

溶存酸素状態の異なる環境下での MEP 嫌気性微生物分解代謝物の毒性の変動

岐阜大学工学部		佐伯 亮
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

現在までに様々な農薬が使われており、それらの中には、ヒトに対する毒性があるものもある。使用された農薬の一部は、田畑などの土壤中に嫌気状態で残留し、微生物分解される。それにより農薬の形態が変化し、毒性の強い代謝物が生成される可能性がある。例えば、殺虫剤 MEP は嫌気性微生物分解により変異原性が増加することがすでに報告されている¹⁾。しかし、増加した変異原性がヒトに曝露されるまでの経路を考えると、河川などの好気条件下を通る場合が大抵である。ところが、増加した変異原性の好気下での消長についての知見はなく、安全性を評価する上でも、それらが好気条件下に流出した時の変動を評価する必要がある。

そこで本研究では、殺虫剤 MEP を対象とし、嫌気状態から好気状態に変化した時の変異原性の変動を Ames 試験により調べ、毒性を評価する。

2. 実験方法

本研究では嫌気状態において MEP の微生物分解を行い、MEP が分解し代謝物が生成された後に好気状態に転換した。溶存酸素状態の異なる系への転換における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 分解菌の前培養

微生物源として、岐阜大学農学部 of イモ畑の表層から 10~15cm 下の土壌 5g を、生理食塩水 50mL に添加し vortex 攪拌後にしばらく静置した。MEP を 10mg/L になるように添加した NB 培地(ポリペプトン 0.5mg/L、酵母抽出物 0.25mg/L、グルコース 0.1 mg/L)に上澄み 20mL を加えて植菌し、窒素ガス曝気を 15 分間行い、20℃の嫌気状態で静置培養した。これにより MEP を嫌気下で分解する菌を得た。

また、上記の分解菌を用いて MEP10mg/L を嫌氣的に分解させた。MEP が完全に分解した時点で、岐阜大学農学部 of イモ畑の表層部分の土壌 20g と NB 培地を添加した。これを 20℃で振盪培養することにより、好気条件下で MEP の嫌気性微生物分解代謝物を分解可能な菌を獲得した。

2.2 嫌気性微生物分解実験

2.1 で得られた MEP 嫌気性分解菌を遠心分離(39191×g, 10min)により集菌し、沈殿を新しい NB 培地に添加した。ここに MEP を 10mg/L になるように添加し、前述の方法と同様に嫌氣的に培養した。

2.3 好気性微生物分解実験

嫌気性微生物分解により MEP がほぼ分解したら、嫌気性微生物分解後の培地を以下の条件に分けた。①分解後の培地 1L を遠心分離(39000×g, 10min)し沈殿と水相に分離した。沈殿した微生物に吸着した代謝物を回収するために、沈殿に 10mL のメタノールを添加して vortex で攪拌した。得られたメタノール相を PTFE 膜(φ=0.2μm, Advantec 製)にてろ過し、全量を水相に添加した。これを PTFE 膜でろ過し、マグネティックスターラーで 15 分ほど激しく攪拌することによって好気状態とした後に、PVDF 膜(φ=0.22μm, Millipore 製)でろ過することによって滅菌した。ここに NB 培地を無菌的に添加し、20℃にて好氣的に恒温振盪培養したここでは MEP 嫌気性微生物分解代謝物を、好気条件で分解可能な微生物による代謝が期待される。②分解後の液体培地 1L を①と同様の方法で滅菌した。前培養で得られた好氣的に MEP 分解代謝物を分解可能な菌群を遠心分離(39000×g, 10min)にて集菌して添加し、20℃にて好氣的に恒温振盪培養した。③分解後の液体培地 1L をマ

グネティックスターラーで15分ほど激しく攪拌して好気条件とし、20℃にて恒温振盪培養した。ここでは嫌気性微生物分解試料中に存在していた通性嫌気性菌による代謝が期待される。④嫌気培養を継続した。

これらの条件で微生物分解実験を行い、それぞれについて経時的に MEP, MEP-amino の濃度を測定するとともに、Ames 試験用のサンプルを抽出し、変異原性を評価した。

2.4 試料の抽出及び測定法

MEP と MEP-amino 定量のために、試料 5mL を 10mL のジクロロメタンで溶媒抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS: 6890N, 5973N, Agilent)にて測定した。定量は SIM で行い、アントラセンを用いた内部標準線法によった。また Ames 試験用には、試料 50mL を PS2 カートリッジ(Waters 製)を用いて固相抽出し、5mL のジメチルスルホキシド (DMSO) で溶出した。

2.5 Ames 試験

本研究では *Salmonella typhimurim* を用いた Ames 試験によって変異原性を評価した。使用菌株はフレームシフト型変異原性検出株である TA98 株、塩基対置換型変異原検出菌株である TA100 株、TA98 株, TA100 株にニトロ還元酵素を高生産する遺伝子を導入した YG1021 株、YG1026 株²⁾、O-アセチル転移酵素を高生産する遺伝子を導入した YG1024 株、YG1029 株³⁾の6株とした。これらの菌株を用いて+S9mix 条件下で Ames 試験を行い、変異原性を評価した。

3. 結果と考察

3.1 好気下の前培養での MEP-amino の濃度変化

図1に好気下の前培養の結果を示す。好気培養初日から徐々に MEP-amino 濃度が減少し、7日目には約70%分解された。MEP 嫌気性微生物分解で生成された代謝物は、好気下で分解されることが分かった。

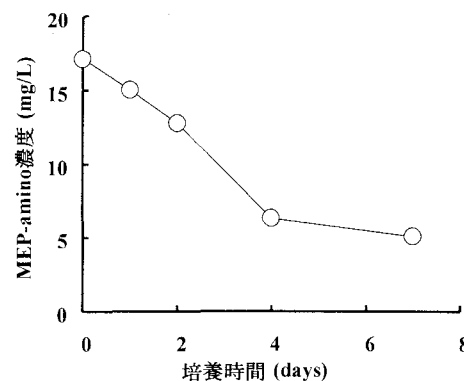


図1.好気前培養の MEP-amino の濃度変化

3.2 嫌気性微生物分解による MEP, MEP-amino の濃度変化

図1に嫌気性微生物分解による MEP, MEP-amino の濃度変化を示す。嫌気性微生物分解によって2日目にはほぼ100%の MEP が分解され、それに伴い MEP-amino が代謝物として生成された。モル基準での MEP-amino への変換率はほぼ100%であった。

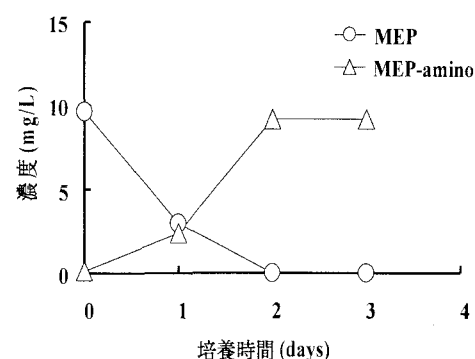


図2. MEP, MEP-amino の濃度変化

4. おわりに

本研究で得られた結果を以下にまとめる。

1. MEP の嫌気性微生物分解により生成された代謝物は、好気状態では微生物を添加することにより、代謝物は分解される。
2. MEP は嫌気性微生物分解により、2 日間でほぼ完全に分解された。それに伴い代謝物として MEP-amino が生成された。生成された量は添加した MEP のほぼ100%であった。

参考文献

- 1) Matsushita *et al.*, *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.516, Issue 1-2, pp.88-95, 2002.
- 2) Watanabe *et al.*, *Mutation Research*, Vol.216, pp.211-220, 1989.
- 3) Watanabe *et al.*, *Mutation Research*, Vol.234, pp.337-348, 1990.