

画像解析による土壌糸状菌バイオマス定量法の開発

こが のぶかず そめや たかし
 ○古賀 伸和・染谷 孝
 (佐賀大学 農学部)

【目的】先に演者らは、エチジウムプロミド (EB) を用いて土壌細菌を染色し、その蛍光画像をパソコンで解析することで、土壌細菌バイオマスを定量する蛍光画像解析法¹⁾を提出した。今回は、この手法を土壌糸状菌バイオマスの定量に応用した。

【方法】佐賀大学畑土壌 (大豆) と阿蘇森林土壌 (杉林) を供試した。この 10^2 希釈土壌懸濁液をヌクレポアフィルター上に吸引ろ過した後、蛍光色素 Calcofluor white M2R (CFW) ($1\text{mg}/\text{mL}$)²⁾ で染色した。このプレパラートを、3D 蛍光顕微鏡 (Edge Scientific Instruments 社)³⁾ に供試し、蛍光画像を得た。この 3D 蛍光顕微鏡を用いることで、特殊な斜光照明光学系により焦点深度の深い画像をリアルタイムで得ることができる。この画像を CCD カメラ (日立電子 KP-C251) を介して、パソコン (Power Macintosh 8500 / 132) に取り込んだ。これを画像解析ソフト NIH Image1.62 で解析し、菌糸片と胞子の短径および周囲長を自動測定することで、個々の biovolume を得た。biovolume の積算値 (測定粒子数 $n \geq 300$) から土壌単位量当たりの biovolume を得て、さらに、これからバイオマス炭素を求めた。その換算係数には、土壌細菌バイオマスの定量に用いられる $0.14\text{ pg C}/\mu\text{m}^3$ を暫定的に使用した¹⁾。

【結果と考察】適切な土壌懸濁液の供試液量と視野面積のサイズおよび測定粒子数について検討した。その結果、 10^2 希釈土壌懸濁液を $100\text{ }\mu\text{L}$ 供試し、対物 20 倍のレンズ (視野面積 $200 \times 200\text{ }\mu\text{m}$) を用い、測定粒子数を 300 以上 (約 75 視野 \times 3 プレパラート) 計測することで、土壌糸状菌バイオマスを精度高く定量することができた。

この条件で測定した土壌糸状菌バイオマスは、畑土壌で $321\text{ }\mu\text{g C}/\text{g dry soil}$ 、森林土壌では $776\text{ }\mu\text{g C}/\text{g dry soil}$ であった。これは、Jones-Mollison 法で測定されたイギリスの畑土壌や森林土壌の土壌糸状菌バイオマスの値⁴⁾とほぼ同じレベルであった。Jones-Mollison 法では、フェノールアニリンブルーを用いて土壌糸状菌を染色し、肉眼で菌糸片や胞子を計測する。そのため、主観が入りやすく、熟練も必要とされる。この点、本法では画像解析により、測定の客観化ができた。

微生物バイオマスの測定にはクロロホルム燻蒸法が広く使われている。しかし、細菌と糸状菌を分けて測定することができないという限界がある。先に発表した土壌細菌バイオマスの定量法と本法を組み合わせることで、土壌バイオマスを細菌と糸状菌に分けて定量することが可能になった。この蛍光画像解析法は、土壌中における物質循環など土壌微生物の生態学的役割の解明に大きな役割を果たすと期待される。

- 1) 染谷 孝 (1999) 新版微生物学実験法, (杉山 純多他編) pp. 260-262, 講談社サイエンティフィック.
- 2) Postma J. (1990) *Soil Biol. Biochem.* 22: 89-96.
- 3) 染谷 孝・田中 智佳子・小平 芳裕 (1996) 日本微生物生態学会 講演要旨集 12: p. 42.
- 4) Jenkinson D.S., Powelson D.S. and Wedderburn R.W.M. (1976) *Soil Biol. Biochem.* 8: 189-202.