

降水中の微生物粒子の存在量

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-01-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 夏目, 崇匡, 鈴木, 款 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00000373

降水中の微生物粒子の存在量

夏目崇匡¹・鈴木 款¹

Abundance of biological micro-particles in rain water

Takamasa NATSUME¹ and Yoshimi SUZUKI¹

Abstract The study of biological micro-particles in rain water have hardly ever published because sampling, storage and measurement are difficult tasks to perform without contamination. This study carefully carried out laboratory experiments and field works at three sites (Shizuoka University, Mt. Fuji and Mt. Norikura). Biological particles in rain water were found to be bacteria and other organisms or organic debris such as spore, pollen and leaf debris. The purpose of this study is to measure the number of bacteria exactly. In order to perform this purpose, more examination of sampling, storage samples and measurement without contamination is required. An alternative approach is to stain the bacteria with DAPI and enumerate them by epifluorescence microscope. As a result of laboratory experiments, the blank of sampling and measurement was about 7.4×10^3 cell/ml. And then, the concentrations of atmospheric samples at three sites were 2.0×10^3 to 4.8×10^4 cell/ml in rain water. Therefore, 13 to 27 % of the total concentration in rain water as a background value was comprised, which comes mainly from Milli-Q water. And then, according to laboratory experiments, the error of counting bacterias was $\pm 1,000$ for 18,000 ($\pm 6\%$). It was confirmed on the measurement for bacteria in rain water.

Key Words: biological micro-particles, rain water, bacteria, organisms, concentration

緒言

降水とは、大気中の水蒸気が浮遊する微粒子に凝結し雲粒となり、雲粒が成長してさらに大きい雨粒となり地上へ落下してきたものを言う。この降水となるまでの過程は、まず大気中の温度と圧力変化により過飽和の状態にあり、それと同時に大気中に微粒子が存在していることが必要である。この微粒子を核として微水滴が形成される。微水滴は激しい対流により時間経過とともに大きくなり、互いに衝突・併合を繰り返しながら大きな水滴と成長していく。

実際のところ、水蒸気だけを含む清浄な大気中では相対水蒸気量が100%に達しても気化熱が奪われすぐに蒸発してしまい水滴は形成されない (Roggers & Yau, 1989)。しかし、あらかじめ核となる物質が大気中に存在している場合は、相対湿度が100%にならなくても水蒸気が核に吸着し、成長していくことができる。この核というのがエアロゾルである。エアロゾルはその物質により発生源や大気中に存在する量、滞在時間、移動距離などが異なるが、このエアロゾルに水蒸気が吸着すると

成長して微水滴となる。地球大気において、雲が形成され降水現象が起こるにはエアロゾルの存在が必要である。

エアロゾルにはまず、吸湿性で凝結核として水蒸気を凝結させる働きのあるものがある。凝結核のうち大気中の湿度で凝結核作用するものは、海水からの海塩粒子(主に塩化ナトリウム、塩化マグネシウム)、工場や自動車からの排ガス、土壌から放出されるイオウ酸化物、窒素酸化物、アンモニア等の物質である。凝結核の典型例は硫酸アンモニウムである。現在、人間活動により凝結核となりえる物質が大気中に多く放出されている。しかし、一般に凝結核作用する粒子が多いと、雲粒1個当たり分配される水の量は少なくなる。小さな雲粒は衝突しにくく、空気と一緒に動き大きく成長しない。したがって人間活動で凝結核数が増加すると、湿度が高いときには微水滴はできるが、大きな雨粒には成長しにくく、降水量の増加には必ずしもつながらない可能性がある。一方、水蒸気を直接水晶にしたり、凍結を早めたりする働きのあるエアロゾルがある。これを氷晶核という。水滴から氷晶になると、成長速度も水と水との飽和水蒸気圧

の違いから約10倍になる。大気中で氷晶核が研究され始めた当初は、そのほとんどが天然起源の鉱物粒子であると考えられていた (Isono *et al.*, 1959)。その後、氷晶核の研究が進み、鉱物粒子の氷晶核作用をし得る温度は $-5 \sim 20^\circ\text{C}$ であることが分かった (Mason, 1971)。さらに、鉱物粒子以外の無機化合物、有機化合物の氷晶核作用のあるものが研究により明らかになった。この温度より低くなると氷晶核作用は起こりやすくなる。海水からの海塩粒子 (主に塩化ナトリウム、塩化マグネシウム) などは氷晶核にはならない。これらは凝結核である。中国大陸の土壤あるいは砂漠の土壤を構成しているカオリナイト、イライトなどの活性化温度は $-12 \sim -15^\circ\text{C}$ と高く、また火山灰も有効である。ところが、さらに氷晶核としての能力の高い有機物粒子が注目を浴びようになる。この有機物粒子は粒径も小さく、土壤、樹木、草や葉の表面からいったん大気中に飛び出せば数百mから数千m、上昇気流に乗れば数千輪送されることが分かっている。実際に大気中でのサンプルを用いて Schnell & Vali (1972) や Blanchard & Sydek (1972) により土壤中の朽葉などが、また、花粉は Dingle (1966)、土壤バクテリアは Maki & Wiloughby (1978) ほかにより氷晶核活性を持つことが報告された。また、ケニアの茶園で採取された枯れた茶葉が非常に良い氷晶核活性を持つことも確認されている (Schnell & Tan-Schnell, 1982)。そして、最近になって実際の降水中に多量のバクテリアあるいはバクテリアと鉱物粒子の混合物が存在していることが明らかになった (Casareto *et al.*, 1996)。これらの報告は、初めて降水中に $10^4 \sim 10^5$ cell/ml のバクテリアが存在することを見出した。これは、中層雲中で水滴が形成される時にバクテリアが氷晶核として働いていることを示唆している。しかも、鉱物粒子との混合の発見は、バクテリアの鉱物粒子との相乗作用により、より活性化が起きる可能性もある。現在までに知られている氷核活性生物となり得る生物は、細菌類が約8種類見つかっている。そのうち3種はシュードブソイドモナス、4種はエルビニア、1種はザントーモナス属である。また、プランクトンの中にも氷核活性を持つものが見つかっている。さらに最近になって、細菌類のタンパク質が関係していることが分かり、これらタンパク質のアミノ酸配列が調べられ、 β シート構造を取っていることが分かった。氷核物質が氷核生成タンパク質と膜成分とを会合したものであることが示されている (小幡, 1991)。

このような有機物粒子の特性が明らかになると、これらが人工降雨形成への氷晶核として用いられてきたヨウ化銀の代わりとして用いることができる。有機物粒子の氷核活性がまだわかっていない頃に、ヨウ化銀は氷晶核として働く温度が比較的高いため用いられていたが、地上への落下時に悪影響を及ぼす可能性があり、しかも実際に降水が観測されなかったという結果であった。有機物粒子が注目された別の理由には人工降水時にも、地上に達してから悪影響が少ないと考えられるためである。今まで用いられていた物質よりも氷晶核として作用し得る温度が約 -2°C と高い。もしこのような有機物粒子が核となっているのなら、上空の温度がそれほど低くなくても、比較的低い高度で雲ができて降水をもたらすことの説明になるかもしれない。また、地上では 4°C 前後で霜が下りるわけだが、どうしてそのような温度で水滴として存在できるのかというのに、葉などの表面に付着しているバクテリアが影響しているのではとも考えること

ができる。このような高い温度でも氷晶核となる物質があれば、今までどうしてその温度で降水が形成されるのかという問題に新たな考え方が生まれてくるわけである。

このように、最近になって有機物粒子に研究の焦点が集まり始めた。そこで本論文の研究対象は、その中でもバクテリアの氷晶核作用に注目して、降水中でのバクテリアの存在量を調べ検討を行なうことにした。しかし、これまでに報告されている論文は大気中でのサンプルを用いたものであり、降水中のバクテリアについての論文は1つしかない (Casareto *et al.*, 1996)。したがって、降水の採取方法や測定方法を独自で考える必要があった。今回、本論文内の研究は、この方法を検討しながらサンプリングの方を行なっていった。

方法

観測機器

降水採取には自動降雨採取器を用いてサンプリングを行なった。自動降雨採取器は、採取面直径45cm (採取面積約 0.16m^2) で降水1mmで100ml得られるようになっている。降雨センサーが付いており、降水を感知すると自動的に蓋が開き採取できるような仕組みになっている。この自動降雨採取器の特徴は、Dry depositionによるエアロゾル、風に舞う砂塵や木の葉等の降水開始以前に混入するのを抑えているところである。本論文での2箇所の観測地点には気象測器を設置し、気象データを収集した。使用した気象測器はポータブル型気象観測ステーション Minni-Met (Phoenix社) である。これは、相対湿度・気温・地中温度・風向・風速・日射量・大気圧・雨量をモニタリングする気象観測ステーションである。

降水の採取方法

降水中のバクテリアを測定するにあたり、降水採取で注意しなければならない点はいくつかある。まず、自動降雨採取器の採取面は常に空気と接触しているため、実際に降水に含まれているバクテリアと採取面に付着しているバクテリアを同時に採取している事になる。これでは降水中のバクテリア数は計測できないために、採取面を洗浄してできるだけそこからのコンタミネーションを軽減する必要がある。そのために、降水を採取する際には、容器を交換するたびに採取面を Milli-Q 水 (Milli-Q 水とは、Millipore社の超純水装置: Milli-Q SP TOCを用いて精製した水である) で洗浄する。これは後で室内実験の結果で示す。これより、付着しているバクテリアを除去でき、コンタミネーションを軽減し、それでも採取面に残ってしまうバクテリア数はブランクという形で考慮する。これ以外の降水採取での注意点としては、降水を採取する際に容器中に空気が残っていないようにいっぱいまで採取することである。これは容器の中に空気が入っていると、その空気中の粒子が採取した降水に含まれてしまうのではないかと考えられるためである。よって、降水の降り終わりで容器がいっぱいにならなかった場合は、その測定は行なわない。また、採取面から容器に入るまでの間は空気に触れてしまうので、直接容器に入るようにする。さらに、保存処理後はまず内蓋をし、そして外蓋をしてさらにパラフィルムで密閉して外部との接触を完全に断つことである。本研究は観測時期に応じて多少の採取方法が異なるので後述する。

室内実験

これは、降水中のバクテリアを測定するにあたり採取方法・測定方法を検討するために行なった実験である。

採取容器、保存処理の試薬は容器によるバクテリア数の違いをみるために実験を行なった。採取容器は4種類、ガラス瓶 250ml、ポリプロピレン容器 1 l、滅菌済みボトル（ポリエチレン）100, 50ml をもちいた。サンプル試料には水道水を用い、それぞれの容器中に空気が残らないようにいっぱいまで入れ、バクテリアの増殖を抑えるため保存処理を行なった。保存処理の試薬は2種類、中性ホルマリンとグルタルアルデヒドである。それをサンプル量に対して5%入れ、測定まで冷暗所に保管しておき、1週間ごとに測定した。

保存期間は採取容器と保存処理の試薬が決定したのちに実験を行なった。サンプル試料には水道水で、採取容器の実験同様いっぱいまで入れ、採取容器には滅菌済みボトル 100ml を用いた。保存試薬にはグルタルアルデヒドを用いて保存処理しないものとサンプル量に対して1, 3, 5%入れたものの4種類で、測定まで冷暗所に保管しておき5週間後まで1週間ごとに測定した。

降雨採取器の洗浄は、降雨採取器の採取表面に吸着しているバクテリアを除去してから降水を採取するため、Milli-Q 水を採取表面に流し続けて洗浄した。これにより、Milli-Q 水で除去が可能な限界量を知ることができる。それを滅菌済みボトル 100ml に取り続け、バクテリア数を測定した。

Milli-Q 水、水道水の検討は、Milli-Q 水、水道水に疑問が生じたために実験を行なった。Milli-Q 水を直接容器に入れ保存処理したのちに測定したものと、あらかじめ降雨採取器の漏斗部分に Milli-Q 水を 1000ml 流して洗浄した後に、Milli-Q 水を 100ml 流してボトルに採取したものを測定した。また、水道水を直接容器に入れたものを測定した。

カウント時における精度の確認は、まず降水を1つの大きなボトルに採取して先にグルタルアルデヒドで保存処理したのち滅菌済みボトル 100ml × 5本に小分けしボトル 1~5 とした。これは、できるだけ実際のサンプルに近い方がよいと言う事で、水道水ではなく降水を用いた。その小分けしたもののうち、まずボトル 1 から 10ml づつ 5本の試験管に取り測定を行なった。次に、小分けしたボトルの先ほどとは違うボトル 2 から、今度は 20ml づつ 5本に取りる過量を変え精度がどう違ってくるのかを見た。さらに今度はボトルごととの違いをみようとして、先ほどのボトル以外のボトル 3~5 からそれぞれ 10ml づつ取り、る過量は 10ml で測定を行なった。

野外観測

観測地点は静岡大学、富士山麓水が塚公園、乗鞍岳の3か所である(図1)。静岡大学は静岡市の南東約 10km、有度丘陵(標高 370m)の西側のなだらかな斜面に位置づけられ、北方向には南アルプスにつながる山々が連なっており、南方向には約 2 km 先に駿河湾が広がっている。また、地理的に三方が山に囲まれており、冬は北西から南アルプスを越えてきた乾いた風が吹き、それ以外の時は南西方向からの海を渡ってきた風により、海塩性の粒子などが運ばれてくるのが分かっている。静岡大学周辺は工業地域ではないが、すぐ近くを東名高速道路が通っており、車からの排ガスの影響が大きい。サンプルの採取はこのような地理的条件下にある静岡大学共通教育C棟屋上(標高 80m)で行なった。観測期間は2000年1月

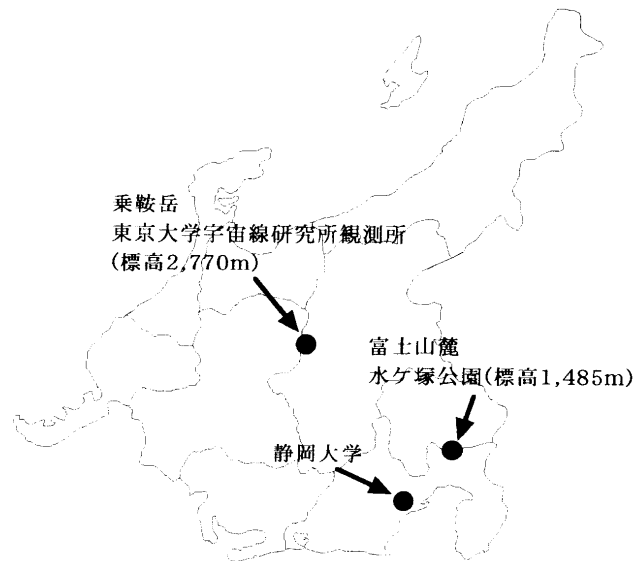


図1 観測地点(乗鞍岳, 富士山, 静岡大学).
Fig. 1 Sampling station at Mt. Norikura, Mt. Fuji, and Shizuoka University.

から2001年1月の間に観測された降水の内の9降水について測定を行なった。静岡における降水採取は大きく4つに分けられる。すべてに共通するのは降水採取に自動降雨採取器を用いたことである。また、2001年1月の観測以外はすべて降水を連続で採取した。

まず2000年1月の2降水は、まだ降水採取・容器・保存処理などが決まっておらず、バクテリア数を測定する前に降水中の粒子数についてのみ測定したものである。降水が始まる直前にアセトンで採取面を洗浄し、その後、採取面に Milli-Q 水がある程度流して洗浄し、採取容器にはポリプロピレン容器 (500ml) を用いた。これは、滅菌しておらず、粒子数のみを測定した。採取直後にホルマリンをサンプル量に対して5%入れ保存処理して測定まで冷暗所に保管し採取後2週間以内に測定を行なった。2000年2月の1降水は降水採取・保存処理等は1月と同じ方法を取り、初めてバクテリア数を計測した。しかし、採取面のコンタミネーションや滅菌していない容器を用いた事によりこのデータは正しくないことが分かり、後々に行なうこととなる室内実験への足掛かりとなる。

2000年5月の2降水は、降水が始まる直前にアセトンで採取面を洗浄し、その後、採取面に Milli-Q 水がある程度流して洗浄した。採取容器には滅菌済みボトル 100ml を用いて容器いっぱいまで採取した。降水採取後の保存処理はグルタルアルデヒドをサンプル量に対して5%入れ、すぐに内蓋外蓋をして冷暗所に保管しておき採取後1週間以内に測定を行なった。

2000年10月から11月までの3降水は室内実験をもとに、採取面は採取容器である滅菌済みボトル 100ml を交換するたびに Milli-Q 水を 500ml 流し、容器いっぱいまで採取した。降水採取後の保存処理はグルタルアルデヒドをサンプル量に対して3%入れ、すぐに内蓋外蓋をしてさらにパラフィルムを巻いて外気との接触を断った。その後、冷暗所に保管しておき、測定は降水採取後1週間以内に行なった。

2001年1月の1降水はカウント時の精度を確認するために、連続採取ではない。あらかじめ、採取面に Milli-

Q水を500ml流してから、1つの容器に約1ℓの降水を採取し、測定を行なった。

富士山麓水ヶ塚公園は標高1,485mで富士山の南東に位置し、周りを森林に囲まれている。公園には大きな駐車場が隣接しており、観光客が立ち寄る場所である。この場所は静岡大学に比べたら気温で言えば7~8℃程度低く、工場などからの排ガスによる大気汚染もあまりない。しかし、測定器を設置した場所はこの駐車場から多少離れているとはいえ、車の排ガスのなどの影響が全くないとは言いがたい。観測期間は観測期間の2000年7月の2週間のうち、降水を採取できたのはわずか7月14日だけであった。降水採取には自動降雨採取器を用いて行なった。しかし今回の富士観測では降水がほとんど採取できなく1降水しかない。採取面は降水が始まる直前にMilli-Q水を500ml流して洗浄した。採取容器には滅菌済みボトル100mlを用いて容器いっぱいまで採取した。降水採取後の保存処理はグルタルアルデヒドをサンプル量に対して3%入れ、すぐに内蓋外蓋をして保管しておく降水採取後3週間以内に測定を行なった。

乗鞍岳の観測は、乗鞍岳山頂から少し下がった所にある東京大学宇宙線研究所観測所(標高2,770m)で行なった。乗鞍岳は岐阜・長野県境に位置し、近辺に大きな都市がない。主な市街地といえば東40kmに長野県松本市、西30kmに岐阜県高山市があるが、その影響もなく非常に大気汚染が少ない地域といえる。また、乗鞍岳は登山で有名な山であり、7月から9月までは避暑地や紅葉のため、乗鞍付近の道路は渋滞が激しい。しかし、一般車が入ってこれる最も標高の高い畳平の駐車場から観測所までは山を越え数kmの道のりがあり、許可がないと車で通行できないため、観光客らの車からの排ガスやホテルからの排出物などの影響も少ないと考えられる。観測所付近は西風が卓越しており、高度が森林限界を越えているため周囲は低木や草などに覆われている。観測期間は2000年9月12日からの1週間で3降水が採取された。降水採取は室内実験をもとにして行なった。採取面は採取容器である滅菌済みボトル100mlを交換するたびにMilli-Q水を500ml流し、容器いっぱいまで採取した。降水採取後の保存処理はグルタルアルデヒドをサンプル量に対して3%入れ、すぐに内蓋外蓋をしてさらにパラフィルムを巻いて外気との接触を断った。その後、冷暗所に保管しておく、測定は降水採取後2週間以内に行なった。

分析

粒子数の測定

降水中の細菌数を研究するにあたり、実際に降水中に含まれている粒子数を知ることによりその比較ができる。その測定に用いたのがコールター・カウンター・マルチサイザーII(Beckman Coulter社)である。コールター・カウンターはアパーチャーと呼ばれる細孔の両側に電極を配し、粒子が細孔を通過する際に生じる電気伝導度の微妙な変化量(これは粒子体積に比例する)を測定し、その粒子数と粒径分布を計測する機器である。アパーチャー・チューブは孔径15μm, 30μm, 50μm, 560μmの4種類が本研究室にはある。本研究では細菌数との比較が目的でありアパーチャー・チューブの孔径15μmのものを用い0.2μm以上の粒子を測定しようとしたが、測定時にすぐに詰まってしまうデータが得られず、出たデータも非常に変動が激しく一定でな

かったため、孔径30μmと50μmのアパーチャーを用いた。孔径30μmものは0.6~18μmの間の粒子数を、孔径50μmものは1.0~30μmの粒子数を測定することができる。降水はそのままでは電流が通りにくく、またその粒子数も非常に多いため実際の測定は電流がある程度通るように電解液(Isoton II)でサンプルを希釈する。実際には、サンプル量も少量で、粒子数も適度なため10倍希釈で行なった。

細菌数の測定

本研究では、Hobbie *et al.*, (1977)の方法を用いて細菌数を直接細菌数で測定した。蛍光標本の作製は、降水採取後、保存処理して冷暗所に保管しているものを、試験管に10mlとり、それにDAPI試薬(4,6-diamidino-2-phenylindoleHCL)を1ml入れる。DAPI試薬は細菌の染色体内のDNA検出のために用いられ、励起波長360nmで460nmに青い蛍光を持つ。DAPI試薬を入れた後に、Test tube mixer(Sibata社)でよく攪拌し、すぐに冷暗所に入れ約30分保存した。その後、クリーンベンチ内で外気との接触を防ぎながら吸引ろ過を行なった。ろ過するフィルターにはメンブランフィルター(polycarbonate, black, 0.2μm)を用い、ろ過に必要なガラス器具や試験管等、すべて滅菌処理後に使用した。

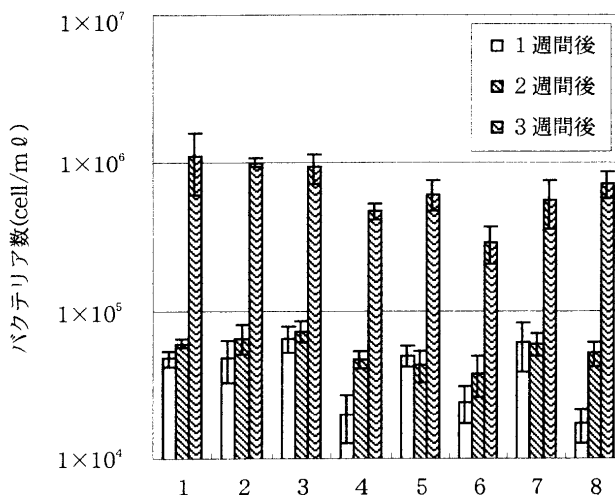


Fig. 2 試料の保存における採取容器と試薬の最適条件の検討結果。

- 1, ガラス*, ホルマリン**.
- 2, ガラス*, グルタルアルデヒド**.
- 3, ポリプロピレン*, ホルマリン**.
- 4, ポリプロピレン*, グルタルアルデヒド**.
- 5, ポリエチレン100ml*, ホルマリン**.
- 6, ポリエチレン100ml*, グルタルアルデヒド**.
- 7, ポリエチレン50ml*, ホルマリン**.
- 8, ポリエチレン50ml*, グルタルアルデヒド**.

Fig. 2 Effect on materials of bottle and chemical poisons for the storage of samples.

- 1, glass*, formaldehyde**.
 - 2, glass*, glutaraldehyde**.
 - 3, polypropylene*, formaldehyde**.
 - 4, polypropylene*, glutaraldehyde**.
 - 5, polyethylene 100ml*, formaldehyde**.
 - 6, polyethylene 100ml*, glutaraldehyde**.
 - 7, polyethylene 50ml*, formaldehyde**.
 - 8, polyethylene 50ml*, glutaraldehyde**.
- *, material of bottle. **, chemical reagents for poison.

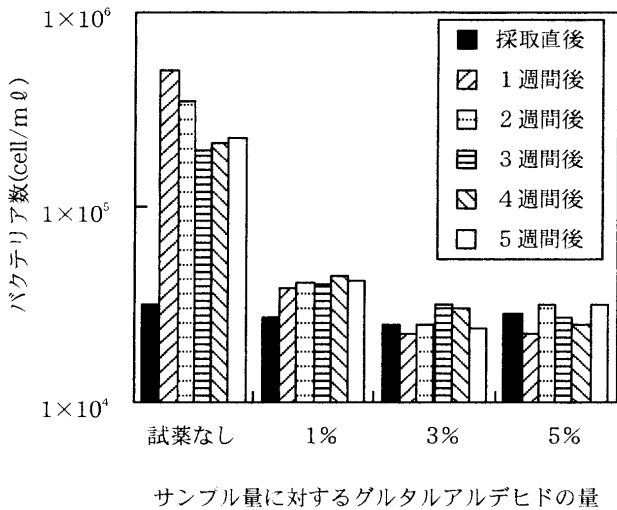


図3 降雨採取器の洗浄結果.
Fig. 3 Effect of rinsing for rain water sampler.

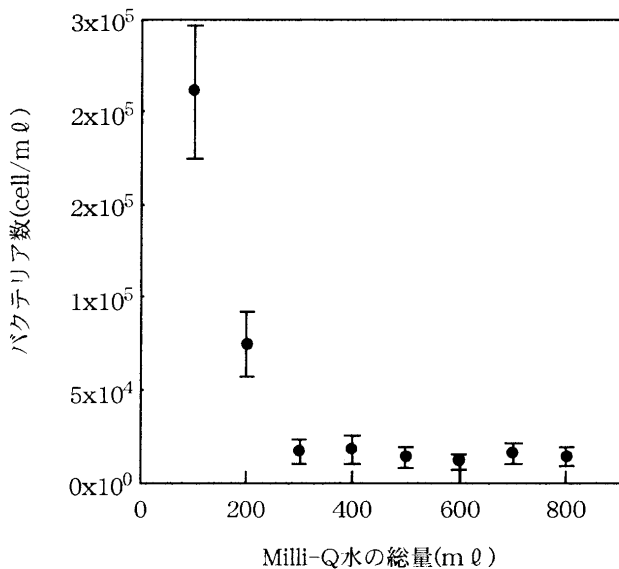


図4 試料の保存期間の検討.
Fig. 4 Examination on storage time of samples.

測定をする際は、蛍光標本にイマージョンオイルを1滴垂らして、ガラスなどからの自家蛍光を防ぎながら行なった。

結果

室内実験

採取容器、保存処理の試薬の検討結果では、最も細菌数が少なかったのは、滅菌済みボトル100mlであった。その中でもホルマリンよりグルタルアルデヒドの方が細菌の増殖を抑えていると考えられた(図2)。

保存期間の結果は、保存処理しなかったものは1週間後には10倍以上の数になっていた。それ以降も他のグルタルアルデヒドを入れたものに比べたら、非常に大きい値であった。グルタルアルデヒドを1%でも入れたものは、1週間後の結果もそれほど増えていなかった。しかし、1%入れた結果は2~5週間で最初の数の7割ほどの増加がみられた。3%以上入れたものは1割未満の増

加にとどまった(図3)。降雨採取器の洗浄結果では、最初の100ml中には10⁵cell/mlもの細菌が含まれていた。Milli-Q水に除去され減少していくのは300ml流し続けるまでであり、それ以降も必ず10⁴cell/mlという数が出てきた(図4)。

Milli-Q水、水道水の検討実験の結果では、Milli-Q水を直接容器に入れたのが3.8×10³cell/ml、採取器を通したのが7.4×10³cell/ml、そして水道水が1.0×10⁴cell/mlになった。これより、すでにMilli-Q水の時だけでも1ml当たり3,600cellの細菌が含まれていることが分かった。そこで、採取器を通した結果はMilli-Q水のブランクを引くと3.6×10³cell/mlということになる。これが採水面に付着している細菌数ということである。また、水道水も実際の細菌数は2.6×10³cell/mlという結果であった。

カウント時における精度の確認は、まず、ろ過量10mlの結果は、細菌数の平均が1.7±0.1×10⁴cell/mlであった。精度は±1,000であった。ろ過量20mlの結果ではろ過量10mlの結果に対し、1.9±0.1×10⁴cell/mlであった。こちらも精度は先ほどと同じ±1,000であった。ボトル別の結果では、まずこの結果のボトル1と2は先ほどの結果の中からNO.1の結果を用いた。結果より5つのボトルの細菌数の平均は1.8±0.1×10⁴cell/mlになり、今回も精度が±1,000であった。

観測結果

静岡大学

2000年1月7日は、寒冷前線を伴う低気圧が日本の上空を通過し、久しぶりに降水が観測された。激しい降水が短時間に観測され、強い北東の季節風が吹いていた。これより、空中を浮遊している粒子が一気に取り込まれたと考えられる。降水採取には、ポリプロピレン容器(250ml)を用いた。これは滅菌しておらず、粒子数のみを測定した。採取直後にホルマリンをサンプル量に対して5%入れ保存処理して測定した結果、粒子数の平均は1.4×10⁴cell/mlであった。

2000年1月10日は、日本の南海上を低気圧が進み、太平洋側の地域に降雪や降水をもたらした。降水はそれほど強くなかった。降水採取は1月7日と同じ方法で行ない、粒子数のみの測定となった。結果より、粒子数の平均は1.4×10³cell/mlであった。

2000年2月7日は、低気圧が日本の東海上を発達しながら進み、それに伴う降水を採取した。降水開始は午前11時50分で約7時間、1lサンプルを採取した。風は弱く降水強度も0.7~3.3mm/hとそれほど強くなかった。降水採取・保存処理等は1月と同じ方法を取り、初めて細菌数を計測した。しかし、採取面のコンタミネーションや滅菌していないポリプロピレン容器を用いた事によりこのデータは正しくないことが分かり、後々に行なうこととなる室内実験へつながる。結果は、細菌数の平均が3.4×10⁵cell/mlであった。

2000年5月13日は、日本付近は高気圧と高気圧の間の気圧の谷の中で、西から弱い低気圧が進んできた影響で降水が観測された。降水採取は降水が始まる直前にアセトンで採取面を洗浄し、その後、採取面にMilli-Q水のある程度流して洗浄した。採取容器には滅菌済みボトル100mlを用いて容器いっぱいまで採取した。降水採取後の保存処理はグルタルアルデヒドをサンプル量に対して5%入れ、すぐに内蓋外蓋をして冷暗所に保管しておき採取後1週間以内に測定を行なった。実際の降水採取は

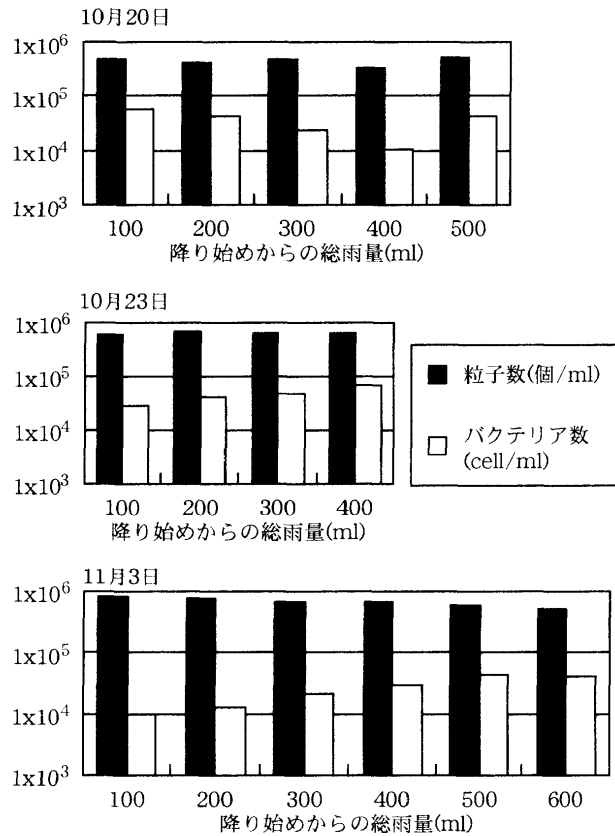


図5 静岡大学における2000年10～11月の結果 (図5, 6, 7, 8の凡例は同様).

Fig. 5 Numbers of bacteria in rain water in Oct. to Nov. at the Shizuoka University (Instructions of squares are same in figures 5, 6, 7 and 8).

降水開始は22時35分で1時間の内に6サンプルが採取された。結果より、バクテリア数の平均は 1.8×10^4 cell/mlであった。

2000年5月15日は南北の高気圧の間に前線が発生し、1日中ぐずついた天気であった。降水開始は16時59分で18時20分までに3サンプルと一つのサンプルを採取するのに非常に長い時間を要した。結果は、バクテリア数の平均が 6.5×10^4 cell/mlと、粒子数よりも多く含まれているということであった。

2000年10月20日以降は室内実験から一つの採取過程が決まる。採取面は採取容器である滅菌済みボトル100mlを交換するたびに Milli-Q 水を500ml流し、容器いっぱいまで採取する。降水採取後の保存処理はグルタルアルデヒドをサンプル量に対して3%入れ、すぐに内蓋外蓋をしてさらにパラフィルムを巻いて外気との接触を断った。その後、冷暗所に保管しておき、測定は降水採取後1週間以内で行なった。天気は南海上に秋雨前線が停滞したが、降水は長くは続かない。そのため1つの降水は4～6サンプルと少ない。3降水の結果は、バクテリア数の平均が採取時と測定時のブランクを引いて10月20日は 4.2×10^4 cell/ml, 23日は 4.6×10^4 cell/ml, 11月3日は 3.7×10^4 cell/mlであった (図5)。

2001年1月7日は日本の南海上に寒気を伴った低気圧が進み、山間部は降雪になるなどの寒い中での降水が夕方から観測された。降水開始は18時02分で約3時間ほどで1lの容器がいっぱいになった。この結果は精度の確

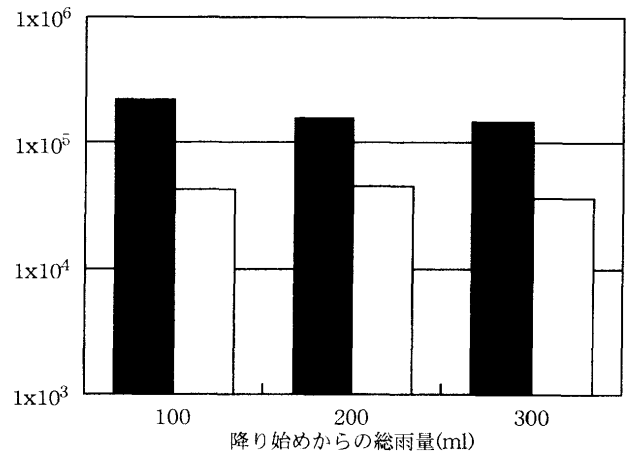


図6 富士山麓 水ヶ塚公園における7月の結果.

Fig. 6 Numbers of bacteria in rain water in July at Mt. Fuji.

認のための結果であり、採取方法が異なるため、精度の検討以外の考察には入れない。結果はバクテリア数の平均が採取時と測定時のブランクを引いて 1.1×10^4 cell/mlであった。

水ヶ塚公園

2000年7月14日の降水は日本のちょうど上空に梅雨前線が停滞し、大平洋側では弱い降水が観測された。しかし、ここ水ヶ塚公園では霧が発生したり晴れが続いたり、なかなか降水を採取することはできなかった。わずかに採取できた降水も霧と雨が混ざったものである。測定は降水採取後3週間以内に行なった。結果では、バクテリア数の平均が採取時と測定時のブランクを引いて 4.8×10^4 cell/mlであった (図6)。

乗鞍岳

2000年9月12日の2降水は南東から台風が接近しており、その影響で日本上空の前線が活発になり、名古屋の集中豪雨となった時の終わり頃である。この日は乗鞍でも非常に強い降水が観測され、サンプル数もかなりの数になった。降水採取は室内実験をもとに行なった。採取面は採取容器である滅菌済みボトル100mlを交換するたびに Milli-Q 水を500ml流した。測定は降水採取後2週間以内で行なった。降水開始は0時17分で18時58分までの間に2降水約20本のサンプルを採取した。結果では、バクテリア数の平均が採取時と測定時のブランクを引いて2降水とも 2.0×10^4 cell/mlであった (図7)。

2000年9月17日は台風は日本から遠ざかったが、日本海に前線を伴う低気圧が台風から湿った空気を含んだ活発になり、強い降水が観測された。風は台風も遠ざかり、それほど強くはなかった。降水開始は前日の16時03分で17日午前3時23分までに30本近いサンプルを採取した。中には1サンプルを採取するのに5～6分という降水の非常に激しい時もあった。結果はバクテリア数の平均が採取時と測定時のブランクを引いて 2.3×10^4 cell/mlであった (図8)。

考 察

室内実験

採取容器では、当初、ガラス瓶250mlが滅菌したあとにすぐ用いたため一番バクテリア数が少ないと考えられたが、結果では滅菌済みボトルの方が滅菌されてから

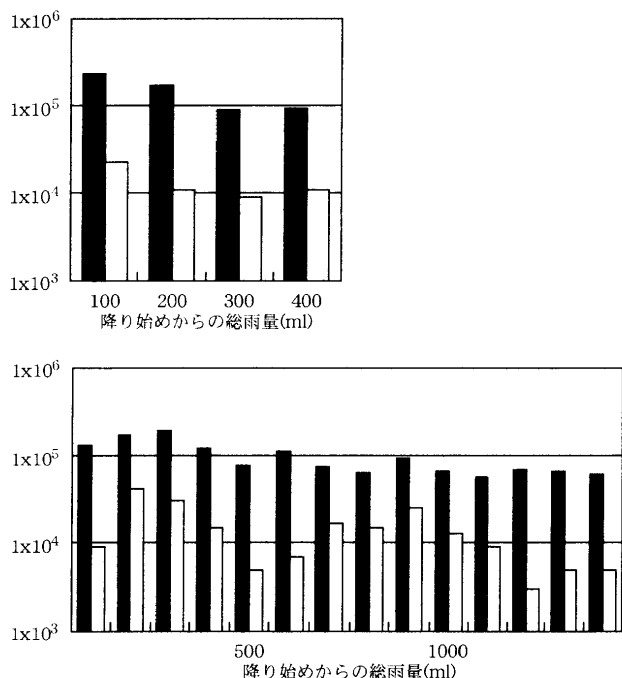


図7 乗鞍岳における2000年9月12日の結果.
Fig. 7 Numbers of bacteria in rain water in Sep. 12 at Mt. Norikura.

長い時間が経過しているにもかかわらずバクテリア数が少なく測定された。ポリプロピレン容器はやはり通常の洗浄のみで滅菌がされていないため、他の容器よりバクテリア数が多く測定された。あらかじめ滅菌されて送られてくる2つの滅菌済みボトル100, 50mlでは同じ試薬のものは結果も良く似ていた。しかし、実際に観測に出たあとに、すぐに降水を測定することはできない。2, 3週間後の結果では100mlの方がバクテリア数はより少なかった。保存処理の試薬については、どの容器をみてもグルタルアルデヒドの方が少ない結果であった。両試薬とも同じ量を入れ入れる前は0.2 μ mのフィルターを通してのこのような結果であった。この事より考察してみたが、ホルマリンではバクテリアの増加を抑えることができなかつたのか、原因は不明である。また、蛍光顕微鏡での観察時にホルマリンでは蛍光がぼやけてしまうため、カウントがしにくい。これは染めた染色体が壊れてしまうためと考えられた。したがって、測定時にバクテリア数が少なく計測され、カウントもしやすいグルタルアルデヒドの方が本研究には適していると考えられた。以上を検討すると、採取容器には滅菌済みボトル100ml、保存処理の試薬にはグルタルアルデヒドで本研究を行なっていくことにした。

降雨採取器の洗浄では、最初の100ml中に非常に多くのバクテリアが含まれていたのは、採取面にバクテリアが吸着していたことを示す。それがさらに Milli-Q 水を流すことにより除去されていくことが結果より分かった。しかし、300ml流し続けて減少し続けた以降に、ある一定量が出てしまう原因は不明である。考えられることは、採取面に吸着しているバクテリアが測定時に出てしまうのではなく、あらかじめ Milli-Q 水に含まれていたのか、もしくは測定するまでのろ過過程で含まれてしまうのではないかと考えられた。前者の Milli-Q 水は0.2 μ mのフィルターを通しての、後者のろ過過程で含ま

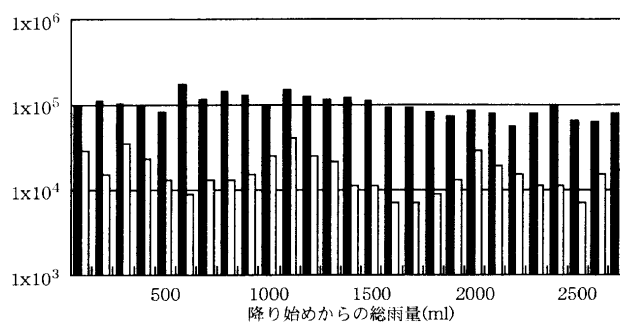


図8 乗鞍岳における2000年9月17日の結果.
Fig. 8 Numbers of bacteria in rain water in Sep. 17 at Mt. Norikura.

れてしまうことが最も妥当であると考えられるが本当にそうなのか、もしそうならろ過のどの過程で含まれてしまうのかは不明である。これより、Milli-Q 水について測定を行ない結果を考察する必要がある。

Milli-Q 水、水道水の検討では、まず、Milli-Q 水を直接容器に入れた結果が 3.8×10^3 cell/ml ということ、Milli-Q 水にはバクテリアは含まれていないと仮定しているため、この量はろ過過程において含まれてしまうことが判明した。しかし、ろ過のどの過程で含まれてしまうのかは分からなかった。それと、まだ降雨採取器の量には及ばない。そこでもう一度、採取器に十分 Milli-Q 水を流した後、さらに Milli-Q 水を流した結果が 7.4×10^3 cell/ml であった。さきほどの300ml流した後に出てきた一定量の結果よりは低い値であった。この値より Milli-Q 水の値を引いた値 3.6×10^3 cell/ml というのが採取器の表面に付着していたバクテリア数で、除去ができなかったものということになる。実際の降水は、海水などに比べてバクテリア数は非常に少ないということ、このブランクが比較的大きな値になってしまうが、本研究ではこれがバクテリア数を減らすことができる限界ということである。

水道水は 1.0×10^4 cell/ml になった。水道水も実際のバクテリア数は Milli-Q 水と採取面のブランクを引いて 2.6×10^3 cell/ml という結果になった。これは、一般的に言われている値に近い結果ということになり、精度が増したということであった。保存期間の結果より、グルタルアルデヒドを3%以上入れれば十分保存できているということと、保存できる期間は少なくとも5週間であることが確認された。これより野外観測ですぐに測定できない時にも、この期間内に行なえば結果に影響はないと考えられる。この結果を踏まえて、本研究では全ての測定を降水を採取してから3週間以内で、保存処理にはグルタルアルデヒドを3%入れて行なっていくことにした。

カウント時における精度の確認より、ろ過量を変えても精度は変わらないということが分かった。また、違うボトルからサンプルを取って測定しても、精度には影響ないことが結果より分かった。精度は18,000に対して $\pm 1,000$ の誤差、パーセントで言えば5~6%ということ、測定結果は信頼がおけるものと言える。

観測結果

観測結果を比較するにあたり、採取方法が違うものは比較できないため、2000年5月半ばまでに行なった測定結果を安易に比較することはできない。

それ以降の結果を地域別で見ると、富士山麓の水ヶ塚

公園で最も細菌数が多かった。しかしこの結果はサンプル数が少なく、これだけから細かく比較することは難しい。次に多かったのが静岡大学である。これは、他の2地点から比べれば市街地にあり、細菌数も最も少ないと考えられたのに意外な結果となった。そして乗鞍岳が一番少ない結果となった。この結果より、細菌数だけでは結果を説明できなかったため、粒子数を含め比較してみることにした。降水中に含まれている粒子数中の細菌数の比でみると、水ヶ塚公園が平均28%で最も多く、続いて乗鞍岳の22%、静岡大学の7%となる。細菌数/粒子数比の検討より、静岡では含まれている粒子数の量が非常に多く、確かに細菌数も多いが比で示すと平均7%であった。それに比べ、他の2地点は細菌数の占める割合が高い。これより、粒子の取り込まれ方と細菌数の取り込まれ方には何か関係があると思われる。しかし、これだけの結果から説明できるのは、市街地に近い大気汚染の激しい静岡大学の結果は、粒子数が非常に多いが、細菌数は他の2地点それほど変わらない。それに対し、他の2地点は降水中の粒子数は少ないが細菌数の占める割合が高いと言えることであった。このことから、市街地よりも比較的大気汚染の少ない環境下では、細菌数が降水に与える影響が大きいと言える。水ヶ塚公園と乗鞍岳の比較では、乗鞍岳の方が、細菌数が少なかったのは森林限界を越えているため、周りが低木か土壌しかなく、水ヶ塚公園は森林に囲まれているということが考えられた。森林からの影響があるかもしれないが、水ヶ塚公園の少ないサンプル数を考慮するとはっきりとした事は言えない。しかし、環境の違いによる細菌数/粒子数比に差がみられるという事は、環境の違いによる降水への関わり方が違うということである。

降水中の細菌数が唯一報告されている Casareto *et al.* (1996) の結果では、静岡の1993年7月の降水中の細菌数は、 $2.4 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ 、細菌数/粒子数比は34%であった。本研究で室内実験をもとに行なった2000年10~11月の静岡の3降水の細菌数の平均は $3.7 \sim 4.6 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ で、細菌数/粒子数比が5~9%であった。これより、細菌数は報告されているものと比べると少し多い程度だが、細菌数/粒子数比は非常に小さいという結果が見られた。この理由については今のところ不明である。

まとめ

降水中の細菌数を測定するにあたり、どのような方法をもって行なっていけばより精度の高い結果を得られるのか、まずは降水の採取方法から検討を始め、それから実際の降水中の細菌数を測定し議論することを本研究の目的とした。

まずは、採取容器、保存処理の試薬、保存期間を確認し、それから得られた結果より、疑問が生じた事を、Milli-Q水、降雨採取器の洗浄で再度検討した。こうして最後に降水中の細菌数を測定する方法を決定し、実際の野外観測に用いて研究を行ってきた。そのため、2000年半ばまでは、採取方法の違いにより、結果を考察することはできなかったが、その室内実験により、精度の高い結果を得られるようになったのである。

地域別に結果を見ると、降水中の細菌数は、富士山麓や乗鞍岳の方が、市街地に近い静岡大学よりも多く、降水に影響を与えているだろうと予測していたが、

実際は乗鞍岳よりも、静岡大学の方が細菌数が多いという結果であった。これについて考察するために細菌数/粒子数比を用いた。この比によって、予測と同じように、富士山麓や乗鞍岳の方が、降水に与える影響が大きいと判断できる。

2000年9月以降の野外観測の結果が室内実験をもとに行なわれたが、降水中の細菌数はこれまでに唯一報告されていた結果と比べると、細菌数はそれほど変わらない。しかし、サンプリング地点が同じであった静岡大学の結果を比較してみると、降水中の粒子数中の細菌数の占める割合に大きな違いが見られた。本研究で測定したものは、細菌数の占める割合が非常に小さいという結果であった。

本研究により、降水中の細菌数の違いが何に関わって起こっているのかということについて、粒子の取り込まれ方と細菌数の取り込まれ方に関係があるということが分かった。それは市街地に近い大気汚染の激しい地域では、粒子数は汚染の少ない地域に比べ非常に多いが細菌数はそれほど変わらない。大気汚染の少ない地域では、降水中の粒子数は多くはないが細菌数の占める割合が大きいと言えることである。市街地よりも比較的大気汚染の少ない環境下では、細菌数が降水に与える影響が大きいということである。これより、細菌数の、環境の違いによる降水への取り込まれ方が違うということが分かった。

今回の考察はあくまで降水中の細菌数を測るということで、連続採取の考察はしていない。この時間別に細菌数の動態をみるのが今後の研究の課題である。

謝辞

富士山観測では太田良和弘氏をはじめ静岡県環境衛生科学研究所の方々には御支援と御尽力を頂き厚く御礼申し上げます。乗鞍観測では、施設や食事等提供していただいた乗鞍岳東京大学宇宙線研究所観測所の職員の皆様にも感謝いたします。研究室の中村昭彦氏、桃谷辰也氏、柏原拓史氏、奥村 貢氏、小坂敏之氏、中島賢邦氏、森田理絵さんにも感謝いたします。

引用文献

- Blanchard D. C. & Syzdek L. D. (1972), Concentration of bacteria in jet drops from bursting bubbles. *Journal of Geophysical Research*, **77**, 5087-5099.
- Casareto B. E., Suzuki Y., Okada K. & Morita M. (1996), Biological micro-particles in rain water. *Geophysical Research Letters*, **23**, 173-176.
- Dingle A. N. (1966), Pollen as condensation nuclei. *Journal de Recherches Atmospheriques*, **2**, 231-237.
- Hobbie J. E., Daley R. J. & Jasper S. (1977), Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**, 1225-1228.
- Isono K., Komabayasi M. & Ono A. (1959), The nature and the origin of ice nuclei in atmosphere. *Journal of the Meteorological Society of Japan*, **37**, 211-233.
- Maki L. R. & Wiloughby K. J. (1978), Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. *Journal of Applied Meteorology*, **17**, 1049-1053.
- Mason B. J. (1971), *The Physics of Clouds*. Clarendon Press, Oxford, 671p.

- 三崎方郎 (1992), 微粒子が気候を変える—大気環境へのもう一つの視点—, 中央公論社, 東京, 202p.
- 小幡 齊 (1991), 氷核活性細菌の利用. 日本食品低温保存学会誌, **66**, 45-52.
- Roggers R. R. & Yau M. K. (1989), *A short Course in Cloud Physics*. Pergamon Press, Oxford. 293p.
- Schnell R. C. & Tan-Schnell S. H. (1982), Kenyan tea litter: a source of ice nuclei, *Tellus*, **34**, 92-95.
- Schnell R. C. & Vali G. (1972), Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. *Nature*, **236**, 163-165.
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (1995), 大規模緑地化にともなう気候変化に関する調査. 財団法人地球環境産業技術研究機構, 東京, 162p.