

現地調査と数理モデルとに基づく河川流下過程 における化学物質と病原微生物の減衰に関する研究

京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 花本 征也

1. はじめに

近年、様々な化学物質や病原微生物が水環境中に存在していることが明らかとなり、ヒトや水生生物に対するリスクが懸念されているため、化学物質や病原微生物の水環境中濃度の推定が必要となっている。しかし、下水処理場などを介して水環境中に排出された化学物質や病原微生物が河川流下過程においてどの程度の減衰を示すのかに関する知見が不足している。具体的には、ラボ実験による減衰因子の検討や、理論的な反応式をもとにした数理モデルの開発は行われてきたが、現地調査によって化学物質や病原微生物の減衰の実態をとらえた事例は少ない。これは、現地調査による減衰の把握には多くの労力を要するためであり、これらの減衰実態に対し、更に労力を要する時間的変動をとらえた事例はほとんどない。

申請者らは、有害化学物質の医薬品類を対象として、現地調査による減衰実態の把握と数理モデルの開発を行い、光分解性の高い医薬品類の減衰が極めて大きな日内変動を示すことを明らかにし、光分解の時間的変動を推定することが可能な確率論的モデル（光分解モデル）を開発した¹⁾。一方で、病原微生物に関しては、水環境中における生残性に太陽光による不活化が大きく影響を与えることが報告されている²⁾ものの、太陽光による不活化速度の推定手法の提案や検証が実施された例は見当たらない。そこで、本研究では、衛生指標微生物の大腸菌と大腸菌ファージの somatic coliphage を対象とし、現地調査により、河川流下過程における減衰の実態を把握した。また、太陽光による不活化と死滅に関するラボ実験を行い、これを現地調査で得られた減衰と比較することで、減衰メカニズムの解明を試みた。

2. 方法

2.1 対象微生物とその測定方法

2.1.1 大腸菌の測定方法

大腸菌の測定に用いる培地には特定酵素基質培地法の一つである XM-G 寒天培地を用いた。XM-G 寒天培地では、2種類の合成酵素基質（X-GLUC、MAGENTA-GAL）により、大腸菌は青色のコロニーを形成する³⁾。検出される菌数が少ないと考えられるものに対してはメンブレンフィルター法を用いて適切な試料量を濾過して測定を行った。実験は、重層寒天培地法にて、以下の手順で実施した。

- 1) 1Lの MilliQ に対して、39.3gの XM-G 寒天培地を加え、攪拌して溶かした後に 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。
- 2) 滅菌シャーレに上記の培地を 10ml 注入し、固化したのを確認した後、試料を 1ml 添加した。
- 3) それに 42~46°C 付近まで冷ました培地を添加し、固化したのを確認した後、37°C の環境で 20±2 時間培養した。
- 4) シャーレ上に検出された青色のコロニーの数を大腸菌数とした³⁾。

2.1.2 Somatic coliphage の測定方法

環境中に存在するファージの濃度は大腸菌と比べて非常に低い、メンブレンフィルター孔径は 0.20~0.45 μm であり、大きさが 24~36nm の大腸菌ファージを補修できないため、大腸菌のようにメンブレンフィルター法を適用することはできない。そこで、通常よりも多くの試料量を測定にかけることが出来る大容量寒天培地法を立ち上げた。この方法は、通常よりも大きい孔径 15cm のシャーレ（これを大容量シャーレとする）を用いることで 1 シャーレにつき最大で 25ml あたりのファージ数を測定できる。以下にその手法を示す。

- 1) 通常ファージ培養法で用いる LB 培地の 2 倍の濃度の培地を作成し、攪拌して溶かした後に 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。
- 2) 42~44°C に冷ました培地に、培養した宿主菌 *E.coli* C (NBRC 13898) を 10ml/L の濃度になるよう添加した。
- 3) 大容量シャーレに直接、サンプルを 25ml 添加した。
- 4) それに手順 2) で作成した培地を 25ml 添加し、固化したのを確認した後、37°C の環境で 20 \pm 2 時間培養した。
- 5) 生育増殖した宿主菌の *E.coli* C を somatic coliphage が溶菌させて透明な円形状のプラークが形成される。そのプラークを計数し、somatic coliphage の濃度を算出した。

2.2 現地調査

2.2.1 調査流域の概要

現地調査は古川において実施した。古川は京都府の宇治市と久御山町を流下する一級河川である。下水道普及率は、久御山町では 98.5% であるものの、宇治市では 81.9% と比較的 low⁴⁾、一般家庭に加え、病院や工場、学校、老人ホームも下水道未整備区域に位置しているものがある。これらの施設の排水は、浄化槽により処理されていると考えられる。また、流域には茶畑などの田畑も多い。

2.2.2 調査方法

古川の下流域を調査区間とし、調査区間の上流端、下流端、支川の井川の計 3 地点で採水を行った（図 1）。地点②と地点③の間は 2.0km であり、この間には、井川以外には有意な流入は見られない。採水方法はGrab採水とし、地点間の流下時間を考慮して採水を行った。調査は、2013 年の 8 月から 11 月の間に計 5 回実施した（表 1）。8 月 5 日は日中のみ採水を行い、10 月 3 日、10 月 23 日、11 月 5 日、11 月 13 日は、日中と夜間に、それぞれ採水を行った。また、10 月 23 日、11 月 5 日、11 月 13 日は、濃度変動の影響を緩和するため、各地点において 10 分おきに計 3 回採水を行い、そのコンポジットサンプルに対して濃度測定を行った。また、2013 年 12 月 4 日には、日内変動を把握するため、自動採水器を用いて、地点①、②、③において、2 時間おき計 12 回採水を行った。また、調査期間中に、調査区間における水深、流速、河川水の吸光係数を測定した。

2.2.3 解析方法

古川における対象微生物の減衰を定量的に把握するためには、地点①~③の微生物濃度に加え、流量を把握する必要がある。地点①~③において採水時に流量を測定す

ることも可能であるが、流量観測にはある程度の誤差が生じると考えられることや、採水した瞬間における流量の把握は難しいことから、水環境中に置いて保存性が高いことが明らかになっている医薬品の crotamiton を用いて⁵⁾、地点①と地点②の流量混合比を推定し、得られた流量混合比を用いて指標微生物の生残率を算出した（式 1, 2）。なお、医薬品の分析は既報に従った⁶⁾。

$$r = \frac{(Q_1 + Q_2)C_3}{Q_1C_1 + Q_2C_2} \times 100 = \frac{(\beta + 1)C_3}{\beta C_1 + C_2} \times 100 \quad (1)$$

$$\beta(C_c)_1 + (C_c)_2 = (\beta + 1)(C_c)_3 \quad (2)$$

ここで、 r = 対象微生物の生残率(%), C_i = 地点 i における対象微生物濃度(cfu or pfu/100ml), Q_i = 地点 i における流量 (m^3/s), β = 地点②に対する地点①の流量($=Q_1/Q_2$)(-) ($(C_c)_i$ = 地点 i における crotamiton 濃度(ng/L)である。

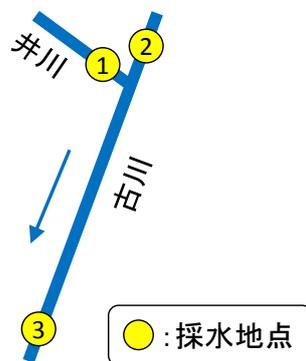


図 1 現地調査の採水地点

表 1 調査日と採水時刻

時間帯	調査日
昼(11時~13時)	8/5、10/3、10/23、11/5、11/13
夜(21~23時)	10/3、10/23、11/5、11/13
24時間連続調査(2時間おき12回採水)	12/4~5
※調査は全て2013年に実施	

2.3 ラボ実験

2.3.1 太陽光による不活化実験

環境水は微生物濃度が低いため、大腸菌は *E. coli* C (NBRC 13898)、somatic coliphage は *phiX174* (ATCC 13706-B1™) をモデル微生物として対象試料水へスパイクし、実験を行った。また、ラボ実験で得られた指標微生物の光不活化速度を環境中へ適用するため、光分解性が既知の医薬品類 18 物質も対象とした^{1,6)}。

ろ過滅菌した古川の河川水に対象微生物を 10^5 個/ml となるように添加し、これを大容量シャーレにそれぞれ 75ml ずつ注入し、太陽光に照射させた。ただし、大腸菌と somatic coliphage はシャーレを分けた。実験開始 0、15、30、45、60 分後に 1ml ずつ各シャーレから採水し、微生物濃度の測定を行った。また、光分解性が既知の医薬品 18 物質に対しても同じ条件で微生物に対する実験と同時に実験を実施した。また、実験終了時には、原水の水温と pH の測定を行った。

実験中の微生物と医薬品の濃度の減衰に 1 次反応式の近似曲線を適用し、光減衰速度定数を算出した。実験は、太陽光の遮断、反射を防ぐため、琵琶湖南湖湖岸の開け

た場所にて、2013年12月から2014年1月にかけて計6回実施した。2014年1月16日には、河川水中の溶存有機物に由来する間接的な光不活化の影響を把握するため、リン酸緩衝生理食塩液（以下 PBS, 10 mM NaCl, 20 mM phosphate, pH=8.0）を実験原水としたものも同時に実施した。なお、対象微生物と医薬品類の濃度が、暗条件のコントロールにおいて変化しないことは確認済みである。実験概要を表2にまとめた。

表2 太陽光による不活化実験の概要

実験日	実験原水	対象微生物	開始時刻	水温(°C)	pH
2013年12月12日	古川河川水	大腸菌	11:31	8.7	7.8
2013年12月29日	古川河川水	大腸菌	16:05	1.5	7.8
2014年1月7日	古川河川水	大腸菌、somaitc phage	11:20	13.0	8.0
2014年1月16日	古川河川水	大腸菌、somaitc phage	11:12	13.0	8.0
	PBS	大腸菌、somaitc phage	11:12	13.0	7.8
2014年1月24日(1回目)	古川河川水	大腸菌、somatic phage	9:38	12.8	8.0
2014年1月24日(2回目)	古川河川水	大腸菌、somatic phage	11:41	15.2	8.0

2.3.2 水温変化を考慮した死滅実験

古川の地点③で採水した河川水を実験原水とし、各サンプルに微生物濃度が 10^5 個/ml となるように微生物株をスパイクした。ただし、大腸菌と somatic coliphage はサンプル瓶を分けた。これらを、4°Cの冷蔵庫内、もしくは冷却水循環装置（東京理化学株式会社、CTP-3000）により 15°Cもしくは 25°Cに設定した水浴中に保管し、4日間（96h）の間に計4回採水を行い、対象微生物濃度を測定した。

2.3.3 ラボ実験結果の水環境中への適用

ラボ実験で得られた指標微生物の減衰速度を水環境中へ適用する方法を以下に記す。

1) 対象微生物と光の影響波長が類似している医薬品（これを医薬品 A とする）の量子収率と吸光係数、古川の水深と吸光係数、調査日の太陽光強度を用いて、各調査日の古川における医薬品 A の光分解速度を推定¹⁾

2) これに太陽光照射実験で得られた対象微生物と医薬品 A の1次反応速度定数の比を乗じることで、各調査日の古川における対象微生物の光不活化速度を推定

3) 死滅実験で得られた対象微生物の死滅速度、その温度依存係数、各調査日の河川水の水温から、各調査日の古川における対象微生物の死滅速度を推定

4) これらに調査区間の流下時間を考慮することで、光不活化と死滅の影響を考慮した対象微生物の生残率（これを推定生残率とする）を算出

3. 結果

3.1 現地調査

3.1.1 対象微生物の濃度

2013年8月から11月までの計5日分の現地調査における大腸菌と somatic coliphage の測定濃度を図2に示した。地点①で濃度が高く、汚染源となっていることが分かった。一方で、地点②の somatic coliphage の濃度は低く、上流の①と②の微生物の挙動が大きく異なっていることが分かった。また、調査日によって濃度が大きく異なっていた。

次に、12月4~5日にかけて実施した日内変動調査における大腸菌、somatic coliphage、医薬品の crotamiton の濃度を図3に示す。ただし、地点③に関しては、採水の際に底

泥を巻き上げたと考えられたため、欠測とした。大腸菌は午後から夜にかけて、somatic coliphage は夕方から翌朝にかけて地点①で濃度が上昇している。濃度の日内変動に影響を与える因子には、太陽光強度、水温、負荷源からの放流負荷量の変動などが考えられ、図 3 に示す濃度の変動は、これらの作用が組み合わさったものであると考えられる。また、crotamiton の濃度変動が大きいと流量混合比の推定精度が低下するが、濃度の変動係数は 15%程度であり、濃度の変動は小さいため、濃度変動が流量比の推定に与える影響は少ないと考えられた。

また、大腸菌と somatic coliphage の濃度の相関を把握したところ、大腸菌と somatic coliphage の相関は低く ($R^2=0.20$)、古川流域においては細菌類とファージとで挙動が違ふ可能性が考えられた。

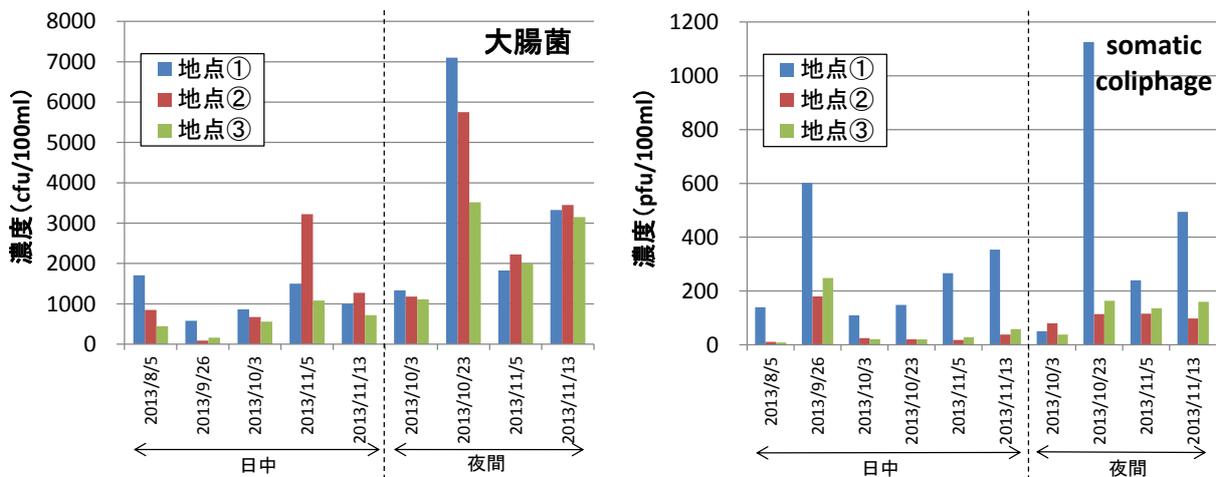


図 2 大腸菌と somatic coliphage の測定濃度

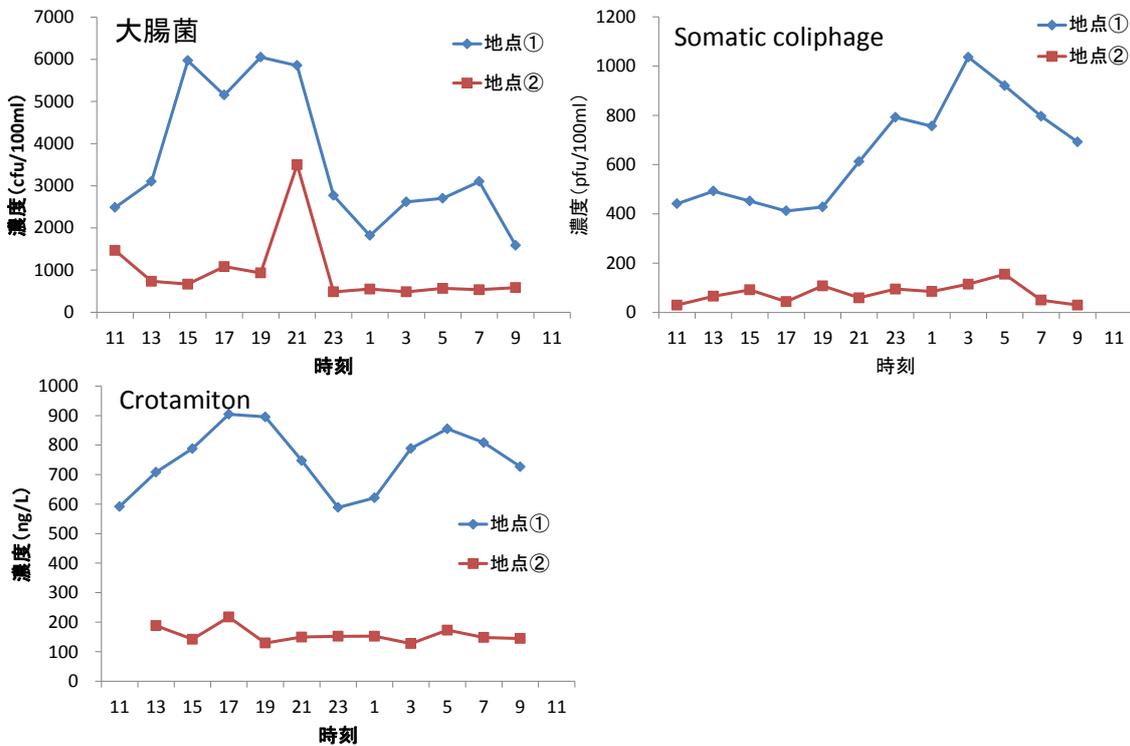


図 3 大腸菌、somatic coliphage、crotamiton の測定濃度の日内変動

3.1.2 対象微生物の減衰

調査区間における大腸菌と somatic coliphage の生残率を図 4 に示した。生残率が 100% の場合は対象微生物が流下過程で増減しないことを示し、100% 以上であると増殖、100% 以下であると減衰することを示す。大腸菌、somatic coliphage とともに、夜では生残性がほぼ 100% に近い値を示したが一方で、昼では大腸菌は平均値で約 53%、somatic coliphage では約 55% の生残性を示しており、日中と夜間とでは生残率が大きく異なっていた。昼夜では主に太陽光強度及び水温が変化していると考えられており、特に太陽光強度の変化は顕著であるため、これらの因子が微生物の減衰に寄与していると考えられた。

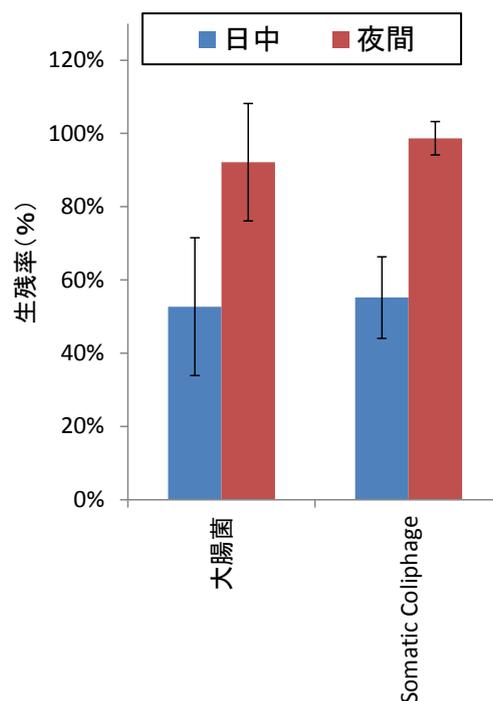


図 4 調査区間における大腸菌と somatic coliphage の生残率

3.2 ラボ実験

3.2.1 太陽光による不活化

大腸菌と somatic coliphage の太陽光照射実験における減衰傾向を図 5 に示す。大腸菌はどの日程においても一次反応に従って減衰したが、somatic coliphage の減衰は一次反応に従っていないと考えられる。先行研究では、somatic coliphage も、太陽光の照射下で一次反応に従って減衰するという報告もあるが、同じ PhiX174 の somatic coliphage の株をスパイクして実施した David C .Love ら⁷⁾は、本研究と同様の減衰傾向を示しており、PhiX174 は太陽光の照射下で図 5 に示すような減衰傾向を示すものであると考えられる。ただし、本研究では、大腸菌と同様に somatic coliphage の光不活化速度も一次反応で近似することとした。

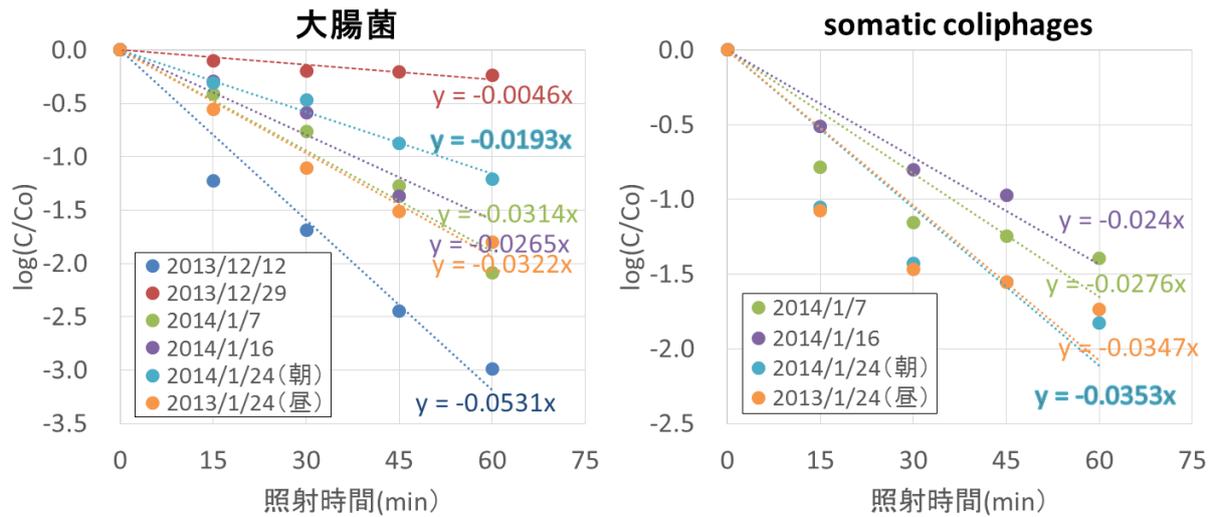


図5 太陽光照射実験における大腸菌と somatic coliphage の減衰傾向

また、大腸菌と somatic coliphage の細胞外、つまり河川水中の溶存物質を経由する間接的な光不活化の影響を把握するために実施した PBS と古川河川水における光不活化速度の比較を図6に示す。減衰傾向は古川河川水と PBS でほとんど変わらなかったため、古川の河川水では、大腸菌と somatic coliphage は、細胞外由来の間接的な光不活化の影響は小さいことが示唆された。

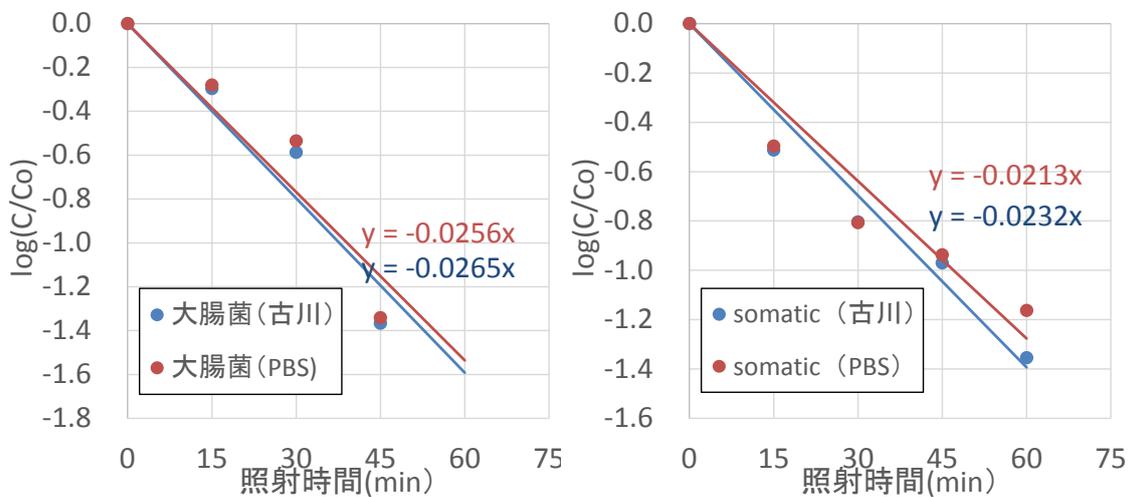


図6 古川河川水と PBS における大腸菌と somatic coliphage の光不活化の比較

太陽光照射実験で得られた指標微生物の光不活化速度と現地調査の結果を比較するにあたり、医薬品の光不活化速度を使用するが、pH7 の純水条件で得られた医薬品の光分解性を用いて解析を行うため、使用する医薬品は、以下の3つの条件を満たしている必要がある。

- 条件①：太陽光照射実験において吸着、間接光分解の影響を受けず、実験中の減衰が全て直接光分解によるものであること
- 条件②：直接光分解速度が環境中の pH の変動に影響されにくいこと
- 条件③：光分解に寄与している波長が指標微生物の光不活化に寄与している波長と類

似していること

条件①は、暗条件での減衰が見られず、かつ、古川河川水と PBS での光分解速度に違いが見られなかった物質が該当し、条件②は、花本ら⁸⁾が実施した pH5.8, 7, 8 の太陽光照射実験において光分解速度に違いが見られなかった物質が該当すると考えられる。その結果、条件①と②を満たす医薬品は、ketoprofen, furosemide, diclofenac, naproxen, sulfapyridine, propranolol の 6 物質となった。次に、条件③についてだが、まず、医薬品の太陽光の吸収スペクトルは既に報告されている¹⁾。一方、指標微生物の光不活化に寄与している波長は、徐々に解明されてきてはいるものの、スペクトルとしての知見はまだ見られない。そこで、本研究で実施した 6 回の太陽光照射実験において、指標微生物の光不活化速度と医薬品の光分解速度に相関が見られた場合に、条件③に該当するとした。複数回実験を実施している大腸菌と somatic coliphage に対する上記の医薬品 6 物質の光反応速度との相関係数を表 3 に示す。大腸菌は diclofenac と、somatic coliphage は ketoprofen と高い相関関係が確認された。両物質とも、350nm 以下の短波長の紫外線のみを吸収する物質であり、このような波長の光が大腸菌や somatic coliphage の不活化に影響を与えていると考えられる。

表 3 微生物と医薬品の光減衰速度の相関係数(R)

物質名	Ketoprofen	Furosemide	Naproxen	Diclofenac	Sulfapyridine	Propranolol
k相関(vsEcoli)	0.68	0.56	0.35	0.90	0.62	0.69
k相関(vsSomatic)	0.95	0.88	0.78	0.59	0.89	0.74

3.2.2 水温変化を考慮した死滅

古川河川水における大腸菌と somatic coliphage の死滅速度を図 7 に示す。大腸菌は水温が高くなるにつれて死滅速度が速くなる傾向が確認されたが、somatic coliphage はどの温度においてもほとんど減衰がみられなかった。また、大腸菌に対して、式 3 に従って温度依存係数を算出したところ、 $\theta = 1.037$ となった。

$$k_T = k_4 \times \theta^{T-4} \quad (3)$$

ここで、 $T =$ 水温 ($^{\circ}\text{C}$)、 $k_T =$ $T^{\circ}\text{C}$ における死滅速度定数、 $\theta =$ 温度依存係数である。

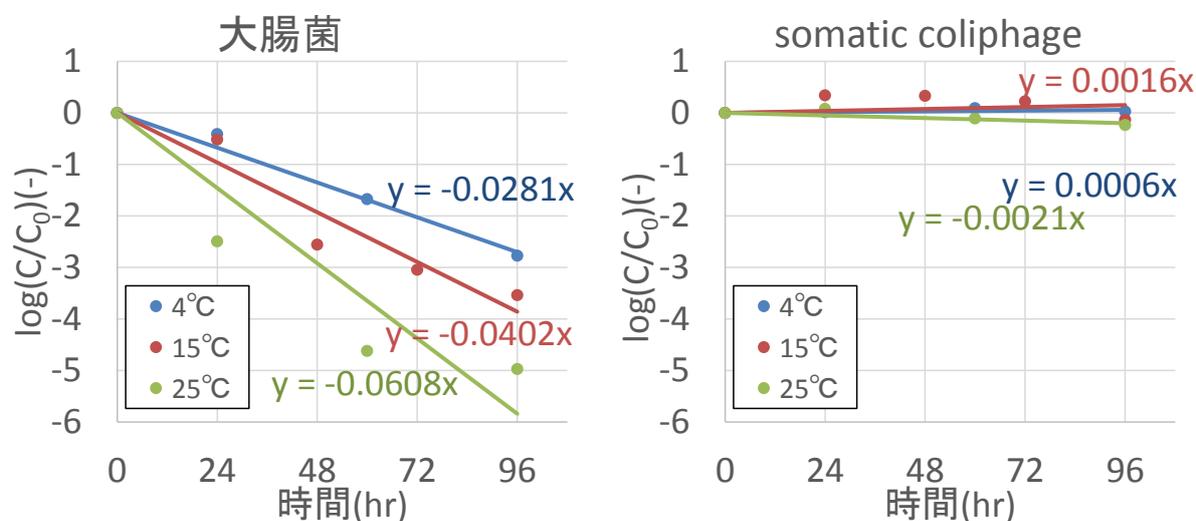


図 7 古川河川水における大腸菌と somatic coliphage の死滅速度の水温変化

3.3 現地調査とラボ実験との比較

現地調査とラボ実験で得られた生残率の比較を図 8 に、各調査日における光不活化速度と死滅速度の比較を図 9 に示す。ただし、現地調査において 10 分間隔のコンポジット採水を行った調査日のみを比較対象とした。ラボ実験と現地調査の結果は概ね近い傾向を示した。また、大腸菌の減衰は太陽光による不活化に大きく影響されているが、死滅による減衰も無視できない程度に影響を受けていることが示唆されたが、一方で、somatic coliphage の減衰は太陽光による不活化の影響が大部分であり、死滅の影響はほとんど受けていないことが示唆された。

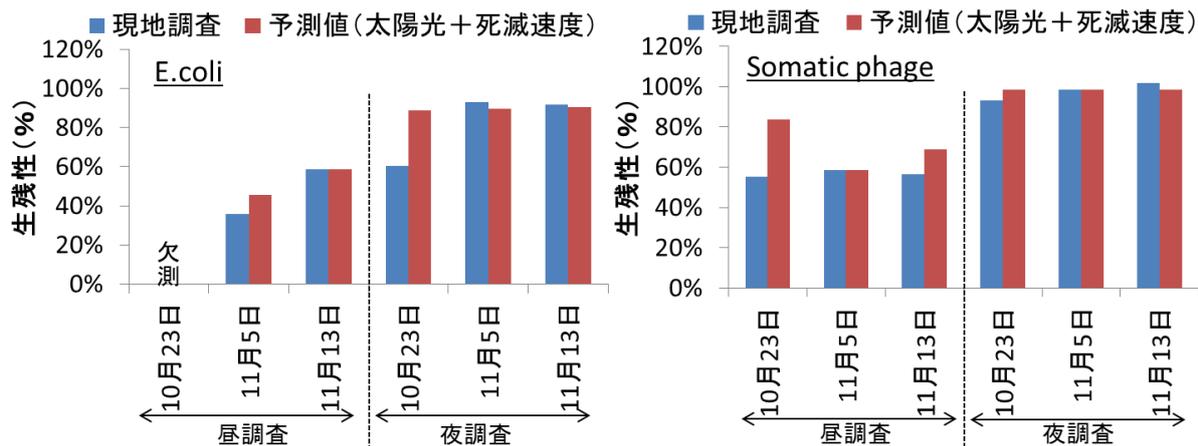


図 8 現地調査とラボ実験で得られた生残率の比較

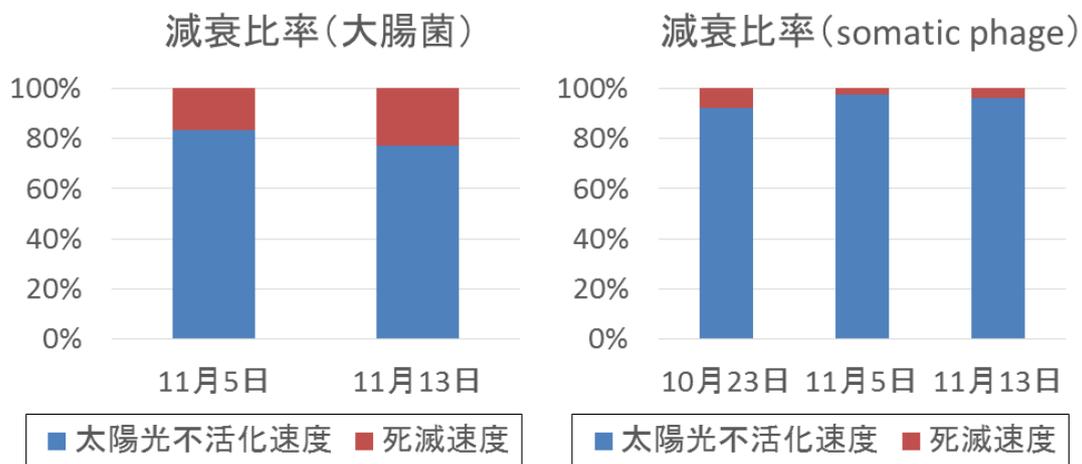


図 9 古川における光不活化速度と死滅速度との比較

4. まとめと今後の課題

本研究では、大腸菌と somatic coliphage を対象とし、現地調査とラボ実験により、河川流下過程における減衰の実態と減衰メカニズムの解明を試みた。その結果、大腸菌、somatic coliphage とともに、夜間にはほとんど減衰していないが、日中に大幅に減衰する傾向があることが分かった。大腸菌の減衰は太陽光による不活化の寄与が大きいですが、死滅による減衰も無視できない程度に影響を受けていたが、一方で、somatic coliphage は太陽光による不活化の影響が大部分であり、死滅の影響はほとんど受けて

いないと考えられた。

今後は、現地調査を繰り返し実施して、指標微生物の減衰の実測値を蓄積するとともに、太陽光による不活化と死滅のモデル構築と検証を行う必要がある。本研究の完成により、衛生指標微生物に対する水環境中濃度の推定精度が向上すると考えられる。また、本研究は河川等の水環境が有する自然浄化機能の有効活用に対しても有用な知見を提供すると考えられる。

参考文献

- 1) Hanamoto, S.; Nakada, N.; Yamashita, N.; Tanaka, H. Modeling the Photochemical Attenuation of Down-the-Drain Chemicals during River Transport by Stochastic Methods and Field Measurements of Pharmaceuticals and Personal Care Products. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 13571-13577.
- 2) UK Water Industry Research (UKWIR), Evaluation of T90 Decay Rates for a Range of Microorganisms Indicative of Sewage Contamination: Phase I - A Review of Documented Historical Laboratory-Based Studies and Field Applications, *UKWIR Report*, Ref No: 04/WW/11/9
- 3) 日水製薬・コスモ会 HP. <http://cosmokai.com/products/>. (access:2013/12/16)
- 4) 京都府の市町村における下水道普及率
<http://www.pref.kyoto.jp/gesuido/documents/04gesuidou.pdf> (access:2014/3/5)
- 5) Nakada, N.; Kiri, K.; Shinohara, H.; Harada, A.; Kuroda, K.; Takizawa, S.; Takada, H. Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (17), 6347-6353.
- 6) Narumiya, M.; Nakada, N.; Yamashita, N.; Tanaka, H. Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion. *J. Hazard. Mater.* **2013**, *260*, 305-312
- 7) Love, D. C.; Silverman, A.; Nelson, K.L. Human Virus and Bacteriophage Inactivation in Clear Water by Simulated Sunlight Compared to Bacteriophage Inactivation at a Southern California Beach. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (18), 6965-6970.
- 8) Hanamoto, S.; Nakada, N.; Yamashita, N.; Tanaka, H. Corroboration of method for estimating the photochemical attenuation of pharmaceuticals in river under over-the-year field condition and evaluation of their toxicity change under sunlight. *in preparation*