

浮遊性バクテリアの生死判別手法

鈴木 信也 (技術研究部)

1. はじめに

1980年代の初頭、水圏におけるバクテリアの生産量が、植物プランクトンによる生産量の20～30%にも相当する場合があることが報告され (Fuhrman and Azam, 1980・1982)、バクテリアによって生産される有機物が水圏における生物を介する物質循環過程に極めて重要であることが提唱された (Azam et al., 1983)。海洋における浮遊性のバクテリアは、ナノサイズ (2～20 μm) の原生動物によって捕食されることが知られている (Weisse et al., 1990)。バクテリアを捕食したナノサイズの原生動物の一部は、マイクロサイズ (20～200 μm) の原生動物により捕食され、これらは、さらに大型の動物プランクトンなどの捕食を受ける (Gifford and Dagg, 1991)。また、後生動物プランクトンの一部は、直接バクテリア細胞を摂食することも報告されている (Kleppel, 1991・1993)。このような、バクテリアを基礎生産者とした物質循環過程を微生物食物網 (Microbial Loop) と称し (Azam et al., 1983)、海洋生態系において植物プランクトンによる光合成生産と同様に重要な役割を持っていると考えられるようになっている。

このような観点から、近年、海洋における浮遊性バクテリアの現存量と生産速度に関する数多くの研究がなされるようになった (例えば、木暮, 1988、Shiah and Ducklow, 1995、Koshikawa et al., 1999、Nagata et al., 2001、永田, 2003 など)。一般に、浮遊性バクテリアの現存量は、バクテリアの細胞体積を計測し、これに実験などから得た炭素含有比と単位水量あたりのバクテリア細胞数を乗ずることで推定する (Nagata and Watanabe, 1990)。あるいは、バ

クテリア1細胞に含まれる炭素含有量を一定 (例えば 20 fgC/cell (Lee and Furhman, 1987)) として、これに単位水量あたりのバクテリア細胞数を乗ずることで推定している。ただしこの方法で推定したバクテリア現存量は、水中に存在する総現存量であるためバクテリアの活性度合いは反映されていない。Roszak and Colwell (1987) は、水中に浮遊するバクテリア細胞のうち、死菌ないし非活性細胞のものが相当量存在するため、生きた細胞とそれ以外の細胞の存在量を把握しておくことが水中におけるバクテリアの動態を把握するうえで重要であることを指摘した。このため、これまで水中に存在するバクテリアの生死を判別するための様々な手法が検討されてきた。

そこで本稿では、これまで開発されてきたバクテリアの生死判別手法の概要をまとめ、近年開発された BacLight LIVE/DEAD 法を適用した筆者の試験例を紹介する。

2. バクテリアの生死判別手法

表1には、これまで検討されてきた生菌数ないし死菌や非活性細胞数を計数する主要な方法を整理した。これまで報告されているバクテリアの生菌数と、死菌数ないし非活性細胞数を定量的に把握する方法としては、主に、バクテリア細胞を培養し細胞の増殖能力や代謝活性を検出する方法と、細胞培養を絡めず細胞膜の物質透過性に基づく方法が用いられてきた。

細胞を培養する方法のなかで従来から多くの研究がなされてきた培養計数法では、寒天培地でのコロ

表1 バクテリアの生死判別手法

		検出方法	原理	利点	留意点
細胞培養必要	染色なし	培養計数法 ¹⁾	寒天培地を用いてコロニーを形成し計数する。	・非生物粒子等の影響を受けない	・時間を要する(24時間以上) ・微生物の多くが培養困難 ・培地により結果が大きく異なる
		DVC法 ²⁾	微量の基質と菌の分裂を阻害する抗菌剤(キノロン系抗菌剤)を添加して培養することにより、バクテリア細胞を伸長肥大化させる。肥大化した細胞のみを計数する。 β-ラクタム系抗生物質を使用するなど3剤併用の改良もされている。	・他の手法(FISH、DAPI)などと併用が可能	・用いる増殖基質や他の抗生物質の併用によって結果が大きく異なる ・富栄養環境の試料はもともとバクテリアサイズが大きいため適用が難しい ・培養前後に細胞数の増加がないか全菌数を測定する必要がある
		CFDA法 ³⁾	Fluorescein diacetate (フルオレッセイン)に2個の酢酸基がエステル結合したものにカルボキシル基を付けた蛍光物質が細胞内に入り、細胞内のエステラーゼによって加水分解され、フルオレッセインを遊離させる。 細胞膜が損傷しているとフルオレッセインが漏出しやすくなるため、染色されない。生細胞はB励起光下で黄緑色に見える。	・比較的短時間(培養に1時間必要)で結果がでる ・他の手法(FISH、DAPI)などと併用が可能	・生細胞しか染色されないため、死菌数を算出するには二重染色が必要 ・培養が必要(その間に増える可能性あり) ・非生物粒子等の影響を受ける
	染色あり	CTC法 ⁴⁾	CTC(5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride)は、モノテトラゾリウム還元色素であり、呼吸活性に伴う電子伝達系の作用で還元され蛍光性のCTC formazan (CTF)になりバクテリア細胞内に蛍光性沈澱として蓄積する。生細胞内がB励起光下で赤色顆粒が見える。	・比較的短時間(培養に30分から4時間必要)で結果がでる ・生じるフォルマザンが蛍光性なのでINTに比べ感度が高く、バックグラウンドが低い	・CTC顆粒は1細胞1個とは限らないため、二重染色が必要 ・アルカリ性では分解が早く、弱酸性では比較的安定 ・溶液状態では保存安定性が悪い ・培養が必要(その間に増える可能性あり) ・非生物粒子等の影響を受ける
		INT法 ⁵⁾	INT溶液は、呼吸活性に伴う電子伝達系の作用で還元されINTフォルマザンに還元され赤色を呈する。	・比較的短時間(培養に2時間必要)で結果がでる ・光学顕微鏡で検出可能	・細胞のサイズを確認する必要がある ・生細胞しか染色されないため、死菌数を算出するには二重染色が必要 ・培養が必要(その間に増える可能性あり)
		PI法 ⁶⁾	細胞膜の健全な生菌にはPIは入らないが、細胞膜に損傷のある死菌にはPIが入り、DNAと結合することにより青色励起光下で赤色に見える。	・培養困難な細胞も検出可能 ・比較的短時間(染色に5分)で結果がでる	・死細胞しか染色されないため、生菌数を算出するには二重染色が必要
細胞培養不要	EB法 ⁷⁾	細胞膜の健全な生菌にはEBは入らないが、細胞膜に損傷のある死菌にはEBが入り、DNAと結合することにより青色励起光下で赤色に見える。	・培養困難な細胞も検出可能 ・比較的短時間(染色に3分)で結果がでる ・非生物粒子等の影響を受けにくい	・死細胞しか染色されないため、生菌数を算出するには二重染色が必要	

出典：1) 日本海洋学会, 1990；2) Kogure et al., 1984；3) , 4) 染谷, 2003；5) Zimmerman et al., 1978；6) , 7) Someya, 1995.

ニー形成や液体ブイヨン培地中の増殖能力を指標とし、生菌数の換算方法として培養計数表が用いられている(Roszak and Colwell, 1987)。しかし、培養計数法による生菌数の測定は、試料中のバクテリアのなかで、ある特定培地の下で特定の温度・気相などの条件下で比較的容易に増殖できるグループの検

出に限られるため、沿岸海域の海水では総菌数と培養計数法による細胞数に1～4桁の差が見られることもある(日本海洋学会, 1990)。そのため培養計数法を絡めた方法のみで、試料中に生存するすべての生きたバクテリア細胞を検出することは不可能とされている(長沼, 1999)。

一方、長期間の培養を必要とせずに、顕微鏡下で直接細胞の生死を判定する技術として蛍光染色試薬が用いられるようになってきた。短時間バクテリアを生かしておく簡単な培養で、生菌の代謝活性物質を蛍光染色により検出する方法として、生菌だけが持つ細胞内エステラーゼ活性を指標に生存率を求める CFDA (5 (6) -Carboxyfluorescein diacetate, solution) 法や、細菌の呼吸活性により蛍光性の還元物質 (Formazan) が成されることを利用した CTC (5-Cyano-2,3-ditoly-2H-tetrazolium chloride) 法などが開発されている (染谷, 2003; 平石・吉田, 2003)。また、死菌のみを染色する PI (Propidium iodide) 法や EB (Ethidium bromide) 法を使用すれば、AO (Acridine orange: Hobbie et al., 1977) や DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole: Porter and Feig, 1980) で核酸物質を染色して総菌数を計数した後、PI や EB で計数した死菌数を差し引くことで生菌数を算出することが可能である。

以上述べてきたこれらの方法は、いずれも死菌ないし生菌を計数し、総菌数から差し引くことで、いま一方の数を算出するものである。このため、これらの方法では、死菌ないし生菌のすべてを正確に計数しているかは確かめようがない。より正確な方法は、死菌と生菌をそれぞれ計数し、その合計値が、別途計数した総菌数とほぼ同じであると示されるものである。

近年、米国の Molecular Probes 社で開発された BacLight LIVE/DEAD (Bacterial Viability Kit (L-7007); Molecular Probes, Inc., 1993) は、生菌を膜透過性の良い SYTO 9 と称する試薬で緑蛍光染色し、死菌を膜非透過性の PI で赤蛍光染色することで、生菌と死菌を同時に計数できるという特徴を有する。原理は、次に示す 1~4 である (Naganuma, 1996)。また、これを図解すると図 1 に示すようになる。

1. 膜透過性の異なる 2 種類の蛍光試薬 (DNA と結合し、緑に蛍光する SYTO9 と赤に蛍光する PI) が含まれている。
2. 生菌 (細胞膜が健全な菌) では緑の蛍光試薬のみが細胞膜を透過し、赤は細胞内に入れない。

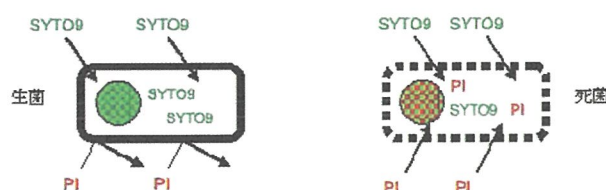


図 1 BacLight LIVE/DEAD の原理
(ベックマン・コールター株式会社: http://www.bc-cytometry.com/system/Quanta-comparison-data_f.html)

3. 死菌 (細胞膜が損傷した菌) では緑、赤両方の蛍光試薬が細胞膜を透過するが、赤の蛍光試薬のほうが DNA との親和性が高い。
4. したがって、緑・赤とも細胞内に入る死菌では赤い蛍光が優先し、緑しか入らない生菌は緑の蛍光を発する。

この方法は、長期間の培養が必要なく簡便な方法であることと、生菌・死菌数とも実際に計数可能であることが優れていると考えられる。このため、弊社でも本方法の使用を検討するための試験を実施した。以降では、本手法を適用した実際の測定例を紹介する。

3. BacLight LIVE/DEAD 法の適用例

3.1 試料の採取

試料は滅菌容器に採取し、クーラーボックス等で冷暗保存のうえ速やかに実験室に持ち帰り、以下の手順で染色およびプレパレーション処理を行う。

3.2 試料の前処理

試料は、均等になるよう充分攪拌し滅菌容器に分取する。分取した試料 1 ml に対して、SYTO 9 と PI を等量に混ぜた蛍光試薬 3 μ l を添加し、15 分間静置して染色する (写真 1)。

染色した試料は、黒暗色に染色済みの孔径 0.2 μ m のヌクレポアフィルター (Whatman 社) を用い減圧ろ過する。その際、吸引が強すぎるとバクテリア細胞が壊れる可能性があるため、20 cmHg 以下でろ過捕集する (日本海洋学会, 1990)。ろ過捕集したフィルターはスライドガラス上に載せ、専用の BacLight mounting oil を滴下し、空気が入らないようカバーガラスで封入する。封入したプレパラートは検鏡す

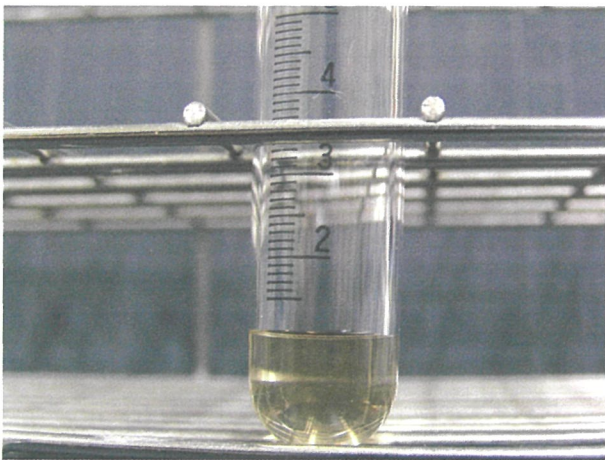


写真1 染色中の試料 (滅菌丸底スピッツ: 栄研化学株式会社)

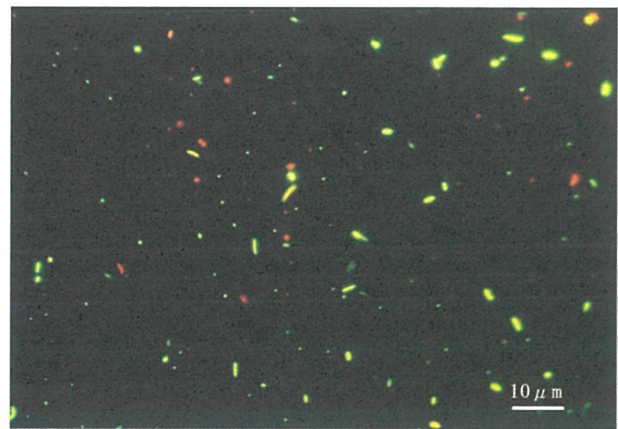


写真3 BacLight LIVE/DEAD 法で観察されるバクテリア細胞
注: 試料は室内に設置してある淡水水槽の水を使用した緑色 (生菌); 赤色 (死菌)

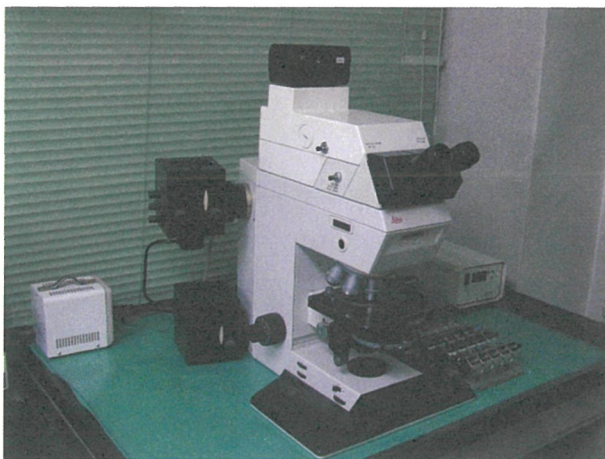


写真2 落射式蛍光顕微鏡 (LEITZ DMRB: Leica 社)

るまで冷凍保存しておく。生死菌の計数には、落射式蛍光顕微鏡 (写真2) を用いて青色励起光下で計数する。なお、冷凍保存しておいても蛍光試薬の退色が時間とともに進むため、できるだけ速やかに細胞の観察・計数を行う。写真3は、この方法で染色したバクテリア細胞の顕微鏡写真である。生菌 (緑色) と死菌 (赤色) が明瞭に染色区分されていることがわかる。

3.3 計数結果

図2は、室内に設置してある淡水水槽の水試料を用い、DAPI染色法による全細胞数の計数結果とBacLight LIVE/DEAD法で計数した生菌と死菌の合計値の関係を示した。両者には高い相関 ($R^2 = 0.99$) があることがわかる。また、相関式の傾きも0.98で

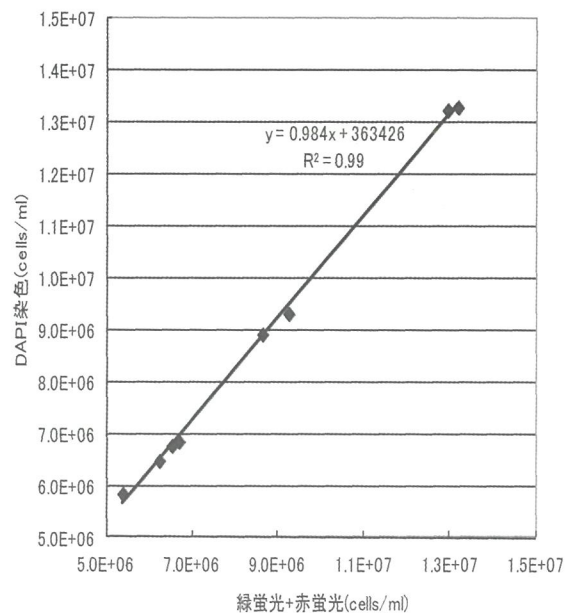


図2 DAPI染色による総菌数計数結果とBacLight LIVE/DEADによる生菌数 (緑蛍光) と死菌数 (赤蛍光) の合計値の関係

あることから、BacLight LIVE/DEAD法で計数された細胞数は、ほぼ全細胞数を捉えていると判断される。長沼 (1999) も瀬戸内海の海水を用いてAO法と、BacLight LIVE/DEAD法で同様の比較をおこなっており、同様に両者には高い相関があることを報告している。したがって、BacLight LIVE/DEAD法で計数される生死菌の数は、水中に存在するものの実体をより正確にとらえていると考えている。

表2には、様々な試料をについてBacLight LIVE/

表 2 BacLight LIVE/DEAD法を用いた生死判別の測定例

水域	総菌数 ($\times 10^5$ cells/ml)	生菌率 (%)	出典
活性汚泥 (汚泥水)		60~70	Vollertsen <i>et al.</i> (2001)
活性汚泥 (汚泥水)		65~86	平石・吉田 (2003)
広島湾・伊予灘	5~28	49~66	長沼・上 (1995)
瀬戸内海		49~71	長沼 (1999)
水槽の水	9	86~91	本研究
東京湾	55~130	39~74	本研究

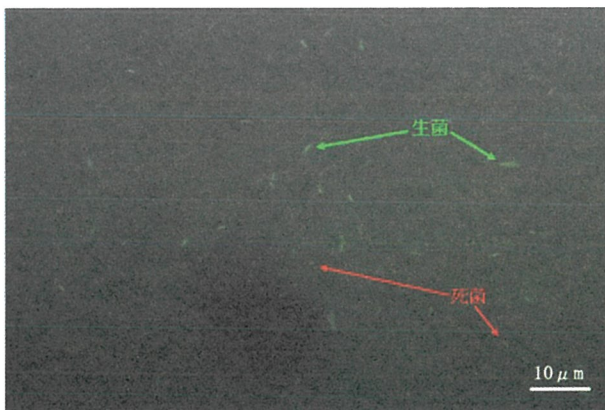


写真 4 海水試料を対象に BacLight LIVE/DEAD 法で観察されるバクテリア細胞
注；試料は東京湾の表層水を使用した
緑色 (生菌)；赤色 (死菌)

DEAD 法を用いてバクテリアの生死菌数を計数し、生菌率を算出した例を示す。

活性汚泥 (汚泥水) や、海水試料を対象にこれまで報告された例では、活性汚泥 (汚泥水) で生菌率が 60 ~ 86 %、海水試料で 49 ~ 71 % 程度である。筆者が、室内に設置している淡水水槽の水と東京湾の海水を用いて生菌率を測定した結果でも、それぞれ 86 ~ 91 %、39 ~ 74 % であった (表 2)。すなわち、水圏に存在するバクテリアのうち、生きてしていると判断されるものは 40 ~ 90 % 程度ではないかと推察される。言い換えると、10 ~ 60 % 程度は死菌ないし非活性であることになり、バクテリアの基礎生産に寄与していないこととなる。水圏における物質循環過程におけるバクテリアの寄与を考えるうえで、死菌ないし非活性菌を無視できないと考える。

4. まとめ

BacLight LIVE/DEAD 法を用いることで、より正確に水中に存在するバクテリア細胞の生死菌の量的関係が把握できるようになり、これによって、水中では総菌数の内 10 ~ 60 % 程度が死菌ないし非活性であると推察できるようになってきた。このことは、例えば低次生態系モデル (堀口・中田, 1995) などの計算初期値で採用するバクテリア現存量 (通用は炭素量で表す) を、現場の総菌数を根拠に与えた場合には、その寄与が過大評価されている可能性があることになる。正確な現存量を把握するためには、より正確なバクテリア細胞の生死判別分析を行う必要がある。

なお、これまでの経験から特殊な条件の実験試水 (pH が低い試料) や海水試料は緑もしくは赤色の蛍光が弱く、生死判別をしにくい傾向にある (写真 4)。現在、塩分の阻害影響などについて検討を加えているが、より鮮明に染色されるまでには至っていない。今後、海水試料についてはより鮮明に観察できるように、染色条件や他の試薬を用いた方法などを含め検討を進めたいと考えている。

参考文献

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. and Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257 - 263.
- ベックマン・コールター株式会社. http://www.bc-cytometry.com/system/Quanta-comparison-data_f.html
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctic, and California. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1085 - 1095.
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine

- surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology*, 66, 109 - 120.
- Gifford, D. J. and Dagg, M. J. 1991. The microzooplankton-mesozooplankton link: consumption of planktonic protozoa by the calanoid copepoda *Acartia tonsa* Dana and *Neocalanus plumchrus* Murukawa. *Marine Microbial Food Webs*, 5, 161 - 177.
- 平石 明, 吉田奈央子. 2003. 活性汚泥における培養不能な細菌の検出. *月刊海洋*, 33, 48 - 55.
- Hobbie, J. E. and Daley, R. J. and Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by Fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, 33 (5), 1225 - 1228.
- 堀口文男, 中田喜三郎. 1995. 東京湾の水質のモデル解析, *海洋理工学会誌*, 1 (1), 71 - 92.
- 木暮一啓. 1988. 海洋細菌の量と生産速度, *月刊海洋*, 20, 32 - 37.
- Kleppel, G. S. 1991. Trophic interactions between copepods and microplankton: a question about the role of diatoms. *Limnology and Oceanography*, 36, 172 - 178.
- Kleppel, G. S. 1993. On the diets of calanoid copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 99, 183 - 195.
- Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Archiv fuer Hydrobiologie*, 102, 117 - 122.
- Koshikawa, H., Harada, S., Watanabe, M., Kogure, K., Ioriya, T., Kohata, K., Kimura, T., Sato, K. and Akehata, T. 1999. Influence of plankton community structure on the contribution of bacterial production to metazooplankton in a coastal mesocosm. *Marine Ecology Progress Series*, 186, 31 - 42.
- Lee, S. and Fuhrman, J. 1987. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (6), 1298.
- Molecular Probes, Inc. 1993. fluorescent probes for assessing cell viability. *BioProbes (New Products and Applications from Molecular Probes, Inc.)*, 18, 1 - 2.
- Naganuma, T. 1996. Differential enumeration of intact and damaged marine planktonic bacteria based on cell membrane integrity. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 5, 217 - 222.
- 長沼 毅. 1999. 沿岸海域における浮遊細菌類の現存量, 生菌率, 生産. *日本プランクトン学会報*, 46 (1), 43 - 49.
- 長沼 毅・上 真一. 1995. 海洋バクテリアの生死判別の試行. *日本海洋学会春季大会*, 372.
- 永田 俊. 2003. 細菌の生物密度と現存量, *生物環境調査計測辞典 第2巻陸域編 (2)*, フジ・テクノシステム, 183 - 187.
- Nagata, T. and Watanabe, Y. 1990. Carbon- and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1303 - 1309.
- Nagata, T., Fukuda, R. Fukuda, H. and Koike, I. 2001. Basin-scale geographic patterns of bacterioplankton biomass and production in the subarctic Pacific, July-September 1997. *Journal of Oceanography*, 57 (3), 301 - 313.
- 日本海洋学会. 1990. 沿岸海洋マニュアル II 水質微生物篇. 日本海洋学会編, 恒星社厚生閣, 269 - 275.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25 (5), 943 - 948.
- Roszak, D. B. and Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Reviews*, 51, 365 - 379.
- Shiah, F. K. and Ducklow, H. W. 1995. Regulation of Bacterial Abundance and Production by Substrate Supply and Bacterivory - a Mesocosm Study. *Microbial Ecology*, 30 (3), 239 - 255.
- Someya, T. 1995. Three-dimensional observation of bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms*, 46, 61 - 69.
- 染谷 孝. 2003. 蛍光染色による土壌微生物の検出法. *月刊海洋*, 33, 14 - 22.
- Vollertsen, J., Jahn, A., Nielsen, J. L., Hvitved-Jacobsen, T. and Nielsen, P. H. 2001. *Water Research*, 35, 1649 - 1658.
- Weisse, T., Muller, H. and Pinto-Coelho, R. M. 1990. Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnology and Oceanography*, 35, 781 - 794.
- Zimmerman, R., Iturriaga, R. and Brick, J. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 926 - 935.