

自然環境下における組換え微生物の利用の際の生態系への影響評価方法の検討

渋谷 勝利
(技術研究所)

§ 1. はじめに

組換え DNA 技術の適用は、研究段階からその一部は閉鎖系大量培養され、医薬品、洗剤、化粧品などの製品としてますます身近なものとなりつつある。さらに、従来の閉鎖系利用から微生物農薬、組換え植物、環境保全分野などでは自然環境下での開放系利用の研究開発が活発になってきている。それに伴い、生態系への影響を危惧する声が高まりつつある。こうした背景のもと、近い将来の開放系利用の有望な分野である環境保全分野での適用を対象に生態系への影響評価方法を検討した。

検討は、環境保全分野のうち、難分解性物質に汚染された土壌浄化に適用する際の事例研究を通じて行なった。組換え微生物の野外実験に際しての安全性についての科学的論議が十分でないため、今回は、我が国では残留性と毒性のため製造が中止されている難分解性の殺虫剤である 1, 2, 3, 4, 5, 6-Hexachlorocyclohexane ([慣用名: γ -BHC], 以下 γ -HCH と略す) を分解し、すでに自然界での生存性が高いことが知られており、生態系への影響を検討する上で適していると考えられる γ -HCH 分解菌(非組換え微生物)を用いて、本剤に汚染された土壌浄化への適用を対象とした。本報告は、生態系への影響評価項目のうち、生存性に及ぼす環境要因、土着微生物(原生動物を含む)への影響評価に関する検討結果について述べる。

§ 2. 実験方法

2.1 概要

組換え微生物の開放系利用の際の生態系への影響評価方法は、確立したものがないため化学物質の安全性評価に用いられているマイクロゾム¹⁾の手法を用いて適用の可能性を含めて検討を行なった²⁾。生存性に及ぼす環境要因に関する検討では、比較的環境要因の均一な、50~100

gの土壌をガラス製の深底ペトリ皿(径6cm×深さ9cm)に入れた小型マイクロゾムと自然界を近似できるように温度(送風温度、地温)、湿度、風速、降水量を制御でき、太陽光近似スペクトルを持つ蛍光灯(トルーライト、デュロテスト社製)を持つ土壌量約200kg(80cm×80cm×深さ40cmの土壌槽)の写真-1の大型マイクロゾムを用いた。マイクロゾムでの実験結果を検証するために写真-2に示す2m×2mの実験圃場を東京都江東区に供試土壌を客土して作製した。

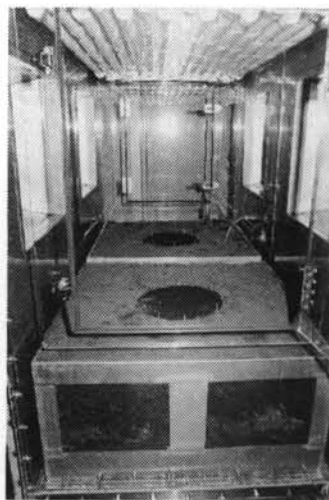


写真-1 大型マイクロゾム



写真-2 客土して製作した実験圃場

供試土壌は、我が国畑地の最大土壌群である黒ボク土（神奈川県伊勢原市産）を用いた。土壌 pH の影響では、酸性度の高い我が国果樹栽培地の最大土壌群である褐色森林土（和歌山県海南市産）を用いた²⁾。滅菌土は121°C、1時間の条件で1日1回、3日間高压蒸気滅菌により調製した。小型マイクロゾムによる検討では、特に記載のない場合は、初期土壌水分を高水分（約30%）とし γ -HCH を10 μ /g-dry-soil 添加し、30°Cの条件で実施した。

2.2 供試微生物

供試微生物である *Sphingomonas paucimobilis* SS86（旧名：*Pseudomonas paucimobilis*）は、和田らによって東京大学農学部 γ -HCH 長期連用圃場より単離され、唯一好氣的に γ -HCH を分解する微生物である³⁾。

その検出は、表-1 に示す γ -HCH を唯一炭素源とした無機培地を用い、30°Cで3週間振盪培養し、分解に伴い遊離する C1 イオンをイオンメータ（堀場 N-8F 型）で検出し、MPN（最確数）法により算出する方法による⁴⁾。

土壌に接種する場合は、Lブロスを用い30°C、48時間振盪培養後、遠心洗浄を3回繰り返し、滅菌水に再浮遊したものを用いた。

§ 3. 小型マイクロゾムによる検討

3.1 生存性及びその環境要因

3.1.1 実験概要

供試微生物の生育温度域および pH 域を測定するとともに、消長に影響を及ぼすと考えられる土壌水分、土壌 pH、土着細菌との競合、原生動物による捕食について選定することとした⁵⁾。さらに、供試微生物が好氣的に唯一炭素源として γ -HCH を資化できることから栄養源

K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NH ₄ NO ₃	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
Fe(SO ₄) ₃	5mg
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	5mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5mg
Yeast extract	5mg
γ -HCH	飽和
精製水	1 ℓ
pH	7.0

表-1 γ -HCH 分解菌検出培地組成

としての γ -HCH 添加量の影響についても検討した。

供試微生物の生育温度域をLブロスを用いバイオフォトレコーダ（東洋科学 TN-112DE 型）を用いて測定するとともに、Lブロスに HCl または NaOH を滴下し pH を変化させた培養液を調整し、生育 pH 域を測定した。

土壌水分の影響では、風乾土に滅菌水を滴下し、初期水分を一定に保持した場合と自然環境下では土壌水分の変動が予測されるため水分変化させた場合の両者について検討した。水分を増加させる場合は滅菌水を再滴下し、乾燥させる場合は30°Cの乾燥器中に5日間放置した。土壌 pH の影響では、褐色森林土に CaCO₃ を0.1%または1%添加したものを供試した。

土着細菌との競合実験では、L. E. Casida Jr. らの方法により競合細菌を分離し、細菌を食べる細菌として知られている *Bdellvibrio* spp. の分離に用いられている軟寒天重層法により単離した競合細菌を用いた^{6,7)}。競合実験は、滅菌土を用い供試微生物の検出は無機培地を用い

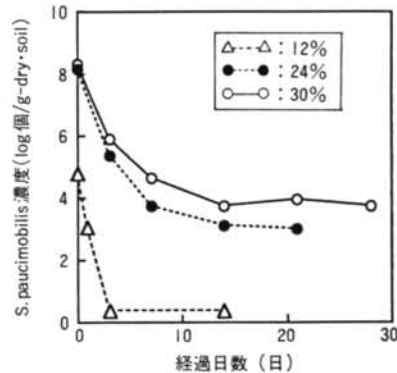


図-1 土壌水分の影響(1)

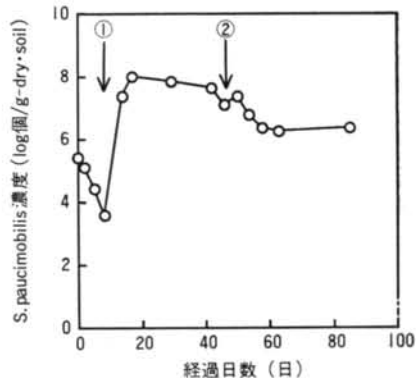


図-2 土壌水分の影響(2) (①: 滅菌水を滴下, ②: デシケータ内で乾燥)

たMPM法により、また同時にLプロセス寒天培地(Lプロセスに寒天を15%添加)によりマイクロゾム内の全微生物(供試微生物+土着競合細菌)を検出し、両者の消長傾向により競合を判定する。原生動物による捕食実験では、移住現象を利用した鈴木らのEAKO(Enakviga Kotonajo)法により原生動物を捕集した⁸⁾⁹⁾。原生動物数は、原生動物の餌菌として*Pseudomonas putida*を滅菌水に入れ、約 10^8 個/mlに調整したものに土壌希釈液を接種し30℃、4~7日間培養後、遠心分離機を用い集積し、これを鏡検しMPN法により算出した。栄養源としての γ -HCHの影響は、接種時の γ -HCH添加量を10, 100, 1000 μ g/gとし消長を比較した。

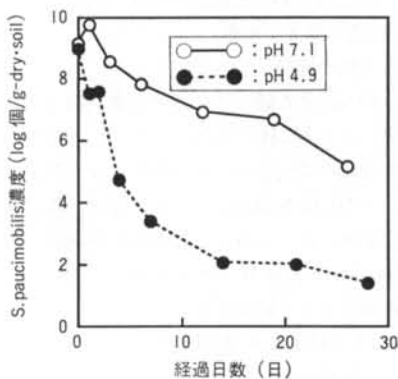
3.1.2 実験結果および考察

1) 生育温度およびpH域

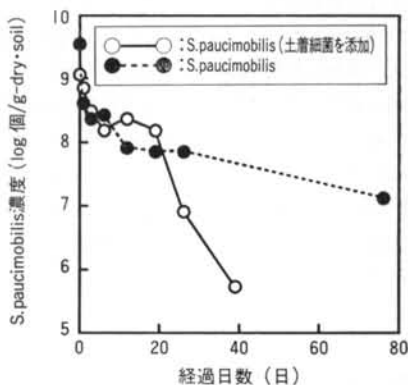
供試 γ -HCH分解菌の生育温度域は、17~41℃で至適温度は、30℃である。同様に生育pH域は、pH4.7~9.5の範囲で、至適pHは7~8.4である。

2) 土壌水分

初期土壌水分30, 24, 12%に調整した場合の γ -HCH



図—3 土壌 pH の影響



図—4 土着微生物との競合実験結果

分解菌の消長を図—1に示す。接種菌濃度 10^8 個/gに対して、高含水率の30%では2週間経過後に約 10^4 個/gに、24%では同様に約 10^5 個/gに定着、安定化する傾向が見られた。低含水率の12%では、接種後3日間で検出されなくなった。 γ -HCH分解菌の消長に接種の土壌水分の影響が大きい。また、初期土壌水分を24%に調整し、12日目(図中①)に28%の高含水率に、さらに42日目(図中②)に乾燥工程に入り11%の低含水率に変化させた場合の消長を図—2に示す。接種直後は、図—1と同様の減少傾向を示したが、滅菌水を滴下し高含水率に変化させると 10^8 個/gレベルが速やかに増殖し 10^9 個/gレベルまで回復した。これを乾燥させ低含水率に変化させると図—1とは異なった挙動を示した。この挙動の相違は、 γ -HCH分解菌の土壌団粒でのニッチ(niche)の獲得によるものと考えられる。

3) 土壌 pH

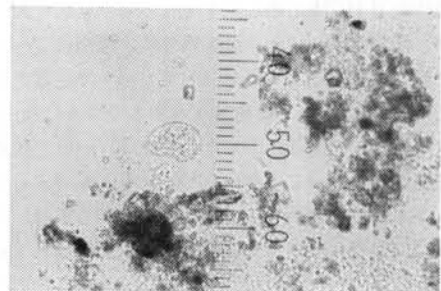
供試褐色森林土は酸性土壌で、 CaCO_3 を0.1%添加すると土壌pHは4.9となり、1%添加ではpH7.1となる。この際の γ -HCH分解菌の消長を図—3に示す。pH4.9の場合、25日経過は 10^1 個/gレベルであるのに対して、pH7.1では 10^5 個/gレベルにあり生存性が良好であった。 γ -HCH分解菌の消長は土壌pHの影響を受ける。

4) 土着細菌との競合

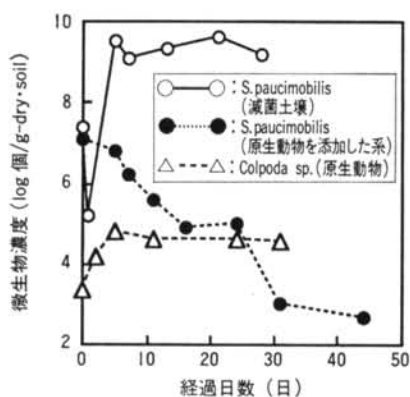
L. E. Casida Jr.らの方法を用いるとフィルタ上に多数の溶菌斑を認めることができ供試微生物に影響を及ぼす土着細菌の存在を示唆した。この溶菌斑の部分より単離した土着細菌(未同定)との競合実験結果を図—4に示す。供試微生物とマイクロゾム内の全微生物はほぼ同濃度で顕著な競合は確認できなかったが、25日経過後から供試微生物数は徐々に減少傾向を示した。一方、全微生物は同濃度を維持していることから競合が確認された。

5) 原生動物による捕食

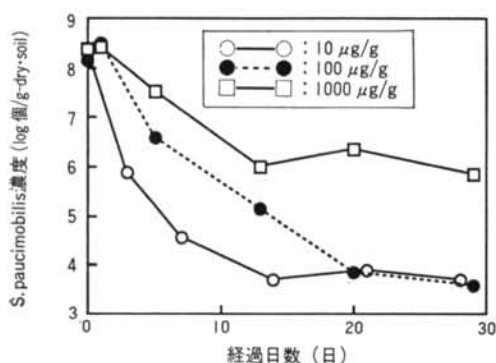
EAKO法により各種原生動物が分離されたが、写真—3に示す原生動物が優占種となった。これは本邦土壌



写真—3 *Colpoda* sp.



図—5 原生動物との捕食実験結果



図—6 接種時の γ -HCH添加濃度の影響

より普遍的に見られ *Colpoda* sp. と同定された。この原生動物を用いた滅菌土壤中での捕食実験結果を図—5に示す。接種菌濃度、約 10^7 個/gの供試微生物は徐々に減少する傾向を示し、約44日経過後では 10^2 個/gレベルとなった。原生動物は 10^3 個/gから飽和レベルと考えられる 10^4 個/gレベルに増殖した。原生動物を加えない対照土壤中での供試微生物は、非常に生存性が良好で 10^9 個/gレベルにあることから土壤より分離した原生動物による捕食を確認した。

6) 栄養源(γ -HCH)添加の影響

接種時の γ -HCHの添加量を変化させた結果を図—6に示す。添加量 $10\mu\text{g/g}$ の実験系では、接種後2~3週間まで徐々に減少しその後 10^4 個/gレベルで定着を示した。 $100\mu\text{g/g}$ の実験系も接種後3週間まで徐々に減少し、 10^4 個/gレベルで定着を示した。 $1000\mu\text{g/g}$ の実験系では、2週間まで減少しその後 10^6 個/gレベルで定着を示した。いずれの実験系も接種後2~3週間で定着、安定化したが、定着した際の供試微生物の菌濃度は、 $100\mu\text{g/g}$ 以下の実験系と $1000\mu\text{g/g}$ の実験系では約100倍の差があり、土壤中の γ -HCH濃度に大きく影響されること

が明確となった。

3.2 土着微生物への影響

3.2.1 実験概要

供試微生物を約 10^8 個/g接種し、土着微生物との相互作用を検討した。土着微生物としては、総細菌、グラム陰性菌を代表するクリスタルバイオレット耐性菌、糸状菌および原生動物を選定した。供試微生物が γ -HCHを分解することから γ -HCHを2週間ごとに添加した実験系で検討した。

総細菌の検出は、アルブミン寒天培地を用い 30°C で2週間培養後計測した。クリスタルバイオレット耐性菌の検出は、 0.1% クリスタルバイオレット液を培地 1ℓ 当たり 5ml 添加したアルブミン寒天培地を用い 30°C で2週間培養後計測した。糸状菌の検出は、 $30\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン添加ローズベンガル寒天培地を用い 30°C で1週間培養後計測した¹⁰⁾。原生動物の検出は、前述のMPN法により計測した。実験初期には、供試土壤の一部をアセトン抽出しECD付きガスクロマトグラフ(HP5890A)で分析し添加した γ -HCH濃度の推移を測定した¹¹⁾。

3.2.2 実験結果および考察

1) 供試微生物の消長

供試微生物の消長を図—7に示す。供試微生物は、接種時に添加した γ -HCHの有無に係らず、2週間目まではほぼ同様の減少傾向を示し、 10^3 個/gまで減少した。

その後、 γ -HCHを接種時に添加しなかった実験系はさらに減少を続けた。一方、 γ -HCHを $10\mu\text{g/g}$ 再添加した実験系では、 γ -HCHを再添加するごとに数日間で約 10^7 個/gレベルまで増殖を示し、その後減少する傾向を繰り返した。この結果より、供試生物は土壤中に γ -HCHが存在すると増殖を示し 10^7 個/gレベルに達するが、土壤に γ -HCHが無い場合には減少することから、本 γ -HCH分解菌は自然環境下で利用する際の安全性の観点から、所定の目的が終了すると減少するという利点がある。

2) 総細菌、グラム陰性菌および糸状菌の挙動

結果を図—7に示す。総細菌は、 γ -HCHの再添加実験系および非再添加実験系ともに 10^8 個/gレベルで安定した値を示した。グラム陰性菌(クリスタルバイオレット耐性菌)は、 γ -HCHの非再添加実験系では 10^7 個/gレベルで安定した値を示したが、再添加実験系では、添加時の供試微生物の再増殖の検出によるものと考えられる増加を示し変動するが、数日後には非再添加実験系レベルとなった。糸状菌の場合は、再添加実験系および非再添加実験系ともに 10^3 個/gレベルで安定した値を示した。

供試微生物は、 γ -HCH の再添加に伴い増殖を示したが、その際総細菌および糸状菌は再添加実験系および非再添加実験系ともにほぼ同レベルにあることから、またグラム陰性菌についても添加時に多少変動を示すが速やかに再添加実験系と同レベルになることより土着総細菌、グラム陰性菌および糸状菌への影響は少ないと考えられる。

3) 原生動物の挙動

結果を図-7に示す。 γ -HCH の非再添加実験系では $10^4 \sim 10^5$ 個/g レベルで変動したが、再添加実験系では非再添加実験系に比べ大きな変動を示したが、自然界での変動レベル内にあるものと考えられる。したがって、供試微生物の消長により原生動物の受ける影響は少ないと考えられる。

4) γ -HCH の濃度推移

図-7に示すように、接種時に添加した $10 \mu\text{g/g}$ γ -HCH は7日間でほぼ消費つくされていた。 γ -HCH の濃度推移と1)の供試微生物の消長を比較すると良く一致する。

§ 4. 大型マイクロゾムと野外との比較実験

4.1 実験概要

小型マイクロゾムでの検討結果を検証するため、大型マイクロゾムと限定された野外との供試微生物および総細菌、グラム陰性菌(クリスタルバイオレット耐性菌)および糸状菌の土着微生物の挙動を1年間検討した。供試微生物および土着微生物の検出は前述の方法による。

供試微生物を 5.7×10^7 個/g含む土壌を実験圃場の中央に30cm径 \times 5cm深さまで接種した。大型マイクロゾムにも同様に接種した。比較実験は、伊勢原市産黒ボク土を10cm深さづつ層別して40cm深さまで採取したものを埋め戻して構築した実験圃場作製後約3か月経過した平成元年1月18日より開始し、平成2年2月6日の1年間にわたり実施した。

深さ方向の試料は、EOG ガス滅菌済み内径20mmの亚克力製管を用い、深さ5cmごとに交換して採取した。供試微生物を接種した区画の0~5cm深さの試料を、10cm深さは8~12cmを、20cm深さは16~20cmの試料を供試した。接種区画からの供試微生物の広がりを検討するために、接種区画横10cmの表層部についても供試した。

大型マイクロゾムの運転は、野外の気象条件に準じて、送風温度は1日の最高最低温度のほぼ平均値にて、約4000luxの太陽光近似スペクトルを持つ蛍光灯は日照時

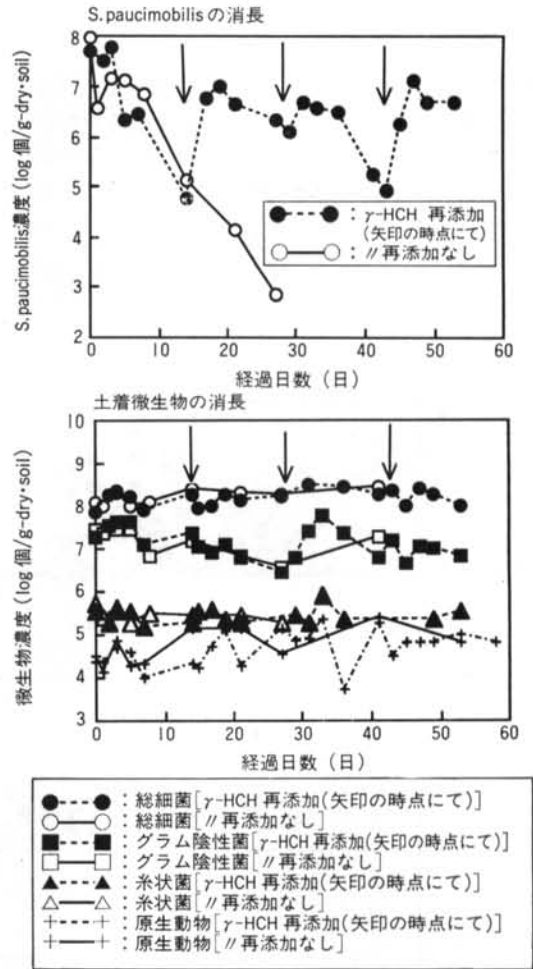
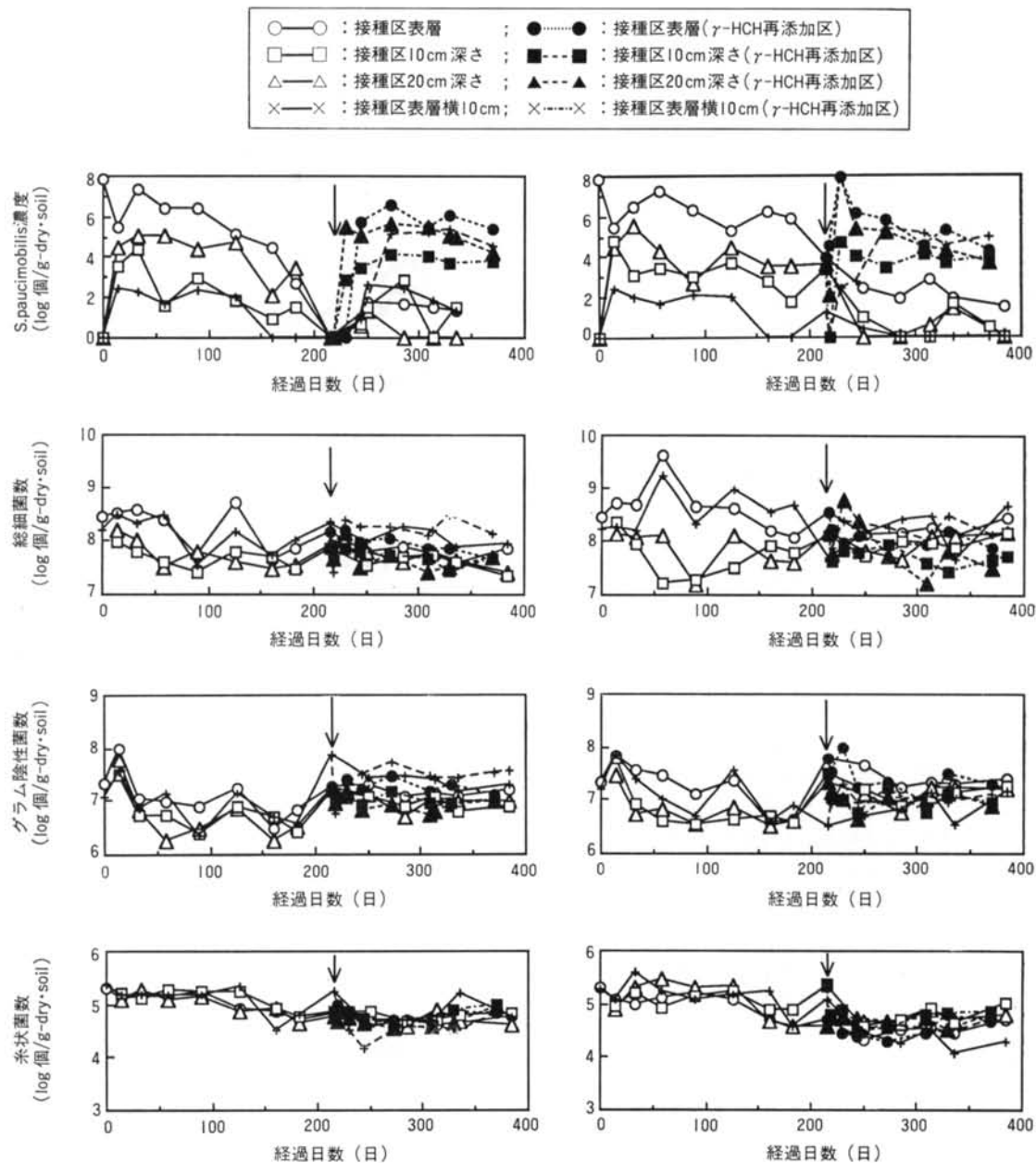


図-7 小型マイクロゾムでの *S. paucimobilis* および土着微生物の消長、 γ -HCH の濃度推移(γ -HCH を $10 \mu\text{g/g}$ -dry-soil 再添加)

間に応じて点灯し実施した。このため、運転条件を決定するためおよび供試微生物の消長に關与すると考えられる地温、表層付近の温度、土壤水分（ただし土壤水分と関連のある pF（水分張力）値で代用）、降水量を計測した。実験圃場の地温は、自記隔測式温度計（小針製）により 5 および 30cm 深さの地温を自記温湿度計（小針製）により表層付近の温度を、マイクロゾムの場合は、同位

置を銅コンスタンタン熱伝対を用いデータロガー（江藤電気サーモダックⅢ）にて、pF 値は野外、マイクロゾムともに 10 および 20cm 深さの pF 値を自記式テンシオメータ（大起製 DIK-3202）を使用して計測した。降水量は貯水型指示雨量計および自記雨量計（電気化学製酸性雨モニタ）を併用し計測し、所定の降水量をマイクロゾムに散水した。



図—8 野外と大型マイクロゾムとの比較実験結果（左：野外，右：マイクロゾム）

4.2 実験結果および考察

1) 気象条件

実験期間中の全般的な気象条件は、春から初夏、秋にかけて例年にない降水を記録した。夏季は、8月より気温の上昇を見たが下旬にやや涼しくなり、また9月に再上昇し中旬まで暑い日が続いた。冬季は、暖冬の様相を呈したが1月中旬より寒さを取り戻した。夏季の場合、大型マイクロコズムは30℃の一定温度で送風したが、野外では地表より5cm深さにおいては供試微生物の生育温度の上限と考えられる42℃以上に達した。

大型マイクロコズムのpF値は、降水量に応じてイオン交換水を散水したため野外と同様な値を保持することができた。実験初期は、例年になく雨天の日が多かったため、土壌は湿潤な状態で低いpF値であった。11~12月は降水量が少なく土壌は乾燥する傾向を示したが、一般的にpF値は3以下となり土壌状態は湿気状態を維持していた。

2) 供試微生物の消長

大型マイクロコズムおよび野外での供試微生物の1年間の消長を図-8に示す。5cm深さまで接種したものが2週間後の1回目の測定時に大型マイクロコズムおよび野外の両者とも、10、20cm深さ、接種区横10cm表層に拡散が見られその後長期にわたり定着が観察された。

大型マイクロコズムおよび野外の供試微生物の全般的な消長傾向は夏季を除きほぼ同様であり、大型マイクロコズムは自然界を良く再現しているものといえる。野外の表層部よりの検出は、約24週間経過した7月初めより顕著な減少を示し、約31週間経過した8月下旬には深さ方向を含めて全ての採取地点でMPN法による検出限界(数個/g)以下となったが、大型マイクロコズムでは、夏季の表層部においても10⁴個/gレベルを維持していた。この挙動の差は、大型マイクロコズムの運転条件と野外の気象条件の相違、すなわち前者が夏季30℃の一定温度で送風しているのに対して、後者は生育温度上限と考えられる42℃以上に達すること、および前者の照度が約4000luxであるのに対して後者は100000luxに達することから温度、照度の影響が大であると考えられることから、小型マイクロコズムを用いた要因解析実験を追試する。

供試微生物は自然界で γ -HCHの添加により増殖を示すことが小型マイクロコズムの実験結果より明らかになっている。したがって、野外実験系の対象微生物の死滅を確認するために、開始216日目にセライト増量法により γ -HCHを大型マイクロコズムと野外の実験区画の半分の表層より10cm深さまで、約10 μ g/g添加し再増殖の有無を確認した。検出限界以下であった野外実験系では、10⁶

/gレベルに再増殖を示し死滅していないことを示した。これは、複数の採取地点、採取時期において検出限界以下を確認したが、検出限界以下の生存または生息地の偏り等に起因するためによる再増殖と考えられる。また、表層部は夏季の気象条件の影響を受けるためか増殖傾向の遅れが見られた。供試微生物の生存が確認されている大型マイクロコズムでも γ -HCHを資化し、約10⁶個/gに再増殖を示した。

このため、検出限界付近での供試微生物の検出が必要とされる場合は、さらに複数の採取地点、時期を選定するなどの配慮が必要とされる。さらに、 γ -HCHを添加することにより供試微生物のみを増殖させるような選択的栄養がある場合は、標的環境から検出限界以下となっても栄養の添加により再増殖する可能性がある。実際の野外利用の際は、利用する組換え微生物のみを増殖させることのできる選択的栄養が標的環境および非標的環境に存在するか否かを十分把握しておく必要がある。

γ -HCHを添加後、野外実験系の非添加区(実験区画の半分)から供試微生物が検出された。これは、添加区からの降水等により拡散定着したものと考えられる。この傾向は、大型マイクロコズムにより野外の方が顕著であり、後者の方が降水状態等が厳しいことに起因しているものと考えられる。

3) 土着微生物の挙動

図-8に大型マイクロコズムおよび野外での土着微生物の1年間の挙動を示す。総細菌の挙動は、気象条件のより厳しい野外よりむしろ大型マイクロコズムの方が大きな変動を示したが、 γ -HCH添加時に若干の変動が見られるもののその後の傾向はほぼ同様であることから、供試微生物の総細菌に与える影響は少ないことを示した。グラム陰性菌および糸状菌に関しても総細菌と同様に γ -HCH添加時に若干の変動が見られるもののその後はほぼ同様の傾向を示した。

これらの結果から、大型マイクロコズムでは総細菌において変動が大きいものの野外の土着微生物の挙動を模擬しており、供試微生物は再増殖の過程を伴うのに係らず土着微生物に与える影響は少ないことを示唆した。

§ 5. 大型マイクロコズムと野外との生存性の相違についての追加実験

5.1 実験概要

大型マイクロコズムと野外との1年間の比較実験において、供試微生物の生存性について夏季に挙動の相違が見

られた。その要因として、大型マイクロゾムの運転条件と野外の気象条件との相違から、日射による地温の上昇および照度の影響が予想された。ここでは小型マイクロゾムを用いて、温度および日射についての要因解析を行ない、大型マイクロゾム構築の際の資料収集を行なう。

温度の影響については、夏季の実験圃場の実際の地温(地表より5cm深さ)測定結果から、42℃・3時間、27.5℃・21時間の日サイクルをもたせたものおよび生育温度上限と考えられる42℃、30℃(対照)の3条件について検討した。

日射の影響については、照度100000luxのソーラーシミュレータ(ウシオ電気製UI-501C/Q-SS)を用いた。供試微生物を接種した土壌を25cm径のペトリ皿に深さ5mmまで詰め、12cm径の穴を開けた厚さ5mmのゴム板を覆い、開口部を日射区、ゴム板で覆われた部分を遮光区とした。実験は、光源による地表面の温度上昇を防ぐため、23℃に設定した恒温室で実施するとともに地表面の温度を熱伝対で計測した。

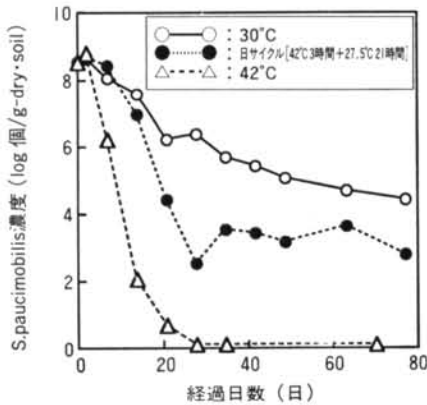


図-9 温度の影響

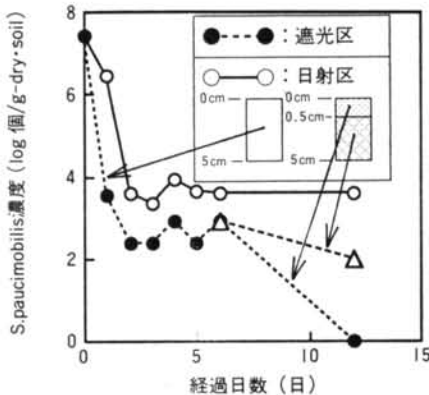


図-10 日射の影響

5.2 実験結果および考察

1) 地温の影響

結果を図-9に示す。供試微生物の生存性は、高い順に30℃、42℃・3時間、27.5℃・21時間の日サイクルをもたせたものおよび42℃の実験系であった。42℃では4週間経過後検出限界以下となった。一方、30℃の場合は、約13週間経過後も10⁴個/gレベルを、また日サイクルの実験系では温度の影響を受けるものの10³個/gレベルを保持している。検出限界以下となった42℃の実験系に、 γ -HCHを10 μ g/g再添加したが増殖を示さず死滅を確認した。

今回の実験では、夏季の大型マイクロゾムの運転は送風温度30℃、地温27.5℃、照度4000luxで実施した。結果として、地温は27.5℃であった。一方、野外では気温は約30℃であるが、地温は太陽の輻射熱で地表より5cm深さは42℃となった。場合により、夏季の地温条件を模擬できるような輻射熱の発生量の大きな照明の採用が必要となる。

2) 日射の影響

結果を図-10に示す。実験期間中の地表面の温度は、32℃以下であったから、日射区および遮光区の消長傾向を比較すると対象微生物は日射の影響を受けていることを確認した。さらに、この現象を明確にするために約6週間経過後の日射区は、表層より5mm深さの極表層部分とそれ以下(5~50mm深さの部分)の部分に区分して計測したところ、日射区の極表層部分は約12週間経過時点で検出限界以下となった。日射区でも5mmより深い場所では生存性が確認され、日射の影響は特に地表面で顕著であることを確認した。

供試微生物に対する日射の影響を確認したことから、場合により大型マイクロゾムは野外と準じた照度を持つ照明装置の具備が必要となる。

大型マイクロゾムは野外の供試微生物の生存性について、地温および日射の影響について検討した。その結果、地温および日射の単独要因では、実験開始1か月以内では検出限界以下には至らず、野外実験系では比較的短期間で検出限界以下となっていることから、夏季の消長の相違は複数の要因が関与しているものと考えられる。

§ 6. まとめ

γ -HCH分解菌の汚染土壌への適用の事例を通じて、生態系に対する評価方法及び供試微生物そのものの挙動を検討したところ、以下のことが明確となった。

(1)化学物質の安全性評価に使用されているマイクロゾムの手法は、組換え微生物の自然環境下での利用の際の安全性評価にも適用可能と考える。

(2)土壌生態系における組換え微生物の生存、増殖および生態系に与える影響の評価は、単純系であり、かつ各要因が比較的均一な試験管レベル、小型マイクロゾムからより複雑な不均一な系である大型マイクロゾム、野外圃場へと段階的な検討を行ない、関与する環境要因を明確にすることは挙動を予測する上で有効である。

(3)大型マイクロゾムと野外での供試微生物の挙動は、夏季を除きほぼ同様であることから相似性が高いものと考えられる。夏季の挙動の相違は、日射に伴う地温の上昇、照度によるものと考えられ、場合により夏季の気象条件を再現できるような大型マイクロゾムの構築が必要となる。

(4)供試微生物の生存、増殖に関与する環境要因について検討したところ、土壌水分、土壌 pH が大きく減少要

因として影響する。土壌水分を高含水率から低含水率に変化させると低含水率に一定に保持した場合と異なった挙動を示し定着、安定化を示した。これはニッチの獲得によるものと考えられる。夏季においては、地温が減少要因となる。また、極表層では日射が減少要因となる。供試微生物は、土着の細菌との競合、原生動物による捕食など生物学的要因も減少要因となる。一方、供試微生物のみが資化できる栄養物 (γ -HCH) の添加は、再増殖を示すことから増殖要因となる。供試微生物は、標的物質がある場合は生存し分解消費すると減少することから、このような性質は自然環境下で利用する際に適しているものと考えられる。

(5)供試微生物の総細菌、グラム陰性菌、糸状菌および原生動物の土着微生物群への影響は、 γ -HCH の添加に伴う再増殖の過程を伴うにも係らず、 γ -HCH の添加時に多少土着微生物数は変動を示すものの直ぐに安定することから影響は少ないものと考えられる。

<参考文献>

- 1) W. G. James et al.: "Chemical Evaluation Projected Application of Terrestrial Microcosm Technology; Microcosms in Ecological Research". U. S. Dept. of Energy (1980)
- 2) 山根一郎, 他: "図説日本の土壌" 朝倉書店 (1986年)
- 3) K. Senco, H. Wada, and Y. Takai: "A γ -HCH-decomposing Aerobic Bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* BHC⁺) Isolated from a Long-term Uplnd Field" Re. Ad. Micro. Eco. (1989)
- 4) 須藤隆一編: "環境微生物実験法" 講談社 (1988年)
- 5) 丸本卓哉, 他訳: "土のバイオテクノロジー" 博友社 (1986年)
- 6) Cark E. Sillman & L. E. Casida Jr: "Isolation of Nonobligate Bacterial Predators of Bacteria from Soil" Can. J. Microbiol. (1986)
- 7) 山里一英, 他編: "微生物の分離法" R&Dプランニング (1986年)
- 8) 田中正明: "河川及び湖沼の間隙水のマイクロ動物調査方法" 水処理技術 (1972年)
- 9) 北沢右三編: "土壌動物生態研究法, 生態学研究法講座26" 共立出版 (1977年)
- 10) 土壌微生物研究会: "土壌微生物実験法" 養賢堂 (1977年)
- 11) 底質浄化協会: "底質の調査・試験マニュアル" (1987年)

