

一方向凍結過程にある蛍光染色土壌のその場観察

In situ observation of directionally freezing soil stained with sFDA

渡辺晋生・伊藤実沙子・武藤由子

三重大大学生物資源学部

Abstract

sFDA で染色した土壌の一方向凍結過程の様子を蛍光顕微鏡を用いて直接観察した。観察画像の蛍光発光面積の変化から、凍結面の進行にともなう凍結領域での土壌微生物の活性の低下、凍結面近傍への微生物の集積、未凍結領域での微生物量の増加が示された。こうした傾向は、アイスレンズが析出する場合顕著であった。

キーワード：凍土、アイスレンズ、土壌微生物、蛍光顕微鏡

Key words: frozen ground, ice lens, soil microbe, fluorescence microscopy

1. はじめに

土中の微生物は、有機物の分解やガスの発生など、土壌圏の物質循環において重要な役割を担っている。特に寒冷地においては、凍土の難透水性のため土壌が湿潤化することがあり、こうした微生物活動が地球温暖化ガスであるメタンの発生源となっている。また、永久凍土の堆積物中には、過去の微生物が休眠している。こうした凍土中の生物資源や生物情報の活用が近年、様々な分野で注目され始めている。しかしながら、土壌の凍結・融解時に微生物が土中のどこに生息しているのか？また、どのような挙動を示すのか？あるいはその活性がどのように変化するのか？といったことは今の所ほとんどわかっていない。そこで本研究では、凍結に伴う微生物の挙動を調べることを目的に蛍光染色した土壌の凍結面近傍の微視的様子を直接且つ連続的に観察した。

2. 試料と方法

微生物製剤 (GHK-II;(株)ゲイト)に純水を加え、異なる含水比(0.6~2.0g/g)の試料とした(表 1)。次に、100%エタノールに 5-Sulfofluorescein diacetate (sFDA)を溶解し 1mM の試薬とした¹⁾。sFDA は元来無色であるが、エステラーゼ(生細胞中の酵素)で分解されると蛍光を発する。

すなわち sFDA は、生きている微生物は染めるがエステラーゼが存在しない土壌や酵素の失活している死細胞は染色しない蛍光試薬である。

試料を $70 \times 20 \times 3 \text{ mm}^3$ のセルに詰め、sFDA 溶液を $200 \mu\text{L}$ 滴下した。試料を 5°C にならした後、試料セル両端の温度を制御し一方向より凍結した ($0.25^\circ\text{C}/\text{mm}$)。試料の凍結過程の様子を落射蛍光顕微鏡下で IB 励起で観察した。観察画像を CCD を介して録画し、解析に用いた。

3. 結果

図 1(a)に一方向凍結過程にある試料 A_L の凍結面近傍の様子を示す。(b)は(a)と同じ場所を蛍光観察した様子であり、微生物由来の発光は白く示される。図から、凍結領域で蛍光発光が消失していることがわかる。また、(a)の凍結面と(b)の微生物の集積個所は一致した。これは氷の成長にともなう異物の吐出効果、あるいは微生物の自発的移動によると思われるが、その詳細は分かっていない。

次に、試料の凍結・水分条件を変え、試料にアイスレンズを析出させた(図 2)。図 1 同様、凍結領域で蛍光発光が消失した。また、微生物の集積場所を凍結面とすると、凍結面はアイスレンズの成長面より 0.2 mm 程高温側と見積もられる。

ここで、 A_L について蛍光発光面積を調べた(図 3)。発光面積は、微生物の数量と活性に比例すると考えられる。図の横軸は凍結面を 0 とした距離であり、高温側を正とする。図から最初均一に分布していた発光個所が、凍結後、凍結領域で減少し、未凍結領域で増大することがわかる。凍結領域での発光面積の減少は、温度低下及び水の凍結による微生物活性の低下によると思われる。また、未凍結領域での増大は、高温部から凍結面への水の流れによる微生物の移流によるものと思われる。未凍結領域の発光面積の増大が微生物数の増加によるものと考えれば、こうした傾向は凍結に伴う凍結面近傍の溶質濃度の変化²⁾と類似している。視野内($-0.8 \leq Z \leq 0.6\text{mm}$)の発光面積の総和は、凍結前には $5400 \mu\text{m}^2$ だったが、凍結後には $7200 \mu\text{m}^2$ にまで増大した。こうした増加量はアイスレンズが析出した場合($12100 \mu\text{m}^2$)顕著だった。

凍結前後で、蛍光場所が異なることから、微生物が試料の凍結時に移動していることは確かである。しかし、発光面積に対する微生物活性の寄与と微生物移動の寄与の分離や、微生物移動のメカニズムの解明は今後の課題である。

4. おわりに

sFDA と蛍光顕微鏡を用いて土壌の凍結過程の様子を直接観察した結果、凍結面の進行に伴う、土壌微生物由来の蛍光発光個所や量の変化が示された。こうした変化は、微生物活性の温度依存性、微生物の移流、自発的移動、氷の吐出効果などによると考えられる。

今後は、こうした微生物の挙動が土壌の物理性や土中の氷の成長機構にあたる影響についても調べていきたい。

参考文献：1) Tsuji et al.,1995, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3415-3421. 2) Watanabe et al., 2001, *Cryst. Growth & Design*, **1**, 207-211.

表 1. 試料

| 呼称 | 微生物種* | 担体 |
|-------|---|------|
| A_L | 低温耐性有り 1 種 | 珪藻土 |
| A_H | 低温耐性無し 1 種 | |
| A_M | A、B を含む複種 | |
| B_L | A_L と同じ | 活性白土 |
| B_H | A_H と同じ | |
| B_M | A_M と同じ | |
| C | A_L 上澄み液 + $2.2\mu\text{m}$ Glass Beads | |
| D | 黒ぼく土 | |

*いずれも油分解性の好気性菌

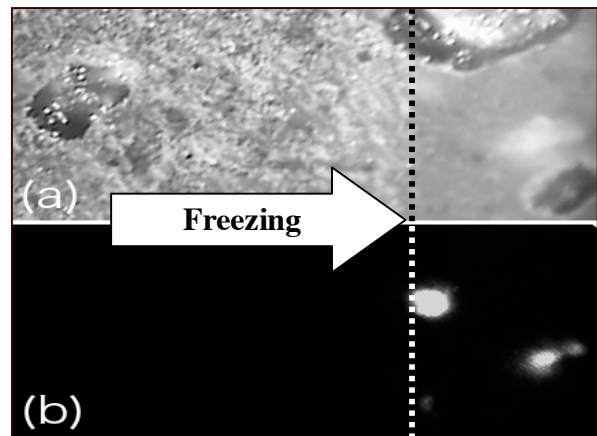


図 1. 凍結面近傍の様子。破線は凍結面

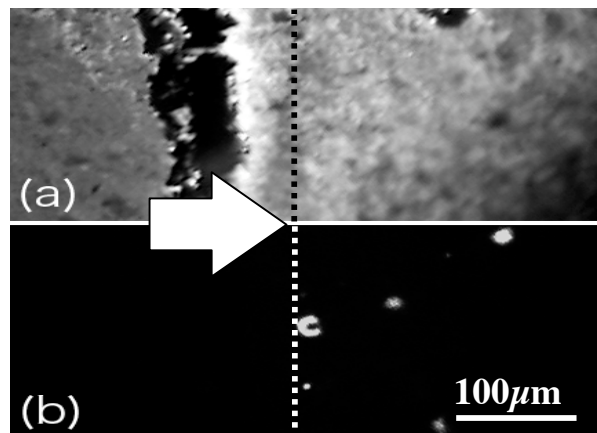


図 2. 最終アイスレンズ近傍の様子

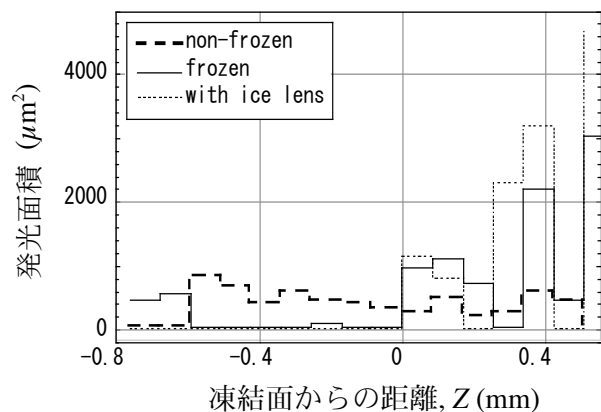


図 3. 蛍光部分の面積と凍結面からの距離