

ホテルビオトープによる環境づくり（その2）－土壌細菌群集構造の解析－

（株）熊谷組技術研究所 正会員 ○門倉 伸行、佐々木 静郎、村上 順也
筑波大学大学院環境科学研究科 内山 裕夫、崔 京振

1. 目的

ホテルの棲める環境づくり「ホテルビオトープ」の創出において、それを構成する土壌環境は非常に重要である。そこで筆者らは、ビオトープを構成する土壌中の細菌と環境とのかかわりを明らかにし、健全なホテルビオトープのあり方を探索することを目的に検討を行った。検討にあたっては、従来から実施しているプレート培養法と近年適用が広まっている分子生物学的手法である PCR-DGGE 法を組み合わせ、土壌中の細菌群集構造の解析を行った。

2. 実験方法

従来、土壌中の微生物群集解析には培養法が用いられてきたが、原核生物では形態学的な特徴に乏しいことによる分類の難しさ、また生きてはいるが培養してもコロニーを形成しない菌 VBNC (Viable But Not Culturable) 状態の菌の存在も報告され、近年は培養法によらない分子生物学的手法による微生物群集構造解析が広まっている。本研究では、土壌から直接抽出した DNA を酵素的に増幅する方法 (PCR) と、DNA 変性剤の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドを用いた電気泳動 (DGGE) を組合せた PCR-DGGE 法の適用を行った。

PCR-DGGE 法の流れを図 1 に示す。菌数の計数は表 1 の培地を用いて 30℃で 3 日間の培養後にコロニーを計数した。供試サンプルは、表 2 に示す筆者らが施工した人工ホテルビオトープならびに実際のホテル生息地域で採取した土壌サンプル（表 3）を対象とした。

3. 結果

人工のホテルビオトープおよび自然のホテル生息地の土壌中生菌数を図 2 に示す。人工ホテルビオトープにおいて施工前後での比較を行ったが、ともに $10^5 \sim 10^6$ CFU/g の生菌数であった。施工前の土壌において 10 倍程度多い生菌数も確認されているが、大きな差異は認められなかった。一方、自然の生息地では $10^6 \sim 10^7$ CFU/g の生菌数であり、人工

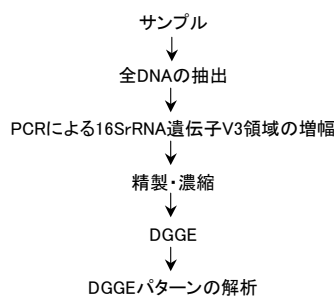


図 1 PCR-DGGE 法の流れ

表 1 NB 寒天培地組成

Nutrient Broth	8 g/L
Agar	15 g/L
pH=6.8(un adjusted)	

表 2 人工ホテルビオトープ土壌サンプル

No.	施設名	ビオトープ種別	サンプリング場所	サンプリング日	
				1回目	2回目
1	国立海洋研究機関	屋外ビオトープ	上流	2005. 5. 13	-
			下流	2005. 5. 13	2005. 6. 15
			比較土壌	"	"
2	大阪いぶきの病院	屋上ビオトープ	ビオトープ	2005. 5. 27	-
3	石坂産業	屋外ビオトープ	ビオトープ	2005. 5月末	2005. 6. 22

表 3 ホテル生息地域土壌サンプル

No.	ホテル生息地	ビオトープ種別	サンプリング日
1	湯河原	ホテル放流	2005. 6. 7
2	熱海	"	"
3	東伊豆町	"	2006. 6. 8
4	中伊豆・冷川	ホテル自生	"
5	伊東	"	"
6	奈良・雑司町	"	2005. 6. 24

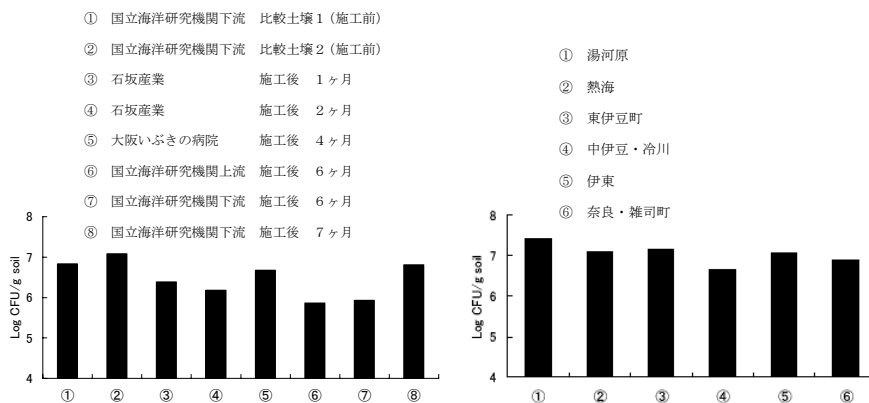


図 2 ホテル生息場所の違いによる土壌中生菌数の比較

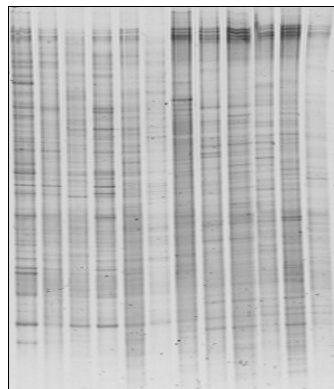
キーワード：ビオトープ、ホテル、土壌細菌、細菌群集解析、DGGE

連絡先：〒300-2651 茨城県つくば市鬼ヶ窪 1043 TEL 029-847-7505 FAX 029-847-7480

ホタルビオトープに比べ約 10 倍多い生菌数であった。

次に、人工ホタルビオトープとホタル自然生息地に対する DGGE 泳動結果を図 3 に示す。各バンドパターンにおけるバンドの輝度および位置は、細菌叢の違いやおおよその菌密度を表している。人工ホタルビオトープのバンドパターン（①～⑥）では、いくつかのバンドに違いはあるものの、全体的には大きな差異は認められなかった。しかし、自然の生息地におけるバンドパターン（⑦～⑫）では、場所により異なるバンドが見られ、同じホタルの生息地ではあっても必ずしも同様の細菌叢が存在するものではないことがわかった。

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫

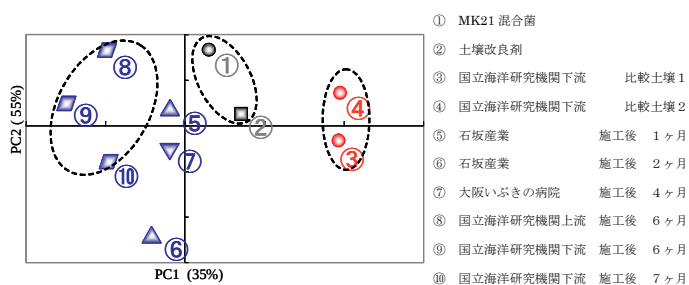


- ① 石坂産業 施工後 1ヶ月
- ② 石坂産業 施工後 2ヶ月
- ③ 大阪いぶきの病院 施工後 4ヶ月
- ④ 国立海洋研究機関 施工後 6ヶ月
- ⑤ 国立海洋研究機関 施工後 6ヶ月
- ⑥ 国立海洋研究機関 施工後 7ヶ月
- ⑦ 湯河原
- ⑧ 熱海
- ⑨ 東伊豆町
- ⑩ 中伊豆・冷川
- ⑪ 伊東
- ⑫ 奈良・雑司町

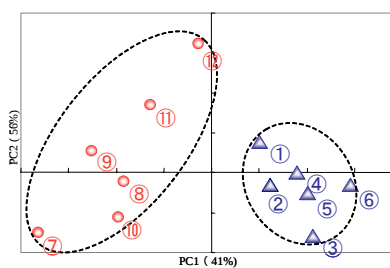
図 3 DGGE 泳動結果

DGGE バンドパターンの解析では、サンプル間の関係を視覚化する主成分分析（PCA:Principal Component Analysis）も行った。人工ホタルビオトープに対する PCA 解析結果を図 4 に示す。図には、人工ホタルビオトープの施工時に土壌改良のために添加した土壌改良材ならびに土壌改良材に含まれる元菌（MK21 混合菌）のデータもあわせて示す。PCA 解析の結果、国立海洋研究機関の施工前（③、④）と施工後（⑧～⑩）では明らかに違う位置にプロットされ、土壌改良材の添加により細菌叢に変化が起こったことが示唆された。また、石坂産業の施工 1 ヶ月後のサンプル（⑤）では、MK21 混合菌や土壌改良材（①、②）と近い位置にプロットされ、施工初期において MK21 混合菌由来の細菌が土壌細菌群集に影響を与えていることが確認された。

図 5 は、人工ホタルビオトープとホタル自然生息地の PCA 解析結果をあわせて示したものである。その結果、人工ホタルビオトープ（①～⑥）は相対的には近い位置にプロットされ、細菌叢の変動はあるものの大きな差異は認められず、施工後の経過時間が短いため大きな変動が起こらなかったと考えられた。一方、ホタル自然生息地（⑦～⑫）ではまとまってなく散在したプロットとなり、人工ホタルビオトープとは明らかに離れた位置に存在していた。自然生息地では、場所により異なる植生を持ち、その種類も多いことから、土壌の細菌叢はそれを反映した多様性を示したものと推測される。したがって、一概には人工ホタルビオトープの細菌叢を自然の生息地の細菌叢と比較することによる健全性の評価にはつながらないことがわかった。



- ① MK21 混合菌
- ② 土壌改良剤
- ③ 国立海洋研究機関下流 比較土壌 1
- ④ 国立海洋研究機関下流 比較土壌 2
- ⑤ 石坂産業 施工後 1ヶ月
- ⑥ 石坂産業 施工後 2ヶ月
- ⑦ 大阪いぶきの病院 施工後 4ヶ月
- ⑧ 国立海洋研究機関上流 施工後 6ヶ月
- ⑨ 国立海洋研究機関下流 施工後 6ヶ月
- ⑩ 国立海洋研究機関下流 施工後 7ヶ月



- ① 石坂産業 施工後 1ヶ月
- ② 石坂産業 施工後 2ヶ月
- ③ 大阪いぶきの病院 施工後 4ヶ月
- ④ 国立海洋研究機関 施工後 6ヶ月
- ⑤ 国立海洋研究機関 施工後 6ヶ月
- ⑥ 国立海洋研究機関 施工後 7ヶ月
- ⑦ 湯河原
- ⑧ 熱海
- ⑨ 東伊豆町
- ⑩ 中伊豆・冷川
- ⑪ 伊東
- ⑫ 奈良・雑司町

図 4 人工ホタルビオトープに対する PCA 解析結果

図 5 生息地の違いによる PCA 解析結果

4. おわりに

本研究では、ホタルビオトープを構成する土壌細菌の群集構造解析を行うことでホタルビオトープのあり方を探索することを目的に検討を行った。その結果、一部のデータにおいて添加した土壌改良材等の影響が示唆されたものの、明確な細菌叢の変化は確認できず、また自然の生息地からのデータでもあるべき姿を見つけ出すことはできなかった。解析に用いたサンプル数も少なく、今後季節や生息環境の異なる条件下でのサンプルを元にした詳細解析が必要と考える。最後に、土壌改良材や元菌の提供をいただいたグリーンパワー研究会の浜島所長に感謝の意を表します。