

堆積物中に存在するバクテリアの細胞数計数方法

鋤崎 俊二・鈴木 信也・江里口 悦子

1. はじめに

水柱におけるバクテリアの総細胞数(以下、総菌数と称する)を計数する場合、落射式蛍光顕微鏡を用いた手法が一般に用いられている。この手法は、バクテリアがもつ核酸(DNA や RNA)を選択的に染色する蛍光染色剤(DAPI; 4', 6-diamino-2-phenylindole や アクリジンオレンジ; Acridine orange など)を使用しており、大きさで0.2 μm 程度の微小細胞も比較的鮮明に観察することができ(写真1)、特に環境中の総菌数に関する情報を必要とする場合には有効である。

水試料を対象にした総菌数測定のための試料固定方法や、計数方法に関してはすでに多くの報告(Hobbie et al., 1977; Porter and Feig, 1980; 鋤崎, 1990; 三好, 1990; 丸山・加藤, 2003 など)があり、これらの方法を使用することで単位水試料あたりの総菌数(例えば、cells/ml)が10% 程度の誤差で計数できる。

一方、堆積物中に存在するバクテリアの総菌数を精度良く計数し、単位堆積物試料あたりの総菌数(例えば、cells/g 乾泥)として表記する方法を報告した

例は少ない。水試料中と異なり、堆積物中に存在するバクテリアは堆積物粒子に付着しているものが多く、堆積物の質的違いなどによって付着する細胞数も大きく異なる。一定量の堆積物に直接蛍光染色剤を滴下し、蛍光顕微鏡下でバクテリアの存在の有無を確認することは可能であるが、付着面におけるバクテリア細胞の不均一分布が大きいことや、堆積物の裏面に付着する量がわからないため、正確な総数を把握することは難しい。

このため、Epstein and Rossel(1995)によって、堆積物表面からのバクテリア細胞の剥離方法の検討がなされ、界面活性剤と超音波分散器を併用することで堆積物中のバクテリア細胞がより精度よく計数できることが報告された。高津・加藤(2003)も一定量の堆積物をろ過除菌した海水に懸濁させ、ブレンダーで十分に攪拌した後、超音波による分散処理することで、堆積物表面からのバクテリア細胞の剥離ができるとしている。

ここでは、これらの報告例を参考にしながら、当社で用いている海域堆積物中に存在するバクテリアの細胞数を計数する方法を紹介する。

2. 試料の採取

2. 1 固定液と試料採取容器

最終濃度が1% になるようボラックスなどで中和したホルマリン海水を用意する。中性ホルマリン濃度が1% と低いのは、固定によるバクテリア細胞の破裂などを防止するためである。また、使用する海水は事前に試料採取場所から採取したものか、試料採取場所の塩分に調整した人工海水を用いてい

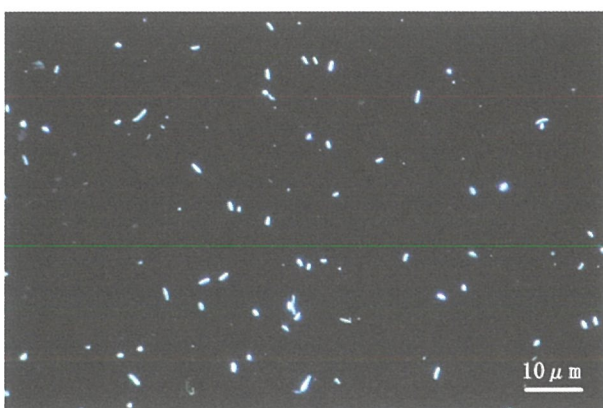


写真1 落射式蛍光顕微鏡で見た水中のバクテリア細胞(DAPI 染色法の例)

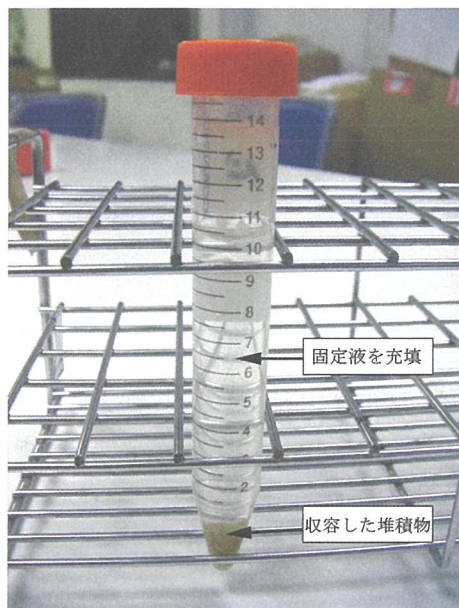


写真2 堆積物固定容器
(容器は 15 ml 容積の Corning 社製を使用)

る。これを、孔径 0.2 μm 以下のヌクレポアフィルターを用いてろ過除菌する。ろ過除菌したホルマリン海水は、事前に 0.2 μm 以上のバクテリア細胞が混在していないことを核酸染色剤による直接計数法 (Hobbie et al., 1977; Porter and Feig, 1980) を用いて確認しておく。

ろ過除菌したホルマリン海水の 10 ml を容積 15 ml 程度のガンマ線滅菌済みのポリプロピレン製容器 (例えば Corning 社製の遠沈管) に分注し、固定容器とする (写真2)。堆積物湿重量あたりの総菌数が知りたい場合には、この時点で固定容器の総重量を測定しておく必要がある。

固定容器は、保存期間中の固定液の揮発や中性ホルマリン濃度が低いことによる微生物の増殖を防止するため、密栓し冷蔵保管しておく。

2. 2 堆積物試料の採取

清浄な小型のスパテラなどを用い、干出した干潟面などは直接に、海底泥は採泥器で取得した堆積物試料から約 1 cm³ 程度の堆積物を採取し、固定容器に収容する。ちなみに当社では、1 ml 用の滅菌済みマイクロピペットチップを 1 本ずつアルミ箔で包んだものをスパテラの代用品に用いている (写真3)。収



写真3 堆積物を採取するために用いているマイクロピペットチップ
上：アルミ箔で包んだマイクロピペットチップ
下：採取時にはアルミ箔の一部を剥離させて使用する
(チップの根元(白円部分)をスパテラとして使用する)

容する堆積物は、10 ml の固定液量に対して 1 cm³ 以上を収容してはならない。これは、これ以上の堆積物を収容した場合、以下に示す超音波分散器による堆積物からのバクテリア細胞の剥離効率が著しく低下する (Epstein and Rossel, 1995) ためである。

堆積物を収容した固定容器は、次項に示す前処理段階まで冷暗状態で保存する。

3. 試料の前処理

3. 1 堆積物粒子からのバクテリア細胞の剥離

堆積物を収容した固定容器の重量を測定する。事前に容器と固定液の総重量が測定されているため、両者の差分が堆積物の湿重量に相当する。

堆積物粒子に付着しているバクテリアを剥離させる方法として Epstein and Rossel (1995) は、Tween 80 とピロリン酸 (sodium pyrophosphate) を用い、両者での剥離効果の違いを検討しており、ピロリン酸のほうがより多くのバクテリア細胞を剥離させることができると報告している。このため、筆者らもピロリン酸を試料中に 0.001 M (0.266 g/l) になるよう滴下し、ペン式の超音波分散器を用いて剥離させている。なお、超音波分散器は、メーカーや機種により周

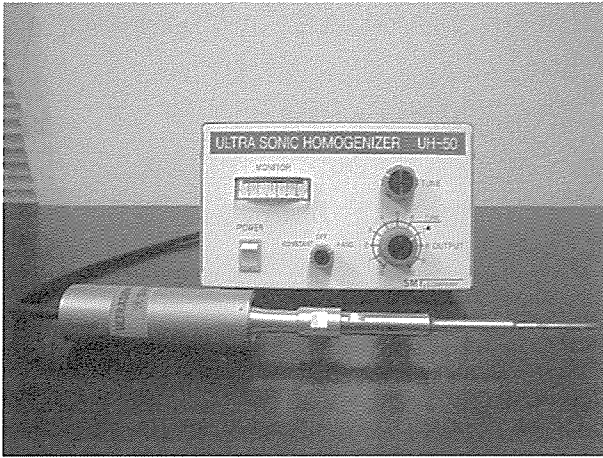


写真4 超音波分散器の例

波数や強度が異なるため、バクテリア細胞を破損させないよう、事前にその性能を把握しておく必要がある。写真4には超音波分散器の例を示した。性能は最大出力 50 W、周波数 20 kHz のエスエムテ社製(UH-50)である。図1は、この超音波分散器を用い、シルト(採取場所; 東京湾内底泥)、細砂(同; 神奈川県八景島)、細礫(同; 水槽)およびサンゴ砂(同; 沖縄県)の各堆積物からバクテリア細胞を剥離させるために適した分散時間を検討した例を示した。いずれの堆積物ともに超音波処理までは同様の前処理を試しており、出力 35 W の条件下で超音波処理を実施した。

シルト、細砂および細礫試料では、ほぼ 45 秒の分

散時間で最も多くの細胞が剥離される傾向にある。それ以上の時間では細胞の破損にともなうと思われる細胞数の減少が認められる。このため、本機種を使用する場合には 45 秒間の処理時間での剥離処理を行うことにしている。サンゴ砂を対象とした場合には、分散処理時間が長ければより多くの細胞が剥離される傾向にあり、他の堆積物とは傾向が異なる。サンゴ砂の場合、砂表面に多くの空隙があり、バクテリア粒子がこの空隙内にも存在する可能性がある。このため、より長時間サンゴ砂を超音波処理することで、サンゴ砂が破碎され、空隙内のバクテリア細胞が剥離されたと考えられる。ただし、超音波分散処理の時間を長くしすぎると細胞の破損が懸念されるため、サンゴ砂のような空隙を多く有する堆積物を対象とする場合には、事前にブレンダーなどでサンゴ砂粒子を微細化した後に、超音波分散処理するなどの考慮が必要であろうと思われる。

3. 2 総菌数計数用試料の作成

超音波分散処理後、堆積物を 1 分間静沈(Epstein and Rossel, 1995)させ、その上澄み液を試料とする。通常、堆積物中の総菌数は水試料に比較し単位体積あたりの数が数桁多い。このため、ろ過捕集する試料の量は 0.05 ~ 0.2 ml 程度である。通常使用する黒暗色に染色した孔径 0.2 μm のヌクレポアフィル

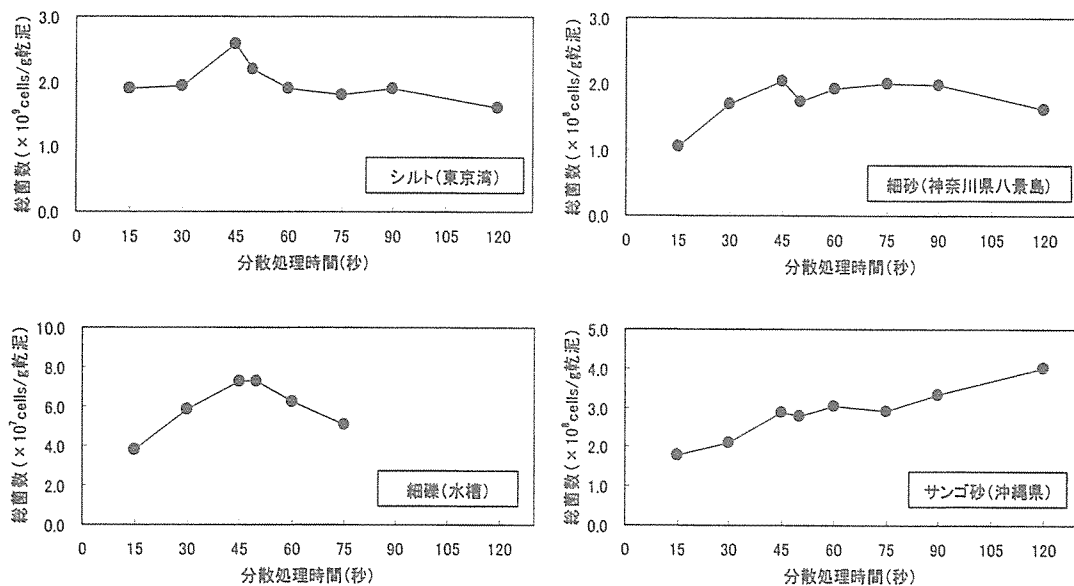


図1 超音波分散器を用いた分散処理時間と総菌数の関係

ター(直径 25 mm)でろ過捕集する場合には、フィルター面に捕集されるバクテリア細胞を均一に分散させる必要がある。そこで、試料に 3 ml 程度のろ過除菌した最終濃度が 1% の中性ホルマリン海水を加えて希釈・攪拌し、ろ過捕集する方法を採用している。

4. 総菌数の計数

バクテリア細胞は、水試料と同様の方法 (Porter and Feig, 1980) で蛍光物質を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で計数する。使用する蛍光物質は DAPI を推奨する。水試料で多用されているアクリジンオレンジは、混在する微細な堆積物も染まるため、バクテリア細胞との区別がつきにくく堆積物試料を対象と

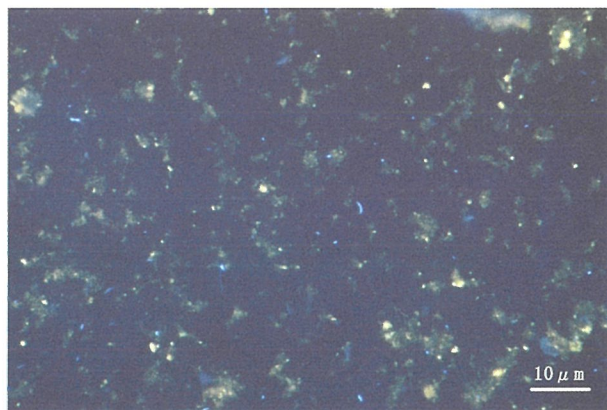


写真5 落射式蛍光顕微鏡で見た堆積物中のバクテリア細胞(ブルーの蛍光を発するものがバクテリア細胞)

した場合には不向きである。一方 DAPI は、核酸中の DNA のみを選択的に染色することができ、泥粒子との区別が容易である(写真 5)。

5. 単位堆積物量あたりの総菌数の算出

堆積物湿重量あたりの総菌数は、固定液の量 (A (ml))、試料のろ過量 (B (ml))、ヌクレポアフィルターのろ過捕集面の面積 (C (μm²))、蛍光顕微鏡で観察したヌクレポアフィルター面の面積 (D (μm²)) と、そこで計数された平均細胞数 (E (n))、堆積物湿重量 (F (g)) から以下の式を用いて算出することができる。

$$\text{総菌数 (cells/g 湿泥)} = (A/B \cdot C/D \cdot E) / F$$

堆積物乾燥重量あたりの総菌数は、別途、固定液中の堆積物の乾燥重量を測定し、この値から上記と同様の換算式で細胞数を算出する。

6. 堆積物中の総菌数測定例

表 1 には、上記方法を用いて数々の水域における堆積物中の総菌数を計数した例を示す。総菌数は 1 g の堆積物乾燥重量あたり 10⁶ ~ 10⁹ cells の範囲内にあり、砂浜では 10⁶ ~ 10⁸ cells と海底泥に比較してその数は少ない傾向にある。また、東京湾では 2.6 × 10⁹ cells/g 乾泥と、他の水域に比較してきわめて高い総菌数が測定された。

表1 数々の堆積物中の総菌数測定例

水域	堆積物	水深 (m)	総菌数 (× 10 ⁷ cells/g 乾泥)	出所
安房小湊	河床	1	0.65	笹原ら (1994)
	砂浜	0	0.15~4.1	
	海底泥	10	1.9~6.4	
東京湾 神奈川県八景島 沖縄県	砂浜	0	0.21~0.50	堀川 (2003)
	海底泥	15	260	本研究
	砂浜	0	21	
砂浜 (サンゴ砂)	0	>40		
東海沖	海底泥	600	1.0~77	鋤崎ら (未発表)
第二渥美海丘近傍	海底泥	1400	2.0~16	
熊野灘	海底泥	2000	2.7~92	

7. まとめ

水試料と異なり、堆積物に存在するバクテリアの総菌数をより正確に計数するためには、多くの前処理が必要である。また、堆積物の性状(粒径の違いや堆積物の質など)の違いによって、異なる前処理方法を採用する必要があることに留意しておかねばならない。さらに、本稿で記載した方法は、生・死菌の区分はおこなわず総菌数のみを測定する場合に採用するものであり、例えば生菌数のみを計数するには同様の前処理では問題があると考えている。特に、堆積物からのバクテリア細胞の剥離のために使用する界面活性剤や超音波分散処理は、生きたバクテリア細胞に対してダメージを与える可能性がある。筆者らは、堆積物中のバクテリアの生菌数測定に際しては、これらの前処理はおこなわず、ろ過除菌した海水に堆積物を収容し振とう器で攪拌した後の上澄み水を試料としている。この場合、堆積物粒子に付着したバクテリア細胞は完全に剥離されていない可能性もあるため、今後これら課題に関しても検討を進めたいと考えている。

8. 引用文献

- Epstein, S. S. and Rossel, J. 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Marine Ecology Progress Series*. 117: 289-298.
- Hobbie, J. E., R. J. Daley and Jasper, S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228.
- 堀川千帆. 2003. 砂浜帯における潮汐とバクテリアの現存量(総菌数)の関係. (株)日本海洋生物研究所 2003 年年報, pp. 51-55.
- 丸山智子・加藤憲二. 2003. 地球環境調査計測辞典. 第3巻. 沿岸域編. フジ・テクノシステム, 東京. pp. 270-271.
- 三好英夫. 1990. 沿岸環境調査マニュアル(水質・微生物編). 日本海洋学会編. 恒星社厚生閣, 東京. pp. 269-301.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- 笹原耕治・豊田光浩・尾長明子・西田和功・李芝旺・国分治代・渡辺晶子. 1994. 平成6年度小湊周辺における河川海域環境調査. (株)日本海洋生物研究所 1994 年年報, pp. 7-26.
- 鋤崎俊二. 1990. 落射蛍光顕微鏡を用いたバクテリア細胞の計数・観察. (株)日本海洋生物研究所 1990 年年報, pp. 1-10.
- 高津知明・加藤憲二. 2003. 地球環境調査計測辞典. 第3巻. 沿岸域編. フジ・テクノシステム, 東京. pp. 272-273.