

2) 凝集・沈殿

凝集・沈殿プロセスの *E. coli* 除去能については、昨年と同じ方法²⁾で追加調査を行い、データを蓄積した。

3) 促進酸化処理

a) OH ラジカルによる不活化効果の検証

オゾン/紫外線併用型の促進酸化処理を対象とする。促進酸化処理プロセスでは、分子オゾンの分解によりヒドロキシル (OH) ラジカルが生成する。OH ラジカルは非常に酸化力が大きいため、促進酸化処理における不活化能を調べる際には OH ラジカルの不活化効果の有無を考慮する必要がある。

昨年度の研究³⁾によるセミバッチ式実験では OH ラジカルの不活化効果の有無を明らかにすることはできなかった。そこで、今年度では Hunt と Marinas⁴⁾の研究で用いられたリアクター (continuous-flow tubular reactor) や、Buffle ら⁵⁾の研究や Gomes ら⁶⁾の研究で用いられた CQF システム (continuous quench-flow system) (図 1) を参考にした連続式リアクター (図 2) を用いて室内実験を行うこととした。まず、オゾンと紫外線それぞれ単独処理と、オゾン/紫外線処理の各条件での大腸菌不活化効果を評価した。次いで、オゾンと紫外線単独処理による大腸菌不活化 log 数を足し合わせて、オゾン / 紫外線処理での不活化 log 数と比較することで OH ラジカルの不活化効果の有無を検証した。用いた紫外線ランプは、185 および 254 nm の波長の紫外線を照射可能で、254 nm の方が 185 nm より相対的に光強度が大きいものである。大腸菌とオゾンあるいは紫外線ランプの反応時間をポンプの流量によって変化させ、0.8 秒～5 秒程度の反応時間を数段階設定し、流出水をオゾン濃度測定用サンプルと大腸菌濃度測定用サンプルとして採取した。

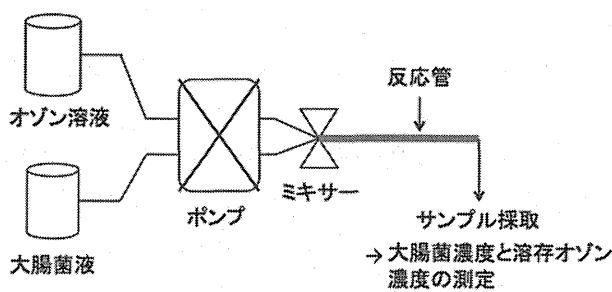


図1 CQF システムの概要

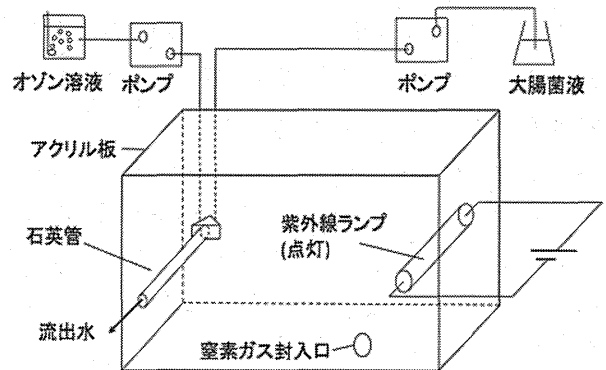


図2 リアクター概略

b) 促進酸化プロセスにおける *E. coli* 不活化能推定

促進酸化プロセスの *E. coli* 不活化能評価には、A 浄水場に設置されているパイロットプラントの気液向流式オゾン接触塔を用いて *E. coli* 添加実験を行い、*E. coli* 濃度および溶存オゾン濃度を測定した。これによりパイロットプラントにおける不活化 log 数とその変動を定量化できる。昨年度の研究³⁾ではパイロットプラントの1塔目での *E. coli* 不活化能を求めたが、オゾン発生機と UV 照射機の位置の都合上、促進酸化処理よりもオゾン+UV 処理に近い条件であった。その点を考慮し、今回は2塔目を使用して添加実験を行った。

4) イオン交換処理

a) イオン交換処理による *E. coli* の除去特性に関する実験的検討

イオン交換処理の処理特性として把握しておくことが必要な事項, すなわち樹脂充填高さ と除去能の関係, 細菌除去機構, pH による影響の3項目について検討を行った。

樹脂の充填高さ と細菌除去能の関係性を把握するためにカラム実験 (図3) を行った。異なるカラムを2本連結させた。1本目のカラムは高さ75 cmで, 下から10 cm 間隔で5個の採水口を取り付けてある。2本目のカラムは高さ50 cmで, 採水口はない。2本のうち, 層厚として10, 20, 30, 40, 50, 100 cm の箇所から採水した。採水時間は通水前のカラムに入っている水が全て交換され安定する, 通水後20, 30, 40分後にした。陽イオン交換樹脂にはダイヤイオンUBK16, 陰イオン交換樹脂にはダイヤイオンPA308(いずれも三菱化学製) を用いた。なお, A浄水場パイロットプラントの陽イオン交換塔の線速度と合わせて本実験の流量を設定し, 105.5 mL/min とした。

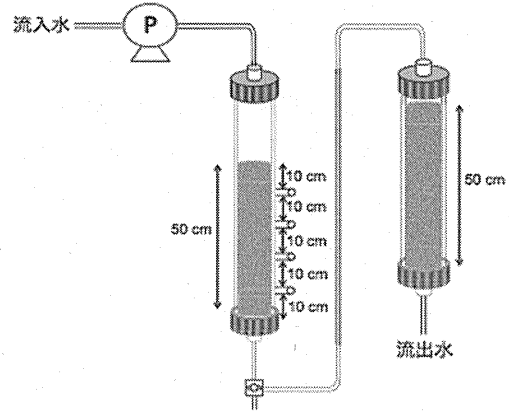


図3 本実験に使用するカラム

E. coli 除去の機構は主に, ①重力沈降・慣性衝突・阻止作用・ブラウン運動による物理的な除去, ②イオン交換による吸着の2つが考えられる。除去機構を考察する際はイオン交換カラム内での *E. coli* 濃度変化を一次元移流拡散方程式で記述し, 定量的に評価した。まず, 主に大腸菌はイオン交換樹脂による吸着で除去されると仮定し, イオン交換カラムに大腸菌液を通水したときの大腸菌濃度変化を次式に示すモデルで表した。次に, このモデルを解くために必要なパラメータを実験などで設定した後, 数値解析を行い, カラムでの実験値と比較した。

[除去モデル]

$$\Delta x \left\{ \theta \frac{\partial C_E}{\partial t} + (1-\theta) \frac{\partial q_E}{\partial t} \right\} = \left(u C_E \Big|_{x=x} - D \frac{\partial C_E}{\partial x} \Big|_{x=x} \right) - \left(u C_E \Big|_{x=x+\Delta x} - D \frac{\partial C_E}{\partial x} \Big|_{x=x+\Delta x} \right)$$

C_E : 水中の大腸菌濃度 (個 / mL)

q_E : イオン交換樹脂内の大腸菌濃度 (個 / mL-R)

θ : 間隙率

u : カラム内の間隙における移流速度 (cm/min)

D : *E. coli* のイオン交換カラム内移動における拡散係数 (cm²/min)

また, イオン交換処理が流入水 pH によって影響を与えるかを調べるため, 流入水 pH を3, 5の2段階に調整し, 調整なしの場合と *E. coli* 除去能を比較した。

b) イオン交換プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定

実施設でのイオン交換処理を想定するため, 高さ50cmのガラスカラムを2本連結し, 線速度と層厚(1 m)を実処理の場合と統一した上で *E. coli* の添加実験を行った。陽イオン交換樹脂にはダイヤイオンUBK16, 陰イオン交換樹脂にはPA308 (いずれも三菱化学製) を用いた。

5) 塩素処理

A 浄水場に設置されているパイロットプラントの塩素接触槽を用いて、低濃度の残留塩素条件（遊離塩素濃度 0.05～0.15 mg/L）で *E. coli* の添加実験を行った。*E. coli* 添加後の遊離残留塩素濃度が上記範囲となるよう塩素注入量を調整した後、高濃度 *E. coli* 懸濁液をインライン注入し、定常状態に達した後（*E. coli* 注入開始 13 分経過後）、試料を複数回採取して残留塩素濃度を測定するとともに、生残 *E. coli* 濃度を測定した。

6) カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象とした定量的微生物リスク評価

以上で収集したデータに基づいて、カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象とした *C. jejuni* の年間感染確率を推定した。原水の *E. coli* 濃度および凝集・沈殿プロセスの *E. coli* 除去能および C/E 比については、今年度蓄積したデータも追加して適切な確率密度関数(PDF)を設定し直した。急速砂ろ過処理の除去能は独自のデータ取得はせず、既往の調査結果を用いた。文献⁷⁾によると、前処理として凝集処理を行っている場合、急速砂ろ過処理による *E. coli* の除去能範囲は $0.4\log_{10}$ - $1.5\log_{10}$ で、平均値は $0.9\log_{10}$ である。したがって急速砂ろ過処理の除去能は最小値 $0.4\log_{10}$ 、最大値 $1.5\log_{10}$ 、最尤値 $0.9\log_{10}$ をパラメータとする三角分布を与えた。非加熱飲水量については昨年度と同様の PDF を設定した²⁾。一方、促進酸化プロセスにおける不活化能は³⁾で得た値を元に PDF を設定した。これらを統合してモンテカルロシミュレーションにより 10 万回の計算を行った。得られた *C. jejuni* の一日当たり摂取量に対して、用量-反応モデル ($P_d=1-\exp(-0.686 \times D)$, D:用量)²⁾を適用して一日感染確率と年間感染確率を算出した。PDF の適合およびモンテカルロシミュレーションには、Crystal Ball (Decisionoering 社)を使用した。

C. 研究結果

1) 微生物濃度の測定

原水 *E. coli* 濃度は周⁸⁾、A 浄水場から提供されたデータ（2009 年 10 月～2013 年 12 月）を含めた計 73 個の原水データに対して分布形を当てはめた結果、ワイブル分布が適当と判断された。C/E 値の分布には不検出を除く 17 個のデータを使用して対数正規分布を当てはめた。

2) 凝集・沈殿

凝集沈殿処理は原水 *E. coli* 濃度と凝集・沈殿水 *E. coli* 濃度をランク法により得られた除去能に対して最も当てはまる最大極値分布を選択した。

3) 促進酸化処理

a) OH ラジカルによる不活化効果の検証

計 3 回実験を行った。オゾン / 紫外線処理における不活化効果のうちオゾンによる寄与と紫外線による寄与を求めその二つを合わせたものと、オゾン / 紫外線処理実験の結果を比較した結果、OH ラジカルは不活化効果に寄与しておらず、オゾン/紫外線処理の不活化能についてオゾン処理と紫外線処理の効果は相加的であると結論づけた。

b) 促進酸化プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定

促進酸化処理の不活化能評価には、本年度行った A 浄水場パイロットプラントの 10 回の実験結果を用いた。この結果から最小値 $7.31\log_{10}$ 、最大値 $9.02\log_{10}$ 、最尤値 $7.65\log_{10}$ の三角分布が得られた。

4) イオン交換処理

a) イオン交換処理による *E. coli* の除去特性に関する実験的検討

樹脂の充填高ささと細菌除去能の関係性を把握するための実験結果を図4に示す。陰イオン交換処理では、樹脂充填高ささと *E. coli* 除去能の関係が線形的であることがわかる。陽イオン交換処理は陰イオン交換処理に比べて全体的に除去能が低く、充填高が変化しても除去能に大きな変化がない。陽イオン交換処理では *E. coli* と樹脂の間でイオン交換反応が起こっていないと考えられる。

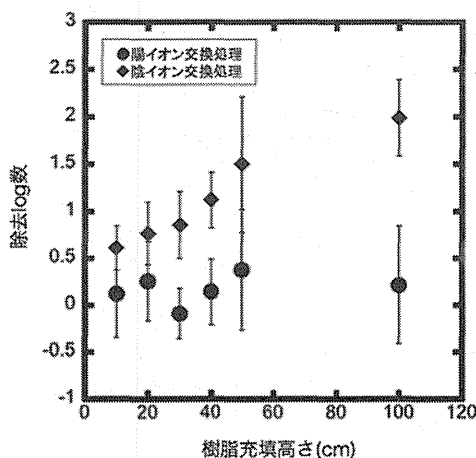


図4 充填高と除去 log 数

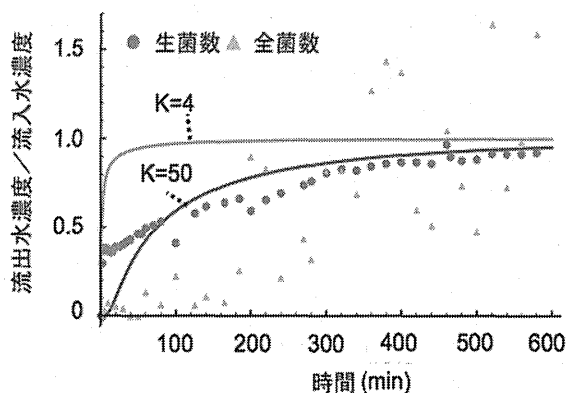


図5 実験結果とモデルの比較

次に、陰イオン交換処理を取り上げ、陰イオン交換処理における *E. coli* 除去機構を検討した。イオン交換カラム内において *E. coli* が吸着除去される一次元移流拡散モデルを作成し、破過実験結果にあてはめた。図5に適合させた結果を示す。ここでは2種類の吸着平衡定数 K の値を示している。一方は回分実験で求めた $K = 4$ を用いて拡散係数 D を合わせたものである。もう一方は吸光度すなわち全菌数の経時変化に適合するように K を探索し、 $K = 50$ を与えたものである。図5からわかるように、 $K = 50$ のときの方が全菌数の経時変化にうまく適合した。 $K = 50$ という値は回分実験の結果に比べて大きな値である。これは回分実験に比べて除去能が大きいことを意味しており、吸着現象だけではなく物理的な捕捉等の現象もカラム内では起こっていると考えられる。

また、イオン交換処理が流入水 pH によって影響を受けるか調べるため、流入水 pH を3および5の2段階に調整し、調整なしのときと *E. coli* 除去能を比較した。その結果、各 pH で *E. coli* 除去能の範囲はほぼ変化しなかった。流入水 pH が変化してもイオン交換処理の *E. coli* 除去能に影響を及ぼさないとと言える。この原因としては、陽イオン交換処理では流入水の pH が7付近であれば流出水の pH は流入水とほぼ同じであるが、流入水 pH が3付近であれば流出水 pH は7に近づいていくことが挙げられる。一方、陰イオン交換処理では流入水 pH が7付近であれば流出水 pH が4付近に近づくが、流入水 pH が3では流出水 pH は変化しない。したがって、陽・陰イオン交換処理ともに処理過程で一定の pH に近づいていく。そのため、*E. coli* 表面のイオン変化はほとんどなく、表面の電荷量に影響がほとんどなくなるために除去能が変化しないと考えられる。

b) イオン交換プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定

QMRA で使用する陽・陰イオン交換処理ともに 15 個のデータを図 6 に示す。各採水時間に採水した流入水の *E. coli* 濃度の平均値と各採水時間における流出水 *E. coli* 濃度の平均値を用いて除去 log 数を求めている。陽イオン交換については除去 log 数が負となるデータが 4 個存在するが、流入水よりも流出水の *E. coli* 濃度が高くなるような現象は本来の浄水処理では考えにくいいため、最小値 0, 最大値 0.96 \log_{10} , 最尤値 0.25 \log_{10} をパラメータとする三角分布を与えた。陰イオン交換処理による除去能は 15 個のデータに対してロジスティック分布を当てはめた。

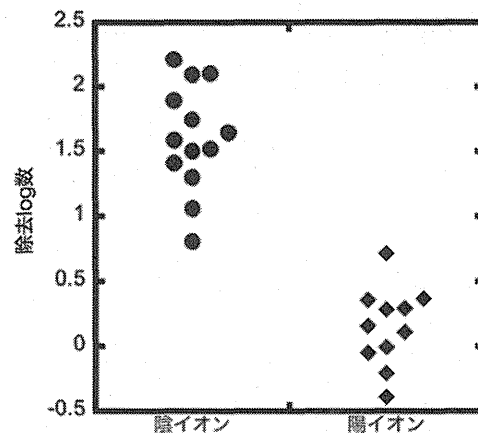


図6 QMRA に用いる除去 log 数

5) 塩素処理

カルキ臭低減型浄水処理プロセスでは塩素濃度を低減させることを想定しているため、塩素添加実験中の残留塩素濃度が 0.1 mg/L 付近のときに得られた 9 回の実験結果を用いる。その結果から、最小値 3.44 \log_{10} , 最大値 5.83 \log_{10} , 最尤値 4.03 \log_{10} をパラメータとする三角分布を与えた。

6) カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象とした定量的微生物リスク評価

原水の *E. coli* 濃度、凝集・沈殿、急速砂ろ過、促進酸化、陽・陰イオン交換、塩素処理の各処理プロセスにおける除去・不活化能、非加熱飲料水消費量、および C/E 比の各要素は上記実験で得た値を元に PDF を設定した。選定した PDF とパラメータをまとめたものを表 1 に示す。各処理プロセスにおける除去・不活化能に対して与えた PDF に基づいてモンテカルロシミュレーションを行い、6 段階の処理プロセスにおける総合除去・不活化能を計算した。得られた総合除去・不活化能の分布を図 7 に示す。中央値 18.14 \log_{10} , 平均値 18.09 \log_{10} が得られた。QMRA による推定値をまとめたものを表 2 に示す。年間感染確率は平均値として 2.07×10^{-11} /人/年 (中央値 0) が得られた。

C. jejuni 年間感染確率に対して感度分析を行った結果を図 8 に示す。年間感染確率に対する寄与率が最も大きい要素は原水中 *E. coli* 濃度であった。これは、測定された *E. coli* の濃度のばらつきが数オーダーレベルに達するためである。その次に寄与率の大きい要素は表流水中 C/E 値であった。これは河川水中 *E. coli* 濃度が年間を通して大きな変化がない一方で、*C. jejuni* 濃度が採水された季節によって約 1~2 オーダー変化するためである。一方、カルキ臭低減型浄水処理プロセスの中では凝集・沈殿処理の影響が最も大きいと評価された。凝集・沈殿処理の除去能は原水 *E. coli* 濃度と凝集沈殿水 *E. coli* 濃度をランク法によってペアリングし除去能を算出する。原水 *E. coli* 濃度は採水ごとに変化が大きく、凝集沈殿水 *E. coli* 濃度は原水ほどの変動幅を持たないため、結果として凝集沈殿処理は変動幅が大きくなってしまふ。そのため凝集沈殿処理の寄与率が大きくなると考えられる。

表1 選定したPDFとパラメータ推定値のまとめ

要素	適合分布形	パラメータとその推定値
原水中 <i>E.coli</i> 濃度	ワイブル分布	
凝集・沈殿処理	最大極値分布	
急速砂ろ過処理	三角分布	最小値:0.4, 最尤値: 0.9, 最大値:1.5
促進酸化処理	三角分布	最小値:7.31, 最尤値: 7.65, 最大値:9.02
陽イオン交換処理	三角分布	最小値:0, 最尤値: 0.25, 最大値:0.96
陰イオン交換処理	ロジスティック分布	
塩素処理	三角分布	最小値:3.44, 最尤値: 4.03, 最大値:5.83
C/E 値	対数正規分布	平均値: 1.87×10^{-4}
非加熱飲水量	指数分布	比率: 3.06×10^{-3}

表2 QMRAによる推定値

	P _{2.5}	中央値	平均値	P _{97.5}
総合除去・不活化 log ₁₀ 数	16.32	18.14	18.09	20.22
水道水 <i>E.coli</i> 濃度 (<i>E.coli</i> /100mL)	1.35×10^{-21}	7.08×10^{-17}	1.32×10^{-14}	7.31×10^{-14}
<i>E.coli</i> 摂取量 (<i>E.coli</i> /日)	1.76×10^{-17}	1.26×10^{-12}	4.38×10^{-10}	2.02×10^{-9}
<i>C.jejuni</i> 摂取量 (<i>C.jejuni</i> /日)	5.88×10^{-22}	5.76×10^{-17}	8.28×10^{-14}	1.97×10^{-13}
<i>C.jejuni</i> 一日当たり感染確率 (人 ⁻¹ 日 ⁻¹)	0	0	5.68×10^{-14}	1.35×10^{-13}
<i>C.jejuni</i> 年間感染確率 (人 ⁻¹ 年 ⁻¹)	0	0	2.07×10^{-11}	4.94×10^{-11}

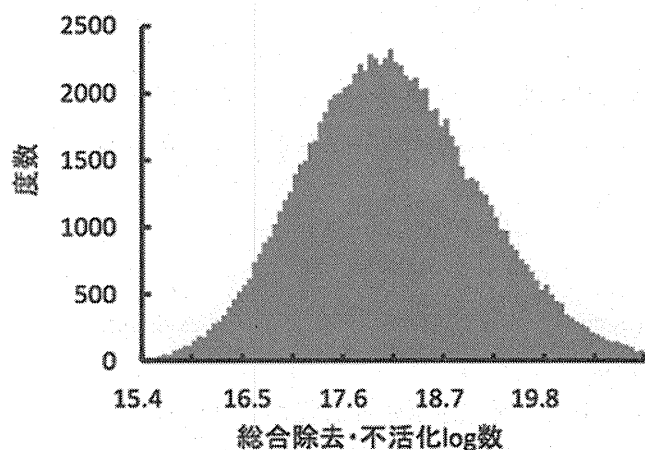


図7 総合除去・不活化能の結果

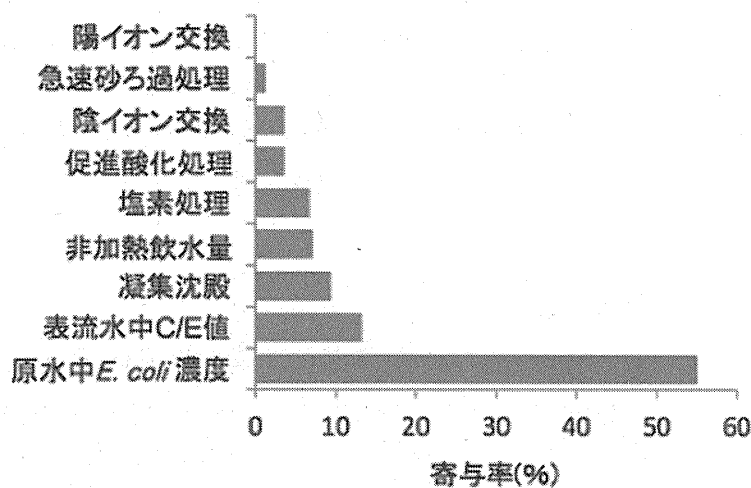


図8 年間感染確率に対する感度分析

D. 考察

得られた年間感染確率から、カルキ臭低減型処理プロセスは、低残留塩素下でも十分に安全な水道水を生産することができると評価できた。また、年間感染確率に対する感度分析を行い、凝集・沈殿処理が重要管理点であることを指摘した。

昨年度行った OH ラジカルの不活化効果を確認するためのセミバッチ式実験からは、OH ラジカルの不活化効果について明らかにすることができなかった。今年度は、オゾン / 紫外線処理の大腸菌不活化能における OH ラジカルの寄与は、実際上考慮する必要は無いと結論づけることができた。この成果はカルキ臭低減化処理プロセスを合理的にモデル化する上で重要な知見を提供している。

一方、今後の課題としては、促進酸化処理における不活化能がパイロットプラントでの実測値を用いただけになっている。実施設での除去能を推定した上で、処理水の年間感染確率を再評価する必要がある。オゾン / 紫外線処理は実施設に導入された例はなく、その大腸菌不活化能の評価は室内実験結果、パイロットプラントでの実験結果と数理モデルを用いて推定すべきものである。実際に昨年度³⁾はこのような手法により実施設スケールでの不活化能を推定した。また、年間感染確率に対する不確実性分析を行い、今後知見の収集が必要な事項を提示する予定である。

E. 結論

オゾン / 紫外線処理における OH ラジカルの不活化効果の有無を検証した結果、オゾン / 紫外線処理で生成が促進される OH ラジカルは不活化効果に寄与していないことを示した。すなわち、オゾン / 紫外線処理の不活化能は、オゾン処理と紫外線処理の効果が相加的であるとして評価できると結論づけた。

イオン樹脂の充填高さとの細菌除去能の関係性を考察した結果、陰イオン交換処理では、樹脂充填高さとの *E. coli* 除去能の関係が線形的であった。陽イオン交換処理の除去能は低く、*E. coli* と樹脂の間でイオン交換反応が起こっていないと考えられた。

陰イオン交換処理における *E. coli* 除去機構を検討した結果、吸着現象だけではなく物理的な捕捉等の現象もカラム内では起こっていると考えられた。

提案したカルキ臭低減化処理プロセスの総合除去・不活化能は中央値 $18.14 \log_{10}$ と評価され、*C. jejuni* による年間感染確率は平均値 2.07×10^{-11} / 人 / 年 (中央値 0) が得られた。これは許容リスクレベル 10^{-4} / 人 / 年を大きく下回り、カルキ臭低減型処理プロセスは、低残留塩素下でも十分に安全な水道水を生産することができると考えられる。ただし、本研究の範囲ではパイロットスケールでの結果を示しており、実施設では結果に差が生じる可能性があることは注意しなければならない。

年間感染確率に対する感度分析を行った結果、凝集・沈殿処理が重要管理点であることを指摘した。一方、陽・陰イオン交換処理ともに除去能は小さく、リスク管理上の重要度は低いことを指摘した。

参考文献

- 1) Echigo, S., *et al.*: Reduction of chlorinous odor by the combination of oxidation and ion-exchange treatment, *J. Wat. Supply: Res. Technol.-Aqua*, 2013 (in press).
- 2) 伊藤禎彦, 越後信哉, 大河内由美子, 周靚, 野村昌弘, 中西智宏: 浄水処理過程および配水過程における微生物リスク管理・低減手法に関する研究, 厚生労働科学研究補助金 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 年度総括・分担研究報告書, pp. 21-33, 2013.
- 3) 中西智宏: 水道水の微生物的安全性に対するオゾン / 紫外線処理の効果に関する研究, 京都大学卒業論文, 2013.
- 4) Hunt, N. K. and Marinas, B. J.: Kinetics of *Escherichia coli* with ozone, *Wat. Res.*, Vol. 31, pp. 1355-1362, 1997.
- 5) Buffle, M. O., Schumacher, J., Salhi, E., Jekel, M. and von Gunten, U.: 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.*, Vol. 40, pp. 1884-1894, 2006.

- 6) Gomes, A. C. , Nunes J. C. and Simões, R. M. : Determination of fast ozone oxidation rate for textile dyes by using a continuous quench-flow system, J. Hazard. Mater., Vol. 178, pp. 57-65, 2010.
- 7) Wim, A.M.H., Madema, G.J. : Elimination of micro-organisms by water treatment processes, IWA Publishing, London, UK, pp.38, 2010.
- 8) 周靚: 高度浄水処理プロセスにおける定量的微生物リスク評価に関する研究, 京都大学大学院工学研究科修士論文, 2012.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohkouchi, Y., Yata, Y., Bun, R., Itoh, S. Chlorine Requirement for Biologically Stable Drinking Water After Nanofiltration, Water Science and Technology-Water Supply, 2014 (in press).
- 2) Zhou, L., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Quantitative Microbial Risk Assessment of Drinking Water Treated with Advanced Water Treatment Process, J. Wat. Supply: Res. Technol.-Aqua, 2014 (in press).
- 3) Itoh, S. Effect of the Ratio of Illness infection of *Campylobacter* on the Uncertainty of DALYs in Drinking Water, Journal of Water and Environment Technology, 11 (3), 309-324, 2013.

2. 学会発表

- 1) Nakanishi, T., Zhou, L., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Effect of ozonation and ultraviolet light treatment on the microbial safety of drinking water, Conference Proceedings, 22nd KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, 2013.7.2-3, Seoul, Korea.
- 2) Asada, Y., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Investigation of methods for isolation and quantitation of *Campylobacter jejuni* in water environment, Conference Proceedings, 22nd KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, 2013.7.2-3, Seoul, Korea.
- 3) Asada, Y., Ohkouchi, Y., Matudate, K., Echigo, S., Itoh, S. Structure analysis of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide associated with Guillain-Barré syndrome in source water for estimating disability adjusted life years, Conference Proceedings, Water Micro 2013, 2013.9.15-20, Florianopolis, Brazil.
- 4) Zhou, L., Nakanishi, T., Matsudate, K., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Infection Risk Assessment of *Campylobacter jejuni* in Drinking Water Treated with Water Treatment Process Reducing Chlorinous Odor, Water Micro 2013, 2013.9.15-20, Florianopolis, Brazil.
- 5) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦, 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* の定量における増菌培養法の比較, 第47回日本水環境学会年会講演集, 71, 2013.
- 6) 浅田安廣, 大河内由美子, 越後信哉, 伊藤禎彦, 糖鎖構造解析に基づいた河川水中 *Campylobacter jejuni* のシアル酸含有リポオリゴ糖保有実態, 環境衛生工学研究, 27 (3), 208-211, 2013.
- 7) 周靚, 松館圭太, 伊藤禎彦, 浄水処理ユニットプロセスにおける微生物除去・不活化能の定量化法, 平成25年度全国会議(水道研究発表会)講演集, 566-567, 2013.

- 8) Zhou, L., Nakanishi, T., Matsudate, K., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Infection Risk Assessment of *Campylobacter jejuni* in Drinking Water Treated with Water Treatment Process Reducing Chlorinous Odor, Asian Core Program 第3回包括シンポジウム, 京都大学宇治キャンパス, 2013.10.28-29.
- 9) 周靚, Infection Risk Assessment of *Campylobacter jejuni* in Drinking Water Treated with Water Treatment Process Reducing Chlorinous Odor (カルキ臭低減型浄水処理プロセスにおける *Campylobacter jejuni* の感染リスク評価に関する研究), 八大学工学系連合会「博士学生交流フォーラム」, 京大桂キャンパス船井記念講堂, 2013.11.8.
- 10) 浅田安廣, 大河内由美子, 松館圭太, 伊藤禎彦, 障害調整生存年数推定を目的とした河川水中 *Campylobacter jejuni* の実態調査, 第16回日本水環境学会シンポジウム講演集, 391-392, 2013.
- 11) 浅田安廣, 大河内由美子, 越後信哉, 伊藤禎彦, 河川水中 *Campylobacter jejuni* に対するギラン・バレー症候群発症関連菌株の推定, 第50回環境工学研究フォーラム講演集, 116-118, 2013.
- 12) 松館圭太, 周靚, 越後信哉, 伊藤禎彦, カルキ臭低減型浄水処理プロセスにおける陽・陰イオン交換処理による細菌除去, 第48回日本水環境学会年会, 2014 (発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書 2

水道水における腸管出血性大腸菌 (*E.coli* O157:H7) を
対象とした微生物リスクの試算

研究代表者 島崎 大
研究協力者 藤村 壮

水道水における腸管出血性大腸菌 (*E. coli* O157:H7) を対象とした微生物リスクの試算

研究代表者 国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究分野 島崎 大
研究協力者 国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究分野 藤村 壮

研究要旨

本研究では、我が国でも重篤な集団食中毒や水系感染事例のある腸管出血性大腸菌 O157:H7 を対象として、障害調整生存年数 DALY を指標として微生物リスク評価を行った。研究は、河川原水における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の存在状況調査結果ならびに凝集沈殿砂ろ過と塩素消毒による大腸菌の除去性能評価実験を行いリスク評価を行った。河川原水中には特異的に腸管出血性大腸菌 O157:H7 抗体に反応する細菌細胞が平均 48.75cells/ml 存在し、凝集沈殿・砂ろ過では大腸菌の除去率が 0.5log 除去～4.12log 除去という結果が得られ、原水濁度が高い時ほど除去率が高くなる傾向が見られた。また、塩素消毒による不活化性能を調べた実験では、微生物の減衰を示す Chick モデルに当てはめることにより、接触 1 時間での不活化性能を 6.53log 不活化という結果を得た。これら実験結果を基に障害調整生存年数 DALY を指標とした微生物リスクを行った結果、濁度によらず微生物濃度が一定である場合には原水濁度が高い時ほど微生物リスクが低くなる傾向が見られた。また、水道水中濃度では通常の大腸菌検出試験では検出できないほどの存在量となるが、WHO の飲料水水質ガイドラインの目標値 1.0×10^{-6} DALY を超える事例も見られた。

A はじめに

我が国の水道では、塩素消毒と残留塩素の保持により水道水中の病原微生物や指標微生物をいっさい含まないことが義務付けられており、これによって水道水の安全性は確実に担保され水系感染症の予防に大きな役割を果たしてきた。諸外国においては浄水処理水中の病原微生物について定量的微生物リスク評価の手法が取り入れられている事例もあり、水道水の安全性を評価する上で大きな役割を果たしている。定量的微生物リスク評価は、原水中の病原微生物濃度や浄水処理による病原微生物の除去性能を加味した上で感染リスクを算定し、許容されるリスク範囲に適合することで水道水の安全性を評価するもので、水道水中に病原微生物が検出されないから感染リスクが「ゼロ」と判断を下す考えとは異なっている。

そこで本研究ではこれら諸外国の事例にもあるように、定量的微生物リスク評価手法を用いて、我が国でも食中毒等で重大な感染事例のある腸管出血性大腸菌 O157:H7 (以下 *E.coli*O157:H7) を対象として微生物リスクの試算を行うことを目的とする。

B 研究方法

微生物リスクの試算には、障害調整生存年数 DALY を指標として試算を行った。WHO は異なる要因によって発生する健康被害を比較するための指標として、この障害調整生存年数 DALY を提案している。DALY の基本的な原理はある要因によって発生した人への影響を、健康状態に応じて 0 (健康状態がまったくない状態) から 1 (死) までの値で重み付けをして評価することであり、健康被害を及ぼす個々の要因 (化学物質や病原微生物) に対して得た評価結果の大小を比較できる。障害調整生存年数 DALY の試算のフローは図 1 の通りである。

(1) 原水中濃度

実際の河川原水中の *E.coli*O157:H7 の存在実態調査を行った。河川原水は近畿地方にある浄水場の原水について調査を行った。調査方法は *E.coli*O157:H7 に特異的に反応を示す蛍光標識された抗体によって染色し、蛍光顕微鏡によって観察し存在状況の調査を行った。また、生菌の指標として細菌細胞における呼吸活性の有無を判別する方法として CTC による染色を同時に行った。調査方法の詳細は以下のとおりである。

- (a) 1.5ml 用マイクロチューブに試料 1ml を分注し、ブロッキング試薬として 3% 牛血清アルブミン加 PBS 溶液を 10 μ l 添加し転倒混和した。
- (b) 吸活性を有する細菌検出のための蛍光試薬 CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)を 20 μ l 注入した。
- (c) O157 検出用の FITC 標識 O157 抗体液(KPL 社製)を 10 μ l 添加した。
- (d) 試料を約 30 分ほど 37°C インキュベーションした。
- (e) 染色した試料を孔径 0.2 μ m の黒色ポリカーボネートメンブレンフィルターに吸引ろ過して補足し、フィルターをスライドガラスに乗せカバーガラスで封入した。
- (f) 作成したプレパラートを蛍光顕微鏡 (Olympus BX40, BX-FLA) を用いて WIB 励起 (励起波長 460-490nm、吸収波長 515nm) にて、緑色に染色された大きさが約 1~5 μ m 程度の桿菌形状の対象物を全視野により計数した。

(2) 浄水処理による除去性能評価

(2)-1 凝集沈殿・砂ろ過による除去実験

凝集沈殿・砂ろ過による浄水処理による微生物除去性能を把握するため、図 2 のように実験を行った。

- (a) 原水 (A 浄水場原水に A 浄水場沈砂池より採取した沈砂を添加して 10 度、30 度、100 度に調整) に高濃度大腸菌液 (*E.coli* K12) を原水初期濃度が約 1.0 \times

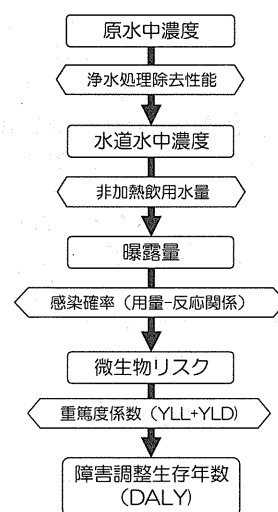


図 1 DALY 算出フロー

10⁶CFU/ml となるよう添加した。

- (b) ジャーテスト (急速攪拌(120rpm) : 1 分間、
緩速攪拌(40rpm) : 10 分間、静置 : 10 分間)
を行う。PAC 注入量については、最適注入率
(10 度 : 25mg/L、30 度 : 45mg/L (A 浄水場
での実績)、100 度 : 80mg/L (ジャーテストに
より設定)) と濁度変化に PAC 注入率が追従
できない場合を想定した低注入率 (10 度 :
10mg/L、30 度 : 25mg/L、100 度 : 45mg/L)
を設定して実験を行った。

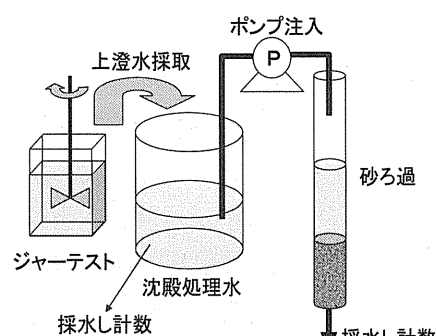


図2 浄水実験 (凝集沈殿・砂ろ過)
実験フロー

- (c) ジャーテストを行った上澄水を採水して、ポンプ注入にて砂ろ過装置 (カラム
径 : 20mm、粒径 0.6mm 均等係数 1.5 のろ過砂を用いてろ層厚 650mm とした)
へ注入しろ過速度を日量 120m として急速砂ろ過を行った。
- (d) これら実験によって得られた原水、沈殿水、ろ過水の各処理水を採水し、XM-G
寒天培地 (日水製薬) を用いて 37°C 24 時間インキュベートした後大腸菌の計数
を行い、除去性能を求めた。

(2)-2 塩素による不活化実験

塩素消毒による大腸菌の不活化性能を把握するため、以下の手順によって実験
を行った。

- (a) 振とう培養した高濃度大腸菌液を遠心分離し、PBS に再懸濁させた。
- (b) 純水に水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.5 程度になるよう pH 調整を行い、
大腸菌懸濁液を添加して実験原水を作成した。
- (c) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を初期濃度 0.5mg/L となるよう添加し、マグネテ
ィックスターラーを用いて攪拌し接触させた。
- (d) 実験水は不活化速度を求めるため 5 分、10 分、15 分ごとに採水し、TSA 培地
を用いて 37°C 24 時間インキュベートし生残した大腸菌を計数し、不活化性能を
求めた。

(3) 非加熱飲用水量

我が国で過去に行われたアンケート結果¹⁾を用いて、0.321L/日・人を用いる。

(4) 感染確率

成人を対象とした指数モデルによる用量反応関係²⁾より 5.09×10^{-3} を用いる。

(5) DALY 係数

既往の研究結果³⁾より 5.47×10^{-2} DALY/case を用いる。

C 研究結果

(1) 実験結果

(1)-1 河川原水中調査の結果

上記方法にて、採水日時が異なる4つのサンプルについて河川水中の *E.coli*O157:H7 の存在状況を調査した結果は表1のとおりである。FITC 標識された特異的に *E.coli*O157:H7 抗原に反応を示す抗体にて染色を行い図3に示すような 1~5 μm 程度の桿菌形状の細菌数を計数し平均 14.3 ~ 109 (cells/ml) という計数結果を得た。



図3 蛍光顕微鏡で観察された *E.coli*O157:H7

濁度やアンモニア態窒素の上昇に伴う *E.coli*O157:H7 の上昇は確認できなかった。また、CTCによる細胞の呼吸活性の有無については、計数された全ての *E.coli*O157:H7 細胞で CTC による蛍光発光が観察できなかったため、今回得られた *E.coli*O157:H7 の計測数は呼吸活性が無い細菌数という結果となった。

表1 河川原水における水質性状と *E.coli*O157:H7 の存在状況

	水温 ($^{\circ}\text{C}$)	濁度	アンモニア態窒素 (mg/L)	<i>E.coli</i> O157:H7 (cells/ml)
サンプル1	6.5	5	0.05	109
サンプル2	6.7	6	0.05	38.7
サンプル3	6.6	4	0.06	14.3
サンプル4	6.4	30	0.19	33

※*E.coli*O157:H7はn=3による平均値

(1)-2 凝集沈殿・砂ろ過による除去実験結果

凝集沈殿・砂ろ過による処理水濁度、大腸菌の除去率 (log 除去率) の結果は表2のようになった。

表2 凝集沈殿・砂ろ過における処理水濁度と大腸菌除去率の実験結果

原水濁度	PAC注入率 (mg/L)	処理水濁度		大腸菌除去率(log除去率)		
		沈殿後	砂ろ過後	沈殿後	砂ろ過後	全体
10度	10	7.15	0.22	0.16	0.34	0.50
	25	0.39	0.06	1.49	1.09	2.58
30度	25	0.47	0.19	1.29	0.78	2.07
	45	0.21	0.09	2.48	0.74	3.22
100度	45	0.27	0.16	2.82	0.29	3.11
	80	0.18	0.02	2.88	1.24	4.12

濁度 10 で PAC 注入量が不足している場合では凝集不良となり、沈殿水濁度が高くなり大腸菌の除去率も低い結果となった。その他の条件については、PAC の最適注入条件ではろ過出口水濁度が 0.1 度以下となり、低注入条件では 0.1 度を上回る結果となり、大腸菌の除去率は 2.07~4.12log 除去という結果が得られ、原水濁度が高いほど大腸菌の除去率が高くなる傾向が見られた。

(1)-3 塩素不活化実験の結果

塩素消毒による、大腸菌の不活化実験により、接触時間ごとの大腸菌濃度と初期濃度に対する大腸菌除去率 (log 除去率) は表3のようになった。

表3 塩素接触時間ごとの微生物生残数の推移 (pH7.6、水温 19.5°C、初期塩素濃度 0.5mg/L)

接触時間 (min)	0	5	10	15	60
大腸菌濃度 (CFU/ml)	7.27×10^6	1.34×10^6	5.07×10^5	2.18×10^5	2.16 (参考値)
初期濃度に対する大腸菌除去率(log除去率)	—	0.73	1.16	1.52	6.53 (参考値)

実験条件: 原水pH7.6、水温19.5°C、初期塩素濃度0.5mg/L

接触時間 15 分までは実験により大腸菌濃度を観測しデータを得たが、接触時間 60 分については、得られた実験結果から推測した参考値である。今回得られた大腸菌濃度の実験結果を用いて、大腸菌の不活化による減衰の傾向を Chick モデルに当てはめて算出した。Chick モデルは以下の式で表現される。

$$N = N_0 e^{-kt}$$

N: その時に存在する微生物濃度

N_0 : t=0 時の微生物濃度

k: 速度定数

t: 時間

今回得られた実験結果を用いてこの Chick のモデルに当てはめると図4のように表現される。

この関係式から、塩素接触時間 1 時間後 (塩素注入から浄水池

出口の標準滞留時間を想定) の塩素消毒の不活化性能として 6.53log という参考値を得た。

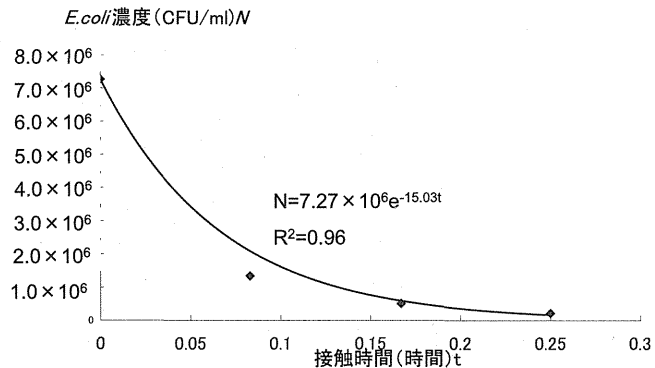


図4 Chick モデルに当てはめた塩素接触時間と E.coli 濃度の関係

(2) リスク算定結果

上記実験結果に対して障害調整生存年数 DALY を指標とした微生物リスクを算出した。算出結果は表4のとおりである。

表4 濁度・PAC 注入率別の年間健康影響度 (DALY) の算出結果

	10度		30度		100度	
	10	25	25	45	45	80
原水中濃度(cells/L)	48750					
浄水除去率(log10)	0.5	2.58	2.07	3.22	3.11	4.12
塩素不活化率(log10)	6.53					
水道水中濃度(cells/L)	4.54×10^{-3}	3.78×10^{-5}	1.22×10^{-4}	8.67×10^{-6}	1.12×10^{-5}	1.09×10^{-6}
曝露量/日	1.46×10^{-3}	1.21×10^{-5}	3.93×10^{-5}	2.78×10^{-6}	3.58×10^{-6}	3.50×10^{-7}
感染確率	5.09×10^{-3}					
感染確率(1日)	7.43×10^{-6}	6.18×10^{-8}	2.00×10^{-7}	1.42×10^{-8}	1.82×10^{-8}	1.78×10^{-9}
感染確率(1年)	2.71×10^{-3}	2.26×10^{-5}	7.30×10^{-5}	5.17×10^{-6}	6.66×10^{-6}	6.51×10^{-7}
1感染当りのDALY	5.47×10^{-2}					
1人当たり年間健康影響度	1.48×10^{-4}	1.23×10^{-6}	3.99×10^{-6}	2.83×10^{-7}	3.64×10^{-7}	3.56×10^{-8}

D 考察

本研究で算出した障害調整生存年数 DALY を見てみると、原水濁度が高いほど DALY の値が低くなる傾向が見られ、PAC 注入量の違いによっても除去性能に約 1 log 程度の違いが現れ DALY の値に大きな影響が現れた。大腸菌は原水中の濁質成分に捕捉されるような形で除去されると考えられるため、微生物濃度が濁度によらず一定である場合には濁度が高い時ほど微生物除去率が高くなることで微生物リスクが低下する傾向があり、また、低濁度時の原水に高濃度汚染などが発生した場合には微生物リスクに対する注意が必要である。今回の試算結果で得られた水道水中濃度を見てみると、どの条件でも通常の大腸菌検出試験を行っている場合では大腸菌は検出されない結果が得られると考えられるが、障害調整生存年数 DALY を指標とした場合、WHO の飲料水水質ガイドラインで示されている病原微生物による障害調整生存年数 DALY の目標値 1.0×10^{-6} DALY を上回る結果が低濁度で PAC 注入量が低い場合などに現れた。

E まとめ

本研究では *E.coli*O157:H7 を対象として障害調整生存年数 DALY を指標として微生物リスク評価を行い、原水濁度によらず微生物濃度が同等である場合には原水濁度が高い時ほどリスクが低下する傾向が見られた。また、濁度変化等に注視して浄水運転管理を行い、塩素消毒を徹底することで微生物リスクの観点からも水道水の安全性が保たれることが確認された。しかしながら、本研究で行った検討内容でも今後も熟慮する項目があり、河川原水中の *E.coli*O157:H7 の存在実態調査や観察された *E.coli*O157:H7 の感染能力の確認、濁度や凝集剤注入量、塩素濃度などより細密な実験条件設定による除去性能データの蓄積を行い、より信頼性のあるリスク評価を行うことが今後の検討課題として挙げられる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

藤村壮、島崎大、秋葉道宏 (2013) 水道水における腸管出血性大腸菌 (*E. coli* O157:H7) を対称とした微生物リスクの試算 第 64 回全国水道研究発表会, pp. 642-643.

H 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- 1) 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活科学部生活工学研究会
- 2) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands RIVM report 257851003/2001 p81
- 3) Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality RIVM report 734301022/2003 p30-32

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 25 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(*Pseudomonas* 菌)の処理耐性等の評価を一度に行う手法として昨年度まで検討してきた分子生物学的手法である T-RFLP 法の定量的応用手法について、塩素消毒処理における不活化に適用できるか検討した。結果として配管中の残留塩素濃度レベルの処理においては遺伝子レベルの損傷には至らないことから、遺伝子検出法である T-RFLP の適用は難しいことがわかった。不活化処理前後の試料に培養工程を入れることによって、培養後濃度を定量的 T-RFLP によって定量するなどの前処理を導入すれば適用は可能ではないかと考えられる。

次にバイオフィームを形成した従属栄養細菌(*Pseudomonas* 菌)に対し、異なる水流(3段階を設定)による剥離強度によってバイオフィームを分類し、各フィルム層への消毒処理の影響を比較検討した。その結果、バイオフィームになることにより浮遊状態よりは不活化効果が低下することがわかった。さらに異なる水流下で残存したバイオフィームへの処理効果を比較したところ、0.1 m/s 以下の水流によってバイオフィームの 90%程度が剥離されるが、残存するバイオフィームの層厚は深部まで塩素が浸透しにくい状況であり、全体としての塩素耐性が最も高かった。一方、0.4 m/s 以上の水流では、99~99.9%程度が剥離され、残存バイオフィームは薄くなるが、その場合は深部まで塩素が浸透する状況であり塩素耐性が低くなっていた。以上のことから水流による剥離によってバイオフィーム状細菌への塩素処理の効果が変わることが確認できた。

病原微生物に対しては、指標細菌である大腸菌 2 種類を用いて、紫外線消毒処理での 210~300 nm における照射波長毎の不活化効果および光回復効果の相違を検討した結果、254 nm より長波長光では、いずれの大腸菌においても光回復が起こり、254 nm と同様の不活化機構が働いていると考えられたが、より短波長光において、一方の大腸菌において光回復が起こらない不活化機構が生じていることが示唆され、回復効果の少ない紫外線消毒方法の可能性が示唆された。

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。本研究では昨年度まで配水管中で増殖が問題となる従属栄養細菌を対象とし、培養検出が不可能な細菌を定量的に把握する方法として T-RFLP 法を応用する手法について、濃度既知のマーカー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結果、*Pseudomonas* 菌に対して T-RFLP 法の定量的測定方法が可能であると示唆された。そこで本年度は、この定量的測定方法が、配管中の残留塩素濃度レベルの塩素処理において、濃度変化の検出に適用できるかを検討し、消毒処理評価への適用可能かを検討した。

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。アニュラーリアクターを用いて管内水流を模擬し、その剪断力による剥離によって生じる残存バイオフィームにおける消毒処理耐性を検討した。

紫外線処理として、最も一般的に用いられる紫外線波長は 253.7 nm の単一光であり、この波長については多種の微生物に対する不活化効果および回復効果などは、詳しく調べられてきた。この波長光以外の検討事例としては、多波長型光源である中圧紫外線ランプを用いたものがある。このランプは 200~500 nm で幅広い照射波長域を持っており、この光源における不活化効果や回復効果は検討事例が多い。しかし多波長光を同時に照射させた場合の複合効果を見ているだけであり、波長毎にこれらの効果に関して詳細に検討した例は非常に少ない。そこで本研究では、紫外光を波長毎に照射できる分光照射器を用いることによって、大腸菌の不活化効果と処理後の光回復効果を詳しく検討することとした。この検討結果によって回復効果の少ない消毒方法の提案に結びつけると考えた。

B. 研究方法

今年度は T-RFLP 法の定量的検出方法の塩素処理への適用および生物膜状の従属栄養細菌への塩素処理効果の検討のいずれについても単離株 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) を用いて検討した。紫外線処理による照射波長光の影響の相違についての検討においては、2 種類の大腸菌株 (NBRC13965 および NBRC3301) を用いて行った。

B.1 T-RFLP 法の定量的検出方法の不活化評価への適用について

本方法で用いた T-RFLP の定量的検出方法は、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ことを利用した方法である。本年度は、塩素処理前後の試料に対して、この定量的検出方法を適用し、濃度変化を評価できるのかについて検討した。

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 10^6 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。

この試料に対し塩素処理を実行した。短い接触時間での塩素処理実験の再現性を確保するため CQF (Continuous Quenching Flow) システムを用いた。Fig.B.1 にその概要図を示す。

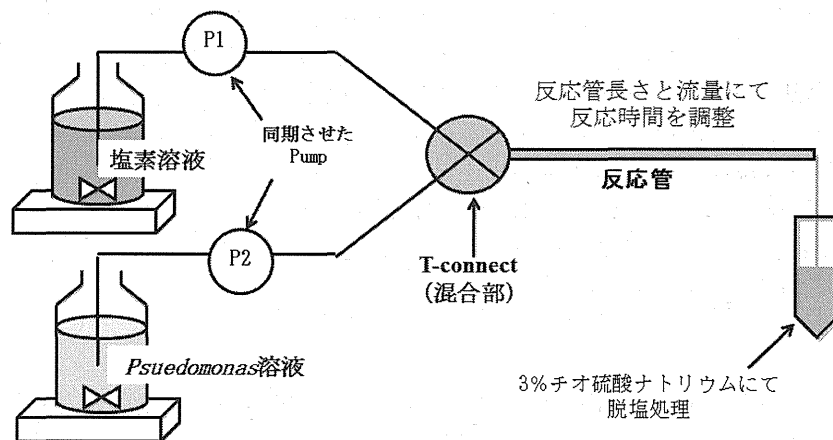


Fig. B.1 CQF システムによる塩素処理装置の概要

塩素濃度が混合後に約 0.5~1.5 mg/L となる様に塩素溶液を調節した。実験毎に反応管出口での塩素濃度を測定した。また管内の滞留時間は反応管長さとして 15 秒に固定した。反応管出口より流出した反応液を予め 3%チオ硫酸ナトリウムを入れておいた採水管にて採取し、採取と同時に塩素反応を停止させることにより反応管内での滞留時間を反応時間として計算した。

1 つの実験条件にて 3 回繰り返し行ったが、塩素濃度が変化するため、実験の度に CT 値は若干変動した。2 回に分けて、実験条件を設定した。

採水した試料中の *P. aeruginosa* 濃度を培養培地による濃度測定法と、T-RFLP の定量的検出法にて測定した。T-RFLP の定量的検出に用いる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 であり、塩素処理前後の *P. aeruginosa* 溶液への投入後濃度は約 10^5 CFU/mL であった。

以下に T-RFLP 法の詳細を示す。

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