

凍結にともなう土中の微生物の位置と活性の変化 Distribution and activity of microorganism in freezing soils

○渡辺晋生・伊藤実沙子・武藤由子
Kunio Watanabe, Misako Ito, Yoshiko Muto

はじめに 寒冷地の農業や利用を計るうえで、土中の微生物に関する知見が有用である。また、高緯度地域に局在する湿地は地球温暖化ガスの主たる放出源であり、ガスフラックスが季節により激しく変動することが知られている。しかし、有機物分解やガス生成を担う微生物が、土壌の凍結・融解時に土中のどこにどんな状態で存在するのか、地温の変化がその活性や量にどのような影響を与えているのかはほとんどわかっていない。さらに、永久凍土中の過去の生物情報を理解するうえでも、凍土中の微生物の挙動を知ることが重要である。そこで本研究では、土壌の凍結過程を直接観察し、土中の微生物の位置や数量の変化を知ることが目的とする。

試料と方法 鉱物油分解微生物製剤（ゲイト，GHK-II）を蒸留水で飽和し、異なる含水比の試料とした（ $w = 0.7, 1.0, 1.3, 1.8 \text{ g/g}$ ）。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、定温実験、および一方向凍結実験を行った（**図 1**）。試料の凍結過程の様子を落射蛍光顕微鏡で観察し（IB 励起）、観察画像を CCD カメラを介してコンピュータに取り込み、微生物の位置と数量を解析した。

結果と考察 1°C に静置した試料（ $w = 1.8 \text{ g/g}$ ）の蛍光顕微鏡観察画像を **図 2** に示す。図中、白点が微生物由来の蛍光（顕微鏡下では緑色）である。試料の主な含有微生物は直径 $2 \mu\text{m}$ 程度の桿菌であり、**図 2** のような土粒子の移動や氷の析出を観察できるスケールでは個々の菌を判別することはできない。そこで、土中の微生物活性と菌数の指標として、観察視野（ $1650 \times 1250 \mu\text{m}^2$ ）内の全蛍光面積を計測した。**図 3** に試料の温度を 1°C から任意の温度まで 40 分かけて低下し、その後定温に維持した際に観察した試料の蛍光面積比（ $A_{T^\circ\text{C}}/A_{1^\circ\text{C}}$ ：蛍光面積を 1°C の蛍光面積で除したもの）を示す。蛍光面積は温度低下に伴い減少し、定温時には一定値となった。一般に、蛍光は励起光の照射時間に応じて退光するが、本実験においては、条件が同じであれば 120 分までほぼ一定の蛍光が得られることがわかる。ここで、異なる含水比の試料の蛍光面積比 $A_{T^\circ\text{C}}/A_{0^\circ\text{C}}$ の温度依存性を調べた（**図 4**）。

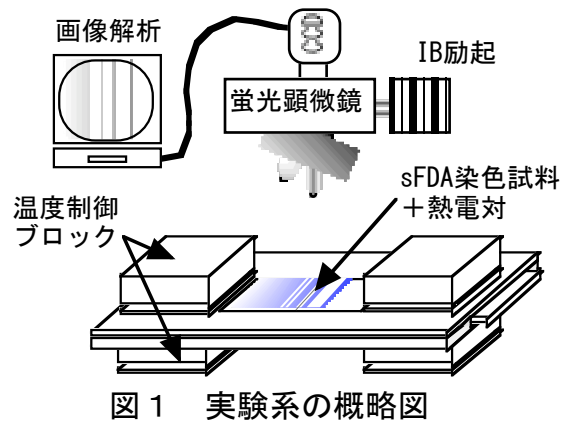


図 1 実験系の概略図

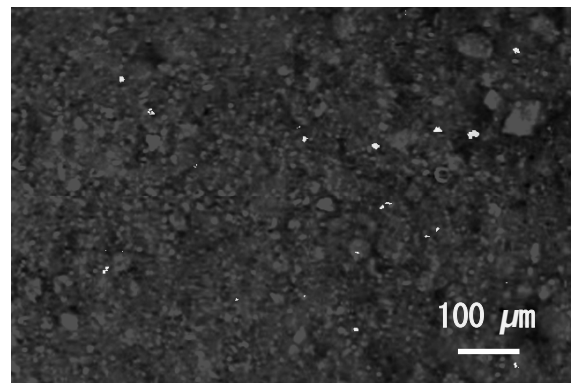


図 2 試料の蛍光観察画像

蛍光面積比は温度が低下するにつれ減少した。この際、発光個所や数の変化はほとんど見られなかった。微生物活性が温度低下にともない低下しているものと考えられる。蛍光面積比の減少率は、0°Cを境に大きく異なった。また、0°C以上においては、試料の含水比が高いほど蛍光面積比の減少率が大きくなり、含水比が低いと蛍光面積のばらつきが大きくなった。こうした含水比による差は、0°C以下ではほとんど見られなかった。これは、0度以上では温度だけでなく水分量が微生物活動の律則過程になっているものの、0度以下では自由水の一部が凍り、微生物の利用できる水（不凍水）量に差がなくなったためと考えられる。

次に、試料に温度勾配(0.25 °C/mm)を与え、試料を一方向から凍結した。試料の凍結速度が遅いと、試料中に氷の結晶（アイスレンズ：IL）が析出し、試料を押しつけながら成長した。ILが析出しない場合は、凍結面の進行に伴う試料の構造や蛍光位置の変化は見られなかった。凍土中に微生物がそのまま取り込まれていると考えられる。一方、ILが析出するとILの成長によって微生物が高温側へ押しやられた。ここで、試料（w = 1.0 g/g）を120分間一方向凍結した際の、試料中の蛍光面積 A_{Tc}/A_{0c} の分布を調べた（図5）。図の横軸は凍結面からの距離であり、低温側を負とする。蛍光面積は高温側で高く、低温側で低くなった。また、こうした傾向は未凍土側へ微生物が押しやられたIL析出時に顕著であった。ところで、図中の黒丸は図4と試料内の温度分布から算出した蛍光面積比である。温度だけでなく、凍結面の進行にともなう熱・水移動が未凍土中の微生物活性に影響を与えていると考えられる。

おわりに sFDA で染色した土の凍結過程を蛍光顕微鏡で観察した結果、温度、含水比、凍結の仕方による土中微生物の位置や活性の変化が明らかになった。現場の土壌を考えるにあたっては、嫌気性菌や自走性菌など異なる微生物種の挙動や気相の影響も考慮する必要があるだろう。

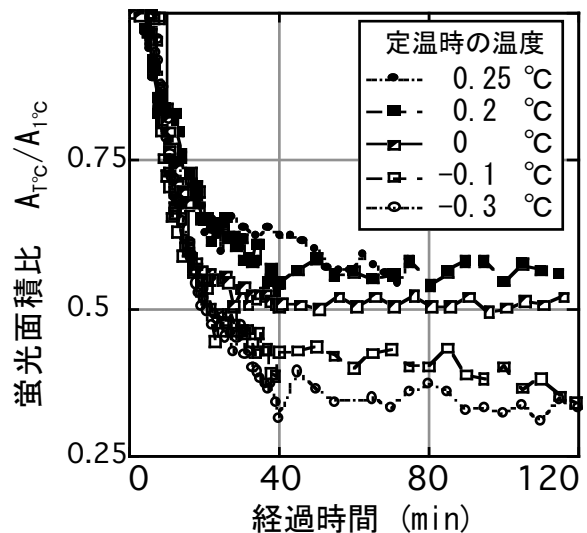


図3 蛍光面積の時間変化

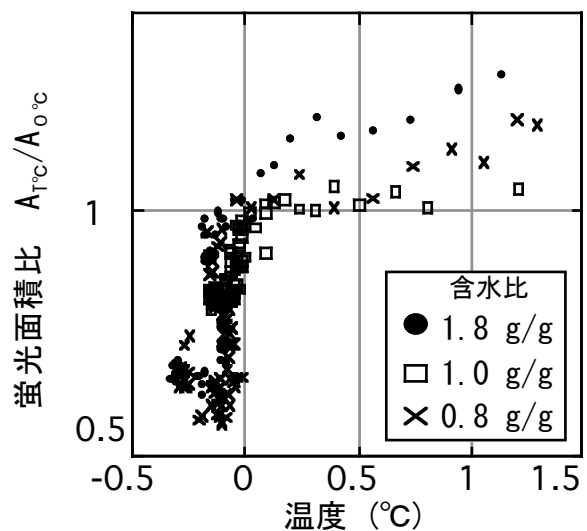


図4 蛍光面積の温度依存性

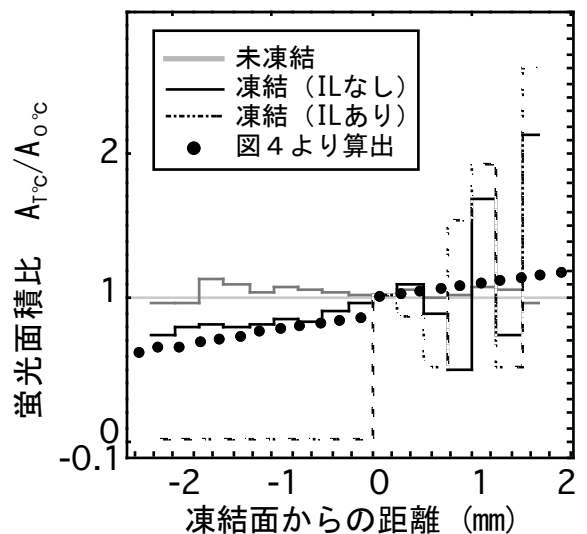


図5 一方向凍結試料中の分布