

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760371
 研究課題名（和文） 水道システムの衛生管理を目的としたバイオフィーム形成診断指標の開発
 研究課題名（英文） Establishment of indicators for biofilm formation to control sanitary conditions in water distribution system
 研究代表者
 大河内 由美子 (OHKOUCI YUMIKO)
 京都大学・地球環境学堂・助教
 研究者番号：00391079

研究成果の概要：

本研究では、給配水管内の衛生管理手法の確立を目的として、一般的に用いられる従属栄養細菌数試験の代替指標としてエンドトキシンに着目した。回分培養試験および連続通水試験の結果、顕著な微生物再増殖が起こった場合には総エンドトキシンが増大することを示した。また、HPC 測定の迅速化を目的として、5-ブromo-2'-デオキシウリジンをを用いた微生物の DNA 合成活性測定法の条件決定を行うとともに、試験の再現性を確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：水道システム，給配水過程，バイオフィーム，微生物指標

1. 研究開始当初の背景

日本の上水道システムは普及拡大の時期から維持管理の時期に移行しつつある。近年、給配水管の洗浄やモニタリングといった維持管理技術の開発が活発に進められているが、多くは濁質や鉄さび、配管内面の腐食に標的をおいているものがほとんどであり、有機物汚染を標的とした報告は少ない。現在は、浄水処理の最終段階で塩素消毒を行い、水中に残存している微生物の不活化を行うものの、給配水管の素材や内面の状態、水中の有機物や栄養塩の状態、消毒剤の残留濃度ある

いは水流状態といった各種の条件が重なることにより、微生物の再増殖、さらにはバイオフィーム形成が引き起こされることが知られている。バイオフィームは残留塩素を消費して消毒副生成物の増大や異臭味を引き起こすのみならず、病原微生物の増殖に適した環境を提供し、結果として健康リスクの増大および快適性低下といった諸問題を引き起こす。給配水過程における衛生管理は急務の課題といえる。

給配水過程における微生物量管理指標としては、水質基準として一般細菌数ならびに

大腸菌数が設定されている。また、従属栄養細菌 (Heterotrophic Plate Count: HPC) を水質基準として採用する国々も多いが、これらの方法は一長一短である。特に、HPCは低栄養条件下に存在する微生物を検出する方法として優れていることが確認されているが、測定には長い時間を要する。そこで、給配水に要する時間の短い日本の水道システムに適した、新しい給配水衛生管理指標が必要と考える。

2. 研究の目的

本研究では給配水管内の衛生管理手法の確立を目的として、水道水中の有機物量ならびに微生物量を反映した指標作成に取り組む。前述のように、水道水中の有機物量は浄水処理により低く保たれているため、水道配管内に形成されるバイオフィーム中の微生物も低栄養状態に長時間さらされるため、従来の培養法では検出にかなり長い時間を要している。そこで、本研究では従属栄養細菌数試験の代替手法として、5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU)を用いた微生物のDNA合成量の定量的検出に基づいた迅速な微生物増殖能試験法を確立するとともに、グラム陰性細菌およびシアノバクテリアの細胞外膜構成成分であるリポ多糖活性(エンドトキシン)の量と存在形態に着目して、バイオフィーム形成に関する診断指標の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)水道水中のエンドトキシン濃度と形態

急速ろ過処理水40試料(夏季)および6試料(冬季)、高度浄水処理水6試料(冬季)を採取し、総エンドトキシンおよび遊離エンドトキシン濃度をエンドポイント比色法(生化学工業)により測定した。総エンドトキシン測定には試料混合後の全画分を、遊離エンドトキシン測定には14,000 rpmで10分間遠心分離後の上清画分を使用した。

(2)水道水試料の回分培養試験

配管内滞留による残留塩素が消費された条件を想定して、以下の実験を行った。(1)で夏季に採取した40試料のうち25試料について、チオ硫酸ナトリウム添加により残留塩素を中和した後、20°Cで静置した。塩素中和直後、1日後、7日後の従属栄養細菌数(HPC)を測定するとともに、形態別のエンドトキシン濃度を測定した。

(3)水道水試料の連続通水試験

現状より残留塩素濃度を低減した給配水環境を想定して、遊離残留塩素濃度を0 mg/L(系列1)、約0.1 mg/L(系列2)の二段階に調整した水道水を、それぞれアニュラーリアクター(BioSurface Technologies Corporation, Model 1320 LS)に通水した。残留塩素濃度の調整は、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加する

ことにより行った。次亜塩素酸ナトリウム溶液にてあらかじめ消毒したPVCスライドを回転ドラムにセットし、通水速度は8.3 mL/min、回転速度は84 rpmに設定した。流入水、流出水をそれぞれ採取し、主に総エンドトキシン、遊離エンドトキシン、従属栄養細菌数の経時変化を調べた。

また、PVCスライド1~2枚を定期的に取り出して、表面に形成されたバイオフィーム試料の回収を行い、バイオフィーム中の従属栄養細菌数を測定した。

(4)BrdUラベル化法の条件決定

モデル微生物として、*Pseudomonas fluorescens* P17を用い、DNA合成活性を指標とした従属栄養細菌定量を試みた。臭素化DNAアナログである5-bromo-2'-deoxy-uridineを添加したR2A液体培地中で短時間培養し、DNA複製に伴い取り込まれたBrdUを免疫学的手法により検出する。微生物濃度がおよそ 10^2 ~ 10^6 (cfu/mL)となるようR2A液体培地を用いて培養液の段階希釈を行った後に、R2A平板培地を用いて20°C、7日間培養後のコロニー数を計数した。同時に、残りの培養液に対してBrdUを100, 500, 1000 nMの三段階の濃度で添加し、5時間、20°Cでラベル化反応を行った。

標識DNAの免疫学的検出は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた抗原抗体反応を用いた。96穴マイクロプレート上に細胞固定後、内在性ペルオキシダーゼの不活化、細胞壁の消化、DNA高次構造の破壊の各処理を行った後、抗体を添加した。BrdU標識DNAと結合した抗体量を測定するため、ペルオキシダーゼの基質としてABTSを使用し、基質添加から0.5, 1, 2時間経過した後に、マイクロプレートリーダーを用いて波長405 nm(対照波長=490 nm)の吸光度を測定した。

これらの検討により決定したラベル化反応・免疫学的検出条件を用いて再現性を確認するとともに、実際の水道水試料を対象として、1)未濃縮試料、2)遠心による10倍濃縮試料の各試料中の微生物をBrdUでラベル化し、同様の検出操作を行った。

4. 研究成果

(1)水道水中のエンドトキシン濃度と形態

結果を表-1に示す。数値は試料各分類ごとの平均値と標準偏差で表した。ここでは、総エンドトキシンに占める遊離エンドトキシンの割合を遊離エンドトキシン比率と定義した。急速ろ過処理水では、夏季の総エンドトキシン濃度は 1.48 ± 0.69 EU/mL、冬季は 1.16 ± 0.13 EU/mLと比較的安定した値を示した。一方、高度浄水処理水では、冬季のみのデータではあるが 6.72 ± 1.85 EU/mLと急速ろ過処理水に対して有意に高い値を示した。遊離エンドトキシンについても、急

速ろ過処理水が 1~1.5 EU/mL に分布したのに対して、高度浄水処理水では 5.52 ± 0.95 EU/mL と有意に高い値であることがわかった。このように浄水中のエンドトキシン濃度が大きく異なる理由として、1) 原水中エンドトキシン濃度の違い、2) 浄水処理方式の違い、特に活性炭処理の有無、が挙げられる。調査対象とした高度浄水処理施設は都市部河川の中流域から取水していることから、エンドトキシン濃度が高い下水処理放流水が原水中に混入する可能性が高い。また、同施設は前塩素/中間塩素処理を行っていないため、活性炭上に生育した微生物が処理水中に流出し、エンドトキシン増大を招いた可能性もある。

これらの結果に対して、遊離エンドトキシン比率は急速ろ過処理水で 0.93~1.01、高度浄水処理水では平均 0.85 であり、顕著な差は見られなかった。以上の結果から、十分な塩素消毒が行われている給水栓水においては、エンドトキシンはその大部分が遊離の状態で見られることが示された。

表 1 給水栓水中の HPC およびエンドトキシン濃度とその形態

測定項目	急速ろ過処理水		高度浄水処理水
	5-6月	1月	1月
試料数	n = 40	n = 6	n = 6
HPC (CFU/mL)	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.9
総エンドトキシン(EU/mL)	1.48 ± 0.69	1.16 ± 0.13	6.72 ± 1.85**
遊離エンドトキシン(EU/mL)	1.46 ± 0.56	1.08 ± 0.23	5.52 ± 0.95**
遊離エンドトキシン比率	1.01 ± 0.15	0.93 ± 0.18	0.85 ± 0.19

*: 急速ろ過処理水(5-6月)に対して $p < 0.01$

** : 急速ろ過処理水(1月)に対して $p < 0.01$

(2)水道水試料の回分培養試験

採水直後、ならびに 1 および 7 日間回分培養後の試料における HPC・エンドトキシンを、表-2 に比較した。7 日後に 6 試料で HPC の顕著な再増殖が確認されたことから、これら再増殖試料と非再増殖試料とを分類して、それぞれの平均値と標準偏差を用いて表した。

培養開始 1 日後の HPC 数に変化が見られたが、エンドトキシン濃度とその形態には大きな変化は確認されなかった。一方、7 日後の増殖試料では、 $2.3 \times 10^3 \sim 4.7 \times 10^5$ CFU/mL まで HPC が増殖した一方、遊離エンドトキシンはわずかに増大しただけであったのに対して、総エンドトキシンは 17.3 ± 12.0 EU/mL

まで増加した。結果として、遊離エンドトキシン比率は平均 0.23 まで低下したが、非増殖試料では総エンドトキシンの大幅な増大も遊離エンドトキシン比率の低下も確認されなかった。以上の結果から、7 日後の再増殖試料では、微生物増殖に伴い細胞結合型のエンドトキシンが増加したことが示された。

(3)水道水試料の連続通水試験

各リアクターのバイオフィーム中 HPC、流入水、流出水中の HPC、総エンドトキシンの変化を図-1 にまとめて示す。0.1 mgCl₂/L に設定したリアクター(系列 2)への流入水中残留塩素濃度は、 0.07 ± 0.05 mgCl₂/L であった。

0.1 mgCl₂/L のリアクターにおけるバイオフィーム中の HPC は、残留塩素なしよりも 1~2 オーダー低い値で最高密度に達した。これらの結果から、0.1 mgCl₂/L といった低濃度の残留塩素濃度ではバイオフィーム形成を抑止できないものの、その蓄積速度を低下させる効果はあると考えられる。また、バイオフィーム蓄積に伴って流出水中の HPC が増大し、バイオフィーム中 HPC と流出水中 HPC の相関をともに対数変換後調べたところ、式(1)で表されることがわかった。

$$Y = 0.873X - 0.426 \quad (R^2 = 0.687) \quad \text{式(1)}$$

Y: 流出水中 HPC (log₁₀ CFU/mL), X: バイオフィーム中 HPC (log₁₀ CFU/mL) である。

以上の結果から、流出水中 HPC はある程度配管内のバイオフィーム蓄積状況を反映していると考えられる。

一方、エンドトキシンについては、残留塩素なしのリアクターでは 50 日経過後から増大および変動がみられた。残留塩素 0.1 mgCl₂/L のリアクターでは流出水中エンドトキシン濃度の増大はわずかであった。流入水・流出水中の HPC と総エンドトキシンの関係を図 2 に示す。特に流出水中の HPC が 5000 CFU/mL 以上となるような著しい微生物再増殖が起こっている条件下では、総エンドトキシンの顕著な増大が確認された。ただし、回分実験により確認された遊離エンドトキシン比率の有意な低下は、連続通水試験では確認することができなかった。この理由として、実際の給配水系統試料のように残留塩素やせん断力などのストレス因子が存在する

表-2 回分培養による微生物再増殖試料中のエンドトキシンと HPC

	非増殖試料			増殖試料		
	採水直後	1日後	7日後	採水直後	1日後	7日後
総エンドトキシン(EU/mL)	1.82 ± 0.83	2.28 ± 0.44	1.35 ± 0.25	1.32 ± 0.33	2.29 ± 0.61	17.3 ± 12.0*
遊離エンドトキシン(EU/mL)	1.76 ± 0.60	2.03 ± 0.38	1.26 ± 0.27	1.36 ± 0.29	2.10 ± 0.37	3.03 ± 1.37*
遊離エンドトキシン比率	1.00 ± 0.15	0.91 ± 0.16	0.94 ± 0.11	1.05 ± 0.19	0.95 ± 0.19	0.23 ± 0.13*
HPC (CFU/mL)	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	4.9 ± 5.3*	240000 ± 90000*

*: 非増殖試料に対して $p < 0.01$

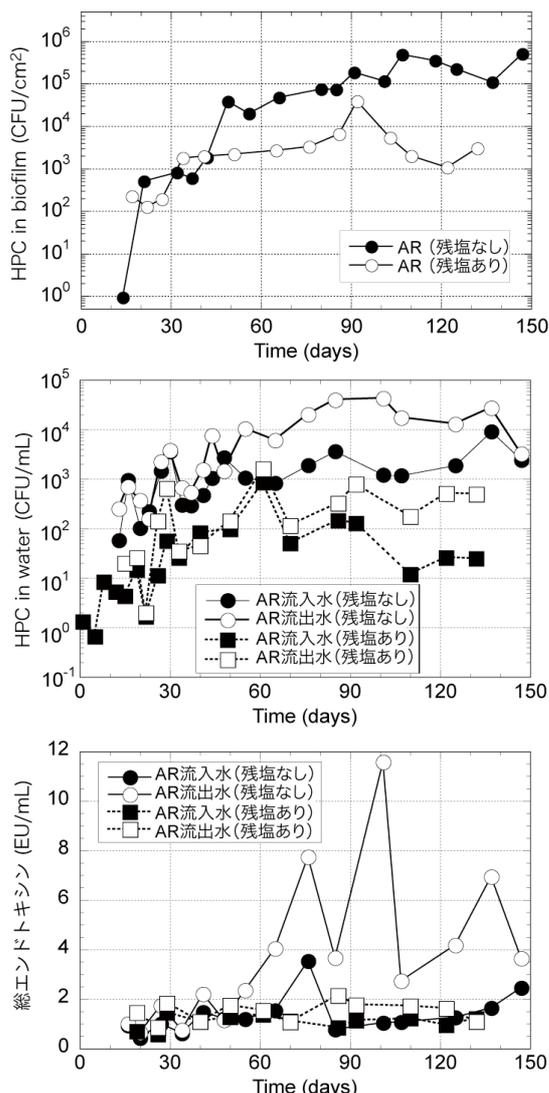


図-1 バイオフィームおよび流入・流出水中の微生物量/エンドトキシンの経時変化

条件下においては、微生物細胞膜も何らかの損傷を受けやすい状況にあり、遊離エンドトキシンの増大も同時に起こること、また今回の運転条件ではリアクター内の滞留時間が約2時間と非常に短いため、損傷を受けた微生物が十分に回復する時間がなかったためと推測される。総エンドトキシン濃度による規準化を行った遊離エンドトキシン比率という指標を用いることにより、元々のエンドトキシン濃度が異なる試料間の比較が可能になると期待されたが、今回の結果からは上記の理由からむしろ総エンドトキシンを指標として用いた方が良いと判断される。

(4) BrdU ラベル化法の条件決定

R2A 平板培地を用いて測定した P17 株細胞数と波長 405 nm における吸光度 (=BrdU 標識 DNA 量) との関係を図-2 に示す。5 時間反応後の *P. fluorescens* P17 株の BrdU 標識 DNA 量は、P17 株細胞数の対数值に比例した。また、BrdU 濃度により上記線形関係が

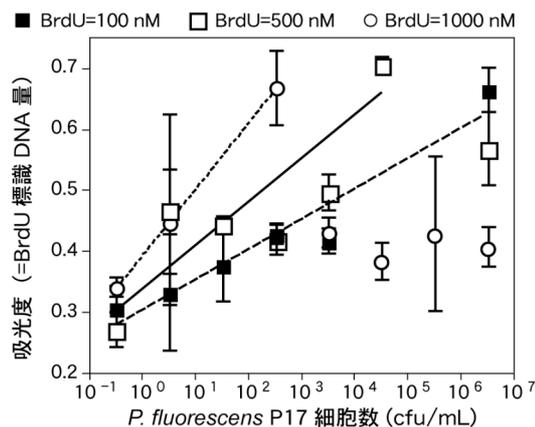


図-2 BrdU 濃度が標識 DNA 量に及ぼす影響

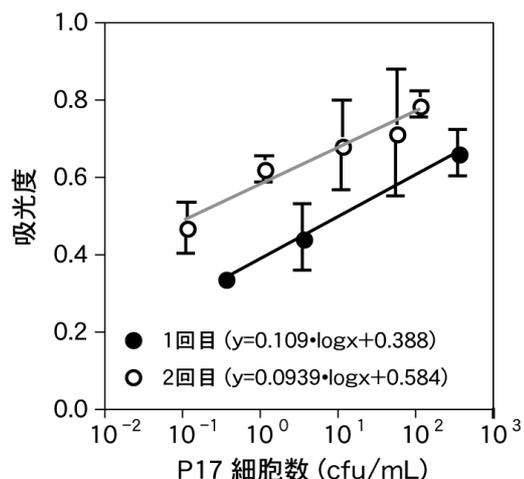


図-3 P17 細胞数と BrdU 標識 DNA 量の関係

得られる HPC 範囲が変化した。ここで、水道水中の微生物濃度を想定すると、今回検討を行った BrdU 濃度のうち 1000 nM が最も適していると考えられる。この条件における定量可能 HPC の上限は 10^3 cfu/mL、下限は 0.1 cfu/mL 付近であった。

続いて、BrdU 濃度を 1000 nM に固定して、プロトコルの再現性を確認した。図-3 に示すように、2 回の測定において Δ 吸光度 / $\Delta \log(\text{微生物数})$ (=図中の傾き) は約 0.1 とほぼ等しい値を示したが、y 切片に相当するバックグラウンド値が測定回ごとに大きく変動することが確認された。何らかの方法でバックグラウンド補正を行う必要性が示された。

本手法により、36 時間程度で増殖微生物数の予測が可能となり、検出下限も 0.1 cfu/mL 相当であったことから、迅速かつ高感度な増殖モニタリング方法になりうると期待される。

最後に、実際の水道水に対して本手法を適用した。未濃縮水道水試料の HPC は 1 未満であり、検出限界以下であった。一方、得られた吸光度を図-3 で算出した P17 株の回帰式を用いて換算したところ、未濃縮試料で 1.0 cfu/mL、10 倍濃縮試料では 16.2 cfu/mL 相当

となった。この結果から、本手法は水道水のような極めて低濃度 HPC 試料に対しても適用可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Ohkouchi, Y., Ly, B. T., and Itoh, S.: Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator, *Advances in Asian Environ. Eng.*, 2009 (*in press*)(査読有)
- 2) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 従属栄養細菌の迅速定量を目的としたプロモデオキシウリジンラベル化 DNA の定量方法に関する基礎的検討, 環境衛生工学研究, Vol.22, No.3, pp.127-124, 2008(査読無)
- 3) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦: 水環境におけるエンドトキシンの変動要因と浄水処理過程におけるエンドトキシン除去特性, 環境工学研究論文集, Vol. 44, pp.247-254, 2007, 査読有
- 4) Ly, B. T., Kusano, T., Ohkouchi, Y., and Itoh, S.: Primary investigation of affected factors and indicated parameters for bacterial regrowth in drinking water distribution system –A case study in Kyoto city, *The 14th Seminar of JSPS-MOE Core University Program on Urban Environment*, pp.187-198, 2007, 査読無
- 5) 石川卓, 小林憲太郎, 高橋恭介, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 環境水中エンドトキシンに対するシアノバクテリアの寄与に関する研究, 環境衛生工学研究, Vol.21, No.3, pp.47-50, 2007, 査読無

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 大河内由美子, 浅田安廣, 伊藤禎彦: DNA 合成量に基づいた従属栄養細菌の迅速定量に関する基礎的検討, 第 41 回日本水環境学会年会, 2008 年 3 月, 名古屋市
- 2) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦: 浄水処理過程における微生物およびその由来物質の挙動に関する研究, 第 58 回全国水道研究発表会, 2007 年 5 月, 釧路市

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河内 由美子 (OHKOUCHI YUMIKO)
京都大学・地球環境学堂・助教
研究者番号: 00391079