

# 大貫谷公園における土壌微生物群集

## － 生息環境の違いによる微生物群集構造の相違 －



実施担当者 国際学園 星槎高等学校  
教諭 垣内 麻由美

### 1 はじめに

横浜市旭区に位置する大貫谷公園には、200年ほど前から手つかずの状態では保たれている土壌があるとされており、そこには土壌本来の微生物叢が保たれていることが想像される。これまで土壌微生物に関する報告は細菌に関するものが中心で、植物病原菌や根圏微生物以外、土壌本来の顕微鏡サイズの微生物群集に関するものは少なく、原生動物を中心とした50～500 $\mu$ mの大きさの微生物に関する報告は見あたらない<sup>1)、2)</sup>。現在これら微生物の進化系統関係が注目されていることから重要な課題となっている。

第33回日本微生物生態学会山梨大会(2019)における高校生ポスター発表<sup>3)</sup>で、D・B・Cの3地点における表層と深さ20cmの土壌試料について、3人の生徒が顕微鏡観察による微生物を検出・計数した結果を図1～図3に示した。これらから、検出された微生物群集の種類数は、いずれも表層の方が深さ20cmの試料より多いことが明らかにされた。また、C地点では表層と深さ20cmの種類構成が類似していたにも関わらず、ウロコカムリが表層で際立って多かったことから、表層の微生物群集はそこに生えている植物の影響を受けている可能性が考察された。

この結果から、さらに深いところではどのような微生物が観られるのか？どこまで微生物が存在しているのか？に関して関心を持った。本校では、これまで公園内の環境の相違により表層の微生物群集が異なるのか？否か？(第32回日本微生物生態学会(沖縄)高校生ポスター発表2018)の検討や、表層と深さ20cmに生息している微生物群集の相違について(第33回日本微生物生態学会(山梨)高校生ポスター発表2019)検討してきたが、本研究はさらに深い土壌における顕微鏡サイズの微生物群集の垂直方向の分布を明らかにしようとするものである。

図1 O君 合算値

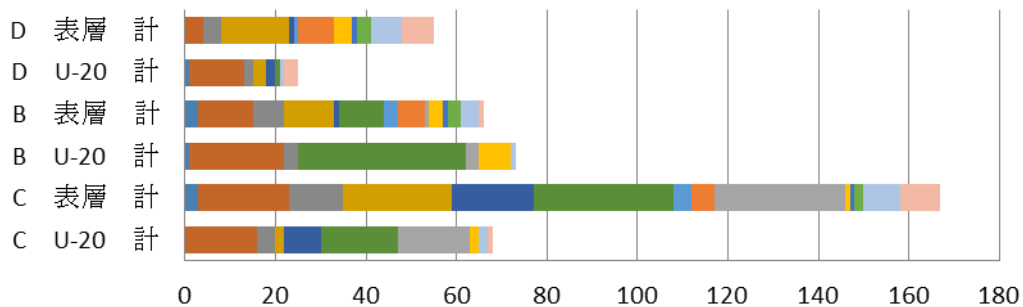


図1 U君 合算値

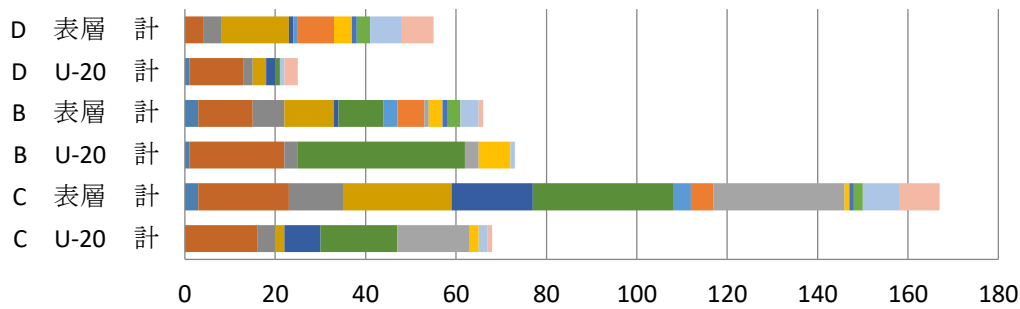
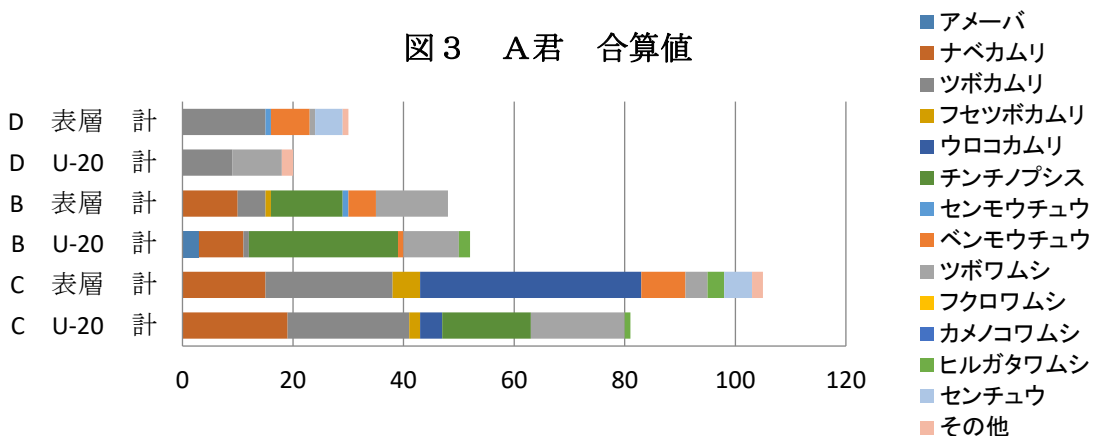


図3 A君 合算値



3人の計数者による大貫谷公園D・B・C地点における土壌微生物群集の種類数の比較<sup>3)</sup>

## 2 本年度の研究結果

### 2-1 方法

大貫谷公園の土壌微生物を観察するにあたり、これまでの土壌微生物研究法に書かれている方法はいずれもうまく適要できなかった。そこで、どのような生物種が存在するか？に関する初歩の観察から始めた。その方法が初年度のメンバー3名によって用いられた『つまようじ法』（2017 環境微生物系学会合同大会 2017 仙台）である。つまようじ法は単位面積、あるいは単位体積当たりの顕微鏡サイズの土壌微生物群集の正確な生息数を決定するには不十分であるが、種類構成の比較は可能である。

この方法で2018年には4名の生徒が参加して、環境の違いによる微生物群集の相違を明らかにしようとしたが、計数値に0が多く説得力のある結論を得るには至らず、この報告に対しては「来年が楽しみで賞」と評価された。2019年度は4名の生徒の参加で、3地点の表層と地下20cmの試料の比較を行い、同学会で発表された高校生ポスター19報中、第3位の「優秀賞」と評価され、それには『ひたすら顕微鏡を覗き続けた姿に感動した』という学会会長のコメントも付け加えられていた。

また分類学的位置づけが明らかにされない種類が多いことから、刊行されている図鑑では異なる区分におかれているにも関わらず同じ属名が与えられているものもあり、図鑑による同定は困難であった<sup>4)~6)</sup>。

### 一 検土杖による土壌採取

工事現場等、土質の調査を行う現場で用いる長谷川式大型検土杖を用いて、試料の採取を行った。検土杖は直径 17mm の試料を長さ 350mm で採取することができ、これを 3 回連続して掘り進むことによって 1050mm (105 cm) の深さまで掘ることが可能である。表層のリター層を取り除いた後、検土杖を打ち込み、1 地点で 3 カ所の試料を採取後、同じ深さの試料を混ぜ合わせて、20 cm 毎に区分けしてビニール袋に採取した。

## 2-2 観察地点の設定

大貫谷公園では、20m の標高差がある公園の高度差と地上部の樹種の違いに基づいて、初年次に 6 箇所の定点を決めた。A 地点は北面の公園入り口でヤブツバキの根本、B 地点は地形的には沢の出口でヒイラギに覆われている。C 地点は植林されたスギ林とグラウンドとの境界線に位置し日当たりが良く、D 地点は海拔高度 90m の山頂でコナラの根本、E1、E2 地点は崖になっている南斜面でササが混生している。設定した 6 箇所の調査地点では、日照・水分・植生条件が異なる。

本研究では標高が最も高い D 地点と、グラウンドに面した人工林がある C 地点を対象に、検土杖を用いて、表層・地下 20 cm ・地下 40 cm ・地下 60 cm ・地下 80 cm ・地下 100 cm の試料を対象に行った。



## 2-3 土壌微生物の名前の決定

これまでの大貫谷公園の土壌における観察結果から、図鑑やインターネットの情報をもとに以下の 14 種類の微生物の存在が明らかにされた。アメーバ・ナベカムリ・ツボカムリ・フセツボカムリ・ウロコカムリ、フセウロコカムリ・チンチノブシス (スナカラムシ、ツボコムシ) ・ベンモウチュウ・ツボワムシ、フクロワムシ、カメノコウワムシ、ヒルガタワムシ、センチュウ、その他である。この 14 種類はそれぞれ 1 つの「種」のみを含んでいるわけではないが、生息している分類群としてこれを単位に計数を行った。なお、『その他』に区分されるものにはいずれにも属さない多様な微生物が含まれている。観察にはオリンパス光学顕微鏡 (CX-23) を用いた。

## 2-4 結果

2020 年 1 月 7 日に C 地点で試し掘り、3 月 25 日に D 地点、11 月 25 日に同じく D 地点で土壌試料を採取して、合計 3 回分、検土杖を用いた土壌試料をえた。採取した試料はチャック付きビニール袋に入れて冷蔵庫で保管している。

すぐに観察が出来ればよかったが、3 月から 9 月はコロナ禍で放課後の課外活動を行うことが出来ず、9 月以降に観察を行った。例年より開始時期が遅れたため、三年生の進路決定の時期と重なり、メンバー全員が揃うことが難しかった。

最初につまようじ法を行い、さらにこれまでの発表で何度か指摘されている『定量化』を行うために、マイクロピペットを用いて 50  $\mu$ l (マイクロリットル) を計数する試みを行った。観察を進めるにしたがってどんどん新しい現象が見いだされ、現在、興味を持って観察を続けている。土壌を構成する成分が微生物と同じ大きさであるために分離が難しく、この点に関して再度検討を行

っている。現段階では0-20 cmの試料と、80-100 cmの試料を観察したが、昨年学会報告したように地表に近い試料に多くの種類の微生物が観察されている。

### 3 まとめ

まず実際に観察した生徒の感想をあげる。

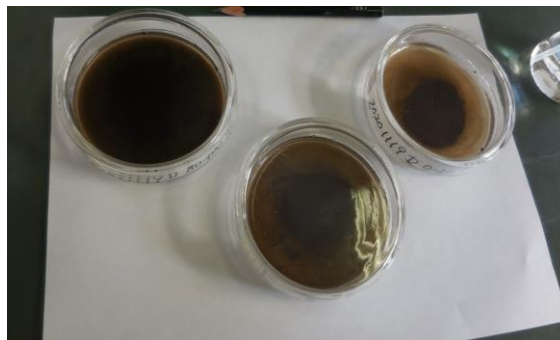
シャーレで土壌を培養している過程で、Tさんは次のような感想を述べた。

○シャーレに入っている試料を攪拌した時に、中心と端を取ったときの結果に違いがあったので、泥だけを取る作業が必要だと感じました。

特に土壌と水を分離して微生物を観察する方法の確立が大事だと思いました。後学期だけと言う短い期間でしたが、時間があれば条件をしっかりと整えたいと研究してみたいと思いました。

また、Mさんは

○ D地点の土を採取し観察したところ、40倍に拡大しないと確認できない微生物が多いと感じました。種類としてはウロコカムリやナベカムリを検出できたのですが、培養の日が経つにつれてチンチノプシスが増えていき、最終的にはほぼチンチノプシスしか発見できなくなりました。特に深くなるにつれてサイズがだんだん大きくなったのが気になりました。また土壌を観察するときに小石や塊がうまく取り出せず、顕微鏡の視野にはいつても多かったので、うまく取り出す方法を模索したいと思いました。



大貫谷公園における50~500 μmの微生物群集の種類構成に、ナベカムリ・ツボカムリ・フセツボカムリ・ウロコカムリなどの有殻アメーバ、あるいはチンチノプシスに区分された砂殻をもつセンモウチュウが検出されたことは興味深い。特にチンチノプシスに区分される一群の微生物に関する記載は、主に沿岸域の砂浜から得られた試料に関するもの<sup>7)</sup>で、土壌におけるチンチノプシスの記載は見当たらない。この仲間は、現在明らかにされつつある生物界の新しい分類区分に位置づけられる<sup>6)</sup>と考えられ、これまでの生物五界説では原生生物界として、原核生物である細菌と真核多細胞生物の間に一括して位置付けられてきたものである。土壌を観察することにより、進化系統関係が明らかでなかったこれらの分類群の位置付けの解明が進むことが期待される。

**謝辞** 本研究の一部は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の助成により行われました。ここに報告して御礼申し上げます。

また、本研究は星槎大学森川和子特任教授のご指導とご支援のもとに行われました。ここに報告して感謝申し上げます。

### 参考文献

- 1) 「土壌微生物学」 豊田剛己編 朝倉書店 2018
- 2) 「微生物生態学への招待」 二井一禎他・竹内祐子・山崎理正編 京都大学出版会 2012
- 3) 高校生ポスター発表 第33回日本微生物生態学会 (山梨) 2019
- 4) 「日本淡水産動植物プランクトン図鑑」 田中正明著 名古屋大学出版会 2002
- 5) 「やさしい日本の淡水プランクトン 図解ハンドブック」 滋賀の理科教材研究委員会編 2005
- 6) 「プランクトンハンドブック 淡水編」 中山剛・山口晴代著 文一総合出版 2018
- 7) 「The Biology and Ecology of Tintinnid Ciliates」 Wiley-Blackwell 2013

以上