

氏 名 (本籍)	かとうひろみ 加藤博美
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第195号
学位授与年月日	昭和52年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻
学位論文題目	ペンタクロロフェノール (PCP) の土壌細菌相に及ぼす影響に関する研究

論文審査委員 (主査)

教授 古坂澄石 教授 高橋 甫

教授 山下恭平

論 文 内 容 要 旨

はじめに

農業の侵蝕作用による土壌の肥力低下は、生物学的な原因によるものである。この問題を解決するために、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。

本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。

本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。本研究は、農業と微生物との相互作用のメカニズムを明らかにし、その制御方法を検討する。

§. I 土壌けん濁液中の細菌数に及ぼす P.C.P の影響

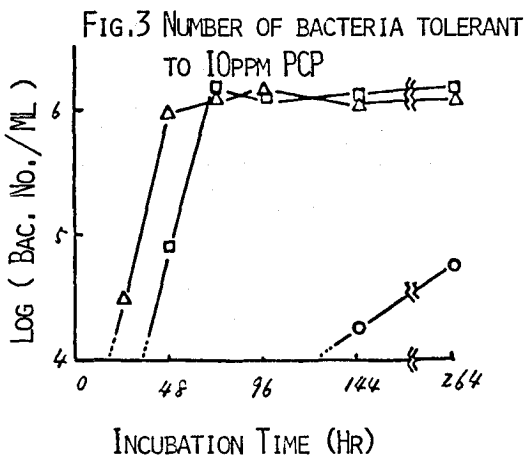
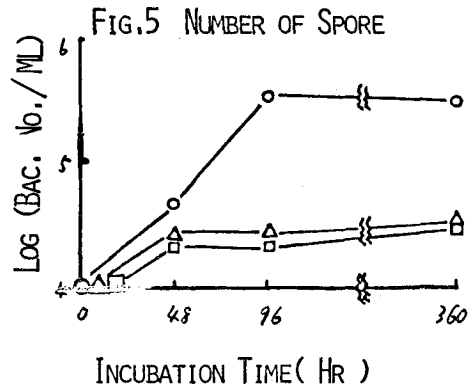
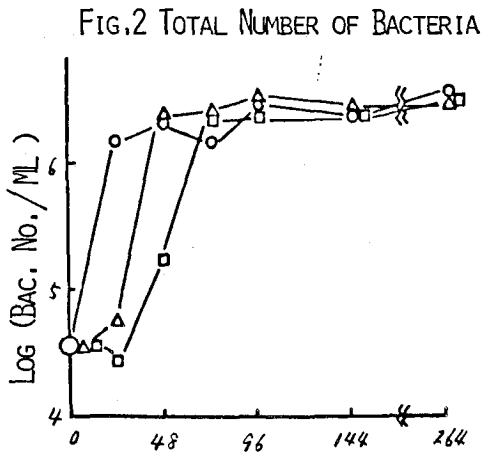
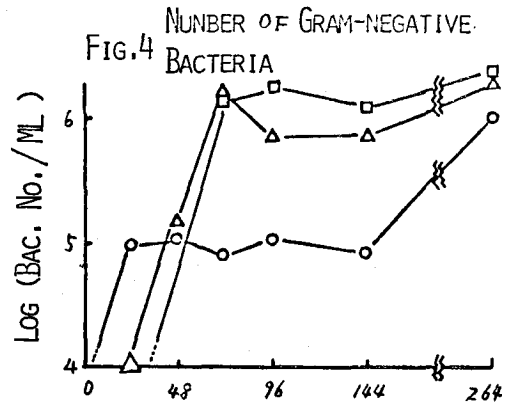
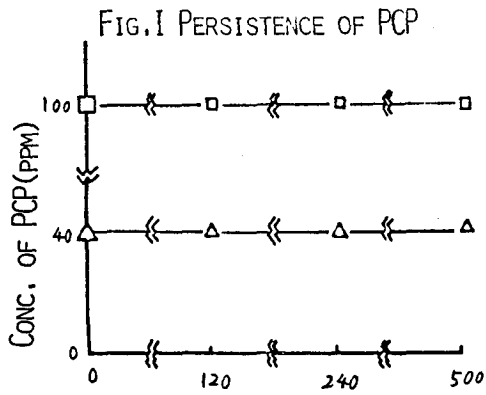
通常の土壌では、P.C.P の影響が不均一に現れる可能性がある。そこで、先が均一に P.C.P の作用を子えることのできる土壌けん濁液を用い、その中で P

(Pの細菌相の変化に及ぼす影響を検討することとし、手始めに細菌数の変化に及ぼす影響を検討した。

方法 500mlの容量の肩付ガラスコップに、40ppmのおよび100ppmのPCP溶液を各々100ml宛に分注し、滅菌後、100ppmのPCP溶液は暗所、30℃で振とう培養し、その水より適時試料採取を行ない、以下の実験に供した。細菌数はPCPの分析は比色法により行ない、希釈平板法により好気性細菌についてのみ行ない、希釈平板法により計測した。計測培地は肉汁寒天培地を10倍に希釈したものをも基本培地とした。

結果と考察 土壌けん濁液中のPCPは培養の期間を通じて減少は認められなかった(50g/l)。これは、全細菌数は、PCP添加土壌けん濁液中に於いては、培養の初期に増加の傾向を示し、その後、減少の傾向を示した(50g/l)。これは、PCPを添加した土壌けん濁液中に於いては、Pの減少が認められ、その結果、細菌群が増加した。10ppmのPCPを添加した土壌けん濁液中に於いては、全細菌数とほぼ同様の傾向を示した。その結果、両PCP添加土壌けん濁液中に於いては、PCP耐性菌の割合は著しく増加した(50g/l)。これは、PCP耐性菌の割合は著しく増加した(50g/l)。これは、PCP耐性菌の割合は著しく増加した(50g/l)。

以上の結果から、PCP添加土壌けん濁液中に於いては、PCPに耐性を有する細菌群が増加して来ることを示している。



PERSISTENCE OF PCP (FIG. I)
AND NUMBERS OF BACTERIA (FIG. 2, 3,
4 AND 5) IN SOIL SUSPENSION.
SOIL SUSPENSIONS WERE CULTURED
WITH 40_{PPM} PCP (Δ), 100_{PPM} (\square)
AND WITHOUT PCP (\circ) RESPECTIVELY.

と、および、それらPcP耐性菌群はグラム陰性の細菌の細菌である。さらに、そのような細菌が全菌の菌数中、高い割合を占める。PcP耐性菌を添加してない懸濁液中の細菌相は、PcP耐性菌が推定される。

5.2 土壤けん濁液中の細菌相に及ぼすPcPの影響

先に述べた細菌数の変化を検討した結果がらの推定を確認するため、具体的にその内容を把握するため、土壤けん濁液中より細菌株を分離し、それらを類別化した。

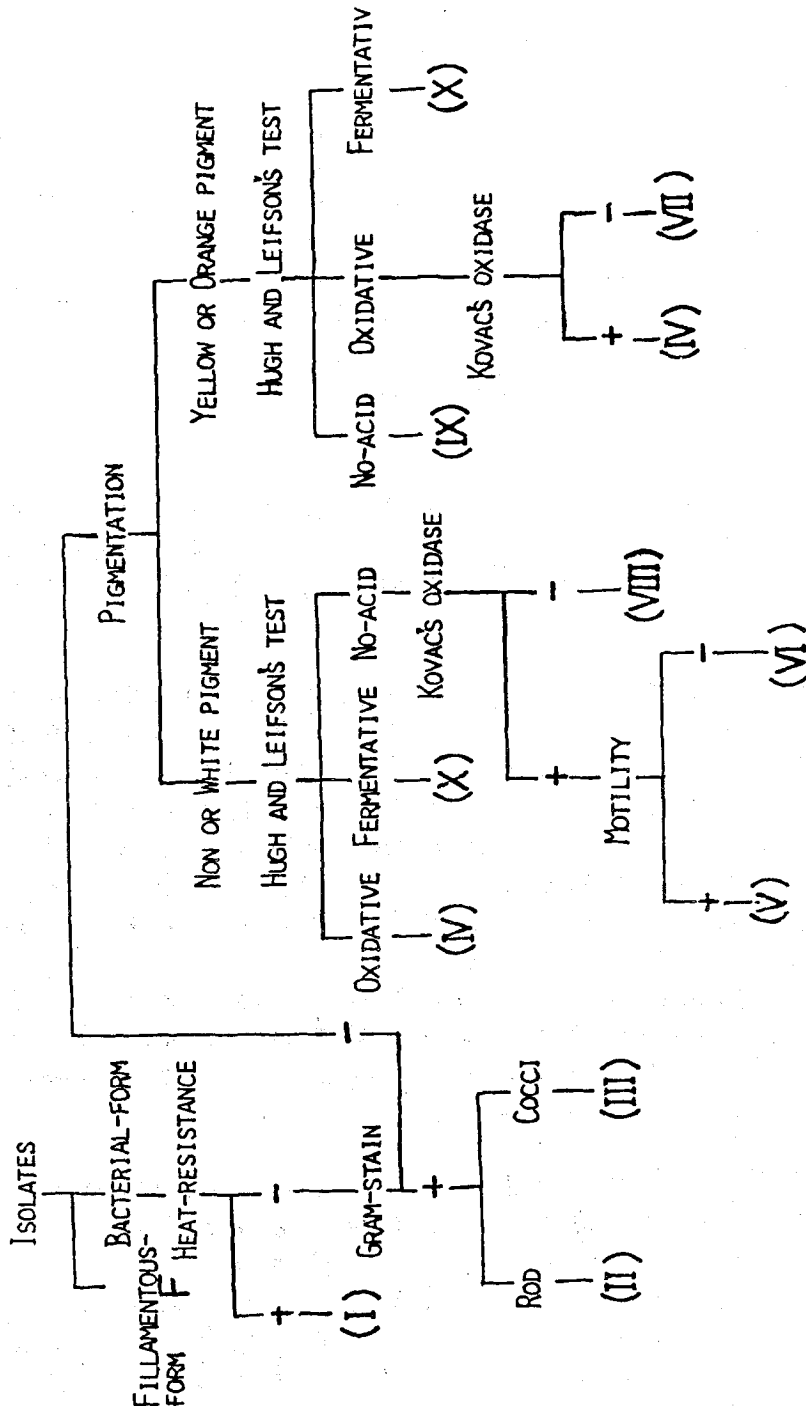
方法 細菌株は、先に全細菌数の計測に用いた希釈平板のうち、40ppm PcP添加土壤けん濁液と無添加土壤けん濁液の培養前、培養後24時間目および48時間目のものより分離した。分離は各々約5株宛行なった。分離株は純化後、8種類の細菌学的性質を調査し、それらの結果を基にして類別化検索表 (Fig. 6) を作成し類別化した。類別化群の推定される分類学的属名はTab. 1に示した。

分離菌株のPcP耐性能はPcPを添加した平板培地上での生育の有無により、感受性 (10ppm)、低度 (10~40ppm)、中度 (40~100ppm)、高度 (100ppm以上) の耐性株として振り分けた。

結果と考察 培養前においては、Bacillus属とグラム陽性球菌群が優占した細菌相であった (Fig. 7)。これを無添加で培養すると、48時間目においては、いくつかの類別化群が著しい優占を示す細菌相が成立した。40ppmのPcPを添加した土壤けん濁液においては、48時間目の細菌相はAcinetobacter属が著しく優占した単純なものであった。

ここで調査した各々の細菌相の中にはPcP耐性株

FIG. 6 DIAGNOSTIC KEY FOR GROUPING OF ISOLATES OF AEROBIC BACTERIA



Tab. I Collective table for grouping of bacterial isolates

I): Bacillus

II): Coryne-form bacteria (Corynebacterium, Arthrobacter, Kruthia)

III): Gram-positive cocci (Micrococcus, Streptococcus, Staphylococcus)

IV): Pseudomonas (Pseudomonas-I, Pseudomonas-2)

V): Pseudomonas-Alcaligenes

VI): Moraxella

VII): Xanthomonas

VIII): Acinetobacter

IX): Flavobacterium

X): Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae-I, Enterobacteriaceae-2)

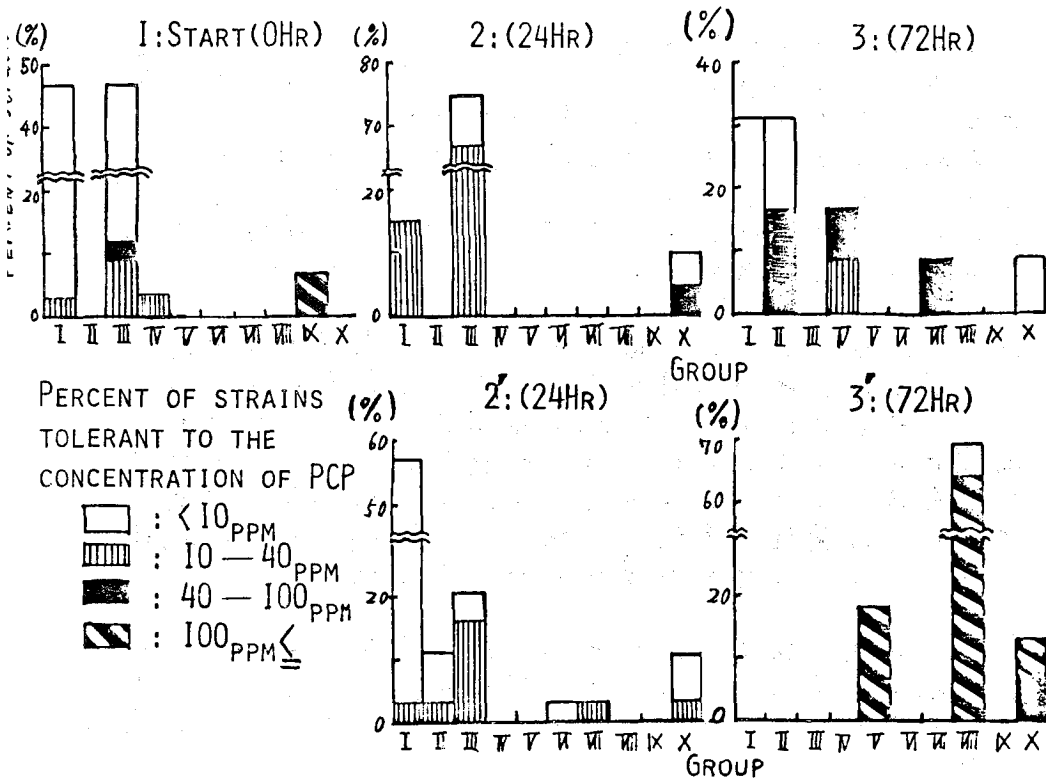


FIG. 7 COMPOSITION OF BACTERIAL FLORAE ESTABLISHED IN SOIL SUSPENSIONS IN THE PRESENCE OF 40 PPM PCP (1, 2, 3) AND IN THE ABSENCE OF PCP (1, 2, 3) RESPECTIVELY.

このような層位別の細菌数の変化に及ぼす影響の差異は、各々の層位中へのPCPの侵入量の相違が第一的義的に作用しているものと考える。

§.4 還元層上部の細菌数に及ぼすPCPの影響

層位によつて、PCPの影響が異なるので、以後還元層の上部を代表して選り検討を加えた。この層位を選りしたのには、こゝまでの水田土壌の研究において注目すべき未だな層位であること、水田の特征的な層位であること、PCPの濃度変化のみらぬことなどである。

方法 湛水土壌は§.3で使用したものを利用した。細菌数の計測も§.3と同様に行なつた。

結果と考察 全好気性細菌数は、PCPを投与してなない区(無処理区)に比較して常用区でやや高、高濃度区でやや低くなる傾向にあつた(所表.16)。計測地地に10ppmのPCPを投与した培地で計測した10ppm耐性菌数は常用区で増加したが高濃度区では増加しなかつた(所表.17)。グラム陰性菌数は常用区で増加したが、高濃度区では増加しなかつた(所表.18)。胞子数は処理のいかんにかかわらず、ほとんど影響がみられなかつた(所表.19)。

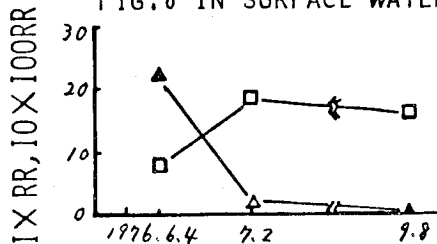
以上の結果から、湛水土壌中においても、PCPの投与により細菌相の変化は影響を受けることが推定される。しかし、その内容には先の土壌懸濁液とは異なつた側面も存在することが推定される。

§.5 還元層上部の細菌相に及ぼすPCPの影響

先に述べた細菌数の変化を検討した結果からの推定の確認と、その具体的な内容を明らかにするために、各処理区より細菌株を分離し、それらの類別を行なつた。

PERSISTENCE OF PCP (FIG. 9, 10, 11 AND 12) AND TOTAL NUMBERS OF AEROBIC BACTERIA (FIG. 13, 14, 15 AND 16) IN VARIOUS PARTS OF WATER-LOGGED SOIL. WATER-LOGGED SOILS WERE SUPPLIED WITH A RECOMMENDED RATE OF PCP (RR) (Δ), A HUNDRED TIMES OF A RECOMMENDED RATE OF PCP (100RR) (\square) AND WITHOUT PCP (\circ) RESPECTIVELY

FIG. 8 IN SURFACE WATER



LOG (BAC. NO./ML)

FIG. 12 IN SURFACE WATER

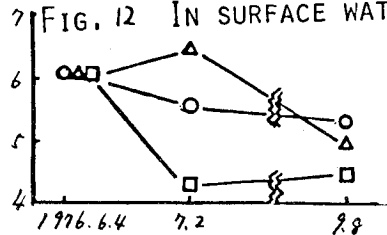


FIG. 9 IN OXIDIZED-LAYER

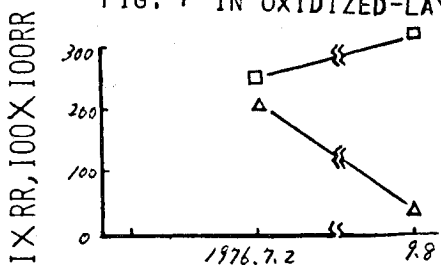


FIG. 13 IN OXIDIZED-LAYER

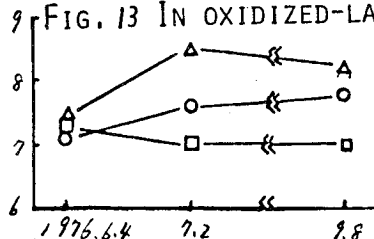


FIG. 10 IN UPPER PART OF REDUCED-LAYER

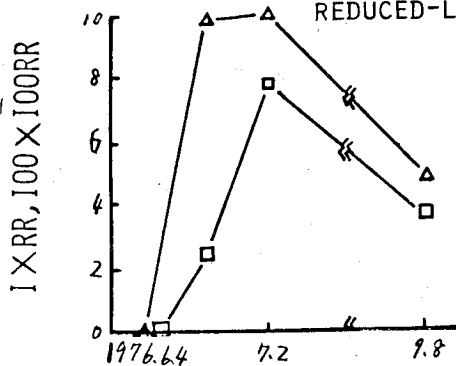
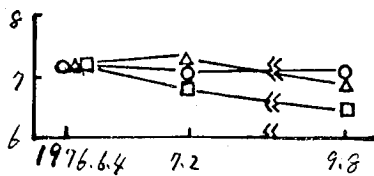


FIG. 14 IN UPPER PART OF REDUCED-LAYER



CONCENTRATION OF PCP ($\mu\text{g}/\text{ML}$)

LOG (BAC. NO./G DRY SOIL)

IX RR, 100X 100RR

FIG. 11 IN LOWER PART OF REDUCED-LAYER

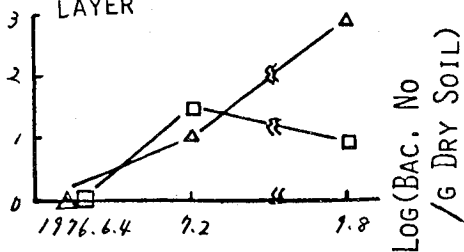
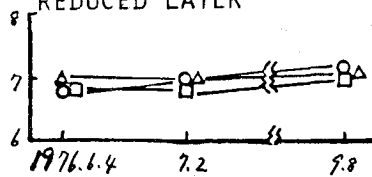
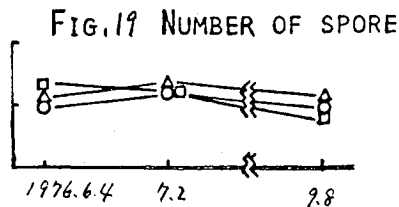
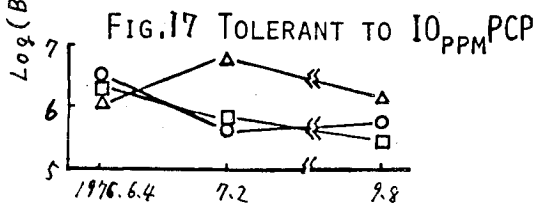
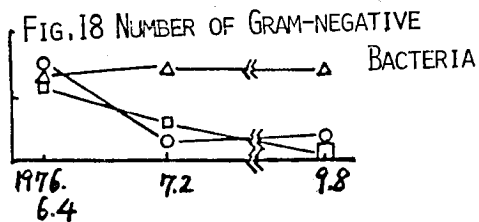
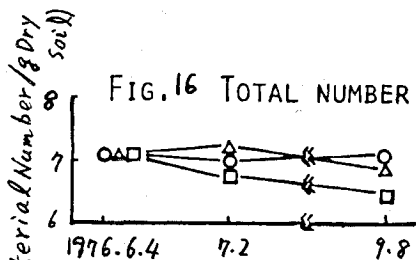


FIG. 15 IN LOWER PART OF REDUCED-LAYER



SAMPLING DATE

NUMBERS OF AEROBIC BACTERIA IN UPPER PART OF REDUCED-LAYER OF WATER-LOGGED SOIL (FIG. 16, 17, 18 AND 19). WATER-LOGGED SOILS WERE SUPPLIED WITH A RECOMMENDED RATE OF PCP (△), A HUNDRED TIMES OF THE RECOMMENDED RATE OF PCP (□) AND WITHOUT PCP (○) RESPECTIVELY.



SAMPLING DATE

方法 細菌株は、§. 4 で用いた全菌数計測用の希釈平板のうち、各処理区の P C P 投与前、投与後 4 週間目および 13 週間目のものより、各々約 100 株分離した。今分離株は純化後、§. 2 と同様に細菌学的諸性質を調査し、類別化した。

分離株の P C P 耐性能は、P C P を添加したアルブミン寒天平板上の生育の有無により、感受性 (10 ppm)、低度 (10 ~ 50 ppm)、中度 (50 ~ 100 ppm)、高度 (100 ppm ≤) の耐性株とした。

結果と考察 P C P 投与前、無処理区のものからの細菌相も *Bacillus* 属と *Corynebacteria* 群が優占していた。また、それら細菌相の分離株の大部分は感受性株だった (Fig. 20)。

常用区においては、*Corynebacteria* 群の他にいくつかの類別化群に属する中度および高度の耐性菌群が優占したために 4 週間目の細菌相は、無処理区のものと比較して多様な細菌相となった。しかし、13 週間目においては、それら耐性菌群は減少し、細菌相は復元した (Fig. 20)。なお、13 週間目 (1975 年度) においては、P C P は検出されなかった。

高濃度区の細菌相は外見上 P C P の影響を受けていないように見受けられた。しかし、4 週間目の細菌相の分離株は約半数が低度耐性株であった。13 週間目において、高度耐性株の出現がみられた (Fig. 20)。これは、この区においては P C P の濃度が高いために、全体的に細菌群の増加が抑制されたためと考えられる。

§. 6 括弧

P C P 投与前区においては、P C P 耐性菌群が増加 (異常に濃度が高い場合は増加抑制) し、その結果、それら耐性菌群が細菌相の中で優占する。

土壌懸濁液系においては、P C P 濃度および培養条件が安定であったために、その条件に最も適応した耐

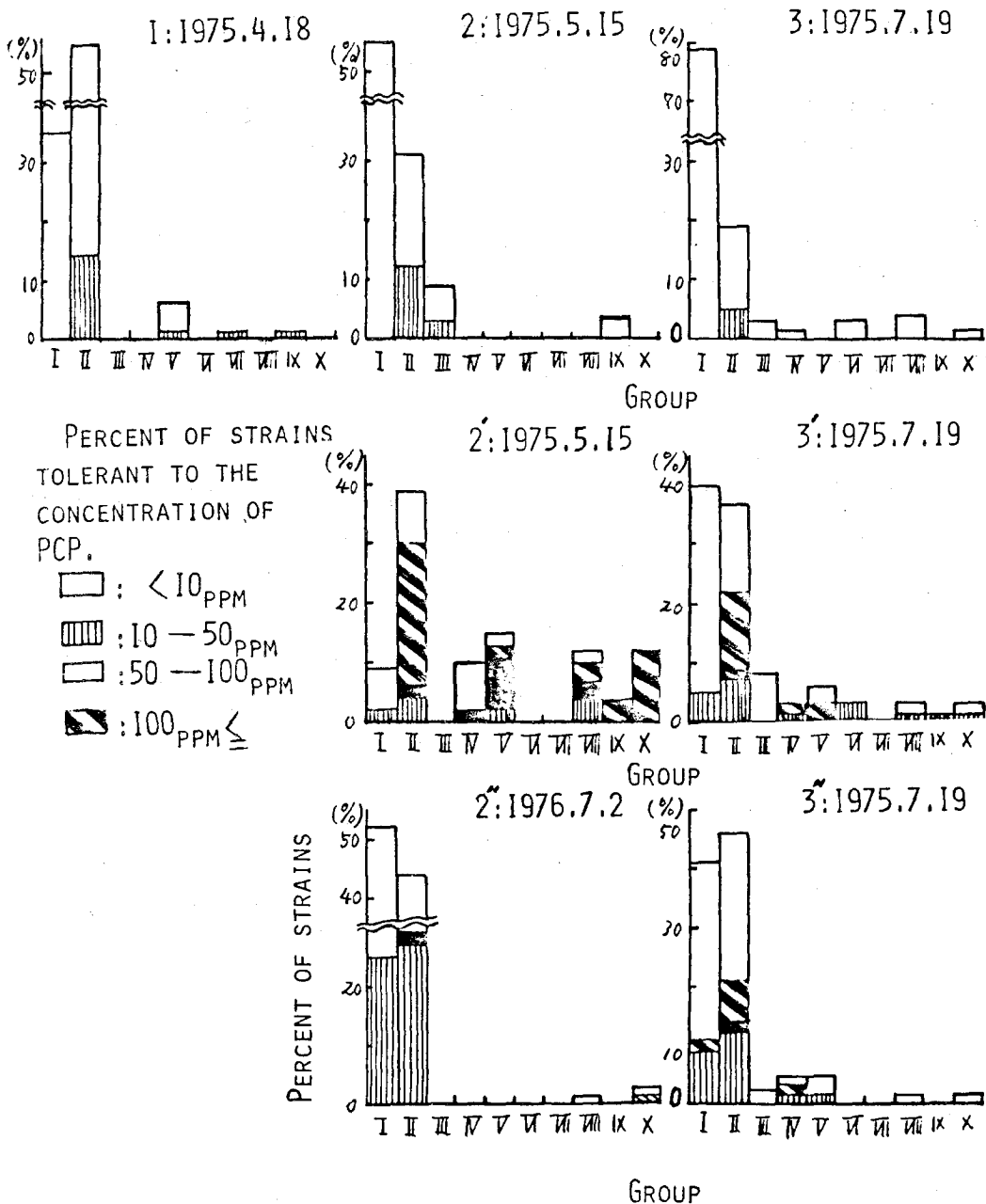


FIG.20 COMPOSITION OF BACTERIAL FLORAE ESTABLISHED IN UPPER PART OF REDUCED-LAYER OF WATER-LOGGED SOILS SUPPLIED WITH A RECOMMENDED RATE OF PCP (1, 2', 3'), A HUNDRED TIMES OF A RECOMMENDED RATE OF PCP (1, 2'', 3'') AND WITHOUT PCP (1, 2, 3) RESPECTIVELY.

性菌群が増加したために、単純な細菌相が成立したと考えられる。それに対して、湛水工環においては、 PCP は不均一に分布し、又、湛水工環自体不均一であるために、多数の類別化群に属する耐性菌群が増加して来た。それを平均化して捉えたために多様な細菌相がみられると考えられる。

PCP によって攪乱された細菌相は、 PCP の消失後に耐性菌群が減少し、その結果復元する。

湛水工環を用いた検討は2回くり返したが、良好な再現性を得た。

本研究を通じて、 PCP により引き起される細菌相の変動を明らかにできたと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

農地に散布された農薬のかなりの部分が土壤中に侵入する。土壤中に侵入した農薬の分解過程を化学的に追跡した研究は数多くあるが、農薬が土壤中の微生物相に与える影響について検討した研究は僅かである。

本研究はわが国の水田除草剤として多量に使用された PCP が水田土壤の細菌相にどのような影響を及ぼすかについて検討したものである。

先ず PCP の作用が均一に行われると見做される土壤懸濁液系を用いて好氣的に検討した。そして、PCP を 40 ppm 及び 100 ppm 添加すると、添加直後の全細菌数の増大が一時的に押えられるが、直ちに無添加区と同数まで増大すること、その主体をなすものはグラム陰性細菌で PCP 耐性を有するものであることを明らかにした。

ついで、水田圃場を模したポット内湛水土壤を用い還元層上部 (0~5 cm) 土壤について前と同様の調査解析を行った。その結果 PCP 添加前に優占する細菌群はグラム陽性の *Bacillus* 及び *Coryneform bacteria* 群であるが、PCP 添加区 (2.67 Kg/10 a 常用量) では約 1 ヶ月後に *Bacillus* 群の優占性が低下し、*Pseudomonas* 群、*Pseudomonas-Alcaligenes* 群、*Acinetobacter* 群、*Enterobacteriaceae* 群等のグラム陰性細菌群が増大した。そして何れの群も高濃度の PCP 耐性菌が主体をなしていた。しかし、約 3 ヶ月後には再び無添加区同様元の菌相に復した。このことは PCP 添加により細菌相は一時的に攪乱されるがやがて元に復することを推定せしめる。

以上の結果は、農薬の安全性について的一端を明らかにしたものであり、農学博士の学位を与えるにふさわしいものと判断した。