

活性炭を付加した高度浄水処理システムにおける指標ウイルスと微生物の除去

-Real time PCR に基づく定量評価-

岐阜大学工学部 学生会員 ○谷岡敬太 岐阜大学大学院工学研究科 学生会員 田中大貴
 岐阜大学大学院工学研究科 非会員 花田良浩 岐阜大学工学部 非会員 稲毛秀敏
 岐阜大学流域圏科学研究センター 非会員 廣岡佳弥子 正会員 李富生
 大阪工業大学 正会員 笠原伸介

1. はじめに

ヒト腸管系ウイルスには人体内で深刻な疾患を引き起こす病原性のもも含まれ、細菌と比較すると浄水処理過程において不活化・除去されにくく、細菌よりも長時間生残することが知られており、近年着目されている¹⁾。日本の水道水からも実際にヒト腸管系ウイルスが検出された事例が報告されている。病原性を有するヒト腸管系ウイルスの汚染から水道水を守るために、浄水場でのウイルスの挙動やウイルスの発生源の特定が重要である。

活性炭吸着は、異臭味物質や農薬などの微量有機物除去を目的として従来の浄水処理方式の後段に付加されることによる高度な浄水処理方法である。活性炭は細孔分布によってはヒト腸管系ウイルスを吸着することが基礎研究から示されているが、実際の活性炭を付加した浄水処理システムでの挙動などについては知見が殆どない。そこで本研究では、活性炭を付加した高度浄水処理過程におけるヒト腸管系ウイルスの代替指標である大腸菌ファージとその宿主となる微生物およびその他の一般的な微生物の挙動を調査し、それらの除去機能の評価を行った。

2. 評価項目と評価方法

調査対象は活性炭処理を付加した高度浄水処理場で処理プロセス順に、原水、凝集剤混和池水、凝集沈殿処理水、中オゾン処理水、急速ろ過水、後オゾン処理水、粒状活性炭(GAC)処理水、塩素処理後の浄水の計8ヶ所で2010年8月と11月の2回採水・調査を行った。

調査項目として、ヒト腸管系ウイルスと挙動が類似しており代替指標として推奨される大腸菌ファージを用いた。また、微生物関係指標として一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌、大腸菌群、DNAに基づく全細菌の濃度を測定した。

大腸菌ファージは、培養法であるブラック形成法と分子生物学的手法である Real-time PCR 法により定量した。ブラック形成法は宿主に感染できる活性のある F 特異 RNA ファージを定量するものである。検

出のための宿主としてサルモネラ菌 WG49 を用い、試料水 1mL あたりのブラック形成数 (PFU) を求めた。Real-time PCR 法では試料水 500mL を酸洗浄アルカリ誘出法と Centriprep YM-50(Millipore 製)を用いた遠心操作により濃縮後、boiling 法²⁾により RNA を抽出し、その後 ReverTra Ace qPCR RT Kit(TOYOBO 製)を用いて逆転写を行った。逆転写により生成した c-DNA を THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(TOYOBO 製)を用いて Taq Man 法による Real-time PCR により定量した。プライマーとプローブのセットは F 特異 RNA ファージの中で動物糞便由来であるグループ I とヒト糞便由来のグループ III にそれぞれ特異的なもの³⁾を用い、由来別のファージ濃度を測定できるようにした。

DNA に基づく全細菌の定量では、試料水 500mL を 0.45 μ m セルロースアセテートフィルターでろ過し、そのろ紙に拘束された細菌から PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO 製)を用いて DNA を抽出・精製した。この DNA 抽出液を SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa 製)を用いたインターカレーター法による Real-time PCR に供し、定量した。プライマーは真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とする com1 と com2⁴⁾を用いた。

一般細菌、従属栄養細菌はそれぞれ上水試験法に定める標準寒天培地法、PGY 寒天培地法に従い、濃度を求めた。大腸菌群・大腸菌は IPTG 添加 ONPG-MUG 培地 (ES コリキャッチ、栄研化学)を用いて上水試験法に定める特定酵素基質培地法に従い、最確数 (MPN) を求めた。

3. 結果と考察

8月と11月の結果を表1に示す。平板培養では F 特異 RNA ファージは一度も検出されなかったが、Real-time PCR 法では F 特異 RNA ファージのグループ III ファージが8月の中オゾン処理水で 96.5PFU/mL、11月の急速ろ過水で 19.0PFU/mL 検出された。8月、11月ともに原水では検出されなかったのに対し、処理プロセス中において検出されたのは、本研究で

表 1 各処理方法における大腸菌ファージと微生物の濃度

	一般細菌	従属栄養細菌	全細菌 as <i>E.coli</i>	大腸菌群	大腸菌	F-RNAファージ ブラック形成法	G I ファージ Real-time PCR	G III ファージ PCR
	CFU/mL	CFU/mL	CFU/mL	MPN/mL	MPN/mL	PFU/mL	PFU/mL	PFU/mL
8月試料水								
原水	50.3 ± 14.5	447 ± 160	$8.0 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^7$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
凝集剤混和池	49.7 ± 17.8	204 ± 60	$1.4 \times 10^7 \pm 2.8 \times 10^6$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
凝集沈殿処理水	3.3 ± 0.6	40 ± 17	$4.7 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^3$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
中オゾン処理水	5.3 ± 4.5	70 ± 44	$3.0 \times 10^4 \pm 6.1 \times 10^3$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	96.5 ± 28
急速砂ろ過水	33 ± 21	887 ± 81	$2.3 \times 10^6 \pm 4.9 \times 10^5$	3,300	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
後オゾン処理水	0 ± 0	0.3 ± 1	$1.4 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^3$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
GAC処理水	1.3 ± 1.5	37 ± 23	$1.6 \times 10^3 \pm 6.3 \times 10^2$	330	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
浄水	2.3 ± 2.5	7.3 ± 1	$2.6 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^2$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
11月 試料水								
原水	797 ± 231	3830 ± 1110	$6.3 \times 10^9 \pm 1.0 \times 10^9$	33,000	700	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
凝集剤混和池	503 ± 118	2977 ± 120	$1.0 \times 10^{10} \pm 6.0 \times 10^9$	490	230	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
凝集沈殿処理水	118 ± 4.4	713 ± 87	$2.6 \times 10^9 \pm 2.5 \times 10^8$	80	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
中オゾン処理水	1.7 ± 1.5	66.3 ± 23	$1.0 \times 10^7 \pm 5.5 \times 10^5$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
急速砂ろ過水	0.3 ± 0.6	390 ± 85	$3.3 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^4$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	19 ± 27
後オゾン処理水	0 ± 0	0 ± 0	$4.5 \times 10^4 \pm 5.7 \times 10^2$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
GAC処理水	0 ± 0	61.7 ± 14	$1.4 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
浄水	0 ± 0	168 ± 14	$6.4 \times 10^5 \pm 9.1 \times 10^4$	-	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

* 値は平均値 ± 標準偏差

- は不検出

対象とした高度浄水処理システムへの流入原水となる河川水中のファージ濃度に時間変化があり、本調査における採取時には濃度が小さかったためであると考えられる。プロセス中から検出されたファージ濃度は比較的低濃度ではあるが、凝集処理やオゾン処理、砂ろ過後でも大腸菌ファージが検出されたため、これらの処理でも条件によっては完全に除去しきれない可能性があるということが示唆された。ただし、これらは分子生物学的手法で活性の有無に関係なく検出したものであり、活性を持った状態のファージは全く検出されなかった。もうひとつの可能性として、プロセス内に一時的に抑留されていたファージがウォッシュアウトされ漏出されたと推察される。研究では、大腸菌ファージの宿主になりうる大腸菌の濃度が、8月の調査では全てのプロセス過程において未検出であり、11月の調査では、原水中に存在した大腸菌は凝集処理とオゾン処理を経て除去され、それ以後は全て検出できなかった。

大腸菌ファージは高度浄水処理システムにより最終的には除去されており、大腸菌ファージと同程度の大きさで、消毒に対し同様の耐性を示すヒト腸管系ウイルスが流入水中に存在した場合にも同様の挙動を示すことが考えられる。一般細菌、従属栄養細菌、全細菌に関しては、浄水プロセス過程で若干の濃度の増加はあるものの、最終的には流入原水に比べて4オーダー程度の濃度の減少となり、処理工程により適切に除去されたことが確認できた。

Real-time PCRによる定量でグループIファージが検出されず、グループIIIファージのみが検出された

ことから、本研究で対象とした高度浄水処理システムに流入するF特異RNAファージは主にヒト糞便由来のものであることが分かった。

4. まとめ

河川水を原水とする高度浄水処理システムによる大腸菌ファージ濃度の除去性を調査し、処理プロセスで存在しているF特異RNAファージのヒト糞便由来のグループIIIが高度浄水処理システムにより微生物の除去とともに除去されることが示された。今後は水道水源での存在実態および処理プロセスでの挙動について調査を重ねる必要があると考えている。

【参考文献】

- 1) IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology : Bacteriophages as model viruses in water quality control, Wat. Res., Vol. 25, pp. 529-545, 1991.
- 2) 片山浩之 *et al.* : 陰電化膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発, 水環境学会誌, 第25巻, pp. 469-475, 2002.
- 3) Sandro Wolf *et al.*, Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, *Journal of Virological Methods*, 149, pp. 123-128, 2008.
- 4) 小塚信幸, 微粒子と生菌数からみた浄水処理過程の評価, 岐阜大学修士論文, pp. 13, 2007.