

5. アジア・モンスーン地域の下水処理施設における病原微生物の消長に関する研究

材料地盤研究グループ (リサイクル)

尾崎正明、諏訪 守、陶山 明子

1. 要約

発展途上国では、一般的にラグーンにより下水処理が行われている。本研究では、アジア・モンスーン地域に属するタイにおいて、下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。タイでの調査は、病原微生物を細菌、ウイルス、原虫に分類し、コンケンおよびバンコクのアジア工科大学 (AIT) に隣接するラグーンを対象とした。コンケンと AIT において各々病原微生物の濃度に違いが見られた。15 年度に沖縄県で行ったラグーンの調査結果と比較すると、特に AIT の流入下水ではジアルジアのシスト濃度、ノロウイルス濃度は 2~3 オーダー高かった。クリプトスポリジウムは検出割合は比較的高いが、検出濃度はジアルジアに比較して低濃度であった。コンケンの流入下水の病原微生物濃度は AIT と比較してそれ程高濃度ではないが、沖縄県の流入下水のノロウイルス濃度と比較すると、最大検出濃度は 2 オーダー高かった。クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出であった。コンケンと AIT における流入下水の病原微生物濃度の違いは、下水の排除方式の差によるものと推定された。ラグーンによる各々の病原微生物の除去率は、1log 程度から 3log 以上の平均除去率が得られており、沖縄県で行ったラグーンの滞留時間が 10 日間での調査結果と比較すると大腸菌群、ジアルジアの除去率は高い。除去率が高い要因はラグーンの配置が多段であることや、推定ではあるが滞留時間が異なることに起因するものと考えられる。しかし、大腸菌群、原虫類に比較してウイルス除去率の変動は比較的大きかった。

2. 研究目的

アジア・モンスーン都市部においても都市化の進展、人口集中などに伴いヒトからの排泄物により、病原微生物の汚染による水環境の悪化が懸念されている。水環境の改善、水資源の確保は重要であり、下水道整備によりその対応を講ずることが望まれる。発展途上国では一般的にラグーンなどにより下水処理が行われているが、処理方法や放流水系状況の違いによって病原微生物の消長は変化するものと考えられ、水環境の改善、水資源の確保の観点からその実態を解明する必要がある。

本研究の目的は、病原微生物を細菌、原虫、ウイルスに分類し、各々の分類毎に指標となる微生物の評価を行い実態を把握するとともに、ラグーン施設の運転条件が病原微生物の除去に及ぼす影響を調査し、水系での消長を解明するものである。

3. 研究計画

15 年度は、沖縄県のラグーン実験施設において、降雨、流出 SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響を把握するとともに、植生浄化法による病原微生物の消長を調査した。

16 年度は、アジア・モンスーン地域に属するタイにおいて、下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性を解明するため、以下の調査をバンコクとコンケンにおいて実施した。

- 1) 流入下水の病原微生物の実態を調査
- 2) ラグーンにおける病原微生物の消長調査

平成 17 年度以降は、タイのコンケンにおいて降雨時の汚濁負荷上昇時に病原微生物の流出負荷特性を把握する予定である。

4. 研究方法および対象微生物

本研究では、アジア・モンスーン地域に属するタイにおける下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。タイでの調査は、コンケンおよびバンコクのアジア工科大学 (AIT) に隣接するラグーンを対象とした。コンケンは個々の家庭でセプティクタンクあるいは浸透式トイレ形式と推定され、その流出水がラグーンに流入するものと考えられる。AIT では水洗トイレにより下水はラグーンに排出される。各々のラグーン施設の概要を図-1、2 に示す。コンケンは3池のラグーンから構成さ

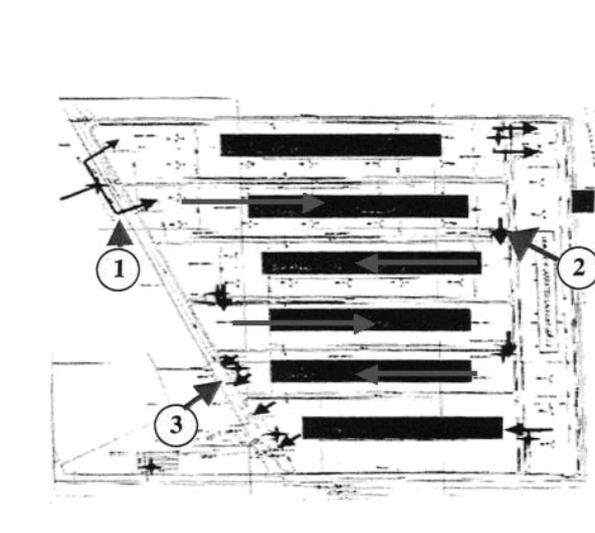


図-1 コンケンのラグーン施設

(1:流入下水, 2:第2池流出水, 3:第3池流出水)

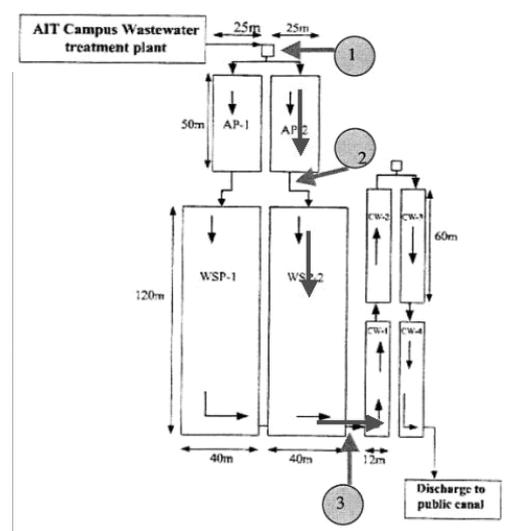


図-2AIT のラグーン施設

(1:流入下水, 2:第1池流出水, 3:第2池流出水)

れており、第2池で間欠曝気を行い、総容量は $46,000\text{m}^3$ 、平均水深は2mである。AITは2池のラグーンから構成されており、容量は $2,125\text{m}^3$ 、 $3,360\text{m}^3$ 、水深は1.7m、0.7mである。

AIT では流入下水、第1、2池流出水、コンケンでは流入下水、第2、3池流出水の各々3試料について採水を行った。病原微生物の対象を大腸菌群数、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ノロウイルスとした。各々の病原微生物の測定法を以下に示す。

大腸菌群数法は、MPN 法あるいは平板培養法とした。

原虫類のジアルジア、クリプトスポリジウムは試料を遠心濃縮、免疫磁気ビーズによる分離の後、間接蛍光抗体染色による顕微鏡観察とした。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズ GC-コンボキット、間接蛍光抗体染色には HYDORO-FLUOR-Combo キット、ENSYS INC.を用いた。

ウイルスの濃縮法は、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法によるもので、試料中にPEG6000 (終濃度8%) およびNaCl (終濃度 0.4M) を添加・攪拌し完全に溶解させた。4°Cで一晩静置した後、 $10,000\times g$ 、30分間遠心分離して沈査を回収した。この沈査をRNase-free水 (遺伝子分解酵素を除去した水) に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。濃縮液中のウイルスは、リアルタイムPCR法により定量を行った。また、リアルタイムPCR法によるウイルスの定量感度を把握するため、ノロウイルスG1型^{1, 2)} G2型^{1, 2)} について各々の高度保存領域を

クローニングしたコントロールcDNAを作製し、TaqManプローブを用いて、その希釈系列に対してリアルタイムPCRを行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Kit(QIAGEN社)を用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN社)でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料1μgをランダムプライマー、Omniscript RT Kit(QIAGEN社)を用い全量20μlの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し2μlをリアルタイムPCRに供した。使用したプライマーおよびプローブを表-1に示した。

ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」に準じた。リアルタイムPCRはQuantiTect Probe PCR Kit(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR装置はLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。

表1 使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ノロウイルス	G1型	COG1F	COG1R	RING1-TP(a) RING1-TP(b)
	G2型	COG2F	COG2R ALFP	RING2AL-TP

5. 研究結果および考察

調査結果を表-2および図-3~6に示す。コンケンとAITにおいて各々病原微生物の濃度に大きな違いが見られた。特にAITの流入下水ではジアルジアのシスト濃度の最大検出濃度は 1.8×10^4 (cysts/L)、ノロウイルス(G1型)濃度は 3.5×10^6 (copies/L)となっており、15年度に行った沖縄県でのラグーンの調査結果との比較となるが、その流入下水と比較すると2~3オーダー高い。大腸菌群の濃度レベルは同程度であった。

表-2 各病原微生物の検出濃度範囲と除去率

微生物 地点		大腸菌群 (cfu or MPN/ml)	ノロウイルスG1 (copies/L)	ノロウイルスG2 (copies/L)	ジアルジア (cysts/L)	クリプトスポリジウム (oocysts/L)
記載データ		H16.6月~H17.2,3月	H16.6~12月,H17.1月		H16.6月~H17.1月	
コンケン	流入下水	4.4E+2~2.3E+5	1.1E+4~9.7E+5	4.1E+2~1.6E+5	ND~1.5E+2 [7/8]	ND [0/8]
	第2池流出水	4.0E+1~3.0E+4	ND~1.0E+3	ND~1.7E+4	ND~2.2E+1 [2/8]	ND [0/8]
	第3池流出水	3.8E+1~2.2E+4	ND~2.9E+2	ND~1.0E+4	ND~1.0E+0 [1/8]	ND [0/8]
	除去率の範囲(%)	0~99.6	82.3~100	0~100	99.3~100	—
	平均除去率(%)	83.2	94.2	85.0	99.9	—
AIT	流入下水	2.1E+4~9.0E+6	4.5E+4~3.5E+6	1.7E+4~2.0E+6	2.6E+2~1.8E+4 [9/9]	ND~1.6E+1 [5/9]
	第1池流出水	4.6E+3~1.6E+6	1.0E+5~2.2E+6	1.3E+4~1.3E+6	1.1E+1~4.1E+2 [9/9]	ND~2.0E+0 [2/9]
	第2池流出水	7.0E+1~5.0E+3	3.6E+1~4.2E+5	ND~6.0E+4	3.0E+0~2.8E+1 [9/9]	ND [0/9]
	除去率の範囲(%)	98.1~99.99	0~99.97	56.8~100	94.6~100	100
	平均除去率(%)	99.6	65.7	92.3	99.2	100

原虫類の欄〔〕内：下段分析検体数、上段検出検体数、検出限界値範囲1~4 oocysts/L
検出限界値以下の場合には除去率を100%として計算した

クリプトスポリジウムは検出割合は比較的高いが、検出濃度はジアルジアに比較して低濃度であった。一方、コンケンの流入下水の病原微生物濃度はAITと比較してそれ程高濃度ではないが、沖縄県でのラグーンの流入下水のノロウイルス濃度と比較すると、最大検出濃度は2オーダー高い。クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出であった(検出限界値1~4oocysts/L)。コンケンとAITにおける流入下水の病原微生物濃度の違いは、先にも述べたが下水の排除方式の差によるものと推定されるが、今後、詳細な現地調査を行いこれらの違いについて

解明する必要がある。

環境水に大きな影響を及ぼすと考えられるラグーン処理水の病原微生物濃度は各々低レベルとなっている。ラグーンによって各病原微生物とも 1log程度から 3log以上の平均除去率が得られており、ラグーンの滞留時間が 10 日間での沖縄県で行った調査結果と比較すると大腸菌群、ジアルジアの除去率が高い。除去率が高い要因はラグーンの配置が多段であることや、推定ではあるが滞留時間が異なることに起因するものと考えられる。しかし、ノロウイルスの除去率の推移に関して図-3~6 示したが、比較的大きな変動を示した。ラグーン内の溶存酸素濃度とコリファージの藻類等の浮遊状粒子への吸脱着現象についての報告³⁾があることから、ウイルス除去率と溶存酸素濃度との関係を整理したが、有意な相関関係は見られなかった。また、他の水質項目との関連も特に見られなかった。

6. おわりに

平成 16 年度では、アジア・モンスーン地域に属するタイにおいて、下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。その結果、コンケンと AIT において流入下水の病原微生物濃度に違いが見られたが、これは下水の排除方式の差によるものと推定された。ラグーンによる病原微生物の除去では、大腸菌群、原虫類に比較してウイルス除去率の変動は比較的大きかった。

なお本実態調査は、アジア工科大学のシピン博士、コンケン大学のパイラヤ博士と共同で実施した。

参考文献

- 1) 篠原美千代、影山努 (2002) 蛍光プローブを用いた RT-PCR 法 日本臨床. Vol. 60 (6) p. 1181-1187.
- 2) 影山努、小嶋慈之、福士秀悦、片山和彦 (2001) 蛍光プローブを用いた Norwalk virus (NV) の高感度検出法の開発. Vita. Vol. 18 (1) p. 42-49
- 3) 大垣眞一郎、アウラピン・ケラタナク、ウタイパン・プラセソム (1986) 酸化池内でのコリファージの挙動に及ぼす日射の影響、衛生工学研究論文集. 22: 163-172.

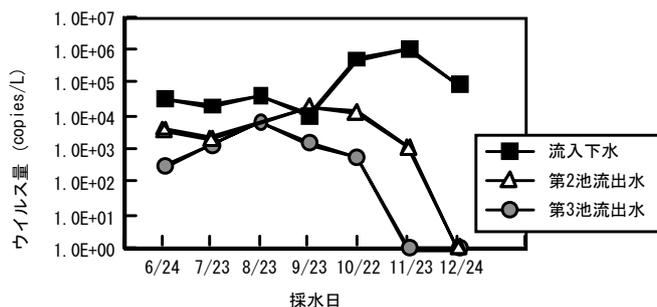


図3 コンケンにおけるノロウイルスG1型濃度

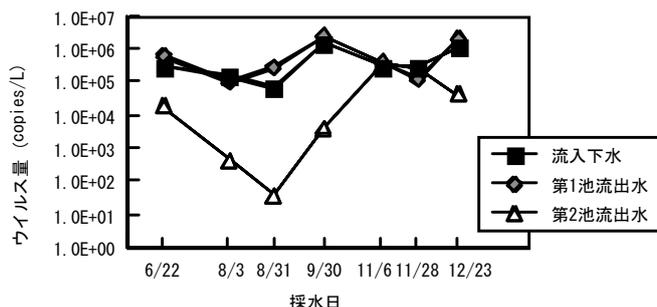


図4 AITにおけるノロウイルスG1型濃度

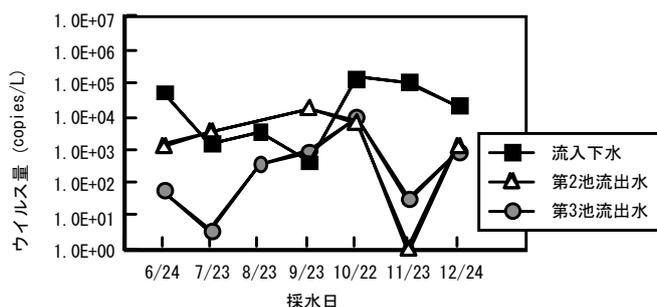


図5 コンケンにおけるノロウイルスG2型濃度

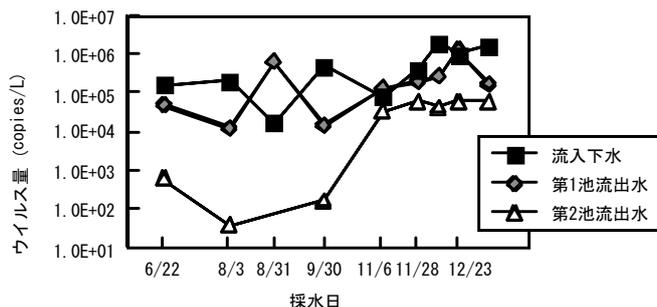


図6 AITにおけるノロウイルスG2型濃度