

微生物の検出方法

detection methods of microorganisms

窪華奈子, 大瀧雅寛

Kanao KUBO, Masahiro OTAKI

お茶ノ水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

1.はじめに

浄水場で処理した水が配管を流れてきて蛇口から出てくる。日本ではこれはもはや当たり前になっている。厚生労働省「水道統計」によると平成10年度において上水道普及率が92.6%~98.0%(地域によって異なる)と報告されている。蛇口から出てくる水を安心して使用するために、給水栓の水や浄水場の水は水質検査され、水質基準を満たすように管理されている。しかし、もし水質検査をくぐりぬける因子があったならどうだろうか。この論文では、微生物検査をくぐりぬける可能性に関して述べる。

2.微生物の損傷

浄水場では必ず塩素“消毒”というプロセスがある。トイレ掃除には“除菌”効果あるいは“殺菌”効果のある洗剤を使って掃除する。実験器具は必要ならば“滅菌”する。このように細菌に対する処理の表現はいろいろある。実験においては“不活化”という表現が使われる。各々を英訳すると、

消毒: disinfect, sterilization

除菌: bacteria elimination, sterile filtration

滅菌: sterilization

殺菌: disinfect, sterilization

不活化: inactivation

以上から“消毒”、“殺菌”、“滅菌”は同様に“細菌を殺す”という意味を持ち、“除菌”は文字通り“細菌を取り除く”という意味を持つ。ここで気をつけたいのは、“sterile”には“無菌の”という意味と“安全性を保持した”という意味がある¹⁾ことである。そこで使用される漢字も考慮すれば“消毒”は、“安全とされる基準値を満たす程度に細菌を無害化すること”、“殺菌”及び“滅菌”は“細菌を完全に死なせること”と考えることもできる。“不活化”は“細菌の活性を失わせること”となる。

以上のように、細菌に対する処理とは、細菌が“生きている”状態から“死んだ”状態にすることだけを意味するのではないことがわかる。つこには“生きているが元気がない”状態も含まれる。このことについて、自然系内の微生物は各々が環境中のストレスにตอบสนองするため、“無傷”“様々な程度の損傷”“不可逆的(回復可能性がない)損傷”の3つの状態が存在すると指摘されている²⁾。前述の消毒に関する“無害化”や不活化に関する“活性を失わせる”という表現の中には“死んだ”状態にすることと“様々な程度の損傷”、“不可逆的損傷”を与えることが含まれている。従って損傷細菌が微生物検査を潜り抜ける可能性³⁾について考えると、消毒や不活化をした時点で細菌が検出されないことが、細菌に致命的損傷を与えているということを意味するものではない。この問題を解決するためには様々な処理方法における細菌に与える損傷の特徴をとらえ、これを把握することが重要である。

損傷細菌の特徴のひとつが、以前よりも厳しい栄養要求性をもつということである。ストレスを受ける前には選択培地で培養できていたものが、ストレスを与えると培養できなくなると報告されている。

⁴⁾ 実際に、非選択培地は無傷の細菌と損傷細菌を培養でき、選択培地は無傷の細菌のみを培養できるという仮定のもとに、各々の培地で培養した結果から各損傷率を算定したという報告もされている。しかし、複製能力の損失など、損傷の種類により非選択培地でも検出できない場合もあると考えられる。

もう1つの特徴が回復である。この回復は非制限的な条件で1~3時間培養することである。この期間を経て、前述のような選択培地と非選択培地で培養した結果、選択培地で培養できる細菌数が増加し、非選択培地で培養する細菌数と一致したという報告²⁾がされている。

3.微生物の検出方法

[乳糖ブイヨン法]⁵⁾

病原微生物の指標である大腸菌群を検出するのに用いられる。乳糖の分解により産出される酸とガスの割合より最確数をもって細菌数を求める。

[平板培養法]

検出したい細菌を培養できる寒天培地で培養し、コロニーを計数して細菌数を求める。選択培地の例として、大腸菌群はデスオキシコール酸塩培地で37℃19～20時間の培養で検出される。糞便汚染特定に使用される糞便性大腸菌群はM-FC寒天培地で44.5℃で24時間の培養して求められる。

[ATP法]⁶⁾

代謝活性を持つ微生物を検出することができる。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用し、発光量からATP量に換算することができる。

[DVC法]⁷⁾

代謝活性を持つ微生物を検出することができる。抗生物質であるナリジキシン酸を使用し、微生物の増殖能力を阻害した上で酵母抽出液により培養し、代謝活性が増殖の代わりに細胞伸張に使われるのを顕微鏡にて観察する。

[DAPI染色法]⁸⁾

損傷、無傷関わらず生きている微生物全てを検出することができる。DAPIはDNAと反応し、励起光(450nm～450nm)を当てると蛍光発光して蛍光顕微鏡で観察できるが、この物質は生細胞膜を通過することができるため、生死の判定に使われる。

[PCR法]⁹⁾

微生物のDNAを検出する。DNAの損傷箇所以外を検出する場合は死んだ微生物も検出してしまう。微生物のDNAポリメラーゼとオリゴヌクレオチド・プライマー対を用いてDNAの特定領域を増幅する方法である。

[ハイブリタイゼーション・プローブ法]¹¹⁾

PCR同様特定DNAを検出する方法であるが、そのDNAが損傷していない場合、生死に関わらず微生物を検出する。蛍光マーカーをつけたDNAまたはRNAプローブを用いてハイブリッドを形成させ蛍光発光させて検出する方法である。

4.まとめ

損傷細菌は水質検査においてだけでなく、新たに消毒方法を開発する際にも無視できない存在である。そのためには従来の検出方法だけでなく、上述の様々な方法を取り入れたり、回復過程を組み合わせたりして、損傷度合いも含めた消毒効果を把握しつつ実行することが重要だと考えられる。

【参考文献】

1. 松田徳一郎ら, リーダーズ英和辞典第2版, 研究社
2. Mossel, D.A. and P. van Netten. 1984. 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
3. J.R. Braswell, A.W. Hoadley, 1974, Recovery of *Escherichia coli* from chlorinated secondary sewage, *applied microbiology*, 28:328-329
4. Goldon A. Mcfeters, David G. Stuart, 1972. Survival of coliform bacteria in natural waters: field and laboratory studies with membrane-filter chambers, *applied microbiology*, 24:805-811
5. 松尾友矩ら, 1999, 大学土木 水環境工学, オーム社出版局
6. Linda L. Dawe, William R. Penrose, 1977, "Bactericidal" property of sea water: death or debilitation?, *applied and environmental microbiology*, 35:829-833
7. Kazuhiro Kogure, Ushio Simidu, Nobuo Taga, 1978, A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, *Canadian journal of microbiology*, 25:415-420
8. G.M. Luna, E. Manini, R. Danovaro, 2002, Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance, *applied and environmental microbiology*, 68:3509-3513
9. Rita R. Colwell, D. Jay Grimes, 培養できない微生物, 学会出版センター