

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 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。

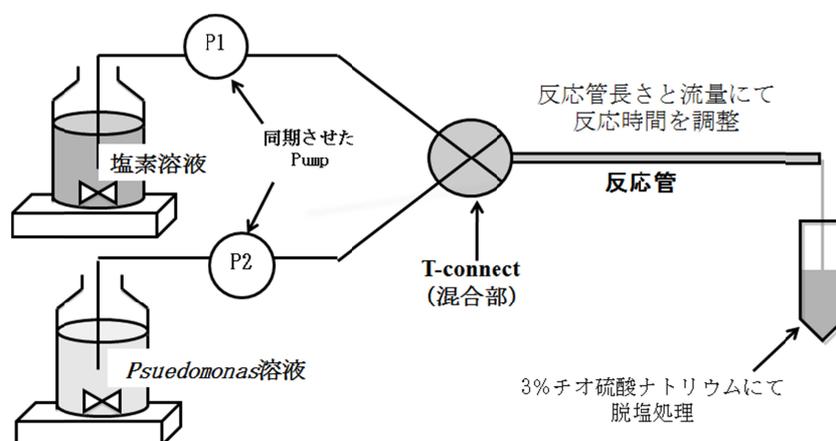


Fig. B.1 CQF システムによる塩素処理装置の概要

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流量調節によって 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。

DNA 抽出

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

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

PCR 増幅

DNA 抽出を行った試料 1 μ L を PCR Master Mix 50 μ L に加え, サーマルサイクラーにて PCR 増幅を行った. その際, 試料の他に滅菌水に対しても同時に PCR 増幅を行い, 試薬に異常がないか確認した. プライマーとして 27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')と 907r(5'-CCGTC AATTC 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℃:30秒 52℃:30秒 72℃:1分) \times 30 サイクル 72℃:10分とし, 反応終了後の庫内は 4℃を保った. PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した後, QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製し, 40 μ L に濃縮した. その後, NanoDrop® ND-1000(NanoDrop Technologies)を用いて DNA 濃度を測定した.

制限酵素処理

PCR 産物 100 ng を, 制限酵素 *Hha* (TaKaRa)を用いて消化した(37℃, 6時間). この消化産物 2 μ L に Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) 17 μ L, サイズマーカー GeneScan 1200LIZ 1 μ L を加え, 95℃で2分間熱変性させた後, 氷冷した.

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.

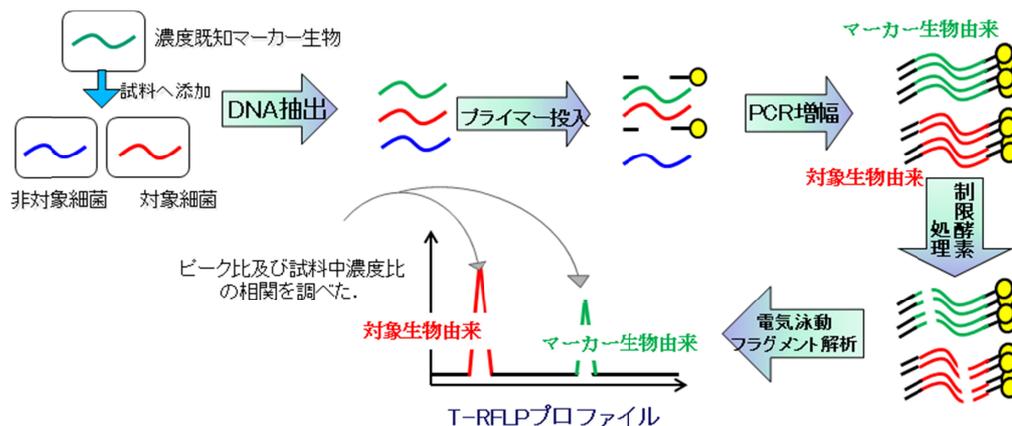


Fig. B.2 定量的 T-RFLP の測定法の流れ.

B.2 *Paeruginosa* 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 *Paeruginosa* 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 *Paeruginosa* 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) バイオフィー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 片をバイオフィーム形成材料とした。滅菌した栄養液体培地 TSB (Tryptic Soy Broth) に *P. aeruginosa* を接種し 30℃ で 24 時間培養した。培養液を滅菌済みペトリ皿 (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℃ 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℃ で 24 時間培養してバイオフィームを形成させた。

形成したバイオフィーム中の *P. aeruginosa* 量は、バイオフィーム形成 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℃ 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ー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、残存バイオフィーム中の *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ー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ー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* バイオフィー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ーム形成片を設置し、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。バイオフィームが残存する 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。溶液は撹拌子にて撹拌し、均一に塩素接触が起こる様にした。塩素処理前後の PVC 片上のバイオフィーム中の生残 *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。

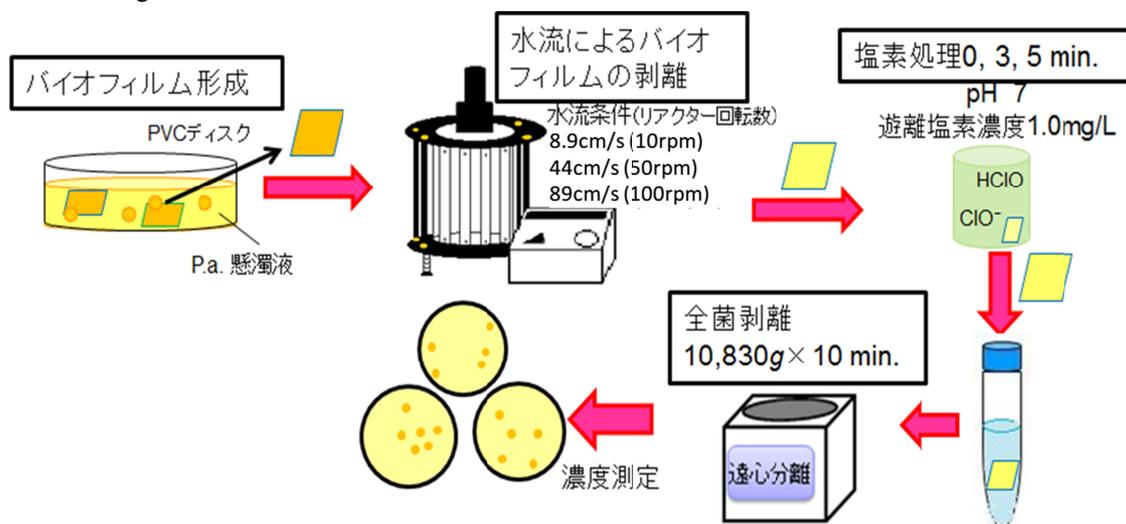


Fig. B.3 アニュラーリアクターによるバイオフィームの剥離と塩素処理実験の流れ

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 でコロニーを形成させ、適量を鈎菌し、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>Paeruginosa</i> 濃度 (CFU mL ⁻¹) (培養測定)	<i>Paeruginosa</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。

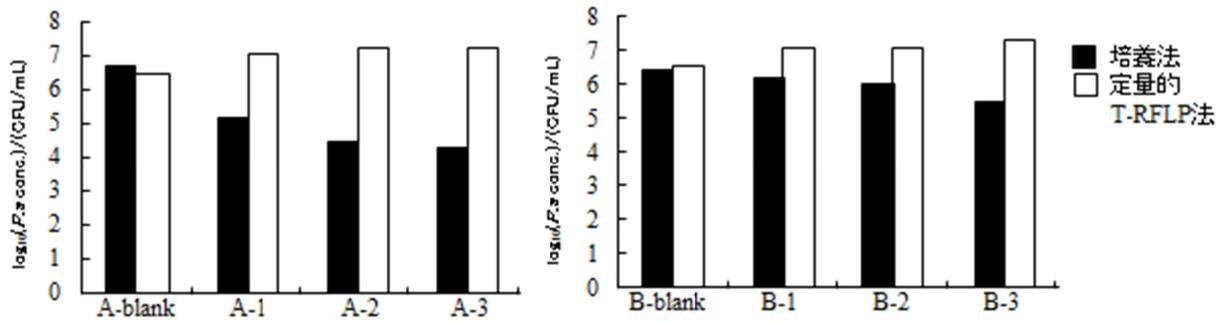


Fig. C.1 不活化実験前後における *P. aeruginosa* 濃度の培養法および定量的 T-RFLP 法による結果

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

本研究では, PVC 片に形成した *P. aeruginosa* のバイオフィル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ル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ルムについて, アニュラーリアクターにて各流速下で運転した際の, 残存バイオフィルム中の *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.

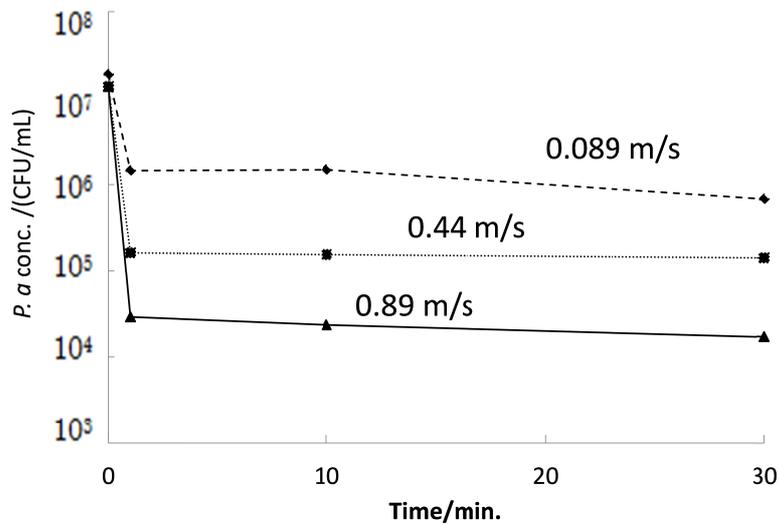


Fig. C.2 各流速下における残存バイオフィルム中の *P. aeruginosa* 量の経時変化

2) 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

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

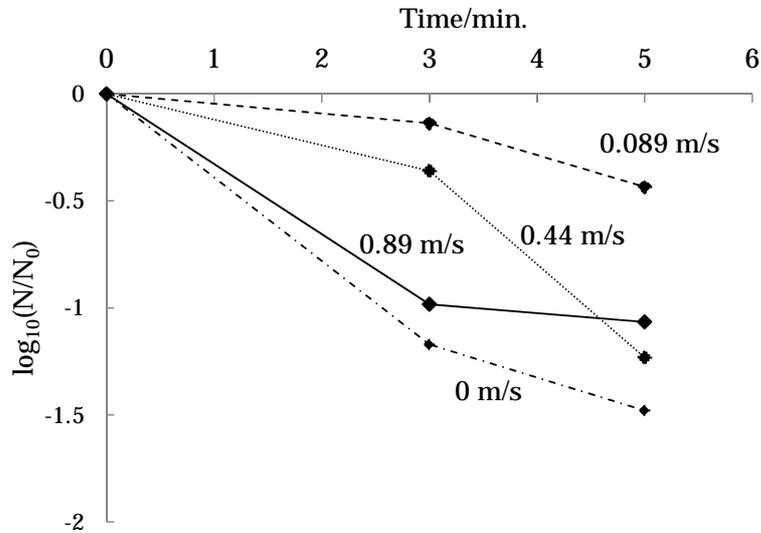


Fig. C.3 各流速下における剥離後の残存バイオフィルムにおける塩素処理の効果

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。

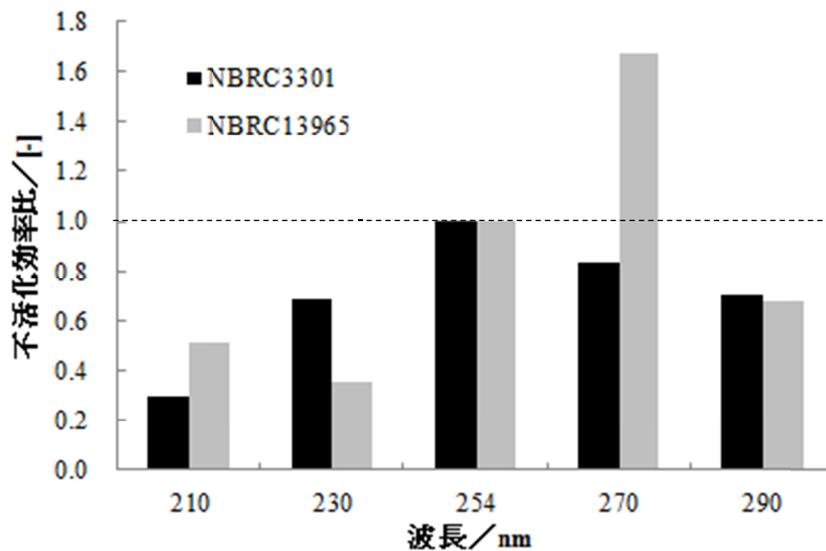


Fig. C.4 波長毎の不活化効果比 (254 nm との相対比)

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

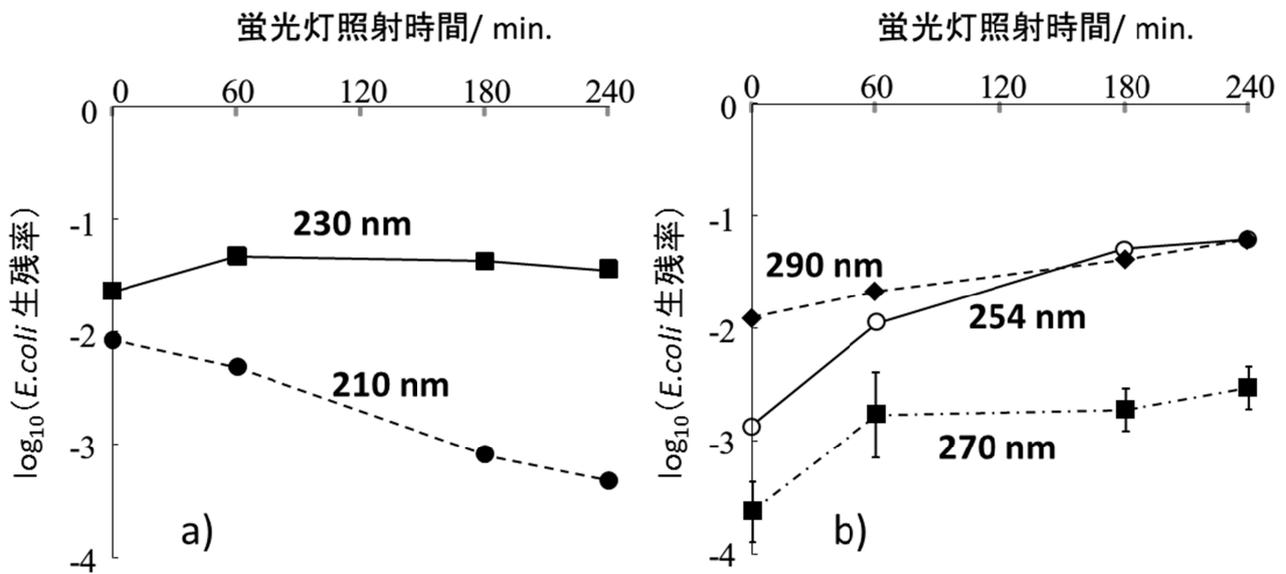


Fig. C.5 NBRC13965 株における各波長光による不活化後の蛍光灯照射下での濃度変化
a) 210 nm と 230 nm による不活化後, b) 254 nm, 270 nm, 290 nm による不活化後

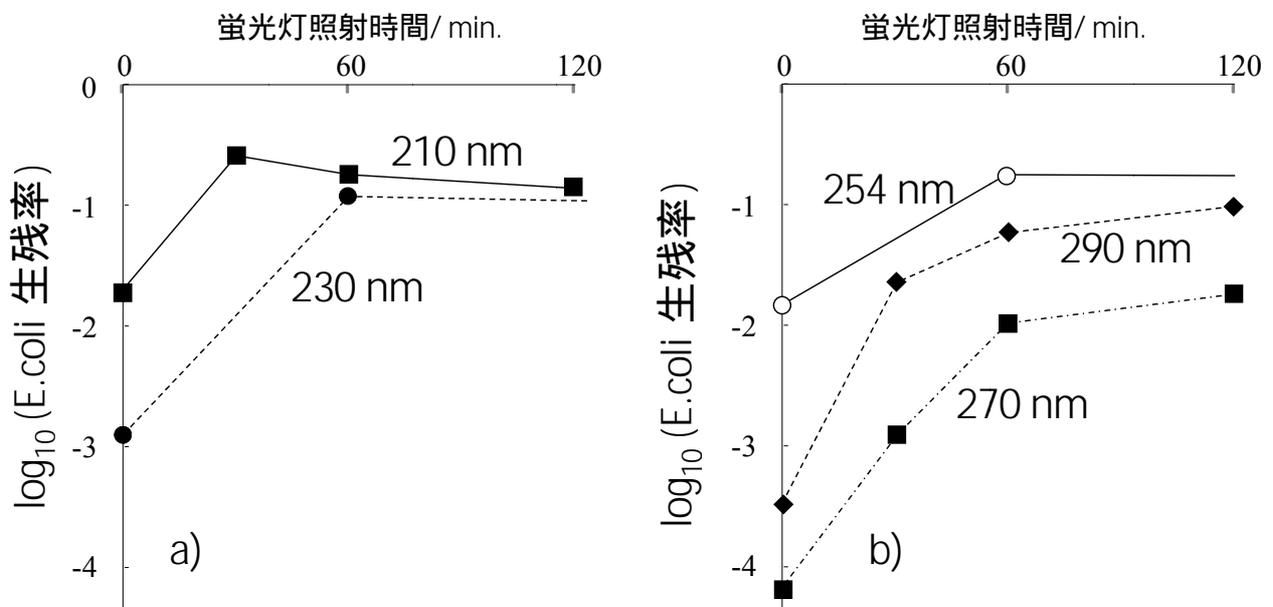


Fig. C.6 NBRC3301 株における各波長光による不活化後の蛍光灯照射下での濃度変化
a) 210 nm と 230 nm による不活化後, b) 254 nm, 270 nm, 290 nm による不活化後

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。

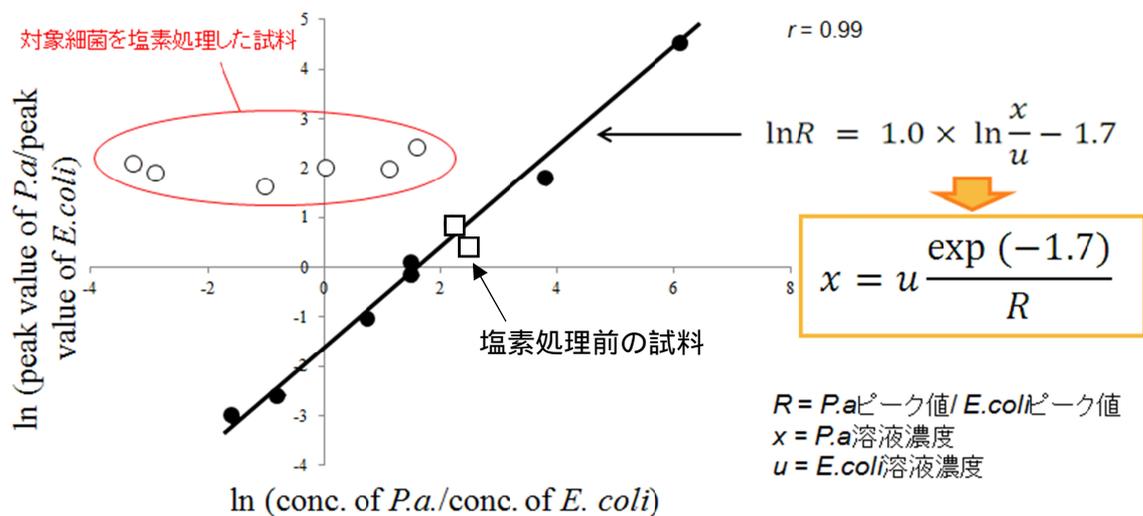


Fig. D.1 対象微生物とマーカーについての定量的 T-RFLP におけるピーク比と培養法による濃度比
 ●：昨年度データ，○：塩素処理後のデータ（今年度），□：塩素処理前のデータ（今年度）

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 抽出率が高くな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. *Paeruginosa* 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

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ル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%にあたる事がわかる。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ルムに対しては、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ル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。

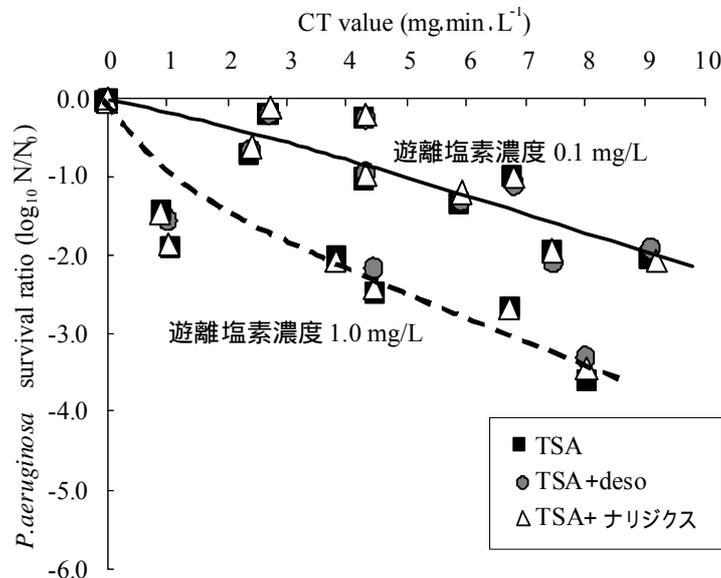


Fig. D.2 塩素投入後の浮遊状態の *P. aeruginosa* の濃度変化 (pH 7)
(平成 21 年度厚労科研分担研究報告書より)

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.

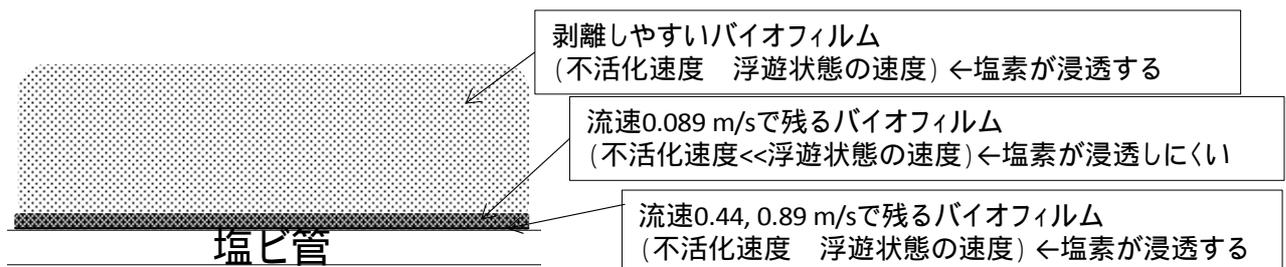


Fig. D.3 各バイオフィーム層の塩素処理耐性からみた特徴

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 NBRC3301 株では、いずれの波長光照射でも 254 nm 照射光と同様に核酸塩基の二量体形成による不活化機構が働いているが、NBRC13965 株では、210 および 230 nm の波長光によって二量体形成以外の不活化機構が働いていた可能性が考えられた。

しかしこの仮説は Fig.C.4 に示した波長毎の不活化効果の傾向から推考される仮説と合致しないため、この点矛盾しない説明が今後の検討課題となる。

13965 株に関しては、どの波長光においても、光回復効果が相対的に低くなってしまい、正確な議論がしづらくなっている。従って、この株においては、不活化率を高めに設定した上で光回復実験を行う必要があると考えられる。

E. 結論

定量的 T-RFLP 法について、消毒処理における不活化に適用できるか検討したところ、配管中の残留塩素濃度レベルの処理においては、対象細菌の遺伝子レベルの損傷には至っていないことや、対象細菌の細胞膜損傷による DNA 抽出工程への影響から、本方法の適用は難しいことがわかった。

バイオフィルムを形成した従属栄養細菌 (*Pseudomonas* 菌) においては、0.1 m/s 以下の流速下においてバイオフィルムの 90%程度が剥離される。そこで残存するバイオフィルムの層厚は深部まで塩素が浸透しにくく不活化効果が低くなることがわかった。一方、0.4 m/s 以上の水流によって、99~99.9%程度が剥離され、その時に残存バイオフィルムの層厚は低くなっているため、深部まで塩素が浸透し不活化しやすい状況であると考えられた。

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。

参考文献

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

F 健康危険情報 特になし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazama S. 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

2. 学会発表 なし

H 知的財産権の出願・登録状況 特になし