

低真空凍結乾燥法を用いた土壌微生物の走査電子顕微鏡観察

広島工業大学大学院 学生会員 吉本 和清
 広島工業大学 フェロー 二神 種弘
 柏原塗研工業（株） 阿部 智昭
 広島工業大学 正会員 島 重章

1. はじめに

1999年6月末の広島市周辺の豪雨災害（死者31名・行方不明者1名）と最近の山陽新幹線トンネル内コンクリート塊の落下は、土木技術者にとって大きな衝撃であり、少子高齢化社会（税収の頭打ちで公共投資の縮減が予想される社会）における国土と社会資本の健全なあり方について大きな問題を投げかけた。これらの問題の発生要因の1つとして、従来の物理学（力学）に基づく土木工学だけでは解決できない、微生物の関与が考えられる。今日、走査型電子顕微鏡（SEM）は、生物観察のために広く利用されている。しかし、それらの観察対象の多くは、炭酸カルシウムや珪酸質の殻を持った植物性微生物や固い外骨格を持った甲殻類種を対称にしたものである。無殻の植物性微生物や殻の柔らかい動物性微生物は、試料作成中に变形や収縮によって満足のいく観察像を得られていない場合が多い。そこで、本研究は低真空走査型電子顕微鏡（LVSEM）を利用した、低真空（LV）凍結乾燥法によって試料作成を試み、土壌微生物の観察を行った。

2. 試料作成

本研究で試みた低真空凍結乾燥法は、液体窒素で凍結乾燥した試料の水分をLVSEM試料室内で昇華・乾燥するものである（Fig.2.1）。この方法は次の点で優れている。

- 1) 熟練した技術を必要としない。
- 2) 短時間で試料を作成できる。

従来型の試料作成法は、微生物の柔らかい形態を保持するために、長時間かつ熟練した技術を固定作業に必要とするものである。低真空凍結乾燥法と従来型試料作成法の比較をFig.2.2に示す。



Fig.2.1 LVSEM（元素分析機能付）

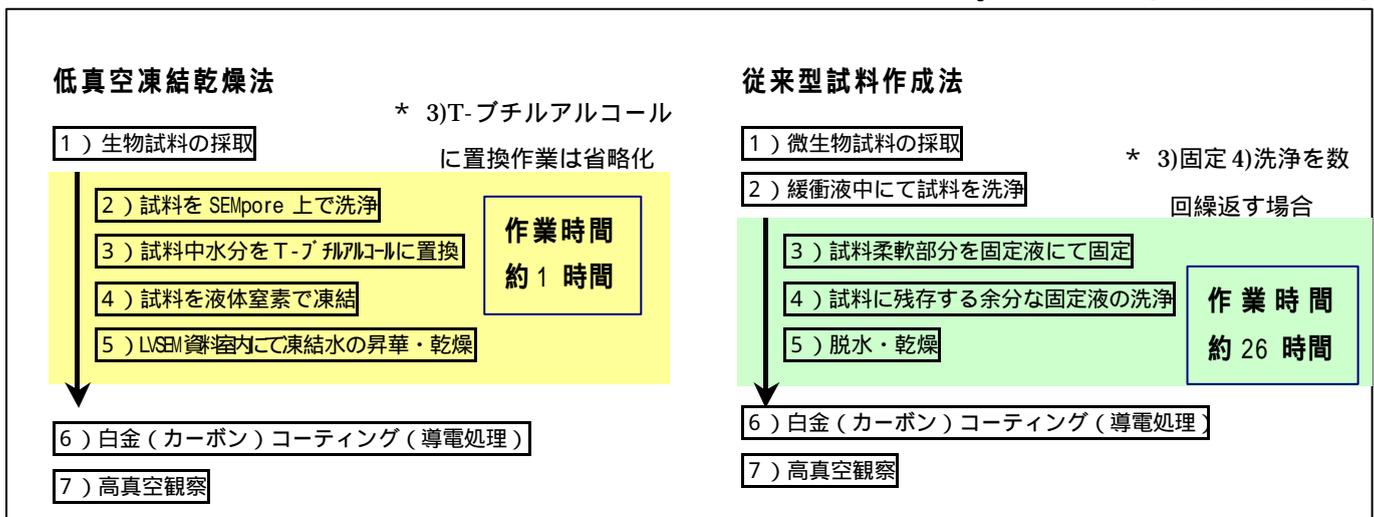


Fig.2.2 低真空凍結乾燥法と従来型試料作成法の比較

キーワード：低真空凍結乾燥法、微生物、走査型電子顕微鏡

連絡先：広島市佐伯区三宅2丁目1番1号 広島工業大学 電話：(082)921-3121 FAX(082)921-8976

3. 観察

1999年6月末の広島市周辺の豪雨災害現場付近の3種類の土壌[(1)地表面近くの腐葉土、(2)地中35cmの土、(3)部分的に土になりかけた強風化花崗岩]から試料を採取した。LV走査型電子顕微鏡を用いLV凍結乾燥法で作成した試料を、高真空状態で観察した(Figs. 3.1~3.4参照)。

地表近くの腐葉土中に多数の原生動物が観察された。原生動物は、単細胞の微生物であるが、多細胞生物と同様に複雑な機能を持つものである。これらの原生動物の多くは、他の微生物と同様、有機物を微細分化して栄養塩に変換し、雨水による栄養塩の地下浸透を促進するものと考えられる。



Fig.3.1 原生生物（腐葉土中）



Fig.3.2 原生生物拡大図



Fig.3.3 紡錘状桿菌（地中35cm）

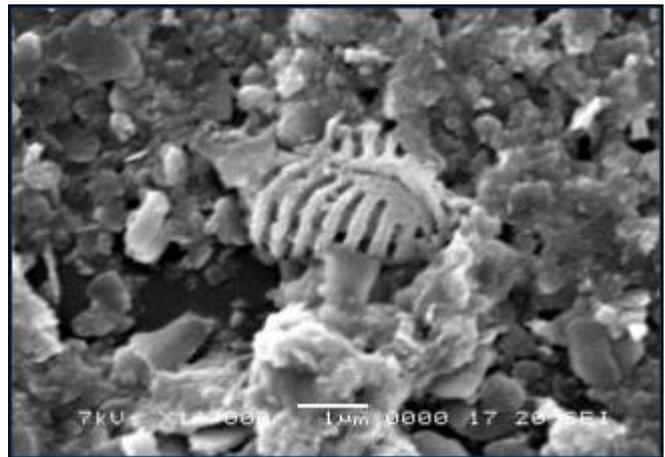


Fig.3.4 魚骨状微生物（強風化花崗岩）

4. 結語

本研究では、SEMを用いて、土壌微生物の観察を行った。試料作成時に、可能な限り微生物の変形を抑えるために、低真空(LV)凍結乾燥法を用いた試料作成を試み、以下のことがわかった。

- 1) LVSEMによって、試料作成段階途中(LVSEM試料室内にて凍結水の昇華・乾燥中)において像の観察が可能になった。これによって、試料作成段階における巧拙の判断が可能になった。
- 2) 従来型の試料作成法は、長時間かつ熟練した技術を固定作業に必要とするが、本研究で行ったLV凍結乾燥は固定作業を行わないため、作業工程の短縮化・簡易化ができ、短時間に大量の観察を可能にした。

以上により、土壌微生物観察におけるLVSEMの有益性、LV凍結乾燥法の利便性を確認できた。

謝辞：本研究を行うにあたり、ご協力頂いた日本電子(株)の磯野晶雄氏に感謝致します。

参考文献

- 1) 二神種弘、阿部智昭、吉本和清、島重章、石井義弘：「走査型電子顕微鏡による地盤劣化微生物の観察」、広島工業大学紀要、第37巻、(2003)、pp.153-158.
- 2) 二神種弘：「7.菌耕による地盤劣化の促進」、生態系読本 暮らしと緑の環境学、地盤工学会(2002) pp.11-12.