

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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup> 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、 $\alpha$ -Proteobacteria のや  $\beta$ -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： $4.1 \times 10^6$  CFU/ $\mu\text{gC}$ 、NOX： $1.2 \times 10^7$  CFU/ $\mu\text{gC}$ ）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。

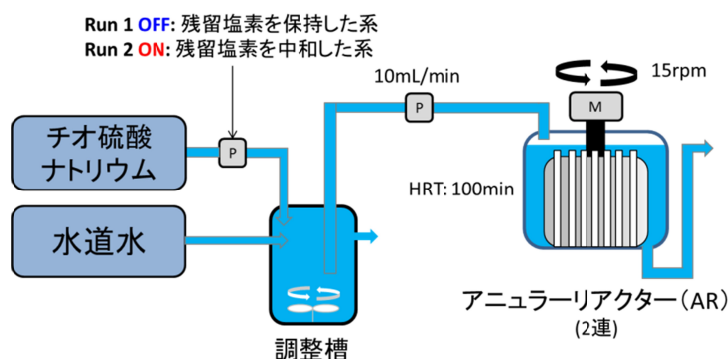


図 1 アニュラーリアクターの構成

## 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

アニユ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/cm<sup>2</sup> 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。

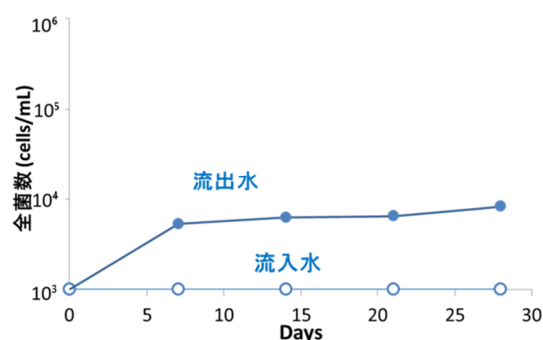


図 2 流入水・流出水中の全菌数  
(Run 1: 残留塩素を保持)

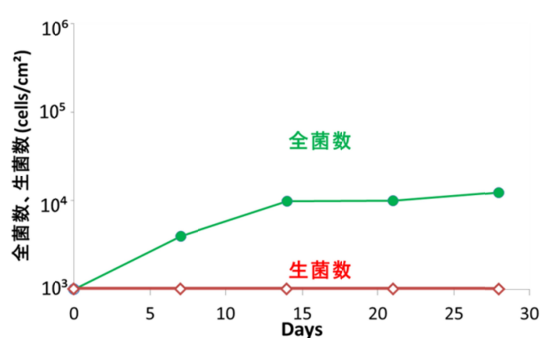


図 3 クーポン上の全菌数・生菌数  
(Run 1: 残留塩素を保持)

### 2. 残留塩素を中和した系 (Run 2)

#### (1) 水質

アニユ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、同一の条件でアニユ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、アニユ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/cm<sup>2</sup> 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。

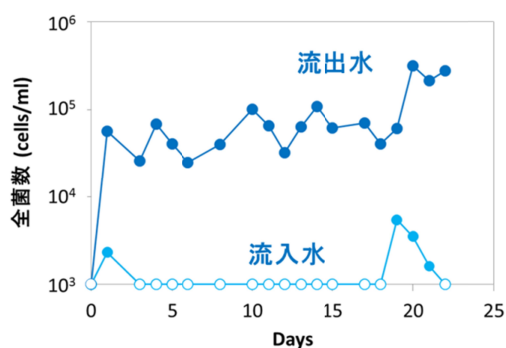


図4 流入水・流出水中の全菌数  
(Run 2: 残留塩素を中和)

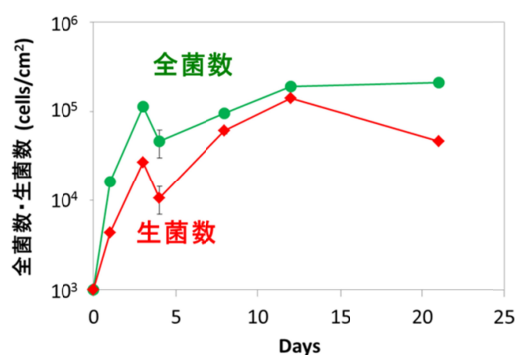


図5 クーポン上の全菌数・生菌数  
(Run 2: 残留塩素を中和)

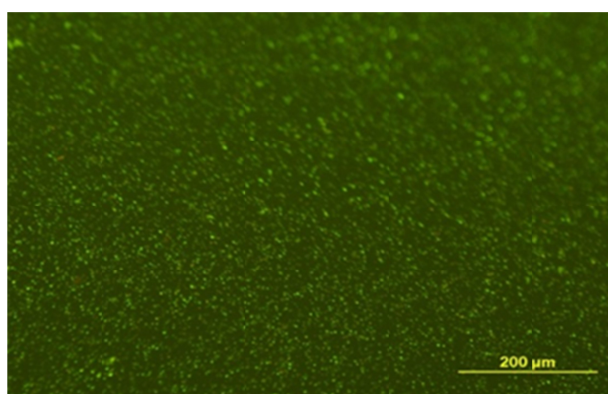


図6 クーポン表面に付着する細菌群  
(運転開始12日後)

## (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<sup>1,2)</sup>。

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

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

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)

$\mu_{bulk}$  : バルク水中の比増殖速度 (1/day)

A : クーポン表面積の合計 (cm<sup>2</sup>)

$X_b$  : クーポン上の全菌数密度 (cells/cm<sup>2</sup>)

$\mu_{biofilm}$  : クーポン上の比増殖速度 (1/day)

$\beta$  : 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、 $\beta$ 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 ( $\mu_{bulk}$ ) 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。

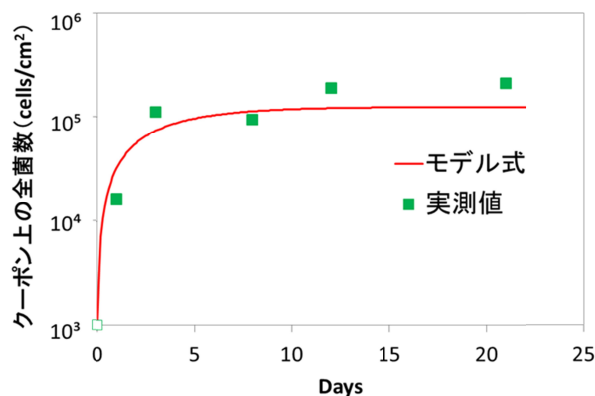


図7 クーポン表面における細菌再増殖の実測値と理論値との比較

#### (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った。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  $\alpha$ -*Proteobacteria*、40%は  $\beta$ -*Proteobacteria*、9%は  $\gamma$ -*Proteobacteria* であった。 $\alpha$ -*Proteobacteria* は、*Rhizobiales* 綱、*Sphingomonadales* 綱に近縁な細菌群が優占していた。 $\beta$ -*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。

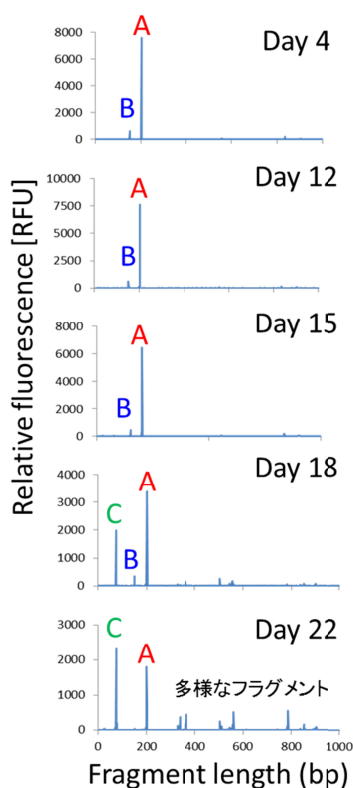


図8 クーポン表面における細菌群集構造の遷移

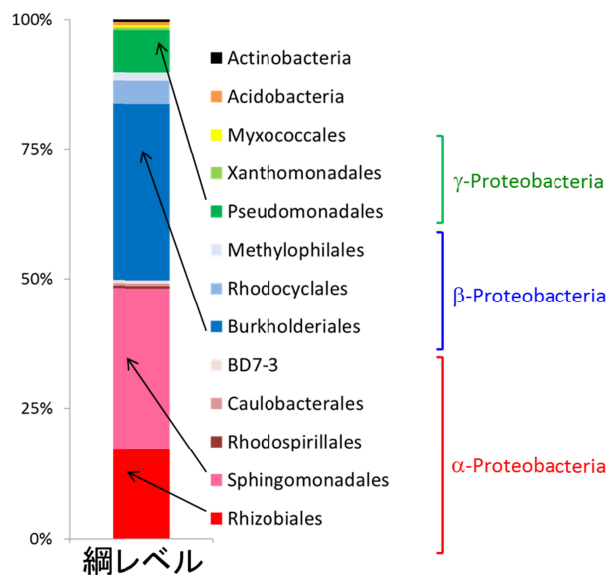


図9 運転開始22日後の16S rRNA 遺伝子組成

#### D. 考察

実際の水道水を用いてアニュ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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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、アニュ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、 $\alpha$ -*Proteobacteria* と  $\beta$ -*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

アニュ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。

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/cm<sup>2</sup> 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。

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。

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