

土壤有殻アメーバと森林シリカサイクル

青木 義幸

土壤有殻アメーバと森林シリカサイクル

(Testate amoebae and silica cycle in the forest soil)

青木 義幸

(AOKI, Yoshiyuki)

名古屋大学大学院環境学研究科 博士 (環境学)

2008 年

要旨

有殻アメーバは広く世界中の土壤に分布し、その個体数も多い。そのため、陸域シリカサイクルに何らかの影響を及ぼしていると考えられる。とくに、*Euglyphidae* は環境中からケイ酸を吸収して鱗片をつくり、それを並べて殻を構築するため、土壤中のケイ酸量の増減に関わっていると予想される。しかしながら、これまで、有殻アメーバのバイオシリカを定量的に評価した例はほとんどなく、したがって、有殻アメーバがどの程度の規模を持ったシリカプールであるのか不明であった。

本研究の目的は、森林シリカサイクルにおいて、これまでほとんど評価されてこなかった有殻アメーバの役割を、定量的なデータから評価することにある。

そのために、有殻アメーバの殻、とくに *Euglyphidae* の殻を EPMA で分析し、化学組成を調べた。また、純粋な鱗片試料を EPMA 分析することによって、有殻アメーバのバイオシリカの化学組成を調べた。その結果、有殻アメーバの殻からは Si, Al, Ca, Fe, K, P, S, Cl, Na, Mg, Mn, Ti が検出され、とくに、*Euglyphidae* の殻からは Si, Al, Ca, K, P, S, Cl, Na, Mg が検出された。一方、鱗片には Si しか含まれておらず、有殻アメーバのつくるバイオシリカが非常に純粋なシリカであることが分かった。また、その他に検出された元素は生息していた土壤環境を反映している可能性があり、それらは殻の内側に付着した生物由来、もしくは、土壤由来の物質、または、鱗片をつなぐ膠着物であったと考えられる。

さらに、有殻アメーバのバイオシリカ量を正確に測定するため、高倍率での観察が可能な SEM による個体密度測定法の吟味を行った。従来のメンブレンフ

フィルター法に分散剤を用いた suspend-settle-decant procedure を導入することによって、90%の有殻アメーバを土壌懸濁液から回収できるようになった。これによって、従来の量の 2.5-25 倍の土壌サンプルから有殻アメーバを抽出し、SEM 観察することができるようになり、それによって、正確な個体密度測定が行えるようになった (RSD:5%)。

有殻アメーバを含む土壌微生物が、土壌からのケイ酸溶出にどのような影響を及ぼすのか、また、有殻アメーバがどれだけのケイ酸をバイオシリカとして固定しているのか確かめるために、ケイ酸溶出実験を行った。その結果、有殻アメーバを含む土壌微生物が、土壌から供給されるケイ酸を一時的に細胞質内に保持、もしくは、バイオシリカとして固定することによって土壌溶液中のケイ酸濃度を低下させていることが分かった。さらに、土壌微生物によって取り込まれたケイ酸の 55%が有殻アメーバによるものと推定されることから、有殻アメーバが土壌におけるシリカ蓄積生物として重要な地位を占めていることが分かった。

有殻アメーバによって保持されているシリカ量、並びに、年間バイオシリカ生産量の推定を行った。アカマツアベマキ林土壌で有殻アメーバの殻として保持されているバイオシリカは $0.45\text{--}1.57 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$ であり、一時的なシリカプールとして植物ケイ酸体の 100 から 1000 分の 1 と、高等植物に匹敵するような規模ではなかった。しかし、有殻アメーバは短いライフタイム、活発な増殖によって、年間に $10\text{--}227 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ものシリカを固定しており、高等植物が落葉落枝として土壌に供給するバイオシリカの量に匹敵していることが分かった。

有殻アメーバはシリカ消費者、供給者として高等植物に匹敵するほどの役割を持っており、とくに、短いライフサイクルと活発な増殖によって、短期的なシリカサイクルに貢献していると考えられる。

目 次

第 1 章 序論	1
1.1 有殻アメーバ	1
1.2 シリカサイクル.....	4
1.3 森林土壌の有殻アメーバの個体密度測定法	9
1.4 本研究の目的	11
第 2 章 材料と方法	13
2.1 土壌サンプル	13
2.2 バオシリカの分析	13
2.2.1 有殻アメーバ試料	13
2.2.2 鱗片試料	15
2.2.3 分析	15
2.3 SEM を利用した有殻アメーバ個体密度測定法	15
2.3.1 被検サンプル処理	15
2.3.2 個体密度測定	18
2.4 ケイ酸溶出実験	19
2.5 有殻アメーバが保持するシリカ量の推定	20
第 3 章 結果と考察	24
3.1 有殻アメーバの殻の組成	24
3.1.1 様々な有殻アメーバの殻の元素分布	24
3.1.2 異なった土壌環境の Euglyphidae の殻の組成	40
3.1.3 Euglyphidae のバイオシリカ	45
3.2 SEM を利用した個体密度測定法の開発	45

3.2.1 分散剤の効果	45
3.2.2 suspend-settle-decant procedure	49
3.2.3 SEMによる個体密度測定における適切な走査領域	49
3.2.4 測定精度	51
3.3 有殻アメーバのバイオシリカ量	53
3.4 ケイ酸溶出実験	53
3.5 アカマツアベマキ林土壌における有殻アメーバのバイオシリカ	58
3.6 年間シリカ生産量の推定	63
3.7 森林シリカサイクル	68
 第4章 結論	 70
謝辞	73
引用文献	74

第 1 章 序論

1.1 有殻アメーバ

有殻アメーバ (testate amoebae) は殻 (shell または test) を持つアメーバの総称で、幅の広い、葉状仮足を持つものと細長い、糸状仮足を持つものがある (図 1)。近年の分子系統解析の研究結果から前者が Amoebozoa に、後者が Rhizaria-Cercozoa に分類されている (Cavalier-Smith, 2003)。両者は異なった亜界に位置づけられる程進化的にかけ離れており、有殻アメーバは非単系統群として、系統学的に興味深い生物群のひとつとなっている。さらに、殻の形、大きさ、仮足開口部の位置や数など、殻の形態的特徴によって細かく分類され、これまでに 300 種以上の有殻アメーバが報告されている。有殻アメーバの殻はその材質によって大きく 3 つのグループに分けることができる。それは、殻の材料として自らシリカやカルサイトの小さなプレート、鱗片 (scale) をつくるグループ (idiosomes, 図 2a-c)、殻の材料を外界からまかなうグループ (xenosomes, 図 2d, f)、そして、それらを利用せずにキチン質で殻をつくるグループである (図 2e)。

有殻アメーバの生息域は川、池、湖、土壌、コケ、地衣類の表面など、主に淡水環境である。有殻アメーバの分布域は非常に広く、赤道から極域まで全世界に分布しており、普遍種がいることも知られている (Ogden & Hedley, 1980 ; Wanner, 1999)。その一方で、*Apodera (Nebela) vas* のように分布域が南半球、かつてのゴンドワナ大陸に限られる種の存在も知られており、近年の原生動物における生物地理学的仮説”everything is everywhere”の議論の中で、最も注目されている有殻アメーバのひとつとなっている (Finlay et al., 2004 ; Mitchell & Meisterfeld, 2005 ; Foissner, 2006 ; Smith & Wilkinson, 2007)。

土壌に生息する有殻アメーバは、その分布域の広さ、個体数の多さ、(e.g.

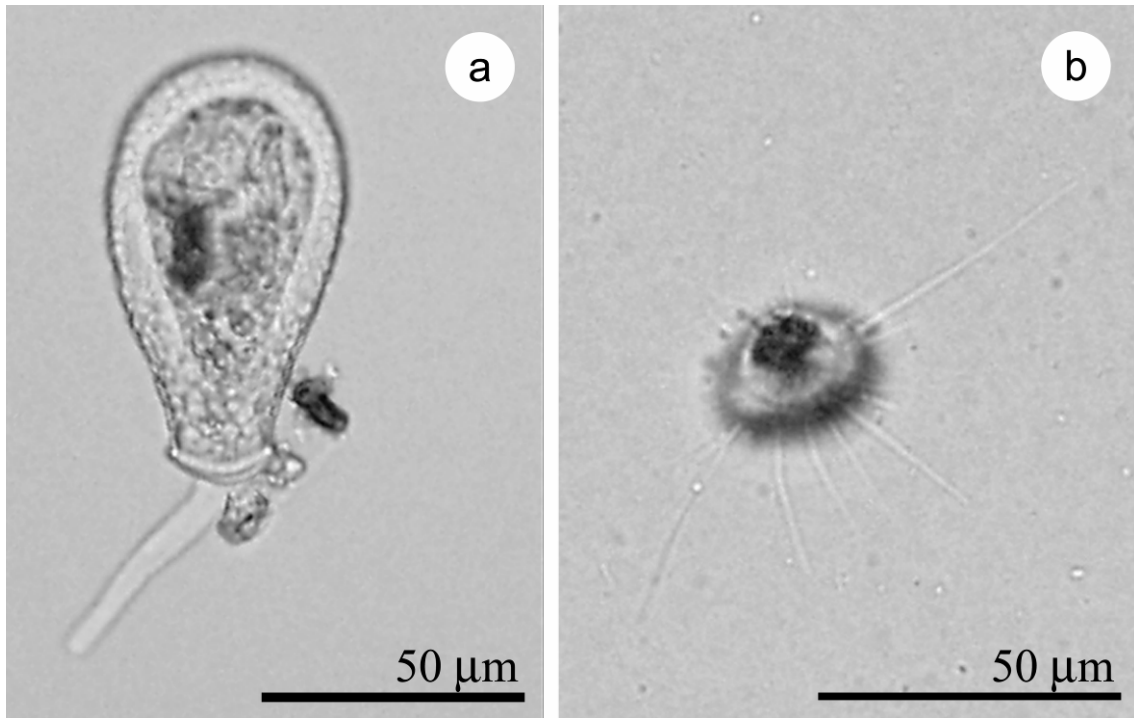


図 1 有殻アメーバの仮足.

(a) 葉状仮足, (b) 糸状仮足.

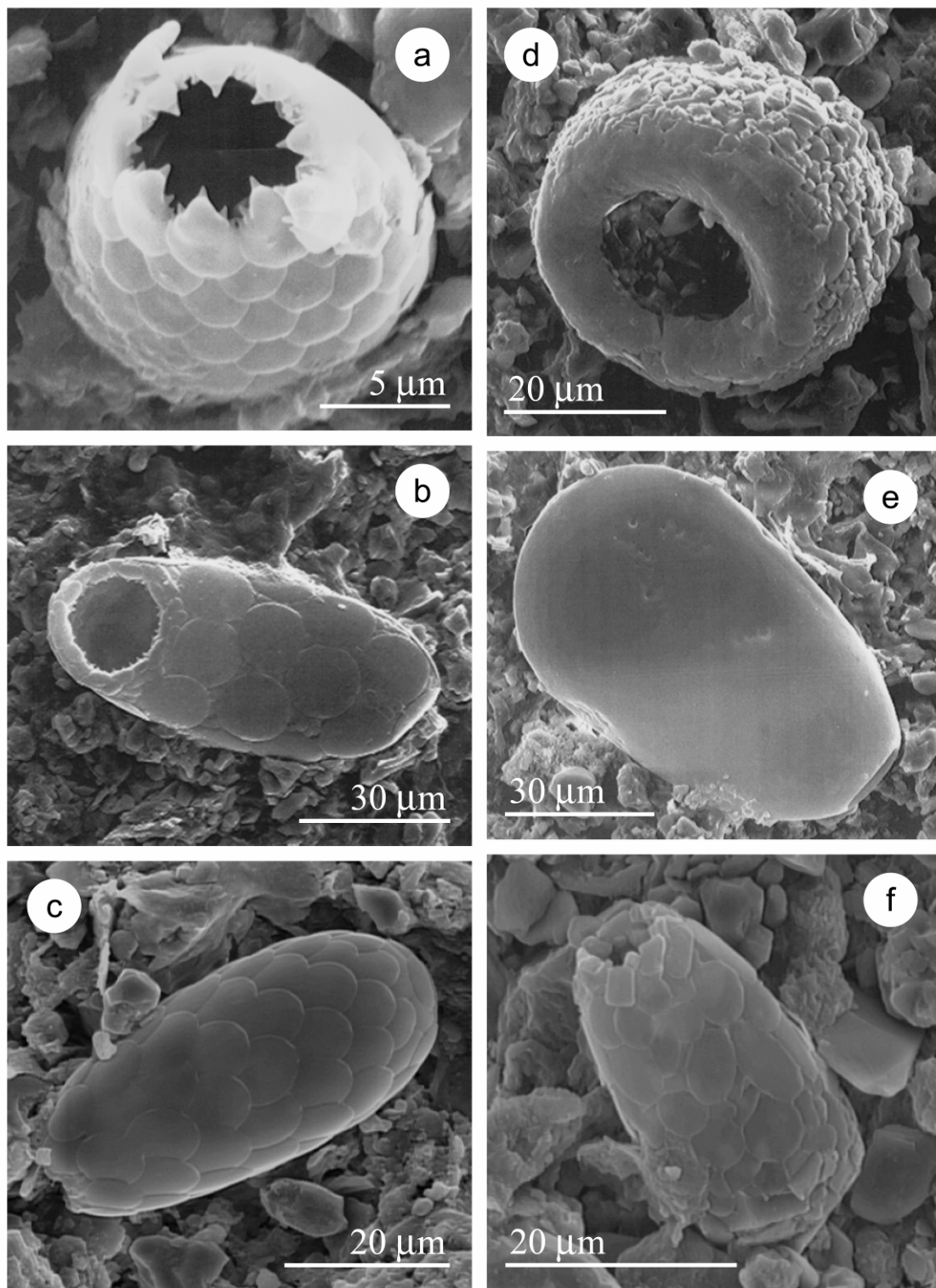


図2 有殻アメーバ.

(a) *Euglypha rotunda*, (b) *Trinema enchelys*, (c) *Tracheleuglypha acolla*,
 (d) *Phryganella acropodia*, (e) *Hyalosphenia subflava*, (f) *Schoenbornia humicola*.

Foissner, 1987, 1999)、そして、形態的特徴から容易に同定が行えることから、比較的良く研究されてきた。形態学的研究とともに生態学的研究も行われており、生物指標としての研究も盛んである。これまでに、腐植のタイプと有殻アメーバの生死率との間に (Schönborn, 1973 ; Foissner, 1987) 、また、サンプルの水分含量、もしくは、地下水面までの深さと個体数、群集構造との間に (Heal, 1964a ; Charman & Warner, 1992 ; Warner et al., 2007 ; Mitchell et al., 2008) 関係があることが明らかにされている。

しかしながら、有殻アメーバとシリカサイクルの関わりについて、定量的に取り扱った研究はこれまで行われてこなかった。有殻アメーバの中でも *Euglyphidae* と *Lesquereusiidae* がシリカの殻をつくることが知られており (図3)、とくに、*Euglyphidae* の *Euglypha* や *Trinema* は土壌中での個体数も多いことから、土壌シリカサイクルに何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

1.2 シリカサイクル

シリカの循環は陸上での岩石風化から始まる。岩石は温度変化や風雨による物理的風化作用によって粉々になり、細かい画分へと変化する。さらに、二酸化炭素の溶け込んだ雨によって、化学的風化作用を受け、ケイ酸、 Si(OH)_4 、を液相に供給する。溶け出したケイ酸は表面流や地下水として河川に供給され、海洋へと運ばれる。海洋に運ばれたケイ酸はケイ藻、ケイ質鞭毛藻、放散虫やカイメンなど、シリカ蓄積生物によって吸収され、バイオシリカ (オパール) として固定される。Tréguer (1995) によると、陸域から河川を通して外洋に供給されるケイ酸は $5.6 \text{ T mol Si yr}^{-1}$ であるのに対し、ケイ藻によって生産されるバイオシリカの量は $200\text{-}280 \text{ T mol Si yr}^{-1}$ である。外洋での循環されているシリカの量に対し、陸域から供給されるケイ酸はわずか 40-50 分の 1 程でしかない。しかしながら、近年の人間活動の影響によってこの供給量が減少し、ケイ藻に代って渦鞭毛藻が卓越することによって引き起こされる、有毒赤潮が海洋資源にダメージを与え、深刻な問題となっている (Egge & Aksnes, 1992 ; Ittekkot et

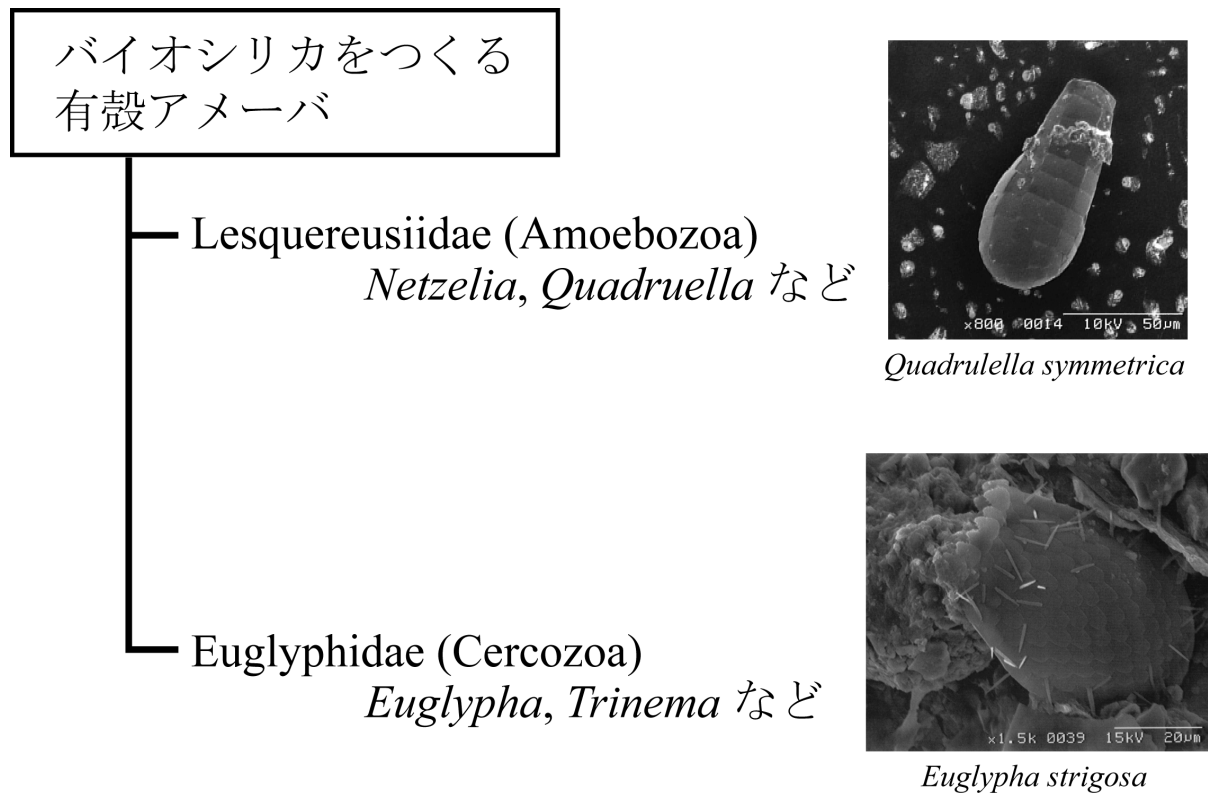


図3 バイオシリカをつくる有殻アメーバ.

al., 2000)。

土壌もまたケイ酸の重要な供給源のひとつである。土壌の中ではシリカは主に二酸化ケイ素、ケイ酸塩として存在しており、バルクとして 53-73 wt.% であると見積もられている (Bowen, 1966)。その中で、土壌溶液に含まれる可給態シリカ、ケイ酸として存在しているのはわずか 6-36 ppm (Epstein, 1994) で、この少ないケイ酸を利用して土壌のシリカ蓄積生物は生活している。

鉱物などから土壌溶液中に溶解出したケイ酸はシリカ蓄積性の微生物や高等植物によって吸収される一方で、一部が再び粘土鉱物として、もしくは、二次的に形成される石英として鉱物粒子表面に固定化される (Basile-Doelsch et al., 2005 ; Sommer et al., 2006)。

近年、高等植物によって毎年蓄積されるバイオシリカが $60-200 \text{ T mol Si yr}^{-1}$ で、海洋でケイ藻によって固定されるバイオシリカの量に匹敵していることが知られ、高等植物の役割に注目する研究が増えている (e.g. Conley, 2002 ; Farmer et al., 2005)。高等植物は根からケイ酸を吸収し、維管束や葉などで細胞壁、細胞の内腔、細胞間隙や表皮組織で植物ケイ酸体 (plant opal、もしくは、opal phytolith) を形成する。イネの研究から、この植物ケイ酸体の形成が生育と収量、酵素活性、表面構造、病虫害抵抗性、水分欠乏耐性、塩類過剰抵抗性、冷害抵抗性などにプラスに働くことが知られている (藤井, 2002)。また、トマトなどの非イネ科植物からもケイ酸による生長促進や病害抵抗性の向上などの効果があることが報告され、ケイ素が高等植物の有用元素であると認められるようになっている (Liang et al., 2007 ; 高橋, 1987, 2007 ; Takahashi et al., 1990)。

森林では高等植物の葉は落葉として土壌に返され、微生物や土壌動物の働きによって粉々にされる。落葉の分解とともに植物ケイ酸体は土壌中に放出され、土壌溶液に溶解出し、ケイ酸をシリカ蓄積生物に供給する。とくに、植物ケイ酸体は非晶質で、ケイ酸塩鉱物と比べ溶解し易く、重要なケイ酸供給源となっている。その一方で、高等植物は根から二酸化炭素を放出したり、有機酸

を分泌することによって、岩石の風化を促進するという一面も持っている。そのため、高等植物は陸域シリカサイクルにおいて非常に重要な地位を占めている (Derry et al., 2005 ; Blecker et al., 2006)。

土壌には多くの微生物が生息しており、これまでの研究から、土壌微生物がケイ酸塩鉱物の溶解、もしくは、風化作用の促進をしていることが知られている (Rogers et al., 1998 ; Bennett et al., 2001 ; Santelli et al., 2001 ; Burford et al., 2003)。その一方で、供給されたケイ酸を積極的に利用する土壌棲のシリカ蓄積微生物は土壌有殻アメーバ以外、ほとんど知られていない。まして、土壌棲のシリカ蓄積生物によって保持されているバイオシリカ量や、年間のバイオシリカ生産量など、定量的なデータは全くなかった (Clarke, 2003 ; Sommer et al., 2006)。しかしながら、土壌有殻アメーバは短いライフタイムと活発な増殖によって毎年大量のバイオシリカを生産していると期待される (図 4)。そのため、土壌有殻アメーバのバイオシリカ量を推定することは、陸域シリカサイクルだけに留まらず、全球的なシリカサイクルの解明においても重要なことである。

土壌有殻アメーバのバイオシリカ量を正確に推定するためには、有殻アメーバがつくるバイオシリカの化学組成を調べ、その中に含まれるシリカの量を調べる必要がある。これまで、X 線マイクロアナライザ (EPMA) によって、有殻アメーバの殻から Si の他に Ca, Al, K, Fe, P, S, Cl, Cu など、様々な元素が検出されることが知られている (Stout & Walker, 1976 ; Jeanson & Coûteaux, 1977 ; Coûteaux & Jeanson, 1977 ; Schönborn & Peschke, 1988, 1990 ; Yang et al., 2004)。これらの元素が有殻アメーバのバイオシリカに含まれているのか、殻をつなぎとめている膠着物質に含まれるのか、あるいは、コンタミネーションに含まれているものなのか突き止め、その上で、有殻アメーバのバイオシリカに含まれるシリカ量を算出する必要がある。

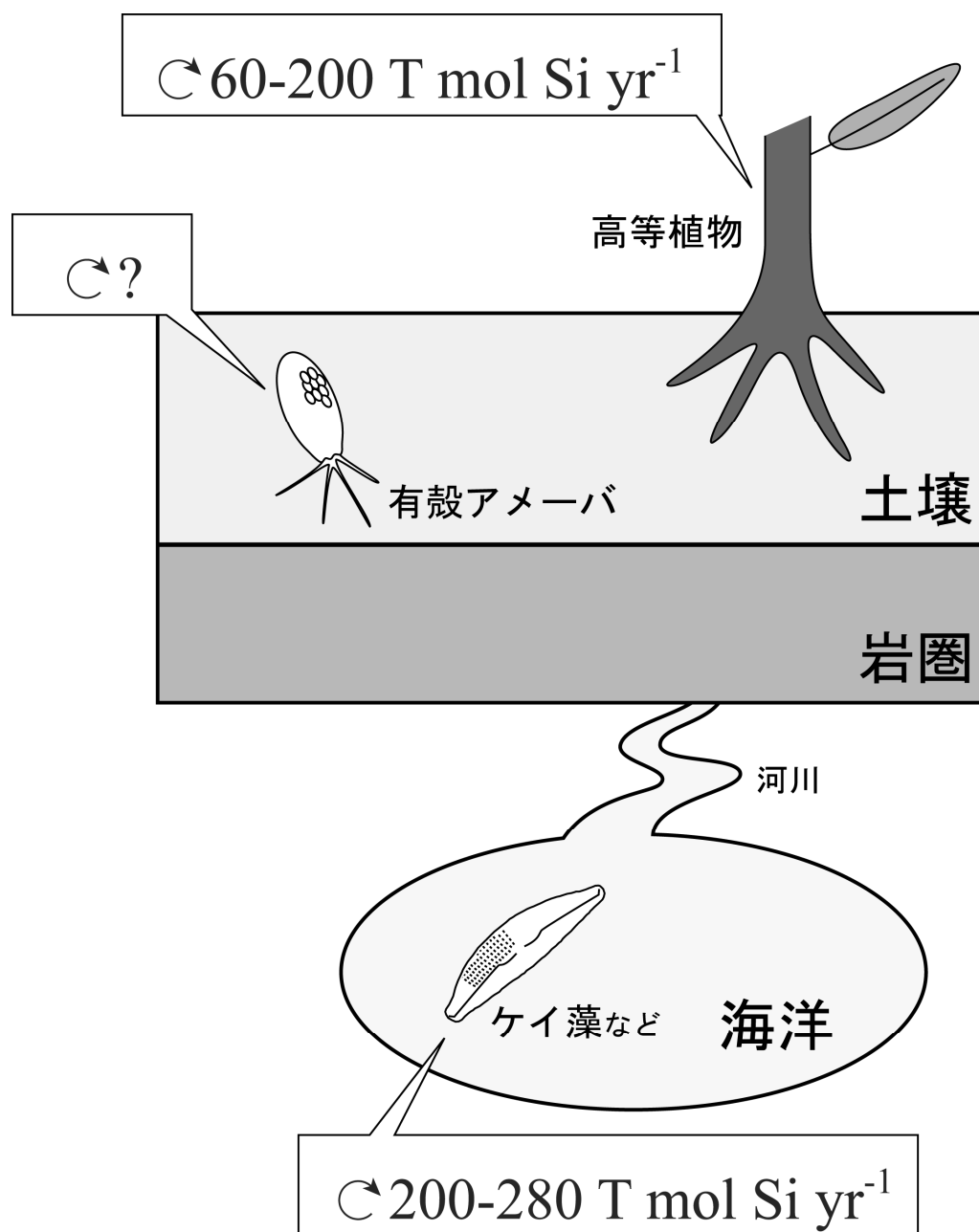


図4 陸域、海洋シリカサイクルのバイオシリカ循環量.

1.3 森林土壌の有殻アメーバ個体密度測定法

バイオシリカ量を推定する上で、土壌有殻アメーバの正確な個体密度を測定する必要がある。しかしながら、土壌は岩石が風化作用を受けて供給される無機物と、生物によって供給される有機物とが混ざり合っただけで複雑な系であり、構成する物質の質、大きさは様々である。そのため、その中の特定の生物を計数したり、抽出したりする際に、この土壌粒子の存在が大きな障害となる。

これまでに多くの研究者によって土壌有殻アメーバの個体密度測定法が考案されてきた。それは大きく分けると培養法 (Heal, 1964b) と直接計数法 (e.g. Coûteaux, 1967 ; Aesch & Foissner, 1996) であった (図 5)。培養法は夾雑する土壌粒子中の有殻アメーバを増殖させることによって計数を容易にする方法である。今までのところ、全ての有殻アメーバ種を同様に増殖させることのできる培地が開発されておらず、正しい個体密度を調べることができないという問題点を持っている。そのため、有殻アメーバ個体密度測定法として、直接計数法が主に利用されてきた (Foissner, 1987, 1999 ; Coûteaux & Darbyshire, 1998 ; Wanner, 1999)。

直接計数法において、有殻アメーバの計数には光学顕微鏡が使用されてきた。光学顕微鏡下では、夾雑する土壌粒子が目的とする有殻アメーバを遮ってしまうことが研究者たちを悩ませてきた。この問題に対し、一度に観察するサンプル量を少なくすることによって対処してきた。これによって、一度に観察できる有殻アメーバの数は減ってしまうが、土壌粒子による被覆を少なくすることができる。例えば、Coûteaux (1985) は最終的に約 1 mg の土壌サンプル中の有殻アメーバを、メンブレンフィルター法によってフィルター上に集め、計数を行った。しかしながら、サンプル量を少なくすると、元々生息密度の小さい有殻アメーバの個体密度を、過小評価、もしくは、過大評価する危険性がある (Foissner, 1987)。有殻アメーバの中でも殻長 10-30 μm の小さな種は、鉱物や腐植など土壌粒子によって容易に覆われ、観察、計数が困難である。とく

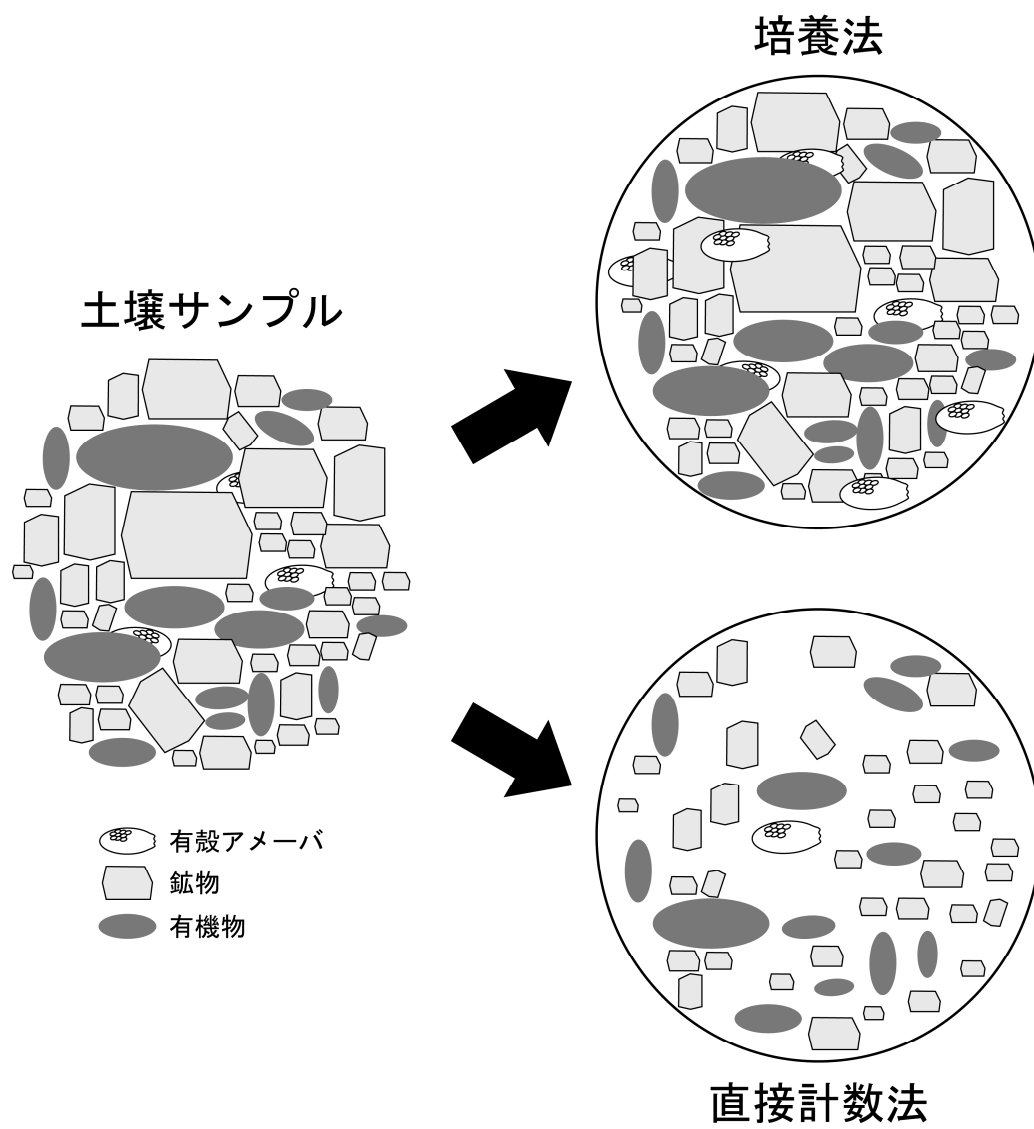


図5 培養法と直接計数法の模式図.

に、光学顕微鏡では細部の観察が困難であり、観察者の熟練度によって誤同定や数え落としが生じてしまう (Lousier & Parkinson, 1981a)。

このような問題の解決手段として、高倍率観察が可能な走査型電子顕微鏡 (SEM) の使用が挙げられる。SEM を利用することによって、有殻アメーバの殻の観察が容易になり、誤同定が少なくなり、正確な個体密度測定を行うことができるようになると考えられる。

1.4 本研究の目的

この研究の目的は、これまでほとんど評価されてこなかった森林シリカサイクルにおける有殻アメーバの役割を定量的に評価することである (図 6)。

そのためにまず、有殻アメーバ、とくに *Euglyphidae* の殻、そして、純粋な鱗片の殻の化学組成を EPMA で分析し、有殻アメーバのバイオシリカに含まれる元素を特定し、シリカ含量を算出した。

さらに、土壌有殻アメーバの正確な個体密度データからバイオシリカ量を推定するため、容易に高倍率、高分解能像での観察が可能な SEM を利用した個体密度測定法の吟味を行った。Coûteaux (1967, 1975) のメンブレンフィルター法に分散剤と suspend-settle-decant procedure を導入することによって、より多くの有殻アメーバを 1 度に観察することができ、高精度での測定が行えるよう、被検サンプル調整、並びに、SEM 下での測定法の吟味を行った。

有殻アメーバを含む土壌微生物が、土壌からのケイ酸溶出にどのような影響を及ぼすのか、また、そのうち有殻アメーバの寄与率はどれだけなのか確かめるために、ケイ酸溶出実験を行った。さらに、森林土壌の有殻アメーバによって保持されているシリカ量、並びに、年間バイオシリカ生産量の推定を行った。

以上の実験結果に基づき、森林シリカサイクルにおける有殻アメーバの役割について議論した。

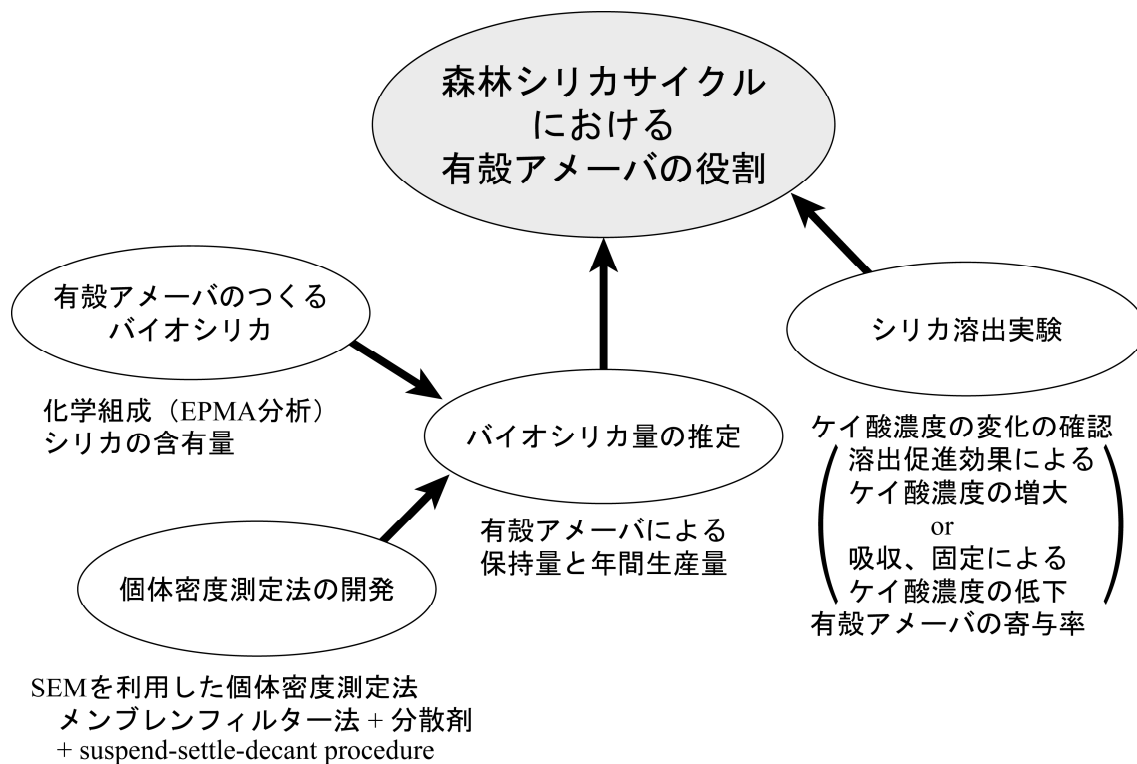


図 6 本研究の実験の流れとその意義.

第 2 章 材料と方法

2.1 土壌サンプル

個体密度測定法の開発、ケイ酸溶出実験のためにアカマツ・アベマキ林土壌を、また、有殻アメーバの殻の組成を調べるためにマツ林土壌、広葉樹林土壌、ユリノキ腐植を採取した。アカマツ・アベマキ林土壌はわが国の林野土壌の分類における褐色森林土で (Ohta & Kumada, 1976)、名古屋大学キャンパス内で採取した。植生としてはアカマツ、アベマキの他、コナラ、ソヨゴ、ヒサカキが見られた。母岩は第四紀の八事・唐山層(砂礫層)であった。マツ林土壌は褐色森林土で、愛知県豊田市深見町向イ田で採取した。植生はマツの他、コナラ、アラカシ、ネズ、ヒサカキが見られた。母岩は第三紀鮮新世の矢田川累層(砂礫層)であった。広葉樹林土壌は褐色森林土で、長野県下伊那郡大鹿村大字大河原、中央構造線安康露頭付近の広葉樹林で採取した。高木層をミズナラ、トチノキが優占しており、その他、フサザクラ、アカシデが見られた。母岩は三波川変成帯の緑色片岩であった。ユリノキ腐植サンプルは、名古屋大学情報文化学部棟屋上に形成されたユリノキの腐植層から採取した。ユリノキ以外の落葉は見られなかったが、腐植サンプルにはバーミキュライトの混入が見られた。

各土壌は、リター層を取り除いた後、腐植、または、A 層より採取した。少なくとも森林内の 6 地点で採取し、ひとつのポリエチレン袋に入れて一様になるようかき混ぜ、以下の実験に供試した。

2.2 バイオシリカの分析

2.2.1 有殻アメーバ試料

日本の有殻アメーバの殻の化学組成とその元素の分布を調べるため、名古屋

屋大学博物館野外観察園内の池の水から *Arcella* sp., *Centropyxis* sp., *Diffflugia acuminata*, *D. minutissima*, *D. oviformis*, *Euglypha acanthophora* を、名古屋大学キャンパス内のアカマツ－アベマキ林から *Assulina muscorum*, *Centropyxis aerophyla*, *Corythion dubium*, *E. compressa*, *E. rotunda*, *Nebela collaris*, *Trinema complanatum*, *T. lineare* を採取した。

シリカの殻をつくる有殻アメーバの中でも、*Euglyphidae* の殻の化学組成が土壌環境の影響を受けて変化するのか調べるため、マツ林土壌、広葉樹林土壌、および、ユリノキ腐植から *Euglyphidae* を採取した。各土壌サンプルから、既に死んで細胞質を含まない *Euglyphidae* の殻を光学顕微鏡下で選別し、採取した。

天然の *Euglyphidae* の殻の組成と比較するため、*E. rotunda* と *T. enchelys* の培養を行った。両種はアベマキの葉と褐色腐朽菌によって分解を受けた木片との混合物を培養したものから分離した。培地としてモミガラ抽出液の 3% 寒天培地の上に蒸留脱イオン水で水層を形成したものをを用いた。モミガラ抽出液は 0.5g のモミガラ粉末 (< 63 μm) を 100ml の蒸留脱イオン水で煮出したものをメンブレンフィルタ (孔径 0.45 μm) でろ過し、使用した。培養は 25°C、暗所で行い、1 ヶ月後、死んで殻だけになったものを選別して EPMA 分析に供試した。

得られた有殻アメーバの殻は 1% ピロリン酸ナトリウムで洗浄後、蒸留脱イオン水で 5 回以上洗浄して EPMA 分析に供試した。

有殻アメーバの同定には Chardez (1969), Clarke (2003), Decloître (1962, 1976, 1978, 1979a, 1979b, 1981, 1982), Deflandre (1929), Foissner (1987), Hedley & Ogden (1974), Meisterfeld (2002a, b), Ogden (1983), Ogden & Hedley (1980), Rauenbusch (1987), Schönborn et al. (1987), Thomas (1958) を参考にした。

2.2.2 鱗片試料

鱗片に含まれる元素を調べるため、天然の有殻アメーバ、および、培養した *E. rotunda* と *T. enchelys* の殻を、90℃の湯浴中で 3-6 時間 H_2O_2 処理し、細胞や膠着物などの有機物を分解した（図 7）。 H_2O_2 処理後、少なくとも 7 回蒸留脱イオン水で洗浄し、純粋な鱗片試料を得た。得られた鱗片試料は EPMA 分析に供試した。また、*E. rotunda* の鱗片を X 線回折（XRD）分析した。モミガラ培地による培養によって得られた、大量の *E. rotunda* の殻を H_2O_2 処理することによって、分析に足る、十分な量の鱗片試料を手に入れることができた。

2.2.3 分析

有殻アメーバ試料、および、鱗片試料の化学組成の定性分析を、X 線マイクロアナライザ（HITACHI, X-560S）を使用して行った。また、有殻アメーバ試料、鱗片試料をのせる試料台としてカーボンを使用した。XRD 分析は X 線回折装置（JEOL, DX-GE-F）、Cu-K α 線で行った。

2.3 SEM を利用した有殻アメーバ個体密度測定法

2.3.1 被検サンプル処理

測定に使用した土壌サンプルはアカマツアベマキ林より採取した。サンプリングは 2000 年 11 月から 2001 年 4 月の間に 5 回行った。

被検サンプルの調整はメンブレンフィルター法（Coûteaux, 1967, 1975）を基に、SEM 観察用に改良を加えた（図 8）。100 ml ビーカーに土壌サンプル 250 mg wet wt.（水分含量：約 20%）を 80 ml の分散剤に懸濁し、マグネティックスターラで 90 分間攪拌した（600 rpm）。分散剤は最終濃度 2 mM ピロリン酸ナトリウムを含むリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）を使用した。また、土壌を分散剤に懸濁した際の最終 pH は 6.8 であった。土壌懸濁液は 100 ml の遠沈管に移し、粘土粒子や細菌細胞などの微粒子を取り除くため、遠心分離した（175 \times g, 20 分間）。この遠心分離によって、微粒子による有殻アメーバの埋

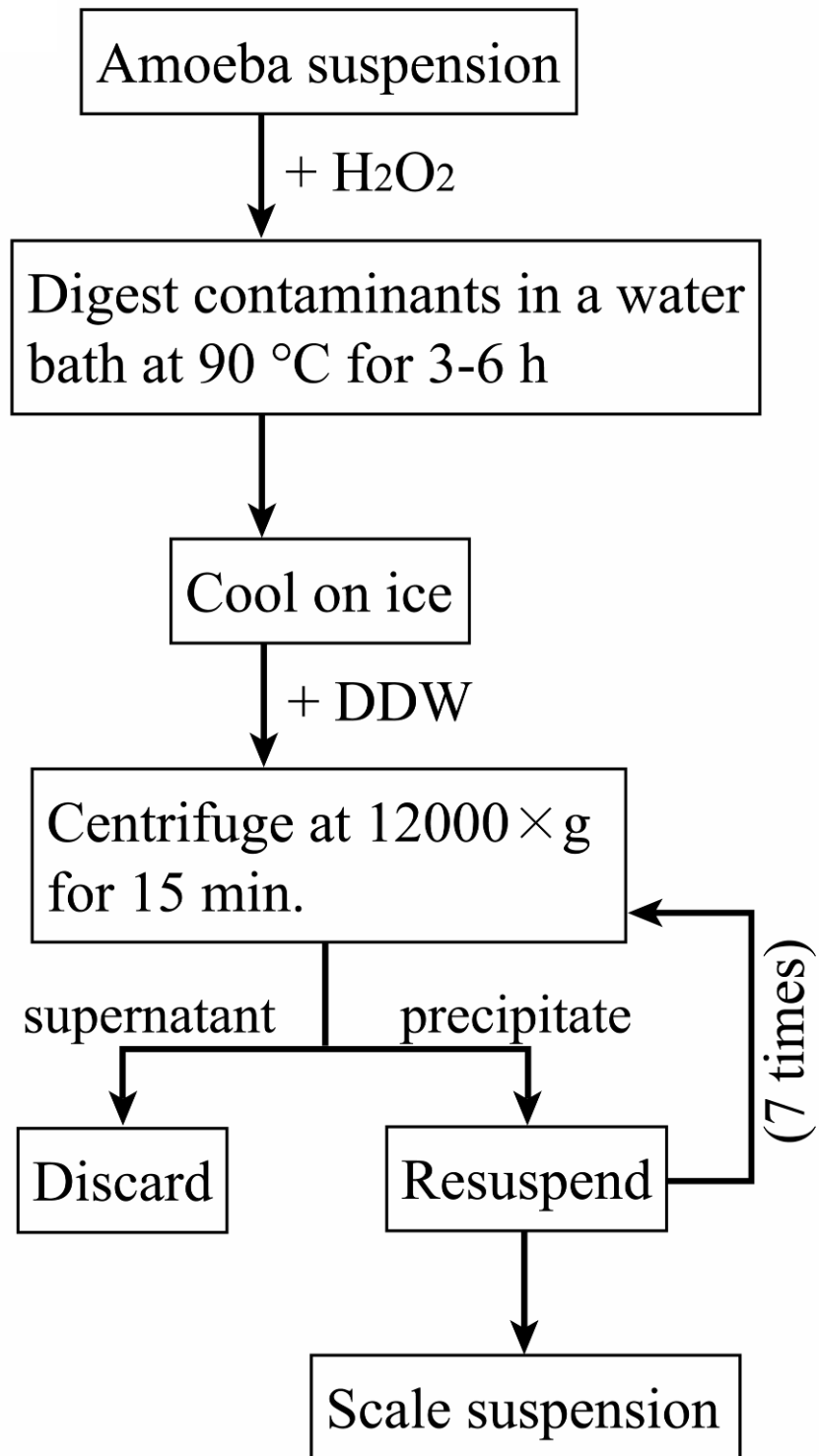
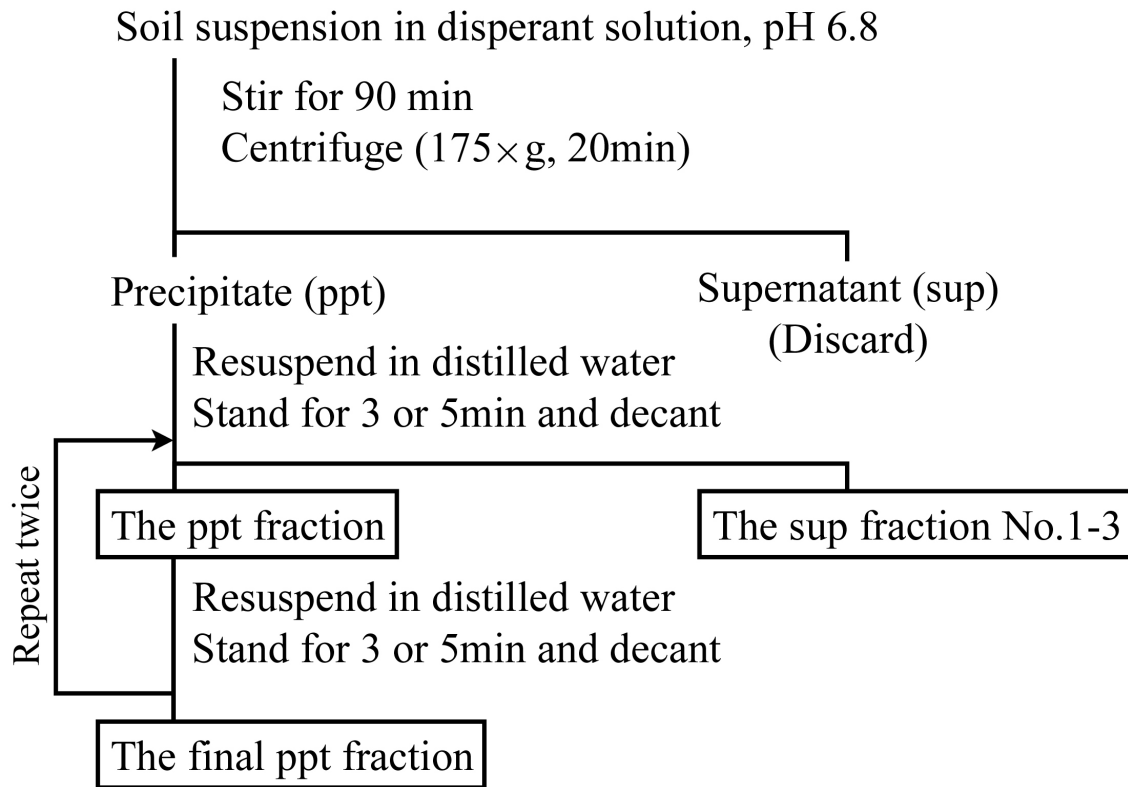


図7 鱗片の H_2O_2 処理.



☒ 8 suspend-settle-decant procedure.

没やメンブレンフィルターの目詰まりを大きく軽減することができた。そして、残った沈殿を 10 ml 試験管に移し、10 ml 蒸留脱イオン水で再懸濁し、3 分、もしくは、5 分静置した後にデカントして上清フラクション (sup fraction No.1) と沈殿 (ppt fraction) に分離した (図 8)。沈殿は再懸濁後、3 分、もしくは、5 分静置し、再びデカントした (suspend-settle-decant procedure)。この操作を 2 度繰り返し sup fraction No.2、No.3、および、final ppt fraction を得た。sup fraction No.1 の波長 660 nm での吸光度 (OD_{660}) が 0.1-0.2 になるように希釈率を決定し、sup fractions No.1-3、および、final ppt fraction を同一の希釈率 ($V_{\text{final}} / V_{\text{sample}}$) でそれぞれ希釈し、そのうちの 10 ml を各々メンブレンフィルター (ADVANTEC, ϕ 25 mm, 孔径 : 0.2 μm , 有効面積 : 296 mm^2) で濾過し、個体密度測定に供試した。この希釈率で希釈した際、微粒子および粗大な粒子によって有殻アメーバが覆われてしまうことはなかった。

2.3.2 個体密度測定

有殻アメーバの観察、および、計数は走査型電子顕微鏡 (HITACHI, S-2300) で加速電圧 10 kV の条件下で行った。

有殻アメーバの計数はそれぞれ 600 倍、800 倍で、ランダムに選んだ 10 区画 (1 区画 : 2 mm \times 2 mm, 合計走査領域 : 40 mm^2)、20 区画 (1 区画 : 1 mm \times 1 mm, 合計走査領域 : 20 mm^2) の走査領域内に現れた有殻アメーバの個体数を測定した。測定した個体数から有殻アメーバの個体密度 [g^{-1} dry soil]を以下のように算出した。

$$(\text{個体密度}) = \frac{N_{\text{total}} \times A_t \times d}{W_{\text{soil}} \times f \times A_{\text{field}}} \quad (1)$$

N_{total} : 有殻アメーバの総個体数 [ind.]

A_t : メンブレンフィルターの有効面積 [mm^2]

d : 懸濁液の希釈倍率

W_{soil} : 土壌サンプルの乾燥重量 [g]

f : 走査領域の数

A_{field} : 1 走査領域の面積 [mm^2]

そして、有殻アメーバの個体密度は 5 フィルターの平均値として表した。

また、各フラクション中に含まれる有殻アメーバの存在量を回収率として以下のように定義した。

$$(\text{回収率}) = \frac{N_x}{N_{\text{total}}} \times 100 (\%) \quad (2)$$

N_x : sup fraction No.x に含まれる有殻アメーバの個体数

先行研究の土壌有殻アメーバ密度データの測定精度は、標準偏差、標準誤差、95%信頼区間など表示が統一されていない。そのため、比較のために相対標準偏差 (RSD) を計算しなおした。

また、得られたアカマツアベマキ林土壌の有殻アメーバ個体密度データは後の有殻アメーバのバイオシリカ量推定にも使用した (3.5 参照)。

2.4 ケイ酸溶出実験

土壌からのケイ酸溶出に対する微生物の影響を調べるために培養実験を行った。土壌サンプルはアカマツアベマキ林土壌を使用した。土壌サンプルは一度、開口径 2mm のふるいにかけて、一部を微生物非存在下でのシリカ溶出量を調べるため、オートクレーブで滅菌処理して滅菌土壌とし、一部をそのまま何も処理もせず未滅菌土壌として実験に供試した。滅菌処理はオートクレーブで 1 度、121℃、20 分間の処理を行ってから 24 時間後に再び同処理を行うこ

とによって実施した。

ケイ酸溶出実験の概要を図 9 に示す。50 ml ポリプロピレンボトルに未滅菌土壌 6.3 g、または、滅菌土壌 6.1 g（未滅菌土壌、滅菌土壌ともに炉乾土 5g に相当）を分取し、蒸留脱イオン水 30 ml を加え、懸濁し、10℃、20℃、30℃ で静置培養した。各温度条件で 18 ボトルずつ、各土壌で計 57 ボトルずつ準備した。培養後 0 日目、1 日目、3 日目、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に各 3 ボトルのシリカ濃度を測定した。測定後、ボトルは破棄した。シリカ濃度測定の前に 200 rpm、30 分間、往復振盪した（Taitec, Recipro shaker SR-2s）。20 分間静置後、上清 1 ml を採取し、遠心分離し（12000 ×g、15 分間）、粘土などの微細な粒子を取り除いた。こうして得られた上清をケイ酸分析に供試した。

ケイ酸分析は、住田（1997）のモリブデンブルー法に従い、分光光度法で行った（HITACHI, U-1100）。培養 0 日目のケイ酸濃度は土壌の水分含量などによって影響を受けるため、ケイ酸溶出量は培養 1 日目の値をゼロとして表した。

有殻アメーバの殻によって保持されているバイオシリカの量を測るため、培養 0 日目、14 日目、28 日目のボトル内の有殻アメーバ個体密度を SEM によって測定した。

2.5 有殻アメーバが保持するシリカ量の推定

有殻アメーバの森林シリカサイクルへの寄与を調べるため、有殻アメーバの殻のバイオシリカ量を算出した。有殻アメーバのバイオシリカ BSi [pg]は以下のように表される。

$$BSi = V_{\text{test}} \times C_{\text{Si}} \quad (3)$$

V_{test} ：有殻アメーバの殻の体積 [μm^3]

C_{Si} ：有殻アメーバの殻の単位体積当たりのシリカ量 [$\text{pg SiO}_2 \mu\text{m}^{-3}$]

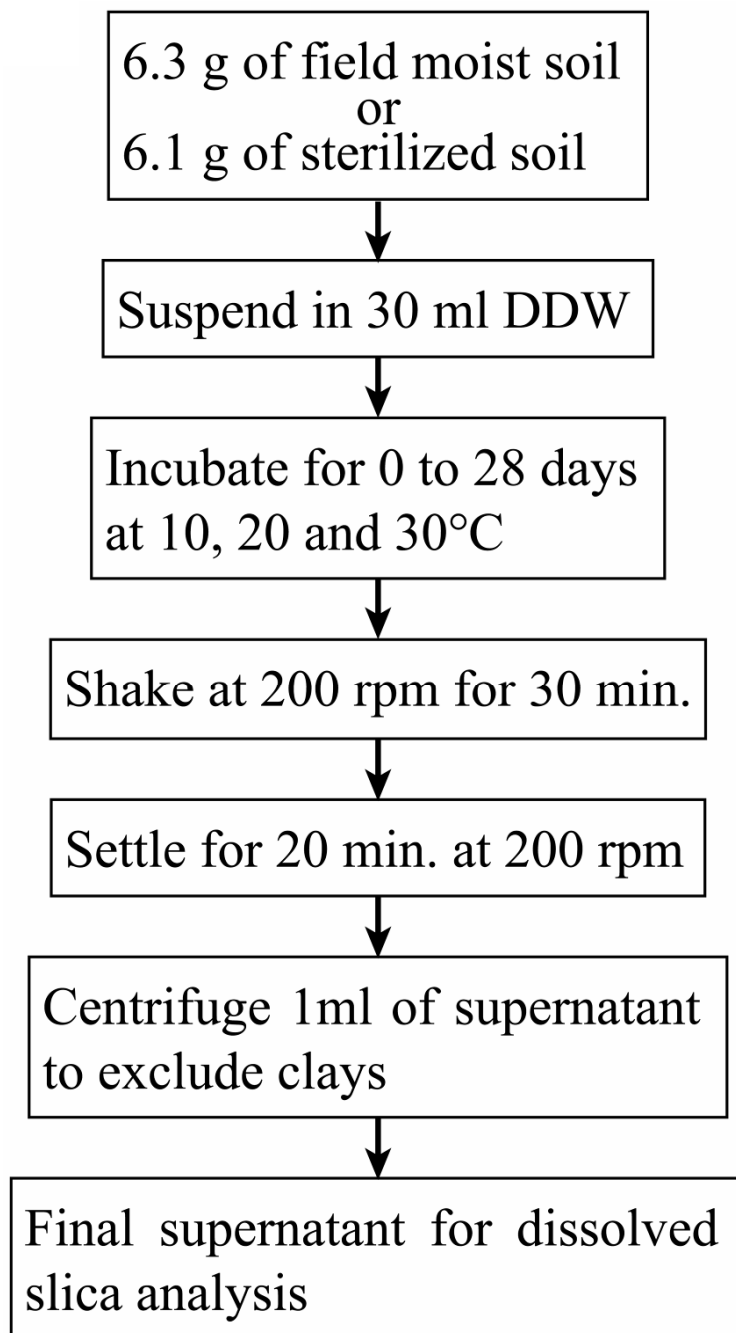


図9 ケイ酸溶出実験とケイ酸分析のサンプル処理法.

有殻アメーバの殻の体積を算出するためには、殻の厚さ t [μm] を測る必要がある。しかし、有殻アメーバの殻は非常に薄く、厚さの測定が困難であるため、以下のように表面積 S_{test} [μm^2] を元にバイオシリカを算出した。

$$BSi = S_{\text{test}} \times t \times C_{Si} = S_{\text{test}} \times \alpha \quad (4)$$

α : 有殻アメーバの殻の単位表面積あたりのシリカ量 [$\text{pg SiO}_2 \mu\text{m}^{-2}$]

α 値の測定は図 10 の方法に従い、任意の鱗片を含む鱗片溶液を 1N NaOH で処理して得られた鱗片溶解液のケイ酸濃度を測定し、鱗片 1 枚当たりのバイオシリカ量を算出した。 α 値の測定には大量の殻が必要であり、本研究では、大量に培養することができた *E. rotunda* の α 値を利用してバイオシリカ量を算出した。

13 種の有殻アメーバの殻の大きさを SEM 下で測定し、表面積を求め、有殻アメーバが保持しているバイオシリカ量を算出した。各有殻アメーバの殻の表面積は 30 個体の平均値として表した。

土壌有殻アメーバによって保持されている総バイオシリカ量 [$\text{pg SiO}_2 \text{m}^{-2}$] は各有殻アメーバ種の個体密度から以下のように求めた。

$$(\text{総バイオシリカ}) = \sum BSi_j \times D_j \quad (5)$$

BSi_j : 有殻アメーバ種 j の殻に含まれるバイオシリカ量 [pg SiO_2]

D_j : 有殻アメーバ種 j の個体密度 [ind. m^{-2}]

アカマツアベマキ林土壌の有殻アメーバ個体密度データをもとに有殻アメーバによって保持されているバイオシリカ量の推定を行った。

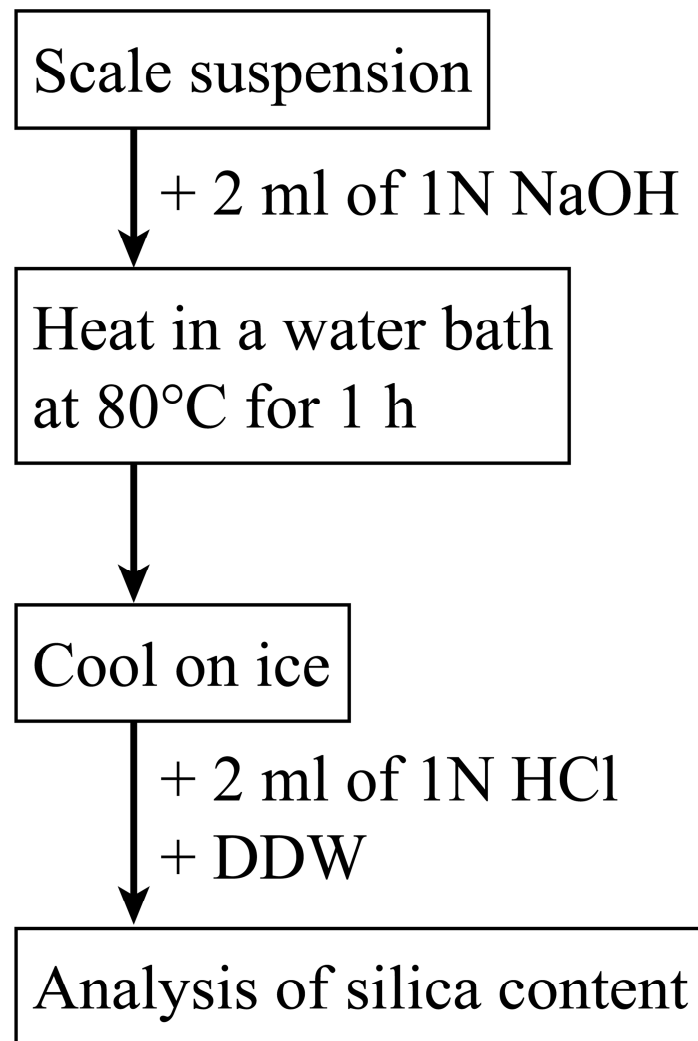


図 10 鱗片の溶解法.

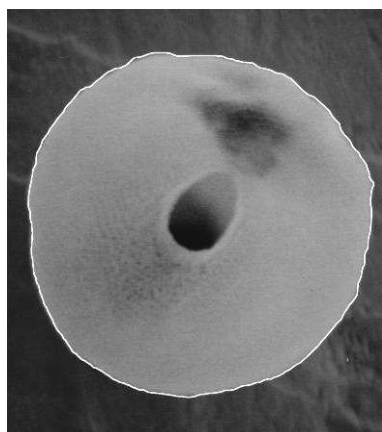
第 3 章 結果と考察

3.1 有殻アメーバの殻の組成

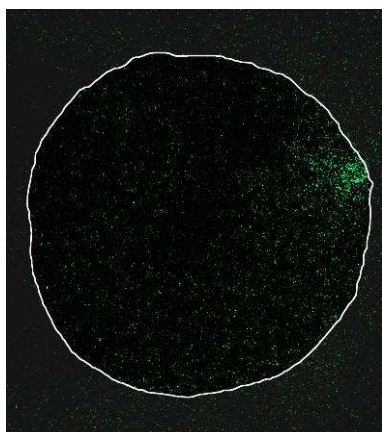
3.1.1 様々な有殻アメーバの殻の元素分布

EPMA による面分析の結果を図 11 に示す。*Arcella* sp.の殻はキチン質からできており、Si の量が少なく、それに対し、Fe、Ca、K が比較的多く検出された。(図 11-1)。一方、その他の有殻アメーバの殻からは多量の Si が確認され、その他には Ca, Al, Fe, K が比較的良好に検出された。また、微量ながら P, S, Cl, Na, Mg, Mn, Ti なども検出された。これらの結果は、先行研究とよく一致している (Stout & Walker, 1976; Jeanson & Coûteaux, 1977; Coûteaux & Jeanson, 1977; Rauenbusch, 1987; Schönborn & Peschke, 1988, 1990)。しかし、今回、先行研究で検出された Cu や Ni はどの有殻アメーバの殻からも検出されなかった。そのため、これらの元素は生息環境を反映している可能性がある。

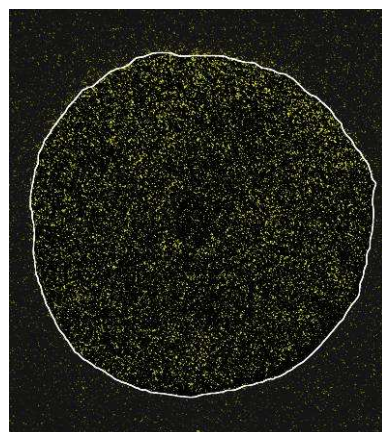
外界の物質で殻をつくる有殻アメーバのうち、*C. aerophyla*, *Centropyxis* sp., *D. acuminata* の殻に含まれる各元素の分布は一樣ではなく、殻の素材となった鉱物やケイソウなどのパターンと元素分布が一致していた (図 11-3,-4, -6)。それに対し、同じタイプの殻を持つ *D. minutissima*, *D. oviformis*, *N. collaris* の元素分布は一樣であった (図 11-7,-8,-12)。*N. collaris* は Euglyphidae を捕食し、その鱗片を殻の素材とするため、このような分布パターンを示したと考えられる。自ら鱗片を分泌し、殻の素材として利用する *Assulina muscorum*, *C. dubium*, *E. acanthophora*, *E. compressa*, *E. rotunda*, *T. complanatum*, *T. lineare* の元素分布は一樣であった (図 11-2,-5,-9,-10,-11,-13,-14)。



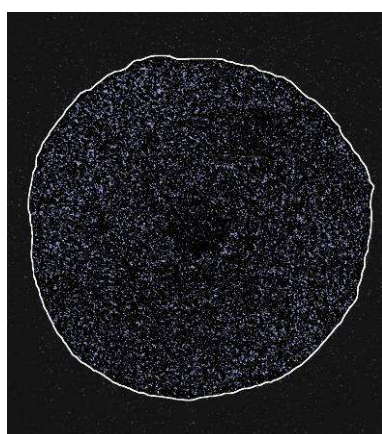
2 次電子線像



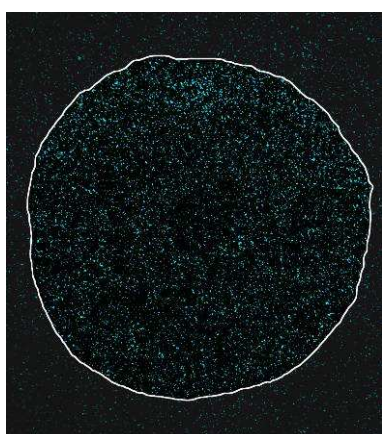
Si



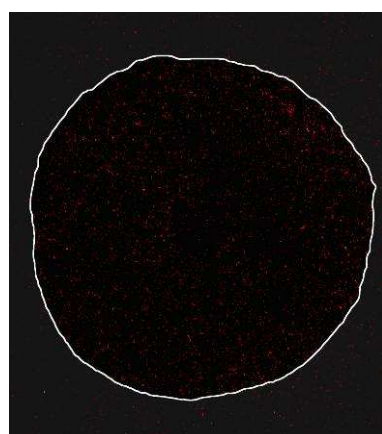
Ca



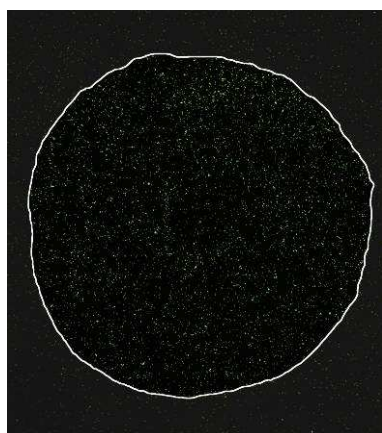
Fe



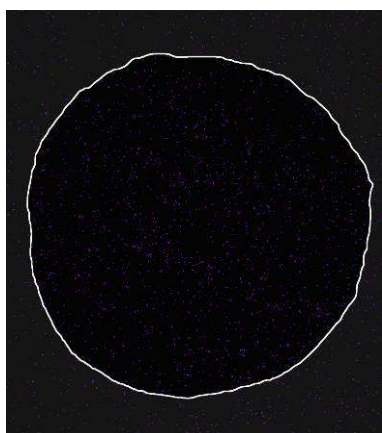
K



Na

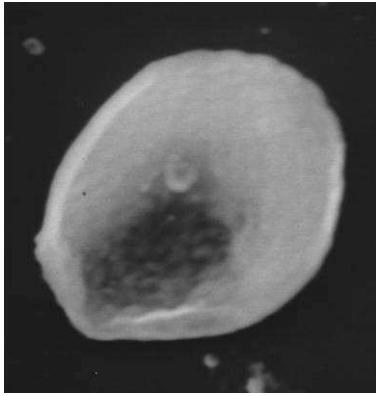


Cl

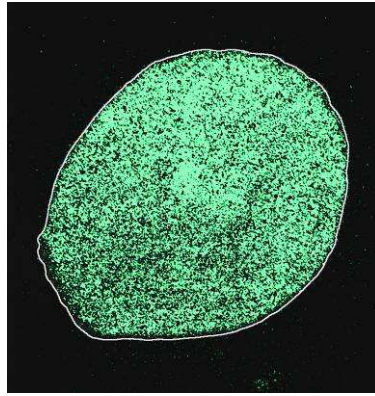


Mn

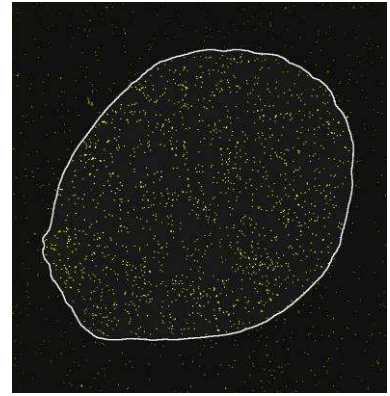
図 11-1 *Arcella* sp. の元素分布.



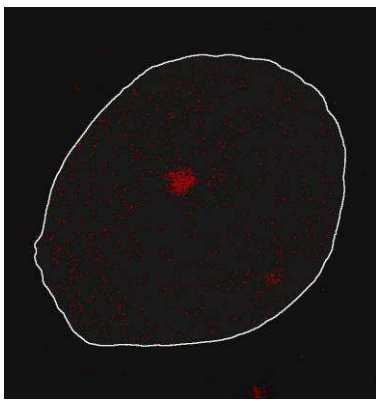
2 次電子線像



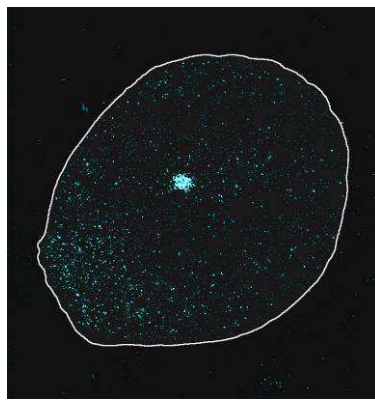
Si



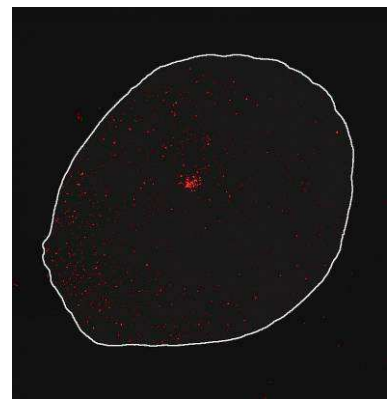
Ca



Al



K

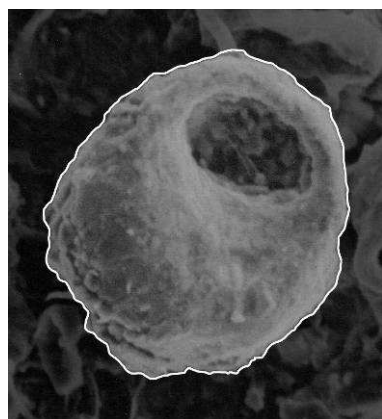


Na

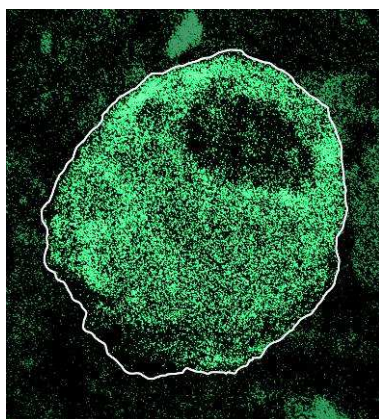


P

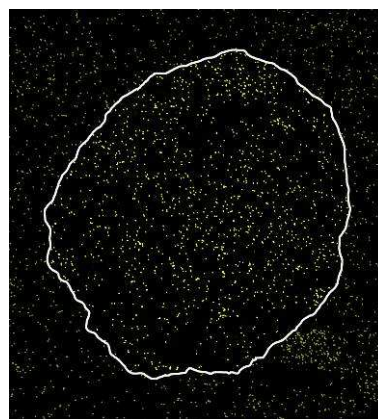
図 11-2 *Assulina muscorum* 元素分布.



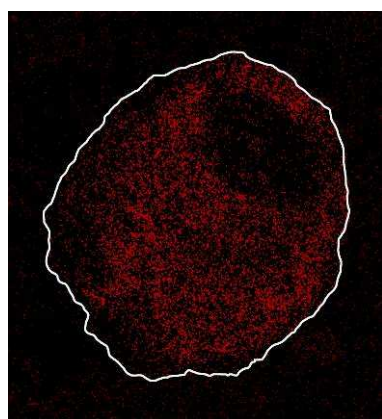
2 次電子線像



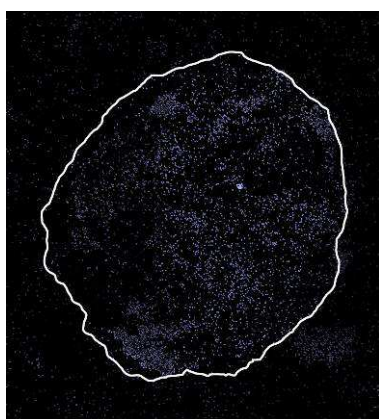
Si



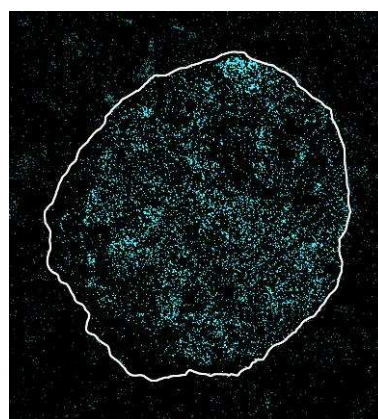
Ca



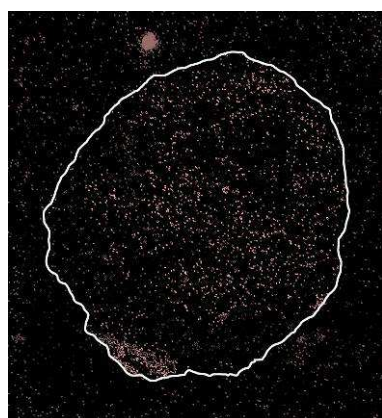
Al



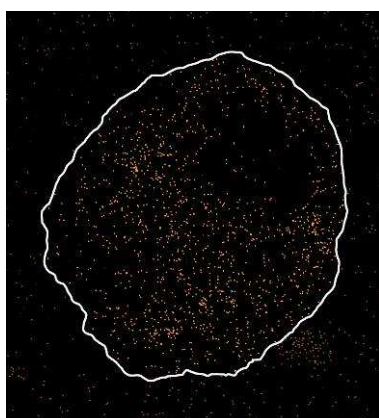
Fe



K

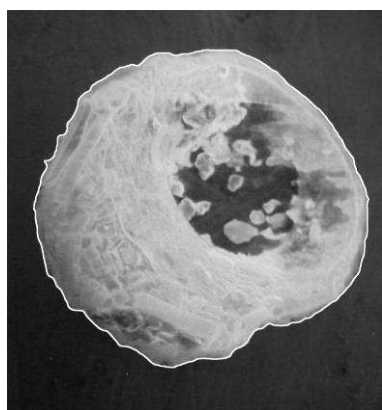


Ti

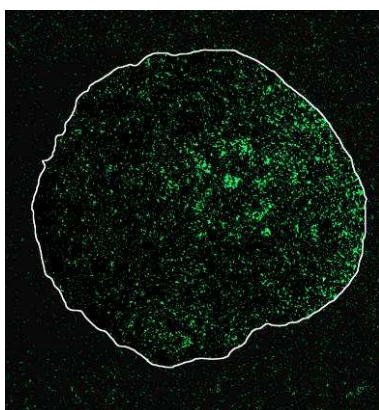


Mg

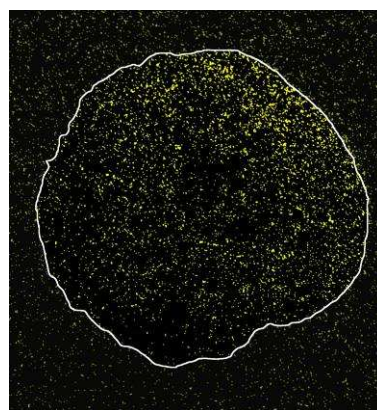
図 11-3 *Centropyxis aerophyla* の元素分布.



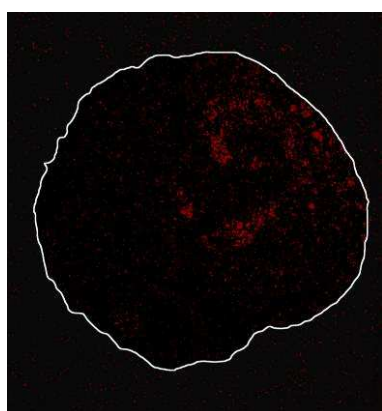
2 次電子線像



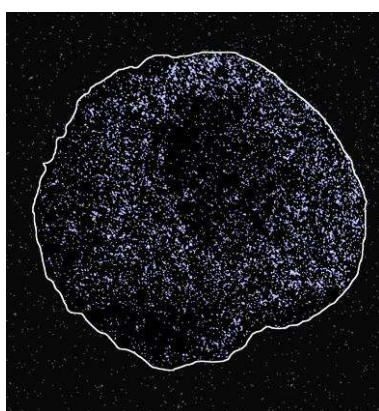
Si



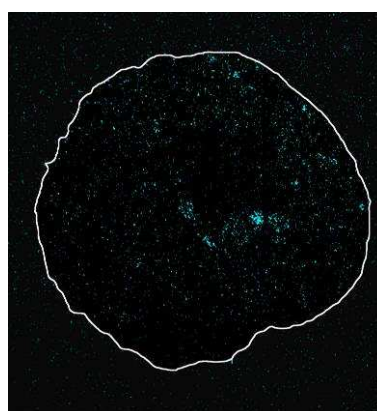
Ca



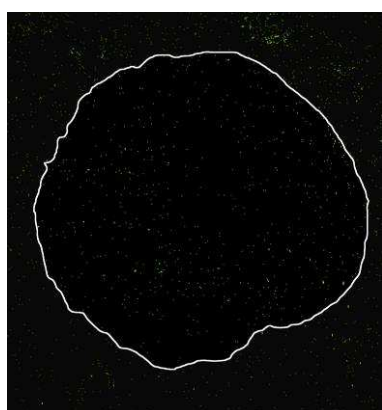
Al



Fe



K

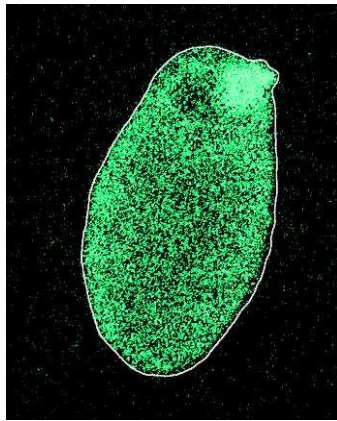


Cl

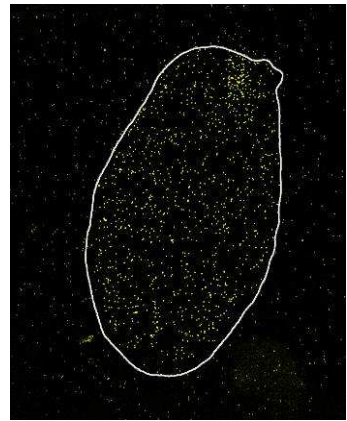
図 11-4 *Centropyxis* sp. の元素分布



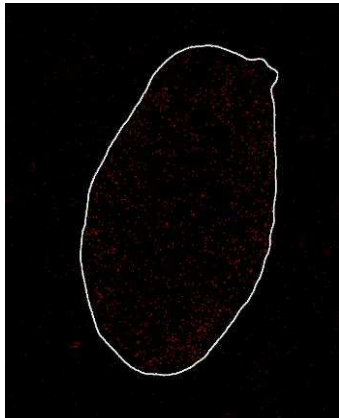
2 次電子線像



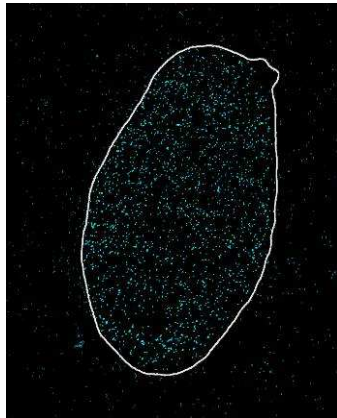
Si



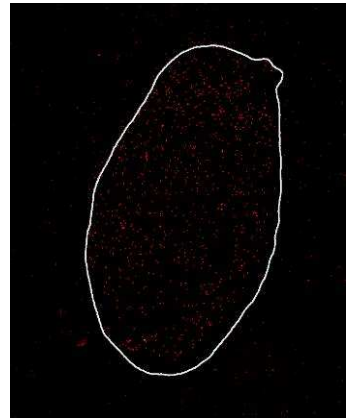
Ca



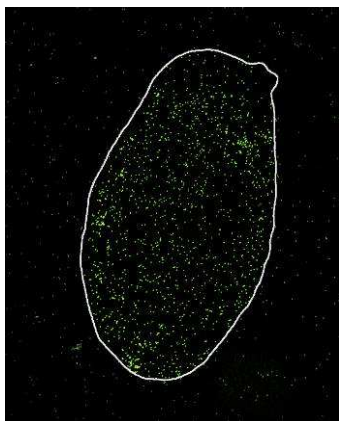
Al



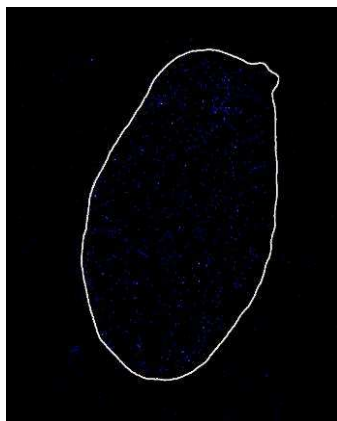
K



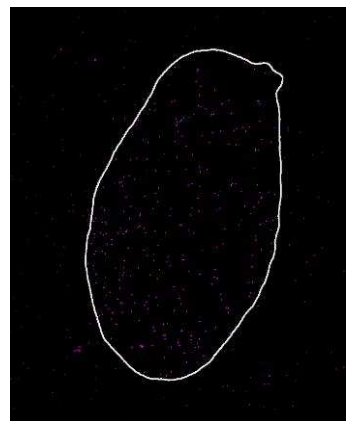
Na



Cl

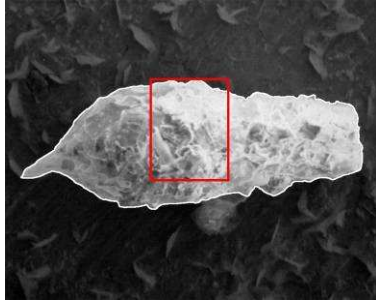


P

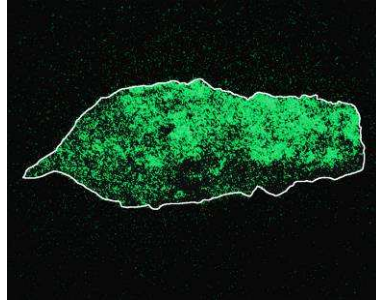


S

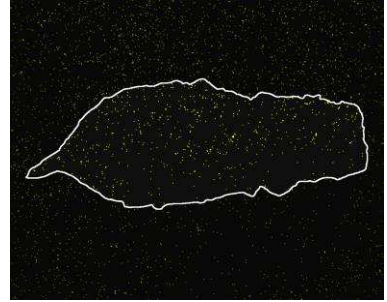
図 11-5 *Corythion dubium* の元素分布.



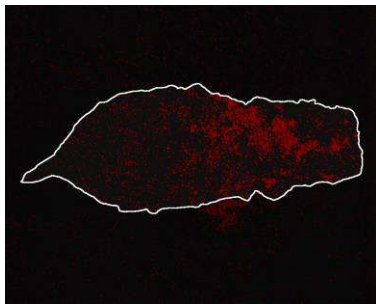
2 次電子線像



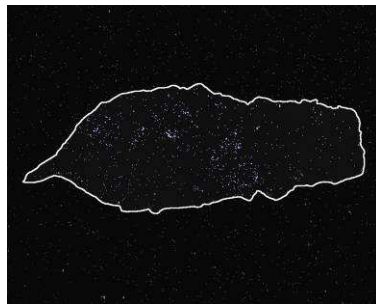
Si



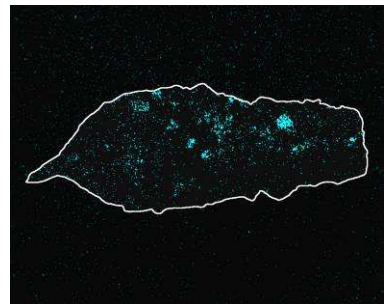
Ca



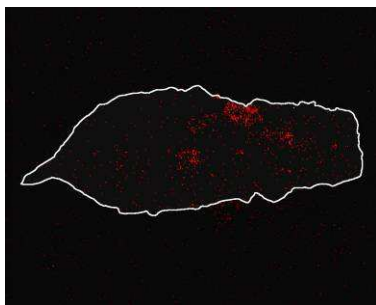
Al



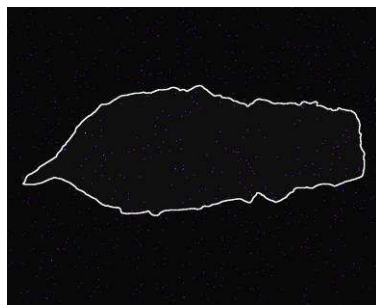
Fe



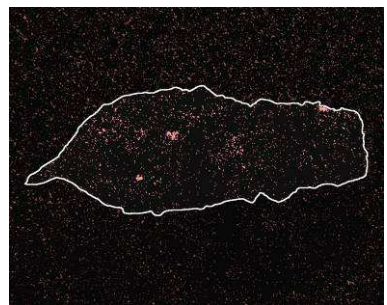
K



Na

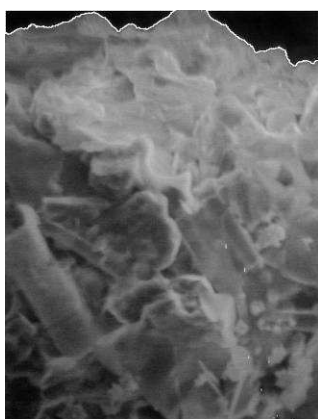


Mn

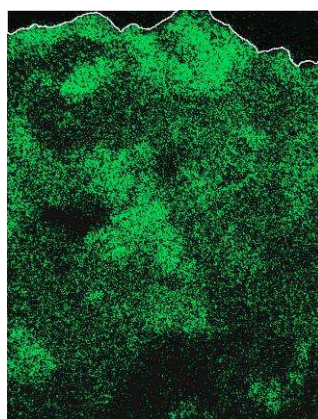


Ti

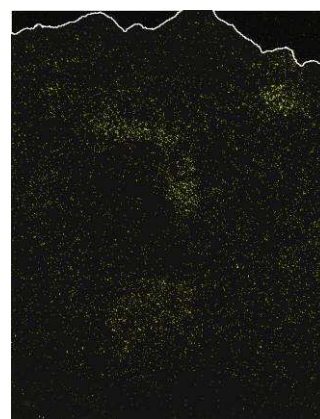
図 11-6a *Diffflugia acuminata* の元素分布.



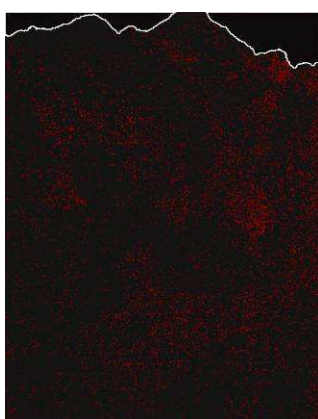
2 次電子線像



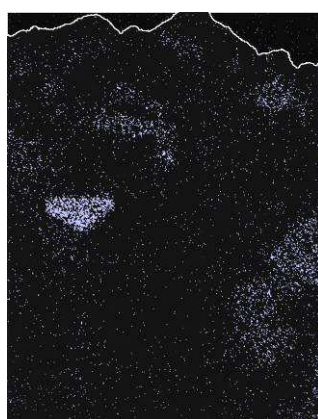
Si



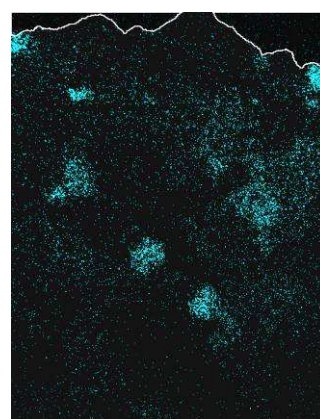
Ca



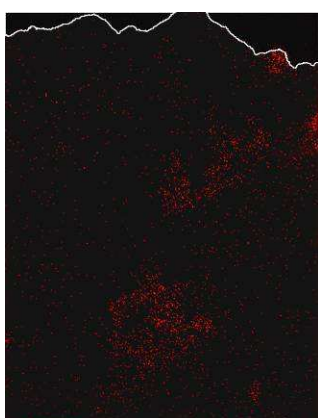
Al



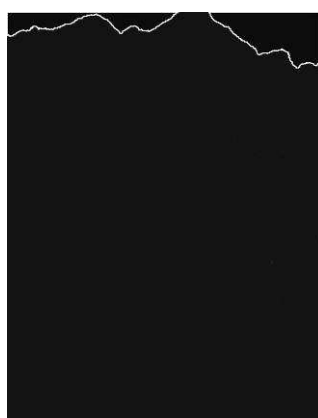
Fe



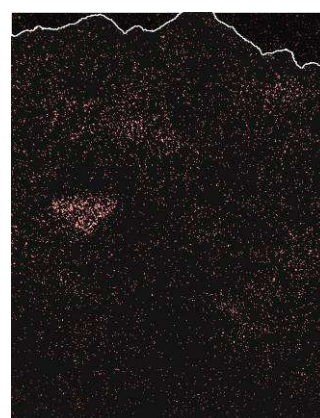
K



Na

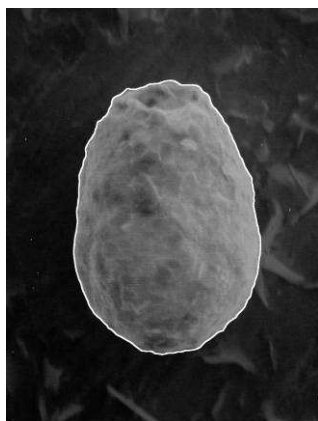


Mn

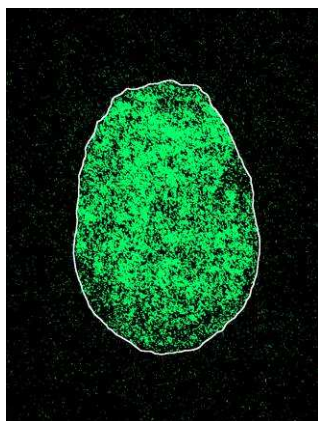


Ti

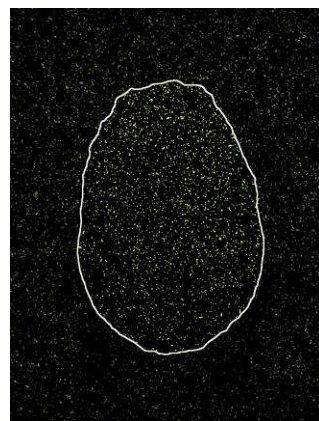
図 11-6b *Diffugia acuminata* の元素分布 (7-6a の枠内の拡大表示).



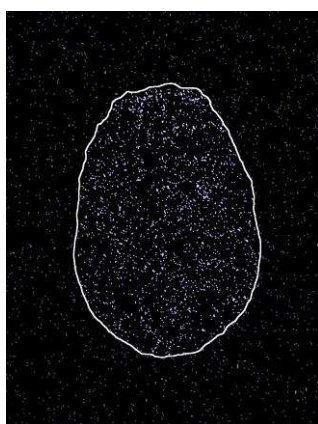
2 次電子線像



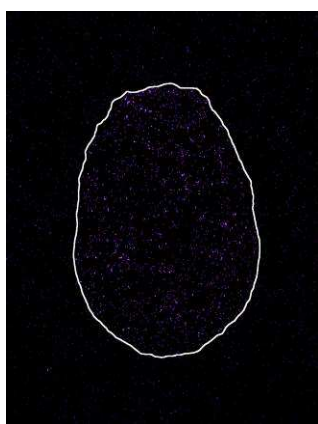
Si



Ca

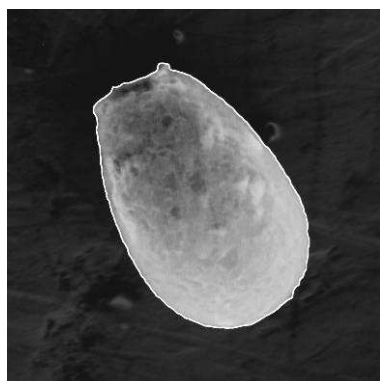


Fe

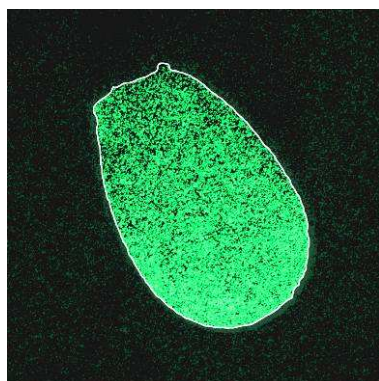


Mn

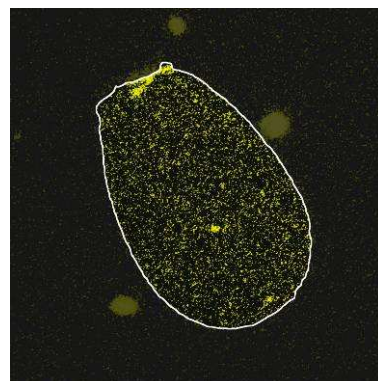
図 11-7 *Diffugia minutissima* の元素分布.



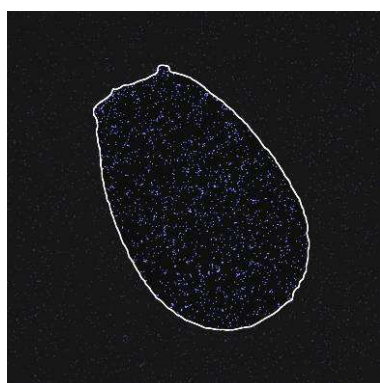
2 次電子線像



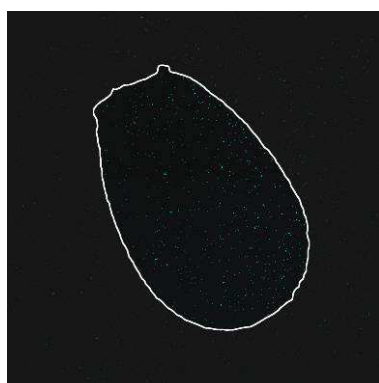
Si



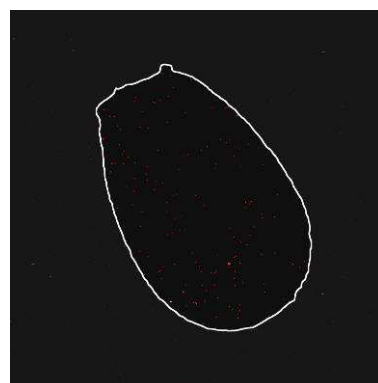
Ca



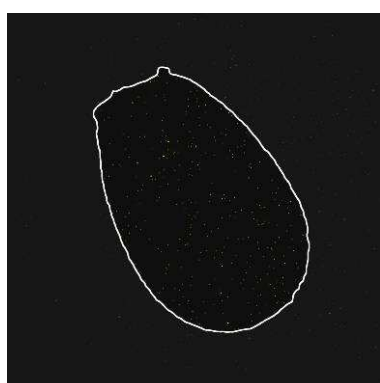
Fe



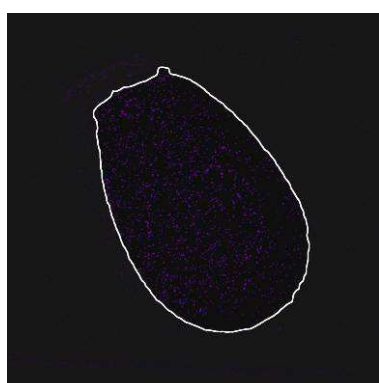
K



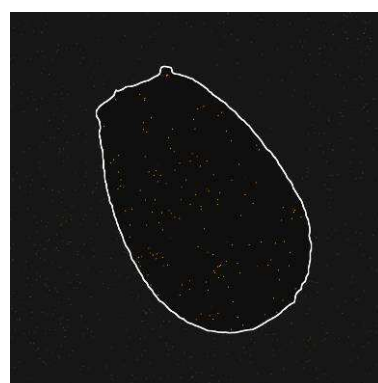
Na



Cl

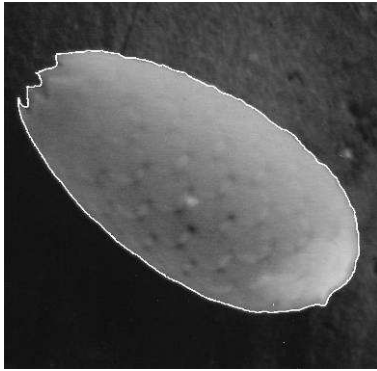


Mn

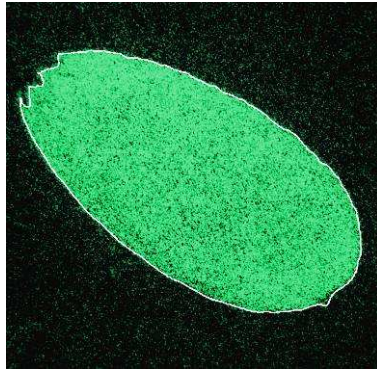


Mg

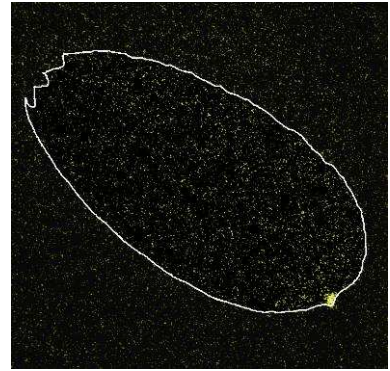
図 11-8 *Diffugia oviformis* の元素分布.



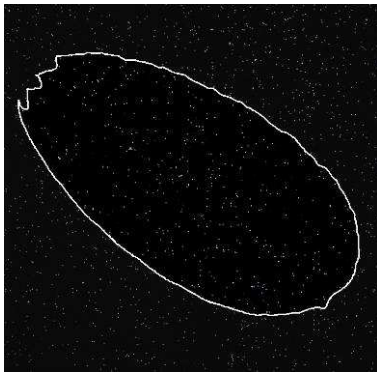
2 次電子線像



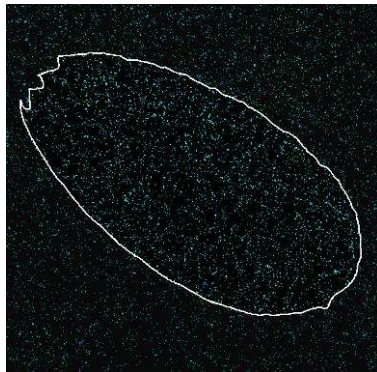
Si



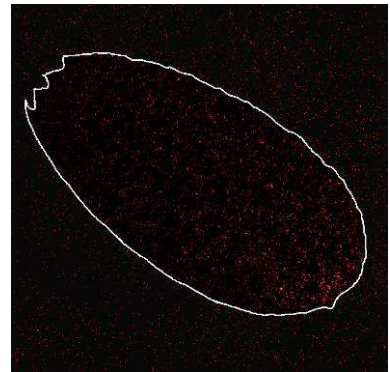
Ca



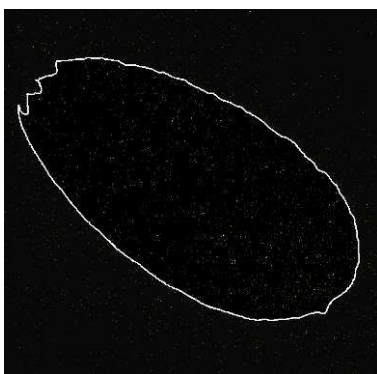
Fe



K



Na

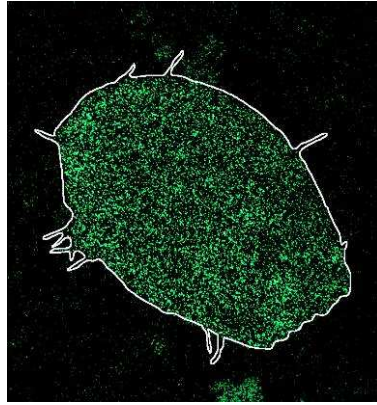


Cl

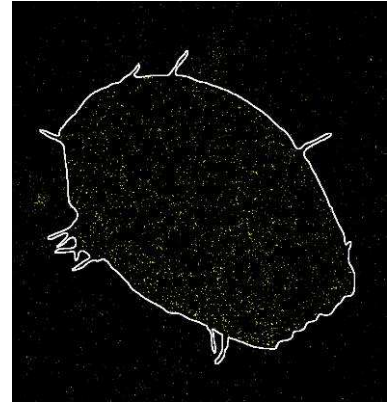
図 11-9 *Euglypha acanthophora* の元素分布.



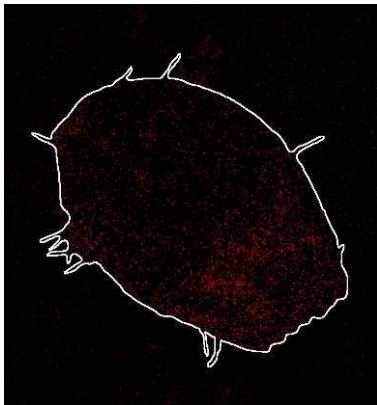
2 次電子線像



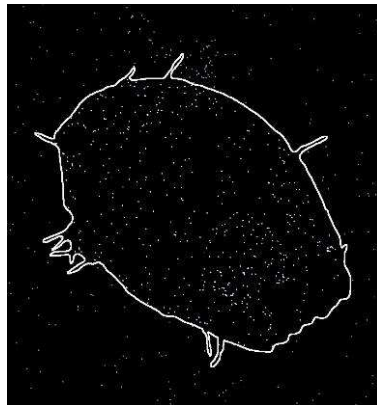
Si



Ca



Al

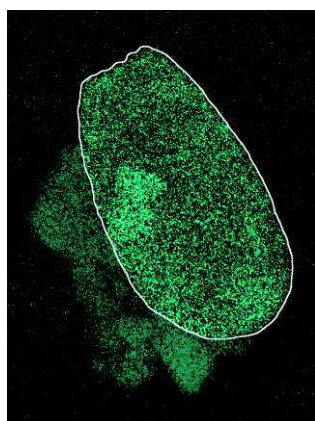


Fe

図 11-10 *Euglypha compressa* の元素分布.



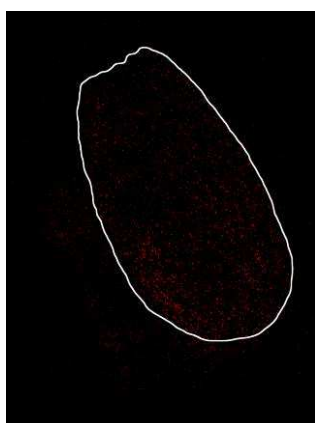
2 次電子線像



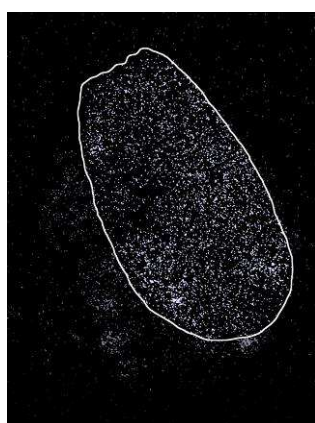
Si



Ca



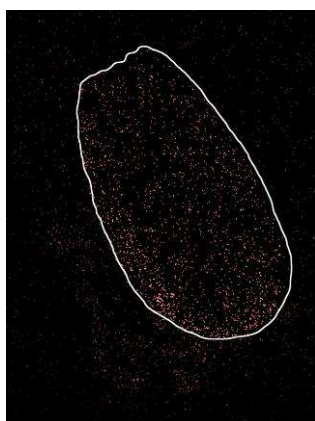
Al



Fe

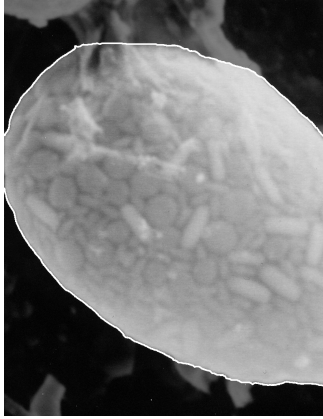


K

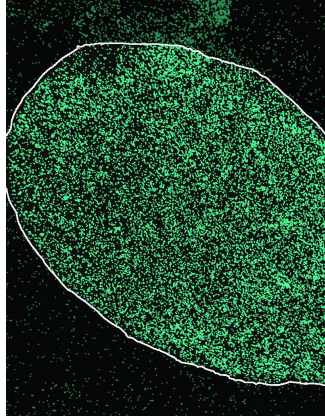


Ti

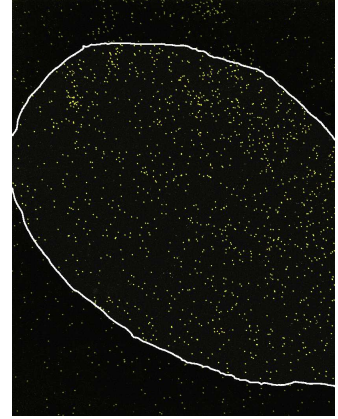
図 11-11 *Euglypha rotunda* の元素分布.



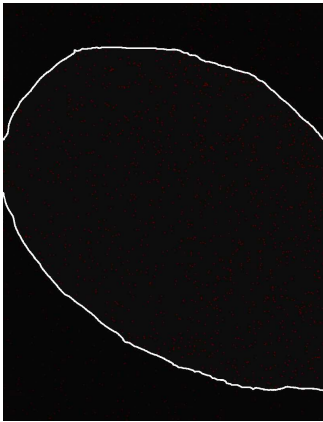
2 次電子線像



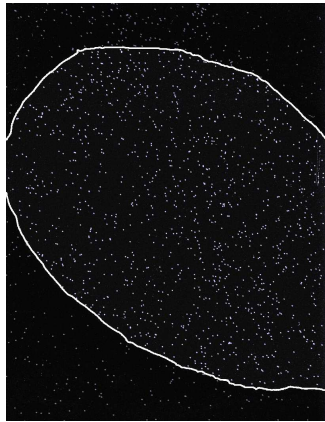
Si



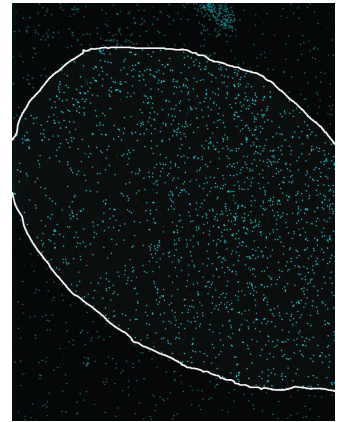
Ca



Al

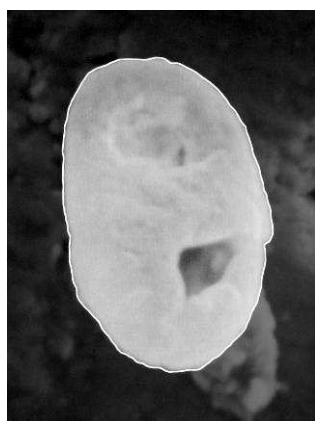


Fe

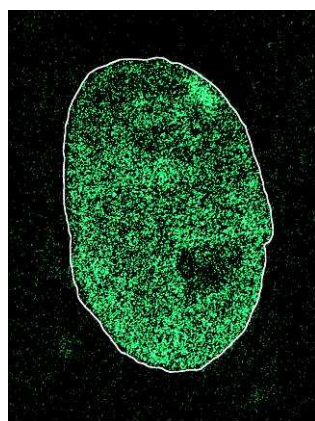


K

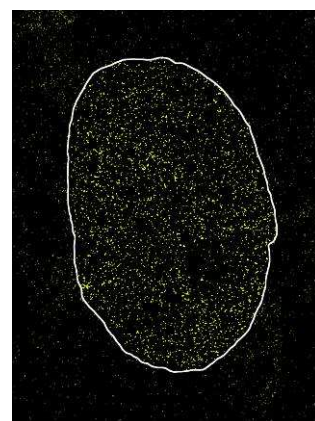
図 11-12 *Nebela collaris* の元素分布



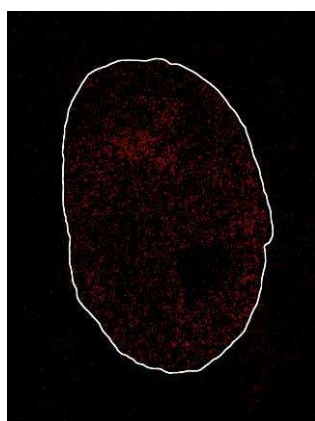
2 次電子線像



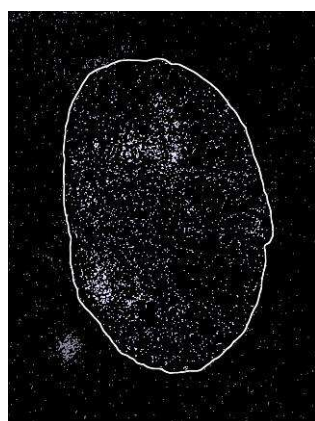
Si



Ca

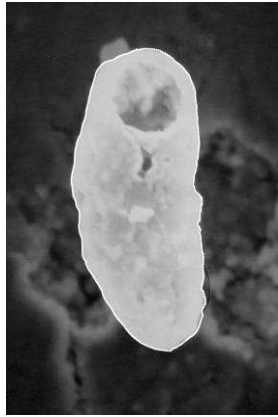


Al

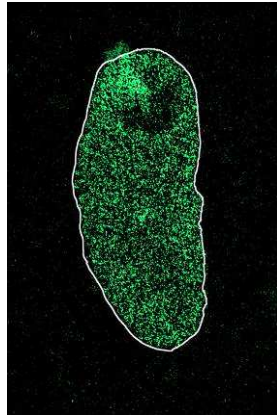


Fe

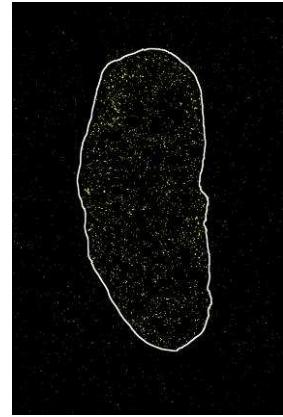
図 11-13 *Trinema complanatum* の元素分布.



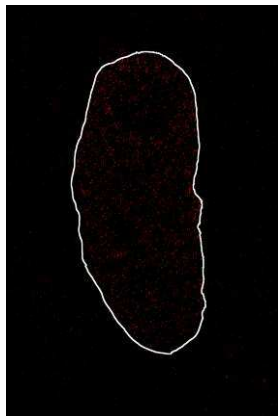
2 次電子線像



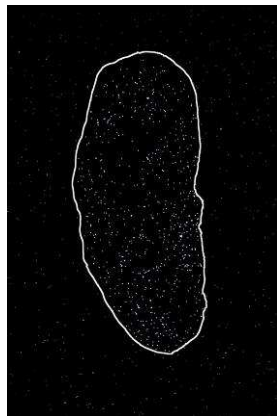
Si



Ca



Al



Fe

図 11-14 *Trinema lineare* の元素分布.

3.1.2 異なった土壤環境の Euglyphidae の殻の組成

異なった土壤の Euglyphidae の殻を EPMA 分析することによって、環境の違いが Euglyphidae の殻の化学組成に変化を与えるか確かめた。

3 種類の土壤サンプルから合計 8 種の Euglyphidae が採取された (表 1)。そのうち *E. rotunda* と *T. lineare* がすべての土壤サンプルから採取された。

すべての土壤の Euglyphidae の殻から共通して多量の Si と微量の Al、Ca が検出された (表 2-4)。広葉樹林土壤ではその他に、微量ではあるが、K が常に検出された (表 3)。また、ユリノキ腐植では Ti や Fe が検出された (表 4)。これらの結果は Euglyphidae の殻の分析を行った先行研究とも一致する (Stout & Walker, 1976; Jeanson & Coûteaux, 1977; Coûteaux & Jeanson, 1977; Rauenbusch, 1987; Schönborn & Peschke, 1988, 1990; Yang et al., 2004)。ユリノキ腐植にはバーミキュライトの混入が見られ、*E. rotunda*, *T. complanatum*, *T. lineare* で検出された Fe はこれが原因だと考えられる。バーミキュライトには一般的な土壤よりも多くの Fe が含まれており、この特殊な土壤環境が Euglyphidae の殻の化学組成に影響したものと考えられる。また、ユリノキ腐植の Euglyphidae の殻では Na, Mg, P, S, Cl, K が検出されなかったが、これらの元素が他の 2 つの土壤サンプルの Euglyphidae でも、常に検出されるわけではないことと、生物を構成する主要元素であることから、殻の内側に付着した生物由来元素が検出された可能性が考えられる。EPMA は対象物の表面数 μm の化学組成を分析することが可能であるが、有殻アメーバの殻はそれよりも薄いため、殻の内部に付着した不純物の元素まで検出してしまう恐れがある。

表 1 各土壌に出現した Euglyphida.

(a) マツ林土壌, (b) 広葉樹林, (c) ユリノキ腐植.

	Soil		
	a	b	c
<i>Assulina muscorum</i>	○		
<i>Corythion dubium</i>	○		
<i>Euglypha compressa</i>	○		○
<i>Euglypha rotunda</i>	○	○	○
<i>Euglypha</i> sp.			○
<i>Trinema complanatum</i>	○		○
<i>Trinema enchelys</i>		○	
<i>Trinema lineare</i>	○	○	○

表 2 マツ林土壌の idiosomes の殻の化学組成.

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
<i>Assulina muscorum</i>	+	-	+	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Corythion dubium</i>	+	-	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Euglypha compressa</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Euglypha rotunda</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema complanatum</i>	+	-	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema lineare</i>	+	-	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

表 3 広葉樹林土壌の Euglyphida の殻の化学組成.

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
<i>Euglypha rotunda</i>	+	+	+	++	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema enchelys</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema lineare</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

表 4 ユリノキ腐植の Euglyphida の殻の化学組成.

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
<i>Euglypha compressa</i>	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Euglypha rotunda</i>	-	-	+	++	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Euglypha</i> sp.	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema complanatum</i>	-	-	+	++	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Trinema lineare</i>	-	-	+	++	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

3.1.3 Euglyphidae のバイオシリカ

Si 以外に微量検出された元素が有殻アメーバのバイオシリカにもともと含まれている元素なのか確かめるため、 H_2O_2 処理して得た鱗片の化学組成を調べた。

培養して得られた *E. rotunda* と *T. enchelys* の殻からは多量の Si と微量の Al, Ca が検出されたが、野生種で確認された Fe, K や Ti は検出されなかった (表 5)。

一方、野生種、培養株双方の殻を H_2O_2 処理し、膠着物などの有機物を分解して得られた鱗片からは、Si 以外の元素は検出されなかった (表 5)。

また、鱗片試料の粉末 X 線回折分析をした結果、回折パターンから有殻アメーバがつくるバイオシリカが、シリカゲル同様、非晶質なシリカであることが分かった (図 12)。

以上のことから、Euglyphidae のつくるバイオシリカが非常に純粋なシリカであり、Si 以外の Na, Mg, Al, P, S, Cl, Ca, K などの元素は殻の内側に付着した生物由来、もしくは、土壌由来の物質に含まれていたか、もしくは、鱗片をつなぐ膠着物に含まれていたものと考えられる。そして、それらの元素は生息していた土壌環境を反映していることが示唆された。

3.2 SEM を利用した個体密度測定法の開発

3.2.1 分散剤の効果

土壌中から効率よく有殻アメーバを回収するために、粘土鉱物学で使用される分散剤、ピロリン酸ナトリウムを使用した。

分散剤を利用しない場合、土壌懸濁液中の 40% の有殻アメーバが final ppt に残ってしまったが、分散剤を使用することによって、それを 3 分の 1 以下に抑えることができた (表 6)。Griffiths & Ritz (1988) は 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) を分散剤とし、鉱質土壌から原生動物を有効に分離しているが、有殻アメーバはその他の原生動物とは異なり、殻を有しているため、遠心分離に

表 5 Euglyphida の化学組成

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
<i>Wild-living</i>															
<i>test</i>															
<i>Euglypha compressa</i>	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Euglypha rotunda</i>	-	-	+	++	-	-	-	+	+	+	-	++	-	-	-
<i>Euglypha</i> sp.	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema complanatum</i>	-	-	+	++	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Trinema lineare</i>	-	-	+	++	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>scale</i>															
<i>Euglypha</i> sp.	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema</i> sp.	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cultured</i>															
<i>test</i>															
<i>Euglypha rotunda</i>	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema enchelys</i>	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>scale</i>															
<i>Euglypha rotunda</i>	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trinema enchelys</i>	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

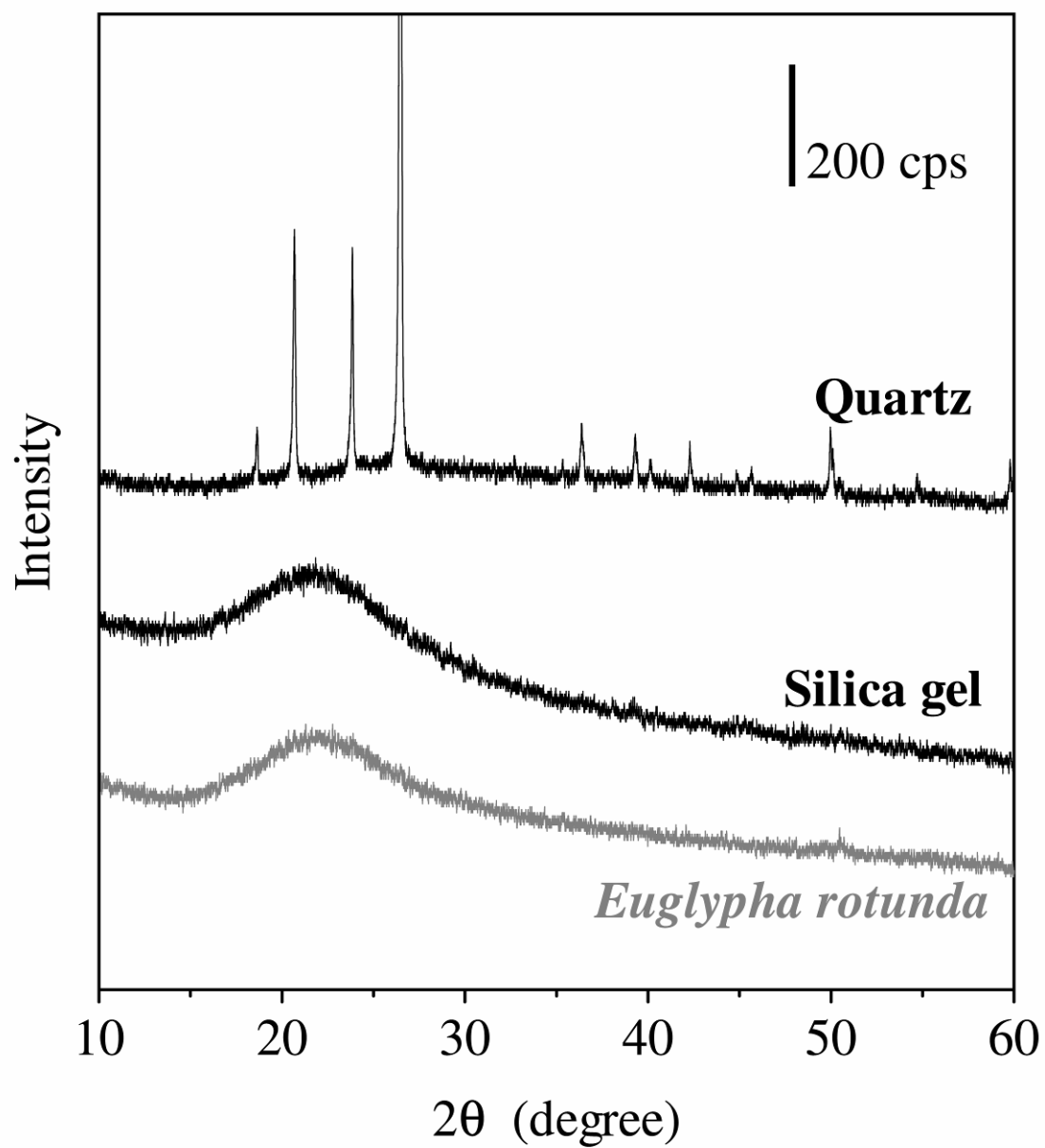


図 12 石英、シリカゲル、*Euglypha rotunda* の X 線回折パターン.

表 6 3 分、5 分の静置時間の Suspend-settle-decant procedure で得られた各フラクションの回収率.

Settling time (min)	Dispersant solution	Recovery rate (%)			
		sup			final ppt
		1	2	3	
5	without	40	13	7	40
5	with	57	22	6	15
3	with	70	19	1	10

よる分離が難しかった。そのため、遠心分離を利用して、粘土鉱物、腐植片、細菌、菌類胞子や小さな原生動物など、微細なフラクションを土壌懸濁液中から取り除いた。この際、上清フラクションを顕鏡したが、有殻アメーバは含まれていなかった。再び、沈殿を懸濁したが、懸濁液にはまだ微粒子が多く存在しているため OD₆₆₀ を 0.1-0.2 になるように希釈し、そのうちの 10 ml をメンブレンフィルターでろ過するのが、SEM による有殻アメーバの計数には適していた。

3.2.2 suspend-settle-decant procedure

静置時間 3 分、及び、5 分で回収した sup fraction No.1 の有殻アメーバの回収率はそれぞれ 70%、57% となったが、sup fractions No.2, 3 を合わせると 90%、85% となり、suspend-settle-decant procedure を 3 度繰り返せば土壌から有殻アメーバを約 90% 回収できることが分かった（表 6）。さらに、高い回収率と作業時間の短縮ができることから、森林土壌においては suspend-settle-decant procedure の静置時間を 3 分にするのが適していた。

suspend-settle-decant procedure を行い、夾雑する土壌粒子を沈殿に分離することによって、より多くの有殻アメーバを 1 度に取り出し、個体密度測定を行うことができるようになった。最終的に一度の測定に従来の 2.5-25 倍に当たる、約 25 mg の土壌サンプルを供試することができた。

3.2.3 SEM による個体密度測定における適切な走査領域

自ら殻の材料をつくる有殻アメーバ（idiosomes、および、キチン質の殻をつくる有殻アメーバ）がほとんど sup fractions No.1-3 に回収される一方で、外界の物質で殻をつくる有殻アメーバ（xenosomes）の回収率は走査領域 20 mm² で 46%、走査領域 40 mm² で 58% であった（図 13）。この低い回収率は sup fraction だけでなく ppt fraction まで計数する必要があることを示している。これは、xenosomes の殻が鉱物などでできているために重く、静置後、比較的早く沈ん

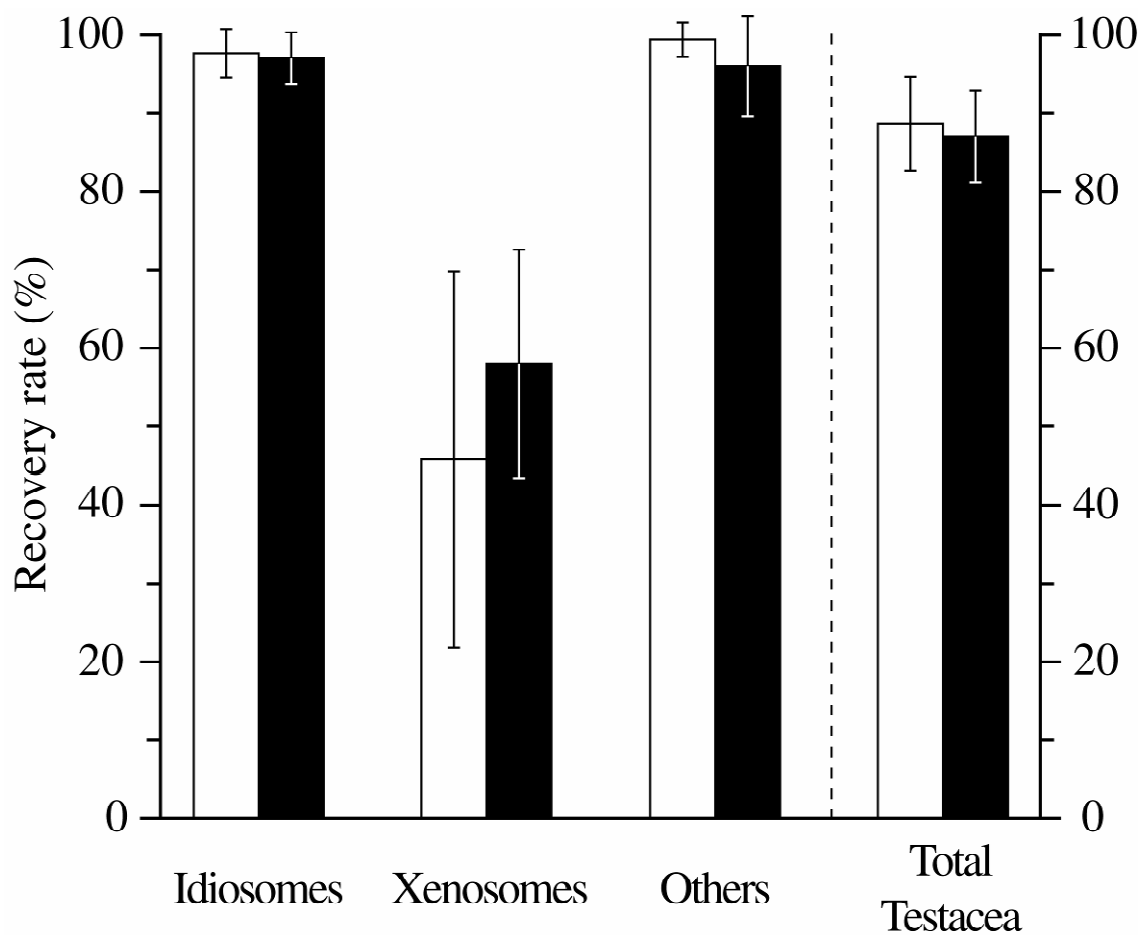


図 13 有殻アメーバの回収率.

3 分の静置時間で suspend-stand-decant procedure を三度繰り返して得られた supfractions No.1-3 を走査領域 20 mm² (□)、および、走査領域 40 mm² (■) で計測して得られた回収率 (エラーバーは標準偏差).

でしまい、sup fraction に回収できなことが原因であると考えられる。xenosomes 以外の有殻アメーバの回収率のばらつきは小さいものの、xenosomes の回収率の標準偏差の大きさから、計測する走査領域は合計で 20 mm² よりも 40 mm² の方が適していることが分かった。

3.2.4 測定精度

表7は本研究によって確立された方法と先行研究の測定精度を比較したものである。本方法の RSD は 5-14 %で、Coûteaux (1985) を除く、すべての方法の RSD よりも小さく、本方法の精度が優れていることを示している。Coûteaux (1985) のリター、土壌サンプル中の有殻アメーバ個体密度測定の測定誤差は非常に小さいが、1 度の計数にかけるサンプル量が 1 mg と非常に少ないものであった。一方、同様の手法で、Lousier & Parkinson (1981a) は一度に森林土壌サンプルを 5 mg、もしくは、10 mg 使い、有殻アメーバ個体密度測定を行ったが、その RSD は Coûteaux (1985) よりも大きなものであった。この RSD の差は、土壌の不均一性と顕鏡時の見落としとが原因であったと考えられる。Lousier & Parkinson (1981a) はメンブレンフィルター法において、光がフィルターを通ることによって起こる解像度の低下が、光学顕微鏡観察を困難にしていることを指摘している。そのため、土壌粒子が多いサンプル中の有殻アメーバを同定する際には、高い技術と高分解能の光学顕微鏡が必要である。その一方で、SEM 観察には特殊な技術は必要なく、容易に同定が行える。仮足開口部の形状が同定のキーとなる種の場合、仮足開口部がメンブレンフィルターに面していると同定が困難になる。しかし、そのような場合でも多くの場合、属までの同定は可能であり、とくにシリカサイクルの研究においてはそれで十分である。また、Wilkinson & Davis (2000) によって、素早く、微生物多様性の評価を行うには属レベルの同定で十分であることが示されている。したがって、本方法によって十分、微生物生態学的にも意味のある情報を得ることができる。SEM 観察では殻の中身を通して見ることはできないため、そ

表 7 有殻アメーバの個体密度測定法の違いによる精度比較.

Data set	Population density		RSD(%)
	(g ⁻¹ dry soil)	(×10 ⁶ m ⁻²)	
Present Data (by SEM)			
Pine-oak forest			
13-Nov-00	13220	277	5
04-Dec-00	11360	176	7
25-Dec-00	6190	107	14
11-Apr-01	11480	243	11
17-Apr-01	13060	274	9
Published Data (by light microscope)			
Watered soil suspensions method by Balik(1996)*			
Oak-hornbeam forest soil		640 - 970	26- 33
Oak forest soil		610 - 2260	36- 56
Beech forest soil		450 - 750	26- 37
Membrane filter technique by:			
Lousier & Parkinson(1981)			
Aspen woodland (moder) soil	6159 - 59144		21- 28
Coûteaux(1967)			
Oak forest (A ₀) soil	77050		16
Coûteaux(1985)			
Mixed forest (dysmoder) soil	87370 - 198990		3- 23
Jones and Mollison slide method by:			
Heal(1964)			
Mixed forest (mull) soil	6000 - 50000		14- 80
Mixed forest (moder) soil	10000 - 182000		18- 40
Oak forest (moder) soil	5000 - 264000		24- 69
Heal(1965)*			
Grassland soil	40000	890	94
Limestone grassland soil	9000 - 69000	448	39- 120
<i>Juncuss squarrosus</i> moor soil	25000 - 32000	195	101- 237
Woodland (moder) soil	4000 - 31000	188 - 465	69- 135
Lousier & Parkinson(1981)			
Aspen woodland (moder) soil	5900 - 13072		168- 275

* Counted only living Testacea

の個体が生きていたのか、死んで殻だけになっていたのか判断が難しいという問題点がある。しかし、SEM 観察には大きな、利点が幾つも存在する。それは、小型の有殻アメーバであっても、比較的同定が容易で、見落としが少ないこと、観察に当たって固定や染色の操作が必要ないこと、金蒸着後の試料は特別な処理を施さなくとも、長時間保管が可能であることである。

3.3 有殻アメーバのバイオシリカ量

本研究では有殻アメーバのバイオシリカ量を算出するために *E. rotunda* の α 値を利用した。*E. rotunda* は有殻アメーバの中でも中間的な大きさで、尚且つ、世界中の土壤に分布し、その個体数も多い。そのため、*E. rotunda* は α 値を代表する種として適していると判断した。

鱗片試料を溶解し、その溶解液に含まれるシリカ量を計測し、*E. rotunda* の鱗片 1 枚に含まれるシリカ量を計算した。その結果、鱗片 1 枚に含まれるバイオシリカは約 10 pg SiO₂ であった。*E. rotunda* の鱗片 1 枚の面積は約 16.6 μm^2 であり、そこから求められる α 値は 0.6 pg SiO₂ μm^{-2} であった。

E. rotunda の α 値を利用して、13 種の有殻アメーバの殻のシリカ量を決定し（表 8）、有殻アメーバによって保持されているバイオシリカの量を推定した（3.4、および、3.5 参照）。

3.4 ケイ酸溶出実験

土壤微生物の活動によって、土壤から溶出するケイ酸の量がどのように変化するのか、また、そのうち有殻アメーバがどの程度の寄与を果たしているのか確かめるために培養実験を行った。

滅菌土壤から溶出したケイ酸の量は、どの温度条件においても、時間とともに増加し、温度が高いほど多かった（図 14）。微生物の生存する、未滅菌土壤においても、時間とともにケイ酸溶出量の増加が見られたが、20℃だけは培養 14 日目にプラトーに達した。これは、微生物によるケイ酸の利用量と溶出

表 8 有殻アメーバの殻の表面積 (S_{test}) とバイオシリカ量 (BSi).

Species	S (μm^2)	BSi (pg SiO ₂)
<i>Assulina muscorum</i>	2690	1610
<i>Corythion dubium</i>	2068	1240
<i>Euglypha cristata</i>	1394	840
<i>E. laevis</i>	1229	740
<i>E. rotunda</i>	1729	1040
<i>E. strigosa</i>	5085	3050
<i>Euglypha</i> sp.1	2611	1570
<i>Euglypha</i> sp.2	3661	2200
<i>Euglypha</i> sp.3	2208	1320
<i>Tracheleuglypha acolla</i>	2688	1610
<i>Trinema complanatum</i>	1803	1080
<i>T. enchelys</i>	2730	1640
<i>T. lineare</i>	1266	760

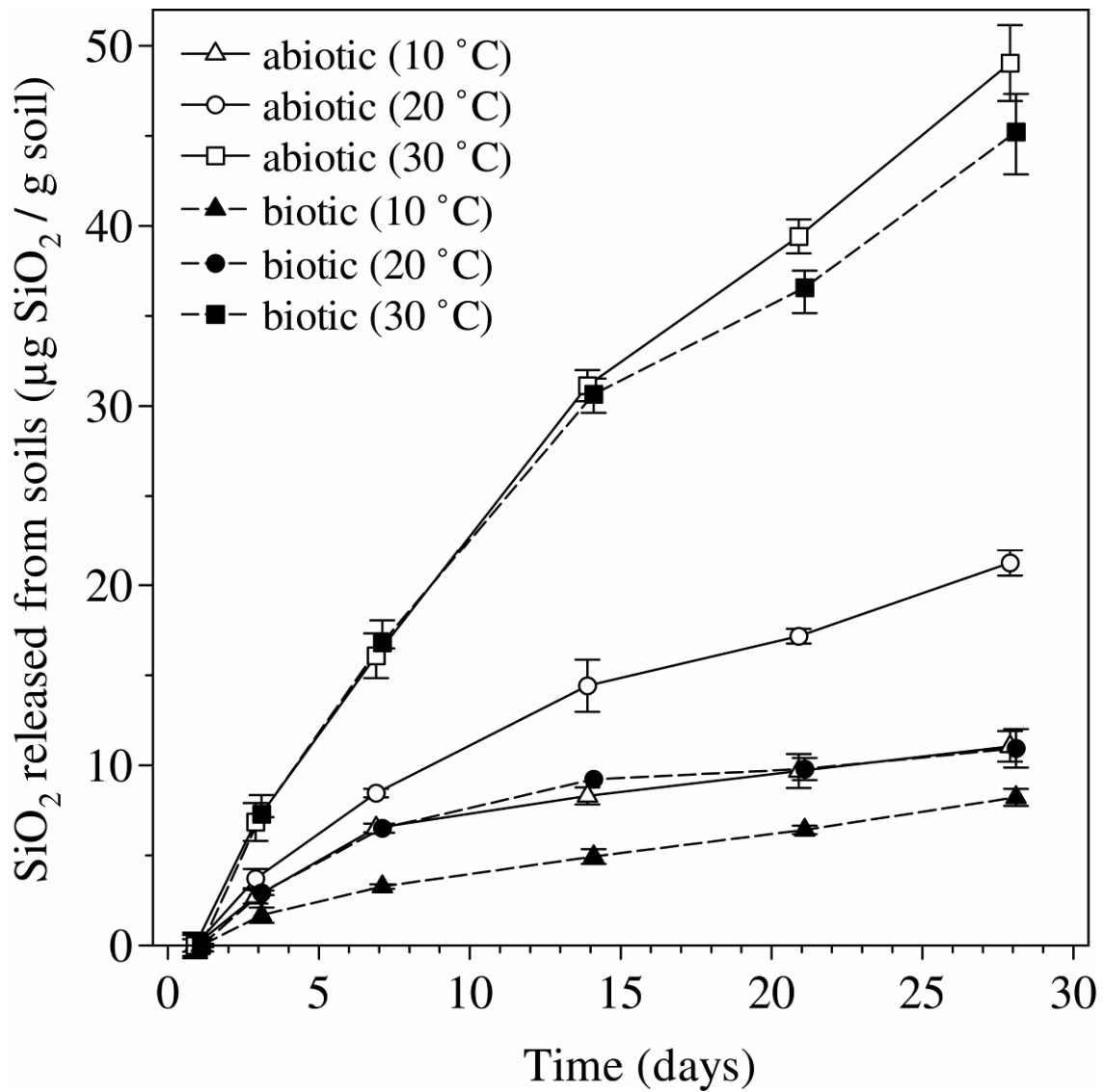


図 14 滅菌土壌、および、未滅菌土壌からのシリカ溶出量.

エラーバーは標準偏差を示す (n=3).

量が釣り合っていることを示している。未滅菌土壌のケイ酸溶出量はどの温度条件においても滅菌土壌より低かった。とくに、20℃で培養した場合に著しく低く、培養 28 日目における非滅菌土壌のケイ酸溶出量は滅菌土壌と比べて $10.3 \mu\text{g SiO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ も低かった。このケイ酸溶出量の差は、有殻アメーバを含む、シリカ蓄積生物の活発な活動、もしくは、滅菌処理によるケイ酸溶出速度の増大のいずれかの可能性がある。滅菌処理によって土壌からのケイ酸溶出が促進されるのか確かめるため、滅菌土壌、未滅菌土壌を 25℃条件下で 100 時間まで反復振盪し、土壌懸濁液のケイ酸濃度の変化を調べた。その結果、各時間における滅菌土壌、未滅菌土壌の懸濁液のケイ酸濃度には有意な差は見られなかった。そのため、培養実験における滅菌土壌と未滅菌土壌のケイ酸溶出量の差は、微生物によって一時的に細胞質内に保持、もしくは、バイオシリカとして固定されていることが原因であると考えられる。

10℃、30℃と比べ、20℃で培養したボトル中の有殻アメーバは著しい増殖が確認された。そのため、有殻アメーバの至適温度と考えられる 20℃において、ケイ酸の溶出量と有殻アメーバの保持するバイオシリカの量を調べた(図 15)。滅菌土壌と未滅菌土壌のケイ酸溶出量の差は、培養 28 日目において $15.7 \mu\text{g SiO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ であった。有殻アメーバによって保持されているバイオシリカの量は、始め $13.6 \mu\text{g SiO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ であったが、実験終了時では $22.3 \mu\text{g SiO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ となった。これは 28 日間のうちに、懸濁液中に溶出した $8.7 \mu\text{g SiO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ のケイ酸を有殻アメーバが吸収し、バイオシリカとして固定したことを示しており、これは微生物によって一時的に細胞質内に保持、もしくは、バイオシリカとして固定されていると考えられるシリカの 55%を占めている。

以上のことから、土壌微生物は細胞質内にケイ酸を保持、または、バイオシリカとして固定することによって、土壌中のケイ酸濃度を低下させており、そのうちの約半分が有殻アメーバによるものと推測される。そのため、有殻アメーバが土壌におけるシリカ蓄積生物として重要な地位を占めていると考えられる。その一方で、土壌微生物は呼吸によって CO_2 を放出したり、代謝物

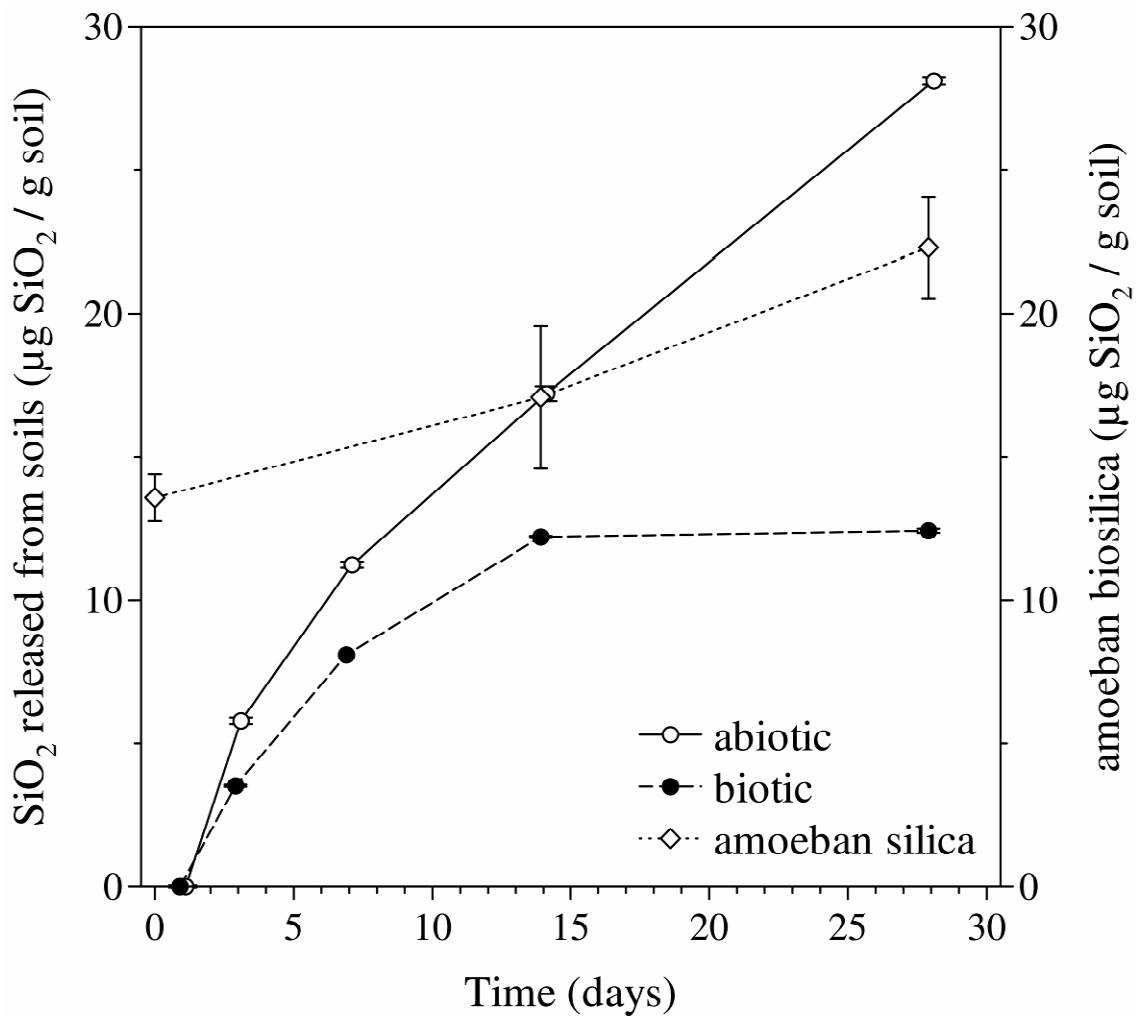


図 15 20℃における滅菌土壌、および、未滅菌土壌からのシリカ溶出量と有殻アメーバのバイオシリカ量.

エラーバーは標準偏差を示す (n=3).

として無機や有機の酸を分泌することによってケイ酸塩鉱物の溶解を促進している (Bennett et al., 2001 ; Burford et al., 2003) 。さらに、細菌や菌類は、Mg, Ca, Fe, Cu など必須金属元素をケイ酸塩鉱物から獲得するためにキレーターを分泌する。その結果、ケイ酸塩鉱物の溶解はさらに促進されていると考えられる (Rogers et al., 1998 ; Santelli et al., 2001) 。

3.5 アカマツアベマキ林土壌における有殻アメーバのバイオシリカ

アカマツアベマキ林土壌の個体密度データ (表 7) から推測される、有殻アメーバの殻として保持されているバイオシリカの量は $0.45\text{--}1.57 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$ であった (表 9) 。有殻アメーバは増殖前、娘細胞のための鱗片を細胞質内に蓄えている (図 16) 。そのため、有殻アメーバの殻として確認されるよりも多くのシリカが有殻アメーバによって蓄えられていると考えられる。それでも、シリカプールとしては高等植物の 100 から 1000 分の 1 の規模でしかない (表 10) 。

2001 年 4 月 11 日、有殻アメーバの殻として保持されていたバイオシリカ量は $1.06 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$ であったが、わずか 6 日間で 50% 増加し、 $1.57 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$ となった (表 10) 。これは有殻アメーバが季節変化に素早く応答し、その個体数を変動させていることを示している。Euglyphidae の世代時間は約 2-5 日と非常に短く (Schönborn, 1975, 1982 ; Ogden, 1981 ; Lousier, 1984 ; Lousier & Parkinson, 1984) 、死んだ個体もすぐに分解を受けることから裏付けられる (Lousier & Parkinson, 1981b ; Schönborn, 1982 ; Meisterfeld & Heisterbaum, 1986) 。Lousier & Parkinson (1981b) の報告によれば、死んで空になった有殻アメーバの殻は 1 週間で 74-97% が、2 週間で 89-98% が分解を受け、ばらばらになるという。そのため、有殻アメーバの殻はそれほど長い時間、そのままの形で土壌中に存在しているのではなく、すぐに分解され、風化作用にさらされると考えられる。また、有殻アメーバの鱗片は植物ケイ酸体と比べて非常に小さく、薄く (図 17)、

表 9 アカマツーアバマキ林土壌の idiosomes の個体密度、総バイオマス量、バイオシリカ量.

	13-Nov-00	4-Dec-00	25-Dec-01	11-Apr-01	17-Apr-01
Population density ($\times 10^6 \text{ m}^{-2}$)	170	98	36	161	186
Total biomass (g m^{-2})	0.60	0.30	0.32	0.55	0.92
Biosilica ($\text{kg SiO}_2 \text{ ha}^{-2}$)	1.15	0.60	0.45	1.06	1.57

表 10 高等植物によるシリカのフラックスと蓄積量.

	Deciduous forest ^{*1)}	Coniferous forest ^{*1)}	Amazon rain forest ^{*2)}	Bamboo forest ^{*3)}
Flux (kg SiO ₂ ha ⁻¹ yr ⁻¹)	fixation	17	-	208-295
	litterfall	11	88	208-295
Reservoir (kg SiO ₂ ha ⁻¹)	biomass	193	1784	-

* data from 1) Bartoli (1983), 2) Lucas et al. (1993), 3) Meunier et al. (1999)

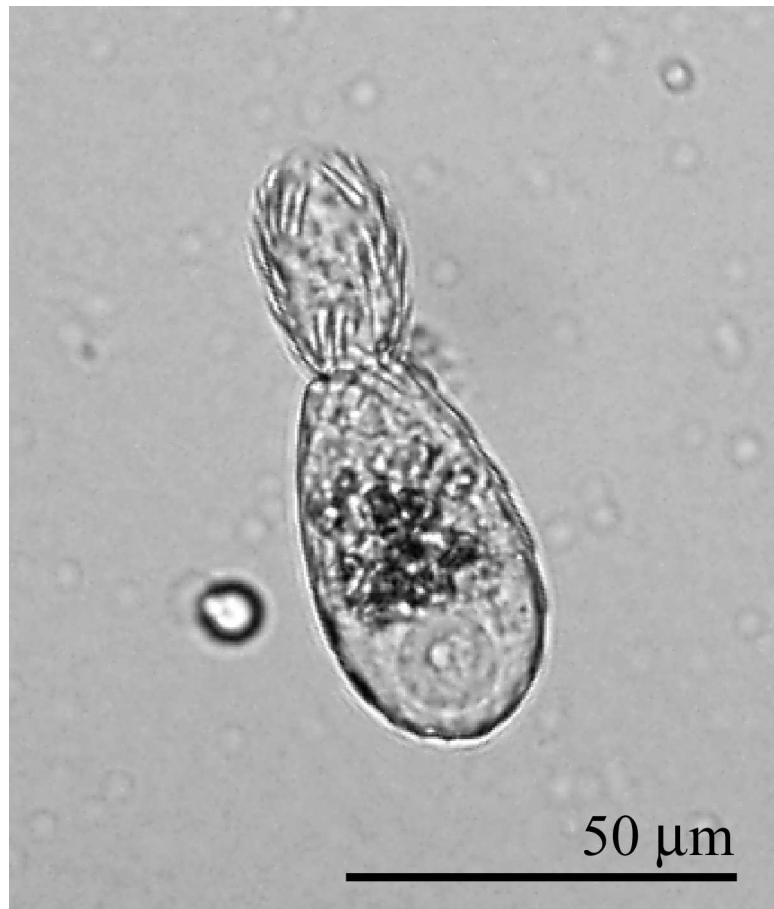


図 16 *Euglypha rotunda* の増殖.

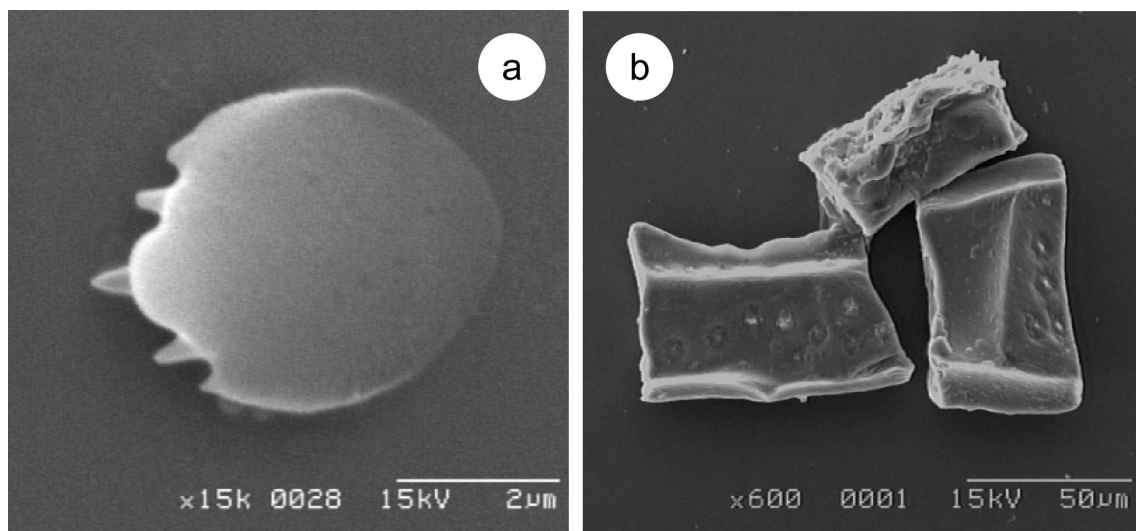


図 17 バイオシリカの比較.

(a) *Euglypha rotunda* の仮足開口部の鱗片, (b) アカマツの植物ケイ酸体.

非晶質であることから比較的早く風化作用を受け、溶解すると考えられる。溶解したケイ酸は再びシリカ蓄積生物によって利用可能となる。

たとえ、有殻アメーバのライフサイクルが短く、シリカプールとしてマイナーであったとしても、有殻アメーバのバイオシリカはすぐに再利用され、結果として、土壌中のシリカ滞留時間を引き延ばし、土壌に生息する生物が利用可能なシリカの量を増大させていると考えられる。

3.6 年間シリカ生産量

先行研究によって、世界各地の土壌で有殻アメーバの存在が確認されており、その上、生息個体数も多いことが知られている。とくに、ヨーロッパやカナダの森林においてその生態が良く調べられている (Foissner & Adam, 1981 ; Lousier & Parkinson, 1984 ; Meisterfeld, 1986 ; Schönborn, 1992) 。 Lousier & Parkinson (1984) 、 Schönborn (1975) 、 Schönborn (1982) の個体密度、バイオマス量、生産量のデータと本研究で得られた α 値から、生きた土壌有殻アメーバによって保持されているバイオシリカ量、および、年間に生産されるバイオシリカ量を算出し、土壌におけるシリカプールとしての有殻アメーバの評価を行った。

先行研究の生態学的データには各有殻アメーバの詳細な大きさの記載はないが、その代わり、バイオマス量が記されている。バイオマス量は、有殻アメーバの殻を回転楕円体と想定し、殻長、殻幅、殻高から算出される体積に、細胞質の比重 1.0 を掛けて求められる (Heal, 1965) 。そのため、本研究ではバイオマス量から有殻アメーバの殻の体積を算出した。1 個体当たりの平均体積 ($V_{\text{mean}} [\mu\text{m}^3]$) は以下のように示される。

$$V_{\text{mean}} = \frac{B_{\text{total}}}{D} = \frac{V_{\text{total}}}{D} \quad (6)$$

B_{total} : 有殻アメーバの総バイオマス量 [mg m^{-2}]

V_{total} : 有殻アメーバの体積の総和 [$\mu\text{m}^3 \text{ m}^{-2}$]

D : 有殻アメーバの個体密度 [ind. m^{-2}]

実際には有殻アメーバの殻は種によって殻長、殻幅、殻高の比率がそれぞれ異なっているが、本研究では単純化のため、球と仮定し、その球の半径 r [μm] を求めて表面積を算出した。半径 r は以下のように示される。

$$r = \left(\frac{3 V_{\text{mean}}}{4\pi} \right)^{1/3} \quad (7)$$

そして、球の半径 r から 1 個体当たりの平均表面積 S_{mean} [μm^2] は以下のように表される。

$$S_{\text{mean}} = 4\pi r^2 = \left(\frac{6 V_{\text{mean}}}{D} \right)^{2/3} \pi^{1/3} \quad (8)$$

得られた平均表面積と *E. rotunda* の α 値、個体密度から土壌有殻アメーバによって保持されているバイオシリカ量、ならびに、年間バイオシリカ生産量を推定した。

生きている有殻アメーバの殻として保持されているバイオシリカの量を Schönborn (1975) Schönborn (1982)、Lousier & Parkinson (1984) の年間平均個体密度 (annual mean population density) と平均バイオマス量 (annual mean biomass) から推定した結果、 $0.16\text{-}0.97 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$ であった (表 11)。これは、アカマツ-アベマキ林の個体密度から推定されたバイオシリカ量、 $0.45\text{-}1.57 \text{ kg}$

表 11 有殻アメーバの平均個体密度、平均バイオマス量と有殻アメーバの殻の総表面積、および、生きた有殻アメーバとして保持されているバイオシリカ量.

	Beechwood soil (moder)	Coniferous soil (moder)	Ash-Maple forest (mull)	Aspen woodland
Annual mean density ($\times 10^6 \text{ m}^{-2}$) [D]	360 ^{*1)}	48.8 ^{*1)}	22.3 ^{*2)}	85.3 ^{*3)}
Annual mean biomass (g m^{-2}) [B]	0.324 ^{*1)}	0.0578 ^{*1)}	0.3526 ^{*2)}	0.3553 ^{*3)}
Total surface area of testate amoebae (μm^2) [S_{total}]	0.162	0.026	0.068	0.107
Biosilica preserved by living testate amoebae as tests ($\text{kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$) [BSi]	0.97	0.16	0.41	0.65

* data from 1) Schönborn (1975), 2) Schönborn (1982), 3) Lousier & Parkinson (1984)

$\text{SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (表 9) ともよく一致している。土壌中には生きている有殻アメーバの数倍から数十倍もの、死んで空になってしまった殻が存在している (Foissner, 1985, 1987)。そのため、より多くのバイオシリカが有殻アメーバの殻として土壌中に存在しているものと考えられる。

有殻アメーバによる年間バイオシリカ生産量を Schönborn (1975) Schönborn (1982)、Lousier & Parkinson (1984) の年間生産量 (個体密度とバイオマス量) から試算した (表 12)。その結果、各森林土壌で年間に有殻アメーバによって生産されるバイオシリカはブナ林で $59 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ 、針葉樹林で $10 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ 、トネリコ・カエデ林で $10 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ 、アスペン林で $227 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ であった。これに対して高等植物が年間で落葉落枝として土壌に供給するバイオシリカ量は落葉樹林で $47 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (Bartoli, 1983)、針葉樹林で $11 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (Bartoli, 1983)、アマゾンの熱帯雨林で $88 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (Lucas et al., 1993)、赤道付近の熱帯雨林で $124\text{--}163 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (Alexandre et al., 1997) である。つまり、土壌有殻アメーバが年間につくり出す総バイオシリカ量は高等植物によって落葉落枝として土壌に供給されるバイオシリカ量に匹敵しているのである。

有殻アメーバは小さいながら、短いライフタイム、活発な増殖によって毎年、大量のケイ酸をバイオシリカへと変換している。さらに、有殻アメーバのバイオシリカは風化を受けやすいことを考慮すると、有殻アメーバは一時的なケイ素の保管庫として、短期的なシリカサイクルに重要な役割を果たしていると考えられる。

表 12 有殻アメーバの年間生産量（個体数とバイオマス量）と有殻アメーバの殻の総表面積、および、有殻アメーバのバイオシリカの年間生産量.

	Beechwood soil (moder)	Coniferous soil (moder)	Ash-Maple forest (mull)	Aspen woodland
Production numbers ($\times 10^6 \text{ m}^{-2}$) [<i>D</i>]	5400 ^{*1)}	1300 ^{*1)}	603 ^{*2)}	27545 ^{*3)}
Production biomass (g m^{-2}) [<i>B_{total}</i>]	39 ^{*1)}	6 ^{*1)}	7.6 ^{*2)}	131 ^{*3)}
Total surface area of testate amoebae (μm^2) [<i>S_{total}</i>]	9.76	1.74	1.58	37.67
Annual biosilicification ($\text{kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$) [<i>BSi</i>]	59	10	10	227

* data from 1) Schönborn (1975), 2) Schönborn (1982), 3) Lousier & Parkinson (1984)

3.7 森林シリカサイクル

これまで述べてきたように、森林土壌において有殻アメーバや高等植物によって土壌中のケイ酸が吸収され、毎年大量のバイオシリカがつくられている。生物体の一部として同化されたシリカは有殻アメーバではその死とともに、高等植物においては落葉落枝として再び土壌に供給される（図 18）。そして、これらのバイオシリカは土壌溶液に接し、溶解し、ケイ酸となって再び、ケイ酸蓄積生物の利用可能な形となる。森林土壌ではこのようにシリカが循環しているが、とくに有殻アメーバは短期的なシリカサイクルを通して土壌中に一定量のケイ酸を、常に、供給し続けており、ケイ酸供給源として非常に重要な役割を果たしていると考えられる。また、有殻アメーバを含む土壌微生物、土壌動物、高等植物の活発な活動に伴う様々な酸がケイ酸の溶出を促進する。生物活動によって分泌される有機酸、呼吸に伴って排出される CO_2 が土壌水に溶け込んでできる炭酸、そして、土壌微生物や土壌動物が落葉落枝を分解することによって形成される腐植酸もまた、ケイ酸の溶出を促進している。しかしながら、陸域シリカサイクルに関する情報は未だ少なく、各コンポーネントがどの程度の影響を及ぼしているのか不明な部分が多い。とくに、土壌微生物がシリカサイクルに及ぼす影響を定量的に明らかにした研究は非常に少なく、更なる研究の必要がある。

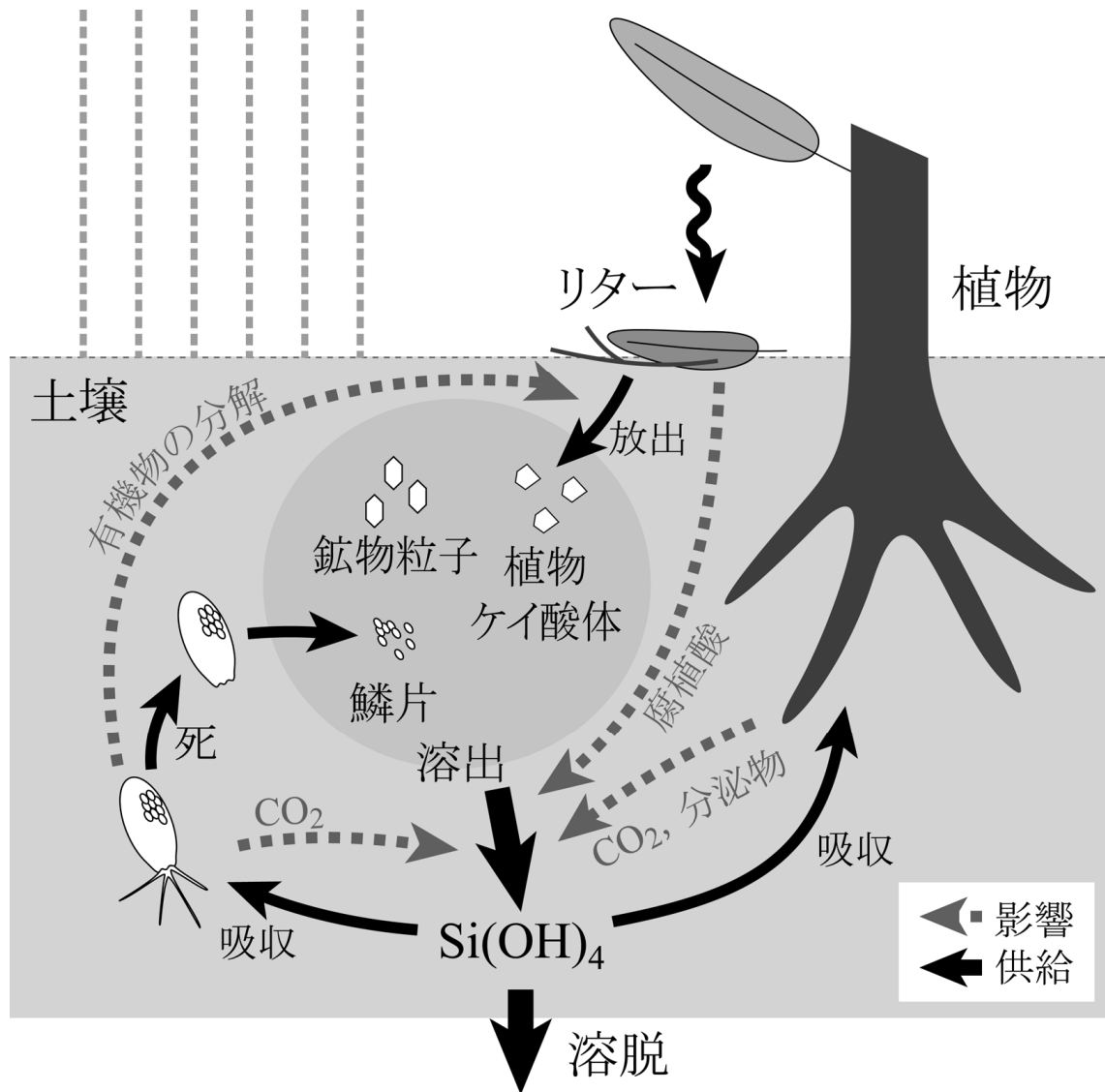


図 18 森林土壌のシリカサイクル.

第 4 章 結論

これまで土壌有殻アメーバは、その分布の広さ、個体数の多さにもかかわらず、シリカサイクルにおいてほとんど評価されてこなかった。有殻アメーバの中には、環境中からケイ酸を吸収して殻を構築するものがあり、土壌中のケイ酸量の増減に少なからず関与していると考えられる。そのため、土壌有殻アメーバのバイオシリカを定量的に評価し、森林シリカサイクルにおける役割を議論した。

そのために、有殻アメーバの殻、とくに *Euglyphidae* の殻を EPMA で分析し、化学組成を調べた。また、純粋な鱗片試料を EPMA 分析することによって、有殻アメーバのバイオシリカの化学組成を調べた。その結果、有殻アメーバの殻からは Si, Al, Ca, Fe, K, P, S, Cl, Na, Mg, Mn, Ti が検出された。また、バイオシリカをつくるグループである *Euglyphidae* の殻からは Si, Al, Ca, K, Cl, S, Na, P, Mg, Fe, Ti が検出された。一方、純粋な鱗片からは Si しか検出されず、有殻アメーバのつくるバイオシリカが非常に純粋なシリカであることが分かった。また、その他に検出された元素は生息していた土壌環境を反映している可能性があり、それらは殻の内側に付着した生物由来、もしくは、土壌由来の物質、または、鱗片をつなぐ膠着物であったと考えられる。

さらに、土壌有殻アメーバのバイオシリカ量を正確に把握するため、高倍率での観察が可能な SEM による個体密度測定法の吟味を行った。従来のメンブレンフィルター法に分散剤を用いた suspend-settle-decant procedure を導入することによって、90%の有殻アメーバを土壌懸濁液から回収することができるようになった。それによって、従来の量の 2.5–25 倍もの土壌サンプルから有殻アメーバを抽出し、SEM 観察することができるようになり、それによって、正確な個体密度測定が行えるようになった (RSD:5%)。

有殻アメーバを含む土壌微生物が土壌からのケイ酸溶出にどのような影響を及ぼすのか、また、有殻アメーバがどれだけのケイ酸をバイオシリカとして固定しているのか確かめるために、ケイ酸溶出実験を行った。その結果、土壌微生物は土壌から供給されるケイ酸を一時的に細胞質内に保持、もしくは、バイオシリカとして固定することによって、土壌溶液中のケイ酸濃度を低下させていることが分かった。さらに、土壌微生物によって取り込まれたケイ酸の55%が有殻アメーバによるものと推定されることから、有殻アメーバが土壌におけるシリカ蓄積生物として重要な地位を占めていと考えられる。

有殻アメーバによって保持されているシリカ量、並びに、年間バイオシリカ生産量の推定を行った。アカマツ－アベマキ林土壌で有殻アメーバの殻として保持されているバイオシリカが $0.45\text{--}1.57 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1}$ であり、一時的なシリカプールとしては植物ケイ酸体の 100 から 1000 分の 1 と、高等植物に匹敵するような規模ではないことが分かった。しかし、有殻アメーバは短いライフタイム、活発な増殖によって、 $10\text{--}227 \text{ kg SiO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ものシリカを固定しており、高等植物が落葉落枝として土壌に毎年供給しているバイオシリカの量に匹敵していることが分かった。

有殻アメーバは小さいながら、短いライフタイム、活発な増殖によって、毎年、大量のバイオシリカを生産している。その一方で、有殻アメーバのバイオシリカはすぐに溶け、再びシリカ蓄積生物によって利用される。この短いターンオーバーを通して有殻アメーバは土壌中のシリカの滞留時間を引き延ばし、生物がすぐに利用できるシリカの量を増大させている。

有殻アメーバはシリカ消費者、供給者として高等植物に匹敵するほどの役割を持っており、とくに、短期的なシリカサイクルに重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究では生きている有殻アメーバ、もしくは、殻の形を留めているものを対象としてバイオシリカ量の推定を行ったが、土壌中にはさらに鱗片の形で有殻アメーバのバイオシリカは存在しており、有殻アメーバのバイオシリカを

正しく評価する上で鱗片の存在量を把握することが必要であろう。さらに、土壌中における鱗片の溶解速度を調べることによってケイ酸供給源としての重要度を量ることも重要な課題である。

謝辞

本研究を進めるに当たり、ご指導いただきました名古屋大学松原輝男名誉教授、環境学研究科星野光雄教授に感謝し、厚く御礼申し上げます。また、有益なアドバイスをいただいた名古屋大学情報文化学部、名古屋大学大学院・人間情報学研究科、および、環境学研究科の諸先生方、大学院生の皆様に感謝いたします。

引用文献

- Aescht, E., Foissner, W. (1996) Microfauna. In: Schinner, F., Hliringer, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds) *Methods in soil biology*. Springer, Germany, pp. 316-337.
- Alexandre, A., Meunier, J.-D., Colin, F., Koud, J.-M. (1997) Plant impact on the biogeochemical cycle of silicon and related weathering processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61(3): 677-682.
- Balík, V. (1996) Soil and moss testate amoebae (Protozoa, Rhizopoda) from forest stands in the biospheric reserve Křivoklátsko (Czech Republic). *Časopis Národního muzea Řada přírodovědná* 165(1-4): 23-34.
- Bartoli, F. (1983) The biogeochemical cycle of silicon in two temperate forest ecosystems. In: Hallberg, R. (Ed.), *Environmental biogeochemistry*. *Ecol. Bull. (Stockholm)* 35, pp. 469-476.
- Basile-Doelsch, I., Meunier, J.D., Parron, C. (2005) Another continental pool in the terrestrial silicon cycle. *Nature* 433: 399-402.
- Bennett, P.C., Rogers, J.R., Choi, W.J., Hiebert, F.K. (2001) Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiology Journal* 18: 3-19.
- Blecker, S.W., McCulley, R.L., Chadwick, O.A., Kelly, E.F. (2006) Biologic cycling of silica across a grassland bioclimate sequence. *Global Biogeochemical cycles* 20, GB3023 doi:10.1029/2006GB002690.
- Bowen, H.J.M. (1966) The composition of the soil. In: Bowen, H.J.M. (Ed.), *Trace Elements in Biochemistry*. Academic Press, London and New York, pp. 25-41.
- Burford, E.P., Fomina, M., Gadd, G.M. (2003) Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineralogical Magazine* 67(6): 1127-1155.
- Cavalier-Smith T. (2003) Protist phylogeny and high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology* 39: 338-348.

- Chardez, D. (1969) Le genre *Phryganella* Penard (Protozoa, Rhizopoda Testacea). Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux 4: 315-322.
- Charman D.J., Warner B.G. (1992) Relationship between testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) and microenvironmental parameters on a forested peatland in northeastern Ontario. Canadian Journal of Zoology 70: 2474-2482.
- Clarke, J. (2003) The occurrence and significance of biogenic opal in the regolith. Earth-Science Reviews 60: 175-194.
- Clarke, K.J. (2003) Guide to the identification of soil protozoa - Testate amoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside.
- Conley, D.J. (2002) Terrestrial ecosystems and the global biogeochemical silica cycle. Global Biogeochem. Cycles 16(4), 1121, doi:10.1029/2002GB001894.
- Coûteaux, M.-M. (1967) Une technique d'observation des Thécamoebiens du sol pour l'estimation de leur densité absolue. Revue d'Ecologie et de Biologie du sol 4: 593-596.
- Coûteaux, M.-M. (1975) Estimation quantitative des Thécamoebians édaphiques par rapport à la surface du sol. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris t.281: 739-741.
- Coûteaux, M.-M. (1985) The effects of compressing forest litter (H layer) on the populations of testate amoebae. Revue d'Ecologie et de Biologie du sol 22(4): 447-461.
- Coûteaux, M.-M., Darbyshire, J.F. (1998) Functional diversity amongst soil protozoa. Applied Soil Ecology 10(3): 229-237.
- Coûteaux, M.-M., Jeanson C.Y. (1977) Essai d'analyse élémentaire de la théque de *Trigonopyxis arcula* (Leidy) Penard (Rhizopoda, Testacea). In: Lohm, U., Persson, T. (Eds.), Soil organisms as components of ecosystems. Ecol. Bull. (Stockholm) 25, pp. 164-172.
- Decloître, L. (1962) Le genre *Euglypha* Dujardin. Archiv für Protistenkunde 106: 51-100.
- Decloître, L. (1976) Le genre *Euglypha* compléments jour au 31. décembre 1974 de la monographie du genre parue en 1962. Archiv für Protistenkunde 118: 18-33.
- Decloître, L. (1978) Le genre *Centropyxis* I Compléments à jour au 31. décembre 1974 de

- la Monographie du genre parue en 1929. Archiv für Protistenkunde 120: 63-85.
- Decloître, L. (1979a) Le genre *Centropyxis* II compléments à jour au 31. décembre 1974 de la monographie du genre parue en 1929. Archiv für Protistenkunde 121: 162-192.
- Decloître, L. (1979b) Mises à jour au 31. 12. 1978 des mises à jour au 31.12.1974 concernant les genres *Arcella*, *Centropyxis*, *Cyclopyxis*, *Euglypha* et *Nebela*. Archiv für Protistenkunde 122: 387-397.
- Decloître, L. (1981) Le genre *Trinema* Dujardin, 1841 révision à jour au 31. XII. 1979. Archiv für Protistenkunde 124: 193-218.
- Decloître, L. (1982) Compléments aux publications précédentes mise à jour au 31. XII 1981 des genres *Arcella*, *Centropyxis*, *Cyclopyxis*, *Euglypha*, *Nebela* et *Trinema*. Archiv für Protistenkunde 126: 393-407.
- Deflandre, G. (1929) Le genre *Centropyxis* Stein. Archiv für Protistenkunde 67: 322-375.
- Derry, L.A., Kurtz, A.C., Ziegler, K., Chadwick, O.A. (2005) Biological control of terrestrial silica cycling and export fluxes to watersheds. *Nature* 433: 728-731.
- Egge, J. K., Aksnes, D. L. (1992) Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Marine Ecology Progress Series* 83: 281-289.
- Epstein, E. (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11-17.
- Farmer, V.C., Delbos, E., Miller, J.D. (2005) The role of phytolith formation and dissolution in controlling concentrations of silica in soil solution and streams. *Geoderma* 127: 71-79.
- Finlay, B.J., Esteban, G.F., Fenchel, T. (2004) Protist diversity is different? *Protist* 156: 15-22.
- Foissner, W. (1985) Protozoologische untersuchungen an almböden im gasteiner tal (Zentralalpen, Österreich). III. Struktur und dynamik der Testaceen- und Ciliatentaxozönose. *Veröffentlichungen des Österreichischen MaB-Programms* 9: 65-95.
- Foissner, W. (1987) Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators, and guide to the literature. *Progress*

- in Protistology 2: 69-212.
- Foissner, W. (1999) Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 95-112.
- Foissner, W. (2006) Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica* 45: 111-136.
- Foissner, W., Adam, H. (1981) Die gemeinschaftsstruktur und produktion der terricolen Testaceen (Protozoa, Rhizopoda) in einigen böden der Österreichischen Zentralalpen (Hohe Tauern, Glocknergebiet). *Veröffentlichungen des Österreichischen MaB-Programms* 4: 53-78.
- 藤井弘志 (2002) 水稻の生育・収量・食味に及ぼすケイ酸の効果. 「ケイ酸と作物生産」(日本土壤肥料学会編), 博友社, 東京, p.39-76.
- Griffiths, B.S., Ritz, K. (1988) A technique to extract, enumerate and measure protozoa from mineral soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20(2): 163-173.
- Heal O.W. (1964a) Observations on the seasonal and spatial distribution of testaceans (Protozoa: Rhizopoda) in *Sphagnum*. *Journal of Animal Ecology* 33: 395-412.
- Heal, O.W. (1964b) The use of cultures for studying Testacea (Protozoa: Rhizopoda) in soil. *Pedobiologia* 4: 1-7.
- Heal, O.W. (1965) Observations on testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) from Signy Island, South Orkney Islands. *British Antarctic Survey Bulletin* 6: 43-47.
- Hedley, R.H., Ogden, C.G. (1974) Observation on *Trinema lineare* Penard (Testacea: Protozoa). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* 26(3): 185-199.
- Ittekkot, V., Humborg, C., Schäfer, P. (2000) Hydrological alterations and marine biogeochemistry: a silicate issue? *BioScience* 50: 776-782.
- Jeanson, C., Coûteaux M.-M. (1977) Microanalyse élémentaire de la théque de Thécamoebiens du genre *Euglypha*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* t.284: 1895-1898.
- Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y., Christie, P. (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation

- of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environmental Pollution* 147: 422-428.
- Lousier, J.D. (1984) Population dynamics and production studies of species of Euglyphidae (Testacea, Rhizopoda, Protozoa) in an aspen woodland soil. *Pedobiologia* 26: 309-330.
- Lousier, J.D., Parkinson, D. (1981a) Evaluation of a membrane filter technique to count soil and litter Testacea. *Soil Biology and Biochemistry* 13: 209-213.
- Lousier, J.D., Parkinson, D. (1981b) The Disappearance of the empty tests of litter- and soil-testate amoebae (Testacea, Rhizopoda, Protozoa). *Archiv für Protistenkunde* 124: 312-336.
- Lousier, J.D., Parkinson, D. (1984) Annual population dynamics and production ecology of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) in an aspen woodland soil. *Soil Biology and Biochemistry* 16(2): 103-114.
- Lucas, Y., Luizão, F.J., Chauvel, A., Rouiller, J., Nahon, D. (1993) The relation between biological activity of the rain forest and mineral composition of soils. *Science* 260: 521-523.
- Meisterfeld, R. (1986) The importance of protozoa in a beech forest ecosystem. *Symposia Biologica Hungarica* 33: 291-299.
- Meisterfeld, R. (2002a) Order Arcellinida Kent 1880. In: Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P.(Eds.), *The illustrated guide to the Protozoa Vol. 2*. Allen Press, Lawrence, KS, pp.827-860.
- Meisterfeld, R. (2002b) Testate amoebae with filopodia. In: Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P.(Eds.), *The illustrated guide to the Protozoa Vol. 2*. Allen Press, Lawrence, KS, pp.1054-1084.
- Meisterfeld, R., Heisterbaum, M. (1986) The decay of empty tests of testate amoebae (Rhizopoda, Protozoa). *Symposia Biologica Hungarica* 33: 285-290.
- Mitchell, E.A.D., Charman, D.J., Warner, B.G. (2008) Testate amoebae analysis in ecological and paleoecological studies of wetlands: past, present and future. *Biodiversity and Conservation* (in press)

- Mitchell, E.A.D., Meisterfeld, R. (2005) Taxonomic confusion blurs the debate on cosmopolitanism versus local endemism of free-living protists. *Protist* 156: 263-267.
- Ogden, C.G. (1981) Observations of clonal cultures of Euglyphidae (Rhizopoda, Protozoa). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* 41(4): 137-151.
- Ogden, C.G. (1983) Observations on the systematics of the genus *Diffflugia* in Britain (Rhizopoda, Protozoa). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* 44(1): 1-73.
- Ogden, C.G., Hedley, R.H. (1980) An atlas of freshwater testate amoebae. British Museum (Natural History), London and Oxford University Press, Oxford.
- Ohta, S., Kumada, K. (1976) Studies on the humus forms of forest soils. I. Microscopic observation and elementary analysis of fractionated horizons of Higashiyama soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22(1): 15-22.
- Rauenbusch, K. (1987) Biologie und Feinstruktur (REM-Untersuchungen) terrestrischer Testaceen in Waldböden (Rhizopoda, Protozoa). *Archiv für Protistenkunde* 134, 191-294.
- Rogers, J.R., Bennett, P.C., Choi, W.J. (1998) Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *American Mineralogist* 83: 1532-1540.
- Santelli, C.M., Welch, S.A., Westrich, H.R., Banfield, J.F. (2001) The effect of Fe-oxidizing bacteria on Fe-silicate mineral dissolution. *Chemical Geology* 180: 99-115.
- Schönborn, W. (1973) Humusform und Testaceen-Besatz. *Pedobiologia* 13: 353-360.
- Schönborn, W. (1975) Ermittlung der jahresproduktion von boden-protozoen I. Euglyphidae (Rhizopoda, Testacea). *Pedobiologia* 15: 415-424.
- Schönborn, W. (1982) Estimation of annual production of Testacea (Protozoa) in mull and moder (II). *Pedobiologia* 23: 383-393.
- Schönborn, W. (1992) Comparative studies on the production biology of protozoan communities in freshwater and soil ecosystems. *Archiv für Protistenkunde* 141: 187-214.
- Schönborn, W., Peschke, T. (1988) Biometric studies on species, races, ecophenotypes and individual variations of soil-inhabiting testacea (Protozoa, Rhizopoda), including

- Trigonopyxis minuta* n. sp. and *Corythion asperulum* n. sp. Archiv für Protistenkunde 136: 345-363.
- Schönborn, W., Peschke, T. (1990) Evolutionary studies on the *Assulina-Valkanovia* complex (Rhizopoda, Testaceafilosia) in *Sphagnum* and soil. Biology and Fertility of Soils 9: 95-100.
- Schönborn, W., Petz, W., Wanner, M. (1987) Observations on the morphology and ecology of the soil-inhabiting testate amoeba *Schoenbornia humicola* (Schönborn, 1964) Decloître, 1964 (Protozoa, Rhizopoda). Archiv für Protistenkunde 134: 315-330.
- Smith, H. G., Wilkinson D.M. (2007) Not all free-living microorganisms have cosmopolitan distributions – the case of *Nebela (Apodera) vas Certes* (Protozoa: Amoebozoa: Arcellinida). Journal of Biogeography 34: 1822–1831.
- Sommer, M., Kaczorek, D., Kuzyakov, Y., Breuer, J. (2006) Silicon pools and fluxes in soils and landscapes – a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 169: 310-329.
- Stout, J.D., Walker, G.D. (1976) Discrimination of mineral particles in test formation by thecamoebae. Transactions of the American Microscopical Society 95(3): 486-489.
- 住田弘一 (1997) 可給態ケイ酸. 「土壤環境分析法」(土壤分析法編集委員会編), 博友社, 東京, pp.273-278.
- 高橋英一 (1987) ケイ酸植物と石灰植物. 農山漁村文化協会, 東京.
- 高橋英一 (2007) 作物にとってケイ酸とは何か, 農山漁村文化協会, 東京.
- Takahashi, E., Ma, J.F., Miyake, Y. (1990) The possibility of silicon as an essential element for higher plants. Comments Agric. Food Chem. 2: 357-360.
- Thomas, R. (1958) Le genre *Plagiopyxis* Penard. Hydrobiologia 10: 198-214.
- Tréguer, P., Nelson, D.M., Van Bennekom, A.J., DeMaster, D.J., Leynaert, A., Quéguiner, B. (1995) The silica balance in the world ocean: a reestimate. Science 268: 375-379.
- Wanner, M. (1999) A review on the variability of testate amoebae: methodological approaches, environmental influences and taxonomical implications. Acta Protozoologica 38: 15-29.

- Warner, B.G., Asada, T., Quinn, N.P. (2007) Seasonal influences on the ecology of testate amoebae (Protozoa) in a small *Sphagnum* peatland in southern Ontario, Canada. *Microbial Ecology* 54(1): 91-100.
- Wilkinson, D.M., Davis S.R. (2000) Rapid assessments of microbial biodiversity using relationships between genus and species richness. *Studies on testate amoebae. Acta Protozoologica* 39: 23-26.
- Yang, J., Beyens, L., Shen, Y.F., Feng, W.S. (2004) Elemental composition of the shell of the Testate Amoeba *Diffugia tuberspinifera* (Sarcodina: Rhizopoda). *Zoological Research* 25(5): 452-455.

副論文

Aoki, Y. (2003) Accurate enumeration and identification of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) in forest soil using scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 55: 791-795.

Aoki, Y., Hoshino, M., Matsubara, T. (2007) Silica and testate amoebae in a soil under pine-oak forest. *Geoderma* 142: 29-35.

青木義幸 (2007) 森林土壌のシリカサイクルにおける有殻アメーバの役割. *土と微生物* 61(1): 61-64.

青木義幸 (2007) 土壌に生息する *Euglyphida* の殻の組成. *原生動物学雑誌* 40(1): 80-81.