

VNC 状態の大腸菌の計測方法に関する研究

八戸高専

○ 横町 尚享

正会員 矢口 淳一

1. はじめに

活性のある病原性細菌が公共用水域中にどれだけ存在しているかは、衛生学的に最も重要なポイントである。従来、活性のある細菌の存在量は培養を基本とする方法によって測定され、培養して出てこなければ菌は存在しないと考えられていた。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（viable but non-culturable;VNC）にある細菌が少なからず存在することが明らかになってきた。病原性細菌やその代替指標である大腸菌の検出方法は培養によってきたため、VNC の状態にある細菌は不活性とみなされ、飲料水や水環境の感染リスクを過小に評価してきた可能性もある。本研究では、汚染指標細菌としての大腸菌に対して VNC 状態の大腸菌の存在を考慮した、活性のある大腸菌の計測方法を確立し、実際に生活排水処理施設の調査を行って VNC 状態の大腸菌の存在量を検討したので報告する。

2. 実験材料及び方法

2.1. 実験材料

理化学研究所系統保存施設から大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649^T)を購入して実験に用いた。八戸高専生活排水処理施設、青森県内の T 下水処理場より試料を採水し調査を行った。生菌と死菌を分別する試薬として、PMA (propidium monoazide;Biotium 社)を使用した。

2.2. 実験方法

図 1 に生活排水処理施設の調査の実験概要を示した。

i) 試料の採水 各処理施設で曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水を採水した。大腸菌と糞便性大腸菌群の菌数は、それぞれ EC-MUG 培地(Difco)による MPN 法と M-FC 培地(Difco)によるメンブレンフィルタ法で計数した¹⁾²⁾。

ii) PMA 処理 採水した試料を 0.5mL の透明なマイクロチューブに準備し、PMA を最終濃度が 50 μ M となるように添加した後、暗室で 5 分間放置し、ハロゲン光源(アークランドサカモト社 GTHT-500S、500W)を 5 分間照射した。照射中チューブは氷の中で冷却した。

iii) DNA の抽出 PMA 処理後、ミニビードビーダー(家田貿易 Model 3110BX、4800rpm、30sec)で試料を破砕し、八戸高専生活排水処理施設

では FastDNA[®]SPIN for Soil Kit(MP Biomedicals 社)、T 下水処理場では DNA Isolation Kit ISOIL for Beads Beating(株ニッポンジーン)を使用し DNA を抽出した。方法は各社のプロトコルに従った。

iv) リアルタイム PCR 大腸菌の選択的検出に使用される β -グルクロニダーゼ酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとして、リアルタイム PCR 反応を MiniOpticon システム(Bio-rad 社)で行った。PCR 反応には、iQ Supermix(Bio-rad 社)を使用した。温度条件は、95 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性させた後、(95 $^{\circ}$ C:45s、60 $^{\circ}$ C:1min)のサイクルを 40 回繰り返した。リアルタイム PCR は同一サンプルで 3 回実施し、データを平均した。

3. 実験結果および考察

3.1. 活性のある大腸菌の定量実験

熱処理した一定量の大腸菌を無処理の活性のある大腸菌に添加し、活性のある大腸菌が PMA 試薬とリアルタイム

キーワード：大腸菌, VNC, リアルタイム PCR, PMA, 活性, 熱処理

連絡先：〒039-1192 青森県八戸市大字田面木字上野平 16 番地 1 TEL 0178-27-7305

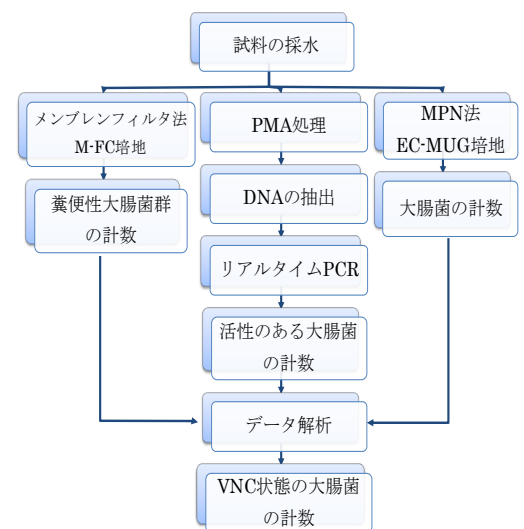


図 1 実験概要

ム PCR 反応で定量できるか検討した。添加した熱処理菌体数を変化させても、活性のある大腸菌と閾値サイクル数の間には一定の関係があることが分かった。しかし、熱処理菌体数が活性のある大腸菌の菌体数の 10 倍以上のデータから傾きが変化していたため、これらのデータを除外すると全ての検量線がほぼ重なった。活性のある大腸菌の定量実験で得られた検量線を一つにまとめたものを図 2 に示した。白抜きマーカー(o)で示した点は PMA 試薬を用いないで、活性のある大腸菌のみに対して PCR 反応を行った場合である。PMA 処理ありの場合の検量線とほぼ重なることが分かる。検量線の傾きは(-3.186)、増幅効率 E は 106.0% となった。

3.2. 八戸高専生活排水処理施設の調査

図 3 に PCR 法、PMA-PCR 法、MPN 法、メンブレンフィルタ法によって計数した八戸高専生活排水処理施設の曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水の大腸菌と糞便性大腸菌群計数結果を示した。PCR 法では、活性のない大腸菌を含むすべての大腸菌が検出され、PMA 処理と組み合わせた PMA-PCR 法では、培養可能な大腸菌を含む活性のある大腸菌が検出される。いずれの計数方法でも、曝気槽流入水より最終沈殿池流出水の方がおよそ 2 オーダー大腸菌が少なく、処理水では大腸菌は検出されなかった。メンブレンフィルタ法で計数した糞便性大腸菌群は、処理水 100 mL をろ過して培養しても検出されなかった。曝気槽流入水、最終沈殿池流出水ともに、PMA-PCR 法による大腸菌の計数値は、MPN 法で計数した大腸菌の培養可能な菌数と PCR 反応で検出された活性のない大腸菌を含むすべての大腸菌数の中間に位置し、多数の大腸菌が VNC 状態で存在することが分かった。

3.3. T 下水処理場の調査

T 下水処理場の調査結果を図 4 に示した。流入水と曝気槽流入水はほとんど差がなく、八戸高専排水処理施設と同様に曝気槽で 2 オーダー近く減少した。処理水では大腸菌は検出されなかった。また、流入水、曝気槽流入水、最終沈殿池流出水ともに、PMA-PCR 法による大腸菌の計数値は、MPN 法と PCR 反応で検出された大腸菌の計数値の中間に位置し、VNC 状態の大腸菌が存在することが確認できた。

4. まとめ

活性のある大腸菌の定量実験では、添加した熱処理菌体数を変化させても活性のある大腸菌と閾値サイクル数の間には一定の関係があり、PMA 処理なしで得られた検量線にほぼ一致する検量線が得られた。また、得られた検量線を適用して八戸高専生活排水処理施設と青森県内の T 下水処理場の調査を行ったところ、曝気槽流入水、最終沈殿池流出水ともに、PMA-PCR 法による大腸菌の計数値は、MPN 法で計数した大腸菌の培養可能な菌数と PCR 反応で検出された活性のない大腸菌を含むすべての大腸菌数の中間に位置し、多数の大腸菌が VNC 状態で存在することが分かった。

〈参考文献〉 1)日本水道協会：上水試験方法, 2001 年版, pp.610-628, 2001.

2)日本下水道協会：下水試験方法 上巻, 1997 年版, pp.721-725, 1997.

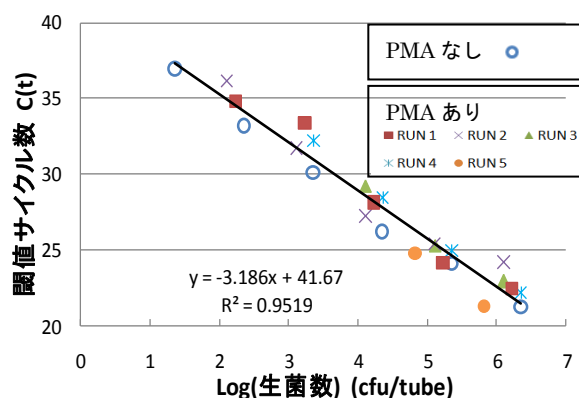


図 2 活性のある大腸菌の検量線

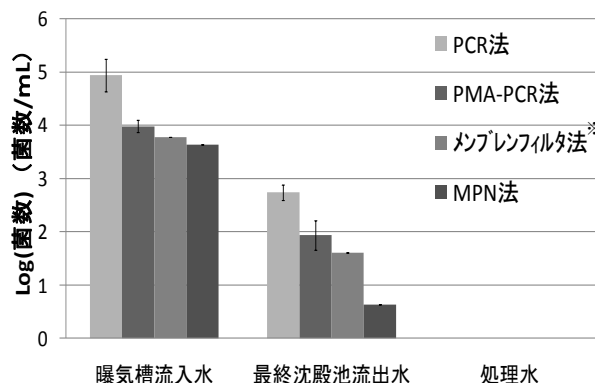


図 3 八戸高専生活排水処理施設の大腸菌数

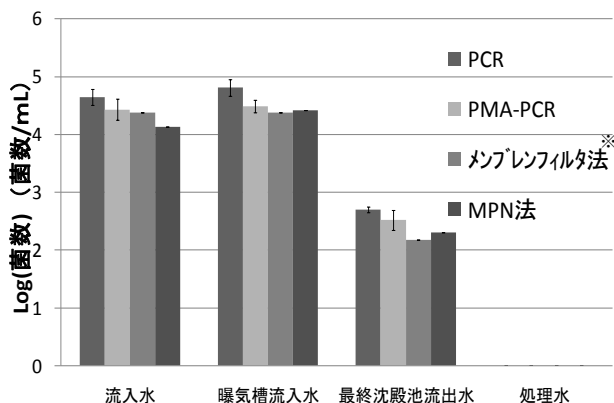


図 4 T 下水処理場の大腸菌数

※糞便性大腸菌群