

図1 採取した生物活性炭の低級カルボン酸除去能

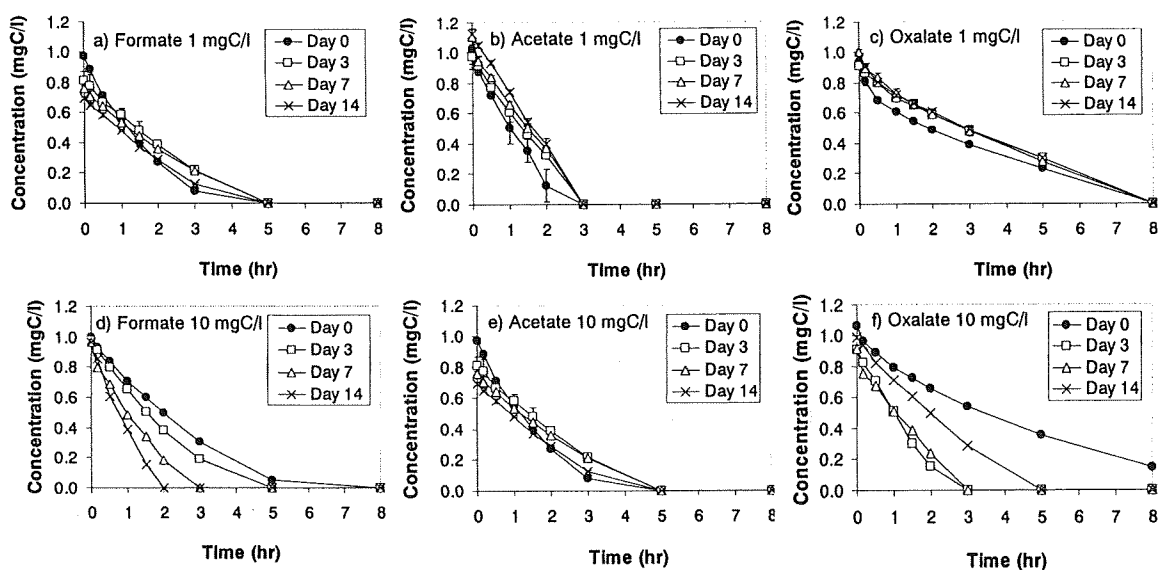


図2 連続カラムリアクター運転に伴う低級カルボン酸除去能の変化
(上段 1mgC/L 培養系、下段 10mgC/L 培養系)

1.3 低級カルボン酸利用細菌の単離

運転終了後の生物活性炭試料から、ギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、シュウ酸ナトリウムを唯一の炭素源とする培地を用いて細菌の単離を試みた。その結果、すべての試料から、2種類のコロニーが検出された。これらのコロニーの 16S rRNA 遺伝子を解析したところ、それぞれ *Pseudomonas aeruginosa* SC-1 (100%)、*Microbacterium* sp. MJ18 (99%) にそれぞれ近縁であった。

2. 安定同位体プロービング法(SIP法)による低級カルボン酸利用細菌の特定

2.1 培養時間の検討

図3に、酢酸を対象物質として、24時間、48時間、120時間培養した際の ^{12}C -DNA、 ^{13}C -DNAの比重分布を示す。24時間では両者のプロファイルに差異は見られなかったが、48時間、120時間では、 ^{13}C -DNAが高比重側にシフトしている様子が読み取れる。培養時間内に利用された有機物を計算したところ、24時間培養では50%程度、48時間では90%程度、120時間では100%程度の利用率であった。

24時間培養系、48時間培養系、120時間培養系の代表画分(24時間培養系 ^{12}C -DNA: $1.709\text{g}/\text{cm}^3$, ^{13}C -DNA: $1.710\text{g}/\text{cm}^3$, 48時間培養系 ^{12}C -DNA: $1.721\text{g}/\text{cm}^3$, ^{13}C -DNA: $1.722\text{g}/\text{cm}^3$, 120時間培養系 ^{12}C -DNA: $1.718\text{g}/\text{cm}^3$, ^{13}C -DNA: $1.719\text{g}/\text{cm}^3$)について、T-RFLPで解析した結果を図4に示す。培養時間24時間後では、両者の比重分布に差異は認められなかったものの、 ^{12}C -DNAのプロファイルと比較した場合、 ^{13}C -DNAのプロファイルでは200bp、330bpのT-RFが主要フラグメントとして検出された。培養48時間、120時間では、 ^{12}C -DNAからはPCR産物が増幅されず、 ^{13}C -DNAからは同じく主要フラグメントとして200、330bpが検出された。いずれの培養時間においても検出された200、330bpのフラグメントは、酢酸を同化した細菌に由来している可能性が高い。一方、120時間の場合には、更に361bpにもフラグメントが認められたが、これは増殖速度が遅い酢酸利用細菌に由来する可能性と、ク

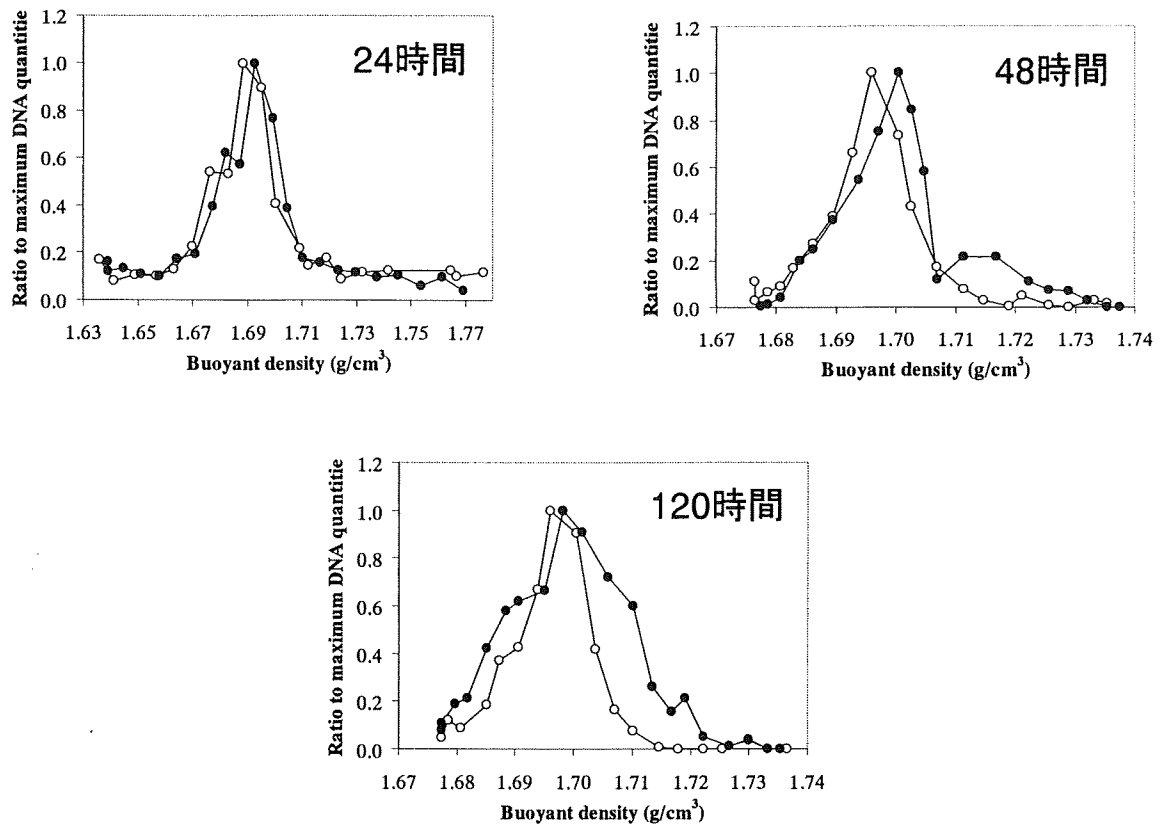


図3 異なる培養時間における ^{12}C 、 ^{13}C -DNAの比重分布

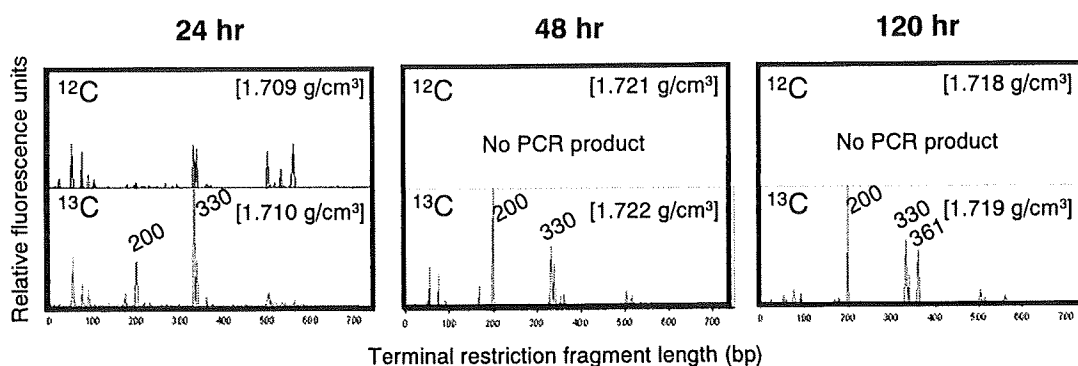


図4 異なる培養時間における ^{12}C -DNA, ^{13}C -DNA の T-RFLP による解析

ロスフィーディングにより酢酸の二次代謝産物を利用した細菌に由来する可能性が考えられる。クロスフィーディングを避けるためには培養時間はなるべく短い方がよく、回分実験の場合の培養時間は48時間が妥当と判断した。

2.2 異なる濃度条件下における低級カルボン酸利用細菌の特定

基質濃度 10mgC/L の場合は回分式、0.5mgC/L の場合は連続式で基質を投与して、SIP 法による解析を行った。図5~7にギ酸、酢酸、シュウ酸を投与した結果を示す。

ギ酸添加系では、10mgC/L, 0.5mgC/L とともに、 ^{13}C -DNA プロファイルから 330bp のフラグメントが顕著に観察された。10mgC/L では、更に 499bp も検出されたが、これは 0.5mgC/L では見られなかった。

酢酸添加系では、高濃度と低濃度の結果に大きな違いが生じた。10mgC/L の系では、 ^{13}C -DNA プロファイルから、酢酸を同化している細菌に由来すると考えられるフラグメントとして、168, 200, 330, 339bp が検出されたが、0.5mgC/L の場合は 330bp のみが検出された。

シュウ酸添加系では、10mgC/L, 0.5mgC/L の結果に大差はなく、ともに 330, 499bp のフラグメントに対応する細菌がシュウ酸を同化していることが推察された。

D. 考察

1. 連続式カラムリアクターを用いた生物活性炭における低級カルボン酸利用細菌の馴致

オゾン処理による副次生成有機物としては、ケトンやアルデヒドではなく、シュウ酸、ギ酸、酢酸などの低級カルボン酸が6割を占めるという知見が報告されている (Hammes *et al.*, 2006)。オゾン処理を行うと AOC·NOX 画分の濃度が上昇するという知見も、オゾン処理によって P17 株が利用できないシュウ酸が生成していることを支持するものである。以上のことから、本研究においても、AOC の代表物質としてギ酸、酢酸、シュウ酸をとりあげた。

カラムリアクターを用いて連続的にこれらの基質を投与することで、それぞれの物質を特異的に利用する細菌群が馴致されることを想定したが、1mgC/L の濃度では分解速度が上

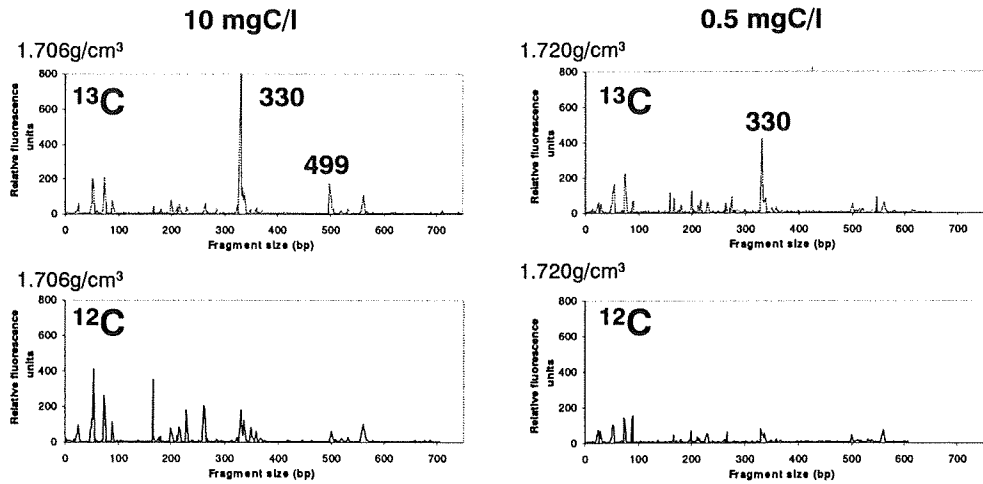


図5 ギ酸添加系の SIP による解析

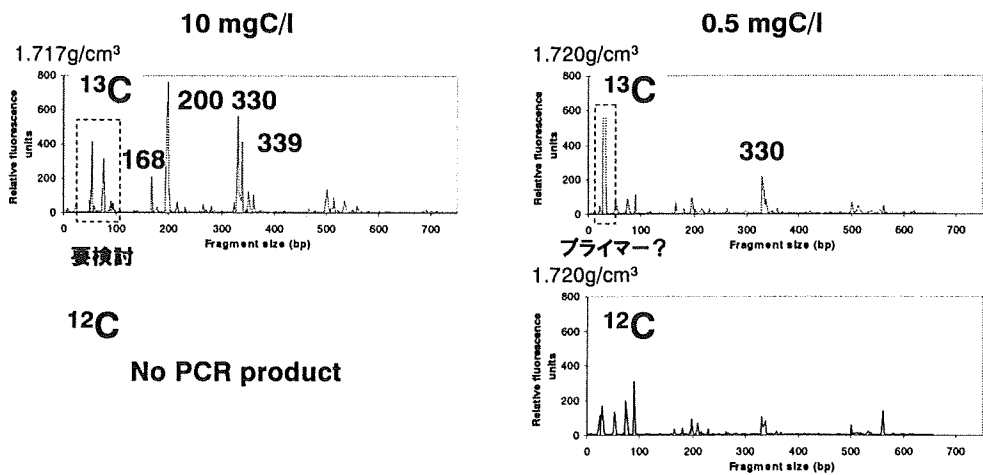


図6 酢酸添加系の SIP による解析

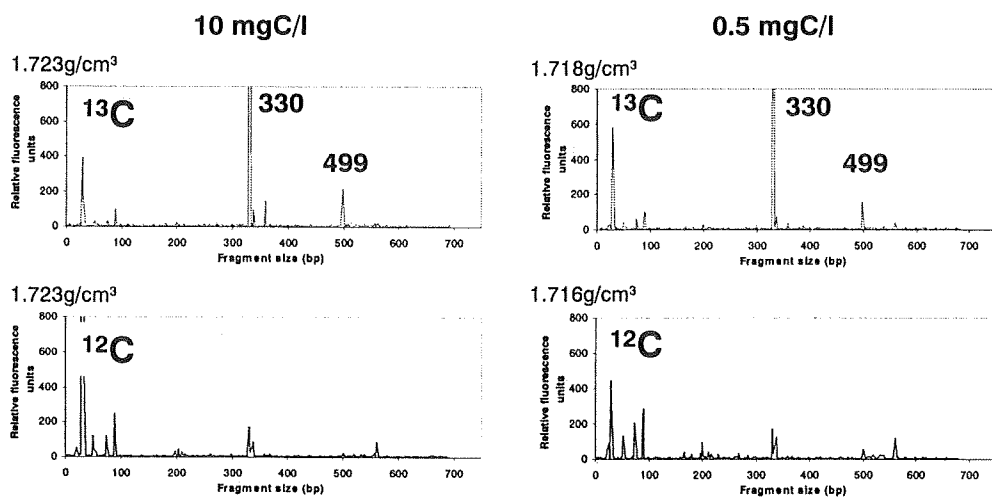


図7 シュウ酸添加系の SIP による解析

昇することは確認されず、十分な集積が進行することは認められなかった。1mgC/Lの濃度条件では、増殖と死滅・捕食の均衡が維持されたものと推察される。一方、10mgC/Lに基質濃度を上げると、酢酸では変化は認められなかったが、ギ酸、シュウ酸では培養時間と共に分解速度が上昇することが確認された。これらの基質を利用可能な細菌の活性が高まった結果なのか、存在量・多様性に変化が生じた結果なのか、更なる検討が必要である。

馴致したカラムリアクターから単離を試みたところ、*Pseudomonas*属、*Microbacterium*属に近縁な2株がすべての条件から単離された。炭素源を変更し、濃度段階を変えたにもかかわらず、これらの2株が単離されたということは、なんらかのバイアスがあった可能性が考えられる。これらの単離株の基質利用性について今後確認を行う必要がある。

2. 安定同位体プロービング法(SIP法)による低級カルボン酸利用細菌の特定

従来のSIP法は高濃度の基質を用いて、DNAの標識率を上げることを意図したものが多かったが、生物活性炭が処理するAOCの濃度レベルは非常に低く、高濃度での培養実験の結果が実際にAOC除去に関与する細菌群の実態を反映しているとは断言できない。そこで、本研究では、10mgC/Lと0.5mgC/Lという異なる濃度条件下でのSIPを試みた。0.5mgC/Lの場合には、細菌に利用される有機物の総量を確保するために、連続的に基質を供給する連続型の培養系を構築することに成功した。

低濃度条件下でのSIPであるために、 ^{12}C -DNAと ^{13}C -DNAの分離が不十分である場合も見られたが、10mgC/L、0.5mgC/Lそれぞれの系において低級カルボン酸を同化している細菌に由来していると推察されるフラグメントを検出することができた。 ^{12}C -DNAプロファイルと比較した場合に、 ^{13}C -DNAプロファイルにおいて検出された主要フラグメントを表1に整理した。

168, 200, 339bpのT-RFは、10mgC/Lの酢酸添加系でのみ検出されている。これらのフラグメントに由来する細菌は、酢酸の同化に特異的であるものの、低濃度環境下での活性は低いことが推測される。一方、330bpのT-RFは、すべての基質、濃度条件下で検出されている。酢酸に加えて、ギ酸やシュウ酸なども同化していることが示されており、通性のメチロトロフである可能性が高く、実際の処理においても低級カルボン酸類を幅広く分解している特性を有していることが推察される。一方、499bpのT-RFは、ギ酸の10mgC/L、シュウ酸の0.5, 10mgC/Lにおいて検出された。このフラグメントは、主にシュウ酸を積極的に利用する細菌群に由来していると推察される。499bpが検出されたことは、複雑な微生物群集において、低級カルボン酸類の利用をめぐる役割分担があることを示唆するものとして興味深い。

今後は、これらのフラグメントの遺伝子解析を進め、特異的なプライマー・プローブを設計して定量解析を行い、AOC除去能とこれらの細菌群との関係性を評価する予定である。また、使用期間や運転方法の異なる複数の生物活性炭試料を対象としてSIPを適用して、低級カルボン酸類を同化できる細菌の分布・存在量に関する知見も収集することを進める。

表 1 SIP の結果の整理

基質	濃度	基質を同化している細菌に由来している可能性がある				
		T-RF(bp)				
		168	200	330	339	499
ギ酸	0.5mgC/L			○		
	10mgC/L			○		○
酢酸	0.5mgC/L			○		
	10mgC/L	○	○	○	○	
シュウ酸	0.5mgC/L			○		○
	10mgC/L			○		○

E. 結論

高度浄水処理としての生物活性炭処理では、硝化や AOC の除去など、微生物再増殖に関与する栄養源の除去が期待されている。本研究では、AOC のモデル物質としてギ酸、酢酸、シュウ酸といった低級カルボン酸を対象として、これらを除去する細菌群の特定を、連続式カラムリアクター及び SIP 法を用いて試みた。連続式カラムリアクターによる馴致の結果、ギ酸、酢酸、シュウ酸添加培地から 2 種類の単離株を得ることができた。また SIP 法を適用することにより、0.5mgC/L という低濃度条件下において、ギ酸、酢酸、シュウ酸を同化する細菌群の候補を特定することに成功した。今後は、これらの知見を更に集積し、生物活性炭の AOC 除去能と密接な関係のある細菌群を特定し、それらの存在量や活性から生物活性炭の AOC 除去能を診断できるようなツールの開発を目指したい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikuro Kasuga, Hirotaka Nakagaki, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai (2010) Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria on biological activated carbon in a pilot-scale drinking water treatment plant with different treatment processes, *Water Science and Technology*, *In press*.

2. 学会発表

Ikuro Kasuga, Hirotaka Nakagaki, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai (2009) Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria on biological activated carbon in a pilot-scale

drinking water treatment plant with different placements of sand filtration, The 3rd IWA-ASPIRE conference Abstracts, p.6.

Suwat Soonglerdsongpha, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai (2009) Comparison of assimilable organic carbon removal by biological activated carbon in different advanced drinking water treatment plants, The 3rd IWA-ASPIRE conference Abstracts, pp.67-68. (Best Student Presentation Award)

Ikuro Kasuga (2009) Characterization of ammonia-oxidizing archaea associated with biological activated carbon used for advanced drinking water treatment, International Workshop on water and Wastewater Treatment at National Cheng Kung University, p.16.

春日郁朗, 中垣宏隆, 栗栖太, 古米弘明, 関哲雄 (2009) 生物活性炭立ち上げ時の微生物定着に及ぼす前塩素処理の影響, 第 60 回全国水道研究発表会講演集, pp.164-165.

前田裕太, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2009) 培養法と分子生物学的手法を用いた給水末端における細菌群の多様性評価, 第 60 回全国水道研究発表会講演集, pp.462-463.

春日郁朗, 中垣宏隆, 栗栖太, 古米弘明 (2009) 生物活性炭における硝化微生物の付着過程と硝化能との関係, 第 9 回日中水道技術交流会論文集, pp.15-18.

春日郁朗 (2010) 水道水における同化性有機炭素の制御と課題, 第 12 回東京大学水環境制御研究センターシンポジウム, 講演要旨集, p.12.

Suwat Soonglerdsongpha, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroyuki Katayama, Hiroaki Furumai (2010) Application of stable isotope probing to evaluate AOC assimilating bacteria attached on BAC in drinking water treatment plant, 第 44 回日本水環境学会年会講演集, pp.169.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書 3

消毒技術に関する検討
(消毒による微生物再増殖の制御方法の検討)

研究分担者 大瀧 雅寛

消毒技術に関する検討 （消毒による微生物再増殖の制御方法の検討）

研究分担者 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

本分担研究の目的は、配水過程で再増殖が問題となる一般細菌および従属栄養細菌に対し、各種消毒処理方法において再増殖および回復を抑制させるための条件を明らかにすることである。本年度はまず個々のモデル細菌（*Pseudomonas* 属や *E.coli* など）に対して、主に塩素消毒処理における損傷レベルの相違をまとめて、細菌への損傷レベルマトリックスを作成した。特に塩素投入濃度の違い、pH の違いといった観点について詳細な検討を行った。特に pH の影響については、次亜塩素酸の形態変化によってモデル細菌への損傷メカニズムが異なることが明らかとなり、定量的にその差を論じることが可能となった。

A. 研究目的

浄水処理において消毒技術を適用した場合、病原微生物に対する不活化効果についての検討は多いものの、その後の配水管中での挙動が問題となる微生物や、病原微生物の再活化といった問題に対しての知見は、それほど多くない。今後副生成物の問題から塩素注入量の低減化や、その他の消毒技術の導入が検討される際、病原抑制の観点のみならず配水管中での病原以外の微生物の挙動に対しても、留意することが必要である。

そこで本研究では、配水管中で増殖が問題となる一般細菌および従属栄養細菌を対象微生物とし、それらの微生物についての種々の消毒処理が及ぼす影響について検討した。まず個々のモデル細菌（*Pseudomonas* 属や *E.coli* など）に対して、塩素消毒処理における損傷レベルの相違をまとめて、細菌への損傷レベルマトリックスを作成することを検討した。

特に塩素投入濃度の違いや、pH の違いについて詳細な検討を行った。pH の影響については、

次亜塩素酸の形態変化が、どのようにモデル細菌への損傷メカニズムに影響を与えるかを確かめ、かつその差を定量的に把握することによって、損傷レベルを考慮した必要消毒処理レベルを提案することを目的とした。

損傷レベルの検証方法としては昨年度から引き続き、異なる培地を同時に適用し、培地の選択性の違いから損傷箇所を推定する方法を用いることとした。

B. 研究方法

B. 1. 実験方法

配水管中での増殖微生物のモデルとして *Pseudomonas*、もしくは同じグラム陰性菌の大腸菌を用いて、消毒処理前後の微生物の状態を評価した。実験に用いた微生物種は *Pseudomonas aeruginosa*（ATCC 15442）、および *E.coli*（NBRC3301）とした。

不活化処理は紫外線照射と塩素処理の 2 種類を行った。

紫外線照射の場合は、細菌の遺伝子損傷が不活化メカニズムであるといったように、ほぼ明らかになっているため、照射強度条件は一つとした。照射時間を変えて照射量を調整して、細菌への影響を調べた。

塩素処理の場合は、細菌の損傷箇所が特定されていないし、塩素濃度や pH によって影響が異なると考えられるため、様々な条件を設定して行うこととした。まずは投入濃度を 1.0 mg/L と 0.1 mg/L の 2 条件に設定し実験を行った。1.0 mg/L は浄水場での塩素処理時の投入レベルを想定しており、0.1 mg/L は配管中で維持されるべき最低濃度レベルを想定した。また反応溶液の pH を水酸化ナトリウムもしくは硫酸にて 5~9 において 5 段階に調整し、pH の影響を検討した。

各不活化処理を施した *Pseudomonas* および *E.coli* の測定は複数培地法によった。これは特定の細菌を検出できるデスオキシコール酸等を用いた選択培地と、非選択培地を用いて細胞膜の損傷などを推定する方法である。非選択培地として Tryptic Soy Agar (以下 TSA) もしくは LB (Luria-Bertani) 寒天培地を用いた。それぞれの測定結果と推定される損傷については以下のとおりである。

- ① TSA (Toryptic Soy Agar) : 非選択培地。代謝能力の有無を見る
- ② TSA+デスオキシコール酸ナトリウム : グラム陰性菌様細胞膜の変容を見る
- ③ TSA+セトリミド : 細胞膜組成の変容を見る
- ④ TSA+ナリジクス酸 : DNA 複製酵素への阻害作用が生じるか見る

ただしこのうち③のセトリミド含有培地での検出感度が非常に悪く、この方法は実験に適用することは適わなかった。

C. 実験結果

C. 1. *P. aeruginosa* の検出方法の確認

実験室にて培養した *P. aeruginosa* 株の希釈液濃度を各種培地にて測定した結果、Fig.1 に示すように、ほぼ同じ検出数となり、健全な *P. aeruginosa* はいずれの追加物質に対しても耐性をもつことが確認された。

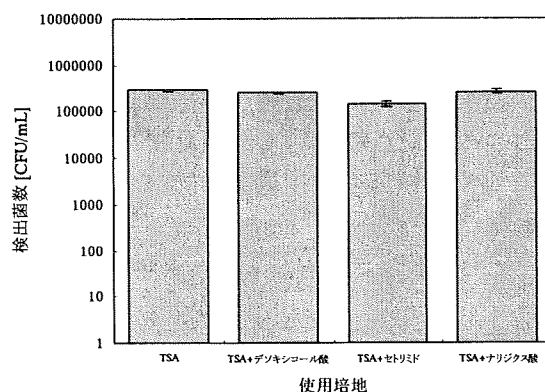


Fig.1 4種の異なる培地による *P. aeruginosa* (ATCC 15442)の検出数

C. 2. 紫外線照射による不活化実験

Fig.2 に、紫外線照射処理を行った場合の *Paeruginosa* の濃度変化を示す。非選択培地として LB (Luria-Bertani) 寒天培地での測定も試みた。

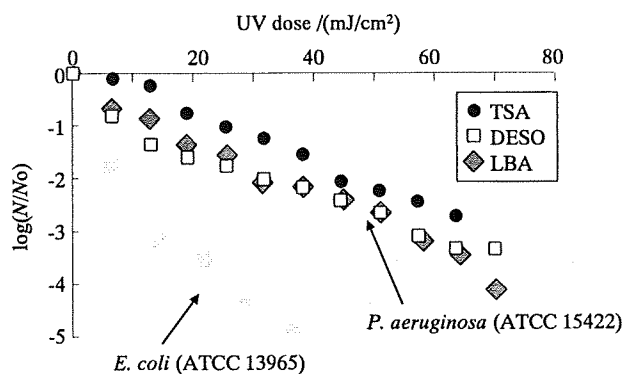


Fig.2 紫外線照射による *P. aeruginosa* の濃度変化を3種の培地にて測定

C. 3. 塩素処理による不活化実験 (*P. aeruginosa* の不活化実験)

対象微生物を *P. aeruginosa* とした場合の不活化実験を行った。次亜塩素酸ナトリウムを消毒剤として使用した場合について、初期濃度約 1.0 mg/L と 0.1 mg/L の 2 条件を設定した。

Fig.3 に pH 7 における結果を示す。いずれも 3 種類の培地 (TSA:非選択培地, TSA+Deso: 選択培地, TSA+ナリジクス酸: 選択培地) にて濃度測定を行った結果である。各培地の測定結果毎に残存率を求め、その対数値を縦軸とした。また遊離塩素濃度と接触時間の積を横軸として、データをプロットした。

また、同様に Fig.4 および Fig.5 に、pH 5 および pH 9 の場合における *P. aeruginosa* の濃度変化を示す。

いずれも Fig.3 と同様に 3 種類の測定培地にて *P. aeruginosa* の濃度を測定し、その結果から残存率を求めて CT 値とプロットしたものである。

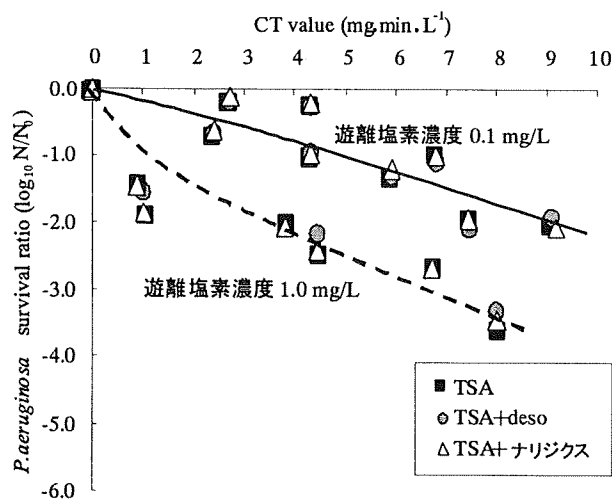


Fig.3 塩素投入後の *P. aeruginosa* (ATCC 15442) の濃度変化 (pH 7)

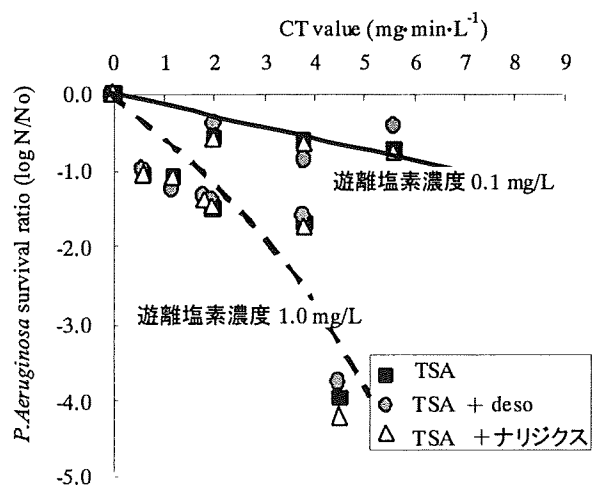


Fig.4 塩素投入後の *P. aeruginosa* (ATCC 15442) の濃度変化 (pH 5)

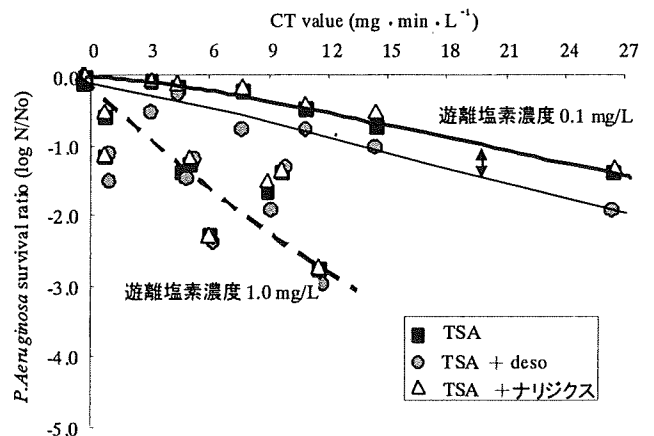


Fig.5 塩素投入後の *P. aeruginosa* (ATCC 15442) の濃度変化 (pH 9)

C. 4. 塩素処理による不活化実験 (*E. coli* の不活化実験)

対象微生物を *E. coli* とした場合の不活化実験を行った。次亜塩素酸ナトリウムを消毒剤として使用した場合について、初期濃度約 1.0 mg/L と設定した。

Fig.6 に pH 7 における結果を示す。いずれも 4 種類の培地 (TSA:非選択培地, TSA+Deso: 選択培地, デソキシコーレイト培地 (以下 DESO): 選択培地, コンパクトドライ培地 (以下 C-EC):

選択培地)にて濃度測定を行った結果である。いずれも Fig.3~5 と同様の方法にてデータを処理し、プロットした。

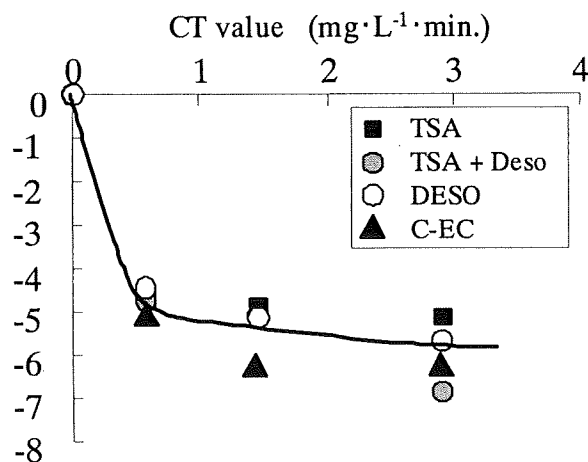


Fig.6 塩素投入後の *E.coli* (NBRC 3301)の濃度変化 (pH 7)

同様に Fig.7 および Fig.8 に、pH 5 および pH 9 の場合における *E.coli* の濃度変化を示す。

いずれも 4 種の測定培地にて濃度測定を行い、各濃度測定値から残存率を算出して、その対数値をプロットした。

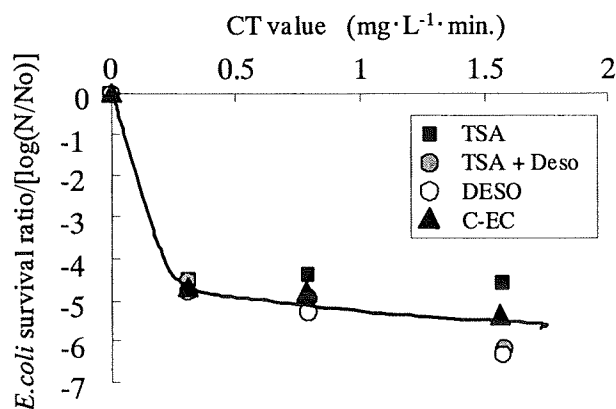


Fig.7 塩素投入後の *E.coli* (NBRC 3301)の濃度変化 (pH 5)

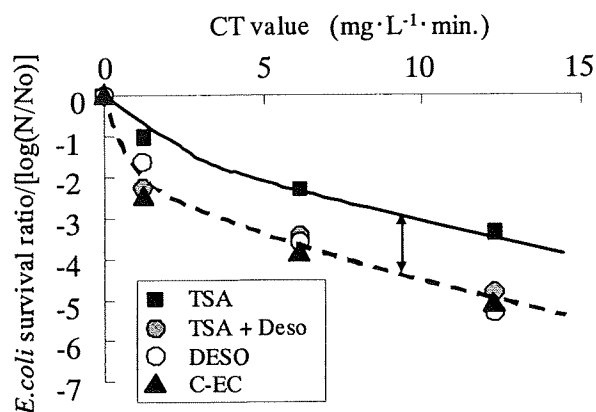


Fig.8 塩素投入後の *E.coli* (NBRC 3301)の濃度変化 (pH 9)

D. 考察

D. 1. 紫外線照射による不活化実験 (*P. aeruginosa* の不活化実験)

Fig.2 に示されるように、いずれも同様な濃度変化を示していた。これは紫外線照射によって遺伝子損傷による増殖能力の不活性化が起こっているために、どの培地を用いても、増殖不可の状態の菌の検出数は同じとなると考えられることから、メカニズムを裏付ける結果と言える。

D. 2. 塩素処理による不活化実験

Fig.3 と Fig.6 の結果を並べてみると、まず *P. aeruginosa* の塩素耐性が、大腸菌と比較して非常に高いことがわかる。次に、各微生物毎に詳細に見ていくと、まず Fig.3~5 のいずれにおいても、投入濃度が低い場合と高い場合では、同じ CT 値であっても不活化効果が異なることがわかった。0.1 mg/L という残留塩素濃度は、水道の塩素濃度基準ギリギリであるが、この様な低濃度では、不活化効果が低くなっていることがわかった。また Fig.3~5 を比べてみると、pH が高くなるにつれて、

投入濃度に関わらず、消毒効果がわずかに低くなっていることがわかる。またいずれにおいても、各測定培地での残存測定数に差が生じていないことがわかる。このことから、*P. aeruginosa* の塩素消毒においては、細胞膜や特定代謝機能の一部が損傷するような半致死の損傷はほとんどなく、損傷を受ける場合は致死的なものであると考えられる。ただし pH 9 で、かつ 0.1 mg/L の低投入濃度の場合には、若干この半致死の損傷が確認されている。これは Fig.9 に示す、次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンの生存比に関わると考えられる。

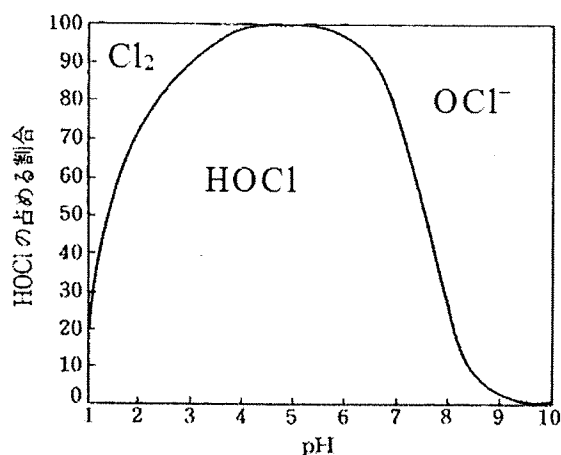


Fig.9 遊離塩素の形態比率と pH の関係¹⁾

図に示される様に pH5~9 においては、pH が高くなるほど、次亜塩素酸イオン (OCl-) の比率が高くなる。この反応種は、膜透過性が悪く細胞内の核酸もしくは必須代謝機能の損傷に至らない割合が増えると考えられる。従って、pH 9 で低濃度投入の場合には *P. aeruginosa* の不活化においてこのような半致死の損傷が生じており、致死の損傷を生じる速度は、半致死の損傷を生じる速度のおおよそ 6~7 割程度に留まっていると推定される。

次に *E.coli* の不活化に関して、Fig.6~8 の結果

を比較してみると、pH5~9 においては、pH が高くなるにつれて、消毒効果が低くなっていることがわかる。

さらに異なる培地による測定結果について、考察すると、pH5~7 においては、特に最初の大幅な不活化の際の、各培地による残存測定数に差が生じていない。その後僅かに差が見られるものの、この比率は非常に小さい。一方、pH 9 になると、はっきりと初期段階から残存測定数に差が生じており、細胞膜や特定代謝機能の一部が損傷するような半致死の損傷が生じていることが推定される。

これは前述の *P. aeruginosa* の場合の考察と同様に、Fig.9 に示されるように pH が高くなるに従って、次亜塩素酸イオンの比率が高くなり、ほとんど次亜塩素酸イオンとなっている pH 9 においては、この反応種の膜透過性の悪さ、選択的反応性から必須代謝機能の損傷に至らないような半致死の損傷を生じる割合が増えたと考えられる。

不活化速度を考えてみると、*P. aeruginosa* の不活化と同様に、致死の損傷を生じる速度は、半致死の損傷を生じる速度のおおよそ 4~5 割程度に留まっていると推定される。

E. 結論

- 1) *P. aeruginosa* の測定に 3 種類の培地を用いて測定することが可能であり、その差から損傷部位を推定することが可能と考えられた。
- 2) *P. aeruginosa* についての 3 種の培地測定法を紫外線不活化に適用した結果、核酸損傷機能と整合性のある結果が得られた。
- 3) 塩素処理を適用した結果、*P. aeruginosa* の耐性が、*E.coli* に比べて高いことが確認された。
- 4) *P. aeruginosa* については塩素投入濃度によって不活化効果が異なり、低塩素投入濃度 (0.1

投入濃度に関わらず、消毒効果がわずかに低くなっていることがわかる。またいずれにおいても、各測定培地での残存測定数に差が生じていないことがわかる。このことから、*P. aeruginosa* の塩素消毒においては、細胞膜や特定代謝機能の一部が損傷するような半致死の損傷はほとんどなく、損傷を受ける場合は致死的なものであると考えられる。ただし pH 9 で、かつ 0.1 mg/L の低投入濃度の場合には、若干この半致死の損傷が確認されている。これは Fig.9 に示す、次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンの生存比に関わると考えられる。

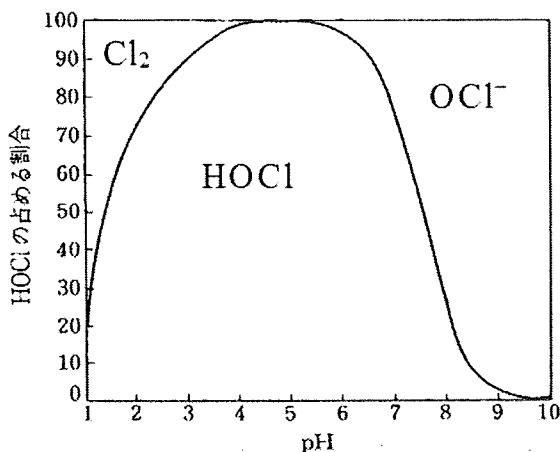


Fig.9 遊離塩素の形態比率と pH の関係¹⁾

図に示される様に pH5~9 においては、pH が高くなるほど、次亜塩素酸イオン (OCI-) の比率が高くなる。この反応種は、膜透過性が悪く細胞内の核酸もしくは必須代謝機能の損傷に至らない割合が増えると考えられる。従って、pH 9 で低濃度投入の場合には *P. aeruginosa* の不活化においてこのような半致死の損傷が生じており、致死の損傷を生じる速度は、半致死の損傷を生じる速度のおおよそ 6~7 割程度に留まっていると推定される。

次に *E.coli* の不活化に関して、Fig.6~8 の結果

を比較してみると、pH5~9 においては、pH が高くなるにつれて、消毒効果が低くなっていることがわかる。

さらに異なる培地による測定結果について、考察すると、pH5~7 においては、特に最初の大幅な不活化の際の、各培地による残存測定数に差が生じていない。その後僅かに差が見られるものの、この比率は非常に小さい。一方、pH 9 になると、はっきりと初期段階から残存測定数に差が生じており、細胞膜や特定代謝機能の一部が損傷するような半致死の損傷が生じていることが推定される。

これは前述の *P. aeruginosa* の場合の考察と同様に、Fig.9 に示されるように pH が高くなるに従って、次亜塩素酸イオンの比率が高くなり、ほとんど次亜塩素酸イオンとなっている pH 9 においては、この反応種の膜透過性の悪さ、選択的反応性から必須代謝機能の損傷に至らないような半致死の損傷を生じる割合が増えたと考えられる。

不活化速度を考えてみると、*P. aeruginosa* の不活化と同様に、致死の損傷を生じる速度は、半致死の損傷を生じる速度のおおよそ 4~5 割程度に留まっていると推定される。

E. 結論

- 1) *P. aeruginosa* の測定に 3 種類の培地を用いて測定することが可能であり、その差から損傷部位を推定することが可能と考えられた。
- 2) *P. aeruginosa* についての 3 種の培地測定法を紫外線不活化に適用した結果、核酸損傷機能と整合性のある結果が得られた。
- 3) 塩素処理を適用した結果、*P. aeruginosa* の耐性が、*E.coli* に比べて高いことが確認された。
- 4) *P. aeruginosa* については塩素投入濃度によって不活化効果が異なり、低塩素投入濃度 (0.1

分担研究報告書 4

残留塩素濃度を低減した水道システムにおける
微生物再増殖管理に関する研究

研究分担者 伊藤 禎彦
研究協力者 大河内 由美子

厚生労働科学研究 平成 21 年度分担研究報告書
残留塩素濃度を低減した水道システムにおける微生物再増殖管理に関する研究

分担研究者:京都大学大学院 伊藤 禎彦

研究協力者:京都大学大学院 大河内 由美子

研究要旨:本研究では残留塩素濃度を最小限にした水道システムの構築を想定し、微生物再増殖を抑制するために要求される水質を調べるとともに、再増殖微生物の迅速な測定法を検討した。最小限の残留塩素存在環境 (0.05 mgCl₂/L) で微生物再増殖を抑制するためには、AOC 濃度を約 11 μgC/L まで低減する必要があることが回分培養試験により示された。一方、現状の高度浄水処理水中の AOC 濃度は概ね 50 μgC/L 以上とかなり高濃度であり、目標達成には新たな処理技術の導入あるいは処理プロセスの再構築が不可欠と考えられる。さらに、浄水中の従属栄養細菌数を迅速に測定する手法として、短時間の培養により BrdU 標識された核酸量を定量する方法を提案した。BrdU 標識反応後の細胞から抽出した DNA を直接固定化した場合 (DNA 固定化法) により高い検出感度が得られた。また抗原抗体反応の前処理時間も短縮可能であることから、DNA 固定化法がより優れていることが示された。実際の浄水試料中の再増殖微生物についても、細胞濃度 10¹~10³ CFU/mL の濃度範囲において、細胞数の対数値と BrdU 標識 DNA 量の間には比例関係が得られることを確認し、本手法が混合微生物系に対しても適用可能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)を炭素源として微生物が再増殖する現象が確認されており、残留塩素を維持することで再増殖現象を抑制しているのが現状である。カルキ臭や消毒副生成物の生成を抑制するためには、反応前駆物質の除去と並んで残留塩素濃度を最小化する必要があるが、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る。そのため、より厳密な微生物マネジメントおよびリスクアセスメント手法が求められる。

そこで本研究では、最小限の残留塩素濃度を維持した水道システムの構築を目的として、1) 微生物増殖を促進しない水質要件の決定、2) 浄水中の従属栄養細菌数を迅速に測定する手法の確立および3) 腸管系病原微生物を対象とした定量的微生物リスク評価に取り組む。具体的には、カルキ臭対策の一環として残留塩素濃度を痕跡程度まで低減する場合、微生物学的安定性を維持するためには生物分解可能な有機炭素濃度を同時に低減する必要があるため、AOC を指標としてどの程度までこれを低減すれば良いかを明らかにする。また、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・標識された 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. 方法

1) 微生物増殖を促進しない水質要件の決定

高度浄水処理プロセスにおける AOC 除去特性

昨年度冬季に、淀川表流水を原水とするオゾン-活性炭(BAC)を導入した高度浄水処理プロセスを

対象とした調査を実施したが、プロセス全体としての AOC 除去効果は確認されなかった。今年度は夏季に昨年度と同様の調査を実施し、AOC 除去効果を確認した。調査概要は下記のとおりである。

- ・ 対象施設: 淀川表流水を原水とする高度浄水処理施設
- ・ 測定時期: 2009 年 6 月と 7 月 (計 2 回)
- ・ 測定項目: AOC, TOC, HPC

残留塩素濃度を低減した浄水中で微生物再増殖を抑止可能な AOC レベルの把握

・低濃度 AOC 含有水道水試料の調製

本研究では、残留塩素濃度を低減した水道システムを想定して、微生物再増殖を抑止可能な AOC レベルを明らかにすることとした。そのため、AOC 濃度の低い ($\sim 20 \mu\text{gC/L}$) 水道水試料の調製が必要となるが、昨年度までの結果から現在の水道水中 AOC 濃度は比較的高濃度であることがわかっている。そのため、実験に先立って低濃度 AOC 含有試料の調製方法を検討した。具体的には、未処理/加熱処理 (121°C , 20 分) した水道水試料に微生物を植種し、植種後の試料を 20°C で長期間培養を行うことで AOC をバイオマスに転換し、増殖バイオマスを $0.2 \mu\text{m}$ ろ紙により除去した (図 1 参照)。植種微生物として、あらかじめ採取して残留塩素を中和した給水栓水試料で再増殖した微生物群を用いた。また、試料の pH を調整することで、中性およびアルカリ条件下で加熱処理を行った。

・残留塩素濃度を低減した浄水中で微生物再増殖を抑止可能な AOC レベルの把握

本実験は回分培養系で行い、異なる AOC 濃度の未処理/前処理済み水道水に対して微生物を植種した後に、間欠的に次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加することにより、0, 0.05 (痕跡程度), 0.1 - 0.15 mgCl_2/L の三段階で塩素濃度のコントロールを行った。培養は 20°C で 10 日間行い、植種後の従属栄養細菌数変化を培養法により経時的に調べた。手順の詳細を図 2 に示す。培養 4 日または 10 日後に初期植種量を超える従属栄養細菌数が確認された場合に、微生物再増殖試料として判定した。

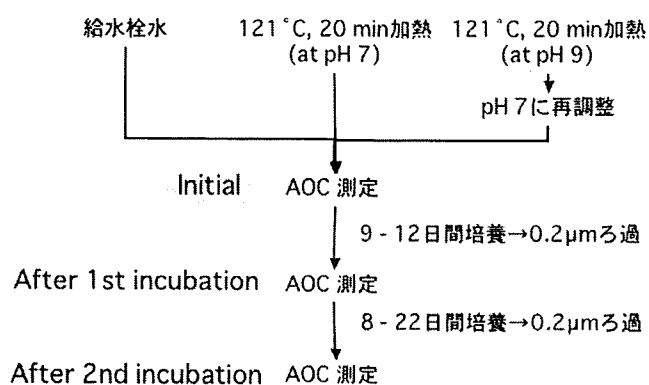


図 1 低濃度 AOC 含有水道水試料の調製方法

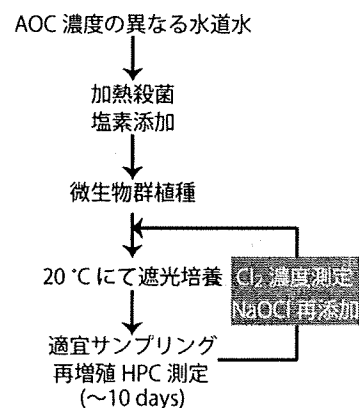


図 2 回分培養試験手順

2) 浄水中の従属栄養細菌数を迅速に測定する手法の確立

抽出した BrdU 標識 DNA 量と従属栄養細菌数の関係

昨年度検討した BrdU 標識反応後の微生物細胞を固定化して抗原抗体反応を行う方法(細胞固定化法)に対して、今年度は BrdU 標識反応後の細胞から抽出した DNA を固定化して抗原抗体反応を行う方法(DNA 固定化法)を検討した。細胞濃度が約 $10^1 \sim 10^4$ cells/mL の 2 種類のモデル微生物 (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Aquaspirillum* sp. NOX) 培養液 100 mL を用いて、BrdU 標識反応 (BrdU 濃度: $1 \mu\text{M}$, 20°C で 5 時間) 後に遠心分離により集菌した菌体から、市販のキットを用いて DNA 抽出を行った。DNA 溶出液 $200 \mu\text{L}$ のうち、 $50 \mu\text{L}$ に対して等量の 0.2 M PBS-Mg 溶液を混合してからマイクロプレートに溶液を移した。 30°C で 2 時間インキュベート後、溶液を除去して乾燥させた後に、従来法である細胞固定化法と同様にヌクレアーゼによる DNA 変性処理および抗原抗体反応を行った。

水道水試料中の従属栄養細菌数測定への適用

急速ろ過処理水ならびに高度浄水処理水給水区において、それぞれ 6 カ所の給水栓から採水を行った。チオ硫酸ナトリウム添加により残留塩素を中和した後、 20°C で 6 日間培養し、再増殖従属栄養細菌数の経時変化を R2A 平板培養により調べるとともに、BrdU 標識反応を行い、細胞固定化法と DNA 固定化法の両手法により BrdU 標識 DNA 量と従属栄養細菌数の関係を調べた。

C. 結果

1) 微生物増殖を促進しない水質要件の決定

高度浄水処理プロセスにおける AOC 除去特性

冬季・夏季それぞれの季節における AOC 除去特性を比較した結果を図 3 に示す。各季節とも 2 回のサンプリングで得られた平均値を示した。原水と処理水の AOC 濃度を比較すると、原水では夏季 $44 \mu\text{g/L}$ 、冬季 $148 \mu\text{g/L}$ だったのに対して、処理水は夏季 $53 \mu\text{g/L}$ 、冬季 $130 \mu\text{g/L}$ となり、ともに冬季に AOC 濃度が顕著に増大することが確認された。我々の調査研究結果から、琵琶湖・淀川水系内では対象施設が存在する事業体以外においても、冬季に給水栓水 AOC が増大する現象が確認されており、水源における有機物量および組成変動が反映された結果と考えられる。また、処理プロセス全体としての TOC 除去率は 50% 前後と安定していたのに対して、AOC 除去は両シーズンともほとんど確認されなかった。一方、各処理プロセスの効果を見てみると、凝集沈殿プロセスで安定した低減効果を示したほか、冬季にはほとんど効果が見られなかった BAC プロセスについても、夏季には約 62% の低減効果を示した。

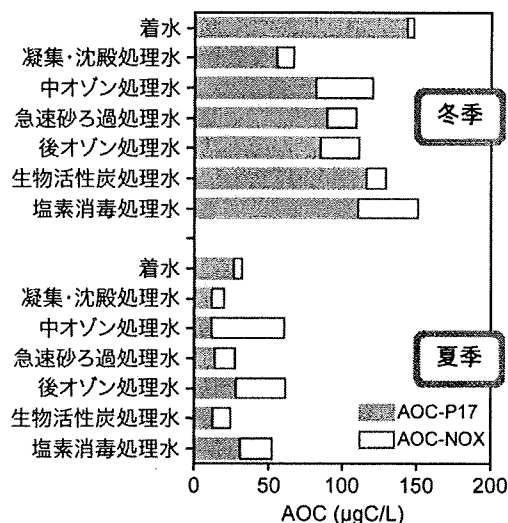


図 3 高度浄水処理プロセスにおける AOC の変化

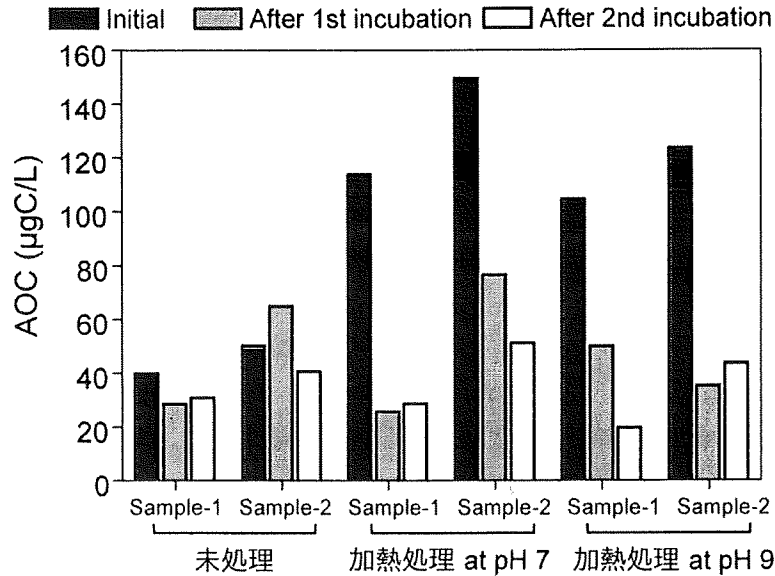


図4 前処理による AOC 低減効果の比較

残留塩素濃度を低減した浄水中で微生物再増殖を抑制可能な AOC レベルの把握

・低濃度 AOC 含有水道水試料の調製

前処理が試料中 AOC 濃度に及ぼす影響を図 4 に比較する。加熱処理により AOC 濃度は 100 µgC/L 以上へと顕著に増大した。この AOC 増大は、水道水中に残存しているより高分子量有機物から構成される生分解性有機物 (Biodegradable Organic Matter; BOM) が、AOC 試験株にも利用可能な低分子量化合物へと加水分解された結果と考えられる。その後、計 20-29 日間の 2 回の培養期間中に、増大した AOC は微生物バイオマスへと変換された。最終的に、増殖バイオマス除去後の試料中 AOC 濃度は最も低い試料 (pH 9 で加熱処理) で 17 µgC/L となった。

ここで、未処理試料についても約 30-40 µgC/L と一見あまり変わらない AOC 濃度を示しているものの、前述のように AOC 画分へと変換されうる多量の BOM が試料中に残存していると考えられ、これらが実験中に徐々に低分子化される可能性が否定できないため注意が必要である。以上の結果から、pH 9 で加熱処理後 20 日間以上の培養を行った水道水試料を、以降の実験では用いることとした。

・残留塩素濃度を低減した浄水中で微生物再増殖を抑制可能な AOC レベルの把握

培養 10 日後のデータプロットを図 5 に示す。Y 軸には培養期間中の平均残留塩素濃度を表した。実験に供した試料の AOC 濃度範囲 17-250 µgC/L において、残留塩素濃度 0 mgCl₂/L の場合には全ての試料で再増殖が確認された。これらのデータセットを用いて、Srinivasan らの報告¹⁾を参考に以下の方法により微生物学的安定性を維持するための AOC 濃度を算出した。

微生物学的安定性を維持するためには、消毒剤による微生物不活化速度が微生物増殖速度と等しいか、より大きい必要がある。微生物増殖が Monod 式、消毒による不活化が Chick-Watson モデルにそれぞれ従うと仮定して、微生物増殖基質(ここでは AOC)と消毒剤(ここでは残留塩素)の関係は以下の式で表される。

$$C_d \geq \frac{\mu_{\max}}{k} \left(\frac{C_s}{K_s + C_s} \right) \quad (\text{式 1})$$

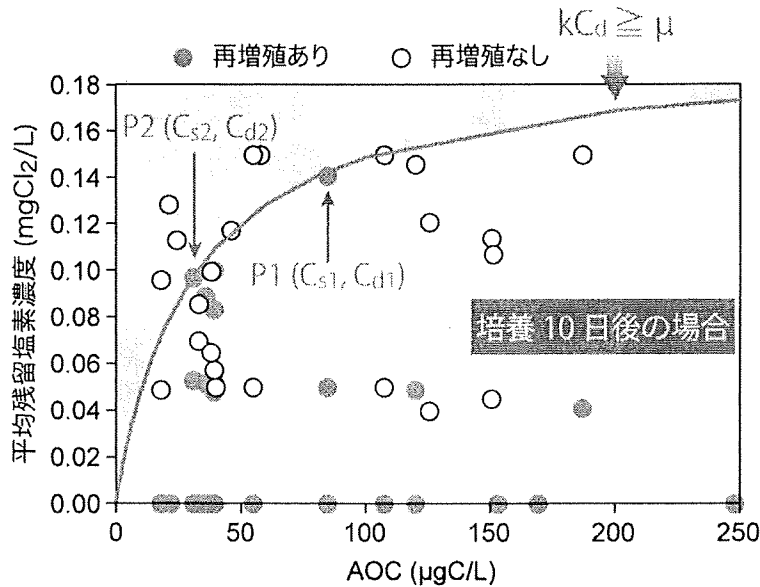


図 5 種々の AOC・残留塩素濃度条件下での微生物再増殖と微生物学的に安定な水質曲線 (培養 10 日後のデータを使用した場合)

ここで、 C_s : 基質(AOC)濃度 ($\mu\text{gC/L}$), C_d : 消毒剤 (残留塩素)濃度 (mgCl_2/L), μ_{\max} : 系内微生物の最大比増殖速度 (h^{-1}), k : 消毒剤の不活化速度定数 ($\text{L}/\text{mgCl}_2 \cdot \text{L}$), K_s : 基質半飽和定数 ($\mu\text{gC/L}$) である。

まず得られたデータセットから、図 5 に示したように 2 つのプロット P1(C_{s1}, C_{d1}) (微生物再増殖が確認されたうち最大消毒剤濃度) および P2(C_{s2}, C_{d2}) (微生物再増殖が確認されたうち最小基質濃度) をそれぞれ選定し、これらを式 1 に代入して K_s および μ_{\max}/k を求めた。培養 10 日後のデータセットで計算した K_s , μ_{\max}/k は、それぞれ $31.4 \mu\text{gC/L}$, $0.19 \text{ mgCl}_2/\text{L}$ であった。これらの係数を用いて決定した“微生物学的に安定な水質曲線”を図 5 に併せて示した。この関係性を用いて、残留塩素濃度 0.05 または $0.1 \text{ mgCl}_2/\text{L}$ の場合に許容される AOC 濃度を計算したところ、 10.9 または $33.6 \mu\text{gC/L}$ の値が得られた。

2) 浄水中の従属栄養細菌数を迅速に測定する手法の確立

抽出した BrdU 標識 DNA 量と従属栄養細菌数の関係

DNA 固定化法により定量した BrdU 標識 DNA 量と微生物細胞数との関係を図 6 に示す。細胞固定化法の場合と同様に、ブランクとして BrdU を同量添加した滅菌 R2A 培地を用いて DNA 抽出を含めた一連の操作を行った試料により得られた吸光度を用い、各試料の測定値を補正した。各モデル微生物の培養液を用いて 3 回ずつ測定を行い、測定値の変動を調べている。

図 6 からわかるように、検討した微生物細胞濃度範囲 ($10^1 \sim 10^3 \text{ CFU/mL}$) で細胞数の対数値と BrdU 標識 DNA 量の間には比例関係が確認された。3 回それぞれの回帰式の直線 (=細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量) は、P17 株を用いた場合には $0.053\text{-}0.059$, NOX 株の場合には $0.047\text{-}0.057$ の範囲であった。この図には示していないが、 10^3 CFU/mL を超える細胞濃度領域では細胞固定化法の場合と同様、吸光度が大きく低下するケースが確認され、DNA 固定化法を用いた場合にも定量可能な上限濃度は 10^3 CFU/mL と判断された。