

2008 年度大会一般講演要旨

***Pseudomonas* 属細菌由来 IncP-7 群分解プラスミドの
モデル環境中における挙動の解析**

新谷政己・松井一泰・山根久和・○野尻秀昭
(東大・生物工学セ)

分解プラスミドの環境中における挙動解析は、分解遺伝子群の水平伝播を利用した土着細菌の分解力の向上を図る上で重要である。我々は、塩基配列が決定済みの IncP-7 群に属するカルバゾール (CAR) 分解プラスミド pCAR1 を材料として環境中における動態の解析を行った。なお、プラスミドの供与菌としての宿主には既にゲノム配列を解読済みの *Pseudomonas putida* KT2440 株を用いた。研究を行うにあたり、実験の再現性を上げるため、また様々な環境因子を人為的に調整可能にするために、実際の土壌や環境水を模した模擬土・模擬環境水を作製した。模擬土としては、土壌の主成分 (二酸化ケイ素、酸化アルミニウムおよび腐植酸) を混合・滅菌し、模擬環境水としてはリン酸バッファーや濾過滅菌した河川・湖沼の水を用いた。これらのサンプルに対し、pCAR1 保持菌株と、その他の菌株を接種した後、接種菌の生残性・CAR 分解力・接合伝達現象について時系列ごとに解析を行った。その結果、模擬土においては水分含量が CAR 分解の鍵因子であり、土の水分含量を飽和させた方が、分解が速いことが判明した。また CAR 分解の「主役」は接種菌そのものであり、プラスミド受容菌は検出できなかった。一方、模擬環境水においては、pCAR1 の接合伝達が認められ、プラスミド受容菌が CAR 分解に重要であることが示唆された。さらに、モデル環境水中での接合伝達の成立には、環境水中の二価カチオンの存在が必須であることが示された。本研究は生研センター基礎研究推進事業として行われた。

**原生生物の捕食圧を制御した環境下での
外来微生物 (大腸菌) の動態**

橋本知義¹⁾・橋爪沙耶香²⁾・染谷 孝²⁾
(¹⁾九州沖縄農研センター、²⁾佐賀大学農学部)

土壌中では多種多様な土壌生物がそれぞれの機能を担っている。原生生物等による細菌群の捕食が植物根圏の養分動態、あるいは有機物施用等に由来する外来微生物の土壌中での定着に大きくかわることは知られているものの、その捕食圧の評価は殺菌土壌を利用したモデル実験によるものでなかった。殺菌土壌へ捕食者 (原生生物等) と被食者 (細菌等) を接種するモデル実験では、土壌中の多様な微生物群集が捕食者や接種微生物の動態に及ぼす影響が不明である。土壌けんだく液 (微生物群集) を接種する方法が提案されているものの、この場合でも、土壌中の微生物群集は多様な生息場所に分布しているのに対して、殺菌土壌に接種した微生物群集の生息場所は異なると想定できる。外来微生物の生残性を評価するためには、土壌微生物の生息する場への攪乱が少なく、かつ原生生物による捕食圧を制御できる新たなモデル実験系を開発することが必要である。

そこで、クロロフォルム薫蒸処理により原生生物の捕食圧を制御し、外来微生物 (大腸菌) の生残性を捕食圧とそれ以外の環境因子に分けて評価するモデル実験系を構築した。24 時間クロロフォルム薫蒸処理後に大腸菌を接種し、原生生物の捕食圧を制御した環境下での接種大腸菌の動態を調査したところ、原生生物は大腸菌を含む一般微生物の捕食により培養 1 週間後には有意に増加することを確認した。また、今回の実験系により、薫蒸処理直後に接種した大腸菌は培養 1 週間後に有意に減少するが、その減少を自然減と捕食圧による減少に区分することができた。

油汚染土のバイオレメディエーションに関する微生物学的検討

○千野裕之^{1,2)}・安達 舞²⁾・李 哲揆²⁾・犬伏和之²⁾

(¹⁾ 株式会社大林組 技術研究所、²⁾ 千葉大学大学院 園芸学研究所)

油汚染土のバイオレメディエーションは、一般に好気性微生物によって行われている。その菌の動態を的確にモニタリングできれば、バイオレメディエーションの進行状況や終点の把握を行ううえで有用である。従来、採取土壌を用いて、全菌数、ヘキサデカン資化性菌数などを希釈平板法を主体に測定してきたが、必ずしも的確に評価できないケースも認められた。

ここでは、油分含有量が TPH として 2% 弱の風化原油由来の砂質油汚染土を用いた。①汚染土のみの場合、②汚染土に栄養として所定量の窒素、リン酸の栄養を加えた場合、③汚染土に所定量の窒素、リン酸およびサウジアラビア産堆肥を体積比 5% 加えた場合について 30℃ 恒温条件で、1 週間に 1 回攪拌を行い培養し、土壌呼吸活性 (土の一部を取り密閉容器で培養し 1 日培養後の炭酸ガス発生量を定量する)、希釈平板法による全菌数を経時的にモニタリングした。

その結果、①、②では土壌呼吸活性は低く、50 mg-C/kg 乾土であったが、③において、2 週間から増加し、1.5~2 ヶ月後にピークとなり、300 mg-C/kg 乾土以上となった。3 ヶ月後には活性は低下した。このことは、現地試験においてははじめの 2~3 ヶ月で油分含有量が初期に 1.8% であったのが 2 ヶ月で 1.0%、3 ヶ月で 0.64% と著しく低下したことと対応していた。同時に測定した全菌数は①で $10^3 \sim 10^7$ CFU/g、② $10^4 \sim 10^8$ CFU/g、③ $10^5 \sim 10^8$ CFU/g を示し、土壌呼吸活性と傾向はほぼ対応していた。

好気的なバイオレメディエーションの進み具合を評価するうえで、土壌呼吸活性をモニタリングするのは有効な方法であるといえる。今後、現場に適用していくためにはさらに簡便で迅速なモニタリング法が望まれる。

**ナシ剪定枝コンポストによる白紋羽病菌抑制作用の
微生物学的研究**

宋戸雅宏¹⁾・横山秀美¹⁾・須田 互¹⁾・牛尾進吾²⁾

(¹⁾ 千葉大学大学院園芸学研究所、²⁾ 千葉県農林総合研究センター)

ナシ園から毎年多量に排出される剪定枝は堆肥化して園内に還元されることが望まれる。しかし、未分解有機物は白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) の好適な栄養源となるため、本菌の活性を促す可能性が懸念される。一方、完熟した堆肥は本菌の生育を抑制するとの報告もあることから、本研究ではナシ剪定枝コンポストが白紋羽病菌に対して抑制作用を示す場合の微生物的な特徴を明らかにすることを目的とした。約 30 種の剪定枝 (チップ) コンポストを用いて白紋羽病菌抑制作用の有無を調査したところ、抑制作用と堆肥化期間や C/N 値との明確な関連性は認められなかった。しかし、菌糸生育を抑制したコンポストを滅菌した場合には菌糸が伸長したことから、白紋羽病菌の抑制にはコンポスト中の生物因子が強く影響していることが考えられた。剪定枝コンポストの酵素活性は菌糸生育抑制作用との関連性が認められなかったが、全脂肪酸 (FAME) 組成の主成分分析によるクラスターは抑制作用の有無により大まかに分割された。このとき各脂肪酸の主成分に対する固有ベクトルから、抑制作用を有する剪定枝コンポストにはグラム陰性細菌の指標となっている 18:0 2OH が多く、また糸状菌の指標となっている 18:2 ω 6,9 が少ないことが示された。一方、PCR-DGGE による細菌群集および糸状菌群集解析では抑制作用の有無による特徴的なバンドやパターンは認められなかった。しかし、細菌群集の主要なバンドのほとんどが *Paenibacillus* sp. であること、また、抑制作用を有したコンポストの主要バンドから腐植や堆肥などの有機物を分解、腐生する数種のキノコを含む糸状菌の存在が示唆された。これらの結果から、白紋羽病菌抑制作用の要因として、グラム陰性タイプの *Paenibacillus* 属菌や、存在量は少ないものの堆肥化に有効な糸状菌群が関与していることが推察された。