

藻類混合培養槽内におけるファージの死滅過程について

岩手大学工学部 学○鈴木真一 八木 徹 那須 智
正 大村達夫 正 大沼正郎 正 相沢治郎

1. はじめに 富栄養化された水域における水質が衛生的に安全であるかどうか評価する際、大腸菌群が病原性細菌の存在を示す代表的な指標として用いられている。しかしながら水質をウイルス学的な見知から評価する場合、大腸菌群の様は細菌学的なレベルで論じようとするには、かなり無理がある様と思われる。けれども、腸管系ウイルスを直接測定し、水質を評価しようとする事は費用、技術、施設、時間等の面から容易ではない。そこで今日、クローズアップされてきているのが細菌に寄生して増殖するバクテリオファージである。バクテリオファージであるコリファージは、病原性腸管系ウイルス(アデノウイルス、エコーウイルス、コクサッキーウイルス等)と違い、その存在数を容易かつ安全しかもじんに速に測定できる。また、その大きさや特性も腸管系ウイルスの指標として用いるには適当であると思われる。しかしながら、富栄養化水域におけるコリファージの指標ウイルスとしての有効性を検討した研究例は少ない。本研究では、こうしたコリファージの性質に注目して、富栄養化水域とみなされる藻類混合培養槽内においてその生存特性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5L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20cmの白色けい光管を2本照射した。槽内には盛岡市内にある高松の池より採水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、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菌であるE. coli Bを植種しその後、反応槽内のコリファージ数及び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、様々の条件下における4ケースの実験が行われ、表1に示されている。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. ファージの測定方法 宿主菌E. coli Bを表2に示すTSA培地上で増殖させる。このTSA培地上から1白金耳量を表3に示す様なTSB液体培地に植種し培養した後、無菌的にアラスティック管に10ml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。本法では、コリファージを5PFU/100ml以上含む試料水に対して適応できるので、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44.5℃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

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	

した検水2ml, host cell 1ml及びTPTZ試薬0.08mlを表4に示す組成のMTSA培地8.5ml中に加え完全に混合した後ペトリ皿に注ぎ固めさせる。37℃で一晚培養した後、出現したコリファージのプラーク数を測定する。

4. 実験結果および考察 図1に培養したコリファージの電顕写真を示す。写真の撮影には、ネガティブ染色法を用いた。まず2% ク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とり、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。ファージのはっきりとした同定は行っていないが、大腸菌(*E. coli* B)を宿主菌とするT系ファージと思われる。この写真から頭部の長さは約98nm、幅約72nm、尾部の長さ約114nmであった。この様に準備されたコリファージを用いて、表1に述べられた実験条件で実験を3回行った結果のコリファージの濃度が図2~4に示されている。ただし、藻類が存在するRUN1及び2の反応槽内の水質の平均値は、MLSSが138mg/l, CODcrが20mg/l, $\text{NH}_4\text{-N}$ が0.04mg/l, $\text{PO}_4\text{-P}$ が0.62mg/l, pHが8.5であった。一方、RUN3及び4はChlo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、RUN1, 2においてはRUN3, 4に比較してコリファージの不活性化が速やかに起っていることである。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代謝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、コリファージの藻類への吸着による見か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、水中の溶存酸素濃度が高い時藻類等の浮遊物質へのコリファージの吸着が促進されることを示している。本実験においては、反応槽内の溶存酸素濃度が高いことからこの点については現在検討を行っている。次にコリファージの宿主菌である*E. coli* Bが存在する系、RUN1, 3において存在しない系RUN2, 4よりコリファージの不活性化が小さくなった。通常、宿主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えられるが実験結果は逆になっている。この点については、宿主菌である*E. coli* Bが藻類培養槽内において、かなり速やかに死滅することが知られており、必ずしもこの様な条件においては*E. coli* Bが、コリファージの宿主菌としての役割を演じていないものと考えられる。従って、本研究においては、コリファージの不活性化において藻類の存在する系と、藻類の存在しない系の間での差の方が重要な要素になっているものと考えられる。

《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, 藻類の混合培養槽内における指標細菌の死滅過程, 第4回環境問題シンポジウム, PP 67~72, 1986

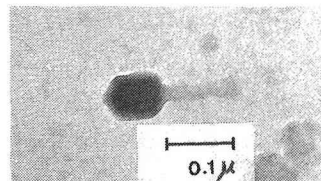


fig 1 transmission electron micrograph of coliphage.

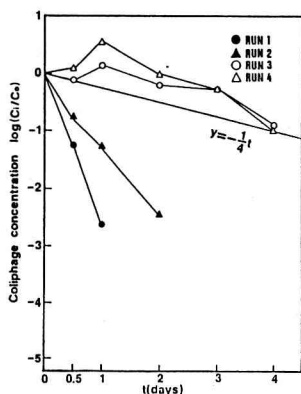


fig 2 Coliphage concentration in a mixed-algal reactor.

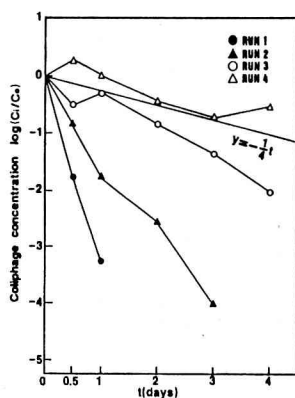


fig 3 Coliphage concentration in a mixed-algal reactor.

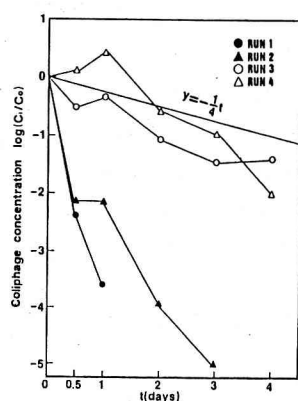


fig 4 Coliphage concentration in a mixed-algal reactor.