

論文の内容の要旨

論文題目：

Evaluation of bacterial regrowth potential in drinking water system using cell cycle parameters

(水供給システムにおける細胞周期因子を用いた細菌再増殖能の評価)

氏名：吳政祐 (OH Jung-Woo)

水供給システムにおける細菌再増殖能は、水道水の安全性に関する最も重要な水質指標の一つとして認識されている。この細菌再増殖能を測定する手法としては、BDOC (Biodegradable dissolved organic carbon), AOC(Assimilable organic carbon)及びBRP(Bacterial regrowth potential)などが提案されている。また、細菌再増殖能を抑制するために塩素など残留性がある消毒剤の注入が伝統的な方法として行われている。しかし、リンや窒素など増殖に影響する栄養塩類の制御の必要性も議論されており、既存の指標では、細菌再増殖能の正確な解析が難しい場合もある。従って、新たな指標及び新しい抑制方法の開発が必要である。

本論文では、水供給システムにおける細菌再増殖能を評価するため、比再増殖速度、及び分子生物学的な情報である細胞周期因子を導入し、新たな評価指標としてその適用性を検討した。この新たな指標を用いて、栄養塩類のさまざまな条件に対する細菌再増殖能の変化を調べ、栄養塩類の制限による抑制効果を明らかにした。

本論文では8つの章から構成されている。

第1章は序論である。

第2章は既存の研究の知見をとりまとめである。

第3章は実験方法である。

第4章はBRP法の改善及び細胞周期の測定法の検討である。

BRP法は対象水道水から分離された土着細菌を植種菌として使用する方法である。従来のBRP法は水道水から作製された植種菌液の一定量(1mL)を試料に注入する方法を採用している。しかし、従来のBRP法の植種菌液に含まれている栄養塩類の濃度を測定した結果、TOC(Total Organic Carbon)及びNO₃-Nの濃度が相対的に高いことが

分かった。従って、植種菌液による影響を最小にするため、遠心膜分離によって植種菌液から植種菌を分離する過程を導入した。このような植種方法の改善によって BRP 法の信頼性を改善した。

細胞周期因子の定量には対数増殖期の細胞の各周期の DNA 含量の比を測定しなければならない。植種菌が注入された後、6 日間にわたり細菌の増殖量及び細胞の各周期の時間的な変化を観察し、その結果、細胞の各周期は 2 日目から安定的な分布が見られることを見出した。従って、本研究では、菌が植種された後の 2 日目から対数増殖期として仮定し、この期間に採水された試料に対して細胞周期因子の定量を行った。

従来の BRP 法は、細菌数検出のための染色剤として SYTO-9 を利用している。しかし、細胞周期を分析するためには SYTO-9 は使用できないのため、染色剤として SYBR Green- I を用いた。なお、両染色剤で染色した細菌の検出数を比較した結果、ほぼ一致する結果($r^2 = 0.9964$, $n=7$)を得たことから、本研究の BRP 法の細菌数検出のための染色剤は SYBR Green- I を用いた。

第 5 章は、水道水に対する細胞周期因子の適用に関する検討である。

水道水の細菌の細胞周期は研究されてきていない。しかし、DNA 含量がそれぞれ異なる細菌の混合培養系では細胞周期の測定ができない。従って、水道水の混合土着細菌の増殖特性をよく反映する指標菌を選定しなければならない。水道水から分離された混合土着細菌と *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* P17, *Sprillum* NOX 及び *Aeromonas hydrophila* の 4 種類の純菌の増殖量と増殖速度を比較した。*Pseudomonas aeruginosa* 及び *Pseudomonas fluorescens* P17 が混合土着細菌と高い相関性を示した。本研究では、比増殖速度及び細胞周期測定のための指標菌として *Pseudomonas fluorescens* P17 を選定した。

水道水中における細菌の細胞周期の特性を詳細に検討するために *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Pseudomonas fluorescens* P17 の細胞周期特性を解析した。まず、細菌が分裂する過程において DNA 含量の分布を意味する DNA ヒストグラムは二つのピークで分かれることが分かった。この分布特性は、遅い増殖速度で現れる特性の一つである。従って、水道水において、細菌の DNA 分裂では、増殖速度が大きい場合に観察される DNA 分裂の Overlapping (以前の DNA 分裂が終わる前に新たな DNA 分裂が行う現象) は発生しないことが分かった。また、DNA ヒストグラムから算定される各周期段階の長さは、相対的に B 段階が長く、C 及び D 段階は短かった。すなわち水道水に対するこの *Pseudomonas* 属の細胞周期特性は、遅い増殖速度の分裂特性をよく反映していること

が分かった。

細胞周期特性を定量的に算定するため細胞周期因子としての有効性を検討した。細菌比再増殖速度と細胞周期因子、すなわちDNA分裂指標 M_i / M_{avg} (分裂初期の細胞質量/平均細胞質量)及びD/B比(D段階の長さ/B段階の長さ)の相関性を調べ、強い相関があることを明らかにした。なお、AODC(Acridine Orange Direct Count)法によって測定した実際の細菌の大きさと比再増殖速度とは強い相関を示した。この結果から、貧栄養塩類の水道水に対して、細胞周期因子を用いた細菌再増殖能による評価方法が信頼性をもつことを示した。

第6章は、栄養塩類の制限による細菌再増殖能の解析である。

栄養塩類のさまざまな条件に対する細菌再増殖能を細胞周期因子で評価した。培養温度の最適条件を決定するため、水道水の土着細菌に対して培養温度条件(37°C及び20°C)が細菌再増殖能に及ぼす影響を調べた。その結果、貧栄養塩類及び低水温に適応している水道水中の細菌は37°Cより20°Cの方が高い増殖量を示した。この結果より培養温度を20°Cとした。

炭素(Glucose, Acetate 及び Humic Acids)、窒素(NH₄-N, NO₂-N 及び NO₃-N)及びリン(PO₄-P)に対する増殖特性を調べた。各栄養塩類の濃度の増加に従い増殖量は増えたが、ある特定の濃度を超えると増殖量はあまり変化しなかった。また、比再増殖速度の各濃度依存性も同様の結果となった。その特定の濃度として、土着細菌に対しては、Glucose 0.5 mgC/L, Acetate 1.0 mgC/L, NH₄-N 0.1 mgN/L, NO₂-N 0.3 mgN/L, NO₃-N 0.5 mgN/L, 及び PO₄-P 5.0 µgP/L であり、*Pseudomonas fluorescens* P17 に対しては、Glucose 1.0 mgC/L, Acetate 1.0 mgC/L, NH₄-N 0.5 mgN/L, NO₂-N 0.3 mgN/L, NO₃-N 0.5 mgN/L, 及び PO₄-P 10.0 µgP/L であった。Humic Acids の場合は細菌の増殖があまり見られなかった。本研究では、比再増殖速度が濃度依存しなくなる対象栄養塩類の特定濃度を、「充足濃度(Sufficient Nutrient Concentration)」と定義した。この充足濃度は細菌再増殖能を抑制するための方法を開発するために有用な情報となる。

本研究で導出された充足濃度を基準にして、Glucose、NO₃-N と PO₄-P をそれぞれ充足濃度の50%と10%(NO₃-Nは60%と20%)と設定し、栄養塩類を一つ、二つあるいは三つを同時に制限した場合に対して、5日後の細菌再増殖量の変化を調べた。その結果、リンを同時に制限した場合の増殖抑制効果が高かった。NO₃-Nは、炭素、窒素及びリンすべてが充足濃度以上である場合より、むしろ低濃度の方が高い増殖量を示し

た。

第7章では、細菌比再増殖速度と細胞周期因子を実際の水供給システム(東京都の金町浄水場及びその配水系統)に適用し、その有効性を検討した。

従来の急速ろ過工程(凝集沈殿-砂ろ過)及び高度処理工程(凝集沈殿-オゾン-生物活性炭-砂ろ過)の両方について水質と細菌再増殖能を測定した結果、細菌再増殖能と TOC の除去率は従来の急速ろ過工程より高度処理工程が高く現れた。そして、オゾン処理によって UV 吸光度の減少及び PO₄-P の増加とともに細菌再増殖能の増加が見られた。細菌再増殖能の処理は生物活性炭工程の役割が非常に大きいことが分かった。また、各処理工程中の細菌再増殖能とリン濃度は同様の変化を示し、金町浄水場内の細菌再増殖はリンの制限によって支配されていることが分かった。この結果より、リンは細菌再増殖を制御する重要な因子であることを明らかにした。

細胞周期因子を用いて実際の細菌比再増殖速度を求めるため、第6章の実験室内で得られた細胞周期因子と細菌比再増殖速度の回帰曲線を、次式(1)のように得た。

$$\frac{M_i}{M_{avg.}} = -0.185 \ln(\mu) + 0.396 \quad (1)$$

$M_i / M_{avg.}$: DNA replication index (The ratio of initiation mass and cell average mass, unit less)

μ : Specific regrowth rate, hour⁻¹

この式(1)を用いて、金町浄水場及びその配水系統の $M_i / M_{avg.}$ を実測し、式(1)から比再増殖速度を計算し、その結果を実測の細菌比再増殖速度と比較した。計算値と実測値は高い相関($r^2=0.8798$, $n=39$)を示した。この結果は、DNA ヒストグラムから実際の細菌比再増殖速度の計算が可能であることを示している。すなわち、ある水道水に存在する指標菌の DNA 含量の比が測定できれば、培養しなくても細菌比再増殖速度と細菌再増殖能の導出ができることを示している。

第8章において、水道水のような低濃度系における細菌再増殖能を、新しい細菌細胞周期により評価したことと、また、栄養塩類の細菌再増殖能への影響を明らかにしたこととをとりまとめて示した。