

## 細菌の活性の指標としての ATP

ATP as indicator of microbial activity

窪華奈子, 大瀧雅寛

Kanakano KUBO, Masahiro OTAKI

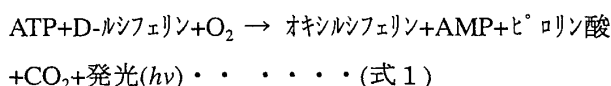
お茶の水女子大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

## 1.はじめに

今日、我々の身の回りでは様々な場面で微生物の活動および存在の制御が必要とされている。例えば、下水処理における活性汚泥法では微生物の有機物分解が活発である必要がある。また、上下水処理における病原微生物の消毒では、病原微生物を規定の数まで不活化しなければならない。細菌の制御において、生存細菌数を確認するためにコロニーカウント法がしばしば用いられる。この方法は、標的細菌用の栄養寒天培地と試料を混ぜ合わせて培養し、できたコロニーを計測するというものである。(1つの細菌が増殖して1個のコロニーを作る。)しかし、この方法は培養に長時間要することや、生存していても増殖能力を欠く細菌は測定できないことなどの欠点をもつ。そこでアデノシン三リン酸(ATP)を指標として使い、細菌の活性を測定することで、コロニーカウント法とは違う観点から細菌の状態を知ることができるという方法が提供されている。例えば、コンポスト化の過程を維持するために、堆肥中の分解菌の活動を、ATPから求められるということが報告されている。<sup>1)</sup>また、細菌の発育増殖層は遅滞期、対数増殖期、静止期、死滅期にわけられる。そのうち、代謝が活発で細胞のサイズが大きくなる遅滞期と、微生物が対数的に増殖する対数増殖期に ATP が活発に合成される。このことから ATP が細菌の活性の指標として利用できることが示唆される。

ATP はリン酸無水結合の分解(ATP→ADP)によりエネルギーを発生し、リン酸無水結合(ADP→ATP)によりエネルギーを貯蔵する。このはたらきにより、様々な代謝経路においてエネルギー

が円滑に利用されたり貯蔵されたりする。ATP法<sup>2)</sup>とはルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(式1)の発光量を測定し、ATP濃度に換算する方法である。専用のルミノメーターと発光試薬が必要である。



本研究では、UV不活化処理によりDNAを損傷し、増殖能力を欠いた細菌の活性をATP法により測定することを試みた。また、バイオトイレ担体処理により不活化された細菌のATPも測定し、違いを比較した。

## 2.実験方法

## 2.1 対象細菌と細菌濃度測定方法

微生物は対数増殖期にある *E.Coli*. K12(NBRC 3301)を使用した。Tryptic soy agarにて24h、37°Cで培養し、リン酸塩緩衝液に形成したコロニーを数個加え、攪拌したものを大腸菌溶液とした。細菌濃度はデスオキシコール酸塩培地を使用した二重寒天法によりコロニー計数にて求めた。

## 2.2 不活化処理

## [UV処理]

光源として低圧UVランプ(20w 東芝殺菌ランプ)を使用した。試料は大腸菌溶液15mLとし、シャーレ(直径5.4cm)に入れてスターラーで攪拌しながら、UVを照射した。照射時間は5s~2h、試料における線量率は約(0.4mW/cm<sup>2</sup>)であった。

## [バイオトイレ担体処理]

37°C、含水率50%の使用済みバイオトイレ担体(北海道大学提供)に大腸菌溶液を1mL投入し、1分間攪拌したものを試料とした。試料0.1gをビーフエキス(3%, pH9.5)10mLにとり、3分間攪拌したものを濃度測定およびATP測定に使用し

た。担体投入時間は1分~120分とし、1分の値を限りなく0分に近い値として大腸菌濃度及びATP濃度を求め、各々 $N_0$ 及び $ATP_0$ とした。

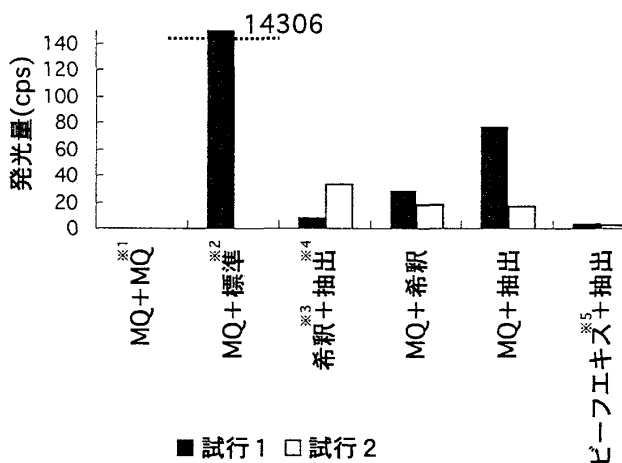
2.3ATP測定

各不活化処理された試料または未処理の大腸菌溶液0.1mLと、細菌からATPを抽出するためのATP抽出試薬(東洋ビーネット(株)LL100-2)をマイクロプレートに投入し、10秒以上静置した。マイクロプレートをルミノメーター(ATTO(株)ルミネッセンサーJNR-II)に設置し、ATP発光試薬(東洋ビーネット(株)LL100-1)を0.1mLずつ投入し、発光量を測定した。なお、各不活化処理に使用される塩素+チオ硫酸ナトリウム、ビーフエキス+バイオトイレ担体、ATP抽出試薬、リン酸塩緩衝液の発光量への影響も調べた。また、ATP標準試薬を使い、発光量を測定して検量線を作成し、ATP濃度を算出した。

3.実験結果と考察

図1の結果より、発光量が100cps以上であれば希釈水、抽出液、ビーフエキスによる発光量の影響は無視できると考えられる。

図2の結果より未処理の大腸菌の場合、コロニーカウントの結果の大腸菌濃度とATP濃度は比例関係であることがわかった。また、大腸菌濃度は $8 \times 10^4$  [CFU/mL]以下では希釈水や抽出試薬の影響を受けてATPに誤差がでる可能性があると考えられる。



※1 MQ: 滅菌済み Milli-Q 水 0.1mL, ※2 標準: ATP 標準試薬  $10^{-7}$ M 0.1mL, ※3 希釈: リン酸塩緩衝液 0.1mL, ※

4 抽出: 抽出試薬 0.1mL, ※5 ビーフエキス: バイオトイレ担体 1mg/mL を含むビーフエキスを10倍希釈したもの

図1 各試薬及び物質の発光量への影響

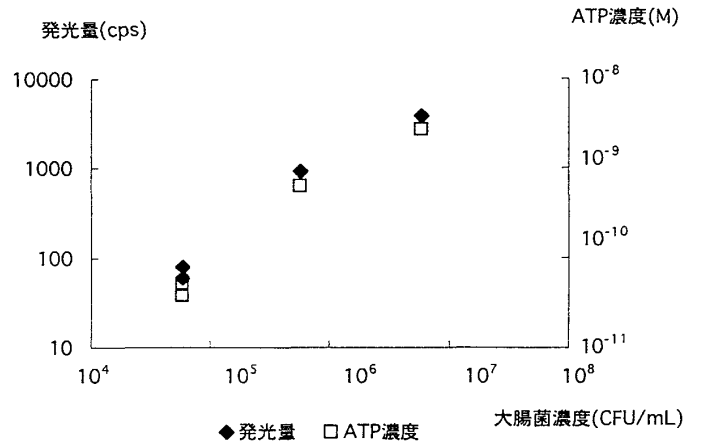


図2 未不活化処理大腸菌濃度(コロニーカウントによる)と発光量及びATP濃度

図3及び図4に示される結果よりコロニーカウント法により求めた大腸菌濃度変化とATP濃度変化が異なることがわかった。コロニーカウントでは、99.999%不活化するのにUV照射時間20秒かかった。しかしATPはUV照射5秒で上昇し、その後照射30秒までは減少傾向にあるものの、それ以上照射するとやや上昇し、一定に保たれている。ATPはUVを120分以上照射すると大きく下降していることがわかる。この理由として、対数増殖期で使用されるATPが増殖できなくなった大腸菌においては使用されずに余ってしまい、その結果ATP濃度が増加したのではないかと考えられる。そして、貧栄養状況にあるために異化作用が促進されないことでATP濃度の生成も減少したことで、見かけのATP濃度が一定となったと考えられる。また、UVを2時間以上照射するとATP濃度が急激に下降していることから、酵素(タンパク質)の生成阻害等のために酵素量が不足し、ATP生成量及び使用量が減少したことが原因ではないとも示唆される。また、図5には各時間UVを照射した試料を不活化後に30分~2時間室温で保存した後にATP濃度を測定した結果である。ATP濃度が

変化しないことから、UV を 2 時間照射したときに ATP が大きく下降したのは、貧栄養状態で異化作用(ATP 生成)が阻害されたことが原因ではないと考えられる。以上の考察を図 6 にまとめた。

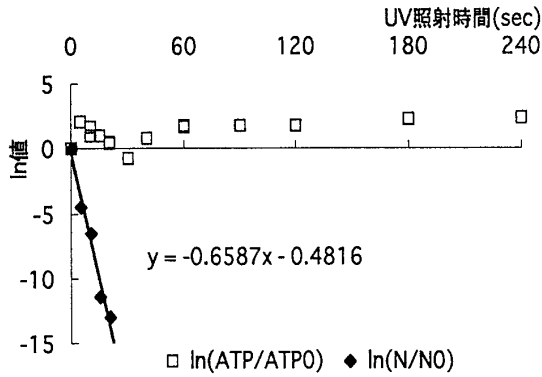


図 3 UV 照射処理により不活化された大腸菌の濃度変化(コロニーカウントによる)と ATP 変化

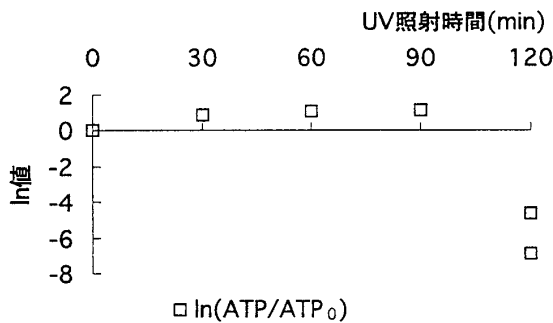


図 4 UV 照射処理により不活化された大腸菌の ATP 変化

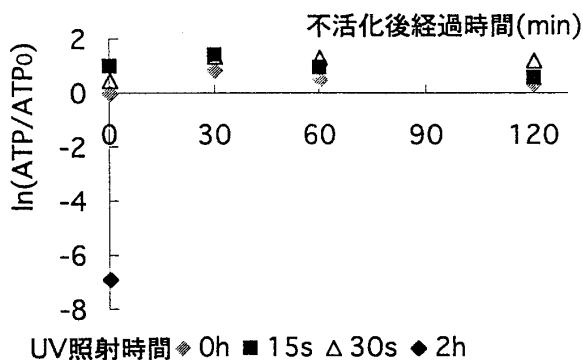
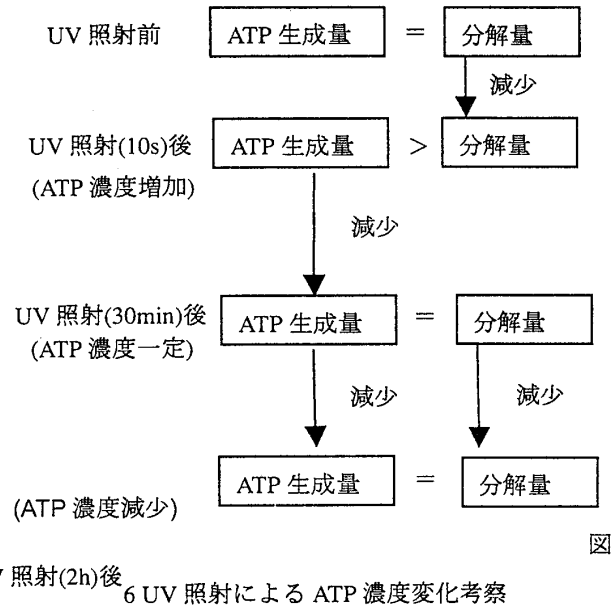


図 5 UV 処理により不活化された大腸菌の不活化後経過時間後の ATP 変化



図

図 7 よりバイオトイレ担体処理においてもコロニーカウントの結果と ATP 濃度の変化が異なることがわかった。UV 処理の場合と異なり、ATP 濃度は一定であった。これはバイオトイレ担体処理により ATP の生成量及び使用量が減少したためであると考えられる。さらに長時間処理を続けることにより ATP 濃度は減少する可能性も考えられる。バイオトイレ担体処理の不活化機構は未だ不明であるが、UV の不活化機構とは異なるということもこのことから示唆される。

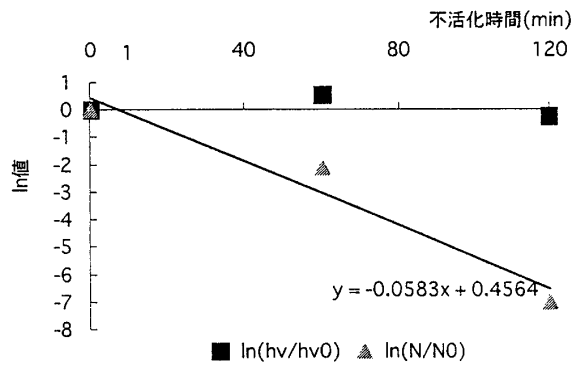


図 7 バイオトイレ担体処理により不活化された大腸菌の濃度変化(コロニーカウントによる)と ATP 変化 4.まとめ

細菌の不活化後の活性の指標として ATP 濃度変化を測定する際には細菌の損傷や、実験に使用する細菌の状態(栄養条件や発育増殖層等)による ATP の生成量及び分解量の変化を考慮する必

要があるという知見が得られた。

【参考文献】

- 1) J.-I.Horiuchi et al., 2002, Simplified method for estimation of microbial activity in compost by ATP analysis, *Bioresource Technology*, 86, 95-98,
- 3) Tobias Kiesslich et al., 2003, Fast and reliable determination of intracellular ATP from cells cultured in 96-well microplates, *Biochem.Biophys.Methods*, 57, 247-251