

(66) 水環境中におけるVNC状態の細菌の挙動について

沢谷 圭介¹・金子 伸一郎²・矢口 淳^{2*}

¹八戸工業高等専門学校 専攻科 建設環境工学専攻 (〒039-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

²八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 (〒039-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

* E-mail: yaguchi-z@hachinohe-ct.ac.jp

生理的活性のある細菌を計測する方法として、直接蛍光顕微鏡下で計測できる4つの蛍光染色法を検討し、それらの方法を用いて青森県内の河川や排水処理施設の流入水や処理水中の細菌数の計測を行なった。河川や湖沼など実際の水環境では、DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)試薬によって検出される全菌数は平板培養法で測定された生菌数より2～5オーダー以上多く、培養できない菌が多数存在することが分かった。一方、処理施設では全菌数と生菌数の差は少なく、1～2オーダーしか違いがなかった。また呼吸活性や増殖活性などの生理的活性のある細菌の数は、河川水も排水処理施設内の排水も生菌数と全菌数の中間に位置し、生菌数よりかなり多く検出された。

Key Words : bacteria, Fluorescent staining, Physiological activity, wastewater treatment plant

1. はじめに

自然界における微生物の生態について研究する微生物生態学の分野では、最近 VNC (または VBNC) という概念が広く注目を集めている¹⁾。つまり、viable but non-culturable (生きてはいるが培養できない) 状態で自然界の微生物の多くは存在すると考えられている。これは、1世紀以上前に Koch によって確立された“培養してコロニーを作れない菌は死んでいる。”という純粋培養の概念を真つ向から否定するものである。顕微鏡で観察できる全菌数と寒天培地で培養される生菌数との間には大きな差があることは以前から指摘されていたが、培養できない菌は生きていないと見なされていた。ところが呼吸能などの生理活性を顕微鏡によって直接検出した最近の研究では、顕微鏡下で見られる細菌の多数が生物活性を維持していることが認められ、自然界には培養できないものの実際には生物活性を維持している VNC の状態で微生物が広範に存在することが認識されてきた¹⁾。培養できない細菌が何らかの活性を示したとしても、VNC の状態が不可逆な死への過程への途上にあるならば問題はない。しかし VNC の状態から通常の生理状態に復帰して増殖可能となる菌についていくつか報告がなされており

²⁾、VNC の状態は必ずしも死へ続く過程とは言えない³⁾。

VNC 状態にある菌の存在が最も問題となるのは病原菌である。我々は1世紀近くも前から水や食品の消毒を行い、病原菌からの水系感染症の防止に努めてきた。しかし病原菌やその代替指標である大腸菌群の検出方法は培養によってきたため、VNC の状態にある細菌は不活性と見なされ、消毒などの不活化効果を過大に評価し飲料水や水環境からの感染リスクを過小に評価してきた可能性もある⁴⁾⁵⁾。

そこで、本研究では培養を行うことなく細菌数を計数する方法や活性のある細菌を評価する方法を検討し、これらの手法を用いて VNC の状態にある細菌の存在量について青森県内の河川や下水処理場で調査を行い、水環境中における挙動についてまとめた。

2. 実験材料および方法

(1) 実験材料

理化学研究所微生物系統保存施設から *Escherichia coli*(JCM1649)、*Enterobacter aerogenes* (JCM1235)を購入して実験に用いた。染色に使用した蛍光試薬類は、

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (和光純薬), CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) (Polysciences 社), BacLight™ (Molecular Probes 社) である。

(2) 細菌数の計測

生菌数の計測には PGY 培地⁶⁾ と R2A 培地⁹⁾を用い、20℃で1週間培養した。全菌数はポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 0.2μm) にろ過捕集後、蛍光染色剤 DAPI 溶液で染色し落射蛍光顕微鏡で計数した⁶⁾。また生理的活性のある細菌を評価する手法として、DVC(Direct viable count)法⁷⁾、マイクロコロニー法⁸⁾、CTC 法⁹⁾¹⁰⁾、BacLight 法¹¹⁾¹²⁾を使用した。4つの方法とも全菌数測定法と同様、ポリカーボネイトフィルター上に細菌を捕集し蛍光試薬を利用して計測するもので、表-1にそれぞれの染色方法を簡略に示した。

(3) 蛍光顕微鏡

落射型蛍光顕微鏡はオリンパス製 BX41 を用いた。励起光源として水銀ランプを使用し、DAPI 染色には U 励起(U-MWL2), CTC および BacLight 試薬には B 励起(U-MNIB2)を用いた。細菌数の計測では、蛍光顕微鏡下で視野をランダムに変え、1サンプルにつき 10 視野以上計数を行った。

(4) 調査水域と処理施設

水環境中の試料は青森県内の5河川(馬淵川, 浅水川, 新井田川, 五戸川, 奥入瀬川)と1湖沼(小川原湖)から2004年冬季から2005年秋季にかけて3回採水した。また、排水処理施設については、八戸高専生活排水処理施設と青森県内のM浄化センターの曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水を採水して細菌数を計測した。

3. 結果と考察

(1) 生理的活性のある細菌の検出

購入した2つの細菌株を使用して、直接顕微鏡下で細

菌数を計測する方法を検討した。表-1に示したように、DAPI 試薬により菌体中の核酸を染色された細菌はUV励起光下で青白い蛍光を発する。*E. coli* と *E. aerogenes* の培養液を用いて染色濃度と計測数の関係を検討した結果、2つの細菌とも DAPI 濃度 10mg/L で検出された細菌数はほぼ最大となり、以下の実験では染色濃度 10mg/L となるように DAPI 溶液を使用した。

BacLight 試薬は2つの染色剤の細胞膜透過性の違いにより、細胞膜が破損された細菌はヨウ化プロピジウムで染色され、正常な細菌は SYTO9 に染色されてそれぞれ B 励起光下で赤色蛍光と緑色蛍光を発する¹¹⁾。さらに SYTO9 で緑色蛍光を発する細菌とヨウ化プロピジウムで赤色蛍光を発する細菌を足し合わせると全菌数が得られる。*E. coli* や *E. aerogenes* の培養液を用いて、DAPI 染色による計測数と BacLight 試薬による計測数 (SYTO 9 + ヨウ化プロピジウム) を比較したところ、ほとんど違いはなかった。また CTC 法は、呼吸活性を持つ細菌を検出する方法で、呼吸能を有する細菌は CTC を菌体内に摂り込み、体内で CTC をホルマザンという非水溶性の物質に変換する。ホルマザンはB励起光を照射すると赤色蛍光を発するため、呼吸能のない細菌と区別できる⁹⁾⁹⁾。CTC 染色後 DAPI と二重染色することによって呼吸能を持つ細菌のみ検出できた。CTC 染色に必要な濃度と時間を検討した結果、染色濃度 10mmol/L で2時間以上染色する必要があることが知られた。

DVC 法⁷⁾とマイクロコロニー法⁸⁾はいずれも増殖能力を持つ細菌を検出する方法である。DVC 法では細胞分裂抑制剤としてナリジクス酸を使用する。分裂できないため、生きている細菌は細胞が伸張したり肥大する。写真-1にDVC法で検出された *E. aerogenes* を示した。一方マイクロコロニー法は、メンブレンフィルター上で細菌を一定期間培養し、肉眼では見えない微視的なコロニーを顕微鏡下で観察する方法である。写真-2には、*E. aerogenes* のマイクロコロニーを示した。DVC 法、マイクロコロニー法とも DAPI 染色して、増殖能のない細菌と蛍光顕微鏡下で区別できる。これらの方法では、細菌の増殖に栄養培地が必要なため、河川水を実験材料とし

表-1 細菌数計測方法の概略

	全菌数測定法	DVC法	マイクロコロニー法	CTC法	BacLight法
細菌の捕集	ポリカーボネイトフィルター (Advantec製、孔径0.2μm)				
染色	DAPI	DAPI	DAPI	CTC-DAPI 二重染色	SYTO9, propidium iodide
添加試薬	無し	ナリジクス酸 R2A培地	R2A培地	CTC 1/2R2A培地(リン無し)	無し
蛍光観察	青色蛍光	伸長・肥大細胞	2個以上の細胞塊	赤色蛍光	死菌-赤色蛍光 生菌-緑色蛍光
備考	核酸染色	細胞分裂阻止	微小コロニー観察	呼吸活性	細胞膜破損
参考文献	6)	7)	8)	9)、10)	11)、12)

てマイクロコロニー法で培地の組成と濃度を検討した。
R2A, (1/10)R2A, (1/100)R2A, PGY, (1/10)PGY, (1/100)PGY および (PGY + ピルビン酸) の7培地を比較した結果, R2A 培地でマイクロコロニーを形成できる菌数が最も多く計測されたため, R2A 培地を用いることにした。

(ここで(1/10)R2A, (1/100)R2A はそれぞれ R2A 培地を 1/10, 1/100 に希釈したものである。) 図-1 に生理的活性のある細菌の検出に用いたこれらの方法の手順を簡略に示した。

(2) 調査水域の水質

表-2 に調査した水域の平成 16 年冬季から平成 17 年秋季にかけての水質を示した。小川原湖と新井田川の採水地点では他の河川に比べて電気伝導度が著しく高く, これは海水が遡上して浸入しているためだと考えられる。また TOC 濃度については平成 16 年冬季しかデータがないが, 小川原湖では TOC 濃度が高く, 富栄養化が進行している。

(3) 水域調査

図-2 に平成 16 年冬季に調査した6つの水域の DAPI と BacLight 試薬によって計数した全菌数と, PGY と R2A 培地を用いた平板培養法によって計数した生菌数を示した。BacLight 試薬では, 前述のように赤色蛍光と緑色蛍光を発した細菌を合わせて全菌数とした。DAPI による計数結果とほぼ同数で, 6つの水域とも 1×10^7 個/mL 前後となっている。一方, 生菌数は $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個/mL の範囲で, 全菌数より 2～3 オーダー低くなった。また R2A 培地と PGY 培地を比較すると, 五戸川を除いて R2A 培地の計数



写真-1 DVC法による増殖活性のある細菌の検出

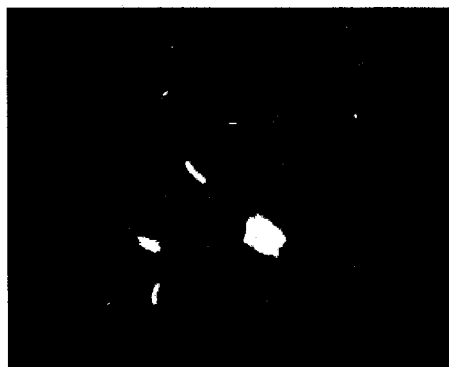


写真-2 マイクロコロニー法による増殖活性のある菌の検出

結果の方が多く, PGY 培地より貧栄養の R2A 培地の方がこれらの水域に適していたことが知られた。また R2A 培

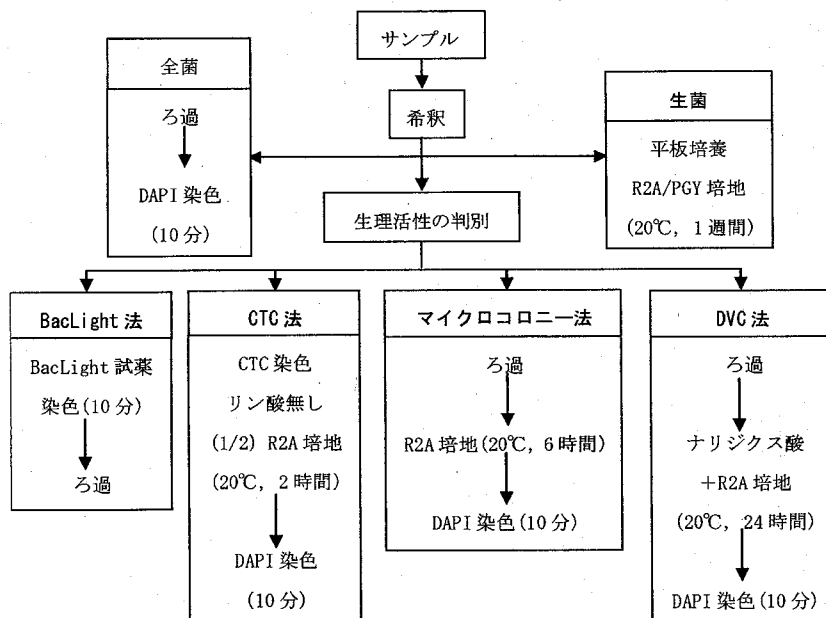


図-1 実験手順の概略

表-2 調査水域の水質

調査水域	採水地点	採水日	水温 (℃)	pH	DO (mg/L)	電気伝導度 μs/cm	TOC mg/L
小川原湖	湖心	2004.12.14	6.8	7.13	12.63	2990	4.6
奥入瀬川	幸福橋	2005.1.6	3.1	6.99	14.68	20	2.7
		2005.8.24	20.6	7.23	8.8	211	
		2005.11.14	7.3	7.09	10.98	174	
五戸川	尻引橋	2005.1.6	2.2	7.14	14.57	161	1.9
		2005.8.24	20	7.11	9.13	140	
		2005.11.14	6.5	6.81	11.35	142	
馬淵川	尻内橋	2004.12.27	3.7	7.06	11.01	146	2.3
		2005.8.5	23.9	7.25	7.29	159	
		2005.11.21	6.4	6.73	9.03	138	
浅水川	八戸市豊崎	2004.12.27	4.6	7.21	10.14	158	3.7
		2005.8.5	22.3	7.17	8.56	180	
		2005.10.31	11.3	7.09	10.7	170	
新井田川	新井田大橋	2005.1.6	3.2	7.45	13.58	9190	3.6
		2005.8.5	23.9	7.19	6.78	8860	
		2005.10.31	13.3	7.24	9.35	8450	

地に含まれるビルビン酸塩の効果も指摘されている¹³⁾。
6水域のDAPIによる全菌数に対するR2A培地による生菌数の比率は0.08~2.16%であり、自然界ではほとんどの細菌が培養できない状態にあることが知られた。

3河川におけるDAPI染色による全菌数とR2A培地で評価した生菌数の季節変化を図-3に示した。全菌数は冬から夏にかけて水温の上昇と共に増加し、夏から秋にかけては変化がない。一方コロニー形成能で計測された生菌数はほとんど変化がなく、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個/mLの範囲で推移した。そのため、夏季に全菌数と生菌数の差が最大となっており、生菌数は全菌数より3~5オーダー少なく、DAPIで検出されるほとんどの細菌が平板培養できなかった。浅水川的全菌数に対する生菌数の割合を計算してみると0.001%~0.780%で、1%未満となった。

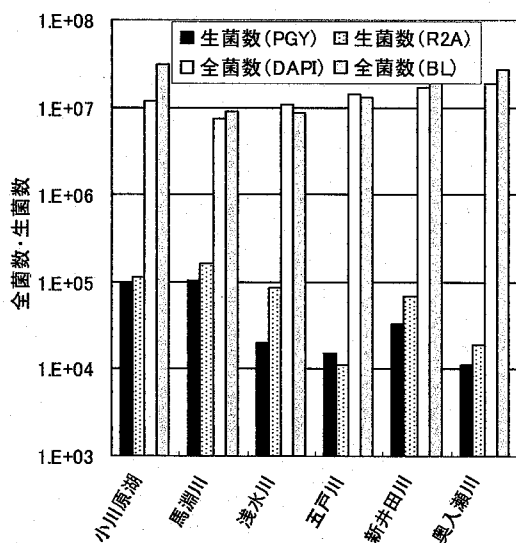


図-2 6水域の全菌数と生菌数 (H. 16年冬季)

図-4には、生理的活性のある細菌を顕微鏡下で検出する4つの方法で求めた浅水川細菌数を、全菌数に対する比率として示した。平成17年1月に実施したCTC法では、呼吸能のある細菌は 1.45×10^6 個/mL以下となり検出できなかった。また図-5には、新井田川の細菌数についても全菌数に対する比率を示した。新井田川でも1月のCTC法では、 2.89×10^6 個/mL以下となり検出できなかった。図-4、5から、生菌数は全菌数の1%にも満たないほどしか検出されなかったのに対して、活性のある細菌はかなり多く検出されたことが知られる。細胞膜の破損状況を指標とするBacLight法では、両河川とも計測時期に係わらず全菌数の70%以上が細胞膜が正常で、11月のデータでは細胞膜が破損した細菌はほとんど見られなかった。一方CTC法では、何れの季節でも

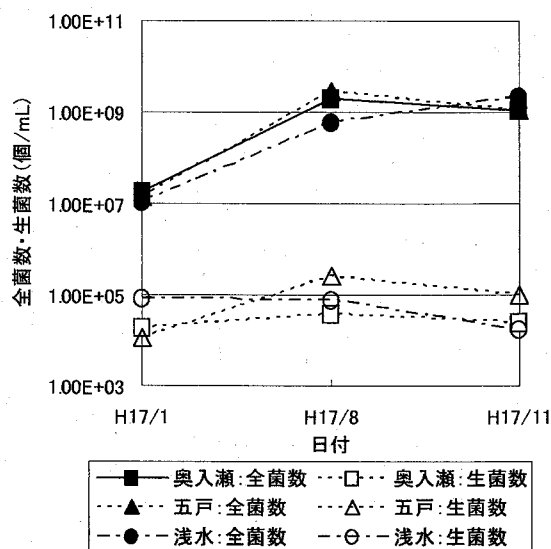


図-3 3河川的全菌数と生菌数の季節変化

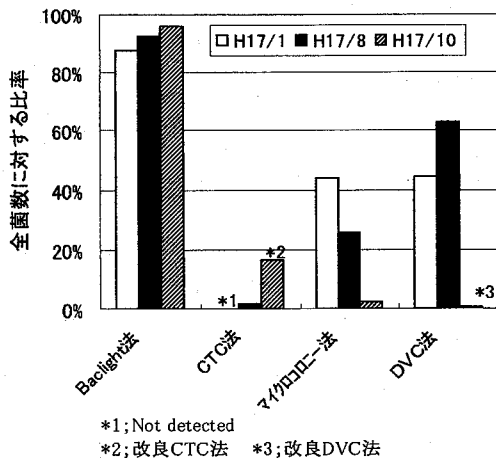


図-4 生理的活性のある細菌量 (浅水川)

20%未満しか呼吸活性のある細菌は検出されなかった。増殖活性を表すマイクロコロニー法とDVC法は、BacLight法とCTC法の中間の値を示し、計測時期によって大きく変動した。これらの傾向は他の河川でも観察された。他の方法に比べてCTC法の検出率が低いので、平成17年11月の測定時には酸化還元補助剤を添加した方法^{14) 15)}を適用したが、大幅な改善は認められなかった。またDVC法では、細胞分裂が阻止されずマイクロコロニーを形成する細菌が認められたので、平成17年11月の計数から抗生物質3剤を使用する木暮の改良法¹⁶⁾を適用した。

Yamaguchiら¹⁷⁾は、大阪湾へ注ぐ2河川の細菌数を計測した結果、平板培養によって得られた生菌数はDAPI染色で得られた全菌数の1~18%であった。またCTC染色で検出された菌の比率は8~20%で、汚染レベルが高い地点ほど両方の比率が高かった。エステラーゼ活性のある細菌の比率は39~50%で、3つの検出法の中では最も高かった。呂瀬ら¹⁸⁾は大阪近郊の地下水を調査した結果、平板培養によって得られた生菌数はDAPI染色全菌数の0~18%で、エステラーゼ活性を示した細菌数はコロニー形成数より多かった。この他、海水中ではDVC法で検出される菌数は、沿岸水で全菌数の数十%、外洋水では数%という報告もあり³⁾、BacLight法では水道水中の全菌数の69%が細胞膜が正常だった¹²⁾。これらの調査結果と本研究のデータを比較すると、コロニー形成能に基づく生菌数の比率は本研究の方が低いレベルにあるが、外部汚染の少ない深井戸だけのデータでは0~0.04%と報告されており¹⁸⁾、本研究のレベルとあまり差がなかった。またCTC染色などで検出された生理的活性のある細菌の比率もほぼ一致していた。

(4) 排水処理施設調査

M浄化センター (擬似嫌気好気法) の曝気槽流入水、

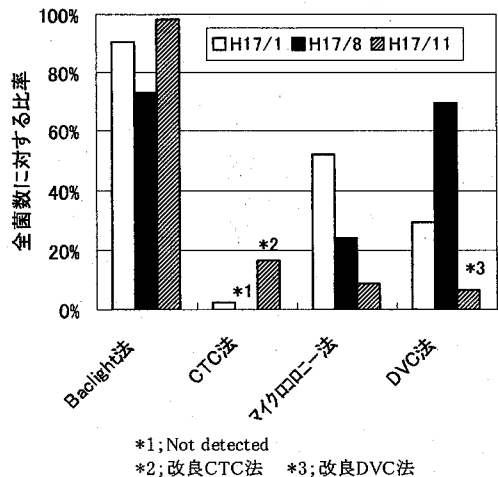


図-5 生理的活性のある細菌量 (新井田川)

最終沈殿池流出水および処理水の細菌数を計数方法毎に図-6に示した。排水の調査では、CTC法、DVC法はすべて改良した方法を用いた。処理水は塩素消毒後なので、すべての計数方法で菌数が曝気槽流入水に比べて3~4オーダー少なくなっている。3つのサンプルとも、河川水に比べてDAPI染色による全菌数とコロニー形成能を示す生菌数の差は小さく、1~2オーダーしか違いがなかった。Yamaguchiら¹⁷⁾の研究結果からも示唆されるように、生活排水流入のため有機物濃度が高い処理施設の方が河川水に比べ細菌が生存しやすいと考えられる。生理的活性のある細菌数は、4つの検出法ともほぼ全菌数と生菌数の中間の計数結果を示した。一方八戸高専生活排水処理施設 (長時間エアレーション法) では、処理水中のコロニー形成能を示す生菌数は 1×10^8 個/mLレベルまで減少していたが、全菌数、生理的活性のある細菌数および生菌数それぞれの差は、ほぼM浄化センターと同じだった。

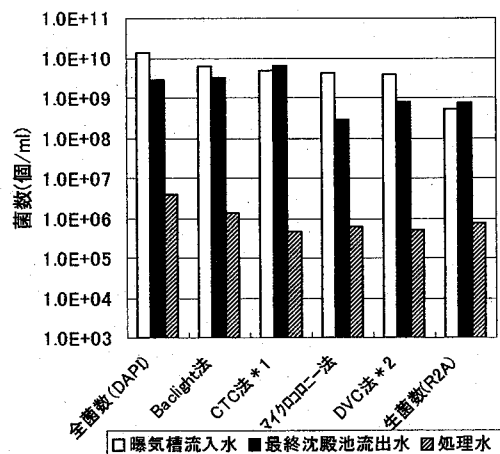


図-6 M浄化センターの細菌数

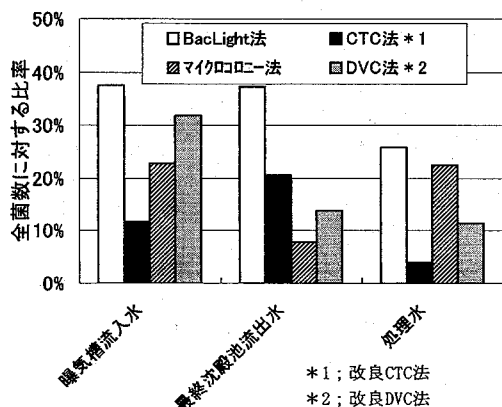


図-7 M浄化センターの生理的活性のある細菌量

図-7 には各計数方法で検出した M 浄化センターの生理的活性のある細菌数の全菌数に対する比率を示した。何れの計数方法でも、流入水に比べて処理水では活性のある細菌の割合が減少していた。また BacLight 法では河川水に比べて生理的活性のある細菌の比率が半分程度に低下し、3つのサンプルとも 40%以下となった。処理場内では、細胞膜が破損された細菌の割合が多いと考えられる。他の方法では河川水と大きな差はなかった。一方八戸高専生活排水処理施設（長時間エアレーション法）では、3つのサンプルともほぼすべての計測方法で活性のある細菌の比率は 15%以下で M 浄化センターの半分程度となり、これは運転方法の違いによるのかもしれない。

(5) 消長実験

a) 大腸菌（純粋培養系）

栄養分を含まない滅菌した生理食塩水中に、一晩液体培養した大腸菌 *E. coli* を添加して 20℃で振とう培養し、その消長を観察した。図-8には DAPI と BacLight 試薬で計測した全菌数と PGY と R2A 培地で計測した生菌数の経日変化を示した。全菌数は実験期間を通して値が大きく変化することはなく、 $2 \sim 4 \times 10^7$ 個/mL の間で推移した。生菌数は、実験開始時には 3.8×10^7 個/mL で全菌数と同程度だったが、29 日目を経過すると 1×10^7 個/mL 程度にまで急激に減少した。図-9には生理的活性のある菌を評価する方法として用いた、4つの菌数計測法の結果を示した。この図は全菌数に対する各計測方法で測定した菌数の比率を示している。4つの方法では、何れも実験開始時にはほとんどの大腸菌が生理的活性を示しており、日を追ってそれが減少していく様子がうかがえた。全菌数、生菌数を含めて、実験開始時にはすべての菌数計測法が 2×10^7 個/mL 以上となり、全菌数に対し生菌数や生理的活性のある細菌数もほぼ同等の値を示

している。従って栄養培地で人工的に培養した純粋培養系では、河川水など水環境中とは異なり培養直後ほとんどの細菌が生きている、もしくは生理的活性があると言える。

また図-9に示した4つの菌数計測法による生理的活性のある菌数の消長の様子を見ると、CTC 法では 10 日目には活性を示す菌の比率が 30%台に減少し、65 日経過する頃にはほとんどの菌が呼吸活性を示さなくなった。マイクロコロニー法でも早い時期から減少が見られ、20 日目には比率は 10%台まで減少し、50 日目からはほとんどの菌が生理的活性を示さなくなった。一方 BacLight 法では 50 日目までは 70%以上の菌が正常な状態を示しているが、それから 65 日目にかけて正常な菌は 25%にまで急激に減少した。同様に DVC 法でも 50 日目から 65 日目にかけて急激な減少が見られた。

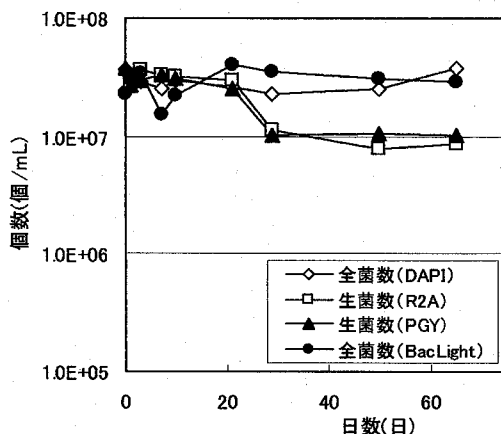


図-8 *E. coli* の消長実験における全菌数と生菌数の変化

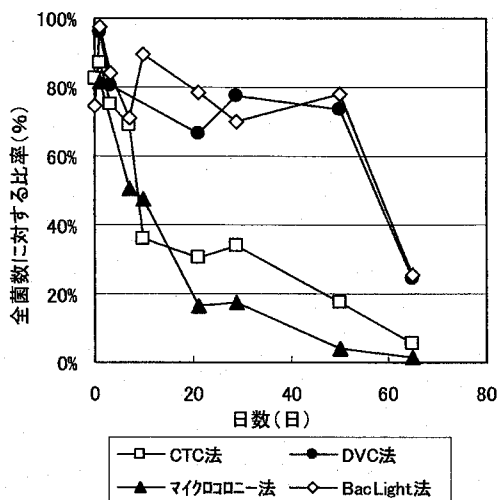


図-9 *E. coli* の生理的活性の変化

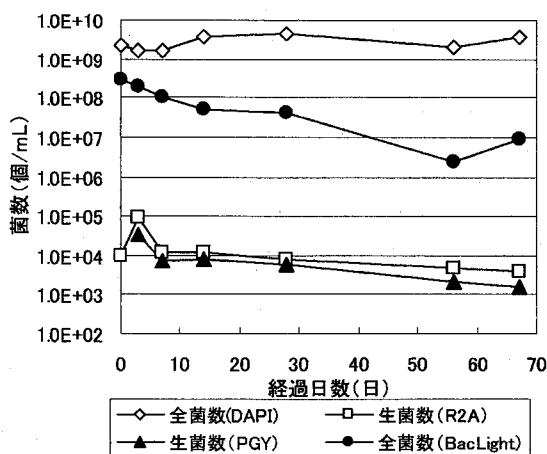


図-10 河川水消毒実験における全菌数と生菌数の変化

b) 河川水の消長実験

平成 17 年 11 月 21 日に採取した馬淵川の流水を 20℃ で振とう培養して、時間経過に伴う細菌数の消長を観察した。図-10 には消長実験中の DAPI と BacLight 試薬で計測した全菌数と、PGY と R2A 培地で計測した生菌数の経日変化を示した。DAPI 染色で検出された全菌数は実験期間を通して値が大きく変化することなく、 $1 \times 10^9 \sim 10^{10}$ の間で推移した。BacLight 試薬で検出された全菌数は、実験開始時から DAPI 検出細菌数より 1 オーダー少なく、BacLight 試薬で検出できない細菌が存在し、その割合は次第に増加した。生菌数は DAPI 全菌数よりも 4～7 オーダー少なく、3 日後に急激に増加したもののその後は次第に減少し、67 日目には 1 オーダー近く減少していた。図-11 には生理的活性のある細菌を評価する 4 つの菌数計測法による細菌数の変化を全菌数に対する比率で示した。河川水の消長実験でも CTC 法と DVC 法は改良した方法を用いた。実験開始から 1 週間の間は、全ての計測方法で活性のある細菌数の全菌数に対する比率が大きく変動している。このように全菌数を除く他の計測法では、実験開始から 1 週間程度は培養による温度変化 (6.4℃→20℃) で実験開始時よりも検出された細菌量が増えるという現象が見られた。全菌数に変化がないことから、一度活性を失って培養できなくなった細菌が温度上昇で活性を取り戻し、一部培養可能となったと考えられる。生理的活性のある細菌は、28 日目以降全菌数に対する比率がすべての計測法でほぼ 10% 以下となり、マイクロコロニー法と DVC 法では 56 日目以降には全菌数の 0.1% 以下となり、菌数では 1×10^5 個/mL 以下まで減少した。増殖能力のある細菌を検出するマイクロコロニー法と DVC 法の減少の傾向は類似していた。

今回の調査研究によって、河川や排水中には生理的活性があるのに培養できない細菌、つまり VNC 状態にある細菌が多数存在することが確かめられた。また消長実験

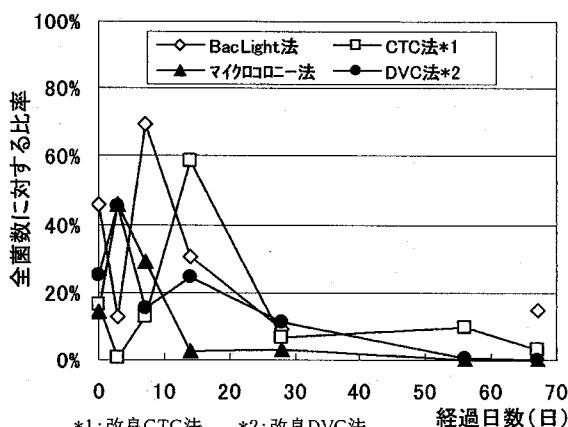


図-11 河川水消毒実験における細菌の生理的活性の変化

の結果、これらの細菌は比較的長期間にわたって活性を維持できることが明らかになった。VNC 状態にある病原細菌が環境の変化によって培養可能な状態へ復帰することがいくつか報告されており^{4) 5)}、河川水や排水などの衛生学的評価を行うには今後 VNC 状態の細菌の存在量や生理状態を考慮することが必要になると考えられる。

4. 結論

生理的活性のある細菌を直接蛍光顕微鏡下で検出する方法として、DVC 法、マイクロコロニー法、CTC 法、BacLight 法の 4 つの手法を検討し、これらの方法と DAPI 染色による全菌数計算法および平板培養法を用いて河川や排水中の細菌数を測定し、水環境中の細菌の挙動についてまとめた。

河川水では、平板培養法で測定した生菌数は DAPI 試薬で検出される全菌数より 2～5 オーダー程度少なく、ほとんどの細菌が平板培養できなかった。一方、排水処理施設では曝気槽流入水、最終沈殿池流出水および処理水について細菌数を計測したが、3 つのサンプルとも生菌数と全菌数の差は小さく、1～2 オーダーしか違いがなかった。また生理的活性のある細菌の数は、河川水も排水処理施設内の排水も生菌数と全菌数の中間に位置し、生菌数よりかなり多く検出された。従って水環境中には生理的活性があるのに培養できない細菌、つまり VNC 状態にある細菌が多数存在することが確かめられた。消長実験の結果、これらの細菌は比較的長期間にわたって活性を維持できることが明らかになった。

謝辞：本研究を進めるに当たり、八戸高専建設環境工学科の学生、外館ルミ子さん、西川直毅君、畠山亜希子さん並びに成田浩明君（当時）にご協力いただきました。

また本研究は、科学研究費補助金基盤研究 C (課題番号 16560488) の支援を得て行われました。ここに記して深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 木暮一啓：生きてはいるが培養できない病原細菌に挑む，科学，Vol. 69，No. 6，pp508～516，1999
- 2) 木暮一啓：微生物学における培養不能細菌の概念，月刊 海洋，号外 No. 33，p6～11，2003
- 3) 木暮一啓：環境を支配している培養できない細菌群：パイオサイエンスとインダストリー，Vol. 57，No. 11，pp731～736，1999
- 4) J.D. オリバー：生きてはいるが培養できないバクテリアの公衆衛生上の重要性，R. R. コールウェル，D.J. グリムズ (遠藤圭子，清水 潮訳)：培養できない微生物たち，pp. 259-280，学会出版センター，2004.
- 5) A. フック，I.N.G. リベラ，R.R. コールウェル：生きてはいるが培養できないバクテリアの疫学上の重要性，R. R. コールウェル，D.J. グリムズ (遠藤圭子，清水 潮訳)：培養できない微生物たち，pp. 281-302，学会出版センター，2004.
- 6) 日本水道協会：上水試験法，2001 年版解説編，p606～607，2001
- 7) Kogure K., Shimidu U., and Taga N.: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, Can J. Microbial, Vol. 25, pp. 415-420, 1979
- 8) Kawai, M., Yamaguchi N., and Nasu M.: Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process, J. Appl. Microbial, Vol. 86, pp. 496-504, 1999
- 9) Rodriguez G.G., Phipps D., Ishiguro K., and Ridgway H. F.: Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria, Appl. Environ. Microbial, Vol. 58, pp. 1801-1808, 1992
- 10) Pyle B. H., Broadaway S. C., and McPeters G. A.: Factors affecting the determination of respiratory activity on the basis of cyanoditotyl tetrazolium chloride reduction with membrane filtration, Appl. Environ. Microbial, Vol. 61, pp. 4304-4309, 1995
- 11) Molecular Probes: Live/Dead BacLight™ bacteria viability kit technical sheet, Molecular Probes Inc., 2003
- 12) Boulos L., Prevost M., Barbeau B., Coallier J., and Desjardins R.: Live/Dead BacLight™: Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, J. Microbial. Method, Vol. 37, pp. 77-86, 1999
- 13) 杉立年弘，森川和子：ピルビン酸ナトリウム添加培地による河川細菌群集の計数値と環境要因，月刊 海洋，号外 No. 33，p65～76，2003
- 14) 染谷 孝：蛍光染色による土壌微生物の検出法，月刊 海洋，号外 No. 33，p14～22，2003
- 15) Yoshida N., and Hiraishi A.: An improved redox dye-staining method using 5-Cyano-2,3-ditotyl tetrazolium chloride for detection of metabolically active bacteria in activated sludge, Microbes Environ., Vol. 19, No. 1, pp. 61-70, 2004
- 16) Kogure K., Shimidu U., and Taga N.: An improved direct count method for aquatic bacteria, Arch. Hydrobiology, Vol. 102, pp. 117-122, 1984
- 17) Yaguchi N., Kenzaka T., and Nasu M.: Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes, Microbes Environ., Vol. 12, No. 1, pp. 1-8, 1997
- 18) 邑瀬章文，内山知二，山口進康，那須正夫：蛍光染色法による地下水中の細菌数評価，防菌防黴，Vol. 27，No. 12，pp785～792，1999

(2006. 5. 26受付)

Behaviors of Physiologically Active Bacteria in Water Environment Keisuke SAWAYA¹, Nakaichiro KANEKO², Junichi YAGUCHI^{2*}

¹Advanced Course of Environmental and Civil Engineering, Hachinohe National College of Technology

²Department of Environmental and Civil Engineering, Hachinohe National College of Technology

Bacteria in the water environment were enumerated by plate counting and fluorescent staining methods. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to determine total bacterial numbers, and 5-cyano-2,3-ditotyl tetrazolium chloride (CTC) was chosen for direct fluorescent microscopic detection of respiring bacteria. BacLight™ kit was used to assess bacterial membrane integrity. Bacteria with growth potential were enumerated using micro-colony technique and direct viable counting (DVC). The total bacterial number in river was $8 \times 10^6 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL, and colony forming units on R2A media were $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL. In the case of wastewater treatment plant, 1～10% of total bacterial cells could form colonies. Physiologically active bacteria in river and wastewater treatment plant determined by fluorescent staining were much higher than those obtained by plate counting.