

水・大気環境連携セミナー2024
2024-12-11

水中微生物のモニタリングの新提案

佐藤 久

北海道大学大学院 工学研究院 環境工学部門

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html>

法で定められた基準値の確認

- 水道水質基準 : 大腸菌。 水道水の衛生学的安全性の担保
- 一般排水基準 : 大腸菌群。 水質汚濁防止
- 環境基準 : 大腸菌。 生活環境の保全
- 食品衛生法など : 一般生菌、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、緑膿菌、、、
食中毒防止

糞便汚染の指標細菌

病原体を検出したい。

しかし、病原体は多種多様であり、特異的に検出することは難しい。

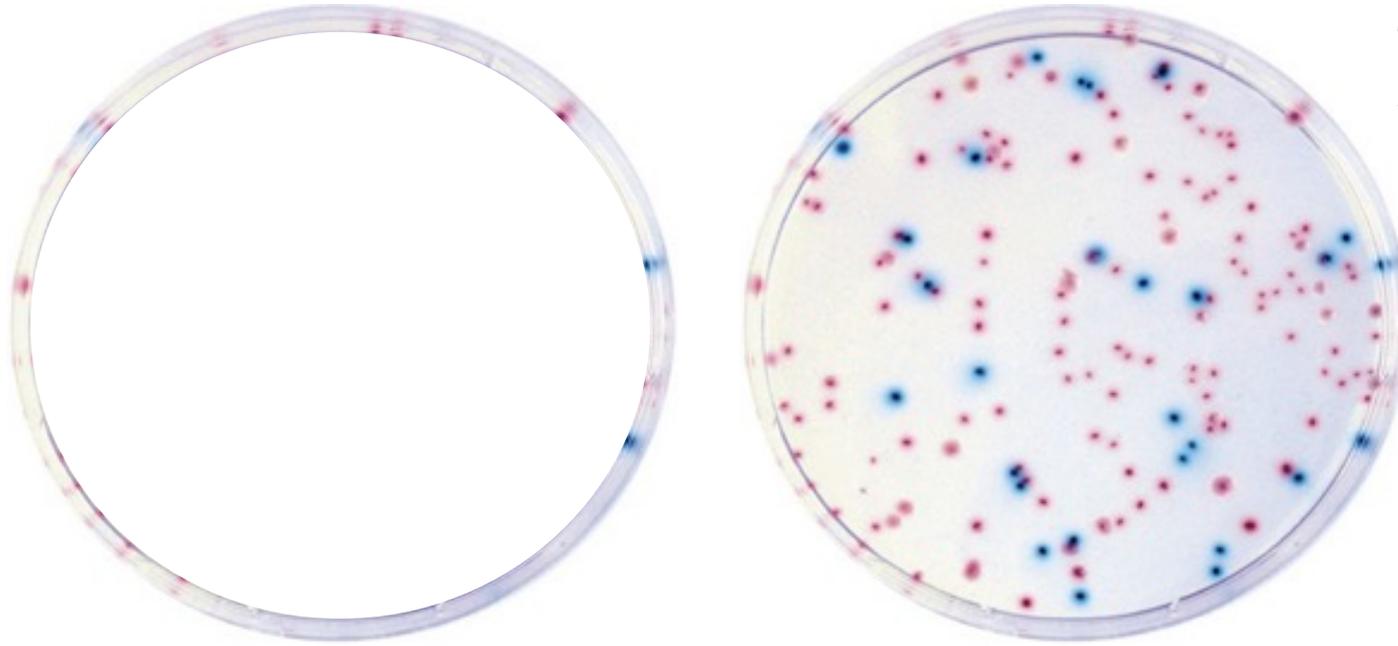
病原体は主に温血動物の腸管内に存在する。

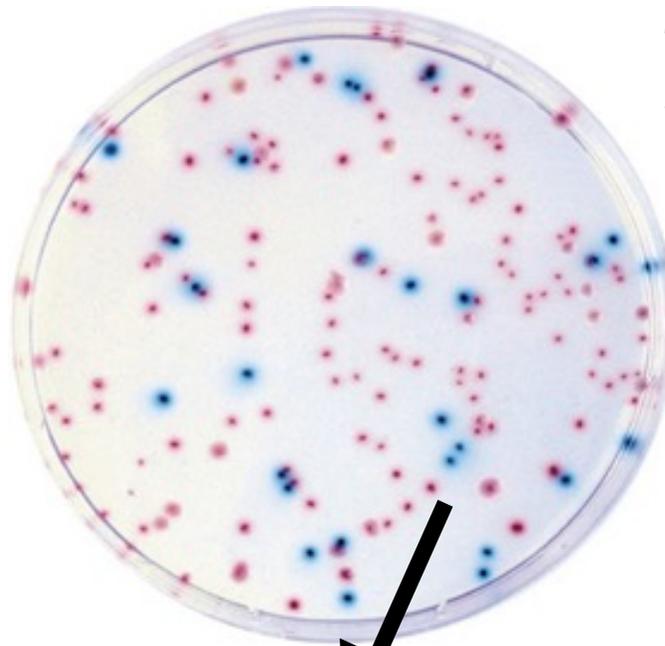
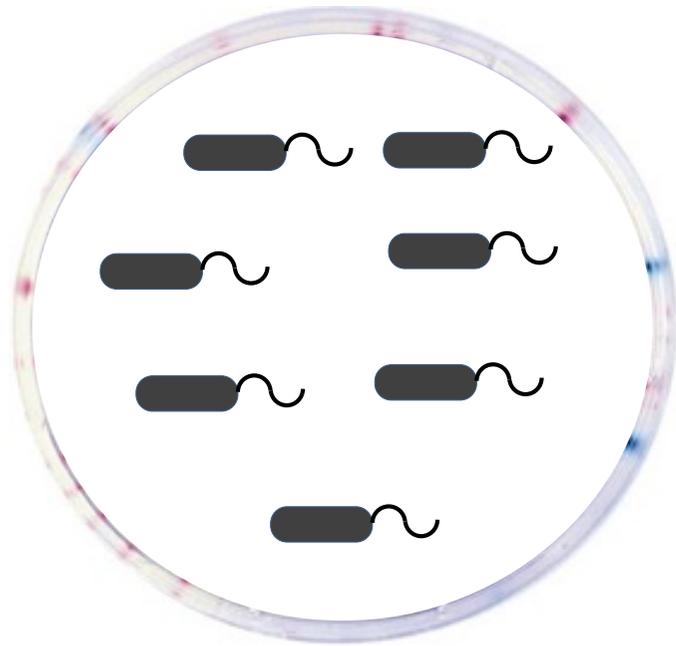
糞便汚染を検出すれば良い。

糞便中に存在する細菌は、大腸菌や腸球菌。

24時間培養。

何故24時間待たなければいけないか？



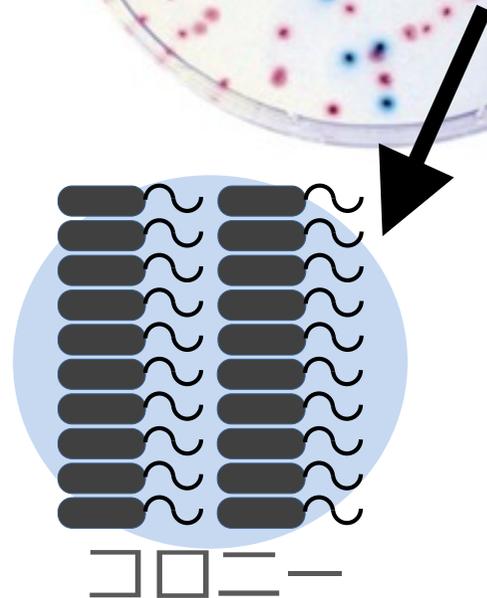


24時間培養。

何故24時間待たなければいけないか？

大腸菌は小さくて見えないから。

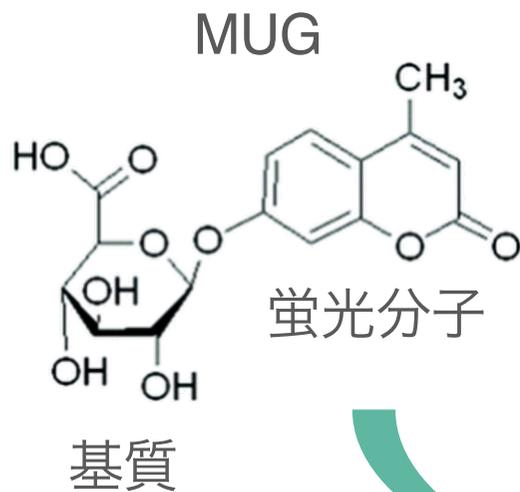
24時間培養することで、コロニーという、肉眼で見えるものを作る。



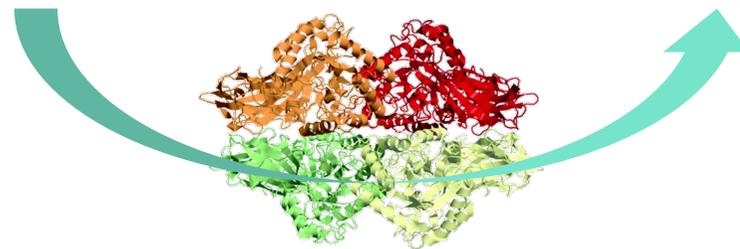
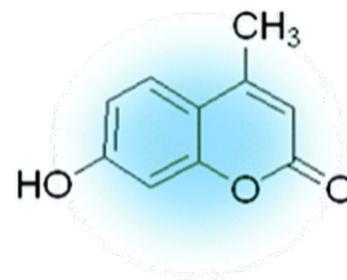
大腸菌用の特定酵素蛍光基質：

4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド (MUG)

水道水質基準の大腸菌の公定法



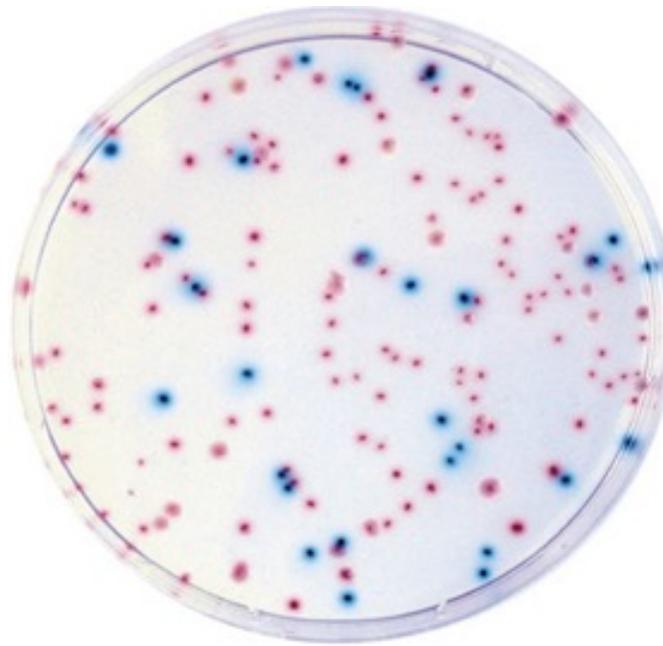
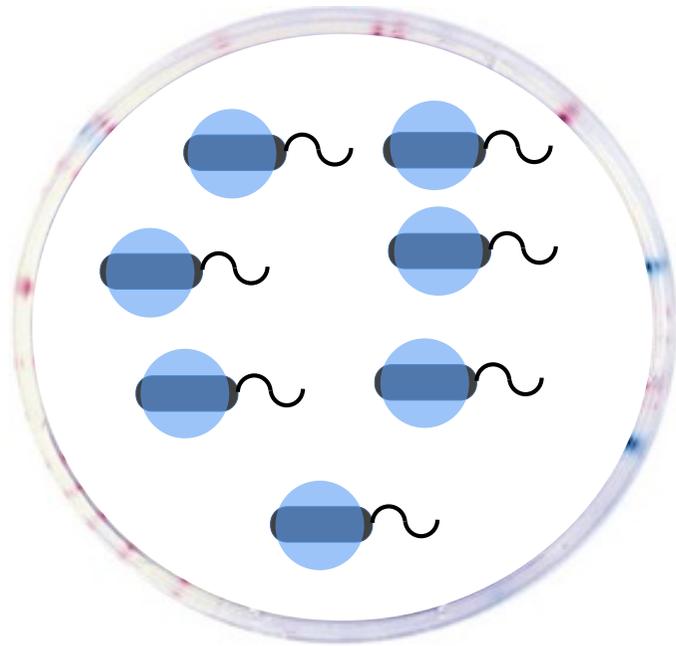
4-メチルウンベリフェロン



酵素：β-D-グルクロニダーゼ



有 無



24時間培養。

何故24時間待たなければいけないか？

大腸菌は小さくて見えないから。

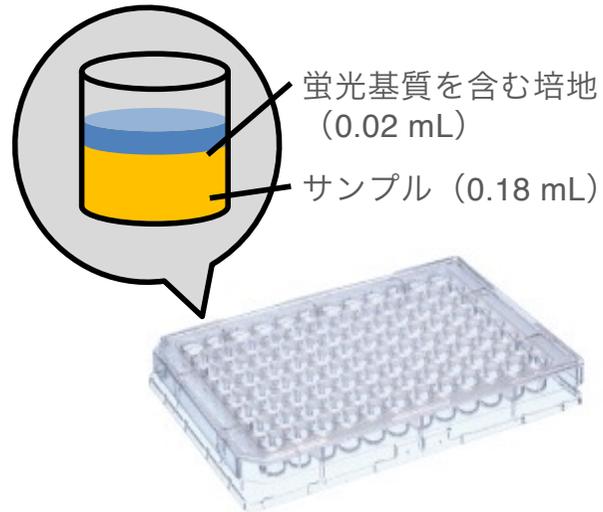
24時間培養することで、コロニーという、肉眼で見えるものを作る。

高感度で検出すれば培養しなくても検出できるのではないか？

培地の組成

成分	濃度 (g/L)
トリプトース	5.0
NaCl	5.0
ソルビトール	1.0
トリプトファン	1.0
リン酸水素二 カリウム	2.7
リン酸二水素 カリウム	2.0
ラウリル硫酸 ナトリウム	0.1
IPTG	0.1
特定酵素蛍光 基質 (MUG)	22 μ M

96ウェルマイクロプレート

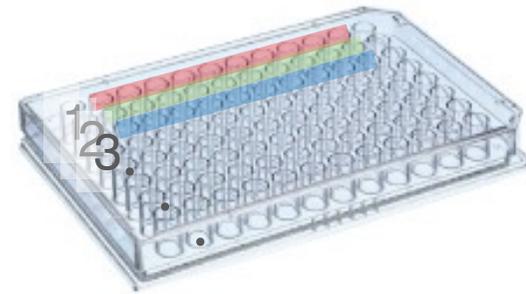
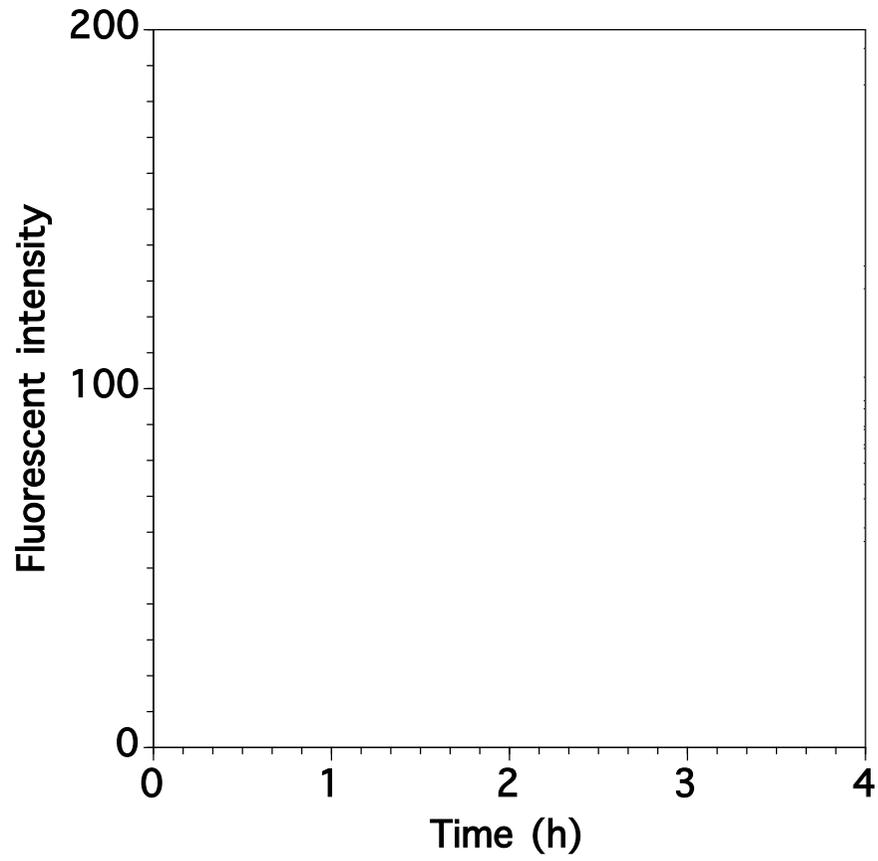


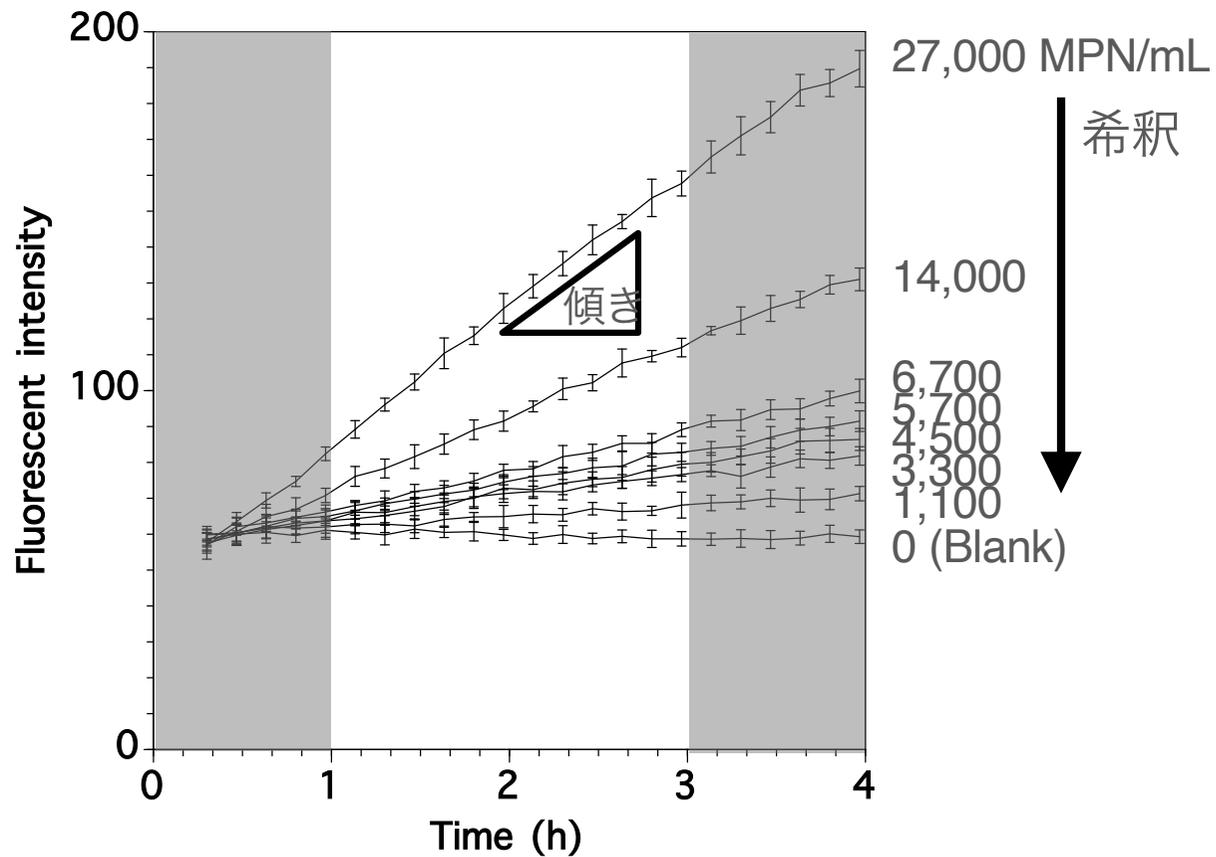
マイクロプレートリーダー

- ・ 37°Cで培養
- ・ 10分毎に蛍光強度を測定

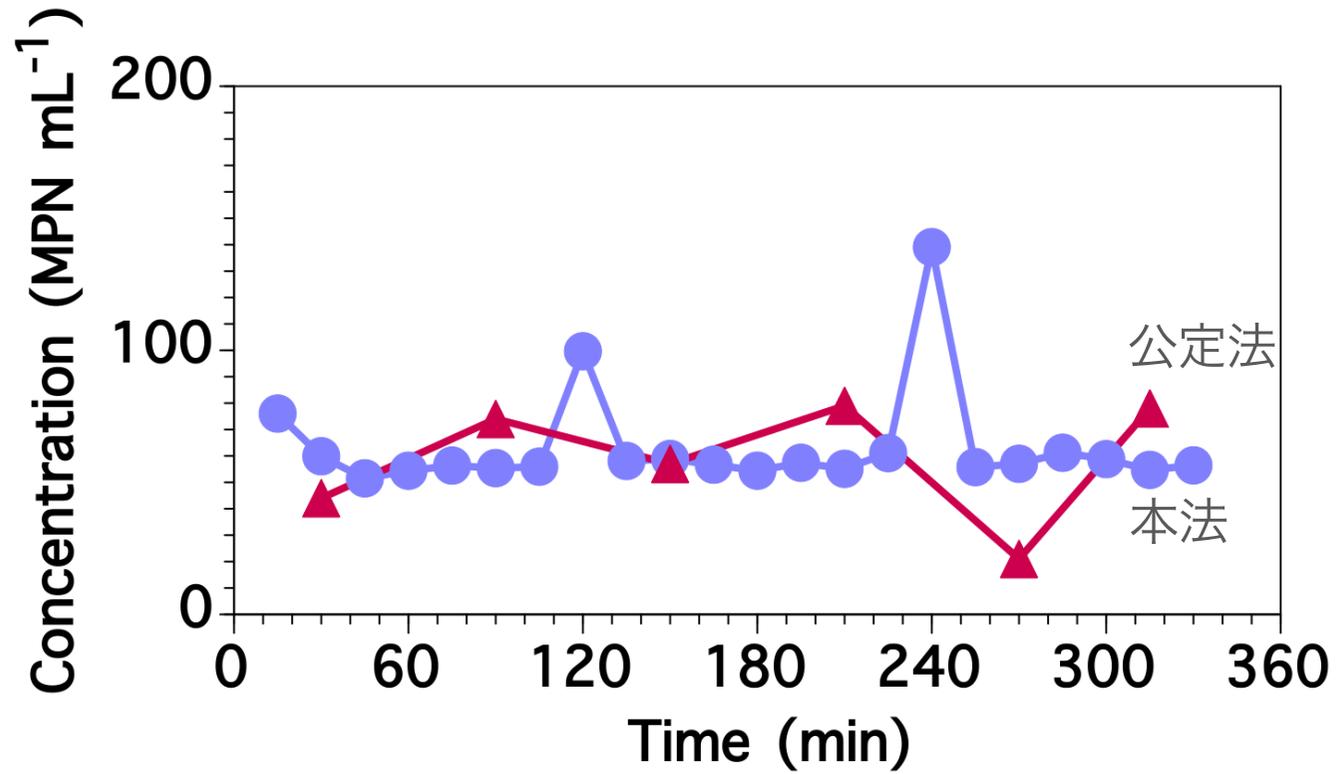


大腸菌数 (MPN/mL) の測定 : Colilert[®]とQuanti-Tray (IDEXX社)





例えるなら、縦軸は「わんこそば」のお椀。
 大腸菌数（公定法）と「傾き」で検量線を作成、
 未知のサンプル中の大腸菌数を測定。





法で定められた基準値の確認

- 水道水質基準 : 大腸菌。 水道水の衛生学的安全性の担保
- 一般排水基準 : 大腸菌群。 水質汚濁防止
- 環境基準 : 大腸菌。 生活環境の保全
- 食品衛生法など : 一般生菌、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、緑膿菌、、、
食中毒防止

糞便汚染の指標細菌

病原体を検出したい。

しかし、病原体は多種多様であり、特異的に検出することは難しい。

病原体は主に温血動物の腸管内に存在する。

糞便汚染を検出すれば良い。

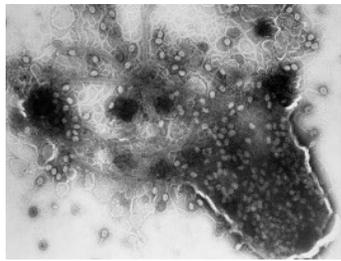
糞便中に存在する細菌は、大腸菌や腸球菌。

特異的に検出したい。

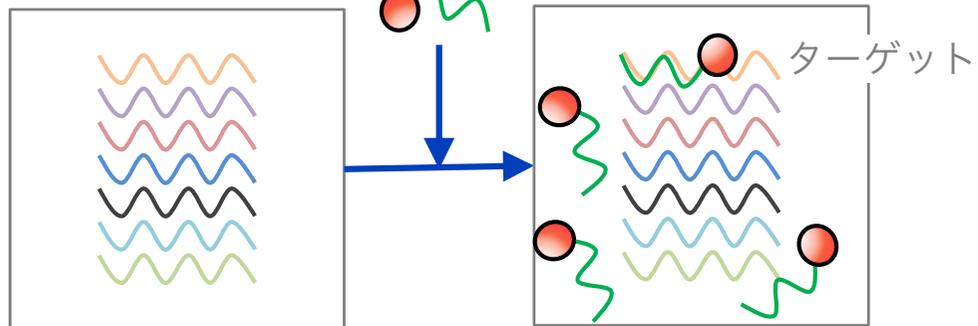
5nm 金ナノ粒子



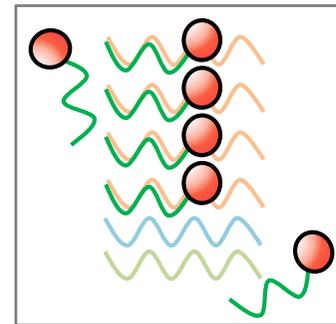
ターゲット微生物の核酸 (DNA、RNA)
のみに結合する塩基配列を持つDNA



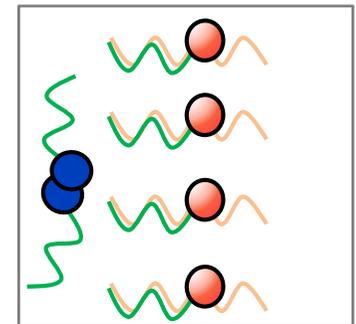
核酸抽出後の
サンプル



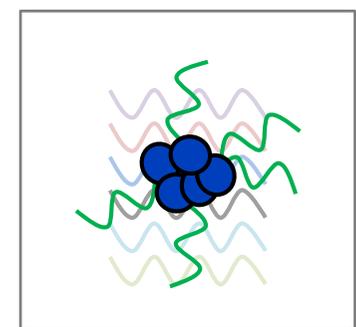
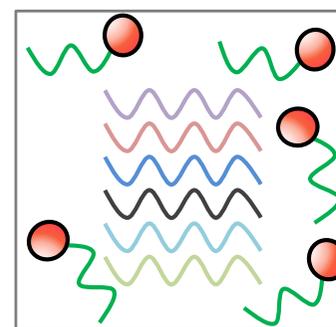
高濃度



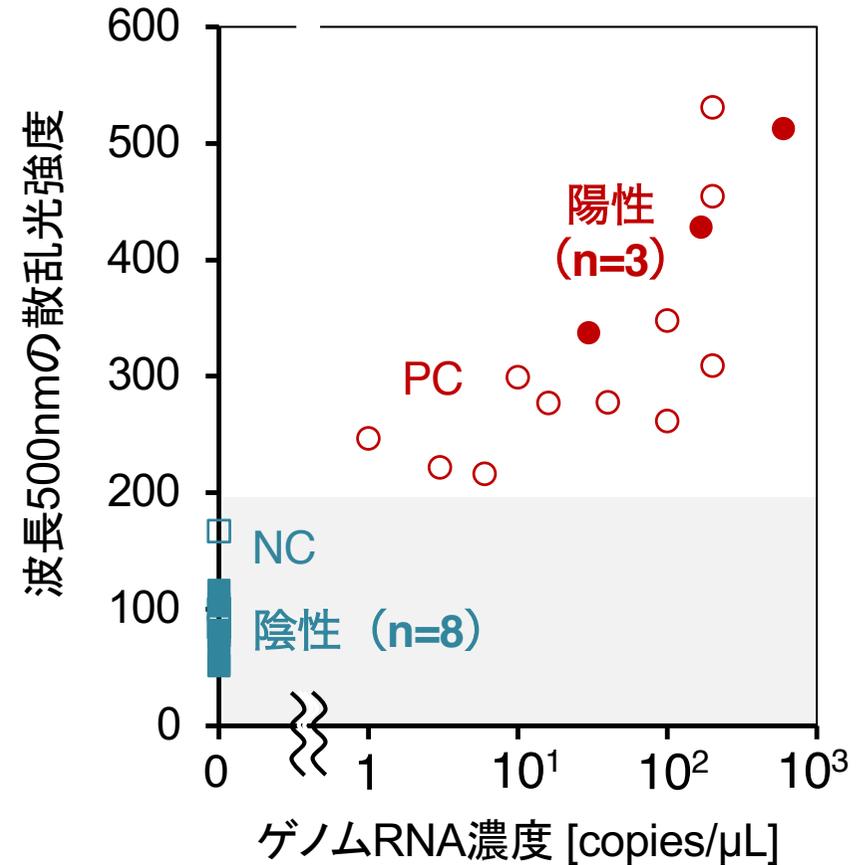
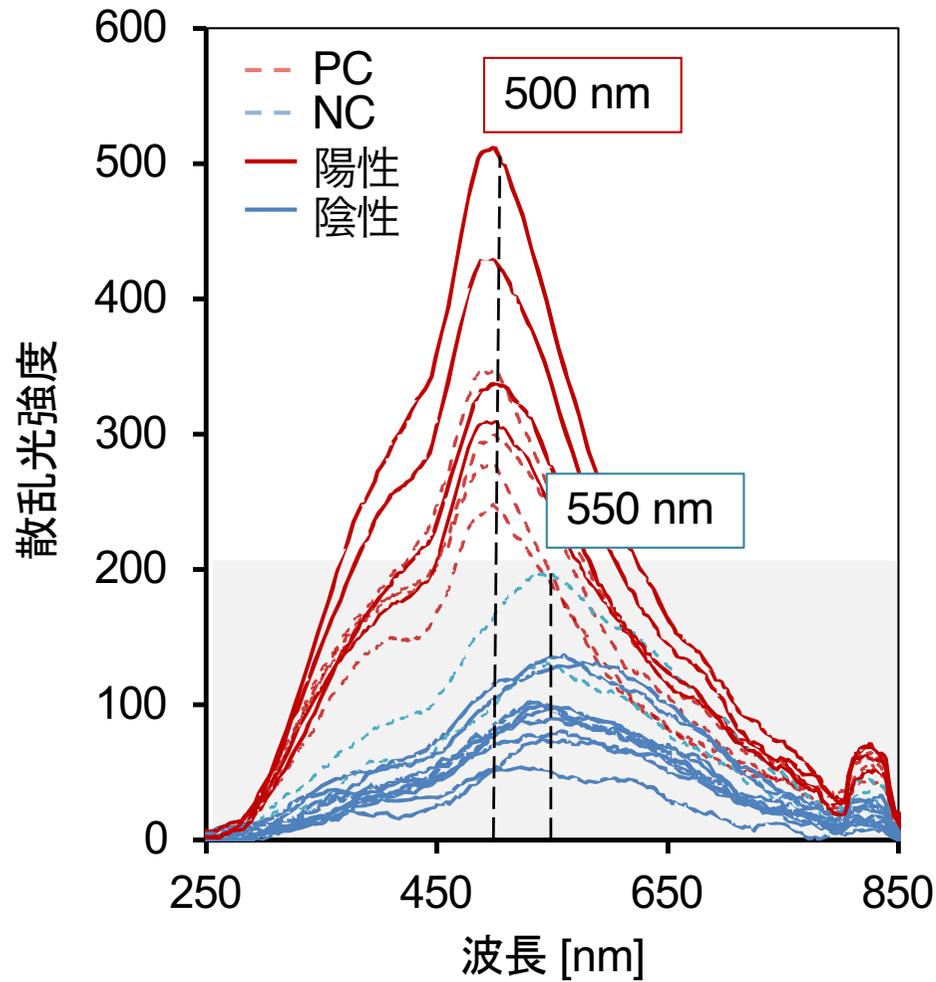
NaCl



なし



SARS-CoV-2のゲノムRNAの検出



法で定められた基準値の確認

- 水道水質基準 : 大腸菌。 水道水の衛生学的安全性の担保
- 一般排水基準 : 大腸菌群。 水質汚濁防止
- 環境基準 : 大腸菌。 生活環境の保全
- 食品衛生法など : 一般生菌、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、緑膿菌、、、
食中毒防止

糞便汚染の指標細菌

病原体を検出したい。

しかし、病原体は多種多様であり、特異的に検出することは難しい。

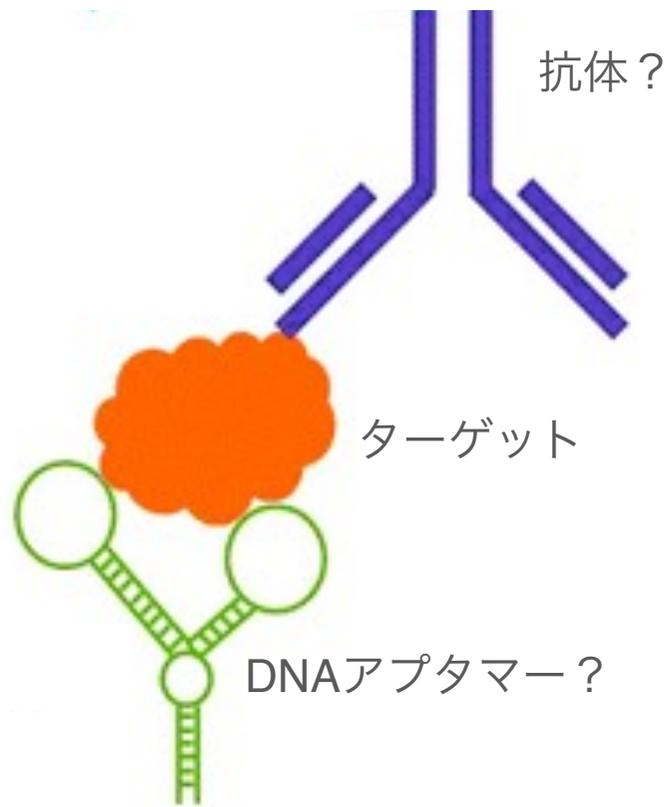
病原体は主に温血動物の腸管内に存在する。

糞便汚染を検出すれば良い。

糞便中に存在する細菌は、大腸菌や腸球菌。

核酸抽出せずに、より簡便に、特異的に検出したい。

- 抗体（タンパク質）と類似の機能を持つ一本鎖DNA
- ギリシャ語のaptus（結合する）と merus（粒子）に由来
- 自己相補的結合により複雑な3次元構造を形成
- 「形」によりターゲットと特異的に結合。抗体と同様の「鍵」と「鍵穴」の関係
- 結合：水素結合、分子間力、静電気力
- 抗体の代替分子
- センサー素子として利用



- 動物を犠牲にすることなく化学的に大量合成可能
- 再生産時の高再現性
- 改変（ラベル化および固定化）しやすい
- 高選択性、高親和性
- 非免疫原性
- 分子量が小さい
- 容易に解離. センサーの繰り返し利用可能

ターゲット	検出限界値
As(III)	5.3 ppb
Hg(II)	0.92 nM
Pb(II)	4 nM
アデノシン	5 nM
ATP	0.1 nM
コカイン	0.5 μ M
イブプロフェン	5 μ M
トロンビン	7.82 aM
Mucin 1 protein	2.2 nM
インフルエンザウイルス	0.43 pM
ノロウイルス	10 aM
<i>E. coli</i>	6 CFU/mL
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	11 CFU/mL
Cancer cells	250 cells/20 μ L

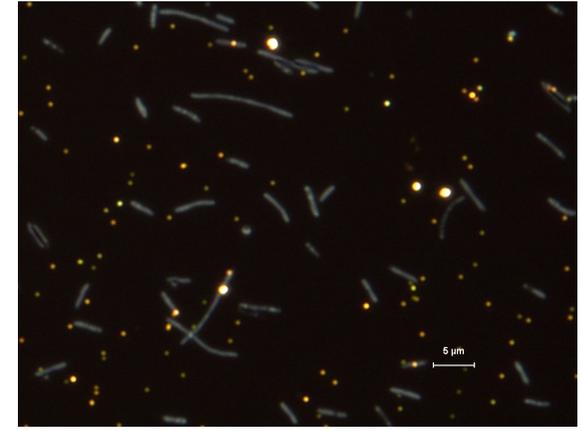
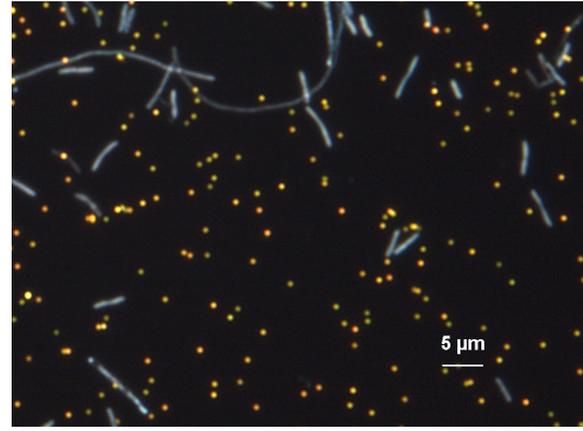
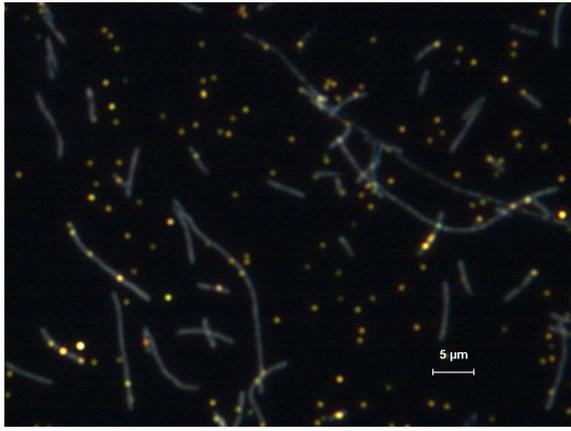
- 広い適用範囲
- 低い検出限界

金ナノ粒子+アプタマー

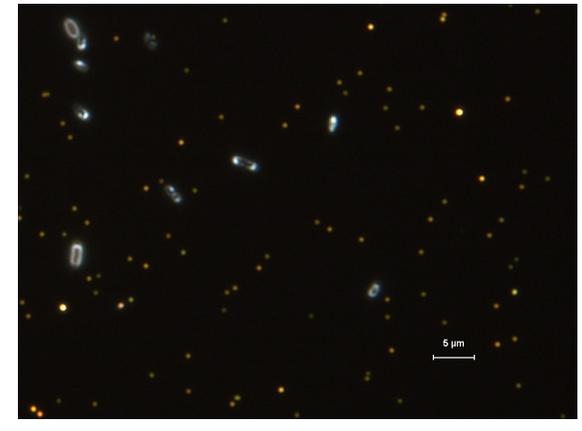
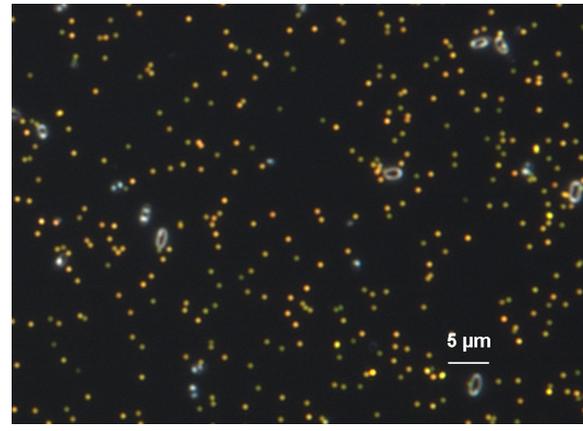
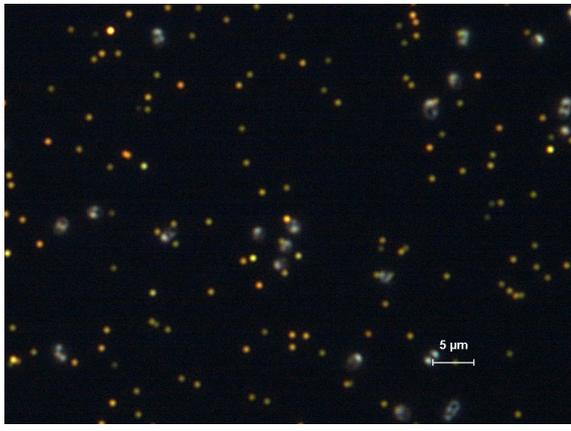
金ナノ粒子

金ナノ粒子+DNA

レジオネラ



大腸菌



簡易に迅速に大腸菌、さらには病原体（細菌、ウイルス）を検出する技術を開発。
検出したい微生物がある方はご連絡を。