

と素による土壌汚染とと素耐性菌の
と素化合物代謝に関する研究

広木 幹 也

ヒ素による土壌汚染とヒ素耐性菌のヒ素化合物代謝に関する研究

広木 幹也

ヒ素による土壤汚染とヒ素耐性菌のヒ素化合物代謝に関する研究

広木幹也

目次

第1章 緒言	3
1.1 日本における重金属土壤汚染の歴史と特徴	3
1.2 ヒ素による環境問題	5
1.3 本研究の目的	7
第2章 ヒ素による汚染が土壤微生物相に与える影響—現地調査—	8
第3章 ヒ素汚染土壤から分離されたヒ素耐性微生物	22
3.1 土壤中のヒ素耐性糸状菌の種構成とヒ素耐性能	22
3.1.1 供試土壤および土壤中の微生物数	22
3.1.2 ヒ素耐性糸状菌の単離	24
3.1.3 単離されたヒ素耐性菌の亜硫酸添加培地における生育とヒ素吸収	25
3.1.4 考察	33
3.2 土壤中のヒ素耐性細菌の種構成とヒ素耐性能	34
3.2.1 ヒ素汚染土壤からのヒ素耐性細菌の分離	34
3.2.2 主要なヒ素耐性細菌の亜硫酸耐性能	42
3.2.3 考察	45

第4章 ヒ素耐性微生物によるヒ素化合物の代謝	48
4.1 ヒ素化合物の形態別定量法	49
4.1.1 原子吸光分光光度計分析条件	49
4.1.2 HPLC-AAシステムにおけるヒ酸および亜ヒ酸の分離および保持時間	50
4.1.3 本研究において用いたヒ酸/亜ヒ酸分離定量システム	55
4.2 ガス状ヒ素化合物の検出法	56
4.3 ヒ素耐性細菌による亜ヒ酸の酸化	60
4.4 ヒ素耐性糸状菌によるヒ素化合物の揮散	71
第5章 ヒ素耐性亜ヒ酸酸化細菌による土壌中の亜ヒ酸の酸化	76
5.1 希釈平板法によるヒ素耐性細菌の計数	76
5.2 ヒ素耐性 <i>Alcaligenes faecalis</i> の土壌中での生残性	79
5.3 土壌環流装置内でのヒ素耐性細菌の増殖と亜ヒ酸の酸化	81
第6章 総合考察	89
6.1 ヒ素による土壌汚染が土壌生態系に与える影響とヒ素耐性微生物の優占	89
6.2 ヒ素耐性微生物によるヒ素代謝	90
6.3 ヒ素耐性微生物の環境浄化への利用の可能性と問題点	91
第7章 摘要	93
謝辞	96
付表	97
引用文献	98

第1章 緒言

1.1 日本における重金属土壌汚染の歴史と特徴

日本には各地に多くの鉱山が存在し、古くから鉱石の採取やそれらを原材料とした精練が行われてきた。精練過程において排出される重金属を含んだ排煙は周辺地域の農耕地に降下し、あるいは鉱山排水が流入した河川水を灌漑や飲料水に使うことにより、農作物への被害や健康への被害が各地で発生してきた。鉱業生産高が急激に増大した明治時代以降、特に、第二次世界大戦中から戦後の混乱期には、これら有害物質の農耕地への蓄積が進み、健康被害が顕在化した昭和40年代以降には公害問題に対する社会的関心も高まり、「農耕地における土壌汚染の防止と対策に関する法律（土壌汚染防止法）」が制定される一方、土壌汚染に関する技術的研究も進められた。

日本の鉱山は多様な鉱石を産出してきたが、そのなかでも、鉱山の数においても、また、鉱業生産高においても、銅（Cu）鉱山が重要な位置を占めてきた。足尾や日立など明治時代、日本の近代鉱業の創生期において深刻な公害問題を引起したのはこれらのCu鉱山とそれに由来する汚染地域においてであった。土壌汚染防止法においてもCuは有害汚染物質の一つに指定され、平成元年度までに基準値以上の汚染が検出された地域は37地域 1,430haに及んでいる（表1-1）。

一方、1968年にカドミウム（Cd）がイタイイタイ病の原因物質であるとの厚生省見解が発表されて以来、Cdによる土壌汚染が問題視され、土壌汚染防止法による基準値以上の汚染が見つかった地域は平成元年度までに91地域 6,510haに及んだ（表1-1）。

土壌汚染防止法による有害化学物質としては、これまで、これらCu、Cdの2元素にヒ素（As）を加えた3元素が指定されている。これらの化学物質による汚染地域としての指定要件は土壌中濃度および玄米中の濃度を基準としており、土壌中の濃度は、それが水稲への生育障害を顕す濃度を根拠としている。この様に、日本の農耕地にお

ける土壤汚染が水稻への生育障害及び水稻による元素吸収を基準としていることは、これまでの土壤汚染が主として鉱山の排水などによる汚染物質が灌漑水等を通して水田を汚染してきたものであり、また、健康被害を考えた場合でも日本人の主食である米を通しての摂取が重要視されたためと思われる。そのため、指定された対策地域も殆どが鉱山および精練所に汚染源が由来する水田であり、重金属土壤汚染に関する研究も、これまでは水稻を始めとする農作物の生育への直接的影響とこれらの作物による汚染物質の吸収に中心がおかれてきた。

現在でもこの様な鉱山に由来する土壤汚染の対策は必ずしも十分とは言えず、これらの汚染物質が基準値以上に見出された全国128地域 7,050haのうち、510haは対策地域の指定がなされておらず、指定地域のうち 1,280haは対策計画が立てられておらず、また、対策計画が策定された地域においても 1,080haは対策事業が完了していない（平成元年11月現在；表1-1）。しかし、新たな要対策地域の指定件数は年々減少の傾向にあり、またこれら新たな指定地域も、その多くは、これまで知られていなかった汚染地が調査によって明らかになったものであり、実際には公害問題に対する認識が十分でなく技術的対策が十分なされていなかった時代に既に汚染されていたものと思われる。そして今後は、廃水基準や排煙防止設備の普及等に伴い、鉱山や精練所周辺で認められたような従来型の激甚な重金属汚染の発生する機会は減少していくと思われる。

この様に鉱山や精練所を中心とした未処理廃水、排煙による局地的かつ激甚な被害の新たな発生の可能性が減少していくなかで、新たな形態の土壤汚染の発生の可能性が増しつつある。すなわち、汚染源としては、都市化の進展と消費生活の拡大に伴い質的にも変化しつつある廃棄物の増加や、農業による汚染など、中程度で広範囲な汚染が問題となる一方、汚染物質としては新素材の利用や生活、産業構造の変化、新エネルギー源の開発などともない、重金属以外の汚染物質による土壤汚染も問題とな

と思われる。

表1-1 日本における重金属汚染農耕地面積（環境庁企画調整局企画調整課 1990）

特定有害 物質	基準値以上 検出地域	対 策 指 定 地 域			未指定 地域	指定解除 地域
		対策計画策定済		未計画地域		
		工事完了	未完了			
カドミウム	6,510	1,800	1,060	1,280	200	2,060
銅	1,430	570	160		130	570
ヒ素	390	200			190	
計	7,050	2,090	1,080	1,280	510	2,090

平成元年11月30日現在、単位 ha。

工事完了地域には県単独事業等完了地域を含む。

1.2 ヒ素による環境問題

Asは、Cu、Cdとともに土壤汚染防止法において特定有害化学物質に指定されている元素の一つであり、平成元年度においては鉱山周辺地域を中心として14地域、390haから土壤汚染防止法による汚染対策指定地域に指定のための基準値以上のAsが検出されている（表1-1）。宮崎県および島根県のAs汚染地では住民に慢性ヒ素中毒症が発生し問題となったが、As汚染対策指定地域はCu、Cdによる汚染地域（平成元年まで、それぞれ1,430haと6,510ha）に比較すると面積的には少ない。

しかし、Asは農業の主要な原料物質のひとつとして殺虫剤、抗菌剤あるいは防朽剤として農林業分野で用いられ（酸性ヒ素剤は作物残留性が強いため昭和48年5月に使用が規制されたが、現在でも有機ヒ素農薬としてメタンアルソン酸鉄が用いられている）、また、近年のハイテク産業においては半導体の原料物質として重要であることから、社会生活の様々な分野での利用量は増加しており、これらは最終的に廃棄物

として環境中に放出される (Shapiro 1971)。また、Asは地熱発電所の排水中にも多く含まれることから、これを新たに開発するに当っては、その環境影響予測評価 (環境アセスメント) において特に評価を要する微量物質に挙げられている (エネルギーと環境 1992)。この様に、従来より問題にされてきた鉱山周辺地域のAs汚染水田の他にも、Asは、新たな環境問題を引起す可能性のある元素の一つである。実際、地熱発電所の排水による農業被害の事例も有り (Tsumumi 1981)、また、果樹園においては多量の含As農業が使用されており、これらの土地を住宅地等に転用する場合には、蓄積したAsの挙動、影響についても注意が払われねばならないであろう。

しかし、環境中でのAs化合物の挙動は非常に複雑である。それは、Asが様々な化学形態をとり、それによって環境中での挙動も異なるためである。そのため、Asによる環境問題を考えるに当っては、Asの環境中での化学形態の変化とその機構を明らかにすることが非常に重要であると思われる。

Asは無機態としては硫化物、ヒ酸 (As^{3+}) あるいは亜ヒ酸 (As^{5+}) などで存在し、また、有機As化合物もモノメチルアルソン酸 (MMA)、ジメチルアルシン酸 (DMA)、アルシン類など様々な化学形態を取り、これらのAs化合物はその化学形態により生物に対する毒性や影響も異なる。Asで汚染された土壌では、As化合物の形態と土壌環境条件により、土壌微生物は様々な影響を受けると考えられるが、一方、As化合物の様々な形態変化にも微生物が関与することが知られている。1890年代には既に、 As^{3+} から揮発性のAs化合物を生成する真菌類の存在が、人間の健康影響との関わりで関心を持たれてきた (Gosio 1893)。環境中でのAs化合物の形態変化については、特に水圏では微生物が関与していると言われている (Johnson and Pilson 1975; Freeman ら 1986 など) が、土壌中でのAsの形態変化とこれに関与する微生物についての知見は少ない (Quastel and Scholefield 1953 など)。

1.3 本研究の目的

先に述べたような鉱山由来による高濃度の汚染を背景として、日本における重金属汚染土壌あるいはヒ素汚染土壌に関する研究は、従来、激甚的汚染地における水稲の生育への直接的影響に重点がおかれてきた。しかし、これら汚染物質の環境影響を考える時には植物への直接的影響に留らず、土壌生態系、特に、その重要な構成要素である土壌微生物への影響に対する研究が不可欠であると思われるが、このような研究は限られている。特にAsの様に自然界においてその存在形態が複雑に変化する物質においては、As化合物の土壌中での形態変化にも関わると思われる土壌微生物との関係は非常に重要である。

本研究では、以上の様なAsによる環境汚染の重要性と特殊性を背景として、As汚染が土壌生態系、特に土壌微生物相に及ぼす影響と、As化合物の微生物的形態変化を明らかにすることを目的として研究を行なった。すなわち、現地As汚染地において調査を行ない、As汚染土壌の微生物相の特徴を明らかにすることにより、As汚染が土壌微生物相に及ぼす影響を明らかにし（第2章）、As汚染土壌からAs耐性微生物を単離し（第3章）、そのAs化合物耐性能（第3章）とAs化合物代謝能（第4章）を調べた。さらに、As化合物代謝微生物の土壌中でのAs化合物代謝能を検討し（第5章）、最後に、Asの土壌生態系への影響とAs化合物の環境中での挙動に対する土壌微生物の寄与、土壌微生物のAs汚染土壌の環境改善への利用と問題点についても考察した（第6章）。

第2章 ヒ素による汚染が土壤微生物相に与える影響—現地調査—

Asによる土壤汚染が生物に及ぼす影響については、水稻への害作用とその対策などが詳細に研究され（例えば山根 1989；宮崎県総農試 1977、1981など）、土壤条件やAsの化学形態によって植物に対する毒性も大きく異なる事などが明らかにされている。しかし、Asによる汚染が土壤生態系、特に、土壤微生物相へ及ぼす影響については、土壤微生物が生態系における物質循環に重要な役割を果たしているにもかかわらず、研究例は僅かであり（達山ら 1974；Yang and Ge 1984；Maliszewska ら 1985；Nordgren ら 1986）、これらの研究においても、特にほ場条件でAs汚染により土壤微生物がどのような影響を受けるのかについては十分には明らかにされていない。本章では、Asによる土壤汚染が土壤生態系、特にその微生物相に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、Asで汚染された地域において、土壤中の微生物相を調査した。

1) 方法

調査地、調査日時：

宮崎県西臼杵郡高千穂町の岩戸川流域のヒ素汚染地域およびその周辺地域において調査を行った（図2-1）。汚染地域では、岩戸川上流において1920年ごろより採掘を開始したAs鉱山および精錬所の排煙中に含まれるAsが土壤表層に蓄積したもので（川原 1978、1980）、1979年に土壤汚染防止法に基づく農用地土壤汚染対策地域（Asによる汚染）に指定された。

汚染対策指定地域内（汚染区；No.1、2ほ場）および汚染対策指定地域外（対照区；No.3、4ほ場）でそれぞれ隣接する水田（No.1、3ほ場）と畑（No.2、4ほ場）、計4ほ場で土壤試料を採取した。調査地はいずれも岩戸川および支流の傾斜地にある湿性黒ボク土壤である。

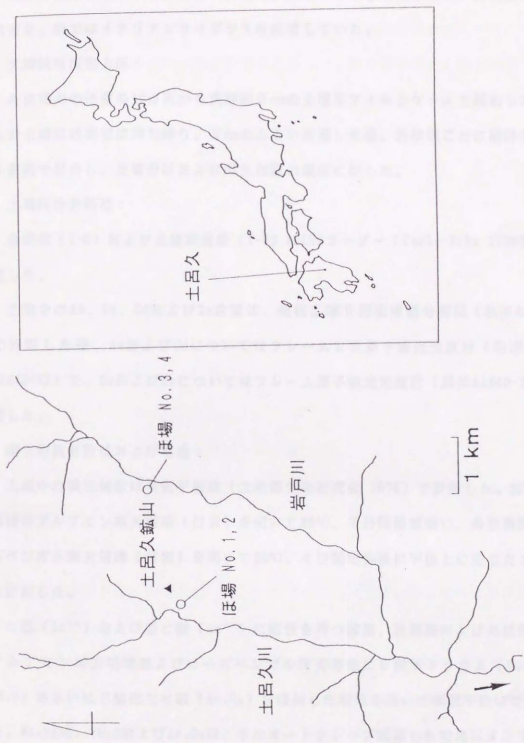


図 2-1 調査地域概図

試料の採取は1982年3月12日に行った。水田は落水期であったが、対照区の水田では麦を、畑ではイタリアンライグラスを栽培していた。

土壌試料採取方法：

各ほ場内の任意の10カ所から表層約5cmの土壌をフィルムケースで採取した。採取した土壌は研究室に持ち帰り、2mmのふるいを通した後、各ほ場ごとに清浄なビニール袋内で混合し、土壌分析および微生物数の測定に供した。

土壌成分分析法：

全炭素(T-C)および全窒素含量(T-N)はCHNコーダー(Carlo-Erba 1106型)で測定した。

土壌中のAs、Cu、CdおよびZn含量は、風乾土壌を過塩素酸分解法(渋谷ら1976)で分解した後、AsおよびCdについてはフレイムレス原子吸光光度計(島津GFA-2/AA640-12)で、CuおよびZnについてはフレイム原子吸光光度計(島津AA640-12)で測定した。

微生物数計数法および培地：

土壌中の微生物数は希釈平板法(土壌微生物研究会1979)で計数した。細菌、放線菌はアルブミン寒天培地(付表)を用いて28°C、7日間培養後に、糸状菌数はローズベンガル寒天培地(付表)を用いて25°C、4日間培養後に平板上に生じたコロニーを計数した。

ヒ酸(As^{5+})および亜ヒ酸(As^{3+})に耐性を持つ細菌、放線菌および糸状菌数は、アルブミン寒天培地およびローズベンガル寒天培地にヒ酸ナトリウム($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$)あるいは三酸化二ヒ素(As_2O_3)を添加した培地を用いて希釈平板法で計数した。 $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ および As_2O_3 は、予めオートクレーブ滅菌した培地にメンブレンフィルターで除菌した $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ あるいは As_2O_3 溶液を、培地中のAs濃度が1mMあるいは10mMとなるように添加した。

糸状菌相の多様性：

ヒ素無添加のローズベンガル寒天培地上に形成された糸状菌コロニーを、1 ぼ場あたり35株ずつランダムにマーチン培地のスラント上に分離した。分離された糸状菌はスラント上で十分に生育させた後、コロニーの色彩と形態を基準にグループ分けした。各グループの菌の各ぼ場からの分離頻度から以下の式により、各ぼ場の糸状菌フロアの多様性、優占度を求めた。

多様性 $H' = -\sum P_i \cdot \ln P_i$ (Shannon 関数)

$$P_i = N_i / N_t$$

N_i ; グループ i に属する株数

N_t ; 全株数

優占度 $D = 1 - J'$

$$J' = H' / \ln N$$

N ; 総グループ数

2) 結果

土壤中のAs含量および他の属性：

各ぼ場の水分含量、 $pH(H_2O)$ 、T-C、T-N、C/N比、Asおよびいくつかの重金属含量を表2-1に示した。

汚染区土壤は高濃度のAs (391および459 mg/kg) を含み、対照区土壤 (32および43 mg/kg) の約10倍のAs含量であった。しかし、対照区土壤のAs含量も日本の農耕地の平均的As含量 (中央値 7.20 μ g/g乾土、幾何平均値 6.82 μ g/g乾土；環境庁水質保全局 1984) に比較して高かった。

各ぼ場のCd、CuおよびZn含量はそれぞれ、0.6~1.7 mg/kg、89~118 mg/kg、195~

377 mg/kgであり、CdとZn含量は汚染区土壌で対照区土壌よりも高かったが、Cu含量は汚染区土壌と対照区土壌の間で有意な差はなかった。

T-C (4.94~5.95%)、T-N (0.48~0.58%) およびC/N比については調査を行なった4ほ場の間では大きな差はなかった。

表 2-1 各調査地土壌の理化学性

	pH(H ₂ O)	T-C*	T-N*	C/N	As**	Cd**	Cu**	Zn**
No.1 汚染水田	6.16	59.5	5.8	10.3	391	1.7	117.7	377
No.2 汚染畑	6.37	50.0	4.9	10.2	459	1.3	90.1	259
No.3 非汚染水田	6.61	49.4	4.8	10.3	32	0.9	90.8	195
No.4 非汚染畑	5.88	52.1	5.1	10.2	43	0.6	88.6	201

* CHNコーダー (Carlo-Erba 1106型) による。単位 mg/g 乾土。

**過塩素酸分解法 (渋谷ら 1978) による。単位 μ g/g 乾土。

土壌中の細菌、放線菌および糸状菌数:

各調査地の微生物数を表2-2 に示した。細菌および放線菌数はそれぞれ、26.6~115.4x10⁶/g乾土、6.3~19.2x10⁶/g乾土であり、ほ場間で差が大きく、放線菌では最高3倍、細菌では最高4.3倍の差があった。これらの菌数は畑地 (No.2、4ほ場)の方が水田 (No.1、3ほ場) よりも高い傾向にあったが、汚染区と対照区の間では有意な差は認められなかった。

糸状菌数は11.0~92.8x10⁴/g乾土であり、汚染区土壌は対照区土壌よりも高く、特にNo.1ほ場で多かった。

放線菌と細菌の菌数の比 (A/B比) は0.166から0.301の間であり、汚染区土壌と対照区土壌の間には差がなかった。細菌と糸状菌の菌数の比 (B/F比) はNo.1ほ場では28.7で、他の3ほ場 (272.8~393.1) よりも明らかに小さく、No.1ほ場では他の3ほ

場に比較して糸状菌の比率が高かった。

表 2-2 各調査地各土壌の微生物数 (CFU/g 乾土)

	細菌	放線菌	糸状菌	A/B	B/F
No.1 汚染水田	28.6 x10 ⁶	8.0 x10 ⁶	92.8 x10 ⁴	0.301	28.7
No.2 汚染畑	115.4	19.2	42.3	0.166	272.8
No.3 非汚染水田	33.3	6.3	11.0	0.189	302.7
No.4 非汚染畑	68.0	17.9	17.3	0.263	393.1

土壌中のAs耐性菌数：

各濃度のAsに耐性を持つ微生物数を、全菌数に対するAs耐性菌数の比率として図2-2に示した。As³⁺添加培地で計数した細菌、放線菌数はいずれのAs³⁺添加濃度でも同濃度のAs⁵⁺を添加した培地による菌数よりも少なかった。細菌の場合、As非添加培地で生育した菌数の30%以上が10mMのAs⁵⁺を添加した培地で生育したが、10mMのAs³⁺に耐性を示したのは3%以下であった。また、10mMのAs³⁺に耐性を示した放線菌はなかったが、非添加培地上に生育したものの20%以上が10mMのAs⁵⁺に耐性を示した。細菌と放線菌に対してはAs³⁺はAs⁵⁺よりも毒性が強いと思われる。

糸状菌については、いずれのほ場においても、As³⁺耐性糸状菌数とAs⁵⁺耐性糸状菌数の間の差は小さかったが、ほ場間では差があり、10mMのAs³⁺添加培地上に形成されるコロニー数は、No.1ほ場では(生菌数の82%)他の3ほ場(同じく38~56%)のそれよりも高かった。

As³⁺耐性糸状菌の全糸状菌に対する比率はAs³⁺耐性細菌の全細菌に対する比率よりも高く、例えば、No.1ほ場では、生菌数の82%の糸状菌が10mMのAs³⁺添加培地上でコロニーを形成したが、細菌では生菌数の2.1%が同濃度のAs³⁺添加培地上でコロニーを形成したにすぎなかった。

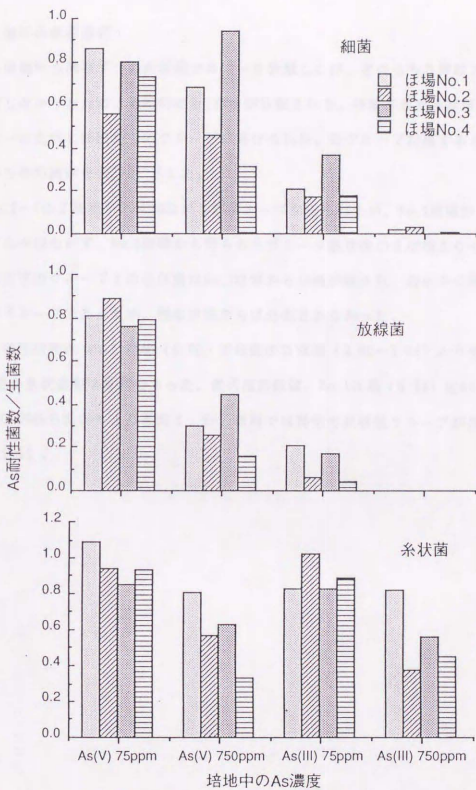


図 2-2 各濃度のヒ酸、亜ヒ酸に耐性を持つ微生物数

土壌中の糸状菌相：

4ほ場から35株ずつの糸状菌コロニーを分離したが、そのうち3株はスラント上で生育しなかったため、最終的に計137株が分離された。分離された糸状菌株はそのコロニーの色彩と形態から57グループに分けられた。各グループに属する糸状菌の各ほ場からの分離数を表2-3に示した。

No.2~4の3ほ場からは20ないし21グループが得られたが、No.1ほ場からは14グループしか得られず、No.1ほ場から得られたグループ数は他の3ほ場よりも少なかった。

未同定のグループ1の糸状菌はNo.1ほ場から16株分離され、最も多く分離された糸状菌グループであったが、他のほ場からは分離されなかった。

多様性指数は No.1 ほ場 (2.00) では他の3ほ場 (2.80~2.84) よりも小さく、No.1ほ場の糸状菌相は単純であった。優占度指数は、No.1ほ場 (0.24) はNo.2~4の3ほ場 (0.07から0.08) よりも高く、No.1ほ場では特定の糸状菌グループが優占していた (表2-4)。

表 2-3 各グループの菌の特徴と各調査地土壌からの出現頻度

グループ	No.1 汚染田	No.2 汚染畑	No.3 非汚染田	No.4 非汚染畑	計	コロニー表面(胞子)／菌糸／裏面(色素生成)
1	16				16	緑色胞子(分生子)／白色長い気菌糸／黄色色素
2	4	1	3	1	9	／気菌糸殆どなし、基底菌糸延びる／黒褐色の色素少し
3	1	2	3	2	8	／基底菌糸のみ
4			7		7	／白色短菌糸
5		2		4	6	黄色のたま、緑黒色の胞子／気菌糸が中程度／黄褐色の色素
6				6	6	表面白～淡紫色／気菌糸短く密／色素無し
7	2		3		5	type8 に似る／色素僅か
8		5			5	表面に菌核?／短い気菌糸／黄褐色色素
9		4		1	5	白色／短気菌糸／色素無し
10		4			4	白～淡黄色、分生子?／気菌糸僅か／裏面淡黄色
11			2	2	4	黄緑色分生子／白色長い気菌糸
12	3				3	／短く密な気菌糸／赤色色素
13	1	1	1		3	／気菌糸短く基底菌糸延びる／黒褐色色素
14			1	2	3	白色／長い揃った気菌糸、寒天を這わない／黄色色素
15	1	1			2	type14 に似る
16	1		1		2	黄色の塊、オレンジの液滴／短い気菌糸／オレンジの色素
17	1			1	2	／長く直線状の淡褐色気菌糸／赤褐色色素
18		1		1	2	表面淡黄色、緑色分生子少し
19		2			2	緑黒色カサブタ状分生子／短気菌糸／色素無し

表 2-3 (続き 1)

グループ	No.1 汚染田	No.2 汚染畑	No.3 非汚染田	No.4 非汚染畑	計	コロニー表面(胞子) / 菌糸 / 裏面(色素生成)
20		2			2	/ 気菌糸僅か / 黒褐色色素
21			1	1	2	表面桃色~緑褐色 // 赤褐色色素
22			2		2	灰緑色ピロード状 // 黄褐色色素
23			1	1	2	白色 / 長い気菌糸
24				2	2	表面淡褐色ピロード(粉?) 状 // 色素ナシ
25	1				1	/ type2 より長い気菌糸 / 赤色色素
26	1				1	type8 に似る // 色素が黒っぽい
27	1				1	type8 に似る / 気菌糸少し延びる
28	1				1	淡黄色ピロード状、生育悪い
29	1				1	灰緑色、分生子多数
30		1			1	短柄の先に灰色の分生子塊
31		1			1	白~淡桃色ピロード状
32		1			1	黒褐色菌核? <i>Chaetomium?</i> / 気菌糸短い / 暗褐色色素
33		1			1	表面灰黒色ピロード状 // 緑黒色
34		1			1	暗褐色綿状 // 暗褐色
35		1			1	黒色ピロード状 // 黒色
36		1			1	/ 気菌糸延びない
37		1			1	緑黒色分生子
38		1			1	/ 気菌糸少ない / 褐色色素

表 2-3 (続き 2)

グループ	No.1 汚染田	No.2 汚染畑	No.3 非汚染田	No.4 非汚染畑	計	コロニー表面(胞子)／菌糸／裏面(色素生成)
39			1		1	type12 に似る／菌糸の形が異なる
40			1		1	白色綿状／／褐色色素
41			1		1	表面黒色分生子塊／／色素ナシ
42			1		1	白色表面黄色の塊状が少し／気菌糸短い
43			1		1	表面黄白色粉状／／黄褐色色素
44			1		1	灰色
45			1		1	／白色菌糸／黒褐色色素
46			1		1	黒褐色／気菌糸少ない／黒褐色色素
47			1		1	灰黒色／／黒色色素
48			1		1	緑色分生子多い
49				1	1	表面黒紫色／気菌糸極短／黒褐色色素
50				1	1	緑黒色分生子が少し／白色気菌糸／色素ナシ
51				1	1	気菌糸ナシ
52				1	1	黒色ピロロド状／／黒褐色色素
53				1	1	灰黒色ピロロド状／／裏面黒
54				1	1	／気菌糸ナシ、生育悪い
55				1	1	／気菌糸ナシ
56				1	1	淡桃色
57				1	1	灰色
総株数(Nt)	35	34	35	33	137	

表 2-4 各調査地土壌の糸状菌相の多様度、優占度

	No.1 (汚染水田)	No.2 (汚染畑)	No.3 (非汚染水田)	No.4 (非汚染畑)	合計
総株数(Nt)	35	34	35	33	137
タイプ数(N)	14	20	21	21	57
多様度(H')	1.996	2.800	2.804	2.835	3.644
優占度(D)	0.244	0.065	0.079	0.069	0.099

多様度 $H' = -\sum P_i \cdot \ln P_i$ (Shannon 関数)

$$P_i = N_i/N_t$$

N_i ; タイプ i の株数 N_t ; 全株数

優占度 $D = 1 - J'$

$$J' = H' / \ln N$$

N ; 総タイプ数

3) 考察

これまで、土壌汚染が土壌微生物に及ぼす影響として、高濃度の重金属で汚染された土壌で土壌中の微生物数が減少し (Jordan and Lechevalier 1975; Williamsら 1977; Hiroki 1992)、また、比較的低濃度の汚染においても土壌微生物相の構成が変化し、汚染物質に耐性を持つ微生物が優占する傾向にあること (Jordan and Lechevalier 1975; Doelman and Haanstra 1979; 山本ら 1981; Olson and Thornton 1982) などが知られている。しかし、本研究におけるAs汚染地においては、汚染土壌の糸状菌数は非汚染土壌のそれよりも高かったが、細菌と放線菌数には汚染土壌と非汚染土壌の間で差はなく、土壌微生物数に対するAs汚染の影響は明確には認められなかった。これは、土壌中の細菌数は水分条件、基質となる有機物、植栽など様々な土壌、環境条件の影響を受け、Asなど土壌中の有害物質の影響よりもむしろ、これらの環境条件によって大きく変動するためであると思われる。

一方、土壌中のこれら微生物数の比を求めると、A/B比は0.17から0.30の範囲にあ

り、細菌や放線菌数の変動（ほ場間の差はそれぞれ最高で4.3倍と3.0倍）よりも小さかった。このことは、土壤環境の変化が細菌や放線菌数に及ぼす影響よりも微生物相の構成に及ぼす影響の方が小さいことを示している。また、B/F比もNo. 1ほ場を除いた3ほ場では270から390の間で最高1.4倍の変動し少なく、細菌や糸状菌数の変動よりも小さかった。しかし、No. 1ほ場でのB/F比は他の3ほ場の1/10の29.0と特に小さな値であった。これらの結果から、今回調査した4ほ場のうちでNo. 1ほ場の微生物相は糸状菌が特に優占した微生物相であると思われる。

ところで、Asの生物毒性はその化学形態や土壤条件により異なり、一般に、As⁵⁺よりもAs³⁺の方が毒性が強いといわれている。例えば、イネに対する障害は、畑条件の酸化的な土壤よりも湛水条件下で還元が進んだ土壤の方が顕著に現れることが知られており、これはAs³⁺が湛水条件下では、毒性が強く、溶解性のAs³⁺に還元されるためであると考えられている（前田、手代木 1957; Reed and Sturgis 1963）。

土呂久As汚染土壤においても、As³⁺耐性糸状菌数とAs⁵⁺耐性糸状菌数の差は明確ではなかったが、細菌および放線菌についてはAs³⁺耐性菌数はAs⁵⁺耐性菌数よりも少なく（図2-2）、As³⁺はAs⁵⁺より細菌および放線菌に対する毒性が強いことが示された。また、As³⁺耐性菌数が全菌数に対して占める比率は細菌、放線菌におけるよりも糸状菌において高かった。一般に重金属汚染土壤においては重金属耐性菌が優占してくる傾向にあるが（Jordan and Lechevalier 1975; Doelman and Haanstra 1979; Olson and Thornton 1982; 山本ら 1981）、As汚染土壤における調査結果において認められた様に、As³⁺に対する耐性、感受性に微生物間で差が認められることは、As³⁺濃度の高い土壤中では感受性の高い細菌が抑えられ、比較的耐性の高い糸状菌が優占してくることを予想させる。すなわち、No. 1ほ場では高濃度のAsが夏期の湛水条件下で毒性の強いAs³⁺に還元されるため、As³⁺感受性の高い細菌、放線菌は抑制され、As³⁺耐性の強い糸状菌が優占するであろう。さらに、夏季に集積したこれらの糸状菌が、土壤

が酸化的条件となる冬季にも多く残存していた可能性は高いと思われる。一方、No.3ほ場のAs含量はNo.1ほ場よりも低く、No.2およびNo.4ほ場は畑状態で常に酸化的に保たれるため土壌中のAs化合物は毒性の低いAs⁵⁺で存在すると思われ、これら3ほ場ではNo.1ほ場の様にAs³⁺耐性糸状菌は優占して行くことはないと思われる。実際、No.1ほ場ではB/F比が他の3ほ場よりも低く(表2-2)、糸状菌相の中でも高濃度のAs³⁺に耐性をもった糸状菌の比率が他の3ほ場よりも高かった(図2-2)という調査結果は、上述したような推定を裏付けるものである。さらに、No.1ほ場で優占していた糸状菌類(グループ1)は他の3ほ場ではみられない特異的な菌であった。このように、No.1ほ場において、高濃度のAs³⁺に耐性を持つ特異的な糸状菌が集積したことは、No.1ほ場の特徴的な微生物相の形成にAs³⁺が大きく影響したことを示唆する。

第3章 ヒ素汚染土壌から分離されたヒ素耐性微生物

Asで汚染された土壌では高濃度のヒ素に耐性をもつ微生物が優占してくる傾向が認められた(第2章)。このことは、As汚染土壌中での物質分解にAs耐性微生物が重要な役割を果たしていることを示すとともに、これらのAs耐性微生物を汚染土壌より単離し、その微生物学的な諸性質を明らかにすることが、この様な汚染土壌の生態系を理解する上で重要であることを示す。一方、これらのAs耐性微生物のあるものはAs化合物を代謝し、生物的に不活性な化学形態に変換したり、有害なAs化合物を生態系から排除することにより、Asに対する耐性を発揮していると考えられ、これらの微生物のAs耐性能を明らかにすることは、土壌中でのAsの形態変化、挙動を明らかにするうえでも重要であると考えられる。本章では、As汚染土壌からAs³⁺耐性能を持つ糸状菌および細菌類を単離し、それぞれの種類構成と主要なグループの微生物的性質、As化合物耐性能を調べた。

3.1 土壌中のヒ素耐性糸状菌の種構成とヒ素耐性能

3.1.1 供試土壌および土壌中の微生物数

1) 方法

大分県西臼杵郡高千穂町のヒ素汚染対策指定地およびその附近の畑および水田、計4地点で採取した土壌から細菌を分離した。A、Bの2土壌は土壌汚染対策指定地域内(それぞれ第2章のNo.2、No.1ほ場)から採取された高濃度のAsを含む表土で、C、Dの2土壌は指定地域外(それぞれ第2章のNo.4、No.3ほ場)の比較的As含量の少ない表土である。これらの土壌は採取後、国立環境研究所で風乾状態で保管されていた。土壌採取地の詳細および採取時の土壌中の微生物数等については第2章で既に述べた(表2-1、2-2)。

これらの供試土壌を畑条件（最大容水量の50%）または湛水条件で25°C、4週間培養し、微生物数の計数およびAs耐性菌の分離に供した。

微生物数は希釈平板法（土壌微生物研究会 1979）で計数した。細菌、放線菌はアルブミン寒天培地を用いて28°C、7日間培養後に、糸状菌数はローズベンガル寒天培地を用いて25°C、4日間培養後に平板上に生じたコロニーを計数した。

As耐性細菌および糸状菌は、As添加（亜ヒ酸ナトリウムを10mM）アルブミン寒天培地およびAs添加ローズベンガル寒天培地を用いて希釈平板法で同様に計数した。

2) 結果

各供試土壌を畑または湛水条件で25°C、4週間培養した後の細菌、糸状菌およびそれぞれの10mM As³⁺耐性菌数を表3-1に示した。

土壌および培養条件によって微生物数は異なったが、畑条件で培養した高濃度As汚染土壌（土壌A、B）には10⁴ CFU/g soil 以上のAs耐性糸状菌が認められ、他の土壌のAs耐性糸状菌数よりも明らかに多かった。

表 3-1 各土壌中の生菌数及び10mM亜ヒ酸耐性菌数

土壌	培養	細菌(10 ⁶ /g)		糸状菌(10 ⁴ /g)	
		生菌数	As耐性菌数	生菌数	As耐性菌数
A	畑	39	0.12 (0.0031)*	7.7	5.8 (0.753)*
	水田	18	0.34 (0.018)	1.6	0.44 (0.075)
B	畑	104	0.15 (0.0014)	6.5	4.34 (0.668)
	水田	17	0.07 (0.0041)	2.6	0.05 (0.019)
C	畑	40	0.0 (0.0)	6.0	0.6 (0.100)
	水田	32	0.14 (0.0044)	1.3	0.06 (0.046)
D	畑	22	0.03 (0.0014)	2.8	0.19 (0.068)
	水田	2	0.0 (0.0)	1.3	0.22 (0.169)

* (As耐性菌数/生菌数)

3.1.2 ヒ素耐性糸状菌の単離

1) 方法

As耐性糸状菌を計数したAs³⁺添加ローズベンガル寒天平板上の糸状菌コロニーをランダムに分離し、As無添加のマーチン寒天培地(付表)の平板上で植菌して純化した。単離された糸状菌は10mM As³⁺添加培地で生育させ、As耐性能を保持していることを確認した。これらの単離された菌株はマーチン寒天培地およびツアベック寒天培地(付表)上に形成するコロニーの色彩、形状などを基準としてグループ分けした。これらのグループのうちで、孢子、分生子等を形成したのものについては顕微鏡による形態観察等により同定を試みた。同定に際しては Gilman (1957)、Barnett (1960)、宇田川 (1978)、Malloch (1983) を参考にした。

2) 結果

各土壌から合計113株のAs耐性糸状菌が単離され、これらはそのコロニーの色彩および形態から50グループに分けられた。このうち、比較的分離頻度の高かったのはFG-1 (16株)、FG-2 (10株)、FG-3 (5株)、FG-8 (21株) およびFG-9 (7株) の5グループで、これら5グループに属する菌が全分離菌数の52%を占めていた(表3-2)。

これらのグループのうち、FG-8に属する菌はいずれも灰白色の短い気菌糸の密なコロニーを形成したが、マーチン培地およびツアベック寒天培地上では分生子や孢子を形成しなかったため、複数の種または属の混合群である可能性もある。

FG-1に属する菌はマーチン培地上に形成されたコロニー表面の色彩が鮮黄色から赤みを帯びた灰色に変化し、赤褐色の色素を生成し、少数の分岐を持つペニシリウム型の分生子頭を形成し(写真3-1)、表面に小さな突起をもつ子の胞子を形成し(写真3-2)、これらの特徴から *Talaromyces* sp. と判断した。FG-1に属する菌は未同定のFG-8を除くと、最も多く分離された。

FG-2に属する菌は、円柱形の分生子頭（写真3-3,4）の形態などから *Aspergillus fumigatus* と判断した。FG-2に属する菌は計10株分離されたが、汚染土壌の一つ（土壌A）からしか分離されなかった。

FG-3およびFG-4に属する菌は合せて6株分離され、螺旋形の頂毛と子のう殻（写真3-5）を持つことから、*Chaetomium* sp.と考えられた。

単褐色のコロニーを形成し、直径6~7 μ mの比較的大きな分生子のペニシリを形成する（写真3-6,7）FG-5は *Scopulariopsis* sp.と判断されたが、1株しか分離されなかった。

FG-9に属する菌は長い白色の密な気菌糸の特徴的なコロニーの形態から同じ種と考えられたが、これらの菌は分生子を形成しなかったため、同定できなかった。

3.1.3 単離されたヒ素耐性菌の亜硫酸添加培地における生育とヒ素吸収

1) 方法

単離されたAs耐性糸状菌のうちFG-1、FG-2、FG-5、FG-7、FG-9、FG-28、FG-50に属する7株（F-49、F-40、F-35、F-1、F-2、F-32、F-83）について、液体培養における生育とAsの吸収を調べた。

マーチンの液体培地（付表）100mlを入れた200ml容の三角フラスコに、滅菌メンブレンフィルターで除菌した1M 亜硫酸ナトリウム（ NaAsO_2 ）溶液を無菌的に1ml加えた。tween80を0.1%添加した滅菌水 50mlに供試糸状菌の分生子を懸濁分散させた後、先述のAs添加マーチン液体培地に供試菌の分生子懸濁液を1mlづつ接種し、25°Cの暗所で静置培養した。対照としてAs³⁺無添加培地にも供試菌の分生子を同様に接種し、暗所で静置培養した。

分生子を接種された培養液は、供試菌によって8日から48日間培養した後、メンブレンフィルターで菌体をろ過、分離した。培養容器、フィルターおよびフィルター上

表 3-2 各グループの糸状菌の特徴と分離数

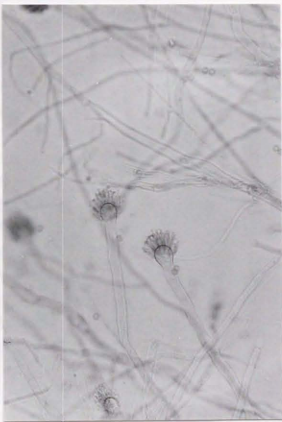
糸状菌 グループ	汚染土壌				非汚染土壌				計	特徴(コロニー色/色素生成/その他/分類)	
	A		B		C		D				
	畑	湛水	畑	湛水	畑	湛水	畑	湛水			
FG-1		2	7					6	1	16	鮮黄色、赤灰色/赤褐色/ベニシリ、子のう胞子/ <i>Talaromyces</i> sp.
2	4	6								10	緑色//円柱形分生子頭/ <i>A.fumigatus</i>
3				1				3	1	5	白色//螺旋形頂毛、子のう殻/ <i>Chaetomium</i> sp.1
4		1								1	白色/色素生成/螺旋形頂毛、子のう殻/ <i>Chaetomium</i> sp.2
5	1									1	淡褐色//比較的大きな分生子/ <i>Scopulariopsis</i> sp.
6	1									1	緑色/橙色?// <i>Penicilium</i> sp.1
7					2					2	白色//鎖状分生子/ <i>Acremonium</i> sp. ?
8	4	3	11	2		1				21	灰色//
9		2		1	1	2			1	7	白色//長い気菌糸/
10				2						2	白色//長い気菌糸?/
11			1	1						2	白色//
12		3								3	黒色//単球有色分生子/
13		2								2	黒色//単球有色分生子/
14				1						1	黄桃色、黒色菌核/赤色
15			1	1					1	3	黄桃色、黒色菌核/赤色/
16				1						1	//気菌糸生育悪い
17							1			1	//生育良く気菌糸まばら

表 3-2 (続き 1)

糸状菌 グループ	汚染土壌		非汚染土壌		計	特徴(コロニー色/色素生成/その他/分類)				
	A		B				C		D	
	畑	湛水	畑	湛水			畑	湛水	畑	湛水
FG-18					1	1	//生育良く気菌糸まばら?			
19			1			1	黒褐色			
20	1		1			2	白色、灰色//球状分生子/			
21				1		1	白色//球状分生子			
22			1			1	白色、灰色//			
23					1	1	白色、密綿毛//			
24					1	1	灰色、粉状///Penicillium sp.2			
25					1	1	白色、ピロード状///Penicillium sp.3			
26						1	白色//短枝、房状分生子?			
27						1	灰色、短密毛/			
28	1					1	白色、短せん毛状			
29	1					1	白色短綿毛			
30		1				1	白色、密綿毛/淡黄色			
31		1				1	濃緑色//円柱状分生子頭			
32		1				1	白色/短枝、球状の分生子頭?			
33			1			1	淡褐色/褐色色素			
34						1	1 白色/赤色色素			

表 3-2 (続き 2)

糸状菌 グループ	汚染土壌				非汚染土壌				計	特徴(コロニー色/色素生成/その他/分類)
	A		B		C		D			
	畑	湛水	畑	湛水	畑	湛水	畑	湛水		
FG-35					1				1	濃緑色ピロード粉状/// <i>Penicillium</i> sp.4
36					1				1	褐色、ピロード状//液滴/ <i>Aspergillus</i> sp.1
37	1								1	短気菌糸、うす毛
38					1				1	白色、緑色//短毛
39					1				1	茶褐色ピロード状短綿毛/// <i>Aspergillus</i> sp.2
40					1				1	淡褐色、短綿毛//液滴
41						1			1	白色//球状分生子
42	1								1	灰緑色、ピロード状
43	1								1	白色、せん毛状
44	1								1	白色短毛
45		1							1	白色/短毛、ピロード状
46			1						1	黄緑、黄色、粉状(90)
47			1						1	白色/短毛ピロード状
48					1				1	/黒色素/気菌糸少ない
49		1							1	灰黒色//密毛
50			1						1	白色/気菌糸長い
Total	17	24	24	12	11	5	12	8	113	



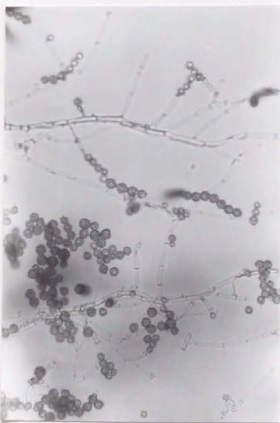


写真3-1 (前頁左上) FG-1 (*Talaromyces* sp.) の分生子頭 (ペニシリ) (200倍)

写真3-2 (前頁右上) FG-1 (*Talaromyces* sp.) の子のう胞子および分生子 (200倍)

写真3-3 (前頁左下) FG-2 (*Aspergillus fumigatus*) の分生子頭 (50倍)

写真3-4 (前頁右下) FG-2 (*Aspergillus fumigatus*) の分生子頭 (200倍)

写真3-5 (左上) FG-3 (*Chetomium* sp.) の子のう殻 (20倍)

写真3-6 (右上) FG-5 (*Scopulariopsis* sp.) の分生子 (100倍)

写真3-7 (左下) FG-5 (*Scopulariopsis* sp.) の分生子 (200倍)

の菌体を蒸留水で2回洗浄し、洗液はろ過した培養液と合わせた。フィルター上の菌体は105°Cで乾燥し、菌体の乾燥重量を求めた後、硝酸-過塩素酸で分解し、フレームレス原子吸光度計(島津製作所 GFA-2/AA640-12)でAs含量を求めた。

2) 結果

培養にともなう供試菌の生育量および菌体に吸収されたAs量、菌体中のAs濃度の変化を表3-3に示した。

F-35株 (FG-5; *Scopulariopsis* sp.) およびF-2株 (FG-7) はAs³⁺添加培地における生育は非添加培地に比較して悪く、実験開始30日目以降もAs³⁺添加培地における生育量は非添加培地における生育量の50%以下であり、また菌体中のAs吸収量も1000 $\mu\text{g/g}$ 以下であった。F-83株 (FG-50)、F-32株 (FG-28) および F-49株 (FG-1; *Talaromyces* sp.) はAs³⁺添加培地では非添加培地に比較して生育はやや遅れるものの、実験後期の最大生育量は非添加培地の生育量に匹敵し、また、1500~4000 $\mu\text{g/g}$ 以上のAsを吸収した。F-40株 (FG-2; *A. fumigatus*)、F-1株 (FG-7; *Acremonium* sp.) はAs添加培地では非添加培地に比較して生育量はやや少なかったが、生育速度が遅くなる実験後期においてもAsの吸収は進み、菌体中のAs濃度は増加し続けた。

表 3-3 As³⁺添加培地中での糸状菌糸の生育とAs吸収量

株 No.	培養日数	菌生育量*(mg)		As吸収量(μg)	
		As無添加	As添加	総取込量	菌体1g当り
F-1	14日目	116	73 (0.63)	34	457
	26日目	252	244 (0.97)	340	1371
	34日目	309	269 (0.87)	885	3491
F-2	14日目	52	18 (0.35)	16	941
	26日目	307	129 (0.42)	69	576
	38日目	388	182 (0.47)	164	905
F-32	17日目	182	146 (0.80)	359	2630
	28日目	223	298 (1.34)	432	1469
	39日目	266	283 (1.06)	434	1496
F-35	11日目	45	27 (0.60)**	20	700
	20日目	250	59 (0.24)	27	535
	34日目	440	66 (0.15)	61	914
F-40	8日目	427	303 (0.71)	134	440
	19日目	649	573 (0.88)	639	1112
	24日目	615	444 (0.72)	2325	5165
F-49	32日目	450	295 (0.66)	804	2078
	41日目	331	331 (1.00)	1367	4183
	48日目	297	373 (1.26)	1538	4278
F-83	14日目	233	200 (0.86)	471	2289
	21日目	285	249 (0.87)	610	3218
	33日目	---	219	860	3930

*乾燥重量； ** (As添加区生育量/As無添加区生育量)

3.1.4 考察

As汚染地では、汚染水田土壌で特徴的な微生物相が認められ、高濃度のAs³⁺に耐性を持つ特異的な糸状菌が優占していることが現地調査で既に明らかになっている(第2章)。しかし、As汚染地から採取したこれらの土壌を実験室内で培養した本章の実験では、高濃度のAsを含む土壌を湛水状態で培養した時にAs耐性糸状菌が特に優占するという傾向は認められず、むしろ、畑条件で培養した時にAs耐性糸状菌数が高かった。この様に、現地のAs汚染水田土壌では優占していた特異的なAs耐性糸状菌が、実験室内で湛水条件で培養した土壌では優占してこなかったのは、これらの糸状菌類が、元来、好氣的微生物であり、現地汚染水田土壌では湛水と落水を繰り返すことによって集積してきたためであると思われる。そのため、室内で培養した土壌と現地汚染土壌の糸状菌相とは必ずしも一致しないかもしれない。しかし、室内培養土壌において優占してきたAs耐性糸状菌は現地汚染土壌から持込まれたものであり、室内で再培養した土壌から単離されたAs耐性糸状菌相も現地汚染土壌の糸状菌相をある程度は反映しているものと思われる。

Gosio (1893) がAsを含んだ壁紙に生える一群のAs耐性真菌類について報告して以来、高濃度のAsを含む基質に生える「ヒ素カビ」の代表的なものとして知られる *Scopulariopsis* 属の菌類は、土壌からも普通に分離される菌類であるとされている(宇田川ら 1978)。しかし、本研究において自然条件下で長期にわたって継続的に高濃度のAsで汚染された土壌を再び培養した土壌から分離されたAs耐性糸状菌の多くのグループのなかで、FG-1 (*Talaromyces*属)、FG-2 (*Aspergillus*属)および未同定のFG-8に属する菌が多く分離されたが、*Scopulariopsis*属の菌類の分離頻度は低かった。かつて、Thom and Raper (1932) も実験室内で人為的にAsを添加した土壌の糸状菌相を調べ、*Penicillium* spp.、*Aspergillus* sp.、*Fusarium* spp.、*Paecilomyces* sp. などのAs耐性菌を単離したが、*Scopulariopsis*属は分離されなかった。本研究

において分離された *Scopulariopsis* sp. は、同時に分離された *Aspergillus fumigatus* や *Talaromyces* sp. に比較して高濃度の As^{3+} 添加による生育の阻害は大きく、耐性が小さいことが As^{3+} 耐性試験の結果、示唆された。*Scopulariopsis* 属は第4章で述べるように As 化合物代謝能を持つが、 As 耐性能は *A. fumigatus* や *Talaromyces* sp. よりも小さいために、 As 汚染土壌で優占してこないのかも知れない。本研究で多く分離された *Talaromyces* 属の分生子世代は *Penicillium* 属であり (宇田川ら 1978)、 As 耐性菌として *Talaromyces* 属や *Aspergillus* 属が多く分離されたことは、Thom and Raper (1932) の As 添加土壌の実験において *Penicillium* 属あるいは *Aspergillus* 属の As 耐性菌が分離されたことと一致し、自然条件下において As で汚染された土壌においても *Penicillium* 属や *Talaromyces* 属、*Aspergillus* 属が優占してくることを示唆する。

3.2 土壌中のヒ素耐性細菌の種構成とヒ素耐性能

3.2.1 ヒ素汚染土壌からのヒ素耐性細菌の分離

1) 方法

3.1節において As 耐性糸状菌を単離した土壌、すなわち、宮崎県西臼杵郡高千穂町の As 汚染対策指定地から採取した土壌を畑条件および淡水条件下で培養した土壌から、 As 耐性細菌を分離した。

供試土壌中の As 耐性細菌数を 3.1.1 で述べたように希釈平板法で測定した後、 As 添加アルブミン寒天平板上に生じた細菌のコロニーをランダムに分離し、ヌトリエントブロス寒天 (Difco) 培地上で植え継ぎ、純化した。単離された細菌株は $10mM$ の As^{3+} 添加ヌトリエントブロス培地 (付表) において培養し、 As 耐性を確認した。

得られた As 耐性細菌株は、Bergey's Manual (Sneath ら 1986) に基づき、形態観察、生理試験などにより同定を試みた。試験の一部は NCIMB (Scotland, UK) に委託

した。

2) 結果

10mM As^{3+} 添加平板上に生じた細菌コロニーをランダムに単離し、10mM As^{3+} 添加培地中での増殖能を確認し、最終的に71株のAs耐性細菌株を得た。

単離されたこれらのAs耐性細菌はその形態および生理的性質から11のグループに分けられた。それぞれの細菌群の形態および主要な生理的性質を表3-4に示した。

BG-1、BG-2、BG-3の3群の細菌はいずれもクリスタルバイオレット添加ヌトリエントプロス寒天培地（付表）でも生育した。クリスタルバイオレットに耐性を示す細菌はいずれもグラム陰性細菌であることが知られている（加藤、鈴木 1979）ので、これら3群の細菌はいずれもグラム陰性細菌であると思われる。BG-1群の細菌はOFテストで好氣的に生育するがグルコースから酸を生成せず、また、周べん毛を持ち運動性を有することから *Alcaligenes* 属と思われ、さらに、他の性質から *A. faecalis* と判定された。BG-2群の細菌はOFテストでグルコースから好氣的に酸を生成し、極べん毛と運動性を有することから *Pseudomonas* 属と思われた。BG-3群は運動性の無い桿菌であった。

BG-1、BG-2、BG-3以外の細菌群はいずれもクリスタルバイオレット添加培地では生育できないことから、グラム陽性細菌と思われた。このうち、BG-4群の2株はカタラーゼを持たず、好気条件でも生育できることから *Lactobacillus* 属または *Sporolactobacillus* 属と思われたが、この群に属する2株はいずれも運動性を持つことから、これらは、*Sporolactobacillus*属と思われる。単離された他のグラム陽性細菌群はいずれもcatalaseを持っていた。BG-5群は細胞の幅が1.1 μ m、長さが2.2~5.0 μ mの大型の桿菌で運動性はなかった。BG-6の菌群はそのコロニーが寒天平板上に薄く広がることで特徴付けられる桿菌であり（写真3-8、9）、内生胞子を形成することから

Bacillus 属と考えられ、また、コロニーが寒天上を移動するという性質や他の性質 (表3-5) から *B. circulance* またはその近縁種と考えられる。BG-7およびBG-8の菌群はVPテストで陽性であったが残りの菌群はいずれもVPテストで陰性であった。これらVPテスト陰性の菌群は硝酸還元性、MRテストからさらに4つの菌群 (BG-9、BG-10、BG-11、BG-12) に分けられたが、運動性や細胞形態、その他の性質に変異があり、それぞれ複数の菌種の混群である可能性がある。

表 3-4 分離されたAs耐性細菌群の性質

菌群 No.*	BG-1	BG-2	BG-3	BG-4	BG-5	BG-6	BG-7	BG-8	BG-9	BG-10	BG-11	BG-12
形態**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
幅(μm)	0.6	0.6	0.5	0.4-0.7	1.1	0.4-0.7	0.7	0.5	0.5-0.8	0.4-0.9	0.5-0.7	0.6
長さ(μm)	1.1	1.0	1.6-2.8	2.4-3.1	2.2-5.0	2.2-3.4	3.1	2.5	2.4-4.7	2.0-3.6	2.2-3.7	3.0
孢子形成	-	-			+	+						
カタラーゼ	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C V耐性	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
運動性	+	+	-	+	-	d	-	+	±	+	±	+
べん毛***	L	P										
O-F テスト****	N	O	~	~	~	~	F	~				
V-P テスト	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
NO ₃ 還元能	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
MRテスト	-	-	-	±	-	+	-	-	+	-	+	-
ゼラチン資化性	-	+			+			+	+		+	
デンプン資化性	-	-			+			+	+		+	
King A培地	+	+	+		-			-				
King B培地	+	+	+		-		-					
分離株数	11	3	2	2	9	11	1	1	19	10	14	1

*BG-1, *A. faecalis*; BG-2, *Pseudomonas* sp.; BG-4, *Sporolactobacillus* sp.; BG-6, *B. circulans*. **R, 桿菌. ***L, 周べん毛; P, 極べん毛. ****N, 酸を生成せず; O, 好氣的に酸を生成; F, 嫌氣的に酸を生成; ~, 生育せず.

表 3-5 As耐性 *B. circulans* 各菌株の形態的、生理的性質

菌株番号	TR-40B	TR-40E	TR-55	TR-63	TR-79	TR-43
細胞形態	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌
長さx直径(μm)	2.2x0.4	2.2x0.4	2.5x0.6	2.2x0.5	2.2x0.5	2.2x0.4
胞子形成	+	+	+	+	+	-
運動性	+	+	+	+	+	+
グラム染色	不定	不定	不定	不定	不定	不定
カタラーゼ ^a	+	+	+	+	+	+
キシナーゼ ^a	+	+	+	+	+	+
NO ₂ ⁻ 生成	+	+	+	+	+	+
胞子形態 ^a	E	E	E	E	E	-
胞子のう膨大	+	+	+	+	+	-
形成部位 ^b	T	T	T	T	T	-
嫌気生育 ^c	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
pH in VP	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
酸生成(グルコース) ^d	+	+	+	+	+	+
酸生成(ソルビトール) ^d	-	-	-	-	-	-
酸生成(アラビノース)	+	+	+	-	+	+
酸生成(ラムノース)	-	-	-	-	-	-
ガス生成(グルコース) ^d	-	-	-	-	-	-
セルロース分解	-	-	-	-	-	+
ゼラチン分解	+	+	+	+	+	+
チロシン分解	-	-	-	-	-	-
澱粉加水分解	+	+	+	+	+	+
CMCセルロース加水分解	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
尿素加水分解	-	-	-	-	+	+
クエン酸資化	-	-	-	-	-	-
アミノ酸資化	-	-	-	-	-	-
コハク酸資化	-	-	-	-	-	-
イソクエン酸	-	-	-	-	-	-
インドール生成	-	-	-	-	-	-

表 3-5 (続き)

菌株番号	TR-40B	TR-40E	TR-55	TR-63	TR-79	TR-43
pH5.7生育	-	+	-	-	-	-
5%NaCl生育	+	+	+	+	+	+
7%NaCl生育	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
10%NaCl生育	-	-	-	-	-	(+)
生 37°C	+	+	+	+	+	+
育 41°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
温 45°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
度 50°C	-	-	-	-	-	-
55°C	-	-	-	-	-	-
リゾ酸, Koser's	-	-	-	-	-	-
DNase	+	+	+	+	+	+
細胞内小球 ^o	-	-	-	-	-	-
知アムアエニコ-ル感受性	-	-	-	-	-	-
カジ'キシン酸感受性	(+)	(+)	+	(+)	+	+
ホ'リミキシンB感受性	+	+	+	+	+	+
ストレプトマイシン感受性	-	-	-	-	-	-

形態的記述は、特に記述がない限り、Lab M nutrient agar における生育による。

^aE, 楕円形または円柱形。 ^bT, 端。 ^oグルコース寒天培地。 ^oペプトン水砂糖、Andrade 指示薬。



写真 3-8 寒天平板上の *B. circulans* コロニーの移動。左列上から0、1、2、4分後、右列上から5、6、8分後。写真中央のコロニーは時間と共に右周りに回転するように移動している。(30倍)



写真 3-9 *B. circulans* 電子顕微鏡写真 (10,000倍)

3.2.2. 主要なヒ素耐性細菌の亜ヒ素耐性能

分離されたAs耐性細菌のなかではBG-1、BG-5、BG-6の3群に属する細菌の分離数が比較的多かった。このうち、BG-5に属する菌はいずれも10mMAs³⁺添加培地で生育が認められたが、その生育量はAs無添加培地に比較して著しく低かった。しかし、BG-1、BG-6に属する細菌はAs³⁺添加培地中でも良好な生育が見られた。そこで、単離したAs耐性細菌のうち比較的分離数が多く、また、As耐性能が高かったBG-1 (*A. faecalis*) とBG-6 (*B. circulans*) の2群についてAs³⁺耐性能を検討した。

1) 方法

BG-1群 (*A. faecalis*) については、単離されたAs耐性株 (TR-17株) および対照として非耐性株 (*A. faecalis* IAM12369株) をAs³⁺添加ペプトン水 (付表) 中で培養し、吸光度の変化から、増殖曲線を求めた。測定にはバイオフォトメーター (BIO-LOG II, Jobin-Yvon 社) を用いた。

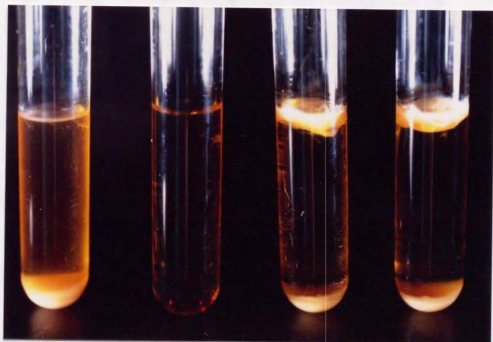
BG-6群 (*B. circulans*) については、各分離菌を亜ヒ素ナトリウムを10、15、20、25、30、35および40mM 添加したヌトリエントブロス培地 (付表) に接種し、28°Cで培養した後、培地の濁りから増殖を判定し、供試細菌が生育し得るAs³⁺の最高濃度を求めた。

2) 結果

BG-1群 (*A. faecalis*) に属するAs耐性株は液体静止培養では表面に厚い菌膜を作り、振とう培養においても増殖した菌体がフロックを形成するため、培地中で均一に増殖しない (写真 3-10)。As耐性TR-17株では、吸光度からみた比増殖速度は一定せず、As非添加培地での培養の対数増殖期においても培養時間の経過と共に比増殖速度が速くなる傾向にあった (図3-1)。この様に、比増殖速度が一定しないため厳密な比較はできないが、10mMのAs³⁺添加培地中でのTR-17株の増殖は、As³⁺無添加培地中で

の増殖に比較して増殖開始が遅れるものの、その増殖速度とAs³⁺無添加培地における増殖速度との差は明瞭でなかった(図3-1)。TR-17株は最高20mMのAs³⁺添加培地中では増殖したが、25mMのAs³⁺添加培地中では増殖しなかった。一方、対照としたAs非耐性株(IAM12369株)では、As³⁺濃度の増加に対して比増殖速度は僅かに減少する傾向にあった(表3-6)。IAM12369株は10mM As³⁺添加培地では増殖しなかった。

BG-6群(*B.circulans*)に属する細菌の一部は純化の過程で失われたが、最終的に得られたTR-40B、40E、43、55、63 および 79の6株は高濃度のAs³⁺添加培地でも生育が可能で、生育できるAs³⁺の最高添加濃度はそれぞれ、TR-40B、25-30mM; TR-40E、25-30mM; TR-43、40mM以上; TR-55、20-25mM; TR-63、25mM; TR-79、30-35mMであった。



As(-) As(+)
As非耐性株 (IAM12369) As耐性株 (TR47)

写真 3-10 As³⁺添加培地中での *A. faecalis* の増殖
As(+), 10mM As³⁺添加ヌトリエントブロス培地
As(-), As非添加ヌトリエントブロス培地

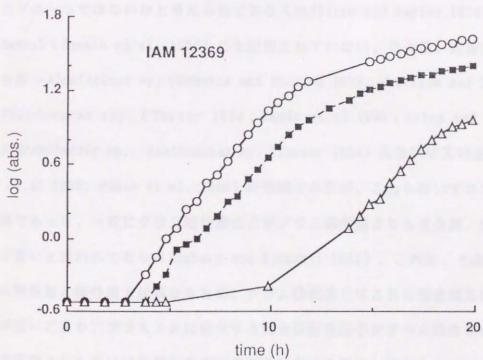
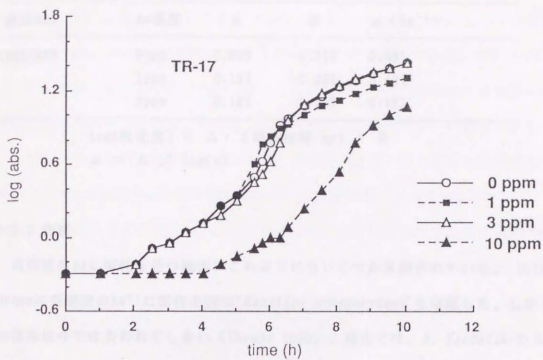


図3-1 As(III)添加培地中での*A. faecalis*の増殖

表 3-6 *A. faecalis* (IAM12369) のAs³⁺添加培地中での比増殖速度 (μ)

菌株No.	As濃度	A	B	μ (hr ⁻¹)
IAM12369	0ppm	0.209	-0.710	0.481
	1ppm	0.187	-0.895	0.431
	3ppm	0.183	-2.159	0.421

$$\log(\text{吸光度}) = A \cdot (\text{培養時間 hr}) + B$$

$$\mu = A / \log(e)$$

3.2.3 考察

高濃度のAsに耐性を持つ細菌はこれまでもいくつか単離されている。1918年にGreenは高濃度のAs³⁺に耐性を持つ*Bacillus arsenoxydans*を単離した。しかし、この菌株は今では失われてしまい(Turner 1949)、現在では、*A. faecalis*のエコタイプの一つではないかと考えられており(Phillips and Taylor 1976)、Bergey's Manual (Sneath et al. 1986)にも記載されていない。その後、高濃度のAs³⁺に耐性を持つ*Alcaligenes* sp. (Osborne and Ehrlich 1976; Phillips and Taylor 1976)、*Pseudomonas* spp. (Turner 1954; Maeda et.al 1990; Arima and Beppu 1964)、*Achromobacter* sp.、*Xanthomonas* sp. (Turner 1954)あるいは未同定の細菌(Maeda et.al 1990; Wakao et al. 1988)が単離されたが、これらはいずれもグラム陰性細菌であった。一般にグラム陰性菌の方がグラム陽性菌よりも重金属、薬剤等への耐性が強いと言われており(Duxbury and Bicknell 1983)、これは、その細胞壁がグラム陰性菌と陽性菌では異なるため、グラム陰性菌ではこれら重金属元素の細胞透過性が低いことや、プラスミドに由来する重金属耐性因子がグラム陰性菌の間ではグラム陽性菌よりも互いに伝播しやすいことなどがその理由と考えられている。

今回単離されたAs耐性細菌のうち、BG-1、BG-2、BG-3の3群、16株がグラム陰性細菌であり、特にBG-1(*A. faecalis*)が多く分離された。*A. faecalis*の一部の株では

高濃度のAsに耐性を持つことが既に報告されており (Osborne and Ehrlich 1976; Phillips and Taylor 1976)、また、*B. arsenoxydans* (Green 1918)、*Achromobacter arsenoxydans* (Turner 1954) も *A. faecalis* のエコタイプであると考えられている (Phillips and Taylor 1976)。対照として培養したIAM12369株が高濃度のAs³⁺には耐性を示さなかった様に、全ての *A. faecalis* が高濃度のAs³⁺に耐性を示すわけには無いが、異なった地域で単離されたAs³⁺耐性菌のなかに同じ種の細菌が高濃度で現れることは *A. faecalis* のAs³⁺耐性機構がこの種の特徴と言えるかもしれない。

グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* のある株はAsや重金属に対する耐性遺伝子プラスミドを持つ (Novic and Roth 1968)。しかし、代表的なグラム陽性の土壌細菌である *Bacillus* 属では高濃度のAs³⁺に耐性を持つ株は、現在では *Bacillus* 属に含まれるかどうか疑問が持たれる *B. arsenoxydans* (Green 1918) の1例を除くと、これまで自然界から殆ど単離されておらず、その菌学的性質も明らかにされていなかった。しかし、今回単離された *B. circulans* の耐性As濃度は、これまでに知られている他のAs耐性グラム陰性菌のAs³⁺耐性能 (6~20mM) に匹敵する。As耐性 *B. circulans* のAs耐性機構については未解明のままであるが、本研究で得られた結果は自然界に存在するグラム陽性菌も高濃度のAsに耐性を持ち得ることを示す。

単離されたAs耐性 *B. circulans* の特徴は、そのコロニーの形態にある。このグループの菌は、寒天の表面に非常に薄く広がる半透明のコロニーを形成し、その一部は渦巻き状に見える小コロニーとなり、寒天表面を不規則に移動し、コロニーの移動速度は速いものでは 0.2mm/min に達した (写真3-8)。また、このグループの菌は、コロニーが寒天表面上をこの様に活発に移動するにもかかわらず、個々の細胞の液体中での運動性は小さく、細胞の周囲に細いべん毛を持つ (写真3-9) が、寒天上のコロニーの動きには別の機構も関与している可能性がある。

単離された *B. circulans* の様に、寒天表面にコロニーが薄く広がり、また集団性

をもって移動することは、従属栄養滑走細菌 (Myxobacteria, Cytophaga) の性質に類似している。これらの滑走細菌は土壌中では個体基質の表面に密着して高分子有機化合物を分解しながら生活すると言われ、その場合、細菌細胞が個体表面を滑走する性質は、個体表面に高密度で密着し、基質を効率良く分解することに有利であると考えられている (Reichenbach and Dworkin 1981)。今回単離された *B. circulans* の土壌中での生態については未だ不明であるが、そのコロニーの特徴から類推されるように、他の滑走細菌と同様、土壌中で高分子有機化合物の表面においてそれらを基質として分解しながら活動している可能性があり、実際、ゼラチン、デンプンやセルロース等の高分子化合物の分解能を示した。Asや重金属で汚染された土壌では、このような有機物の表面は重金属が吸着・濃縮される場であり、また、高濃度に濃縮されたAsや重金属類が土壌中での有機物の分解を妨げているならば、高濃度の重金属に耐性を持つことは高分子の基質の表面で活動する細菌にとって、より有利な性質であると考えられる。

As⁵⁺を始め重金属や抗生物質に対する耐性にはプラスミドに由来するものがある (中原 1988)。グラム陽性細菌においても、*Staphylococcus aureus*のある株はAsや重金属に対する耐性遺伝子プラスミドを持つが (Novic and Roth 1968)、グラム陰性細菌において重金属耐性菌が多い理由の一つとしてグラム陰性細菌間でこれらのプラスミドが伝播しやすいことが考えられている。これらのプラスミドは細胞間の接触により伝播すると考えられている。供試した高濃度As耐性 *B. circulans* が寒天平板上で移動する時、互いに接触してマイクロ集落を形成し移動することは、もしこれらの細菌のAs耐性がプラスミドに由来するならば、細胞が互いに接触することは、これらのプラスミドの伝播に非常に有利な形質であり、これらの細菌が高濃度の重金属に耐性を示すのに好都合であるとも考えられる。

第4章 ヒ素耐性微生物によるヒ素化合物の代謝

Asは、有機および無機態の様々な化学形態で存在し、その形態によって環境中での挙動や生物への毒性も異なる。As化合物の化学形態の変化には微生物も関与し、いわゆる「ヒ素カビ」と呼ばれる一群の真菌類によって無機態の As^{3+} からアルシン等のガス状の有機As化合物が生成することなどは古くから知られていた (Gosio 1893)。これらのAs代謝微生物は、その生理、代謝系については比較的良く研究が成されている (例えば Bird et al. 1946) のに比べ、生態に関しては古くから関心が持たれてきたにもかかわらず研究例は多くない。しかし、水圏において As^{3+} を As^{5+} に酸化する微生物 (Turner 1954; Wakao ら 1988) の存在や、海洋における As^{5+} の As^{3+} への還元 (Johnson and Pilson 1975)、湖沼の底泥でのAsの酸化還元 (Freeman 1986) には微生物の寄与が大きいことなどが報告されている。また、土壌圏においても、Thom and Raper (1932) は実験室内でAsを添加した土壌から単離された糸状菌についてアルシン発生能を調べた。しかし、実際の自然条件下でAsに汚染された土壌におけるAs耐性微生物とこれらのAs化合物代謝能についての調査例はこれまで殆ど無い。第2章で述べたように自然条件下で長期間に渡ってAsで継続的に汚染された土壌ではAsに耐性を持つ微生物が集積しており、これらのAs耐性微生物もAsの土壌中での形態変化に関わっている可能性がある。そこで、第4章ではAs耐性微生物によるこれらAs化合物の形態変化を検討するために、As化合物の形態別定量法 (第1節)、ガス状のAs化合物の簡易検出法 (第2節) について検討した後、土壌から単離された細菌による As^{3+} の酸化 (第3節) と、糸状菌による As^{3+} からのアルシン類の揮散 (第4節) について検討した。

4.1 ヒ素化合物の形態別定量法

As化合物を形態別に定量する方法には、薄層クロマトあるいはペーパークロマトにより分離し、比色法により検出、定量する方法 (Osborne and Ehrlich 1976; Phillips and Taylor 1976)、イオン交換カラムにより分離する方法 (Takamatsuら 1982)、As化合物を還元してアルシン類に変え、その沸点の差により分離する方法 (神 1983)、高速液体クロマトグラム (HPLC) とプラズマ発光分光光度計 (ICP) を組合せたシステムによる方法 (Moritaら 1981、1987) などがある。しかし、イオン交換カラムによる分離 (Takamatsu ら 1982)、アルシン類の沸点の差を利用する方法 (神 1983) は測定に時間がかかり、あるいは、特殊な装置を必要とする。HPLC-ICPシステムによる方法 (Moritaら 1981、1987) は、簡便かつ短時間で測定できる点で有効な方法であると思われるが、検出装置として用いられているICPは原子吸光光度計に比較して必ずしも一般的でない。本節では、As⁵⁺とAs³⁺を簡便に分別定量する方法として、HPLCと原子吸光光度計を組合せて用いることとし、原子吸光光度計、高速液体クロマトグラムの分析条件について検討した。

4.1.1 原子吸光分光光度計分析条件

HPLCで分離された試料を直接、原子吸光光度計で測定する際に、HPLCの移動相によって原子吸光の感度が影響を受けることも考えられる。そこで、As標準液を蒸留水とリン酸緩衝液で希釈し、希釈液の差が原子吸光分光光度計の吸光度に及ぼす影響を検討した。

1) 装置、材料、および方法

装置：原子吸光分光光度計、島津製作所 AA640-12型

燃焼ガスおよび助燃ガス流量：水素 15 liter/min-空気 10 liter/min

バーナー高さ：予備実験により最適条件 (1 mm) に設定

標準試料溶液：ヒ酸ナトリウムを（A）蒸留水または（B）pH6.8、10mM リン酸緩衝液に溶解し、15ppm As^{5+} 標準溶液を調製

方法：標準液（A）および標準液（B）の吸光度の3秒間の積算値を各20回ずつ繰り返し測定し、各標準液の吸光度の繰り返し測定における平均値および変動を求めた。

2) 結果

（A）、（B）両標準液について各20回測定した結果を表4-1に示した。両標準液の吸光度の間には平均値では差は無かったが、（B）リン酸緩衝液希釈標準液（ $cv=2.8\%$ ）の方が（A）蒸留水希釈標準液（同 5.5%）よりも変動は小さかった。

この結果は、試料を原子吸光分光光度計により測定する際にはリン酸緩衝液で希釈して測定する方が蒸留水で希釈した試料を測定するよりも測定値の変動が小さい点で有利であり、従って、HPLCと原子吸光分光光度計を直結したシステム（HPLC-AAシステム）におけるHPLCの移動相にはリン酸緩衝液を用いる方が有利であることを示している。

4.1.2 HPLC-AAシステムにおけるヒ酸および亜ヒ酸の分離および保持時間

（4.1.1 節）において HPLC-AAシステムの移動相として適当と思われたリン酸緩衝液を用いた時の、HPLC-AAシステムにおける As^{5+} と As^{3+} の分離能、それぞれの感度および検量線の直線性に及ぼす影響を検討した。

1) 装置、材料および方法

装置 : 高速液体クロマトグラフ、島津製作所 LC-3A型

原子吸光分光光度計、島津製作所 AA640-12 型

カラム : イオン排除カラム SCR-101H

表 4-1 原子吸光分光光度計によりAsを測定する時に試料希釈液の
差が吸光度とその変動に及ぼす影響

No.	蒸留水	緩衝液*	No.	蒸留水	緩衝液*
1	156**	177	13	174	168
2	164	179	14	175	165
3	171	174	15	171	173
4	189	178	16	145	169
5	177	166	17	179	174
6	172	179	18	180	176
7	181	171	19	173	177
8	176	177	20	169	172
9	182	174			
10	168	173	Ave.	172.25	174.0
11	170	172	C.V.(%)	5.5	2.8
12	173	186			

* 10mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)

**吸光度 (相対値)

運転条件： 移動相、10mMリン酸緩衝液 (pH 6.8)、3.0 ml/min

試料注入量、100 μ l

試料： As⁵⁺、As³⁺を所定の濃度となるように混合し、蒸留水、50mMおよび10mMリン酸緩衝液 (pH 6.8)、マーチン培地 (付表) で希釈して標準溶液を調製した。

方法： As⁵⁺、As³⁺混合標準液をHPLC-AAシステムで分離定量し、各ピークの高さを求めた。

2) 結果

As⁵⁺およびAs³⁺の保持時間：

10mMリン酸緩衝液によって希釈したAs⁵⁺、As³⁺混合標準液（各750ppm）をHPLC-AAシステムで測定した時のチャートの例を図4-1に示した。As³⁺の保持時間（4.1 min.）はAs⁵⁺の保持時間（1.65 min.）よりも長く、この2つの物質は明確に分離された。

試料希釈液の差がAs⁵⁺とAs³⁺の感度に及ぼす影響：

蒸留水、リン酸緩衝液およびMartin培地で希釈したAs標準液中のAs⁵⁺およびAs³⁺のピーク高を表4-2に示した。リン酸緩衝液で希釈した試料ではリン酸濃度が高まるにつれピーク高さが低くなり、分離能が悪くなる傾向にあった。Martin培地で希釈した試料ではリン酸緩衝液希釈試料よりもさらにピーク高さは低かった。

表 4-2 試料希釈液がピーク高さに及ぼす影響

希釈液	As ⁵⁺	As ³⁺
蒸留水	35.25	24.25
10mM緩衝液	29.25	22.25
50mM緩衝液	26.0	21.25
Martin 培地	22.5	19.0

試料中のAs濃度はAs⁵⁺、As³⁺それぞれ750ppmずつ

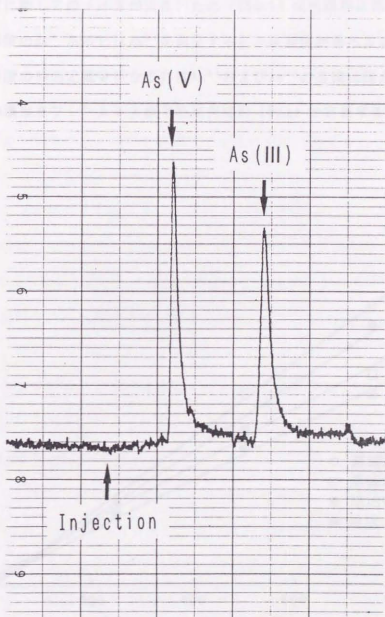


図 4-1 HPLCによるAs⁵⁺とAs³⁺の分離

検量線の直線性：

図4-2に示したように、 As^{5+} 、 As^{3+} ともに750 ppmまで検量線はほぼ直線であった。しかし、測定に際してのノイズが大きいため(図4-1)検出限界は高く、HPLC-AAシステムで微量濃度の As^{5+} あるいは As^{3+} を測定することは精度が落ちると思われた。そのため、微量濃度のAsの定量を行なうには As^{5+} および As^{3+} の各流出画分を別個に採取し、各画分中のAs濃度をフレームレス原子吸光光度計(FAA)で定量する事が適当と思われる。

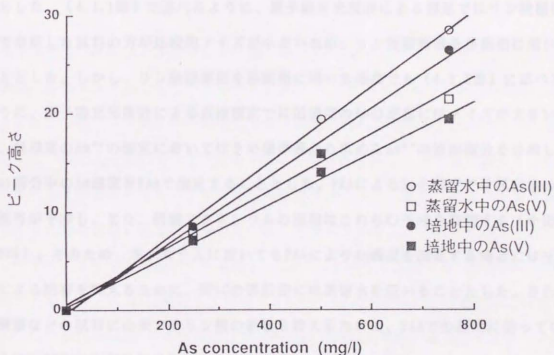


図4-2 蒸留水およびMartin培地で希釈した標準液の検量線

4.1.3. 本研究において用いたヒ酸/亜ヒ酸分離定量システム

以上の実験結果からHPLC-AAシステムでAsを分離定量する場合の問題点として、次の事が明らかとなった。(1) 原子吸光分光光度計によるAsの測定においては、リン酸緩衝液で希釈された試料は蒸留水で希釈された試料より吸光度の変動は小さい。(2) HPLC-AAシステムにおいて移動相にリン酸緩衝液を用いた時、HPLCに注入される試料は緩衝液によって希釈されたものの方が蒸留水で希釈したものより分離能はやや悪い。また、HPLCにより分離された試料を直接原子吸光光度計で測定すると、ノイズが大きいため、微量のAsの定量はFAAで測定するのが適当である。

これらの予備実験の結果を踏まえ、本研究では図4-3に示したような、HPLCと原子吸光光度計を接続したシステム(HPLC-AAシステム)で As^{5+} と As^{3+} を分別定量することとした。(4.1.1節)で述べたように、原子吸光光度計による測定ではリン酸緩衝液で希釈した試料の方が比較的ノイズが小さいため、リン酸緩衝液を移動相に用いることとした。しかし、リン酸緩衝液を移動相に用いた場合でも(4.1.2節)に述べたように、原子吸光光度計による直接測定では低濃度のAsの定量にはノイズが大きいため、低濃度の As^{5+} の測定においては予め標準液から求めた As^{5+} の流出画分を分離し、その画分中のAs濃度をFAAで測定することとした。FAAによるAsの測定では試料中のリン酸等が干渉し、また、硝酸マグネシウムの添加はこれらの干渉を抑制する(小田中1979)。そのため、本システムにおいてもFAAによりAs濃度を測定する場合にはリン酸による妨害を抑えるために、HPLCの移動相には蒸留水を用いることとした。さらに、培養液などの試料に由来するリン酸の影響を抑えるために、FAAでの測定に当ってはさらに0.25%の $Mg(NO_3)_2$ を添加した。

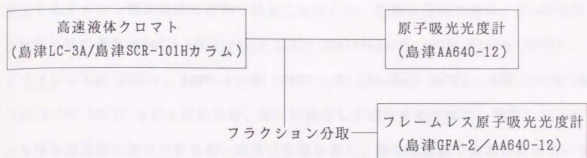


図 4-3 ヒ酸/亜ヒ酸分離定量システム

4.2 ガス状ヒ素化合物の検出法

無機態の As^{3+} やモノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)などの有機As化合物をメチル化してトリメチルアルシン(TMA)などのガス状の有機As化合物(アルシン類)を生成する一群の真菌類の存在が知られている。As汚染土壌で優占してくるAs耐性糸状菌類が、この様なアルシン発生能を持つかどうかということは、As汚染土壌におけるAs化合物の挙動を明らかにするうえで、また、As汚染土壌で優占してくるこれらの糸状菌類の生態学的意味を考えるうえで重要であると考えられる。

これまで、アルシン類の発生を検定するには、A)嗅覚によりアルシン類特有の臭いを検出したり、B)通気培養して気相中のAs化合物を物理的または化学的に回収したり、C)head space法により培養容器内の気相中のAs化合物量を直接ガスクロで定量する、などの方法が行われてきた。

このうち、A)の方法は、アルシン類に特有のニンニクの様な臭いを感知する方法で、初期の研究においては行われていた(Thom and Raper 1932)ようであるが、

発生するアルシン類が非常に有毒であることから、危険な方法である。B)の方法は反応容器の通気を HgCl_2 (Biginelli 1901; Challengerら 1933; Birdら 1948)、ビリジン (山根 1989)、 AgNO_3 (山根 1989)、KI (Woolson 1977)、 HNO_3 (McBride and Wolfe 1971) などと反応させ、時には冷却して回収する方法で、発生したアルシン類を定量的に回収できるが、複雑な装置を要し、操作も複雑であることから、多数の試料についてアルシン発生能を一次的に検索するには適さない。C)の方法 (Cox and Alexander 1973; Cullenら 1979) も直接ガスクロで定量するため、特定の化合物の検出には適するが、未知の化合物も含めたAs化合物の揮散を捉えるには必ずしも適当ではない。

一方、高松ら (1983a, 1983b) は土壌から発生するアルシン類を検出するために、気相の一部を AgNO_3 溶液をしみ込ませたろ紙に通過させ、吸着したAsを蛍光X線分析法により検出した。本研究ではアルシンの発生を簡便に検出する方法として、高松ら (1983a, 1983b) の方法を基本として、サンプルカップに入れた AgNO_3 溶液に気相中のAs化合物を吸収させ、これをFAAで検出する方法を検討した。

1) 方法

大気中のアルシン類の AgNO_3 溶液への溶け込みを検討するために、0.01、0.1、1.0%の AgNO_3 溶液2mlを入れた小型のサンプルカップを、 As^{3+} 添加培地でAs耐性糸状菌を培養しているインキュベーター内に置いた。インキュベーター内はかすかにニンニク様の臭いがした。24時間後にサンプルカップを取り出し、 AgNO_3 溶液中のAs含量をFAA (島津GFA2/AA640-12) で測定した。

2) 結果および考察

いずれの濃度の硝酸銀溶液も培養容器から洩れたインキュベーター内の空気中のAs

を吸収したが、 AgNO_3 濃度の増加に従いAsの吸収量は増加し（表4-3）、アルシン吸収量は AgNO_3 濃度によって異なることが明らかとなった。しかし、気相中に僅かにアルシン臭を感じる程度のアルシン発生でも、0.01%の AgNO_3 溶液でAsを十分検出することが可能であり、アルシンの発生を定性的に検出するには、本法の様に低濃度の AgNO_3 溶液をサンプルカップに入れて置くだけで十分な感度が得られた。また、 AgNO_3 溶液に吸収されたAs化合物を直接FAAで計測できるなど、従来法に比較して非常に簡便であると思われた。

表 4-3 インキュベータ内においた AgNO_3 溶液中のAs濃度

AgNO_3 濃度	処 理	ピーク高*
0.01%	As (75.0ppb) 添加	53 mm
0.01%	インキュベーター内放置	69 mm
0.1%	インキュベーター内放置	90 mm
1.0%	インキュベーター内放置	111 mm
1.0%	対照(インキュベーター外)	0 mm

* FAAによるピーク高

以上の結果から、半閉鎖系の培養容器内の気相中の高濃度のアルシンは AgNO_3 溶液によって十分吸収、検出できると思われたため、次の様な方法で真菌類のアルシン類発生能を判定することとした。すなわち、10mMの As^{3+} を添加したマーチンの液体培地（付表）50mlを100ml容の三角フラスコに入れ、供試糸状菌を接種する。25°Cで6日から3週間静置培養し、糸状菌が十分生育した後、0.1%の AgNO_3 溶液 2mlを入れたサンプルカップをフラスコの口から吊るし、フラスコ上部をアルミホイルで閉じる（図4-4）。再び培養を続け、フラスコ内の気相中のAs化合物を AgNO_3 溶液に吸収させた後、24時間後に AgNO_3 溶液を入れたサンプルカップをフラスコから回収し、 AgNO_3 溶液中の

As濃度をフレイムレス原子吸光光度計（島津GFA-2/AA640-12）で測定する。糸状菌を接種しないフラスコに同様に吊した AgNO_3 溶液中のAs濃度を対照とし、これより明らかにAs濃度が高い糸状菌株を、As化合物を揮散する能力をもつ株と判定する。

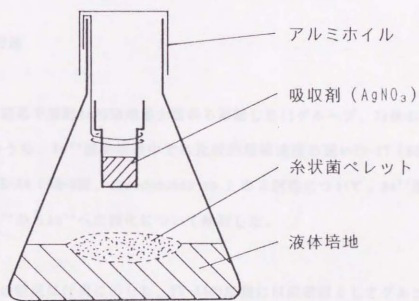


図 4-4 As化合物揮散検定用培養法

4.3 ヒ素耐性細菌による亜ヒ酸の酸化

これまで、As化合物の酸化還元、例えば、鉱山排水中に多量に含まれるAs³⁺の酸化 (Wakao ら 1988) や、海洋におけるAs³⁺のAs⁵⁺への還元 (Johnson and Pilson 1975)、湖沼の底泥でのAsの酸化還元 (Freeman 1986) には微生物の寄与が大きいことが報告され、*Alcaligenes* spp.、*Pseudomonas* spp. など、As³⁺をAs⁵⁺に酸化する能力を持つ細菌が分離されている (Turner 1954; Phillips and Taylor 1976; Osborne and Ehrlich 1976)。土壤中においても、As汚染土壌ではAs耐性微生物が優占してくる傾向にあり (第3章)、これらのAs耐性微生物が土壌中のAs化合物の代謝に関与している可能性もある。本節では第3章においてAs汚染土壌から単離したAs耐性細菌の代表的なものについてAs³⁺酸化能を培養系において検討した。

1) 材料および方法

供試細菌:

宮崎県西臼杵郡高千穂町As汚染畑地土壌から単離した11グループ、71株のAs耐性細菌 (第3章) のうち、As³⁺添加培地中でも比較的増殖速度の速いTR-17 (BG-1群、*A. faecalis*) とTR-44 (BG-2群、*Pseudomonas* sp.) の2菌株について、As³⁺添加培地中での増殖とAs³⁺からAs⁵⁺への酸化について検討した。

使用培地:

使用した培地の組成は付表に示した。TR-44の培養には炭素源としてグルコース、窒素源としてアスパラギン酸を基礎培地の無機塩類に加えて用いた。TR-17株はグルコースを資化せず、また、栄養要求性があるため、基本培地にアスパラギン酸 (0.2%) と微量の酵母エキス (0.5%) を添加した培地を用いた。As³⁺添加培地はこれらの培地にNaAsO₂を10mM添加した。

実験方法:

図4-5に実験の概要を示した。As無添加培地で前培養（28℃、40時間）した供試菌を、一定の濃度（TR-17, 4.4×10^6 /ml; TR-44, 9.2×10^6 /ml）まで希釈したものを、200ml容坂口フラスコ内のAs⁵⁺添加およびAs無添加培地に1mlづつ接種し、28℃で振とう培養した。培養中、経時的に培養液の一部を採取し、培地のpHと菌の増殖量（550nm 吸光度）および培養液中のAs⁵⁺濃度を測定した。pHによっては培地の無機塩類が沈殿するため、550nm 吸光度の測定には、採取した培養液に塩酸を添加してpH 約3.0に調整し、無機塩類を溶解させた後に、吸光度を測定した。培養液中のAs⁵⁺濃度は遠心分離器（10,000rpm）によって菌体を分離した後、HPLC-AA システム（4.1節）によって測定した。微量のAs⁵⁺の測定には、As⁵⁺が流出するフラクション中のAs濃度をフレームレス原子吸光度計で測定した。

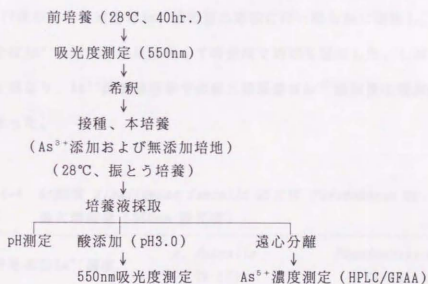


図 4-5 実験フローチャート

2) 結果

As³⁺添加濃度と菌の増殖：

As³⁺添加培地中での供試細菌の増殖を図4-6に示した。

TR-17株は培地へのAs³⁺添加量の増加につれて増殖開始が遅れ、20mMのAs³⁺添加培地では増殖開始まで50時間以上を要し、25mMのAs³⁺添加培地では増殖は認められなかった。また、対数増殖期の増殖速度はAs³⁺の濃度が高くなるにつれ僅かに遅くなる傾向にあった。

TR-44株は10mMのAs³⁺の添加では増殖開始は遅れたものの、増殖期の増殖速度ではAs無添加培地との間に明確な差は認められなかった。しかし、15mM以上のAs³⁺の添加では生育しなかった。

各菌株の最大増殖量：

各供試菌株をAs³⁺添加培地で培養した時の最大増殖量（吸光度）を表4-4に示した。TR-17株の最大増殖量はAs³⁺添加量の増加に伴い明らかに増加し、20mMのAs³⁺添加培地ではAs³⁺無添加培地に比較して吸光度で約60%増加した。しかし、TR-44株はTR-17株と異なり、As³⁺添加培地中での最大増殖量はAs³⁺添加量の増加に伴い低下する傾向にあった。

表4-4 As耐性 *Alcaligenes faecalis* および *Pseudomonas* sp. の最大増殖量（550nm 吸光度）

培地添加As ³⁺ 濃度	<i>A. faecalis</i> (TR-17)	<i>Pseudomonas</i> sp. (TR-44)
0mM	0.560	1.367
10mM	0.710	1.157
20mM	0.903	-

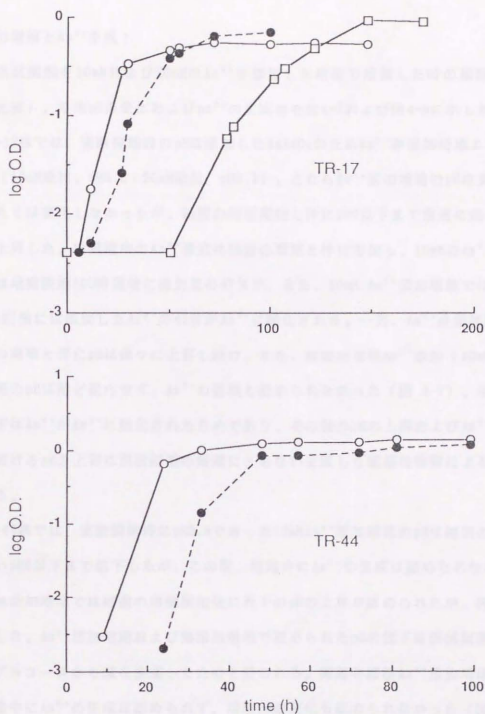


図 4 - 6 As(III)添加倍地におけるAs耐性 *A. faecalis* (TR-17株)および *Pseudomonas* sp. (TR-44株)の生育

—○— , 0mM; ---●--- , 10mM; —□— , 20mM

細菌の増殖とAs⁵⁺生成：

各供試菌株を10mMおよび20mMのAs³⁺を添加した培地で培養した時の細菌の増殖量（吸光度）、培地pHの変化およびAs⁵⁺の生成量を図4-7および図4-8に示した。

TR-17株では、実験開始時のpHは添加したNaAsO₂のためAs³⁺非添加培地よりも高かった（10mM添加、pH8.6；20mM添加、pH9.1）。これらAs³⁺添加培地のpHは実験開始後しばらくは変化しなかったが、細菌の増殖開始と共にpH7以下まで急速に低下した後、再び上昇した。培養液中のAs⁵⁺濃度は細菌の増殖と共に増加し、10mMのAs³⁺添加培地中では培養開始100時間後に添加量の47%が、また、20mM As³⁺添加培地では培養開始175時間後には添加したAs³⁺の43%がAs⁵⁺に酸化された。一方、As³⁺非添加培地では細菌の増殖と共にpHは徐々に上昇し続け、また、細菌非接種As³⁺添加（10mM）培地では培地のpHは殆ど変化せず、As⁵⁺の蓄積も認められなかった（図4-7）。培養中のpHの低下はAs³⁺がAs⁵⁺に酸化されたためであり、その後のpHの上昇およびAs³⁺無添加培地におけるpHの上昇は供試細菌の増殖にともない生成した塩基性物質によるものと思われる。

TR-44株では、実験開始時にpH8.3であった10mMAs³⁺添加培地のpHは細菌の増殖にともないpH6以下まで低下したが、この間、培地中にAs⁵⁺の生成は認められなかった。As³⁺無添加培地では細菌の増殖開始後に若干のpHの上昇が認められたが、再び次第に低下した。As³⁺添加培地および無添加培地で認められたpHの低下は供試細菌の増殖に伴いグルコースから酸を生成したためと思われる。細菌非接種As³⁺添加培地においては培地中にAs⁵⁺の生成は認められず、培地pHの変化も認められなかった（図4-8）。

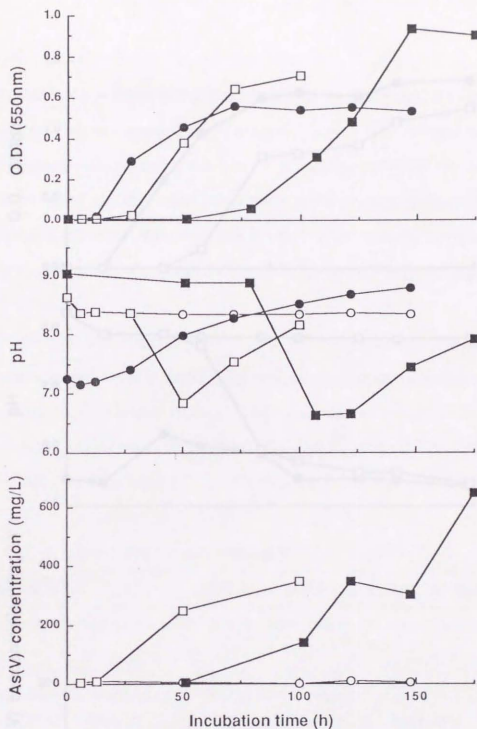


図4-7 As耐性 *A. faecalis* (TR-17) の増殖と培地pHの変化, As(V)の生成

●, As 0mM; □, As 10mM,
 ■, As 20mM; ○, As 10mM, 細菌非接種

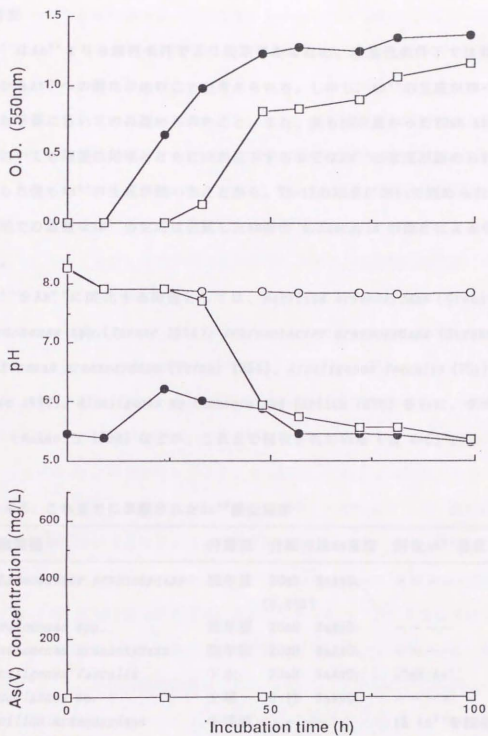


図4-8 As耐性 *Pseudomonas* sp. (TR-44) の増殖と培地pHの変化, As(V)の生成

●—, As 0mM; □—, As 10mM; ○— As 10mM, 細菌非接種

3) 考察

As³⁺はAs⁵⁺よりも酸性条件下でより安定であるため、塩基性条件下では非生物学的なAs³⁺からAs⁵⁺への酸化が進むことも考えられる。しかし、As⁵⁺の生成がTR-17株を接種した培養においてのみ認められたこと、また、最もpHが高かった20mM As³⁺添加培地においても細菌の増殖とともにpHが低下するまではAs⁵⁺の生成が認められず、pHが低下した後もAs³⁺の生成が続いたことから、TR-17の培養において認められたような短時間での急激なAs⁵⁺の生成は供試したAs耐性 *A. faecalis* の働きによるものと思われる。

As³⁺をAs⁵⁺に酸化する細菌としては、*Bacillus arsenoxydans* (Green 1918)、*Pseudomonas* spp. (Turner 1954)、*Achromobacter arsenoxydans* (Turner 1954)、*Xanthomonas arsenoxydans* (Turner 1954)、*Alcaligenes faecalis* (Phillips and Taylor 1976)、*Alcaligenes* sp. (Osborne and Ehrlich 1976) さらに、グラム陰性菌 sp. (Wakao ら 1988) などが、これまで報告されている (表 4-5)。

表 4-5 これまでに単離されたAs³⁺酸化細菌

細菌種	分離源	分離培地As濃度	耐性As ³⁺ 濃度	Ref.*
<i>Achromobacter arsenoxydans</i>	洗羊液	20mM NaAsO ₂ (0.26%)	----	A
<i>Pseudomonas</i> spp.	洗羊液	20mM NaAsO ₂	----	A
<i>Xanthomonas arsenoxydans</i>	洗羊液	20mM NaAsO ₂	----	A
<i>Alcaligenes faecalis</i>	下水	20mM NaAsO ₂	10mM As ³⁺	B
<i>Alcaligenes</i> sp.	土壌	0.1% NaAsO ₂	----	C
<i>Bacillus arsenoxydans</i>	牛洗液	----	1% As ³⁺ を酸化	D
グラム陰性菌 sp.	鉱山排水			E
<i>Alcaligenes faecalis</i>	土壌	10mM NaAsO ₂	20mM As ³⁺	F

*A, Turner (1954); B, Phillips and Taylor (1976); C, Osborne and Ehrlich (1976); D, Green (1918); E, Wakao ら (1988); F, 本研究

これらのAs³⁺酸化細菌の多くは洗羊液から分離され (Turner 1954, Green 1918)、下水 (Phillips and Taylor 1976)、高濃度のAsを含んだ鉱山排水 (Wakao ら 1988) あるいは、動物の糞中にも見出されている。一方、土壌中にはAs³⁺耐性細菌やAs³⁺酸化細菌は少ないと言われ、(Green and Kestell 1918/Turner 1954から引用; Turner 1954; Phillips and Taylor 1976)、土壌からAs³⁺酸化細菌を分離した例も比較的少なかった (Osborne and Ehrlich 1976)。しかし、本研究においては土呂久のAs汚染土壌から、特にAsを添加して集積培養することなしにAs³⁺酸化細菌を分離することができた。このことは、自然条件下のAs汚染土壌中にも相当数のAs³⁺酸化細菌が集積していることを示唆する。

これまでに分離されたAs³⁺酸化細菌のうち、*B. arsenoxydans* (Green 1918)は現在では失われ、Bergey's manualにも記載されていないが、*A. faecalis* の ecotype の一つではないかと考えられている (Turner 1954; Phillips and Taylor 1976)。また、*Achromobacter arsenoxydans* (Turner 1954) は Bergey's manual (Sneath ら 1986) では *A. faecalis* に再分類されている。この様に、これまでAs³⁺酸化細菌として *A. faecalis*、(あるいは *Pseudomonas* 属の菌) が多く分離されている。本研究において土呂久As汚染土壌から単離されたAs³⁺酸化細菌 *A. faecalis* TR-17 株は、これまで単離されたAs³⁺酸化 *A. faecalis* および *A. faecalis* の ecotype と思われる細菌と比較して (表 4-6) 生理的性質は非常に類似していた。また、これまでに単離されたAs³⁺酸化 *A. faecalis* をAs³⁺非添加培地で前培養した時には、As³⁺添加培地に移植した数時間後にAs³⁺酸化能が細胞内に誘導された (Osborneら 1976; Phillips and Taylor 1976) が、本研究において土呂久As汚染土壌から単離された TR-17 株もAs³⁺添加濃度が高くなるにつれ、増殖開始が遅れた (図 4-6) ことは、これまでに報告されたAs³⁺酸化 *A. faecalis* と同じく、As³⁺酸化系がAs³⁺添加培地中で培養することにより誘導されるものであることを示唆している。

A. faecalis の As^{3+} 酸化系についてはこれまで、以下の様なことが明らかにされてきた。すなわち、各種の呼吸系阻害剤（塩化水銀、パラクロロベンゾエイト水銀、ジニトロフェノール、KCN、 NaN_3 、NaF、アタブリン、ジコマロール）の As^{3+} 酸化に対する影響から、 As^{3+} 酸化に伴いフラビン結合の酸化還元酵素チトクローム c、チトクローム酸化酵素、酸素へと電子が伝達することが示唆された (Osborneら 1976)。また、 As^{3+} 酸化能が誘導され、飢餓状態にある *A. faecalis* は、 As^{3+} 添加液中の方が As^{3+} 非添加液中よりも生残率が高かった (Welch; M.S.thesis/H.L.Ehrlich 1978より引用)。これらの結果から、*A. faecalis* As^{3+} 酸化株は As^{3+} を酸化することによって増殖および維持のためのエネルギーを獲得していると考えられた。また、理論的にも As^{3+} の As^{5+} への酸化により嫌氣的発酵と同じぐらいのエネルギーが得られることが推定されている (Turner 1954)。一方、Phillips and Taylor (1976) は 0.02M As^{3+} を添加した培地で As^{3+} 酸化菌を培養したが増殖速度および細胞収量に増加は認められなかったが、彼らは、これは培養条件によっては As^{3+} 酸化能が誘導されるのに時間を要し、定常期に入ってから As^{3+} 酸化能が高まるためと考えた。一方、本研究において土呂久 *As* 汚染土壌より単離された TR-17 株の As^{3+} 添加培地における増殖を As^{3+} 非添加培地におけるそれと比較すると、 As^{3+} 添加による比増殖速度の増加は認められなかったが、最大増殖時の菌収量は As^{3+} 添加量の増加に伴い増加した。また、 As^{3+} 酸化能を持たない As^{3+} 耐性 *Pseudomonas* TR-44 株では添加 As^{3+} 濃度の増加と共に菌収量が減少する傾向にあった。これらのことは、TR-17 株がこれまでに報告された As^{3+} 耐性 *Alcaligenes* sp. と同じく、 As^{3+} を酸化することによりエネルギーを獲得し、増殖に活用したことを示唆する。

表 4-6 これまでに単離されたAs³⁺酸化 *A. faecalis* の生理的性質

Reference*	A	B	C	D	E
周べん毛	+	+	+	+	+
蛍光性色素	-	-		-	-
非水溶性黄褐色色素	-	-		-	-
偏性好気性	+		+	+	+
塘から酸を生成	-		-	-	-
ゼラチン液化	-	-	-	-	-
NO ₃ ⁻ からN ₂	-			+	-
NO ₃ ⁻ からNH ₄ ⁺	+			-	
NO ₃ ⁻ からNO ₂ ⁻			+		+
デンプン資化性	-				-
酪酸資化性	+				
生育可能温度 (°C)		25-42	25-37		
グラム染色			-		-
細胞形態			rods		rods
孢子			-		-
リトマスミルクをアルカリ			+		
カタラーゼ			+		+
H ₂ S生成			-		-
インドール生成			-		

*A, Turner 1954; B, Phillips and Taylor 1976; C, Osborne and Ehrlich 1976; D, Green 1918; E, 本研究

このように、本研究において土呂久As汚染土壌から分離されたAs³⁺耐性*A. faecalis*はこれまでに報告されているAs³⁺酸化*A. faecalis*と非常に類似した性質を有していた。第3章において既に述べたように、*A. faecalis*の全ての株がこの様なAs耐性能を持つものではない。しかし、異なった地点、環境から類似のAs³⁺酸化能を持つ細菌株が多く単離されることから、このようなAs³⁺酸化能が*A. faecalis*に特徴的に認められる性質であるといえよう。

4.4 ヒ素耐性糸状菌によるヒ素化合物の揮散

*Scopulariopsis brevicaulis*など、いわゆる「ヒ素カビ」と呼ばれる真菌類が高濃度のAsを含む培地に生育し、ガス状のAs化合物を生成することが1890年代に既に知られていた。その後、*Aspergillus* spp.、*Fusarium* sp.、*Paecilomyces* sp.、*Candida* sp.、*Gliocladium* sp.、*Penicillium* spp.など、多くの真菌類がこの様な揮発性のAs化合物を生成することが報告され(Thom and Raper 1932; Cox and Alexander 1973; Bird et al. 1948)、今では、*Scopulariopsis*属の菌類は全てアルシン類を揮散する能力があることが明かとなっている(宇田川ら 1978)。一方、これらの真菌類によって揮散されるAs化合物がトリメチルアルシン(TMA)などのアルシン類であることが明らかにされ(Challenger 1933; Bird et al. 1948)、アルシン類を生成する真菌類の生理代謝系については比較的良く研究されているのに対し、アルシン類生成物の自然界での生態についての研究は少なく、Thom and Raper (1932)が実験室内でAsを添加した土壌から単離された糸状菌についてアルシン生成能を調べているのみで、自然条件下でAsに汚染された土壌中の「ヒ素カビ」の生態についてはこれまで殆ど調査されていない。一方、第2章において述べたように、As汚染土壌においては高濃度のAs³⁺に耐性を持つ菌類が集積する傾向にあり、これらのAs耐性菌類は土壌中でのAsの形態変化に関わっている可能性がある。本節では、3.1節において自然条件下で継続的に汚染されたAs汚染土壌から単離されたAs耐性糸状菌のガス状As化合物の生成能を調べた。

1) 材料および方法

供試糸状菌：

宮崎県西臼杵郡高千穂町のAs汚染土壌から単離された10mMAs³⁺耐性糸状菌(3.1節)50グループ、計113株を供試した。

アルシン揮散能検定方法：

4.2節で述べた方法により、 As^{3+} 添加培地からのガス状As化合物揮散能を検定した。

2) 結果

アルシン非生成菌培養および菌を接種していないフラスコ中に吊るした吸収剤 (0.1% $AgNO_3$ 溶液 2ml) 中のAs濃度は24時間後にも0.03mg/L 以下であったのに対し、アルシン生成菌と判断された菌の培養中の $AgNO_3$ 溶液のAs濃度は数株が0.06mg/L であった他は、全て0.3mg/L 以上のAsを含み、アルシン生成菌と非生成菌は明確に区別された。

供試した113株 (50グループ) のうち、54%の61株 (26グループ) が As^{3+} 添加培地からAs化合物を揮散したが、他の52株ではAs化合物の揮散が認められなかった。各菌株ごとのガス状ヒ素化合物揮散株数を表4-7に示した。FG-2 (*A. fumigatus*) に属する10株およびFG-9に属する7株はいずれも As^{3+} 添加培地からAs化合物を揮散した。しかし、FG-1 (*Talaromyces* sp.) に属する菌の殆どの株やFG-3、4 (*Chaetomium* sp.) に属する株はいずれも As^{3+} 添加培地からのAs化合物の揮散は認められなかった。

3) 考察

本研究において分離された50グループ、113株のAs耐性糸状菌のうち、半数の26グループ、61株が As^{3+} 添加培地から揮発性As化合物を生成し、土壤中のAs耐性糸状菌のうちの広い群でアルシン発生能が認められた。なかでも *A. fumigatus* (FG-2) の10株全てと他の *Aspergillus* 属の菌 (FG-36、FG-39) はいずれも As^{3+} からAs化合物を、揮散することができた。*Aspergillus* 属の菌ではこれまでも、*A. fischeri*、*A. sydowi*、*A. fumigatus*、*A. glaucus*、*A. ochraceus*、*A. versicolor* など As^{3+} からアルシンを揮散するものが多く報告されている (Thom and Raper 1932; Cox and Alexander 1973;

表 4-7 各菌群におけるAs化合物揮散菌の比率（揮散能を持つ株数／総株数）

	汚染土壤		非汚染土壤		計	
	A	B	C	D		
FG-1	0/2	1/7		0/7	1/16	<i>Talaromyces</i> sp.
2	10/10				10/10	<i>A. fumigatus</i>
3		0/1		0/4	0/5	<i>Chaetomium</i> sp.1
4	0/1				0/1	<i>Chaetomium</i> sp.2
5	1/1				1/1	<i>Scopulariopsis</i> sp.
6	0/1				0/1	<i>Penicillium</i> sp.1
7			2/2		2/2	<i>Acremonium</i> sp. ?
8	6/7	10/13	0/1		16/21	
9	2/2	1/1	3/3	1/1	7/7	
10		2/2			2/2	
11		2/2			2/2	
12	3/3				3/3	
13	1/2				1/2	
14		0/1			0/1	
15		1/2		0/1	1/3	
16		0/1			0/1	
17				0/1	0/1	
18				1/1	1/1	
19		0/1			0/1	
20	1/1	0/1			1/2	
21			1/1		1/1	
22			0/1		0/1	
23			1/1		1/1	
24				0/1	0/1	<i>Penicillium</i> sp.2
25				0/1	0/1	<i>Penicillium</i> sp.3
26				1/1	1/1	
27				1/1	1/1	
28	0/1				0/1	
29	0/1				0/1	
30	0/1				0/1	

表 4-7 (続き)

	汚染土壌		非汚染土壌		計	
	A	B	C	D		
31	1/1				1/1	
32	0/1				0/1	
33		1/1			1/1	
34				0/1	0/1	
35			0/1		0/1	<i>Penicillium</i> sp.4
36			1/1		1/1	<i>Aspergillus</i> sp.1
37	0/1				0/1	
38			0/1		0/1	
39			1/1		1/1	<i>Aspergillus</i> sp.2
40			0/1		0/1	
41			0/1		0/1	
42	0/1				0/1	
43	1/1				1/1	
44	0/1				0/1	
45	0/1				0/1	
46		0/1			0/1	
47		1/1			1/1	
48			0/1		0/1	
49	1/1				1/1	
50		1/1			1/1	
Total	27/41	21/36	9/16	4/20	61/113	

Bird et al. 1948)。一方、土呂久土壌からは *Aspergillus* 属と並んで *Talaromyces* 属の菌が多く分離された。*Talaromyces*属の分生子世代は *Penicillium*属であり(宇田川ら 1978)、両者は *Aspergillus* 属と並んで土壌中の主要な糸状菌類であるが、本研究において土呂久土壌から分離した *Penicillium*属および *Talaromyces*属の菌ではFG-1の1株の培養の吸収剤で僅かにAsを検出したのみで、殆どはAs³⁺からアルシン

を生成しなかった。また、これまで多くの菌類がアルシン類を生成することが報告されているなかで、*Talaromyces* 属あるいは *Penicillium* 属では *Penicillium* sp.、*P. notatum*、*P. chrysogenum*、などがモノメチルアルソン酸 (MMA)、ジメチルアルシン酸 (DMA) など有機As化合物から揮発性のAs化合物を生成することが報告されている (Bird et al. 1948; Cox and Alexander 1973) もの、 As^{3+} からのアルシン類の生成は *P. duclauxi* においてその可能性が指摘されている (Thom and Raper 1932) のみで、*Talaromyces* 属および *Penicillium* 属の菌で As^{3+} からアルシン類を生成するという明確な報告はない。このように、*Aspergillus* 属の菌で As^{3+} からアルシンを生成する菌が多く見られ、*Talaromyces* 属や *Penicillium* 属では As^{3+} からアルシンを生成する菌が見られなかったことは、従来の報告と合せて、アルシン発生能が種あるいは属によって偏っていることを示唆する。しかし、 As^{3+} からはアルシン類を生成しない *Penicillium* 属の菌も *Penicillium* sp.、*P. notatum*、*P. chrysogenum*、などが MMA、DMA から TMA を生成する事が報告されており (Bird et al. 1948; Cox and Alexander 1973)、土壌条件によっては *Talaromyces* などでもアルシン生成に寄与している可能性はある。これらの菌のAs化合物揮散能が土壌中で発揮される条件については今後明らかにされねばならない。

第5章 ヒ素耐性亜硫酸酸化細菌による土壤中の亜硫酸の酸化

前章までで、As汚染土壌中には多く種類のAs耐性微生物が存在し、これらの中にはAs化合物代謝能を持つ微生物が含まれることを示した。これらの微生物の代謝能を人為的に利用することにより、土壌をはじめとする環境を汚染するAs化合物の不活性化や除去を行なうことを考えた時、富栄養な培地中で活発な増殖とAs化合物代謝能を示したこれらの微生物が土壌の様な比較的貧栄養と考えられる環境中でも増殖し、その活性を維持するであろうかということが問題となる。本章では、土壌から分離されたAs³⁺酸化能を持つAs耐性細菌を人為的に土壌に添加した時の土壌中での生態とAs³⁺の酸化について調べた。すなわち、土呂久汚染土壌から単離されたAs³⁺酸化*A. faecalis* (TR-17株)の土壌からの検出法(5.1節)、土壌中での生残性(5.2節)について検討した後、細菌を添加した土壌中でのAs³⁺の酸化を土壌環流装置を用いて調べた(5.3節)。

5.1. 希釈平板法によるヒ素耐性細菌の計数

目的とするAs耐性細菌を希釈平板法によって定量的に検出するためには、As³⁺を添加した選択培地を用いることが適当である。しかし、培地の選択性を増すために添加As³⁺濃度を高めると、目的とする細菌のコロニー形成率も低下することが考えられる。そこで、添加As³⁺濃度および培養期間とコロニー形成数の関係を調べ、選択性が高くコロニー形成数も高い培地と培養条件を検討した。

1) 材料および方法

供試菌株；

As耐性 *Alcaligenes faecalis* TR-17株 (第4章 4.3節)

使用培地；

ストリエントブロス寒天培地（NB培地）、これにクリスタルヴァイオレット（CV）を添加した培地（CN培地）および、CN培地にさらに As^{3+} を5、10、15、20mM添加した培地を用いた。 As^{3+} の添加に際しては、溶解した寒天培地にミリポアフィルターで除菌した1M $NaAsO_2$ 溶液を使用直前に添加した。

実験法；

供試細菌の培養液 1ml を50mlのペプトン水に接種し、1 昼夜前培養した。前培養液を希釈（550nm 吸光度 0.291）した後、希釈液中の生菌数を各培地を用いた希釈平板法で測定し、28°Cで培養して平板上に形成されるコロニーを毎日計数した。

2) 結果および考察

培養によって各平板上に形成されるコロニー数の変化を図 5-1に示した。

NB培地およびCN培地では培養開始1日目に既にコロニーが認められ、3日目以降は新たなコロニーの形成は認められなかった。しかし、5mM、10mMおよび15mMの As^{3+} を添加した培地では、それぞれ培養開始2、3、3日目以降に初めてコロニーの形成が認められ、それぞれ、4、5、9日目まで新たなコロニーの形成が続いた。この様に、培地への As^{3+} 添加濃度の増加にともない平板上でのコロニー形成に要する時間は長くなった。

NB培地とCN培地および10mMの As^{3+} 添加CN培地の間で形成コロニー数に有意な差は見られなかったが、15mM以上の As^{3+} 添加CN培地では形成コロニー数は大きく減少し、20mM添加では10日間培養してもコロニーは形成されなかった。

この様に、 As^{3+} の添加は培地の選択性を増すと共に、目的細菌のコロニー形成に時間を要し、さらに添加 As^{3+} 濃度を高めるとコロニー形成数が減少した。このことから、目的細菌を選択的に計数するために培地の As^{3+} 濃度を10mMまで高めると、培養期間を

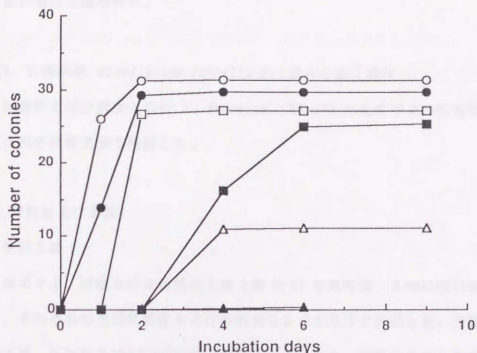


図5-1 各種培地の平板上に形成されるコロニー数と培養期間

- | | | | |
|---|-------------------|---|-------------------|
| ○ | NB培地 | ● | CN培地 |
| □ | CN培地+5mM As(III) | ■ | CN培地+10mM As(III) |
| △ | CN培地+15mM As(III) | ▲ | CN培地+20mM As(III) |

長くする必要があることが明かとなった。しかし、As耐性細菌を分離した経験（第3章）では、土壌中には *A. faecalis* 以外のAs耐性細菌も存在し、これらの多くは増殖速度は比較的遅かった。従って、長期間培養を行なうことは、これらのコロニー形成の遅い他のAs耐性細菌をも計数する可能性が大きくなる。一方、これらのAs耐性細菌の多くはCV耐性を持たなかった。このことから、培地にCVを添加することにより、これらの比較的増殖の遅いCV感受性の細菌のコロニー形成は抑えられると考えられる。さらに、目的とする *A. faecalis* はCV添加培地中では特徴のある紫色のコロニーを形成し、比較的生育の速い *Pseudomonas* などのCV耐性細菌のコロニーとも区別できた。

そのため、計数にはCVと 10mM As^{3+} を添加した培地を用いて28°Cで5日以上培養することが適当と思われた。

5.2. ヒ素耐性 *Alcaligenes faecalis* の土壤中での生残性

畑条件土壤に添加された *A. faecalis* (TR-17) の土壤中での生残性についてフラスコ内の静置土壤で検討した。

1) 材料および方法

供試土壤；

黒ボク土、沖積土の2種類の土壤(表 5-1)を風乾後、2mmの篩いを通して供試した。それぞれの土壤は滅菌および非滅菌の2つの条件で供試した。非滅菌土壤系の試験では、風乾細土10gを300ml容三角フラスコに取り、蒸留水を加えて含水率を最大含水量(黒ボク土壤 0.762g/g 乾土、沖積土 0.582g/g 乾土)の50%に調整し、25°Cで5ないし7日間培養して微生物相等を安定させた後に実験を行なった。非滅菌土壤中のAs耐性細菌数は 10^2 CFU/g 乾土 以下であった。滅菌土壤系の試験では、同じく風乾細土10gを300ml容三角フラスコに採取し、120°Cで1時間、3日間繰り返し蒸気滅菌した後、非滅菌土壤系と同量の滅菌水を実験直前に加えた。

供試細菌および前培養；

As耐性 *A. faecalis* (TR-17株)を供試した。1%ペプトン水50mlで1晩培養した供試細菌前培養液 1.25mlを滅菌水90mlで希釈し、この 0.5mlをフラスコ中の土壤に接種し、振り混ぜた。この結果、黒ボク土壤では 1.48×10^4 /g 乾土、沖積土では 2.14×10^4 /g 乾土 の細菌が添加された。

土壤培養条件、期間；

水分が蒸発しないように容器をアルミホイルで覆い、25°Cで1、3、7、14、28日

間静置培養した後、土壤中の微生物数を測定した。各培養は2連で行なった。

微生物数の測定；

土壤中の細菌数、糸状菌数、放線菌数、As耐性細菌数を希釈平板法で測定した。細菌、放線菌数はアルプミン寒天培地を用いて、28°C、7日間、糸状菌数はローズベンガル寒天培地を用いて25°C、4日間、As耐性細菌数は10mM As³⁺添加CN培地（4.1節）を用いて5日間培養し計数した。

表 5-1 供試土壌の性質

	土性	pH(H ₂ O)	pH(KCl)	T-C*	T-N*	CEC**	最大容水量***
黒ボク土	LiC	6.6	5.9	54.5	3.7	45.4	0.762
沖積土	LiC	7.4	6.2	6.0	0.59	24.4	0.582

* mg/g 乾土； ** me/100g 乾土； *** g/g 乾土

2) 結果

滅菌土壌中では、添加されたTR-17株は1日目に急激に増殖し、7日目には菌数はほぼ飽和（黒ボク土壌、 $4 \sim 8 \times 10^7$ /g 乾土；沖積土壌、 $2.5 \sim 4 \times 10^7$ /g 乾土）に達した後、菌数は28日目まで維持された。非滅菌土壌中では、1日目には増加（黒ボク土壌、 6×10^4 /g 乾土；沖積土壌、 $7 \sim 8.5 \times 10^4$ /g 乾土）したが、その後、菌数は徐々に減少し、28日目には土壌中の全生菌数（細菌）の約1/1000の約 10^4 /g 乾土となった。滅菌土壌、非滅菌土壌とも、黒ボク土壌の方が沖積土壌よりも生残数は高かった。（図 5-2）

この様に、土壌に添加された *A. faecalis* (TR-17) は、滅菌土壌中では急激に増殖しその菌数が維持されるものの、非滅菌土壌中で他の微生物と共存した系では、接種後一時的には増殖するもの、細菌相の中で優占する事はなく次第に減少した後、菌数は安定した。

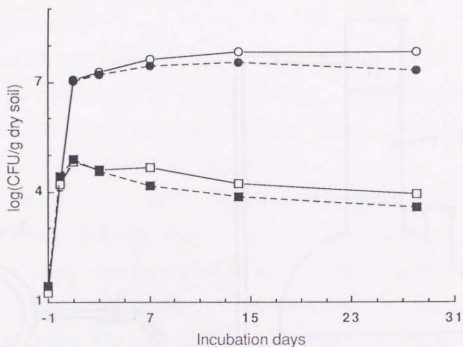


図5-2 滅菌土壌および非滅菌土壌中でのヒ素耐性細菌の生残

—○— 滅菌黒ボク土 —□— 非滅菌黒ボク土
 - - ● - - 滅菌沖積土 - - ■ - - 非滅菌沖積土

5.3 土壌環流装置内でのヒ素耐性細菌の増殖と亜ヒ酸の酸化

土壌中での As^{3+} の As^5+ への酸化における As^{3+} 酸化細菌の効果を評価するために、淡色黒ボク土壌を充填した土壌環流装置の環流液に As^{3+} を添加した後、環流液内の As^{3+} 濃度を経時的に測定し、土壌に As^{3+} 酸化細菌を接種した系と非接種系を比較した。

1) 材料、装置および方法

装置：

高木ら（私信）が用いた土壌環流装置（図 5-3）を用いた。

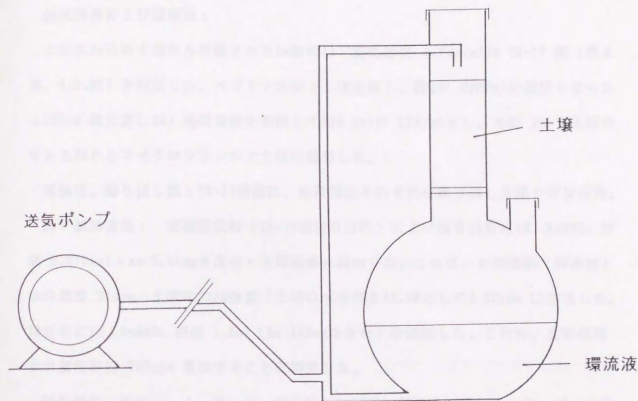


図 5-3 土壌環流装置

供試土壌：

茨城県つくば市から採取した淡色黒ぼく土壌 (pH(H₂O), 7.6; pH(KCl), 6.4; CEC, 26.3 me/100g 乾土; T-C, 16.8 mg/g 乾土; T-N, 1.5 mg/g 乾土; 土性 HC) を供試した。土壌は風乾 (含水率約25%) した後、篩別し、2~5mm径の団粒33g (乾土として24.8g) を環流装置のカラム部 (内径35mm、長さ41-42mm) に充填した。下部のフラスコ部に蒸留水 (160ml) を入れ、ポンプから送気 (空気 12 ml/min) して液を環流

(約 0.7 ml/min) しながら、25°Cで1週間培養し、土壌を馴化、安定させた。この時、カラム土壌の含水比は約0.931(乾土24.8g、水分23.1g)であった。

供試細菌および接種法：

土呂久As汚染土壌から単離されたAs耐性As³⁺酸化細菌 *A. faecalis* TR-17 株(第4章、4.3.節)を供試した。ペプトン水中で1夜培養し、約10⁹ CFU/mlの濃度となった(550nm 吸光度1.58)前培養液を希釈して約6.5x10⁶ CFU/mlとし、その1mlを土壌カラム上部からマイクロシリンジで土壌に接種した。

試験区、繰り返し数：TR-17接種区、無接種区それぞれを繰り返し2連で行なった。

As³⁺添加方法： 実験開始時(TR-17接種0日目)および同8日目に1M、NaAsO₂溶液0.0701ml(As 5.26mgを含む)を環流液に添加した。これは、土壌溶液(環流液)中の濃度 31ppm、土壌中のAs含量(土壌の水分率を48.2%として)29ppmに相当した。14日目に1M、NaAsO₂溶液 1.5ml(As 113mgを含む)を添加した。これは、土壌溶液中の濃度が約 750ppm 増加することに相当した。

試料採取、測定： 1、2、3、8日目のAs³⁺添加前および後、9、10、13、14日目のAs³⁺添加前および後、15、16、17日目に環流液を採取し、As⁵⁺およびAs³⁺濃度を測定した。この間の試料採取に伴う環流液の欠損を補うために、8日目に10mlの蒸留水を追加した。19日目の実験終了時に環流液のAs⁵⁺およびAs³⁺濃度、土壌の水分含量および微生物数を測定した。

環流液中のAs濃度の測定法：

第4章 4.1節に述べたHPLC-AA/FAA法でAs⁵⁺およびAs³⁺の濃度を測定した。但し、FAAで測定の際には硝酸マグネシウム 0.25% 溶液で希釈して測定した。

微生物数測定法：

ブレンダー(池本理化工業、ハイパワーホモジナイザー)を用いて土壌を滅菌水中で分散(15,000rpm、2min.; 金沢ら 1977)させた後、As耐性菌(10mM As³⁺ 添加CN

培地)、細菌、放線菌(アルブミン寒天培地)および糸状菌(ローズベンガル寒天培地)数を希釈平板法で測定した。

2) 結果

1 回目の As 添加後の環流液中の As^{5+} および As^{3+} 濃度の変化を図 5-4 に示した。
 $NaAsO_2$ 溶液添加によって約 31ppm となった土壌水(環流液)中の As^{3+} 濃度は、TR-17 接種区では、1 日後には 6.6ppm に減り、2 日後には 2.7ppm に、3 日および 8 日後にはそれぞれ 1.6ppm および 0.9ppm に減少した。これに対し、細菌非接種区では、TR-17 接種区と同様に急激に As^{3+} 濃度が減少したが、1、2、3、8 日後の濃度はそれぞれ 10.9、3.7、2.5、1.2ppm であり、細菌非接種区の As^{3+} 濃度の減少は TR-17 接種区よりも緩やかであった(図 5-4 上)。一方、環流液中の As^{5+} 濃度は TR-17 接種区では 1、2、3 および 8 日後にはそれぞれ 0.53、0.51、0.28、0.28ppm であり、1 日および 2 日目に As^{5+} 濃度の増加が認められた後に再び減少した。しかし、細菌非接種区では As^{3+} 添加後 1 日および 2 日目に As^{5+} 濃度の若干の増加が認められたものの、増加した濃度は TR-17 接種区に比較すると僅かであった(図 5-4 下)。

土壌水中の As^{5+} および As^{3+} は一部が土壌固相に吸着され、特に、実験に供試した様な火山灰土壌では、 As^{3+} よりも As^{5+} の吸着性が強い(山根 1989)。本実験においても環流液中の As 濃度は急激に減少し、このため、環流液中の As^{3+} および As^{5+} の濃度のみから土壌中での As^{3+} から As^{5+} への変化量を正確に推計することはできない。特に As^{3+} の酸化により生成したと思われる As^{5+} の大部分は土壌に吸着され、環流液中の As はその殆どが As^{3+} の形態であり As^{5+} は僅かであった。しかし、 As^{3+} 濃度の減少は TR-17 接種区の方が非接種区より速く、また、 As^{3+} 添加後 1、2 日目に TR-17 接種区で非接種区よりも高濃度の As^{5+} の蓄積が認められた。これらのことは、TR-17 接種区では細菌非接種区よりも As^{3+} から As^{5+} への酸化がより速く進んだことを示している。

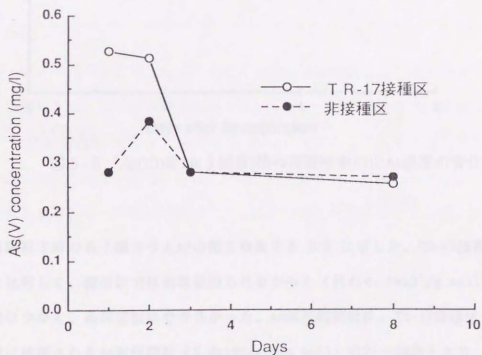
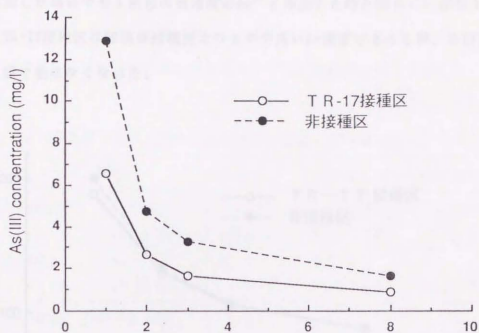


図5-4 As(III)添加後(1回目)の還流液中のAs(III)およびAs(V)濃度の変化

3回目のAs添加後の環流液中の全As濃度の変化を図5-5に示した。高濃度のAs³⁺を添加した場合でも1回目の低濃度のAs³⁺を添加した時と同じく、添加1、2日後まではTR-17接種区は細菌非接種区よりもやや高いAs濃度であったが、3日目からは両区の間で差はなくなった。

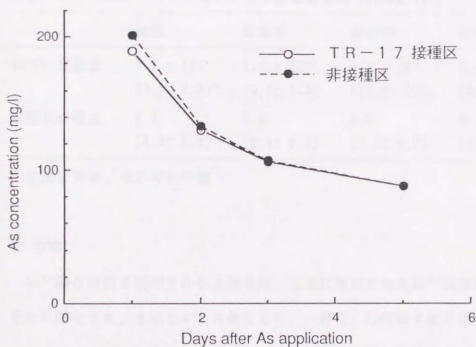


図5-5 As(III)添加(3回目)後の還流液中の全As濃度の変化

実験終了時の各土壌カラム中の微生物数を表5-2に示した。TR-17接種区は非接種区と比較して、細菌数では差は認められなかった(何れも 3×10^7 /g soil)が、放線菌数は少なく、糸状菌数はやや多かった。As耐性細菌数は、TR-17接種区では実験開始時に接種されたAs耐性菌数 (2.6×10^5 /g dry soil)の25~32倍となり、これは、全細菌数(生菌数)の23%に達したが、細菌非接種区においても全細菌数の9%程のAs耐性細菌が認められた。この様に、環流土壌中の全細菌数が静置土壌におけるAs耐性

菌の生残性試験（5.2節、非滅菌土壌系）におけるそれと同程度であったにも拘らず、土壌中のAs³⁺耐性細菌数が大きく異なったのは、環流試験ではAs³⁺溶液を繰り返し添加されたことによりAs³⁺耐性細菌が優占してきたためであり、また、環流土壌ではTR-17非接種区においても供試土壌に由来するAs³⁺耐性細菌が蓄積してきた。

表 5-2 実験終了時の土壌カラム中の微生物数 (CFU/g soil)

	細菌	放線菌	糸状菌	As ³⁺ 耐性菌
TR-17 接種区	3.2 x 10 ⁷ (3.5; 2.9)*	1.6 x 10 ⁶ (1.8; 1.3)	8.1 x 10 ³ (10.6; 5.5)	7.4 x 10 ⁶ (8.3; 6.5)
細菌非接種区	3.4 (3.4; 3.3)	2.3 (2.1; 2.4)	4.0 (2.2; 5.7)	3.1 (3.1; 3.2)

* 2 連の実験、それぞれの値

3) 考察

As³⁺酸化細菌を接種された土壌では、土壌に添加されたAs³⁺は非接種土壌よりも速やかに酸化され、土壌水中から消失した。一般に、As汚染土壌での植物への障害は、As⁵⁺よりも溶解度が高く、毒性も強いAs³⁺によると考えられている (Reed and Sturgis 1963) ので、土壌中のAs³⁺がAs⁵⁺に酸化され、土壌粒子に吸着されることは、As汚染による植物への障害を回避するうえで有効と思われる。しかし、As³⁺酸化細菌非接種土壌においてもAs³⁺濃度は減少した。この事は、As³⁺酸化細菌を特に添加しなくても酸化的条件では非生物学的あるいは土壌由来のAs³⁺酸化細菌によってAs³⁺は次第にAs⁵⁺に酸化されることを示している。As³⁺酸化細菌を人為的に土壌に添加することの効果はAs³⁺添加1ないし2日後までに速やかにAs³⁺濃度が減少することにある。このことから考えて、As³⁺酸化細菌はAs汚染土壌の除染あるいは障害の抑制に利用す

るよりも、汚水処理などに利用することの方が、より有効かもしれない。すなわち、 As^{3+} 酸化細菌を接種することにより、カラムに流れる As^{3+} が短時間の間に酸化、土壤に吸着されることは、この様なカラムを汚水処理などに利用しようとするうえで好都合である。この場合、土壤に添加された As^{3+} 酸化細菌が土壤中でその菌数と活性を維持するかどうかの問題となる。 As を添加しない静置土壤中では添加された As^{3+} 酸化細菌も時間の経過と共に徐々にその菌数が減少した(5.2.節)のに対し、高濃度の As^{3+} を繰り返し環流した時には、土壤中で As^{3+} 耐性細菌が増殖し、また As 耐性細菌を添加しなかった土壤においても As 耐性細菌が集積してきた。この事は、高濃度の As^{3+} 負荷をかける事により、土壤中の As 耐性細菌の菌数と活性を維持させることが可能であることを示す。

第6章 総合考察

6.1 ヒ素による土壤汚染が土壤生態系に与える影響とAs耐性微生物の優占

これまで、高濃度の As_2O_3 の添加によって土壤微生物相に影響が現れることが、土壤への人為的なAs添加実験により指摘されている (Maliszewska ら 1985; Yang and Ge 1984) が、実際のAs汚染地において長期間継続的に土壤が汚染された時に土壤微生物相がどの様な影響を受けるのかについての研究は少ない。このような調査の例としては、Nordgrenら (1986) が精練所周辺の100~300ppmのAsで汚染された森林土壤で細菌数が減少することを報告している。しかし、これは、Asの他にPb、Zn、Cu等の重金属による複合汚染地域における調査であり、その土壤微生物に対する影響も、Asの影響というよりはむしろそれぞれ数100ppm含まれていたこれら重金属類の影響と思われる。それに対し、本研究において調査を行なった土呂久As汚染地では、CdおよびZn含量において汚染土壤は非汚染土壤よりもやや高かったが、その差は小さく (表2-1)、Asが主要な土壤汚染物質であったと考えられ、自然条件下での継続的なAs汚染がAs耐性糸状菌を優占させ、また、As汚染の微生物相への影響は畑土壤よりも水田土壤においてより顕著に現れ、特徴的な微生物相が形成されることが示された。この様に、実際のAs汚染土壤においてAs耐性微生物が優占してくる傾向にあることは、この様な環境下でAsが微生物に対して毒性を発揮する濃度と形態で土壤中に存在している事を示している。一方、優占してきたAs耐性菌のなかには、これらの有毒なAsを不活性化または除去することによりその耐性を発現しているものが含まれている可能性がある。実際、この様なAs汚染土壤に優占し、集積してくるAs耐性微生物のなかにはAs化合物代謝能を持つものが多く見出された。

6.2 ヒ素耐性微生物によるヒ素代謝

重金属耐性細菌に関するこれまでの研究で、その重金属耐性能の一部がプラスミドに由来し、このプラスミド上にはAs耐性遺伝子も存在することが明らかとなっている (Novic and Roth 1968)。このプラスミド上の遺伝子のAs耐性能は、細胞膜において AsO_4^{3-} を能動的に細胞外に排除する (アニオンポンプ) ものである。本研究においては多くのAs耐性細菌が見出されたが、そのなかでも比較的分離頻度が高かった *A. faecalis* には As^{3+} 酸化能が認められた。これは、上述のプラスミド由来のAs耐性菌において知られている様なアニオンポンプによる As^{5+} の排斥機構とは別のAs耐性機構である。これまでも高濃度のAsに耐性を持ち As^{3+} 酸化能をもつ *A. faecalis* が多く分離されていることから、(全ての *A. faecalis* がこの様な性質を持つのではないにせよ) この様な As^{3+} 酸化能は、*A. faecalis* に特徴的に見られる性質かも知れない。

As汚染土壌から分離された真菌類についてはアルシン揮散能が調べられた。土壌からのアルシン類の生成に関して、Woolson (1977) は種々のAs化合物を添加した土壌を好気および嫌気条件下で培養し、MMAやDMAなど有機As化合物を添加した土壌では As^{5+} を添加した土壌よりもアルシン類の発生量が大きく、また、有機As化合物を添加した土壌からのアルシン類の発生量は嫌気条件よりも好気条件で高いことを報告している。しかし、その土壌からアルシンを生成する微生物については示していない。アルシンを生成する微生物として、メタン産生細菌 (*Methanobacterium*) がAs化合物をメチル化することが報告されている (McBride and Wolfe 1971) が、この細菌はこの様な好氣的条件では生育しない。畑土壌のような好気条件下でAs化合物をメチル化する微生物は真菌類が知られているのみである。本研究では、高濃度のAsを含んだ土壌を畑条件下で培養した時に最もAs耐性糸状菌数が多く (第3章)、また、単離されたAs耐性糸状菌の半数が As^{3+} からアルシン類を揮散できた。好氣的条件下にある畑土壌では一般に As^{3+} は殆ど存在しないと思われ、これらのAs耐性糸状菌類が As^{3+} からアルシ

ンを生成するのは限られた状況であると思われる。しかし、Bird ら (1948) や Cox and Alexander (1973) によると、 As^{3+} からアルシン類を揮散する菌類はすべて、MMA、DMAからもアルシン類を生成し得る。これらのことは、好氣的条件でのAs添加土壌からのアルシン類の生成量の増加 (Woolson 1977) が、畑条件のヒ素汚染土壌で優占してくるヒ素耐性糸状菌とそのアルシン揮散能によるものであることを示唆する。

6.3 ヒ素耐性微生物の環境浄化への利用の可能性と問題点

As汚染土壌ではAs耐性菌が優占する傾向にあるが、As含量以外の環境要因によって優占してくるAs耐性菌の種類は異なってくる。例えば、*A.fumigatus* と *Talaromyces* sp. はどちらも代表的な土壌糸状菌類であり、培地中では高濃度の As^{3+} に耐性を示し、Asを吸収した (第3章3.1節) が、*Talaromyces* sp. は実験に用いた2つの汚染土壌の何れからも分離されたのに対し、*A.fumigatus* は一方の土壌からしか分離されなかった (第3章)。一方、これらのAs耐性菌は種によってAs化合物の代謝能が異なり、*Talaromyces* sp. は As^{3+} からアルシン類を生成できなかったが、*A.fumigatus* は As^{3+} から活発にアルシンを生成した。As化合物揮散能を持つ *Aspergillus* 属が優占した土壌ではアルシン類の発生は大きい、As化合物揮散能のない *Talaromyces* 属や *Penicillium* 属が優占した土壌では As^{3+} からのアルシン類の揮散は小さくなるかもしれない。すなわち、As汚染土壌にどのようなAs耐性微生物が優占してくるかによって土壌中のAs化合物の形態変化、挙動が異なってくるのが考えられるが、土壌の微生物相と土壌中のAs化合物の代謝の関係については今後、明らかにされる必要がある。また、土壌にAs化合物代謝細菌を人為的に添加することにより、As汚染土壌の除染や浄化に利用することを考えた時、非汚染土壌中では添加された As^{3+} 酸化細菌は優占できなかったが、高濃度の As^{3+} の負荷を受けている土壌中では増殖し、 As^{3+} 酸化能を発揮した。しかし、自然条件下のAs耐性細菌が全て As^{3+} 酸化能を持つわけではなく、こ

第7章 摘要

土壤汚染物質として、近年その環境への悪影響の懸念が増加しつつあるAsについて、汚染が土壤微生物相に及ぼす影響と、As化合物の微生物的形態変化を明らかにするために、主としてAs耐性微生物に注目して調査、実験を行ない、合せて、これらの微生物の環境改善への利用についても考察した。

1. ヒ素による汚染が土壤微生物相に与える影響

宮崎県西臼杵郡高千穂町のAs汚染対策地域および周辺の水田および畑において調査を行ない、汚染土壌と非汚染土壌の微生物相を比較検討した。その結果、土壌中のAs含量と微生物数の間に明確な関係は認められなかったが、汚染水田土壌の微生物相は非汚染土壌および汚染畑地土壌の微生物相に比較して糸状菌が優占していた。何れの土壌においても、細菌および放線菌は糸状菌よりもAs³⁺に対する耐性が低い傾向にあった。また、汚染水田土壌中の糸状菌相は他の土壌よりも多様性が低く、高濃度のAs³⁺に耐性を持つ特異的な糸状菌が優占していた。これらの事実は、As汚染水田ではAsが還元されてより毒性の強いAs³⁺に変化し、As³⁺耐性の強い特異的な糸状菌が集積してくるのに対し、畑土壌ではAsが還元されず、毒性の弱いAs⁵⁺の形態でとどまるため、土壤微生物相へのAs汚染の影響が畑土壌では水田土壌に比較して小さい事を示唆していると思われた。

2. ヒ素汚染土壌から分離されたヒ素耐性微生物

As汚染土壌に優占するAs耐性微生物の種類と性質を明らかにするために、As汚染土壌を培養し、そこに出現するAs耐性微生物を分離した。糸状菌類では *Aspergillus fumigatus*、*Talaromyces* sp.、*Penicillium* spp. など多くの菌群が単離された。これらの分離された糸状菌類を10mM As³⁺添加液体培地中で培養した結果、比較的高頻度で分離された *A. fumigatus*、*Talaromyces* sp. などでは、As³⁺添加培地における生育

量はAs非添加培地における生育量と比較して差は小さく、また、これらの菌は高濃度のAsを蓄積した。As汚染土壌から分離されたAs耐性細菌も多くのグループを含み、中でも、*Alcaligenes faecalis*、*Bacillus circulans*などの分離頻度が高かった。これらの細菌は高濃度のAs³⁺に耐性を示し、それぞれ最高20mMおよび40mMのAs³⁺を添加したペプトン水およびヌトリエントブロス培地で増殖した。

3. ヒ素耐性微生物によるヒ素化合物の代謝

糸状菌類によるアルシン類生成能の簡便な検定法として、生成する揮発性のAs化合物を0.1%硝酸銀溶液に吸収させ、フレイムレス原子吸光分光光度計でAsを検出した。As汚染土壌から分離されたAs耐性糸状菌についてAs化合物揮散能を検索した結果、供試した113株のうちの61株がAs³⁺から揮発性As化合物を生成した。供試菌株のうち、*A. fumigatus* など *Aspergillus* 属に属する株は全て揮発性As化合物を生成することができたが、*Talaromyces* sp. の殆どや *Penicillium* spp. はAs³⁺から揮発性As化合物を生成できず、As³⁺からのアルシン生成能には属レベルで偏りが認められた。

As³⁺からAs⁵⁺への酸化量を測定するために、高速液体クロマトと原子吸光分光光度計を組合せたシステム（HPLC-AAシステム）により培地中のAsの形態別定量を行なった。As汚染土壌から単離したAs³⁺耐性 *A. faecalis* (TR-17株) は、As³⁺添加によりAs非添加培地よりも増殖開始は遅れ、増殖速度もやや遅れる傾向にあった。しかし、TR-17株は増殖にともないAs³⁺をAs⁵⁺に酸化し、10mM As³⁺添加培地では100時間で添加したAs³⁺の47%を、20mM As³⁺添加培地では175時間で添加したAs³⁺の43%をAs⁵⁺に酸化した。また、TR-17株は培地へのAs³⁺添加量の増加に伴い最大生育量は増加し、As³⁺をその増殖に活用していると考えられた。一方、As³⁺耐性 *Pseudomonas* sp. (TR-44株) は10mMのAs³⁺添加培地中でも増殖したが、As³⁺からAs⁵⁺への酸化は認められなかった。

4. ヒ素耐性亜ヒ酸酸化細菌による土壌中の亜ヒ酸の酸化

純粋培養系で As^{3+} 酸化能を発揮したAs耐性細菌を土壌に接種した時に、土壌中でも増殖し、 As^{3+} 酸化能を発揮し得るかを、淡色黒ボク土壌を充填した土壌環流装置などを用いて検討した。その結果、 As^{3+} 非添加土壌に接種されたTR-17株の土壌中での生残性は高くなかったが、土壌環流装置中では As^{3+} を繰り返し添加することによりAs耐性細菌が優占してきた。また、TR-17株を接種した土壌環流装置ではTR-17株を接種していない土壌環流装置よりも速やかに環流液中の As^{3+} が酸化された。

これらの結果は、 As^{3+} 酸化細菌を土壌に人為的に接種することにより土壌中の As^{3+} の酸化を促進し、As汚染による被害の軽減をはかり得る可能性を示唆するものである。

謝辞

本論文は国立環境研究所（旧国立公害研究所）において行なわれた「土壌生態系に与える無機汚染物質の影響に関する研究（昭和55～57年度）」、「重金属汚染土壌における微生物相に関する研究（昭和58、59年度）」、「土壌および地下水圏における有害化学物質の挙動に関する研究（昭和60～平成元年度）」および「環境中における重金属の挙動と微生物の相互作用に関する研究（平成2～4年度）」のなかで行なわれた研究のうち、関係部分を取りまとめたものである。研究を遂行するにあたって御指導頂いた、国立公害研究所水質土壌環境部土壌環境研究室室長、高松武次郎博士、同主任研究員、久保井徹博士、国立環境研究所生物圏環境部環境微生物研究室室長、渡辺信博士に深謝の意を表する。

本論文を取りまとめるにあたっては、東京大学農学部教授、松本聰博士に御懇切な御校閲と御教示を賜わった。衷心よりお礼申上げる。

島根大学助教授、山本広基博士には糸状菌類の同定に関して御教示頂き、また、国立公害研究所水質土壌環境部陸水環境研究室室長、矢木修身博士には細菌類の同定に関して御教示頂いた。電子顕微鏡による観察と撮影は国立公害研究所計測技術部分析室、柴田恵子氏にお願いした。ヒ素汚染地の調査にあたっては、宮崎県総合農業試験場、有村玄洋博士に御協力頂いた。また実験を遂行するにあたっては日本大学農獣医学部農芸化学科土壌学教室、吉原貴仁、小尾匡、笠原浩二の各氏に御協力頂いた。ここに謹んで感謝の意を表する。

尚、本研究の遂行中、国立公害研究所水質土壌環境部土壌環境研究室、国立環境研究所生物圏環境部環境微生物研究室の諸兄姉には、終始激励と御協力を頂いた。厚く感謝する。

付表 培地組成 (g/l)

777⁺ ミ寒天培地

エグアルブミン	0.25
グルコース	1.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	trace
寒天	15.0
pH6.8	

ツアベック寒天培地

NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
シュークワース	30.0
agar	15.0

マーチン培地

KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
グルコース	10.0
ペプトン	5.0
pH6.8	

マーチン寒天培地

マーチン培地に寒天 (2%) を添加

ローズベンガル寒天培地

マーチン寒天培地にローズベンガル (0.0033%) を添加

ヌトリエントブロス (NB) 培地

ビーフエキス	10.0
ペプトン	10.0
NaCl	5.0
pH7.2	

クリスタルヴァイオレット添加NB培地
NB培地にクリスタルヴァイオレット
(0.0005%) を添加

ペプトン水

ペプトン	10.0
NaCl	5.0
pH7.0	

As⁺ 酸化能検定培地

基本培地 :

NH ₄ NO ₃	1.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KCl	0.2

TR-17用培地 :

基本培地	1000ml
Asp(0.2%)	2.0
酵母エキス	0.5

pH7.2

TR-44用培地

基本培地	1000ml
Glc	10.0
Asp	2.0
pH5.4	

引用文献

- Arima, K. and Beppu, M. (1964): Induction and mechanism of arsenite resistance in *Pseudomonas pseudomalei*. *J. Bacteriol.*, 88, 143-150
- Barnett, H.L. (1960): Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Burgess Publishing Co.
- Bird, M.L., Challenger, F., Charton, P.T., and Smith, J.O. (1948): Studies on biological methylation 11. The action of moulds on inorganic and organic compounds of arsenic. *Biochem. J.*, 43, 78-83
- Challenger, F., Higginbottom, C., and Ellis, L. (1933): The formation of organo-metalloidal compounds by micro-organisms. Part I. Trimethylarsine and dimethylarsine. *J. Chem. Soc. (London)*, 95-101
- Cox, D.P. and Alexander, M. (1973): Production of trimethylarsine gas from various arsenic compounds by three sewage fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicology*, 9, 84-88
- Cullen, W.R., McBride, B.C., and Reimer, M. (1979): Induction of the Aerobic Methylation of arsenic by *Candida humicola*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 21, 157-161
- Doelman, P. and Haanstra, L. (1979): Effect of lead on the soil bacterial microflora. *Soil Biol. Biochem.*, 11, 487-491
- 土壤微生物研究会編 (1979) : 土壤微生物実験法、養賢堂
- Duxbury, T. and Bicknell, B. (1983): metal tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biol. biochem.*, 15, (3), 243-250
- Ehrlich, H.L. (1978): Inorganic energy sources for chemolithotrophic and

- mixotrophic bacteria. *Geomicrobiol. J.*, 1, 65-83
- エネルギーと環境 (1992) : 地熱発電の開発相次ぎ環境アセスメントの対象に. エネルギーと環境, No.1187, p.4-5
- Freeman, M.C., Aggett, J., and O'Brien, G. (1986): Microbial transformations of arsenic in lake Ohakuri, New Zealand. *Wat. Res.*, 20, 283-294
- Gilman, J.C. (1957): *A Manual of Soil Fungi*, The Iowa University Press
- Gosio, B. (1893): Azione di alcune muffe sui composti fissi d'arsenico. *Rivista d'igiene e Sanita Pubblica III*, 201-230 and 261-273
- Green, H.H. (1918): Isolation and description of a bacterium causing oxidation of arsenite to arsenate in cattle dipping baths. *Rep. Dir. Vet. Res. S. Afr.*, 5-6, 593-599
- Green, H.H. and Kestell, N.H. (1918): *Rep. Vet. Res. S. Afr.* 7/8: 701 (Turner, A.W. 1954 から引用)
- Hiroki, M. (1992): Effects of heavy metals contamination on soil microbial population. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 38, 141-147
- Hiroki, M. (1993a): Effect of arsenic pollution on soil microbial population. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 39, 227-235
- Hiroki, M. (1993b): As-tolerant *Bacillus circulans* isolated from As-polluted soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 39, 351-355
- Hiroki, M. and Yoshiwara, Y. (1993): Arsenic fungi isolated from arsenic-polluted soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 39, 237-243
- 神 和夫 (1983) : 北海道産海藻中のヒ素濃度 総ヒ素濃度の定量三価、五価無機ヒ素、モノメチルヒ素、およびジメチルヒ素の分別定量. 道衛研所報, 33, 21-27
- Johnson, D.L. and Pilson, M.E.Q. (1975): The oxidation of arsenite in seawater.

- Env. Letters*, 8, 157-171
- Jordan, M.J. and Lechevalier, M.P. (1975): Effect of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. *Can. J. Microbiol.*, 21, 1855-1865
- 金沢晋二郎・高井康雄 (1977) : 亜高山帯針葉樹林下の土壤有機物の性状と分解過程 (第5報) 本地域の土壤中の β -グルコシダーゼおよびプロテアーゼ活性について. 日本土壤肥科学雑誌, 48, 534-539
- 環境庁企画調整局企画調整課編 (1990) : 平成2年版環境白書、各論. 土壤汚染の現状と対策. 162-164
- 環境庁水質保全局 (1984) : 土壤汚染環境基準設定調査
- 加藤邦彦・鈴木達彦 (1979) : 家畜ふん尿施用土壤における微生物フロアの研究. 農技研報告 B30, 73-135
- 川原一之 (1978) : 土呂久鉱毒病-被害者の復権のために-. 公害研究, 7, (4), 29-38
- 川原一之 (1980) : 口伝亜砒焼き谷、岩波新書
- 前田信寿・手代木智 (1957) : 水田に於ける砒素害除毒について. 日本土壤肥科学雑誌, 28, 185-188
- Maeda, S., Ohki, A., Miyahara, K., Takeshita, T., and Higashi, S. (1990): Growth characteristics and arsenic metabolism of two species of arsenic-tolerant bacteria. *J. Biol. Chem.*, 4, 245-250
- Maliszewska, W., Dec, S., Wierzbicka, H., and Wozniakowska, A. (1985): The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil micro-organisms. *Environ. Pollut. Ser. A*, 37, 195-215
- Malloch, D. (1983): カビの分離培養と同定. 宇田川俊一・室井哲夫訳、医歯薬出版株式会社

- McBride, B.C., and Wolfe, R.S. (1971): Biosynthesis of dimethylarsine by methanobacterium. *Biochemistry*, 10, 4312-4317
- 宮崎県総合農業試験場 (1977) : ひ素汚染土壌対策試験成績書
- 宮崎県総合農業試験場 (1981) : 水稻のひ素害に対する主要因の解明成績書
- Morita, M., Uehiro, T., and Fuwa, K. (1981): Determination of Arsenic compounds in biological samples by liquid chromatography with inductively coupled argon plasma-atomic emission spectrometric detection. *Anal. Chem.*, 53, 1806-1808
- Morita, M. and Shibata, Y. (1987): Speciation of arsenic compounds in marine life by high performance liquid chromatography combined with inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Sci.*, 3, 575-577
- 中原英臣 (1988) : 重金属と微生物. 重金属と生物, 茅野充男・斎藤寛編, 博友社, 11-79
- Nordgren, A., Kauri, T., Baath, E. and Soderstrom, B. (1986): Soil microbial activity, Mycelial lengths and physiological groups of bacteria in a heavy metal polluted area. *Environ. Pollut. Ser. A*, 41, 89-100
- Novic, R.P. and Roth, C. (1968): Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 95, 1335-1342
- 小田中芳次・俣野修身・後藤真康 (1979) : 炭素炉原子吸光法による環境試料中の無機及びアルキルヒ素の定量法並びに各種共存試薬の増感及び干渉抑制効果. 分析化学, 28, 517-522
- Olson, B.H. and Thornton, I. (1982): The resistance patterns to metals in contaminated land. *J. Soil Sci.*, 33, 271-277
- Osborne, F.H. and Ehrlich, H.L. (1976): Oxidation of arsenite by a soil

- isolate of *Alcaligenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 41, 295-305
- Phillips, S.E., and Taylor, M.L. (1976): Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 392-399
- Quastel, J.H. and Scholefield, P.G. (1953): Arsenite oxidation in soil. *Soil Sci.*, 75, 279-285
- Reed, J., F. and Sturgis, M.B. (1963): Toxicity from arsenic compounds to rice on flooded soils. *J. Am. Soc. Agr.*, 28, 432-436
- Reichenbach, H. and Dworkin, M. (1981): Introduction to the gliding bacteria. In *The Prokaryotes*, Ed. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, and A., Schlegel, H.G., 19, p.315-327, Springer, New York
- Shapiro (1971): Arsenic and phosphate: Measured by various techniques. *Science*, 171, 234
- 渋谷政夫・小山雄生・渡辺久男 (1978): 重金属測定法、土壤汚染元素と定量法の解説。博友社
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.) (1986): *Bergey's manual of Systematic Bacteriology Vol.2.*, Williams & Wilkins, Baltimore
- Takamatsu, T., Aoki, H., and Yoshida, T. (1982): Determination of arsenate, arsenite, monomethylarsonate, and dimethylarsinate in soil polluted with arsenic. *Soil Sci.*, 133, (4), 239-246
- 高松武次郎・青木博・吉田富男 (1983): 水稻を栽培したポット土壌でのAsの化学形態—ヒ酸, 亜ヒ酸, モノメチルアルソン酸及びジメチルアルシン酸について—。国立公害研究所研究報告、第47号、153-163
- 高松武次郎・比嘉房江・吉田富男 (1983): ヒ素汚染土壌からのガス状ヒ素の発生について。日本土壤肥科学雑誌、54、340-346

- 達山和紀・江川宏・山本広基・井上啓一 (1974): 金属化合物による土壤汚染と微生物相. 日菌報、15、246-250
- Thom, C. and Raper, K.B. (1932): The Arsenic fungi of Gosio. *Science*, 76, 548-550
- Tsutsumi, M. (1981): Arsenic Pollution in Arable Land. Heavy Metal Pollution in Soils of Japan, 181-192, ed. K. Kitagishi and I. Yamane, Japan Scientific Societies Press, Tokyo
- Turner, A.W. (1949): Bacterial oxidation of arsenite. *Nature*, 164, 76-77
- Turner, A.W. (1954): Bacterial oxidation of arsenite. I. Description of bacteria isolated from arsenical cattle-dipping fluids. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 452-478
- 宇田川俊一・椿啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹夫・横山竜夫・渡辺昌平 (1978): 菌類図鑑 (上、下). 講談社サイエンティフィック
- Wakao, N., Koyatsu, H., Komai, Y., Shimokawara, H., Sakurai, Y., and Shiota, H. (1988): Microbial oxidation of arsenite and occurrence of Arsenite-oxidizing bacteria in acid mine water from a sulfur-pyrite mine. *Geomicrobiology J.*, 6, 11-24.
- Williams, S.T., McNeilly, T., and Wellington, E.M.H. (1977): The decomposition of vegetation growing on metal mine waste. *Soil Biol. Biochem.*, 9, 271-275
- Woolson, E.A. (1977): Generation of alkylarsines from soil. *Weed Science*, 25, 412-416
- 山本広基・達山和紀・江川宏・古田敏行 (1981): 銅汚染土壤中の微生物相. 日本土壤肥科学雑誌、52、119-124

山根忠昭 (1989): 水稻におけるヒ素被害の発生機構と対策. 島根農試研報、24、1~

95

Yang J. and Ge J. (1984): Studies on the effects of arsenic on farmland ecosystem. *Acta Ecologica Sinica*, 4, 34-45 (in Chinese with English summary)

Studies on arsenic soil pollution and transformation of
arsenic compounds by arsenic-tolerant microorganisms

Mikiya HIROKI

Summary

Arsenic (As) is one of the major soil pollutants. It arises from various sources, such as mines and smelters, waste water from geothermal electric power stations, inorganic and organic arsenic compounds used as fungicides and the use of As in industry. Arsenic consists of various organic and inorganic chemical forms, and its behavior in the environment and toxicity to organisms differ depending on the chemical form. Therefore the fate of As in the environment and its effect on ecosystems have become an important area of investigation. As the transformation of As compounds is known to be carried out by microorganisms, the present studies were planned to clarify the effect of As on soil microorganisms and the transformation of As compounds by microorganisms in soil.

1. Effect of As pollution on soil microbial population

In order to estimate the effect of arsenic pollution on soil microorganisms, a field survey was carried out in arsenic-polluted (391-459 mg/kg dry soil) and unpolluted (32-43 mg/kg dry soil) fields located in Takachiho, Miyazaki Prefecture, Japan, and the following results were obtained. Fungi appeared to be much more tolerant to

As(III) than bacteria and actinomycetes. There were differences in the microbial population of a polluted paddy field subjected to submerged conditions in summer and populations of other fields, including a polluted upland field and unpolluted fields; in the former, the ratio of number of bacteria to number of fungi was significantly lower than in the latter; the ratio of the As(III)-tolerant fungi to the whole fungal population was higher in the former; the fungal group which predominated in the former belonged to a unique group and was never observed in the latter; the diversity index of the fungal flora of the former was lower than the indices of the latter. In conclusion, the continuous pollution of soil by As promoted the predominance of As-tolerant fungi, and the effect of As pollution on the microbial population was more drastic in paddy than in upland fields.

2. As-tolerant microorganisms in As-polluted soils

In order to isolate the As-tolerant microorganisms predominant in the As-polluted soils, and to establish their characteristics, As-polluted and unpolluted soils were incubated and the following results were obtained. The number of As-tolerant fungi was largest in heavily polluted soils under aerobic incubation. Talaromyces sp. and Aspergillus fumigatus, which could grow and absorb a high concentration of As in medium treated with 0.75 g/L

As(III), were predominant among the As-tolerant fungi isolated from As-polluted soils. Some strains of As-tolerant bacteria were isolated from As-polluted soils, including Alcaligenes faecalis and Bacillus circulans, which were tolerant to a high concentration of As(III), up to 3.0 g/L As(III) in the case of the latter.

3. Ability of the As-tolerant microorganisms to transform As compounds

In order to determine their ability to volatilize As-compounds from As(III), As-tolerant fungi isolated from As-polluted soils were cultured in a medium treated with As(III). Volatile As compounds from the culture were collected in AgNO₃ solution to be determined by flameless atomic absorption spectrometry. Among the 113 As-tolerant isolates, 61 were able to produce a volatile As compound from As(III). All the examined strains of A. fumigatus were able to produce a volatile As-compound from As(III), unlike most of the strains of Talaromyces and Penicillium.

In order to determine the oxidation of As(III) to As(V) by As-tolerant bacteria, concentrations of As(III) and As(V) in cultures were measured using a system based on high-performance liquid chromatography and atomic absorption spectrometry. An As-tolerant isolate of A. faecalis (TR-17) which was isolated from As-polluted soil was able to oxidize As(III) to As(V) in a medium treated

with As(III). The isolate oxidized 47% of As(III) in a medium treated with 0.75 g/L As(III) in 100 h, and 43% of As(III) in a medium treated with 1.5 g/L As(III) in 175 h. Since the maximum growth of the isolate increased with increasing concentration of amended As(III), the isolate appears to use As(III) for growth in culture.

4. Oxidation of As(III) by As-tolerant bacteria in soil

In order to determine the role of As-tolerant bacteria in the oxidation of As(III) in soil, an experiment was carried out using perfusion apparatus with columns filled with Andosol. In the experiment, an As-tolerant isolate of A. faecalis (TR-17) which was able to oxidize As(III) in a pure culture was inoculated to the soil to determine number of As-tolerant bacteria in the soil and the concentrations of As(III) and As(V) in the soil water. In the apparatus amended with As(III), the number of As-tolerant bacteria increased and became predominant in the soil, unlike those in the apparatus without As(III). In the apparatus to which the isolate (TR-17) was inoculated, the concentration of As(III) in the soil water decreased sooner than in apparatuses in which the isolate had not been inoculated. These results suggest that the inoculated As-tolerant bacteria promoted the oxidation of As(III) in the soil and that it may be possible to use these As-tolerant microorganisms to improve As-polluted soils.

