

土壌における農薬分解菌の生態

島根大学生物資源科学部
農林生産学科

井藤 和人

はじめに

農業資材として使用された農薬は、その役割を終えた後には、速やかに分解・消失することが望まれる。分解によって生成した中間分解生成物も含めて、農薬が環境中で長期間にわたり残留すると、気散や水の動きに伴う地球規模での拡散、食物連鎖を通しての生物濃縮などにより、様々な生態系における、人間を含めた標的外生物に悪影響を及ぼすリスクがあることは、過去の苦い経験からよく知られている。このため、現在では、環境中で一定の分解性を持たない農薬は、その登録が保留されることで、環境および生態系が保全されるようになっている。

農薬の環境中における分解には、非生物学的なものと同生物学的なものがある(カーク・オスマー 2009)。非生物学的な分解には、酸化、還元、加水分解といった一般的な化学反応に加え、土壌表面、表層水、植物体表面での光化学反応による分解があり、生物学的な分解は、主に土壌微生物によるものである。散布された農薬の大部分が最終的には土壌に到達するため、土壌微生物による農薬の分解は、農薬の分解経路や残留性、植物や地下水への移行性といった土壌中での挙動に大きな影響を及ぼす。ここでは土壌における農薬の分解に大きな影響を及ぼしている農薬分解菌の生態について概説する。

土壌中の微生物

土壌中には土壌 1g あたり 10^{8-9} もの多種多様な細菌が生息し、また、畑地土壌では細菌に匹敵する生物量の菌類が生息し、動植物遺体などに由来する有機物や易分解性の土壌有機物を分解することで、土壌生態系における物質循環に重要な役割を果たしている。微生物が持つこのような高い分解能力は、天然物由来の有機化合物に対してだけでなく、農薬等の人工有機化合物に対しても発揮され、ほとんどの農薬は、土壌中の微生物の働きにより分解される。これには、微生物が本来の基質である天然物と類似の化学構造を農薬の化学構造の中に認識して農薬を分解する場合と、農薬の持つこれまでにない新規な化学構造に微生物が適応して分解能力を新たに獲得する場合があると考えられる。

土壌中には多様な微生物が相互作用しながら生息している。農薬分解菌も

それらの一員であり、様々な環境要因や微生物間、微生物-植物間などの生物間相互作用の影響を受けており、それらの結果が農薬の分解活性に反映される。土壌は、その生成要因や構成成分などによって分類されるが、同じ土壌でも様々な種類、大きさの土壌粒子が単独または団粒を形成して存在し、土壌有機物や各種無機成分の分布も一様ではない(図-1)。このため、およそ $1\mu\text{m}$ といった大きさの細菌にとっては、多様な環境が土壌中には存在し、その多様性が多様な微生物の生息を可能にしている。このような土壌における様々な環境因子の中でも、土壌の酸化・還元状態が微生物の種類やそれらの代謝活動に最も影響を与えると考えられる。畑地など酸化環境では、主に好気性の微生物が生息し、酸素を電子受容体とした好気的な呼吸によりエネルギーを獲得し、農薬は水酸化や芳香族環の酸化的な開裂など酸化的に分解される。水田の下層土、底質など還元

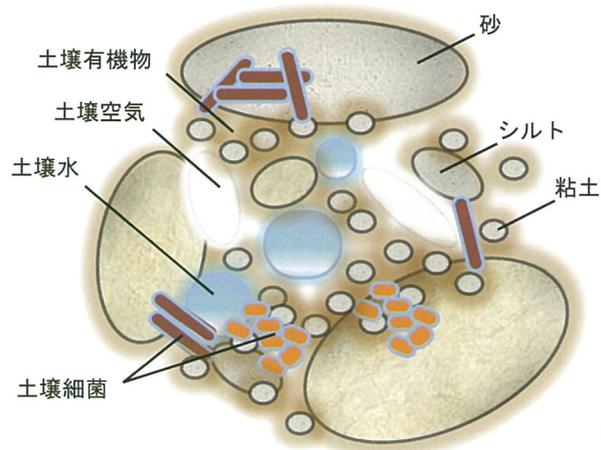


図-1 土壌中の微生物の生息環境

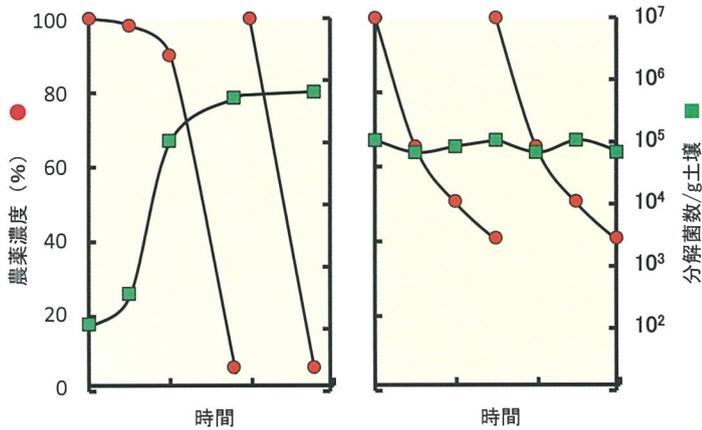


図-2 農薬の資化的な分解（左）と共代謝による分解（右）における農薬の消長と分解菌数の推移

的な環境では、主に嫌気性の微生物が生息し、発酵または硝酸イオンや硫酸イオンなど酸素以外の化合物を電子受容体とした嫌気的な呼吸によりエネルギーを獲得し、農薬はニトロ基の還元、不飽和結合の還元、脱塩素反応など還元反応により分解される。水田の表層土壌など酸化層と還元層の境界では、低レベルの酸素を好む好気性菌や好気的な呼吸と発酵、嫌気的な呼吸の両方法でエネルギーの獲得が可能な通性嫌気（好気）性菌が生息している。

農薬を分解する微生物

これまでに多くの農薬に対する分解菌が種々の環境から分離され、また、多くの場合、一つの農薬に対して多種類の分解菌の存在が報告されている。これらの分解菌は、農薬に対する代謝能力によって、農薬を資化的に分解する微生物と共代謝によって分解する微生物に分類される（片山・山本 1999）。農薬を資化できる微生物は、農薬を無機化するために必要な一連の遺伝子・酵素群を持ち、農薬を呼吸のための電子供与体として用いて、酸化的に無機化することによってエネルギーを得るとともに、農薬の構成成分である炭素や窒素を増殖に利用することができる。このため、農薬資化性菌は、農薬が繰り返し散布されると、農薬を分解することで増殖し、土壌中

の菌密度が上昇することで農薬の分解活性も高くなる（図-2）。土壌における農薬の分解活性が高まることは、環境保全のためには望ましいことであるが、土壌処理剤の場合には、効力が速やかに失われることになるため、問題になることがある。実際、除草剤2,4-Dを繰り返し散布した土壌で、除草効果が失われた原因を解明する過程で、2,4-Dを資化できる微生物の存在が明らかにされたのが、農薬資化性菌発見の最初の一例である（Audus 1950）。

一方、共代謝によって農薬を分解する微生物は、農薬を無機化するために必要な一連の遺伝子・酵素群のいずれかを持っていないため、農薬の分解過程における中間代謝物が蓄積する。従って、農薬資化性菌とは異なり、農薬の分解によりエネルギーを得たり、農薬の構成成分である炭素や窒素を増殖に利用したりすることができない。このため、共代謝による農薬分解菌は、農薬を分解しても土壌中の菌密度は変化せず、農薬の分解活性も高くない（図-2）。共代謝による農薬の分解では中間代謝物が生成するが、これらの化合物は、通常、土壌中では他の微生物により引き続き分解される。このように、土壌中における農薬は、複数の微生物の共代謝により分解され、最終的には無機化されることが一般的である。共代謝による農薬分解菌は、炭素源を農薬以外の有機化合物に依存しているため、土壌中の物質循環の中で、

それらの有機物を供給する微生物が、何らかの影響を受けて活性が変化すると、農薬分解菌が間接的にその影響を受け、土壌の農薬分解活性が変化することがある。殺菌剤クロロタロニルは、土壌中で主に共代謝により分解されると考えられているが、クロロタロニルを連用することで、分解菌の炭素源となる有機物を供給する微生物が影響を受け、結果として、土壌におけるクロロタロニルの分解活性が低下した例が報告されている（Katayama *et al.* 1991）。

農薬の分解によるエネルギー獲得の特異な例として、嫌気性菌による有機塩素化合物の脱塩素反応がある（Mohn and Tiedje 1992）。ある種の嫌気性菌である還元的脱塩素菌は、農薬などの有機塩素化合物を嫌気呼吸の電子受容体として利用して、エネルギーを得ることができる。この過程で有機塩素化合物の塩素原子は還元的に脱塩素されて水素原子に置換される。通常、脱塩素された農薬は、嫌気的な環境ではそれ以上分解されないため、脱塩素菌は、有機塩素化合物の脱塩素によってエネルギーを得ることはできるが、農薬およびその脱塩素化合物を炭素源として利用することはできない。多くの嫌気性微生物は利用できる基質が限られているため、嫌気的な環境における有機物の分解・無機化には、複数の異なる種類の微生物の協同が必要である（永井 1993）。例えば、発酵で生成し

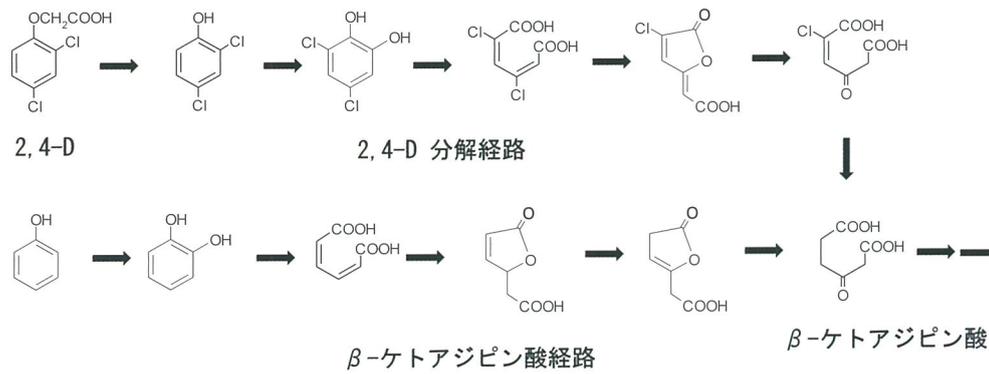


図-3 2,4-D 分解経路とβ-ケトアジピン酸経路の比較

た有機酸やアルコールは水素・酢酸生成菌の働きで水素と酢酸に変換され、生成された水素と酢酸は、さらに硫酸還元菌やメタン生成菌の働きで、二酸化炭素やメタンに変換される。3-クロロ安息香酸の嫌氣的脱塩素菌は、脱塩素により安息香酸を生成する脱塩素菌、安息香酸を水素と酢酸に分解する水素・酢酸生成菌、水素を消費するメタン生成菌の3種類の微生物が共存することにより脱塩素が可能で、単独では脱塩素できないことが示されている (Shelton and Tiedje 1984)。適切な環境条件下において、脱塩素菌は脱塩素反応によってエネルギーを獲得することができるので、電子受容体となる有機塩素化合物を繰り返し添加すると、菌数が増加し、脱塩素活性も上昇する。

農薬の資化的な分解によりエネルギーや炭素源を獲得できる農薬分解菌は、農薬の反復添加により菌数を増加させ、土壌微生物群の中で優占させることができるため、分離することが比較的容易で研究例も多いが、共代謝によって農薬を分解する微生物は、農薬の分解によって菌数が増えないので、もともと土壌中で優占していないとそれらの分離は困難で、研究もあまりなされていない。

また、農薬を分解する細菌については多くの例が報告されているのと比較して、糸状菌の農薬分解菌に関する報告は限られている。しかし、糸状菌に

分類される白色腐朽菌は、基質特異性の低い酸化酵素であるペルオキシダーゼを分泌することが知られており、この酵素の難分解性化合物に対する分解能を利用したバイオレメディエーション技術への活用が期待されている (Marco-U and Reddy 2012)。また、過去に2,4-Dおよび2,4,5-Tを含む枯葉剤が大量に散布されたベトナム土壤では、無作為に分離した糸状菌の7%が2,4-Dを分解し、さらに、汚染度が高かったと思われるベトナム南部の土壤からは2,4,5-T分解菌が分離されている (Itoh *et al.* 2012)。畑地土壤における糸状菌の生物量は細菌に匹敵していることが知られていることから、土壤中の農薬分解における糸状菌の寄与については適切な評価が必要だと思われる。

分解菌が持つ農薬分解遺伝子

農薬分解菌が農薬を分解するために必要な酵素は農薬分解遺伝子にコードされ、これまで農薬資化性菌を中心にそれらの遺伝子が同定され、酵素の特徴が研究されてきた。農薬分解遺伝子はプラスミド、トランスポゾン、遺伝子アイランドなどの可動性遺伝子上に存在する場合があります。これらの農薬分解遺伝子が水平伝達によって獲得されたことが示唆されている (Top *et al.* 2002)。これまでよく研究されてきた除草剤2,4-Dの資化性菌では、2,4-D

の資化に必要な遺伝子群がプラスミド上にクラスターを形成して存在しており、また、それらの遺伝子配列が分解菌により異なる場合があることから、これらの遺伝子群が水平移動による獲得と編集、再編成により形成されたことが示唆されている (Fulthorpe *et al.* 1995)。2,4-D資化性菌では、一連の分解遺伝子オペロンが安息香酸、カテコールなどの芳香族化合物の分解遺伝子クラスターと対応していることから、これら天然物の分解遺伝子クラスターが起源となり、有機塩素芳香族化合物の分解遺伝子クラスターが形成されたと考えられている (図-3)。2,4-Dを分解するための遺伝子については、本来の基質に関する情報はないが、相同性のある遺伝子がダイズ根粒菌には広く分布していることが分かり、これらの微生物群の中で何らかの働きを担っていることが推察される (Itoh *et al.* 2004)。この酵素は2,4-Dには弱い活性しか示さないが、2,4-Dから塩素原子を除いたフェノキシ酢酸には相対的に高い活性を示したので、塩素原子を持たない天然の類似化合物が本来の基質であると思われる (Itoh *et al.* 2002)。

さらに、上記の2,4-D資化性菌とは異なる分類群からも2,4-D資化性菌が分離されており、それらは異なる酵素系で2,4-Dを分解する (Kitagawa *et al.* 2002)。この分解遺伝子クラスターに相同性がある遺伝子は、ダイズ根粒

菌とその近縁種に広く分布し、それらの遺伝子構造の違いから、2,4-D 資化性菌と非分解菌の（分解）遺伝子の起源は異なっていると考えられている (Itoh *et al.* 2004)。また、ダイズ根粒菌に近縁な 2,4-D 資化性菌はハワイの溶岩下やカナダの原生林土壌からも分離されていることから、2,4-D とは無関係に存在している遺伝子クラスターであると推察されている (Kamagata *et al.* 1997)。2,4-D 資化性菌に関しては特殊な例かもしれないが、土壌中にはこのように分類群においても分解遺伝子に関しても多様な農薬分解菌が生息していると思われ、それらの働きにより農薬が分解、無機化されている。

農薬分解菌の土壌中での挙動

土壌中の様々な環境因子が農薬分解菌の挙動に影響する。農薬分解菌の挙動は、土壌から分解菌を分離して調べることが一般的であるが、土壌中の微生物の大部分は、通常の方法では培養できないことが知られている。これまでに多数の農薬分解菌が単離されているが、通常、農薬の添加により農薬分解菌を集積し、分離を試みるので、その条件で優占する農薬分解菌が分離されるが、優占していない他の農薬分解菌は分離されず、それらの存在や特徴は未知なままである。このような中で、最近の分子生物学的手法の発展により、土壌から抽出した DNA の情報を基に、土壌中の微生物の群衆構造を調べる手法が一般的になっている。ベ

トナム土壌または土壌けんたく液に 2,4-D を繰り返し添加し、経時的に DNA を抽出して、土壌微生物群集の推移を微生物の培養を伴わない方法で調べると、優占する 2,4-D 分解菌が属または種レベルで変化した (Nguyen *et al.* 2008)。また、栄養塩の添加によっても 2,4-D 分解菌の群集構造が変化した (王ら 2011)。このような微生物群集の遷移の要因となる環境因子や分解菌群集内での競争、他の土壌微生物との相互作用などについては不明な点が多いが、これらの点が解明されれば土壌における農薬分解菌の挙動や働きについての理解が進むと思われる。

まとめ

土壌中には農薬を分解できる微生物が生息し、それらは散布後の農薬を分解することで生態系の保全に重要な役割を果たしている。登録された農薬は分解性が確認されているので、それぞれの農薬を分解できる多様な微生物が存在していると思われるが、これまでに研究の対象として分離され、報告されているものはそれらの中のごく一部である。ほとんどの農薬は使用されるようになってから間もない人工有機化合物であるにもかかわらず、これらの化合物をも分解できる微生物が有する代謝様式の多様性には驚くべきものがある。このような代謝様式における多様性は微生物群としての多様性であり、土壌における微生物の多様性に依存している。近年、進歩が著しい分子

生物学的手法の応用が、培養が困難な微生物群をも含めた農薬分解菌群集やそれらのもつ機能的な多様性、さらには微生物間相互作用の仕組みを解明するために期待されている。

引用文献

- Audus, L.J. 1950. Biological detoxication of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soils: isolation of an effective organism. *Nature* 166, 356.
- Fulthorpe, R.R. *et al.* 1995. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3274–3281.
- Itoh, K. *et al.* 2002. *tfdA*-like genes in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium*-*Agromonas*-*Nitrobacter*-*Afpia* cluster in α -*Proteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3449–3454.
- Itoh, K. *et al.* 2004. Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdAa* and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2110–2118.
- Itoh, K. *et al.* 2012. Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading fungi in Vietnamese soils. *FEMS Microbiology Ecology* 84, 124–132.
- カーク・オスマー 2009. 土壌中における農薬の挙動. 「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, 丸善, pp.345-363.
- Kamagata, Y. *et al.* 1997. Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic

- acid-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2266-2272.
- Katayama, A. *et al.* 1991. Suppression of chlorothalonil dissipation in soil by repeated application. *Journal of Pesticide Science* 16, 233-238.
- 片山新太・山本広基 1999. 農薬と微生物. 新・土の微生物 (4) 環境問題と微生物, 博友社, pp.29-69.
- Kitagawa, W. *et al.* 2002. Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *Journal of Bacteriology*. 184, 509-518.
- Marco-Urrea, E. and C.A. Reddy 2012. Degradation of chloroorganic pollutants by white rot fungi. In *Microbial Degradation of Xenobiotics. Environmental Science and Engineering*, Springer-Verlag, pp.31-66.
- Mohn, W.W. and J.M. Tiedje 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews* 56, 482-507.
- 永井史郎 1993. 嫌気性微生物のエコロジー. 嫌気性微生物学, 養賢堂, pp.1-16.
- Nguyen, L.H. *et al.* 2008. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacterial community in soil-water suspension during the enrichment process. *Microbes and Environment* 22, 142-148.
- 王 秋実ら 2011. 2,4-D の添加により土壌中で不均一に優占する 2,4-D 分解菌群集. 土壤微生物学会 2011 年度大会.
- Shelton, D.R. and J.M. Tiedje 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 840-848.
- Top, E.M. *et al.* 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 199-208.