

B-14 不活化した大腸菌の損傷に関する研究

お茶の水女子大学大学院人間文化研究科 ○窪華奈子・大瀧雅寛

1. はじめに

環境中には、悪条件や人工的な抗生物質にさらされることで損傷した細菌が存在する。これらの損傷した細菌は通常用いられる培地および培養条件では検出できない可能性があることが報告されている。さらに、自然系内の微生物には各々が環境中のストレスに応答するため、“無傷”、“様々な程度の損傷”“不可逆的(回復可能性の無い)損傷”の3つの状態が存在すると指摘されている¹⁾。

現在、塩素消毒だけでなく様々な消毒方法が検討されている。もし、病原細菌に対する消毒による損傷が、回復しうるような可逆的な損傷であった場合、危険が残る可能性がある。また新たな消毒方法の導入あるいは既存の消毒方法を考える際に、それらの消毒方法の効果、原理、特徴の違いによって、細菌への損傷程度の測定法への反映のされ方も異なると考えられる。本研究では2種の消毒処理により不活化された大腸菌の損傷程度と測定方法毎による差異と調べることによって、損傷程度の特徴を捉えることを目的とした。

2. 実験方法

2. 1 不活化処理

モデル微生物には *E. Coli* K 12(NBRC3301)を使用し、平面培地で37℃で24時間培養して形成された大腸菌コロニーを釣菌し、リン酸緩衝液に溶解させて使用した。

(1) 紫外線照射処理

初期条件は、大腸菌濃度が約 10^6 CFU/ml とした。濁質有り(落合水再生センターの一次処理水を使用)と無し(ろ過水)の条件を設定した。濁質有りの場合は、濁度は約240 NTU~260 NTU、吸光度(波長254 nm) $1.5 \text{ cm}^{-1} \sim 1.9 \text{ cm}^{-1}$ であり、濁質無しでそれぞれ約1 NTU~3 NTU、 $0.04 \text{ cm}^{-1} \sim 0.2 \text{ cm}^{-1}$ であった。

光源として低圧水銀ランプ(20W 東芝殺菌ランプ)を使用した。試料をシャーレ(直径5.7 cm)に入れて、スターラーで攪拌しながら紫外線を照射した。

試料の採取により液体体積が減少し、照射時の水深は1.03 cm から0.73 cm となるが、平均値0.93 cm を平均線量率の計算に使用した。水面における紫外線線量率をヨウ酸カリウムとヨウ化カリウムを利用した化学線量計²⁾にて測定し、平均値 0.37 mJ/s/cm^2 を平均線量率の計算に使用した。

(2) 塩素処理

初期条件は大腸菌濃度が約 10^6 CFU/ml、濁度が1.0 NTU~1.3 NTU とした。

塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液(キシダ化学(株))を使用し、初期塩素濃度を0.07 mg/l~0.4 mg/l となるように投入し、各々の濃度において投入の1分後に試料を採取した。試料10 ml に対する脱塩素剤として、3%チオ硫酸ナトリウム(キシダ化学(株))を0.1 ml 使用した。

2. 2 大腸菌の測定方法

(1) コロニー形成法

細菌の増殖能力を測定するため、コロニー形成法を用いた。測定には、大腸菌群の選択培地であるデスコキシコーレイト寒天培地(栄研器材(株))と、非選択培地である Tryptic Soy Agar(Difco 和光(株))を使用し、共に重層寒天法により大腸菌濃度を測定した。

(2) ATP 法

細菌の代謝活性を測定するために、ATP 量を測定した。測定には、ATP 発光キット(東洋ビーネット(株))、ATP 抽出キット(東洋ビーネット(株))、Luminescence JNR-II AB2300(ATTO(株))にて ATP 量を求めた。

(3) 回復量測定法

細菌の損傷程度を測定するために不活化後の回復量を測定した。不活化後の試料を標準液体培地に投入し37℃で培養し、回復させた。

3. 実験結果と考察

Fig.1～Fig.3に、紫外線処理および塩素処理後のコロニー形成法による濃度測定結果を示した。また Fig. 4～Fig. 6に、それぞれの場合における2つのコロニー形成法測定結果の相関を示した。

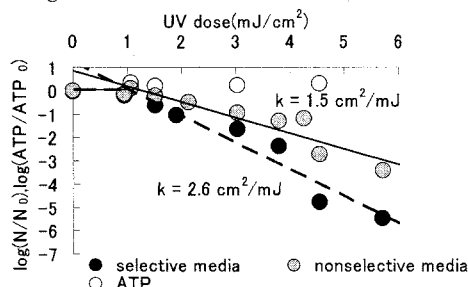


Fig. 1 inactivation by UV irradiation

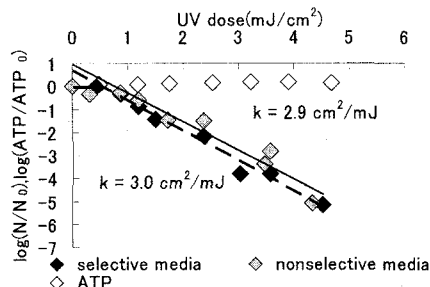


Fig. 2 inactivation by UV irradiation (with sludge)

紫外線による微生物数の減少は式(a)に従う。

$$\ln(N/N_0) = -kIt \quad (a)$$

N : 照射後微生物数, N_0 : 照射前微生物数

k : 不活化速度定数, I : 紫外線線量率, t : 照射時間

Fig. 1, Fig. 2より濁質有りのほうが不活化速度定数が小さいことから、紫外線に対する感受性が大きいことがわかった。よって、濁質中には紫外線によるDNA損傷を補助する因子か、まったく別の損傷を与える因子が存在すると考えられる。選択培地と非選択培地によるコロニー形成能の差は濁質有りの方が小さかった。このことから、

濁質中での紫外線不活化では濁質無しの場合と比べて深い損傷を与えられている可能性がある。ATP量はほとんど変化せず、不活化後の大腸菌もATPを保持していると考えられる。

塩素処理による大腸菌の減少は式(b)に従う。

$$\ln(N/N_0) = -k[C] \cdot dt \quad (b)$$

N : 塩素処理後微生物数, N_0 : 塩素処理前微生物数, k : 不活化速度定数, C : 塩素濃度, t : 塩素処理時間

Fig. 3より選択培地により培養できる大腸菌の減少は式(b)に従ったが、非選択培地においては不活化が遅れた。このことから塩素濃度の違いにより不活化過程が異なることが考えられる。ATP量の変化は小さく、紫外線処理と同様に、代謝機能の阻害は明確にはならなかった。

Fig. 4～Fig. 6において、選択培地で培養できる状態を“active condition”，非選択培地で培養できて選択培地で培養できない状態を“slight damage”，両培地で培養できない状態を“severe damage or dead”と定義した。

紫外線処理(濁質無)と塩素処理を比較すると、選択培地による生存率($\log(N/N_0)$)が0から約-3の範囲では同様の状態を示し、-3以下では塩素処理の方が深い損傷状態に移行する細菌数が多かった。このことから、ある程度以上の不活化量では紫外線処理(濁質無)よりも、塩素処理のほうが確実に損傷させることができることがわかる。紫外線処理(濁質有)と塩素処理を比較すると、紫外線処理(濁質有)では不活化後の大腸菌のほとんどが深い損傷状態になっているため、紫外線処理(濁質有)のほうが確実に損傷させると考えられる。

Fig. 7～Fig. 8に回復後の結果を示す。回復時のATP生成量の増減より代謝機能の状態について考えた。選択培地により培養できる大腸菌の濃度が初期濃度に対して 10^2 , 10^4 , 10^6 となるように不活化し、各々を回

復させた。

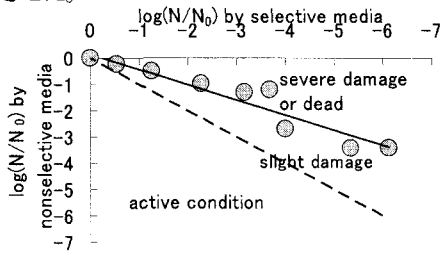


Fig. 4 damage of *E.Coli* K 12 after UV irradiation

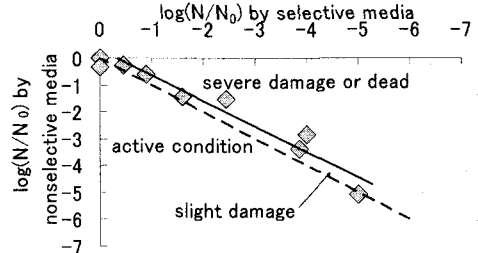


Fig. 5 damage of *E.Coli* K 12 after UV irradiation (with sludge)

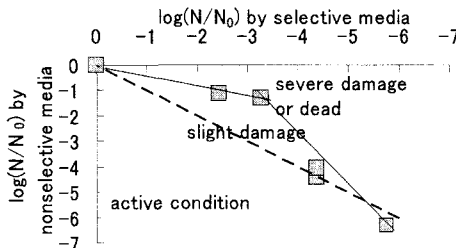


Fig. 6 damage of *E.Coli* K12 after Chlorine treatment

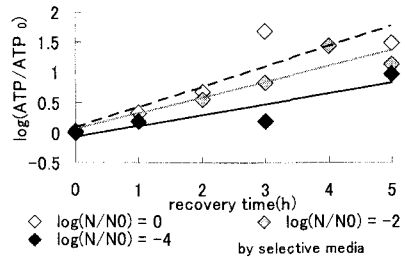


Fig. 7 recovery form UV damage

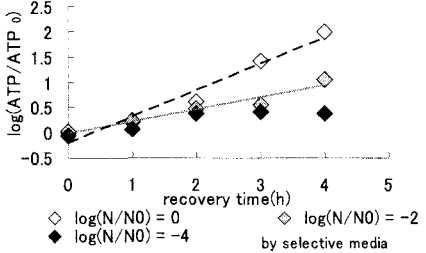


Fig. 8 recovery from UV damage (with sludge)

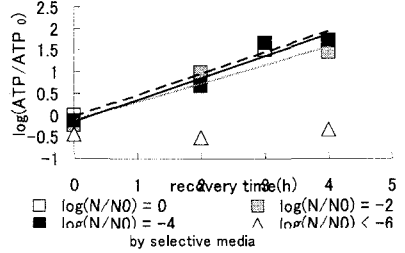


Fig. 9 recovery from Chlorine damage

Fig. 7, Fig. 8 より, 紫外線処理では不活化により ATP 回復量が減少した。濁質無しでは代謝が活性化しているが 濁質有りでは, 10^4 まで不活化した大腸菌の代謝活性化は停止した。よって紫外線処理の濁質共存下であれば DNA 損傷の他に, 代謝機能を阻害する因子が働くと考えられる。Fig. 9 より低濃度の塩素処理後の大腸菌は代謝が活発化した。低塩素濃度で処理した場合は可逆的な代謝阻害をし, 高塩素濃度で処理した場合は不可逆的な代謝阻害をしたと考えられる。

4. まとめ

紫外線処理における濁質の有無による違いについては, 濁質共存下のほうが不活化されやすく, 選択培地で測定した不活化量が同じでも, 深い損傷を与えている割合が多いことが示唆された。

塩素処理については, 塩素濃度によって不活化過程が異なるが, 紫外線処理とは異なる傾向を示すことがわかった。低塩素濃度では可逆的な代謝機能の阻害をするが, 高塩素濃度では不可逆的な代謝機能の阻害をすることが考えられた。

【参考文献】

- 1) Mossel, D.A. and P. van Netten. "Harmful effects of selective media on stressed microorganisms", nature and remedies, p.329-371. In M.H.E. Andrew and A.D. Russell (ed.), The Revival of injured microbes. Academic Press, London, United Kingdom. 1984
- 2) Rahn, R.O., Bolton, J.R. and Stetan, M.F. "The Iodide/Iodate Actinometer in UV disinfection" Proc. of AWWA water Quality Technology conference, 2000