

紫外線消毒への濁質の影響に関する研究

Effect of Sludge on UV Irradiation

窪華奈子, 大瀧雅寛

Kanako KUBO, Masahiro OTAKI

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

1.はじめに

現在, 日本の上下水道では主に塩素消毒が利用されている. しかし, 1985年に塩素消毒後に発がん性物質であるトリハロメタンが生成されることが指摘されたこと, 1992年に金町浄水場でオゾン, 活性炭処理が導入されたことにより塩素以外の消毒方法もより注目されるようになった. 現在, 前述のような浄水場の高度処理以外にも, 下水処理場で紫外線消毒が導入される等, 様々な塩素の代替消毒方法について研究が進んでいる.

代替消毒方法の一つである紫外線消毒の不活化原理は, 細胞のDNA及びRNAの損傷による複製能力の喪失させることである. 不活化後も細胞は生きているため, その回復可能性についても研究されている¹⁾. また, 核酸が紫外線を吸収することが必要であるため, 対象液体の吸光や, 液体中の物質への細胞の吸着により紫外線の消毒効果が減少するという問題点もあり, 水中の懸濁物質の影響についても研究されている. そこで, 本研究は消毒後細菌の損傷状態及び回復可能性に着目して, 紫外線消毒への濁質の影響を調べることを目的とした.

2.実験方法

2.1 モデル微生物

モデル微生物として, *E. coli* K12 (NBRC 3301) を使用し, 平面培地で37℃で24時間培養して形成された大腸菌コロニーを釣菌し, リン酸緩衝液に溶解させて使用した.

2.2 紫外線照射処理による不活化処理

初期条件として, 大腸菌濃度を約 5×10^6 CFU/ml とした. 濁質として上水濃縮汚泥を希

釈し,濁度が約240 NTU~260 NTU, 吸光度(254 nm)が 1.5 cm^{-1} ~ 1.9 cm^{-1} となるように調整した. 濁度調整後, 121℃で高圧蒸気滅菌したものと滅菌していないものを試料に投入した. また, 濁質を投入しない試料も実験に使用し, 濁度は約1 NTU~3 NTU, 0.04 cm^{-1} ~ 0.2 cm^{-1} であった. 光源として低圧水銀ランプを使用した. 試料をシャーレ(直径5.7 cm)に入れて, スターラーで攪拌しながら紫外線を0~40秒照射した. 実験装置図をFig. 1に示した. 試料の採取により体積が減少し, リアクター内の水深は1.03 cm~0.73 cmとなる. そこで, 平均値0.93 cmを平均線量率の計算に使用した. 水面の紫外線(波長254 nm 線量率をヨウ素酸カリウムとヨウ化カリウムを利用した化学線量計にて測定して, 算定したところ平均値 0.37 mJ/s/cm^2 となった.

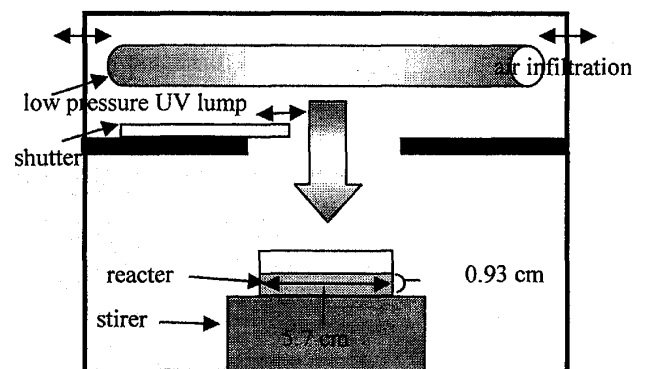


Fig.1 experiment apparatus

2.3 大腸菌の測定方法

(1) コロニー形成能測定

培養条件によるコロニー形成能力の差から細菌の損傷レベルを評価するために²⁾, 大腸菌群の選択培地であるデソキシコーレイト寒天培地と, 非選択培地である Tryptic Soy Agar を使用し,

共に重層寒天法により大腸菌濃度を測定した。

(2) ATP 測定

細菌の代謝活性を測定するために、ATP 量を測定した。測定には ATP 発光キット(東洋ビーネット(株)), ATP 抽出キット(東洋ビーネット(株)), Luminescence JNR-II AB2300 (ATTO(株))にて ATP 量を求めた。

(3) 回復量測定

細菌の損傷程度を測定するために不活化後の回復量を測定した。デソキシコーレイト寒天培地による大腸菌の生存率を S_a とした場合、 $0.001 \leq S_a \leq 0.01$, $0.00001 \leq S_a \leq 0.0001$ となるように不活化し、各試料を標準液体培地に投入し 37 °C 暗所にて培養し、回復させた。また、不活化後の大腸菌の回復過程と、未処理の大腸菌の増殖過程を比較するために、未処理の試料を生存率 S_a が 0.01 及び 0.0001 となるようにリン酸緩衝液で希釈して、不活化後の試料と同様に標準液体培地に投入し、37°Cにて培養した。

3. 実験結果と考察

各条件において、大腸菌濃度は照射した紫外線の線量に対し一次反応(式 1)に従って減少した。Fig.2 に各条件における不活化速度定数 k を示した。培地の種類による k の差に関しては、濁質有(滅菌有無)よりも濁質無の方が大きかった。よって、濁質無で不活化された大腸菌の損傷は、選択培地では培養できないが非選択培地では培養できる損傷(これを軽度損傷細菌と呼ぶ)の割合が大きいがわかった。この損傷は選択培地のコロニー形成は乳糖分解によることから、乳糖分解能力が低下している状態であると考えられる。選択培地における k の大きさに関しては、濁質無と滅菌済濁質有がほぼ等しく、濁質無よりも濁質有は大きかった。

$$\ln(N/N_0) = -kIt \quad (\text{式 1})$$

N : 大腸菌濃度 (CFU \cdot ml $^{-1}$)

N_0 : 大腸菌初期濃度 (CFU \cdot ml $^{-1}$)

k : 不活化速度定数 (mJ $^{-1}$ \cdot cm 2)

I : 紫外線線量率 (mW \cdot cm $^{-2}$)

t : 紫外線照射時間 (s)

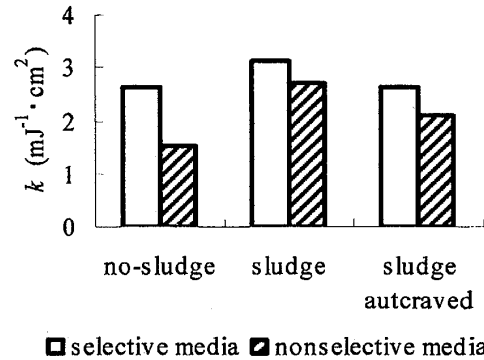


Fig.2 inactivation rate constant by various conditions

Fig.3(a), (b)に回復結果を示した。Fig.3(a)において、大腸菌濃度変化に着目すると、未処理(Fig.3(a)-(i))において選択培地、非選択培地共に回復0~2時間で増加せず回復処理で2時間~4時間で増加した。不活化後(濁質有無)(Fig.3(a)-(i), (ii))において、回復処理0~2時間で、非選択培地では全く増加せず、選択培地では増加し、回復処理2~4時間で、両培地共増加した。紫外線不活化後の回復処理0~2時間の間に選択培地で測定できる大腸菌数が非選択培地で測定できる大腸菌数に近づいたことは、軽度損傷細菌が回復し、選択培地でのコロニー形成能力を再取得したことを意味していると考えられる。また、回復処理2時間~4時間の両培地での大腸菌濃度増加は、未処理の場合と同様の傾向が見られたため、増殖を意味していると考えられる。ATPに着目すると、未処理では大腸菌濃度の増加に伴ってATP量が増加した。(回復0時間においては検知限界以下)不活化後(濁質無)では、選択培地による大腸菌濃度増加に伴ってATP量が増加した。不活化後(濁質有)では回復処理0~2時間で大きく増加し、回復処理2~4時間で一定になった。これらのことから、回復及び増殖時にATP生成が活発になることがわかった。濁質共存下で不活化された大腸菌が回復時に多くのATPを生成した原因として、試料で紫外線を照射された大腸菌の中でも選択培地でのコロニー形成能力を失わない程度に損傷した細菌(軽度損傷細菌よりも軽い損傷の細菌)が存在し、それらの細菌が回復するためのATPが生成されたことが考えられる。その原理は、濁

質によって紫外線が水中で散乱し、吸光度によって計算される紫外線量が同じでも、濁質が共存しない場合よりも光子が大腸菌に当たる確率が高いということである。

4Fig.3 (b)において、大腸菌濃度変化に着目すると、未処理(Fig.3(b)-(i)), 不活化後(濁質有無)(Fig.3(b)-(ii), (iii))間の相違点は Fig.3(a)と同様

ATPに着目すると、未処理(Fig.3(b)-(i))では検知限界のため測定できず、濁質無(Fig.3(b)-(ii))ではATP量が一定、濁質有(Fig.3(b)-(iii))では回復処理0~1時間で大きく増加し、回復処理1~4時間で減少傾向が見られた。Fig.3(a)-(ii), (iii)と比較すると、生存率 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ まで不活化した場合より生存率 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ まで不活化した場

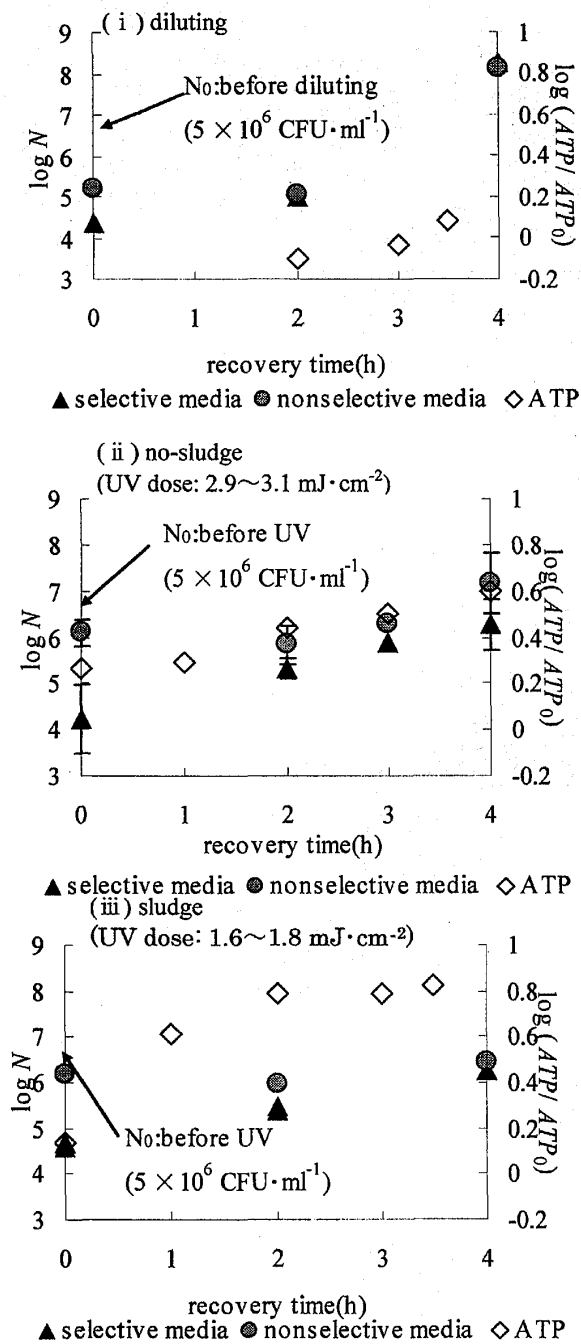


Fig.3 (a) recovery of *E.Coli* by various conditions ($0.001 \leq S_a \leq 0.01$)

の傾向が見られ、回復処理0~2時間で軽度損傷細菌が回復し、回復処理2~4時間で増殖した。

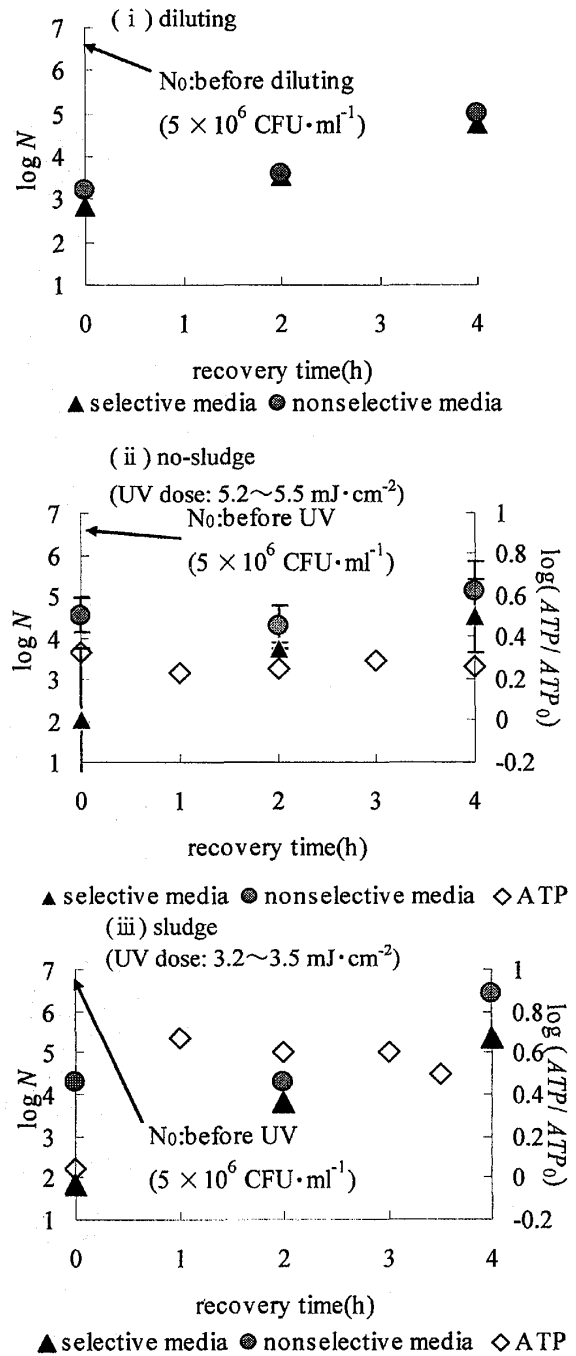


Fig.3 (b) recovery of *E.Coli* by various conditions ($0.00001 \leq S_a \leq 0.0001$)

合のほうが回復処理時のATP生成量が少なく、代謝が活発でないことがわかった。

4. 結論

選択培地による消毒効果の測定は過大評価を招く可能性があり、その危険性は紫外線照射時に濁質を含む場合より含まない場合のほうが高いことがわかった。また、高栄養条件で、不活化によって喪失した生理的機能(乳糖分解)を再取得できると考えられる。このような回復は選択培地でのコロニー形成数に影響し、観察することができた。

濁質共存下で紫外線照射による不活化を行う場合、濁質による紫外線の散乱により、様々な程度の損傷が考えられる。不活化によって異なる損傷程度の大腸菌が存在することは、前述のように回復時の培地の種類によるコロニー形成数の差によって確認されたが、回復時のATP生成量の違いにも現れた。

【参考文献】

- 1) K.Oguma et al., Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium- pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6029-6035
- 2) G.A.McFecters et. al., 2004, 239-257, 培養できない微生物たちー自然環境中での微生物の姿, ㈱学会出版センター