

令和3年度 修士論文

里山環境での土地利用法ごとの
微生物群衆構造の解析

Analysis of soil microbial community structure
by land use method in wood land near a village, satoyama

高知工科大学院
生命科学コース
1245103 藤原夕莉

指導教員 堀澤栄

目次

1.概要

2.背景

3.実験方法

3-1.試料概要

3-2.DNA の抽出

3-3. PCR による目的配列の増幅

3-4. 次世代シーケンスによる塩基配列の決定・微生物の同定

3-5. 土壌成分の測定

3-5-1.検水の調整

3-5-2.pH の測定

3-5-3.土壌中の栄養塩量の測定

3-6. 群集構造の解析

4.結果

4-1.PCR 条件の検討

4-2.バクテリアの同定結果(古民家裏コア)

4-3.バクテリアの同定結果(農地コア)

4-4.真菌の同定結果(古民家裏コア)

4-5.真菌の同定結果(農地コア)

4-6. α 多様度の評価(バクテリア)

4-7.pH 測定結果

4-8.土壌中の栄養塩量の測定

4-9.nMDS による類似度の評価と環境要因との関連(バクテリア)

4-10.nMDS による類似度の評価と環境要因との関連(真菌)

5.考察

6.結論

7.謝辞

8.参考文献

1.概要

高知工科大学では「里山基盤整備の社会実装モデルプロジェクト」通称里山プロジェクトに取り組んでいる。その中で農林業などの一次産業の高度化が一つの目標とされており里山での心豊かな暮らしを実現させるためには土壌の活用は欠かせないと考えられる。土地の生産力や物質循環力を反映すると考えられる土壌微生物は植生との関連が深く土壌微生物を解析することは農業などに一次産業に適した土地の評価にも繋がる。植物の根は地下2mほどまでであるがその下の地層についても土壌微生物を解析することによって土地の履歴についての理解を進めることもでき、地下水についての関連も調べることにより地滑りなどの自然災害についての一つの指標が得られると考えられる。したがって、どのような微生物群集構造が構成されているかを解析することとした。

里山プロジェクトの対象地である高知県香美市土佐山田町佐岡地区中後入にある古民家付近でボーリングされた土壌コア2本(680 cm,900 cm)から所定の深度ごとに土壌試料を採取した。この土壌試料をメノウ乳鉢・乳棒を用いて細粉し、**Extrap soil DNA Kit Plus Ver.2**(日鉄環境株式会社、東京)を用いて全DNAを抽出した。その後、PCRによって16S rDNA配列でバクテリアを検出、ITS配列で真菌を検出した。得られたPCR産物を次世代シーケンスでアンプリコン解析を行い、塩基配列をデータベース検索することによって相同性の高い生物種の情報から同定を行った。また、土壌中の栄養塩(亜硝酸態窒素, 硝酸態窒素, アンモニア態窒素, リン酸態リン, カリウムイオン)とpHの測定を行った。

その結果、これらの土壌は窒素循環に関連する根粒菌 *Rhizobium* 属や硝化菌などがほとんど存在せず硝酸態窒素やアンモニア態窒素が存在しない貧栄養土壌であると考えられ農業利用に適していない可能性が示唆された。また、微生物群集構造の形成に関連が深い要素として深度と地下水が挙げられた。しかし、これらの環境要因がどのように微生物群集構造の形成に影響するのかはまだ明らかとなっていない。さらに、栄養塩などの環境要因については全体的に貧栄養土壌となっていたことから微生物群集構造への影響が少なかったと考えられる。したがって今後はさらに様々な利用をされている土壌からDNAを抽出し微生物群集構造を明らかにすることによって影響の大きい環境要因を特定すること、また、環境要因間の相互関係を明らかにすることが課題であると考えられる。

2.背景

高知工科大学は里山での暮らしが我が国の将来にわたる心豊かな生き方の一つの理想となるような地域社会のモデル構築を目指した里山基盤整備の社会実装モデルプロジェクト(通称：里山プロジェクト)に取り組んでいる。

その中で心豊かな暮らしとは貨幣価値で表すことが出来ないようなコミュニティや自然の美しさなどであると考えている。里山は多くの森林資源を有しておりそれをうまく活用し一次産業の高度化を目指すことは里山プロジェクトの一つの目標である。農林業により暮らしに必要な物資を一部まかない自然の景観を整えることにもつながる。

植生は土壌、ひいては土壌微生物と関連が深く一次産業の高度化には土壌の有効活用が欠かせない。したがって土壌微生物を解析することは農業などに一次産業に適した土地の評価に繋がる。植物の根は地下 2m ほどまでであるがその下の地層についても土壌微生物を解析することによって土地の履歴についての理解を進めることもでき、地下水についての関連も調べることにより地滑りなどの自然災害についての一つの指標が得られると考えられる。したがって、どのような微生物群集構造が構成されているかを解析することとした。また、より正確な土地の評価を行うために土壌中の栄養塩の存在量や pH を測定し、微生物群集構造の形成に相関があると考えられる環境要因を特定した。

3.実験方法

3-1.試料概用

高知県香美市土佐山田町佐岡中後入にある古民家付近からボーリングされた長さ 700 cm および 900 cm の土壌コア計 2 本を用いた。深度 0cm から 50cm までは 10 または 20cm ごとに、それ以下では 50cm ごとに土壌を採取した。またコア採取地点周辺のスギ林、竹林、畑からも、表層部および 30cm より土壌を採取しそれらを土壌サンプルとした。土壌コアはもともと里山プロジェクトの一環である地質・水文環境調査の為に里山プロジェクトの拠点である古民家付近(古民家裏・農地)からボーリングされたものであり、採取後は 1.0m ずつ区切られて木箱に保管されていた。古民家裏コアから農地コアの採取地の地表面にかけて緩やかな下りとなっており地表面は約 10m の標高差があった(図 1)。



写真 1 (A)土壌コア採取地(高知県香美市土佐山田町佐岡中後入)と(B) 土壌コア外観

(A)赤い矢印:古民家裏コア採取地 白い矢印:農地コア採取地

(B)古民家裏からボーリングされた土壌コア(0.00~5.00m)

深度により様々な土質が現れた

表 1. 土壌サンプルリスト. 通し番号と採取地, 左から古民家裏でボーリングされた土壌コア(18 サンプル)、農地でボーリングされた土壌コア(23 サンプル)、その他土壌(9 サンプル)から採取した土壌サンプルの通し番号と採取した深度

古民家裏		農地		その他		
No.	深度	No.	深度	No.	採取地	深度
1	0	19	0	42	スギ林	10
2	10	20	10	43	スギ林	30
3	20	21	20	44	農地 B	10
4	30	22	30	45	農地 B	50
5	50	23	50	46	竹林 A	10
6	100	24	100	47	竹林 A	50
7	150	25	150	48	竹林 B	10
8	200	26	195	49	竹林 B	30
9	255	27	235	50	竹林 B	50
10	300	28	295			
11	350	29	345			
12	400	30	345-2			
13	445	31	400			
14	495	32	445			
15	550	33	495			
16	600	34	540			
17	640	35	600			
18	680	36	635			
		37	705			
		38	755			
		39	795			
		40	865			
		41	900			

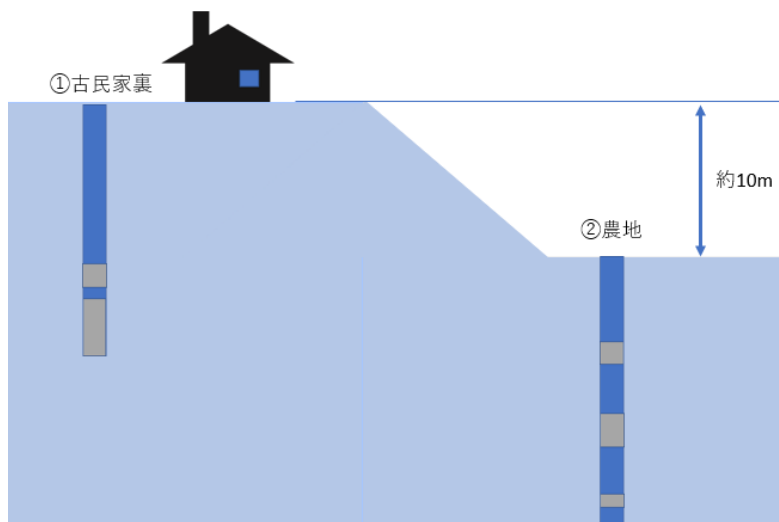


図1 コア採取地の位置関係の簡易図

古民家裏コアから農地コアの採取地にかけてなだらかな下りとなっており地表面は10m程度差があった

3-2.DNA の抽出

採取したの土壤サンプルから Extrap Soil DNA Kit Plus ver2(日鉄環境株式会社, 東京) を用いて DNA を抽出した。土壤サンプルの一部を一定期間室温で乾燥させメノウ乳鉢ですりつぶしたのち、0.4g より上記の DNA 抽出キットを用い、マニュアルを改変したプロトコル (図 2) に従って DNA 抽出を行った。

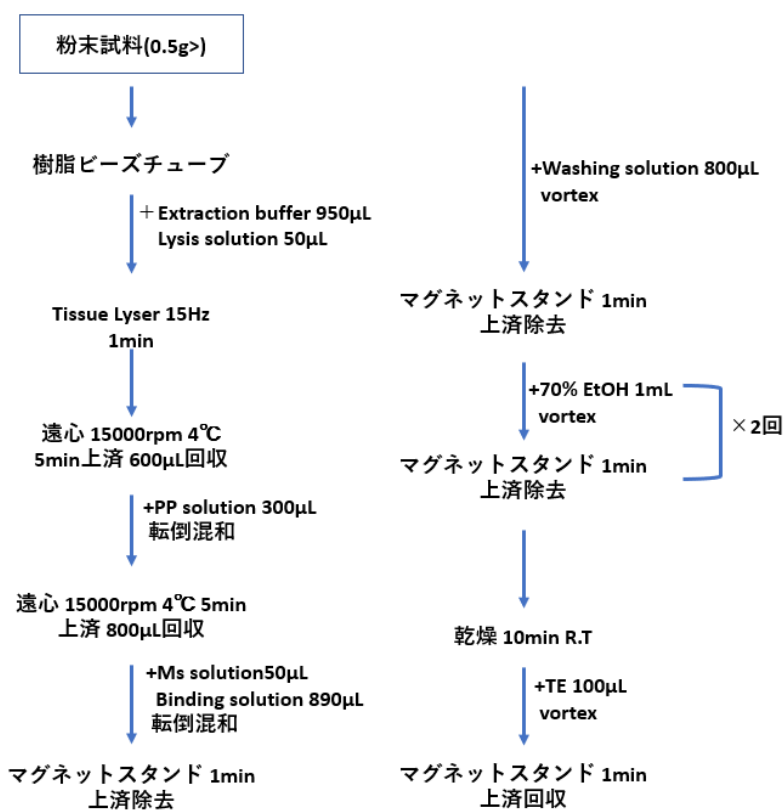


図 2 Extrap Soil DNA Kit Plus ver2 改変プロトコル

3-3.PCR による目的配列の増幅

上記で抽出した DNA を鋳型として目的配列の増幅を行った。真菌の同定にあたっては ITS 配列を、細菌の同定にあたっては 16s rDNA 配列を目的配列とした。PCR 後、PCR products を電気泳動し増幅の有無を確認した。

細菌の同定の際、1st PCR には PCR kit として Mighty amp を用い、2nd PCR には Ex-taq を使用した。2ndPCR で目的配列の増幅を確認したのち 1st PCR products を Exo-SAP 処理したものを鋳型として新たに 2ndPCR を行った。

真菌の同定の際には、1st PCR ・ 2nd PCR ともに Gflex (Takara, Shiga) を使用した。細菌の同定と同様に 2nd PCR で目的配列の増幅を確認したのち 1st PCR products を正規のプロトコルを改変したプロトコルで Exo-SAP 処理した DNA 溶液を鋳型として新たに 2nd PCR を行った。

真菌の同定について後の qPCR による定量で濃度が極端に低い DNA サンプルについて酵素は Gflex を使用し、プライマーを変えて再度 PCR を行った。その後の定量までの過程も他の DNA サンプルとは異なるので以下記す。

表 2 使用したプライマーペア一覧

領域	1 st PCR	2 nd PCR
16s rDNA	27F 1492R	341F 805R
ITS	NS7 NL4	fITS7 ITS4
ITS (定量少)	NS7 NL4	P-fITS7 P-ITS4

3-4.次世代シーケンスによる塩基配列の決定・微生物の同定

前項で得られた PCR 産物 40 μ L より illumina Truseq PCR フリーDNA サンプル調製キット(illumine, CA, US) を用いて次世代シーケンス解析のためのライブラリを調製した。DNA 精製用磁気ビーズを用いて精製し、DNA 溶液 30 μ L を回収した。そこに A-tailing mix 4 μ L を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。さらに Ligation mix 1 μ L とアダプタ 2 μ L を加え室温で 1 日インキュベートした。アダプタを連結したライブラリ DNA はビーズを用い再度精製を行った後、32 μ L を回収した。

精製した DNA を q PCR により定量し、各土壌試料の DNA が同量となるように混和した。このライブラリに TE を加え最終的に 3nM になるように濃度を調整した。

定量の結果、濃度が極端に低かった DNA サンプルについては、酵素は Gflex のままプライマーを 1stPCR で NS7-NL4、2nd PCR で P-fITS7-P-ITS4 に変更し再度 PCR を行った。その後 ThruPLEX DNA-seq Kit(TaKaRa, 滋賀)を使用し以下の方法で Library Amplification までを行い、ビーズを用い再度精製を行った。その後、上記の手順と同じように定量した後ライブラリの調整を行った。

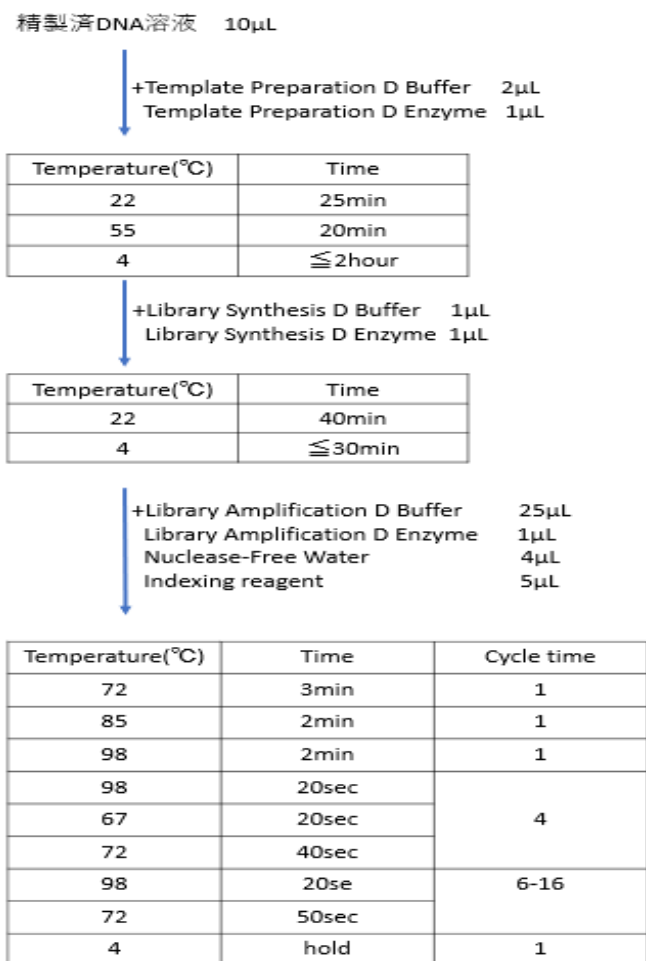


図3 ThruPLEX DNA-seq Kit プロトコル

このライブラリを Miseq (illumine, CA, US)を用い, Miseq Regent nano Kit ver.2 500 cycle (illumine, CA, US) を用いシーケンスした。得られた塩基配列データを CLC work bench v6(CLC bio, Filgen) を用いてペアエンド配列のマージおよび fasta 形式に変換した。その後、Usearch 7.0.1001 を用いて OUT を作成し、SILVA_138_SSU_tax_silva をデータベースとして各 OUT の代表配列の Blast 検索し、該当する生物種名によって同定した。

3-5. 土壌成分の測定

3-5-1. 検水の調整

各土壌試料を 1g ずつ 15mL チューブに採取し miliQ を 10mL 加え攪拌し、一日以上静置することにより土壌・その他不純物を沈殿させた(検水①)。上済を 1mL 程度回収し、15000rpm、20℃で 5 分間遠心し、その後上済を再度回収した(検水②)。

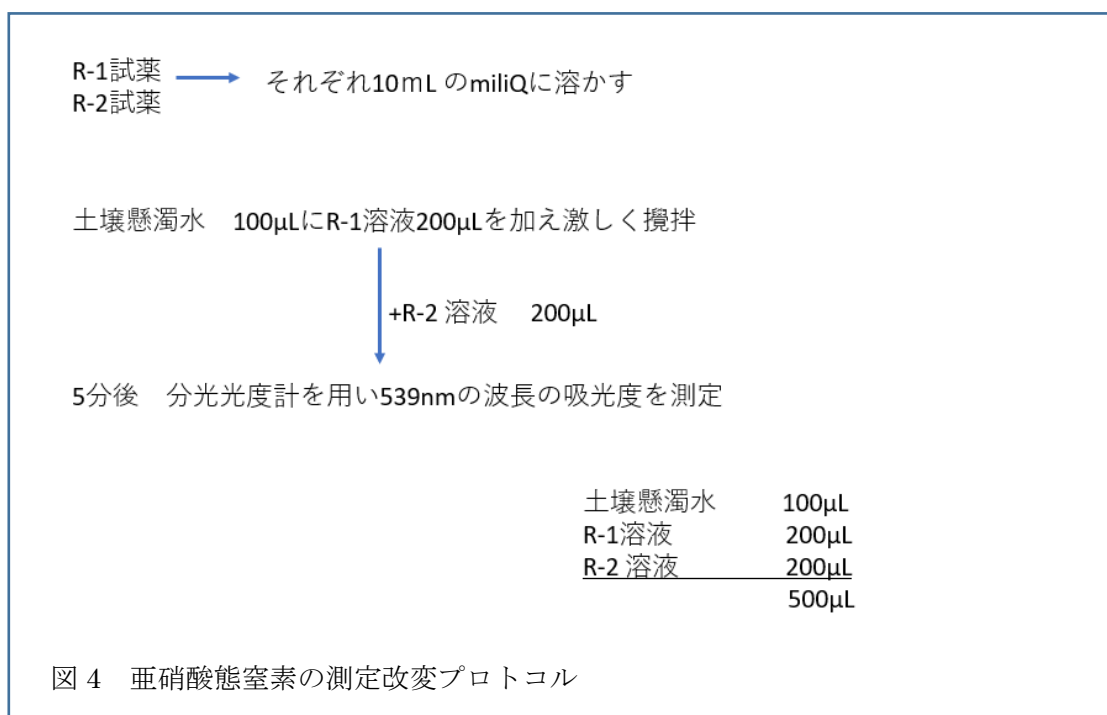
3-5-2. pH の測定

pH メーター(株式会社堀場アドバンスドテクノ)を用いて、上記で調整した検水①の pH を測定した。測定する試料(検水)が 50 サンプルと大量だったため 30 分経過ごとに一度校正を行った。

3-5-3. 土壌中の栄養塩量の測定

水質測定用試薬セット No.18 亜硝酸(亜硝酸態窒素)、No.19 硝酸(硝酸態窒素)、No.17A アンモニウム(アンモニウム態窒素)、No.12 りん酸(りん酸態りん)、No.36 カリウム(株式会社 共立理化学研究所、東京)を改変したプロトコルを検水②に使用し、各土壌試料中の栄養塩量の測定を行った。

検水②に各試薬を加え調整した検水③を分光光度計を使用し測定したい栄養塩によってあらかじめ設定された波長の吸光度を測定、事前に測定した検量線をもとに存在量を明らかとした。



3-6. 群集構造の解析

次世代シーケンスによって得られた塩基配列のリード数を各試料ごとに分類階級の目レベルで集計した。その後、各試料のリード数のばらつきを考慮し希釈法を用いた解析処理を行ったのち存在比を算出した。各試料に形成された群集構造の比較の為に **non metric multidimensional scaling (nMDS)** 法を用い、各試料において多様度の評価と類似度の計算、群集構造の形成に相関があると考えられる環境要因の特定を行った。

4.結果

4-1.PCR 条件の検討

多数の土壌サンプルを扱うため抽出した DNA をもとに目的配列を増幅する前に PCR 条件の検討を行った。PCR 伸長反応の時間が長すぎる場合、目的外の DNA 鎖が合成されて後の解析に悪影響が出る。したがって、伸長反応の時間を目的の DNA 領域が合成に必要な時間まで短縮することで、目的外の DNA 鎖が合成されることを防ぐことを考えた。土壌中の真菌を同定するにあたって Tks Gflex™ DNA Polymerase (TaKaRa) を用いており、この酵素では伸長反応の時間が 1kbp あたり 30 秒程度と設定されている。この時間を 10 秒ずつ減少させ抽出済みの DNA をテンプレートに 1st PCR、2nd PCR を行い、反応産物の長さを電気泳動によって確認した。その結果、2nd PCR の電気泳動像において伸長反応を 20 秒、10 秒に減らした作業プロトコルにおいても伸長反応 30 秒の作業プロトコルものと変わらない程度に目的外の DNA バンドが現れた。しかし、目的の DNA バンドも同程度に確認することが出来たので今後は伸長反応 10 秒の作業プロトコルを採用することで作業時間の短縮が可能となった。

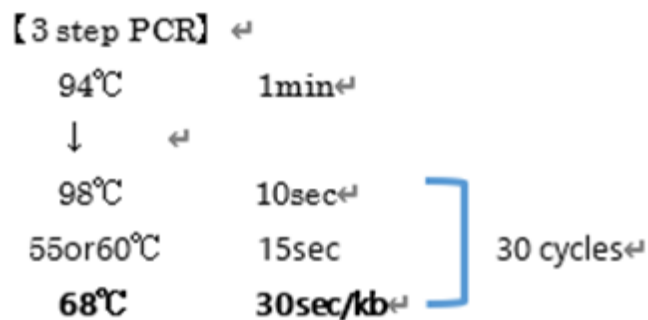


図 5 従来の Tks Gflex™ DNA Polymerase PCR プロトコル

太字で表記してある伸長反応の時間を変化させ(20sec, 10sec)検討を行った。

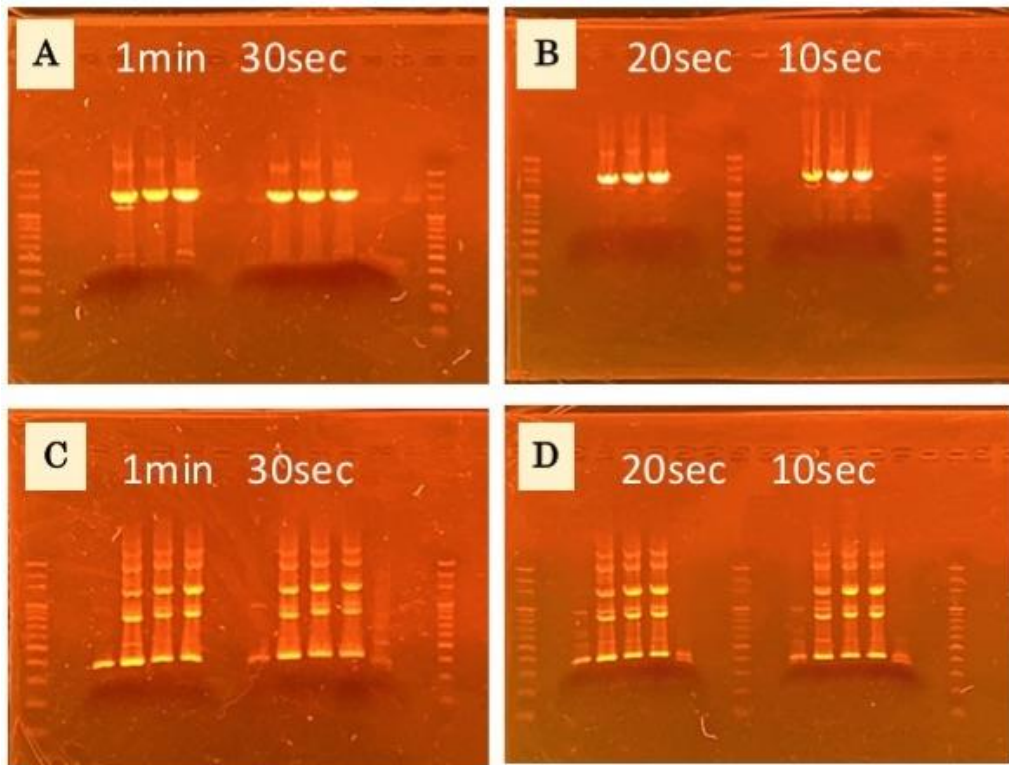


写真 2 電気泳動図

(A)1st PCR 1min 30sec (B) 1st PCR 20sec 10sec

(C)2nd PCR 1min 30sec (D) 2nd PCR 20sec 10sec

4-2. バクテリア同定結果(古民家裏コア) ⁽¹⁾

古民家裏のコアについて深度ごとに目(order)レベルの群集構造を図 5 に示した。No.6、No.8 は近しい深度と存在比が大きく異なり、地下水位上ではほとんど存在しない *Propionibacteriales* が優占しており反対に *Cellvibrionales* が存在しない。特に No.6 では他の深度にはあまり存在しない *Streptomyetales* が優占しており周りの深度との類似度の低さが示された。深度が大きくなるにつれて、特に地下水位下では特定の種が優占しており多様度が減少していた。

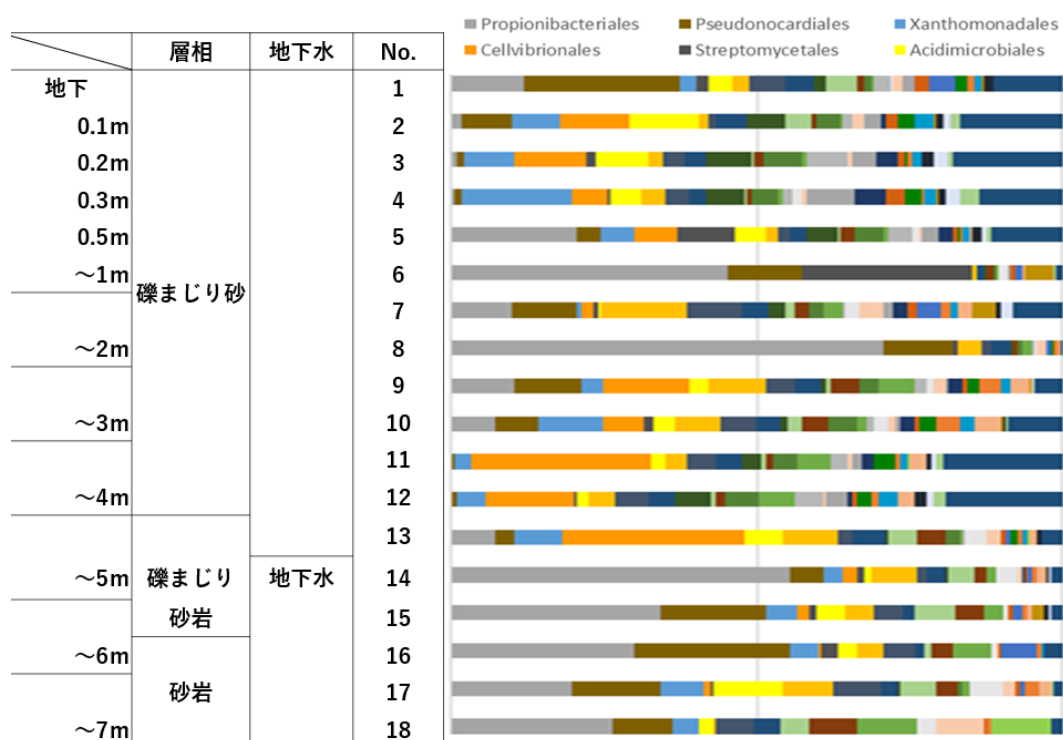


図 6 古民家裏より採取された土壌コアにおける深さによるバクテリア目(order)レベルの存在比の変化. 目分類が不明なものについては上位分類名を用いた. 試料番号は表 1 に対応する.

4-3. バクテリアの同定結果(農地コア)

農地のコアについて深度ごとに目(order)レベルで群集構造を図 6 に示した。図 5 で示されたバクテリアと同じバクテリアは同じ色で示した。記載できていない深度については解析結果が得られていない深度である。

No.27、28 の二つの深度では他の深度にはほとんど存在しない *Propionibacteriales* が優先しており地下水位下では *Pseudomonadales* が優占していた。古民家裏コア、農地コアに共通して土壌に広く存在する *Propionibacteriales*、植物性病原性細菌の *Xanthomonadales* が高い割合で現れた。

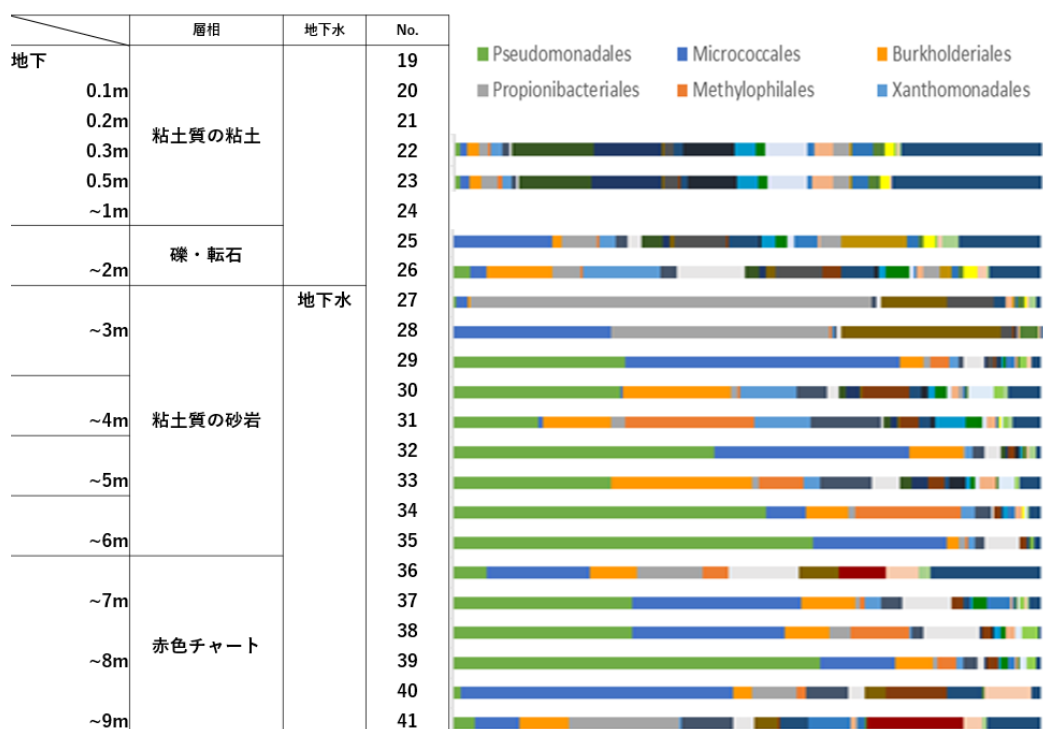


図 7 農地より採取された土壌コアにおける深によるバクテリア目(order)レベルの存在比の変化。目分類が不明なものについては上位分類名を用いた。試料番号は表 1 に対応する。

4-4. 真菌の同定結果(古民家裏)

バクテリアに比べて単純な群衆構造となっており、存在する真菌種は土壤に広く存在するものがほとんどであった。地下水位上では土壤に広く存在し、植物病原菌でもある *Fusarium* が優占しており、地下水位下では *Penicillium* (アオカビ)が優占していた。

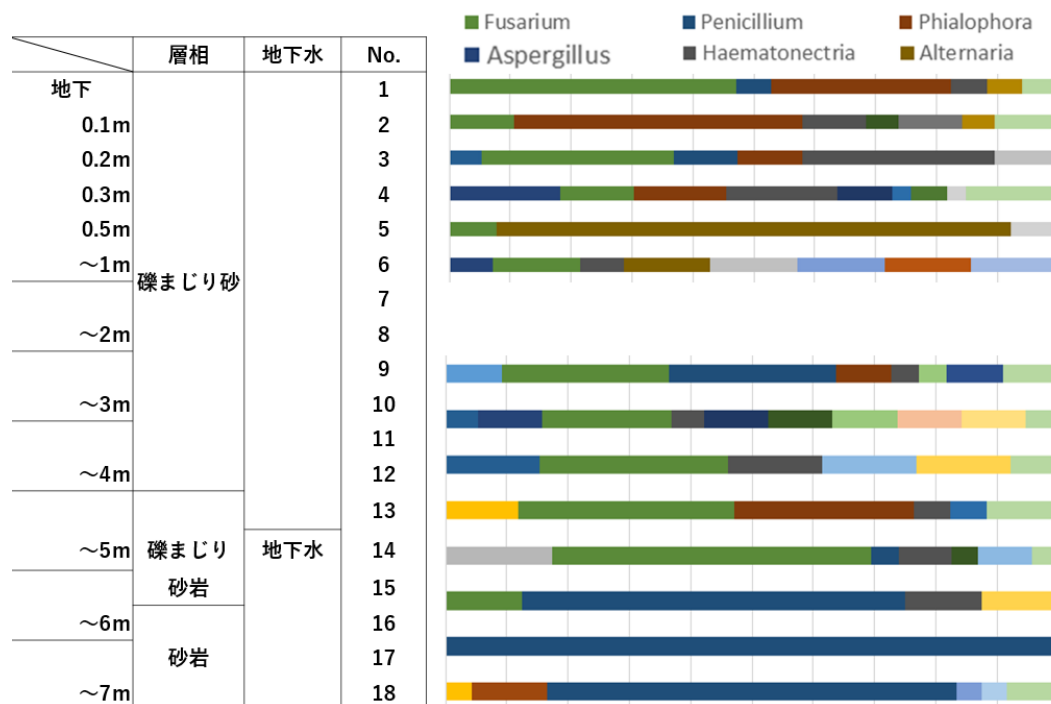


図 8 古民家裏から採取した土壤コアの深さによる真菌類の属(genus)レベルの存在比の変化. 属分類が不明なものについては上位分類名を用いた. 試料番号は表 1 に対応する. 存在比の図が表記されていない深度については解析中である.

4-5. 真菌の同定結果(農地)

森林だけではなく草原や耕作地などといった土壌にも広く存在する *Mortierella* (クサレケカビ) が多くの深度に存在した。No.21-23 が特に単純な群衆構造であり No.21,22 については *Pseudogymnoascus* が優占しており多様度が低下していた。

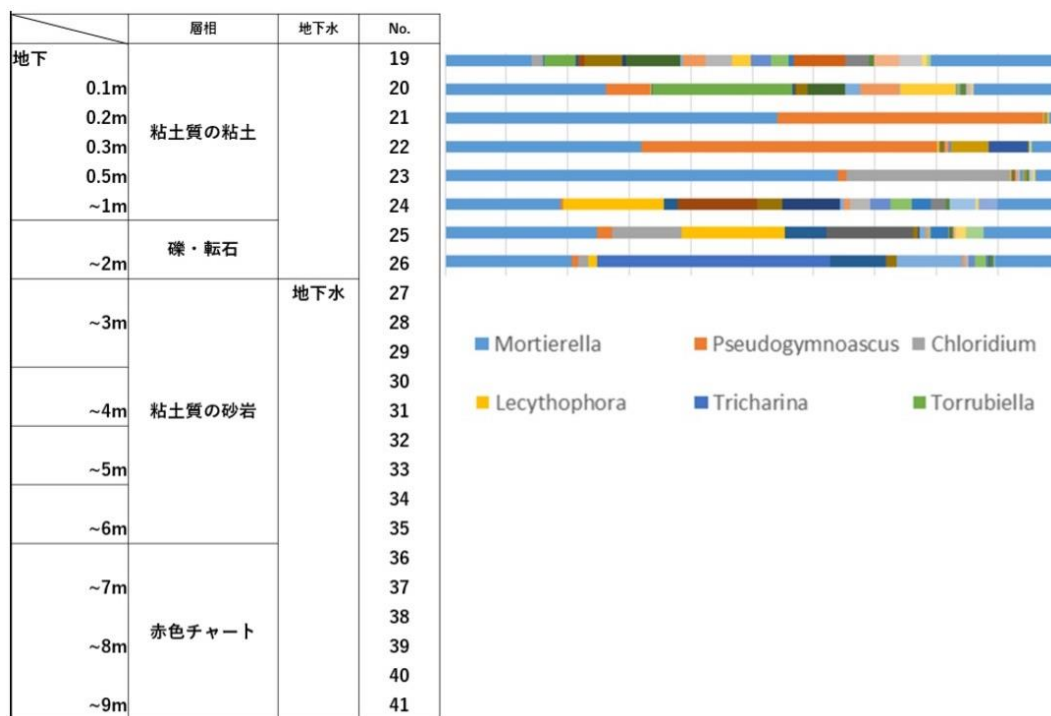


図 9 農地から採取した土壌コアの深さによる真菌類の属(genus)レベルの存在比の変化。属分類が不明なものについては上位分類名を用いた。試料番号は表 1 に対応する。存在比の図が表記されていない深度については解析中である。

4-6. α 多様度の評価(バクテリア)

バクテリアの α 多様度を Shannon-wiener 式を用いて計算した (図9)。古民家裏コア、農地コアともに深度が大きくなるにつれて多様度が減少する傾向がみられた。不自然に多様度が低下している深度は存在比のグラフにて特定の種が優占していた深度である。それらの深度は岩石に近い深度や小石が多い深度であった。

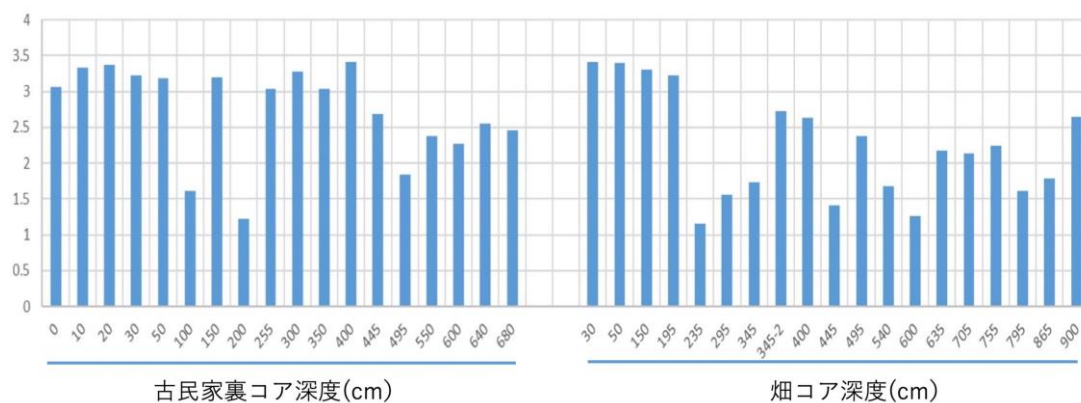


図10 α 多様度の計算結果(Shannon-wiener 式使用)

古民家裏コアは *Propionibacteriales* が優占していた深度で多様度が低下するという結果だったが、農地コアでは *Propionibacteriales* が優先していた深度以外でも多様度が低下している深度があった。それらの深度では *Peudomonadales* が優占していた。

4-7. pH 測定結果

古民家裏コア、農地コア、その他土壌での pH の最大値、最小値、平均値を以下に示す(表 3)。古民家裏のコアについては No.10 でのみ pH7 を下回りコア全値の平均は pH7.43 と全体的には弱アルカリ性となっていた。農地コアは全体的に中性となっており、その他土壌はすべての土壌・深度で pH7 を下回り弱酸性となっていた。

表 3 pH 測定結果 最大値、最小値、平均値(深度)

	①古民家裏	②農地	コア以外
最大pH(cm)	8.02 (200)	7.65 (650)	6.7 (竹林A:50)
最小pH(cm)	6.85 (300)	6.73 (700)	5.94 (竹林B:30)
平均 pH	7.43	7.12	6.39

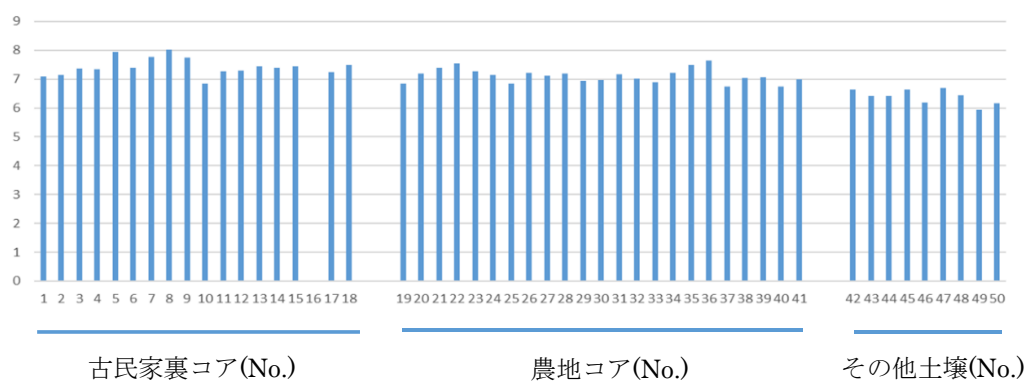


図 11 pH 測定結果

土壌を水に懸濁した上清の pH の測定結果を示した。No.16 はほとんどが岩石だったため測定ができなかった。

4-8. 土壌中の栄養塩量の測定結果

今回測定した栄養塩は植物の生育に欠かせないとされる窒素(窒素循環に関連する三つの状態の窒素)、リン、カリウムであったため根圏が形成される地下 2m ほどまでで豊富に存在するかと考えていたが深度と栄養塩に明確な関係はなかった。

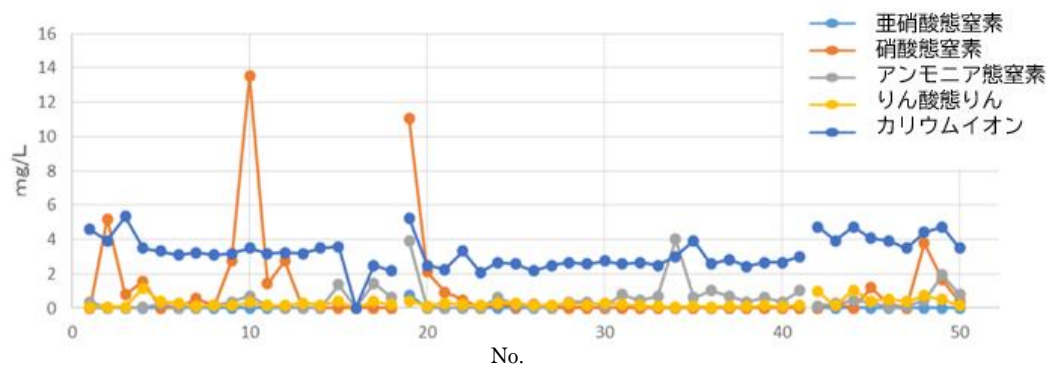


図 12 土壌中の栄養塩量測定結果

亜硝酸態窒素：概ね存在しない

アンモニア態窒素：比較的深度が大きいところに存在

硝酸態窒素：No.10 では 13.5 mg/L， No.19 で 11.1mg/L

りん酸態りん：概ね存在しない

カリウムイオン：ほとんどの深度で 2 mg/L を超える程度

4-9.nMDSによる類似度の評価と環境要因との関連:バクテリア

Non metric multidimensional scaling (nMDS) によって各サンプルの類似度が高いと近くに、低いと遠くに二次元的に視覚化した。古民家裏コア、農地コアともに 0-50 cmまでの地表部は類似度が高く近くにプロットされた。

環境要因として、深度、多様度、亜硝酸態窒素量、硝酸態窒素量、アンモニア態窒素量、りん酸態りん量、カリウムイオン量、pHを環境要因とした。その中で各サンプルと関連が高いものを矢印で示したところ、深度と多様度の2軸が示された。環境要因として地下水の有無を加えると地下水も関連が高いと示されるが、nMDSにおいて有無の判断は多少強引になってしまうので環境要因からは外した。以下の図12に示した緑の深度が地下水位下の深度である。

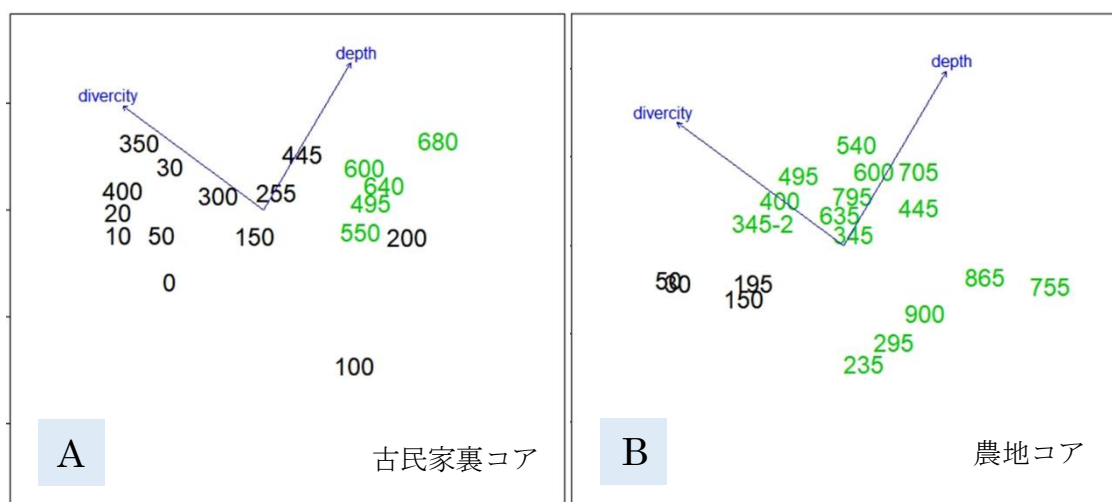


図13 nMDSによるバクテリア群集構造の類似度の比較(A:古民家裏コア B:農地コア)
各深度のバクテリア群集構造の類似度を nMDS によって視覚化した。
深度と多様度がバクテリアの群集構造に関連が深い要因としてあげられた。しかし、栄養塩の存在量についての関連は見られなかった。

4-10.nMDSによる類似度の評価と環境要因との関連:真菌

バクテリアと違い地表部の類似度が低く、関連が高い環境要因として深度は挙げられず多様度のみが示された。地下水水位下のサンプルが凝集していることから真菌群集の類似度にも地下水が影響することが明らかとなった。

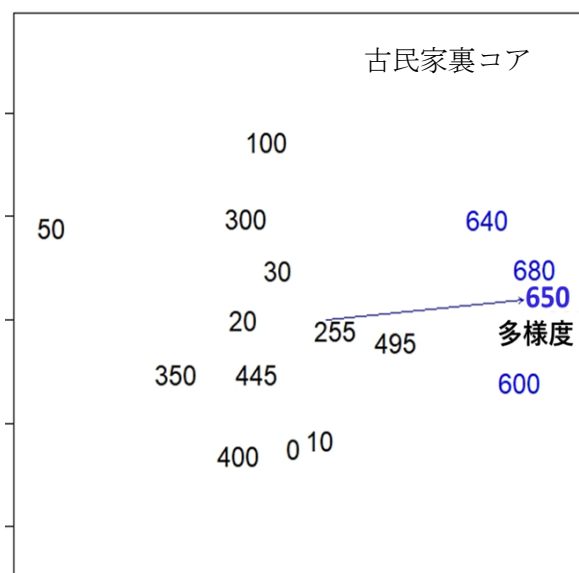


図 14 nMDS による真菌群集構造の類似度の比較

各深度の真菌群集構造の類似度を nMDS によって視覚化した。

類似度のプロットに関連が高い要因として多様度のみが示された。

5. 考察

土壌中の細菌・真菌の同定の結果、高知県香美市土佐山田町佐岡中後入にある古民家付近の土壌には、広く土壌に存在するような *Propionibacteriales* 目の細菌、*Fusarium* 属の真菌類などが高い割合で存在することが分かった。しかし、存在比を算出したとき上位を優占する菌には差があったため土地の利用法によって土壌に構成される菌群集構造には差が生じることが明らかとなった。特に違いがみられる点として地下水位下での群集構造が挙げられた。地下水位下では特定の種が優占し、細菌だけでなく真菌も多様性が減少した。

土壌中の pH と栄養塩量の測定を行ったところ人の手があまり入っていないと考えられるコア以外の土壌では弱酸性となっていた。一般的に日本の土壌は雨水の影響を受け弱酸性になっているため^②この結果から調査地は一般的な日本の土壌に該当する。古民家裏コア・農地コアの pH が上昇し弱アルカリ性・中性になっていたのはかつて土地が利用されていた影響ではないかと考えられる。古民家裏の土壌は弱アルカリ性となっていたが、その原因を以下のように考察した。古民家裏はすぐ山となっておりその山の中腹には神社がある。その御神木の根元の崖がえぐれて倒れる危険があるため斜面保護の目的で木灰コンクリート舗装^③しているため雨水等でコンクリートからアルカリ成分が溶出し流れてきたのではないかと考えた。このことから土地の利用法だけではなく近隣の近隣の建築物が土壌に影響を与える可能性が示された。

また栄養塩量の測定の結果これらの土壌は全体的に栄養が少ない貧栄養土壌であることが分かった。これらの栄養塩は植物の育成に欠かせないので、植物の根圏、地下約 2m 程度までで豊富に存在するのではないかと考えたが深度と栄養塩量に明確な関連はないように思われた。この結果を受け、根粒菌の *Rhizobium* 属、硝化菌がどの程度存在するか調べたところ、*Rhizobium* 属が全体の 1%程度、硝化菌が全体の 0.5%程度しか存在しないことが明らかとなった。*Rhizobium* は植物と関連が深いので、根圏を離れると存在しないこともあげられる。

このようにコア採取地とその他の土壌を比較すると pH に小さな違いがあったものの土壌中の栄養塩量に大きな差はなかった。pH だけで土地を評価するのはとても難しいことではあるが栄養塩量にそれほど差がないのであればアグロフォレストリーを積極的に取り入れることで農地だけではなく森林土壌についても有効に活用する為ことが出来るのではないだろうか。

以上のように深度と多様度のみが土壌試料の微生物群集構造の類似度に関連が深い、すなわち群集構造の形成に影響があることが明らかとなり pH や栄養塩の存在量などの影響は示されなかった。地下水も群集構造の形成に影響を与えることは分かっているが地下水の存在によって酸素減少しているからなのか、地下水の移動により菌が選別されているからかなどの詳細はこの結果からは分からない。

6.結論

土地の利用法により異なる微生物群集構造が形成されることが明らかとなった。しかし、微生物群集を構成する菌群は広く土壤に存在するような *Propionibacteriales* 目、*Fusarium* 属などが高い割合で存在していること、深度が大きくなるにつれて、特に地下水位下では特定の種が優占し多様度が減少する傾向は共通していた。

一般的に日本の土壤は雨水の影響を受け弱酸性となっているが、半自然環境のコア採取地では pH が上昇し中性、または弱アルカリ性となっていた。コア以外の土壤は弱酸性であり植物の生育に適しているため、今後これらの森林土壤はアグロフォレストリー的な活用が期待できる。しかし、土壤中の栄養塩量はどの土壤でも少なく貧栄養土壤となっていたため農林業等活用のためには手を加える必要があると考える。

これらの環境要因間をあわせて nMDS 解析を行ったところ、群集構造の類似度に関連が深い、すなわち群集構造の形成に影響を与えるのは深度と多様度のみであった。今回、栄養塩量についてはどの深度においても基本的にわずかしが存在しなかったため群集構造との関連を明らかとすることが難しかったのではないかと考える。

一次産業に適した土壤の評価にはこれらの微生物群集構造を形成する菌の機能をより正確に把握することや微生物群集の形成に影響がある環境要因を明らかにすること、さらにはそれらの環境要因間の相互関係を明らかにすることが必要であると考えられる。

7.謝辞

今回の試料を提供してくださった高知工科大学 高木方隆教授にお礼申し上げます。

また、本研究のご指導をしていただきました堀澤栄教授、ならびに同研究室の皆様にご深く感謝いたします。

8.参考文献

(1)藤原夕莉 「里山環境の土壌ごとの土壌細菌群集の解析」(2020)

(2)谷昌幸「pH と酸性化：降水量多い日本の土は一般的に弱酸性」

ニューカントリー66 (7) : 56-57(2019)

<http://id.nii.ac.jp/1588/00004420/>

(3)鈴木麻由 谷野正和ら

「木灰コンクリートを用いた斜面保護ブロックの設計、作成と施工」

高知工科大学紀要 15(1) : 33-40(2018)

<http://hdl.handle.net/10173/1941>