

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 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 准教授

研究要旨

塩素の代替方法としてのオゾンおよび二酸化塩素消毒法によって細菌に与えられるダメージについて、大腸菌をモデル細菌として検討した。また紫外線照射装置のもつ消毒効果に関して生物線量計を用いて、装置内照射量の分布の推定を行った。

オゾン溶解水による消毒では pH により反応主体が変化し、それに伴って、細菌への損傷部位が変わることがわかったが、オゾン曝気においては、いずれの pH においてもオゾン分子が反応主体となっており、外膜の損傷が起こりやすい状況であることが推測された。また二酸化塩素の場合には、外膜への損傷は起こらずに細胞内部で酵素活性の失活を起こしやすいということが示唆された。いずれにおいても大腸菌を用いて各消毒法の評価を行う場合は、細胞のある部分に損傷を受けてはいるが、増殖が可能であるような低い損傷レベルの大腸菌を、誤陰性としてしまい消毒効果の過大評価につながる恐れがあることがわかった。

紫外線照射装置の評価に関しては、流水式装置において異なる流量条件において、生物線量計による線量測定を各条件毎に 40~60 データ収集し、標準偏差を求めた。この値より、母集団すなわち異なる流量条件における流水式装置のもつ線量分布の標準偏差を推定し、いずれの条件においてもほぼ等しいことが実測された。

A. 研究目的

塩素の代替消毒法についての導入可能性について検証するために、次の 2 点に関して研究を行った。1) 代替消毒法が病原細菌に与える損傷レベルを比較検討することで、消毒処理後の病原細菌の再増殖を抑制出来るかどうかを推定して、残留塩素による配水管中の再増殖抑制効果に相当する効果について検討する。

2) 代替消毒法として紫外線照射を対象とし、実用化にあたって維持管理方法、装置の設計など諸問題の解決を図る

本年度は、1) に関しては、オゾンおよび二酸化塩素について、諸条件の不活化実験のもとで大腸菌に与える損傷レベルを複数の培養培地にて測定して損傷レベルを推定するとともに、細胞染色法による顕微鏡観察結果も併せて、この推定結果について検証を行った。2) に関しては、UV 流

通装置内の紫外線線量分布の推定の提案、および多波長ランプに対応する化学線量計の提案について検証をおこなった。

B. 研究方法

1) 代替消毒法の病原細菌への損傷レベルの推定
代替消毒方法としてオゾンおよび二酸化塩素を選定し研究に供した。また病原細菌の代替細菌として大腸菌 (NBRC3301) を用いた。

オゾンはオゾン発生装置 (RZ-100N) を用いて発生させたオゾンを、pH を調整したリン酸緩衝液に通気して、オゾンを溶解させた。pH は 5, 7, 9 の 3 段階とした。充分通気して溶解させた後にオゾン通気を止めて、大腸菌を投入しその濃度変化を測定した。また通気したままで大腸菌を投入し、その濃度変化を測定した。大腸菌の測定方法は後述する。

表1 各測定方法の名称とその特徴

名称	略称	特徴
Tryptic Soy Agar 培地	TSA	代謝能力をもつ大腸菌数の測定となる
コンパクトドライ™ EC	C-EC	β-グルクロダーゼ生成能を持つ大腸菌数の測定となる。
デスオキシコレート培地 (デスオキシコール酸 Na抜き)	No-DESO	乳糖代謝能力を持つ大腸菌数の測定となる
デスオキシコレート培地	DESO	乳糖代謝能力を持ち、デスオキシコール酸 Na耐性のある大腸菌数の測定となる

注) No-DESOはTSAとほぼ同じ結果となることが前実験でわかったため、実験結果では示さない場合もある。

二酸化塩素は、二酸化塩素水溶液 (2,000 ppm, ファイネックス社製) を希釈して用いた。初期濃度を 0.05~0.5 mg/L に調整し、接触時間を 1 分もしくは 2 分として CT 値を調整して大腸菌の濃度変化を測定した。大腸菌の濃度測定方法は、上述の消毒方法が細菌 (大腸菌) へ与える損傷レベルを推定するために、次の 2 つの方法による。

(1) 異なる培養培地による培養可能細菌数の比較

これをオゾンおよび二酸化塩素の各不活化処理を施し、その濃度変化を異なる培地にて計測した。用いた培地名とそれらの計測に関する特徴を表 1 に示す。即ち、これらの培地にて計測される不活化率の違いが、大腸菌に与える損傷レベルを示唆するものと考えた。

(2) 染色細胞の顕微鏡観察

大腸菌細胞を DAPI および PI 染色剤にて染色した。DAPI 染色は、生死に関わらず大腸菌細胞内の核酸が染色されるため、DAPI により染色されるかどうかで、大腸菌細胞の判別を行い、同時に観測対象液中の大腸菌細胞数の計測に用いる。一方 PI 染色は、通常活性を持つ細胞膜は透過しないため、細胞膜に異常のない大腸菌細胞は染色されないと考えられる。従って、PI 染色の有無によって細胞膜異常の有無を推定することとした。以上の判別方法に関して、まとめたものを表 2 に示す。

消毒処理を施した大腸菌溶液を 10,000 倍に希釈した後、DAPI および PI 溶液による染色作業を行い、メンブレンフィルターにてろ過濃縮した試料を蛍光顕微鏡にて 400 倍で計数した。計数は視野内にて 100 個程度の DAPI による輝点を計測し、

同一試料にて 3 回ずつ行った。それぞれの測定条件は以下のとおり

DAPI: 励起波長 360nm, 蛍光波長 460nm, 青色蛍光を持つかどうかで判断

PI : 励起波長 530nm, 蛍光波長 620nm, 赤色蛍光を持つかどうかで判断

細胞膜に異常の無い細胞数の比率を生残率として、次式にて算定した。

$$\text{生残率} = \frac{N_{\text{DAPI}} - N_{\text{PI}}}{N_{\text{DAPI}}} \quad (1)$$

ここで、 N_{DAPI} : DAPI 陽性 (+) となった細胞数、 N_{PI} : PI 陽性 (+) となった細胞数

表2 DAPI/PI 染色法による大腸菌細胞の計数法

		DAPI 染色	
		+ (染色される)	- (染色されない)
PI 染色	+	細胞膜に異常を持つ 大腸菌細胞	大腸菌細胞として カウントしない
	-	細胞膜に異常の無い 大腸菌細胞	

2. 2. 流水式紫外線装置の線量分布推定

流水式紫外線装置を通過する水がどのような線量を受けるかは、その水塊がどのような滞留時間を持って、どのような紫外線強度プロファイルを持っているかによって決まるが、それらを測定することはほぼ不可能である。厚生労働省令によれば、通過する水量の 95% 以上が 10 mJ/cm² 以上の線量を受けていることとされているが、これを実測するのは不可能であるため、流動解析モデルや装置内強度分布モデルを組み合わせて推定する方法

が行われている。ただしこれらを実証する方法は現在のところ確立されていない。ここでは、生物線量計として大腸菌ファージQ β を流水式装置に投入し、異なる流量条件において流入濃度と出口濃度を測定し、その比率を測定した。一流量条件においてその比率測定を40~60サンプル行い、その比率の分布を求めた。大腸菌ファージQ β の紫外線耐性は既知であるので、この各サンプルの比率データより、紫外線線量が求められるが、この線量は分布を持つことになる。これは母集団が全流下ファージだとすると、そこからn個のファージをサンプリングし、その不活化平均値を測定したことになる。従って中心極限定理を用いれば、母集団のもつ分布幅を推定することが可能となると考えた。

流水式装置には容積450 mlの二重円筒管装置を用いた。内管外径: 1.15 cm, 外管内径: 3.15 cm, 液層の厚さ: 2 cm, 長さ: 16.5 cmであった。試料は、地下水にQ \square を混合したものをを用いた。紫外光源には4 Wの低圧水銀灯(岩崎電気製, QCGL 4W-2)を用いた。

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容積の2倍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下図に示した。流量は250~1,000 ml \cdot min $^{-1}$ とし、流量を変化させて行った。

紫外線照射装置通過前後の試料中Q \square 濃度を重層寒天培地法にて測定した。

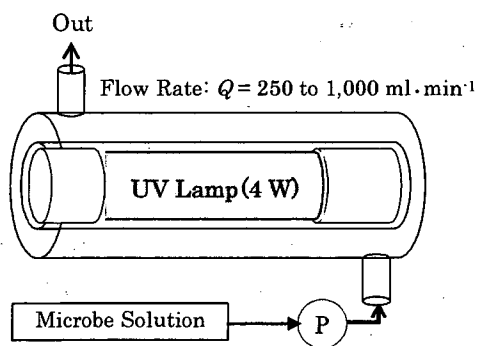


図 2.2.1 Setup of Flow UV Irradiation Experiment

C. 研究結果および考察

1) 代替消毒法の病原細菌への損傷レベルの推定

1-1) オゾンによる大腸菌不活化実験結果

図 3.1.1 に溶存オゾンによる不活化実験結果を示す。図 3.1.2.には各反応を一次反応と仮定して求めた速度定数を示した。これらの図より、pH7以下とpH8において異なる傾向を示すことがわかった。オゾンは高pH領域では、水溶液中の水酸化物イオンと反応し分解が促進され、オゾン濃度は減少するが、活性ラジカル種が生成され、それによる反応機構が働くと考えられる。pH7以下においては、オゾンは分解が余り進まず、オゾン分子による反応が主であると考えられる。

pH7以下においては、3種の培地を比較してみると、DESO培地による速度定数が最も大きく、C-ECおよびTSAは非常に小さいことがわかる。またいずれの場合においてもDAPI/PI染色による顕微鏡観察による生残率変化データは、DESOの測定結果に近い値となっていた。DAPI/PI法は前述の通り細胞膜活性の有無に関わっていると考えられ、これによって不活化と判断された細胞は、細胞膜に損傷があることが考えられる。一方表1に示すとおりDESO培地による測定では、デソキシコール酸が細胞膜を通過してしまうと、増殖が抑制されてコロニー形成に至らず不活化と判断されることになる。以上のことから、DAPI/PIとDESO培地の測定法の傾向が類似しているのは、細胞膜損傷の有無を検出しているためであると考えられる。C-EC法は乳糖分解酵素の生成が抑制されているかを判断する方法である。これは酵素合成の損傷もしくは遺伝子損傷を示すと考えられる。またTSA法は増殖能力の有無を示すと考えられる。従って、pH7以下ではオゾン分子によって、細胞膜損傷が起こりやすいが、酵素合成能力や遺伝子損傷に至らず、増殖能力を抑制するまでには至りづらいと考えられる。速度定数を比較した結果、本溶解濃度(0.11 mg/L)では、オゾンの増殖能力抑制力は、膜損傷能力の10分の1以下であると考えられる。一方pH8になると培地による差違が小さくなり、オゾン分解によって生成する活性種が主体となる反応では、細胞損傷能力と酵素合成抑制能力はほぼ同じとなり、増殖能抑制力はその3分の1程度となると考えられる。

また、以上の結果からオゾン溶解水による大腸菌の濃度変化を DESO 培地によって測定した場合には、pH7 以下であれば、細胞膜損傷の有無を判断していることになるので、大腸菌の代謝能力即ち増殖能力の有無を判断していることにはならないことに留意しなければならないと言える。

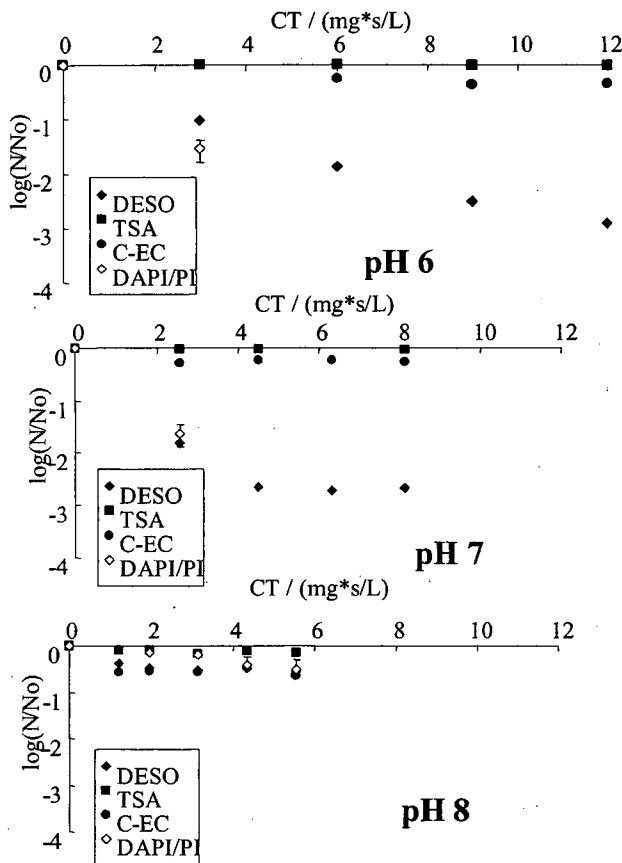


図 3.1.1. 各 pH のオゾン溶解水による大腸菌の不活化 (測定法 4 種)

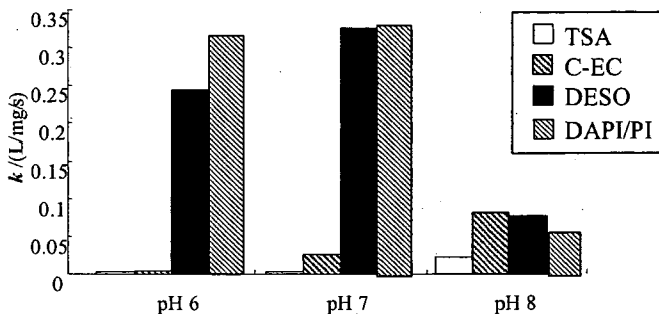


図 3.1.2. 各 pH のオゾン溶解水による大腸菌の不活化速度定数

図 3.1.3. にオゾン曝気による大腸菌の不活化実

験結果を示す. 図 3.1.4. には各反応を一次反応と仮定して求めた速度定数を示した. これらの図より、オゾン溶解水の場合と異なり、pH5~pH9 においてはいずれも同様な傾向を示すことがわかった. オゾン曝気においては、気液界面における気相中オゾンによる不活化が主に働いていて液相中での反応の割合が低く、pH の影響が小さくなったのではないかと考えられる。

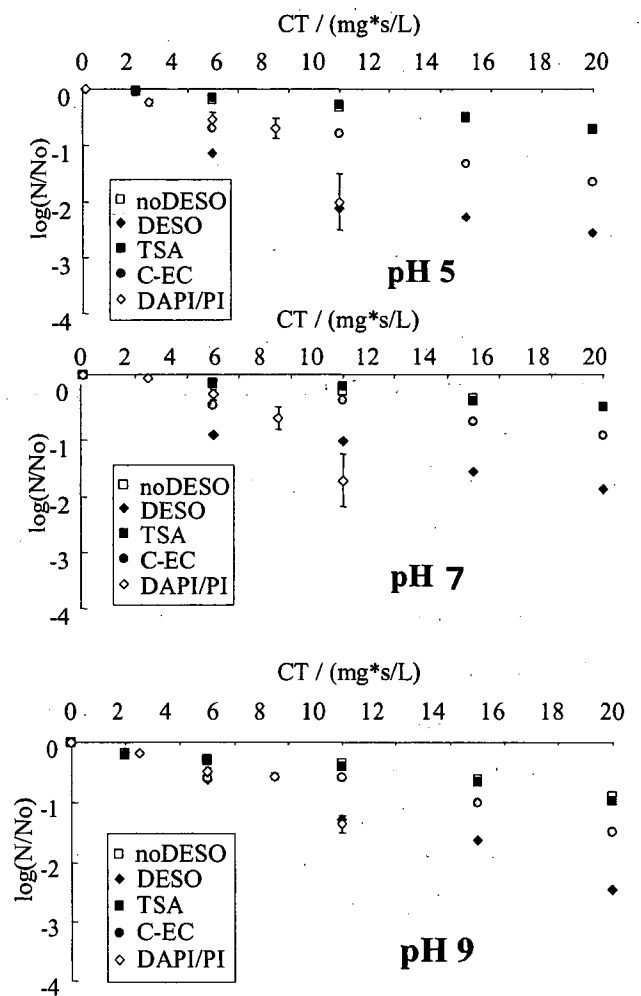


図 3.1.3. 各 pH におけるオゾン曝気による大腸菌の不活化 (測定法 5 種)

3 種の培地を比較してみると、オゾン溶解水の pH7 以下と同様に DESO 培地による速度定数が最も大きく、C-EC, TSA の順に小さいことがわかる. C-EC および TSA の速度定数は DESO 培地の場合と比較して、オゾン溶解水の場合ほど小さくはなかった. またいずれの場合においても DAPI/PI 染色による顕微鏡観察による生残率変化データは、DESO の測定結果に近い値となっていた。

以上のことから、オゾン曝気による大腸菌の不活化においては、pH の影響は大きくなく、オゾン分子が主な反応主体であると考えられる。そのため細胞膜の損傷が最も速く起こり、酵素合成の抑制がその次に起こりやすく、増殖能力の抑制が最も起こりにくいと考えられた。また溶解水の場合よりも高濃度のオゾンに接触するため、酵素合成の抑制力および増殖能の抑制力に関しては細胞膜損傷能力のそれぞれ半分程度および3分の1程度となったことがわかった。

従って、オゾン曝気による大腸菌の濃度変化を DESO 培地によって測定した場合には、いずれの pH においても、細胞膜損傷の有無を判断していることになり、大腸菌の代謝能力即ち増殖能力の有無を判断していることにはならないが、増殖能の抑制はほぼ3分の1程の速度で達成されていると考えればよいと言える。

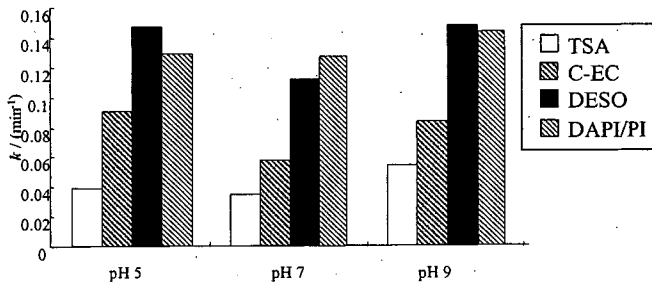


図 3.1.4. 各 pH のオゾン曝気による大腸菌の不活化速度定数

1-2) 二酸化塩素による大腸菌不活化実験

図 3.1.5 に二酸化塩素による大腸菌の不活化実験結果として、二酸化塩素濃度 0.02 mg/L における生残率変化を 3 種の培地にて測定した結果を示す。また図 3.1.6 には、反応時間を 1 時間に統一して、二酸化塩素の投入濃度を 0.02~0.5 mg/L とした時の生残率変化を 3 種の培地にて測定した結果を示す。

図に示されるように、3 種の培地の測定とも一次反応と見なすことができる。各々の速度定数値は、TSA : 0.07 L/mg/min., C-EC : 0.70 L/mg/min., DESO : 0.20 L/mg/min. となった。オゾンの不活化と異なり、C-EC 測定による速度が最も大きくなっており、DESO 測定のほぼ倍以上の速度となっ

ている。表 1 の測定原理と照らし合わせてみると、細胞膜損傷を及ぼすよりも、酵素合成の抑制力が起こりやすいと考えられる。これは二酸化塩素が細胞膜と反応せずに通過し、細胞内の酵素合成に関わる箇所との反応が起こっていることを示している。二酸化塩素濃度 0.02 mg/L の場合で考えると、酵素合成を抑制する能力は高いものの、細胞損傷能力は、酵素合成抑制力の約 3 分の 1 程度であり、増殖抑制能力は、酵素合成抑制力の約 10 分の 1 程度であることが推察される。つまり二酸化塩素は細胞内物質に作用し、酵素合成を抑制しているからといって増殖能力を抑制するまでには至らないような消毒力を持っていると言える。

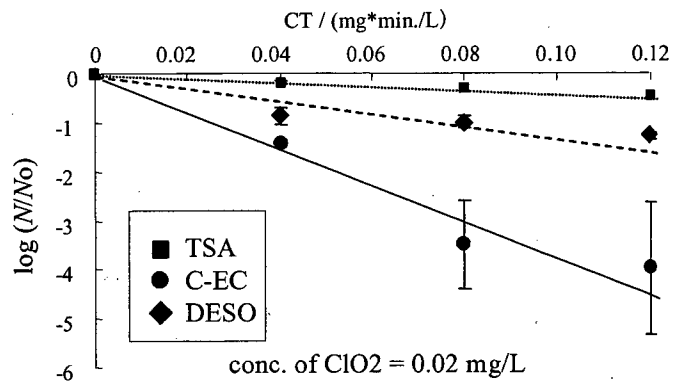


図 3.1.5. 二酸化塩素による大腸菌の生残率変化 (測定法 3 種, ClO₂ 濃度 0.02mg/L)

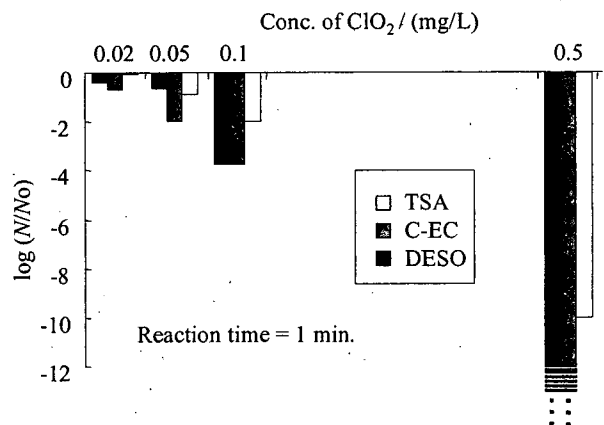


図 3.1.6. 異なる二酸化塩素濃度による大腸菌の不活化 (測定法 3 種, 反応時間 1 分)

図 3.1.6 は、二酸化塩素の投入濃度を変えた場合について示したものであるが、この結果より

0.05 mg/L 以下においては、酵素合成能力の抑制が最も起こりやすいが、0.1 mg/L 以上となると、細胞膜損傷の起こりやすさが増していることがわかるこの様な場合では、オゾン曝気と同程度の DESO 測定による誤陰性の危険性があると考えられる。

2-1) 流水式紫外線装置の線量分布推定

生残率は正規性を示すため、生物線量計を行なえんと考えられる。外れ値を除外したデータを元にしたデータ値の分布は表 3.2.1. に示した。

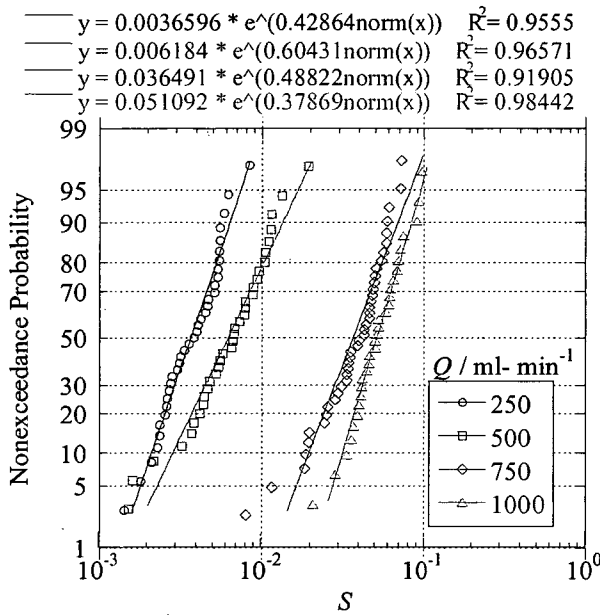


図 3.2.1. 生残率の対数正規分布確率紙 $V_0 = 450$ ml

生残率の変動を対数正規確率図として図 3.2.1. に示した。縦軸に生残率の非超過確率[%]を表し、横軸に生残率を対数で表した。生残率が直線で近似できるため、この変動は対数正規分布に従うことがわかった。

先に述べたとおり、これは母集団である被照射水塊からの無作為抽出サンプルの平均値の分布とみなすことができる。中心極限定理より、母集団: N の標準偏差を σ_A とし、一つ一つの抽出サンプルの数: n のとき、サンプルの平均値の標準偏差: σ_a とすれば

$$\sigma_a = \sqrt{\frac{N-n}{N-1}} \cdot \frac{\sigma_A}{\sqrt{n}} \quad 3.1$$

$$\delta = \sqrt{\frac{N-n}{N-1}} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \quad 3.2$$

となる。ここで、 N, n は今回の実験では水塊を仮定しているため、母集団の水塊量: N_{aqua} と、サンプル量: n_j であると考えられるため、 N_{aqua} は n_j と比較して充分大きい。

従って、

$$\sigma_A = \frac{\sigma_a}{\sqrt{n_j}} \quad 3.3$$

と近似できる。4 つの流量条件の下では、抽出サンプルサイズはほとんど変わらないため式右辺において、分母に相当する量は等しいと仮定できると考えられる。表 3.2.1. において、標準偏差を考えると、0.17 0.25 となっており、約 1.5 倍の幅におさまっている。従って、この母集団水塊における分布の標準偏差も、ほぼその幅内におさまっていると考えられる。すなわち、本研究で用いた流水式 UV 照射装置においては、流量が 250 1,000 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ と変化させても装置内線量分布の標準偏差は大きく異ならなかったと判断できる。

D. 結論

1) オゾン、二酸化塩素処理における大腸菌への損傷作用機構を推定する方法を提案した。デソキシコロール酸塩培地による測定方法は、DAPI/PI 染色による顕微鏡観察によって検証した結果、細胞膜損傷を受けた大腸菌の測定には適しているものの、オゾン溶解水 (pH7 以下) 及び二酸化塩素においては、処理によって増殖能力を失活した大腸菌の測定には適していないことがわかった。これは、オゾン分子および二酸化塩素では、細胞膜損傷が起こっていても増殖能は失活していない大腸菌が存在するためであった。また細胞膜の損傷力と増殖能の抑制力を速度定数で比較したところ、pH7 以下のオゾン溶解水では、10 倍以上、二酸化塩素では、3 倍以上の差があった。

コンパクトドライ EC による測定方法は、その原理から大腸菌が乳糖分解酵素である β グルコニダーゼの合成能力を持っているかどうかの判定となる。実験結果から、pH7 以下のオゾン溶解

表3 各消毒法による大腸菌への推定損傷メカニズム

消毒プロセス	反応主体	推定される主な損傷の 対象	留意点	
塩素 (高濃度)	次亜塩素酸イオン	代謝能の失活		
(低濃度)		細胞壁の変性	DESOによる誤陰性	
UV	254nm 光	核酸の変性	DESOによる誤陰性	
オゾン水	(酸性～中性)	オゾン	細胞壁の変性	DESOによる誤陰性
	(アルカリ性)	オゾン,ラジカル	代謝能失活	
オゾン曝気(酸性～アルカリ性)	気相中オゾン	細胞壁の変性	DESOによる誤陰性	
二酸化塩素	二酸化塩素		C-ECによる誤陰性	
		酵素生成能失活	DESOによる誤陰性 (0.1mg/L以上)	

水およびオゾン曝気の場合は、細胞膜の損傷力には劣るものの、増殖能力の抑制力よりは低いことがわかった。二酸化塩素の場合は、低濃度であれば細胞膜損傷よりも酵素合成機能の損傷の方が起こりやすく、高濃度では、同等の能力を持つことがわかった。

いずれの測定方法にしても pH8 以上のオゾン溶解水を除けば、ほぼほとんどの場合において増殖能力の抑制を表しているものではないことが明確となったので、この点に留意する必要があると考えられる。本研究によって各消毒方法における大腸菌への作用機構が推定されたが、それをまとめたものを表3として示す。

これまで多くの研究論文において大腸菌を用いて、二酸化塩素及びオゾンの消毒機構に関する研究が報告されている。表5および表6にいくつかの事例を元に 99.9%不活化に必要な CT 値およびその値を求めるにおいて用いられている大腸菌の測定方法をまとめた。これによると多くの場合が Standard Method に準拠して、m-Endo 培地を用いている。この培地はデスオキシコレート酸ナトリウムを含む選択培地であり、本研究における DESO 培地と同様の測定方法であると考えられる。従って、多くの値が、大腸菌測定の誤陰性に基くものであり、大腸菌が増殖能を失活していることを保証するものではないと考えられる。つまり増殖能の失活を持って、殺菌とするならば、99.9%

の殺菌効果に必要な CT 値は、報告値よりも高い値となっているはずであり、本研究の結果を参照すれば、オゾンにおいて 10 倍、二酸化塩素において 3 倍程度の高い値と見積もられると考えられる。

2) 実験で得られた多数の生残率データを解析した結果、被照射水塊全体に照射された UV 量の分布を中心極限定理を用いて推測し、今回設定した流量 250～1,000 ml・min⁻¹ の範囲では、推測される UV 線量の変動幅はほぼ変らないことが分かった。即ち、線量分布が大きく異なるものではないことが推測された。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 廣戸裕子, 大瀧雅寛, 2006, 「流水式紫外線照射装置における一般細菌を用いた生物線量計の実用性」, 用水と廃水, Vol.48, No.11, pp.989-993.

2. 学会発表

- 1) 大瀧雅寛, 廣戸裕子(2007)「紫外線量の化学光量計による計測」第10回日本水環境学会

シンポジウム

- 2) 王雪丹, 大瀧雅寛 (2007) 「オゾン処理における大腸菌損傷レベルの評価方法」 第17回日本オゾン協会年次研究講演会講演集, pp.95-97

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし.

アニュラーリアクターを用いた配水管路内における
微生物再増殖制御に関する検討

主任研究者	国包	章一
分担研究者	島崎	大
研究協力者	岩田	和隆

アニュラーリアクターを用いた配水管路内における微生物再増殖制御に関する研究

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	岩田 和隆

研究要旨

配水過程における微生物再増殖性（生物膜形成性）に関わる浄水水質側および管路側の要件には消毒剤の種類、残留消毒剤濃度、栄養源となる有機物質および無機物質濃度、温度、濁度、流速、配水管の材質、管壁面の粗度などが挙げられる。ここでは消毒剤の種類と配水管の材質に着目し、生物膜モニタリング装置であるアニュラーリアクターを用いて、各々が配水過程における微生物再増殖性に及ぼす影響について調べた。定常状態に達した生物膜に対して、異なる消毒剤（二酸化塩素および次亜塩素酸ナトリウム）およびキレート剤である EDTA を 2 日間添加し、それらの生物膜除去効果と生物膜中の細菌種について検討した。その結果、管内面に付着する細菌数および流出水中の細菌数は二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウムの添加により大きく減少したが、EDTA の添加による生物膜剥離効果は確認できなかった。生物膜中の細菌群は、消毒剤の有無およびその種類による影響を受け、球菌と桿菌の割合や同定された細菌種に相違が見られた。配水管の材質については、鋳鉄、SUS304、コンクリート被覆ポリカーボネイトの 3 種類を設定し、残留塩素なしで通水したところ、流出水中の細菌数はいずれの材質も同程度であったが、管内面に付着する細菌数は材質が鋳鉄の場合に多く、定常期の細菌数は他の材質よりも 1 桁前後高かった。また、生物膜中の細菌群は材質や次亜塩素酸ナトリウムの添加による影響を受け、グラム陽性菌とグラム陰性菌の割合や同定された細菌種に相違が見られた。

A. 研究目的

残留塩素に依存しない水道の給配水システムでは、微生物の栄養源となる有機物や無機物の濃度が高い等、浄水中の微生物学的安定性が確保されていない場合において、微生物再増殖性が大いに増大することが想定される。ここでは、生物膜モニタリング装置であるアニュラーリアクターを用いて、残留塩素が存在しない状況下での微生物再増殖ポテンシャル、また消毒剤等の種類（EDTA、二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウム）および配水管の材質（鋳鉄、SUS304、コンクリート被覆ポリカーボネイト）が及ぼす影響につき明らかにすることを目的とする。なお、キレート剤である EDTA の添加理由は、 Ca^{2+} イオンが生物膜を構成する細胞外ポリマー物質間の架橋機能を有すると考えられているため、キレート剤による Ca^{2+} イオンの吸着阻害により生物膜剥離効果が生じるのではないかと想定したためである。

B. 研究方法

1. 異なる消毒剤とキレート剤による形成済み生物膜の除去効果

原水として国立保健医療科学院水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムを添加することにより、全系統の試料水の遊離残留塩素濃度を 0.0mg/L 程度となるように調整し、29 日間連続的にアニューラーリアクターへ通水した。ただし、通水開始後 27 日目は、各系統の試料水中の残留濃度が 0.5mg/L 程度となるように EDTA、二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウムを添加したものを 24 時間通水し（順に系統 1~3 とする。）、形成された生物膜の剥離状況を調べた。流入量を 10mL/分に設定し、滞留時間を約 100 分（容積約 1L）とした。試験片の材料はポリカーボネイトとした。回転ドラムを 180rpm の速度で回転させ、流速 50cm/秒、内径 200mm に相当する配水管内の状況を再現した。各試料水の水温は 23℃前後に維持した。試験片表面に付着した生物膜は、滅菌済みのスクレーパーで剥ぎ取った後、2 分間超音波にかけ試験片 1 枚あたり 10mL の希釈水（リン酸塩緩衝希釈水）で攪拌したものを試料とした。流入水・流出水および試験片表面に付着した微生物を週 1 回の間隔でサンプリングし、各系統の流入水・流出水および試験片表面における一般細菌数と従属栄養細菌数を測定するとともに、生物膜中の細菌種の簡易同定を行った。一般細菌数の測定は上水試験方法に準じ、従属栄養細菌数は R2A 培地（Difco 社製）を用いて 20℃で 7 日間培養した。菌種を同定するにあたり、試験片表面試料から 1 白金耳を採取し、普通寒天培地に 37℃で 24 時間培養後、独立したコロニーを釣菌し再び普通寒天培地に 37℃で 18~20 時間培養し増菌させた後、増菌させた分離株各々についてバーミー法によるグラム染色を行った。そこでグラム陰性桿菌と判定できた分離株について、グラム陰性桿菌の同定が可能な API20E および API20NE（日本ビオメリユー（株））を用いて菌種の簡易同定を行った。

2. 異なる管材質における微生物再増殖性の相違

試験片の材質を鋳鉄、SUS304、コンクリート被覆ポリカーボネイトの 3 種類とし、順に系統 1~3 とした。原水として国立保健医療科学院水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムを添加することにより全ての系統の試料水の遊離残留塩素濃度が 0.0mg/L 程度となるように調整し、36 日間連続的にアニューラーリアクターへ通水した。ただし、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べるため、通水開始後 28 日目は、全系統において一時的に遊離残留塩素濃度 0.7mg/L 程度となるように調整し 24 時間通水した。滞留時間、ドラムの回転速度、水温は「1. 異なる消毒剤とキレート剤による形成済み生物膜の除去効果」と同様とし、サンプリングは週 2 回行った。また、菌種の同定にあたり、試験片表面試料から 1 白金耳を採取後、分離株を得るまでに約 1 週間要した。

C. 結果および考察

1. 異なる消毒剤とキレート剤による形成済み生物膜の除去効果

表-1に流入水の水質を示す。水温以外の水質項目については、使用した水道水の水質によるが、特に微生物再増殖性の指標となる AOC 濃度は 175 μg/L であり、国内の他の測定例と比べて高く、微生物が比較的再増殖しやすい水質であったといえる。

表-1 流入水の水質

(平均値、9/19~10/17に測定)

水温	22.3℃
pH	7.51
TOC	0.83mg/L
AOC	175 μg/L
NO ₃ -N	1.9mg/L
NO ₂ -N	0.004mg/L
PO ₄	0.13mg/L

図-1に各系統の遊離残留塩素濃度を示す。実験期間中の水道水の平均遊離残留塩素濃度は0.54mg/Lであった。消毒剤添加24時間後の残留消毒剤濃度は、二酸化塩素を添加した系統2が0.03mg/L、次亜塩素酸ナトリウムを添加した系統3が0.28mg/Lしか検出されなかったため、さらに24時間後の濃度が0.5mg/Lとなるように、添加する消毒剤の濃度および流入量を増やした結果、系統2が0.54mg/L、系統3が0.73mg/Lとなった。

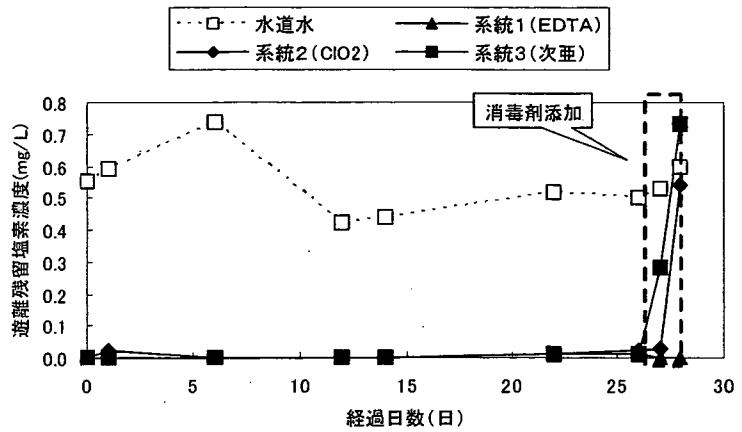


図-1 各系統の遊離残留塩素濃度

※消毒剤添加後の系統2については二酸化塩素濃度(mg/L)

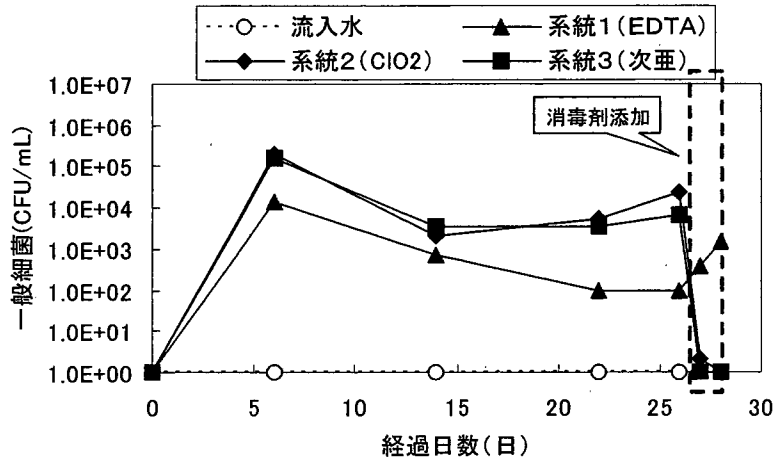


図-2 一般細菌数経日変化(流入水・流出水)

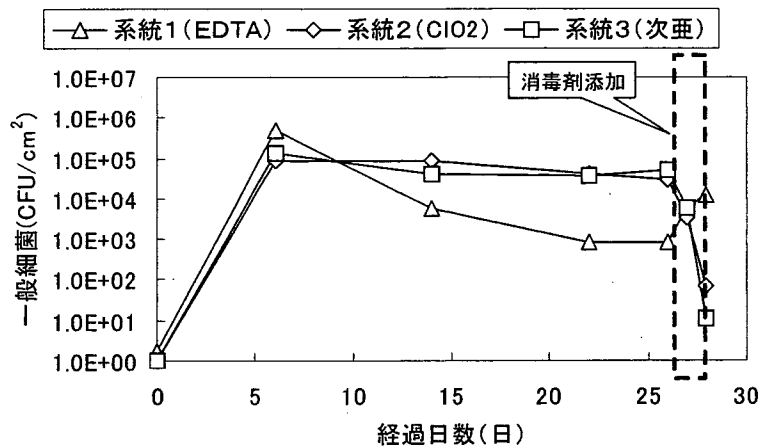


図-3 一般細菌数経日変化(試験片表面)

流入水・流出水および試験片表面の一般細菌数を図-2および図-3に示す。流入水の一般細菌数は、ほぼ0CFU/mLで推移した。流出水および試験片表面の一般細菌数は、いずれの系統においても通水開始6日後に最大となり、14日後以降は定常状態に達したものと考えられる。また、定常期における系統1の一般細菌数は系統2および3に比べ1~2桁程度低い状態で推移した。

系統1では、EDTA添加後、流出水では 1.0×10^2 CFU/mLから 1.5×10^3 CFU/mLに増加しているが、同時に試験片表面においても 7.9×10^2 CFU/cm²から 1.2×10^4 CFU/cm²に増加していることから、EDTAの生物膜剥離効果は確認できなかった。

系統2および3については、消毒剤添加により、添加前に比べ流出水、試験片表面とも一般細菌数は減少し二酸化塩素および次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が確認できた。しかし、流出水では消毒剤添加後いずれの系統もほぼ0CFU/mLとなったのに対し、試験片表面では系統2が 2.8×10^4 CFU/cm²から 6.7×10^1 CFU/cm²、系統3が 5.2×10^4 CFU/cm²から 1.0×10^1 CFU/cm²と細菌数は3log程度減少したが、0CFU/cm²までは低下しなかった。このことから、流出水中の細菌に比べ、試験片表面には消毒剤に対する耐性が強い細菌叢が形成されていると考えられる。

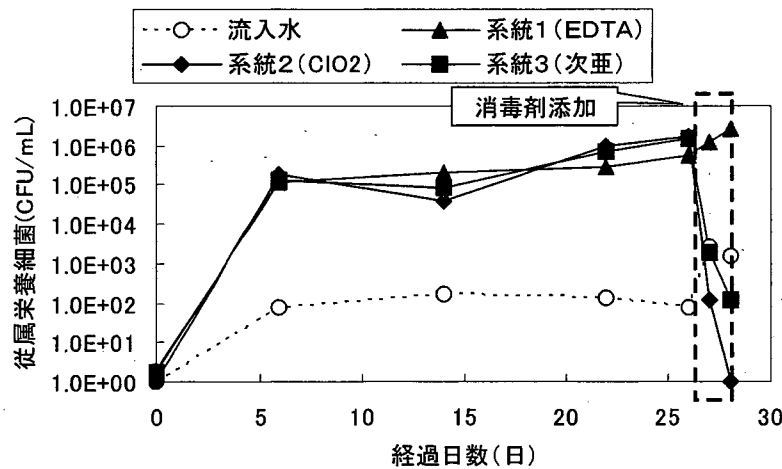


図-4 従属栄養細菌数経日変化(流入水・流出水)

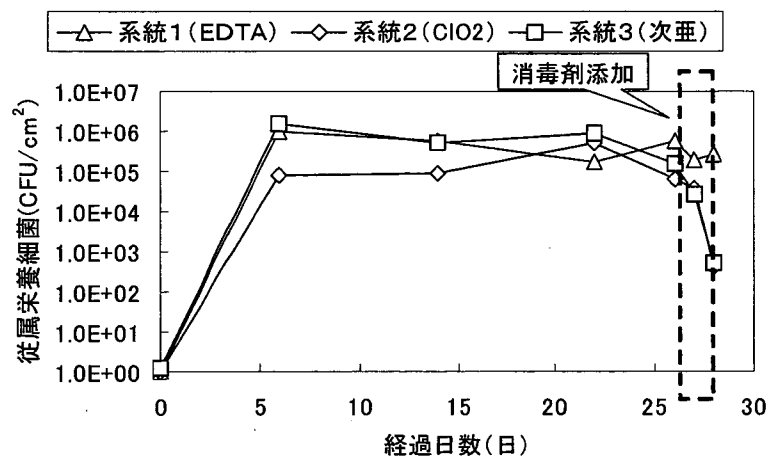


図-5 従属栄養細菌数経日変化(試験片表面)

流入水・流出水および試験片表面の従属栄養細菌数を図-4 および図-5 に示す。流入水中の従属栄養細菌数は、 $7.3 \times 10^1 \sim 2.7 \times 10^3$ CFU/mL で推移した。流出水および試験片表面の従属栄養細菌数については、一般細菌数と異なり通水開始後 26 日目まで漸増傾向を示すものが多かった。

EDTA 添加後の系統 1 では、流出水の細菌数が 5.8×10^5 CFU/mL から 2.6×10^6 CFU/mL に増加し、かつ、試験片表面の細菌数が 5.5×10^5 CFU/cm² から 2.7×10^5 CFU/cm² と 1log 弱ではあるが減少していることから、EDTA の生物膜剥離効果が生じた可能性がある。ただし、EDTA 添加前後の細菌数の変化が小さいため、定常期における増減の範囲内であるとも考えられる。また、当初想定した EDTA 添加による生物膜の剥離効果は不明瞭であったことから、カルシウムイオンの特異的キレート剤である EGTA を添加した場合についても検証する必要があると考えられる。

系統 2 および 3 では、消毒剤添加後、流出水ではそれぞれ 1.6×10^6 CFU/mL から 0 CFU/mL、 1.6×10^6 CFU/mL から 1.2×10^2 CFU/mL に減少した。試験片表面でもそれぞれ 6.2×10^4 CFU/cm² から 4.0×10^2 CFU/cm²、 1.6×10^5 CFU/cm² から 5.1×10^2 CFU/cm² に減少しており、二酸化塩素および次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が確認された。なお、流出水においては、系統 2 (0.54mg/L) の方が系統 3 (0.73mg/L) よりも残留消毒剤濃度が低いにもかかわらず、細菌数の減少が大きいことから、流出水の従属栄養細菌に対しては、次亜塩素酸ナトリウムよりも二酸化塩素の消毒効果が高いといえる。

API による同定の事前に行った系統 3 のグラム染色の結果 (図-6) では、次亜塩素酸ナトリウム添加前の桿菌は 2 割程度だったが、添加後は 9 割を占め、次亜塩素

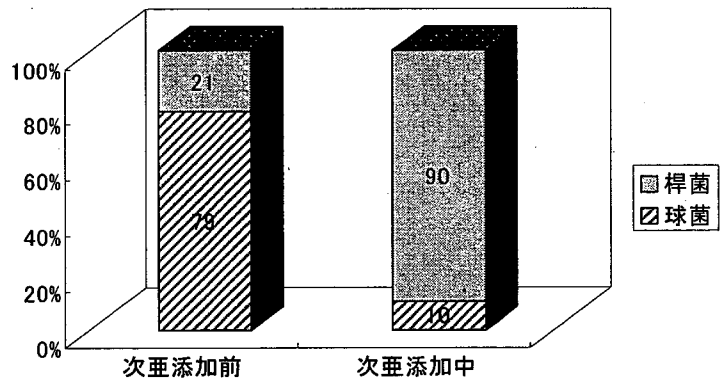


図-6 次亜塩素酸ナトリウム添加前後の細菌形状分布(系統 3)

表-2 API20E による試験片表面の菌種同定結果

系統	26日後(添加前)	27日後(添加中)
1(EDTA)	試験なし	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2(二酸化塩素)	試験なし	<i>Pseudomonas luteola</i>
3(次亜塩素酸ナトリウム)	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

表-3 API20NE による試験片表面の菌種同定結果

系統	26日後(添加前)	27日後(添加中)
1(EDTA)	試験なし	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2(二酸化塩素)	試験なし	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
3(次亜塩素酸ナトリウム)	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Delftia acidovorans</i>

酸ナトリウムの添加が試験片表面の細菌種およびその構成を変化させたと考えられる。

試験片表面上の細菌群のAPIによる菌種同定結果を表-2および表-3に示す。API20Eにより腸内細菌およびグラム陰性桿菌が、API20NEにより腸内細菌以外のグラム陰性桿菌が同定可能であるが、API20EとAPI20NEでは同定可能菌種が多少異なっているため、同一系統でも異なる菌種が同定されることがある。通水開始26日後は系統3のみしか菌種同定を行っていないが、これは全系統とも同じ条件でアニュラーリアクターを運転していたため、全系統同一菌種であると想定したからである。

API20NEの系統3を除き、消毒剤添加前後で試験片表面の菌種が変化した。また、消毒剤添加後においては、API20Eでは系統1および3と系統2の菌種とは異なっており、API20NEでは全系統とも菌種が異なっていた。これらのことから、消毒剤の有無およびその種類により、生物膜中の細菌種が変化する可能性があるといえる。

2. 異なる管材質における微生物再増殖性の相違

表-4に流入水の水質を示す。「1. 異なる消毒剤とキレート剤による形成済み生物膜の除去効果」とほぼ同様の結果となったが、AOCは240 μg/Lとかなり高く、微生物が再増殖しやすい水質であったといえる。

表-4 流入水の水質

(平均値、11/13~12/18に測定)

水温	20.9℃
pH	7.34
TOC	0.78mg/L
AOC	240 μg/L
NO ₃ -N	1.9mg/L
NO ₂ -N	0.003mg/L
PO ₄	0.13mg/L

図-7に各系統の遊離残留塩素濃度を示す。実験期間中の水道水平均遊離残留塩素濃度は、0.60mg/Lであった。系統別試料水については、次亜塩素酸ナトリウム(以下、「次亜」という。)の添加24時間後、系統1が0.04mg/L、系統2が0.78mg/L、系統3が0.76mg/Lであった。系統1について

では、試験片から多量の鉄が溶出する

(表-5)とともに、試験片表面が激しく酸化されていることから、鉄の酸化に消費されてしまい、遊離残留塩素として検出されず、消毒効果が損なわ

表-5 流出水の鉄濃度(単位: μg/L)

	系統1 (铸铁)	系統2 (SUS304)	系統3 (コンクリート)
27日後(次亜なし)	382.4	30.7	34.2
28日後(次亜あり)	1053.0	7.9	5.4

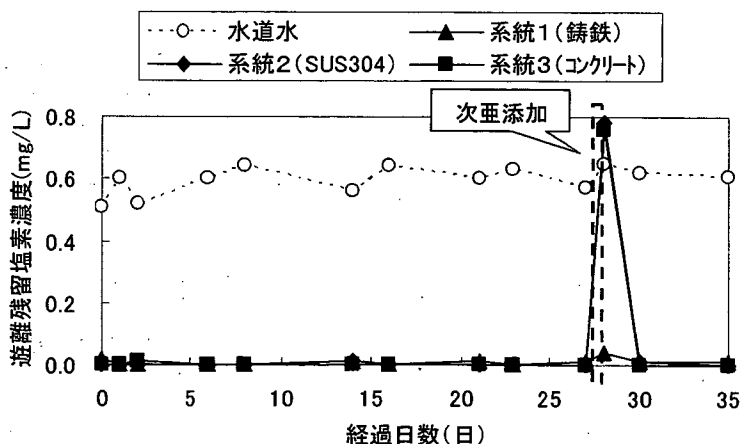


図-7 各系統の遊離残留塩素濃度

れていた可能性が高い。

流入水・流出水および試験片表面の一般細菌数を図-8および図-9に示す。流入水の一般細菌数は $0 \sim 1.1 \times 10^1 \text{CFU/mL}$ で推移した。流出水および試験片表面の一般細菌数は、通水開始15日後前後で定常状態に達したものと考えられる。定常期における一般細菌数は、流出水では材質の違いによる差は小さかった。また、試験片表面では、系統1が $2.3 \times 10^4 \sim 4.8 \times 10^4 \text{CFU/cm}^2$ で推移したのに対し、系統2および3ではそれぞれ $9.8 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3 \text{CFU/cm}^2$ 、 $7.3 \times 10^2 \sim 3.3 \times 10^3 \text{CFU/cm}^2$ であり、系統1よりも1桁程度低かった。

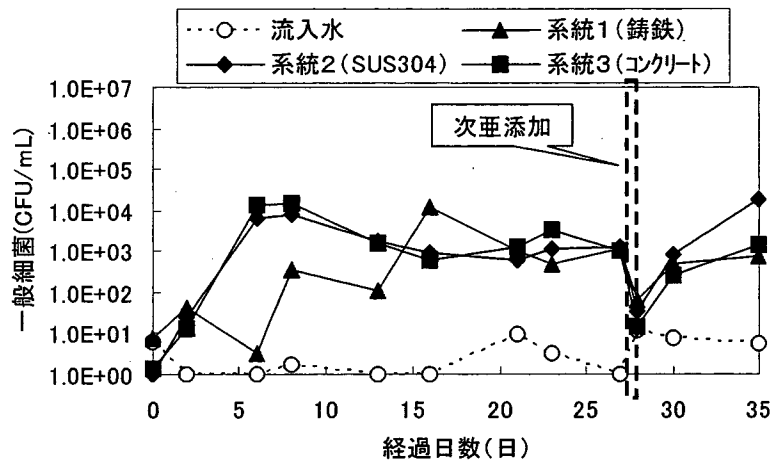


図-8 一般細菌数経日変化(流入水・流出水)

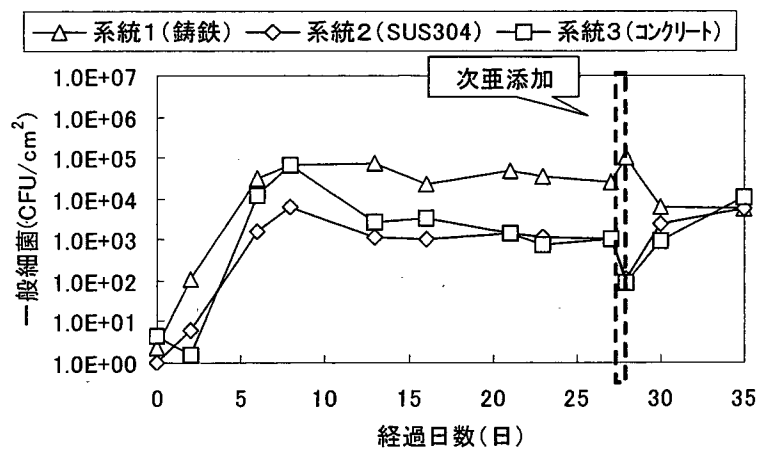


図-9 一般細菌数経日変化(試験片表面)

次亜の添加により、流出水では系統1が $1.2 \times 10^3 \text{CFU/mL}$ から $6.6 \times 10^1 \text{CFU/mL}$ 、系統2が $1.3 \times 10^3 \text{CFU/mL}$ から $3.4 \times 10^1 \text{CFU/mL}$ 、系統3が $9.9 \times 10^2 \text{CFU/mL}$ から $1.4 \times 10^1 \text{CFU/mL}$ と、いずれの系統も細菌数は2log程度減少した。また、試験片表面でも系統2が $9.9 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$ から $1.1 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$ に、系統3が $9.8 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$ から $8.8 \times 10^1 \text{CFU/cm}^2$ と1log程度減少したが、系統1では $2.5 \times 10^4 \text{CFU/cm}^2$ から $9.6 \times 10^4 \text{CFU/cm}^2$ へと微増した。このことから、

流出水に比べ試験片表面への消毒効果は低いといえる。また、次亜の添加終了後は、流出水、試験片表面とも2日後には定常期の細菌数まで回復した。

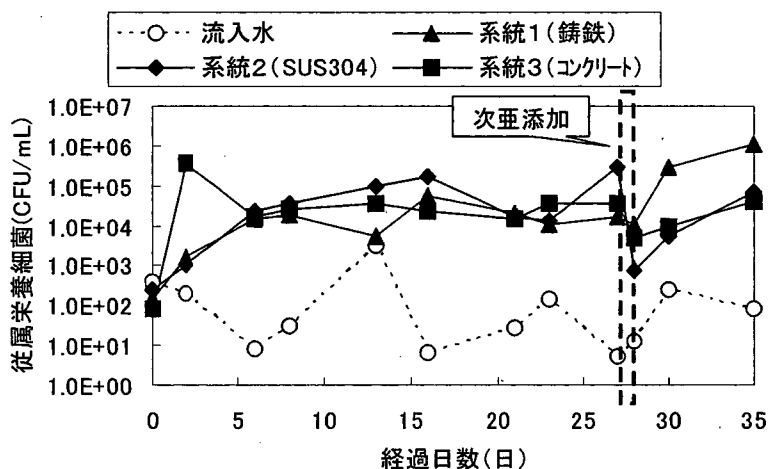


図-10 従属栄養細菌数経日変化(流入水・流出水)

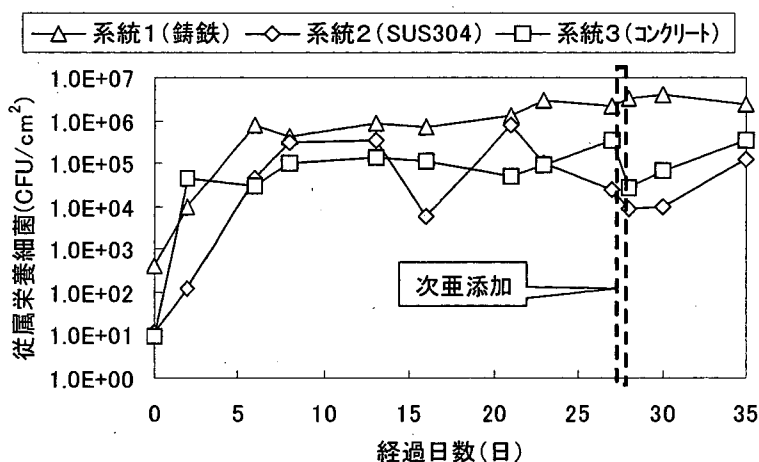


図-11 従属栄養細菌数経日変化(試験片表面)

流入水・流出水および試験片表面の従属栄養細菌数を図-10 および図-11 に示す。流入水の従属栄養細菌数は、 $5.0 \times 10^0 \sim 3.1 \times 10^3 \text{CFU/mL}$ で推移した。流出水および試験片表面の従属栄養細菌数は、一般細菌数同様、通水開始 15 日後前後で定常状態に達したものと考えられる。定常期における従属栄養細菌数も、一般細菌数同様、流出水では材質の違いによる差は小さかった。また、試験片表面では系統 1 が $4.4 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^6 \text{CFU/cm}^2$ で推移したのに対し、系統 2 および 3 はそれぞれ $6.0 \times 10^3 \sim 8.1 \times 10^5 \text{CFU/cm}^2$ 、 $2.9 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^5 \text{CFU/cm}^2$ であり、系統 1 に比べやや低かった。

次亜を添加すると、流出水では系統 1 が $1.7 \times 10^4 \text{CFU/mL}$ から $1.0 \times 10^4 \text{CFU/mL}$ 、系統 2 が $3.0 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ から $7.4 \times 10^2 \text{CFU/mL}$ 、系統 3 が $3.5 \times 10^4 \text{CFU/mL}$ から $4.7 \times 10^3 \text{CFU/mL}$

と全系統とも添加前に比べ減少した。一方、試験片表面では系統1が 2.1×10^6 CFU/cm²から 3.3×10^6 CFU/cm²となり微増、系統2および3ではそれぞれ 2.6×10^4 CFU/cm²から 8.8×10^3 CFU/cm²、 3.5×10^5 CFU/cm²から 2.8×10^4 CFU/cm²と1log程度の減少となり、試験片表面の一般細菌と同様の結果を示した。

次亜の添加終了後は、系統1の流出水の細菌数が定常期よりも2桁程度高くなっているほかは、流出水、試験片表面ともに7日後には定常期の細菌数まで回復したが、一般細菌が2日後には回復したのに比べると、回復速度は従属栄養細菌の方が緩やかであった。このことから、一般細菌の方が従属栄養細菌よりも塩素濃度の変動に対する応答が鋭敏であるといえる。

系統1においては、次亜を添加したにもかかわらず、試験片表面の一般細菌数と従属栄養細菌数がわずかではあるが増加する結果となった。これは、次亜が鉄の酸化に消費され、試験片表面の細菌叢に対して消毒剤として作用しなかったためであると考えられる。

次亜添加前後の系統別グラム染色の結果を図-12に示す。系統1では、次亜の添加にかかわらずグラム陰性菌の占める割合が高かった。系統2および3については、次亜の添加がない27、30日後はグラム陰性菌の占める割合が高いが、次亜を添加するとグラム陰性菌の割合は激減した。グラム染色の結果だけ見ても、次亜の添加により生物膜中の細菌種およびその構成が変化する可能性が高いと示唆される。

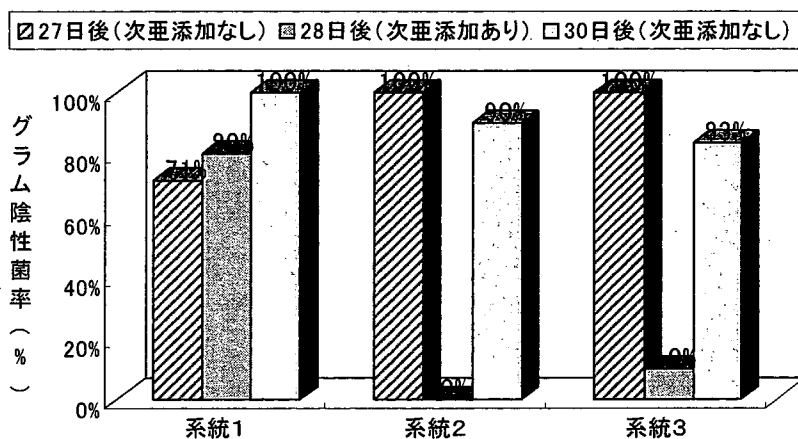


図-12 次亜添加前後の系統別グラム染色結果

試験片表面上の細菌群のAPIによる菌種同定結果を表-6および表-7に示す。API20Eにおいては、系統1および3で検査項目に全て陰性反応を示し、菌種の同定が不可能であることが多かった。また、次亜添加中の系統2については、グラム陰性桿菌が検出されず、API20EおよびAPI20NEによる同定が不可能であった。

系統1については、API20NEで、次亜の添加をはさんで*Pasteurella* sppと同定されているが、その同定確率は低く信頼性に欠ける。しかしながら、次亜添加の有無にかかわらず同一菌種が同定されたということは、遊離残留塩素濃度が非常に低くだったので、細菌種が変化しなかったと考えられる。系統2については、次亜添加中を除き*Stenotrophomonas maltophilia*である可能性が非常に高く、次亜添加時はグラム陽性菌しか検出されなかったことから、次亜添加により細

表-6 API20E による試験片表面の菌種同定結果

系統	21日後(次亜なし)	23日後(次亜なし)	27日後(次亜なし)	28日後(次亜あり)	30日後(次亜なし)
1(鑄鉄)	同定不能	<i>Pseudomonas oryzae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas oryzae</i>	同定不能	同定不能
2(SUS304)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	グラム陽性菌のため同定不能	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3(コンクリート)	同定不能	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas oryzae</i>	同定不能	同定不能

表-7 API20NE による試験片表面の菌種同定結果

系統	21日後(次亜なし)	23日後(次亜なし)	27日後(次亜なし)	28日後(次亜あり)	30日後(次亜なし)
1(鑄鉄)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Pasteurella</i> spp	<i>Pasteurella</i> spp	<i>Pasteurella</i> spp
2(SUS304)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Pasteurella</i> spp	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	グラム陽性菌のため同定不能	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3(コンクリート)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

菌種が変化する可能性が高いと考えられる。系統3については、次亜なしの場合、*Pseudomonas oryzae*、または、*Sphingomonas paucimobilis* の同定確率が高く非典型反応もないことから、これらの細菌種のどちらかである可能性が高い。次亜添加時は、API20NE で *Brevundimonas vesicularis* が同定されており、系統2同様、次亜添加により細菌種が変化する可能性が高いと考えられる。

以上のことから、試験片表面上の細菌群は、次亜の有無や材質の違いにより同定される細菌種が異なる可能性が高いと考えられる。

D. 結論

1. 異なる消毒剤とキレート剤による形成済み生物膜の除去効果

定常状態に達した生物膜に対し、一時的に消毒剤として二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウムを添加すると、流出水中および試験片表面における一般細菌数および従属栄養細菌数は大きく減少した。一方、EDTA の添加による生物膜剥離効果は確認できなかったことから、Ca²⁺イオンの特異的キレート剤である EGTA を添加した場合についても検証する必要がある。

試験片表面上の細菌群は、消毒剤の有無およびその種類による影響を受け、球菌と桿菌の割合や、同定された細菌種についても相違が見られた。

2. 異なる管材質における微生物再増殖性の相違

試験片表面上の一般細菌数および従属栄養細菌数は、材質が鑄鉄の場合が多く、定常期の細菌数は SUS304 およびコンクリート被覆ポリカーボネイトに比べ1桁前後高かった。一方、流出水中の細菌数は、いずれの材質も同程度であった。また、一時的な遊離残留塩素濃度の変動に対しては、一般細菌の方が従属栄養細菌よりも応答が鋭敏であった。

試験片表面上の細菌群は、材質や次亜塩素酸ナトリウムの添加による影響を受け、グラム陰性菌とグラム陽性菌の割合や、同定された細菌種についても相違が見られた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(該当なし)

2. 学会発表

- 1) Dai Simazaki , Masako Takai and Shoichi Kunikane (2007) Effect of residual chlorine concentration and roughness of pipe wall surface on bacterial regrowth potential in the course of drinking water distribution, Proceedings of IWA 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (Sep. 9- 15, 2007, Tokyo, Japan).
- 2) 岩田和隆, 島崎大, 国包章一(2008) 配水過程における微生物再増殖に対する管材質および残留塩素の影響, 第 59 回全国水道研究発表会 (発表予定).

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