

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

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ○廣戸裕子, 大瀧雅寛

Validity of the Standard Plate Count Bacteria as Biosimulator in Flow UV Reactor, by Yuko HIROTO, Masahiro OTAKI (Dept. of Human Environmental Science, Ochanomizu Univ.)

1. はじめに

運転中の紫外線装置において、消毒線量を実測する方法として原水中の一般細菌を生物線量計として利用する方法を試みた。既に生物線量計として用いられることの大腸菌ファージとの整合性を、流水式装置を用いて様々な条件下において検討した。

2. 実験方法

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。実験装置を Fig. 1 に示した。Qβ を生物線量計として用いて線量を測定した。なお、算定式は $UV\ fluence = -5.9 \times \ln(S_{UV})\ mW \cdot s \cdot cm^{-2}$ を用いた¹⁾。

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。

紫外線装置通過前後の試料中の、Qβ と一般細菌を測定した。Qβ は重層寒天培地法を用い、37 °C で 24 時間程度培養した。一般細菌は直径 5 cm, 孔径 0.45 μm 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 °C で 24 時間程度培養し、コロニー数を計数した。

試料の 254 nm における吸光度はいずれの場合も約 0.03 cm⁻¹ であった。Qβ の初期濃度は 4.0 × 10⁷ PFU・ml⁻¹ であった。一般細菌の初期濃度は 3.8 CFU・ml⁻¹ であった。

3. 実験結果と考察

回分式による不活化実験の結果を Fig. 3 に示した。縦軸には生残率を対数で表し、Qβ によって算出した UV 量を横軸に表した。一般細菌の生残率は UV 量が 20 mW・s・cm⁻² 付近を境界として二段階の減少を見せた。これは、一般細菌中に UV 耐性の強い種がある割合で存在したためと考えられる。

Fig. 4 に流水式による Qβ, 一般細菌のそれぞれの不活化結果から算定した UV 量と、平均滞留時間の関係を示した。Qβ の場合は平均滞留時間が増すにつれ算定 UV 量も増加する結果となった。一般細菌は結果に大きくばらつきが見られるが、UV 量の算出結果が Qβ と一致する点も見られた。結果がばらつく原因として、一般細菌はろ紙上に捕集した細菌数に差が見られ、かつ個体数が少ないことが多かった。特に平均滞留時間が 4.4 min では個体数の少なさとばらつきが出ていたため、微生物測定法の信頼性が非常に低い。よって、滞留時間が大きく、不活化率が大きな条件では、その点を改善して再度実験を行う必要がある。

4. まとめ

一般細菌は、回分式実験により、不活化率から UV 量を算定する式を求めることが出来た。その再現性も十分にありと考えられた。流水式への適用においては、不活化率が大きい条件でデータの信頼性が低下するという課題が残るが、この点を改善することにより、一

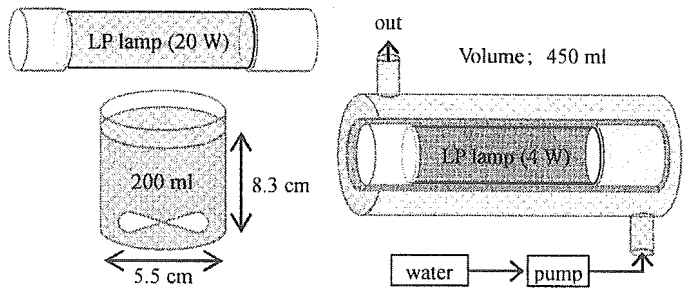


Fig. 1 Setup for Batch UV Irradiation

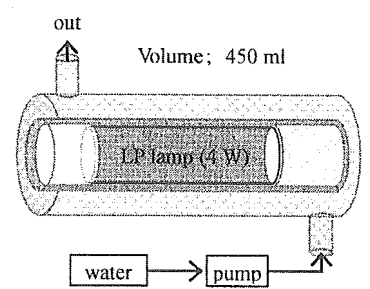


Fig. 2 Setup for Flow UV Irradiation

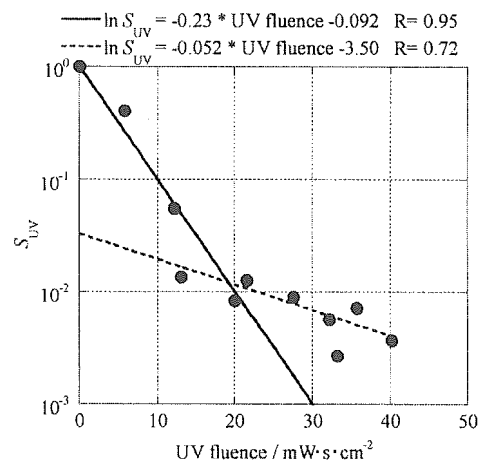


Fig. 3 Inactivation after UV irradiation by Batch

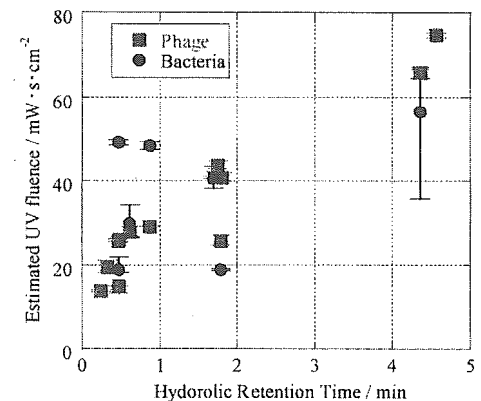


Fig. 4 Estimation of UV in Flow Reactor

般細菌が流水式においても生物線量計としても用いられる可能性が示された。

参考文献

- 1) KAMIKO N. OHGAKI S. RNA coliphage Qβ as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency. Wat. Sci. Tech., 21, (3) 227-231, 1989.
- 2) KAMIKO N. et al. Photoreactivation kinetics of the fecal indicator bacteria in the released effluent. Proceedings of 1st Asia International Conference of IUVA, Singapore, 2002.

謝辞

本研究は、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「残留塩素に依存しない水道の水質管理手法に関する研究」により実施した。

生物活性炭処理における微生物群集構造の特性評価

国立保健医療科学院水道工学部 ○春日郁朗, 島崎大, 国包章一

Characterization of Microbial Community Associated with Biological Activated Carbon, by Ikuro KASUGA, Dai SHIMAZAKI and Shoichi KUNIKANE (National Institute of Public Health)

1. はじめに

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。このうち、活性炭表面に微生物が繁殖し、有機物の生分解やアンモニア酸化、活性炭吸着能の再生などの生物学的作用が認められるものは、生物活性炭と呼称され、通常の粒状活性炭処理とは区別されている。しかし、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。そこで本研究では、オゾン-活性炭処理を行っている浄水場を対象として、活性炭表面に付着している微生物群集構造（真正細菌、真核生物）の特性を T-RFLP 法（Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism）によって評価することを試みた。また、原水中の微生物群集構造についても解析し、活性炭に付着している微生物群集構造との比較を行った。

2. 実験方法

2005 年 8 月から 9 月にかけて、オゾン-活性炭処理を導入している A から G の 7 箇所の浄水場にご協力いただき、原水、および活性炭を採取した。活性炭の採取は、逆洗の直前に行った。原水中の微生物群集、活性炭に付着している微生物群集から、UltraClean Soil DNA Isolation kit (MO BIO) を用いて核酸抽出を行った。5'末端を蛍光標識したフォワードプライマーと未標識のリバースプライマーを用いて、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子、真核生物の 18S rRNA 遺伝子をそれぞれ PCR によって増幅した。増幅産物 100ng を制限酵素 *HhaI* によって消化し、蛍光標識された 5'末端断片を ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって分離・検出した。解析は、GeneMapper™ v3.0 (Applied Biosystems) を用いて行った。また、浄水場 B の原水と活性炭については、別途 16S rRNA 遺伝子及び 18S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを構築し、構成微生物の推定を行った。

3. 実験結果と考察

16S rRNA 遺伝子については、すべての浄水場の原水・活性炭試料から増幅産物を得ることができた。18S rRNA 遺伝子については、原水試料からはすべて増幅産物を得ることができたものの、活性炭試料については、浄水場 C と浄水場 F からは増幅産物を得ることができなかった。

浄水場 B の原水、活性炭試料について、16S rRNA 遺伝子および 18S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを構築した。16S rRNA 遺伝子を解析したところ、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、*β-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 rRNA 遺伝子の解析では、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。

16S rRNA 遺伝子および 18S rRNA 遺伝子を T-RFLP 法で分析し、そのパターンを主成分分析で比較した (図 1, 図

2)。その結果、原水中の微生物群集構造と活性炭表面上の微生物群集構造には差異があることが示された。16S rRNA 遺伝子の場合、原水中の細菌群集構造は浄水場によってばらつきがあるものの、活性炭上の細菌群集構造のパターンは浄水場間で類似していることが示唆された。同様の傾向は 18S rRNA 遺伝子の比較でも示されたが、活性炭試料の中で、浄水場 E のパターンはその他の浄水場のパターンとは異なる特徴を有していた。

活性炭表面上に類似した微生物群集構造が形成されている理由としては、微生物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推察された。

4. まとめ

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に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では、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。今後は、微生物が活性炭に定着する過程や、微生物群集の機能的特徴についても解析を進める予定である。

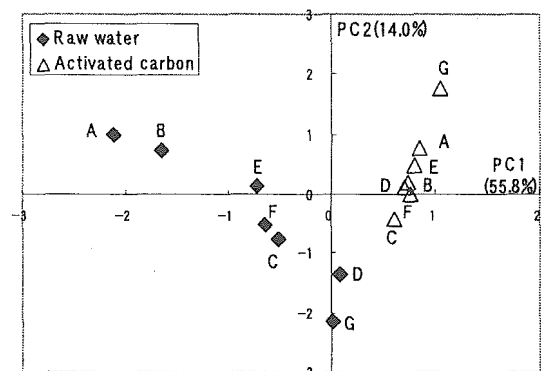


図 1 主成分分析による T-RFLP パターンの比較 (16S rRNA 遺伝子)

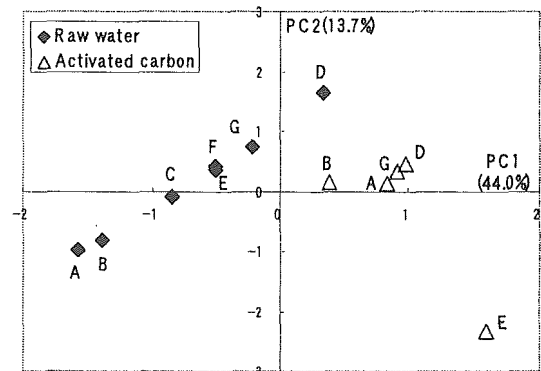


図 2 主成分分析による T-RFLP パターンの比較 (18S rRNA 遺伝子)

オゾン-活性炭処理における活性炭表面付着微生物群集の 分子生物学的手法による解析

○ 春日 郁朗(国立保健医療科学院)
島崎 大(国立保健医療科学院)
国包 章一(国立保健医療科学院)

1. 研究の背景と目的

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、アンモニアの硝化、活性炭吸着能の維持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。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、粒状活性炭と区別する定義も明瞭ではない。このため、生物学的作用を担う微生物群集に関する基礎的な情報の不足から、生物活性炭は依然として概念的な理解に留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TRFLP法(末端制限酵素断片長多型: Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)を採用した。

2. 実験方法

オゾン-活性炭処理を導入しているA~Gの7箇所の浄水場を対象とし、原水、活性炭、水質データを提供していただいた。基本的に、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をそれぞれ解析に加えた。試料の一覧を表1に示した。

活性炭に付着した細菌数(全菌数)の測定は、活性炭をMilli-Q水中で超音波処理し、上澄み中に剥離された細菌をDAPI染色し、蛍光顕微鏡で計数した。

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	4日	固定床下向流
	活性炭 逆洗後	A-AC-a	同上		
	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	4日	固定床下向流
	活性炭 逆洗後	B-AC-a	同上		
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	3日	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	-		

オゾン-活性炭処理における活性炭表面付着微生物群集の 分子生物学的手法による解析

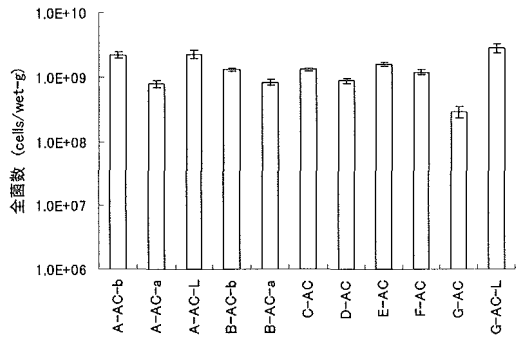


図1 活性炭付着細菌数 (全菌数)

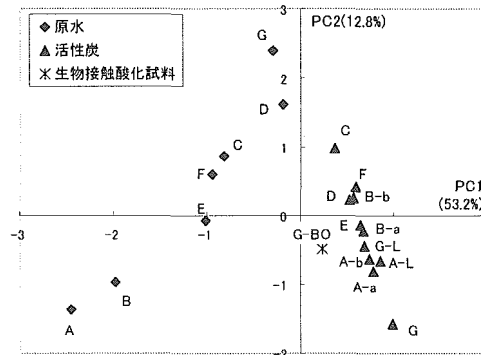


図2 16S rDNA 遺伝子の
T-RFLP パターンの比較

原水中の微生物、活性炭に付着している微生物から核酸を抽出し、5'末端を蛍光標識したフォワードプライマーと未標識のリバースプライマーを用いて、16S rDNA、18S rDNA をそれぞれPCR 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、5'末端断片をキャピラリーシークエンサーで分離・検出した。

3. 結果及び考察

活性炭試料の全菌数の計数を行ったところ、浄水場によらず、 10^8 - 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、同一の処理池について、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繰り返されていることを考えると、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。

原水、活性炭、生物接触酸化試料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構築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。浄水場 G の生物接触酸化試料の T-RFLP パターンは、原水よりも活性炭試料のパ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 と G における使用期間の異なる活性炭試料については、浄水場 A で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 パターンには差異が認められた。

18S rDNA の T-RFLP パターンについても、16S rDNA と同様に解析した結果、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。浄水場 G の生物接触酸化試料は、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。

4. 結論

- 1) 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 - 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。
- 2) 16S rDNA、18S rDNA を対象として、原水、活性炭、生物接触酸化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低く、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。

今後は、微生物群集の構造特性に加え、機能特性にも類似性があるのか研究を進める予定である。

謝辞 試料の採取にご協力いただいた各水道事業者の方々に深謝いたします。