

嫌気・好気条件の変化を伴う微生物分解過程での CNP の変異原性の変動

岐阜大学工学部

松井 佑介

同上

正会員

松下 拓

同上

正会員

松井 佳彦

同上

正会員

井上 隆信

1.はじめに

現在までに多くの農薬が使われており、それらの一部は田畑の土壌に残留している。また、一部は河川等に流出し、湖沼の底泥等に蓄積していると指摘されている。これらの残留、蓄積した農薬は微生物分解により形態が変化し、毒性を持つ代謝物へと変換される可能性がある。たとえば、わが国で大量に使用された除草剤 CNP が特に嫌気性微生物分解を受けることによって、代謝物である CNP-amino が生成され、その CNP-amino が変異原性の増加に大きく寄与していることが報告されている。しかし、農薬の散布から飲料水源として取水されるまでの経路を考えると、河川等に流出することで必ず好気条件となるため、嫌気下で増加した変異原性が好気下におかれた場合にどうなるかを検討する必要がある。そこで本研究では CNP を対象とし、嫌気・好気条件の変化を伴う微生物分解過程における毒性の変動を検討する。

2.実験方法

本研究ではまず嫌気下で CNP の微生物分解を行い、CNP が消失した後に好気条件に転換した。このような嫌気・好気条件の変化を伴う微生物分解過程において、経時的にサンプリングを行い、変異原性を Ames 試験により評価した。

2.1 CNP の嫌気性微生物分解実験

岐阜大学周辺の畑の表層から 10～15cm 下の土壌を、CNP を添加した液体培地に加え嫌氣的に前培養することにより CNP の嫌気性分解菌を得た。得られた CNP の嫌気性分解菌を、新しい液体培地に CNP と共に添加した。これらに窒素ガス曝気を行い、容器を密封することで嫌気状態として 20℃で静置培養した。

2.2 嫌気性微生物分解後の条件分け

嫌気性微生物分解によって培地中の CNP がほぼ分解したら、嫌気性微生物分解後の液体培地を 3 分し、以下の条件分けを行った。①嫌気性の培養をそのまま継続した。②嫌気性微生物分解後の液体培地に炭素・窒素源としてグルコース、ポリペプトン、酵母抽出物を添加した (NB 培地)。これをマグネティックスターラーで 5 分間激しく攪拌することによって好気状態とし、その後 20℃で振盪培養した。この系では嫌気性微生物分解試料中に存在していた微生物による代謝が期待される。以下この系を「微生物添加なし」と呼ぶ。③あらかじめ用意した CNP 嫌気性微生物分解後の液体培地に NB 培地を添加し、そこに微生物源として岐阜大学周辺の畑土壌を添加して好氣的に前培養を行うことで、試料に含まれる CNP 微生物分解代謝物を好氣的に分解する微生物を獲得した。この微生物を②と同じ試料に継代し、②と同様の条件で好氣的に培養した。この系では嫌気性微生物分解試料中に存在していた微生物と、CNP 微生物分解代謝物を好氣的に分解可能な微生物の両方の代謝が期待される。以下この系を「微生物添加あり」と呼ぶ。

これらの 3 条件で培養を行い、それぞれについて経時的に CNP と CNP-amino の濃度を測定するとともに、Ames 試験用によって試料の変異原性を評価した。

2.3 試料の抽出及び測定法

CNP, CNP-amino 定量のために、試料 50mL を *n*-ヘキサン 10mL で溶媒抽出した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られた *n*-ヘキサン相を遠心濃縮機で減圧濃縮をした後、得られた残渣を *n*-ヘキサン 1mL で再溶解させて、GC/MS(6890N, 5973N, Agilent)にて測定した。また Ames 試験用には、試料 3L を *n*-ヘキサン 300mL で溶媒抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。*n*-ヘキサン相をロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮して得られた残渣を 3.6mL のジメチルスルホキシド (DMSO) に再溶解し、Ames 試験に供した。

2.4 Ames 試験

本研究では *Salmonella typhimurinum* を用いた Ames 試験によって変異原性を評価した。使用菌株はアミノアレン類の代謝活性を高めた菌株のうち、フレームシフト型変異原検出菌株である YG1024 株と塩基対置換型である YG1029 株とし、+S9mix 条件下で試験を行った。本研究でこれらの菌株を用いるのは、既往の研究で CNP の嫌気性微生物分解過程で変異原性が増加するということが報告されているためである。

3.結果と考察

3.1 嫌気性微生物分解に伴う CNP,CNP-amino の濃度変化

図 1 に嫌気性微生物分解に伴う CNP,CNP-amino の濃度変化を示す。嫌気性微生物分解によって 4 日目には 98% の CNP が分解され、それに伴って CNP 初期濃度の約 50% の CNP-amino が生成された。すなわち、添加した CNP のうち 50% は他の未知代謝物へと変換されたと考えられた。

3.2 好気条件へ転換後の CNP-amino の濃度変化

図 2 に条件分け後の各サンプルの CNP-amino の残存率の経時変化を示す。微生物添加ありでは分解が最も進み、4 日目までにほとんど分解された。一方、微生物添加なしでも CNP-amino の分解が見られた。これは CNP 嫌気微生物分解試料中には、CNP-amino を好氣的に分解可能な微生物が存在していたことを意味する。この系での 1 次反応を仮定した分解速度係数は 0.46day^{-1} であり、微生物添加ありの 1.08day^{-1} よりも小さかった。また、嫌気状態を継続した系については、分解速度がもっとも小さく、CNP-amino の大きな減少は確認されなかった。なお、本実験では CNP-amino 濃度のみモニタリングしており、嫌気性微生物分解で存在が指摘された未知代謝物がどのような代謝を受けたかについては議論できない点に注意が必要である。

4.おわりに

本研究で得られた結果を以下にまとめる。

1. CNP は嫌気性微生物分解により、4 日間でほぼ完全に分解された。それに伴い代謝物として CNP-amino が添加した CNP の約 50% 生成されたが、残りの 50% は未知代謝物へと変換された。
2. 嫌気状態を継続した系では、CNP-amino の大きな減少は確認されなかったが、嫌気条件から好気条件に転換した系では、速やかに分解が行われた。

CNP の嫌気性微生物分解過程では CNP-amino 以外にも未知代謝物が生成されており、好気へと転換された場合にこれらがどのように変換されたかはわからなかった。これらの未知代謝物が変異原性に寄与している可能性があるため、総合的な変異原性の評価が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Matsushita *et al.*, Changes in mutagenicity of herbicide Chlornitrofen during biodegradation, *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.516, Issue 1-2, pp.71-79, 2002.

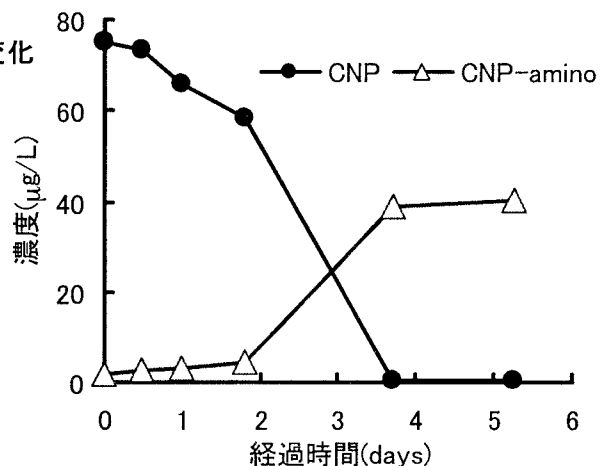


図1. 嫌気性微生物分解に伴うCNP,CNP-amino濃度変化

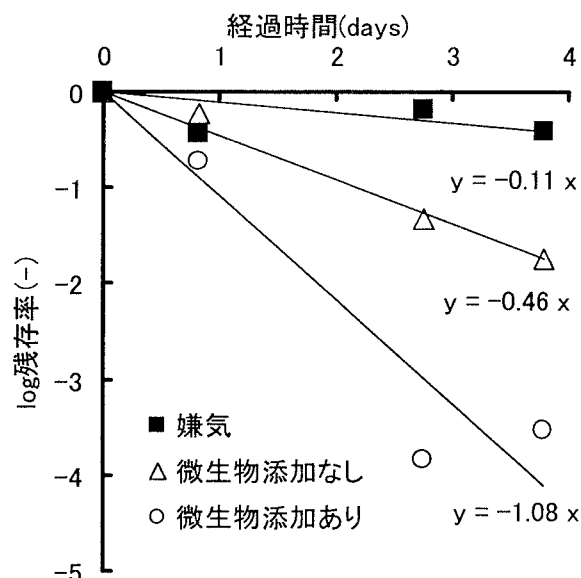


図2. 好気条件転換後のCNP-aminoのlog残存率