

緩速ろ過池砂層内における微生物と指標ウイルスの分布と構造に関する研究

岐阜大学大学院工学研究科 学生会員 ○田中大貴 岐阜大学工学部 学生会員 谷岡敬太
 岐阜大学流域圏科学研究センター 非会員 廣岡佳弥子 岐阜大学工学部 正会員 山田俊郎
 岐阜大学流域圏科学研究センター 正会員 李富生

1. はじめに

日本の浄水処理システムは、現在、主として急速ろ過法が用いられているが、生物膜を利用した緩速ろ過法も用いられている。緩速ろ過法は、薬品の使用を必要としないことや他の浄水処理方法に比べて少ないエネルギーで運用できるという利点があるため、発展途上国で比較的簡単に導入できる浄水処理法である。

緩速ろ過のメカニズムは、砂に形成された生物膜による物理化学的な吸着作用と、生物学的な作用によって、水中の浮遊物質、溶解性有機物、微生物などが除去されるものである。ただし、生物膜の構成および鉛直方向での変化、並びに層内におけるウイルスの除去挙動については未だに解明されておらず、水質リスクのさらなる低下を考える場合には、これらについて検討することは大変重要である。

そこで本研究では、実際に使用されている緩速ろ過池の砂層における微生物と指標ウイルスの深度方向の濃度分布と構造変化について従来の培養法に加えて、分子生物学的手法に基づく検討を行った。

2. 実験方法

2010年1月に河川水を原水とする緩速ろ過池を対象に表層から深さ20cmまでの砂層をコアサンプラーを用いて採取し、2cmごとに分割した。

採取した砂をそれぞれ2gずつ量り取り、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PCR-DGGEに供し、真正細菌の群集構造を調べた。プライマーは真正細菌の16S rRNA遺伝子を標的とするGC-EUB341-FとUNIV907-Rを用いた⁽¹⁾。

同様に、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、全細菌の定量をおこなった。プライマーは真正細菌の16S rRNA遺伝子を標的とするcom1とcom2⁽²⁾を用いた。

大腸菌ファージと細菌の培養法における定量のために、層ごとに採取した砂50gにMilli-Q水500mLを加え、100rpmで10分、500rpmで2分攪拌することによって砂粒子上の生物膜を剥離させた。1分間静置させた上澄みを試料とし、指標ウイルスとして大腸菌ファージ、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌群、大腸菌の実験に供した。

大腸菌ファージはブラック形成法に基づいて定量し、砂1gあたりのブラック形成数(PFU)を求めた。宿主大腸菌としてWG49とWG5を用いた。大腸菌ファージのうち、F特異RNAファージは大腸菌のF繊維毛にしか吸着できないため、これを有するWG49

を用いた。ただし菌体表面吸着ファージも同時に検出されるため、F特異RNAファージの増殖を阻害するRNA分解酵素(RNase A)を添加しない系と添加した系の差からF特異RNAファージを求めた。菌体表面吸着ファージはF繊維毛の有無に関係なく大腸菌の細胞壁に吸着するので、F繊維毛を持たないWG5を宿主大腸菌として濃度を求めた。

一般細菌、従属栄養細菌は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、単位砂重量あたりの濃度を求めた。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、砂1gあたりの最確数(MPN)を求めた。

3. 結果と考察

真正細菌群集構造解析の結果を図1に、大腸菌ファージと細菌の定量結果を図2に示す。図1より、砂層の表層で検出されたDGGEバンドの中の何本かは、深度方向が深くなるにつれて薄くなり、10cm以上の深度では完全に検出されなくなった。これは、表層に存在した細菌の何種類かが深部に向かうにつれ減少していったことを示唆する。逆に、深度に向かうにつれて現れる細菌はなかった。すなわち、砂層表面からの深度が深くなっていくに従い、細菌の群集構造が単純になる傾向がみられた。砂層表面からの深度が0-2cmの砂層でもっとも複雑な群集構造が見られ、他の深度ではみられない細菌が存在していた。そこで表層6cmまでのみ見られたBand Aを0~2cmの砂層から、深さ方向ですべて確認されたBand Bを4-6cmの砂層からそれぞれバンドを切り出し、同定を行った。同定結果を表1に示す。検出された細菌は2門(Cyanobacteria, Flavobacteria)であり、その近縁種を表1に示す。

F特異RNAファージはすべての砂層深度において検出されなかった。ろ過池に流入する原水にもF特異RNAファージが検出されていなかったため、F特異RNAファージが同水道水源には存在していなかったことを示唆している。

一方、菌体表面吸着ファージは砂層表面から12cmの深さまで検出された。砂層表面から深くなるにつれて濃度が減少し、12cm以降の深度の砂層では検出されなかった。菌体表面吸着ファージは、砂層表面から12cmまでの砂層で不活化されていることが分かった。

指標微生物については、培養法で検出した一般細菌と従属栄養細菌濃度に比べて1オーダーから2オーダー程度、高い値を示しており、生物膜には生菌

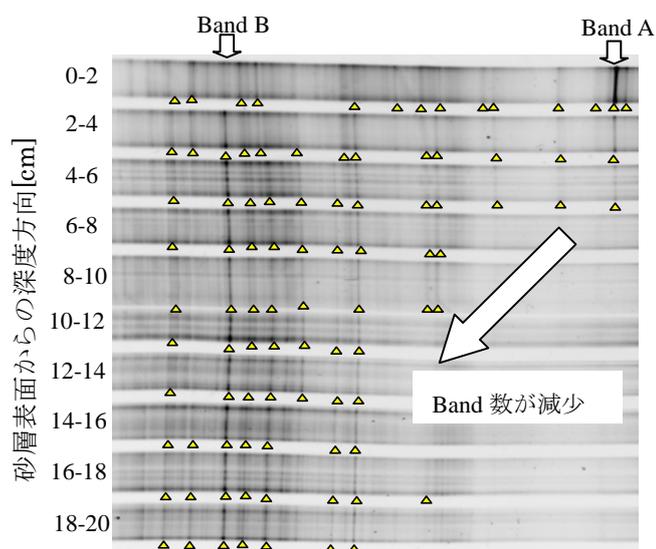


図1 緩速ろ過池砂層内の真正細菌群集構造

表1 細菌の同定結果

Band	Closest	Identity	Number
A	Uncultured cyanobacterium	98%	AY942896
B	Flavobacteria Flavobacteriales	97%	AF493694

に比べて死菌が大量に存在していることが明らかである。

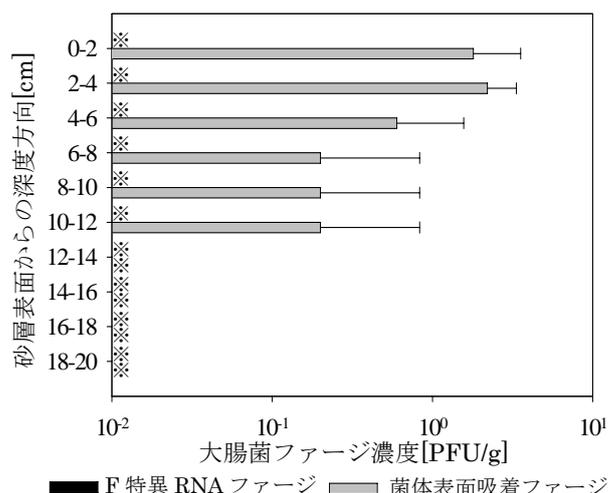
砂層の深度方向において一般細菌、全細菌ともに菌数に大きな変化はなかった。緩速ろ過の浄水機能に一番寄与すると考えられる表層 20cm 以内の砂層に付着している微生物はほぼ同一であることがわかった。しかし、一方で、深度方向にしたがって群集構造は変化していた。これは砂層の深度方向での有機物を含む基質に依存しているためであると考えられる。

大腸菌群は砂層表面からの深度が 2-4cm, 4-6cm の砂層で最も濃度が高く (920MPN/g), それ以降の深度では $10^1 \sim 10^2$ [MPN/g] 程度であり, 細菌全体に占める割合は非常に小さかった。また, 大腸菌は 6-8cm の砂層でのみ検出され, 濃度も非常に低い (2MPN/g) ため, 砂層に流入した大腸菌ファージが砂層中で大腸菌に感染・増殖する可能性はほとんどなかったと考えられた。すなわち, 本調査で砂層から検出された菌体表面吸着ファージは, ほぼ大部分が原水由来で, それらは砂層上部の生物膜によって不活化されていたという推測の裏づけとなった。

4. まとめ

実際に使用されている緩速ろ過池の砂層における微生物と指標ウイルスの深度方向の濃度分布と構造変化について従来の培養法に加えて, 分子生物学的手法に基づく検討を行った。その結果, 砂層 20cm までにおける個数密度の差は小さく, 菌体表面吸着ファージは上層から下層へと濃度が減少した。砂層表面からの深度が深くなっていくに従い, DGGE バンド数から見た微生物種は単純化されていることが明らかとなった。

A : 大腸菌ファージ



B : 指標微生物

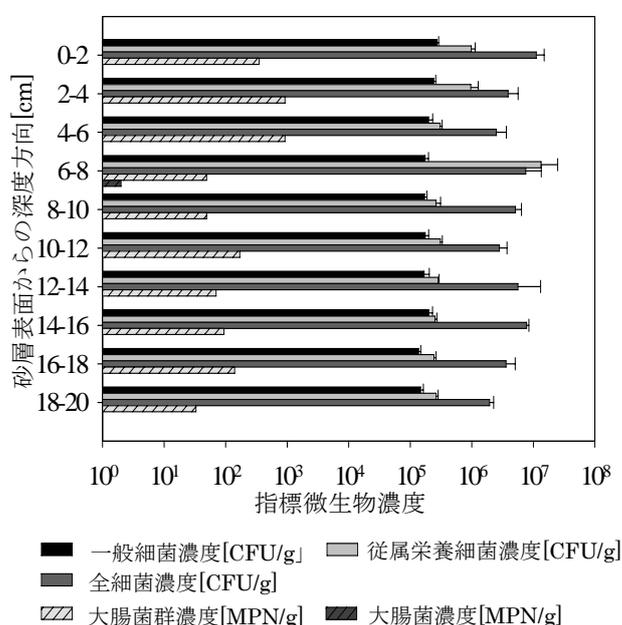


図2 緩速ろ過池砂層における大腸菌ファージ濃度 (A) と微生物濃度 (B) の分布 (※: 不検出, エラーバー: 標準偏差, 全細菌は DNA から CFU/g に換算, 大腸菌ファージ, 一般細菌, 従属栄養細菌 (n=10), 全細菌 (n=3), 大腸菌群, 大腸菌 (n=1))

【参考文献】

- (1) W.G, WEISBURG, 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol.173, No.2, pp697-703, 1991
- (2) W.Zhou, Monitoring of microbiological water quality by real-time PCR, Environmental Technology, Vol.28, pp545-553, 2007