

II-437 藻類混合培養槽内における ファージの不活性化過程について

日本上下水道設計K.K. 正員 鈴木 真一
岩手大学 正員 大村 達夫 大沼 正郎 相沢 治郎

1. はじめに 本研究では、ウィルス汚染に対する指標として考慮されてきているコリファージについて富栄養化水域とみなされうる藻類混合培養槽内においてその挙動を実験的に解明しようとしたものである。

2. 実験方法 本研究に用いられた実験装置は容量5 lの連続流完全混合反応槽である。反応槽内の水理学的滞留時間は4日とし、上部より20 Wの白色蛍光管を2本照射した。槽内には盛岡市内にある高松の池より採取してきた水を遠心分離し、その沈殿物を藻類の植種として反応槽に加えた。なお、反応槽への流入水は Chuの培地から成っている。そして、藻類が増殖し反応槽内における水質が定常期になったと考えられる時点においてあらかじめ純粋培養しておいたコリファージとその宿主細菌である E. coli Bを植種した後、反応槽内のコリファージ数および E. coli Bの数をそれぞれ経日的に測定しその生存状況を調べた。また比較のために、tab. 1に示されている様な各条件下における4ケースの実験が行なわれた。

E. coli Bの測定には、デスオキシコーレイト平板法を用いコリファージの測定は以下に示す方法を用いた。

3. コリファージの測定方法 宿主細菌 E. coli Bをtab. 2に示すようなTSA培地上で増殖させる。このTSA培地上から1白金耳量を tab. 3に示すようなTSB培地に植種、培養した後、無菌的にプラスチック管に10 mlずつ分注する。これを-20℃で凍結保存し実験の際に host cellとして用いる。そしてコリファージ数が30~300個以内に入る様に10倍希釈法を用いて試料水を適当に希釈し測定した。操作方法

としてはまず frozen host cellを45℃の water bath上で溶かしておく。次に、反応槽内からサンプリングした試料水又は適当に希釈した検水2 ml, host cell 1 ml, 及びTP TZ試薬 0.03 mlを tab. 4に示すような組成のMTSA培地 8.5 ml中に加え完全に混合した後、ペトリ皿に注ぎ固まらせる。そして37℃で一晩培養した後、出現したコリファージのブラック数を測定する。

4. 実験結果及び考察 fig. 1に培養したコリファージの電子顕微鏡写真を示す。写真の撮影には、ネガティブ染色法を用いた。まず2%グルタルアルデヒドで試料を固定し、これをカーボンコートコロジオン膜メッシュ上に取り、風乾させ1%酢酸ウランで染色し再び乾燥させた後、電顕にかけたものである。コリファージのはっきりした同定は行なっていないが、大腸菌 (E. coli) を宿主細菌とするT系ファージと思われる。この写真からその大きさを計算すると頭部はおおよそ 98×72 nm, 尾部の長さは約 114 nmであった。この様に準備されたコリファージを用いて tab. 1で述べられたような実験条件でそれぞれ

table 1 Experimental conditions

	Algae	Coliphage	E.coli. B
RUN 1	○	○	○
RUN 2	○	○	—
RUN 3	—	○	○
RUN 4	—	○	—

○ : existence
— : non existence

table 2 Constituent of
TSA medium.

Tryptone	15.0g
Soytone	5.0g
NaCl	5.0g
Agar	15.0g
distilled water	1.0L
pH=7.3 at 25 °c	

table 3 Constituent of
TSB medium.

Tryptone	17.0g
Soytone	3.0g
Dextrose	2.5g
NaCl	5.0g
K ₂ HPO ₄	2.5g
distilled water	1.0L
pH=7.3 at 25 °c	

table 4 Constituent of
MTSA medium.

Ingredients of TSB	
NH ₄ NO ₃	1.60g
Sr(NO ₃) ₂	0.21g
Agar	15.0 g
distilled water	1.0 L
pH=7.3 at 25 °c	

3回ずつ実験を行なった時のコリファージの濃度変化を fig. 2~4 に示している。ただし、藻類が存在する RUN 1 及び RUN 2 の反応槽内の水質の平均値は、MLSS が 138mg/l, COD_{cr} が 20mg/l, NO₃-N が 0.04mg/l, PO₄-P が 0.62mg/l, pH が 8.5 であった。一方、RUN 3 及び RUN 4 は Chu の培地のみが反応槽内に存在している。これらの図より明らかなことは、RUN 1, 2 においては RUN 3, 4 に比較してコリファージの不活性化が速やかに起こっている事であ

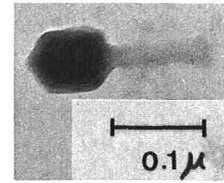


fig.1 Transmission electron micrograph of coliphage.

る。すなわち藻類の存在する系の方がコリファージの不活性化を促進する効果があり、これは藻類がコリファージの不活性化に寄与する細胞外代謝生産物を放出している可能性があることを示している。また同時にコリファージの藻類への吸着による見掛け上の不活性化も考えられる。大垣¹⁾は、酸化池内のコリファージの挙動を調べ、水中の DO が高い時、藻類などの SS へのコリファージの吸着が促進されることを報告している。そこでフラスコレベルでファージの吸着実験を行なったところ tab.5 に示すような結果が得られた。これから、遠心分離後の方が若干高いファージの濃度を示している場合もある。従って、吸着によるファージの濃度の減少は見られず、本研究においてはファージの見掛け上の不活性化をほとんど考慮する必要がないものと思われる。次に、宿主細菌が存在する系、RUN 1, 3 において、宿主細菌が存在しない系、RUN 2, 4 よりコリファージの不活性化が大きくなった。通常、宿主細菌が存在する系の方がコリファージにとっては有利となることが考

tab.5 Effect of adsorption to algae on coliphage density.

MLSS (mg/l)	non-centrifuged samples (PFU/ml)	centrifuged samples (PFU/ml)
304	4.7×10^4	2.4×10^5
272	2.1×10^4	4.9×10^4
172	5.0×10^4	1.5×10^5
116	2.2×10^5	8.6×10^4
54	3.0×10^4	7.8×10^4
19	2.7×10^4	1.1×10^4
16	2.1×10^4	2.8×10^5

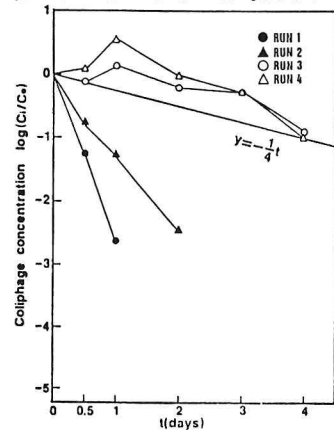


fig 2 Coliphage concentration in a mixed-algal reactor.

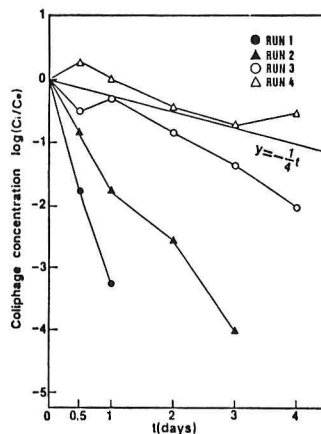


fig 3 Coliphage concentration in a mixed-algal reactor.

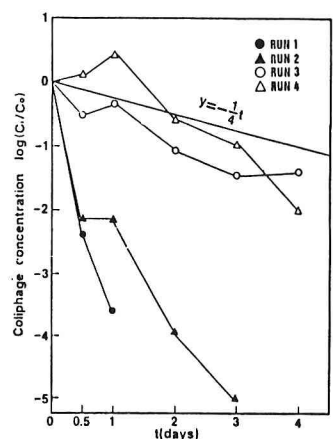


fig 4 Coliphage concentration in a mixed-algal reactor.

参考文献

- 1) 大垣ら、酸化池内でのコリファージの挙動に及ぼす日射の影響、衛生工学研究論文集、第22巻、pp163~171、1986
- 2) 大村ら、藻類混合培養槽内における指標細菌の死滅過程、第14回環境問題シンポジウム、pp67~72、1986