

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510083

研究課題名（和文）

バイオレメディエーションを目指した有機ヒ素化合物の嫌氣的微生物変換機構の解明

研究課題名（英文）

Studies on microbial effects and biotransformation of diphenylarsinic acid in anaerobic soils

研究代表者

原田 直樹 (HARADA NAOKI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：50452066

研究成果の概要（和文）：

嫌気土壌において、1)ジフェニルアルシン酸（DPAA）が微生物叢に与える影響と、2)DPAA変換に関わる影響因子についてモデル実験にて検討した。その結果、DPAAの添加は土壌細菌及び古細菌群集構造に明瞭な影響を与えなかった。土壌を硫酸還元条件に誘導するとDPAA濃度が著しく低下し、チオ化物（ジフェニルチオアルシン酸）が生成した。このDPAAの嫌氣的変換には硫酸還元菌が関与していることが推察された。

研究成果の概要（英文）：

The objectives of this study were to investigate, 1) effects of diphenylarsinic acid (DPAA) on microbial community structures and 2) factors affecting biotransformation of DPAA, in anaerobic soils. As a result, the presence of DPAA did not distinctly change soil bacterial and archaeal community structures under submerged and anaerobic conditions. The microbial transformation of DPAA in soil was enhanced under sulfate-reducing conditions and diphenylthioarsinic acid (DPTA) was found as a major metabolite. Participation of sulfate-reducing bacteria in the transformation of DPAA to DPTA is predicted.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術

## 1. 研究開始当初の背景

二度の世界大戦の後、化学兵器として生産された有機ヒ素化合物が世界各地の海洋や

土壌に大量に遺棄された。この行為による環境汚染は現在に至っても解消されておらず、特に中国大陸においては旧日本軍と関連した遺棄現場が全土に散在しており、その修復が進められている。国内でも2003年3月に茨城県神栖町(現神栖市)にて不法投棄された有機ヒ素化合物、diphenylarsinic acid (DPAA)による地下水汚染が起こり、汚染された井戸水を飲用していた住民に健康被害が発生した。付近の水田で産出されるコメへのヒ素混入も確認された。その後汚染源は撤去されたが、周辺環境の汚染は未だ解消されていない。

このように有機ヒ素による土壌汚染は世界的な問題となっているが、フェニルヒ素化合物の環境中での挙動に関する報告例はまだ少ないのが現状である。遺棄化学兵器に含まれるフェニルヒ素化合物である diphenylchloroarsine と diphenylcyanoarsine の場合、化学的に DPAA へと変化して環境中に蓄積することが知られている。また副生成物である phenyldichloroarsine も phenylarsonic acid (PAA) にまで変換される。DPAA や PAA は比較的分解されにくく、汚染現場周辺でよく検出されることから有機ヒ素汚染土壌の浄化の鍵はこの両物質、中でも DPAA の分解にあると理解されている。

環境中におけるフェニルヒ素化合物の変換には微生物が関与することが知られている。これまで、DPAA を好氣的に脱フェニルし無機化する細菌として *Kytococcus sedentarius* NK0508 株や、*Shinorhizobium* sp. L2406 株が神栖市の DPAA 汚染土壌から単離されている。

その一方で、嫌気条件におけるフェニルヒ素化合物の挙動に関しては情報が少なく、特に上記のような変換に関与する微生物についてはほとんど報告がない。そこで我々は、模擬 DPAA 汚染土壌を用意して湛水処理と易分解性有機物施用によって強還元状態に誘導したところ、好気条件よりも迅速に DPAA の分解が起こることを見出した。到達濃度も低いことから、このような嫌氣的微生物変換は有機ヒ素汚染土壌の浄化に有効な方法となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではバイオレメディエーション法、つまり微生物を用いての有機ヒ素汚染土壌の新たな修復技術の開発を念頭に、土壌の有機ヒ素汚染物質として最も重要な DPAA をモデル化合物として、還元的雰囲気下における DPAA が土壌微生物群集構造に与える影響の解明と、DPAA 変換の制御因子の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) DPAA が嫌気土壌の微生物群集構造に与える影響

### ① 供試土壌と稲わら

次の3土壌を供試土壌とした：新通土壌、沖立土壌及び野口土壌。いずれも水田の作土(0-10 cm)から採取した。土壌は風乾・通篩(2 mm)後、ポリエチレン袋に入れて使用時まで室温で保管した。また炭素源として稲わらを乾燥後粉碎し、粉末状としたものを用いた。総C及び総Nは乾燥重量当たり各351、4.6 mg/gであった。

### ② 土壌培養

100 ml 容三角フラスコに土壌 20 g、10 µg-As/g 乾土となるように DPAA を加えた脱イオン水 30 ml、稲わら粉末 0.2 g を加え、ボルテックスで混合した後、30°C で静置培養した。を添加後、よく混合した。これに炭素源として稲わらを 10 mg/g 乾土相当加えたものとそうでないものを用意し、30°C 暗所にて5週間静置培養した。

### ③ DPAA の定量とヒ素種の同定

培養した土壌に 16 M NaOH 溶液を 1 ml 加え、直ちにボルテックスで 30 秒間混合して DPAA をアルカリ抽出した。上澄み液 2 ml を 2 ml 容チューブに入れて遠心分離(10,000 rpm、5 分間)し、その上澄み液 0.5 ml を 1.5 ml 容チューブに移し、1 M HNO<sub>3</sub> 溶液 0.5 ml を加えて中和後、再度遠心分離(10,000 rpm、5 分間)した。この上澄みを検液として以下の分析に供した。

まず DPAA 濃度を逆相 HPLC 法によって求めた。使用カラムは CAPCELL-PAK C18 MG (5 µm, 4.6 mm i. d. × 250 mm, Shiseido)、カラム温度は 40°C、移動相溶媒は 0.2% (v/v) リン酸溶液・アセトニトリル混液 (3:1)、流速を 1 ml/min とした。また、試料注入量は 10 µl とし、検出には UV 検出器 (220 nm) を用いた。

有機ヒ素の化学形態分析には LC-ICP-MS (Prominence series, Shimadzu+X series 2, Thermo Fisher Scientific) を用いた。注入量は 100 µl とし、逆相カラム (SPELCO Discovery C18, 5 µm, 4.6 × 250 mm, Sigma-Aldrich) にて 0.1%ギ酸と 0.1%ギ酸を含むメタノールを移動相溶媒に用いたグラジェント法で各ヒ素種を化学形態別に分離した後、ICP-MS に誘導して検出した。As(V)、PAA、phenylmethylarsinic acid、diphenylmethylarsine oxide (DPMAO) 及び DPAA を含む混合溶液をヒ素化合物標準溶液として使用した。

### ⑤ DGGE による微生物群集構造解析

1、3 及び 5 週間培養した土壌の一部を採取し、ビーズビーティング法で土壌 DNA を抽出した。これを鋳型にユニバーサルプライマー(細菌用：F984GC/R1378、古細菌用：

A0344F/A915rGC) を用いて PCR を行い、DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad 製) を用いて微生物群集構造を解析した。アプライした PCR 産物は 100 ng、ゲルの変性剤濃度は 50~70% とした。58°C、50V にて 18 時間電気泳動を行った後、SYBR Gold で染色し、LAS-3000 ルミノイメージングアナライザー (富士フィルム製) で撮影した。バンドの一部を切り出して同じプライマーセットを用いて PCR 増幅し、その産物の塩基配列を決定した。その際、必要に応じてクローンライブラリー法を併用した。得られた塩基配列データを基に、GenBank データベースに対して BLAST エンジンにて相同性検索をし、近縁種を推定した。

#### (2) DPAA 変換に関わる影響因子の解析

##### ① 供試土壌及び稲わら

次の 4 土壌を供試土壌とし、比較した：黒河畑土壌 (中国)、チチハル水田土壌 (中国)、五十嵐畑土壌 (新潟) 及び新通水田土壌 (新潟)。また稲わらは (1) と同じものを用いた。

##### ② 土壌培養

(1) と同様とした。さらに硫酸根を加えた場合、また硫酸還元菌の特異的阻害剤として知られるモリブデン酸を最終濃度が 5 mM になるように加えた場合についても試験した。

##### ③ DPAA の定量とヒ素種の同定

(1) と同様に、DPAA の定量は HPLC 法、代謝物の同定には LC-ICP-MS を用いた。また未知ヒ素代謝物の構造推定のため、LC-TOF-MS を用いた精密質量分析を実施した。LC 部では逆相カラム (SPELCO Discovery C18, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm) と 0.1% ギ酸・メタノール (0.1% ギ酸添加) 混液 (50:50) を用いて分離を行った。TOF-MS 接続部にはスプリッターを連結して、MS 注入口量を 0.2 ml/min に調節した。TOF-MS 部 (JEOL JMS-T100LP、日本電子) において、イオン化法は ESI 法とし、正イオンモードで測定した。コーン電圧は 80 V とした。精密質量分析の際の内部標準物質には PEG-MIX を用いた。

##### ④ DPAA 変換に関与する微生物の解析

五十嵐土壌から、DPAA の嫌気的変換に関与する微生物の単離を限界希釈法と嫌気平板培養法を用いて試みた。単離菌 (複合微生物系を含む) の DPAA 変換能は DPAA を加えた MM 培地 (pH7.0) で嫌気培養することによって検定した。なお、MM 培地の組成は次の通り：1 l あたり、1.2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 ml 微量元素溶液及び 10 ml ビタミン溶液。

#### 4. 研究成果

(1) DPAA が嫌気土壌の微生物群集構造に与える影響

まず 3 つの水田土壌 (野口土壌、沖立土壌及び新通土壌) を用いて DPAA の模擬汚染土壌を調製して嫌気的に培養した。その結果、いずれの土壌においても DPAA 濃度の減少が認められ、これは稲わらの添加によって部分的に促進された (表 1)。代謝物として、ヒ酸、フェニルアルソン酸 (PAA) 及び未知ヒ素化合物が LC-ICP-MS によって検出された。

次いで新通土壌を対象に、DPAA が嫌気土壌における細菌及び古細菌群集構造に及ぼす影響を分子生態学的手法を用いて検討した。土壌 DNA を抽出し、16S rDNA を標的とし

表 1 嫌気土壌条件における DPAA 濃度の継時変化<sup>†</sup>

供試土壌 <sup>#</sup>	DPAA 濃度 ( $\mu$ g-As/g 乾土)	
	1 week	2 week
野口土壌		
RS(-)	10.25 (96)	7.89 (74)
RS(+)	8.25** (77)	3.78*** (35)
沖立土壌		
RS(-)	10.16 (95)	9.14 (85)
RS(+)	8.54** (80)	3.54*** (33)
新通土壌		
RS(-)	10.45 (98)	9.81 (92)
RS(+)	5.87*** (55)	1.17*** (11)

<sup>†</sup> カッコ内は開始時を 100 とした際の相対値、<sup>#</sup>RS(-): 稲わら添加無、RS(+): 稲わら添加有、\*\*、\*\*\* 稲わらの有無により有意差有 (Student の *t* 検定、危険率はそれぞれ 1%, 0.1%)

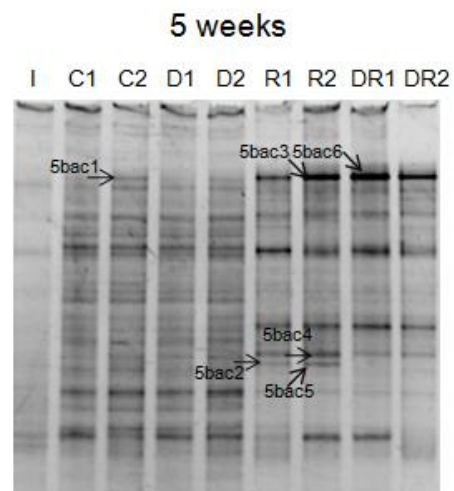


図 1 16S rDNA-based DGGE パターン (新通土壌、5 週後)。I: 開始時、C: 対照、D: DPAA 添加、R: 稲わら添加、DR: DPAA+稲わら添加。略号の後の数字は反復を表す。5bac2、5bac4 及び 5bac5 が DPAA の添加により影響を受けたと考えられるバンド。

た PCR-DGGE を行ったところ、培養開始後 1 週間で *Clostridium* や *Methanosarcina* などの嫌気性細菌及び古細菌が優占することが明らかになった。いくつかの細菌 DGGE バンドは DPAA を添加した土壌において時間経過とともに消失したり、バンド強度が弱くなった (図 1)。そのうち、5bac2 は *Bacterium* Ellin7522、*Rhodothermus marinus* mm-13、Unidentified eubacterium clone BSV28 及び *Streptomyces galbus* strain NBRC 12864 と、5bac4 は *Bacterium* Ellin7522、*Anaerolinea thermolimos* IMO-1、*Clostridium* sp. 6-31、Firmicutes bacterium LX-B 及び *Bacillus* sp. NBK37 と、5bac5 は *Bacterium* Ellin7522、*Bacterium* Ellin7544 及び *Bacterium* Ellin 5106 と最も近縁な配列を含んでいた。しかし、菌叢全体として見ると、有意な影響は認められなかった。また DPAA の添加は古細菌の DGGE バンドパターンには殆ど影響を与えなかった。これらの知見から、嫌気土壌において DPAA の添加は若干の優占細菌種に影響を与えるものの、細菌及び古細菌群集構造は DPAA の有無によらず概して安定的に推移することが示唆された。

## (2) DPAA 変換に関わる影響因子の解析

新通及びチチハルの両水田土壌においては、培養開始後から急激な DPAA 濃度の減少が認められ、稲わら添加の影響はほとんど認められなかった。その一方、五十嵐及び黒河で採取した畑土壌の場合、DPAA 濃度の減少は緩慢であった。稲わら添加の影響は両土壌で明確に異なり、黒河土壌では DPAA 分解が大いに促進されたが、五十嵐土壌ではその程度は小さかった。

供試土壌のうち、DPAA の減少が最も緩やかであった五十嵐土壌を用いて、硫酸根及び稲わら等の有機物の添加が DPAA 濃度変化に与える影響を調べたところ、硫酸根のみを添加した場合は DPAA 濃度が対照とほとんど変わらなかった。しかし、硫酸根と有機物を同時に添加すると DPAA 濃度の顕著な低下が認められ、この DPAA の濃度変化は硫酸還元の特異的阻害剤であるモリブデン酸の添加によって抑制された。このことから還元的条件における DPAA 変換への硫酸還元菌の関与が強く示唆された。

次に代謝物について検討を行った (図 2)。硫酸根のみを加えた土壌培養液では、DPAA の代謝物として DPMAO、無機ヒ素及び未知ヒ素化合物が検出されたがいずれもわずかであった。稲わらを追加した場合、主たる代謝物として (1) で検出されたものと同じ位置に未知ヒ素化合物が現れ、他に DPMAO、無機ヒ素、PAA 等が検出された。モリブデン酸で硫酸還元を阻害すると未知ヒ素ピークは認められ

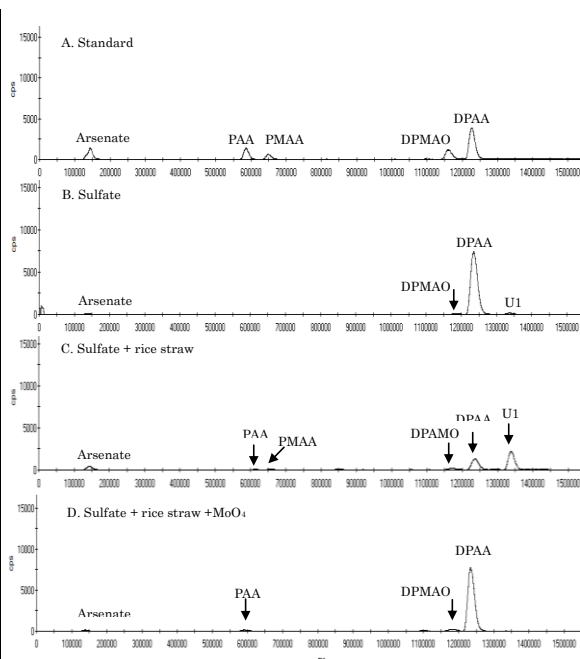


図 2 LC-ICP-MS を用いた有機ヒ素の化学形態分析：(A) 標準溶液、(B) 硫酸根添加、(C) 硫酸根及び稲わら添加、(D) 硫酸根、稲わら及びモリブデン酸添加。供試土壌は五十嵐土壌。未知ヒ素化合物を U1 で示す。

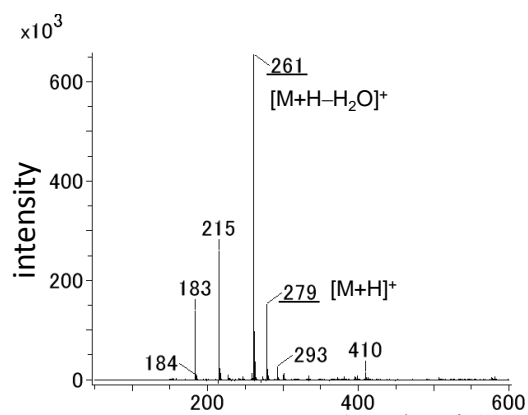


図 3 LC-TOF-MS を用いた未知ヒ素化合物ピークの質量スペクトル

表 2 LC-TOF-MS を用いた未知ヒ素化合物ピークの精密質量分析結果

測定精密質量 ( $m/z$ )	推定組成式	右の精密質量 ( $m/z$ )	差分 ( $u$ )
260.97173	$C_{12}H_{10}AsS$	260.97192	-0.00019
278.98255	$C_{12}H_{12}AsSO$	278.98249	0.00006

なかった。以上のことから、本研究で認められた還元的な DPAA 変換には、硫酸還元が密接に関与しているものと推察された。

次に LC-TOF-MS を用いた精密質量分析を行い、未知ヒ素化合物の構造推定を行った (図 3、表 2)。その結果、この未知ヒ素化合物の分子イオンピーク ( $[M+H]^+$ ) は  $m/z = 278.98255$

に現れ、その組成式は  $C_{12}H_{12}AsSO$  と推定された。また、脱水物と考えられるフラグメントイオン ( $[M+H-H_2O]^+$ ) が  $m/z=260.97173$  に認められた (推定組成式は  $C_{12}H_{10}AsS$ )。推定組成式との精密質量の差分は  $[M+H]^+$  で  $-0.0019$  u、 $[M-H_2O]^+$  で  $0.00006$  u と十分に小さく、推定される組成式を支持した。以上の結果から未知ヒ素化合物は diphenylthioarsinic acid (DPTA) と推定され、硫酸還元条件において DPAA のチオ化が起こることが本研究において初めて示された。

さらに DPAA のチオ化に関与する嫌気性微生物の単離を試みた結果、DPAA を DPTA に変換可能な複合微生物系を 4 種獲得し、そのいずれからも硫酸還元菌に特異的な機能遺伝子である亜硫酸還元酵素遺伝子 *dsrAB* が PCR 法によって検出された。一方、同じ土壌培養液から得られたが DPAA 変換が認められなかった複合微生物系では *dsrAB* が検出されなかった。したがって、DPAA から DPTA への嫌気的変換には硫酸還元菌が深く関与していることが裏付けられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Guan L, Hisatomi S, Fujii K, Nonaka M, Harada N, Enhanced transformation of diphenylarsinic acid in soil under sulfate-reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 査読有, 241-242, pp. 355-362, 2012, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.054
- ② Guan L, Harada N, Ono Y, Takahashi T, Fujii K, Liu X, Nonaka M, Effects of diphenylarsinic acid on bacterial and archaeal community structures in an anaerobic paddy soil. *Geoderma*, 査読有, 195-196, pp. 243-250, 2013, doi: 10.1016/j.geoderma.2012.12.007

[学会発表] (計 7 件)

- ① Guan L, Harada N, Nonaka M, Impacts of diphenylarsinic acid on microbial diversities in paddy soil amended with rice straw. The 4th international meeting for the development of integrated pest management in Asia and Africa, pp. 10-11, 2011, Mymensingh, Bangladesh
- ② Guan L, Harada N, NONAKA M, Analysis of soil microbes engaging in anaerobic transformation of diphenylarsinic acid, 第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011, 旭川市

- ③ Guan L, Ono Y, Takahashi T, Harada N, Fujii K, Liu X, Nonaka M, Degradation of diphenylarsinic acid in anaerobic paddy soil and its effects on soil microbial communities. International Symposium on Environmental Biogeochemistry XX, PSI-20, 2011, Istanbul, Turkey
- ④ Guan L, Hisatomi S, Fujii K, Nonaka M, Harada N, Availability of sulfate and electron donating substrates influences transformation of diphenylarsinic acid in anaerobic soil. Proceedings of SoilRem 2012 SiteRem2012, pp. 29-31, 2012, Yantai, China
- ⑤ Harada N, Guan L, Hisatomi S, Nakajima M, Fujii K, Nonaka M, Biotransformation of diphenylarsinic acid under anaerobic soil conditions. Proceedings of SoilRem 2012 SiteRem2012, pp. 19-21, 2012, Yantai, China
- ⑥ Hisatomi S, Guan L, Fujii K, Nakajima M, Nonaka M, Harada N, Determination of a sulfur containing arsenic metabolite in the anaerobic soil culture contaminated with diphenylarsinic acid. Proceedings of SoilRem 2012 SiteRem2012, pp. 36-38, 2012, Yantai, China
- ⑦ 久富志穂子・GUAN Ling・藤井邦彦・中島真美・野中昌法・原田直樹, 還元的土壌中におけるジフェニルアルシン酸の変換生成物の同定、日本土壌肥料学会鳥取大会講演要旨集, 57, pp.171, 2012, 鳥取市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原田 直樹 (HARADA NAOKI)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号: 50452066