

B-31 水環境における VNC 状態の細菌類の検出と存在量について

八戸高専 正会員 ○矢口 淳一

正会員 金子伸一郎

1. はじめに

水環境や水道水、排水中に活性のある微生物がどれだけ存在しているかは衛生学上非常に重要なポイントである。従来微生物の存在量は、寒天培地を使用した平板培養法によって測定されてきた。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にある細菌 (Viable but nonculturable; VNC) が少なからず存在することが明らかになってきた。¹⁾ このような VNC 状態にある細菌類は従来の手法では計数できず、存在する細菌数を過小評価してしまう。そこで培養を行うことなく細菌数を計数する方法や活性のある細菌を評価する方法を確立し、これらの手法を用いて VNC の状態にある細菌の存在量について青森県内の 6 水域で調査を行ったので報告する。

2. 実験材料および方法

2-1 調査水域

試料は青森県内の 5 河川 (馬淵川、浅水川、新井田川、五戸川、奥入瀬川) と 1 湖沼 (小川原湖) から 2004 年 12 月 14 日から 2005 年 1 月 6 日にかけて採水した。

2-2 実験材料

理化学研究所微生物系統保存施設から *Escherichia coli* (1649^T), *Enterobacter aerogenes* (1235^T) を購入して実験に用いた。染色に使用した蛍光試薬類は、DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (和光純薬), CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) (Polysciences 社), BacLightTM (Molecular Probes 社) である。

2-3 細菌数計測

生菌数の計測には PGY 培地と R2A 培地を用い、20℃ で 1 週間培養した。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で計数した。また生理的活性のある細菌を評価する手法として、DVC 法、マイクロコロニー法、CTC 法、BacLight 試薬を使用した。4 つの方法とも全菌数測定法と同様、ポリカーボネイトフィルター上に細菌を捕集し蛍光試薬を利用して計測するもので、表-1 に簡略にまとめた。これらの方法の詳細は解説²⁾ を参照してほしい。

2-4 蛍光顕微鏡

落射型蛍光顕微鏡はオリンパス製 BX41 を用いた。励起光源として水銀ランプを使用し、DAPI 染色には U 励起

表-1 細菌数計数方法の概略

	全菌数測定法	DVC法	マイクロコロニー法	CTC法	BacLight試薬
細菌の捕集	ポリカーボネイトフィルター (0.2 μm)				
試薬	無し	ナリジク酸	無し	CTC	propidium iodide
培養	無し	R2A	R2A	1/2R2A (リン酸無し)	無し
染色	DAPI	DAPI	DAPI	CTC-DAPI 二重染色	SYTO9
蛍光観察	青白蛍光	伸長、肥大細胞	2個以上の細胞塊	赤色蛍光	死菌-赤、生菌-緑
備考	核酸染色	細胞分裂阻止	微小コロニー観察	呼吸活性	細胞膜破損

(U-MWU2)、CTC および Baclight 試薬には B 励起(U-MNIB2)を用いた。細菌数の計測では、蛍光顕微鏡下で視野をランダムに変え、1 サンプルにつき 10 視野以上計数を行った。

3. 結果と考察

3-1 生理的活性のある細菌の検出

購入した 2 つの細菌株を使用して平板培養法以外の細菌数計測法を検討した。表-1 に示したように、DAPI により核酸を染色された細菌は UV 励起光下で青白い蛍光を発した。CTC 法は、呼吸活性を持つ細菌を検出する方法で、呼吸能を有する細菌は CTC を菌体内に摂り込み、体内で CTC をホルマゼンという非水溶性の物質に変換する。ホルマゼンは B 励起光を照射すると赤色蛍光を発するため、呼吸能のない細菌と区別できる。CTC 染色後 DAPI と二重染色することによって呼吸能を持つ細菌のみ検出できた。また Baclight 試薬は 2 つの染色剤の細胞膜透過性の違いにより、細胞膜が破損された細菌は Propidium iodide で染色され、正常な細菌は SYTO9 に染色されてそれぞれ B 励起光下で赤色蛍光と緑色蛍光を発した。さらに SYTO9 で緑色蛍光を発する細菌とヨウ化プロピジウムで赤色蛍光を発する細菌を足し合わせると全菌数が得られる。*E. coli* や *E. aerogenes* の培養液を用いて、DAPI 染色による計測数と Baclight 試薬による計測数 (SYTO9 + ヨウ化プロピジウム) を比較したところほとんど違いはなかった。DVC 法とマイクロコロニー法はい



写真-1 DVC法による生菌の検出



写真-2 マイクロコロニー法による生菌の検出

ずれも増殖能力を持つ細菌を検出する方法である。DVC 法では細胞分裂抑制剤としてナジク酸を使用する。分裂できないため、生きている細菌は細胞が伸張したり肥大する。写真-1 に DVC 法で検出された *E. aerogenes* を示した。一方マイクロコロニー法は、メンブリフィルター上で細菌を一定期間培養し、肉眼では見えない微視的なコロニーを顕微鏡下で観察する方法である。写真-2 には、*E. aerogenes* のマイクロコロニーを示した。DVC 法、マイクロコロニー法とも DAPI 染色して、増殖能のない細菌と蛍光顕微鏡下で区別できる。

3-2 調査水域の水質

表-2 に調査した水域の水質を示した。小川原湖と新井田川の採水地点では他の河川に比べて電気伝導度が著しく高く、これは海水が遡上して浸入しているためだと考えられる。また小川原湖では TOC 濃度も高く、

表-2 調査水域の水質

水質項目 (単位)	採水地点	採水日	水温 ℃	pH	DO mg/L	電気伝導度 μS/cm	TOC mg/L
小川原湖	湖心	2004 12. 14	6. 8	7. 13	12. 63	2990	4. 6
馬淵川	根城大橋	2004 12. 27	3. 7	7. 06	11. 01	146	2. 3
浅水川	豊崎	2004 12. 27	4. 6	7. 21	10. 14	158	3. 7
五戸川	尻引橋	2005 1. 06	2. 2	7. 14	14. 57	161	1. 9
新井田川	新井田大橋	2005 1. 06	3. 2	7. 45	13. 58	9190	3. 6
奥入瀬川	幸運橋	2005 1. 06	3. 1	6. 99	14. 68	20	2. 7

富栄養化が進行している。

3-3 計測法の比較

図-1にDAPIとBaclight試薬によって計数した全菌数とPGYとR2A培地を用いた平板培養法によって計数した生菌数を示した。Baclight試薬では、赤色蛍光と緑色蛍光を発した細菌を合わせて全菌数とした。DAPIによる計数結果とほぼ同数で、6つの水域とも 1×10^7 個/mL前後となっている。一方、生菌数は $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個/mLの範囲で、全菌数より2～3オーダー低くなった。またR2A培地とPGY培地を比較すると、五戸川を除いてR2A培地の計数結果の方が多く、PGY培地より貧栄養のR2A培地の方がこれらの水域に適していたことが知られる。DAPIによる全菌数とR2A培地による生菌数の比率は、0.08～2.16%であった。図-2には生理的活性のある細菌の検出法として使用した、4つの方法で求めた細菌数を全菌数に対する比率として示した。新井田川と奥入瀬川では、CTCで赤色蛍光を示す細菌が 5.79×10^4 未満となり検出できなかった。また馬淵川では、培養期間が長すぎたためマイクロコロニーが多数発生し計数できなかった。図-2に示した4つの水域ともBaclight試薬による計数結果が最も多く、呼吸活性のある細菌を検出できるCTC法が最小となった。顕微鏡下で直接細胞形態変化や微視的コロニーを観察するDVC法とマイクロコロニー法はその中間の値を示した。

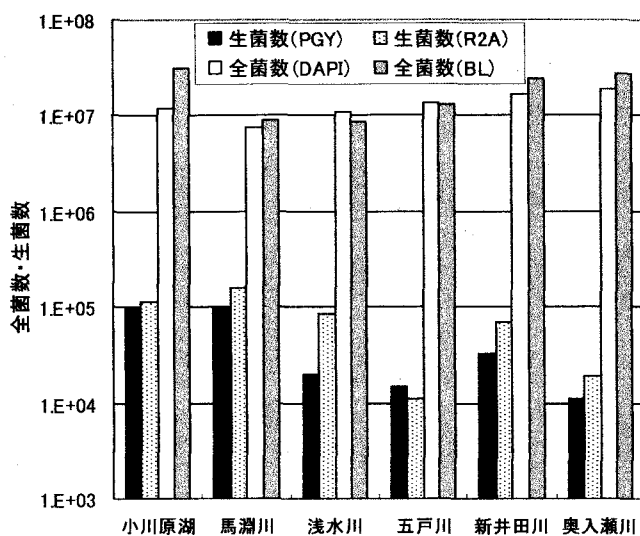


図-1 全菌数と生菌数の比較

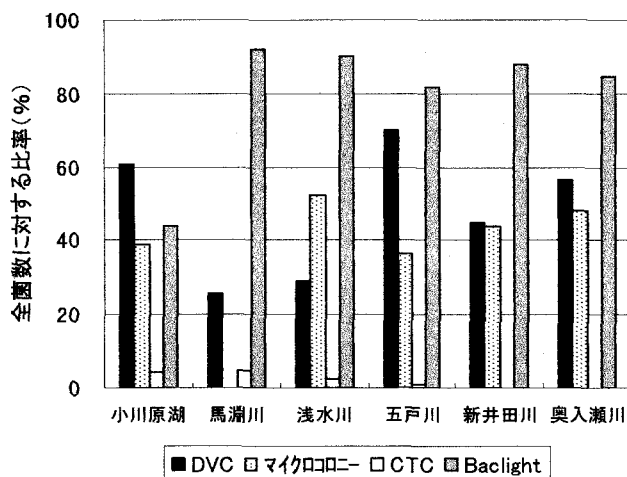


図-2 生理的活性のある菌の比率

4. まとめ

河川や湖沼など実際の水環境では、全菌数は生菌数より2～3オーダー多く、培養できない菌が多数存在することが分かった。生理的活性のある細菌を評価する4つの方法で求めた細菌数は全菌数と生菌数の中間の値を取り、中でもBaclight試薬による計数結果が最も多く、またCTC法が最も少なく、DVC法とマイクロコロニー法はその中間の値を示した。

<参考文献>1) 木暮一啓, 科学, Vol. 69, No. 6 p 508-516 (1999)

2) 木暮一啓; 培養不能細菌, 月刊海洋号外 No. 33 (2003)