

## 「原著」

# 落射蛍光顕微鏡を用いたバクテリア細胞の計数・観察

鋤崎 俊二

### 1. はじめに

微生物(microorganism)は、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いることによって、はじめてその形態が識別される生物群である。微生物は核膜構造の違い等から、酵母や菌類等の真核生物とバクテリアあるいは放線菌等の原核生物、およびバクテリオファージ等のウイルスに大別することができる。それぞれの微生物は、形態、大きさ等が全く異なるため、その計数・観察手法は同一ではない。ここでは、主に水圏に生息する微生物の中で、特に現存量が多いと考えられるバクテリアを対象とした計数・観察手法を中心に述べる。

一般に、水圏におけるバクテリアの役割は、有機物の分解者(Decomposer)のみでなく、処理屋(Scavenger)としても重要な働きをすると考えられている(加藤, 1985)。さらに、バクテリア細胞自身が、高次の捕食者にとって餌料源ともなり得る(Lenz, 1977; Azam and Hoodson, 1977; Ducklow and Kirchman, 1983)。このような微生物食物環(Microbial Loop)の観点から、水中におけるバクテリアの分布構造や機能を調べることは、水圏の低次生産生態系における物質収支を解明するうえで極めて重要となる(鋤崎ら, 1990)。

このような課題に関連して、これまで陸水域あるいは海洋の全域にわたって、バクテリアの数および量等の測定や見積りがなされてきた(例えば、Ducklow and Hill, 1985; Fuhrman and Azam, 1980 など)。

水圏に生息するバクテリアは、大半が0.2  $\mu\text{m}$  から約1  $\mu\text{m}$  の大きさ(まれに5  $\mu\text{m}$  以上の大きさのものも出現する)であり、これらの細胞を通常の光学顕微鏡下で直接、観察・計数することは容易ではない。このため、従来からエリスロシン等による染色法を用いた光学顕微鏡下での観察が行われてきた。しかし、この手法では、0.5  $\mu\text{m}$  以下の細胞はよく見えないため、しばしば微生物数を過小評価することが指摘されてきた(木暮, 1985)。

バクテリア細胞のより正確な観察・計数が可能になったのは、蛍光物質を用いた計数手法の開発(Fobbie et al., 1977)による。これは、バクテリア細胞が持つ核酸を直接蛍光物質で染色し、蛍光顕微鏡下で観察するものである。蛍光顕微鏡を用いた手法の場合には、微小粒子(0.2  $\mu\text{m}$  前後)も比較的鮮明に観察することが可能であるため、特に環境中のバクテリア細胞の「数」に関する情報を必要とする場合には有効である。さらに、バク

テリア細胞のみが選択的に蛍光を発するため、数に関する情報だけでなく、細胞の大きさ、分裂状態および懸濁物質への付着状況等に関する情報も同時に入手することが可能となった。本報告では、落射蛍光顕微鏡を用いた微生物の計数・観察手法について概括し、さらに本手法を用いて得られる各種情報について紹介する。

## 2. 観察・計数手法

### 2. 1 試料の調整

ある試料中のバクテリアの細胞数を計数するためには、まず、試料を顕微鏡観察に適した状態にする必要がある。水中に生息する微生物を計数する場合には、試水の一定量について直ちに染色処理を行えばよいが、底泥中や生物体内に生息するバクテリアを対象とする場合には、バクテリア細胞と泥粒子あるいは組織とを分散させる必要がある。そのため、試料の一定量を孔径  $0.2\mu\text{m}$  の Nuclepore filter (Nuclepore Corp.) で濾過した蒸留水(または、濾過海水)中に懸濁させ、物理的あるいは化学的に分散させる手法が用いられる。底泥試料の場合には、AUTOMATIC MIXER (Scientific Industries Inc.) 等で約10分間十分に分散させる。この操作だけでは泥粒子に付着している微生物を完全に分散させることができないため、軽く超音波をかけるか、Tween 80 (和光純薬工業) 等の界面活性剤等を添加することもあるが、顕著な効果は得られないようである(清水, 1985)。

生物体内に生息する微生物の場合には、

試料の一定量をBrender(日本精機)等で破碎する方法が有効であろう。ただし、物理的にバクテリア細胞を分散させるときには、細胞の破壊をまねくことのないよう事前に分散強度等を検討しておく必要がある(須藤, 1988)。

通常は、分散液の上水をバクテリア細胞の観察・計数用試料として使用する。

### 2. 2 蛍光物質による染色

水試料の場合には、試料に最終濃度が0.01%になるようAcridin Orange(東京化成)を添加し、約2分間染色する。これを、あらかじめSudan Black B(東京化成)あるいはIrgalan Black(Ciba-Geigy Corp.)等で黒暗色に染色した孔径  $0.2\mu\text{m}$  のNuclepore filter(直径25mm)で濾過する。濾水量は、フィルター上のバクテリア粒子を均一に分散させる必要があることから、最低2ml以上必要である。底泥試料や懸濁物質の多い試料の場合には、Acridin OrangeのかわりにDAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole:Sigma Co. Ltd.)を使用する場合がある(Porter and Feig, 1980)。これはAcridin Orangeでは、バクテリア細胞以外の無機懸濁粒子等もある程度染色されるのに対し、DAPIの場合には、バクテリア細胞中のDNAをより特異的に染色するため、懸濁粒子と区別がしやすいことによる。なお、DAPI染色時には試水のpH値をやや下げることにより、より多くの細胞が染色される傾向にある(表1)。

Acridin Orangeで染色されたバクテリア細胞は淡黄色から橙色の蛍光を発し、

DAPI染色されたバクテリア細胞は淡白色から淡青色の蛍光を発することから、他の粒子との区別が可能となる。

表1 DAPI染色時の試料水pHと計数値の関係

pH	計数された総細胞数 ( $\times 10^7$ cells/ml)
3.03	1.59 $\pm$ 0.35
3.81	4.32 $\pm$ 0.73
5.05	4.14 $\pm$ 1.00
6.02	3.72 $\pm$ 0.76
6.96	2.82 $\pm$ 0.36
7.96	3.78 $\pm$ 0.73

### 2.3 バクテリア細胞の計数

バクテリア細胞の計数にあたっては、落射蛍光顕微鏡を用いる。落射蛍光顕微鏡システムには、各種の蛍光物質に対応できるように複数のフィルターセットが装着されているが、Acridin OrangeおよびDAPIの吸収波長に対応した、専用のフィルターを使用する必要がある(表2)。

表2 落射蛍光顕微鏡に必要なフィルター等の組合せ(Nikon社製の場合)

フィルター等	アクリジンオレンジ	DAPI
光源	100W 水銀	100W 水銀
ダイクロックミラー	510	400
励起フィルター	450-490	330-380
吸収フィルター	520	420
対物レンズ	Plan 100	Plan 100

バクテリア細胞の計数には、接眼レンズ内に5mmを5等分したメッシュ枠を装着し、その中にある細胞の全数を計数する。通常一視野当り30~40細胞程度出現するよう試料を調整すると、統計的に最も安定した値が得られる(Kirchman et al., 1982)。細胞数がこれ以上の場合には、孔径0.2 $\mu$ mのNuclepore filterで濾過した蒸留水で希釈し、細胞数が少ない場合には、濾水量を多くする必要がある。一枚のフィルターにつき10視野を計数し、その平均値と濾水量から以下の式(木暮, 1985)にしたがって試水1ml当りの細胞数を算出する。

$$\text{総細胞数} = \frac{a \cdot b}{c \cdot d} \text{ (cells/ml)}$$

ここでaは、一枠中の平均細胞数、bはフィルターの濾過面積、cは、試料水の濾過量(ml)、dは一枠の面積である。

底泥試料の場合は、さらに懸濁させた濾過水の量(ml)を乗じ、底泥量(g)で割ることにより総細胞数(cells/g)を算出することができる。

なお、細胞数を表示する場合には、10視野間での標準偏差値を併記しておくとうい。

さらに、バクテリアの計数および観察には、研究者によって判断基準が異なるため(Someya et al., 1988)、どの基準を採用するかは、事前に充分検討する必要がある。

### 3. バクテリア細胞の選択的計数

Acridin OrangeあるいはDAPI染色を用いた直接計数法により、試料中に存在するバクテリアの総細胞数に関してはかなり正確な情報を得ることができる。しかし、バクテリアの種類に関する情報を得ることはできない。そこで、抗原抗体反応を利用して、特定のバクテリア細胞のみを計数する手法(Fluorescent Antibody:FA 法)が検討されている。これは、目的とするバクテリア細胞にウサギから得られた目的菌の抗体を反応させ、さらにウサギ抗体に対して、蛍光色素でラベル済みのヤギ抗体を反応させることにより、バクテリア細胞・ウサギ抗体・ヤギ抗体という3者間の結合体を形成させる。この結合体は、蛍光顕微鏡下で発色することから、目的菌の数を計数することが可能となる(木暮, 1984)。本手法は、極めて特異性が高いため、微生物の種レベルまでの区分が可能であると考えられている。ただし、本手法を水圏のバクテリアに適用した事例は少なく、ウサギ抗体もごく限られたバクテリアのものしかない。したがって、ウサギ抗体のないバクテリアの計数を行う場合には、新たに抗体を製作する必要がある。蛍光抗体の取り扱い方法および抗体の製作方法の詳細についてはいくつかの報告(例えば、Dahel and Laake, 1982など)がある。

### 4. バクテリアの観察

#### 4. 1 バクテリア細胞の存在形態別の計数

水圏におけるバクテリア細胞は、主に

浮遊状態(Free living Bacteria)のものと懸濁粒子等に付着した状態(Particulate associated Bacteria 又はParticulate attached Bacteria)で存在している。河口域等の懸濁粒子が多い水域を除けば、一般に浮遊状態のバクテリア数の方が、懸濁粒子に付着しているものと比較して多い(Fukami et al., 1983)。しかし、懸濁粒子に付着しているバクテリアの大きさは、浮遊性のものより比較的大きくなる(深見, 1988)ことが報告されている。これは、有機物濃度が比較的薄い水中でも懸濁物質の内部および周辺には有機物が高濃度に凝集し、付着したバクテリアの有効な栄養源となるため、細胞が肥大化すると考えられている(Hodson et al., 1981)。数の少ない付着性のバクテリアも、その現存量でみれば、水圏中のバクテリア群集にとって無視できない程大きいと考えられる。

また、浮遊性および付着性バクテリアは、有機物の分解過程において果たす役割が異なることも想定され、水圏中の両者の数量的関係を明かにすることは、微生物の動態を考えるうえにおいて重要である。懸濁粒子に付着するバクテリアの計数にあたっては、黒暗色に染色した孔径  $1.0\mu\text{m}$  のNucleopore filterで試水を濾過することにより、浮遊性のバクテリア細胞を取り除いた後、Acridin OrangeあるいはDAPI染色を行う。蛍光顕微鏡下で視野内に出現した懸濁粒子の数とそれに付着しているバクテリアの細胞数を計数する。

#### 4. 2 バクテリア細胞の大きさからの 現存量推定

水圏生態系におけるバクテリアの位置を明かにしていくうえで、バクテリアの量を炭素量に変換して論議する場合がある。これは、バクテリアを化学量論的な、あるいは速度論的な論議に持ち込むには、バクテリアの現存量を炭素量等に置き換え、物質の流れの面から考える必要があるためである(加藤, 1988)。

微生物態現存量の見積りには、その手法から大きく2つに区分することができる。一つは、細胞内に含有する物質を測定し、その量を炭素量に換算する手法であり、いま一つは、細胞体積から微生物態炭素量を概算する手法である。細胞内物質としては、ATP量(Strickland and Parsons, 1968)、LPS (lipopolysaccharide)量(Stanley et al., 1977)、DNA量(Holm-Hansen et al., 1968)等があるが各量からの炭素量への換算係数については、十分な知見はない。

そこで、より簡便な細胞体積からの炭素量への見積りがなされている(Bratbak and Dundas, 1984; 木暮, 1985)。蛍光染色されたバクテリア細胞は、その形態が比較的鮮明に観察されることから、大きさの測定が可能である。バクテリア細胞の計数時に、一方の接眼レンズ内にマイクロメーターを装着しておき、細胞の大きさを同時に計測する。計測部位は、球状菌の場合にはその直径(w)を、桿状菌の場合には、その長さ(L)と幅(w)である。これらの測定は、一試料について約50細胞以上行う。細胞サイズからの体積換算

は、次の式に近似して推定することができる。

$$\text{球状菌} : \text{Vol.} = 4/3 \cdot \pi \cdot (w/2)^3$$

$$\text{桿状菌} : \text{Vol.} = \pi \cdot (w/2)^2 \cdot (L - 2/3 \cdot w/2)$$

より簡便な手法として、試水を孔径の異なる(0.4  $\mu\text{m}$ , 0.6  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$ )Nucleopore filter で濾過し、各フィルター上に捕集されたバクテリア数と分画した孔径サイズの平均値から細胞体積を概算することもできる(加藤, 1985)。

この他、バクテリア細胞の大きさおよび数をビデオカメラを用いて直接画像解析する手法も検討されており(Sieracki et al., 1985; Kogure and Koike, 1987)、さまざまな水域で適用されつつある。

炭素量への換算には、細胞の比重を1.1、乾重量:湿重量比を0.22、炭素量:乾重量比を0.5と仮定して推定する方法(木暮, 1984)、あるいは、細胞体積( $\text{mm}^3$ )当り0.22mgC(Bratbak and Dundas, 1984)~0.38mgC(Lee and Fuhrman, 1987)という係数を用いる方法がある。自然界に生息するバクテリアは、その栄養状態によって炭素の含有量が変化することが考えられるため、上記の換算係数が現場のバクテリアの炭素量を代表しているかどうかは不明であるが、自然界のバクテリアの現存量を概算するには有効な手法であると考えられる。

#### 4. 3 分裂中の細胞数からの増殖速度の推定

水圏中に生息するバクテリアの増殖速度を推定することは、水域の物質代謝速度を考えるうえにおいて重要な項目の一つにあげられる(Ducklow and Hill, 1985)。

バクテリアの増殖速度を測定する手法としては、ラベルしたチミジンの細胞内への取り込みからDNA合成速度を推定し、増殖速度に変換する手法(Fuhrman and Azam, 1982)および細胞数の変化を直接測定することにより増殖速度を求める方法(Ducklow and Hill, 1985)などがあるが、いずれの手法も一定期間の培養操作が必要となる。Hargstonら(1979)は、増殖中のバクテリア群中に占める分裂中の細胞数の割合(Frequency of Dividing Cells:FDC)を測定し、これがバクテリアの増殖速度と対応していることを報告した。FDCを用いた手法の場合、培養操作なしでバクテリアの増殖速度を見積ることができる。バクテリアを対象としたFDCの実測例(Newell and Christian, 1981)では、総細胞数に対するFDC値は、約2~10%の範囲にあった。一般に、FDC値は水温と関連があることから、Hagstrom and Larsson(1984)は表3に示す関係式を培養細胞を用いた実験から導き出している。

FDC法の理論的裏付けは、現在までのところ充分にはなされていない(木暮, 1984)が、水圏におけるバクテリア群集の増殖速度を比較的簡便に推定できる面では有効な手法である。

表3 培養細胞から導き出されたFDCと増殖速度の関係

培養温度 (°C)	関係式
5	FDC = 60.2 $\mu$ + 5.5
10	FDC = 70.0 $\mu$ + 3.8
15	FDC = 36.6 $\mu$ + 3.5
20	FDC = 21.2 $\mu$ + 0.5

$\mu$ : 増殖速度 (hr<sup>-1</sup>)

#### 5. 培養法との併用による生細胞数の推定

蛍光物質を用いた総細胞数の計数では、試料中のすべてのバクテリア細胞を観察計数しているため、生・死菌の区別を行うことはできない。従来、生きた微生物の数を知らるために、合成培地を用いた平板法(Simizu et al., 1983)やMPN法(清水, 1985)等の培養計数法が使用されてきた。しかし、これらの手法を用いた場合、生菌数は総細胞数のほぼ1/100から1/1000程度と少なくなる等、さまざまな問題点が指摘されている(清水, 1972)。

そこで、実際に基質を取り込み、呼吸、代謝、増殖などを行っているバクテリア細胞のみを選択的に蛍光顕微鏡下で計数する手法が考えられている。その一つに、DNA合成阻害物質を用いたDVC法(Direct Viable Count, Kogure et al., 1980)がある。

DVC法は、試水に酵母エキス等の基質とDNA合成阻害物質(Nalidixic Acid: TCI Co. Ltd.)をそれぞれ0.025%、0.002%になるよう添加し、20°C暗条件下で6時間培養を行う。培養期間中、バクテリア細胞は、DNA合成を阻害されているため、

分裂・増殖することはできない。一方、RNA あるいはタンパク質合成は、Nalidixic Acidでは阻害されにくいため、バクテリア細胞は成長のみ行うことを利用した手法である。生菌数は、蛍光顕微鏡下で伸長あるいは肥大した細胞を観察・計数して判定する。ここで重要なのは、細胞の成長をどのように判断するかである。加藤(1988)は、培養前後の試水を0.6  $\mu\text{m}$  のNuclepore filterで濾過し、フィルター上に捕集される細胞数の変化から生菌数を推定している。鋤崎ら(未発表)は、試料中のバクテリア粒子の大きさを直接計測し、その体積分布の変動から生菌数を判定する手法を検討している。

本手法は、比較的短時間に生菌数を推定できることから汎用性に優れている。

蛍光顕微鏡を用いた計数・観察手法には、この他、呼吸活性を持つバクテリア細胞のみを計数する方法(Tabor and Neihof 1982)、あるいは放射性同位元素を用いたマイクロオートラジオグラフィ法(Tabor and Neihof, 1982) 等があるが、その取り扱い方法の難しさからまだ多くの報告例はない。

## 6. おわりに

ここでは水圏におけるバクテリア細胞の計数・観察手法と、その結果得られるさまざまな情報に関して紹介した。蛍光顕微鏡を利用した計数、観察手法はバクテリアの数に関する情報だけでなく、量や増殖速度等に関する情報も、多くの情報を与えてくれる。

『バクテリア等の微生物は、水界中では最も数的に多い生物である(清水, 1985)』。この事実に関し誰もが疑問の余地を持たなくなったのは、顕微鏡下で直接微生物の数を計数できる手法が確立されてからである。蛍光顕微鏡を用いることによって、有機物濃度が極めて低く、高水圧・低水温の深海底付近においてさえ1 mlの海水中には1000個以上のバクテリア細胞が存在し、深海域に生息する生物群集中の主要な構成群となることも明かにされてきた(鋤崎ら, 1988)。

さらに、その現存量も炭素量からみると、全生物量の約 1/4に達することもしばしばある(Maeda and Taga, 1979) 等、水圏生態系を構成する生物群のなかでも量的に無視できないことも明かにされつつある。しかし、蛍光顕微鏡を用いて得られる情報のみによって、水圏のバクテリア群集の動態を論じられるわけではない。本手法は、あくまでも数および大きさから水圏におけるバクテリアの役割を推察しているにすぎない。したがって、水圏の低次生産生態系におけるバクテリア群集の動態を明かにするためには、有機物の取り込み速度、あるいは呼吸速度等の代謝活性を直接測定する手法等も同時に採用していく必要があるだろう。

引用文献

- Azam F. and R. E. Hoodson, 1977. Size distribution and activity of marine microheterotrophs, *Limnol. Oceanogr.*, Vol. 22:495-502.
- Bratbak D. and I. Dundas, 1984. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:755-757.
- Dahle A. B. and M. Laake, 1982, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 43:169-176.
- Ducklow H. W. and D. L. Kirchman, 1983. Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hodoson River plume, USA, *Plankton Res.*, Vol. 5, No. 3. :
- Ducklow H. W. and S. M. Hill, 1985. The growth of heterotrophic bacteria in the surface water of warm core rings, *Limnol. Oceano.*, Vol. 30, No. 2:239-259.
- Fuhrman J. A. and F. Azam, 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 39:1085-1095.
- Fuhrman J. A. and F. Azam, 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters, evaluation and field results, *Mar. Biol.*, Vol. 66:109-120.
- Fukami K., U. Simidu and N. Taga, 1983. *Can J. Microbiol.*, Vol. 29:253-255.
- 深見 公雄, 1988. 海洋生態系における付着細菌と浮遊細菌, *海洋科学*, Vol. 20, No. 2:85-90.
- Hagstron A., V. Larsson, P. Horstedt and S. Normark, 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments, *App. Environ. Microbiol.* 337:805-812.
- Hobbie J. E., R. J. Daley and S. Jasper, 1977. Use of Nuclepor Filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, *App. Environ. Microbiol.*, Vol. 33:1225-1228.
- Hodson R. E. and A. E. Maccubbin and L. R. Pomeroy, 1981. *Mar. Biol.*, Vol. 64:43-51.
- Holm-Hansen O. and W. H. Sutcliffe, Jr. and J. Sharpe, 1968. *Limnol. Oceanogr.*, 13:507-514.
- 加藤憲二, 1985. 水界生態系の中のバクテリア, -その働きと戦略-, *生物科学*, Vol. 55, No. 4:250-254.
- 加藤 憲二, 1986. 水圏生態系におけるバクテリアの新しい生態像, -現存量・増殖速度とその推定方法-, *公害*, Vol. 23, No. 4:1-9.
- Kirchman K., J. Sigda, R. Kapuscinski and R. Mitchell, 1982. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 44:376-382.
- Kogure K. and I. Koike, 1983. Particulate counter determination of bacterial biomass in seawater, *Appl.*



- Environ. Microbiol., 53:274-277.
- Kogure K., U. Simidu and N. Taga, 1980. Distribuion of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan, Can. J. Microb., Vol. 26:318-323.
- 木暮 一啓, 1985. 海洋微生物研究法, 門田・多賀編, 学会出版センター: 33-40.
- 木暮 一啓, 1985. 生態系の中の微生物, 微生物生態学Ⅱ, 共立出版株式会社, :12-90.
- Lee S. and Fuhrman J. A., 1987. Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton, Appl. Environ. Microbiol. 53:1298-1303.
- Lenz J., 1977. On detritus as a food source for pelagic filter-feeders, Mar. Biol., Vol. 41:39-48.
- Maeda M. and N. Taga, 1979. J. Appl. Bacteriol., 47:175-182.
- Newell S. Y. and R. R. Christian, 1981. Frequency of dividing cells as an estimator of bacterial productivity, App. Environ. Microbiol., 42:23-32
- Porter K. G. and Y. S. Feig, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, Limnol. Oceano., Vol. 25, No. 5:943-948.
- Sieracki M. E., Johnson P. W., and Sieburth J. M., 1985. Detection, enumeration and sizing of plankton bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy, Appl. Environ. Microbiol., Vol. :799-810.
- 清水 潮, 1985. 海洋微生物研究法, 門田・多賀編, 学会出版センター:33-52
- 清水 潮, 1972. 海洋の微生物とその研究の展望, 海洋科学, Vol. 20, No. 1: 4-6.
- 清水 潮, 1982. 海洋環境測定, 黒木敏郎編, 恒星社厚生閣:106-151.
- Simidu U., W. Lee and K. Kogure, 1983. Comparison of different techniques for determining plate counts of marine bacteria. 日水誌, Vol. 49:1199-1203.
- Stanley W. W., T. J. Novitsky, H. L. Quinby and F. W. Volois, 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 33, No. 4:940-946.
- Someya T., Nagata T., Konda T., Yamamoto M., Morikawa K., Fukui M., Kuroda N., Takahashi K., Oh S., Mori M., Araki S., and Kato K, 1988. Intercalibration for counting planktonic bacteria by the acridine orange direct count method.
- 須藤 隆一, 1988. 環境微生物実験法, 講談社サイエンティフィック:104-132.

鋤崎 俊二, 辻 義人, 長沼 毅, 池本  
栄子, 堀田 宏, 1989. 深海域に  
おける微生物の現存量および呼吸速  
度の推定, 「しんかい2000」研  
究シンポジウム講演要旨集.

鋤崎 俊二, 辻 義人, 長沼 毅, 池本  
栄子, 堀田 宏, 1990. 深海底泥中  
における微生物の動態, - 分布特性  
および呼吸速度-, 海洋科学技術セン  
ター試験研究報告, 第23号, 印刷  
中

Tabor P. S. and R. A. Neihof, 1984.

Improved method for detemination  
of respiration individual micro-  
organisms in natural waters,  
Appl. Environ. Microbiol., Vol. 43,  
No. 6:1249-1255.