

付表1 実験データ (水温、濁度、検出トレーサー数、トレーサー除去率)

原水濁度 (度)		10		30		100		
原水水温 (°C)		18.5		20.4		20.3		
PAC注入率 (ppm)		10	25	25	45	45	80	
原水中100 μ L中クリプト数		71	71	69	86	66	64	
原水中1L中クリプト数		7.1E+05	7.1E+05	6.9E+05	8.6E+05	6.6E+05	6.4E+05	
沈殿水濁度 (度)		1.152	0.671	0.623	0.413	0.224	0.152	
沈殿水1mL中クリプト数		245	110	23	16	13	16.3	
沈殿水1L中クリプト数		2.5E+05	1.1E+05	2.3E+04	1.6E+04	1.3E+04	1.6E+04	
除去率 (凝集沈殿)		65.49%	84.51%	96.67%	98.14%	98.03%	97.45%	
除去率 (凝集沈殿)		6.5E-01	8.5E-01	9.7E-01	9.8E-01	9.8E-01	9.7E-01	
ろ過水濁度	ろ過水経過時間	30分	0.1647	0.1499	0.2175	0.1511	0.1815	0.0454
		60分	0.2181	0.1084	0.1688	0.1018	0.151	0.0301
		90分	0.1374	0.1429	0.1189	0.1174	0.1446	0.0123
		120分	0.1374	0.1045	0.1228	0.1167	0.1353	0.0091
		150分	0.1344	0.0941	0.0991	0.0875	0.1271	0.0064
		180分	0.1682	0.0800	0.0925	0.0641	0.133	0.0089
ろ過水中100mL中クリプト数	ろ過水経過時間	30分	657	15	10	1	0	0
		60分	810	40	11	4	0	0
		90分	505	12	7	9	0	0
		120分	720	59	7	0	0	0
		150分	1123	111	0	2	0	0
		180分	770	114	6	0	0	0
ろ過水中1L中クリプト数	ろ過水経過時間	30分	6570	150	100	10	0	0
		60分	8100	400	110	40	0	0
		90分	5050	120	70	90	0	0
		120分	7200	590	70	0	0	0
		150分	11230	1110	0	20	0	0
		180分	7700	1140	60	0	0	0
除去率 (ろ過)	ろ過水経過時間	30分	97.3184%	99.9388%	99.9592%	99.9959%	100.0000%	100.0000%
		60分	96.6939%	99.8367%	99.9551%	99.9837%	100.0000%	100.0000%
		90分	97.9388%	99.9510%	99.9714%	99.9633%	100.0000%	100.0000%
		120分	97.0612%	99.7592%	99.9714%	100.0000%	100.0000%	100.0000%
		150分	95.4163%	99.5469%	100.0000%	99.9918%	100.0000%	100.0000%
		180分	98.9155%	99.8394%	99.9915%	100.0000%	100.0000%	100.0000%
除去率 (全体)	ろ過水経過時間	30分	99.0746%	99.9789%	99.9859%	99.9986%	100.0000%	100.0000%
		60分	98.8592%	99.9437%	99.9845%	99.9944%	100.0000%	100.0000%
		90分	99.2887%	99.9831%	99.9901%	99.9873%	100.0000%	100.0000%
		120分	98.9859%	99.9169%	99.9901%	100.0000%	100.0000%	100.0000%
		150分	98.4183%	99.8437%	100.0000%	99.9972%	100.0000%	100.0000%
		180分	98.9155%	99.8394%	99.9915%	100.0000%	100.0000%	100.0000%

付表2 実験データ (各処理水中の微粒子数)

原水濁度 (度)		10		30		100		
PAC注入率 (ppm)		10	25	25	45	45	80	
原水微粒子数	0.5	8077400	11580000	43040600	51413900	34613000	34961300	
	1	2059500	2594900	16286000	21225400	42995100	44037000	
	3	856800	961100	5781200	7153300	16807200	17575800	
	7	186700	184600	1169200	1255900	912300	987800	
	12	46600	37000	281700	264800	38200	49900	
	15	44700	33700	109200	94000	7800	21800	
沈殿水微粒子数	0.5	5000000	4147900	7188700	4205500	12900900	3786800	
	1	742000	289200	525800	233000	1281000	330200	
	3	213100	48900	95300	56100	227000	77400	
	7	36100	9600	21800	16300	42000	18600	
	12	8400	2600	6100	5100	8300	6100	
	15	6200	800	2800	2400	7100	12400	
ろ過水微粒子数 0.5 μm	ろ過水経過時間	30分 ①	911137	876198	1145721	977705	892857	500572
		60分 ②	1005896	701280	956729	813891	840462	367541
		90分 ③	730260	825506	818776	890857	812224	195971
		120分 ④	723389	693001	868200	883487	762722	164587
		150分 ⑤	744802	587839	720919	720600	742228	118765
		180分 ⑥	693294	545474	728991	600580	747516	157829
		平均	801463	704883	873222	814520	799668	250877
ろ過水微粒子数 1 μm	ろ過水経過時間	30分 ①	140049	147181	253879	110565	194366	15742
		60分 ②	222016	104700	172978	52339	144608	9023
		90分 ③	107690	143240	83550	60904	139656	3695
		120分 ④	105703	102728	85017	61235	140285	3356
		150分 ⑤	136420	93680	59986	40706	125600	1777
		180分 ⑥	95641	74589	58416	40088	139092	2474
		平均	134586	111019	118971	60972	147267	6011
ろ過水微粒子数 3 μm	ろ過水経過時間	30分 ①	9449	7012	6963	2643	2398	97
		60分 ②	17187	6598	8831	976	1327	92
		90分 ③	12596	8068	3208	970	1450	45
		120分 ④	12579	6171	3052	988	1560	30
		150分 ⑤	19578	8996	2903	1095	1740	26
		180分 ⑥	14639	7047	2420	1217	1879	25
		平均	14338	7315	4562	1314	1725	52
ろ過水微粒子数 7 μm	ろ過水経過時間	30分 ①	1148	606	365	281	24	4
		60分 ②	1527	489	247	50	13	2
		90分 ③	1481	633	377	46	55	5
		120分 ④	1442	470	133	65	4	4
		150分 ⑤	2296	835	496	231	11	2
		180分 ⑥	1695	793	140	77	7	6
		平均	1598	637	293	125	19	3
ろ過水微粒子数 12 μm	ろ過水経過時間	30分 ①	169	138	155	171	4	3
		60分 ②	255	99	28	16	2	0
		90分 ③	289	155	172	13	5	2
		120分 ④	247	84	15	27	1	1
		150分 ⑤	418	155	254	129	4	2
		180分 ⑥	325	203	24	29	1	1
		平均	283	139	108	64	2	1
ろ過水微粒子数 15 μm	ろ過水経過時間	30分 ①	32	41	92	110	6	8
		60分 ②	54	29	11	9	10	0
		90分 ③	72	63	100	9	4	0
		120分 ④	50	21	7	16	0	0
		150分 ⑤	78	34	156	83	6	0
		180分 ⑥	62	54	10	14	0	0
		平均	58	40	62	40	4	1

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

平成 24 年度 分担研究報告書
分担研究テーマ： 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)

研究要旨

本分担研究では、配水過程での生物膜形成といった再増殖が問題となる微生物を対象として、各種消毒処理方法（塩素、紫外線照射など）において、不活化および再増殖を抑制させるための条件を、明らかにすることを目的としている。まず多種の細菌の集合である従属栄養細菌の処理耐性等の評価を一度に行う手法として T-RFLP 法を応用する手法について昨年度より継続して検討した。モデル微生物として *Pseudomonas aeruginosa* 株を用い、濃度既知のマーカ生物を投入することによる濃度定量法について検証を重ねた。このことから T-RFLP 法を用いて複数種の微生物群の消毒処理耐性やその後の増殖能力を一度に解析することが可能となると考えられた。

またバイオフィームを形成した従属栄養細菌 (*Pseudomonas* 菌) に対する消毒処理の効果について、バイオフィームの外部、内部の不活化機構を調査することによって、生物膜形成状態での消毒処理の効果に対する相違点を損傷メカニズムの観点から検討した。具体的には PVC 片上およびフロストガラス片上に形成させた生物膜を、異なる遠心分離強度によって剥離させ分類する方法を検討した。この方法によってバイオフィームの付着強度の違いによる分類が可能となった。また顕微鏡による計数と培養法による計数の比較によって、分離処理による細菌への不活化効果は見られないことが確認された。結果として配水管中で剥離せずバイオフィームの種となる可能性が高い部分については、損傷レベルはいずれも致死性であるものの、不活化速度は浮遊状態の菌や、剥離しやすい部分に比べて約半分であることがわかった。

さらに塩素消毒処理において、同じ CT 値を設定した場合の接触遊離塩素濃度 (0.3~3.0 mg/L) による細菌への損傷レベルの相違について検討した結果、同じ CT 値であっても、遊離塩素濃度で 2.0 mg/L 以上では、1.0 mg/L 以下に比べて、より膜損傷を与えやすいことと、3.0 mg/L では、1.0 mg/L 以下に比べて致死性な損傷を高く与えていると考えられた。

A. 研究目的

本分担研究では、配水過程での生物膜形成といった再増殖が問題となる微生物を対象として、各種消毒処理方法（塩素、紫外線照射など）によって、不活化および再増殖を抑制させるための条件を、明らかにすることを目的としている。本研究では昨年度より配水管中で増殖が問題となる従属栄養細菌を対象とし、塩素処理による効果の評価を一度に行う手法として T-RFLP 法を応用する手法について検討してきた。T-RFLP 法は広範な細菌群集を検出できる方法として近年幅広く利用されている分子生物学的手法の一つであるが、定量法としては活用されていない。ここでは *Pseudomonas* 菌を用いて、T-RFLP 法による定量的測定方法の検討をさらに進めた。濃度既知のマーカ生物として大腸菌を対象試料に投入し、その T-RFLP ピーク面積の比を求めることにより、対象微生物の濃度推定を行う方法を検討した。

またバイオフィーム形成従属栄養細菌のモデル細菌として *Pseudomonas* 菌を用いて、バイオフィーム状での塩素消毒による不活化効果を検討した。まずは遠心分離によって付着強度による分離を行い、それぞれの菌数を測定する方法の確立を狙った。方法が確立した後、付着強度毎における塩素処理の不活化効果を調べることにした。従来より複数の培養培地による濃度測定によって、その差から損傷部位を推定する方法を提案しており、これをバイオフィーム状の *Pseudomonas* 菌に対して適用することによって損傷レベルを推定することとした。

さらに塩素消毒処理において、同じ CT 値を設定した場合の接触遊離塩素濃度の違いによって対象細菌への不活化効果および損傷レベルが異なるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

今年度は T-RFLP 法による定量的検出方法の検討および生物膜状の従属栄養細菌への不活化効果のいずれについても単離株 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) を用いて検討した。接触塩素濃度の違いによる細菌への不活化効果及び損傷レベルの相違の検討については、大腸菌株 (NBRC13965) を用いて行った。

B.1 T-RFLP 法による定量方法の検討について

本方法は T-RFLP を用いた定量方法について、濃度既知の生物マーカーを対象試料に投入することにより、T-RFLP の測定プロセスを経ても、対象微生物と生物マーカーの濃度の相関性が保たれると仮定するものである。

1) 使用細菌株について

本研究では、対象微生物として *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) (以下 *P. aeruginosa* と示す) を使用した。液体培地 (Tryptic Soy Broth、以下 TSB と示す) 中にて冷蔵保存してある *P. aeruginosa* を、滅菌済みシャーレに固化させておいた状態の Tryptic Soy Agar (以下 TSA) 培地上に滅菌ループで画線したのち、37 °C のインキュベータ内にて 18~24 時間静置して培養した。形成されたコロニーを滅菌ループで釣菌し、滅菌済みリン酸緩衝液 10 mL に懸濁したものを初期試料溶液とした。このとき初期試料の濃度は約 10^8 CFU/mL 程度であった。なお、*P.aeruginosa* の培養は毎回実験前日から当日にかけて行った。

定量用のマーカー微生物として大腸菌 *Escherichia coli* (NBRC13965) (以下 *E.coli* と示す) を用いた。大腸菌は *P. aeruginosa* と同様の方法で培養し、高濃度溶液を準備した。初期試料の濃度は約 10^7 CFU/mL であった。

P.aeruginosa の初期試料溶液を希釈液 (滅菌済みリン酸緩衝液) にて希釈し表 B.1 に示す濃度の *P.aeruginosa* 溶液を作成し定量検出を試みた。この試料へマーカー生物として *E.coli* 溶液を表 B.1 に設定する濃度となるように投入した。

表 B.1 各混合溶液中の *P.aeruginosa* 濃度と *E.coli* 濃度

混合溶液名	<i>P.aeruginosa</i> 濃度	<i>E.coli</i> 濃度
Mixture I	2.9×10^5 CFU/mL	1.4×10^5 CFU/mL
Mixture II	2.9×10^4 CFU/mL	
Mixture III	5.9×10^5 CFU/mL	1.3×10^5 CFU/mL
Mixture IV	5.9×10^5 CFU/mL	
Mixture V	5.9×10^4 CFU/mL	
Mixture VI	5.9×10^6 CFU/mL	1.3×10^4 CFU/mL
Mixture VII	5.9×10^5 CFU/mL	
Mixture VIII	5.9×10^4 CFU/mL	

2) T-RFLP 解析について

準備した混合溶液を順次 T-RFLP 解析に供した。各条件はこれまでと同様とした。

①DNA 抽出

各々の試料溶液 60 mL を遠心分離をした (11000 rpm, 4 °C, 10 min) 後、上澄みを捨て、滅菌済みリン酸緩衝液 5 mL を加え混合攪拌した。これを再び同条件にて遠心分離した。再び上澄みを捨て、滅菌済みリン酸緩衝液 1 mL を加え混合攪拌し同条件にて遠心分離して、上澄みを捨てた溶液を DNA 抽出試料とした。

DNA の抽出には ISOPLANT (NIPPON GENE) を使用し、抽出工程はキットのプロトコルに従った。

②PCR 増幅

DNA 抽出を行った試料 1 μ L を PCR Master Mix 50 μ L に加え、サーマルサイクラーにて PCR 増幅を行った。その際、試料の他に滅菌水に対しても同時に PCR 増幅を行い、試薬に異常がないか確認した。プライマーとして 27f (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 907r (5' -CCGTCAATTC MTTTRAGTTT-3') を用いた。なお、T-RFLP の解析用にフォワードプライマー 27f の 5' 末端を蛍光色素 6-FAM (6-carboxyfluorescein) で標識した。DNA ポリメラーゼには TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を用い、付属の試薬を用いて PCR Master Mix を調整した。温度条件は (94°C:30 秒 \rightarrow 52°C:30 秒 \rightarrow 72°C:1 分) \times 30 サイクル \rightarrow 72°C:10 分とし、反応終了後の庫内は 4 °C を保った。PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、40 μ L に濃縮した。その後、NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies) を用いて DNA 濃度を測定した。

③制限酵素処理

PCR 産物 100 ng を、制限酵素 *Hha I* (TaKaRa) を用いて消化した (37°C, 6 時間)。この消化産物 2 μ L に Hi-Di

Formamide (Applied Biosystems) 17 μ L, サイズマーカー GeneScan 1200LIZ 1 μ L を加え, 95°C で 2 分間熱変性させた後, 氷冷した.

④電気泳動処理およびフラグメント解析

キャピラリー電気泳動は, ABI PRISM®310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用し, GeneMapper™v3.0 (Applied Biosystems) を用いてフラグメント解析を行った.

B.2 *P.aeruginosa* 生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

本方法は *P.aeruginosa* を用いてガラスや PVC 上に生物膜を形成させ, 付着強度による分類を調べるために, 異なる強度の遠心分離の適用を試みるものである. また付着強度毎に塩素処理による *P.aeruginosa* の不活化効果を調べた.

1) 使用細菌株について

本研究では, B.1 と同様に *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) (以下 *P. aeruginosa* と示す) を使用した.

2) 生物膜の形成方法

配水管の枝管材料である PVC 片と傷のついた管壁を想定したフロストガラス片を生物膜形成材料とした. 滅菌した栄養液体培地 TSB (Tryptic Soy Broth) に *P. aeruginosa* を接種し 30°C で 24 時間培養した. 培養液を滅菌済みペトリ皿 (ϕ 90 mm) に移し, そこに滅菌したフロストスライドガラス片および PVC 片 (20 mm \times 30 mm) それぞれ二つずつを投入し, さらに 25°C で 1 時間培養し菌を付着させた. バクテリアが付着したガラス片および PVC 片を別に用意した滅菌済み TSB 入ペトリ皿に移動し 25°C で 24 時間培養して生物膜を形成させた.

3) 遠心分離による付着強度毎の分離

上記 2) にて作成したバイオフィーム形成片のうち一枚を 1 mL の滅菌済み PBS (リン酸緩衝液) で洗浄した. 洗浄廃液中の *P. aeruginosa* 濃度を栄養寒天培地 TSA (Tryptic Soy Agar) を用いた希釈平板法にて測定した. 洗浄済みのガラス片もしくは PVC 片を室温で滅菌済み遠沈管に予め投入しておいた 9 mL PBS 内に移動し 100 rpm (0.9 g) \times 1 分間遠心分離した. スライドを取り出し, 別の新しい遠沈管内 PBS 9 mL に投入し, また 100 rpm (0.9 g) \times 1 分間遠心分離した. 次は新しい遠沈管内 PBS 9 mL に投入してから 500 rpm (22.4 g) \times 5 分間, 続いて 1,000 rpm (90 g) \times 10 分間遠心分離した. 各操作毎に生成した *P. aeruginosa* が懸濁した PBS 溶液を遠沈管ごと超音波洗浄器内に投入し, 20 分間運転させて *P. aeruginosa* を分散させた. PBS 溶液中の *P. aeruginosa* 濃度は, 栄養寒天培地 TSA を用いた希釈平板法にて測定した.

上記 2) にて作成したバイオフィーム形成片の残りの一枚を滅菌済み遠沈管に予め投入しておいた 9 mL PBS 内に移動し 1,000 rpm (90 g) \times 10 分間遠心分離した. スライドガラスを取り出した後, 上記と同様 PBS 溶液を遠沈管ごと超音波洗浄器内に投入し 20 分間運転させて *P. aeruginosa* を分散させ, 栄養寒天培地 TSA を用いた希釈平板法にて *P. aeruginosa* の濃度を測定した.

4) 遠心分離による *P. aeruginosa* の増殖活性への影響

上述の遠心分離法による剥離操作が与える *P. aeruginosa* 菌の増殖能力への影響を確認した. 顕微鏡による直接計数と栄養寒天培地 TSA を用いた希釈平板法による濃度測定結果を比較することによって, 剥離した菌が増殖能力を維持しているか確認した. 上記 2) にて作成したバイオフィーム形成スライドガラスを 1,000 rpm (90 g) \times 10 分間遠心分離と超音波分散処理を 2 回繰り返し, *P. aeruginosa* 懸濁溶液を作成した. この懸濁液を血球計算盤上に移し, 位相差顕微鏡観察 (400 倍) によって直接計測した. また同時に懸濁液中の *P. aeruginosa* 濃度を TSA を用いた希釈平板法によって測定した.

5) バイオフィーム状 *P. aeruginosa* の塩素処理による不活化実験

滅菌済みリン酸緩衝液 200 mL (pH 7) に, 1 分後の残留遊離塩素濃度が約 1.0 mg/L となるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を投入した. 残留遊離塩素濃度は DPD 法にて測定した. 上記 2) の手順にて *P. aeruginosa* 菌がバイオフィームを形成したフロストガラスおよび PVC 片を上記の塩素溶液 10 mL に投入し, 所定時間塩素

と接触させた。バイオフィーム形成ガラス片もしくはPVC片を3%チオ硫酸ナトリウム 0.1 mL を予め入れている滅菌済み遠沈管内のPBS 9 mL 中に投入し、塩素反応を停止させた。遠沈管内の *P. aeruginosa* 懸濁溶液を1,000 rpm (90 g) ×10 分間の遠心分離と超音波による分散処理により剥離させた。剥離させた *P. aeruginosa* 懸濁溶液を複数の培地培養法にて濃度測定を行い細胞膜の損傷などを推定した。

用いた栄養寒天培地は非選択培地として Tryptic Soy Agar (以下 TSA), 非選択培地としてデスオキシコール酸を TSA に投入した培地 (以下 TSA+deso), およびナリジクス酸を TSA に投入した培地 (以下 TSA+ナリジクス酸) 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。

- TSA : 非選択培地. 代謝能力の有無を見る
- TSA+DESO : グラム陰性菌様細胞膜の変容の有無を見る
- TSA+ナリジクス酸: 薬剤耐性能力の有無を見る

B.3 異なる塩素濃度における塩素処理の及ぼす損傷レベルの相違の検討

使用大腸菌は *E.coli* (NBRC13965) とした。TSA 培地上にて 37°C, 18~24 時間培養したコロニーを 1 μL 程度釣菌し、滅菌済みリン酸緩衝液 200 mL に懸濁させ、試料溶液を作成した。試料溶液の大腸菌濃度は約 4.0×10^7 CFU/mL となった。投入塩素濃度は 0.3~3 mg/L と設定した。この濃度で大腸菌の不活化実験を行うと接触時間 1 分にて、検出限界以下まで不活化されてしまう。そのため、今回は接触時間を正確に任意に設定することが可能な CQF (Continuous Quench-Flow) システムを利用した。図 B.1 に CQF システム 1) の概要を示した。可変式ポンプ (Masterflex 社製) を用い、図 B.1 の P1 と P2 を同期させ、同流量で流し、mixing device へと導き、等量比にて混合させた。チオ硫酸ナトリウムを予め採水管に入れておくことで、採水時に塩素反応を停止させた。反応管での滞留時間を反応時間と設定し、2, 3, 6, 20 秒となるように反応管長さおよび流量を設定した。予め混合溶液を反応管での反応時間の 2 倍以上流し、反応管内の溶液が置き換わった後に採水を開始した。採水管は、3 %チオ硫酸ナトリウム 0.1 mL を入れて滅菌した 15 mL コニカルチューブ (BD Falcon 社製) とし、約 10 mL を採水した。

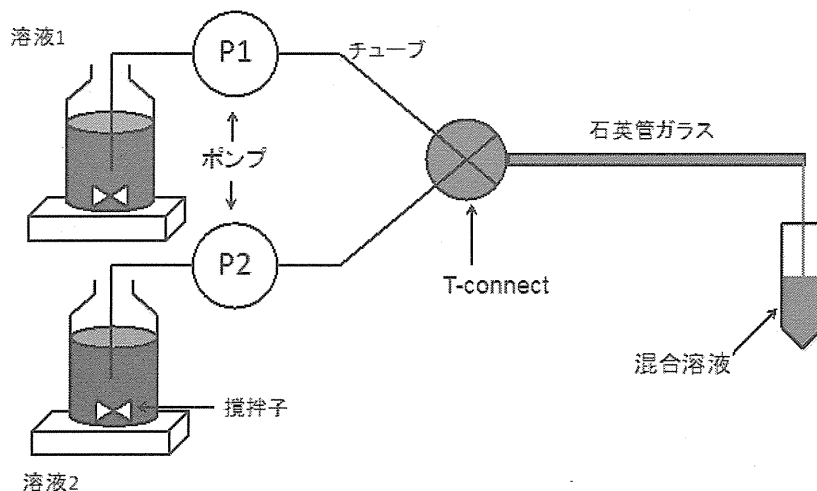


図 B.1 Continuous Quench-Flow (CQF) システムの概要

大腸菌の濃度測定方法は、3 種の重層寒天法にて測定した。用いた栄養寒天培地は非選択培地として Tryptic Soy Agar (以下 TSA), 非選択培地としてデスオキシコール酸を TSA に投入した培地 (以下 TSA+deso), およびコンパクトドライ培地 (ニッスイ製) 以下 EC) 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。

- TSA : 非選択培地. 代謝能力の有無を見る
- TSA+DESO : グラム陰性菌様細胞膜の変容の有無を見る
- EC : 乳糖代謝に関わる酵素の変容の有無を見る

C. 研究結果

T-RFLP 法による定量的検出方法の検討についての結果については C.1 に、生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討については C.2 に、異なる遊離塩素濃度による消毒効果の違いについては C.3 に示す。

C.1 T-RFLP 法による定量方法の検討について

1) 混合溶液 7 種類 (Mixture I~VII) の T-RFLP プロファイルから得られた各生物毎のピーク値を表 C.1 にまとめた。

表 C.1 各混合溶液の各蛍光ピーク値とピーク比

混合溶液名	<i>P.aeruginosa</i> 濃度/CFU mL ⁻¹	<i>E.coli</i> 濃度/CFU mL ⁻¹	<i>P.aeruginosa</i> のピーク値	<i>E.coli</i> のピーク値	<i>P.aeruginosa</i> ピーク値 / <i>E.coli</i> ピーク値
Mixture I	2.9×10 ⁵		287	810	0.35
Mixture II	2.9×10 ⁴	1.4×10 ⁵	51	1,063	0.048
Mixture III	5.9×10 ⁶		2,081	349	6.0
Mixture IV	5.9×10 ⁵	1.3×10 ⁵	791	924	0.86
Mixture V	5.9×10 ⁴		113	1,498	0.075
Mixture VI	5.9×10 ⁶		2,747	29	95
Mixture VII	5.9×10 ⁵	1.3×10 ⁴	578	878	0.66
Mixture VIII	5.9×10 ⁴		307	287	1.1

C.2 生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

本研究では、*P. aeruginosa* 生物膜の付着強度による分離方法の検討と、生物膜状の塩素処理による *P. aeruginosa* 濃度変化を 3 つの培養培地方法 (TSA, TSA+DESO, TSA+ナジク酸) にて濃度測定を行うことにより損傷箇所の推定を行った。

1) 遠心分離による付着強度毎の分離

表 C.2 に生物膜形成ガラスを強度の異なる遠心分離処理した時の各剥離菌数を示す。

表 C.2 各遠心分離条件における剥離菌数

処理方法	時間/min.	剥離菌数/CFU mL ⁻¹	
		フロストガラス	PVC
遠心分離 0.9 g	1	2.0×10 ⁸	5.0×10 ⁷
遠心分離 0.9 g	1	2.3×10 ⁶	1.4×10 ⁵
遠心分離 22.4 g	5	3.5×10 ⁵	4.3×10 ⁴
遠心分離 90 g	10	1.2×10 ⁴	2.6×10 ³

2) 遠心分離による *P. aeruginosa* の増殖活性への影響

表 C.3 に位相差観察法による細胞数、および栄養培地 TSA による希釈平板法にて測定した菌数の結果を示した。

表 C.3 遠心分離および超音波処理後の *P. aeruginosa* の顕微鏡計数値と TSA による希釈平板測定結果

顕微鏡計数値/CFU mL ⁻¹	希釈平板測定値/CFU mL ⁻¹
2.7×10 ⁸	1.9×10 ⁸

3) バイオフィーム状の *P. aeruginosa* の塩素処理による不活化実験

図 C.3 にバイオフィーム状の *P. aeruginosa* に塩素処理を行ったときの付着強度の強い画分における濃度変化を示す。また図 C.4 にはバイオフィーム状の付着強度が弱い部分の塩素処理効果を示す。

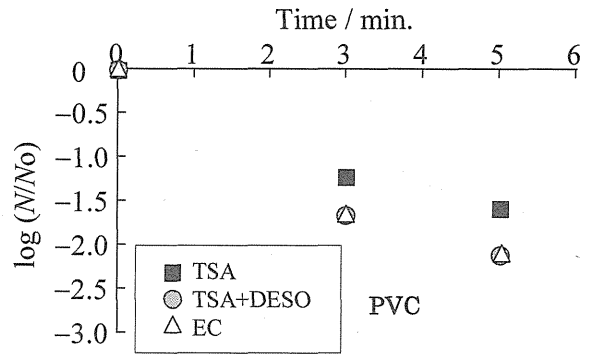
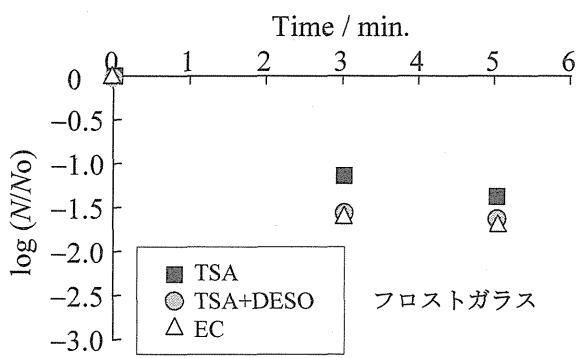


図 C.1 塩素投入後のバイオフィルム状の *P. aeruginosa* (付着強度が弱い部分) の濃度変化 (pH7)

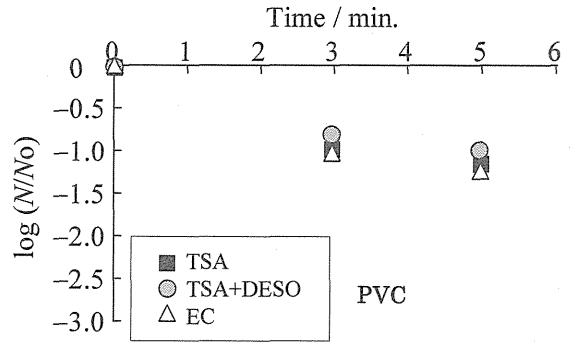
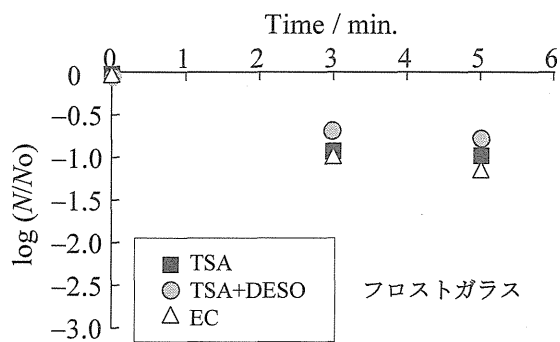


図 C.2 塩素投入後のバイオフィルム状の *P. aeruginosa* (付着強度が強い部分) の濃度変化 (pH7)

C.3 異なる塩素濃度における塩素処理の及ぼす損傷レベルの相違の検討

図 C.3 に不活化実験の結果を示した. CT 値は, 濃度と時間の積であり, 一般的にはこの値が同じであれば同程度の不活化となると考えられている. 本実験では, CT 値が約 0.1 mg·sec./L となるように設定した.

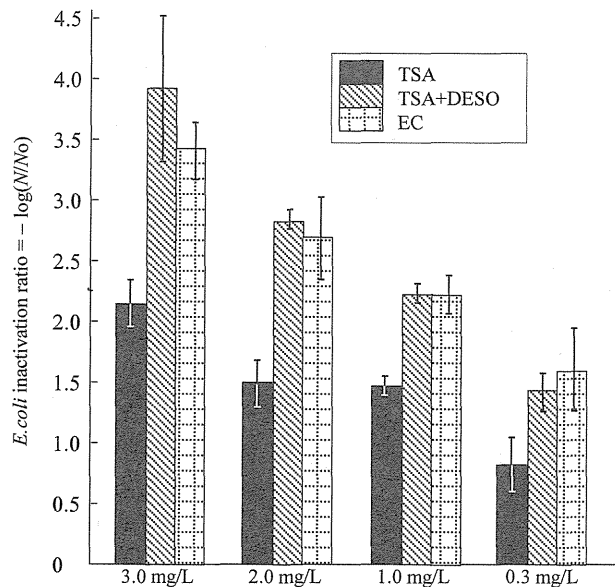


図 C.3 CT=0.1 mg·sec./L の時の各投入濃度における不活化効果 (残存率の対数値)

D. 考察

D.1. T-RFLP 法による定量方法の検討について

表 C.1 の値を基に、それぞれの濃度比の対数値のグラフを図 D.1 に示した。この図においては、Mixture VII のデータ点が外れてしまっている以外は、式 (1) および式 (2) に示す相関を持っていると考えられた。結果、投入したマーカー生物 (*E.coli*) 溶液の濃度が異なっても、同じ回帰直線で表すことができると考えられた。回帰直線は下式(1)となった。またこの式を変形して、マーカー生物(*E.coli*)のピークに対する対象試料(*P.aeruginosa*)のピーク比 R とマーカー生物 (*E.coli*) 濃度 u から対象微生物(*P.aeruginosa*)濃度 x を求める式(2)を示した。

$$\ln R = 1.0 \ln \frac{x}{u} - 1.7 \quad (1)$$

$$x = u R e^{1.7} \quad (2)$$

R : *P.aeruginosa* ピーク値 / マーカー生物 (*E.coli*) ピーク値

x : *P.aeruginosa* 濃度, u : *E.coli* 濃度

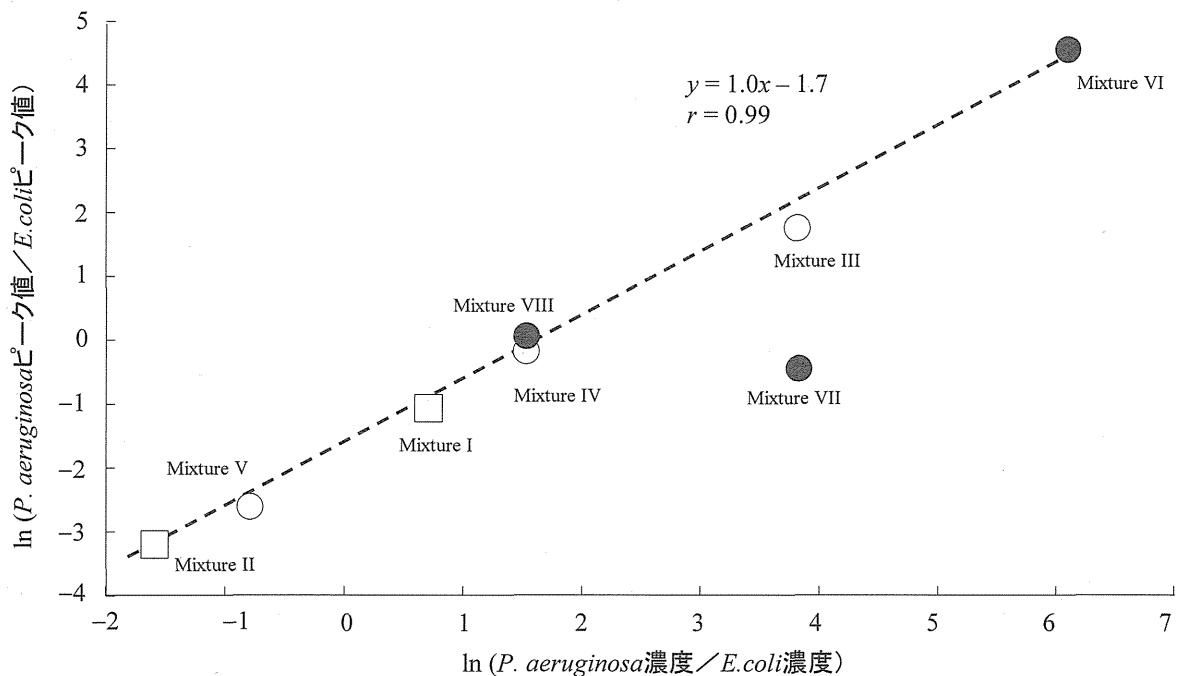


図 D.1 混合溶液中の生物濃度比と各生物の T-RFLP プロファイルピーク値の比の関係

今後は、複数種の従属栄養細菌を含む試料について、T-RFLP 法を用いての定量分析が可能かを調べる必要があると考えられる。その後、塩素消毒処理前後の定量分析手法の確立を目指す。

D.2. 生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

1) 遠心分離による付着強度毎の分離

図 D.2 は表 C.2 の値を基に各遠心分離の強度によって分離される画分を図示したものである。図に示されるとおり生物膜を付着強度の違いによって分離することが可能であることが分かった。またフロストガラスの方が、PVC に比べて、バイオフィームとしての付着量が多いことがわかる。特に再深部と考えられる付着強度の最も強い部分の付着量が高くなっている。

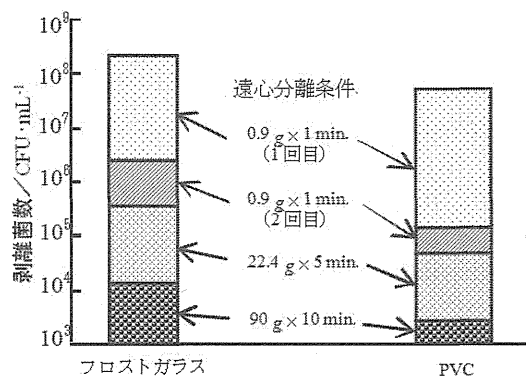


図 D.2 各遠心分離条件における剥離菌数

2) 遠心分離による *P. aeruginosa* の増殖活性への影響

表 C.3 に示された結果から、位相差観察法による細胞数と栄養培地 TSA による希釈平板法にて測定した菌数値は完全に一致していないもののオーダー的には一致していることがわかる。このことから、遠心分離および超音波処理によって *P. aeruginosa* の増殖活性はほぼ影響を受けないものと考えられた。

3) バイオフィーム状の *P. aeruginosa* の塩素処理による不活化実験

図 C.1 と図 C.2 を比較すると、不活化速度は約半分で推移していることがわかった。即ち、バイオフィームの付着強度が強く剥離しにくい部分においては、遊離塩素による不活化効果が浮遊状態の約半分ほどになってしまうことがわかった。

図 D.3 は既報における浮遊状態の *P. aeruginosa* に塩素処理を行った場合の結果である。不活化率を図 C.1 と比較すると、ほぼ同じ不活化速度で推移していることがわかった。即ち、バイオフィーム状であっても付着強度が弱く剥離しやすい部分においては、遊離塩素による不活化効果は浮遊状態と変わらないことがわかった。

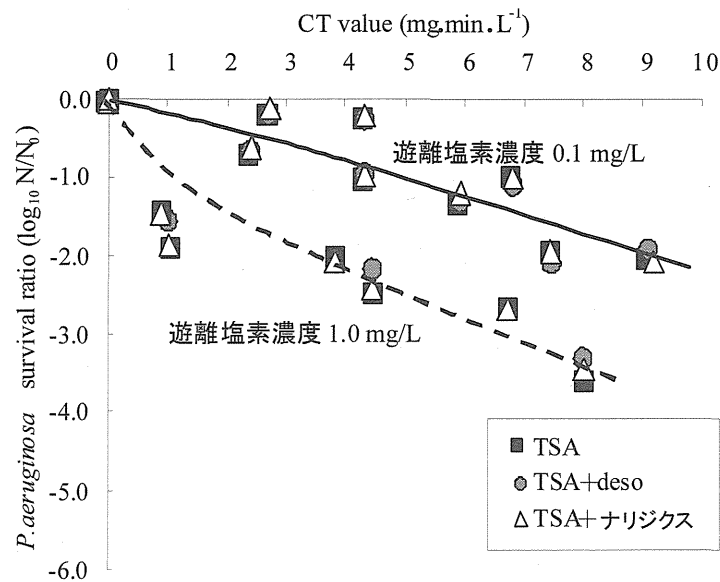


図 D.3 塩素投入後の浮遊状態の *P. aeruginosa* の濃度変化 (pH 7)
(平成 21 年度厚労科研分担研究報告書より)

図 C.1, 図 C.2 の両方において、不活化速度はフロストガラスと PVC の間に顕著な差は見られなかったことからバイオフィームが形成される材質が不活化へ与える影響は、付着強度に係わらず無視できると考えられた。また 3 つの培地における測定結果の差については、図 C.1 においては TSA とその他の培地とに若干の差が見られたが、図 C.2 においてはほぼ見られなかった。このことから、付着強度が弱い部分においてはいずれの場合にも細胞膜の損傷もしくは薬剤耐性の失活が、代謝機能の失活に比べて起こりやすいことを示していると考えられる。

まとめると遊離塩素による不活化効果においては、バイオフィームにて付着強度の弱い部分の不活化効果は浮遊状態の菌と同等であったが、付着強度の高い部分の不活化効果はそれに比べて半減していることがわかった。異なる培地による計測によって不活化機構の相違を検討した結果、付着強度の弱い所で若干の亜致死的損傷細菌の存在が確認されたが、付着強度の強い部分では、いずれも致死的損傷であったことが示唆された。今後の課題としては遊離塩素と結合塩素による違いや投入塩素濃度をより低濃度 (0.1 mg/L 程度) に設定した条件での効果について調べていく必要がある。

D.3 異なる塩素濃度における塩素処理の及ぼす損傷レベルの相違の検討

図 C.6 に示される結果を Microsoft Excel (Microsoft Excel 2007, Microsoft 社製) を用いて F 検定および t 検定を行い、反応させた遊離塩素濃度の違いによって、それぞれの培地の不活化率に有意差があるかを調べた。

TSA+デソにおいては、遊離塩素濃度で 2.0 ~ 3.0 mg/L においては有意差がみられなかったが、1.0, 0.3 mg/L

は有意に低く、塩素濃度が低いほど効果は小さくなっていた。また TSA と EC においては、1.0, 0.3 mg/L は 3.0 mg/L に比べて有意に低かった。この結果から、塩素濃度 2.0~3.0 mg/L においては不活化レベルおよび損傷部位の差はみられなかったが、2.0 mg/L 以上は 1.0 mg/L 以下に対して膜損傷を与えること、3.0 mg/L は 1.0 mg/L 以下よりも、核酸や必須代謝機能の致死の損傷を有意に高く与えていると考えられた。

以上のように CT 値が同じでも、不活化効果が異なることが確かめられた。そこで下式 (3) で表される Chick-Watson モデルを仮定し、3 種の培地の結果から得られる不活化率、それぞれにおいて係数を求めた。

$$\ln \frac{N}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t \quad (3)$$

N/N_0 : 微生物の生残率, C : 消毒剤濃度, t : 反応時間, k : 不活化速度定数, n : 定数,

表 D.3 に測定培地毎の大腸菌不活化モデル式 (Chick-Watson モデル) の各係数値を示した。n は培地毎の差は小さくほぼ 1.3~1.4 にまとまった。k 値は TSA が、そのほか 2 つの培地 (TSA+DESO と EC) に比べると低くなっており、不活化速度は最も低いが、TSA+DESO と EC の差が小さいことがわかる。

表 D.3 塩素処理による測定培地毎の大腸菌の不活化モデル (Chick-Watson モデル) の各係数値

測定培地	$k / (L^n / \text{mg}^n \cdot \text{min.})$	n
TSA	13.3	1.38
TSA + DESO	23.1	1.41
EC	23.0	1.31

表 D.3 に示される係数を用いて、各投入濃度における任意の CT 値における推定残存率を図 D.4 に示す。図中の点は実験データ値である。たとえば CT 値が 0.2 mg·min./L の場合では、濃度が 0.3 mg/L、3 mg/L と 10 倍異なると、残存率でおよそ 10 倍 (1 log) 異なると推測される。

図 D.5 は投入濃度を 2 mg/L とした場合の、各培地毎にモデル式を用いて、残存率を推定したものである。図中の点は実験データ点である。TSA は致死的な損傷を与えられていない菌の残存率を示すと考えられる。TSA+DESO は膜損傷を与えられていない菌の残存率を示すと考えられる。EC は乳糖代謝機能の損傷を与えられていない菌の残存率を示すと考えられる。これを見ると例えば CT 値が 0.2 mg·min./L の場合では、膜損傷を与えられる作用は、致死的な損傷を与える作用に比べて 10 倍 (1 log) 多く与えていると考えられる。

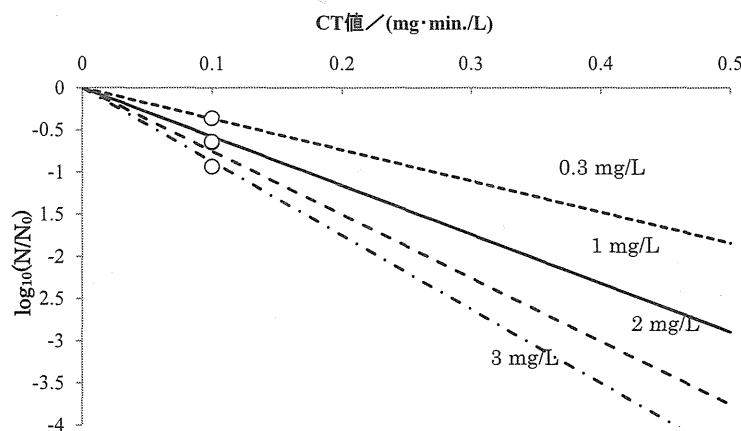


図 D.4 塩素処理における各投入濃度での CT 値と推定残存率

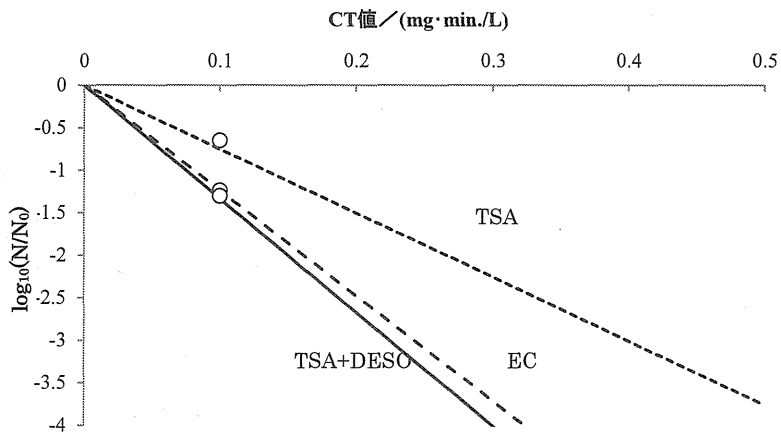


図 D.5 塩素処理における CT 値と各測定培地の結果推定残存率

E. 結論

T-RFLP 法を用いてモデル微生物として *Pseudomonas aeruginosa* 株を用い、濃度既知のマーカ生物を投入することによる濃度定量法について検証を重ね、複数種の微生物群の消毒処理耐性やその後の増殖能力を一度に解析することが可能となると考えられた。

PVC 片上およびフロストガラス片上にバイオフィームを形成させた *Pseudomonas* 菌を剥離強度によって分類する方法を確立した。また顕微鏡による計数と培養法による計数の比較によって、分離処理による細菌への不活化効果は見られないことが確認された。塩素処理によって配水管中で剥離せずバイオフィームの種となる可能性が高い部分については、損傷レベルはいずれも致命的であるものの、不活化速度は浮遊状態の菌や、剥離しやすい部分に比べて約半分であることがわかった。

塩素消毒処理において、同じ CT 値を設定した場合の接触遊離塩素濃度 (0.3~3.0 mg/L) による細菌への損傷レベルの相違について検討した結果、同じ CT 値であっても、遊離塩素濃度で 2.0 mg/L 以上では、1.0 mg/L 以下に比べて、より膜損傷を与えやすいことと、3.0 mg/L では、1.0 mg/L 以下に比べて致命的な損傷を高く与えていることがわかった。また Chick-Watson モデルを仮定して、各投入濃度、もしくは各損傷レベルの不活化率が推定できた。

参考文献

- 1) Marc-Olivier Buffle et al. (2006) Measurement of the initial phase of ozone decomposition in water and wastewater by means of a continuous quench-flow system: Application to disinfection and pharmaceutical oxidation, *Wat. Res.*, 40, pp.1884 – 1894

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazama S. Otaki M., Quantitative analysis of inactivation mechanisms of *Escherichia coli* by a newly developed method using propidium monoazide 論文投稿中

2. 学会発表

- 1) Mawatari S., Otaki M., Development of quantitative analysis of heterotrophic bacteria by T-RFLP method, *Proc. of Water and Environment Technology Conference 2012*, (東京, 6月)
- 2) 曹雪, 大瀧雅寛, バイオフィーム状態の細菌に対する塩素処理の不活化効果, 第 47 回日本水環境学会年会, p. 189.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書 4

配水過程における再増殖微生物の塩素耐性と増殖特性解析

研究分担者 春日 郁朗
研究協力者 大坂 幸弘

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）

「水道の浄水処理および配水過程における微生物リスク評価を用いた水質管理手法に関する研究」

平成 24 年度分担研究報告書

配水過程における再増殖微生物の塩素耐性と増殖特性解析

研究分担者	東京大学大学院工学系研究科	春日 郁朗
研究協力者	東京大学大学院工学系研究科	大坂 幸弘

研究要旨

10 か所の屋外・屋内給水栓から従属栄養細菌の単離を行った。16S rRNA 遺伝子を対象とした二重標識 T-RFLP によって分類を行った後、系統的に異なる 19 株を得た。塩素耐性試験では、塩素添加による消毒作用の影響を膜損傷とコロニー形成能から評価した。その結果、各菌株の不活化は Chick-Watson 式に従うことが確認されたが、塩素消毒の影響は膜損傷よりもコロニー形成能に顕著に表れることが確認された。塩素耐性は単離株によって異なり、*Mycobacterium* や *Methylobacterium* などに近縁な単離株が他の単離株よりも高い塩素耐性を持つことが示された。また、これらの単離株の水道水中での最大増殖量を評価し、塩素耐性と水道水中での増殖性から単離株の再増殖特性を分類した。浄水工程水における増殖性を評価したところ、各工程が単離株の増殖性に異なる影響を与えることが示された。

A. 研究目的

残留塩素の低減化が進められる中、水道給配水系における細菌再増殖リスクが高まることが懸念されている。残留塩素低減化を達成しつつ、生物学的に安定な水道水質の維持を達成するためには、細菌再増殖を適切に監視、制御する手法の確立が求められている。そのためには、再増殖する細菌の生理・生態を理解することが欠かせないが、我が国では水道水中の細菌再増殖や細菌現存量を、「一般細菌」に加えて「従属栄養細菌（Heterotrophic Plate Count: HPC）」（平成 20 年 4 月から水道水質管理目標値に追加：暫定目標値 2000 CFU/mL）で評価しているのが現状である。しかし、HPC の指標性・有用性については、十分な知見が蓄積されていない。

そこで、本研究では、再増殖細菌の生理・生態特性に基づいた細菌再増殖の評価手法・制御策に資する基礎的な知見を得ることを目的とする。今年度は、実際の給水末端で検出される従属栄養細菌を単離し、多様性や再増殖特性（塩素耐性、増殖性）を評価した。

B. 研究方法

1. 採水試料からの HPC の単離と同定

東京都内の屋外 9 か所(主に公園)、屋内 1 か所の給水栓を対象とした連続採水を行った。採水は、約 5L/min の流速で合計 20L をガンマ線滅菌済みマイティパックに採水した。採水間隔は、0-1L を 200mL 間隔、1-6L を 1L 間隔、6-20L を 2L 間隔とした。フラクションごとに、水温、全塩素濃度、遊離塩素濃度、全菌数（フローサイトメーター）、従属栄養細菌数（HPC）を測定した。

採水試料について、前半 0-2L、後半 10-20L のフラクションを混合してコンポジットとし、HPC の単離を行った。R2A 寒天培地上にコロニーを形成した株について、単一であることが確認されるまで画線を繰り返した。16S rRNA 遺伝子を対象として二重標識による Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) の分析を行った。プライマーには、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした 27f と 907r を用い、それぞれのプライマーの 5'末端を 6-FAM、HEX で別々に標識した。PCR による増幅後、制限酵素 *HhaI* による消化を行った。フラグメント解析には Genetic Analyzer 3500 (life technologies) を用い、5'末端および 3'末端の断片長情報に基づいて OTU (Operational taxonomy unit) の分類を行った。異なる OTU に分類された HPC を対象として、16S rRNA 遺伝子のフルシーケンスを決定し、RDP classifier によって系統解析を行った。

2. 塩素耐性試験

単離株を R2A 寒天培地上に塗布し、コロニー形成後に白金耳を用いて釣菌し、リン酸緩衝液 40mL 程度に懸濁させることでストック菌液を調製し、実験開始前に菌濃度を確認した。試験には 250ml ねじ口瓶を用い、リン酸緩衝液 200ml (pH:7.0) を入れてオートクレーブを行った。初期生菌数（膜損傷のないフラクション）が約 1.0×10^6 cells/mL になるようにストック菌液を添加すると共に、表 1 に示した濃度条件になるよう次亜塩素酸ナトリウムも添加し、スターラーによる攪拌を行った（室温）。表 1 に示した時間間隔でサンプリングを行い、遊離塩素濃度（DPD 法）を測定すると共に、チオ硫酸ナトリウムを用いて塩素をただちに中和した後、菌数（塗布法による HPC 計数、SYBR Green I/ PI による膜損傷性評価）の測定を行った。

表 1 塩素耐性試験条件

初期生菌（膜損傷なし）濃度	1.0×10^6 cells/mL
初期(1分後)遊離塩素濃度	0, 0.1, 0.4, 1.0mg/L
サンプリング時間（菌数測定）	15, 30, 45sec, 1, 2, 4, 8, 16, 32min
〃（塩素濃度測定）	1, 4, 16, 32min

* 遊離塩素濃度はそれぞれ 0.1 ± 0.1 , 0.4 ± 0.1 , 1.0 ± 0.2 mg/L の範囲で維持をした。範囲を下回りそうになったときは塩素を再度添加し、1分後に遊離塩素濃度を測定した。

3. 水道水中での増殖特性試験

単離株、*Pseudomonas fluorescens* P17 株、*Aquaspirillum* sp. NOX 株、大腸菌を対象として、増殖特性試験を行った。本学実験室の水道水（5 分間、5L/min で放水後採取）をろ過、加熱殺菌し、チオ硫酸ナトリウムによる塩素中和、無機栄養塩の添加を行った。初期菌数が 1.0×10^3 cells/mL になるよう植菌し、暗所、20°C で静置培養を行った。全菌数の経時変化をフローサイトメーターで測定した。

4. 浄水処理工程水中での増殖特性試験

水道水中で増殖が確認された単離株等を対象として、浄水処理工程水（原水、前段ろ過、オゾン処理水、BAC 処理水、浄水）における増殖性を比較した。採水した工程水をろ過、加熱殺菌し、チオ硫酸ナトリウムによる塩素中和、無機栄養塩の添加を行った。初期菌数が 1.0×10^3 cells/mL になるよう植菌し、暗所、20°C で静置培養を行い、全菌数の経時変化をフローサイトメーターで測定した。

C. 研究結果

1. 採水試料からの HPC の単離と同定

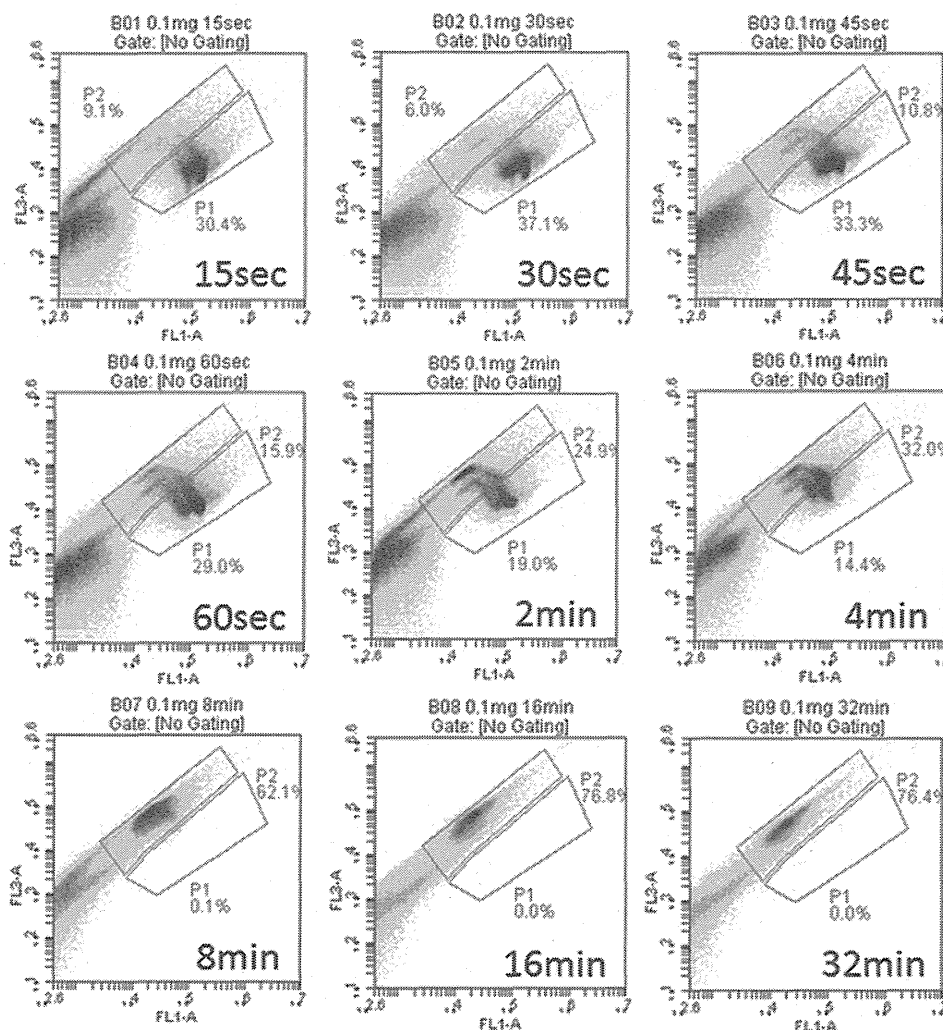
6-FAM 標識したフォワードプライマーと、HEX 標識したリバースプライマーを用いて、単離した株の 16S rRNA 遺伝子を T-RFLP で解析し、単離株を 19 種類の OTU に分類した。各給水栓からの単離の状況・系統解析の結果を表 2 に示した。これら 19 株は 14 種類の属に大きく分類されることが明らかになった。

表 2 単離した従属栄養細菌

Name	Fragment(bp)		Classification Information			採水地点														
	5'-end	3'-end	Phylum	Genus	Identity	色	A	B	C	D	E	F	G		H	I	J1		J2	
													0-2L	10-20L			0-1L	10-20L		
HPC1	53	160	Firmicutes	Exiguobacterium	100%	橙											○	●		
HPC2	75	62	Proteobacteria	Sphingopyxis	100%	黄	○	○	○	○			○				○	○	●	○
HPC3	169	223	Actinobacteria	Mycobacterium	100%	白														●
HPC4	174	43	Proteobacteria	Roseomonas	100%	赤														
HPC5	200	340	Proteobacteria	Burkholderia	100%	白					●									
HPC6	210	687	Bacteroidetes	Sediminibacterium	100%	橙													●	
HPC7	234	225	Firmicutes	Staphylococcus	100%	白							○				●			
HPC8	237	160	Firmicutes	Bacillus	100%	黄														●
HPC9	329	525	Proteobacteria	Brevundimonas	100%	赤													●	
HPC10	329	158	Proteobacteria	Brevundimonas	100%	白													●	
HPC11	338	62	Proteobacteria	Methylobacterium	100%	赤	○	○	○	○	●		○							
HPC12	359	341	Proteobacteria	Aquabacterium	100%	白													●	
HPC13	362	223	Actinobacteria	Mycobacterium	100%	白												●		
HPC14	365	66	Actinobacteria	Micrococcus	100%	黄					●									
HPC15	369	467	Proteobacteria	Lysobacter	100%	白					●							○		
HPC16	510	61	Firmicutes	Bacillus	100%	白														●
HPC17	573	160	Firmicutes	Bacillus	100%	白							○	○	○					●
HPC18	662	223	Actinobacteria	Mycobacterium	100%	白														●
HPC19	764	61	Proteobacteria	Sphingomonas	100%	黄	●													

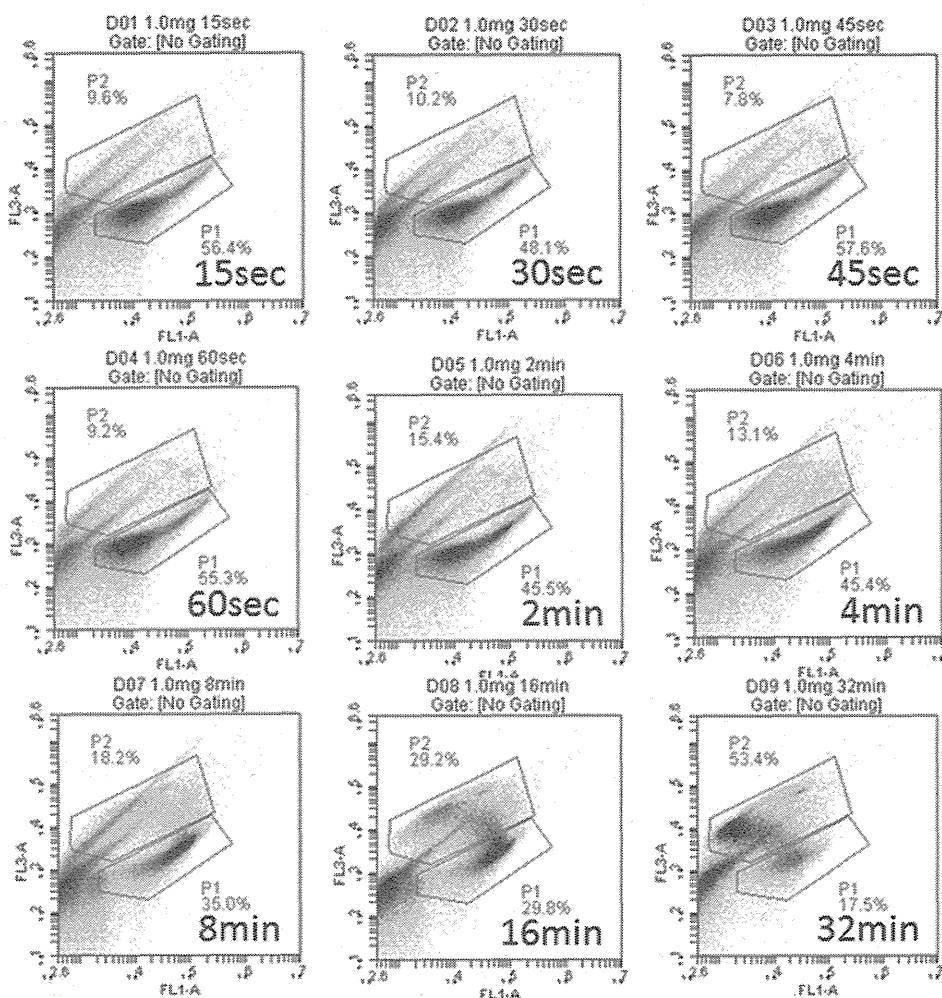
2. 塩素耐性試験

例として HPC1 株 (*Exiguobacterium* 属近縁) (遊離塩素濃度 0.1mg/L)、HPC13 株 (*Mycobacterium* 近縁) (遊離塩素濃度 1.0mg/L)の塩素耐性試験 (膜損傷の変化) の結果を図 1 (A・B) に示す。P1 ゲートは膜損傷がない菌 (生菌) を、P2 ゲートは膜損傷がある菌 (死菌) をそれぞれ示す。なお、塩素無添加系では全菌数や膜損傷性に変化は見られなかった。(A) HPC1 株 (*Exiguobacterium* 属近縁) と比べて (B) HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁) は遊離塩素濃度が 10 倍高いにもかかわらず、P1 ゲートから P2 ゲートへの遷移は前者が 1 分頃に生じているのに対して、後者は 16 分頃から顕著な変化が観察され、株によって膜損傷の程度は大きく異なることが示された。



(A) HPC1 株 (*Exiguobacterium* 属近縁) : 遊離塩素濃度 0.1mg/L

図 1 HPC1 株と HPC13 株を塩素処理した時の膜損傷の推移



(B) HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁) : 遊離塩素濃度 1.0mg/L

図 1 HPC1 株と HPC13 株を塩素処理した時の膜損傷の推移

膜損傷のない生菌割合の変化を図 2 に示す。縦軸は生残割合の対数值、横軸は CT 値である。初期値 1.0×10^6 cells/mL に対して、定量下限値 1.0×10^3 cells/mL であるため、3log までの減少を評価可能である。ほぼすべての株について、膜損傷速度定数 k の値は遊離塩素濃度によらずほぼ同程度であり、Chick-Watson 式に従っていることが確認された。

HPC11 株 (*Methylobacterium* 属近縁) と HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁) の死滅速度定数がそれぞれ 0.015, 0.019 L/mg min (全濃度のプロットを合算して算出) と、他の株と比べて著しく高い塩素耐性を有していることが確認された。最も塩素耐性が低かったのは *E.coli* であり、死滅速度定数は 8.0 L/mg min であった。

また、塩素耐性をコロニー形成能で評価した場合、膜損傷よりも顕著な影響が出ることが明らかになった。HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁) を例として、膜損傷性とコロニー形成能で評価した速度定数の比較を表 3 に示す。HPC 試験で得られる死滅速度定数の方が膜損傷速度定数よりも 3.6-5.5 倍ほど高かった。

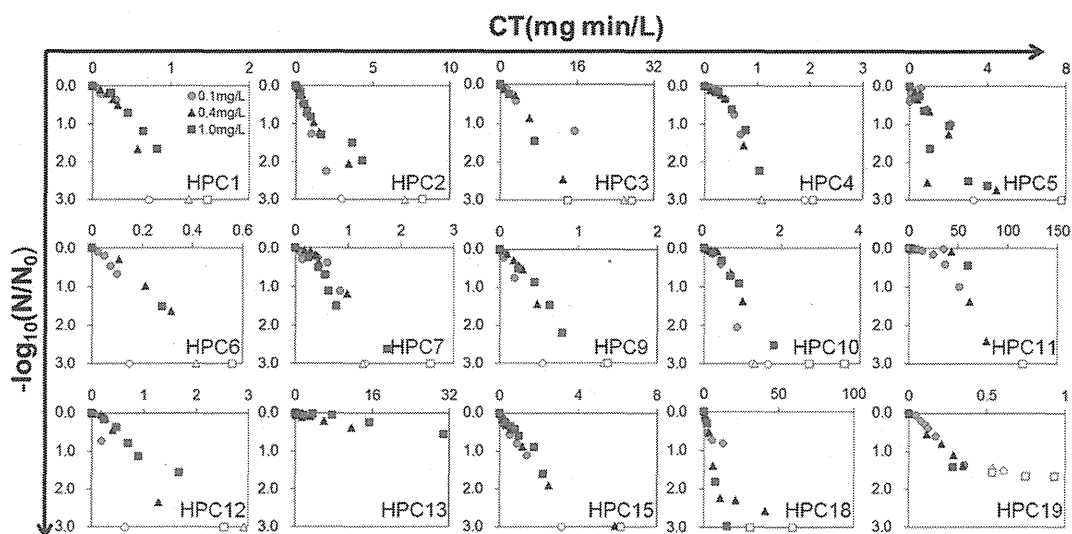


表3 HPC13株 (*Mycobacterium*属近縁) の膜損傷速度定数、コロニー形成不活化定数

k(L/mg min)	free chlorine concentration		
	0.1mg/L	0.4mg/L	1.0mg/L
FCM	0.0234	0.0294	0.0171
HPC	0.128	0.107	0.0612
HPC/FCM 比	5.5	3.6	3.6

3. 水道水中での増殖特性試験

単離株、P17株、NOX株を対象として、増殖特性試験を行った。増殖特性試験の結果、19株中8株 (HPC2株、HPC4株、HPC5株、HPC6株、HPC11株、HPC12株、HPC15株、HPC19株) 及びP17株、NOX株が水道水中で増殖した。HPC5株、HPC12株、HPC15株などは、P17株やNOX株と同程度の最大増殖量を示したが、他の株の最大増殖量は小さかった。

4. 浄水処理工程水中での増殖特性試験

単離株、P17株、NOX株を対象として、浄水工程水 (原水、前段ろ過水、オゾン処理水、BAC処理水、浄水) 中における増殖特性を評価した。例として、図3にP17株、HPC4株、HPC11株の増殖の様子を示す。菌株によって最大増殖量、比増殖速度、最大増殖量の半値に達するまでの時間が異なることが明らかになった。比増殖速度 μ は、P17株、NOX株では0.17-0.24 (h^{-1})であったのに対し、今回単離した株では0.016-0.092 (h^{-1})と2-10倍程度の