

## 凍結にもなう土壤中の微生物の位置と数量の変化

501102 伊藤実沙子 (土壌圏循環学教育研究分野)

**はじめに** 温暖化ガスとして知られるメタンの主な発生源の一つに、高緯度地域に局在する自然湿地があげられる。こうした湿地の土壌は凍結・融解を繰り返しており、土壌からのメタン発生量が季節によって大きく変化する。しかし土壌が凍結する際、メタン生成菌が土中のどこにどんな状態で存在するのか、温度変化がメタン生成菌の数や活性にどんな影響を与えているのかはあまりわかっていない。そこで本研究では土壌の凍結過程を直接観察し、微生物の位置や数量の変化を知ることが目的とした。

**試料と方法** 鉱物油分解微生物製剤(ゲイト, GHK-II)に蒸留水を加え、異なる含水比の試料とした(0.8, 1.0, 1.8 g/g)。試料をガラスセル(容積  $26 \times 76 \times 3 \text{ mm}^3$ )に詰め、sFDA 溶液(1 mmol/エタノール L)を 50  $\mu\text{L}$  滴下した。sFDA は細胞内のエステラーゼで分解されると蛍光(520 nm)を発する試薬であり、土壌や死菌体を染色せず、生菌体のみを染める。試料セルの両端の温度を制御し、試料を一方向より凍結した。試料の内部温度の変化を熱電対で経時的にモニターした。試料の凍結過程の様子を落射蛍光顕微鏡で直接観察し(IB 励起)、観察画像を CCD カメラを介してコンピューターに取り込んだ。観察画像から微生物の位置を解析し、微生物の量や活性を示す蛍光面積を算出した。

**結果と考察** セル両端に温度差を与え、試料を凍結した。試料の含水比が高いとまたは凍結速度が遅いと試料中に氷の結晶(アイスレンズ:IL)が析出し土壌を押しよせながら成長した。IL が析出しない場合は、試料の色や構造に変化は見られなかった。次に凍結面近傍の様子を蛍光観察した。試料中の粘土鉱物による自家蛍光はほとんど見られなかった。IL が析出しない場合は凍結面の進行に伴う蛍光像の位置の変化はなく、凍土に微生物がそのまま取り込まれることがわかった。一方 IL が析出すると、IL によって微生物が高温側へ押しやられた。次に、IL が析出しない場合の試料の凍結面近傍( $1650 \times 1250 \text{ }\mu\text{m}^2$ )における蛍光面積を調べた(図 1)。図の蛍光面積比は各温度における蛍光面積  $A_T$  を、 $0 \text{ }^\circ\text{C}$  の蛍光面積  $A_0$  で除したものである。温度の低下に伴い、蛍光面積が徐々に減少した。これは温度によって微生物の活性が低下したためと考えられる。 $0 \text{ }^\circ\text{C}$  未満になると温度に対する蛍光面積比の傾き  $S$  は  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  以上の 7 倍になった。これは土中水の凍結によると考えられる。また、含水比が低いほど蛍光面積の値のばらつきは大きくなり、含水比が高いほど  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  以上での  $S$  が大きくなった。

**おわりに** 蛍光顕微鏡を用いて土壌を直接観察する事により凍結面近傍における土中の微生物の位置や数、活性の温度及び含水比依存性が明らかになった。今後はメタン生成菌や嫌気的条件下での観察が必要である。

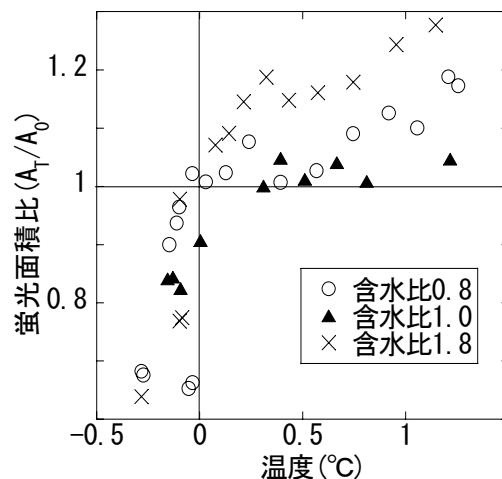


図 1 蛍光面積の温度依存性