環境 DNA で土壌くん蒸処理の微生物影響をみる

生物環境安全部微生物・小動物研究グループ微生物生態ユニット　星野(高田)　裕子

はじめに

近年、様々な環境汚染の生物に対する影響が懸念されており、これらの評価が求められている。環境中の生物のうち、微生物は物質循環など生態系で基礎となる重要な役割を果たしているが、土壌などに生息する微生物は、大部分が従来の培養法では培養できず、環境影響を測る上で手法上の問題があった。最近、培養という作業を経ないで土壌から直接抽出した DNA(環境 DNA)を用いて、土壌中の微生物を調べる方法が注目を集めている。ここでは、病害虫防除のための土壌くん蒸剤が防除対象以外の土壌微生物に与える影響について、環境 DNA を用いた手法で解析し、手法の有用性を検討した結果を紹介する。

環境 DNA を用いた解析手法

対象とする土壌は、殺虫・殺菌剤のクロルピクリン、D-D（1,3-ジクロロプロペン）のいずれかで土壌くん蒸処理を行った土壌とした。これらの土壌くん蒸剤は、臭化メチルの廃止に伴い、代替薬剤として使用増大が予想され、非標的生物に及ぼす影響が懸念されている。ホウレンソウ畑で年1回これらの薬剤による土壌くん蒸処理を行い、2年間にわたり、土壌中の微生物相の変化を細菌と糸状菌それぞれについて、環境 DNA を用いた手法（PCR-DGGE 解析）で追跡した。

土壌から直接抽出した DNA は、理論上、土壌中に存在する全ての生物（細菌・糸状菌・小動物・植物など）の遺伝子の混合物である。ここでは、細菌あるいは糸状菌のみの群集構造を調べるため、特異的なプライマーを用いた PCR によりそれぞれの生物の遺伝子を増幅した。この PCR 産物には、さらに様々な種類の細菌あるいは糸状菌由来のものが含まれているので、変性剤勾配ゲル電気泳動（DGGE）という手法で分離した。この手法では、配列の違いにより遺伝子が一つ一つのバンドとして分離され、微生物の種類によりリボゾーム RNA 遺伝子配列は異なるために、PCR-DGGE バンドパターンから、微生物群集の多様性や、群集構造の変化を検出することができる。

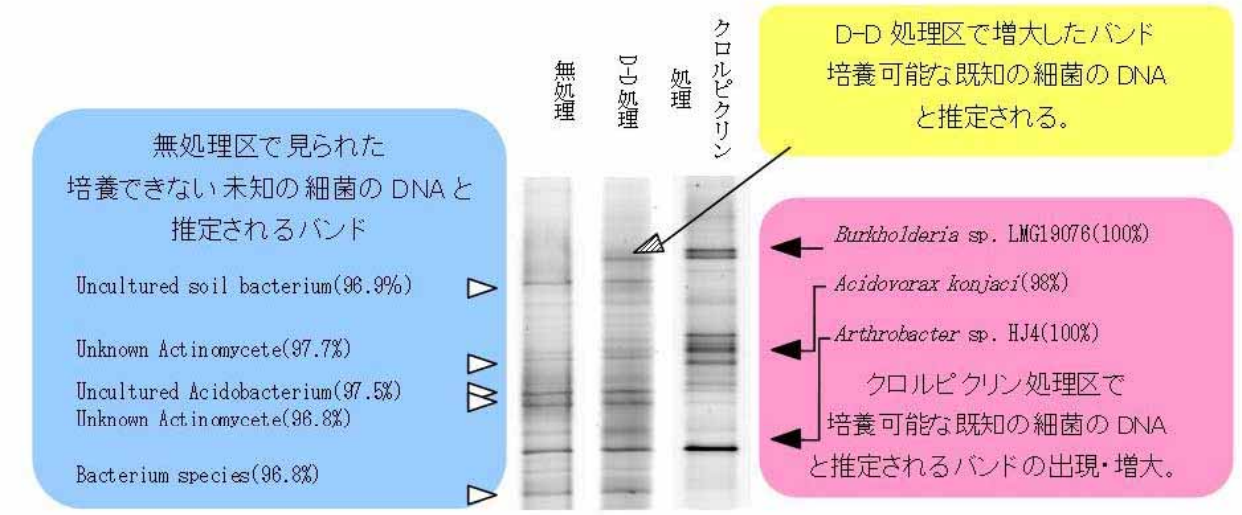

図1　土壌くん蒸処理による細菌16S rDNA DGGE パターンの変化

ホウレンソウ畑で農薬を1年に一度処理しており、2年目（2回目）の処理から1ヶ月後の土壌を解析。特にクロルピクリン処理区では培養できない細菌が消失し、培養可能な細菌が増えてくる。
（　）内はデータベース上の最も近い配列との相同性（%）。

また、このバンドの塩基配列を調べることで、存在する微生物の分類群を推定することが可能となる。例えば、細菌相についての解析では、無処理土壌の DNA バンド（図１左）には、培養できない未知の細菌と推定される細菌 DNA のバンドが存在した。しかし、クロルピクリン処理の土壌では、これらのバンドは消失し、新たに出現・増大するバンド（図１右）の塩基配列は培養可能な細菌の配列と一致した。このことは、この手法によれば、従来の培養法では評価できなかった培養困難な菌を含めて、薬剤処理が及ぼす影響を解析できることを示している。

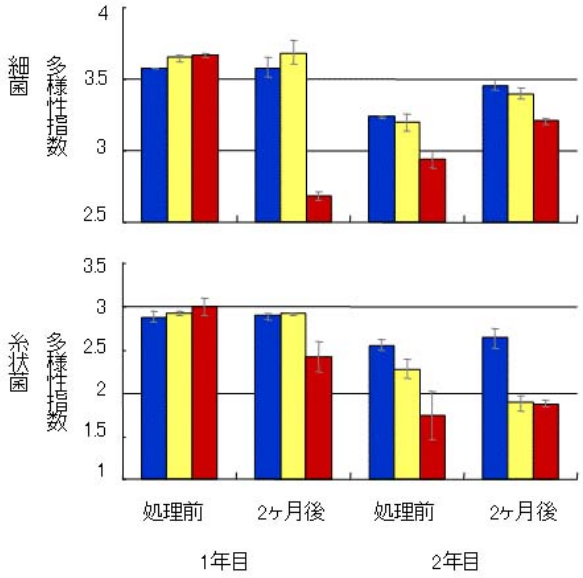

図2　土壌くん蒸処理による細菌と糸状菌の多様性変化
無処理(■)、D-D 処理(□)、クロルピクリン処理(■)

各種薬剤の影響評価

PCR-DGGE 解析の結果、クロルピクリン処理あるいは D-D 処理が、微生物群集構造に影響を与えることが明らかになった。

まず、作物に病害を起こす細菌や糸状菌の防除を目的としたクロルピクリン処理の影響を解析した。DGGE パターンのバンドの濃さを数値データに変換し、これからシャノンウィナーの多様性指数を計算したところ、処理により土壌微生物の多様性は大きく減少した(図２)。さらに、バンドパターン由来の数値データを多変量解析手法の多次元尺度解析することにより、群集構造の変化を2次元上に表した(図３)。クロルピクリン処理により群集構造は大幅に変動し、この影響は、処理後１年を経過しても回復しなかった。

一方、植物寄生性線虫の防除を目的とした D-D 処理の影響は、クロルピクリン処理よりも土壌微生物に及ぼす影響は少ない。しかし、D-D 処理後2年目に、糸状菌相において多様性が低下し(図２)、また細菌相については無処理区にはない細菌 DNA のバンドが増大した（図１)。このように、D-D においても処理を繰り返すことにより微生物相に影響が現れることが明らかになった。

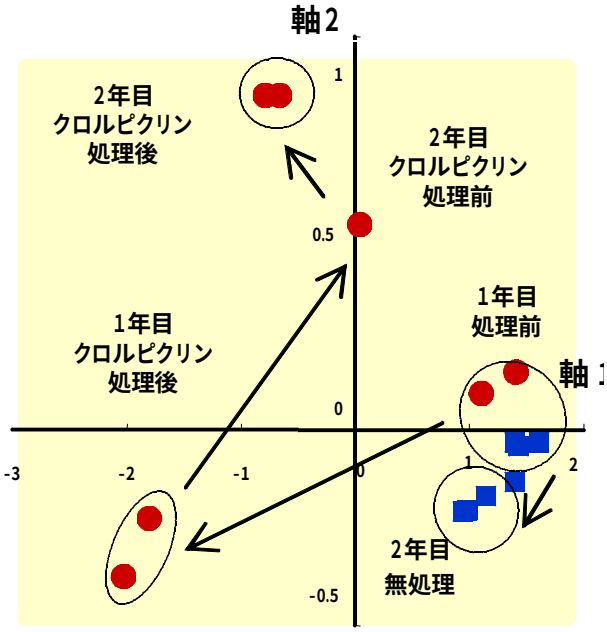

図3　クロルピクリン処理による細菌群集構造の変化
無処理(■)、クロルピクリン処理(●)

環境 DNA を用いた生物影響評価法の活用について

土壌から直接抽出した環境 DNA を用いる解析法は、農業現場における土壌微生物相の変化をとらえることができるので、化学物質や有機物施用などが環境に及ぼす影響評価に利用できると期待される。環境 DNA は理論上土壌中に存在する全ての生物の遺伝子を含んでいるため、本解析法では、目的とする生物に応じてプライマーを使い分けることにより、例えば細菌や糸状菌など、同じ環境 DNA サンプルから個別に解析できる。さらに、機能性遺伝子を対象に解析することで、特定の機能を持つ群集の解析にも応用できる。