

B-45 VNC状態の細菌に対する塩素消毒効果

沢谷 圭介¹・金子 伸一郎²・○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 青森県八戸市大字田面木字上野平16の1)

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

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

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 non-culturable ; VNC) が少なからず存在することが明らかになってきた。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。病原菌やその代替指標である大腸菌群の検出方法も培養によってきたため、VNC 状態にある菌は不活性とみなされ消毒などの不活性化効率を過大に評価し、病原菌から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¹⁾は、VNC 状態の細菌を検出し計測する方法を検討し、水環境中には VNC 状態にある細菌が多数存在することを確かめた。本研究では、消毒操作による VNC 状態の細菌の不活化率に着目し、VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果を検討するために、大腸菌と河川水を使用して塩素消毒実験を行った。

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* (JCM1649²⁾ を購入して実験に用いた。河川水は八戸市内を流れる馬淵川から 2007 年の 6 月～8 月にかけて計 5 回採取した。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) 塩素消毒実験

大腸菌を使用した実験では、大腸菌を R2A 培地を用いて一晩 25℃ で振とう培養し、培養液を遠心濃縮してリン酸緩衝液で 2 回洗浄した。300mL の三角フラスコに超

純水 (和光純薬) で作成したリン酸緩衝液 (pH 7.2) 200mL を入れて滅菌し、20℃ の恒温水槽に設置した。洗浄した大腸菌を濃度が約 1×10^7 個/mL 前後となるように三角フラスコに接種した。塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液 (和光純薬) を使用し、初期塩素濃度を 0.05mg/L ～ 0.7mg/L となるように投入し、三角フラスコをスターラーで攪拌しながら 1～2 分間塩素処理して試料を採取した。

河川水を使用した実験では、300mL の三角フラスコに河川水を 200mL 入れて、20℃ の恒温水槽に設置した。塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液 (和光純薬) を使用し、初期塩素濃度を 0.1mg/L ～ 0.9mg/L となるように投入し、三角フラスコをスターラーで攪拌しながら 2 分間塩素処理して試料を採取した。大腸菌、河川水のどちらの実験でも脱塩素剤として 100mg/L の濃度のチオ硫酸ナトリウム溶液を用い、残留塩素濃度は DPD 法²⁾ で測定した。

(3) 細菌数計測

大腸菌の菌数計測には、非選択培地として R2A 培地と大腸菌群の選択培地である m-Endo 培地 (Difco) を用い、R2A 培地は平板培養法、m-Endo 培地はメンブレンフィルター法で計測した。河川水の菌数計測には R2A 培地のみを使用し、平板培養法で計測した。全菌数はポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 0.2 μ m) 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。生理的活性のある細菌を評価する手法として、BacLight 法³⁾、CTC 法⁴⁾、DVC (Direct viable count 法)⁵⁾、マイクロコロニー法⁶⁾ 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した。

(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 (U-MNU2)、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。

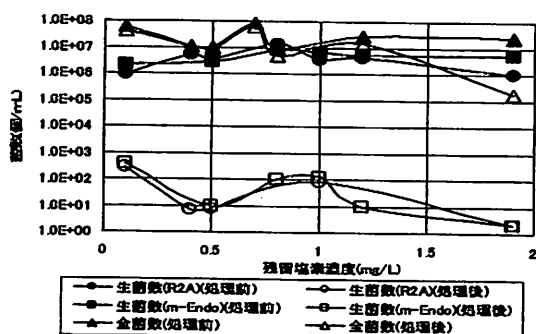


図-1 大腸菌の塩素処理による全菌数と生菌数の変化

3. 実験結果および考察

(1) VNC状態の細菌に対する塩素消毒効果

直接顕微鏡下で活性のある細菌を検出できる計測法を用いて、VNC状態の大腸菌に対する塩素消毒効果について検討した。図-1に残留塩素濃度と塩素処理前後の全菌数と培養可能な生菌数の変化を示した。図-1に示したのは塩素処理時間2分間の実験データのみである。残留塩素濃度が0.7mg/Lの時、希釈率を適切に設定できなかったため生菌数は計測できなかった。塩素処理によって不活性化された大腸菌も検出する全菌数は、処理前・処理後ともに残留塩素濃度1.2mg/Lまではほぼ同数で $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個/mLの範囲で推移した。しかし、残留塩素濃度1.9mg/Lにおける処理後の全菌数は 1×10^5 個/mL程度まで減少し、処理前に比べて2オーダー低い値となった。一方、R2A培地とm-Endo培地で計測された生菌数は塩素処理前では全菌数より少なく $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mLの範囲で、処理後では $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3$ 個/mLまで減少し、処理前に比べて4～6オーダー低い値となった。非選択培地であるR2A培地と、選択培地のm-Endo培地で測定した処理後の大腸菌数には明白な違いは認められなかった。

図-2には、蛍光顕微鏡を使用した4つの方法で求めた

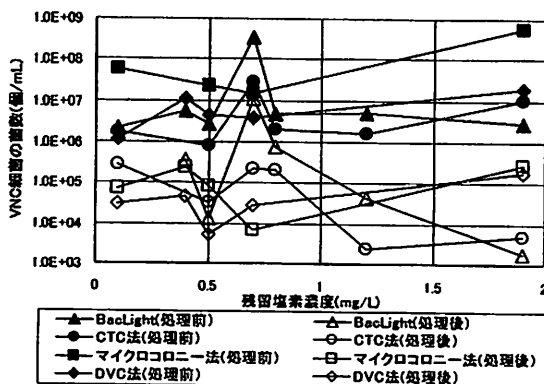


図-2 残留塩素濃度に対する生理的活性のある大腸菌数の変化

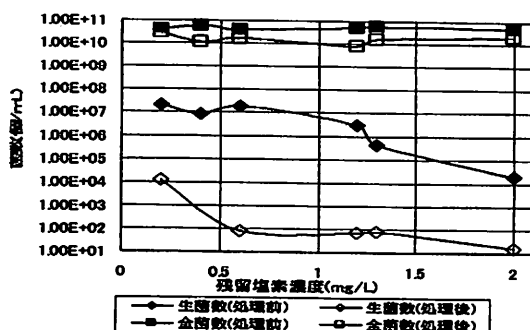


図-3 河川水塩素処理による全菌数と生菌数の変化

生理的活性のある大腸菌の塩素処理前後の菌数変化を示した。図-2も塩素処理時間2分間のデータである。マイクロコロニー法では、コロニーが発生しすぎて計測不能となるケースが見られた。図-1に示した培養法で求めた大腸菌数の変化とは大きく異なり、生理的活性のある大腸菌は塩素処理前に比べて処理後は1～3オーダー程度しか菌数の変化がなく、塩素消毒への感受性が低かった。

(2) 河川水中の細菌に対する塩素消毒効果

図-3には、河川水を用いて行った塩素消毒実験結果として残留塩素濃度と塩素処理前後の全菌数及び培養可能な生菌数の変化を示した。残留塩素濃度が0.4mg/Lの時、希釈率を適切に設定できなかったため塩素処理後の生菌数は計測できなかった。塩素処理によって不活性化された全菌数は、処理前後でほとんど変化がなく $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/mLの範囲で推移した。河川水中の全菌数に対する培養可能な生菌数の割合は2～5オーダー程度低く、2005年に行った調査結果¹⁾とだいたい一致した。R2A培地で計数された培養可能な生菌数は塩素処理によって3～6オーダー低下し、大腸菌より低下の割合は幾分少なかった。図-4には、生理的活性のある細菌を顕微鏡下で検出する4つの方法で求めた、河川水中のVNC状態の細菌に対する塩素消毒効果を示した。生理的活性のあるVNC状態の細菌は塩素処理前に比べると、処理後は1～3オーダー程度の菌数の減少が確認され、大腸菌の場合と大きく変わらなかった。

(3) 不活性化速度定数

図-5.6には、大腸菌と河川水中の細菌の塩素処理に伴う不活性化の割合とCT値(残留塩素濃度と時間の積)の関係をそれぞれ示した。塩素処理による大腸菌などの細菌の減少は(1)式で表される。⁷⁾

$$\ln(N/N_0) = -k \int C \cdot dt \dots (1)$$

N : 塩素処理後細菌数 N_0 : 塩素処理前細菌数

k : 不活性化速度定数 C : 塩素濃度 t : 塩素処理時間

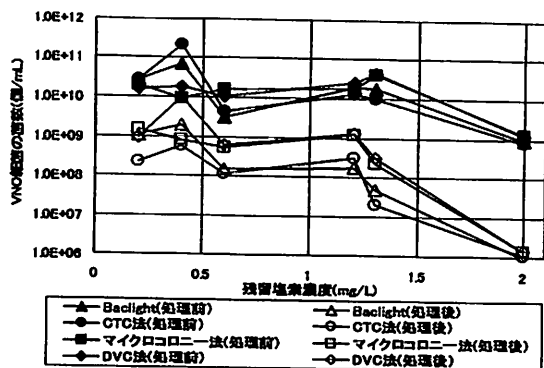


図-4 残留塩素濃度に対する河川水中の生理的活性のある細菌数の変化

表-2 には、大腸菌・河川水それぞれの計測方法毎に(1)式より求めた不活性化速度定数 k を示した。VNC 状態の大腸菌を計測する 4 つの方法で求めた k 値は大差がなく、2.1~2.5 (L/mg/min) の範囲で、R2A や m-Endo 培地による培養法の約 1/2 程度であった。直接蛍光顕微鏡で検出した生理的活性のある大腸菌は、培養可能な大腸菌より塩素消毒に対する抵抗性が強く、VNC 状態の細菌の存在を考慮した消毒効果の再評価が必要だと考えられる。また図-5 に見られるように窪ら⁷が指摘しているように、CT 値 0.5 (mg・min/L) 以下では k 値が大きく異なり、塩素処理による不活化の機構が異なっていることも示唆された。特に R2A、m-Endo 培地で測定した大腸菌数の変化は、CT 値の範囲で大きく変化していた。

河川水中の VNC 状態の細菌を計測する 4 つの方法で求めた k 値は、0.7~0.9 (L/mg/min) の範囲で、R2A 培地による培養法の 1/2~2/3 程度であった。大腸菌と河川水中の細菌を比較すると、培養可能な細菌も直接顕微鏡で検出した生理的活性のある細菌も、河川水中の細菌の k 値は大腸菌の 1/2 以下となり、大腸菌の方が河川水中の細菌より塩素消毒に対する感受性が高いことが知られる。

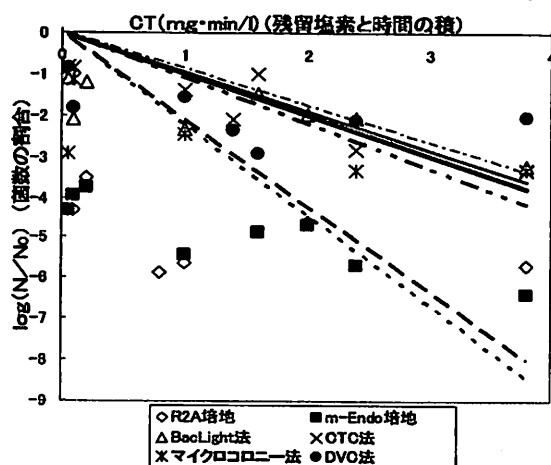


図-5 大腸菌塩素処理による不活性化と CT 値の関係

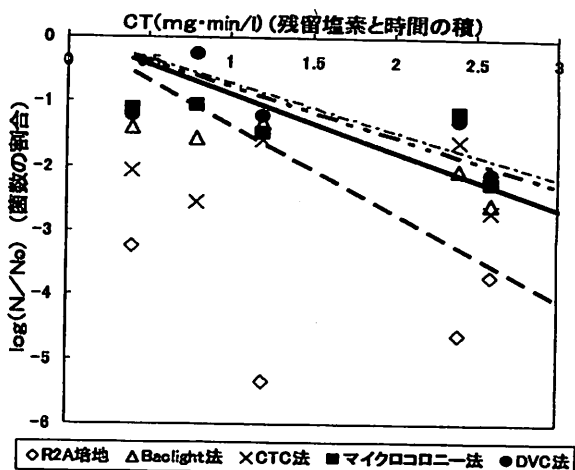


図-6 河川水塩素処理による不活性化と CT 値の関係

これは河川水中には様々な汚濁物質が存在し、消毒以外に塩素が消費されるためだと考えられる。

4. まとめ

塩素消毒実験より、大腸菌及び河川水中の細菌とも生理的活性のある細菌の方が培養可能な細菌より塩素消毒に対する抵抗性が強いことが分かった。不活性化速度定数は、生理的活性のある細菌を計測した 4 つの方法とも大差がなく、大腸菌では培養法の約 1/2 以下、河川水中の細菌では 1/2~2/3 程度であった。

<参考文献>

- 1) 沢谷圭介, 金子伸一郎, 矢口淳一: 環境工学研究論文集 Vol. 43, pp551-558 (2006)
- 2) 清水壽美子, 上村仁, 伊藤伸一: 神奈川県衛生研究所研究報告 No. 34 (2004)
- 3) Molecular Probes: technical sheet, Molecular Probes Inc. (2003)
- 4) 染谷 孝: 月刊 海洋, 号外 No. 33, pp14-22 (2003)
- 5) 川井眞好, 那須正夫: 月刊 海洋, 号外 No. 33, pp170-178 (2003)
- 6) Kogure K., Shimidu U., and Taga N., Can J. Microbial., Vol. 25, pp415-420 (1979)
- 7) 窪華奈子, 大瀧雅寛: 第 42 回環境工学研究フォーラム講演集, pp75-77 (2005)

表-2 各計測方法の不活性化速度係数

細菌数計測法	k(L/mg/min)	
	大腸菌	河川水
R2A	4.8	1.4
m-Endo	5.1	
BacLight	2.1	0.9
CTC	2.3	0.9
マイクロコロニー	2.5	0.8
DVC	2.1	0.7