Note

画像解析システムを用いたアクリジンオレンジ染色による 河川細菌群集の計数

森川 和子・杉立 年弘

Enumeration of Acridine Orange Stained Bacterial Community in the River Using Image-Analyzed Epifluorescence Microscopy

Kazuko MORIKAWA and Toshihiro SUGITATE

Abstract

The numbers of bacteria in river water and the epilithon of the river bed were enumerated using color image-analyzed epifluorescence microscopy. Bacteria stained by acridine orange (AO) are known to show fluorescent green or red-orange colors. The two colors of stained particles were separated and counted independently by an image analyzer (nexusQube), and the area of each stained particle displayed on the microscope field was measured. Bacterial communities in the river water and river epilithon were composed of two subcommunities which were stained red-orange or green. The bacterial particles stained fluorescent green were small in area, but the red-orange ones were composed of various sizes of stained particles. Judging from the particle area and color, no differences were observed in the composition of bacterial communities between the river water and the epilithon at the Koremasa site of the Tamagawa River.

Key words: acridine orange (AO), image analyzer, river, bacterial number

1. はじめに

自然水界の細菌群集を計数する場合、蛍光色素アクリジンオレンジ (AO) を用いた染色法はよく用いられる方法の一つである (OSGOOD *et al.*, 1990; PEDERSEN *et al.*, 1990 等)。AO 染色により細菌は赤橙色, または緑色の蛍光を発する。一般に総細菌数を得る場合, このように染色された粒子の中で明らかに細菌の形状をしたものを合計して得ている (例えば, POWELL *et al.*, 1987; KORSHOLM *et al.*, 1988; AL-HADITHI *et al.*, 1989 等)。しかしこの値は, 水界の細菌群集を平板上に接種して, 生じたコロニーを計数して得られる生菌数の値と比較すると, 2 桁から 3 桁多くなっている。自然界において AO により染色される粒子の数の変動の

幅は小さい。AO で染色された粒子がどのような生物学的意味をもっているかを明らかにする事は, 自然界の細菌群集の生態を解析する上での重要な問題点の一つである。

最近, 細菌細胞の計数に画像処理技術を用いようとする試みが行われている。(SIERACKI *et al.*, 1985; 岡野ら, 1990; SINGH *et al.*, 1990)。顕微鏡を用いた肉眼による計数には, 基準の設定が必ずしも統一されない欠点がある (NAGATA *et al.*, 1989)。画像処理システムを用いることでより計数の客観性が増し, また画像を保存できることから, 前の画像との比較が行える利点がある。さらにまた, 2 値化した処理画像から面積や形状が数値化されることによって, 自然界の細菌群集の動態の解明を一步深めることが期待される。本報では AO 染

色をした細菌群集を肉眼による計数ではなく、カラービデオカメラで画像を取り込んだ上で、画像処理を行うことによって赤橙色と緑色を分別計数する試みを行った結果を報告する。

2. 材料および方法

2-1. 河川水および河床付着層の採取

多摩川の中流域是政橋下流右岸において1991年3月6日、河川水と河床付着層の試料を、前報に従って採取した(森川, 1984)。採取時の水温は13.8°C, pH 7.58であった。5×5 cm²の付着層試料2個は、それぞれ260 ml, 225 mlの河川水に懸濁して現場水温に保って研究室に持ち帰った。

2-2. AOによる染色

河川水はそのまま、河床付着層試料は河川水でさらに1/10に希釈して各10 mlの試料にグルタルアルデヒド(25%) 0.5 mlを加えて固定後、冷蔵庫に保存した。これまでの調査から河川水と付着層試料の細菌数には大きな差があるので、この方法で両者が区別できなくなるような影響はない。このサンプルについて染色直前に超音波処理(大岳製作所5202-T, 20 KHz, 50 W, 60 sec, ストレート型φ8チップ)をほどこし、その1 mlを取り濾過滅菌水(Nuclepore フィルター0.2 μm) 1 mlに加えて、0.4%アクリジンオレンジ0.05 mlを添加攪拌後3分間静置した。これを直径25 mm, 孔径0.2 μmのNuclepore フィルター(φ=0.2 μm)を用いて濾過後、蛍光顕微鏡で観察した(Hobbie *et al.*, 1977)。

2-3. 画像の取り込み

顕微鏡にアダプターを用いて、ビクター(KY-F 30) 3 CCDビデオカメラを接続した。接続にあたっては、オリンパスの2.5倍の写真撮影用接眼レンズを用いた。画像の取り込みは像の安定性を考慮して、すべてカメラの自動モードで行った。一般に、入射光の特性に影響される色のバランスを白色の撮影によって行うが、AO染色画面ではこれができないためカメラ内部にある機能を用いてホワイトバランスをとった。

用いた顕微鏡はオリンパスBHS-RFKタイプで、blue励起フィルター(BP 490)を用い、補助励起フィルターは使用しなかった。ダイロックミラーユニットの位置はB(DM 500+O 515)で、補助吸収フィルター(O 530)を用いて行った。画像取り込みに当たっては、顕微鏡の対物レンズ(UVFL×100)の絞りを固定し、Hg電源(100 w)・落射蛍光投光管の視野絞り・開口絞りを、顕微鏡の視野に最も多くの粒子が見える位置で固定

して行った。

2-4. 画像の処理

ネクサスキューブ(株式会社ネクサス)を用いて画像処理を行った。顕微画像の照度が暗いためにノイズデーターがのりやすいので、これを回避するために積算入力(平均化)を32回行った。処理画像は512×480画素のうち、左側8, 下側8を除いて、これにかかった粒子すべてを除去し、画像処理の精度上、右側8, 上側8画素も除いた。その結果、495×463画素内の粒子について計測を行った。AO染色による赤橙色と緑色の蛍光を発する粒子を個別に数えるため、次のような処理を行った。波長で区切ることがうまくできなかったので、人間の視覚を絶対値としてRGB成分の強弱により赤橙色と緑色の差が経験的に8階層以上のものを赤橙色としてまず分離した。1画素以下の粒子は、ノイズの可能性が高いので除去し、250画素以上のものは細菌としては大きすぎるので同様除去した。画像の各部分の輝度による補正は、微少ブロックにわけ、それぞれのキャリブレーションをとることによって行った。

顕微鏡で観察した画面と、処理をした赤橙色と緑色の写真をFigure 1に示した。1画素の1辺の長さは、0.1041 μm, 面積は0.01084 μm²で、処理面積は2484 μm²であった。なお、この面積内での顕微鏡レンズの収差に基づく測定値の変化は、直径0.49 μmの蛍光ビーズ(2.5% Solid-Latex, Carboxylate Microspheres)によるキャリブレーションの結果、認められなかった。各染色粒子について赤橙色、緑色毎に、面積・最大長・形状係数(最大長/円相当径)²を求めた。

3. 結果及び考察

3-1. 肉眼の計数値と画像処理による計数値の比較

Table 1に同一サンプルを蛍光顕微鏡を用いて肉眼で計数した値と、画像処理によって計数した赤橙色と緑色の値を合計した値を示した。いずれのサンプルについても肉眼による計数値の方が画像処理による値よりも約15%多かった。今回の計数に際しては、肉眼で蛍光を発している粒子を細菌の形状をしているか否かを問わずすべて計数したため、画像処理ではノイズの可能性があると看做して落とした1画素以下の粒子を肉眼で拾っていたことによると思われる。

3-2. 河川水及び河床付着層を構成する細菌の面積・最大長・形状係数について

Figure 2aに河川水の、2bと2cに付着層を構成

Fig. 1. Photographs of AO stained particles displayed on the TV monitor. a, original TV screen; b, TV screen of red- orange stained particles; c, TV screen of green stained particles.

する細菌群集についてテレビモニター上にみられた染色性粒子の面積を $0.1 \mu\text{m}^2$ 毎に示した。赤橙色の粒子は $0.3\text{--}0.4 \mu\text{m}^2$ にピークをもち、以後徐々に減少するカーブを示した。斜線を施した緑色の粒子は最小の階級で最も多く、階級値の増加に伴って、指数関数的に減少した。この減少傾向はいずれのサンプルにおいても等しく、非生物による染色性粒子の存在が考えられる。粒子の分布からみた多摩川是政における河川水と河床付着層のサンプルの傾向は等しく、染色性や粒子の大きさから、河川水と付着層の細菌群集を構成する菌群の差異は見いだせなかった。これは細菌群集を構成する菌の最大長に関しても同じ傾向であった (Table 2)。形状係数についても河川水の細菌群集と付着層の細菌群集で差はなかった (Table 3)。

以上、河川水と河床付着層に生息している細菌群集は AO 染色に対して赤橙色を示す粒子と緑色の染色性を示す 2 種類の粒子から構成されていたが、今回得られた結果から、河川水と付着層の細菌群集の構成に面積や長さ・形で表わされる差は認められなかった。これは、河川の上流域で得られた河川水と河床付着層の細菌フロアに違いがみられたという結果 (MORIKAWA, 1987) とは一致しない。染色法で得られる細菌群集の数と平板法で得られる細菌群集の数の違い、あるいは中流域と上流域の河川に生息する細菌群集の種類構成の違いや季節による違いなどによるのであろう。さらにまた、ここで測定したような値では区別できない細菌群集の構成の差があるのかも知れない。

最近、MCFETERS *et al.* (1991) が大腸菌を用いて培養の時期により AO の染色性が異なり、対数増殖期の細胞は赤橙色に、定常期の細胞は緑色に染色されること、しかしこれは大腸菌を培養する培養基組成により異なり、栄養培地で培養すると培養時期に応じて赤橙色から緑色に変化するが、合成培地による培養では赤橙色のままであること、定常期に緑色になったものを同じ条件で植え継ぐと緑色であるが、ミリ Q 水に植え継ぐと 6 分後から赤橙色の細胞が増えてくること等、大腸菌の純

Table 1. Comparison of numbers of particles stained with acridine orange which were counted by naked eye on a microscope field and the image-analyzed epifluorescence microscope system. The values were converted into the number per $2484 \mu\text{m}^2$ percentage showed the ratio of the image analyzer counts to the direct eye counts.

Samples	River water	Epilithon 1	Epilithon 2
Direct eye counts	880	1035	1194
Image analyzer counts	745 (84.7 %)	898 (86.8 %)	1029 (86.2 %)

Fig. 2. Distribution of the area of the AO stained particle. a, river water; b, epilithon 1; c, epilithon 2; $\square$, the number of red-orange particles; ▨ , the number of green particles.

Table 2. Distribution of the maximum length of the acridine orange stained particle calculated by an image analyzer. The values show the mean value of the ten fields of the image analyzer.

Samples	River water		Epilithon 1		Epilithon 2	
	red-orange	green	red-orange	green	red-orange	green
0.210-0.314 μm	13.9	74.0	20.5	88.3	12.9	135.8
0.315-0.419	5.9	9.6	4.8	14.9	4.2	17.5
0.420-0.524	8.5	15.8	12.0	20.7	8.7	21.9
0.525-0.629	10.0	13.7	14.0	18.8	13.6	25.0
0.630-0.734	15.4	5.9	18.0	7.5	13.9	9.5
0.735-0.839	16.0	4.3	17.3	4.7	16.4	7.7
0.840-0.944	17.8	3.3	22.6	3.4	20.7	6.4
0.945-1.049	9.1	2.2	9.4	2.1	9.6	3.1
1.050-1.154	7.9	1.4	10.1	1.5	10.0	1.8
1.155-1.259	7.0	1.5	6.9	0.3	7.6	1.5
1.260-1.364	6.1	0.1	5.8	0.1	5.8	1.0
1.365-1.469	5.7	0.3	6.3	0.0	4.8	0.3
1.470-1.574	3.4	0.0	3.8	0.1	3.6	0.2
1.575-1.679	3.6	0.1	3.0	0.0	3.5	0.1
1.680-1.784	2.3	0.0	3.4	0.1	2.7	0.0
1.785-1.889	2.3	0.0	2.5	0.0	3.0	0.0
1.890-1.994	1.8	0.0	2.2	0.0	2.0	0.1
1.995-2.099	1.4	0.0	1.4	0.0	1.5	0.0
2.100 $\leq$	30.0	0.0	30.0	0.0	22.0	0.0

Table 3. Coefficient of the shape of the particle stained with acridine orange analyzed by an image analyzer. The values show the maximum length per the length of the diameter corresponded to a circle.

Samples	River water		Epilithon 1		Epilithon 2	
	red-orange	green	red-orange	green	red-orange	green
1.000-1.150	24.9	5.8	29.7	8.2	27.6	11.2
1.150-1.500	12.3	7.7	13.4	4.6	14.7	9.6
1.500-2.000	2.7	2.0	3.7	1.7	3.3	2.5
2.000<	0.6	0.6	0.9	0.4	1.3	0.8

粹培養における AO 染色性の違いが、培養時期・培養条件により異なることを報告している。また、PORTER and FEIG (1980) は有機物濃度の高い水域では非生物に由来するものも含めた AO 染色性粒子があることから細菌の計数に AO を用いることの是非を述べている。従って、今回得られたこのような赤橙色と緑色の差は、DALEY and HOBBI (1975) が述べたように単純に細菌の生理状態を反映しているとは言えない。しかし、固定法や染色法など条件を一定にするならば、自然界に生息している細菌群集をこのような方法で観察計数する

ことによって、生息環境との関連の一側面を明らかにできる可能性があると考えられる。また、画像処理を行うことによって、計数値の客観性が増し、細菌と非生物の粒子をこの計測値をもとに分別することも可能であろう。同様、AO 染色による赤橙色と緑色の染色性の違いもその内容が明らかにされると思われる。今後さらにデータの蓄積が必要であろう。

謝 辞

本報告の一部は東急かんきょう浄化財団の助成

によってなされました。ここに報告して感謝の意を表します。また、画像処理に関しては株式会社ネクサスの石原剛一技師にお世話になりました。感謝の意を表します。

摘 要

画像解析システム (nexusQube) を用いて、蛍光色素アクリジンオレンジ (AO) で染色した河川水及び河床付着層の細菌群集の計数を行った。AO によって、染色された粒子の顕微画像をカラービデオ装置で取り込み、画像解析により赤橙色と緑色の粒子を分別計数した。いずれのサンプルの細菌群集も赤橙色の蛍光を発するものと緑色の蛍光を発する粒子から成り立っていた。緑色の粒子は小さく、赤橙色に染色される粒子は種々の大きさのものから構成されていた。面積や色調からは、多摩川は政地点における河川水と付着層の細菌群集の構成に差は認められなかった。

文 献

- AL-HADITHI, S. A. and R. GOULDER (1989): Physiological state of epiphytic bacteria on submerged stems of the reed *Phragmites australis* compared with planktonic bacteria in gravel-pit ponds. *J. Appl. Bact.*, **66**: 107-117.
- DALEY, R. J. and J. E. HOBIE (1975): Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.*, **20**: 875-882.
- HOBIE, J. E., R. J. DALEY and S. JASPER (1977): Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 1225-1228.
- KORSHOLM, E. and H. SØGAARD (1988): An evaluation of direct microscopical counts and endotoxin measurements as alternatives for total plate counts. *Water Res.*, **22**: 783-786.
- MCFETERS, G. A., A. SINGH, S. BYUN, P. R. CALLIS and S. WILLIAMS (1991): Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods*, **13**: 87-97.
- 森川和子 (1984): 多摩川上流域における好気性従属栄養細菌数の季節変動とそれの環境要因との関係について. *陸水雑*, **45**: 69-78.
- MORIKAWA, K. (1987): Characteristics of generic composition of aerobic heterotrophic bacteria in periphyton at an oligotrophic region in the Tamagawa River. *Jpn. J. Limnol.*, **48**: 55-65.
- NAGATA, T., T. SOMEYA, T. KONDA, M. YAMAMOTO, K. MORIKAWA, M. FUKUI, N. KURODA, K. TAKAHASHI, S. OH, M. MORI, S. ARAKI and K. KATO (1989): Intercalibration of the acridine orange direct count method of aquatic bacteria. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **4**: 89-99.
- 岡野正豪・築城幹典・斉藤元也 (1990): 画像処理による土壌中の微生物の識別. *土と微生物*, **35**: 35-37.
- OSGOOD, M. P. and C. W. BOYLEN (1990): Seasonal variations in bacterial communities in Adirondack Streams exhibiting pH gradients. *Microb. Ecol.*, **20**: 211-230.
- PEDERSEN, K. and S. EKENDAHL (1990): Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of Southeastern Sweden. *Microb. Ecol.*, **20**: 37-52.
- PORTER, K. G. and Y. S. FEIG (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 943-948.
- POWELL, J., C., P. E. DABINETT and J. A. GOW (1987): An annual cycle of abundance and activity of heterotrophic bacteria and abundance of hydrocarbonoclastic bacteria in Newfoundland coastal water. *Can. J. Microbiol.*, **33**: 377-382.
- SIERACKI, M. E., P. W. JOHNSON and J. M. SIEBURTH (1985): Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 799-810.
- SINGH, A., F. YU and G. A. MCFETERS (1990): Rapid detection of chlorine-induced bacterial injury by the direct viable count method using image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 389-394.

(著者: 森川和子・杉立年弘, 東京農工大学一般教育部, 〒183 東京都府中市幸町3-5-8; Kazuko MORIKAWA and Toshihiro SUGITATE, Laboratory of Biology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183.)

1991年8月6日 受付

1992年1月26日 受理