

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	吳 聖 進
題 目	<p>蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションを用いた非培養法と培養法の比較による堆肥及び土壌の微生物的安全性評価に関する研究          (Biosafety Assessment of Manure and Soil by Culture-independent Methods using Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization as compared with Conventional Plate Counting)</p>
<p>近年、食品安全への国民の関心が高まっている。ヒト病原菌が汚染堆肥の施用と共に土壌に導入され、生食野菜を介して食中毒を起こすことが懸念されている。一方、ヒト病原菌が自然環境中に出ると、生きてはいるが培養できない (Viable but non-culturable, VNC) 状態に陥るため、培養法では検出できなくなることが水圏環境では知られている。そこで本研究では、農業環境の微生物的安全性評価のため、糞便汚染指標菌である大腸菌を検出する非培養法を2種類開発し、土壌中における大腸菌の生残性を検討した。さらに、太陽熱処理により汚染土壌の微生物安全化について検討した。</p> <p>1. 堆肥や土壌中の大腸菌の生菌数を特異的に定量する方法として、Direct viable counts and fluorescence <i>in situ</i> hybridization (DVC-FISH)法を開発した。牛糞堆肥及び土壌に添加した大腸菌は <math>10^7 \sim 10^{10}</math> cells <math>g^{-1}</math> DW の範囲で本法により定量的に検出され、その回収率はそれぞれ 53%、51%であり、正確な定量が可能となった。</p> <p>2. 堆肥及び土壌中に接種した大腸菌の生残性をビーカー実験で検討した。大腸菌は 30°C で 40 週間以上も生残し、このとき DVC-FISH 法による大腸菌数は培養法より数倍から数十万倍も高くなり、大腸菌細胞の大部分が VNC になることが証明された。</p> <p>3. 土壌中の大腸菌の検出法として、より高感度な Microcolony-FISH (<math>\mu</math>C-FISH)法を開発した。フィルター上に試料を捕集し寒天培地上にて 30°C で 16 時間インキュベートしマイクロコロニーを形成させ、FISH の後、マイクロコロニー自動計測装置 (MACS) で計数した (1 フィルター当たり 1 分間)。その結果、<math>10^4 \sim 10^7</math> cells <math>g^{-1}</math> DW の菌数範囲で検出率は約 58% と良好で、大腸菌を迅速かつ特異的に自動検出することが可能となり、マニュアル計数とよく一致した (<math>R^2=0.998</math>, <math>y=1.03x</math>)。レタスやコマツナを栽培したポット土壌に接種した大腸菌の生残性を <math>\mu</math>C-FISH 法及び培養法で検討した結果、大腸菌の生存はレタス土壌で良好で、コマツナ土壌で悪いという作付け品目による違いが認められた。</p> <p>4. 陽熱消毒による大腸菌汚染土壌の微生物安全化についてハウス土壌及び露地土壌で検討した結果、陽熱処理により土壌温度が上昇し、堆肥とともに土壌中に接種した大腸菌が、ハウス土壌では 1 週間後、露地土壌では 4 週間後に不検出となった。</p> <p>以上の結果から、大腸菌が堆肥及び土壌中で VNC 状態に陥ることを初めて明らかにした。DVC-FISH 法及び <math>\mu</math>C-FISH 法により、堆肥や土壌中に VNC 状態で生き残っている大腸菌を検出可能にした。これらのデータは、安全・安心な有機農産物に向けた農耕地生態系の微生物的安全性の評価及び管理の基礎になると期待される。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Shengjin WU
題 目	Biosafety Assessment of Manure and Soil by Culture-independent Methods using Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization as compared with Conventional Plate Counting (蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションを用いた非培養法と培養法の比較による堆肥及び土壌の微生物的安全性評価に関する研究)

Recently, food safety issue is of increasing public concern. Human pathogenic bacteria may be brought into agricultural environments following the application of contaminated compost and finally enter into food chain. On the other hand, some pathogenic bacteria released into natural environments may become viable but nonculturable (VNC) and escape being detected by conventional culture methods. Thus, this study aims to develop culture-independent techniques for detecting viable cells of *Escherichia coli*, an indicator bacterium of fecal contamination, in manure and soil for the biosafety assessment of agricultural environments. Using these techniques, survival of *E. coli* in manure and soil was estimated. Moreover, biosafety control of contaminated soil by solarisation was also investigated.

1. The direct viable counts and fluorescence *in situ* hybridization (DVC-FISH) using the ES445 probe was developed for the specific detection of viable *E. coli* in manure and soil. The method proved to be very effective in differentiating viable from dead cells of *E. coli*, and in enumerating accurately the viable cells of *E. coli* at the inoculum range of  $10^7$  to  $10^{10}$  cells  $g^{-1}$  dry weight in manure and soil, with good cell recovery (53% and 51%, respectively). The method had higher sensitivity than the plate counting, as to reveal higher viable counts of *E. coli* in cow manure and soil samples incubated for several weeks.

2. *E. coli* survived for much longer in the sterile (>44 weeks) than non-sterile (8-12 weeks) cow manure and soil samples. *E. coli* entered into the VNC state after exposure to manure and soil for several weeks on the basis of the DVC-FISH counts and the plate counts.

3. A microcolony-fluorescence *in situ* hybridization ( $\mu$ C-FISH) was developed for the enumeration of viable *E. coli* in soil. Micro-colonies were formed by incubation on the 1/100 strength LB agar at 30°C for 16 h and those of *E. coli* were detected by the ES445 probe and enumerated by a micro-colony automatic counting system (MACS). The method gave rapidly, automatically and specifically the counts of viable *E. coli* in soil at a range of  $10^4$  to  $10^7$  cells  $g^{-1}$  DW with a cell recovery of ca. 58%. The number of *E. coli* by MACS was consistent with that by manual epifluorescent microscopy. *E. coli* was detectable in pot soil throughout the cultivation period of Lettuce and Komatsuna by both  $\mu$ C-FISH and plate counting, and the counts were 3-5 folds higher by the former than the latter in the late cultivation period.

4. Soil solarization in a greenhouse and an upland field was examined for the biosafety control of contaminated soil. Soil solarization greatly increased soil temperature and effectively inactivated *E. coli* introduced into soil with cow manure within 1 and 4 weeks in the greenhouse and upland field, respectively.

These results suggest that *E. coli* can enter the VNC state in manure and soil environments, and can be detected by the DVC-FISH and the  $\mu$ C-FISH. All these data would be useful for constructing the base of biosafety assessment and control of agricultural environments.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	ウー センジン 呉 聖進
審査委員	主査 佐賀大学 教授 井上 興一
	副査 佐賀大学 准教授 染谷 孝
	副査 鹿児島大学 准教授 境 雅夫
	副査 琉球大学 教授 渡嘉敷 義浩
	副査 鹿児島大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
題目	<p>Biosafety Assessment of Manure and Soil by Culture-independent Methods using Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization as compared with Conventional Plate Counting</p> <p>(蛍光<i>in situ</i> ハイブリダイゼーションを用いた非培養法と培養法の比較による堆肥及び土壌の微生物的安全性評価に関する研究)</p>
<p>本論文は、近年生産が奨励され使用量が増えている堆肥（コンポスト）およびそれを施用した土壌の微生物的安全性を評価するため、糞便汚染指標菌である大腸菌をモデルとして、これを検出・定量するための培養によらない新規手法を開発し、堆肥や土壌中における大腸菌の生残性について培養法と比較検討し、さらに汚染土壌の無害化手法として、太陽熱消毒効果について検討したものである。</p> <p>堆肥の原料となる家畜糞や下水汚泥等には、人や家畜、植物の病原微生物が含まれることがあるが、通常は適切な堆肥化に伴う発酵熱により死滅し無害化される。しかし、不適切な製造により生残することがあり、堆肥を使用して生産された生鮮野菜を介した食中毒の発生が懸念されている。</p> <p>一方、大腸菌などのヒト病原菌が環境中に出た場合、生きてはいるが培養できない（viable but nonculturable, VNC）状態になり、培養法では検出できなくなることが水圏環境で知られている。土壌や堆肥中でも同様の現象が起きるかは不明であるが、その可能性を考慮すると、培養法に依存しない検出・定量法が求められる。</p>	

そこで、大腸菌をモデル微生物として、堆肥や土壌中の生菌数を特異的に定量可能な Direct viable counts and fluorescence *in situ* hybridization (DVC-FISH)法を開発した。本法はすでに水圏試料には使用されている手法であるが、堆肥や土壌など、腐植物質や粘土鉱物に富む試料には適用できなかった。これを独自の前処理法の導入により解決し、適用可能とした。これにより、牛糞堆肥及び土壌に添加した大腸菌は  $10^7$ ~ $10^{10}$  cells  $g^{-1}$  DW の範囲で定量的に検出され、正確な定量が可能となった。

堆肥及び土壌中に接種した大腸菌の生残性をモデル実験で検討した結果、大腸菌は  $30^{\circ}\text{C}$  で 12 週間以上も生残することが DVC-FISH 法により見いだされ、このとき培養法では数分の 1~数十万分の 1 の低い菌数しか得られず、大腸菌細胞の大部分が VNC になることが証明された。

より高感度な大腸菌の生菌数定量法として、Microcolony-FISH 法を開発し、さらに自動測定装置と組み合わせ簡便化を図った。その結果、 $10^4$ ~ $10^{10}$  cells  $g^{-1}$  DW の範囲で、大腸菌を迅速かつ特異的に自動検出することが可能となった。レタスやコマツナを栽培したポット土壌に大腸菌を接種し、その生残性を本法及び培養法で検討し、大腸菌の土壌中における生存が作付け品目により異なることを見いだした。

さらに、大腸菌汚染土壌の太陽熱消毒による無害化について、ハウス土壌と露地土壌で検討した。太陽熱処理により土壌温度が上昇し、ハウスでは 1 週間後、露地では 4 週間後に大腸菌が不検出となり、安全化達成条件を明らかにした。

以上のように本論文は、農業生産環境における有害微生物の動態解明のための新規定量法を開発し、堆肥や土壌中における大腸菌の動態に関して、VNC 化という新たな知見を見いだした。本手法は、他の病原菌や植物病原菌等にも応用が可能であり、普及が期待できる。さらに、太陽熱による土壌消毒法の成果は、農業現場への実用化に直結している。これらの研究成果は先駆的であり、国民の求める食の安全・安心に関わる有機農産物生産のための技術的基盤となるものであり、社会的意義も高く、学位論文として十分価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	ウー センジン 呉 聖進
審査委員	主査 佐賀大学 教授 井上 興一
	副査 佐賀大学 准教授 染谷 孝
	副査 鹿児島大学 准教授 境 雅夫
	副査 琉球大学 教授 渡嘉敷 義浩
	副査 鹿児島大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月23日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年1月23日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	ウー センジン 呉 聖進
<p>[質問 1] VNC 大腸菌を培養法と DVC-FISH 法との菌数の差で見ているが、他の方面からの証明は？</p> <p>[回答 1] VNC とは、「生きてはいるが培養できない」ということです。培養法では検出できないが、培養法を用いない方法である、生きている細胞を定量的に測定できる DVC-FISH 法を用いて、両者の差から VNC 細胞の存在を証明しました。他の方法、たとえばリアルタイム PCR 法などでは、「生きていること」と「特異的に検出定量すること」の両方を同時に計測することはできません。</p> <p>[質問 2] コマツナとレタスの栽培試験で、土壌サンプリングはどのように実施したか？</p> <p>[回答 2] ポット栽培試験で、ポット内の土壌の約 3 分の 1 を上から下までそっくり採取して、よく混合してから分析用試料を取りました。ポットは 3 連でおこないました。</p> <p>[質問 3] その栽培試験で、作付けしない対照区土壌での大腸菌の挙動は？</p> <p>[回答 3] 学位論文の実験では無作付け区は設定しませんでした。学位論文提出後に実施した栽培試験では、無作付け区を設定して同様の試験を行いました。その結果、無作付け区土壌では、レタス栽培区土壌よりも大腸菌の生残性が悪かったです。つまり、作付けによって、大腸菌の生残性が上がりました。</p> <p>[質問 4] 土壌中での大腸菌の VNC 化が、コマツナとレタスという作物の種類で異なるのはなぜか？ また、作物があったほうが、生残しやすい理由は？</p> <p>[回答 4] 作物の根からの分泌物の影響が考えられますが、調べてはいません。</p> <p>[質問 5] 新規手法での大腸菌の回収率が約 50%というのを「良い」と評価しているが、むしろ回収率が低いのであって、良くないのでは？</p> <p>[回答 5] 土壌からの細菌細胞の分離濃縮法は様々あり、本研究での回収率は、従来の他の研究のものより高いです。濃縮法と検出法を合わせた回収率が約 50%ですが、広い菌濃度範囲で常に一定の約 50%という回収率なので、定量性はとても良いと言えます。</p> <p>[質問 6] 土壌の種類によって回収率は異なるのか？</p> <p>[回答 6] 土壌の種類を変えて調べたデータがありますが、多少異なる程度です。</p> <p>[質問 7] DVC 培地でのインキュベーションで常在菌と大腸菌のマイクロコロニー形成に違いがあるが、どうしてか？</p> <p>[回答 7] 常在菌と大腸菌とで、薬剤（細胞分裂阻害剤）に対する感受性が違うと考えられます。常在菌には多種多様な菌種が存在するので、薬剤に対する感受性の低い菌がい</p>	

ると考えられます。

[質問 8] 堆肥と土壌とで挙動が異なる、つまり、堆肥では常在菌の細胞分裂がかなり抑えられているが、土壌では押さえられにくい理由は？

[回答 8] 堆肥中の何らかの物質が、大腸菌の増殖を抑えている可能性が考えられます。本研究では、従来の液体インキュベーション法に代えて、フィルターを用いたインキュベーション法を採用しました。液体では大腸菌の伸張が良くなかったのですが、フィルター法では良く伸張するようになりました。これも、試料中の増殖阻害物質が、フィルター法では洗い流されて、その効果が少なくなったためと考えられます。

[質問 9] VNC 大腸菌は本当にヒトに有害なのか？ 学位論文中でも考察しているが、今後の展望として、どうお考えか？

[回答 9] VNC 状態から回復して培養可能になると同時に、動物に対する病原性を示すようになったという報告がいくつかの病原菌で出ています。たとえば、45℃、1 分間の熱ショックで回復するという報告がコレラ菌であります。しかし大腸菌では、この「回復」の現象については証明されていないので、今後の課題です。

[質問 10] 大腸菌が土壌や堆肥中で VNC になることを証明されたわけですが、他の病原菌についても同様だろうと示唆していると考えていいか？

[回答 10] はい、その通りです。本研究では大腸菌をモデル菌として用いましたが、本研究で開発した手法は他の病原菌にも適用できると思いますので、証明が可能だと思います。すでに、サルモネラに対しては、後輩が適用試験を進めています。

[質問 11] 作物体内に病原菌が入るかどうかという点については？

[回答 11] 本研究では扱っていませんが、外国の研究者が大腸菌 0157 などで植物組織中に移行するという報告をしています。