

土壌環境中の細菌の検出法

Methods for the Detection of Bacteria in the Soil Environment

金原 和秀*, 飯島 想, 下村 有美, 谷 明生
KAZUhide KIMBARA, SOU IJIMA, YUMI SHIMOMURA, and AKIO TANI

岡山大学資源生物科学研究所 〒710-0046 岡山県倉敷市中央 2-20-1

*TEL: 086-434-1235 FAX: 086-434-1235

*E-mail: kimbara@rib.okayama-u.ac.jp

Research Institute for Bioresources, Okayama University
2-20-1 Chuo, Kurasaki, Okayama 710-0046, Japan

キーワード: 蛍光, 検出, 細菌, 土壌

Key words: fluorescence, detection, bacteria, soil

(原稿受付 2008年11月7日 / 原稿受理 2008年11月12日)

1. はじめに

現在, 汚染土壌を浄化する手段として, 微生物によるバイオレメディエーションが注目されている。しかし, 再現性良く浄化が行えていないことが問題点として指摘されている。これは, 土壌に添加した細菌が土着の細菌との競合に負けて能力を発揮できないことや, 人工的に培養した細菌が, 環境が激しく異なる土壌環境の中に入れられることで, その生理活性が変化して物質分解能力が低下することなどが考えられる。土壌環境中での微生物の生理活性の変化に関しては報告が少なく, 実際の現場でどのような状態になっているのか分かっていないのが現状である。それは, 土壌中の微生物の生理変化を見極める良い方法が無いことが原因のひとつである。そこで, バイオレメディエーションに使用される細菌のモニタリングを行い, 分解効率の向上につなげるために, 土壌中の細菌の生理活性・分解活性を生きのまま測定する方法の構築を目的としてわれわれは研究を行っている。

2. 固体上の細菌の観察法

環境中の微生物を観察する方法を構築するにあたり, まず, 固体上の細菌の成長を観察することを目的として, 寒天培地上に形成するコロニーの成長を観察する手法の構築を試みた。細菌の細胞は小さいため, 実体顕微鏡では個々の細胞の様子を観察することが難しい。そこで, 寒天培地上のコロニーではなく, 細菌細胞をフィルター上にトラップし, 寒天培地上で生育させる方法を考えた。

2.1. フィルター培養法を用いた細菌細胞のコロニー形成方法

本研究ではポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解菌 *Coma-*

monas testosteroni TK102 株を用いて行った。細菌細胞の調製法を以下に述べる。TK102 株を 1/3 に希釈した LB (1/3LB) 寒天培地に植菌して培養後, 寒天培地にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を滴下し, 培地上の菌体を PBS に懸濁した。次に, 懸濁液を PBS で希釈して菌体濃度を約 10^3 cells/ml に調整した。菌体を捕集するフィルターとして, 孔径が $0.2 \mu\text{m}$ のポリカーボネート製・黒色メンブレンフィルター (直径 25 mm, ADVANTEC) を使用した。フィルターは使用前に, ビーカーに入れた蒸留水中に浮遊させ, 121°C で 15 分間のオートクレーブ滅菌を行った。滅菌後のフィルターは, 同じくオートクレーブ滅菌したフィルターホルダー (ADVANTEC) に設置し, 菌体濃度を調整したサンプルを 1 ml 加えて減圧濾過した。菌体を捕集したフィルターは, 捕集面とは反対の面を 1/3 LB もしくは土壌浸出液培地に密着させ, 30°C で 3 時間から 21 時間培養した。土壌浸出液培地を用いた理由は, 土壌環境に近い成分を用いた実験系でコロニー形成を観察することで, 実際の環境中での分解菌の挙動を解析できると考えたからである。

2.2. 蛍光試薬を用いたコロニーの二重染色とスライドグラス試料の作成

コロニー中の生細胞は, Oregon Green[®] 488 carboxylic acid diacetate succinimidyl ester (Carboxy-DFFDA SE) (Molecular Probe) を用いて染色した。この試薬は無蛍光であるが, 生細胞に取り込まれて細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けると, 蛍光を発する物質となる。死細胞は, Propidium Iodide (PI) を用いて染色した。PI は生細胞には取り込まれず, 細胞膜構造が壊れた細胞に入り, DNA にインターカレートして蛍光を発する物質である。Carboxy-DFFDA SE, および PI を, 終濃度がそれぞれ $5 \mu\text{M}$, $4 \mu\text{M}$ となるように PBS に添加し,

染色液を作製した。染色液は、疎水性が高く、かつ蓋のできるタッパーなどの容器に入れて使用した。培養したフィルターを、培地から静かにはがし、コロニーが生育している面を上にして、コロニーに染色液が付着しないように、染色液の上に浮かせた状態で静置した。フィルターの乾燥を防ぐため、容器に蓋をして 30°C の恒温培養器に入れ、30 分間静置して染色を行った。染色後、フィルターを染色液から取り、蒸留水を含ませたキムワイブの上に置いて余分な染色液を取り除いた後乾燥させた。蛍光観察用のイマージョンオイルを、スライドグラスに滴下し、その上にフィルターを載せ、オイルがフィルターに均一に行き渡るようにフィルターで延ばした。カバーガラスをかける際に、再度イマージョンオイルをカバーガラスに滴下し、気泡が入らないようにフィルター上に静かにかぶせた。試料は用いるまで 4°C で保存し、コロニーの撮影およびレーザスキャニングサイトメータ (LSC) による蛍光測定を行った。

観察の際、フィルターに付着した蛍光試薬の漏出等によるバックグラウンド蛍光の増加が起るため、蛍光顕微鏡によるコロニーの撮影や LSC による蛍光測定の直前に、スライドグラス上のフィルターを、カバーガラスごとにはがし、さらにフィルター上のコロニーを崩さないように、フィルターをカバーガラスから静かにはがした。フィルターはコロニーが生育している面を表にして油取り紙の上に載せ、油取り紙ごとフィルターホルダーに載せて吸引し、フィルターに含まれるオイルを吸い取った。スライドグラス上に残ったオイルも完全にふき取り、新しいイマージョンオイルを添加してフィルターを載せ、新しいカバーガラスにイマージョンオイルを滴下してフィルターにかぶせた。これらの細かい操作を行うことで、コロニー上の細菌細胞の形状を壊すことなく観察することが可能となった。

2.3. 蛍光顕微鏡によるコロニーの観察

コロニーの観察には、100 W の水銀ランプを光源とする蛍光顕微鏡 (BX 50, Olympus) を用いた。Carboxy-DFFDA SE の緑色蛍光は、470-490 nm の励起フィルターを通して励起し、蛍光は 510-550 nm の吸収フィルターで観察した。PI の赤色蛍光は、520-550 nm の励起フィルターを通して励起し、580 nm 以上の波長の光を吸収するフィルターで観察した。コロニーの画像は CCD カメラ (DP70, Olympus) で取得した。緑色と赤色の蛍光画像の重ね合わせは、それぞれの画像を取得した後、DP manager ソフトウェア (Olympus) を用いて行った。

フィルター上の細菌細胞は、2.2. の通りに Carboxy-DFFDA SE、ならびに PI で二重染色し、その蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、フィルター上の細菌細胞が、分裂を開始してマイクロコロニーを形成し、目視可能なコロニーを形成するまで、コロニー集団内の細胞の生存状態を観察できた (図 1)¹²⁾。また、土壌抽出液培地にビフェニルを添加して培養した場合、コロニー形成初期の、細胞が単層の段階からフィラメント状の死細胞が数多く確認され、多くのマイクロコロニーで、細胞の死滅とコロニーの成長停止が観察された (図 2)。フィラメント状の細胞の形成は、水酸化された代謝中間体を添加した培地でも観察された。また、このような現象は、

ビフェニルを基質とした液体培養においても観察されている^{5,6,14)}。しかし、1/3LB のような栄養培地を用いた場合には観察されなかった。

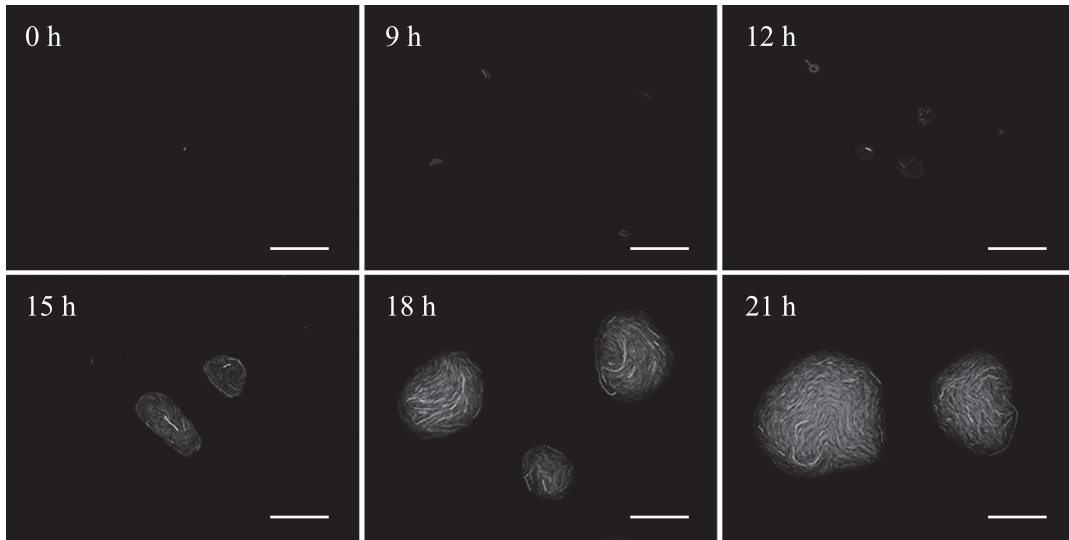
これらの結果から、ビフェニルの分解過程で生じる水酸化された代謝産物が、コロニーの形成ならびに細菌細胞の生存率に影響を及ぼすことが示唆された。また、化学物質の影響は、単独の分解菌細胞が分裂を開始してコロニーを形成する、ごく初期の段階から現れることが分かった。このことは、目視で確認できるコロニーを形成する以前に影響が生じていることを意味している。これらの現象は、栄養培地を用いた培養では観察されなかったことから、栄養の乏しい土壌環境中で生じる影響であることが示唆された。土壌環境中では、環境汚染物質ならびにその代謝産物が微生物の生存に大いに影響し、わずかな毒性であっても生理活性の変化に関与していることを示唆する結果である。したがって、実際のバイオレメディエーションの現場では、実験室の環境と異なり、微生物生理に対する環境汚染物質の影響が顕著に現れる可能性を意味している。したがって、バイオレメディエーションの処理効率を向上させるには、土壌中の微生物の生理的变化をモニタリングし、その挙動を正確に把握する必要がある。

3. 土壌中の細菌の観察法

2章で述べたように、固体上に形成するコロニーの観察方法を確立することが出来た。ここでは、実際の土壌中の微生物を観察する方法に関して検討した結果を述べる。環境中の細菌細胞を検出する方法としては、前の章と同様に顕微鏡観察が挙げられる。これは簡単そうに思えるが、土壌中には細菌細胞と同じような大きさの粒子がたくさん混入しているため、それらの妨害を除去する必要がある。そこで、蛍光色素で染色して細菌細胞を見分ける方法が従来から用いられている。しかし、土壌粒子は自家蛍光を持つものが多く、細菌細胞との区別が困難である (図 3)。現在、本章で述べるように、さまざまな蛍光色素が開発されていて、さまざまな細胞構成成分を染色できるようになっている。それらを適切に選択して用いれば、蛍光で細菌細胞を見分けることが可能である。しかし、土壌粒子の混入が多い場合は、やはり困難である。そこで、蛍光顕微鏡とサイトメトリの両方の機能を持つ、LSC を用いて、土壌細菌を蛍光染色により、直接検出する手法を開発した。

3.1. LSC を用いた土壌試料中の細菌細胞を検出する方法の開発

LSC は、スライドグラス上の試料をレーザで走査して蛍光を測定し、統計処理を行う装置である。主な用途は、培養細胞の特異的蛍光染色による観察などの医学的用途にあるが、土壌などの固相中に生息する微生物細胞のモニタリングにも利用可能である。使用した LSC (オリンパス社製、LSC2) は励起光として 488 nm のレーザをもち、緑 (515-545 nm)、オレンジ (570-630 nm)、赤 (> 650 nm) の 3 波長域の蛍光測定ができる。また本装置は 10 mm² の面積を約 5 分程度でレーザ走査することができるため (40 倍の対物レンズ使用時)、LSC で細菌



スケールバー: 50μm

図1. *C. testosteroni* TK102 株のコロニー形成

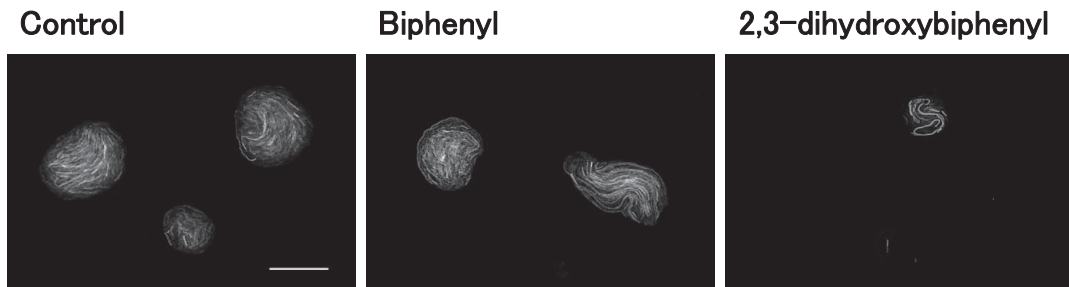


図2. ビフェニルならびにその水酸化物が TK102 株のコロニー形成に及ぼす影響

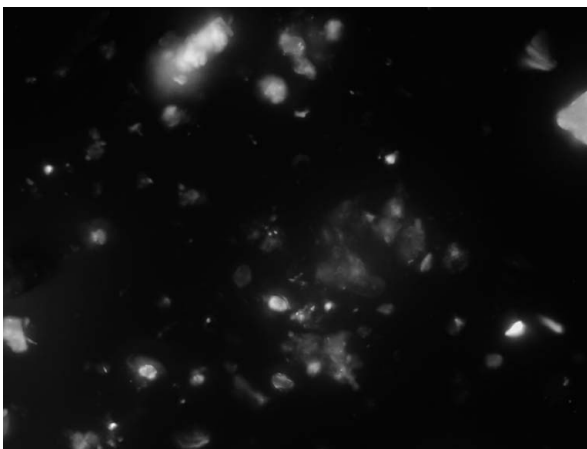


図3. 土壌粒子の蛍光顕微鏡画像

細胞が検出できれば、蛍光色素で染め分けた細胞の計数に要する時間を大幅に短縮できる。しかし、土壌中の細菌細胞を LSC で正確に検出するためには、試料に混入する土壌の粒径を小さくして試料の厚みを薄くし、かつ粒子中の細菌細胞を分散させる必要がある。また、土壌中には植物や生物の遺体を由来とする有機物が多く存在し、しばしば蛍光を発する。特に腐植物質は、有機物質

が微生物による分解を受け、その分解産物から化学的、生物学的に合成される有機高分子の混合物で、脂肪族や多糖類だけでなく、多環芳香族などの蛍光を発する物質を含む。このような蛍光物質は、標識細胞の計数を妨げるため、土壌粒子の蛍光と細菌細胞の蛍光を識別する手法が必要である。それらの問題点を解決するため、以下のように検出条件を検討した。

まず、土壌を緩衝液に懸濁し、超音波による分散処理を行った。その後、大きな粒子は静置により沈降させ、シルトや粘土を含む上澄み液を採取し、希釈してメンブレンフィルター上に捕集して LSC 測定試料とした。

次に、波長の異なる数種類の蛍光試薬を用いて細胞を染色し、細胞と土壌粒子をそれぞれ LSC で走査して蛍光を測定して蛍光値の比較を試みた。細胞染色用の蛍光試薬は、緑の蛍光を発する Carboxy-DFFDA SE, オレンジの蛍光を発する SYTOX Orange, Ethidium Bromide (EtBr), 赤の蛍光を発する PI, Ethidium homodimer-1 (EthD-1), ならびに LDS-751 を用いた。土壌は、腐植含量がそれぞれ 3.3%, 10.8%, 31.6% の 3 種類の土壌を用いた。LSC で土壌そのものをスキャンして測定したところ、本研究の条件下では、腐植含量に関係なく緑、オレンジ、赤の蛍光値の比はほぼ一定で、オレンジの蛍光が最も強く測定され、次いで赤、緑の順であった。また、細胞の蛍光と土壌の蛍光を比較したところ、緑色も

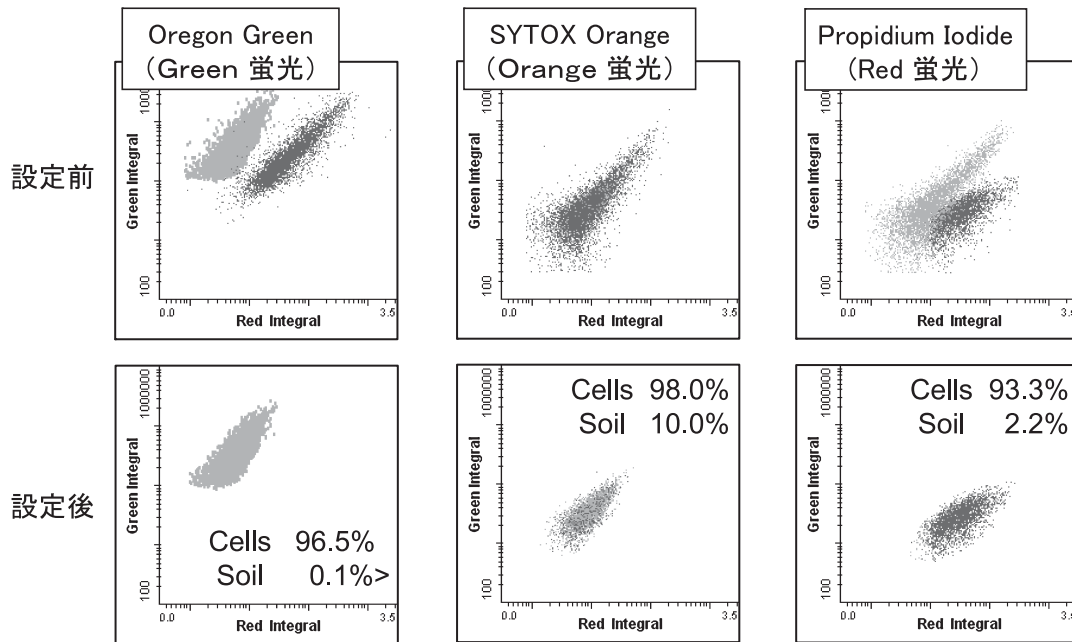


図4. 蛍光染色した細菌細胞の土壌粒子混合液からの検出
設定後検出された細菌細胞と土壌粒子の割合 (%)

しくは赤色の蛍光を発する細胞では土壌の蛍光特性との間に差が見られたが、オレンジ色の蛍光を発する細胞ではあまり差が見られなかった。そこで、細菌細胞の蛍光のみ抽出できるように、装置の解析ソフトウェアを用いて、差が見られた蛍光値に対して設定幅を設けた。一例を図4に示した。このような設定幅をいくつか設定し、土壌粒子と蛍光染色した細菌細胞の混合試料を測定したところ、緑色の蛍光を発する細胞の場合、土壌粒子の混入が最も少ない結果であった。その他の波長の蛍光を発する細胞においても、土壌の混入が最大10%程度認められたものの、全体の90%以上の細菌細胞を検出することができた。

これらの結果より、土壌中の細菌細胞の検出率を上げるためには、①蛍光試薬は細胞を染色した時に得られる蛍光強度が高いものを選択する、②土壌の蛍光領域と重複する蛍光試薬を用いない、③土壌の希釈率を上げる、などの処置が有効であると考えられた。以上の検討を行うことで、蛍光染色した細菌細胞と土壌粒子との区別が可能であることが明らかになった。

3.2. 検出法の利用

本研究では、蛍光の励起波長を488 nmに固定して行ったが、蛍光の励起に用いられるレーザーの波長は、488 nmだけでなく、405 nm, 543 nm, 590 nm, もしくは633 nmのものが存在する。405 nmのレーザーでは、青色の蛍光を励起できるため、DAPIやHoechst33342などの青色蛍光試薬で染色した細胞を測定できる。特にHoechst33342は細胞膜透過性の核酸染色色素であるため、細胞の核染色や微生物細胞のTotal countに利用できる。543 nmや590 nmなどの励起光は、赤色の蛍光を励起するのに用いられる。また蛍光試薬については、核酸染色だけでなく、細胞内のカルシウム濃度やpH、膜電位や活性酸素などを指標にしたものも存在する。ま

た抗体に蛍光色素を結合させ、目的物質の特異的な蛍光標識を行って、蛍光染色画像を取得することもよく行われる手法である。そのため、今後このような染色試薬で二重染色や三重染色を行い、異なる波長のレーザーを組み合わせて測定を行えば、細胞の様々な生理現象を同時に測定することが可能になると期待できる。

しかし、この方法では、細菌の数と生理状態を解析することは可能であるが、細菌の種類は分からない。特定の菌を検出する方法としては、FISH法¹¹⁾や安定同位体を用いたFISH-MAR法¹⁵⁾が最近開発され用いられている。これらの方法は、細菌細胞を固定してプローブを交雑させるため、生きたままの細菌を観察することができない。従来から多く用いられている方法として、寒天プレートを用いてコロニー数(CFU)を計測し、微生物の生存数を数える方法があるが、自然界には培養困難な微生物が圧倒的に多く存在するため、環境中での実際の細菌数を数えることはできない。それらの欠点を克服するため、特定の微生物を生きたまま観察できる方法の開発が望まれる。そこで、次の章では、特定の細菌細胞を生きたまま見分ける方法の開発を試みた。

4. 特定の細菌細胞を検出する試み

土壌中から機能特異的に細菌細胞を検出する試みは、微生物の研究が始まった頃から様々な手法で行われている。しかし、これまでの手法は、培養を基本としているため、難培養性の細菌を検出・獲得することはできないという大きな欠点があった。そこで、現在では安定同位体を基質として、放射性同位元素の代謝取り込みを指標として細菌細胞を検出・獲得するstable isotope probing (SIP)法なども開発されている⁴⁾。しかし、cross-feedingにより、目的以外の細菌が放射性代謝産物を取り込む問題なども指摘されている^{8,13)}。そこで、われわれは簡便

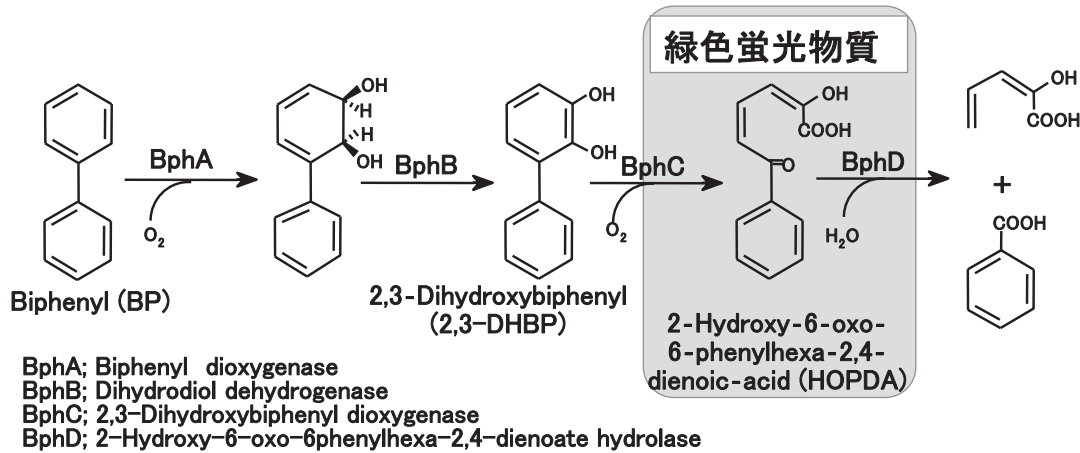


図5. ビフェニル上流代謝経路

でハイスループットな方法を目指して、蛍光性を有する代謝産物を指標とした検出と単離法を考案した。

4.1. 蛍光性代謝産物を用いた細菌細胞の特異的検出

ここでは、ビフェニルの代謝中間体である 2,3-dihydroxybiphenyl がメタ開裂した物質 (HOPDA) が、緑色の蛍光を発することを利用した (図5)。このメタ開裂物質は黄色を呈するが⁷⁾、蛍光分光光度計でスキャンしてみると、514 nm の波長に緑色の蛍光を発することが分かった (図6)。そこで、PCB 分解菌 TK102 株を特異的に検出することを目標として、検出系の構築を試みた。まず、メタ開裂の基質である 2,3-dihydroxybiphenyl を添加して、蛍光の検出を試みた。その結果、バックグラウンドの緑色蛍光は認められるものの、細胞の蛍光がすぐに退色し、その検出は困難であった。これは、蛍光を発する代謝産物が水溶性であり、細胞内から細胞外へ容易に流出分散してしまうことが原因であると考えられた。そこで、代謝産物が疎水的な性質を持つことを期待して、ビフェニルの 4 位にアルキル鎖が付加した類似体を用いることにした。まず、アルキル鎖の長さや細胞への残留性を検討したところ、アルキル鎖の無いビフェニルでは細胞内への残留がまったく認められないことが分かった。また、4-ethylbiphenyl はわずかな残留性を示すのみであり、4-butylbiphenyl を用いることで、代謝産物である、2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl の 46% が細胞内に蓄積し、細菌細胞が蛍光を発することが明らかになった。アルキル鎖が長くなると蓄積は起こるものの、分解効率の低下が観察されたため、基質として、2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl を用いることとした。

2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl は市販されていないため、PCB 分解遺伝子をクローンした大腸菌を用いて 4-butylbiphenyl から生合成し、HPLC で精製したものを基質として使用した。TK102 株に精製した 2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl を添加して、蛍光顕微鏡下で観察した結果、蛍光を保持する細胞が明確に検出できた。また、添加する基質濃度が増加するにつれ、蛍光強度が上昇し、蛍光を保持している時間も長くなった。このことから、2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl を基質として、細胞を検出することが可能となった。

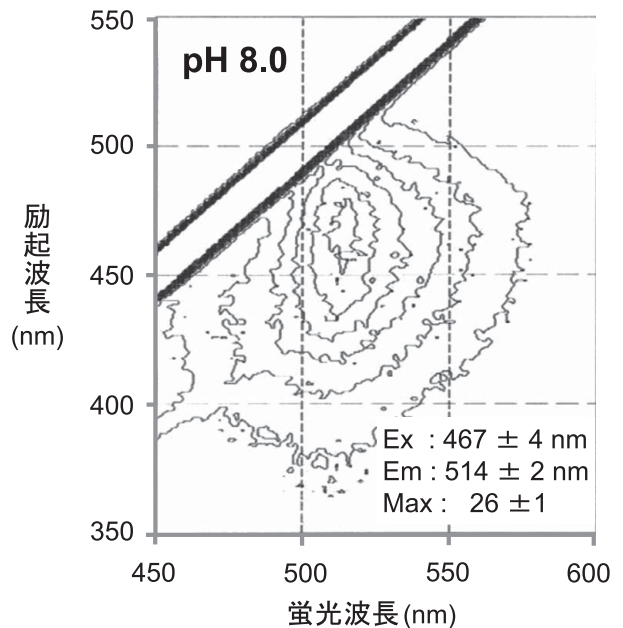


図6. メタ開裂物質の三次元蛍光スペクトル

次に、フローサイトメトリ (FCM) を用いて、蛍光を発する細胞を解析したところ、市販されている蛍光染色剤と比較して、2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl がメタ開裂して発する蛍光は強度が極めて低いことが明らかとなった。図7に鉱物粒子の自家蛍光とメタ開裂物質に由来する細菌細胞の蛍光強度との比較を示すが、鉱物粒子の自家蛍光とメタ開裂物質の蛍光が重複する領域があることが分かる。この原因として、励起波長の違いが考えられた。HOPDA の最大励起波長は、pH の上昇によって変化するものの⁹⁾、463 nm (pH7.0) ~ 471 nm (pH8.5) である。蛍光顕微鏡の水銀ランプの光源波長は、460 ~ 490 nm であり、HOPDA の励起波長の範囲を含むが、使用した FCM に装備されているレーザーの光源波長は 488 nm であり、HOPDA の最大励起波長を外れている。したがって、励起波長が限定されるというレーザーの特性から、励起波長がブロードな蛍光顕微鏡と比較して蛍光の励起に差があり、強度が低くなっていることが示唆さ

れた。このような欠点はあるものの、PCB分解菌TK102株と非分解菌を一定の割合で混合した懸濁液から、HOPDAに由来する蛍光を指標としてTK102株の分取を行ったところ、弱い蛍光ながらも緑色蛍光において差が生じ、TK102株を優先的に単離することに成功している。

4.2. 密度勾配遠心法による土壌粒子の除去

第2章で述べたように、土壌中には蛍光を発する腐食質や鉱物粒子が多く含まれている。そこで、それらの妨害物質の中から、蛍光強度の低い2,3-dihydroxy-4-butylbiphenyl由来の蛍光を発する細胞のみを検出する必要がある。この問題を解決するため、土壌粒子などの妨害物質を除去する方法を確立する必要がある。

土壌粒子を除去し、微生物を抽出する方法は、古くから様々な方法が用いられている。よく用いられている方

法として、界面活性剤により、土壌粒子と微生物細胞の表面電荷を打ち消したうえで、密度勾配遠心を行い、分離を試みたものがある²⁾。一例として、Sorensenの研究グループは、界面活性剤のtween80と密度勾配遠心用に開発されたHistodenz (Nycodenz)を用いて土壌から細菌細胞を回収した場合、回収率は20～50%であったと報告している^{3,10)}。この回収率はさらに改善の余地があると考えられる。

そこで、Histodenzを用いた密度勾配遠心法を改良して、細菌細胞の抽出効率の改善を試みた。まず、陽イオン性、陰イオン性、両イオン性、非イオン性の4種の界面活性剤について検討を行った。土壌粒子は、主に負の電荷を帯びていることが分かっている。これは、主に、粘土質と、腐植質に起因している。しかし、実際は、両方の電荷を持つ粒子が混在している。また、細菌細胞表面の電荷の強さも細菌種によって異なり、一様に電荷を

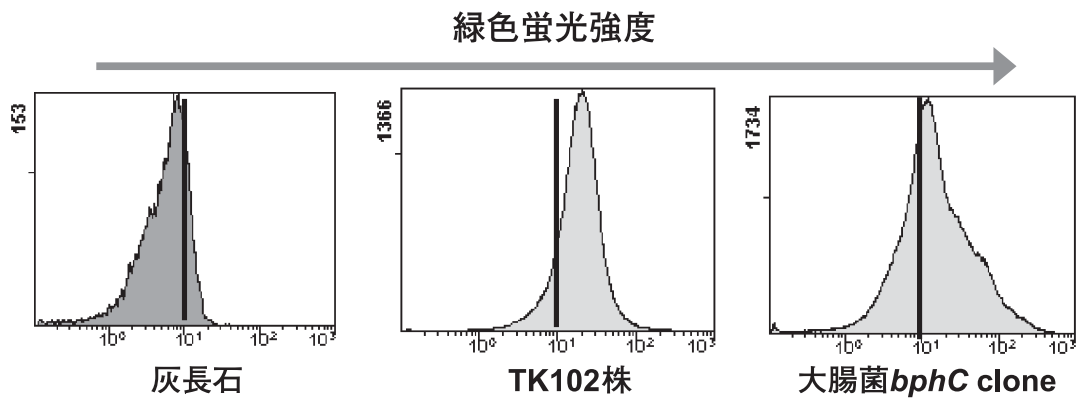


図7. 鉱物粒子の自家蛍光とメタ開裂物質の蛍光強度の比較

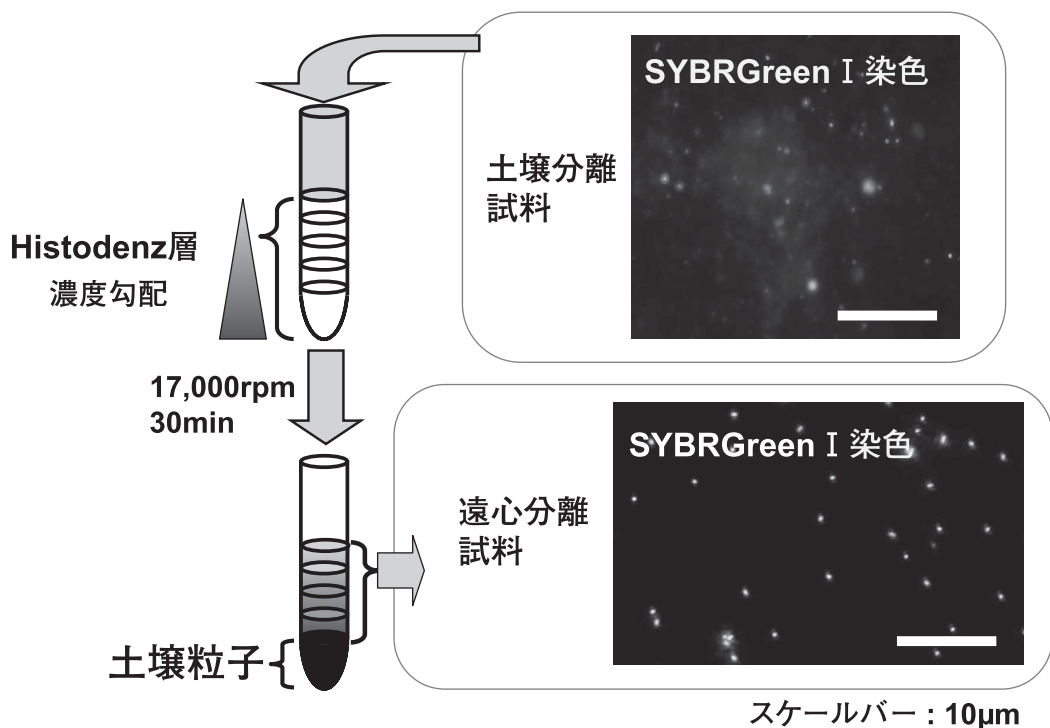


図8. 密度勾配遠心による土壌粒子の除去

打ち消すことは、難しいものと考えられた¹⁾。さらに、4種の界面活性剤のうち、非イオン性界面活性剤以外は、処理後の細菌の生育率を低下させることもわかった。これは、細菌の細胞膜に深刻な影響を与えたためと考えられた。この検討から、界面活性剤は、前例と同様に、非イオン性の tween80 を用いることとした。

密度勾配遠心については、単層の Histodenz 溶液上に土壌懸濁液を重層して遠心したところ、粗い土壌粒子は分離できたが、細菌画分には多くの微細な粒子が残留していた。次に、濃度勾配をつけるため、濃度の異なる Histodenz を複数重層し、その上に土壌懸濁液を重層して遠心分離した結果、顕微鏡観察では土壌粒子が視野にほとんど入らない程度まで土壌粒子を除去することに成功した(図8)。また、このときの細菌細胞の回収率は60%であった。しかし、Hisodenz を除去する過程で若干の細胞の損失があるため、今後の改善が必要である。

5. 特定の細菌細胞を単離する試み

第4章で述べた手法を用いて、土壌中から細菌細胞を回収し、特定の細菌を単離する手法の構築を試みた。ここでは、これまでの検討結果を総合して、土壌から細菌細胞を抽出し、そこに代謝基質を添加して蛍光を発色させ、FCMのソーティング機能を用いて、目的細胞を分取するという方法を用いた。これまで、PCB分解菌と、分解遺伝子の一部である、メタ開裂酵素遺伝子をクローニングした大腸菌をモデル土壌に添加して、蛍光を発する目的細菌を単離する系を構築した。しかし、FCMは検出感度が高いため、Histodenzの密度勾配遠心を用いて土壌粒子を除去したものの、わずかに混入している菌と同様の大きさの土壌粒子がノイズとして検知され、目的細菌の解析と分取を阻害してしまうことが分かった。したがって、ノイズの混入をさらに改善する必要がある。

FCM解析では、通常、粒子の大きさに基づいてデータを取得し、その蛍光特性の相異から、特定の集団のみを解析図上で分離する操作をおこなう。解析図上で特定の集合のみを分離できれば、ソーティング機能で細胞の分取が実行できる。しかし、HOPDAが発する蛍光の強度が低いため、土壌粒子とPCB分解菌との間で、緑色蛍光の差を区別することが困難である。環境サンプルを使用した場合は、メタ開裂酵素を持つ菌の存在が極めて少ないと考えられることから、分取効率の改善は、重要な課題である。この問題の解決策の一つとして、緑色蛍光以外を発する、無害な染色剤で細菌細胞を染色し、その蛍光を指標として土壌粒子と区別する方法が考えられる。近年、細胞の成育に害の無い染色剤が開発されていることから、それらを組み合わせることで、解決できるものと期待している。

6. おわりに

メタゲノム解析のように、環境中の微生物ゲノムが一気に解読されてしまう時代に突入した今、ゲノム解析か

ら得られた細菌群集構造の中で、個々の細菌はどのように生きているのかを検出する必要が出てきている。しかし、多くの微生物は難培養性であり、従来の培養を介する検出方法には限界があることは周知の事実である。

近年、いろいろなデバイスも開発されつつあり、メタゲノム解析の次に来る未培養菌も含めた細菌検出手法の構築を目指したい。

文 献

- 1) 尾立泰久, 岩田進午編. 2003. 土のコロイド現象. 学会出版センター.
- 2) Bakken, L. R. 1985. Separation and purification of bacteria from soil. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1482-1487.
- 3) Burmolle, M., L. H. Hansen and S. J. Sorensen. 2005. Presence of N-acyl homoserine lactones in soil detected by a whole-cell biosensor and flow cytometry. Microbial Ecol. 50: 226-236.
- 4) Friedrich, M. W. 2006. Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. Curr. Opin. Biotechnol. 17: 59-66.
- 5) Hiraoka, Y., and K. Kimbara. 2002. Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2031-2035.
- 6) Hiraoka, Y., T. Yamada, K. Tone, Y. Futaesaku, and K. Kimbara. 2002. Flow cytometry analysis of changes in the DNA content of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102: effect of metabolites on cell-cell separation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5104-5112.
- 7) Khan, A., and S. Walia. 1989. Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83. Appl. Environ. Microbiol. 55:798-805.
- 8) Manefield, M., R. Griffiths, N. P. McNamara, D. Sleep, N. Ostle, and A. Whiteley. 2007. Insights into the fate of a 13C labeled phenol pulse for stable isotope probing (SIP) experiments. J. Microbiol. Methods. 69: 340-344.
- 9) Martin, M. M., and L. Lindqvist. 1975. The pH dependence of fluorescein fluorescence. Luminescence 10:381-390.
- 10) Norman, A., L. H. Hansen, and S. J. Sorensen. 2006. A flow cytometry-optimized assay using an SOS-green fluorescent protein (SOS-GFP) whole-cell biosensor for the detection of genotoxins in complex environments. Mutation Research. 603: 164-172.
- 11) Rogers, S. W., T. B. Moorman, and S. K. Ong. 2007. Fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 71: 620-631.
- 12) Shimomura, Y., R. Ohno, F. Kawai, and K. Kimbara. 2006. Method for assessment of viability and morphological changes of bacteria in the early stage of colony formation on a simulated natural environment. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5037-5042.
- 13) Singleton, D. R., M. Hunt, S. N. Powell, R. Frontera-Suau, and M. D. Aitken. 2007. Stable-isotope probing with multiple growth substrates to determine substrate specificity of uncultivated bacteria. J. Microbiol. Methods. 69: 180-187.
- 14) Yamada, T., Y. Shimomura, Y. Hiraoka, and K. Kimbara, K. 2006. Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73: 452-457.
- 15) Wagner, M., P. H. Nielsen, A. Loy, J. L. Nielsen, and H. Daims. 2006. Linking microbial community structure with function: fluorescence *in situ* hybridization-microautoradiography and isotope arrays. Curr. Opin. Biotechnol. 17: 83-91.