熱帯の河川における細菌の活性および群集構造の解析

見 坂 武 彦* 山 口 進 康* 藤 本 一 馬**
田 所 博** 那 須 正 夫*

Bacterial Community Structure and Their Activity in Tropical Rivers Determined by Fluorescent Staining Methods

Takehiko KENZAKA*, Nobuyasu YAMAGUCHI*, Kazuma FUJIMOTO**,
Hiroshi TADOKORO** and Masao NASU*

* Environmental Science and Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871 Japan

** Kurume Research Laboratories, Chemical Biotesting Center, Chemicals Inspection & Testing Institute, 19-14, Chuoh-Machi, Kurume, Fukuoka 830-0023 Japan

Abstract

Tropical river waters in South East Asia have been seriously polluted by recent urbanization and industrialization, and microbial ecology of bacteria in tropical rivers must be investigated. In this study, bacterial community structure and their physiological activity in tropical rivers (Kelang River basin, Malaysia) were investigated at a single cell level. Estimates of culturable bacteria on R2A medium accounted for 10 to 30% of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)-stained bacteria. The number of bacteria with enzymatic activity, as determined by 6CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate), was 10 to 30% of the total bacteria. Bacterial community structures in tropical water samples were analyzed by rRNA-targeted in situ hybridization with HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) and the direct viable count approach. Forty to 55% of total cells could be detected with EUB338 probe. The bacterial community structure was dominated by the *Acinetobacter* group in any sample, accounting for 20 to 35% of total cells. Bacterial activity and dominant genera were different from those in temperate river samples.

Key words: bacteria, tropical river, activity, community structure, fluorescent staining

1. はじめに

急速な工業化, 都市化の進む東南アジアでは, 生活排水, 工業廃水による水質汚濁が深刻化している¹⁻⁵⁾。環境汚染に対して的確な対策を講じるためには, まず河川環境の現状を明らかにすることが重要であり, 特に生態系に対する汚染物質の影響を評価することが必須となる。細菌は多様な機能と豊富な現存量をもとに分解者として生態系の根幹部を支えているため, 汚染物質の生態系影響評価にあたっては微生物学的な検討が必要である。

また河川の持つ自浄作用において, 細菌は極めて重要な役割を果たしている。したがって, 今後社会の発展を維持しながら, 淡水資源を安全かつ効率的に利用していくためには, 自浄作用における細菌の能力を評価し, 河川水中の細菌の動態および多様性に関して深く理解することが必要である。

環境中の細菌を調査・研究するにあたり, その現存量の測定, 生理活性の評価, 群集構造の解析は基本となる。これらは従来, 主に寒天平板培地を用いた培養法により行われていたが, 蛍光染色を基本とする直接計数法⁶⁾の普及によって, 環境中には培養困難な細菌が大部分を占めることが明らかとなっている。その結果, 欧米諸国を中心にこの10年間で微生物の検出方法は急速な進歩を遂げ, シングルセルレベルで生理活性を評価する方法として蛍光活性染色法^{7,8)}, 特定の微生物を検出する方法としてFluorescent in situ hybridization (FISH) 法⁹⁾が普及しつつある。これらの方法を用いることにより, 環境中には培養が困難であるが生理活性を有している細菌が高い割合で存在していること^{7,8)}, 冷温帯では *Proteobacteria* の Beta サブグループに属する細菌が高い割合で存在すること^{10,11)}が明らかとなってきている。しかしながら, 環境中の細菌の調査・研究は, 主に冷温

* 大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野 (衛生化学) 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6

** 財化学品検査協会化学品安全センター久留米研究所 〒830-0023 福岡県久留米市中央町19-14

帯に生息する細菌を対象として行われてきた。東南アジアにおける細菌の現存量、生理活性、群集構造に関する研究は、環境汚染対策の基礎となるものであるにも関わらず、未だその知見は限られている。本研究ではマレーシアの Kelang 川を対象として、河川水中の細菌の現存量、活性および群集構造を調査し、大阪近郊の河川水で得られた結果と比較・検討した。

2. 実験材料および実験方法

2.1 試料採取

マレーシアの首都クアラルンプール市内を経てマラッカ海峡へ流れる Kelang 川流域の 5 地点にて河川の表層水を採取した (Fig. 1)。KL1 から KL4 はクアラルンプール市内、SA5 は Kelang 川下流の Shah Alam 市に位置する。KL1 から KL4 では、川幅は約 10m であり両岸はコンクリートで護岸されている。周囲は市街地であり、家庭排水の流入がみられる。SA5 では、川幅は約 50m であり周囲は工場地帯である。試料採取は 1997 年 11 月に行った。

2.2 全菌数

試料を 3% paraformaldehyde を用いて 4 °C で固定した後、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 終濃度 1 ppm) で 5 分間染色した。ポリカーボネートフィルター (直径 25mm, 孔径 0.2 μm, 東洋濾紙製) に細菌を捕集し、蛍光顕微鏡 (AX70, オリンパス製) UV 励起光下 (U-MWU キューブ) で計数した。

2.3 活性を有する細菌数

コロニー形成細菌数は、R2A 培地¹²⁾および TSA 培地 (17 g pancreatic digest of casein; 5 g NaCl; 3 g papaic digest of soybean meal; 2.5 g K₂HPO₄; 2.5 g

glucose; 15 g agar per liter H₂O) を用いて測定した。段階希釈した試料を各培地に塗抹し、30 °C, 1 週間培養し、コロニーを計数した。

エステラーゼ活性を有する細菌数は、6CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) を用いて測定した^{13,14)}。ポリカーボネートフィルター (直径 25mm, 孔径 0.2 μm, 東洋濾紙製) をセットし、ガラスファンネル内に試料および試料の 1/2 量の 6CFDA 染色用バッファー (0.3 M sodium phosphate buffer, 15% NaCl, 1.5 mM EDTA, pH 8.5) を入れて混合し、6CFDA stock solution (終濃度 150 ppm, Sigma 製) を加えて 3 分間染色を行った。染色後、細菌をフィルターに捕集し、蛍光顕微鏡 (AX70, オリンパス製) 青色励起光下 (U-MNIBA キューブ) で計数した。

2.4 HNPP-FISH 法

FISH 法により河川水中の細菌群集構造を解析するにあたり、前報¹⁵⁾にて報告した 5 種のグループ特異的な rRNA プロブを用いた。すなわち *Flavobacterium-Cytophaga* のグループ (5'-AGGTACCCCCAGCTTC-CATGGCT-3'), *Burkholderia-Rubrivivax-Bordetella* のグループ (5'-GTGTGCCGTTCTCTTTTCGAGCAC-3'), *Vibrio-Aeromonas* 属のグループ (5'-ACGACG-CACCTTTTGGGATTCGCTCACTATCGCAAG-3'), *Acinetobacter* 属 (5'-GCGCCACTAAAGCCT-CAAAGGCC-3'), *Pseudomonas* I 型 (5'-ATTTCAGC-CTACCACCTTAA-3') である。また真正細菌に共通なプロブとして Amann らが報告している EUB338 の配列 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')¹⁶⁾ を利用した。

細菌試料の固定、および蛍光色素 HNPP を用いた

Fig. 1 Map of peninsular Malaysia. The sampling sites are marked by open circles.

FISH 法 (NPP-FISH 法) は前報¹⁵⁾にしたがい行った。

2.5 DVC 法

FISH 法の検出感度を向上させるため、Direct viable counting (DVC) 法^{17,18)}を併用した。すなわち試料を容量50mlの遠心チューブ (Corning 社製) に入れ、yeast extract ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), nalidixic acid ($20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), pipemidic acid ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), piromidic acid ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), cephalexin ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ciprofloxacin ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) を加え、 30°C で、18時間静置した後、HNPP-FISH 法を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 全菌数および活性を有する細菌数

各試料の全菌数、エステラーゼ活性を有する細菌数、R2A および TSA 培地により求めたコロニー形成細菌数を Fig. 2 に示した。全菌数は $4.7\text{--}9.0\times 10^6\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ であり、大阪近郊河川と比べ顕著な違いはみられなかった。R2A 培地により求めたコロニー形成細菌数およびエステラーゼ活性を有する細菌は、いずれも全菌数の10–30%を示した。一方、培地成分の濃度が高い TSA 培地上のコロニー数は全菌数の1–8%であった。大阪近郊の河川では、R2A 培地により求めたコロニー形成細菌数は全菌数の1–20%であるのに対して、エステラーゼ活性を有する細菌の割合はこれよりも高い値(30–50%)を示す¹⁴⁾。したがってマレーシアの河川水試料では、極めて多くの細菌が R2A 培地上にコロニーを形成することが分かった。冷温帯では全細菌の0.1%から20%しかコロニーを形成できず、生きてはいるが培養できない (Viable But Non-Culturable: VBNC) 状態の細菌が高い割合で存在することが報告されている^{17,19–22)}。これに対し今回マレーシアの河川で得られた結果は、これら冷温帯の河川での報告とは異なるものである。またエステラーゼ活性を有する細菌数が、コロニー形成細菌数と類似した値を示す点も特徴として挙げられる。この理由の一つとして、今回のマレーシアの試料中の細菌の多くは蛍光染色剤 6CFDA が細胞膜を十分に透過せず、エステ

Fig. 2 Bacterial number in water samples taken from Kelang river basin.

ラーゼ活性を有する細菌数を過小評価していることが考えられる。また対数増殖期の細胞は定常期に比べ染色性されにくいこと²³⁾、細菌種により染色されにくいものがあること²⁴⁾が報告されており、今後詳細な検討が必要である。

3.2 細菌群集構造

FISH 法を用いて細菌群集構造を定量的に解析するにあたり、まず真正細菌に共通な EUB338 プローブを用いてその検出効率を検討した (Fig. 3)。その結果マレーシアの河川水試料では、全細菌に対する EUB338 プローブとハイブリダイズした細菌の割合は15–25%であった。この値は大阪近郊の河川水での値、すなわち40–70%を大きく下回るものである¹⁵⁾。一方、細胞分裂を阻害しながら細胞を伸長・肥大させる DVC 法を行った後 HNPP-FISH 法を行ったところ、FISH 法の検出効率は40–55%に向上した。この理由として、試料中の生きていた細菌内の rRNA 含量が増加したことが考えられる。

Fig. 4 は DVC 法を行った試料に対し、グループ特異的な5種のプローブを用いて HNPP-FISH 法を行った結果である。横軸は全細菌に対する各プローブとハイブ

Fig. 3 Staining efficiency of HNPP-FISH with EUB338 probe before (□) and after (■) incubation for 18h with medium and antibiotics.

Fig. 4 Bacterial community structure in Kelang river samples determined by HNPP-FISH with the DVC incubation.

リダイズした細菌の割合を表している。いずれの試料においても *Acinetobacter* プローブとハイブリダイズする細菌が最も多く、20–35%存在していた。大阪近郊の河川水を用いた研究では、*Flavobacterium-Cytophaga* プローブとハイブリダイズする細菌が優占し、その割合は10–30%である¹⁵⁾。

河川環境を微生物学的に評価するためには、河川の化学的因子、物理学的因子と微生物との関係を検討することが必要である。本研究ではその基礎となる細菌の現存量、活性、群集構造を調査した結果、熱帯に位置するマレーシアの河川と温帯に位置する大阪の河川では細菌の優占種および生理状態が大きく異なることが明らかとなった。自然環境中の細菌は群集ごとに異なった生理状態にあると考えられ、強い活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される。したがって細菌の生理状態を的確に評価すること、そして活性を持つ細菌の群集構造を詳細に検討することが重要である。今後、細菌の生理活性評価法を最適化すること、さらにこれを特定細菌検出法と組み合わせることが課題である。

4. ま と め

東南アジアにおける河川環境を微生物学的に評価するためには、生態系における分解者である細菌の解析が必要である。そこでマレーシアの河川水中の細菌の現存量、活性および群集構造をシングルセルレベルで検討した。温帯河川水を用いた従来の結果と比較したところ、温帯河川と熱帯河川では細菌の生理状態や優占種が大きく異なることが明らかとなった。

謝 辞

本研究は、平成11年度科学技術庁科学技術振興調整費知的基盤整備推進制度により行ったものであり、関係各位に感謝いたします。また本研究を行うにあたり、実験室ならびに実験器具等を提供していただいた、Standards and Industrial Research Institute of Malaysia (SIRIM) に深謝いたします。

(原稿受付 1999年7月16日)

(原稿受理 1999年10月4日)

参 考 文 献

- 1) Lee, Y.H. and Stuebing, R.B. (1990) Heavy metal contamination in river toad, *Bufo juxtasper* (inger), near a copper mine in East Malaysia, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 272–279.
- 2) Sukasem, P. and Tabucanon, M.S. (1993) Monitoring heavy metals in the Gulf of Thailand using mussel watch approach, *Sci. Total. Environ.*, **1**, 297–305.
- 3) Kusamran, W.R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M. and Sugimura, T. (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters, *Mutat. Res.*, **325**, 99–104.
- 4) Tan, G.H. (1995) Residue levels of phthalate esters in water and sediment samples from the Klang river basin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 171–176.
- 5) Department of environment, Ministry of science, Technology and the Environment, Malaysia (1997) Environmental Quality Report.
- 6) Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225–1228.
- 7) Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H. F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1801–1808.
- 8) Porter, J., Diaper, J., Edwards, C., and Pickup, R. (1995) Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2783–2786.
- 9) Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, **59**, 143–169.
- 10) Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glöckner, F.O., Wille, A. and Psenner, R. (1996) Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2138–2144.
- 11) Glöckner, F.O., Amann, R.L., Alfreider, A., Pernthaler, L., Psenner, R., Trebesius, K. and Field, K.G. (1996) An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria, *System. Appl. Microbiol.*, **19**, 403–406.
- 12) Reasoner, D.J. and Gerldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1–7.
- 13) Dive, C., Cox, H., Watson, J.V. and Workman, P. (1988) Polar fluorescein derivatives as improved substrate probes for flow cytological assay of cellular esterases, *Mol. Cell. Probes.*, **2**, 131–145.
- 14) Yamaguchi, N., Kanzaka, T. and Nasu, M. (1997) Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes, *Microb. Environ.*, **12**, 1–8.
- 15) Kanzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. (1998) rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water, *Microbiology*, **144**, 2085–2093.
- 16) Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919–1925.
- 17) Kogure, K., Simidu, U. and Taga, T. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415–420.
- 18) Joux, F. and Lebaron, P. (1997) Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3643–3647.
- 19) Tabor, P.S. and Neihof, R.A. (1982) Improved microautoradiographic method to determine individual microorganisms active in substrate uptake in natural waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 945–953.
- 20) Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environments, *Microb. Ecol.*, **8**, 313–323.
- 21) Winding, A., Binnerup, S.J. and Sørensen, J. (1994) Viability of indigenous soil bacteria assayed by respiratory activity and growth, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2869–2875.
- 22) Yamaguchi, N. and Nasu, M. (1997) Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment, *J. Appl. Microbiol.*, **83**, 43–52.
- 23) Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (1999) Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process, *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 496–504.
- 24) Diaper, J.P. and Edwards, C. (1994) The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry, *J. Appl. Microbiol.*, **77**, 221–228.