

博士論文

好氣的条件下で POPs 農薬を分解する細菌の分離と  
その特性評価

東京大学大学院 農学生命科学研究科  
応用生命工学専攻 植物機能工学研究室  
平成 18 年 博士課程入学 松本 えみ子  
指導教員 小柳津 広志

# 目次

第 1 章 序論 .....	1
1-1 本研究の背景と目的.....	2
1-1-1 POPs 農薬汚染問題の現状 .....	2
1-1-2 ドリン系農薬汚染問題解決に向けての課題 .....	6
1-2 研究目的 .....	7
1-3 研究目的の解決に向けての戦略 .....	8
1-4 本論文の構成 .....	9
第 2 章 非汚染土壌の POPs 農薬分解菌分離源としての利用可能性の検証 .....	13
本章の要旨 .....	14
2-1 研究の背景と目的.....	14
2-2 実験方法 .....	16
2-2-1 対象とした POPs 農薬.....	16
2-2-2 試薬 .....	17
2-2-3 土壌試料 .....	17
2-2-4 土壌マイクロコズムの調製.....	19
2-2-5 土壌マイクロコズム試料からの POPs 農薬の抽出 .....	21
2-2-6 GC/MS 分析条件 .....	21
2-2-7 土壌 DNA の抽出ならびに PCR-DGGE 解析 .....	22
2-2-8 16S rDNA クローン解析 .....	24
2-3 結果および考察.....	26
2-3-1 非汚染土壌のドリン系農薬に対する分解能の評価 .....	26
2-3-2 非汚染土壌の HCH 類およびアルドリンに対する分解能の評価.....	29
2-3-3 分解能を有した森林土壌の菌相解析結果.....	31
2-3-4 PCR-DGGE 法による細菌群集構造の変化の解析 .....	35
2-4 結論 .....	37

第3章 ドリン系農薬分解菌群の効率的取得方法の開発 .....	41
本章の要旨 .....	42
3-1 研究の背景と目的 .....	42
3-2 実験方法 .....	43
3-2-1 ドリン系農薬分解菌分離のために検討した培養基質 .....	43
3-2-2 試薬 .....	43
3-2-3 森林土壌からのドリン系農薬アナログ物質を用いた分解菌の集積培養 .....	45
3-2-4 集積培養液を用いたドリン系農薬分解試験 .....	45
3-2-5 分解試験試料の前処理方法 .....	46
3-2-6 GC/MS 分析条件 .....	46
3-2-7 集積培養液からの DNA 抽出条件ならびに PCR-DGGE 解析 .....	46
3-2-8 DGGE バンドの塩基配列解析ならびに系統学的解析 .....	48
3-3 結果および考察 .....	49
3-3-1 森林土壌からのドリン系農薬分解微生物群の集積培養 ～アナログ物質の培養基質と しての有用性の評価～ .....	49
3-3-2 集積培養液におけるドリン系農薬の代謝物 .....	50
3-3-3 ドリン系農薬分解微生物群の構成菌 .....	50
3-4 結論 .....	56
第4章 ドリン系農薬分解菌の分離・同定およびそれらの特性評価 .....	58
本章の要旨 .....	59
4-1 実験方法 .....	59
4-1-1 試薬 .....	60
4-1-2 ドリン系農薬分解菌群からのドリン系農薬分解菌の分離 .....	60
4-1-3 分離菌を用いたドリン系農薬分解試験 .....	60
4-1-4 分解試験試料の前処理方法 .....	61
4-1-5 GC/MS 分析条件 .....	61
4-1-6 LC/MS 分析によるドリン系農薬代謝物の確認 .....	61
4-1-7 添加したドリン系農薬分解菌の土壌中における機能性の評価 .....	61

4-1-8	ドリソ系農薬分解菌の分類・同定 .....	62
4-2	結果および考察 .....	68
4-2-1	ドリソ系農薬分解菌群からの分解菌の分離 .....	68
4-2-2	分離菌株のドリソ系農薬分解活性の評価 .....	70
4-2-3	分離菌株の菌体および培養上清におけるドリソ系農薬分解活性の評価 .....	73
4-2-4	分離菌株によるドリソ系農薬代謝物の LC/MS による確認 .....	76
4-2-5	添加したドリソ系農薬分解菌の土壤中における機能性の評価 .....	80
4-2-6	ドリソ系農薬分解菌の分類・同定 .....	82
4-3	結論 .....	90
第 5 章	結論 .....	94
5-1	総括 .....	95
5-1-1	研究課題ならびに解法 .....	95
5-1-2	ドリソ系農薬分解菌群の取得方法の開発に関する総括 .....	95
5-1-3	取得したドリソ系農薬分解菌の特性評価に関する総括 .....	96
5-2	将来課題と展望 .....	97
Appendix	18S rRNA 遺伝子を用いた森林土壤中の微生物群集構造解析 .....	99
	謝辞 .....	105

# 第1章 序論

---

## 1-1 本研究の背景と目的

### 1-1-1 POPs 農薬汚染問題の現状

今日、人類が化学物質による環境問題に直面するに至った背景には、利便性を追求し、多種多様な化学物質を大量に生産、消費、廃棄する社会経済活動や生活様式を人類が受け入れてきたということがある。現代社会においては、様々な産業活動や日常生活のなかで数万種に上ると言われる多種多様な化学物質が利用され、人々の生活に利便性を与えている（環境省, 2007）。その一方で、化学物質の中には、その製造、流通、使用、廃棄の過程で環境に排出され、環境中に拡散・蓄積した結果として人の健康や生態系に悪影響を及ぼすおそれのあるものも存在している。とりわけ、農薬は他の化学物質と異なり、意図的に農耕地を中心とした環境中に放出される物質であり、その使用規制の歴史は、化学物質に依存する社会と環境問題の関係を体現している。

農薬は、病虫害や雑草等の作物生育を阻害する種々の要因を防除するための有効な手段として、農業生産性の向上と安定化、さらには省力化に多大な効果を上げてきた。日本国内においては、明治維新後に欧米の技術が輸入され、防虫菊のような天然物やボルドー液などの無機化合物を主体とする農薬が用いられるようになった（大谷, 2008）。戦後には食糧増産のために農薬が必要不可欠なものとなり、その当時開発、実用化された DDT、ヘキサクロシクロヘキサン（HCH）、ドリノ剤、パラチオンなどの殺虫剤、有機水銀剤などの殺菌剤、2,4-D などの除草剤が使用され、有機合成農薬を中心とする農薬使用量が飛躍的に増加していった。しかしその反面、1962 年に刊行されたレイチェル・カーソンの『サイレント・スプリング』において DDT の危険性が指摘されたことをきっかけに、過去に使用された有機合成農薬の中には残留性・有害性が非常に高い物質が含まれていることが認識され、その使用が引き起こす地球的規模での環境汚染が世界各地で社会問題として取り上げられるようになった。

日本国内で広範に使用されていた有機合成農薬のなかでも、1940～50 年代に農薬として登録されていた有機塩素系殺虫剤のアルドリン、ディルドリン、エンドリン、DDT、クロルデン、ヘプタクロル、HCH は、強い毒性をもつとともに、高い化学的安定性および脂溶

性のため、環境中での長期残留や生物体内への蓄積が特に懸念された。これらの有機塩素系農薬の毒性は、Table 1-1に示すとおり非常に高く、とりわけ魚毒性が高い特徴がある。特にエンドリンの急性毒性は極めて強く、致死率が高い。また、いずれも中枢神経系を刺激する作用をもち、動物実験により発ガン性が認められており、アルドリン、エンドリン、DDT、クロルデンについては、催奇形性、変異原性も報告されている（東京都立衛生研究所, 1999）。このため、毒性や残留性の高いこれらの有機塩素系農薬については、次々に使用禁止措置がとられた（上路ら, 2002）。DDT および HCH はイネ害虫に卓効を示し、コメ生産に大いに貢献したが、牛乳および母乳汚染の実態が判明し（厚生省, 1971）、1971 年に農薬登録が失効した。アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロルも残留性の観点から 1975 年に農薬登録が失効した。

Table 1-1 Toxicity of organochlorine pesticides

	ADI(TDI) <sup>1)</sup> (mg/kg/day)	LC <sub>50</sub> (Fish) <sup>2)</sup> (mg/L)	LD <sub>50</sub> <sup>3), 4)</sup> (mg/kg)
Aldrin	0.0001 (Aldrin+Dieldrin)	0.12-0.55 (Carp, 48h), 0.081 (Medaka, 48h)	39 (Rat♂, oral), 44 (Mouse, oral), 98 (Rat♂, dermal)
Dieldrin	0.0001 (Aldrin+Dieldrin)	0.018-0.32 (Carp, 48h), 0.035 (Medaka, 48h)	46 (Rat♂, oral), 24 (Mouse, oral), 60 (Rat♀, dermal)
Endrin	0.0002	0.00084-0.0047 (Carp, 48h), 0.008 (Medaka, 48h)	7.5 (Rat♀, oral), 1.37 (Mouse, oral), 15 (Rat♀, dermal)
DDT	0.01	0.11-0.25 (Carp, 48h), 0.012 (Medaka, 48h)	217 (Rat♂, oral), 110 (Mouse, oral), 2510 (Rat♂, dermal)
Chlordane	0.0005	0.26 (Carp, 48h), 0.01-0.1 (Medaka, 48h)	335 (Rat♂, oral), 125 (Mouse, oral), 690 (Rat♀, dermal)
Heptachlor	0.0001	0.30-0.86 (Carp, 48h), 0.2-0.56 (Medaka, 48h)	100 (Rat♂, oral), 70 (Mouse, oral), 195 (Rat♂, dermal)
γ-HCH	0.005	0.17 (Carp, 48h), 0.12 (Medaka, 96h)	88 (Rat♂, oral), 129 (Mouse, oral), 900 (Rat♀, oral)

1) JMPR, 2006, 2) 田中, 1978, 3) Gaines, 1969, 4) 東京都立衛生研究所, 1999

一方、国際的な動向では、これらの有機塩素系農薬による地球的規模での環境汚染が世界各地で指摘されるようになり、2001 年に「残留性有機汚染物質（Persistent organic pollutants: POPs）に関するストックホルム条約（POPs 条約）」が採択され、日本を含む 50

カ国の締結をもって 2004 年に条約が発効した。この条約により、特に優先して対策を取るべき物質として、上述の有機塩素系農薬のうち HCH を除く 6 種類が POPs に指定され、POPs 条約加盟国は国際的に協調してその適切な管理・処理をおこなうことが義務付けられた。以後、この 6 種類の POPs と新規 POPs 候補物質として現在検討中にある HCH をあわせて POPs 農薬とよぶ。

使用規制の強化がおこなわれた POPs 農薬の使用残については、昭和 40 年代に農林水産省の指導の下に地中に埋設処理された。2008 年の農林水産省の調査によると、POPs 農薬は全国 24 道県、168 ヶ所に総量で約 4,400 t 埋設されたことが確認されている（農林水産省、2008）。2004～05 年には農林水産省からの補助事業（埋設農薬最終処理事業）により、埋設農薬が掘削・回収され、物理化学的な方法による無害化処理が進行し、これまでに無害化処理された埋設農薬は、全国 46 ヶ所の総量で約 2,200 t ある（農林水産省、2008）。しかしながら、補助事業が廃止となった 2006 年以降、無害化処理は自治体の財政難により難航しており、現在も 2,000 t 以上の POPs 農薬が地中に埋設されたままとなっている。このような POPs 農薬は、埋設容器の劣化等が原因で埋設地点周辺の土壌や地下水に漏洩し、低濃度で汚染している可能性が指摘されている。実際に、秋田県、福島県、千葉県、滋賀県などにおいて、埋設された POPs 農薬の漏洩が明らかとなっている（高木、2008）。このような漏洩が原因と考えられる土壌の汚染は広範囲に及び、処理量が大量となることから、物理化学的手法の適用はコスト的に困難とされ、無害化処理は進んでいない。また、埋設農薬の無害化処理を進めるなかで、低濃度汚染土壌の回収量が莫大になるという新たな課題も浮上している（土壌環境センター、2006）。これは、埋設農薬を処理する際、安全のために汚染がない範囲の土壌まで広く掘削除去したことや、漏洩に起因すると思われる土壌濃度指針値（土壌溶出試験による溶出基準値）をわずかに越える程度の汚染土壌が大量に発生（埋設農薬回収量の 5 倍程度）したことなどが原因である。

一方、過去に農耕地で使用された POPs 農薬は、使用禁止後 30 年以上経過した現在においても、農作物や農地表層土壌に残留し深刻な影響を及ぼしている（Hashimoto, 2005）。

近年、POPs 農薬のなかでもディルドリンおよびエンドリン（以後、ドリリン系農薬）がキュウリ果実から食品衛生法に定められた残留基準値を超える濃度で検出され、大きな問題となっている。東京都では 2001 年および 2002 年にキュウリから残留基準値を超えるド



リン系農薬が検出された。これは土壤中に長期残留していたドリリン系農薬が農作物に移行したものと考えられたことから、都内の農地土壌に対して、その残留実態が調査された(近藤ら, 2003)。その結果、農地土壌 814 検体のうち 85 検体 (10.4%) から 0.01~2.60 ppm のディルドリンが、3 検体 (0.4%) から 0.01~0.12 ppm のエンドリンが検出され、ドリリン系農薬が農地土壌に広範囲にわたり残留している深刻な実態が明らかとなった。2003 年には山形県と新潟県のキュウリ畑土壌やそこで栽培されているキュウリ果実からもドリリン系農薬が検出されるなど、全国規模で問題となっている(高木, 2008)。ドリリン系農薬の土壌残留基準値は設定されていないが、食品衛生法によると、食品の残留基準値はディルドリンが 0.02 ppm、エンドリンは検出を認めないこととなっている。そのため、農作物からドリリン系農薬が基準値を超えて検出された産地では、出荷自粛、作付け転換などの対応を余儀なくされ、消費者だけではなく生産者にとっても深刻な問題となっている。

海外においても、農産物からのドリリン系農薬の検出は数多く報告されている。米国においては、飼料用の大豆油でディルドリンが 9200 ppb、エンドリンが 400 ppb という高濃度の汚染が報告されている(植村ら, 1992)。これは配合飼料などに添加して使用されることが見込まれ、肉、乳製品の潜在的な汚染の原因となる恐れがある。中国では、近年、野菜 10 種類(ニンジン、ラディッシュ、レタス、キャベツ、セロリ、ニンニク、ニラ、ホウレンソウ、トマト、カボチャ)からディルドリンおよびエンドリンにとどまらず、DDT、HCH、HCB までもが検出されている(Gao *et al.*, 2005)。また、日本で輸入量が多いメキシコ産のカボチャについても、2002 年のアメリカにおける検査においてディルドリンとエンドリンが検出されている(登田ら, 2007)。さらに、オランダにおいても、ズッキーニのディルドリン残留濃度が残留基準の 0.02 ppm を超過する事例がしばしば見受けられるため、欧州食品安全機関では残留基準の引き上げを検討している(European food safety authority, 2007)。一方、農産物ではないが、イラクでは、母乳からディルドリンが 809 ppb(乳脂肪中濃度)という高値で検出された事例が報告されている(植村ら, 1992)。母乳の脂肪含量を 3%とし、体重 4 kg の新生児が一日に少なくとも 400 g の母乳を飲むとすると、ディルドリン摂取量は 2.4  $\mu\text{g/kg/day}$  に相当する。これはディルドリンの ADI(一日許容摂取量) 0.2  $\mu\text{g/kg/day}$  をはるかに超える危険なレベルである。母乳の汚染は、ドリリン系農薬で汚染した食物の摂取に起因していると考えられる。したがって、こうしたドリリン系農薬による

農作物の汚染は、汚染土壌に由来することが明白であり、世界的にもドリリン系農薬による土壌汚染は深刻な状況にあるといえる。

このように、ドリリン系農薬は長期間を経ても土壌中で容易に分解されず、埋設地点周辺や農耕地の表層土壌などにおいて低濃度ではあるが広範囲に分布している残留実態を前に、浄化対策の適用が急務となっている。

汚染土壌の浄化方法には、物理的手法、化学的手法、生物的手法などが挙げられる。これらの手法は、その汚染状況に応じて使い分ける必要がある。埋設農薬自体の無害化処理には、高温焼却（約 1000℃以上）、アルカリ触媒分解法、金属ナトリウム分散体法、超臨界水酸化法、水熱分解法、メカノケミカル法、ジオメルト法、真空加熱法が適正に処理できる技術として選定されている（環境省, 2005）。これらの物理化学的手法は、汚染物質を短時間で除去できることが大きなメリットであるが、大量のエネルギーを要し、処理に伴うコストが高いことの他にも、二次汚染の懸念や土壌機能の破壊などのデメリットがある。このため、これらは工場跡地や事故等による流出現場などの高濃度汚染スポットの対策に適した方法であり、埋設農薬自体の無害化処理には最適といえる。一方、生物的手法は、微生物や植物を用いるため浄化作用が緩やかで汚染の除去に時間がかかる、現場の環境条件の影響を受けやすいなどのデメリットがあるが、低コストに抑えられ、処理後も土壌機能が維持されることなどが大きなメリットとして挙げられる。このため、大量の低濃度汚染土壌の浄化処理法としては、生物的手法が適していると考えられている。特に、浄化処理後に作物生産をおこなう農耕地土壌の汚染対策としては、生物的手法が有用とされている。

以上のことから、ドリリン系農薬が低濃度レベルながら広範囲に残留している土壌の処理対策技術としては、生物の持つ浄化能力を利用する手法に期待が寄せられている。

### 1-1-2 ドリリン系農薬汚染問題解決に向けての課題

ドリリン系農薬汚染土壌を無害化するための有力な生物的手法としては、微生物の分解力を活用するバイオレメディエーションが挙げられる。

バイオレメディエーションの実現には、分解菌の性能が鍵を握る。しかしながら、ドリリン系農薬については、バイオレメディエーションに利用できる有用な分解菌はほとんど得られていないのが現状である。

嫌気性微生物によるドリリン系農薬の分解については、近年、底質等由来の集積培養菌群 (Maule *et al.*, 1987; Chiu *et al.*, 2005) やメタングラニュール汚泥中の微生物群集 (Baczynski *et al.*, 2004) 等、脱塩素化活性を有するものが多種報告され、微生物群集を用いたドリリン系農薬の嫌気分解に関する知見が集積されつつある。

一方、好気性微生物によるドリリン系農薬の分解に関する研究は、1960 年代後半から行われていたが、80 年代以降は研究が停滞し、農地表層土壌などの好氣的汚染環境が問題となっているにも関わらず、現在まで進展がないままである。この停滞の原因は、1975 年のドリリン系農薬の登録失効とともに分解菌の研究が打ち切られてきた経緯もあるが、より大きな要因として高い分解能を有する微生物の単離が困難であることが挙げられる。通常、土壌中の汚染物質についての分解菌の探索は、土壌から培養可能な微生物を単離し、それぞれについて分解能を評価することによっておこなわれてきた。しかしながら、ドリリン系農薬のような難分解性化合物についての分解菌は、土壌中に存在していたとしても全菌数に占める割合は非常に小さいと推測される。したがって、たとえ分解菌が集積している可能性がある汚染土壌を分離源として用いたとしても、その分離には多大な時間と労力を要する。実際、Matsumura らは、高濃度ドリリン系農薬汚染土壌から 577 菌株を分離したが、その中でディルドリン分解能を示したのはわずか 10 菌株であったことを報告している (Matsumura and Boush, 1967)。また、同様に汚染土壌から分離した 150 菌株について、エンドリン分解能を調べたところ、分解活性を示したのは 25 菌株のみであり、それらすべてがエンドリンをより毒性の高い代謝物であるケトエンドリンに変換していたことを報告している (Matsumura *et al.*, 1971)。以上のように、これまでのドリリン系農薬分解菌のスクリーニングは、効率が非常に悪く、さらにその分解能にも問題があった。ましてや分解菌が集積されていない非汚染土壌から分解菌を分離することは、現状では非現実的である。このような状況を打開して有用な分解菌を得るためには、効率的に有用な好気性ドリリン系農薬分解菌をスクリーニングできる手法の開発が成否を握ると考えられる。

## 1-2 研究目的

以上の課題をうけて、本研究では次の 2 点を研究目的とした。

## 好気性ドリン系農薬分解菌の効率的なスクリーニング手法の開発

多様な微生物が存在する土壌から有用な好気性ドリン系農薬分解菌を選択的かつ短時間でスクリーニングできる手法を開発することを第1の目的とした。

## 新規ドリン系農薬分解菌の獲得

この新たに開発したスクリーニング手法を用いて土壌から新たなドリン系農薬分解菌を獲得することを第2の目的とした。これは、非常に知見の少ない好気性のドリン系農薬分解菌の研究に貢献する意味において、また、本研究において開発したスクリーニング方法を評価する意味においても重要であるという考えに基づいて取り組むものである。

### 1-3 研究目的の解決に向けての戦略

第1の研究目的であるスクリーニング手法の開発にあたり、ドリン系農薬の類似構造物質（以下、アナログ物質）を資化する微生物がドリン系農薬を分解できるのではないかと、という仮説をおいた。

POPs のなかでも PCB やダイオキシン類の好気性分解菌は、それらのアナログ物質の資化菌の中から見出されている (Ahmed and Focht, 1973; Klecka and Gibson, 1980; Wittich *et al.*, 1992)。ドリン系農薬の好気性分解菌についても同様のことが考えられるが、過去にドリン系農薬のアナログ物質資化菌に着目して分解菌をスクリーニングした例はない。このような資化菌がドリン系農薬分解菌として有用であるならば、アナログ物質を基質として利用することで、効率的に有用な分解菌が分離可能になると考えられるため、これを探求する。

第2の研究目的に対して、分解菌の分離源に着目し、ドリン系農薬で汚染されていない非汚染土壌が分解菌の新たな分離源となりえるかを検証した。

好気性ドリン系農薬分解菌の分離源は、ほとんどが高濃度のドリン系農薬で汚染した土壌であった。これは汚染土壌中には分解菌が集積していると考えられていたためであるが、その結果として分離できた分解菌の数は少なく、分離源として本当に汚染土壌が最適であるのか疑問が残る。したがって、新規に分解菌を分離するためには、スクリーニング手法の開発だけでなく、新しい分離源の開拓も必要である。また、汚染土壌中の微生物多様性は非汚染土壌に比べて大幅に低下することも報告されており (Kozdroj and van Elsas,

2001; Gans *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006), 新規分離源として高い微生物多様性を保有する非汚染土壌が大きな可能性を秘めていると考えた。したがって、非汚染土壌にもドリリン系農薬に対して分解活性を有するものがあり、かつ分解菌の効率的なスクリーニング方法が開発できるならば、非汚染土壌までを分離源として扱うことは有効なのではないかと考えた。そこで、非汚染土壌がドリリン系農薬分解能を有するかどうかを調べることで、分解菌の存在を確認し、その分解菌分離源としての利用可能性を評価する。

#### 1-4 本論文の構成

本論文の構成を以下に記す。

第2章では、スクリーニング法開発の前段階として、ドリリン系農薬分解菌を有する土壌の探索をおこなった。その際に、微生物の多様性の観点から、非汚染土壌がドリリン系農薬分解菌の分離源として有用かを検証した。

第3章では、第2章で明らかとなった分解菌を有する土壌を分離源として、分解菌を効率的に分離培養できる方法の開発に取り組んだ。

第4章では、第3章で獲得したドリリン系農薬分解菌群の中から、ドリリン系農薬分解活性を有する分解菌を分離し、その分離や分解特性について調べた結果を記述した。

第5章では、全体の総論的総括をおこなった。

## 第 1 章の引用文献

- Ahmed M, Focht DD, Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. Can J Microbiol 19: 47-52 (1973)
- Ahn JH, Kim MS, Kim MC, Lim JS, Lee GT, Yun JK, Kim T, Kim T, Ka JO, Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbon. J Microbiol Biotech 16: 704-715 (2006)
- Baczynski TP, Grotenhuis T, Knipscheer P, The dechlorination of cyclodiene pesticides by methanogenic granular sludge. Chemosphere 55:653–659 (2004)
- Chiu CT, Yen JH, Hsieh YN, Wang YS, Reductive transformation of dieldrin under anaerobic sediment culture. Chemosphere 60: 1182-1189 (2005)
- 土壤環境センター，平成 17 年度環境省請負業務 POPs 廃農薬等無害化処理技術検証事業報告書. (2006)
- European food safety authority, Opinion of the scientific panel on plant protection products and their residues on a request from the commission on the risks associated with an increase of the MRL for dieldrin on courgettes. The EFSA Journal 554: 1-48 (2007)
- Gaines TB, Acute toxicity of pesticides. Toxicol Appl Pharm 14: 515-534 (1969)
- Gans J, Wolinsky M, Dunber J, Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309: 1387-1390 (2005)
- Gao HJ, Jiang X, Wang F, Wang DZ, Bian YR, Residual levels and bioaccumulation of chlorinated persistent organic pollutants (POPs) in vegetables from suburb of Nanjing, People's Republic of China. Bull Environ Contam Tox 74: 673-680 (2005)
- Hashimoto Y, Dieldrin residue in the soil and cucumber from agricultural field in Tokyo. J Pestic Sci 30: 397-402 (2005)
- JMPR (Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues), Inventory of IPCS and other WHO pesticide evaluations and summary of toxicological evaluations performed by JMPR through 2006
- 上路雅子，永山敏廣，食品安全性セミナー3 残留農薬. 中央法規出版 (2002)

環境省，残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施計画 (2005)

<http://www.env.go.jp/chemi/pops/plan/all.pdf>

環境省，平成 19 年度環境白書 (2007)

近藤治美，天川映子，佐藤寛，安田和男，大貫憲一，秋葉美智子，金谷和明，多摩地域産きゅうり  
におけるディルドリン検出に関する事例研究．東京都健康安全研究センター研究年報 54,  
132-135 (2003)

厚生省，第 1 章 児童と健康，第 2 節児童の健康はどのように守られているか，6 母乳まで汚染した  
BHC，厚生白書 (1971)

Kleka GM, Gibson DT, Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxins by a *Beijerinckia*  
species. Appl Environ Microbiol 39: 288-296 (1980)

Kozdroj J, van Elsas JD, Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by  
molecular and cytochemical approaches. J Microbiol Methods 43: 197-212 (2001)

Maule A, Plyte S, Quirk AV, Dehalogenation of organochlorine insecticides by mixed anaerobic microbial  
populations. Pestic Biochem Physiol 27:229-236 (1987)

Matsumura F, Boush GM, Dieldrin degradation by soil microorganisms. Science 156:959-961 (1967)

Matsumura F, Khanvilkar VG, Patil KC, Boush GM, Metabolism of endrin by certain soil microorganisms. J  
Agr Food Chem 19:27-31 (1971)

農林水産省，埋設農薬等の管理状況等に係る調査の結果について (2008)

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouyaku/080729.html>

大谷卓，農薬の土壌残留と作物吸収抑制技術，農業技術大系・土壌施肥編 2007 年度版（追録第 19  
号）土壌と活用VI: 32 の 19 の 2-12 (2008)

高木和広，POPs 汚染土壌のバイオレメディエーション技術の最近の動向，第 8 回有機化学物質研  
究会「農薬由来の POPs による土壌汚染の環境修復に関する最近の動向」37-44 (2008)

田中二良，水生生物と農薬：急性毒性資料編．サイエンティスト社 (1978)

登田美桜, 杉田たき子, 田中敬子, 佐々木史歩, 畝山智香子, 山本都, 森川馨, 各国の食品中残留  
農薬の検出状況に関する調査. Bull Natl Inst Health Sci 125: 51-60 (2007)

東京都立衛生研究所, 内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生態影響データ集 (1999)

植村振作, 河村宏, 辻万千子, 富田重行, 前田静夫, 残留農薬データブック. 三省堂 (1992)

Wittich RM, Wilkes H, Sinnwell V, Francke W, Fortnagel P, Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by  
*Sphingomonas* sp. strain RW1. Appl Environ Microbiol 58: 1005-1010 (1992)



## 第2章 非汚染土壌のPOPs 農薬分解菌分離源と しての利用可能性の検証

---

## 本章の要旨

本章では、非汚染土壌が POPs 農薬分解微生物の新規分離源となりえるかを土壌マイクロコズム試験により評価した結果について論じる。

POPs 農薬のなかでもディルドリンおよびエンドリンを主対象に、非汚染土壌からなる 4 種のマイクロコズムにおける、それらの残留率を追跡した。

結果、森林土壌マイクロコズムにおいて、ドリ系農薬の迅速な分解が確認された。また、本土壌マイクロコズムは、HCH 類やアルドリ系に対して分解能を有していた。

以上の結果より、非汚染土壌が POPs 農薬についての分解菌の新たな分離源となりえることを明らかにした。本結果は、ドリ系農薬のバイオレメディエーション研究における非汚染土壌の有用性をはじめて報告したものである。

## 2-1 研究の背景と目的

POPs 農薬による低濃度汚染環境の浄化技術として、微生物を利用するバイオレメディエーションに期待が寄せられている。実際に POPs 農薬汚染が問題となっている環境としては、POPs 農薬を散布していた畑土壌などの好気的環境や埋設地周辺の深層土壌などの嫌気的環境が挙げられる。

POPs 農薬を分解する嫌気性微生物としては、底質等由来の集積培養菌群 (Maule *et al.*, 1987; Chiu *et al.*, 2004; Chiu *et al.*, 2005) やメタングラニュール汚泥中の微生物群集 (van Eekert *et al.*, 1998; Baczynski *et al.*, 2004) 等、脱塩素化活性を有するものが多種報告されている。

一方、POPs 農薬の好気性分解菌に関する知見は、その分解の困難さから非常に少なく、現時点において有用な分解菌はほとんど取得されていない。

過去の好気性分解菌に関する研究では、有害物質で汚染された環境試料にはその物質に対する分解菌が集積するという事実および仮定に基づき、高濃度の POPs 農薬で汚染された土壌等が分解菌の分離源として精力的に用いられてきた (Khan, 1980)。しかしながら、POPs 農薬のなかでも、特にディルドリンおよびエンドリンについては分解能を示す微生物はほとんど取得することができず、取得された微生物についても必ずしも分解対象物質

の毒性を低くするという本来の目的に合致するものではなかった。例えば、ドリリン系農薬の高濃度汚染土壌から分離した好気性分解菌は、ディルドリンを *trans*-ジオール体 (Kodous and Matsumura, 1982) のような毒性の低い物質へ変換する割合が低い、あるいは、ディルドリンおよびエンドリンからフォトディルドリン (Georgackis and Khan, 1971) およびケトエンドリン (Bedford *et al.*, 1975) のような毒性の高い代謝物を生成する、などの問題を有していた (Matsumura and Boush, 1967; Matsumura *et al.*, 1971)。このため、ドリリン系農薬のバイオレメディエーションの実現には、新規分解菌の取得が命題とされている。

近年、非汚染土壌が汚染土壌と比較して、はるかに多様な細菌相を有していることが報告されている。例えば、重金属汚染土壌を対象に細菌種の数进行推定したところ、汚染土壌と非汚染土壌の間で細菌数はほとんど変わらなかったにもかかわらず、汚染土壌の細菌種数は非汚染土壌よりも 99.9% も減少していたことが報告されている (Gans *et al.*, 2005)。また、重金属に限らず、農薬やディーゼル油で汚染した土壌においても同様に、汚染土壌では細菌種の多様性が大幅に低下していたことが報告されている (Kozdroj and van Elsas, 2001; Ahn *et al.*, 2006)。

これまでは、非汚染土壌中には分解菌が存在していたとしても集積されていないことから、そこから分解菌を取得することは非効率として、非汚染土壌は分離源の対象にはされてこなかった。しかしながら、上記の多様性に関する報告は、非汚染土壌中には多様な細菌が存在すること、すなわち、これまでに取得されていないものも含めた多様な分解菌が生息している可能性があることを推測させる。

以上の知見ならびに推測から、私は微生物分離源として非汚染土壌に着目し、より幅広い土壌中の多様な微生物に目を向けることで、有用な新規分解菌の存在を見出せないかと考えた。

本章では、好気性 POPs 農薬分解菌を探索する前段階として、非汚染土壌が分解菌の分離源となりえるかを評価することを目的とした。具体的には、非汚染土壌に POPs 農薬を添加した土壌マイクロコズムを作製し、その中での POPs 農薬残留率の経時的变化や細菌相の解析結果から、分解菌の分離源としての非汚染土壌の利用可能性を評価・考察した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 対象とした POPs 農薬

本研究では，POPs 農薬のなかでも，ディルドリンおよびエンドリンを対象に，非汚染土壌の分解菌の分離源としての利用可能性を評価した。また，一部の土壌については，HCH 類（ $\alpha$ -HCH， $\beta$ -HCH，および  $\gamma$ -HCH）やアルドリンについての分解特性もあわせて評価した。対象とした 6 種の POPs 農薬の構造式を Fig. 2-1 に示す。

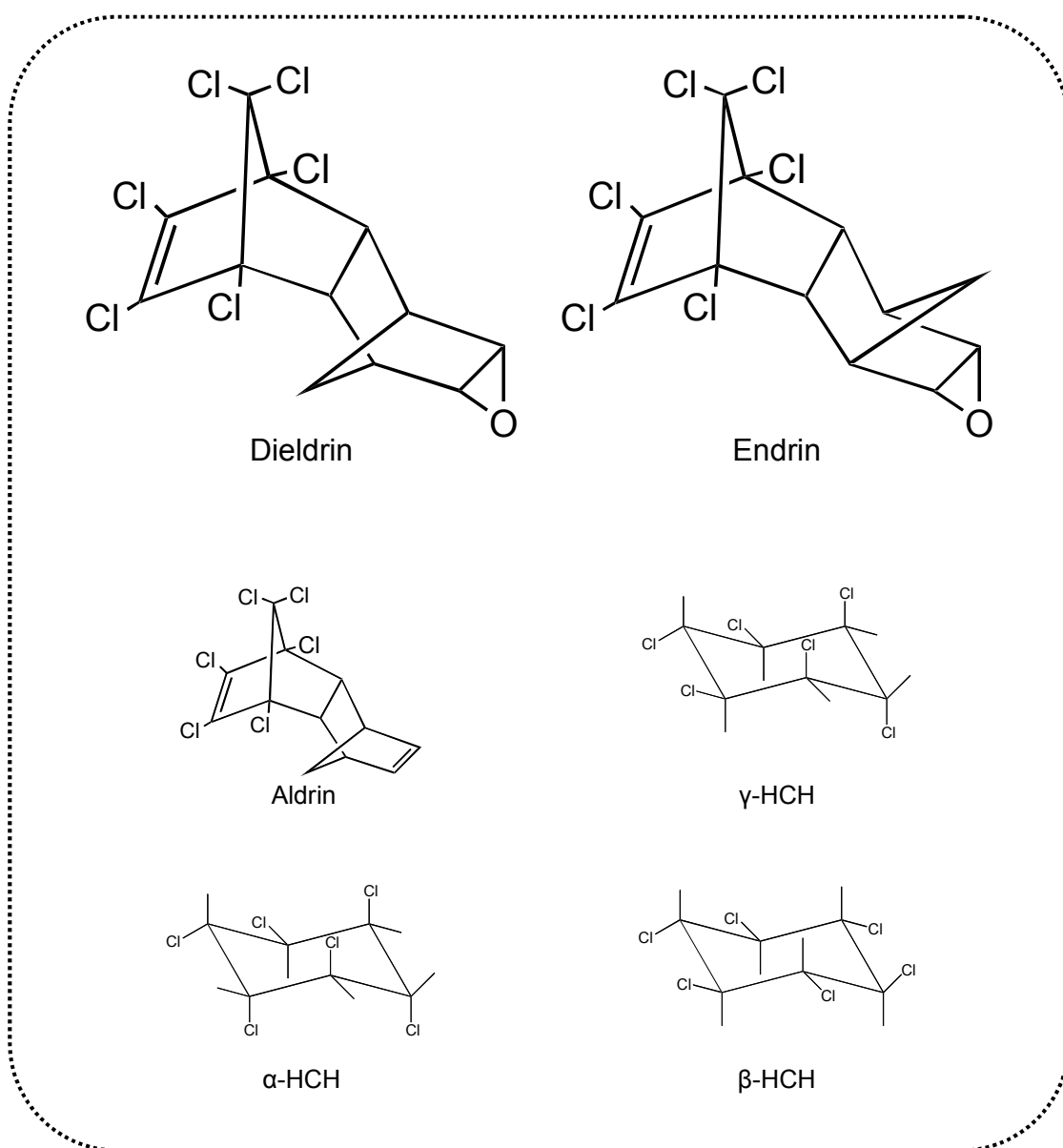


Fig. 2-1 Structural formulas of target POPs pesticides.

## 2-2-2 試薬

POPs 農薬は、Dr. Ehrenstorfer GmbH 製を用いた。分析用溶媒であるアセトンおよびヘキサンについては残留農薬試験用（和光純薬工業製）を用いた。GC/MS 分析用の内部標準物質には、フルオランテン-d<sub>10</sub>（和光純薬工業製）を用いた。その他の試薬ならびに溶媒については特級グレードもしくはそれと同等のものをを用いた。

## 2-2-3 土壌試料

土壌試料は、畑土壌 3 種類と森林土壌 1 種類である。畑土壌 1 は兵庫県豊岡市岩井のブドウ畑土壌，畑土壌 2 は兵庫県豊岡市日高町赤崎のキャベツ畑土壌，畑土壌 3 は兵庫県福知山市夜久野町の茶畑土壌，森林土壌は東京都三鷹市の土壌である。これらの土壌は，POPs 農薬の散布履歴がなく，ディルドリンおよびエンドリンは，いずれの土壌からも検出されないことを確認した。これらの土壌は，表層 5～15 cm から採取した後，未風乾のまま 2 mm メッシュの篩にかけ，使用するまでの期間，20℃，暗条件にて静置保存した。水分含量は，105℃で 1 日乾燥させたときの減量を水分として計算した。pH は，乾土 10 g 相当量に対し，蒸留水または 1 M KCl を 25 mL 加え，振り混ぜてから 1 時間以上放置後，ガラス電極 pH 計（TOA 社製，HM-35V）で測定した。強熱減量は，105℃で乾燥した土壌試料を 375℃で 16 時間強熱させたときの減少質量を乾燥土の質量に対する百分率として計算した。強熱温度および時間は，土壌中の有機物量の測定に適すると報告のある条件を採用した（Ball, 1964）。EC は，乾土 10 g 相当量の未風乾土に，乾土に対する水の比が 1:5 となるように蒸留水を添加し，1 時間振とう後，懸濁液の EC 値を電気伝導率計（TOA 社製，CM-5S）で測定した。菌数は，蛍光染色により直接計数した。土壌を滅菌水で 100 倍希釈してホモジナイザーで分散させ，中性ホルマリンを 2% 添加した。固定液をヌクレオポアフィルター（ミリポア社製，孔径 0.2 μm，黒色）にろ過捕集し，エチジウムブロミド溶液で染色後，菌数を蛍光顕微鏡（オリンパス社製，BX51 落射蛍光システム）で計測した。腐植は乾式燃焼法（Yanaco 社製，MT-700）により測定した。その他の土壌分析は，土壌環境分析法（土壌環境分析法編集委員会，1997）に従いおこなった。マイクロコズム試験で用いた土壌試料の特性値を Table 2-1 にまとめて示す。

Table 2-1 Physical, chemical, and biological characteristics of soil samples

Soil	Water content	% LOI <sup>a</sup>	pH(H <sub>2</sub> O)	pH(KCl)	EC	NH <sub>4</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	Available phosphate	Exch. K	Exch. Ca	Exch. Mg	CEC	Humus	No. of bacteria <sup>b</sup>
	(wt%-wet)	(wt%-dry)			(mS cm <sup>-1</sup> )	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	(me/100g)	(%)	(g <sup>-1</sup> dry wt)
Field soil 1	15.1	4.3	6.6	5.7	0.2	1.07	17.79	136.6	77.1	348.6	54.4	16.98	4.36	1.42×10 <sup>9</sup>
Field soil 2	19.5	5.8	6.0	4.8	0.1	0.21	4.58	62.9	61.0	275.1	38.3	15.62	2.81	1.62×10 <sup>9</sup>
Field soil 3	36.5	21.6	3.8	3.4	0.1	0.25	26.49	32.0	41.5	33.2	9.3	38.35	15.79	4.02×10 <sup>9</sup>
Forest soil	45.9	34.4	5.1	4.4	0.1	0.47	71.86	1.8	10.7	268.7	38.7	45.17	19.87	2.00×10 <sup>10</sup>

<sup>a</sup> LOI: Loss on ignition, determined at 375°C for 16 h.

<sup>b</sup> Total numbers of bacteria were measured by ethidium bromide staining.

#### 2-2-4 土壌マイクロコズムの調製

非汚染土壌が POPs 農薬分解菌の新たな分離源となりえるかを検証するため、各土壌試料についてドリリン系農薬を添加した土壌マイクロコズムを調製し、ドリリン系農薬残留量の変化を追跡した。土壌マイクロコズムの調製はドラフトにておこなった。1 g (乾土) のオートクレーブ処理土壌を 500 mL 容のメディウム瓶に加えた。この土壌は、農薬のメディウム瓶への付着を防ぐためのものである。そこへ、ドリリン系農薬 100  $\mu$ L (アセトン溶液、各 1 mg/mL) を添加した。目視によってアセトンが完全に揮発することを確認するまで、メディウム瓶のふたを開けたまま放置した。メディウム瓶に、99 g (乾土) の非オートクレーブ処理土壌を数回に分けて添加し、滅菌スパーテルを用いてよく混合した。このような調製により、ドリリン系農薬濃度が各 1 mg/kg となる土壌マイクロコズムを準備した。メディウム瓶はテフロン加工された蓋で密閉し、暗条件、25  $^{\circ}$ C に保たれたインキュベーター内で 30 週間静置培養した。メディウム瓶内の好気的環境を維持するため、1~2 週間おきにメディウム瓶の蓋を開けて空気曝気をおこなった。対照の土壌マイクロコズムとして、120  $^{\circ}$ C で 1 時間のオートクレーブ処理を 1 日に 1 回、連続して 3 日間おこなった土壌を用いて、上記と同様に調製したものを用意した。各土壌マイクロコズムからの土壌採取は、培養開始時、3, 7, 14, および 30 週目におこなった。土壌マイクロコズムの写真を Fig. 2-2 に示す。

森林土壌については、 $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, およびアルドリンを添加した土壌マイクロコズムも上記と同様に調製し、各農薬の残留量の変化を追跡した。



Fig. 2-2 The soil microcosms prepared for degradation assays of POPs pesticides.



### 2-2-5 土壌マイクロコズム試料からの POPs 農薬の抽出

土壌試料からの POPs 農薬の抽出には超音波抽出法を用いた。試料 0.5 g (乾土) を 10 mL 遠沈管に採取し、これにアセトン 3 mL を加え、超音波発生装置 (発振周波数 28 kHz, 45 kHz, 100 kHz, 本多電子製) に 10 分間かけた。抽出液は、遠心分離機 (小型卓上遠心機 H-18, コクサン製) に 10 分間 (3000 rpm) かけ、溶液部を別の 10 mL 遠沈管に移した。本抽出操作を合計 3 回行い、溶液をあわせた。混合した溶液は、窒素ガス吹き付けにより 1 mL 程度まで濃縮した。濃縮液に、5% NaCl 水溶液を 5 mL、および内部標準 (フルオランテン-d<sub>10</sub>) 入りヘキサン 2 mL を加えた後、2 分間振とうした。本溶液を遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) した後、ヘキサン層の一部を無水硫酸ナトリウムで脱水し、GC/MS 分析用の検液とした。各土壌マイクロコズム試料からのドリノ系農薬の抽出は 5 連、HCHs およびアルドリノの抽出は 3 連でおこなった。POPs 農薬分解活性は、土壌マイクロコズム中の POPs 農薬残留量をオートクレーブ土壌マイクロコズム中の残留量と比較することで評価した。

### 2-2-6 GC/MS 分析条件

GC/MS は Agilent 製の HP6890/HP5973N を、分離カラムには Agilent 製の DB5-MS (0.25 mm i.d. × 30 m) を用いた。GC/MS における分析条件の詳細は Table 2-2 に示したとおりである。

Table 2-2 Operating conditions for GC/MS

<b>GC</b>	HP6890 (Agilent)
Column	DB5-MS ( 0.25 mm i.d.×30 m, Agilent)
Carrier gas	He
Oven temperature	40 °C(1 min) → 10 °C /min → 310 °C (5 min)
Injection mode	Splitless
Injection volume	1 µL
Injector temperature	280 °C
<b>MS</b>	HP5973 (Agilent)
Ionization mode	EI
Monitoring ion	Dieldrin 79(263), Endrin 81(263), Aldrin 263(154), HCHs 181(219)
Ion source temperature	230 °C

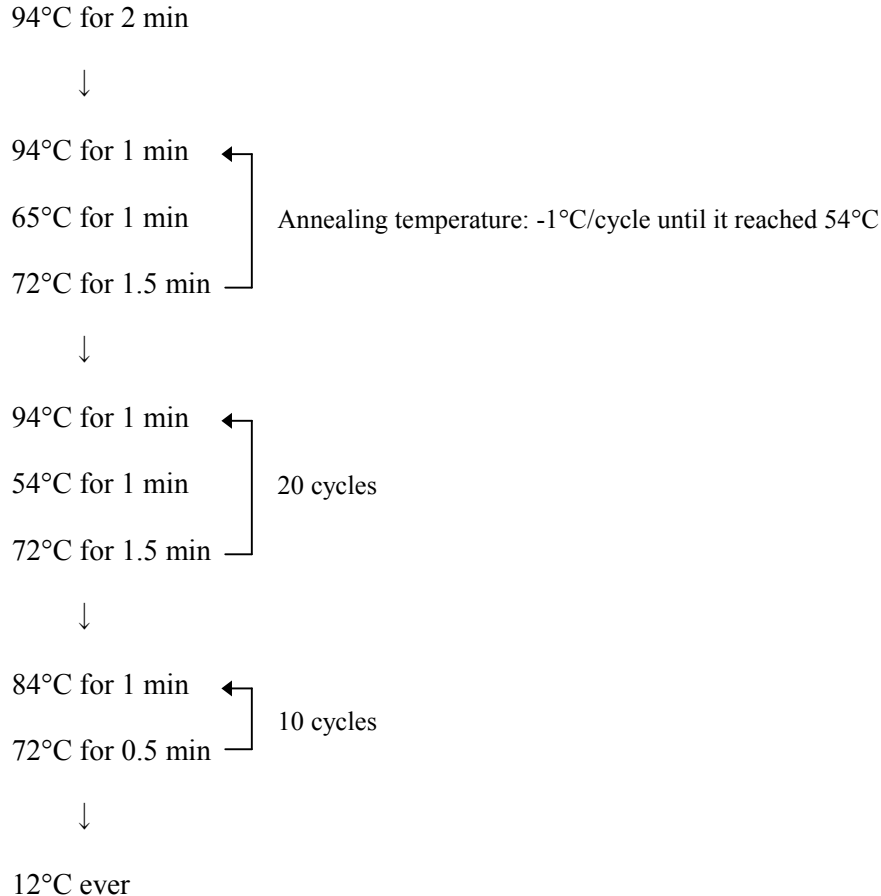
## 2-2-7 土壌 DNA の抽出ならびに PCR-DGGE 解析

土壌 DNA の抽出は、0.5 g (湿土) の各土壌試料から ISOIL for Beads Beading (Nippon gene 製) を用い、抽出バッファーにスキムミルクを添加しておこなった (Hoshino *et al.*, 2004)。抽出した土壌 DNA の濃度および純度は、吸光度測定およびアガロースゲル電気泳動により確認した。

土壌マイクロコズム中の微生物群集構造の特徴を把握するため、細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析をおこなった。16S rRNA 遺伝子の PCR は、GC クランプ付きプライマー 357F (5'-cgc cgg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg gggg cct acg gga ggc agc ag-3' ; 下線部は GC クランプに相当) と 518R (5'-att acc gcg gct gct gg-3') を用いて、大腸菌の rRNA 位置で 341 番目から 537 番目に相当し、遺伝子変異が多いとされる V3 領域を増幅した (Muyzer *et al.*, 1993)。PCR 反応液は、以下の組成とした。

土壌 DNA	50 ng
10× <i>Ex Taq</i> budfer	10 µL
dNTP mixture (2.5 mM each)	8 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6 µL
10 µM each primer	2 µL
Bovine serum albumin	10 µg
<i>Ex Taq</i> DNA polymerase (Takara Bio)	10 units
滅菌水	61 µL
<hr/>	
Total	100 µL

サーマルサイクラーは、MJ Research 製の PTC-200 を用いた。PCR 増幅は、以下の Touchdown プログラムで実施した ;



環境試料から直接抽出した DNA を鋳型とした微生物群集構造解析手法において、PCR サイクル数が多くなると、2 種類以上の遺伝子が混合された配列 (chimera) や異種遺伝子間の 2 本鎖 (heteroduplex) が生成しやすくなるという問題点が指摘されている (Kanagawa, 2003)。そこで、chimera や heteroduplex の解消を目的として、PCR のサイクル数を 20 サイクルと少なくするだけでなく、PCR の最後の段階で、熱変性ステップ (84°C) と再会合ステップ (72°C) を 10 サイクル繰り返す Reconditioning cycle をおこなった (野田ら, 2004)。

DGGE は、Muyzer らによって報告されている標準的な方法で実施した (Muyzer *et al.*, 1993)。DGGE 装置は、D-Code system (Bio-Rad 製) を用いた。DGGE で用いるゲルは、変性剤としてホルムアミドと尿素を含むポリアクリルアミドゲルで、解析する 2 本鎖 DNA サンプルのサイズおよび多様性に応じて、アクリルアミド濃度および変性剤の濃度勾配を変えることが可能である。本試験では、8%アクリルアミド濃度で変性剤の濃度勾配が 35% から 55%のゲルを作製し、DGGE 解析に用いた。電気泳動は、1×TAE バッファー (20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH8.0) 中で、180 V 電圧下、60°Cで、6 時間泳動し

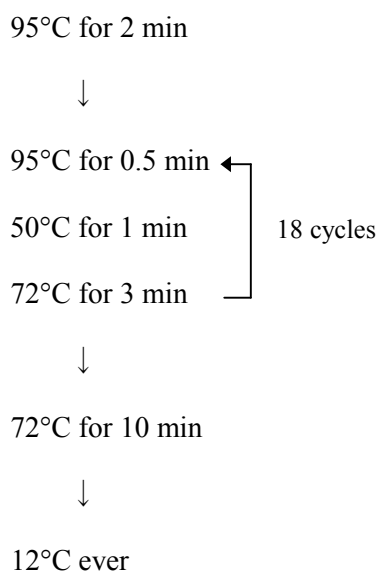
た。泳動後、ゲルは、エチジウムブロミドで染色し、UV トランスイルミネーターで DGGE バンド（DNA 断片）パターンを視覚化し、写真撮影をおこなった。

## 2-2-8 16S rDNA クローン解析

土壌中の細菌種の構成を明らかにするため、土壌 DNA を用いた 16S rDNA クローン解析をおこなった。16S rDNA の PCR は、ユニバーサルプライマーの 27F（5'-aga gtt tga tcm tgg ctc ag -3'）と 1492R（5'-tac ggy tac ctt gtt acg actt-3'）を用いて、大腸菌の rRNA 位置で 8 番目から 1512 番目に相当する約 1500bp を増幅した。PCR 反応液は、以下の組成とした。

土壌 DNA	100 ng
10× <i>Ex Taq</i> buffer	5 µL
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µL
10 µM each primer	5 µL
Bovine serum albumin	5 µg
<i>Ex Taq</i> DNA polymerase (TaKaRa)	5 units
滅菌水	35 µL
<hr/>	
Total	50 µL

PCR は、以下のプログラムで実施した。



PCR 産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN 製) を用いて精製・濃縮した。精製した PCR 産物は、pGEM-T Vector System (Promega 製) を用いてクローニングした。塩基配列の決定は、プライマー357F (5'-cct acg gga ggc agc ag-3') を用いて、96 クローンについておこなった。決定した塩基配列は、BLAST で近縁配列を探索した。塩基配列データは、RDP II の Check Chimera プログラムおよび Bellerophon server を用いてキメラ配列を判別した。キメラ配列を除いた配列データは、CLUSTAL X を用いて配列を整列し、NJ plot を用いて系統樹を作成した。系統樹においてクラスターを形成するクローン群の配列、および BLAST 検索で得られた近縁配列の間で、それぞれ 1 対 1 で BLAST をかけ、97%以上の配列相同性を持つクローン同士を一つの *phylotype* として分類した。

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 非汚染土壌のドリリン系農薬に対する分解能の評価

30 週間好氣的に培養した土壌マイクロコズムにおけるディルドリンおよびエンドリンの残留率の変化をFig. 2-3に示す。対照のオートクレーブ土壌マイクロコズムと比較すると、森林土壌マイクロコズムにおいてディルドリンおよびエンドリン残留率の著しい減少が認められた。培養 30 週間後のドリリン系農薬の土壌中濃度は、培養開始時の濃度に対してディルドリンで 39%，エンドリンで 74%も減少していた。本培養期間において、対照であるオートクレーブ土壌マイクロコズム中ではディルドリンおよびエンドリン濃度の減少は認められなかったことから、森林土壌マイクロコズムにおけるドリリン系農薬の減少は微生物による分解に起因していると考えられた。

ドリリン系農薬の残留率の対数値は、Fig. 2-4に示すように、経時的な直線性を示したことから、本分解は一次反応的に進行していると考えられた。本直線の傾きから森林土壌マイクロコズム中における、それぞれの半減期を推定したところ、ディルドリンでは 150 日、エンドリンでは 70 日という値が得られた。

一般に、ディルドリンおよびエンドリンは土壌中に何年にもわたり残留すると言われていた。WHO (IPCS, 1989 and 1992) によると、温帯土壌におけるディルドリンおよびエンドリンの半減期は、およそ 5 年および 12 年と報告されている。英国ローザムステッド農業試験場の畑土壌においては、ディルドリンの半減期が 25 年程度と算出されている (Meiher *et al.* 2001)。したがって、本マイクロコズム試験に用いた森林土壌中におけるディルドリンおよびエンドリンの分解は極めて早いものと考えられた。

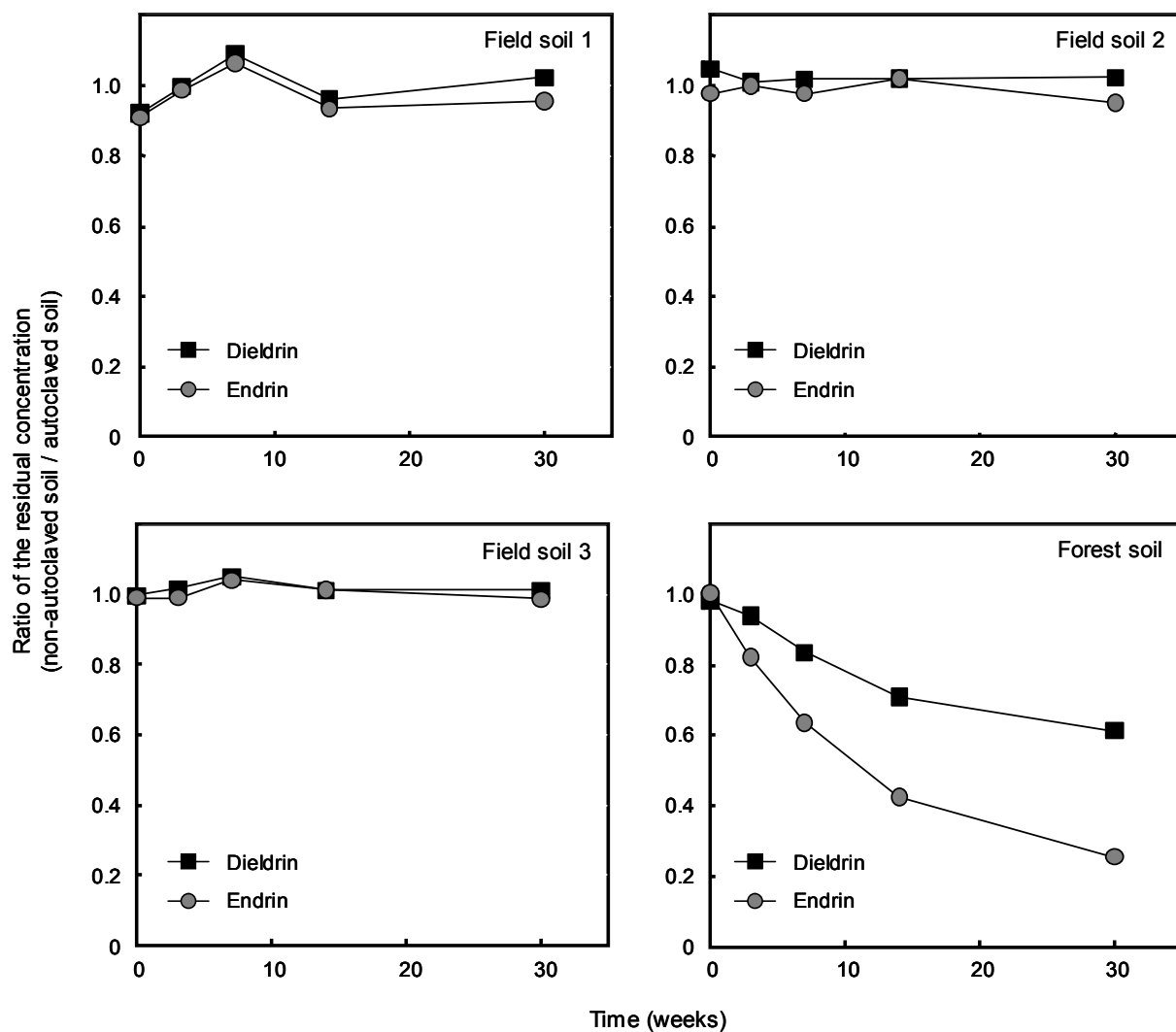


Fig. 2-3 Changes in the concentrations of dieldrin and endrin during 30 weeks of incubation of soil microcosms. Each point represents the ratio of the residual concentration of dieldrin and endrin in non-autoclaved soil to that in autoclaved soil (control).

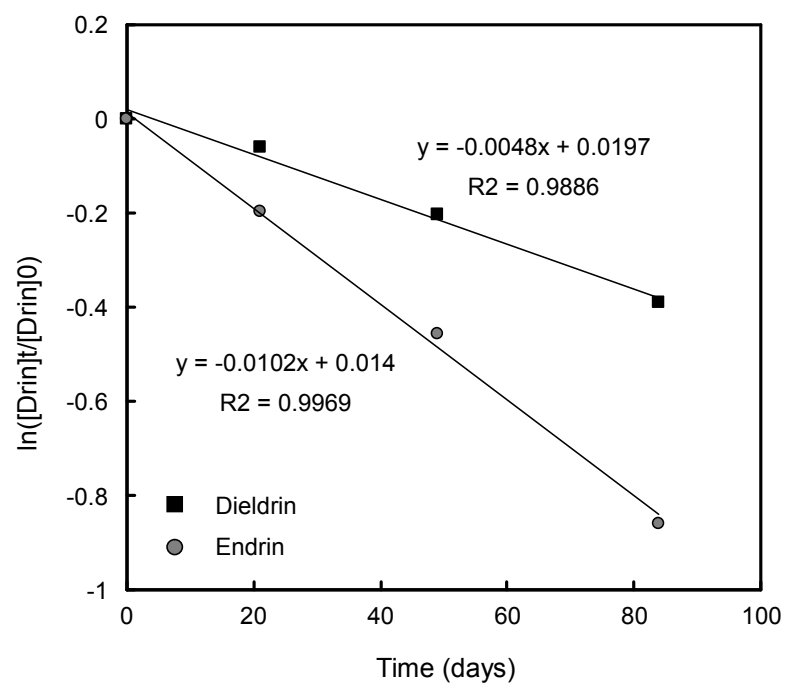


Fig. 2-4 Natural logarithm of concentrations of dieldrin and endrin in the forest soil microcosms.



本研究において森林土壌が示したドリリン系農薬の迅速な好氣的分解は、非汚染土壌中の菌群によるドリリン系農薬の好氣的分解として、はじめて見出されたものである。

これまでの好氣性のドリリン系農薬分解菌に関する研究は、高濃度のドリリン系農薬で汚染された土壌等を分離源として行われてきたが、有用な分解菌の分離には至っていない。

一方、前述したように非汚染土壌は汚染土壌よりも微生物の多様性がはるかに高く、その観点からは、非汚染土壌は、新規分解菌の探索源として優れていると推測される。

非汚染土壌からの有害物質分解菌の取得に関する報告は極めて少ないが、近年、POPs の 1 つである PCB について、汚染された履歴のない土壌や底質中に分解能を有する多様な微生物群集が存在していることが報告されている (Baba *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007)。

これらの知見からもわかるように、本研究で得られた結果は、非汚染土壌がドリリン系農薬をはじめとする POPs 農薬分解菌の分離源として有用であり、大きな利用可能性を秘めていることを期待させるものである。

### 2-3-2 非汚染土壌の HCH 類およびアルドリリンに対する分解能の評価

次に、ドリリン系農薬に対して分解活性を示した本森林土壌が他の POPs 農薬に対しても分解能も持ち合わせているかどうかをマイクロコズム試験により検証した。7 週間にわたり好氣的に培養した森林土壌マイクロコズムにおける  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, およびアルドリリンの残留率を Fig. 2-5 に示す。対照のオートクレーブ土壌マイクロコズムと比較すると、 $\beta$ -HCH を除いた 3 物質において、残留率の著しい減少が認められた。 $\beta$ -HCH については、好氣的環境では、 $\alpha$ -HCH や  $\gamma$ -HCH と比べて、生分解を受けにくいことが報告されており (Phillips *et al.*, 2005), 本研究においても同様の傾向が認められた。一方、培養 7 週間後において、その他の POPs 農薬の土壌中濃度は、 $\alpha$ -HCH で 93%,  $\gamma$ -HCH で 70%, アルドリリンで 55% も減少しており、本森林土壌はドリリン系農薬だけでなく、 $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, およびアルドリリンに対しても好氣性分解菌の分離源となりえることが示唆された。

好氣性 HCH 分解菌は、これまでに HCH 類汚染土壌や  $\gamma$ -HCH 長期連用土壌から取得されており、分解菌の分離源としての汚染土壌の有用性が示唆されてきたが (Senoo and Wada, 1989; Mohn *et al.*, 2006), HCH の散布歴のない土壌を分離源とした HCH 類分解菌の取得については知見が非常に少ない。本研究では、森林土壌のような非汚染土壌においても HCH

類分解菌の存在が示唆されたことから、このような土壌を分離源とすることで、より多様な分解菌の取得が可能となると考えられた。

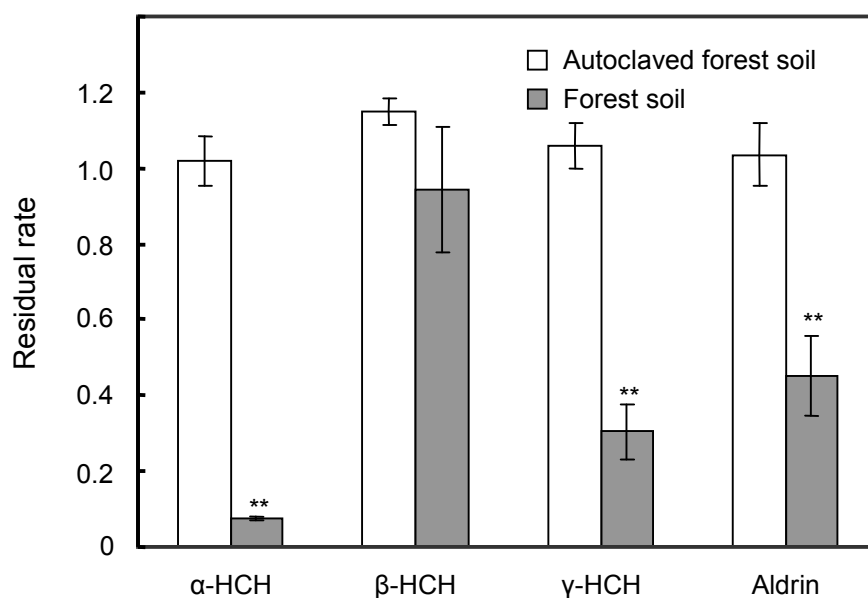


Fig. 2-5 Residual rates of  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, and aldrin in the forest soil microcosms after 7 weeks of incubation. Error bars represent standard deviation (n=3). \*\*Significant differences ( $P < 0.01$ ) by Student's t-test for the degradation efficiency of forest soil microcosms vs. autoclaved forest soil microcosms.

### 2-3-3 分解能を有した森林土壌の菌相解析結果

ドリン系農薬に対して高い分解活性を示した森林土壌（分解試験 30 週目）について、16s rDNA クローン解析を行い、本土壌の細菌相に関する特徴を調べた。

森林土壌における細菌相の門レベルの構成割合をFig. 2-6に示す。本森林土壌からは、*Acidobacteria* ならびに *Proteobacteria* が高頻度に検出され、両者でバクテリアクローン全体の 80%程度を占めていた。*Acidobacteria* は、培養に成功した例が少ないため生理学的情報が非常に少ないが、分子生物学的手法を用いると  $\alpha$ -*Proteobacteria* と共に土壌から数多く検出されることが報告されており、土壌中で重要な役割を果たしていると考えられている (Griffiths *et al.*, 2006)。また、多くの森林土壌において、*Acidobacteria* は優占して存在すると報告されているように (Lim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007)、本研究で用いた森林土壌においても *Acidobacteria* は優占的に存在していた。本研究で用いた森林土壌の細菌相は、門レベルの解析においては特異性は認められず、一般的な森林土壌とほぼ同様の構成であった。

次に、細菌相の詳細な系統解析の結果 (Fig. 2-7, Fig. 2-8) について、これまでのドリン系農薬分解菌に関する報告をもとに考察を試みた。

ドリン系農薬の好気性分解菌としては、*Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属、そして *Aerobacter* 属に分類される菌株が分離されている (Matsumura and Boush, 1967; Wedemeyer, 1968)。なお、*Pseudomonas* 属および *Bacillus* 属の分解菌については、種の同定まではされていない (Matsumura and Boush, 1967)。

森林土壌のクローン解析の結果をこれらと照合すると、本土壌中には *Bacillus* 属に分類される菌株が、わずか1クローン（それも分解菌と同種であるかは不明のもの）確認されたのみであり、*Pseudomonas* 属ならびに *Aerobacter* 属については、属レベルで見ても存在は全く認められなかった。

本結果は、森林土壌において、これまでに報告のない好気性ドリン系農薬分解菌が存在している可能性、すなわち非汚染土壌がドリン系農薬分解菌の新規分離源となりえることを示唆している。

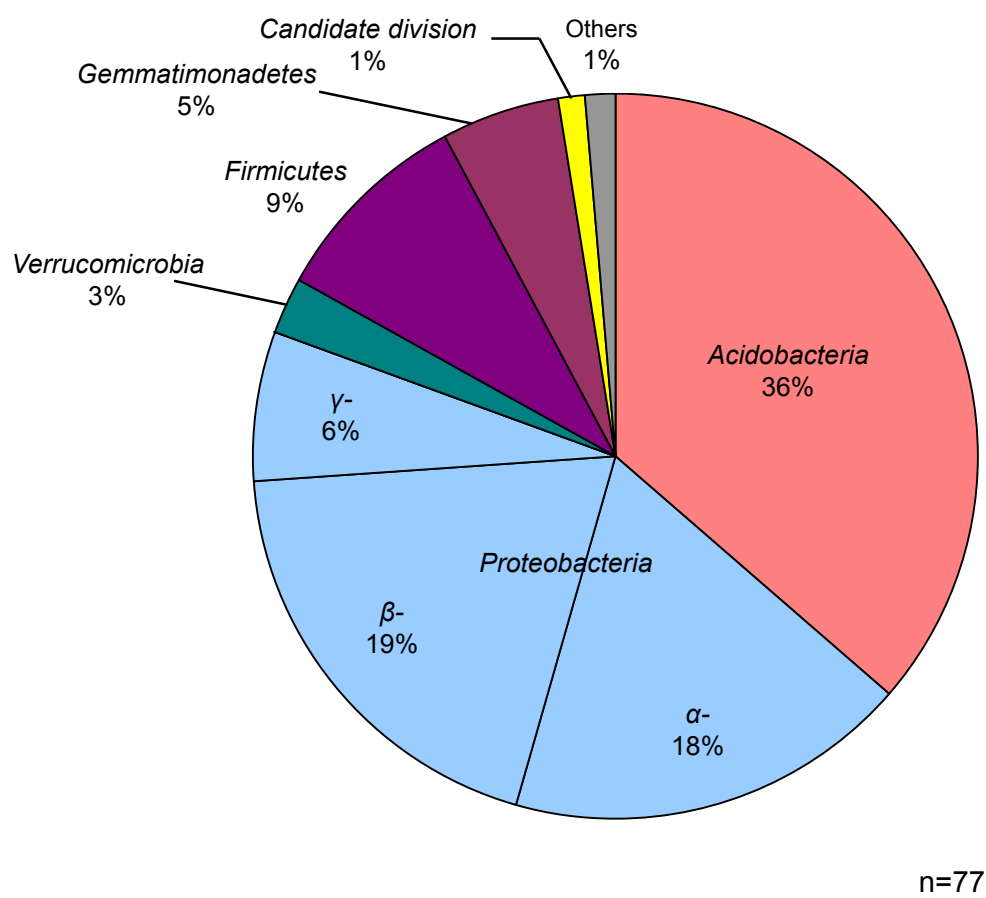


Fig. 2-6 Distribution of various divisions obtained from the 16S rRNA gene partial clone sequences for the forest soil sample.

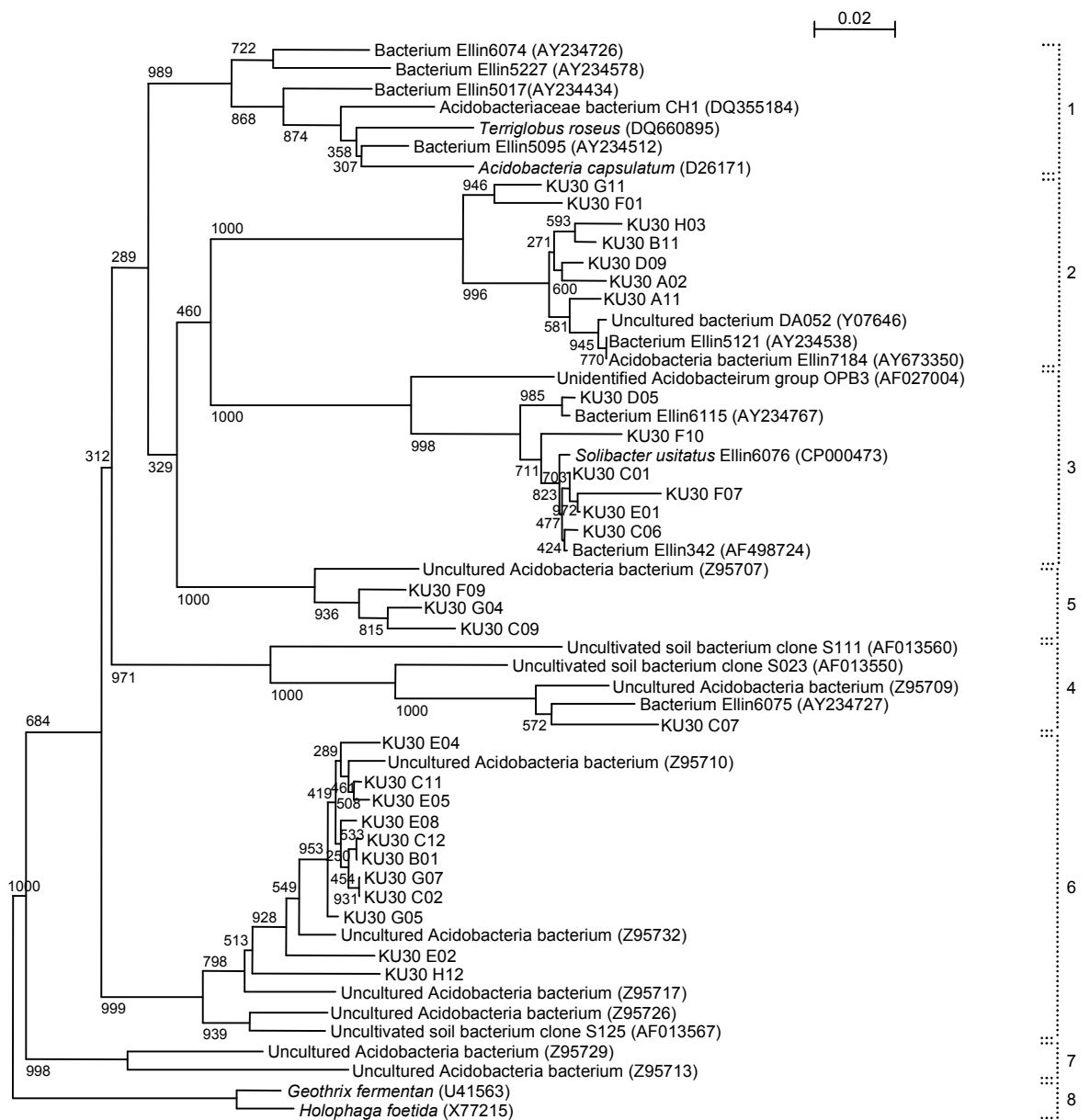


Fig. 2-7 Phylogenetic dendrogram representing the analysis of recovered rRNA sequences affiliated with the *Acidobacteria* division from the forest soil. Bootstrap values are shown for each node. The scale bar indicates 0.02 change per nucleotide. Brackets at the right of the tree indicate subdivisions.



#### 2-3-4 PCR-DGGE 法による細菌群集構造の変化の解析

ドリリン系農薬に対して分解活性を示した森林土壌マイクロコズムについて、それらの分解に伴う細菌相の変化を PCR-DGGE 法により調べた結果をFig. 2-9に示す。なお、本研究では好気性の細菌類に焦点を当てているため、菌類についての解析結果ならびに考察については Appendix に載せるにとどめる。

DGGE の結果からは、ドリリン系農薬未添加系マイクロコズムだけでなく、添加系マイクロコズムにおいても経時的なバンドパターンの変化は認められなかった。すなわち、本森林土壌マイクロコズムにおけるドリリン系農薬の分解はマイクロコズム中の細菌相を大きく変化させるほどのものではなかった。

多種多様な細菌類が生息する非汚染土壌中においては、土壌中に存在する有機物質の中でも分解速度が相対的に極めて小さい POPs のような化学物質に対しての分解菌の経時的変化は軽微なものであり、DGGE 法によってその変化を検出する、すなわち分解菌を推定することは困難と考えられた。

また、本結果は、分解活性がみられた土壌においても、分解菌は必ずしも集積されていないことを示唆しており、非汚染土壌を分解菌の新規分離源として利用するには、そこからの分解菌の効率良い分離方法をあわせて開発する必要があることを強く示唆している。

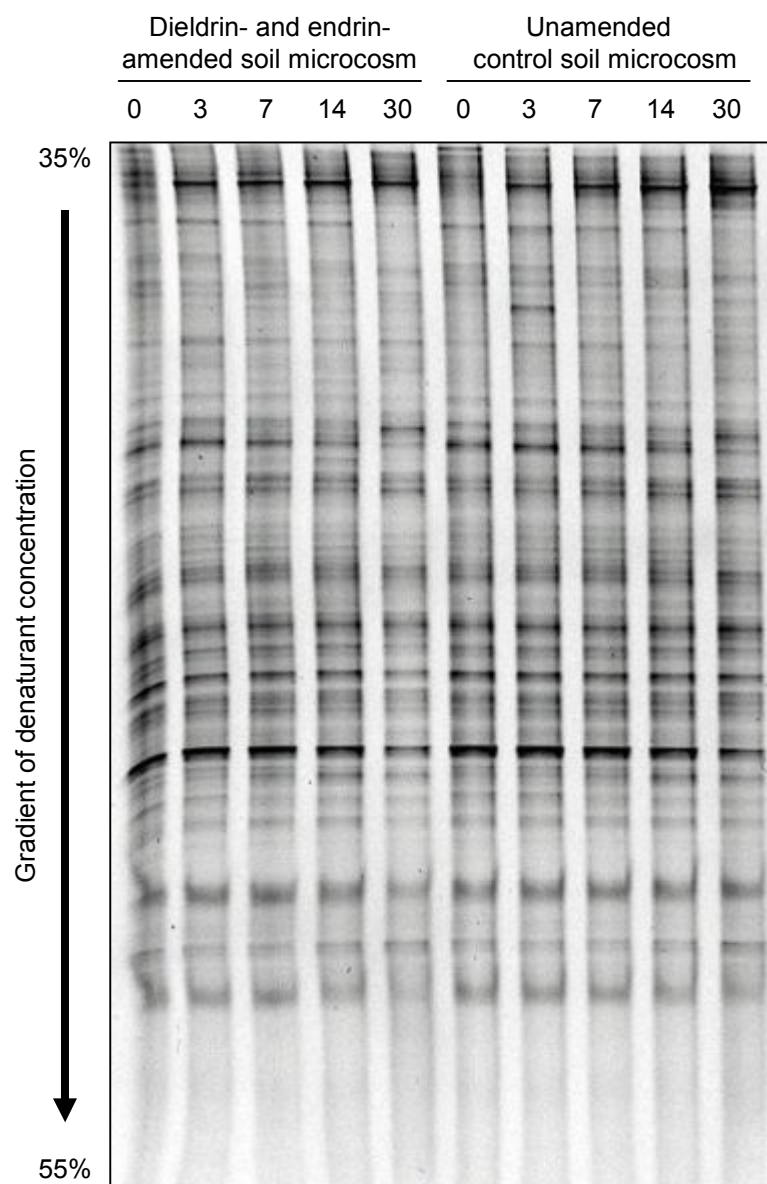


Fig. 2-9 DGGE profiles of PCR-amplified 16S rRNA fragments of dieldrin- and endrin-amended forest soil microorganism and unamended forest soil microorganism at 0, 3, 7, 14, and 30 weeks of incubation.



## 2-4 結論

本章では、非汚染土壌が POPs 農薬分解菌、とりわけドリリン系農薬分解菌の分離源となりえるかということ、複数の非汚染土壌マイクロコズムを用いた分解試験の結果より論じた。本試験は、非汚染土壌が汚染土壌と比較して細菌相の多様性が高いため、これまでに検出・分離されていない分解菌が非汚染土壌中には存在するのではないか、という推測に基づいて実施したものである。

結果、POPs 農薬で汚染されていない森林土壌を用いたマイクロコズム中において、ドリリン系農薬の迅速な分解が認められた。本土壌は、30 週間で、ディルドリンを 39%、エンドリリンを 74% も分解する能力を有していた。これは、ドリリン系農薬の土壌中における半減期から考えると、非常に高い分解能である。さらに、本土壌は、HCH 類やアルドリリンに対しても高い分解能を有していることが確認された。

また、クローン解析の結果から、本非汚染土壌中には、これまでに取得されていない好気性分解菌が存在していることが示唆された。

以上の結果より、非汚染土壌は、POPs 農薬分解菌の新規分離源として大きな可能性を秘めていると考えられた。

一方、本土壌マイクロコズムの DGGE 解析においては、ドリリン系農薬の分解に伴うバンドパターンの変化は認められず、ドリリン系農薬の分解はマイクロコズム中の細菌相を大きく変化させるようなものではなかった。

これは、分解活性がみられた土壌においても、分解菌は必ずしも集積されていないことを意味しており、多種多様な微生物を有する非汚染土壌を分解菌の新規分離源として用いるには、そこからの分解菌の効率良い分離方法を開発することが必須であると考えられた。

次章では、本章の知見を受けて、ドリリン系農薬分解菌を土壌から選択的に培養する方法を検討した結果について論じる。

## 第 2 章の引用文献

- Ahn JH, Kim MS, Kim MC, Lim JS, Lee GT, Yun JK, Kim T, Kim T, Ka JO, Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbon. *J Microbiol Biotech* 16: 704-715 (2006)
- Baba D, Yasuta T, Yoshida N, Kimura Y, Miyake K, Inoue Y, Toyota K, Katayama A, Anaerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls by a microbial consortium originated from uncontaminated paddy soil. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1627–1636 (2007)
- Baczynski TP, Grotenhuis T, Knipscheer P, The dechlorination of cyclodiene pesticides by methanogenic granular sludge. *Chemosphere* 55:653–659 (2004)
- Ball DF, Loss-on-ignition as an estimate of organic matter and organic carbon in non-calcareous soils. *European journal of soil science* 15: 84-92 (1964)
- Bedford CT, Huston DH, Natoff IL, The acute toxicity of endrin and its metabolites to rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 33: 115-121 (1975)
- Chiu CT, Yen JH, Liu TL, Wang YS, Anaerobic degradation of organochlorine pesticides DDT and heptachlor in river sediment of Taiwan. *Bull Environ Contam Toxicol* 72: 821–828 (2004)
- Chiu CT, Yen JH, Hsieh YN, Wang YS, Reductive transformation of dieldrin under anaerobic sediment culture. *Chemosphere* 60: 1182-1189 (2005)
- 土壤環境分析法編集委員会, 土壤環境分析法, 博友社 (1997)
- Gans J, Wolinsky M, Dunber J, Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-1390 (2005)
- Georgacakis E, Khan MAQ, Toxicity of the photoisomers of cyclodiene insecticides to freshwater animals. *Nature* 233: 120-121 (1971)
- Griffiths RI, Bailey MJ, McNamara NP, Whiteley AS, The functions and components of the Sourhope soil microbiota. *Appl Soil Ecol* 33: 114-126 (2006)
- Hoshino YT, Matsumoto N, An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes Environ* 19: 13-19 (2004)

- Kadous AA, Matsumura F, Toxicity of dieldrin, photodieldrin, and endrin in the cockroach. *Arch Environ Contam Toxicol* 11: 635-643 (1982)
- Kanagawa T, Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reaction (PCR). *Journal of bioscience and bioengineering* 96: 317-323 (2003)
- Khan SU, Pesticides in the soil environment. Elsevier, Amsterdam (1980)
- Kim JS, Sparovek G, Longo RM, de Melo WJ, Crowley D, Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. *Soil Biol Biochem* 39: 684-690 (2007)
- Kozdroj J, van Elsas JD, Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J Microbiol Methods* 43: 197-212 (2001)
- Lim HK, Chung EJ, Kim JC, Choi GJ, Jang KS, Chung YR, Cho KY, Lee SW, Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71: 7768-7777 (2005)
- Macedo AJ, Timmis KN, Abraham WR, Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination. *Environ Microbiol* 9:1890–1897 (2007)
- Matsumura F, Boush GM, Dieldrin degradation by soil microorganisms. *Science* 156:959–961 (1967)
- Matsumura F, Khanvilkar VG, Patil KC, Boush GM, Metabolism of endrin by certain soil microorganisms. *J Agr Food Chem* 19:27–31 (1971)
- Maule A, Plyte S, Quirk AV, Dehalogenation of organochlorine insecticides by mixed anaerobic microbial populations. *Pestic Biochem Physiol* 27:229–236 (1987)
- Meijer SN, Halsall CJ, Harner T, Peters AJ, Ockenden WA, Jonston AE, Jones KC, Organochlorine pesticide residues in UK soils. *Environ Sci Technol* 35: 1989-1995 (2001)
- Mohn WW, Mertens B, Neufeld JD, Verstraete W, de Lorenzo V, Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane-degrading bacteria in soils from Spain. *Environ Microbiol* 8: 60-68 (2006)

- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695-700 (1993)
- 野田尚宏, 鎌形洋一, 金川貴博, 蔵田信也 バルキング原因菌の定量的解析と分子生物学的手法の問題点の解析. 第7回日本水環境学会シンポジウム講演集: 76-77 (2004)
- Phillips TM, Seech AG, Lee H, Trevors JT, Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. Biodegradation 16: 363-392 (2005)
- Senoo K, Wada H, Isolation and identification of an aerobic gamma-HCH-decomposing bacteria from soil. Soil Sci Plant Nutr 35:79-87 (1989)
- van Eekert MHA, van Ras NJP, Mentink GH, Rijnaarts HHM, Stams AJM, Field JA, Schraa G, Anaerobic transformation of  $\beta$ -HCH by methanogenic granular sludge and soil microflora. Environ Sci Technol. 32:3299-3304 (1998)
- Wedemeyer G, Partial hydrolysis of dieldrin by *Aerobacter aerogenes*. Appl Microbiol 16: 661-662 (1968)
- WHO/IPCS, Aldrin and Dieldrin. Environmental Health Criteria 91. Geneva, Switzerland (1989)
- WHO/IPCS, Endrin. Environmental Health Criteria 130 Geneva, Switzerland (1992)

## 第3章     ドリン系農薬分解菌群の効率的取得方 法の開発

---

## 本章の要旨

ドリン系農薬による汚染は、農耕地土壌などに代表される好気的環境で顕在化しているにもかかわらず、好気性のドリン系農薬分解菌の研究は非常に限られている。その主な要因は、土壌等の環境媒体中における好気性ドリン系農薬分解菌の存在率が低いため、その取得に多くの時間と労力を要することが挙げられる。

本章では、土壌から好気性のドリン系農薬分解菌を効率的に分離する手法を開発することを目的として、ドリン系農薬の類似構造物質による分解菌群の集積培養を試みた。得られた培養菌群のドリン系農薬分解能から類似構造物質の基質としての有用性を評価した。

結果、森林土壌から 1,2-エポキシシクロヘキサンを基質として集積培養した菌群がドリン系農薬に対して高い分解能を有することを見出した。また、その分解菌として集積された培養系の構成菌は、これまでにドリン系農薬分解菌として報告されていない菌種であることも明らかにした。

本検討により、1,2-エポキシシクロヘキサンを基質として用いる好気性ドリン系農薬分解菌の高効率分離方法の開発に成功した。本結果は、ドリン系農薬分解菌を選択的に分離培養できる基質についてのはじめての知見である。

### 3-1 研究の背景と目的

バイオレメディエーションにより農耕地土壌などの好気的汚染環境を修復するためには、好気性のドリン系農薬分解菌が必要であるが、現時点では有用な分解菌は得られていない。好気性ドリン系農薬分解菌の探索は、1960 年代から 1970 年代にかけて高濃度汚染土壌を対象に精力的になされた。その探索方法は、汚染土壌から大量のコロニーを分離し、それらすべてについて分解活性の有無を確認するという極めて多くの時間と労力を要するものであった。それにもかかわらず、報告されている分解菌の種類や数は非常に少なく、それらについても必ずしも有用な微生物といえるものではなかった。

このため、ドリン系農薬のバイオレメディエーションの実現には、効率的に、短期間で有用なドリン系農薬分解菌をスクリーニングできる手法の開発が必要とされている。

一方、POPs のような難分解性物質の好気性分解菌の分離には、炭素源・エネルギー源として利用可能で、なおかつその部分的構造を有する、より単純な化合物（アナログ物質）が基質として有用となる場合がある。例えば、PCB 分解菌の場合、PCB のアナログ物質であるビフェニルを基質とすることで、土壌からの PCB 分解菌の分離に成功している (Ahmed and Focht 1973)。しかしながら、ドリリン系農薬分解菌については、基質として有用なアナログ物質についての報告はこれまでに全くない。

そこで、私は、培養基質としてドリリン系農薬のアナログ物質に着目することで、好気性ドリリン系農薬分解菌の効率的な分離方法の開発ができないかと考えた。本章では、ドリリン系農薬に対して分解能を有することを確認した森林土壌を分離源として、ドリリン系農薬のアナログ物質による分解菌群の集積培養を試みた。得られた集積培養菌群のドリリン系農薬分解能から培養基質であるアナログ物質の有用性を評価した。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 ドリリン系農薬分解菌分離のために検討した培養基質

本研究では、ディルドリン、およびエンドリンを分解対象物質として、効率的に分解菌を分離できる培養基質のスクリーニングをおこなった。培養基質としては、Fig. 3-1に示す 9 種類のアナログ物質を用いた。また、微生物炭素源として一般的に利用されている糖類 3 種類についてもあわせて検討した。

### 3-2-2 試薬

ドリリン系農薬は、Dr. Ehrenstorfer GmbH 製を用いた。ヘプタメチルノナンは Acros Organics 製を用いた。培養基質として使用した、グルコース、イノシトール、キシロース、カンファー、ナフタレン、クマリンは和光純薬工業製を、ボルネオール、1,2-エポキシシクロヘキサン (ECH)、ノルボルナン、2-ノルボルネン、シクロヘキサジオールは東京化成工業製を、*cis*-デカヒドロナフタレン、*trans*-デカヒドロナフタレンは関東化学工業製を用いた。代謝物分析の誘導体化試薬としては BSTFA（東京化成工業製、GC 用）を用いた。フェノールは核酸抽出用（和光純薬工業製）を用いた。その他の溶媒ならびに試薬については、すべて残留農薬試験用あるいは試薬特級グレードを用いた。

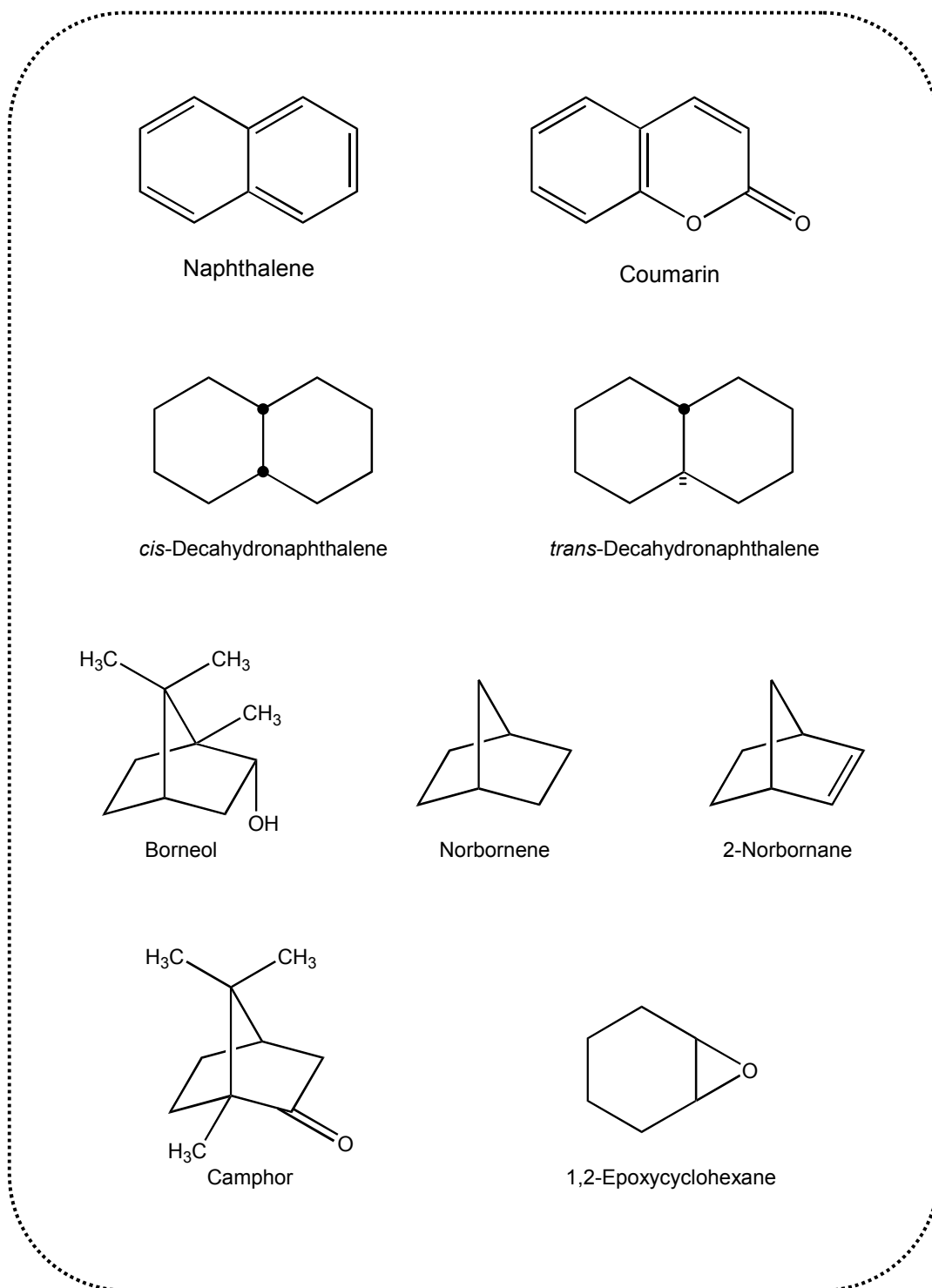


Fig. 3-1 Structural formulas of analog compounds for dieldrin and endrin.



### 3-2-3 森林土壌からのドリリン系農薬アナログ物質を用いた分解菌の集積培養

ドリリン系農薬に対して分解能を有することを確認した森林土壌を微生物分離源として、ドリリン系農薬分解菌群の集積培養をおこなった。集積培養には、0.05%の Yeast extract (Difco 製) を含有する RM2 無機塩 (RM2+) 培地 (Hiraishi *et al.*, 2002) と Mineral salts (MS) 培地の 2 種類を用いた。RM2+培地の組成 (g/L) は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05, Trace element solution SL8 1.0 mL で、培地の pH は HCl を用いて 6.8 に調整した。Trace element solution SL8 の組成 (g/L) は、EDTA 5.21,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.49,  $\text{ZnCl}_2$  0.068,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.099,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.062,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.19,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.017,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.024,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036 で、pH は 6.5 に調整して用いた (Biebl and Pfennig, 1978)。MS 培地の組成 (g/L) は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_4\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01 である。培地の pH は、HCl を用いて 7.0 に調整した。培地には、炭素源およびエネルギー源として、糖類 (グルコース, イノシトール, キシロース) またはアナログ基質 (ボルネオール, カンファー, *cis*-デカヒドロナフタレン, *trans*-デカヒドロナフタレン, ECH, ノルボルナン, 2-ノルボルネン, ナフタレン, クマリ ン) のいずれかを添加して用いた。これら炭素源溶液は、0.2  $\mu\text{m}$  径のフィルターに通して滅菌してから用いた。炭素源として用いた化合物のうち、水溶性の物質は培地に直接添加し、非水溶性の物質は培地に重層したヘプタメチルノナン層へ添加して用いた。

滅菌済みのねじ口試験管に 0.5 g (湿重) の森林土壌を添加した。そこへ、炭素源として 30 mM の糖類または 0.1% wt./vol. のアナログ物質を含有する 10 mL の RM2+培地を添加し、集積培養をおこなった。培養は、暗条件、25°C, 120 rpm で好氣的におこなった。微生物の増殖を確認したら、同じ炭素源を添加した RM2+培地へ集積培養液を 10% (v/v) 植え継いだ。その後は、7-10 日間隔で同じ炭素源を添加した MS 培地へ前培養液を 5% (v/v) 継代し、集積培養を維持した。

### 3-2-4 集積培養液を用いたドリリン系農薬分解試験

好気性のドリリン系農薬分解菌群を選択的に分離培養することが可能な炭素源を見出すため、各集積培養菌群のドリリン系農薬分解能を以下の分解試験により評価した。

試験管にディルドリンおよびエンドリン（アセトン溶液，各 0.2 mg/mL）を分解試験液中濃度が 400 ng/mL となるように添加した後，目視によってアセトンが完全に揮発することを確認するまで，試験管の蓋を開けたまま放置した。そこへ，前培養と同じ炭素源を含む 9.5 mL の MS 培地と培養 7 日目の 0.5 mL の前培養液を添加し，分解試験液とした。対照として，前培養液を添加しない系を同様に調整した。分解試験は，テフロン加工された蓋で密閉し，暗条件，25°C，120 rpm でおこなった。各集積培養菌群のディルドリンおよびエンドリン分解能は，培養 14 日目の分解試験液中のディルドリンおよびエンドリンの残留量から評価した。

### 3-2-5 分解試験試料の前処理方法

10 mL の分解試験液が入った試験管に 2 mL の内部標準（フルオランテン- $d_{10}$ ）入りヘキサンを加え，手で 2 分間振とうした。遠心分離機に 3000 rpm，10 分間かけた後，ヘキサン層の一部を無水硫酸ナトリウムで脱水し，GC/MS 分析用の検液とした。検液の一部は，ドリリン系農薬ならびに ECH の代謝物を測定するために，BSTFA を用いて誘導体化処理（TMS 化）をおこなった。

### 3-2-6 GC/MS 分析条件

対象物質の測定には GC/MS 法を用いた。ディルドリン，エンドリン，ECH の定量は SIM モードにて，代謝物の検索は SCAN モードにておこなった。その他の条件は Table 2-2 に示したとおりである。

### 3-2-7 集積培養液からの DNA 抽出条件ならびに PCR-DGGE 解析

培養 7 日目の集積培養液を 10000 rpm，5 分間の遠心分離で集菌し，上清を除いてペレットにした。このペレットからの DNA 抽出は，Current Protocols in Molecular Biology のプロトコル（Wilson, 1991）に従った。以下に手順を示す。

- 1) ペレットに 567  $\mu$ L の TE buffer を添加してピペッティングにより懸濁し，30  $\mu$ L の 10% SDS と 3  $\mu$ L の 20 mg/mL proteinase K（和光純薬工業製）を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。

- 2) 100  $\mu$ L の 5M NaCl を加えて Voltex してよく混ぜ、さらに 80  $\mu$ L の CTAB/NaCl 溶液 (0.7 M NaCl, 10% CTAB) を加えてよく混ぜ、65°C で 10 分間インキュベートした。
- 3) ほぼ等量 (700  $\mu$ L 程度) の 24:1 クロロホルム・イソアミルアルコール (CI) を加え、Voltex してよく混ぜて均一なエマルジョンにし、15000 rpm, 5 分間、室温で遠心した。
- 4) 水層を新しいチューブに移す。そこへほぼ等量 (700  $\mu$ L 程度) の 25:24:1 フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (PCI) を加え、Voltex してよく混ぜて均一なエマルジョンにし、15000 rpm, 5 分間、室温で遠心した。
- 5) 上層を新しいチューブに移す。そこへイソプロパノールを 0.6 容 (450  $\mu$ L 程度) 加え、白いひも状の DNA がはっきり見えるようになるまでチューブを上下に反転させて混ぜる。室温で 10 分間静置し、15000 rpm, 5 分間、室温で遠心した。
- 6) 上清を除き、1 mL の 70% エタノールを加え、軽く混ぜて DNA を洗浄し、15000 rpm, 5 分間、4°C で遠心した。上清を除き、真空乾燥機でペレットを乾燥させた。
- 7) 100  $\mu$ L の TE buffer に溶解させ、1  $\mu$ L の 10 mg/mL の RNase (シグマアルドリッチジャパン製) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。
- 8) 等量の PCI を加え、Voltex して均一なエマルジョンにし、15000 rpm, 5 分間、室温で遠心した。
- 9) 上層を新しいチューブに移し、下層に再度 100  $\mu$ L の TE buffer を添加した。これを Voltex してよく混ぜ、15000 rpm, 5 分間、室温で遠心し、上層を先に取り出したものに加えた。
- 10) この上層 200  $\mu$ L に、20  $\mu$ L の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 500  $\mu$ L の 100%エタノールを加え、よく混ぜた後、室温で 10 分間静置した。15000 rpm, 5 分間、室温で遠心した。

11) 上清を除き, 1 mL の 70% エタノールを加え, 軽く混ぜて DNA を洗浄し, 15000 rpm, 5 分間, 4°C で遠心した。上清を除き, 真空乾燥機でペレットを乾燥させた。

12) 100  $\mu$ L の TE buffer に溶解させ, 260 nm の吸光度測定およびアガロースゲル電気泳動により, 濃度および分子量を確認した。

集積培養菌群を構成する菌種を特定するため, 細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析をおこなった。PCR は, 集積培養菌群から抽出した DNA 50 ng を鋳型として, 2-2-5 に示した条件でおこなった。DGGE 解析は, 2-2-5 に示した条件でおこなった。

### 3-2-8 DGGE バンドの塩基配列解析ならびに系統学的解析

集積培養菌群を構成する主要な DGGE バンドについては, ゲルから切り出し, 0.1% SDS を含有する 100  $\mu$ L の TE buffer 中に入れて 37°C で一晩振とうし, ゲル中の DNA を溶出した。溶出した DNA を鋳型として, 2-2-5 で示した条件で再度 PCR 増幅および DGGE 解析をおこなった。再 DGGE 解析の結果, 再 PCR 産物が切り出した DGGE バンドと同じ位置で単一バンドとして検出されることが確認できた場合は, 直接, 再 PCR 産物を塩基配列解析に用いた。一方, 再 PCR 産物に非特異的増幅 (DGGE 解析の結果, 切り出した位置以外にもバンドが検出される) が認められた場合は, 目的のバンド DNA だけを検出できるようになるまで, 上記の操作を繰り返した。非特異的増幅が除去できない場合は, 再 PCR 産物をクローニングし, 切り出した DGGE バンドと同じ位置で検出されるクローンを取得し, 塩基配列解析に用いた。クローニングおよびダイレクトシーケンスに用いる PCR 産物は, QIAquick PCR purification kit (QIAGEN 製) を用いて精製した。精製した PCR 産物をクローニングする場合は, pGEM-T Vector System (Promega 製) を用いた。シーケンス反応は Thermo Sequenase Cy5.5 Terminator sequencing kit を, DNA シーケンサーは Gene Rapid sequencer (いずれも GE ヘルスケアバイオサイエンス (旧アマシヤムバイオサイエンス) 製) を用いて塩基配列を解析した。DGGE バンドの塩基配列は, GENETYX-WIN (Version 4, GENETYX 製) で解析し, NCBI-BLAST データベースの BLAST サーチプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて, 16S rRNA 遺伝子配列との相同性検索をおこなった。

### 3-3 結果および考察

#### 3-3-1 森林土壌からのドリリン系農薬分解微生物群の集積培養 ～アナログ物質の培養基質としての有用性の評価～

森林土壌を分離源に，ドリリン系農薬のアナログ物質または糖類を炭素源およびエネルギー源とする集積培養を試みたところ，12 種類の基質を用いた系で集積培養に成功した。また，ドリリン系農薬を唯一の炭素源およびエネルギー源とする分離培養も試みたが，その系においては菌の増殖は認められなかった。これらの培養試験の結果および集積培養に成功した 12 種の系についてドリリン系農薬分解活性を評価した結果を Table 3-1 に示す。

12 種類の集積培養菌群のうち，ドリリン系農薬のアナログ物質である ECH を用いた集積培養菌群が高いドリリン系農薬分解活性を示した。この集積培養菌群は，培養 14 日間でディルドリンを 38%，エンドリンを 32% も分解する能力を有していた (Fig. 3-2a, b)。なお，ECH 集積培養菌体からの抽出液中にはドリリン系農薬が検出されなかったことから，ECH 集積培養によるドリリン系農薬の減少は，菌体への付着によるものではないことを確認した。また，ナフタレンを用いた集積培養菌群についても，ECH ほどではないものの分解能が認められた。残る 10 物質を用いた系においては分解活性が認められなかった。キシロース，イノシトール，デカヒドロナフタレン，およびボルネオールは，汚染土壌中のアルドリリンおよびディルドリンの微生物分解を促進すると報告されているため (Hugenholtz and MacRae, 1990)，分解菌を選択的に増殖させることのできる基質として期待したが，本試験においては培養基質としての有用性は認められなかった。

本研究において，ドリリン系農薬のアナログ物質の中でも，ECH による集積培養液がドリリン系農薬に対して高い分解活性を示すことを明らかにした。本結果は，ECH を唯一の炭素源およびエネルギー源として利用することで，ドリリン系農薬分解菌を集積できることを意味する。すなわち，ECH はドリリン系農薬分解菌の分離のために有用な基質となると考えられた。

ドリリン系農薬分解菌を効率的に取得するために，分解が容易なアナログ物質を炭素源として利用することは，これまでに全く検討されておらず，本研究結果がはじめての報告で

ある。本成果は、ドリリン系農薬のバイオレメディエーションの実用、すなわち、有用な分解菌の取得に非常に役立つものと考えられる。

### 3-3-2 集積培養液におけるドリリン系農薬の代謝物

ドリリン系農薬の代謝物は、ECH 集積培養液から抽出した有機相からはほとんど検出されず、主として水溶性の高い化合物に代謝されたと推測された。これまでも、ドリリン系農薬の代謝物については、同定はされていないものの、主に水相に存在しているという報告がいくつかされている (Matsumura and Boush, 1967; Jagnow and Haider, 1972)。一方、ECH 集積培養菌群は、培養 7 日目ではほぼすべての ECH を消費して増殖しており (Fig. 3-2(c))、減少した ECH は、集積培養液中で *trans*-シクロヘキサジオールに代謝されていることが GC/MS 分析により確認された (Fig. 3-3, Fig. 3-4)。この変換は、エポキシド加水分解酵素 (epoxide hydrolase) によるものと考えられる。以上のことから、本研究で得た ECH 集積培養液において、ドリリン系農薬は epoxide hydrolase により水溶性の高いジオール体に変換されているのではないかと推測された。

哺乳動物体内において、ディルドリンは加水分解反応により *trans*-ジオール体となり無毒化されることが報告されている (加藤ら, 2000)。環境中においても、本研究で分離した分解菌によって *trans*-ジオール体へ変換することができれば、汚染現場の毒性影響を低下させることが可能になると考えられる。今後、水溶性物質の同定に適した LC/MS 等を用いて、ドリリン系農薬の代謝物を明らかにする必要があると考えられた。

### 3-3-3 ドリリン系農薬分解微生物群の構成菌

ドリリン系農薬に対して分解活性が認められた ECH 集積培養液の微生物群集構造を PCR-DGGE 法により解析した。炭素源としてディルドリン、エンドリン、および ECH を添加して 7 日間培養した集積培養液の DGGE バンド写真を Fig. 3-5 に示す。本集積培養液からは、主要な DNA バンドが 4 本確認された。塩基配列解析の結果、これらの DGGE バンドは *Burkholderia* 属, *Cupriavidus* 属, および *Alcaligenes* 属に近縁な菌株によることが明らかになった (Table 3-2)。

本章の DGGE 解析において検出した *Burkholderia* 属, *Cupriavidus* 属, および *Alcaligenes* 属は、いずれもドリリン系農薬分解菌としての報告例がない。そのため、どの菌がドリリン系

農薬の分解に関与しているのか非常に興味を持たれる。そこで、ドリソ系農薬分解微生物群の構成菌を単一菌として分離し、それらの分解特性を解析することにした。これについては次章にて詳述する。

Table 3-1 Degradation activity of dieldrin and endrin by enrichment cultures derived from dieldrin- and endrin-degrading soil microcosm

Substrates (Carbon source)	Enrichment <sup>a</sup>	Degradation activity of dieldrin and endrin <sup>b</sup>
Dieldrin and endrin	-	-
Glucose	+	-
Inositol	+	-
Xylose	+	-
Naphthalene	+	+
Coumarin	+	-
<i>cis</i> -Decahydronaphthalene	+	-
<i>trans</i> -Decahydronaphthalene	+	-
Borneol	+	-
Camphor	+	-
Norbornane	+	-
2-Norbornene	+	-
1,2-Epoxy cyclohexane	+	++

Enrichment of microbial communities was performed with the respective substrate as the sole carbon and energy source.

<sup>a</sup> +: could be obtained, -: could not be obtained

<sup>b</sup> ++: >30%, +: <30%, -: no degradation



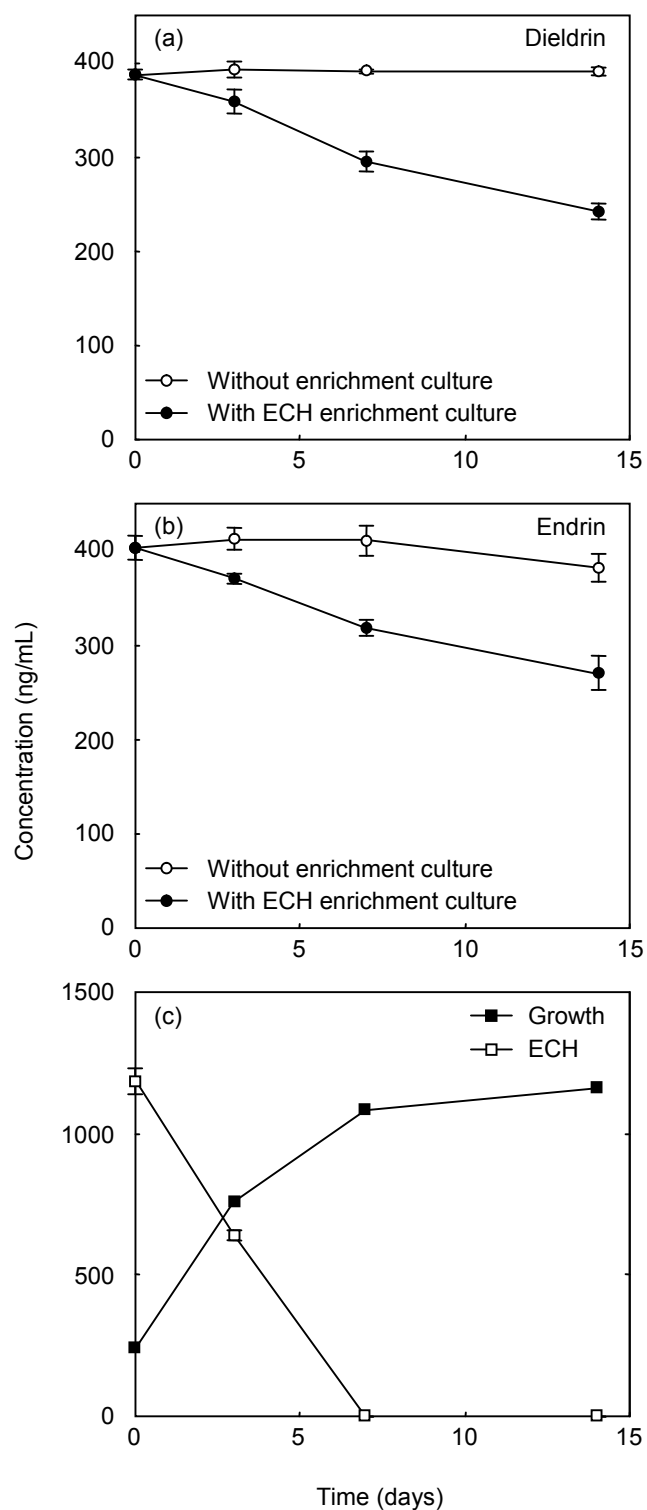


Fig. 3-2 Degradation of dieldrin (a), endrin (b), and ECH (c) by ECH enrichment culture and growth of the ECH enrichment culture. Residual dieldrin and endrin were measured in the uninoculated (open circles) and inoculated (closed circles) enrichment culture. Growth of the ECH enrichment culture and residual ECH were measured in the inoculated enrichment culture. Each point represents the mean of triplicate samples with standard deviation (vertical bars).

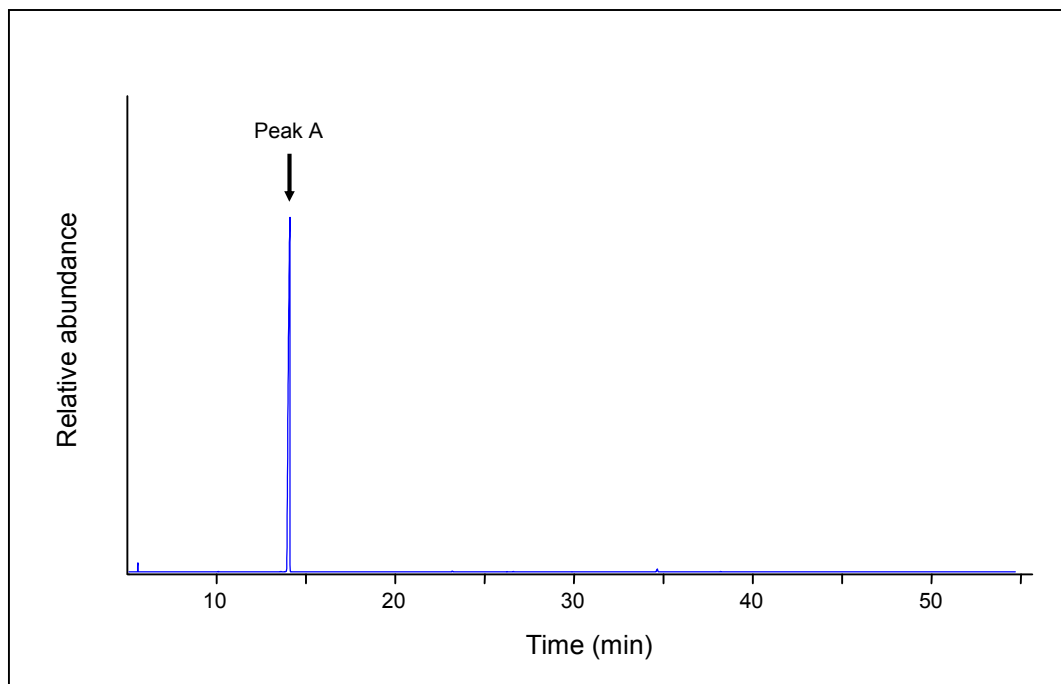


Fig. 3-3 GC/MS chromatogram of the test sample after the degrading test by ECH enrichment culture.

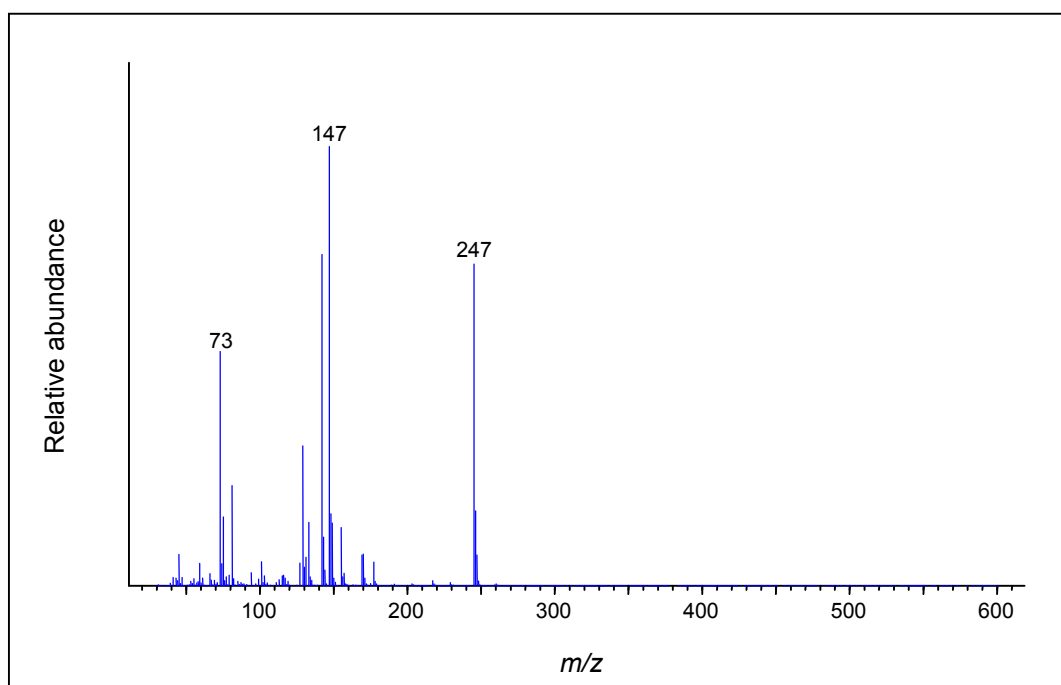


Fig. 3-4 Mass spectrum of the peak A in Fig. 3-3. Peak A was identified as the trimethylsilyl (TMS) derivative of *trans*-1,2-cyclohexanediol.

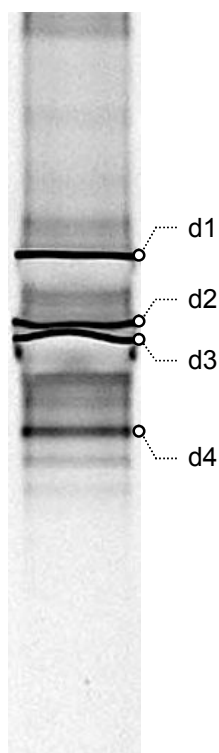


Fig. 3-5 DGGE profile of PCR-amplified 16S rRNA fragments of the ECH enrichment culture. The DGGE bands designated d1 to d4 were excised for DNA sequencing analysis (see Table 3-2).

Table 3-2 Sequence analysis of major DGGE bands of the dieldrin- and endrin-degrading cultures grown with ECH

DGGE band <sup>a</sup>	Closest phylogenetic relative	Accession no.	% Similarity to closest relative
d1	<i>Burkholderia</i> sp. C308	AB212228	99.4
d2	<i>Alcaligenes</i> sp. PCNB-2	AY283260	100
d3	<i>Burkholderia</i> sp. C308	AB212228	100
d4	<i>Cupriavidus</i> sp. amp18	DQ530650	99.4

<sup>a</sup> DGGE bands correspond to those shown in Fig. 3-5.

### 3-4 結論

本章では、ドリン系農薬分解菌の培養基質としてアナログ物質（類似構造物質）が有用であるかを検証した結果について論じた。

ドリン系農薬に対して分解能を示す森林土壌から、アナログ物質や糖類を用いて集積培養した 12 種の菌群についてドリン系農薬分解能を評価したところ、ECH 集積培養菌群が高い分解能を有していることが明らかになった。

本培養菌群は、その分解過程において、ECH を cyclohexanediol に代謝していることから、ドリン系農薬の分解には、エポキシド加水分解酵素がかかわっている可能性、すなわちドリン系農薬はジオール体へ代謝されている可能性が示唆された。

また、ECH 培養菌群の構成を PCR-DGGE 法によって解析した結果、*Burkholderia* 属、*Cupriavidus* 属、および *Alcaligenes* 属に分類される菌が優先化していることが明らかになった。これらの属の菌については、ドリン系農薬分解菌としての報告はなく、新規分解菌の存在が強く示唆された。

以上の結果より、ドリン系農薬のアナログ物質である ECH を基質として用いた集積培養は、ドリン系農薬分解菌の選択的培養法として非常に有用であると考えられた。本知見は、好気性ドリン系農薬分解菌の選択的培養法に関するはじめてのものである。

次章では、ECH 集積培養菌群からのドリン系農薬分解菌の分離、ならびに分離菌の特性等の評価結果について詳細に論じる。

## 第 3 章の引用文献

Ahmed M, Focht DD, Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. Can J Microbiol 19:47–52 (1973)

Biebl H, Pfennig N, Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. Arch Microbiol 117: 9-16 (1978)

Hiraishi A, Yonemitsu Y, Matsushita M, Shin YK, Kuraishi H, Kawahara K, Characterization of *Porphyrobacter sanguineus* sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium capable of degrading biphenyl and dibenzofuran. Arch Microbiol 178:45–52 (2002)

- Hugenholtz P, MacRae IC, Stimulation of aldrin and dieldrin loss from soils treated with carbon amendments and saturated-ring analogues. *Bull Environ Contam Toxicol* 45:223-227 (1990)
- Jagnow G, Haider K, Evolution of  $^{14}\text{CO}_2$  from soil incubated with dieldrin- $^{14}\text{C}$  and the action of soil bacteria on labelled dieldrin. *Soil Biol Biochem* 4:43-49 (1972)
- 加藤隆一，鎌滝哲也，薬物代謝学 東京化学同人 82-85 (2000)
- Matsumura F, Boush GM, Dieldrin degradation by soil microorganisms. *Science* 156:959-961 (1967)
- Wilson K, Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds), *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York, pp 2.4.1-2.4.5 (1991)

## 第4章     ドリン系農薬分解菌の分離・同定および              それらの特性評価

---

## 本章の要旨

前章で分離したドリン系農薬分解菌群において、どの構成菌がその分解に寄与しているのかに興味をもたれた。

本章では、ドリン系農薬分解能を有する細菌群の中から主要構成菌を分離し、それらの分解特性の評価ならびに菌種同定をおこなった。

その結果、主要構成菌 3 種のうち 2 種の細菌がドリン系農薬に対して分解活性を有していることが明らかとなった。これらの分解菌は、ECH を添加した培養条件において高いドリン系農薬分解活性を示した。さらに、ドリン系農薬だけを炭素源とする培養条件においてもこれらの菌は分解活性を示した。

また、分解菌 2 種について分解活性の所在を調べたところ、活性は菌体そのものにおいてだけではなく、培養物から分解菌を除去した培養上清においても認められることが明らかになった。

この分解菌 2 種は、分類同定をおこなった結果、*Cupriavidus necator* と *Burkholderia terrae* と同定され、これまでにドリン系農薬分解菌として報告のない菌種であることが明らかとなった。

### 4-1 実験方法

ドリン系農薬に対して分解活性を示した ECH 集積培養菌群の構成菌を調べた結果、主に 3 種類の細菌で構成されていた。それらは、いずれもドリン系農薬分解菌として報告されていない属の細菌であったことから、各菌のドリン系農薬分解能に興味をもたれた。そこで、この ECH 集積培養菌群のなかでドリン系農薬の分解に寄与している細菌を特定することを目的として、主要な構成菌の分離を試み、それらのドリン系農薬分解能を評価した。

#### 4-1-1 試薬

ドリリン系農薬は、Dr. Ehrenstorfer GmbH 製を用いた。ECH は東京化成工業製を用いた。その他の溶媒および試薬については、すべて残留農薬試験用あるいは試薬特級グレードを用いた。

#### 4-1-2 ドリリン系農薬分解菌群からのドリリン系農薬分解菌の分離

3-2-3 で分解活性を示した集積培養菌群の培養液を標準寒天培地および R2A 寒天培地(日本製薬製)に塗抹し、25°C で好氣的に培養した。標準寒天培地の組成(g/L)は、casein peptone 5, yeast extract 2.5, グルコース 1, 寒天 15 で、培地の pH は 7.0 に調整して用いた。培地上に生育したコロニーは、画線培養を繰り返し、菌株の純化をおこなった。

分離した 2 株、*Burkholderia* sp. strain MED-7 および *Cupriavidus* sp. strain MED-5 は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センターへ寄託し、NITE P-575 および NITE P-574 として登録された。

#### 4-1-3 分離菌を用いたドリリン系農薬分解試験

各分離菌のドリリン系農薬分解能を以下の分解試験により評価した。

各分離菌は、R2A 培地で対数増殖期の後期まで培養した。この菌体を遠心分離により回収し、MS 培地で 2 回洗浄した。分解試験液は、3-2-4 で示した方法と同様に調製した。ただし、添加する菌体は前述の洗浄菌体を用い、OD<sub>600</sub> が 0.005 となるように MS 培地へ添加した。分解試験は、ECH を添加する系と添加しない系、両方の条件を 5 連で行い、培養 14 日後におけるディルドリンおよびエンドリンの残留率からの各分解菌の分解能を評価した。ドリリン系農薬分解活性の有意性は、t 検定による有意差検定によって判定した。

次に、分解能を確認した分離菌の分解活性の所在を調べるため、休止菌体および培養上清を用いてドリリン系農薬分解試験をおこなった。各分離菌の休止菌体は、R2A 培地で対数増殖期の後期まで培養し、上記のように調製した菌体を OD<sub>600</sub> が 2.0 となるように MS 培地へ添加して試験に用いた。各菌の培養上清は、R2A 培地で培養した培養液を遠心分離して菌体を除去したものを用意した。分解試験液は、3-2-4 で示した方法と同様に調製し、前処理は試験開始後 5 日目におこなった。ただし、培養上清の分解試験液には、培地と菌体の代わりに培養上清を用いた。



#### 4-1-4 分解試験試料の前処理方法

10 mL の分解試験液が入った試験管に 2 mL の内部標準（フルオランテン- $d_{10}$ ）入りヘキサンを加え、手で 2 分間振とうした。本溶液を遠心分離機に 3000 rpm, 10 分間かけた。ヘキサン層の一部を無水硫酸ナトリウムで脱水し GC/MS 分析用の検液とした。

#### 4-1-5 GC/MS 分析条件

ディルドリンおよびエンドリンの定量には第 2 章に記述した GC/MS 法を用いた。GC/MS 法によるディルドリンおよびエンドリンの測定条件は Table2-1 に示したとおりである。

#### 4-1-6 LC/MS 分析によるドリリン系農薬代謝物の確認

ドリリン系農薬分解試験後の溶液について、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）による代謝物の確認を試みた。分解試験の方法については、基本的には 3-2-4 に示したとおりである。ただし、本試験においては、ディルドリンとエンドリンを個別に添加するとともに、それらの初期濃度を 10  $\mu\text{g/mL}$ , 培養期間を 5 日間とした。試験は、MED-5 株ならびに MED-7 株について、それぞれおこなうとともに、菌を添加しない試験系をコントロールとして準備した。

液体クロマトグラフ（HPLC）には、Hewlett Packard 製の HP1100 シリーズを用いた。移動相には、アセトニトリルと水の混合溶媒系を用い、流量は 0.2 mL/min とした。カラム恒温槽温度は 40  $^{\circ}\text{C}$ , 試料注入量は 10  $\mu\text{L}$  とした。分離カラムには Mightysil RP-18（150 mm  $\times$  2.1 mm i.d., 3.5  $\mu\text{m}$ , 関東化学製）を用いた。

質量分析計（MS）には TSQ 7000 四重極型タンデム質量分析計（Thermo Quest 製）を、イオン化法はエレクトロスプレーイオン化（ESI）法を用いた。ESI 法での加熱キャピラリー温度は 350  $^{\circ}\text{C}$ , シースガス圧は 80 psi とした。分析モードには、SCAN モードを用いた。

#### 4-1-7 添加したドリリン系農薬分解菌の土壌中における機能性の評価

本研究において取得したドリリン系農薬分解菌の土壌への適用可能性を検証するため、以下の土壌マイクロゾム試験を行い、ドリリン系農薬の残留量を追跡した。本試験では、土壌における投与菌の生残性の低さの問題の回避をねらい、土壌へのアクティブな分解菌の繰り返し投与を実施した。

土壌は、第2章の試験においてドリソ系農薬分解能を有していないことが確認された畑土壌（Field soil 2）を用いた。ドリソ系農薬模擬汚染土壌の調製および培養条件は、2-2-3に示した方法と同様である。土壌マイクロコズムの含水率を制御するために、メディウム瓶のふたはアルミ箔に適切な数の穴をあけたものを用いた。添加する分解菌は、MED-5株、およびMED-7株とした。各菌はR2A培地で培養し、対数増殖期後期で集菌後、洗浄して添加菌液を調整した。各菌は、 $1 \times 10^7$  cells/g-soil（乾土）となるように添加し、同じ量の菌を7日おきに繰り返し添加し、滅菌スパーテルで混合した。対照とする土壌マイクロコズムとしては、ドリソ系農薬分解菌の代わりに滅菌水を添加する系を用意した。水分量は、試験開始時は最大容水量の50%となるように調整し、培養期間中は上限が60%、下限が40%の範囲の変動におさまるように水分調整をおこなった。

#### 4-1-8 ドリソ系農薬分解菌の分類・同定

ディルドリソおよびエンドリソ分解能を示したMED-5株およびMED-7株の分類・同定をおこなった。分類・同定試験として、DNAの分析（16S rRNA遺伝子の塩基配列決定および系統解析、DNA塩基組成分析、DNA-DNAハイブリダイゼーション）、形態観察、ならびに生理・生化学試験をおこなった。

##### 1) 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定および系統解析

分離菌株を10 mLのR2A培地で培養し、ゲノムDNAを3-2-6に示した方法で抽出した。16S rRNA遺伝子は、ユニバーサルプライマーの27F（5'-aga gtt tga tcm tgg ctc ag -3'）と1492R（5'-tac ggy tac ctt gtt acg actt-3'）を用いてPCR増幅し、塩基配列を決定した。塩基配列データは、GENETYX-WINを用いて解析し、アポロンDB-BA4.0データベース（基準株由来DNA塩基配列データ、テクノスルガ・ラボ）およびNCBI-BLASTデータベースに基づき、最近縁種を検索した。各分離菌の16S rRNA遺伝子配列は、AB438046とAB438647の登録番号でDDBJに登録した。

系統解析は、Clustal Xを用いておこなった（Thompson *et al.*, 1997）。系統樹推定の基となる進化距離の計算にはKimuraのモデルを使用し（Kimura, 1980）、系統樹作成には近隣結合法（neighbor joining method）を用いた（Saitou and Nei, 1987）。近隣結合法で作成された系統樹の分岐パターンの統計学的信頼度は、1000回のブートストラップ計算により求めた（Felsenstein, 1985）。

## 2) DNA 塩基組成分析

系統解析の結果から, strain MED-5 と近縁な既知種として *C. necator* を, strain MED-7 と近縁な既知種として *B. caribensis*, *B. hospita*, *B. phymatum*, *B. terrae* を選択した。各既知種の基準株は, *B. terrae* 以外は DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) から, *B. terrae* は NITE の生物遺伝資源部門から取り寄せた。DNA 塩基組成分析および DNA-DNA ハイブリダイゼーションに用いるゲノム DNA の調製方法は, 以下に示したとおりである (鈴木, 2001)。

- ① 数増殖期後期で集菌した菌体約 1 g (湿重) を 5 倍量の saline-EDTA (0.15 M NaCl – 0.1 M EDTA (pH 8.0)) に懸濁した。
- ② 菌体懸濁液にリゾチームを 1 mg/mL 程度となるように加え, よく溶解し, ときどき攪拌しながら 37°C で 30 分間保持した。粘度の増加を確認したら, ただちに -30°C で凍結した。
- ③ 凍結試料を 60°C の湯浴に入れ, 等量の Tris-SDS (0.1 M Tris-HCl (pH 9.0) – 1% SDS) を加え, ガラス棒で界面を混合しながら溶菌させた。60°C で 10 分間保持した後, 氷冷した。
- ④ ほぼ等量の水飽和フェノールを加え, 氷冷しながら 15 分間振とうした。
- ⑤ 10000 rpm, 20 分間, 4°C で遠心し, 上層の水層を回収した。
- ⑥ 冷却エタノール (-30°C) を 2 倍量加え, ガラス棒で混ぜながら沈殿してくる DNA を巻き取った。
- ⑦ 巻き取った DNA を 70%エタノールに 30 分間浸してすすぎ, 同様に 80%エタノール, 90%エタノールでもすすいでフェノールを除いた。
- ⑧ ガラス棒の DNA を風乾し, 10 mL の 1/10×SSC (0.15 M NaCl – 15 mM クエン酸三ナトリウム (pH 7.0)) に入れ, 一晚冷蔵庫中でゆっくりと溶解させた。その後, ガラス棒を外して穏やかに混合し, 十分溶解させた。
- ⑨ DNA 溶液に 1/40 量の RNaseA 溶液 (0.2% RNaseA – 0.15 M NaCl) を加えてよく混合し, 37°C で 30 分間保持した。これに 1/10 量の水飽和フェノールを加え, ④~⑤を繰り返した。

- ⑩ 3 M 酢酸ナトリウムを加えて氷冷し、0.54 倍量の冷却イソプロパノールを加えて沈殿をガラス棒で巻き取った。⑦~⑧を繰り返した。但し、最後に精製ゲノム DNA を溶解させる溶媒は、TE buffer とした。
- ⑪ 精製 DNA は、260 nm における吸光度測定による濃度の測定、純度の確認（吸光度の比  $A_{260}/A_{280}$  が 1.8 以上であること）、ならびにアガロースゲル電気泳動による分子量の均一性の確認をおこなった。

DNA 塩基組成分析は、HPLC 法による分離・定量をおこなった。測定方法は、以下に示したとおりである（Mesbah *et al.*, 1989; Tamaoka and Komagata, 1984）。

- ① 5  $\mu$ L の各精製ゲノム DNA 溶液を 60°C で 1 時間保持した後、100°C（沸騰水中）で 2 分間保持し、氷上へ移して急冷して熱変性した。
- ② 以下の組成を調整し、Flash 遠心後、37°C で 2 時間保持した。

ゲノム DNA 溶液	25 $\mu$ L
40 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.3) – 2 mM ZnSO <sub>4</sub>	25 $\mu$ L
P1 ヌクレアーゼ溶液 (20 U/mL)	5 $\mu$ L
滅菌水	20 $\mu$ L

- ③ 2.5  $\mu$ L の Glycine buffer (0.1 M, pH 10.4) と 2  $\mu$ L のアルカリフォスファターゼ (60 mU/ $\mu$ L) を加えて Flash 遠心後、37°C で一晩保持した。Standard nucleotides として、以下の組成も用意し、同様にアルカリフォスファターゼ処理をおこなった。

標準ヌクレオチド混合物（ヤマサ醤油製）	10 $\mu$ L
40 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.3) – 2 mM ZnSO <sub>4</sub>	25 $\mu$ L
滅菌水	40 $\mu$ L

- ④ HPLC は島津製作所製の LC-10ADvp 型ポンプ，CTO-6A 型カラムオーブン，SPD-6AV 紫外可視検出器，ならびに C-R6A 型クロマトパックを連結して用いた。HPLC 条件の詳細は Table 4-1 に示したとおりである。

Table 4-1 Operating conditions for HPLC

<b>HPLC</b>	LC-10ADvp/CTO-6A/SPD-6AV system (Shimazu)
Column	Cosmosil 5C18-AR (250 mm×4.6 mm i.d., Nakarai tesque)
Mobile phase	0.2 M Ammonium phosphate monobasic / acetonitrile (40 : 1)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	5 µL
Oven temperature	40 °C
Detection	UV270 nm

### 3) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

分離菌株と近縁な既知種間の DNA 相同値を求めるため、DNA-DNA ハイブリダイゼーションをおこなった。DNA-DNA ハイブリダイゼーションは、蛍光検出によるマイクロプレート法による。

#### マイクロプレートへの DNA 固定

- ① 精製ゲノム DNA 溶液を TE buffer で 100 µg/mL に希釈した。
- ② 希釈した各 DNA 溶液を沸騰水中で 5 分間保持した後、氷水中で急冷した。
- ③ PBS-Mg (PBS に MgCl<sub>2</sub> を終濃度 0.1 M になるよう加えた) を加えて 10 µg/mL に希釈し、ボルテックス後、すぐにマイクロプレートの各ウェルに 100 µL ずつ分注して 28°C で 3 時間保持した。
- ④ 流しの上でプレートを逆さに府ってウェル中の溶液を捨て、キムタオルで水切りした後、45°C で一晩乾燥させた。

#### フォトビオチン標識 DNA の作製

- ① 10 µg 分の各ゲノム DNA 溶液に 400 µL の冷却エタノールを加えて混ぜ、DNA を沈殿させた。 -20°C で 5 分間静置後、12000 rpm で 10 分間遠心した。
- ② エタノールを捨てて、エバポレーターで 10 分間乾燥した。
- ③ 10 µL の滅菌水を加え、ボルテックス後、Flash 遠心した。
- ④ DNA 溶液を 60°C で 30 分間保持し、溶解させた。
- ⑤ 暗室で 10 µL のフォトビオチン溶液 (Vector Labs 製) を添加し、ピペッティング後、Flash 遠心した。

- ⑥ 氷上に置いてチューブのふたを開け、水銀ランプ下に 20 分間置いた。
- ⑦ サンプルの色がオレンジ色から褐色になったことを確認し、180  $\mu\text{L}$  の 0.1 M Tris-HCl (pH 9.0) を加えたて混合した。そこへ 200  $\mu\text{L}$  の 1-ブタノールを加えてよく混合し、15000 rpm で 5 秒間遠心した。
- ⑧ ビオチンの色のついたブタノール層を取り除き、使用するまで-20°C 保存した。

#### ハイブリダイゼーション

- ① DNA を固定したプレートのウェルに 200  $\mu\text{L}$  ずつプレハイブリダイゼーション溶液 (2 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's 溶液, 0.1 mg/mL Denatured salmon DNA, 50% ホルムアミド) を分注し、37°C で 30 分間保持した。
- ② フォトビオチン標識 DNA 溶液を沸騰水中に 5 分間保持した後、氷水上で急冷した。それを超音波破碎機に 30 秒間入れ、標識 DNA を断片化した。
- ③ 4 mL のハイブリダイゼーション溶液 (2 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's 溶液, 0.1 mg/mL Denatured salmon DNA, 50% ホルムアミド, 25 mg/mL 硫酸デキストラン) に 200  $\mu\text{L}$  のフォトビオチン標識 DNA を添加し、よく混合した。
- ④ プレートのプレハイブリダイゼーション溶液を捨て、ウェルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ標識 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液を分注した。プレートシールを貼り、51°C で 3 時間保持してハイブリダイゼーション反応をおこなった。
- ⑤ 反応終了後、シールをはがし、プレートのハイブリダイゼーション溶液を捨て、水切りをおこなった。
- ⑥ ウェルを 300  $\mu\text{L}$  の 1 $\times$ SSC で 3 回洗浄した。

#### ハイブリッド DNA の定量

- ① ウェルに 100  $\mu\text{L}$  のストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ溶液 (0.5% BSA 含有 PBS, 0.1% ストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ (Roche Diagnostics 製)) を分注し、37°C で 20 分間保持した。
- ② 水切りし、ウェルを 300  $\mu\text{L}$  の 1 $\times$ SSC で 3 回洗浄した後、100  $\mu\text{L}$  の 4-メチルウンベリフェリルガラクトピラノシド (MUF) 溶液 (1% 4-MUF 含有 PBS) を分注し、37°C で加温しながら 5~10 分おきに蛍光プレートリーダーで蛍光強度を

測定した。蛍光プレートリーダーは、CytoFluor Fluorescence Multi-Well Plate Reader (Perceptive BioSystems (現 Applied Biosystems) 製) を用いた。

#### 4) 形態観察

グラム染色は、フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬製) を用い、光学顕微鏡により形態観察をおこなった。また、位相差顕微鏡による形態観察もおこなった。

#### 5) 生理・生化学試験

Barrow らの方法に基づき、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵 (O/F) について試験をおこなった (Barrow *et al.*, 1993)。その他の生理・生化学試験は、同定キットである API20NE (bioMérieux 製) を用いた。

## 4-2 結果および考察

### 4-2-1 ドリン系農薬分解菌群からの分解菌の分離

第3章においてドリン系農薬分解能を確認した ECH 資化菌群の各構成菌種を分離するため、標準寒天培地および R2A 寒天培地上にコロニーを形成させた。コロニーの単一分離を繰り返して純化した後、各コロニーについて 16S rRNA 遺伝子の DGGE 解析を行い、ECH 資化菌群の DGGE 解析において検出した4本のバンドと同じ位置にバンドが検出されるコロニーを探索した。その結果、4本の DGGE バンドの位置と一致するバンドを示す3種類の菌株の取得に成功した (Fig. 4-1(b))。そのうち、2種類の菌株は標準寒天培地で分離されたものであり、これらを MED-7 株および MED-1 株とした。残りの1種類の菌株は R2A 寒天培地で分離され、これを MED-5 株とした。いずれの菌株も R2A 寒天培地上には生育したが、MED-5 株は標準寒天培地上に生育しない特徴を有していた。

MED-1 株の DGGE バンドの位置は、ECH 資化菌群の DGGE バンド d2 (*Alcaligenes* 属細菌由来と考えられる) と一致した (Fig. 4-1(a),(b))。バンド間の塩基配列の相同性は 99.4% であったことから、MED-1 株は *Alcaligenes* 属菌と考えられた。

MED-5 株の DGGE バンドの位置は、ECH 資化菌群の DGGE バンド d4 (*Cupriavidus* 属細菌由来と考えられる) と一致した (Fig. 4-1(a),(b))。各バンド間の塩基配列の相同性は 100% であったことから、MED-5 株は *Cupriavidus* 属菌と考えられた。

一方、MED-7 株の DGGE バンドは2本検出され、それらのバンドの位置は ECH 資化菌群の DGGE バンド d1 および d3 (いずれも *Burkholderia* 属細菌由来と考えられる) と一致した (Fig. 4-1(a),(b))。このことから、MED-7 株は塩基配列の異なる 16S rRNA 遺伝子を複数コピー保有していると推測された。MED-7 株と ECH 資化菌群の DGGE ゲル上の位置が一致するバンド間の塩基配列相同性は、MED-7 株と d1 間で 99.4%、MED-7 株と d3 間で 100% であったことから、MED-7 株は *Burkholderia* 属菌と考えられた。

以上の結果より、ECH 資化菌群を構成する主要な菌種は *Alcaligenes* 属菌、*Cupriavidus* 属菌、および *Burkholderia* 属菌の3種類であることが明らかとなった。



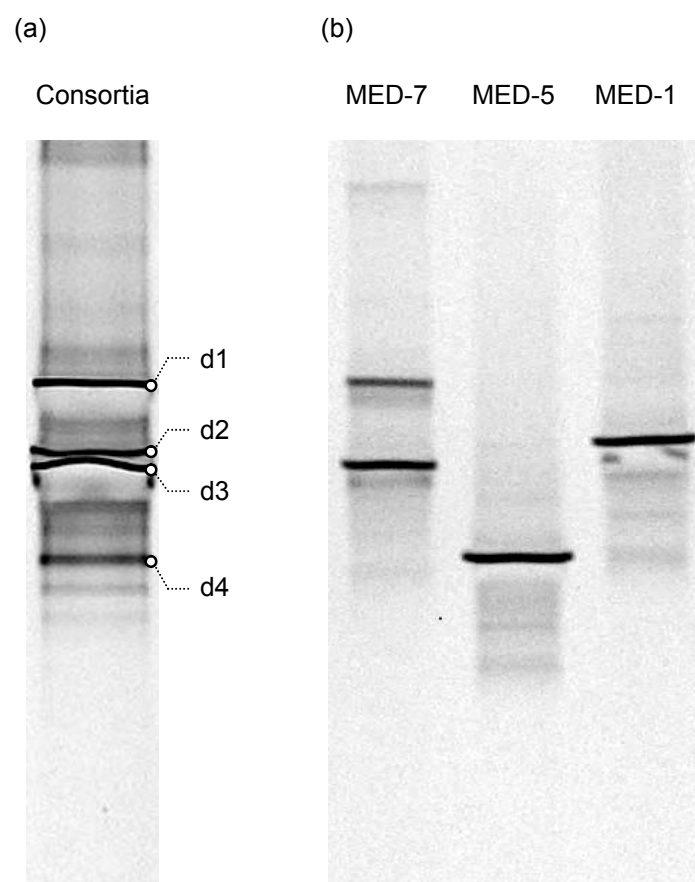


Fig. 4-1 DGGE profiles of PCR-amplified 16S rRNA fragments for the ECH enrichment culture (a) and strains MED-1, MED-5, and MED-7 (b). The DGGE bands designated d1 to d4 were excised for DNA sequencing analysis (see Table 3-2).

#### 4-2-2 分離菌株のドリン系農薬分解活性の評価

分離した 3 菌株について好氣的条件下におけるドリン系農薬分解活性を調べた結果をFig. 4-2に示す。対照（菌非添加）と比較して、MED-1 株を除く 2 菌株（MED-7 株および MED-5 株）がドリン系農薬を有意に分解できる能力を有していることが明らかとなった ( $P<0.01$ )。

ECH およびドリン系農薬を炭素源として添加して 14 日間培養した MED-7 株および MED-5 株は、ディルドリンに対して 49%および 38%, エンドリンに対して 51%および 40% もの分解活性を示した (Fig. 4-2(a))。なお、ドリン系農薬の培養菌体への吸着量は添加した量の 1%程度と少なく、本試験系におけるドリン系農薬残留率の低下は吸着による影響をほとんど受けていないことを確認している。したがって、ECH 資化菌群においてドリン系農薬分解に関与している構成菌は、主として MED-7 株と MED-5 株の 2 種であると考えられた。これまでに報告されているドリン系農薬分解菌による分解率は低く（例えば *Aerobacter aerogenes* によるディルドリンの分解率は 12% (Wedemeyer, 1968)），本研究で分離した MED-7 株と MED-5 株は非常に高い分解能を有していると言える。

また、本試験結果は、ECH で集積された 3 種の主要菌株のうち 2 菌株が、ドリン系農薬に対して高い分解能を有していることを示している。したがって、前章で提案した ECH による集積培養法は、ドリン系農薬分解菌を高選択的に培養可能であり、分解菌取得のための非常に有用な方法と考えられた。

さらに、MED-7 株と MED-5 株は ECH を添加しない条件、すなわちドリン系農薬のみを炭素源とする条件においても増殖が見られ、また、ドリン系農薬の分解も認められた (Fig. 4-2(b))。本試験では、MED-7 株および MED-5 株の培養液から調製した洗浄菌体を、ドリン系農薬のみを炭素源として添加した MS 培地に植菌しているため、前培養液から持ち越した栄養源を利用した増殖ではない、つまり、両菌はドリン系農薬を炭素源として増殖していると考えられた。

*Burkholderia* 属および *Cupriavidus* 属細菌には、クロロベンゼン、PCB、有機塩素系農薬などの塩素化芳香族化合物の好氣的分解能を有するものが存在している (Field and Sierra-Alvarez, 2007; Bedard *et al.*, 1986; Sánchez and González, 2007)。しかしながら、ディルドリンおよびエンドリンの好氣的分解能を有する *Burkholderia* 属および *Cupriavidus* 属細菌の分離ははじめての報告である。さらに、これらの分離菌はディルドリンおよびエンドリ

ンを他の炭素源が存在しない条件でも分解できるはじめての細菌という重要な特性を有していることがわかった。

また、本試験結果は、ECH はドリソ系農薬分解菌の効率的分離培養のための基質としてだけではなく、土壌におけるドリソ系農薬の微生物分解を促進する土壌添加物としても有用なのではないかという発展性を期待させるものであった。MED-7 株および MED-5 株のドリソ系農薬分解効率は、ECH を添加する系の方が添加しない系よりも高かった (Fig. 4-2)。これは、ECH を炭素源として添加することで、MED-7 株および MED-5 株のドリソ系農薬分解効率が著しく促進されることを示している。ECH の分解促進作用については、これまでに知られていない。それどころか、土壌中においてドリソ系農薬の分解活性を促進させる物質についての報告すら一報存在するのみであり (Hugenholtz and MacRae, 1990), 本研究で得られた ECH の分解促進作用は非常に興味を持たれる知見である。今後は、ECH の示した分解促進作用について、ドリソ系農薬の分解機構ならびに ECH の資化性等の観点からより詳細に調べていく必要があるだろう。一方、ECH は弱いながらも、それ自体が毒性を有している。したがって、実汚染環境への利用に向けて、より安全な分解促進剤の探索も同時に必要と考えられた。

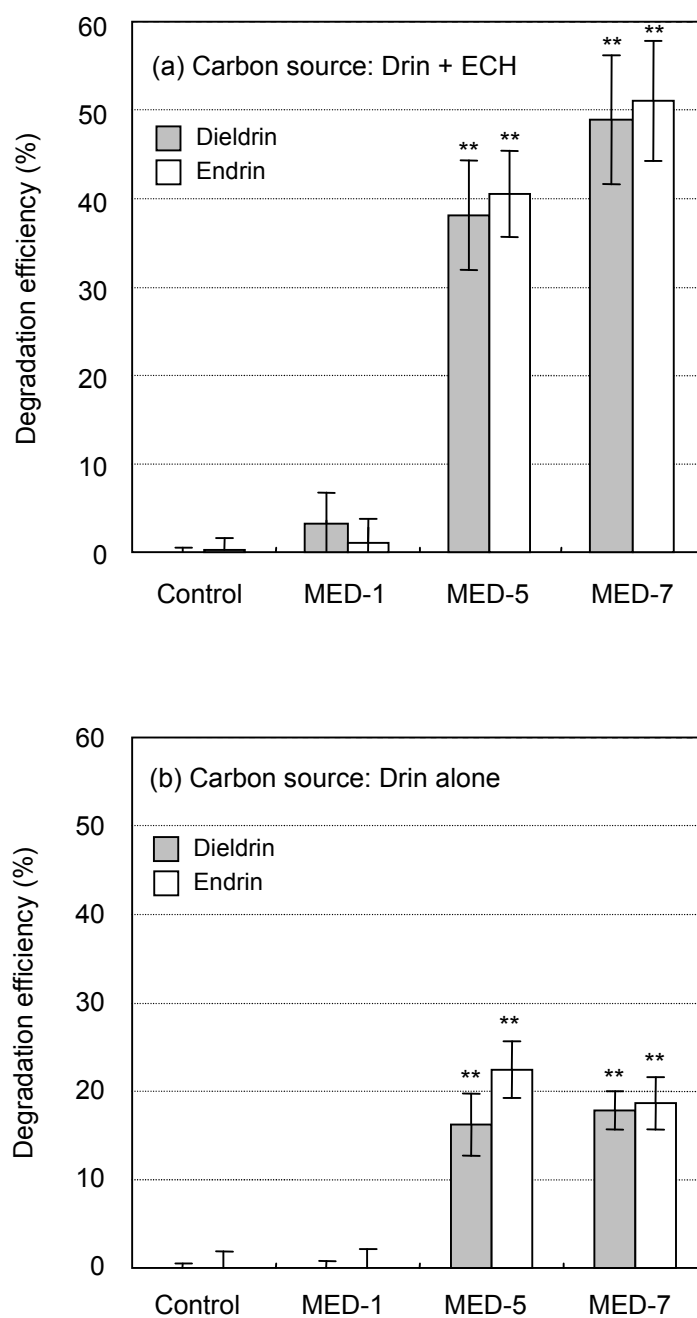


Fig. 4-2 Degradation efficiencies of dieldrin and endrin by strains MED-1, MED-5, and MED-7 in the medium to which dieldrin, endrin, and ECH were added together (a) and that in which dieldrin and endrin were added together (b). Control was measured in the uninoculated medium. Error bars represent standard deviation (n=5). \*\*Significant differences ( $P < 0.01$ ) by Student's t-test for degradation efficiency of each strain vs. control.

#### 4-2-3 分離菌株の菌体および培養上清におけるドリソ系農薬分解活性の評価

MED-5 株ならびに MED-7 株について、休止菌体および培養上清それぞれにおける分解活性を調べた結果をFig. 4-3, Fig. 4-4に示す。本試験は、ドリソ系農薬に対する分解活性の所在を調べるためのものである。

いずれの菌株も生育菌体と同様に休止菌体でもドリソ系農薬分解活性を示したが、上清において、より高い分解活性が認められた。本結果は、増殖に伴って各菌体からドリソ系農薬の分解に関与する酵素が菌体外に放出されている可能性を示唆するものと考えられた。

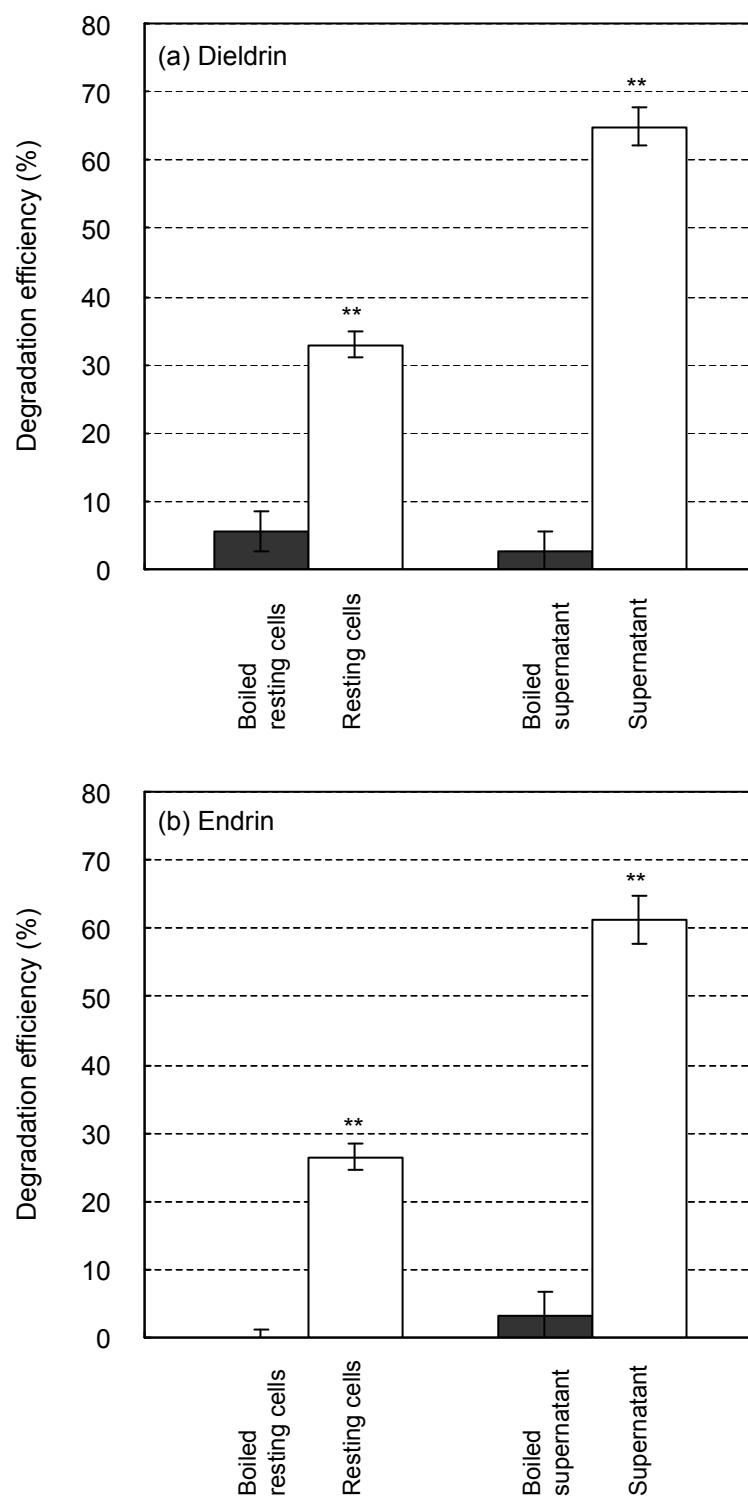


Fig. 4-3 Degradation efficiencies of dieldrin (a) and endrin (b) by resting cells and supernatant of strain MED-7. Error bars represent standard deviation (n=3). \*\*Significant differences ( $P < 0.01$ ) by Student's t-test for degradation efficiency of resting cells or supernatant vs. each boiled control.

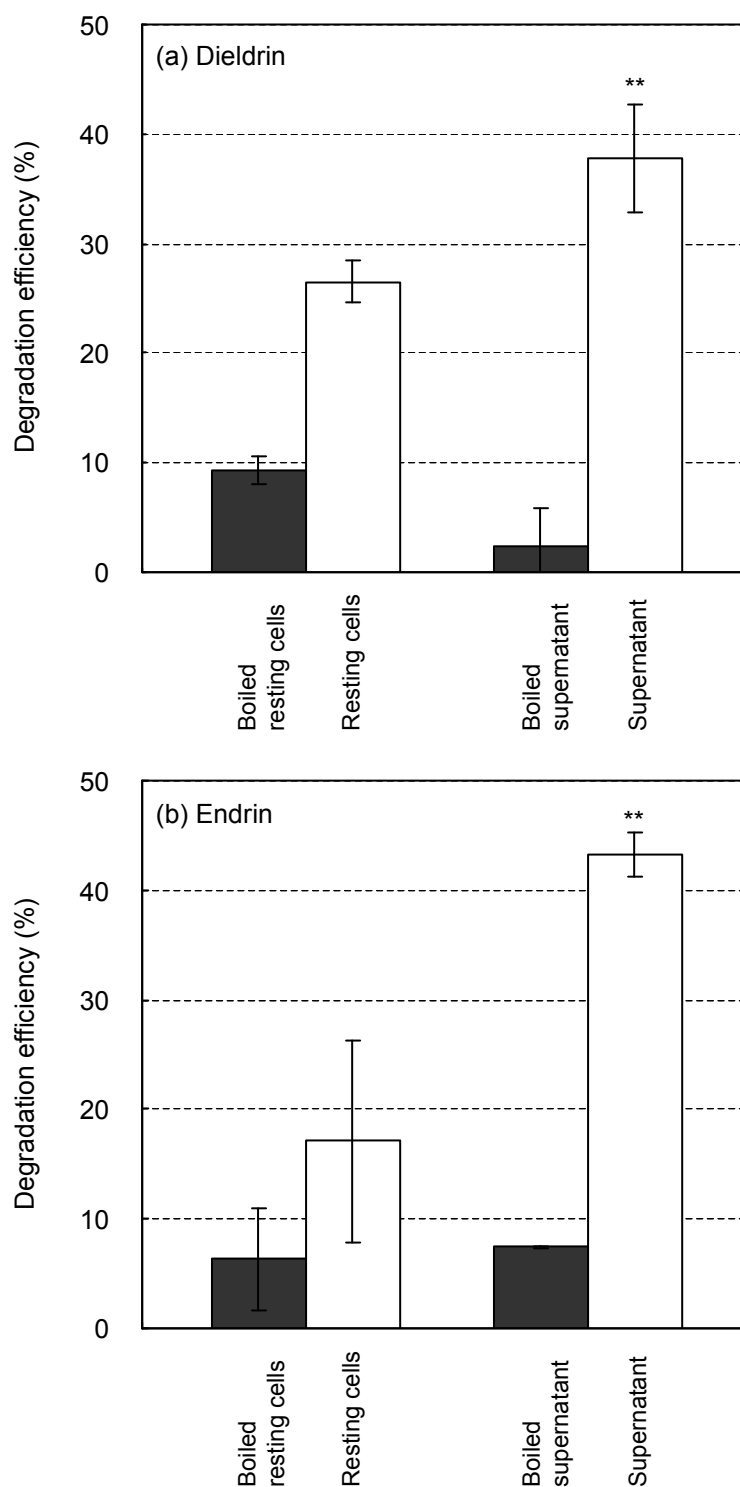


Fig. 4-4 Degradation efficiencies of dieldrin (a) and endrin (b) by resting cells and supernatant of strain MED-5. Error bars represent standard deviation (n=3). \*\*Significant differences ( $P < 0.01$ ) by Student's t-test for degradation efficiency of resting cells or supernatant vs. each boiled control.

#### 4-2-4 分離菌株によるドリリン系農薬代謝物の LC/MS による確認

3 章において、ECH 培養菌群によるドリリン系農薬の分解は、水溶性化合物への代謝が主であるとの推測を記述した。そこで、水溶性化合物の生成を確認することを目的に、MED-5 株ならびに MED-7 株による各ドリリン系農薬分解試験後の溶液について、4-1-6に記載した方法で LC/MS を用いて測定をおこなった。ただし、LC/MS は、GC/MS とは異なり水溶性の高い化合物の検出が可能であるが、マスライブラリ（化合物ごとのマススペクトルのデータベース）が整備されていないことから、標準試薬を保有していない物質の同定が困難な装置である。一方、ドリリン系農薬の予想される水溶性代謝物についての標準試薬は市販されていない。そこで、本研究では、塩素を複数含有する化合物に特有のマススペクトルパターン（塩素は主要な同位体の質量数が 35 と 37 の 2 種であるため、含塩素化合物のマススペクトルは 2 マス置きに強度が高くなる。）から代謝物の探索を試みた。ディルドリンおよびエンドリン、それぞれについての分解試験 5 日後の溶液の LC/MS クロマトグラムを Fig. 4-5 および Fig. 4-7 に示す。

ディルドリンについては、MED-5 株および MED-7 株の両試験系において、コントロール（ドリリン系農薬添加、菌非添加）の系には認められないピークの存在が確認された。そのなかで、およそ 1.8 分のピーク（Peak A および Peak B）は、塩素系化合物に特有のマススペクトルパターンを有しており、ディルドリンの代謝物であることが推測された。Peak B のマススペクトルを Fig. 4-6 に示す。なお、Fig. 4-6 は MED-7 株の試験系におけるマススペクトルであるが、MED-5 株の試験系においても同様のスペクトルが確認された。

一方、エンドリンについても Fig. 4-7 に示すように両菌株の試験系において、ディルドリンと同様のリテンションタイムに、コントロールの系にはみられない、代謝物と思われるピーク（Peak C および Peak D）が認められた（Fig. 4-8）。

前述したように、LC/MS にはマスライブラリが存在しないため、本マススペクトルから代謝物を同定することはできないが、本化合物はリテンションタイムが 1.8 分と極めて早い、すなわち疎水性物質への吸着能が非常に弱い特徴を有していることが明らかになった。本結果は、両菌株がドリリン系農薬を水溶性化合物に代謝していることを意味しており、前章における推測を支持するものであった。



また、ディルドリンおよびエンドリンの代謝物とみられるピークのマスペクトル (Fig. 4-6ならびにFig. 4-8) がほぼ同様であることから、両物質ともに同じ代謝経路をたどっていることが強く示唆された。

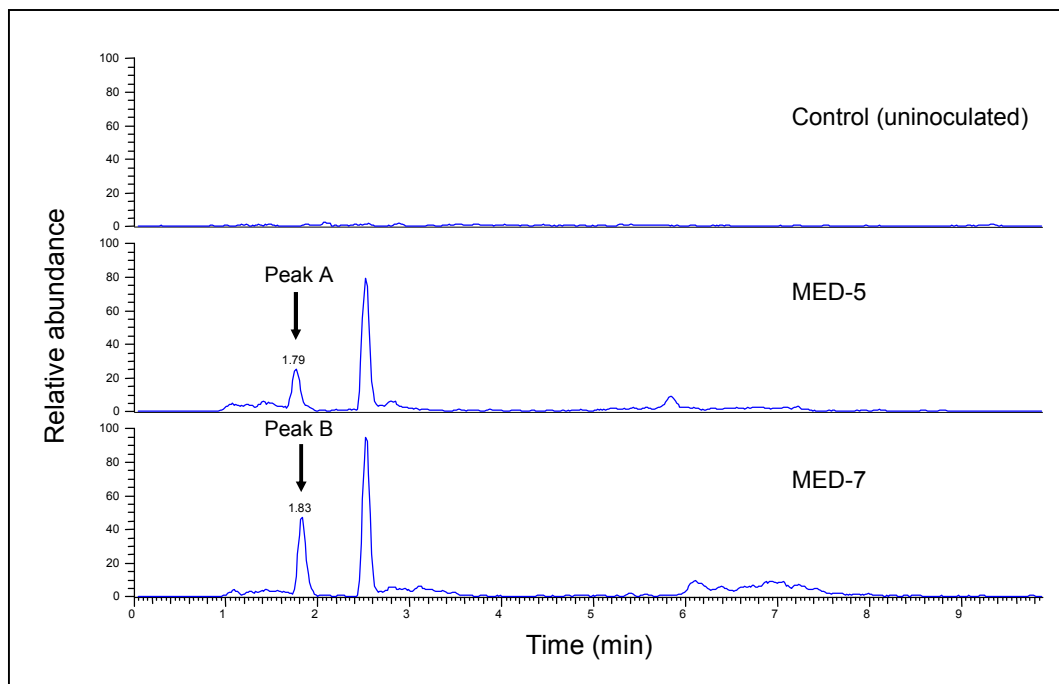


Fig. 4-5 LC/MS chromatograms of test samples after the dieldrin-degrading test by strain MED-5 and MED-7. Control was measured in uninoculated medium.

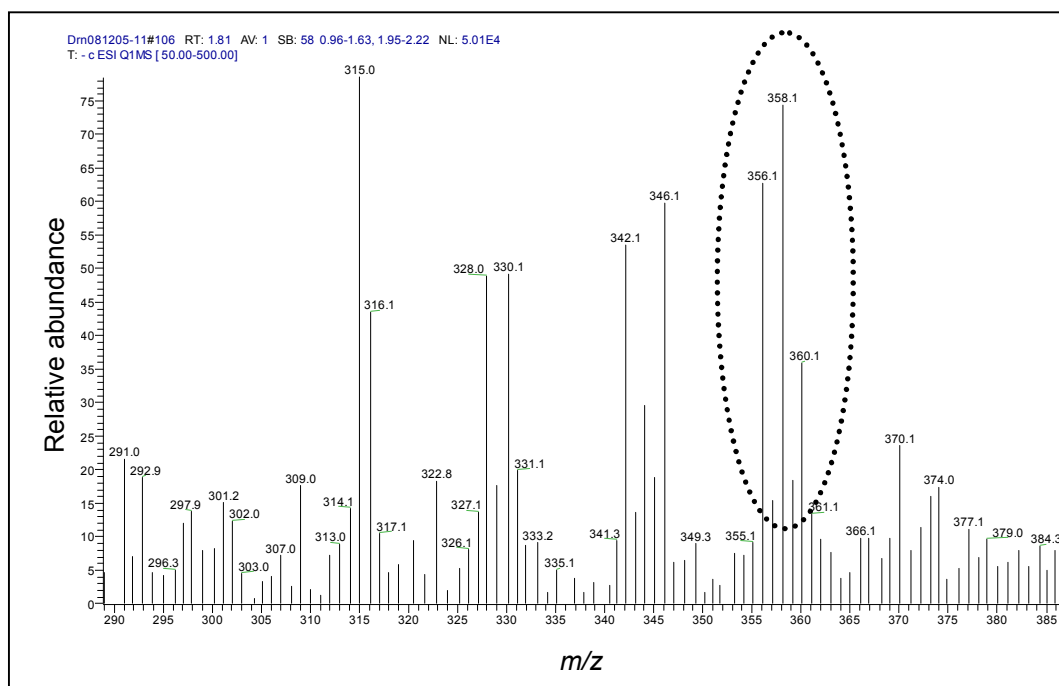


Fig. 4-6 Mass spectrum of the degradation product (peak B in Fig. 4-5) of dieldrin by strain MED-7.

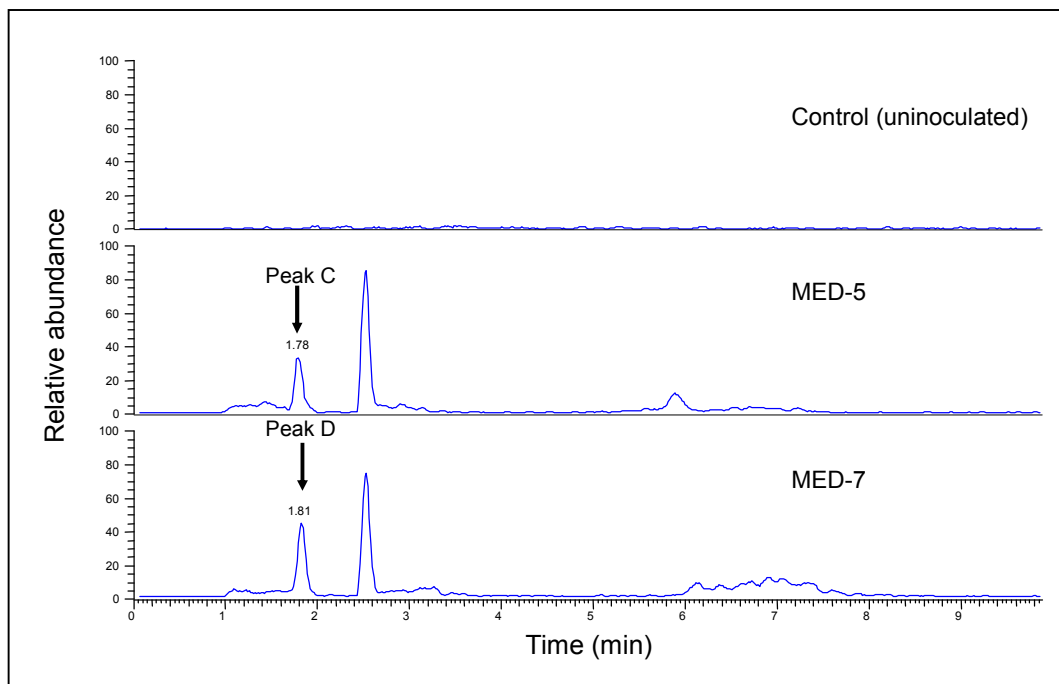


Fig. 4-7 LC/MS chromatograms of test samples after the endrin-degrading test by strain MED-5 and MED-7. Control was measured in uninoculated medium.

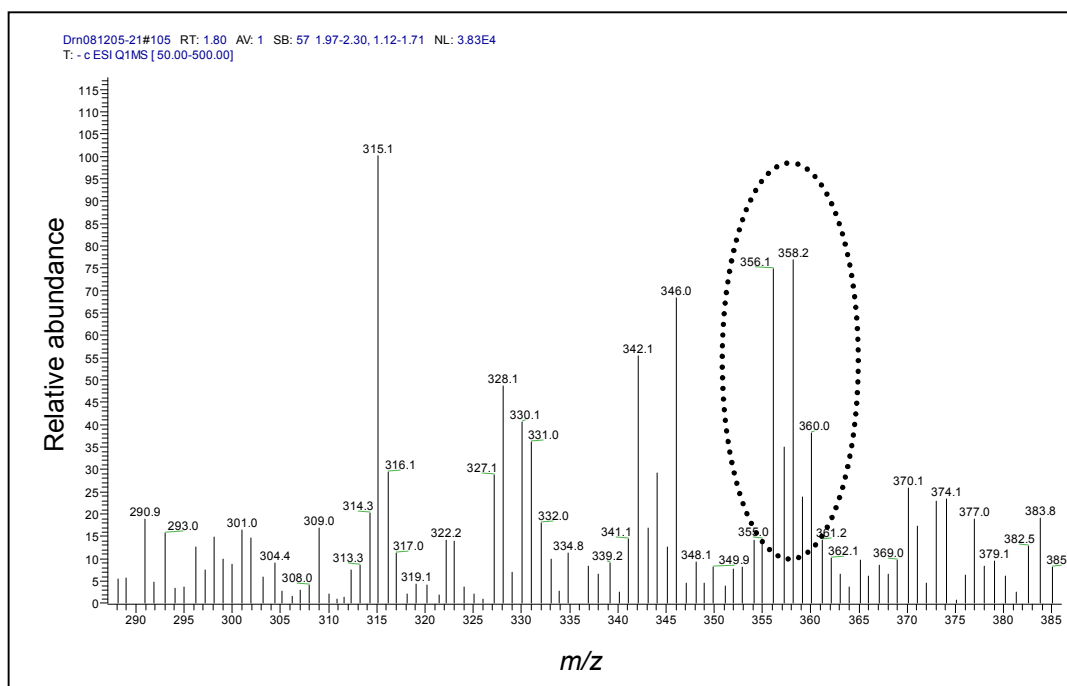


Fig. 4-8 Mass spectrum of the degradation product (peak D in Fig. 4-7) of endrin by strain MED-7.

#### 4-2-5 添加したドリン系農薬分解菌の土壌中における機能性の評価

液体培養において高いドリン系農薬分解活性を示した MED-7 株および MED-5 株について、土壌中における機能性をマイクロコズム試験により評価した。各菌を 13 週間繰り返し投与した土壌マイクロコズムにおけるドリン系農薬の土壌残留量を Fig. 4-9 に示す。

MED-5 株については、培養菌体のみを添加した本試験系においては分解能が認められなかった。一方、MED-7 株については、培養菌体を繰り返し投与することで、ディルドリンおよびエンドリンともに土壌中における分解を確認することができた。

一般に、土壌に導入された微生物の菌数は時間の経過とともに死滅により減少することが知られている（妹尾ら, 1998）。このため、バイオレメディエーションに有用な分解微生物を汚染環境に投入したとしても、それらがその環境で生残増殖して期待どおりに働く可能性は極めて低い。本試験では、繰り返しアクティブな分解菌を土壌に添加することで、土壌における投与菌の低い生残性の問題を回避できないかと考えた。実際に、PCB 汚染土壌に活性化した（分解活性を誘導した）分解菌を 1 回だけ投与しても PCB はほとんど分解しないが、繰り返し添加することで土壌における PCB の分解が促進されることが報告されている（Gilbert and Crowley, 1998）。本研究においても、MED-7 株の繰り返し添加により分解効果が確認された。MED-5 株については、今後、土壌中における生残性を確認するなどの検討をおこなう必要があるだろう。

また、本研究では農業分野において農薬や肥料等、他の液体資材との混合利用といった活用上の利便性を考慮して、集菌した分解菌を液状のまま土壌に添加する方法で検討をおこなった。しかしながら、液体資材を繰り返し添加する方法を汚染現場に適用するには労力の面で課題が残る。したがって、今後は分解菌を吸着・維持させる担体の開発など、土壌中で投与菌の生育の場を確保する技術も検討し、より管理が簡単な方法への改良も検討していく必要があると考えられた。

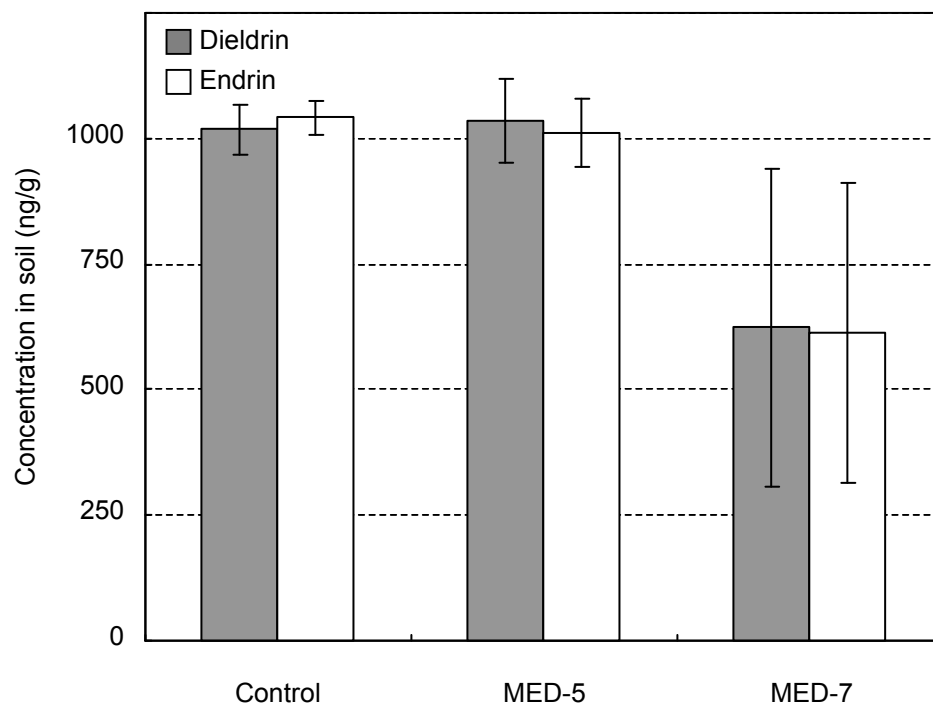


Fig. 4-9 Residual concentrations of dieldrin and endrin in soil microcosms after 13weeks (repeated applications of water (control), strain MED-5 and MED-7). Error bars represent standard deviation (n=3).

#### 4-2-6 ドリン系農薬分解菌の分類・同定

ドリン系農薬に対して分解活性を示した MED-5 株ならびに MED-7 株についての菌種同定結果を以下に記す。

##### MED-5 株

BLAST を用いたアポロン DB-BA4.0 に対する相同性検索の結果、MED-5 株の 16S rDNA 塩基配列は *Cupriavidus* 由来の 16S rDNA に対し高い相同性を示し、*C. necator* ATCC43291 株の 16S rDNA に対し相同率 99.0%と最も高い相同性を示した。NCBI-BLAST に対する相同性検索の結果においても、MED-5 株の 16S rDNA は *Ralstonia*, *Cupriavidus* などの *Burkholderiaceae* 科に由来の 16S rDNA に対し高い相同性を示した。相同性検索結果の第 4 位および第 7 位に検索された *Ralstonia eutropha* (Pohlmann *et al.*, 2006) は 2004 年に *C. necator* に統合されており、現在では *C. necator* の Basonym として扱われている (Vandamme *et al.*, 2004)。MED-5 株とアポロン DB-BA4.0 に対する相同性検索上位 16 株の 16S rDNA を用いておこなった系統解析の結果、MED-5 株は *Cupriavidus* のクラスター内に含まれ、*C. necator* の 16S rDNA とクラスターを形成したが、両者は異なる分子系統学的位置を示した (Fig. 4-11)。以上のことから、16S rDNA 塩基配列解析の結果からは、MED-5 株は既知種 *C. necator* に近縁な *Cupriavidus* sp.と考えられた。

位相差顕微鏡による形態観察結果を Fig. 4-10 (a)に、生理・生化学試験の結果を Table 4-2 に示す。MED-5 株は運動性を有するグラム陰性桿菌で、グルコースを酸化せず、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応は陽性を示した。これらの性状は、16S rDNA 塩基配列解析の結果において帰属が示唆された *Cupriavidus* の一般性状と一致する (Makker *et al.*, 1987)。API キットを用いた試験の結果、MED-5 株は硝酸塩を還元せず、インドールを産生せず、ウレアーゼ活性を示さず、エスクリンおよびゼラチンを加水分解せず、グルコース、L-アラビノース、および D-マンノースなどを資化せず、N-アセチル-D-グルコサミン、グルコン酸カリウム、およびアジピン酸などを資化した。また、MED-5 株は嫌気条件下で生育し、3% NaCl および 41℃で生育し、でんぷんを加水分解しなかった。これらの性状は、*C. necator* の性状に類似する点が多いが、3% NaCl で生育する点は *C. necator* の性状と異なった。

次に、*C. necator* 基準株との DNA-DNA ハイブリダイゼーションをおこなった結果を G+C 含量と共に Table 4-3 に示す。MED-5 株と *C. necator* の間の相同値は 70% 以上を示した。同一種と認める判別基準は相同値が 70% 以上とされている (Johnson, 1984)。

以上の結果より、MED-5 株は *C. necator* の基準株と異なる性状も一部認められたが、*C. necator* と考えられた。

## MED-7 株

BLAST を用いたアポロン DB-BA4.0 に対する相同性検索の結果、MED-7 株の 16S rDNA 塩基配列は *Burkholderia* 由来の 16S rDNA に対し高い相同性を示し、*B. terrae* KMY02 株の 16S rDNA に対し相同率 98.9% と最も高い相同性を示した。NCBI-BLAST に対する相同性検索の結果においても、MED-7 株の 16S rDNA は *Burkholderia* 由来の 16S rDNA に対し高い相同性を示した。最も相同性が高かったのは有機リン系殺虫剤フェニトロチオン分解菌として報告されている *Burkholderia* sp. strain KFA1 (98.9% sequence identity over 1470 bp) で (Tago *et al.*, 2006)、基準株では *B. phytofirmans* PsJN 株および *B. terricola* LMG20594 株の 16S rDNA に対し相同率 98.2% の相同性を示した。MED-7 株とアポロン DB-BA4.0 に対する相同性検索上位 16 株の 16S rDNA を用いておこなった系統解析の結果、MED-7 株は *Burkholderia* 由来の 16S rDNA で形成されるクラスター内に位置したが、既知種とは独立した系統枝を形成した (Fig. 4-12)。以上のことから、16S rDNA 塩基配列解析の結果からは、MED-7 株は *Burkholderia* sp. と考えられた。

位相差顕微鏡による形態観察結果を Fig. 4-10 (b) に、生理・生化学試験の結果を Table 4-2 に示す。MED-7 株はグラム陰性桿菌で、運動性を示さず、グルコースを酸化せず、カタラーゼ反応は陽性、オキシダーゼ反応は陽性を示した。API キットを用いた試験の結果、MED-7 株は硝酸塩を還元せず、インドールを産生せず、ウレアーゼや  $\beta$ -グルコシダーゼなどの活性を示さず、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示し、グルコース、L-アラビノース、および D-マンノースなどを資化し、マルトースおよび n-カプリン酸を資化しなかった。また、MED-7 株は嫌気条件下で生育せず、3% NaCl で生育しなかった。これらの性状は、16S rDNA 塩基配列解析の結果において近縁性が示唆された *B. terrae* の性状に類似性があるものの、相違点も認められた。特に、運動性を示さず、オキシダーゼ反応が陰性を示した点は *B. terrae* の性状と異なった (Yang *et al.*, 2006)。また、今回の試験で得られた結果と完全に一

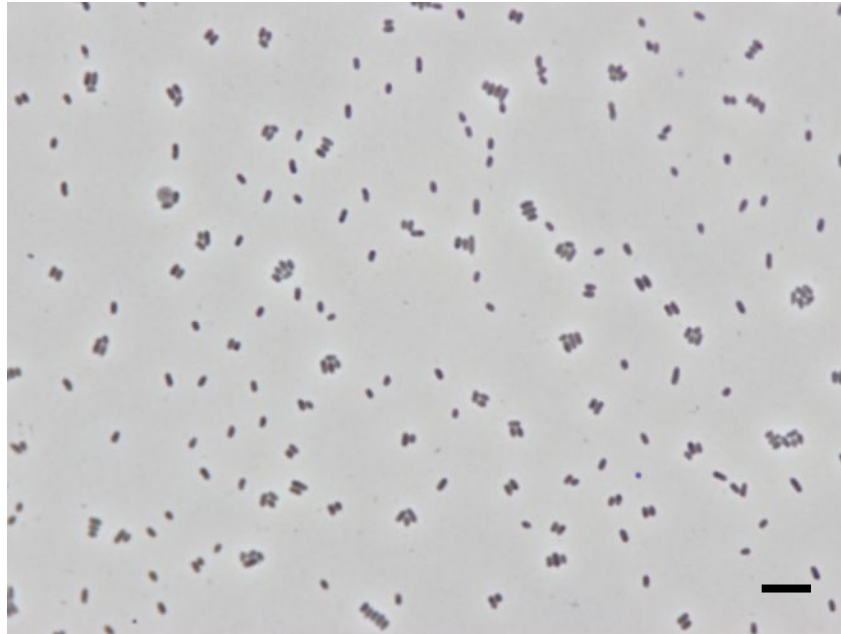
致する既知種も見当たらない。以上のことから、MED-7 株は *Burkholderia* の既知種と異なることを示唆しており、*Burkholderia* の新種を形成する可能性も考えられた。

次に、*Burkholderia caribensis*, *B. hospita*, *B. phymatum*, および *B. terrae* 基準株との DNA-DNA ハイブリダイゼーションをおこなった結果を Table 4-4 に示す。MED-7 株は、*B. terrae* と最も高い相同値を示し、その相同値は 82% 以上であった。しかしながら、近年、16S rDNA 塩基配列の相同率が 98.7-99% であれば、別種である可能性が高いことが報告されている (Stackebrandt and Ebers, 2006)。MED-7 株と *B. terrae* 基準株の 16S rDNA 塩基配列の相同率 (98.9%) は、この範囲内であることから、本相同値については再検討の必要性があると考えられた。また、前述のように MED-7 株と *B. terrae* の生理・生化学的性状は大きく異なり、新種である可能性も示唆された。

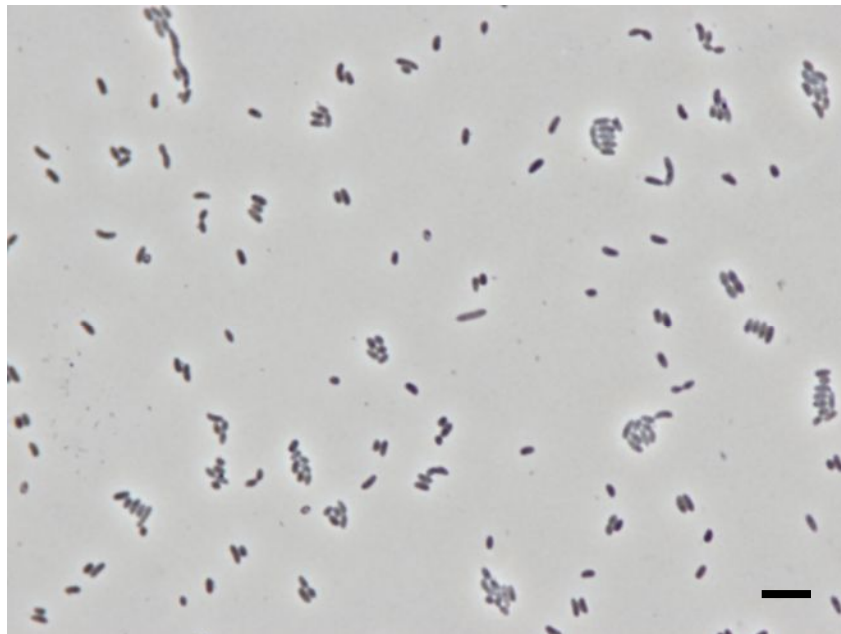
以上の結果より、MED-7 株は *B. terrae* あるいはその近縁種であると考えられた。



(a) Strain MED-5



(b) Strain MED-7



Bar: 5  $\mu$ m

Fig. 4-10 Phase-contrast micrographs of strain MED-5 cells (a) and strain MED-7 cells (b).

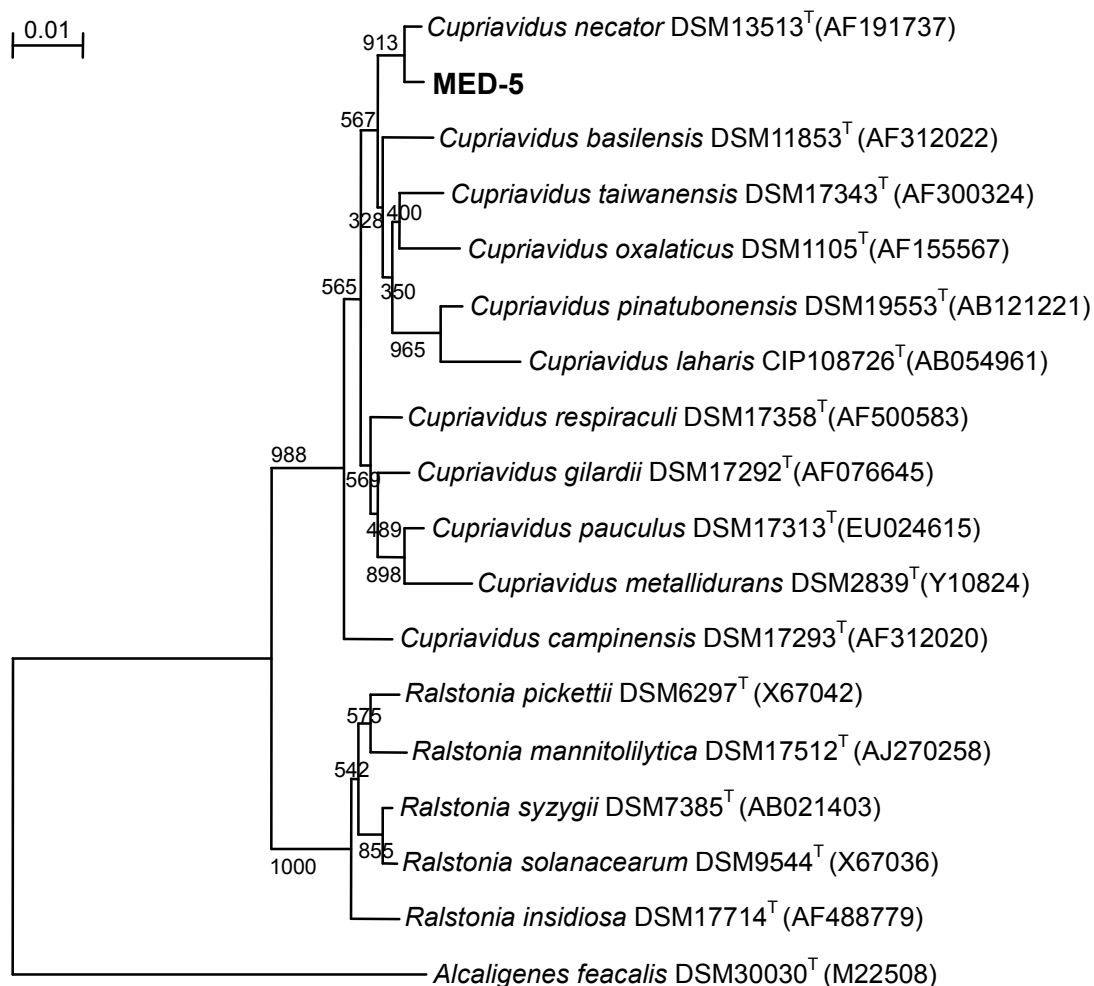


Fig. 4-11 Phylogenetic tree of the 16S rDNA sequences from strain MED-5 and closely related species. The tree was constructed by neighbor-joining method and bootstrap values were calculated from 1000 trees.

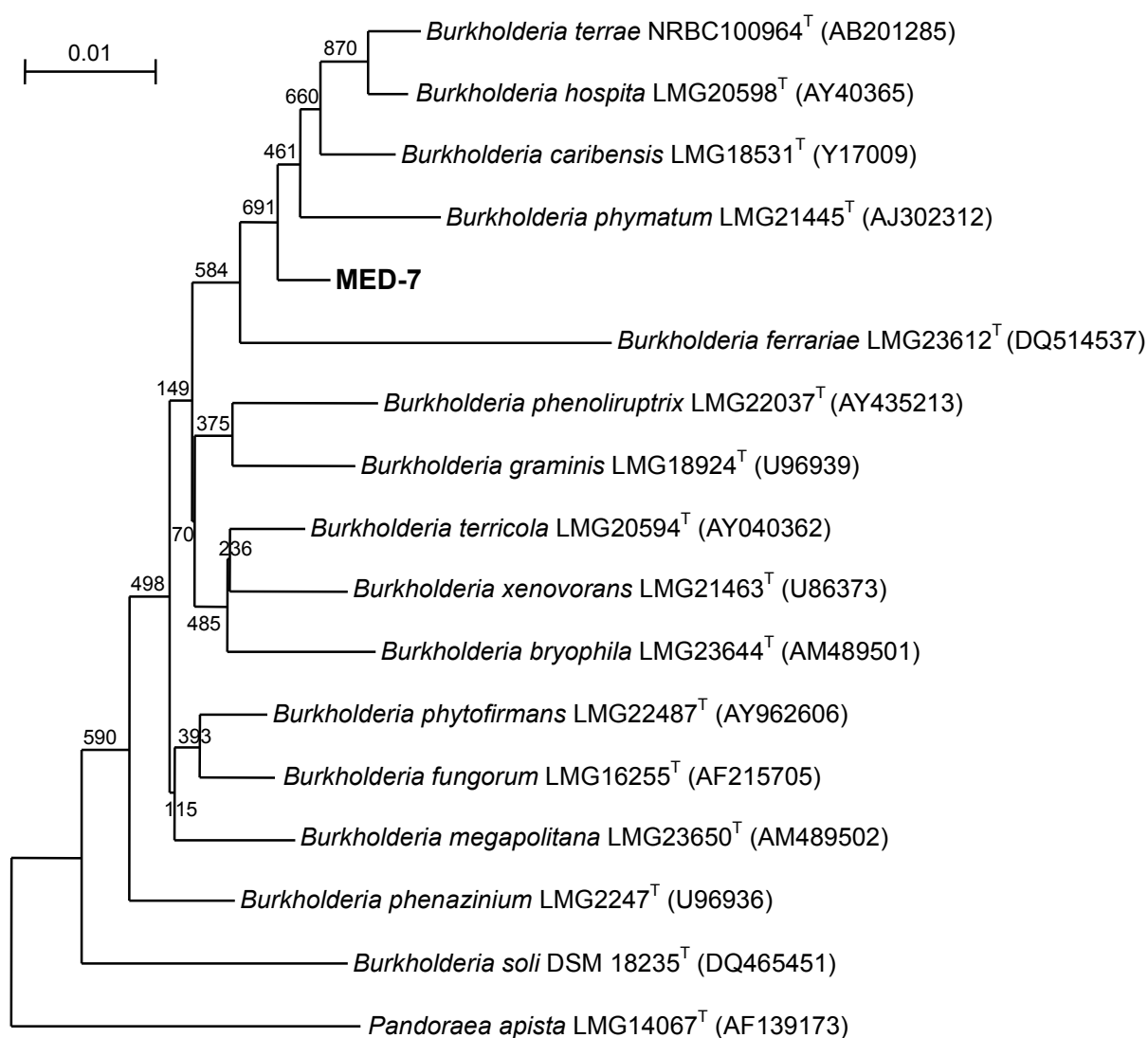


Fig. 4-12 Phylogenetic tree of the 16S rDNA sequences from strain MED-7 and closely related species. The tree was constructed by neighbor-joining method and bootstrap values were calculated from 1000 trees.

Table 4-2 Phenotypic characteristics of strain MED-5 and MED-7

Characteristic	MED-5	MED-7
Morphology	Rod (0.8×1.0-1.5 μm)	Rod (0.6-0.7×1.0-1.5 μm)
Gram reaction	-	-
Spores	-	-
Motility	+	-
Colony shape	Circular, convex, pale yellow color (Nutrient agar)	Circular, convex, cream color (R2A agar)
Growth at 37 °C	+	+
41 °C(MED-5), 42 °C(MED-7)	+	-
45 °C	-	-
Growth in the presence of 3% NaCl	+	-
Catalase	+	+
Oxidase	+	-
Acid/gas production (glucose)	-/-	-/-
Oxidation-Fermentation (OF) test	-/-	-/-
Nitrate reduction	-	-
Production of indole	-	-
Acidification of glucose	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Urease	-	-
Aesculin hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-
Hydrolysis of starch	-	-
β-galactosidase	-	+
Cytochrome oxidase	+	-
Assimilation of:		
Glucose	-	+
L-Arabinose	-	+
D-Mannose	-	+
D-Mannitol	-	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+
Maltose	-	-
Potassium gluconate	+	+
N-Capric acid	-	-
Adipic acid	+	+
DL-Malic acid	+	+
Sodium citrate	+	+
Phenyl acetate	+	+
Ability to grow under anaerobic conditions	+	-

+: Positive, -: Negative

Table 4-3 DNA-DNA relatedness between strain MED-5 and type strain of *Cupriavidus necator*

Strain	G+C (mol%)	1	2
1 Strain MED-5	66	100	85
2 <i>Cupriavidus necator</i> DSM13513 <sup>T</sup>	66	70	100

Table 4-4 DNA-DNA relatedness between strain MED-7 and type strains of *Burkholderia caribensis*, *B. hospita*, *B. phymatum*, and *B. terrae*

Strain	G+C (mol%)	1	5
1 Strain MED-7	62	100	82
2 <i>Burkholderia caribensis</i> LMG18531 <sup>T</sup>	63	49	-
3 <i>Burkholderia hospita</i> LMG20598 <sup>T</sup>	63	62	-
4 <i>Burkholderia phymatum</i> LMG21445 <sup>T</sup>	63	47	-
5 <i>Burkholderia terrae</i> KMY02 <sup>T</sup>	63	90	100

#### 4-3 結論

本章では、ドリン系農薬に対して高い分解活性を有することが確認された ECH 集積培養菌群から主要構成菌を分離し、どの菌が分解に寄与しているのかを明らかにするとともに、その分解特性を評価した結果について論じた。本試験は、ECH 集積培養菌群の構成菌が、いずれもドリン系農薬分解菌として分離されていない菌種であったことから、それらのドリン系農薬分解力に興味を持ち、実施したものである。

結果、ドリン系農薬分解菌群は、主として *Burkholderia* 属菌 MED-7 株、*Cupriavidus* 属菌 MED-5 株、および *Alcaligenes* 属菌 MED-1 株の 3 菌種から構成されていることが明らかとなり、それらすべての分離に成功した。

この 3 種の主要構成菌のうち、ドリン系農薬分解活性は MED-7 株および MED-5 株に認められた。ECH およびドリン系農薬を炭素源として添加して 14 日間培養をおこなった条件においては、MED-7 株および MED-5 株は、ディルドリンを 49%および 38%、エンドリンを 51%および 40%も分解する能力を示した。本分解能は、過去に報告されたドリン系農薬分解菌と比べても非常に高いものであった。さらに、MED-7 株と MED-5 株は、ドリン系農薬のみを炭素源とする条件下においても分解能を発揮することが明らかとなった。これらの分解菌は、ドリン系農薬を炭素源とすることができる細菌としてはじめて見出されたものであった。

また、本試験結果は、ECH で集積された 3 種の主要菌株のうち 2 菌株が、ドリン系農薬に対して高い分解能を有していることを示している。したがって、前章で提案した ECH による集積培養法は、ドリン系農薬分解菌を高選択的に培養可能であり、分解菌取得のための非常に有用な方法と考えられた。

さらに、ECH は MED-7 株と MED-5 株の分解活性を向上させる能力を有していることが本結果から示唆された。これは、ECH がドリン系農薬の分離培養基質として有用であるだけでなく、分解促進剤としても利用可能性が高いことを期待させるものである。

一方、MED-7 株と MED-5 株は生育菌体だけではなく、休止菌体においてもドリン系農薬分解活性を示した。さらに興味深いことに、MED-7 株と MED-5 株の培養上清にも高いドリン系農薬分解活性が認められた。これは、分解酵素の菌体外への放出を示唆するもの

であるとともに、MED-7 株と MED-5 株のドリン系農薬分解機構の解明へつながる結果と考えられた。

最後に、MED-7 株と MED-5 株の分類同定をおこなった結果、MED-7 株は *Burkholderia terrae* あるいは *B. terrae* に近縁な新種であること、そして、MED-5 株は *Cupriavidus necator* に分類される菌種であることが明らかになった。いずれについても、これまでにドリン系農薬に対する分解能は報告されておらず、本結果はそれぞれの菌種において新しい知見を与えるものであった。

## 第 4 章の引用文献

Barrow GI, Feltham RKA, Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition. Cambridge University Press (1993)

Bedard DL, Unterman R, Bopp LH, Brennan MJ, Haberl ML, Johnson C, Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. Appl Environ Microbiol 51:761–768 (1986)

Felsenstein J, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791 (1985)

Field JA, Sierra-Alvarez R, Microbial degradation of chlorinated benzenes. Biodegradation doi:10.1007/s10532-007-9155-1 (2007)

Gilbert ES, Crowley DE, Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil. Appl Microbiol Biotech 50: 480 9-494 (1998)

Hugenholtz P, MacRae IC, Stimulation of aldrin and dieldrin loss from soils treated with carbon amendments and saturatedring analogs. Bull Environ Contam Toxicol 45:223–227 (1990)

Johnson JL, Nucleic acids in bacterial classification. In Krieg NR, Holt JG(eds), Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore 8-11 (1984)

Kimura M, A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111–120 (1980)

- Makker NS, Casida Jr. LE, *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* 37: 323-326 (1987)
- Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB, Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J System Bacteriol* 39:159-167 (1989)
- Pohlmann A, Fricke WF, Reinecke F, Kusian B, Liesegang H, Cramm R, Eitinger T, Ewering C, Potter M, Schwartz E, Strittmatter A, Voss I, Gottschalk G, Steinbuechel A, Friedrich B, Bowien B, Genome sequences of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotech* 24: 1257-1262 (2006)
- Saitou N, Nei M, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425 (1987)
- Sánchez MA, González B, Genetic characterization of 2,4,6-trichlorophenol degradation in *Cupriavidus necator* JMP134. *Appl Environ Microbiol* 73:2769–2776 (2007)
- 妹尾啓史, 西山雅也, 土壤環境に導入された微生物の生残性を規制する要因. 三重大大学生物資源学部紀要 20: 23-30 (1998)
- Stackebrandt E, Ebers J, Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33:152-155 (2006)
- 鈴木健一郎, 2. DNA の調整, pp:15-21, 鈴木健一郎, 平石明, 横田明 編, 微生物の分類・同定実験法. スプリンガー・フェアラーク東京 (2001)
- Tago K, Sekiya E, Kiho A, Katsuyama C, Hoshito Y, Yamada N, Hirano K, Sawada H, Hayatsu M, Diversity of fenitrothione degrading bacteria in soils from distant geographical areas. *Microbes Environ* 21: 58-64 (2006)
- Tamaoka J, Komagata K, Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 25:125-128 (1984)
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882 (1997)



- Vandamme P, Coenye T, Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int J Syst Evol Microbiol 54: 2285-2289 (2004)
- Wedemeyer G, Partial hydrolysis of dieldrin by *Aerobacter aerogenes*. Appl Microbiol 16: 661-662 (1968)
- Yang HC, Im WT, Kim KK, An DS, Lee ST, *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. Int J Syst Evol Microbiol 56: 453-457 (2006)

## 第5章 結論

---

## 5-1 総括

### 5-1-1 研究課題ならびに解法

本研究では、ドリリン系農薬に対する好気性分解菌が、分離に極めて労力を要するという理由からほとんど取得されていない現状を受け、分解菌（群）の効率的な取得方法の確立ならびにそれを用いた新規分解菌の取得を目指した。ドリリン系農薬等の POPs 農薬による土壤汚染は、過去に散布履歴のある畑土壤を中心に大きな社会問題となっており、本課題の解決は、それらに対する浄化手段として期待されているバイオレメディエーションの実現に大きく寄与するものと考えられる。

具体的には、ドリリン系農薬の類似構造物質（アナログ物質）を培養基質として用いることにより、ドリリン系農薬に対して分解活性を持つ菌群の選択的な分離培養を試みた。その際に、多種多様な細菌相を有する非汚染土壤を分離源とすることで、これまでに取得されていない新規ドリリン系農薬分解菌の分離をねらった。

### 5-1-2 ドリリン系農薬分解菌群の取得方法の開発に関する総括

本研究では、分解菌の分離源の拡大と選択的な培養方法の開発という 2 つの視点から、新規分解菌の効率的な取得方法の開発をおこなった。それぞれの視点についての検討結果を以下にまとめる。

#### 非汚染土壤のドリリン系農薬分解菌分離源としての利用可能性の検証

非汚染土壤は、汚染土壤と比較してはるかに多様な微生物相を有していることに着眼し、非汚染土壤がドリリン系農薬分解菌の新たな分離源となりえるかということを検証した。

複数の非汚染土壤マイクロコズムにドリリン系農薬を添加し、それらの残留率の変化から土壤の分解能を評価したところ、森林土壤マイクロコズムにおいて高い分解能（30 週間で、ディルドリンを 39%、エンドリンを 74% 分解）が認められた。

本森林土壤が示したドリリン系農薬の迅速な分解は、非汚染土壤中の微生物によるドリリン系農薬の好氣的分解としてはじめて見出されたものであり、本結果から、ドリリン系農薬分

解菌の新たな分離源として、非汚染土壌は大きな利用可能性を秘めていることが強く示唆された。

### ドリソ系農薬分解菌の選択的培養法の開発

ドリソ系農薬のアナログ物質が、それらの分解菌群の選択的な培養基質となるのではないかという推測のもと、各種アナログ物質の分離培養基質としての有用性を評価・考察した。

森林土壌を分離源に、12 種のアナログ物質等による培養菌群のドリソ系農薬に対する分解能を評価した結果、ECH を基質として培養した菌群が、ドリソ系農薬に対して高い分解能を有することを見出した。

DGGE 解析の結果、本培養液の構成菌は 3 菌種にまで絞られていることがわかり、そこから分離した各菌のドリソ系農薬に対する分解活性を調べたところ、2 菌種までもが分解活性を示すことが明らかになった。

このように、ECH による培養方法は、ドリソ系農薬分解菌の選択性に極めて優れており、多種多様な細菌相を持つ非汚染土壌からの分解菌の分離も可能とするものであった。本結果は、好気性ドリソ系農薬分解菌の選択的培養法についてのはじめての報告である。

### 5-1-3 取得したドリソ系農薬分解菌の特性評価に関する総括

ECH を用いた分離培養法により非汚染土壌から得られた 2 株のドリソ系農薬分解菌、MED-7 株および MED-5 株について、分解活性の評価および菌種の同定をおこなった。

ECH およびドリソ系農薬を炭素源として添加して 14 日間培養をおこなった条件において、MED-7 株および MED-5 株は、ディルドリンを 49%および 38%、エンドリンを 51%および 40%も分解する能力を示した。本分解能は、過去に報告されたドリソ系農薬分解菌と比べても非常に高いものであった。

さらに、MED-7 株と MED-5 株は、ドリソ系農薬のみを炭素源とする条件下においても分解能を発揮することが明らかとなった。これらの分解菌は、ドリソ系農薬を炭素源とすることができる細菌としてはじめて見出されたものであった。

一方、MED-7 株ならびに MED-5 株の分解活性は、培養中の上清において高く認められたことから、これらの菌は分解酵素を菌体外に放出していることが示唆された。

MED-7 株および MED-5 株について同定をおこなった結果、MED-7 株は *Burkholderia terrae* あるいは *B. terrae* に近縁な新種であること、そして、MED-5 株は *Cupriavidus necator* に分類される菌種であることが明らかになった。いずれの種においても、これまでにドリリン系農薬分解菌としての知見はなく、本研究においてはじめて報告されるものであった。

本研究では、非汚染土壌を新たな分離源に、そして ECH を分解菌の選択的な培養基質として用いることで、これまでに報告されていない新たなドリリン系農薬分解菌の分離に成功した。本研究で開発した分解菌の分離培養法は、ドリリン系農薬のバイオレメディエーション研究においてネック工程となっている分解菌の分離段階の労力を大きく軽減させるものであり、バイオレメディエーションの実用化に貢献するものと考えられる。

## 5-2 将来課題と展望

汚染土壌の浄化技術は、浄化対象物質の種類、その濃度・拡がりの程度、浄化後の土地利用といった汚染サイトごとの状況に応じて使い分けるべきである。低濃度ではあるが広範囲に及ぶドリリン系農薬で汚染された農地表層土壌を浄化する場合には、浄化後も農地として使い続けたいという要望に合う技術の適用が望ましいと考える。このような汚染サイトに最適な土壌浄化技術は、浄化後も作物生産が可能な土壌機能を維持できるバイオレメディエーションであろう。しかしながら、好氣的条件下でバイオレメディエーションに利用可能なドリリン系農薬分解菌は取得されておらず、現段階でドリリン系農薬汚染土壌に適用可能な浄化技術は、物理化学的手法のみというのが実状である。物理化学的手法による浄化対策は、高額な費用が必要となるため地方自治体での適用は埋設地点周辺に限定されており、農地土壌への適用には至っていない。さらに本質的な問題は、浄化処理後の土壌の物理化学的性状を大きく変化させてしまうため、農地という土地用途に合わないことである。すなわち、物理化学的手法は、低濃度汚染農地にとっては土壌浄化技術であっても、土壌機能を壊してしまうため、土壌修復技術ではないといえる。このため、ドリリン系農薬で汚染した農地対策として根本的な解決手段となりえる技術は、バイオレメディエーションだけであると筆者は考える。

このような汚染農地対策の厳しい状況のなか、本研究では、従来は分離が困難とされてきた好気性のドリン系農薬分解菌の取得に成功し、ドリン系農薬汚染土壌のバイオレメディエーションの実現に大きく貢献する知見を得たことは意義深いと思われる。

本研究で開発した、アナログ物質である ECH を用いる分解菌の分離培養法は、非汚染土壌である森林土壌に適用し、その有効性が確認された。今後は、本法をドリン系農薬汚染土壌や他の非汚染土壌に対しても適用し、その汎用性ならびに適用範囲を確認するとともに、新たなドリン系農薬分解菌の取得を進めていくことで、バイオレメディエーションの実用段階における対応力を大きく向上させることが可能になると考える。

一方、有用な分解菌を分離できたとしても、それが土壌中で期待される機能を十分に発揮できるとは限らない。実際に、本研究においても、MED-7 株と MED-5 株の土壌添加試験において分解活性の発現に差が認められた。今後は、両菌を含め、分解菌を土壌において有効に機能させるための制御技術についても確立していく必要があると考える。

上述したような技術的課題はまだ残されているが、本研究成果を活かすことで、農地におけるドリン系農薬汚染を残置した状態にせず、土壌汚染対策費用の負担を低減でき、時間を要するが原位置で浄化をしながら作物栽培も継続できるという、農地に適応した現実的かつ理想的なバイオレメディエーションが開発できると期待している。

近年、植物の機能を利用する浄化技術であるファイトレメディエーションのドリン系農薬汚染農地への適用に関する研究も日本を中心に始まっている。しかしながら、現時点でのファイトレメディエーションによるドリン系農薬の浄化効率（吸収効率）は低く、植物によるそれらの吸収を増進させるための技術開発が望まれている。一方、本研究で取得した分解菌はドリン系農薬を水溶性化合物に変換している可能性が高く、それらは植物にとって親化合物であるドリン系農薬そのものよりも吸収しやすい状態になっていると考えられる。今後は、バイオレメディエーションとファイトレメディエーションを組み合わせる技術の開発なども視野に入れて、汚染土壌からのドリン系農薬の除去効率が大きく向上して短期間で無害化できる、よりよい浄化技術の開発が期待される。

## Appendix 18S rRNA 遺伝子を用いた森林土壌中 の微生物群集構造解析

---

## A-1 研究の背景と目的

本研究で用いた森林土壌は pH が比較的低いため、ドリリン系農薬の分解において菌類が重要な役割を果たすことも考えられる。そこで、18S rDNA を用いてドリリン系農薬添加土壌マイクロコズムおよび非添加土壌マイクロコズムにおける菌類群集構造の時間的変化を PCR-DGGE 法により解析し、土壌中で分解に関与する菌類の推定を試みた。

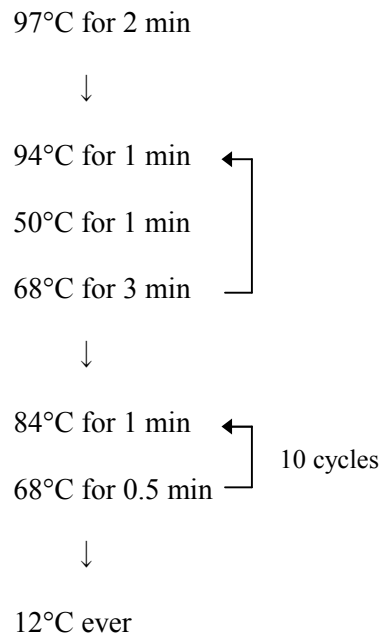
## A-2 実験方法

18S rRNA 遺伝子の PCR は、真核生物の中でも菌類に特異的なプライマーとして報告のあるものについて検討した結果、増幅効率がよく、植物由来の遺伝子等が増幅してこなかった以下のプライマーセットを使用した。土壌 DNA を鋳型としたとき、1 回の PCR では増幅が困難であったため、nested-PCR をおこなった。Forward プライマーは、NS1(5'-cgc cgg ccg cgc gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg gggg gta gtc ata tgc ttg tctc-3' ; 下線部は GC clamp に相当する)を、1st PCR と 2nd PCR において共通で用いた (White *et al.*, 1990)。Reverse プライマーは、プライマー-SSU-1536(5'-att gca atg cgc tat ccc ca-3')を 1st PCR、プライマー-SSU-1196(5'-tct gga cct ggt gag ttt cc-3')を 2nd PCR に用いた (Borneman *et al.*, 2000)。以上のプライマーを用いて、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の rRNA 位置で 20 番目から 1196 番目に相当し、V1, 2, 3, 4, 5 領域を含む領域を増幅した。1st PCR 反応液は、以下の組成とした。2-2-7で用いた TaKaRa の *Ex Taq* DNA polymerase では、土壌 DNA から 18S rRNA 遺伝子を増幅できなかったため、18S rRNA 遺伝子を対象とした PCR 増幅には KOD-Plus- DNA polymerase (東洋紡製) を用いた。2nd PCR 反応液は、4  $\mu$ L の 1st PCR 産物を鋳型とした。

土壌 DNA	50 ng
10 $\times$ buffer for KOD -Plus-	10 $\mu$ L
dNTP mixture (2 mM each)	10 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	6 $\mu$ L
10 $\mu$ M each primer	2 $\mu$ L
Bovine serum albumin	10 $\mu$ g
KOD -Plus- DNA polymerase (TOYOBO)	10 units
滅菌水	54 $\mu$ L
Total	100 $\mu$ L



1st PCR は、以下のプログラムで実施した。2nd PCR は、アニーリング温度を 55°C に変更して実施した。



PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動によって目的の DNA 断片サイズを確認し、DNA 濃度を推定した。この PCR 産物の 50μl を DGGE へ供した。

DGGE は、6%アクリルアミド濃度で変性剤の濃度勾配は 20%から 35%のゲルを作製し、DGGE 解析に用いた。DGGE バンドの中でも、微生物群集において特徴的なバンドやバンド強度が強い主要なバンドについては、ゲルから切り出し、3-2-7 に示した方法で塩基配列解析ならびに系統学的解析をおこなった。

### A-3 結果および考察

18S rDNA を用いてドリリン系農薬添加土壌の菌類群集構造を解析した結果、培養 7 週目において、非添加土壌系におけるバンド N1 とほぼ同様の位置に 2 本のバンド (D1 および D2) が出現していることを確認した (Fig. A- 1)。また、これら 2 本のバンドの強度は、いずれもドリリン系農薬の減少に伴いバンド強度が増加していた。

これらの DGGE バンドの塩基配列結果を Table A- 1 に示す。バンド D1 と N1 は共に *Mortierella* 属菌と最も近縁であり、それらはドリリン系農薬の有無にかかわらず土壌マイクロバクテリウム中に存在していると考えられた。すなわち、ドリリン系農薬の減少に伴い特異的に出現したのは *Nectria* 属菌と最も近縁なバンド D2 であり、本菌がドリリン系農薬の分解に関与している可能性が強く示唆された。そこで、本森林土壌においてドリリン系農薬分解に寄与する菌類の取得を目的として、菌類培養用の PD 培地 (ポテトデキストロース培地、日水製薬) を用いて集積培養をおこなったが、得られた菌類群にはドリリン系農薬分解能は認められなかった。現段階では、本土壌におけるドリリン系農薬分解に寄与する菌類の分離には至っていないが、今後も、他の菌類培養用の培地を用いて集積培養を試みる等の検討を継続していく必要があると考えられた。

*Nectria* 属菌は子囊菌門ボタタケ目ネクトリア科に属する。*Nectria* 世代はテレオモルフ (有性世代) で、アナモルフ (無性世代) は 20 種以上存在する (Samuels and Seifert, 1987)。それらは多様な生態を有し、植物病害菌や害虫に寄生して植物を保護するものや、植物や害虫に寄生して植物病害を引き起こすものなどが含まれる。バンド D2 と最も近縁な *N. mariannaeae* のアナモルフは *Marianaea elegans* で、その病原性等の情報は不明である。環境省および経済産業省が 2004 年に告示した「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」において、利用微生物の病原性についてはバイオレメディエーションの安全性を評価する上で必要な情報として指定している。*Nectria* 属菌には植物病原性を有する菌も含まれることから、農地土壌等の浄化への適用可能性については詳細な調査・検討が必要と考えられた。

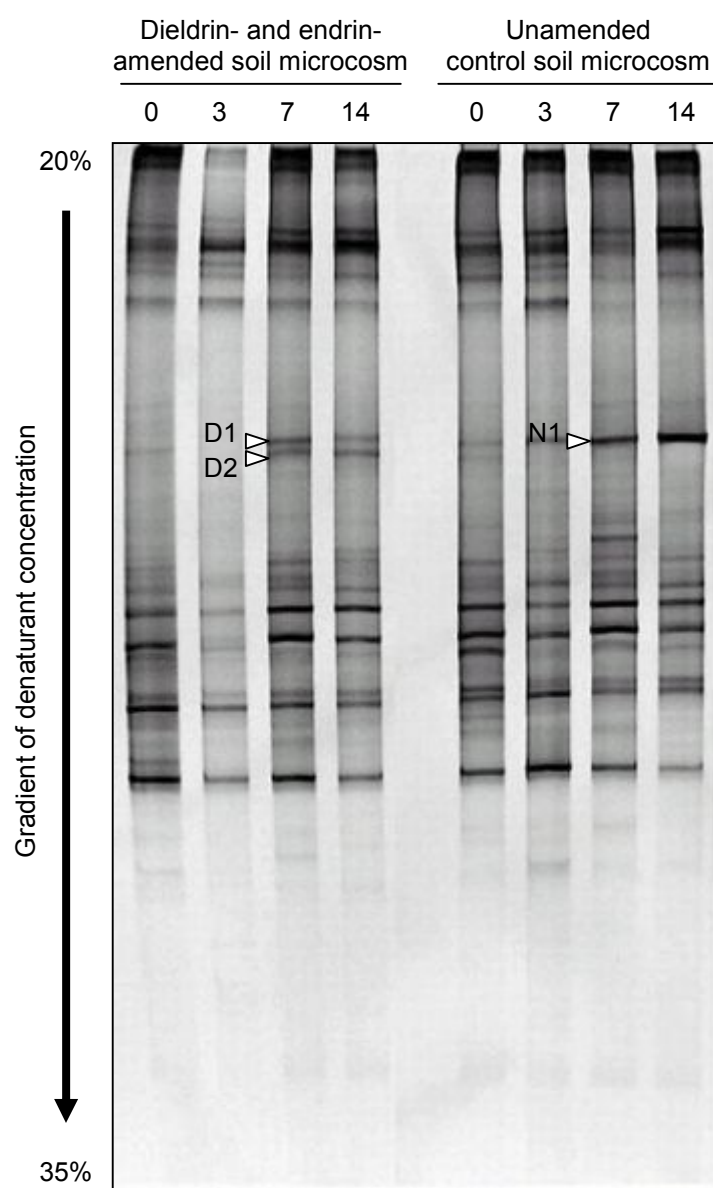


Fig. A- 1 DGGE profiles of PCR-amplified 18S rRNA fragments of dieldrin- and endrin-amended forest soil microorganism and unamended forest soil microorganism at 0, 3, 7, and 14 weeks of incubation.

Table A- 1 Sequence analysis of major DGGE bands of the forest soil microcosm

DGGE band <sup>a</sup>	Dieldrin	Closest phylogenetic relative		% Similarity to closest
	Endrin	(Accession Number)		relative
D1	+	<i>Mortierella verticilata</i>	(AB016017)	95
D2		<i>Nectria mariannaeae</i>	(AB111492)	92
N1	—	<i>Mortierella verticilata</i>	(AB016017)	97

<sup>a</sup> DGGE bands correspond to those shown in Fig. 2-3b

## Appendix の引用文献

Borneman J, Hartin RJ, PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. Appl Environ Microbiol 66:4356-4360 (2000)

Samuels GJ, Seifert KA, Taxonomic implications of variation among Hypocrealean anamorphs. pp. 29-56 In: Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications, Kodansha, Tokyo (1987)

White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor JW, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press, San Diego (1990)

## 謝辞

本研究を行うにあたり，東京大学大学院 農学生命科学研究科 小柳津広志教授には，あらゆる面でご指導をいただきました。ここに心から感謝の意を表します。

本論文の審査および完成にあたり，貴重なご意見をいただきました東京大学大学院 農学生命科学研究科 妹尾啓史教授，分子細胞生物学研究所 横田明准教授，農学生命科学研究科 石井正治准教授，農学生命科学研究科 藤原徹准教授に厚く御礼申し上げます。また，研究を進めるにあたり種々の有益なご助言をいただいた東京大学大学院 農学生命科学研究科 青野俊裕助教，実験手法・学術的知見に関して多大なるご助言をいただくとともに常に温かく見守ってくれた頼もしい友人でもある鈴木志野博士，そして植物機能工学研究室の皆様には感謝の意を表します。

株式会社環境管理センター 水落陽典社長，鯨島総一郎副社長，環境基礎研究所 尹順子所長には，本研究を行う機会を与えてくださるとともに多くのご助言をいただきました。そして，快く博士課程への国内留学を承認していただきました。心より厚く御礼申し上げます。

研究の遂行にあたっては多くの方のご助言とご協力をいただきました。株式会社環境管理センター 環境基礎研究所 川中洋平リーダーには，研究の方向性・実験手法・論文執筆等に関して多大なるご指導，ご協力をいただくとともに，研究のやりがいと面白さを常に示してくださいました。株式会社環境管理センター 土屋悦輝先生，岩島清先生には，研究の遂行ならびに論文執筆にあたり多くの有益なご助言をいただきました。東京大学 分子細胞生物学研究所 安善榮博士には，菌の同定を行うにあたり多くのご指導，ご意見をいただきました。また，株式会社環境管理センター 環境基礎研究所 王寧副所長，今井志保さん，平岡都さん，二宮咲子さん，辻本浩子さん，原元利浩さんには，研究を進めていく上で日々ご助言をいただくとともに，本論文をまとめるにあたって様々なご協力・ご理解をいただきました。ここに，心から御礼申し上げます。

以上の方や，ここに書ききれしていない実験に協力していただいた方々のおかげで，本論文をまとめることができました。深く感謝いたします。

最後に，3年にわたる研究生生活を理解し，温かく見守ってくれた，そしてあらゆる面で全面的にサポートしてくれた家族に，心より感謝いたします。

## 本論文に関連する研究業績一覧

### <学術論文>

Matsumoto, E., Kawanaka, Y., Yun, S.J., Oyaizu, H., Isolation of dieldrin- and endrin-degrading bacteria using 1,2-epoxycyclohexane as a structural analog of both compounds. Applied Microbiology and Biotechnology 80: 1095-1103 (2008)

### <特許出願>

松本えみ子, 川中洋平, “新規菌株及びそれを用いた浄化方法”, 特願 2008-177539 (2008. 7. 8 出願)

### <学会発表>

Matsumoto, E., Kawanaka, Y., Wang, N., Yun, S.J., Oyaizu, H., Aerobic degradation of dieldrin and endrin by a microbial consortium. Proceedings of 13th International Symposium on Toxicity Assessment, P35, (2007)

松本えみ子, 川中洋平, 王 寧, 尹 順子, 小柳津広志: ディルドリンおよびエンドリン分解能を有する土壌中の微生物群集構造解析, 第 13 回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 (2007)

松本えみ子, 川中洋平, 王 寧, 尹 順子: 土壌微生物群によるディルドリンおよびエンドリン分解能の強化, 日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006)

松本えみ子, 川中洋平, 王 寧, 尹 順子: 好気条件下の土壌におけるディルドリンおよびエンドリンの微生物分解, 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005)