

B-11 損傷を受けた毒素原性大腸菌の検出

麻布大学環境保健学部 ○土佐光司, 平田強, 田口勝久

1. はじめに

水中の細菌は常に種々のストレスにさらされており、このため、種々の損傷を受ける。損傷を受けた細菌は正常な増殖能力を喪失する。例えば、選択培地中で増殖できなくなる例が知られている。損傷を受けた細菌は適当な環境に恵まれれば元の状態を回復し増殖能を再獲得する。従って、損傷を受けた水中の病原細菌の検出は公衆衛生上重要な課題である。近年、このような損傷を受けた病原細菌の検出方法についての検討がなされているが、最適な検出条件については必ずしも明確ではない。

我々は、水中の毒素原性大腸菌が特にストレスを受けなかった場合及びクロラミンとの接触により損傷を受けた場合について、培地、希釈水及びプレーティング方法が計数値に及ぼす影響を実験的に検討し、若干の知見を得たのでここに報告する。

2. 実験方法

2. 1 細菌試験

供試菌株は耐熱性エンテロトキシンを産生する毒素原性大腸菌（血清型O168）でデンカ生研（株）から分与された。供試菌株は標準寒天培地で24時間培養後、60mMリン酸緩衝希釈水に懸濁し、供試菌液とした。供試菌液は0, 0.6, 6及び60mMリン酸緩衝液希釈水でそれぞれ希釈した。希釈菌液中の生菌数は標準寒天培地, 0.1%デソキシコール酸ナトリウム添加標準寒天培地（以下、SPC-D培地と表記）、デソキシコール酸塩寒天培地（以下、デソ培地と表記）、トリプティックソイ寒天培地（以下TSA培地と表記）及び0.1%デソキシコール酸ナトリウム添加TSA培地（以下、TSA-D培地と表記）を用いて、塗抹法及び混釈法により36℃で48時間培養し、培地上に形成された集落数を計数した。

2. 2 クロラミンと毒素原性大腸菌の接触

クロラミン溶液は次亜塩素酸ナトリウム溶液と硫酸アンモニウム溶液を遊離塩素と窒素の重量比が3:1となるように混合して調製した。供試菌株は36℃で24時間培養し、6mMリン酸緩衝希釈水に懸濁させた。これを恒温水槽中で20℃に保った褐色三角フラスコに1.0⁵cfu/mLとなるように注入し、スクレーパーで緩やかに攪拌し、供試菌液とした。供試菌液にクロラミン溶液を注入し、経時的に菌液を採取した。採取した菌液はチオ硫酸ナトリウム溶液を加えて残留塩素を中和した後、6mMリン酸緩衝希釈水で希釈し、培地に塗抹、36℃で48時間培養後、集落数を計数した。クロラミン及び遊離塩素濃度はオルトリジン法で測定した。

3. 結果と考察

3. 1 消毒剤と未接触の毒素原性大腸菌の検出

60mMリン酸緩衝希釈水で希釈し、TSA培地塗抹法で培養したものは試験した他のどの方法よりも大きな集落数が得られた。そこで、本研究では、次式のように回収率を定義する。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{各方法で得られた集落数}}{\text{TSA培地塗抹法 (希釈水濃度=60mM) で得られた集落数}} \times 100$$

塗抹法の回収率を図1に、また、混釈法の回収率を図2に示した。

デソ培地はすべての希釈水で他のどの方法よりも回収率が悪く、強い増殖阻害効果を示した。

TSA-D培地は、希釈水が高濃度の場合はTSA培地や標準寒天培地と同様に高い回収率であるが、希釈水濃度が低いと回収率は大きく低下した。これに対してTSA培地は多くの希釈水で最高の回収率である。従ってTSA培地は低濃度の希釈水で浸透圧ショックを受けた毒素原性大腸菌に対するデソキシコール酸ナトリウムの増殖阻害効果を緩和する能力が低いことが示された。

SPC-D培地は、高濃度の希釈水ではTSA-D寒天培地と比較して低い回収率を示したが、低濃度の希釈水でも、TSA-D培地やデソ培地ほどの回収率低下を示さず、安定した結果を示した。

全ての場合で塗抹法の回収率はその他の条件が同じである混釈法の回収率を上回った。しかし、これが熱ショックによるものか、あるいはその他の理由によるものかは不明である。

薄い希釈水での希釈は細菌に浸透圧ショックを与えるため、デソキシコール酸塩のような増殖を阻害する物質の存在下では、細菌の回収率に影響するということは既に報告がある^{1),2)}。しかし、本研究の実験結果では、特に阻害剤を加えていない培地での回収率に大きく影響することが示されている。

3. 2 クロラミンとの接触による損傷

損傷率を次のように定義する。

$$\text{損傷率 (\%)} = \frac{\text{非選択培地上的集落数} - \text{選択培地上的集落数}}{\text{非選択培地上的集落数}} \times 100$$

選択培地は、既述のとおり、それぞれの非選択培地に0.1%のデソキシコール酸ナトリウムを添加して調製した。

実験結果を図3に示す。

TSA培地で増菌し、0.54mgCl₂/Lのクロラミンと接触したものは、SPCとTSAで損傷率の初期値が大きく異なる。TSAでは損傷率が低いのにに対して、SPCでは損傷率は高い。TSAでは接触に伴い損傷率の増加がみられ、ほぼ一定となるのに対して、SPCでは若干の変動が認められるものの、TSAのような顕著な増加は示していない。

TSA培地で増菌し、0.38mgCl₂/Lのクロラミンと接触したもの、同様に、SPCの初期損傷率はTSAより大きい。TSAでは接触時間の増加に伴い損傷率の増加がみられ、ほぼ一定となった後、再び緩やかな減少がみられる。この傾向はSPCでも同様である。

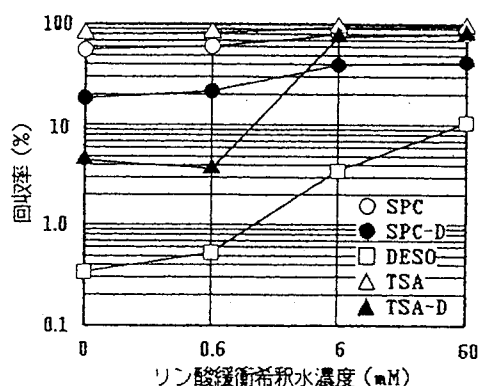


図1 塗抹法の回収率

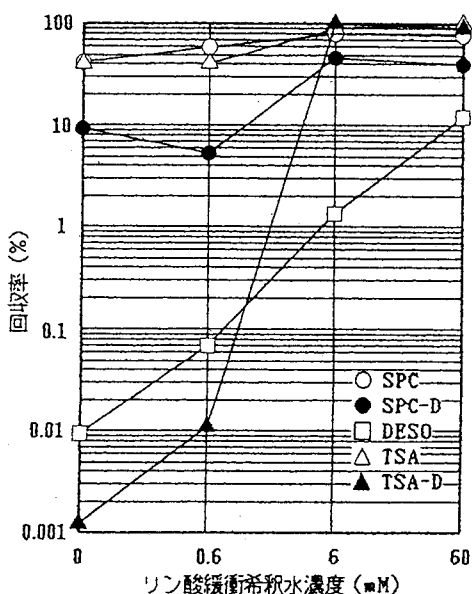


図2 混釈法の回収率

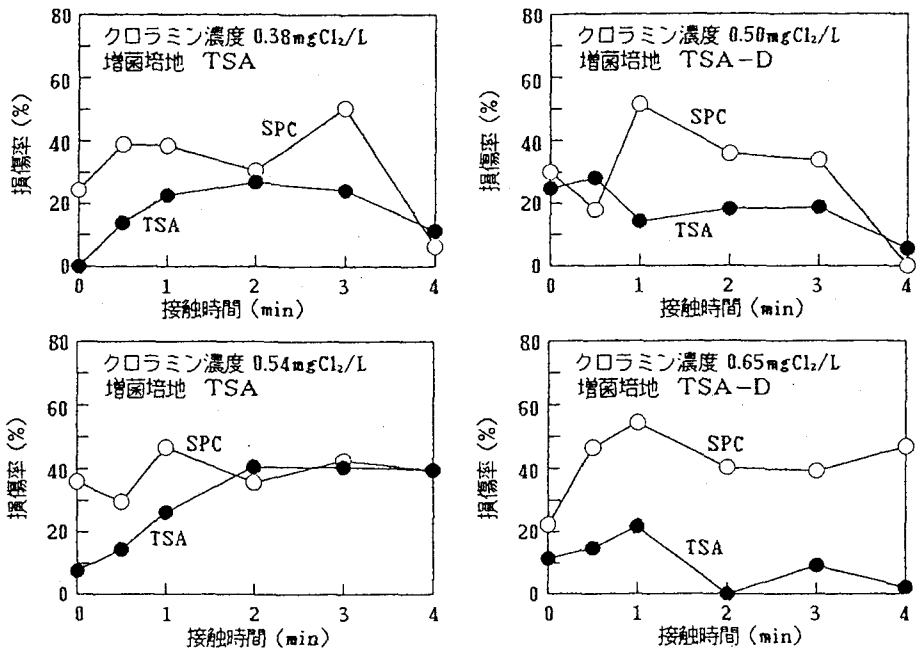


図3 損傷率の経時変化

TSA-D培地で増菌し、0.50mgCl₂/Lのクロラミンと接触したものは、TSA培地での損傷率は時間とともに減少し、ほぼ0となった。SPCでの損傷率は一時的に増加したが、その後はTSAの場合と同様に減少し、やはり、ほぼ0となった。また、損傷率の初期値はSPCとTSAで同程度の値を示した。

TSA-D培地で増菌し、0.65mgCl₂/Lのクロラミンと接触したのも、TSA培地での損傷率は時間とともに減少し、ほぼ0となった。これに対して、SPCでの損傷率は時間とともに増加し、その後は一定の値となった。

増菌培地にかかわらず、クロラミン濃度の低い実験条件では、損傷率が一時的に増加しても、その後、損傷率の減少を示している。オルトトリジン法による残留塩素濃度の測定値は一定であったが、クロラミンは細菌細胞と反応し、クロラミンとは異なる形態の結合塩素となっていたとも考えられ、損傷率の進行が進まなかった可能性が考えられる。

4. まとめ

毒素原性大腸菌の検出について特に損傷を考慮して検討した結果以下のような知見が得られた。

- (1) 特に損傷を与えていない細菌細胞も、公定法で採用されている濃度の希釈水で希釈されることにより、浸透圧による損傷を受け、選択培地中での増殖能力を喪失するものがある。
- (2) クロラミンとの接触により生じる損傷は増菌培地や接触したクロラミン濃度によって異なる。

<参考文献>

- 1) MacFeter, G. A. *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, 43, No.1, 97-103
- 2) 住友 他, 第42回全国水道研究発表会講演集, 581-583