

5. 処理水の衛生学的リスク制御技術

および水再生処理の評価に関する調査

下水処理研究室 室長 山下 洋正
研究官 松橋 学

1. はじめに

環境基準の衛生学的な指標を大腸菌群数から大腸菌数へ変更することが議論されていることから、下水処理場の放流水の指標も現在の大腸菌群数からの変更について検討が必要である。また、再生水利用に関する国際規格が策定される予定であり、国内においても従来技術によるリスクと性能を評価した上で再生水利用の効果も踏まえた技術基準の検討が必要である。そのため、大腸菌について、下水処理場における除去特性や現在の基準である大腸菌群数との関係性を整理し、基準の変更の必要性や新たな基準値の設定、基準達成に必要な技術の評価手法を確立することが求められる。また、再生水利用については、下水処理水を直接摂取する可能性があることから衛生学的リスクの指標となりうる指標生物を選定すると共に、新たな指標生物の評価手法を確立し、実態調査をした上で、衛生学的リスクがどの程度に制御されるのかといったリスク評価の観点から踏まえた基準値設定の考え方を確立することが求められる。

このことから、本研究において平成 29 年度は、評価手法の確立や基準値の設定のために必要な下水処理場における水処理・消毒工程での大腸菌群数及び新たな指標生物となりうる微生物等の現状把握を目的に、大腸菌群、大腸菌、及びウイルス等を測定し、冬季の水処理・消毒工程での除去特性について調査した。

2. 調査方法

2.1 調査概要

平成 29 年 12 月から平成 30 年 3 月の期間に 4 回の調査を実施した。調査対象の処理場は A 処理場（分流式、OD 法、塩素消毒、処理量約 17,800m³/日）及び B 処理場（分流式、標準活性汚泥法、生物膜を用いたろ過、UV 消毒、処理量約 29,000m³/日）を選定した。採水及び水質測定は表 1 に示す箇所で行った。また採水はスポットサンプリングにより行い、採水時間は処理場における滞留時間を考慮した。なお、塩素消毒後の放流水については、測定への影響を防ぐため、残留塩素濃度の測定を実施し、チオ硫酸ナトリウムで中和した。調査対象とした各処理場の消毒施設の緒元を表 2 に示す。

表 1 採水箇所一覧

| 処理場 (処理/消毒)方式 | 流入水 | 処理水 (消毒前) | ろ過後の水 (消毒前) | 放流水 (消毒後) |
|--------------------|-----|--------------|----------------|--------------|
| A処理場 (OD/塩素消毒) | ○ | ○ | - | ○ |
| B処理場 (標準法/UV消毒) | ○ | ○ | ○ | ○ |

表 2 消毒施設緒元

| 処理場 | 消毒方法 |
|--------------------|--|
| A処理場 (OD/塩素消毒) | 次亜塩素酸ソーダ（有効塩素12%） 注入率 1 mg/L 接触時間15分 |
| B処理場 (標準法/UV消毒) | 密閉方式 中圧紫外線ランプ 照射量250J/m ² |

2.2 測定項目

(1) 水質測定項目

水質測定は、水温、pH、浮遊物質（SS）、残留塩素を下水試験方法¹⁾に準じて測定した。

(2) 大腸菌群数及び大腸菌数の測定

大腸菌群数及び大腸菌数は下記の方法により測定した。

- ・デソキシコール酸塩培地を用いた平板培養法（大腸菌群数のみ）
- ・コリラート培地 QT トレイを用いた最確数法
- ・クロモアガーECC 培地を用いた平板培養法
- ・クロモアガーECC 培地を用いたメンブレンフィルター法（MF 法）
- ・クロモアガーECC 培地を用いた格子付きメンブレンフィルター法（HGMF 法）

(3) 嫌気性芽胞菌の測定

嫌気性芽胞菌は、上水試験法に準じてハンドフォード改良寒天培地を用いたパウチ法により測定し、培養後3枚のパウチの1mm以上の黒色集落数を計数し、その平均値より算出した。²⁾

(4) ノロウイルス G1、G2 の測定

試料水に PEG が濃度 8%、NaCl が終濃度 0.4 (mol/L) になるように添加し、静置後、濃縮液から RNA を抽出した。

RNA の抽出効率には抽出カラムへの SS 負荷量に影響されるため、既往文献³⁾を参考に RNA の抽出に供する試料を 0.1 (mg-

SS) 以下になるように調整した。また試料の濃縮液からの RNA の精製は、1 試料につき 1 回実施した。精製した RNA 試料をリアルタイム PCR により定量した。なお検出用プライマー及びプローブは表 3 を用いた⁴⁾。

(5) 大腸菌ファージの測定

大腸菌ファージはプラーク法を用いて測定した。流入水については重層法により測定し、消毒工程の前後及び B 処理場のろ過行程の前は単層法により測定した。また、宿主は大腸菌 *Escherichia coli* K-12 株 (NBRC3301) を用いた。

表 3 ノロウイルス測定のパライマー及びプローブ

| 標的 | 種類 | 名称 | 塩基配列 (5'-3') |
|----|-------|----------------|------------------------------------|
| G1 | プライマー | | CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA |
| | | COG1R | CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C |
| | プローブ | RING1 - TP (a) | AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA |
| | | RING1 - TP (b) | AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA |
| G2 | プライマー | COG2F | CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG |
| | | ALPF | TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG |
| | | COG2R | TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA |
| | プローブ | RING2 - TP | TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT |
| | | | |

表 4 水質項目分析結果

3. 結果及び考察

3.1 水質測定の結果

各処理場における水質項目測定結果を表 4 に示す。水温、pH、SS については、調査期間を通じてほぼ一定の値を示した。

| | | 水温 ℃ | pH | SS mg/L | NH4-N mg/L |
|------|-------|-----------|---------|------------|---------------|
| A処理場 | 流入水 | 15.5~18.3 | 7.8~8.0 | 160~180 | - |
| | 処理水 | 16~17.9 | 6.6~6.7 | 3.2~11.0 | 0.6~1.5 |
| | 放流水 | 16~17.7 | 6.5~6.7 | 0.8~1.8 | 0.5~0.8 |
| B処理場 | 流入水 | 17.7~19.2 | 7.1~7.2 | 120~160 | - |
| | 処理水 | 18.5~19.7 | 6.2~6.7 | 0.8~1.8 | - |
| | ろ過槽後水 | 18.5~20.5 | 6.4~6.5 | (0.1) ~0.5 | - |
| | 放流水 | 18.8~20.4 | 6.4~6.7 | (0.1) ~0.5 | - |

※B処理場のSSについて括弧書きは定量限界 (0.5mg/L) 以下のため参考値

B 処理場の処理水の SS については、ろ過後の SS 濃度が定量限界下限値である 0.5 (mg/L) またはそれ以下であった。また塩素濃度について A 処理場の放流水において遊離塩素 0.02~0.19 (mg/L)、結合塩素 0.05~0.25 (mg/L) であった。A 処理場における消毒前アンモニア濃度は 0.6~1.5 (mg/L) 消毒後は 0.5~0.8 (mg/L) であった。

3.2 大腸菌群数及び大腸菌数の測定結果

対象処理場の放流水中の大腸菌群数は、A 処理場で $10^1 \sim 10^2$ (CFU/mL)、B 処理場では、定量下限値 0.03 (CFU/mL) 又はそれ以下の値で放流水質基準を満たす良好な処理が行われていた (図 1)。次に各工程の大腸菌群数及び大腸菌の除去率について説明する。除去率は下記の式 (1) で算出される対数除去率を用いた。

$$\text{対数除去率}(\log) = \log(\text{処理前の濃度}) - \log(\text{処理後の濃度}) \dots (1)$$

例: 除去率99.00%: 対数除去率2.0log、
除去率99.90%: 対数除去率3.0log

A 処理場の水処理工程及び消毒工程での平均の除去率はそれぞれ大腸菌群数 (特定酵素培地 (平板法)) で 2.19log 及び 0.57log、大腸菌数 (特定酵素培地 (平板法)) で 2.34log 及び 0.55log であった。B 処理場では、水処理工程、ろ過工程では、それぞれ大腸菌群数 (特定酵素培地 (平板法)) で 2.87log 及び 0.34log、大腸菌数 (特定酵素培地 (平板法)) で 3.23log 及び 0.46log (図 2) であった。B 処理場の消毒工程の除去率は平板法の測定結果が定量下限値以下であることから MF 法での検討を行った。大腸菌群数 (特定酵素培地 (MF 法)) で 2.66log、大腸菌数 (特定酵素培地 (MF 法)) で定量下限値を含む一点を除き 2.97log であった。次に、大腸菌群数、大腸菌数の測定法の比較結果について説明する。大腸菌群数、大腸菌数ともに測定法による差はほとんど見られなかったが、処理水において A 処理場の 12 月の MF 法を用いた大腸菌群数、大腸菌数及び 2 月の最確数法を用いた大腸菌群数、大腸菌数がそれぞれ

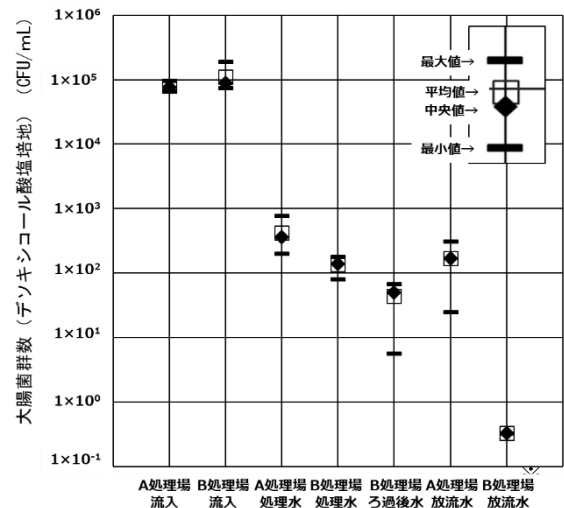


図 1 各工程の大腸菌群数 (デソキシコール酸塩培地) (※1 点除き定量下限値以下)

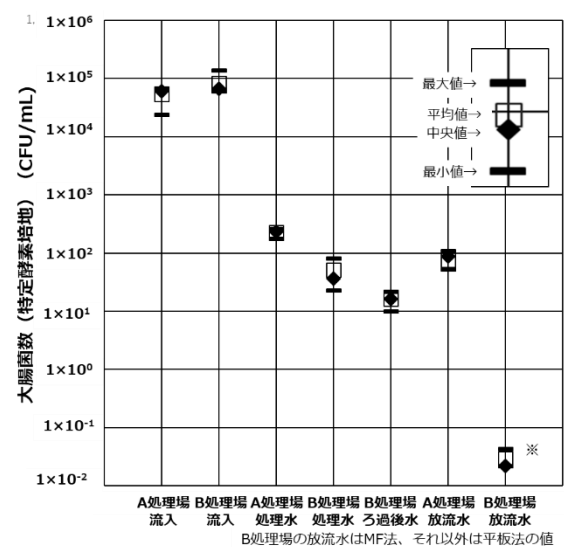


図 2 各工程の大腸菌数 (特定酵素培地) (※は MF 法、それ以外は平板法)

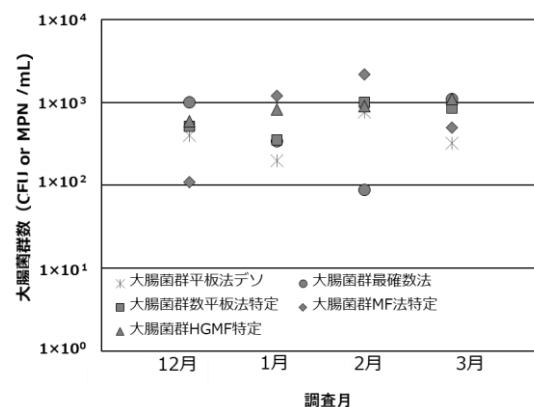


図 3 A 処理場における処理水中の測定法別の大腸菌群数

10⁻¹ から 10⁻² (CFU/mL)程度他の測定法に比べ低い値となった (図 3、4)。

次に測定法別の処理水中の大腸菌群に占める大腸菌の割合の平均値を図 5 に示す。処理水中の割合は、特定酵素基質培地を用いた A 及び B 処理場でそれぞれ平板法では 37%及び 29%、MF 法では 29%及び 13%、HGMF 法では 23%及び 14%、最確数法では、25%及び 32%となった。過去の調査⁵⁾では、処理水では概ね 20~40%の割合との報告がされており、本調査においてもやや低い値を示す測定方法があったものの同様の結果となった。また、流入水では処理水に比べ全体的に大腸菌の割合が高い結果となり、最確数法、平板法では平均値が 50%を超える割合のものもあった (図 6)。前述の除去率等から水処理工程において大腸菌群に含まれる大腸菌以外の菌に比べ大腸菌の除去率が大きいことが原因であると考えられる。例えば大腸菌群数に含まれる大腸菌以外の菌として *Klebsiella* 属は消毒抵抗性をもつなど大腸菌とは違う消長を示すものが含まれている。

3.3 嫌気性芽胞菌の測定結果

嫌気性芽胞菌は大腸菌等の細菌よりも消毒抵抗性が高く上水道では糞便性指標と合わせて消毒効果指標として用いられている⁵⁾。各工程の嫌気性芽胞菌濃度を図 7 に示す。A 及び B 処理場の流入濃度は 10³ (CFU/mL) 程度であり、放流水の濃度は A 処理場で 10¹ (CFU/mL) 程度、B 処理場では 10⁰ 程度 (CFU/mL) まで除去されていた。除去率は A 処理場の消毒工程及び放流水の平均で 1.78log 及び 0.17log であった。B 処理場の水処理工程、ろ過行程及び消毒工程ではそれぞれ 1.88log、0.63log 及び 0.64log であった。除去傾向は A 及び B 処理場の水処理工程における除去率の差はほとんどないが、水処理工程より後段では、塩素消毒を実施している処理場 A に比べ、ろ過+UV 消毒を実施している処理場 B の方が高い除去率であった。

3.4 ノロウイルスの測定結果

ノロウイルスによる感染性胃腸炎は毎年国内報

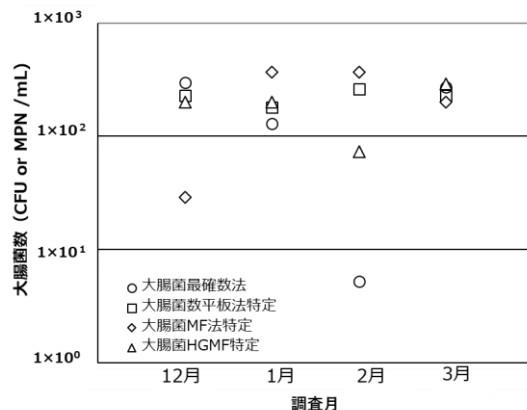


図 4 A 処理場の処理水中の測定法別の大腸菌数

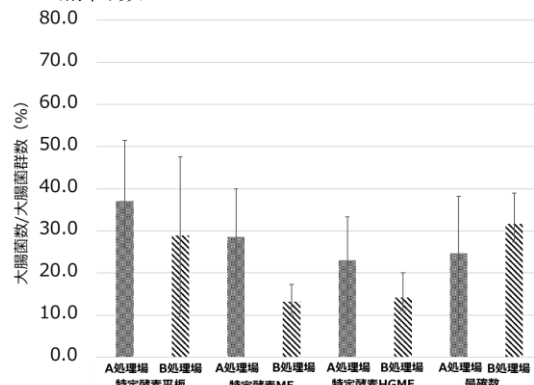


図 5 処理水の大腸菌群中の大腸菌の割合

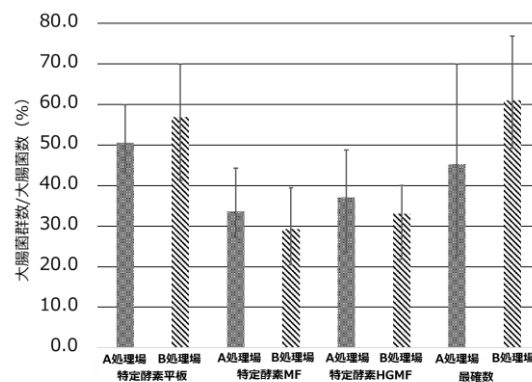


図 6 流入水の大腸菌群中の大腸菌の割合

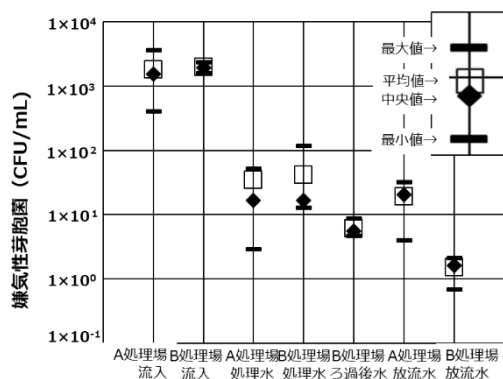


図 7 各工程の嫌気性芽胞菌濃度

告され、原因別の食中毒の患者数が最も多いといわれている⁶⁾。本調査におけるノロウイルス G2 濃度を図 8 に示す。A 及び B 処理場の流入濃度は 10^9 (copies/L)程度で放流水では 10^6 及び 10^5 (copies/L)程度まで除去された。除去率について、A 処理場の水処理工程及び消毒工程でそれぞれ 2.22log、及び 0.28log であった。B 処理場の水処理工程、ろ過工程及び消毒工程ではそれぞれ 3.02log、0.35log 及び 0.22log であった。除去傾向は、水処理工程より後段では A 処理場の塩素消毒のみに比べ B 処理場のろ過+UV の方が除去効果は高い結果となった。なお UV 消毒により不活化したウイルスであっても PCR で検出されてしまうため消毒効果の評価をする際は安全側の評価となることに留意する必要がある。

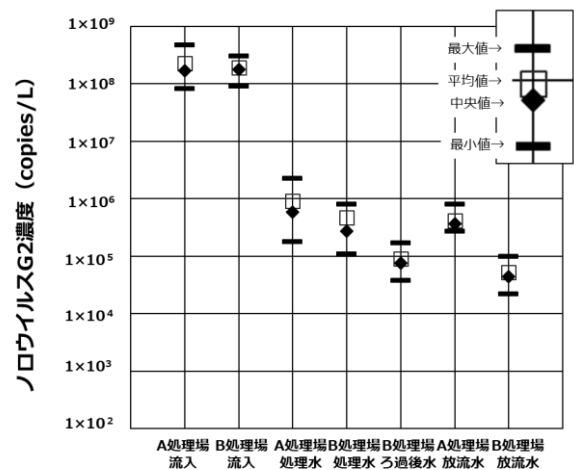


図 8 各工程のノロウイルス G2 の濃度

3.5 大腸菌ファージの測定結果

大腸菌ファージは水中における挙動がウイルスに似ていると想定され、様々な研究が行われている。また、ノロウイルスは培養法による測定法が確立されていないが大腸菌ファージは培養法による測定法が確立されている。そのためノロウイルスと大腸菌ファージの除去効果の違いをより詳細に検討することにより、ノロウイルスに対するリスク制御技術の評価に向けて大腸菌ファージの活用が期待される⁷⁾。本調査における大腸菌ファージ濃度を図 9 に示す。A 及び B 処理場の流入濃度は 10^5 及び 10^6 (PFU/L)程度で放流水では 10^2 及び 10^1 (PFU/L)程度まで除去された。除去率について、A 処理場の水処理工程及び消毒工程ではそれぞれ 2.17log 及び、0.44log であった。B 処理場の水処理工程及びろ過工程ではそれぞれ 3.51log、-0.1log であり、消毒工程では放流水の定量下限値以下の値を除いた除去率が 1.88log であった。除去の傾向は A 処理場においては他の生物と同様の傾向を示した。また B 処理場では、ろ過槽での除去効果がほとんど確認されず多くが UV 消毒により除去されていた。ノロウイルスと大腸菌ファージを比較すると A 処理場では各工程の除去率はほぼ同程度であった。B 処理場では、ろ過工程においてノロウイルスの除去は確認されたが大腸菌ファージの除去はほとんど確認できなかった。一方で全体の除去率については、ノロウイルスに比べ大腸菌ファージの方が大きくなっていった。B 処理場の比較についてノロウイルスを PCR 法、大腸菌をブランク法(培養法)で測定しており PCR 法による不活化したウイルス検出の可能性があるので、評価の際は安全側の評価になることについて考慮する必要がある。

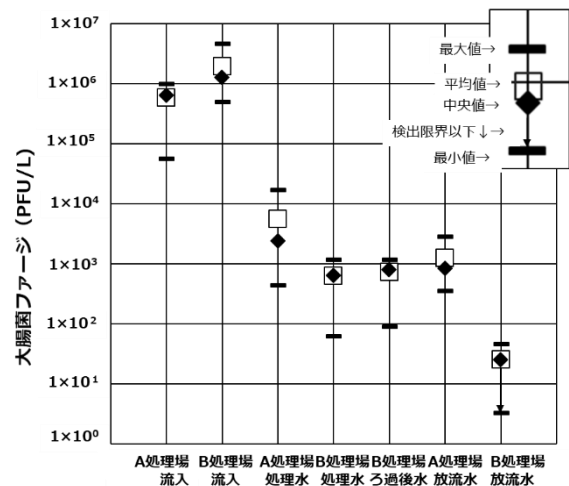


図 9 各工程の大腸菌ファージ濃度

4. まとめ

本調査では、大腸菌群、大腸菌及び指標生物となりうる微生物等について OD 法、標準法の 2 つの処理方式及び塩素消毒、ろ過+UV の 2 つの異なる消毒等の工程における挙動を把握した。調査期間中の 2 つの処理場の大腸菌群及び大腸菌数の流入水濃度は $10^4 \sim 10^5$ (CFU/mL)程度、水処理工程（B 処理場においてはろ過前まで）の除去率は 2 処理場とも 2~3log で水処理方法による大きな違いはなかった。一方、水処理以降のプロセスにおいては、除去率で 1log 程度差があった。また、大腸菌群に占める大腸菌の割合は処理水では概ね 20~40%の割合であり過去の知見と同様の結果であった。

その他の指標生物となりうる微生物等については、調査期間中の流入水濃度は、両処理場ともに、嫌気性芽胞菌で 10^3 (CFU/mL) 程度、ノロウイルス (G2) で 10^9 (copies/L)程度、大腸菌ファージ $10^5 \sim 10^6$ (PFU/L)程度であった。除去率については、A 処理場における各工程で調査期間中ほぼ同様の除去率で処理場全体の除去率も 2.9~2.5log 程度で、嫌気性芽胞菌は他の微生物に比べ 1 log 程度低い除去率であった。また、B 処理場における除去率は、A 処理場とほぼ同様の傾向となったが、ろ過工程で嫌気性芽胞が多く除去される一方、大腸菌ファージがほとんど除去されないこと、消毒工程において大腸菌ファージが他の微生物等より多く除去されるなどの差異があった。

今後も通年の調査を実施し、大腸菌等に関する過去の知見の確認及び下水道の放流水の適切な基準となりうる指標微生物についての実態を把握したいと考えている。

【参考文献】

- 1) 下水試験方法 2012 年度版上巻、公益社団法人日本下水道協会 P229,P245,p251,
- 2) 上水試験法 2011 年度版 V 微生物編、公益社団法人日本水道協会、P81
- 3) 諏訪守、尾崎 正明、岡本誠一郎、陶山明子：下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響, 下水道協会誌 Vol.46、 No.561、 pp.91-100、 2009
- 4) 厚生労働省：ノロウイルスの検出方法について、食安監発第 0514004 号最終改定、平成 19 年 5 月
- 5) 原田一郎、藤井都弥子他：下水処理施設への新たな衛生学的指標導入に関する検討、平成 24 年度下水道関係調査研究年次報告書集、国土技術政策総合研究所資料、No.773、pp59-66、 2014
- 6) 渡邊渡：好きになる微生物学、講談社、p84、 2015
- 7) 片山浩之：水環境とウイルス、ウイルス第 66 巻第 2 号、 pp.163-170、 2016