

## 迅速・高精度な細菌モニタリング

大阪大学大学院薬学研究科 山口 進康, 馬場 貴志, 那須 正夫  
環境科学技術研究所 多胡 靖宏

### Rapid and accurate monitoring of bacteria

*Nobuyasu Yamaguchi, Takashi Baba and Masao Nasu*

Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

*Yasuhiro Tako*

Institute for Environmental Sciences, Kamikita, Aomori 039-3212

E-mail: nasu@phs.osaka-u.ac.jp

**Abstract:** A Controlled Ecological Life Support System (CELSS) is essential for habitation in extreme environments (space, polar regions, ocean depths, etc.) and an enormous amount of freshwater is used and regenerated for drinking and living. In order to assure human health, microbiological quality control of freshwater used in CELSS is required, and bacterial population dynamics in the system should be determined rapidly and accurately. In this study, bacterial abundance and the numbers of bacteria with physiological activity in freshwater used and regenerated in Closed Ecology Experiment Facilities (CEEF; Aomori, Japan) during the Closed Habitation Experiments were determined to understand bacterial abundance and activity in a closed habitation. The numbers of total bacteria and esterase-active bacteria in each sample were determined by fluorescent staining techniques. Colony-forming units were determined by the plate-counting technique and growing cells were also counted by the microcolony method. Our results suggest that bacterial numbers and their activities in freshwater used in CELSS could be accurately determined within a few hours by fluorescent vital staining. Rapid microbiological methods would contribute to the technical progress in the quality assurance of freshwater used in CELSS. For further simple and automated microbiological monitoring, we developed a simplified microfluidic device for quantification of bacteria in potable water. Comparisons of counts of *Escherichia coli* by the microfluidic system and by fluorescence microscopy closely correlated ( $r^2=0.99$ ). Bacteria in natural mineral water and in purified household tap water were accurately enumerated by using this system within 15 min after fluorescent staining.

**Key words:** Space Habitation, Freshwater, Microbiological Monitoring, Rapid Microbiological Methods, Microfluidic device

## 1. 緒言

これまで宇宙ステーションにおける安全対策は、物理的・化学的な側面からは十分に図られてきたが、衛生微生物学的な安全対策についてはその重要性が認識されているものの、未だ十分な知見が集積されていない。微小重力下ではヒトの免疫能が低下するという報告があり、地上では健康人に対してはほとんど病原性がないとされる微生物による日和見感染のリスクが高くなるため、地上での生活以上に微生物汚染に対して注意を払う必要があると言われている<sup>1)</sup>。また宇宙ステーション内の微生物は搭乗者の健康に対するリスクとなるばかりではなく、電子機器や配線等を腐食させ、機器のトラブルの原因になることも報告されている<sup>1)</sup>。したがって、宇宙ステーション内を衛生微生物学的に評価し、宇宙滞在や宇宙居住における安全・安心を保証するための基盤

を構築しなければならない。

宇宙居住においては、大量の淡水が使用され、さらにその再利用が必要となる。したがって、宇宙居住の実現のためには、使用または再利用する淡水の衛生微生物学的な安全性の確保が重要となる。そのためには、閉鎖居住空間内の水環境中に存在する微生物の現存量や生理状態を正確に把握することに加え、危害微生物を特異的に検出しなければならない。

これまで微生物を検出・同定する手法として、培養法が一般的に用いられてきた。しかしながら、水環境中に生息する細菌の多くは、通常の培養法では目に見えるコロニーを形成しないことが明らかとなってきた。また培養過程に時間を要するとともに、微生物を増殖させることからバイオハザードのリスクが上昇する等の問題点がある。そこで、閉鎖居住システムで用いられる水の衛生微生物管理には、迅

速かつ高精度な新たな微生物検出法が求められている。

我々は蛍光染色法や分子微生物生態学的手法など、微生物を培養することなく個々の細胞レベルで検出し、さらに群集構造を解析するための方法を開発してきた<sup>2)</sup>。核酸結合性蛍光染色剤を用いて微生物を直接染色することにより、その現存量を把握できる。また蛍光活性染色法を用いることにより、エステラーゼ活性を有する細菌数を数分間で測定できる。そこでこれらの手法を用いて、閉鎖型生態系実験施設 (CEEF; Closed Ecology Experiment Facilities)<sup>3)</sup>における生活用水および水耕栽培用水中に存在する細菌の現存量を測定し、その生理活性を評価した。さらに、細菌モニタリングの自動化のために、マイクロ流路デバイスを用いた細菌数測定法を開発した。

## 2. 材料と方法

**試料** (財)環境科学技術研究所内の閉鎖型生態系実験施設において、2週間の閉鎖居住実験(2007年10月16日から10月30日)の終了時に、上水タンク、居住区および水耕栽培区より試料水を採取した (Fig. 1)。居住区では浄水器を通した飲用水の他、流し、洗面台、シャワー室の蛇口より水または湯を採取した。植物栽培区ではタンク、ダイズやイネの栽培槽から栽培液を採取し、同時に凝結水を採取した。

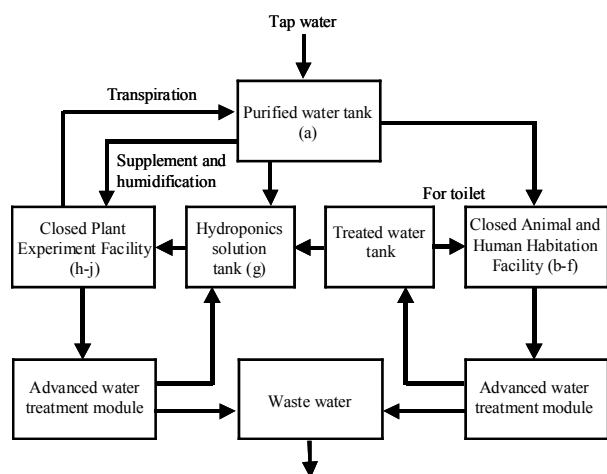


Fig. 1. Water flow in the Closed Ecology Experiment Facilities (CEEF). 10 samples from this system were collected and analyzed: Purified water in tank (a), Closed Animal and Human Habitation Facility (b-f), hydroponic solution in tank (g), Closed Plant Experiment Facility (h-j).

### コロニー形成細菌数 (CFU) の測定

各試料を段階希釈し、その 100  $\mu$ l を水環境中の細菌検出に用いられる貧栄養培地である R2A 寒天培地に塗抹した。25°C で 7 日間培養した後、培

地表面に生じたコロニーを計数した。

### 全細菌数およびエステラーゼ活性を有する細菌数の測定

全細菌数の測定には 4', 6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI) を用い、エステラーゼ活性を有する細菌数測定には carboxyfluorescein diacetate (CFDA) を用いた<sup>4)</sup>。試料中の細菌をポリカーボネートフィルター (直径 25 mm, 孔径 0.2  $\mu$ m) 上に捕集し、染色用バッファー (0.1 M phosphate buffer [pH 8.5], 5% [w/v] NaCl, 0.5 mM EDTA) を添加した後、6CFDA 溶液 (10 mg/ml DMSO 溶液) および DAPI 溶液 (10  $\mu$ g/ml 水溶液) をそれぞれ終濃度 150  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml となるように添加し、約 3 分間染色を行った。観察にあたっては、蛍光顕微鏡 (E-400; ニコン社) の青色励起光下でエステラーゼ活性を有する細菌を計数し、UV 励起光下で全細菌を計数した。計数にあたっては、20 視野を計数し、菌数の平均値が 2 以下または 0 の視野数が 5 視野以上の場合に検出限界以下とした。

### マイクロコロニー形成細菌数 (mCFU) の測定

試料中の細菌をポリカーボネートフィルター (直径 25 mm, 孔径 0.2  $\mu$ m) 上に捕集し、フィルターのろ過面を上にして R2A 培地上、25°C で 24 時間静置した。その後 4%ホルマリンを染みこませたろ紙の上にフィルターを 30 分以上静置してフィルター上の細菌を固定した。SYBR Gold 溶液 (invitrogen 社; 原液を 1,000 倍希釈, 2% [w/v] Tween 20 を添加) を染みこませたろ紙の上に 10 分間静置し染色した後、無菌水を染みこませたろ紙上に約 1 分間静置してフィルターを洗浄し、蛍光顕微鏡を用いてマイクロコロニーを観察・計数した。観察にあたっては、蛍光顕微鏡 (E-400) の青色励起光下で計数した。計数にあたっては、20 視野を計数し、マイクロコロニー数の平均値が 2 以下または 0 の視野数が 5 視野以上の場合に検出限界以下とした。

### マイクロ流路システム

マイクロ流路デバイスは、polydimethylsiloxane (PDMS) およびスライドガラスで作製した。ソフトリソグラフィにより、PDMS に微小流路を作製した<sup>5)</sup>。マイクロ流路デバイスのサイズは 48 mm  $\times$  23 mm, 微小流路は 28.5 mm  $\times$  14 mm となるように作製した。微小流路の幅は 75  $\mu$ m, 深さは 15  $\mu$ m とした (Fig. 2A)。

細菌数測定にあたっては、蛍光染色した試料をマイクロシリンジ内に充填し、マイクロ流路デバイスとシリコンチューブでつないだ。シリンジポンプを用いてマイクロシリンジ内の細菌試料をデ

バイスの微小流路に一定の速度で流した。マイクロ流路デバイスをシステムのステージに固定し、流路内を倍率 20 倍の対物レンズを用いて観察した。蛍光顕微鏡にカラー CCD カメラをマウントし、青色励起光下で微小流路を流れる細菌の映像を、パーソナルコンピュータのハードディスクに記録した。記録した映像を再生し、一定時間内に流路内を流れる細菌数を測定した (Fig. 2B)。映像の記録時間は 10 分以下とした。

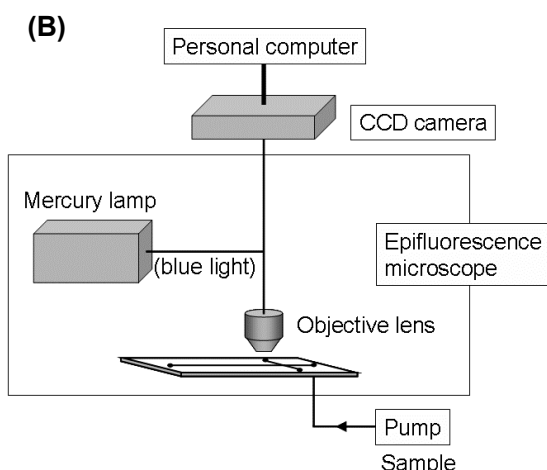
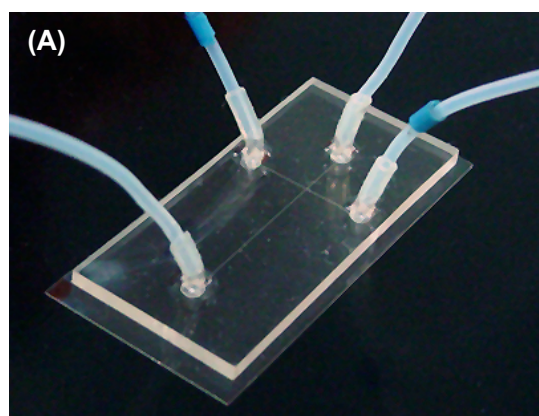


Fig. 2. Microfluidic system. (A) Fabricated microfluidic device. (B) Schematic representation of microfluidic system.

マイクロ流路システムの細菌数測定精度の確認にあたっては、大腸菌 O157:H7 ATCC43888 (非病原性) 株を LB 培地で定常期になるまで培養した。菌体を遠心操作により集め、中性リン酸緩衝液で 2 回洗浄した。洗浄した細菌を  $10^4$  から  $10^6$  cells/ml となるように無菌水で希釈し、SYBR Green II (invitrogen 社; 原液を 1,000 倍希釈) で 5 分間、室温で染色後、直ちに蛍光顕微鏡およびマイクロ流路デバイスを用いて、細菌数を測定した。

さらに、飲用水 (ナチュラルミネラルウォーターおよび浄水器を通した水道水) 中の細菌数についてもマイクロ流路システムで測定し、蛍光顕微鏡で得

られた計数値と比較した。

### 3. 結果と考察

#### 閉鎖居住空間における細菌数と生理活性

居住区において、全細菌数は飲用水では検出限界以下であり、他の生活用水では  $10^3 \sim 10^4$  cells/ml であった。これらは、地下水などの清浄な水環境中の細菌数と同程度であった。また全細菌の約 40% がエステラーゼ活性を有していた。水耕栽培区における全細菌数は  $10^4 \sim 10^5$  cells/ml であり、居住区と比べ 10 倍高くなっていた。しかしながら、商業的に利用されている水耕栽培システムでは全細菌数が  $5 \times 10^6$  cells/ml を超えることも頻繁にあることから、CEEF における水耕栽培システムでは細菌の顕著な増殖は起こっていなかったことがわかった。

CEEF における水耕栽培液は毎週交換されており、このような管理方法は、閉鎖型システムで使用する水の微生物管理方法として、有効であると考えられる。

また、居住区の流しで採取した水では全細菌数の約 40% が R2A 培地上でコロニーを形成した。河川や湖沼などの自然環境中においては、R2A 培地上でコロニーを形成する細菌の割合は 1~10% 程度であり、居住区内の流しで採取した水におけるその割合は、自然環境中に比べ高かった。したがって、閉鎖居住空間においては、細菌数の測定だけでなく、その生理活性についても評価し、システムの状態を評価することが重要であるとわかった。

#### マイクロ流路システム

大腸菌および地下水試料について、マイクロ流路システムで得られた細菌数は、蛍光顕微鏡で求めた値の 75~99% であった。したがって、今回作製した計数システムは、蛍光顕微鏡と同等の定量性を有し (Fig. 4)、しかも飲用水をはじめとする菌数の少ない試料 ( $10^4$  cells/ml レベル) に適用できることがわかった。

本手法は蛍光染色した細菌をフィルター上に捕集することなく約 15 分間で計数可能である。すなわち、マイクロ流路デバイスを用いることにより、細菌を培養することなく、迅速にその計数ができる。またマイクロ流路デバイスは閉鎖系であるために、バイオハザードのリスクを軽減することができる。したがって、細菌数測定の自動化に大きく寄与するものと考えられる。

また今回は、核酸結合性の蛍光染色剤を用いて、水試料中の全細菌数を測定した。今後、エステラーゼ活性の指示薬である CFDA を用いることにより、試料中の生菌数測定も可能となると考えられる。

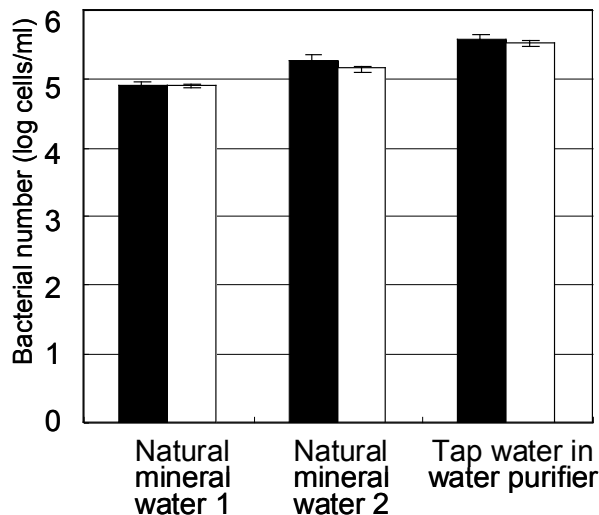


Fig. 3. Bacterial numbers in potable water determined by fluorescence microscopy (■) and microfluidic system (□).

#### 4. 結論

蛍光活性染色法により、閉鎖居住空間における細菌の現存量や生理状態の変化を数時間内に知ることができ、これらの情報をもとに的確な対策ができるようになる。したがって、蛍光活性染色法は閉鎖居住システムの衛生微生物学的に安全な運用のために有用であると考えられる。

またマイクロ流路デバイスを用いることにより、細菌数を自動かつ、より安全に測定できることがわかった。今後、染色反応をデバイス上で行えるよう改良することにより、蛍光活性染色法による閉鎖居住空間の迅速・高精度な細菌モニタリングの自動化が可能になるものと考えられる。

#### 5. 謝辞

本研究は（財）日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に関する地上研究公募」プロジェクトの一環として行ったものである。閉鎖型生態系実験施設は青森県からの委託事業として運用された。

#### 6. 参考文献

- 1) 一條知昭, 那須正夫: 宇宙居住環境中の微生物. 生態工学会誌, 19: 185-189 (2007)
- 2) 大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野 (衛生化学): 環境微生物学実験プロトコール. KEY LAB, 大阪, 2006.
- 3) 馬場貴志, 山口進康, 篠原正典, 多胡靖宏, 那須正夫: 閉鎖型生態系実験施設 (CEEF) の水環境中における細菌の動態. 生態工学会誌, 20: 11-17 (2008)
- 4) Yamaguchi N., Kenzaka T., Nasu M.: Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. Microb. Environ., 12:

1-8 (1997)

- 5) Yamaguchi, N., Sakamoto C., Yamada M., Nagase H., Seki M, Nasu M.: Rapid quantification of bacterial cells in potable water using a simplified microfluidic device. J. Microbiol. Methods, 68: 643-647 (2007)