ピルビン酸ナトリウム添加培地による自然水界細菌群集の コロニー形成の増加

Increase in Colony-Forming Unit of Bacterial Communities in Aquatic Environments by Supplementation with Sodium Pyruvate

森川 和子^{*1}, 井上 真¹, 落合 正宏²

KAZUKO MORIKAWA, MAKOTO INOUE and MASAHIRO OCHIAI

¹ 東京農工大学農学部応用生物科学科 〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

² 東京都立大学理学部化学教室 〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

¹ *Laboratory of Microbial Ecology, Division of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwaicho, Fuchu, Tokyo, 183-8509, Japan*

² *Laboratory of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Minamiohsawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan*

(受付 1999 年 12 月 28 日—受理 2000 年 2 月 7 日)

It has been reported that higher plate counts for bacterial communities in river epilithon were yielded on agar plates by supplementation with sodium pyruvate, compared to the counts without supplementation. To support the credibility of this phenomenon, studies were conducted regarding the bacterial communities in several aquatic environments. Consequently, degrees of the ratio of colony-forming unit (CFU) on agar plates supplemented with sodium pyruvate to that without supplementation were grouped into two categories: a 2 to 3 magnitude group and a 5 to 6 magnitude one. According to cluster analysis of the water quality, higher degrees of the ratio were observed at environments that had a DOC concentration around 1 ppm and had a low NO_3^- concentration. The compositions of the abundantly-appearing bacterial colonies were suggested to be different from that of those appearing on the agar plates without supplementation of sodium pyruvate.

Key words: sodium pyruvate, aquatic environment, increase of cfu, DOC, NO_3^-

1. はじめに

河川に生息する細菌群集を平板法で計数する場合、培養基にピルビン酸ナトリウムを添加すると計数値が増加する現象がみられている⁸⁾。計数値の増加割合は、河床付着層の細菌群集を計数した場合とくに顕著で、20倍以上にも達することがあった。これに対して、表流水の細菌群集を計数した場合には、増加割合は3倍前後で一定しており、細菌群集

の存在状態の違いを反映していると推測された。

本報では、このようなコロニーの計数値の増加が、他の自然水界における細菌群集の計数に際しても観察されるかについて調査した。また、この増加を引き起こす要因について、水質分析との関係から考察した。

2. 材料と方法

2.1. 調査地点の概要

調査地点は、河川以外の水界で、人工池、貯水池、公園の池、湧水を対象とした。人工池 A、B は

* Corresponding author; E-mail: mic.eco@cc.tuat.ac.jp

東京農工大学構内の直径約 10 m の池で、A 池（地点 A）は常にわずかな水道水が流れており、ポーラスコンクリートブロックと吸リン剤を投入して浄化処理を行なっている、水質が管理された池である。ここで、異なる時期に 4 回の調査を行なった。人工池 B（地点 B）は水流が全くなく、2 年に 1 度の清掃以外は、そのまま放置されている。本調査が行なわれたのは、8 月に清掃され水が交換された直後から、時期を異にした 6 回である。他に東京都の水道水供給源の 1 つである村山上貯水池（地点 M）において 2 回の採水を行なった。また公園の池として、都立井の頭公園の池（地点 I）を用いた。ここは、都市公園としてコイが飼われ、餌が豊富に与えられているため富栄養化している。さらに、都立農業高校神代農場内の池（地点 J）も用いた。湧水と

しては、多摩川国分寺崖線の真姿の池湧水（地点 SM）、同じく国分寺崖線の都立農業高校神代農場内で湧出する湧水（地点 SJ）、多摩川の一支流である平井川の菅瀬橋付近の湧水（地点 SH）を用いた。調査地点の概況と試料番号を Table 1 に示した。

2.2. 試料の採取

細菌計数用には滅菌採水ビンに試料を直接採取した。水質分析用には 1 l のポリエチレンビンに試料を採取した。採取時に、現場で気温、水温、pH、電気伝導度 (EC) を測定し、試料は現場水温に保って実験室に持ち帰った。

2.3. 水質分析

採水した試水は、一部はそのまま原試水として、

Table 1. Site description of each sample.

Sample	Sampling date	W.T. (°C)	pH	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Pond A (with flowing water)				
A1	981013	17.5	8.08	210
A2	981110	15.0	7.99	199
A3	981227	6.1	7.60	199
A4	990328	13.2	8.64	233
Pond B (without flowing water)				
B1	981022	17.0	9.42	222
B2	981103	15.8	9.33	228
B3	981114	11.3	9.23	238
B4	981205	9.2	8.79	243
B5	981227	5.0	7.65	280
B6	990225	8.9	7.58	276
Pond I (urban park)				
I	981118	14.2	8.12	296
MURAYAMA Reservoir				
M1	981211	8.3	8.56	119
M2	990317	11.6	7.70	109
Pond J (shaded)				
J	990111	12.8	7.92	239
Spring				
SM1	981105	16.2	6.57	194
SM2	981227	15.9	6.11	216
SM3	990328	15.8	6.12	194
SH1	981105	17.1	7.35	217
SH2	981214	9.3	7.77	148
SJ	981221	16.4	6.23	303

一部は Whatman GF/C フィルターでろ過してろ過試水とし、 -20°C で分析時まで凍結保存した。測定項目は、溶存有機態炭素 (DOC), 全有機態炭素 (TOC), 反応性リン (RP), 全リン (TP), クロロフィル *a* (Chl.*a*), フェオフィチン *a* (Phaeo.*a*) と、 Cl^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-} , Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^{+} イオンである。DOC はろ過試水を用いて、TOC は原試水を用いて湿式酸化赤外吸収法²⁾ により測定した。RP の定量はろ過試水を用い、TP は原試水を用いてモリブデン青法⁵⁾ により比色定量した。クロロフィル量は、径 47 mm の Whatman GF/C フィルターに試料の一部をろ過後、分析時まで -20°C で凍結保存し、Lorenzen の方法¹⁾ でクロロフィル *a* (Chl.*a*) とフェオフィチン *a* (Phaeo.*a*) を分離定量した。また、陽イオン分析はイオンクロマトグラフ装置 (ダイオネックス社、DX300) により、溶離液は EL (メタンスルホン酸 1.3 mmol l^{-1}) をもちい、カラムは IONPAC (ダイオネックス社 CS12, $4 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$) を使用して測定した。陰イオン分析

は、イオンクロマトグラフ装置 (ダイオネックス社 DX100) により、溶離液は EL (Na_2CO_3 1.8 mmol l^{-1} と NaHCO_3 1.7 mmol l^{-1} の混合液) を用い、カラムは IONPAC (ダイオネックス社 AS4A-SC, $4 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$) を使用した。

2.4. 細菌数の計数

細菌コロニーの計数には、平面塗抹法を用いた。持ち帰った試料をそのまま滅菌水道水で段階希釈後、寒天平板に 1 段階宛 3 枚ずつ 2 希釈段階を平面塗抹した。希釈に際しては、生じるコロニーがシャーレ 1 枚あたり 100 個前後になるように、1/2 あるいは 1/5 という希釈も行なった。用いた寒天平板の培養基組成は、PYG 培地 (ポリペプトン 2 g, イーストエキス 1 g, グルコース 0.5 g, 寒天 15 g, 水道水 1 l, pH 7.0)⁷⁾ をもとに、1/2, 1/4, 1/8, 1/16 に希釈したもので、これを P(−) 培地とした。また、それぞれに杉立ら⁸⁾ に基づき、ピルビン酸ナトリウム 0.15 g l^{-1} を添加して P(+) 培地とした。各

Table 2. Biological and chemical analysis of examined water during experimental time.

Sample	DOC (mgC/l)	TOC (mgC/l)	RP ($\mu\text{g atmP/l}$)	TP ($\mu\text{g atmP/l}$)	Chl. <i>a</i> ($\mu\text{g /l}$)	Phaeo. <i>a</i> ($\mu\text{g/l}$)
A1 981013	2.05	2.12	0.072	0.083	0.26	5.78
A2 981110	1.38	1.35	0.129	0.103	0.59	0.70
A3 981227	1.63	1.78	0.016	0.043	0.18	2.69
A4 990328	2.02	2.60	0.088	0.301	1.75	1.62
B1 981022	2.54	7.52	0.054	0.852	70.52	26.06
B2 981103	4.73	6.07	0.035	0.731	33.73	13.12
B3 981114	3.10	4.00	0.035	0.326	15.33	2.96
B4 981205	7.84	8.49	0.035	0.366	3.79	5.22
B5 981227	8.22	8.72	0.035	0.306	3.70	1.81
B6 990225	7.86	8.97	0.164	0.813	12.33	11.26
I 981118	1.13	3.83	0.035	1.014	14.81	5.55
M1 981211	0.94	1.04	0.035	0.245	2.77	11.85
M2 990317	1.06	1.13	0.241	0.364	0.00	3.84
J 990111	0.68	0.75	0.016	0.063	0.11	0.51
SM1 981105	0.68	0.74	0.167	0.144	—	—
SM2 981227	0.67	1.25	0.167	0.144	—	—
SM3 990328	0.62	1.01	0.202	0.437	—	—
SH1 981105	—	0.84	0.618	0.569	—	—
SH2 981214	—	—	—	—	—	—
SJ 981221	0.93	1.04	0.091	0.144	—	—

DOC: dissolved organic carbon, TOC: total organic carbon, RP: reactive P, TP: total P, Chl.*a*: chlorophyll *a*, Phaeo.*a*: pheophytin *a*, (—: no data)

寒天平板に試料 0.1 ml を平面塗抹した後、20°C で 28日間培養し、経時的に生じたコロニー数から cfu として表わした。最終日にはコロニーを色別に分けて計数後、集計した。

2.5. 統計処理

Table 1, Table 2, Table 3 および DOC/TOC, RP/TP, C/C+P の値について、統計処理ソフト HALBAU (ver.3.33)¹⁰⁾ を用いてクラスター分析を行なった。測定値は標準化し、群平均法による距離を求めた。

3. 結 果

3.1. 水質分析の結果

Table 2 に示した通り、DOC で表わされる有機態炭素量は、湧水では 0.6 ppm 以上、1 ppm 以下であった。止水系では、人工池 A は平均 1.8 ppm であったが、人工池 B では浮遊性の微細藻類が増殖するのに伴って、順次増加して 8 ppm まで増加

した。井の頭公園池では DOC の値は 1.13 ppm で、村山上貯水池では 1 ppm 前後であった。同じ止水でも神代農場の池では、湧出地付近の水中の湧水よりも低く、0.68 ppm であった。

RP, TP として測定したリンの量は今回調査した地点では、湧水で 1 桁高い傾向があったが、止水では低い傾向にあった。

クロロフィル量は止水では測定できたが、流水域では検出限界以下であった。

陰イオン濃度は、Table 3 に示したが、Cl⁻ イオンは井の頭公園池と、3月に測定した人工池 A および 3月に測定した真姿の池で 10 ppm を超えたが、他は 6~8 ppm で特に村山上貯水池では低かった。これらの値に対して NO₃⁻ イオン濃度は調査地点による変動が大きく、人工池 A および人工池 B の後半部の調査では低い値を示した。これに対して国分寺崖線の 2つの湧水では常に 20 ppm の高い値が記録された。しかし、平井川の湧水では 4.98 ppm と他の湧水とは異なっていた。SO₄²⁻ イオンの濃度は人工池 A の後半の調査と、人工池 B およ

Table 3. Biological and chemical analysis of examined water during experimental time.

Sample	Cl ⁻ (ppm)	SO ₄ ²⁻ (ppm)	NO ₃ ⁻ (ppm)	Na ⁺ (ppm)	K ⁺ (ppm)	Mg ²⁺ (ppm)	Ca ²⁺ (ppm)	NH ₄ ⁺ (ppm)	
A1	981013	6.23	8.97	0.26	6.98	2.24	2.07	15.23	ND
A2	981110	6.33	9.68	0.26	7.14	1.97	2.51	17.10	ND
A3	981227	7.41	11.29	1.10	7.50	1.73	3.38	20.64	ND
A4	990328	12.30	28.30	2.48	7.43	1.85	3.56	23.96	0.02
B1	981022	8.62	14.25	6.59	9.19	3.23	3.49	22.76	ND
B2	981103	8.37	12.78	4.51	9.19	3.32	3.36	21.22	ND
B3	981114	8.73	13.80	3.45	9.33	3.62	3.28	21.62	ND
B4	981205	9.00	13.43	0.35	9.41	6.05	3.81	30.59	ND
B5	981227	8.99	13.37	0.31	9.26	5.80	3.71	30.79	ND
B6	990225	11.12	10.54	0.00	6.56	5.45	2.50	29.54	0.01
I	981118	13.46	11.01	19.57	17.01	1.35	8.95	21.34	ND
M1	981211	1.13	4.24	1.54	3.96	1.13	1.17	14.29	ND
M2	990317	3.21	8.39	3.09	3.83	0.72	1.42	14.52	0.09
J	990111	8.39	6.11	25.65	13.53	0.80	9.16	16.97	0.49
SM1	981105	6.92	5.78	19.88	5.80	0.17	3.63	6.79	ND
SM2	981227	7.03	6.24	22.67	11.97	0.41	7.71	13.84	0.04
SM3	990328	13.10	8.97	26.90	10.82	0.48	6.65	12.53	0.00
SH1	981105	3.30	31.15	4.98	20.38	4.46	9.21	58.50	ND
SH2	981214	—	—	—	—	—	—	—	—
SJ	981221	8.31	5.98	25.35	13.52	0.74	8.68	15.05	0.02

(ND: not detected, —: no data)

Fig. 1. Colony forming unit observed on the several diluted PYG agar plates with (■) or without (□) sodium pyruvate at artificial pond with purification treatment (A), intact artificial ponds (B), urban park pond (I), reservoir (M) and farm pond (J). Vertical lines represent standard deviation.

び井の頭公園池で高く、特に平井川の湧水では31.2 ppm と最も高い値を示した。

陽イオン濃度は、 Na^+ イオンが Cl^- イオンと同じような変動を示したが、 NH_4^+ イオンはほとんどの地点で検出限界以下であった。 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} イオンは藻類の繁殖した人工池 B で高く、人工池 A がこれに次いだ。 K^+ イオンは湧水では低い値を示したが、人工池 B では藻類の増殖に伴って増加した。

3.2. コロニー計数値

各調査地点で得た、それぞれの培地濃度によるコロニー計数値を Fig. 1 に示した。人工池 A におけるコロニーの計数は、異なる季節に計 4 回行なった。人工池 A における細菌密度は、P(−) 培地の場合 $1.8 \times 10^4 \text{cfu ml}^{-1}$ 前後であったが、P(+) 培地では 5×10^4 から $1 \times 10^5 \text{cfu ml}^{-1}$ にあった。ピルビン酸ナトリウム添加による cfu の増加割合は、A3 の 1/2PYG 培地による 1 データを除いて、いずれの培地濃度においても 3 倍から 7 倍までの値をとっ

た。これらの増加割合を Table 4 に示した。また、10月13日に A1 で得られた増加割合は、培地の希釈割合が高い試料で高い値が得られる傾向にあったが、他は 1/4PYG 培地を用いた時の増加割合が高いことが多かった。それぞれの培地濃度で得た細菌密度のピークと増加割合のピークは異なり、細菌密度はピルビン酸ナトリウムの添加の有無にかかわらず 1/8PYG 培地による計数値が高いことが多かった。1/8PYG 培地は 400 ppm 程度の有機物しか含んでいない、かなり低栄養な培地である。ここに計数値の最大値があるという、本実験の結果から、人工池 A は貧栄養な水界であったことが示唆される。ポーラスコンクリートブロックにより NO_3^- イオンがきわめて少なく、さらにリンの除去が行なわれていることから、藻類の生産量が低く DOC は 1 ppm 前後であった。

人工池 B におけるコロニーの計数は、人工池の水が新しく変えられて 2 ヶ月後から始め、異なる季節に 6 回行なった。10月22日には、表層水は徐々に緑色を呈し、水質分析の結果 (Table 2) にみられ

Table 4. Ratio of CFU obtained by with and without sodium pyruvate in each water sample.

Sample \ Media		1PYG	1/2PYG	1/4PYG	1/8PYG	1/16PYG
A1	981013	4.70	6.41	6.26	6.21	7.59
A2	981110	3.46	3.60	5.10	4.27	4.49
A3	981227	3.41	2.43	5.55	3.40	4.17
A4	990328	4.11	3.93	5.74	5.23	4.76
B1	981022	1.20	3.35	1.07	2.22	2.63
B2	981103	2.98	1.82	1.71	2.23	2.63
B3	981114	2.58	—	1.69	3.29	2.77
B4	981205	2.56	1.99	1.51	1.93	2.63
B5	981227	0.94	1.62	2.09	1.71	1.83
B6	990225	1.51	1.94	2.43	1.85	2.10
I	981118	2.42	2.36	1.70	1.62	2.83
M1	981211	5.38	5.79	5.08	4.19	4.44
M2	990317	4.86	5.61	6.28	4.67	4.69
J	990111	2.16	3.09	2.57	2.84	3.26
SM1	981105	—	—	—	2.12	—
SM2	981227	—	—	—	2.62	—
SM3	990328	—	—	—	2.49	—
SH1	981105	—	—	—	2.05	—
SH2	981214	—	—	—	2.86	—
SJ	981221	—	—	—	2.31	—

Numbers express ratio: CFU-sodium pyruvate (+)/CFU-sodium pyruvate (−), —: no data

るようにクロロフィル量が $96.58 \mu\text{g ml}^{-1}$ と最も高い値を示した。その後、クロロフィル量は減少し、12月27日には最も低くなった。クロロフィル量の減少とは異なり、TOC の値は11月14日までは減少し、その後増加に転じた。細菌密度は P(-) 培地で、 5×10^4 から $1 \times 10^5 \text{cfu ml}^{-1}$ の間にあり、P(+) 培地では 7×10^4 から $3 \times 10^5 \text{cfu ml}^{-1}$ であった。また、cfu の値のピークが得られた培地濃度は、1/2PYG または 1/4PYG 培地にあることが多かった。人工池内の有機物量が DOC 量として当初の値の3.2倍と大きく変動したにもかかわらず、2 データを除いて、いずれの調査においてもピルビン酸ナトリウム添加による cfu の増加割合は1倍から2倍の間にあった。増加割合のピークを得た培地濃度はいずれか1つの希釈倍率に偏ることなく、各調査時で一致した傾向は認められなかった。

井の頭公園池における調査では、ピルビン酸ナトリウム添加による cfu の増加割合は2倍前後であった。倍率のピークは1度の調査であるため明らかではないが、cfu の値のピークは P(-) 培地では 1/8PYG にあり、P(+) 培地では有機物濃度がもっ

とも低いところにあった。

村山上貯水池における菌密度は P(-) 培地で $2 \times 10^3 \text{cfu ml}^{-1}$ 前後と、他と比較して低かったが、P(+) 培地では増加したため $2 \times 10^4 \text{cfu ml}^{-1}$ となり、他の試料と同程度になった。貯水池における計数は2回であったが、増加割合はいずれも4倍から6倍と高かった。

神代農場の湧水をためている池では、cfu の値は村山上貯水池より低かった。増加割合は2~3倍と低く、細菌密度の最大値がえられた培地濃度は、PYG 培地の希釈倍率の低いところにあった。

湧水の細菌群集に関してはこれまでの調査結果に基づいて、1/8PYG 培地のみを用いて行ない、結果を Fig. 2 に独立して示した。真姿の池湧水では P(+) 培地による細菌密度は $1 \times 10^2 \text{cfu ml}^{-1}$ と低

Fig. 2. Colony forming unit observed on the 1/8 PYG agar plates with (■) or without (□) sodium pyruvate at Masugata Spring (SM), Hiraigawa Spring (SH) and Jindai Spring (SJ). Vertical lines represent standard deviation.

Fig. 3. Colony color observed on the 1/4 PYG agar plates with and without sodium pyruvate of A3 sample (a) and B4 sample (b).

く、増加割合は2.5倍で安定していた。同じく国分寺崖線の神代農場の湧水では、P(+) 培地による細菌密度は $2.9 \times 10^2 \text{cfu ml}^{-1}$ でピルビン酸ナトリウム添加による cfu の増加割合は2.3倍であった。平井川の湧水では、P(+) 培地による細菌密度は $5 \times 10^2 \text{cfu ml}^{-1}$ で、増加割合はやはり2～3倍であった。

3.3. コロニーの色別の計数による種類構成

Fig. 3 に計数の最終日に、生じたコロニーを赤、白、黄色、その他に別けて計数した実数値を示した。典型的な例として A3, B4 を示したが、赤色を示すコロニーの数はP(−)培地による計数と、P(+) 培地による計数値に大きな変化が見られなかったのに対して、白色と黄色のコロニーはいずれも大きく増加した。この傾向は5～6倍に増加したグループ(A3)の計数値より、増加割合が2～3倍のグループ(B4)で特に顕著であった。

4. 考 察

4.1. 増加割合のグループ分け

人工池や、貯水池、公園の池、あるいは湧水に生息する細菌群集を計数する場合、ピルビン酸ナトリ

ウム 0.15g l^{-1} を異なる濃度の PYG 培地に添加した平板を用いると、いずれの濃度の培地でもコロニーの計数値が増加した。その増加割合は2倍から6倍におよんだが、杉立ら⁸⁾が報告したように10倍以上になるものはなかった (Table 4)。この増加割合は人工池 B における6回の調査のように、DOC が変化したサンプリング時期でも変わらないことからその現場環境に固有のもので、今回の調査地点は2つのグループすなわち、2～3倍の増加割合を示す地点と、5倍前後の地点に区分されるようであった。この2グループの違いをより客観的に評価するために、各培地濃度における増加割合を独立した変数として扱い、標準化して群平均法によるクラスター分析を行なった。その結果を Fig. 4 に示した。クラスター分析の結果は、最初に分かれたクラスターで増加割合が2倍前後のグループと、5倍前後のグループが区分されることを示している。その結果、人工池 A (A1, A2, A3, A4) と村山上貯水池 (M1, M2) が1つのクラスターを形成し、他の調査地点とは異なるコロニー数の増加割合を示していたことが明らかである。この区分がどのような環境要因を反映しているのかを明らかにするため、測定した水質項目に関して測定値相互の相関係数に基づく統計学的考察、および主成分分析等を行なったが、この

Fig. 4. Dendrogram of cluster analysis based on the magnification of CFU observed on the agar plate with and without sodium pyruvate. Bracket shows a group which enhances cfu number with five times higher than others.

2グループを明らかに区分するような要因は見出せなかった。

4.2. 水質の区分別け

分析した水質項目に関して、全項目を一括してクラスター分析を行なったが、試料 A4 が異なるクラスターに区分され、倍率を基にしたクラスターと同じ区分別けは得られなかった。そこで分析項目を1項目ずつ独立にクラスター分析を行なったが、いずれの分析項目を基にしたクラスター分析でも、倍率によるグループ分けと一致するものはなかった。次に2項目ずつの組み合わせでクラスター分析を行なったところ、DOC 濃度と NO_3^- イオン濃度の測定値を合わせてクラスター分析を行なった結果のみが Fig. 5 に示したとおり、倍率を基にした2つのグループ分けと合致する区分別けを示すことが明らかにされた。このグループは試料の DOC 濃度がすべて 1 ppm 前後で、 NO_3^- イオン濃度は他の調査地点より低い値を示す地点である。これらの事実は、PYG 寒天平板にピルビン酸ナトリウム 0.15 g l^{-1} を添加してコロニー計数を行なう場合、DOC 1 ppm 前後でかつ NO_3^- イオン濃度がきわめて低い水域においては、ピルビン酸ナトリウム添加によるコロニーの計数値の増加割合が5倍前後と高くなる

ことを意味している。このとき増加したコロニーは、コロニーの色別の計数値 (Fig. 3) から明らかに、その水域に存在している細菌群集の全体が等しく増加したのではなく、ある1部の細菌群集がピルビン酸ナトリウムの添加に反応した結果の反映であると考えられる。個々の菌株の有機物利用特性に関しては現在検討中であるが、P(+) 培地で増加したコロニーの数は栄養要求性が高い可能性が推測される。とくに試料 B や、試料 I のように環境が富栄養なところでは赤色のコロニーの実数はほとんど変化しなかった。計数値が増加しなかった赤色のコロニーは必ずしも1種類の細菌から構成されるとは断定できないが、他の細菌株が増殖できないような低栄養環境で出現する優占コロニー⁴⁾と近似しており、ピルビン酸ナトリウム添加に関係なく低栄養環境でコロニー形成を行う菌株であると考えられる。DOC 濃度が 1 ppm 前後と低く、かつ NO_3^- イオン濃度が低いという低栄養な環境においては、高濃度の有機物を増殖に必要とする細菌群集は環境中に利用し得る有機物が不足しているため、コロニーとして肉眼で見えるまで分裂を続けられない。ここにピルビン酸ナトリウムのような物質が添加されると、直接有機物源として利用したり、あるいは何らかの要因で分裂の引き金が引かれ、コロニーを

Fig. 5. Dendrogram of cluster analysis based on the concentration of DOC and NO_3^- of all samples. Bracket shows five times group. Bracket shows a group which enhances cfu number with five times higher than others.

形成できる状態になるのではないかと推測される。この引き金がどのようなものであるかは、今回の実験では明らかにされていない。

ピルビン酸ナトリウム添加によるコロニー計数値の増加は、損傷細胞からの復帰という点で単一菌に関しての報告が中心である^{3,9)}。低栄養環境におかれるというストレスが損傷状態と同一のものであるかを明らかにする必要がある。さらにまた、水界に生息している多様な細菌群集全体に対して、同じ機構でピルビン酸ナトリウムが作用するわけではないと考えられ、今後増加した細菌群集に関する情報を蓄積する必要がある。

引用文献

- 1) Lorenzen, C.J. 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnol. Oceanogr.* **12**: 343-346.
- 2) Menzel, D.W. and R.F. Vaccaro. 1964. The measurement of dissolved and particulate carbon in sea water. *Limnol. Oceanogr.* **9**: 138-142.
- 3) Mizunoe, Y., S.N. Wai, A. Takada and S. Yoshida. 1999. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O-157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Arch Microbiol* **172**: 63-67.
- 4) Morikawa, K. 1987. Characteristics of Predominant Bacteria in Periphyton at an Oligotrophic Region in the Tamagawa River with Special Reference to Chemotaxonomy. *Jpn. J. Limnol.* **48**: 67-70.
- 5) Murphy, J. and J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural water. *Anal. Chim. Acta* **27**: 31-36.
- 6) 永翁一代, 森川和子. 1999. 都市湧水・真姿の池の細菌群集の変動とその要因. *陸水雑*, **60**: 177-184.
- 7) 桜井善夫. 1967. 水中の一般細菌試験法に関する二, 三の検討. *日本水処理生物誌*, **2**: 21-27.
- 8) 杉立年弘, 森川和子. 1999. Sodium pyruvate 添加培地での河川細菌群集の計数値の増加. *Microb. Environ.* **14**: 85-87.
- 9) Xu, H.-S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes and R.R. Colwell. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313-323.
- 10) 柳井晴夫, 高木廣文編. 1986. 多変量解析ハンドブック. 現代数学社.