

論文の内容の要旨

論文題目 土壌環境中における農薬の cometabolism に関する研究

氏名 元永 圭

自然環境中に放出された農薬の多くは、単一の微生物によって無機化されることは少なく、むしろ cometabolism によって分解されることが多いと考えられる。しかしながら、従来の cometabolism 研究は単離菌によって純粋培養系で行われたものが殆どであり、一般的に貧栄養と考えられる土壌環境中での cometabolism 分解がどのような因子によって規定されているかについての研究は見出すことができない。そこで、モデル物質として cometabolism によって分解されることが示唆されている殺菌剤

TPN(Tetrachloroisophthalonitrile)を選び、その土壌中での分解速度に影響する要因を明らかにすることを目的として研究を行った。一連の研究には、1974年に東京大学構内に設置された農薬長期連用圃場のTPN連用区、堆肥連用区、対照区(無処理)の土壌を使用した。

1. TPN の cometabolism 速度に対する土壌溶液中の有機物濃度の影響

まず、TPN が土壌中でどのように分解されているかを確認するために、対照区、堆肥区土壌に TPN 40 ppm を処理後、TPN 残留量、Cl⁻生成量、土壌呼吸量を測定した。次に、対照区土壌においては、TPN を連用した場合の分解速度の変化を調べるため、初回処理した TPN がほぼ分解された時点で再度 TPN を処理し、同様の測定を行った。

これらの実験により、全体として TPN1 分子から 1 個の塩素原子が Cl⁻として脱離するまで急速に分解が進むが、その後 Cl⁻の放出は緩やかになり、塩素原子が 1 個はずれた代謝物が土壌中に残留していることが示唆された。これにより、TPN は土壌中で無機化されてい

ないことが明らかとなり、cometabolism による分解であることが確認された。

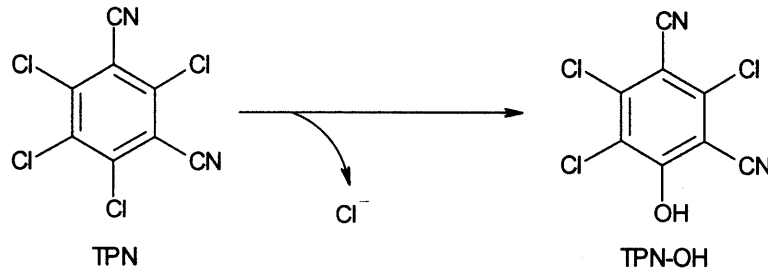


図1 土壌中における TPN-OH の生成機構

また、初回処理された TPN がほぼ消失した後(処理 51 日以降)であっても土壌呼吸量が抑制されており、かつ再処理した TPN の分解も抑制されることが明らかとなった。そこで、土壌中における TPN の主要代謝物と考えられている TPN-OH (4-hydroxy-2,3,5-trichloroisophthalonitrile) を合成し(図 1)、HPLC による検出・定量法を確立した。TPN 処理後の土壌中の TPN-OH 濃度は経時に増加し、TPN の連続投与によってさらに蓄積していく傾向にあった。さらに、TPN-OH 単独の前処理によって対照区土壌中での土壌呼吸量が抑制され、かつ TPN の分解速度も抑制されることが明らかとなった。代謝物による親化合物の分解速度のフィードバック的な阻害は過去に報告がなく興味深い。なお、TPN-OH の毒性は TPN よりは低いが、本研究の結果により TPN-OH の土壌残留性が TPN と比較して高く、土壌吸着力が低いことが明らかとなり、TPN-OH の土壌溶液中での濃度が長期に渡って高く維持されるため、結果として土壌微生物に与える影響が大きくなるものと推察された。

さて、以上の実験(対照区土壌及び堆肥区土壌)における土壌呼吸量と TPN 分解速度の比較を行った結果、これらの間に相関関係が認められた($n=7$, $P < 0.05$)。堆肥連用区の土壌においては、土壌呼吸が対照区土壌よりも大きく、かつ TPN 分解速度も速かった。土壌呼吸量と土壌溶液中の有機物濃度との間には高い相関関係があることが知られており、土壌溶液中の利用可能な有機物の量が、TPN の cometabolism 速度を規定する大きな要因の一つであることが明らかとなった。Cometabolism 分解には、被分解物の他に生育基質となる物質が必要であるが、貧栄養である土壌環境中では、土壌溶液中の利用可能な有機物量が cometabolism 速度の大きな規制要因となっていると考えられる。

2. TPN の cometabolism に及ぼす分解菌相の影響

Cometabolism 分解速度に影響する要因としては、利用可能な有機物量の他に、実際に分解に関わる微生物の特性も考えられる。そこで次に、TPN を分解する微生物について検討した。過去の圃場における連用試験結果から、TPN は連用初期には比較的速く分解されるが、徐々に分解速度が低下し、連用 12~14 年目には分解能が完全に失われることが明らか

にされている。ところが、本研究においては、さらに TPN 連用を続けると再び TPN が分解されていることが明らかとなった(連用 17 年目)。TPN 分解が回復した土壌を用いた容器内試験でも同様に分解が再現され、TPN1 分子に対して 1 個の Cl⁻の放出が確認された。この結果より、TPN 分解の回復は、TPN 無機化によるものではなく、cometabolism によることが明らかとなった。この土壌における TPN 分解菌は、TPN 結晶を懸濁させた各種の平板培地(微生物の一般的な生育基質を含む)において、TPN 結晶を溶解しクリアゾーンを形成するコロニーから単離することができた。1/10 L-broth で前培養したこの分解菌は、他の生育基質なしで、ラグタイムなしに TPN を分解し TPN-OH 及び Cl⁻へと変換したが、明らかな増殖は認められなかった。よって、この分解菌は、構成的に発現している酵素により、cometabolic に TPN を分解することが判明した。対照区、TPN 連用区に存在する分解菌を比較したところ、対照区では分解能力が低い多種類の微生物が存在するが、TPN 連用区では今回単離した、より分解能力の高い微生物のみが認められた。また、分解菌数は TPN 連用区の方が対照区よりも 4 倍程度多かった。以上の結果より、一つの例として、cometabolism 分解に関与する微生物相が、「多種類の分解能の低い微生物」から、「1 種類の分解能の高い微生物」へと変化することで、土壌中における cometabolism 速度が変化することが明らかとなった。従来、土壌中での農薬の分解速度が連用によって速くなるのは、その農薬を生育基質として利用する微生物、もしくは微生物群が土壌中に集積するためだとされているが、本研究においては cometabolism に関与する微生物相の変化によっても分解速度が速くなる例を初めて明らかにした。

3. まとめ

本研究においては土壌中における cometabolism を制御する因子として次の 2 点を明らかにした。

- ① 土壌中での TPN の cometabolism 分解の重要な因子として、土壌呼吸量、言い換えると土壌溶液中の有機物濃度があげられる。これが大きいほど cometabolism 分解は促進される。土壌呼吸量を高く維持させる方法のひとつとしては堆肥の連用が考えられる。なお、本研究においては、TPN の代謝物 TPN-OH がフィードバック的に TPN の土壌中での分解を抑制することを見出した。土壌呼吸量を抑制する因子としては親化合物の毒性だけでなく、代謝物の毒性についても、1)土壌微生物への毒性の強さ、2)土壌への吸着性、3)土壌残留性から総合的に判断する必要がある。
- ② 従来、農薬連用に伴う分解速度の加速現象(Enhanced biodegradation)の原因は、その農薬を生育基質として利用する微生物の集積にある、とされてきた。本研究においては、それに加えて土壌中の cometabolism 分解菌の微生物相が変化し、より分解能の高い微生物が集積することで cometabolism が促進される例を示した。