

学会賞受賞論文

(業績賞)

土壌中の農薬分解に関与する微生物群の構造と挙動

片山 新太

名古屋大学大学院生命農学研究科*

Behavior and Structure of Microbial Community Degrading Agrochemicals in Soil

Arata KATAYAMA

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan

はじめに

農薬は、高い食糧生産性を実現するために現在の農業にとって必要不可欠なものである。しかし、人間にとって都合の悪い生物、すなわち害虫や植物病原菌および雑草に対し生物活性を示すため、自然環境という点から見ると影響のない農薬はあり得ない。それゆえ、影響を最小限にするために多大な努力が払われてきた。現在では、低毒性でかつ環境中での残留性も小さい農薬が用いられている。

第2次世界大戦後、化学合成農薬が使われはじめた時期には、DDTやガンマ-HCHなどの有機塩素系殺虫剤が多く用いられた。レイチェル・カーソン¹⁾が「Silent Spring(邦題: 生と死の妙薬)」で有機塩素系殺虫剤の野生生物への影響を指摘し、大きな社会問題となった。それ以来、農薬の環境中での残留性は農薬の安全性を調べる上で重要な項目となっている。農薬は最終的には土壌中に入り、土壌微生物によって分解を受けるため、農薬の土壌中での代謝分解およびその分解微生物に関する研究が数多く行われ、現在では農薬の化学構造から分解経路をある程度推定できるほどになっている²⁾。

近年では、トリクロロエチレンやPCB等の工業用難分解性化学物質による土壌汚染が問題になり、これらの化学物質を分解処理するために微生物の働きを利用して分解するというバイオレメディエーション技術の開発が進みつつある。

しかしこれまでの研究は、農薬分解能を有する様々な微生物を集積培養法により土壌から単離し、純粋培養条件下でその性質を調べるという方法をとってきた。分解菌を単離することによって分解微生物の存在は示せても、得られ

た単離菌が土壌中で主要な分解菌として働いていたものか否かは多くの場合不明であった。このような単離した分解微生物に関する情報は、土壌中における化学物質分解の予測や制御にはあまり役立たない情報となっている。土壌微生物の量(微生物バイオマス)、質(微生物群集構造)およびその機能(活性)の3項目とそれらの相互関係の解明することが土壌微生物の挙動の把握に必要不可欠であるが、これまではこのような解析方法が無かった。解析方法を確立し、土壌環境条件の変化に伴う土壌中の全微生物群と分解微生物群の動態を明らかにすることができれば、土壌中の化学物質分解微生物の制御のための基礎的情報として有用であると考えられる。

本研究は、このような背景の中で農薬分解に関与する土壌微生物群の動態を解析する方法の確立を行ったものである。その結果、抗生物質を用いた部分阻害法およびキノン組成法という2種類のアプローチが有効であることを明らかにした。

土壌微生物群の各種解析方法

Table 1に各種の解析法と土壌微生物の量・質・機能(有機物分解活性)との関係を比較してまとめた³⁾。我々の開発した部分阻害法、および¹⁴C標識キノン組成法は3項目とも明らかにできるという点で優れている。他に3項目とも明らかにできる方法としては直接検鏡法がある。この方法は、微生物バイオマスを直接測定する方法であり、分類学的情報は属特異的なDNAプローブの利用によって得られ、また代謝活性との関係もナリジシン酸等の細胞分裂阻害剤を用いて増殖細胞を検出できる。しかし、直接検鏡法による土壌微生物の計数作業には熟練した土壌微生物学者でないと再現性のある結果が得にくい上、大変手間がか

* 現所属: 名古屋大学難処理人工物研究センター

Table 1 Methods to detect microbial groups metabolizing a single substrate in soil.

Methods	Detectable microbial groups	Correlation to microbial biomass	Correlation to taxonomy	Potential ability	Detection of metabolizing microorganisms	Comments
Dilution plate method	All culturable microbes	No	Only isolates			Traditional method
Direct microscopic method	All	Very good	Good by using DNA probe	Good by direct viable count method		Soil is observed after suspension in sterile water
Partial inhibition method with antibiotics	Only metabolizing microbes	Possible	Good by using antibiotics	Very good		Glucose-metabolizing capacity correlates with microbial biomass.
mRNA gene analysis	All	No	Poor*	Very good		DNA extraction biased Gram-negative bacteria
rRNA gene analysis	All	No	Very good by DGGE analysis and sequencing	Poor**		
Phospholipid fatty acid analysis	All	Very good	Fair	Good by isotopic labeling		Many non-specific fatty acids
Isoprenoid quinone analysis	All except for methanogens	Very good	Good	Very good by isotopic labeling		One dominant quinone species in individual microbial species

* Possible only when targeted family genes are specific to Genus, such as genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase.

** Only viable microorganisms can be detected by direct extraction of rDNA from soil.

かるという欠点がある。直接顕微鏡法は、方法の簡便化が必要不可欠であろう。また希釈平板法が土壤中の微生物群集をとらえる方法として不十分なものであることは、培養可能な細菌が土壤中の細菌の数%以下しかいないことから明らかである。一方、本研究で用いた部分阻害法は、土壤微生物バイオマスの指標として用いられている基質誘導呼吸法(土壤にグルコースを加えた際に発生する最大 CO₂ 発生速度)を応用したもので、細菌と糸状菌という二つのグループにしかわけることができないが、簡便性で優れている。

土壤微生物に広く含まれるバイオマーカー (RNA/DNA, リン脂質脂肪酸, イソプレノイドキノン) を分析する方法の中では、キノン分析は脂質分析で再現性が高いこと、また多くの微生物が一優占キノン種をもつのでキノン組成の変化は即ち微生物群集構造の変化ととらえること等の点で有利な方法である。土壤中のリボソーム RNA 遺伝子やメッセンジャーRNA 遺伝子を解析する方法では、土壤微生物を詳細に調べることが可能であるが、土壤微生物バイオマスとの関連がつかめない欠点がある。脂質成分であるリン脂質脂肪酸とイソプレノイドキノンはともにバイオマスとの相関が高いが、リン脂質脂肪酸の場合は一微生物種が多様な脂肪酸を有し、微生物の生理状態によってその割合が変化する上に、多くの脂肪酸が各微生物に共通するため、リン脂質脂肪酸組成の変化が即ち微生物群集構造の変化とはいえないという問題点がある。対象とする土壤と検出の目的に応じて、各種の方法を使い分けることが今後重要となると思われる。

以下、抗生物質を用いた部分阻害法に関してクロロタロニル (2,4,5,6-tetrachloroisphthalonitrile) とパラコート (4,4'-dimethylbipyridinium dichloride) を対象として行った結果、および¹⁴C標識キノン組成法に関する結果を紹介する。

抗生物質を用いた部分阻害法による 農薬分解菌の寄与率の推定

土壤微生物バイオマスの指標の一つとして、土壤にグルコースをそれ以上呼吸量が高まらない十分な量を添加して得られる呼吸速度が用いられている(基質誘導呼吸法)。グルコース添加後、6時間から8時間は呼吸速度は、ほぼ一定に保たれ、この値が測定される。抗生物質を用いることにより、呼吸に対する細菌と糸状菌の寄与率の比が求められる。直接顕微鏡で得られる細菌・糸状菌バイオマスと抗生物質を用いた基質誘導呼吸法の間に良い相関があることが報告されている。本研究では、グルコースを用いて呼吸速度を測定する代わりに、土壤に農薬を添加し、抗生物質を加えた際の農薬の分解速度を求め、それぞれの寄与率を測定した。農薬としてクロロタロニルおよびパラコートを対象した。

通常、農薬を繰り返し施用すると土壤中の分解微生物の

菌数が高まり分解速度が高くなることが知られているが、殺菌剤クロロタロニルの場合には繰り返し施用すると消失速度が低下するという奇妙な現象が見いだされた^{4,5}。堆厩肥を施用した土壌中では、土壌中のフェノール誘導体とクロロタロニルが化学反応を起こすことも観察された⁶が、大半のクロロタロニルは殺菌土壌では消失しないことから、この消失は主に微生物分解によることが示唆された。クロロタロニルを分解する細菌は施用歴の無い土壌でも 10^6 CFU/g-soil 程度存在し、クロロタロニルの施用によって更に 10 倍程度に集積された。このことから消失速度の低下は、繰り返し施用による土壌環境の変化の結果、主要分解微生物の活性が押さえられているものと推察された⁷。分解菌は Table 2 に示すように細菌・糸状菌を含む非常に分類学的に広い範囲にわたり見いだされ⁸、その殆どが分解のために他の炭素源・エネルギー源を必要とした。*Azomonas* および *Flavobacterium* に属する分解菌 2 株から、基質特異性が高いことが示され、クロロタロニル分解酵素は他の構造類似の農薬により誘導されたものではなく広く存在する酵素系であることが示唆された⁹。単離菌によるクロロタロニル代謝経路として Fig. 1 に示すような 4

Table 2 List of microorganisms degrading chlorothalonil.

Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria	Fungi
<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Torula</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Tilachlidium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Klebsiella</i>		Sterile fungi
<i>Moraxella</i>		
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Sphingomonas</i>		
<i>Xanthomonas</i>		

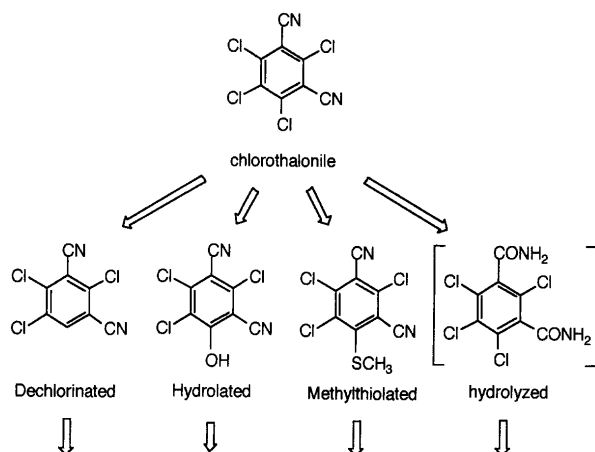


Fig. 1 Possible metabolic pathways of chlorothalonil by soil microorganisms.

経路が推定された。この内、細菌がメチルチオ基で塩素を置換する反応は、細菌に初めて見いだされた代謝反応であった¹⁰。

クロロタロニルはセルロース分解を阻害し、土壌中の濃度が 15 mg/kg-soil を超えると特に顕著であった¹¹。クロロタロニル分解細菌の多くは、低栄養条件ではクロロタロニルを分解しなかった¹²。グルコースなどの基質を添加すると低下した消失速度がある程度回復した。繰り返し施用による消失速度の低下は、分解菌にとっての炭素源・エネルギー源の不足が一因と考えられる。また、土壌 pH もクロロタロニル消失速度に大きく影響することが明らかになった¹³。土壌 pH を中性付近に矯正することによって分解活性が高まった。

このクロロタロニル消失速度の変化に対する分解菌群の寄与を調べた。即ち、クロロタロニル分解に対する細菌および糸状菌の寄与を抗生物質を用いた部分阻害法によって定量的に評価した¹⁴⁻¹⁶。細菌の寄与率を測定するためにアンピシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンの混合物を、糸状菌の寄与率を測定するためにシクロヘキシミドを用いた (Fig. 2)。抗生物質による部分殺菌効果を最小にするために、土壌にブイオンと酵母エキスの混合物を基質として加えた。クロロタロニル分解および CO_2 発生速度は、抗生物質および基質添加後 6 時間はほぼ一定に保たれた。クロロタロニル感受性菌の乾燥粉末を添加した場合と、ブイオンと酵母エキスを添加した場合とで、寄与率はほぼ一致し、推定方法が正しいことが示唆された。堆肥施用土壌ではクロロタロニル消失速度が増加したが、それは糸状菌の寄与率の増加によるものであった (Fig. 3)。また、土壌 pH を中性に矯正した場合の分解速度の増加も、糸状菌の分解活性の増加によるものであった。繰り返し施用による消失速度の低下は、細菌・糸状菌両方の分解活性の低下あるいは糸状菌の分解活性の低下によるもので、細菌のみが影響することは無かった。これらのことから、クロロタロ

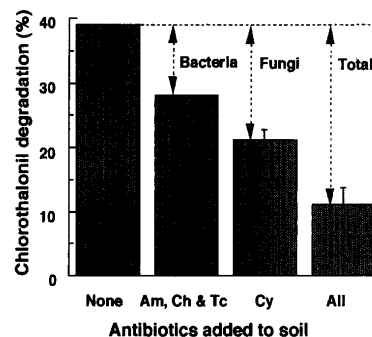


Fig. 2 Estimation of total microbial degradation capacity (total), bacterial dissipating capacity (Bacteria) and fungal dissipating capacity (Fungi). Antibiotics used consisted of a mixture of ampicillin (Am), chloramphenicol (Ch) and tetracycline (Tc) against bacteria, and cycloheximide (Cy) against fungi.

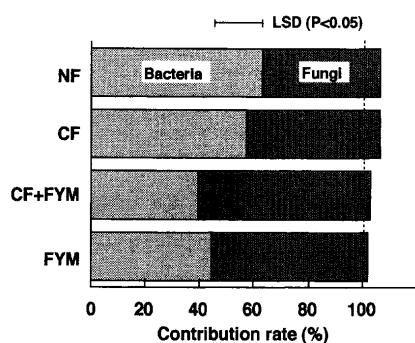


Fig. 3 Contribution rates of bacteria and fungi to chlorothalonil degradation in non-fertilized soil (NF), the soil receiving only chemical fertilizers (CF), the soil receiving chemical fertilizers and farmyard manure (CF+FYM) and the soil receiving only farmyard manure (FYM). NB+YE was used as substrate. A horizontal bar denotes the least significant difference ($P<0.05$).

ニルの消失速度は糸状菌の分解活性によって大きく変化していたことが示された。主要クロロタロニル分解糸状菌を同定するために、土壤洗浄法を用いて糸状菌菌糸を直接単離した¹⁷⁾。ランダムに菌糸を単離して得られた分解糸状菌の4割以上が *Fusarium* 属であったことから、*Fusarium* 属菌が土壤中でクロロタロニルの分解に関与する主要糸状菌と推定した。対象に土壤中の胞子に由来するものが多いと考えられている希釈平板法で分解糸状菌を単離したところ、*Penicillium* 属菌が最も頻度高く単離された。

除草剤パラコートは、土壤に強く吸着するために微生物分解を受けないとされているが、長期的には徐々に消失することがフィールドで観察されている。これまでパラコートを窒素源として分解する *Lipomyces* 属酵母が世界各地で単離され、我々も日本の土壤から単離したが、この酵母が土壤に吸着したパラコートを消失する証拠は得られていない¹⁸⁾。一方で、我々は植物遺体上、特に C/N 比の高い植物遺体上でパラコートが分解されることを見出した。パラコートが茎葉処理剤であることから植物体から土壤に吸着移行が起こる前に微生物分解が起こる可能性を示している。稲ワラの例ではモノピリドン (1',2'-dihydro-1,1'-dimethyl-2'-oxo-4,4'-bipyridinium ion) と $^{14}\text{CO}_2$ が [methyl- $^{14}\text{C}_2$]-パラコートからの代謝産物として検出された。尿素、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウムで分解抑制が起こり、分解菌の窒素代謝とパラコート分解の関係が示唆された¹⁹⁾。シクロヘキシミドとポリミキシン B を添加しても分解活性が殆ど変化しなかったことから、*Lipomyces* 属酵母が分解しているのではなく、グラム陽性細菌が主要分解菌であることが推定された。

キノン組成法による化合物資化性菌の検出

バイオマーカーとしてイソプレノイドキノンを用いて、一

つの化合物を資化する微生物群集を推定する方法を開発した。イソプレノイドキノンは、単離菌の分類学的位置を決定する際のバイオマーカーとして利用されてきた。微生物群集構造の解析に初めて利用したのは、Hedrick と White (1986)²⁰⁾ が初めてである。彼らは、水系微生物群の好氣的代謝と嫌氣的代謝の指標として、ユビキノンとメナキノンの比を用いた。その後、Hiraishi (1988) が水系微生物群(下水や下水汚泥)を対象に各キノン種に基づく微生物群集構造解析法に発展させた²¹⁾。しかし Hiraishi の研究は水系微生物群に限られており、土壤微生物群の解析法としての有用性は不明であった。そこでキノン組成分析による土壤微生物の群集構造解析法の確立し、その有用性を検証するとともに、さらに ^{14}C 標識化合物を組み合わせることにより、土壤中の化合物資化性菌群を直接検出することに成功した。

環境中で検出される主なキノン種には、Fig. 4 に示すようなユビキノン、メナキノンおよびプラスキノンがあるが、土壤中で検出されるのは殆どの場合ユビキノンとメナキノンである。ユビキノンおよびメナキノンとも呼吸系における電子伝達物質として微生物に含まれており呼吸鎖キノンとも呼ばれる。土壤から単離されることの多い細菌および糸状菌とそれらの微生物がもつキノン種の対応表を作成した (Table 3)²²⁾。イソプレノイドの長さおよびその水素飽和度によって、対応する微生物が異なる。ユビキノン-8 (ユビキノンにイソプレノイド鎖が8個ついたもの) は、プロテオバクテリアの β -サブクラスと一部の γ -サブクラスの細菌が対応する。ユビキノン-9 は、 γ -サブクラスのプロテ

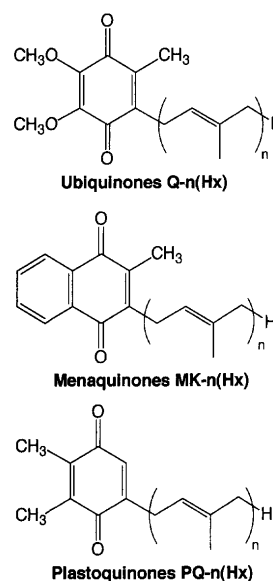


Fig. 4 Isoprenoid quinones observed in environmental samples.

Table 3a Correspondence of respiratory quinones to major soil Gram-negative bacteria.

Quinones	Gram-negative bacteria
Ubiquinones	
Q-8	<i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> , (<i>Escherichia coli</i>)*
Q-9	<i>Pseudomonas</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Acinetobacter</i>
Q-10	<i>Acidiphilium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Sphingomonas</i>
Menaquinones	
MK-6	<i>Cytophaga</i>
MK-7	<i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Flexibacter</i>
MK-8	<i>Aeromonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> , (<i>Escherichia coli</i>)**

* *Escherichia coli* is not abundant in soil. (Adapted from Ref. 22)

Table 3b Correspondence of respiratory quinones to major soil Gram-positive bacteria.

Menaquinones	Gram-positive bacteria
MK-7	<i>Bacillus</i> , <i>Thermoactinomyces</i>
MK-7(H2)	<i>Brevibacterium</i>
MK-8	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i>
MK-8(H2)	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i>
MK-8(H4)	<i>Janibacter</i> , <i>Nocardia</i> *, <i>Nocardioideis</i> , <i>Terrabacter</i>
MK-9	<i>Arthrobacter</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Thermoactinomycetes</i>
MK-9(H2)	<i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Gordona</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Streptosporangium</i>
MK-9(H4)	<i>Actinoplanes</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Saccharothrix</i> , <i>Streptosporangium</i>
MK-9(H6)**	<i>Streptomyces</i> , <i>Actinomadura</i>
MK-9(H8)**	<i>Streptomyces</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Catenuloplanes</i>
MK-10	<i>Rathayibacter</i>
MK-10(H2)	<i>Glycomyces</i>
MK-10(H4)	<i>Actinoplanes</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Nocardioopsis</i>
MK-10(H6)	<i>Nocardioopsis</i> , <i>Thermomonospora</i>
MK-10(H8)	<i>Thermomonospora</i> , <i>Catenuloplanes</i>
MK-11	<i>Agrococcus</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Microbacterium</i>
MK-12	<i>Agrococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Microbacterium</i>

* It is reported that *Nocardia* contains MK-8(H4, w-cyclo). (Adapted from Ref. 22)

Table 3c Correspondence of respiratory quinones to major soil fungi.

Ubiquinones	Fungi
Q-9	<i>Arthroderma</i> , <i>Ascobolus</i> , <i>Aspergillus</i> (<i>Chaetosartorya</i> , <i>Eurotium</i>), <i>Ctenomyces</i> , <i>Eladia</i> , <i>Microsporon</i> (<i>Nannizzia</i>), <i>Mucor</i> **, <i>Oidiodendron</i> , <i>Paecilomyces</i> (<i>Byssochlamys</i>), <i>Penicillioopsis</i> **, <i>Penicillium</i> (<i>Eupenicillium</i>)
Q-10	<i>Aspergillus</i> (<i>Neosartorya</i>), <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> (<i>Talaromyces</i>)
Q-10(H2)	<i>Acremonium</i> , <i>Amauroascus</i> , <i>Arachniotus</i> , <i>Aspergillus</i> (<i>Emericella</i>), <i>Botryotrichum</i> (<i>Chaetomium</i>), <i>Botrytis</i> (<i>Sclerotinia</i>), <i>Chloridium</i> , <i>Chrysosporium</i> (<i>Gymnoascus</i>), <i>Cladorrhinum</i> (<i>Apiosordaria</i>), <i>Dothichiza</i> , <i>Fusarium</i> (<i>Gibberella</i> , <i>Nectria</i>), <i>Geomyces</i> (<i>Pseudogymnoascus</i>), <i>Gliocladium</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> (<i>Talaromyces</i>), <i>Phialophora</i> (<i>Coniochaeta</i>), <i>Phoma</i> (<i>Westerdykella</i>), <i>Preussia</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Sporothrix</i> , <i>Trichoderma</i> (<i>Hypocrea</i>), <i>Verticillium</i> (<i>Pseudeurotium</i>)
Q-10(H4)	<i>Botryotrichum</i> (<i>Chaetomium</i>), <i>Penicillium</i> (<i>Talaromyces</i>)

* The genera are shown as the anamorph except for *Mucor* and *Penicillioopsis*. The genera in parentheses denote the corresponding teleomorph. (Adapted from Ref. 22)

オバクテリアと糸状菌, ユビキノ-10は α -サブクラスのプロテオバクテリア, ユビキノ-10 (H2) (ユビキノにイソプレノイド鎖が10個つき, いちばん端の2重結合が水素添加されたもの)は糸状菌が対応する。 δ -サブクラスと ε -サブクラスのプロテオバクテリアおよびグラム陽性低G+C細菌は, メナキノ-6, 7, 8を有し, *Cytophaga-Flavobacterium* クラスタに属する菌がメナキノ-6と-7を有している。メナキノのイソプレノイド側鎖が9より長いものおよび水素添加されているものは, いずれもグラム陽性高G+C細菌 (*Actinobacteria*) に属する。プラストキノンは酸化的な光合成系における電子伝達物質で, 水系の藻類(クロロプラスト)やシアノバクテリアに含まれており, 土壌中では殆ど検出されない。これらのキノン種以外に, ある種の微生物には特異的なキノン種も存在している。

呼吸鎖キノンは土壌から中性脂質として抽出し, その分子種はフォトダイオードアレイ検出器のついた逆相カラム高速液体クロマトグラフを用いて決定する。得られたキノン組成は, Hiraishi²³⁾によって導入された非類似度 (D) によって比較することができる。

$$D(i,j)=1/2\sum_{k=1}^n|f_{ki}-f_{kj}|\times 100$$

ここで, f_{ki} と f_{kj} は2つの土壌*i, j*の同一キノン種のモル分率を示している。異なる4土壌(水田酸化層(OP), 黒ボク土(IA), 施肥管理の異なる黄色土(CF+ FYM および CF))を分析した例を Fig. 5 に示した。このように通常土壌中には約20から25種類のキノン種が検出される。水田土壌, 黒ボク土壌, 黄色土畑土壌間での非類似度は30%以上で微

生物群集構造が大きく異なっていること, 一方施肥管理の違う同じ黄色土畑土壌間では17%と違いが小さいことが示された。また各キノン種の合計量と, 燻蒸抽出法による土壌微生物バイオマス炭素の間には直線的な相関関係があった²⁴⁾。キノン量は土壌微生物バイオマスの良い指標となると考えられる。土壌中のキノン量は土壌によって異なるが, 農耕地土壌では0.1~10 $\mu\text{mol/kg}$ 土壌の範囲にある。通常キノンの検出限界は, 数nmol程度である。キノンの土壌中における半減期は10日以下であった³⁾。測定したキノン組成はその土壌の生きた微生物群集を反映するものと考えられる。

各微生物種が一優占キノン種をもつことを利用して, キノンの多様性によって各土壌中の微生物の多様性を評価することができる。土壌細菌が有意な速度で農薬分解するのに必要な菌数は通常 10^6CFU/g-soil 位で, 全生細菌数の1/100程度にあたる。そこで, 多様性に小さな割合のキノン種も反映される新しいキノン多様性指数 DQ を導入した²⁵⁾。

$$DQ=\left(\sum_{k=1}^n(\sqrt{f_k})\right)$$

ここで, n は検出されたキノン種の数, f_k はキノン種 k の割合を示す。全キノン種の量が等しい場合は, $DQ=n$ となり多様性指数 DQ はキノン種の数に等しくなる。この多様性指数は, 従来広く用いられている Shannon 指数 (H')

$$H'=\sum_{k=1}^n f_k \ln f_k$$

に較べて小さいフラクションの変動に対して感度が高いのが特徴である。

施肥管理の土壌微生物群集への効果を土壌のキノン組成

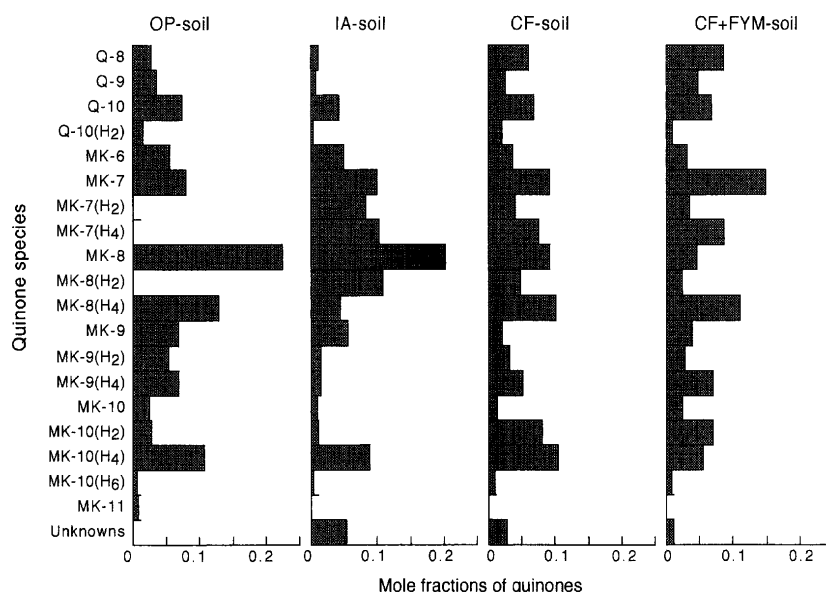


Fig. 5 Respiratory quinone profiles of the soils. OP-soil: Aerobic layer of paddy soil in Nagoya University Farm, IA-soil: Ibaraki ando soil, CF-soil: Upland field receiving only chemical fertilizers, CF + FYM-soil: Upland soil receiving farmyard manure as well as chemical fertilizers. All unknown quinone species were menaquinones highly hydrogenated. Abbreviations of quinone species are the same as in Fig. 4. MK-10(H4) and MK-10(H2) contained MK-9(H8) and MK-9(H6), respectively. (Adapted from Ref. 22)

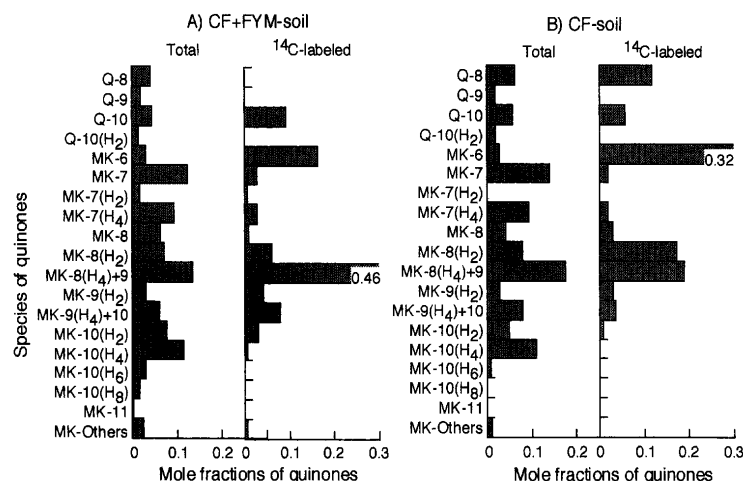


Fig. 6 Profiles of total quinones and [¹⁴C]-labeled quinones obtained by the addition of [U-¹⁴C]glucose in CF+FYM soil and CF soil. The abbreviation of the soil are the same as Fig. 5. Abbreviations of quinone species are the same as in Fig. 4.

の測定によって調べたところ、圃場開設時にはほぼ同一の微生物群集構造であったものが、施肥管理の違いによって数年後にはそれぞれの施肥管理に特徴的な微生物群集構造が形成されたことが明らかにされた²⁶⁻²⁷。堆肥施用土壌の方が、化学肥料区よりもキノン組成が多様な結果となり、微生物群集が多様化していることが示唆された²⁸。堆肥施用土壌では、メナキノ-7の増加が特徴的であった。堆肥自体のキノン組成ではメナキノ-7が約40%を占めた。堆肥施用によってメナキノ-7が増加したことが示された。

ペンタクロロフェノール(PCP)を添加した環流土壌による微生物群集構造の変化をキノン組成分析によって追跡することに成功した²⁹。20 mg/lのPCP溶液の環流で、ユビキノ-10(H₂)が消失し、糸状菌の減少を示した。高濃度PCP溶液(200 mg/l)の環流では、微生物群集構造がより大きく変化した。すなわち、メナキノ-7が消失し、ユビキノ-9が出現した。メナキノ-7は、*Bacillus*のようなグラム陽性低G+C細菌および*Cytophaga-Flavobacterium*群に属するグラム陰性細菌を示し、またユビキノ-9は*Pseudomonas*等のグラム陰性細菌を示している。

以上のようにキノン組成の測定が土壌微生物群集構造の解析に効果的であることが明らかにされた。次に[¹⁴C]標識化合物を土壌に添加して生合成される[¹⁴C]標識キノンを調べることによって資化性微生物群を検出した³⁰。[U-¹⁴C]グルコース、[U-¹⁴C]グリシンおよび[1,2-¹⁴C]酢酸の場合は、土壌に添加し6時間培養した後に合成された[¹⁴C]キノンを分析した。[U-¹⁴C]フェノールや[phenyl-¹⁴C]安息香酸では培養時間を長くとることによって、[¹⁴C]標識キノンの検出に成功し、土壌中でこれらの化合物を代謝する微生物群および土壌中の全土壌微生物群の構造を同時に推定することができた。[U-¹⁴C]グルコースと[U-¹⁴C]グリシンで標識されるキノン種はほぼ同じで、同じ微生物群が分解している可能性が示された。また、[1,2-¹⁴C]

酢酸の場合は、6時間では標識キノンも検出されなかった。酢酸分解菌が非常に少なかったか分解菌が働かなかったことを示している。Fig.6に[U-¹⁴C]グルコースを2つの異なる施肥管理土壌に添加した例を示した。化学肥料と厩肥両方を施用する慣行区土壌では高度に水素添加されたメナキノ-8が標識されるのが特徴的で、*Actinobacteria*がグルコースを代謝していることが示された。また、化学肥料区の土壌では、ユビキノ-8が標識されたのが特徴的であった。これはプロテオバクテリアのβサブクラスと一部のγサブクラスの細菌群がグルコースの代謝に大きく寄与したことを示している。また両土壌でユビキノ-9およびユビキノ-10(H₂)は標識されず、糸状菌の寄与が殆どなかったことが示唆された。

おわりに

これまでの過去の研究では、土壌微生物を量(微生物バイオマス)、質(微生物群集構造)、機能(活性微生物群)を解析するためには、それぞれの項目を別々の方法で測定し、その関係を調べて土壌微生物群の挙動を推定することしかできなかった。しかし現在では抗生物質を用いた部分阻害法や[¹⁴C]標識キノン法によって、これらの情報が関連づけた形で得られ、土壌微生物群の各グループの有機化合物の分解への寄与が解析できるようになった。現在、各種化学物質を分解する微生物群を決定する土壌環境要因を明らかにすべく研究を継続している。化学物質を分解する土壌微生物群の動態制御を目指し、今後も研究に精進したいと考えている。

本研究の遂行にあたり、名古屋大学名誉教授鎌塚昭三先生には農薬分解に関する貴重なご指導、ご鞭撻を賜りました。また、カリフォルニア大学デービス校教授 松村文夫先生からは研究の考え方を学びました。また、島根大学教授 山本広基先生、豊橋技術科学大学教授 藤江幸一先生、同助教授 胡洪宮先生、横浜

国立大学教授 浦野紘平先生、には、共同研究を通して様々なご教示を頂きました。心より御礼申し上げます。名古屋大学教授 木村真人先生、同教授 吉田重方先生、同助教授 渡邊彰先生、現東京農工大学助教授 豊田剛己先生には、研究を通して終始ディスカッションして頂きました。また、多くの学生の方達には研究を遂行して頂きました。特に、伊勢村浩司氏、野村和代氏、鶴飼敏彰氏、森徹氏、伊藤武治氏、李錫俊博士、藤村佳樹氏、三浦聡子氏、野澤満実枝氏、田中基氏、高橋さゆり氏、斎藤敬克氏、山川晴義氏、長崎賢一朗氏、般坂敬子氏には大きな貢献をして頂きました。その他にも様々な方から、ご援助ならびにご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究は、名古屋大学農学部および大学院生命農学研究科での個別研究として、また島根大学生物資源科学部、豊橋技術科学大学エコロジー工学系、および横浜国立大学工学部との共同研究として行ったものです。ここに記して謝意を表します。

引用文献

- 1) レイチェル・カーソン：“Silent Spring,” 1962 (生と死の妙薬, 青樹築一訳), 新潮社, 東京, 1970
- 2) 鉦塚昭三・山本広基：土と農薬—環境中における農薬の行くえ—, 日本植物防疫協会, 東京, 200pp., 1998
- 3) A. Katayama & K. Fujie: Characterization of soil microbiota with quinone profile, in “Soil Biochemistry Vol. 10,” ed. by J.-M. Bollag & G. Stotzky, Marcel Dekker, New York, p. 303, 2000
- 4) A. Katayama, H. Isemura & S. Kuwatsuka: *J. Pesticide Sci.* **16**, 233 (1991)
- 5) 片山新太：植物防疫 **47**, 351 (1993)
- 6) A. Katayama, T. Mori & S. Kuwatsuka: *Soil Biol. Biochem.* **27**, 147 (1995)
- 7) A. Katayama: Degradation of chlorinated aromatic compounds by microorganisms in soil—changes in degradation rate and soil microflora—, in Proceedings of International Symposium on Pesticide Science, Pesticide/Environment: Molecular Biological Approaches,” p. 321, Saitama, Japan, 1993
- 8) A. Katayama, T. Ukai & T. Itoh: *J. Pesticide Sci.* **22**, 12 (1997)
- 9) A. Katayama, H. Isemura & S. Kuwatsuka: *J. Pesticide Sci.* **16**, 239 (1991)
- 10) A. Katayama, T. Ukai, K. Nomura & S. Kuwatsuka: *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1520 (1992)
- 11) A. Katayama & S. Kuwatsuka: *Soil Sci. Plant Nutr.* **37**, 1 (1991)
- 12) A. Katayama: *Mol. Ecol.* **3**, 617 (1994)
- 13) T. Mori, K. Fujie, S. Kuwatsuka & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* **42**, 315 (1996)
- 14) A. Katayama & T. Mori: “Abstracts of 7th International Symposium of Microbial Ecology,” p. C3-4.1, Santos, Brazil, 1995
- 15) A. Katayama & T. Mori: “Abstracts from the 2nd International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology, Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality,” p. 182, Beanue, France, 1996
- 16) T. Mori, K. Fujie & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**, 297 (1998)
- 17) T. Mori, T. Itoh, H. Yamamoto, K. Fujie & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* submitted
- 18) A. Katayama & S. Kuwatsuka: *J. Pesticide Sci.* **17**, 129 (1992)
- 19) J. S. Lee, A. Katayama & M. Kimura: *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1343 (1995)
- 20) D. B. Hedrick & D. C. White: *J. Microbiol. Methods* **5**, 243 (1986)
- 21) A. Hiraishi: *J. Gen. Appl. Bacteriol.* **34**, 39 (1988)
- 22) K. Fujie, H.-Y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saitou & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**, 393 (1998)
- 23) A. Hiraishi, Y. Morishima & J. Takeuchi: *J. Gen. Appl. Bacteriol.* **37**, 57 (1991)
- 24) K. Saitou, K. Nagasaki, H. Yamakawa, H.-Y. Hu, K. Fujie & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**, 775 (1999)
- 25) H.-Y. Hu, K. Fujie, H. Nakagome, K. Urano & A. Katayama: *Water Res.* **33**, 3263 (1999)
- 26) K. Fujie, H.-y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saitou & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**, 467 (1998)
- 27) A. Katayama, H.-Y. Hu, M. Nozawa, H. Yamakawa & K. Fujie: *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**, 559 (1998)
- 28) 片山新太：園芸学会平成9年度秋期大会シンポジウム講演要旨, p. 2, 1997
- 29) S. Uchida, H. Tanaka, K. Fujie & A. Katayama: *J. Pesticide Sci.* **24**, 186 (1999)
- 30) K. Saitou, K. Fujie & A. Katayama: *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**, 669 (1999)

略歴

片山 新太
生年月日：1957年10月15日
最終学歴：東京工業大学大学院総合理工学研究科
化学環境工学専攻博士課程修了
趣味：ジョギング、尺八演奏

Society Awards 2000

(on prominent achievement)

Behavior and Structure of Microbial Community Degrading Agrochemicals in Soil

Introduction

Isolations of microorganisms by dilution plate method

and their characterization only show the presence of potential degrading microorganisms in soil because only several percentages of soil bacteria grow on the agar

media used in laboratory. In most of the cases, the information of the isolates did not help to assess or control the degradation of agrochemicals in soil. To understand the rolls of microorganisms in the agrochemical degradation in soil, it is essential to evaluate the microbial biomass, the microbial community structure and the function in soil without bias by cultivation in laboratory media. At the same time, it is important to elucidate the relations among them. However, there has been no single method to determine these microbial parameters at once.

In this study, two different methods, partial inhibition method and [^{14}C]quinone profile method, were developed. Each single method estimated the microbial biomass, the microbial community structure and the degrading activities in soil. Compared with other methods such as direct microscopic methods combined with DNA probing technique, 16S-rDNA analysis and phospholipid fatty acids, these methods have been considered to give better reflection of microbial community degrading single compound in soil.

Bacterial and fungal contributions to degradation of agrochemicals estimated by partial inhibition method

Partial sterilization method is based on the substrate-induced respiration method that is used as an indicator of the microbial biomass in soil. The respiration rate is measured several hours after the addition of glucose to soil. The respiration rate of soils during 6 to 8 hours are maintained at relatively constant. Antibiotics against bacteria and fungi enable to estimate the contribution of bacteria and fungi to respiration. There are reports to show the good correlation between the respiration and the microbial biomass under the conditions using antibiotics. In this study, instead of glucose, agrochemicals were used and the degradation rates of bacteria and fungi have been estimated.

It was found that repeated application of chlorothalonil decelerated the dissipation of chlorothalonil in soil. In the soil amended with farmyard manure at a high rate, there was chemical reaction between chlorothalonil and phenolic compounds in soil. However, the dissipation of chlorothalonil was mainly due to the microbial action. Chlorothalonil-degrading bacteria present at about 10^6 CFU/g-soil even in virgin soil and enriched by 10 times after the repeated application. This indicated that changes in soil conditions suppressed the activity of the degrading microorganisms. Chlorothalonil-degrading microorganisms were found in diverse taxonomic positions including Gram-negative and -positive bacteria and fungi. Most of the degrading microorganisms required other carbon and energy source for the degradation. Chlorothalonil-degrading *Azomonas* and *Flavobacterium* showed narrow spectrum of substrate specificity, indicating that the degrading

enzyme was not induced by other chemicals. Four possible degrading pathways were present: Substitutions of chlorine with hydroxyl group, methylthio group and hydrogen, and hydrolysis of nitrile. This is the first case that methylthiolation by bacteria was observed.

Degradation of cellulose in soil was inhibited by chlorothalonil application, especially at higher than 15 mg/kg-soil. Most of chlorothalonil-degrading bacteria required relatively high concentration of other carbon source. Glucose addition to soil accelerated the dissipation of chlorothalonil. These indicated that deficiency of carbon and energy source in soil caused the deceleration. Soil pH also a factor to change the degradation rate. Neutral pH enhanced degradation.

Contribution of microbial groups to the changes in chlorothalonil degradation rate was estimated quantitatively by partial inhibition method using antibiotics. To measure bacterial contribution, the mixture of ampicillin, chloramphenicol and tetracycline was used. Cycloheximide was used for the estimation of fungal contribution. The mixture of nutrient broth and yeast extract was added as substrates to minimize the partial sterilization effect. Chlorothalonil degradation rate and carbon dioxide evolution rate were maintained at constant for 6 hours after the addition of the substrates. When freeze-dried powders of chlorothalonil-susceptible microorganisms were used instead of the mixture of nutrient broth and yeast extract, the contribution rates of microbial groups were identical, indicating the validity of the use of the mixture as substrates. Partial inhibition method revealed that increase in the degradation rate in the soils receiving farmyard manure and in the soil conditioned at neutral pH was mainly due to the increase in the degrading capacity of fungi. Deceleration by repeated application was due to the decrease in the fungal capacity or both bacterial and fungal capacities. These indicated that chlorothalonil-degrading fungi control the degradation rate of chlorothalonil in soil. To identify the major degrading fungi in soil, fungal hyphae in soil was directly isolated by a soil washing method. Higher than 40% of isolates were classified into *Fusarium* spp. On the other hand, *Penicillium* spp. were isolated as degraders by a dilution plate method.

Paraquat is adsorbed so strongly that little degradation in soil can be expected. However the long-term observation documented that the dissipation of paraquat in soil. Paraquat-degrading yeast, *Lipomyces* spp. has been isolated from all over the world, although there is no evidence to support the degradation of paraquat in soil by the yeast. We found that paraquat was degraded on the plant debris, especially the one with high carbon to nitrogen ratio. Monopyridon and $^{14}\text{CO}_2$ were detected as metabolites. Urea, ammonia and nitrate suppressed the degradation, suggesting the involvement of nitrogen metabolism. Cycloheximide and polymixin B did not

inhibit the degradation, indicating Gram-positive bacteria as major degrading microorganisms.

Detection of microbial groups degrading a substrate using [^{14}C]quinone profile method

Method to detect microbial groups metabolizing single substrate in soil was enabled by the combination of isoprenoid quinone profile analysis and [^{14}C]-labeled substrate. Isoprenoid quinone has been used as biomarkers to determine the taxonomic position of isolates. The utilization of isoprenoid quinones for environmental samples was pioneered by Hedrick and White (1986), who used the ratio of menaquinones to ubiquinones as an indicator of anaerobic vs. aerobic metabolism. Then, Hiraishi (1988) has extended the method to monitor the structure of aquatic microbial communities based on individual quinone species. However, there was no application of quinone profile method to the soil microorganisms. We have reevaluated the quinone profile method as the method for characterization of soil microbial communities and developed a new method to detect degrading microbial groups as well as total microbial community structure by [^{14}C]-labeling of quinones in soil.

In the soil environment, menaquinones (naphthoquinone) and ubiquinones (benzoquinone) are detected. Each species of microorganism contains one major quinone species generally. Ubiquinone-8 (ubiquinone with 8 isoprenoid units) is contained in β -subclass and some of γ -subclass of Proteobacteria. Ubiquinone-9 is contained in γ -subclass of Proteobacteria and fungi. Ubiquinone-10 is contained in α -subclass of Proteobacteria. Ubiquinone-10(H₂) (ubiquinone with 10 isoprenoid units with hydrogenation of one double bond) is contained in fungi. δ - and ϵ -subclass of Proteobacteria and Gram-positive bacteria contain menaquinone-6, -7, or -8. *Cytophaga-Flavobacterium complex* contains menaquinone-6 or 7. *Actinobacteria* contain menaquinone with side chain of longer than 9 isoprenoid units.

Isoprenoid quinones are extracted as neutral lipids from soil and determined by high performance liquid chromatography equipped with photodiode array detector. Quinone profiles can be subjected to the numerical analysis using a dissimilarity index. Number of quinone species detected in soils were in the range from 20 to 25. There was a linear relation between total amount of quinones and microbial biomass carbon measured by fumigation-extraction method. Half lives of quinones were shorter than 10 days.

Diversity of microbial community was evaluated by newly introduced quinone diversity index. The application of farmyard manure increased quinone diversity index of a yellow soil. Microbial community structure

had changed specific to each fertilizing practice for several years and became stable. Menaquinone-7 was characteristic in the soil receiving farmyard manure. Farmyard manure itself contained menaquinone-7 by 40% as mole fraction. It was suggested that farmyard manure application resulted in menaquinone-7.

Changes in microbial community structure by the application of pentachlorophenol in a percolation flask were successfully monitored by quinone profile analysis. Decrease in fungi was indicated by the disappearance of ubiquinone-10(H₂) at 20 mg/l of pentachlorophenol. At 200 mg/l of pentachlorophenol, changes in the community structure became wider: disappearance of menaquinone-7 and appearance of ubiquinone-9.

These results clearly have shown the usefulness of quinone profile method for the characterization of microbial community structure in soil. Then, [^{14}C]-labeled substrate was used to detect the microbial groups to metabolize the single substrate. [^{14}C]-labeled glucose, glycine, acetate, phenol and benzoate were examined. During 6 hours of incubation of soil after the incorporation of [^{14}C]-labeled substrates, [^{14}C]-labeled quinones synthesized were detected in glucose and glycine but not in acetate, suggesting that acetate-degrading microorganisms was negligible in population or not active under the conditions. The species of [^{14}C]-labeled quinones from glucose were the same as those from glycine, suggesting that the same microbial groups metabolized both substrates. In the soil receiving farmyard manure, highly hydrogenated menaquinone was labeled from glucose, suggesting the metabolism by *Actinobacteria*. On the other hand in the soil receiving only chemical fertilizers, metabolism by β -subclass and some of γ -subclass of Proteobacteria were indicated by labeled ubiquinone-8. It was also suggested that there was no contribution of fungi. Phenol and benzoate-metabolizing microbial groups were detected after 3 days of incubation from the incorporation.

Conclusions

Previous studies measured separately microbial biomass, microbial community structure and functions and then scientists tried to correlate these parameters to estimate the behavior the microorganisms. However, the correlation did not reflect behavior of individual microbial groups in soil. Here, partial inhibition method using antibiotics and [^{14}C]quinone-profile method were introduced. These methods are powerful to correlate the microbial biomass, community structure and the activity metabolizing a substrate. To understand the degradation of agrochemicals by microorganisms in soil, these methods should be useful and will provide microbial information to assess and control the degradation of various chemicals in soil.