

異なる消毒処理における大腸菌損傷レベルの比較評価

Injury Assessment of *Escherichia Coli*. Inactivated by different disinfections

窪華奈子, 大瀧雅寛

Kanakano KUBO, Masahiro OTAKI

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

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し、その様な場合、生理的機能や構造的機能を喪失しつつ、生きている状態となると考えられる¹⁾。これらは、無傷の細菌に比べて各種検出方法に対する感受性の差が生じる。よって、一つの方法によって検出されないからといって、活性を回復する細菌がないと判断するのは過小評価を招く可能性がある。

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。それらの消毒方法は、消毒機構が異なるので、当然細菌への損傷程度も異なると考えられる。すなわち、測定法への反映のされ方も異なると考えられる。

本研究では消毒方法による損傷細菌についての測定方法を様々検討するとともに各種消毒処理後の大腸菌の損傷程度を比較することで各々の消毒処理の特徴を比較評価することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 不活化処理

モデル微生物として、*E. coli* K12 (NBRC 3301)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) 塩素処理

初期条件として、大腸菌濃度を約 10^6 CFU/ml、試料濁度を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塩素接触時間1分とした。接触後の試料10 mlに、3%チオ硫酸ナトリウムを0.1 ml投入し、脱塩素を行った。

(2) 紫外線照射処理

初期条件として、大腸菌濃度を約 10^6 CFU/mlとした。試料濁度は約1 NTU~3 NTU、吸光度は 0.04 cm^{-1} ~ 0.2

cm^{-1} であった。光源として低圧水銀ランプを使用した。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0~40秒照射した。試料の採取により体積が減少し、リアクター内の水深は1.03 cm~0.73 cmとなる。そこで、平均値0.93 cmを平均線量率の計算に使用した。水面の紫外線(波長254 nm)線量率をヨウ素酸カリウムとヨウ化カリウムを利用した化学線量計にて測定して、算定したところ平均値 0.37 mJ/s/cm^2 となった。

(3) コンポスト型トイレ処理

約3ヶ月間コンポスト型トイレで使用したおがくず(ヒノキ)を滅菌して使用した。おがくず5 gに前述の大腸菌を溶解させたリン酸緩衝液0.3 mlを投入し、含水率68~72%、温度50℃で0~30時間静置した。

2.2 大腸菌の測定方法

(1) コロニー形成能測定

培養条件によるコロニー形成能力の差から細菌の損傷レベルを評価するために²⁾、大腸菌群の選択培地であるデソキシコーレイト寒天培地と、非選択培地であるTryptic Soy Agar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測定

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

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℃暗所にて培養し、回復させた。

3. 実験結果と考察

選択培地により測定される残存率 S_a と非選択培地により測定される残存率 S_b の比を使って損傷レベルを評価した。各不活化処理における残存率比 $\log S_a / \log S_b$ をFig.1に示した。残存率比が1より大きいほど、非選

択培地で検出されるが選択培地で検出されない損傷を受けた菌(これを軽度損傷細菌と呼ぶ)の割合が多いことを示す。残存率比が1に近いほど、どちらの培地でも検出されない損傷を受けた菌(これを重度損傷細菌と呼ぶ)の割合が多いことを示す。よって、全ての不活化処理において軽度損傷細菌は存在するが、その数は紫外線処理及び塩素処理では多く、コンポスト型トイレによる処理では少ないことがわかる。

Fig.2-a)は未処理の大腸菌に不活化後回復実験と同様の処理を施した結果を示した。Fig.2-b), 2-c)には塩素及び紫外線により99%不活化した後の回復量測定結果を示した。Fig.2-a)より、未処理の大腸菌は回復処理時間によって、非選択培地による大腸菌濃度およびATP濃度が増加することがわかった。選択培地では、大腸菌濃度増加がみられなかった。Fig.2-b), Fig.2-c)の回復時間2時間までのデータに着目すると、非選択培地では大腸菌濃度が増加せず、選択培地では増加した。このことから、大腸菌は、回復処理2時間の間に選択培地でのコロニー形成能力を再取得したと考えられる。選択培地のコロニーは、大腸菌が発育する際に乳糖分解によって生ずる酸が、デソキシコール酸ナトリウム(選択培地の材料)から不溶性のデソキシコール酸を析出させ、デソキシコール酸は同時に酸性で赤変した中性紅(選択培地の材料)と強く結合して大腸菌群の集落を著しく混濁赤変させることにより形成される。よって塩素および紫外線による不活化で低下していた乳糖分解能力が、回復処理2時間により上昇したと考えられる。従って、回復処理2時間のATP濃度増加は増殖によるのではなく回復によるものだと考えられる。回復処理2時間から4時間のデータでは、非選択培地で増加していることから2時間後以降は、ATP濃度増加は増殖によるものだと考えられる。

4. 結論

選択培地による消毒効果の測定は、過大評価を招く可能性があり、検出されない軽度損傷細菌が存在する可能性を意識して、リスク評価をする必要があることがわかった。さらに塩素処理及び紫外線処理後の軽度損傷細菌は高栄養条件2時間では、低下した乳糖分解能力が上昇し、それがATP量に反映され、続いて、2時間から4時間では増殖がATP量に反映したと考えられる。

コンポスト型トイレによる消毒においては紫外線処理や塩素処理よりも軽度損傷細菌が少なく、過大評価を招く可能性は小さいと示唆される結果が得られた。

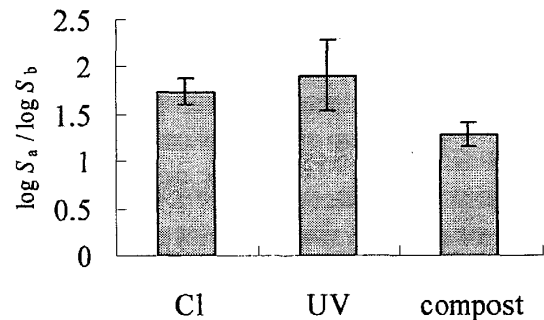


Fig.1 survival rate proportion of E. Coli inactivated

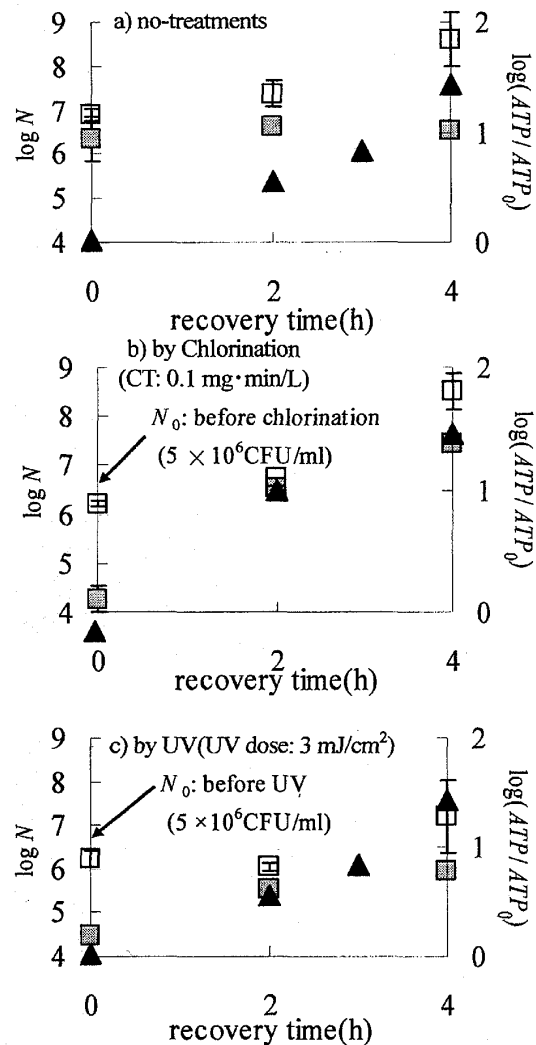


Fig.2 recovery of E. Coli by various treatments

■ selective media □ nonselective media ▲ ATP

0.291119

【参考文献】

- 1) G.A.McFeters et. al., 2004, 239-257, 培養できない微生物たち—自然環境中での微生物の姿, (株)学会出版センター
- 2) G.A.McFeters et. al., 1972, 805-811, American Society for Microbiology.

【発表状況】

生活工学研究, 2004, 6(2), 208-211

生活工学研究, 2005, 7(2), 164-165

第42回環境工学研究フォーラム講演集, 2005, 75-77,