

School of Public Health on behalf of the World Health Organization and The World Bank, Cambridge, MA., 1996.

- 16) World Health Organization The Global Burden of Disease: 2004 Update, 146p., 2008.
- 17) Van Lier, E. A., Havelaar, A. H., Disease burden of infectious diseases in Europe: a pilot study, RIVM report 215011001, 2007.
- 18) 伊藤禎彦, 越後信哉: 水の消毒副生成物, 技報堂出版, 325p., 2008.
- 19) Havelaar, A. H., De Hollander, A. E. M., Teunis, P. F. M., Evers, E. G., Van Kranen, H. J., Versteegh, J. F. M., Van Koten, J. E. M., Slob, W.: Balancing the risk and benefits of drinking water disinfection: Disability adjusted life-years on the scale. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 108, No. 4, pp. 315-321, 2000.
- 20) 厚生科学審議会: 水質基準の見直し等について (答申), 2003.
- 21) World Health Organization: WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases, A summary document, 2008.
- 22) Havelaar, A. H., Melse, J. M.: Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality; A burden of disease approach, RIVM report 734301022, 2003.

Our approaches for reducing chlorinous odor to establish satisfactory water supply systems in Japan

Yumiko OHKOUCHI¹, Shinya ECHIGO¹, Nagahisa HIRAYAMA², Sadahiko ITOH¹

¹ Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

² Graduate School of Engineering, Kyoto University

Introduction

Waterworks in Japan have been working on improvement of drinking water quality to reduce health risks caused by micropollutants including disinfection by-products. However, customers' complaints for drinking water have been getting increased, even after advanced water treatment processes were installed to reduce micropollutants.

Our results of questionnaire survey¹⁾, which were conducted in Osaka City area where is supplied with drinking water treated by advanced treatment processes in every region, indicated that only 40.6 % customers were satisfied with current drinking water. The result also suggested that around 35 % customers sensed chlorinous odor of drinking water. In particular, the percentage was increased among customers, who prefer bottled water for drinking behavior, over 40 % people sensed chlorinous odor. Thus, customers' concern about chlorinous odor has still been growing, and waterworks can no longer ignore this issue.

Framework of our research

A framework of our research is shown in Fig. 1. Our research includes three subjects, field survey on chlorinous odor, chemical approach, and biological approach to reduce it. First of all, a field survey on current levels of chlorinous odor in drinking water was conducted in Osaka City. Based on the results, we are working on two approaches to reduce chlorinous odor. One is chemical approach to reduce precursors by improving water treatment processes, such as nitrogen compounds, which cause chlorinous odor by reaction with chlorine. And another is biological approach to prevent bacterial regrowth, assuming lowering of chlorine residual in distribution systems.

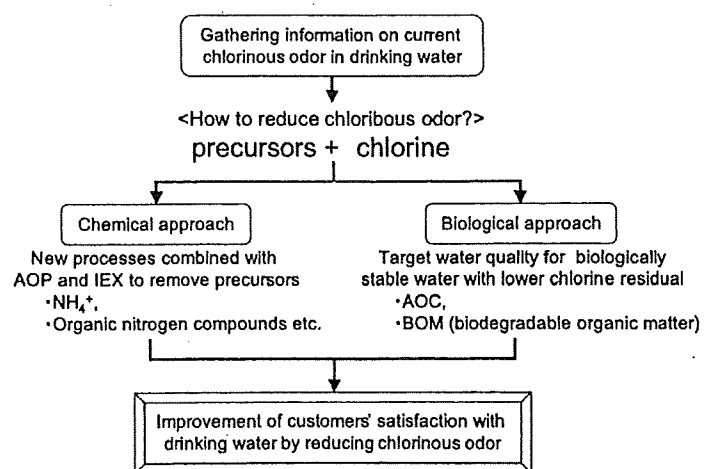


Fig. 1 Framework of our research

Field survey on chlorinous odor in drinking water

TONs of tap water samples were determined in Fig. 2 by sensory tests with three

samples at each dilution²). The TONs of samples with chlorine residual were ranged from 3 to 88. After neutralizing chlorine residual, the TON values were decreased significantly in all samples. These results confirmed that current water treatment processes including ozonation and BAC could not prevent formation of chlorinous odor after chlorination. There is some debate over whether chlorinous odor causes failure in customers' daily lives, but the fact that considerable customers are avoiding direct ingestion of tap water by sensing chlorinous odor should be paid attention carefully.

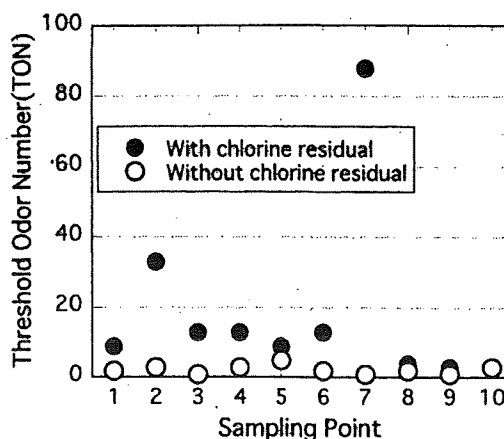


Fig. 2 Threshold odor number in current tap water samples

Chemical approaches to reduce chlorinous odor at water treatment processes

Several compounds have been proposed as major compounds of chlorinous odor, and trichloramine was believed as the most likely compound among them³). It is well-known that trichloramine is produced by reactions between chlorine and ammonium ion or organic nitrogen compounds⁴). Therefore, an approach to remove one of precursors, ammonium ion, by cation exchanger must be an effective to reduce chlorinous odor.

The removal ammonium ion from BAC effluent supplemented with 100 µg/L ammonium ion by cationic exchanger, zeolite, was shown in **Table 1**. Two types of zeolite, MOR-Na and A4, were chosen based on the removal efficiency in batch-mode experiments. Chlorine was added to the ion-exchanged water at chlorine residual of 1.0 mg/L after 24 hours chlorination, and then the TONs were also compared. Although almost 60 % of the ammonium ion could be removed by cation exchange treatment using selected zeolites, only 17 – 35 % decrease of the TONs after chlorination of treated water were observed. These results suggested that there were possible precursors besides ammonium ion in BAC effluent, and that the impact of ammonium ion removal on reducing chlorinous odor was very limited. Another candidates of precursors were organic nitrogen compounds.

The effect of removal of dissolved organic matter (DOM) from BAC effluent by anion exchange treatment using commercial resin SA-10 on chlorinous odor formation was also shown in **Table 1**. About 10 % DOC could be removed after 24 hour anion exchange treatment, and the TON after chlorination was also reduced by 72 %. At the same condition, the TON was reduced by 55 % by cation exchange treatment using MOR-Na. These results indicated that not only ammonium ion but also dissolved organic matter contribute to chlorinous odor formation equivalently.

Now, we are working on establishing new water treatment processes with combination of advanced oxidation process and ion exchange process aimed at organic matter or ammonium ion, which are difficult to remove even through an existing advanced water

treatment processes.

Table 1 Effect of ion exchange on removal of ammonium ion and chlorinous odor

Resin used for ion exchange	BAC effluent +100 µg/L NH ₄ ⁺		BAC effluent only		
	Residual NH ₄ ⁺ (µg/L)	TON	Chlorine residual after 24 hours (mg/L)	TON	Chlorine residual after 24 hours (mg/L)
None(Control)	100	82	0.889	56	0.869
MOR-Na	40.7	53	1.097	31	0.808
A4	37.2	68	1.173	-	-
SA-10A	-	-	-	40	0.937

Biological approaches for minimization of chlorine residual in water supply systems

The other approach to reduce chlorinous odor is reduction of chlorine disinfectant. This approach means that waterworks make sacrifice microbiological safety for improving comfort of drinking water with lower disinfection levels than present. In Japan, 0.1 mg/L chlorine residual should be kept at each faucet, but many waterworks try to control chlorination process as higher concentration of chlorine residual, around 0.4 mg/L, can be detected at each faucet. This chlorine residual level works effectively to inactivate bacteria in distribution systems. As you know well, however, water supply systems without chlorine disinfection are established in the Netherlands, with various efforts not only at water treatment plant, but also at distribution processes to keep biological stability of finished water⁵⁾.

On the other hand, there is little information on biological stability of finished water in Japan. The importance of maintenance of distribution pipes to supply high quality water has also become recognized only recently among researchers and engineers. Thus, there are several technological hurdles to establish water supply systems without chlorine residual. The first choice that we should take in Japan is minimizing chlorine residual within water distribution systems to prevent chlorinous odor formation, without any worsening of microbiological safety.

First, the current AOC levels in drinking water were determined. The water samples taken at each faucet in Kyoto City contained 59.8 ± 15.6 µgC/L AOC in summer (n=40), and 173.9 ± 43.5 µgC/L AOC in winter (n=6), respectively. The target area was supplied with treated water by conventional treatment processes. The large difference was observed between AOC level in summer and in winter, and it was considered to reflect the seasonal changes of AOC in water resource. Thus, the current AOC levels were much higher than the level for biologically stable water proposed by van der Kooij⁶⁾.

Based on the above results, we should reduce AOC levels in drinking water prior to minimizing chlorine residual to establish water supply systems without chlorinous odor formation. The target level of chlorine residual was set at 0.05 mg/L, considering the range for its stable measurement. Then, how much lower AOC will be required for biologically

O-9

stable drinking water at a such trace level of chlorine residual? Now, we are trying to determine a curve for biologically stability as shown in Fig. 3, which represents points that the rates of inactivation by chlorine became equal to the growth rates of bacteria at different AOC and chlorine concentrations, in batch-mode experiments. This curve for biologically stability will help us to set a target AOC level at trace level of chlorine residual, and to make choices in reassembling water treatment processes to achieve the target AOC.

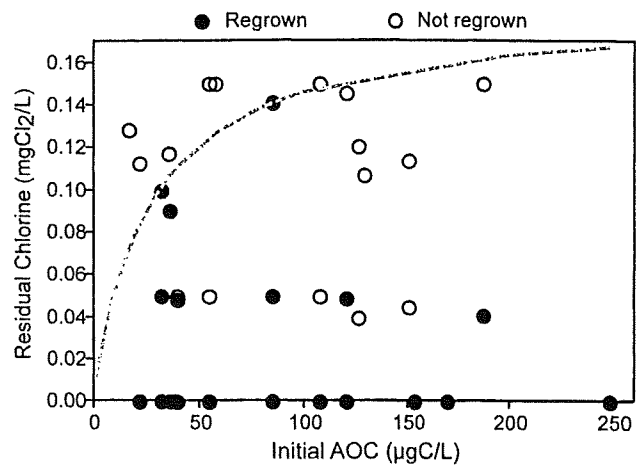


Fig. 3 Bacterial regrowth after 10 days incubation at different AOCs and chlorine residuals

Summary

In addition to above-mentioned approaches, it is important to analyze possible hazards and their risks caused by pathogens, especially when water treatment processes will be reassembled based on new concepts and technologies. We believe that these multi-directive approaches can help us to optimize water treatment processes totally in terms of specific aquatic environment and water quality in Japan.

Reference

- 1) Itoh, S., Shiro, S., Hirayama, N., Echigo, S. and Ohkouchi, Y.: Factors related to citizens' satisfaction with tap water and analysis of improvement needs in water supply system, *Environ. Sanit. Eng. Res.*, 21(1), pp. 9-19, 2007 (in Japanese)
- 2) Yanagibashi, Y., Quan, D., Itoh, S., Echigo, S., Miyamoto, T. and Ohkouchi, Y.: Application of a triangle test to the measurement of threshold odor numbers (TONs) in the water supply, *J. Jpn. Water Works Assoc.*, 78, pp. 2-12, 2009 (in Japanese)
- 3) Nabeta, Y. and Nishikawa, M.: A major compound of chlorinous odor and its reduction, *J. Jpn. Water Works Assoc.*, 66, pp.16-23, 1997 (in Japanese)
- 4) Kajino, M., Morizane, K., Umetani, T. and Terashima, K.: Odors arising from ammonium and amino acids with chlorine during water treatment, *Water Sci. Technol.*, 40 (6), pp. 107-114, 1999
- 5) van Liverloo, J. H. M., Medema, G. and van der Kooij, D.: Risk assessment and management of faecal contamination in drinking water distributed without a disinfectant residual, *J. Water Suppl.: Res. Technol. Aqua*, 55, pp.25-31, 2006
- 6) van der Kooij, D.: Assimilable organic carbon as indicator of bacterial regrowth, *Journal Am. Water Works Assoc.*, 84 (February), pp. 57-65, 1992.

Rapid Quantification of Heterotrophic Bacteria in Drinking Water Based on the Amount of DNA Labeled with Bromodeoxyuridine

Yasuhiro ASADA*, Yumiko OHKOUCHI** and Sadahiko ITOH**

* Graduate School of Engineering, Kyoto University

** Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

Introduction

As one of the indicators for integrity of water treatment processes and hygienic status of water distribution systems, heterotrophic plate count (HPC) is often used. However, it usually takes 7 days for HPC measurement. In many cases, water quality management based on HPC numbers in distribution systems will not work effectively, because water distribution time is usually within 2 days in Japan. Therefore, to quantify rapidly regrown bacteria in distributed water, newly synthesized DNA during short time incubation was focused on here. Synthesized DNA during short incubation was labeled with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), which was a thymidine analogue. The objective of this study was to establish several conditions for labeling DNA with BrdU or quantitating labeled DNA using model bacterial stains, *Pseudomonas fluorescens* P17 and *Aquaspirillum* sp. NOX.

Methods

The procedure of proposed method here was shown in Fig.1. To optimize a labeling reaction with BrdU and an immunochemical detection, the following factors were examined in this study;

- (1) BrdU concentration: 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M
- (2) Reaction time for BrdU labeling: 3, 5, 7 hours

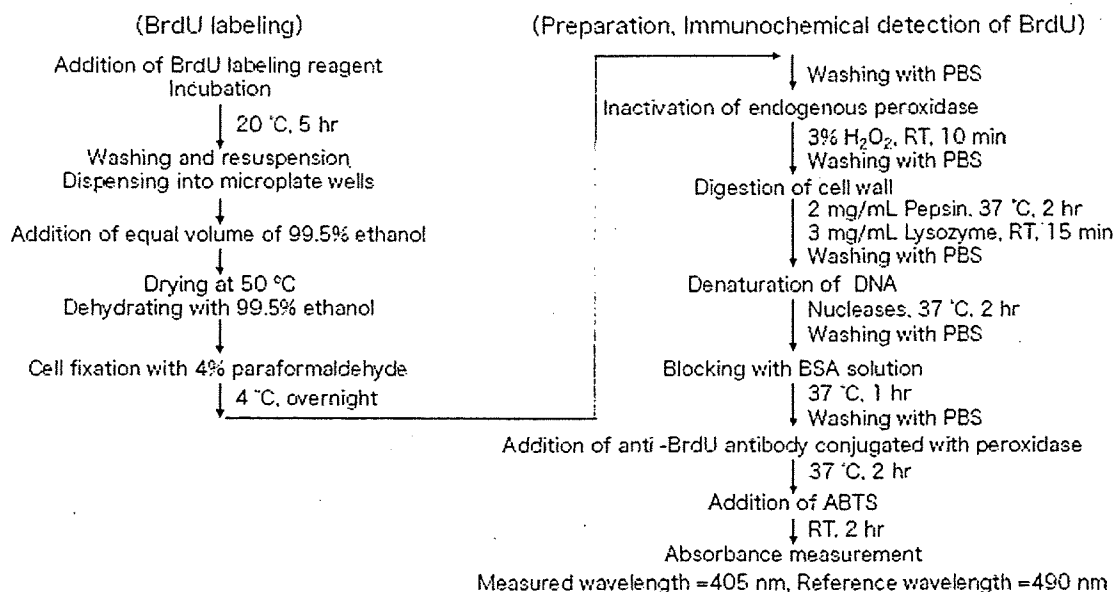


Fig.1 The flow chart of the experimental procedure modified based on Hamasaki *et al.* (2004)

- (3) Anti-BrdU antibody concentration: 40 mU/mL,
200 mU/mL
- (4) The effect of blocking with bovine serum albumin (BSA) solution for prevention of non-specific antibody adsorption

Results and Discussion

First, the conditions for a labeling reaction and an immunochemical detection were determined based on relationships between bacterial cell counts on R2A agar medium and amounts of DNA labeled with BrdU. The labeled DNA amounts were increased proportionally with the logarithmic values of bacterial cell count. So, the conditions, in which obvious positive correlations were obtained between them for both strains, were chosen as follows;

- (1) BrdU concentration: 1 μ M
- (2) Reaction time for BrdU labeling: 5 hours
- (3) Anti-BrdU antibody concentration: 200 mU/mL
- (4) Performing the blocking with 1% BSA solution

Then, the amounts of DNA labeled with BrdU were measured under the above-determined conditions in triplet and the reproducibility of them was checked. The results obtained using P17 strain were shown in Fig.2. The slopes of linear regression line were quite stable in triplet trials. It was suggested that this method enabled us to estimate HPC numbers in water samples within 2 days based on the labeled DNA amounts. However, the slopes of liner regression for NOX strain were greater than that for P17 strain. Many bacterial species with different growth rates exist in tap water. Therefore, the determined conditions of our proposed method should be examined for a wide range of indigenous bacteria in tap water.

Conclusions

The conditions for labeling DNA with BrdU and quantitating labeled DNA were determined. By our proposed method, HPC numbers in water samples could be estimated within 2 days. In future, an applicability of this method should be evaluated using real tap water samples containing various kinds of heterotrophic bacteria.

Reference

- Hamasaki, K., Long, R. A. and Azam, F., "Individual cell growth rates of marine bacteria, measured by bromodeoxyuridine incorporation," *Aquat. Microb. Ecol.*, 35(3), 217-227(2004).

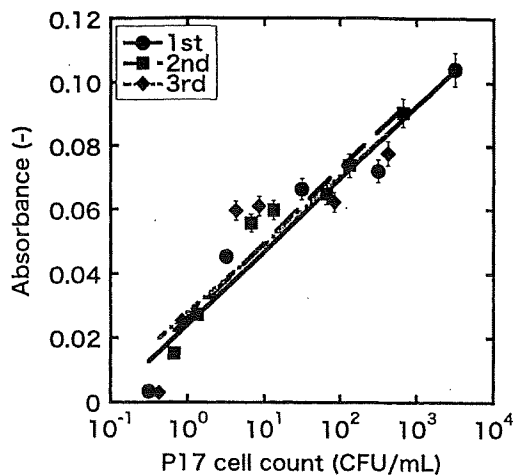


Fig.2 Relationship between bacterial cell counts and amounts of DNA labeled with BrdU

微生物の定量的感染リスク評価手法

伊藤禎彦¹, Patrick Smeets², Gertjan Medema²
¹京都大学, ²KWR Watercycle Research Institute

1. はじめに

1980年代以来、飲料水の微生物的安全性を定量化するため定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)が適用されてきた(Medema *et al.*, 2006)。感染リスクは、飲料水中に含まれる病原微生物の摂取量と、その摂取によって感染が起きる確率から計算される。多くの研究では、浄水処理ステップの除去・不活化能のような各要素の変動は確率密度関数(PDF)によって記述される。年間感染確率は、モンテカルロシミュレーションによって定量的に評価される。本研究では、これまでのQMRA研究で開発されてきた手法を取り込み、オランダでのケーススタディの中で*Campylobacter*の年間感染リスクを評価した。その中では、処理前後の微生物濃度データのペアリング方法について検討したことが特徴である。ついで、評価結果に対して不確実性分析を行った。

2. 方法

2.1 対象浄水処理プロセス:オランダ西部に位置する Waternet の Weesperkarspel 浄水場をケーススタディとして用いた。原水は Bethune polder から取水される表流水である。夏季に需要水量が増大する時期には、Amsterdam-Rhine canal の水 (ARK-water) が追加して取水される。その取水量は年間の全水量の5%である。原水はまず、凝集・貯水、急速砂ろ過によって前処理される。貯水池における平均滞留時間は89日である。この水は主浄水場に送られ、オゾン処理、軟化、粒状活性炭、緩速砂ろ過によって処理される。

2.2 対象微生物とデータ: *E. coli* をとりあげ浄水プロセスの除去・不活化能を評価した。その後、表流水中で測定された *Campylobacter* に対する *E. coli* との比率を用いて *Campylobacter* 数に換算する。*E. coli* と *Campylobacter* は、急速砂ろ過、緩速砂ろ過、オゾン処理で、同様に除去・不活化されることが認められている(Hijnen *et al.*, 2005; Smeets *et al.*, 2005)。原水中 *E. coli* 濃度のデータは2002年4月から2004年12月までに46回測定された値を用いた。

2.3 データのペアリング方法: 浄水処理プロセスの除去・不活化能は通常、デイト法(date method)によって評価される。同じ日に採取された流入水と流出水のサンプルの測定値をペアリングし除去・不活化率を計算する。一方、ランク法(rank method)では、流入水濃度と流出水濃度との間に相関があることを仮定する。つまり、流入水濃度が高ければ流出水濃度も高くなり、流入水濃度が低ければ流出水濃度も低くなるという仮定である。このほかランダム法(random method)という方法もある。流入水濃度と流出水濃度のデータセットから値をランダムに取り出してペアリングする。Smeets *et al.* (2008)らの検討例を参考に、ここではデイト法とランク法を比較した。さらに、データセットの信頼限界を調べるためブートストラップサンプリングを組み合わせて評価した。

2.4 除去・不活化能に対する分布型あてはめ: 対象とした浄水場の処理プロセスで、主な微生物のバリアと考えられるのは、凝集-貯水、急速砂ろ過、オゾン処理、緩速砂ろ過である。ここで評価する対象はこれらの4段階とした。各ステップにおいて、ランク法によって評価された除去・不活化能の分布に対して適合する分布型を選択した。緩速砂ろ過後の水は、配水される水道水を意味する。2003年1月から2004年12月まで毎日測定された合計1393回の*E. coli*の測定値は、1回だけ検出(0.2 *E. coli* /100mL)されたが、そのほかはすべて0であった。このため除去能を評価するためにはパイロットスケールで行われた*E. coli*の除去実験の結果を用いた(Dullemeont *et al.*, 2006)。水温13°C以下の条件下で測定された6回の除去能測定値から、最小値4.2 log₁₀, 最尤値2.4 log₁₀, 最大値2.0 log₁₀を得、これらをパラメータとする三角分布を設定した。除去・不活化率に対して与えられたPDFをもとにモンテカルロシミュレーションを行い、4段階の処理ステップの総合除去能を計算した。

2.5 感染リスク評価: *E. coli*の1日あたり摂取量(*E. coli*/day)は水道水中*E. coli*濃度と飲水量(Mons *et al.*, 2007)から計算した。次に、表流水中の*E. coli*に対する*Campylobacter*の比率(C/E ratio)を用いて*Campylobacter*摂取量(*Campylobacter*/day)に換算した。C/E ratioにも分布型を仮定した。*Campylobacter*に関する用量反応モデルを用いて、1日あたりの感染確率 P_d (infection person⁻¹ d⁻¹)を

計算した。*Campylobacter jejuni*の用量反応モデルとしては、Teunis *et al.* (2005)によって提示されたBeta-Poissonモデルがあるが、問題点が指摘されている(Petterson *et al.*, 2006)ので、指数モデル($P_d = 1 - \exp(-0.686 \times D)$, D:用量)を用いた。これより、年間感染リスク P_y (infection person⁻¹ yr⁻¹)を計算した。原水中*E. coli*濃度、4段階の処理ステップ、水消費量、C/E ratioに対してモンテカルロシミュレーションを行い、年間感染確率 P_y を求めた。

3. 結果と考察

3.1 デイト法とランク法の比較：各方法によって評価された流出水中の*E. coli*濃度と、実際に測定された流出水中の*E. coli*濃度を比較した。この結果、デイト法の方が除去能が低く評価される傾向があり、ランク法の方が測定値をよく再現しており望ましかった。

3.2 分布形のあてはめ：分布形選定の結果、原水*E. coli*にはガンマ分布、凝集—貯水にはロジスティック分布、急速砂ろ過にはワイブル分布、オゾン処理には正規分布、C/E ratioには対数正規分布を適用した。

3.3 総合除去能と年間感染確率：4つの処理ステップの総合除去能を求めた結果、中央値は7.46 log₁₀、平均値は6.22 log₁₀であった。処理水中の*E. coli*濃度がほぼ全て0であるにもかかわらず除去率を100%とは考えず、7.46 log₁₀ (中央値)の除去能を有すると評価している点が重要である。処理水中*E. coli*濃度、*E. coli*摂取量、*Campylobacter*摂取量、1日あたりの感染確率、年間感染確率の推定結果をTable 1に示す。年間感染確率は、平均値1.68×10⁻³ person⁻¹ yr⁻¹、中央値3.37×10⁻⁸ person⁻¹ yr⁻¹が得られた。オランダではQMRAによって年間感染確率が1×10⁻⁴ person⁻¹ yr⁻¹以下であることが求められているが、平均値はこれより大きな値となった。

Table 1 Statistics estimated in the QMRA

	Lower 95% CI boundary	Median	Mean	Upper 95% CI boundary
Over-all log reduction	5.41	7.46	6.22	9.58
<i>E. coli</i> in the treated water (<i>E. coli</i> /100 mL)	1.07×10 ⁻⁸	4.35×10 ⁻⁶	1.64×10 ⁻⁴	9.25×10 ⁻⁴
<i>E. coli</i> dose (<i>E. coli</i> /day)	0	1.24×10 ⁻⁸	2.99×10 ⁻⁴	1.36×10 ⁻³
<i>Campylobacter</i> dose (<i>Campylobacter</i> /day)	0	1.35×10 ⁻¹⁰	9.52×10 ⁻⁶	3.36×10 ⁻⁵
Daily risk of infection (person ⁻¹ d ⁻¹)	0	9.24×10 ⁻¹¹	6.51×10 ⁻⁶	2.30×10 ⁻⁵
Yearly risk of infection (person ⁻¹ yr ⁻¹)	0	3.37×10 ⁻⁸	1.68×10 ⁻³	9.06×10 ⁻³

3.4 不確実性分析：QMRAにおける各予測項目および最終的に評価された年間感染確率は、当然、大きな不確実性をもつ。ここでは結果に大きく影響すると予想される項目をとりあげ、不確実性分析を行った。

(1) **ARK-waterの取水**：取水量は年間の全水量の5%であり、Bethune polder 水よりも汚染されている。取水するのは夏季の主として6月~8月の3ヶ月間である。*E. coli*濃度は、Bethune polder水の1.75倍に設定した(Hijnen *et al.*, 2005)。年間感染確率の計算結果をTable 2に示す。平均値は1.72×10⁻³ person⁻¹ yr⁻¹とわずかに増大したが、大きな影響はみられなかった。

(2) **緩速砂ろ過における高水温期の除去率の影響**：水温13°C以下での測定結果6例に対し、13°C以上での測定結果が3例ある(Dullemont *et al.*, 2006)。これより最小値5.6 log₁₀、最尤値3.6 log₁₀、最大値3.1 log₁₀を求め、これらをパラメータとする三角分布を設定した。水温13°C以上となるのは、5月~9月の概ね5ヶ月間である。この期間の緩速砂ろ過の除去能は上記の値にしたがうものとした。Table 2より、平均値は1.01×10⁻³ person⁻¹ yr⁻¹とやや低減した。5ヶ月間にわたって緩速砂ろ過の除去能を1 log₁₀以上高めた効果が表れている。

(3) **C/E ratio**：ベースモデルに用いたC/E ratioとしては、river Meuseでの測定値に対して平均値0.042、標準偏差0.10をもつ対数正規分布が設定された。これに対し、WHO Drinking Water Quality

Guideline, 3rd ed.(2004) が示したデータから最小値として 0.001 (0.1%)を設定する。一方、最大値はオランダ内での他地点での調査結果(Smeets, 2008)を参考にして 1(100%)を設定した。年間感染確率の計算結果をTable 2 に示す。0.001 の場合、平均値は $6.59 \times 10^{-5} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と極めて低い値となった。一方、1 の場合では $2.53 \times 10^{-2} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と増大した。C/E ratioの値が感染確率の評価値に大きく影響することがわかる。本浄水場の原水での*Campylobacter*/*E. coli*または*Campylobacter*濃度そのものの調査を進める必要性が高いと指摘できる。

(4) 用量反応モデルの影響：指数モデルの代わりにMaximum risk curveを適用した。Table 2 より、平均値は $2.30 \times 10^{-5} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ とやや増大した。Beta-Poissonモデルを使用することは適切でないと記した。ここでは試しにBeta-Poissonモデルを使用して感染確率を計算してみた。平均値は $4.24 \times 10^{-3} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ となり、Maximum risk curveでの平均値 $2.30 \times 10^{-5} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ よりも大きな値となり、やはりBeta-Poissonモデルの使用は適切ではない。

(5) デイト法とランク法の比較：ここでは参考のため、凝集-貯水、急速砂ろ過、オゾン処理の3段階の除去能をデイト法を用いて評価した。不確実性分析の項目として取り上げたのは、データのペアリング方法を吟味しない場合、通常、デイト法を採用するからである。まず、総合除去率の中央値は $6.18 \log_{10}$ とランク法の中央値 $7.46 \log_{10}$ より $1.28 \log_{10}$ 小さい値となった。年間感染確率の計算結果(Table 2)は、平均値 $3.18 \times 10^{-2} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ とランク法と比較して 19 倍も大きな確率となった。QMRAを行う前に、データの適切なペアリング方法を選択する必要があるといえる。

Table 2 Uncertainty analysis of yearly risk of infection

		Yearly risk of infection ($\text{person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)			Note
		P2.5	Mean	P97.5	
Base case		0	1.68×10^{-3}	9.06×10^{-3}	
Amsterdam-Rhine canal water (ARK-water)		0	1.72×10^{-3}	8.60×10^{-3}	
Removal efficacy by SSF in high temperature		0	1.01×10^{-3}	3.72×10^{-3}	
C/E ratio	0.001 (0.1%)	0	6.59×10^{-5}	3.54×10^{-4}	Min. (WHO, 2004)
	1 (100%)	0	2.53×10^{-2}	2.84×10^{-1}	Max. (Smeets, 2008)
Dose-response model	Maximum risk curve	0	2.30×10^{-3}	1.27×10^{-2}	
	Beta-Poisson	0	4.24×10^{-3}	2.77×10^{-2}	$\alpha=0.024, \beta=0.011$ (Tenuis <i>et al.</i> , 2005)
Date method		0	3.18×10^{-2}	4.72×10^{-1}	

4. おわりに

オランダの浄水場をとりあげたケーススタディにおいて*Campylobacter*の年間感染リスクが評価された。まず、処理前後の微生物濃度データのペアリング方法についてはランク法が優れていることが確認された。次に、4つの処理ステップの総合除去能の中央値は $7.46 \log_{10}$ 、平均値は $6.22 \log_{10}$ と評価された。年間感染確率の平均値は $1.68 \times 10^{-3} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と評価され、 $10^{-4} \text{ person}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ よりも大きな値となった。不確実性分析の結果、浄水処理における除去能に対する水温の影響、病原微生物数と指標微生物の比の影響、処理前後の微生物濃度データのペアリング方法の影響が大きいことを示した。これらをもとに、QMRAの評価値の精度を向上させるために必要な事項、および収集する必要性が高いデータを指摘した。

参考文献

- Dullemont, Y.J., Schijven, J. F., Hijnen, W.A.M., Colin, M., Magic-Knezev, A., Oorthuizen, W. A. 2006 Chapter 2 Removal of microorganisms by slow sand filtration. In *Recent Progress in Slow Sand and Alternative Biofiltration Processes* (Gimbel, R., Graham, N. J. D., Collins, M. R. eds.), 12-20, IWA Publishing, London, UK.
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E. & Medema, G.J. 2005 *Additional memo including rapid sand filtration, GAC filtration and direct filtration to Elimination of microorganisms by drinking water treatment processes* Kiwa NV, Nieuwegein, The Netherlands.
- Hijnen, W.A.M., Dullemont, Y.J., Medema, G.J. 2005 *Weesperkarspel site report, Catchment survey & monitoring program, MICRORISK*.
- Medema, G.J., Loret, J. F., Stenstrom, T., Ashbolt, N. eds. 2006 *MICRORISK; Quantitative microbial risk assessment in the water safety plan*.
- Mons, M. N., van der Wielen, J. M., Blokker, E. J. M., Sinclair, M. I., Hulshof, K. F. A. M., Dangendorf, F., Hunter, P. R., Medema, G. J. 2007 Estimation of the consumption of cold tap water for microbiological risk assessment: an overview of studies and statistical analysis of data, *J. Wat. Health*, **5**(Suppl. 1), 151-170.
- Petterson, S., Singor, R., Ashbolt, N., Roser, D. 2006 Chapter 7 QMRA methodology. In *MICRORISK; Quantitative microbial risk assessment in the water safety plan* (Medema, G.J., Loret, J. F., Stenstrom, T., Ashbolt, N. eds.).
- Smeets, P.W.M.H., Dullemont, Y.J. and Medema, G.J. 2005 *E. coli* as surrogate for *Campylobacter* inactivation at bench-scale and full-scale and high ozone resistance of environmental *E. coli* and *Campylobacter*, *17th IOA conference 22-26 August 2005, Strasbourg, France*.
- Smeets, P.W.M.H. 2008 *Stochastic modeling of drinking water treatment in quantitative microbial risk assessment*, Water Management Academic Press, Delft, The Netherlands.
- Smeets, P.W.M.H., Dullemont, Y.J., van Gelder, P., van Dijk, J.C., Medema, G.J. 2008 Improved methods for modelling drinking water treatment in quantitative microbial risk assessment; a case study of *Campylobacter* reduction by filtration and ozonation. *J. Wat. Health* **6** (3), 301-314.
- Tennis, P.F.M., van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., van den Kerkhof, H., van Pelt, W. 2005 A reconsideration of *Campylobacter* dose-response relation, *Epidemiol. Infect.*, **133**, 583-592.
- WHO 2004 Guidelines for Drinking Water Quality, third edition, WHO, Geneva.

Paring methods of influent and effluent concentrations in water treatment process for
Quantitative Microbial Risk Assessment, by Sadahiko ITOH(Kyoto Univ), Patrick Smeets,
Gertjan Medema(KWR Watercycle Research Institute), Song Jinji(Kyoto Univ)

1. はじめに

浄水処理プロセスにおいては、さまざまな不純物や微生物の除去・不活化能は通常デイト法によって評価される。この方法では同じ日(あるいは同時刻)に採取された流入と流出サンプルの測定値をペアリングし、除去・不活化率を計算する。この場合、浄水処理施設内での滞留時間(通常数時間)の影響は無視されることが多い。この取り扱いが滞留時間が短い場合はよいが、滞留時間が長くなる(例えば数日、数週間、数ヶ月など)とその取り扱い方を吟味する必要が生じるであろう。

飲料水の微生物的安全性を管理するために行うのが定量的感染リスク評価(QMRA)である。QMRAでは原水中微生物濃度や各処理ステップにおける除去・不活化率などに分布を設定し、モンテカルロシミュレーションを行う。この場合、ある原水中微生物濃度に対して、生成乱数に対応した除去・不活化率を乗じて処理水中微生物濃度を求めることになる。すなわち、除去・不活化率としていかなるデータセットをもっておくかが重要となる。本文は処理プロセスの除去・不活化能を適切に評価するための方法について検討したものである。

2. 方法

オランダのヴェスパカスブル浄水場を対象とした。処理フローは、凝集-貯水(滞留時間89日)-急速砂ろ過-オゾン処理-軟化-粒状活性炭-緩速砂ろ過であり、塩素消毒は行われていない。ここでは凝集-貯水を取りあげた。原水の *E. coli* 濃度データは、2002年4月から2004年12月までに46回測定された値を用い、処理後の *E. coli* 濃度は、2002年1月から2005年8月までに91回測定された値を用いた。

ペアリング方法としてはデイト法のほかには、流入水濃度と流出水濃度のデータセットを降順にソートしておき、その後ペアリングを行って除去・不活化率を計算するランク法がある。つまり、流入水濃度が高ければ流出水濃度も高くなり、流入水濃度が低ければ流出水濃度も低くなると仮定している。また、ランクや日付による相関を仮定せず、流入水濃度と流出水濃度のデータセットから値をランダムに取り出してペアリングするランダム法もある¹⁾。ここではこれら3つの方法を比較した。データセットの信頼限界を調べるため、ブートストラップサンプリングを組み合わせて評価した。まず、凝集-貯水の処理前後の *E. coli* 濃度のデータセットに対してブートストラップサンプリングを行った。各ブートストラップデータセットに対して3種類の方法によってペアリングを行い、除去率を計算した。ただし、滞留時間を考慮してデイト法においても89日間の間隔を与えた。得られた除去率を流入水濃度に乗じて流出水濃度を計算し、計算された流出水濃度と実際に測定された流出水濃度を比較した。

3. 結果と考察

ランク法とデイト法の結果をFigure 1 (a), (b)に示す。CCDF(Complementary Cumulative Distribution Function)として表示してある。濃度分布は95%信頼区間とともに示した。デイト法の場合除去能が低く評価される傾向にあることがわかる。デイト法ではしばしば低除去率がみられるため、負の除去率が出現することさえある。これは処理後の微生物濃度の方が処理前の濃度よりも高いことを意味し、通常ありえ

ない。Figure 1 (a), (b)より、ランク法の方が実測値をよく再現しており、望ましいことがわかる。一方、ランダム法はデイト法とよく似た結果を与えた。

4. おわりに

QMRAにおける浄水処理プロセスの流入・流出水濃度のデータペアリング方法としてはランク法がもっとも優れていることが明らかになった。そこでランク法を採用してQMRAを行い、年間感染確率などを計算した²⁾。また、ランク法とデイト法によるデータペアリングが年間感染確率に及ぼす影響については不確実性分析の中で検討を行った³⁾。

参考文献

- 1) Smeets, et al., J. Water and Health, 6(3), 301-314, 2008.
- 2) 伊藤ら, 第44回年会講演集, 2010.
- 3) 伊藤ら, 第61回全国水道研究発表会講演集, 2010(印刷中).

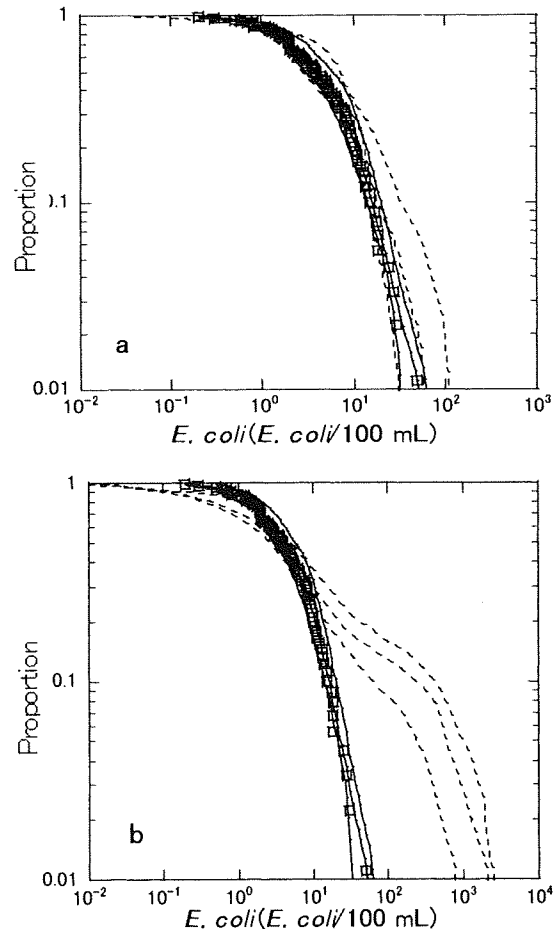


Figure 1 *E. coli* concentration after coagulation and storage calculated with the non-parametric model validated by the rank (a) and date (b) methods. Calculated concentration by the rank and date methods (dashed) are compared to monitored concentrations (line and markers). Median concentration and 95% CI are shown.

1. はじめに

オランダのゲェルカスブル浄水場を対象として定量的感染リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)を行うため、まず処理プロセス前後の微生物濃度データのポアソン方法について検討し、方法が適切であることを示したり。本稿では *Campylobacter* の年間感染リスクを評価する。QMRAでは通常、結果に対し感度分析と不確実性分析を行うが、後者は他稿²⁾で示すこととし、ここでは感度分析について論ずる。

2. 年間感染確率の推定

対象浄水場の処理フローは、凝集-貯水(滞留時間 89 日)-急速砂ろ過-オゾン処理-軟化-粒状活性炭-緩速砂ろ過であり、塩素消毒は行われていない。*E. coli* を指標微生物とし、浄水プロセスの除去・不活化能を評価する。*E. coli* データは 2002 年から 2005 年に得られたものを使用した。原水の *E. coli* 濃度分布にはガンマ分布をあてはめた。

本浄水場で主な微生物のバリアは、凝集-貯水、急速砂ろ過、オゾン処理、緩速砂ろ過であり評価対象はこれら 4 段階とする。各ステップにおいて方法による除去・不活化能に対して分布を選択し、凝集-貯水はロジスティック分布、急速砂ろ過はワイブル分布、オゾン処理は正規分布(いずれも除去・不活化 \log_{10} 数に対して)をあてはめた。一方、緩速砂ろ過後の *E. coli* 測定値はほぼ全て 0 であったので、パイロットスケールで行われた *E. coli* の除去実験結果から最小値 4.2 \log_{10} 、最尤値 2.4 \log_{10} 、最大値 2.0 \log_{10} を得、これらをパラメータとする三角分布を設定した。

以上の確率密度関数をもとにモンテカルモシミュレーション(100,000回)を行い、4処理ステップの総合除去・不活化能を計算した結果、中央値 7.46 \log_{10} 、平均値 6.22 \log_{10} であった。処理水中の *E. coli* 濃度がほぼ全て 0 であるにもかかわらず除去率を 100%とは考えず、上記除去・不活化能を有すると評価している点が重要である。原水中 *E. coli* 濃度にこの除去率を適用し水道水中 *E. coli* 濃度を求めた(平均値 1.64×10^{-4} *E. coli*/100 mL)。

E. coli の 1 日当摂取量は、水道水中 *E. coli* 濃度と非加熱飲料水消費量データから計算した。オランダでは平均値 0.706 glass/日 (1 glass=250 mL) をもつポアソンモデルで与えるのが適当とされている。平均値 2.99×10^{-4} *E. coli*/日を得た。次に、*E. coli* に対する *Campylobacter* の比率(C/E, 対数正規分布)を用いて *E. coli* 摂取量を *Campylobacter* 摂取量に換算した。

Campylobacter に関する用量反応モデルである指数モデル($P_d = 1 - \exp(-0.686 \times D)$, D:用量)を用い 1 日当感染確率 P_d を計算した(平均値 6.51×10^{-6} 人⁻¹日⁻¹)。これより年間感染確率として平均値 1.68×10^{-3} 人⁻¹年⁻¹を得た。目標値である 10^{-4} より大きな値となった。

3. 感度分析と水消費量データの影響

感度分析は、要素間でのスピアマンの順位相関係数を求めた後、要素全体で 100% となるように正規化し寄与率として表示した。水道水中 *E. coli* 濃度に対する感度分析結果を Figure 1 に示す。オゾン処理が最大で、次いで原水中 *E. coli* 濃度である。これは、オゾン処理による不活化率が 0 \log_{10} から 4 \log_{10} まで分布しており、ここでいかに不活化されるかが水道水中 *E. coli* 濃度に最も大きく影響するのである。*E. coli* 摂取量に対する感度分析結果を Figure 2 に示す。最も大きく影響するのは水消費量で、他の項目は非常に小さい寄与であった。*E. coli* 摂取

量は、水道水中 *E. coli* 濃度に水消費量を乗じて求めるだけだが、Figure 1 と大きく異なる。なお、年間感染確率に対する分析結果は Figure 2 とほぼ同じである(C/E の寄与は僅か)。これは水消費量のデータ集計法に理由がある。水消費量はポアソン分布という離散分布で与えられ、48% の人々が全く水道水を飲まない統計となっている。この飲水量が 0 であるか否かが、*E. coli* 摂取量および年間感染確率に最も大きく影響する。

考察のため水消費量データに指数分布(比率 6.05×10^{-3})をあてはめた。年間感染確率はほとんど変化はないが、0 ではない下限値が存在する。感度分析の結果、最も寄与するのはオゾン処理(寄与率 37.7%)であり、水消費量は第 3 位(寄与率 13.1%)となった。次に歯磨き時の誤飲量として 1 mL および 10 mL を設定した。年間感染確率に大きな差はない。感度分析の結果、誤飲量 1 mL の場合、最大寄与は Figure 2 と同様に水消費量であるが、その寄与率は 50.5% に大きく低減した。誤飲量 10 mL の場合では、オゾン処理(寄与率 32.0%)と水消費量(寄与率 25.7%)の大小関係が逆転し、オゾン処理がもっとも影響する結果となった。やはりポアソン分布において水消費量 0 が出現することが大きく影響しているとわかる。

4. おわりに

Campylobacter の年間感染確率は *E. coli* 測定値がほぼ 0 であるにも関わらず 1.68×10^{-3} 人⁻¹年⁻¹ と評価され、 10^{-4} より大きかった。水消費量データの統計的取り扱い方法が感度分析の結果に大きく影響することがわかった。統計的に取り扱いを適切な方法で行わないと混乱を招く恐れがある。これを回避するためには、少なくとも離散モデルであるポアソンモデルよりも指数モデルのような連続モデルを用いる方が好ましい。以上より本浄水場では、年間感染確率の大きさに最も寄与するのはオゾン処理である。その低下のためには、オゾン処理を適切に管理し微生物を確実に不活化することが重要と指摘できる。

参考文献

- 1) 伊藤ら, 定量的感染リスク評価における浄水処理プロセスの流入・流出水濃度のデータポアソン方法, 第 44 回年会講演集, 2010.
- 2) 伊藤ら, 定量的感染リスク評価の不確実性分析による必要調査項目の提示, 第 61 回全国水道研究発表会講演集, 2010(印刷中).

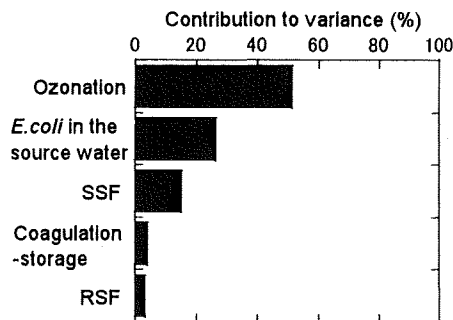


Figure 1 Sensitivity analysis of *E. coli* in the treated water.

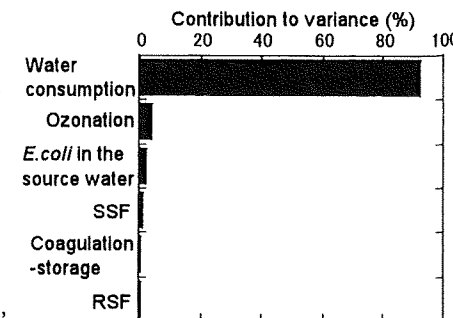


Figure 2 Sensitivity analysis of *E. coli* dose.

京都大院・工 ○河野圭浩, Ly Bich Thuy, 月島機械株式会社 石川卓
京都大院・地環 大河内由美子, 伊藤禎彦

Removal of biodegradable organic carbon in drinking water treatment processes, by Yoshihiro Kawano, Bich Thuy Ly(Kyoto Univ.), Suguru Ishikawa(Tsukishima Kikai Co.,Ltd.), Yumiko Ohkouchi, Sadahiko Itoh (Kyoto Univ.)

1. はじめに

現在の水道システムは残留塩素を維持することで微生物の増殖活性を抑制し、微生物学的安定性を保っているものの、同時に生成するカルキ臭によって水道水離れが進んでいる。この問題の解決法の一つとして残留塩素濃度低減に関する検討が進められているが、同時に微生物学的安定性を維持するための対策が不可欠となる。そこで本研究では、生物分解性有機物の評価指標として同化可能有機炭素(AOC)ならびにAOC前駆物質に着目し、AOC前駆物質濃度測定のための加水分解処理条件を検討した。また、稼働中の浄水処理施設を対象として、浄水処理過程におけるこれらの除去特性および浄水中濃度を調べた。

2. 実験方法

調査対象として、淀川水系を原水とするA浄水場を選定した。A浄水場は、凝集沈殿、中オゾン、急速ろ過、後オゾン、生物活性炭(BAC)、塩素消毒から構成される。各プロセス前後で夏期と冬期それぞれ2回採水を行い、TOCおよびAOC濃度を測定した。またAOC前駆物質の加水分解を目的として、塩酸または水酸化ナトリウムの添加によりpHを4.0-10.0に調整した試料を、75℃-121℃で30-120分間の加熱処理を行った後、pHを中性に戻してAOC濃度を測定した。

3. 結果および考察

浄水処理プロセスにおけるTOCおよびAOC濃度の変化を表1に示す。浄水処理プロセス全体としてTOCは44-55%の減少が確認された。しかし、原水のAOC濃度が夏44 µg/L、冬148 µg/Lであったのに対して、処理水は夏53 µg/L、冬130 µg/Lであり、AOC濃度には明確な減少がみられなかった。また、オゾン処理及び塩素消毒により、AOC濃度が増加した。これは、酸化作用によって高分子量有機物の低分子化が促進されたためと考えられる。BACは一般的にAOC除去に対して高い効果を発揮すると報告¹⁾されている。本研究でも、夏期にはBACで効率的にAOCが除去されているものの、塩素消毒によりAOCが再度増加しており、AOCのみならずAOC前駆物質についても確実に除去する必要があると考えられる。そこで、AOC前駆物質濃度の測定方法についても検討を加えた。

AOC前駆物質の加水分解処理条件の検討結果を図1に示す。pH=10.0, 121℃の条件で加熱処理した試料でAOC濃度が最も増加した。アルカリ条件下での加熱処理により、直接的にはAOCとして計測されていなかった高分子量有機物が加水分解され、AOC測定菌株が利用可能な低分子有機物に変換されたためと考えられる。また、一部の試料で長時間加熱した場合、TOCが増大

する傾向が確認されたため、本研究では30分間の加熱処理を選定した。決定した条件(pH=10.0, 121℃で30分間加熱処理)で測定した処理水のAOC前駆物質濃度は120 µg/Lであり、AOC濃度の2.26倍程度残存することが示された。

表1 各浄水処理プロセスでのTOCおよびAOC濃度の変化
(冬期・夏期それぞれ2回測定の平均値)

	TOC (mgC/L)		AOC (AOC _{P17} , AOC _{NOx}) (µgC/L)	
	冬期	夏期	冬期	夏期
原水	2.05	2.05	148(144,4)	44(36,8)
凝集沈殿後	1.70	1.45	67(56,11)	21(13,8)
中オゾン後	1.70	1.35	110(72,38)	62(13,49)
急速ろ過後	1.45	1.10	100(80,20)	29(16,13)
後オゾン後	1.50	1.00	125(95,30)	63(31,32)
BAC後	1.15	0.90	133(122,11)	24(13,11)
塩素消毒後	1.15	0.85	130(98,32)	53(33,20)

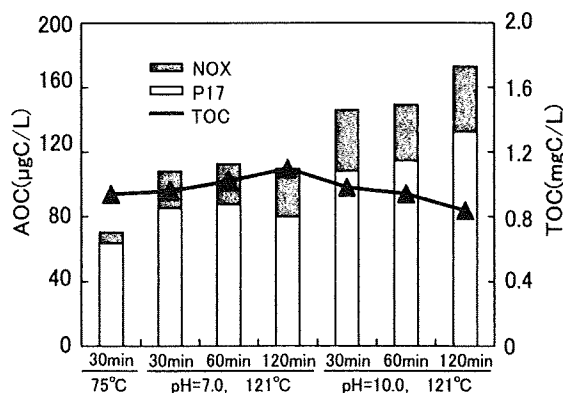


図1 AOC前駆物質の加水分解処理条件の検討結果

4. 結論

- 対象施設の浄水処理プロセスではTOCは除去可能だが、AOCの除去効果はほとんど確認されなかった。
- pH=10.0, 121℃で30分間加熱処理後にAOC測定を行うことで、AOC前駆物質濃度を評価した。
- 浄水処理プロセスにおけるAOCおよびAOC前駆物質の除去率向上が必要である。

謝辞

採水にご協力いただいたA浄水場の皆様に深謝します。

参考文献

- Chen, C. C., et al.: Effectiveness of AOC removal by advanced water treatment: a case study, *Desalination*, 202, pp.318-325, 2007.

(4-42) 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

○大瀧 雅寛(お茶の水女子大学大学院) 溝添 倫子(お茶の水女子大学)
林 紗綾佳(お茶の水女子大学)

1. はじめに

浄水処理において消毒処理は、病原微生物によるリスクを下げるための必要不可欠なプロセスであるといえる。現在我が国においては、塩素注入による方法が主流となっているが、塩素耐性の高い原虫の脅威や、塩素消毒副生成物の問題などから、その他の消毒方法についての検討が続いている。また塩素およびその他の消毒方法による病原微生物の不活化効果については、研究実績があり報告例も枚挙にいとまがないが、各消毒方法の作用機序については、十分な検討がされているとは言い難い。既存の報告¹⁾によれば、消毒処理による具体的な作用機序として①構造破壊、②透過機構の阻害、③代謝系の阻害、④代謝系への作用による2次的変化としている。このように定性的に把握されているものの、各消毒方法における処理条件と作用機序との関係を定量的に検討した例は少ない。ある消毒条件で不活化した微生物が致命的な状態であるのか、回復が可能な仮死状態であるのか、といった点が不明確なままでは、より確実な病原リスクの低減を目論むことは難しい。

本研究は各消毒方法による病原微生物に対する損傷レベルを定量的に測定し、これを把握することを目的とするものである。まず病原微生物の代替生物として、指標細菌である大腸菌を用い、グラム陰性腸内細菌に属する病原微生物への影響を推定した。また消毒方法としては、塩素消毒方法に付加的な処理として導入が開始され始めた紫外線照射、および塩素消毒副生成物の生成が低い点が長所として注目されている二酸化塩素に焦点を絞って検討することとした。

2. 実験方法

2. 1. 大腸菌の準備と濃度測定法

病原微生物のうちグラム陰性腸内細菌に属するものの代替生物として、大腸菌 (NBRC3301 および ATCC13965) を用いた。指定の培養用寒天栄養培地にて、37°Cで12時間程度培養した後、形成したコロニーを2~3個程度、滅菌ルーブにて鉤菌し、これを100 mL リン酸緩衝液(希釈溶液として調整したもの²⁾)中に分散させて大腸菌溶液を作成した。この大腸菌溶液の濃度は約 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mLであった。消毒処理前後の大腸菌の濃度測定には、以下に示す3種類の栄養寒天培地法を同時に用いた。それらの培地にて検出される細菌の持つ特徴も併記した。

- ①トリプチックソイ寒天培地(以下TSAと略記): タンパク質分解機能を保ち増殖可能な細菌が計数される。Tryptic Soy Agar (Difco社製)の所定濃度溶液を作成し、高圧蒸気滅菌したものを用いて測定した。
- ②コンパクトドライ EC培地(以下C-ECと略記): 乳糖分解酵素である β -グルクロニダーゼを持つ細菌が選択的に測定される。コンパクトドライ EC(日水製薬製)を用いて測定した。
- ③デスオキシコール酸含有培地(以下DESOと略記): 乳糖分解能力の有無、もしくはグラム陰性様細胞膜を保持している細菌が計数される。デスオキシコレイト培地(栄研化学製)を所定量、加温水中にて溶解させて調整し用いた。

二酸化塩素を用いた実験においては、上記の寒天培地法の他にDAPIおよびPI染色(いずれも和光純薬製)による細胞染色法を用いて、細胞膜の活性の有無を測定した。計数は蛍光顕微鏡(オリンパス製BX-51)にて、200倍にて観察した。

2. 2. 不活化実験方法

紫外線による不活化実験では、紫外線光源は低圧紫外線ランプ(東芝製GL-20, 20 W)を用いた。大腸菌溶液を内径5.4 cmのペトリ皿に20 mL注入し、ランプ下約12 cmに設置して紫外光を照射した。この条件にて試料に照射される紫外線強度は 0.5 mW/cm^2 であった。照射する紫外線線量は照射時間によって調節した。紫外線照射後の試料は、光回復の影響を避けるため、遮光下において濃度測定作業をおこなった。

二酸化塩素による不活化実験では、二酸化塩素水溶液2,000 ppm (Finex社製)を純水(Milli-Q水)を用いて希釈し、5 mg/lの二酸化塩素原液を作成した。大腸菌溶液に所定濃度となるように注入し、設定時間毎に採水し、大腸菌濃度を測定した。大腸菌濃度測定用の採水に際しては、0.03%チオ硫酸ナトリウムにて二酸化塩素を消費させて不活化作用を停止させた。

3. 実験結果と考察

既存の報告³では、塩素消毒においては、低CT値での不活化条件にて、TSA培地とDESO培地による検出濃度の差が生じていた。またオゾン処理に関する報告⁴では、オゾン溶解水およびオゾン曝気水のいずれにおいても、TSA培地やC-EC培地に比べてDESO培地による検出濃度が著しく低くなっていた。これらはいずれも、塩素およびオゾンが大腸菌の細胞膜の損傷を優先的に引き起こし、故にグラム陰性様の細胞膜では無くなったため、デソキシコール酸による増殖抑制効果が働きやすくなったためとしている。

図1は紫外線照射による大腸菌不活化実験を行った場合の、濃度変化を各測定培地毎に示したものである。紫外線照射はその作用機序が核酸損傷によることがわかっている¹が、実験結果はそれを裏付けるものであった。即ち、核酸損傷によるダメージは、その細胞自体の膜活性や代謝機能が失活していなくても、細胞増殖ができなくなる損傷である。従って培地の検出特性に関わらず増殖できないことによって等しく不検出となったことにより、どの培地においてもその検出濃度変化が等しくなったと考えられる。

図2は二酸化塩素による大腸菌不活化を行った場合の濃度変化を各測定培地毎に示したものである。紫外線照射とは異なり、培地によってその濃度変化に差が生じていた。特徴的であるのは、DESO培地に比べて、C-EC培地の検出濃度が低くなっている点である。これは既存のオゾンの結果とは異なっており、その作用機序が細胞膜ではなく、細胞内部における酵素の失活が優先的であったと考えられた。図2には、培地法と併せてDAPI/PI染色法によって、活性のある細胞膜を有する細胞数割合が示されているが、ここでは細胞膜の活性が失活した細胞は見られなかった。従って、二酸化塩素は細胞膜と反応せずに膜を透過し、まずは細胞内部の酵素を失活させる能力が高いことが推察された。またTSA培地の結果から代謝機能全般を失活させるには至っていないことも推察された。

4. まとめ

複数の培養培地測定法と細胞染色法によって、二酸化塩素および紫外線による細菌の不活化作用機序を調べた結果、紫外線は、核酸損傷以外の不活化作用機序は見られず、二酸化塩素においては、オゾンや塩素と異なり、細胞膜を通過して、まずは細胞内の酵素を失活させる能力が高いことが考えられた。ただ代謝機能全般を失活させるほどの損傷を与えることは難しいということがわかった。

さらに二酸化塩素の殺菌効果が大腸菌にて評価する場合、測定法によっては致死的状态に至らずとも不活化されたと判定されるいわゆる誤陰性の判断となってしまう可能性があると考えられた。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（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」の一環として行われたものである。

参考文献

- 金子光美編（1997）水質衛生学，技報堂出版，東京
- 厚生省生活衛生局水道環境部監修（1993）上水試験方法，日本水道協会，東京
- 窪華奈子ら（2005）不活化した大腸菌の損傷に関する研究，第42回環境工学フォーラム講演集，75-78
- 王雪丹ら（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，95-97

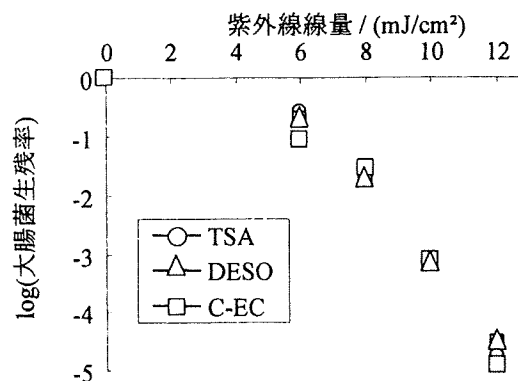


図1 紫外線による大腸菌の不活化（測定法：TSA培地，EC培地，DESO培地）

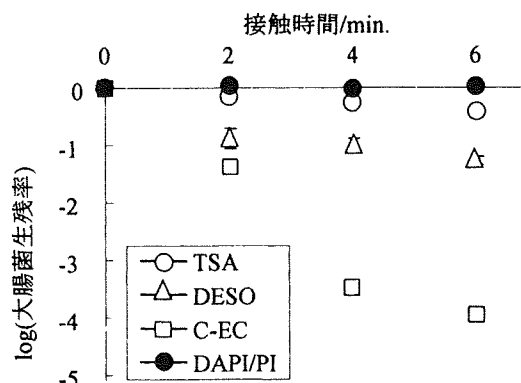


図2 二酸化塩素（0.05 mg/L）による大腸菌の不活化（測定法：TSA培地，EC培地，DESO培地及びDAPI/PI法）

Quantitative analysis of damage mechanisms of *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by disinfection, by Michiko MIZOZOE, Masahiro OTAKI, Mamiko SANO (Ochanomizu Univ.), Myriam Ben Said (CERTE, Tunisia)

1. はじめに

これまで消毒処理に関しては、その効果についての報告は多いが、どの様な消毒機構が関与しているかについてまで併せて検討している例は少ない。そこで本研究では、病原細菌の代替細菌である大腸菌、およびバイオフィーム形成細菌である *Pseudomonas* 菌を対象とし、塩素やUVなどの消毒処理によってどの様な損傷を受けるのかについて、複数の性質の異なる培地を用いる方法にて定量的に把握することを試みた。

2. 実験方法

E.coli (NBRC 13965), および *P. aeruginosa* (ATCC 15442) を培養し、リン酸緩衝液に所定の濃度になる様分散させて実験に供した。各消毒処理を行った後、性質の異なる培地を用いて *E.coli* および *P. aeruginosa* 濃度を測定し、それらを比較することにより損傷レベルを推定した¹⁾。各培地の特徴と、それらの検出、不検出から推定される損傷を表1にまとめた。

3. 実験結果と考察

図1に *E.coli* の遊離塩素濃度 0.1 mg/L 時の塩素処理結果を示す。培地による測定結果に差が見られ、この結果から遊離塩素は *E.coli* に乳糖代謝機能を抑制する損傷を優先的に与え、次に膜損傷を生じさせていると推定された。また致命的損傷には至っていない *E.coli* の存在が確認された。

一方、*P. aeruginosa* の結果を図2に示す。*E.coli* に比べ *P. aeruginosa* は塩素耐性が非常に高いが、遊離塩素濃度によって耐性に差が見られた。またどちらの濃度においても培地による測定結果に差が見られなかった。従って遊離塩素は *P. aeruginosa* の膜損傷のみ生じさせるような不活化は起こしていないと考えられ、いずれも致命的損傷に至っていると考えられた。さらに pH を変化させて、HOCl, OCl⁻ の比率を調整し反応主体となる種による損傷部位の差についても検討した。

紫外線処理においては *E.coli*, *P. aeruginosa* ともに培地による差が見られず、その機構が DNA 損傷にあることを裏付ける結果が得られた。また、塩素消毒同様、*E.coli* に比べ *P. aeruginosa* は紫外線耐性が数倍程高いことも確認された。

4. 結論

塩素および紫外線による消毒処理において、*P.*

aeruginosa は *E.coli* に比べ耐性が高かった。また塩素処理では、*E.coli* は乳糖代謝機能を抑制する損傷、膜損傷を特異的に受け、致命的な損傷に至っていない菌の存在が確認できたが、*P. aeruginosa* ではその様な半致命的な状態が起こりにくいことがわかった。

表1 各培地の特徴 (○: 検出, ×: 不検出)

	核酸損傷 必須代謝損傷	膜損傷	乳糖代謝 機能の損傷
Tryptic Soy Agar(TSA) 非選択培地	×	○	○
TSA+デスオキシコロール酸Na (TSA+deso)	×	×	○
TSA+ナリジク酸	×	○	—
デスオキシコロール培地(DES0)	×	×	×
コッカトドラEC(EC)	×	○	×

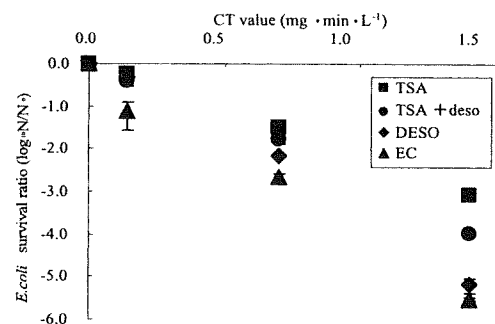


図1 塩素処理(遊離塩素濃度 0.1 mg/L)による *E.coli* の濃度測定結果(pH7)

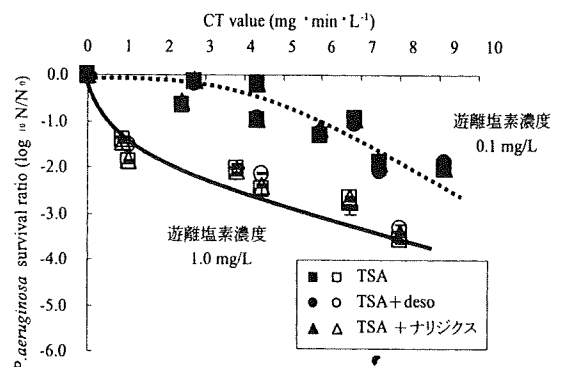


図2 塩素処理による *P. aeruginosa* の濃度測定結果(pH7)

参考文献

1) 王雪丹ら(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, pp95-97.

Comparison of Assimilable Organic Carbon Removal by Biological Activated Carbon in Different Advanced Drinking Water Treatment Plants

S. Soonglerdsongpha¹, I. Kasuga¹, F. Kurisu², H. Furumai²

¹ Department of Urban Engineering, the University of Tokyo 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan
(E-mail: suwal@env.t.u-tokyo.ac.jp, kasuga@env.t.u-tokyo.ac.jp)

² Research Center for Water Environment Technology, the University of Tokyo 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan
(E-mail: kurisu@env.t.u-tokyo.ac.jp, furumai@env.t.u-tokyo.ac.jp)

Annotation

This study was to compare the removal efficiency of assimilable organic carbon (AOC) by biological activated carbon (BAC) filtration in three advanced drinking water treatment plants in Japan. The influence of total microbial abundances and bacterial community associated with BAC on AOC removal was also investigated. Results showed that AOC concentrations were increased after ozonation treatment. BAC filtration offered high removal efficiency of AOC from 53% to 73%. The highest reduction was observed in plant A. Total microorganisms on BAC in plant A, B and C enumerated by DAPI staining method were 4.4×10^8 , 9.0×10^8 and 5.1×10^8 cells/g-wet, respectively. Cell-specific activity of AOC removal in BAC treatment followed the order of plant A, plant C and plant B. The bacterial community structures of raw water and BAC samples were investigated by PCR-DGGE and T-RFLP. Bacterial communities in raw water of all three plants were similar but significantly different from those on BAC. This suggests that community structure changes along the treatment process. Bacterial community on BAC of plant A was slightly different from those on BAC of plant B and C. The difference in service time or retention time of BAC filtration might have some influence on bacterial community structures.

Keywords

Advanced drinking water treatment, Assimilable organic carbon (AOC), Bacterial community, Biological activated carbon (BAC), Polymerase chain reaction-Denaturant gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

1. INTRODUCTION

Biological stability of drinking water has been gaining considerable attention in the fields of water treatment and water quality management. Biologically stable water is defined as the water in which the growth of microorganisms is limited in drinking water distribution system. Bacterial regrowth in drinking water distribution system leads to deterioration of water quality, acceleration of pipe corrosion and the risk of microbial diseases [1-2]. Chlorination is not always effective for

controlling bacterial regrowth because residual chlorine decreases with time [3]. It is commonly recognized that organic substrate is one of the main factors for bacterial regrowth. Thus, potential of bacterial regrowth can be quantified by abundance of assimilable organic carbon (AOC) in water. AOC is defined as a part of dissolved organic carbon which can be assimilated by reference bacterial strains [4]. The heterotrophic bacterial growth can be limited when AOC is lower than 10 µg acetate-C/l in systems without residual disinfectants [4]. On the other hand, LeChevallier *et al.* suggested that AOC should be controlled between 50 and 100 µg acetate-C/l in systems maintaining the appropriate level of residual chlorine [5].

Ozonation combined with biological activated carbon (BAC) filtration is one of the major advanced drinking water treatment technologies. Ozone oxidation can produce AOC by degrading large organic molecules to smaller ones such as carboxylic acids, aldehydes, and ketones [6]. Although these hydrophilic and low-molecular weight materials are hard to be removed physicochemically, they are efficiently removed by biological oxidation in BAC filtration [7-10]. However, the mechanism of AOC removal in BAC filtration has not been elucidated yet. In this study, we compared the removal efficiencies of AOC by BAC filtration in three advanced drinking water treatment plants in Japan. In addition, microbial abundances and community structures associated with BAC were characterized since they are the important factors relating to the efficiency of AOC removal.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sampling site selection

Three advanced drinking water treatment plants (plant A, B, and C) introducing ozonation-BAC filtration in Japan were investigated. Water and BAC samples were collected from these plants in November and December 2008. BAC in plant A (BAC-A) had been used for 4 years while BAC in plant B (BAC-B) and plant C (BAC-C) had been used for 1 year. Plant A and plant B receiving raw water from the same river and operate with the same treatment configuration: coagulation/sedimentation, primary sand filtration, ozonation, BAC filtration, chlorination, secondary sand filtration and post-chlorination. On the other hand, plant C receiving raw water from another river operates with the similar treatment processes as plant A and B, excluding primary sand filtration. Retention time of BAC filtration was 15 min in plant A while that in plant B and C was 12 min.

2.2 AOC determination

AOC in water samples were determined according to the Van der Kooij method [4]. Briefly, water samples were pasteurized at 75°C for 30 min in water bath after sampling to inactivate indigenous bacteria. After cooling, *Pseudomonas fluorescens* strain P17 and *Aquaspirillum* sp. strain NOX were inoculated into the water samples at the initial concentration of about 500 CFU/ml of each strain. The water samples were incubated at 15°C for 7 days and then the colonies were

counted on R2A agar by spread plate method. In this study, we used the yield coefficients of 4.1×10^6 CFU/ μg acetate-C for P17 and 1.2×10^7 CFU/ μg acetate-C for NOX [4].

2.3 Enumeration of total microorganisms on BAC

Microorganisms attached on BAC were detached by vortex for 1 min and ultrasonication at 40 W for 3 min. Suspended cells were harvested and immobilized on a 0.22 μm -polycarbonate membrane filter then stained with 1 mg/l of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) for 15 min. They were enumerated with an epifluorescent microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan).

2.4 PCR-DGGE analysis of bacterial communities in raw water and on BAC

DNA was extracted from raw water and BAC samples by using PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA). The extracted DNA was used as templates in polymerase chain reaction to amplify the V3 regions of bacterial 16S rRNA genes. Two primers (357fGC and 518r) were used for the amplification. The amplified fragments were separated on 8% polyacrylamide gels (37.5:1 acrylamide/bis-acrylamide) with denaturing gradient ranging from 35% to 55%. After the electrophoresis at 130 V for 5 hr, the gels were stained with Vistra green (Cambrex Bio Science Rockland, USA) and scanned with a FluorImager 595 (Molecular Dynamics, USA).

2.5 T-RFLP analysis of bacterial communities in raw water and on BAC

Bacterial 16S rRNA genes were amplified using primer 27f and 927r. The 5' end of 27f was labelled with 6-carboxyfluorescein (6-FAM). The 200 ng of purified products was digested separately with 10 U of *HhaI*, *MspI* and *RsaI* (Toyobo, Osaka, Japan) at 37°C for 6 hr. Separation of fluorescently labelled fragments was conducted with an automated DNA sequencer (ABI 3100 Prism Avant Genetic analyzer, Applied Biosystems, USA). Fragment analysis was carried out with GeneMapper (Applied Biosystems). The major terminal restriction fragments (T-RFs) obtained by *HhaI* digestion whose relative fluorescence units were more than 50 were selected and transformed to the binary data (1 or 0 corresponding to presence or absence of T-RF). The binary data was used for principal components analysis. The composition of microbial community was estimated by matching the T-RFLP profiles obtained by *HhaI*, *MspI* and *RsaI* digestion with the database of bacterial T-RFs through the phylogenetic assignment tool (PAT) (<http://trflp.limnology.wisc.edu/>) [11].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 AOC concentrations in treatment processes

The concentrations of AOC in the treatment processes of three drinking water treatment plants are presented in **Figure 1**. The total AOC concentrations in raw water of plant A, plant B and plant C were 136, 69 and 52 μg acetate-C/l, respectively. The increase of AOC concentrations were