

MEP の嫌気性微生物分解により増加した変異原性の好気下での消長

岐阜大学工学部		豊田 徳一
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

田畑などに散布された農薬の一部は河川に流出し、一部は土壤中に残留する。多種多様の農薬が使用されることにより水環境や土壌の汚染が危惧され、農薬の環境中での消長を取り挙げた報告も多数出されている。ところが、環境中での分解により生成される農薬の中間代謝物については未知な点も多い。生成された代謝物が、発ガン性や変異原性を持つ可能性もあるため、分解により消失されても、逆に毒性が強くなる可能性も考えられる。水質の安全性を確保するためにはそのような毒性について評価することが必要となろう。

このような観点から、殺虫剤 MEP を性微生物分解過程での変異原性の変動が調べられ、MEP は嫌気性微生物分解によりほぼ完全に分解したにもかかわらず、変異原性が増加したと報告されている¹⁾。また、この変異原性の増加には嫌気性微生物分解により生成された MEP-amino が大きく寄与していたとも報告されている²⁾。ところが、嫌気下で増加した変異原性がそのままヒトへと曝露するケースは少なく、好気ゾーンを通過した後に飲料水源として取水される場合が大抵である。そこで本研究では、MEP の嫌気性微生物分解で増加した変異原性が、好気条件へと変換された場合にどのように変動するかを調べた。その間に MEP 及び MEP の嫌気性微生物分解により生成される一般的な代謝物である MEP-amino の濃度測定を行った。そして分解に伴って生成される代謝物の変異原性を Ames 試験によって評価した。

2. 実験方法

2.1 試料抽出及び測定方法

MEP、MEP-amino の定量用に試料 5mL をジクロロメタン 10mL で溶媒抽出を行い、得られたジクロロメタン相を無水硫酸ナトリウムで脱水後に GC/MS (6890N, 5973N, Agilent) で測定した。また、Ames 試験用サンプルとして試料 350 mL をジクロロメタン 35mL で抽出を行った。得られたジクロロメタン相を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターにより揮発させ、残渣を DMSO 3.5 mL に再溶解させたものを Ames 試験に供した。

2.2 MEP の嫌気性微生物分解

無機塩等を含む液体培地に岐阜大学周辺の畑より採取した土壌と MEP を添加した。これを嫌氣的に前培養することで、MEP 分解菌を獲得した。この分解菌を新たな液体培地に入れ、MEP を 5mg/L となるように添加した。これらに窒素ガス曝気を行い、嫌気状態で、20℃にて静置培養した。

2.3 分解条件の変更

嫌氣的な分解により MEP が分解された試料を 2 つの条件に分けた。①このまま嫌気分解を継続した。②炭素・窒素源としてグルコース、ポリペプトン、酵母抽出物の 3 種(NB 培地)を添加した後、試料をスターラーにて 10 分間攪拌することで好気状態にした。これを 20℃にて振とう培養した。

2.4 Ames 試験

本研究では *Salmonella typhimurium* を用いた Ames 試験により変異原性を評価した。本研究では、TA100 株を親株として O-アセチル転移酵素生産性を高めた YG1029 株と O-アセチル転移酵素生産性とニトロ還元酵素生産性を高めた YG1029 株を使用し、+S9mix 条件下で試験を行った。ここでこの 2 種類の菌株を使用したのは、それらの菌株に対する間接変異原性が MEP の嫌気微生物分解過程で増加することが報告されているためである²⁾。

3. 実験結果と考察

3.1 嫌気分解に伴う MEP、MEP-amino の濃度変化

図 1 に嫌気微生物分解に伴う MEP と MEP-amino 濃度の変化を示す。22 日の培養により MEP はほぼ解され、それに伴い MEP-amino が生成された。MEP-amino は添加した MEP に対し 63%(モル基準) 生成した。

3.2 分解条件を変更後の代謝物濃度の変化

条件分け後の MEP-amino 濃度の変化を図 2 に示す。嫌気状態を継続した系は濃度が緩やかに減少した。好気条件の系では濃度は 9 日目までは 85% まで減少し、それ以降に増加が観察された。

また、特に好気分解条件時、試料の GC/MS のクロマトグラム上に、培養に伴い増加する未知ピークが確認された。マススペクトル解析により、この未知ピークは MEP-acetylamino であると推定されたが、この標準品が入手できないため定量をすることができなかった。そこで、クロマトグラム上での MEP-acetylamino のピークの面積値を、内部標準物質として添加したアントラセンのピーク面積値で除した値を、MEP-acetylamino 相対濃度として評価した。その経時変化を図 3 に示す。MEP-acetylamino は嫌気状態を維持した系では生成量は小さいが、好気条件に変換した系では 9 日間の培養で大きく増加し、その後減少した。これらより、MEP-amino は好氣的あるいは嫌氣的に分解され、MEP-acetylamino へと代謝され、生成された MEP-acetylamino は、好気下では MEP-amino へと再変換されるのではないかと考えられた。

4. まとめ

本研究の結果等を以下にまとめる。

- ① MEP の嫌気性微生物分解で生成された MEP-amino は嫌気状態ではあまり分解が起らなかったが、好気状態では分解が起きた。
- ② MEP-amino の分解に伴い MEP-acetylamino の生成が確認された。MEP-acetylamino 生成量は嫌気状態より好気状態の方が大きかった。

本実験中に生成された MEP-acetylamino と MEP-amino を含む代謝物が変異原性に寄与している可能性があるため、Ames 試験を行って総括的な評価を行う必要がある。

参考文献

- 1) Matsushita *et al.*, Changes in mutagenicity during biodegradation of fenitrothion, *Chemosphere*, **47**(1), 9-14, 2002.
- 2) Matsushita *et al.*, Contribution of metabolites to mutagenicity during anaerobic biodegradation of fenitrothion, *Chemosphere*, **50**(3), 275-282, 2003.

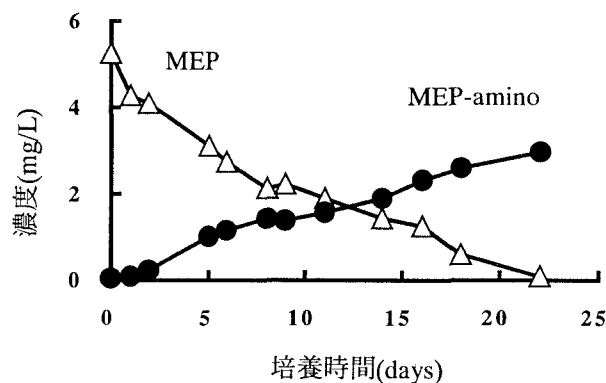


図1. 嫌気性微生物分解に伴う MEP, MEP-amino 濃度の経時変化

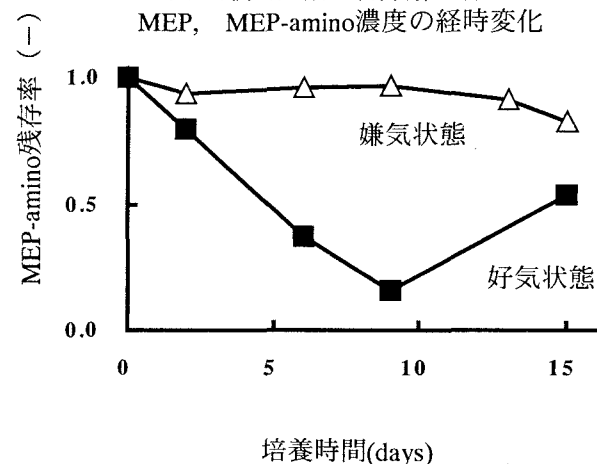


図2. 分解条件変更後の MEP-amino 濃度の経時変化

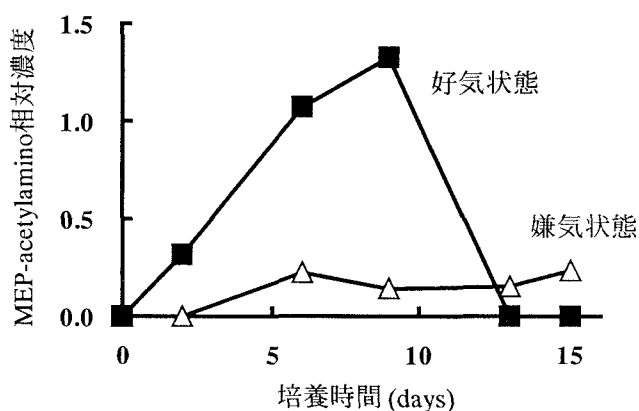


図3. MEP-acetylamino 相対濃度の変化