

従属栄養細菌に対する効果を以下の様にまとめた。

- 1) 飲料用タンクや水泳プールを対象とした研究から、*Protomonas* 属や *Pseudomonas* 属の塩素耐性は *E.coli* の 10~100 倍であった。
- 2) 下水における調査報告では、従属栄養細菌、*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* の紫外線感受性は、0.113, 0.129 0.201  $\text{cm}^2/\text{mJ}$  であった。従属栄養細菌では、高耐性の細菌の存在が示唆していた。
- 3) 同じく下水処理における別報告では、*Pseudomonas aeruginosa* の紫外線消毒後の光回復はみられなかった。
- 4) 222 nm の照射光と 254 nm の照射光を比較したところ、芽胞菌では、222 nm の方が効果が高いが、*Pseudomonas aeruginosa* は 254 nm の方が効果が高い。

## C. 2. 実験結果

### C. 2. 1. 異なる培地を用いた方法

*P. aeruginosa* (ATCC 15422) を培養して適度に希釈した溶液に紫外線を照射し、その濃度を 3 種の培地にて計測した結果、Fig.1 に示すような、いずれも同様な不活化速度を示した。

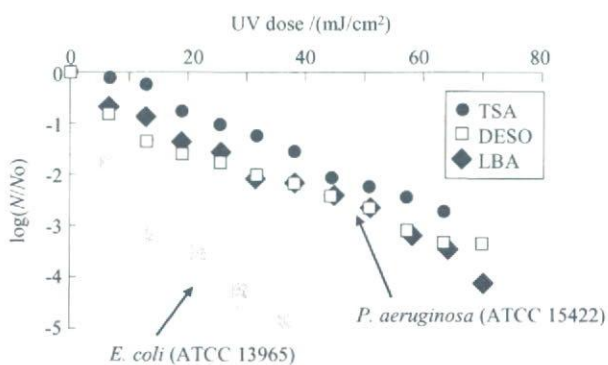


Fig.1 紫外線照射による *P. aeruginosa* の濃度変化を 3 種の培地にて測定

また併せて大腸菌株の 1 つである *E.coli* (ATCC 13965) の紫外線照射による濃度変化も測定し、その結果を示した。

### C. 2. 2. 細菌ファージを用いた感染試験方法

Fig.2 は異なる紫外線線量に曝露させた大腸菌に Q $\beta$  を投入した場合の濃度変化を示したものである。これは、主に吸着速度および吸着量を示したものである。紫外線照射が増えるに従って、吸着速度が遅くなっていることがわかる。

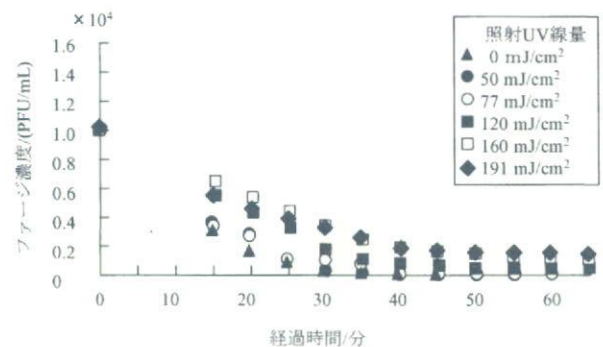


Fig.2 紫外線照射後の大腸菌溶液に投入した Q $\beta$  ファージの濃度変化

Fig.3 は異なる紫外線線量に曝露した大腸菌に Q $\beta$  を投入して、溶液中の Q $\beta$  濃度変化を観察したものである。一旦、吸着により溶液中濃度は減少するが、再び増加する減少が見られた。これは大腸菌に感染した Q $\beta$  が増殖して、再び溶液中に現れたことを意味している。

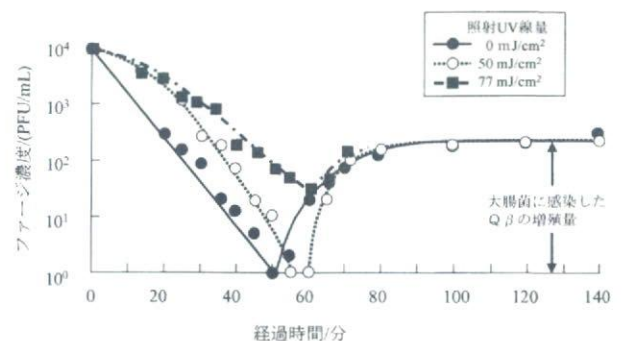


Fig.3 UV 照射後の大腸菌溶液に投入した Q $\beta$  濃度の時間変化

### C. 2. 3. 消毒後の細菌の運動性の評価

Fig.4~6に、異なる寒天濃度の栄養培地にてスポット滴下した *Pseudomonas* 細菌によって生じる巨大コロニーの直径を示した。いずれの図も紫外線消毒 (40 mJ/cm<sup>2</sup>照射) 前後におけるコロニーの直径を比較している。

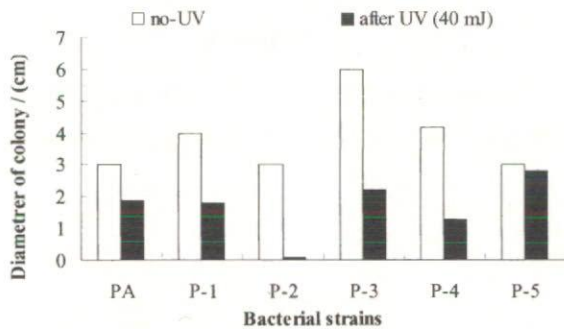


Fig.4 寒天濃度 0.3%における UV 消毒処理前後の *Pseudomonas* 菌による形成コロニー径

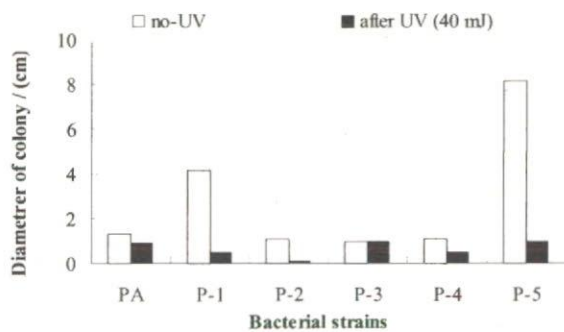


Fig.5 寒天濃度 0.5%における UV 消毒処理前後の *Pseudomonas* 菌による形成コロニー径

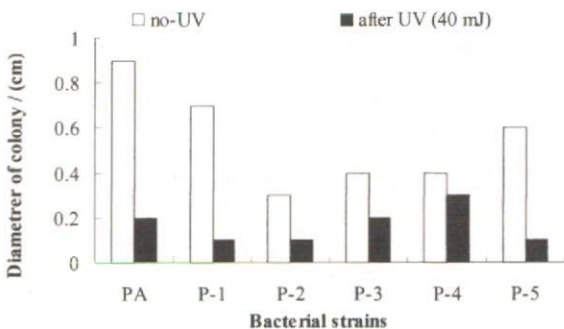


Fig.6 寒天濃度 1.0%における UV 消毒処理前後の *Pseudomonas* 菌による形成コロニー径

図中の菌名は、PA が *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC1522)として購入したもの、P-1~P-5 は下水処理水から単離培養した *Pseudomonas* の野生株であることを示している。

Fig.4 は寒天濃度 0.3%での数種の *Pseudomonas* 菌の運動性を示したものである。形成コロニー径の大きさによって、細菌の個々の移動性 (Swimming ability) が評価される。

Fig.5 は寒天濃度 0.5%での実験結果を示している。この場合は、細菌が集団的に増殖し移動していく活性 (Swarming ability) が評価される。

Fig.6 は寒天濃度 1.0%での実験結果である。この場合は生物膜形成能力に大きく関わっていると考えられている。

### C. 3. 3. T-RFLP 法の適用

T-RFLP 法を適用するには、サンプル中の対象菌の遺伝子を適切なプライマーを用いて PCR 法により増幅させる必要がある。今回、紫外線照射後の *Pseudomonas* 菌に PCR 法にての DNA 増幅を試みた結果、Fig.7 に示すとおり、照射後の細菌における増幅量が著しく減少した効果が見られた。

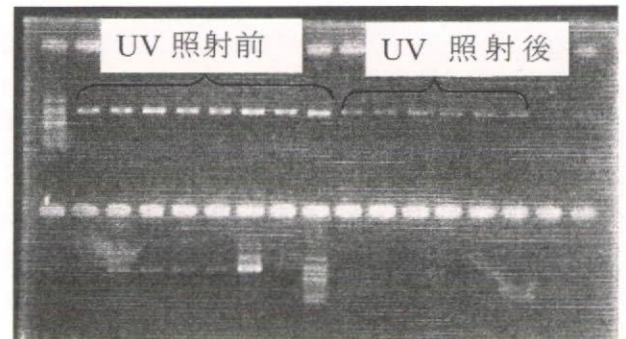


Fig.7 紫外線照射前後における *Pseudomonas* 菌の PCR 後の増幅 DNA の蛍光バンド

現在、増幅量が減少する様な場合、予備的な培

養をしておく方法など事前処理について検討している。

#### D. 考察

##### D. 1. 異なる培地を用いた方法

Fig.1 の結果から、3種の培地の結果が同じになったのは、紫外線照射の殺菌機構が、DNA 損傷によるものであり、細胞膜に特異な変化を与えたり、特定の代謝機構が損なわれるものではないということからも説明される。ただし2種の非選択培地に若干の違いが見られており、実験回数を増やして、再現性を含めて今後検証していく必要がある。また、併せて示した大腸菌の耐性試験結果と比べると、緑膿菌 (*Pseudomonas* 属) は紫外線耐性が高いことが示唆される。

##### D. 2. 細菌ファージを用いた感染試験方法

Fig.8 は、Fig.2 を元にして、ファージが感染出来なくなった大腸菌数の推定値である。この図から紫外線照射が増えるに従ってその数が増えていることがわかる。

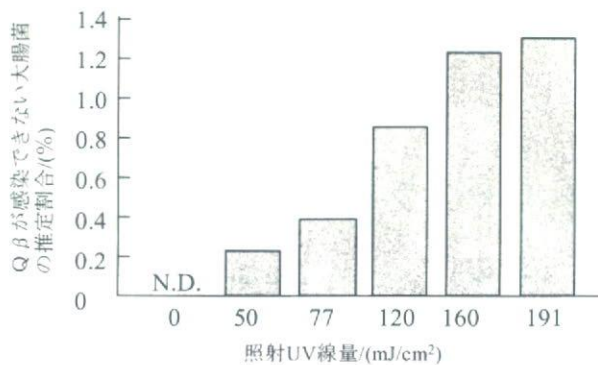


Fig.8 UV 照射後 45 分後における Qβ が感染出来ない大腸菌の推定値 (N.D.: 検出限界以下)

また Fig.3 に示される後半部分の溶液中濃度増加は即ち大腸菌に感染した Qβ が増殖して増えたことを意味する。即ちこの増加分は代謝機能を

有し活性化した大腸菌の存在数を示すものであると考えられる。この増分を比較してみると紫外線線量に曝露していない大腸菌に比べて、曝露線量が増加するに従って、増分が少なくなっている。即ち活性化大腸菌の存在数が少なくなっていることがわかる。

##### D. 3. 消毒後の細菌の運動性の評価

Fig.9 は、Fig.4~6 の結果から、UV 照射前後におけるコロニー径の比率を示したものである。比率が小さいほど、UV 照射後の運動性が低くなったことを示す。同じ紫外線照射条件であるので、3つの寒天実験のいずれにおいても存在菌数ならびに増殖可能な菌数は同じであるが、その運動性の減少率には大きな差が生じた。*Pseudomonas* 菌の種類によって、その特徴は異なるが、6種のうち3種は、寒天濃度が高い程、比率が小さくなるという傾向を示した。これは個々の運動性の減少よりも、生物膜形成能力の減少の度合いが高いことを示していると考えられる。

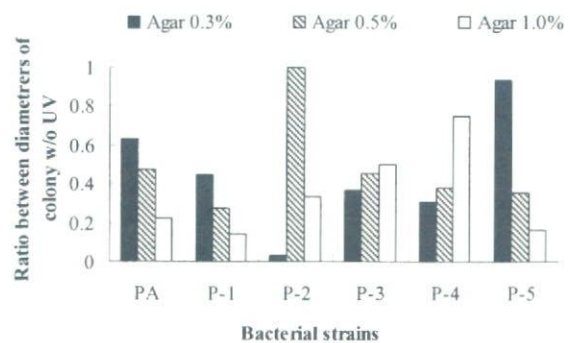


Fig.9 UV 照射前後の *Pseudomonas* 菌の形成コロニー径の比率

#### E. 結論

病原微生物以外の一般細菌や従属栄養細菌に対する各種消毒法の効果に関しては、定量的な考察を行っている先行研究が余り多く見つからず、

今後も論文検索が必要である。これまでのレビュー結果からは、*Pseudomonas*などを対象とした場合、往々にして消毒耐性は大腸菌に比べると高い傾向がみられた。

消毒効果の評価方法として、様々な方法の適用が可能かどうか検討した。

大腸菌において既に実績のある異なる培地を用いての方法は *Pseudomonas* に対しても有効に用いることができることがわかった。

ファージの感染性を用いての細菌の代謝機能評価については、紫外線消毒をケーススタディーとして検討した結果、ファージの吸着速度および増殖速度の2つの観点からの評価方法が可能であることがわかった。今後、他の消毒方法に対しての適用が可能であると考えられる。

異なる寒天濃度を用いた細菌の運動性、移動性試験によって、*Pseudomonas* の個々の運動性、生物膜形成能などが測定できることが確認できた。紫外線消毒をケーススタディとして検討した結果、生物膜形成能に影響が大きい種が多く見られた。この方法も他の消毒方法に対して適用が可能であると考えられる。

T-RFLP 法については、その前処理段階である PCR による DNA 増幅において紫外線照射によっても PCR 阻害が生じるため、何らかの工夫が必要であった。今後の検討課題である。

#### 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

大瀧雅寛，溝添倫子，林紗綾佳（2009）紫外線

および二酸化塩素処理における大腸菌の細胞損傷レベルの測定，第60回全国水道研究発表会講演集（発表予定）。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(該当無し)

浄水中有機物と配水管路における  
微生物再増殖モニタリング手法に関する研究

研究分担者 伊藤 禎彦  
研究協力者 大河内 由美子

## 浄水中有機物と配水管路における微生物再増殖モニタリング手法に関する研究

研究分担者 京都大学大学院工学研究科 伊藤禎彦  
研究協力者 京都大学大学院工学研究科 大河内由美子

### 研究要旨

本研究では、日本の給配水状況に適した微生物再増殖モニタリング手法を検討するとともに、求められる水質管理手法を探索するための基礎情報を収集した。BrdU を添加した R2A 液体培地中でモデル微生物を 5 時間培養することで新たに複製された DNA を標識し、標識 DNA 量を免疫学的手法により測定した結果、0.1～1000 CFU/mL の範囲では標識 DNA 量に基づいて試料中の従属栄養細菌数を予測することが可能となった。また、適切なネガティブコントロールを設定することにより、測定回毎に変動するブランク値を安定させることができた。本手法を水道水試料に適用した結果、同じ濃度範囲で標識 DNA 量と従属栄養細菌数との間に相関が確認されたが、試料ごとにその関係性は大きく変動し、検出方法に関してさらに検討を重ねる必要がある。一方、各浄水処理プロセス水ならびに給水栓水中の AOC 濃度を調べた結果、特に冬季の試料中には高濃度の AOC が残存していること、また高度浄水処理の AOC 低減効果は限定的であることが示された。この理由として、生物活性炭層内の微生物叢が未成熟であったことが考えられる。また、微生物が多く存在する試料の前処理方法としては、無機化合物フィルターを用いたろ過除菌が適切であることを示した。

### A. 研究目的

浄水中には生菌や不活化された微生物、それらに由来する物質が存在している。給配水過程においては、ごく微量に残存する同化可能有機炭素(AOC)を炭素源としていったん不活化された微生物が再増殖する現象が確認されており<sup>1)</sup>、残留塩素を維持することで再増殖現象を抑止しているのが現状である。現状のまま残留塩素濃度を低減すれば、再増殖微生物による健康リスクの増大あるいは水質悪化による快適性の低下は不可避であり、より厳密な水質管理および微生物マネジメント手法が求められる。

そこで本研究では、求められる水質管理手法を探索するための基礎情報として、水道水中の微生物増殖関連因子項目の現状レベルを調べるとともに、日本の給配水状況に適した微生物再増殖モニタリングを目的として浄水中の従属栄養細菌数を迅速に測定する手法を確立する。具体的には、給水栓水中 AOC 濃度に関するデータを収集するとともに、コロニー形成数により測定する従属栄養細菌数の代替手段として、低濃度有機物存在下で短時間の培養を行い新たに合成された DNA 量の測定を行うことで、その栄養条件下で増殖活性を有する微生物を検出する。新規に合成された DNA は 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を用いて標識したうえで標識 DNA の定量的検出方法を確立し、実際に給配水系統から採取した水道水試料に対する適用可能性を検討する。

### B. 研究方法

#### 再増殖微生物モニタリング手法に関する検討

##### 1) BrdU 標識 DNA の定量方法の確立

モデル微生物として、*Pseudomonas fluorescens* P17 株を用い、DNA 合成活性を指標とした従属栄養細菌定量を試みた。ハロゲン化 DNA アナログである BrdU を添加した R2A 液体培地中で短時間培養し、DNA 複製に伴い取り込まれた BrdU を免疫学的手法により検出する方法である。微生物濃度がおよそ  $10^{-1}$ ～ $10^5$  (cfu/mL)とな

るよう R2A 液体培地を用いて培養液の段階希釈を行った後に、微生物懸濁液の細胞数を測定するため R2A 寒天培地を用いて 20°C、7 日間培養した。同時に、残りの培養液に対して BrdU を添加し、ラベリング反応を行った。続いて、BrdU 標識 DNA の検出・定量方法の基礎的検討として、測定値の安定性に関する検討を行った。具体的には免疫学的検出する際の酵素基質溶液 (ABTS 溶液) の要時調製に加えて、ネガティブコントロールの設定を試みた。ネガティブコントロールは滅菌 R2A 培地に BrdU のみを添加した試料とし、微生物溶液 (*P. fluorescens* P17 株) 試料と同様に遠心回収・洗浄、固定化および抗原抗体反応の各操作を行ったうえで吸光度測定値から差し引いた。ラベリング反応はすべて、BrdU 濃度 1  $\mu$ M、反応時間 5 時間、温度は 20°C で行った。

## 2) BrdU ラベル化法の水道水試料への適用

近畿地方の A 市 B 浄水場配水区、C 市 D 浄水場配水区において、それぞれ 6 カ所の給水栓から採水を行った。C 市における採水は 10 月末と 12 月上旬の 2 回、A 市の採水は 1 月に行った。採水後実験室に持ち帰り、水道水試料の残留塩素を中和した後に 20°C で培養し、0、2、3 または 4 日目、6 日目にサンプルを一部採取し、従属栄養細菌数の測定と BrdU ラベリング反応を行った。BrdU ラベリング反応は水道水試料 1 mL に 5 $\times$  R2A 液体培地を 0.25 mL 添加し、BrdU を 1  $\mu$ M となるよう添加した後に 20°C で 5 時間反応させた。集菌・洗菌後、水道水試料 100  $\mu$ L 相当量をマイクロプレートウェルに固定化、細胞壁溶解等の前処理を行った後、抗原抗体反応により BrdU 標識 DNA 量を測定し、培養法による従属栄養細菌数との照合を行った。

従属栄養細菌数が検出下限 (1 CFU/mL) 以下になると予想される 0 および 2 日目の試料については、通常の R2A 平板培地培養に加えて、孔径 0.2  $\mu$ m の滅菌済メンブレンフィルターでそれぞれ 50 mL、10 mL 試料中の微生物を捕集し、R2A 液体培地 2 mL を含ませた吸収パッド入りペトリディッシュ ( $\phi$  47 mm) で 20°C、7 日間培養した。本研究ではこの方法をメンブレン法と呼ぶ。

## 浄水中同化可能有機炭素に関する検討

### 1) AOC 測定のための前処理方法に関する検討

AOC 測定はバイオアッセイ手法であるため、対象試料中に元々従属栄養細菌が多く存在した場合には、試験株である *P. fluorescens* P17 株および *Aquaspirillum* sp. NOX 株とこれらの常在性細菌との間で競合的な基質利用が起き、AOC として正確な測定ができない可能性がある。一般的には、70~75°C で 30 分の熱処理を行うことにより常在性細菌を不活化した後に試験株の植種を行うが、一部の細菌はこの処理では不活化されないことが指摘されている<sup>2)</sup>。そこで本研究では、AOC 測定のための前処理方法として、ろ過除菌方法に関する検討を加える。検討したろ紙の材質はそれぞれ親水性ポリエーテルスルホン (PES)、親水性 PTFE、酸化アルミニウムで、孔径はすべて 0.2  $\mu$ m のものを用いた。約 1 L の Milli Q 水を通水した後の Milli Q 水中 TOC 濃度、AOC 濃度を測定し、給水栓水ろ過前後での変化を調べた。さらに一部のフィルターでは、実際の給水栓水を用いて同様の試験を行った。AOC 測定の前処理として熱殺菌を行う場合には 70°C、30 分の加熱を行うこととした。

### 2) 採水調査

調査地点は、A 市 B 浄水場 (前塩素-凝集沈殿-急速ろ過-後塩素) の給水区域から 6 地点、C 市 D 浄水場 (凝集沈殿-中オゾン-急速ろ過-後オゾン-活性炭-塩素混和) の給水区域から 6 地点をそれぞれ選定した。調査は冬季 (1 月) に実施し、TOC、AOC、従属栄養細菌数、遊離塩素濃度、結合塩素濃度の各項目について測定を行った。また、残留塩素を中和後 20°C にて培養し、再増殖した HPC を平板培養法により経時的に測定した。なお、HPC 数が少ないことが予想される試料に対しては、メンブレン法による測定も同時に行った。

また、浄水処理過程における AOC 濃度の変化を調べるため、C 市 D 浄水場にて 12 月および 1 月に採水調査を行った。測定項目は、TOC、AOC、従属栄養細菌数である。

### C. 研究結果

#### 再増殖微生物モニタリング手法に関する検討

##### 1) BrdU 標識 DNA の定量方法の確立

抗原抗体反応において酵素基質として使用する ABTS 溶液を要時調製に切り替えたが、測定値の変動は抑制できなかった。そこで、続いてネガティブコントロールを設定し、測定値の補正を試みた。得られた結果を昨年度の検討結果と併せて図1に、各回帰式を以下に示す。

①:  $y = 0.109 \cdot \log(x) + 0.388$   $R^2 = 0.881$

②:  $y = 0.0939 \cdot \log(x) + 0.584$   $R^2 = 0.612$

③:  $y = 0.0543 \cdot \log(x) + 0.0414$   $R^2 = 0.728$

昨年度の結果では、測定回毎にブランク値(y 切片相当値)が大きく変動していたが、今回設定したネガティブコントロール値を用いて補正を行うことで、ブランク値を大幅に低下させることが可能になった。なお、1000 CFU/mL を超える領域では、吸光度値の低下が見られたため、これ以降の検討では定量可能範囲の上限を 1000 CFU/mL とした。

##### 2) BrdU ラベル化法の水道水試料への適用

全域で高度浄水処理水が供給されている C 市の採水試料では、残留塩素中和後の全ての試料で従属栄養細菌の再増殖が確認された。急速ろ過処理水が供給されている A 市の採水試料の一部では再増殖が起らなかった。C 市給水栓水試料中の再増殖微生物の比増殖速度は 10 月末では  $0.068 \text{ hr}^{-1}$  以上(倍加時間  $\leq 10.2 \text{ hr}$ )、12 月上旬では  $0.087 \text{ hr}^{-1}$  以上(倍加時間  $\leq 7.7 \text{ hr}$ )と計算された。

従属栄養細菌数と BrdU 標識 DNA 量との関係を図 2 に示す。算出した回帰式はそれぞれ以下の通りであり、回帰式の傾きはこれまで示してきた値よりさらに小さい値となっている。なお、C 市の給水栓水ではネガティブコントロール補正を行っていない。

C 市 1:  $y = 0.0282 \cdot \log(x) + 0.208$   $R^2 = 0.868$

C 市 2:  $y = 0.0165 \cdot \log(x) + 0.0731$   $R^2 = 0.632$

A 市:  $y = 0.0837 \cdot \log(x) + 0.0364$   $R^2 = 0.530$

#### 浄水中同化可能有機炭素に関する検討

##### 1) AOC 測定のための前処理方法に関する検討

各フィルターによるろ過前後または約 1L 通水後の Milli Q 水中 TOC および AOC 濃度を、表 1 に比較して示す。PES フィルターを用いた場合にはろ過後の TOC が大幅に増大し、約 1L 通水した後もおよそ  $0.8 \text{ mgC/L}$  と非常に高い値を示した。AOC に関しては TOC に比べて上昇幅は小さいもののおよそ 1.6 倍の上昇を示したことから、フィルターからの有機物溶出が疑われる。親水性 PTFE フィルターを用いた場合には、ろ過開始直後のろ

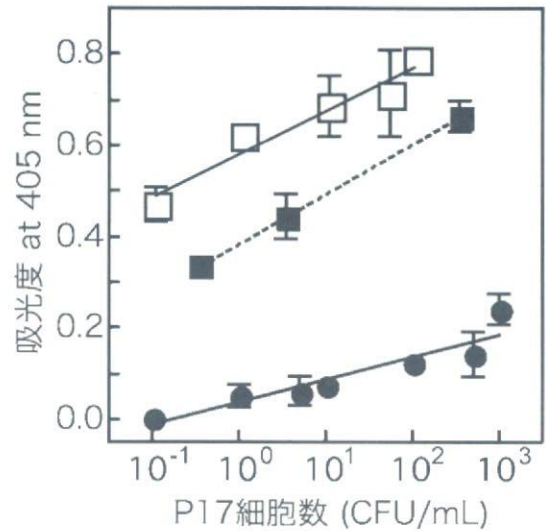


図1 P17 株コロニー数と BrdU 標識 DNA 量との関係

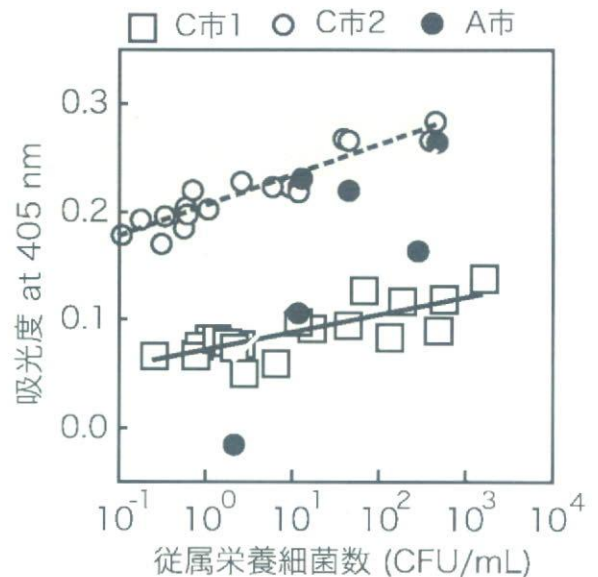


図2 従属栄養細菌数と BrdU 標識 DNA 量との関係



液と比較して約 1L 通水後のろ液中でも TOC・AOC 濃度が増大しており、PES フィルターと比較して極微量ずつではあるものの有機物溶出が継続していることが示唆された。一方、酸化アルミニウムフィルターを用いた場合にはろ過開始直後にはわずかに TOC 増大が認められたものの、約 1L 通水後には TOC 濃度の変化は見られなかった。また、AOC に関しても 1L 通水後では大きな濃度変化は見られなくなった。

さらに、実際の給水栓水を用いて洗浄後の酸化アルミニウムフィルターろ過前後における AOC 濃度の変化を調べたところ、給水栓水についても大きな AOC 濃度変化は確認されなかった(ろ過前: 145.3 $\mu$ gC/L, ろ過後: 152.6  $\mu$ gC/L)。

表 1 フィルター材質が AOC 測定に及ぼす影響

フィルター材質	TOC (mgC/L)			AOC ( $\mu$ gC/L)		
	Milli Q水	ろ過後Milli Q水	約1L通水後のMilli Q水	Milli Q水	ろ過後Milli Q水	約1L通水後のMilli Q水
PES	0.479	1.944	0.822	54.4	86.7	-
親水性PTFE	0.346	0.457	0.516	137.7	152.8	171.0
酸化アルミニウム	0.327	0.473	0.268	115.1	-	112.9

## 2) 採水調査

冬季に採水を行った A 市給水栓水および C 市給水栓水中の有機物濃度、残留塩素濃度、および従属栄養細菌数の比較を表 2 に示す。ここでは、前課題で実施した夏季採水時の A 市給水栓水中の各測定結果を併せて示した。両配水区とも給水栓水中で平均 0.3 mgCl<sub>2</sub>/L を下回らない高いレベルの残留塩素が検出され、従属栄養細菌数も 1 CFU/mL 未満と十分に不活化されていた。夏季の給水栓水中平均 AOC 濃度(A 市)が 59.8 $\pm$ 15.6  $\mu$ gC/L であったのに対して、冬季は高度浄水処理が導入されている C 市の平均値が 136.0 $\pm$ 36.2  $\mu$ gC/L、急速ろ過方式の A 市で 173.9 $\pm$ 43.5  $\mu$ gC/L と、ともに有意に高い値を示した。一方、浄水処理方式による冬季の AOC 濃度の差異はわずかであった。また、AOC-NOX 成分は季節変動が小さいのに対して、AOC-P17 成分は冬季に大幅に増大していることがわかった。

表 2 給水栓水中の微生物増殖に関連する水質項目測定結果  
(\*:  $p < 0.01$ , A 市夏季データとの比較)

測定項目	A市		C市
	5-6月	1月	1月
試料数	n = 40	n = 6	n = 6
HPC (CFU/mL)	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 1.9
TOC (mgC/L)	1.8 $\pm$ 0.25	-	1.3 $\pm$ 0.13*
残留塩素 (mgCl <sub>2</sub> /L)	0.52 $\pm$ 0.13	0.30 $\pm$ 0.06*	0.31 $\pm$ 0.11*
遊離塩素	0.4 $\pm$ 0.12	0.25 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.10*
結合塩素	0.12 $\pm$ 0.02	0.088 $\pm$ 0.03	0.096 $\pm$ 0.02
AOC ( $\mu$ gC/L)	59.6 $\pm$ 15.6	173.9 $\pm$ 43.5*	136.0 $\pm$ 36.2*
AOC-P17	39.5 $\pm$ 13.8	135.6 $\pm$ 41.7*	104.7 $\pm$ 37.1*
AOC-NOX	20.3 $\pm$ 9.6	38.3 $\pm$ 11.0*	31.2 $\pm$ 3.9

また、残留塩素中和後に 20 °C で培養した時の再増殖微生物数の経時変化を表 3 に示す。ここでは、通常の平板培養法で 1 CFU/mL となった試料についてはメンブラン法による測定値を代わりに示した。表中に計数不能と示した部分は、試料希釈が十分でなかったため平板上に生育したコロニー数を計数することができなかつ

表 3 給水栓水中の再増殖微生物数の経時変化

試料 No.	配水区	浄水処理方式	従属栄養細菌数 (CFU/mL)			
			0日目	2日目	4日目	6日目
1	A市	急速ろ過処理	0.07	13.4	計数不能	計数不能
2			0.1	0.12	520	計数不能
3			0.01	0.2	15.3	306
4			0.06	6.5	1597	計数不能
5			0.03	1.7	計数不能	計数不能
6			0.19	1.8	38	515
7	C市	高度浄水処理	0.01	6	18	3224
8			0.02	0.02	10	2933
9			4.7	21.3	32	計数不能
10			0.04	0.12	5	58.5
11			0.07	7	11	716
12			0.03	1.3	4.3	169

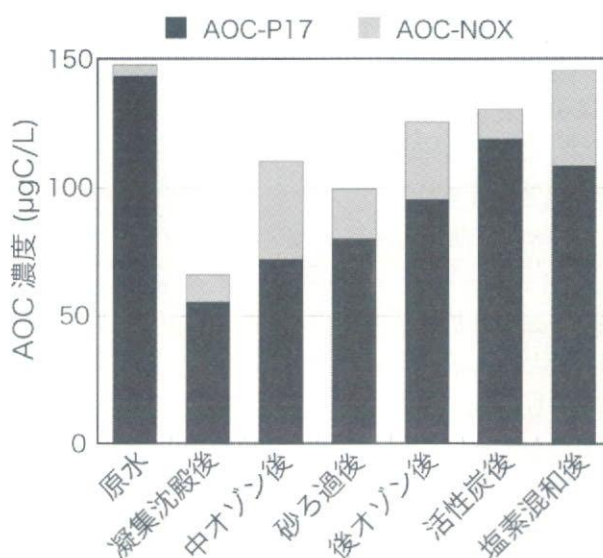


図 3 C市D浄水場処理過程におけるAOCの変化

表 4 C市D浄水場処理過程における従属栄養細菌数・TOCの変化

採水地点	従属栄養細菌		TOC	
	測定値 (CFU/mL)	除去率 (%)	測定値 (mgC/L)	除去率 (%)
原水	10300	-	2.04	-
凝集沈殿後	4472	58.6	1.70	16.7
中オゾン後	47	99.5	1.68	17.6
砂ろ過後	37	99.6	1.45	28.9
後オゾン後	2	100	1.45	28.9
活性炭後	5	100	1.15	43.6
塩素混和後	1	100	1.14	44.1

たものであり、少なくとも 1000 CFU/mL 以上のコロニーが存在していた。また、6 日目には A 市の多くの試料で計数不能となった。試料ごとに微生物再増殖速度は異なるが、平均的に見ると A 市の給水栓水中では C 市のそれに対して大きな再増殖速度が得られたことが示唆される。

最後に、C 市 D 浄水場で実施した採水調査により得られた各プロセスにおける AOC 濃度の変化を図 3 に、TOC および従属栄養細菌数の変化とその除去率を表 4 に示す。2 回行った採水試料の平均値を採用した。また生物活性炭処理後の AOC 測定を行う際には、1) で選定した洗浄後の酸化アルミニウムフィルターで予めろ過した試料を用いた。凝集沈殿後および砂ろ過後の試料で AOC 濃度の低減が確認されたが、最終処理水の AOC 濃度は原水とほぼ同レベル (約 150 μgC/L) が残存しており、浄水処理プロセスによる AOC 濃度低減効果は確認されなかった。オゾン処理後または塩素処理後の試料で AOC-NOX 成分の割合増大が確認されたものの、全体を通して AOC-P17 成分が占める割合が非常に大きいことも明らかになった。

## D. 考察

### 再増殖微生物モニタリング手法に関する検討

BrdU ラベリング—免疫学的検出の一連のプロトコルを通して、ネガティブコントロールを適切に設定することにより、測定値の安定性向上を図ることができたと考えられる。ただし、昨年度の結果と比較すると得られた回帰式の傾きが若干低くなっている。この原因は未解明であるが、試験に供した *P. fluorescence* P17 株の増殖ステージの違い、すなわち増殖速度の違いに起因している可能性がある。

また、同様の手法を実際の給水栓水に適用した結果、A 市給水栓水、C 市給水栓水ともに、約 0.1 ~1000 CFU/mL の範囲で従属栄養細菌数の増加に伴って BrdU 標識 DNA 量も増大する傾向が確認された。ただし、両者の相関は試料ごとにまちまちであり、現在のところ一定の関係性は得られていない。特に、C 市給水栓水では得られた回帰直線の傾きが大幅に低下している。その原因として、試料中に存在する微生物種の増殖速度の違いが影響している可能性もあるが、形成されたコロニー観察からは A 市給水栓水のそれとそれほど大きな差は見られなかったことから、他の要因が大きく影響したと考えられるのが妥当であろう。他の要因としては、a) BrdU 標識効率の低下、b) 細胞固定化率の低下、c) 前処理効率の低下、d) 抗体標識酵素活性の低下の各ステップが挙げられる。また、現在のプロトコルでは抗体を標識している酵素（ペルオキシダーゼ）と基質（ABTS 溶液）との反応は室温で行っているため、室温低下の影響を受けている可能性も考えられる。今後は、安定した酵素活性を得るために温度制御下で呈色反応を行うとともに、反応阻害がどのステップで起こっているかを特定する必要がある。

このように、現在適用している手法には BrdU 標識 DNA を菌体内に有する微生物細胞をマイクロプレートウェルに固定化した後、その細胞壁・細胞膜を溶解し、さらに DNA を変性させるというステップがあり、これらの各ステップが結果に大きく影響した可能性を考えると、BrdU 標識後の細胞から標識核酸を抽出して試験に供することが望ましいと考えられる。

### 浄水中同化可能有機炭素に関する検討

AOC 測定前の殺菌方法として、上水試験方法では 75 °C、30 分の熱処理が推奨されている<sup>3)</sup>。本研究では、Standard Methods<sup>4)</sup>と同様 70 °C、30 分の加熱処理を行ったが、原水試料あるいは生物活性炭後の試料等の一部で試験菌株以外の微生物増殖が確認されたことから、試料中に多くの微生物が存在する場合にはこの条件では十分な殺菌ができていなかったと考えられる。加熱処理の温度を上げる、または処理時間を長くといった対処法は AOC 画分の増大を招く可能性があるため、本研究で試みたフィルターによる除菌は、微生物が多く存在する試料に対して有効な前処理方法となりうる。

採水調査の結果、冬季に給水栓水中の AOC が増大する傾向が確認されたが、浄水場出口の AOC を測定していないため、この季節変動が原水の水質変動によるものか、あるいは低水温により配水過程で消費される AOC 量が減少したためかは特定できていない。しかし、サンプリング時期は異なるものの、C 市 D 浄水場の塩素混和後試料の AOC 濃度は末端給水栓水の値と同程度であったことから、低水温となる冬季には配水過程における AOC 消費はほとんど見られず、原水水質の変動が最終処理水の AOC 増大に寄与していると推察される。また、AOC-P17 成分が高濃度で残存し AOC の大部分を占めていたことから、水質改善策を考える際には主にカルボン酸から構成される AOC-NOX 成分よりむしろ AOC-P17 成分を構成する低分子量有機物、例えばアミノ酸、糖類、アルコール、芳香族酸等の除去を中心に考える必要があるだろう。

一方、高度浄水処理過程で AOC 除去に重要な役割を果たすとされている生物活性炭<sup>5)</sup>であるが、今回の測定結果では明確な除去効果は得られなかった。表 4 に示したとおり、活性炭流出水中の従属栄養細菌数も他の浄水場データ（数千～数万 CFU/mL）と比較して極端に低い値を示していた<sup>6)</sup>ことから、活性炭層内の微生物叢が未成熟であったことが強く示唆される。低水温期であることも重なった結果として、最終処理水の AOC 濃度は原水とほとんど変わらない濃度を示した。また、データは示していないが、プロセスごとの AOC 変化の傾向は 2 回の測定で必ずしも同一ではなかった。これらの結果は、処理水中に残存している高分子物質をも含む生分

解性有機物画分 (BOM: Biodegradable Organic Matter) から新たに AOC が生成することを示している。AOC は易分解性有機物画分を測定対象としており、低濃度まで測定可能であることから微生物学的安定性の指標として用いられる。そのため、日本のように比較的給配水時間の短い配水システム内における微生物学的安定性の指標としては非常に有用と考えられる一方、浄水処理による微生物学的安定性を論じる際には、AOC のみならず BOM にも着目した評価が望ましいことが示唆された。

## E. 結論

本研究では、日本の給配水状況に適した微生物再増殖モニタリング手法を検討するとともに、求められる水質管理手法を探索するための基礎情報を収集した。BrdU を添加した R2A 液体培地中でモデル微生物を 5 時間培養することで新たに複製された DNA を標識し、標識 DNA 量を免疫学的手法により測定した結果、0.1～1000 CFU/mL の範囲では標識 DNA 量に基づいて試料中の従属栄養細菌数を予測することが可能となった。また、適切なネガティブコントロールを設定することにより、測定回毎に変動するブランク値を安定させることができた。本手法を水道水試料に適用した結果、同じ濃度範囲で標識 DNA 量と従属栄養細菌数との間に相関が確認されたが、試料ごとにその関係性は大きく変動し、いずれかの反応ステップにおいて阻害されたと考えられるため、検出方法についてはさらに検討を重ねる必要がある。一方、各浄水処理プロセス水ならびに給水栓水中の AOC 濃度を調べた結果、特に冬季の試料中には高濃度の AOC が残存していること、成分別にみると AOC-P17 成分の占める割合が非常に高いこと、また高度浄水処理の AOC 低減効果は限定的であることが示された。この理由として、生物活性炭層内の微生物叢が未成熟であったことが考えられる。なお、微生物が多く存在する試料の AOC 測定前処理方法としては、無機化合物フィルターを用いたろ過除菌が適切であった。

## 参考文献

- 1) van der Kooij, D.: Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth, *J. Am. Water Works Assoc.*, Vol. 84, pp.57-65, 1992
- 2) Escobar, I. C. and Randall, A. A.: Sample storage impact on the assimilable organic carbon (AOC) bioassay, *Water Res.*, Vol. 34, No. 5, pp. 1680-86, 2000.
- 3) 日本水道協会: 上水試験方法解説編, 東京, pp. 935-41, 2001
- 4) APHA-AWWA-WEF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> edn., Washington DC, pp. 9-42-47, 1998
- 5) 笠原伸介, 相澤拓, 渡辺義公, 小澤源三, 岡部聡: AOC を指標とした高度浄水処理システムの性能評価, 水道協会雑誌, Vol. 67, No. 11, pp.12-21, 1998.
- 6) 阪神水道企業団管理部水質試験所: 平成16年度 調査試験年次報告, 通第53号, 2004.

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) Sadahiko Itoh, Yuki Yoshimura, Tomoyuki Okada (2008) Components of estrogenic effect in chlorinated drinking water, Proceedings of The 17th Joint KKNN Symposium on Environmental Engineering (CD-ROM).
- 2) Yumiko Ohkouchi, Ly Bich Thuy, Sadahiko Itoh (2008) Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator, Proceedings of The 17th Joint KKNN Symposium on

Environmental Engineering (CD-ROM).

- 3) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2008) 従属栄養細菌の迅速定量を目的としたプロモデオキシウリジンラベル化 DNA の定量方法に関する基礎的検討, 環境衛生工学研究, Vol. 22, No. 3, pp.124-27.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

配水過程における微生物再増殖に対する消毒剤等の影響

研究代表者	島崎	大
研究分担者	国包	章一
研究協力者	岩田	和隆

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
「水道の配水過程における水質変化の制御および管理に関する研究」  
平成 20 年度分担研究報告書

## 配水過程における微生物再増殖に対する消毒剤等の影響

研究代表者	国立保健医療科学院水道工学部	島崎 大
研究分担者	静岡県立大学環境科学研究所	国包 章一
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

生物膜モニタリング装置を用いた室内実験により、異なる残留消毒剤（次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素）およびキレート剤（EGTA）における微生物再増殖の抑制効果と主たる細菌種の変化を比較した。消毒剤による効果は次亜塩素酸ナトリウムよりも二酸化塩素が高く観察されたが、添加停止に伴って共に速やかに生物膜中の細菌数は回復した、また、EGTA の添加による生物膜の抑制効果が確認された。

### A. 研究目的

残留塩素濃度を低減した水道の給排水過程においては、微生物の栄養源となる有機物や無機物の濃度が高いなど浄水中の微生物学的安定性が確保されていない場合、微生物再増殖性の増大が想定される。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、また異なる消毒剤およびキレート剤が形成済み生物膜の制御に及ぼす効果について明らかにすることを目的とした。なお、先行研究においてキレート剤 EDTA による生物膜剥離効果は確認できなかったため、生物膜を構成するカルシウムイオンを特異的にキレートする EGTA を用いることで、キレート剤の有効性について検討した。

### B. 研究方法

原水として国立保健医療科学院の水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムの添加により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、連続的にアニュラーリアクターへ通水した。試料水の流入量は 10mL/分に設定し、各リアクター内の滞留時間を約 100 分とした。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。水温は各々 23℃前後に維持した。通水開始後 27～33 日目において、系統 1 はキレート剤 EGTA を最終濃度 0.5mg/L 程度となるように添加し、また、系統 2 および 3 は二酸化塩素および次亜塩素酸ナトリウム（以下「次亜」）を最終濃度 0.7mg/L 程度となるように添加して生物膜の剥離状況を測定した。34～41 日目は再び残留塩素を除去した水道水のみを通水し、生物膜の回復状況を測定した。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数と従属栄養細菌数を測定するとともに、試験片表面の細菌種の簡易同定を行った。リ

アクター内の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。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°C 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°C 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°C 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。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 キットおよび API20NE キット（日本ビオメリュー（株））を用いて菌種の簡易同定を行った。

### C. 結果

#### ① 流入水の水質および各系統の遊離残留塩素濃度

表-1 に流入水の水質を、図-1 に各系統の遊離残留塩素濃度を示す。

表-1 流入水の水質

（平均値、1/30～3/10 に測定）

水温	21.7°C
pH	7.20
TOC	1.07mg/L
NO <sub>3</sub> -N	1.5mg/L
NO <sub>2</sub> -N	0.003mg/L
PO <sub>4</sub>	0.14mg/L

実験期間中の水道水の遊離残留塩素濃度は比較的安定しており、平均値は 0.57mg/L であった。消毒剤添加中の平均残留消毒剤濃度は、二酸化塩素を添加した系統 2 が 0.48mg/L、次亜を添加した系統 3 が 0.63mg/L であった。なお、二酸化塩素は揮散性が高く（沸点 11°C）、本実験でも添加 1 日後の残留濃度は 0.51mg/L であったが、4 日後には 0.35mg/L まで低下しており、添加時の保存方法について検討が必要である。また、次亜を添加した系統 3 の添加 1 日後の残留濃度は 0.23mg/L しかないが、これは流出水中の細菌の不活化等により消費されたためと考えられる（図-4、5 参照）。

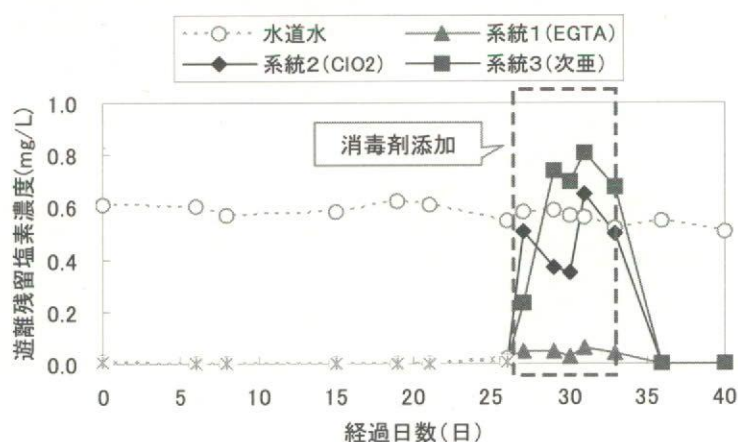


図-1 各系統の遊離残留塩素濃度

※消毒剤添加中の系統2については二酸化塩素濃度(mg/L)

#### ② 試験片表面の細菌数

試験片表面の一般細菌数および従属栄養細菌数を図-2 および図-3 に示す。試験片表面の細菌数は、一般細菌、従属栄養細菌いずれも通水開始後 20 日前後で定常状態に達しており、定常期における細菌数はそれぞれ  $1.0 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>、 $3.4 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> であった。

EGTA 添加 1 週間後の系統 1 の細菌数は、一般細菌数が  $5.2 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> から  $6.2 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup>（最大  $2.6 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> まで減少）に、従属栄養細菌数が  $3.8 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> から 2.9



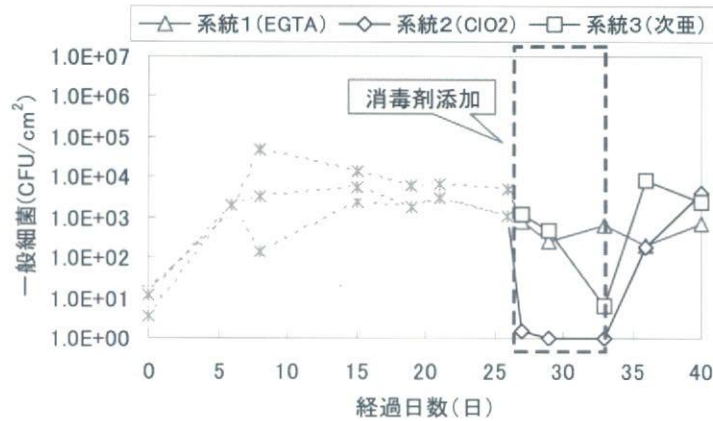


図-2 一般細菌数経日変化(試験片表面)

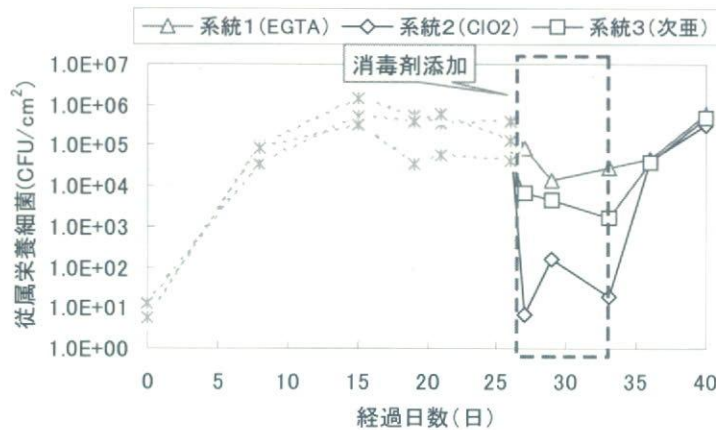


図-3 従属栄養細菌数経日変化(試験片表面)

$\times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> (最大  $1.4 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> まで減少) と、いずれも 1log 程度減少した。この試験片表面の細菌数の減少は、当初想定したように、EGTA 添加によりカルシウムイオンがキレートされ、生物膜を構成する細胞外ポリマー物質の強度が低下した結果、生物膜が剥離したためである可能性が考えられる。また、EGTA の添加を停止すると、一般細菌数は EGTA 添加中と同程度の  $2.0 \times 10^2 \sim 7.2 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> で推移し、従属栄養細菌数は 1 週間後に定常期と同程度の  $5.7 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> となった。このことから、EGTA 添加停止後の 1 週間程度は、その効果が維持されることが考えられる。

二酸化塩素添加 1 週間後の系統 2 の細菌数は、一般細菌数が  $1.0 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> からほぼ 0 CFU/cm<sup>2</sup> に、従属栄養細菌数が  $1.3 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> から  $1.9 \times 10^1$  CFU/cm<sup>2</sup> (最大  $6.7 \times 10^0$  CFU/cm<sup>2</sup> まで減少) と 4log 程度減少した。一方、次亜添加 1 週間後の系統 3 の細菌数は、一般細菌数が  $1.1 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> から  $6.3 \times 10^0$  CFU/cm<sup>2</sup> と 3log 弱程度減少、従属栄養細菌数が  $4.4 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> から  $1.6 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> と 1log 程度の減少にとどまったことから、二酸化塩素の方が次亜よりも消毒効果は高いといえる。また、消毒剤添加時の細菌数の減少は、系統 2、3 いずれにおいても一般細菌数の方が従属栄養細菌数よりも大きいことから、従属栄養細菌の方が一般細菌よりも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。

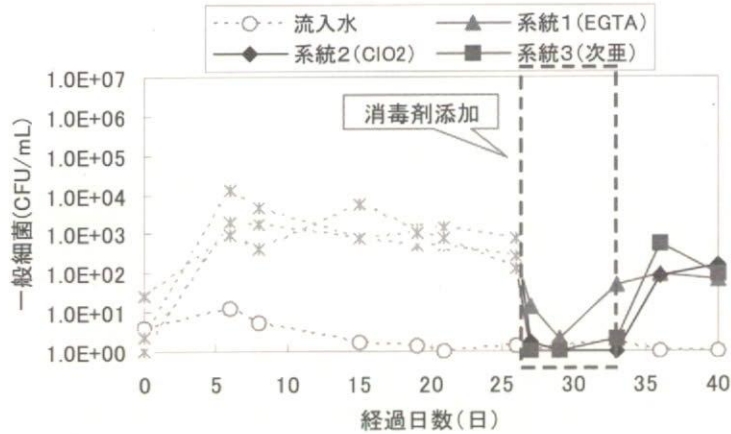


図-4 一般数経日変化(流入水・流出水)

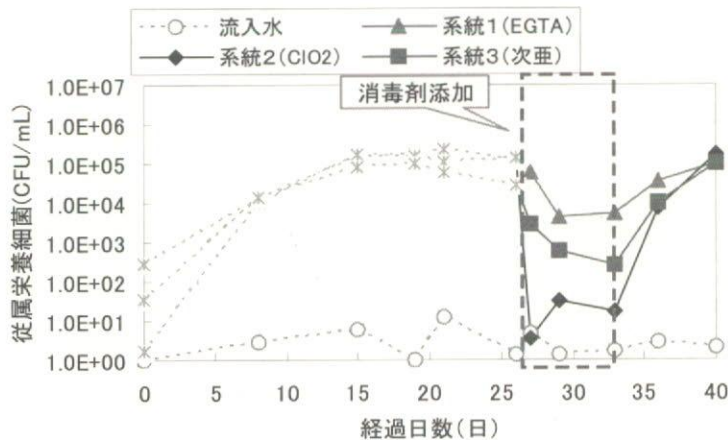


図-5 従栄養細菌数経日変化(流入水・流出水)

消毒剤の添加停止後2日目には、系統2、3いずれも一般細菌数、従属栄養細菌数ともに定常期の細菌数まで回復した。このことから、試験片表面に付着した細菌群は、消毒剤の添加により完全に死滅したのではなく、培地培養法では測定できない程度に損傷を受けたが試験片表面には生残していたため、消毒剤の添加停止により急速に回復した可能性がある。

### ③ 流入水・流出水中の細菌数

流入水・流出水の一般細菌数および従属栄養細菌数を図-4および図-5に示す。流入水中の一般細菌数は $0 \sim 1.3 \times 10^1$  CFU/mL、従属栄養細菌数は $0 \sim 1.2 \times 10^1$  CFU/mLで推移した。試験片表面同様、流出水中の一般細菌数および従属栄養細菌数は通水開始後20日前後で定常状態に達しており、定常期の細菌数はそれぞれ $1.3 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$  CFU/mL、 $3.0 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5$  CFU/mLであった。

EGTA添加1週間後の系統1の細菌数は、一般細菌数が $2.7 \times 10^2$  CFU/mLから $5.1 \times 10^1$  CFU/mL(最大 $2.0 \times 10^0$  CFU/mLまで減少)と1log弱程度減少、従属栄養細菌数が $1.2 \times 10^5$  CFU/mLから $5.2 \times 10^3$  CFU/mL(最大 $4.5 \times 10^3$  CFU/mLまで減少)と2log弱程度減少した。EGTAの添加を停止すると、一般細菌数は添加中と同程度の $6.7 \times 10^1 \sim 9.6 \times 10^1$  CFU/mLで推移

し、従属栄養細菌数は1週間後に定常期と同程度の $1.0 \times 10^5$ CFU/mLまで回復しており、試験片表面の細菌数と同様の結果であった。

二酸化塩素添加1週間後の系統2の細菌数は、一般細菌数が $7.2 \times 10^2$ CFU/mLからほぼ0CFU/mLに、従属栄養細菌数が $1.3 \times 10^5$ CFU/mLから $1.7 \times 10^1$ CFU/mLと4log程度減少した。一方、次亜添加1週間後の系統3の細菌数は、一般細菌数が $1.3 \times 10^2$ CFU/cm<sup>2</sup>から $2.0 \times 10^0$ CFU/mL（最大0CFU/mLまで減少）と2log程度減少、従属栄養細菌数が $3.0 \times 10^4$ CFU/mLから $2.5 \times 10^2$ CFU/mLと2log程度の減少であったことから、二酸化塩素の方が次亜よりも消毒効果は高いといえる。また、消毒剤の添加停止後2日目には、系統2、3いずれも一般細菌数、従属栄養細菌数ともに定常期の細菌数近くまで回復し、試験片表面の細菌数と同様の結果であった。

#### ④試験片表面の細菌種

APIキットによる同定の事前に行ったグラム染色では、消毒剤等添加の有無によらず、グラム陰性桿菌以外の細菌が検出されることは非常に少なかった。一方、今回と同じ試験片材質（ポリカーボネイト）で実験した先行研究の研究成果においては、消毒剤添加前の球菌の占める割合は78.6%であった。表-2に示すとおり、原水として利用した科学院水道水の水温が10℃以上異なることから、流入水中に存在する細菌種も異なると考えられる。

表-2 供試水道水の水温(平均値)

	実験期間	水温
既往	H19.9.19~10.17	22.9℃
今回	H20.1.30~3.10	12.6℃

試験片表面上の細菌群のAPIによる菌種同定結果を表-3および表-4に示す。API20Eにより腸内細菌およびグラム陰性桿菌が、またAPI20NEにより栄養要求性が厳しくない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、同じ系統のリアクターであっても異なる菌種が同定されることがある。

通水開始26日後までは3系統のリアクターとも同じ水質の試料水を通水したため、同定される細菌種には相違はないと考えられるが、系統1のみ異なる細菌種が同定された。これは、従前に系統1のリアクターを用いて実施した試験において鋳鉄試験片を用いたため、鋳鉄から溶出した鉄イオンがリアクター内に残留していたため、系統2、3のリアクターとは異なる水質であった可能性が考えられる。

系統1については、API20EとAPI20NEの同定結果は異なっているが、いずれも*Pseudomonas*属の細菌であった。また、EGTA添加の有無によらず、細菌種は変化しなかったことから、EGTAには生物膜中の主たる細菌構成を変えることなく、生物膜を剥離させる作用のみを有すると考えられる。系統2については、二酸化塩素添加前は*Stenotrophomonas maltophilia*が同定され、添加中に同定されたのは*Brevundimonas vesicularis*であったことから、*Brevundimonas vesicularis*は二酸化塩素に対する耐性が強いと示唆される。また、添加を停止すると再び*Stenotrophomonas maltophilia*が同定されたことから、*Stenotrophomonas maltophilia*は二酸化塩素により培地での増殖性を失う程度の損傷しか受けていなかった可能性がある。系統3については、次亜添加の有無にかかわらず、同定された細菌種は*Stenotrophomonas maltophilia*であった。このことから、*Stenotrophomonas maltophilia*には次亜に対する耐性があるとも考えられるが、原水である科学院水道水の遊離残留塩素濃度（平均0.57mg/L）と次亜添加時の遊離残留

表-3 API20E による同定結果

系統	19日後(消毒なし)	26日後(消毒なし)	27日後(消毒あり)	33日後(消毒あり)	40日後(消毒なし)
1	<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>
2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	同定不能	試験なし*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	試験なし*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

表-4 API20NE による同定結果

系統	19日後(消毒なし)	26日後(消毒なし)	27日後(消毒あり)	33日後(消毒あり)	40日後(消毒なし)
1	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	試験なし*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	試験なし*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

※普通寒天培地にコロニーを形成せず、試験を実施できなかった。

赤：80%ID 以上（非典型反応なし） 黒：80%ID 以上（非典型反応あり） 灰：80%ID 未満

塩素濃度（平均 0.63mg/L）に特段の差がなかったため、細菌種が変化しないまま推移したとも考えられる。

#### D. 考察

形成済み生物膜に対し EGTA を一時的に添加すると、生物膜剥離効果により試験片表面中の細菌数は 1log 程度減少し、流出水中の細菌数も 1~2log 程度減少した。また、EGTA の添加を停止すると、一般細菌数は添加中と同程度で推移し、従属栄養細菌数は定常期の水準まで回復するのに 1 週間程度要しており、EGTA には添加停止後も微生物再増殖を抑制する効果があると考えられる。同様に、形成済み生物膜に対し二酸化塩素または次亜塩素酸ナトリウムを添加すると、いずれの消毒剤においても細菌数は大きく減少し、また、その消毒効果は二酸化塩素の方が次亜塩素酸ナトリウムよりも高かった。しかしながら、消毒剤の添加停止に伴い、細菌数は定常期の水準まで急速に回復したことから、生物膜中の細菌群は、消毒剤により培地での増殖性を失う程度に損傷していた可能性がある。

生物膜中の細菌種については、EGTA 添加の有無にかかわらず同一種であったことから、EGTA は細菌種を変化させることなく、生物膜の剥離させる作用があると考えられる。消毒剤の影響については、二酸化塩素を添加すると、添加前とは異なる *Brevundimonas vesicularis* が同定され、添加を停止すると添加前と同一の *Stenotrophomonas maltophilia* が同定されたことから、二酸化塩素添加の有無により細菌種が変化する可能性がある。一方、次亜塩素酸ナトリウムについては、添加の有無にかかわらず、同定された細菌種は *Stenotrophomonas maltophilia* であった。いずれの消毒剤においても、消毒剤添加前と添加停止後に *Stenotrophomonas maltophilia* が同定されていることから、*Stenotrophomonas maltophilia* は消毒剤により完全には死滅せず、培地での増殖性を失う程度の損傷にとどまっていた可能性がある。