

光触媒による高塩濃度中細菌の処理機構の解明

根岸 信彰¹, 山田 奈海葉², 鈴木 昌弘², 小池 和英³, 忽那 周三³

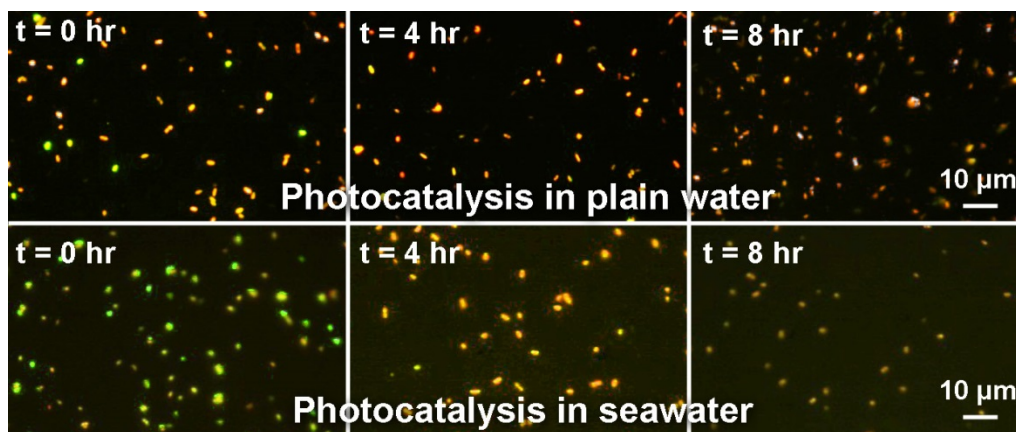
¹産業技術総合研究所環境管理技術研究部門環境負荷制御研究グループ,

²同海洋環境評価研究グループ, ³同未規制物質研究グループ

概要 海水中細菌の光触媒による殺菌効果を調べるために、淡水、0.5% NaCl 水溶液、及び人工海水中の全てで生存可能な大腸菌 *Escherichia coli* K-12 の光触媒による除去を実施した。海水中の NaCl は、光触媒作用により残留塩素の生成要因になると予期されたため、残留塩素計による光触媒への光照射に伴う残留塩素濃度の濃度変化についてモニターした。その結果、光触媒共存下において NaCl 水溶液への UV 光照射のオンオフにตอบสนองした残留塩素レベルの変化が観察された。そのレベルは最大でも 0.2 mg/L 程度であったが、光触媒近傍ではこれより高いと推察された。

また、残留塩素レベルは塩濃度に比例していたことから、明らかに塩素活性種が塩と光触媒の相互作用によって生成していると考えられた。光触媒共存下における淡水中 *E. coli* K-12 への UV 照射では生菌数は暫時減少することが観察されたことから、光触媒による細菌の不活化は可能であることが分かった。しかしながら、生死を問わない全菌数の変化は 8 時間の UV 照射では観察されなかった。

一方、人工海水中 *E. coli* K-12 への UV 照射では生菌数は急激に減少したばかりでなく、全菌数の減少も観察された。この全菌数の減少という結果は、細菌の細胞そのものが破壊（～無機化）されていることを示すものであり、水中におけるこのような現象は殆ど報告例がない。この結果は光触媒表面に生成した塩素活性種が細菌に取り込まれて急速に不活化したことにより、生物としての抵抗力が失われ、その結果として光触媒作用による細胞質の酸化分解が行われたと推察された。



1. 研究の背景と目的

これまで、光触媒による環境水中の殺菌に関する研究は、安全な飲料水を供給するという目的から淡水環境を主として数多く実施されている。一方、海水の殺菌も海洋

に関わる様々な分野で必要とされている。現在、海水中に存在する微生物の処理は漁業への応用だけでなく船舶のバラスト水の越境移動の問題などからも大きく注目されている^{1,2)}。一方、薬剤投入による殺菌は海洋汚染の原因

ともなることから控えるべきものと考えられる。このような観点から、太陽光を励起光とした殺菌効果が期待される光触媒に期待が集まることが期待されている。しかしながら、海水中には NaCl をはじめとする数多くのミネラル分が含まれており、海水中での光触媒作用による殺菌が淡水中とは異なるメカニズムで進行する可能性があるが、これについて指摘した研究は知られていない。それ以前に、海水中に含まれる有機物の光触媒分解に関する報告も、淡水中の有機物の分解の研究と比べると、極めて少ないのが現状である³⁻⁶⁾。このため、淡水環境と海水環境における光触媒による殺菌効果の差を調べることで、光触媒の海洋環境への応用について新たな知見が得られることが期待される。食塩水と光触媒との作用により、活性塩素種が生成するという報告はすでになされており、海水でも同様の現象が起きると期待される^{7,8)}。なお、大気化学の分野では、海洋上大気において太陽光励起による海塩からのマルチフェーズ光化学メカニズムによる Cl 原子生成が知られており、そこから HOCl に至るスキームも見つかっている^{9,10)}。光触媒の介在により、この反応量を劇的に増やすことは可能であると考えられる。

光触媒による殺菌効果は一般的には OH ラジカルや活性酸素種の生成によるものが一般的であるが¹¹⁻¹³⁾、もし光触媒表面において活性塩素種が生成していれば塩素殺菌と同様の効果が期待され、淡水中よりも海水中の方が殺菌の効率が上がることが期待される。

このため、本研究では、NaCl 水溶液に対する光触媒反応による残留塩素生成挙動の観察を行うため、NaCl、人

工海水 (ASW)、及び NaCl と同じ金属塩である KCl 水溶液を用いて同様の実験を行い、残留塩素生成が認められるか検討した。また、細菌処理と残留塩素生成の関連性について検討を行うために、淡水及び海水中における生残率に差のない菌株を用い、この両者における光触媒反応に伴う生理活性の差を観察した。

2. 研究方法

2.1 使用した薬品並びに実験システムの構築

光触媒は新東 V セラックス製 HQC21 を使用した¹⁴⁾。この光触媒は TiO₂ アナターゼ相をシリカゲル上に約 20 wt% コーティングしたものである。HQC21 の平均粒径は約 3.5 μm、比表面積は約 200 m²/g である。高塩濃度調製用の試薬には、NaCl、KCl、並びに ASW を使用した。NaCl は 0.5% 並びに 3.5% の濃度で調製し、KCl は 3.5% の濃度で調製した。MQ は純水として使用したほか、各塩濃度の各水溶液調製にも使用した。

約 14 g の HQC21 を長さ 300 mm、内径 10 mm、外径 12 mm のパイレックスガラス管に充填し、これを 10 本用意した。二本ずつをひと組とし、光触媒リアクターを組み立てた。このリアクターを用い、**図 1** に示すような残留塩素測定用閉鎖循環システム (a)、並びに細菌試験用閉鎖循環システム (b) の二種類の反応ラインを組み上げた。なお、本実験に使用した光源としては光触媒の励起に最適でありなおかつ大腸菌への影響が小さい波長 352 nm (UV-A 領域) の 10 W ブラックライト 4 本を使用した。閉鎖循環システムの流速は 7.5 L/h とした。

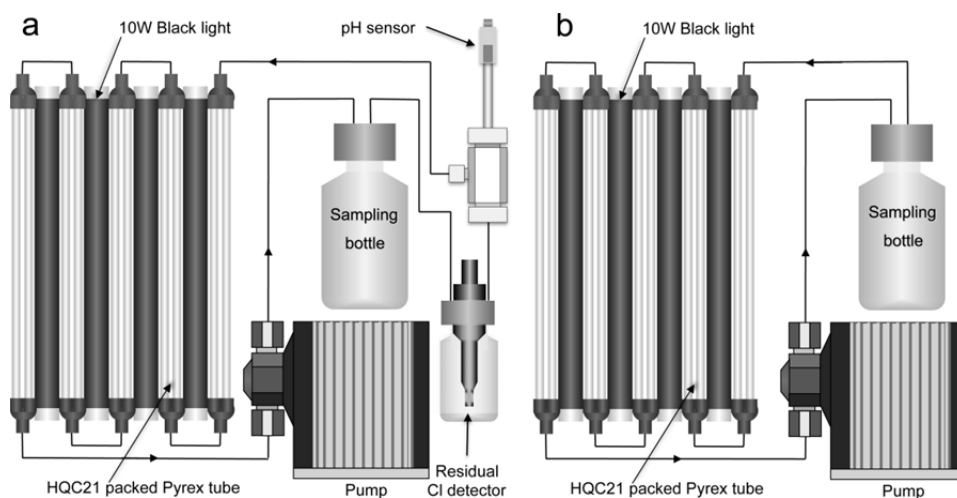


図 1. 残留塩素測定用閉鎖循環システム (a)、細菌試験用閉鎖循環システム (b) の概略

2. 2 モデル細菌の培養

モデル細菌として大腸菌 *E. coli* K-12 を使用した。*E. coli* K-12 の初期培養は 37°C 36 時間 0.5% NaCl を含む培養液中で行った。*E. coli* K-12 を純水、0.5% NaCl 水溶液、及び ASW に 10^3 レベルで希釈し、培養した。本実験で使用した器具類は全て 121°C 20 分処理ないしガンマ線照射により滅菌されたものを使用した。

2. 3. 実験手法

2. 3. 1 光触媒への UV 照射に伴う残留塩素の生成確認と pH 変化の観察

この実験では、図 1a に示すような閉鎖循環系の実験は 9 時間実施し、最初の 1 時間は暗条件、次に UV 照射を基本的に 6 時間継続、その後 2 時間暗条件で循環し続け、光照射開始並びに停止に伴う残留塩素値並びに pH 変化を観察した。サンプル溶液の体積は 1 L とし、2. 1 における実験条件を用いた。

2. 3. 2 *E. coli* K-12 への UV-A 照射の影響調査

光触媒による処理実験を行うに当たり、光触媒を励起するのに用いられる UV-A ($\lambda \sim 365$ nm) 照射に対する *E. coli* K-12 の影響を事前に調べておく必要がある。このため、10 mL の試験管に 2. 2 で調製した *E. coli* K-12 分散液を入れ、これらを 15 W ブラックライトで 8 時間照射し、2 時間毎にサンプリングしてカウントすることにより *E. coli* K-12 の UV-A 照射に対する影響を調べた。

2. 3. 3 様々な水溶液環境下における *E. coli* K-12 の光触媒処理による変化

図 1b に示すような閉鎖循環ラインを用い、規定の *E. coli* K-12 を入れた純水、0.5% NaCl 水溶液、及び人工海水各 1 L を循環させた。このときの循環速度は 7.5 L/min であった。本実験を行うに当たり、閉鎖循環ラインは 70% のエタノール溶液で前処理してから使用した。10 mL の循環溶液を遠沈管に 2 時間毎にサンプリングした。

2. 3. 4 細菌の存在量、細胞膜状態、生存活性

細菌存在量と細胞膜状態は生死判定キット (LIVE/DEAD BacLight, L/D) を使用して測定した。2 mL に等分したサンプリング溶液に 3 μ L/mL の L/D 試薬を入れ、濾過した後マウントオイルで顕微鏡観察用プレパラート上に固定した。

呼吸活性を調べるため、CTC (fluorogenic tetrazolium dye 5 cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride) 試薬を用いた

¹⁵⁾。CTC は無色であるが、呼吸活性に伴う電子伝達系の作用により還元され、赤色蛍光を発する。初期濃度を 50 mM とし、これを各サンプリング溶液に 2 mM (淡水並びに 0.5% NaCl 水溶液) ないし 5 mM (人工海水) となるよう添加した。染色したサンプルは顕微鏡用プレパラート上に固定し顕微鏡観察を行った。

3. 研究結果

3. 1 UV 照射に伴う残留塩素生成及び pH 変化の観察

はじめに、純水、ASW、3.5% NaCl、及び 3.5% KCl 水溶液の暗条件における循環での残留塩素値の経時変化を観察した。その結果、水の循環を行っていた 9 時間の間、水中塩の有無に関わらず残留塩素値に変化は見られなかった。次に、純水、ASW、3.5% NaCl、及び 3.5% KCl 水溶液の 5~6 時間 UV 照射に伴う残留塩素値の経時変化を観察した。純水環境では、UV 照射に伴う変化は残留塩素に見られなかったが、ASW、3.5% NaCl、及び 3.5% KCl 水溶液の各環境では UV 照射開始と同時に残留塩素値の上昇が見られた。この上昇は UV 照射後約 30 分で頭打ちとなり、UV 照射停止と同時に低下して 1~2 時間後に元のレベルに回復した。これら結果を図 2 に示す。なお、本研究ではブラックライトにアルミ箔を巻き付け、暗条件でランプの発熱の影響が残留塩素値に変化を与えるかについて観察した。その結果、温度上昇に伴う残留塩素値の変化は全く観察されなかった。従って、塩を含む環境

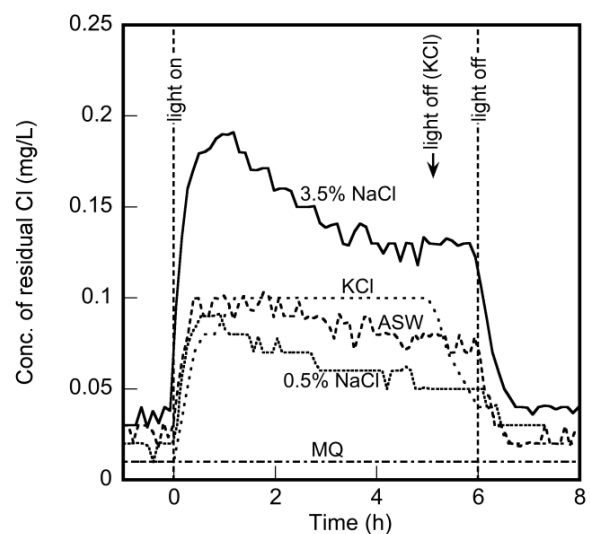


図 2. 純水、ASW、3.5% NaCl、及び 3.5% KCl 水溶液の UV 照射に伴う残留塩素値の経時変化

ではUV照射により残留塩素種が明らかに生成されると判断した。本実験では、残留塩素値の上昇は0.1~0.2 mg/Lの範囲であり、この濃度レベルはDPD法などその他残留塩素測定法では観察できないが、ポーラログラフ法を用いることで0~0.1 mg/Lの範囲の測定が可能となり、この僅かな残留塩素値の変化を確認することができた。

ポーラログラフによる残留塩素の測定では、活性種の特定は不可能である。しかしながら、平川らは塩素イオン(Cl⁻)と光触媒反応に伴う水酸ラジカル(OH[•])との反応によりHOClが生成することを示している^{7,16)}。HOCl(ハイポクロラス)が強い殺菌性を有することは広く知られている。しかしながら、HOClは寿命が比較的短いとされており、我々のシステムでもUV照射と共に残留塩素値が急速に下がることから、光触媒を伴う海水への照射によるHOClの生成が予測される。ThurmanらはpHが4~7の範囲ではイオン種としてのHOClが比較的安定であることを示している¹⁷⁾。我々の系で測定されたUV照射下でのpHは、3.5% NaCl、3.5% KCl、及びASWでそれぞれ平均4.75、4.48、5.97であったことから、少なくともHOClはUV照射下では安定して存在できる環境となっていたと考えられる(これと比較してOH[•]の寿命は短い^{18,19)})。なお、光触媒表面では水中より活性塩素種の濃度が高いことが予想されるため、光触媒表面で生成する活性酸素種だけでなく活性塩素種の殺菌に対する相乗効果が得られることが期待される。この光触媒表面における活性種生成挙動については引き続き詳細に観察する予定である。

3.2 大腸菌の各水溶液環境における光触媒殺菌効果

この実験では、まず淡水(MQ)中とASW中においてほぼ同様の生残率を有する菌種の使用が必要である。このため、MQ中、及びASW中における*E. coli* K-12の経時変化を調べる予備実験を行った。その結果、*E. coli* K-12の8時間後の生残率はASWでは約88%、MQでは約66%であった。また、MQではASWの系と比べ、サンプリング毎の測定誤差がかなり大きかった。*E. coli* K-12の生残率はMQと比べASWの方が良かったが、これは恐らく浸透圧に関する結果であると思われる。いずれにせよ、*E. coli* K-12はASW中において安定であることが明らかとなったので、この菌株は本実験に適していると判断した。次に、光触媒による滅殺実験を行う前にMQ、0.5% NaCl、及びASWの各環境下における*E. coli* K-12のUV-A照射

に対する影響を調べた。その結果、0.5% NaCl、ASWの各環境下ではUV照射の有無による菌数変化の有意の差は見られなかった。MQのみUV照射による生残率の低下が認められたが、8時間のUV-A照射でもなお60%以上の生残率を示していたため、UV-A照射のみによる滅菌効果はほぼないと判断した。各環境中の*E. coli* K-12の暗条件及びUV-A照射条件におけるL/D法による生残率を表1に示す。

E. coli K-12の各塩環境における暗条件下での反応システム内8時間循環時のL/D法で評価した経時変化を図3に示す。同じくUV照射下での反応システム内8時間循環時のL/D法で評価した経時変化を図4に示す。また、暗条件及び照射に伴うCTC法の経時変化を図5に示す。暗条件では、生菌数の経時変化はどの系でもL/D法及びCTC法との間で大きな差は見られなかった。MQの系のみサンプリング毎の変動が大きかったが、これは純水環境が*E. coli* K-12の生育に適していないためと考えられる。一方、0.5% NaCl水溶液の系では、*E. coli* K-12の生育に適した生理食塩水に組成が近い環境であるため、時間の経過と共にその数が増加したと考えられる。ASWでは、8時間の循環の間*E. coli* K-12の増減は全く観察されず、海水環境も*E. coli* K-12にとって適していると考えられる。

UV-A照射に伴う*E. coli* K-12の時間変化は塩分濃度により大きな違いが見られた。MQの系では、図4Aに示すように生菌数は2時間の循環で約90%減少したが、その後の変化は小さく、8時間の循環後でもゼロとはならなかった(約97%の減少)。また、図5Aの結果に示すとおり、8時間の照射後もCTC+(呼吸活性を有する細胞)はゼロとはならなかった。この結果を図4Aと比較すると、LiveだけでなくInjuredも呼吸活性を有していると考えられる。一方、MQの結果に対し、NaClを含む系では光触媒反応に

表1. 各種環境中における*E. coli* K-12の暗条件及びUV照射下における8時間後の生残率

Condition	MQ	0.5% NaCl	ASW
dark	97%	97%	99%
UV	62%	97%	99%

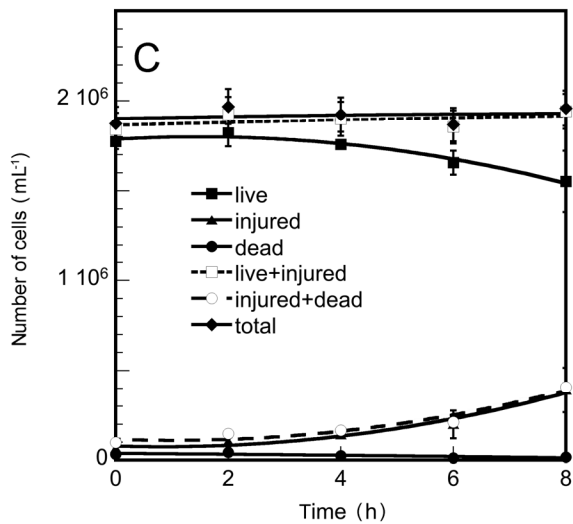
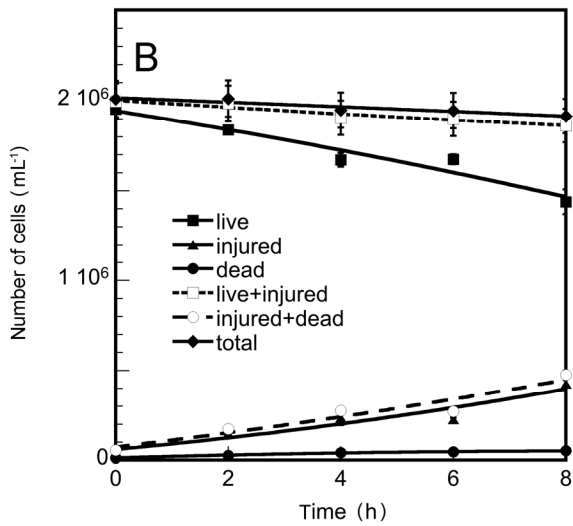
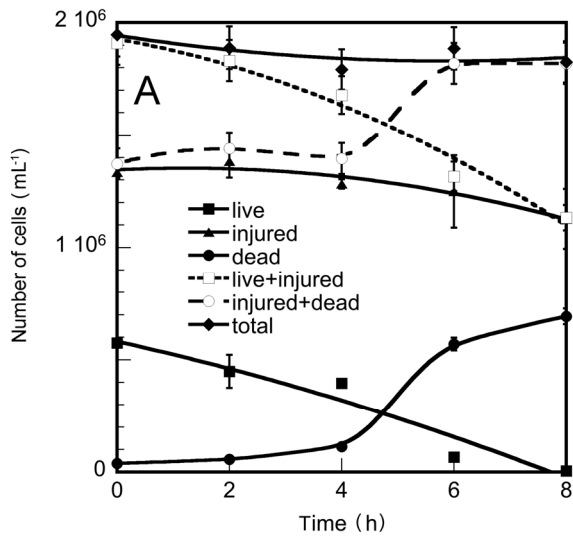


図 3. *E. coli* K-12 の各塩環境における暗条件下 8 時間循環時の L/D 法で評価した経時変化。A: MQ、B: 0.5% NaCl、C: ASW

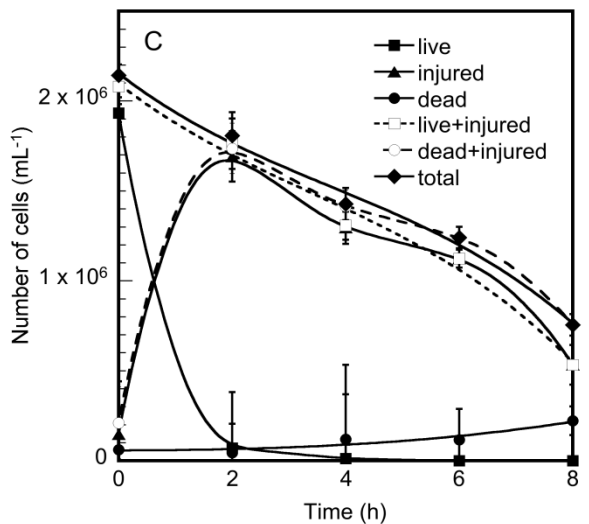
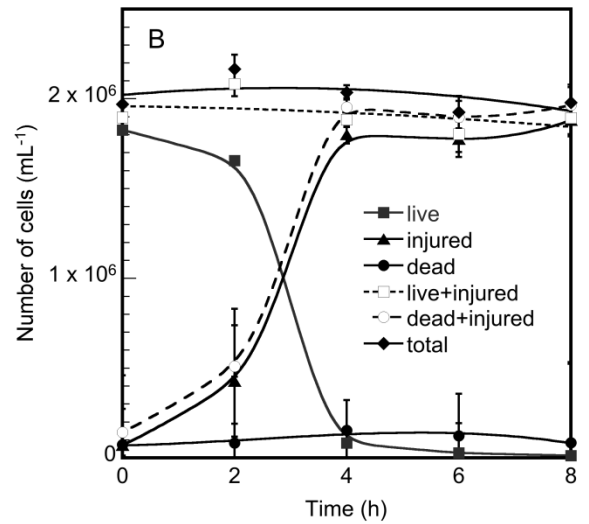
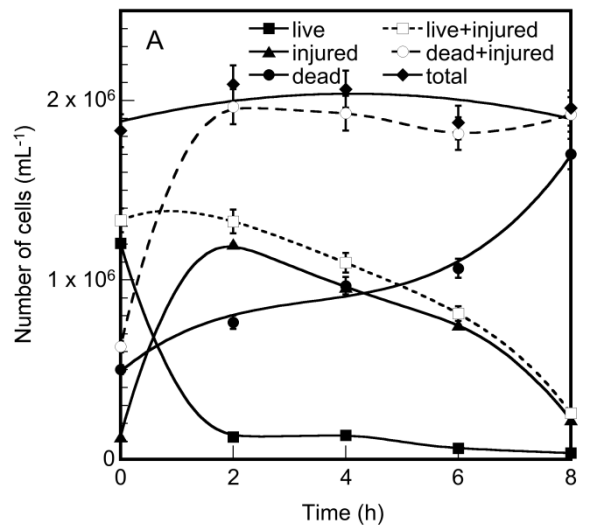


図 4. *E. coli* K-12 の各塩環境における UV 照射下 8 時間循環時の L/D 法で評価した経時変化。A: MQ、B: 0.5% NaCl、C: ASW

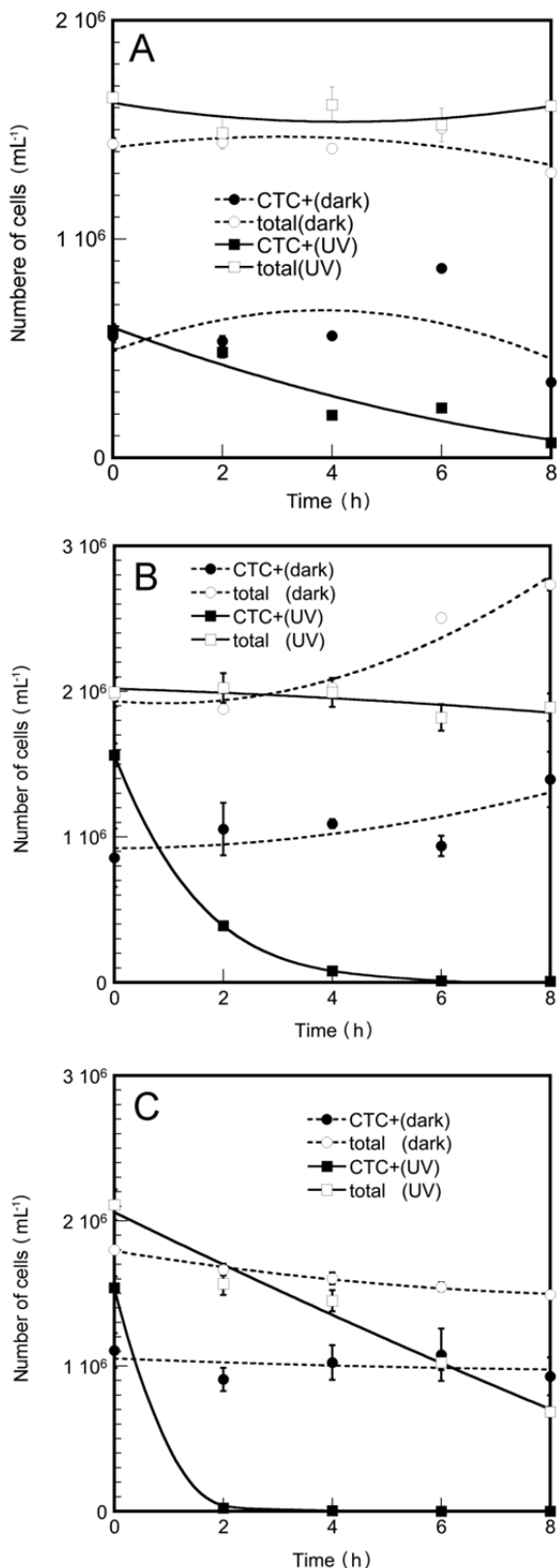


図 5. *E. coli* K-12 の各塩環境における 8 時間循環時の CTC 法で評価した呼吸活性の経時変化。A: MQ、B: 0.5% NaCl、C: ASW

伴う *E. coli* K-12 の減衰挙動はかなり異なっていた。すなわち、0.5% NaCl 水溶液系では、図 5B に示すように光照射開始後 6 時間で呼吸活性がほぼゼロとなり、図 4B に示す L/D 法でも生菌数は同じく 6 時間後にほぼゼロとなった。一方、Injured は 6 時間後にほぼ全菌数に匹敵した。ASW の系では、図 4C で示すように光照射開始後 2 時間で呼吸活性はほぼゼロとなり、L/D 法でも同 2 時間で Live はゼロに近い数値を示した。一方、Injured は同 2 時間で Max となった。これら NaCl を含む系で共通することは、L/D 法の生菌数と CTC 法の呼吸活性がほぼ一致しており、すなわち、MQ の系とは異なり Injured はほぼ呼吸活性を有しないと考えられる。

MQ の系と NaCl を含む系との違いは、3. 1でも示したように遊離塩素の生成である。WHO でも飲料水の処理には塩素処理を必須としているが²⁰⁾、これは HOCl などの塩素活性種が強い殺菌効果を示すためである。すなわち、光触媒反応に伴い生成する水と酸素をソースとする活性種 ($\cdot\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 等: $\cdot\text{OH}$ は高活性であるが寿命が短い) 以上に塩素由来の活性種は殺菌効果が高く、これが NaCl を含む系で光触媒反応を行わせると光触媒により生成した活性酸素の殺菌効果と重なり、滅殺率が向上する要因ではないかと考えられる。この結果と CTC 法の観察結果とを比較すると、NaCl を含む系では、光触媒反応により生成した遊離塩素が *E. coli* K-12 内に入り込み、その結果、呼吸活性が失われるのではないかと推察される。

ここで興味深いのは、ASW の系において、UV 照射時間の経過と共に全菌数が著しく減少していることである。この結果は、殺菌効果のみならず、菌体そのものが光触媒分解されている可能性を示している。我々はこの全菌数の変化を全有機炭素濃度 (TOC) により観察しようとしたが、残念ながら水中溶存培養液の炭素濃度が細菌の炭素量よりはるかに多く、TOC では有意の差は観察できなかった。また、ASW の系において光触媒反応に伴ってなぜ全菌数が著しく低下するのかは現時点では不明であり今後その理由について検討を行う予定であるが、現象論としては、細菌の光触媒による無機化という淡水中では達成が難しかった反応を ASW で容易に行うことができた。この結果はすなわち生残細菌への有機物の栄養供給を絶つ効果があることを示しており、光触媒の海水中における利用の応用範囲を広げることになると思われる。

4. まとめ

NaCl を含む水中での光触媒による殺菌効果を調べるため、MQ、0.5% NaCl 水溶液、及び人工海水中で *E. coli* K-12 の光触媒反応に伴う時間変化を観察した。光触媒共存下において NaCl 水溶液、及び KCl 水溶液への UV 光照射のオンオフに応答した 0.1 mg/L レベルの残留塩素の増減が観察された。光触媒共存下における淡水中 *E. coli* K-12 への UV 光照射では生菌数は暫時減少することが観察されたが、全菌数の変化は観察されなかった。一方、人工海水中 *E. coli* K-12 への光照射では生菌数は急激に減少したばかりでなく、全菌数の減少も観察された。人工海水中における生菌数の急激な減少は光触媒表面に生成した塩素活性種の生成と関連性があると推察された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Wu, D., You, H., Zhang, R., Chen, C. and Lee, D. Ballast waters treatment using UV/Ag-TiO₂+O₃ advanced oxidation process with *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus* as indicator microorganisms. *Chemical Engineering Journal* (2011) 174, 714-718.
- 2) David, M., Perkovic, M., Suban, V. and Gollasch, S. A generic ballast water discharge assessment model as a decision supporting tool in ballast water management. *Decision Support Systems* (2012) 53, 175-185.
- 3) Minero, C., Maurino, V. and Pelizzetti, E. Photocatalytic transformations of hydrocarbons at the sea water / air interface under solar radiation. *Marine Chemistry* (1997) 58, 361-372.
- 4) Al-Rasheed, R. and Cardin, D.J. Photocatalytic degradation of humic acid in saline waters. Part 1. Artificial seawater: influence of TiO₂, temperature, pH, and air-flow. *Chemosphere* (2003) 51, 925-933.
- 5) Negishi, N. Spiral type photocatalytic water purifier. *Materials Integration* (2006) 19, 8-16.
- 6) Kim, M., Choo, K. and Park, H. Photocatalytic degradation of seawater organic matter using a submerged membrane reactor. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2010) 216, 215-220.
- 7) Hirakawa, T., Nakaoka, Y., Nishino, J. and Nosaka, Y. Primary passages for various TiO₂ photocatalysts studied by means of luminol chemiluminescent probe. *Journal of Physical Chemistry B* (1999) 103, 4399-4403.
- 8) Pagal, R. and Dohrmann, J.K. Thermochemical study of photoinduced process at TiO₂ nanoparticles in aqueous suspension containing Br⁻ or Cl⁻. Photodegradation and subsequent processes. *Journal of Physical Chemistry C* (2007) 111, 4458-4464.
- 9) Lawler, M.J., Sander, R., Carpenter, L.J., Lee, J.D., von Glasow, R., Sommariva, R. and Saltzman, E.S. HOCl and Cl₂ observations in marine air. *Atmospheric Chemistry and Physics* (2011) 11, 7617-7628.
- 10) Jammoul, A., Dumas, S., D'Anna, B. and George, C. Photoinduced oxidation of sea salt halides by aromatic ketones: a source of halogenated radicals. *Atmospheric Chemistry and Physics* (2009) 9, 4229-4237.
- 11) Kikuchi, Y., Sunada, K., Iyoda, T., Hashimoto, K. and Fujishima, A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1997) 106, 51-56.
- 12) Sunada, K., Watanabe, T. and Hashimoto, K. Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2003) 156, 227-233.
- 13) Subrahmanyam, M., Boule, P., Kumari, V. D., Kumar, D. N., Sancelme, M. and Rachel, A. Pumice stone supported titanium dioxide for removal of pathogen in drinking water and recalcitrant wastewater. *Solar Energy* (2008) 82, 1099-1106.
- 14) Takeuchi, S. *Shinto no Hikarishokubai Silica Gel Series*. Toso to Toryo (2004) 658, 15-19.
- 15) Choi, J.W., Sherr, B.F. and Sherr, E.B. Dead or alive? A large fraction of ETS-inactive marine bacterioplankton cells, as assessed by reduction of CTC, can become ETS-active with incubation and substrate addition.

- Aquatic Microbial Ecology (1999) 18, 105-115.
- 16) Hirakawa, T., Nosaka, Y. Properties of $O_2^{\cdot-}$ and OH^{\cdot} formed in TiO_2 aqueous suspensions by photocatalytic reaction and the influence of H_2O_2 and some ions, *Langmuir* (2002) 18, 3247-3254.
- 17) Thurman, R.B. and Gerba, C.P. Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. *Advances in Applied Microbiology* (1988) 33, 75-105.
- 18) Nakamura, R., Imanishi, A., Murakoshi, K. and Nakato, Y. In situ FTIR studies of primary intermediates of photocatalytic reactions on nanocrystalline TiO_2 films in contact with aqueous solutions. *The Journal of American Chemical Society* (2003) 125, 7443-7450.
- 19) Okuda, M., Tsuruta, T. and Katayama, K. Lifetime and diffusion coefficient of active oxygen species generated in TiO_2 sol solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics* (2009) 11, 2287-2292.
- 20) WHO Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first and second addenda., World Health Organization (2006).

Research for the Elimination Mechanism of Bacteria in Saline Water by Photocatalysis

Nobuaki NEGISHI, Namiha YAMADA, Masahiro SUZUMURA, Kazuhide KOIKE,
Shuzo KUTSUNA

Research Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology

Summary

Photocatalytic inactivation in freshwater is widely studied for the purpose of improving the quality of drinking water. In addition, inactivation of seawater has important applications in various marine fields. The objective of our research is to establish means to eliminate bacteria and/or plankton without the addition of bactericide in seawater to prevent marine contamination. In our research work, the effects of UV irradiation on the respiration and survival of *Escherichia coli* in various concentrations of aqueous NaCl were investigated in the presence of a photocatalyst. In this study, we anticipated that the photocatalysis of residual chlorine generated in a solution containing Cl⁻ would result in bacterial elimination. Our results indicated a gradual reduction in the *E. coli* survival ratio in freshwater; however, no decrease in total abundance was observed during 8 h of photocatalysis with UV irradiation. Conversely, the survival ratio of *E. coli* in the artificial seawater decreased drastically as a consequence of photocatalysis, with a concomitant decrease in total abundance. These results revealed that the chlorinated active species that formed on the photocatalyst surface influenced the observed inactivation.