カビによる BHC 異性体の吸収*

江川 宏**・達山和紀***・赤井重恭**

Uptake of BHC Isomers by Several Fungi*

Hiroshi EGAWA**, Kazuki TATSUYAMA*** and Shigeyasu AKAI**

摘要: BHC を含む溶液中に菌体を加え、BHC を吸収させた後に、BHC を含む新しい溶液中に菌体を移すという装作をくりかえし、溶液の交換する回数と BHC 吸収量との関係方程式を求めて、*Fusarium roseum* による α -、 β -および δ -BHC の連続吸収量を計算した結果、生菌体 1mg 当りのおおの 0.049 μ g, 0.033 μ g および 0.055 μ g であった。続いて、 α -および δ -BHC, α -および γ -BHC のおおのの混合液中でのカビによる BHC 吸収の差異について検討した。 α -および δ -BHC 混合液では、*Aspergillus oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Fusarium roseum* ともに δ -BHC の方が α -BHC よりよく吸収された。 α -および γ -BHC 混合液では *Cochliobolus miyabeanus* は γ -BHC の方をよく吸収したが、*Aspergillus oryzae* と *Fusarium roseum* はともに α -BHC の方をよく吸収した。

I 緒 言

γ -BHC を含む溶液にカビの菌系を加えると、短時間に溶液中の BHC の90%以上がカビに吸収されることを、前報において明らかにした²⁾。その後、カビによる BHC の最大吸収量、吸収に及ぼす光の影響などについて検討を加え、すでに報告した³⁾。

今回はひきつづき、 α -、 β -、 δ -BHC の連続吸収最大量、BHC 異性体混合液からの BHC 異性体の吸収などについて検討を加えた。その結果について報告する。

本実験を行うにさいして、BHC 異性体をご分譲下さった日本曹達株式会社生物研究所谷口卓蔵博士、供試菌をご分譲下さった信州大学繊維学部松尾卓見博士、また実験にご協力いただいた島根大学農学部管河清学士ならびに山本広基学士に深謝する。

II 実験材料

この実験に用いた BHC 異性体は日本曹達株式会社から分譲されたもので、GLC レベルでの純品を供試した。供試 *Fusarium roseum* は信州大学繊維学部保存菌 SU-G を用い、*Aspergillus oryzae* KU および *Cochliobolus miyabeanus* KU-13 は京都大学農学部保存菌を用いた。

III 実験方法および結果

1. *Fusarium roseum* 菌系の α -、 β -、 δ -BHC 連続吸収最大量の比較

ツアベック培地のりん酸2カリウムをりん酸1カリウムでおきかえたツアベック改良培地で4日間振とう培養して *Fusarium roseum* の菌体をえた。この菌体の200mg (生重) を BHC 0.2 μ g/ml を含むりん酸緩衝液に加え、28°C 1時間振とうし、遠心分離して菌体と水溶液とに分け、水溶液中の BHC を n-ヘキサンで抽出して、常法の GLC で測定した^{1,2)}。さらに菌体には新しい BHC 水溶液 2ml を加え、第2回目の吸収量を第1回目と同様に測定した。この方法を8~10回くりかえし、*Fusarium roseum* のこの条件下での連続吸収最大量を調べた。

前報³⁾と同様に縦軸 (Y) に BHC 吸収率 (%) をとり、横軸 (X) に BHC 水溶液をとりかえた回数をプロットした。この値を最小自乗法で計算し、*Fusarium roseum* の新しい BHC 溶液をくりかえし与えた場合の吸収直線の方程式を求めた。 α -BHC の場合を第1図、 β -BHC を第2図、 δ -BHC を第3図に示した、各 BHC 異性体の吸収直線の方程式はつぎのようであった。

* 農薬の微生物分解に関する研究(4)

Studies on the biodegradation of pesticides by microorganisms (4)

** 京都大学農学部 Coll. of Agr., Kyoto Univ., Kyoto, JAPAN.

*** 島根大学農学部 Fac. of Agr., Shimane Univ., Matsue, JAPAN.

Figure 1. Continuous uptake of α -BHC by the mycelia of *F. roseum* from the 10 successive culture media containing α -BHC

Final uptake quantity after 58 treatments: 0.049 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fresh weight

Figure 3. Continuous uptake of δ -BHC by the mycelia of *F. roseum* from the 10 successive culture media containing δ -BHC

Final uptake quantity after 62 treatments: 0.055 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fresh weight

Figure 2. Continuous uptake of β -BHC by the mycelia of *F. roseum* from the 8 successive culture media containing β -BHC

Final uptake quantity after 37 treatments: 0.033 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fresh weight

$$\alpha\text{-BHC: } Y = -1.45X + 84.02$$

$$\beta\text{-BHC: } Y = -2.48X + 90.06$$

$$\delta\text{-BHC: } Y = -1.45X + 89.12$$

この式から $Y=0$ とすると, BHC 水溶液を何回とりかえたと菌体は BHC を吸収しなくなるかという理論値 ($X=X_1$) がえられる. α -BHC の場合 $X_1=57.94$ (58回), β -BHC は $X_1=36.31$ (37回), δ -BHC は $X_1=61.46$ (62回) であった.

したがって各方程式の $X=0$ から $X=X_1$ までの積分値を求めれば *Fusarium roseum* が連続的に吸収すると考えられる BHC の最大値を求めることが出来る. しかし 200mg の菌体を用いたので生菌体 1mg 当り

に換算する必要がある, また $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ BHC 2ml に含まれる BHC の μg 量, 積分でえられる値 (100%) を比の値に変換するために, 求められた各積分値に $0.4 \times \frac{1}{100} \times \frac{1}{200}$ の常数を乗じて生菌体 1mg に吸収される BHC 吸収最大量 (μg) を求めた. BHC 各異性体の計算された吸収最大値は下記のようなのである.

α -BHC の場合は

$$0.4 \times \frac{1}{100} \times \frac{1}{200} \int_0^{58} (-1.45X + 84.02) dX \\ = 0.049 \mu\text{g}/\text{mg}$$

β -BHC の場合は

$$0.4 \times \frac{1}{100} \times \frac{1}{200} \int_0^{37} (-2.48X + 90.06) dX \\ = 0.033 \mu\text{g}/\text{mg}$$

δ -BHC の場合は

$$0.4 \times \frac{1}{100} \times \frac{1}{200} \int_0^{62} (-1.45X + 89.12) dX \\ = 0.055 \mu\text{g}/\text{mg}$$

が *Fusarium roseum* の菌体によつて吸収される最大量である.

2. *Fusarium roseum* に吸収された γ -BHC の追跡
Fusarium roseum の菌体を γ -BHC を含む水溶液に加えて振とうすると90%以上の γ -BHC が菌体に吸収される. しかしこの吸収された γ -BHC が菌体内でどこに, どのような形態で存在するのかは明らかでない. γ -BHC を吸収した菌体を種々の方法で磨砕し, n-ヘキサンで抽出し GLC で調査すると γ -BHC が見出されることはすでに報告した²⁾.

Figure 4. Extraction of γ -BHC from the mycelia of *Fusarium roseum* cultured on a modified Czapek-KH₂PO₄- γ -BHC medium

今回は n-ヘキサン以外の溶剤で抽出される γ -BHC 関連塩素系化合物の検索を行った。

ツァペック改良培地を用いて *Fusarium roseum* を 28°C, 4 日間振とう培養した。この菌体を充分水洗した後、 γ -BHC 1 μ g/ml および 10 μ g/ml を含む 1/15M-りん酸緩衝液 (pH 6.98) を加え、1 時間振とうした。その後菌体と水溶液とを分け、菌体は充分に水洗して、第 4 図のように n-ヘキサン、酢酸エチル、メタノールで連続抽出を行った。n-ヘキサン、酢酸エチル、メタノール抽出部について各々 GLC と TLC で BHC およびその関連塩素系化合物の検討を行った。GLC による BHC の定性は前報^{2,3)} の条件にしたがって試み、TLC による検討はシリカゲル G で TLC を作成し、クロロホルム:n-ヘキサン (3:7 (v/v)) などで展開後、0.5% トリジン-エタノール液をふん霧し殺

菌灯下で発色させ、対照の BHC などと比較し定性した。

γ -BHC 1 μ g/ml を含む水溶液を用いると n-ヘキサン抽出部のみに γ -BHC が認められ、10 μ g/ml の γ -BHC 溶液を用いると n-ヘキサンおよび酢酸エチル抽出部に γ -BHC が認められた。その他の抽出部には γ -BHC およびその関連塩素系化合物は見出されなかった (第 1 表)。

3. α -, β -, δ -BHC を各々混合した場合のカビによる BHC 異性体の吸収

従来までの実験は、カビに各々の BHC 異性体を吸収させた結果であるが、今回はカビに BHC の各異性体を混合して吸収させた場合の異性体の吸収量を比較する目的で実験を行った。(1) α -BHC 0.1 μ g/ml, δ -BHC 0.1 μ g/ml (2) α -BHC 0.1 μ g/ml, γ -BHC

Table 1. γ -BHC detection of the extracts from the mycelia of *Fusarium roseum* cultured on a modified Czapek-KH₂PO₄- γ -BHC medium

Culture medium	n-Hexane fraction	Ethyl acetate fraction	Methanol fraction
γ -BHC 1 μ g/ml	+(γ -BHC)	—	—
γ -BHC 10 μ g/ml	+(γ -BHC)	+(γ -BHC)	—
Control —	—	—	—

Table 2. Uptake of BHC isomers by several fungi cultured in a modified Czapek's medium containing the mixture of two BHC isomers

BHC isomers	Fungi	Uptaken percentage (%)		$\delta\text{-BHC} \times 100/\alpha\text{-BHC}$
		$\alpha\text{-BHC}$	$\delta\text{-BHC}$	
$\alpha\text{-}$	<i>A. oryzae</i>	55.4	71.9	129.8
and	<i>C. miyabeanus</i>	49.5	64.1	129.5
$\delta\text{-BHC}$	<i>F. roseum</i>	66.1	78.5	128.6
		$\alpha\text{-BHC}$	$\gamma\text{-BHC}$	$\gamma\text{-BHC} \times 100/\alpha\text{-BHC}$
$\alpha\text{-}$	<i>A. oryzae</i>	45.7	40.8	89.4
and	<i>C. miyabeanus</i>	30.5	40.1	131.5
$\gamma\text{-BHC}$	<i>F. roseum</i>	72.0	71.4	99.3

0.1 $\mu\text{g/ml}$ の BHC 異性体混合液をつくり, これに *Aspergillus oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Fusarium roseum* の振とう培養菌体生重 500mg を各混合液 2ml に加え, 1時間, 28°C で振とうした. その後 n-ヘキサンで抽出した BHC を GLC にて測定した. この結果を第2表に示した. $\alpha\text{-BHC}$ と $\delta\text{-BHC}$ との混合液では *Aspergillus oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Fusarium roseum* とともに $\alpha\text{-BHC}$ よりも $\delta\text{-BHC}$ の方が吸収がよかった. $\alpha\text{-BHC}$ と $\gamma\text{-BHC}$ 混合液では *Cochliobolus miyabeanus* による $\gamma\text{-BHC}$ の吸収が $\alpha\text{-BHC}$ よりもすぐれていたが, *Aspergillus oryzae* および *Fusarium roseum* の場合は $\gamma\text{-BHC}$ よりも $\alpha\text{-BHC}$ の方が吸収されやすいようであった.

他の BHC 異性体混合のくみ合せによる実験は, $\alpha\text{-}$ と $\beta\text{-BHC}$, $\beta\text{-}$ と $\gamma\text{-BHC}$, $\gamma\text{-}$ と $\delta\text{-BHC}$ の GLC での保持時間 (Retention time) が近似するために筆者らの GLC の条件では同時の定量実験が不可能であった.

IV 考 察

今回考察した *Fusarium roseum* による $\alpha\text{-}$, $\beta\text{-}$, $\delta\text{-BHC}$ の連続吸収最大量は各々 0.049 $\mu\text{g/mg}$, 0.033 $\mu\text{g/mg}$, 0.055 $\mu\text{g/mg}$ であった. 前報³⁾ の $\gamma\text{-BHC}$ の 0.054 $\mu\text{g/mg}$ と比較すると, $\alpha\text{-}$, $\gamma\text{-}$, および $\delta\text{-BHC}$ の連続吸収最大量および吸収直線の方程式もほとんど変わらないので, $\alpha\text{-}$, $\gamma\text{-}$, および $\delta\text{-BHC}$ は各々単独で *Fusarium roseum* に吸収させた場合では類似の行動をとるものと考えられる. *Fusarium roseum* による $\beta\text{-BHC}$ 吸収量は $\alpha\text{-}$, $\gamma\text{-}$, および $\delta\text{-BHC}$ の吸収量より低い. このことが他の土壌微生物にも同様に当てはまるとすれば, $\beta\text{-BHC}$ の土壌中での残存量がもっとも多いという事実と関係があるのではないかと考えられる. 今後土壌中での BHC 異性体とその微生物によ

る吸収, 代謝などとの関係を追求する必要があると考えられる.

BHC 異性体の1回の吸収量³⁾と比較して, 連続吸収最大量の値が低くすぎるが, これは溶液中の $\gamma\text{-BHC}$ の濃度と関係があるものと考えられるので今後さらに検討すべき事項である.

吸収された BHC の行くえについては今回の実験の範囲では代謝が認められず, そのまま菌体中に存在するようであるが, 今後吸収されてからさらに長時間放置後の $\gamma\text{-BHC}$ の行くえを追求する必要があると考えられる.

2種の BHC 異性体を同時に吸収させた場合は当然その吸収能は単独で与えた場合と相違することも考えられるので, $\alpha\text{-}$ と $\gamma\text{-BHC}$, $\alpha\text{-}$ と $\delta\text{-BHC}$ の各々の混合液に *Aspergillus oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Fusarium roseum* の生菌体を加えて, BHC の吸収をしらべた結果, 3種のカビとともに $\delta\text{-BHC}$ の方が $\alpha\text{-BHC}$ よりも吸収がすぐれていた. また *Aspergillus oryzae* と *Fusarium roseum* は $\alpha\text{-BHC}$ よりも $\gamma\text{-BHC}$ をよく吸収し, *Cochliobolus miyabeanus* はその反対であった. しかし筆者らの GLC の条件では $\alpha\text{-}$ と $\beta\text{-BHC}$, $\beta\text{-}$ と $\gamma\text{-BHC}$, $\gamma\text{-}$ と $\delta\text{-BHC}$ を同時に定量することが不可能であったので, $\alpha\text{-}$, $\beta\text{-}$, $\gamma\text{-}$, $\delta\text{-BHC}$ 間の吸収量の比較をすることは出来なかった. $\gamma\text{-}$ と $\delta\text{-BHC}$ との間の吸収は $\alpha\text{-}$ と $\gamma\text{-BHC}$, $\alpha\text{-}$ と $\delta\text{-BHC}$ との結果から計算可能なので, $\alpha\text{-BHC}$ の吸収率を 100%として $\gamma\text{-}$ および $\delta\text{-BHC}$ の吸収率を計算した結果が第3表である.

第3表の結果から, *Aspergillus oryzae* では $\delta\text{-BHC} > \alpha\text{-BHC} > \gamma\text{-BHC}$, *Cochliobolus miyabeanus* では $\gamma\text{-BHC} \geq \delta\text{-BHC} > \alpha\text{-BHC}$, *Fusarium roseum* では $\delta\text{-BHC} > \alpha\text{-BHC} \geq \gamma\text{-BHC}$ の順に吸収されやすかった.

Table 3. Comparison of uptaken rates of γ - and δ -BHC by several fungi calculated from the value on Table 1.

Fungi	α -BHC	γ -BHC	δ -BHC	δ -BHC $\times$ 100/ γ -BHC
<i>A. oryzae</i>	100%	89.4	129.8	145.2
<i>C. miyabeanus</i>	100	131.5	129.5	98.4
<i>F. roseum</i>	100	99.3	128.6	129.4

以上の結果からカビの種類によって、また BHC の異性体の種類によってカビによる BHC の吸収に差異が認められるものと考えられる。異性体の種類によってカビによる吸収に差異を生ずる機構については現段階においてはまったく解明されていない。今後、検討すべき問題と考えられる。

引用文献

- 1) UHEYAMA, A., H. EGAWA, and M. TSUDA (1969) : Proceed. Kansai Pl. Protect. Soc., 11: 40-42.
- 2) —, —, and — (1969): Ann. Phytopathol. Soc. Jap., 35(5): 347-350.
- 3) —, —, M. MASUKO, and H. SHIKATA (1971): Trans. Mycol. Soc. Jap., 12: 103-107.

Summary

We have studied on the uptake of γ -BHC by fungal mycelium. In this experiment, the uptakes of α -, β -, and δ -BHC by fungus were studied, and it was clear that the maximum uptaken weights of α -, β -, and δ -BHC by *Fusarium roseum* were respectively 0.049, 0.033, and 0.055 μ g/mg of fresh mycelial weight.

The weight of α - and δ -BHC uptaken by *Aspergillus oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus* and *Fusarium roseum* from the medium containing these BHC-isomers were calculated. The weight of δ -BHC uptaken by every fungus used in this experiment was greater than one of α -BHC. On the other hand, in the case of using of another medium containing α - and γ -BHC, the mycelia of *C. miyabeanus* uptook γ -BHC more than α -BHC, and it was opposite result on the uptake of the isomers by mycelia of *A. oryzae* and *F. roseum* from the medium.

(昭47.1125.受付)