

土壤微生物生息数を計測するための蛍光顕微鏡画像の処理手法について

岐阜大学工学部

学生員 ○ 清水宏紀

岐阜大学大学院工学研究科

学生員 鈴村貴幸

岐阜大学総合情報メディアセンター

正員 篠田成郎

岐阜大学流域圏科学研究センター

正員 児島利治・李富生

1. 緒言

森林内に生息する土壤微生物は、落葉落枝や生物遺体などの有機物を分解し、森林生態系における物質循環に重要な役割を果たしている。とくに、間伐等の森林管理が行われず、放置された人工林では、土壤微生物の生息数が減少し、森林内での生物多様性の低下のみならず、腐植土層の醸成能力の低下を招き、降雨流出の短期化や濁水長期化などの影響を下流に及ぼすことになる^{1),2)}。こうしたことから、著者らは、2007年10月より、岐阜県郡上市大和町古道地区の郡上市有林において、放置人工林の環境への影響に関する現地観測を継続的に行っている。

土壤微生物の計数には様々な方法が提案されているが、著者らは、微生物種の同定よりも、その生息数と森林管理状態および水収支とを関係づけることを目的とするため、蛍光染色による直接計数法³⁾を用いることにした。写真-1は、現地森林で採取した土壤サンプルから得られた微生物を蛍光顕微鏡で撮影し、これを2値化した画像を示す。この写真に写っている白っぽい靄は、土壤サンプル採取時に混じった石英であり、これにより正確な土壤微生物生息数をカウントすることが困難になっている。そこで本研究では、画像処理ソフトウェア ELDAS を用いて画像の靄を除去することで、より正確な土壤微生物生息数を計測する方法を提案する。

2. 蛍光顕微鏡による土壤微生物計数の概要

まず、蒸留水10mL、ホルムアルデヒド溶液0.7mL、濃度1%のピロリン酸水溶液1mLで調整した保存液に、現地で採取した土壤サンプルを1g固定し、超音波攪拌機に10秒間かけることにより、微生物と土粒子を分離する。このサンプルを0.2 μ mのフィルタ（東洋濾紙製 Membrane filter）を用いて真空吸引濾過した上で、染色剤（Lonza社製SYBR Green II RNA Gel Stains）で微生物の遺伝子を染色し、倒立型蛍光顕微鏡（Carl Zeiss社製Axiovert）で検鏡・画像撮影する。染色剤の最大励起波長および最大蛍光波長はそれぞれ494nmおよび519nmであり、図-1に示すFilter1の励起および蛍光の波長域はそれぞれ450～490nmおよび515～565nmである。

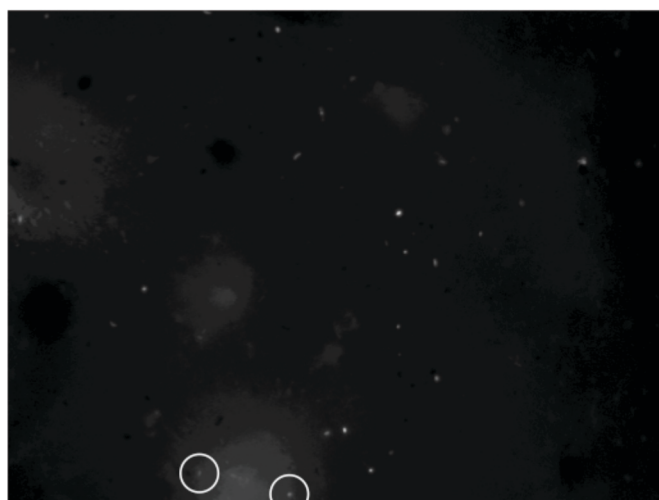


写真-1 Filter1で撮影した画像

3. 画像処理による土壤微生物の抽出

Filter1を用いて撮影した図-1では、土壤微生物だけでなく広い範囲の波長に反応する石英も発光している。そこで、この撮影位置を保ったままで、Filter1を土壤微生物が発光しないFilter43（励起および蛍光波長域がそれぞれ525～575nmおよび535～675nm）に換え、石英のみを発光させて撮影する。その画像を図-2に示す。

得られた画像の濃淡を1～255の輝度値としてデジタル化すると、図-1での土壤微生物のしきい値は輝度値75以上となる。一方、図-2で白く写った石英は輝度値が120より大きい数値となっている。このことからELDASを用いて、しきい値が図-1で75以上、かつ図-2で120以下の画素を取り出して2値化する。この方法による解析画像を図-3に示す。図-1に見られた靄は無くなり、土壤微生物のみがはっきりと見られる。また、図-1左下部に見られる靄の中には土壤微生物のコロニーと思われる小さな光が2つ見受けられる（図中に白枠○印で示す）が、従来の計測ソフト（例えば、三谷商事ビジュアルシステム部製の画像処理・計数ソフトウェアWinR00F）ではこの2つのコロニーはカウントされない。しかし、ここで提案する手法を使うことにより、白っぽく光る靄のみを除去することができ、従来のソフトでも計数することが可能になる。

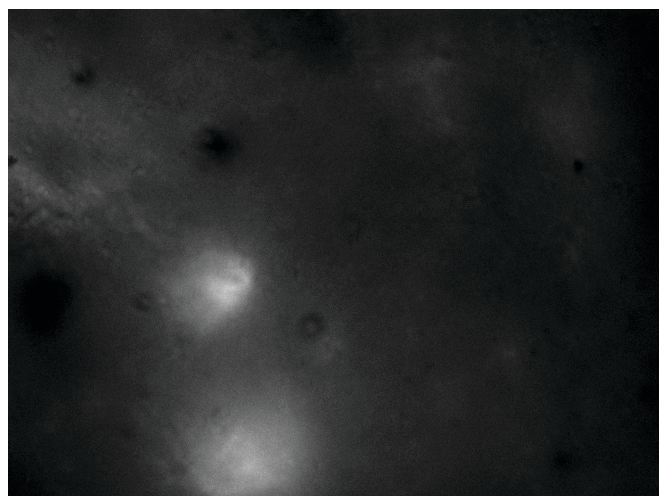


図-2 Filter43で撮影した画像

4. 結語

以上、簡便な画像解析により、蛍光顕微鏡による検鏡画像から土壤微生物だけを抽出する方法を提案することができた。なお、輝度値のしきい値については、ケースごとに決める必要があり、この点については、今後の検討課題として残される。

最後に、現地調査に際して市有林の利用を許可していただいた岐阜県郡上市ならびに森林調査の助力をいただいた NPO 法人ウッズマンワークショップに深謝の意を表すとともに、本研究が、平成 18～21 年度科学研究費補助金基盤研究 B（課題番号：18310021）および平成 22 年度科学研究費補助金挑戦的萌芽研究（課題番号：22651012）の一部であることを付記する。

参考文献

- 1) 今井慎太郎：森林土壤環境に及ぼす間伐効果に関する微生物調査とその評価，平成21年度岐阜大学工学部卒業論文，2010。
- 2) 鈴木貴幸ら：間伐の有無による林床土壤流出および粒径分布の相違に関する現地観測，平成21年度土木学会中部支部研究発表会講演概要集，2010。
- 3) 土壤微生物研究会：新編土壤微生物実験法，養賢堂，1992。

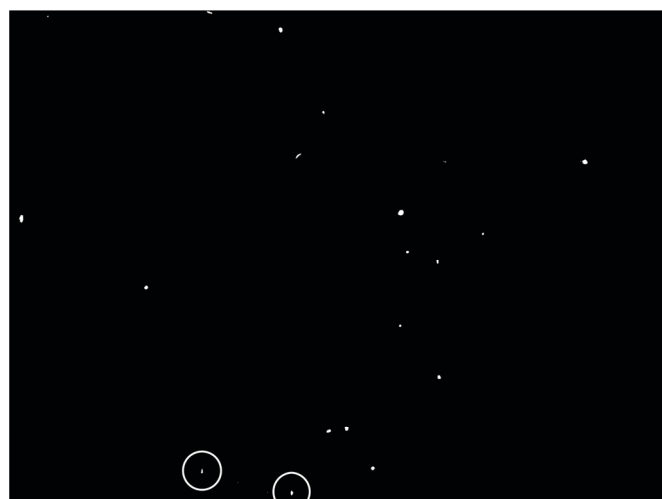


図-3 土壤微生物だけを抽出した解析画像