琵琶湖岸ヨシ群落における生息微生物種構成の調査

京都大学流域圏総合環境質研究センター　学生会員　○西村想　正会員　田中周平　正会員　藤井滋穂
学生会員　熊田裕佳子　正会員　清水芳久　龍谷大学理工学部　正会員　越川博元

１．はじめに

自然再生推進法では「自然再生事業は科学的知見に基づいて実施し、事業の着手後においても再生状況を監視、科学的に評価し事業に反映する」と記載されており、自然再生事業の科学的な評価が求められている。琵琶湖岸では沿岸環境修復を目標としてヨシ植栽事業が実施されているが、著者らは過年度に植物種構成を指標とした自然再生状況の評価手法[1)]を提案し、植栽ヨシ群落が時間経過に伴い自生ヨシ群落と異なる植生に遷移した事例を報告した[2)]。そこで、本研究では植栽ヨシ群落に生息する微生物の種構成を調査し、自生ヨシ群落と比較することを目的とした。山本ら[3)]は分子生物学的手法を用い、琵琶湖岸のヨシ茎表面に形成されるバイオフィルム中の微生物の現存量および種構成などを調査している。本研究では茎表面に加えて根圏に生息する微生物の調査を琵琶湖岸の複数のヨシ群落で行い、結果を得たのでここに報告する。

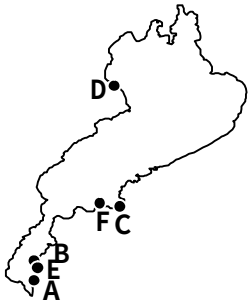

図1　微生物調査地点

表1　調査対象群落の特徴

記号	地域		群落名	成因	優占種	DO(mg/L)
A	南湖	東岸	帰帆北橋	自生	ヨシ	8.8
B			草津川①			9.1
C	北湖		長命寺			9.9
D		西岸	針江	植栽		8.8
E	南湖	東岸	草津川②			9.6
F	北湖		牧		ﾁｸｺﾞｽｽﾞﾒﾉﾋｴ	1.4

２．調査および実験の概要

微生物調査は 2005 年 12 月 13 日に**図 1** に示す琵琶湖岸ヨシ群落(計 6 群落)で行った。自生ヨシ群落からは、南湖東岸を代表して帰帆北橋(A)および草津川①(B)を、北湖東岸を代表して長命寺 (C)を選定した。植栽ヨシ群落からは、帰帆北橋(A)と地盤高分布が近似し植物種構成が異なる針江(D)、草津川①(B)の近傍で植物種構成が近似する草津川②(E)、長命寺(C)の近傍で帰化植物チクゴスズメノヒエが優占し水中のDOが低い牧(F)を選定した。なお、**表 1**、**図 2** に調査群落の特徴および植物種構成(2003 年 9,10 月に *Braun-Blanquet* 法[4)]により調査[1)])を示す。

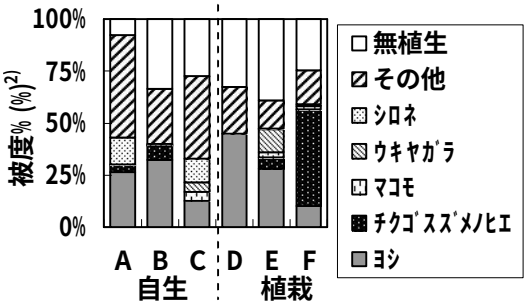

図2　琵琶湖岸ヨシ群落の植物種構成

調査では水深約 10cm に生育するヨシを根から引き抜き、沈水部分の茎および根を滅菌したはさみで切取り、滅菌済みの容器に入れ持ち帰った。なお、牧(F)ではヨシに加えて優占種チクゴスズメノヒエの茎および根も採取した。茎は 0.8 M 食塩水に浸し 10 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後 4℃、10,000 g で 1 分間遠心分離し、形成された沈殿を試料とした。根は付着土壌を軽く振り落とした後、はさみで細かく切り試料とした。微生物種構成は rDNA クローンライブラリー法[5)]を用いて調査した。手順を**図 3** に示す。試料からの DNA 抽出は Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit（MO BIO 社）を、電気泳動終了後のアガロースゲルからの DNA 回収・精製は QIA quick gel extraction kit (QIAGEN 社)を、クローニングは TOPO Cloning Kit for Sequencing（Invitrogen 社）を用いて行った。シークエンス解析にはタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターの DNA シークエンス解析受託サービスを利用した。

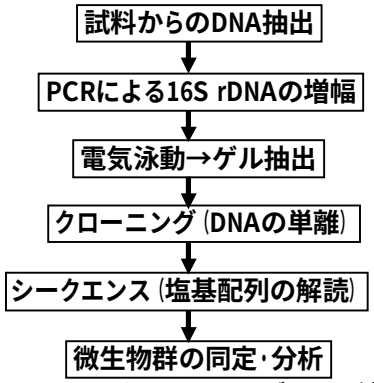

図3　rDNAクローンライブラリー法の手順

キーワード　琵琶湖、ヨシ群落、微生物群集、茎表面、根圏
連絡先　〒520-0811　滋賀県大津市由美浜 1-2　京都大学流域圏総合環境質研究センター　TEL 077-527-6220

３．調査の結果

琵琶湖岸ヨシ群落における茎表面および根圏微生物の種構成を**図 4** に示す。自生ヨシ群落では、帰帆北橋(A)の茎表面でα-Proteobacteria, Bacteroidetesが共に約20%を、根圏でβ-Proteobacteria, Bacteroidetesがそれぞれ約10, 15%を占めた。草津川①(B)の茎表面ではβ-Proteobacteria, Cyanobacteriaが約10, 20%を、根圏でβ, γ-Proteobacteria, Cyanobacteriaが約10%を占めた。長命寺(C)では茎表面でβ-Proteobacteriaが約55%を、根圏でβ-Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetesが約40, 10, 10%を占めた。すべての自生ヨシ群落で茎表面にα, β, γ-Proteobacteria, Bacteroidetesが、根圏にα, β, γ-Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetesが確認され、茎表面ではProteobacteriaが全体の20～75%を占めた。山本ら[3)]の調査では茎表面のすべての菌株はα, β, γ-Proteobacteria, Actinobacteria, Deinococcus-Thermusphylaに属し、約90%はProteobacteriaに属すると報告されている。本研究においても同様の傾向が示された。

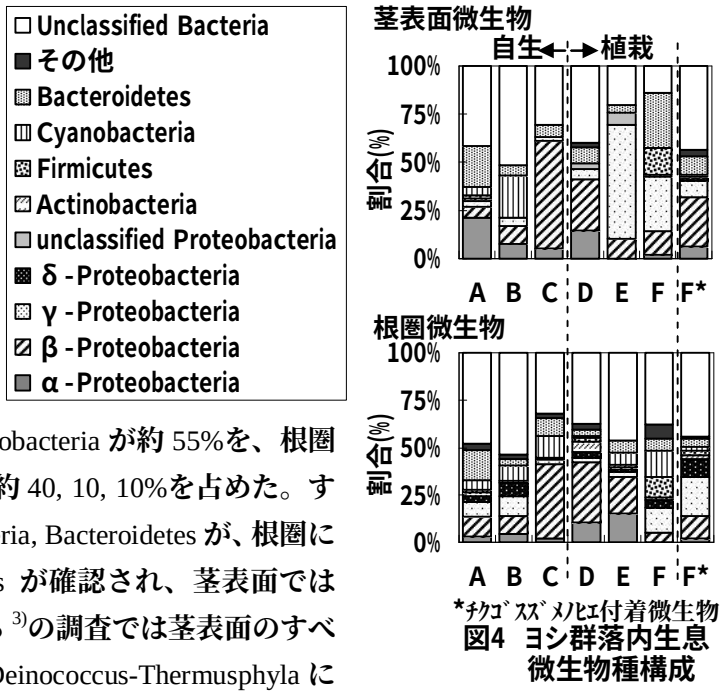

図4 ヨシ群落内生息微生物種構成

植栽ヨシ群落にでは、針江(D)の茎表面でα, β-Proteobacteriaが約15, 25%を、根圏で約10, 30%を占めた。草津川②(E)の茎表面ではβ, γ-Proteobacteriaが約10, 60%を、根圏ではα, β-Proteobacteriaが約15, 20%を占めた。牧(F)の茎表面ではγ-Proteobacteria, Bacteroidetesが共に約30%を、根圏ではγ-Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteriaが10～15%を占めた。

４．茎表面および根圏に生息する微生物群集

植栽ヨシ群落の草津川②(E), 牧(F)のヨシ茎表面ではγ-Proteobacteriaが約60, 30%を占め、自生ヨシ群落(A, B, C)での割合(5%以下)に比べて非常に大きかった。また、牧(F)では自生ヨシ群落でほとんど確認されなかったFirmicutesも約15%を占めた。一方で、針江(D)の植栽ヨシ群落では、長命寺(C)の自生ヨシ群落と似た微生物種構成を示した。

根圏の微生物種構成では、自生ヨシ群落(A, B, C)でほとんど確認されなかったFirmicutesが植栽ヨシ群落の牧(F)では約10%を占めるなど、異なる微生物種構成を示した。一方、針江(D), 草津川②(E)の植栽ヨシ群落の根圏では、長命寺(C)の自生ヨシ群落と似た微生物種構成を示した。

５．まとめ

琵琶湖岸ヨシ群落に生息する微生物の種構成を調査した結果、植栽ヨシ群落の中には自生ヨシ群落と異なる微生物種構成を示す群落も存在することが示された。ただし本研究では1群落あたり1試料分しか調査を行っておらず、今後1群落あたりの試料数を増やして調査を行い、その代表性を検討する必要がある。

参考文献

1)澤本直樹；立命館大学大学院修士論文、植生調査によるヨシ群落再生評価手法の提案とその適用、2003

2)田中周平、藤井滋穂、山田淳、西川博章、澤本直樹；琵琶湖沿岸ヨシ群落の植物種構成による再生評価手法の検討、環境衛生工学研究、Vol.18、No.4、11-20、2004

3)Masayasu Yamamoto、Hiroshi Murai、Aya Takeda、Suguru Okunishi and Hisao Morisaki；Bacterial Flora of the Biofilm Formed on the Submerged Surface of the Reed *Phragmites australis*、Microbes Environ. Vol.20、No.1、14-24、2005

4）*Braun-Blanquet.E.*；Grundlagen und Methoden des biologischen Wasserbaus、Der biologische Wasserbau an den Bundeswasserstrassen、p.17-78、1965

5)熊田裕佳子；京都大学学士論文、油汚染土壌のPAHs分解実験における微生物群集解析、2004