

可視光照射による糞便汚染指標細菌の不活化

東北大学 学生会員 ○佐竹明日香
東北大学大学院 正会員 真砂佳史
東北大学大学院 フェロー会員 大村達夫

1. はじめに

現在日本では河川、海域、公衆浴場や下水処理水などの環境水質基準の微生物学的項目として大腸菌群が指標微生物として用いられている¹⁾。しかし、大腸菌群の要件を満たす微生物には、糞便汚染に関係のない環境由来の菌なども多数存在し、また生育環境が整えば環境水中でも増殖することができる。そのため、糞便汚染が想定されない山間部の河川等においても基準値を大きく上回る大腸菌群数が検出されるなど、その指標性の乏しさが指摘されている²⁾。

近年では、大腸菌群に代わる新たな糞便汚染の指標として、環境水中での生存期間が短いなどの点からより糞便汚染指標性の高い大腸菌や腸球菌が検討されている。また環境省の今後の水環境保全の目的の一つとして人と水とのふれあいの場の確保や健康保護の為の水質管理が挙げられているが³⁾、効率よく適切な水質管理を行う為には環境水中での指標微生物の挙動を知ることが重要となる。温度、塩分などの環境要因の影響による指標微生物の増減に関して、下水処理水放流先や河川水中などについて検討されてきたが、可視光のほぼ全域を含む太陽光による微生物の不活化の知見は少ない。環境水中での指標微生物の挙動を把握する為には、太陽光による病原微生物の不活化を検討することが重要と考えられる。

本研究では、新たな水質指標として検討されている大腸菌および腸球菌、環境水中に実際に存在する大腸菌群、ウイルスの挙動を検討するためのバクテリオファージMS2の4種の微生物を用いて、LEDソーラーシミュレーターを使用して、可視光による微生物不活化速度の評価を行った。

2. 実験方法

2.1 微生物の培養

実験に使用する細菌およびバクテリオファージとし

て独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより分与された*Escherichia coli* (NBRC No. 102203)、*Enterococcus faecalis* (NBRC No. 100480)、*Escherichia coli* phage MS2 (NBRC No. 102169) の3種と宮城県のA浄化センターで採取した塩素添加前の二次処理水中の大腸菌群を用いた。NBRCより分与された細菌株はBacto Tryptic Soy Broth (TSB, BD) にて37°Cで24時間培養した。MS2は、まず宿主である*Escherichia coli* (NBRC No. 106373) をTSBで培養してからMS2を添加して37°Cで24時間培養した。培養後、宿主の大腸菌を取り除くために孔径0.22μmのマイレクスGPフィルター (Merck) を用いて試料をろ過して保存した。下水中の大腸菌群には、クロモカルトコリフォーム寒天培地 (Merck) を孔径0.22μmマイレクスGPフィルターでろ過して寒天を取り除いた培養液で、37°C、24時間培養した。

2.2 可視光照射試験

培養した試料2.5mlを遠心チューブに分注し、遠心分離 (4,000×g、20°C、25 min) を行った。遠心分離後、上澄みを廃棄し、残ったペレットにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または人工海水 (LIVESeaSalt、DELPHIS) 2.5mlを加えて激しくボルテックスし再懸濁させた。再懸濁後、懸濁液を48ウェルプレートに1ウェルあたり0.5ml (厚さ4.5mm) 分注した。MS2については、遠心分離を行わず、培養した試料をPBSで10³倍希釈してプレートに分注した。

微生物を添加した48ウェルプレートを緩やかに攪拌しながらLEDソーラーシミュレーター (WSLED 100SC、ワコム電創) を用いて可視光の照射を行った。照射した波長域は350nm~1100nmで、照射強度は太陽光と同じ波長スペクトルになるように設定した (図1)。実験中の溶液温度は23°Cで一定となるようにした。

キーワード：可視光、不活化

連絡先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06, TEL: 022-795-7483, E-mail: masago@water.civil.tohoku.ac.jp

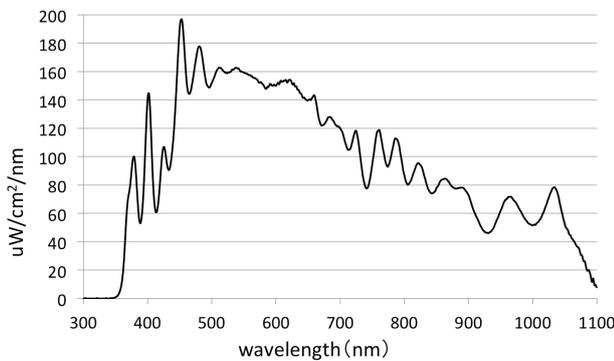


図 1.ソーラーシミュレーターの波長スペクトル

2.3 試料の濃度測定

0, 1, 2, 4, 6 時間疑似太陽光を照射した後に試料を回収し、各微生物濃度を測定した。*Escherichia coli* と下水由来の大腸菌群はクロモカルトコリフォーム寒天培地 (MERCK)、*Enterococcus faecalis* は M-エンテロコッカス寒天培地 (BD) を用いたメンブレンフィルタ一法で濃度を測定した。MS2 は Bacto Tryptic Soy Agar (BD) を用いた二重寒天培地法で測定した。

3. 結果及び考察

疑似太陽光照射による各微生物試料の不活化実験を行ったところ、*Escherichia coli* および大腸菌群は顕著に不活化したが、MS2 はほとんど不活化しなかった (図 2)。また、人工海水中で同様の実験を行ったところ、腸球菌以外の微生物では不活化速度が速くなった (図 3)。不活化速度の違いから微生物種によって太陽光への抵抗力に違いがあることが確認された (表 1)。

可視光照射による不活化機構として、細胞内のポルフィリンが細胞内で光増感剤として作用し、光励起によるエネルギー移動によって一重項酸素が発生し、バクテリアが不活化することが報告されている⁴⁾。今回の実験では 3 種の細菌は可視光により不活化したが、ファージ MS2 はほとんど不活化しなかった。ウイルスは粒子中に可視光照射による不活化の原因となるポルフィリンを持たないため、不活化しなかったと考えられる。

今回の結果から、大腸菌群と大腸菌は太陽光による不活化について、ほぼ同じ傾向を示すことが確認できた。腸球菌は大腸菌や大腸菌群と比べ、太陽光に対しての耐性が高いことがわかった。そのため、糞便汚染の影響をより長く示すことができ、前者 2 種よりも指標微生物として適していると考えられる。また、MS2 の結果から、ウイルスが指標細菌とは異なった挙動を

示すことがわかった。よって、ウイルスの指標として指標細菌を使用することは難しいと考えられる。

謝辞

本研究は環境省環境研究総合推進費の補助を受けて行われた。

参考文献

1. 環境省, 水質汚濁による環境基準について, 1971
2. 厚生労働省, 微生物に係る基準の考え方, 2002
3. 環境省, 今後の水環境保全の在り方について, 2011
4. Maclean, M *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(7), 1932-1937, 2009

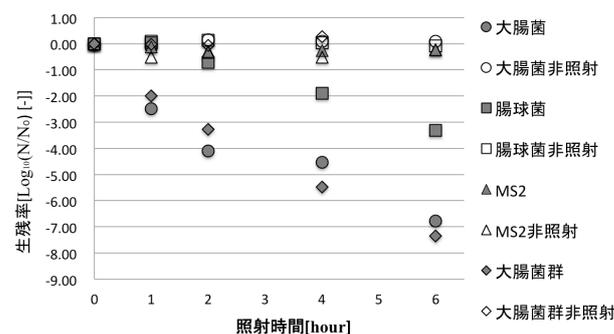


図 2.可視光照射後の生残率 (PBS)

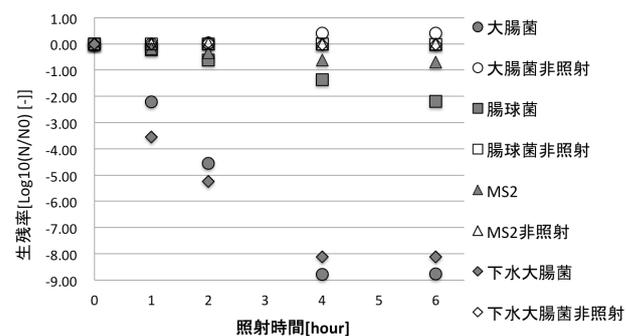


図 3.可視光照射後の生残率 (人工海水)

表 1.不活化速度

試料名	不活化速度[hour ⁻¹]
大腸菌	-0.99
大腸菌(人工海水)	-2.2
腸球菌	-0.58
腸球菌(人工海水)	-0.37
MS2	-0.03
MS2(人工海水)	-0.12
大腸菌群	-1.18
大腸菌群(人工海水)	-1.93