

(54) 低圧及び中圧紫外線ランプ照射による *Anabaena variabilis* の増殖抑制

Growth Inhibition of *Anabaena variabilis* by Low- or Medium- Pressure UV Lamp Irradiation

酒井宏治*、小熊久美子*、片山浩之*、大垣眞一郎*

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

ABSTRACT; A pure culture of *Anabaena variabilis* (NIES-23) was exposed to low-pressure (LP) or medium-pressure (MP) UV lamps. Irradiated samples were subsequently incubated under white light fluorescent lamps with 12h/12h of light/dark cycle. During incubation, profiles of the number of cells and of the damage of DNA were determined for each sample. At the UV fluence of 600 [mWs/cm²], the net log reduction of cells after 7days incubation was 2.3 log or 2.2 log by LPUV or MPUV, respectively. The number of DNA damage was 6.07 [10⁻⁴ ESS/base] (LPUV) and 4.48 [10⁻⁴ ESS/base] (MPUV) just after UV irradiation and it became 0.23 [10⁻⁴ ESS/base] (LPUV) and 0.40 [10⁻⁴ ESS/base] (MPUV) after 3days incubation, where the cell number turned to increase. Therefore, the repair of DNA damage had an impact on the growth inhibition of *Anabaena variabilis* by UV irradiation. In order to describe the behavior of cell number, model calculation was conducted. All parameters except one were obtained from experimental data. The model calculation successfully described the observed behavior of the cell number of *Anabaena variabilis*.

KEYWORDS; Growth inhibition, *Anabaena variabilis*, UV irradiation, model calculation

1. はじめに

水道水源となる湖沼、貯水池における藻類の異常増殖は、その後の水処理工程に大きな影響を与えている。藻類は、2-MIB やジェオスミンなどの臭気物質を発生させるだけでなく (1, 2)、ミクロキスティンなどの毒性物質も産生する (3, 4, 5)。このため、これらの障害を引き起こす藻類の異常増殖を抑える必要がある。最も抜本的な対策は、これらの湖沼、貯水池への栄養塩負荷を減少させることであるが (6)、実際には底泥などからの栄養塩の寄与も大きく、外部からの栄養塩負荷の抑制だけでは、増殖抑制対策として必ずしも有効な方法とはならない。水処理工程への影響を軽減するための一時的な対策としては、湖沼における硫酸銅の散布や浄水場での前塩素処理などが用いられている。しかしながら、これらの処理方法は、化学物質を投入する処理方法であり、増殖抑制に用いた化学物質が残留することによる生態系への影響や、副生成物などの問題が懸念されている (7)。これに対し、紫外線処理は残留性が少なく、副生成物の生成も抑えられるという点で既存の処理方法の短所を補うことのできる処理方法であると考えられる。このような利点から、紫外線処理は、藻類の増殖を抑制する新たな処理方法となることが期待されている。

紫外線照射による微生物の不活化の主な原因と考えられるのは、遺伝子に生じる損傷である。この遺伝子損傷のおかげで、微生物は増殖する能力が失われ、紫外線照射による処理効果が得られる。遺伝子損傷の修復については、光回復酵素と可視光の組み合わせによって起こる光回復現象がよく知られている。この光回

* 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)

復現象は、これまで *Escherichia coli* (8, 9)、*Cryptosporidium parvum* (8, 10)、*Legionella pneumophila* (11) などの病原微生物に対して検討がなされてきた。しかし、*Anabaena* などの藻類を対象にした場合、紫外線照射による遺伝子損傷の修復の起こる程度や、その後の細胞数の変化に関する知見は少なく、この点を検討することが必要である。紫外線照射による藻類の増殖抑制は、既に *Microcystis aeruginosa* を対象にして検討した事例 (12) が存在する。しかしながら、*Microcystis* と並んで湖沼、貯水池内で異常増殖する藻類の代表種である *Anabaena* に対する検討は、これまでなされておらず、この観点からも検討が必要である。

紫外線照射の光源として、最も一般的に用いられているのは、低圧紫外線ランプ及び中圧紫外線ランプである。中圧紫外線ランプは、低圧紫外線ランプと比較して、より出力が大きく、より広い波長域を出力するという特徴を持ち、*E. coli* の純粋培養株を対象に検討した結果 (9) では、光回復を抑制できることが報告されていることから、より効率的な処理を行う可能性がある。本研究では、異なる特徴を持つこの2種類の紫外線ランプを、*Anabaena variabilis* の純粋培養株の増殖抑制に適用し、ランプ間の増殖抑制効果の比較を行った。

以上のような点を踏まえ、本研究では、*Anabaena variabilis* の純粋培養株を対象にして、紫外線照射後の培養中における細胞数、遺伝子損傷数の変化を把握すること、遺伝子損傷の修復の影響を検討することを目的とした。また、その際の細胞数の変化を、モデル式にて記述することを試みた。

2. 実験方法

2.1 供試藻類

Anabaena variabilis (NIES-23) を国立環境研究所より入手し、M-12 培地で培養した。M-12 培地の組成を Table 1 に示した。実験に供する際には、M-12 培地中で7日間培養し、 5×10^6 cells/ml 程度の濃度に達したものをを用いた。培養条件は、光強度は、3000 [lux]、温度は25°C、明暗サイクルは12h (明)/12h (暗) に設定し、恒温培養器 (BITEC-500L, Shimadzu) にて蛍光灯照射下 (FL20SW-B, 20W, GE/Hitachi) で行った。

Table 1 Composition of M-12 Media

Ingredients	Concentration
NaNO ₃	100 mg/l
K ₂ HPO ₄	10 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	40 mg/l
Na ₂ CO ₃	20 mg/l
Fe-Citrate	1 mg/l
pH	8

2.2 紫外線照射

紫外線照射装置を Figure 1 及び Figure 2 に示した。紫外線光源として、低圧紫外線ランプ (GL-15, 15W×2 本, National)、中圧紫外線ランプ (330W×1 本, B410MW, Ebara) を用いた。試料に対する平均紫外線線量率は F 特異 RNA 大腸菌ファージ Q β を用いた生物線量計 (13) によって測定し、低圧ランプでは $0.4 \text{ [mW/cm}^2\text{]}$ 、

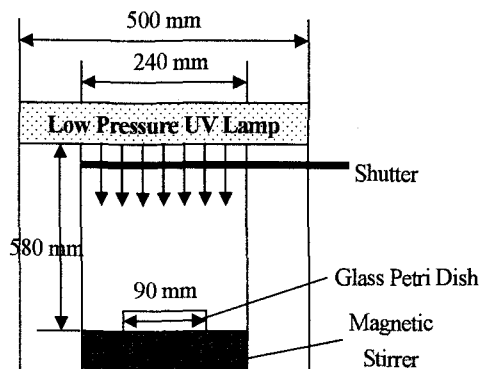


Figure 1 Low Pressure UV lamp System

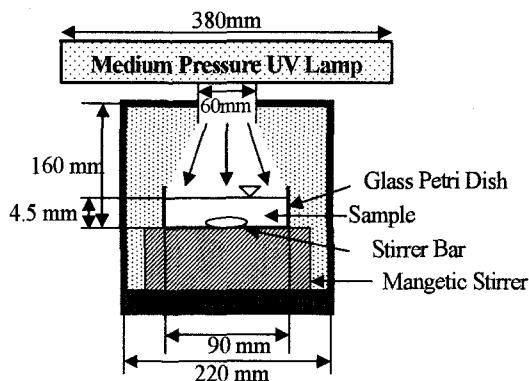


Figure 2 Medium Pressure UV lamp System

中圧ランプでは1.5 [mW/cm²]であった。紫外線照射は、12h (明) /12h (暗) の明暗サイクルのうち、明サイクルが6±1時間経過した時点で行った。紫外線を照射した藻類は、100ml 三角フラスコに移し、2.1に示した培養条件に従い、培養を行った。また、紫外線照射中に生成したラジカル種が、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、塩素消費量の無いように処理を施して実験に供した (14)。紫外線照射量は、低圧、中圧紫外線ランプ共に180、600、1800 [mWs/cm²]の3段階とした。紫外線線量率は実験を通して一定とし、紫外線照射量は照射時間によって調節した。

2.3 細胞数測定

紫外線照射直後、1, 3, 5, 7日後に試料を採取し、そのときの細胞を、蛍光顕微鏡 (BH2, Olympus) にてG励起を用いて計数した。細胞計数にはプランクトン計数板 (MPC-200, 松浪硝子) を用いて、200倍で検鏡を行い、10視野の算術平均を一試料の細胞濃度とした。細胞が明らかに破損している場合は計数せず、形状が顕微鏡で明らかに確認できる細胞のみ計数した。

紫外線照射処理では、紫外線を照射してから細胞が消滅するまでに時間を要するため、紫外線処理の効果を確認するためには培養を行う必要がある。このため、本研究では、紫外線照射を行った試料と紫外線照射を行っていない対照試料を培養した後の細胞数の差を、増殖抑制効果として評価した。

2.4 遺伝子損傷数の測定

紫外線照射直後、1, 3, 5, 7日後に試料を採取し、そのときの遺伝子損傷数をESS法によって測定した。ESS法は、環境工学分野では、これまで *Escherichia coli* (8, 9)、*Cryptosporidium parvum* (8, 10)、*Legionella pneumophila* (11) などの病原微生物に対して適用されている。具体的な測定方法は、既報 (8) に従った。

2.5 細胞数変化のモデル化

培養実験において得られた *Anabaena variabilis* の細胞数の変化を、モデル式によって表現することを試みた。このモデルでは、紫外線照射によって、増殖可能な細胞 (X_1) と、紫外線照射による損傷を受ける細胞 (X_2) があることを仮定した。また、紫外線による損傷を受けた細胞の一部は、損傷を修復して再び増殖し、それ以外の細胞は損傷を修復できずに死滅することを仮定した。

モデルの計算にあたり、 X_1 、 X_2 の初期値及び μ 、 k_d は細胞数の経時変化から実験的に求めた。 k_p は、実験で観察された細胞数変化に見合うよう、適切なパラメーター値を設定した。

なお、本研究で扱ったモデルは、(1)~(3)の式で表される。この3式は、解析的に解くことができ、その解は(4)式と(5)式で表される。

$$X = X_1 + X_2 \dots (1)$$

$$X_2 = X_{20} e^{-(k_d + k_p)t} \dots (4)$$

$$\frac{dX_1}{dt} = \mu X_1 + k_p X_2 \dots (2)$$

$$X_1 = e^{\mu t} \left(-\frac{k_p X_{20}}{k_d + k_p + \mu} e^{-(\mu + k_d + k_p)t} + C \right) \dots (5)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = -k_d X_2 - k_p X_2 \dots (3)$$

X: 全細胞数、 X_1 : 増殖可能な細胞数、 X_2 : 紫外線照射によって損傷を受けた細胞数

μ : 細胞の増加速度、 k_d : 細胞の減少速度係数、 k_p : 細胞の損傷修復速度係数、C: 積分定数、 X_{20} : X_2 初期値

3. 結果及び考察

3.1 細胞数

Figure 3 に紫外線照射後培養した *A. variabilis* の細胞数の経時変化を示した。図の横軸には、紫外線照射後

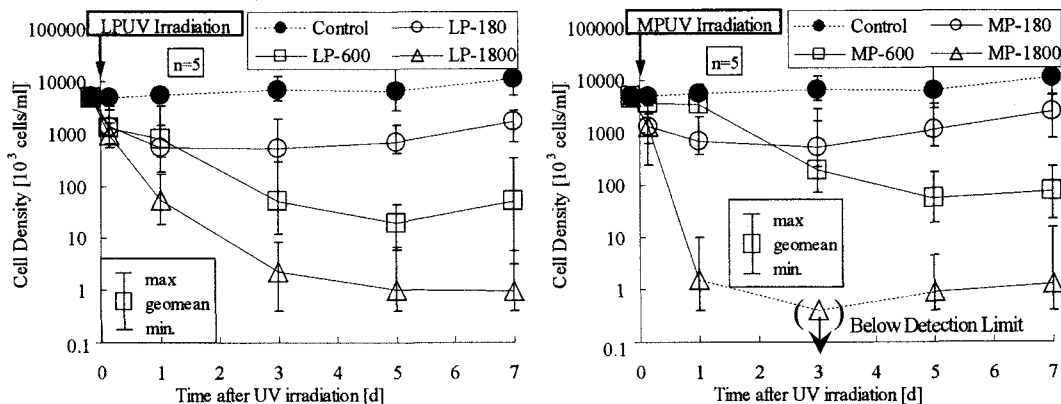


Figure 3 Cell number profiles of *Anabaena variabilis* (left: LPUV, right: MPUV)

の経過時間、縦軸には、細胞濃度を 10^3 [cells/ml]の単位で示したものを示した。また、図中の LP- MP- は、それぞれ低圧ランプ、もしくは中圧ランプを用いて紫外線を照射した試料を表している。LP, MP に続く数字は紫外線の照射量を[mWs/cm²]の単位で示したものである。なお、縦軸付近の左右に位置するプロットは、紫外線照射直前及び直後の細胞数をそれぞれ示している。

紫外線を照射した試料では、細胞数に減少が見られた。7日後の細胞数を、紫外線を照射していないControlとの差と比較すると、その差は、紫外線照射量が1800 [mWs/cm²]、600 [mWs/cm²]、180 [mWs/cm²]の順に、低圧ランプでは、4 log 以上、2.3 log、0.8 log、中圧ランプでは、4 log 以上、2.2 log、0.7 log となった。なお、7日後の細胞数は、ランプの相違による違いは観察されなかった。また、紫外線照射直前直後で0.12-0.72 logの細胞数の変化が見られ、この差は、t検定により、有意な変化であることが確認された (n=84, p<0.01)。最後に、低圧ランプ、中圧ランプ、どちらで処理した試料においても細胞数が増加に転じている傾向が確認された。LP-180、MP-180 では、3日後以降に、LP-600 と MP-600 では5日後以降に、それぞれ細胞数が増加していく傾向が確認された。

紫外線照射によって *A. variabilis* の細胞数は減少するものの、3~5 日間培養後は、再び増加に転ずることが明らかになった。この現象は、*M. aeruginosa* を対象にした既存の研究報告 (12) では観察されておらず、紫外線照射による藻類の増殖抑制についての新たな知見である。ただし、紫外線照射を受けた試料では3~5 日間培養後に細胞数は増加に転じるものの、7日後の細胞数は依然としてControl よりも少なく、紫外線照射による増殖抑制の効果はあるといえる。

3.2 遺伝子損傷数

Figure 4 に紫外線照射後培養した *A. variabilis* の遺伝子損傷数の経時変化を示した。図の横軸は紫外線照射後の経過時間、縦軸には遺伝子損傷数を示している。また、縦軸付近の左右に位置するプロットは、紫外線照射直前及び直後の遺伝子損傷数をそれぞれ示している。なお、中圧ランプで1800 [mWs/cm²]の紫外線を照射した試料においては、紫外線照射直後の遺伝子損傷数が不安定で、1日後以降では、定量的な測定値を得ることができなかった。これは、中圧ランプで1800 [mWs/cm²]の紫外線を照射した試料において、遺伝子損傷の生成だけでなく細胞の分解が速やかに進行し、遠心分離による細胞の回収が安定的に行えなかったためであると考えられる。

低圧ランプ、または中圧ランプを照射した試料において、紫外線照射直後に生成した遺伝子損傷数は4.48-8.92 [10^4 ESS/base] (n=32, SD=2.90) の範囲の値を取り、ランプの相違による違いは観察されなかった。

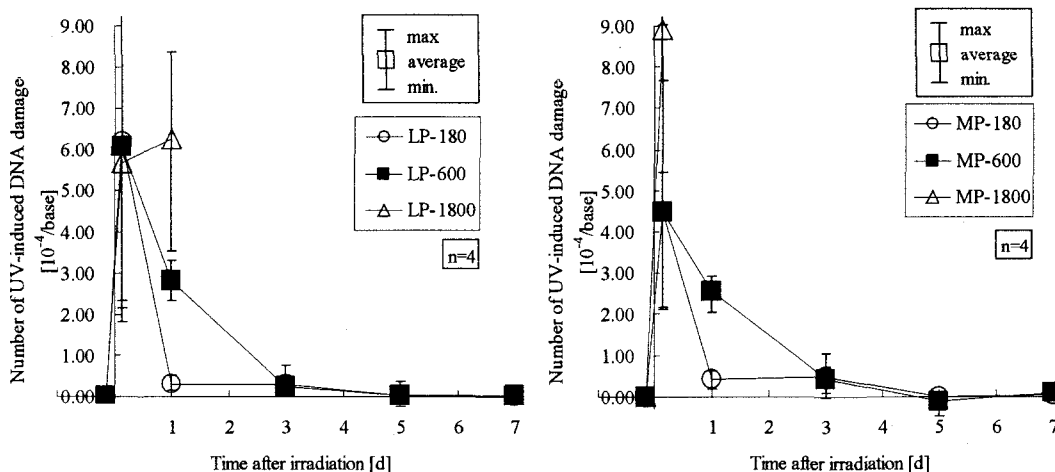


Figure 4 DNA damage profiles of *Anabaena variabilis* (left: LPUV, right: MPUV)

また、いずれの紫外線ランプを照射した試料においても、紫外線照射量の増加に伴う遺伝子損傷数の増加は観察されなかった。これは、本実験で設定した最小の紫外線照射量 ($180 \text{ [mWs/cm}^2\text{]})$ において、定量的に測定できる以上の遺伝子損傷数が生じてしまったためと考えられる。紫外線照射による遺伝子損傷は、紫外線照射量が $180 \text{ [mWs/cm}^2\text{]}$ の場合には、紫外線照射 1 日後には修復が見られ、低圧ランプで $0.29 \text{ [} 10^{-4} \text{ ESS/base] (n=6, SD=0.14)}$ 、中圧ランプで $0.40 \text{ [} 10^{-4} \text{ ESS/base] (n=6, SD=0.15)}$ まで遺伝子損傷数が減少し、培養 1 日間で、ほぼ全ての遺伝子損傷が修復されることが分かった。また、紫外線照射量が $600 \text{ [mWs/cm}^2\text{]}$ の場合には、紫外線照射 3 日後には、低圧ランプで $0.23 \text{ [} 10^{-4} \text{ ESS/base] (n=4, SD=0.18)}$ 、中圧ランプで $0.40 \text{ [} 10^{-4} \text{ ESS/base] (n=4, SD=0.29)}$ まで遺伝子損傷数が減少し、培養 3 日間でほぼ全ての遺伝子損傷が修復されることが分かった。一方、*E. coli* を対象にした既存の研究においては、中圧ランプでは遺伝子損傷がほとんど修復されず、低圧ランプでは、一部の遺伝子損傷が修復されずに残存することが知られている。このことから、本研究で用いた *A. variabilis* は、*E. coli* と比較した場合、非常に高い遺伝子損傷の修復能力を持っていることが分かった。

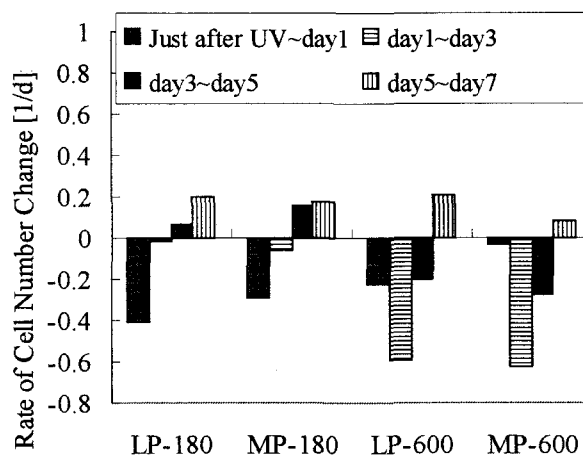


Figure 5 Rate of Cell Number Change

Figure 5 に培養中の各期間の細胞数の変化率を示し、遺伝子損傷の修復が細胞数に与える影響を検討した。Figure 4 の結果から、紫外線照射量が $180 \text{ [mWs/cm}^2\text{]}$ の場合には、遺伝子損傷は、1 日後までにほぼ全て修復された。このとき、Figure 5 から、細胞数は、低圧ランプ、中圧ランプともに、3 日後までは減少し、3 日後以降は、増加に転じていることが分かる。紫外線照射量が $600 \text{ [mWs/cm}^2\text{]}$ の場合には、同様に、遺伝子損傷は、3 日後までにほぼ全て修復された。このとき、細胞数は、低圧ランプ、中圧ランプともに、5 日後までは

減少し、その後は増加に転じた。すなわち、遺伝子損傷が修復されて2日以降経つと、細胞数が増加に転じた。この結果から、*A. variabilis* の増殖抑制に関しては、紫外線照射による遺伝子損傷が増殖抑制の主な要因であると考えられ、遺伝子損傷の修復を抑制する手法を開発する必要があることが分かった。

3.3 細胞数の経時変化のモデル化

紫外線照射によって藻類の増殖抑制を行う場合、紫外線照射後の細胞数変化を予測することは、処理効果を予測するという点で、重要な課題といえる。ここでは、細胞数の変化を予測することを目的として、2.5にて示した方法で、モデルを作成した。

各パラメーター値の決定は、2.5に示したとおりに行った。ここでは、LP-180の場合を例に、具体的な決定方法を説明する。まず、細胞の増加速度 μ は、Controlの7日間の細胞の増加速度から $0.0978 [1/d]$ と求め、これが全ての試料に対して共通であると仮定した。 X_1 の初期値は、試料の7日後の細胞数 (1.66×10^6 [cells/ml]) から、細胞の増加速度 μ を仮定した場合の7日間の細胞数の増加分を差し引き、 8.39×10^5 [cells/ml] とした。 X_2 の初期値は、紫外線照射前の細胞数から X_1 の初期値を差し引き、 4.23×10^6 [cells/ml] とした。 k_d は、紫外線照射前と紫外線照射1日後の細胞数の差から、 $2.25 [1/d]$ として求めた。他の試料も、同様の手順によって求めた。ただし、MP-600の k_d に対してのみ、紫外線照射前と紫外線照射3日後の細胞数の差から求めた。これは、MP-600の場合、紫外線照射1日後の細胞数には大きな減少が見られないため、細胞の減少速度の算出としては不適当であると判断したためである。 k_{rp} のみ、モデル曲線が実測値に適合するように、適切なパラメーター値を設定した。

Table 3 Determined parameter values for model calculation of *Anabaena variabilis*

	Control	LP-180	LP-600	LP-1800	MP-180	MP-600	MP-1800
Initial value of X_1 [10^3 cell/ml]	4930	839	26.1	0.486	1230	39.5	0.675
Initial value of X_2 [10^3 cell/ml]	0.00	4230	4870	4880	3830	4860	4750
μ [1/d]	0.0978	0.0978	0.0978	0.0978	0.0978	0.0978	0.0978
k_d [1/d]	-	2.25	1.85	4.48	2.00	1.08	8.05
k_{rp} [1/d]	-	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-5}

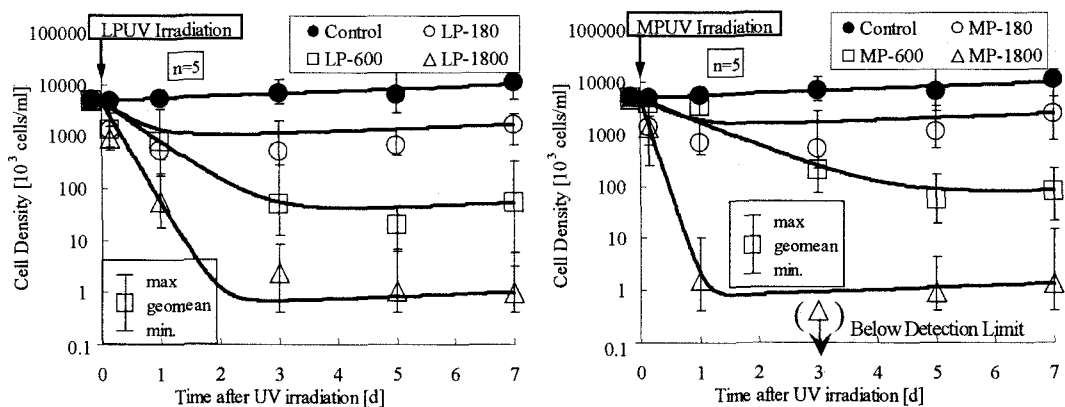


Figure 6 Model calculation result of cell number of *Anabaena variabilis* is indicated in full line. Observed data are also plotted in each legend symbol. (left: LPUV, right: MPUV)

モデルに設定した値を Table 3 に、モデルによる計算結果を Figure 6 に示す。Figure 6 から、モデルによる計算結果は、実験結果を概ね再現できるものであることが分かった。このモデルが他の場合にも適用可能かどうかは、今後のデータの蓄積を待ってさらに検討することが必要である。しかしながら、紫外線照射後の細胞数の変化をモデルで予測できる可能性が示されたことは、実際に処理を行う上で役立つ知見を得たといえる。

4. まとめ

本研究では、紫外線照射による *A. variabilis* の増殖抑制について実験的に検討し、以下の結論を得た。

- 1) 紫外線照射によって、*A. variabilis* の増殖抑制は抑制され、低圧ランプと中圧ランプでは、ほぼ同等の効果が得られた。また、遺伝子損傷が修復されると、細胞数が増加に転じた。
- 2) *A. variabilis* は、*E. coli* と比較して非常に高い遺伝子損傷の修復能力を示した。
- 3) 紫外線照射後の *A. variabilis* の細胞数の変化は、紫外線照射による損傷の生成、及び、その修復を仮定したモデルによって表現できた。

今後の課題としては、細胞数変化モデルの汎用性の検討、及び、光回復を効果的に抑制する手法の開発などが挙げられる。

参考文献

1. Hargessheimer, E. E., S. B. Watson. 1996. Drinking water treatment options for taste and odor control. *Water Res.* **30**: 1423-1430
2. Sugiura, N., N. Iwami, Y. Inamori, O. Nishimura, and R. Sudo. 1998. Significance of attached cyanobacteria relevant to the occurrence of musty odor in Lake Kasumigaura. *Water Res.* **32**: 3549-3554
3. Carmichael W. W. 1992. Cyanobacterial secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 445-459
4. Humpage, A. R., and I. R. Falconer. 1999. Microcystin-LR and liver tumor promotion: effects of cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. *Environ. Toxicol.* **14**: 61-75
5. Lambert, T. W., C. F. B. Holmes, and S. E. Hrudey. 1994. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environ. Rev.* **2**: 167-186
6. Ryding, S. O., and W. Rast. 1989. The control of eutrophication of lakes and reservoirs, Parthenon Publishing Group
7. Hoehn R. C., D. B. Barnes, B. C. Thompson, C. W. Randall, T. J. Grizzard, and P. T. B. Shaffer. 1980. Algae as sources of Trihalomethane precursors. *J. Am. Water Works Assoc.* **72**: 344-350
8. Oguma, K., H. Katayama, H. Mitani, S. Morita, T. Hirata, and S. Ohgaki. 2001. Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4630-4637
9. Oguma, K., H. Katayama, and S. Ohgaki. 2002. Photoreactivation of *Escherichia coli* after Low- or Medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6029-6035
10. Morita, S., A. Namikoshi, T. Hirata, K. Oguma, H. Katayama, S. Ohgaki, N. Motoyama, and M. Fujiwara. 2002. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5387-5393
11. Oguma, K., H. Katayama, and S. Ohgaki. 2004. Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Water Res.* **38**: 2757-2763
12. Alam, M. Z. B., M. Otaki, H. Furumai, S. Ohgaki. 2001. Direct and indirect inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation. *Water Res.* **35**: 1008-1014
13. Kamiko, N., and S. Ohgaki. 1989. RNA coliphage Q β as a bioindicator of the Ultraviolet disinfection efficiency. *Water. Sci. Technol.* **21**: 227-231
14. 酒井宏治、片山浩之、大垣眞一郎 2003 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 環境工学研究論文集 **40**: 213-221