

令和3年度 修士論文

地下環境での木材分解に関与する
微生物群集構造の解析

Analysis of microbial community structure involved in
wood degradation in the underground environment

高知工科大学

工学研究科 基盤工学専攻 生命科学コース

1245096 岡野大輝

指導教員 堀澤栄 教授

目次

1. 概要
2. 緒言
3. 実験方法
 - 3-1. 試料
 - 3-2. 丸太および土壌の微生物群集構造解析
 - 3-2-1. 微生物 DNA の抽出
 - 3-2-2. PCR
 - 3-2-3. Miseq による塩基配列の決定
 - 3-2-4. 微生物の同定
 - 3-2-5. R 言語を用いた微生物群集構造の解析
 - 3-3. 丸太および土壌の成分測定
 - 3-4. 丸太の密度測定
 - 3-5. 丸太の細胞観察
4. 結果
 - 4-1. 微生物群集構造の解析
 - 4-1-1. 真菌の同定結果
 - 4-1-2. バクテリアの同定結果
 - 4-1-3. R を用いた解析
 - 4-2. 丸太および土壌の成分測定
 - 4-3. 丸太の密度測定
 - 4-4. 丸太の細胞観察
5. 考察
6. 結論
7. 謝辞
8. 参考文献

1. 概要

地震が頻繁に起こる日本において、軟弱な地盤で起こる液状化現象は深刻な問題である。液状化対策のひとつとして杭の打設による地盤の安定化があげられる。中でも杭として丸太を用いる丸太打設液状化対策&カーボンストック工法(Log Piling Method for Liquefaction Mitigation and Carbon Stock Method, LP-LiC)は、環境親和性のある材料の使用、森林資源の活用、炭素貯蔵効果などの利点がある。LP-LiC 工法による地盤安定効果の長期的な持続のためには、丸太の耐久性が大きく影響する。木材の屋外利用における劣化要因は、生物による腐朽や蟻害、日光や風雨による劣化、摩耗などが考えられる。一方、LP-LiC 工法における丸太は地中に埋設されることから、風雨・日照はないが、低酸素濃度、地下水の存在など異なる環境に暴露されることとなる。本研究では、地盤安定化のために地中に埋設された丸太の劣化を評価するために、丸太とその周辺の土壌を採取し、微生物の検出および成分分析を行った。

八戸市の漁港施設の基礎杭として55年間埋設されていた丸太を分析した。地表から1300mm下の地中に埋設された長さ4000mm~4400mmの丸太を重機で引き抜いた。また比較のために1ヶ月埋設した丸太も分析した。引き上げた丸太は暗所で1年間静置した。丸太を引き上げた際にそれぞれの丸太表面に付着していた土壌および丸太内部の組織よりDNAを抽出し、細菌類、真菌類の微生物群集を解析するとともに、化学成分を分析した。

また、丸太については、密度測定と光学顕微鏡を用いた細胞組織の顕微鏡観察を行った。

2. 緒言

研究の背景には、丸太打設液状化対策&カーボンストック(Log Piling Method for Liquefaction Mitigation and Carbon Stock Method, LP-LiC) 工法がある。地震の時に低密度な地盤で起こる液状化被害の発生防止にはいくつかの工法が開発されている。地盤の土質を振動などによって改良する締固め工法、土壌を固化させる資材を直接金剛する固化法、土壌にドレーンを施工して土壌中の間隙水圧を消散させる間隙水圧消散法などがあげられる¹⁾。これらは土質改良することで直接的に液状化発生を防止する方法である。それに対し、液状化の発生は許すが被害を軽減する目的で施工される方法がある。そのひとつに杭を打設することで地盤を改良する工法がある。サンドコンパクションパイル(sand compaction pile, SCP)工法では、砂を杭状に振動圧入することで地盤を密実化させるもので、これまでにいくつかの大地震で効果を発揮した実績が数多くある。その杭に丸太を用いたものが丸太打設液状化対策&カーボンストック(LP-LiC)工法である²⁻⁴⁾。間伐材などの森林資源を緩い地盤に打設することで地盤の高密度化を実現する。SCP工法と同様の効果を期待できるが、丸太による炭素貯蔵効果が付加される。さらに炭素貯蔵、低振動低騒音、無排土、近接周辺地盤への変位抑制も期待できる²⁾。

LP-LiC工法は、日本の木材資源の利用拡大の目的と非常に適合する。例えば令和元年11月に完成した高知市新庁舎では、LP-LiC工法により地盤改良および液状化対策がなされ、直径16cm、長さ4.0mの丸太が約15700本用いられた。このように木材利用量に大きく貢献する可能性があるが、工法の普及には木材の劣化が問題となる。基礎材として広く利用されている鋼材やコンクリートに比べて木材は劣化しやすいという懸念の払拭が不可欠である。木材劣化の主な原因には紫外線や雨風による風化、虫による食害、そして菌類による分解が挙げられる。そのうち、生物劣化は短期間のうちに著しく強度を失うことから非常に大きな問題となる。菌類による木材腐朽には栄養、水、酸素、温度が条件となるが、嫌気条件や地下水位以下である土の中では、菌類による腐朽や虫害は起こらないとされる⁵⁾。土中における木材の劣化を検討するために、55年前に施工された杭基礎に用いた丸太を引き抜き、周囲の地盤、丸太の残存強度、丸太内および周囲の土壌の微生物群集の解析などを行うこととし、本研究では主に微生物関連、丸太密度、光学顕微鏡による木材組織の顕微鏡観察を行った。

3. 実験方法

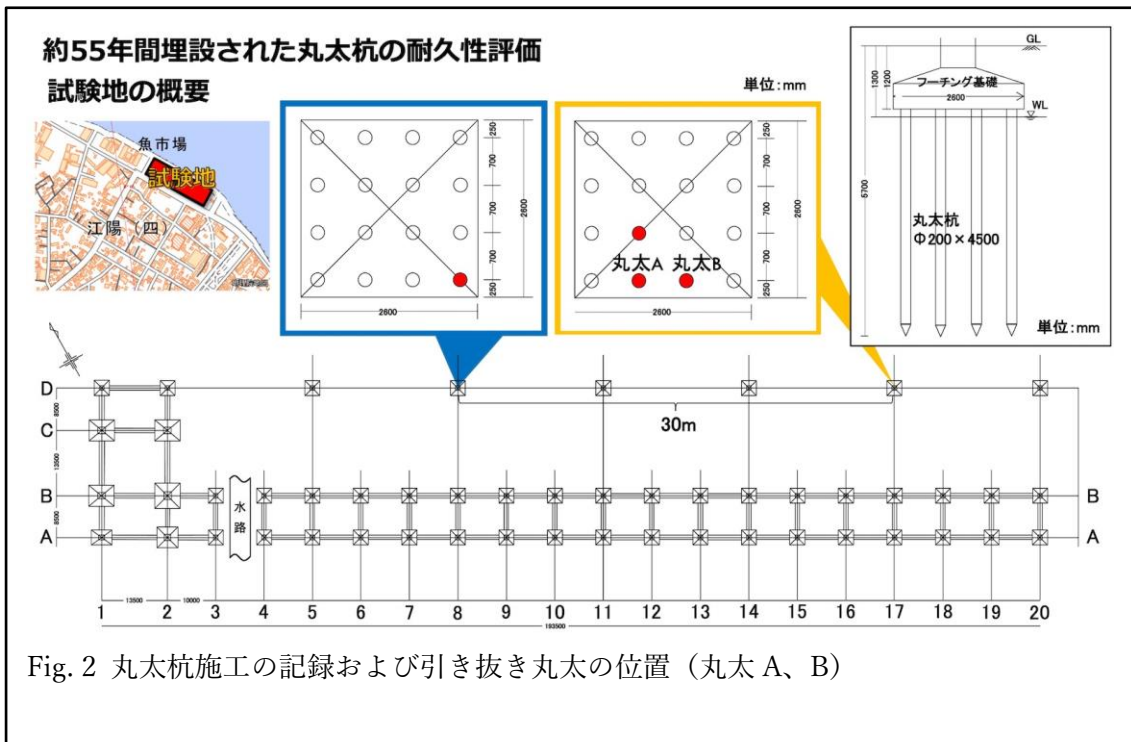
3-1. 試料

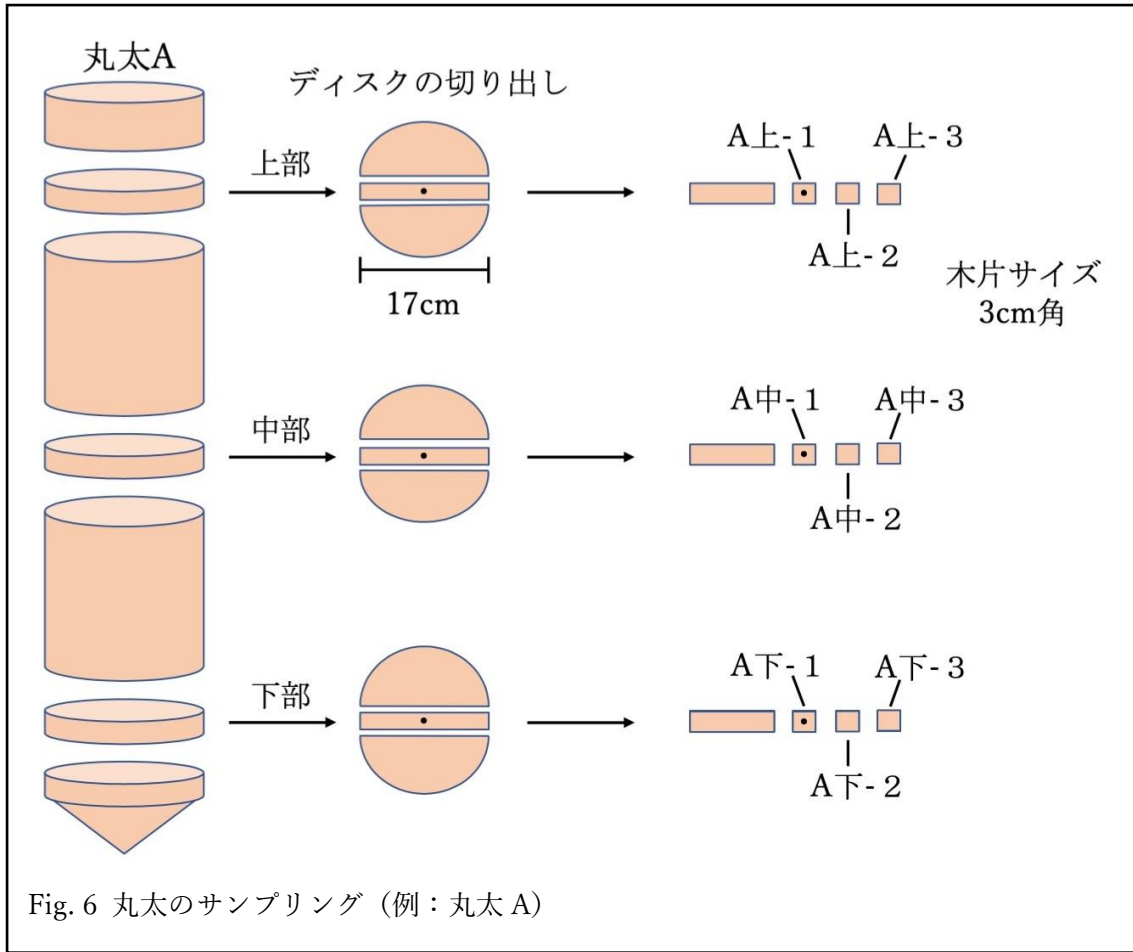
本研究では青森県八戸市第二魚市場跡地(40.528235, 141.516299)で55年前に杭基礎として打設された丸太2本と埋設期間の比較用に1ヶ月間埋設された丸太1本を引き抜き、実験に供した (Fig. 1, 2)。記録によると樹種は、カラマツ *Larix kaempferi*、アカマツ *Pinus densiflora*、クロマツ *Pinus thunbergii* のいずれである。全3本の丸太を本研究の試料とし、そのうち55年間埋設されていた丸太2本をそれぞれ丸太A、丸太B、1ヶ月間埋設されていた丸太を丸太Cと番号付けした。丸太を引き抜く際、地下水位は地表下900mm付近で確認できた。丸太A、B、Cは地表下1300mmで丸太上部の露出を確認した。油圧ショベルを用いて土壌を掘り進め、ワイヤーで丸太上部を固定し引き上げた (Fig. 3)。各試料の材全長は丸太A=4400mm、B=4000mm、C=4000mmであった。材下部の先端はペンシル状に削られていた (Fig. 4)。55年間埋設されていた丸太A、Bに関して、55年前に樹皮付きのまま丸太を埋設した記録が残っていたが、引き上げた際に樹皮は付いていなかった (Fig. 5)。回収した丸太サンプルは実験に用いるまでの約1年間暗所で静置されていた。丸太から木片を切り出して実験に供した際のサンプリング方法を以下に示した (Fig. 6)。丸太から上部、中部、下部とディスク状に三枚切り出し、そのディスクの真ん中をさらに棒状に切り出した。さらに心材から辺材にかけて三分割した。丸太Cについては、丸太下部のサンプルを回収することができなかった。

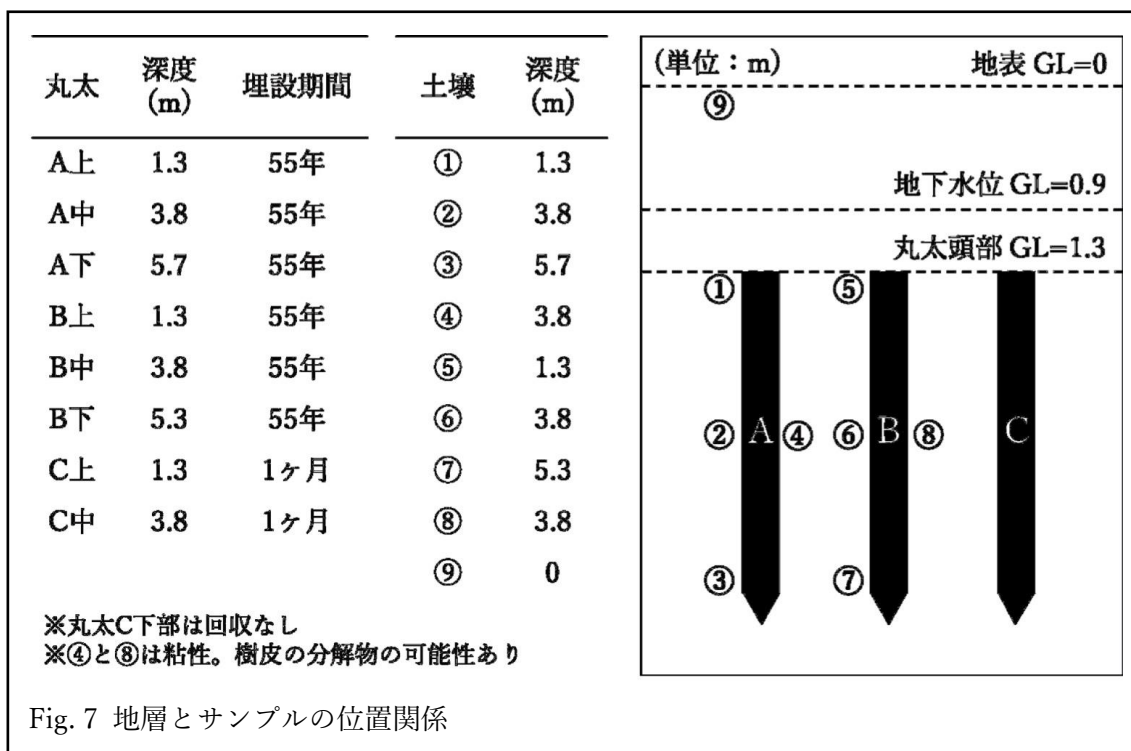
また、丸太の周辺から土壌を回収し、深さや特性ごとにサンプリングした。このように採取した丸太と土壌の実際の位置関係をサンプル表とともに以下に示した (Fig. 7)。



Fig. 1 青森県八戸市第二魚市場跡地







3-2. 丸太および土壌の微生物群集構造解析

3-2-1. 微生物 DNA の抽出

丸太から円盤をチェーンソーで切り出し、その後ハンマーとナタを用いて円盤から直径を通る割り箸程度の大きさの材片を割り出した。この木片をカットミル (IKA-Works, Staufen, Germany) で粉砕し、0.5mm 格子を通過する木粉を回収した。さらに、ハンマーミル Tissue Lyzer (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用い 25Hz で粉末状になるまで粉砕した (Fig. 8)。その後、ISOPLANT II (ニッポン・ジーン、東京都) を用いてメーカーのプロトコルにより DNA 抽出を行った。

土壌は、小石や枯葉リターなどの不純物を除去するために、風乾した土壌を乳鉢に入れ、乳棒ですり潰し、茶こしで篩分けを行った (Fig. 9)。その後、Zymo BIOMICS DNA Miniprep kit (フナコシ株式会社、東京都) を用いてメーカーのプロトコルにより DNA 抽出を行った。

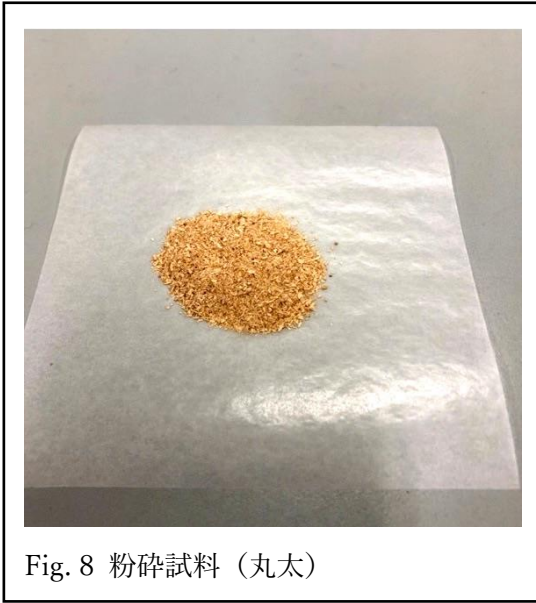


Fig. 8 粉碎試料（丸太）

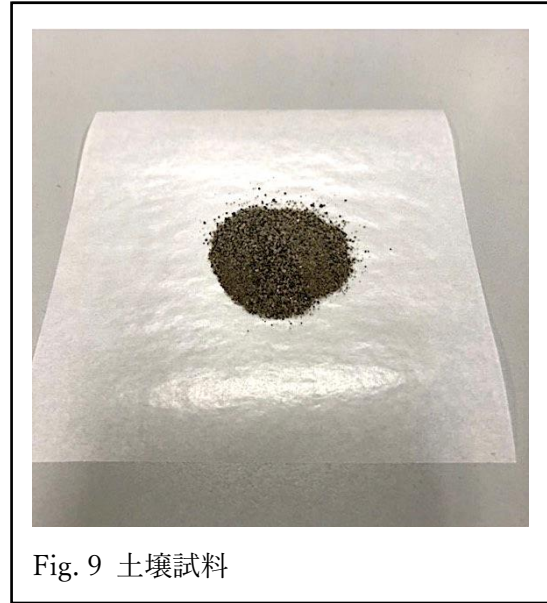


Fig. 9 土壌試料

3-2-2. PCR

抽出した微生物の rDNA を鋳型として、真菌は Internal transcribed spacer (ITS) 領域、細菌は 16S 領域を 1st PCR、2nd PCR によって増幅した。各 PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動にて PCR 産物の確認を行った。

真菌は、1st PCR に Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ、滋賀県)、NS7 と NL4 のプライマーペアを用いた。2nd PCR ではプライマーを fITS4 と ITS7 に変え PCR を行った。細菌は、1st PCR に MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (タカラバイオ、滋賀県)、27F と 1492R のプライマーペアを用いた。2nd PCR では、酵素キットを TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ、滋賀県)、プライマーペアを 341F⁶⁾と 805R⁷⁾に変え PCR を行った。プライマーのリストを Table 1 に示した。

Primer	Target barcode	Sequence (5'--3')	PCR
NS7	18S partial-ITS-28S partial	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	1st
NL4		GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
fITS7	ITS II	GAACACAGCGAAATGTGA	2nd
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
27F	Full-length of 16s rDNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1st
1492R		TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
341F	16s rDNA V3V4 region	CCTACGGGAGGCAGCAG	2nd
805R		GACTACCAGGGTATCTAATC	

3-2-3. Miseq による塩基配列の決定

PCR で得た DNA を精製するために、NucleoMag NGS Clean-up and Size Select(タカラバイオ、滋賀県)を用いた。PCR 産物 40 μ l を 1.8 倍量の磁性ビーズで精製し、DNA 溶液 17 μ l を回収した。TruSeq DNA PCR-Free (illumina、CA, US)、DNA Ligation kit<Mighty Mix> (タカラバイオ、滋賀県) とその改変プロトコルを用いてタグ付けを行った。DNA 溶液 17 μ l に対して、A-tailing mix 4 μ l を添加して処理した。得られた溶液 21 μ l と DNA Ligation kit<Mighty Mix>10 μ l、アダプタ 2 μ l を混和し、室温で over night した。その後、1.8 倍量の磁性ビーズで再度精製した後、DNA 溶液 32 μ l を回収した。

精製した DNA を定量し、その濃度に基づいて各試料の DNA が同量となるように混和し、最終的に 2 nM になるように TE で希釈して混和ライブラリとした。混和ライブラリを Miseq Reagent Kit v2 500 cycle (illumina、CA, US) を用いて製品マニュアルに従って Miseq (illumina、CA, US) で塩基配列を解析した。

3-2-4. 微生物の同定

得られた塩基配列データを CLC workbench ver 6.0 (CLC bio, Cambridge, MA)を用いて、リードのマージを行った。その後、Usearch v.7 (21)を用いて、150bp 以上の配列をクラスタリングし、operation taxonomic unit (OTU)ごとに分類した。得られた塩基配列をもとに、生物情報データベースに登録されている塩基配列を BLAST 検索して相同性の高いもの (90%以上) の登録情報より生物種を同定した。使用したデータベースは、真菌については UNITE から取得し、バクテリアについては SILVA から取得した⁸⁻⁹⁾。

3-2-5. R を用いた微生物群集構造の解析

R を用いて nMDS 解析や多様度の計算を行った。同定された配列数について、R の vegan パッケージの rareflope 関数を用いて coverage ベースの rarefaction 解析を行った。これによりサンプル間のリード数の差に補正をかけた。その後、R の vegan パッケージの metaMDS 関数を用いて、サンプル間の類似度を可視化するために Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) 解析によって二次元プロットを行った。

また、サンプルの α 多様度については、R の vegan パッケージの diversity 関数を用い、Shannon-wiener 式に基づいて計算を行った。サンプルの深さや埋設期間などのサンプルの環境要因について、R の envfit 関数で計算を行った。環境要因のうち関連度が高いもの (P 値 0.01 以下) について、図上に矢印で表示した。

3-3. 丸太および土壌の成分測定

成分測定を行う準備として丸太と土壌の風乾および篩分けをした。丸太は、ハンマーミル Tissue Lyzer (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用い 25Hz で粉末状になるまで粉碎し、茶こしで篩分けを行った。その後、アルミホイル上に薄く延ばして置き、2 日間風乾した。土壌

は、アルミホイル上に薄く延ばして置き、3日間風乾した。その後、小石や枯葉リターなどの不純物を除去するために、風乾した土壌を乳鉢に入れ、乳棒ですり潰し、茶こしで篩分けを行った。

測定を行った項目は、全炭素量、全窒素量の2項目である。全炭素量(T-C)、全窒素量(T-N)はそれぞれ、土壌中の有機物の指標および肥料成分の指標となる^{10,11)}。本研究では、これらは乾式燃焼法で求めた。

3-4. 丸太の密度測定

丸太の密度測定は、容積密度数を求める方法で行った¹²⁾。水が入った容器に全乾した木材を沈め、十分脱気した。その後、体積の増加量を測定し、全乾した木材の質量を容器内の水の体積増加量で割ることで容積密度数を求めた。

3-5. 丸太の細胞観察

細胞組織に劣化が見られた場合、リグニンを分解する白色腐朽菌やその他主成分の分解能を有する微生物の存在を示唆することになる。そこで、丸太内部の細胞組織を観察するために、染色による顕微鏡観察を行った^{13,14)}。

実験に使用する材は miliQ 水で保存した。電子冷却式凍結マイクローム (大和光機工業株式会社、埼玉県) を用いて、丸太の木口面を厚さ $20\mu\text{m}$ に切り出した。切り出した超薄切片は染色するまで miliQ 水中で保存した。細胞壁の主成分であるリグニンを赤色に呈する Safranin (Safranin 粉末 0.5g + miliQ 水 50ml) とセルロースを青色に呈する Astra blue (Astra blue 粉末 0.25g + 99.7%酢酸 1ml + miliQ 水 50ml) で染色した。上記のように調製した試薬を以下の手順で染色に用いた。

- I. 超薄切片を Safranin (赤色) で3分間染色
- II. 70%エタノールで1分間洗浄
- III. Astra blue (青色) で3分間染色
- IV. 70%エタノールで1分間洗浄
- V. 80%エタノールで1分間洗浄
- VI. 100%エタノールで1分間洗浄

その後、染色した超薄切片でプレパラートを作成し、光学顕微鏡を用いて観察を行った。プレパラートを作成する際、染色した超薄切片を100%グリセロールに浸し、その上からカバーガラスを被せた。

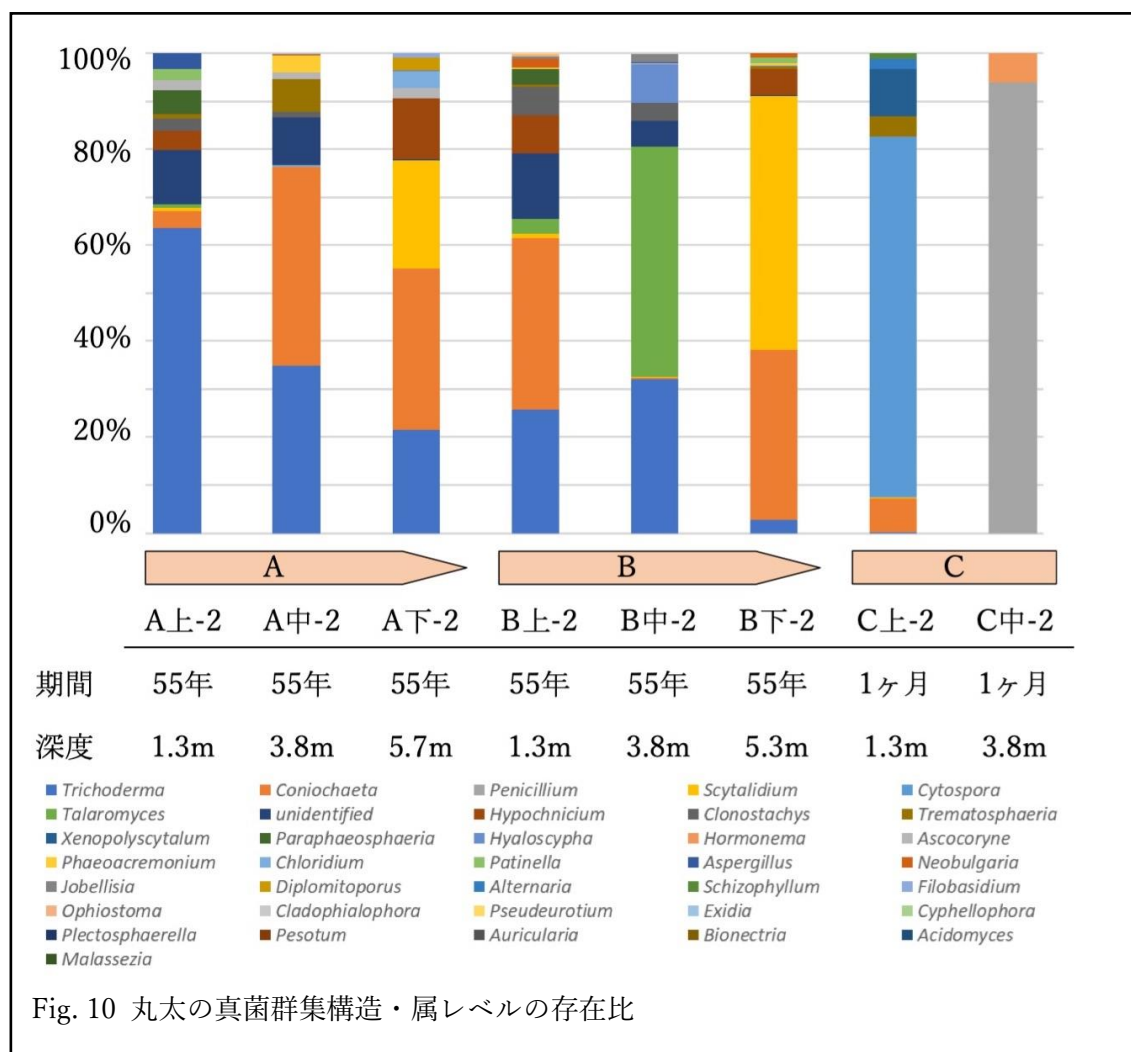
4. 結果

4-1. 微生物群集構造の解析

4-1-1. 真菌の同定結果

木材の劣化に影響する白色腐朽菌の存在を確認するために丸太と土壌の各サンプルについて、真菌の同定を行った。真菌の属レベルの存在比をグラフで示した (Fig. 10)。

丸太の真菌群集構造について、丸太 A、B と丸太 C の間には大きく違いがある。丸太 A、B では軟腐朽菌の *Trichoderma* 属が広く存在し、深度が増すと存在比が低下する傾向が見られた。*Trichoderma* 属は主に好気性であるため酸素濃度が低い深層部を嫌っていると考えられる。*Trichoderma* 属はセルロース分解性を持つものが報告されており¹⁵⁾、丸太の主成分であるセルロースの分解に関与している可能性を示唆した。その他に樹木に関する病原菌を多く含む *Coniochaeta* 属やアオカビの *Penicillium* 属の優占度が高くなっているが、木材の劣化と強く結びついている菌は確認できなかった。



土壌について、真菌の属レベルの存在比をグラフで示した (Fig. 11)。土壌の真菌群集構造は、先程の丸太の真菌群集構造と比較すると大きく異なっていることが分かった。真菌の種属や優占種が大きく異なっているため、丸太の内部と外部では群集構造に明確な違いがある。*Puccinia*属は、植物のさび病を引き起こすカビとして知られている。

Sordariomycetes 綱の下位分類には、朽木やリターの分解者となる種が多く存在している。しかし、丸太の真菌群集構造と同様に木材の劣化と強く結びついている菌は確認できなかった。また、*Trametes* 属には、腐朽試験に用いられるような高い腐朽力を持つものが知られているが、丸太内部には存在が確認できず土壌での存在比は極めて小さい。

真菌は、好気条件下で活発になる種が多く、嫌気条件下である地下水位以下において丸太の分解に大きく影響は与えない可能性が大きいと考えられる。

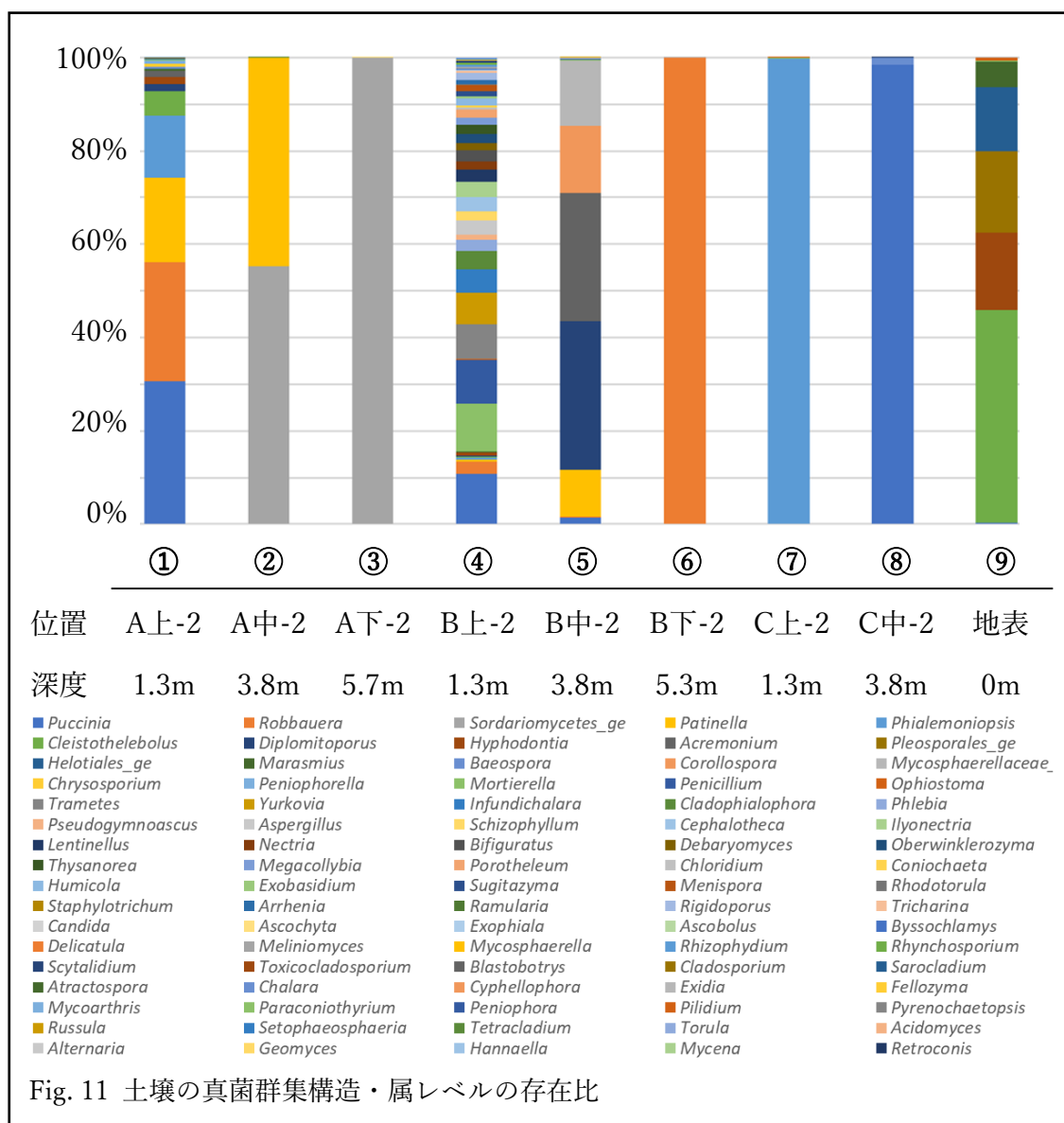


Fig. 11 土壌の真菌群集構造・属レベルの存在比

4-1-2. バクテリアの同定結果

続いて丸太と土壌の各サンプルについて、バクテリアの同定を行った。バクテリアの目レベルの存在比をグラフで示した (Fig. 12)。

丸太のバクテリア群集構造について、真菌と同じく丸太 A,B と丸太 C の間に大きく違いがある。嫌気性細菌 *Clostridiales* 目が広く存在し、深度が増すと存在比が増加する傾向が見られた。反対に、深度が小さい場所では、バクテリアの多様度が増加している。

Clostridiales 目には、セルロース分解性を持つものが報告されており¹⁶⁻¹⁷⁾、丸太の主成分であるセルロースの分解に関与している可能性を示唆した。その他には、土壌に普遍的に存在しているバクテリアが確認できた。

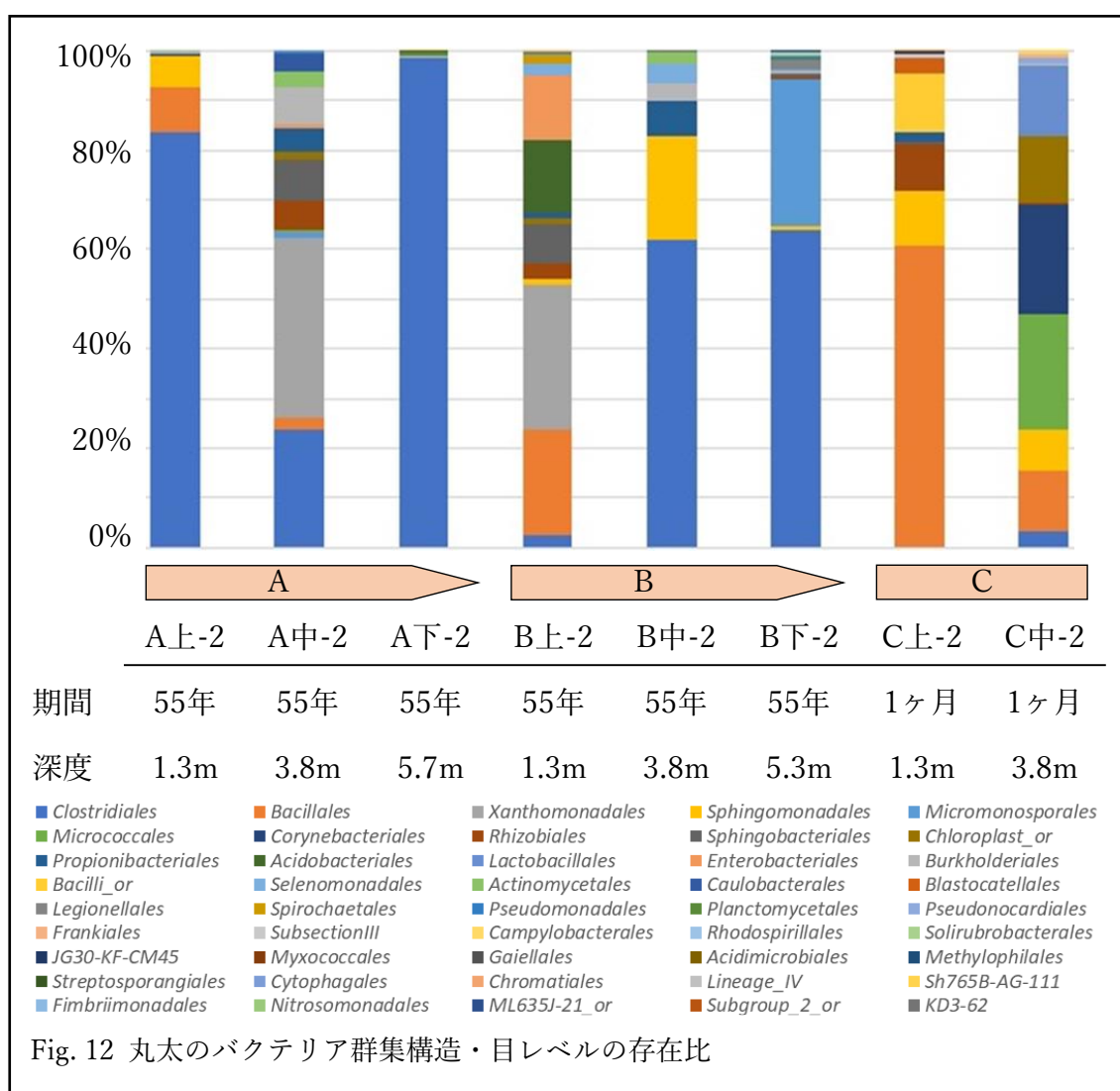
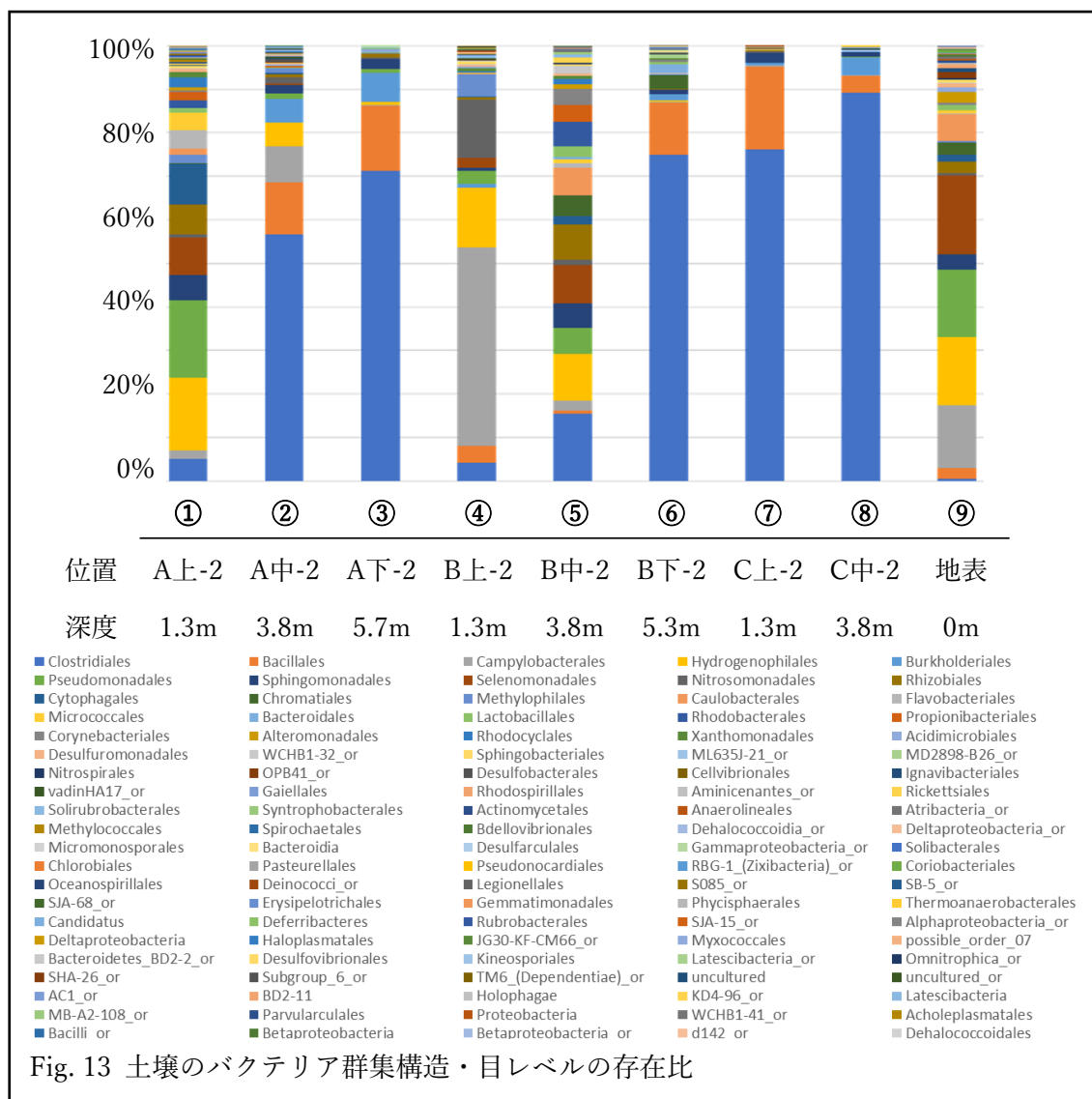


Fig. 12 丸太のバクテリア群集構造・目レベルの存在比

土壌について、細菌の目レベルの存在比をグラフで示した (Fig. 13)。土壌の細菌群集構造は、先程の丸太の細菌群集構造と比較すると類似している。嫌気性細菌 *Clostridiales* 目が広く存在し、深度が増すと存在比が増加する傾向が見られた。反対に、深度が小さい場所では、細菌の多様度が増加している。

地下水位以下において、嫌気条件下でセルロースの分解能を有する *Clostridiales* 目などの細菌が丸太の分解に関与した可能性が示唆された。



4-1-3. R 言語を用いた解析

丸太と土壌サンプルの真菌・バクテリア群集構造について、Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) 解析を行った。各サンプルに含まれている微生物群集構造の情報から類似度を計算し、類似していれば近くに、類似していなければ遠くなるようにプロットされている。また、これらの微生物群集構造に影響を与えている要因を調べるために、環境要因（深さ、埋設期間、炭素量、窒素量、真菌多様度、バクテリア多様度）と各サンプルの関連を計算し、P 値 0.01 以下の環境要因を矢印で示した。計算に用いたツールは、R 言語の `vegan` パッケージに含まれる `envfit` 関数である。

丸太と土壌サンプルについて、真菌・バクテリアの α 多様度の結果を以下に示した (Table 2)。

丸太	A上	A中	A下	B上	B中	B下	C上	C中	
真菌	1.418	1.266	1.483	1.771	1.419	1.134	0.568	0.264	
バクテリア	0.669	1.842	0	1.87	1.055	0.852	1.269	1.948	
土壌	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
真菌	1.916	0.53	0	2.687	1.671	0	0	0	1.448
バクテリア	3.032	2.615	1.051	2.257	3.132	1.584	0.898	0.349	2.796

真菌群集構造の nMDS 解析を以下に示した (Fig. 14)。丸太サンプルは、おおよそ左下にまとまっている。しかし、C 中のみ離れた位置にプロットされており群集構造が大きく異なっている。土壌サンプルは、全体的にまとまっていないが、深度の小さい①、⑤、⑨が比較的近い位置にプロットされた。また、関連のある環境要因として示されたものは、炭素量のみだった。丸太と土壌は、それぞれまとまって分かれており、丸太内部と外部では、真菌群集構造が異なっていることが示された。また、ストレス値は 0.0677 であった。

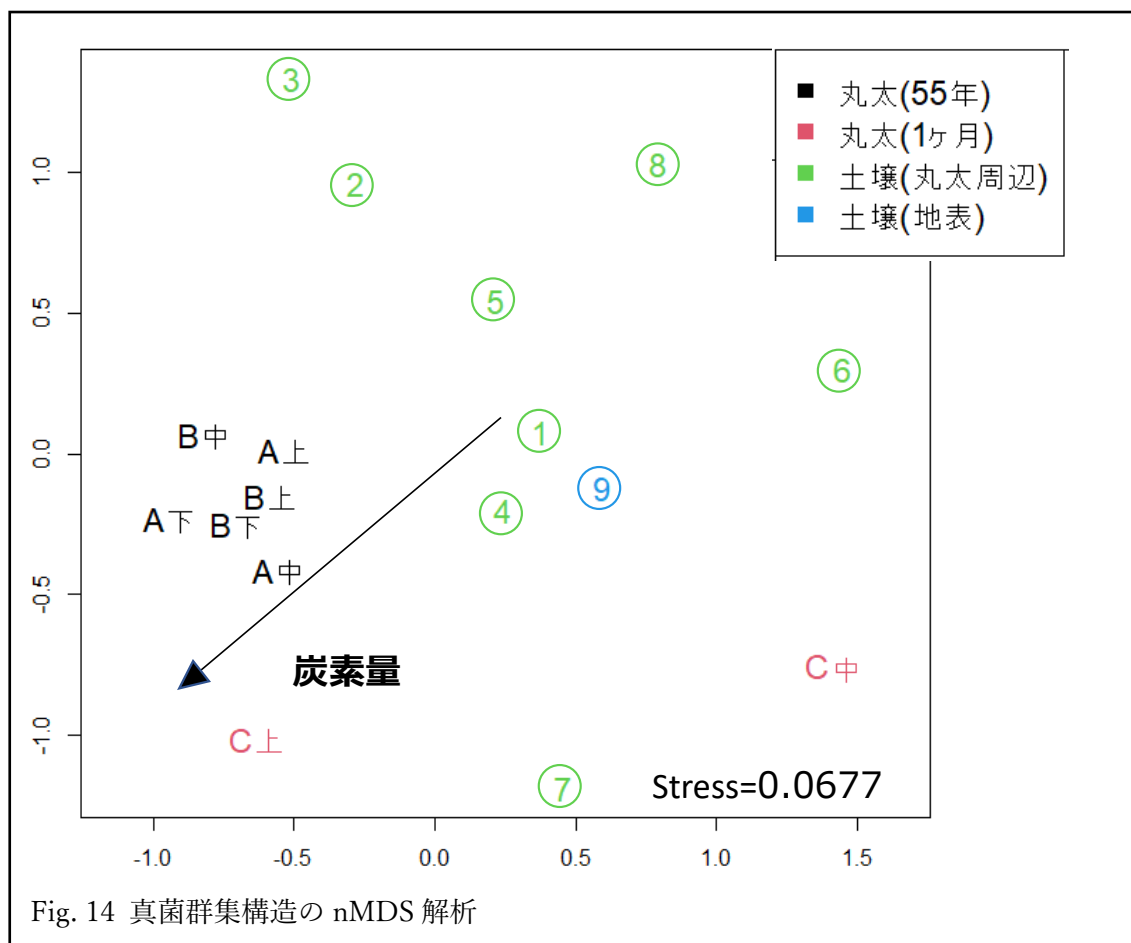
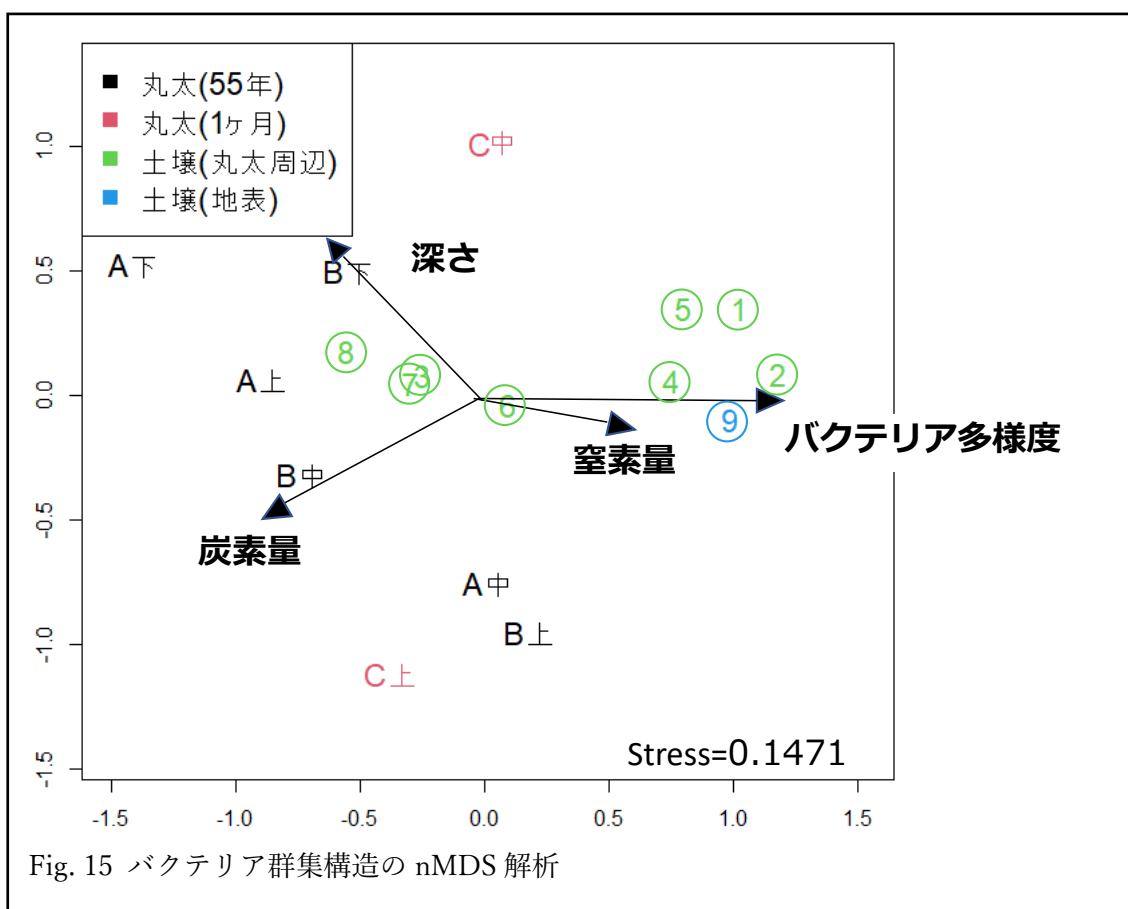


Fig. 14 真菌群集構造の nMDS 解析

バクテリア群集構造の nMDS 解析を以下に示した (Fig. 15)。丸太サンプルは、A 上が他の深度が小さいサンプルの集団と離れた場所に位置している。土壌サンプルは、左側の集団に深度が大きいサンプル、右側の集団に深度の小さいサンプルがおおよそまとまっている。また、関連のある環境要因として示されたものは、深さ、炭素量、窒素量、バクテリア多様度だった。深さとバクテリア多様度がおおよそ反対方向に矢印が伸びていることから、深度が大きくなるとバクテリア多様度が減少する、反対に深度が小さくなるとバクテリア多様度が増加する傾向が示された。また、ストレス値は 0.1471 であった。



4-2. 丸太および土壌の成分測定

丸太と土壌の成分測定の結果を以下に示した (Fig. 16、17)。前提として、一般的に樹木の C/N 比は 50~120、樹皮や腐朽材は 1000 付近になる。土壌の C/N 比は 10~30 と大きく異なっているため、丸太と土壌の測定結果は、単に比較ができない。

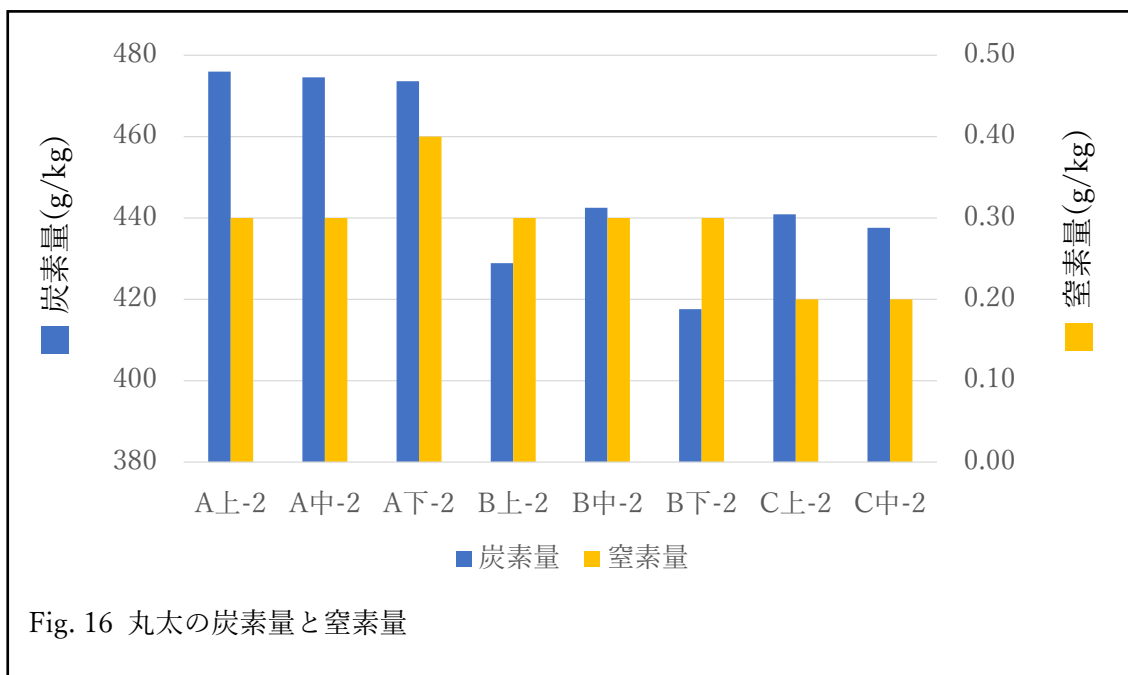


Fig. 16 丸太の炭素量と窒素量

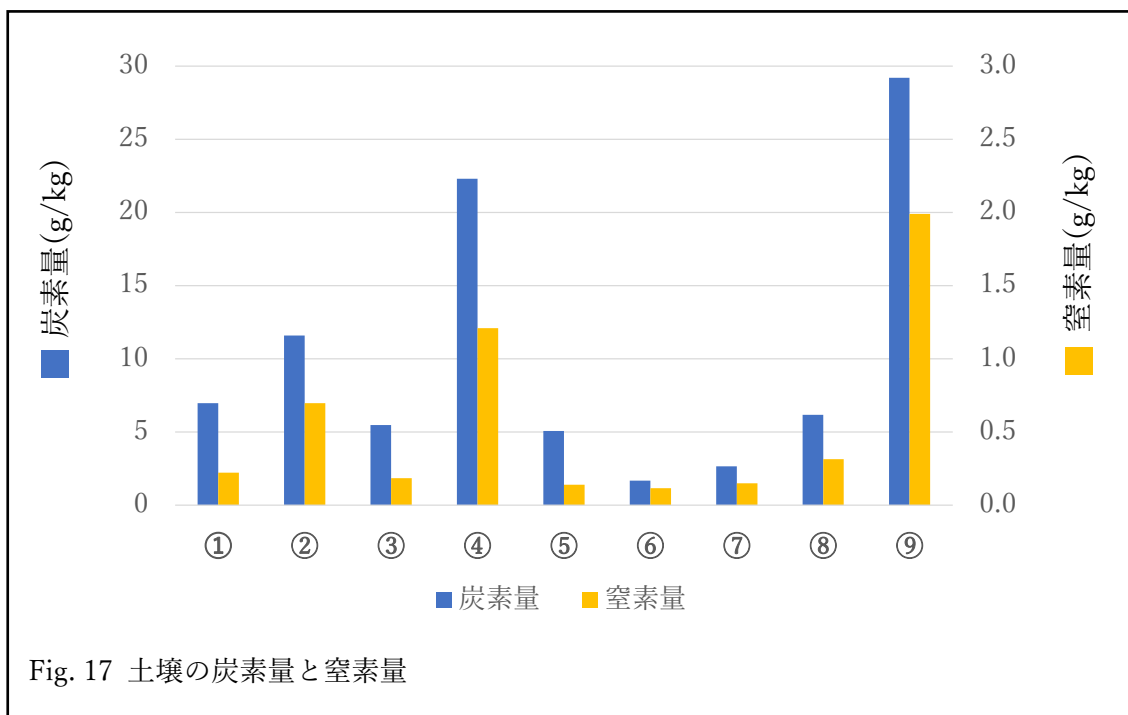


Fig. 17 土壌の炭素量と窒素量

4-3. 丸太の密度測定

丸太の密度と強度は、おおよそ比例関係にある。赤いグラフで示された丸太の心材の密度は、丸太の辺材より高い傾向があるとわかった (Fig. 18)。また、一か月間埋設されていた丸太 C の密度は、55 年間埋設されていた丸太 A、B より全体的に高い傾向があるとわかった。

しかし、マツ・カラマツの一般的な平均密度は、 0.53g/cm^3 付近であり、今回の結果と比較しても著しく密度が低下しているとは言えない。

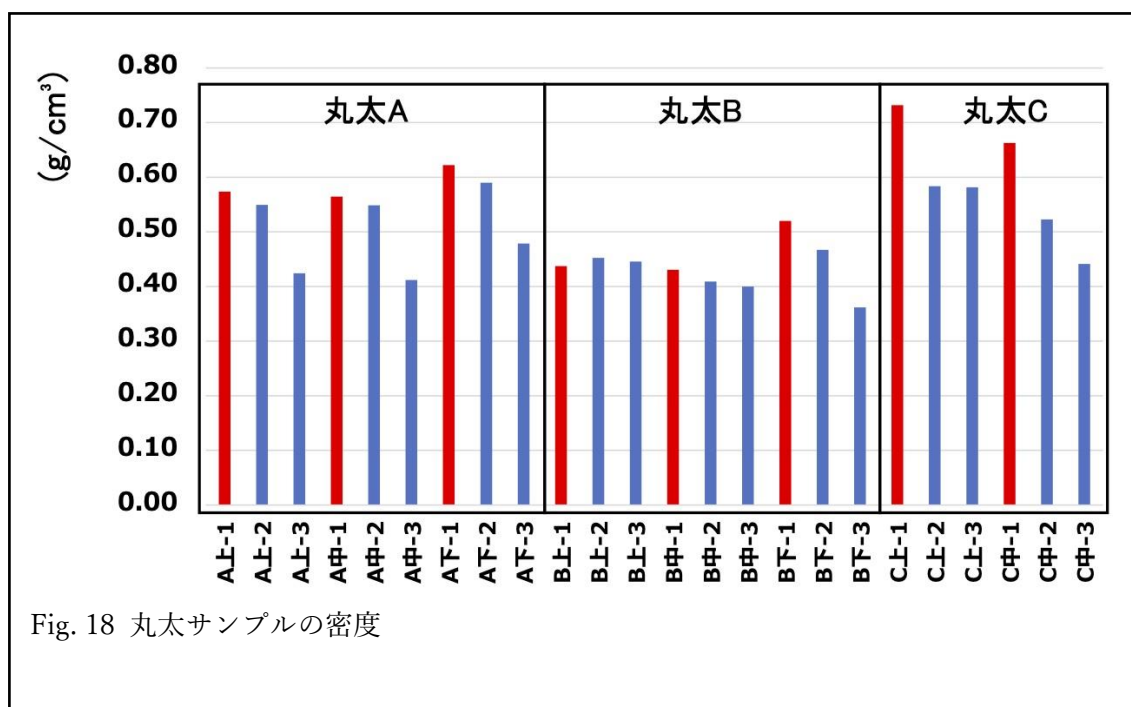


Fig. 18 丸太サンプルの密度

4-4. 丸太の細胞観察

木材の主成分であるリグニンは赤色、セルロースは青色に染色して観察を行った (Fig. 19、20、21、22、23、24)。細胞壁は穴が開いておらず、きれいに整列していた。また、細胞壁セルロースの染色を試みたが、リグニン同様の染色が見られなかった。そのため Astra blue のみで染色をしたが、やはり細胞壁の呈色は見られなかった (Fig. 25)。また、細胞壁内腔において、青色に呈された斑点を確認した。そのサイズや特徴から、これはセルロースではないと考えられる。

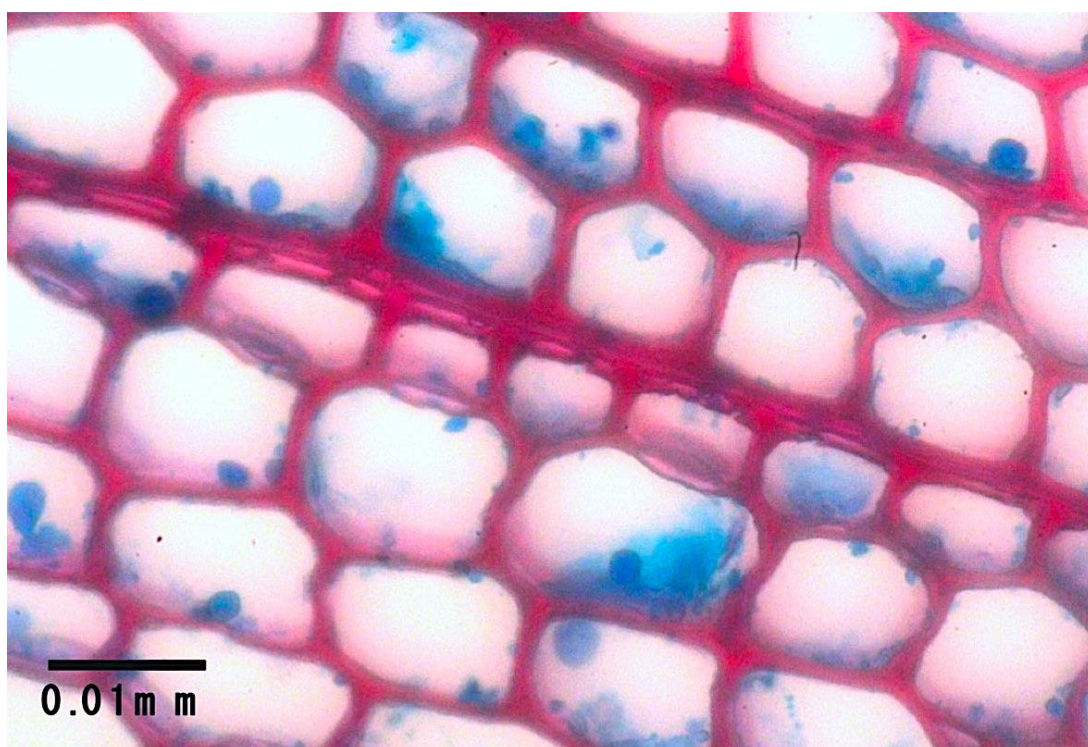


Fig. 19 丸太の A 上-1 (早材)

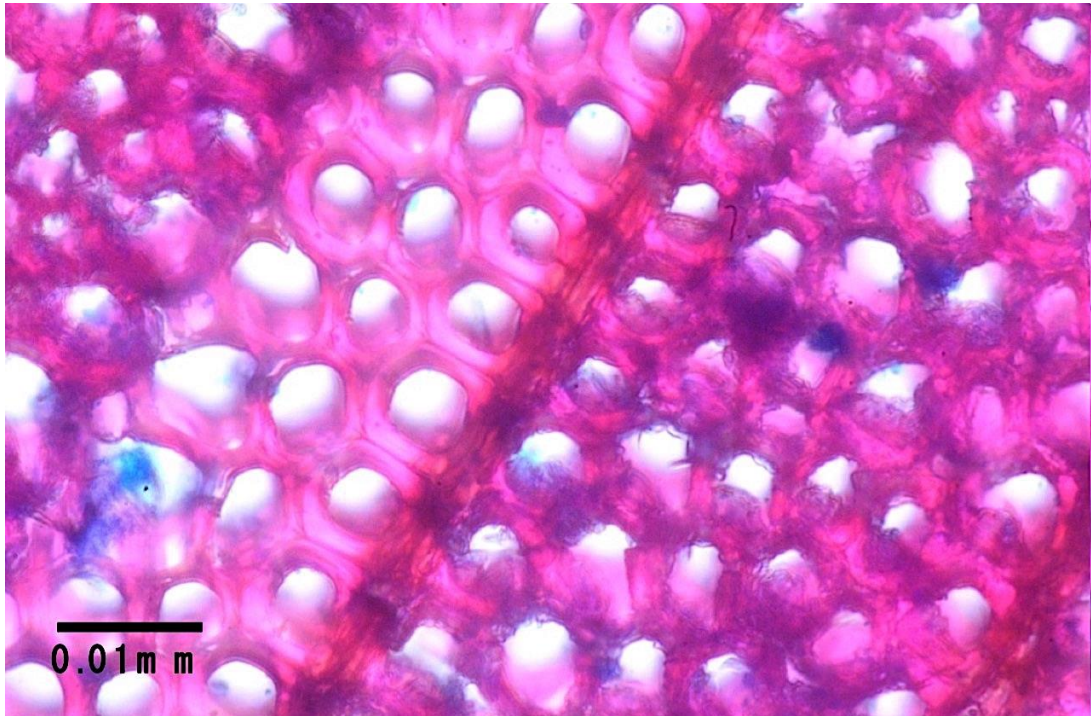


Fig. 20 丸太の A 上-2 (晩材)

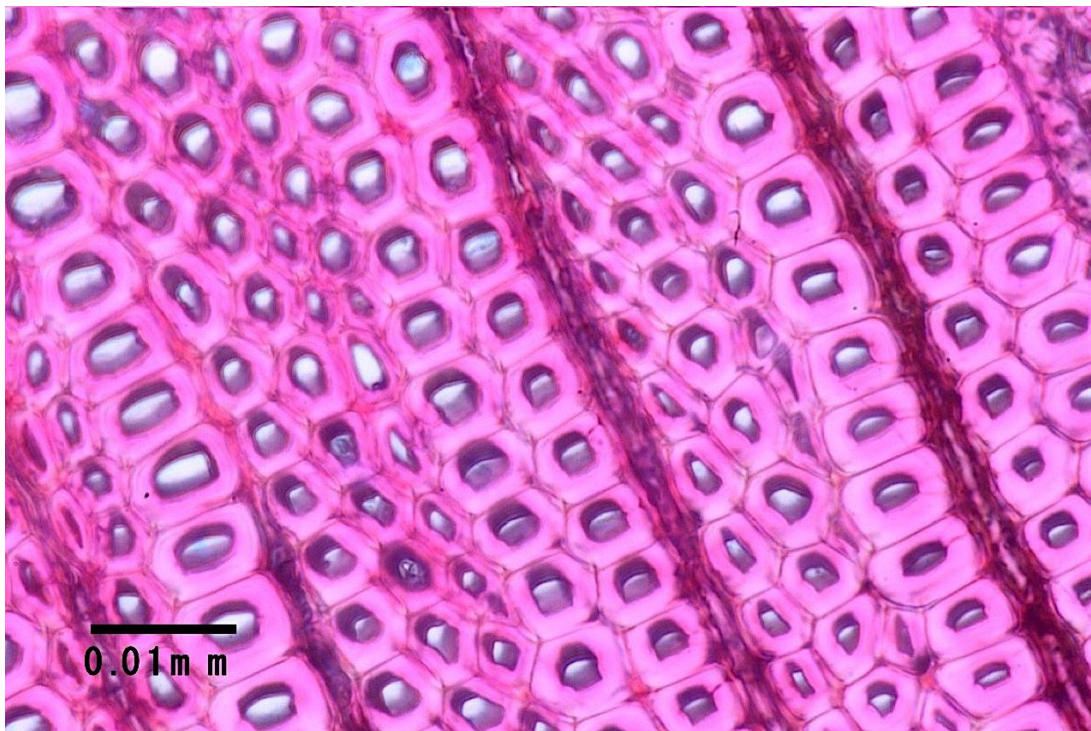


Fig. 21 丸太の A 上-3 (晩材)

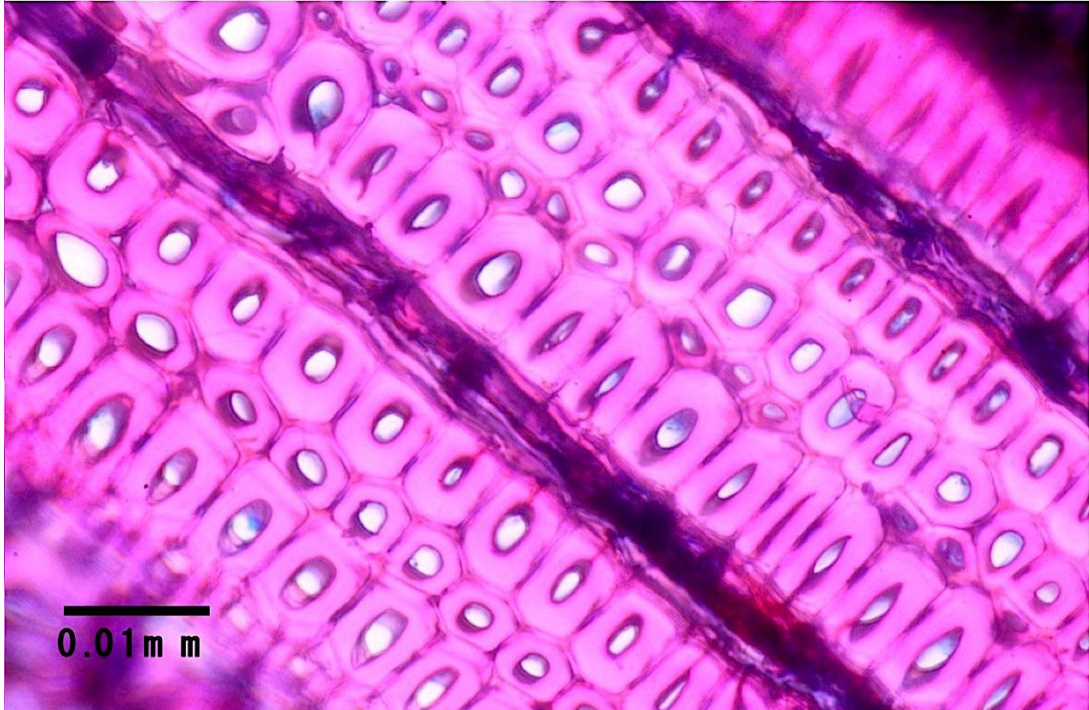


Fig. 22 丸太の A 中-1 (晩材)

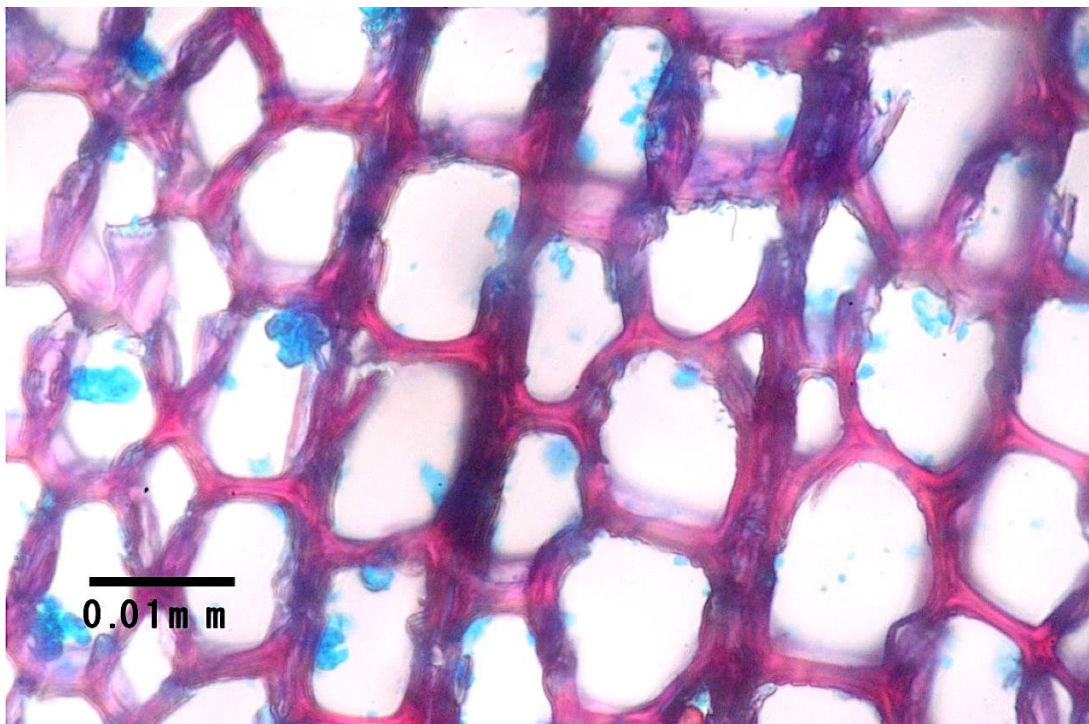


Fig. 23 丸太の A 中-2 (早材)

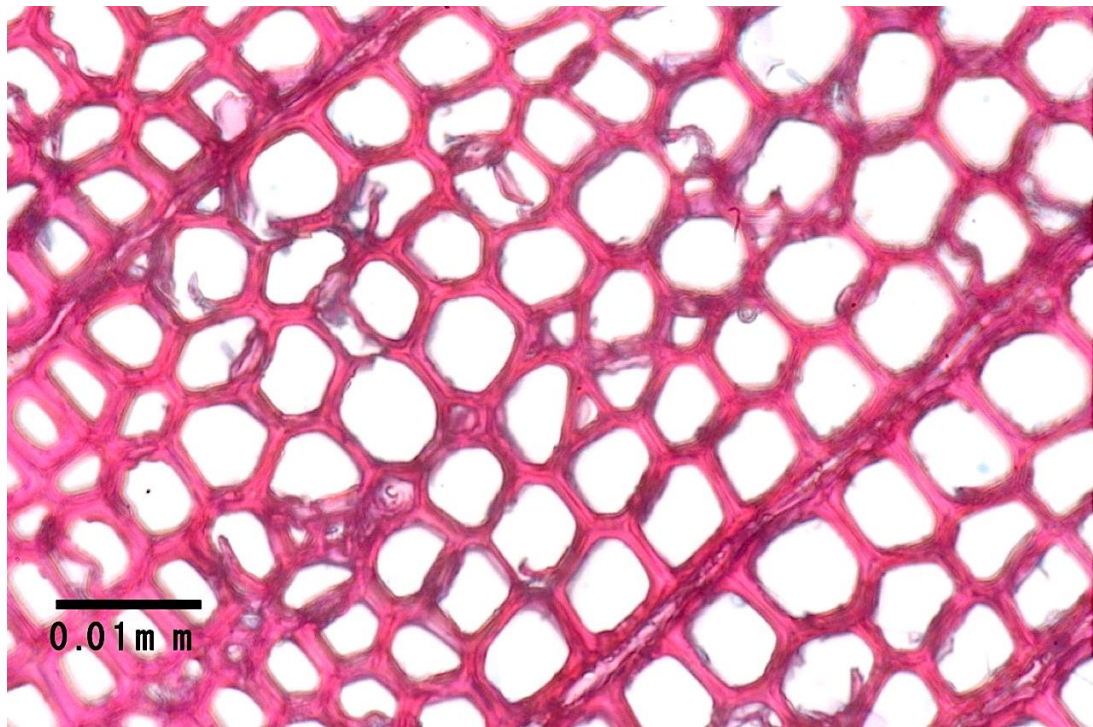


Fig. 24 丸太の A 中-3 (早材)

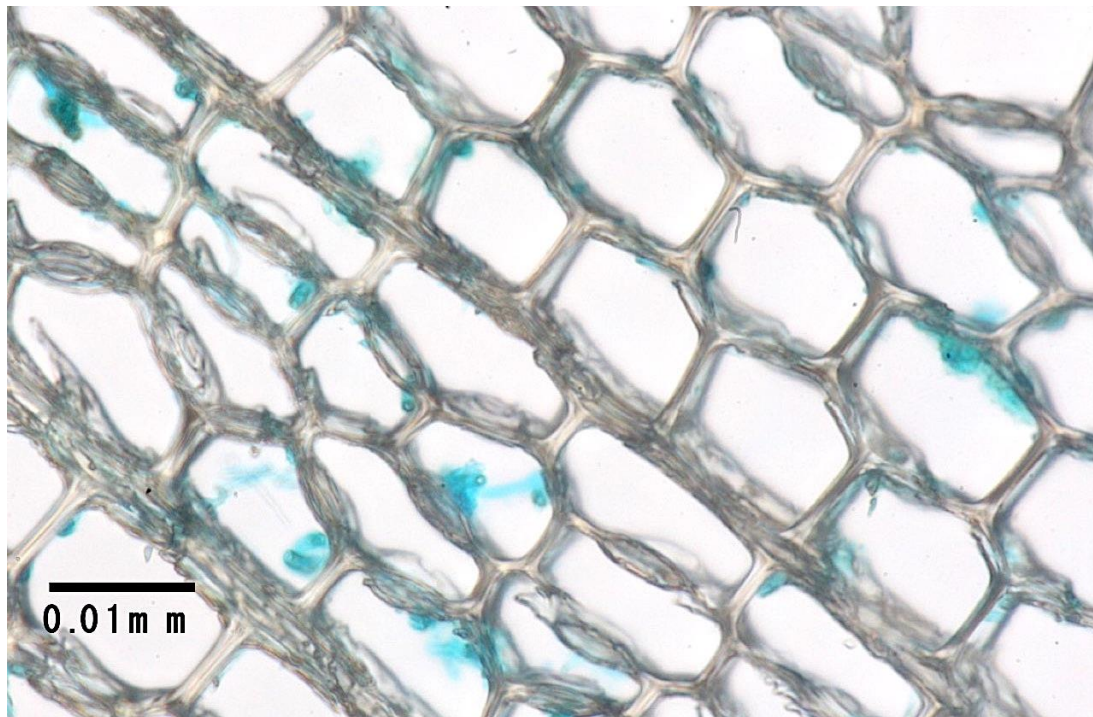


Fig. 25 丸太の A 中-2 (早材、Astra blue 染色のみ)

5. 考察

微生物群集構造に関して、丸太 A, B, C やその周辺土壌いずれにおいても嫌気性細菌が優占していた。地中の深度が増すと微生物の生育条件（栄養素、酸素濃度）が限られているため、特定種の優占度が高くなり多様性が減少する傾向が見られた。土壌の成分測定からも、地表付近の有機物量は高く、深度が増すにつれて減少していく傾向が見られた。地中深層部の嫌気性細菌 *Clostridiales*、地中浅層部のカビ *Tricoderma* にはセルロース分解性をもつものが知られており、丸太劣化の可能性を示唆した。しかし、実際にこれらの微生物が丸太に対してどの程度のセルロース分解を行っているか示すことはできなかった。また、細胞壁の主成分であるリグニンを分解できる白色腐朽菌などの真菌が見られなかった。白色腐朽菌は、好気条件下で分解能を有する種が多く、嫌気条件下である地下水位以下における丸太は、白色腐朽菌の影響を受けないことが分かった¹⁸⁾。丸太 C の微生物群集構造は、場所によって同定種、存在比が大きく違っていた。丸太 A, B との比較により、時間経過とともに環境に適さない種が淘汰され、結果で示した優占種を含む群集構造に固定化されていくと考えられる¹⁹⁾。

群集構造の nMDS 解析では、深さや埋設期間といった環境要因が群集構造に関連が小さいという結果が示された。丸太 C の群集構造は、丸太 A, B と比較すると大きく異なっており、これが要因として挙げられる。丸太や土壌のサンプル数を増やすことでイレギュラーなサンプルの重みが小さくなり、深さや埋設期間などどの条件が大きく関連するのかわすことができるのではないかと考えた。

丸太の細胞組織の観察から、細胞壁リグニンの分解はほとんど見られず、細胞壁の構造は保たれていることが分かった。しかし、セルロースの染色が上手くできなかったため、プロトコルを改変してセルロースの状態を確認する必要がある²⁰⁾。青色で染色された斑点は、そのサイズや特徴から木材のセルロースではなく真菌に含まれるキチンが染色されたと考えられ、材中に真菌の菌体が侵入しているものの細胞壁は劣化が進んでいないことが示された。

密度測定より、埋設期間 50 年の丸太の密度は、1 ヶ月の丸太に比べて減少していたものの、減少は軽微にとどまっていることが分かった。同樹種マツ・カラマツの一般的な密度と比較しても大差ないため、劣化が著しいとは言えない。

6. 結論

地下水位以下における微生物群集構造は、時間経過とともに環境に適さない種が淘汰され、変化するということが分かった。木材劣化の要因として懸念されていた白色腐朽菌などは、嫌気条件下である地下水位以下に存在せず、杭材としての機能は保たれていた。

本研究で用いた埋設期間 55 年の丸太 A、B は、健全材として評価することができる。本研究では、物理強度・耐久性について触れていないため、あくまでも生物学的観点からの結論である。

7. 謝辞

本研究にご協力いただきました高知大学 原忠教授、兼松サステック株式会社様に感謝申し上げます。

また、論文作成にあたりご指導いただきました堀澤栄教授、ならびに同研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

8. 参考文献

- 1). 大西智晴, 吉富宏紀(2012) 液状化対策工法 コンクリート工学 50(1), 109-112.
- 2). 沼田淳紀ら(2014) 丸太打設液状化対策&カーボンストック(LP-LiC)工法の開発.とびしま技報 63, 13-21.
- 3). Miwa S et al. (2015) Log Piling as a Liquefaction Countermeasure for Existing Houses, Proceeding of the 6th International Conference on Earthquake Geotechnical Engineering, 1-4 November 2015 Christchurch, New Zealand.
- 4). 三輪滋ら(2016) 丸太打設による既設戸建て住宅の液状化対策の小型振動実験および数値解析による検討. 土木学会論文集 A1(構造・地震工学), 72(4)(地震工学論文集第35巻), I_117-I_128.
- 5). 染谷 孝, 長谷部 亮, 松本 貞義 (1996) 土壤生物, Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition, Vol.67, No.5, p.489.
- 6). Casamayor EO et al., (2000) Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Appl Environ Microbiol 66(2): 499-508.
- 7). Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59: 695-700.
- 8). Rolf Henrik Nilsson, Karl-Henrik Larsson, Andy F S Taylor, Johan Bengtsson-Palme, Thomas S Jeppesen, Dmitry Schigel, Peter Kennedy, Kathryn Picard, Frank Oliver 20 Glöckner, Leho Tedersoo, Irja Saar, Urmas Kõljalg, Kessy Abarenkov(2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. Nucleic Acids Research 47:D259-D264
- 9). Pelin Yilmaz, Laura Wegener Parfrey, Pablo Yarza, Jan Gerken, Elmar Pruesse, Christian Quast, Timmy Schweer, Jörg Peplies, Wolfgang Ludwig, Frank Oliver Glöckner(2014) The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. Nucleic Acids Research 42:D643-D648
- 10). 山根一郎ら「土壌学」文永堂出版、1984
- 11). 山中健生「環境にかかわる微生物学入門」講談社サイエンティフィク、2003
- 12). 藤原 健 (2014) 木材の密度について, 海外の森林と林業, No. 90, p.37-39
- 13). Holger Gärtner et al. (2015) A Technical Perspective in Modern Tree-ring Research - How to Overcome Dendroecological and Wood Anatomical Challenges, Jove Journal, 10.3791,52337

- 14). 福島 郁 (2007) 顕微鏡観察による白色腐朽菌の腐朽タイプの評価. 高知工科大学卒業論文.
- 15). 野崎功一, 郭 博洋, 畠中理志, 天野良彦 *Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ誘導・生産メカニズムの解明 – β -グルコシダーゼの役割について– 応用糖質科学, 6 (2), 96–102 (2016)
- 16). 森隆 (1991) *Clostridium thermocellum* のセルロース分解酵素系. 土と微生物, No.37, p.1-8
- 17). 市川俊輔ら (2018) *Clostridium* 属細菌によるセルロース系バイオマス分解と化成品原料生産, 日本応用糖質科学会, 8 巻 2 号, p. 94-100
- 18). 星野純ら (1985) 脱酸素剤嫌気下での微生物の挙動に関する研究, 微生物の生育におよぼす脱酸素剤 使用時の包装条件の影響,
- 19). Julia Meyer et al. (2022) From Surface to Subsurface: Diversity, Composition, and Abundance of Sessile and Endolithic Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Communities in Sand, Clay and Rock Substrates in the Laurentians (Quebec, Canada), *Microorganisms*. 2022 Jan; 10(1): 129.
- 20). Andriy Novikov et al. (2021) Modified staining protocol with Safranin O and Astra Blue for the plant histology, *Plant Introduction*: 89-90 pp. 110-113.