

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間： 2007 ～ 2008  
 課題番号：19790105  
 研究課題名（和文） 植物水耕栽培における微生物の動態解析  
 研究課題名（英文） Monitoring of viable bacteria in hydroponics  
 研究代表者  
 馬場 貴志 （BABA TAKASHI）  
 大阪大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：20423121

## 研究成果の概要：

食品の安全・安心の確保を大目的として、近年、大規模施設で行われるようになってきた植物水耕栽培における微生物の動態をモニタリングするために、蛍光活性染色法、マイクロコロニー法、マイクロコロニー-in situ ハイブリダイゼーション（MC-FISH）法など、培養に依存しない新たな迅速・高精度な細菌数測定法を確立した。また本研究における栽培条件下では、培養液中に混入した大腸菌は、水耕栽培にともなってその増殖活性が大きく低下することがわかった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：植物水耕栽培、細菌モニタリング、迅速高精度検出、マイクロコロニー、大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

植物水耕栽培は土壌を用いず、栄養塩類を溶解した培養液を用いて植物栽培が可能であるため、野菜などを年間を通じて安定的に供給する上で重要な栽培法の一つとなっており、大規模なものは「植物工場」として商業化されている。水耕栽培に用いる培養液には多量の養分が溶解しているうえに、使用した培養液を処理し再利用することが環境保全の一環として推奨されるようになってきており、水耕栽培環境は管理が不十分な

場合、微生物が繁殖しやすい環境となると考えられる。実際に、養液中にフザリウム菌やバーチリウム菌などの植物病原細菌が短時間のうちに広がったという報告がある。これは、通常の土壌での栽培などに比べて細菌の多様性が低いため、ある特定種の細菌の増殖が起こった場合に、その増殖を抑制する作用が働きにくいことに起因している可能性がある。さらに、1996年に国内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 の集団感染事件では、その原因食材として水耕栽培されたカイワ

レダイコンが疑われた。さらに世界的にも、サラダを原因とする食中毒例が多数報告されており、大腸菌による汚染事例の報告も多い。したがって、水耕栽培液中の微生物管理が不十分であった場合、大規模な感染症が発生する危険性があることから、水耕栽培における微生物の動態解析は極めて重要な問題である。

微生物モニタリングは培養法が広く用いられてきたが、環境微生物学分野の進展とともに、環境中には培養困難な細菌が多数存在することが明らかになっており、さらに培養法のみでの微生物モニタリングには検出までに時間がかかるなど、その問題点が指摘されており、培養に依存しない新たな迅速かつ高精度な微生物検出法によるモニタリング法の確立が望まれている。

## 2. 研究の目的

水耕栽培システムにおける植物やヒトに対する危害微生物の増殖を防ぐためには、水耕栽培システム内の細菌動態を正確に把握し、迅速かつ適切なシステム管理を行い、水耕栽培の衛生微生物学的な安全性を高める必要がある。特に、「生きている」細菌のモニタリングが重要となる。そこで本研究では、食の安心、安全の確保を大目的として、これまでに開発・応用してきた培養に依存しない細菌検出法を最適化し、特に増殖活性を指標とした細菌の迅速・高精度モニタリング法の確立を行った。さらに、特定細菌が培養液中に混入した場合を想定し、汚染事例の報告が多い大腸菌を標的細菌として、水耕栽培にともなう増殖活性をもつ大腸菌の動態をモニタリングするとともに、他の細菌種への応用についても検討した。

## 3. 研究の方法

これまでに、開発・応用してきた培養に依存しない細菌検出法を最適化し、水耕栽培における細菌動態を解析した。さらに、特定細菌が混入した場合のモデルとして、大腸菌を指標としてその動態を解析した。

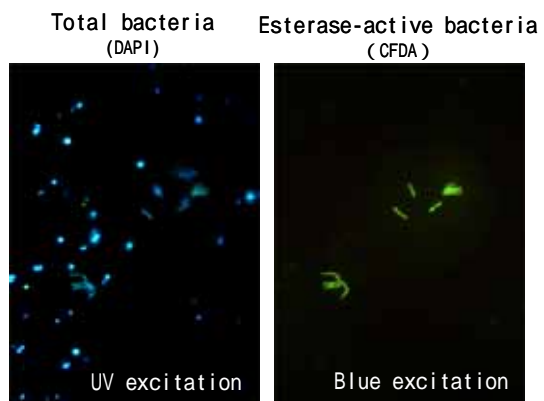
- (1) エステラーゼ活性を指標とした蛍光活性染色法および増殖活性を指標としたマイクロコロニー法を植物水耕栽培における細菌数測定に応用するための諸条件を検討し、最適化した。
- (2) 特定細菌として大腸菌を標的として、その動態を追跡するために、マイクロコロニー in situ ハイブリダイゼーション (MC-FISH) 法を応用するための諸条件を検討し最適化した。
- (3) 水耕栽培モデルを作成し、(1)および(2)で確立した蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法も用いて、水耕栽培にともなう細菌

菌数およびその生理活性の変化をモニタリングした。

(4) 水耕栽培モデルに大腸菌を添加し、(2)で確立した MC-FISH 法を用いて、増殖活性を指標として「生きている」大腸菌のモニタリングを行った。

## 4. 研究成果

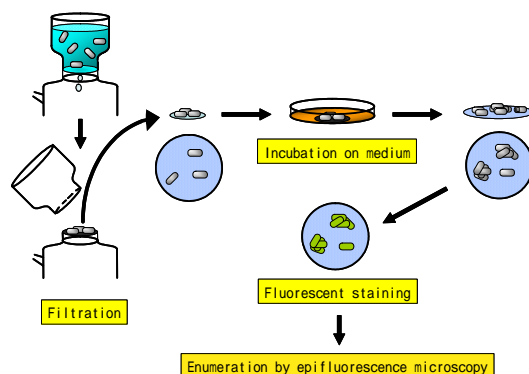
(1) 水耕栽培にともなう細菌現存量およびその生理活性の変化を捉えるために、エステラーゼ活性を指標とした蛍光活性染色法を検討した。4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) および 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA) を用い、水耕栽培液中のエステラーゼ活性をもつ細菌数測定を行い、本手法の有用性を確認した。



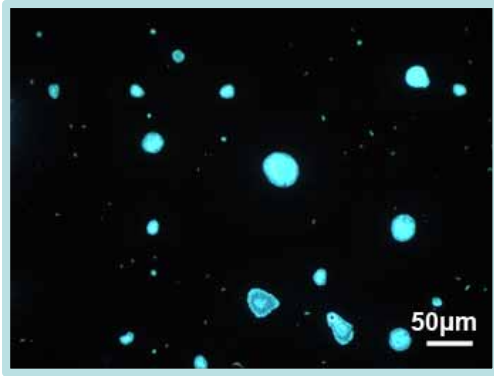
DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole  
CFDA: 6-carboxyfluorescein diacetate

Bacterial cells in hydroponic solution  
double stained with CFDA and DAPI

(2) 増殖活性を指標として細菌数を測定するために、マイクロコロニー法の最適化を行った。使用する培地、培養温度、培養時間などの諸条件を検討し、貧栄養培地である R2A 培地を用い、25℃、16~24 時間培養に決定した。



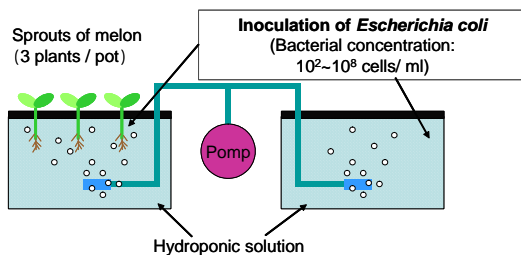
Procedure of microcolony method



Sample: hydroponic solution  
trapped on polycarbonate filter  
Incubation: 20 h (R2A medium)  
Fluorochrome : DAPI(1 μg/ml)

Microcolony-forming bacteria in hydroponic solution

(3) これまでに報告されている国内外の食中毒事例をもとに、水耕法により栽培されている植物のうちメロンを選択して水耕栽培モデルを作成し、細菌モニタリングを行った。その結果、本研究における水耕栽培条件において、培養液中には  $10^6$  cells/ml の細菌が存在し、その 70%以上がエステラーゼ活性を、約 50%が増殖活性をもっており、植物水耕栽培液中の細菌は非常に高い活性をもった状態で存在していることがわかった。また栽培にもなって増殖活性をもつ細菌数が増加する傾向が認められた。したがって、管理が不十分な場合、細菌の急激な増殖をまねく可能性があることから、水耕栽培の衛生微生物学的安全性を確保するためにも、微生物モニタリングが非常に重要となることが確認できた。

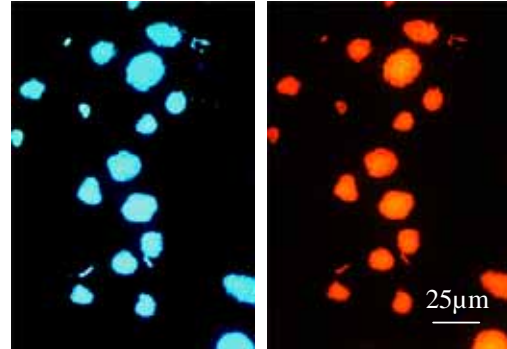


Scheme of detection *E. coli* in hydroponic solution

(4) 水耕栽培における特定細菌のモニタリング法として MC-FISH 法を最適化した。大腸菌を標的として、遺伝子プローブの特異性を確認した。さらに、水耕栽培における大腸菌

のマイクロコロニー形成条件を検討した結果、マイクロコロニー形成は栽培期間が長くなるにしたがって遅くなり、培養時間を延長する必要があることがわかった。

DAPI (UV excitation)      ES445 probe (Green excitation)



Specific detection of *E. coli* by MC-FISH

(5) 水耕栽培培養液に大腸菌を添加し、栽培にともなう大腸菌数の変化についてモニタリングを行った。その結果、栽培期間とともに徐々に増殖活性をもった大腸菌数が減少し、栽培終了時には添加量の約 1/100 に低下することがわかった。また、従来の選択培地を用いた培養法では、栽培期間中に検出限界以下となったことから、本研究において最適化した MC-FISH 法は、従来よりも迅速かつ高精度に大腸菌のモニタリングが可能であることがわかった。

さらに、現在、病原細菌を中心として、多くの遺伝子プローブが設計されており、それらを MC-FISH 法へ応用することにより、多様な細菌種を対象とすることができることから、その汎用性・実用性も高いと考えられた。

本研究により確立した細菌モニタリング法を用いることにより、従来の培養法と比較して、迅速かつ高精度に細菌の動態を解析することが可能となった。さらに、他の細菌を標的とした遺伝子プローブを用いることにより、多様な細菌種を標的とできることから、その汎用性・実用性も高く、水耕栽培をはじめとした様々な環境における微生物学的な安全性の向上に寄与できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Baba, R. Matsumoto, N. Yamaguchi, M. Nasu, Bacterial population dynamics in a reverse-osmosis water purification system determined by fluorescent staining and PCR-denaturing gradient gel

electrophoresis、Microbes Environ.、 in press.

〔学会発表〕(計2件)

馬場貴志、RO水製造工程における細菌の動態、日本細菌学会、2008年3月26日、京都

馬場貴志、RO水製造工程における生菌数の自動測定、海洋深層水利用学会、2007年10月4日、北海道

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 貴志 (BABA TAKASHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20423121