

(73) 生存可能な大腸菌の計測方法と排水処理施設中の挙動について

横町 尚享¹・矢口 淳一^{2*}

¹八戸工業高等専門学校 専攻科 建設環境工学専攻 (〒039-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

²八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 (〒039-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

* E-mail: yaguchi-z@hachinohe-ct.ac.jp

大腸菌に特異的な塩基配列を用いたリアルタイムPCR反応と、細菌膜損傷の有無を区別できるPMA試薬を組み合わせることで、生存可能な大腸菌のみを迅速に定量することができた。培養した大腸菌を熱処理して無処理の大腸菌と混合した実験では、熱処理菌体数が無処理の大腸菌数の10倍以内なら、無処理で生存可能な大腸菌数とPCR反応の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。PMA-PCR法を適用して排水処理施設の調査を行ったところ、流入水や曝気槽流入水、最終沈殿池流出水中にはVNC状態の大腸菌が培養可能な大腸菌の0.27~87倍存在することが分かった。また塩素消毒によってもVNC状態を含む生存可能な大腸菌数は大幅な減少が見られず、塩素消毒はVNC状態の大腸菌には不活化効果が低いと考えられる。

Key Words : *Escherichia coli* , DNA , viable but non-culturable (VNC) , real-time PCR , PMA

1. はじめに

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、生存可能な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、培養して出現しなかった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¹⁾²⁾。これらの細菌は、VNCの状態から通常の生理状態に復帰して増殖可能となることもある³⁾。VNCの状態にある菌の存在が最も問題となるのは病原菌であり、その代替指標である大腸菌である。病原性細菌や大腸菌の検出方法は培養によってきたため、VNC状態にある細菌は不活性とみなされ、消毒などの不活性化効果を過大に評価し、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がある。筆者ら⁴⁾は、VNC状態の細菌を検出する方法を検討し、4つの計測方法を用いて水環境中にはVNCの状態にある細菌が多数存在することを報告した。しかしこれらの方法では特定の細菌数を計測することができない。近年、急速に発展している分子生

物学的手法を水環境中の微生物に適用して、遺伝子レベルで特定の細菌を検出する方法が研究開発されてきた⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。DNA中の特定領域を増幅することができるPCR反応は、特定の細菌に特異的な塩基配列を利用することにより、選択培地に替わる迅速で特異性の高い新しい検出方法を提案できる。ところがPCR反応やそれを応用してDNA量を定量できるリアルタイムPCR法では、細胞死滅後もDNAが比較的長期間にわたって環境中で保持されるため⁹⁾¹⁰⁾、生存している細菌と死滅して生理的活性のない細菌を区別することができない。

最近DNAインターカレート剤であるEMA (ethidium monoazide)¹¹⁾¹²⁾¹³⁾やPMA (propidium monoazide)¹⁰⁾¹⁵⁾をリアルタイムPCR反応と組み合わせることによって、生存可能な特定細菌のみを検出する方法が提案されている。このうちEMAは、その毒性と細胞浸透能のため、生存可能な細菌の一部を検出できないことが報告されている¹⁰⁾¹⁶⁾。そこで、本研究ではPMA試薬とリアルタイムPCR法を組み合わせ、糞便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生存可能な大腸菌の計測方法を確立し、排水処理プロセスにおけるVNC状態の大腸菌の挙動について検討した。

2. 実験材料および方法

(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)を購入して実験に用いた。全菌数測定用の細菌染色剤として、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole;和光純薬)、細胞膜損傷の有無を区別する試薬として、PMA (propidium monoazide;Biotium 社)試薬を使用した。

(2) 大腸菌の培養

大腸菌を LB 液体培地を使用して一晩 37℃で振とう培養した。極少量の培養液を新しい LB 液体培地に添加してさらに数時間培養した。培養液の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(オリンパス製 BX41)で計数した。生菌数は LB 寒天培地を使用して平板培養法で計測した。培養液中の生菌数と全菌数はほぼ一致しており、培養液中の全ての大腸菌が生育活性があることを確認しながら実験を行った。大腸菌の不活化は熱処理(80℃、10 分間)によって行い、LB 寒天培地で処理液を 1 週間 20℃で平板培養してコロニーが形成されないことを確認した。

(3) PMA 処理

培養液やサンプルを 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 μM 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 GHT-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。

(4) 大腸菌の PMA 染色

大腸菌を LB 培地で培養した後、培養液の一部を熱処理(80℃、10 分間)して、PMA 試薬と DAPI 試薬で二重染色した。所定濃度に希釈した培養液に PMA 試薬(最終濃度 50 μM)を添加し、5 分間静置した後ポリカーボネイトフィルターで培養液をろ過し、DAPI 溶液(10mg/L)を添加してさらに 5 分間放置した。PMA と DAPI で二重染色した大腸菌は蛍光顕微鏡(オリンパス製、BX41)で観察し、DAPI 試薬には U 励起光(U-MW2)、PMA 試薬には B 励起光(U-MNIB2)を用いて観察した。

(5) DNA の抽出

大腸菌培養液を PMA 処理後、遠心分離して上澄み液を除去したのち、マイクロチューブに InstaGene Matrix (Bio-rad 社)を 180 μL 添加した。チューブを 56℃で 30 分間加熱し、混合後さらに 100℃で 8 分間加熱した。混合して遠心分離し、上澄み液を PCR 反応に用いた。また、

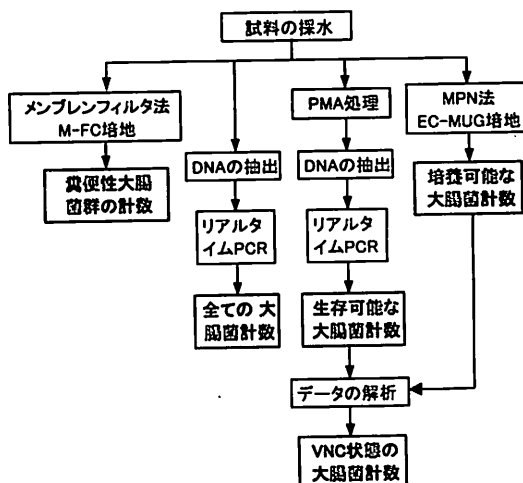


図-1 排水処理施設における大腸菌計数方法の概要
生活排水処理施設の調査ではミニビードビーダー(家田貿易 Model 3110BX, 4800rpm, 30sec)で試料を破砕し、八戸高専生活排水処理施設では FastDNA[®]SPIN for Soil Kit(MP Biomedicals 社)、青森県 T 下水処理場では DNA Isolation Kit ISOIL for Beads Beating(關ニッポンジーン)を使用して DNA を抽出した。方法は各社のプロトコルに従った。

(6) 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(反応液 25 μL)には、iQ Supermix (Bio-rad 社)を使用し、Frahm & Obst¹⁷⁾が用いたプライマーとプローブを使用して、Reverse Primer の濃度のみ 300(nM)に変更した。温度条件は、95℃で 10 分間熱変性させた後、(95℃:45s, 60℃:1min)のサイクルを 40 回繰り返し返した。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。

(7) 排水処理施設の調査

八戸高専生活排水処理施設(長時間エアレーション法、処理流量 330 m³/日;採水日 2010 年 8 月 4 日, 12 月 21 日)と青森県 T 下水処理場(標準活性汚泥法、処理流量 50,000m³/日;採水日 2010 年 10 月 29 日, 11 月 15 日, 12 月 6 日)の流入水、曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水をグラブ採水して大腸菌および糞便性大腸菌群の計数を行った。計数方法の概要を図-1 に示した。大腸菌と糞便性大腸菌群の計数は、それぞれ EC-MUG 培地(Difco)による MPN 法^{10) 11)}と M-FC 培地(Difco)によるメンブレンフィルター法で行った¹⁰⁾。また、死滅した大腸菌を含むすべての大腸菌はリアルタイム PCR 法で、培養可能な大

腸菌と VNC 状態の大腸菌を含む生存可能な大腸菌は、PMA 処理とリアルタイム PCR 法を組み合わせた PMA-PCR 法によってそれぞれ計数した。培養可能な大腸菌は MPN 法で検出されるので、本研究では PMA-PCR 法と MPN 法で検出された大腸菌の差が VNC 状態の大腸菌を表すことになる。この時最終沈殿池流出水と処理水については、遠心分離機(トミー精工 CAX-370, 20000×G, 30 分間)を使用して 100~200 倍に濃縮し PCR, PMA-PCR 処理を行った。

3. 結果と考察

(1) 大腸菌 DNA 定量実験

購入した大腸菌株を用いて、リアルタイム PCR 反応で大腸菌が計数できるか先ず検討した。図2に大腸菌の生菌数と DNA 増幅が検出された閾値サイクル数 C(t) の関係を示した。大腸菌の生菌数が $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ (cfu/PCR 反応液) となるように調整して、リアルタイム PCR 反応を行った。生菌数が 1×10^0 (cfu/PCR 反応液) の場合は検出できなかったため、検出限界だと考えられる。検量線の傾きから以下の式で DNA の増幅効率(E)が求められる³⁹⁾。

$$\text{増幅効率}(E) = 10^{\frac{-1}{\text{傾き}}}, \% \text{効率} = (E - 1) \times 100$$

理想的な PCR 反応では各サイクルでコピー数が 2 倍となり、これは増幅効率が 2 であることに相当する。パーセンテージで表わすと 100% となり、増幅効率が 100% に近いほど精度が高くなることを意味する。図-2 より本実験では、増幅効率(E)=2.069, %効率=106.9%, 決定係数 $R^2=0.9930$ という結果が得られた。大腸菌の *uidA* 遺伝子を利用して大腸菌量を定量している Frahm & Obst¹⁷⁾ の実験では検量線の傾きが -3.6, 決定係数 $R^2=0.99$ となっており、これより増幅効率を算出すると、増幅効率(E)=1.9, %効率=90% となる。彼らが使用した大腸菌は本実験とは異なるが、本実験の方が増幅効率は 100% に近く、またデータの変動も少なく精度の高い値が得られ

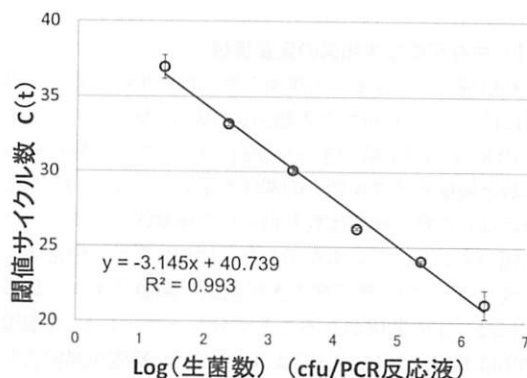


図-2 大腸菌生菌数と閾値サイクル数の関係



写真-1 熱処理した大腸菌体
(U 励起光を照射した場合)

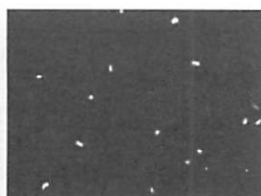


写真-2 熱処理した大腸菌体
(B 励起光を照射した場合)

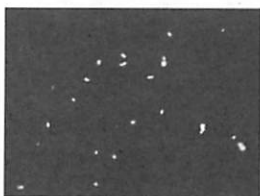


写真-3 無処理菌体と熱処理
菌体の等量混合
(U 励起光を照射した場合)



写真-4 無処理菌体と熱処理
菌体の等量混合
(B 励起光を照射した場合)

た。

大腸菌の *uidA* 遺伝子は、1 つの細胞当りの遺伝子コピー数は 1 なので、得られた検量線を用いることで閾値サイクル数から菌数を求めることができ、特定酵素基質培地法では 24 時間の培養が必要であるが、リアルタイム PCR 反応では数時間で菌数が決定できる。

(2) PMA 染色実験

PMA 試薬は細胞膜が正常である生存可能な細菌では細胞内に浸透することができず、DNA と反応できない。しかし、細胞膜が破損している細菌では細胞内に浸透し、ハロゲン光を照射することで DNA と光化学的に反応してインターカレートする。そのため PMA と結合した DNA は PCR 反応によって増幅することができない。これにより PMA 試薬と PCR 反応を組み合わせることで、生存可能な細菌と死滅した細菌を区別することができる¹⁰⁾。

PMA 試薬が細胞膜損傷を受けた死滅した菌体のみに浸透するか確認するため、培養した大腸菌を熱処理して無処理の大腸菌と混合し、PMA と DAPI 試薬による二重染色を行い、無処理の生存可能な大腸菌と熱処理した大腸菌を区別できるかを検討した。写真-1, 2 には 80°C, 10 分間熱処理した大腸菌を二重染色し、蛍光顕微鏡で観察して示した。DAPI 試薬は U 励起光を照射することで青白い蛍光を発し、PMA 試薬は B 励起光を照射することで赤色蛍光を発する。熱処理した大腸菌は DAPI でも PMA でも二重に染色されていることが分かる。次に、無処理菌体と熱処理菌体を等量混合したサンプルを二重染色して写真-3, 4 に示した。DAPI 試薬で青白く発光した大腸菌のうち半数の菌体が PMA によって染色されており、生存可能な大腸菌と区別できている。また、写真には示していないが無処理の生存可能な大腸菌を二重染色した結

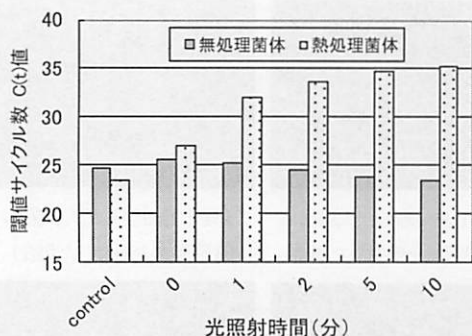


図-3 照射時間と閾値サイクル数の関係

果, PMA 試薬で赤色蛍光を発する大腸菌は全く観察できず DAPI 試薬のみ発光した。従って PMA 試薬は細胞膜を破損した死滅大腸菌のみを染色し, 生存可能な大腸菌と分別できることが確認できた。

(3) 大腸菌の PMA 処理実験

PMA 試薬の死滅した細菌に対する効果が確認できたので, 次に大腸菌培養液を用いて, リアルタイム PCR 反応に対する PMA 処理の効果について検討した。熱処理した大腸菌の菌体と無処理菌体に PMA を添加し, ハロゲン光を照射後 DNA を抽出しリアルタイム PCR を行った。図-3 にハロゲン光の照射時間と閾値サイクル数の関係を示した。熱処理菌体におけるサイクル数は照射時間 0 分では, PMA 無添加のコントロールとほとんど変わらなかったが, 照射時間 1 分から大きく増加し, 5 分ではほぼ一定となった。一方無処理の菌体では, 照射時間 10 分まで閾値サイクル数はほぼ一定の値を示している。このように生存可能な無処理菌体では PMA の効果は認められないが, 死滅した熱処理菌体では 5 分間以上の照射時間で PMA の効果が増大し, 閾値サイクル数が最大となった。

表-1 混合実験における無処理菌体と熱処理菌体の混合割合

実験番号	I	II	III	IV	V	VI
無処理菌体液量 (μL)	1000	500	100	10	1	0
熱処理菌体液量 (μL)	0	500	900	990	999	1000

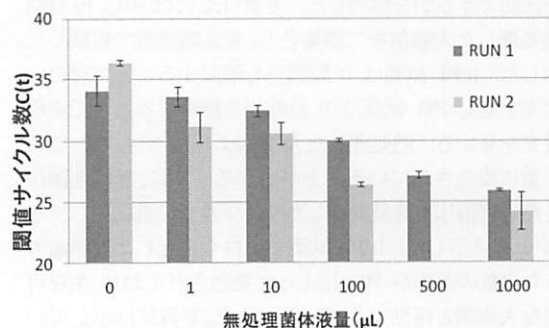


図-4 無処理菌体と熱処理菌体の混合実験の結果

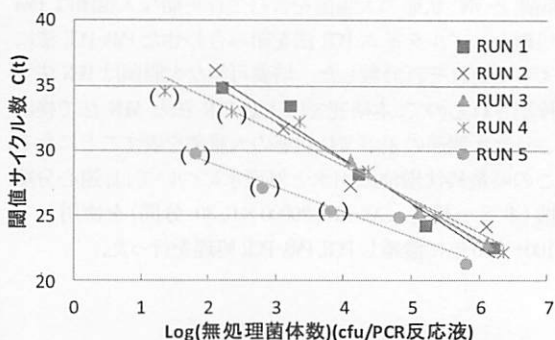


図-5 PMA-PCR 反応による生存可能な大腸菌の定量実験結果

表-2 検量線の増幅効率と%効率

	熱処理菌体数 (cfu/tube)	数式	決定係数 R^2	増幅効率 E	%効率
RUN 1	0	$y = -3.395x + 42.95$	0.9667	1.927	92.7
RUN 2	1.15×10^{-1}	$y = -3.027x + 41.38$	0.9357	2.038	103.8
RUN 3	1.17×10^2	$y = -3.161x + 41.94$	0.9786	2.040	104.0
RUN 4	2.05×10^2	$y = -2.571x + 39.14$	0.9590	2.359	135.9
RUN 5	6.00×10^4	$y = -1.912x + 32.94$	0.9530	2.813	181.3

(4) 混合実験

次に熱処理した大腸菌菌体液と無処理の大腸菌液を表-1 のように混合して PMA 処理を行い, リアルタイム PCR によって無処理の生存可能な大腸菌のみを検出できるか検討した。実験は 2 回行い, 図-4 に添加した無処理菌体液量と閾値サイクル数の関係を示した。RUN1, RUN2 ともに無処理菌体液量が増加するにつれて, 閾値サイクル数が顕著に減少する傾向が認められた。しかし熱処理菌体のみの実験 (VI) でも DNA の増幅が認められ, 閾値サイクル数が検出された。無処理菌体のみの実験 (I) と熱処理菌体のみの実験 (VI) とのサイクル数の差が大きく生じているため, 生存可能な大腸菌と死滅した大腸菌を区別して定量するには十分であると考えられる。実験番号 (I) と実験番号 (VI) との閾値サイクル数の差は, RUN1 で 8.13 サイクル, RUN 2 で 12.2 サイクルとなり, Nogva ら¹¹⁾ や Rudi ら¹²⁾ が EPA 試薬を用いて行った実験結果を大きく上回り, Nocker ら¹⁰⁾ が病原性大腸菌 O157:H7 を PMA 試薬で処理した場合とほぼ匹敵する差が得られた。

(5) 生存可能な大腸菌の定量実験

熱処理した一定量の大腸菌を無処理の生存可能な大腸菌に添加し, 生存可能な大腸菌が PMA 試薬とリアルタイム PCR 反応で定量できるか検討した。図-5 に無処理菌体数と閾値サイクル数との関係を示した。また, 表-2 には添加した熱処理菌体数と得られた検量線から決定した増幅効率および%効率を示した。添加した熱処理菌体数を変化させても, 無処理の大腸菌数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, 増幅効率は RUN1, 2, 3 については 100% に近く精度が高いことが分かるが, RUN4, 5 は増幅効率が 100% を大きく離れて

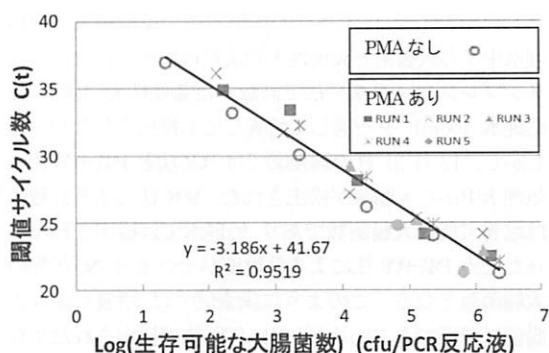


図-6 生存可能な大腸菌の検量線

いる。また、RUN4, 5 は途中から傾きが変化しており、図-5 中の () で示した熱処理菌体数が無処理の大腸菌数の 10 倍以上のデータから変化している。これらのデータを除外すると、RUN4 は傾き (-3.370), 増幅効率 E=97.4%, RUN5 は傾き (-3.316), 増幅効率 E=93.2% となり、RUN1~RUN5 までの全ての検量線がほぼ重なった。

RUN1~RUN5 のデータの一つにまとめ、検量線を描くと、傾き (-3.316), 増幅効率 E=100.3% となり、図-2 に示した PMA 処理なしの場合の検量線とほぼ重なることが分かる。Pan & Breidt¹⁵⁾ は、PMA 試薬とリアルタイム PCR を組み合わせて生存可能な病原菌 *Listeria monocytogenes* の定量を試み、死滅した菌数が生存可能な菌数の 1 万倍以上になると検量線の線形性が失われることを示した。本研究では熱処理菌体数が生存可能な無処理の大腸菌数の 10 倍以上になると検量線の傾きが変化し、彼らの研究より適用範囲がかなり限定される。そこで図-6 には、図-2 と図-5 のデータの一つにまとめて示し、検量線を描いた。白抜きマーカー (○) で示した点は、図-2 に示した PMA 試薬を用いないで PCR 反応を行った場合である。検量線の傾き (-3.186), 増幅効率 E は 106.0% となった。図-2 と図-5 の検量線がほぼ重なったことから、PMA 試薬とリアルタイム PCR 反応を組み合わせることにより、死滅した大腸菌が大量に存在しても生存可能な大腸菌のみを定量できることが実証された。

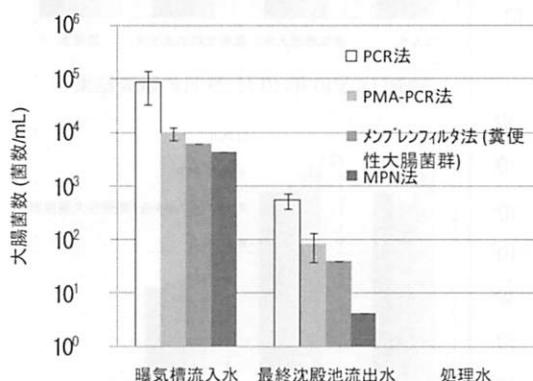
(6) 排水処理施設調査

a) 八戸高専生活排水処理施設

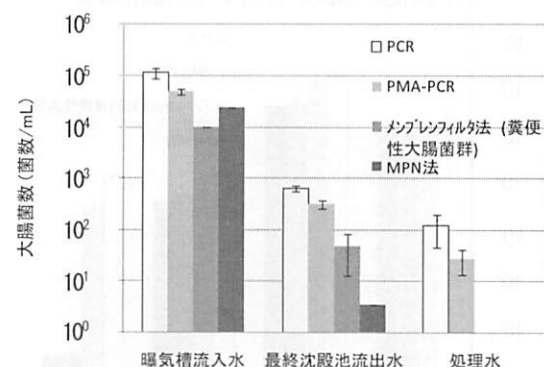
図-6 で得られた検量線を使用して、八戸高専生活排水処理施設の調査を 2 回行い、図-7 に PCR 法、PMA-PCR 法、MPN 法、メンブレンフィルター法によって計数した曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水の大腸菌と糞便性大腸菌群の計数結果をそれぞれ示した。図-1 に示したように、PCR 法では死滅した大腸菌を含むすべての大腸菌が検出され、PMA 処理と組み合わせた PMA-PCR 法では、培養可能な大腸菌と VNC 状態の大腸菌を含む生存可能な大腸菌が検出される。また培養可能な大腸菌、糞便性大

腸菌群はそれぞれ MPN 法とメンブレンフィルター法で検出される。MPN 法で大腸菌の特異的検出に使用される EC-MUG 培地は、大腸菌に特有の β -グルクロニダーゼ酵素の反応を利用しており、また PCR 反応ではこの酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとしている。従って MPN 法と PCR 法で計数対象としている大腸菌は同一の種と考えられ、本研究では PMA-PCR 法と MPN 法で検出された大腸菌の差が VNC 状態の大腸菌を表すことになる。

今まで排水処理分野では、排水基準などの指標に大腸菌群を用いていることもあり、MUG など特定基質法による大腸菌の計数はほとんど実績がなく、本研究では大腸菌群より厳しく糞便汚染を特定できる糞便性大腸菌群数を測定し、特定基質法による大腸菌の計数値と比較して大腸菌数を検証した。培養可能な大腸菌数と糞便性大腸菌群数は、曝気槽流入水ではほぼ一致していたが、最終沈殿池流出水では少し差が見られた。2 回の調査とも、MPN 法を除くいずれの計数方法でも最終沈殿池までのプロセスで約 2 オーダー大腸菌、糞便性大腸菌群が減少し、MPN 法で測定した培養可能な大腸菌はさらに 3~4 オーダー減少した。曝気槽流入水、最終沈殿池流出水と



a) 調査①:2010 年 8 月 4 日の調査結果



b) 調査②:2010 年 12 月 21 日の調査結果

図-7 八戸高専生活排水処理施設の大腸菌数

もに、PMA-PCR 法による大腸菌の計数値は、MPN 法で計数した培養可能な大腸菌の菌数と PCR 反応で検出された死滅した大腸菌を含むすべての大腸菌数の中間に位置し、VNC 状態の大腸菌は培養可能な大腸菌の 1.1~87 倍存在することが分かった。また PCR 法の計数値は PMA-PCR 法の値の 10 倍以内で、図-6 に示した生存可能な大腸菌の定量範囲内だった。

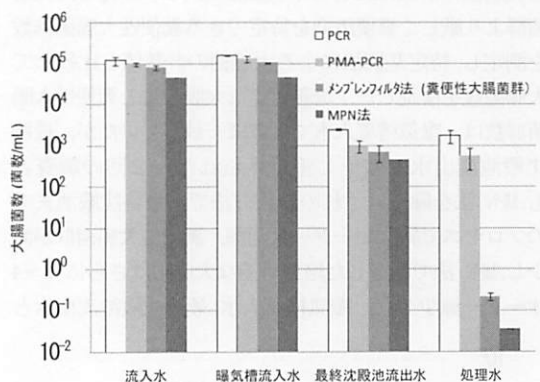
八戸高専排水処理施設では消毒槽への固形塩素剤の添加によって塩素消毒が行われ、残留塩素濃度 0.3mg/L 以上を保つように管理されている。8月4日にサンプリン

グした調査①では、すべての検出方法で塩素消毒後の処理水中から大腸菌と糞便性大腸菌群は検出されなかった。メンブレンフィルター法で計数した糞便性大腸菌群は、処理水 100mL をろ過して培養しても検出されなかった。しかし、12月21日の調査②では PCR 法と PMA-PCR 法で処理水中から大腸菌が検出された。MPN 法による計数値は培養可能な大腸菌数であり、処理水では検出されなかったため、PMA-PCR 法による計数値がそのまま VNC 状態の大腸菌数となる。このように調査②では、培養可能な大腸菌は消毒できているが、PMA-PCR 法で検出された生存可能な大腸菌は 91%減少するに留まった。

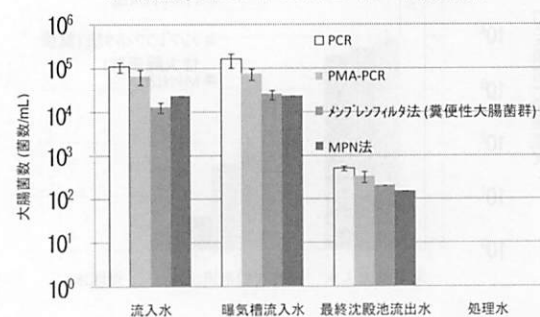
b) 青森県 T 下水処理場

青森県 T 下水処理場では3回調査を行い、図-8 にその結果を示した。3回の調査全てで流入水と曝気槽流入水はほとんど差がなく、大腸菌数は $1 \times 10^4 \sim 10^5$ (菌数/mL) 程度であった。12月6日に実施した調査③では、流入水よりも曝気槽流入水の方が大腸菌濃度が少し高くなった。八戸高専生活排水処理施設と同様に、MPN 法を含むすべての計数法で3回の調査とも大腸菌数、糞便性大腸菌群数は曝気槽と最終沈殿池でほぼ2オーダー減少した。また MPN 法とメンブレンフィルター法で検出された大腸菌数と糞便性大腸菌群数は、ほぼ一致していた。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、すべて 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 状態の大腸菌は培養可能な大腸菌の 0.27~2.2 倍存在することが分かった。T 処理場でも PCR 法の計数値は PMA-PCR 法の 10 倍以内であった。

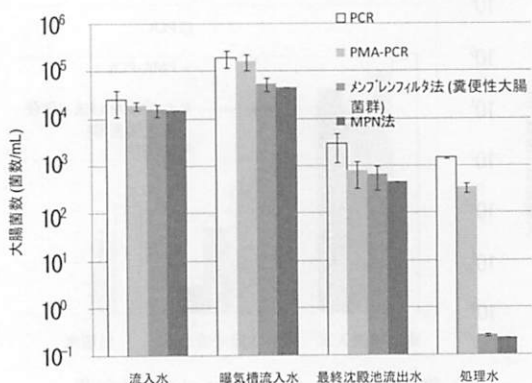
処理水は八戸高専生活排水処理施設と異なり、調査①と調査③でメンブレンフィルター法と MPN 法で糞便性大腸菌群と大腸菌がそれぞれ検出された。一方調査②ではすべての検出方法で糞便性大腸菌群、大腸菌は検出されず、塩素消毒の効果は採水日によって大きく異なっていた。T 下水処理場は、次亜塩素酸ソーダの注入率は 2mg/L で、塩素混和池の滞留時間は採水期間中 2.1~2.5 (hr) であった。MPN 法の計数値から培養可能な大腸菌数は、調査①と③とも塩素処理によりゼロに近い値まで減少しているが、VNC 状態の大腸菌を含む生存可能な大腸菌数である PMA-PCR 法の計数値は最終沈殿池流出水と比べてほとんど変化がなかった。また、死滅した大腸菌を含む PCR 法で計数されたすべての大腸菌数も最終沈殿池流出水と比べてほとんど変化がなかった。以上の調査結果より、八戸高専生活排水処理施設の調査と同様に、塩素消毒は培養可能な大腸菌と比べて VNC 状態の大腸菌には不活化効果が非常に低いと考えられる。しかし八戸高専生活排水処理施設、青森県 T 下水処理場ともに排水基準（大



a) 調査①:2010年10月29日の調査結果



b) 調査②:2010年11月15日の調査結果



c) 調査③:2010年12月6日の調査結果

図-8 青森県 T 下水処理場の大腸菌数

腸菌群数 3,000 個/mL) は何れの検出法でも超過したことはなかった。

遺伝子レベルの分子生物学的手法を用いた水環境中の病原菌の計数は、過大評価につながるのではないかと懸念されており⁸⁾、下水処理場の *Enterococcus* 属細菌をリアルタイム PCR 法とメンブレンフィルター法で計数した He & Jiang⁹⁾ の研究では、最初沈殿池流入水、曝気槽流入水と最終沈殿池流出水では両者はほぼ一致したが、塩素処理後の流出水では、メンブレンフィルター法では *Enterococcus* 属が検出できなかったのに対し、リアルタイム PCR 法では、 1×10^5 (copies/100mL) であった。彼らは塩素処理された処理場流出水におけるリアルタイム PCR とメンブレンフィルター法の計数値の不一致は、塩素消毒では細菌細胞の不活化はされるが、DNA は完全に破壊されないためだとし、また塩素処理によって VNC 状態に入った可能性も示唆している。本研究結果は彼らのデータとよく一致しており、メンブレンフィルター法や MPN 法で検出できなかった大腸菌の大部分が完全に不活化されたわけではなく、VNC 状態、少なくとも細胞膜は破損していない状態で存在している場合が多いことを初めて示した。

沢谷ら²¹⁾ は、直接蛍光顕微鏡下で生理的活性のある細菌を計測できる 4 つの方法を用いて大腸菌の塩素消毒実験を行い、生理的活性のある大腸菌の方が培養可能な菌より塩素消毒に対する抵抗性が強く、不活性化速度定数は 4 つの方法とも培養法の 1/2 以下であったことを報告している。本研究でもメンブレンフィルター法や MPN 法で検出された培養可能な大腸菌は、塩素消毒で検出できなくなったり、大幅に減少したが、PMA-PCR 法で検出された VNC 状態を含む生存可能な大腸菌に対する塩素消毒効果は著しく低かった。塩素剤は、糖代謝で重要な役割を果たす SH 酵素の作用を阻害することが知られ、その他細胞壁、細胞膜など細胞構造の破壊とそれに伴う細胞透過性の阻害や他の代謝酵素との反応、毒性物質の生成などで消毒効果を現す²²⁾。排水処理施設の運転状況によって塩素消毒効果は異なるが、8 月 4 日に採水した八戸高専生活排水処理施設の調査結果では何れの計数方法でも大腸菌は検出できず、夏休みのため処理量が通常時の 1/4 程度に減少し塩素消毒槽の滞留時間が長く確保され、塩素が最終的には核酸にも作用しリアルタイム PCR 法でも大腸菌が検出されなくなったと考えられる。これらの結果から、塩素は培養不能 (増殖停止) → 細胞膜破壊 → 核酸の損傷の順に大腸菌に作用すると考えられる。

4. 結論

大腸菌に特異的な塩基配列を用いてリアルタイム PCR 反応を行うことで大腸菌の菌数を迅速に定量することができた。PMA 試薬は熱処理した大腸菌と無処理の生存可能な大腸菌を区別し、死滅した大腸菌のみを染色することを確認した。生存可能な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無処理で生存可能な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。しかし、熱処理菌体数が生存可能な大腸菌数の 10 倍以上になると検量線の傾きが変化することが分かった。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 T 下水処理場の調査を行ったところ、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 法で計数した培養可能な大腸菌の菌数と PCR 反応で検出された死滅した大腸菌を含むすべての大腸菌数の中間に位置し、VNC 状態の大腸菌が培養可能な大腸菌の 0.27~87 倍存在することが分かった。また、八戸高専生活排水処理施設、T 下水処理場ともに、塩素消毒前である最終沈殿池流出水と塩素消毒後の処理水で、培養可能な大腸菌数の大幅な減少は確認できたが、VNC 状態を含む生存可能な大腸菌数では大幅な減少が見られない場合が多く、塩素消毒は VNC 状態の大腸菌には不活化効果が低いと考えられる。

謝辞：本研究を進めるに当たり、八戸高専建設環境工学科の学生、中山雄介君、類家翔君、池田義嗣君、工藤栄一君、東森教嗣君並びに山本瑛祐君 (当時) にご協力いただきました。また本研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究 C (課題番号 19560555) の支援を得て行われました。ここに記して深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Roszak D. B. and Colwell R. R. : Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Review*, Vol.51, pp 365-379, 1987.
- 2) 木暮一啓：生きてはいけるが培養できない病原細菌に挑む，科学，Vol. 69, No. 6, pp508-516, 1999.
- 3) 木暮一啓：環境を支配している培養できない細菌群：バイオサイエンスとインダストリー，Vol. 57, No. 11, pp731-736, 1999.
- 4) 沢谷圭介，金子伸一郎，矢口淳一：水環境中における VNC 状態の細菌の挙動について，環境工学論文集，Vol. 43, pp. 551-558, 2006.
- 5) Haugland R.A., Siefing S.C., Wymer L.J., Brenner K.P. and Dufour A.P. : Comparison of *Enterococcus* measurements in fresh water at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis, *Wat. Res.*, Vol.39, pp.559-568, 2005.
- 6) He J. and Jiang S. : Quantification of *Enterococci* and human adenovirus-

- es in environmental samples by real-time PCR, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 71, pp.2250-2255, 2005.
- 7) Vliegen I, Jacobs J.A, Beuken E, Bruggeman C.A. and Vink C.: Rapid identification of bacteria by real-time amplification and sequencing of the 16S rRNA gene, *J. Microbiol. Methods*, Vol.66, pp.156-164, 2006.
- 8) Girones R, Ferrus M. A., Alonso J. L., Rodriguez-Manzano J., Calgua B., Correa A., Hureda A., Camataia A. and Bofill-Mas S.: Molecular detection of pathogens in water -The pros and cons of molecular techniques, *Wat. Res.*, Vol.44, pp.4325-4339, 2010.
- 9) Josephson K.L., Gerba C.P. and Pepper I.L.: Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.59, pp.3513-3515, 1993.
- 10) Sheridan G.E.C., Szabo E.A. and Mackey B.M.: Effect of post-treatment holding conditions on detection of tufA mRNA in ethanol-treated *Escherichia coli*: implications for RT-PCR-based indirect viability tests, *Letters in Applied Microbiology*, Vol.29, pp.375-379, 1999.
- 11) Nogva H.K., Dromtorp S.M., Nissen H. and Rudi K.: Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria, *BioTechniques*, Vol.34, pp.804-813, 2003.
- 12) Rudi K., Moen B., Dromtorp S.M. and Holck A.L.: Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples, *Appl Environ Microbiol*, Vol.71, pp.1018-1024, 2005.
- 13) Inoue D, Tsutsui Y., Yamazaki Y., Sei K., Soda S., Fujita M. and Ike M.: Application of real-time polymerase chain reaction (PCR) coupled with ethidium monoazide treatment for selective quantification of viable bacteria in aquatic environment: *Wat.Sci.Technol.*, Vol.58, pp.1107-1112, 2008.
- 14) Nocker, A., Cheung C.Y. and Camper A.K.: Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells, *J. Microbiol. Methods*, Vol.67, pp.310-320, 2006.
- 15) Pan Y. and Breidt Jr., F.: Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells, *Appl Environ Microbiol*, Vol.73, pp.8028-8031, 2007.
- 16) Flekna G., Stefanic P., Wagner M., Smulders F.J.M., Mozina S.S. and Hein L.: Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR, *Res. Microbiol.*, Vol.158, pp.405-412, 2007.
- 17) Frahm E. and Obst U.: Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples, *J. Microbiol. Methods*, Vol.52, pp.123-131, 2003.
- 18) Becton, Dickinson and Company: Difo™ & BBL™ Manual, EC Medium with MUG, pp.201-202, 2009. (http://www.bd.com/ds/technical-Center/miso/difocobblmanual_2nded_lowres.pdf)
- 19) 日本下水道協会: 下水試験方法 上巻, 1997 年版, pp. 719-724, 1997.
- 20) 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 ライフサイエンス事業本部: アプリケーションガイド Real-Time PCR, pp. 6-10, 2007.
- 21) 沢谷圭介, 金子伸一郎, 矢口淳一: VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果, 第 45 回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 148-150, 2008.
- 22) 金子光美: 水質衛生学, pp. 258-261, 技報堂出版, 1996.

(2011. 5. 30受付)

Quantification of Viable *Escherichia coli* in Water Environment by Real-time PCR with Propidium Monoazide Naotaka YOKOMACHI¹ and Junichi YAGUCHI^{2*}

¹Advanced Course of Environmental and Civil Engineering, Hachinohe National College of Technology

²Department of Environmental and Civil Engineering, Hachinohe National College of Technology

A combination of PMA (propidium monoazide) and real-time PCR was developed to enumerate viable *Escherichia coli* in the presence of dead cells. Mixtures of viable cells and heat-treated cells were subjected to real-time PCR with PMA treatment. Condition of 50 μM PMA and a 5-min light exposure excluded DNA from heat-treated cells. Viable cell counts were linearly related to real-time PCR threshold cycle values for PMA-treated cells in the mixtures of viable and heat-treated cells, as long as the ratio of dead cells to viable cells was no greater than 1×10^1 . In the wastewater treatment plants, total, viable and culturable *E. coli* were enumerated by real-time PCR, real-time PCR coupled with PMA treatment and MPN method using EC-MUG medium, respectively. The concentrations of viable *E. coli* cells in the wastewater treatment plants were much higher than those of culturable cells. In addition, they were even more chlorine resistant than culturable cells.