

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 μL を PCR Master Mix 50 μL 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 $^{\circ}\text{C}$:30 秒 \rightarrow 52 $^{\circ}\text{C}$:30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$:1 分) \times 30 サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$:10 分とし、反応終了後の庫内は 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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 $^{\circ}\text{C}$, 6 時間)。この消化産物 2 μL に Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) 17 μL , サイズマーカー GeneScan 1200LIZ 1 μL を加え、95 $^{\circ}\text{C}$ 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。

実験の流れを Fig. B.2 に示した。

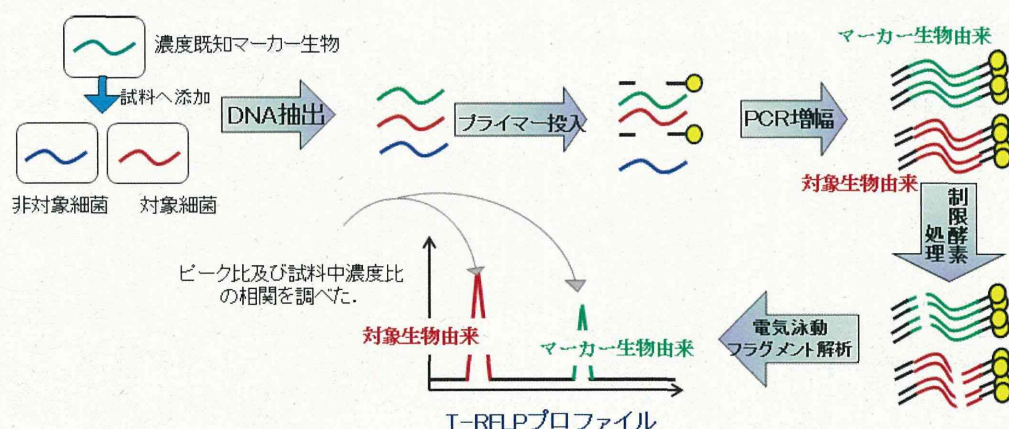


Fig. B.2 定量的 T-RFLP の測定法の流れ。

B.2 *P.aeruginosa* 生物膜 (バイオフィルム) 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) バイオフィルム形成方法および形成細菌量測定方法

配水管の枝管材料である PVC 片をバイオフィルム形成材料とした。滅菌した栄養液体培地 TSB (Tryptic Soy Broth) に *P. aeruginosa* を接種し 30 $^{\circ}\text{C}$ 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 PVC 片 (20 mm×30 mm) 必要枚数投入し, さらに 25°C で 1 時間培養し菌を付着させた. その後, バクテリアが付着した 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 時間培養してバイオフィルムを形成させた.

形成したバイオフィルム中の *P. aeruginosa* 量は, バイオフィルム形成 PVC 片を 20 mL PBS を封入した遠心管に移動し 10,832 g×10 分間の遠心分離により, PVC ディスク上の付着菌を全て剥離し PBS 液相に移した. PBS 液相に移した細菌を, 栄養寒天培地 TSA を用いた希釈平板法にて測定した. 培養条件は 37°C で 18~24 時間とした. 30~300 のコロニーが得られた希釈倍率のペトリ皿を採用し平均値を濃度とした. 単位は CFU(colony forming unit)/mL とした.

3) アニュラーリアクターでの水流による剥離

上記 2)にて作成したバイオフィルム形成片をアニュラーリアクター (BioSurface Technologies corp.) に設置し, 回転数 10, 50, 100 rpm にて回転させた. 回転継続時間を 1, 10, 30 分とし, それぞれの継続時間後に形成片を取り出して, 残存バイオフィルム中の *P. aeruginosa* 量を上述の方法にて測定し, 各回転数における残存バイオフィルム量の推移を測定した.

用いたアニュラーリアクターにおける各回転数において相当する流速と設定継続時間を表 B.1 にまとめた.

表 B.1 アニュラーリアクターによるバイオフィルム剥離実験の実験条件

| 回転数 (rpm) | 流速 (m/s) | 継続時間 (min) |
|-----------|----------|--------------|
| 10 | 0.089 | 0, 1, 10, 30 |
| 50 | 0.44 | 0, 1, 10, 30 |
| 100 | 0.89 | 0, 1, 10, 30 |

4) 残存 *P. aeruginosa* バイオフィルムに対する塩素処理による不活化実験

アニュラーリアクターにバイオフィルム形成片を設置し, いずれの回転数においても回転継続時間 10 分に固定し, 水流による剥離を行わせた. バイオフィルムが残存する PVC 片を取り出し, 用意した塩素溶液に投入し塩素に接触させた. 塩素溶液は, 滅菌済みリン酸緩衝液 200 mL に, 1 分後の残留遊離塩素濃度が 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用意した. 塩素濃度は DPD 法で測定した. アニュラーリアクターから取り出した PVC 片を, 上記の塩素溶液 10 mL に投入して所定時間静置した. 溶液は攪拌子にて攪拌し, 均一に塩素接触が起こる様にした. 塩素処理前後の PVC 片上のバイオフィルム中の生残 *P. aeruginosa* 濃度を上述 2)の方法にて測定した.

実験の流れを Fig. B.3 に示す.

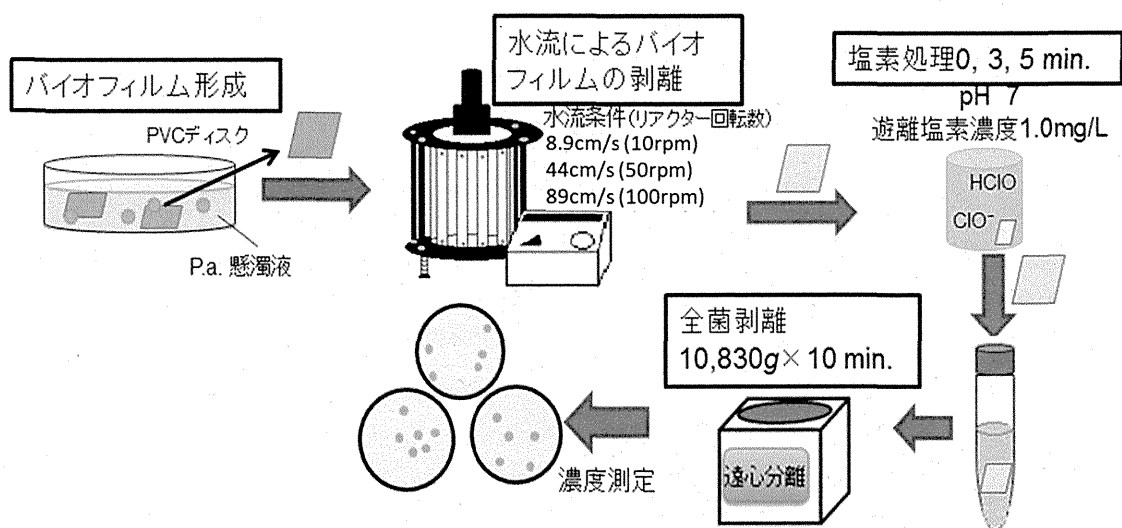


Fig.
B.3
アニ

ニュラーリアクターによるバイオフィルムの剥離と塩素処理実験の流れ

B.3 異なる紫外線波長光における不活化効果と回復能への影響の検討

大腸菌は NBRC13965 と NBRC3301 の 2 種とした。各株は、栄養寒天培地 (Tryptic Soy Agar) にて 37°C 下でコロニーを形成させ、適量を釣菌し、PBS 溶液に懸濁させて、対象試料とした。この時各大腸菌株の濃度は $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL となった。

各試料を 1 cm×1 cm の石英セルに 2 mL 投入し、小型分光器 (島津製作所製, SPG-120UV) から出射する各波長光を照射した。石英セル内の試料は小型のマグネチック攪拌子を用いて実験中は絶えず攪拌した。照射した波長光は 210, 230, 254, 270, 290 nm とした。

各照射波長光の照射量は、化学線量計 (KI/KI O₃ 溶液) を用いて測定したが、照射量算定に用いた各波長の量子収率は既報 1) を参考にした。

各照射波長光によって 99~99.9% 程度不活化させた大腸菌試料に対し、蛍光灯 (東芝製, 6W) による可視光照射を石英セルの両透過面から行った。石英セルと蛍光灯の距離は 6 mm とした。可視光照射時は絶えず送風機による空冷にて定温を維持した。照射時間毎に試料から 0.1 mL ずつ採取し濃度測定を行った。

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、異なる照射波長光による不活化効果の違いについては C.3 に示す。

C.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

各 3 回ずつ合計 6 回の実験結果について表 C.1 にまとめた。各 CT 値は、反応管出口にて実測した塩素濃度と接触時間 15 秒 (= 0.25 min.) として算出した。生残率は各処理後の濃度を処理前の濃度で除して求め、対数値にて表記した。

表 C.1 各混合溶液の各蛍光ピーク値とピーク比

| サンプル | CT 値 (mg·min./L) | <i>P.aeruginosa</i> 濃度 (CFU mL ⁻¹) (培養測定) | <i>P.aeruginosa</i> log (生残率) | T-RFLP 定量用に投入した <i>E.coli</i> 濃度 (CFU/mL) |
|---------------|---------------------|--|----------------------------------|--|
| 実験 1 回目 | | | | |
| 処理前 (A-blank) | | 5.3×10^6 | | |
| 処理後-1 (A-1) | 0.21 | 1.6×10^5 | -1.52 | 4.4×10^5 |
| 処理後-2 (A-2) | 0.29 | 2.4×10^4 | -2.34 | |
| 処理後-3 (A-3) | 0.30 | 1.7×10^4 | -2.49 | |
| 実験 2 回目 | | | | |
| 処理前 (B-blank) | | 3.3×10^6 | | |
| 処理後-1 (B-1) | 0.13 | 1.8×10^6 | -0.26 | 3.6×10^5 |
| 処理後-2 (B-2) | 0.20 | 1.1×10^6 | -0.48 | |
| 処理後-3 (B-3) | 0.28 | 3.7×10^5 | -0.95 | |

また処理前および処理後の試料について、培養測定法にて測定した結果と T-RFLP の定量的適用法にて求めた濃度の結果を Fig. C.1 に示した。

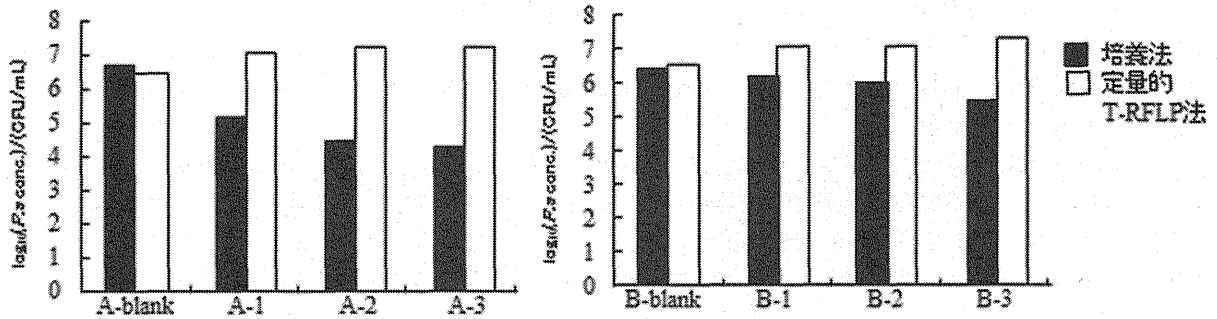


Fig. C.1 不活化実験前後における *P. aeruginosa* 濃度の培養法および定量的 T-RFLP 法による結果

C.2 *P.aeruginosa* 生物膜 (バイオフィーム) 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, PVC 片に形成した *P. aeruginosa* のバイオフィームをアニュラーリアクターにおける各水流条件にて剥離させ, 残存したバイオフィームに対する塩素処理の効果を検討した.

1) アニュラーリアクターでの水流による剥離

PVC 片にて形成させたバイオフィームについて, アニュラーリアクターにて各流速下で運転した際の, 残存バイオフィーム中の *P. aeruginosa* 量の変化を Fig. C.2 に示した. 図に示されるとおり, 回転運転を開始して1分後には, いずれの運転条件においても, ほぼ定常状態に達していることがわかる.

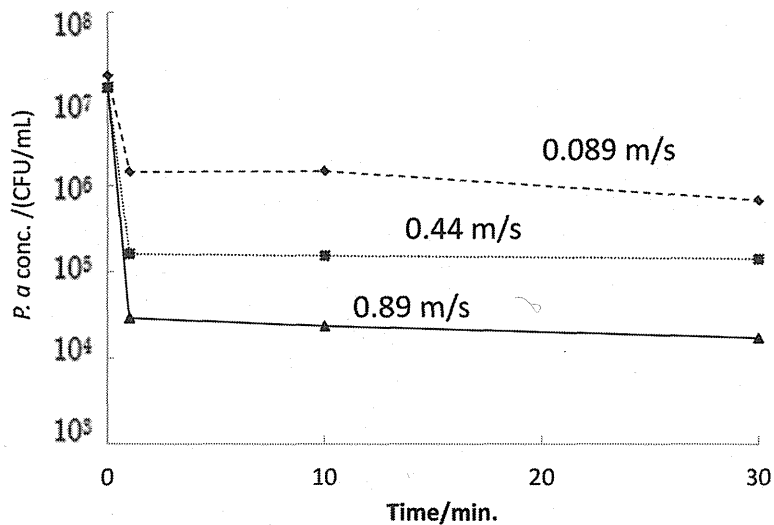


Fig. C.2 各流速下における残存バイオフィーム中の *P. aeruginosa* 量の経時変化

2) 残存 *P. aeruginosa* バイオフィームに対する塩素処理による不活化実験

各流速下にて残存したバイオフィームに対する塩素処理を行った結果を Fig.C.3 に示す.

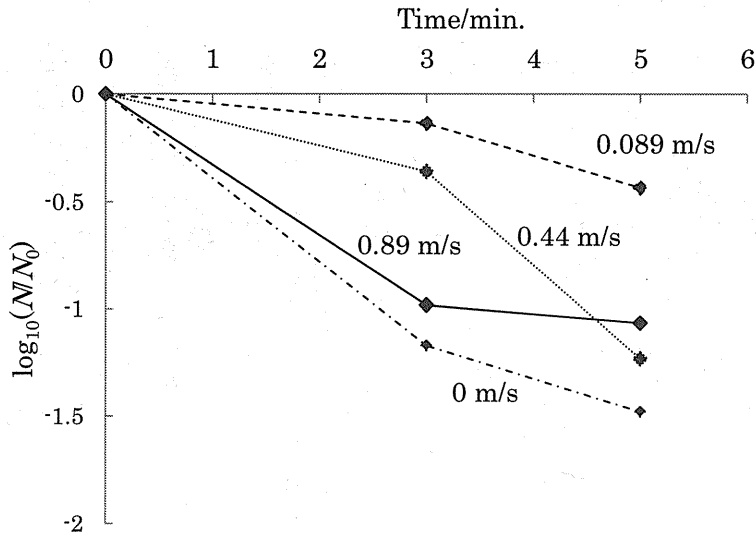


Fig. C.3 各流速下における剥離後の残存バイオフィルムにおける塩素処理の効果

流速 0 m/s は、形成させて剥離させなかったバイオフィルムを意味する。この状態での不活化効果が最も高かった。一方、非常に低い流速下 (0.089 m/s) による剥離にて残存したバイオフィルムの不活化効果が最も低くなっていた。

C.3 異なる紫外線波長光における不活化効果と回復能への影響の検討

Fig. C.4 に大腸菌の NBRC13965 株と NBRC3301 株の照射波長毎の不活化効果を 254 nm 光の効果との相対比で示した。

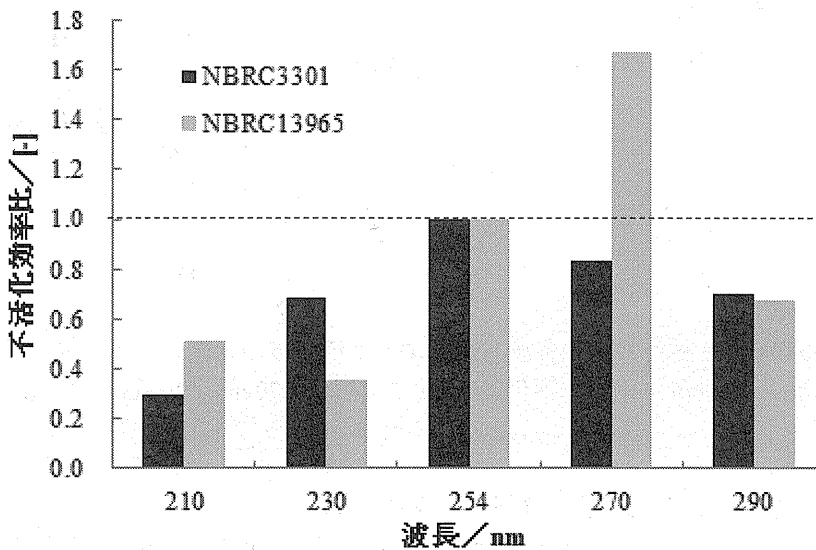


Fig. C.4 波長毎の不活化効果比 (254 nm との相対比)

Fig. C.5 および C.6 に、それぞれの大腸菌株における可視光照射下での濃度変化を示す。これらの図を比較すると、NBRC3301 株は光回復効果が高い株であることがわかる

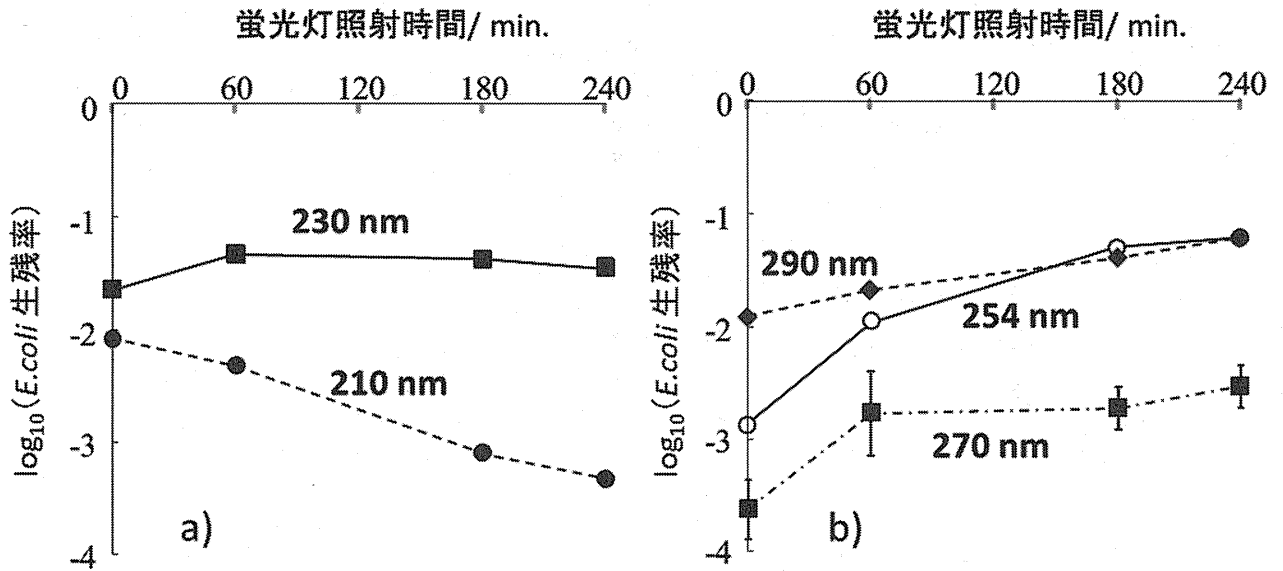


Fig. C.5 NBRC13965 株における各波長光による不活化後の蛍光灯照射下での濃度変化
 a) 210 nm と 230 nm による不活化後, b) 254 nm, 270 nm, 290 nm による不活化後

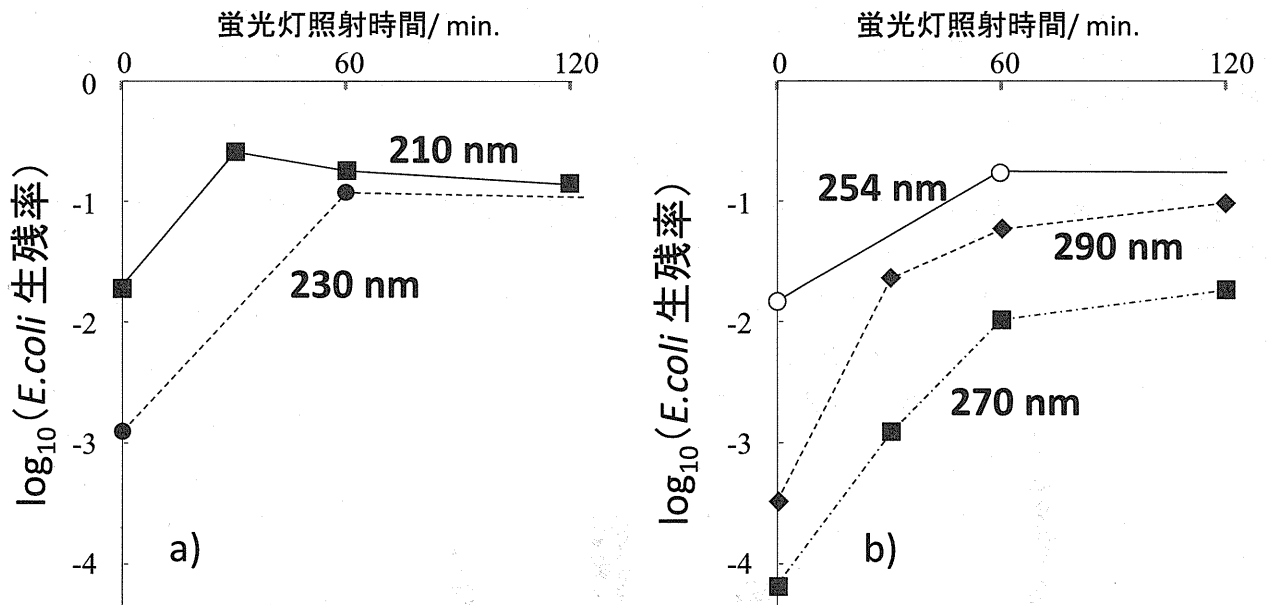


Fig. C.6 NBRC3301 株における各波長光による不活化後の蛍光灯照射下での濃度変化
 a) 210 nm と 230 nm による不活化後, b) 254 nm, 270 nm, 290 nm による不活化後

D. 考察

D.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

Fig. C.1 の結果からわかることは、塩素処理前の試料に対しては定量的 T-RFLP 法による推定濃度は培養法による濃度値と合致しているものの、塩素処理を行った試料に対しては合致しないことである。また塩素処理を行った試料については定量的 T-RFLP 法による推定濃度は、塩素処理前の推定濃度に比べて一様に高い値となっていた。

Fig. D.1 に今回の実験結果と昨年度の実験結果を合わせた図を示す。

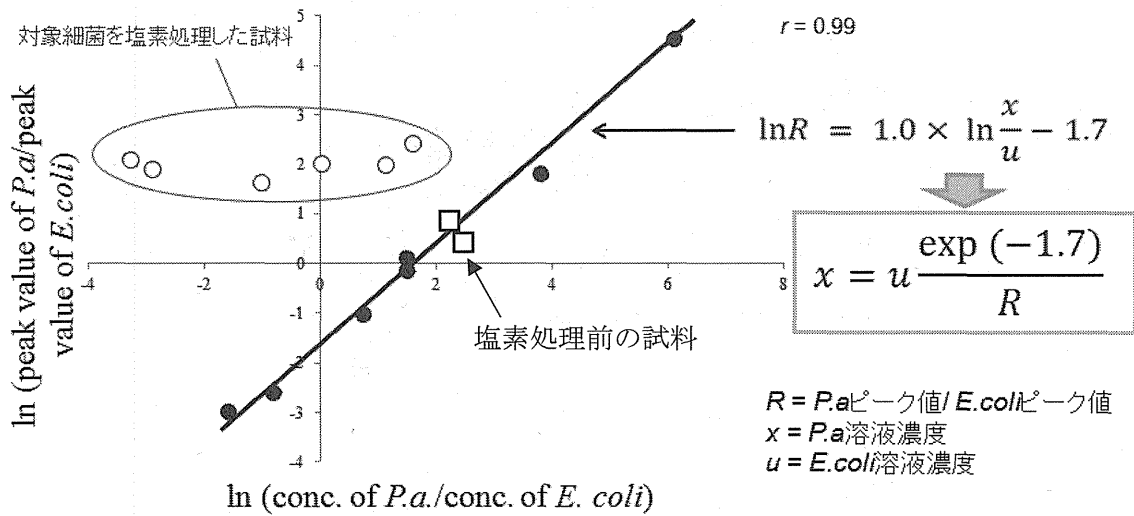


Fig. D.1 対象微生物とマーカーについての定量的 T-RFLP におけるピーク比と培養法による濃度比
 ●: 昨年度データ, ○: 塩素処理後のデータ (今年度), □: 塩素処理前のデータ (今年度)

対象微生物(*P. aeruginosa*)濃度およびマーカー生物 (*E. coli*) 濃度の組合せは昨年度と今年度では異なる条件であったが、図に示されるように、塩素処理前データは、昨年度データから得られる相関に合致していたことから、図中の相関式が違う条件下でも成立することが確認できた。

塩素処理後の試料に関しては、図中の相関式からは外れる結果になっていることがわかる。Fig. C.1に見られる様に、塩素処理前試料に比べて生残濃度が低くなっているにも関わらず T-RFLP ピークが高く出ているのは、塩素処理によって対象微生物(*P. aeruginosa*)の細胞膜に損傷が生じており、DNA 抽出過程における DNA 抽出率が上がったためと考えられる。

いずれにしても塩素処理後の試料においては、定量的 T-RFLP 法によって残存 *P. aeruginosa* 濃度を定量することは困難であることがわかった。塩素処理などの不活化処理後の試料に、生物の培養過程を挟み残存生物数の違いを判別し易い工夫をする必要がある。

D.2. *P. aeruginosa* 生物膜 (バイオフィーム) の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

Fig. C. 3 に示される様に、0 m/s の場合は、形成させたバイオフィームに対する塩素処理の効果を示したものである。Fig. C.2 に示す様に、0.089 m/s という低い流速下によって剥離する菌量は、0 m/s の場合の 90%にあたるのがわかる。従って、低流速でも剥離するような非常に付着強度の弱い菌が全体の 90%を占めており、この上層の不活化率が全体の不活化率を示すことになる。Fig.C.3 に示される様に、0 m/s の場合が最も不活化効果が高かったのは、この剥離しやすい上層のバイオフィームに対しては、塩素の浸透が起りやすく、不活化効果が現れやすかったためと考えられる。

Fig. D.2 に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を示した。図中の TSA が示すデータが、今回の実験方法と同じ測定条件のものである。今回の塩素処理は遊離塩素 1.0 mg/L 条件下で行ったものであり、Fig.D.2 における同条件下での不活化効果と今回の 0 m/s の場合比較すると、今回は不活化効果が低くなっている。従って、剥離しやすい上層のバイオフィームにおいては塩素の浸透が起りやすいといえども、浮遊状態よりは塩素処理の効果が若干低く抑えられる効果があると考えられた。

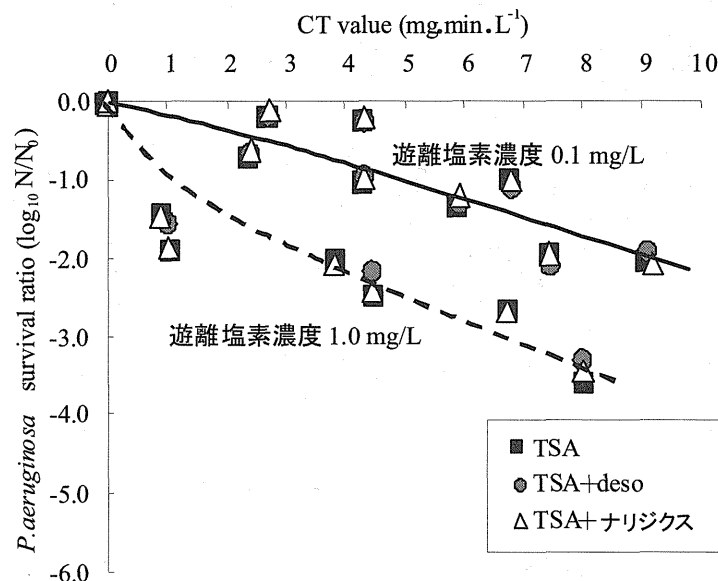


Fig. D.2 塩素投入後の浮遊状態の *P. aeruginosa* の濃度変化 (pH 7)
(平成 21 年度厚労科研分担研究報告書より)

0.089 m/s の流速下では、Fig.C.2 の結果から PVC 上に残存している菌は剥離前の状態の 10%程度であり、0.44 m/s の流速下で残存する菌が 1%程度であるのに対し、10 倍ほど多いことがわかる。この条件での残存バイオフィームでの不活化効果が最も低いことが示されているが、これは、このバイオフィーム状態においては塩素が深部にまで浸透せず、塩素の効果が抑制されることになったバイオフィーム層の残存率が高く、かつバイオフィーム全体に占める割合も高いことから、全体の不活化効果が低くなったと考えられた。

さらに 0.44 m/s, 0.89 m/s と相対的に大きな流速下では、せん弾力が高くなり剥離効果が高いため、残存菌が 10 分の 1, 100 分の 1 と少なくなるに従って、フィルム層が薄くなり深部にまで塩素が浸透しやすく、全体の不活化効果が高まったと考えられた。

Fig. D.3 に各バイオフィーム層に対する塩素処理の効果を模式的に表した図を示す。

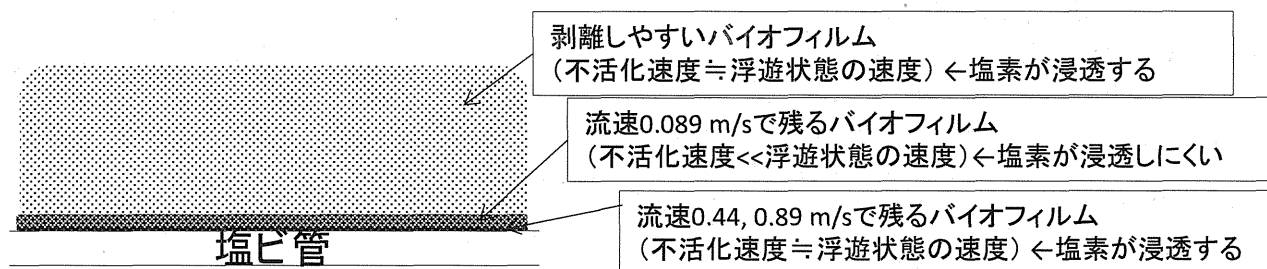


Fig. D.3 各バイオフィーム層の塩素処理耐性からみた特徴

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

Fig.C.4 に示したように不活化効果に対しては、大腸菌の NBRC13965 株では 270 nm が最も高い効果となっており、230 nm が低くなっている。一方大腸菌の NBRC3301 株では 254 nm が最も高い効果であり、210 nm において効果が低くなっている。同じ大腸菌でも株により波長毎の感受性の相対比が異なっていることがわかった。不活化効果が核酸 (DNA) の吸収スペクトルの相対比と似た傾向であるのは 13965 株である。従って 3301 株においては核酸の吸収だけでは説明できない不活化機構が働いている可能性も考えられる。

Fig. C.5 と C.6 を比較すると、大腸菌の NBRC3301 株はいずれにおいても光回復効果が高い株であることがわかる。波長光毎に見てみると、254 nm 以上の波長光 (254, 270, 290 nm) においては、3301 株でも 13965 株においても光回復効果が見られた。従って 270 nm と 290 nm による不活化メカニズムは、これまで解明されてきた 254 nm 光による不活化機構と同じであると推定された。

一方、短い波長光における傾向は株によって異なっていた。すなわち 210 nm および 230 nm の波長光においては NBRC3301 株では光回復現象が明確に見られたが、NBRC13965 株では見られなかった。従って

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

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 25 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

研究要旨

残留塩素が低減化した時に、実際の水道水の生物学的安定性がどのように変容するのかを明らかにすることは重要な課題である。そこで本研究では、アニュラーリアクターを用いて水道配水系を模擬し、残留塩素の有無が細菌再増殖に及ぼす影響を調査した。残留塩素が 0.2mg/L 程度保持されていても、クーポン上の全菌数は 10^4 cells/cm² 程度まで増加することが明らかになった。一方、残留塩素を中和すると、クーポン上の全菌数は 10^5 cells/cm² 程度まで急激に増加した。定常状態における収支から、バルク水及びクーポン上の比増殖速度を求めたところ、それぞれ 14.2 (1/day)、0.14 (1/day) と、バルク水中の比増殖速度の方が大きかった。また、全菌の分布も、バルク水中に 71%、クーポン上に 29% とバルク水中の細菌再増殖の寄与の方が大きいことも推察された。クーポン上に形成された細菌群集構造を解析したところ、 α -*Proteobacteria* のや β -*Proteobacteria* が主に優占していた。

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、アニュラーリアクターを用いて実際の水道配水系を模擬して、残留塩素の有無が細菌再増殖に与える影響を評価した。特に、残留塩素が消失した場合に、どのような細菌群がどのように再増殖するのかについて詳細に解析した。

B. 研究方法

1. アニュラーリアクターの運転条件

図1にアニュラーリアクターの構成を示す。アニュラーリアクターは2連で運転し、ポリカーボネート製のクーポンを用いた。回転速度は15rpmとした。この回転速度は、直径10cmの管路における約10cm/秒の流水に相当するせん断応力をクーポンに与える。原水は、東京大学実験室の水道水（水温：10～12℃、遊離残留塩素：0.2～0.3mg/L）を用いた。Run 1では、残留塩素を中和せずに直接アニュラーリアクターに通水した。Run 2ではチオ硫酸ナトリウムで事前に残留塩素を中和した後にアニュラーリアクターに通水した。アニュラーリアクター内の平均的な滞留時間は100分となるように、通水流量を10mL/分に設定し、Run 1、Run 2ともに約1か月運転した。

2. サンプルング及び水質分析

アニュラーリアクターの流入水、流出水、クーポンを定期的にサンプルングした。クーポン表面で増殖した細菌は、滅菌済みスクレーパーで物理的に回収し、リン酸緩衝液中で懸濁し、超音波処理（5W, 2分間）して分散させた。

3. 水質

流入水・流出水の水温、遊離残留塩素濃度、同化性有機炭素濃度（Assimilable Organic Carbon:AOC）を測定した。AOCの測定は、上水試験方法に従い、*Pseudomonas fluorescens* P17株、*Aquaspirillum* sp. NOX株を試料に同時に添加し、最大増殖量を酢酸当量の収率（P17： 4.1×10^6 CFU/ μgC 、NOX： 1.2×10^7 CFU/ μgC ）を用いて炭素濃度に換算した。

4. 細菌現存量

細菌現存量は、フローサイトメーター（Accuri C6、BD）を用いて分析した。全菌数は、SYBR Green Iで染色した。生菌数/死菌数は膜損傷性に基づいて定義し、SYBR Green IとPropidium Iodideで二重染色した。

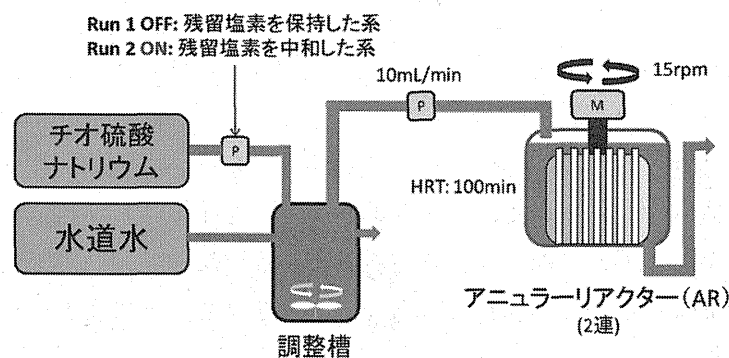


図1 アニュラーリアクターの構成

5. 細菌群集構造

クーポン上で再増殖する細菌群集の構造を、16S rRNA 遺伝子を標的とした Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) とアンプリコンシーケンシングで評価した。

C. 研究結果

1. 残留塩素を保持した系(Run 1)

(1) 水質

アニュラーリアクター流出水中の遊離残留塩素濃度は、運転期間中を通して 0.18～0.24mg/L を示した。特に外部から残留塩素を追加することなく、リアクター内の残留塩素を保持することができた。培養 1 か月後の流入水・流出水中の AOC はともに 36 $\mu\text{gC/L}$ であり、差は見られなかった。

(2) 細菌現存量

図 2 に流入水、流出水中の全菌数濃度の結果を、図 3 にクーポン上の全菌数と生菌数の結果を示す。流入水中の全菌数は、運転期間を通じて定量下限未満であったが、流出水中の全菌数は、運転開始 1 週間後より 10^4 cells/mL 程度に増加し、そのレベルを維持した。一方、クーポン上の全菌数は運転開始 2 週間後にかけて増加し、最終的に 10^4 cells/cm² オーダーで安定化した。しかし、生菌数は運転期間を通じて定量下限未満であった。細菌群集構造については、クーポン上の付着量が少ないために分析することができなかった。

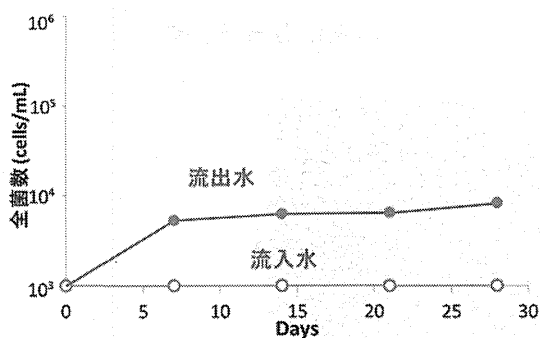


図 2 流入水・流出水中の全菌数
(Run 1: 残留塩素を保持)

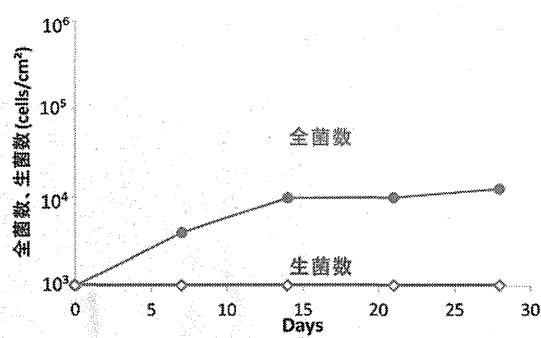


図 3 クーポン上の全菌数・生菌数
(Run 1: 残留塩素を保持)

2. 残留塩素を中和した系(Run 2)

(1) 水質

アニュラーリアクターに流入する前にチオ硫酸ナトリウムで残留塩素を中和した以外は、同一の条件でアニュラーリアクターを運転した。培養 1 か月後の流入水・流出水中の AOC は、43 $\mu\text{gC/L}$ から 20 $\mu\text{gC/L}$ に減少しており、アニュラーリアクター内で AOC が消費されていることが推察された。P17、NOX それぞれの寄与を個別に評価すると、主に AOC-NOX が大きく減少していることが明らかになった。

(2) 細菌現存量

図4に流入水、流出水中の全菌数濃度の結果を、図5にクーポン上の全菌数と生菌数の結果を示す。流入水中の全菌数は、運転期間を通じてほぼ定量下限未満であることが多かったが、流出水中の全菌数については、運転開始1日後には 10^4 cells/ml オーダーに急増し、最終的には 10^5 cells/mL オーダーに達した。一方、クーポン上の全菌数も運転開始直後から増加傾向を示し、約2週間後以降 10^5 cells/cm² オーダーで安定化した。Run 1とは異なり、全菌数の20~70%が生菌数として定着していることが確認された。運転開始12日後のクーポンをSYBR Green I/PIで二重染色し、蛍光水深レンズで非破壊的に観察した結果を図6に示す。観察の結果、細菌群はいわゆる生物膜状にクーポンに付着しているのではなく、分散した状態で付着していることが明らかになった。

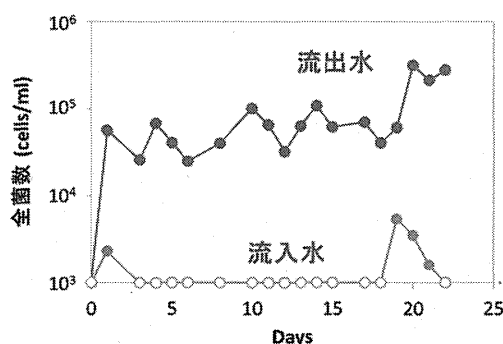


図4 流入水・流出水中の全菌数
(Run 2: 残留塩素を中和)

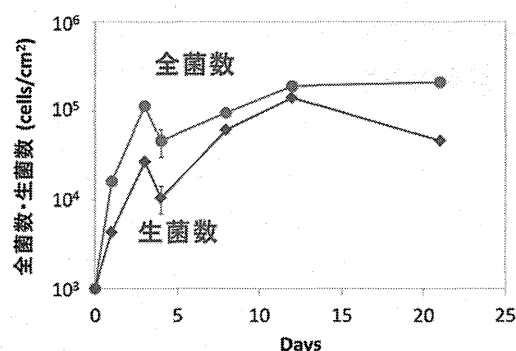


図5 クーポン上の全菌数・生菌数
(Run 2: 残留塩素を中和)

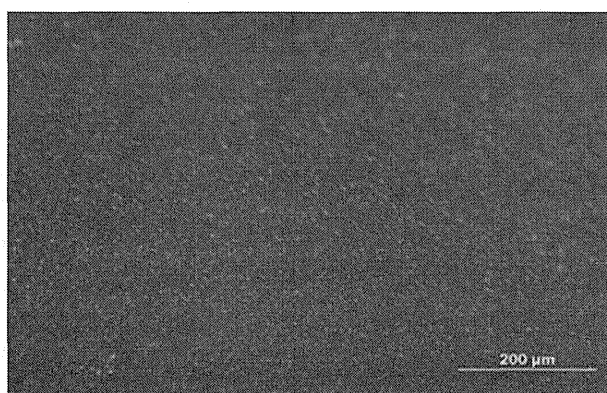


図6 クーポン表面に付着する細菌群
(運転開始12日後)

(3) 比増殖速度の推定

流入水、流出水中の全菌数、クーポン上の全菌数のデータをもとに、バルク水中、クーポン上で再増殖する細菌群の比増殖速度の推定を試みた。バルク水中、クーポン上での細菌現存量の収支式を(1)式、(2)式に示す。なお、バルク水からクーポンへの細菌の付着につ

いては、生物膜形成のごく初期のみに影響するという既存の知見からここでは考慮しなかった^{1,2)}。

$$\text{バルク水中の収支式} \quad V \frac{dX}{dt} = Q(X_{in} - X) + \mu_{bulk}XV + \beta X_b A \quad (1)$$

$$\text{クーポン上の収支式} \quad A \frac{dX_b}{dt} = \mu_{biofilm}X_b A - \beta X_b A \quad (2)$$

ここで

V : バルク水容積 (mL)

Q : 流量 (mL/day)

X : バルク水中の全菌数 (cells/mL)

μ_{bulk} : バルク水中の比増殖速度 (1/day)

A : クーポン表面積の合計 (cm²)

X_b : クーポン上の全菌数密度 (cells/cm²)

$\mu_{biofilm}$: クーポン上の比増殖速度 (1/day)

β : クーポンからの剥離係数 (1/day)

クーポン上への細菌の付着の時系列データより、 β を推定したところ 0.14 (1/day) という値が得られた。実測値とモデル式に基づいた理論値の比較を図 7 に示す。

運転後期を定常状態と仮定し、バルク水中及びクーポン上での比増殖速度を求めたところ、バルク水中の比増殖速度 (μ_{bulk}) は 14.2 (1/day)、クーポン上の比増殖速度 ($\mu_{biofilm}$) は 0.14 (1/day) と推定され、バルク水中に比べてクーポン上での比増殖速度は 1/100 程度であることが示された。また、定常状態における細菌現存量の分配を評価したところ、バルク水中に存在する細菌は全体の 71%、クーポン上に存在する細菌は全体の 29% であり、多くの細菌はバルク水中に存在していることが明らかになった。

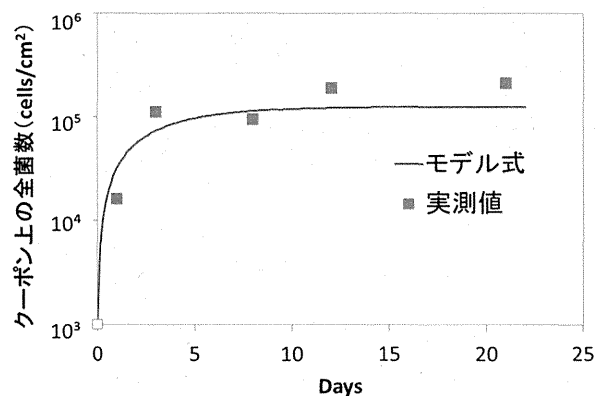


図 7 クーポン表面における細菌再増殖の実測値と理論値との比較

(4) 細菌群集構造

図 8 にクーポン上に発達した細菌群集の構造を T-RFLP により評価した結果を示す。運転開始 4 日後には、A と B の 2 種類のフラグメントが観察されたが A の方が強度は大きかった。その後、運転開始 18 日後には新たにフラグメント C が観察されると共に、400bp 以上に微細なフラグメントが出現し始めている。22 日後には、主なフラグメントは A と C ののみとなり、多様なフラグメントの強度が相対的に大きくなっていた。運転開始 22 日後の試料の 16S rRNA 遺伝子組成をシーケンシングによって解析した結果を図 9 に示す。大半は *Proteobacteria* 門に近縁な細菌群によって占められており、全体の 50%は α -*Proteobacteria*、40%は β -*Proteobacteria*、9%は γ -*Proteobacteria*であった。 α -*Proteobacteria* は、*Rhizobiales* 綱、*Sphingomonadales* 綱に近縁な細菌群が優占していた。 β -*Proteobacteria* は、*Burkholderiales* 綱に近縁な細菌群が優占していることが明らかになった。

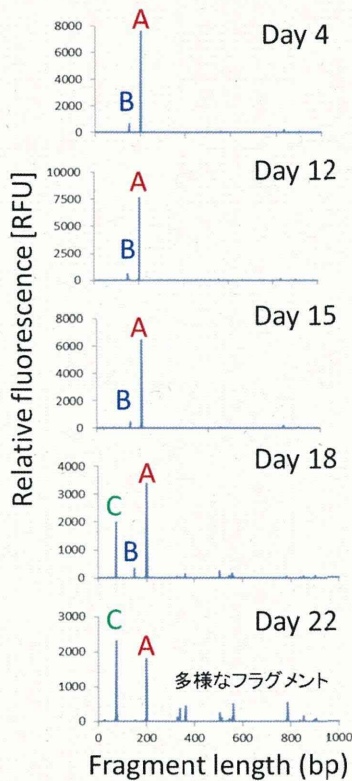


図 8 クーポン表面
における細菌群集構造の遷移

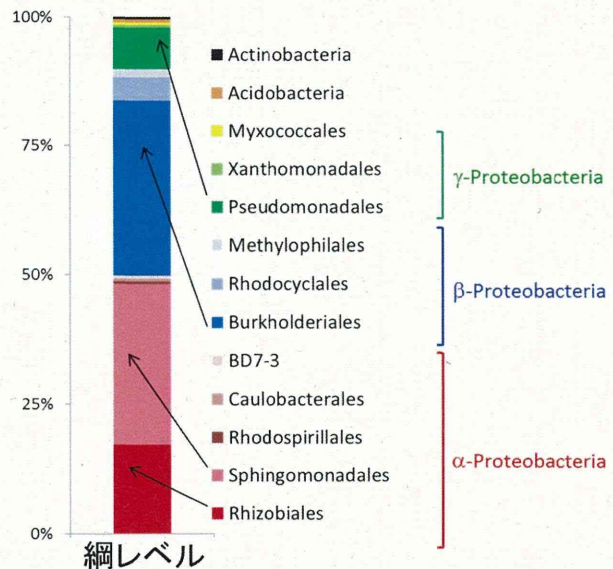


図 9 運転開始 22 日後の
16S rRNA 遺伝子組成

D. 考察

実際の水道水を用いてアンユラーリアクターを運転し、残留塩素を保持した場合と除去した場合に生じる細菌再増殖現象を評価した。

0.2mg/L 程度の遊離残留塩素濃度が保持されている場合、残留塩素を中和した場合と比

較すると 1/10 程度であるが、バルク水及びクーポン上での細菌再増殖が観察された。しかし、クーポンに付着している細菌のほとんど全ては膜損傷を受けた状態にあることも示唆された。本研究では便宜的に生菌、死菌という分類をしているが、これはあくまで膜損傷の程度に基づいて操作的に定めているだけであり、完全に死滅しているとは一概に言いきれない。今回は、細菌現存量が少なく、詳細な分析ができなかったが、残留塩素に耐性のあるこれらの細菌群の生理・生態については更なる知見を得る必要がある。

残留塩素を中和すると、顕著な細菌再増殖がバルク水中、クーポン上で生じることが明らかになった。細菌再増殖現象は、流入水・流出水中の AOC 濃度の変化にも反映されていた。バルク水中の全菌数は 10^5 cells/ml 程度に達したが、これは残留塩素を用いていないオランダの水道水中の全菌数とほぼ同程度である³⁾。定常状態におけるクーポン上の比増殖速度は 0.14 (1/day) と見積もられた。この値は、既存研究において PVC 上の比増殖速度 (0.15 1/day) や HDPE 上の比増殖速度 (0.14 1/day) の推定値ともほぼ一致していた⁴⁾。一方、バルク水中の比増殖速度は HRT とほぼ同程度の 14.2 (1/day) = 0.59 (1/h) を示した。本課題研究の平成 23 年度の成果として、給水末端における細菌群の比増殖速度を 0.22 (1/h) と推定したが、今回得られたバルク水中の比増殖速度とオーダーは等しい。このことは、従来、細菌再増殖では生物膜形成が重視されてきたが、残留塩素が消失すると数時間程度の滞留がある場合には浮遊状態での細菌再増殖も顕著に生じる可能性があることを示唆している。実際、アニユラーリアクターにおいて、バルク水中に存在する細菌は全体の 71% とストックとしても多かった。残留塩素を低減化した場合、いかに水道水の滞留を無くすかが重要と考えられる。

残留塩素を中和した系でクーポン上に形成された細菌群集は経時的に変化したが、顕微鏡観察の結果からいわゆる生物膜状態をとらずにクーポンに付着していることが推測された。今回は、1 か月程度の短期間の結果であったが、この後、クーポン上の群集構造は安定するのか、更に生物膜状に遷移していくのか、細菌組成と付着形態の点から更に継続的な調査を行う必要がある。シーケンシングにより群集組成を解析した結果、*Proteobacteria* が大半を占めていた。特に、 α -*Proteobacteria* と β -*Proteobacteria* で全体の 90% を占めており、これらが実際の水道水中で細菌再増殖を引き起こす主な細菌群であることが明らかとなった。残留塩素を保持した Run 1 でもわずかながら細菌再増殖が観察された。残留塩素を保持した系で再増殖した細菌群と、残留塩素を中和した系で増殖した細菌群がどのような関係にあるのか、今後明らかにして、配水過程において注視すべき細菌群の生理・生態について更なる知見を蓄積したい。

E. 結論

- ① アニユラーリアクターを用いて水道配水系における細菌再増殖を評価したところ、残留塩素を保持した水道水と比較して、残留塩素を中和した水道水では顕著な細菌再増殖が観察された。

- ② 残留塩素を中和した系では、クーポン上の全菌数が 10^5 cells/cm² 程度まで増加し、生菌数も同時に増加する様子が観察された。
- ③ クーポン上で増殖する細菌群の比増殖速度は 0.14 (1/day)程度であり、バルク水中で増殖する細菌群の比増殖速度の 1/100 程度であった。
- ④ クーポン上の細菌群集構造は経時的に遷移し、徐々に複雑になっていった。特に、 α -*Proteobacteria* や β -*Proteobacteria* が優占していた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2013) Chlorine resistance and growth potential of drinking water bacteria, The 5th International Conference on Microbial Ecology and Water Engineering, 12927. [Honorable Mention Best Poster Award]
- 大坂幸弘, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2013) 膜損傷とコロニー形成能を指標とした給水末端から単離された従属栄養細菌の塩素耐性評価, 平成 25 年度水道研究発表会, pp.598-599.
- 大坂幸弘, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2013) 水道水中の細菌再増殖に与える水温および残留塩素の影響評価, 第 29 回日本微生物生態学会大会, p.89.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

<参考文献>

- 1) Bott, T.R. and Miller, P.C. (1983) Mechanisms of biofilm formation on aluminum tubes. J. Chem. Tech. Biotech., 33 (B), 177-184.
- 2) Melo, L.F. and Vieira, M.J. (1999) Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. Bioprocess Eng., 20 (4), 363-368.
- 3) Liu, G., van der Mark, E.J., Verberk, J.Q.J.C. and van Dijk, J.C. (2013) Flow cytometry total cell counts: A field study assessing microbiological water quality

and growth in unchlorinated drinking water distribution systems. *BioMed Res. Int.*, 595872.

- 4) Manuel, L., Nues, O.C. and Melo, L.F. (2006) Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Wat. Res.*, 10, 1016-1027.

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- 1) 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) 岸田直裕, 島崎 大, 小坂浩司, 小菅瑠香, 秋葉道宏, 林 謙治 (2013) 銅を用いた水中の微生物の不活化技術 *日本公衆衛生雑誌*, 60(9), 1-7.
- 3) Kazama S. and Otaki M. (2013) Quantitative analysis of the inactivation mechanisms of *Escherichia coli* by a newly developed method using propidium monoazide, *J. of Water and Environment Technology*, 11(6), pp.507-517
- 4) 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).
- 5) 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).

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) Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2013) Chlorine resistance and growth potential of drinking water bacteria, *The 5th International Conference on Microbial Ecology and Water Engineering*, 12927.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 周靚, 松館圭太, 伊藤禎彦 (2013) 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, 第64回全国水道研究発表会講演集, 566-567, 2013.
- 8) 大坂幸弘, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2013) 膜損傷とコロニー形成能を指標とした給水末端から単離された従属栄養細菌の塩素耐性評価, 第64回全国水道研究発表会講演集, pp.598-599.
- 9) 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) を対象とした微生物リスクの試算, 第64回全国水道研究発表会講演集, pp.642-643.