

東京大学大学院工学系研究科 ○大坂幸弘, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明

Chlorine tolerance and growth characteristic of heterotrophic plate count (HPC) bacteria isolated from the end of water distribution system
by Yukihiro OSAKA, Ikuro KASUGA, Futoshi KURISU, Hiroaki FURUMAI (Grad. Sch. of Eng., Univ. of Tokyo)

1. 序論

近年、より安全でおいしい水の供給を目的とした残留塩素低減化が各地で進められているが、一方で、水道給配水系における細菌再増殖のリスクが高まることも懸念される。細菌再増殖の監視、制御の指標としては細菌現存量指標である従属栄養細菌数(Heterotrophic Plate Count: HPC) が用いられている。しかし、HPC として捉えられている細菌の再増殖特性については更なる知見の収集が求められている。そこで、本研究では、実際の給水末端から単離・同定した個々の従属栄養細菌を対象として、それらの塩素耐性および増殖特性を評価した。

2. 実験方法

従属栄養細菌の単離: 都内 10 か所の給水末端から水道水を採水し、R2A 培地で培養後、HPC として検出された細菌を単離した。二重標識 T-RFLP により異なる断片長を持つものを選択、16S rRNA 遺伝子の全長を決定し、RDP classifier による系統解析を行った。同化性有機炭素測定に用いられる *Pseudomonas fluorescens* P17 株、*Aquaspirillum* sp. NOX 株を加え、以下の試験を行った。

塩素耐性試験: 初期生菌数を 1.0×10^6 cells/mL に調整したリン酸緩衝液 (pH7) に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、遊離塩素濃度を約 0.1, 0.4, 1.0 mg/L に維持した (室温)。所定の時間間隔で試料を採取し、直ちにチオ硫酸ナトリウムで塩素を中和した。試料を SYBR Green I (Invitrogen) と propidium iodide (Wako) で二重染色し、生菌/死菌 (Live/Dead 染色: 膜損傷評価) を区別してフローサイトメーター (FCM) (Accuri C6, BD 社) で計数した。塗布法によるコロニー計数 (20°C、7 日間、R2A 培地) も行った。以降、前者を生菌数、後者をコロニー数と呼ぶ。増殖特性試験: 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、全菌数の経時変化 (20°C、11 日間) を FCM で測定した。

3. 結果及び考察

都内 10 か所の給水末端から、系統的に異なる 19 株 (HPC1-19 株) を単離した。

塩素耐性試験の結果、ほとんどの株で生菌数とコロニー数の両方で生残割合の対数値が CT 値に比例しており、Chick-Watson 式に従うことが確認された。一例として、HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁)、HPC19 株 (*Sphingomonas* 属近縁) の結果を図 1 に示す。HPC13, 19 株の死滅速度定数は生菌数で評価した場合、それぞれ 0.019, 4.0 L/mg min と大差があった。また、コロニー数で評価した死滅速度定数も、それぞれ 0.069, 16 L/mg min と大差があり、いずれの場合でも、HPC13 株の方が塩素耐性が高いことが示された。また、この例と同様に、全ての株においてコロニー数により評価した死滅速度定数の方が大きな値を示し、生菌数による不活化の評価はより安全側であることが確認された。その他、HPC11 株 (*Methylobacterium* 属近縁) の塩素耐性

が著しく高いことも明らかとなった。

増殖特性試験の結果、19 株中 8 株及び P17 株、NOX 株が水道水中で増殖した。特に、HPC5 株 (*Burkholderia* 属近縁)、HPC15 株 (*Lysobacter* 属近縁)、P17 株、NOX 株の最大増殖量が他よりも高く、これらの株に利用しやすい基質が水道水中に多く存在することなどが推測された。

図 2 に水道水中で増殖した株を対象として、それらの最大増殖量と塩素存在下での死滅速度定数 (生菌数で評価) とを比較した。塩素耐性が高く、水道水中での増殖を示す HPC11 株、塩素耐性は低いものの最大増殖量が高い HPC5, 15 株など、株によって塩素耐性や増殖特性には差異が見られた。このことから、HPC として検出される細菌群の塩素耐性や増殖特性は菌株により異なり、それらの再増殖特性は一樣ではないことが確認された。こうした知見は細菌再増殖を監視、制御する上で有用と考えられる。

4. 結論

給水末端から単離した HPC の塩素耐性および増殖特性を評価した。その結果、HPC として包括的に評価される細菌群中には幅広い塩素耐性、増殖特性を持つ菌が存在することが確認された。

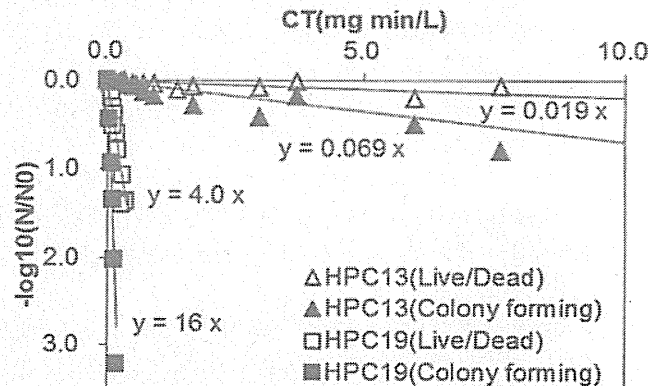


図 1 生菌数及びコロニー数に対する死滅速度定数の比較 (HPC13 株と HPC19 株の例。傾き: 死滅速度定数)

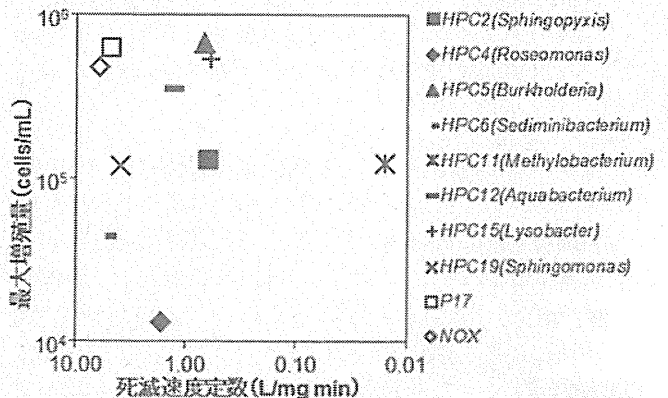


図 2 各菌株の水道水中での最大増殖量と死滅速度定数との比較

