

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00616

研究課題名(和文) ネオニコチノイド系農薬の環境における残留性と分解菌との関連性の解明

研究課題名(英文) Analysis of the relationship of persistence of neonicotinoid pesticides with degrading microbe

研究代表者

森 美穂 (Mori, Miho)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70581031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：屋外に設置した人工水田におけるジノテフランとイミダクロプリドの連用による環境中への残留性を明らかにするとともに、水質や微生物の菌数・菌叢の変化を経時的に調査した。土壌中のジノテフラン濃度は、1年目と比較して2年目において、期間を通じて上回っており、イミダクロプリド濃度は、年度ごとに残留濃度が高くなる傾向がみられた。水質項目と微生物数・種類は、農薬散布による大きな差異は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物は生態系で主に分解者として重要な役割を担っているので、ネオニコチノイド系農薬によるそれらの生物活性や多様性の変化を屋外試験で調べる必要がある。その際には、実現場での使用を想定し、長期間・連続施用における環境中の残留性・蓄積性を明らかにし、分解菌を含む微生物生態系との関連性を明らかにすることが重要である。また、分解経路や分解産物を明らかにすることは、バイオレメディエーションの観点から重要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the persistence of dinotefuran and imidacloprid in the environment and the changes of water quality and microbial count and type by continuous use in artificial paddy fields set up outdoors. The residual concentration of dinotefuran in soil was higher in the second year than in the first year throughout the period, and the residual concentration of imidacloprid tended to increase every year. No significant difference was observed in the water quality items and the microbial count and type due to pesticide spraying.

研究分野：環境微生物

キーワード：ネオニコチノイド農薬 ジノテフラン イミダクロプリド 分解菌 影響評価

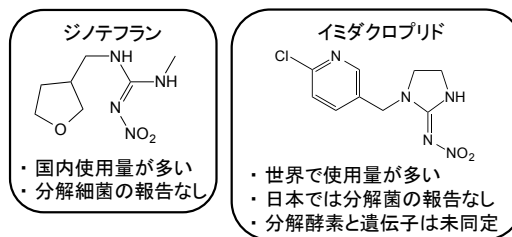
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、世界で広く普及しているネオニコチノイド系農薬は、有機リン系農薬の代替農薬として、1990年頃にニコチンの構造を参考にして開発された比較的新しい殺虫剤である。神経シナプスにあるニコチン性アセチルコリン受容体に結びついて、神経に刺激を与える。現在日本国内でも多量に使用されており、高い浸透性と残効性から、作物内部に多く吸収され、実際の環境中に散布された剤の80~98%が土壌中に残留することなどが報告されている<sup>1)</sup>。これらの中には、防除対象外の非標的生物種（エビ、カニ、カゲロウやトンボ等）への悪影響やミツバチが大量死・大量失踪する蜂群崩壊症候群の原因と疑われている成分もある<sup>2)</sup>。そのため、欧州では期限付きでイミダクロプリドを含むいくつかの成分の使用と販売を禁止し、科学的知見に基づくリスク評価が進められている。この20年間にネオニコチノイド系農薬の世界市場におけるシェアは25%を超え、日本国内における使用量も過去15年で3倍に増加した。それらの中でイミダクロプリドは世界で最も使用量が多く、ジノテフランは近年、急速に国内で出荷量を伸ばしており、5年前の4倍に増えてネオニコチノイド系農薬の中でトップの出荷量である。

農薬の分解に関する研究は、殺虫剤の持続効果と生物への安全性を評価するために必要である。ネオニコチノイド系農薬の微生物分解については、実験室試験で一定の温度や湿度条件下において、土壌微生物による分解を検証した報告例はいくつか存在するが、屋外試験における報告例は存在しない。また、これまでに7成分中、アセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、およびチアメトキサムについては分解菌に関する報告が複数存在するが、クロチアニジン、ニテンピラム、およびジノテフランについては一つしか報告されていない。また、植物、昆虫、動物におけるネオニコチノイド系農薬の代謝に関する酵素や遺伝子については知られていないが、微生物では未だに特定されていない。日本においては、ネオニコチノイド系農薬の使用量が非常に多いにも関わらず、日本における微生物による分解については、白色腐朽菌が報告されているのみであり<sup>3)</sup>、細菌による分解についての報告はない（図1）。



【課題】

- ・屋外試験における分解を検証した報告例はない
- ・代謝に関する酵素・遺伝子は特定されていない
- ・日本では細菌による分解についての報告例はない

図1 ネオニコチノイド系農薬の微生物分解の課題

2. 研究の目的

現在、ネオニコチノイド系農薬は日本を含めて世界的に使用量が増加している一方、ミツバチやトンボをはじめとする防除対象外の生物への悪影響が懸念されている。環境中では、土壌や昆虫体内などの広範囲に渡って検出されており、その高い残留性も問題視されている。本研究では、屋外に人工水田を設け、ネオニコチノイド系農薬処理による影響評価を、分解者として重要な役割を担っている微生物を中心に実施した。また、イミダクロプリドとジノテフラン分解菌の単離・同定を行い、これらの菌の分解特性の解析から、土壌への残留性ととの関連性について考察した。本研究の成果は、複雑な野外環境における農薬の動態や、その場に生息する微生物も含む全ての生物間相互作用をも加味した生物への影響評価手法の開発につながると思われる。

3. 研究の方法

(1) 農薬処理区画の設置とサンプリング方法

人工水田として、大学内実験圃場に大型プラスチック製コンテナ（幅1.2m×長さ2.8m×深さ0.5m）を6基設置し（図2）、農薬の連続施用による影響を想定して、ジノテフランとイミダクロプリド剤の箱処理（イネ育苗箱への薬剤処理）を3年間にわたり実施した。イネ株の移植後は、刈り取りまでの5ヶ月間（140日）で10回（3年で計30回）のサンプリングを行った。各回、コンテナ内の20箇所から計2Lの水と、5箇所から計200gの土壌を採取し、実験用試料とした。

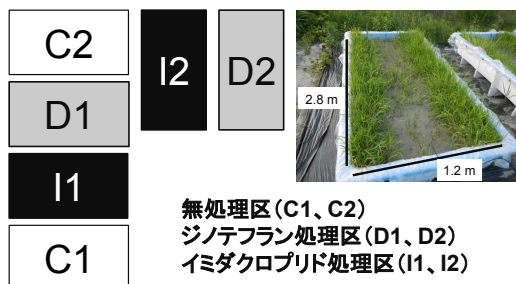


図2 実験区画

(2) ネオニコチノイド系農薬濃度と水質測定

農薬の濃度は、各試料から抽出・濃縮後に LC-MS/MS で測定した。また、水試料については COD、全リン、全窒素についても測定した。

(3) 微生物の数と種類の経時的変化

採取した水試料と土壌試料のそれぞれについては、適宜滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し、

シクロヘキシミド 50 mg/L を添加した R2A 寒天培地とクロラムフェニコール 100 mg/L を添加した PDA 寒天培地に 50  $\mu$ L 塗抹し、25°C で培養した。菌叢変化の解析は寒天培地上のコロニーの形態観察と PCR-DGGE により行った。

#### (4) 分解菌の特性と増殖阻害試験

各処理区からイミダクロプリド、あるいはジノテフランを単一炭素源あるいは単一窒素源とした合成培地を用いて分解菌の単離を試みた。菌の増殖が確認できたものは HPLC を用いて農薬濃度の分解を確認した。さらに得られた菌株は塩基配列情報に基づいて同定を行った。

農薬を 0.2~20.0 g/L の濃度になるように添加した寒天培地を用いて、標準菌株と人工水田で単離した優占菌株の増殖阻害を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) ネオニコチノイド系農薬濃度と水質の経時的変化

採取した水試料と土壌試料の農薬濃度を測定した。水中のイミダクロプリド濃度は 3 年とも散布 2 時間後でピークとなり、2 年目と 3 年目の残留濃度は 1 年目の残留濃度より下回った。土壌中のイミダクロプリド濃度は、年度ごとに残留濃度が高くなる傾向がみられた。1 年目と 2 年目の水中のジノテフラン濃度は、散布 2 時間後でピークとなり以後急速に減少したが、完全には分解されず、土壌中のジノテフラン濃度は、1 年目と比較して 2 年目において、期間を通じて上回っていた。

水質測定の結果、測定した 3 項目について 3 つの区画で有意な差は認められなかった。

#### (2) 農薬散布による微生物の数と種類の経時的変化

3 年間の調査で、水と土壌試料ともにイミダクロプリド散布による細菌数と真菌数の著しい変化は認められなかった。ジノテフラン散布では、水と土壌試料ともに細菌数は未処理区と比較して大きな差は認められず、真菌数は散布 7 日後に菌数の増加が見られたものの、全体としての有意差は認められなかった。土壌から抽出した DNA を用いて PCR-DGGE による菌叢解析を行った結果、両剤とも散布による細菌叢と真菌叢に及ぼす影響は確認できなかった。

#### (3) 分解菌の特性と増殖阻害試験

分解菌の単離実験では、両剤とも単一炭素源とした液体培地では菌の増殖を確認することができず、単一窒素源とした培地でのみ菌の増殖を確認することができた。分解菌は単離同定後、-80°C 保存し、再度分解試験を実施すると、分解活性が著しく低下したり、分解能を失うといった現象がみられた。最終的に両剤の分解菌として 2 つの属の細菌とジノテフラン分解真菌を 1 菌株単離することができた。農薬処理区画の土壌で両剤とも残留が認められたことや、安定した分解活性を示す菌が取得できなかったことなどから、環境中では特に低濃度の剤を分解できる微生物が少ないか、もしくは分解に適した状態で存在していない可能性が示唆された。

取得した単離菌（以下 Y01 株）のジノテフラン分解試験では、50 mg/L ジノテフランが 28 日間の培養後、39.2%減少した。また、HPLC 分析では、Y01 株の増殖過程でジノテフランの分解に伴い、分解産物と思われる 4 個のピーク面積の増加を確認することができた。

両剤を用いた細菌の増殖阻害試験では、2.0 g/L の高濃度でも影響が確認できなかった。両剤の環境中でのピーク濃度は増殖阻害がみられた濃度より著しく低いものであったことから、両剤は短期間・単回施用では微生物に対して、直接的にも間接的にも生育には影響を及ぼさない可能性が示された。

#### <引用文献>

- 1) Sánchez-Bayo, F. (2014) The trouble with neonicotinoids. *Science*. 346: 806-807.
- 2) Cressey, D. (2015) Bee studies stir up pesticide debate. *Nature*. 520(7548): 416.
- 3) Wang, J. et al. (2012) Biotransformation of acetamiprid by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 831-835.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森 美穂	4. 巻 2
2. 論文標題 化学物質が環境と微生物に及ぼす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobashi Koji, Harada Takaaki, Adachi Yoshihiro, Mori Miho, Ihara Makoto, Hayasaka Daisuke	4. 巻 138
2. 論文標題 Comparative ecotoxicity of imidacloprid and dinotefuran to aquatic insects in rice mesocosms	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 122 ~ 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ecoenv.2016.12.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾枝 良哉、伊藤 秋実、脇屋 香、城島 透、早坂 大亮、森 美穂
2. 発表標題 人工水田におけるネオニコチノイド系農薬が微生物生態系に及ぼす影響評価
3. 学会等名 日本防菌防黴学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----