

## (73) プラスミド保持細菌の導入による 土壌微生物群集の構造と機能の変化

井上 大介<sup>1\*</sup>・筒井 裕文<sup>1</sup>・山崎 祐二<sup>1</sup>・村重 勝士<sup>1</sup>・清 和成<sup>1</sup>・  
惣田 訓<sup>1</sup>・藤田 正憲<sup>1,2</sup>・池 道彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

<sup>2</sup>高知工業高等専門学校 (〒783-8508 高知県南国市物部乙200-1)

\* E-mail: inoue@wb.see.eng.osaka-u.ac.jp

土壌マイクロコズムに自己伝達性または可動性プラスミドを保持する細菌を導入し、土着微生物群の構造と物質循環機能の遷移を解析した。外来菌の導入によって、土着微生物群の構造が一時的に変化することが認められたが、その攪乱は外来菌数の減少によって緩和された。また、自己伝達性プラスミドを導入した場合は、外来菌から土着微生物への接合伝達によってtransconjugantが検出されたが、その数は外来菌数と共に減少し、土着微生物群の構造と機能への明確な影響は認められなかった。これらの結果から、外来菌及びtransconjugantが定着しない条件下では、外来菌の導入が土着微生物群に及ぼす影響（バイオリスク）は、長期的に持続するものではないと考えられた。

**Key Words :** bioaugmentation, bio-risk, exogenous bacteria, plasmid transfer, structure and metabolic functions of microbial community

### 1. はじめに

外来の分解微生物を汚染現場に導入し浄化を図るバイオオーグメンテーションは、分解菌が少ないかほとんど存在しておらず、土着菌による浄化が望めない環境場における有望な浄化戦略として期待されている<sup>1)</sup>。特に、浄化機能や環境中での生存性を高めた遺伝子組換え微生物 (Genetically Engineered Microorganisms ; GEMs) の活用は、野生型微生物による浄化能力の限界を取り払い、効率的な浄化を可能にする魅力的な戦略である<sup>2,3)</sup>。様々な土壌・地下水汚染が顕在化している現状から、GEMs 活用への期待も高まっていくものと予想される。しかし、GEMs に限らず、外来菌の人為的な環境放出は、人及び生態系に対して未知の影響 (バイオリスク) をもたらす可能性があると考えられ、その安全性への懸念が実用化に向けた大きな障害となっている。

外来菌の活用によって生じ得るバイオリスクとして、外来菌の挙動やプラスミドの土着微生物群への伝播などに起因した人及び動植物に対する健康影響 (病原性) の上昇と生態系の構造・機能の攪乱が挙げられる<sup>4)</sup>。バイオオーグメンテーションの実施中及び実施後の安全管理

には、これらのバイオリスクの発生を評価・予測し、必要に応じて安全措置を講じる必要がある。外来菌の導入は土着微生物構造の変化をもたらすことが確認されているが<sup>5,6)</sup>、外来菌及びその保持プラスミドの挙動と微生物群集構造の遷移との関連性に関しては詳細な検討がなされていない。また、生態系機能への影響については検討例がないのが現状である。このため、リスク評価の基礎となる科学的知見をさらに蓄積していく必要がある。

本研究では、プラスミド保持、非保持の外来菌を土壌マイクロコズムに導入し、外来菌とその保持プラスミドの挙動、ならびに土着微生物群集の構造及び機能 (炭素資化能及び窒素循環機能) の遷移を解析し、外来菌の導入に伴う微生物生態系の攪乱の可能性について検討した。ここでは、外来菌として、伝達性の異なるプラスミド (自己伝達性プラスミド及び可動性プラスミド) を保持する *Escherichia coli* C600<sup>10)</sup> 及び *Pseudomonas putida* BH<sup>11)</sup>、プラスミドを持たない *P. putida* BH を使用することにより、特に外来菌の挙動とプラスミドの接合を介した挙動が土着微生物群集に及ぼす影響を評価した。なお本研究では、外来菌導入が土着微生物群集に及ぼす影響を直接的に評価するために、化学物質による汚染から受けるインパクト

トを排除した条件下で試験を実施した。

## 2. 実験材料及び方法

### (1) マイクロコズム試験

マイクロコズム作成には、2005年4月に大阪大学構内より採取した森林土壌 (pH 5.8, 含水比 23.3% (w/w), 従属栄養細菌数  $7.1 \times 10^7$  CFU/g-dry soil (R2A培地)) を用いた。採取後の土壌は、孔径2.0 mmの篩にかけ、使用前まで冷凍保存した (-20°C)。マイクロコズムは、解凍した土壌の含水比を30% (w/w) に調整し、その湿重量 250 gを500 ml容三角フラスコに添加して作成した。なお、2005年10月に実施した試験には、冷凍保存した同土壌を用いた。導入菌には、プラスミド非保持の野生型の *P. putida* BH (サリチル酸を資化できない)、自己伝達性プラスミドRP4<sup>12)</sup>を保持する *E. coli* C600 (チアミン、ロイシン、トレオニンに対する要求性を示す) 及び *P. putida* BH、可動性の組換えプラスミドpBH500<sup>13)</sup>を保持する *P. putida* BHを用いた。ここで、自己伝達性プラスミドは、接合伝達時に供与菌と受容菌をつなぐ性繊毛の合成等を担う自己伝達性 (*tra*) 遺伝子をコードしており、それを保持する細胞から別の細胞にプラスミドを接合伝達させることができる。一方、可動性プラスミドは*tra*遺伝子をコードしていないため、それを保持する供与菌が mobilizer と称される別の細菌から自己伝達性プラスミドを獲得し、自己伝達性プラスミドによって性繊毛が合成されてはじめて接合伝達される。即ち、可動性プラスミドの伝達にはmobilizerから供与菌への自己伝達性プラスミドの伝達が必要であるため、一般に可動性プラスミドの伝達が起こる可能性は自己伝達性プラスミドに比べて低い。導入菌は、適宜抗生物質 (RP4保持細菌: カナマイシン (Km) 50 mg/l, pBH500保持細菌: ストレプトマイシン (Sm) 50 mg/l) およびフェノール (*P. putida* BH: 400 mg/l) を添加したL培地 (バクトペプトン 10 g/l, 酵母エキス 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.2) で一晩振盪培養 (120 rpm, 28°C) した後、遠心分離 (8,500 ×g, 4°C, 10分)

により集菌し、50 mMリン酸カリウム緩衝液 (PB;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 7.5) で2回洗浄し、約  $1.0 \times 10^8$  CFU/g-wetとなるように異なるマイクロコズムに接種した (表-1)。また、外来菌を導入しない対照系も作成した。各マイクロコズムは、暗所、28°Cで静置培養し、試験開始0, 1, 3, 6, 10, 20日後に土壌の一部をサンプリングし、導入菌及びプラスミドの挙動と土着微生物群の構造・機能の遷移を解析した。なお、マイクロコズム試験は全て1連で実施した。

### (2) 平板培養法による生菌数の計測

希釈平板培養法により、導入菌、土着菌及び導入菌よりプラスミドを獲得した土着菌 (transconjugant) の生菌数を計測した。土壌サンプルの湿重量1 gを9 mlの5 mg/l滅菌トリポリリン酸ナトリウム水溶液に懸濁して強撹拌し、10倍ずつ段階希釈した後、以下に示す選択培地に塗布し、28°Cで適当期間静置培養し、2枚あるいは3枚の平板培地に生えたコロニーを平均して生菌数を求めた。

*E. coli* C600(RP4)の検出には、Km, アンピシリン (Ap), テトラサイクリン (Tc) をそれぞれ50, 100, 25 mg/lの濃度で添加したパールコア®デスオキシコーレイト寒天培地 (栄研器材) を用いた。*P. putida* BHの検出には、フェノールを単一炭素源として400 mg/lの濃度で添加した無機塩平板培地 (BSM:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l,  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 g/l, NaCl 0.1 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/l, agar 17 g/l, pH 7.2) を用い、*P. putida* BH(RP4)の検出にはKm, Ap, Tcをそれぞれ50, 100, 25 mg/l, *P. putida* BH(pBH500)の検出にはSmを20 mg/lの濃度でさらに添加した。

また、以下のBSMを用い、可能な限り多様な細菌種を対象として、transconjugantを特異的に検出した。本研究の導入菌のうち、*E. coli* C600(RP4)はチアミン、ロイシン、トレオニンを含まないBSM (炭素源は別途添加) では生育しないため、同株を導入した系Aでは、TCA回路に組み込まれるアセチルCoAの生成に必須の物質であり、多様な細菌種が利用可能と考えられるピルビン酸を単一炭素源として1 g/lの濃度で添加したBSMにRP4の検出マーカーであるKm, Ap, Tcをそれぞれ50, 100, 25 mg/lの濃度で添加した培地を用いてtransconjugantの検出を行った。*P. putida* BHは、栄養要求性がなく、ピルビン酸や他の易分解性有機物質を広く利用できるものの、サリチル酸を利用できない。そこで、*P. putida* BH(RP4)を導入した系Bでは、サリチル酸を単一炭素源として1 g/lの濃度で添加したBSMにRP4のマーカーであるKm, Ap, Tcをそれぞれ50, 100, 25 mg/lの濃度で添加した培地により、transconjugantを検出した。他方、可動性プラスミドpBH500は自己伝達性プラスミドRP4に比べて伝達能力に

表-1 実験に用いたマイクロコズム

| 系 | 導入菌                               | 実施時期     |
|---|-----------------------------------|----------|
| A | <i>Escherichia coli</i> C600(RP4) | 2005年7月  |
| B | <i>Pseudomonas putida</i> BH(RP4) | 2005年10月 |
| C | <i>P. putida</i> BH(pBH500)       | 2005年7月  |
| D | <i>P. putida</i> BH               | 2005年10月 |
| E | —                                 | 2005年7月  |
| F | —                                 | 2005年10月 |

劣るため、transconjugantの発生を確認するためには広範な細菌種を対象にする必要がある。そこで、*P. putida* BH(pBH500)を導入した系Cにおけるtransconjugantの検出には、ピルビン酸を単一炭素源として1 g/lの濃度で添加したBSMにpBH500のマーカーであるSmを20 mg/lの濃度で添加した培地を用いた。また、transconjugantの親株としての土着菌群を検出するために、系A、Cではピルビン酸資化菌、系Bではサリチル酸資化菌を、それぞれピルビン酸およびサリチル酸を1 g/lの濃度で添加したBSMにより検出した。また、系Bと同時期に試験した系Dにおいても、サリチル酸資化菌を土着菌群の指標として検出した。

真菌の増殖を阻害するため、使用した全ての培地にシクロヘキシミドを100 mg/lの濃度で添加した。

### (3) Transconjugantの特徴づけ

検出された transconjugant は、Cowan と Steel の一次鑑別試験<sup>19</sup>及び API20NE (BioMerieux) により、生理学的特徴に基づいて分類した。

また、transconjugantを接合伝達試験<sup>15</sup>に供し、プラスミド伝達能(2次的供与菌としての能力)を評価した。Transconjugant及び*E. coli* HB101<sup>16</sup>を個別に一晩往復振盪培養(120 rpm, 28°C)し、遠心分離(8,500 ×g, 4°C, 10分)により集菌し、PBで2回洗浄後、それぞれOD<sub>600</sub>=0.1(約1.0 × 10<sup>7</sup> CFU/ml)になるようにL培地に植種し、30°Cで24時間静置培養した。共培養後のサンプルを希釈平板培養法に供し、*E. coli* HB101および*E. coli* HB101(RP4)の生菌数を計数した。*E. coli* HB101の検出にはD(+)-グルコースを1 g/l、チアミン、ロイシン、プロリンをそれぞれ50 mg/l、Smを20 mg/l添加したBSMを用い、*E. coli* HB101(RP4)の検出には、さらにKmを50 mg/lの濃度で添加した培地を用いた。

### (4) DNAテンプレートの調製

土壌からのDNAの抽出にはISOIL for Beads Beating (Nippon Gene)を用いた。また、土壌中に含まれるフミン質等のPCRを阻害する夾雑物を除去するため、抽出したDNAはMagExtractor®-PCR&Gel Clean up- (Toyobo)を用いて精製した。

### (5) T-RFLP法による土着微生物群集構造の解析

フォワードプライマーの5'末端を6-FAMで蛍光標識したプライマーセット[27F-FAM, 1392R]<sup>17</sup>を用いて、真正細菌の16S rDNAをPCR増幅した。PCRは、熱変性95°C(5分)の後、熱変性95°C(1分)、アニーリング57°C(1分)、伸長72°C(3分)を27サイクル繰り返し、最後に伸長72°C(10分)を行うHot-start法により、Mastercycler

standard (Eppendorf)を用いて実行した。PCR産物は、Montage PCR (Millipore)を用いて精製・濃縮した後、制限酵素*Hha*Iにより断片化した(37°C, 5時間)。消化物の1 µlを12 µlの脱水ホルムアミド (Applied Biosystems) 及び0.5 µlのサイズスタンダード (GeneScan 2500 TAMRA或いはGeneScan 2500 ROX Size Standard, Applied Biosystems)と混合し、変性処理(95°C, 3分)を行った後、DNAシーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic analyzer, Applied Biosystems) によるレーザー蛍光検出キャピラリー電気泳動に供した。断片長解析ソフトウェア (version 3.7, Applied Biosystems) を用いて蛍光末端断片 (Terminal Restriction Fragment ; T-RF) のサイズを求め、オンライン統計ソフトPAST古生物学統計プログラム ver. 1.3.4 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>)を用いたクラスター解析に供し、各マイクロコズムの微生物相を比較した。なお、デンドログラムはDice's coefficientsを用いたUPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) 法により作成した。

### (6) Biolog法による炭素資化能の評価

Widmerら<sup>18</sup>の方法を一部修正した以下の方法により、土着微生物群の炭素資化能を評価した。湿土壌1 gを滅菌生理食塩水9 mlに添加して30分間激しく攪拌し、10分間静置した。この上清の2 mlを新しい滅菌生理食塩水18 mlで希釈したものをGN2マイクロプレート (GSI Creos) の各ウェルに150 µlずつ分注し、暗所、28°Cで静置培養した。培養開始後は、72時間まで経時的に各ウェルの吸光度 (A<sub>595</sub>) を測定し、各ウェルのA<sub>595</sub>値から炭素源を含まないブランクウェルのA<sub>595</sub>値を差し引いた値の変化により炭素源ごとの代謝能を評価した。また、AWCD (Average well color development)<sup>19</sup>も土着菌群の炭素資化能を評価する指標として用いた。

### (7) 窒素循環機能の評価

#### a) 硝酸還元試験

Tiedje ら<sup>20</sup>の方法を一部修正した以下の方法により、土着微生物の硝酸還元能を評価した。9 mlの滅菌硝酸標準液 (KNO<sub>3</sub> 1 mM, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mM) を分注した25 ml容バイアル瓶に湿重量1 gの土壌を添加した。バイアル瓶内部をN<sub>2</sub>ガスで嫌気状態にした後、回転振盪培養(120 rpm, 28°C)を行った。経時的にサンプリングし、遠心分離(14,000×g, 4°C, 10分)後の上清をイオンクロマトグラフィー分析に供し、硝酸態窒素濃度を測定した。分析は、イオンクロマトグラフィーシステム (DX-300, Dionex), 分離カラム (Ion Pac® AS4A-SC, Dionex), ガードカラム (Ion Pac® AG4A-SC, Dionex) を用い、溶離液 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1.7 mM) の流速を1.5 ml/min

とし、UV-VIS 検出器 (SPD-10AV, Shimadzu) を用いて 215nm の吸光度を測定することで行った。

#### b) MPN-PCR 法による窒素循環関連遺伝子の定量

アンモニア酸化細菌が保持する *amoA* 遺伝子及び脱窒菌が保持する *nirK* および *nirS* 遺伝子を MPN-PCR 法<sup>20)</sup>により定量した。(4)で調製した DNA テンプレートを 10 倍ずつ段階希釈し、各希釈率のサンプルを 3 連で PCR に供した。

アンモニア細菌が保持する *amoA* 遺伝子の検出にはプライマーセット[*amoA*-1F, *amoA*-2R]<sup>20)</sup>を用い、熱変性 94°C (5 分) の後、熱変性 94°C (30 秒), アニール 55°C (30 秒), 伸長 72°C (45 秒) を 35 サイクル、最後に伸長 72°C (10 分) を行った。脱窒菌が保持する *nirK* 遺伝子及び *nirS* 遺伝子の検出には、それぞれプライマーセット[NIRK-F, NIRK-R]及び[NIRS-F3, NIRS-R3]<sup>20)</sup>を用い、熱変性 95°C (6 分) の後、熱変性 95°C (30 秒), アニール 70-60.5°C (-0.5°C/サイクル, 40 秒), 伸長 72°C (30 秒) を 20 サイクル、熱変性 95°C (30 秒), アニール 60°C (40 秒), 伸長 72°C (30 秒) を 15 サイクル行った後、伸長 72°C (7 分) を行う Touch-Down PCR を

実施した。

PCR 産物は、1.5% (w/v) アガロースゲル (Invitrogen) を用いた電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色と紫外線照射によって確認した。増幅産物が確認されたサンプルを陽性と判定し、各希釈段階で得られた陽性本数に基づき、確率的に標的遺伝子数を算出した。

### 3. 実験結果及び考察

#### (1) 導入菌及びプラスミドの挙動

マイクロコズムに導入した細菌は、いずれも緩やかに減少した。*E. coli* C600(RP4)と *P. putida* BH は 10 日後にバックグラウンド値に達した (図-1A, D)。*P. putida* BH(RP4)及び *P. putida* BH(pBH500)は、20 日後にそれぞれ  $3.0 \times 10^2$ ,  $1.3 \times 10^4$  CFU/g-dry soil まで減少した (図-1B, C)。これらの土着菌の減少は土着菌による淘汰或いは環境の変化によるストレスを受けて死滅した結果であると考えられた。

土着のピルビン酸資化菌及びサリチル酸資化菌は、試

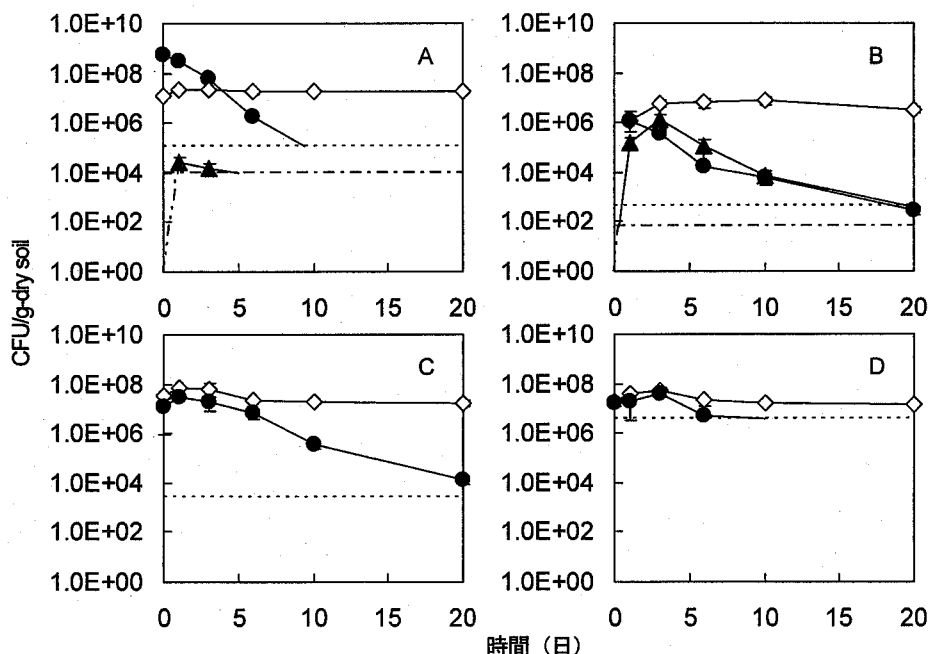


図-1 実験系 A~D における導入菌と transconjugant の挙動

●, 導入菌; ◇, 土着菌 (ピルビン酸資化菌 (A, C) 或いはサリチル酸資化菌 (B, D));

▲, 土着 transconjugant

点線, 導入菌検出培地のバックグラウンド; 一点破線, transconjugant 検出培地のバックグラウンド。

エラーバーは 95%信頼区間を表す (n=2-3)。

験期間を通じて大幅な増減はなく、それぞれ  $2.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^6$  CFU/g-dry soil 程度で推移した (図-1)。これらの土着菌から発生した transconjugant を検出したところ、自己伝達性プラスミド RP4 を保持する外来菌を導入した系 A, B において、transconjugant の発生が確認された (図-1A, B)。検出された transconjugant は、プラスミド RP4 にコードされる *traG* 遺伝子の特異的に検出する PCR で陽性を示し (データ不掲載)、プラスミド RP4 を保持していることが確認された。系 A では、発生した transconjugant は 1 日後に  $2.6 \times 10^4$  CFU/g-dry soil まで増加したが、7 日後までにバックグラウンド値以下に減少した。系 B においては、transconjugant は 3 日後に  $1.4 \times 10^6$  CFU/g-dry soil まで増加したが、その後は時間とともに減少し、20 日後に  $3.9 \times 10^2$  CFU/g-dry soil となった。一方、可動性プラスミド pBH500 を保持する *P. putida* BH を導入した系 C においては、transconjugant は実験期間を通じて検出されなかった (図-1C)。

系 A, B においては、試験初期に transconjugant の発生が確認された (図-1A, B)。系 B ではプラスミド RP4 の供与菌である導入菌は系 A よりも少なかったが、系 A よりも多く transconjugant が検出された。プラスミドの伝達能<sup>2)</sup>及び受容菌の種類<sup>2)</sup>は供与菌の種類によって異なることが既往研究で確認されている。後に詳しく記述しているが、本研究で発生した transconjugant も導入菌の種類によって異なった (表-2)。また、発生した transconjugant の 2 次供与菌としての能力もその宿主によって異なり (表-2)、計数した transconjugant の一部は 2 次的に発生したものも含まれていたと考えられる。系 A, B における transconjugant 発生数とその挙動の相違は導入菌の種類に依存したものと推察された。

系 C においては、導入菌が高い生残性を示したにも関わらず、transconjugant の発生は認められなかった (図-

1C)。系 C の導入菌が保持するプラスミド pBH500 は可動性であるため、その伝達には土着菌から自己伝達性プラスミドを獲得することが必要となる。しかし、過去の研究において、本研究の供試土壌と同じ採取場所から別の時期に採取した土壌中の優占菌において mobilizer として機能し得る細菌は検出されなかったことから<sup>29)</sup>、供試土壌中の mobilizer 数は非常に少ないものと考えられる。このため、導入菌が自己伝達性プラスミドを獲得することができず、pBH500 の可動化が生じなかったものと考えられた。

## (2) Transconjugant の特徴づけ

系 A, B で検出された transconjugant の分類結果を表-2 に示す。*E. coli* C600(RP4)を導入した系 A で検出された transconjugant の多くは腸内細菌科に典型的な生理特性 (カタラーゼ活性陽性、オキシダーゼ活性陰性、グルコースを嫌気発酵) を示したが、腸内細菌科と異なる生理的特性を有するものも含まれた。*P. putida* BH(RP4)を導入した系 B では、導入菌と同様の生理特性 (運動性あり、カタラーゼ活性陽性、オキシダーゼ活性陽性、グルコースを好気酸化) を示すものを含め、生理特性の異なる多様な transconjugant が検出された。これらの結果から、発生する transconjugant 種は導入菌によって異なることが示唆された。

*E. coli* HB101 を受容菌に用い、transconjugant のプラスミド伝達能を評価したところ、8 種類の transconjugant はいずれもプラスミド伝達能を有することが確認された。また、7 種類の transconjugant が *E. coli* C600(RP4)を donor とする同種間伝達と同程度の伝達能を示した (表-2)。土着菌を宿主とする transconjugant は当該環境中での生残能に優れることから、このように高いプラスミド伝達能をもつ場合、transconjugant を 2 次供与菌とする伝達が環境

表-2 Transconjugant の分類およびプラスミド伝達能<sup>a)</sup>

| 系 | 菌株    | グラム | 形態 | 運動性 | CAT | OX | OF | プラスミド伝達能 <sup>b)</sup>        |
|---|-------|-----|----|-----|-----|----|----|-------------------------------|
| A | T-5   | -   | 桿状 | -   | +   | -  | F  | $4.1 \times 10^{-3}$ (1.4)    |
|   | T-12  | -   | 桿状 | -   | +   | -  | F  | $2.1 \times 10^{-3}$ (0.73)   |
|   | T-23B | -   | 桿状 | ±   | -   | +  | -  | $2.4 \times 10^{-6}$ (0.0085) |
|   | T-29  | -   | 桿状 | -   | +   | -  | F  | $3.7 \times 10^{-3}$ (1.3)    |
| B | S-1   | -   | 桿状 | +   | +   | +  | O  | $3.3 \times 10^{-3}$ (1.1)    |
|   | S-4   | -   | 桿状 | +   | +   | +  | O  | $2.0 \times 10^{-3}$ (0.70)   |
|   | P-13  | -   | 桿状 | ±   | +   | -  | O  | $6.1 \times 10^{-3}$ (2.1)    |
|   | P-16  | -   | 桿状 | -   | +   | +  | O  | $2.8 \times 10^{-3}$ (0.97)   |

<sup>a)</sup> CAT, カタラーゼ活性; OX, オキシダーゼ活性。

<sup>b)</sup> プラスミド伝達能は、接合伝達頻度の平均値 ( $n = 3$ ) で表示している。括弧内の値は、*E. coli* C600 から *E. coli* HB101 への接合伝達頻度に対する各 transconjugant を供与菌とした接合伝達頻度の比を表している。

中に導入されたプラスミドの拡散および長期的な残存に大きく寄与する可能性がある。しかし、発生した transconjugant は即座に減少することが確認された (図-1)。Transconjugant が保持するプラスミド RP4 には Km, Ap, Tc に対する耐性遺伝子が含まれているため、それらの抗生物質が存在する特殊な環境下では宿主の生育に有利に働く。しかし、プラスミド RP4 は、細胞複製など、宿主の通常の生育に必要な遺伝子を含んでおらず、上記の抗生物質が存在しない通常の環境下では細胞複製 (生育) に負荷をもたらすことになる。本研究の供試土壌も抗生物質が含まれるような特殊な土壌ではないため、プラスミド RP4 の保持は宿主にとって負荷となり<sup>27)</sup>、transconjugant の生育に負の影響を及ぼしたことによるものと考えられた。

### (3) 土着微生物群集構造の遷移

T-RFLP 法により、土着微生物群集構造の遷移を解析

した。系 A~D においては、実験初期には導入菌に由来する T-RF が優占的に検出され、全体的な T-RF パターンが対照系 E, F と大きく異なった (図-2 左)。しかし、時間経過とともに導入菌由来の T-RF が減少し、系 A~D の T-RF パターンは対照系と同様になり、20 日後にはマイナーな T-RFs を除き概ね一致した (図-2 右)。T-RF パターンに基づくクラスター解析の結果、プラスミド保持・非保持の *P. putida* BH を導入した系 B~D において、実験初期に対照系と大きく異なる微生物相を示すことが確認された (図-3)。一方、対照系を含め、各系の微生物相は時間とともに変化し、20 日後の系 B~D の微生物相は 0 日よりも対照系と高い相同性を示した。*E. coli* C600(RP4) を導入した系では 0 日目に対照系と同様の微生物相を示したのに対し、プラスミド保持・非保持の *P. putida* BH を導入した系 B, C, D では 0 日目に対照系と異なる微生物相を示した。このことから、T-RFLP 法の解析対象である 16S rDNA の細胞当たりのコピー数が *P.*

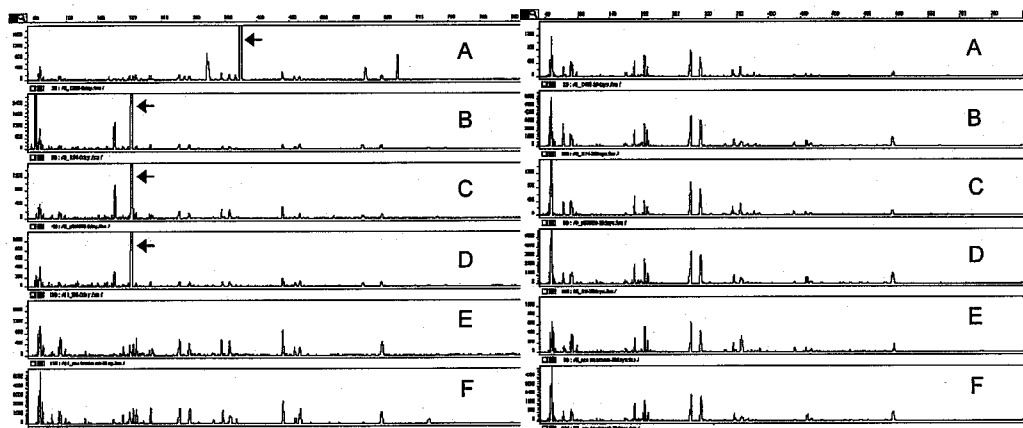


図-2 0日 (左) および20日 (右) における真正細菌 16S rDNA の T-RF プロファイル  
矢印は導入菌に由来する T-RF を表している。

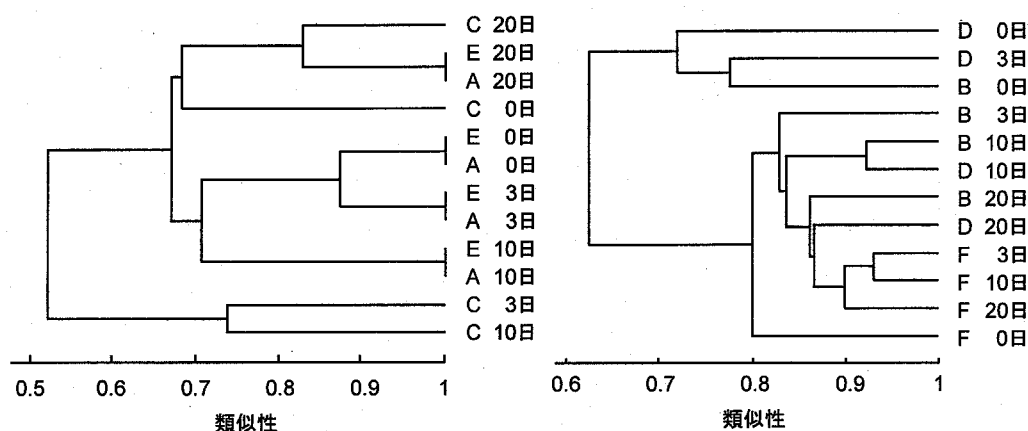


図-3 真正細菌 16S rDNA の T-RF プロファイルのクラスター解析結果

*putida* BH > *E. coli* C600 であり、系 B, C, D の DNA テンプレートからの PCR 増幅では導入菌由来の 16S rDNA が優先的に増幅し、土着のマイナーポピュレーション由来の 16S rDNA の増幅が抑制され、T-RFLP 法で検出されなかった可能性が考えられた。他方、10 日目には、導入菌数は土着菌数に比べて非常に少なくなったにも関わらず (図-1)、系 B, C (特に系 C) の微生物相は対照系と大きく異なった (図-3)。この時点では、上述した要因の影響は小さいと考えられるため、外来菌の導入が土着微生物群の構造変化を導いたものと考えられた。他方、系 A においては、実験期間を通して対照系 E と非常に高い相同性を示した。本研究のクラスター解析では、各 T-RF の存在 (+/-) に基づいて評価を行っており、優占的な T-RF も、検出限界を僅かに越えるマイナーな T-RF も同じ 1 種類のポピュレーションとして扱っている。マイナーポピュレーションは数多く存在する上、相対量が小さいため、僅かな外来インパクトにも影響を受け、検出される場合と検出されない場合が生じる。つまり、本研究のクラスター解析ではマイナーポピュレーションを含む多様性への影響が反映されるため、系 A の結果から、*E. coli* の導入は土着微生物生態系中のマイナーな種にも殆ど影響を及ぼさなかったものと考えられた。以上のことから、外来菌の導入は一時的に微生物相の変化をもたらすが、その影響は導入菌の生残性に依存し、導入菌の減少に伴って緩和されることが示唆された。また、系 B, D の比較から、プラスミド伝達による微生物相への顕著な影響はないものと推察された。

#### (4) 土着微生物群の炭素資化能の変化

0 日及び 20 日後の土着微生物群による炭素資化能を調査した結果、20 日後の利用可能な炭素源数はいずれの系でも 0 日より減少したが、外来菌を導入した系と

対照系に明確な違いは認められなかった (データ不掲載)。また、系 C を除き、AWCD の傾き (95 種類の炭素源に対する平均的な資化速度) は 20 日後において 0 日より小さくなる傾向を示した (図-4)。系 A, B, D においては、導入菌が 20 日後までに大きく減少したため (図-1)、土着微生物群の炭素資化能に顕著な影響を及ぼさず、対照系と同様に AWCD の傾きが低下したものと考えられた。他方、系 C の AWCD パターンは 0 日と 20 日後で殆ど変化せず、他の系で認められた資化能の低下は確認されなかった (図-4)。しかし、系 C でも、導入菌は系 B と同様に 20 日後までに大きく減少しており、プラスミド pBH500 の伝達による transconjugant の発生も確認されていないことから、導入菌及びプラスミドの挙動と炭素資化能に変化がなかったことに明確な因果関係は確認されなかった。炭素の代謝には多種多様な微生物種が関わっているため、僅かな外来インパクトによる顕著な変化は生じないものと推測されるが、特に本研究では、前述した通り、外来菌導入による微生物生態系構造の攪乱は一時的なものであったため、炭素資化能に顕著な影響を及ぼさなかったものと考えられた。

#### (5) 土着微生物群の窒素循環能の変化

0 日及び 20 日後の土着菌群による硝酸還元活性を図-5 に示す。0 日においては、系 A, C, E では 18 時間後、系 B, D, F では 24 時間後から硝酸還元が開始し、いずれの系でも 48 時間後までに硝酸は完全に還元された (図-5A)。20 日後のマイクロコズム土壌においては、系 A, C, D では 24 時間後、系 B, E では 30 時間後、系 F では 36 時間後から明らかな硝酸還元が確認された (図-5B)。その後、系 A, B では 36 時間後、系 C, D では 48 時間後までに硝酸は消失したが、対照系 E, F では 60 時間後でもそれぞれ 10%, 40% の硝酸が還元され

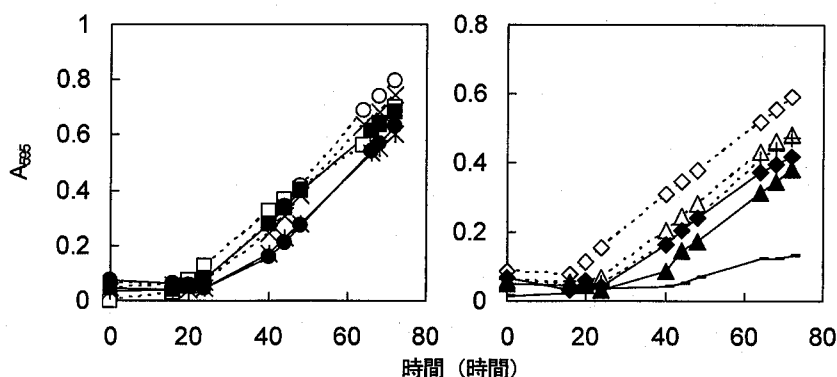


図4 0日 (点線) 及び 20 日後 (実線) の土着菌による 95 種類の炭素源に対する平均資化速度 (AWCD パターン)

○●, 系 A; △▲, 系 B; □■, 系 C; ◇◆, 系 D; ×\*, 系 E; +-, 系 F

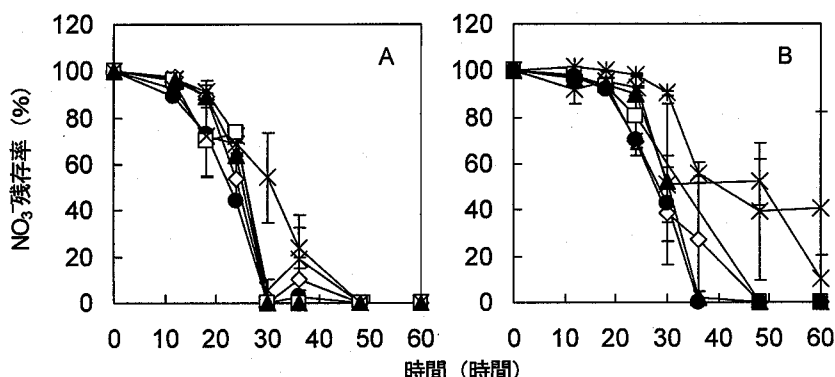


図-5 0日 (A) 及び 20日後 (B) の土着微生物群の硝酸還元活性.

●, 系 A; ▲, 系 B; □, 系 C; ◇, 系 D; ×, 系 E; \*, 系 F  
エラーバーは2連の実験系におけるデータ範囲を表す.

ずに残存した.

アンモニア酸化細菌が保持する *amoA* 遺伝子, 脱窒菌が保持する *nirK* 及び *nirS* 遺伝子の定量結果を図-6に示す. 各遺伝子は, 対照系 E, F を含め, いずれのマイクロコズムでも, 実験初期に大きく変動したが, 多くの場合, 時間経過とともに変動が小さくなる傾向を示した. また, 各遺伝子の変動幅はいずれの系でも同程度であった. このため, 外来菌とプラスミドの導入及び挙動による *amoA*, *nirK* 及び *nirS* 遺伝子保持細菌群の挙動に対する顕著な影響は認められなかった.

20 日後の土壌を用いた硝酸還元活性試験において, 外来菌を導入した系 A~D で対照系 E, F に比べて明らかに高い活性が認められた. しかし, *nirK*, *nirS* 遺伝子の定量結果を見る限り, 系 A~D に対照系よりも顕著に多くの脱窒菌が存在したとは考えにくい. また, マイクロコズムに導入した外来菌はいずれも硝酸還元能を有していないため, それら自体が硝酸還元活性に影響を及ぼすことはない. これらのことから, 20 日後までに死滅した導入菌が栄養源となり, 従属栄養の脱窒菌群の活性を高めた可能性が考えられた. そこで, 実験に用いた *P.*

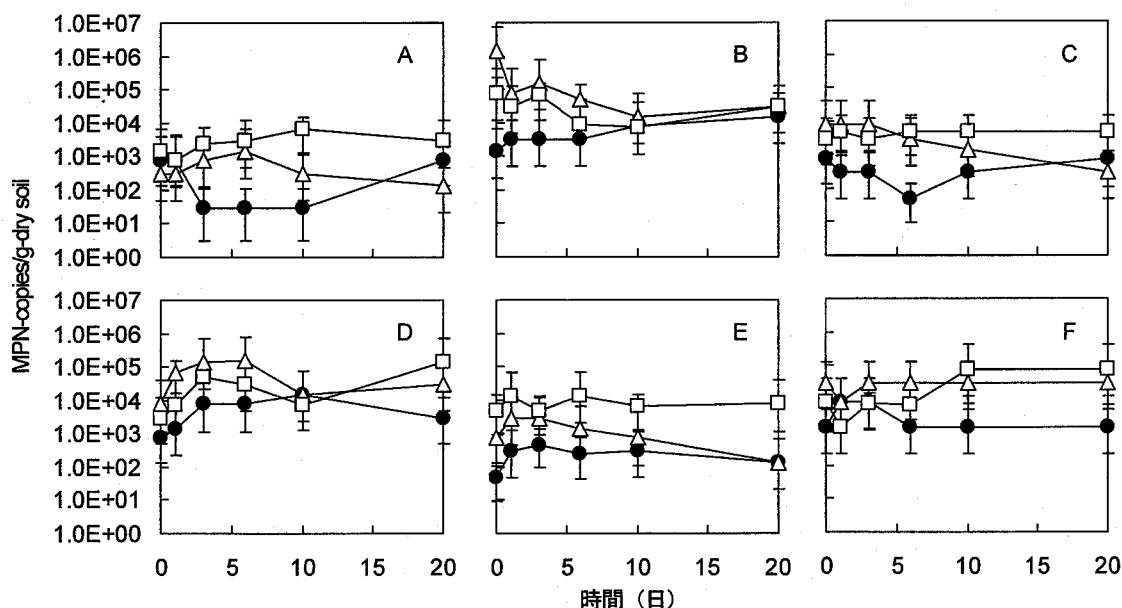


図-6 系 A~F における *amoA* (●), *nirK* (△), *nirS* (□) 遺伝子数の変化.

エラーバーは 95% 信頼区間を表す.



*putida* BH(RP4)をオートクレーブ (121°C, 20 分) に供してから供試土壌に混合し、同菌株を植種していない対照系とともに、マイクロコズム試験と同条件で 20 日間培養し、硝酸還元活性を測定した。その結果、対照系の土壌では硝酸の消失に 60 時間を要したが、死菌を植種した土壌では 48 時間後までに硝酸が消失し、死菌を混合した土壌で非混合土壌よりも高い硝酸還元活性が認められた。このことから、外来菌を導入した系における高い硝酸還元活性は、死滅した外来菌が脱窒菌の活性化のための栄養源になったことに起因しており、外来菌及びプラスミドの挙動に起因するものではないことが示唆された。

#### (6) 外来菌の導入が土着微生物群に及ぼす影響に関する考察

多種多様な微生物種により構成されている微生物生態系は、自然環境中における物質循環、エネルギーフローなどの底辺的な役割を担っている。微生物生態系は、自然環境の状態変化に応じて変動し、その機能のある範囲で維持している。しかし、急激な外来インパクトが加えられた場合、自然の変動の幅を超えた変化がもたらされる。その中で、ある種が激減あるいは消滅することにより、その種が担っていた生態系機能の低下或いは喪失を引き起こす可能性がある。バイオオーグメンテーションでは、外来菌を人為的に導入することにより、次のような形で生態系への影響が引き起こされると考えられる。まず、導入した外来菌が生態系内で定着・優占化すると、ある種がニッチを失い、その種が保持している機能が失われる可能性がある。また、GEMs などのプラスミド保持細菌を用いた場合、浄化機能をコードするプラスミドを受け取った一部の土着菌が優占化し、結果として生態系の構造及び機能に変化をもたらす可能性がある。さらに、プラスミドは進化速度が速く、相同組換え等の遺伝子再編成を起こし易いため<sup>20)</sup>、プラスミドを受容した土着菌中で遺伝子再編成が生じ、その細菌のもつ機能が変化することで、生態系としての機能の変化につながる可能性がある。これらの結果、生態系に必須の機能が失われ、それが回復されなくなった場合には、重大な悪影響になり得る。

本研究では、微生物生態系の構造と、微生物が重大な役割を担っている代表的な物質循環機能として炭素資化能、窒素循環機能に着目し、プラスミド保持細菌の導入がそれらに及ぼすインパクトについて検討した。炭素源資化能及び窒素循環機能については、外来菌の導入によるものと考えられる明確な変化は認められなかった。一方、外来菌を導入することにより、微生物生態系は対照系と異なる構造に変化した。しかし、時間経過とともに、

外来菌導入系の微生物生態系構造は対照系と類似したものに移行した。この間、導入菌は減少の一途をたどり、また導入菌からプラスミドを獲得した土着菌 (transconjugant) も定着せず減少した。これらのことから、外来菌の導入は微生物生態系にインパクトをもたらすが、外来菌及び transconjugant が長期間生残・優占化しなかったため、そのインパクトは長期的に持続せず、生態系への重大な影響 (生態系構造の劇的な変化や生態系機能の喪失) に発展しなかったと考えられた。

#### 4. 結論

本研究では、土壌マイクロコズムに導入した外来菌と外来菌が保持するプラスミドの挙動、ならびに土着微生物群集の構造と物質循環機能の遷移を解析し、外来菌の導入が微生物生態系に及ぼす影響について検討した。

土壌マイクロコズムに導入した外来菌は、導入直後から常に減少した。また、自己伝達性プラスミドを保持する外来菌を導入したケースでは、transconjugant が発生したが、プラスミド保持に有利な環境条件ではなかったため、発生した transconjugant は速やかに減少した。微生物群集の遷移解析から、外来菌の導入は土着微生物群集の構造変化を招くが、その影響は時間が経つにつれて緩和することが示唆された。これらのことから、外来菌の導入は土着微生物群集の構造にインパクトを及ぼすが、導入菌及び transconjugant が定着せずに減少する場合、そのインパクトが長期的に持続し、生態系に重大な影響を及ぼす可能性は低いものと考えられた。今後は、種々のケースを想定した試験の実施することにより、どのようなケースで生態系に重大な影響が生じるか、さらに詳細に検討していく必要がある。

謝辞：本研究は、生物機能活用型循環産業システム創造プログラム「遺伝子組換え体の産業利用におけるリスク管理に関する研究事業」、平成15年度科学研究補助金基盤研究 (B) (課題番号 15310055) 及び平成18年度科学研究補助金若手研究 (B) (課題番号 18710026) の一環として実施したものである。ここに記して謝意を表する。

#### 参考文献

- 1) El Fantroussi S., and Agathos S.N.: In bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? Current Opinion in Microbiology, Vol. 8, No. 3, pp. 268-275, 2005.
- 2) Pieper D.H., and Reineke W.: Engineering bacteria for bioremediation. Current opinion in Biotechnology, Vol. 11, No. 3, pp. 262-270, 2000.
- 3) Saylor G.S., and Ripp S.: Field applications of genetically engineered

- microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 11, No. 3, pp. 286-289, 2000.
- 4) 経済産業省, 環境省: 微生物によるバイオレメディエーション利用指針, 2005.
  - 5) Sarand I., Haario H., Jørgensen K.S., and Romantschuk M.: Effect of inoculation of a TOL plasmid containing mycorrhizosphere bacterium on development of Scots pine seedlings, their mycorrhizosphere and the microbial flora in *m*-toluate-amended soil, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 31, No. 2, pp. 127-141, 2000.
  - 6) Jernberg C., and Jansson J.K.: Impact of 4-chlorophenol contamination and/or inoculation with the 4-chlorophenol-degrading strain, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L, on soil bacterial community structure, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 42, No. 3, pp. 387-397, 2002.
  - 7) Wenderoth D.F., Rosenbrock P., Abraham W.-R., Pieper D.H., and Höfle M.G.: Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater, *Microbial Ecology*, Vol. 46, No. 2, pp. 161-176, 2003.
  - 8) Chao W.L., and Hsu S.F.: Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacterial, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 36, No. 3, pp. 479-487, 2004.
  - 9) Baxter J., and Cummings S.P.: The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure, *Biodegradation*, Vol. 17, No. 3, pp. 207-217, 2006.
  - 10) Applyard R.K.: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12, *Genetics*, Vol. 39, No. 4, pp. 440-452, 1954.
  - 11) 橋本奨, 藤田正憲: 活性汚泥より分離した 3 種のフェノール分解菌の同定とその性質について, *下水道協会誌*, Vol. 24, No. 273, pp. 27-33, 1987.
  - 12) Jacob A.E., and Grinter N.J.: Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engineering, *Nature*, Vol. 255, No. 5508, pp. 504-506, 1975.
  - 13) Bagdasarian M., Luze R., Ruckert B., Franklin F.C., Bagdasarian M.M., Frey J., and Timmis K.: Specific-purpose plasmid cloning vector II. broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*, *Gene*, Vol. 16, No. 1-3, pp. 237-247, 1981.
  - 14) Cowan S.T., and Steel K.J.: *Manual for the identification of medical bacteria*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1974.
  - 15) Inoue D., Sei K., Soda S., Ike M., and Fujita M.: Potential of predominant activated sludge bacteria as recipients in conjugative plasmid transfer, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, No. 6, pp. 600-605, 2005.
  - 16) Boyer H.W., and Roulland-Dussoix D.: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 41, No. 3, pp. 459-472, 1969.
  - 17) Amann R.L., Ludwig W., and Schleifer K.H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Review*, Vol. 59, No. 1, pp. 143-169, 1995.
  - 18) Widmer F., Fließbach A., Laczkó E., Schulze-Aurich J., and Zeyer J.: Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog<sup>TM</sup>-analysis, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 33, No. 7-8, pp. 1029-1036, 2001.
  - 19) Garland J.L.: Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 28, No. 2, pp. 213-221, 1996.
  - 20) Tiedje J.M.: Denitrifiers, in *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Madison, WI: Soil Science Society of America, pp. 245-267, 1994.
  - 21) Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., and Simonet P.: Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 9, pp. 2717-2722, 1992.
  - 22) Rothauwe J.H., Witzel K.P., and Liesack W.: The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 12, pp. 4704-4712, 1997.
  - 23) 清和成, 内河裕美, Sang N. Nguyen, 池道彦, 藤田正憲, 石垣智基, Blent Inanc, 井上雄三, 三井清志, 前田信一, 鈴木學, 門上希和夫, 肥塚隆男: 浸出水循環式を適用した海面埋立廃棄物処分場の安定化促進モデル試験, *環境工学研究論文集*, Vol. 43, pp. 319-325, 2006.
  - 24) Newby, D.T., Gentry, T.J., and Pepper, I.L.: Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pIP4 donors, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 8, pp. 3399-3407, 2000.
  - 25) De Gelder, L., Vandecasteele, F. P. J., Brown, C. J., Fomey, L. J., and Top, E. M.: Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-β plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 9, pp. 5309-5317, 2005.
  - 26) Inoue D., Murashige K., Sei K., Soda S., Ike M., and Fujita M.: Distribution and characteristics of plasmid mobilizers in aquatic and soil environments and activated sludge, *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 53, No. 1, pp. 67-70, 2007.
  - 27) Sobecky P.A., Schell M.A., Moran M.A., and Hodson R.E.: Adaptation of model genetically engineered microorganisms to lake water: growth rate enhancements and plasmid loss, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 11, pp. 3630-3637, 1992.
  - 28) Velkov, V.V.: Stress-induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment. *Journal of Bioscience*, Vol. 26, No. 5, pp. 667-683, 2001.

(2007.5.25受付)

## Changes in structure and functions of microbial community in soil by introduction of plasmid-harboring bacteria

Daisuke INOUE<sup>1</sup>, Hirofumi TSUTSUI<sup>1</sup>, Yuji YAMAZAKI<sup>1</sup>, Katsushi MURASHIGE<sup>1</sup>,  
Kazunari SEI<sup>1</sup>, Satoshi SODA<sup>1</sup>, Masanori FUJITA<sup>1,2</sup> and Michihiko IKE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Div. Sustainable Energy and Environmental Engineering, Osaka University

<sup>2</sup>Kochi National College of Technology

In bioaugmentation of contaminated environments, assessment of bio-risks associated with the environmental release of exogenous bacteria is needed. In this study, soil microcosm experiments were carried out to analyze the changes in the structure and metabolic functions of indigenous microbial community by introduction of exogenous bacteria with and without self-transmissible and mobilizable plasmids. The introduction of the exogenous bacteria transiently disturbed the microbial community structure. However, the adverse effect lessened with the decrease in the exogenous populations. In addition, disturbance of the microbial metabolic functions by the introduction of exogenous bacteria was not detected throughout the experimental period. Transconjugants, which were formed by conjugative plasmid transfer from the exogenous bacteria to the indigenous bacteria, were temporarily detected when the exogenous bacteria harboring the self-transmissible plasmid were introduced into the microcosm. The occurrence of the transconjugants did not have any apparent effect on the structure and functions of the microbial community. These results suggest that if the exogenous bacteria and the transconjugants do not survive in the environment, the effects of the introduction of the exogenous bacteria on the indigenous microbial community (bio-risks) do not persist for a long time.