

# 蛍光顕微鏡を用いた土の凍結面近傍の観察

○渡辺晋生・伊藤実沙子（三重大）

Observation of soil near freezing front using fluorescence microscopy

Kunio WATANABE and Misako ITO

**はじめに** 寒冷地では、凍土の非透水性のため地表の土壌が湿潤化することがある。こうした湿地は、メタンガスの放出源として注目されている。ところで、メタンガスは土壌中の嫌気性微生物の活動によって生じる。しかし、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？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？は殆どわかっていない。そこで、凍結融解過程にある土中の微生物の移動や活性の変化を直接観察する方法を模索するため、手始めとして、一方向凍結過程にある土の凍結面近傍の様子を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

**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(0.1~0.6g/g:飽和〇〇g/g)の試料とした。また微生物製剤(1,2,3g)と純水(100g)の混合液の上澄み液と径 2.2 $\mu$ m のガラスビーズを混ぜ、異なる含水比(1.2~0.8g/g:飽和 77g/g)の試料とした。次に、100%エタノールに 5-Sulfofluorescein diacetate (sFDA)を溶解し 1mM の試薬とした<sup>1)</sup>。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 mm<sup>3</sup> のセルに詰め、sFDA 溶液を 200 $\mu$ L 滴下した。試料を 5 $^{\circ}$ C にならした後、一方向より凍結した。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。

**結果** 図 1,2(a)に試料の凍結過程の様子を示す。図は左から右へ凍結している。(b)は(a)と同じ場所を蛍光観察した様子であり、微生物のコロニーが白く認識できる。こうした観察から、凍結による微生物担体の動きが殆どないこと、凍結前後で微生物活性が異なることなどがわかる。凍土中の微生物の挙動を観察するのに、sFDA と蛍光顕微鏡を用いた直接観察が有効と思われる。

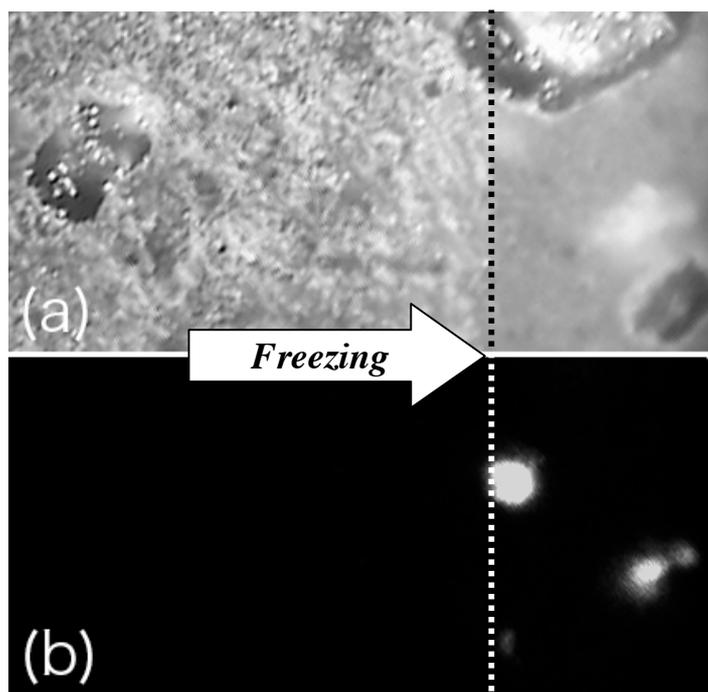


図 1. 凍結面近傍の様子。図中破線は凍結面

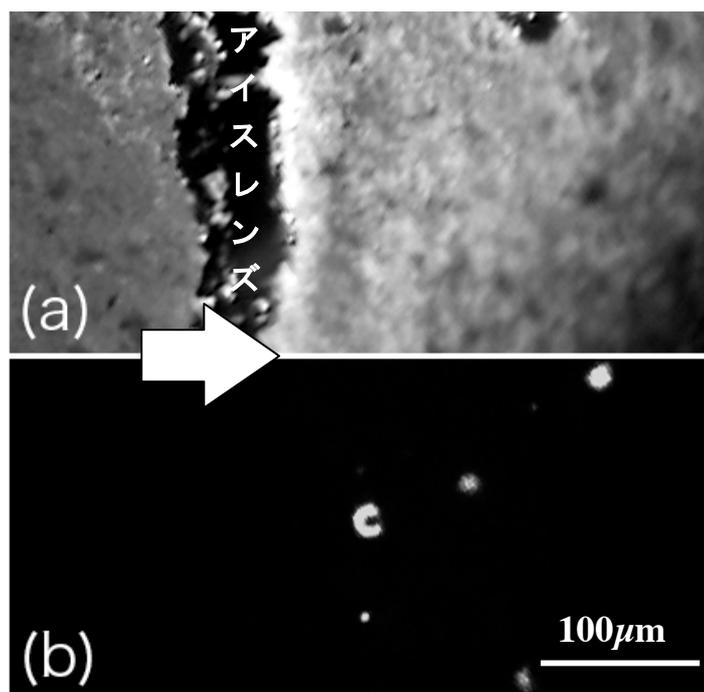


図 2. 最終アイスレンズ近傍の様子

参考文献 : 1) T. Tsuji, Y. Kawasaki, S. Takeshima, T. Sekiya, S. Tanaka, 1995, *Appl. Environ. Microbiol.*