浄水処理における細菌の塩素消毒に及ぼす線虫類の影響

The Effect of Nematoda on the Chlorination of Bacteria in Water Supply Systems

丁 国際¹、徐 開欽²、西村 修³、稲森悠平²、須藤隆一³

¹茨城県科学技術振興財団／〒305-0047 つくば市千現2-1-6つくば研究支援センター

²環境庁国立環境研究所／〒305-0053 つくば市小野川16-2

³東北大学大学院工学研究科／〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉06

GUOJI DING¹, KAIQIN XU², OSAMU NISHIMURA³, YUHEI INAMORI², and RYUICHI SUDO³

¹The Science and Technology Promotion Foundation of Ibaraki, /2-1-6, Sengen, Tsukuba, 305-0047, Japan

²National Institute for Environmental Studies, /16-2, Onogawa, Tsukuba, 305-0053, Japan

³Department of Civil Engineering, Tohoku University, /06, Aoba, Sendai, 980-8579, Japan

Abstract

An ultrasonication method was developed to study the effect of nematodes on the chlorination of bacteria and to investigate numbers of bacteria associated with nematodes isolated from a distribution system. The organisms selected for this study were Nematoda *Rhabditis* sp. and Bacteria *Escherichia coli* C600. The results of experiment showed that ultrasonication of nematodes was effective for determining the numbers of bacteria in the body of the nematode and the most suitable condition of ultrasonication was 40 w for 60 sec. It was clear that resistance of associated bacteria to free chlorine was 1,000 times higher than that of unassociated bacteria and there was a positive correlation between the survive ratio of associated bacteria and nematodes, which suggested that surviving nematodes can serve as carriers to protect bacteria lived in their body from chlorination and decreasing the survive ratio of nematodes will be effective for decreasing that of bacteria. The results of investigation on numbers of bacteria associated with nematodes isolated from an actual distribution system showed that a lot of viable bacteria were detected from surviving nematodes treated by ultrasonication, which confirmed the above experiment results and suggested that viable bacteria associated with nematodes might leak into the distribution system.

Key words: nematode, bacteria, chlorination, water supply, *Rhabditis*

1. はじめに

水道原水由来の微小動物の大部分は浄水場で除去されるが、若干の種類は生物活性炭処理の反応槽に増殖し、水道水に漏出することがしばしば報告されている¹⁻⁴⁾。生物活性炭反応槽の中に棲息する微小動物は、その役割はすべて解明されていないが、細菌とのかかわりから見れば、主に細菌を栄養源として捕食する役割を演じることになる。ワムシ類はもちろん、線虫類はその増殖に大

量の細菌を要する⁵⁾。したがって、線虫類の棲息が細菌の低減に大きく貢献することは明らかである。しかし、これらの微小動物は、生物活性炭反応槽から水道水に漏出すると、体内に消化されていないあるいは消化できない細菌または病原体を保有するなどの衛生学的問題を発生させる可能性がある。これらの微小動物の中でも、とくに線虫類は、高い出現頻度、高い生存率⁶⁻⁸⁾、および広範な細菌捕食性^{5,9)}があるため、線虫類の制御のみならず線虫類が体内に保有する細菌のリスクに十分な注意

を払わなければならない。

自由生活性の線虫類は腸管系病原体を摂取し、塩素消毒から保護¹⁰⁾、生きたまま排泄することが、過去の研究により報告されてきた¹¹⁾。しかし、実際の水道水から分離された線虫類の体内から、細菌が検出された¹²⁾あるいは検出されなかった¹³⁾という異なる報告もある。また、塩素処理による線虫類の保有する細菌の生存性に関する定量的な分析手法は確立されていない。それは、生菌を線虫類の体内から分離する良い方法がまだ明確にされていないことに起因すると考えられる。

超音波破碎器、ブレンダーおよび超高速回転型ホモジナイズは、組織の破碎や微生物の分散分離などにおいて応用されている。その中で、超音波破碎器は、最も広範囲に利用されており、これを用いて線虫類の体内から細菌を分離する手法の開発が効果的と考えられる。

塩素処理された線虫類の不活化率は90%に達しても、腸管系病原菌 *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*、腸管系ウイルス *Coxsackie A9* は依然として生存することが報告されている¹⁰⁾。これは、線虫類が塩素処理により不活化されても線虫類の体内細菌はなお生存する可能性が高く、すなわち、線虫類が一旦水道水に混入すると、塩素消毒は線虫類の体内細菌の制御に対して無効となる可能性を意味している。したがって、線虫類の制御対策として、まず、線虫類を水道水に混入させないことが重要である。一方、消毒の強化による不活化を図る上で、線虫類の生存状態と体内細菌の生存性との関係は欠くことのできない情報であり、この関係を定量的に解明することはリスクの適正な評価と対策手法の確立のために必須である。

本研究では、上記の点に鑑み、まず線虫類の体内の細菌を測定する手法として、線虫類の体内細菌の超音波破碎による分離方法を検討した。そして水道水から検出された線虫類の体内細菌を評価し、体内細菌の塩素消毒に及ぼす線虫類の影響に関して定量的な解析を行なった。

2. 材料および方法

2. 1 供試微生物

1) 供試線虫類

供試線虫類は、水道水から分離し、LE 培地¹⁴⁾で細菌 *Escherichia coli* を餌として培養した *Rhabditis sp.* (Fig. 1) を用いた。線虫類は供試に際し、メッシュ10 μm のプランクトンネットを用いて滅菌 pH7 リン酸緩衝液で十分にろ過洗浄した後、プランクトンネットに残留する線虫類を滅菌 pH7 リン酸緩衝液で洗い出し、1 ml あたり10個体になるように調整した。

2) 供試細菌

供試細菌としては大腸菌 *E. coli* C600 を用いた。供試に際しては、100ml の PY 培地を入れた300ml 三角フラスコに1白金耳分かきとり接種し、30℃、暗所において振蕩しながら48時間培養した。培養後、遠心分離で集菌して滅菌したイオン交換水で3回洗浄し、懸濁液にして用いた。

2. 2 実験方法

1) 超音波処理による線虫類の体内細菌の測定方法

線虫類の体内細菌の測定にあたっては、生菌を損傷させることなく分離することが重要である。本研究ではこのために超音波処理を行い、処理時間と出力が細菌の測

Fig. 1 Micrograph of *Rhabditis sp.*

定にどのような影響を与えるか検討を行った。実験は、Fig. 2 に示したように、5 ml の線虫類懸濁液を所定超音波処理時間と出力で水で冷却しながら破碎し、その懸濁液の 3 ml を採取し、1 ml ずつを 3 枚の PY 寒天培地を入れたシャーレに採取し、細菌を培養して生菌数を調べ、残りの 2 ml の試料水を用いて倒立顕微鏡で線虫類の形態の観察を行った。生菌数の単位は $\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ として表した。超音波処理した線虫類の形態は、おおその変化の程度により：(1)変化なし、(2)半切断、(3)全切断、(4)切断および粉碎、(5)全粉碎という五つの段階に分けて評価した。超音波処理条件は、出力 20、40、60 W および処理時間 15、30、60、120 秒に設定した。なお、対照実験系として同じ濃度の線虫類懸濁液を超音波で処理せず直接 PY 寒天培地で培養した。

2) 塩素消毒による線虫類の体内細菌の不活化効果

本実験は塩素処理による線虫類体内細菌の不活化効果を評価するために行い、細菌のみを添加した細菌添加系、および細菌を捕食した線虫のみを添加した線虫類添加系という二つの実験系を設定した。細菌添加系においては、細菌添加濃度 $1.1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、線虫類添加系においては、線虫の添加濃度 $10 \text{ 個} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、線虫 1 個体当たりの体内細菌数が $1.8 \times 10^3 \text{ cfu}$ になるように設定した。なお、体内細菌数は、本研究で確立した超音波前処理の方法で確認した。

実験手順としては、まず 250 ml 三角フラスコに 200 ml の滅菌した pH7 のリン酸緩衝液を入れ、濃度を調整した細菌あるいは線虫類の懸濁液を添加し、よく振って混合

させ、上記濃度の試水を準備した。そして、試水をスターラーで攪拌しながら塩素溶液を遊離塩素として初期濃度 0.5、1.0、1.5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ となるよう添加し、接触時間として 0、3、15、30 min 後の試水を 3 本の 10 ml 容試験管に、それぞれ 5 ml ずつ採取した。三つのサンプルはそれぞれ細菌の測定、生物の顕微鏡観察、遊離残留塩素の測定に用いた。ここで塩素溶液は、次亜塩素酸ナトリウム液をリン酸緩衝液で所定濃度に調整し、さらにイオン交換水で希釈して用いた。また実験は温度 20℃ の恒温室にて、各実験系それぞれ 3 連で行った。

細菌の測定方法としては、採取したサンプルに直ちに 0.1 ml の 10% チオ硫酸ナトリウムを添加して残留塩素を中和した後、所定条件の超音波処理を行い、そのサンプルの 3 ml を採取し、1 ml ずつを 3 枚の PY 寒天培地を入れたシャーレに採取し、細菌を培養して生菌数を調べた。なお、超音波処理の条件は、細菌添加系においては、出力 40 W、処理時間 10 秒、および線虫類添加系においては、出力 40 W、処理時間 60 秒に設定した。

生物の顕微鏡観察用サンプルはサンプリングした直後 0.1 ml の 10% チオ硫酸ナトリウムを添加し $\phi 4.5 \text{ cm}$ ベトリ皿に入れ、倒立顕微鏡下で観察を行なった。なお、細菌添加系では細菌の分散状態および線虫類添加系では線虫類の生死状態を観察した。線虫類の生死の判定は、動きがあるものを生存しているものとした。

水中の遊離残留塩素の測定は DPD 法に準じて行った²⁵⁾。なお、以下塩素濃度の表示は遊離残留塩素として示した。

Fig. 2 Schematic diagram of enumeration of bacteria ingested by *Rhabditis* sp.

3) 水道水から分離された線虫類の体内細菌の測定

供試線虫類はつくば市の水道水をメッシュ10 μm のプランクトンネットですくって採集した。分離は国立環境研究所の水生物実験棟の無菌室で行った。水道水から分離された生死を合わせた100個体数の線虫類はTable 1に示したように線虫類の生存状態および培養前の超音波処理の有無により四つの実験系に均等に配分した。超音波処理しない実験系では、生死実験系にかかわらず、線虫類25個体を1 mlの滅菌リン酸緩衝液に入れ、上水試験方法に準じて一般細菌の測定用標準寒天培地で36℃で培養した。超音波処理する実験系では、生死実験系にかかわらず、線虫類25個体を5 mlの滅菌リン酸緩衝液を入れた試験管に採取し、超音波破砕機を用い氷水

で冷却しながら出力40w 処理時間60秒の条件下で超音波処理し、1 mlずつとり標準寒天培地で36℃で培養した。全実験系において、標準寒天培地にコロニーを形成し計測ができるまで24時間毎に観察した。

3. 結果および考察

3. 1 線虫類の体内細菌の定量化

1) 超音波処理の有効性

線虫類の体内細菌を定量化するために、前処理としての超音波処理法の有効性を検討した。

Fig. 3には、滅菌した pH7のリン酸緩衝液で十分にろ過洗浄した線虫類懸濁液を超音波で処理した際の、それ

Table 1. Numbers of nematodes used for enumeration of associated bacteria

life state of nematodes	before the culture of bacteria	
	with ultrasonication	without ultrasonication
surviving	25	25
dead	25	25

Fig. 3 Numbers of viable *E. coli* ingested by *Rhabditis* sp. and shapes of *Rhabditis* sp. during ultrasonication

それぞれの超音波処理条件に応じ検出された生菌数、および線虫類の形態を示す。

線虫類から検出された生菌数は、超音波出力20Wでは処理時間の増加とともに徐々に増加する傾向が見られた。超音波出力40Wでは、処理時間60秒まで処理時間の増加とともに増加する傾向が見られ、処理時間60秒では最大値が得られたものの、処理時間120秒では逆に減少した。超音波出力60Wでは処理時間15秒から30秒まで増加し、60秒以上では減少する傾向が見られた。これらの結果から、線虫類から検出される細菌の生菌数は、超音波処理時間の延長と出力の増加とともに増加するものの、処理時間が長過ぎても出力が強過ぎても減少することがわかった。したがって、最大生菌数を得るためには処理時間と出力を適切に組み合わせることが重要である。

一方、線虫類の体表に付着している細菌を測定するために、上記の実験と同様な線虫類懸濁液を用い超音波で処理せず細菌培養した対照実験系を設置した。ここで、線虫類は培養過程で死亡していることが確認されたため、捕食による細菌の減少は考慮しなかった。対照実験系において、培地には1ml当たり9個のコロニーが検出され、超音波処理実験系で得られた1ml当たりの約30,000個のコロニーと比べて非常に少ないことがわかつ

た。これらの結果から、線虫類の体内細菌の現存量は、線虫類の体表細菌に比べて桁違いに多いため、計数上は線虫類の体表細菌を無視できること、また超音波処理による線虫類の組織の破壊はその体内生菌の測定に有効かつ必要であることが明らかになった。

2) 超音波処理条件の最適化

線虫類の形態の変化と生菌数との関係については、Fig. 3 に示したように、出力40Wと60Wの実験系では、検出された生菌数は、線虫類が切断される程度によって変化し、変化無しから半切断まで増加し、半切断から全切断までさらに増加し、全切断のとき最大値が得られ、そして粉砕すると減少することが明らかになった。つまり、線虫類の体内生菌を測定するためには、線虫類の全切断が有効であるが、線虫類が粉砕されると検出される生菌数は逆に減少する。この原因に対して超音波処理が試料の水温を上昇させ細菌を不活化すること、および直接的に超音波処理が細菌を不活化することの影響について検討を行なった。

水道水を試料水とし氷水で冷却した場合としない場合の超音波処理過程での水温測定を行なった。その結果はFig. 4 に示すとおりである。冷却しない場合、水温は最初20℃であるが、処理時間30秒では45℃に達し、処理時

Fig. 4 Change of water temperature during ultrasonication with and without cooling

間120秒では70℃を超え、水温が処理時間の経過とともに急速に増加した。また、冷却した場合、水温が超音波処理時間の経過とともに増加したものの、30秒で0.6℃、120秒で5.7℃の増加にとどまり、培養温度である36℃を超えることはなかった。この結果から、超音波を用いて線虫類の組織を破壊し線虫類の体内細菌をその外に分散させる場合、線虫類が存在する試料水の水温の上昇を抑制することが必要と考えられる。ただし、本実験では、予備実験の結果から、すべての試料水を冷却して実験を行ったため、線虫類の組織が全部切断された後の粉碎に至る過程での生菌数の減少は、水温の変化が要因ではないと考えられる。

超音波処理が細菌に及ぼす影響を検討するために、細菌のみの超音波処理実験を行なった。Fig. 5には細菌のみを用いて超音波出力40 Wの条件下で処理時間と検出された生菌数との関係を示した。生菌数は、処理時間の増加とともに減少する傾向が見られ、超音波処理前と比較すると、処理時間60秒では40%減少することがわかった。この結果は、超音波処理が線虫類の組織だけではなく細菌を不活化することを示している。つまり、超音波処理によって、線虫類が全切断される時、線虫類の体内細菌は体内から分離し、水中に分散するため最大生菌数の測定が可能であり、線虫類が粉碎された場合は、既に水中に分散する細菌が不活化されと考えられる。本実験から、線虫類の体内細菌を正確に測定するための条件として、線虫類が全切断される時の超音波出力と処理時間の

組み合わせが最適であると考えられ、具体的には出力40 W、処理時間60秒を選定し、以後の実験を行なった。

3. 2 細菌消毒に及ぼす線虫類の影響

1) 塩素処理による線虫類の不活化効果

Fig. 6は、塩素処理による線虫類の生存率の結果を示す。遊離塩素添加濃度 $0.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の場合、試料水における線虫類の生存率は、接触時間3分では56%、接触時間15分では43%、接触時間30分では37%となった。塩素添加濃度 $1.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の場合、接触時間3分では47%、接触時間15分では32%、30分接触時間では26%となり、塩素添加濃度 $0.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と比べて、添加濃度が2倍に増加しても、接触時間30分の不活化率は11%の増加であった。そして、塩素添加濃度 $1.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と高くなっても、接触時間30分では線虫類の生存率は21%であり、約80%の不活化率にとどまった。これらの結果は、通常行われている塩素消毒濃度より高く、また接触時間をより長くしても、線虫類に対する不活化効果に大きな改善が認められないであろうことを示している。

CT値は、一次反応が理論的な根拠となっており、微生物をある程度不活化するのに必要な消毒剤濃度 (C) とその濃度での接触時間 (T) の積であり、小さいほど殺菌力または不活化力が強いことを意味している。その簡潔性のために微生物の不活化または消毒の効果を評価する指標として最も広く用いられている。細菌 *S. typhimurium*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter*

Fig. 5 Change of numbers of viable *E. coli* treated by ultrasonication with time

Fig. 6 Survival ratio of *Rhabditis* sp. during chlorination

freundii, *Enterbacter agglomerans*, *S. sonnei*, *Yersinia enterocolitica* 等に対して、本研究と同様に塩素を用いた場合の99%殺菌の時のCT₉₉値は一般に1mg · min · l⁻¹以下である¹⁵⁻¹⁸⁾。本研究では、79%線虫類が不活化された時のCT値は45mg · min · l⁻¹であり、99%線虫類が不活化される時のCT₉₉値は得られなかったものの、線虫類CT₉₉値は45mg · min · l⁻¹以上であることが推測できる。線虫類のCT₉₉値は細菌に比べて1桁以上高いことから、線虫類は塩素で抑制しにくいものと考えられる。

2) 塩素処理による細菌の不活化効果

細菌添加系および線虫類添加系において、それぞれ塩素処理による細菌の生存率の経時変化をFig. 7にまとめた。

細菌添加系において、細菌生存率は、塩素添加濃度0.5mg · l⁻¹の場合、接触時間3分で0.003%以下となり、接触時間15分以上では検出されなかった。塩素添加濃度1.0mg · l⁻¹の場合も、塩素添加濃度0.5mg · l⁻¹と同様な結果が得られた。また、塩素添加濃度1.5mg · l⁻¹の場合、接触時間3分でも、細菌は100%不活化していた。

線虫類添加系において、塩素処理による線虫類体内細菌の生存率は、塩素添加濃度0.5mg · l⁻¹の場合、接触時間3分では58%となり、同一の接触時間と塩素添加濃度条件下の細菌添加系と比べて1,000倍以上高くなった。すなわち、細菌のみかけ上の塩素抵抗力は、線虫類の保護により1,000倍以上増加したことが明らかになった。

また、塩素添加濃度0.5から1.5mg · l⁻¹まで、接触時間3分から60分までの実験範囲において、線虫類の体内細菌の生存率は、塩素添加濃度の増加、あるいは接触時間の増加とともに低下する傾向が見られたものの、塩素添加濃度1.5mg · l⁻¹、接触時間60分でも生存率は7.5%であり、通常の塩素濃度レベルでは線虫類の体内細菌の消毒に十分な効果が期待できないことがわかった。

Table 2は保菌者である原生動物および後生動物の存在の有無が細菌の遊離塩素による消毒効果に及ぼす影響をまとめたものである。細菌のCT₉₉値は、原生動物、後生動物の種類に関わらず、保菌者である原生動物、後生動物が存在すればほぼ2桁以上高まる。また、細菌のCT₉₉値は、細菌の種類による差があまり大きくないものの、原生動物または後生動物が存在する場合、腸管病原菌 *S. typhimurium*、*S. sonnei* 等に関して大腸菌 *E. coli* の値と比較して著しく高くなっている。一方、原生動物および後生動物の中でも *Rhabditis* sp. は原生動物である肉質虫類 *Acanthamoeba castellanii*、絨毛虫類 *Tetrahymena pyriformis*、および後生動物である端脚類 *Hyalella azteca* に比べて細菌の保護能がより高いことが、*E. coli* を用いた King¹⁸⁾、Levy¹⁶⁾ の実験と本実験結果の比較から明らかになった。本研究では大腸菌 *E. coli* をモデル菌として用いたが、微小動物が保有する細菌を塩素消毒から保護するリスクを検討するためには、細菌とその保護者である微小動物の種類が重要な因子であり、よ

Table 2 Inactivation of bacteria associated with or without carrier in water by free chlorine

Bacteria	Carrier	Solution	Residual (mg/l)	Temp. (°C)	pH	Time (min)	Reduction (%)	CT ^a ₉₉	Reference
<i>Escherichia coli</i>		CDFB ^b	0.13	25	7	1.1	99	0.14	King ¹⁸⁾
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	CDFB	1	25	7	90	99	90	King ¹⁸⁾
<i>Escherichia coli</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	1	25	7	60	99	60	King ¹⁸⁾
<i>Citrobacter freundii</i>		CDFB	0.13	25	7	2	99	0.26	King ¹⁸⁾
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	CDFB	1	25	7	120	99	120	King ¹⁸⁾
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	1	25	7	60	99	60	King ¹⁸⁾
<i>Enterobacter agglomerans</i>		CDFB	0.13	25	7	2.5	99	0.33	King ¹⁸⁾
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	CDFB	1	25	7	120	99	120	King ¹⁸⁾
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	1	25	7	75	99	75	King ¹⁸⁾
<i>Enterobacter cloacae</i>		CDFB	0.13	25	7	2	99	0.26	King ¹⁸⁾
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	CDFB	1	25	7	110	99	110	King ¹⁸⁾
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	1	25	7	120	99	120	King ¹⁸⁾
<i>Klebsiella oxytoca</i>		CDFB	0.13	25	7	2	99	0.26	King ¹⁸⁾
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	CDFB	1	25	7	120	99	120	King ¹⁸⁾
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	1	25	7	35	99	35	King ¹⁸⁾
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		CDFB	0.13	25	7	0.8	99	0.1	King ¹⁸⁾
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	CDFB	1	25	7	120	99	120	King ¹⁸⁾
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	1	25	7	80	99	80	King ¹⁸⁾
<i>Shigella sonnei</i>		CDFB	0.25	25	7	0.4	99	0.1	King ¹⁸⁾
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	4	25	7	120	99	480	King ¹⁸⁾
<i>Yersinia enterocolitica</i>		CDFB	0.25	25	7	0.5	99	0.13	King ¹⁸⁾
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	4	25	7	80	99	320	King ¹⁸⁾
<i>Salmonella typhimurium</i>		CDFB	0.25	25	7	0.5	99	0.13	King ¹⁸⁾
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliophora)	CDFB	4	25	7	65	99	260	King ¹⁸⁾
<i>Legionella pneumophila</i>		CDFB	0.0003	25	7.2	30	99	0.009	Domingue ¹⁹⁾
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Sarcodina)	PAS ^c	50	25	7.2	1080	viable	—	Kilvington ²⁰⁾
<i>Escherichia coli</i>		CDFB	1	20	6	1	>99	<1	Levy ¹⁶⁾
<i>Escherichia coli</i>	<i>Hyalella azteca</i> (Amphipoda)	CDFB	1	20	6	60	98	>60	Levy ¹⁶⁾
<i>Enterobacter cloacae</i>		CDFB	1	20	6	1	>99	<1	Levy ¹⁶⁾
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Hyalella azteca</i> (Amphipoda)	CDFB	1	20	6	60	85	>>60	Levy ¹⁶⁾
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pristionchus lheritieri</i> (Nematoda)	—	10 ^d	room	—	15	86.5	>>150	Smerda ¹¹⁾
<i>Salmonella wichita</i>	<i>Pristionchus lheritieri</i> (Nematoda)	—	10 ^d	room	—	15	53.4	>>150	Smerda ¹¹⁾
<i>Escherichia coli</i>		CDFB	0.5	20	7	3	>99.99	<<<1.5	this study
<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhabditis</i> sp. (Nematoda)	CDFB	1.5	20	7	60	92.5	>90	this study

a: the value that disinfectant residual concentration C in mg/l multiplied by the disinfection contact time t in min necessary to attain a 99% inactivation

b: chlorine-demand-free buffer solution

c: Page's amoeba saline

d: added chlorine concentration

り詳細な検討が必要である。

3) 線虫類の生存率と細菌の生存率との関係

Fig. 6 と Fig. 7 を比較してみると、線虫類と線虫類の体内細菌は、塩素消毒下の生存率の挙動が非常に似ていることがわかる。このため、同一の遊離塩素濃度と処理時間において線虫類の生存率とその体内細菌の生存率との関係を Fig. 8 にまとめた。その関係を直線に近似したところ、線虫類の生存率と体内細菌の生存率との間に、相関係数0.942 ($P < 0.01$) の高い正の相関関係が認められ、細菌の生存率は線虫類の生存率に依存することが示された。線虫類の存在により細菌の塩素消毒効果が大きく低下することが過去の研究において示されているが¹⁰⁾、本研究では、生きている線虫類が死線虫類よりその効果が高いこと、つまり生きている線虫類は死線虫類より体

内細菌を保護する可能性が高いことが明らかになった。したがって、水道水における微小動物と関連する細菌の消毒効果の改善を図る上では、浄水処理過程で水道水に線虫類などの生物を漏出させないのはもちろんのこと、それが不可能である場合、細菌の生存率を低減させる上で線虫類の生存率を低減することが重要であると考えられる。

3. 3 水道水から分離された線虫類の体内細菌の調査

1) 細菌の現存量

上記の室内実験の結論を検証し、実際の水道水における線虫類と関連する細菌問題の現状を把握するために、水道水から線虫類を分離し、線虫類に関連する細菌学的な調査を行なった。ここで、調査した水道水の遊離残留塩素濃度は $0.51 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。分離された線虫類のおよ

Fig. 7 Survival ratio of *E. coli* associated with and unassociated with *Rhabditis* sp. during chlorination

Fig. 8 The relation between survival ratio of *Rhabditis* sp. and survival ratio of *E. coli*

Table 3 Results of bacteriological investigation of nematodes isolated from a tap under the different experimental condition

life state of nematodes	number of viable bacteria (CFU · ml ⁻¹)	
	with ultrasonication	without ultrasonication
surviving	106	2
dead	1	0

そ14%は生線虫類、86%は死線虫類であった。

線虫類の生存状態と超音波処理の有無により分けた四つの実験系において25個体数の線虫類あたりの線虫類体内から検出された生菌数を Table 3 にまとめた。同じ条件の超音波処理を行った場合、生存線虫類から検出された細菌数は死亡線虫類と比較すると多かった。また、線虫類の生存状態にかかわらず、超音波処理した線虫類から検出された細菌数は超音波処理しない線虫類と比較すると多かった。とくに超音波処理した生線虫類から検出された生菌数は他の実験系と比べて2桁高い生菌数を検出した。この結果は、室内実験において明らかになった、塩素消毒による線虫類の死亡が線虫類体内細菌の生存率を低下させるという傾向に一致している。つまり、線虫類は生存すれば体内細菌が塩素消毒から免れる可能性が

高くなること、線虫類体内細菌を定量的に測定するためには細菌の培養前に超音波処理法のような手法を用い線虫類の組織を適正に破碎する必要があることが確認され、また、細菌が存在しない給配水管の末端である蛇口においても、線虫類の存在によって体内細菌として生存する可能性があることが示された。

季節を変えて超音波処理を用いた生存線虫類の細菌学的調査を行なった。3回の結果を Table 4 にまとめた。7月に1個体線虫類あたり最も多い生菌数97.1コロニーが検出された。また、本研究で得られた生存線虫類の細菌学的調査結果と文献に報告されている結果を比較したものを Table 5 にまとめた。浄水中の線虫類の細菌学的調査については、Lupi ら²¹⁾は一年間に10回、Mott¹²⁾は78年3月から4月まで37回行っている。平均1個体線虫類

Table 4 Results of bacteriological investigation of nematodes isolated from a tap at different season

data	average number of bacteria for each nematode
May, 1994	4.2
July, 1994	97.1
Oct., 1994	85.9

Table 5 Comparison of results of bacteriological investigation of nematodes between this study and references

sample	number of bacteria (CFU/nematode)	reference
treated water	0.1– 6.5	Mott ¹⁸⁾
drinking water	0.3–18.3	Lupi ²⁶⁾
drinking water	4.2–97.1	this study

あたり生菌数に対し、本研究の結果は、Lupi らおよび Mott の報告に比べてはるかに多かった。これは、Lupi らおよび Mott の調査において線虫類の生死状態を考慮しなかったためではないかと考えられる。

2) 細菌の種類

水道水から分離された線虫類の体内細菌の培養を標準寒天培地を用い36℃で行なった。細菌の培養時間は一般に二日程度で十分であることに比べて、本実験では細菌のコロニーは培養を行なった二日目においてはまだ小さ過ぎ、計測できるまでに7日間を要た。この結果は、高度浄水処理施設の活性炭層から分離された細菌の培養における現象についての文献³¹⁾と一致しており、検出されたバクテリアの種類としては *Pseudomonas* sp.、*Oerskovia* sp.、*Alcaligenes* sp.、*Flavobacterium* sp.、*Aeromonas* sp. などが報告されている。本研究では、細菌の種類を同定するまでに至らなかったものの、用いた線虫類は活性炭処理を行なっている水道施設から給水される水道水から分離されたものであること、線虫類が活性炭層に増殖しやすいこと、および細菌の培養に要する時間が著しく長くなる特徴を有することから、線虫類から検出された細菌は主に活性炭に生息しているものではないかと推察される。

実際の浄水に出現する線虫類から検出された細菌の種類について、Levy ら¹⁶⁾は *Pseudomonas cepacia* のみを報告している。これに対し、Lupi ら²¹⁾は *Citrobacter freundii*、*Enterobacter aerogenes*、*Hafnia alvei*、*Klebsiella*

oxitoca、*Providencia alcalifaciens*、*Serratia fonticola* 等の多種の腸内細菌を、および Mott¹²⁾は *E. coli*、*Aeromonas hydrophila* 等を含む多種の細菌を検出したことを報告した。水道水中に出現している線虫類の衛生学上の意義を検討するとき、細菌の種類を明らかにすることは必須であり、今後、線虫類の体内細菌の情報を蓄積するためさらなる調査研究が必要不可欠である。

水道水において線虫類が病原菌を保護することによる感染症の発生についての報告はまだないようである。しかし、線虫類が生存状態で水道水中に漏出する可能性があること、その結果体内細菌が人に摂取されるリスクもあること、および線虫類と細菌との間に捕食と被食関係のみならず病原性細菌の増殖を助ける等の複雑な関係²²⁻²⁴⁾があることから、衛生学上の角度から線虫類等の微小動物が水道水中に漏出する問題をより重視する必要があると考えられる。

4. まとめ

本研究では、浄水処理における細菌の塩素消毒に及ぼす線虫類の影響を明らかにするために、線虫類の体内細菌を定量的に測定する手法の開発、細菌の消毒に及ぼす線虫類の影響についての検討、および実際の水道水から線虫類を分離してその体内細菌の調査などを行い、以下の結果を得た。

(1) 超音波処理法を用いて線虫類の体内細菌を測定する

手法は効果的であり、本実験から、最適超音波処理条件は処理時間60秒、出力40 Wであることがわかった。

- (2) 細菌の塩素消毒効果は、線虫類の存在により1,000倍以上低下する可能性が明らかになった。細菌の塩素消毒効果の低下は、細菌が線虫類の体内に生存することで塩素の影響を受けにくくなるためと考えられる。
- (3) 塩素処理による線虫類の体内細菌の生存率は、同一の消毒条件の場合の細菌の生存率と比べて著しく高くなり、また塩素添加濃度の増加および接触時間の延長とともに低下する傾向が見られるものの、通常の塩素処理では効果が十分でないことが示唆された。
- (4) 線虫類の生存率と体内細菌の生存率の間に高い正の相関関係があり、細菌の生存率を低減させるためには、線虫類の生存率を低減することが有効であることがわかった。
- (5) 実際の水道水から分離された線虫類を対象とした調査を行い、線虫類が存在する場合、生菌数を正確に把握するためには超音波のような適正な処理が必要であることを確認し、生存線虫類の体内には多数の生菌が検出されることを明らかにした。

参考文献

- 1) Rice, R. G. and Robson, C. M.: Biological activated carbon (enhanced aerobic biological activity in GAC systems), 83-84, Ann Arbor Science Publishers Michigan (1982).
- 2) 三輪雅幸、森実圭二：オゾン・粒状活性炭処理における微小動物の挙動、用水と廃水、30、32-38 (1988)。
- 3) 浅野滋啓、中濱一雄、安達清、仲町秀雄、高山保、岡由子、城野久美子：高度浄水処理施設の活性炭層から分離された微生物、防菌防黴、23 (8)、465-472 (1995)。
- 4) Schreiber, H., Schoenen, D. and Traunsperger, W.: Invertebrate colonization of granular activated carbon filters, Water Research, 31, 743-748 (1997).
- 5) 丁国際、徐開欽、稻森悠平、須藤隆一：水道水から分離された線虫類の増殖特性、水環境学会誌、19、629-636 (1996)。
- 6) Mott, J. B. and Harrison, A. D.: Nematodes from river drift and surface drinking water supplies in southern Ontario, Hydrobiologia, 102, 27-38 (1983).
- 7) Lupi, E., Ricci, V., and Burrini, D.: Occurrence of nematodes in surface water used in a drinking water plant, Journal Water SRT-Aqua, 43, 107-112 (1994).
- 8) 丁国際、徐開欽、西村修、稻森悠平、須藤隆一：水道水中に出現する線虫類の種類、現存量および生存率、日本水処理生物学会誌、31、105-115 (1995)。
- 9) Klug, M. J. and Kotarski, S.: Bacteria associated with the gut tract of larval stages of the aquatic crane fly *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae), Applied and Environmental Microbiology, 40, 408-416 (1980).
- 10) Chang S. L., Berg G., Clarke N. A. and Kabler P. W.: Survival and protection against chlorination of human enteric pathogens in free-living nematodes isolated from water supplies, Amer., J. Trop. Med. Hyg., 9, 136-143 (1960).
- 11) Smerda S. M., Jensen H. J. and anderson A. W.: Escape of Salmonellae from chlorination during ingestion by *Pristionchus lheritieri* (Nematoda: Diplogasterinae), Journal of Nematology, 3, 201-204 (1971).
- 12) Mott J. B.: Nematodes in surface drinking water supplies in Southern Ontario, A Thesis of University of Waterloo, pp162 (1979).
- 13) Chang, S. L., Austin, J. H., Poston, H. W., and Woodward, R. L.: Occurrence of a nematode worm in a city water supply, Journal of American Water Works Association, 51, 671-676 (1959).
- 14) Sudo, R. and Aiba, S.: Growth rate of Vorticellidae isolated from activated sludge, Jap. J. Ecol., 21, 70 (1971).
- 15) Hoff, J. C.: Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants, EPA/600/2-86/067, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio (1986).
- 16) Levy, R. V., Hart, E. L., and Cheetham, R. D.: Occurrence and public health significance of invertebrates in drinking water systems, Journal of American Water Works Association, 78, 105-110 (1986).
- 17) Blaser, M. J., Smith P. F., Wang W. W. and Hoff, J. C.: Inactivation of *Campylobacter Jejuni* by chlorine and monochloramine, Applied and Environmental Microbiology, 51, 307-311 (1986).
- 18) King, C. H., Shotts, E. B., JR., Wooley, R. E. and Porter K. G.: Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination, Applied and Environmental Microbiology, 54, 3023-3033 (1988).
- 19) Domingue, E. L., Tyndall, R. L., Mayberry, W. R. and Pancorbo, O. C.: Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* Serogroup 1, Applied and Environmental Microbiology, 54, 741-747 (1988).
- 20) Kilvington, S. and Price J.: Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure, Applied and Environmental Microbiology, 68, 519-525 (1990).
- 21) Lupi, E., Ricci, V. and Burrini, D.: Recovery of

- bacteria in nematodes isolated from a drinking water supply. J. Water SRT-Aqua, 44, 212-218 (1995).
- 22) Aguilera, M. M. and Smart, G. C., JR. : development, reproduction, and pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in monoxenic culture with different species of bacteria, Journal of Invertebrate Pathology, 62, 289-294 (1993).
- 23) Richter, S.: Phoretic association between the dauerjuveniles of *Rhabditis stammeri* (Rhabditidae) and life history stages of the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae), Nematologica, 39, 346-355 (1993).
- 24) Fodor, E., Szallas, E., Kiss, Z., Fodor, A., Horvath, L. I., Chitwood, D. J. and Farkas, T.: Composition and biophysical properties of lipids in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*, symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes, Applied and Environmental Microbiology, 63, 2826-2831 (1997).
- 25) 日本水道協会: 上水試験方法 (1993)
(受付 1998. 2. 10)
(受理 1998. 7. 21)