

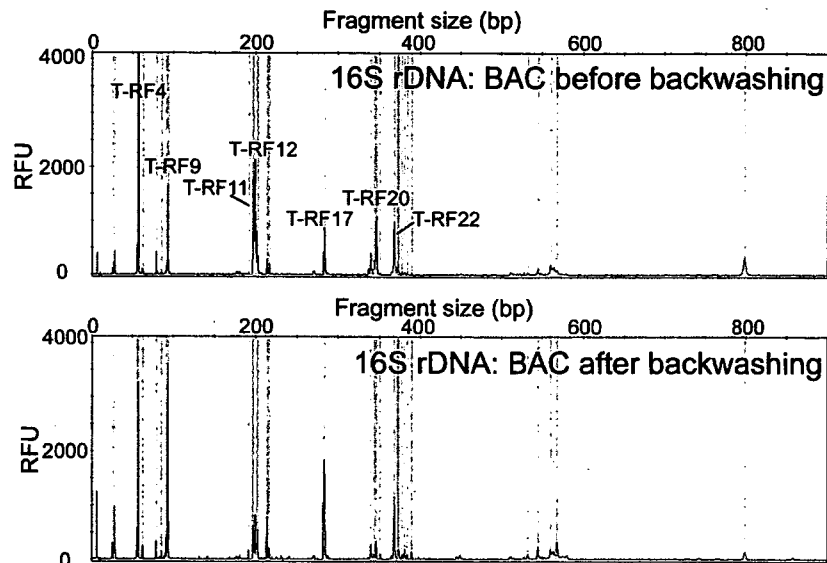


Figure 1 Electropherograms showing the bacterial 16S rDNA T-RFLP profiles of the BAC samples before and after backwashing

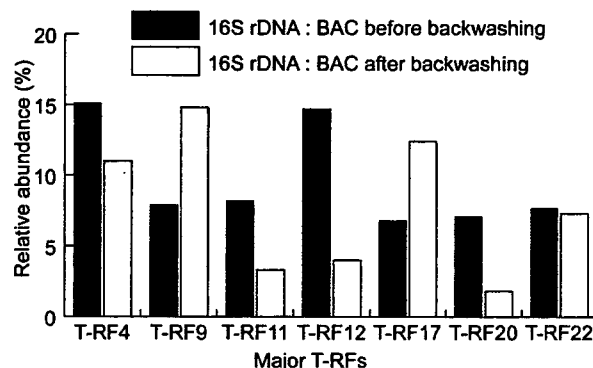


Figure 2 Differences in the relative abundances of the major 16S rDNA T-RFs before and after backwashing

fluid shear stress causes such changes, though these changes might be due in some part to replacement of activated carbon in the top layer with the activated carbon from other layers by mixing. Some microorganisms may be easily washed out, while others may remain, resulting in the reduction of bacterial abundance and changes in relative dominances of microorganisms in the biofilm. It is possible that the T-RFs whose relative abundances decreased after backwashing are derived from the microorganisms that are easily stripped off from BAC by backwashing.

T-RFLP analysis of 18S rDNA fragments

Figure 3 shows the electropherograms of the eukaryotic 18S rDNA T-RFLP profiles before and after backwashing. As well as the bacterial T-RFLP profiles, the eukaryotic profiles were mainly composed of the same T-RFs of the identical sizes; however, some of the T-RFs had different peak areas before and after backwashing. Clone analysis showed that T-RF6 was derived from the protozoan *Cryothecomonas*-related clone. T-RF14 and T-RF24 were associated with the protozoan *Cercomonas*-related clones. *Cryothecomonas* and *Cercomonas* belong to the phylum *Cercozoa*, which includes many types of organisms that exhibit various ecological and morphological features (Keeling, 2001). T-RF25 was found to be derived from clones related to the phylogenetically different protozoans *Echinamoeba* and *Lecythium*. The protozoan *Gymnophrys*-related clone corresponded to T-RF26. It has been shown that both *Lecythium* and *Gymnophrys* also belong to the *Cercozoa* group (Nikolaev *et al.*,

2003). On the other hand, the metazoan clones related to *Chaetonotus* (phylum *Gastrotricha*) and *Paratripyla* (phylum *Nematoda*) produced T-RFs of the same length as T-RF7. Clones corresponding to the other major T-RFs were not found.

Figure 4 shows the differences in the relative abundances of the major 18S rDNA T-RFs before and after backwashing. The relative abundances of T-RF7 (the metazoan *Chaetonotus*- and *Paratripyla*-derived fragment) and T-RF22 (unidentified) decreased from 7.6% to 0.9% and from 15.9% to 7.1%, respectively. On the other hand, the relative abundances of T-RF6 and T-RF14 derived from the protozoan *Cryothecomonas*- and *Cercomonas*-related clones increased from 15.6% to 21.0% and from 3.0% to 11.0%, respectively. No large changes were observed in the relative abundances of the other identified T-RFs (T-RF24, T-RF25, and T-RF26). The increases or decreases in relative abundances of the eukaryotic T-RFs suggest that backwashing also causes changes in relative composition of the eukaryotic community in the top layer of the BAC bed as found in the bacterial community. The eukaryotes corresponding to the T-RFs whose relative abundances decreased after backwashing are possibly susceptible to backwashing.

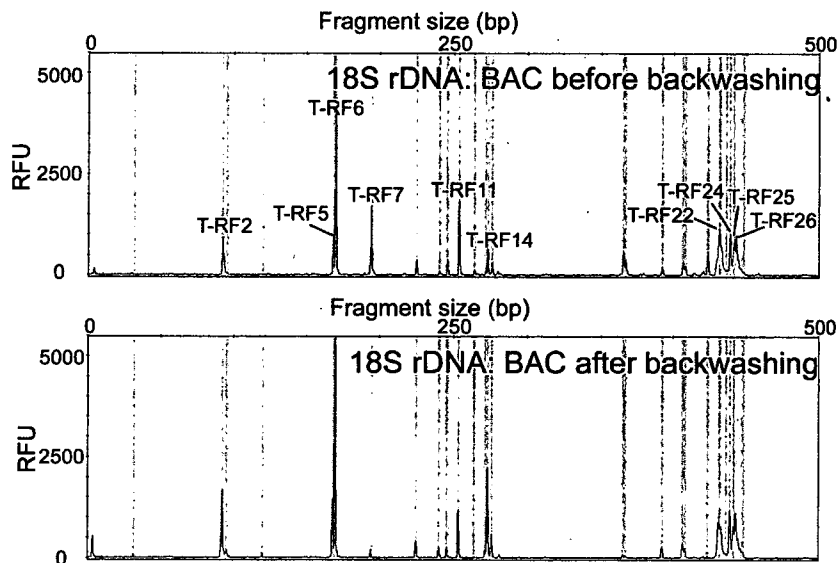


Figure 3 Electropherograms showing the eukaryotic 18S rDNA T-RFLP profiles of the BAC samples before and after backwashing

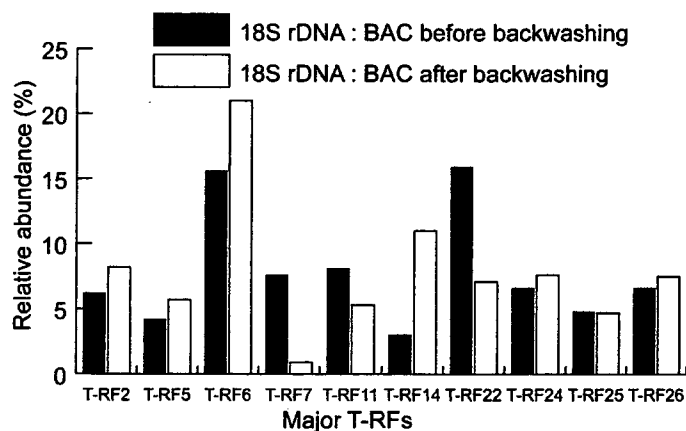


Figure 4 Differences in the relative abundances of the major 18S rDNA T-RFs before and after backwashing

CONCLUSIONS

In this study, we used T-RFLP analysis of 16S rDNA and 18S rDNA to evaluate the influence of backwashing on the biofilm community developed on BAC used in a drinking water treatment plant in Japan. The enumeration of the bacterial cells attached to the BAC before and after backwashing revealed that 36% of the bacterial cells were lost after backwashing. Analysis of the bacterial and eukaryotic communities associated with the BAC in the top layer of the bed demonstrated that the relative abundances of some T-RFs changed significantly after backwashing. The increases or decreases in the relative abundances of the T-RFs suggest that backwashing can provide impacts on the relative dominances of microorganisms in the BAC biofilm. Monitoring of the biofilm in the recovery process after backwashing and examination of the effects of backwashing on the biofilm community under more controlled conditions would be useful for discussing the results obtained in this study.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financially supported by Health and Labour Sciences Research Grants from the MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare) of Japan.

REFERENCES

- Brummer I. H. M., Felske A. D. M. and Wagner-Dobler I. (2004). Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Appl. Env. Microbiol.*, **70**(9), 5094–5101.
- Hoefel D., Monis P. T., Grooby W. L., Andrews S. and Saint C. P. (2005). Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J. Appl. Microbiol.*, **99**(1), 175–186.
- Hozalski R. M. and Bouwer E. J. (1998). Deposition and retention of bacteria in backwashed filters. *J. Am. Water Works Assoc.*, **90**(1), 71–85.
- Hozalski R. M. and Bouwer E. J. (2001). Non-steady state simulation of BOM removal in drinking water biofilters: Model development. *Water Res.*, **35**(1), 198–210.
- Huber T., Faulken G. and Hugenholtz P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, **20**(14), 2317–2319.
- Keeling P. J. (2001). Foraminifera and Cercozoa are related in actin phylogeny: Two orphans find a home? *Mol. Biol. Evol.*, **18**(8), 1551–1557.
- Kim W. H., Nishijima W., Shoto E. and Okada M. (1997). Pilot plant study on ozonation and biological activated carbon process for drinking water treatment. *Wat. Sci. Tech.*, **35**(8), 21–28.
- Lane D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), Wiley, Chichester, UK, pp. 115–175.
- LeChevallier M. W., Becker W. C., Schorr P. and Lee R. G. (1992). Evaluating the performance of biologically active rapid filters. *J. Am. Water Works Assoc.*, **84**(4), 136–146.
- Lehtola M. J., Miettinen I. T., Vartiainen T. and Martikainen P. J. (2002). Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes. *Water Res.*, **36**(15), 3681–3690.
- Liu W. T., Marsh T. L., Cheng H. and Forney L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.*, **63**(11), 4516–4522.
- Liu W., Wu H., Wang Z., Ong S. L., Hu J. Y. and Ng W. J. (2002). Investigation of assimilable organic carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system. *Water Res.*, **36**(4), 891–898.

- Morin P. and Camper A. K. (1997). Attachment and fate of carbon fines in simulated drinking water distribution system biofilms. *Water Res.*, **31**(3), 399–410.
- Nikolaev S. I., Berney C., Fahrni J., Mylnikov A. P., Aleshin V. V., Petrov N. B. and Pawlowski J. (2003). *Gymnophrys cometa* and *Lecythium* sp. are core Cercozoa: evolutionary implications. *Acta Protozool.*, **42**, 183–190.
- Strumberg D., Pilon A. A., Smith M., Hickey R., Malkas L. and Pommier Y. (2000). Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell. Biol.*, **20**(11), 3977–3987.
- Suzuki M. (1997). Role of adsorption in water environment processes. *Wat. Sci. Tech.*, **35**(7), 1–11.
- Takeuchi Y., Mochizuki K., Matsunobu N., Kojima R., Motohashi H. and Yoshimoto S. (1997). Removal of organic substances from water by ozone treatment followed by biological activated carbon treatment. *Wat. Sci. Tech.*, **35**(7), 171–178.
- Volk C. J. and LeChevallier M. W. (2002). Effects of conventional treatment on AOC and BDOC levels. *J. Am. Water Works Assoc.*, **94**(6), 112–123.
- Wilcox D. P., Chang E., Dickson K. L. and Johansson K. R. (1983). Microbial growth associated with granular activated carbon in a pilot water treatment facility. *Appl. Env. Microbiol.*, **46**(2), 406–416.
- Winnepeninckx B., Backeljau T. and Wachter R. D. (1995). Phylogeny of protosome worms derived from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, **12**(4), 641–649.

1-G-17-4

表皮角化細胞を用いた水中エンドトキシンの毒性評価

京都大学大学院工学研究科 ○高橋恭介, 小林憲太郎, 大河内由美子, 伊藤慎彦

Evaluation of the Toxicity of Endotoxin in Water using Human Keratinocytes, by Kyosuke TAKAHASHI, Kentaro KOBAYASHI, Yumiko OHKOUCHI, Sadahiko ITOH(Dept. of Eng., Kyoto Univ.)

1. はじめに

現在、水質基準の対象となっている化学物質は発がんなどの重篤なエンドポイントをもつものである。しかし今後、より安全な水道水の供給を目指すために、生体恒常性を攪乱することで健康状態からの乖離を引き起こす物質についても知見を集積する必要があると考えられる。本研究では、微生物細胞外膜構成物質であるエンドトキシン(LPS)を一例としてとりあげ、毒性評価を行う。塩素やオゾンによる酸化処理を受けると、エンドトキシンは微生物から水中へと放出されて除去されにくくなるため、水道水中に残存するエンドトキシン活性やそれが誘発する生理活性を評価することが重要である。本研究では、特にヒト表皮角化細胞を用いることにより、水中エンドトキシンの経皮曝露を想定した免疫毒性発現について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 LPS 曝露による細胞毒性試験・マイクロアレイ解析

正常ヒト成人乳房表皮角化細胞に *E. coli* O55:B5 由来 LPS を 100, 1000, 10000 ng/mL の濃度で 4 時間および 100 ng/mL で 24 時間曝露した。また、LPS 濃度 0~50 µg/mL の範囲で 24 時間の曝露を行い、Cell counting kit-8(同仁化学製品)を用いて細胞毒性を調べた。次に、RNeasy Mini Kit(QIAGEN), amino-allyl RNA amplification kit(Sigma Genosys)を用いて Cy 色素で標識した aRNA を調製し、AceGene® Oligo Chip 30K 1Chip Version(DNA チップ研究所)上でハイブリダイゼーションを行った。洗浄・乾燥後、Scan Array Express(Perkin Elmer)および DNASIS Array(HitachiSoft)を用いて蛍光スポットの定量化および遺伝子発現の数値化を行った。

2.2 浄水処理水の分画濃縮および曝露試験

A 浄水場の各浄水処理過程における処理水を採水し、分画分子量 10000 の限外ろ過膜を用いてエンドトキシンを含む高分子化合物を分画濃縮、OASIS HLB カートリッジ(Waters)を用いて親水性成分、疎水性成分への分画濃縮を行った。これらの分画を用いて上記と同様に曝露試験を行った。

3. 実験結果

3.1 LPS 曝露による細胞毒性試験・マイクロアレイ解析

各濃度の LPS を曝露し、アレイ解析を行った結果を図 1 に示す。LPS1000 ng/mL, 4 時間の曝露を行った細胞において IL-12A の発現強度が 2.8 倍程度に増大した。IL-12A は Th1 細胞の分化を誘導し、Th1 が過剰優位になると自己免疫疾患を引き起こすといわれている。一方、樹状細胞やマクロファージなどの細胞において LPS 曝露により産生増大すると報告されている IL-1β, IL-6, TNF-α などの炎症性サイトカインには、際立った発現比の増大が認められなかった。LPS の活性を抑制する BPI 様物質の発現比増加も同時に見られたため、その作用によって炎症性サイトカインの発現が抑制された可能性もある。

3.2 浄水処理水の分画濃縮および曝露試験

各サンプルの濃縮分画の細胞毒性を調べた。高分子化合物分画中のエンドトキシン濃度を表 1 に、24 時間曝露による細胞生存率の変化を図 2 に示す。着水井>急速ろ過後>粒状活性炭吸着後と、浄水処理が進むにつれて細胞毒性は低減した。また、各サンプルとも同程度の活性を示す濃度の *E. coli* 由来 LPS よりも強い細胞毒性を示した。この結果は、エンドトキシン以外にも強い細胞毒性を示す物質群が原水中に存在しており、浄水処理、特に活性炭処理によりその大部分が除去されているものの、若干の毒性物質群が残留することを示唆している。一方、親水性成分の分画については強い細胞毒性が見られなかったため、高分子化合物分画が細胞毒性において大きな寄与を示していると推定された。細胞毒性の変化と比較して免疫毒性がどのような変化を示すかについて、マイクロアレイ解析を行うことが必要であると考えられる。

4. まとめ

1) 1000 ng/mL(13000 EU/mL 相当), 4 時間の曝露条件において

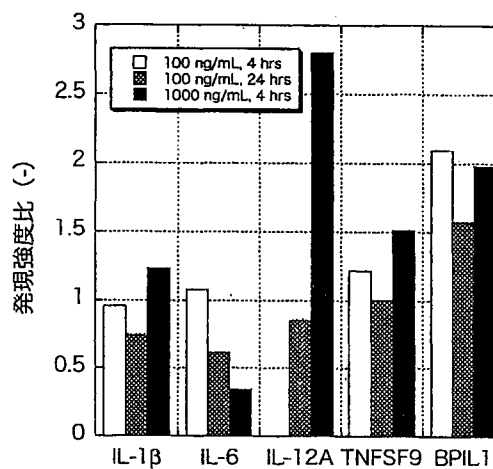


図 1 各遺伝子の発現強度比変化

表 1 高分子化合物分画のエンドトキシン濃度

採水箇所	着水井	ろ過後	オゾン後	活性炭後
エンドトキシン濃度 (EU/mL)	97.4	26.4	9.96	18.5

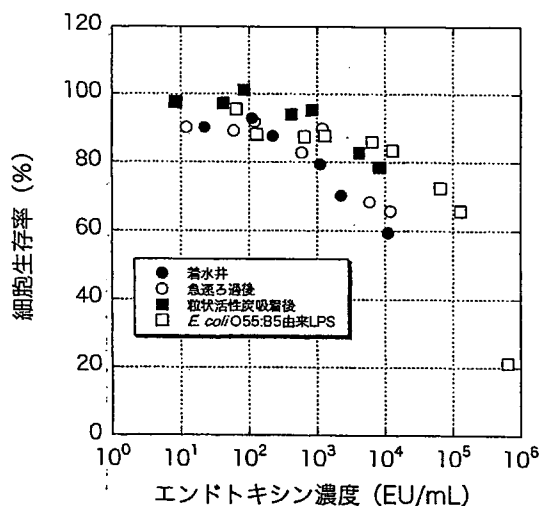


図 2 高分子化合物分画および LPS の細胞毒性

炎症性サイトカイン IL-12A の発現増大が確認された。

2) エンドトキシンを含む高分子化合物分画において強い細胞毒性が見られた。

謝辞

採水にご協力いただいた A 浄水場関係者各位に深謝いたします。

参考文献

- Rapala, J., et al.(2002) Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment, *Wat. Res.*, 36, 2627-2635.
 Uematsu S, Akira S(2006) Toll-like receptors and innate immunity, *J. Mol. Med.*, 84, 712-715.

(8-46)流出クリプトスポリジウム・オーシスト量算出のための予備的調査

○西村 和之(県立広島大学) 国包 章一(国立保健医療科学院)

1. はじめに

様々な調査により、各地の水道原水中にクリプトスポリジウム・オーシストが存在することが明らかとなっているが、検出感度等の点で定量的な把握が十分で無い事が指摘されている¹⁾。従来の手法を用いた場合でも、定期調査の実施等によりデータの蓄積が図れるならば、原水の持つクリプトスポリジウムに関するリスクの把握は可能である。しかしながら、感度の高い手法が活用されるならば、少ない労力でリスク管理に必要な情報が得られることになる。本調査は、家畜糞尿中に排出されたオーシスト数^{2, 3)}が、取水点等へ到達する割合等の算出根拠を得るために、迅速性や感度において優れている PCR 法を活用した検出法⁴⁾による定量を比較的清浄な河川を対象として行った。

2. 調査地点および調査方法

調査は 2006 年 11 月、12 月に実施した。調査地点は、酪農地帯を流れる一級河川江の川水系に属する「生活環境の保全に関する環境基準」の A 類型に指定されている西城川の 1) 平子(ゆめの橋)、2) 川手(庄原大橋)と同比和川の 3) 比和川橋とした。試料は、河川水 200L をポリタンクで採水後、実験室内でポリエチレン製 MF 中空糸膜モジュール(孔径 0.1 μ m、有効濾過面積 4,000cm²、三菱レイヨン製)を用いて V 底遠心容器(175ml 用)に濃縮した⁵⁾。濃縮試料は 2 分割し、一方は、公定法に定められているショ糖密度勾配遠心法と免疫磁気ビーズ法による精製を経て蛍光抗体染色法により顕微鏡観察を実施した。残りの一方は、クリプトスポリジウム・オーシストの遺伝子(RNA)を抽出し、東和科学(株)製 *C. parvum* 検出キットを用いて NASBA 法により *hsp* 86 領域を増幅し定量を行った。また、別途に採水した 40L の試料を用いたクリプトスポリジウム・オーシストの遺伝子(DNA)、を抽出し、*hsp*70 領域を対象として PCR 増幅した後、塩基配列を決定し、ホモロジー検索による遺伝子型の同定を行った。

3. 結果および考察

顕微鏡観察法と RNA 検出法による定量結果の一部を表-1 に示す。顕微鏡観察法では、オーシスト添加回収試験におけるオーシストの回収率が 7~15%と低く 100L 相当の試料中からであっても顕微鏡観察法ではクリプトスポリジウム・オーシストは検出できなかった。一方、RNA 検出法では、2 地点、3 試料で 1~5 個/100L のオーシストが検出された。また、*hsp*70 を対象遺伝子とした遺伝子解析を行った。図-1 に電気泳動の結果を示すが、得られたバンドを用いたホモロジー解析の結果、12 月 12 日の平子地点と 11 月 16 日の比和川橋の試料からは *Cryptosporidium parvum* と

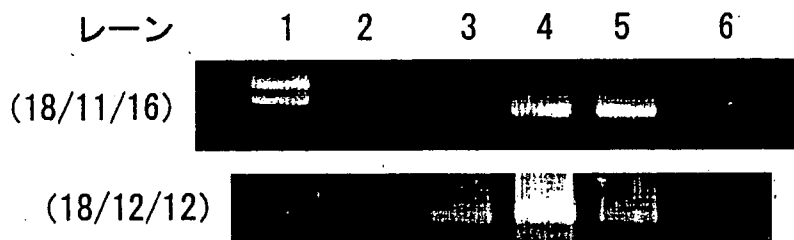
ト型 (*Homo sapiens*) と 100%の相同性が認められた。また、12 月 12 日比和川橋の試料からは *C. parvum* ヒト型 (*Homo sapiens*) と *C. parvum* ウシ型 (*Bovine*) との存在が示唆された。

このように、PCR に基づく手法を用いることにより、比較的清浄な河川水に存在するクリプトスポリジウム・オーシスト量と遺伝子型の把握が可能であると判断された。

表 1 顕微鏡法および核酸検出法による検出結果 (単位: 個/100L)

		西城川 平子地点	西城川 川手地点	比和川 比和川橋地点
H18/11/16	顕微鏡観察法	0	0	0
	RNA 検出法 ¹⁾	0	0	2
H18/12/12	顕微鏡観察法	0	0	0
	RNA 検出法 ¹⁾	0	1	5

1) RNA 検出法はコピー数に基づく定量法



レーン 1 λ/HindIII 2 西城川 平子地点 3 西城川 川手地点
4 比和川 比和川橋地点 5 P.C. (オーシスト 5 個) 6 N.C.

図 1 電気泳動結果

まとめ

本調査で利用した PCR 法に基づく手法は、試料量が多いが試料当たり 1 オーシストから検出可能であり、濃度の低い河川水中であっても遺伝子型を含めて検出することができる。これらの手法を活用した調査を実施することにより、放牧地の様な面的な負荷源からの流達オーシスト量の算出に利用可能な情報が得られると考えられる。

1)保坂 三継:原虫類によるわが国水環境の汚染状況、水環境学会誌、Vol.26, No.1、2003

2)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

3)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

4)原弘之ら、平成 18 年度全国飲料水検査研究発表会、2006

5) 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

(8 -50) 培養法と分子生物学的手法による生物活性炭槽内の従属栄養細菌の評価

○春日 郁朗(東京大学大学院) 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

現在、水道水質基準における細菌の現存量指標としては、培養法による“一般細菌”が用いられているが、一般細菌として検出される細菌は、細菌群集全体のごく一部であり、現存量指標としては必ずしも適していない。そこで、培地濃度を低くし、培養時間を長くすることで、より多くの細菌を検出することを意図した“従属栄養細菌”が注目されている。しかし、環境中には培養法では検出できない細菌が大量に存在することも知られており、従属栄養細菌の解釈にも注意が必要である。一方、近年の分子生物学的手法の発達により、培養を介さずに遺伝子レベルで細菌群集を把握することが可能になってきた^{1,2)}。分子生物学的手法によって培養法の結果を精査することにより、培養法が検出対象とする細菌群を識別することができる。

そこで、本研究では、高度浄水処理施設の生物活性炭試料を対象として、全細菌数、従属栄養細菌数を計数すると共に、従属栄養細菌として検出される細菌群を単離し、分子生物学的手法による細菌群集構造解析の結果と比較した。

2. 実験方法

オゾン-生物活性炭処理を導入している A、B の 2 箇所の浄水場から、生物活性炭を採取した(浄水場 A : 2005 年 9 月、浄水場 B : 2005 年 8 月)。活性炭に Milli-Q 水を加え、超音波処理を行った後、上澄み液中の全細菌数、従属栄養細菌数を評価した。全細菌数は、DAPI 染色した後、蛍光顕微鏡で計数した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地(ベクトン・ディッキンソン社)を用いて、25℃、7 日間培養後のコロニー数を計数した³⁾。本研究では、単離を行うため、混釈法ではなく、塗抹法を採用した。培養後、色・形状の異なるコロニーを選択し、R2A 培地に画線し、単一のコロニーになるまで純化を繰り返した。単離した株の同定は、16S rDNA 配列を決定して行った。分子生物学的手法による細菌群集構造の評価には、TRFLP 法(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism : 末端制限酵素断片長多型)を適用した。活性炭試料から核酸を抽出し、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、真正細菌の 16S rDNA を 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することで、細菌群集構造を評価した。単離した株についても、同様に TRFLP 法で解析し、生物活性炭試料の TRFLP プロファイルとの比較を行った。

3. 結果及び考察

生物活性炭試料の全細菌数、従属栄養細菌数を計数した結果を表 1 に示す。全細菌数は、浄水場 A では $2.2 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^8$ (cells/wet-g)、浄水場 B では $1.3 \times 10^9 \pm 8.1 \times 10^7$ (cells/wet-g) であり、細菌の現存量としては、ほぼ同程度であった。一方、R2A 培地を用いて計数した従属栄養細菌数は、浄水場 A が 4.5×10^7 (CFU/wet-g)、浄水場 B が 3.2×10^7 (CFU/wet-g) であった。全細菌数に対する従属栄養細菌数の比は、浄水場 A では 2.0%、浄水場 B では 2.4%であり、どちらの浄水場の生物活性炭試料も、従属栄養細菌として検出される細菌数は、全細菌数の約 2%に過ぎないことが示された。

表 1 生物活性炭試料の全細菌・従属栄養細菌の計数値

活性炭試料	全細菌数 (DAPI 染色) (cells/wet-g)	従属栄養細菌数 (R2A) (CFU/wet-g)	R2A 計数値/DAPI 計数値 (%)
浄水場 A	$2.2 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^8$	4.5×10^7	2.0
浄水場 B	$1.3 \times 10^9 \pm 8.1 \times 10^7$	3.2×10^7	2.4

表2 単離株 16S rDNA の相同性検索の結果

単離株	コロニ ーの色	[Accession No.] 最近縁配列 (既知種)	分類	最近縁配列 との相同性 (%)
A1	橙	[AY559429] <i>Porphyrobacter donghaensis</i> strain SW-158	α - <i>Proteobacteria</i>	100
A2	黄	[AJ556799] <i>Comamonadaceae</i> bacterium MWH55	β - <i>Proteobacteria</i>	98
A3	透明	[DQ241397] <i>Leptothrix</i> sp. S1.1	β - <i>Proteobacteria</i>	96
A4	白	[AJ007857] <i>Mesorhizobium</i> sp. HB5A4	α - <i>Proteobacteria</i>	100
A5	桃	[AJ007857] <i>Bosea thiooxidans</i> strain DSM9653	α - <i>Proteobacteria</i>	94
B1	白	[AB162081] Denitrifying bacterium W49b	α - <i>Proteobacteria</i>	99
B2	黄	[AJ556799] <i>Comamonadaceae</i> bacterium MWH55	β - <i>Proteobacteria</i>	97
B3	黄	[AF235997] <i>Alpha proteobacterium</i> F0813	α - <i>Proteobacteria</i>	100
B4	透明	[AY826639] <i>Acidovorax</i> sp. '6.5 MW-10'	β - <i>Proteobacteria</i>	100
B5	白	[AJ864853] <i>Afpia</i> sp. J44 isolate J44	α - <i>Proteobacteria</i>	99
B6	白	[AY568510] <i>Afpia massiliensis</i> strain NW-12	α - <i>Proteobacteria</i>	100

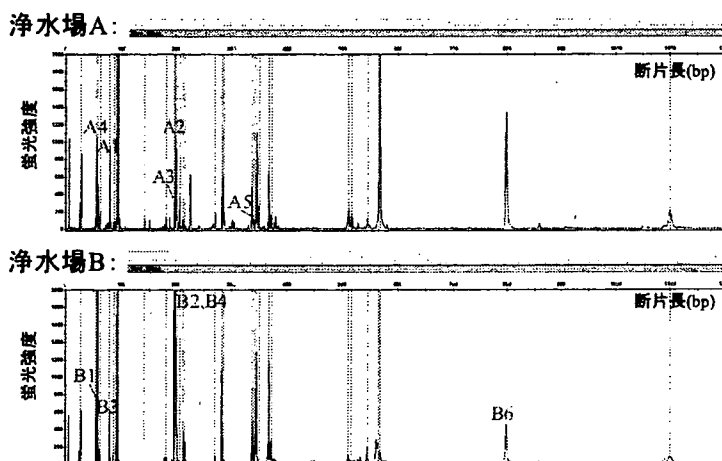


図1 浄水場 A と浄水場 B の生物活性炭試料の細菌群集及び単離株の T-RFLP 法による解析

単離の結果、浄水場 A の活性炭からは 5 株 (A1–A5)、浄水場 B の活性炭からは 6 株 (B1–B6) を得た。単離株の 16S rDNA の相同性検索の結果を表 2 に示す。単離された株は、すべて α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* に近縁であった。図 1 に、浄水場 A、浄水場 B の生物活性炭試料の細菌群集を T-RFLP 法で解析した結果を示す。両者の T-RFLP パターンを比較すると、双方に共通する T-RF が存在する一方、その構成には差異が見られた。単離株についても T-RFLP 法で分析し、生物活性炭試料との比較を行った。図 1 において、単離株由来と推定された T-RF に株名を付記した。A1–A5 に該当する T-RF は、浄水場 A の生物活性炭の T-RFLP プロファイルに確認できたが、ピーク強度の強い T-RF (93bp, 567bp, 798bp 等) に該当する株は単離されなかった。浄水場 B では、B1–B4, B6 由来と推定される T-RF と生物活性炭の T-RFLP プロファイルを照合できたが、B5 については該当する T-RF が検出されなかった。また、浄水場 A、浄水場 B 共に、生物活性炭試料の T-RFLP プロファイル中に単離株由来以外の T-RF が確認され、従属栄養細菌として検出できる細菌群には限界があることが示された。単離されない細菌群の一部は、*Planctomycetes* や *Acidobacteria* に近縁であることが推察された²⁾。

4. 結論

- 1) 生物活性炭試料を対象として細菌現存量を評価したところ、従属栄養細菌数は全細菌数の約 2% に相当することが示された。また、単離された株は、すべて α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* に近縁であった。
- 2) 生物活性炭試料の細菌群集と単離株を T-RFLP 法によって解析したところ、従属栄養細菌としては検出されない細菌群の存在が示唆され、培養法の限界を推察することができた。

参考文献

- 1) 春日ら (2006) 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, 第 57 回全国水道研究発表会講演集, pp.264-265.
- 2) 春日ら (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 回水環境学会年会講演集, p.374.
- 3) 保坂ら (2001) 水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討, 東京都衛生研究所年報, Vol. 52, pp.245-249.

(8-51)配水過程における微生物再増殖に及ぼす残留塩素濃度の影響

○高井 正子(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. はじめに

水道法では微生物学的な安全確保の視点から塩素消毒と残留塩素保持が義務づけられているが、その一方で塩素消毒剤由来の異臭味や消毒副生成物等により、過剰注入とならないよう、塩素剤の注入率を低減することも求められている。国内の各水道事業体においては、塩素剤の注入率低減化について様々な取り組みが行われており、高度浄水処理の導入による浄水水質の改善に加えて、残留塩素濃度のオンラインモニタリングや塩素消費シミュレーション、塩素剤の多点注入等による注入率のきめ細かな制御により、一定の成果を上げている。しかし、残留塩素濃度を下げることによって、消毒効果が弱まり、配水過程における微生物再増殖のポテンシャルは増大する。残留塩素濃度の低減を図るとともに、末端給水栓においても微生物学的に安定した水質の水道水を提供する必要がある。本研究では、異なる残留塩素濃度における微生物再増殖性の相違について実験的検討を行った。

2. 実験方法

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、管路内における微生物の付着・増殖を疑似的に再現した。アニュラーリアクターは、ガラス製の円筒容器と回転ドラムで構成され、回転ドラムの外壁には試験片 20 枚を着脱できるようになっている。

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または次亜塩素酸ナトリウムを添加することにより、各系統の試料水の遊離塩素濃度がそれぞれ 0.0mg/L、0.1mg/L、0.5mg/L 前後となるように調整し、44 日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した。ただし、通水開始後 34 日目は、全ての系統において一時的に遊離塩素濃度を 1.0～1.2mg/L に上げ、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べた(図. 1)。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 20mm に相当する給水管内の状況を再現した。各試料水の水温は 20℃前後に維持した。流入水、流出水および試験片表面に付着した微生物を週 2 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と従属栄養細菌を測定した。測定は上水試験方法に準じ、従属栄養細菌は R2A 培地を用いて 20℃で 7 日間培養した。

3. 結果と考察

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 濃度は平均 199 μ g/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。

試験片表面の従属栄養細菌密度は、図. 2に示すように、いずれの残留塩素濃度においても、通水開始当初は増加していくものの、15～20 日以降は変動が小さくなり、定常期に達した。増殖期における試験片表面の従属栄養細菌増加速度は残留塩素濃度 0.0mg/L が最も早く、残留塩素により

表. 1 流入水の水質試験結果
(平均値)

水温	19.6℃
pH	7.95
TOC	1.35mg/L
AOC*	199 μ g/L
NO ₃ -N	2.4mg/L
NO ₂ -N	0.036mg/L
PO ₄	0.28mg/L

※給水栓から直接採水

微生物膜の増殖が抑制されていた。定常期（16～27 日）における試験片表面の従属栄養細菌密度は、残留塩素濃度 0.0mg/L で $6.5 \times 10^5 \sim 3.1 \times 10^6$ CFU/cm² であり最も大きかった。0.1mg/L と 0.5mg/L の場合は、それぞれ $6.4 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$ CFU/cm²、 $3.5 \times 10^2 \sim 5.7 \times 10^3$ CFU/cm² となった。残留塩素濃度 0.5mg/L では変動が大きく、不安定な微生物膜が形成されたといえる。

流出水中の微生物については、試験片表面で増殖した微生物が剥離したものと考えられる。図. 3 に示すように、残留塩素濃度 0.0mg/L、0.1mg/L の場合は、試験片表面と同様に 15～20 日で定常期に達し、定常期（16～30 日）の従属栄養細菌濃度はそれぞれ $3.4 \times 10^3 \sim 8.0 \times 10^5$ CFU/ml、 $1.6 \sim 4.2 \times 10^3$ CFU/ml であった。残留塩素濃度 0.5mg/L では増減を繰り返しているが、20 日目を除き、他の残留塩素濃度における値以下を示し、最高で 2.3×10^3 CFU/ml であった。

35 日目は、試験片表面、流出水中ともに残留塩素濃度を高めた影響を受け減少しているが、一時的なものであり 5 日前後で回復した。また、この時、試験片表面、流出水ともに従属栄養細菌では最大で 2log 程度下がったが、一般細菌では最大で 4log 程度下っており、従属栄養細菌は塩素濃度の変化による影響が一般細菌に比べて小さいといえる。

4. まとめ

- 微生物の付着量および流出水中濃度は、15～20 日で定常期に達した。
- 定常期における従属栄養細菌の付着量は、残留塩素濃度 0.0mg/L の場合に比べて、0.1mg/L では 2log 程度、0.5mg/L では 3log 程度抑制された。定常期における従属栄養細菌の流出水中濃度は、残留塩素濃度 0.0mg/L の場合に比べて、0.1mg/L、0.5mg/L とともに 2log 程度抑制された。
- 残留塩素濃度を 1.0～1.2mg/L として 1 日中通水することにより微生物の付着量および流出水中の微生物濃度は減少したが、5 日前後で元の数値まで回復した。

【参考文献】（社）日本水道協会：酸化・消毒剤注入量の低減化に関する研究報告書（3 年間のまとめ）、平成 15 年 3 月

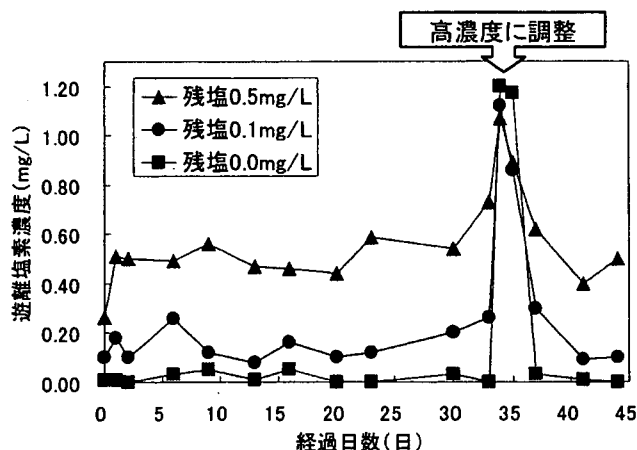


図. 1 各系統の遊離塩素濃度

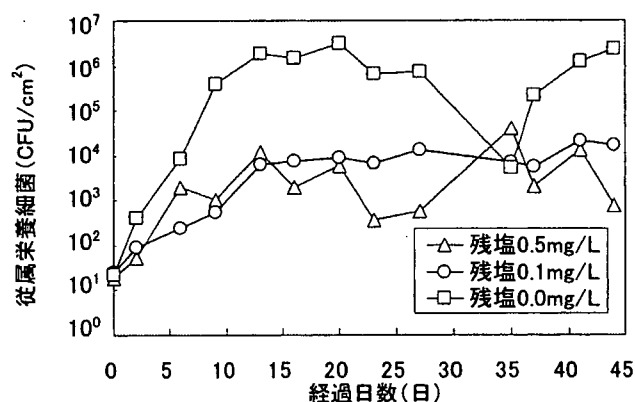


図. 2 従属栄養細菌経日変化 (試験片表面)

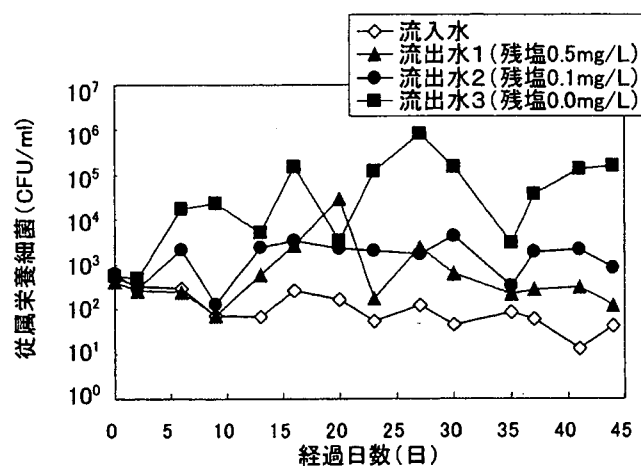


図. 3 従属栄養細菌経日変化 (流入水・流出水)

(8-54) 浄水処理過程における微生物およびその由来物質の挙動に関する研究

○大河内由美子(京都大学大学院)

石川 卓(京都大学)

高橋 恭介(京都大学大学院)

伊藤 慎彦(京都大学大学院)

1. はじめに

現行の水道水質基準では病原性微生物に関する項目として、1) 一般細菌数、2) 大腸菌の2項目が設定され、末端給水栓において残留塩素を保持することが定められている。浄水処理の最終段階で塩素消毒を行うことにより、微生物による健康リスクを制御しているわけであるが、不活化された微生物をはじめとした微生物に由来する化学物質群は浄水中に残存しているのが現状である。これらの物質のうち、グラム陰性細菌やシアノバクテリアの細胞外膜構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) は、生体内で強い免疫反応を惹起することが知られており、この生物活性 (エンドトキシン) に対して医療・製薬現場では個別に対策が取られている。近年、高濃度エンドトキシンを吸入することにより呼吸器系炎症のリスクが高まることが指摘され¹⁾、日常生活におけるエンドトキシン曝露とアレルギー疾患発症との関連が注目されつつあるものの、水中に存在するエンドトキシン活性量やヒトへの曝露状況に関する知見はごく限られている²⁾。

さらに、浄水中のエンドトキシンは配水過程における微生物の再増殖、あるいは水源におけるシアノバクテリアの大量発生などにより増大する可能性がある。本研究では、浄水処理過程ならびに水道水中におけるエンドトキシンの活性量・存在形態を詳細に調べ、エンドトキシンの除去特性と水道水中濃度を明らかにする。

2. 採水調査および実験方法

2.1 採水調査について

調査対象施設は、琵琶湖・淀川水系から取水している A 浄水場である。本施設は、急速ろ過後にオゾン・活性炭処理を行う高度浄水処理施設である。採水は、2006 年 11 月および 12 月に計 3 回行った。浄水処理フローならびに採水ポイントを図 1 に示す。採水容器は、予め 250℃、2 時間の乾熱滅菌処理によりエンドトキシン汚染を除去したガラス瓶を使用した。塩素消毒された試料のうち一部の試料については、比較対照として残留塩素除去操作を行った試料 (チオ硫酸ナトリウム 0.05g を入れてオートクレーブ滅菌したガラス瓶に採水) についても測定を行った。

2.2 測定方法

採水試料は 4℃ 保冷下で持ち帰り、4 時間以内に以下に示す各項目の測定を行った。

- 1) 微生物試験：一般細菌数 (標準平板計数; 37℃, 24 時間)、従属栄養細菌数 (R2A 平板計数; 20℃, 7 日間)、全菌数 (蛍光染色計数; DAPI(4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩))
- 2) 全有機炭素 (TOC)、紫外線吸光度 (E260)、pH、濁度
- 3) 総エンドトキシン、遊離エンドトキシン

総エンドトキシン活性の測定は水試料の全画分を用いて、また遊離エンドトキシンの測定は、14,000 rpm、10 分間遠心分離した後の上清を用いた。エンドトキシン測定用の試料は -80℃ で保存した。エンドトキシン活性の測定は、カプトガニ血球抽出成分 LAL (エンドスピーシー ES-50M, 生化学工業) を使用したエンドポイント比色法 (トキシカラー DIA-MP, 生化学工業) により行った。

3. 実験結果と考察

本研究では、エンドトキシンをその存在形態ごとに測定しており、総エンドトキシンから遊離エンドトキシンを差し引いた値を微生物細胞に結合した状態で存在する結合エンドトキシン量と考えることとする。

浄水処理過程における微生物計数結果ならびにエンドトキシン活性の変化を表 1 に示す。ここでは 3 回調査を行った結果の平均値を示している。着水井における総エンドトキシンの平均値は 75.1 (EU/mL)、遊離エンドトキシンは 38.7 (EU/mL) であった。着水井におけるこれらの値を基に、各プロセスにおける除去率をそれぞれ算出した。これらの結果から、各手法で測定した微生物計数 (一般細菌数 (SPC)・従属栄養細菌数 (HPC)・全菌数 (DAPI))、総エンドトキシン、遊離エンドトキシンともに凝集・沈殿処理により良好に除去されることがわかった。

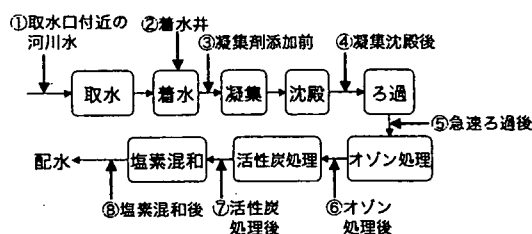


図 1 対象施設の処理フローと採水ポイント

表 1 浄水処理過程における微生物量・エンドトキシン量の変化

採水地点	一般細菌数 (SPC)		従属栄養細菌数 (HPC)		全菌数 (DAPI) *		総エンドトキシン		遊離エンドトキシン	
	測定値 (cfu/mL)	除去率 (%)	測定値 (cfu/mL)	除去率 (%)	測定値 (cells/mL)	除去率 (%)	測定値 (EU/mL)	除去率 (%)	測定値 (EU/mL)	除去率 (%)
取水口付近河川	1144		22572		8.96E+05		56.22		35.63	
着水井	1359	0.0	17534	0	8.45E+05	0.0	75.11	0.0	38.73	0.0
凝集剤添加前	1481	-9.0	22972	-31.0	9.91E+05	-17.3	78.16	-4.1	38.41	0.8
凝集沈殿後	255	90.2	1502	122.4	2.01E+05	93.5	11.63	88.6	5.67	84.5
急速ろ過後	63	14.1	590	5.2	1.35E+05	7.9	10.26	1.8	7.30	-4.2
オゾン処理後	0	4.7	0	3.4	1.05E+03	15.8	6.645	4.8	7.04	0.7
活性炭吸着後	5	-0.4	238	-1.4	2.28E+04	-2.6	10.98	-5.8	8.44	-3.6
塩素混和後	0	0.4	0	1.4	5.07E+03	2.1	9.66	1.8	11.82	-8.7

* ただし、取水～急速ろ過後試料の全菌数については2回の調査結果の平均値、オゾン処理以降の試料については1回のみの調査で得られた結果を示している。

急速ろ過プロセスにおける平均除去率は、総エンドトキシンで86.2% (78.1～92.8%)であったのに対して、遊離エンドトキシンでは79.5% (65.1～95.5%)と若干低い値を示した。一方、微生物計数結果から算出される平均除去率は、一般細菌数で90.3%、従属栄養細菌数 (HPC) で91.9%、全菌数では82.0%となった。これらの結果から、遊離エンドトキシンの除去率は全菌数のそれとよく一致しているのに対して、総エンドトキシンの除去率は寒天培地を用いて計数した増殖可能菌数のそれと全菌数のその中間に位置することが示された。

その後のオゾン処理により総エンドトキシンの累積除去率は91.2%に達したものの、遊離エンドトキシンでは80.5%とあまり変化が見られなかった。さらに、後段に設置された活性炭処理水では総エンドトキシン、遊離エンドトキシンともに増大することが示された。従来の研究から、オゾン処理により浄水中の生物同化性有機炭素 (AOC) は増加し、その後の活性炭処理により AOC は吸着除去されることが知られている³⁾。これを踏まえて考えると、表1からオゾン処理により微生物が不活化されるものの、活性炭に吸着した有機物を炭素源として活性炭上で微生物が再増殖し、エンドトキシン増大に寄与していると考えられる。今回の結果は、Rapala らが調査した浄水処理過程における総エンドトキシンの挙動と同じ傾向を示している⁴⁾。この中に、再生直後の活性炭流出水ではエンドトキシン増大が見られなかったことが同時に指摘されており、本研究で得られた結果とも合致する。最後に、塩素消毒により SPC や HPC といった増殖可能菌数は減少するものの、総エンドトキシンはあまり除去されず、逆に遊離エンドトキシンは増大することが示された。この現象は、塩素処理により微生物細胞膜が損傷を受け、エンドトキシンの遊離化が進んだ結果と解釈される。

さらに、総エンドトキシン中の遊離エンドトキシンが占める割合の変化を図2に示す。急速ろ過後の試料では、その大部分が遊離エンドトキシンとして水中に残存していることが示された。さらに、凝集剤添加前あるいは活性炭処理後といった微生物の再増殖が起りやすい状況にある試料では、遊離エンドトキシンの比率が低下することから、微生物細胞の状態 (増殖状態/不活化状態) とエンドトキシンの存在形態は密接に関連していることが示された。

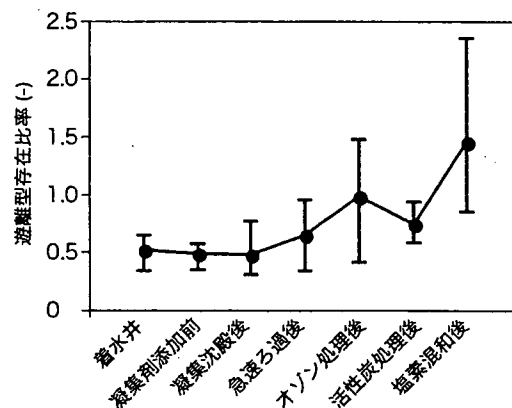


図2 浄水処理過程におけるエンドトキシン存在形態の変化

4. おわりに

本研究では、A 浄水場を対象として浄水処理過程における微生物量およびエンドトキシン活性量の変化を調べ、エンドトキシンの除去特性を明らかにした。特に、活性炭処理プロセスで微生物の再増殖が起りエンドトキシンが増大すること、また遊離エンドトキシンの存在比率は微生物細胞の状態を反映し、浄水処理後の試料ではそのほとんどが遊離エンドトキシンとして存在することを示した。今後は、これらの結果を踏まえて、エンドトキシンを指標とした給配水過程における微生物モニタリングに取り組む予定である。

謝辞：試料をご提供いただいた A 浄水場関係者各位に深謝する。

参考文献：1) Reed, C. E., Milton, D. K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. J. Allergy Clin. Immunol., 108 (2), pp.157-66, 2001, 2) Anderson, W.B. et al.: A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure, Can. J. Microbiol., 48, pp.568-83, 2002, 3) Polanska, M. et al.: Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water. Wat. Res., 39, pp.2259-2266, 2005, 4) Rapala, J. et al.: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. Wat. Res., 36, pp.2627-35, 2002.

Measurement of UV dose by chemical actinometer, by Masahiro OTAKI, Yuko HIROTO (Dept. of Human Env. Sci., /Ochanomizu Univ.)

1. はじめに

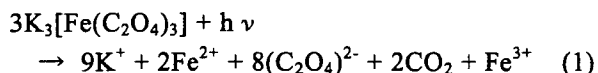
例えば, ある容器中に水溶液があるとして, この水溶液が受ける照射光線量, もしくは線量率を測定したいとしよう. 一般に照度計による測定では正確な測定は難しい. 何故ならば照度計ではセンサー部にあたる光のみの線量率測定であるため, 溶液の照射面における線量率分布, 容器による光の反射など様々な因子を照度計の測定値に加味する必要があるからである. 別の方法として対象水溶液の受けた光エネルギーの全量を一度に測定することは比較的簡単に行える. 線量計とはそのための測定手法であるが, ここではその代表例として化学光量計について紹介する.

2. 化学光量計の原理

光エネルギーを吸収し光化学反応によって別物質へと変化するような物質は多数存在する. 吸収された光量子数に対する生成した物質数の割合を量子収率 ϕ という¹⁾. 一般に一定条件の下では, この量子収率は一定である. 従って光照射後に生成した物質数を測定できれば, 吸収された光量子数を算定することができる. これが化学光量計の原理である.

3. 紫外線線量測定に用いられる化学光量計

代表的なものとしてシュウ酸鉄カリウム溶液がある²⁾. これは次の反応式 (1)式) に示されるように光照射後に生成する Fe^{2+} を測定し, 量子効率から照射線量を算定するものである.



この光量計は比較的感度が高く(量子収率が高い), 生成 Fe^{2+} 量はフェナントロリン複合体の吸光度によって簡易に測定できるという長所を持ち光量測定にこれまで広く利用されてきた. しかしこの溶液は幅広い波長光 (250 nm ~ 700 nm) に反応してしまうので, 紫外線光を測定したい場合には, 可視光の影響を避けるため, 暗所で行わなければならないという不便さがある.

光量計に用いられるその他の化学物質を以下に列挙する.

1) Reinecke's salt ($\text{KCr}(\text{NH}_3)_2(\text{NCS})_4$)

近紫外光から可視光 (300nm~700nm) の光測定に用いられるが, 熱的に不安定である点や, シュウ酸鉄カリウムと同様に可視光を避けて測定しなければならないという短所を持つ³⁾.

2) uranyl oxalate ($(\text{UO}_2)_2\text{C}_2\text{O}_4$)

反応する光波長が 450nm 以下であり, 紫外光付近のみを対象とできる光量計であるが, 取り扱いの困難さがネックである⁴⁾.

3) ペルオキシ二硫酸カリウム ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)

感度が非常に高く, 300nm 以下の光にのみ反応するため暗所でなくても利用できる光量計である. 反応により H^+ が生成するため, pH 変化によって簡易に測定できる反面, 溶存酸素が充分保持されていないと量子収率が安定しないという短所もある⁵⁾.

4) ヨウ化カリウム (KI)

ヨウ素酸カリウムを共存させることにより量子収率を上げることが可能である. 300nm 以下の光にのみ反応するため暗所でなくても利用できる. 反応によって生成する三ヨウ化イオン量は, 352nm 吸光度にて簡易に測定できる⁶⁾⁷⁾.

5) ウリジン ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$)

核酸の構成要素であるので, 生物への影響という観点から考えると, 消毒用紫外光の測定には都合が良いと考えられるが, 量子収率が低く, 感度が悪いので, 高線量測定でないと適用は難しい⁸⁾.

上記の他には, クロロ酢酸やマラカイトグリーン化合物, アゾベンゼンなどの溶液も報告されている⁹⁾.

4. 紫外線消毒分野への適用

化学線量計に用いられる化学物質の量子収率は, 照射光波長によって変わる. 従って紫外線消毒分野への適用を考える際には, 測定対象となるランプによって適用性が大きく異なる. 消毒装置として用いられることの多い低圧水銀灯は, その照射光が主に 254 nm に限られる単色光である. 従って化学線量計を用いる場合には 254nm における量子収率のみを考えれば十分である.

一方, 中圧水銀灯のような広波長光のランプを用いる場合には, 「照射される全線量の測定」を行うの

か、「消毒に効果のある線量の測定」を行うのかによって、適用する算定式は異なる。「全照射線量の測定」のためであれば、波長スペクトルと各波長での量子収率の積算値を用いて算定する必要がある。「消毒に効果のある線量の測定」を行う場合は、上記の積算過程に、各波長の消毒効率を組み入れる必要があると考えられる¹⁰⁾。しかしこの算定方法はあくまでも各波長の消毒効率が全対象病原微生物で等しいと仮定した場合にのみ成立するが、生物種によって波長毎の消毒効率は等しくないという報告¹¹⁾もあり、この点は十分な検討を要する。

広波長光の線量測定を、生物への影響という観点から考えると、前述の化学光量計物質の中では、核酸の構成物質であるウリジンが、波長依存性において適しているのではないかと考えられる。実際、太陽光による生物影響関連線量の測定にウラシルの薄膜結晶を用いて測定するという研究報告がある¹²⁾。ウラシルの水溶液を用いる化学光量計について調べたところ、その量子収率は低い、濃度が高くなるにつれて量子収率も高くなることがわかった。図1はウラシル水溶液の各濃度における量子収率を示したものである。しかし最も高濃度の1g/Lにおいても0.026と低い値に留まっている。

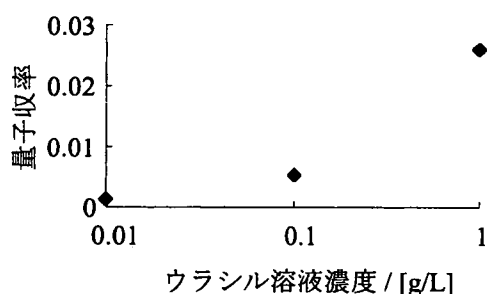


図1 ウラシル溶液の濃度と量子収率

5. 生物線量計との違い

化学物質の代わりに紫外線感受性がわかっている微生物を用いる方法が生物線量計である。表1は両者の特徴を示したものである。

表1 化学線量計と生物線量計の比較

	化学線量計	生物線量計
測定時間	数時間以内	一日以上
線量計の保存性	良い	良くない
測定対象	吸収光	透過光

化学線量計の場合、一般的に紫外光透過率が10%未満の溶液を用いるために、照射光の殆ど全てが溶液に吸収されたとして照射線量を算定するため、測定されるのは吸収光エネルギーである。一方、生物

線量計は、数万～数百万個/mLの生物粒子濃度の溶液なので、紫外光透過率90%以上の溶液を用いることが多い。この場合は、吸収エネルギー量ではなく、透過光エネルギーを求めることに近い。従って化学光量計は測定時間、安定性において優れているもの、紫外線装置内の透過光エネルギーを測定するには適さない。

6. 化学光量計の新たな試み

森田ら(2006)¹³⁾は、紫外光で変色する感光剤を直径数μmのマイクロカプセルに封入し、擬似微生物粒子として光量計に用いる試みを報告している。この様に溶液としてだけでなく、別の形態として用いる工夫をすれば、生物線量計のような長所を持った化学線量計を提案することが可能となるであろう。

7. 参考文献

- 1) 大槻哲夫訳, (1981) 光化学の基礎, 丸善株式会社
- 2) Parker C. A. (1953) A New Sensitive Chemical Actinometer, *Proc. R. Soc. Lond.* A220, 104
- 3) Wegner E. E. (1966) Photochemistry of complexes. III, *J. of Am. Chem. Soc.*, 88(3), 394
- 4) Leighton W. G. et al. (1930) Precision actinometry with uranyl oxalate, *J. of Am. Chem. Soc.*, 52, 3139
- 5) Mark G. et al. (1990) A chemical actinometer for use in connection with UV treatment in drinking-water processing, *J. Water SRT-Aqua*, 39(5), 309.
- 6) Rahn R. O. (1997) Potassium iodide as a chemical actinometer for 254 nm radiation, *Photochem. Photobiol.*, 66(4), 450.
- 7) Rahn R. O. (2000) The iodide/iodate actinometer in UV disinfection, *Proc. of AWWA Wat. Qual. Tech. conf.*
- 8) Gurzadyan et al (1996) Depopulation of highly excited singlet states of DNA model compounds: quantum yields of 193 and 245 nm photoproducts of pyrimidine monomers and dinucleoside monophosphates, *Photochem. Photobiol.*, 63(2), 143
- 9) Kuhn H. J. et al (2004) Chemical actinometry (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.*, 76(12), 2105.
- 10) Meuleman C.C.E. (1987) The basic principles of UV-disinfection of water, *Ozone Sci. Eng.*, 9, 299
- 11) Linden K.G. et al (2000) Comparison of monochromatic and polychromatic UV light for disinfection efficacy, *Proc. of AWWA Wat. Qual. Tech. conf.*
- 12) Horvath R. et al (2001) The effect of UV irradiation on uracil thin layer measured by optical waveguide lightmode spectroscopy, *Biosensors & bioelectronics*, 16, 17.
- 13) 森田ら (2006) 有機発色剤による紫外線照射線量の測定, 第40回日本水環境学会年会講演集, 423.

オゾン処理における大腸菌損傷レベルの評価方法

Methods for estimating injury level on *E. coli* inactivated by ozonation

王 雪丹、大瀧 雅寛

お茶の水女子大学、ライフサイエンス専攻、環境工学研究室

論文要旨

オゾン処理ではpHによって異なる消毒メカニズムが働くために、微生物に対する損傷程度に違いが生じる可能性が考えられる。オゾン処理を施した大腸菌を複数の培地で測定し比較することにより、その損傷レベルの差異を推定する方法を検討した。その結果、低pH域では、残存オゾンによる軽度の損傷のために増殖能力があるにも関わらず、デスオキシコール酸寒天培地では検出されない割合が大きくなり、消毒効果の過大評価になる可能性があるが、高いpH域では、酸化力の強いラジカル反応が主となり、培地測定の差異は小さくなることがわかった。

ozonation used has different disinfection mechanism in a different pH ,and the difference may cause different damage on the microorganism. In this research,it was examined by comparing the results of 3 growth media when *E. coli* bacteria inactivated by ozonation. As a result, in the low pH region, there was significant different between count by Desoxycholate medium method and TSA .It may result in over estimating of disinfection efficacy. In a high pH region, strong oxidative radical made difference among them smaller.

キーワード：不活化, 微生物, 単独

1. はじめに

浄水処理した水や食品産業において、水の安全性を獲得するために、水質検査を行い水質基準を満たすように管理されている。そのための消毒方法として、アメリカや日本では塩素注入による消毒が一般的であるが、ヨーロッパではオゾンの使用には長い歴史を持つ。消毒効果は大腸菌などを用いて実験されたり、水質管理項目として測定されることで管理しているがもし消毒後の水質検査では問題ないものの、その後生存、回復するような病原細菌が存在する場合には、健康危害を引き起こす可能性が生じる。従って各消毒条件における微生物の損傷程度を把握しておく必要がある。又、その点を考慮しつつ、消毒効果の実験を行う方法論を確立しておく必要がある。

微生物の損傷には、“致命的損傷”や“亜致命的損傷”が考えられる¹⁾。“致命的損傷”とは損傷を受け後、損傷を回復できず、世代交代もできず死に至る損傷とする。“亜致命的損傷”は損傷後に回復し世代交代が可能な損傷である。このような損傷が多いと消毒や殺菌（不活化）をした時点では細菌が検出されないという結果になるが、細菌に致命的損傷を与えていると判断ととならなくなる。そこで、現在多く使われている塩素消毒や今後注目されるオゾンや紫外線消毒方法において細菌に与える損傷の程度を測定方法も含めて把握することが重要である。回復については非制限的な条件で消毒後に1～3時間培養することで選択培地と非選択培地で培養した結果、選択培地で測定できる細菌数が増加し、非選択培地で測定する細菌数と一致したという報告²⁾がされている。

2. 実験方法

損傷の程度を非選択培地と選択培地を用いて推定する方法を試みた。本研究では大腸菌（NBRC3301）を用

いてオゾン処理による影響を調べた。濃度測定の際3種類の培地を用いて結果を比較し、培地測定結果と損傷レベルの関連性を考察した。使用した培地およびその特徴を以下にまとめた。

培地1：Tryptic Soy Agar (TSA 培地)

特徴：蛋白質を代謝し増殖できる大腸菌を検出

培地2：デソキシコール酸寒天培地（デソ培地）

特徴：乳糖の代謝機能を持ちデソキシコール酸による生育抑制を受けない大腸菌を検出

培地3：ニッスイ製コンパクトドライ EC (C-EC 培地)

特徴：ペプトンとピルピン酸もしくは乳糖の代謝に関わる酵素（ β -グルクロニダーゼ）生成機能を持つ大腸菌を検出

例えば、選択培地としてデソキシコーレイト寒天培地を用いた場合には、コロニーを形成できない大腸菌は、増殖能力を失活したか、乳糖分解能力を失活したか、デソキシコール酸による生育抑制されたことを示すが、非選択培地の場合では、蛋白質の代謝機能を失って増殖能力を失活したことを示す。従って、その二つの培地測定の結果の差は乳糖分解能力を失活したか、デソキシコール酸によって生育を抑制されたかを示すことになる。コンパクトドライ EC を用いた場合には、コロニーを形成できない大腸菌は、酵素（ β -グルクロニダーゼ）生成機能を制限されたことを示す。従って、その二つの培地の差は酵素（ β -グルクロニダーゼ）生成機能を制限されたことを示すことになる。

3. オゾン溶解水による大腸菌の不活化機構

オゾンは、その強い酸化力から不飽和結合を開裂させる力が強く、大腸菌においては細胞壁の脂肪酸の二重結合に作用し膜変性を起こし、溶菌させることにより消毒効果をもたらすといわれる³⁾。オゾン溶解水での反応としては、水中の溶存オゾンが大腸菌と直接反応するか、オゾンから生じるフリーラジカルが大腸菌と反応する間接反応があると考えられる。

4. 実験方面

4.1 実験方法

リン酸緩衝液（pH=6, 7, 9）400 mL にオゾンガスを20分間以上吹き込み、気液接触させ飽和オゾン水（0.11 mg/L）を作った。オゾン水を攪拌しながら試料4 mL を添加し30、60、90、120秒オゾン水と接触させた後、上述の3つの培地で培養測定し、20時間後に計数した。

4.2 実験結果

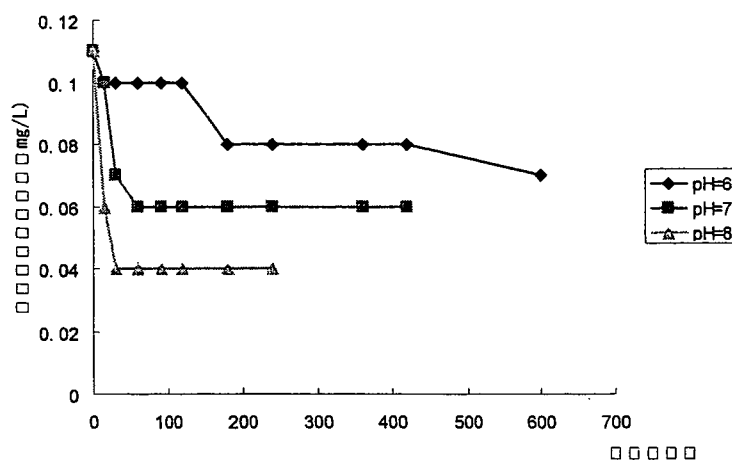


図1 オゾンの残留濃度

図-1は大腸菌投入後のオゾン溶解水中の溶存オゾン残留濃度を示したものである。pHが高いとオゾン分解が進み、安定性が低下するので、溶存オゾンが消費された量が多くなると考えられる。

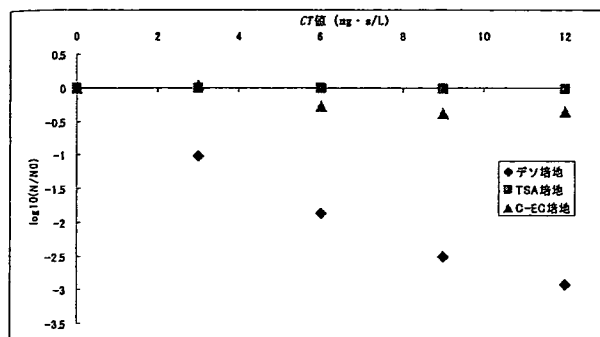


図2 pH=6 におけるオゾン処理による大腸菌の濃度変化

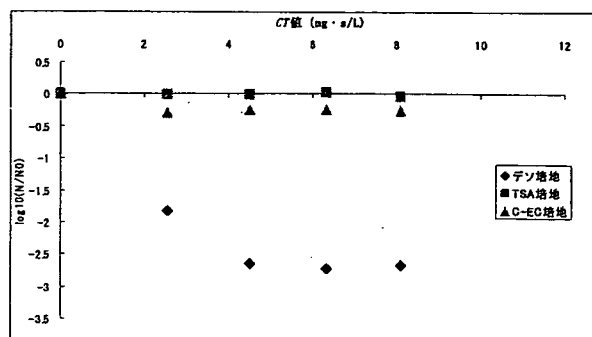


図3 pH=7 におけるオゾン処理による大腸菌の濃度変化

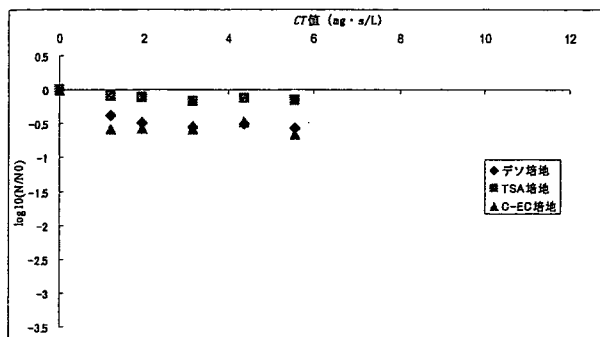


図4 pH=8 におけるオゾン処理による大腸菌の濃度変化

図2、3、4にオゾン溶解水による大腸菌の生存率変化を示した。ここでCT値は時間に対する溶存オゾン濃度変化の積算値であり、次式で求められる。 $CT値 = \int_0^T C dt$

C: 溶存オゾン濃度 (mg/l), T: 接触時間 (sec)

図2、3を見ると同じCT値であっても、デソキシコール酸寒天培地とTryptic Soy Agar培地によって測定される生存率に大きな差が生じた。この生存率の差は乳糖分解能力を失活したか、デソキシコール酸によって抑制されるようになる損傷、例えば外膜が損傷されたが増殖は可能であるような亜致死的損傷を示すものと考えられる。コンパクトドライEC培地による結果がTryptic Soy Agar培地に近いので、外膜の損傷といった軽度の損傷ではあるが、乳糖代謝能力は有しており、増殖は可能であるような大腸菌の割合が多いためと考えられる。pHが高くなると、デソキシコール酸寒天培地による不活化率は低くなるものの、他の培地との差が小さくなった。それはオゾンから生じるフリーラジカルが大腸菌に対して、重度の損傷を与えたためと考えられる。従ってpHが高い場合、大腸菌の測定によく使われるデソキシコール酸寒天培地の測定では、消毒効果の過大評価はあまり大きくないが、低pHでは、その可能性が非常に高くなると考えられる。

5. まとめ

pHがオゾンの消毒効率および消毒メカニズムに大きく影響することがわかった。また、中～低pHでは不活化後の大腸菌中に亜致死的な損傷の割合が大きく、デソキシコール酸寒天培地などの選択培地による消毒実験においては効果の過大評価を招く危険性があることがわかった。

参考文献

- 1) Rita R. Colwell, D. Jay Grimes, 培養できない微生物, 学会出版センター
- 2) Mossel, D.A. and P. van Netten. 1984. Harmful effects of selective media on stressed microorganisms: nature and remedies, p. 329-371. In M.H.E. Andrew and A.D. Russell (ed), *The Revival of injured microbes*. Academic Press, London, United Kingdom
- 3) Scott and Leshner 1963; Mudd et al. 1969; Hinze et al. 1987; Pryor et al. 1991

Primary Investigation on Rapid Quantification for Heterotrophic Bacteria Based on the Amount of Newly Synthesized DNA, by Yumiko OHKOUCHI (Graduate School of Eng., Kyoto Univ.), Yasuhiro ASADA (Faculty of Eng., Kyoto Univ.), Sadahiko ITOH (Graduate School of Eng., Kyoto Univ.)

1. はじめに

従属栄養細菌数 (以下, HPC) は, 浄水処理過程や消毒過程での細菌の挙動評価, あるいは塩素消失や滞留の結果としての細菌再増殖といった配水系の微生物汚染の状況評価に適することから, 2007 年の水道水質基準の改正により水質管理目標設定項目として追加され, データの蓄積が進められている。しかしながら, その測定には 7 日間を要することから, 給配水時間が短いわが国の水道システムにおいては HPC 測定結果のフィードバックによる水質管理は実現が難しいと考えられる。一方で, 消毒副生成物やカルキ臭の生成抑制を目的として, 残留塩素濃度の低減の検討が進められており, より厳密な微生物リスク管理が求められている。

そこで本研究では, 従属栄養細菌数の迅速測定法を確立するため, DNA 合成に着目した検出方法・条件を検討する。具体的には, 微生物増殖に伴う DNA 合成時に 5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) を用いて標識を行い, その定量的測定を試みる。

2. 実験方法

モデル微生物として, *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642; P17 株) および *Aquaspirillum* sp. NOX (ATCC 49643; NOX 株) を使用した。BrdU 標識および検出のための前処理操作については, Hamasaki らにより報告されている海洋微生物の増殖速度測定方法¹⁾を参考にして, 多検体同時処理が可能となるよう 96 穴マイクロプレートを用いた測定方法へと改変した。実験方法の流れを図 1 に示す。ペルオキシダーゼ (POD) 基質には ABTS を使用し, 基質添加から 2 時間経過した後に, マイクロプレートリーダーを用いて波長 405 nm (対照波長 = 490 nm) の吸光度を測定した。BrdU 溶液, ヌクレアーゼ, POD 標識 anti-BrdU 抗体, ABTS 溶液は, BrdU Labelling & Detection Kit III (ロシュ・ダイアグノスティックス) に同梱された試薬を使用した。本稿では, 以下の条件検討を行った。

- 1) BrdU 濃度の影響; 100, 500, 1000 nM
- 2) 培養時間の影響; 5, 7 hr
- 3) ブロッキング操作の有無
- 4) マイクロプレート表面処理の影響

3. 実験結果と考察

R2A 平板培地で求めた P17 株細胞数と波長 405 nm における吸光度との関係を図 2 に示す。この図から, 5 時間培養後の BrdU 標識 DNA 量は, R2A 平板培地により求めた P17 株細胞数の対数値に比例しており, 短時間の培養で検出が可能となることがわかった。また, BrdU 濃度の影響を調べたところ, BrdU 濃度が高いほど低濃度 HPC 領域において大きな吸光度の傾きが得られること, また高濃度 HPC 領域では吸光度が逆に低下してしまうこと, そのため BrdU 濃度により定量可能な HPC 濃度範囲が変化することが判明した。ここで, 水道水中の微生物濃度を想定すると, 今回検討を行った BrdU 濃度のうち 1000 nM が最も適していると考えられ, この時の定量可能 HPC の上限は 10^3 cfu/mL 付近となった。また, 定量下限は 0.5 cfu/mL 程度と十分に低いことが示された。

一方, NOX 株については培養時間を 7 時間に延ばした際に,

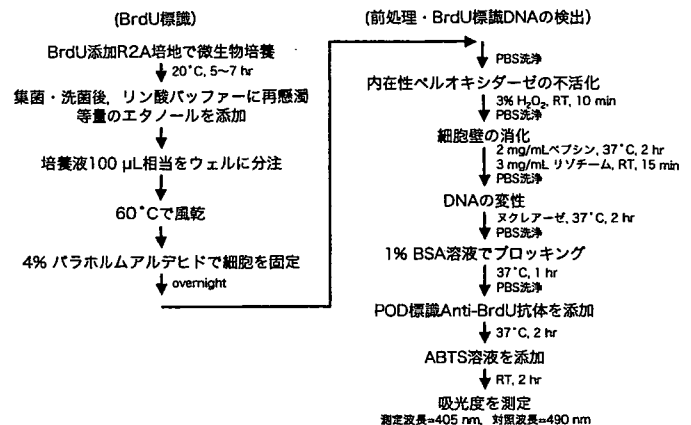


図 1 実験方法の流れ

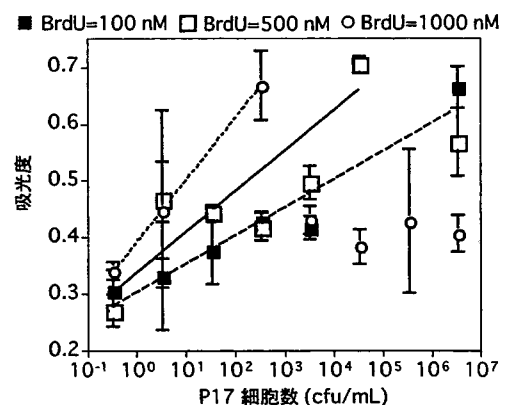


図 2 P17 株細胞数と吸光度の関係

BrdU 標識 DNA 量が細胞数の対数値に比例して増大した。実際の水道水試料では, 増殖速度の異なる微生物集団が検出対象となるため, 増殖速度の違いを考慮して適切な培養時間を選択することが必要と考えられる。

なお, 同一試料でもウェル間で大きく吸光度が変化するケースがあり, またマイクロプレートウェルの表面処理の有無によっても吸光度値が顕著に変化したことから, BrdU 標識した DNA を検出するために適したプレート種類や操作手順についても検討を重ねる必要があるだろう。

4. まとめ

本研究では水道水中の従属栄養細菌数の迅速測定を目的として, モデル微生物を用いて BrdU 標識条件, ならびにその検出条件の基礎的検討を行った。その結果, 5~7 時間の培養により標識 BrdU の定量的検出が可能であることを示した。また, 水道水中の微生物検出には, 1000 nM の BrdU 濃度が最適と判断された。また, プレートウェルの表面処理が測定値に大きく影響することもわかった。今後は, 本研究で提案した実験操作および条件が実際の水道水試料に対して適用可能性の検討を進める必要がある。

参考文献

- 1) Hamasaki, K., Long, R.A. and Azam, F.: Individual cell growth rates of marine bacteria, measured by bromodeoxyuridine incorporation, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 35, No., pp. 217-227, 2004.

配水過程における微生物再増殖と細菌種に及ぼす 管材質及び残留塩素の影響

国立保健医療科学院水道工学部 ○岩田 和隆
島崎 大
国包 章一

1. はじめに

水道法では、微生物学的な安全確保の視点から塩素消毒と残留塩素保持が義務づけられているが、その一方で塩素消毒剤由来の異臭味や消毒副生成物等により、過剰注入とならないよう、塩素剤の注入率を低減することも求められている。しかし、残留塩素濃度を下げることによって、消毒効果が弱まり、配水過程における微生物再増殖のポテンシャルは増大する。そのため、残留塩素濃度の低減を図ると同時に、微生物学的に安定した水質の水道水を提供する必要がある。本研究では、異なる管材質における微生物再増殖性の相違について実験的検討を行うとともに、グラム染色法および API キットを用いて生物膜中の細菌種の簡易同定を行った。

2. 実験方法

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、管路内における微生物の付着及び増殖を疑似的に再現した。試験片の材質は鋳鉄、SUS304、コンクリート被覆ポリカーボネートの3種類とし、順に系統1～3とした。

原水は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、各系統の試料水の遊離塩素濃度が 0.0mg/L となるように調整し、36日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した(表. 1)。ただし、通水開始28日後は、全系統において一時的に遊離塩素濃度を 0.7mg/L 前後となるように次亜塩素酸ナトリウム(以下、次亜という。)を添加し(表. 2)、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べた。流入量は 10mL/分に設定し、滞留時間を約 100 分(容積約 1L)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 22℃前後に維持した。流入水、流出水及び試験片表面に付着した微生物を週2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した。

また、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 3～4 日間培養後、独立したコロニーを釣菌し、再び普通寒天培地に 37℃で 2～3 日間培養し増菌させた後、増菌させた分離株各々についてパ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 及び API20NE (日本バイオメリュー(株))を用いて菌種の簡易同定を行った。

3. 結果と考察

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、AOC 濃度は 240 μ g/L と国内の他の測定例と比べて高く、微生物学的安定性が低い(微生物の再増殖性が高い)水質であったといえる。

系統2及び3においては、次亜添加後、設定した遊離残留塩素濃度に近い濃度となったが、系統1においては、試験片から多量の鉄が溶出するとともに、試験片表面が激しく酸化され、次亜添

表. 1 流入水の水質(平均値)

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