

7-BHC 分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* を用いた

土壌微生物の個生態学的研究

赤尾 啓 史

γ -BHC分解菌 Sphingomonas paucimobilis を
用いた土壤微生物の個生態学的研究

東京大学農学部

妹尾 啓史

目次

序章 第I部のはじめに	1
0.1 土壌中における農薬の残留・分解に関する研究	1
0.2 BHCの土壌中での残留・分解に関するこれまでの知見	3
0.3 東大農学部構内に設置された農薬長期連用畑圃場	7
0.4 本研究第I部の目的	7
第1章 農薬長期連用畑圃場ならびに室内モデル系における γ -BHCの分解状況	13
1.1 圃場の設計	13
1.2 圃場における農薬の消失状況	15
1.3 室内モデル系における γ -BHCの分解状況(1): 対照区土壌、 γ -BHC連用区土壌における γ -BHCの分解状況	23
1.4 室内モデル系における γ -BHCの分解状況(2): γ -BHC連用区土壌に集積した γ -BHC分解菌の性質	24
第2章 γ -BHC分解菌の単離と同定	32
2.1 γ -BHC分解菌の単離	32
2.2 γ -BHC分解菌の同定	37
2.3 圃場における γ -BHC分解菌の経時的計数	42
2.4 γ -BHC分解菌の接種による土壌中の γ -BHCの分解	45
第3章 第I部の総合考察	51
3.1 第I部の実験結果のまとめ	51
3.2 これまでの研究の問題点と本研究の特徴	51
3.3 Bio-remediationを成功させるには	52
第4章 第II部のはじめに	56
4.1 これまでの土壌微生物研究の主流	56
4.2 土壌微生物のオートエコロジ- (個生態) 研究の必要性	56
4.3 オートエコロジ-研究のために必要な「検出・計数技術」	58
4.4 オートエコロジ-研究のモデル微生物としての γ -BHC分解菌	58

第5章 γ -BHC分解菌の土壌からの検出・計数方法の検討	62
5.1 SS86株における γ -BHC分解能の安定性	62
5.2 土壌中のSS86株の検出-土壌の分散条件の検討	66
5.3 土壌中のSS86株の検出-選択性と検出感度の検討	68
5.4 非滅菌土壌に接種されたSS86株の挙動	70
第6章 γ -BHC分解菌の土壌中での増殖・生残・死滅状況	77
6.1 野外試験圃場に接種されたSS86株の増殖・生残・死滅・移動 (5月接種)	77
6.2 野外試験圃場に接種されたSS86株の増殖・生残・死滅 -10月および2月の接種	80
6.3 農薬連用圃場における土着 γ -BHC分解菌の増殖・生残・死滅	84
6.4 室内モデル系における接種ならびに土着 γ -BHC分解菌の増殖 ・生残・死滅	84
第7章 γ -BHC分解菌の土壌中での死滅要因の解析	92
7.1 γ -BHC分解菌の死滅要因の解析(1):液体培養系	92
7.2 γ -BHC分解菌の死滅要因の解析(2):滅菌土壌系	95
7.3 γ -BHC分解菌の死滅要因の解析(3):非滅菌土壌系	99
7.4 その他の死滅要因	103
第8章 土着 γ -BHCと接種 γ -BHC分解菌の生残性の違いを もたらず要因	111
8.1 各種土壌処理条件下での接種ならびに土着 γ -BHC分解菌の 挙動の比較	111
8.2 毛管孔隙の生残部位としての有利さ	120
8.3 長期生残を可能にする別の要因の可能性	121
第9章 総合考察	125
9.1 第II部の実験結果のまとめ	125
9.2 γ -BHC分解菌の土壌中でのライフサイクルについて	127
9.3 長期生残部位(マイクロハビタット)の性質について	129
9.4 GEMs、有用微生物の土壌環境への導入利用を成功させるための戦略	130
9.5 今後への展望	133

序章 第 I 部のはじめに

本論文は第 I 部と第 II 部から構成されている。第 I 部では、東京大学農学部構内に設置された農薬長期連用畑圃場における γ -BHCの分解消失状況とその速やかな分解に寄与する分解菌の単離・同定、ならびに単離された分解菌を用いての土壤中の農薬の制御・浄化の可能性について述べる。第 II 部では、単離・同定された γ -BHC分解菌を、野外の土壤環境に導入利用される組換えDNA微生物の、ならびに土壤微生物の個生態を解明するためのモデル微生物として用い、土壤に接種された、ならびに土壤に土着の微生物の生態とそれを規制する要因を解明することを試みた研究について述べる。

本章では農薬、特にBHCの土壤中での分解・残留についてこれまでに知られている知見を概説し、農薬長期連用畑圃場が設置された意義と本研究第 I 部の目的について述べる。

なお、BHCの化学名は1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexaneであり、その略称はHCHとするのが正しく、近年の学術論文ではHCHが用いられている。本論文の本文中では、農薬名として広く知られているBHCの方を用いることにした。BHCの分子構造を図0-1に示した[28]。

0.1 土壤中における農薬の残留・分解に関する研究

土壤中での農薬分解あるいは微生物による農薬分解の研究の歴史は30年余りになる。1940年代後半より、2,4-Dおよび関連化合物の分解に関する研究が始められていたが、広範囲に農薬についての研究が行われるようになったのは、農薬の環境汚染が問題視されるようになった1960年代以降である。その後、農薬の土壤残留性に関するデータが法的にも要求されるようになり、現在までに蓄積された研究成果は膨大なものになっている。これらの知見は以下のようにとりまとめることが出来る[1]。

耕地や林地などに散布された農薬は、その大部分が土壤表面に到達し、一部には土壤表面から揮散したり光分解を受けるものもあるが、ほとんどが土壤中に入り、土壤の比較的表層部に吸着保持され、分解を受ける。一部の農薬は土壤から溶脱し、地下水に達する。

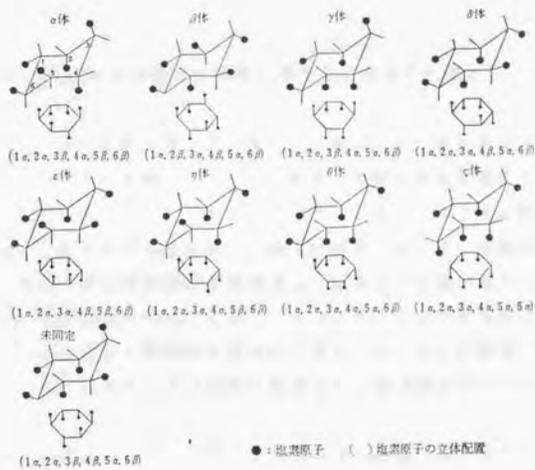


図0-1 BHCの立体異性体 [28]

各種農薬の土壌中での残留期間は、半減期が1日以内から1年以上までさまざまであるが、有機塩素系農薬の多くは比較的長期間残留する。

土壌中での農薬残留に関する要因は様々である。農薬の化学的・物理化学的性質、農薬の剤形・施用法、農薬が施用される場を取り巻く気象条件、農薬が施用される土壌の種類・性質・土壌環境などによって、残留の程度が左右される。

土壌中における農薬分解は、土壌微生物の活動によるところが大きい。これは一般的に土壌を殺菌すると農薬の分解速度が著しく抑制されることから明らかである。従って、上述した農薬残留に関するいくつかの要因は、農薬分解微生物の数と活性、および農薬の微生物よっての分解されやすさの程度を左右し、間接的に微生物分解に関与していることになる。

0.2 BHCの土壌中での残留・分解に関するこれまでの知見

BHCは、ニカメイチュウ、アブラムシ、ヨコバイ、マツケムシなど多種にわたる昆虫類に対する殺虫剤として、稲、野菜、果樹などを生産する農耕地あるいは森林地に施用されてきた。しかし、このBHCをはじめとする有機塩素系農薬は自然環境中における残留性が高く、地球的規模にまで及ぶ環境汚染が問題となり、1960年代後半からその使用を規制あるいは禁止する国が増えた。日本でも1967年にその使用が禁止された。しかし、インドのような熱帯地域に属する開発途上国においては主として経済的な理由から現在でもBHCの製造・使用がなされており、インドではBHCは1988年に製造された殺虫剤全体の45%にもものぼっている。

BHCは工業原体中には α 、 β 、 γ 、 δ の4つの異性体が存在し、このうち γ -体が強い殺虫有効性を持つ。諸外国では γ -体99%以上を主体としたものをlindaneと呼び、使用してきたが、日本では工業原体を使用してきた[3]。BHCの物理化学的・農薬学的諸性質を表0-1に示した。

BHCに関しては、地球的規模での挙動、動物・植物・作物中での残留・蓄積・分解など多様な研究が成されているが、本項ではその中で特に水田及び畑圃場における残留及び土壌微生物による分解について述べることにする。

①土壌中におけるBHCの残留

BHCは畑土壌では残留性が高く、水田土壌では比較的速やかに分解するとされてきた。このことは野外の圃場だけでなく、室内モデル実験でも確かめられている[4-7]。図0-2および図0-3に立川ら[7]およびYoshidaら[8]が室内モデル実験

表0-1 BHCの物理化学・農薬学的諸性質 [2]

<凡例>

農薬名 J: 日本で登録されていた農薬

I: International Standards Organization により承認された農薬名

B: British Standards Institution により承認された農薬名

1. [I] 殺虫剤

商品名 () は開発・製造または販売会社名

2. 適用作物: 対象病害虫名

3. 化学名

4. 分子式: 分子量. 化学構造

5. 物理化学性

6. 毒性データ

AO: 急性経口毒性の体重当り LD₅₀

AD: 急性経皮毒性の体重当り LD₅₀

LC: 魚毒性 50% 致死濃度

R: ツツト M: マウズ D: イヌ RD: ウサギ

MHW: 厚生省農薬残留許容量

AD1: 体重 kg 当りの 1 日 当り 許容摂取量

EA: 環境庁農薬残留保留基準

BHC (α, β)

1. [1] BHC (J)

• mixed isomer.....BHC(LB), hexachlor-
hexachloran, Comp-661(CI)

• γ-Isomer.....BHC(J), lindane, gamma-BHC

(BL, HCH(D), gammexane)(CI), Lindex γ-BHC

2. いね: ニホ(イネ) 5.7%, 7.4%, 8.7%, 10.4%, 12.1%, 13.8%, 15.5%, 17.2%, 18.9%, 20.6%, 22.3%, 24.0%, 25.7%, 27.4%, 29.1%, 30.8%, 32.5%, 34.2%, 35.9%, 37.6%, 39.3%, 41.0%, 42.7%, 44.4%, 46.1%, 47.8%, 49.5%, 51.2%, 52.9%, 54.6%, 56.3%, 58.0%, 59.7%, 61.4%, 63.1%, 64.8%, 66.5%, 68.2%, 69.9%, 71.6%, 73.3%, 75.0%, 76.7%, 78.4%, 80.1%, 81.8%, 83.5%, 85.2%, 86.9%, 88.6%, 90.3%, 92.0%, 93.7%, 95.4%, 97.1%, 98.8%, 100.5%

3. Isomers of 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane

4. C₆H₆Cl₆: 286.83



5. カビ臭を有する白-褐色粉末: mp: α 159-161°, β

312°, γ 112.9°, δ 138-139°, ε 218.5-219.3°, VP: α

0.000ml/g/40°, β 0.17ml/mg/40°, γ 9.4×10⁻⁴

ml/mg/20°, sol 水: α 1.133ppm, β 0.015-0.02

ppm, γ 5.75ppm, δ 20.3ppm/28°, 石油エーテル:

α 136/kg, β 28/kg, γ 356/kg, δ 270/kg, ε 62

6/kg, β 188/kg, γ 289/kg, δ 418/kg, γ 口

口ホウレン: α 65g/kg, β 36/kg, γ 230g/kg, δ 137

g/kg/20°, 合成品構成: α 67-70%, β 5-6%, γ

13%, δ 6% その他

6. 毒性は Isomer により異なる。γ: AO: R 8.88mg/kg

R 9.91mg/kg, AD: R 8.1000mg/kg, R 9.900mg/kg

LC 0.17ppm/48h, (MHW) 93ppm, 魚毒性: LC

許容濃度 0.2ppm (α, β, γ, δ の平均), 牛乳 0.2

ppm (β-BHC)

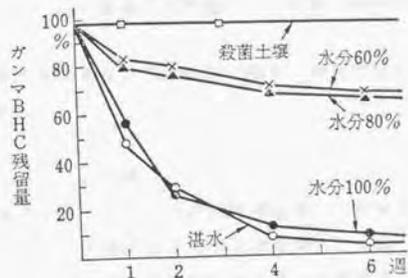


図0-2 γ -BHC分解速度と土壌地温との関係
(地温37°C) [7]

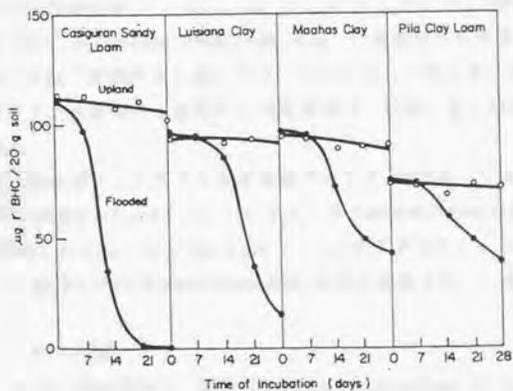


図0-3 Degradation of γ -BHC in Philippine soils
under upland and flooded conditions. [6]

で土壤中のBHCの分解を調査した結果を示した。室内モデル実験では土壤中に施用された γ -BHCの半減期は畑状態で10カ月、湛水状態では10-20日とされている。

従って、土壤中におけるBHCの分解に関する研究は主として湛水条件下のものに集中している。

②湛水条件下でのBHCの分解

土壤を殺菌すると、 γ -BHCの分解速度は著しく抑制されることから、湛水土壤中での γ -BHCの分解は主として土壤微生物によるものと考えられている[7,8]。また、 γ -BHCを反復投与するとその分解速度が遅まる傾向も見られている。

湛水土壤を振とうして好氣的条件を保ったり、土壤に $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ や MnO_2 を添加してEhの低下を抑制すると γ -BHCの分解は遅くなる[6]。逆に、土壤に稲葉を添加すると γ -BHCの分解が速くなり、これは稲葉添加がEhの低下を促進したためと考えられた[6]。これらの事から、湛水土壤中でのBHCの分解には主として嫌氣性菌が関与していると考えられた。そして実際、BHC分解菌として Clostridium が水田土壤から単離されている[9-12]。

分離された Clostridium を用いてBHCの嫌氣的な分解経路も研究され、 γ -pentachlorocyclohexane(γ -PCCH)[13]、 γ -tetrachlorocyclohexane(γ -TCCH)の生成[12,14,16]、Stickland reactionに付随して脱塩素反応が進行し、 γ -TCCHが生成すること[17]が認められた。BHCやその他の近隣塩素化合物からの脱塩素反応において、化合物の半波電位と脱塩素速度との間に高い相関関係が見られている[18]。

湛水土壤中からは γ -BHCの分解産物として γ -TCCHおよび微量の γ -2,3,4,5,6-tetrachlorocyclohexane[19]、 γ -3,4,5,6-tetrachlorocyclohexane(γ -TCC Hane)、微量の1,2,4-trichlorobenzene、1,2,3,5-または1,2,4,5-tetrachlorobenzene、1,2,3,4-tetrachlorobenzene[20]などが検出されている。

③BHCの好氣的分解

5種類の耕地土壤を混合し、DDT, Dieldrin, heptachlor およびlindaneを添加して6カ月間水で還流したところ、lindaneのみが分解し、分解産物として γ -PCCHが検出された[21]。また、この土壤から in vitro でlindaneを脱塩酸できると思われる Bacillus 属の細菌が得られた[21]。

土壤、底質、水などの環境中から単離された354種の微生物のうち、71種が yeast-mannitol培地中で微好氣的条件下、 γ -BHC分解能を示した。そのうち、

*Pseudomonad putida*を用いて分解経路を調べたところ、 γ -1,3,4,5,6-PCCHを生成する主要経路と、NADに依存して γ -3,4,5,6-TCCHを生成する経路とが見いだされた[22]。

3種類の土壌にlindaneを添加し、畑状態の下で保温静置した室内実験で、lindaneの添加量にしたがって土壌呼吸量および Cl^- の生成量が増加し、土壌中からlindaneの分解産物として γ -PCCH、 α -3,4,5,6-TCCH、 γ -3,4,5,6-TCCH、pentachlorobenzeneが得られた[23]。また、砂壌土から好氣的に分離された147種の微生物のうち、71種がlindaneを唯一の炭素源として生育し、そのうち8種の細菌と3種の放線菌を用いてlindaneの分解産物を調べたところ、 γ -PCCH、 α -3,4,5,6-TCCH、 β -3,4,5,6-TCCH、 γ -3,4,5,6-TCCH、およびpentachlorobenzeneが確認された[24]。

近年、オランダのBHCで汚染された底質土壌で α -BHCの好氣的分解が確認された[25,26]。また、インドの砂糖きびの根圏土壌から好氣的に α -、 β -、 γ -BHCを分解できる*Pseudomonas*属細菌が単離された[27]。

0.3 東大農学部構内に設置された農薬長期連用畑圃場

以上のように、土壌中における農薬の残留・分解に関してはBHCに関するものだけでも多数の知見が蓄積されるに至った。しかし、農薬を長期間にわたって施用した場合や、複数の農薬を混合施用した場合に、土壌中で農薬が残留・分解する様式がどの様に変化するのか、また、土壌生物相がどの様な影響を受けるのかなどについての研究は乏しい状態であった。

この点を考慮して、1974年、東大農学部構内に殺虫剤(γ -BHC)・殺菌剤(TPN)および堆肥のそれぞれを単独あるいは混合投与した試験区が設けられ、投与農薬の残留量、残留形態、土壌生物相の変化などを長期間にわたって追跡する研究が開始された。この試験圃場の設計やこれまでに得られた知見は第1章に述べる。

0.4 本研究第I部の目的

農作物生産性を向上させるための有力な手段の一つとして農薬が農耕地や林地に施用され始めてから数十年が経過した。この間、農薬の施用によって引き起こされた問題の一つに環境中への残留・蓄積等の環境汚染があり、社会問題として

大きく取り上げられた。それを契機に、農薬の土壌残留性についても法的規制が設けられ、残留性の低い農薬を開発する努力が続けられてきた。

しかし、もう1歩進んで、農薬の分解・消失を人為的に制御するという考え方はこれまでに提案されていなかった。それが可能になれば、施用した農薬の分解消失を「成行き任せ」にしている現状と比べ、環境汚染・農業生産のいずれの観点からみても、より好ましいと思われる。

この考え方の当否を採る上で、残留性の高い農薬の分解・消失を促進する機構を解明し、その機構に基づいて農薬の挙動を制御するという試みが1つのモデルとなりうるであろう。また、この考え方は、残留農薬のみならず、環境中に放出され、残留して環境を汚染している難分解性化合物一般にも適用可能であろう。後者は近年、Bio-remediation（生物浄化）として注目されている分野である。

このような考え方を背景とし、その当否を採ることを目的として、東大農学部構内の農薬長期連用畑圃場の γ -BHC連用区を研究材料として選んだ。それは次章に述べるように、①これまで残留性がきわめて高いとされてきた γ -BHCが、長期連用することにより急速に分解する現象が明確にみられていること、②この急速な分解は、土壌中に集積してきた γ -BHC分解菌の活動によるものであると予想され、 γ -BHCの分解機構を解明する対象を比較的明確に絞れること、③野外条件で γ -BHC分解菌が集積してきたこの試験区の土壌は、圃場で γ -BHCを分解している主要な微生物を単離する対象としてきわめて好適であり、野外条件下で農薬の分解を制御したり、農薬汚染を浄化できる微生物を単離できる可能性が極めて高いと予想されること、等を考え合わせたからである。

これまでも、農薬の微生物分解に関する研究は膨大なものがなされており、農薬分解菌も数多く検索・単離されてきた。しかし、この種の研究で残された重要な問題点は、「*in vitro*の条件で農薬を分解できる農薬分解菌は多数見つけれられているが、それが現場の土壌中(*in situ*)で実際に農薬を分解していた微生物であったか否かが明確ではない」事である。すなわち、土壌中や保存菌株からのランダムスクリーニングで単離した微生物について目的の農薬の分解能を*in vitro*で調べたり、還流装置などを用いて、かなり特殊な条件下において土壌から農薬分解菌を単離する研究がこれまでは主流を占めていた。0,2で述べた、 γ -BHCを分解する好気性菌を単離した報告もそのような例である。

このような方法で農薬分解菌を得る試みも、目的によってはきわめて重要な意味を持つことは言うまでもない。しかし、筆者らが取り組もうとしている目的のためには、農薬分解菌の生態学的特徴を把握した上で、野外の土壌中(*in situ*)で農薬分解能を発現している主要な分解菌を単離し、その菌の性格を十分に理解し、野外でその微生物を人為的に利用できるレベルにまで知見を高める必要があ

る。本研究はこの点を特に意識しながら行われたものである。

序章の引用文献

- [1] 鍛塚昭三：土壤および土壤微生物による分解、「農業—デザインと開発指針」、p539、ソフトサイエンス社
- [2] 上路雅子、富沢長次郎編：最新農業データブック、ソフトサイエンス社（昭和57年）
- [3] 金沢純編：生態系と農業、p45、岩波書店
- [4] Stewart, D.K.R. and Chisholm, D. (1971) Long-term persistence of BHC, DDT, and CHLORDANE in a sandy loam soil. *Can. J. of Soil Sci.*, 51, 379-383
- [5] Guenzi, W.D., Beard, W.E. and Viets, F.G.Jr. (1971) Influence of soil temperature in persistence of six chlorinated hydrocarbon insecticides in the field². *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 35, 910-913
- [6] Yoshida, T. and Castro, T.F. (1970) Degradation of γ -BHC in rice soils¹. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 34, 440-442
- [7] 立川涼、脇本忠明、小川恒彦（1970）農業BHCによる自然環境汚染、食衛誌、11、1-8
- [8] Raghu, K. and MacRae, I.C. (1966) Biodegradation of the gamma isomer of Benzene hexachloride in submerged soils. *Science*, 154, 263-264
- [9] Yoshida, T., (1966) Pesticide residues. *IRRI Annual Report*, pp.120-127
- [10] MacRae, I.C., Raghu, K. and Bautista, E.M., (1969) Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp., *Nature*, 221, 859-860
- [11] Ohisa, N. and Yamaguti, M. (1978) Degradation of gamma-BHC in flooded soils enriched with peptone. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1983-1987
- [12] 吉田富男、山谷裕子（1984）農業 γ -hexachlorocyclohexaneの土壤中における微生物分解、土肥誌、55、97-10
- [13] Sethunathan, N., Bautista, E.M. and Yoshida, T. (1969) Degradation of benzene hexachloride by a soil bacterium, *Can. J. Microbiol.* 15, 1349-1354
- [14] Heritage, A.C. and MacRae, I.C. (1977) Identification of intermediates formed during the degradation of hexachlorocyclohexane by

- Clostridium sphenoids. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1295-1297
- [15] Heritage, A.C. and MacRae, I.C. (1979) Degradation of hexachloro-cyclohexane and structurally related substrates by Clostridium sphenoids. Aust. J. Biol. Sci., 32, 493-500
- [16] Ohisa, N. and Yamaguchi M. (1978) Gamma-BHC degradation accompanied by the growth of Clostridium rectum isolated from paddy field soil, Agric. Biol. Chem. 42, 1819-1823
- [17] Ohisa, N., Yamaguchi, M. and Kurihara, N. (1980) Lindane degradation by cell-free extracts of Clostridium rectum. Arch. Microbiol., 125, 221-225
- [18] 大久長範, 山口益郎: 湛水土壤におけるxenobioticsの分解—BHCの脱塩素反応を中心として、微生物生態研究会編、微生物の生態10。学会出版センター
- [19] Tsukano, Y. and Kobayashi, A. (1972) Formation of γ -BTC in flooded rice field soils treated with γ -BHC. Agric. Biol. Chem., 36, 166-167
- [20] Mathur, S.P. and Saha, J. (1975) Microbial Degradation of lindane- 14 C in a flooded sandy loam soil. Soil Sci., 120, 301-307
- [21] Yule W.N., Chiba, M. and Morley H.V. (1967) Fate of insecticide residues. Decomposition of lindane in soil. J. Agric. Food Chem., 15, 1000-1004
- [22] Matsumura, F., Benezet, H.J. and Patil, K.C. (1976) Factors affecting microbial metabolism of γ -BHC. J. Pest. Sci., 1, 3-8
- [23] Tu, C.M. (1975) Interaction between lindane and microbes in soils. Arch. Microbiol., 105, 131-134
- [24] Tu, C.M. (1976) Utilization and degradation of lindane by soil microorganisms. Arch. Microbiol., 108, 259-263
- [25] Bachmann, A., de Bruin, W., Jumelet, J.C., Rijnaats, H.H.N., and Zehender, J.B. (1988) Aerobic biomineralization of alpha-hexachloro-cyclohexane in contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol. 54, 548-554
- [26] Bachmann, A., Walet, P., Wijnen, P., de bruin, W., Huntjens, J.L.M., Roelofsen, W., and Zehender, A.J.B. (1988) Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. Appl. Environ. Microbiol. 54, 143-149

- [27] Sahu, S.K., Patnaik, K.K., Sharmila, M., and Sethunathan, N. (1990)
Degradation of alph-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a
soil bacterium under aerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol.
56, 3620-3622
- [28] 高橋伸孝、基礎農薬学、p131、養賢堂 (1989)

第1章 農薬長期連用畑圃場ならびに室内モデル系における γ -BHCの分解消失状況

農薬の連用が土壌生態系におよぼす作用を解析することを目的として、東京大学農学部構内に殺虫剤 (γ -BHC: γ -1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane、lindane、 γ -HCH)、殺菌剤 (TPN: 2,4,5,6-tetrachloro-1,3-isophthalonitrile) および堆肥のそれぞれを単独あるいは混合投与する試験区が設けられた。この圃場において投与農薬の消失過程が追跡された。

本章では、この間に得られた知見および投与10年目に筆者が得た知見を述べ、この試験圃場における農薬の消失状況について概説する。また、この試験圃場から採取した土壌を用いて、室内系土壌インキュベーション実験によって γ -BHCの土壌中での分解機構とその条件を解析するいくつかの実験を行った。

1.1 圃場の設計

①試験区の配置

この農薬圃場は1974年に設置された。各試験区の配置を図1-1に示した。縦8m、横5.5mの圃場を8分し、以下の6区の農薬及び堆肥の投与区が設けられた。

A区: 対照区

B区: 堆肥施用区

C区: TPN単独投与区

D区: γ -BHC単独投与区

E区: γ -BHC・TPN混合投与区

F区: γ -BHC・TPN・堆肥混合投与区

尚、この試験区の配置で圃場試験を開始する前年(1973年)の1年間は、試験区の配置と投与農薬の種類が若干異なっており、以下の4区が設置されていた。

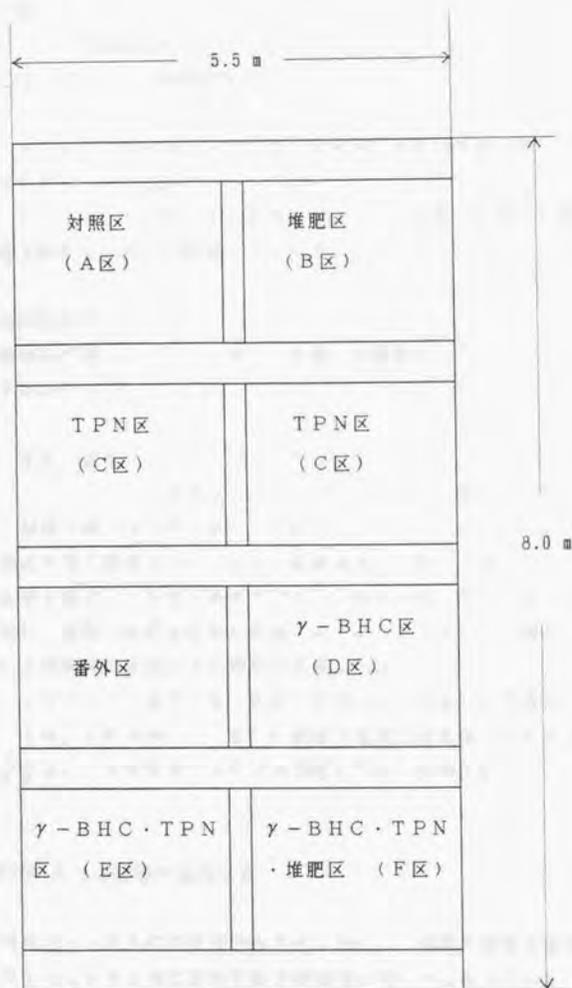


図1-1 農業長期連用畑圃場の設計

A区+B区：番外区

C区：対照区

D区： γ -BHC単独投与区

E区+F区：アルドリン単独投与区

従って、 γ -BHC単独投与区は1973年が、それ以外の投与区は1974年
が各々投与初年目となる。

また、E区は1983年にその左半分、各区主有機物の施用が農薬で損なわ
れた土壌生態系を回復する試験が行われた。

②土壌の理化学性

この圃場の土壌は火山灰に由来し、多量の有機物を含んでいる。土壌の理化学
性の一部を表1-1に示した[1]。

③農薬・堆肥の投与

γ -BHC、TPNは単独投与、混合投与のいずれの場合にもセライト増量法
により、表層土壌10cmに乾土あたりそれぞれ10ppm ($1g/m^2$)、40ppm ($4g/m^2$)投与し
た。堆肥はやはり表層10cmに $3kg/m^2$ (湿潤重量)の割合で施用した。農薬・堆肥
の投与は年1回とし、5月下旬または6月上旬に実施した。投与の直前に表層10
cmを耕起し、農薬・堆肥を投与した後、均一になるようによく混合した。

使用した農薬の規格は以下の通りである。

BHC：1973-1977年 BHC粉剤 (γ -BHC有効成分0.5%)

1978年以降 γ -BHC試薬 (東京化成規格1級またはシグマ)

TPN：ダコニール水和剤 (TPN有効成分75% 武田薬品)

1.2 圃場における農薬の消失状況

この圃場の γ -BHCの投与された区において、農薬の連用を重ねる過程で1
973年から1981年にかけて以下の事項が明らかになっていた[2,3]。

① γ -BHC単独施用区(D区)では、 γ -BHCの分解消失速度は初年目には
低かったが、年ごとに高くなり、3年目以降にはきわめて高い値を示した(図1-
2)。

② γ -BHCとTPNを混合投与(E区)すると、どちらの分解消失速度も著し
く低下した。しかし、この場合も投与を繰り返すと次第に分解速度が高まった(

表1-1 農業長期連用畑圃場の各設定区の土壌の理化学性

区	水分量 (%)	pH(H ₂ O)	pH(KCl)	全炭素量 (%)	全窒素量 (%)	C/N比
対照区	31.31	5.8	4.9	3.63	0.273	13.3
堆肥区	31.20	5.9	5.3	3.61	0.288	12.5
TPN区	28.81	6.2	5.5	2.82	0.205	13.8
γ-BHC区	31.56	6.2	5.6	2.79	0.206	13.5
TPN-BHC区	28.26	6.2	5.3	2.86	0.211	13.6
TPN-BHC 堆肥区	31.94	6.1	4.9	3.77	0.278	13.6

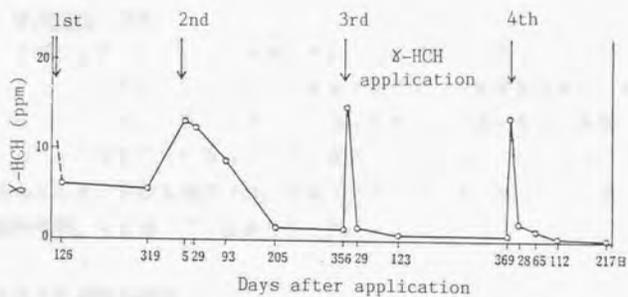


Fig. 1-2 Persistence of γ -HCH in the experimental upland field.

図1-3)。

③BHCとTPNを混合投与し、それに更に堆肥を施用した区ではどちらの農薬についても消失速度がE区よりも高まった(図1-3)。

④BHCの単独投与区において、1981年に β -BHCの存在が確認された[4]。

⑤BHC単独投与区での γ -BHCの急速な消失は、揮散によるものではないことが確認された[4]。

筆者は上述した現象の一部を再確認する目的で、1983年の農薬投与後1カ月に圃場での農薬消失状況を調査した。

<方法>

土壌の採取・調整

圃場のD区(γ -BHC単独投与区)、E区(γ -BHC・TPN混合投与区)、F区(γ -BHC・TPN・堆肥混合投与区)の各試験区から、直径8cm、深さ10cmのコアサンプラーを用いて土壌を採取した。採取数は1試験区につき5点とし、これらを均一に混合した後、風乾することなく2mmのふるいを通し、供試土壌とした。供試土壌は分析に供試するまでは冷凍保存した。土壌の採取は農薬投与直後、9日後、32日後に行った。

土壌中の農薬の抽出

供試土壌30g(乾土相当)をワーリングブレンダー(佐久間、Type 500C)の容器にとり、蒸留水30ml、アセトン100mlを加えて、18000rpmで3分間攪拌した。静置後、上澄液4mlを200ml容分液ろうとにとり、17%食塩水150ml、n-ヘキサン10mlを加えて手で200往復激しく振とうし、 γ -BHCをn-ヘキサンに転溶させた。

抽出した農薬の精製

得られたn-ヘキサン層には土壌からの不純物が混在しているので、フロリジルカラムクロマトグラフィーによりクリーンアップを行った。

内径10mm、長さ120mmのガラスカラムに、あらかじめアセトンおよびn-ヘキサンで洗浄し[5]、130°Cで3時間乾熱して活性化させたフロリジル(60-100mesh)をn-ヘキサンと混合して湿式充填し、上部に2gの無水硫酸ナトリウムをのせた。

このカラムの上部に、得られたn-ヘキサン層を全量注ぎ、カラム下部からn-ヘキサンをゆっくりと排出させてn-ヘキサン中の γ -BHCをフロリジルの上部に吸着させた。次に10mlのn-ヘキサンをカラム上部に注ぎ、下部から排出させる操

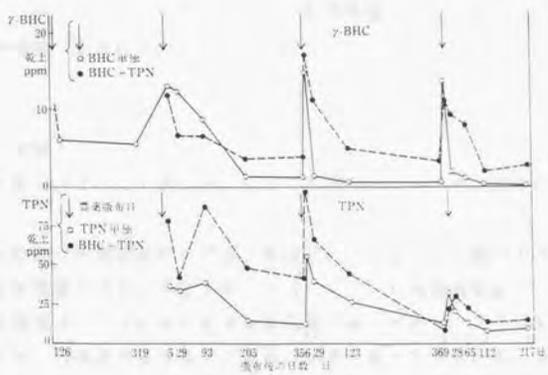


図1-3 試験圃場土壌中における投与農薬の経時的残留量

作を2回繰り返して、フロリジルに吸着されない不純物を除去した。最後にn-ヘキサン-エチルエーテル混合液(85:15, v/v) 50mlをカラムに流して、カラム上部に吸着されていた γ -BHCを溶出した。これをn-ヘキサンで適宜希釈してガスクロマトグラフ分析用の試料とした。

ただし、TPNを含む試料をフロリジルカラムで精製する場合は、n-ヘキサン-エーテルの代わりにn-ヘキサン-エタノール(95:5, v/v)を用いた。

ガスクロマトグラフによる γ -BHCの定量

試料中の γ -BHCはECD付きガスクロマトグラフ(ECD-GC)を用いて定量した。用いたECD-GCの機種ならびに測定条件は表1-2に示した。

用いた試薬

n-ヘキサン、アセトン、エチルエーテル、無水硫酸ナトリウムは全て残留農薬試験用(和光純薬)を用いた。

<結果および考察>

D、E、F区でいずれも上述したこれまでの結果とほぼ同様の結果が得られた(図1-4)。

D区(γ -BHC単独投与区)では、やはり γ -BHCの分解消失速度がきわめて高いことが確認された。E区(γ -BHC・TPN混合投与区)での γ -BHC分解消失速度は、D区のそれとほぼ同程度になっており、TPNの混合投与による γ -BHC分解消失速度低下の度合は小さくなってきている。また、堆肥の施用が、この γ -BHC分解消失速度の低下を軽減する効果も、顕著には現れにくくなっている(F区、 γ -BHC・TPN・堆肥混合投与区)。

これらの事から、 γ -BHCを投与したいずれの区にも、各々の農薬を分解する微生物が集積していることが示唆される。そこで、農薬分解消失速度が最も高まっていること、混合投与の影響がない単純な系であること、 γ -BHCが圃場でこれほど速やかに分解消失した例は世界的に初めてであり、 γ -BHCを長期連用した土壤からその分解菌が単離された例はこれまでに全く無いこと等を考えあわせて、D区(γ -BHC単独投与区、次章以降では γ -BHC連用区と呼ぶ)の土壤を研究対象として選ぶことにした。

表1-2 ガスクロマトグラフによる γ -BHCの分析条件

使用機種：島津GC-8AE (^{63}Ni -ECD検出器付き)
カラム：内径3mm、長さ2mガラス製スパイラルカラム
充填剤：3%シリコンOV-17 on Chromosorb W (AW-DMCS)
80-100mesh
分析温度：カラム 185°C 検出器：250°C
キャリアガス：純窒素B 流速60ml/分

γ -BHC残留量

($\mu\text{g/g}$ 乾土)

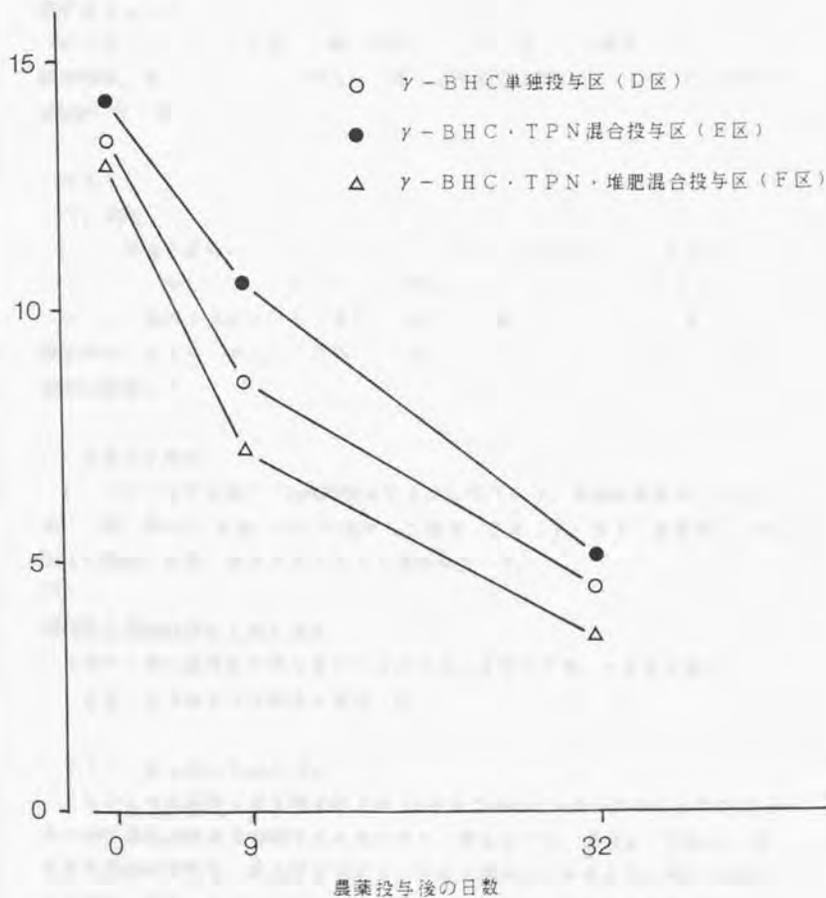


図1-4 農業長期連用畑圃場の各区土壌中における γ -BHCの経時的残留量 (1983年)

1.3 室内モデル系における γ -BHCの分解状況(1): 対照区土壤、 γ -BHC 連用区土壤における γ -BHCの分解状況

前節までに述べたように、東大農学部構内に設けられた γ -BHC連用区畑圃場では、 γ -BHC分解消失速度が次第に高まり、これは γ -BHC連用区の土壤中に γ -BHCを分解する微生物が集積しているためと推測される。そこで、室内保温静置実験によって、 γ -BHC分解菌が土壤中に集積していることを確認することを試みた。

γ -BHCを次の3種類の土壤に添加し、その分解状況を調査した。

- ①対照区土壤 ② γ -BHC連用区土壤 ③対照区土壤に γ -BHC区土壤を10%混合した土壤

<方法>

土壤の採取

農薬長期連用圃場の γ -BHC連用区、対照区のそれぞれから、直径8cm、深さ10cmのコアサンプラーを用いて土壤試料を採取し、2mmのふるいを通した後、次に述べる一部の土壤試料以外は風乾する事なく実験に供した。なお、採取した土壤試料が水分を多く含んでいる場合は、最大容水量の50%をやや下まわる程度まで室内に放置した。

γ -BHCの投与

γ -BHCは乾土当り10ppmの割合で土壤に投与した。保温静置実験に用いる土壤の一部(約10%)をあらかじめ風乾して置き、これに γ -BHCを添加し、乳鉢でよく摩砕した後、湿潤土壤に加えて攪拌混合した。

対照区土壤の連用区土壤の混合

対照区土壤へ連用区土壤を混合する区では、連用区土壤:対照区土壤=90:10(乾土重量)となるように両者を混合した。

畑状態インキュベーション[6]

上記のように調整した土壤を乾土当り30gずつ50mlビーカーに詰め、同時にビーカーの中央部に水分を補給するためのガラス管を立てた。連用区、対照区土壤、混合土壤のいずれも、最大容水量の50%の土壤水分になるようにガラス管から水を加え、アルミホイルでビーカーに軽く蓋をした後、30°Cの恒温室に静置した。2-3日おきに蒸発した水分の補給を行った。

実験は2連で行い、0、1、2、4、6週後にインキュベーションを停止し、土壌中に残留している γ -BHCの抽出・分析に供した。

γ -BHCの抽出・精製・分析

1.2に示した方法と同様に行った。

<結果と考察>

室内インキュベーション実験における、 γ -BHC連用区土壌、対照区土壌および混合土壌での γ -BHCの分解状況を図1-5に示した。 γ -BHC連用区の土壌では、対照区土壌よりも速やかに γ -BHCが分解していることがわかる。

対照区土壌に連用区土壌を10%混合すると、 γ -BHCの分解速度は高まり、2週間目以降は γ -BHCの分解率は連用区土壌でのそれとほぼ変わりがなくなっていた。

これらの結果から、 γ -BHC連用区の土壌には、 γ -BHCを分解する微生物が確かに集積していること、そしてその微生物は少量を接種することによって対照区土壌中でも増殖し、 γ -BHCを分解することが出来ることが確認された。

1.4 室内モデル系における γ -BHCの分解状況(2): γ -BHC連用区土壌に集積した γ -BHC分解菌の性質[8]

1.3では、 γ -BHC連用区土壌には、 γ -BHCを分解する微生物が集積していることを示した。そこで、この、 γ -BHC分解菌の性格を知り、分解菌を単離する際の手がかりとするために、室内インキュベーション実験において、土壌水分・土壌温度・抗生物質の添加・土壌の風乾等が γ -BHCの分解に与える影響を調べた。すなわち、これらの実験によって、土壌中で γ -BHCを分解する主要な微生物が、好気性菌であるのか、嫌気性菌であるのか、かび型、バクテリア型のいずれであるのか、胞子の有無、 γ -BHCを分解する最適温度などをあらかじめ知ろうと試みた。

<実験の設定>

この実験ではすべて γ -BHC連用圃場の土壌を用いた。設定した実験は以下の4種類である。

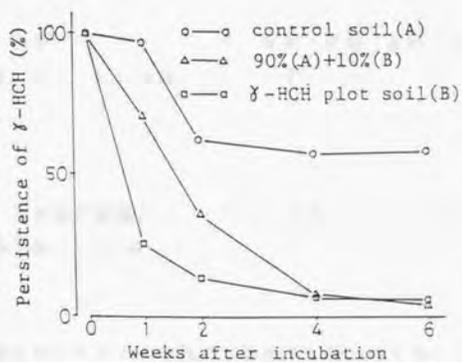


图1-5. 降解度 of γ -HCH 在控制土壤, γ -HCH plot 土壤, 和混合土壤.

実験① 土壌水分が γ -BHCの分解に及ぼす影響：土壌水分を最大容水量の25, 45, 65, 85%のそれぞれに調整してインキュベーションし、 γ -BHCの分解速度に及ぼす影響を調べた。

実験② 土壌温度が γ -BHCの分解に及ぼす影響：土壌温度が20℃、30℃、40℃の各々の条件の下でインキュベーションし、 γ -BHCの分解速度に及ぼす影響を調べた。

実験③ ストレプトマイシンの添加が γ -BHCの分解に及ぼす影響：土壌にストレプトマイシンを2000, 10000, 20000 $\mu\text{g/g soil}$ 添加してインキュベーションし、 γ -BHCの分解に及ぼす影響を調べた。

実験④ 土壌の風乾が γ -BHCの分解に及ぼす影響：供試土壌をあらかじめ風乾しておいた後に γ -BHCを投与し、インキュベーションした。

<方法>

土壌の採取

土壌はすべて東大農学部構内の γ -BHC連用区圃場から採取したものをを用いた。土壌の採取方法は1.2に準じた。

土壌の調整

採取した土壌は2mmのふるいを通し、実験4に用いる土壌以外は風乾する事なく実験に供した。土壌水分は、実験1では最大容水量の25, 45, 65, 85%に、実験2, 3では50%に調整した。実験4ではふるいを通した土壌を30℃の恒温室で10日間風乾した後に、最大容水量の50%に水分を調整した。

γ -BHCの投与

γ -BHCの投与はセライト増量法によった。供試土壌の2%に相当するセライト（和光、No.535）を、あらかじめ酸で洗浄して乾燥させた後、 γ -BHCのエーテル溶液を滴下・混合し、ドラフト中に放置してエーテルを揮散させた。これを供試土壌に投与し、よく攪拌混合した。 γ -BHCの投与量は10 $\mu\text{g/g soil}$ （乾土当り）である。

ストレプトマイシンの添加

供試土壌の2%（乾土当り）に相当するセライトにストレプトマイシンを土壌

(乾土当り)に対して各々2000, 10000, 20000 $\mu\text{g/g soil}$ になるように添加・混合した後に土壤に投与した。

畑状態インキュベーション

1.3の方法にしたがって、30°Cの下で畑状態インキュベーションを行った。ただし、実験1では、30°Cの他に20°C、40°Cの下でも行った。

各実験とも2連で行い、実験1、2、4ではインキュベーション開始後0、1、2、4、6週後に、実験3は0、1、2、4、6日後にインキュベーションを停止し、分析に供した。

γ -BHCの抽出・精製・定量

1.2に示した方法と同様に行った。

<結果及び考察>

実験①及び実験②の結果を各々図1-6および図1-7に示した。

図1.6より、土壤水分が最大容水量の45-60%の時に γ -BHCの分解が最も速やかに行われていることがわかる。これは序章の図0-2および図0-3とは明らかに異なっている。このことから、 γ -BHC連用区土壤に集積している γ -BHC分解菌は、好気性菌であることがわかる。

また、図1-7より、この微生物が γ -BHCを分解する最適温度は30°C付近であることがわかる。

土壤にストレプトマイシンを添加した実験③の結果を図1-8に示した。これを見ると、ストレプトマイシンを土壤に20000 $\mu\text{g/g soil}$ 添加した区では、 γ -BHCの分解が抑制されている。ストレプトマイシンはバクテリアに対して増殖を抑制する作用を持ち、カビや放線菌に対してはこの作用を示さない。また、土壤中に投与された場合にもこの効果を示すことが確認されている[7]。

これらのことから、 γ -BHC連用区土壤中で γ -BHCを分解する主要な微生物はバクテリアであることが推測された。

実験④の結果を図1-9に示した。土壤を風乾すると、 γ -BHCの分解にlagが現れており、 γ -BHC分解菌が乾燥に弱い非孢子形成菌であることを示唆している。

以上の4つの実験の結果から、 γ -BHC連用区土壤に集積している γ -BHC分解菌は、好気性の非孢子形成菌であることが推測され、 γ -BHCを分解する最適温度は、30°C付近であることが確認された。

そこで、この事を踏まえて、この γ -BHC分解菌を単離する試みへと進むこ

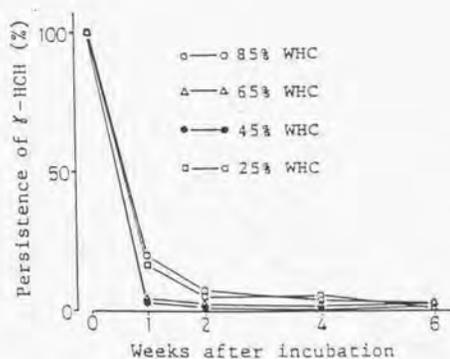


图 1-6 Effect of soil moisture content on the degradation of γ -HCH.

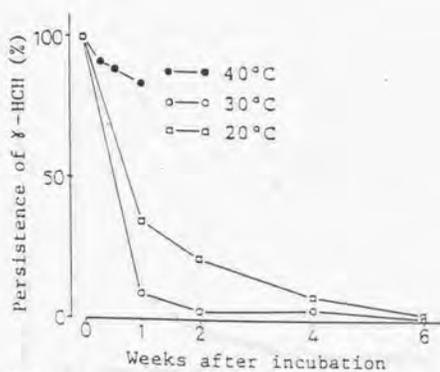


图 1-7 Effect of soil temperature on the degradation of γ -HCH.

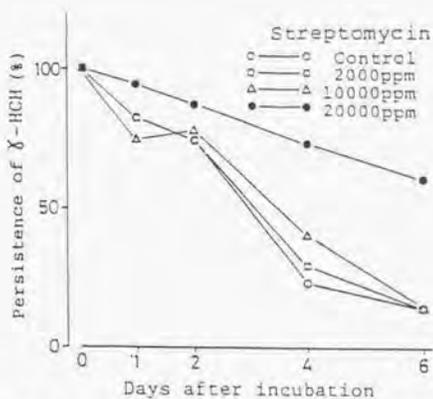


图1-8 Effect of streptomycin on the degradation of γ -HCH.

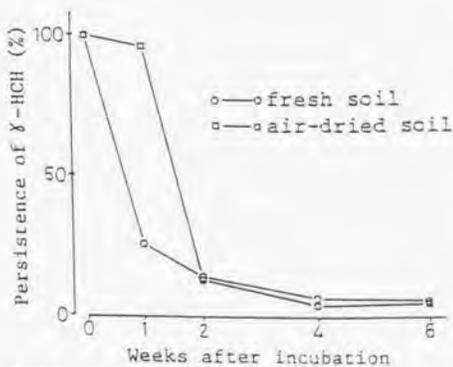


图1-9 Effect of air-drying of soil on the degradation of γ -HCH.

第1章の引用文献

- [1] 橋本知義、高井康雄、和田秀徳 (1983) 有機質資材の施用が農薬連用土壌の微生物相に及ぼす影響について。 東京大学農学部卒業論文、未発表
- [2] 梁昌述 (1975) 農薬と土壤微生物の相互作用に関する研究 東京大学博士論文
- [3] 和田秀徳、高井康雄、高橋信孝、北沢右三、吉田富男 (1979) 土壤生態系における合成薬剤の学動とそれが土壤微生物相に及ぼす影響。 日産科学振興財団研究報告書 2, p43
- [4] 相川保史、高井康雄、和田秀徳 (1983) 農薬の連用が農薬の分解速度とセルロースの微生物分解に及ぼす影響。 東京大学農学部卒業論文、未発表
- [5] 脇本忠明、立川涼、小川恒彦、渡辺功 (1974) 乾式採気法による大気中の有機塩素化合物の定量法。 分析化学、23、790-793
- [6] 東京大学農学部農芸化学教室編 実験農芸化学(上巻) p.310
- [7] Anderson, J.P.E. and Domsch, K.H. (1973) Quantification of bacterial and fungal contribution to soil respiration. Arch. Microbiol., 93, 113-127
- [8] Wada, H., Senoo, K., and Takai, Y. (1989) Rapid degradation of γ -HCH in upland soil after multiple applications. Soil Sci. Plant Nutr. 35, 71-77

第2章 γ -BHC分解菌の単離と同定

第1章で述べたように、 γ -BHC連用区畑土壌には γ -BHCを分解する微生物が集積していること、その微生物は孢子を形成しない好気性細菌であること、 γ -BHC分解の最適温度は30℃付近であることが明らかになった。そこで、この γ -BHC連用区土壌から γ -BHC分解菌を単離し、同定することを試みた。

2.1 γ -BHC分解菌の単離

γ -BHC連用区土壌に γ -BHC分解菌が集積しているとはいえ、その菌数は一般土壌細菌数と比べて同等またはそれ以上であるとは考えにくい。従って、ランダムスクリーニング法にはよらず、まず集積培養法によって液体培地中に γ -BHC分解菌を選択的に集積させ、単離に持ち込むことを試みた。

<方法と結果>

培地

用いた液体培地の組成を表2-1に示した[1]。炭素源として γ -BHCのみを添加した。 γ -BHCは水に対する溶解度が5.75mg/l (28℃) [2]きわめて低く、また、この濃度にまで短時間のうちに γ -BHCを溶解させることも困難であった。培地に溶解している γ -BHCが低濃度であると集積培養の効率が悪いので、次の方法によって溶解度以上の γ -BHCを培地中に添加した。

培地に添加する無機塩を溶解した溶液に、飽和量の5倍の γ -BHCを溶解し、ホットスターラーを用いて、80-90℃で3時間加熱攪拌し、 γ -BHCを溶解させた。冷却しないうちにすばやく0.22 μ mのミリポアフィルターを通して除菌した。無機塩のうち $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ は加熱する際にリン酸と結合して沈澱を作るので、別に殺菌したものを後で加えた。この方法によって、 γ -BHCを約20mg/l含む培地が得られた。

集積培養

殺菌済みのシリコ栓付き坂口フラスコに、 γ -BHCを加えない無機培地270mlを入れ、オートクレーブ滅菌した。 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ は別に殺菌して冷却後加えた。これに γ -BHC連用区土壌30gを入れ、往復振とう機で15分間振とうして土壌懸濁

表2-1 γ -BHC分解菌単離用無機培地の組成

K_2HPO_4	1 g	$Fe_2(SO_4)_3$	5 mg
KH_2PO_4	1 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	5 mg
NH_4NO_3	1 g	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	5 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g	γ -BHC	20 mg
蒸留水	1 l	pH	7.0

液を得た。

乾熱滅菌済みのシリコ栓付き試験管に上述した方法で調整した培地を10ml加え、土壌懸濁液を1ml接種した。この試験管を30°C恒温室中の往復振とう機に設置し、培養を行った。

培地に含まれる γ -BHCの濃度は約20ppmであり、この培地中で γ -BHC分解菌が生育しているかどうかを菌の生育に由来する濁度によって判定することは困難であった。そこで、培地中の γ -BHCの分解をECDガスクロマトグラフで定量追跡し、分解菌の生育を判定した。その方法は次の通りである。

培養液0.1mlを200ml容分液ろうとに取り、17%食塩水150mlとn-ヘキサン10mlを加えて、手で200往復激しく振とうし、培養液に含まれていた γ -BHCをn-ヘキサン層に転溶させた。得られたn-ヘキサン層を分取し、適宜n-ヘキサンで希釈してECDガスクロマトグラフに注入し、 γ -BHCを定量した。

この方法によって、土壌懸濁液を接種した培地中の γ -BHCは培養開始後3日で90%以上が分解していることが分かり、 γ -BHC分解菌が生育していると判断された。この培養液を、新しい培地を加えた試験管に接種し、同様に培養した。

γ -BHC分解の確認-植え継ぎの操作を9回繰り返し、 γ -BHC分解菌の集積培養液を得た。

純粋分離

平板塗抹培養法[3]に従った。

集積培養に用いたものと同じ成分の培地（ただし γ -BHCは含まない）で、集積培養液を適宜希釈し、試料懸濁液とした。

一方、 γ -BHCを含まないこの培地に精製寒天1.5%を加えてオートクレーブ殺菌したものを乾熱済みペトリ皿に注いで冷却、表面の乾燥を行った平板培地を用意した。この平板培地上に試料懸濁液0.1mlをのせ、スプレッターで全面にまんべんなく塗抹した。

先にも述べたように、 γ -BHCは水に対する溶解度がきわめて低く、 γ -BHCが溶解した培地を寒天で固めた平板培地を用いたのでは、 γ -BHC分解菌のコロニーを得ることが困難であると予測された。また、 γ -BHCを飽和以上に含んだ培地をオートクレーブ殺菌し、冷却しても、寒天内部および表面に γ -BHCが「かたまり」となって不均一に存在し、 γ -BHC分解菌のコロニー形成には適さないと思われる。そこで、微粉末状の γ -BHCを寒天表面に一緒に散布することを考えた。その方法として浄原の方法[4]を採用した。

培養希釈液を塗抹した平板培地表面に、 γ -BHC-エチルエーテル溶液（10

:90, w/v) を噴霧し、 γ -BHCの微結晶を均一に付着させた。これを30°Cの恒温室で数日間培養した。

培養後、周囲にクリアゾーンを伴ったコロニーが出現した(図2-1)。生育したコロニーのうち、単一コロニーと判断されるものはその大きさがきわめて小さいため、実体顕微鏡の下で白金耳を用いて釣菌し、純化を繰り返した(図2-2)。また、 γ -BHC-エチルエーテル溶液中から雑菌が混入する可能性が考えられたため、対照として集積培養液を塗抹しない平板培地表面に γ -BHC-エチルエーテル溶液を噴霧したものを同様に培養したが、微生物の生育は見られなかった。

最後に、純化されたコロニーを集積培養に用いたものと同一組成の液体培地に植菌し、 γ -BHCの分解をECD-GCによって確認して、 γ -BHC分解菌を得た。

<考察>

先にも述べたように、好気性菌だけで 10^8 /g soil存在するといわれる土壤中から、 γ -BHC分解菌を単離する場合、ランダムスクリーニング法を用いたのでは大変な労力と時間を要すると予想された。すなわち、 γ -BHC連用区土壤には、 γ -BHC分解菌が集積しているとは言え、その菌数はやはり土壤細菌と比べてはるかに少ないことが予想され、土壤からの直接の単離は困難であると考えられた。このため、集積培養によって γ -BHC分解菌を選択的に集積させることが、単離を行う上で有利であると考えた。しかし、土壤細菌の中には、合成液体培地中で良好な生育をしないものも少なくない。 γ -BHC分解菌がこのような性質を持つならば、そもそも集積培養が不可能となり、単離方法を根本的に変更しなければならない。この点を念頭に置きつつ、まず第1段階の取り組みとして、集積培養を試みた。

γ -BHC分解菌の集積培養が可能であるとしても、その成否は用いる培地の組成や培養条件に大きく依存する。一般に、農薬が微生物の栄養源として分解されている場合には、それを唯一の菌体合成およびエネルギー生成のための元素となるように培地を選択すればよい。しかし、農薬の分解は他にエネルギー源、菌体合成物質が共存して初めて可能な場合(co-metabolism)が多く知られている[20]。このような場合には、培地組成の決定が極めて困難となり[5]、また集積の効率も高くないと予想される。

γ -BHC長期連用圃場が集積している γ -BHC分解菌の場合も、 γ -BHCが唯一の炭素源およびエネルギー源として分解されているのか、あるいはco-metabolismによって分解されているのかは明確ではなかった。

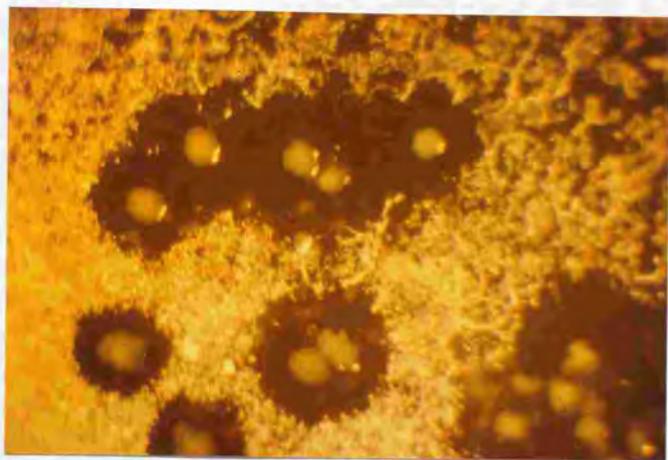


図2-1 クリアゾーンを周囲に伴った γ -BHC分解菌のコロニー

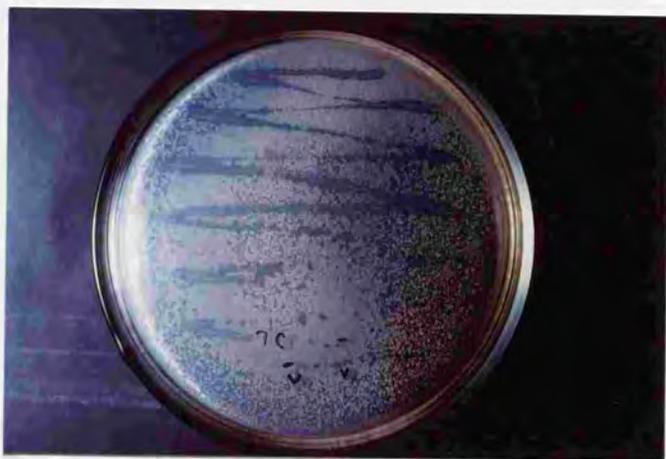


図2-2 γ -BHC分解菌の純化

しかし、 γ -BHCを連用することによって分解菌が集積してきたこと、室内モデル系実験では最適条件の下で γ -BHCの分解が極めて急速に行われたことから、 γ -BHC分解菌が γ -BHCを炭素源およびエネルギー源として代謝、分解しているのであろうと推測し、集積培養の培地には γ -BHCを唯一の炭素源およびエネルギー源として加えた。

次に、培地に加える他の無機養分の種類・濃度や増殖因子の有無等が問題になる。しかし、これは試行錯誤により決定する以外に方法はないと考えられた。そこで、過去にランダムスクリーニング法によって γ -BHC分解菌を得たTuらを用いた培地[1]を採用して、 γ -BHC分解菌の集積培養を試み、もし良好な増殖が見られなければ、その培地の組成を適宜改変するつもりで実験を始めた。

また、培養条件については、室内モデル系実験によって、土壌中で γ -BHCが分解される最適温度は30°C付近であること、土壌中に集積している γ -BHC分解菌は好気性菌であることが知られていたため、30°Cでの振とう培養を行うことにした。

以上のような経過で培地の組成、培養条件を決定し、集積培養を行った。幸いなことに、植え継ぎを何度繰り返しても、用いた培地中で γ -BHCは分解されて、 γ -BHC分解菌が生育したと判断され、しかもその分解速度は遅くはならず、常に3-4日の培養で初めに培地に含まれていた γ -BHCの90%以上が分解されることが確認されたので、2-3日の周期で植え継ぎを繰り返すことが出来た。これにより、採用した培地、培養条件が γ -BHC分解菌の集積培地として一応適したものであることが分かった。また、土壌細菌、 γ -BHC分解産物の分解菌の菌数に比べて、目的とする γ -BHC分解菌を十分多く集積させることが出来たと考えられた。

2.2 γ -BHC分解菌の同定

2.1で述べたように、 γ -BHC連用区畑圃場から γ -BHC分解菌を単離することに成功した。そこで、この分解菌の基本的な性質を明らかにし、将来的な応用利用も念頭に置いて、菌の同定を行った。これにあたり、微生物の化学分類的知見を一部に取り入れた。

<方法>

菌体の培養は、特に断わりのあるもの以外は30°Cで静置培養を行った。前培

養および基本培地としては、肉汁寒天（肉エキス(Difco);1%, Bactoペプトン(Difco);1%, NaCl;0.5%, 寒天;1.5%, pH;7.2)または酵母エキス-ペプトン寒天培地（酵母エキス;0.25%, ペプトン;0.25%, NaCl;0.125%, 寒天;1.5%, pH;7.0)を用いた。

①細胞形態観察

細胞形態・運動性と鞭毛・グラム染色は、肉汁寒天または酵母エキス-ペプトン寒天上で生育した菌細胞を用いて観察した。運動性と鞭毛は20℃で、それ以外は30℃で培養を行った。

細胞形態[6]

肉汁寒天上で4日間培養した細菌細胞を、スライドガラス上に火炎固定し、クリスタルバイオレット液で染色・水洗した後光学顕微鏡を用いて1500倍、油浸で検鏡した。

運動性と鞭毛[6]

酵母エキス-ペプトン寒天上で20℃の下、4日間培養した細菌細胞を用い、運動性は懸滴法により、鞭毛染色は戸田法により観察した。

グラム染色[6]

肉汁寒天上で3日間培養した細菌細胞を用い、Huckerの変法によって観察した。なお、対照として *Pseudomonas fluorescens* および *Bacillus subtilis* を用いた。

②化学分類滴知見

菌体脂肪酸組成[7]

肉汁培地で30℃の下、72時間振とう培養した菌体を遠沈後蒸留水で2回洗浄し、凍結乾燥菌体として分析に共した。

細胞の脂肪酸のメチルエステルは、塩酸-メタノール法により調整した。

脂肪酸の分析はFID付きガスクロマトグラフを用いて行った。分析条件は以下の通りである。

ガスクロマトグラフ：島津GC-7A

データ処理装置：島津C-R1A

インジェクタ温度：220℃

カラム温度：180℃

カラム：内系3mm x 5m 充填剤 10%DEGS

キャリアガス：N₂ 流速50ml/min

検出器：FID

不飽和脂肪酸は水素添加によるピークの移動と消滅により、ヒドロキシ脂肪酸はTLC分画（メルク、シリカゲル60F₂₅₄、20cm x 20cm、展開溶媒：石油エーテル-ジエチルエーテル 4:1, v/v）により同定した。

キノンの分子種 [7]

肉汁培地で30℃の下、72時間振とう培養した菌体を遠心分離し、エーテル-アセトン混液(1:4, v/v)によって脂質抽出物を得た。この脂質抽出物からTLC（メルク、シリカゲル60F₂₅₄、20cm x 20cm、展開溶媒：石油ベンジ-エチルエーテル、9:1, v/v）を用いてキノンの精製を行った[8]。精製の結果、存在するキノンはユビキノンであることが判明し、ユビキノンの分子種をHPLCによって同定した。HPLCによる分析条件は次の通りである。

使用機種：島津LC-5A

カラム：Zorbax-ODS 内径4.6mm x 250mm

溶媒：メタノール-イソプロピルエーテル 3:1, v/v

流速：1.0ml/min

温度：室温

注入量：1-5μl

検出器：島津 SPD-2AM (270nm) 0.02 AUFS

記録計：島津 C-R1B

なお、菌体脂肪酸組成およびキノンの分子種の分析は、東京大学教授駒形和男博士（現在東京大学名誉教授）に依頼したものである。

③生理的性質

生理的性質は特に断わりの無い限り30℃で静置培養を行った後に調べた。

硝酸塩の還元[9]

硝酸塩肉汁およびコハク酸-硝酸塩培地を用いて培養し、亜硝酸塩の生成をスルファニル酸と α -ナフチルアミンによって3, 7日後に判定した。

デンプンの分解[6]

0.2%の可溶性デンプンを含んだ酵母エキス-ペプトン寒天の平板に画線培養し、培養1, 3, 7日後にルゴール液を注いでデンプン分解能を判定した。

ウレアーゼ[6]

クリステンセンセンの尿素培地を用い、7日間の培養の後判定した。

オキシダーゼ

市販のオキシダーゼ試験紙(日水製薬)を用い、肉汁寒天上で生育した新鮮な培養菌体をつけ、気泡の発生の有無により判定した。

OFテスト[10]

OF basal medium (Difco) および PYP OF mediumの両者を用いて行った。ブドウ糖は過濃減菌し、最終濃度が1.0%になるように培地に添加した。7日間の培養後、指示薬の変色を観察した。

生育温度

酵母エキス-ペプトン寒天を用い、5°C、36.5°C、42°Cの下で生育の有無を判定した。

<結果>

上述の試験の結果を表2-1にまとめた。また、この菌は孢子を形成せず(Dorner染色法)、生育最適温度は30°C付近(肉汁寒天)であり、肉汁寒天上のコロニーには、非水溶性色素特有の黄色が見られた。

Oyaizu and Komagataの報告[11]および、Bergey's Manual[12]に基づいて検索した結果、この γ -BHC分解菌は、*Pseudomonas paucimobilis*と同定された。また、株番号をSS86とした。

なお、1992年に*Pseudomonas paucimobilis*は属名が変更され、*Sphingomonas paucimobilis*となった[13]。従って、以後本文中ではこの γ -BHC分解菌は*Sphingomonas paucimobilis* SS86と記述する。

Table 2-2. Phenotypic and chemotaxonomic characterization of γ -HCH-decomposing microorganism.

		Method	Reference
Gram stain	-	Hucker's modification	HASEGAWA <i>et al.</i> 1985 [6]
Shape of cell	rod $1.3 \times 0.7 \mu\text{m}$	Scanning electron microscope	
Motility	+	Hanging drop	HASEGAWA <i>et al.</i> 1985 [6]
Flagellation	single polar	Staining method of Toda	
Nitrate respiration	-	Method of Iizuka and Komagata	IIZUKA and KOMAGATA 1963 [7]
Nitrate reduction	Medium N	Method of Iizuka and Komagata	IIZUKA and KOMAGATA 1963 [7]
	Medium S		
Hydrolysis of starch	+	Iodine solution on starch-containing agar	HASEGAWA <i>et al.</i> 1985 [6]
OF test (glucose)	O	OF basal medium (Difco 0688) and PYP OF medium	YABUCHI <i>et al.</i> 1979 [10]
	F		
Urease activity	-	Christensen's medium	HASEGAWA <i>et al.</i> 1985 [6]
Oxidase test	+	Cytochrome oxidase test paper (Nissui Seiyaku)	
Catalase activity	+	Bubbles in hydrogen peroxide solution	HASEGAWA <i>et al.</i> 1985 [6]
Growth at	5°C	On nutrient agar	HASEGAWA <i>et al.</i> 1985 [6]
	37°C		
	42°C		
Quinone system	Q-10	Purification: Method of Yamada <i>et al.</i> Identification: HPLC	YAMADA <i>et al.</i> 1969 [8] KOMAGATA <i>et al.</i> 1982 [7]
Cellular fatty acid composition	<i>n</i> -16 : 0	Extraction and methylation: Hydrogen chloride-methanol system	KOMAGATA <i>et al.</i> 1982 [7]
	<i>n</i> -18 : 0		
	<i>n</i> -16 : 1	Identification: GC	
	<i>n</i> -18 : 1		
	20H-14 : 0		
	20H-16 : 0		

2.3 圃場における γ -BHC分解菌数の経時的計数

前節までに γ -BHC連用区土壌から γ -BHC分解菌を単離・同定した経過を述べた。しかし、単離された分解菌が、圃場の土壌の*in situ*で γ -BHCを分解する主要な微生物であるかどうかは依然不明である。すなわち、単離された γ -BHC分解菌は、実験室内条件でのみ γ -BHCを分解することができ、圃場で γ -BHCを分解しているのは実は別の微生物であるという可能性が無いとは言えない。この点を明らかにするための1つの方法として、集積培養に用いたものと同一組成の培地を用い、MPN法によって γ -BHC連用区圃場の γ -BHC分解菌数の計数を経時的に行った。

<方法>

γ -BHC分解菌数の計数は最確値法(MPN法)[14]によって行った。

土壌の採取・調整

γ -BHC連用区(D区)および対照区(A区)の両区から、農薬投与直前、1カ月後、2カ月後、5カ月後に土壌を採取し、土壌中の γ -BHC分解菌数を経時的に計数することとした。

土壌試料の採取は、1.2で述べた方法に従った。

希釈液と培地

いずれも集積培養(2.1)で用いたものと同一のものを用いた。

操作手順

常法[14]に従った。10倍希釈5連法によった。

培養

試験管を、30℃恒温室中の往復振とう機に設置し、4週間培養を行った。

γ -BHC分解菌生育の判定

培地中の γ -BHCをECD-GCを用いて定量することによって、分解菌生育の有無を判定した。

培養後の培地0.5mlを200ml溶分液ろうとにとり、17%食塩水150ml、n-ヘキサ

ン10mlを加えて、200往復振とうした。n-ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、適宜n-ヘキサンで希釈してGCへの供試サンプルとした。分析条件は1,2に述べたものと同一である。

生菌数の算出

培地中の γ -BHCの濃度がもとの1/2以下に減少している試験管を γ -BHC分解菌が生育したものとし、生菌数の算出は最確値表[14]をもとにして計算した。

<結果と考察>

MPN法によって、 γ -BHC連用区圃場および対照区圃場での γ -BHC分解菌を経時的に計数した結果を表2-3に示した。

γ -BHC連用区土壌には、 γ -BHC分解菌が生息しており、その菌数は γ -BHC投与後に著しく増大していること、 γ -BHCが分解した後は再び減少して γ -BHCの投与前の菌数レベルに戻る可以看出。一方、対照区土壌からは γ -BHC分解菌は検出されなかった。

このMPN法による γ -BHC分解菌の計数に用いた培地及び培養条件は、2, 1で述べた集積培養で用いたものと同一である。従って、ここで得られた結果は、筆者が単離した γ -BHC分解菌*Sphingomonas paucimobilis*は、圃場の土壌環境条件下において確かに γ -BHCを分解していた主要な微生物であることを示している。なぜならば、単離した、SS86株が圃場においては γ -BHCの分解を行っていないとすれば、この培地を用いた方法では γ -BHC分解菌の連用区土壌での集積や、 γ -BHC投与後の増殖が計数されないはずだからである。

とは言うものの、単離したSS86株が圃場で最も活発に γ -BHCの分解を行っている菌であると断定するにはやや不十分である。それは次の理由による。①集積培養やMPN法による菌数の計数において、筆者が用いたものとは別の組成の培地を用いた場合、別の分解菌が単離され、菌数ももっと高い値が計数されるかも知れず、その場合は、そちらの菌の方が圃場で分解する最も主要な分解菌となる。②co-metabolismによって γ -BHCを分解する微生物が圃場における主要な分解菌である可能性が残る。しかし、 γ -BHCを唯一の炭素源として活発に増殖する分解菌が γ -BHC連用区の土壌中に存在している以上、co-metabolismによって γ -BHCを分解する微生物の寄与は小さいと思われる。

そこで、次節に述べる様な接種実験を行うことにした。

表2-3 農薬長期連用畑圃場の γ -BHC連用区土壌および対照区土壌における
 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis* 菌数の経時的变化

区	γ -BHC投与後の月数			
	0	1	2	5
γ -BHC区	4.5×10^3	6.7×10^6	4.8×10^3	4.7×10^1
対照区	N.D.	N.D.	-	N.D.

N.D.; 検出限界以下 (cells/g soil)

2.4 γ -BHC分解菌の接種による土壌中の γ -BHCの分解

単離されたSS86株を γ -BHCを添加した対照区土壌に接種し、その時に γ -BHC連用区土壌で見られたのと同様に γ -BHCの速やかな分解が起こるかどうかを確かめることにした。もし、ここで単離した γ -BHC分解菌が、実験室内の条件でのみ γ -BHCを速やかに分解することが出来、土壌中では γ -BHC連用区土壌で示されたような速やかな γ -BHCの分解が起こらないのであれば、 γ -BHC連用区土壌中で γ -BHCの分解に関わっているBHC分解菌は他に主要なものが存在する可能性が強い。逆に、接種によって γ -BHCの分解が速やかに起これば、いわゆる「コッホの原理」が成立することになり、ここで単離した γ -BHC分解菌が土壌中でも γ -BHCを分解する主要な菌であると言えることが出来よう。

この実験は、SS86株を用いての土壌中の γ -BHCの分解の人為的な制御ならびに γ -BHC汚染土壌のBio-remediationの可能性の当否を採るものでもある。

ここでは対照区土壌（火山灰土壌）、灰色低地土および砂質土壌を用いて接種実験を行い、SS86株が一般的にBHC汚染土壌の浄化に使えるかどうか検討した。

<方法>

供試土壌

次の3種類の土壌を用いた。

- ・農業長期連用畑圃場の対照区土壌（火山灰土壌）
- ・愛知県農業総合試験場内畑圃場から採取した土壌（赤黄色土壌）
- ・埼玉県農業試験場内畑圃場から採取した土壌（灰色低地土）

いずれの土壌も圃場の表層から採取し、風乾する事なく2mmのふるいを通過させた後実験に供した。

土壌への γ -BHCの添加

セライト増量法により乾土当り10 μ g/g soilの割合で添加した。

土壌へのSS86株の接種

SS86株はL-brothを用いてO.D.が約0.2となるまで前培養し、遠沈・集菌後蒸留水で洗浄し、蒸留水中に懸濁した。これをガラス製スプレーを用いて土壌に噴霧し、よく混合した。接種菌数はおよそ10⁴および10⁶ cells/g soilとした。

土壌のインキュベーション

γ -BHCを添加し、SS86株を接種した土壌は常法にしたがって、最大容水量の50%の土壌水分に調整し、30°Cの恒温室内でインキュベーションを行った。

土壌中の γ -BHCの定量

インキュベーション後0、1、2、4週目に土壌を取り出し、2.2で述べた方法に従って土壌中に残留する γ -BHCを定量した。

<結果>

結果を図2-3、2-4に示した。これらから明らかなように、実験に用いた3種類のいずれの土壌においてもSS86株を接種しない場合には γ -BHCの分解がゆるやかまたはほとんど分解されないのに対してSS86株を接種すると γ -BHCは速やかに分解されるようになった。また、農薬連用圃場の対照区土壌に104 cells/g soilのSS86株を接種したとき、 γ -BHCの分解速度は γ -BHC連用区土壌において確認された γ -BHCの分解速度に類似していた。

<考察>

対照区土壌にSS86株が約 10^4 cells/g soil接種された場合に、添加された γ -BHCが速やかに分解され、その分解速度は γ -BHC連用区土壌に添加された γ -BHCの分解速度と類似していた結果は、SS86株が、 γ -BHC連用区土壌において γ -BHCの分解に関与していた主要な分解菌であることを示している。

また、灰色低地土ならびに砂質土壌においても接種されたSS86株は土壌に添加された γ -BHCを速やかに分解することができた。

これらの結果は、単離されたSS86株を用いて農薬 γ -BHCの分解を人為的にコントロールすることができることを示唆している。例えば γ -BHCを施用し、期待する防除効果が達成された後にはこの分解菌を散布することにより、土壌に残留する γ -BHCを分解除去でき、環境汚染を最小限に抑えることができるであろう。このことは同時に γ -BHCで汚染された土壌のBio-remediationにSS86株が使える可能性があることも示唆している。

BHCは1960年後半に先進諸国においてはその使用が禁止されたがインドなどの開発途上国においては衛生害虫や作物害虫の駆除のために現在も使われている。そのために、農地や河口の底質においてBHCによる残留汚染が認められている[18]。また、既に使用が禁止されたオランダでも今だに多くの汚染地域が存在している[19]。これらの地域においては、Bio-remediationによるBHCの分解除去が現実的な問題として必要となろう。ただし、実際にBio-remediationを行う場合

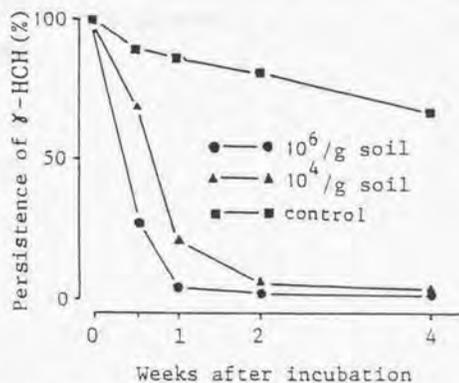


图2-3 接种对照区土壤以 *P. paucimobilis*。

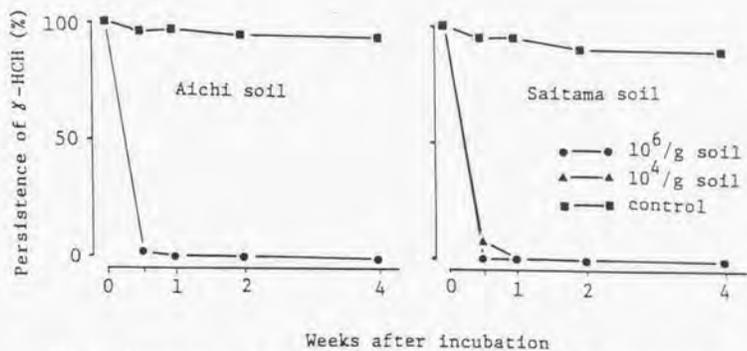


图2-4 接种爱知土壤和埼玉土壤以 *P. paucimobilis*。

には、野外環境に放出する微生物自体の安全性評価に加えて、 γ -BHCが分解される際の2次代謝産物による環境汚染、すなわち2次代謝産物の環境中での残留蓄積性、生物体への影響をあらかじめ調べておかねばならない。これまでの所、 γ -BHC分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* による γ -BHCの中間代謝産物として筆者は2,5-dichlorophenolならびに2,3,5-trichlorophenolを[15]、Imaiらは γ -PCCHと1,2,4-trichlorobenzeneを[16,17]を、NagataらとNagasawaraはdead-end産物としての2,5-dichlorophenolならびに1,2,4-trichlorobenzeneを同定している[21,22,23]。

第2章の引用文献

- [1] Tu, C.M. (1976) Utilization and degradation of lindane by soil microorganisms. Arch. Microbiol., 108, 259-263
- [2] 上路雅子、富永長次郎編、最新農業データブック、ソフトサイエンス社 (昭和57年)
- [3] 実験農芸化学 (下巻) p.190 東京大学農学部農芸化学教室編 朝倉書店 (1978)
- [4] Kiyohara, H., Nagao, K., and Yano, K. (1982) Phenanthrene-utilizing Alcaligenes faecalis and a rapid procedure for screening of bacteria able to degrade water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol., 43, 454-
- [5] 新版土壤微生物実験法 土壤微生物研究会編 p.358 養賢堂 (1992)
- [6] 長谷川武治編 (1985) 改訂版微生物の分類と同定 (下)、学会出版センター
- [7] 駒形和男編 (1982) 微生物の化学分類実験法、学会出版センター
- [8] Yamada, Y., Aida, K., and Uemura, T. (1969) Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol. J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 181-196
- [9] Iizuka, H., and Komagata, K. (1963) An attempt at grouping of the genus Pseudomonas. J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 73-
- [10] Yabuuti, H., Tanimura, E., Ooyama, A., Yano, I., and Yamamoto, A. (1979) Flavobacterium devorans ATCC 10829: A strain of Pseudomonas paucimobilis. J. Gen. Appl. Microbiol., 25, 95-
- [11] Oyaizu, H., and Komagata, K. (1983) Grouping of Pseudomonas species on the basis of cellular fatty acid composition and ubiquinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 17-40
- [12] Murry, R.G.E., et al., (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, Williams and Wilkins Co., Baltimore
- [13] Yabuuti, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Yamamoto, H. (1990) Proposals of Sphingomonas paucimobilis gen. nov. and comb. nov., Sphingomonas parapaucimobilis sp. nov., Sphingomonas yanoikuyae sp. nov., Sphingomonas adhaesiva sp. nov., Sphingomonas capsulata comb. nov., and two genospecies of the genus Sphingomonas. Microbiol. Immunol., 34, 99-119
- [14] 土壤微生物研究会編、新編土壤微生物実験法 p.45 養賢堂

- [15] Senoo, K., and Wada, H. (1989) Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35, 79-87
- [16] Imai, R., Nagata, Y., Senoo, K., Wada, H., Fukuda, M., Takagi, M., and Yano, K. (1989) Dehydrochlorination of γ -hexachlorocyclohexane (γ -BHC) by a γ -HCH-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2015-2017
- [17] Imai, R., Nagata, Y., Fukuda, M., Takagi, M., and Yano, K. (1991) Molecular cloning of *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. *J. Bacteriol.* 173, 6811-6819
- [18] 立川涼 (1989) 地球規模の海洋汚染 - 有機塩素系化合物を対象に 環境情報科学 18, 45-50
- [19] Backman, A., Walet, P., Wijnen, P., DeBruin, W., Huntjens, J.L.M., Roelofsen, W., and Zehnder, A.J.B. (1988) Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 143-149
- [20] Horvath, R.S. (1972) Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.*, 36, 146-155
- [21] Nagata, Y., Imai R., Sakai, A., Fukuda, M., Yano, K., and Takagi, M. (1993) Isolation and characterization of Tn5-induced mutants of *Pseudomonas paucimobilis* UT26 defective in γ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (Lin A). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57 (5) 703-709
- [22] Nagasawa, S., Kikuchi, R., Nagata, Y., Takagi, M., and Matsuo, M. (1993) Stereochemical analysis of γ -HCH degradation by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere*, 26, 1187-1201
- [23] Nagasawa, S., Kikuchi, R., and Matsuo, M. (1993) Indirect identification of an unstable intermediate in γ -HCH degradation by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere*, 26, 2279-88

第3章 第I部の総合考察

3.1 実験結果のまとめ

① 土壌における γ -BHCの分解状況

γ -BHCは畑土壌中では半減期が10カ月以上であるのに対し、湛水土壌中では半減期が10~20日であることが室内実験で知られている。これは、湛水されると土壌が還元状態になり、嫌気性菌が γ -BHCを脱塩素するためと考えられた。事実、 γ -BHCを脱塩素する嫌気性菌が土壌から分離されている。

一方、 γ -BHCを分解する好気性菌は見いだされはしたが、畑土壌中で γ -BHCが速やかに消失する事例は皆無であった。

ところで、東大農学部構内に設けられた γ -BHC長期連用畑圃場においては、 γ -BHCの消失が初年目、2年目には遅かったが、3年目以降には著しく速やかになっていた。

② 室内モデル系による γ -BHC分解過程の解析

上述した連用圃場における γ -BHCの消失過程を室内モデル系で確認・解析した。その結果、 γ -BHC連用区土壌には γ -BHCを分解する好気性細菌が集積していること、この細菌は γ -BHCを連用していなかった土壌中でも γ -BHCを分解できることが示された。

③ γ -BHC分解菌の単離・同定

γ -BHC連用区土壌に集積している γ -BHC分解菌を単離することを試みた。 γ -BHCを唯一の炭素源として加えた無機培地を用いた集積培養を行い、 γ -BHC分解菌を単離した。この分解菌は*Sphingomonas paucimobilis*と同定された。

また、上述した培地を用いて圃場における γ -BHC分解菌数の変動をMPN法により計数したところ、 γ -BHC連用区土壌では対照区土壌に比べて γ -BHC分解菌数ははるかに多だけでなく、 γ -BHC施用後に γ -BHC分解菌数が著しく増大することが確認された。また、対照区土壌に添加された γ -BHCの分解速度はこの土壌に γ -BHC分解菌を接種することにより著しく早められた。これらの結果は、単離した γ -BHC分解菌が圃場においても γ -BHCを分解する主要な微生物であることを示唆している。

3.2 これまでの研究の問題点と本研究の特徴

筆者は、 γ -BHCを単離するにあたって、「野外の自然環境条件下の土壤中で γ -BHCを能率良く分解できる微生物を単離する」ことに留意した。この事は、土壤中から農薬分解菌を単離する研究において、これまでに見過ごされてきた重大な点である。すなわち、これまでに行われてきた農薬分解菌の探索の研究は*in vitro*の条件下で行われた物が大部分であり、農薬分解菌を単離してきた現場での農薬の分解状況はどうであったのか、また、単離してきた微生物が、単離したその現場で実際に農薬を分解していた主要な微生物であったのかどうか、という点はこれまでの農薬分解とそれに関わる微生物の研究において残されてきた大きな問題点であった。事実、BHCに関しても、数多くの研究者がその分解菌を探索した事もあり、多くの好気性分解菌が報告されている[1,2]。それにも関わらず、それらの微生物が単離された土壤中BHCが速やかに分解された例や、単離された微生物を土壤に接種することによりBHCの分解を促進できたと言う例は報告されていない。一般的に、農薬の残留した土壤にその農薬の分解菌を接種して農薬を分解できたという報告がほとんど見あたらないのはこの問題点に由来していると思われる。

この点を克服することは、それ自体が大きな課題であるだけでなく、農薬分解菌を用いて土壤中での農薬の挙動を制御したり、農薬で汚染された土壤の微生物浄化を行う試みの成否の鍵を握っていることになる。このため筆者は、 γ -BHC運用区土壤から γ -BHC分解菌の単離を行う前に、 γ -BHCの消失が主として微生物分解によるものであることを確認し、さらに単離すべき分解菌のおおまかな性質を一連の室内モデル実験によって確認した上で分解菌の単離を行った。さらに、単離した γ -BHCの分解菌の菌数を圃場において経時的に計数すること、分解菌を γ -BHCの分解が遅い土壤に接種することにより γ -BHCの分解が促進されるかどうかを確認する実験を行った。その結果、土壤環境中で実際に γ -BHCを速やかに分解できることのできる確かな分解菌を得ることができ、土壤中での農薬の制御やBio-remediationに対して実現可能な展望が開けたと言える。もちろん、これを実際に行うにあたっては、微生物を大量に環境中に放出するわけであるから、接種微生物の接種後の挙動、環境への影響評価、人体や動物への安全性評価、分解代謝産物の確認等を行っておくことが必要であるのは言うまでもない。

3.3 Bio-remediationを成功させるには

野外環境に拡散した環境汚染物質をその分解微生物を用いて浄化しようとする試み、いわゆるBio-remediationの手法が世界的に注目されており、研究が進められている[7]。有害廃棄物などに汚染された土壌のBio-remediationによる浄化も、ペンタクロロフェノール[3]、クレオソート[4]、揮発性炭化水素[5]などで試みられている。筆者の研究から、これを成功させるために考慮しなければならないと考えられる点を、微生物の生態の側面から述べてみたい。

①導入される微生物は、その導入環境に適応できる物である必要がある。

例えば、大腸菌は組換えDNA微生物の宿主としてしばしば用いられ、環境汚染物質分解能を付与することは可能であろうが、これを自然環境中に放出した場合には、極めて速やかに死滅する[6]。腸内と自然環境とは、その物理化学的環境や栄養環境があまりにもかけ離れているためにこれはむしろ当然と言える。このような極端な場合で無くとも、自然環境に普遍的にみられる微生物を用いる場合でも、同様の事が言える場合がある。一般に自然環境から単離されるとされている微生物でも、さらにミクロに見れば実は環境中の特有な部位に生息している場合がある。土壌系では、根圏や根面、植物残渣、粘土鉱物表面[8]、土壌団粒[9]などがその特有な部位に相当する。一方、自然環境中に微生物が導入される場合、必ずしもそのような部位が用意されているとは限らないし、用意されているとしてもそこに菌体が到達できるとは限らない。このように導入微生物が生息するには特有な部位が必要とされる場合、やはり導入環境に適応できない事が予想される。

②分解能を自然環境下で発現できることが必要である。

これまでも述べてきたように、例えば農薬分解菌の研究の多くは、実験室内の培養条件下で農薬分解能が確認されたものの、自然環境下でもそれが発現しているかどうかは未確認な場合が多かった。このような例の一つに、co-metabolismによる農薬分解がある。この場合、農薬分解菌を自然環境中に導入して目的の農薬を分解しようとする時に別の有機物の存在が必要となるが、土壌系や水系などは極めて貧栄養な環境であるために、導入菌が利用できるような余分な有機物は存在しないのが一般的であろう。また、存在していても、それは他の微生物の基質ともなり得るため、競争が生ずることになろう。従って、菌体の導入と同時にco-metabolismを行わせるための有機物を大量に投与することが必要となる。

③目的の化合物を炭素源として資化・分解できることが有利。

浄化したい化合物を炭素源として資化・分解できる場合には他の有機物を与え

る手間は省けることになり、Bio-remediationにとっては極めて有利である。また、この場合には、浄化したい化合物を基質として増殖し、基質を消費し尽くして生残期に達したときには浄化が終了したことを意味しているので、①に述べたような生息部位については考慮しなくても良いことになる。ただし、分解能の程度によっては大量の菌体を長期間目的とする部位に生残させなければならない必要がでてくることも考えられる。その場合には、分解能を強化することと生息部位を与えてやる必要があるだろう。

Bio-remediationを目的として微生物を探索したり、組換えDNAの手法によって育成する場合には、上記の点を考慮に入れればより有効であり、実現性が高いと考えられる。

第3章の引用文献

- [1] Matsumura, F., Benezet, H.J., and Patil, R.C. (1976) *J. Pesticide Sci.* 1, 3-
- [2] 鎌塚昭三 農薬の土壌および土壌微生物における分解 In: 農薬—デザインと開発指針 pp.539-575 ソフトサイエンス社
- [3] Middleton, A.C. (1983) Land disposal and spill site environments. In: Genetic control of Environmental pollutants. Ed. Owen, G.S. and Hollaender, A. pp.137-148, Plenum Press, London
- [4] Linkenheil, R. (1988) On-site biological treatment of Creosote-contaminated soils. In: Reducing risks from environmental chemicals. Ed. Owen, G.S. pp.454-455 Plenum Press, London
- [5] John, W.D., and Sikes, D.J. (1988) Complex industrial waste sites. In: Environmental Biotechnology. Reducing risks from environmental chemicals. Ed. Owen, G.S. pp.237-252 Plenum Press, London
- [6] 組換え体の環境影響分析に関する基礎調査(その2) 昭和59年度環境微生物基礎調査報告書 pp.20-26 三井情報開発株式会社
- [7] Bewley, R.J.F. (1992) Bioremediation and waste management. In: FEMS symposium No.63, The release of genetically modified microorganisms—Regem 2 pp.33-46 Ed. Stewart-Tull, D.E.S., and Sussman, S. Plenum Press, New York
- [8] Emerson, W.W. The structure of soil crumbs. *J. Soil Sci.* 10, 235-244
- [9] Hattori, T. The microenvironments of microbes in the soil (2): aggregate level. In: Microbial life in the soil. pp.263-312 Marcel Dekker, New York

第4章 第II部のはじめに

4.1 これまでの土壌微生物研究の主流

これまでに土壌微生物学においては膨大な知見が蓄積されてきたが、それらは大まかには次のように分類される[1,2]。

①土壌微生物の群集全体の量とその大まかな中身を解析するもの：土壌微生物バイオマス、微生物フロラ（糸状菌、放線菌、孢子形成細菌、グラム陰性菌、グラム陽性菌）の研究がこれに相当する。前者は作物の養分のプールとして、後者は土壌微生物の群集構造の一つの指標として重要なものであった。

②土壌微生物の特定群集の機能を解析するもの：土壌中での硝化、脱窒、窒素固定、有機物分解、水田土壌の生化学反応（硝化、脱窒、Mn還元、Fe還元、硫酸還元、メタン生成など）などがこれに相当する。これらは土壌中での作物養分の動態や、水田土壌の還元過程の発達と関連した物である。

③土壌微生物の特定微生物種の機能とそれを規制する要因を解析するもの：作物にとって有用なあるいは有害な微生物の機能と作物生産との関わりを研究するものである。窒素固定菌、VA菌根菌、土壌病害菌、根圏微生物の研究などが相当する。

これら数多くとり行われてきた土壌微生物研究を生態学として眺めてみると、少なくとも上に記した①と②は、土壌微生物全体を1つの集団あるいは数種の群集の集合体としてとらえるもの、または特定の群集の機能を重点的に解析するいわゆる「群集生態学」であるということが出来る。また、③について個々の微生物の挙動よりもむしろ微生物が有効に機能する（あるいは機能しない）土壌環境や作物との相互作用の解析が主であった。

4.2 土壌微生物のオートエコロジー（個生態）研究の必要性

生態学には上に述べたような「群集生態学(synecology)」に対して「個生態学(autealogy)」という分野が存在する。これは、群集生態学が生物種概念をあまり問題とせず、群集の構造や機能を解析するのに対し、個々の生物種を対象としてとりあげ、その増殖・死滅・生残状況やそれに関わる因子、生息環境、他の生物種との相互作用などを明らかにしようとするものである[3]。

土壌微生物の生態に関する研究においては、後に述べるような手法上の問題点

があつて、この個生態学的な研究はこれまであまり行われてこなかった。しかしながら、近年の土壤微生物学を取り巻く状況から、個生態学的研究の必要性は極めて高いものとなっている。それは以下のような状況である。

①組換えDNA微生物(GEMs)の自然環境下への導入利用の機運がたかまっている[4-9,21]。

組換えDNAの手法を用いてある特定の機能を付与された微生物を作物生産、環境浄化、鉱工業生産、排水処理などの現場に導入し、有効利用しようとするものである。この際、目的とする効果を有効に発揮させるために、また、環境に対する安全性を評価するためには、導入された微生物の環境中での挙動、他の生物との相互作用、導入した遺伝子のfateなどを明らかにしておくことが必要となる。これらはまさに導入微生物の個生態学的な情報が必要とされていることに他ならない。

②農業分野では既に有用微生物の接種利用が図られている[10,11,22]。

農業現場では作物生産にとって有用な機能をもった微生物を選抜し、土壤に接種して生産向上を図る試みが古くからなされている。根粒菌(Rhizobium)、リン溶菌、VA菌根菌などが代表的なものであり、その他にも蛍光性Pseudomonas、Agrobacterium、土壤病害菌の拮抗微生物などが試みられている。また、含まれている微生物によるとされる種々の効果がうたわれた微生物資材が市販されている。

これらのうち根粒菌など一部については目的とする効能が確かに得られ、広く実用化されて、生産・流通組織も確立しているが、大部分の物は期待した効果が安定的に得られるまでには至らず、中にはあやしげなものも存在しているのが実状である。そして、期待した効果が得られない大きな原因は接種菌が土壤の土着菌と競合関係にあるために土壤に定着できないためであろうと推定されている。

このような状況を打開して、有用微生物の安定で効果的な利用を成功させるには、土壤に接種された微生物の挙動を解析し、微生物の生残・死滅・定着・機能の発現を規制する要因を明らかにして、それらをコントロールできる技術を確認することが必要となる。現在実用化されている根粒菌についても実はこの点に関する詳細な知見はむしろ少なく、現場技術が先行している感がある。また、この様な知見は①で述べたGEMsの有効利用のためにも必要となることは言うまでもない。

③土壤微生物生態学の基礎的知見として

①と②で述べたのは土壤に外来の微生物のオートエコロジーであるが、土壤に元来生息している微生物についてそのオートエコロジーを解明し、知見を集積することももちろん重要である。不均一な土壤構造の中で環境の変動に常にさらされながら生息している土壤微生物の生活環において、個々の微生物種が生息する

微細環境の性質やある機能を発現する微細環境条件の解析は、とりわけ土壤に特有な事項であるにもかかわらず、現在の土壤微生物学で解明の遅れている部分であると思われる。このような知見はもちろん応用的にも重要であり、例えば土壤病害菌に対して拮抗微生物が拮抗作用を示す「場所」と「タイミング」を個生態学的に捉えておけば、応用技術を開発する場合にも有効となろう。

4.3 オートエコロジー研究のために必要な「検出・計数技術」

特定種の微生物の生態を問題にするオートエコロジー研究に必須なのは、狙いとする微生物種を選択的に検出・計数する技術である。土壤微生物に関しては、硝化菌、鉄酸化細菌、メタン生成菌などの特定の機能を持つ微生物群は、その機能に即した培地を用いた培養法によって群集全体の計数は可能であった。また、青枯れ病菌、軟腐病菌などある種の土壤病害菌についてはそれを選択的に計数する選択培地が考案されてきた[12]。しかし、一般的には土壤微生物の特定種を計数する技術は確立されておらず、従来の土壤微生物学で個生態学的な研究が進展しなかったのは、この技術が不十分であったからに他ならない。

この状況を打開するさざしが見えたのはGEMsの野外導入の機運にともなった計数技術の開発である。4.2で述べたように、GEMsの自然環境への導入にあたっては、その効果や安全性評価の側面から、導入した微生物のfateを追跡する、すなわち導入微生物を検出・計数することが必然的に求められることとなる。そのために、DNAプローブ法、蛍光抗体法、マーカー導入法（薬剤耐性、*LucZ*、*lux*、重金属耐性など）[13-17]などが開発され、ある程度の成果を挙げている。ただし、これらの方法は主として導入微生物の検出用に開発された物であり、これを直ちに土壤に元来生息している微生物の検出・計数に用いるにはまだ問題が残されている。例えば、マーカー導入法は土着微生物の検出には使えないし、蛍光抗体法は選択性と感度の点で不十分である。近年、細菌の16SrRNAの種特異的な配列の部分を探るプローブとしたDNAプローブ法が環境微生物の検出に利用され始めており、土壤微生物の検出にも有望であると思われる。[18-20]

4.4 オートエコロジー研究のモデル微生物としての γ -BHC分解菌

以上に述べたような状況から、土壤環境に人為的に導入された微生物ならびに土壤にそもそも生息する微生物の両者の個生態に関する知見の集積は極めて重要

であるといえる。そして、筆者が第I部において取得した γ -BHC分解菌はこの両者について1つの事例を示すことの出来る有望な菌株であることが期待された。それは以下の理由による。

①土壤中の γ -BHC分解菌の検出・計数が容易に行える。

筆者が取得した γ -BHC分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* は、 γ -BHCを唯一の炭素源として好氣的に資化・増殖できるという極めて稀な性質を有している。そこで、この好氣的 γ -BHC分解能をマーカーとして利用し、 γ -BHCを唯一の炭素源とする合成培地を用いたMPN法により土壤中の本菌株の菌数を高感度で簡便に計数することが出来る。BHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌の計数については既に2.3で示した。土壤に接種された *S. paucimobilis* SS86株の計数については第5章で述べることになる。

②土壤に接種した場合と土壤に土着の場合の両方のオートエコロジーを解析できる。

2.3で述べたように、農業長期連用圃場の γ -BHC連用区土壤にはこのBHC分解菌が年間を通じて生息しており、 γ -BHCを年1回土壤に投与している限りは土壤微生物の一員となっていると考えられる。一方、やはり2.3に示したように同じ圃場内の、 γ -BHCを含め農業を全く投与しなかった対照区土壤からはBHC分解菌は検出されない。従って、この土壤に *S. paucimobilis* SS86株を接種してMPN法により接種菌のみを計数することが可能となるはずである(第5章)。以上の事から、土着菌の場合と接種菌の場合の両方について γ -BHC分解菌を用いてオートエコロジーが比較解析できると考えられる。この、「接種菌と土着菌の生態の比較」はこれまでに研究例がなく、有用微生物の野外放出利用と土壤微生物生態の基礎的研究の両面に対して有益な知見を与えることが期待される。

以上のような背景と考え方を基にして、本論文の第II部を展開する。まず、 γ -BHC分解菌の土壤からの検出・計数方法を検討し(第5章)、それを用いて γ -BHC分解菌が土壤に土着の場合と接種された場合の挙動の概要を比較・調査する(第6章)。そして、両者の土壤中での死滅要因(第7章)と、土着菌の一部のみが死滅を免れて長期生残できる要因(第8章)を解析し、 γ -BHC分解菌についてのオートエコロジーを構築して他の事例への拡張を試みる(第9章)。

第4章の引用文献

- [1] 土の微生物 土壤微生物研究会編 博友社 (昭和56年)
- [2] Lynch, J.M. 土のバイオテクノロジー (丸本、佐藤、金沢、渡辺共訳) 博友社 (昭和60年)
- [3] 辻 堯 組換えDNA生物の環境放出と生態学。 In:組換えDNA技術の安全性 p.156 中村桂子、加藤順子、辻 堯 講談社(1989)
- [4] Committee on the Introduction of Genetically Engineered organisms into the Environment (1987) Introduction of recombinant DNA-engineered organisms into the environment: Key issues, National Academy Press, Washington, D.C.
- [5] Straus, H.S., Hattis, D., Page, D., Harrison, K., Vogel, S. and Caldart, C. (1986) Genetically-engineered microorganisms. II. Survival, multiplication and genetic transfer, *Recomb. DNA Tech. Bull.*, 9, 69-89
- [6] Regal, P.J. (1989) Models of genetically engineered organisms and their ecological impact. *Recomb. DNA Tech. Bull.*, 10, 67-85
- [7] Dowsh, K.H., Driesel, A.J., Goebel, W., Andersch, W., Lindenmaier, W., Lota, W., Rober, H. and Schmidt, F. (1988) Consideration on release of gene-technologically engineered microorganisms into the environment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53, 261-272
- [8] Keeler, K.H. (1988) Can we guarantee the safety of genetically engineered organisms in the environment? *CRC Crit. Rev. Biotech.*, 8, 33-84
- [9] Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Mack, R. N. and Regal, P.J. (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms. Ecological consideration and recommendations. *Ecology*, 70
- [10] 梅谷献二、加藤肇編 (1990)、農業有用微生物—その利用と展望—。農林水産省農業研究センター、養賢堂
- [11] 岸國平、大畑貫一編 (1986)、微生物と農業—農業の未来を開く微生物—。全国農村教育協会。
- [12] 土壤微生物研究会編、新編土壤微生物実験法 (1992)。養賢堂
- [13] McCormic, D. (1986) Detection technology. The key to environmental biotechnology. *Bio/Technology*, 4, 419-422
- [14] Levin, M.A., Seidler, R., Borquin, A.W., Fowle, J.R. III and Barley,

- T. (1987) EPA developing methods to assess environmental release. *Bio/Technology*, 5, 38-45
- [15] Jain, R.K., Burlage, R.S., and Sayler, G.S. (1988) Method for detecting recombinant DNA in the environment. *CRC Crit. Rev. Biotech.*, 8, 85-97
- [16] Saunders, J.R., and Saunders, V.A. (1993) Genotypic and phenotypic methods for the detection of specific released microorganisms. In: *Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment*. pp.27-60 Ed. Edward, C., WILEY
- [17] Pickup, R.W., and Saunders, J.R. (1990) Detection of genetically engineered traits among bacteria in the environments. *Tibtec*, 8, 329-335
- [18] Giovannoni, S.J., DeLong, E.F. Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1988) *J. bacteriol.*, 170, 720-726
- [19] DeLong, E.F., Wickham, G.S., and Pace, N.R. (1989) *Science*, 243, 1360-1363
- [20] 小柳津広志 (1992) 16SリボソームRNAの塩基配列による細菌の同定と細菌相の分析、*微生物の生態* 18、p.51、日本微生物生態学会編、学会出版センター
- [21] 合衆国議会技術評価局編、都留信也・辛島恵美子監訳 遺伝子工学生物の野外試験 東京書籍
- [22] 本間善久 (1991) 拮抗微生物による土壌病害の生物的防除 *化学と生物* 29, 503-509

第5章 γ -BHC分解菌の土壌からの 検出・計数方法の検討

第4章に述べたように、 γ -BHC分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* SS86 は、土壌に導入された微生物ならびに土壌に土着の微生物のオートエコロジーを研究するモデル微生物として有望である。しかし、SS86株が研究材料として使えるためにはあらかじめ検討しておかなければならない事柄がいくつかある。それは次の様なものである。①土壌中のSS86株を計数・検出するためのマーカーとなる γ -BHC分解能が、安定に保持されており、容易に脱落することは無いかどうか。② γ -BHC分解能をマーカーとして土壌中のSS86株が低い菌数レベルまで正確に計数できるかどうか。③土壌に接種されたSS86株が研究を遂行するのに必要な程度の期間生存できるかどうか。

本章ではこれらの点について検討した結果について述べる。

5.1 SS86株における γ -BHC分解能の安定性

<目的>

Sphingomonas paucimobilis SS86 を上記の目的に利用するためにはSS86株の γ -BHC分解能が菌体に安定に保持されていることが必要条件となる。細菌における難分解性化合物分解能はプラスミド上にコードされていることがあり、それは菌体の培養条件によってはしばしば脱落することが知られている。ここでは薬剤処理および栄養培地での継代培養によりSS86株からの γ -BHC分解能のCuringを試み、分解能の安定性を調べた。

<方法>

(1) 薬剤処理によるCuring

Curing剤としてアクリジシオレンジ(AO)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、マイトマイシンC(MC)の3種類を用いた。これらの薬剤をL-brothに以下の濃度段階に添加した。

AO:1, 5, 10 μ g/ml

SDS:1, 5, 10 μ g/ml

MC:0.01, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/ml}$

これらの濃度段階は予備実験としてSS86株に対するこれらの薬剤の最小阻止濃度(MIC)を調べた結果から設定した。10mlのL-brothを中型試験管に入れ、シリコ栓をしてオートクレーブ滅菌しておき、上記の薬剤の水溶液を0.22 μm のミリポアフィルターを通過させて除菌したものを適量添加して薬剤を含む培地を調整した。

L-broth中30°CでSS86株を振とう培養し、O.D.が約0.2になった時に培養液の0.1mlをこれらの培地に添加し、30°Cで振とう培養を行った。O.D.が約0.5になった時に培養をやめ、培養液を滅菌NaCl水(0.8%)で10倍ずつ希釈し、別に用意したL-broth寒天培地上に塗抹し、30°Cで培養した。約1週間の培養でコロニーが形成された後、寒天培地の表面に γ -BHCのエーテル溶液(約10%)をスプレーで噴霧し、引き続き約1週間培養を行った。培養後、周囲にクリアゾーンを伴ったコロニー(BHC⁺)と伴わないコロニー(BHC⁻)の数をそれぞれカウントし、 γ -BHC分解能の消去率を算出した。

(2) 継代培養によるCuring

10mlのL-brothを中型試験管に入れ、オートクレーブ滅菌しておく。この培地中でSS86株を30°Cで振とう培養し、O.D.が約0.5(約 10^8 cells/ml)になった時に培養液10 μl を次の培地に植菌した。これを再び30°Cで振とう培養し、植菌を繰り返した。この操作を10回繰り返す。それぞれの培養ごとに培養液0.1mlを採取し、滅菌NaCl水で希釈し、(1)と同様にL-broth寒天培地にひろげ、培養後、 γ -BHC-エーテルスプレー法によりBHC⁺とBHC⁻を計数し、消去率を算出した。

<結果>

3種類の消去剤により γ -BHC分解能を失った株が出現したが、その頻度は低いものであった(表5-1)。また、継代培養法によっても分解能消去株が出現し、植え継ぎを繰り返すにつれて消去株の存在割合が上昇した(図5-1)。これらの結果はSS86株の γ -BHC分解系遺伝子の少なくとも一部はプラスミドにコードされている可能性を示唆している。

ところで、SS86株の分解能が高頻度で脱落するのであれば γ -BHC分解能をマーカーとして用い、土壌など自然環境中でのSS86株の挙動を追跡することは不可能となる。継代培養実験において3回の植え継ぎによって初めて γ -BHC分解能消去株が出現し、おそらくは消去株の方が増殖速度が速いため植え継ぎを繰

表5-1 Curing of HCH⁺ of *P. paucimobilis* SS86 with various agents.

Curing agents	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	HCH ⁻ /total colonies	Curing rate (%)
AO	10	122/1,488	8.2
	5	2/1,062	0.19
	1	1/905	0.11
SDS	10	50/980	5.1
	5	26/359	7.2
	1	65/1,232	5.3
MC	0.1	16/309	5.2
	0.05	144/1,075	13.4
	0.01	40/440	9.1

AO, acridine orange; SDS, sodium dodecylsulfate; MC, mitomycin C.

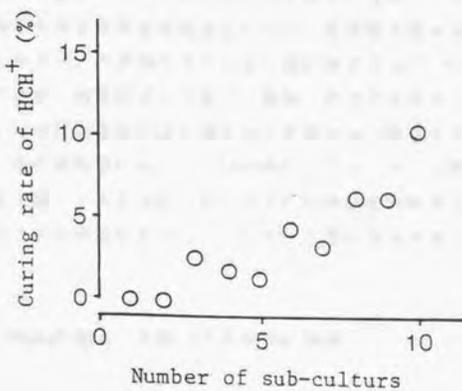


図5-1 Curing rate of HCH⁺ in *P. paucimobilis* SS86 by sub-culturing.

り返す事に消去株の存在割合は上昇したが、10回の植え継ぎを繰り返しても消去株の存在割合は約10%であった。培養の開始時と終了時の菌密度を考慮すると1回の植え継ぎでSS86株は約10回の分裂を行っていることになり、この事から、栄養培地中で約100回もの分裂を繰り返しても分解能消去株の存在割合は10%程度であるといえることができる。SS86株の土壤環境中でのdoubling timeは不明であるが、一般的に土壤微生物の土壤中でのdoubling timeは非常に長く、地温25°Cの条件下で平均9.6日とされている[1]。従って、土壤微生物の1年間の土壤中での分裂回数はせいぜい数10回であると考えられ、SS86株が土壤中で分裂回数を著しく重ね、高頻度で γ -BHCを失うことは考えにくい。また、一般に特定の化合物の分解能がプラスミドにコードされている場合、その化合物を含む培地で菌体を培養すると分解能は脱落しにくく、化合物を含まない栄養培地で培養すると脱落しやすいことが知られている。後に示すように、SS86株が非滅菌土壤に接種されたとき、同時に γ -BHCを添加したときのみSS86株は増殖を示し、 γ -BHC無添加の場合には土壤水分の変動が無い限り増殖を示さない。従って今後行う一連の実験系において、SS86株から γ -BHC分解能が高頻度で脱落することはまず無いと考えられ、 γ -BHC分解能はSS86株の土壤環境中での挙動を追跡するときの有用なマーカーとなりうる事が示された。

5.2 土壤中のSS86株の検出—土壤の分散条件の検討

<目的>

土壤に存在する細菌の多くは土壤粒子の表面や土壤団粒の表面または内部に吸着されていることが知られている[2,3]。そのため、MPN法やプレート法によって土壤細菌を計数する場合、ブレンダーや超音波を用いて細菌菌体を十分に分散させた後に計数の操作に供するのが通常である[4,5]。さもなければ菌数を実際よりも低く見積ることになってしまう。対照区土壤に接種されたSS86株も接種後時間を経るにつれて土壤に吸着されていく可能性がある。そこで、対照区土壤に接種されたSS86株について、MPN法による計数を行う際の土壤の分散条件を決定する検討実験を行った。

<方法>

土壤：農業長期運用圃場の対照区の表層(0-10cm)から採取し、風乾する事なく2mmのふるいを通過させ、供試土壤とした。

土壌への γ -BHCの添加: セライト増量法により $10\mu\text{g/g soil}$ の γ -BHCを土壌に添加した。

SS86株の接種: L-brothで前培養(30°C、振とう培養)した。O.D.が約0.2となった時に速心集菌し、滅菌蒸留水で洗浄した後、滅菌蒸留水中に懸濁した。これをガラス製噴霧器を用いて土壌に噴霧し、土壌をよく攪はんして均一に接種した。土壌と菌体懸濁蒸留水との割合は10:1(w/w)とし、この接種によって土壌水分が最大容水量の60%(60%WHC)となるように、接種前に土壌を少し乾燥させておいた。

土壌のインキュベーション: γ -BHCを添加し、SS86株を接種した土壌30g(乾土相当)を50ml容ビーカーに入れ、中央部に水分補給用のガラス管を立て、アルミホイルでビーカー上部をゆるやかに覆い、30°Cの恒温室内でインキュベーションを行った。

土壌の分散: インキュベーション直後、11日後、27日後に土壌中のSS86株のカウントを行った。カウントに先立ち、土壌の分散を次の要領で行った。

(A) ワーリングブレンダーによる分散・・・土壌10g(乾土相当)をワーリングブレンダー(佐久間、モデル500C)のカップにとり、無機培地90mlを加え、18000rpmで攪はんした。攪はん時間は30秒、1分、2分、3分、5分の5段階を設定した。

(B) タッチミキサーによる分散・・・土壌1gを試験管にとり、無機培地9mlを加え、タッチミキサーで内容物を攪拌した。攪拌時間は30秒、1分30秒、3分、5分の4段階設定した。

(C) 往復振とう機による分散・・・土壌10gを坂口フラスコにとり、無機培地90mlをいれ、往復振とう機(140往復/分)で10分間振とうを行った。

以上の分散は基本的に無機培地を用いて行ったが、土壌からの菌体の分散に効果的であると報告されているトリス緩衝液(0.01M, pH7.0)およびピロリン酸ナトリウム溶液(0.005M, pH7.0)[6]もワーリングブレンダー2分攪拌区において使用した。

MPNカウント: 上記の方法で分散を行った土壌懸濁液を無機培地で10倍ずつ希釈した。過飽和の γ -BHCを含む無機培地2mlを小型試験管に入れ、各希釈段階から希釈懸濁液を1mlずつ5本の試験管に加えた(10倍希釈5連法)。これらの試験管を30°Cで2週間振とう培養した。培養後、 γ -BHCの分解に

より培地中に生成した塩素イオンの有無をチオシアン酸水銀法[17]により定性的に判定し、最確値表から供試土壌中のSS86数を算出した。

<結果と考察>

得られた結果を表5-2に示した。

接種直後の計数ではどの分散方法を用いても計数値には大きな差はなかった。接種に用いたSS86株の蒸留水懸濁液中の菌数をL-broth 寒天プレートを用いて計数したところ、土壌への接種菌数は 1.3×10^4 cells/g soilであり、MPN法による計数値に近いものであった。

これに対し、接種1日後の計数においては、ワーリングブレンダーで1分間の分散を行った場合に最大菌数が得られ、タッチミキサーや往復振とう機による弱い分散を行った場合にはそれよりも低い計数値が得られた。ワーリングブレンダーで3分間以上の分散を行うと計数値は1分の場合よりも低くなったが、これは強い分散を継続したために菌体が損傷され、死滅したものと思われる。

接種27日後にはこれらの傾向はさらに強まった。

なお、SS86株菌数は接種1日後には 10^8 cells/g soilのレベルまで増殖し、27日後には 10^4 cells/g soilのレベルへと減少した。

また、分散剤として、無機培地の代わりにトリス緩衝液やピロリン酸ナトリウムを用いても計数値に大きな差異はなかった。

以上の結果から、対照区土壌に接種されたSS86株の計数を行うにあたっては、接種後のどの時期においても、無機培地を分散剤とし、ワーリングブレンダー1分の処理を施した後にMPNカウントを行えば最大菌数が計数されることがわかり、以後の実験においてはこの分散条件に従うこととした。

ここで、接種直後には、往復振とう機やタッチミキサーを用いた弱い分散方法によってもSS86株はほぼ完全に回収、計数されたのに対して、接種後1日及び27日にはSS86株の最大計数値を得るために比較的強い分散方法が必要であったことが注目される。SS86株は接種直後には土壌粒子や土壌団粒からフリーな状態で存在していたが、土壌中でγ-BHCを資化して増殖する間に土壌粒子や土壌団粒に吸着された、あるいは団粒内部に進入した可能性が示唆される。

5.3 土壌に接種されたSS86株の検出—選択性と検出感度の検討

Table 5-2 MPN counting of *P. paucimobilis* SS86 inoculated into soil.

Dispersion method	Days after inoculation		
	0	11	27
Blender			
30 s	3.7×10^4 (cells/g soil)	1.4×10^8	5.5×10^4
1 min	2.4×10^4	3.7×10^8	8.4×10^4
2 min	7.6×10^3	1.4×10^8	7.6×10^1
2 min ^a	3.0×10^4	1.4×10^8	3.7×10^4
2 min ^b	1.3×10^4	8.4×10^7	8.4×10^4
3 min	2.3×10^4	1.2×10^7	7.0×10^1
5 min	1.3×10^4	1.2×10^7	5.1×10^1
Touch mixer			
30 s	4.9×10^4	3.4×10^7	1.7×10^2
1.5 min	6.5×10^4	5.5×10^7	2.2×10^2
3 min	3.0×10^4	2.5×10^8	7.2×10^4
5 min	1.6×10^4	1.4×10^8	5.1×10^1
Mechanical shaker			
10 min	1.8×10^4	1.1×10^7	1.2×10^2

All the soils were dispersed with the basal mineral medium except ^a (Tris buffer) and ^b (sodium pyrophosphate). Inoculation density of *P. paucimobilis* SS86 was 1.3×10^4 cells/g soil. Factor for 95% confidence limit is 0.33 (Alexander 1982).

<目的>

γ -BHC分解能をマーカーとし、MPN法を用いて非滅菌土壌中のSS86株を計数する場合、SS86株のみを選択的に計数しているかどうか、また、低い菌数レベルの場合にも正確に計数されているかが問題となる。この点を確認するために対照区土壌に種々の菌数レベルのSS86株を接種し、接種後直ちにMPN法により計数を行い、接種菌数を反映した正確な計数値が得られるかどうかを調べた。

<方法>

5.1と同様の方法で、前培養したSS86株の滅菌蒸留水懸濁液を作製した。これを適宜希釈したものを対照区土壌に接種し、接種菌数レベルが $10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^5, 10^7$ cells/g soilとなるようにした。接種後直ちに5.2で決定した方法でSS86株の計数を行った。

これとは別に、接種に用いた菌体懸濁液中のSS86株菌数をL-broth寒天培地によるプレートカウントならびに γ -BHC添加無機培地を用いたMPN法により計数した。

<結果と考察>

得られた結果を表5-3に示した。どの接種菌数レベルにおいても、接種菌体液をプレートカウントした値、接種菌体液をMPNカウントした値、ならびに土壌に接種された菌体をMPN法によってカウントした値はよく一致していた。さらに、SS86株を接種しなかった場合には土壌からのバックグラウンドとしての値は検出されなかった。これらの結果から、ここで採用したMPN法より、土壌に接種されたSS86株は選択的、高感度(数cells/g soil)、かつ正確にカウントできることが確認された。検出感度については、必要な場合には、希釈倍率と1希釈段階あたりの培養数を変更することにより、理論的にはさらに向上させることも可能である[7]。

5.4 非滅菌土壌に接種されたSS86株の挙動

このMPNカウント法を用いて、対照区土壌に接種されたSS86株の菌数の変動を室内系実験において実際に調査し、その生残が研究を行うに適正な期間認められるかどうかを調べた。

Table 5-3 Recovery of *P. paucimobilis* SS86 inoculated into soil.

Inoculation density ^a (plate counting) (CFU/g soil)	Inoculation density ^b (MPN counting) (cells/g soil)	Recovery from soil ^b (MPN counting) (cells/g soil)
7.6×10^7	1.1×10^8	1.7×10^8
7.6×10^6	6.3×10^7	6.8×10^7
7.6×10^5	1.2×10^7	1.7×10^7
7.6×10^2	3.4×10^2	5.9×10^2
7.6×10^1	2.7×10^1	8.8×10^1
7.6	4.5	5.6

^a CV=24.3%. ^b Factor for 95% confidence limit is 0.33 (Alexander 1982).

<方法>

土壌: 農業長期連用圃場の対照区土壌を用いた。圃場の表層10cmから採取し、風乾する事なく2mmのふるいを通して実験に供試した。この土壌にセライト増量法により γ -BHCを添加(10 μ g/g soil)した。

SS86株の接種: L-broth で前培養、集菌洗浄し、滅菌蒸留水に懸濁したものをスプレーを用いて土壌に噴霧し、均一に混合した。接種菌数は約10⁴ cells/g soilとした。

土壌のインキュベーション: 土壌30g を50ml容ビーカーに入れ、中央部に水分補給用のガラス管を立て、アルミホイルで軽く蓋をして、30°Cの恒温室内に保温静置した。土壌水分は60%WHCに保持した。

SS86株のカウント: インキュベーションした土壌を経時的に取り出し、MPN法により土壌中のSS86株菌数を計数した。

<結果と考察>

S. paucimobilis SS86菌数の経時的变化を図5-2に示した。約10⁴ cells/g soil接種されたSS86株は、添加された γ -BHCを資化して増殖し、1日後に最大菌数(約10⁸ cells/g soil)に達した。その後菌数は減少に向かった。菌数が約10⁴ cells/g soilとなった3日後に γ -BHCを再び土壌に添加(10 μ g/g soil)すると、SS86株は再び増殖し、最大菌数に達した後減少に向かった。

ここで、土壌に接種したSS86株が増殖を示したことは、土壌に γ -BHCを添加していることから至極当然の事のように感じられるが、土壌に接種した微生物を土壌中で増殖させることに成功した事例はむしろ少ない。

土壌に導入された微生物の生残性については、GEMsの挙動の観点からいくつかの研究がなされており、種々の微生物について土壌への接種後のfateが室内モデルで調べられている[8-12]。その大部分においては接種後増殖を示す事なく緩やかにまたは急速に減少に向かっており、増殖を示すのは土壌にグルコース等の基質を添加した場合[13]、あるいは、幾分乾燥した土壌に菌体を接種し、その後土壌水分を増加させた場合[14]に限られる。植物根からの分泌物を資化出来るように遺伝子組換えされた*Pseudomonas*[15]を根圏土壌に接種したり、多様な基質を資化出来る*Pseudomonas*を接種菌として用いた例[16]もあるが、いずれも生残性を高めることには成功していない。SS86株の場合も、 γ -BHCを添加しない土壌に接種された場合には増殖を示す事なく、速やかに死滅に向かうことが西山に

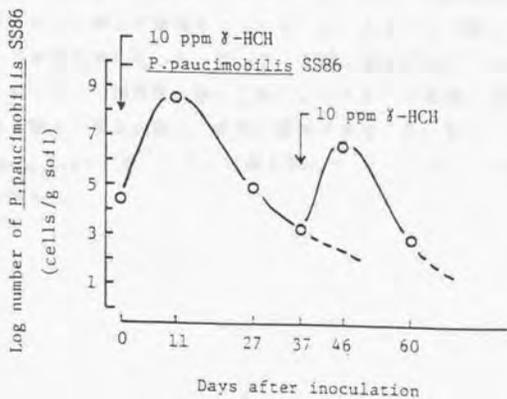


Fig 5-2 Chase in the number of *P. paucimobilis* SS86 inoculated into soil.

よって確認されている（第6章）。

いずれにせよ、土壤に接種されたSS86株は、土壤に γ -BHCを添加することにより増殖させることができ、その後数週間生残することができた。また、菌数が減少した時に再び γ -BHCを土壤に添加することにより再増殖させ、生残期間を延長させることができた。このことは、土壤中のSS86株の増殖を γ -BHCを基質として用いることによりコントロールできることをも意味しており、SS86株を用いて土壤微生物の生態の研究—増殖・生残・死滅状況とそれらを規制する要因の解析—を行うにあたってきわめて有利な性質であると言える。

以上、本章に述べた結果から、土壤中に存在する γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* SS86は、その菌数を選択的・高感度・正確に計数することができること、土壤に接種されたSS86株は、数週間生残でき、 γ -BHCを選択的基質として土壤に添加することによりその増殖をコントロールできるという極めて稀な性質を持っていることが明らかになった。従って、土壤に導入された *S. paucimobilis* SS86ならびに γ -BHC運用区土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の挙動とそれを規制する要因が極めて詳細に解析できることになり、 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*を材料として土壤微生物のオートエコロジーを研究する道が開けたことになる。

第5章の引用文献

- [1] Domsch, K.H., Jagnow, G., and Anderson, T.H. (1983) An ecological concepts for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Reisdue Reviews*, 86, 65-105
- [2] Hattori, T. (1965) Microbial distribution and its variation in soil aggregates. *Jpn. J. Soil. Sci. Plant Nutr.*, 37, 302-304
- [3] Hattori, T. (1977) Microbial habitat in soil. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 11, 24-29
- [4] Ramsay, A.J., (1984) Extraction of bacteria from soil: Efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 475-481
- [5] Ozawa, T., and Yamaguchi, M., (1986) Fractionation and estimation of particle-attached and unattached Bradyrhizobium japonicum strains in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 911-914
- [6] 実験農芸化学(上) p.306 東京大学農学部農芸化学教室編 朝倉書店 (1978)
- [7] Alexander, M. (1982) Most probable number method for microbial populations. In: *Methods of soil Analysis, Part 2*, Ed. Page, A.L. Miller, R.H., and Keeney, D.R., P.815-820, ASA, Madison
- [8] Liang, L.N., Sinclair, J.L., Mallory, L.M., and Alexander, M. (1982) Fate in model ecosystem of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 708-714
- [9] Compeau, G., Al-Achi, B.J., and Platsouka, E. (1988) Survival of rifampicin-resistant mutants of Pseudomonas fluorescense and Pseudomonas putida in soil systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2432-2438
- [10] Devanas, M.A., and Stotzky, G. (1986) Fate in soil of a recombinant plasmids carrying a Drosophila gene. *Curr. Microbiol.*, 30, 507-533
- [11] Stotzky, G., and Babich, H. (1986) Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.*, 31, 93-108
- [12] Wang, Z., and Crawford, D.L. (1989) Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant Streptomyces in a soil ecosystem. *Can. J. Microbiol.*, 35, 535-543

- [13] Acea, M.J., and Alexander, M. (1988) Growth and survival of bacteria introduced into carbon-amended soil. *Soil Biol. Biochem.*, 20, 703-709
- [14] Acea, M.J., Moore, C.R., and Alexander, M. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 20, 509-515
- [15] Yeung, K-H, A., Schell, M.A., and Hartel, P.G. (1989) Growth of genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3243-3246
- [16] Wessendorf, J., and Lingens, F. (1989) Effect of culture and soil conditions on survival of *Pseudomonas fluorescense* R1 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 97-102
- [17] 那須義和、江口静子 (1966) 塩素イオン (2) In: 解説水の分析, pp.150-152. 日本分析化学会北海道支部編、化学同人、京都

第6章 γ -BHC分解菌の土壤中での 増殖・生残・死滅状況

前章で土壤中の γ -BHC分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* の計数方法を確立した事を述べた。そこで、その計数方法を用いて *S. paucimobilis* SS86が土壤に接種された場合、ならびに γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*が γ -BHC連用区土壤に土着菌として生存している場合の兩者について、その増殖・生残・死滅状況を圃場の様々な条件下で調査した。

調査した項目は以下の通りである。

- ① 野外試験圃場に春に接種されたSS86株の生残と移動状況。
- ② 野外試験圃場に秋または冬に接種されたSS86株の生残状況。
- ③ γ -BHC連用圃場に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の生残状況。

また、西山は、土壤に接種されたSS86株ならびに土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の生残状況を室内系土壤インキュベーション実験によって再現・確認している。

本章ではそれらの結果について述べる。

6.1 野外試験圃場に接種されたSS86株の増殖・生残・死滅・移動（5月接種）

S. paucimobilis SS86が野外の土壤環境に導入された場合の挙動を把握するために東大農学部構内弥生圃場に野外試験圃場を設置し、SS86株を土壤表層に接種して、接種部位における増殖・生残性、ならびに降雨・風による菌体の水平・垂直方向への移動性について調査した。尚、SS86株の接種は、農業連用圃場における農業の投与時期に合わせて、5月下旬とした。

<方法>

試験圃場：東大農学部構内弥生圃場内に設置した。この圃場の土壤は農業長期連用試験圃場の土壤と同一の性質を持ち、これまでにいかなる農業も投与された経歴を持たない。

試験開始前に、圃場の設置部位2m四方にわたり、深さ50cmまでの土壤を掘り起こし、れき・瓦の破片等を取り除き、1cmのふるいを通過させ再び埋め戻した。この状態で約1カ月間放置した後、試験を開始した。

γ-BHCの投与とSS86株の接種 (図6-1) : 試験圃場 (2m x 2m) の中央部の表層土壌を円柱状 (直径30 cm、深さ10cm) に掘り出し、セラライト増量法によりγ-BHC (10 μg/g soil) を均一に添加した。SS86株はL-broth で前培養し、集菌・洗浄して滅菌蒸留水に懸濁したものをスプレー法によって、この土壌に均一に接種した。接種菌数は 1.3×10^5 cells/g soilであった。この土壌を試験圃場の元の位置にただちに埋め戻した。γ-BHCの投与とSS86株の接種は5月25日に行った。

土壌のサンプリング部位 (図6-1) : SS86株の接種後経時的に試験圃場内の土壌をサンプリングした。サンプリング部位は接種部位 (部位1)、接種部位の鉛直方向下方の下層土 (30-40 cm) (部位2)、接種部位から水平方向に20 cm離れた部位の表層土 (0-10 cm) (部位3)、接種部位から水平方向に20 cm離れた部位の下層土 (30-40 cm) (部位4) の4カ所である。サンプリングには板倉式土壌採取装置を用いた。

SS86株のカウント : 採取した土壌は直ちにMPNカウントに供した。カウントの方法は第5章で述べたものと同様である。土壌の分散・希釈ともに飽和以上のγ-BHC (500mg/l) を含む無機培地で行い、各希釈段階から1mlの希釈液をマルチウェルプレート (CORNING CELL WELL, 24穴) の各ウェルに入れて、プレートごと振とう培養した。培養後、各ウェル中の培養液に生成したCl⁻をチオシアン酸水銀法により定性分析し、発色がみられた物を陽性とした。尚、試験開始前に試験圃場の4カ所のサンプリング部位についてあらかじめγ-BHC分解菌数をカウントしておいた。その結果、γ-BHC分解菌は計数されず、バックグラウンド菌数は検出限界以下であることが確認された。

<結果と考察>

試験圃場内4カ所のサンプリング部位におけるSS86株菌数の経時変化を図6-1に示した。接種部位 (部位1) においては、SS86株は接種後2-5週にわたってγ-BHCを資化して増殖し約 10^9 cells/g soilのレベルにまで達したが、その後は次第に減少し、接種後21週目には 10^1 cells/g soil程度が生残していた。この増殖・生残パターンは室内系インキュベーション実験で得られたものと類似していた。野外試験圃場に接種された菌体が増殖を示した事例は本研究の他には見あらず、一般的に接種菌は接種後徐々に検出限界以下まで減少する事が報告されている[1-3]。

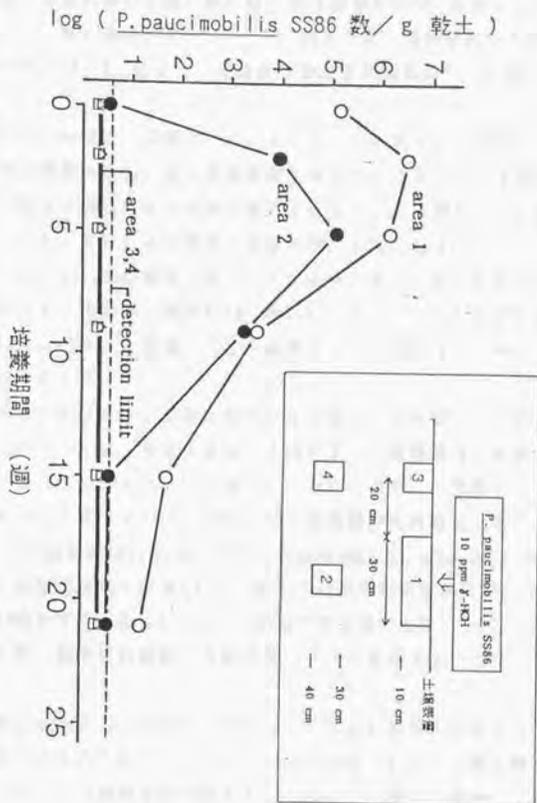


図6-1 野外試験圃場に接種されたγ-BHC分解菌*S. paucimobilis* SS86の生残性と移動性

次章以下で詳細に検討することになるが、土壤に接種された細菌の死滅要因の1つとして、原生動物による捕食が報告されている[4-6]。とりわけ、土壤の団粒構造外部のような原生動物の活動が活発な部位に存在する細菌は原生動物によって捕食され易く、逆に団粒内部の毛管孔隙の様な原生動物が到達できないような部位では捕食されにくい事が示されている[7]。このような、捕食を免れる部位は「マイクロハビタット」[8,9]と呼ばれ、土壤微生物の生残部位の1つと考えられている。

部位1に接種されたSS86株は、基質としての γ -BHCを資化して増殖し、その際の増殖速度は原生動物の捕食による死滅速度をはるかに上まっている事、 γ -BHCを消費した後は捕食による死滅が優位となること、接種されたSS86株は「マイクロハビタット」をほとんど獲得できない事が示唆される。

接種部位の鉛直下方30-40 cmの部位(部位2)においてはSS86株が検出される場合があった。すなわち、接種後2週目に 10^2 cells/g soilレベルの菌数が検出され、5週目には 10^5 レベルまで増殖し、その後減少した。接種後15週目、21週目には検出されなかった。

接種菌体の接種部位から下方への移動は降水による浸透水の移動に伴うものであると考えられる。おそらくは、接種直後から2週目までに接種部位で増殖した菌体と未分解の γ -BHCが降水による浸透水にともなって下方へ移動し、下層土中で増殖・減少を示したのであろう。透水に伴う接種菌体の移動は土壤カラム中での*E. coli*[10]、field microplots 中での*Pseudomonas fluorescence*、*Bacillus subtilis*でも確認されている[1]。土壤中での微生物菌体の移動には土壤の水ポテンシャルが寄与すること[11,12]、一般的には土壤の水分、pH、塩の種類と濃度、土壤の性質、微生物の性質、有機物及び水圧が影響するとされている[13]。

接種菌体が接種部位から下方へ移動する現象は、野外放出菌体の利用系外への漏出の可能性を示唆するものであり、GEMsの野外利用において注意を要する点であろう。このため、この現象を室内系カラムを用いて、詳しく解析し、特に接種菌体の各生育ステージ(接種直後、増殖期、死滅期)における移動性について調べた。その詳細は第8章に述べるが、接種菌体はいずれの生育ステージにおいても透水により一定の割合で洗脱されることが確認された。

なお、接種部位から水平方向に離れた部位(部位3)およびその部位の下層土(部位4)からはSS86株は検出されなかった。

8.2 野外試験圃場に接種されたSS86株の増殖・生残・死滅-10月および2月の

接種

異なった時期に野外の土壤環境に放出された微生物は、土壤温度に影響されて放出後の土壤中での挙動が異なることが予想される。6.2 においては野外試験圃場で春にSS86株を接種し、その後の挙動を調べた結果について述べた。ここでは、秋および冬に野外の土壤に接種されたSS86株の挙動について述べる。

<方法>

試験圃場の設定:今回は春の接種とは異なり、接種菌体の垂直・水平方向への移動性については調べなかった。従って、広い面積の圃場を準備することはせず、小規模な枠試験によった。東大農学部構内の弥生圃場内の一区画に直径20cm、深さ30cmの塩ビ製カラムを埋め込んだ。カラム内部の土壤を掘り出し、2mmのふるいを通過させた。この土壤へのγ-BHCに添加ならびにSS86の接種を10.3に述べた方法にしたがって行い、再びカラム内に埋め戻した。秋の接種は10月15日に、冬の接種は2月14日にこの操作を行った。

接種後経時的に土壤をサンプリングし、SS86菌数をMPN法によりカウントした。

<結果>

得られた結果を6.1の春の接種の結果と併せて図6-2に示した。また、月の前半と後半に分けて最高地温・最低地温（地表から5cm）の平均値を図6-2の欄外に示した。春（5月25日）に接種されたSS86は接種後直ちにHCHを資化して増殖し、最大菌数に達した後次第に減少に向かったのに対し、秋と冬の接種ではこれとは異なった挙動が見られた。

秋（10月15日）に接種されたSS86は接種後11月6日までは増殖し、約 10^6 cells/g soilの菌数を示した。その後この菌数は減少したが4月12日まではその減少速度は極めて緩やかであり、約 6×10^5 cells/g soilの菌体が2月から4月にかけて生残していた。しかし、4月を過ぎると死滅速度は急速になり8月12日には約 10^1 cells/g soil程度の菌数しか生残していなかった。

冬（2月14日）に接種された場合、（接種菌数は 8.2×10^5 cells/g soil）接種後2月28日までは菌数は急速に減少したが、その後増殖に向かい、5月15日には最大菌数（ 2.4×10^6 cells/g soil）に達した。その後は再び速やかに死滅し、8月12日には 10^2 レベルとなった。

<考察>

S. paucimobilis SS86 菌数 (log, cells/g soil)

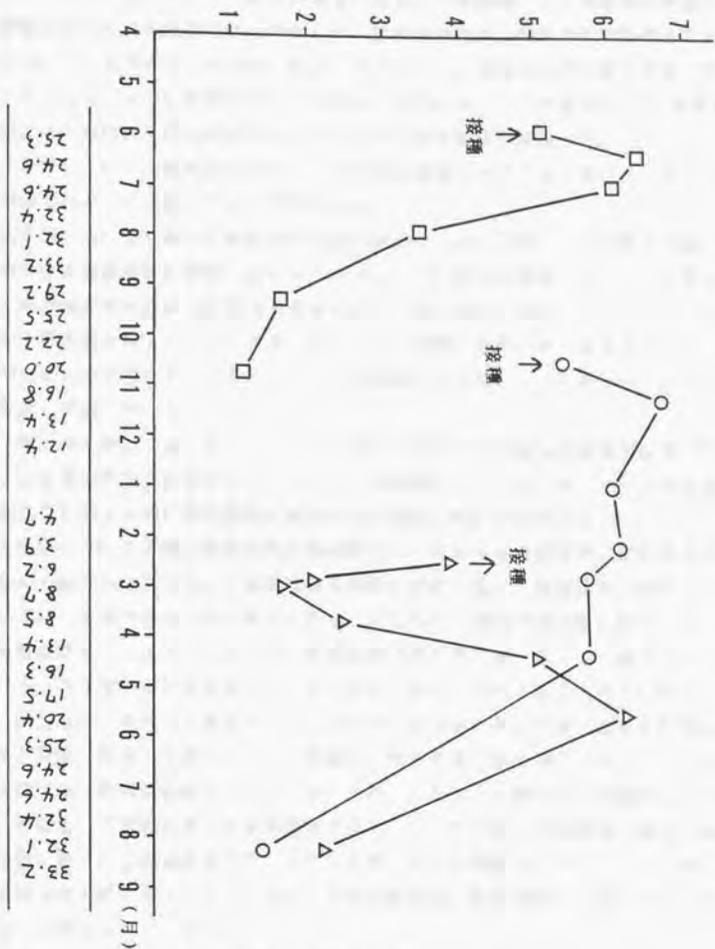


図6-2 異なる時期に野外試験圃場に接種された*S. paucimobilis* SS86の生現性

(欄外は月の前半・後半別平均菌数 (°C))

SS86株の挙動と地温の関係について

SS86株の野外の土壤環境中での増殖・生残・死滅と土壤温度との関係について次の事が言える。

①増殖について：SS86株が野外の畑土壤環境中で増殖可能な土壤温度は約10℃以上であると言える。これは次の理由による。5月接種、10月接種の場合には接種後直ちにSS86株は増殖を開始した。接種時付近の土壤温度の平均値はそれぞれ25.3℃（8月前半の平均値）および20.0℃（10月後半の平均値）であった。これに対し、2月に接種されたSS86株は、3月に入り平均地温が8.7℃、最高地温が15℃付近にしばしば達するようになってから増殖を開始した。

ただし、6.2の結果から考えて、SS86株が増殖を示すのは土壤にγ-BHCが添加されたときに限られると考えられる。

②死滅について：野外の畑圃場で地温が約20℃以上の時に、SS86株を死滅に向かわせる死滅要因が機能し始めると言える。これは次の理由による。5月接種、2月接種の場合にはSS86株は増殖後直ちに比較的急に死滅に向かった。この時の土壤温度は約24℃以上であった。10月接種の場合には、増殖後きわめて緩やかにしか死滅せず、4月に入って平均地温が16.3℃となってからからようやく急速な死滅を示した。

第7章で詳しく述べるように、SS86株の土壤中での主要な死滅要因は原生動物による捕食作用が主要なものであることが確認されている。従って、土壤温度が約20℃以上の時に原生動物の捕食作用が機能し始めると言える。

③生残について：秋に接種されたSS86株は11月から4月にかけての死滅速度が極めて緩やかであった。この間は原生動物の活動が低く、接種菌体が捕食されないために生残できるものと考えられる。すなわち、捕食作用の低い秋から冬（平均地温約20℃以下）の時には、接種菌体は第8章に述べるような捕食をまぬがれるような特別な方策を備えていなくとも土壤中で生残できると考えられる。

西山はγ-BHCが添加された、ならびに添加されない土壤に接種されたSS86株の増殖・死滅・生残パターンと地温との関係を室内系土壤インキュベーション実験により詳細に検討している[15]。それによると、土壤中SS86株がγ-BHCを資化して増殖できるのは地温が20℃、30℃の時、原生動物の捕食作用が活発に働くのは地温が20℃、30℃の時、そして地温が10℃、3℃の時には死滅速度が緩やかになっている。これらの事実は、圃場実験から得られた結果に良く合致するものである。

尚、2月に接種されたSS86株は接種後一時的にきわめて急速な死滅を示したが、これは富栄養な培地(L-broth)で前培養された菌体が貧栄養な土壤環境に導入されたときにその栄養環境の急激な変化に適応できなかったためであると考えられ

る。これについては次章で詳しく述べる。

野外の土壤環境に導入された微生物の生残性は土壤地温に大きく影響されることが明らかになった。野外の土壤環境へGEMsを導入するに先立って、室内系土壤ミクロコズムを用いたGEMsの生残性試験を行うことになるであろうが、この際、対象とする土壤で導入菌体が増殖可能な温度範囲ならびに原生動物の捕食作用が機能する温度範囲を調べておくことが重要な点の1つになる。これらを把握しておけば、野外の土壤中での導入菌体の増殖・生残パターンをある程度予測できるであろう。

秋の接種実験で観察されたように、接種菌体が増殖して高い菌数に達した後に地温が下がり、捕食作用が低下した場合、土壤中に接種菌が高密度で長期間生残することになる。このような状況下では、6.1で述べたような降水により菌体が対象とした系外へ漏出する可能性も高くなると考えられ、GEMsの野外利用に際して注意を要する点であろう。

6.3 農業連用圃場における土着 γ -BHC分解菌の増殖・生残・死滅

農業連用圃場BHC区における γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*菌数の経時的変化については第2章において既に示した。しかし、この時には γ -BHC分解菌数のMPNカウントを行うにあたっての土壤の分散方法が緩やかであり（往復振とう機による15分間の振とう）、5.2の結果から考えて菌数を過小評価していた可能性がある。そこで改めて γ -BHC区における γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*菌数の変動を γ -BHC投与後1年にわたって調査した。

<方法>

この調査は1988年から1989年にかけて行った。 γ -BHCの投与量・投与方法は第2章で述べたものと同様である。

1988年5月25日に γ -BHCを投与し、その後経時的に γ -BHC連用区の土壤をサンプリングし、 γ -BHC分解菌数をMPN法により計数した。この時、土壤の分散はワーリングブレンダーを用いて1分間(1800rpm)を行った。それ以外の操作については6.1で述べたものと同様である。

<結果>

結果を図6-3に示した。比較として6.2で述べた野外試験圃場での接種SS86株の生残性（部位1における）も示した。

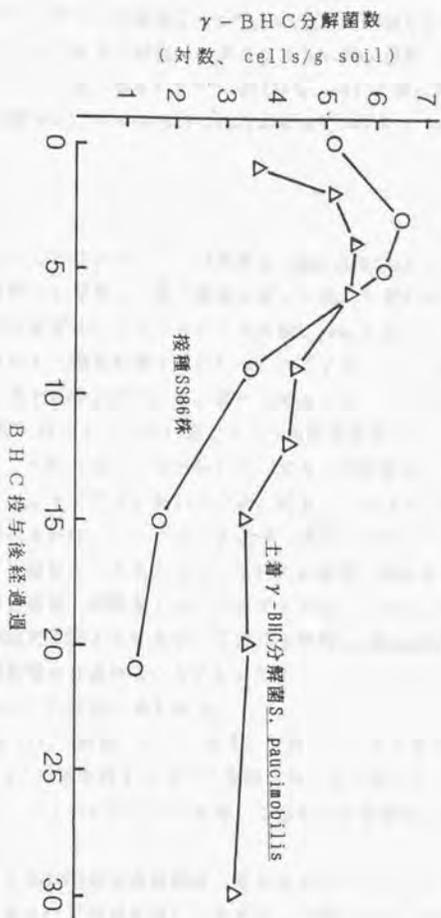


図6-3 土壌に接種された *S. paucimobillis* SS86 と γ -BHC 適用区土壌に土着の γ -BHC 分解菌 *S. paucimobillis* の生存性の違い (野外試験圃場)

BHC区における γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は、第2章で示した結果とほぼ同様の経時変化を示した。5月25日の γ -BHC投与直前には 4.8×10^3 cells/g soil の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* が生存しており、 γ -BHCの投与により 10^5 レベルまで増殖し、6月27日に最大菌数に達した。その後菌数は減少し、9月12日には 2.3×10^3 cells/g soil となった。その後菌数はほぼ 10^3 レベルを維持し、翌年のBHCの投与直前にも 4.8×10^3 cells/g soil であった。

<考察>

γ -BHC区に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は γ -BHCの投与後、 γ -BHCを資化して増殖し、最大菌数に達した後に比較的速やかに減少に向かった。この推移は接種された γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* SS86と同様であった。しかしながら、菌数の減少は 10^3 レベルで止まり、この菌数が次年度の γ -BHCの投与まで維持されていた。即ち、土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は長期間生残することが可能であった点が接種菌とは大きく異なっていた。

5月末のBHCの投与後、6月下旬に γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は最大菌数に達し、9月上旬までは比較的速やかに死滅し、9月から翌年の6月までは 10^3 レベルの菌数を維持していた訳であるが、前節で考察したように、この間6-10月ならびに翌年4、5月には γ -BHC分解菌の畑土壤中での死滅要因（原動物の捕食作用）が機能していたはずである。したがって、9、10月と翌年4、5月の頃に生残していた γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は何らかの方策によって死滅要因から逃れていたことになる。

これらの結果から次の事が示される。

- ①約 10^3 cells/g soil の菌数レベルで安定に生残している土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は死滅要因から逃れて長期生残できる何らかの方策を備えている。
- ②投与された γ -BHCを資化して増殖した増殖分の菌体はこの方策を備えていない。
- ③土壤に接種されたSS86株は接種菌体、増殖菌体ともにこの方策を備えていない。

この死滅要因ならびに死滅要因から身を守る方策について次章以降で詳しく解析するが、いずれにしてもこの結果は、「接種された微生物と土着の微生物とは異なる生態を示す」ことを示唆しており、きわめて興味深い。

6.4 室内モデル系における接種ならびに土着 γ -BHC分解菌の増殖・生残・死滅 [15]

前節までに述べたように、野外試験圃場に接種された γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* SS86と、農業長期連用圃場の γ -BHC区に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* とでは、その生残性に大きな違いがあることが見いだされた。この点を確認するために西山は対照区土壤に接種されたSS86株とBHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の増殖・生残・死滅状況を室内系土壤インキュベーション実験により詳細に調べた[14, 15]。その結果をここに引用する。設定した区は以下の通りである。

- ① γ -BHCを添加した対照区土壤にSS86株を接種
- ② γ -BHCを添加しない対照区土壤に、L-brothで前培養し、対数増殖期に達したSS86株を接種
- ③ γ -BHCを添加しない土壤に、土壤浸出液培地で10週間飢餓培養したSS86株を接種
- ④ BHC連用区土壤に γ -BHCを添加(土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*を増殖させる)

土壤はいずれも30℃、最大容水量の60%水分でインキュベーションした。得られた結果を図6-4に示した。

図から明らかなように、 γ -BHCを添加した対照区土壤に接種されたSS86株は、増殖後死滅に向かい、接種後12週目には検出限界以下となった。これに対し、 γ -BHCを添加したBHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*は、増殖後約 10^4 cells/g soilまでは急速な死滅を示したが、それ以降は死滅速度は極めて緩やかであり、インキュベーション期間中ほぼこの菌数を維持した。これらの結果は、6.3で示した、圃場における接種SS86株と土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の挙動の差異を再現・確認するものである。

また、 γ -BHCを添加しない対照区土壤にSS86株を接種した時、接種菌体は、増殖を示す事なく接種直後から死滅に向かった。その際、接種細胞の前培養条件によって、死滅速度が大きく異なっていた。すなわち、対数増殖期にある栄養細胞は接種後急速に死滅したのに対し、飢餓培養された細胞は死滅速度が緩やかであった。この理由について西山は、飢餓細胞が土壤の貧栄養環境に対して生理的適応ができていないこと、飢餓細胞が原生動物の捕食作用を受けにくい何等かの要因を有していること、等を推察している。

接種した菌体が急速に死滅する現象は、6.2で述べた、圃場にSS86株を2月に接種した際の接種直後にも見られたものであった。このとき、10月にすでに接種したSS86株は安定に生残していたため、2月接種の菌体の急速な死滅は奇異に感じられた。この時期には平均地温は10℃以下と低く、原生動物の捕食作用は小

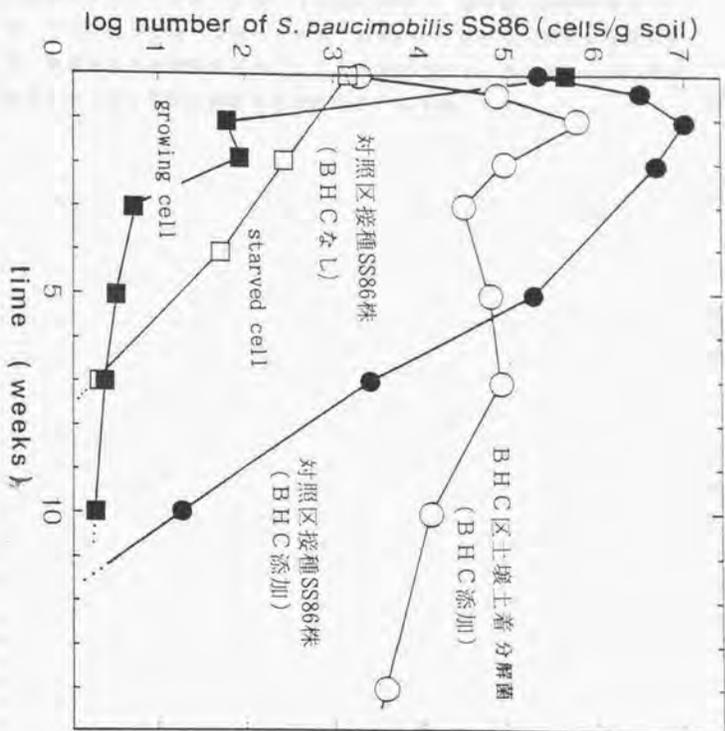


図6-4 対照区土壌に接種された *S. paucimobilis* SS86 と γ -BHC 適用区土壌に土着の γ -BHC 分解菌 *S. paucimobilis* の生存性の違い (室内系実験) [157]

さいと考えられるので、この急速な死滅は接種菌体（L-brothで前培養した栄養細胞）が土壤環境に適応できなかった事に由来すると考えられる。

以上、本章においては土壤に接種された、および土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* の増殖・生残・死滅状況を主として圃場において調べた結果を述べてきたが、①接種菌体は降水により移動すること、②接種菌体の生残性は土壤温度に大きく影響されること、③接種菌と土着菌とではその生残性が大きく異なり、土着菌は土壤中で安定に生息しているのに対して接種菌は比較的速やかに死滅に向かうこと、が特筆されるべき知見である。とりわけ③の事実は有用微生物の野外土壤環境での有効利用を図る上で重大な点であり、本論文の以後の部分はこの現象をもたらす要因を解析する事を骨子として論じていく。

第6章の引用文献

- [1] van Elsas, J.D., Dijkstra, A.F., Govaert, J.M., and van Veen, J.A. (1986) Survival of Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis introduced into two soils of different texture in field microplots. FEMS Microbiol. Ecol., 38, 233-242
- [2] Morel, J.L., Bitton, G., Chaudhry, G.R., and Awong, J. (1989) Fate of genetically modified microorganisms in the corn rhizosphere. Curr. Microbiol., 18, 355-360
- [3] Bentjen, S.A., Fredrickson, J.K., van Volis, P., and Li, S.W. (1988) Intact soil-core microcosms for evaluating the fate and ecological impact of the release of genetically engineered microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 55, 198-202
- [4] Danso, S.K.A., Keya, S.O., and Alexander, M. (1975) Protozoa and the decline of Rhizobium populations added to soil. Can. J. Microbiol., 21, 884-895
- [5] Habte, M., and Alexander, M. (1975) Protozoa as agents responsible for the decline of Xanthomonas campestris in soil. Appl. Microbiol. 29, 159-164
- [6] Habte, M., and Alexander, M. (1977) Further evidence for the regulation of bacterial populations in soil by protozoa. Arch. Microbiol., 113, 181-183
- [7] Vargas, R., and Hattori, T. (1986) Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. FEMS Microbiol. Ecol., 38, 233-242
- [8] Hattori, T. (1985) Microbial distribution and its variation in soil aggregates. Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., 37, 302-304
- [9] Hattori, T. (1977) Microbiol habitat in soil. Jpn. Agric. Res. Q., 11, 24-29
- [10] Smith, M.S., Thomas, G.W., White, R.E., and Ritonga, D. (1985) Transport of Escherichia coli through intact and disturbed soil columns. J. Environ. Qual., 14, 87-91
- [11] Hamdi, Y.A. (1971) Soil-water tension and the movement of Rhizobia. Soil Biol. Biochem., 3, 121-126
- [12] Wilkinson, H.T., Miller, R.D., and Miller, R.L. (1981) Infiltration of fungi and bacterial propagules into soil. Soil Sci. Soc. Am. J.,

45, 1034-1039

- [13] Yates M.U., and Yates S.R. (1988) Modeling microbial fate in the subsurface environment. *Critic. Rev. Environ. Control.*, 17, 307-344
- [14] Senoo, K., Nishiyama, M., Wada, H., and Matsumoto, S. (1992) Differences in dynamics between indigenous and inoculated *Sphingomonas paucimobilis* strain SS86 in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 86, 311-320
- [15] 西山雅也 (1991) BHC 分解菌 *Pseudomonas pucimobilis* SS86 の土壤中での挙動 東京大学修士論文

第7章 γ -BHC分解菌の土壤中での 死滅要因の解析

前章で野外試験圃場および室内モデル系における γ -BHC分解菌の増殖・生残・死滅状況について述べてきた。土壤に接種されたSS86株とBHC区土壤に土着の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*とでは、その生残性に明らかな違いが見られ、長期生残している土着 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*は菌体を死滅にいたる要因を免れる方策を得ている事が示された。しかしながら、 γ -BHC分解菌の死滅要因の具体的な内容については未知であった。接種菌体と土着菌体の生残性の差異をもたらし機構を解析するに先だて、菌体の土壤中での死滅要因を明らかにしておくことが必要である。

本章ではこの死滅要因を明らかにすることを目的としていくつかの実験を行った。

7.1 γ -BHC分解菌の死滅要因の解析(1): 液体培養系

γ -BHC分解菌の土壤中での死滅要因としては、原生動物による捕食[1,2]、接種菌の野生株を含む土着微生物との基質を巡る競争[13]、土着微生物による拮抗などが可能性として考えられた。そこでこれらの点を取扱いの比較的容易な液体培養系によってまず解析することを試みた。ここでは2種類の実験を行った。

<方法>

(実験1) (土壤サスペンション添加実験)

SS86株の培養: SS86株の培養には土壤浸出液培地[3]を用いた。即ち、対照区土壤と蒸留水を1:2.5(w/w)の割合で混合し、ワーリングブレンダーを用いて高速攪拌(18000rpm, 1分)した。4℃で1晩静置した後、上澄液を採取し、2200 x gにて10分間遠沈して懸濁物を沈澱させた。上澄液を0.22 μ mのメンブレンフィルター(ニトロセルロース製、富士フィルム)を通過させ、除菌した。

この土壤浸出液培地100mlを坂口フラスコに入れ、SS86株を少量接種し、シリコ栓をして30℃にて静置培養を行った。この培養は3本行った。

土壌サスペンションの調整: 上記のSS86株の培養系に対して、Frey[4]らの方法に準じて調整した2種類の土壌サスペンションを添加した。

まず、対照区土壌10gを最大容水量の60%に水分調節し、30℃で2日間培養した。培養後の土壌に90mlの蒸留水を加え、ワーリングブレンダーで緩やかに攪拌し(3000rpm、10分間)、1晩静置した。上澄液を採取し、30×gで10分間遠沈した。この上澄液をBFPと呼ぶ。この上澄液をさらに3.0μmのメンブレンフィルター(cellulose-nitrate、東洋濾紙)を通過させた。これをBFと呼ぶ。BFPは細菌、糸状菌、原生動物を含有し、BFは細菌、糸状菌を含有する。

土壌サスペンションの添加とインキュベーション: SS86株の土壌浸出液培地での培養において定常期に達した培養3週目に、上記で調整した土壌サスペンションBFPまたはBFを5ml培地に添加し、さらに培養を続けた。経時的にサンプリングを行い、SS86株菌数をMPN法により計数した。

(実験2)(フィルター分離培養)

SS86株の培養: 実験1と同様に、土壌浸出液培地を用いてSS86株を定常期に至るまで培養した。

分離培養: 図7-2の様に中央部を0.22μmのメンブレンフィルターで仕切ったガラス製培養器を用意し、これをオートクレーブ滅菌した後フィルターの両側にSS86株の培養液を50mlずつ入れた。さらに、一方には実験1で調整した土壌サスペンションBFP1mlを添加した。この培養器を用いた培養とは別に坂口フラスコを用いてSS86株を土壌浸出液培地で培養した。いずれの培養も30℃、静置で行い、経時的にSS86株数を計数した。

<結果>

(実験1)(図7-1)

土壌浸出液培地中でSS86株は増殖後長期間の生残を示し、死滅速度は極めて緩やかであった。培養3週目に土壌サスペンションBFPを培養液に添加するとSS86株はサスペンション添加後3日目まで急激に減少し、その後も緩やかに減少を

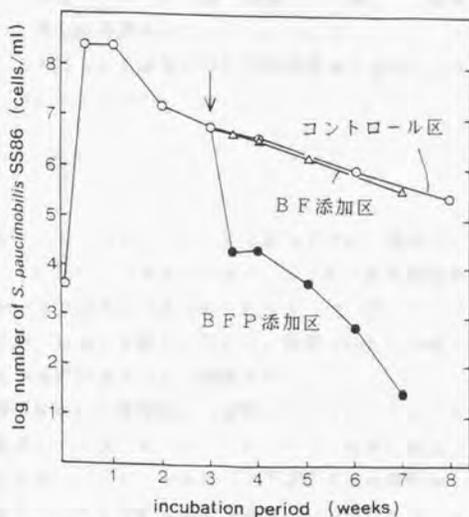


図7-1 Changes in the number of *S. paucimobilis* SS86 in soil extract medium. ○, control; ●, centrifuged soil suspensions added; △, 3 μ m-filtrate soil suspensions added; ↓, addition of soil suspensions. Incubation temperature was 30°C.

続けた。これに対して、土壌サスペンションBFPを添加したときにはSS86株菌数はコントロールと同様の推移を示した。

(実験2)(図7-2)

SS86株の土壌浸出液培地での純粋培養(コントロール区)では、実験1と同様にSS86は長期間生残していた。土壌サスペンションBFPを添加すると、これも実験1と同様にSS86株は急速な死滅を示した。0.22 μm のメンブレンフィルターで仕切られた区においてはSS86株の生残は短期間の培養(3週間)においてはコントロール区と大差なかった。培養が長期(10週間)に及ぶとフィルターで仕切られた区の生残SS86株菌数は約 10^3 cells/mlでコントロール区の1000分の1となった。この時BFP添加区のSS86株菌数は3週目に比べてやや増加し、やはり約 10^3 cells/mlとなっていた。

<考察>

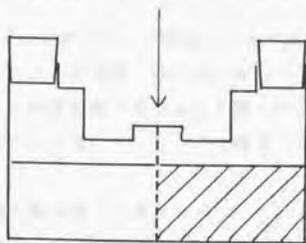
実験1、2のいずれにおいても、原生動物を含む土壌サスペンションBFPが添加されたときにSS86株は急速な死滅を示したが、原生動物を除去したBFPを添加した区においては急速な死滅はみられなかった。従って、この液体培養系において土壌サスペンションを添加したときに観察されたSS86株の死滅は原生動物の捕食作用によるものであることが確認された。

なお、実験2において培養が10週間におよぶと、フィルターで仕切られた区のSS86株菌数はコントロール区の1000分の1程度に減少したが、これは培養が長期間になれば、フィルターを介して共存する他の微生物との養分を巡る競争関係が顕在化し、このような差が現れたものと考えられる。また、この時土壌サスペンションBFP添加区においてSS86株菌数が3週目に比べて増加したのは、原生動物の捕食活性が低下したためであると考えられる。

7.2 γ -BHC分解菌の土壌中での死滅要因の解析(2): 滅菌土壌系

前節では液体培養系を用いてSS86株の死滅要因を解析したが、実際の土壌での死滅要因が液体培養系で正しく反映されているとは限らず、土壌系で解析することが必要である。本節ではそれを試みた。滅菌土壌系に土壌サスペンションBFPまたはBFPをあらかじめ添加して前培養した後、SS86株を接種する実験を行った。

0.22 μ m メンブレンフィルター



土壌浸出液 SS86 土壌浸出液
 土壌懸濁液 (BFP)
 SS86

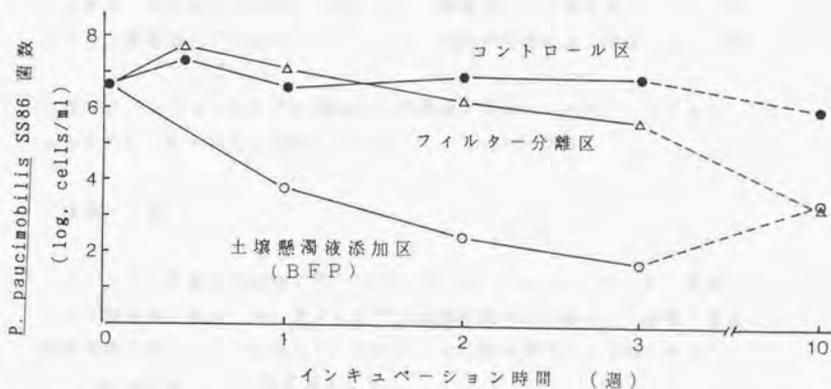


図7-2 土壌浸出液 (フィルター分離培養系) 中での *S. paucimobilis* SS86 の生残性

<方法>

土壌: 対照区土壌200gを500ml容三角フラスコに入れ、シリコ栓をして130°Cで1時間オートクレーブ滅菌した。この滅菌は2日の間をあけて2回行った。

土壌サスペンションの添加: 7.1で述べたのと同様の方法で調整した2種類の土壌サスペンションBFPならびにBFを滅菌土壌200gに対して10ml添加し、フラスコを振ってよく混合し、さらに滅菌蒸留水を加えて土壌水分が50%WHCとなるように調整した。なお、この実験では土壌にγ-BHCは添加しなかった。

土壌サスペンション添加土壌の前培養: 土壌サスペンションBFPまたはBFを添加された土壌、ならびに添加しないコントロール土壌は30°Cで1週間前培養を行った。

SS86株の接種: 前培養を行った土壌に、常法に従ってSS86株を接種し、土壌水分が60%WHCとなるように調整した。

インキュベーションと計数: 上記によって調整された土壌は30°Cでインキュベートし、経時的に土壌をサンプリングしてSS86株菌数をMPN法により計数した。

土壌サスペンションBFPが添加された滅菌土壌をBFP区、BFが添加された区をBF区、何も添加しなかった区をコントロール区と呼ぶ。

<結果> (図7-3)

コントロール区では接種されたSS86は 10^9 cells/g soilレベルまで増殖し、その後は緩やかに減少した。BFP区ではSS86は緩やかに減少し、接種6週後には接種菌数の約1/10となった。BF区では死滅は急速で、接種6週目には 10^1 cells/g soilのレベルまで減少した。

<考察>

接種されたSS86株の増殖について

コントロール区では接種されたSS86株は急速に増殖することができたが、BF

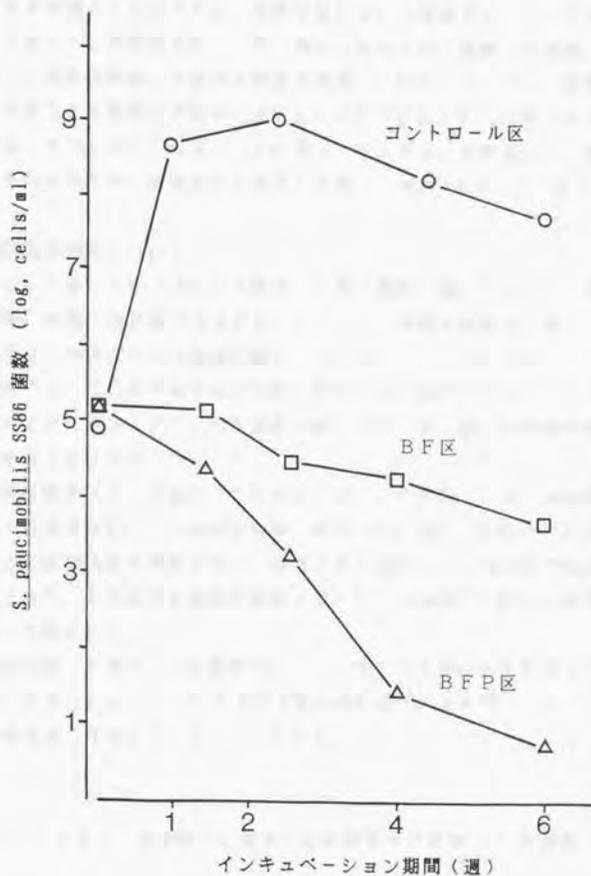


図 7-3 土壤懸濁液添加滅菌土壤系での *S. paucimobilis* SS86 の生残性
 ○, コントロール区; △, centrifuged soil suspension (BFP) 添加区; □, 3 μ m-filtrate soil suspension (BF) 添加区

PやBFを添加して1週間前培養した後にSS86株を接種するとSS86株は増殖を示さなかった。滅菌土壌には土壌や土壌生物由来の有機物が存在しており、接種されたSS86株はこれを基質として利用して生育する。滅菌土壌中ではSS86株がいわば純粋培養されているため、有機物を利用して増殖することができる。一方、BFがあらかじめ添加されていた土壌では添加された細菌と糸状菌、BFPの場合さらに原生動物がこの基質を前培養期間中に利用してしまい、接種されたSS86株が利用できる基質は消費されている。そのためこれらの系ではSS86株は増殖できないものと考えられる。この結果は、 γ -BHCを添加しない非滅菌土壌に接種されたSS86株が増殖を示す事なく死滅した事実(6.4)に合致するものである。

SS86株の死滅について

コントロール区ではSS86は増殖して最大菌数に達した後徐々に菌数が減少し、土壌に細菌と糸状菌が共存する(BF区)と増殖する事なく徐々に減少した。この系はいわゆるバッチ培養であり、インキュベーションの途中での養分の添加は無いため、これらの減少はSS86株が利用できる養分が欠乏したための死滅(飢餓死)であると言えよう。減少速度が緩やかなのは、菌体が飢餓状態となり代謝活性が低下したためと考えられる。

原生動物がさらに加わって共存する系(BFP区)では、SS86株の死滅速度はさらに速まった。これは原生動物の捕食作用が加わったためであろう。

この実験系から判断すると、基質を巡る競争によるSS86株の死滅は比較的緩やかであり、それよりも捕食作用が土壌中でのSS86株の主要な死滅要因となっていると判断される。

SS86株の土壌中での死滅要因として、他の微生物の拮抗作用も予想されたが、コントロール区とBF区でのSS86株の減少速度がほぼ同じであったことから、拮抗は大きく作用していないようである。

7.3 γ -BHC分解菌の土壌中での死滅要因の解析(3): 非滅菌土壌系

7.1、7.2では滅菌系を用いたが、さらに非滅菌土壌を用いて原生動物の捕食によるSS86株の死滅を確認する実験を行った。ここでは原生動物の活動を抑制する薬剤としてシクロヘキシミドを土壌に添加する実験を行った。

γ -BHCを添加した対照区土壌(非滅菌土壌)にシクロヘキシミド耐性の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis* CR91を接種し、畑状態インキュベーションを行った。CR91株が死滅期にあるときにシクロヘキシミドを土壌に添加し、その後の

CR91株の死滅状況を調べた。

<方法>

接種菌体: SS86株はシクロヘキシミドに対して感受性であったため(シクロヘキシミドは真核生物に作用する抗生物質であるので本来無関係であるはずなのだが)、シクロヘキシミド耐性株を作成した。即ち、シクロヘキシミド900 ppm を含有するL-broth を用いてSS86株を前培養し、増殖した菌体をからシクロヘキシミド耐性株を取得し(CR91株)、これを接種菌として用いた。

菌体の接種、γ-BHCの添加、土壌のインキュベーション: 常法に準じて行った。土壌は30℃、60%WHCで保温静置した。

シクロヘキシミドの添加: 土壌(乾土)に対して300ppm[5]添加した。シクロヘキシミド水に対する溶解度が低く、この濃度を水溶液によって添加することは困難であったので、セライト増量法により土壌に添加した。添加時期は菌体接種後5週間目(最大菌数に達した後、死滅期にさしかかった時)とした。添加頻度は週1回と週2回の2通り設定した。

CR91株の計数: シクロヘキシミドの添加後2および4週目にCR91株菌数の計数を行った。

<結果>

結果を図7-4に示した。シクロヘキシミドを週1回添加した区ではCR91株の死滅が抑制され、添加後2週目には対照区(非添加区)での生残CR91株菌数が 10^6 cells/g soilのレベルであったのに対して、添加区では 10^4 のレベルであった。ただし、添加後4週目にはこの差異は縮まった。シクロヘキシミド週2回添加区も週1回添加区と同様の結果を示した。

<考察>

7.1や7.2で述べた実験では除菌土壌溶液や滅菌土壌に微生物や原生動物を添加する系を用いたために、天然の土壌生態系を反映しているとは言い難い。そこで非滅菌対照区土壌を用いた系を設定したのである。

シクロヘキシミドは真核生物の活動を抑制するため、土壌に添加した場合には、原生動物と糸状菌の両者を抑制すると考えられる。従って、本実験の結果のみか

γ-BHC分解菌 *S. paucimobilis* 菌数

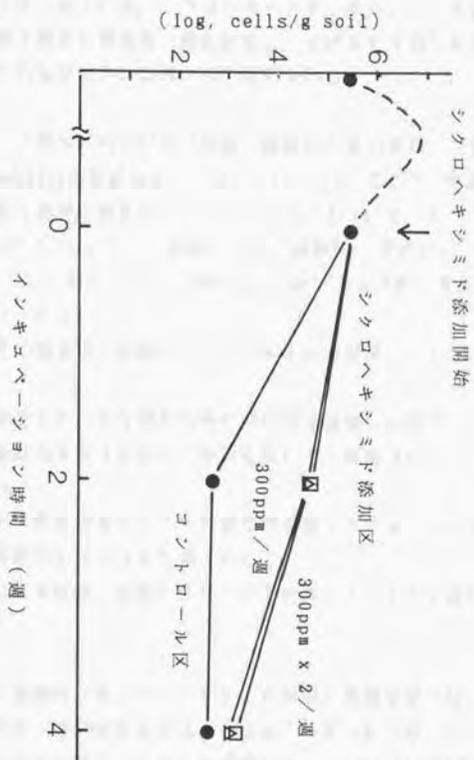


図7-4 シクロヘキシミド添加土壤中でのγ-BHC分解菌 *S. paucimobilis* の生残性

ら判断するとSS86の土壤中での死滅には原生動物の捕食作用または糸状菌の何らかの作用が関わっている、との結論しか導くことはできない。ただし、7.1および7.2の結果とあわせて考えると、原生動物の捕食作用が土壤中でのSS86株の主要な死滅要因であると判断して良からう。

原生動物の活動のみを抑制する薬剤があればそれを用いてさらにクリアーな実験結果が得られたかも知れない。しかしそのような薬剤は知られていない[6]。

シクロヘキシミド添加4週目には添加区とコントロール区でのSS86生残菌数の差異が小さくなった。これはシクロヘキシミド耐性の原生動物が存在し、増殖して捕食作用を示した事、あるいは、シクロヘキシミドの添加により真核生物の活動が抑制され、土壤生態系の構成員に攪乱が生じ、SS86株の生残に対して何らかの害作用がもたらされた事などが原因として考えられる。

以上の結果から、土壤中でのSS86株の死滅（接種SS86株の死滅、土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の増殖後の 10^3 - 10^4 cells/g soilまでの比較的速度やかな死滅）は主として原生動物の捕食作用によるしてよからう。そして、 γ -BHC区の土壤中での 10^3 - 10^4 cells/g soilの菌数レベルで長期間生残する γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*はこの捕食作用から逃れることができるための何らかの方策を備えている、と考えられる。

また、土壤に外来の微生物が接種されたときの生存と死滅について以下の事が示唆された。

- ①すでに土着菌が存在している土壤に外来の微生物を接種した場合、その微生物が利用できる土壤由来の基質はすでに土着微生物により利用されているため、接種菌は増殖できない。
- ②増殖はできないが、飢餓細胞となって代謝活性を低下させることにより、基質利用に関しては接種菌の生存自体は可能である。
- ③しかし、土壤では原生動物の活動が活発であるためにそのような菌体も捕食により死滅してしまう。

ここで γ -BHC連用区土壤での γ -BHC分解菌の長期生残に関して確認しておかなければならない事柄が存在する。それは「BHC区土壤では殺虫剤 γ -BHCを連用してきたために γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の捕食に関わる原生動物が死滅しており、そのために γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*が長期間生残できるのではないか」という可能性が残る点である。

これについては、BHC連用区土壤に添加された γ -BHCは γ -BHC分解菌により急速に、ほぼ完全に分解されること(1.2)[7]、BHC連用区に土着の γ

γ-BHC分解菌 *S. paucimobilis* も最大菌数 (約 10^8 cells/g soil) に達した後に約 10^4 のレベルにまで比較的速やかに減少すること (6,4) から、γ-BHC 運用区土壤中の原生動物が死滅してしまっている可能性は極めて低いと言うことができる。また、さらにこの点を確認するために西山が以下のような実験を行っている [12]。

γ-BHC 運用区土壤に γ-BHC を添加し、室内系畑状態インキュベーションを行い、γ-BHC 分解菌 *S. paucimobilis* が最大菌数に達した後にこの土壤を対照区土壤に混合し (γ-BHC 区土壤: 対照区土壤 = 1: 9, w/w)、引続きインキュベーションした。この時、混合土壤中での γ-BHC 分解菌 *S. paucimobilis* の死滅速度は BHC 運用区単独土壤での死滅速度と変わらず、生残菌数は γ-BHC 運用区単独土壤の $1/10$ で、土壤の混合比と同じであった (図 7-5)。この系では、γ-BHC 運用区土壤中の土着 γ-BHC 分解菌 *S. paucimobilis* が増殖して最大菌数に達した後、すなわち添加された γ-BHC をほぼ消費し尽くした後に対照区土壤に混合したのであるから少なくとも対照区土壤中に存在していた原生動物はそのまま生存しているはずである。

γ-BHC 運用区単独土壤と混合土壤での γ-BHC 分解菌 *S. paucimobilis* の死滅速度がほぼ同じであった事実は、γ-BHC 運用区土壤でも原生動物による捕食が行われていることを示唆するものであり、また、混合土壤中でも γ-BHC 分解菌 *S. paucimobilis* が生残できた事実は、γ-BHC 運用区土壤中の長期生残する γ-BHC 分解菌 *S. paucimobilis* は捕食から逃れる方策を備えている事を示すものである。

7.4 その他の死滅要因

6.4 に示したように、γ-BHC が添加されない土壤へ γ-BHC 分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* SS86 を接種してその生残性を調べた西山の実験において、栄養培地 (L-broth) で前培養し、その対数増殖期にある細胞を接種したときにはきわめて速やかに接種菌は死滅した。一方、土壤浸出液培地で 5 週間飢餓培養した細胞を接種したときにはその死滅速度は比較的緩やかであった。栄養細胞を土壤に接種した際に急速に死滅する現象は野外試験圃場への 2 月の接種においても見られた (6.2)。この理由としては、次のような物が考えられた。① 栄養培地で前培養された細胞が土壤に接種されたとき、培養環境が富栄養環境から土壤の貧栄養環境に急速に変化するために細胞が速やかに適応することが出来ず、死滅する。

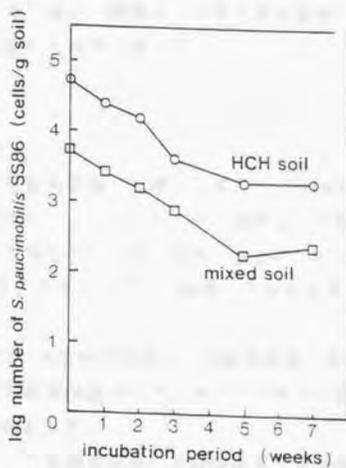


Fig. 7-5 Survival of indigenous *S. paucimobilis* SS86 in HCH soil (○) and in mixed soil (HCH soil mixed with the control soil by 1:9, □). Soil samples were incubated at 30°C with 60% of WHC. [12]

② 飢餓培養され飢餓状態にある細胞は原生動物による捕食を受けにくい。

次章でも述べるように、土壌や水界の様な貧栄養環境で細菌が長期生存しているとき、細菌は、実験室内で栄養培地によって培養されているときや環境に投入された有機物を資化して増殖しているときのような富栄養条件におかれたときとはその細胞の形状や生理的性質が大きく異なり、starvation survivalを行っている[8,9]。その際、細胞のサイズが小さくなったり、細胞表層が疎水的になることにより原生動物の捕食を受けにくくなるという報告もなされている[10,11]。

γ -BHC分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* SS86の栄養細胞は γ -BHC添加されない土壌に接種されたときに速やかに死滅するが、飢餓細胞はそれよりも緩やかに死滅する現象は、栄養細胞の土壌の貧栄養環境への不適応による物なのかどうかを確認するために、圃場から土壌溶液を採取し、この溶液中での栄養細胞ならびに飢餓細胞の生存性を調べた。

<方法>

土壌溶液: 農薬長期連用圃場の対照区の表層から10cmの部位に土壌溶液採取用のポーラスカップを埋設し、ハンドポンプで減圧して土壌溶液を採取した。この土壌溶液には土壌微生物ならびに原生動物が含まれている。これをそのまま、あるいは0.22 μ mのミリポアフィルターで除菌したものを培地として用いた。

接種菌体: SS86株をL-brothで培養し、対数増殖期にあるものを集菌、洗浄し、蒸留水に懸濁した物を栄養細胞とした。また、土壌浸出液培地(7.1)で5週間前培養した物を飢餓細胞とした。

培養: シリコ栓をした滅菌試験管に土壌溶液または除菌土壌溶液を10ml入れ、SS86株の栄養細胞または飢餓細胞の懸濁液を接種し、30°Cのもとで静置培養した。

SS86株の計数: MPN法によった。

<結果>

図7-6に示したように、栄養細胞は非除菌土壌溶液、除菌土壌溶液のいずれに接種された場合にも1週間は接種菌数を維持または若干の増殖を示したものの、1週目から2週目にかけて急速に死滅し、 10^2 cells/mlのレベルにまで減少し、その後は若干の増殖が見られた。飢餓細胞の場合、除菌土壌溶液に接種された時には接種後1週目にかけてやや増殖し、その後は死滅はきわめて緩やかで 10^6 cells/ml程度の菌数を長期間維持した。非除菌土壌溶液に接種された場合には、

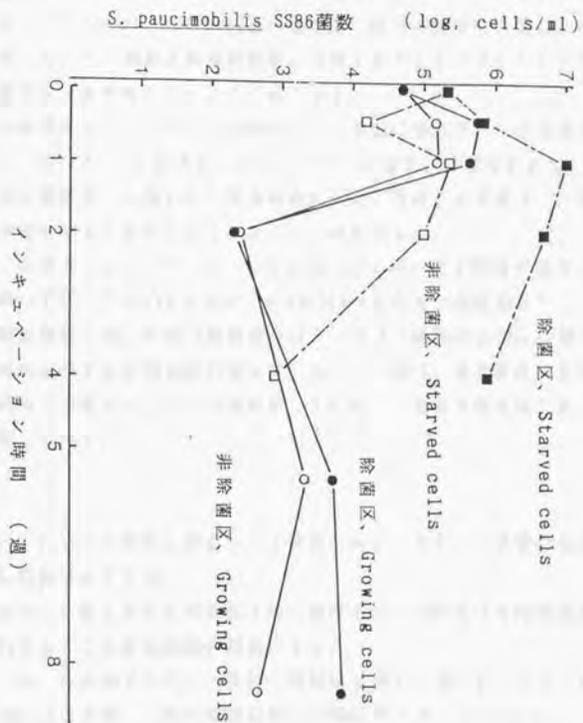


図7-6 土壌溶液中での*S. paucimobilis* SS86の栄養細胞および
飢餓細胞の生残性

接種後死滅に向かい、8週目には検出限界以下となった。

<考察>

飢餓細胞が除菌区では高い菌数で長期間生残できたのに対し非除菌区では死滅したのは、非除菌区では原生動物による捕食を受けたためと考えられる。栄養細胞は除菌区でも非除菌区でも同様に速やかに死滅したことから、栄養細胞の死滅は貧栄養環境への不適応が最も大きな要因であり、捕食による死滅速度をはるかに上回るものであると言える。

栄養細胞が接種後1週間は菌数を維持またはやや増殖したのは前培養中に菌体内に取り込んだ栄養を消費し分裂できたためと考えられるが、この間に貧栄養環境への適応がなぜ出来なかったのか不明である。また、1~2週目にかけて急速な死滅を示したものの、 10^2 cells/ml程度の一部分の細胞は生残し、その後も長期間生残した。この菌体は貧栄養環境に適応できたものと考えられるが、なぜこのような菌体が一部存在したのかも不明である。

以上の結果から、 γ -BHCを添加しない土壤に接種された栄養細胞がきわめて急速に死滅した(6.4)事実および γ -BHCを資化して増殖できない地温にある時に野外試験圃場に接種された栄養細胞が急速に死滅した事実は、土壤貧栄養環境への不適応が主な要因であると言える。

なお、本研究において γ -BHCを添加した土壤へのSS86株の接種は通常栄養細胞を用いて行ったものであるが、6.4の図6-4をみると接種菌が γ -BHCを消費して最大菌数に達した後の死滅速度は γ -BHC無添加土壤に接種された飢餓細胞の死滅速度とほぼ同程度になっている。この事は、栄養細胞で接種されても、土壤環境中で増殖することが出来れば、その間に土壤貧栄養環境に適応できたことを示唆している。

本章のこれまでの結果を総合して土壤中での γ -BHC分解菌の死滅要因は次のように結論づけられる。

- ① γ -BHCの添加された対照区土壤に接種されたSS86株は増殖後死滅に向かうが、これは主として原生動物の捕食による。
- ② γ -BHCの添加された γ -BHC連用区土壤で土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobillis* は増殖して最大菌数に達した後に 10^7 - 10^4 cells/g soilのレベルまで比較的速やかに減少するが、これは主として原生動物の捕食作用による。その後 10^3 - 10^4 のレベルで長期間生残する γ -BHC分解菌 *S. paucimobillis* は、捕食を免れるための何らかの方策を備えている。

③接種されたSS86株は捕食を免れるための方策を得ることが出来ていない。

第7章の引用文献

- [1] Danso, S.K.A., Keya, S.O., and Alexander, M. (1975) Protozoa and decline of Rhizobium populations added to soil. *Can. J. Microbiol.* 29, 159-164
- [2] Clarholm, M. (1981) Protozoan grazing of bacteria in soil - impact and importance. *Microb. Ecol.* 7, 343-350
- [3] 土壤微生物研究会編 新編土壤微生物実験法 p.380 養賢堂 (1992)
- [4] Frey, J.S., McClellan, J.F., Ingham, E.R., and Coleman, D.C. (1985) Filter-out-grazers (FOG): a filtration experiment for separating protozoan grazers in soil. *Biol. Fert. Soils* 1, 73-79
- [5] Acea, M.J., and Alexander, M. (1988) Growth and survival of bacteria introduced into carbon-amended soil. *Soil. Biol. Biochem.* 8, 209-213
- [6] Ingham, E.R., and Coleman, D.C. (1984) Effects of Streptomycin, Cycloheximide, Fungizone, Captan, Carbofuran, Cygon, and PCNB on soil microorganisms. *Microb. Ecol.* 10, 345-358
- [7] Wada, H., Senoo, K., Takai, Y. (1989) Rapid degradation γ -HCH in upland soil after multiple applications. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35, 71-77
- [8] Roszak, D.B., and R.R. Colwell. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379
- [9] Henis, Y. (1987) Survival and dormancy of bacteria. In: *Survival and dormancy of micro-organisms* (Henis, Y., Ed.), pp.1-108 Willey, New York
- [10] Guriijara, K.R., and Alexander, M. (1990) Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1631-1635
- [11] Gonzalez, J.M., Sheer, E.B., and Sheer, B.F. (1990) Size-selective grazing of bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 583-589
- [12] 西山雅也 (1991) BHC分解菌 Pseudomonas paucimobilis SS86の土壤中での挙動 東京大学修士論文
- [13] van Elsas, J.D., van Overbeek, L.S., Feldmann, A.M., Dullemans, A. M., and de Leeuw, O. (1991) Survival of genetically engineered

Pseudomonas fluorescens in soil in competition with the parent strain. FEMS Microbiol. Ecol., 85, 53-64

第8章 土着 γ -BHC分解菌と接種 γ -BHC分解菌の生残性の違いをもたらす要因

前章までに、対照区土壤に接種されたSS86は土壤に添加された γ -BHCを資化していったんは増殖できるが、その後時間の経過とともに死滅に向かうのに対し、 γ -BHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は増殖後 10^3 - 10^4 cells/g soil のレベルまでは死滅するものの、その後はこの菌数レベルで長期間生残すること、そして、これらの死滅は原動物の捕食作用によるものであることが確認され、長期間生残する土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* は捕食を免れる何らかの方策を備えていることが示唆された。

この、土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* の長期間の生残を可能にする要因が何であるのか、なぜ、接種されたSS86株はそのような生残要因を獲得していないのかは非常に興味深い点である。この生残要因が解明されれば、農業有用微生物や組換えDNA微生物の土壤環境中への導入利用において、より導入菌の生残性を高めることにより、効率的な利用が可能になるとともに、土壤に土着の微生物の生態をより深く理解することにもつながるであろう。

そこで本章では、接種されたSS86株が生存している対照区土壤と土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* が生存している γ -BHC連用区土壤が様々な処理条件下におかれた時の γ -BHC分解菌の挙動を比較・解析することにより、土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* の長期生残を可能にする要因、裏返せば、接種SS86株が長期生残できない要因を調べた。

すなわち、 γ -BHC連用区土壤ならびにSS86株の接種された対照区土壤を乾燥処理、透水処理、クロロホルム薫蒸処理し、それぞれの条件下での γ -BHC分解菌の挙動を比較・解析した。

B.1 各種土壤処理条件下での接種ならびに土着 γ -BHC分解菌の挙動の比較

(実験1) 乾燥土壤中での γ -BHC分解菌の生残性

ここでは、SS86株が接種された対照区土壤(γ -BHC添加および無添加)ならびに γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* を土着菌として含有するBHC連用区土

壤を風乾し、 γ -BHC分解菌の生残性を調べた。

<方法>

供試土壌：対照区土壌および γ -BHC運用区土壌の両者を用いた。農業圃場の表層から採取し、生土のまま2mmのふるいを通したものを実験に用いた。BHC運用区土壌は土着 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*が長期生残期にある時期に採取した。

γ -BHCの添加：対照区土壌は2分し、その一方に γ -BHCをセライト増量法により添加した。添加量は10 μ g/g soilである。 γ -BHC運用区土壌にも同様に γ -BHCを添加した。

菌体の接種：L-brothで前培養し、集菌・洗浄したSS86株菌体を対照区土壌に接種した。 γ -BHCを添加しない対照区土壌には、 10^2 、 10^3 、 10^4 cells/g soilの3段階の接種菌数を設定し、 γ -BHCを添加した対照区土壌には約 10^4 cells/g soil接種した。

土壌のインキュベーション： γ -BHCを添加した対照区土壌と γ -BHC区土壌は、SS86株の接種後あるいは γ -BHCの添加後30 $^{\circ}$ C、60%WHCでインキュベーションを行った。 γ -BHCを添加しない対照区土壌はインキュベーションを行う事なく次の風乾の操作を行った。

土壌の風乾： γ -BHC無添加対照区土壌はSS86株の接種後直ちに土壌を風乾した。

γ -BHCを添加したBHC区土壌と対照区土壌は、土壌をインキュベーションして γ -BHC分解菌が最大菌数に達した後に種々の菌数レベルにまで減少したときに風乾を開始した。

インキュベーション後の土壌を適当な大きさのビーカーに厚さ4cm程度になるように入れ、ビーカーの上部をアルミホイルで軽くおおった。これを30 $^{\circ}$ Cの恒温室におき、風乾した。完全な風乾には約1週間を要した。風乾終了後の土壌も、このままの状態を保持した。

γ -BHC分解菌数のカウント：MPN法によった。

<結果> (図8-1)

対照区土壤に γ -BHCが添加されていない場合、接種されたSS86株は、どの菌数レベルで接種された場合にも、土壤を風乾すると速やかに死滅した。

対照区土壤に γ -BHCが添加され、それを資化してSS86株が増殖した後に土壤が風乾されるとされると、SS86株は風乾前の菌数によらず、風乾終了時に約 10^3 cells/g soilのレベルに減少し、この菌数を約1週間保持した。その後土壤の乾燥状態を保持すると、SS86株は緩やかに死滅に向かった。

γ -BHC連用区の土壤では、風乾前の菌数がどのレベルにあるときにも、土壤を風乾すると、菌数は約 10^3 cells/g soilまで減少し、土壤の乾燥状態を維持しても、この菌数はインキュベーションの期間中保持された。

(実験2) 土壤の透水による菌体の洗脱性

対照区土壤が様々な菌数レベルのSS86株を保持している時に土壤をカラムに詰め、透水を行って菌体の洗脱状況を調べた。これと同様の事を γ -BHC区土壤についても調べ、両者の結果を比較した。

<方法>

土壤カラム: 直径4.4cm、高さ6cmの円筒形塩ビカラムを用いた。カラムの下部には、ガラス管をさしたゴム栓を取り付け、そこから透水液が排出されるようにした。

対照区土壤: 農薬長期連用畑園場の対照区表層(10cm)から採取し、風乾する事なく2mmのふるいを通過させた。この土壤に γ -BHCを $10\mu\text{g/g soil}$ 添加し、常法にしたがってSS86株を接種した。これらの処理を施した土壤を充填密度 0.70dry soil/cm^3 にて上記のカラムに詰めた。このような土壤カラムを多数用意した。

土壤カラムのインキュベーション: 土壤水分を最大用水量の50%、土壤温度を 30°C に保ち、暗所にてインキュベーションを行った。

透水: 接種直後及びインキュベーション後21, 30, 40, 68日目に透水を行った。土壤カラムの上部に $50\text{mm}/2.5\text{hours}$ の割合で蒸留水を静かに滴下した。本実験は破壊実験であり、一度透水処理を行った土壤カラムはSS86株菌数の計数に供し、引き続きのインキュベーションは行っていない。

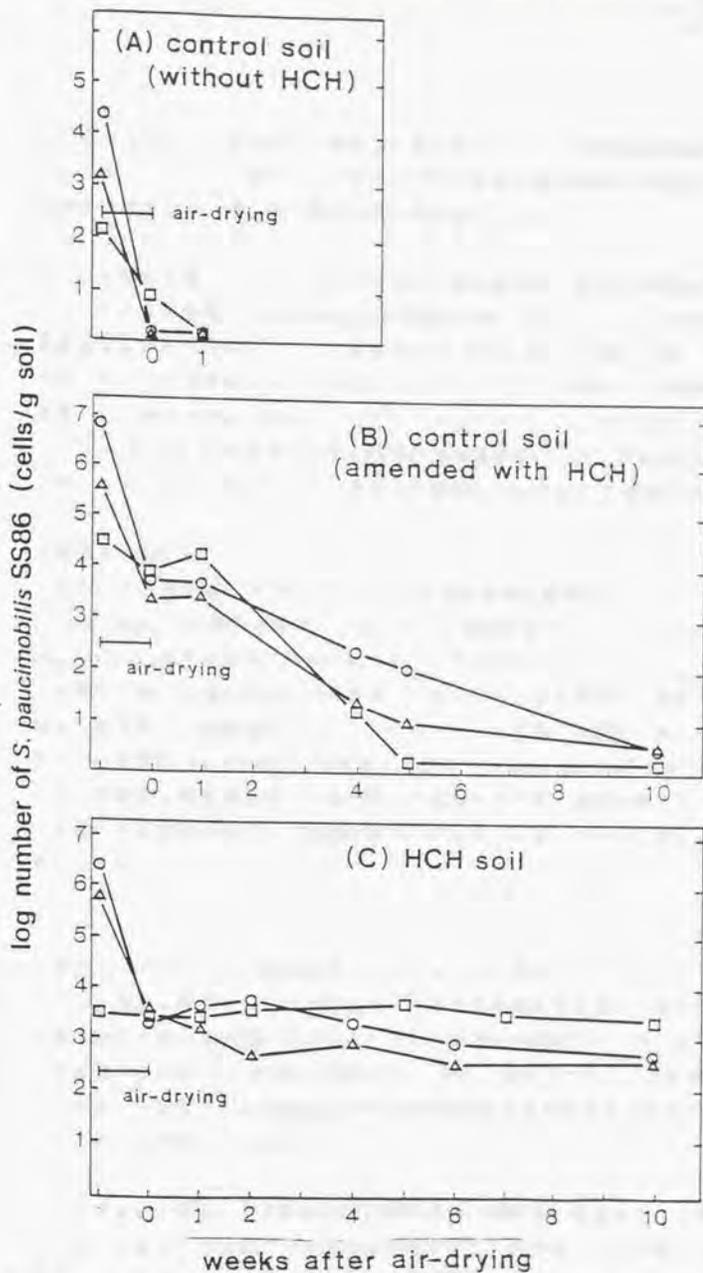


図8-1 土壌を風乾した時の接種 *S. paucimobilis* SS86 と土着 γ -BHC 分解菌 *S. paucimobilis* の生残性の違い。(A) γ -BHC を添加しない対照区土壌、(B) γ -BHC 添加対照区土壌、(C) γ -BHC 連用区土壌

SS86株のカウント：透水後の土壌および透水液について、SS86株を常法に従ってMPNカウントした。透水後の土壌中のSS86株菌数と透水液中に洗脱されたSS86株菌数の和をもって透水前土壌中のSS86株菌数とした。

BHC連用区土壌についても上記の対照区土壌と基本的に同様に実験を行った。

γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* が長期生残期にある γ -BHC連用区土壌を農業連用圃場から採取し、生土のまま2mmのふるいを通して実験に供試した。この土壌にセライト増量法により10 μ g/g soilの γ -BHCを添加し、80%WHCに水分調整した土壌をカラムに詰め、30°Cでインキュベートした。 γ -BHC添加後5, 11, 21, 30, 40, 61日目に対照区土壌と同様の透水処理を行った。透水液と透水後の土壌についてMPN法により γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* 菌数を計数した。

<結果> (図8-2)

得られた結果を図8-2に示した。これらは透水前の土壌中の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* の菌数を横軸に、透水液中に洗脱された γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* 菌数を縦軸に対数目盛りで示したものである。

対照区土壌では透水前のSS86株菌数がどのレベルにある時でも、透水を行うとほぼ一定の割合で洗脱された。これに対して、 γ -BHC連用区土壌では、 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* が増殖して約10⁴ cells/g soilよりも高い菌数の時には、対照区土壌と同様に、一定の割合で洗脱されたが、菌数が低下するにつれて洗脱される割合は減少し、菌数が約10² のレベルに達した時にはほとんど洗脱されなくなった。

(実験3) クロロホルム薫蒸処理された土壌での生残性

クロロホルム薫蒸は、土壌の微生物バイオマスを測定する際に土壌中に存在する微生物の大部分を死滅させる方法として土壌微生物研究においてしばしば用いられる操作である[1]。対照区土壌及び γ -BHC連用区土壌にこの処理を施し、 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* の生残性を比較する実験を西山が行っている[22]。その結果をここに示す。

γ -BHCを添加した対照区土壌に接種されたSS86株が増殖後種々の菌数にあるときに土壌を25分間クロロホルム薫蒸すると、薫蒸後にはSS86株はほとんど生残していなかった。一方、BHC区土壌で同様の処理を行うと、10²-10⁴

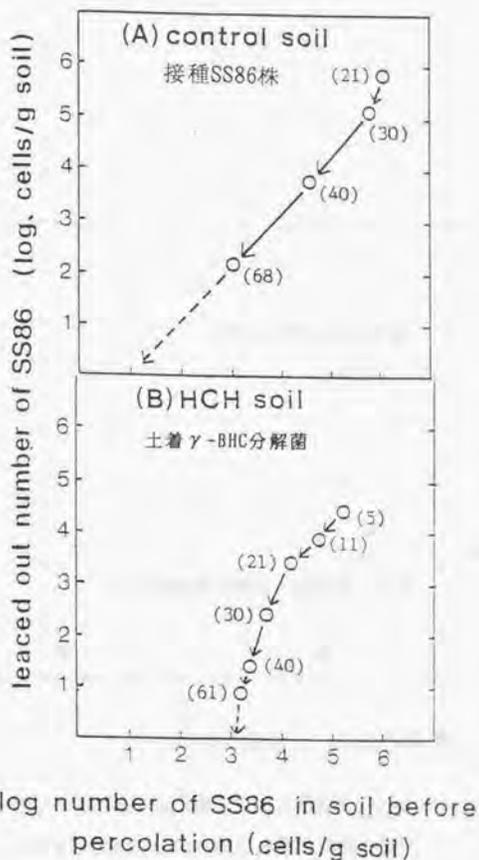


図8-2 土壤を透水した時の接種 *S. paucimobilis* SS86 と土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis* の洗脱性の違い。
(A) 対照区土壤に接種されたSS86株、(B) γ -BHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*

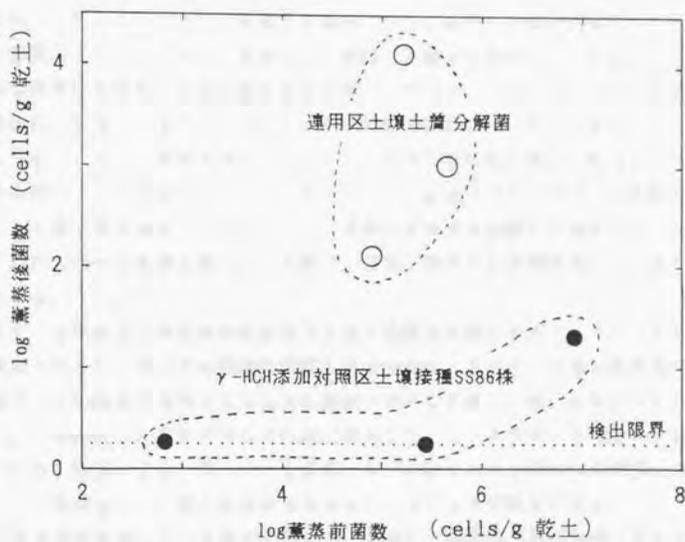


図8-3 土壌をクロロホルム薫蒸した時の接種 *S. paucimobilis* SS86 と土着 γ -HCH 分解菌 *S. paucimobilis* の生残性の違い。

cells/g soilの土着 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*が生残した(図8-3)。

<考察>

以上の3つの実験結果から、 γ -BHC連用区に土着の 10^3 cells/g soil程度の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*が長期生残できる要因、ならびに対照区土壤に接種されたSS86株が長期生残できない要因について、次のように考察される。

まず、風乾処理された土壤中での γ -BHC分解菌の生残性を比較した実験の結果から考察する。

図8-1に示された死滅状況は大まかに、次の3つに区分できるであろう。

- ①極めて速やかな死滅：これはBHC無添加対照区土壤に接種されたSS86株の全体、 γ -BHC添加対照区土壤に接種され、 γ -BHCを資化して増殖した後の菌体のうち 10^3 cells/g soilを越える部分、BHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌のうち、 γ -BHCを資化して増殖した部分が示すものである。
- ②短期間菌数を維持した後の緩やかな死滅：これは γ -BHC添加対照区土壤に接種され、増殖した後の 10^3 cells/g soil程度の菌体が示すものである。
- ③死滅を示さず、長期間生残：これは、 γ -BHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌が示す。長期生残している約 10^3 cells/g soilの γ -BHC分解菌を保持する土壤を風乾処理したときに、この菌数が変化することなく保持されたことから、この土壤中の長期生残している菌体が風乾土壤中でも長期生残していると考えられる。

さて、土壤はその構造の中に大なり小なり孔隙を保持しており、 γ -BHC分解菌はそれらの孔隙の中の液相に存在しているわけであるが、土壤の風乾処理の過程で、土壤構造の保持する大きな孔隙から小さな孔隙へと順に水分が失われていく。この過程で水分の失われた孔隙に存在していた γ -BHC分解菌は乾燥にさらされ、死滅に至る。従って、上記の、3つの区分の γ -BHC分解菌が存在していた場所をその孔隙の孔径から大まかに以下のように推定できる。

- ①土壤の風乾処理によって極めて速やかに死滅した菌体は、風乾処理によって容易に水分の失われる孔隙、すなわち土壤の非毛管孔隙中に存在していた。
- ②1週間ほど生残した後緩やかに死滅した菌体(接種され、増殖した菌体の一部)は、風乾処理によって容易には水分の失われない孔隙、すなわち孔径の大きな毛管孔隙中に存在していた。
- ③風乾処理下でも生残する菌体(γ -BHC連用区土壤の土着長期生残菌体)は風乾によっても水分を保持する微細な毛管孔隙中に存在していた。

ただし、土壤の孔隙の孔径や形態は一律ではなく、様々な形状が考えられる。しかも、土壤水分の変化にともなって、粘土鉱物の膨潤・収縮が起こり、孔径が

変化することも有り得るが、ここでは上の大まかな3種類の分類のまま考察を進めることにする。

上記の説明から、土壤に接種されたSS86株ならびに土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*の存在部位とその推移について次のように考察される。

- ①対照区土壤にSS86株が接種された時、その菌体は土壤の非毛管孔隙に存在する。
- ② γ -BHCが土壤に添加された場合、接種されたSS86株は増殖を開始する。増殖の過程において、増殖菌体の一部は孔径の大きな毛管孔隙中に進入する。進入できた菌体の数は 10^3 - 10^4 cells/g soilである。進入できなかった菌体は、そのまま非毛管孔隙に存在する。
- ③ γ -BHC連用区土壤に長期生残している 10^3 cells/g soilの γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*は、微細な毛管孔隙中に生残している。土壤に γ -BHCが添加されて増殖すると土壤の非毛管孔隙へと進出する。

この考察は残りの2つの実験結果からも支持される。

透水実験において、対照区土壤に接種されたSS86株は、約 10^3 cells/g soil以上のどの菌数レベルにある時に透水処理が施されてもほぼ一定の割合で菌体が洗脱されたが、この洗脱割合は、約 10^4 cells/g soilを越える土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*のそれと類似していた。この結果は、接種され、BHCを資化して増殖したSS86株と、土壤に土着で、 γ -BHCを資化して増殖した γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*は、土壤中の同様な性質を持つ部位に存在していることを意味している。そしてこのような、透水処理によって容易に菌体が洗脱されるような部位とは、非毛管孔隙が相当するであろう。

γ -BHC連用区土壤に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*が、 10^4 cells/g soil以下に減少すると、減少にしたがって洗脱される菌数の割合が少なくなり、 10^3 cells/g soil程度で長期間生残している菌体はほとんど洗脱されなくなった。このことは、 10^3 - 10^4 の長期生残している土着 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*は、透水の影響を受けにくい部位に生息していることを意味し、そのような部位として微細な毛管孔隙は理にかなうものである。

10^3 - 10^4 cells/g soil程度の、孔径の大きな毛管孔隙に進入することが出来たと考えられた接種SS86株も、それ以上の増殖菌体と比較して土壤の透水処理による洗脱状況が異なることが予想されるが、本実験では、その菌数レベルでのデータが不足しており、明確な結論は導けなかった。

一方、土壤をクロロホルム薫蒸した時、毛管孔隙の入口付近に存在する菌体は溶菌したが、毛管孔隙の深潤部に存在していた菌体は生残した事が報告されている[2]。この時、非毛管孔隙に存在した菌体はもちろん死滅したと考えられる。こ

の結果を実験3の結果に適用するならば、クロロホルム蒸気で生残した 10^2-10^4 cells/g soilの土着 γ -BHC分解菌S. paucimobilisは、毛管孔隙の深潤部に存在していたことになる。また、先に接種した菌体のうち 10^2-10^4 の部分は、増殖時に孔径の大きな毛管孔隙に進入できたとしたが、これは毛管孔隙の入口近くと考えることもできる事になる。いずれにしても、実験3の結果も上記の考察を支持・補強するものである。

8.2 毛管孔隙の生残部位としての有利さ

それではなぜ微細な毛管孔隙あるいは毛管孔隙深潤部が γ -BHC分解菌S. paucimobilisの長期生残部位として有利なのであろうか。

まず、土壤の水分条件の変動、即ち、土壤の乾燥や過湿から身を守ることが第一に考えられる。 γ -BHC分解菌S. paucimobilisはグラム陰性の非孢子形成菌であり、耐乾燥性が弱い。土壤の表層は、特に夏場など乾燥状態にさらされることがあるが、土壤の毛管孔隙はそのような場合でも土壤水分を保持できる場であり、そこに生残部位を獲得しておれば、土壤の乾燥の影響を受けにくい訳である。逆に、土壤が大量の降水を受け、下方浸透水が存在する場合に、菌体の溶脱を防ぐ役割も重要であろう。これらの事は上述の土壤の風乾あるいは透水処理実験から明らかである。

土壤細菌の微視的生息部位について、大まかに言えば乾燥に比較的強いグラム陽性菌は土壤団粒外部に、乾燥に比較的弱いグラム陰性菌は団粒内部に生息しているとされている[3]。また、強い分散によらなければ土壤から分散されないような菌体が土壤には存在し、そのような菌は土壤が乾燥状態に置かれたときにも生残している事が報告されている[3,4]。このような知見は、変動する水分環境のもとで毛管孔隙内の γ -BHC分解菌S. paucimobilisが安定して生残している事実と合致するものである。

もう一つの重要な役割は、原生動物の捕食作用から菌体を保護することである。前章でSS86株の死滅要因は主として原生動物の捕食であることを示した。原生動物のサイズはおよそ $10\mu\text{m}$ より大であるために、この作用を逃れて生存するためにはそれよりも小さい孔隙に入り込んでおけばよい。 γ -BHC分解菌S. paucimobilisの生残部位となっている毛管孔隙の孔径は風乾土壤の水ポテンシャル(pF約4)から考えて約 $0.3\mu\text{m}$ であり、この大きさの孔隙には原生動物はどうも侵入することはできない。つまり毛管孔隙中に入ることの出来ているSS86は原生動物の捕食作用を逃れることができ、長期生残しているのである。このような

捕食作用から菌体を保護する場としての孔隙の重要さはPostma[5,6]、Heijnen [7]、Hattori[3,4,8]らの指摘するところでもある。

8.3 長期生残を可能にする別の要因の可能性

γ -BHC連用区土壌に土着の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*が長期生残できる理由として土壌構造の側面以外の要因も可能性として挙げられる。

それは、土壌に接種されたSS86株と土壌に土着の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*の生理的性質の違いである。例えば、土壌環境中で生息している土壌微生物のある部分は、それが実験室内で培養されている時とは細胞の大きさ、増殖速度、細胞成分、細胞表層などを異にし、いわゆる"starvation survival"を行っているとされている[9-11]。細胞の大きさや表層構造の違いが原生動物による捕食のされ易さ[12,16]や土壌中での移動水による細胞の運搬[13,17]に影響するという報告もなされており、starvation survivalは、細胞が長期生残するための1つの戦略であると言うことができる。実際、飢餓処理された細胞を自然環境を模したマイクロゾムに接種すると、栄養細胞を接種したときよりも生残性が高まった事例が報告されたおり[14,15]、本研究でも7.5に述べたように、飢餓培養した後のSS86株を土壌に接種すると栄養細胞を接種したときよりも死滅速度が緩やかになることが確認されている。

自然環境中の微生物が長期生残するための戦略としてしばしば備えているもう1つの生理的性質に、菌体外多糖などのbiopolymerの生産がある。biopolymerの生産により、バクテリアの耐乾性が上昇すること[18]、土壌構成成分の表面への吸着能が高まること[19,20]、吸着能の上昇により原生動物の捕食を受け難くなること[19]などが報告されている。

BHC連用区土壌に土着の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*は、その具体的な内容は不明であるが、上に述べたような何等かの生理的性質を備えており、接種SS86株は単離された後に実験室内での培養や植え継ぎを重ねるうちにそれを欠失し、長期生残できなくなった可能性が考えられるわけである。長期生残できる土着 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*が土壌の風乾に耐える事、透水によって移動しにくい事、クロロホルム蒸気に耐える事は、上記の生理的性質のいずれかによっても説明可能なのである。

この可能性は、接種SS86株でも土着 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*と同様に長期生残できるような事例が見いだされれば否定できることになる。そして実際、そのような事例を西山がすでに示している。それは、土壌に γ -BHCを添加し

てそのまま5週間放置し、その後にSS86株を接種するというものである[21]。5週間放置されている間おそらくは γ -BHCが土壤毛管孔隙の細部にまで拡散・到達し、その状態の時に接種されたSS86株は、 γ -BHCへの走性により毛管孔隙に進入したため長期生残できたと推測され、生理的性質の違いに由来して長期生残が出来るという可能性は否定された。

第8章の引用文献

- [1] Jenkinson, D.S., and Paulson, D.S. (1976) The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. biochem.* 8, 209-213
- [2] Foster, R.C. (1988) Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils*, 6, 189-203
- [3] Hattori, T. (1973) The microenvironment of microbes in the soil (2) : aggregates level. In: *Microbial life in the soil*, pp. 263-312. Marcel Dekker, New York.
- [4] Hattori, T. (1988) Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. The reports of the Institute for Agricultural Research Tohoku University, 37, 23-36
- [5] Postma, J., Hok-A-Hin, C.H., and Van Veen, J. A. (1990) Role of microniches in protecting introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii against competition and predation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 495-502
- [6] Postma, J., and van Veen, J.A. (1990) Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii introduced into soil. *Microb. Ecol.* 19, 149-161
- [7] Heijnen, C.E., and van Veen, J.A. (1991) A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 73-80
- [8] Vargas, R., and Hattori, T. (1986) Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 233-242
- [9] Roszak, D.B., and Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379
- [10] Morita, R.Y. (1988) Bioavailability and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can. J. Microbiol.* 34, 436-441
- [11] Henis, Y. (1987) Survival and dormancy of bacteria. In: *Survival and dormancy of micro-organisms* (Henis, Y., Ed.), pp.1-108. Willey International Publications, New York.
- [12] Gurijará, K.R., and Alexander, M. (1990) Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1631-1635

- [13] Gannon, J.T., Manilal, V.B., and Alexander, M. (1981) Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 190-193
- [14] Thompson, I.P., Cook, K.A., Lethbridge, G., and Burns, R.G. (1989) Survival of two ecologically distinct bacteria (*Flavobacterium* and *Arthrobacter*) in unplanted and rhizosphere soil: laboratory studies. *Soil Biol. Biochem.* 22, 1029-1037
- [15] Gauthier, M.J., Munro, P. M., and Breittmayer, V.A. (1989) Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater. *Can. J. Microbiol.* 35, 379-383
- [16] Gonzalez J.M., Sheer, E.B., and Sheer, B.F. (1990) Size-selective grazing of bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 583-589
- [17] Yates, M.U., and Yates, S.R. (1988) Modeling microbial fate in the subsurface environment. *Critic. Rev. Environ. Control.* 17, 307-344
- [18] Hepper, G.M. (1975) Extracellular polysaccharides of soil bacteria. In: *Soil Microbiology* (Waker, N., Ed.), pp. 93-110. Butterworths, London.
- [19] Balkwill, D.L., and Casida, Jr., L.E. (1979) Attachment to autoclaved soil of bacterial cells from pure cultures of soil isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1031-1037
- [20] Fehrmann, R.C., and Weaver, R.W. (1978) Scanning electron microscopy of *Rhizobium* spp. adhering to fine silt particles. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 279-281
- [21] Nishiyama, M., Senoo, K., Matsumoto, S. (1993) Establishment of γ -1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane-assimilating *Sphingomonas paucimobilis* SS86 into soil. *Soil Biol. Biochem.* 25, 769-774
- [22] Senoo, K., Nishiyama, M., Wada, H., and Matsumoto, S. (1992) Differences in dynamics between indigenous and inoculated *Sphingomonas paucimobilis* SS86 in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 86, 311-320

第9章 総合考察

9.1 第II部の実験結果のまとめ

① 土壤微生物のオートエコロジ（個生態学）研究の重要性

農耕地において有用微生物を土壤に接種し作物収量の向上や病害の防除などに利用する試みは古くからなされてきた。また、近年は組換えDNA技術によって有用機能を付与された組換えDNA微生物（genetically engineered microorganisms, GEMs）を農業生産向上、環境浄化、鉱工業生産などの目的で野外の土壤環境に放出して利用する機運が高まっている。いずれの場合においても、利用しようとする特定種の微生物の土壤環境中での挙動とそれを規制する要因を解明することが、目的とする微生物の効果的な利用ならびに安全性確保の面から必要となってくる。また、その知見は学問的にも興味深いものである。

② モデル微生物としての γ -BHC分解菌

土壤中の特定種の微生物の生態（個生態、オートエコロジ）を解明するためには、その微生物を選択的、高感度に検出することが必要となり、その種々の方法が世界的に開発されつつある。 γ -BHC長期連用畑圃場から単離された γ -BHC分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* SS86（以下 γ -BHC分解菌と記す）は、好氣的に γ -BHCを分解すると言う極めてまれな性質を持つため、 γ -BHC分解能をマーカーとして土壤中の菌数を選択的に計数できることが期待された。事実、 γ -BHCを唯一の炭素源とする選択培地を用いたMPN法により、土壤中の γ -BHC分解菌を選択的、高感度（検出限界は2.1 cells/g soil）、簡便に計数できることを確認した。また、本菌株において γ -BHC分解能は安定に保持されていること、非滅菌土壤に接種された γ -BHC分解菌は、その土壤に選択的基質として γ -BHCを添加することにより増殖できることも明らかになった。従って、 γ -BHC分解能をマーカーとして土壤中での γ -BHC分解菌の挙動を詳細に追跡することが可能であると判断された。

一方、 γ -BHC分解菌は、農業長期連用圃場の γ -BHC区土壤には土壤微生物の一員として常に生息しているが、 γ -BHCを投与していなかった対照区土壤からは検出されなかった。このことを利用し、対照区土壤に接種された γ -BHC分解菌と γ -BHC区土壤に土着菌として存在している γ -BHC分解菌の両者の挙動を比較解析することを試みた。すなわち、土壤環境に新たに導入された外来微生物と、土壤環境にそもそも生息する土着微生物の両者のオートエコロジを解析するためのモデル微生物として γ -BHC分解菌を用いたのである。

③接種菌と土着菌の土壤中での生残性の違い

はじめに土壤に接種された γ -BHC分解菌と γ -BHC区土壤に土着の γ -BHC分解菌の生残性を野外試験圃場において調査した。試験圃場の表層10cm、直径30cmの円柱形の部位に10 μ g/g soilの γ -BHCを投与し、約10⁶ cells/g soilの γ -BHC分解菌を5月に接種した。 γ -BHC分解菌は γ -BHCを資化して約10⁶ cells/g soilまで増殖した後減少に向かい、接種後21週目には10¹ cells/g soilのレベルになった。なお、菌体の接種部位からの鉛直方向下方への移動現象も確認された。秋と冬にも接種試験を行ったところ、接種された γ -BHC分解菌の増殖、生残、死滅は地温に大きく影響され、冬に地温が低下すると死滅は停止することが明らかになった。農業連用圃場の γ -BHC区においては γ -BHCの投与直前に約10³ cells/g soilの γ -BHC分解菌が生息しており、 γ -BHCを投与するとやはり増殖した後減少に向かったが、減少は約10³ cells/g soilのレベルで停止し、その後はこの菌数が長期間維持された。同様の現象は室内モデル系実験によっても確認された。また、室内モデル系実験では、 γ -BHCを投与されない土壤に接種されたSS86株は増殖する事なく死滅に向かうことも見いだされた。

④ γ -BHC分解菌の土壤中での死滅要因

土壤浸出液を培地として γ -BHC分解菌を培養し、生残期にある時に細菌と糸状菌を含む土壤懸濁液または細菌、糸状菌、原生動物を含む土壤懸濁液を培地に添加したところ、前者の添加は γ -BHC分解菌の菌数に影響を与えなかったのに対して後者の添加により γ -BHC分解菌の菌数は著しく減少した。同様の結果は、土壤浸出液培地の代わりに滅菌土壤を用いた実験においても得られた。また、 γ -BHCを添加した土壤に γ -BHC分解菌を接種し、 γ -BHC分解菌増殖後死滅期にあるときに土壤にシクロヘキシミドを添加すると γ -BHC分解菌の死滅は抑制された。これらの結果から、 γ -BHC分解菌の土壤中での死滅は主として原生動物の捕食作用によりもたらされることが示された。従って、 γ -BHC区土壤に長期生息している土着の γ -BHC分解菌は原生動物の捕食から逃れる何らかの方策を備えていること、対照区土壤に接種された γ -BHC分解菌はその方策を得ることが出来ていないことが示唆された。

⑤接種菌と土着菌の生残性の違いをもたらす要因としてのマイクロハビタット

γ -BHC分解菌が接種された対照区土壤ならびに γ -BHC連用区土壤に様々な処理を施すことにより、土着 γ -BHC分解菌が原生動物の捕食から逃れる方策を明らかにすることを試みた。接種 γ -BHC分解菌あるいは土着 γ -BHC分解菌が土壤中で γ -BHCを資化して増殖した後種々の菌数レベルにあるときに土壤を風乾処理すると、接種 γ -BHC分解菌は完全に死滅したが、土着 γ

-BHC分解菌は約 10^3 cells/g soilの菌体が長期間生残した。

上記の系において土壌を風乾する代わりに透水処理を施すと、接種 γ -BHC分解菌は透水前の菌数に関わりなく常に一定の割合で土壌から溶脱されたのに対し、土着 γ -BHC分解菌は約 10^3 cells/g soilの菌体が溶脱をまぬがれた。

また、 γ -BHC分解菌の生残する土壌をクロロホルム薫蒸すると、接種 γ -BHC分解菌は完全に死滅したのに対し、 $10^2 \sim 10^3$ cells/g soilの土着 γ -BHC分解菌は生存していた。

以上の結果は、接種 γ -BHC分解菌と土着 γ -BHC分解菌とではそれらが土壌中で存在するマイクロな部位が異なることを示している。 γ -BHC連用区土壌で原生動物の捕食を逃れて長期間安定に生息している約 10^3 cell/g soilの土着 γ -BHC分解菌は、風乾、透水、クロロホルム薫蒸の影響を受けにくいような土壌のマイクロな部位、すなわち土壌の毛管孔隙深淵部を生残部位（マイクロハビタット）としていることを示している。これは裏返せば、 γ -BHCが添加されて 10^3 cells/g soilを越えて増殖した土着 γ -BHC分解菌ならびに土壌に接種された γ -BHC分解菌はこのような部位には存在していないことを意味している。

9.2 γ -BHC分解菌の土壌中でのライフサイクルについて

これまで得られた知見をもとにして、 γ -BHC連用区土壌に土着の γ -BHC分解菌および対照区土壌に接種された γ -BHC分解菌の生活環を次のように描くことができる（表9-1）。

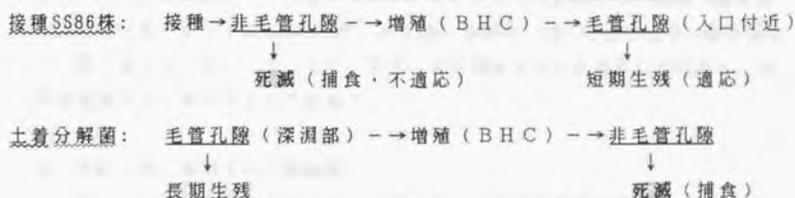
① γ -BHC連用区土壌に土着の γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*

この土壌には $10^3 \sim 10^4$ cells/g soilの γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*が土着菌として生息している。この菌体は、土壌構造内の微細な毛管孔隙あるいは毛管孔隙の深淵部を生残部位としている。

土壌に γ -BHCが投与されるのは通常毎年5月下旬から8月上旬である。この時の地温は γ -BHC分解菌が増殖できる範囲にあるので、 γ -BHC分解菌 *S. paucimobilis*は γ -BHCを資化・分解しながら増殖する。増殖した細胞は毛管孔隙から進出して非毛管孔隙に分布する。

投与された γ -BHCを消費し尽くすのにはほぼ1カ月かかる。この後は非毛管孔隙中の増殖菌体は主として原生動物の捕食作用により、また養分の欠乏による飢餓も加わって死滅にいたる。捕食作用は平均地温約 20°C を切る11月末ま

表9-1 土壤に接種された γ -BHC分解菌*S. paucimobilis* SS86ならびに
 土壤に土着の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*の増殖・生残・死滅部位



で続く。一方、毛管孔隙中の生残部位に存在している菌体は捕食されることなく生残し続け、翌年の γ -BHCの投与を待つことになる。おそらく、秋から冬にかけて地温が下がると、捕食作用も停止し、 γ -BHC分解菌自体の活性も低下して、いわゆる休眠状態になって越冬するのであろう。

以上は基本的な生活環であるが、細かく言えばderivativeが存在しよう。例えば、地温が、 γ -BHC分解菌が増殖可能でかつ原生動物が活動可能な温度範囲にあるときに、土壌が一旦乾燥した後に降水により湿潤すれば、 γ -BHC分解菌はすかさず増殖し、その後再び捕食により減少するであろう。この事は、土壌の風乾処理実験の結果(8.2)から明らかである。 γ -BHC分解菌が増殖した際に降水によって土壌水の下方移動があればそれによって増殖菌体の一部は下層土壌へ運搬されるであろう(8.2)。また、ある種の有機物、例えば植物遺体や動物遺体が土壌に混入してきたときにも γ -BHC分解菌はそれを基質として増殖し、その後捕食されて減少するのであろう。

②対照区土壌に接種されたSS86株

土壌にSS86株が接種されたとき、土壌構造中の非毛管孔隙に存在する。

土壌に γ -BHCが施用されていなければ、SS86株は増殖することなく、原生動物の捕食により死滅する。

土壌に γ -BHCが施用されていると、SS86株はそれを資化して増殖する。増殖は主に土壌の非毛管孔隙中で起こるが、増殖菌体の一部は団粒内の毛管孔隙に入れる。ただし、孔径の大きな毛管孔隙、または毛管孔隙の入口近くであろう。この部位では土壌の乾燥から短期間なら菌体は保護される。

非毛管孔隙、比較的孔径の大きな毛管孔隙のいずれに存在する菌体も、主として原生動物の捕食により死滅にいたり、土壌に定着・長期生残することはない。

接種菌の場合にも土着菌で述べたのと同様の多少のderivativeは存在する。

以上は春の土壌の平均地温が20°Cを越えるような場合に接種した場合の話であるが、8.3で示したように、接種時期が異なればその後の生活環は大きく異なってくる。しかし、基本的にはSS86株の γ -BHCを資化しての増殖可能な地温の範囲と原生動物の捕食作用が活発な地温の範囲のかねあいで生活環は決定される。

9.3 長期生残部位(マイクロハビタット)の性質について

これまでに、BHC運用区土壌に土着の γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*の長期生残部位は土壌構造の微細な毛管孔隙または毛管孔隙深淵部である事を示して

きたが、土壌の不均一な構造性を考えた場合、毛管孔隙のさらに細かな性質を長期生残部位の性質として考慮しなければならないであろう。それは例えば、孔隙径、孔隙の立体構造、孔隙の構成物の種類と表面の性質、孔隙の寿命などである。土壌は1次鉱物、2次鉱物、酸化物、新鮮有機物、腐朽有機物、腐植物質、土壌生物などから成り、それらが凝集して不均一・複雑な立体構造を構築している[1]。従って、毛管孔隙も多種多様な性質を有するものに分類されるはずである。

事実、泉らはBHC連用区土壌から、毛管孔隙を提供する構造体としての土壌団粒を分画し、数百個の団粒について γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*の分布状況を調べたところ、 γ -BHC分解菌の存在している団粒はごく一部であり、しかも存在菌数にもばらつきが見られた[2]。この事は、 γ -BHC分解菌が生残するのに適した性質を有する毛管孔隙とそうではない毛管孔隙とが土壌中に存在することを示唆している。また、西山は種々の孔隙を有する多孔質ガラスを人工的なマイクロハビタットとして利用し、孔隙の中にSS86株を導入した後に土壌に埋設してSS86株を長期生残させることを試みたが、良好な結果は得られなかった[3]。さらに西山は γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*の生残する土壌を耐水性団粒分画した際に、植物遺体画分に高密度の γ -BHC分解菌が生息している事を見いだした[4]。これらの結果は、毛管孔隙を構成する構成物の種類や表面構造が長期生残部位の性質の重要な部分であること、植物遺体が長期生残部位の構成物の1つであり、おそらく菌体への基質の供給の役割を担っていることを示唆している。

本研究で用いた土壌はいずれも火山灰土壌であるが、この土壌は団粒構造に富んでおり、BHC連用区土壌、対照区土壌のいずれもその重量の約90%が団粒化している[4]。そして、団粒は長期生残部位を提供する主要な場となっている[4]。しかしながら、団粒は形成・崩壊を繰り返しており、寿命を有するものである[5]。従って、 γ -BHC分解菌*S. paucimobilis*の長期生残部位にも寿命が存在することになり、BHC連用区土壌に安定して生残している γ -BHC分解菌の一部は、新規の生残部位の獲得をその生活環の中のいずれかの時点で行っているはずである。これがどの様な条件下で、どのようなメカニズムで行われているのか興味深い点である。

9.4 GEMs、有用微生物の土壌環境への導入利用を成功させるための戦略

作物生産の分野では旧来から窒素固定菌、土壌病害菌の拮抗菌、植物の生育を促進する蛍光性*Pseudomonas*などを土壌に接種し、作物生産を向上させる試みがな

されてきた[6,9,10]。この事は農業や化学肥料の多用による環境汚染の観点から、その重要性がますます高まっている。その際に最も問題となるのは目的とする微生物をいかにして捕食や競争に打ち勝って生残・定着させ、目的の機能を発揮させるかという点である。単に微生物を土壤に接種してもほとんど効果が見られず、生残性を高めるために接種菌のキャリアとしての粘土鉱物の利用[11,12]、や、種子へのバクテリアゼーションなどが有効であることが経験的に知られている[6,7]。GEMsを自然環境下へ導入して有効利用する場合にも、この点が克服すべき大きな問題点となろう。

本研究から得られた知見はこれを解決するための示唆を与えるものである。すなわち、有用微生物の土壤環境での有効利用に際しては、次のような基本原理が考えられる。

①単に土壤に微生物を接種したのではその微生物は速度の大小こそあれ死滅に向かう。

種々の微生物を土壤に接種し、その生残性を調べた実験において、いずれの微生物も顕著な増殖は示さず、次第に死滅に向かうことが明らかにされている[8]。*E. coli*のように、土壤とは全く別の環境から単離された微生物を土壤に導入した場合に死滅してしまうのは、環境条件の違いからむしろ当然と思われるが、土壤から単離した土壤細菌を土壤に接種してもやはり生残できない。γ-BHC分解菌では、単離された土壤(γ-BHC連用区土壤)とほぼ同じ性質を有する土壤(対照区土壤)に接種されても死滅する事が示された(7.6)。

この事実は、土壤への導入微生物がその土壤で生態的地位を獲得することの難しさを物語っている。土壤に外来の微生物が侵入してきた時には、捕食や競争といった排除圧がかかるために容易には定着できないと考えられる。生態学においてはある生物群集構造の中に外来の生物群が侵入し、定着できるためには「置き代わり」や「追い出し」が行われることが必要とされており、これは土壤微生物の群集構造においてもあてはまるであろう。

②土壤に導入された微生物を増殖させ、生残性を高めるには選択的基質の添加が有効である。

土壤に外来の微生物が導入されたとき、生存に必要な基質や微量元素を巡って土着微生物と激しい競争を行わなければならない。また、捕食による菌数の急速な減少が生じる。また、導入された菌体は貧栄養な土壤環境中では代謝の不活性化休眠状態に陥り、目的とする機能を発現しないことが考えられる。これらに打ち勝って接種菌数を維持または増殖させ、活性化させるためには、導入微生物が

利用できる基質を与えてやる必要がある。その際なるべく他の微生物には利用されない様な基質を与えてやることより有利である。

③導入微生物に生残部位（マイクロハビタット）を与えるとさらに生残性が高まる

導入微生物に発揮させたい目的機能は常に発現させたいとは限らない。例えば農業利用の場合、土壤病害の発生状況や作物の生育ステージに応じて発現させたいタイミングが存在するであろう。このような場合、導入微生物を長期間生残させる必要が生じる。

導入微生物が土壌から単離された物である場合、元来生息していた土壌中では固有のマイクロハビタットを獲得していた可能性が高い。そのマイクロハビタットの性質を解明し、その性質を有する人工または天然のハビタットを導入微生物の「住み家」として利用すれば、さらに生残性が高まるはずである。

農業分野で有用微生物の接種利用が成功していると考えられる数少ない事例 [6]においては、上記の原理が成立していると考えられる。例えば、接種した根粒菌が豆科植物に根粒を形成している場合がある。それはパーミキュライトなどを担体として根粒菌を大量に根圏域に接種すると、根に接種菌に由来する根粒が形成されるというものである。この場合、根粒菌はおそらくパーミキュライトに強く吸着されているために捕食されにくく、死滅速度が緩やかなのであろう。そして、緩やかに死滅に向かう途中で植物の根が伸長して菌体の近傍に到達し、根粒を形成するのであろう。根粒中では根粒菌は植物からの有機物を基質として利用でき、また、根粒そのものがハビタットとして機能しているわけである。別の例としては、PGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacterium)として知られる蛍光性 *Pseudomonas* のバクテリゼーションがある。これは、麦などの種子に蛍光性 *Pseudomonas* を大量にまぶしてから播種すると、その種子から生育した植物の根の表面にこの細菌が生息し、植物の生育を促進したというものである。この場合、種子から根が伸長したときにその近傍には他の土壤細菌よりも圧倒的に多数の接種菌が存在しているために、接種菌が根の表面に付着し、そこをハビタットとして根から分泌される有機物を基質として利用していると考えられる。

特に農業分野での有用微生物の利用に関して、目的効果を得るための接種技術は経験的な現場技術が先行し、定着のメカニズムの解明は立ち遅れている感がある。有効な接種技術の確立のためには、有用微生物がそもそも土壌に土着菌として生息し、機能していた微細環境条件を解析してその微生物の生態を明らかにし、

そこから得られた知見をもとにして接種技術へと応用する、いわば、「土着菌に学ぶ」事が近道の一つであると考え。

ここまでは導入微生物の増殖と生残についてのみ論じてきたが、「目的の機能を発現させる」こと、すなわち機能のコントロールはさらに別の問題として解決しなければならないであろう。例えば、合成培地上で検索して取得した土壤病害菌の拮抗菌を土壤に接種して病害を防除する試みはほとんどの場合成功しない。これは、接種菌がそもそも土壤中で生残しているのかどうか、さらに、目的とする土壤病害菌の近傍に到達できているのかどうか最も疑われる所であるが、それとともに、合成培地上で示したような拮抗機能を培地とはかけ離れた土壤環境条件下で発現できるのかも疑わしい。第I部の考察とも関連するが、自然環境下で発現できることが確かな機能を利用する、または構築する事が肝要と思われる。さらに、その機能を発現させるタイミングをも制御できることが必要となろう。すなわち、有用微生物を野外土壤環境で使いこなすには、生残、増殖、活性、機能発現、さらには死滅を制御できることが必要になる。

本研究では、「接種菌の生態と土着菌の生態は異なる」ことが明らかになった。これはGEMsの自然環境下での利用の安全性を評価するにあたって考慮にいれなければならない点であろう。接種菌は土壤水の移動によってより運搬され易いこと、一般的に死滅し易いが接種時期によっては高い菌数で長期間生残する場合があることなどが見いだされ、このことは菌体の系外への流出や他の微生物への遺伝子の伝達により高頻度で起こる可能性を示唆している。ただし、そのようなことが起こること自体が問題であるのかどうかは、また別の議論となろう。

9.5 今後への展望

本研究を振り返ってみて、残された課題と今後への展望を記してみたい。

まず、 γ -BHC分解菌を用いた本研究で、この微生物の土壤中での長期生残部位が微細な毛管孔隙や毛管孔隙深淵部であろうとの結論が導かれたが、これは間接証明の域を出るものではない。是非とも直感的に*in situ*でこれを確認したいところである。その際、生残部位を構成する成分や生残菌体を取り巻く微細環境の性質も明らかにできれば、マイクロハビタットの性質が解明されることになろう。

γ -BHC分解菌の土壤中での挙動を調べることは、土壤微生物のオートエコ

ロジーを説明するための1つの事例としての意味が含まれていた。そして土壌での生残部位やそれを拠点とした生活環がある程度説明されたわけであるが、それではこれが土壌微生物のどの部分を反映する事例として解釈すれば良いのかが問題となる。一般的にグラム陰性菌は土壌の団粒内の孔隙を住み家としているとされているが、土壌微生物において多様性が保持されていることを裏返せば、その生息環境や生残部位の多様性も保証されているはずであり、この問題は一概には解答できないであろう。γ-BHC分解菌が属する*Sphingomonas*属も土壌からだけでなく、稲の初や雑草表面から検出されており[14]、植物との相互作用をも含めたさらに広い生活環が形成されている可能性が高い。従って、本研究で説明されたのは土壌微生物のオートエコロジーのごく一部であると言わざるを得ず、土壌微生物の生態全般を理解するためにはさらに広範な知見の蓄積が必要である。

ところで、個々の土壌微生物の生態を説明するためには、検出・計数技術が必要となる。GEMsの野外利用の機運にともなって、土壌中の特定微生物を検出・計数する手法が各種考案されている[13]。ここで注意しなければならないのは、薬剤耐性、生物発光能などのマーカーを人為的に付与した微生物を土壌に導入し、そのマーカーを利用して検出する手法は、元来土壌に生息する微生物の生態の研究には一般的には使えないという事である。これは、接種菌の生態と土着菌の生態は異なるという本研究の結果から導かれる。従って、土壌微生物がそもそも保有している何らかの性質を利用しなければならない。人為的に付与したマーカーが使えるのは、土壌に外来から侵入した微生物が土壌に定着して土壌微生物の一員となることが明らかな場合、例えば土壌病害菌の感染などの場合に限られる。

本研究は、BHC分解菌*Sphingomonas paucimobilis* SS86がγ-BHC汚染土壌のbio-remediationに使える可能性を示し、また、土壌環境に導入されたGEMsの挙動と有効利用法を探るための一事例でもあったわけであるが、土壌生態系での生活環が明らかにされた現在、微生物農薬や他の環境汚染物質の浄化の目的で土壌環境に導入するGEMsの宿主微生物としても有望である[15]ことも付記しておきたい。

第9章の引用文献

- [1] Duchaufour, P. 粒子の配列: 構造、通気性 In: コンサイス土壌学 pp.71-86 永塚鎮男訳 博友社 (昭和63年)
- [2] 妹尾啓史, 泉賢一郎, 西山雅也, 松本聡 (1992) γ -HCH分解菌の土壌中での生残部位の解析 日本土壌肥科学会講演要旨集第38集 p.43
- [3] 西山雅也 (1991) BHC分解菌 *Pseudomonas paucimobilis* SS86の土壌中での挙動 東京大学修士論文 未発表
- [4] Nishiyama, M., Senoo, K., Wada, H., and Mastumoto, S. (1992) Identification of soil micro-habitats for growth, death and survival of a bacterium, γ -1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane-assimilating *Sphingomonas paucimobilis*, by fractionation of soil. FEMS Microbiol. Ecol. 101, 145-150
- [5] Elliott, E.T., and Coleman, D.C. (1988) Let the soil work for us. Ecological Bulletins 39, 23-32
- [6] 本間善久 (平成2年) 拮抗微生物とくに細菌・放線菌利用による土壌病害の防除 農業有用微生物 pp.108-123 梅谷猷二・加藤肇共編 農林水産省農業研究センター 養賢堂
- [7] van Elsas, J.D., and Heijnen, C.E. (1990) Methods for the introduction of bacteria in soil: A review. Biol. Fertil. Soils 10, 127-133
- [8] Acea, M.J., Moore, C.R., and Alexander, M. (1988) Survival and growth of bacteria introduced into soil. Soil Biol. Biochem., 20, 509-515
- [9] van Elsas, J.D. and Heijnen, C.E. (1990) Methods for the introduction of bacteria into soil. A review. Biol. Fertil. Soils 10, 127-133
- [10] 特集号: 微生物による病害防除 (昭和63年) 植物防疫 42
- [11] Heijnen, C.E., Hok-A-hin, C.H., and van Veen, J.A. (1991) Protection of *Rhizobium* by bentonite clay against predation by flagellates in liquid cultures. FEMS Microbiol. Ecol. 85, 65-72
- [12] Kotb, S.I., and Angle, J.S. (1986) Survival of blue-green algae in various carrier media. Trop. Agric. 63, 113-116
- [13] O'Donnell, A.G., and Hopkins, D.W. (1993) Extraction, detection and identification of genetically engineered microorganisms from soils.

In: Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment. pp.111-131 Ed. Edwards, C. John Wiley & Sons, Chichester

- [14] Nishiyama, M., Oyaizu, H., Kawahara, K., Senoo, K., and Matsumoto, S. High population of Sphingomonas species on plant surface. Appl. Environ. Microbiol., (in contribution)
- [15] 福田雅夫 Pseudomonas paucimobilisにおける宿主-ベクター系の構築と BHC 分解能の育種 「人間環境系」研究報告集 N-1 小領域人為起源物質の環境中の循環と制御 平成4年度研究成果報告書 pp.209-210 文部省 「人間環境系」重点領域研究N1 「人為起源物質」基礎班

謝辞

本研究の材料となった農薬長期連用畑圃場を設置され、本研究を開始するにあたってテーマを与えられ、御指導頂いた高井康雄東京大学名誉教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、絶大なる御指導、御助言を頂いた和田秀徳東京大学前教授に心から感謝致します。

本研究を行うにあたり数多くの御助言、御支援を頂いた松本穂東京大学教授に心から感謝致します。

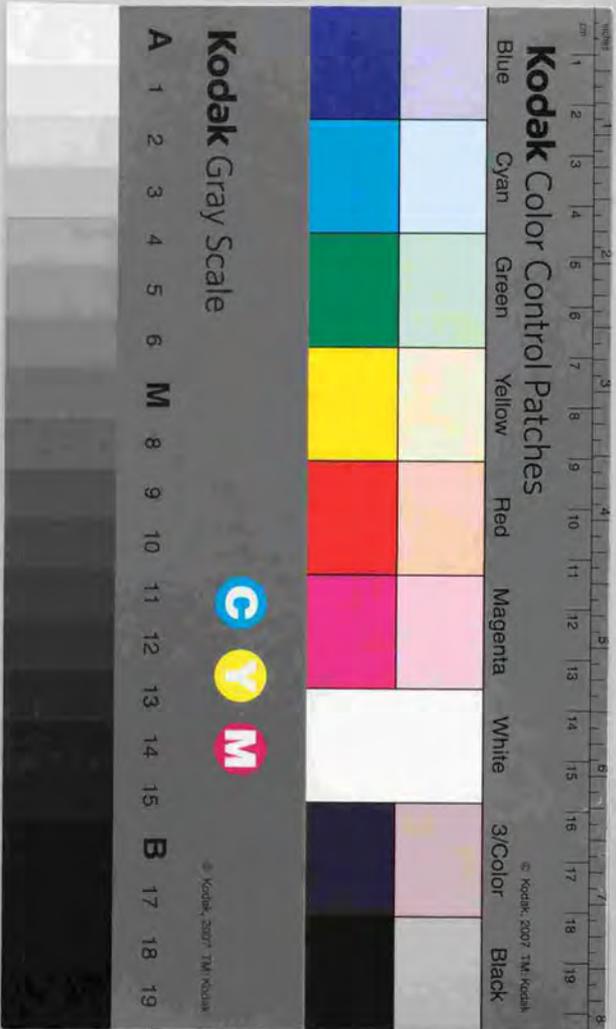
本研究を取りまとめるにあたり数多くの御助言を頂いた小柳津広志東京大学助教授に深く感謝致します。

農薬長期連用畑圃場において数々の知見を発見され、本研究の基礎を築いて下さった東京大学土壌学研究室の諸先輩方に、筆者の研究生活を支えて下さった土壌学研究室の室員の皆様に感謝致します。

BHC分解菌の単離を行うに際して、矢野圭司東京大学名誉教授に貴重な御助言を頂いた。また、BHC分解菌の同定に際して駒形和男東京大学名誉教授ならびに応用微生物学研究所第三研究部（現分子細胞生物学研究所分子系統研究分野）の室員の方々に貴重な御助言ならびに御協力を頂いた。ここに心から感謝致します。

最後に、土壌学研究室西山雅也氏とは、本研究を進めるにあたり数多くの有益な議論を重ねることができ、研究の進展に御協力頂いた。ここに特に記して謝意を表します。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19