

簡易土壤薄片製作法とそのヒノキ林土壤 有機物層の微細形態観察への応用

武 田 博 清

A Rapid Slicing Method for The Carbowax Embedding Samples
and its Application to The Micro-morphological Observation of
Soil Organic Layers.

Hiroshi TAKEDA

要 旨

ポリエチレングリコールを用いた土壤有機物層の薄片製作法の紹介を行なった。今回の改良によって土壤薄片製作におけるポリエチレングリコール法の欠点を改良することができた。改良点はポリエチレングリコール包埋試料のミクロトームによる切断に先立って試料面にセメンダインを被膜することをその特徴としている。この薄片製作法をヒノキ林の土壤有機物層の微細形態の観察に応用し、その有効性を示した。

は じ め に

土壤微細形態学の手法は、森林における土壤有機物層の構造やその形成過程を研究する上で有効な手段となっている¹⁾。土壤微細形態学の分野において、各種の土壤薄片作成の技術が考察されている。通常、土壤薄片の製作は土壤の充填剤による固化、固化試料の裁断、研磨、接着といった工程を含んでおり、薄片作成において多少とも技術を必要とする²⁾³⁾。最近、簡易な土壤薄片の作成法が土壤における動物の直接観察の方法として提案されている。そこでは自然状態のまま有機物層を充填する材料として水溶性の寒天⁴⁾、ゼラチン⁵⁾⁶⁾が用いられている。水溶性の土壤の充填剤は、充填にあたって事前の乾燥を必要としない事や、土壤の固化、研磨、裁断に特別な装置を必要としないといった点において優れている。しかし、寒天やゼラチンを用いた薄片作成法は、もともと土壤における動物の観察法として考察されたものであり、固化試料からの薄片の厚さには限界があり、約0.5mm以下の薄片を得ることはむずかしい。さらに薄い薄片を必要とする、土壤微生物や腐植形態の観察薄片の充填剤としては適していない。水溶性の固化剤のうちポリエチレングリコールが有機質土壤の薄片作成における固化剤として利用されてきている⁷⁾。しかし、ポリエチレングリコール法は他の合成樹脂固化剤から作成された固化試料と同様に薄片の作成にあたって、研磨、裁断等の工程を含んでおり、そうした過程でその材質の軟らかさのために技術的な困難さを伴う。また、ポリエチレングリコール法により得られた薄片は薄片の顕微鏡による観察での透過性において光学的な問題を持っている。今回、この報告で紹介する新し

い薄片作成法によって、従来のポリエチレングリコール法の欠点を改良することができた。さらに、その有効性をヒノキ林土壌の有機物堆積層の薄片作成への応用を通じて紹介する。

1. 土壌有機物層の採集法

土壌微形態の観察にあたっては、土壌の構造を攪乱することなく試料の採集をすることがのぞましい。そうした目的で、ANDERSON & HEARLY はドライアイスにより土壌有機物層をあらかじめ凍結し採集する方法を提案している⁹⁾。ここでは新しい方法としてポリエチレングリコールによる固化法を紹介する。試料の採集にあたって、ポリエチレングリコールにより土壌表面を固化することで、土壌有機物層を自然の状態にて採集した。ポリエチレングリコール（カーボワックス）は、常温ではその分子量1000以下は液体であり、4000, 6000は固いパラフィン状である。通常ポリエチレングリコールの6000が土壌の充填剤として用いられてきているが、土壌が著しく過湿でない場合には4000の方が粘性が低く土壌への浸透性においてすぐれる。ポリエチレングリコール4000は約60°Cにおいて溶解し、その粘度は低い。

土壌採集地点において、10×10cmの土壌表面を区ぎり、そこに約100ccのポリエチレングリコール溶液を注ぎ土壌表面を固める。ポリエチレングリコールの固まったのち、10×10cmのプラスチックの板を土壌表面に置き、その縁に沿ってカッターにより土壌の4断面を垂直に切断する。切断面に10×10cmのプラスチック板を挿入し、4枚のプラスチック板からなる枠に土壌ブロックを採集する。プラスチック板の継ぎ目をビニールテープではりあわせてプラスチックの箱とする（図. 1-A）。このように土壌の採集にあたって、ポリエチレングリコールで表面を固めることで、土壌有機物層を攪乱することなく採集できる。採集した試料は実験室に持ち帰り冷蔵庫に保存しておく。

2. ポリエチレングリコールによる土壌試料の充填

充填剤として、ポリエチレングリコール4000を用いる。ポリエチレングリコールをビーカーにとりホットプレートにおいて約80°Cで溶かす。プラスチックケースに採集した土壌を入れたままポリエチレングリコールの充填を行なう。土壌表面にポリエチレングリコールを注ぎ浸透させる。土壌表面の固化の後、同様にして土壌の下面からポリエチレングリコールを浸透させ固化する。試料を冷蔵庫に保存しておく。おおまかにポリエチレングリコールで固めた土壌試料を用いて、その後の薄片作成用のブロックを切りだす材料とする（図. 1-B）。ブロックの切だし方は、目的とする薄片作成部によりことなる。

ここではヒノキ林の厚さ4cmの土壌有機物層の垂直断面の薄片製作法を述べる。まず土壌固化試料を5×5×4cmのブロックに切だす。ブロックの切断にあたって、灼熱したカッターを用いることで容易に切断が可能である。切だした、5×5×4cmのブロックに側面からポリエチレングリコールを浸透させる。その後、ブロックを冷蔵庫に保存する。さらに、そのブロックから2×5×4cmのブロックを切だし、それを薄片作成用のブロックとする。薄片製作用のブロックを、ブロックと同じサイズ（2×5×4cm）の紙ばこに入れ、ポリエチレングリコールによりブロックを包埋し、冷蔵庫において固化する。固化後、紙ばこからブロックを取りだしデシケーターに保存する。

3. 薄片の切断方法

土壤有機物層の包埋ブロックをポリエチレングリコールをもちいて台木（2×3×1 cm）に接着する（図.1—C）。滑走式マイクロームにブロックを固定，荒削りして土壤有機物層の断面を出す。通常の切断方法では，薄片はもろく壊れてしまう。そこで，薄片切断方法の改良として，ここではセメンダインを用いて，ブロック面を被膜して薄片を切断する方法を考察した。市販のセメンダインは，セルロースをアセトンなどの溶剤に溶かしたものであり，CEMENDINE は，セルロースを25%含んでいる。セメンダインの濃度を，アセトンを加えることで12%に薄め粘度を低し，薄片切断面にセメダインを塗る。セメンダインは約50 μ 程度の深さまで浸透させる，その場合，セメンダインの量は1 cm² であり0.05cc程度である。セメンダインが乾いたのち，マイクロームでスライスして薄片を切りだす。土壤有機物層の観察用の薄片として40~50 μ の厚さが好ましい。ポリエチレングリコール包埋法にセメンダイン法を導入することで，従来は困難であった各種の分解段階にある土壤有機物の薄片を作成することが可能となる。

4. 薄片の染色と薄片標本の作成法

顕微鏡観察の薄片作成法

セメンダインを被膜して切断した薄片は，土壤有機物層がセメンダインに包埋されたかたちになっている。従って，洗浄，染色の過程において土壤有機物がセメンダイン膜から剝離することはない。薄片を50%アルコールにより洗浄することでポリエチレングリコールを除去することができる。ポリエチレングリコールの除去により薄片を顕微鏡で観察した時の透過の問題点がなくなる。染色は洗浄の後ちに行なう。薄片を染色液に漬けて染色する。土壤有機物層における菌体の観察をおこなう場合にはあらかじめ土壤有機物を過酸化水素の20%で脱色した後に染色を行なうと菌の観察が容易となる。薄片は乳酸により封入する。永久標本の封入剤としてガムクロラールやカナダバルサムを用いるとよい。

土壤有機物層の乾燥標本

薄片はまた乾燥標本としても保存することができる。マイクロームにより切断した薄片を台紙にセメンダインで貼りつける。その場合，セメンダイン膜面を上側にして台紙にはりつける。薄片をはりつけた台紙を市販の透明粘着ブックカバーで覆う（図. 1—D, E）。こうして得られた土壤有機物層の標本は自然な色調を示し長期の保存が可能である。

5. ヒノキ林の土壤有機物層の微細形態の観察

土壤有機物層の微細形態

ここでは本法を用いた京都市山科の35年生のヒノキ人工林の土壤有機物層についての観察例を紹介する。ヒノキの平均樹高，DBH はそれぞれ15m，17cmである。土壤は B_{D(a)} 型であり土壤堆積腐植型は moder (mull-like-mor) を示す。前述した方法により土壤有機物層の薄片を作成しその微細形態についての観察を行なった。

図2，3に土壤有機物層の構造を示す。L, F, H 層はそれぞれ0.5, 1.5, 0.5cm。

L層は落下後1年未満の落葉から成り立っていた。そこでは広葉樹，ヒノキ針葉の表面に菌糸のコロナイズや節足動物の脱ぶんが少しみとめられるにすぎない。F層は黒褐色化した針葉と土

壤動物の脱ぶんを主な構成要素とし、そこに発達する細根から成り立っている（図4-1, 4-2）。針葉の葉肉部分がササラダニより摂食され、針葉の内部に脱ぶんがみられる（図4-5, 4-7）。針葉堆積の間にトビムシ、カの幼虫、ヒメミミズの脱ぶんの堆積が認められる（図4-1, 2）。針葉内部のサララダニの脱ぶんや針葉間に堆積する節足動物、ヒメミミズの脱ぶんに腐植化は進んでいない。F層は土壤有機物層において最も生物の分解活動の盛んな層位であることがわかる。針葉は分解の結果、土壤動物の脱ぶんや菌体にと変化するが、そうした物質において腐植化作用は進んでいない。H層はそうした生物分解の産物である脱ぶん、植物組織の破片の集積層を形成している。（図4-3, 4）。

ヒノキ針葉の分解過程

落葉の分解に伴う重量、養分物質の変化が調べられてきているが、分解にともなう落葉の形態変化についての知見は少ない。落葉の分解に伴う形態の変化の観察から分解過程における土壤動物や微生物の寄与を推測することができる。ここでは土壤有機物層のヒノキ針葉の分解に伴う形態の変化を述べる。それに先立って、ヒノキ針葉の形態について述べる。ヒノキは維管束軸に4枚鱗片葉を相互に対生し、この単位が連続してヒノキ葉列を成している。4枚のうち下部の対生する2枚はかま状の舟形であり、その上に付く2枚の鱗片は広い卵状三角形である。鱗片葉は表皮と葉肉からなりたち、維管束をかいている。針葉の観察にあたって、一つの単位として4枚の鱗片葉とその中央に位置する維管束部を一つの単位とみなすことができる。

針葉は落葉後数か月間は淡い褐色を示すが、分解にともない黒褐色に変化していく。その後、表皮系は菌糸に覆われ、それをトビムシやササラダニが摂食する結果、表皮の分解が進む。また葉肉部は菌の侵入とササラダニにより分解されていく。そうした生物分解をF層を通じて受け、最終的に針葉は動物の脱ぶんと菌体にと変換し、H層に堆積する。

図5の1-4に表皮系の分解に伴う形態の変化を示す。表皮系は外側からクチクラ、表皮、内皮の三層からなりたっている。針葉の落下後1年の間に、クチクラ層は完全に菌糸におおわれる（図5-2）。クチクラ層はそこを覆う菌糸と共にトビムシなどの菌糸を摂食する節足動物の活動により接触され消失していく。さらに菌糸は表皮細胞に侵入し、そうした結果として表皮は褐色化していく（図5-3, 4-7）。表皮組織の大部分は菌体に変化する。菌に覆われた表皮は、葉肉部分がササラダニによって摂食された後にも残存し表皮のみの中空化した分解葉となる（図5-4）。その後、表皮系は破壊されH層に堆積する。

次に葉肉と維管束系の分解に伴う変化を紹介する。図5の5-8に葉肉の分解に伴う変化を示した。L層の表面にある針葉の葉肉は淡褐色を示し、葉肉内に透明な菌糸がすでに侵入している。F層において葉肉は菌糸によりコロナイズされるようになる（図4-5, 図4-6）。また葉肉部は穿こうせいのササラダニの一群により摂食され、卵型の脱ぶんに変化する（図4-5, 図4-7, 図5-8）。葉肉の分解において、菌類とササラダニは葉肉という共通の食物資源をめぐって競争している。こうした菌類と土壤動物の関係は、トビムシのように菌類のグレーザとして働いている動物と異なる。維管束部は分解にともなって褐色化を呈する。F層の下部において維管束部の消失した針葉が多いことから、その分解が表皮や葉肉系に比べて特に遅いということとはなさそうである。

以上、土壤有機物層における分解の様式を紹介した。土壤有機物層についての微細形態の観察からL, F, Hの各層の特徴と、土壤生物の分解活動の様式を知ることができた。この報告では、ヒノキ林の土壤有機物層についての一観察事例を述べたに過ぎないが、ここで紹介した薄片作成法が、土壤の堆積腐植の生成やその類型化の研究に応用された場合、有効な方法となろう。さらに、今回紹介した薄片作成法は簡便であり特に技術を必要としないので広く土壤における分解や

細根, 菌根の研究といった土壌生物学に関心をもつ研究者にも調査法として広く薦めることができる。

引用文献

- 1) BAL, L.: Zoological ripening of soils. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 365 pp, 1982
- 2) FITZPATRICK, E. A.: Micromorphology of soils. Chapman and Hall, London. 1984
- 3) 八木久義・三浦覚: 土壌微細形態学(1)土壌薄片のつくり方. 森林立地26: 45-47, 1984
- 4) HAARLØV, M AND T. WEIS-FOGH: A microscopical technique for studying the undisturbed texture of soils. Oikos, 4: 44-57, 1953
- 5) MINDERMAN, G.: The preparation of microtome sections of unaltered soil for the study of soil organisms *in situ*. Plant and Soil, 8; 42-48, 1956
- 6) ANDERSON, J. M. AND I.N. HEALEY: Improvements in the gelatine embedding technique for woodland soil and litter sample. Pedobiologia, 10: 108-120, 1970
- 7) MACKENRIE, A. F. AND J. E. DAWSON: The preparation and study of thin sections of wet organic soils materials. Journal of Soil Science 12:142-144 with 4 plates, 1961

Résumé

In this report, we describe a quick slicing method for the preparation of Carbowax embedding samples using a sliding microtome and its applications to the observations of soil organic layer of a moder type humus accumulation in a 35 year *Chamaecyparis obtusa* Endl. forest. This slicing method describe here is simple and require little equipment for the preparation of thin sections. For the simplicity of this method, this slicing technique provides a useful research technique for the soil biological studies. Application is shown in the attached figure (fig. 1 to fig.5) .

図1 土壌ブロックの作成過程。A. 10×10×10cmのプラスチック箱に採集した土壌有機物層。B・ポリエチレングリコールにより充填された土壌有機物層 C・薄片用ポリエチレングリコール包埋ブロック。D, E. 土壌有機物層の標本

図2 35年生ヒノキ人工林における土壌堆積腐植の形態。

図3 図2の基となった土壌堆積腐植の顕微鏡写真(20X)

図4 土壌堆積腐植層の構造とその構成要素。

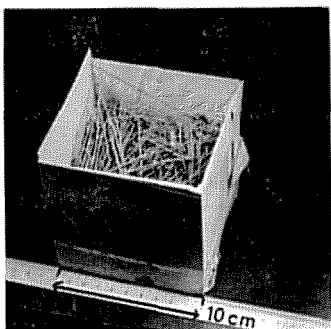
1. F層におけるヒノキ針葉と土壌動物の脱ぶん塊 (fa)。
2. F層下部における針葉 (ne) と土壌動物の脱ぶん (fa) のモザイク。針葉はササラダニにより摂食され、脱ぶんは脱らくして菌糸によって覆われた表皮が残存している。こうした針葉はF層下部に見られる。
3. H層に集積した脱ぶん (fa) と植物組織片 (ne) 。
4. H層下部における有機物 (fa) と鉱物質 (m) のマトリックス。
5. F層におけるヒノキ針葉。葉肉 (me) は暗褐色を呈し、表皮 (ep) に褐色の菌糸 (fm) が侵入している、またササラダニの脱ぶん (fa) 存在している。
6. F層における針葉の葉肉 (me) 部に侵入した褐色の菌糸 (fm) 。
7. ササラダニにより摂食され中空化したヒノキ針葉。維管束 (va) は残存している。表皮 (ep) にはトピムシなどの脱ぶん (fa) が付着している。
8. F層に発達したヒノキの細根 (r)

図5 1. 新鮮落葉。菌のクテクラ層におけるコロナイズが始まっている。A. クテクラ層 B. 表皮細胞, C. 内皮(繊維質)

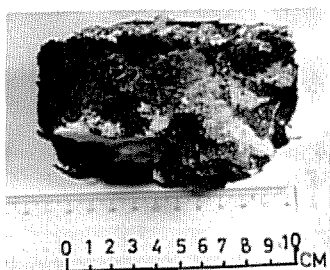
2. クテクラ層は完全に菌糸により覆われている。D. 菌糸

3. クチクラ層は消失し、菌糸は菌体を表皮細胞に侵入させている。その結果、表皮は黒褐色に変化している。
4. ササラダニにより葉肉を摂食され、菌糸により覆われた表皮のみが残存している針葉。A. 表皮
5. L層の新鮮落葉。淡褐色をしめす。菌 (Fu) は針葉間にコロニーをなす。
6. L層の落葉。5にしめした新鮮落葉と比べて、黒褐色を呈している。表皮 (ep) に脱ぶんの堆積が見られる。
7. F層の落葉。ササラダニの摂食とその脱ぶんがみられる。fa. 脱ぶん, ep. 表皮
8. F層の落葉。fa. ササラダニの脱ぶん。

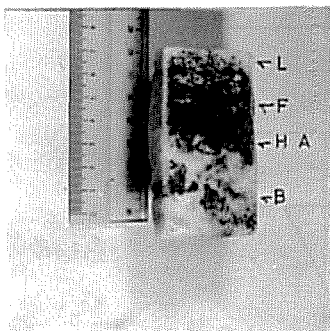
A



B

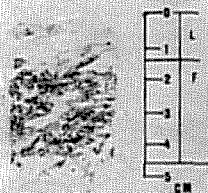


C



D

MOR TYPE
SECTION OF *Pinus* AND
Quercus FOREST SITE

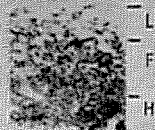


Note

A profile of soil organic layer (A_0) in a pine forest mixing with *Quercus* in Kamigamo Experimental Station of Kyoto University, Kyoto Japan. Collected 12 March, 1986.

E

MOR TYPE
SECTION OF *Chamaecyparis obtusa*
FOREST SITE



Note:

A profile of soil organic layer (A_0) in a 15 year old *Chamaecyparis obtusa* Endl. plantation in Yamashina, Kyoto, Japan. Collected 15 April, 1986.

土壤有機堆積層 (A:)

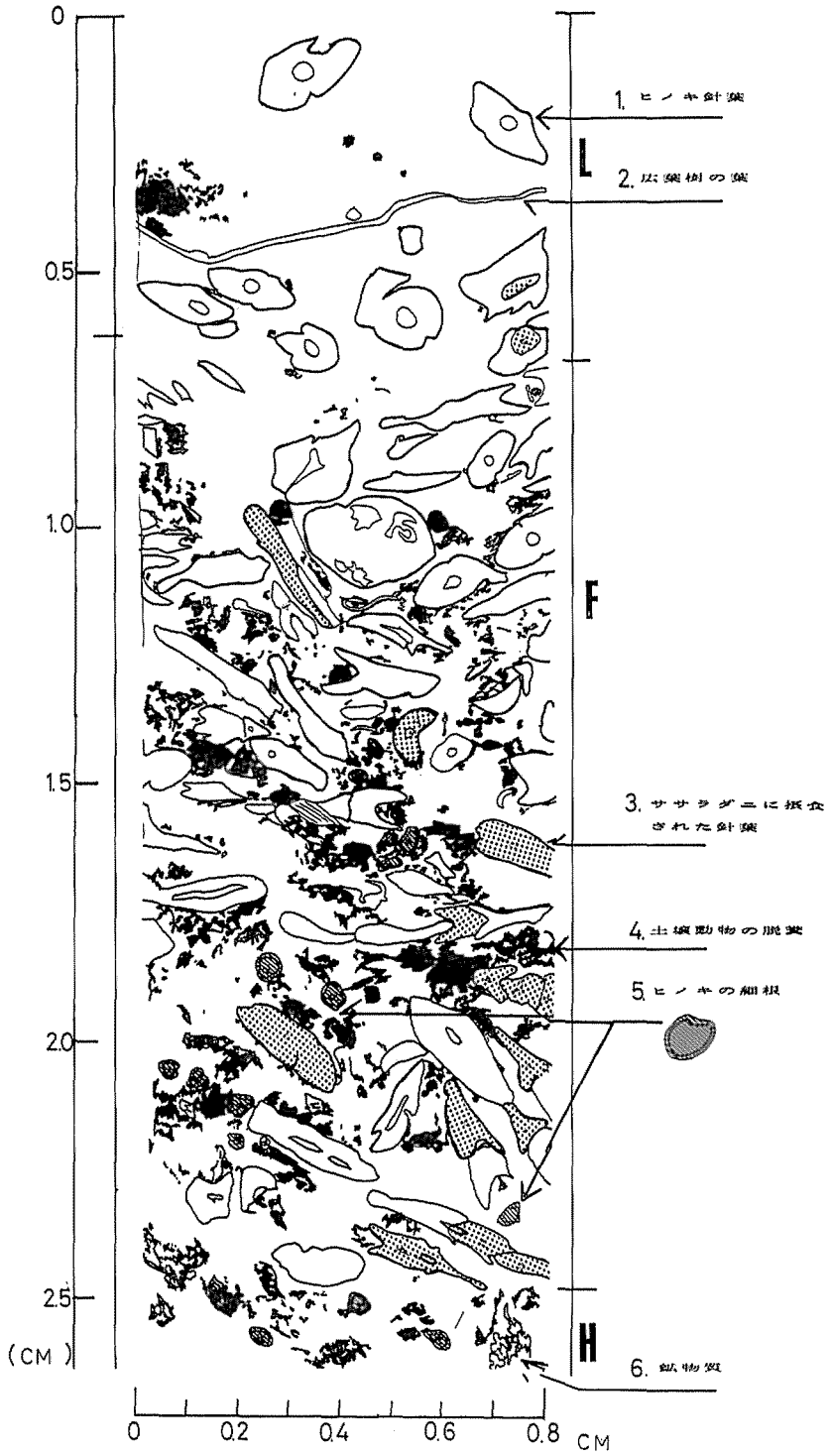
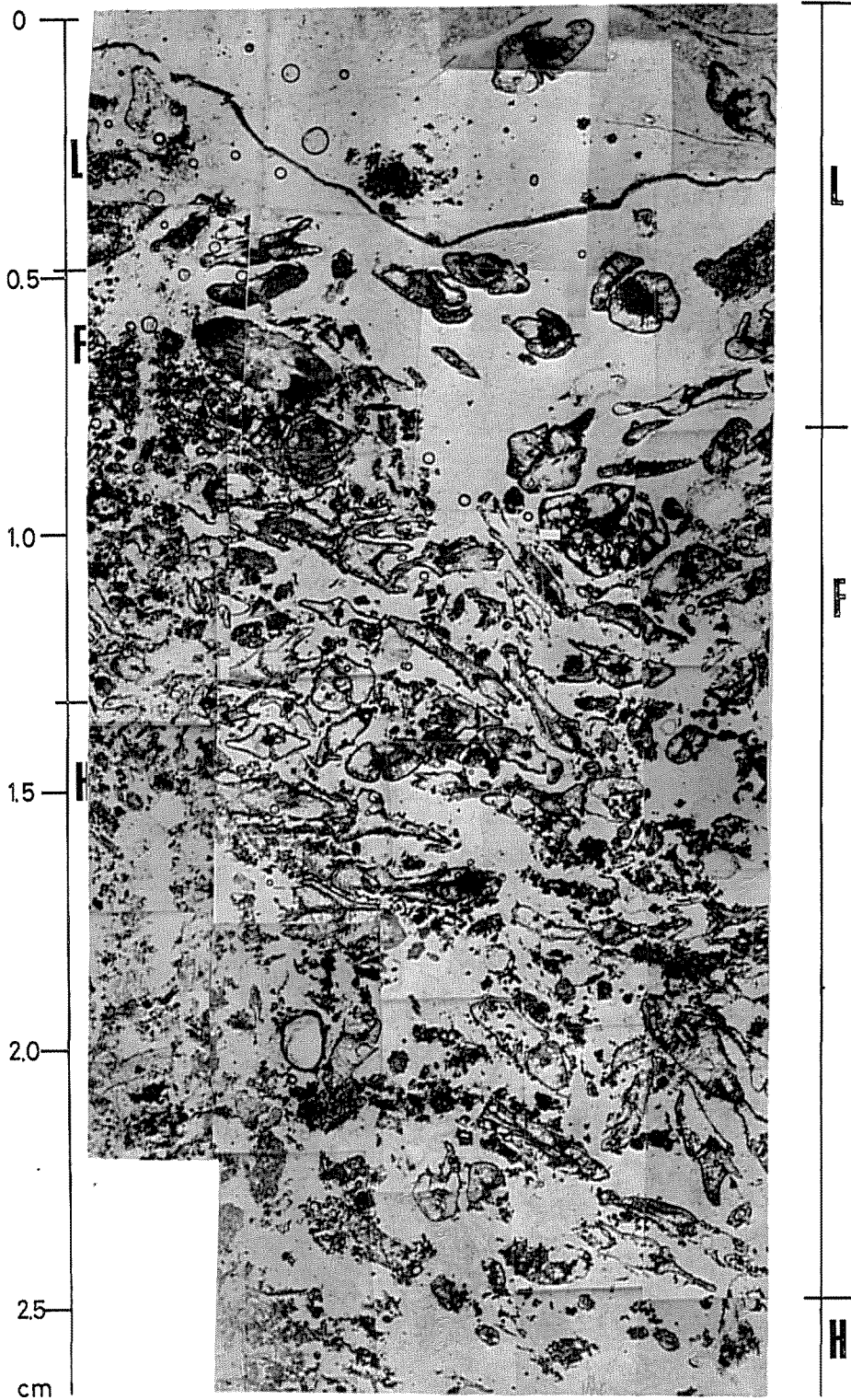


図 2



☒ 3

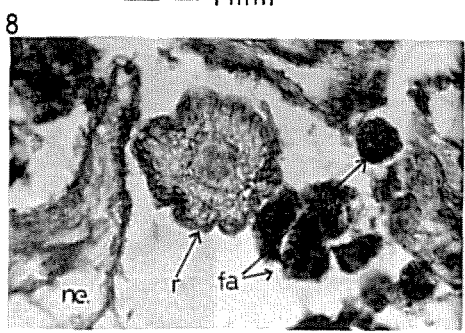
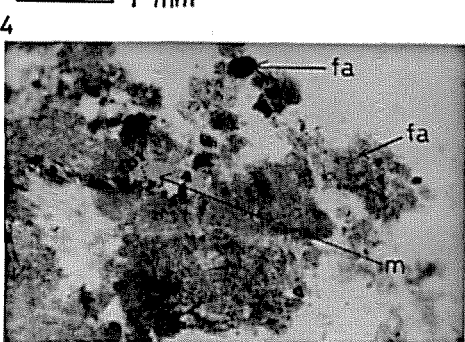
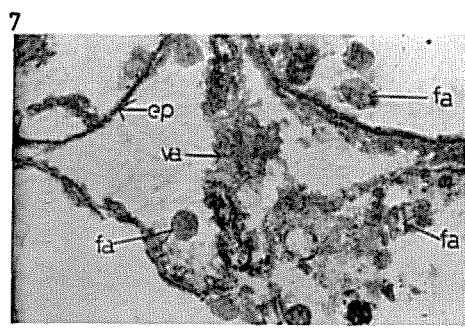
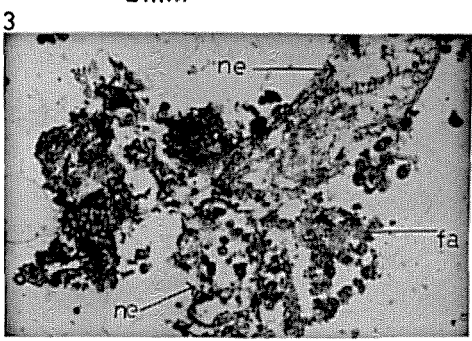
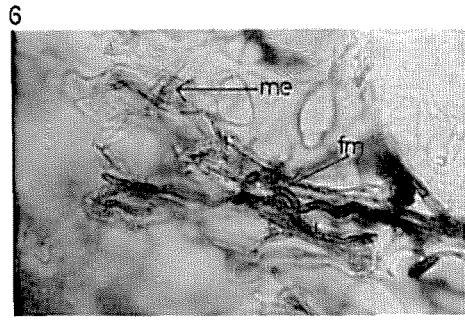
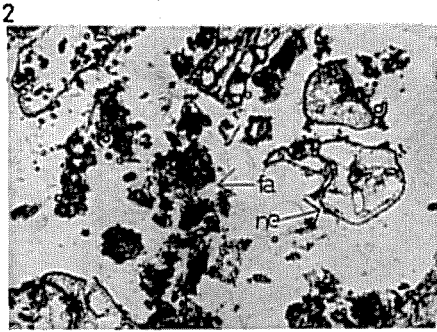
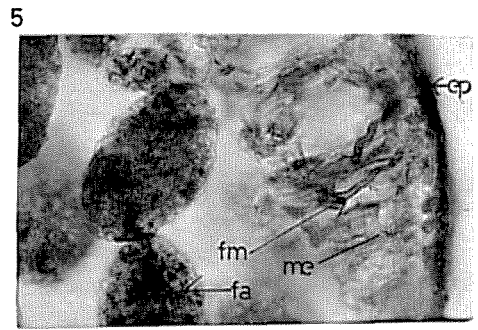
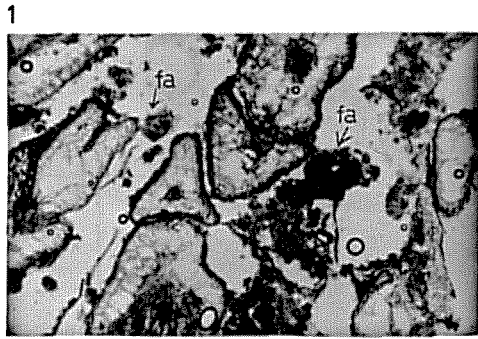


图 4

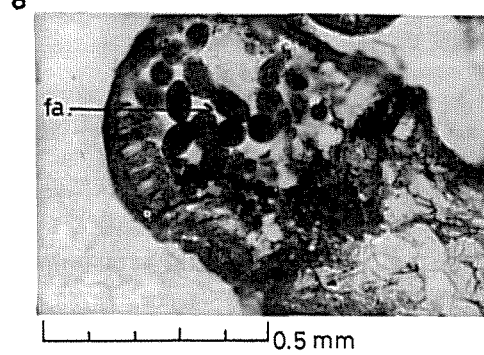
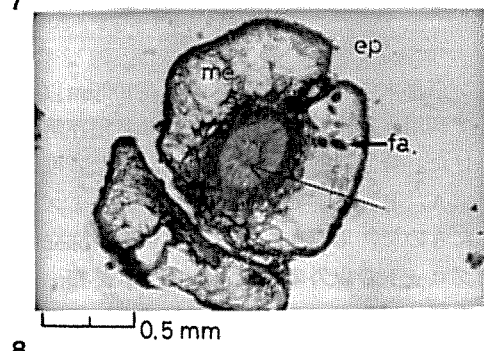
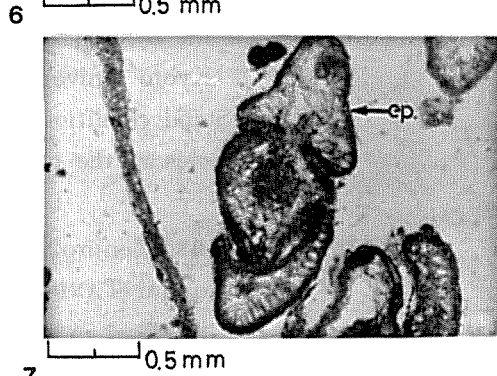
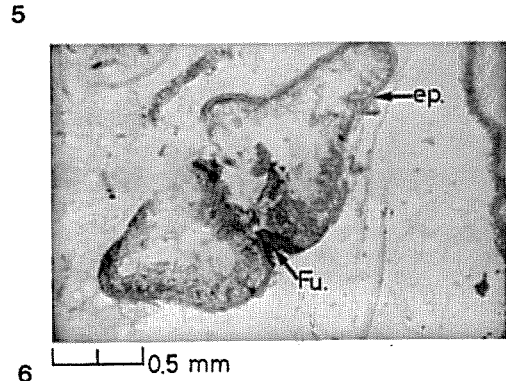
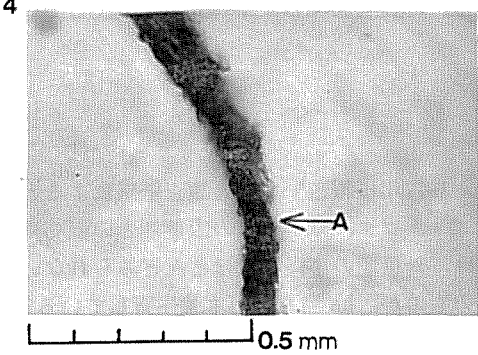
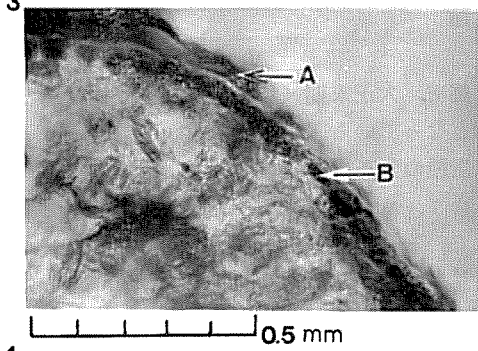
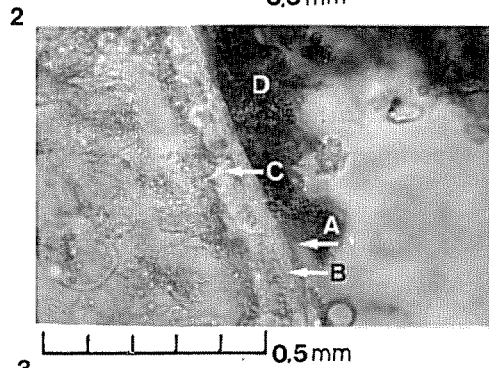
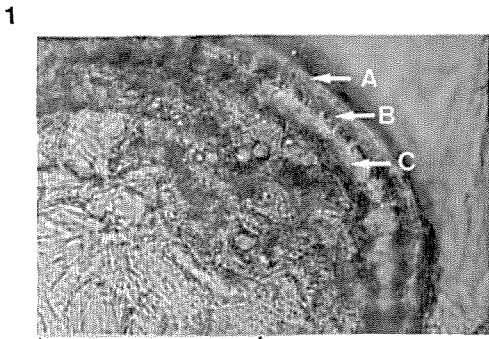


图 5