

(14) 酸化池内でのコリファージの挙動に及ぼす日射の影響

EFFECT OF SUNLIGHT ON THE FATE OF COLIPHAGE IN
AN OXIDATION POND

大垣 真一郎^{*}, アウラビン・ケラタナク^{**}, ウタイパン・ブラセソム^{**}

Shinichiro OHGAKI^{*}, Awrapin Ketratanakul^{**}, Uthaiphun Prasertsom^{**}

ABSTRACT; Increase in water use has required an understanding of the inactivation process or survival mechanism of enteric viruses in natural waters for preventing waterborne diseases due to pathogenic viruses. The fate of virus in an oxidation pond (in Bangkok, Thailand) was investigated using coliphage (host cell: E. coli B) as an indicator of virus. Batch experiments showed the adsorption of coliphage to the microbial particulates (mainly algae) occurred in aerobic conditions. The desorption of coliphage from the particulates was observed under anaerobic conditions. The adsorption-desorption process was reversible and was controlled by dissolved oxygen concentration. The same mechanism of adsorption-desorption was observed in the oxidation pond. The degree of inactivation of coliphage in the oxidation pond (design retention time = 20 days) was 90 % (1 log). Survey with submerged bottles in the oxidation pond and sunlight-expose experiment using beakers showed that coliphage would be inactivated by sunlight only near water surface (less than 10 cm depth at the deepest estimate) in the oxidation pond.

KEYWORDS; Virus, oxidation pond, sunlight, inactivation, adsorption-desorption.

1. はじめに

河川水や運河の水を直接接触型で利用することがまだ盛んに行なわれている開発途上国においては、水質汚濁防止対策の中でも腸管系病原性ウイルスの対策は最も緊急な課題の一つである。また、被害は出ていないものの、廃水の再利用あるいは河川水系の高度利用が進んでいる日本などの先進諸国にとっても、腸管系ウイルス汚染の実態把握と処理施設内および水系内でのウイルスの消長の解析は重要な課題である。腸管系ウイルスが2次下水処理水からも分離されることは、Mahdy (1979)¹⁾や矢野ら(1985)²⁾によって報告されている。

丘(1980~1981)³⁾の総説に示されているように、ウイルスの自然水系中での挙動は、未解明の点が多く、ウイルス対策のための体系立った水系汚濁管理体制の確立がおくれる原因の一つとなっている。Smithら(1978)⁴⁾とDahlingとSafferman(1979)⁵⁾は腸管系ウイルスが自然水系中で長く生存し続けることを

* 東京大学工学部都市工学科, Department of Urban Eng. The Univ. of Tokyo.,

** Asian Institute of Technology (AIT), Bangkok.

報告している。

腸管系病原ウイルスを直接測定して研究することは可能であり、必要であるが、特殊な施設が必要である点、熟練技術を要する点、費用が高い点、危険なためトレーサーとして病原ウイルスそのものを使用できない点など、その調査・研究に当ってはいろいろな障害がある。これらの障害を避ける方策として、大腸菌を宿主とするコリファージを腸管系病原ウイルスの指標として利用することを提唱している研究者がいる（Kottら1974⁶⁾、Kottら1978⁷⁾、Grabowら1978⁸⁾）。その理由は、コリファージは、病原ウイルスより一般的に耐性があり、簡便で経済的な手法によって短時間（1日）で測定でき、かつ、人体に全く危険性がないことである。工学的観点からも、トレーサーとして人為的な注入等も可能であり、有用な指標となりうる。もちろん、ウイルスのもつ特異性、動物ウイルスと細菌ウイルスの相違からコリファージを指標とすることには限界はある。それを示した研究（Bell, 1976⁹⁾、Neimi 1976¹⁰⁾）もある。

本研究は、E.coli. Bを宿主菌とするコリファージを指標として、酸化池（タイ国バンコク市）内でのウイルスの挙動を調べたものである。①酸化池内の調査、②溶存酸素濃度とコリファージの挙動の関係、③日射による不活化、の3つの調査・実験から構成されている。酸化池のウイルス除去機構を知ることと共に、自然の気象条件下にある酸化池内でのコリファージの消長の解明により、自然水系中でのウイルスの消長に関する情報および、コリファージの指標ウイルスとしての有効性と限界についての情報を得ることも本研究の目的に含まれている。

2 対象とした酸化池と実験方法

2.1 酸化池

タイ国バンコク市北40km（北緯約14度）にあるアジア工科大学（AIT）の廃水処理用酸化池である。約600名の学生の工科大大学院教育と研究活動の廃水および学生寮、職員寮等（計約900名規模）からの生活廃水を受け入れている。Fig.1に示すように設計滞留時間8日の第1池と同20日の第2池が直列につながれたものであり2系列ある。水深は約1.4mである。

2.2 用いたコリファージとその定量方法

(A)培地。ペプトンブイヨンの組成は、0.1% Bacto ペプトン、0.3% 牛肉エキス（Difco Nutrient broth）および0.5% NaCl、0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.005% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、0.15% ブドウ糖である。ペプトン寒天培地は、このブイヨンにBacto-寒天（Difco）1.1%を加えた。ペプトン上層寒天培地は寒天を0.6%としたものを用いた。ブイヨンは、宿主菌（*Escherichia coli* B）の培養およびコリファージ測定時の試料の希釈にも用いた。

(B)宿主菌（指示菌）。AITの農業食糧工学科に保存してあった *Escherichia coli* B を宿主菌として用いた。

(C)コリファージの分離と増殖。酸化池処理水の放流先である小運河 Klong Nueng の水を4℃ 12,000 rpm で10分間遠沈し、その上澄液を滅菌した0.45 μm メンブレンフィルターによってろ過した。下記に示すブラック定量法と同じ手法により、この汚

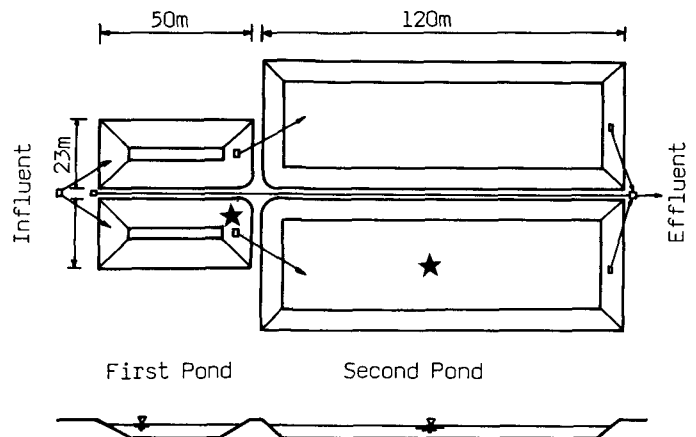


Fig.1 Oxidation Pond of AIT
(★:sampling points)

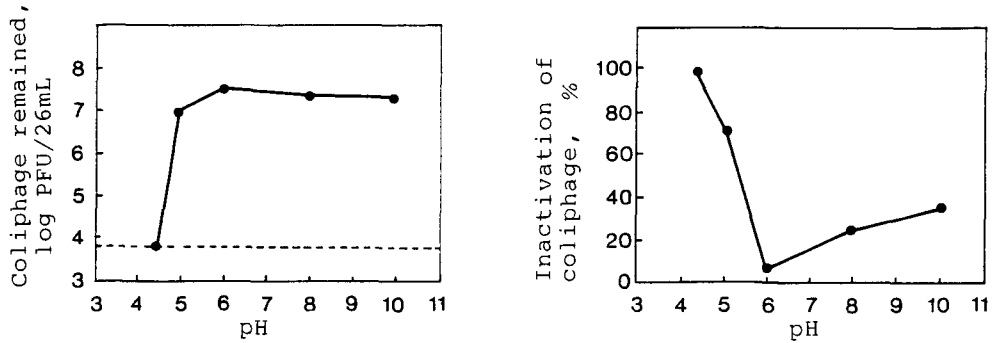


Fig.2 Effect of pH on coliphage inactivation.

note 1) The dotted line shows the minimum detectable count.

note 2) Initial coliphage concentration = 3.3×10^7 PFU/26mL.

液から寒天培地上に単一ブラクを形成させた。この単一ブラクを白金耳でペプトンブイヨンに接種し37℃で4時間培養した後、4℃、12,000 rpmで10分間遠沈した。上澄液を希釈し再び寒天培地上に2度目のブラク形成を行なわせた。さらに3度目のブラク形成の後、同サイズのブラクを、ペプトンブイヨンに2 mlに1ブラクの比率で移した。別に10 mlのペプトンブイヨンにE. coli Bを接種し37℃で3.5～4時間培養した。このE. coli Bの培養液と前述のブラクを移したペプトンブイヨンを1:20の割合で混合し、37℃で2～3時間培養した。透明になった後、4℃、12,000 rpm、10分間の遠沈および滅菌済0.45 μmメンブレンフィルターによる濾過を行なった。濾液を4℃で保存し、各種の実験に用いた。このコリファージ保存液は $10^8 \sim 10^9$ ブラク/mLを示した。

(D)コリファージの定量. 段階的に希釈した試料(0.1 mL), 0.3 mLの宿主菌(あらかじめ培養(37℃, 6時間)しておいたもの), 0.2 mLのCaCl₂液(CaCl₂ · 2H₂O 15 gを1000 mLの水に溶かしたもの)および4 mLの上層寒天培地(加熱溶解45℃に保温)を混合し、寒天平板培地上にプレートし固めた。37℃で1晩培養しブラク数を計数した。30～300ブラクの出ている平板の平均値と希釈倍数から、もとの試料のコリファージ量をPFU(plaque forming unit)/mLとして定量した。

(E)コリファージのpH耐性. コリファージの同定は、バンコクでは純粋株が入手できないため行なえなかった。ただし、pH緩衝液中での1時間振とう実験結果(Fig. 2. Ohgaki et al, 1985¹¹⁾)より、ここで用いたコリファージのpH耐性を知ることができる。pH 5以下では急激に耐性が落ち、pH 8～10で弱い耐性を示した。

2.3. 溶存酸素濃度変動による脱吸着実験

第1池より採取した浮遊状粒子(主に藻類)65 mg/Lを含む液を20本の300 mLガラスビンに分注し、光合成活動を抑えるためアルミホイルで遮光した。コリファージの保存液を各ビンに加え約 10^5 PFU/mLとし、エアポンプにより3時間曝気した。室内(約25℃)に静置し、21時間後に再び曝気(3時間)を行なった。ガラスビン1本は溶存酸素計による溶存酸素(DO)の測定に用い、他のビンはコリ

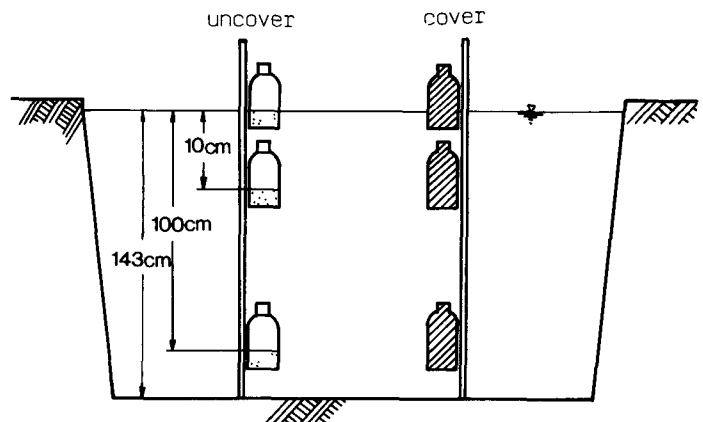


Fig.3 Submerged-bottle experiments system

ファージ濃度の経時変化の測定に用いた。

ビンからの試料を 12,000 rpm, 4℃で 20 分間遠沈し, その上澄液のコリファージ濃度を測定した (後に示す Fig. 4 中の "Supernatant" の値)。沈殿物は 10~20 倍量の 3% 牛肉エキス (pH=9.0) に浮遊させ 10 分間 75 rpm で振とうした。振とうののち, 0.45 μm メンブレンフィルターで濾過し, その濾液のコリファージ濃度をもって, 浮遊状粒子に吸着していたコロファージの量とした (Fig. 4 の "eluate" の値)。この抽出方法は, Seeley (1979)¹²⁾ の方法を一部改めたものである。

2.4 日射による不活化実験

(A) ビーカー等の容器による実験. ビーカー, 試験管あるいはガラスビンに, リン酸 pH 緩衝液または酸化池内浮遊状粒子 (藻類等) を入れ, コリファージの保存液を適当量加えたのち日射にさらした。6 系列の実験を行なった。それぞれの実験条件はあとに示す Table 1. 中に結果と共に示す。アルミホイルによって覆ったものと覆わないものについてコロファージ濃度の変化を測定した。日射量は全天日射量計により測定した。

(B) 酸化池内現場測定実験. ガラスビン (300 mL) にリン酸 pH 緩衝液 (pH=6.7) とコロファージ保存液適当量を入れ, Fig. 3 に示すように, 酸化池の第 2 池の各水深 (水面, 10cm および 100cm) に竹竿を用いて設置 (水深毎に複数のビン) した。アルミホイルで覆った系列と覆わない系列についてコロファージ濃度の変化を測定した。

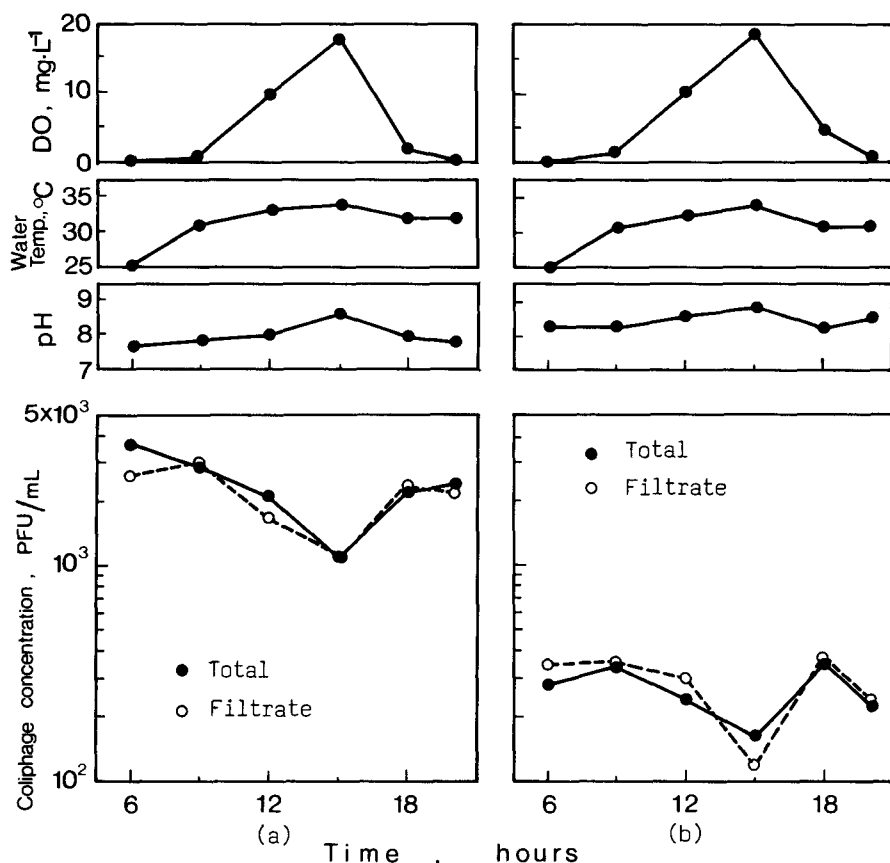


Fig.4 Variation of coliphage concentration (9 May 1985)

(a) 1st pond, ss=77.5, COD_{CR}(Total)=110.7, COD_{CR}(Filtrate)=20.9mg/L,
 (b) 2nd pond, ss=66.3, COD_{CR}(Total)= 78.2, COD_{CR}(Filtrate)=22.9mg/L,

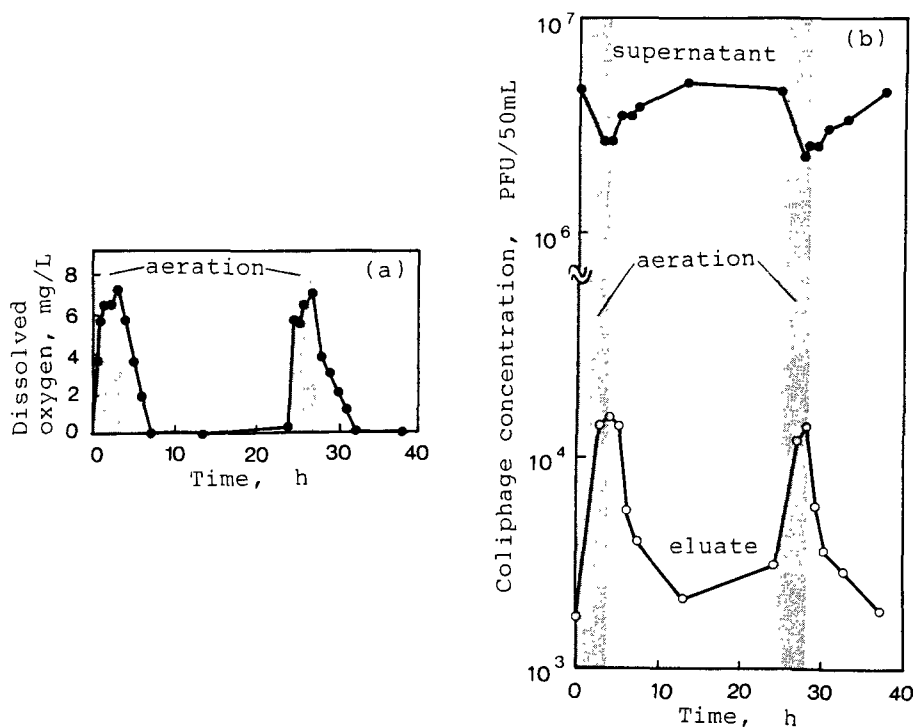


Fig. 5. Adsorption of coliphage to microbial particulates.

3. 調査・実験結果と考察

3. 1. 酸化池内でのコリファージの挙動

Fig. 4 (a)に第1池, Fig. 4 (b)に第2池の各種水質項目の日中の変動を示す。藻類(池内のSS値は第1池77.5 mg/L, 第2池66.3 mg/L)の光合成活動により, DOは午後3時には20 mg/L近くにまで上り, pHも応じて高くなった。水温は, 25℃から34℃まで上昇した。コリファージの濃度はGF/Cフィルターで濾過したもの(○)と原水そのままを測定したもの(●)を示してある。両者共, 朝の9:00ごろより減少をはじめ午後3時(15:00)には最小となり, 夜明け直前の6:00の値の約40%程度となった。第2池のコリファージ濃度は濃縮操作を含まないブラク法の定量範囲の下限近くであり精度は第1池に比べて低い。しかし, 定性的には第1池と同じ動きを示している。日没後の午後8(20:00)には, 夜明け前の値に回復しており, 日射, pH上昇あるいは温度上昇によるコリファージの不活化現象だけではなく(不活化であれば濃度は減少する一方のはずである), 脱吸着等の可逆過程が存在していることを示唆している。

また, 第1池と第2池のコリファージの濃度比は約10(1 log)であり, 第2池(設計滞留時間20日)において1

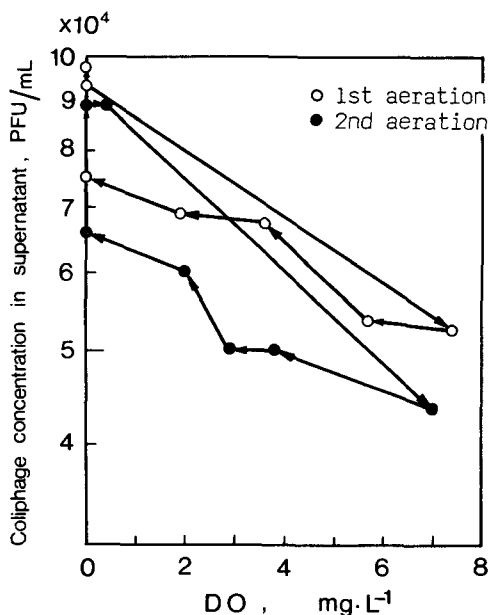


Fig. 6. Effect of DO on coliphage adsorption-desorption

log程度の減衰（約90%の不活化）しか生じないことを意味している。

コリファージの日中の濃度変動の要因および日射による不活化の程度を実験的に調べた結果が次の3.2 および3.3である。

3.2 溶存酸素濃度によるコリファージの脱吸着現象

DOの変化をFig.5 (a)に示す。曝気により8 mg L⁻¹ 近くまで上昇し、曝気停止後3～4時間で0 mg L⁻¹ になった。酸素消費は藻類等の呼吸によるものである。水相側のコリファージ濃度（Fig. 5(b)の "supernatant"）は曝気の間減少し、曝気停止後のDO減少に伴ない増加した。浮遊状粒子（藻類等）から抽出したコリファージの量（Fig. 5(b)の "eluate"：ビン内溶液基準の濃度表現）は、逆に曝気の間増加し、曝気停止後減少した。2回目の曝気においてもまったく同様の結果を示し、この現象が可逆的なものであることがわかる。水相側に減少した量（すなわち吸着したであろう量）に対し、抽出された量は約1%程度であり、収支は定量的には一致しなかった。これは抽出効率が低いためである。しかし、増減の定性的な関係は一致しており、溶存酸素の増減によって、吸着・脱着が生ずること、また、ほぼ全量が脱着してくることがわかる。さらにコリファージ濃度とDOとの関係をFig. 6の形で整理すれば可逆性も明らかとなる。しかし、これらの現象を支配している機構の解明は今後の課題である。

以上より、Fig. 4 (a), (b)に示した酸化池内でのコリファージの変動は、光合成活動に基づく溶存酸素濃度の変動に依るものであることがわかる。原水のまま汜過せずに測定した値（Fig. 4の●）も汜過したものと同一変動を示した原因は、藻類等に吸着したコリファージが平板培地上でそれぞれ個別のブラクを形成できないためと考えられる。Shimohara, Sugishima and Kaneko（1984）¹³⁾は、活性汚泥処理プロセスで空気曝気の代りにN₂ガス注入を行なうと、1時間後にはウイルス（poliovirus 1）の除去が止まり、その後はむしろウイルス濃度が増加したと報告している。本実験結果と同様の脱着現象と考えられる。

Table 1. Inactivation of coliphage by sunlight

Run	vessel	volume, mL	depth in vessel, cm	sunlight expose condition*	pH	temperature, °C	suspended conc., mg/L	R ₁₀ ** (inactivation dose), cal/cm ²	Figure	remarks
A	tube	50	14.0	dark	6.3	32 ~ 37	0	(1080)	7	
B	tube	50	14.0	expose(D)	6.3	32 ~ 37	0	420	7	
C	bottle	20	2.5	expose(G)	6.3	27 ~ 40	0	230	8	
D	beaker	20	2.0	expose(D)	6.3	27 ~ 35	0	80	8	
E	beaker	50	2.5	dark	-	24.5-34.5	300	(∞)	9	
F	beaker	50	2.5	expose(D)	-	24.5-34.5	300	100-200	9	
G	bottle	40	1.7	dark	6.7	29.0-33.5	0	(1100)	10	in oxidation pond surface 10 cm & 100 cm depth
H	bottle	40	1.7	expose(G)	6.7	29.0-33.5	0	700	10	
I	bottle	40	1.7	dark	6.7	29.0-33.5	0	(1100-2600)	10	
J	bottle	40	1.7	expose(G)	6.7	29.0-33.5	0	1100-2600	10	

NOTE *) (D) means "direct expose" and (G) means "through glass".
NOTE **) R₁₀ in parenthesis is the value of R₁₀ under dark condition.

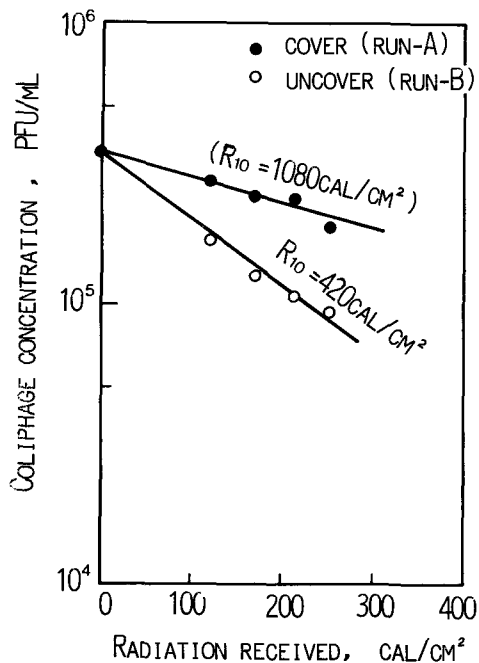


Fig.7 Effect of sunlight radiation (RUN-A, RUN-B, tube, depth=14cm, Sample volume=50mL)

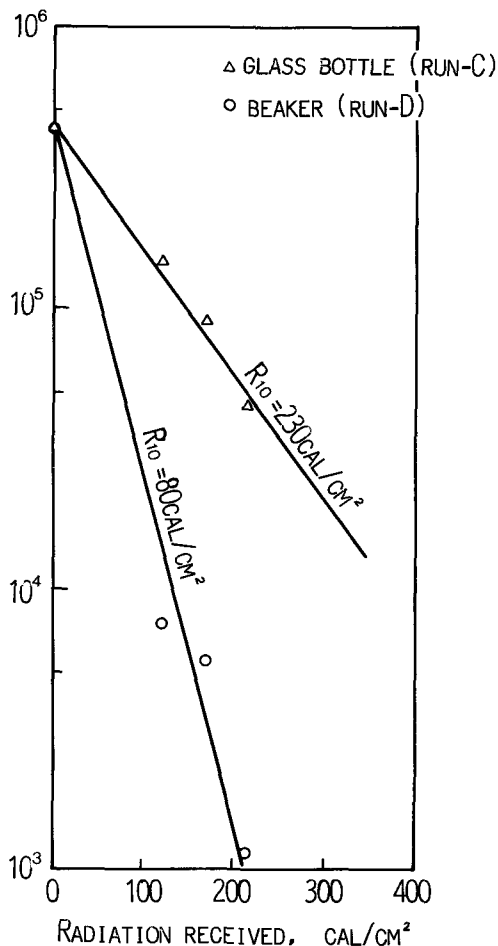


Fig.8 Effect of sunlight radiation (RUN-C, RUN-D, beaker and glass bottle, uncover)

3.3. 日射によるコリファージの不活化

(A)不活化速度. 紫外線によるウイルスの不活化の解析には“1 ヒット性1 標的”モデルが適用でき、ウイルスの不活化速度は次式のように表わされる(近藤, 1972)¹⁴⁾

$$S = e^{-D/D_0}$$

ここに, S: ウイルスの生存(プラク形成能)率。 D: 紫外線量。 D_0 : 不活性化線量。

本実験解析では、総括的に日射の影響を表現するために、紫外線量(D)を「照射開始より測定時刻までの日射量の積算値 R (cal·cm⁻²)」と読み替え、また、直観的にわかりやすくするために生存率が0.1(10%)になるまで(90%または1 log不活化されるまで)の日射量を R_{10} として、不活化速度の指標とする。この場合、生存率は次式であらわされる。

$$S = e^{-\frac{R}{2.3 R_{10}}} = 10^{-\frac{R}{R_{10}}}$$

(B)測定結果. 各系列の測定結果をまとめたものを Table 1 に示す。試験管を用いて液深14cmとしたRun-A, Run-Bの測定値の変化(10:00より15:00までの5時間の照射)を Fig. 7 に示す。

ガラスビンとビーカーを用いて、ガラスビンのガラスを透過した日射の影響と直接照射の差を比較した結果(Run-C, Run-D)を Fig. 8 に示す。

ビーカーに酸化池内浮遊状粒子を300mgL⁻¹ 入れ、9:30より5時間の照射を2日繰り返した場合の結果

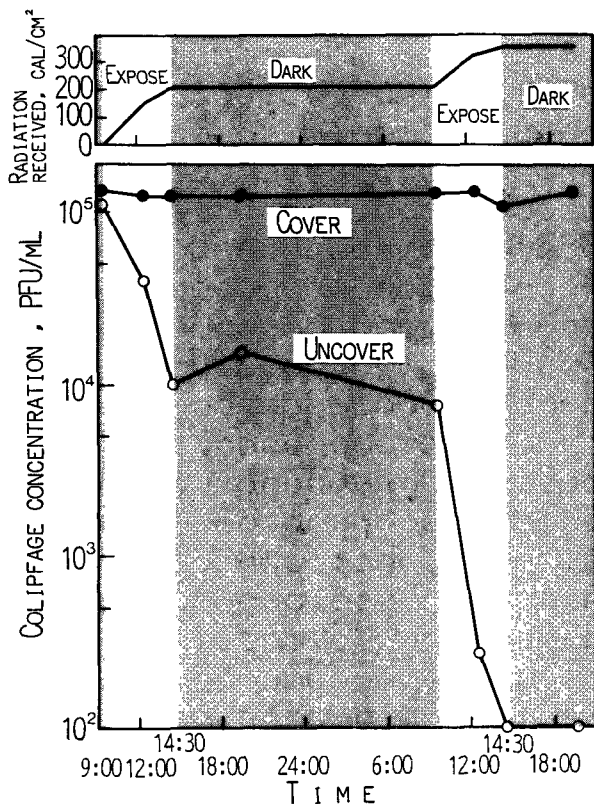


Fig.9 Effect of sunlight radiation
(RUN-E, RUN-F, beaker system with microbial
paticulates 300mg/L)

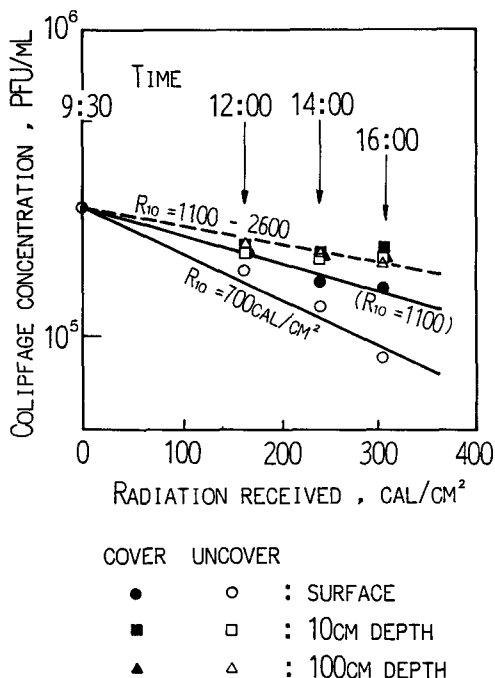


Fig.10 Submerged-bottle experiment
in oxidation pond
(RUN-G,H,I,J)

(Run - E, Run - F) を Fig. 9 に示す。なお、14:30以降は室内に暗条件で静置した。

酸化池内現場測定の結果を Fig. 10 に示す。9:30より16:00までの6時間30分照射した結果である。水深10cmおよび100cmに設置した系の結果は、10cmと100cmの場合、水深の差はあらわれないこと、および、どちらの水深においても明条件と暗条件による差がほとんどないことを示している。なお、暗条件下では日射による直接の不活化は生じないはずであるから、コリファージの減少速度（不活化の速度）は時間の関数とすべきであるが、対応する明条件の結果と比較し易いように、日射量基準のみかけ R_{10} 値を計算し、カッコ書きで示した。

以上より次のことがわかる。

① 暗条件下のリン酸緩衝液中での不活化の速度は R_{10} 表示で約 $1,000 \text{ cal cm}^{-2}$ (時間にして約20時間後に生存率が10%になることに相当する。表中, Run A, G。)を示した。藻類など酸化池内の浮遊状粒子を含む系(表中, Run - E)ではほとんど不活化は生じなかった($R_{10} = \infty$)が、この場合、液内に本コリファージの宿主菌である *E. coli* B が存在し、コリファージの増殖が可能となり、不活化された分が相殺されている可能性もある。なお、第1池および第2池内の大腸菌群数は、それぞれ 5.2×10^4 個/mL, 1.22×10^8 個/mLであった (Awraipin, 1985)¹⁵⁾。

② 試料の液面に日射を直接当てた場合の結果(表中, Run - B, D, F)から、透明で水深が2.0cmの場合 $R_{10} = 80 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Run - D)であるが、水深が深く(14cm)なると $R_{10} = 420 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2}$ と不活化速度は小さくなることがわかる。矢野・藪内・田口(1985)¹⁶⁾によれば、殺菌灯からの紫外線が蒸留水を透過する率は水深15cmで89%である。日射量計で測定される日射量と紫外線量とを直接、比較することはでき

ないが、日射の水中での減衰によって不活化速度が小さくなることは明らかである。

Run-F の場合は、藻類等を 300 mg L^{-1} (酸化池内濃度の約 5 倍) 含むが、 $R_{10} = 100 \sim 200 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2}$ を示した。水深が浅い場合 (25cm) は、清水 (Run-D) の結果 ($R_{10} = 80 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2}$) と比べてあまり差がなく、不活化速度は藻類の存在の影響をあまり受けていないようである。なお、この系-F の場合は、藻類等による吸着のための見かけ上の不活化も含まれているが、14:30以降、暗条件にしても脱着量が小さいことにより、照射中に実質的に不活化されたものとみなしてもよいと思われる。

③ ガラスビンのガラスを通った日射の不活化力は 小くなるものの不活化が生じることは、Fig. 8 および表中の Run-C (ガラスビン) と Run-D (ビーカー) の比較からわかる。従って、ガラスビンを用いた現場測定実験結果から水深方向の不活化の速度の相対的な評価はできることがわかる。

④ 現場測定実験 (Fig. 10, 表中の Run-G, H, I, J) の結果は、水深10cm, 100cmのガラスビン中では、明暗条件によらず、不活化速度は Run-A, Run-G と同じ程度であり、日射の影響がないことを示している。Run-H (水面) の結果 ($R_{10} = 700 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2}$) より水面では不活化が生じていることがわかる。

すなわち、酸化池水面では日射による不活化が進行するが、10cm以深ではほとんど生じないことがわかった。

4. 結 論

E. coli B を宿主菌とするコリファージの酸化池内での挙動に及ぼす日射の影響を調べた結果をまとめると次のようになる。

① 日射によるコリファージの直接的な不活化は、水面のみで生じ、深い部分ではほとんど生じない。

② 日射による光合成活動により酸化池内での溶存酸素濃度が増加すると、コリファージは藻類等の浮遊状粒子に吸着する。日没後呼吸活動等により溶存酸素濃度が低下し、消失すると、コリファージは浮遊状粒子から脱着する。この溶存酸素濃度の変動に伴う脱吸着反応は可逆的な過程である。

謝 辞

本研究の主要部分は、著者の一人 (大垣) が国際協力事業団の個別派遣専門家として、アジア工科大学 (AIT) に派遣されている間に行なわれたものである。研究遂行にあたり、両機関より多くの便宜を与えていただいた。また、タイ国国立マヒドール大学公衆衛生学部微生物学科のオラサ・スティンク講師からも有益な協力を受けた。ここに関係の方々に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Mahdy, M.S. (1979), Viruses in the water environment — An underestimated problem, Jour. AWWA, 71, 8, pp 445—449.
- 2) 矢野一好, 林 志直, 藪内 清, 田口文章 (1985), 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 (第1報), 用水と廃水, 27, 5, pp 39—45.
- 3) 丘 依 枢 (1980—1981), <講座>ウイルスと水汚染, 水質汚濁研究, 3, 2; 3, 3; 4, 1; 4, 2; 4, 3; 4, 5.
- 4) Smith, M. et al. (1978), Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment, Appl. Envir. Microbiol. 35, 685.
- 5) Dahling, D.R. and Safferman R. S. (1979), Survival of enteric viruses under natural conditions in a subarctic river, Appl. Envir. Microbiol. 38, 1103—1110.
- 6) Kott. Y. R. Roze. N. Sperber, S. and Betger, M. (1974), Bacteriophages as viral

- pollution indicators, Wat. Res. 8, 165-171.
- 7) Kott, Y. et al. (1978), Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluents, Prog. Wat. Tech. 10 (1/2), 337-346.
 - 8) Grabow, W.O.K., Coubrough, P., Nupen, E.M. and Batemon, B. (1984), Evaluation of coliphages as indicator of the virological quality of sewage-polluted water. Wat. S. A. 10 (1), 7-14.
 - 9) Bell, R.G. (1976), The limitation of the ratio of fecal coliforms to total coliphage as a water pollution index, Wat. Res. 10, 745-748.
 - 10) Neimi, N. (1976), Survival of Escherichia Coliphage T7 in different water types Wat. Res. 10, 751.
 - 11) Ohgaki, S. et al. (1985), Adsorption of coliphage to particulates, IAWPRC's First Asian Conference on Human Wastes, Tokyo.
 - 12) Seeley, N.D. and Primose, S.B. (1979), Concentration of bacteriophage from natural waters, Jour. Appl. Bacteriol. (G.B.), 46, 103-117.
 - 13) Shimohara, Sugishima and Kaneko (1984), Virus removal by activated sludge treatment, Post-conference seminar on water virology, Amsterdam IAWPRC.
 - 14) 近藤宗平, (1972), 分子放射線生物学, 学会出版センター
 - 15) Awrapin, Ketatanakul (1985), Inactivation mechanism of coliphage in stream, Master Thesis, AIT.
 - 16) 矢野一好・藪内 清・田口文章, (1985), 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 (第2報), 用水と廃水, 27, 6.