

(22) 紫外線照射後の水中における細菌増殖抑制効果に関する栄養塩の役割

Role of Nutrients in Producing the Growth Inhibitory Effect on Bacteria in UV-irradiated Water

酒井宏治*、片山浩之**、大垣眞一郎*

SAKAI Hiroshi*, KATAYAMA Hiroyuki**, OHGAKI Shinichiro*

ABSTRACT; UV disinfection is considered as a useful disinfection process. In application to water treatment, residuality of its germicidal effect needs to be evaluated. In this study, two groups of water samples were prepared with different compositions of nutrients and three levels of concentrations of nutrients. All samples contain both photosensitizing organic matter and ferric ion. These water samples were tested to produce growth inhibitory effect after UV irradiation and its effect was evaluated by reduction of *E.coli*. Water samples were irradiated by medium-pressure UV lamp to produce 1600mWs/cm² just before inoculating exponentially growing *E.coli*, whose survival was determined for 48 hours by colony forming assay. Up to 2.0 log reduction of *E.coli* was observed in the UV irradiated water containing no nutrients, and the reduction was enhanced up to 3.3 log by addition of nutrients. Among the added nutrients, nitrate ion and sodium glycerophosphate enhanced the reduction of *E.coli*. In the three levels of nutrients concentrations tested, maximum reduction of *E.coli* was observed at the following concentrations: 0.05g/l of Sodium Glycerophosphate, 0.1g/l of KNO₃, 0.15g/l of Ca(NO₃)₂, 0.04g/l of MgSO₄. The UV energy absorbed in the water was not related well to the reduction of *E.coli*.

KEYWORDS; nutrients, ultraviolet, growth inhibitory effect, reduction of bacteria, nitrate ion

1. はじめに

わが国の上下水処理では、これまで塩素消毒が最も一般的に用いられてきた。塩素の消毒効果は、水中において長く残存し、処理水の病原性微生物管理において高い安全性を保証してきた。特に浄水処理においては、水道水質基準として給水の遊離残留塩素濃度 0.1mg/l 以上、もしくは結合残留塩素濃度 0.4mg/l 以上が義務付けられ、法律の上でも塩素消毒の適用が規定されている¹⁾。

しかし、1996年に埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウムの集団感染に代表されるように、塩素消毒では十分に不活化されない病原性微生物の発生が問題となっている。また、塩素消毒の副生成物の一部には発癌性があることが明らかとなっている。これらの観点から、最近になって塩素消毒の見直しの機運が高まっている。

浄水処理において塩素消毒の短所を補う方策として、紫外線消毒の導入が考えられている。紫外線消毒では、クリプトスポリジウムを不活化することができ、上水道におけるクリプトスポリジウム対策の要件を備

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

** 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 (Institute of Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

えている。紫外線の適用に際しては光回復現象が懸念されているが、クリプトスポリジウムは、光回復したとしても感染性については回復しない²⁾ことが明らかとなっている。現状では、クリプトスポリジウムへの対策は、ろ過池出口での濁度管理と原水の水質管理を行うといった暫定的な対策しか取られておらず³⁾、抜本的対策として紫外線消毒の導入が有望視されている。アメリカのEPA(Environmental Protection Agency)の表流水処理規則には、紫外線処理によってクリプトスポリジウムを99.9%以上不活化できることが記されている⁴⁾。

塩素消毒と紫外線消毒の特徴を表1にまとめた。紫外線消毒では、消毒効果が残留しないといわれており、下水処理では放流先の生態系に影響を及ぼさないことからこれが長所と考えられ、逆に浄水処理ではこれが短所と考えられてきた⁵⁾。

ところが、最近になって紫外線照射後の水中で、藻類や細菌の増殖が抑制されるという報告がなされている⁶⁾⁷⁾。もし、紫外線の消毒効果に残留性があるならば、水質に何らかの変化が生じていることになる。従って、消毒副生成物が存在する可能性もあり、紫外線消毒を導入するにあたって考慮すべき点に変化が生じる。

紫外線の効果が残留する現象は、湖沼を対象にした研究でも既に発見されており⁸⁾、その機構として、紫外光による活性酸素及びラジカル種の生成が微生物に影響を与えているということが示唆されている⁹⁻¹²⁾。紫外線を水処理に適用することを念頭におき、紫外線照射後の水中における細菌の増殖抑制現象に関して検討した事例は、あまり存在しない。これらの点を踏まえ、本研究では紫外線消毒に関して、その効果の残留性について実験的に検討した。

表1 塩素消毒と紫外線消毒の比較

評価項目	塩素消毒	紫外線消毒
消毒効果の残留性	消毒効果が残留する	消毒効果が残留しない
副生成物	トリハロメタン等、 有害性のある副生成物が存在する	物質を添加しないため 副生成物が存在しない
クリプトスポリジウム	クリプトスポリジウムを 十分に不活化できない	クリプトスポリジウムを不活化でき、 感染性も回復しない
経済性	価格が安い	電気代がかさむ
その他	光回復現象が存在しない	光回復現象が存在する

2. 実験方法

2.1 遮光

本研究で取り扱う増殖抑制効果については、未解明の部分が多く残されており、可視光を含めた紫外線以外の波長の光が、この効果に寄与している可能性がある。そのため、試料には紫外線ランプ以外の光を当てないこととし、実験は全て部屋を暗くし、実験に使用する全ての器具はアルミホイルにより遮光して用いた。

2.2 ガラス器具

本研究で取り扱う増殖抑制効果は、活性酸素及びラジカル種の持つ酸化力が関与していると推定される。これらのラジカル種がガラス器具壁面に付着した微量有機物等によって除去されることを防ぐために、実験に用いるガラス器具は、塩素消費量の無い器具として実験に供した。ガラス器具は、10~50mg/l 程度の次亜塩素酸ナトリウム溶液に一晩漬けおき、Milli-Q 水で徹底的に洗浄した後、Milli-Q 水に一晩漬けおいた。その後、Milli-Q 水で再び洗浄し、121℃にて15分間オートクレーブ滅菌を行った。塩素は、Milli-Q 水で繰り返し洗浄することにより、ほぼ完全に除去され、その段階でも残留する塩素はオートクレーブ滅菌を行うことで完全に除去される。この操作を経て、ガラス器具は塩素消費量の無い器具として実験に供した。

処理が適切に行われたことを確認するため、以上の処理を施した器具の中から無作為に2本の試験管を取り出し、1本には Milli-Q 水を入れ、もう1本には全塩素濃度 0.6mg/l 程度の次亜塩素酸ナトリウム溶液を投入した。2本の試験管は、溶液と微生物を投入した試験管と同様に、25°C のインキュベーターにおいて振盪し、実験開始時と終了時に遊離塩素濃度及び全塩素濃度を測定した。塩素濃度の測定には、DPD 法による残留塩素濃度測定器(DR890/COLORIMETER, HACH)を用いた。Milli-Q 水を入れた試験管では、全塩素濃度が検出限界(0.02mg/l)以下であり、実験中に塩素が溶出していないことを確かめた。次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れた試験管では、実験中に結合塩素濃度が増加していないことを確認し、塩素消費量が無いことを確かめた。これらの確認は、ガラス器具を使用する際に毎回行った。

2.3 溶液の調整方法

本研究では、溶液の組成を変化させる実験と濃度を変化させる実験の2系列の実験を行い、増殖抑制効果に与える影響を検討した。既存の報告⁶⁾にあった溶液の構成物質のうち、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 以外の微量金属を除いた6種類の物質を取り上げ、Milli-Q 水に溶解し

表2 溶液の組成

物質		濃度
有機物	Bicine	0.5g/l
	β グリセロリン酸ナトリウム $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05g/l
栄養塩	KNO_3	0.1g/l
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.15g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04g/l
微量金属	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.57mg/l

て溶液を作成した。6種類の物質とその濃度は表2の通りとした。このうち、既存の報告⁶⁾では藻類に対して増殖抑制効果が見られる条件として Bicine が必要とされており、本研究でもこれに従って、光増感剤となる可能性のある有機物として Bicine を用いた。この他、全ての溶液は NaOH を用いて pH を 7.0 ± 0.2 に調整した。これらの溶液は、121°C にて15分間オートクレーブ処理を行った後、中圧紫外線ランプを用いて紫外線を照射した。

組成を変化させた実験においては、3種類の溶液を調整し、実験を行った。栄養塩のみが投入されているもの、有機物のみが投入されているもの、有機物と栄養塩の両方が投入されているものの3種類である。濃度を変化させた実験では、栄養塩の濃度を3段階に変化させて実験を行った。すなわち、表2に示した各栄養塩の濃度の1/20倍濃度と10倍濃度のものを作成した。有機物と栄養塩の両方を投入したものについては、栄養塩を一つずつ加えた溶液を調整し、栄養塩の役割を調べた。また、溶液系内への光の吸収と増殖抑制効果の関係を調べるため、溶液の吸収スペクトルを分光光度計(U-2010 Spectrophotometer, Hitachi)により測定した。

2.4 紫外線照射装置と線量率の測定

紫外線照射装置を図1に示した。光源には、中圧水銀ランプ(330W, B410MW, EBARA)を用い、試料はガラスシャーレに投入し、スターラーで攪拌しながら紫外線を照射した。低压ランプは254nmのみの単波長の光を出力するのに対し、中圧ランプは、200-600nmの広い波長域の光を出力する。そのため、新たな副生成物を生じる可能性が高いと考え、本研究では中圧ランプを用いた。中圧紫外線ランプの出力スペクトルは、瞬間測光器

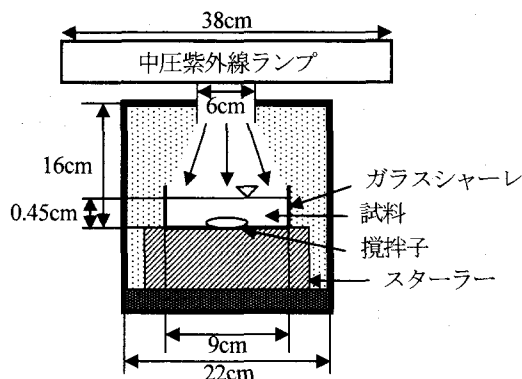


図1 紫外線照射装置

(MCPD2000, OTSUKA)を用いて測定した。この装置の254nmにおける線量率は、紫外線線量計(UVR-2, UD-25, TOPCON)による方法とF-特異RNA大腸菌ファージQ β を用いた生物線量計による方法で測定した。紫外線

線量計による測定結果は $0.78[\text{mW}/\text{cm}^2]$ 、生物線量計による測定結果は $1.5[\text{mW}/\text{cm}^2]$ であった。生物線量計は、中圧ランプの照射エネルギーを 254nm において殺菌効果のある紫外線線量に換算し、算定するものである。既存の研究により、換算のための数値が求められ¹³⁾、これを用いて中圧ランプのエネルギーを評価できるとされている¹⁴⁾。紫外線線量計は、 254nm における紫外線のエネルギーを直接測定するものであり、この2種類の方法での線量率測定結果には大きな開きがあった。増殖抑制効果が報告された事例⁶⁾では、低圧ランプを用い、 $1600[\text{mW}/\text{cm}^2]$ の線量で効果が出たとされている。2種類の線量計の測定結果に対し、これと同等の線量を照射するため、紫外線の照射時間は18分、35分の2段階とした。また、紫外線を照射しない対照試料も用意した。

2.5 微生物濃度測定

紫外線を照射した溶液中における微生物の増殖抑制効果を調べるため、紫外線を照射した溶液は、照射後すぐに試験管に移し、同時に*E.coli* K12F⁺(A λ)を投入した。*E.coli* K12F⁺(A λ)は、大腸菌が病原性微生物の指標として用いられることから選択した。

E.coli K12F⁺(A λ)は、Luria-Bertani(LB)寒天培地上に形成したコロニーを釣菌し、 37°C にてLB-Broth (Invitrogen 社製)中で4~6時間程度振盪し、対数増殖期にある大腸菌懸濁液を調整した。懸濁液は、紫外線を照射する溶液と同じ組成の溶液を用いて10000倍に希釈し、希釈した大腸菌液1mlを紫外線照射後の溶液中に投入した。溶液と微生物を投入した試験管は、 25°C のインキュベーターにおいて振盪し、微生物投入後0時間、24時間、48時間において、微生物濃度を測定した。微生物濃度の測定は、デスオキシコロール酸塩寒天培地を用いた重層寒天法により行った。

3. 結果及び考察

3.1 溶液の組成及び濃度の変化による増殖抑制効果への影響

溶液の組成を変化させた試料の実験結果を図2に、栄養塩の濃度を変化させた試料の実験結果を図3に示した。微生物濃度を縦軸に、紫外線照射後の溶液に大腸菌を投入してから溶液と大腸菌の接触時間を横軸としてグラフ化した。図中で対照試料は紫外線を照射していない試料、中圧18分及び中圧35分は、それぞれ中圧ランプを18分、35分照射した試料である。紫外線照射を行った試料では、24時間接触後及び48時間接触後において、微生物濃度が対照試料と比べて減少している。ただし、図2a)は光増感剤となる有機物が無い試料であり、この場合には微生物濃度の減少は見られなかった。同じ接触時間における対照試料の微生物濃度との差を、微生物濃度の純減少分と定義し、図4にまとめた。微生物濃度減少が生じているかどうかの判断には、1LOG以上の減少を判断基準とし、そ

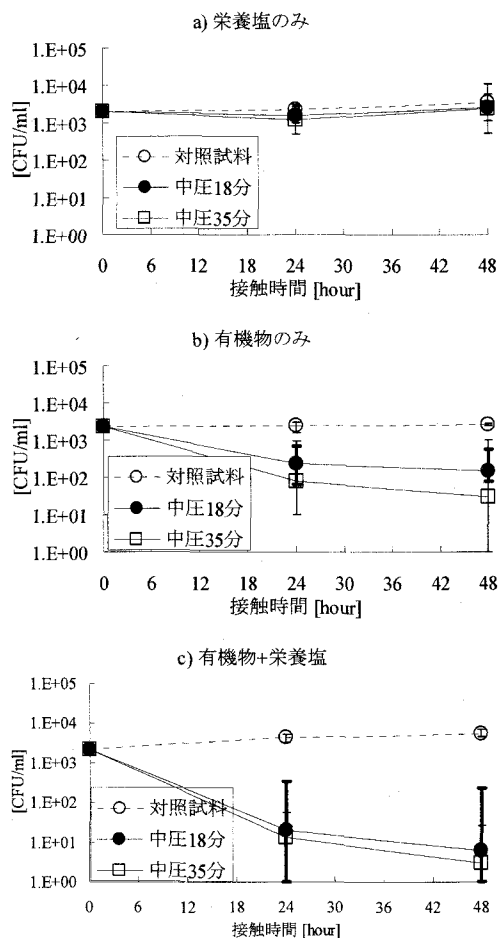


図2 溶液の組成を変化させた試料の実験結果

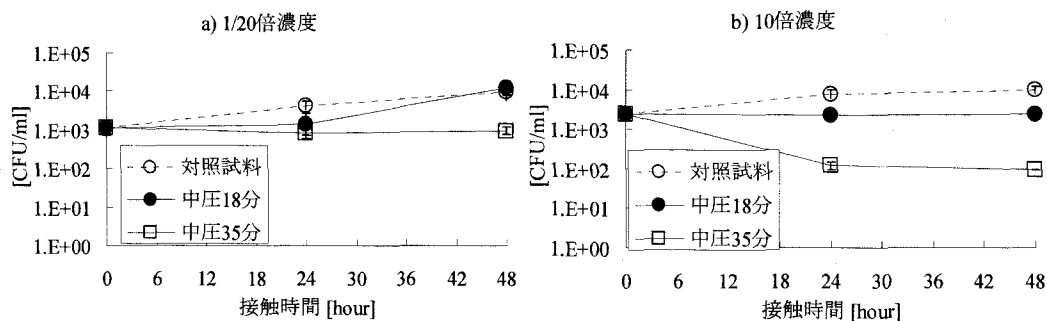


図3 図2c)の栄養塩濃度を基準として栄養塩濃度を变化させた試料の実験結果

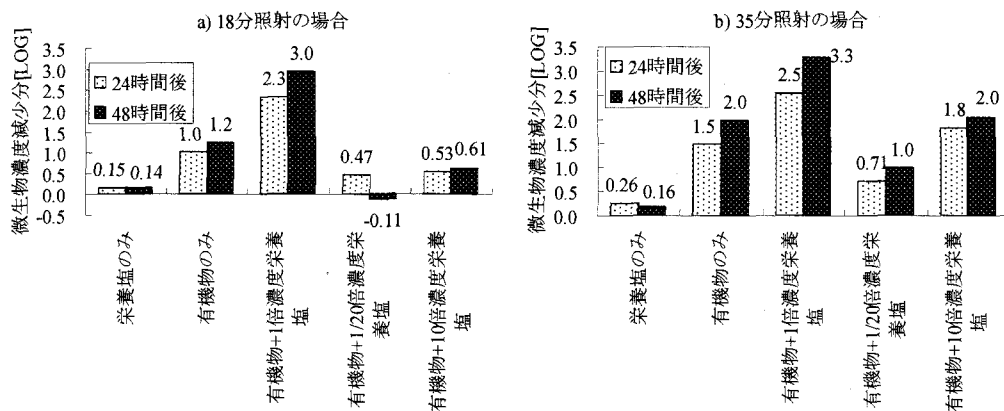


図4 溶液の組成及び濃度を变化させた場合の微生物濃度の純減少分比較

れを下回る場合には実験操作の誤差の範囲内とした。同一試料の同一希釈倍率のコロニー数を比較すると、誤差範囲はおおよそ 0.5LOG 以内であったことから、ここでは微生物濃度減少が生じているかの判断に 1LOG 以上の減少を基準とした。

栄養塩のみの試料では、微生物濃度減少は最大で 0.26LOG にとどまり、微生物濃度減少は見られなかった。有機物のみの試料、有機物+栄養塩の試料については、共に 1LOG 以上の微生物濃度減少が見られた。この2つの試料の結果を比較すると、有機物+栄養塩の試料のほうが、有機物のみの試料と比べて微生物濃度減少が大きく、最大で 2.5 倍の減少が見られた。この結果より、有機物の存在によって増殖抑制効果が生じ、栄養塩が存在することで、その効果が増大されるといえる。

図5には、栄養塩濃度を变化させた場合の溶液の吸収スペクトルの变化と中圧ランプの出力スペクトルを示した。本実験で用いた栄養塩には硝酸塩が含まれており、栄養塩濃度が増大するにつれて、短波長側での吸収が増大している。栄養塩の濃度を变化させて実験を行った結果から、溶液の吸収スペクトルが増殖抑制効果にどのような影響を与えているかを検討した。35分照射した場合の実験結果では、栄養塩の濃度が1倍

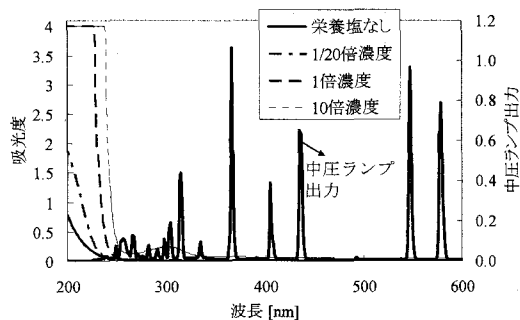


図5 栄養塩濃度を变化させた各試料の吸収スペクトル及び中圧紫外線ランプの出力スペクトル

濃度の試料では最も増殖抑制効果があり、濃度を 1/20 倍、10 倍に変化させた試料では、いずれも増殖抑制効果に減少が見られた。1/20 倍濃度の試料では最も増殖抑制効果が小さく、10 倍濃度の試料では、0 倍濃度の場合とほぼ同等の効果が見られた。このことから、実処理への適用を考えた場合に、増殖抑制に最適となる栄養塩濃度が存在することがわかった。一方、18 分照射した場合は、1/20 倍濃度の試料と 10 倍濃度の試料のどちらも、微生物濃度の純減少分は 1LOG 以下であり、増殖抑制効果は見られなかった。

1/20 倍濃度の試料で、増殖抑制効果が見られなかった原因として、 $MgSO_4$ の影響が強く出た可能性が考えられる。 $MgSO_4$ は、栄養塩を一つずつ投入した実験系では、効果を増大するよりむしろ減少させるものであるという結果が出ている(3.2 にて後述)。また、10 倍濃度の試料で増殖抑制効果が見られなかった原因としては、同様の可能性のほか、吸光阻害が一つの原因として考えられる。これを検討するため、3.3 節では溶液系内に吸収されたエネルギーと微生物濃度の純減少分の関係を調べた。

3.2 増殖抑制効果において各栄養塩が果たす役割

栄養塩として投入した 4 種類の物質のうち、どの物質が増殖抑制効果を増大させているかを調べるため、有機物に栄養塩を 1 種類ずつ追加した溶液を調整し、その役割について検討した。これらの試料の実験結果を図 6 に示した。栄養塩なし(有機物のみ)の試料の実験結果を含めて、対照試料との差を微生物濃度の純減少分として図 7 にまとめた。実験に用いた溶液の吸収スペクトル及び中圧紫外線ランプの出力スペクトルを図 8 に示した。中圧ランプの出力は短波長側では小さくなるものの、 KNO_3 、 $Ca(NO_3)_2$ を加えた試料は、グリセリン酸ナトリウム、 $MgSO_4$ を加えた試料と比べて、短波長側での吸収が大きくなっている。

$MgSO_4$ を加えた試料は、有機物のみを試料と比較して、中圧ランプの照射時間及び実験開始からの経過時間に関わらず、いずれの場合においても微生物濃度減少分が小さくなっている。従って、 $MgSO_4$ は効果増大に寄与するよりも、むしろ効果を減少させていると考えられた。

グリセリン酸ナトリウムを加えた試料では、35 分照射した試料の 24 時間接触後の結果では有機物のみ

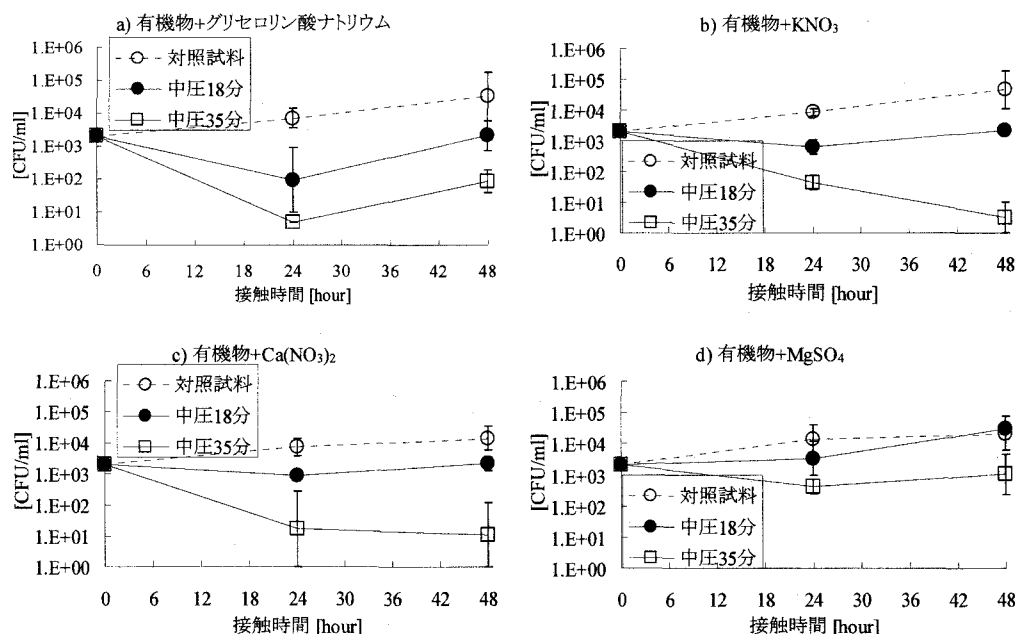


図 6 栄養塩の種類を変化させた試料の実験結果

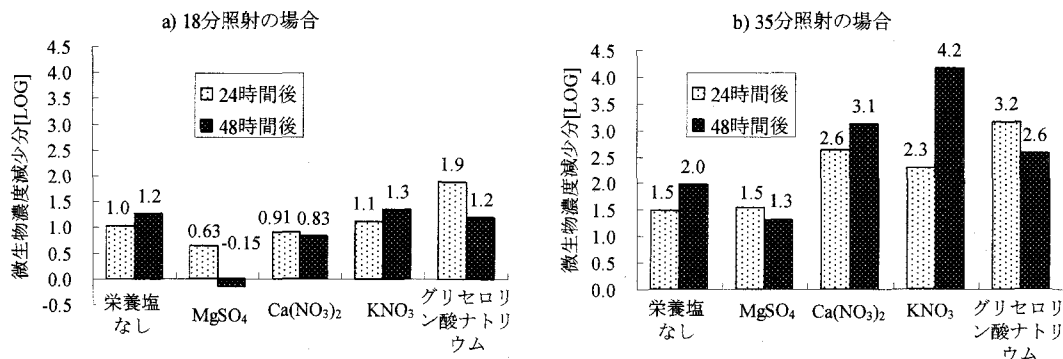


図7 栄養塩の組成を変化させた場合の微生物濃度の純減少分比較

の試料の2倍程度の減少が観察されたが、48時間接触後では、有機物のみの試料と比較して1~1.3倍程度の減少分しか観察されなかった。18分照射した試料でも同様の傾向が見られ、グリセロリン酸ナトリウムは24時間接触後までは効果を増大させていると考えられた。

KNO₃を加えた試料は、35分照射した場合では、24時間接触後で1.5倍、48時間接触後で2.1倍の微生物濃度減少が観察された。同様に、Ca(NO₃)₂を加えた試料は、35分照射した場合の24時間接触後の結果では1.7倍、48時間接触後では1.5倍の微生物濃度減少が見られた。どちらの試料も、18分照射した場合では、栄養塩なしの試料と比較して効果の増大は認められなかった。18分では効果を増大させるのに十分でなかった可能性が考えられるが、これについては今後の検討課題である。いずれにせよ、35分照射した場合については効果増大が認められ、どちらの試料にも共通している硝酸イオンが、効果増大に寄与している可能性がある。

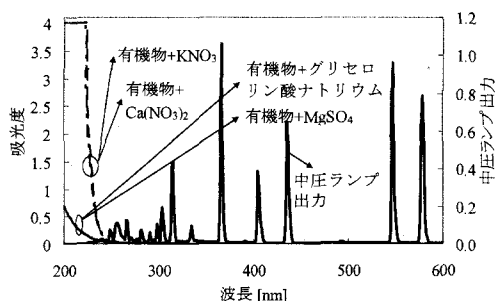


図8 栄養塩の種類を変化させた溶液の吸収スペクトル及び中圧紫外線ランプの出力スペクトル

3.3 吸収エネルギーと微生物濃度減少の関係

本研究では、溶液の組成を変化させる実験と濃度を変化させる実験の2系列の実験を行い、増殖抑制効果に与える影響を検討した。本節では、それぞれ

の実験での微生物濃度減少と溶液系内に吸収されたエネルギーの関係を検討した。溶液系内に吸収されたエネルギー値は、200-600nmにおける中圧紫外線ランプの出力スペクトルと各溶液の吸収スペクトルから、相対的なエネルギー値として求め、結果を図9に示した。中圧紫外線ランプの出力と各溶液の吸収スペクトルは200-600nmにおいて1nm刻みで測定した。各波長における吸光度から、Lambert-Beerの法則に従って、リアクターの深さ方向における吸収割合を平均し、これと中圧紫外線ランプの出力スペクトルをかけあわせることで、溶液系内に吸収されたエネルギーを求めた。吸収された相対エネルギー値と微生物濃度減少の間に

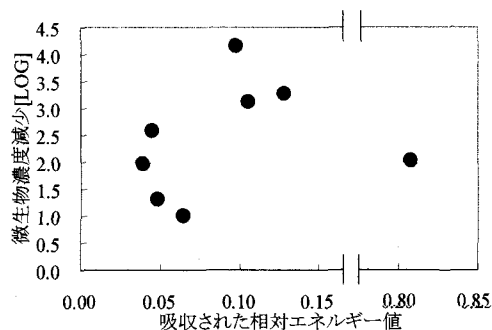


図9 吸収された相対エネルギー値と微生物濃度減少[LOG]の関係

相関は見られなかった。吸収されたエネルギーに増殖抑制効果が比例しているとはいえ、さらに複雑な反応機構が存在すると考えられる。

4. まとめ

本研究では、紫外線消毒効果の残留性について実験的に検討し、以下の結論を得た。

- 1) 有機物、栄養塩、鉄(III)イオンを含む溶液に中圧紫外線ランプを照射したところ、照射後の溶液中で細菌増殖抑制効果が確認された。
- 2) 有機物が存在しない系では増殖抑制効果は確認されなかった。栄養塩が投入された系では増殖抑制効果が増大された。栄養塩のうち、硝酸イオン及びグリセロリン酸ナトリウムが増殖抑制効果を増大させていることが示唆された。濃度を変化させた試料では、増殖抑制効果に最適な栄養塩の濃度が存在することがわかった。
- 3) 溶液系内に吸収されたエネルギーと各溶液における微生物濃度減少の関係を調べた結果、溶液系内に吸収されたエネルギーのみでは微生物濃度減少の効果を説明できなかった。溶液系内に吸収されたエネルギーに比例して増殖抑制が生じているわけではないことがわかった。

今後の課題として、増殖抑制効果が生じる条件について研究を行い、実際に水処理を行う上での影響を調べることが挙げられる。同時に、増殖抑制効果が生じる機構を特定し、微生物へ与える影響の評価につなげていく必要がある。紫外線照射後の水中における細菌増殖抑制の機構については未解明なことが多い。今後は、紫外線消毒の導入が予想されるため、さらなる知見が必要である。

参考文献

- 1) 水道法施行規則 16 条(1957)
- 2) Oguma Kumiko, Katayama Hiroyuki, Morita Shigemitsu, Hirata Tsuyoshi, and Ohgaki Shinichiro (2001) Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV Light Inactivation, Photo-reactivation, and Dark Repair *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10):4630-4637
- 3) 厚生省 (1996) 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針
- 4) Environmental Protection Agency (2001) National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule
- 5) 金子光美 (1996) 水質衛生学 技報堂出版
- 6) Alam Md Zamir Bin, Otaki Masahiro, Furumai Hiroaki and Ohgaki Shinichiro (2001) Direct and Indirect Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation *Water Research* 35(4):1008-1014
- 7) Gjessing Egil T. and Kallqvist Torsten (1991) Algicidal and Chemical Effect of u.v.-Radiation of Water Containing Humic Substances *Wat. Res.* 25(4):491-494
- 8) Frimmel Fritz H. (1998) Impact of Light on the Properties of Aquatic Natural Organic Matter *Environment International* 24(5/6):559-571
- 9) Larson A. Richard and Berenbaum R. May (1988) Environmental Phototoxicity -Solar Ultraviolet Radiation Affects the Toxicity of Natural and Man-made Chemicals- *Environmental Science and Technology* 22(4):354-360
- 10) Palenik Brian, Price M. Neil and Morel M. M. Francois (1991) Potential Effects of UV-B on the Chemical Environment of Marine Organisms: A Review *Environmental Pollution* 70:117-130
- 11) Hessen O. Dag and Donk Van Ellen (1994) Effects of UV-Radiation of Humic Water on Primary and Secondary Production *Water, Air and Soil Pollution* 75:325-338
- 12) Moran Ann Mary and Zepp G. Richard (1997) Role of Photoreactions in the Formation of Biologically Labile Compounds from Dissolved Organic Matter *Limnology and Oceanography* 42(6):1307-1316
- 13) Kamiko Naoyuki and Ohgaki Shinichiro (1989) RNA Coliphage Q β as a Bioindicator of the Ultraviolet Disinfection Efficiency *Wat. Sci. Tech.* 21(3):227-231
- 14) 大瀧雅寛、鹿島田浩二、石渡淳、赤井田悟史、大垣眞一郎 (1997) 紫外線照射処理および紫外線-光触媒処理における細菌の光回復 *環境工学研究論文集* 34:75-82