

VII-17

水環境中における VNC 状態の細菌の挙動について

八戸高専 建設環境工学科 学生会員 ○沢谷 圭介
成田 浩明

正会員 金子伸一郎
矢口 淳一

1. はじめに

水環境や水道水、排水中に活性のある微生物がどれだけ存在しているかは衛生学上非常に重要なポイントである。従来微生物の存在量は、寒天培地を使用した平板培養法によって測定されてきた。しかし、最近水環境中には生存しているものの培養できない状態にある細菌(Viable but nonculturable; VNC)が少なからず存在することが明らかになってきた。このような VNC 状態にある細菌類は従来の手法では計数できず、存在する細菌数を過小評価してしまう。そこで昨年度の研究²⁾では、VNC 状態の細菌を検出する方法を確立した。本研究では、これらの方法を用いて青森県内5河川と下水処理場において VNC 状態の細菌の存在量を調査したので報告する。

2. 実験材料および方法

(1) 調査箇所 試料は浅水川、奥入瀬川、五戸川、新井田川、馬淵川の県内 5 河川と、八戸高専生活廃水処理施設、青森県内の M 浄化センターから採水した。

(2) 実験材料 染色に使用した蛍光試薬類は、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (和光純薬)、CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) (Polysciences 社)、Backlight™(Molecular Probes 社)である。

(3) 細菌数計測 生菌数の計測には PGY 培地と R2A 培地を用い、20℃で 1 週間培養した。全菌数はポリカーボネイトフィルター(Advantec 製、孔径 0.2 μm)にろ過捕集後、蛍光染色剤 DAPI 溶液で染色し落射蛍光顕微鏡で計数した。また VNC 状態の細菌を評価する手法として、DVC 法、マイクロコロニー法、CTC 法、Backlight 試薬を使用した。4つの方法とも全菌数測定法と同様、ポリカーボネイトフィルター上に細菌を捕集し蛍光試薬を利用して計測するものである。

(4) 蛍光顕微鏡 落射型蛍光顕微鏡はオリンパス製 BX41 を用いた。励起光源として水銀ランプを使用し、DAPI 染色には U 励起(U-MWU2)、CTC および Backlight 試薬には B 励起(U-MNIB2)を用いた。細菌数の計測では、蛍光顕微鏡下で視野をランダムに変え、1 サンプルにつき 10 視野の計数を行った。

3. 結果と考察

(1) 河川環境調査 青森県内の3河川に対して、DAPI 染色による全菌数と R2A 培地で評価した生菌数の季節変化を図-1に示した。全菌数と生菌数を比較すると生菌数は全菌数より3~5オーダー少なく、DAPI で検出されるほとんどの細菌が培養できない。浅水川的全菌数に対する生菌数の割合を計算してみると 0.001% ~0.780%で 1%以下しか存在しないということが分かる。季節ごとの菌数の変化の傾向を見てみると冬から夏にかけて水温の上昇とともに全菌数は増加し、そして夏から冬にかけて減少している。しかし、生菌数はほとんど変化がなく、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ で推移した。

図-2には VNC 状態の細菌を検出する方法として使用した4つの方法で求めた浅水川の細菌数を、全菌数に対する比率として示した。生菌数は全菌数の1%にも満たないほどしか検出されなかったのに対して、VNC 状態の細菌はかなり多く検出された。細胞膜の破損状況を

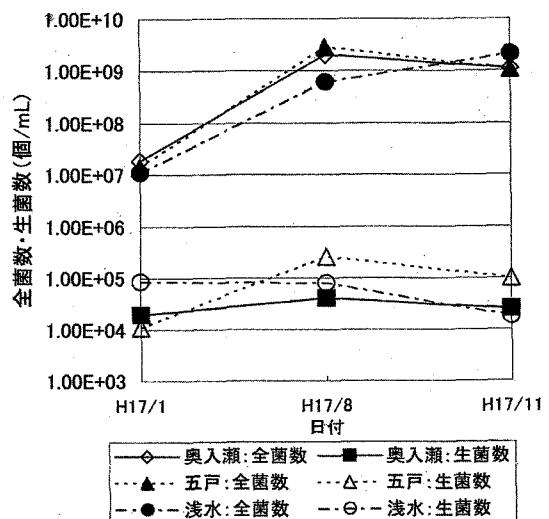


図-1 全菌数と生菌数の季節変化

指標とする Baclight 法では全菌数の 70%以上が生理的活性があり、一方呼吸活性を表す CTC 法は 20%以下しか検出されなかった。増殖活性を表すマイクロコロニー法と DVC 法はその中間の値を示し、測定時期によって大きく変動した。CTC 法の 8 月は 1.45×10^6 個/ml 以下となり検出できなかった。11 月の計数時には検出方法に改良を加えた。

(2) 排水処理場調査 M 浄化センターの、曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水の全菌数と生菌数及び VNC 状態の細菌数を図-3 に示した。処理水は塩素消毒後なので、全菌数生菌数とも曝気槽流入水に比べて 3~4 オーダー少なくなっている。3 つのサンプルとも河川水に比べて全菌数と生菌数の差は小さく、1~2 オーダーしか違いがなかった。生活排水のため有機物濃度が高い処理場の方が河川水に比べ細菌が生存しやすいのかもしれない。4 つの検出法で測定した VNC 状態の細菌数は、いずれの方法でもほぼ全菌数と生菌数の中間の計数結果を示した。

図-4 には 4 つの方法で検出した VNC 状態の細菌の全菌数に対する比率を示した。Baclight 法と DVC 法は VNC 状態の細菌比率の変化の傾向が類似しており、曝気槽流入水 > 最終沈殿池流出水 > 処理水の順に比率が低下していた。VNC 状態の細菌の比率を河川水と比較すると、Baclight 法では河川水に比べて比率が半分程度に低下し、3 つのサンプルとも 40%以下となった。処理場内では、細胞膜が破損された細菌の割合が多いと考えられる。他の方法では河川水と大きな差はなかった。

4. 結論

河川水では、生菌数は全菌数より 3~5 オーダー少ないのに対し、排水処理場では生菌数と全菌数の差は小さく、1~2 オーダーしか違いがなかった。VNC 状態の細菌数は、河川水も排水処理場内水も生菌数と全菌数の中間に位置し、ほぼ全菌数より 1 オーダー低い程度だった。

本研究は、科学研究費補助金基盤研究 C (課題番号 16560488) の一環として行われたものである。

<参考文献> 1) 木暮一啓, 科学, Vol.69, No.6, p508-516(1999) 2) 矢口ら, H16 年度土木学会東北支部技術研究発表会, p842-843 (2005)

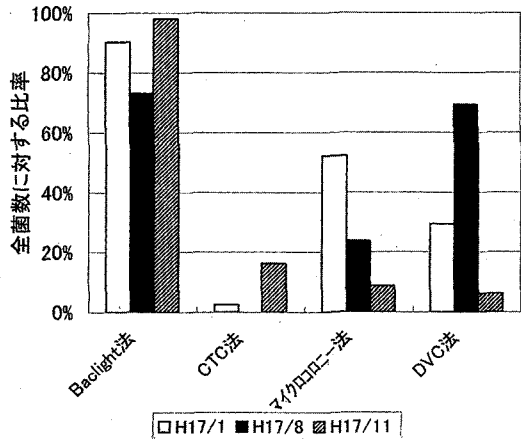


図-2 VNC状態の細菌量(浅水川)

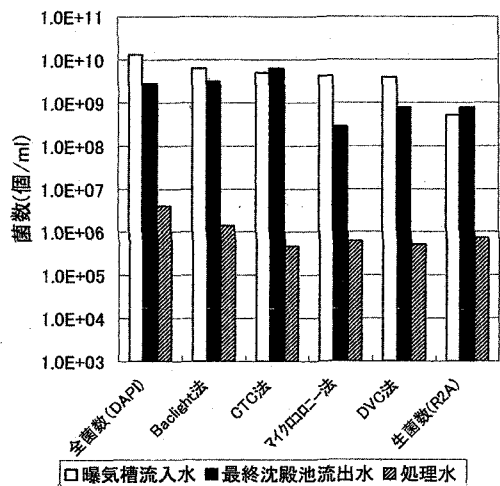


図-3 全菌数と生菌数の比較(M浄化センター)

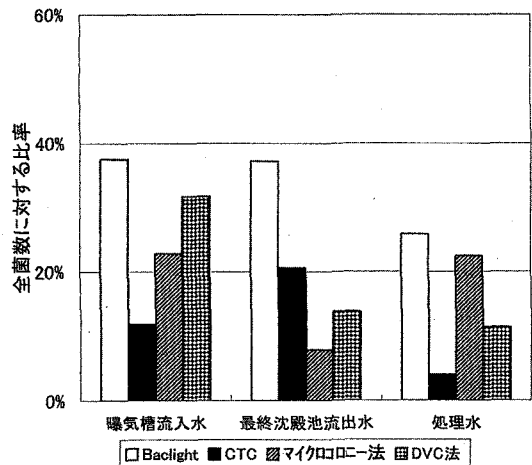


図-4 VNC状態の細菌の比率(M浄化センター)