

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 黄 明九

本論文は、Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* in Water by Using Silver and Copper (銀及び銅を用いた水中の *Legionella pneumophila* と *Pseudomonas aeruginosa* の不活化) と題し、水系病原細菌を対象とし、人工水道水条件下における銀と銅の消毒効果とそのメカニズムの定量的分析、ならびに原生動物の存在が消毒にあたえる影響について研究したものである。9章で構成されている。

第1章では、水系病原微生物である *L. pneumophila* を対象として銀と銅の消毒特性について研究する必要性とその目的、ならびに研究の流れを示している。

第2章では、本研究で取り扱う微生物 (*L. pneumophila*, *P. aeruginosa* および *Acanthamoeba polyphage*) についての概論と、これらの微生物の VBNC (生命力はあるが増殖は出来ない) という状態に関する既存の知見をまとめている。また、銀と銅を用いた消毒に関する既存の研究についてもとりまとめている。

第3章では、本研究において用いた微生物の準備方法ならびに培養法による増殖可能状態の菌数の計測法、フローサイトメーター(FCM)を用いた生存微生物 (VBNC を含む) の計測法を示している。また、銀 (Ag^+) および銅 (Cu^{++}) の定量法を示し、特に、菌体あたりの蓄積量 (C_s 値) の測定方法について説明している。

第4章では、細菌の不活化特性をモニタリングするためにフローサイトメーター(FCM)を適用する妥当性を検討している。細菌の Ag^+ と Cu^{++} に対する生存特性と細菌数は、SYTO-9 と propidium iodide (PI) の2種類の核酸染色プローブの細胞膜浸透性を利用して区別でき、FCM を用いて生存微生物数を測定することが可能であるとしている。

第5章では、 Ag^+ および Cu^{++} に対する浮遊状態の細菌の生存特性を評価している。 Ag^+ と Cu^{++} の消毒能力を評価するため、接触時間(T)と C_s 値との積($C_s \times T$ 値)に対する菌の生残率($\text{Log} N_t/N_0$)の関係を調べ、 $C_s \times T$ 値が解析に有効であることを示している。*L. pneumophila*、*P. aeruginosa*、および、*E. coli* に対して、検出限界以下となるような不活化(7.2 log reduction)に必要な Ag^+ および Cu^{++} の $C_s \times T(7.2)$ 値をそれぞれ求め、*L. pneumophila* が他の微生物より Ag^+ および Cu^{++} に対して耐性が高いことを明らかにしている。

第6章では、VBNC 状態に入る細菌の生理学的特性と、その *A. polyphage* 細胞中での

再活性化特性の解析である。*P. aeruginosa* は人工水道水中で増殖したが、*L. pneumophila* は増殖可能状態の菌数は減少したものの、VBNC 状態の菌数は 190 日の培養期間において一定に維持された。VBNC 状態に入っていた *L. pneumophila* は、*A. polyphage* に寄生するとアメーバの細胞中で増殖可能性を回復することを示し、7 日間でアメーバ細胞内において 1.7×10^7 CFU/ml まで増殖した例を示している。

第 7 章では、*A. polyphage* の特性を調べている。*A. polyphage* に *E. coli* を加えるとその菌体を利用してアメーバは増殖することを確認している。一方、*L. pneumophila* と *P. aeruginosa* はアメーバ細胞に寄生して増殖する能力のある細菌であるため、これらを加えると *A. polyphage* の数が減少することを観察している。

第 8 章では、*L. pneumophila* と *P. aeruginosa* が *A. polyphage* の細胞内に存在する状態における、 Ag^+ (0.1mgAg/L)、 Cu^{++} (1.0mgCu/L)、および Ag^+ と Cu^{++} 混合による消毒特性を研究している。アメーバ細胞内に存在する細菌数は、消毒剤注入から 7 日後にも生残していることを示している。第 5 章で得られた浮遊状態の細菌に対する $Cs \times T$ (7.2) 値と、本章での浮遊状態の菌およびアメーバの細胞内に存在している菌の $Cs \times T$ 値の比較を行ない、 Ag^+ と Cu^{++} を個別に加えた場合については、アメーバ細胞内に存在する細菌に関して 7 日後の $Cs \times T$ 値は $Cs \times T$ (7.2) 値以下であり、両細菌とも生残していたことを示している。 Ag^+ と Cu^{++} 混合の場合について、細胞内に存在する細菌の 7 日後の $Cs \times T$ 値は Ag^+ と Cu^{++} 混合の場合の $Cs \times T$ (7.2) 値より大きく、検出限界以下まで不活化されたとしている。この結果から、水中のみならずアメーバに寄生している状態の細菌についても、 $Cs \times T$ 値が Ag^+ と Cu^{++} による不活化特性を説明する有効な指標となりうることを示している。

第 9 章は総括であり、本論文の成果を取りまとめて示してある。

以上のように、本論文は、水道水の処理技術ならびに配水水質管理の高度化のために、*L. pneumophila* と *P. aeruginosa* に対する銀および銅の消毒効果、および、その効果に対する *A. polyphage* の存在の影響を明らかにした研究であり、都市環境工学の学術分野に大いに貢献する成果である。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。