

B-45 水環境中におけるVBNC状態の大腸菌の検出と挙動について

○上野 亮超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上野平16-1)

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

1. はじめに

これまで病原菌やその代替指標の検出方法は培養によってきたため、生きてはいるが培養できないVBNC (Viable but nonculturable)状態の菌は不活性と見なされ、消毒などの不活化効果を過大に評価し飲料水や水環境からの感染リスクを過小に評価してきた可能性がある。最近核酸染色試薬であるPMA (Propidium monoazide)とリアルタイムPCR法を組み合わせ、VBNC状態を含む活性のある大腸菌のみを検出する方法が研究開発された¹⁾。しかし、この方法は感度が低く、病原菌や指標細菌濃度が低くて不活性な死滅した細菌が多数存在する河川・湖沼などの自然環境に適用することが難しい。本研究では、メンブレンフィルタ法でろ過捕集した大腸菌にPMA-PCR法を適用し、メンブレンフィルタとPMA-PCR法を組み合わせた場合の最適条件について検討し、PMA-PCR法の感度の改善をはかるとともに水環境中に存在するVBNC状態を含む活性のある大腸菌を定量するため、八戸市周辺の河川や海域で採水したサンプルについて従来法と比較しながら大腸菌の挙動を調査した。

2. 実験材料および方法

2-1 実験材料

理化学研究所系統施設から大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649T)を購入し実験に用いた。全菌数測定のために使用した蛍光試薬はDAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)(和光試薬)で、生理的活性のある細菌と死滅した細菌を区別する試薬としてBiotium社のPMA (propidium monoazide)を使用した。

2-2 実験方法

まず、メンブレンフィルタ上に捕集した大腸菌に対してPMA処理を行い、PMA添加濃度、処理時間、ハロゲン光照射時間及びPMA添加回数について最適条件を見出し、熱処理と無処理の大腸菌濃度混合比を変えて検証実験を行った。確立したPMA処理条件を使用して河川・海域中の活性のある大腸菌濃度を測定した。

2-2-1 大腸菌の培養

大腸菌をLB液体培地を用いて一晩37°Cで振とう培養した。さらに極少量の培養液を新しいLB培地に添加して数時間培養した。培養液の全菌数はフィルターにろ過捕集後、蛍光染色剤DAPI溶液を用いて染色し、落射蛍光顕微鏡で計数した。大腸菌の不活化は熱処理(80°C, 10分間)によって行い、LB寒天培地で処理液を1週間20°C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。

2-2-2 PMA処理

試料をメンブレンフィルタでろ過した後、所定の濃度のPMAを添加して暗室で放置し、ハロゲン光(アークランドサカモト社、GTHH500s、500W)を所定時間照射した。照射中メンブレンフィルタは氷の中で冷却した。

2-2-3 DNAの抽出

大腸菌培養液では培養液をポリカーボネイトフィルター(Advantec製、孔径0.4µm、直径47mm)でろ過し、大腸菌をろ過固定したフィルターをマイクロチューブに丸めて挿入した。Instagene Matrix(Biorad社)を180µL添加してボルテックスを激しく繰り返し行い、Biorad社のプロトコールに従ってDNAを抽出した。水域の調査では採水したサンプルをポリカーボネイトフィルターを使用して100~150倍にろ過濃縮後、ガラスビーズを用いてミニビードピーダー(家田貿易 Model3110BX、4800RPM、60sec)でろ紙を粉碎し、QIAamp DNA Stool

キット(Qiagen社)を用いた方法でDNAの抽出を行った。

2-2-4 リアルタイムPCR

大腸菌および水域調査で採水したサンプルのリアルタイムPCRは、MiniOpticonシステム(Biorad社)で行った。大腸菌については、大腸菌の選択的検出に使用されるβ-グルクロニターゼ酵素をコードする*uidA*遺伝子をターゲットとして、IQ Supermix(Biorad社)を使用し、Frahm & Obst²が用いたプライマーとプローブを使用し、Reverse Primerの濃度のみ300nMに変更した。温度条件として、95℃で10分間熱変性させた後、(95℃:45s、60℃:1min)のサイクルを40回繰り返した。

2-2-5 水域の調査

青森県八戸市内を流れる新井田川(St.1 是川地区、St.2 新井田橋、St.3 新井田川河口付近)の3地点で、2013年8月1日にサンプルを採水して大腸菌の計数を行った。蕪島海水浴場(St.4)については、2013年8月6日に採水調査した。大腸菌の計数には、EC-MUG培地(Difco)によるMPN法とリアルタイムPCR法、PMA-PCR法を用い、大腸菌群および糞便性大腸菌群の計数はMF-Endo培地(Difco)、M-FC培地(Difco)によるメンブレンフィルタ法で行い³、大腸菌数との比較を行った。また、PMAを加えないリアルタイムPCRにより大腸菌の全菌数を計数し、活性のある大腸菌に関してはPMA処理とリアルタイムPCRを組み合わせたPMA-PCR法により測定した。水域サンプルによるPCR反応阻害の程度について検証するため、 1.28×10^8 個/filterの大腸菌をサンプルと一緒にろ過濃縮したメンブレンフィルタを各サンプル毎に作成し、DNA抽出後リアルタイムPCRに供した。

3. 結果および考察

3-1 PMA 処理条件の検討

3-1-1 PMA 濃度実験

熱処理した大腸菌をろ過濃縮したメンブレンフィルタへのPMA添加濃度を変化させ、DNA増幅が検出された閾値サイクル数とPMA濃度の関係を図1に示した。PMA濃度が増加するに伴い50μMまで閾値サイクル数も増加しているが、50μMと100μMの違いはほとんど見られなかった。そのため、最適のPMA濃度は

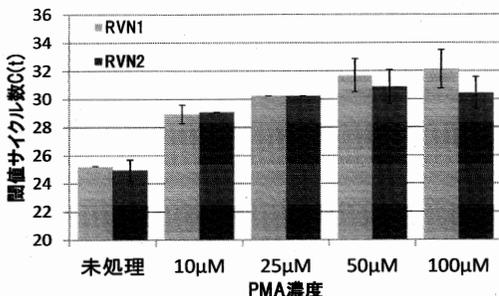


図-1 PMA濃度実験結果

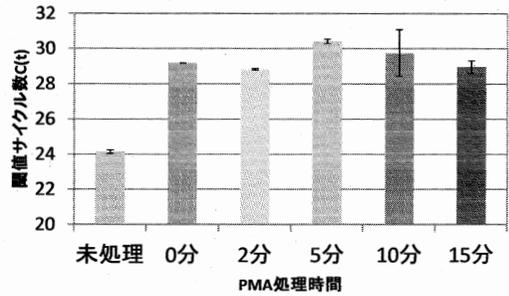


図-2 PMA 処理時間実験結果

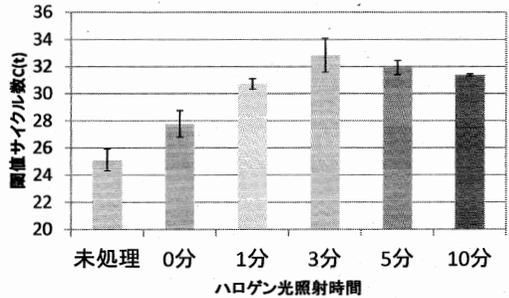


図-3 ハロゲン照射時間実験結果

50μM と考えられる。以降の実験では PMA 濃度は 50μM とした。

3-2-2 PMA 処理時間実験

メンブレンフィルタに固定された大腸菌を PMA 処理するのに必要な処理時間の検討を行った。実験結果を図2に示した。PMA 処理時間5分の時に閾値サイクル数は最大値を示しており、5分以上の処理時間は閾値サイクル数を増加させなかった。実験した PMA 処理時間0~15分では閾値サイクル数にあまり大きな変化が見られなかったが、PMA 処理時間は5分間とした。

3-2-3 ハロゲン照射時間実験

メンブレンフィルタに固定した熱処理した大腸菌を PMA で処理し、ハロゲン光(500W)を照射して DNA と PMA の結合に必要な照射時間を検討した。ハロゲン光照射時間と閾値サイクル数の関係を図3に示した。照射時間が増加するにつれ、DNA 増幅が検出される閾値サイクル数が増大していき、3分が最大となりそれ以上はあまり変化が見られなかった。この結果から、照射時間は3分以上必要なことが分かったが、安定的なデータを取得するため5分間の照射を行うことにした。

3-2 検証実験

無処理大腸菌濃度を一定にして、無処理の大腸菌体と熱処理した大腸菌体を様々な比率で混合し、PMA-PCR法をメンブレンフィルタ法に適用した場合の検出感度について検討を行った。検証実験の結果を図4に示した。無処理菌体と熱処理菌体を等量混合した場合(1/1)少し閾

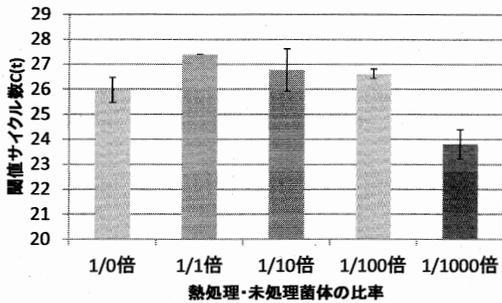


図4 無処理菌体/熱処理菌体の混合比と閾値サイクル数の関係

値サイクル数が高くなったが、混合比率(1/100)までは熱処理菌体無添加の場合(1/0)とほぼ同程度の閾値サイクル数が得られた。しかし、1/1000の比率では閾値サイクル数が大きく低下している。従って、無処理大腸菌濃度の100倍まで熱処理した大腸菌が存在しても適用可能であることが分かった。

3-3 水域調査の結果

メンブレンフィルタでろ過濃縮した八戸市周辺の水域サンプルにPCR法、PMA-PCR法を適用して水環境中の大腸菌群、糞便性大腸菌群、及びMPN法による大腸菌の計数結果と比較した。図5にSt.1~St.4の調査結果を示した。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-PCR法ではVBNC状態の大腸菌を含む生理的活性のある大腸菌のみが検出される。ま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法の計数値の差がVBNC状態の大腸菌濃度を表すことになる。今回の調査ではPCR法とPMA-PCR法での大腸菌数の差は2オーダー未満であったため、PMA-PCR法の適用範囲内であった。また、水域サンプルに一定量の大腸菌を添加した場合、大腸菌のみの場合の閾値サイクル数との差は1.0以内でほとんどなく、採水したサンプルによるPCR阻害は考慮する必要がないことが分かった。

市街地から少し離れた上流のSt.1は、大腸菌濃度は低いと考えられたが、前日の降雨のためか他の新井田川

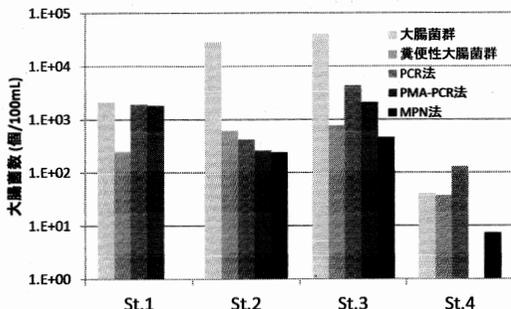


図5 調査水域4地点の大腸菌数

の地点と同程度の 1×10^3 個/100mL程度となった。そのためMPN法では希釈倍率の失敗で大腸菌数を計測できなかった。またSt.2とSt.3では大腸菌群数のみ 1×10^4 個/100mLを越えているが、他の方法では 1×10^3 個/100mL程度となっている。大腸菌群の値が高く計数されたことからSt.2とSt.3では大腸菌以外の自然由来の細菌を多く計数していることが分かる。St.4の蕪島海水浴場では、大腸菌濃度は $1 \times 10^1 \sim 10^2$ 個/100mL程度の値となっており、150倍にろ過濃縮したがPMA-PCR法では大腸菌は検出できなかった。

PMA-PCR法の計数値は、PCR法の計数値とMPN法の計数値及び糞便性大腸菌群数の中間に位置し、このことから水環境中では多くの大腸菌がVBNC状態で存在していることが示された。PCR法、PMA-PCR法およびMPN法にて計測された大腸菌数を使用してVBNC状態の全大腸菌数に占める割合を計算した結果、St.2は4.5%、St.3は37.5%となった。

4. まとめ

メンブレンフィルタにろ過濃縮した大腸菌にPMA-PCR法を適用する場合のPMA処理条件を検討した結果、PMA添加濃度50 μ M、PMA処理時間5分間、ハロゲン光照射時間5分間とする方法がPMA処理の最適条件であると考えられた。これらの条件を用いてPMA-PCR法をメンブレンフィルタ法に適用した場合の検出感度について検討し、無処理大腸菌濃度の100倍まで熱処理した大腸菌が存在してもPMA-PCR法を適用可能なことが分かった。八戸市周辺の4つの水域の調査では、PMA-PCR法の計数値は、PCR法とMPN法の大腸菌数及び糞便性大腸菌群数の中間に位置し、水環境中では多くの大腸菌がVBNC状態で存在していることが示された。VBNC状態の全大腸菌数に占める割合を計算した結果、St.2は4.5%、St.3は37.5%となった。

参考文献

- 1) 横町尚享, 矢口淳一: 土木学会論文集 G(環境), Vol. 67, pp.643-650, 2011.
- 2) Frahm, E. and Obst, U.: Journal of Microbiological Methods, Vol.52, pp.123-131, 2003.
- 3) 日本下水道協会: 下水試験法 上巻, 1997年度版, pp.698-725, 1997.

謝辞

本研究は科学研究補助金基盤研究C(課題番号25420562)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わします。