

等の土壌由来微生物は生存することが確認されている。

表-5 畜産廃棄物の資源化施設におけるクリプトスポリジウム検出結果の年度別比較

			検出オーシスト			
			DNA検出法	RNA検出法	顕微鏡観察法	
H14 年度	1月	受入	2.30E+03 個/ml	<1E+01 個/ml	7.70E+02 個/ml	5.2×4.6μ
		消化液1	4.50E+02 個/ml	<1E+01 個/ml	1.10E+02 個/ml	5.1×4.8μ
		一次発酵前	2.80E+03 個/g	<1E+01 個/g	1.60E+03 個/g	5.1×4.6μ
		堆肥製品	6.20E+02 個/g	<1E+01 個/g	1.50E+02 個/g	5.2×4.8μ
	3月	受入	2.10E+02 個/ml	<1E+01 個/ml	1.10E+02 個/ml	5.1×4.6μ
H15 年度	6月	受入	1.30E+01 個/ml	2.20E+01 個/ml	1.40E+01 個/ml	5.1×4.7μ
		消化液1	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		脱水脱離液	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		一次発酵前	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
		堆肥製品	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
	10月	受入	1.70E+04 個/ml	1.50E+04 個/ml	1.50E+02 個/ml	5.0×4.8μ
		消化液1	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		消化液2	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		脱水脱離液	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		一次発酵前	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
		堆肥製品	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
	1月	受入	1.10E+05 個/ml	8.80E+04 個/ml	2.80E+03 個/ml	5.1×4.8μ
		消化液1	2.30E+03 個/ml	1.10E+03 個/ml	8.50E+01 個/ml	5.0×4.8μ
		消化液2	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		脱水脱離液	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
		一次発酵前	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
		堆肥製品	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
	H16 年度	10月	受入	2.50E+02 個/ml	1.50E+02 個/ml	2.80E+01 個/ml
消化液1			<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
消化液2			<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
脱水脱離液			<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+00 個/ml	—
一次発酵前			<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
堆肥製品			<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+00 個/g	—
1月		受入	3.90E+02 個/ml	1.80E+02 個/ml	3.80E+01 個/ml	—
		消化液1	6.00E+01 個/ml	3.00E+01 個/ml	5.40E+00 個/ml	—
		消化液2	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	—
		脱水脱離液	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	<1E+01 個/ml	—
		一次発酵前	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	—
		堆肥製品	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g	—

さらに、同じ調査<sup>8)</sup>において堆肥化製品からは検出されていないが、表-7に示すように家畜糞尿中等にはノロウイルスやエンテロウイルスが存在しており、ウイルス検出の困難さを考慮した場合、纏まった形での調査を行い排出の可能性や排出が不可避である場合の排出負荷量の把握等を行っておく必要があると考えられる。

以上のように、本調査の結果、西城川水系においてクリプトスポリジウム・オーシストと腸内細菌群やビブリオ菌群の存在が明らかとなった。西城川水系上流域には、多くの家畜動物（ウシおよびブタなど）の飼育施設が点在し、数千匹の家畜動物が飼育されていることから、今後も、定期的にクリプトスポリジウム・オーシ

ストなどの病原性微生物の動向調査を調査することは必須であると同時に、これら病原性微生物の水道水源への流達リスクの算定が塩素なし水道の実現の為には必要であると考えられる。今後は、季節の変化によるクリプトスポリジウム・オーシスト量の変遷や汚染状況について調査を継続する予定である。

表-6 堆肥化共同利用施設で採取した試料からの有害微生物検出状況

施設名	試料	<i>Sta. aureus</i>	<i>Vib. Parahaemolyticus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Ba. cereus</i>
埼玉県 O郡	堆肥化前	+	-	-	+
	堆肥化後	-	-	-	+
宮崎県 A町	原料牛糞	+	-	-	-
	一次発酵	-	-	-	-
	製品	-	-	-	-
京都府 Y町	受入槽汚泥	+	-	-	-
	消化液	-	-	-	-
	一次発酵前	-	-	-	-
	一次発酵後	-	-	-	-
	製品	-	-	-	-
奈良県 I市	生ごみ	+	-	-	+
	汚泥	-	-	-	+
	発酵槽	-	-	-	-
	コンポスト	-	-	-	+
静岡県 I市	堆肥化前	+	-	-	-
	堆肥化後	-	-	-	-
北海道 B町	主スラリー	-	-	-	-
	消化液	-	-	-	-
	発酵液	-	-	-	-
	コンポスト	-	-	-	-
京都府 Y町	受入	-	-	-	-
	脱離A	-	-	-	-
	脱離B	-	-	-	-
	コンポスト前	-	-	-	+
	コンポスト	-	-	-	-
山形県 N町	原料	-	-	-	+
	牛糞	-	-	-	+
	一次出口	-	-	-	-
	コンポスト	-	-	-	-

次に、本年度の調査で明確な定量結果が得られたクリプトスポリジウム・オーシストについて、河川中から検出された既存の報告を表-8に示す<sup>9)</sup>。

調査対象は表流水（ダム及び湖沼を含む。）及び伏流水からなる全国94水源水域、277地点（1水源水域につき3地点程度）で、試験水量は5L（一部の試料については10L）である。クリプトスポリジウム・オーシストが検出されたのは、秋田、山形、栃木、群馬、熊本、沖縄の6県の計6水源水域8地点（陽性率2.9%）で、そのオーシスト濃度は2~4個/10Lであった。ただし、この調査時点では検査技術にまだ不慣れであったため、陽性率が低く算定された可能性がある。

また、神奈川県衛生研究所の行った表流水、地下水、伏流水等の水源水域25地点での調査では、表流水11地点のうち4地点（36.4%）からオーシストが検出されており、その濃度は1~30個/50Lと報告されている<sup>10)</sup>。

平田ら<sup>11)</sup>は、相模川水系に表流水6試料のうち4試料（陽性率66.7%）からクリプトスポリジウム・オーシストを検出、濃度は3~4,500個/100Lと報告している。

さらに、兵庫県衛生研究所が免疫磁気ビーズ法を用いて1998年と1999年に実施した兵庫県内の18河川、156地点の調査では、13河川(72%)の74地点(47%)からオーシストが検出されており、濃度は5~40個/100Lと報告されている<sup>12)</sup>。

一方、下水処理場におけるクリプトスポリジウム実態調査結果<sup>13)</sup>によると、全国67カ所の下水処理場の流入下水73試料のうち9.6%に当たる7試料からオーシストが検出されており、濃度は8~50個/Lであった(検出限界3~33個/Lでの調査)。

このように、本調査研究の結果と同様に、様々な環境水中からクリプトスポリジウム・オーシストが検出されていることから、家畜糞尿を由来とするクリプトスポリジウム・オーシストが取水点まで到達する割合について試算を試みた。

国立環境研究所の調査<sup>8)</sup>において、受け入れ家畜糞尿からクリプトスポリジウム・オーシストが検出された3例について抜粋すると表一9となる。これらの値と受け入れ貯留層容積、搬

入述べ頭数から牛1頭当りのクリプトスポリジウム・オーシスト数を計算すると、3箇所(述べ頭数5000頭)平均で $7.07 \times 10^8$ 個 *C. p.*/頭と成った。また、既存の文献<sup>14, 15)</sup>から、感染率と感染牛の糞尿中オーシスト数から求めた結果(述べ頭数5000頭に対する計算結果)は、 $1.89 \times 10^9$ 個 *C. p.*/頭であったことから、我が国における牛糞尿由来のクリプトスポリジウム・オーシスト負荷は、 $1.0 \times 10^9$ 個 *C. p.*/頭程度であると算定された。

一方、本調査でクリプトスポリジウム・オーシストが検出された12月の西城川流量を国土交通省の水文水質データベースから浄水場取水点近傍観測点から求める<sup>16)</sup>と $10 \text{ m}^3/\text{s}$ となり、採水時間6.75時間中に取水点を通過した河川水量は約243ktとなることから、検出結果から取水点を流下した可能性のあるクリプトスポリジウム・オーシストの総量は $2.4 \times 10^6$ 個と推定される。

以上の数値を用いると、 $7.5 \times 10^{11} \sim 2.0 \times 10^{12}$ 個 *C. p.*流域に負荷されたと推定されるクリプトスポリジウム・

施設	原材料	表一7 ウイルス検査成績 試料	リアルタイムPCR#1		組織培養
			ノロウイルスG1	ノロウイルスG2	
新潟県 J市	ヒト糞尿	堆肥前	$1.8 \times 10^3$	$5.3 \times 10^4$	echol1
		堆肥後	—	—	—
埼玉県 O郡	家畜糞尿	堆肥前	—	—	ブタエンテロ
		堆肥後	—	—	—
静岡県 I市	家畜糞尿	堆肥前	—	—	ブタエンテロ
		堆肥後	—	—	—
北海道 S市	ヒト糞尿	脱水汚泥	—	—	—
		堆肥後	—	—	—
京都府 Y町	家畜糞尿	受入	ウシカリシ	—	ブタエンテロ
		消化	—	—	—
		一次醗酵前	—	—	—
		一次醗酵後 製品	—	—	—
奈良県 I市	ヒト糞尿	汚泥	$2.4 \times 10^3$	$5.6 \times 10^5$	—
		メタン醗酵槽 製品	—	$1.4 \times 10^3$	—
		—	—	—	—
宮崎県 A町	牛糞尿	原材料	—	—	—
		一次醗酵後 製品	—	—	—
北海道 B町	家畜糞尿	生スリラー	—	—	ブタエンテロ
		消化液	—	—	—
		一時醗酵後 製品	—	—	—
京都府 Y町	家畜糞尿	受入槽	—	—	ウシエンテロ
		脱水ケーキ1	—	—	—
		脱水ケーキ2	—	—	—
		二次醗酵前 製品	—	—	—
山形県 N町	牛糞便	原材料	—	—	—
		一次醗酵	—	—	—
		製品	—	—	—

オーシスト量が  $7.1 \times 10^{-5} \sim 2.7 \times 10^{-5}$  程度希釈されて取水点まで到達したものと推計される。

以上のように、極粗い試算ではあるが、実際の河川環境中でのクリプトスポリジウム・オーシスト量を把握することにより、排出された家畜糞尿由来のオーシスト量が水道原水の取水点まで到達する割合を推計できるものと考えられる。従って、より詳細な調査を行う事により、本検討の精度を上げることは、水道水源が持つ感染性微生物による健康影響リスクを推算するための一助となると考えられる。

表—8 水道水源水域におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの検出状況調査

都道府県	水 源	水道水源 水域	A 浄水場取水地点		B 取水地点0.3~24km上流		C 取水地点1.1~49km上流	
			クリプト スポリジウム	ジアルジア	クリプト スポリジウム	ジアルジア	クリプト スポリジウム	ジアルジア
青森県	表流水	馬淵川		2		4		
岩手県	表流水	北上川		2				
秋田県	表流水	雄物川		2	2	2		
山形県	表流水	最上川			4			
福島県	表流水	阿賀川				2		
栃木県	ダム放流・表流水	鬼怒川					2	
群馬県	表流水	烏川	2	4	4	6		
東京都	伏流水	多摩川		2				4
新潟県	表流水	阿賀野川				1		
島根県	伏流水	飯梨川				2		
島根県	ダム直接	忌部川				3		
岡山県	表流水	高梁川						2
広島県	ダム直接	黒瀬川		1		1		1
佐賀県	伏流水	玉島川				2		
長崎県	ダム直接	大井手川		2				23
熊本県	伏流水	水俣川			2			
大分県	表流水	大分川						2
鹿児島県	表流水	万之瀬川		2				
沖縄県	表流水	天願川	1	8	2	14		

備考 1. 各水源水域について3点（取水地点A及び取水地点の上流2地点B、C）において採水  
2. 数字は検出個数（個/10L）。空欄は「0個/10L」を意味する。

表—9 家畜糞尿中からのクリプトスポリジウムの検出結果

京都府 Y町	受入畜糞	1.30E+01 個/ml	2.20E+01 個/ml
	堆肥製品	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g
北海道 B町	生スリ-	3.50E+03 個/ml	8.30E+02 個/ml
	コンポスト	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g
山形県 N町	牛糞	2.90E+03 個/ml	2.10E+03 個/ml
	コンポスト	<1E+01 個/g	<1E+01 個/g

## 6. まとめ

広島県庄原市の水道原水である西城川を研究対象地域として、水道原水が持つ病原性微生物による健康影響リスクの把握を目的とした調査を行った。得られた結果を以下に列記する。

1) 研究対象地域の概要は、集水域面積約268km<sup>2</sup>、人口は約7800人であり、乳牛350頭、肉牛700頭、豚1900頭（H16年度）が飼育されていると推計され、経年的にBOD（75%値）が1mg/L以下で推移するA類型河川である。

2) 平成17年度冬季に2回実施した調査により、西城川原水からクリプトスポリジウム・オーシストが1度1個C.p./100L検出され、2回とも腸内細菌群やビブリオ菌群の陽性であり、一般的な水質項目で清浄な河川であっても、糞便由来による微生物汚染が検出範囲内にあると判断された。

3) クリプトスポリジウム・オーシストの実測値と文献値から、排出源を牛糞尿のみと仮定した場合、対象地域内で排出されたオーシストは、取水点までに  $7.1 \times 10^{-5} \sim 2.7 \times 10^{-5}$  程度希釈されると試算された。

## 7. 健康危険情報

(該当なし)

## 8. 研究発表

### 論文発表

- 1) Daisuke Nakajima, Ruri Ishii, Kazuyuki Nishimura, Yukihiko Takagi, Shigeru Mineki, Sukeo Onodera and Sumio Goto: Effect of organic solvent in luminescent umu test using *S. typhimurium* TL210, *J. Environmental Chemistry*, 2005, 3, 569-574
- 2) Yong-Jun Jung, Yoshiaki Kiso, Rabi Atul Adawih binti Othman, Akira Ikeda, Kazuyuki NISHIMURA, Kyung-Sok Min, Atsuo Kumano, Akihiko Arij: Rejection properties of aromatic pesticides with a hollow-fiber NF membrane, *Desalination*, 2005, 180, 63-71

### 学会発表

(該当なし)

## 9. 知的財産権の出願・特許

(該当なし)

- 
- 1) 今岡務、平成 15 年度第 1 回排水・廃棄物リサイクル技術研究会
  - 2) [http://www.pref.hiroshima.jp/doboku/kasenki/kasenskeikaku/saijo/1\\_2\\_3.html](http://www.pref.hiroshima.jp/doboku/kasenki/kasenskeikaku/saijo/1_2_3.html)
  - 3) 原 弘之、大田美咲、小林美佐子、白井勝久、大河内由美子、西村和之、井上雄三：分子生物学的手法を用いたコンポストからのクリプトスポリジウムの活性オーシストの検出、第 37 回日本水環境学会第 37 回講演集、427、(2003)
  - 4) U.S.EPA: USEPA Method 1623 *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, GC. EPA 821-R99-006, 1999
  - 5) 板倉智敏ら：子牛のクリプトスポリジウム感染症(文献展望と日本初発例)、*日本獣医師会雑誌*、38(12)、796-801(1985)
  - 6) 橋本温ら：相模川推計のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染とその汚染指標の検討、*水環境学会誌*、22(4)、272-287 (1999)
  - 7) 猪又明子ら：秋川・盆堀川上流域におけるクリプトスポリジウム汚染調査、*水道協会雑誌*、71(9)、31-38 (2002)
  - 8) 井上雄三ら：「有機性廃棄物の資源化技術・システムの構築に関する研究」報告書、国立環境研究所 循環型社会形成推進・廃棄物研究センター 最終処分技術研究開発室 (印刷中)
  - 9) クリプトスポリジウム等の水道水源における動態に関する研究報告書、*厚生科学研究* (1997)
  - 10) 神奈川県衛生部報道発表資料、クリプトスポリジウムに係る水道原水調査の結果について (1997.7.2)
  - 11) 橋本温、平田強；相模川水系におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染レベル、*水環境学会誌*、第 21 巻、第 2 号、119-122 (1998)
  - 12) 兵庫県健康福祉部、兵庫県におけるクリプトスポリジウム汚染実態調査報告書 (2000.3)
  - 13) 鈴木穰；クリプトスポリジウムと下水道、特集・水のクリプトスポリジウム汚染と対策、*環境技術研究協会* (1997.9)
  - 14) 更科孝夫、坂井宏明、津島良典、長沢秀行、田辺茂之、宇塚雄次、健康牛のクリプトスポリジウム汚染の実態調査、*用水と廃水*、Vol.44(4)、291-294、2004
  - 15) 佐伯晋吾ら：兵庫県下のクリプトスポリジウムの汚染実態調査ーと畜場搬入牛のオーシスト排出状況ー、*日本獣医公衆衛生学会誌*、53、25-29、2000
  - 16) <http://www1.river.go.jp/>

消毒技術に関する検討  
(消毒代替技術間の消毒機構の比較及び  
それら代替技術の管理手法の開発)

分担研究者 大瀧 雅寛

消毒技術に関する検討  
（消毒代替技術間の消毒機構の比較及び、それら代替技術の管理手法の開発）

分担研究者 お茶の水女子大学大学院人間文化研究科 大瀧雅寛

研究要旨

本分担研究では、代替消毒法と塩素消毒の消毒機構の比較については、今年度は、塩素消毒と紫外線消毒方法における処理対象細菌の不活化効果の比較を、複数の培地を用いた測定法および回復処理を施した場合の影響の両側面から捉えることにした。結果として、塩素消毒は適用する CT 値によって、損傷レベルが異なるが、紫外線消毒では、一定の損傷レベルが得られていた。また回復処理において塩素消毒は紫外線消毒に比べて回復量が著しく多いことがわかった。

代替処理法導入の際の管理手法の確立については、今年度は、紫外線消毒法を対象とし、原水に自生する細菌類を生物線量計として用いる方法の検討を行った。結果として回分式試験においては一定の紫外線用量－反応関係が得られたが、流通式装置に適用した場合、ある一定以上の紫外線線量を測定するのに不都合が生じることがわかり今後の課題が残った。

A. 研究目的

塩素代替技術には、紫外線照射やオゾン注入などが考えられるが、それらの消毒技術を適用する際には、あらかじめ 1) 消毒機構が異なることによる消毒効果についての基礎的知見の蓄積、2) 代替技術の導入の際の管理手法の確立、が不可欠であると考えられる。

この2点において、それぞれ今年度のテーマとして、消毒機構に関しては、塩素消毒と紫外線消毒方法における処理対象細菌の不活化効果の比較を、複数の培地を用いた測定法および回復処理を施した場合の影響の両側面から捉えることとした。また管理手法に関しては、紫外線消毒法を対象とし、原水に自生する細菌類を生物線量計として用いる方法の検討を行った。

以下にそれぞれに関して詳細な報告を行う。

B. 研究方法

B. 1. 消毒機構の比較

B. 1. 1. 不活化処理

モデル微生物には E.Coli K 12(NBRC3301)を使用し、平面培地で 37 °C で 24 時間培養して形成された大腸菌コロニーを釣菌し、リン酸緩衝液に溶解させて使用した。

(1) 紫外線照射処理

初期条件は、大腸菌濃度が約  $10^6$  CFU/ml とした。濁質有り(金町浄水場より分与された浄水汚泥を希釈して使用)と無しの条件を設定した。濁質有りで濁度は約 240 NTU~260 NTU, 吸光度(波長 254 nm)  $1.5 \text{ cm}^{-1}$ ~ $1.9 \text{ cm}^{-1}$  とし、濁質無しでそれぞれ約 1 NTU~3 NTU,  $0.04 \text{ cm}^{-1}$ ~ $0.2 \text{ cm}^{-1}$  とした。

光源として低圧水銀ランプ(20W 東芝殺菌ランプ)を使用した。試料をシャーレ(直径 5.7 cm)に入れて、スターラーで攪拌しながら紫外線を照

射した。

試料の採取により体積が変化するため、照射時の水深は 1.03 cm~0.73 cm となり、平均値 0.93 cm を平均線量率の計算に使用した。水面の紫外線(波長 254 nm 線量率をヨウ素酸カリウムとヨウ化カリウムを利用した化学線量計<sup>1)</sup>にて測定した。平均値 0.37 mJ/s/cm<sup>2</sup> を平均線量率の計算に使用した。

## (2) 塩素処理

初期条件は大腸菌濃度が約 10<sup>6</sup> CFU/ml、濁度が 1.0 NTU~1.3 NTU とした。

塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液(キシダ化学(株))を使用し、初期塩素濃度を 0.07 mg/l ~0.4 mg/l となるように投入し、各々の濃度において投入の 1 分後に試料を採取した。試料 10ml に対する脱塩素剤として、3%チオ硫酸ナトリウム(キシダ化学(株))を 0.1 ml 使用した。

## B. 1. 2. 大腸菌の測定方法

### (1) コロニー形成法

細菌の増殖能力を測定するため、コロニー形成法を用いた。測定には、大腸菌群の選択培地であるデスオキシコーレイト寒天培地(栄研器材(株))と、非選択培地である Tryptic Soy Agar(Difco 和光(株))を使用し、共に重層寒天法により大腸菌濃度を測定した。

### (2) ATP 法

細菌の代謝活性を測定するために、ATP 量を測定した。測定には、ATP 発光キット(東洋ビーネット(株)), ATP 抽出キット(東洋ビーネット(株)), Luminescence JNR-II AB2300(ATTO(株))にて ATP 量を求めた。

### (3) 回復量測定法

細菌の損傷程度を測定するために不活化後の

回復量を測定した。不活化後の試料を標準液体培地に投入し 37°C で培養し、回復させた。

## B. 2. 紫外線消毒の管理手法の検討

### B. 2. 1. 装置および手順

紫外線源には低圧水銀灯を用いた。流水式装置には、容積 450 ml の二重円筒管装置を用い、回分式には内径 5.5 cm のガラスシャーレを用いた。井戸水に、大腸菌ファージ Qβ を少量加え、よく攪拌したものを試料とした。

回分式不活化実験では、試料をビーカーに入れ、攪拌させながら紫外線を照射した。UV メーターを用いて測定した、試料表面での 254 nm における紫外線線量率は 200 mW·cm<sup>-2</sup> であった。回分式の実験装置を Fig. 1 に示した。

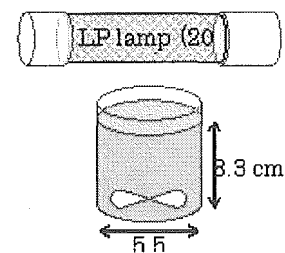


Fig. 1 回分式装置

流水式不活化実験では、装置内を試料で満たし、定常流を仮定するため紫外線を照射しながら試料を 1 l 程度流下させた後に試料を採取した。流水式の実験装置を Fig. 2 に示した。

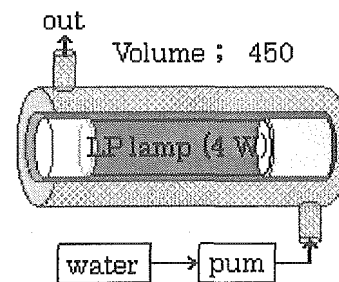


Fig.2 流通式装置



試料の 254 nm における吸光度は  $0.027 \text{ cm}^{-1}$  であった。QB の宿主菌は E. coli K12 13965 を用い、QB の初期濃度は  $3.95 \times 10^7 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$  であった。一般細菌の初期濃度は  $3.8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$  であった。紫外線照射後、大腸菌ファージと一般細菌を培養した。大腸菌ファージは重層寒天培地法を用い、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間程度培養し、一般細菌は直径 5 cm、孔径  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで試料を吸引ろ過し、普通寒天培地にのせ、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間程度培養し、コロニー数を計数した。

### C. 実験結果

#### C. 1. 1. 消毒機構の比較

Fig.3~Fig.5 に、紫外線処理および塩素処理後のコロニー形成法による濃度測定結果を示した。

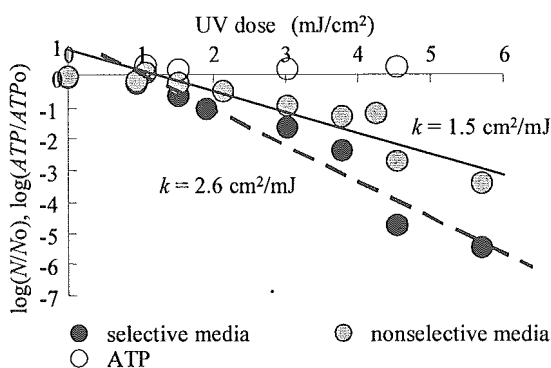


Fig.3 紫外線消毒結果 (濁質無し)

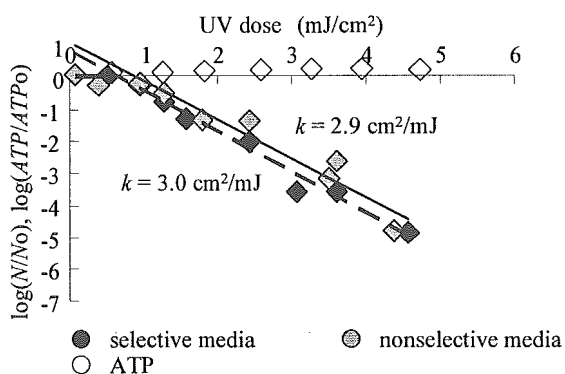


Fig.4 紫外線消毒結果 (濁質有り)

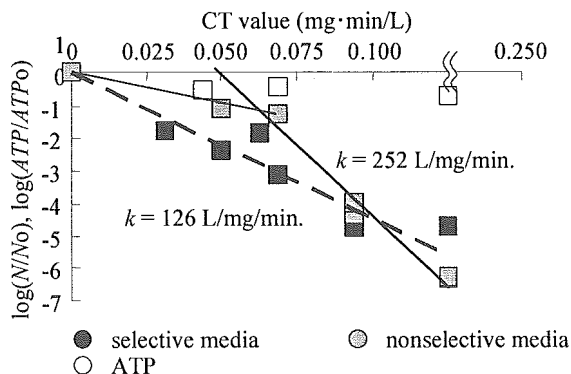


Fig.5 塩素消毒結果

Fig. 6~Fig.8 に、各消毒後の回復処理結果を示した。

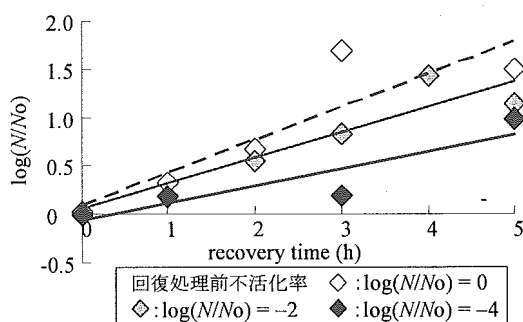


Fig.6 紫外線消毒 (濁質無し) 後の回復結果

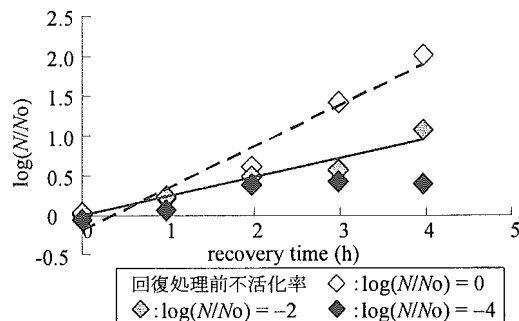


Fig.7 紫外線消毒 (濁質有り) 後の回復結果

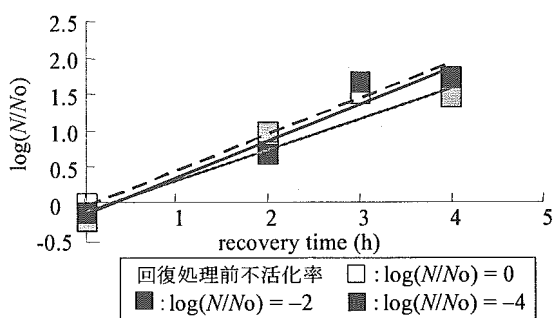


Fig.8 塩素消毒後の回復結果

C. 1. 2. 管理手法の検討

Fig.9 に回分式実験の結果を示す. また Fig.10 に流通式装置の測定結果を示す.

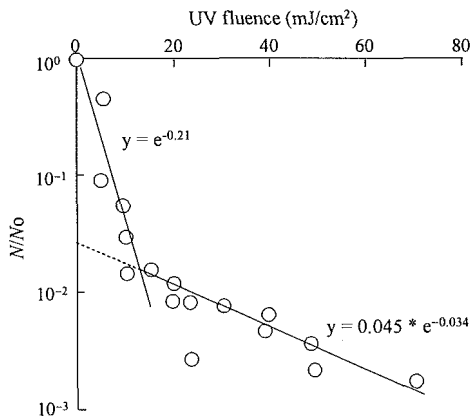


Fig.9 一般細菌とファージの回分式実験結果

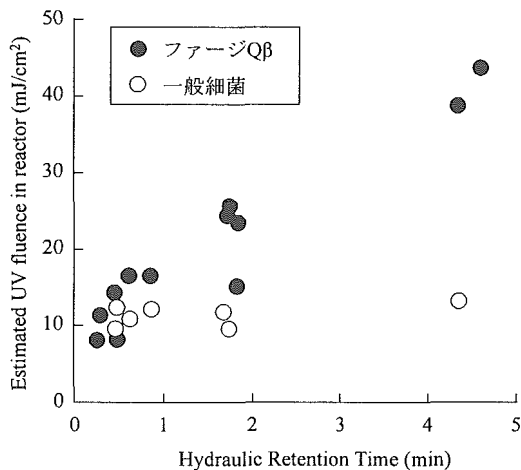


Fig.10 一般細菌とファージの流通式装置実験結果

D. 考察

D. 1. 消毒機構の比較

Fig.11~Fig.13 に, それぞれの場合における 2 つのコロニー形成法測定結果の相関を示した. 紫外線による微生物数の減少は式(a)に従う.

$$\ln(N/N_0) = -kIt \quad (a)$$

N: 照射後微生物数, N<sub>0</sub>: 照射前微生物数

k: 不活化速度定数, I: 紫外線線量率, t: 照射時間

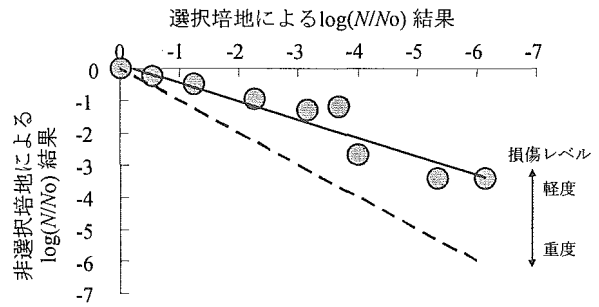


Fig.11 各培地の結果の相関 (紫外線濁質無し)

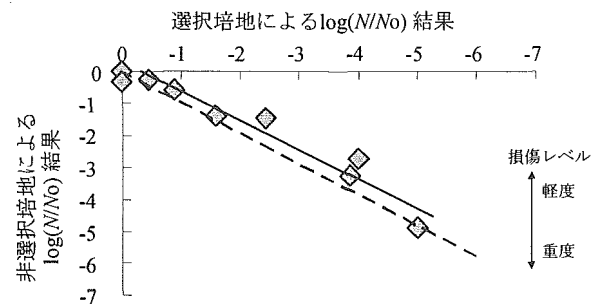


Fig.12 各培地の結果の相関 (紫外線濁質有り)

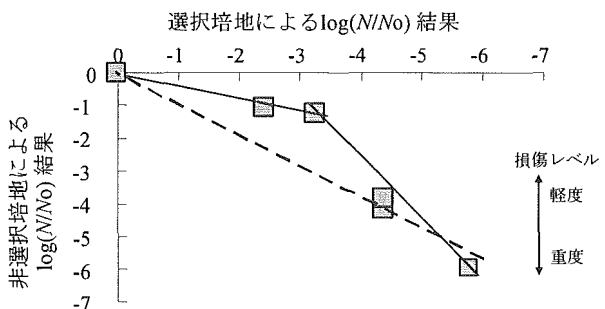


Fig.13 各培地の結果の相関 (塩素消毒)

Fig. 11, Fig. 12 より濁質有りのほうが不活化速度定数が小さいことから, 紫外線に対する感受性が大きいことがわかった. よって, 濁質中には紫外線による DNA 損傷を補助する因子か, まったく別の損傷を与える因子が存在すると考えられる. 選択培地と非選択培地によるコロニー形成能の差は濁質有りの方が小さかった. このことから, 濁質中での紫外線不活化では濁質無しの場合と比べて深い損傷を与えられている可能性がある.

ATP量はほとんど変化せず、不活化後の大腸菌もATPを保持していると考えられる。

塩素処理による大腸菌の減少は式(b)に従う。

$$\ln(N/N_0) = -k \int C \cdot dt \quad (b)$$

N: 塩素処理後微生物数, N<sub>0</sub>: 塩素処理前微生物数,  
k: 不活化速度定数, C: 塩素濃度, t: 塩素処理時間

Fig. 13 より選択培地により培養できる大腸菌の減少は式 (b) に従ったが、非選択培地においては不活化が遅れた。このことから塩素濃度の違いにより不活化過程が異なることが考えられる。ATP量の変化は小さく、紫外線処理と同様に、代謝機能の阻害は明確にはならなかった。

選択培地で培養できる状態を“active condition”, 非選択培地で培養できて選択培地で培養できない状態を“slight damage”, 両培地で培養できない状態を“severe damage or dead”と定義した。紫外線処理(濁質無)と塩素処理を比較すると、選択培地による生存率(log(N/N<sub>0</sub>))が0から約-3の範囲では同様の状態を示し、-3以下では塩素処理の方が深い損傷状態に移行する細菌数が多かった。このことから、ある程度以上の不活化量では、紫外線処理(濁質無)よりも、塩素処理のほうが確実に損傷させることができることがわかる。紫外線処理(濁質有)と塩素処理を比較すると、紫外線処理(濁質有)では不活化後の大腸菌のほとんどが深い損傷状態になっているため、紫外線処理(濁質有)のほうが確実に損傷させると考えられる。

Fig. 6~Fig. 8の結果より、回復時のATP生成量の増減より代謝機能の状態について考えると、選択培地により培養できる大腸菌の濃度が初期濃度に対して10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>となるように不活化し、各々を回復させた。紫外線処理では不活化によりATP回復量が減少した。濁質無しでは代

謝が活性化しているが濁質有りでは、10<sup>-4</sup>まで不活化した大腸菌の代謝活性化は停止した。よって紫外線処理の濁質共存下であればDNA損傷の他に、代謝機能を阻害する因子が働くと考えられる。Fig. 8より低濃度の塩素処理後の大腸菌は代謝が活発化した。低塩素濃度で処理した場合は可逆的な代謝阻害をし、高塩素濃度で処理した場合は不可逆的な代謝阻害をしたと考えられる。

## D. 2. 管理手法について

回分式による不活化実験の結果をFig. 9に示した。縦軸には生残率を対数で表し、UVメーターによって測定したUV量を横軸に表した。大腸菌ファージの生残率は、周知のとおり、紫外線量に対して一次反応として減少した。しかし、一般細菌の生残率はUV量が20 mWs・cm<sup>-2</sup>において二段階の減少を見せた。これは、一般細菌の中のUV耐性菌の存在によるものと考えられる。

Fig. 10には流水式による不活化実験の結果を示した。縦軸にUV量を表し、横軸に平均滞留時間を表した。Qβは平均滞留時間とUV量が比例関係にあった。それに対し、一般細菌は平均滞留時間が増加してもUV量はほとんど増加しなかった。これは、細菌のほとんどが不活化しているにもかかわらず、UV耐性の強い種が残留し、生残率が高くなるからと思われる。

一般細菌は、回分式においてはUV耐性を示し、また再現性も十分にあると考えられた。流水式による不活化ではUVに対して強い耐性があるように見えた。

## E. 結論

消毒機構に関しては、塩素消毒と紫外線消毒方法における処理対象細菌の不活化効果の比較を、複数の培地を用いた測定法および回復処理を施

した場合の影響の両側面から検討した結果、塩素消毒は適用する CT 値によって、損傷レベルが異なることがわかった。また CT 値が低い場合には、軽度な損傷が多く見られ、CT 値が高くなるほど重度な損傷となることが示唆された。これは塩素消毒が複数のメカニズムからなっているためと考えられた。一方紫外線消毒では、単一の消毒機構のため、投入線量によらず一定の損傷レベルが得られることがわかった。また回復処理を施したところ、塩素消毒は紫外線消毒に比べて回復量が著しく多いことがわかった。

また管理手法の検討に関しては、紫外線消毒法を対象とし、原水に自生する細菌類を生物線量計として用いる方法の検討を行った。結果として地下水を複数回サンプリングして行った回分式試験においては一定の紫外線用量－反応関係が得られ、生物線量計としての使用が可能であると考えられたが、流通式装置に適用した場合、ある一定以上の紫外線線量（約 20mJ/cm<sup>2</sup>）以上を測定するのに不都合が生じることがわかり今後の課題が残った。

#### F. 健康危険情報

（該当なし）

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

（該当なし）

##### 2. 学会発表

- 1) 窪華奈子, 大瀧雅寛「不活化した大腸菌の損傷に関する研究」第 42 回環境工学フォーラム講演集, pp.75-77, 2005
- 2) 廣戸裕子, 大瀧雅寛「流水式 UV 装置における生物線量計としての一般細菌の妥当性」第 40 回日本水環境学会年会講演集, pp.426,

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（該当無し）

分担研究報告書 6

水道水における微量有機物および再増殖微生物の特性評価

主任研究者	国包	章一
分担研究者	島崎	大
研究協力者	春日	郁朗

## 水道水における微量有機物および再増殖微生物の特性評価

主任研究者	国立保健医療科学院水道工学部長	国包 章一
分担研究者	国立保健医療科学院水道工学部	島崎 大
研究協力者	国立保健医療科学院水道工学部	春日 郁朗

### 研究要旨

オゾン-活性炭処理は高度浄水処理法の1つとして、各地の浄水場で導入が進められているが、どのような微生物が活性炭上で増殖し、処理に関与しているのかについては、ほとんど明らかになっていない。本研究ではオゾン-活性炭処理を導入している7箇所の浄水場を対象として、原水、活性炭表面に付着している真正細菌、真核生物の群集構造をT-RFLP法によって比較した。その結果、原水中の微生物群集構造は浄水場間のばらつきが見られたが、活性炭表面上の微生物群集構造は、一部に例外はあるものの浄水場間の差異は小さく、類似した群集構造が形成されていることが示唆された。

### A. 研究目的

高度浄水処理の1つであるオゾン-活性炭処理は、本来、オゾンによる酸化分解と活性炭による物理吸着を主眼とした処理法である。しかし、実際には各種の微生物が活性炭表面に定着・繁殖し、溶存有機物の生分解、アンモニアの酸化、活性炭吸着能の更新などに関与していることが報告されている。このような生物学的処理能力を併せ持った活性炭は、通常の粒状活性炭処理と区別して“生物活性炭”と呼称されている。特に、易分解性有機物を生物学的作用によって除去することが可能であるため、配水管路における微生物再増殖を抑制する効果が期待されている。しかし、この生物活性炭の“生物”については不明な点が多く、生物学的作用を担う微生物群集に関する基礎的な知見は限られている。このため、生物活性炭は依然として概念的な理解にとどまっているのが現状である。

そこで本研究では、オゾン-活性炭処理工程において、どのような微生物群集構造が活性炭表面に構築されているのかを遺伝子レベルから明らかにし、各地の浄水場でどのような特徴があるのか、原水中の微生物群集構造とどのような差異があるのかを評価することを試みた。微生物群集構造の解析には、真正細菌の16S ribosomal RNA 遺伝子（16S rDNA）、および真核生物の18S ribosomal RNA 遺伝子（18S rDNA）を対象としたPCR-クローニング法及びTerminal-Restriction Fragment Length Polymorphism法（末端制限酵素断片長多型：T-RFLP法）を採用した。T-RFLP法では、微生物群集構造の特徴をパターンとして総合的に捉えることが可能である。

### B. 研究方法

オゾン-活性炭処理を浄水処理に導入している全国7箇所の浄水場(A~G)を対象とし、原水、

表 1 解析対象試料の一覧

浄水場	試料	略号	活性炭使用期間	逆洗頻度	備考
A	原水	A-W	-	-	河川水
	活性炭 逆洗前	A-AC-b	2年	-	固定床下向流
	活性炭 逆洗後	A-AC-a	同上	4日	
活性炭 長期使用	A-AC-L	8年	-	-	
B	原水	B-W	-	-	河川水
	活性炭 逆洗前	B-AC-b	9ヶ月	-	固定床下向流
	活性炭 逆洗後	B-AC-a	同上	4日	
C	原水	C-W	-	-	湖水
	活性炭	C-AC	1ヶ月	-	流動床上向流
D	原水	D-W	-	-	ダム湖水
	活性炭	D-AC	3年	3日	固定床下向流
E	原水	E-W	-	-	河川水
	活性炭	E-AC	12年(年20%新炭補充)	1日	流動床上向流
F	原水	F-W	-	-	河川水
	活性炭	F-AC	12年(年20%新炭補充)	1日	流動床上向流
G	原水	G-W	-	-	ダム湖水・河川水・地下水
	活性炭	G-AC	5ヶ月	-	固定床下向流
	活性炭 長期使用	G-AC-L	13年	-	
	生物接触酸化装置 (付着生物膜)	G-BO	-	-	-

活性炭を採取した。試料の一覧を表 1 に示す。原則として、活性炭試料は逆洗工程の直前に採取した。また、浄水場 A, B については逆洗前後の活性炭を、浄水場 A, G については使用期間の異なる活性炭を、浄水場 G からは生物接触酸化装置の付着生物膜試料（担体）をそれぞれ解析に加えた。

まず、原水中の微生物、活性炭に付着した微生物から核酸を抽出し、16S rDNA, 18S rDNA に特異的なプライマー（フォワードプライマーについては 5'末端を蛍光標識した）を用いて各遺伝子を PCR 法によって増幅した。増幅産物を制限酵素 *HhaI* によって消化し、消化産物をキャピラリーシーケンサーによって分離、検出した。浄水場 B の原水、活性炭試料については、未標識プライマーを使用して、クローンライブラリーを構築した。活性炭に付着した細菌数（全菌数）の計数は、蛍光顕微鏡を用いて行った。

### C. 結果および考察

#### 1. 活性炭付着細菌数（全菌数）の計数

活性炭付着細菌数（全菌数）の計数を行ったところ、浄水場によらず、 $10^8 \sim 10^9$  cells/g（湿重量）の細菌が付着していることが明らかになった（図 1）。浄水場 A, B については、同一の処理池を対象として、逆洗前後の活性炭試料の全菌数を比較した。その結果、逆洗によって全菌数は浄水場 A では 36%、浄水場 B では 64%に減少した。逆洗工程は定期的に行われていることを考える。

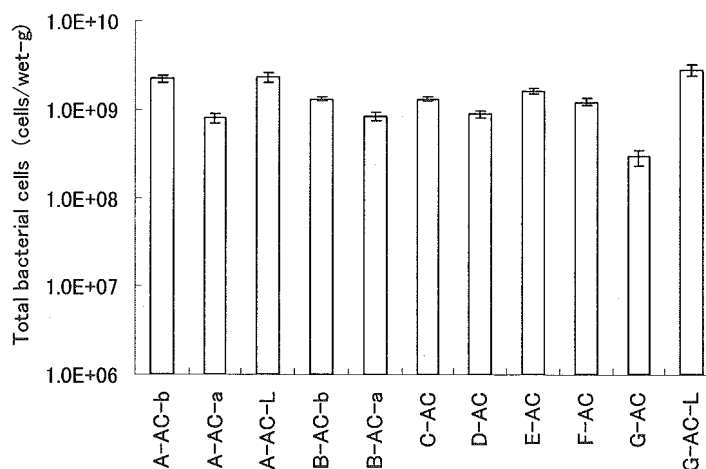


図 1 活性炭付着細菌数の比較（全菌数）

と、付着細菌数は逆洗サイクルに合わせて大きく変動していることが推察された。また、活性炭の使用期間による全菌数の差異を浄水場 A と G で比較した。浄水場 A では、2 年間連続使用している活性炭と、8 年間連続使用している活性炭との間に大差はなかったが、浄水場 G では、5 ヶ月間使用した活性炭よりも、13 年間使用した活性炭の方が、全菌数は約 10 倍多かった。

## 2. クローンライブラリーの構築

浄水場 B の原水、活性炭試料について、16S rDNA および 18S rDNA 増幅産物からクローンライブラリーを構築した。16S rDNA を解析したところ、原水では藍藻類 *Cyanobacteria* に近縁なクローンが優占していたのに対して、活性炭試料では、 $\beta$ -*Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* などに近縁なクローンが優占しており、原水と活性炭試料では、細菌群集構造が大きく異なることが示唆された。一方、18S rDNA の解析では、原水試料で珪藻類や緑藻類などの真核藻類に近縁なクローンが優占していたのに対して、活性炭では原生動物 *Cercomonas* や、後生動物 *Chaetonotus* (イタチムシ) などに近縁なクローンが優占するという特徴が確認された。活性炭に特徴的に見られた微生物群が、どのような過程を経て活性炭上に定着したのか、興味深い点である。

## 3. T-RFLP 法による微生物群集構造の比較

原水、活性炭、生物接触酸化装置担体の微生物群集構造を T-RFLP 法によって比較した。16S rDNA の T-RFLP パターンを主成分分析によって解析した結果を図 2 に示す。原水試料と活性炭試料は、主に第一主成分によって分離された。原水試料の T-RFLP パターンは地点間でのばらつきが大きかったのに対して、活性炭試料の T-RFLP パターンについては、浄水場間の差異は原水ほど大きくはなく、比較的類似した真正細菌群集構造が形成されていることが推測された。付着細菌数に加えて、群集構造にも類似性があるということは興味深い知見である。細菌の付着特性や各処理工程における生残性の差異、オゾン処理による有機物の均質化の影響などが、群集構造の類似性に影響していることが推察された。浄水場 G の生物接触酸化装置担体試料の T-RFLP パターンは、原水よりも活性炭試料のパ

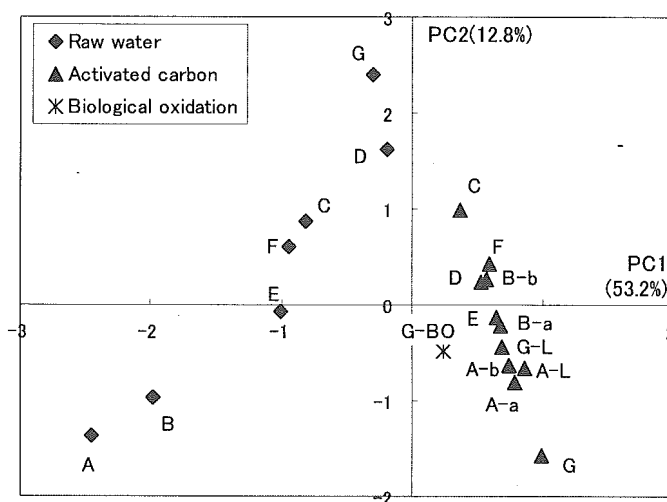


図 2 主成分分析による T-RFLP パターンの比較  
(真正細菌 : 16S rDNA)

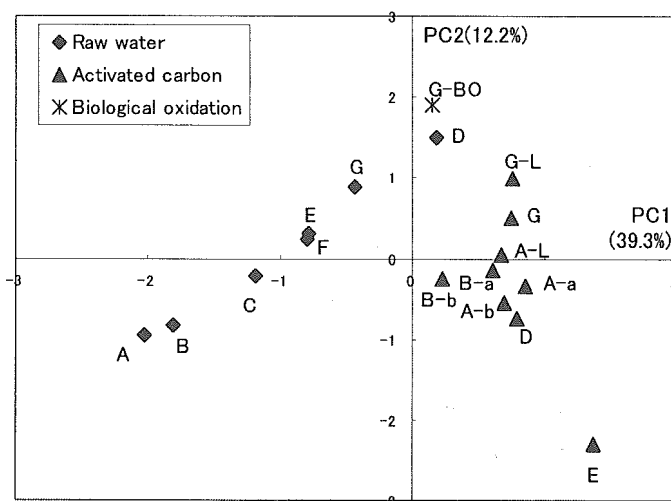


図 3 主成分分析による T-RFLP パターンの比較  
(真核生物 : 18S rDNA)



ターンに類似していた。浄水場 A と B の逆洗前後の活性炭試料のパターンには大きな変化は見られなかった。浄水場 A では、2 年間使用した活性炭と 8 年間使用した活性炭の T-RFLP パターンには差異がほとんどなかったものの、浄水場 G では、5 ヶ月間使用した活性炭と 13 年間使用した活性炭の T-RFLP パターンに差異が認められた。

18S rDNA を PCR で増幅した結果、浄水場 C, F からは増幅産物が得られなかった。これらの浄水場の活性炭処理は、流動床上向流であるという運転上の共通点があった。流動床上向流では、原生動物や微小後生動物が定着しにくく、存在量が非常に少ないことが推測された。ただし、浄水場 F と同一の条件で運用されている浄水場 E では、流動床上向流であるにもかかわらず、増幅産物が確認された。18S rDNA の T-RFLP パターンを解析すると、16S rDNA の解析結果と同様に、原水試料は地点間の差異が大きかったが、活性炭試料（逆洗前後、使用期間の差異を含む）については、浄水場 E の活性炭を除いて近接してプロットされ、相互に類似していることが示唆された（図 3）。原水や運転条件に差異のある活性炭試料の微生物群集（真正細菌、真核生物）に共通性が見られたことは、非常に興味深い。浄水場 E の 18S rDNA の T-RFLP パターンについては、他の試料と比べて検出ピーク数が少なく、群集構造が単純であることが推察された。浄水場 C, E, F の結果を踏まえると、流動床上向流は、真核生物の定着や多様性に大きな影響を及ぼすことが推測される。浄水場 G の生物接触酸化装置担体試料は、活性炭試料よりも浄水場 D の原水のパターンと類似していた。

#### D. 結論

- ・ オゾン-活性炭処理を導入している全国 7 箇所の浄水場の活性炭試料の付着細菌数を評価したところ、浄水場によらずほぼ  $10^8 \sim 10^9$  cells/g（湿重量）の細菌が付着していた。また、浄水場 A, B では、逆洗工程によって全菌数はそれぞれ 36%, 64% に減少した。
- ・ 浄水場 B の原水、活性炭試料からクローンライブラリーを構築した。16S rDNA の解析の結果、原水では藍藻類に近縁なクローンが優占していたのに対して、活性炭では *β-Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* などに近縁なクローンが優占していた。一方、18S rDNA の解析では、原水では真核藻類に近縁なクローンが優占していたのに対して、活性炭からは原生動物 *Cercomonas* や、後生動物 *Chaetonotus* に近縁なクローンが得られた。
- ・ 16S rDNA, 18S rDNA を対象として、原水、活性炭、生物接触酸化装置担体の真正細菌群集、真核生物群集を T-RFLP 法によって解析した。その結果、16S rDNA, 18S rDNA とともに、原水試料の微生物群集構造は地点間によるばらつきが大きいものの、活性炭試料では浄水場間の差異は比較的小さく、類似した微生物群集構造が構築されている傾向が示された。また、18S rDNA の解析結果からは、流動床上向流による活性炭処理が、真核生物群集の定着や多様性に大きな影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

（該当無し）

#### F. 研究発表

1. 論文発表

(該当無し)

2. 学会発表

- 1) 春日郁朗, 島崎大, 国包章一 (2006) 生物活性炭処理における微生物群集構造の特性評価, 第40回日本水環境学会年会講演集, p. 374
- 2) 春日郁朗, 島崎大, 国包章一 (2006) 生物活性炭処理に関する微生物群集構造と処理特性の関係, 第57回全国水道研究発表会 (発表予定)
- 3) Ikuro Kasuga, D.Shimazaki and S.Kunikane (2006) Influence of backwashing on microbial community in biofilm developed on biological activated carbon in an advanced drinking water purification plant, IWA-specialist conference Biofilm Systems VI (Submitted)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 1. 論文発表

- 1) Daisuke Nakajima, Ruri Ishii, Kazuyuki Nishimura, Yukihiro Takagi, Shigeru Mineki, Sukeo Onodera and Sumio Goto (2005) Effect of organic solvent in luminescent umu test using *S. typhimurium* TL210, *J. Environmental Chemistry*, 3, 569-574
- 2) Yong-Jun Jung, Yoshiaki Kiso, Rabi Atul Adawih binti Othman, Akira Ikeda, Kazuyuki NISHIMURA, Kyung-Sok Min, Atsuo Kumano, Akihiko Arijji (2005) Rejection properties of aromatic pesticides with a hollow-fiber NF membrane, *Desalination*, 180, 63-71

### 2. 学会発表

- 1) 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦 (2006) 環境水中のエンドトキシン存在形態に関する研究, 第40回日本水環境学会年会講演集, p.276
- 2) 窪華奈子, 大瀧雅寛 (2005) 不活化した大腸菌の損傷に関する研究, 第42回環境工学フォーラム講演集, pp.75-77.
- 3) 廣戸裕子, 大瀧雅寛 (2006) 流水式UV装置における生物線量計としての一般細菌の妥当性, 第40回日本水環境学会年会講演集, pp.426.
- 4) 春日郁朗, 島崎大, 国包章一 (2006) 生物活性炭処理における微生物群集構造の特性評価, 第40回日本水環境学会年会講演集, p.374
- 5) 春日郁朗, 島崎大, 国包章一 (2006) 生物活性炭処理に関与する微生物群集構造と処理特性の関係, 第57回全国水道研究発表会 (発表予定)
- 6) Ikuro Kasuga, D.Shimazaki and S.Kunikane (2006) Influence of backwashing on microbial community in biofilm developed on biological activated carbon in an advanced drinking water purification plant, IWA-specialist conference Biofilm Systems VI (Submitted)