

【ノート】

Legionella の低濃度オゾン水殺菌効果に及ぼす 温度及び pH の影響

中室 克彦^{1*}, 土井 均², 肥塚 利江², 枝川亜希子²

Disinfection Efficacy of Low Levels of Dissolved Ozone against
Legionella pneumophila at various pHs and 40°C

Katsuhiko NAKAMURO^{1*}, Hitoshi DOI², Toshie HIZUKA² and Akiko EDAGAWA²

¹Faculty of Science and Engineering, Setsunan University,
17-8 Ikeda-Nakamachi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

²Department of Environment Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health,
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

This study was conducted to elucidate the disinfection efficacy of low levels of dissolved ozone against *Legionella pneumophila* at various pHs and 40°C, in consideration of the possible application of ozone to bathtub water. The results of the laboratory batch-type experiments showed that the dissolved ozone concentration decreased rapidly in phosphate buffer solution in the high pH range. However the initial dissolved ozone concentration of 0.026mg/l almost completely killed the *L. pneumophila* after three minutes of exposure in the pH range of pH5.8 to pH9.5 at the water temperature of 40°C.
(Accepted 12 September 2011)

Key words : Bathtub water (浴槽水)/*Legionella* (レジオネラ)/Low levels of dissolved ozone (低濃度オゾン水)/pH (pH値).

緒 言

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において四類感染症に規定されているレジオネラ症は、患者報告数が増加傾向にあり公衆衛生上の問題となっている¹⁾。

感染源のひとつと考えられている公衆浴場などの浴槽水は、塩素消毒を義務付けるなど種々の対策が講じられている²⁾。しかしながら、塩素消毒を行っているにもかかわらず *Legionella* が検出される事例が見受けられ³⁾、塩素消毒だけでは *Legionella* に対して十分な抑制効果が得られない場合がある。

塩素消毒に相補的な効果を持つ新たな消毒方法を、レジオネラ症の発生を低減化する目的で、導入することは、公衆衛生上急務である。塩素消毒を補完する消毒剤として殺菌作用が強いオゾンがその候補の一つと考えられる。オゾン浴槽水の消毒に導入することは、塩素による殺菌・消毒を強化するためレジオネラ症発生の低減・阻止に寄与するものとする。

著者らは前報において低濃度オゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果について検討し、pH7.2の条件で0.01mg/lの低濃度オゾンレベルで十分殺菌効果を示すことを報告した⁴⁾。これらの知見をふまえ今回は、浴槽水の消毒にオゾン

¹摂南大学理工学部 〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17番8号 ☎072-839-8084

²大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 〒537-0025 大阪市東成区中道1丁目3番69号 ☎06-6972-1321

導入するために、実際の水道水や温泉水等を原水とした浴槽水を想定して、pH の水道水質基準である pH5.8~8.6 およびアルカリ泉を想定した pH 9.5 の条件で、水温 40°C における 0.03mg/l 付近の低濃度オゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果について詳細に検討した。

実験方法

1. 各種 pH オゾン処理溶液の調製⁵⁾

pH5.8~pH9.5 の希釈液を下記の方法により調製した。

1) pH5.8 および pH7.2 希釈液

0.425M リン酸塩溶液 125ml に精製水を加えて全量を 5 l とした。この水溶液を 1 N 塩酸と 1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH を 5.8 および 7.2 に調整し、2 l 褐色試薬瓶に 1.2 l ずつ分注し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌を行った。その後、pH 測定計（堀場製作所製、F-22 II 型）を用いて希釈液の pH を測定し、pH が 5.8 および 7.2 であることを確認した。

2) pH8.6 および pH9.5 希釈液

pH を 7.2 に調整したリン酸塩溶液 125ml に精製水を加えて全量を 5 l とした。この水溶液を 1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH を 8.9 および 9.8 に調整し、これを 2 l 褐色試薬瓶に 1.2 l ずつ分注し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌を行った。その後、pH 測定計を用いて希釈液の pH を測定し、pH が 8.6 および 9.5 であることを確認した。

各 pH 希釈液をマグネチックスターラー（アズワン社製、RSH-1D）の上に載せた 40°C の恒温水槽内に置き希釈液の水温を 40°C に保った。

2. *Legionella* 試験菌液の調製⁴⁾

Legionella pneumophila ATCC33152 (I 型) を用いて試験を行った。使用菌株を B-CYE α 寒天培地（栄研化学）に画線塗抹し、36°C、4 日間培養した。その一白金耳をリン酸塩希釈液 (pH7.2)⁵⁾ 10ml に懸濁して 1500g で 20 分間遠心分離操作を行い、上澄みを捨てた。再度リン酸塩希釈液 10ml を加えて同様の操作で洗浄を行った。沈渣にリン酸塩希釈液を加えて希釈し、菌数が約

2×10^8 CFU/ml になるように試験菌液を調製した。

3. オゾン処理実験水の調製

40°C の恒温水槽内に置いた調製済みの各 pH 希釈液を所定のオゾン濃度 (0.026mg/l と 0.037mg/l) にするために、電解式オゾン水生成器 AOD-TH (アイ電子工業(株)製：電解方式) で生成した約 2 mg/L のオゾン水 (pH7.0) を加えて攪拌 (500g) を行い、溶存オゾン濃度計 (荏原実業(株)製、EL-55-RD, 定量限界：0.001mg/l) 内を一定流量で通水しながらオゾン濃度を測定した。所定のオゾン濃度で通水を止めてオゾン処理実験水とした。この時に残留したオゾン処理実験水量は、溶存オゾン濃度計に通水したのちメスシリンダーに排水することによって求めた水量を差し引いた水量をオゾン処理実験水量とした。なお、濃度が 0.026mg/l の各 pH オゾン処理実験水を調製するためにオゾン水を pH5.8 の試験水は 15ml, pH 7.2 の試験水は 25ml, pH8.6 の試験水は 75ml, そして pH9.5 の試験水は 100ml をそれぞれの pH 希釈液に加えて試験を行った。また、濃度が 0.037mg/l の各 pH オゾン処理実験水はオゾン水を pH5.8 の試験水は 20ml, pH7.2 の試験水は 30 ml, そして pH8.6 と pH9.5 の試験水は 100ml 加えて試験を行った。

4. オゾン処理実験

所定のオゾン濃度にしたオゾン処理実験水 1 l に 2.0×10^8 CFU/ml の *Legionella* 試験菌液 1 ml を加えて攪拌し、0.5 分後と 1 分後と 3 分後に 0.01mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液 50 μl 入りの滅菌済み試験管に採取した。採取した試料 100 μl を B-CYE α 寒天培地に塗布した。36°C、5 日間培養を行い、発育コロニー数を数えて生残菌数を算出した。

5. 塩素処理実験

上水試験方法の塩素抵抗性試験⁶⁾に準じて行った。すなわち、0.4g/l リン酸二水素カリウム溶液 - 2.5g/l 硫酸マグネシウム溶液に 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 7.0, 7.8 およ

び8.9に調整した試験水に *Legionella* 試験菌液を添加した菌懸濁液100ml (約 4.0×10^6 CFU/ml) を300ml 褐色三角フラスコに採った。これに次亜塩素酸ナトリウム溶液を試験水で希釈して所定の残留塩素濃度 (0.60~0.80mg/l) にした塩素水100ml を加え、一定時間毎にチオ硫酸ナトリウム入りの滅菌済み試験管に採取した。採取した試料100 μ l を B-CYE α 寒天培地に塗布し、36°C、5日間培養した。発育コロニー数を数えて生残菌数を算出した。

結果および考察

1. 各種 pH の異なるオゾン水の減衰曲線

一般に浴槽水に用いられる平均的な水温40°Cにおける各種 pH の異なるオゾン水の減衰曲線を検討するために酸性側からアルカリ性側における初期 pH (pH5.8, 7.2, 8.6, 9.5) をいずれも維持する目的で同じ組成で、しかも緩衝能をもたせるために日本水道協会、上水試験方法の細菌試験の試料の希釈水に用いている0.425M リン酸塩溶液を用いた³⁾。その結果を Fig.1 に示す。前報⁴⁾で検討した水温20°Cにおいては、pH7.2の低濃度領域におけるオゾン水は、3.3分~5.8分でオゾン

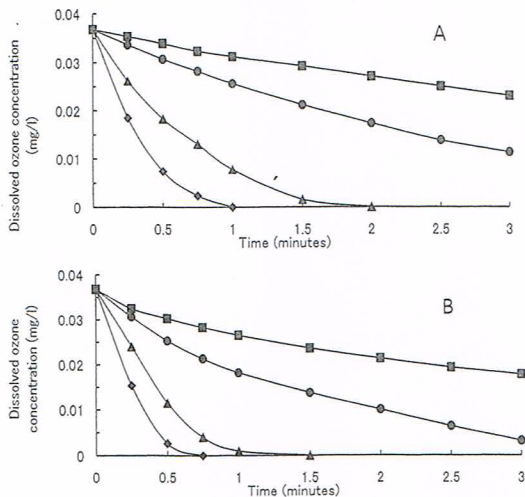


Fig.1. Decrease of the ozone concentration in phosphate buffer solution (A) and phosphate buffer solution with *Legionella* suspension (B) at various pH and 40°C (■ : pH5.8, ● : pH7.2, ▲ : pH8.6, ◆ : pH9.5)

濃度が半減することを報告した。今回、菌無添加時に水温を40°Cに設定した場合、Fig.1A に示すように pH7.2においては1.9分の半減期を示した。この事実は、水温20°Cよりも水温40°Cの方が速い速度でオゾン濃度が減衰することを示している。Fig.1A に示すごとく、異なる pH のオゾン水が示す半減期は、pH8.6では0.5分、pH9.5では0.25分でオゾン濃度が半減し、pH 値が高くなるにつれ急速なオゾン濃度の減少が認められた。しかし、酸性側の pH5.8では3分後においても63%のオゾン濃度が残存した。これは pH がアルカリ性領域においてはオゾンが OH ラジカルに瞬時に変化し消失していることが考えられる^{7,8)}。今回用いたリン酸塩希釈水のリン酸によるラジカル消去作用を考慮する必要がある。しかし、このアルカリ性で生成する OH ラジカルおよびアルカリ性が殺菌効果に対し関与していることを否定できないと考える。

また、オゾン処理実験水に試験菌液 1 ml を添加したときのオゾン濃度の減衰曲線を Fig.1B に示す。いずれの pH においても菌液の添加により菌液無添加の場合に比べて、より急速なオゾン濃度の減少が認められた。菌液添加時は無添加に比較すると残存オゾンの濃度の減衰時間が早いことを示した。この事実は菌体表面の構成物とオゾンが反応したことを示すものである。すなわち、*Legionella* 菌体に対するオゾンの酸化反応は pH 値が中性からアルカリ側に高くなるほど速やかに起こり早いオゾン消費を示すことが判明した。このことから、アルカリ泉などではオゾン消費が早いためオゾン濃度の制御に注意を払うことが必要であることが考えられた。

2. 各種 pH の異なるオゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果

pH が5.8, 7.2, 8.6および pH9.5と異なる pH を示すオゾン水を用いたオゾン処理実験における経過時間毎の供試菌の生残率を Fig.2 に示す。オゾン水は0.026~0.037mg/l の低濃度領域においても *Legionella* に対して強い殺菌作用を示した。また、pH5.8, 7.2, 8.6および pH9.5のいずれの pH においてもオゾン濃度が0.026mg/l において

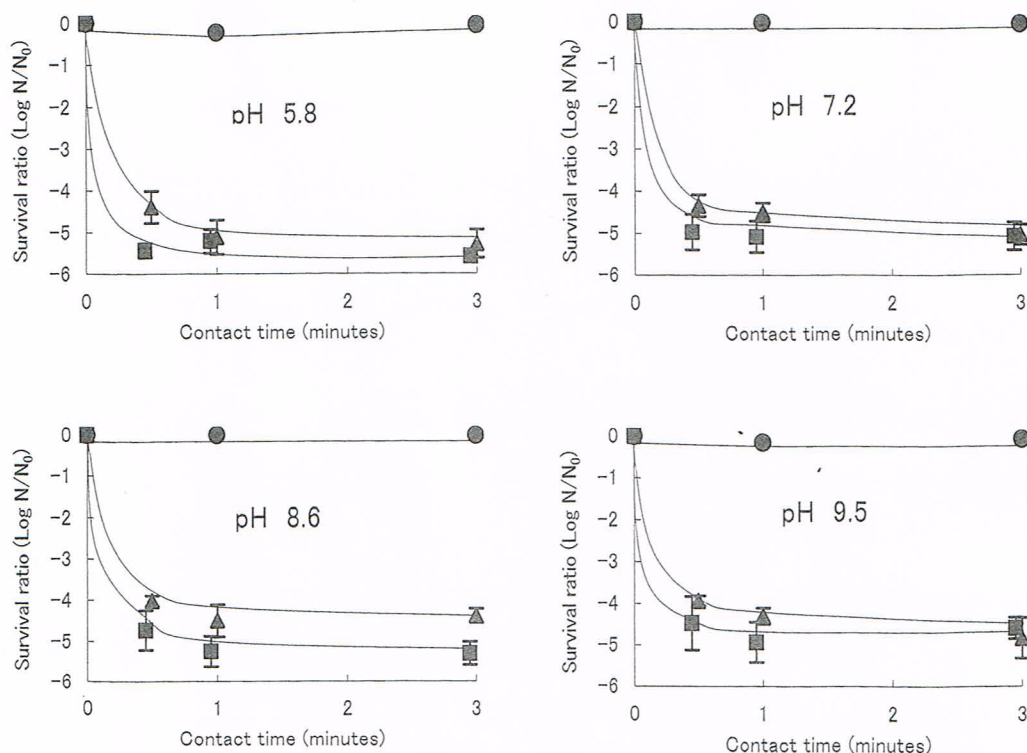


Fig.2. Effect of pH on the bactericidal activity of dissolved ozone solution against *L. pneumophila* ATCC33152 at 40°C (● : control, ▲ : 0.026mg/l, ■ : 0.037mg/l initial dissolved ozone concentration, Mean±S.D.)

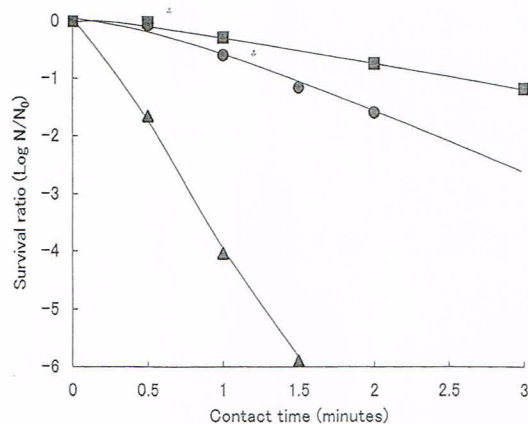


Fig.3. Bactericidal effect of chlorine at different pHs on *L. pneumophila* ATCC33152 at 20°C (■ : pH8.9, 0.40mg free chlorine/l, ● : pH7.8, 0.32mg free chlorine/l, ▲ : pH8.9, 0.40mg free chlorine/l, △ : pH7.0, 0.30mg free chlorine/l)

は、0.5分後には *Legionella* を 4 Log 以上不活化し、3分後には 5 Log の不活化が認められ、ほぼ完全に不活化することを認めた。しかし、

Fig.1 に示したオゾン減衰曲線において、オゾンが検出されない 3 分後において殺菌効果が増加することを示した。この理由の一つとしては殺菌までは至らないが菌体に対して相当の傷害を与えていたことを示すものと考えられる。

次に、オゾンと塩素の *Legionella* に対する消毒効果を比較検討する目的で、0.30~0.40mg/l 塩素水の *Legionella* に対する消毒効果について検討した結果を Fig.3 に示す。pH7.0 の 0.30mg/l 塩素水においては 1.5 分後に 6 Log の不活化が認められ *Legionella* はほぼ完全に抑制された。しかし、pH7.8 の 0.32mg/l 塩素水では 1.5 分後において 1 Log の不活化しか認められず、pH8.9 の 0.40mg/l 塩素水では 3 分後に初めて 1 Log の不活化が認められるにとどまった。このように塩素処理における殺菌効果は pH の相違によって大きな影響を受けることが認められた。この原因としては塩素消毒の場合は、消毒効果が強い次亜塩素酸 (HClO) と、殺菌力が次亜塩素酸の 1/80

～1/300程度に減少する次亜塩素酸イオン(ClO^-)の存在比率がpHにより大きく異なるためである。殺菌効果の強い次亜塩素酸は、pHが7.0では75%存在するが、pH8.0では22%、pH9.0では3%に減少する^{9,10)}。今回の実験結果においても次亜塩素酸の存在比に比例する形で殺菌効果が減少する結果となった。

このように、塩素消毒においては*Legionella*に対する殺菌効果はpHにより大きな影響を受けることが示された。しかし、オゾン処理においてはアルカリ性のpH域では急速なオゾン濃度の減少が認められるが、*Legionella*に対する殺菌効果はいずれのpHにおいても短時間で迅速な同様の殺菌効果が認められ、pHによる影響はほとんど認められなかった。これら結果を総合的に考察すると、塩素による*Legionella*に対する殺菌がpHにより影響を受けるため、pHにより影響を受けないオゾンを効率よく使用することによって、浴槽水の細菌学的な安全性を担保しうることが考えられた。

結 論

浴槽水を低濃度のオゾン水で消毒することを想定して水温40℃でpHが5.8～9.5の条件において*Legionella*を低濃度オゾン水で処理した。その結果、以下のことが明らかとなった。

- (1)オゾン濃度はpH値が高いほど減少速度が速く水温が40℃の場合pHが7.2では1.9分後、pHが8.6では0.5分後、pHが9.5では0.25分後にオゾン濃度が半減した。しかし、pHが5.8の酸性域では3分後においても63%のオゾンが残存し、pHによってオゾン濃度の減少速度に大きな影響が認められた。
- (2)*Legionella*に対する殺菌効果は塩素消毒ではpHにより大きな影響を受ける。しかし、オゾ

ン水ではpHが5.8～9.5の範囲ではpHの影響はほとんど受けず、いずれのpHにおいても0.026mg/lのオゾン濃度で、3分後には5 Logの不活化が認められ*Legionella*をほぼ完全に抑制した。

- (3)オゾンは*Legionella*に対する塩素消毒を補完しうることが考えられた。

文 献

- 1) 杉山順一 (2010) レジオネラ症のリスクマネジメント5：レジオネラ症のリスクマネジメント、防菌防黴, 38, 181-188.
- 2) 大阪府公衆浴場法施行条例 平成17年1月1日一部改正.
- 3) 猪又明子 (2010) レジオネラ症のリスクマネジメント9：浴場施設の衛生的維持管理, 防菌防黴, 38, 319-329.
- 4) 中室克彦, 土井 均, 肥塚利江, 枝川亜希子 (2009) 低濃度オゾン水の*Legionella*に対する殺菌効果, 防菌防黴, 37, 407-412.
- 5) 社日本水道協会 (2001) 上水試験方法 (2001年版), pp.584-585, 日本水道協会, 東京.
- 6) 社日本水道協会 (2001) 上水試験方法 (2001年版), pp.658-662, 日本水道協会, 東京.
- 7) 宗宮 功編 (2004) オゾンハンドブック, pp.67-81, サンユウ書房.
- 8) ブッカーズ編 (2008) OHラジカル類の生成と応用技術：特性・反応・シミュレーションから環境浄化・衛生管理・製造プロセスへの応用まで, pp.45-56, (株)エヌ・ティー・エス.
- 9) White G. C. (1972) Handbook of Chlorination : For potable water, wastewater, cooling water, industrial processes, and swimming pools, pp.182-227, Van Nostrand Reinhold Company.
- 10) 金子光美編 (2006) 水道の病原微生物対策, pp.170-172, 丸善株式会社.