

Fig. 1. Effects of lipopolysaccharides from *E. coli* O55:B5 on (a) cell viability and (b) IL-8 secretion of human keratinocytes. The data represent the mean \pm the standard deviation of three independent experiments. Asterisks indicate significant difference in comparison to the cells without LPS stimulation.

LPS stimulation was observed with endotoxin stimulation above 45000 EU/mL. The cytokine levels at different LPS concentrations were compared in Figure 1(b) using the amounts of cytokine production per 10^5 viable cells. The IL-8 secretions were also increased significantly by stimulation with endotoxins above 45000 EU/mL. The decrease of cell counts, however, caused by the cytotoxic effect at a higher LPS stimulation contributed significantly to these increments. No TNF- α secretion was observed with LPS stimulation in NHEK.

Our previous results indicated that the endotoxin levels in water systems in Japan ranged from 10^0 (drinking water) to 10^4 (effluent from sewage treatment facility) EU/mL.^[18] The NHEK cytokine secretions occurred only with stimulation at extremely high LPS concentrations compared to the endotoxin levels in aquatic environments.

CD14⁺ monocytes

The cell survivals of CD14⁺ monocytes after stimulation with purified *E. coli* LPS for 6 or 24 h are shown in Figure 2. Although there were no large changes in cell counts with 6 h stimulation, the approximately 1.5-fold cell counts after 24 h stimulation were observed in all examined endotoxin levels (30 – 30,000 EU/mL).

The cytokine secretions, TNF- α and IL-8, are presented in Figure 2(b). In all of the following figures, the cytokine levels at different LPS concentrations were compared using the amounts of cytokine production per 10^6 viable cells. The IL-8 production after 6 h stimulation at 30 EU/mL was drastically increased to 30,000 pg/ 10^6 cells. The same level of IL-8 secretion even at 0.3 EU/mL was observed here (data not shown). At a higher range of endotoxins, the IL-8 stayed at around 20,000 pg/ 10^6 cells.

On the other hand, secreted IL-8 levels were decreased to 16,000 – 21,000 pg/ 10^6 cells after 24 hours stimulation. The TNF- α was also increased up to 4800 pg/ 10^6 cells by LPS stimulation at 30 EU/mL for 6 h, but further increased to more than 7800 pg/ 10^6 cells with LPS stimulation above 3000 EU/mL. After 24 h stimulation, the TNF- α were then decreased to less than 260 pg/ 10^6 cells at all LPS concentrations. These results suggested that cytokines were secreted within 6 h and the decomposition rate of each cytokine largely exceeded the newly secretion during the next 18 h.

As described previously, the endotoxin levels in aquatic environment were in the range of 10^0 – 10^4 EU/mL in Japan^[18]. The LPS stimulation even at very low levels caused significant cytokine secretions, and no clear dose-dependent changes in cytokine secretions was obtained.

THP-1

The cell survivals of THP-1 after stimulation with purified *E. coli* LPS for 6 or 24 h are compared in Figure 3(a). The cell counts of THP-1 after 6 h stimulation showed no significant change in the examined endotoxin range of 7 – 70,000 EU/mL as well as CD14⁺ monocytes, but the counts were increased significantly in a dose-dependent manner after 24 hours stimulation.

The IL-8 and TNF- α secretions after LPS stimulation are also presented in Figure 3 (b). The cytokine productions after 6 h LPS stimulation were increased dose-dependently in the examined endotoxin range, although the secreted levels were 890 and 640 pg/ 10^6 cells at maximum for IL-8 and TNF- α , respectively, which were much lower than the levels observed in CD14⁺ monocytes. After 24 h stimula-

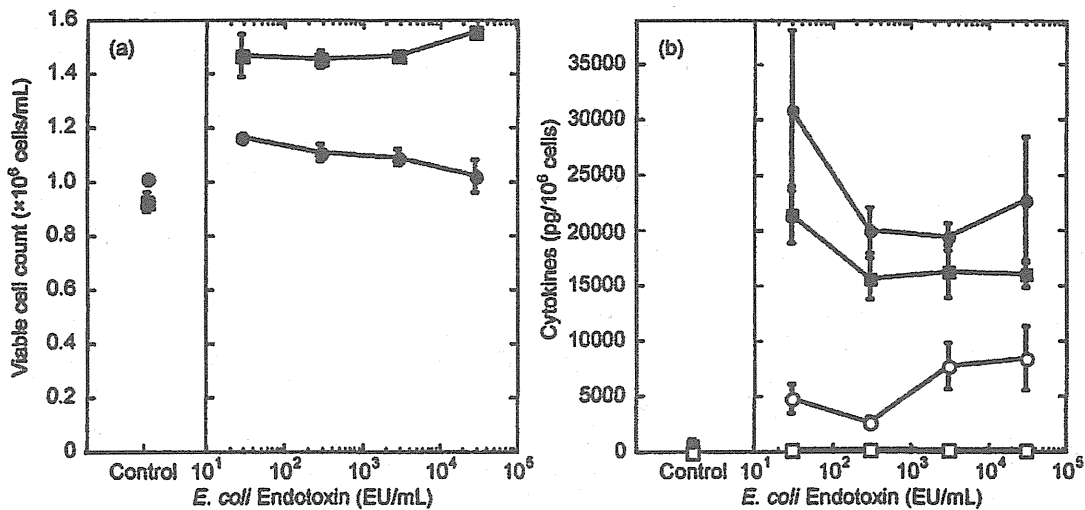


Fig. 2. Effects of lipopolysaccharides from *E. coli* O55:B5 on (a) cell viability and (b) cytokine secretion of CD14⁺ monocytes. In (a), the viable cell count after 6-h stimulation (solid circle) and 24 h stimulation (solid square) are presented. In (b), the IL-8 after 6 h (solid circle) and 24 h (solid square) stimulation and the TNF- α after 6 h (open circle) and 24 h (open square) stimulation are also presented. The data represent the mean with the range of two independent experiments.

tion, TNF- α disappeared completely, while IL-8 production decreased, but was still detected in the culture medium.

The exposure routes of endotoxins via water in daily life include oral ingestion, inhalation, and dermal contact, and only inhalation route has been already identified as a health risk factor^[19-21]. Among the examined cell lines in this investigation, NHEK is the only cells forming the boundary

of the human body against endotoxin exposure via water in daily life. Therefore, the obtained inflammatory responses in NHEK could be more directly interpreted as toxicity on the skin via dermal contact to water. Our results, however, showed very poor inflammatory responses of NHEK with LPS stimulation.

On the other hand, the human blood cells revealed more sensitive responses to LPS stimulation at average levels in an

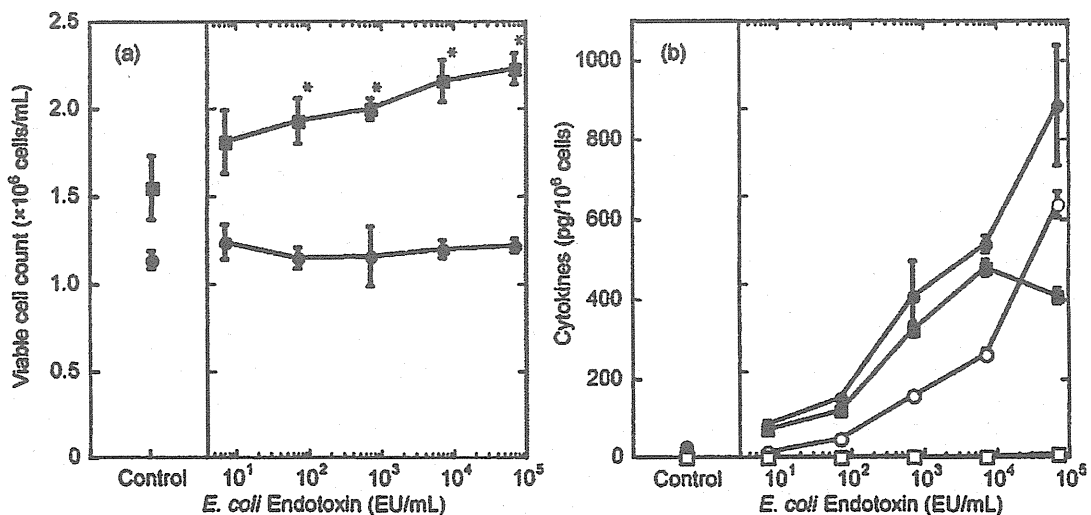


Fig. 3. Effects of lipopolysaccharides from *E. coli* O55:B5 on (a) cell viability and (b) cytokine secretion of THP-1. In (a), the viable cell count after 6 h stimulation (solid circle) and 24 h stimulation (solid square) are presented. In (b), the IL-8 after 6 h (solid circle) and 24 h (solid square) stimulation and the TNF- α after 6 h (open circle) and 24 h (open square) stimulation are also presented. The cell count data represent the mean \pm the standard deviation of four independent experiments. The cytokine data represent the mean with the range of two independent assays. Asterisks indicate significant difference in comparison to the cells without LPS stimulation.

Table 1. Microbiological parameters of river water samples.

	<i>Yodo River sample</i>
Heterotrophic plate counts (CFU/mL)	4.1×10^3
Total bacterial cell counts (cells/mL)	3.9×10^5
Total Endotoxin (EU/mL)	4.4×10^2
Free Endotoxin (EU/mL)	2.4×10^2
Cell-bound endotoxin (EU/mL)	2.2×10^2

aquatic environment. By comparison of CD14⁺ monocytes with THP-1, the dose-dependent responsiveness in THP-1 could cover a wide range of endotoxin levels generally observed in aquatic environments, while CD14⁺ monocytes significantly responded to a trace level of endotoxin. Based on these results, THP-1 with 6-h LPS stimulation was chosen for the following assay to determine the inflammatory potencies caused by endotoxins in aquatic environments.

Obviously, there is a limitation to applying the obtained data using these cell lines to a toxicity assessment caused by LPS, because the blood cells are rarely exposed to them directly except during medical care or in wound tissues. The blood cells are usually exposed only to some portion of inhaled or ingested endotoxins because of various physical and chemical defenses in the human body. The actual inflammatory responses in blood cells, therefore, should be estimated based on the internal doses, but little information on internal LPS doses is currently available. This limitation of THP-1 assay system should be considered in a further toxicity assessment, however, the assay system enables us to detect and to compare the inflammatory potency in various water samples taken from aquatic environments or water treatment/reclamation processes, which were contaminated with endotoxins at different levels.

LPS extraction from indigenous bacterial cells in aquatic environment

Table 1 shows a summary of microbiological parameters in the river water sample taken in the downstream area of the Yodo River. It is a main river in the Kinki region in Japan, and is a main resource of drinking water in Osaka City, the second biggest city in Japan. The heterotrophic plate counts were 4.1×10^3 CFU/mL, and the total bacterial cell counts determined by DAPI staining were 3.9×10^5 cells/mL. This result indicates that only 1.1% of indigenous bacteria in the river water could be cultivated on R2A agar medium at 20°C, which is the ordinary condition for detecting heterotrophic bacteria in aquatic environments. Additionally, this result suggested that such an unculturable fraction of the aquatic bacterial community could contribute to endotoxins in aquatic environments.

The total endotoxins determined by LAL assay were 440 EU/mL. The free endotoxins determined after centrifugation to remove cell-bound endotoxins were 240 EU/mL. The endotoxic activity per indigenous bacterial cell was cal-

culated as 1.1×10^{-3} EU/cell in this sample. Our previous investigation showed that the endotoxin levels in the middle part of the river were greater than 1500 EU/mL, because there are many contamination sources of endotoxins, such as the inflow of effluent from several sewage treatment facilities located along the river^[18]. However, the endotoxin contamination seemed to be partially mitigated less than 1000 EU/mL in the downstream of the Yodo River based on our two time samplings.

The changes of total endotoxin and weight in the sample during purification steps are shown in Table 2. After enrichment with ultrafiltration membrane, the total endotoxic activity increased by 78%. We have not yet identified the reason for the endotoxin increase, but new endotoxin synthesis with multiplication or release from existing bacteria might have occurred because it took a few days to concentrate over 20 L sample by ultrafiltration. During the purification steps, 72% and 54% of the endotoxic activities were removed by phenol extraction and RNase A treatment, respectively. In these two steps, the losses of dry weight overwhelmed the decrease in the total endotoxic activity, and consequently the endotoxic activity per dry weight increased.

Phenol extraction can destroy cell membranes and remove proteinaceous compounds contained in bacterial cells by denaturing. The RNase A treatment was then applied to the crude extract, because it was considered to still contain abundant RNA fractions. The degraded high molecular weight RNA could be removed by the following dialysis in this procedure. As a result, the purity of the LPS contained in the extract from indigenous bacterial cells could be increased. Finally, the purified LPS sample exhibited 1.29×10^6 EU/mg.

Inflammatory responses caused by LPS derived from indigenous bacteria in aquatic environment

The THP-1 cell viability after 6 h stimulation with purified LPS from the river water samples, called environmental LPS here, is presented in Figure 4(a). The cell viability was increased by 20% with LPS stimulation in all examined ranges. This result was inconsistent with the observation in THP-1 cells stimulated with the purified *E. coli* LPS for 6 h. There are two possible reasons for the difference. The first is that the remaining contaminant substances except LPS, which are hydrophilic high molecular weight organic compounds and could not be removed by phenol extraction or the following dialysis, could activate THP-1 cells. The second is that the variety of LPS structures in environmental bacteria could affect the cell viability. Unfortunately, there is no clear evidence to identify which factor could contribute more to the THP-1 activation at this stage.

The IL-8 and TNF- α secretions from THP-1 are compared in Figure 4(b), and both secretions were increased in a dose-dependent manner. It is of note that the environmental LPS induced stronger inflammatory responses in THP-1

Table 2. Purification of LPS from indigenous bacterial cells in the river water sample.

	Total endotoxic activity (EU)	Dry weight (mg)	Endotoxic activity per dry weight (EU/mg)	Relative purity* (%)
River water	9.59×10^6	—	—	—
After ultrafiltration	1.71×10^7	20.3	8.40×10^5	100
After phenol extraction	4.78×10^6	4.4	1.09×10^6	130
After RNase A treatment	2.19×10^6	1.7	1.29×10^6	154
After sterilization	2.50×10^6	—	—	—

*Relative purity means how much endotoxic activity per dry weight was increased compared to the start sample after ultrafiltration.

than purified *E. coli* LPS at the doses corresponding to the same endotoxic activities determined by LAL assay. With regard to the overall range of endotoxins, more than 10-fold cytokine productions were observed in the culture medium of THP-1 with the environmental LPS stimulation.

The second noteworthy point is that TNF- α secretion was comparable to IL-8 secretion in THP-1 stimulated with the environmental LPS, whereas IL-8 secretion was superior to TNF- α secretion in all tested human cells stimulated with LPS from *E. coli* O55:B5 as shown in Figures 1–3. Thus, the stimulation of THP-1 with the environmental LPS induced completely different levels and patterns of cytokine secretions compared to *E. coli* LPS.

Previous researches investigated the secretions of various proinflammatory and immunoregulatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, interferon (IFN)- γ , and TNF- α , from human blood cells after stimulation with various bacterial LPS [6, 14]. Recently, Skovbjerg et al. [22] compared productions of several cytokines from PBMCs stimulated with gram-positive bacteria and gram-negative

bacteria inactivated by UV irradiation, respectively. These researches proved that gram-negative bacteria more strongly induced IL-10, IL-8, and IL-6 than gram-positive bacteria, while gram-positive bacteria induced more IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β .

Their results suggested that the IL-8 and TNF- α secretions tested in our investigation might be consequences of different responsiveness to inflammatory substances derived from aquatic bacteria. Based on the above knowledge, the stronger IL-8 secretion could be attributed to the diversity of LPS structures and their inflammatory potency as a reflection of the diversity of indigenous bacteria in aquatic environments, while some part of the TNF- α elevation observed here might be caused by unidentified contaminated substances from gram-positive bacteria in the river water or other microorganisms.

In addition to the above information, several literatures would be helpful for interpreting our result. For example, it is known that peptidoglycan or lipoteichoic acid derived from gram-positive bacteria could be inducers

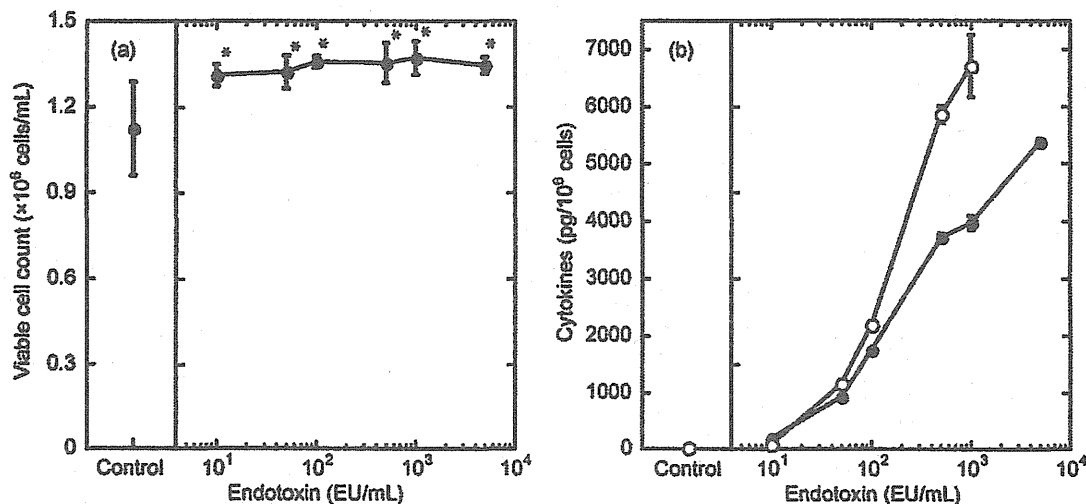


Fig. 4. Effects of lipopolysaccharides from indigenous bacteria in river water samples taken from the Yodo River on (a) cell viability and (b) cytokine secretion of THP-1. Two types of cytokines, IL-8 (solid circle) and TNF- α (open circle) were determined after 6-h stimulation. The cell count data represent the mean \pm the standard deviation of 6 independent experiments. The cytokine data represent the mean with the range of two independent assays. Asterisks indicate significant difference in comparison to the cells without LPS stimulation.

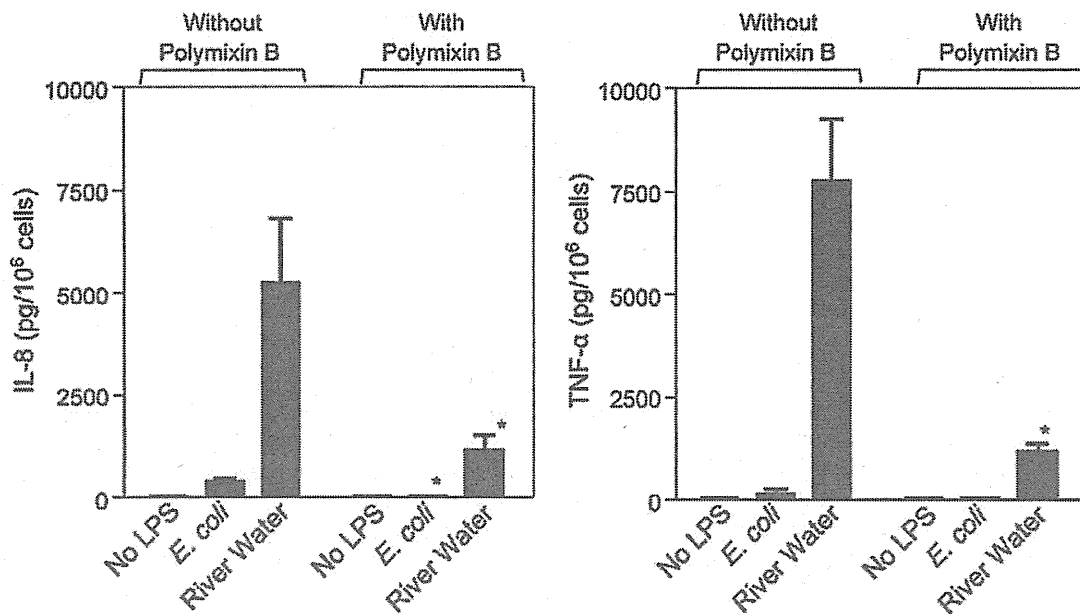


Fig. 5. Effects of Polymixin B addition as an inhibitor of endotoxin activity on cytokine secretion of THP-1. Two types of cytokines, IL-8 and TNF- α were determined after 6 h stimulation with LPS samples and pretreated LPS with Polymixin B, respectively. The cytokine data represent the mean with the standard deviation of four independent assays. Asterisks indicate significant difference in comparison to the cells without Polymixin B pretreatment.

of pyrogenic reactions in human blood cells. Nucleic acids could also cause cytokine secretion. The river water contains these bacterial substances as abundantly as LPS. However, it would be reasonable to conclude that there was little contribution of these contaminated substances to cytokine secretions. The following researches are evidences.

Nakagawa et al.^[23] compared cytokine (IL-6, IL-1, TNF- α) inducibility with several pyrogens using a monocytic cell line, Mono Mac 6, and reported that the equivalent cytokine secretions were observed only after stimulation with 250-fold or higher doses of peptidoglycan and poly (I:C), which is a synthetic analog of double-stranded RNA, compared to endotoxin. Similarly, several researches proved that the equivalent cytokine secretions also required more than 100-fold amounts of lipoteichoic acid compared to LPS.^[13, 17]

To clarify the contribution of contaminant substances in the prepared environmental LPS samples to the TNF- α elevation, the changes in mRNA expression levels of TLR-2, which can recognize lipoteichoic acid and peptidoglycan from gram-positive bacteria as ligands, after stimulation were examined. In THP-1, mRNA of TLR-2 was constitutively expressed without any stimulation, but no increase in the expression level after the stimulation was observed (data not shown).

On the other hand, the addition of Polymixin B as an inhibitor of endotoxin activity significantly, not completely, inhibited both cytokine secretions as shown in Figure 5. This result clearly indicated that the major contributor to

cytokine elevations was LPS components in the environmental LPS sample. The higher secretion level of TNF- α than IL-8 by stimulation with the environmental LPS sample was also confirmed in this experiment.

Above all information strongly suggested that the contribution of contaminated substances from gram-positive bacteria to TNF- α elevation was not significant in our result. On the other hand, Erridge et al.^[24] reported that *Acinetobacter* LPS could induce higher levels of TNF- α secretion than IL-8 in THP-1. They also proved that *Acinetobacter* LPS could induce stronger immunoreactions than *E. coli* LPS in THP-1. Thus, some bacteria existing ubiquitously in aquatic environment possibly induce stronger inflammatory responses including TNF- α elevation. The impact of various bacterial LPS in aquatic environment on inflammatory potencies or patterns of cytokine secretions should be further investigated to deeply understand immunoreactions in human cells caused by LPS in aquatic environment.

Our result also suggested a limitation of the LAL assay for detecting the toxicity changes caused by endotoxins to humans. Wichmann et al.^[10] have already reported that filtered river water samples could induce cytokine production in healthy human blood cells. Their report also indicated that cytokine production in human blood cells could be a good indicator for LPS in river water. In addition to their findings, our results presented that cytokine secretion assay using THP-1 cells can reflect the differences of LPS derived from aquatic bacteria in their potency to induce inflammatory responses in humans.

Dehus et al.^[6] reported that cytokine release from human whole blood did not correlate with LAL activity based on the results of whole blood samples stimulated with LPS from enteric bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*, and their result also strongly supported our result. The bacterial community differs according to the locations or water types, such as river, lake, effluent from sewage treatment facilities, or inside water distribution pipes. Our proposed THP-1 cell culture assay combined with cytokine production could be a useful tool for covering a broad range of water types inducing human inflammatory responses by various bacterial communities in aquatic environments.

Conclusion

This investigation indicated that cytokine assay using THP-1 with stimulation for 6 h could be useful for detecting the changes in inflammatory potencies of bacterial LPSs. The environmental LPSs purified from a river water sample induced stronger cytokine secretions in THP-1 including TNF- α elevation than *E. coli* LPS. Our findings suggested not only that LAL assay has a limitation for detecting changes in toxicity of bacterial LPSs in aquatic environment, but also that indigenous bacteria in aquatic environment can cause strong immune responses in humans even though they exhibited relatively low endotoxic activities.

References

- [1] Rapala, J.; Lahti, K.; Rasanen, L.A.; Esala, A.L.; Niemela, S.I.; Sivonen, K. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. *Water Res.* 2002, 36, 2627-2635.
- [2] Ohkouchi, Y.; Ly, B.T.; Itoh, S. Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator. *Adv. Asian Environ. Eng.* 2009, 8, 13-19.
- [3] O'Toole, J.; Sinclair, M.; Jeavons, T.; Leder, K. Alternative water sources and endotoxin. *Water Sci. Technol.* 2008, 58, 603-607.
- [4] Norton, C.D.; LeChevallier, M.W. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 268-276.
- [5] Guizani, M.; Dhahbi, M.; Funamizu, N. Assessment of endotoxin activity in wastewater treatment plants. *J. Environ. Monit.* 2009, 11, 1421-1427.
- [6] Dehus, O.; Hartung, T.; Hermann, C. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not correlate with *Limulus* amoebocyte lysate assay. *J. Endotoxin Res.* 2006, 12, 171-180.
- [7] Hansen, L.A.; Poulsen, O.M.; Wurtz, H. Endotoxin potency in the A549 lung epithelial cell bioassay and the *limulus* amoebocyte lysate assay. *J. Immunol. Meth.* 1999, 226, 49-58.
- [8] Rietschel, E.T.; Kirikae, T.; Schade, F.U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A.J.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F.; others. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994, 8, 217-225.
- [9] Pool, E.J.; Jagals, C.; van Wyk, J.H.; Jagals, P. The use of IL-6 induction as a human biomarkers for inflammatory agents in water. *Water Sci. Technol.* 2003, 47, 71-75.
- [10] Wichmann, G.; Daegelmann, C.; Herbarth, O.; Strauch, G.; Schirmer, K.; Wostemeyer, J.; Lehmann, I. Inflammatory activity in river-water samples. *Environ. Toxicol.* 2004, 19, 594-602.
- [11] Hoffmann, S.; Peterbauer, A.; Schindler, S.; Fennrich, S.; Poole, S.; Mistry, Y.; Montag-Lessing, T.; Spreitzer, I.; Loschner, B.; van Aalderen, M.; others. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoic cells. *J. Immunol. Meth.* 2005, 298, 161-173.
- [12] Poole, S.; Thorpe, R.; Meager, A.; Gearing, A.J. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release from monocytes. *Dev. Biol. Stand.* 1988, 69, 121-123.
- [13] Eperon, S.; De Groote, D.; Werner-Felmayer, G.; Jungi, T.W. Human monocytoic cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus* amoebocyte lysate assay. *J. Immunol. Meth.* 1997, 207, 135-145.
- [14] Eperon, S.; Jungi, T.W. The use of human monocytoic lines as indicators of endotoxin. *J. Immunol. Meth.* 1996, 194, 121-129.
- [15] Pivarsci, A.; Kemeny, L.; Dobozy, A. Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2004, 51, 303-310.
- [16] Bernardová, K.; Babica, P.; Maršálek, B.; Bláha, L. Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga. *J. Appl. Toxicol.* 2008, 28, 72-77.
- [17] Yang, S.; Tamai, R.; Akashi, S.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Sugawara, S.; Takada, H. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytoic cells in culture. *Infect. Immun.* 2001, 69, 2045-2053.
- [18] Ohkouchi, Y.; Ishikawa, S.; Takahashi, K.; Itoh, S. Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment and characterization of endotoxin removal in water treatment process. *Environ. Eng. Res.* 2007, 44, 247-254 (in Japanese).
- [19] Anderson, W.B.; Slawson, R.M.; Mayfield, C.I. A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure. *Can. J. Microbiol.* 2002, 48, 567-587.
- [20] Muittari, A.; Rylander, R.; Salkinoja-Salonen, M. Endotoxin and bath-water fever. *Lancet* 1980, 316, 89.
- [21] Thorne, P.S.; Kulhankova, K.; Yin, M.; Cohn, R.; Arbes, S.J. Jr.; Zeldin, D.C. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005, 172, 1371-1377.
- [22] Skovbjerg, S.; Martner, A.; Hynsjo, L.; Hessle, C.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E.; Tham, W.; Wold, A.E. Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness. *J. Interferon Cytokine Res.* 2010, 30, 23-32.
- [23] Nakagawa, Y.; Maeda, H.; Murai, T. Evaluation of the *in vitro* pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9, 588-597.
- [24] Erridge, C.; Moncayo-Nieto, O.L.; Morgan, R.; Young, M.; Poxton, I.R. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J. Med. Microbiol.* 2007, 56, 165-171.

[報 文]

ナノろ過膜処理を適用した浄水の細菌再増殖特性の評価

Characterization of Bacterial Regrowth in Nanofiltrated Drinking Water

大河内由美子* 矢田祐次郎**
文 亮太*** 伊藤 禎彦*

微生物学的安定性向上の一手法として、現行の高度浄水処理の後段にナノろ過(NF)処理を導入した場合の、浄水の微生物学的水質評価を行なった。NF処理により92%と安定して高い細菌阻止率が得られたものの、処理水からは恒常的に従属栄養細菌が検出された。また、残留塩素なしの条件では、これらの顕著な再増殖が確認された。とくに、NF処理水中の再増殖細菌群は、同等の炭素量からより多くのバイオマスを生産することが判明した。また、NF処理水中の代表的な再増殖細菌種は、*Herbaspirillum*属、*Curvibacter*属、*Undibacterium*属であり、文献調査の結果からこれらは普遍的に水環境に存在し、かつ極貧栄養条件下での増殖に適した細菌種であることがわかった。

本研究の成果は、NF処理により同化可能有機炭素(AOC)を十分に除去しても、一度汚染が起これば残存する少量のAOCを基質として爆発的な再増殖が起こることを意味する。そのため、NF処理適用後にも浄水水質に応じて最小限の残留塩素を併用することが不可欠である。

Key words : ナノろ過処理, 微生物学的安定性, 細菌再増殖, 水道システム

1. はじめに

日本の水道事業は、原水水質の状況に合わせてオゾン(O₃)-粒状活性炭(GAC)処理を軸とした高度浄水処理を導入し、科学的な観点から十分に安全な水を供給する努力を続けてきた。しかし、このように格段に水質が向上した水道水であって

も、利用者からは必ずしも高い評価を得ているわけではない¹⁾。水道水に対する満足感を低下させる因子として、塩素との反応生成物であるカルキ臭に対する注目が集まっている。カルキ臭を抑制するためには、塩素消毒プロセスに先立つ前駆物質の除去と並んで、残留塩素濃度の最小化が有効なアプローチとなり得る。前者については、化学

* Yumiko OHKOUCHI, Sadahiko ITOH, 京都大学大学院地球環境学堂 博士(工学) 〒615-8540 京都市西京区
京都大学桂C-I, Dr. Eng., Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, C-I Kyoto
Daigaku Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto-shi 615-8540 Japan (E-mail: yohkouchi@urban.env.kyoto-u.ac.jp)

** Yujiro YATA, 日立造船㈱

*** Ryota BUN, バブコック日立㈱

酸化処理とイオン交換処理を組み合わせたプロセスにより、多種多様な無機・有機化合物により構成されるカルキ臭前駆物質を大幅に低減できることが報告されており²⁾、従来の高度浄水処理の枠組みを超えた取組みが進められている。カルキ臭原因物質としてはトリクロロアミンの他、有機クロロアミンやN-クロロアルドイミン、アルデヒドなどの物質が報告されている³⁾⁴⁾が、水道水カルキ臭に対する寄与が約20%を占めるトリクロロアミンの場合、低有離残留塩素濃度領域では生成されにくいことが明らかとなっている⁵⁾。一方、現在の多くの水道システムでは、給水末端で0.3~0.4 mg/l前後の残留塩素を維持する⁵⁾ことで細菌類の再増殖抑制に成功している。

上述のように残留塩素濃度とカルキ臭は密接に関連しており、過剰な塩素添加がカルキ臭上昇を招くと考えられる。たとえば、促進酸化-GAC-陽イオン交換処理を行なった水に対して、24時間後の遊離残留塩素濃度が0.05~0.08mg/lとなるよう塩素処理を行なうことで、15°Cにおける臭気強度を60TON超から10TON以下へと大幅低減可能であることがわかっている⁶⁾。これらの情報を踏まえると、給水栓で検出される残留塩素濃度を必要最小限、たとえば0.05mg/l程度に低減することにより、同時にカルキ臭抑制も達成できると考えられる。

しかし、残留塩素濃度の低減は浄水の微生物学的安全性の悪化に直結するため、同時に微生物学的に安定な浄水水質の確保が必要となる。筆者らは、現在主流のO₃-GAC処理を軸とした高度浄水処理プロセスを対象に、微生物学的安定性の一つの指標として細菌再増殖の基質となる同化可能有機炭素(AOC)の除去特性の評価⁷⁾に取組むとともに、残留塩素濃度を最小化した水道システムの微生物学的安定性維持に求められるAOC条件を提示した⁸⁾。また、現行の処理プロセスでは季節変動が大きく不十分なAOC処理能強化を目的として、物理化学的処理の一種であるナノろ過(NF)膜処理の適用による浄水の微生物学的安定性の向上を検討した結果、NF膜処理プロセスを現行の高度処理プロセス後段に増設した場合、浄水のAOC濃度を半減できるものの処理性は大きく変

動し、微生物学的に安定な水質条件の継続的な達成は難しいこと、また、残留塩素なしの条件ではNF処理水であっても容易に細菌類が再増殖するため、極微量の残留塩素維持が必要であることも明らかにした⁹⁾。

このように、本来有機物除去能のみならず微生物物バリアーとしても高い性能を発揮すると期待されるNF膜であるが、微生物学的に安定な水質を継続的に達成するためには、NF処理水の細菌再増殖ポテンシャルを把握したうえで、再増殖抑制に必要な残留塩素レベルを決めることが重要である。以上の背景を踏まえて、本研究ではNF処理による細菌阻止能ならびに処理水の細菌再増殖特性の評価に取組み、微生物学的に安定な水供給の達成に向けた基礎情報の収集を行なう。

2. 実験方法

2.1 実験施設概要

淀川表流水を原水とするA浄水場実験処理施設で稼働中のNF膜処理ユニット(表1)を対象とした。なお、使用した膜はメーカーによると逆浸透膜に分類されているが、運転はむしろNF膜に適用される圧力範囲で行なっていることから、本稿ではNF膜として取り扱うこととした。本実験処理施設の設計処理能は50t/dであり、実施のO₃-GAC処理水を通水して膜処理を行なった。運転期間中、膜ファウリングにより膜間差圧の上昇がみられた場合には、薬品洗浄(クエン酸洗浄+カ性ソーダ洗浄)を実施した。

2.2 採水方法

NF処理の細菌阻止性能把握を目的とした採水は、2010年5~12月、2011年8~12月の期間に行なった。採水バルブを開けて数分間放水した後に、NF膜供給水(GAC処理水)およびNF処理水の各

表1 使用した膜処理ユニットの概要

膜形式	スパイラル型NF膜(超低圧RO膜)
サイズ	φ99.5mm×L1.016mm
本数	3本(2本-1本の1パス2段式)
型式	ESNA1-4040(日東電工(株)製)
除塩率	90%
膜材質	芳香族ポリアミド樹脂

試料を有機物フリーの採水瓶に採取して密栓し、4℃で運搬した。再増殖細菌の16S rRNA系統解析を目的とした試料は、2010年12月、2011年1月、8月、9月に、それぞれ同様の方法で採取した。

2.3 NF処理による細菌阻止性能

NF処理前後で採取した試料の、従属栄養細菌数(HPC)の測定を行なった。必要に応じて試料を希釈後、R2A寒天培地(日水製薬(株)製)を用いて20℃で7日間の培養により形成された集落数をカウントした。また、一部の試料については、孔径0.20 μmのフィルター上に試料中の細菌を捕集した後に、4',6'-Diamidino-2-phenylindole(DAPI, 株同仁化学研究所製)を添加して室温で10分間染色し、蛍光顕微鏡を用いて染色細胞を計数することにより全菌数を測定した。

2.4 再増殖性評価試験

再増殖性の評価は、回分培養系で2通りの試験方法により行なった。いずれの系においても塩素処理は行っていない。試験方法(1)では、採取した試料をそのまま密栓し、遮光条件・20℃で培養し、経時的に試料を採取して再増殖HPCを測定した。この方法は、NF処理による水質変化、すなわち炭素のみならず窒素やリン、微量元素などの水質変化、ならびに微生物量と種の変化が再増殖性に与える影響を、総合的に評価する手法とみなすことができる。一方、試験方法(2)では、各試料採取後、いったん加熱殺菌により残存細菌を不活化した後に、窒素・リンを補給したうえで0~200 μgC/lの濃度で酢酸ナトリウムを添加し、さらに、あらかじめ再増殖させておいたGAC処理水・NF処理水におのおの由来する菌体を植種した。試験方法(1)と同様の条件で培養し、再増殖HPCの測定を行なった。この方法では、おもにNF処理により変化した微生物種が再増殖性に及ぼす影響評価が可能となる。

2.5 再増殖細菌を対象とした16S rRNA系統解析

各試料1 l採取後、6倍濃縮R2A液体培地を1/5容積添加し、24時間培養してから再増殖細菌を孔径0.20 μmの滅菌済みメンブレンフィルター上に集菌した。リン酸緩衝液で洗菌後、Ultra Clean[®] Water DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories

社製)を用いて混合DNA試料を調製した。これらの混合DNA試料を鋳型として、バクテリア用ユニバーサルプライマー対(27F/5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R/5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')¹⁰⁾を用いて、16S rRNA領域を対象としてPCRを行なった。

得られたPCR断片をアガロースゲル電気泳動により分離した後、該当バンドを切り出し、Nucleospin Gel and PCR Clean-up(タカラバイオ(株)製)を用いて標的産物の精製を行なった。さらに、pCR4-TOPOベクターを用いたTAクローニング(Invitrogen, Life Technologies社製)により得たクローン株を対象として、1試料につき96クローンをピックアップしてシーケンス解析を行なった。シーケンス解析は、タカラバイオ(株)ドラゴンジェノミクスセンターに依頼した。十分な長さが得られた塩基配列に対してblastnデータベースを用いた相同性検索を行ない、99%以上かつ最も高い相同性を示す微生物種を最近縁種として決定した。

3. 結果と考察

3.1 NF処理による細菌阻止性能

NF処理前後におけるHPCの変化を、図1に示す。期間中、一時的にNF処理水のHPCが劇的に上昇したが、採水前にバルブを全開にしてしばらく放水することで通常レベルに戻ったことから、二次側配管での滞留水が影響したと考えられる。この異常値を除いたHPCの平均除去率は92±7%と高くかつ安定しているものの、NF処理後も平均12CFU/ml(濃度範囲: 2~32CFU/ml)のHPCが恒常的に検出される状況であった。

本来、膜孔径と比較するとはるかに大きいサイズである細菌類が膜処理水から検出される原因としては、膜エレメントの構造に起因する一次側からの漏出と並んで、二次側の汚染に由来する可能性が指摘できる。Owenらは、パイロットスケール装置を用いて*Bacillus subtilis*の芽胞添加実験を行なった結果、中空糸型MF膜を使用した場合には5.6~5.9logの孢子除去率が得られたのに対して、平均膜孔径が2オーダー小さいスパイラル型

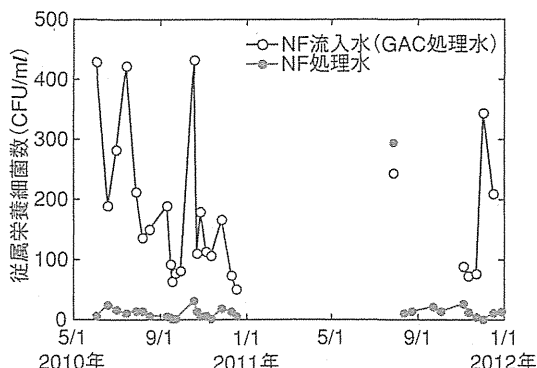


図1 ナノろ過処理前後における従属栄養細菌数の経時変化

NF膜を使用した場合でも2.2~4.5logの阻止率にとどまることを報告し、袋状かつ原水/透過水スプレーヤーが挿入されたスパイラル型膜の構造に起因すると指摘した¹¹⁾。この知見に基づくと、本研究で用いたスパイラル型膜構造から細菌が漏出する可能性は十分に考えられるものの、現時点ではHPC検出の原因は特定できておらず、今後詳細な検討が待たれるところである。なお、NF処理水の全菌数をDAPI染色により調べた結果、約3,000cells/mlが残存しており、HPCより2オーダー程度多い“R2A培地で検出できない細菌”がNF処理水に存在することも明らかとなった。

3.2 NF処理水の微生物再増殖性評価

試験方法(1)で得られた、AOC濃度の異なる試料における最大再増殖HPCの結果を図2に示す。NF処理によりAOCが低減されているにも関わらず、より多量の再増殖HPCが検出されている傾向がわかる。また、NF処理水では、試料のAOC濃度に比例して最大再増殖量が增大する傾向が弱いながらも確認された一方で、GAC処理水では両者の間に明確な関係は確認できなかった。GAC処理水には直接的にはAOCとして計測されない中~高分子量の生物分解性有機物類が多量に残存しており、AOCのみならずこれらの画分も再増殖に影響を及ぼした可能性が高い。

続いて、試験方法(2)で得られた、酢酸添加濃度と最大再増殖HPCの関係を図3に示す。試験方法(1)で得られた結果と同様に、酢酸ナトリウ

ム濃度が同等の場合、NF処理水で得られた最大再増殖量はGAC処理水のそれを大きく上回った。前述のように、試験方法(2)では窒素やリン、ミネラル分などを試料水に添加しているため、同一炭素濃度での最大再増殖量の違いはNF菌体とGAC菌体の増殖性の違いを表わしているとみなせる。添加した酢酸ナトリウム濃度と各最大再増殖量の間には、線形関係が認められた。得られた回帰式の傾きに基づくと、GAC菌体のバイオマス収率は1 μgCのAOC当たり0.54細胞であるの

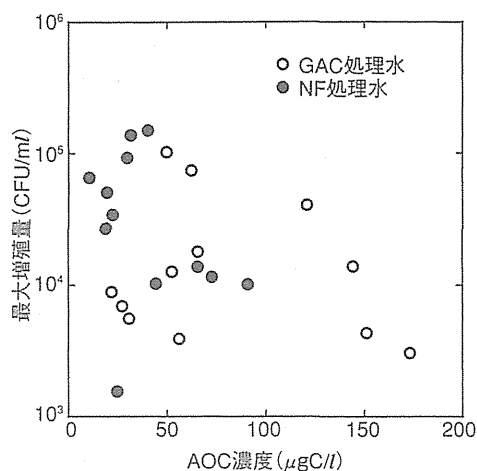


図2 試料水AOC濃度と最大再増殖量の関係：試験方法(1)の場合

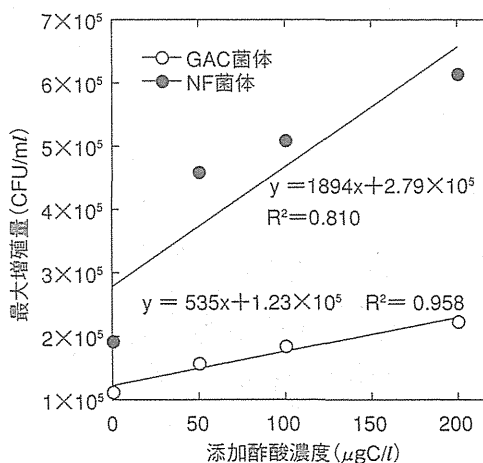


図3 添加酢酸濃度とGAC菌体/NF菌体の最大再増殖量との関係：試験方法(2)の場合

に対して、NF菌体のバイオマス収率は1.9細胞と3倍以上高いバイオマスへの変換率と推定される。すなわち、低いAOC濃度であるNF処理水試料には、微量に残存する生物分解性有機物を利用して多量のバイオマスを生産可能な微生物種が存在すると判断される。

この結果は、NF処理により細菌類および生物分解性有機炭素の大部分を除去しても、処理水中に細菌がわずかに漏出あるいは混入すれば、結果として爆発的な再増殖につながることを示唆する。実のところ、既往研究においてもNF処理水が高い細菌再増殖ポテンシャルを有する現象は複数の研究者により繰り返し確認されてきた。たとえば、Parkらは逆浸透(RO)膜処理水を連続通水して生物膜形成を調べた結果、RO透過水では細菌細胞がほとんどなくかつ低栄養状態であるにも関わらず、残留消毒剤なしの場合には生物膜が蓄積されることを示した¹²⁾。また、Liikanenらも種々のNF膜の水質改善効果を比較した結果、供給水と比較してNF処理によりAOCやMicrobially available phosphateが低減された膜透過水で、従属栄養細菌の増殖倍率がより大きいことを報告した¹³⁾。その理由として、膜処理により、

- 1) 微生物増殖阻害因子、たとえばアルミニウム塩が除去された¹³⁾、
- 2) 微生物細胞当たりの利用可能なAOC量が増大した¹⁴⁾、

などの、いくつかの因子関与の可能性が指摘されてきた。

しかし、ここには示していないが、筆者らが塩

化アルミニウムを添加して細菌再増殖に及ぼす影響を調べた結果、0~100 $\mu\text{gAl/l}$ のアルミニウム塩の濃度範囲では細菌再増殖抑制効果はみられないことを確認している¹⁵⁾。むしろ本研究で得られた結果は、膜処理が再増殖細菌種の変化をより直接的に引き起こしている可能性を明確に示している。

3.3 再増殖細菌を対象とした16S rRNA系統解析

そこで、NF処理前後における再増殖細菌種の変化を明らかにするとともに、とくにNF処理水中に出現するバイオマス収率の高い再増殖細菌種の推定を試みた。まず、各試料で再増殖した細菌種を、16S rRNA配列に基づいて網レベルで比較した結果を図4に示す。GAC処理水ではガンマプロテオバクテリアおよびバチルス綱が優占しており、ベータプロテオバクテリアが占める割合は小さかったのに対して、NF処理後の試料ではいずれも網レベルでの多様性が減少し、ベータプロテオバクテリア綱が優占種となっていることがわかる。

また、低水温期試料の再増殖微生物を、種レベルで比較した結果を表2に示す。12月採水時の水温は約13°Cであったが、1月採水時には水温は10°C以下へと低下し、それに伴いGAC処理水の再増殖細菌の優占種も*Bacillus*属から*Pseudomonas*属へと大きく変化していた。一方、NF処理水では、12月および1月の各採水試料における優占再増殖細菌種は、それぞれ*Herbaspirillum*属、*Curvibacter*属であった。このように1カ月という比較的短期

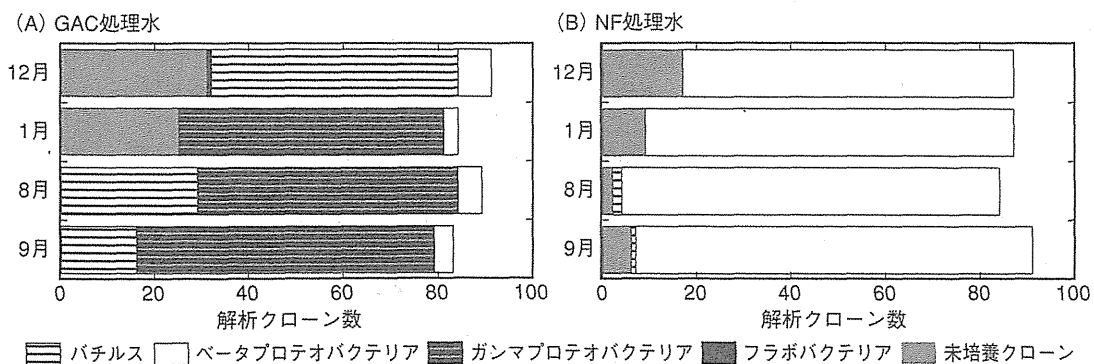


図4 16S rRNA系統解析による再増殖微生物種の網分類結果

間に大きく再増殖細菌種が変化するという結果からも、水温や水質といった環境条件の変化に反応して、GAC上あるいはNF処理システム二次側配管内の細菌叢が変化したことがわかる。もちろんこの結果は、GAC処理水・NF処理水に存在する細菌種の存在割合をそのまま反映しているわけではなく、少量の有機物を添加した24時間の培養を経ることにより、存在割合の多い細菌種がさらに優先的に増殖し、存在割合の差を増幅した可能性がある点に注意が必要である。また、NF処理前後で1月採水試料を比較すると、検出割合は小さいものの、GAC処理水で検出された*Curvibacter*属がNF処理水では優占種となっており、NF膜エレメントのスパイラル型構造等に由来して漏出した

表2 16S rRNA配列解析結果に基づいた低水温期試料において優占的に再増殖した細菌種の多様性

最近縁種	GAC処理水	
	12月	1月
<i>Bacillus cereus</i>	29(31.9)	—
<i>Bacillus</i> sp.	22(24.2)	—
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1(1.1)	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	—	24(28.6)
<i>Pseudomonas</i> sp.	—	32(38.1)
<i>Acidovorax</i> sp.	2(2.2)	—
<i>Flavobacterium</i> sp.	1(1.1)	—
<i>Curvibacter</i> sp.	—	1(1.2)
ベータプロテオバクテリア	5(5.5)	2(2.4)
未培養クローン	31(34.1)	25(29.8)
計	91	84

最近縁種	NF処理水	
	12月	1月
<i>Herbaspirillum</i> sp.	43(49.4)	1(1.1)
<i>Curvibacter</i> sp.	—	40(46.0)
<i>Curvibacter gracilis</i>	—	33(37.9)
<i>Ralstonia</i> sp.	1(1.1)	1(1.1)
Oxalobacteraceae bacterium	—	1(1.1)
ベータプロテオバクテリア	26(29.9)	2(2.3)
未培養クローン	17(19.5)	9(10.3)
計	87	87

括弧内の数値は存在割合(%)を表わす

細菌がNF処理水で再増殖した可能性も指摘できる。

同様に、高水温期の再増殖細菌群を種レベルで比較した結果を表3に示す。GAC処理水ではともに*Aeromonas*属、次いで*Bacillus*属が再増殖細菌の大きな割合を占めていた。一方、NF処理水で再増殖が確認された主要な細菌種は、8月採水試料では*Undibacterium*属、9月採水試料では上述の12月採水試料と同様に*Herbaspirillum*属であった。また、8月採水試料をNF処理前後で比較すると、やはりGAC処理水に少数ながら存在して

表3 16S rRNA配列解析結果に基づいた高水温期試料において優占的に再増殖した細菌種の多様性

最近縁種	GAC処理水	
	8月	9月
<i>Aeromonas hydrophila</i>	24(27.0)	3(3.6)
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	16(18.0)	1(1.2)
<i>Aeromonas jandaei</i>	—	25(30.1)
<i>Aeromonas encheleia</i>	1(1.1)	—
<i>Aeromonas</i> sp.	14(15.7)	34(41.0)
<i>Undibacterium</i> sp.	2(2.2)	4(4.8)
<i>Vogesella</i> sp.	3(3.4)	—
<i>Bacillus cereus</i>	23(25.8)	9(10.8)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1(1.1)	—
<i>Bacillus</i> sp.	5(5.6)	7(8.4)
計	89	83

最近縁種	NF処理水	
	8月	9月
<i>Undibacterium</i> sp.	79(94.0)	—
<i>Herbaspirillum</i> sp.	—	44(47.3)
<i>Aquabacterium</i> sp.	1(1.2)	1(1.1)
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	—	1(1.1)
<i>Bacillus subtilis</i>	1(1.2)	—
<i>Bacillus megaterium</i>	1(1.2)	—
<i>Bacillus</i> sp.	—	1(1.1)
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	—	2(2.2)
ベータプロテオバクテリア	—	38(40.9)
未培養クローン	2(2.4)	6(6.5)
計	84	93

括弧内の数値は存在割合(%)を表わす

いた*Undibacterium*属がNF処理水の優占再増殖細菌となっており、なんらかの理由で膜処理プロセスから漏出してHPC再増殖の原因となっていることが示唆される。

ここで、NF処理水で優占的な再増殖が確認された*Herbaspirillum*属、*Curvibacter*属、*Undibacterium*属の特徴に触れておく。これらはいずれもベータプロテオバクテリアに分類され、好気または微好気条件下で増殖する。トータルで最も高い検出率となった*Herbaspirillum*属については、BergらがR2A培地や有機炭素を含有しない低栄養細菌分離用培地を用いた場合に、少数ながらも種々の環境水試料から分離されることを報告している¹⁶⁾。また、窒素固定能を有する種が多いこと、浄水¹⁷⁾や血液透析システム¹⁸⁾といった非常に有機炭素濃度が低い試料水からも分離されること、が報告されている。一方、*Curvibacter*属は井戸水¹⁹⁾やボトルウォーター²⁰⁾、*Undibacterium*属も飲料水や精製水からの分離例²¹⁾がそれぞれ報告されており、いずれの細菌種も普遍的に環境水中に存在しており、かつ極貧栄養条件下での増殖に適した細菌種であるとみなされる。つまり、NF処理水のようにきわめて低濃度の有機炭素が残存する条件下では、この極貧栄養条件下であっても生育可能という特性を最大限に活かして、他の低～中栄養細菌種との増殖競争に打ち勝ち、高い収率でバイオマスを生産すると推測される。

一方、より多様性が確認されたGAC処理水における再増殖細菌群のなかには、ヒトに対する病原性も一部の種で報告されている*Aeromonas*属や*Bacillus*属²²⁾が優占種となるケースも確認された。NF処理水で優占種となった*Herbaspirillum*属についても、リンパ芽球性白血病患者の血液培養サンプル²³⁾²⁴⁾や嚢胞性線維症の患者の痰サンプル²⁵⁾から分離されており、これらの菌株が日和見感染症を引き起こす可能性も指摘されている。繰り返しになるが、本研究で得られた結果がそのまま各処理水に存在する細菌種の存在割合を表わしているわけではないものの、適切な濃度の残留塩素が維持されないなど、一度再増殖を許す環境に置かれると、これらの病原細菌が再増殖してくると予想される。このように、前節でも述べた通りNF処

理を行なったとしても、なんらかの理由で細菌が混入すると爆発的な再増殖につながる可能性が高い点に加えて、水系感染症予防の観点からも、浄水水質に応じて必要最小限の残留塩素を維持することにより、水道システム内における再増殖を抑制する必要があることが再確認された。

4. まとめ

最後に、本研究で得られた結果をまとめる。NF処理による従属栄養細菌の除去は92%と安定して高いものの、恒常的に処理水からHPCが検出される状況であり、かつ残留塩素なしの条件のNF処理水では顕著な細菌再増殖が確認された。NF処理水における再増殖細菌群はGAC処理水のそれと比較して、同等の炭素量から3倍程度多くのバイオマスを生産するためと考えられる。NF処理水で再増殖が確認された微生物種について16S rRNA系統解析を行なった結果、*Herbaspirillum*属、*Curvibacter*属、*Undibacterium*属が代表的なものであり、文献調査の結果からこれらの細菌は普遍的に水環境に存在するのみならず、極貧栄養条件下での増殖に適した種であることがわかった。

本研究で得られた結果は、NF処理により仮に十分なAOC除去が可能になったとしても、一度汚染が起これば少量の有機炭素を基質とした爆発的なHPC再増殖につながることを意味する。汚染の原因が膜漏出にあるのか、あるいは二次側配管内の再増殖にあるのかは現時点では不明であるが、いずれにせよNF処理適用後も浄水水質に応じた最小限の残留塩素の併用は不可欠であることが確認された。

謝辞

本研究の遂行に当たり、膜ユニットの運転維持管理にご尽力いただいたA浄水場関係者に深謝する。また、本研究で得られた結果の解釈において、有益なご意見をいただいたダイセン・メンブレン・システムズ(株)の阿瀬智暢氏に謝意を表す。なお、本研究の一部は、厚生労働科学研究費「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(H20-健危-一般-006)」および科学研究費補助金若手研究(B)「微生物再増殖を促進する浄水中同化可能有機炭素成分の解明と量的質的

制御に関する研究(21760416)」の補助を受けて、それぞれ行なったものである。

—参考文献—

- 1) 伊藤禎彦, 城 征司, 平山修久, 越後信哉, 大河内由美子: 水道水に対する満足感の構成概念と水道システムにおける必要改善項目の分析, *環境衛生工学研究*, 21(1) 9~19(2007).
- 2) 越後信哉, 伊藤禎彦, 久本祐資, 小松良光: 連続系における酸化処理とイオン交換処理の組合せによるカルキ臭制御, 第63回全国水道研究発表会講演集, 226~227(2012).
- 3) 佐藤尚行, 越後信哉, 伊藤禎彦, 小坂浩司: 塩素処理水の臭気に対するカルキ臭原因物質の寄与, *土木学会論文集G(環境)*, 67(7)Ⅲ_41~Ⅲ_49(2011).
- 4) Froese, K. L., Wolanski, A., Hrudehy, S. E.: Factors governing odorous aldehyde formation as disinfection by-products in drinking water, *Water Research*, 33(6) 1355~1364(1999).
- 5) ㈲日本水道協会: 平成20年度水道統計, 日本水道協会, 東京(2010).
- 6) 村田道拓: 水道水のカルキ臭測定方法とパイロットプラントにおけるカルキ臭低減効果に関する研究, 京都大学大学院地球環境学舎修士論文(2010).
- 7) Ohkouchi, Y., Ly, B. T., Ishikawa, S., Aoki, Y., Echigo, S., Itoh, S.: A survey on levels and seasonal changes of assimilable organic carbon(AOC) and its precursors in drinking water, *Environmental Technology*, 32(13-14) 1605~1613(2011).
- 8) Ohkouchi, Y., Ly, B. T., Ishikawa, S., Kawano, Y., Itoh, S.: Determination of an acceptable assimilable organic carbon(AOC) level for biological stability in water distribution systems with minimized chlorine residual, *Environmental Monitoring and Assessment*(DOI: 10.1007/s10661-012-2642-9).
- 9) 大河内由美子, 矢田祐次郎, 伊藤禎彦: ナノろ過処理を適用した浄水の微生物学的安定性に関する研究, 第62回全国水道研究発表会講演集, 662~663(2011).
- 10) Lane, D. J.: 16S/23S rRNA sequencing, In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt, E., Goodfellow, M. eds.), John Wiley & Sons, Chichester(1991).
- 11) Owen, C., Tayler, J. S., Robert, C., Reiss, C. R.: Microbial Challenge of integrated membrane system largescale pilot plants treating a highly organic surface water, *Proceedings of AWWA Water Quality Technology Conference*(1999).
- 12) Park, S.-K., Hu, J. Y.: Assessment of the extent of bacterial growth in reverse osmosis system for improving drinking water quality, *Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 45(8)968~977(2010).
- 13) Liikanen, R., Miettinen, I., Laukkanen, R.: Selection of NF membrane to improve quality of chemically treated surface water, *Water Research*, 37(4)864~872(2003).
- 14) Meylan, S., Hammes, F., Traber, J., Salhi, E., von Gunten, U., Pronk, W.: Permeability of low molecular weight organics through nanofiltration membranes, *Water Research*, 41(17)3968~3976(2007).
- 15) 矢田祐次郎: ナノろ過膜処理を適用した浄水の微生物学的安定性に関する研究, 京都大学大学院地球環境学舎修士論文(2011).
- 16) Berg, K. A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J.: High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms, *The ISME Journal*, 3, 314~325(2009).
- 17) Rapala, J., Niemela, M., Berg, K. A., Lepisto, L., Lahti, K.: Removal of cyanobacteria, cyanotoxins, heterotrophic bacteria and endotoxins at an operating surface water treatment plant, *Water Science and Technology*, 54(3)23~28(2006).
- 18) Gomila, M., Gasco, J., Gil, J., Bernabeu, R., Inigo, V., Lalucat, J.: A molecular microbial ecology approach to studying hemodialysis water and fluid, *Kidney International*, 70(9)1567~1576(2006).
- 19) Ding, L., Yokota, A.: *Curvibacterfontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56(3)267~271(2010).
- 20) Falcone-Dias, M. F., Vaz-Moreira, I., Manaia, C. M.: Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria, *Water Research*, 46(11)3612~3622(2012).
- 21) Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Hermansson, M., Persson, F., Huber, B., Falsen, E., Busse, H.-J.: *Undibacterium pigrum* gen. nov., sp. nov., isolated from drinking water, *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 57(7)1510~1515(2007).
- 22) World Health Organization: Chapter 11. Microbial fact sheet, In *Guidelines for Drinking Water Quality 4th ed.*, World Health Organization, Geneva(2011).
- 23) Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Sandoghchian, S., Zheng, D., Wang, S., Xu, H.: *Herbaspirillum* species: a potential pathogenic bacteria isolated from acute lymphoblastic leukemia patient, *Current Microbiology*, 62(1)331~333(2011).
- 24) Ziga, E. D., Druley, T., Burnham, C.-A. D.: *Herbaspirillum* species bacteremia in a pediatric oncology patient, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11)4320~4321(2010).
- 25) Spilker, T., Uluer, A. Z., Marty, F. M., Yeh, W. W., Levison, J. H., Vandamme, P., Lipuma, J. J.: Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8)2774~2777(2008).

(原稿受付日: 2012年 9月18日)

(原稿受理日: 2012年10月31日)

(8-14)濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および微生物リスク評価

○藤村 壮(国立保健医療科学院) 能岡 勉(大阪広域水道企業団)
 小田嶋 慎(八戸圏域水道企業団) 倉田 知司(国立保健医療科学院)
 島崎 大(国立保健医療科学院) 伊藤 雅喜(国立保健医療科学院)
 秋葉 道宏(国立保健医療科学院)

1 はじめに

近年、地球温暖化に伴う気候変動の影響により集中豪雨などが多く観測されており、このような豪雨時において急激な原水濁度上昇時の浄水処理対応が課題となっている。また、自然河川中において病原微生物の検出報告が度々なされており、豪雨時には家畜や野生動物等に由来する水道原水の病原微生物汚染の危険性が高まり、水道に由来する水系感染症の潜在的リスクが上昇することが考えられる。

このような状況を勘案して、本研究では実際の集中豪雨等の原水濁度急変時を想定し実験プラントを用いた浄水処理工程による大腸菌 (*E. coli* K12) 除去性の評価実験を行った。また、得られた実験結果ならびに既往の研究結果等を引用して、微生物リスク評価について検討を行った。

2 微生物除去実験

国立保健医療科学院の浄水処理プラントを用いて凝集沈殿、砂ろ過の各浄水処理工程による微生物除去実験を行った。実験フローを図1に示す。集中豪雨時の河川での急激な濁度変化を想定し、図2のように通常の低濁度(5度)から急激にピーク時の高濁度状況(300度)に変化させ、濁度を徐々に漸減させた。また、原水中の微生物は *E. coli* K12 を用い、図2のように濁度に比例して注入量を変化させた。PAC注入量について1系は注入量を一定、2系では注入量を濁度変化に追随するよう漸減させた。浄水処理水は各濁度ごとに合計8回採水し、デソキシコレート寒天培地を用いて37°C24時間培養して大腸菌数を計数した。実験結果を表1に示す。大腸菌除去率は1系では96.90~99.28%、2系では93.30~99.92%となり、共に原水濁度が高いほど大腸菌除去率が高くなる傾向が見られた。本実験結果より、凝集沈殿処理による除去率を93.30%~99.92%、砂ろ過による除去率を99.99%と評価した。

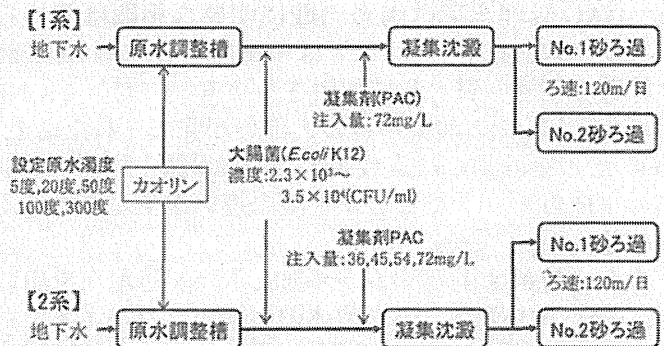


図1 浄水プラント処理工程フロー

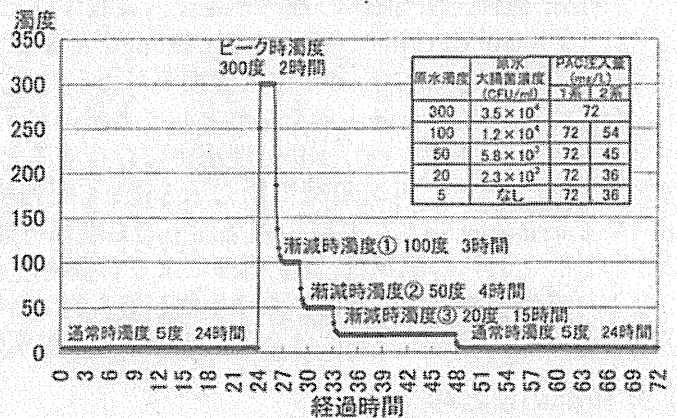


図2 原水濁度、大腸菌濃度およびPAC注入量

表1 各浄水処理水における大腸菌濃度と大腸菌除去率

経過時間	原水濁度	原水大腸菌濃度 (CFU/ml)	1系				2系							
			沈澱水大腸菌濃度 (CFU/ml)	凝集沈殿大腸菌除去率 (%)	No.1砂ろ過大腸菌濃度 (CFU/ml)	No.1砂ろ過大腸菌除去率 (%)	沈澱水大腸菌濃度 (CFU/ml)	凝集沈殿大腸菌除去率 (%)	No.1砂ろ過大腸菌濃度 (CFU/ml)	No.2砂ろ過大腸菌除去率 (%)				
25	319.4	3.50×10^4	3.60×10^2	98.97	0	100	0.67	99.81	2.70×10^1	99.92	0	100	0	100
26	319.4	4.16×10^4	3.00×10^2	99.28	0	100	0.33	99.89	6.00×10^1	99.86	0	100	0	100
27.5	110.1	1.70×10^4	1.77×10^2	98.96	0	100	0	100	1.40×10^2	99.18	0	100	0	100
29	110.1	2.03×10^4	1.93×10^2	99.05	0	100	0	100	4.97×10^2	97.55	0.33	99.93	0	100
31	55.3	1.20×10^4	3.10×10^2	97.42	0	100	0	100	3.87×10^2	96.78	0	100	0	100
33	55.3	1.41×10^4	3.47×10^2	97.54	0	100	0	100	5.13×10^2	96.36	0	100	0	100
35	21.2	1.01×10^4	3.13×10^2	96.90	0.33	99.90	0.33	99.89	6.77×10^2	93.30	0.33	99.95	0	100
37	21.2	1.11×10^4	2.57×10^2	97.68	0	100	0	100	6.67×10^2	93.99	0	100	0	100

3 微生物リスク評価の検討

(1) 病原微生物に関する諸条件

浄水処理実験で用いた微生物 *E. coli* K12 株は病原性等を持っていないため、我が国でも食品由来の感染事例のある腸管出血性大腸菌 O157 (*E. coli* O157:H7) を想定したリスク評価を行った。近年、自然河川中のような低温・貧栄養な環境においても、生きてはいるが通常の培地では培養させることが困難な状態 (VBNC) として *E. coli* O157:H7 が検出された事例があり、1ml 中に 1.0×10^2 から 1.0×10^3 cell 存在するという報告がある¹⁾。ここでは原水 1ml 中に 1.0×10^2 cell 存在し、浄水処理による除去性は K12 株と同様であると仮定した。また、曝露量に関連する事項としては、我が国で過去に行われたアンケート結果²⁾より非加熱飲用水量を 0.321L/人・日とした。大腸菌 O157 の感染確率については、オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) によって示されている成人を対象にした指数モデルの用量反応関係から 5.09×10^{-3} を引用した³⁾。

(2) 浄水処理に関する諸条件

浄水処理に関する場合分けとして未処理の場合 (Case1) と各浄水処理過程での除去率を変化させた場合 (Case2~Case5) で段階的なリスク評価検討を行った。なお、塩素消毒に関する除去率は既往の研究結果より 99.999% (5log 除去) の数値を引用した⁴⁾。

(3) リスク評価指標

リスク評価の指標には障害調整生存年数 DALYs の概念を用いた。DALYs は損失生存年数 (YLL) と障害生存年数 (YLD) の合計値で表したものであり、RIVM が算定した数値として、1 感染当りの DALYs 値 5.47×10^{-2} を引用した⁵⁾。

(4) リスク評価結果

検討結果を表 2 に示す。オランダにおける水道水質基準では、1 年間の各種病原微生物による感染率が 10^{-4} 以下と評価されることが明記されており、これに適合するケースは塩素消毒を行う Case4, Case5 のみとなる。また WHO の飲料水水質ガイドラインでは、1 人 1 年当りの病原微生物における感染リスクが 10^{-6} DALYs 以下という目安値があり、これを満たす

表 2 *E. coli* O157 を対象にした水道由来の微生物リスク評価結果

原水中濃度(cells/L)		Case1	Case2	Case3	Case4	Case5
浄水処理	凝集沈殿(%)	0	93.30 1.2log除去	99.92 3.1log除去	93.30 1.2log除去	99.92 3.1log除去
	砂ろ過(%)	0	99.99 4log除去	99.99 4log除去	99.99 4log除去	99.99 4log除去
	塩素消毒(%)	0	0	0	99.999 5log除去	99.999 5log除去
	浄水処理除去率合計	0	5.2log除去	7.1log除去	10.2log除去	12.1log除去
	水道水中濃度(cells/L)	1.00×10^5	6.70×10^{-1}	8.00×10^{-3}	6.70×10^{-6}	8.00×10^{-9}
飲用水量(L/日)		3.21×10^{-1}				
曝露量/日		3.21×10^4	2.15×10^{-1}	2.57×10^{-3}	2.15×10^{-6}	2.57×10^{-9}
感染確率		5.09×10^{-3}				
1感染当りDALYs値		5.47×10^{-2}				
1日当りの感染率 (年間感染率)		1.63×10^2 (5.96×10^4)	1.09×10^{-3} (4.00×10^{-1})	1.31×10^{-5} (4.77×10^{-3})	1.09×10^{-6} (4.00×10^{-6})	1.31×10^{-10} (4.77×10^{-9})
1人当りの 年間健康影響度(DALYs)		3.26×10^3	2.19×10^{-2}	2.61×10^{-4}	2.19×10^{-7}	2.61×10^{-9}

条件も塩素消毒を行う Case4, Case5 の場合のみである。浄水処理における除去率の合計として、オランダの基準値には約 9log 除去、WHO のガイドラインには約 10log 除去が必要となる。

4 まとめ

本実験結果より、原水濁度が高い時ほど大腸菌除去率が高くなる傾向が見られ、上記条件下で算定したリスク評価では、オランダの基準や WHO のガイドラインを満たすためには、浄水処理で 9~10log 程度の除去性能が必要であることが示された。リスク評価の設定条件においては病原微生物の原水中濃度など不確実な要素があり、今後さらなる検証が必要であると考えられる。

【参考文献】

- 1) 谷佳津治、那須正夫 河川中の大腸菌 O157 Microbes and Environments Vol.14, No2, 101-105 1999
- 2) 大瀧雅寛 生活工学研究第 4 巻第 2 号(2002), p222-227 お茶の水女子大学生生活科学部生活工学研究会
- 3) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands RIVM report 257851003/2001 p81
- 4) 金子光美 水道の病原微生物対策 p172
- 5) Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality RIVM report 734301022/2003 p30-32

代替トレーサー粒子を用いた浄水処理におけるクリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価

国立保健医療科学院 ○藤村壮, 島崎大, 秋葉道宏, 広島県広島水道事務所 石川力也
宇部市ガス水道局 平岩雅貴, 下関市上下水道局 西原昌弘

Removal performance and health risk assessment of *Cryptosporidium* by water treatment using the pseudo tracer particles,
by So FUJIMURA, Dai SIMAZAKI, Michihiro AKIBA (National Institute of Public Health), Rikiya ISHIKAWA (Hiroshima prefecture water supply authority),
Masaki HIRAJWA (City of Ube water and gas works bureau), Masahiro NISHIHARA (City of Shimonoseki waterworks and sewerage bureau)

1 はじめに

我が国では、クリプトスポリジウム(以下クリプト)等耐塩素性の病原微生物に対して浄水処理での濁度管理を徹底するなどの対応が求められているが、近年諸外国では水道水質の安全性把握のため定量的微生物リスク評価を取り入れている事例がある。そこで本研究では、クリプトを想定した代替トレーサー粒子(以下トレーサー粒子)を用いた浄水処理工程におけるクリプト除去性能評価実験を行い、得られた実験結果を用いて水道水由来の微生物リスクの定量的評価を行った。

2. 研究方法

実験方法は、原水にトレーサー粒子を約 1.0×10^6 個/mLとなるよう添加し、ジャーテスト(急速攪拌 120rpmを1分間、緩速攪拌 40rpmを10分間、静置 10分間)による凝集・沈殿の後、上澄水を採取して急速砂ろ過(カラム径 20mm、ろ層厚 650mm、ろ過速度 120m/日)を行った。原水、沈殿水、ろ過水を採水してトレーサー粒子を蛍光顕微鏡を用いて計数し、また水中の微粒子数についても高感度濁度計を用いて計数を行った。実験条件として、原水濁度は 10 度、30 度(A浄水場原水)、100 度(脱塩素処理した科学院水道水にカオリンで調整)の3条件で実験を行い、これら濁度におけるPACの最適注入(10 度: 25mg/L、30 度: 45mg/L、100 度: 80mg/L)と注入不足(10 度: 10mg/L、30 度: 25mg/L、100 度: 45mg/L)の2条件を設定し除去率の比較を行った。リスク評価については障害調整生存年数DALYを年間健康影響度として試算した。本試算では、原水中のクリプト濃度のデータはA浄水場で計測された過去3年分のデータを用い、実験により得られた除去率によって水道水中のクリプト濃度を推定するが、試算方法は各データの平均値から算出する点推定と、原水濃度と除去率を三角分布に当てはめてモンテカルロシミュレーションによって算出する区間推定により行った。試算した水道水中クリプト濃度に、暴露量として非加熱飲用水量 $0.32\text{L/日} \cdot \text{人}$ を乗じ、感染確率については指数モデルによる用量反応関係²⁾から 4.0×10^{-3} 、DALY係数については既往の研究結果³⁾より、 1.03×10^{-3} を用いた。

3 結果と考察

実験で得られたトレーサー粒子除去率とトレーサー粒子径 $5 \mu\text{m}$ を含む $3 \sim 7 \mu\text{m}$ の微粒子の除去率の結果は表 1 の通りである。各条件においてPAC注入率と原水濁度が高いほどトレーサー粒子と微粒子の除去率が高くなる傾向が見られた。また、トレーサー粒子除去率と $3 \sim 7 \mu\text{m}$ の微粒子除去率との関係を図 1 に示す。両者の関係には比較的高い相関性があることが伺え、現状でのろ過水の濁度管理を徹底することと共にクリプトの粒子径($5 \mu\text{m}$ 程度)と同程度の微粒子数を監視することで、クリプトの浄水処理による除去性能を推測することが可能ではないかと考えられる。また、この実験結果より各条件での除去率(100 度については図 1 より算定した参考値)と算出した水道水中クリプト濃度を表 2 に、各

条件における1人あたりの年間健康影響度を図 2 に示す。原水濁度が上がるにつれて年間健康影響度の値は低くなる傾向が見られる。また、WHO飲用水水質ガイドラインでは、クリプト等病原微生物による年間健康影響度の値 1.0×10^{-6} DALYsを推奨しており、原水濁度 10 度でPAC注入量

表 1 トレーサー粒子除去率と微粒子除去率

原水濁度	PAC 注入量 (mg/L)	5 μ mトレーサー粒子log除去率			3~7 μ m微粒子log除去率		
		点推定	区間推定	全体	点推定	区間推定	全体
10度 (河川水)	10	0.46	1.51	1.97	0.60	1.22	1.63
	25	0.81	2.27	3.08	1.39	0.77	2.16
30度 (河川水)	25	1.48	2.53	4.00	1.80	1.24	3.03
	45	1.73	2.78	4.51	2.17	1.52	3.69
100度 (調整水)	45	1.71	(ND)	(ND)	1.87	2.12	3.99
	80	1.59	(ND)	(ND)	2.36	3.17	5.52

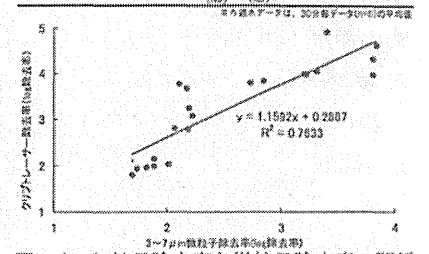


図 1 トレーサー粒子除去率と微粒子除去率の関係

10mg/Lと低濁度でPAC注入量が不十分であった場合には除去性能が発揮されず推奨値に満たない結果であった。

表 2 各浄水処理条件の推定クリプト除去率と推定水道水中濁度

log 除去率	区間推定	10度		30度		100度	
		10mg/L	25mg/L	25mg/L	45mg/L	45mg/L	80mg/L
点推定 (平均値)	1.97	3.08	4.00	4.51	4.91 (参考値)	6.69 (参考値)	
最小値	1.80	2.79	3.50	3.99	—	—	
最大値	2.15	3.77	4.06	4.93	—	—	
最尤値	1.98	3.16	3.99	4.76	—	—	
水道水 点推定	2.43×10^{-4} 1.86×10^{-4} 2.18×10^{-4} 8.49×10^{-5} 2.71×10^{-4} 4.52×10^{-4}						
中濁度 区間	5 μ -7 μ 分値	1.70×10^{-3}	1.03×10^{-3}	9.32×10^{-4}	3.34×10^{-4}	—	
(個/L) 推定	95 μ -7 μ 分値	1.99×10^{-3}	1.66×10^{-3}	1.76×10^{-4}	9.48×10^{-5}	—	

4 まとめ

以上より、原水中の濁質成分の存在量が少ないほどクリプトの除去率が低下することから、クリプト原

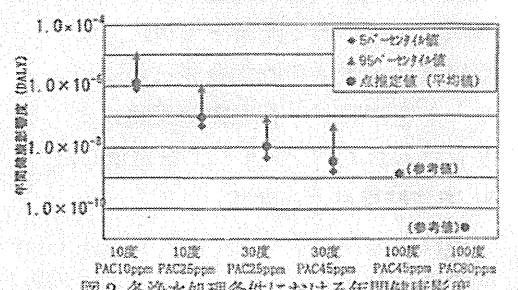


図 2 各浄水処理条件における年間健康影響度

水中濃度が同程度である場合には、原水が低濁度であるほど微生物リスクが高くなる傾向があると言える。しかしながら定量的微生物リスク評価の信頼性向上には、より多くのデータが必要であるので、様々な濁度条件によるデータの蓄積を行うことが今後の課題である。

【参考文献】1) 大瀧雅寛 非加熱飲用水量アンケート調査の結果報告 生活工学研究 第4巻第2号 2002 2) Haas CN, Crockett CS, Rose JB, Gerba CP, Fazil AM. Accessing the risk posed by oocysts in drinking water. J Am Water Works Assoc 1996;88(9) 3) A.H. Havelaar, J.M. Melse RIVM report 734301022/2003 Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality

お茶の水女子大学大学院 人間文化創成科学研究科 ○曹雪, 大瀧雅寛

The effect of chlorination on biofilm bacteria formed on the pipe wall, by Xue CAO, Masahiro OTAKI (Dept. of Human-Environmental Sciences, Ochanomizu Univ.)

1. 序論

給配水においては配水管や貯水槽の内壁などから剥離した微生物が問題となる。一度配水管の壁面にバイオフィームが形成されると、消毒効果が深部にまで有効に作用しないため、バイオフィーム状態の細菌の消毒性は浮遊状態と比べて高いことが知られている。従って、バイオフィーム状態の深部の細菌がどの程度不活化されるかは重要な課題である。

本研究では、バイオフィームの付着強度によって分類し、塩素消毒による不活化機構を解明することを目的とする。

2. 実験方法

滅菌したフロストスライドガラス (10 mm×10 mm), PVC ディスク (10 mm×10 mm) に *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442 以下 Pa) のバイオフィームを形成させた¹⁾。

菌が付着した二種類のディスクをそれぞれ残留遊離塩素濃度が 1.0 mg/L となる塩素溶液 10 ml に投入し、所定時間攪拌し、塩素処理を行った。処理済みのディスクを 9 ml PBS を封入したチューブに移動し 90 g×10 分間遠心分離して付着菌を剥離し、これを全菌とした。別の処理済みのディスクは、まず、9 ml PBS を封入したチューブに移動し 0.9 g×1 分間にて遠心分離し、剥離菌をチューブ内へ移した。さらにディスクを 9 ml PBS を封入したチューブに移動し、0.9 g×1 分間遠心分離し、剥離菌を移した。この手順で 22.4 g×5 分間、90 g×10 分間遠心分離を行い、その都度剥離した菌体を各チューブ内溶液に残した。

対比の塩素未処理のディスクも同じ遠心分離操作を行った。塩素処理済みと未処理のディスクから剥離した生菌数をそれぞれ TSA, TSA+デオキシコール酸ナトリウム, TSA+ナリジク酸の三種類の培地で細菌濃度を測定し、損傷レベルを推定した²⁾。

3. 実験結果と考察

表1は各ディスクに形成したバイオフィームの各強度での遠心分離処理時の剥離菌数を示す。遠心分離の強度によって、バイオフィームを付着強度毎に分類することができた。また、PVC ディスクの方が付着強度が強いと考えられた。

図1, 図2はガラスディスクと PVC ディスクから剥離した全菌の不活化率変化である。どちらも TSA に比べて、他の二つの培地の不活化率が大きくなっており、外膜損傷のみが与えられている菌の存在が示唆された。

図3, 図4はそれぞれ最初にガラスディスクと PVC ディスクから剥離した付着強度が弱い部分 (0.9 g×1 分間遠心分離) の不活化率変化を示す。全菌の場合と同様の結果となった。全菌数のうち付着強度が弱い部分の割合が大きいため、この結果となったと考えられる。

図5, 図6はガラスディスクと PVC ディスクへの付着強度が強い部分 (90 g×10 分間遠心分離) の不活化率変化を示す。三つの培地の差は殆ど見られず、いずれも致死性的損傷を受けていると考えられた。また、付着強度が弱い部分の不活化率と比較すると、不活化

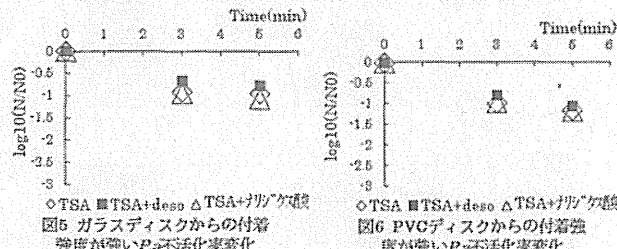
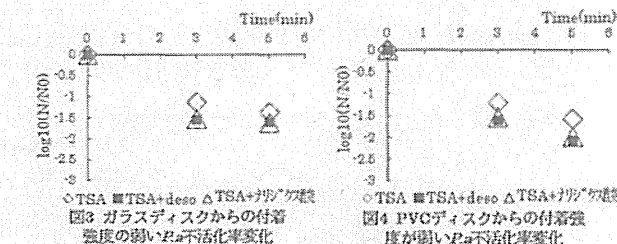
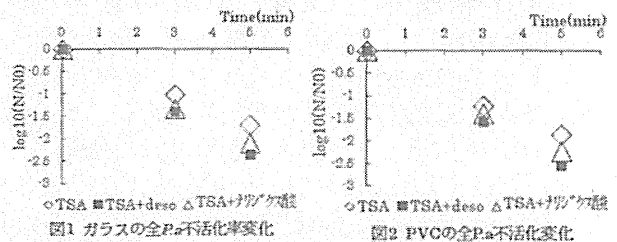
速度は半分程度になっていた。従って、剥離しにくい菌においては塩素消毒による損傷は致死性的ではあるが、不活化レベルは大幅に低くなることが分かった。

4. 結論

本実験の PVC ディスクとフロストスライドガラスディスクは実際の配水過程において、それぞれ新しい PVC 管と傷が付いた古い管に相当すると考えた。菌の付着強度は傷のついた管の方が強いと考えられる。また、二つの管とも同じく、剥離しやすい部分は塩素消毒の不活化は高いが、海外膜損傷のみの菌の存在が示唆された。剥離しにくい部分の不活化レベルが大幅に低下することが分かった。

表1 各強度の遠心分離下の剥離生物数

遠心分離強度	時間 min	ガラスからの剥離菌数 CFU/ml	PVC からの剥離菌数 CFU/ml
0.9 g	1	2.0×10 ⁵	5.0×10 ⁷
0.9 g	1	2.3×10 ⁶	1.4×10 ⁵
22.4 g	5	3.5×10 ⁵	4.3×10 ⁴
90 g	10	1.2×10 ⁴	2.6×10 ³



参考文献

- 1) Moira, D.J. et al. (1995) J. of Microbiological Methods 21, 15-26
- 2) Kazama. et al. (2012) J. of Water and Envir. Tech., 10(4), 363-374

謝辞

本研究は厚生労働科研究費「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」の一環として実施した。

(8-5) 給水栓における滞留に伴う水質変化と細菌再増殖との関係

○大坂 幸弘(東京大学) 春日 郁朗(東京大学)
栗栖 太(東京大学) 古米 弘明(東京大学)

1. 研究の背景と目的

近年、より安全でおいしい水に対する需要が高まっている。遊離残留塩素濃度の基準値は国の水道法施行規則、水質管理目標設定項目によりそれぞれ 0.1mg/L 以上、1.0mg/L 以下という範囲で定められているが、上限値に独自基準を設けるなど、残留塩素低減化の取り組みが各地で進められている。一方、残留塩素濃度の低下により、水質の微生物学的安定性が崩れ、水道給配水系において細菌が再び増殖する「細菌再増殖」のリスクが高まることも懸念される。2008 年に水質管理目標設定項目として「従属栄養細菌」(目標値: 2000 CFU/mL) が追加され、水道水中の細菌現存量に関する知見は増えているが、我が国の水道水中における細菌再増殖の実態については依然として不明な点が多い。本研究では、水の滞留に伴う局所的な水質変化が発生しやすい給水栓に着目し、滞留時間に伴う水温及び遊離残留塩素濃度の変化と細菌数との関係性を評価することを目的とした。

2. 実験方法

2011 年 12 月に、東京大学本郷キャンパスの実験室内給水栓を対象として採水を行った。本実験室のある建物では、屋上高架水槽に一度受水した後、各部屋に給水を行っている。初めに、5L/min で 5 分間の放水を行った後、10L を採水した。次いで、同じ給水栓を 24 時間使用停止とし、給水栓付近の水道水を滞留させた。その後、水道水を 5L/min で放水し、2L ずつ連続的に分取しながら計 20L を採水した。以後、使用停止時間を 24, 16, 8, 4 時間と変化させ、同様の採水を繰り返した。採水した試料については、水温及び遊離塩素濃度を測定すると共に、全菌数及び従属栄養細菌数 (Heterotrophic Plate Counts: HPC) を求めた。全菌数は、試料中の微生物を SYBR Green I (Invitrogen) で染色した後、フローサイトメーター (Accuri C6, BD 社) を用いて計数した。HPC は、R2A 培地を用い、20°C で 7 日間培養し、形成されたコロニー数を計数した。また、放水直後 0-2L (計 2L) の試料と、放水後 10-20L (計 10L) の試料を対象として、分子生物学的手法による

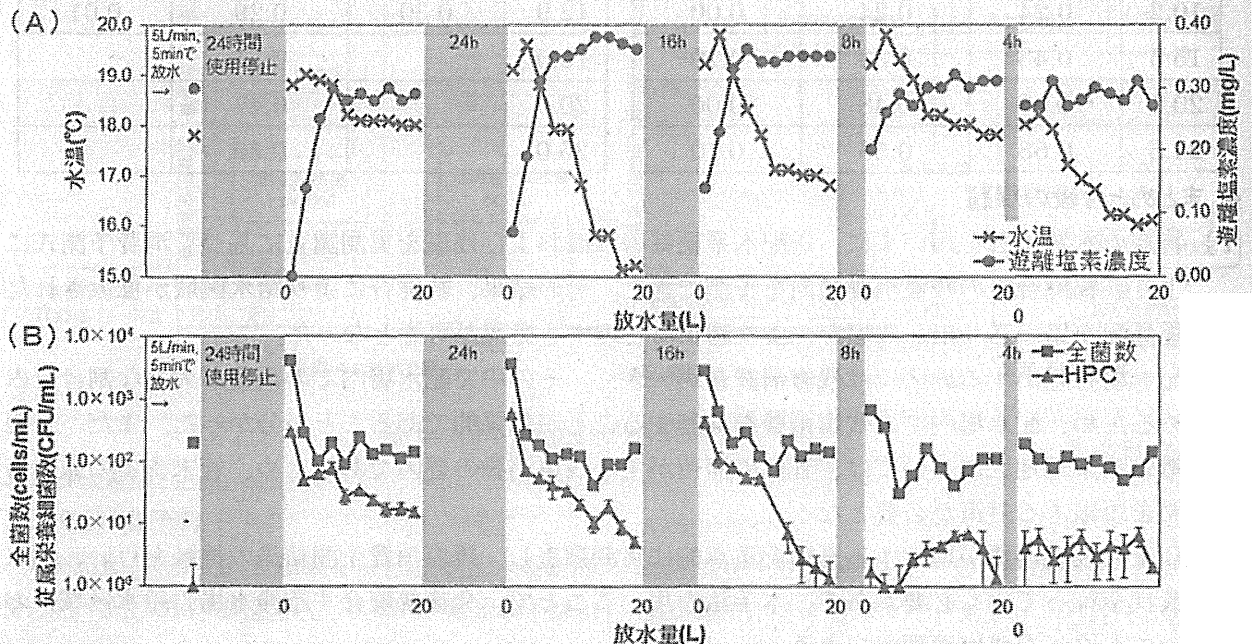


図 1 滞留及び放水に伴う給水栓水道水の水質変化

(A) 水温、遊離塩素濃度、(B) 全菌数、従属栄養細菌数 (使用停止時間 16 時間後の 10-12L 放水分は欠測)

細菌群集構造解析を行った。試料を孔径 0.22 μ m のポリカーボネート製フィルターでろ過して細菌を捕捉した後、核酸を抽出し、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象として T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 解析を行った。

3. 結果及び考察

図 1 に、異なる滞留時間とその後の放水に伴う給水栓における水質変化を示す。水温は、給水栓を 8-24 時間使用停止させた前後で、15.2-18.0 $^{\circ}$ C から 18.8-19.2 $^{\circ}$ C まで上昇し、建物内の気温の影響を受けたことが推察された。4 時間の滞留による水温上昇は明確ではなかった。遊離塩素濃度は、滞留前には 0.27-0.36mg/L と十分な濃度が維持されていたが、24 時間の滞留により 0-0.07mg/L まで減少した。滞留時間が短くなると、減少幅も小さくなった。放水により水温の低下、遊離塩素濃度の上昇が観察された。遊離塩素濃度は、2L 放水後には、いずれの場合も基準値である 0.10 mg/L 以上に回復した。

全菌数は、実験開始時には 2.0×10^2 cells/mL であったが、24 時間滞留後には 3.9×10^3 cells/mL に増加していた。放水を行うと、全菌数はただちに減少し、2L 放水後には滞留前のレベルに戻った。再度、給水栓で 24 時間滞留させた後の全菌数は、1 回目の滞留と同程度 (3.6×10^3 cells/mL) まで増加し、給水栓における細菌再増殖現象には再現性が認められた。滞留時間を 16 時間にした場合も同程度の変化が確認されたが、8 時間の場合には 0.7 log の増加にとどまり、24 時間の場合 (平均 1.4 log) や 16 時間の場合 (1.2 log) と比較して増加量が少なかった。4 時間の滞留による増加は認められなかった。

一方、HPC も、全菌数と同様の変化を示した。実験開始時には 1 CFU/mL であったが、24 時間の滞留後には 302 CFU/mL まで増加した。放水を行うとただちに減少し、20L 放水後には 15 CFU/mL まで低下した。再度、24 時間滞留させた時には 570 CFU/mL に増加しており、ほぼ同程度の増殖が観察された。これらの値は、目標値 2000 CFU/mL よりも十分に低く、水道水中で生じる細菌再増殖ポテンシャルは小さいことが確認された。滞留時間を 16 時間にした場合も、滞留前後で 5 CFU/mL から 425 CFU/mL まで増加し、ほぼ同程度の増殖が観察された。しかし、滞留時間が 8 時間以下の場合には、顕著な増加は確認されなかった。

図 1 に示したように、遊離残留塩素濃度の局所的な低減が細菌再増殖を誘発していると考えられるが、滞留に伴う水温上昇も細菌の増殖活性を高めていることが推察される。

滞留時間 16-24 時間の試料を対象として細菌群集の T-RFLP 解析を行った結果を図 2 に示す。主に 52, 75, 332, 833bp など共通のピークが見られ、中でも、図 2 で示した 75, 332bp のピークは滞留後に存在割合が相対的に増加していることが観察された。今後は、これらのフラグメントに相当する細菌を同定し、再増殖制御に有用な知見を得る予定である。

4. 結論

本研究で対象とした室内給水栓では、水道水の滞留によって、滞留時間 8-24 時間の間に水温の上昇や遊離残留塩素の減少が起こり、細菌再増殖が生じることが確認された。ただし、HPC で確認した細菌再増殖のレベルは、目標値以下であった。放水を行うと、水温の低下、遊離残留塩素の上昇と共に全菌数、HPC の急激な低下が確認され、細菌の再増殖は給水栓の局所的な部位で生じていることが推察された。

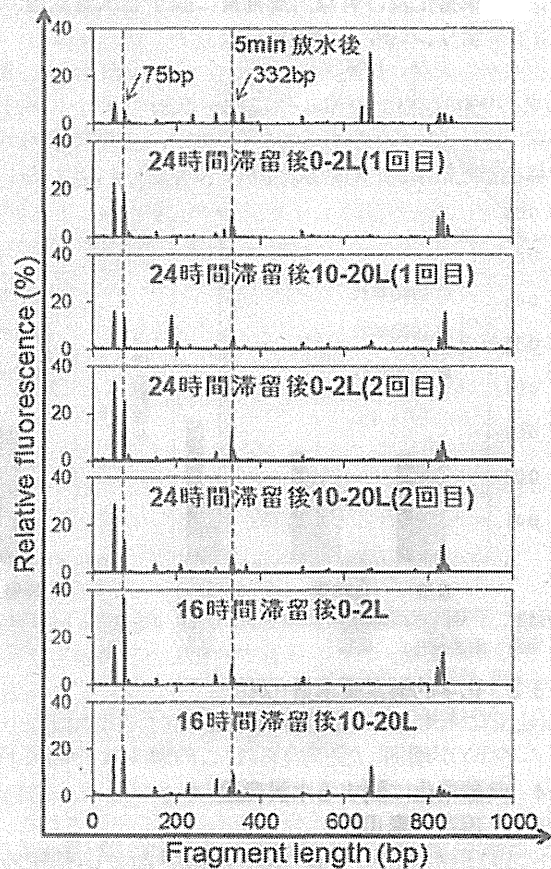


図 2 T-RFLP 解析結果