

## 9. 下水処理水再利用における衛生学的安全性評価手法に関する調査

下水処理研究室 室 長 南山 瑞彦  
主任研究官 田嶋 淳  
研 究 員 桜井 健介

### 1. はじめに

都市内における貴重な水資源確保の観点から、下水処理水の適切な再利用がより一層重要なものとなると考えられる。このため、国土交通省都市・地域整備局下水道部及び国土技術政策総合研究所下水道研究部は、平成 15 年度に下水処理水再利用に関わる水質基準等に関する委員会を設置し、委員会における審議を経て、「下水処理水の再利用水質基準等マニュアル」<sup>1)</sup>を策定した。この検討の中で、適切な再生水利用を進めるために、マニュアルが有効に機能しているか適宜フォローアップを行い、必要に応じて本マニュアルの見直しを行っていく必要があることに加え、(1)大腸菌に関する知見の収集、(2)再生水曝露量の設定、(3)ウイルス対応の基準の検討、(4)病原微生物測定技術の改良、(5)安価で高度な水処理技術の開発、(6)新たな利用用途に関する検討、(7)再生水が藻類等の水生生物に与える影響等の検討等に対応していく必要があると指摘された<sup>1)</sup>。

以上を踏まえ、本調査では、(2)再生水曝露量の設定に関連して、下水処理水再利用における空中浮遊菌発生量の評価方法に関する検討、(3)ウイルス対応の基準の検討に関連して、PCR 法における検出結果の評価方法に関する検討を行うこととする。

### 2. 下水処理水再利用における空中浮遊菌発生量の評価方法に関する検討

霧状の飛沫が発生するような大規模な滝や噴水等への下水処理水の利用事例が見られるが、これらの用途における下水処理水の曝露量の実態については不明な点が多く、リスク評価が困難な状況にあるため、基礎的な知見を集積する必要がある。

#### 2. 1 空中浮遊菌の指標細菌の検討

##### (1) 調査方法

空中浮遊菌の測定方法は、落下菌法、衝突捕集法、遠心衝突法、衝突洗浄法(インピンジャー法)、ろ過法に大別される。

本検討では、衝突捕集法のうち、多孔板法を採用することとし、空中浮遊菌測定エアースAMPLER-BIO-SAS(アイネクス社製)を使用した。なお、多孔板法方式の機器は小型で、使用も簡単で価格も安いことから、多くの利用実績がある<sup>2)</sup>。本検討で用いたエアースAMPLERは「無菌医薬品製造区域の微生物試験法」浮遊菌測定サンプリング装置の捕集性能試験に定められた試験方法、ISO14698-1(クリーンルーム生物汚染管理、一般原則)による捕集性能試験で、 $0.8\mu\text{m}$ 以上の枯草菌芽胞を99%捕集できることが確認されているが、試験性能の確認に用いられている枯草菌芽胞は、乾燥などの物理的条件に強く、試験中に容易に死滅せず、発生器を用いて一定時間安定、かつ単体で発生でき、人体に危険がなく、

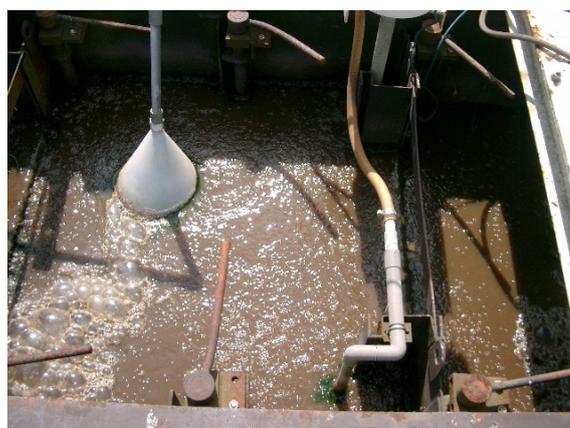


写真-1 空中浮遊菌発生源(パイロットプラント生物反応槽)

外部からの汚染物と区別ができるなどの条件を満足する生物粒子として選定されたものである。

一方、下水処理水再利用における空中浮遊菌発生量を評価するにあたっては、下水中に特異的に存在し、かつ環境条件に強い細菌を選定する必要がある。そのため、大腸菌群、大腸菌、腸内細菌、一般細菌及び嫌気性芽胞を対象として、下水処理水再利用における空中浮遊菌の指標細菌として最も適切と考えられるものについて検討を行うこととした。なお、測定に用いる培地は、大腸菌群、大腸菌及び腸内細菌についてはクロモカルト寒天培地、一般細菌については標準寒天培地、嫌気性芽胞についてはハンドフォード改良寒天培地とした。

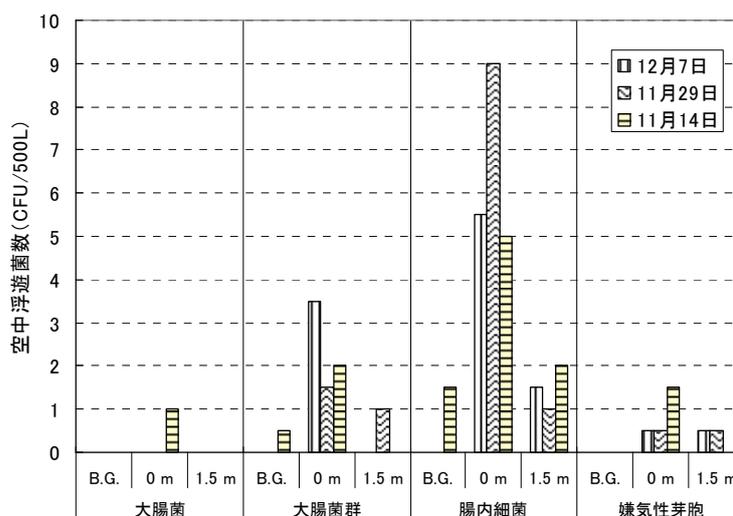
調査は、空中浮遊菌発生源としてパイロットプラントの生物反応槽（写真—1）を用いて、空中浮遊菌発生源近傍（生物反応槽からの距離 0m、1.5m）及びバックグラウンド（生物反応槽からの距離約 25m であり、生物反応槽との間には高さ 6~7m 程度の建物があるため、影響は殆ど無いと考えられる）にて空気を捕集し、前述の細菌の測定を行った。なお、生物反応槽からの距離 1.5m 地点及びバックグラウンドについては、地表からの高さ約 1.5m で捕集を行い、生物反応槽からの距離 0m 地点については、反応槽水面からの高さ約 0.4m で捕集を行った。パイロットプラントの処理法は標準活性汚泥法であり、運転条件は HRT=10hr、曝気槽内の MLSS 濃度 = 1700mg/L、SRT=5.2day であった。調査は晴天時（12月7日）、曇天時（11月14日）及び夜間（11月29日）の3回行い、エアースンプラーによる空気吸引速度は 100L/min とし、5分間吸引を行い、空気 500L 中に含まれる空中浮遊菌の測定を行った。調査時の気象条件は表—1 の通りである。空中浮遊菌の測定は各条件において 2 回ずつ行い、2 回の平均値を採用した。

表—1 実験時の気象条件

実験日	温度 (°C)	湿度 (%)	照度(LUX)	風速(m/s)
11月14日	13~16	63~69	1200~2900	0.3~0.4
11月29日	10~12	46~61	0	0.4
12月7日	13~16	27~33	7080~9580	0.4~0.6

## (2) 結果および考察

一般細菌については、下水の影響が殆どないと考えられるバックグラウンドの空気中からも非常に多く検出され、計数は不可能であった。一般細菌は下水中以外の環境にも広く存在する細菌であり、現にバックグラウンドの空気中からも非常に多く検出されていることから、一般細菌を指標細菌とするのは適切とは言えないことが分かった。大腸菌群、大腸菌、腸内細菌、嫌気性芽胞については、バックグラウンドでは殆ど検出されず、下水中に特異的に存在するとの条件を概ね満たしていると考えて良いと考えられた。これらの細菌のうち環境条件



図—1 空中浮遊菌発生源からの距離と空中浮遊菌数の関係

に最も強い細菌は、一般に嫌気性芽胞であると考えられる。大腸菌は下水処理水の再利用水質基準等マニュアル<sup>1)</sup>の水質基準として新たに採用されたものである。大腸菌群も長く用いられてきた指標である。これらは指標細菌

として有望であると考えられたが、嫌気性芽胞、大腸菌群及び大腸菌は、生物反応槽上（0m 地点）において検出されないか、検出されたとしても検出量は僅かとの結果が得られた（図—1）。これは、反応槽内濃度が小さいことに起因すると思われる（図—2）。再利用に供する下水処理水中の細菌濃度は、今回の実験で用いた生物反応槽内の濃度レベルよりもさらに 2~3Log 以上低いと考えられ、本実験において殆ど検出されない細菌を、下水処理水再利用における空中浮遊菌の指標細菌として選定するのは適切ではないと考えられる。

一方、腸内細菌は、生物反応槽上（0m 地点）において比較的多く検出された（図—1）。これは、腸内細菌の生物反応槽内濃度が他の細菌に比べ大きいことが大きな理由と考えられ（図—2）、空中浮遊菌の指標細菌として腸内細菌を採用するのが現実的であると考えられる。

なお、生物反応槽上（0m 地点）で3回の調査実験全てにおいて空中浮遊菌が検出された大腸菌群、腸内細菌、嫌気性芽胞について、生物反応槽内の濃度

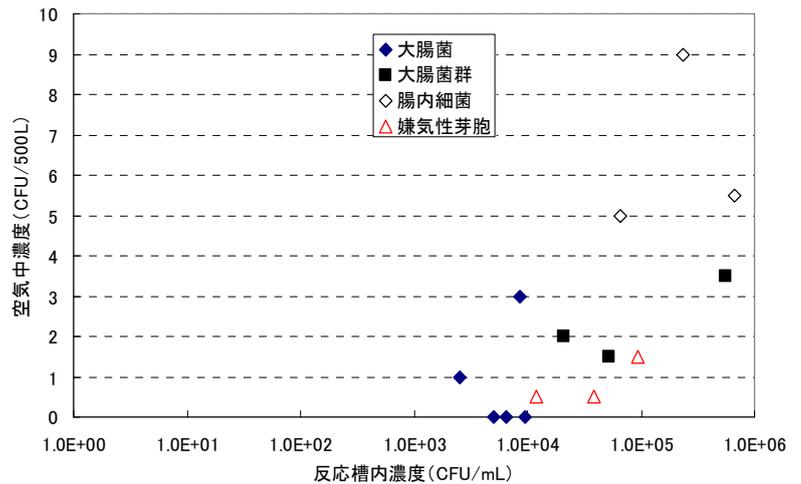
（CFU/mL）に対する空中浮遊菌濃度（CFU/L）の比率（以下、捕捉率（単位：L/mL）と呼ぶ）を比較したところ、各細菌種について、 $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$ 程度となっており、細菌の種類による捕捉率の違いの傾向は特に見られなかった（図—3 参照）。

## 2. 2 空中浮遊菌数に影響を与える因子の検討

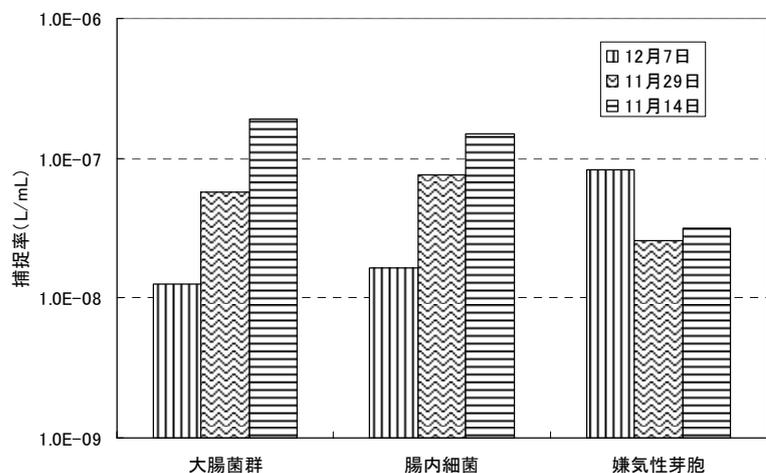
### (1) 実験要領

空中浮遊菌濃度に影響を与える重要な要因として、太陽光線、湿度、気温、風速、発生源からの距離、飛沫の発生規模、下水中細菌濃度等が考えられる<sup>3)</sup>。本検討では、これらの要因のうち、発生源からの距離が空中浮遊菌濃度を与える影響の検討を行った。

空中浮遊菌は、孔径 2mm のノズルをホース先端に取り付け、地下水で 16 倍に希釈したパイロットプラント生物反応槽内の水をホースに通水し、ポンプの圧力により 1.5m の高さから下方に向け噴



図—2 生物反応槽内濃度と空中濃度の関係



図—3 生物反応槽内濃度に対する空中浮遊菌濃度の割合



写真—2 空中浮遊菌発生方法

霧することにより発生させ（写真－2）、噴霧箇所から風下側へ 1m、3m、5m、10m（一部）の距離における空中浮遊菌を測定した。なお、測定位置は地表より 1m の高さとした。

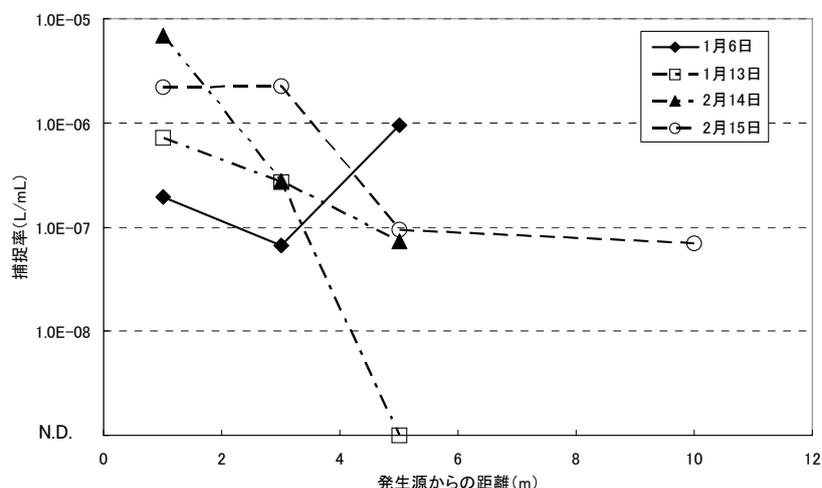
実験は、1月6日、1月13日、2月14日、2月15日の4回行った。なお、実験時の気象条件は表－2に示す通りである。

表－2 実験時の気象条件

実験日	温度 (°C)	湿度 (%)	照度(LUX)	風速(m/s)
1月6日	3~4	33~37	1070~1910	0.3~1.3
1月13日	3	59~63	3340~10500	0.4~0.6
2月14日	16~18	25~29	62400~79100	1.6~2.1
2月15日	21~22	33~39	52000~60500	1.9~2.0

## (2) 結果および考察

実験中に風速の変化の影響を大きく受けた1月6日の結果を除き、発生源からの距離が長くなるほど腸内細菌の捕捉率は低下する傾向が見られた（図－4）。また、大腸菌、大腸菌群及び嫌気性芽胞についても同様の傾向が見られた。但し、データ数が十分でなく、距離と捕捉率との関係を定量的に評価するためにはデータを更に蓄積する必要がある。なお、気象条件が捕捉率に与える影響については、気温及び照度と捕捉率の間には負の相関関係が



図－4 発生源からの距離と捕捉率の関係（腸内細菌）

あり、風速及び湿度と捕捉率の間には正の相関関係がある<sup>3)</sup>とされているが、今回の実験ではデータ数が十分でないため、明確な傾向を見出すことはできなかった。

## 3. PCR 法における検出結果の評価方法に関する検討

細胞培養法で検出ができないノロウイルス等については PCR 法で検出が可能であるが、PCR 法では感染性の有無を評価することができないため、リスク評価を行うことができない状況にある。そのため、基礎的な知見を集積する必要がある。

### (1) 実験要領

PCR 法の利点として、①実験操作が感染危険性から見て安全であること、②実験操作が簡単であること、③実験結果が短時間で得られること、④検出感度がよいこと、⑤細胞培養法で検出ができないウイルスも検出が可能であること 等が挙げられるが、感染性の有無を評価することができないという問題点がある。

そこで、消毒強度と不活化率の関係について、PCR 法による検出結果と細胞培養法による検出結果を比較検討することにより、PCR 法における検出結果と感染性の有無の関係について実験的検討を行った。具体的には以下の通りとした。

測定対象微生物は、F 特異大腸菌ファージ Q $\beta$  (NBRC20012) を用いた。なお、F 特異大腸菌ファージは構造と大きさが腸管系ウイルスのエンテロウイルスに似ていることから、ウイルスの指標として消毒実験用に活用されている。Milli-Q 水に Q $\beta$  を添加することにより消毒前試料を作成した。

消毒方法には、塩素消毒及び紫外線消毒を採用した。消毒条件は表—3 に示す通りとした。

表—3 消毒条件

塩素消毒	塩素注入率	3.4mg/L、6.5mg/L	接触時間	15 分
紫外線消毒	照射強度	36mW/cm <sup>2</sup>	照射時間	1 分、2 分、3 分

Q $\beta$  数は、E.coliK12F<sup>+</sup>株 (NBRC13965) を宿主としたブラック法及び PCR 法によって測定した。消毒前試料中の Q $\beta$  が高濃度 (ブラック法で 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>PFU/mL) となるように設定したため、PCR 法では前処理としての濃縮工程は省略した。また、PCR 法における Q $\beta$  の検出は、片山らの報告<sup>4)</sup> に準じ、プライマー-Q $\beta$  + 及び Q $\beta$  -、TaqMan プローブとして Q $\beta$  プローブを用い、AB7500 (Applied Biosystems) を用いて蛍光強度をリアルタイムに測定し、MPN 法により定量評価を行った。

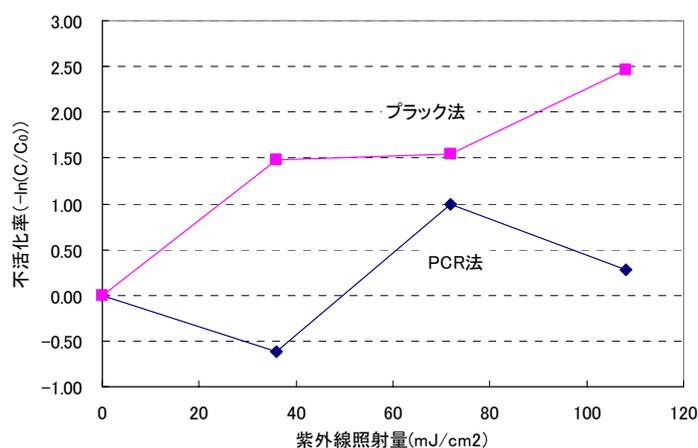
## (2) 結果および考察

紫外線消毒における照射線量と Q $\beta$  不活化率の関係を図—5 に、塩素消毒における Ct 値と Q $\beta$  不活化率の関係を図—6 に示す。データ数が不足しており定量的な評価は困難だが、塩素消毒及び紫外線消毒ともに、PCR 法における不活化率は、ブラック法における不活化率に比べ小さな値を示しており、PCR 法により算出される消毒工程における不活化率は過小評価となる可能性が示唆された。このような結果が得られた理由としては、PCR 法による検出では、消毒により外被や遺伝子の一部が破壊され不活化されても、PCR 反応で増幅させる遺伝子領域が残存していれば検出される可能性があるためと考えられた。このような PCR 法の特徴を考慮すると、PCR 法における不活化率とブラック法による不活化率の関係は消毒強度により変化するものと考えられ、消毒強度の範囲を更に広げて両者の関係について検討を行う必要がある。

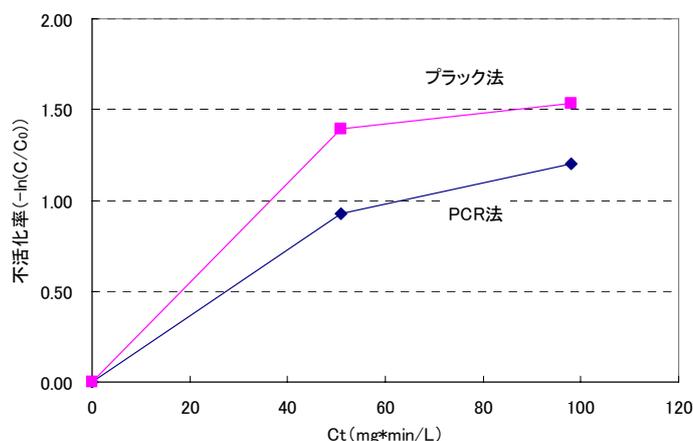
## 4. まとめ

本調査では、PCR 法における検出結果の評価方法に関する検討及び下水処理水再利用における空中浮遊菌発生量の評価方法に関する検討を行った。調査の結果得られた知見を以下に示す。

(1) 腸内細菌は空中浮遊菌発生源近傍では比



図—5 消毒強度と不活化率の関係 (紫外線消毒)



図—6 消毒強度と不活化率の関係 (塩素消毒)

較的多く検出され、バックグラウンドでは検出されなかったことから、下水処理水再利用における空中浮遊菌の指標細菌として用いることが可能であることが示唆された。

- (2) 空中浮遊菌発生源からの距離が大きいほど、空中浮遊菌濃度は低下するが、その関係は気象条件により変化することが考えられた。
- (3) PCR法により算出される不活化率は、ブラック法により算出される不活化率に比べ小さな値を示しており、PCR法により算出される消毒工程における不活化率は過小評価となる可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 国土交通省：下水処理水の再利用水質基準等マニュアル、pp.44-45、2005
- 2) 三瀬勝利、井上富士男編：食品中の微生物検査法解説書、講談社サイエンティフィック、1996
- 3) USEPA：Guidelines for Water Reuse、1992
- 4) 片山浩之他：陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発、水環境学会誌、25(8)、pp.469-475、2002