

# 水環境中における VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果

八戸高専 学生会員 ○沢谷 圭介 東京大学 福士 謙介  
須藤 誠 八戸高専 正会員 矢口 淳一  
正会員 金子仲一郎

## 1. 目的

水環境や水道水、排水中に活性のある微生物がどれだけ存在しているかは衛生学上非常に重要なポイントである。従来微生物の存在量は、寒天培地を使用した平板培養法によって測定されてきた。しかし、最近水環境中には生存しているものの培養できない状態にある細菌(Viable but nonculturable;VNC)が少なからず存在することが明らかになってきた。このような VNC 状態にある細菌類は従来の手法では計数できず、存在する細菌数を過小評価してしまう。そこで我々は、VNC 状態の細菌を検出し計測する方法を確立し、それらの方法を用いて青森県内 5 河川と下水処理場での VNC 状態の細菌の存在量を調査した。その結果、VNC 状態の細菌は平板培養法で計測した生菌数よりかなり多く、水環境中には VNC 状態にある細菌が多数存在することが確かめられた。<sup>1)</sup>本研究では、VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果を検討するため、大腸菌 *Escherichia coli* を使用して塩素消毒実験を行った。

## 2. 実験材料および方法

1) 実験材料 理化学研究所系統保存施設から大腸菌 *Escherichia coli*(JCM1649<sup>T</sup>)を購入して実験に用いた。染色に使用した蛍光試薬類は、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (和光純薬)、CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) (Polysciences 社)、BacLight<sup>TM</sup>(Molecular Probes 社)である。

2) 塩素消毒実験 大腸菌を、R2A 培地を用いて一晚 25°Cで振とう培養し、培養液を遠心濃縮してリン酸緩衝液で 2 回洗浄した。300mL の三角フラスコに超純水(和光純薬)で作成したリン酸緩衝液(pH 7.2)200mL を入れて滅菌し、20°Cの恒温水槽に設置した。洗浄した大腸菌を濃度が約  $1 \times 10^7$  個/mL 前後となるように三角フラスコに接種した。塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液(和光純薬)を使用し、初期塩素濃度を 0.05mg/L ~ 0.7mg/L となるように投入し、三角フラスコをスターラーで攪拌しながら 1~2 分間塩素処理して試料を採取した。脱塩素剤として、100mg/L の濃度のチオ硫酸ナトリウム溶液を用いた。

3) 細菌数計測 大腸菌の菌数計測には、非選択培地として R2A 培地と大腸菌群の選択培地である m-Endo 培地(Difco)を用い、R2A 培地は平板培養法、m-Endo 培地はメンブレンフィルター法で計測した。全菌数はポリカーボネイトフィルター(Advantec 製、孔径  $0.2 \mu m$ )にろ過捕集後、蛍光染色剤 DAPI 溶液で染色し落射蛍光顕微鏡で計数した。生理的活性のある細菌を評価する手法として、DVC 法、マイクロコロニー法、CTC 法、BacLight 試薬を使用した。4つの方法とも全菌数測定法と同様、ポリカーボネイトフィルター上に細菌を捕集し蛍光試薬を利用して計測するものである。<sup>1)</sup>

## 3. 結果と考察

図-1 に残留塩素濃度と塩素処理前後の全菌数と大腸菌数の変化を示した。図-1 に示したのは塩素処理時間 2 分間の実験データである。塩素処理によって不活性化された大腸菌も検出する全菌数は

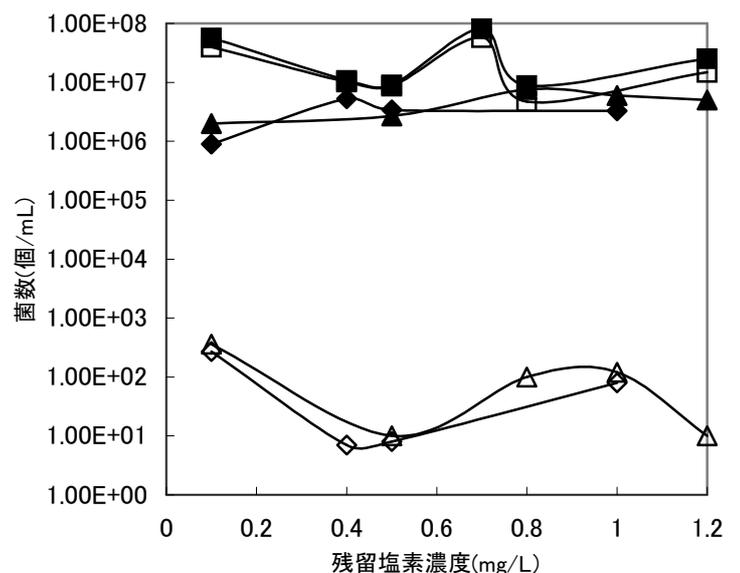


図-1 塩素処理による全菌数と大腸菌数の変化

処理前、処理後ともにほぼ同数で  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  個/mL の間で推移した。一方、培養法で計測された大腸菌数は塩素処理前では全菌数より少なく  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  個/mL で、処理後では  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3$  個/mL の範囲となり、処理前に比べて 3~6 オーダー低い値となった。非選択培地である R2A 培地と、選択培地の m-Endo 培地で測定した処理後の大腸菌数には明白な違いは認められなかった。

図-2 には、生理的活性のある細菌を顕微鏡下で検出する 4 つの方法で求めた VNC 状態の大腸菌の塩素処理前後の菌数変化を示した。図-2 も塩素処理時間 2 分間のデータである。残留塩素濃度 0.7mg/L の場合、塩素処理前の BacLight 法で計測した大腸菌数が図-1 の全菌数を越えているが、BacLight 法でも全菌数は計測でき、<sup>1)</sup>このとき  $3.8 \times 10^8$  個/mL となった。またマイクロコロニー法では、コロニーが発生しすぎて計測不能となるケースが見られた。図-1 に示した培養法で求めた大腸菌数の変化とは大きく異なり、VNC 状態の大腸菌は塩素処理前に比べて処理後は 1~3 オーダー程度しか菌数の変化がなかった。

図-3 には、塩素処理に伴う不活化の割合と CT 値(残留塩素濃度と時間の積)の関係を示した。塩素処理による大腸菌の減少は(1)式で表される。<sup>2)</sup>

$$\ln(N/N_0) = -k \int C \cdot dt \quad \dots (1)$$

$N$ : 塩素処理後微生物数  $N_0$ : 塩素処理前微生物数  
 $k$ : 不活化速度定数  $C$ : 塩素濃度  $t$ : 塩素処理時間

表-1 には、それぞれの大腸菌計測方法毎に(1)式より求めた不活化速度定数  $k$  を示した。VNC 状態の大腸菌を計測する 4 つの方法で求めた  $k$  値は大差がなく、R2A や m-Endo 培地による培養法の 1/2~1/3 程度であった。また窪ら<sup>2)</sup>が指摘しているように、CT 値 0.5(mg・min/L) 以下では  $k$  値が大きく異なり、塩素処理による不活化の機構が異なっていることも示唆された。特に R2A、m-Endo 培地で測定した大腸菌数の変化は、CT 値の範囲で大きく変化していた。

表-1 各計測方法の不活性化速度定数  $k$

大腸菌計測方法	R2A	m-Endo	BacLight	CTC	マイクロコロニー	DVC
$k$ (L/mg/min)	-3.6	-2.8	-1.0	-1.3	-1.6	-1.3

- <参考文献> 1) 沢谷圭介,金子伸一郎,矢口淳一: 環境工学研究論文集 Vol.43, pp551\_558 (2006)  
 2) 窪華奈子,大瀧雅寛: 第 42 回環境工学研究フォーラム講演集, pp75\_77 (2005)

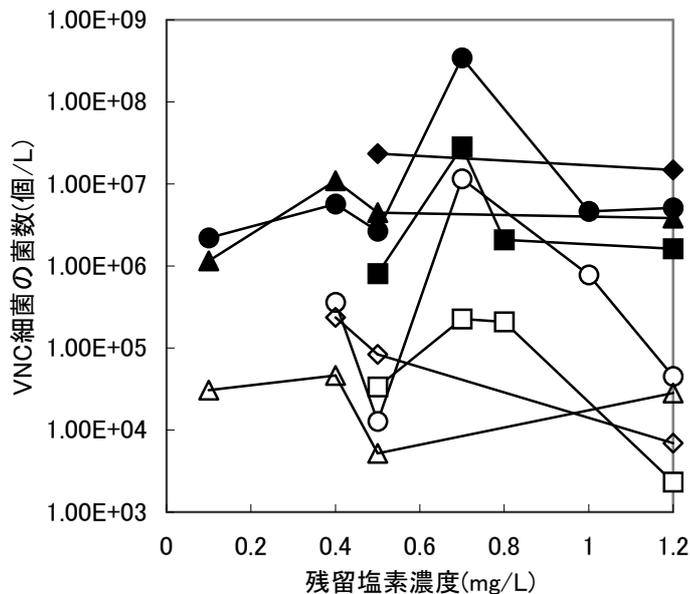


図-2 残留塩素濃度に対する VNC 状態の大腸菌数の変化

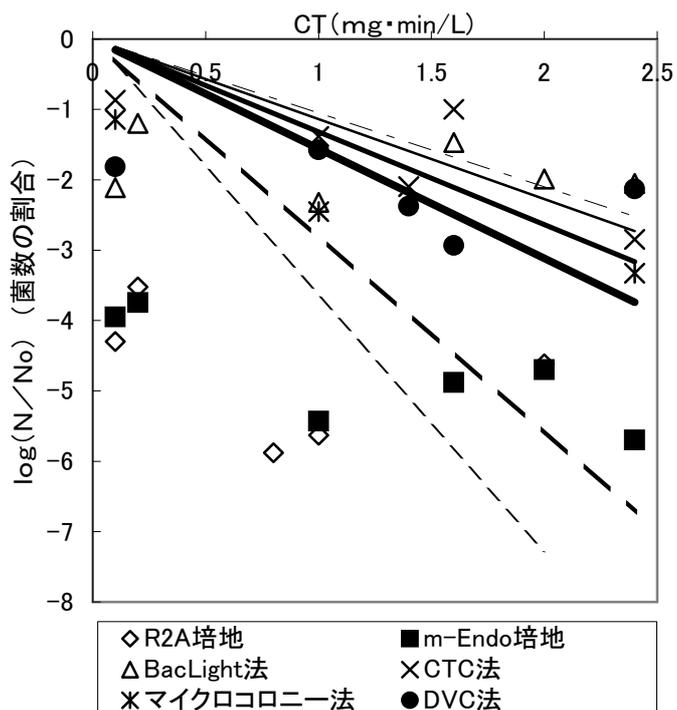


図-3 塩素処理による不活化と CT 値の関係