

(17) 界面活性タンパク質を用いた泡沫分離法による海水からの細菌除去

Removal of bacteria from seawater by foam separation
using surface-active protein

鈴木祥広*, 花ヶ崎宣昌*, 吉田照豊**, 丸山俊朗*

Yoshihiro SUZUKI, Nobuaki HANAGASAKI, Terutoyo YOSHIDA, Toshiroh MARUYAMA

Abstract ; The removal of bacteria from rearing seawater of fish or using seawater in fishing port is important from the viewpoint of the reduction of infection risk and hygienics of public health. It is necessary to develop seawater purification technology for the improvement of hygienic conditions on the coastal environment. In this study, the removal of suspended bacteria *Enterococcus faecalis* from seawater by foam separation using several kinds of surface-active proteins as a chemical agent was examined. The removal efficiency of enterococcus was extremely low by foam separation using each protein without coagulation, because these surface-active materials did not function as a collector. When processing by foam separation with coagulation as a pretreatment, however, proteins such as milk casein and fish mucus showed the greatest capability of suspended bacteria. For treatment of seawater containing enterococcus (10^7 CFU/mL), the removal efficiency of counts number was over 99% with the small dosages of iron coagulant (FeCl_3) 1mg-Fe/L and casein 1mg /L. Foam separation using surface-active protein with coagulation process has a high potential as a new method for removing bacteria from seawater.

Keywords; bacteria, *Enterococcus faecalis*, seawater, hygienics, foam separation, surface-active protein

1. はじめに

近年、陸上類養殖システムや水族館では、飼育水を循環して使用する循環式システムが普及してきている。循環している飼育水には、天然海水と比較して、細菌が高密度に増殖する可能性が高く、養魚介類や飼育動物の疾病に重要な影響を及ぼすとされる。しかしながら、飼育水の細菌に関する管理は、定期的に塩素や紫外線で消毒するか、あるいは換水して細菌の密度を制御しているのが現状であり、管理指標となる数値等は設定されていない。また、最近では衛生管理の観点から、水産物を取り扱う漁港においても使用する海水の細菌除去・殺菌が必要となってきた¹⁾。既存の塩素やオゾンによる殺菌法は、殺菌効果が高いものの、有害な酸化性物質が残留する^{2,3)}ため、飼育水や漁港の使用海水への適用は困難が伴うと推察される。生物の飼育水や港湾を含む沿岸海水を処理対象とした場合には、大量処理が可能で処理水に副生成物や残留物を生じない細菌除去法が望ましい。飼育水や漁港内海水等においても、細菌学的安全性の向上を目的として、今後、細菌の除去技術が強くと求められると予想される。しかしながら、細菌学的観点からの海水浄化を目的とした細菌除去に関する研究は極めて少ない。

ところで、魚類の体表面粘質物（以降、粘質物とする）は、細菌の進入を阻止する物理的かつ生化学的な防御機能を有しており^{4,5)}、多種多様な細菌や微生物の混在する水中で魚類が健全に生育していくために極めて重要な役割を果たしている。したがって粘質物は、細菌に対する親和性が高いと推察される。また、粘質物は親水性と疎水性の側鎖を兼ね備えている界面活性を有する複雑な巨大分子の糖タンパク質であり⁶⁾、微細懸濁物質に対する吸着性が

* 宮崎大学工学部土木環境工学科 (Dep. of Civil and Environmental Engineering, Miyazaki University)

**宮崎大学農学部生物環境科学科 (Dep. of Biological Production and Environmental Science, Miyazaki University)

極めて高く、しかも気泡を供給すると水面上に安定泡沫を形成して容易に分離することが可能である^{6,7)}。著者らは、この現象に着目し、泡沫分離法による飼育水浄化システムの研究を進めてきた。飼育水に分泌された粘質物は、懸濁物に吸着して懸濁物を疎水化し、気泡を供給すると疎水化した懸濁物が気泡の気液界面に強く結合して水面まで浮上し、さらに界面活性物質である粘質物が水面上に安定な泡沫を生成することによって、安定泡沫とともに懸濁物も飼育水から除去される。すなわち粘質物は、懸濁物を気泡界面に結合させる働き（吸着・捕集機能）と、水面上に安定泡沫を生成させる働き（泡沫生成機能）の二役を担っていると考えられる。市販の界面活性タンパク質も、粘質物と類似した機能を持ち合わせていることが明らかとなった⁸⁾。既に、泡沫分離プロセスを組み込んだ閉鎖循環式の魚類飼育システムを構築し、泡沫分離プロセスでは、酸素を供給するとともに、排泄物などの汚濁物質が粘質物起源の安定泡沫に連行されて飼育水から除去され、水質が良好に維持されることを報告した^{9,10)}。この飼育システムには殺菌装置を設置していないのにも関わらず、過去の数回にわたる飼育試験において、養魚が罹病した経験がなく、泡沫分離プロセスが病原性細菌の除去機能を有していることが示唆された。しかしながら、粘質物あるいは界面活性タンパク質を利用した泡沫分離法による細菌除去に関する知見や情報は、ほとんど得られていない。

腸球菌は、大腸菌と比較して水環境における生残性や消毒耐性が強いとされ¹¹⁾、河川や港湾から検出される人畜糞便由来の重要な細菌である¹²⁾。また、環境・衛生管理を目的として、海水浴場や沿岸環境における汚染指標菌として腸球菌が用いられている^{12,13)}。そこで本研究では、細菌学的安全性の向上を目的とした海水浄化技術の開発を目的とし、腸球菌 *Enterococcus faecalis* について、粘質物およびタンパク質を利用した泡沫分離法による除去特性に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 供試細菌と原水作成

腸球菌 *E. faecalis* (ATCC 19448) を Todd Hewitt 培地 (DIFCO, TH 培地) 500mL に移植し、25℃で24時間培養した。増殖した菌体は遠心分離 (6,000rpm, 30分間) で集菌し、滅菌人工海水で2回洗浄した。続いて、再度、遠心分離で菌体を集菌した後、滅菌人工海水 250 mL に再懸濁させた。この腸球菌懸濁液の濁度を積分球式濁度計 (三菱化成, SEP-PT-706D 型, 標準物質: カオリン) を用いて測定し、懸濁液の濁度が 50 度 (あるいは 5 度) になるように人工海水で希釈し、実験用原水とした。濁度 50 度の腸球菌懸濁海水は、TH 培地において腸球菌が最高密度の状態に達したときの濁度 (約 500 度) と比較して、1桁低い濁度に相当する。腸球菌数は平板培養による直接計数法によって求めた。

すなわち、数段階に希釈した腸球菌懸濁海水を TH 寒天

平板培地表面に 0.1mL 接種し、25℃で24時間培養した後に出現したコロニー数を計数した。コロニー数と希釈倍率から試料中の細菌数を算出した。図-1 には、任意に希釈した腸球菌懸濁海水の濁度と腸球菌数の関係を示した。両者は高い相関関係を示したことから、泡沫分離処理における腸球菌懸濁海水の処理性を評価する指標として、簡便で多数の試料の測定が可能である濁度を用いることにした。

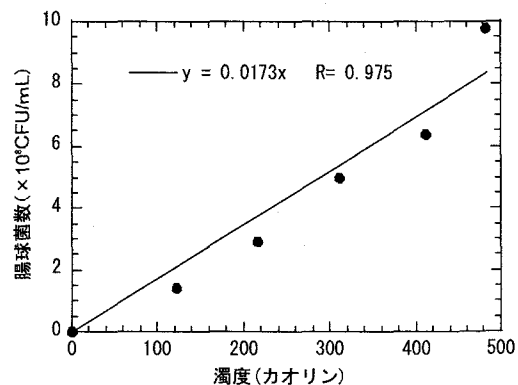


図-1 濁度と腸球菌数の関係。

2.2 供試海水

宮崎県 A 漁港内の港奥部 2 点、港口部 1 点において、表層海水（0.5m）をバンドーン採水器（宮本理研工業）を用いて採水した。試料海水は実験室に持ち帰り、直ちに実験に供した。一般細菌の生菌数は、海水平板培地（DIFCO）表面に採水した海水を 0.1mL 接種し、25℃で 24 時間好氣的に培養した。出現したコロニー数から海水 1mL 当たりの生菌数を測定した。

2.3 試薬

粘質物は、ウナギから抽出した。活ウナギ 650g（約 200g を 3 尾）を -20℃で凍結してから再び解凍し、エタノール（1 級、99.5%、和光純薬）1L に浸漬させ、5 分間放置した¹⁴⁾。ゲル状になった粘質物を体表面から丁寧に葉さじで剥ぎ取り、GF/C フィルターで吸引る過してこのゲルを回収した。さらにゲル状粘質物をエタノールで数回洗浄後、減圧乾燥させ、乳鉢で粉末にした。粘質物粉末は 0.01M の水酸化ナトリウム水溶液に溶解して用いた。カゼイン（乳製、和光純薬）、アルブミン（卵製、和光純薬）、ヘモグロビン（牛血製、片山化学）、ならびに大豆タンパク（和光純薬）の原液（10,000mg/L）は、それぞれの試薬を 0.01M の水酸化ナトリウム水溶液に溶解して作成した。ゼラチン（和光純薬）については、50～60℃程度の温蒸留水に溶解させた。合成界面活性剤である陰イオン性の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（和光製薬）とドデシル硫酸ナトリウム（ナカライテスク）、陽イオン性の塩化ベンザルコニウム（ナカライテスク）、両イオン性の CHAPS（SIGMA）、ならびに非イオン性のポリオキシエチレンドデシルエーテル（ナカライテスク）の原液（10,000mg/L）は、蒸留水に溶解して作成した。実験に用いた粘質物、界面活性タンパク質および合成界面活性剤の名称と略号を表-1 に示した。

表-1 タンパク質、界面活性剤の名称と略称

タンパク質・界面活性剤	略語
ウナギ体表面粘質物	Mucus
カゼイン	Case.
アルブミン（卵製）	Alb.
ヘモグロビン（牛血製）	Hemo.
ゼラチン	Gela.
タンパク粉末（大豆製）	Soy
(-)直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩	LAS
(-)ドデシル硫酸ナトリウム	SDS
(+)塩化ベンザルコニウム	BC
(±)[3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate]	CHAPS
(非)ポリオキシエチレンドデシルエーテル	PDE

2.4 泡沫分離実験（凝集プロセス無し）

原水 200mL を 300mL ビーカーに取り、各種の界面活性物質を所定濃度となるように加えて、ジャーテスターで 1 分間急速攪拌した。この懸濁液 200 mL を分取し、回分式泡沫分離装置の気液接触塔に移して、泡沫分離処理を行った。気液接触塔本体は、塔高 54cm、内径 2.6cm のアクリル管から成り、その底部には微細気泡を供給するためのガラスボールフィルター（木下理化学工業、501G-4、公称ポアサイズ 5～10μm）を取り付けた。通気ガスには空気を用い、送気ポンプ（レイシー）および流量計（小島製作所）によって所定の流量に調整して塔内に通気した。水面上に形成される安定泡沫は、アスピレーターによって吸引・回収した。分離・回収された泡沫の消泡した液体を泡沫分離水と称する。吸引管は送気時の水面から約 2cm の位置に設置した。泡沫分離の操作条件は、送気流量を 0.3L/min、泡沫分離処理時間は 3 分間とした。気液比（試水量に対する送気量の比）は 4.5 となる。泡沫分離処理の終了後、ドレンより気液接触塔内の処理水を採水し、積分球式濁度計で濁度を測定した。濁度除去率は、原水の濁度と処理水の濁度から求めた。また、処理水の腸球菌数は平板培養法で計数した。

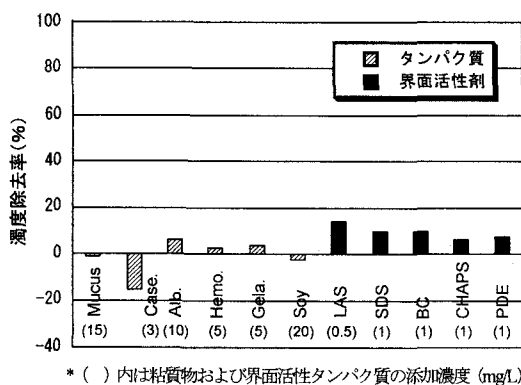
2.5 凝集・泡沫分離実験

細菌原水 200mL を 300mL ビーカーに取り、ジャーテスターで急速撹拌を行いながら凝集剤 FeCl_3 を所定濃度になるよう添加して 3 分間急速撹拌し、凝集フロックを形成させた。続いて、各種の界面活性物質を所定濃度となるように加え、さらに 1 分間急速撹拌した。凝集プロセスなしの泡沫分離実験と同様に、このフロック懸濁海水 200mL を分取し、回分式泡沫分離装置の気液接触塔に移して、泡沫分離処理を行った。泡沫分離処理の終了後、処理水を採水し、濁度を測定した。

3. 結果と考察

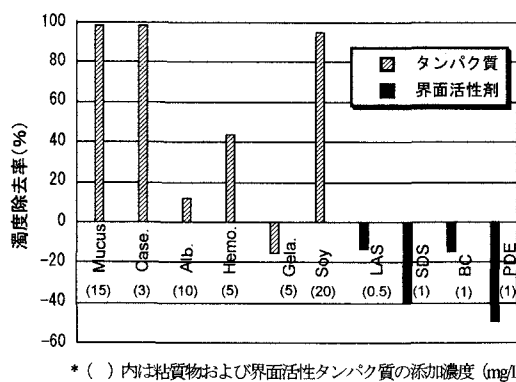
3.1 泡沫分離法による細菌除去

原水濁度 50 度（細胞密度 10^8 CFU/mL）の超高密度の腸球菌懸濁海水を用いた場合における、粘質物、タンパク質、および界面活性剤を用いた泡沫分離処理における濁度除去率を図-2 に示した。なお、各添加濃度は、いずれの物質の場合においても泡沫が発生するように設定した。泡沫が生成され、分離回収されたのにも関わらず、いずれの粘質物、タンパク質、および界面活性剤を用いた場合にも細菌の除去率は極めて低かった。懸濁粒子が泡沫に濃縮されるためには、界面活性を有する物質すなわち捕集剤を用いて、親水性界面を疎水性界面に改変することが必須条件である。既報⁹⁾において、本実験で用いた粘質物および界面活性タンパク質は、カオリン懸濁粒子の界面に吸着し、界面が疎水性に改変されることによって泡沫に濃縮・分離されること、これに対して、SDS 等の合成界面活性剤はカオリン粒子への吸着性がタンパク質と比較して極めて低く、カオリン粒子が発生する泡沫に濃縮される現象は全く認められないことを報告した。腸球菌に対して、粘質物とタンパク質は全く捕集剤の機能、すなわち細胞表面に吸着して界面を疎水化する機能を示さないことがわかった。カオリン粘土粒子と腸球菌に対する粘質物と各種タンパク質の吸着特性は著しく異なると推察される。固液分離を目的とする泡沫分離法の処理性は、懸濁粒子界面への界面活性物質の吸着性に強く支配される。いずれの粘質物とタンパク質においても凝集プロセスなしの泡沫分離処理のみでは、腸球菌を除去することができないことがわかった。細菌は種類によって細胞界面の状態が大きく異なるとされることから、各種細菌の粘質物およびタンパク質の細菌への吸着性と泡沫分離法による処理特性の関係に関する検討は、今後の重要課題である。



* () 内は粘質物および界面活性タンパク質の添加濃度 (mg/L)

図-2 泡沫分離法におけるタンパク質または界面活性剤による濁度除去率。



* () 内は粘質物および界面活性タンパク質の添加濃度 (mg/L)

図-3 凝集・泡沫分離法におけるタンパク質または界面活性剤による濁度除去率 (FeCl_3 : 10mg- Fe/L)

3.2 凝集・泡沫分離法による細菌除去

タンパク質は、正荷電の界面を有する酸化鉄粒子あるいは水酸化鉄で構成される凝集ブロックに対して著しい吸着性を示すこと⁸⁾から、凝集処理プロセスを泡沫分離プロセスの前段に導入することによって効果的な腸球菌の除去が可能であると考えた。また、液中に分散している腸球菌を集塊させることによって、処理性の向上も期待された。そこで、凝集・泡沫分離法による腸球菌懸濁水の処理について検討した。腸球菌を凝集処理してから各種の粘質物、タンパク質および界面活性剤を用いて泡沫分離処理した場合における細菌の除去率を図-3に示した。凝集注入率は10mg-Fe/L一定とし、粘質物、タンパク質および界面活性剤の各注入率（添加濃度）は、いずれの物質の場合にも泡沫が発生されるように設定した。ウナギ粘質物、カゼインおよび大豆タンパクを用いた場合において、95%以上の極めて高い細菌除去率が得られた。除去率と添加濃度から判断すると、カゼインは腸球菌の凝集ブロックを分離・除去する機能が最も高い。一方、合成界面活性剤を用いた場合には、全く処理されないことが明らかである。凝集・泡沫分離法は、無機粘土粒子⁹⁾と有機懸濁物¹⁰⁾を高効率に除去できる処理法であるため、本法を適用することによって飼育水や海水の細菌以外の濁質も同時に除去できると考えられる。

3.3 凝集・泡沫分離法における最適注薬条件の設定

図-4には、原水濁度50度の腸球菌懸濁海水を用いた場合における、凝集剤とカゼインの注入率を変化させたときの濁度除去率を示した。凝集剤10mg-Fe/L、カゼイン5mg/L以上の条件において99%以上の高い除去率が得られた。凝集剤とカゼインの注入率を適切に設定すれば、高密度の腸球菌懸濁海水からも極めて効果的に腸球菌を除去できることがわかった。ただし、実際の飼育水や沿岸水には細胞数 10^8 CFU/mLで存在する可能性は極めて低い。そこで、人工海水で希釈して細胞数が1/10の腸球菌懸濁海水（ 10^7 CFU/mL）を作成し、同様にして、凝集剤とカゼインの注入率を変化させたときの細菌除去率を調べた（図-5）。なお、この希釈原水の生菌数においても、実際の漁港海水で検出される生菌数（約 $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL）¹⁾よりも3～5オーダー高い。この希釈原水について最適注薬条件を調べた結果、凝集剤とカゼインの注入率は大幅に削減され、それぞれ1mg-Fe/Lと1mg/Lの条件において、濁度除去率97%以上の高い除去率が得られた。この最適条件において、再度、別途に培養した腸球菌懸濁海水（ $6.55 \cdot 10^6$ CFU/mL）を用いて3回の繰り返し実験を行った結果、処理水濁度はいずれも0.00度となり、検出限界以下となった。また、処理水中の残留腸球菌数は、 $7.3 \pm 3.5 \cdot 10^2$ CFU/mL（n=3）であった。凝集・泡沫分離法によって、腸球菌を極めて効率的に海水から除去できることがわかった。実際の魚介類等の飼育水あるいは漁港等の沿岸海水を処理する場合においても、少ない凝集

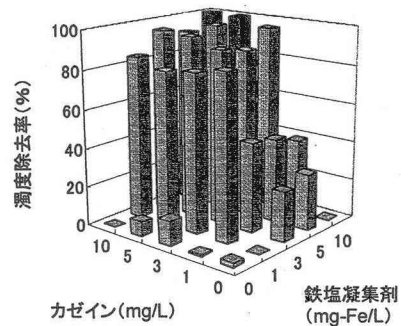


図-4 凝集剤、カゼインの添加濃度を変化させた場合の濁度除去率。（原水濁度50度）

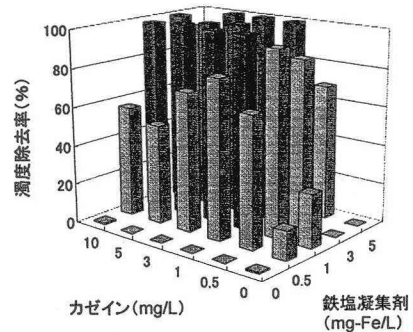


図-5 凝集剤、カゼインの添加濃度を変化させた場合の濁度除去率。（原水濁度5度）

剤とカゼインの注入率 (1mg-Fe/L, 1mg/L) で効率的に細菌が除去できると考えられる。

3.4 表層海水の処理

泡沫分離処理および凝集・泡沫分離処理による漁港内表層海水からの濁質と細菌の除去を検討した (図-6)。濁質および細菌の除去率は、原水と処理水の濁度および一般生菌数から求めた。カゼインの注入率を 1mg/L とした場合における泡沫分離処理において、濁度除去率は 27.5~77.0%, 細菌除去率は 91.5~95.7% となった。実海水を対象とした場合には、凝集プロセス無しの泡沫分離処理においても、泡沫に濁質および細菌が濃縮されることがわかった。注入したカゼインによって、一部の懸濁粒子と細菌の界面が疎水性に改変されたと考えられる。しかしながら、泡沫分離処理のみでは、処理水に 60~170CFU/mL の細菌が残留した。本実験に供した腸球菌にも見られたように、カゼインでは界面が疎水性に改変されない細菌の存在が示唆された。一方、凝集・泡沫分離処理においては、濁度除去率は 74.4~86.7%, 細菌除去率は 97.1~99.3% となり、処理水の生菌数は 10~40CFU/mL と大幅に減少した。実海水においても、凝集プロセスを前段に導入することによって細菌除去の著しい向上が期待できる。

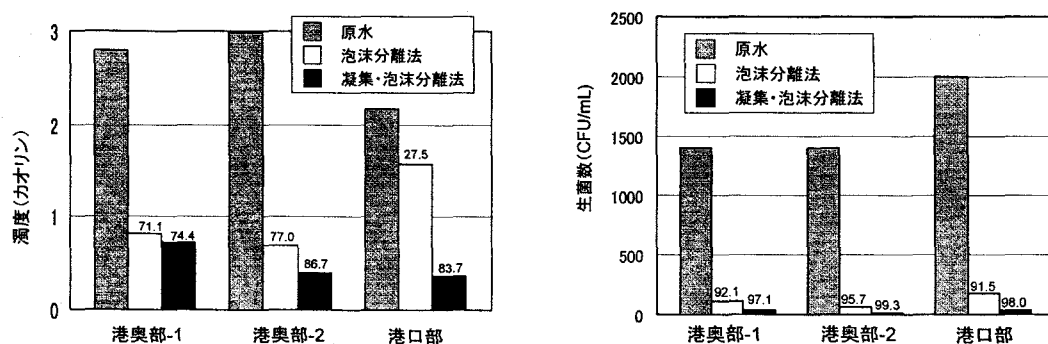


図-6 漁港内表層海水の泡沫分離法における濁度と生菌数の除去率

泡沫分離法: カゼイン 1mg/L

凝集・泡沫分離法: FeCl₃ 1mg-Fe/L, カゼイン 1mg/L

4. まとめ

養殖システムや水族館の飼育水ならびに漁港市場の使用海水からの細菌の除去は、羅病リスクの軽減および公衆衛生の観点から重要である。したがって、細菌学的安全性の向上を目的とした海水浄化技術の開発が必要である。そこで本研究では、一般的な腸球菌を対象として、粘質物およびタンパク質を利用した泡沫分離法による細菌の除去特性について検討した。粘質物とタンパク質は、腸球菌に対して、泡沫分離プロセスにおいて不可欠な捕集剤の機能を全く示さないことがわかった。しかしながら、凝集処理プロセスを泡沫分離プロセスの前段に導入することによって腸球菌は、極めて効率的に除去できた。腸球菌懸濁水 (細胞密度 10^7 CFU/mL, 濁度 5 度) を原水とした場合、最適注薬条件において (凝集剤 1mg-Fe/L, カゼイン 1mg/L), 濁度除去率は 97% 以上、生菌数の除去率は 99% となった。実際の漁港海水を処理した場合、泡沫分離プロセスのみの一般細菌の生菌数の除去率は 92~96% であった。凝集と泡沫分離の両プロセスを組み合わせた場合には、生菌数の除去率は 97~99% に著しく向上した。細菌の除去を目的とした海水浄化技術として、泡沫分離法の適用性は高いと考えられる。

参考文献

- 1) 笠井久会, 杉山絵美, 吉水守: 衛生管理型標津漁港の細菌学的調査, 日本水産学会誌, Vol. 70, pp. 60-65, 2004.
- 2) Wolfe, R. L., N. R. Ward and B. H. Olson: Inorganic chloramines as drinking water disinfectants: A review., Journal AWWA, Vol. pp. 74-88, 1984.
- 3) 磯野良介, 伊藤康男, 木下秀明, 城戸勝利: シロギス卵・稚魚の生残に及ぼす海水オゾン処理の影響, 日本水産学会誌, Vol. 59, pp. 1527-1533, 1993.
- 4) 浅川牧夫: ウナギ体表面粘質物の組織化学的研究, 日本水産学会誌, Vol. 36, pp. 83-87, 1970.
- 5) 浅川牧夫: 魚類体表面粘質物の生態防御における役割: ウナギシアル酸含有糖タンパク質の構造と機能, 日本水産学会誌, Vol. 62, pp. 291-292, 1996.
- 6) 丸山俊朗, 奥積昌世, 佐伯昭和, 島村茂: 活魚輸送・畜養における泡沫分離法の飼育海水浄化能, 日水誌, Vol. 57, pp. 219-225, 1991.
- 7) 鈴木祥広, 丸山俊朗: 魚類の体表面粘質物を利用した泡沫分離法による懸濁物除去に関する基礎的研究, 水環境学会誌, Vol. 23, pp. 181-186, 2000.
- 8) Suzuki, Y. and T. Maruyama: Removal of suspended solids by coagulation and foam separation using surface-active protein, Wat. Res., Vol. 36, pp. 2195-2204, 2002.
- 9) 鈴木祥広, 丸山俊朗, 佐藤大輔, 神田猛, 道下保: 閉鎖循環式泡沫分離・硝化システムを用いたヒラメの飼育における飼育水水質の変化および物質収支, 日本水産学会誌, Vol. 66, pp. 1-9, 2000.
- 10) Suzuki, Y., T. Maruyama, H. Numata, H. Sato and M. Asakawa: Performance of a closed recirculating system with foam separation, nitrification and denitrification units for the intensive culture of eel: Towards zero emission, Aquacult. Eng., Vol. 29, pp. 165-182, 2003.
- 11) 平田強: 微生物汚染指標「水質衛生学」(金子光美編), pp. 468-483, 技法堂出版, 東京, 1996.
- 12) 国府島泉: 腸球菌の水質汚染指標性の検討, 用水と廃水, Vol. 31, pp. 982-986, 1989.
- 13) Haack, S. K., L. R. Fogarty, D. and C. Wright: *Escherichia coli* and Enterococci at beaches in the Grand Traverse Bay, Lake Michigan: Sources, characteristics, and environmental pathways, Environ. Sci. Technol., Vol. 37, pp. 3275-3282, 2003.
- 14) Sumi, T., Y. Hama, D. Maruyama, M. Asakawa and H. Nakagawa: Isolation and properties of a sialoglycoprotein from the skin mucus of the stingray *Dasyatis akajei*, Fish. Sci., Vol. 63, pp. 453-458, 1997.
- 15) 鈴木祥広, 丸山俊朗: 凝集・泡沫分離法による高塩分濃度濁水の処理, 水環境学会誌, Vol. 25, pp. 163-169, 2002.