

平成 22 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580381
 研究課題名（和文） 人工化学物質を分解する土壌微生物の群集レベルでの応答と土壌の微小環境が及ぼす影響
 研究課題名（英文） Response of soil microbial community to xenobiotic in relation to soil microenvironments
 研究代表者
 井藤 和人（ITOU KAZUHITO）
 島根大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：20273922

研究成果の概要（和文）：除草剤 2,4-D および 2,4,5-T に高度に汚染された経歴を持つベトナム土壌の分解菌群集は遺伝的にも地理的にも多様であった。土壌中の分解菌を含む微生物群集の挙動を培養法と非培養法で調べ、両方法の重要性を明らかにした。微小な土壌粒子からはその形状によっても異なる多様な微生物群集が集積され、土壌の微小環境には従来の方法では集積されなかった多様な分解菌が生息することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Herbicide 2,4-D- and 2,4,5-T-degrading bacteria were genetically and geographically diverse in Vietnamese soils which have a history of heavy pollution of these chemicals. Microbial community structures in the soils were examined by culture-dependent and independent methods and showed importance of both approaches. Diverse microbial communities were observed among soil particles indicating novel degraders may present in the soil microenvironments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境浄化、人工化学物質、土壌微生物、微生物群集、分解微生物、土壌微小環境

1. 研究開始当初の背景

生態系における分解者として微生物は重要な役割を果たしており、地球上の物質循環のためにはなくてはならないものである。その分解能力は広範囲に及び、微生物は天然由来の化学物質に限らず、人間が新たに作り出した多くの非生体物質をも分解できることが知られ、様々な人工化学物

質にさらされた自然環境の保全に大きく寄与している。しかしながら、中には微生物によって分解が困難な化学物質も存在し、それらは結果として環境中に長期間残留するため、生態系に悪影響を及ぼすことが懸念されている。このような問題を解決するための方法の一つとして、難分解性の人工化学物質を分解できる微生物を探

索・利用することが試みられている。これまでにも多数の分解菌が報告されているが、それらのほとんどは汚染された環境試料を用いた集積培養により単離されている。しかし、この方法では、用いた集積条件において優占したものだけを単離することになり、結果として単離された分解菌以外の分解菌がいても優占しないものは単離されず、また、集積過程における分解菌群集の動態も把握することができない。一方、人工化学物質を分解できる微生物を利用して環境修復を行う場合に、汚染環境に生息している土着の分解菌を活用したり、非土着の分解菌を導入して利用したりするいずれの場合においても、その場における分解菌群集の動態を把握することは、その動態に影響する環境因子や分解菌の生理・生態学的性質との関係さらには分解菌個体群間の相互作用を解明するために必要であり、微生物を利用した環境修復を有効にするための科学的根拠を提供する。

人工化合物の分解菌としては、除草剤2,4-Dの分解菌が最も研究されており、これまで世界各地で単離された分解菌の進化系統学および分解酵素の生理学的性質の違いから、それらは3つのグループに分類されている。これまでのほとんどの研究は単離された分解菌に関するものであり、環境中の動態についても個々の分解菌に関するものであり、分解菌群集に着目したものはほとんどない。

一方、微生物の生息場所としての土壤環境を考えると、その構成成分や構造の不均一性のために多様な微小環境が存在している。また、人工化合物の分解菌のように特定の機能を持った微生物菌群集を考える場合にも、それぞれの個体群の分布は不均一であることが予想される。分解菌群集の土壤中での相互作用を研究対象にする場合には、これらの不均一性について考慮する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、土壤に2,4-Dを添加した後の2,4-D分解菌群集の挙動に着目し、土壤環境と分解菌群集の分布の不均一性を考慮して、2,4-D分解菌の集積過程における分解菌群集構造とそれに影響する生物学および物理化学的要因の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 土壤における2,4-D分解菌の多様性の解明

これまでに2,4-Dで汚染された経歴を持つベトナムの中南部の8箇所および汚染歴のない北部の2箇所方土壤を採取し、

その土壤けんだく液に2,4-Dを100ppmとなるように添加し、25℃の暗所で好氣的に培養した。経時的に土壤けんだく液の一部をサンプリングして2,4-Dの濃度を測定し、分解が確認できたときには再度2,4-Dを100ppmとなるように添加し引き続き培養した。1および2回目の分解時に土壤けんだく液の一部を取り、2,4-Dを唯一の炭素源とした無機塩寒天培地を用いた希釈平板法により細菌を分離した。出現したコロニーのすべてについて2,4-Dおよび2,4,5-Tの分解能をそれらを100ppmで含む無機塩液体培地で調べた。

得られたすべての分解菌からDNAを抽出し、16S rDNA遺伝子および2,4-D分解に関与する*tfdA*、*tfdB*、*tf tA*、*tf tC*、*cadA*遺伝子をPCRで増幅し、それらの塩基配列から分解菌および分解遺伝子の多様性を調べた。

(2) 2,4-D分解菌の集積過程における分解菌群集構造の動態の解明

(1)の実験で、土壤けんだく液に2,4-Dを100ppmとなるように添加、培養し、細菌の分離のために採取した土壤けんだく液の一部を用いて、土壤DNA抽出キットISOILによりDNAを抽出した。これを鋳型として、16S rDNA遺伝子を対象に、GCクランプ付ユニバーサルプライマーでPCR増幅し、DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)により、土壤けんだく液中の細菌菌群集構造を調べた。

2,4-Dの添加により出現した主要なDGGEバンドの塩基配列を決定し、データベース検索により最近縁種を決定するとともに、(1)の実験で単離した2,4-D分解菌から抽出したDNAについても同時にDGGEを行い、土壤けんだく液由来のバンドとの対応を行なった。

(3) 土壤の微小環境が分解菌の集積過程における菌群集構造の動態に及ぼす影響の解明

(1)(2)の実験で、多様な分解菌の存在が確認された土壤を用いた。直径約1.0mmの団粒状粒子と直径1.6~2.0mmの鉋物状粒子のそれぞれ一粒ずつを96穴マイクロプレートに取り、また、土壤200mgを24穴マイクロプレートの各ウェルに入れ、2,4-Dの濃度が100ppmの無機塩液体培地をそれぞれ200μlおよび1.5ml添加し、25℃の暗所で静置培養した。土壤粒子の大きさは、およそ半数のウェルで2,4-Dが分解するように設定した。

培養液中の2,4-Dの分解を吸光度の測

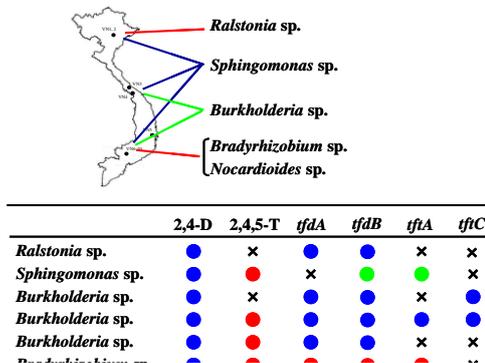
定により判定し、2, 4-Dが分解した個々のウェルからISOILによりDNAを抽出し、16SrDNA-PCR-DGGE法を用いて微生物群集構造を調べた。それぞれのDGGEのバンドパターンから微生物群集構造を比較した。

4. 研究成果

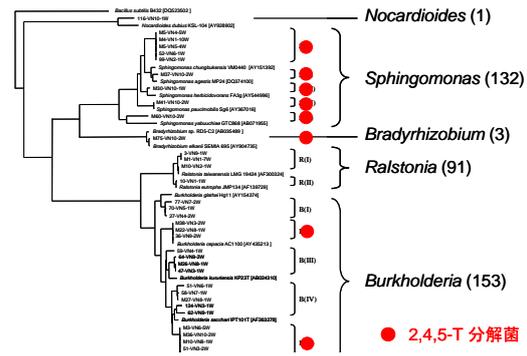
(1) 土壌における2, 4-D分解菌の多様性の解明
 10種類の土壌から353株の分解菌ができ、3つの主要なグループ*Burkholderia* (43%)、*Sphingomonas* (40%)、*Ralstonia* (15%)と2つの少数のグループ*Bradyrhizobium* (0.8%)、*Nocardioides* (0.3%)からなることを明らかにした。*Burkholderia* に属する分解菌はベトナムの中部および南部で単離されたのに対し、*Ralstonia* に属する分解菌は北部でのみ単離された。また、*Sphingomonas* に属する分解菌はベトナムの全土で単離され、それらは地理的に特徴ある分布を示した。さらに、一つの土壌中に複数種の分解菌が共存する場合や、同じ分解菌が多数の土壌から単離される場合があった。2, 4, 5-Tの分解菌は全体の65%で、すべての土壌から単離された。*tfdA*は*Sphingomonas*を除くすべての分解菌に、*tfdB*はすべての分解菌に、*tftA*は*Sphingomonas*、*Burkholderia*、*Bradyrhizobium*に属する分解菌に、*tftC*は*Burkholderia*のみで検出された。

以上の結果は2, 4-Dおよび2, 4, 5-Tの分解菌群集はベトナム全土に生息し、遺伝的にも地理的にも多様であることを示している。このような分解菌の多様性はこれまでに報告されたことがなく、土壌がこれらの除草剤に高度に汚染された経歴を持つことが原因であると示唆された。

ベトナム土壌の2,4-D・2,4,5-T分解菌と分解遺伝子の多様



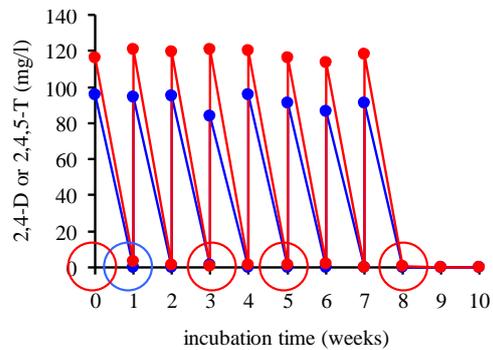
ベトナム土壌から単離された2,4-D・2,4,5-T分解菌の16S rDNA



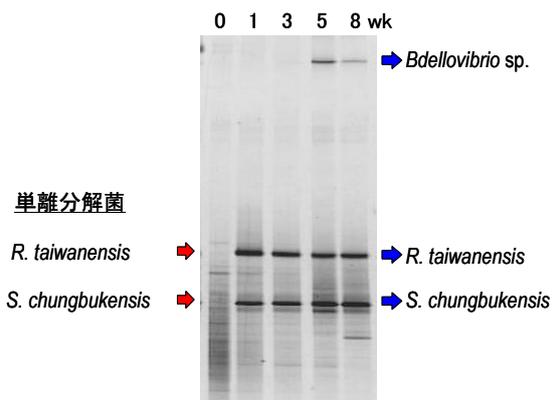
(2) 2, 4-D分解菌の集積過程における分解菌群集構造の動態の解明
 土壌けんたく液から直接DNAを抽出して、16SrDNA-PCR-DGGE法により微生物の群集構造を解析した結果、単離した分解菌のバンドが優占していた場合が多かったが、同じ土壌から単離された複数種の分解菌の中には優占するものとしないうものがあつた。また、それらの群集構造は培養に伴い遷移していた。単離した分解菌以外でバンドが優占した微生物の単離を試みた結果、*Frateuria* sp. に近縁な細菌が単離できたが、この菌は2, 4-Dおよび2, 4, 5-Tのいずれも分解できなかった。

土壌中の分解菌を含む微生物群集の挙動を非培養法により把握することができた結果、分解菌でも優占する菌としない菌がいることが分かり、さらに、それらの一部については単離することができたので、今後、これらの菌を用いることにより、土壌中におけるそれらの相互作用や環境因子の影響を調べることが可能となる。また、土壌中の分解菌の群集構造を調べるときには培養法と非培養法のいずれの手法も重要であることが示唆された。

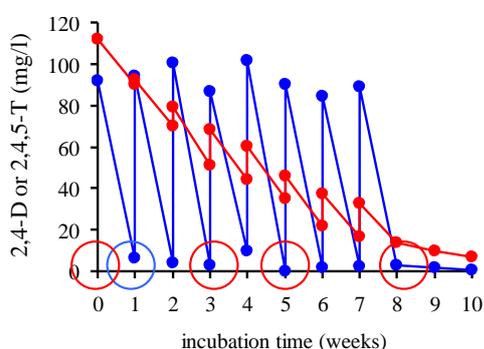
土壌けんたく液中での2,4-D(●)および2,4,5-T(●)の分解(VN2)



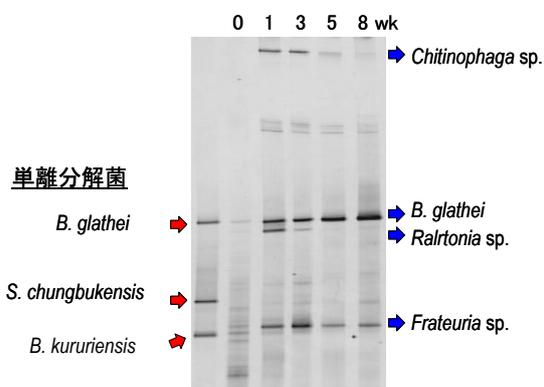
土壤けんだく液中で微生物群集構造の遷移(VN2)



土壤けんだく液中での2,4-D(●)および2,4,5-T(●)の分解(VN4)



土壤けんだく液中で微生物群集構造の遷移(VN4)

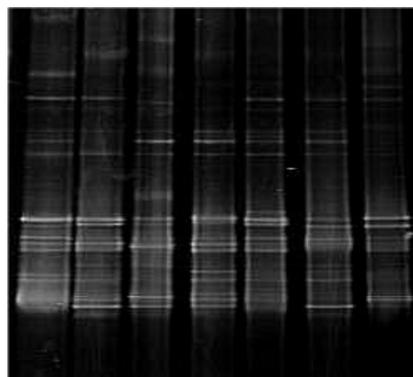


(3) 土壤の微小環境が分解菌の集積過程における群集構造の動態に及ぼす影響の解明

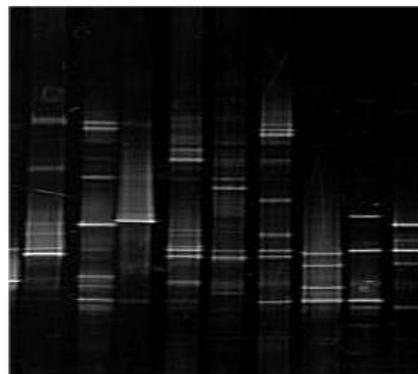
土壤粒子から集積培養したマイクロウェルプレート内の各ウェル内からは多様なDGG Eバンドが確認され、土壤粒子上には多様な微生物が生存していることが明らかとなった。土壤200mgから集積培養された微生物群集のDGG Eバンドパターンは土壤粒子からのものと比較して一様であり、各ウェル間での多様性は低かつ

た。団粒状と鉱物状の土壤粒子を比較すると、団粒状粒子では鉱物状粒子の約半分の大きさであってもほぼ同数のウェルで2,4-Dが分解し、団粒状粒子にはより多くの2,4-D分解菌が生息していることが示唆された。2,4-D分解菌は細かな粒子が集まった団粒内に多く存在しており、鉱物状と団粒状との土壤粒子の表面積の違いが分解菌の数に影響したと考えられた。また、団粒内では多様な微小環境が形成されているため多様な微生物が生息していると一般的に考えられているが、DGG Eバンドパターンは鉱物状粒子の方が多様であった。これは団粒の内部は鉱物表面とは異なり安定した環境が維持されているため限られた菌のみが優占しやすいと考えられた。

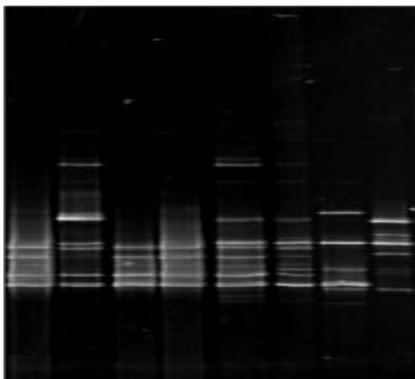
以上の結果から、土壤200mgを使用した場合には比較的均一な微生物群集が集積されるのに対して、土壤粒子から集積培養した場合にはより多様な微生物群集が集積されることが明らかとなった。また、土壤粒子の形状によっても微生物群集構造が異なった。これより、土壤粒子から集積培養を行うことで従来の方法では集積されなかった多様な分解菌が優占し、分離できる可能性が示唆された。



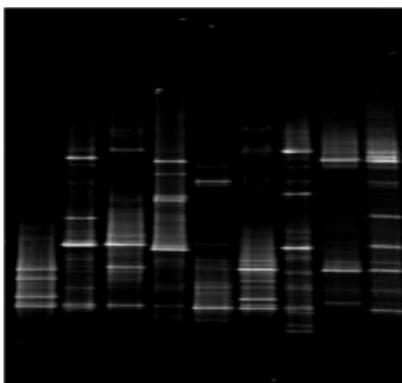
土壤200mgから集積培養した各ウェルにおける微生物群集構造



土壤粒子から集積培養した各ウェルにおける微生物群集構造



団粒状土壌粒子から集積培養した各ウェルにおける微生物群集構造



鈎物状土壌粒子から集積培養した各ウェルにおける微生物群集構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Kazuhito Itoh, Nguyen L. Huong, Kousuke Suyama, Diversity of herbicides 2,4-D- and 2,4,5-T-degrading bacterial communities in Vietnamese soils, Proceedings of SoilRem 2008, 312-319, 2008, 査読有

② Nguyen L. Huong, Kazuhito Itoh, Kousuke Suyama, 2,4-Dichlorophenolxyacetic acid (2,4-D)- and 2,4,5-Trichlorophenolxyacetic acid (2,4,5-T)-Degrading Bacterial Community in Soil-Water Suspension during the Enrichment Process, Microbes and Environments. 23, 142-148, 2008, 査読有

③ Nguyen L. Huong, Kazuhito Itoh, Kousuke Suyama. Diversity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid (2,4,5-T) Degrading Bacteria in Vietnamese Soils. Microbes and Environments. 22, 243-256, 2007, 査読有

[学会発表] (計1件)

① 井藤和人, 伊東夕海, 王秋実, 巢山弘介, 土壌粒子の大きさと2,4-D分解菌の多様性との関係に関する研究, 日本微生物生態学会, 2009.11.22, 東広島

[図書] (計1件)

① 井藤和人, 山本広基, 丸善, 土壌中における農薬の挙動 (訳書), カーク・オスマー「科学技術・環境ハンドブックII」グリーン・サステイナブルケミストリー, 日本化学会監訳, 2009, pp345-363

[その他]

ホームページ等

<http://www.kankyuu.shimane-u.ac.jp/soilmicrobe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井藤 和人 (ITOU KAZUHITO)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 20273922