

1. 試験研究費による研究

1. 熱帯・亜熱帯地域の下水道施設計画に関する研究

下水道研究室 室長 井上 弥九郎
主任研究員 植松 龍二
三次処理研究室 室長 鈴木 穰
研究員 諏訪 守
平出 亮輔

[要旨]

本研究は、熱帯・亜熱帯地域の開発途上国に適した下水道技術の確立を目的としており、平成12年度は以下の研究成果を得た。

熱帯・亜熱帯地域の開発途上国では安定化池法、活性汚泥法、散水ろ床法、OD法及び曝気式ラグーン法が主に採用されている。このため、下水処理方式の選定においては、これらの処理法を建設・維持管理両面より整理すると共に、我が国において一般的でない安定化池法及び曝気式ラグーン法の設計手法について取りまとめた（詳細は参考文献1）参照）。

また、通性池および曝気式ラグーンについて、実験施設を用いて、処理の安定性向上方策、および適正な負荷条件等について検討した。

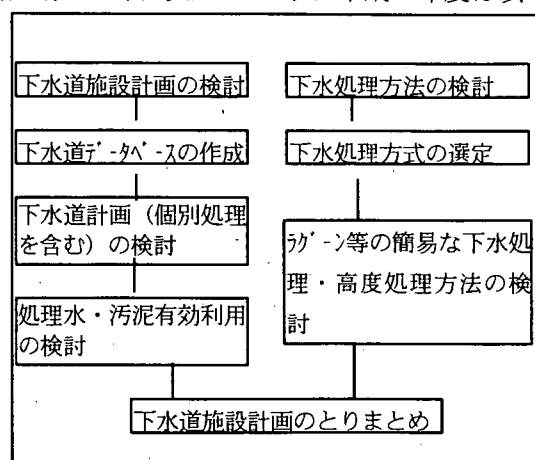


図-1 研究のフロー

1. 研究目的

熱帯・亜熱帯地域に属する開発途上国においては、経済の発展、人口の都市集中及び下水道の未整備等に起因する水質汚濁、生活環境の悪化に悩まされており、これらに対処するため、政府開発援助（ODA）の一環として、開発途上国の下水道施設計画・建設に関する援助への期待が高まっている。我が国の下水道技術は世界的にも最先端の水準にあるが、これをそのまま開発途上国に適用することは、経済・社会状況及び自然条件等を勘案すると、必ずしも最適とは言えない。このような背景から、本研究は、熱帯・亜熱帯に属する開発途上国の状況に適した下水道施設計画の確立を目的として実施した。

2. 研究方法

2.1 下水処理方式選定についての検討

熱帯・亜熱帯地域の開発途上国においては、気候、望まれる処理水準、支出可能な投資額（建設費、維持管理費）及び取得可能な用地面積等が先進国とは異なる。このため、これらの開発途上国では安定化池法、活性汚泥法、散水ろ床法、OD法及び曝気式ラグーン法が主に採用されている。そこで、海外の文献等を参考に、これらの処理法を建設・維持管理両面より整理すると共に、我が国において一般的でない安定化池法及び曝気式ラグーン法の設計手法について取りまとめた。

2.2 下水処理方式についての検討

沖縄県具志川浄化センター内に設置されたラグーン実験施設を用いて、沖縄県との共同研究により通性および曝気式ラグーンシステムについて実験を行った。通性ラグーンは、低水温期における除去性能を向上させる目的から11年度に設置した接触材の効果についての把握を行った。曝気式ラグーンは、11年度にはラグーン内MLSSの自己酸化係数の把握を行った。また、MLSS濃度上昇に伴う過剰時間の短縮の

問題等が明らかとなった。このため、12年度は攪拌強度を下げて沈みやすいSSを沈降させた状態での処理性能の把握を行った。

3. 研究結果

3.1 下水処理方式選定についての検討

(1) 処理方式の選定

処理方式を選択する際の評価事項の重要性は先進国と開発途上国においては差異があり、一般的には、先進国で決定的な項目は効率性、信頼性、汚泥処分、所要土地面積であり、これらは開発途上国においても重要ではあるが、その重みは先進国に比べると小さくなっている。これらに代わって開発途上国で決定的と考えられる項目は建設費、運転費、単純性であり、これらの項目は先進国でも重要であっても、決定的とは考えられない。したがって、開発途上国において下水道計画を行う場合は、処理方法については、建設費、維持管理費、維持管理の容易さ、除去効率及び所要土地面積を検討することが最低限必要であろう。Sperlingは、汚水処理方法を5つのグループ(安定化池法、活性汚泥法、散水ろ床法、嫌気性処理法、土壌処理方式)に分け、それぞれの特徴につき評価している(表1参照)。なお、同表の1人当たりの建設費は用地費・汚泥処理施設を含まない汚水処理施設のみであると考えられる。

(2) 安定化池法

表1 主要下水処理方式の代表的特性

処理方式	除去率				所要量		建設費 (US\$/人)	総水理的 滞留時間 (日)	汚泥処理量 (m ³ /人・年)
	BOD (%)	N (%)	P (%)	大腸菌群数 (%)	土地面積 (m ² /人)	電力 ^(b) (W/人)			
予備処理	0 - 5	- 0	- 0	- 0	<0.001	- 0	2 - 8	-	-
一次処理	35 - 40	10 - 25	10 - 20	30 - 40	0.03 - 0.05	- 0	20 - 30	0.1 - 0.5	0.6 - 1.3
通性池	75 - 85	30 - 50	20 - 60	60 - 99	2.0 - 5.0	- 0	10 - 30	15 - 30	-
嫌気性池+通性池	75 - 90	30 - 50	20 - 60	60 - 99.9	1.5 - 3.5	- 0	10 - 25	12 - 24	-
部分混合曝気式ポンド	75 - 90	30 - 50	20 - 60	60 - 96	0.25 - 0.5	1.0 - 1.7	10 - 25	3 - 9	-
完全混合曝気式+沈殿ポンド	75 - 90	30 - 50	20 - 60	60 - 99	0.2 - 0.5	1.0 - 1.7	10 - 25	4 - 9	-
標準活性汚泥法	85 - 93	30 - 40 ^(a)	30 - 45 ^(a)	60 - 90	0.2 - 0.3	1.5 - 2.8	60 - 120	0.4 - 0.6	1.1 - 1.5
長時間アレーション法(連続式)	93 - 98	15 - 30 ^(a)	10 - 20 ^(a)	65 - 90	0.25 - 0.35	2.5 - 4.0	40 - 80	0.8 - 1.2	0.7 - 1.2
回分式活性汚泥法	85 - 95	30 - 40 ^(a)	30 - 45 ^(a)	60 - 90	0.2 - 0.3	1.5 - 4.0	50 - 80	0.8 - 1.2	0.7 - 1.5
標準散水ろ床法	85 - 93	30 - 40 ^(a)	30 - 45 ^(a)	60 - 90	0.5 - 0.7	0.2 - 0.6	50 - 90	NA	0.4 - 0.6
高速散水ろ床法	80 - 90	30 - 40 ^(a)	30 - 45 ^(a)	60 - 90	0.3 - 0.45	0.5 - 1.0	40 - 70	NA	1.1 - 1.5
上向流嫌気性汚泥ブランケット法	60 - 80	10 - 25	10 - 20	60 - 90	0.05 - 0.10	- 0	20 - 40	0.3 - 0.5	0.07 - 0.1
腐敗槽+嫌気性ろ床	70 - 90	10 - 25	10 - 20	60 - 90	0.2 - 0.4	- 0	30 - 80	1.0 - 2.0	0.07 - 0.1
最初沈殿池+標準浸透	94 - 99	65 - 95	75 - 99	>99	10 - 50	- 0	10 - 20	NA	-
最初沈殿池+急速浸透	86 - 98	10 - 80	30 - 99	>99	1 - 6	- 0	5 - 15	NA	-
最初沈殿池+路床浸透	90 - 98	10 - 40	85 - 95	>99	1 - 5	- 0	5 - 15	NA	-
表面流し	85 - 95	10 - 80	20 - 50	90 - >99	1 - 6	- 0	5 - 15	NA	-

NA: 不適用

(a) 本処理方式を変形すれば栄養塩類を付加的に除去できる。

(b) 所要エネルギー量には結果として生じる流入下水の揚水は含んでいない。

安定化池法においては、特徴の異なる嫌気性池、通性池及び熟成池を適宜配列する。通常は、嫌気性池-通性池-熟成池あるいは通性池-熟成池のように直列に用い、直列の各段は2池以上で並列運転する場合もある。しばしば、嫌気性池は全体の所要用地面積削減のために第1ポンドとして用いられる。

1) 嫌気性池における処理

嫌気性池においては、大部分の浮遊物質はポンドの底に沈殿し、そこで、嫌気性分解、濃縮及び部分的な無機化を受ける。嫌気性細菌の代謝活動(呼吸作用及び繁殖)を通して、一部の有機物は無機物に変換される。この過程でガス、主としてCO₂、CH₄、H₂Sが発生し、これらのガスは液面を通過して大気中へと放散される。汚泥濃縮と共にこの反応により嫌気性池内で非常にゆっくりと固形物が形成される。蓄積汚泥の生成速度は年間1人当たり約40リットルである。嫌気性池では水面に形成されるスカム等のカバーにより不快臭が最小化されることとなっているが、臭気問題は予測し得ない状況(例えば温度の急激な低下)の結果として、つねに発生する可能性がある。通常、滞留日数として1~5日、水深として2.5~5.0mを採用する。設計方法は一般的には、容積負荷(λ)に基づき行われており、以下のような式が提案されている。なお、不快臭を避けるために、300gBOD₅/m³dという上限値が設定されている。

気温 $T < 10^{\circ}\text{C}$: λ ($\text{gBOD}_5/\text{m}^3\text{d}$) = 100、BOD 除去率 = 40%

気温 $T = 10 \sim 20^{\circ}\text{C}$: λ ($\text{gBOD}_5/\text{m}^3\text{d}$) = $20T - 100$ 、BOD 除去率 = $2T + 20$ %

気温 $T > 20^{\circ}\text{C}$: λ ($\text{gBOD}_5/\text{m}^3\text{d}$) = 300、BOD 除去率 = 60% (ただし現地状況により 60%以上の値も採用可能)

2) 通性池における処理

通性池は水深が浅く同容量の嫌気性池よりも表面積を大きくとって建設される。嫌気状態の下層の上に好気状態の上層が浮いた状態に保つ。上層の好気状態は溶存酸素によって生じる。この溶存酸素は主にポンドの藻類の上に日光が照射されて起こる光合成により発生する。上中層の好気性及び通性細菌は、溶解性、コロイド性、浮遊性有機物質を代謝し、その過程で溶存酸素を消費し CO_2 を生成する。この CO_2 は藻類の細胞物質 (有機炭素) へ変換される。また、通性細菌は遊離酸素を使い尽くすと硝酸塩及び硫酸塩の結合酸素を消費する。熱帯・亜熱帯地域では、(嫌気性池に続く) 第2ポンドとして用いられる通性池は、典型的な生活排水に対し最低5日間の滞留時間を保たなければならない。通性池を第1ポンドとして用いる場合は滞留時間は数十日となる。水深は通常 1.5~2mを採用する。負荷の大きいポンドは負荷の小さいポンドと比較して、沈殿汚泥の蓄積が非常に早く、メタン醗酵が良好に進んでいる場合の汚泥形成速度は年間1人当たり約30lである。通性池のBOD除去率は未ろ過サンプル(藻類が関与するBODも含む)で通常70~80%、ろ過処理サンプルで90%程度である。設計モデルは数多くあり一部は複雑なものであるため、開発途上国では比較的簡易な水面積負荷又はGloynaの式が広く採用されている。特に、通性池は上記で述べたとおり、ポンド内の藻類と細菌は密接に関連しており、日光(藻類の光合成に必要とされるエネルギー)はポンド表面に達するので、水面積負荷に基づいて設計される方法が、最も頻繁に用いられる。本方法についても数名の研究者がそれぞれ異なる式を提案しているが、例えばMaraは最大水面積負荷 L_s と気温 T_a ($^{\circ}\text{C}$) との関係、次式で表している。

$$L_s (\text{kgBOD}_5/\text{ha}\cdot\text{d}) = 350 (1.107 - 0.002T_a)^{T_a - 25}$$

一方、Gloynaによって提案された式は、通性池の滞留時間が比較的長いのでUBOD、そしてポンド水温を変数として、所要ポンド容量を求めるものである。この式により算出される設計値は、目標のBOD除去率を達成するばかりでなく美観的な公害、特に不快臭発生防止を勘案して、広範な安全性を与えるものである。

3) 熟成池における処理

熟成池は病原生物の減少を主たる目的に用いられている。ただし、実際は高濃度の糞便性細菌、ウィルス、原生動物、その他の病原菌の除去の他に、一部の藻類、栄養塩も除去される。熟成池における滅菌効果は、沈殿、日光紫外線の放射、高温度及び自然死等の幾つかの要因による。熟成池は通性池、または別の熟成池等からの流出水を高度化するためにのみ用いられる。熟成池は2つ以上を直列で配置する場合は一般的に滞留時間を3~10日(1つのみの配置の場合は最低5日)とし、典型的な水深は1.0~1.5mである。また、糞便性大腸菌の除去については、完全混合反応タンクにおける一次動力学によってモデル化できるとして、2池以上の直列のポンドでは、 N_i (流入水中の大腸菌数)、 N_e (流出水中の大腸菌数)、 K (反応係数 d^{-1})、 θ (滞留時間 d) を用いて次式のようなになる。

$$N_e = N_i / (K\theta_1 + 1) (K\theta_2 + 1) \dots \dots \dots (K\theta_n + 1)$$

また、 K は温度に従属しており、温度 $T^{\circ}\text{C}$ における K と 20°C における K の関係は次式による。

$$K_T = K_{20} \cdot \theta'^{(T-20)} \quad (\text{通常、} K_{20} : 2.6 \text{ d}^{-1}、\text{温度定数 } \theta' : 1.19)$$

設計においては上記の式を活用し、 N_e が規制値以下となるように、熟成池のポンド数を決定する。

(3) 曝気式ラグーン法

曝気式ラグーン法は、元々、冬期に光合成では微生物に必要な酸素量を供給できない北米地域の通性池のために開発された。しかしながら、エアレーターを設置すると2週間程度以内に、藻類が消滅し、微生物植物相は活性汚泥と同様になる。温度にもよるが、本処理法では滞留時間が2~6日(最も一般的な値で4日)である。また、流出水を放流する前に、熟成池又は沈殿池等により浮遊状態にある固形物を除去する必要がある。ポンドの水深は一般的に1.5~5mである。エアレーターによりポンド内に水の乱れが生じるため、堤防及びポンド底部を浸食・洗掘より保護することが必要である。また、曝気式ラグーン法は、完全混

合式と部分混合式に分類される。ポンドの形状は、完全混合式では通常正方形を、部分混合式では押し出し流れの状態に近づくように長さ：幅が3～4：1である長方形を採用する。

1) 完全混合式

固形物は常に浮遊状態にあり、BOD 除去率と流出水特性は一般に完全混合反応タンクにおける一次動力学モデルを用いて予測され、基本式は(2)4)の大腸菌の除去式と同様であるが、通常、定数 K_{20} は $2.5d^{-1}$ 、温度定数 θ' は1.085を採用する。なお、この場合の温度はポンド水温を使用する。また、酸素要求量は物質収支に基づく式を使って予測されるが、完全混合式においては固形物を浮遊状態に保つのに必要な動力はポンドに流入するBODを酸化するのに十分な酸素移動を起こすためのものよりも一般的に大きい。

2) 部分混合式

ポンド内の全ての固形物を浮遊状態に保つ必要はない。エアレーションは基本的には十分な酸素移動を起こすためのものであるが、攪拌により一部の固形物は浮遊状態となり、また一部の有機性物質は沈殿し嫌気性分解される。酸素供給量の差異以外に完全混合式と同様であり、通常BOD除去も反応速度は異なるが完全混合反応タンクにおける一次動力学モデルを用いて予測される。定数 K_{20} は $0.276d^{-1}$ 、温度定数 θ' は1.036を採用しており、完全混合式に比較して容積当たりの浄化率は小さい。なお、最近の研究によると押し出し流れモデル及び一次動力学を用いてより詳しく部分混合式の浄化率を予想できることが明らかとなっているが、現在まだ正確な反応速度の値が設定されていないため、完全混合モデルで算定されている。部分混合式では、下水がポンドを流下する間に有機性物質は酸化され削減されるために、必要な動力はポンドから次のポンドにいくに従って減少する。

3. 2 下水処理方法についての検討

沖縄県具志川浄化センター内に設置されたラグーン実験施設を用いて、沖縄県との共同研究により通性および曝気式ラグーンシステムについて実験を行った。

3.2.1 検討方法

(1)通性ラグーンによる処理の安定性：通性ラグーンは、水深2m、 $100m^3$ の池である。12年度は、11年度に引き続きHRTを30日(BOD面積負荷 $22.7kg/m^2 \cdot d$)に設定して、除去性能を向上させる目的から設置した接触材(運転日数：266日目より設置、形状：ひも状、材質：ポリプロピレン+ビコン製、全表面積：約 $730m^2$)の有機物等除去効果に関して把握を行った。また、浮草が水面に多量に発生し維持管理等に支障をきたしたため、運転当初より設置していた阻流板を350日目より撤去した。

(2)曝気式ラグーン：曝気式ラグーンは、水深2m、 $100m^3$ の池に曝気装置、後段に上向流ろ過装置を備える。曝気装置は、攪拌強度および曝気量の制御が可能なフロート式スクリュウ形である。上向流ろ過装置のろ材は、空隙率90%前後、比重1.0以下で、単位面積あたりのSS捕捉量が大きく長時間の連続処理に適した小型円筒形プラスチックろ材を用いた。12年度は、HRTを5～10日程度、最大酸素供給量を $100kg-O_2/d$ 、曝気装置の攪拌強度を30～60Hz、24時間曝気とし、主に攪拌強度を下げた場合の有機物等除去効果に関して把握を行った。

水質分析項目は、BOD、COD_{Cr}、K-N、NH₄-N、PO₄-Pおよび大腸菌群数とした。

3.2.2 検討結果

以下に示す検討結果は、運転日数が300日以前のもは11年度、それ以降は12年度のものである。通性・曝気式ラグーンとも11年度から連続運転を行っており、運転条件等変更に伴い、その結果等を評価する上で継続して記述した。

水温、pH、DOの推移について図-1～4に示す。夏季の高水温期は水温が約30℃で推移しているが、冬季には15℃程度となった。水温低下に伴い通性ラグーンの処理水のpHは7付近、DOレベルも低濃度となっており、藻類による光合成活性が低下したことが伺える。

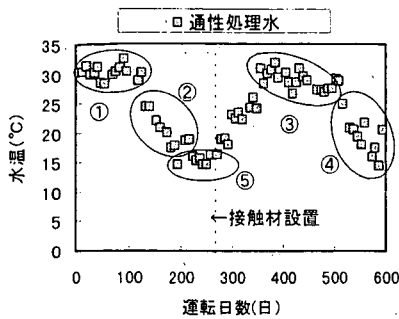


図-1 水温の推移

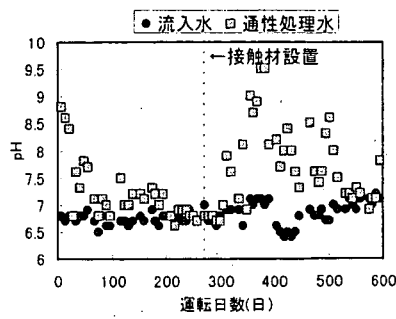


図-2 pHの推移

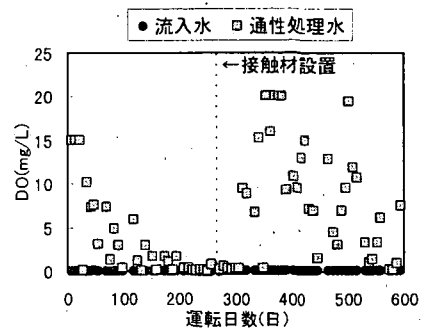


図-3 DO濃度の推移

各々のプラントの処理状況および流入下水の平均濃度について表-1に示す。全期間の平均で両施設ともT-COD_{Cr}の除去率は約60%、T-BODは約80%であり、有機物の除去は概ね良好であると考えられる。通性ラグーンでの高水温期①と低水温期⑤(ともに接触材なし)の除去率を比較すると、BOD、CODでともに10%程度、T-K-N、NH₄-N、PO₄-Pでは約20%の違いが見られた。また、高水温期①と③で接触材設置効果を溶解性試料で比較(③では阻流板を撤去したため)すると、除去率は各々の項目で数%程度向上しているが、水温低下期の②と④で接触材設置効果を比較した場合には、懸濁性試料のBOD、CODで10%程度、溶解性試料COD、PO₄-Pで20%程度除去率が向上している。これは、接触材設置経過に伴う付着生物量の増加や、DOレベルの上昇によるものと推定される。

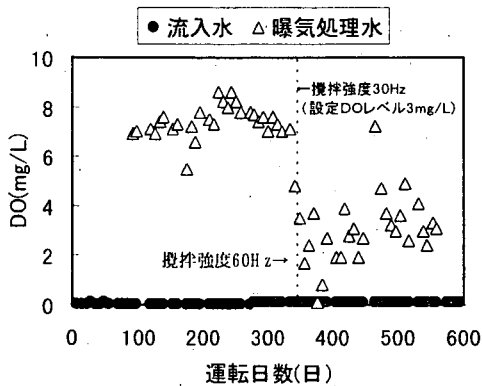


図-4 DO濃度の推移

表-1 通性・曝気式ラグーンの有機物等の除去率

流入下水の平均濃度 (mg/L)	通性	342	178	461	145	42	31	2.8	備考
	曝気	344	180	454	150	40	31	2.8	
項目		平均除去率 (%)							接触材の設置
運転条件等		T-BOD	D-BOD	T-COD _{Cr}	D-COD _{Cr}	T-K-N	NH ₄ -N	PO ₄ -P	
通性ラグーン	全期間平均	79.3	81.5	61.2	54.5	50.0	62.6	75.0	-
	高水温期①	81.3	84.9	66.7	55.6	59.3	72.8	79.3	なし
	高水温期③	77.8	87.6	54.0	61.1	53.2	73.9	90.9	あり
	水温低下期②	75.0	78.8	54.6	41.5	42.7	54.5	57.1	なし
	水温低下期④	85.9	91.5	65.3	62.8	43.8	54.1	77.4	あり
	低水温期⑤	72.4	69.0	49.1	44.1	41.6	48.1	56.3	なし
曝気式	全期間平均	82.7	86.6	65.0	67.5	57.6	70.6	46.4	-
	HRT15日	91.7	99.1	69.0	77.8	79.4	98.4	42.9	-
	HRT10日①	91.7	97.9	57.7	76.1	74.7	98.8	46.7	-
	HRT5日	-	-	61.3	63.4	46.4	54.9	37.0	-
	HRT10日②	91.7	95.0	73.0	71.2	68.4	84.9	73.3	-

※流入下水の平均濃度は、全期間のものであり運転方式別等の流入下水の平均濃度とは若干異なる。

また、通性ラグーンの処理水のpHとDOレベルも接触材設置前の水温低下期の②と比較すると④では高くなっており、藻類による光合成の活性化が計られているようである。しかし、T-K-N、NH₄-Nの除去に関しては、接触材設置に伴う改善効果はあまり見られなかった。大腸菌群数の推移について図-5に示す。流入下水の平均濃度は約 3.9×10^5 個/mLであり、通水当初の除去率は99.7%と比較的高かったが、運転日

数が500日以降では93%程度の除去率で安定している。

曝気式ラグーンは、HRTが短くなる程、有機物等の除去率が若干低下していた。また、曝気式ラグーンのNH₄-N濃度の推移について図-6に示す。HRTが15、10日の場合には処理水中のNH₄-N濃度は1mg/L以下であるが、HRTを5日にした場合には、ラグーン槽内にDOが存在していても硝化されず処理水中のNH₄-N濃度は上昇したが、HRTを10日に変更すると、処理水中のNH₄-N濃度は低下した。これは、HRTが5日程度では槽内に硝化細菌が保持されないためであると推定される。大腸菌群数の推移は図-5に示したが、HRTが15、10日ではともに除去率は98%以上であるが、HRTが5日では92%に低下した。

曝気式ラグーン後段に設置した上向流ろ過装置のSSの捕捉状況について、図-7に示す。処理水のSS濃度が高い場合には、比較的良好にSSは捕捉されているが、攪拌強度を下げた場合には、SSは捕捉されにくくなっている。

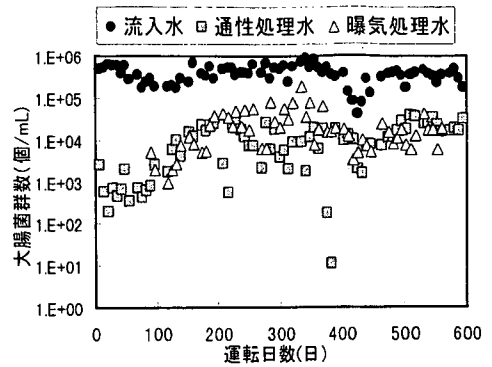


図-5 大腸菌群数の推移

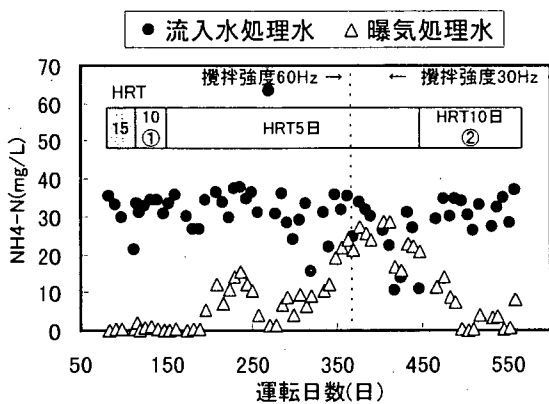


図-6 NH₄-N濃度の推移

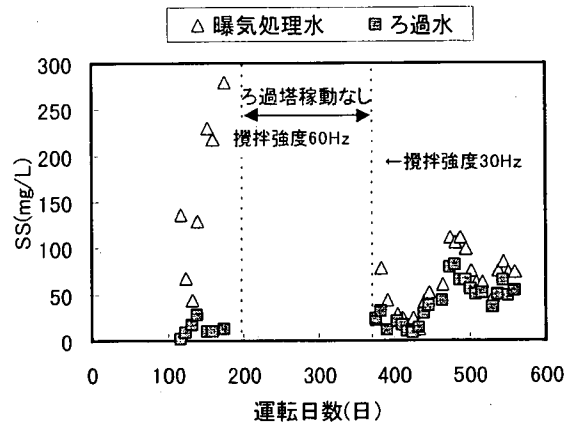


図-7 SS濃度の推移

しかし、攪拌強度を30Hzに弱めたことにより、処理水のSS濃度の低下が図られており、100mg/L程度で推移している。また、HRT10日①と②で他の水質項目を比較すると、T-COD_{Cr}とPO₄-Pで15~20%程度除去率が向上している。さらに、HRT5、10日②では、ろ過を行っていない処理水のT-BOD濃度は約30mg/Lであり、有機物除去は良好であった。

3. 3 まとめ

12年度は11年度に引き続き、通性・曝気式ラグーンの有機物質の除去効果に関して把握を行った。検討結果を要約すると以下のとおりとなる。

- ①通性ラグーンでの高・低水温期の除去率を比較すると、BOD、CODはともに10%程度、T-K-N、NH₄-N、PO₄-Pでは約20%の違いが見られた。
- ②通性ラグーン内に接触材を設置することで、水温低下期における有機物等の除去率は向上した。
- ③曝気式ラグーンは、攪拌強度を下げることで生物処理水のSSを下げ、HRTが5、10日ともにBOD 30mg/L程度の処理水が得られた。しかし、HRTを5日とした場合にはNH₄-Nがほとんど除去されなくなった。

おわりに、本検討を行うにあたり、多くの便宜をはかっていただいた沖縄県・具志川浄化センターの皆様、深く感謝いたします。

参考文献 1) 熱帯・亜熱帯地域における下水道計画に関する調査、土木研究所資料、第3778号、2001年2月

2. 汚水性状と管路施設の劣化に関する調査

下水道研究室 室長 井上 弥九郎
主任研究員 檜物 良一
研究員 豊田 忠宏
交流研究員 能勢 正樹

1. はじめに

下水道普及率も 60 %となり下水道事業も建設から維持管理の時代へと大きく変化する時期を迎えようとしている。また普及率の向上に伴い、下水道管路施設のストックは膨大な延長となっている。これまでに蓄積された管路施設のストックの内大部分を占める昭和 40 ~ 50 年代以降に建設された下水道施設では、主に分流式下水道が採用されている。分流式の汚水性状は大都市を中心に戦前から建設されてきた合流式下水道とは異なるため、汚水性状に起因する管路施設劣化について十分な知見が得られていない状況である。特に分流式汚水管渠については、その原理からして汚水の希釈や管渠内の雨天時のフラッシングといった効果は期待できないため、合流式に比較して劣化が容易に進行する恐れがある。さらに環境面では臭気対策など、生活面から節水などの下水道を取り巻く状況が変化するにつれ、一段と汚水性状が変化を来す要件が増している。これらの要因の結果として、管路が急速に劣化していく事例が報告されている。

また管路施設が劣化した場合の改築更新計画は、従来は主に大都市で得られた知見を活用してきた。しかし今後必要性の高い分流式下水道管路施設の補修技術と更新計画の策定にあたっては、分流式の状況下に対応したコンクリート製管路施設の劣化メカニズムを把握することが不可欠である。そこでこれらの管路施設の寿命制限因子となる腐食等による劣化に汚水性状の変化が与える影響についての知見を得るために調査を行い、管路施設の劣化診断技術に関する基礎情報と、劣化診断・対策技術の一般化、および健全度評価技術の開発のための基礎資料を整理を行う。そしてそれをもとに劣化箇所毎に補修・更新の必要性の有無を把握し、合理的な補修・更新計画に反映させることを目的とする。

2. 調査対象としての流域下水道

本調査の趣旨に合致する対象として、全国の流域下水道の管路施設に関する調査を行った。流域下水道事業は昭和40年に大阪府の寝屋川流域下水道で開始されて以降の事業のため、経過年数は最長で37年と土木構造物の耐用年数を超過していない。そして排除方式は初期のものを除いて基本的に分流式を採用しているため、分流式独自の現象調査に適している。

汚水は流下中に好気状態や嫌気状態を経ることで生物的又は化学的にその性状が変成する。特に管路施設の途中に存在しているポンプ場や圧送管路・伏越し等の汚水が極端に嫌气的となる箇所では、汚水性状の変成が急激に進行している場合がある。汚水中で硫酸イオンを還元し硫化物が生成することは、その現象の一例である。そして生成した硫化物は下流側の管路内で気中に硫化水素として放出され、管路施設の腐食の原因となる。従って管路施設の腐食状況を調査するにあたって汚水性状の変成状況を把握することは重要である。流域下水道は処理区域が大きいので、管路延長は長大であり、流下中の汚水性状変成現象が生じる可能性が高いと予想される。

3. アンケートによる流域下水道の現況調査

(1) 概況

全国全ての流域下水道管路施設を対象にアンケート調査を行った。調査年度は平成 10 年度とし、平成 10 年度中までに供用を開始した 149 処理区から回答を得た。

各処理区の供用開始以来の経過年数は、11 年～ 15 年までが最も多く、大多数は 30 年以内に供用した処理区である。管路施設は土木施設であり耐用年数は 50 年以上といわれている。従って流域下水道の管路施設は、老朽化し補修更新工事を必要とするにはまだ十分間があるはずである。

次に整備状況を図 1 に示す。人口普及率は約 60 %であるが、処理区毎の差が大きく低普及率の箇所から高普

及率の箇所までどの普及率でもまんべんなく分布している。これに対して計画汚水量に対する流入実績では 50 %以上が2割以下となっており、終末処理場建設はこれからの事業であることを示している。これに反して管渠は、計画延長の 80 %以上が整備済みの処理区が約 2/3、60 %以上整備済みでは9割以上となっている。このことは流域下水道では管渠の建設はほぼ概成し建設から維持管理が主体の時期となっていることを現している。従って今後一段と管路施設の劣化や補修に関する知見の必要度が増していく。

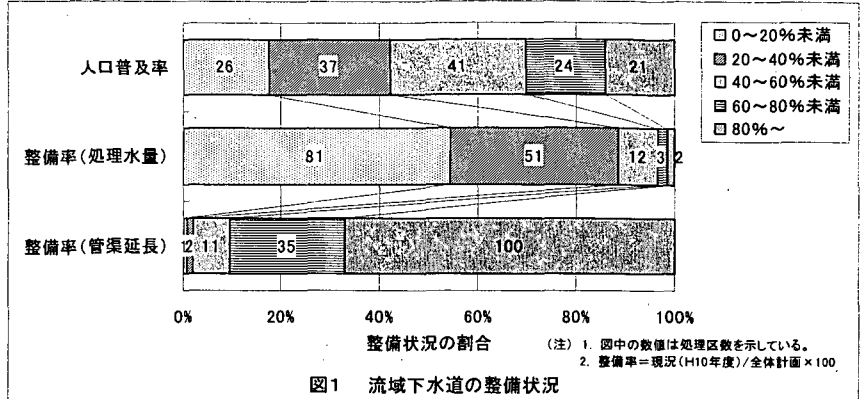


図1 流域下水道の整備状況

(2) 管路施設の腐食発生状況

①腐食発生の有無

管路施設の腐食が生じていると回答した処理区は、全体の31 %である。しかしこれはその程度の頻度でしか腐食が生じないことを示しているわけではない。腐食についての調査を行っている処理区は 58 %しか無く、残りの処理区では調査すら行われていない。調査有りの箇所に限ってみると過半数の処理区で腐食は発生している。また調査を行っていない処理区の内 1/3 以上が腐食は生じていないと回答している。これは腐食のみならず管路施設の管理上からも危険な兆候である。後に述べるように管路施設の腐食・劣化は非常に速やかに生じている。調査無しの場合腐食が無いと回答している下水道管理者は、腐食の有無に関して確認がされていないことを示している。管路施設の腐食は特定の地域で生じる特異な現象ではなくどこにでも生じる可能性が有るため、日常の点検管理は非常に重要である。

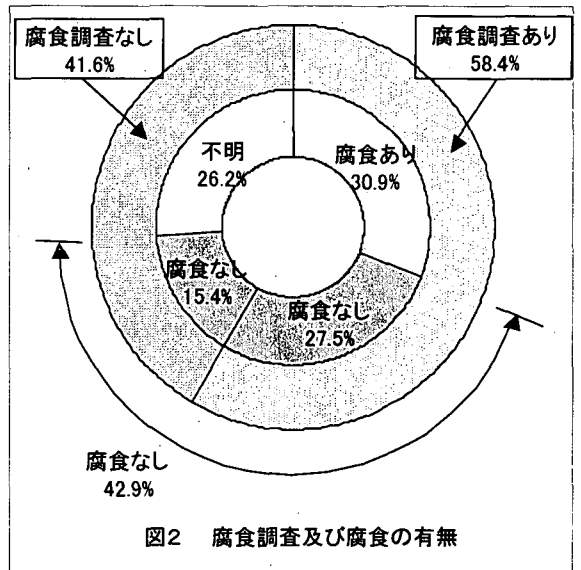


図2 腐食調査及び腐食の有無

②腐食発生箇所

腐食有りと回答した処理区で、腐食が生じた箇所の特性について調査した(図3参照)。最も多く生じている箇所は汚水を圧送した下流側で自然流下になった地点である。これはこれまで土木研究所で行ってきた調査結果と同じく、圧送管路内で汚水が嫌気化し硫化物が生成していることを表わしている¹⁾。そして自然流下となった箇所で硫化物は硫化水素として気化し、さらにコンクリート表面で酸化され硫酸が生成しコンクリート構造物を腐食させていると考えられる。流入汚水の水質が原因で腐食が生じているのは温泉排水と工場排水の場合であるが、その度数は各々4箇所と2箇所とその割合は小さいものである。したがって腐食が生じてい

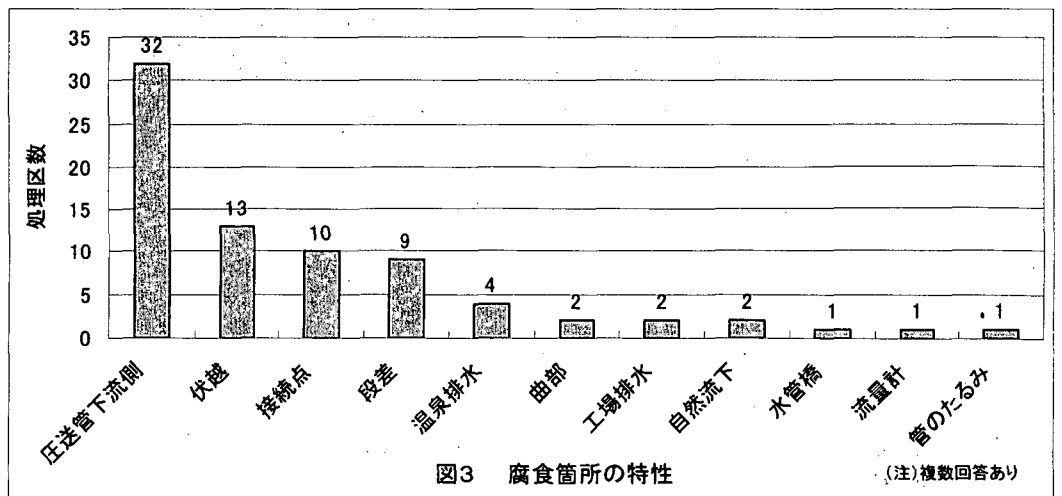


図3 腐食箇所の特性

る大部分の箇所の汚水性状はごく一般的なものであると見なされる。これは腐食は特殊な水質環境下で生じるものではなく、通常の汚水水質である何処の処理区でも起こり得る現象であることを示している。また伏越しや水管橋・流量計設置箇所・管のたるみでは汚水が滞水する事や堆積物が生じやすいため、汚水は嫌気化し硫化物が生成しているため腐食が生じている。また、接続点や段差部・管路の曲部では汚水が水理的に乱されることで、汚水中の硫化物が硫化水素として気化しやすい環境となっている。従ってこれらの箇所で腐食が生じていることはその腐食箇所よりさらに上流側で硫化物の生成が行われていることを示している。つまり上流側には圧送管や伏越など汚水が嫌気化する箇所が存在する可能性が高い。以上の事から腐食が生じた箇所の共通点は、硫化水素が発生する環境下にあるということである。流域下水道のように供用開始以来 30 年以内のまだ十分に耐用年数が残っている管路施設の腐食要因は、ほとんどが硫化水素によるものであることが判る。なお戦前から下水道整備を行っている政令指定都市では、これまで挙げた箇所の他に管路施設の老朽化やビルピット排水流入箇所においても腐食劣化が生じている。

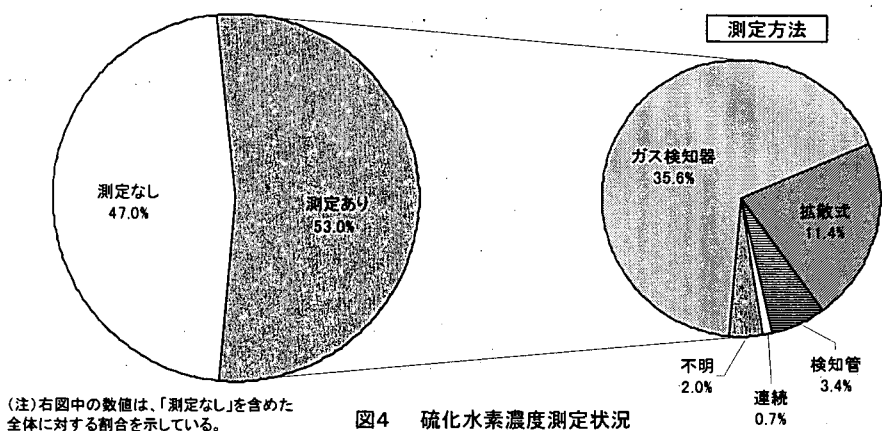
ところで地域的な分布では腐食が生じた処理区は本州の日本海側に比較的多く見受けられている。聞き取り調査によれば、その原因は汚水水質に共通の要因があるためではなく、近隣の県同士での情報交換を行い地域全体として硫化水素腐食についての認識度が高いことが寄与していることが伺えた。

③硫化水素測定状況

管路内での腐食の主因は硫化水素によるものと判断されることから、硫化水素の測定状況を調査した。その結果図 4 のとおり過半数の 53 % で調査有りと回答している。ところがその測定法の内容を精査すると、図 5 に示すとおり測定方法によって硫化水素濃度に大きな違いが見られる。

最も多く使われている簡易型的气体検知器は、測定有りのうち約 2/3 を占めている。ところがこの方法では人孔蓋が解放された状態で測定することとなる。硫化水素の比重は空気とほぼ同じであるから、このような状態では容易に拡散する。ガス検知器での測定値は 0 付近に集中しているが、実際に硫化水素が発生していないのか拡散した結果なのか区分できない。故にガス検知器での測定値は硫化水素の有無の判断や維持管理作業を行う際の安全上の目安として使用できるが、定量的な考察の対象とはなり得ない。また検知管では測定時点での濃度は測ることが出来るが、経時的に連続測定を行うことが多大な労力が必要である。硫化水素濃度は時間的に非常に大きく変動するため、瞬時値では最大値や平均値に比べて評価しきれない。検知管での測定値は瞬時値であるため、連続測定できる拡散式に比べて相対的に低い結果となる原因だと考えられる。

管路施設への硫化水素曝露量を正確に把握するためには、密閉された状態で連続的に測定する必要がある。土木研究所の共同研究の成果の一つである拡散式硫化水素測定器はこれらの条件を満たしているが、11 % の処理



(注)右図中の数値は、「測定なし」を含めた全体に対する割合を示している。

図4 硫化水素濃度測定状況

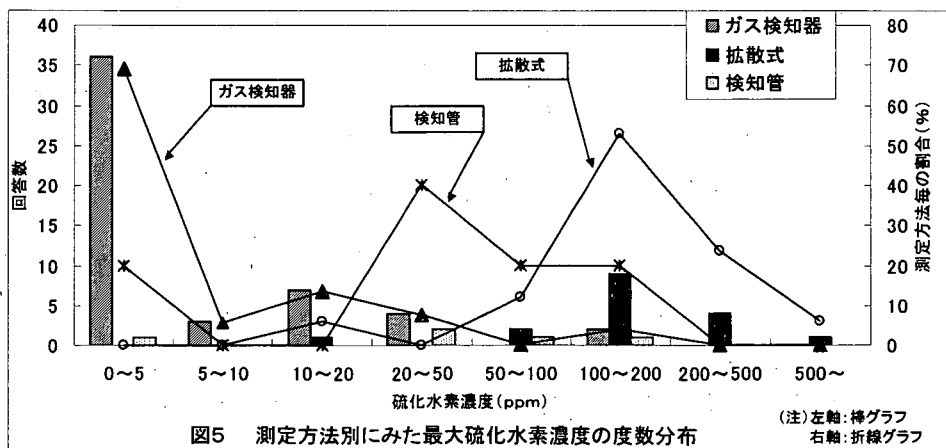


図5 測定方法別にみた最大硫化水素濃度の度数分布

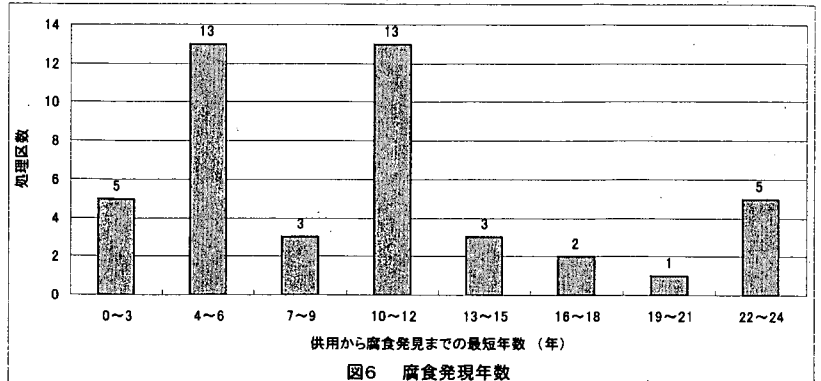
(注)左軸:棒グラフ 右軸:折線グラフ

区でしかまだ使用されていない。正確な状況把握のため、早急な普及が待たれる。拡散式で測定された値は 100ppm 以上がほとんどである。腐食が特に問題化している箇所であるからこそ拡散式測定器を採用していると考えられるため元来高濃度の硫化水素が発生している処理区である可能性もあるが、測定方法別の濃度分布から判断すれば、他方式に比較して拡散式測定器の優位性は明らかである。

なお、半数近くが硫化水素の測定を行っていない。労働安全規則では硫化水素の許容値は 10ppm とされており、腐食のみならず作業環境の観点からも管路施設の維持管理作業時に硫化水素の発生に注意しない行動は非常に危険である。

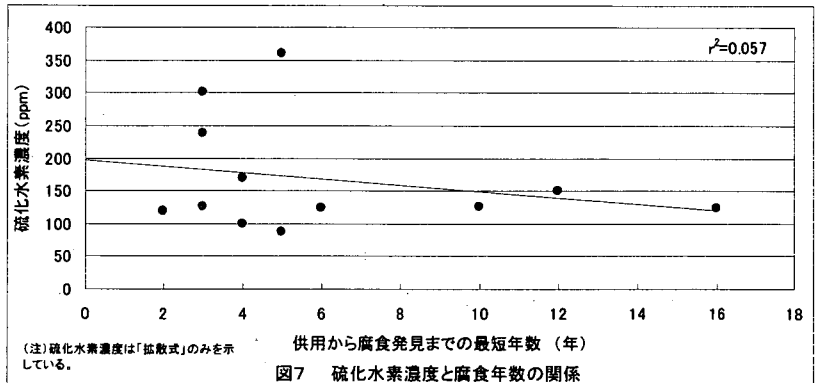
④腐食発現まで期間

腐食があった処理区で下水道管理者が管路施設の供用後、腐食に気づくまでの最短年数を図6に示す。これはあくまで気づくまでの年数であり、実際の腐食はこれ以前の何れかの時点で生じている。全体の3/4以上が12年以内となっている。さらに6年以内で40%を占めており管路施設の腐食は非常に速やかに生じる現象である。土木構造物の耐用年数は50年以上と考えられており、このような急激な劣化は想定されていない。管路施設の場合は、硫化水素腐食の恐れがある箇所について、定期的に例えば3年に1度以上の頻度での調査を行う必要があると考えられる。



⑤腐食速度と硫化水素濃度の関係

硫化水素ガス濃度測定法として最も信頼できる拡散式測定器による計測値と腐食発見までの期間の関係を図7に示す。全体的には、硫化水素濃度が高いほど腐食は早く生じる傾向が見られる。そして硫化水素最大濃度が100ppm以上ではほぼ確実に腐食が進行しており、その結果5年以内で発現する可能性が高い。硫化水素濃度と腐食発見年数に明確な相関が得られなかった原因は、腐食状況の判断が自治体により一様でないこと、管内調査を毎年行っていない自治体が多いこと、腐食したコンクリートの劣化状況分析を行っていないこと等が挙げられる。

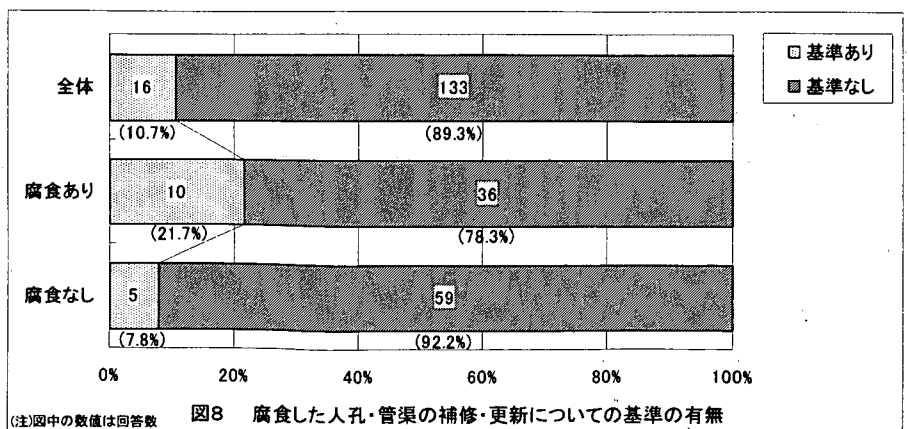


硫化水素濃度とコンクリート腐食に関して定量的な関係を得るためには、硫化水素がコンクリート中のCaと反応して固定化されていくため、長期間にわたる連続測定を行い硫化水素の曝露量を積算して算出する必要がある。供用初期当初は、特に注意が必要である。汚水量が少ないためポンプ場や圧送管路内での滞留時間が長くなり強い嫌気状態となるため、硫化水素は非常に高い濃度で発生する可能性が高い。腐食発見時点での硫化水素濃度だけでは評価するのではなくそれまで経時的な曝露量を把握する必要がある。また腐食速度に影響を与える硫化水素以外の環境要因として気温、湿度、結露の有無等が挙げられる。

腐食した人孔・管路の補修・更新についての基準の有無

⑥腐食後の対応

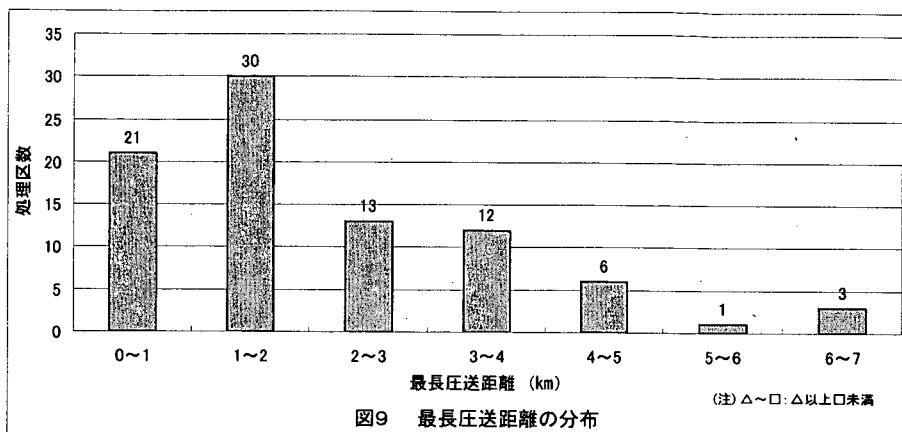
管路施設の腐食はこれまで述べた



ようにいろいろな箇所で生じてきているが、それに対する補修更新に関する基準について図8に示した。腐食有りと答えた処理区においても約20%しか基準を有していない。全体では約90%が基準を持っていない。同様に腐食したコンクリートに関する調査についても腐食有りの箇所のうち、35%しか実施していない。今後増加が予想される管路施設腐食に対する自治体側の準備は、まだ整っていない状況である。

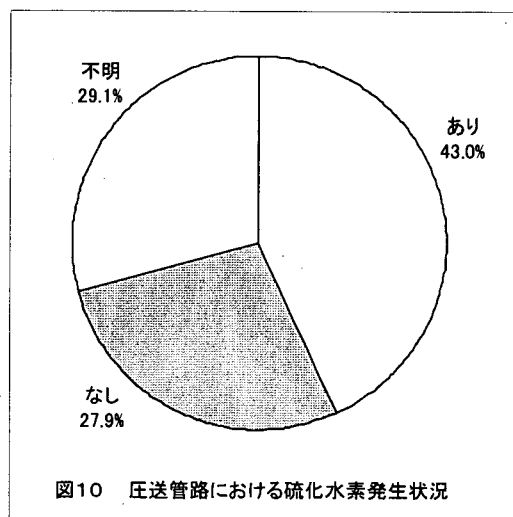
⑦ 圧送管路の状況

硫化水素生成の主たる原因は污水圧送である。調査した流域下水道149処理区のうち86処理区で污水圧送が行われている。圧送区間は284箇所あり総延長は385.5kmにのぼっている。1箇所当たりの平均延長は1357mとなる。圧送管路施設でこれまで実施してきた調査結果から判断すれば、この圧送延長は硫化水素が発生するに十分な延長である。処理区毎の圧送管路最長延長の分布を図9に示す。

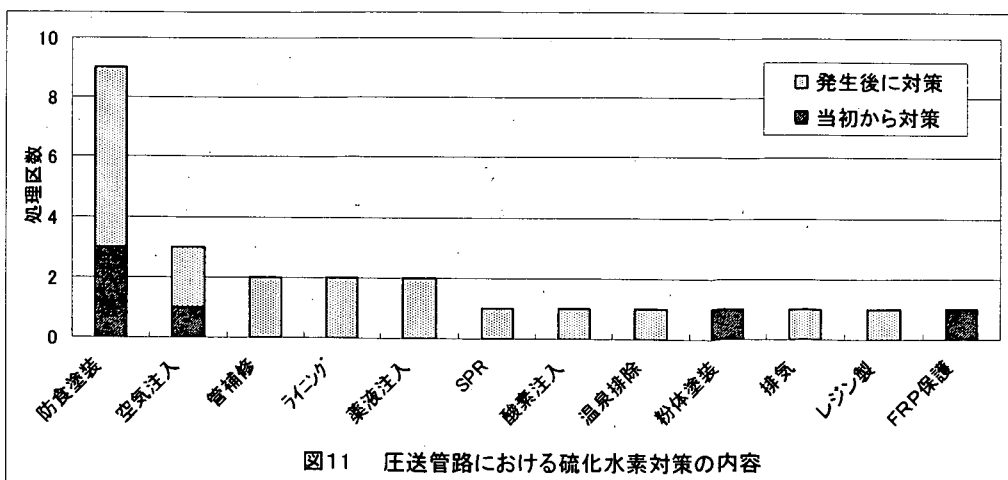


2 km以上の長距離圧送が1/3以上を占め、最長6600mとなっている。これらの圧送区間のポンプ運転状況は、1日の内稼働している時間が平均9時間となり、停止している時間の方が長くなっている。さらに6時間未満の箇所が39%となっている。ポンプの停止中に污水は圧送管路内で滞水し、長時間嫌気性下にあるために硫化水素が多量に生成する。汚水量が計画量に比べて少ないことも一因であるが、硫化水素腐食に対しては危険側となる運転を行っている。

ところが圧送管の下流側において硫化水素が発生していると回答した処理区は43%にすぎない。不明の箇所はともかく無しと回答した処理区も28%に及んでいる(図10)。しかし圧送管路延長や地域性に関して硫化水素発生に有意な差が見られなかったため、これらの処理区において硫化水素が発生している可能性もある。特に調査無しで無しと回答している処理区では早急に調査を実施し現況の確認を急がなくてはならない。



圧送管路下流側における硫化水素腐食対策は図11のとおりである。供用開始以前から行っている処理区は少なく、大多数は腐食が生じたための後追いの対策を実施していた。腐食した箇所の防食が最も多い。現時点では圧送管内で硫化水素が生成し腐食の原因になるという認識がまだ一般に広まっていない。しかし今後は污水圧送を計画する時点で硫化水素腐食に関する検討は必要不可欠の課題とすべきである。対策の内容は大きく2点に分類される。



第一は圧送管内において硫化水素の生成を防止することである。例えば硫黄分の多い温泉排水を分離することや

圧送管路内が嫌気化することを防ぐため空気・酸素や薬剤を注入する方法が行われている。第2は硫化水素ガスが発生している又は発生が予見される箇所において防食性の材料を用いる。それ以外に管路内の換気することで硫化水素濃度を低下させている処理区もある。その発生箇所の特性を考慮し、最適な方法を採用していくことが望ましい。

4. 管路施設内での汚水の水質挙動について

流域下水道は処理区域が大きいと、汚水の流下距離も長大である。アンケート調査では最長 56.9km、計画延長平均 20.6km、供用延長平均 18.6km となっている。流速 1m/sec で流下するとして、計画延長平均で 5.7 時間、最長で 15.8 時間となる。実際には途中にポンプ場や伏越など汚水が滞流する施設があるため、処理場に流入するまで 1 日以上経過する場合もあると思われる。

このように汚水が流下する際、管路施設内における水質変化一例を以下に示す。図 12 はある流域下水道の汚水継ポンプ場における調査結果である。汚水が嫌気化した際発生する代表的な物質である全硫化物と溶存メタ



図12 沈砂池での水質変化

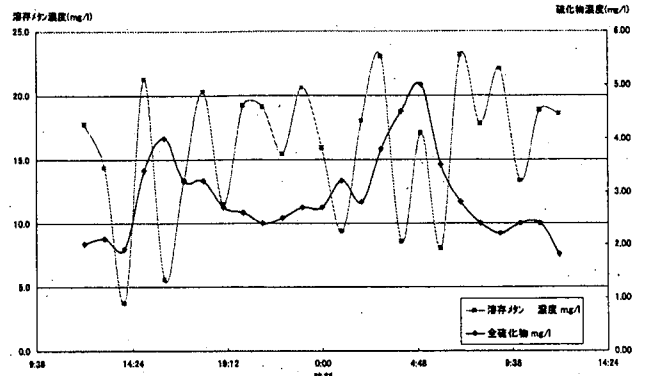


図13 7250m下流での水質変化

ン濃度について、経時変化を表したものである。ともに深夜から早朝にかけて濃度が上昇している。これはこの時間帯は汚水流量が一日で最も減少するため、ポンプ場上流部で汚水が嫌気化しているためと考えられる。また図 13 はそのポンプ場から 7,250m 下流側の人孔での水質経時変化である。沈砂池と比較して濃度の増減が見られることから、ポンプ場下流の自然流下区間においても物質毎に生成や分解・空気中への放散などの現象が生じていることが示されている。汚水は処理場まで流下する間に水質的に変動していることは明らかである。今後管路施設内での汚水水質の挙動を把握することで、腐食対策のみならず処理場機能の一部を担うことも期待される。

5. まとめ

本年度の調査結果は以下のとおりである。

- ①流域下水道を対象に調査した管路施設の腐食は、汚水が流下中に変質し硫化水素が発生することが主な原因であった。汚水から硫化水素が生成している箇所は圧送管など汚水が容易に嫌気化している地点である。その腐食現象は速やかであり、早い箇所では2～3年で管路施設の劣化が生じている。このような地点では硫化水素が100ppm以上発生している事例が見られた。
- ②硫化水素の発生によるコンクリート腐食について、下水道管理者間で意識の相違が大きい。施設の延命化・事故の発生・維持管理作業の安全性確保のため、全ての管理者が硫化水素に起因する施設劣化問題を認識し対応する必要がある。それに伴い硫化水素腐食に関する定量的な検討の精度を上げることができる。
- ③管路施設の流下中に汚水は、嫌気化・好気化などの環境変化により、その水質が大きく変化している。

<参考文献>

- 1) 田中、北川他「下水道施設における経済的な硫化水素対策技術の開発に関する共同研究報告書」、共同研究報告書整理番号第194号、1998

3. 水循環健全化のための環境ホルモン等リスク対策の調査検討

三次処理研究室 室長 鈴木 稔
主任研究員 小越 眞佐司
STA 710-研究員 金 時俊

1. はじめに

環境水中で女性ホルモン作用を発現する物質（以下、環境ホルモン等という）のうち、ノルフェノールと女性ホルモンである17βエストジオールは下水処理水中でも検出頻度が高く、除去が十分に行われていない可能性がある物質である。これらの2物質を対象として下水処理過程における除去機構を明らかにし、処理条件の改善によって除去率を向上させる手法や分解能力の高い微生物等を用いてより効率的な除去を行う方法の基礎的検討を行っている。

11年度に実施した研究の結果以下の成果が得られた。

1) 下水処理場の活性汚泥から17βエストジオールを分解する微生物14株、ノルフェノールを分解する微生物6株が分離された。これらのうち17βエストジオールを分解する微生物は全て17βエストジオールをエストロンに変換するものであった。しかし、これらが単離される前の集積培養液中にはエストロンの残留が認められなかったことから、17βエストジオールは、複数の微生物の作用によってエストロンを経て更に他の物質へと変換されていることが示唆された。一方、単離されたノルフェノール分解微生物によるノルフェノールの分解率は最大で約62%にとどまっており、更に分解率の高い微生物の探索が必要と考えられた。

2) 活性汚泥中の環境ホルモン等の集積部位を検討するため酸、アルカリ、メタノール、ヘキササン等による短時間の振盪抽出を行ったが、活性汚泥間隙水と同等以上の濃度で抽出された物質はなかった。したがって、活性汚泥に移行した環境ホルモン等はこれらの抽出液によって容易に抽出される状態に無いと考えられた。

3) ルーズ RO 膜による純水中に存在する環境ホルモン等の分離実験の結果、17βエストジオールの分離性は操作圧力に依存しないが、ノルフェノールの分離性は圧力依存性であり、操作圧力が大きい方が高い分離率を示した。

11年度の結果に基づき、12年度は以下の検討を実施した。

1) 下水処理場等の活性汚泥から、17βエストジオールの一次代謝産物と考えられるエストロンをさらに分解する微生物の探索を行った。また、11年度に分離された微生物と12年度に新たに分離した微生物のうち、分解能力の高いものについて属の同定を行った。

2) 17βエストジオール及びノルフェノールの活性汚泥中での集積部位について、抽出試験による検討を継続して行った。

3) 逆浸透膜による環境ホルモン等の除去について下水処理水を対象にして基礎的な検討を行った。

4) 下水中の環境ホルモン等の除去について、膜分離活性汚泥法の室内実験装置を用いて検討し、他の物質との関係や単離された分解微生物の添加による効果、活性炭による吸着除去について検討した。

2. 環境ホルモン等分解微生物の探索・同定

2.1 エストロン分解微生物の探索

12年度の女性ホルモンを基質とした集積培養液と集積培養液から単離された微生物株について、エストロンの資化性を検討した。昨年度と同様にエストロンを炭素源とする Modified DOMINIC & GRAHAM's medium を用いてエストロン分解微生物の集積培養を行い75株の微生物を単離した。単離株のうち8株のエストロン分解微生物が確認された。

表-1 環境ホルモン等分解微生物の同定試験結果

項目	17βエストラジオール分解微生物		エストロン分解微生物		ニルフェノール分解微生物	
	T45	T31	F5	T53	T3N2	FN1
株No.	T45	T31	F5	T53	T3N2	FN1
同定属名	<i>Rhodococcus</i>	<i>Candida</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Moraxella</i>
グラム染色性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性
形態	短桿菌	—	球菌	—	—	—
芽胞	なし	なし	なし	なし	なし	なし
コロニーの色	オレンジ	白	肌色	ピンク	黒	淡黄色
耐塩性 0%	+	+		+	+	+
2%	+	+		+	±	+
5%	+	+		—	—	±
7%	±	+		—	—	—
10%	—	±		—	—	—
ブドウ糖からの酸生成	—	+	+	—	—	—
硝酸還元能	—	+	—	+	+	+

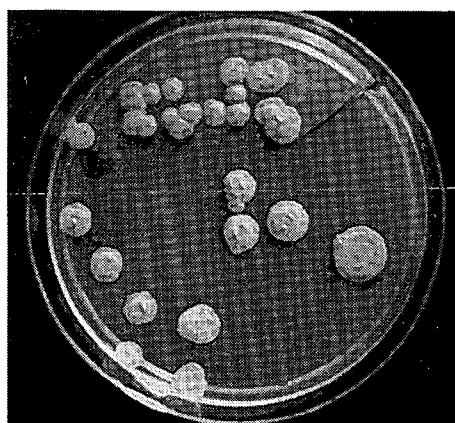


写真-1 T45株

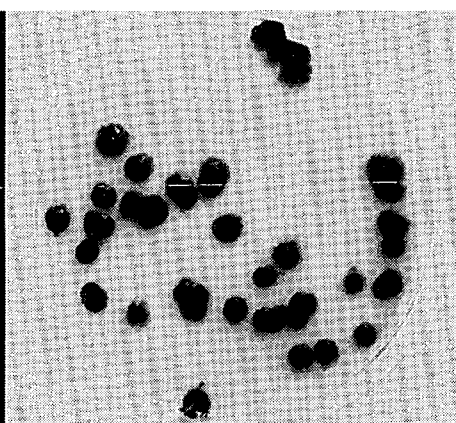


写真-2 T3N2株

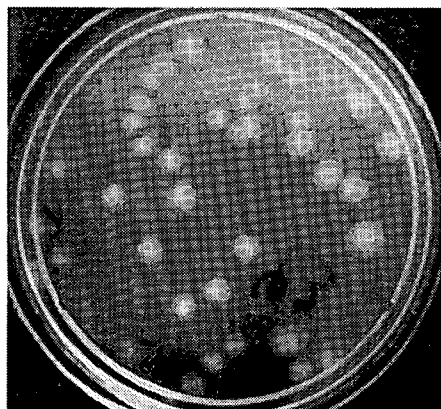


写真-3 FN1株

2.2 環境ホルモン等分解微生物の同定

11年度に分離され、高い分解能力が確認されたニルフェノール分解微生物2種類、17βエストラジオール分解微生物2種類及び本年度分離されたエストロン分解微生物2種類について、生化学的性状等に基づく種属の同定を行った。その結果を表-1に示す。

17βエストラジオール分解微生物は *Rhodococcus* sp. (写真1) 及び *Candida* sp. であり、エストロン分解微生物は *Micrococcus* sp. 及び *Rhodococcus* sp.、ニルフェノール分解微生物は *Micromonospora* sp. (写真2) 及び *Moraxella* sp. (写真3) であった。17βエストラジオール及びエストロン分解微生物は何れもグラム陽性であったが、ニルフェノール分解微生物はグラム陰性であった。また、17βエストラジオール分解性の *Rhodococcus* とエストロン分解性の *Rhodococcus* は耐塩性や硝酸還元能の違いがあり、別種のもものと判定される。なお、6種のうち4種まで硝酸還元能を有しており、通性嫌気性微生物に、これらの物質を分解する能力の高いものが多いことを示唆するものと考えられる。

3. 活性汚泥中の環境ホルモン等の集約部位に関する検討

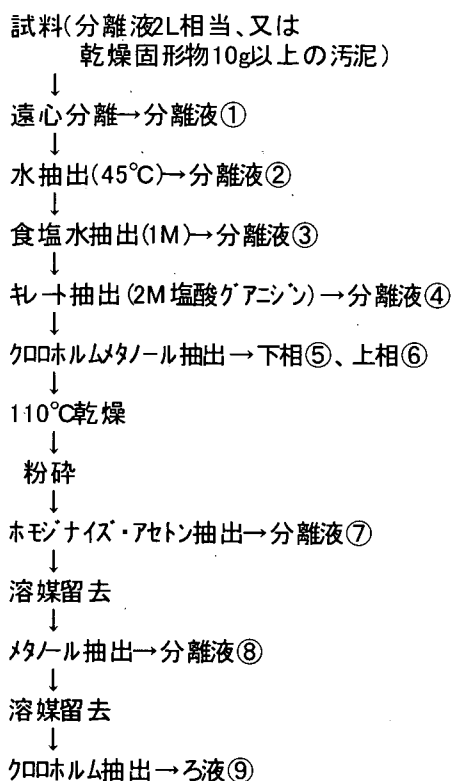
3.1 方法

湖北総合実験施設の生物処理プラント返送汚泥を採取し、図-1の抽出法I、IIに示すフローによって汚泥成分の段階抽出を行った。各抽出段の想定抽出物質は表-2に示す通りである。また、機器分析に先立ち、各抽出液からニルフェノール及び環境ホルモン等物質を分離精製した手法は表-3に示す通りである。

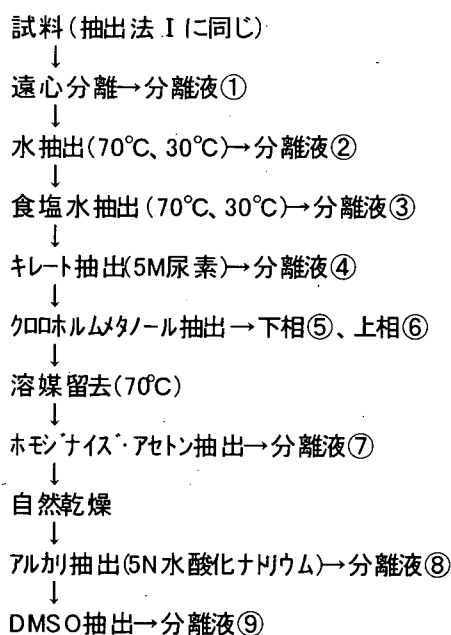
3.2 検討結果

抽出液中の環境ホルモン等の濃度は表-4に示す通りであった。昨年度の結果と異なり、ほとんどの抽出液

抽出法 I



抽出法 II



抽出法 III

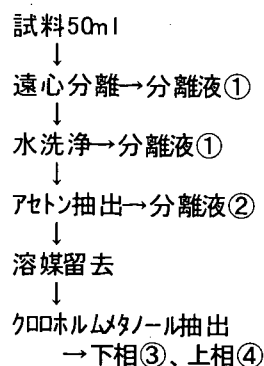


図-1 活性汚泥中の環境ホルモン等抽出試験方法

表-2 抽出液中に推定される抽出物質

抽出成分の仮称	試料	主として抽出される物質
水溶性分	抽出法 I、II の①、②、抽出法 III の①	単糖、アミノ酸、イオン
表在多糖類	抽出法 I、II の③	結合の緩やかな多糖類
表在蛋白	抽出法 I、II の④	表在蛋白、多糖類と蛋白の複合体
脂質 I	抽出法 I、II の⑤、抽出法 III の③	単純脂質
メタノール溶分 I	抽出法 I、II の⑥、抽出法 III の④	リン脂質及び糖脂質の一部
アセトン溶分	抽出法 I、II の⑦、抽出法 III の②	糖脂質
メタノール溶分 II	抽出法 I の⑧	リン脂質及び糖脂質の一部
脂質 II	抽出法 I の⑨	単純脂質
アルカリ抽出分	抽出法 II の⑧	蛋白質
DMSO抽出分	抽出法 II の⑨	多糖類

表-3 抽出液中の環境ホルモン等分離精製方法

分析対象	ノルフェノール	17β エストラジオール
固相抽出の前処理	浮遊物のある場合 GFBろ過、中和等	水溶液はろ過及び中和、溶媒は留去し、水で希釈
固相カラムのコンディショニング	メタノール	メタノール
抽出溶媒	メタノール	酢酸エチル:メタノール(5:1)
クリーンアップカラムのコンディショニング	ヘキサン:クロホルム(4:1)	アセトン
クリーンアップ	クロホルム	アセトン:ジクロロメタン(1:9)

で定量限界値以上のノニルフェノール (NP)、ノニルフェノールエトキシレート (NPEO)、ノニルフェノールエトキシ酢酸 (NPEC) 及びエストロン (E1) が検出された。17β エストラジオール (E2) は抽出法 I の水溶性分中には検出されたが、それ以外の部分では検出されず、抽出法 II では全ての抽出液から検出されなかった。多くの試料でノニルフェノール等の検出量が増加したのは、昨年度より試料汚泥量を増し抽出液量も増やしたこと、及び、試料を抽出液で 1 回処理する方法から同じ試料を異なる抽出液で繰り返し処理する方法に変更したことによる効果であると考えられる。表中の女性ホルモン様活性とは女性ホルモン受容体に結合する物質の総量として測定された包括的な女性ホルモン様活性*

表-4 抽出試験結果 (汚泥 1 l 中の濃度に換算した値)
(空欄は分析せず、-は定量限界以下)

抽出法	抽出液	ノニルフェノール (μg/l)	17β エストラジオール (ng/l)	エストロン (ng/l)	ノニルフェノールエトキシレート (μg/l)	ノニルフェノールエトキシ酢酸 (μg/l)	女性ホルモン様活性 (μg/l)
抽出法 I	①+②	1.91	30.6	32.0	1.90	10.8	310
	③	3.49	-	11.1	5.54	3.67	259
	④	1.32	-	5.56	6.79	3.59	187
	⑤	25.2	-	-	7.72	158	594
	⑥	0.75	-	0.73	-	1.49	346
	⑦		-	1.28		4.46	
	⑧	5.21	-	5.18	-	10.0	102
	⑨	23.9	-	0.87	5.50	1.55	42.5
	抽出法 II	①+②	7.08	-	35.1	43.2	15.2
③		1.09	-	11.2	12.3	6.05	229
④		8.14	-	6.94	13.0	15.7	151
⑤		24.5	-	1.51	104	-	355
⑥		1.52	-	1.21	5.30	1.21	3.21
⑦		2.52	-	0.68	4.21	0.50	7.88
⑧		0.36	-	0.91	0.35	1.77	25.7
⑨		0.37	-	0.38	2.67	3.04	1.95

(以下 BEACON と記し、濃度は女性ホルモン換算値で表示) である。

図-2 は表-4 に基づき、抽出法 I と II の各抽出段階の濃度の合計として計算した汚泥混合液中の各環境ホルモン等物質の推定濃度を示したグラフである。抽出法 I と II では汚泥中の NPEO と NPEC の濃度が大きく異なっていることが示されている。抽出法 I と II では分析した汚泥の採取時期が約 2 週間異なっているので、その間に活性汚泥中での分解経路に変化が生じ、抽出法 I を試した汚泥では進行していた NPEO から NPEC に変化する反応が、約 2 週間の間に低下した可能性があると考えられる。

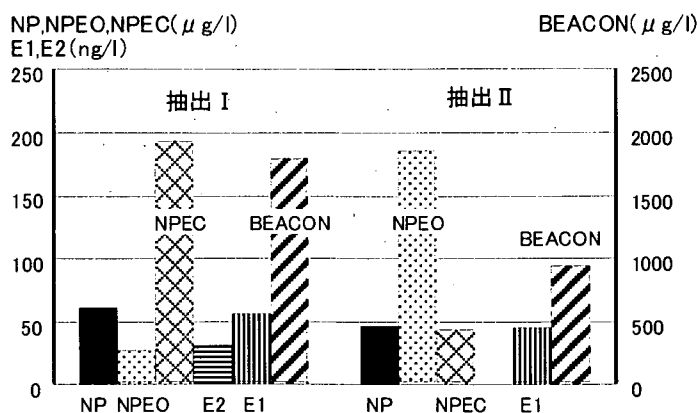


図-2 環境ホルモン等の汚泥中濃度

図-3 は汚泥中の各物質がどのような抽出対象物質と共に抽出されたかを汚泥中の推定濃度に対する比率で示したグラフである。図-3 では、NP、NPEO、NPEC、E2、E1 で各々結びつきやすい物質が異なっていることがうかがえる。例えば、NP は知れぬで抽出される脂質と結びついている割合が多く、E2 は全て水溶性画分に含まれる。NPEO も脂質と共に抽出される割合が高く、抽出法 I II とも 50~60% は脂質の画分に含まれている。その他の画分に含まれる比率は抽出法 I と II では異なっており、抽出法の違いによるものと考えられる。NPEO は、多糖類や蛋白質に該当する画分にも含まれるが、汚泥中では NP と類似の部位に存在する傾向にあると考えられる。抽出法 I の結果では NP と NPEO の 2 物質は知れぬタール抽出後に脱水乾燥粉碎した試料からも多量に抽出されており、乾燥粉碎前の知れぬタールによる抽出が十分

なものであったとすれば、2回目の抽出に含まれていたものは汚泥を構成する細胞膜等の有機体と強く結合していたことを示すのではないかと考えられる。EIは水溶性画分中に最も多い60%程度が含まれ、多糖類や蛋白質の画分にも含まれるが、脂質画分にはほとんど含まれない。BEACON で表される成分は脂質画分に最も多く含まれるがその割合は30~40%で、水溶性、多糖類、蛋白質の画分にも各々10%以上含まれている。

NPEC は抽出法 I と II で大きく異なる結果になっている。即ち、抽出法 I の結果では NPEC は80%以上が脂質画分から検出されたのに対し、抽出法 II では水溶性分と多糖類の画分から80%以上検出された。抽出法 II では温水、食塩水、キレート剤による抽出時間を抽出法 I の場合より長くすると共に、クロホルム-メタノール抽出後の乾燥粉碎試料からは蛋白や多糖類の抽出を行い、脂質の抽出を行わなかった。その結果、抽出法 I と比較して、相対的に脂質画分の寄与は小さくなり、水溶性、多糖類、及び蛋白質の画分が増加すると考えられる。しかし、NPEC に見られる抽出画分の相違は、この様な相違で説明するには極端な異なり方であり、含有濃度の大きな相違と併せて、活性汚泥中の生物反応あるいは生物相が変化したこと等、何らかの原因によって汚泥中で NPEC と共存する物質が異なっていたものと考えられる。

*女性ホルモン受容体への競合結合反応に基づいて測定された女性ホルモン様活性の値は、抗体との結合を測定原理とする ELISA 法で検出される女性ホルモンの量よりかなり大きいことが知られている。その理由として、受容体と結合する物質だけでなく、受容体との結合を阻害する物質も共に測定されることや、複数存在する結合物質の競争結合反応が相加的でなく相乗的である可能性があること等が考えられている。また、下水試料中の妨害物質分離のために採用した前処理方法も、多数の試験例に基づいてその効果が立証され、本測定の前処理法として確立された方法ではない。したがって、本報告書に示された女性ホルモン様活性の測定値は、上述のような問題を含む分析手法によって得られた女性ホルモン活性の一評価値であって、今後の測定法の改善によって変更の可能性のある値であることを付言する。

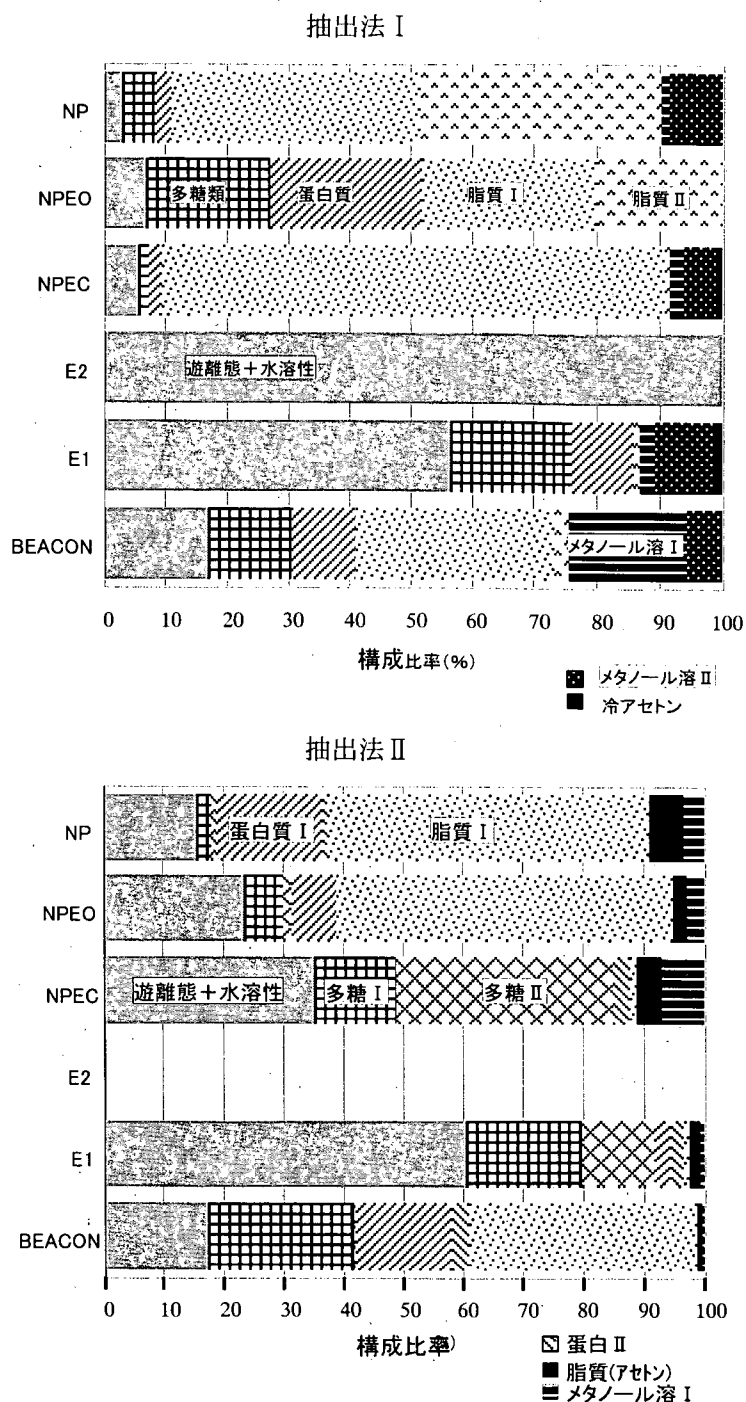


図-3 環境標子等物質の汚泥中での共存物質

4. 活性汚泥に添加した分解微生物によるノルフェノールの処理

4. 1 実験方法

膜分離活性汚泥法室内実験装置（図-4）によって、4-ノルフェノール約1mg/L を添加した茨城県霞ヶ浦湖北流域下水道浄化センターの流入水を処理し、活性汚泥処理による除去機能と分解微生物添加による効果を比較検討した。NP はエタノール溶液として SY1系と SY3系の原水に表-5の区分1から添加した。区分1に先立つ無添加の区分0との処理水濃度の相違や SY1系と SY3系の処理能力の相違を検討した。次に区分3の始めに SY1系に分解微生物を添加し、その後の NP 除去性を分解菌無添加の SY3系を対照系として除去性を比較した。SY2系は SY3系の処理水を更に粉末活性炭によって処理する系で、区分1から50mg/l の割合で粉末活性炭を添加した。処理効果は BEACON2000による女性ホルモン様活性の測定、または GC-MS 法による NP 濃度の分析によって検討した。実験装置の運転条件は図-4中に示した通りであり、SY1系と SY3系は好気槽 DO を1.5mg/l 以下に制御した。分解微生物として添加したのは、先の表-1にノルフェノール分解微生物として示されている *Rhodococcus. sp* である。添加量は、あらかじめ NP 等を含まないイーストエキス等の有機混合基質中で増殖させた菌液10mL で、添加位置は SY1系の好気槽である。また、区分2の中盤に各系の膜分離槽内の混合液50ml を採取し、先に図-1に示した抽出法Ⅲによって混合液中の NP の逐次抽出を行った。

4. 2 実験結果

全期間の女性ホルモン様活性等の状況を図-5に、区分毎の濃度と除去率の平均値を表-6に示す。

(1)NP 添加前の処理状況(区分0) :

SY1と SY3の処理状況には大きな違いはなく、女性ホルモン様活性 (BEACON) は90%程度の除去率であった。SY2系は活性炭の新規添加が長期間ない状態にあり、SY3処理水からの除去率で平均34%であった。

(2)NP 添加後の処理状況(区分1) :

図-5の流入 BEA に示す様に NP 添加による BEACON の増加は明確には現れなかった。処理水中の BEACON は添加開始後1週間は添加前と同じであったが、その後、図-5に示す様に SY1, SY

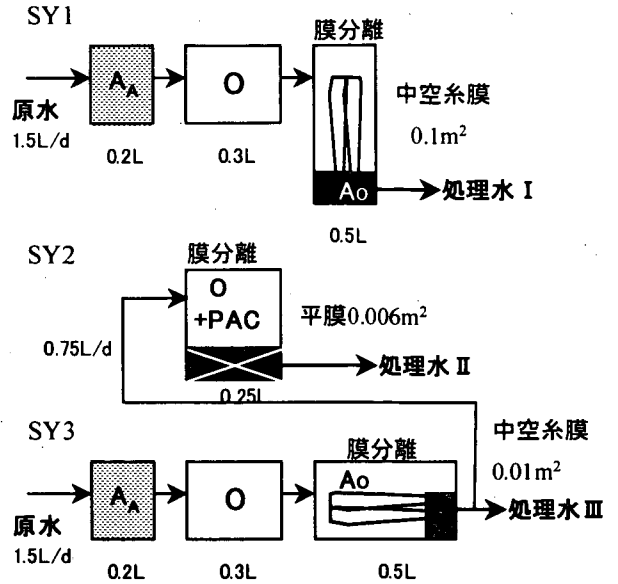


図-4 膜分離活性汚泥法による実験の概要

表-5 ノルフェノール処理実験条件

区分	期間	条件等
0	2001/1/11-2/12	通常下水処理
1	2001/2/13-2/26	NP添加下水処理
2	2001/2/27-4/27	NP分解菌添加

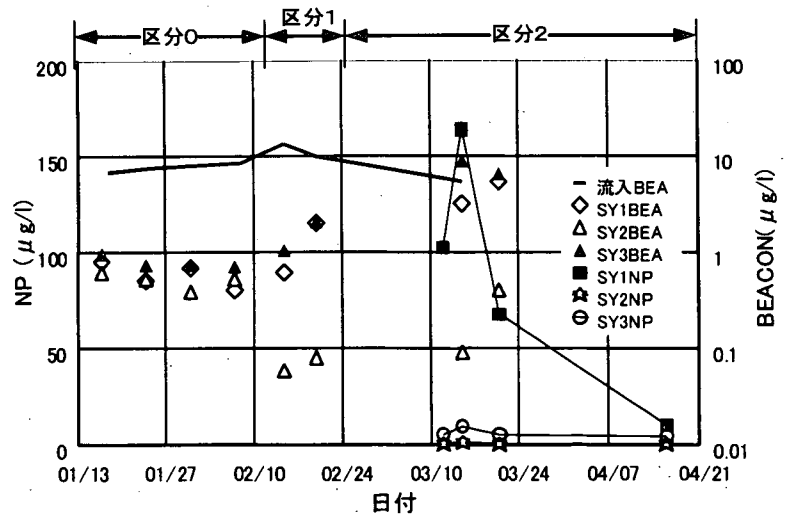


図-5 実験結果 (女性ホルモン活性等の処理状況)

3共に処理水中の濃度が増加し、除去率は70%台に低下した。SY2系では本区分から未使用活性炭の添加を開始した結果、BEACONの除去率は区分0より著しく向上して95%以上となった。なお、NP添加による原水のBEACONが余り変化していないのは、添加したNPの多くがSSに付着し、分析の際に十分抽出できなかったことによるものと考えられる。

表-6 実験結果(平均濃度と平均除去率)

区分	項目	流入水	SY1処理水	SY2処理水	SY3処理水
0	BEACON($\mu\text{g/l}$)	7.80	0.60	0.52	0.80
	除去率(%)	-	92.1	34	89.7
1	BEACON($\mu\text{g/l}$)	12.1	1.34	0.07	1.59
	除去率(%)	-	87.7	95.3	85.9
2	BEACON($\mu\text{g/l}$)	5.52	4.32	0.25	7.89
	除去率(%)	-	21.8	96.4	-42.9
	NP($\mu\text{g/l}$)	1310	86.5	0.45	6.22
	除去率(%)	-	70.4	93.1	98.3

(3)NP分解微生物添加後の処理状況(区分2):

区分2ではSY1、SY3共に処理水中のBEACONが区分1より更に増加し、除去率が低下した。分解菌無添加のSY3系の方が濃度増加が大きい傾向になっている。NPの除去は反対に分解菌を添加したSY1で除去が悪い結果であった。SY1では2月27日に分解菌を添加してから約2週間後に処理水中のNP濃度が最大に達し、その後、次第に低下して行った。SY3でも類似の変動が認められたが変動幅は10分の1以下であり、約7週間後のSY1処理水のNP濃度はSY3処理水の約2倍であった。区分2の中盤で各系の混合液を採取して表-1の抽出法Ⅲによる逐次抽出を行った。その結果を図-6、7に示した。図-6は各抽出液中のNPの総和として得られた混合液中のNP濃度である。混合液中のNP濃度はSY1が最も高く、その値は原水濃度より少し高い

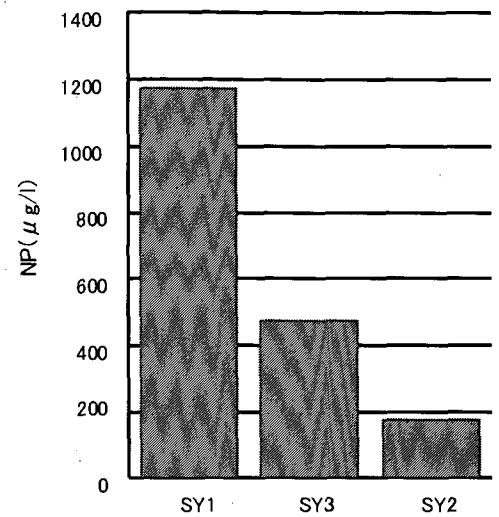


図-6 混合液中のニルフェノール濃度

値である。SY3では原水濃度の半分以下の濃度であり、粉末活性炭処理を行っているSY2では原水として流入するSY3処理水の平均濃度の30倍程度の濃度である。これらの結果から、SY1とSY3ではNPの分解が生じていたと考えられ、分解菌を添加したSY1の方がNPの分解率は低く、分解菌として添加した放線菌 *Rhodococcus* は活性汚泥中ではうまく機能しなかったと考えられる。他の活性汚泥処理に適した種を選択することや、担体に固定化するなどの

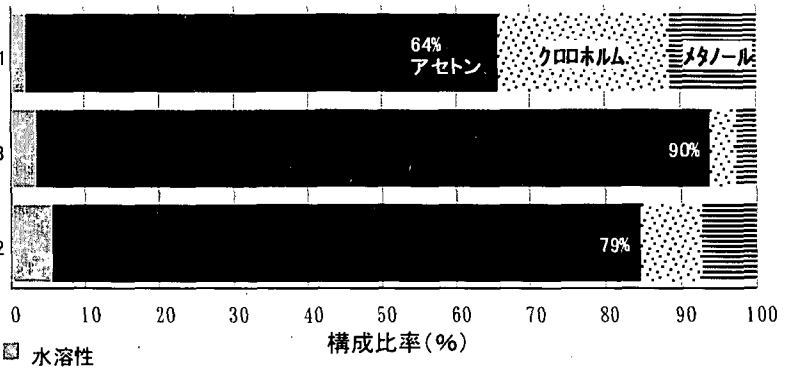


図-7 混合液ニルフェノールの抽出溶媒別比率

の利用法についても検討が必要と考えられる。図-7は抽出されたNPの抽出溶媒別の比率を示している。各系ともアセトンで抽出される割合が最も大きく、先に3.で述べた抽出法Ⅰ、Ⅱの結果とは異なる結果であった。アセトン抽出後のクロロホルムメタノール抽出でクロロホルム層に抽出されるNPが少なくなっていることから、抽出法Ⅰ、Ⅱで脂質と共存すると考えられたNPの多くがアセトンで抽出可能な成分ではないかと思われるが、今後の検討が必要である。

5. 逆浸透膜による環境ホルモン等物質の除去特性

5.1 調査方法

ポンプ加圧式の日東電工(株)製 RUM-10 型逆浸透膜実験装置により 0.5MPa に加圧し、平膜テストセル(日東電工製 C10-T、有効膜面積; 60cm²) に同社製で塩阻止率の異なる NF 膜 (NTR7410 塩阻止率 10%、NTR7250 塩阻止率 60%) 及びルーズ RO 膜 (LF10 塩阻止率 99.5%) を装着してクロスフローろ過方式で下水処理水中の環境ホルモン等物質の除去性と pH の関係を検討した。実験は活性汚泥法による都市下水処理水を pH 無調整 (pH 6.5 ~ 6.8)、pH9、7 および 5 に変化させ、E2、NP およびビスフェノール A (以下、BPA と記す) を各々の濃度が 50nM/l、5000nM/l および 100000nM/l になるように添加して行った。溶質阻止率は、膜処理前後の女性ホルモン様活性を分析しエストロゲン濃度に換算して求めた。

5.2 調査結果

NTR7410 膜は、E2 に対し、pH 無調整、pH 9、pH 7 および pH 5 に調整したときには各々 11 %、13 %、16 % および 18 % の負の阻止率を示した。BPA に対しては同じく pH 変化により各々 2 ~ 14 %、16 ~ 50 %、10 ~ 52 % および 7 ~ 46 % の阻止率を示した。BPA はエストロゲン活性が低いことから阻害率 50 % に相当する高濃度で実験を行ったため、処理が進むにつれて濃縮液側の濃度が更に上昇して一部が不溶性となり、析出した粒子が膜表面に付着するなど、膜のファウリングが生じ、阻止率が増加したと考えられる。NP に対しては pH 変化による阻止率はそれぞれ 92 %、80 %、73 % および 54 % と、pH が高くなるほど阻止率が上昇する pH 依存性が示唆された。NTR7250 膜は、E2 に対し pH 変化により各々 87 %、78 %、77 % および 72 % の阻止率を示した。BPA に対しては pH 変化による阻止率は各々 70 %、72 %、74 % および 66 % であった。NP に対しては pH 変化による阻止率は各々 49 %、55 %、52 % および 59 % と、pH 変化による阻止率の差は小さいことが示唆された。LF10 膜では、E2、BPA、および NP に対し、pH 変化による阻止率の差は無く、各々 99 %、95 % および 93 % 以上の高阻止率を示した。

以上の通り、NF 膜 NTR7250 およびルーズ RO 膜 LF10 による環境ホルモン等の除去において、pH 変化による阻止率の差はほとんど無く、E2 (m.w.=272)、BPA (m.w.=228) および NP (m.w.=220) と、分子量の大きい順に高い阻止率を示した。一方、もう一つの NF 膜 NTR7410 膜では逆に NP の阻止率が高くなり、E2 は負の阻止率を示した。また、BPA および NP に対し若干ではあるものの、pH が高くなるにしたがって阻止率も高くなる傾向が示唆された。何れの膜の場合も純水中に添加した環境ホルモン等を対象とした場合より低い阻止率であった。

6. まとめと今後の課題

下水中に含まれている環境ホルモン等は、活性汚泥処理によって 90% 程度除去されている。それらのうち、女性ホルモンである 17β エストラジオールは微生物によってエストロンを経てより活性の低い物質へ分解されていること、ニルフェノールは活性汚泥中の脂質に濃縮されており一部は分解されている可能性があることがわかった。活性汚泥から分離されたニルフェノールを良く分解する微生物の一つはグラム陰性の放線菌であった。この菌を活性汚泥に添加したところ、ニルフェノール除去率はむしろ低下した。分解微生物利用を実用化するためには、活性汚泥中で機能発現が可能な微生物を選択すると共に、有望な微生物の適用方法を検討する必要がある。生物処理水中に残留した NP や女性ホルモン様活性の除去法として、活性炭処理で 90% 以上の除去が可能であること、逆浸透膜処理のうち NF 膜では膜の種類と対象物質によって阻止率や pH 依存性が異なるのに対し、ルーズ RO 膜では pH と無関係に 90% 以上阻止できること、等が明らかになった。

4. 水系における病原性微生物の挙動に関する研究

三次処理研究室 室長 鈴木 穰
研究員 畑津十四日
研究員 中村みやこ

1. はじめに

上水道取水源上流域での下水道普及の進展や国民の水辺回復要求の高まり、水の循環・再生利用の必要性増大等の現状を受けて、水系の衛生学的基準のあり方について再検討する必要が高まってきている。しかし、放流先水系での病原性微生物の挙動についてはいまだ不明な部分が多い。本研究は、このような衛生学的基準についての判断資料とすべく、消毒方法や水系状況の相違に伴う下水処理水中の病原性微生物の水系での挙動について調査を行うものである。

2. 過年度の調査内容

(1) 文献調査

水系における感染症は、飲料水やレクリエーション水（プール、海水浴、親水利用）などによるものがある。近年の我が国における水系感染症の集団発生事例では、原因は地下水、簡易水道を中心とする水道施設の管理不十分や給水設備の故障によるものであり、原因微生物は、大腸菌とカンピロバクターが大部分を占め、その他サルモネラ、赤痢菌、クリプトスポリジウム、ウェルシュ菌等であった。

環境中に放出された微生物の生残・死滅に影響を与える要因は、非生物的要因として、温度、圧力、電磁波、基質、無機養分、イオン組成、有効水、pH、酸化還元電位、ガス組成、毒性等であり、生物的要因としては、競争、拮抗、捕食、植物との相互作用、菌体側の要因として、耐久型細胞の有無、生理状態、保有するプラスミド等が考えられている。

(2) 水中における指標細菌の消長

微生物の消長に与える水温および溶存酸素の影響を把握することを目的として、生理食塩水および下水二次処理水に、数種の細菌および大腸菌ファージを添加し、その微生物濃度の変化を把握した。また、同様の実験を、流入下水や消毒処理水を用いて行い、水質の微生物挙動への影響について検討を行った。

その結果、どの微生物も4℃で増殖することはなかったが、20℃および30℃では初期に増加する菌種が認められた。また、減少速度は、温度が高いほど大きくなる傾向が見られた。このように、水温はその微生物の状態（増殖期にあるか、減衰期にあるか）によって、増殖および減衰速度が水温と正の相関があると考えられた。

(3) 塩素消毒における細菌再増殖の検討

消毒処理水中における細菌の挙動では、塩素処理水、オゾン処理水および紫外線処理水ともに、細菌の再増殖が懸念されたため、塩素消毒における消毒レベルと細菌再増殖の検討を行った。

その結果、塩素消毒により大腸菌生残比を $-4\log$ とした場合であっても再増殖はみとめられるが、消毒レベルを高めることで、再増殖を防げるとともに増殖までのラグタイムが長くなる傾向がみられた。

3. 水路内における細菌の挙動に関する調査

3.1 研究方法

国土交通省土木研究所湖北総合実験棟内に設置した実験水路を用い、水路内での細菌の挙動について検討を行った。

実験装置は、原水槽、原水供給ポンプ、循環水槽、循環水供給ポンプおよび水路から構成されている。水路Aの長さは30mであり、一過式で供試水が流下する。水路Bは長さ30mの水路を2本直列に接続しており、一過式もしくは循環式で供試水を流下することが可能である。水路Aの処理フローを図-1、水路Bの循環式処理フ

ローを図-2に示す。

(1) 連続実験

連続的に K 下水処理場三次処理水（砂ろ過水）を水路に供給し、流入部および流出部での水質を測定した。実験条件を表-1に示す。

RUN1 では、水路床を水路 A：砂利、水路 B：SUS とした。流出部採水は両水路ともに 30m 地点で行い、水路床の材質による影響を検討した。RUN2 では、水路床は両水路ともに砂利を用い、水路 B を循環式とすることで乱流を形成し、水流による影響の検討を試みた。RUN3 は、RUN2 と水路条件は同じであるが、流入水量を低下することで、水路内滞留時間の影響を検討した。

測定項目は、指標細菌として大腸菌、大腸菌群および一般細菌とし、一般水質項目として水温、pH、DO、CODcr、溶解性 CODcr、SS、各態窒素およびりんを測定した。大腸菌および大腸菌群の測定は、合成発色酵素基質培地（MERCK 社製クロモカルト寒天培地）を用い、βガラクトシダーゼ活性とβグルクロニダーゼ活性の有無を形成集落の色調により判別（表-2）した。一般細菌、デソキシコール酸塩培地による大腸菌群（以下、DESO 法とする）およびその他の一般水質項目の測定は、下水試験方法に準拠した。

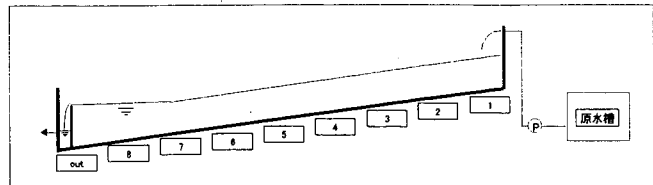


図-1 水路 A（水路長 30m 一過式）

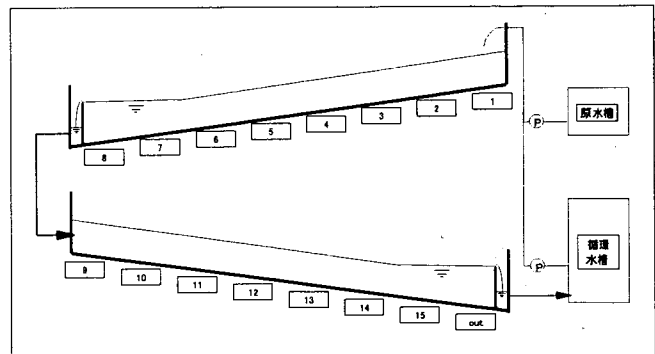


図-2 水路 B（水路長 60m 循環式）

表-2 大腸菌および大腸菌群の判別

判別項目	大腸菌 ^{注)}	大腸菌群
βガラクトシダーゼ	+	+
βグルクロニダーゼ	+	-

注) 大腸菌の一部にはβグルクロニダーゼ活性を有さない型(例 O157H7)も存在する。

表-1 連続水路実験の実験条件

		RUN 1	RUN 2	RUN 3
実験期間		0～59 日	63 日～90 日	91 日～104 日
水路 A	水路形状	30,000mm ³ × 200mm ² × 100mm ¹		
	水路床	玉砂利、粒度 8-12mm 粒径内 75%/85%、空隙率：36.7%		
	流入水量 [L/min]	15		7
	循環水量 [L/分]	0（一過式）		
	堰高 [mm]	30		
	勾配	120/30000=0.004		
	容量 [L]	180		98
	滞留時間 [分]	8.7		14
水路 B	水路形状	30,000mm ³ × 200mm ² × 100mm ¹	水路部：30,000mm ³ × 200mm ² × 100mm ¹ × 2 水槽部：1,000mm ³ × 1250mm ² × 450mm ¹	
	水路床	SUS	玉砂利、粒度 8-12mm 粒径内 75%/85%、空隙率：36.7%	
	流入水量 [L/min]	15		7
	循環水量 [L/分]	0（一過式）	100	100
	堰高 [mm]	20		
	勾配	120/30000=0.004		
	容量 [L]	86	水路部：447 水槽部：563	水路部：447 水槽部：563
	滞留時間 [分]	5.7	61（循環時間 8.0 分/回）	131（循環時間 8.6 分/回）

(2) 水路床付着物および堆積物の測定

通水 104 日目(水路 B は砂利設置後 43 日目)において、水路内の水路床付着物および堆積物の測定を行った。
〔付着物の測定〕

水路 A 水路床 7 より砂利を採取し、生理食塩水ですすぎ洗いをを行った。この時の洗い排水を洗浄水とした。ポ

リプロピレン容器に入れた洗浄した砂利を生理食塩水に浸し、超音波処理（9KHz±200Hz、20分）を行った。洗浄水および超音波処理水中の指標細菌濃度を測定し、単位砂利量当たりの付着菌数を算出した。

〔堆積物の測定〕

水路A、Bの堆積物の分布範囲を測定し、水路A水路床7より堆積物を採取し、指標細菌濃度および水質分析を行った。

(3) 回分実験

連続実験RUN2の後に、水路Bを用いた循環水路内での細菌減衰速度の把握を行った。実験は、連続実験RUN2の条件において、流入水を停止し、水路内の指標細菌濃度を経時的に測定した。

3.2 研究結果

(1) 連続実験

連続実験時の水路内縦断面図を図-3に示す。なお、横軸は測定地点を示し、図-1,2の水路床番号に準ずる。また、流れの状況を表-3に示す。

水路A RUN1,2では、高さ10~15mmで設置した砂利は、流下方向に進むにしたがい若干高くなる傾向が見られ、多少の砂利の流動があった。水位は砂利高さに比例し、水路床7,8では、堰による水位上昇が認められた。水路B RUN1では水路床に何も設置せず、水路の材質であるSUSを水路床とした。水路床7までの水位は10mm程度と一定であり、水路床7以降は徐々に水位が上昇した。水路A RUN3では、RUN1,2に比較して流入水量が少なくなっているため、水位全体が低くなり、水路床の流動もほとんど見られなかった。水路B RUN2,3では、流入水量が異なるが、水位や水路床分布の変化は認められなかった。両者とも、循環式として水量が多くなることにより、水位は高くなり、水路連結部である水路床8→9およびout→1の直前で、水位が大きく上昇した。また、水位上昇部において、流動した砂利の堆積が見られた。

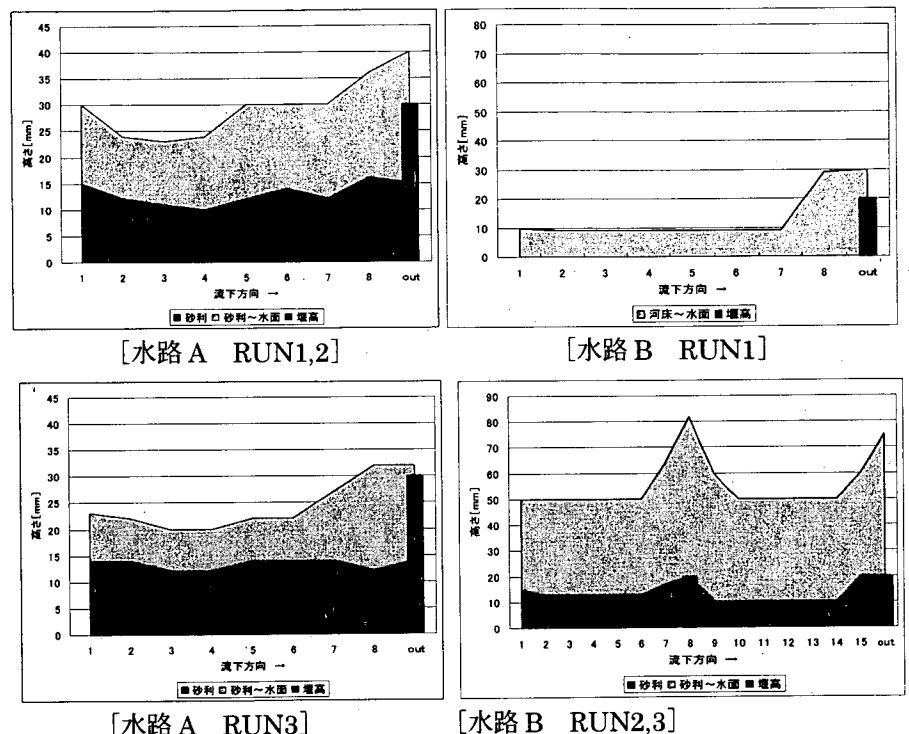


図-3 水路内縦断面図

表-3 流れの状況

	水路 A			水路 B		
	RUN 1	RUN 2	RUN 3	RUN 1	RUN 2	RUN 3
水路長[m]	30	30	30	30	60	60
補給水量[L/min]	15.0	15.0	7.0	15.0	15.0	7.0
循環水量[L/min]	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0
堰高[mm]	30	30	30	20	20	20
水路幅[mm]	200	200	200	200	200	200
平均水深[mm]注1)	15.0	15.0	8.8	9.0	38.5	38.5
平均流速[m/h]注1)	233	233	153	500	789	735
レイノルズ数注1)	915	915	448	1,002	5,824	5,419
水路全容量[m ³]	0.179	0.179	0.148	0.086	0.447	0.447
水路滞留水量[m ³]注2)	0.130	0.130	0.098	0.086	0.355	0.355
循環水槽内水量[m ³]					0.563	0.563
平均滞留時間[min]	8.7	8.7	14.0	5.7	61.2	131.1
循環時間[min/回]					8.0	8.6

注1) 平均水深、平均流速およびレイノルズ数は、水路床2~7(水路長30m)、水路床2~7,10~14(水路長60m)の平均とした。なお、平均流速およびレイノルズ数は砂利部空隙率を考慮した流積を用いて算出した。
 注2) 水路滞留水量は、水路全容量-砂利容量×砂利空隙率により算出した。

流入水質および処理水質と水路内での水質変動率をまとめて表-4に示す。

水路内での水質変化はほとんど見られないが、DOが上昇し、その他の水質項目は若干減少した。

表-4 流入水質および処理水質と水路内水質変動率

	流入水質		処理水質			
			水路A		水路B	
	平均値 (最大値 ~ 最小値)	平均値	RUN1,2	RUN3	RUN1	RUN2,3
			平均値 (変動率%=(処理水質-流入水質)/流入水質×100)			
水温	(11.1 ~ 17.3)	21.1				
pH	(6.3 ~ 6.6)	6.9	6.6 (1.2)	6.6 (1.2)	6.8 (3.6)	7.0 (7.2)
DO[mg/L]	(4.6 ~ 5.8)	7.1	7.4 (27.8)	6.4 (3.3)	8.3 (44.5)	9.5 (55.8)
CODcr[mg/L]	(3 ~ 9.6)	17	8.2 (-21.4)	8.5 (-16.0)	9.0 (5.3)	8.0 (-4.2)
SS[mg/L]	(0.3 ~ 1.4)	4.2	1.3 (-26.6)	0.5 (-47.9)	1.3 (-15.1)	0.6 (-39.6)
T-N[mg/L]	(0.8 ~ 7.7)	12.1	6.9 (-2.3)	11.0 (-2.4)	7.0 (0.5)	12.1 (8.1)
NH4-N[mg/L]	(0.05 ~ 0.19)	0.54	0.15 (-26.7)	0.25 (-3.9)	0.14 (-36.3)	0.19 (-25.6)
NOx-N[mg/L]	(0.8 ~ 8.0)	11.1	7.4 (1.0)	10.4 (-1.3)	7.5 (1.4)	11.6 (0.8)
T-P[mg/L]	(0.04 ~ 0.12)	0.27	0.11 (1.3)	0.16 (-0.7)	0.11 (-5.0)	0.17 (-2.3)
大腸菌[CFU/mL]	(1.5×10^1 ~ 3.2×10^1)	1.8×10^2	3.2×10^1 (-20.6)	1.3×10^1 (-45.3)	4.4×10^1 (0.3)	1.6×10^1 (-23.8)
大腸菌群[CFU/mL]	(5.1×10^2 ~ 1.6×10^3)	6.2×10^3	1.2×10^3 (-20.5)	7.9×10^2 (-50.3)	1.2×10^3 (-4.9)	8.4×10^2 (-34.6)
DESO法 大腸菌群[CFU/mL]	(9.0×10^0 ~ 1.9×10^2)	1.2×10^3	2.0×10^2 (-18.8)	6.5×10^1 (-37.5)	2.6×10^2 (3.1)	7.4×10^1 (-28.4)
一般細菌[CFU/mL]	(1.3×10^2 ~ 2.4×10^3)	2.2×10^4	2.1×10^3 (-20.0)	5.4×10^2 (-57.3)	2.6×10^3 (-6.2)	6.5×10^2 (-46.0)

通水開始日は水路内での細菌の増減はほとんど見られず、水路内での細菌の沈降、吸着や捕捉は無視しうる程度と考えられた。吉越らの報告¹⁾において、水温20℃での大腸菌の沈降速度は0.005~0.04mm/hであり、大腸菌濃度が増加すると沈降速度が遅くなり、水温上昇に伴い沈降速度は速くなるという結果が得られている(ただしこの報告は、一夜培養した大腸菌を用いた結果であり、供試された大腸菌濃度は高濃度であったと類推されるため、本実験の水路内での大腸菌の沈降速度は0.04mm/hより大きいものと考えられる)。RUN1での水面積負荷は150m/h、水路内平均流速は、水路A:233m/h、水路B:500m/hであり、大腸菌の沈降速度を遙かに上回る値であり、大腸菌の自然沈降は無視しうるものと考えられる。また、通水開始時の水路は水道水での洗浄を行ったものであり、水路床として用いた砂利は新品であったため、生物膜は存在しなかった。

各指標細菌の除去率を表-5に示す。

6日経過後では、水路Aにおいて大腸菌および大腸菌群除去率が25%程度となり、その後、変動はあるものの水路内で指標細菌が減少する傾向にあった。一方、水路Bにおいては、水路床がSUSの場合(RUN1)では、水路内での指標細菌の変動は、ほとんど見られなかったが、水路床を砂利にすることによって、指標細菌が水路内で減少する傾向が見られた。これは、連続的に供試水に接している部分に生物膜が形成され、形成された生物膜に接触した細菌等が吸着・除去されたためと考えられた。また、SUSにおいても生物膜は形成されるが、砂利と比較して表面積が小さいとともに、形成された生物膜は水流により剥離されやすいため、水路内での細菌の除去傾向が認められなかったものと考えられた。

水路AのRUN1、RUN3を比較すると、水路内の滞留時間が長いほど、除去率が高くなる傾向が見られた。水路BのRUN2、RUN3を比較すると、有意な差とは言えないが、水路内の滞留時間が長いRUN3の方が、若干、除去率が高かった。

また、水路Bは水路Aに比較して除去率が低かった。水路Bは、循環式とし水流を激しく乱流とすることにより、水路床との接触効率を高め、水路内での除去率の向上を図った。しかし、水流を激しくすることで、水路内での生物膜や堆積物が形成されにくくなり、高い除去率が得られなかったものと考えられる。

表-5 指標細菌の除去率

	水路A		水路B		
	RUN 1,2	RUN 3	RUN 1	RUN 2	RUN 3
	砂利, HRT8.7分	砂利, HRT14分	SUS, HRT5.7分	砂利, HRT61分	砂利, HRT131分
大腸菌除去率 [%]	20.6	45.3	-0.3	18.6	27.3
大腸菌群(特定酵素)除去率 [%]	20.5	50.3	4.9	34.3	34.8
大腸菌群(DES0)除去率 [%]	18.8	37.5	-3.1	24.9	30.5
一般細菌除去率 [%]	20.0	57.3	6.2	49.3	43.9
データ数	24	32	18	8	13

微生物の減衰は、一般的に Chick のモデル (式 1) で示される。

$$N = N_0 e^{-kt} \quad \dots \dots \dots (式 1)$$

N_0 : 最初の微生物濃度、 N : その時存在する微生物濃度、 k : 速度定数

そこで、Chick のモデルを元に各々の速度定数を求め、平均したもの表-6 に示す。

指標細菌の減衰速度定数は、水路 A RUN3>水路 A RUN1,2>水路 B RUN2>水路 B RUN3 となった。

水路 A では、水路内の滞留時間が長い RUN3 における速度定数が大きく、水路 B では、水路内の滞留時間が長くなるほど、速度定数が小さくなるという相反する結果となった。

表-6 速度定数

	水路A		水路B		
	RUN 1,2	RUN 3	RUN 1	RUN 2	RUN 3
	砂利, HRT8.7分	砂利, HRT14分	SUS, HRT5.7分	砂利, HRT61分	砂利, HRT131分
大腸菌速度定数 [h ⁻¹]	1.93	2.76	0.13	0.24	0.19
大腸菌群(特定酵素)速度定数 [h ⁻¹]	1.93	3.22	0.96	0.48	0.26
大腸菌群(DES0)速度定数 [h ⁻¹]	1.93	2.82	0.18	0.34	0.25
一般細菌速度定数 [h ⁻¹]	2.27	4.26	1.03	0.86	0.33
データ数	24	32	18	8	13

(2) 水路床付着物および堆積物の測定

実験が経過するにしたがい、水路床表面に茶褐色の付着物が生成するとともに、活性汚泥状のものが堆積した。この堆積物は流下方向に進むにしたがい増加した。また、水路 B において、循環式とし乱流にした場合には、堆積物が少なかった。

水路床付着物の測定結果を表-7、水路床付着物が一様に付着していると想定した場合の付着物中の総菌数を表-8 に示す。また、堆積物の測定結果を表-9、水路内堆積物中の総菌数を表-10 に示す。

得られた水路内の指標細菌総数および流入水細菌累積数、処理水細菌累積数をもとに、指標細菌の収支を検討した。図-5 は大腸菌および大腸菌群の収支を百分率で示すものである。なお、水路 A は 104 日間の累積値、水路 B は砂利設置後の 43 日間の累積値とした。

表-7 付着物中の指標細菌濃度

	大腸菌 [CFU/砂利 L]	大腸菌群 [CFU/砂利 L]	一般細菌 [CFU/砂利 L]
洗浄水	6.2×10 ⁴	1.3×10 ⁴	8.6×10 ⁶
超音波処理水	1.2×10 ⁵	2.2×10 ⁵	3.6×10 ⁶
合計	1.8×10 ⁵	1.5×10 ⁶	1.2×10 ⁷

表-8 水路内付着物中の指標細菌数

	大腸菌 [CFU]	大腸菌群 [CFU]	一般細菌 [CFU]
水路A	8.9×10 ⁹	7.5×10 ⁷	6.1×10 ⁸
水路B	1.7×10 ⁷	1.4×10 ⁸	1.2×10 ⁹

表-9 堆積物の性状

MLSS [mg/L]	MLVSS [mg/L]	T-N [mg/L]	T-P [mg/L]	大腸菌 [CFU/mL]	大腸菌群 [CFU/mL]
6974	3382	336	168	7.0×10 ¹	2.9×10 ⁴

表-10 水路内堆積物中の指標細菌数

	堆積 [L]	大腸菌 [CFU]	大腸菌群 [CFU]
水路A	42.0	2.9×10 ⁶	1.2×10 ⁹
水路B	2.4	1.7×10 ⁵	7.0×10 ⁷

累積値より算出した水中からの大腸菌移行率は、水路 A : 33.3%、水路 B : 26.6%であり、移行した大腸菌の大部分(水路 A : 99.97%、水路 B : 99.81%)が不活化していることとなった。

(3) 回分実験

図-6 は、回分実験における指標細菌濃度の経時変化を示す。

細菌は経時的に減少し、24 時間後の生残比は、大腸菌 : $-1.1\log$ 、大腸菌群 : $-1.3\log$ 、一般細菌 : $-1.8\log$ であった。また、Chick のモデルを元に、各々の速度定数を求めると、大腸菌 : $0.08h^{-1}$ 、大腸菌群 : $0.15h^{-1}$ 、一般細菌 : $0.14h^{-1}$ となった。

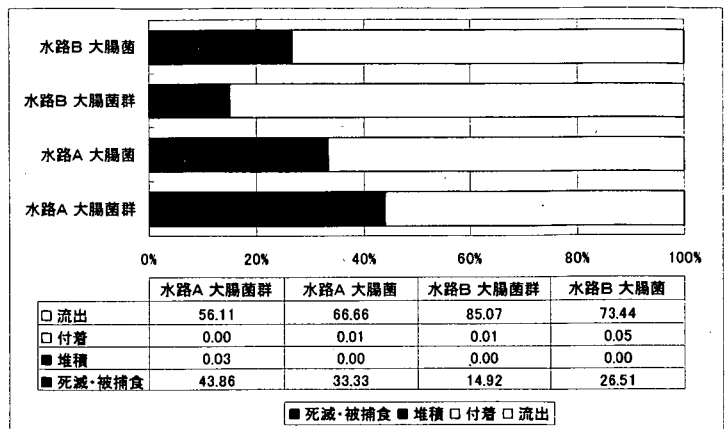


図-5 大腸菌および大腸菌群の収支

図中の直線は指数近似式を示し、Chick のモデルを示すものである。ほぼ直線に合致しているが、どの指標細菌も、減衰速度が経時的に減少する傾向が見られ、一般細菌、大腸菌群、大腸菌の順で、その傾向は顕著であった。これは、減衰速度の異なる細菌が混在し、減衰速度の大きい(弱い)細菌が先に減少し、減衰速度の小さい(強い)細菌が生き残るため、減衰速度が時間経過とともに減少したのと考えられる。一般細菌は、ヒトの体温と同温度で比較的短時間に増殖する従属栄養細菌を測定するものであり、大腸菌群に比較して、より幅広い細菌群を示す。また、大腸菌群は大腸菌を含む乳糖を分解してガスと酸を生成する、グラム陰性、無芽胞の好気性または通性嫌気性桿菌の総称であり、大腸菌より幅広い細菌群を示す。したがって、混在菌種が多い、一般細菌、大腸菌群、大腸菌の順にモデル式に合わなくなったのと考えられる。

ここで、前述の連続実験結果と回分実験結果を比較すると、連続実験の速度定数は、大腸菌 : $0.24h^{-1}$ 、大腸菌群 : $0.48h^{-1}$ 、一般細菌 : $0.86h^{-1}$ であり、回分実験結果の速度定数は連続実験結果の 1/10 となった。この要因は、前述の除去効率が時間経過とともに低下するためと考えられた。すなわち、連続実験は、除去効率の高い滞留初期の結果を反映するため速度定数が大きくなり、逆に、回分実験では、滞留時間の長時間化とともに効率が低下したのと考えられる。

さらに、平成 10 年度の調査²⁾と比較すると、平成 10 年度調査結果において、二次処理水を水温 $20^{\circ}C$ で静置保存した場合、二次処理水中の大腸菌および大腸菌群の減衰速度定数は、 $0.012h^{-1}$ および $0.007h^{-1}$ であった。したがって、本年度の結果は 100 倍もの大きい速度となる。この要因として、本実験の滞留時間は数分~数百分の範囲にあり、平成 10 年度の結果は数日~数十日の評価であること、また、生物膜の有無が関与するものと考えられる。平成 10 年度の調査結果において、約 30 日間の調査の内、最も減衰率の大きかった部分の速度定数は、大腸菌 : $0.04h^{-1}$ 、大腸菌群 : $0.01h^{-1}$ であり、今だ差があるのは、生物膜に起因するものと考えられた。

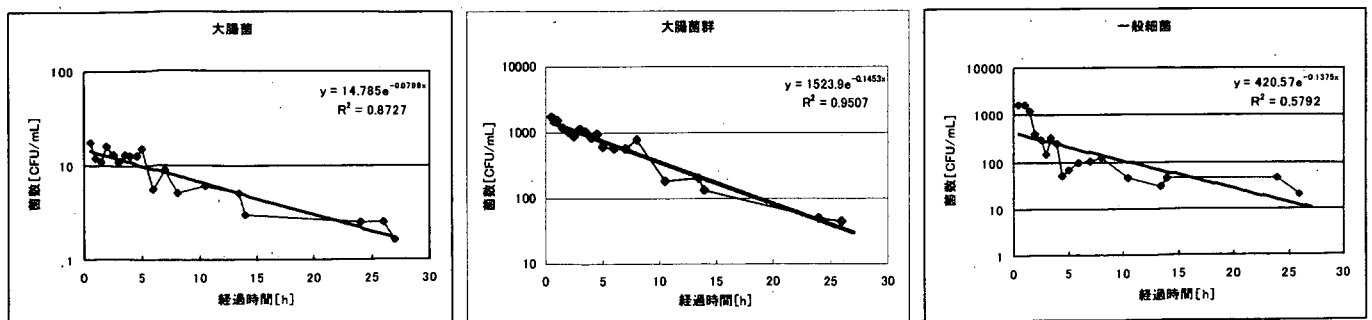


図-6 指標細菌の経時変化

4. RT-PCR 法による下水処理水中のウイルス検出

4. 1 研究目的

本研究の最終的な目的は、下水および下水処理水中の病原ウイルスの存在状況を把握すること、および各下水処理過程でのウイルスの挙動を把握することである。水中病原ウイルスを安全・迅速・高感度に検出する手法として、遺伝子工学的手法のひとつである RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction ; 逆転写 PCR) 法の適用を試みる。そのためにはまず、水中に存在する RT-PCR 法の阻害物質をできるだけ除去し、安定した高いウイルス RNA 回収率が得られるように試料を濃縮精製する必要がある。本年度は、下水処理水中のウイルスを RT-PCR 法で検出する場合、検出感度が下がってしまう程度と其原因を調べた。また市販の RNA 抽出精製キットの有効性についても検討した。

4. 2 基礎的事項

(1) 実験対象ウイルス

実験対象ウイルスには大腸菌 RNA フェージ Q β を用いた。フェージ (=バクテリオフェージ) とは、細菌に感染して増殖するウイルスの総称である。フェージは測定が容易でヒトに対して安全であるため、水処理消毒工程における病原ウイルスの除去効率を推定するためによく利用される。フェージの中でも特に、F 特異 RNA フェージ (細菌の F 繊維毛に吸着して感染するフェージのうち、核酸として RNA をもつものの総称) は、その構造と大きさがピコルナウイルス科のエンテロウイルス属 (ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルスなどの腸管系ウイルスが含まれる) に類似している。大腸菌 RNA フェージ Q β は、大腸菌を宿主とする F 特異 RNA フェージの一つである。図 7 に Q β とポリオウイルスの構造を示す。

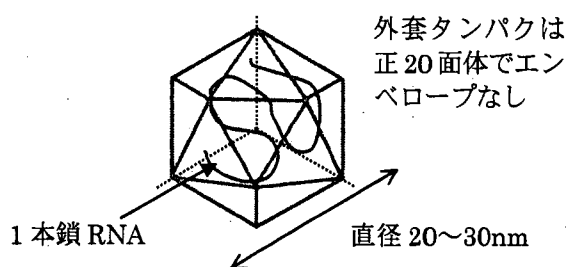


図 7 Q β とポリオウイルスの構造

(2) RT-PCR 法の原理 (図 8)

PCR 法とは、DNA 複製酵素を用いて DNA の一部分 (特定遺伝子の一部分) を化学的に大量に複製する方法であり、複製した DNA は電気泳動法などにより検出する。RNA を検出対象とする場合は、まず逆転写酵素を用いて RNA から DNA をつくり、その DNA を PCR で増幅する RT-PCR 法を適用する。RT-PCR 法により対象とする RNA を検出するために要する時間は、数時間程度である。

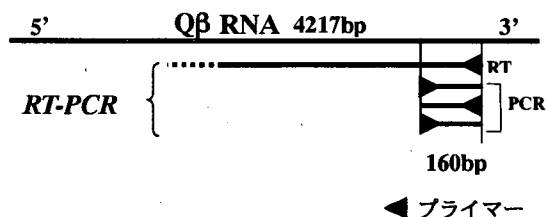


図 8 RT-PCR 法の概要

4. 3 実験方法

実験対象ウイルスには、大腸菌 RNA フェージ Q β を用いた。試料水は、国土交通省土木研究所湖北総合実験施設の下水二次処理水、三次処理水、および Milli-Q 水を用いた。ウイルスの RNA を検出するための手順は、ウイルスから RNA を抽出し、これを RT-PCR 法により増幅し、電気泳動法で検出した。ウイルスから RNA を抽出する方法は、加熱による抽出 (ウイルスの外套タンパクを熱破碎) と、市販のスピンカラム式 RNA 抽出精製キットによる抽出 (タンパク変性剤を用いて RNA の抽出と試料の部分精製を同時に行う) の 2 とおりでいった。

実験で調べた内容と、対応する実験方法の概略を以下に示す。

① 下水処理水中で検出感度が下がる程度およびその原因を調べる。

- ・ RT-PCR 反応はどの程度阻害されるのか。
 - ウイルスから加熱抽出した RNA を各試料水に添加して、RT-PCR 法の検出感度を比較する。
- ・ ウイルスから RNA を加熱抽出する時、RNA はどの程度分解されてしまうのか。
 - 各試料水に Q β を添加して、加熱により RNA を抽出する。そして RT-PCR 法の検出感度を比較する。

②抽出精製キットの効果と問題点を調べる。

- RNA の回収率は十分高いか。
→ Milli-Q 水に Q β を添加する。加熱および抽出精製キットの 2 通りの方法で RNA を抽出し、RT-PCR 法の検出感度を比較する(高濃度の Q β 溶液から RNA を抽出し、その後で希釈列をつくり RT-PCR 法で検出する)。
- RT-PCR 反応を阻害する物質はどの程度除去できるのか。
→ 下水処理水を抽出精製キットに通してろ液を得る。ろ液に RNA を添加して、RT-PCR 法の検出感度を比較する。
- RNA を分解する物質はどの程度除去できるのか。
→ 下水処理水を抽出精製キットに通してろ液を得る。ろ液に Q β を添加して、加熱により RNA を抽出する。そして RT-PCR 法の検出感度を比較する。
- 抽出精製キット由来の RT-PCR 反応阻害物質が試料に混入しないか。
→ Milli-Q 水に Q β を添加する。加熱および抽出精製キットの 2 通りの方法で RNA を抽出し、RT-PCR 法の検出感度を比較する (Q β 溶液の希釈列をつくり、それぞれから RNA を抽出し、RT-PCR 法で検出する)。

4. 4 実験結果および考察

①下水処理水中で検出感度が下がる程度およびその原因

RT-PCR 反応の阻害により検出感度が下がる程度は、二次および三次処理水ともに 0.5log 程度であった。一方、下水処理水中で加熱によりウイルス RNA を抽出すると、二次処理水で 4log、三次処理水で 3log 程度検出感度が下がった。このことから、下水処理水中には高温下でウイルス RNA を分解する物質(総称 RNase)が多く存在することが示唆された。

②抽出精製キットの効果と問題点

実験に用いた RNA 抽出精製キットの効果は、二次および三次処理水中の RNase をほぼ完全に失活させ、さらに高温条件を経ないことから、RNA を分解されずに抽出できることであった。また RNA の回収率は十分に高かった。一方問題点としては、RT-PCR 反応を阻害する物質は除去できなかった。またスピンカラムというキットの構造上、キット中のタンパク変性剤が試料に混入して、RT-PCR 酵素が失活する可能性が示唆された(検出感度が 0.5log 程度低下)。

5. まとめ

下水処理水放流先の河川を模擬した実験水路を用いて、大腸菌および大腸菌群を指標とした細菌の挙動について検討を行った。その結果、水路床が SUS の場合、水路内での細菌の減少は見られないが、水路床が砂利の場合、細菌が減少し、その除去率は水理学的滞留時間が長い方が大きくなった。また、水理学的滞留時間 14 分、水路床が砂利の場合、三次処理(砂ろ過)水中の大腸菌は水路内で 33% 除去され、生物膜や堆積物へ移行し、移行した大腸菌の 99.97% は、死滅や被捕食により減衰することが明らかになった。細菌の減衰速度は、時間経過とともに低下する傾向が見られた。水路床が砂利の場合、約 1 日での大腸菌の減衰速度定数は 0.08h^{-1} であり、自然減衰での 0.04h^{-1} に比較して高く、生物膜は細菌除去に有効であると考えられた。

大腸菌 RNA フェージ Q β を下水処理水に添加し、RT-PCR 法で検出した。その結果、RT-PCR の酵素反応の阻害に起因する検出感度の低下は、二次および三次処理水ともに 0.5log 程度であった。また下水処理水中には、高温下で RNA を分解する物質が多く存在していた。実験で用いた RNA 抽出精製キットは、RNA を分解されずに抽出する為には有効だが、RT-PCR の酵素反応を阻害する物質を除去することはできなかった。

6. 主な研究成果物

① 土木研究所資料 下水道関係調査研究年次報告書集(平成 12 年度)

【参考文献】

- 1) 吉越昭夫 他、腸内細菌の沈降現象 I、日本バイオレオロジー学会誌、Vol.6、No.3、1992
- 2) 平成 10 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料、第 3661 号、2000

5. 病原性微生物の下水処理過程での制御に関する研究

汚泥研究室 室長 森田 弘昭
主任研究員 落 修一
研究員 北村 友一

1. はじめに

平成8年6月に、埼玉県越生町において水道水を原因とするクリプトスポリジウム感染症が発生した。埼玉県衛生部の報告によると水道原水の第一汚染源は特定できなかったものの、浄水場の取水地点上流に農村集落排水処理施設が位置しており、河川を介して農村集落排水処理施設の処理水と上水との間でクリプトスポリジウムの循環系が形成されたことにより汚染が拡大したとされている。

近年、下水道の普及の拡大により、河川上流域に下水処理施設が建設されることが増え、また、下水処理水量の増加は、環境水や上水原水に占める下水処理水の割合を増加させている。このように、下水処理水を含む環境水が上水に利用されることが多くなりつつある。環境水域への負荷削減、上水道施設と下水道施設間における悪循環形成の阻止、一旦形成された悪循環を断ち切るためには、下水処理施設においてクリプトスポリジウムを十分に安全なレベルまで除去するか不活化しなければならない。また、クリプトスポリジウムは下水処理過程で汚泥中に移行することから、汚泥の再利用にあたっては、汚泥の衛生的処理を確実にすることも重要である。

クリプトスポリジウムは、少ない個数で感染が成立し、塩素消毒に著しく耐性があり通常の病原細菌とは大きく異なる特徴を有している。これまでの病原細菌に対する不活化法では、不活化効果は期待できないことから、下水処理過程においても新たな制御手法を至急確立する必要がある。

2. 目的

前年度までの研究において、下水処理場に流入するクリプトスポリジウムオーシストのほとんどは、凝集沈殿処理や活性汚泥処理により汚泥に移行することを明らかにした。汚泥の再利用における感染リスクを低下させるためには、汚泥処理過程で安全なレベルまでオーシストを不活化しておく必要がある。汚泥処理過程におけるオーシストの不活化効果は未解明であることから、汚泥処理過程におけるオーシストの不活化効果を明らかにする必要がある。汚泥処理過程におけるクリプトスポリジウムの生残率に影響を及ぼす重要な環境因子は、水温と時間であると考えられる。オーシストの感染性は60℃以上で容易に消失されることは報告されているが、4～60℃の水温においてオーシストの生残率を経時的に調査した報告は少ない。そこで、本研究では、オーシストの生育活性の評価に利用されることが多い脱囊法から、4～60℃の範囲におけるクリプトスポリジウムオーシストの生残率の減少傾向を探った。

3. 実験方法

2.1 供試クリプトスポリジウムオーシスト

本実験で使用したクリプトスポリジウムオーシストは、大阪市立大学医学部医動物学教室の井関基弘博士から分与された *Cryptosporidium parvum* (HNJ-1) である。実験に供するオーシストは、HNJ-1株をSCIDマウスで継代し、排出された糞便から比重1.10のPercollシヨ糖液による遠心浮遊法で精製し、リン酸緩衝液で遠心

洗浄した。なお、本実験では、排出されてから1週間以内に精製・洗浄したオーシストを実験に供した。

2.2 実験操作

本実験では、4, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60°Cの温度条件下で0から150日間保存したオーシストの生残率を脱囊法から評価した。実験では、15mlのチューブと1.5mlのチューブを使用した。4から45°Cまでの実験では、10⁶個/1mlにリン酸緩衝液で調整したオーシスト液10mlを15mlチューブに入れ、このチューブを10, 20, 30, 40, 45°Cに設定したインキュベータ内に保管した。4°Cの条件は4°Cに設定された冷蔵庫に保管した。その後、経日的に保存用チューブからオーシスト液を0.2ml取り出し、このオーシスト液について脱囊操作を行った。50, 55, 60°Cのケースでは、オーシスト液が設定温度にできるだけ速く到達するように1.5mlのマイクロチューブを使用した。このチューブに10⁶個/1mlのオーシスト液を1.5ml入れ、このチューブを50, 55, 60°Cに設定したウォーターバスで保温し、経時的に各チューブからオーシスト液を0.2mlを取り出し脱囊操作を行った。脱囊操作は2.3に示す。なお、本試験は全ケース3回行った。

2.3 脱囊操作

脱囊操作は、基本的にCampbellら²⁾の方法によった。脱囊操作は次のとおりである。脱囊操作を行う試料0.2mlは、1.5mlのチューブへ入れ、4°C, 11000G, 1分の条件で遠心分離を行い、底部0.1mlを残し上澄水を吸引除去した。次に、塩酸酸性HBSS (pH2.75)液を1ml加え、37°Cに設定したウォーターバスにより30分間保温した。その後、4°C, 11000G, 1分の条件で遠心分離を行い、底部0.1mlを残し上澄水を吸引除去した。次に、HBSSをベースに調整した0.1%デソキシコール酸ナトリウムと0.2%炭酸水素ナトリウムの混合液を1ml加え、37°Cに設定したウォーターバスにより4時間保温した。脱囊操作を終えたチューブは、4°C, 11000G, 1分の条件で遠心分離した後、上澄水0.5mlを吸引除去し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液を0.5ml加えて4°Cの冷蔵庫に一晩保管し、翌日、2.4の手順により蛍光抗体染色を行った。

2.4 蛍光抗体染色操作

本実験では、空オーシストと完全オーシストを迅速に判別できるフローサイトメトリーを脱囊評価に利用した。オーシストをフローサイトメーターで検出する場合、オーシストを蛍光抗体染色する必要がある。本研究では、FITC直接蛍光抗体試薬(Crypt-a-glo, waterborne社製)をリン酸緩衝液で10倍に希釈し、0.45 μmのシリンジフィルターでろ過処理したものを使用した。蛍光抗体染色は、1.5mlのチューブ内で次の通り行った。蛍光抗体染色を施すサンプルは4°C, 11000G, 1分の条件で遠心分離し、底部0.1mlを残し上澄水を吸引除去した後、このチューブにヤギ血清0.1mlと10倍希釈蛍光抗体試薬を0.1ml加えて攪拌し、室温暗所で45分間、蛍光抗体染色を行った。染色終了後、リン酸緩衝液を1ml加え攪拌し、4°C, 11000G, 1分の条件で遠心分離を行い、底部0.1mlを残し上澄水を吸引除去した。次に、このチューブに0.1%Tween80溶液を1ml加え攪拌した後、目開き37 μmのナイロン製メッシュでろ過し、このろ液中のオーシストの脱囊率を算出した。

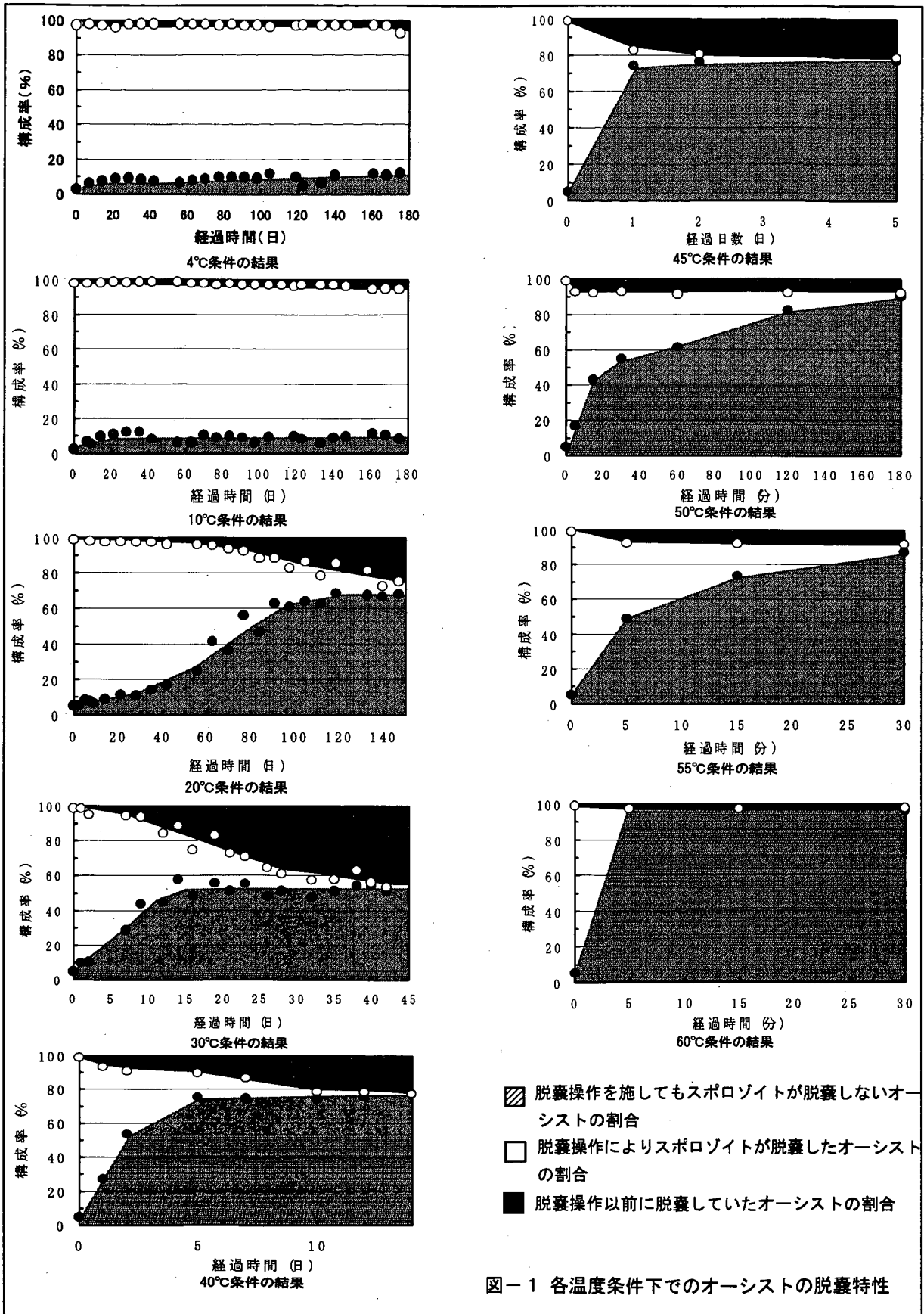
2.5 フローサイトメーターの設定条件

フローサイトメトリーによる完全オーシストと空オーシストの判定は基本的にVesey³⁾らの方法によった。なお、オーシストは10000個測定した。フローサイトメーターは、Beckman Coulter社製のALTRAを使用した。フローサイトメーターの分析条件は次のとおりである。アルゴンレーザー出力:40mW, FS:106V, PMT1:378V, PMT2:541V, ディスクリミネーター660、フローレイト:約200個/秒。

以上の脱囊操作による新鮮なオーシストの脱囊率は、90～95%の範囲であった。

2.6 生残率の計算方法

脱囊率からのオーシストの生残率の算出は小澤ら⁴⁾の方法を基本とした。この評価法では、脱囊操作によりスポロゾイトが脱囊したオーシストを生育活性有りと判定し、脱囊操作前に脱囊していたオーシストおよび脱囊



操作で脱糞しなかったオーシストは、生育活性無しと判定される。

$$V = (E_a - E_b) / (E_c - E_d) \dots \dots (1)$$

ここで、

V : 生残率 (脱糞操作によりスポロゾイトが脱糞したオーシストの割合)

E a : 各温度条件下で各期間保存した後における脱糞操作後の脱糞率 (%)

E b : 各温度条件下で各期間保存した後における脱糞操作前の脱糞率 (%)

E c : コントロール (新鮮なオーシスト) の脱糞操作後の脱糞率 (%)

E d : コントロール (新鮮なオーシスト) の脱糞操作前の脱糞率 (%)

$$\text{脱糞率 (\%)} = (\text{全検出オーシスト個数} - \text{完全オーシストの個数}) / \text{全検出オーシストの個数} \times 100 \dots \dots (2)$$

3. 実験結果

図-1に各温度条件下でのオーシストの脱糞特性を示した。図-1よりオーシストは、保存しているだけでも脱糞することが明らかとなった。保存しているだけで脱糞するオーシストの割合が高い温度条件は、30℃であった。30℃の条件では、約4割のオーシストが保存しているだけで脱糞していた。2.6で定義した生残率から各温度条件における経過時間とオーシストの生残率の関係を図示すると、図-2、3、4が得られる。各温度で生残率が90%まで減少する時間を図より読みとると60℃では約3分、55℃では42分、50℃では3時間、45℃では31時間、40℃では7日、30℃では31日、20℃では150日となった。10℃及び4℃では、150日間保存した後もオーシストの生残率の減少は10%以下であった。図-5は、図-2、3、4の結果を基に、各温度条件下においてオーシストの生残率が90%、99%、99.9%減少するまでに要する時間を外挿した結果

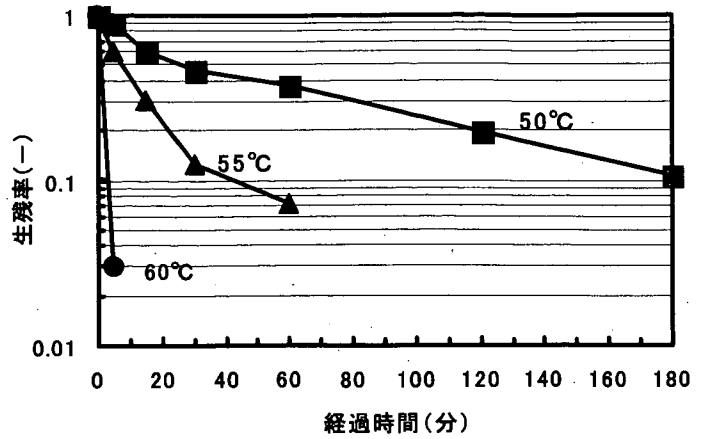


図-2 50℃, 55℃, 60℃条件下での経過時間とオーシストの生残率の関係

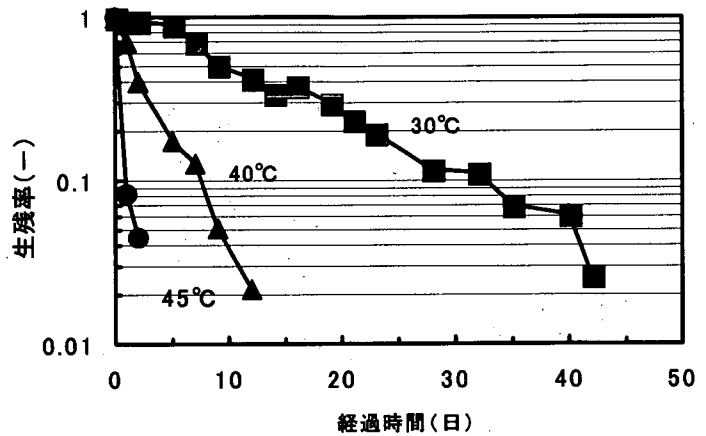


図-3 30℃, 40℃, 45℃条件下での経過時間とオーシストの生残率の関係

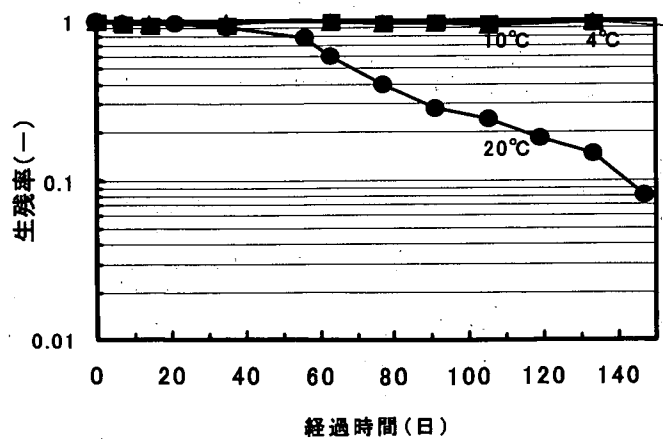


図-4 20℃, 10℃, 4℃条件下での経過時間とオーシストの生残率の関係

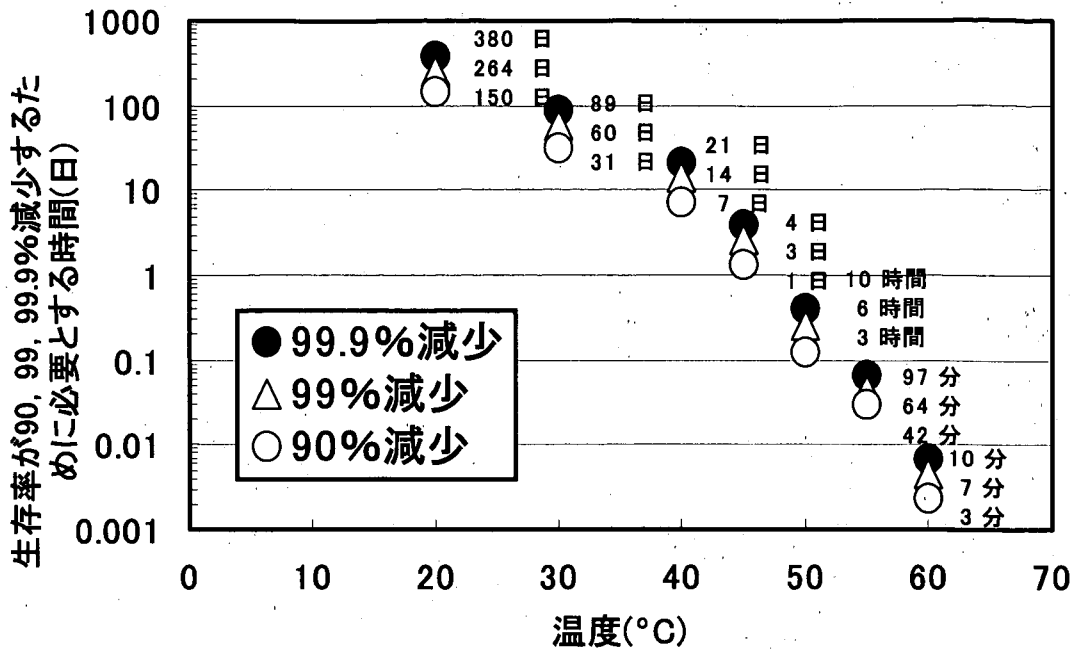


図-6 各温度条件下において生残率が90, 99, 99.9%減少するために必要とする時間を図示したものである。

4. 考 察

本実験から温度20~60°Cの範囲におけるクリプトスポリジウムパルブムオーシストの生残率の減少速度を把握することができた。一方、4°Cおよび10°Cの条件下で0~150日間保存しても、オーシストの生残率はほとんど減少せず、オーシストの生残率の減少速度は得られなかった。図-6から、4°Cおよび10°Cの条件でオーシストの生残率が90%減少するまでのおおよその時間を推測すると、200日以上は必要と考えられる。Medemaら⁵⁾は、5°Cおよび15°Cの河川水中にオーシストを6ヶ月以上保存した後においても、生育活性のあるオーシストは検出されたと報告しており、低温環境下にあるオーシストは、長期間生存することが予想される。

温度とオーシストの感染性を調査した報告はFayerら⁶⁾のものがある。Fayerらは、-10~35°Cの範囲におけるオーシストの感染性をマウスによる感染実験から評価している。Fayerらの報告によると、30、20、10、5°Cの条件においてマウスへの感染性を90%減少(10匹中1匹が感染)させるまでの期間は、30°Cでは4週間(28日)、20°Cでは24週間(168日)であった。10°C、5°Cでは24週間(168日)保存した後も感染力はほとんど失われていない。また、60°C以上の高温域の感染実験¹⁾では、65°C、5分以上でマウスへの感染性が消失されることを報告している。Vergara-Castiblancoらは、オーシストの生育活性と感染性の相関は株により異なることを指摘している⁷⁾。このことから、著者らの脱嚢試験の結果からオーシストの感染性が消失される条件を明らかにすることや株が異なるFayerらの結果と比較することはできないが、オーシストの生存性や感染性の減少は、温度が上昇するに従い高くなることは明らかである。本研究から得られた温度とオーシストの生残率の減少速度の関係から、汚泥処理過程でのオーシストの生残率の減少に有効な処理は、発酵温度が60°C近くまで達するコンポストや55°Cの高温嫌気性消化であると推察される。オーシストの生残率は温度の他に塩分やアンモニアにも影響されることが報告⁸⁾⁹⁾されている。このことから、オーシストの生残率は保存する溶媒により変化すると

考えられ、今後、汚泥中のオーシストの生存可能期間も調査する必要がある。

5. まとめ

本研究では、脱嚢-フローサイトメトリー試験から、水温4~60℃の条件下におけるクリプトスポリジウムパルブムオーシストの生残率を経時的に調査した。その結果、オーシストの生残率は、水温が高くなるに従い速く減少した。オーシストの生残率が90%減少するに要する時間は、60℃では3分、55℃では42分、50℃では3時間、45℃では31時間、40℃では7日、30℃では31日、20℃では150日、10、4℃では150日保存後でもオーシスト生残率は10%以下であった。

今後、衛生上の安全性を確保するための処理レベルを決定するためには、感染実験からもオーシストの感染性を判定する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) R. Fayer: Effect of High Temperature on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 8, pp. 2732-2735, 1994
- 2) A. T. Campbell, L. J. Roberttson and H. V. Smith: Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts: Correlation of In Vitro Excystation with Inclusion or Exclusion of Fluorogenic Vital Dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 11, pp. 3488-3493, 1992
- 3) G. Vesey, K. R. Griffiths, M. R. Gauci, D. Deere, K. L. Williams and D. A. Veal: Simple and Rapid Measurement of *Cryptosporidium* Excystation Using Flow Cytometry, *International Journal for parasitology*, Vol. 27, No. 11, pp. 1353-1359, 1997
- 4) 小澤克行, 竹馬大介, 平田強: 脱嚢法とDAPI/PI染色法による *Cryptosporidium parvum* オーシストの生育活性値に及ぼす酸前処理の影響, *水環境学会誌*, Vol. 22, No. 10, pp. 827-832, 1999
- 5) G. J. Medema, M. Bahar, and F. M. Schets: Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, *Fecal Enterococci* and *Clostridium perfringens* in River Water: Influence of Temperature and Autochthonous Microorganisms, *Water Science and Technology*, Vol. 35, No. 11-12, pp. 249-252, 1997
- 6) R. Fayer, J. M. Trout, and M. C. Jenkins: Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperatures, *Journal of Parasitology*, Vol. 84, No. 6, pp. 1165-1169, 1998
- 7) C. A. Vergara-Castiblanco, F. Freire-Santos, A. M. Oteiza-Lopez, M. E. Ares-Mazas: Viability and infectivity of two *cryptosporidium parvum* bovine isolates from different geographical location, *Veterinary Parasitology*, Vol. 89, pp. 261-267, 2000
- 8) F. Freire-Santos, A. M. Oteiza-Lopez, C. A. Vergara-Castiblanco, E. Ares-Mazas: Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques, *Veterinary Parasitology*, Vol. 89, pp. 253-259, 2000
- 9) Michael B. Jenkins, Dwight D. Bowman, William C. Ghirso: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 2, pp. 784-788, 1998

6. 下水中病原性微生物の同定方法に関する研究

汚泥研究室 室長 森田 弘昭

主任研究員 落 修一

研究員 北村 友一

1. はじめに

下水や下水処理水及び汚泥中の病原性微生物を同定し定量することは、水環境の微生物学的安全性を評価するために重要である。これまで微生物の検出は、主に培養法により行われてきたが、微生物の中には寒天培地上にコロニーを形成せず、また液体培地中でも増殖しないために検出することが難しいものも多く存在する。また、培養法は、結果が出るまでに2日から1週間程度かかることからタイムラグが生じる。さらに、近年、コレラ菌や大腸菌O157などの病原菌を含む多くの細菌が、飢餓状態等のストレスを受けることにより、VBNC(Viable but nonculturable:生きているが培養できない)状態で存在することがあることも明らかになってきている¹⁾。病原性微生物の中で、病原性原虫も検出することが困難な微生物の一つである。例えばクリプトスポリジウム原虫は、細胞内寄生性であるため宿主外では増殖しない。そのため通常の培養法による検出方法を適用することができない。さらに、環境中ではオーシストとして存在し、その直径も5 μ mと非常に小さく、多くの夾雑物の中からオーシストだけを分離精製することは非常に難しい。培養法による微生物の検出は、微生物数を過小評価する可能性があり、また、もともと培養不可能な微生物も存在することから、微生物を検出定量する上では重要な問題となる。

微生物の培養法に変わる検出方法としては、遺伝子検出法や抗原抗体検出法が考えられている。遺伝子検出法は、目的微生物だけが持っている遺伝子を検出するものであり、PCR法やFISH法などが適用される。抗原抗体法は、抗原抗体反応を利用したものであり、蛍光抗体法やELISA法が適用される。しかし、これらの方法による微生物の検出法は十分に確立されておらず、その確立が望まれている。そこで、本研究は、下水や汚泥中の病原性微生物を迅速かつ簡便に検出するための方法の確立を目指している。

2. 研究目的

本研究ではフローサイトメトリー及びPCR法を適用し下水中の病原性原虫の迅速検出方法の開発を目指している。下水中の病原性原虫をPCR法により高感度に検出するためには、下水中に含まれる様々な粒子から病原性原虫を分取し、濃縮・精製する操作が必要不可欠である。次に、病原性原虫を検出するための至適PCR条件を明らかにすることも重要である。そこで、本年度は、下水汚泥中のクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストをフローサイトメトリーにより同時検出できるかどうかを検討した。さらに、クリプトスポリジウムオーシストをPCR検出するために必要となるDNA抽出方法と高感度検出可能なプライマーの検索を行った。

3. 実験方法

3.1 供試クリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシスト

本実験に使用したクリプトスポリジウムオーシストは、井関基弘博士(当時大阪市立大学医学部)から分与された *Cryptosporidium parvum* (HNJ-1 株)、ジアルジアシストは Waterborne 社から購した *Giardia lamblia* である。

3.2 フローサイトメトリーによるクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの同時検出方法

実験では、嫌気性消化汚泥にクリプトスポリジウムオーシスト 10^4 個とジアルジアシスト 10^2 個を添加し、この試料に対し Waterborne 社製のクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの同時 FITC 直接蛍光抗体試薬 (Aqua-glo) により蛍光染色した。蛍光染色後、ナイロン製メッシュにより夾雑物を除去し、ろ液をフローサイトメトリーにより分析した。分析手順の詳細を図-1 に示す。フローサイトメトリーの検出器は、前方散乱強度検出器、側方散乱強度検出器、FITC 強度検出器の3つの検出器を使用し、オーシストとシストが判別できるかどうかを検討した。フローサイトメトリーの

分析条件は以下のとおりである。アルゴンレーザー出力: 40 mW, 前方散乱検出器電圧 106 V, 側方散乱検出器電圧 378 V, FITC 蛍光検出器電圧 541 V, フローレート約 200 個/秒。

3.3 PCR法によるクリプトスポリジウムオーシストの検出

クリプトスポリジウムオーシストを高感度 PCR 検出するためには、高回収率 DNA 抽出方法とクリプトスポリジウムの遺伝子に特異的に反応するプライマーが必要となる。クリプトスポリジウムオーシストからの DNA 抽出方法は、文献調査した結果、凍結融解法^{2) 3)} が多く利用されている。また、クリプトスポリジウムのプライマーについても、現在までに国内外においていくつか開発されてきている^{4) 5) 6) 7)}。本研究では、クリプトスポリジウムの DNA の抽出には凍結融解法の代わりに、簡便な DNA 抽出キットの適用性を検討した。使用した DNA 抽出キットは、Qiagen 社製 Dneasy Tissue Kit 中の2種類の方法であり、本法がクリプトスポリジウムの DNA 抽出に適用できるかどうかを検討した。抽出方法を図-2, 3 に示す。

次に、この DNA 抽出液を試料とし、これまでに報告されているプライマーの検出感度を比較し、高感度検出可能なプライマーを検索した。比較したプライマーは、Wu⁴⁾, Laxer⁵⁾, Awad^{5) 6)}, Rochelle⁷⁾ らが設計したものである。PCR 液の組成は、1 × PCR Gold buffer, 3mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, プライマー-50pmol, 1.5U AmpliTaqGold である。PCR 条件は、95°C, 10 分加熱後、熱変性 95°C, 30 秒、アニリング 50 ~ 55°C, 30 秒、伸長反

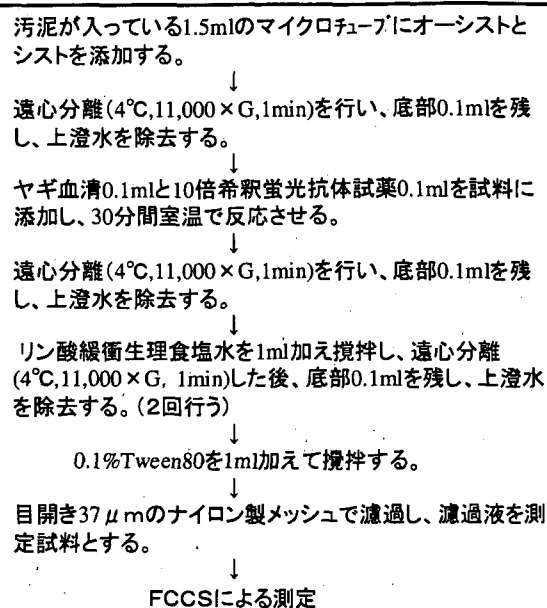


図-1 オーシストとシストの直接蛍光抗体染色の手順

応72℃, 1分の条件で35または40サイクル行い、最後に72℃, 10分の伸長反応を加えた。表-1にクリプトスポリジウムのプライマー配列、フラグメントサイズ及び各プライマーのアーニリング温度を示した。実験では、オーシストを 2.4×10^5 個から6段階のミリQ水により希釈系列を作成し、DNA抽出-PCR-電気泳動で検出可能なレベルを決定した。

4. 実験結果と考察

4.1 フローサイトメトリーによるクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの同時検出結果

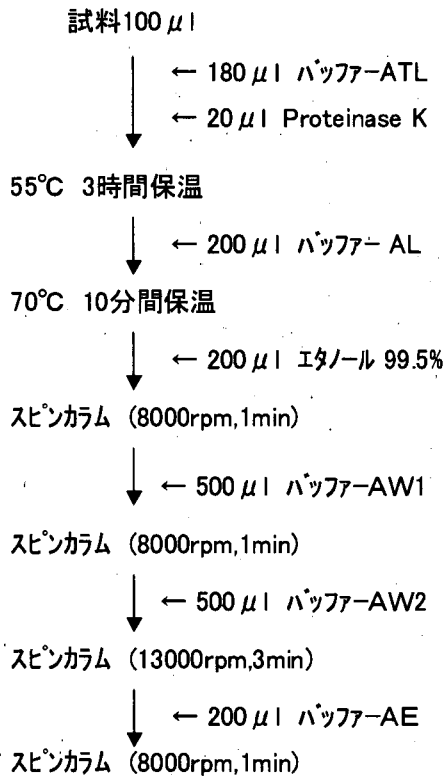


図-2 DNA抽出方法1

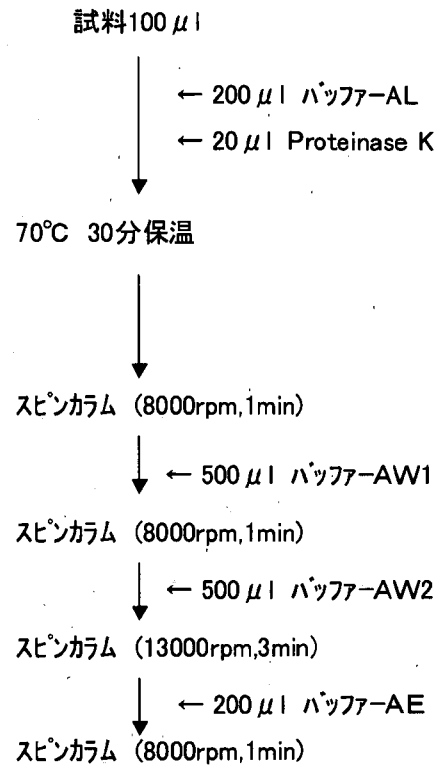


図-3 DNA抽出方法2

表-1 実験に使用したクリプトスポリジウムのプライマー配列とアーニリング温度

開発者	標的遺伝子	プライマー名	プライマー配列	フラグメント サイズ	アーニリング 温度
Wu ⁴⁾	?	SB012F: SB012R	5'-CTCCGTTTCGATGATGCAGATG-3' 5'-CGGCCCTGTAGAAATAAGTCA-3'	458	51°C
Laxer ⁵⁾	Chromosomal	Lax469F Lax869R	5'-CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTACGAA-3' 5'-TAGCTCCTCATATGCCTTATTGAGTA-3'	451	52°C
Awad ⁵⁾	18SrRNAgene	AWA995F AWA1206R	5'-TAGAGATTGGAGGTTGTTCT-3' 5'-CTCCACCAACTAAGAACGGCC-3'	256	54°C
Awad ⁶⁾	18SrRNAgene	AWA772F AWA1235R	5'-AGTGCTTAAAGCAGGCAACTG-3' 5'-CGTTAACGGAAATTAACCCAGAC-3'	556	50°C
Rochelle ⁷⁾	Hsp70gene	cphsp2423F cphsp2764R	5'-AAATGGTGAGCAATCCTCTG-3' 5'-CTTGCTGCTCTTACCAGTAC-3'	361	55°C

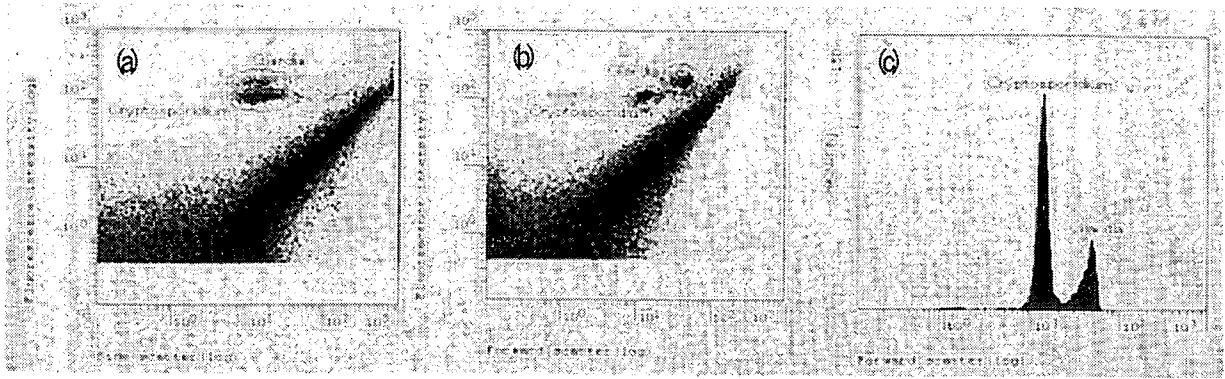


図-4 フローサイトメトリーによる汚泥中のクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの同時検出
(a) 側方散乱強度と蛍光強度の関係, (b) 前方散乱強度と蛍光強度の関係, (c) 前方散乱強度と計数個

図-4にフローサイトメトリー分析結果を示した。図(a)は側方散乱強度と蛍光強度の関係を、図(b)は側方散乱強度と前方散乱強度の関係を、図(c)は前方散乱強度と計数個の関係を示した。図-4から分かるように、クリプトスポリジウムオーシストはジアルジアシストより蛍光強度と前方散乱強度が小さくなることが分かった。この蛍光強度と前方散乱強度の差異からオーシストとシストを判別できることが分かる。オーシストの直径は約 $5\mu\text{m}$ であるのに対しシストの直径は約 $10\mu\text{m}$ とオーシストより大きい。オーシスト壁の表面積は、シスト壁の表面積より小さくなる。よって、オーシストとシスト間での蛍光強度の差異は、オーシスト壁に吸着する蛍光物質の大きさによるものである。前方散乱の差異は粒子の大きさによるものである。また、汚泥粒子の散乱特性は、オーシストとシストの散乱特性と異なることが分かった。これらのことから、汚泥中のオーシストとシストの同時検出は可能となることが分かる。

4.2 PCR法によるクリプトスポリジウムオーシストの検出結果

図-5、6は、SB012プライマーを使用

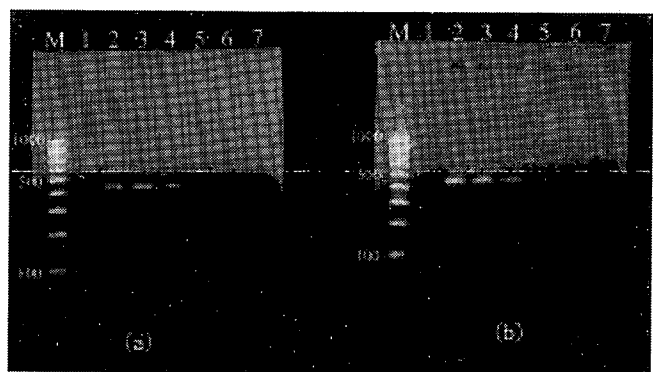


図-5 DNA抽出方法と検出感度の関係1

(a) 抽出方法1 (b) 抽出方法2

PCR条件 プライマー: SB012F-R, サイクル数: 35回
M: 100-1000マーカー, レーン1: ネガティブコントロール, レーン2: 2.4×10^5 オーシスト, レーン3: 2.4×10^4 オーシスト, レーン4: 2.4×10^3 オーシスト, レーン5: 2.4×10^2 オーシスト, レーン6: 2.4×10^1 オーシスト, レーン7: 2.4×10^0 オーシスト

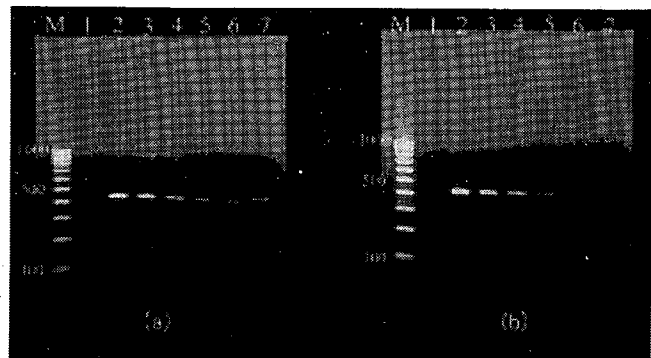


図-6 DNA抽出方法と検出感度の関係2

(a) 抽出方法1 (b) 抽出方法2

PCR条件 プライマー: SB012F-R, サイクル数: 40回
各レーンの試料性状: 図-5と同じ

した条件におけるDNAの抽出方法とサイクル数が、クリトスポリジウムの検出感度にどの程度影響するかを示したものである。DNAの抽出方法について見ると、サイクル数35回の条件では、検出感度に顕著な違いはみられないが、サイクル数40回の条件では、DNA抽出方法1を採用した方が検出感度が高くなることが分かった。DNA抽出方法1、サイクル数40回の条件では、 2.4×10^0 個のオーシストの検出が可能であった。DNA抽出方法1と2の異なる点は、プロテナーゼKの処理温度と処理時間である。プロテナーゼKは、55℃付近で最もタンパク質分解活性が高くなることから、細胞の溶解が高まり、これがDNAの回収率を高めたものと考えられる。

次に、プライマーの違いが検出感度にどの程度、影響するについて検討した結果を図-2、3、4、5、6に示す。図よりプライマーの種類によって検出感度が大きく異なることが分かる。検出感度が高いプライマーから順番に記載すると、SB012 (10^0 個まで検出可)、LAX469F-LAX869R (10^0 個まで検出可)、cphsp2423F-2764R ($10^0 \sim 1$ 個まで検出可)、AWA772F-AWA1235R (10^1 個まで検出可)、AWA995F-AWA1206R

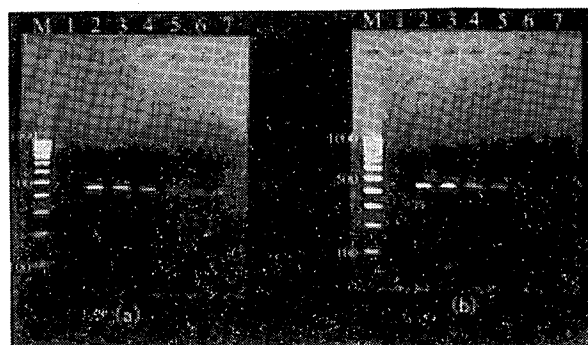


図-7 DNA抽出方法と検出感度の関係3

(a) 抽出方法1 (b) 抽出方法2

PCR条件 プライマー:LAX469F-LAX869R, サイクル数:40回
各レーンの試料性状:図-5と同じ

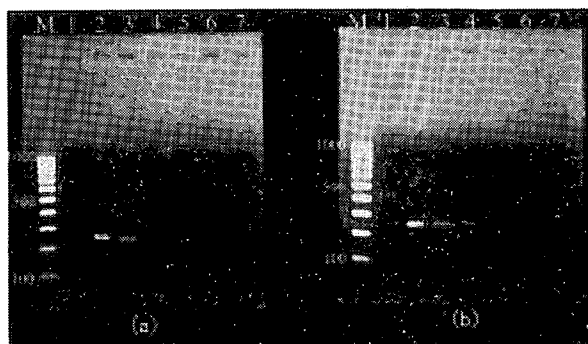


図-8 DNA抽出方法と検出感度の関係4

(a) 抽出方法1 (b) 抽出方法2

PCR条件 プライマー:AWA995F-AWA1206R, サイクル数:40回
各レーンの試料性状:図-5と同じ

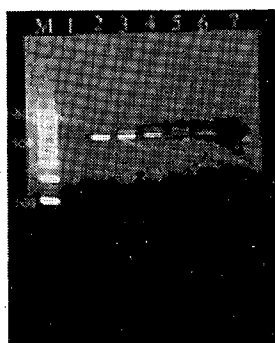


図-9 プライマーAWA772F-AWA1235R
を使用した場合の検出感度
DNA抽出方法:DNA抽出方法2
サイクル数:40回
各レーンの試料性状:図-5と同じ

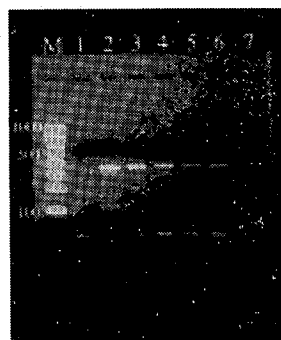


図-10 プライマーcphsp2423F-2764R
を使用した場合の検出感度
DNA抽出方法:DNA抽出方法2
サイクル数:40回
各レーンの試料性状:図-5と同じ

(10^3 個まで検出可)となる。

本実験から得られた結果は、HNJ-1株に関するものである。環境中に存在する様々なクリプトスポリジウムを高感度検出するためには、今後、様々な株を使用し、至適PCR条件を明らかにする必要がある。また、フローサイトメトリーにより、クリプトスポリジウムとジアルジアシストの同時検出及び濃縮・精製が可能であることから、マルチプレックスPCR法によるクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの同時検出方法の開発も重要である。

5. まとめ

本研究では、下水汚泥中のクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストをフローサイトメトリーにより同時検出できるかどうかを検討し、さらに、クリプトスポリジウムオーシストをPCR検出するために必要となるDNA抽出方法と高感度検出可能なプライマーの検索を行った。本研究で得られた結果を以下に示す。

(1)クリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストをフローサイトメトリーにより分析した結果、オーシストとシストの散乱特性は異なっていた。この散乱特性の差異から下水汚泥中のクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストのフローサイトメトリーによる同時検出は可能であった。

(2)クリプトスポリジウムオーシストのDNA抽出法は、市販の抽出キットでも可能であった。DNAの抽出率はプロテナーゼKの処理温度と処理時間に影響され、DNAの回収率が高くなるプロテナーゼKの処理条件は55℃、3時間であった。

(3)クリプトスポリジウムのPCR検出において、検出感度が高いプライマーから順番に記載すると、SB012F-SB012R、LAX469F-LAX869R (10^0 個まで検出可)、cphsp2423F-2764R ($10^0\sim 1$ 個まで検出可)、AWA772F-AWA1235R (10^1 個まで検出可)、AWA995F-AWA1206R (10^3 個まで検出可)となった。

参考文献

- 1)木暮一啓：生きているが培養できない病原菌に挑む，科学，Vol.69，No.6，pp.508-516，1999
- 2)Cynthia L. Mayer, Carol J. Palmer:Evaluation of PCR, Nested PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Species in Wastewater, Applied and Environmental Microbiology, Vol.62, No.6, pp.2081-2085,1996
- 3)Dominique Champliaud, Philippe Gobet, Muriel Naciri, Odile Vagner, Jose Lopez, Jean Christophe Buisson, Istvan Varga, Geraldine Harly, Roseline Mancassola and Alain Bonnin:Failure to Differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C.meleagridis* based on PCR Amplification of Eight DNA Sequences, Applied and Environmental Microbiology, Vol.64, No.4, pp.1454-1458,1998
- 4)Z. Wu, I.Nagano, A.Matsuo, S.Uga, I.Kimata, M.Iseki and Y.Takahashi:Specific PCR Primer for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity, Molecular and Cellular Probes,Vol.14,pp-33-39,2000
- 5)Paul A.Rochelle, Ricardo de Leon, Mic H. Stewart and Roy L. Wolfe:comparison of Primers and Optimization of PCR conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol.63, No.1, pp.106-114,1997
- 6)F. M. Awad-El-Kariem, D. C. Warhurst and V. McDonald:Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using system based on PCR and endonuclease reaction, Parasitology, Vol.109 vol. 109, pp19-22, 1994
- 7)Paul A. rochelle, Donna M. Ferguson, Troy J. Handojo, Ricardo de Leon, Mic H. Stewart, Roy L. Wolfe:An Assay Combining Cell Culture with Reverse Transcriptase PCR to Detect and Determin the Infectivity of Waterborne *Cryptosporidium parvum*, Applied and Environmental Microbiology, Vol.62, No.5, pp.2029-2037,1997

7. 環境ホルモン生成物質の水環境中での挙動に関する研究

水質研究室 室長 田中宏明
主任研究員 小森行也
主任研究員 白崎 亮
主任研究員 石井宏幸

1. はじめに

人や生物へ、内分泌攪乱作用を引き起こす可能性のある化学物質の問題が指摘され、環境庁では、67種類の化学物質をリストアップしている¹⁾。界面活性剤として普遍的に使用されているノニルフェノールエトキシレート（以下、NPnEO）は、このような化学物質には含まれないが、分解によりエチレン鎖が短くなるとともに、エチレン鎖の末端がカルボキシル化された化合物（以下、NPEC）を生成し、これらの物質が嫌気消化により内分泌攪乱作用を有すると疑われるノニルフェノール（以下、NP）を生成することが明らかになっており、また、国内の河川水、底質中でもNPは高い割合で検出されている²⁾。このため、発生源や排出源等での効率的な負荷削減対策を図るために、NPnEOやNPECなどの水、底泥等の水環境中での挙動を把握した上で削減戦略を検討する必要がある。

12年度は、NPnEOの生物分解実験を行い、分解生成物の把握と生分解性の把握を行った。また、綾瀬川の底泥を用いた溶出実験を実施し、溶出速度の把握を行うとともに溶出実験前後において底泥中のNP、NPnEO、NPECの変化を調査した。

2. 実験方法

2.1 NPnEOの生分解性試験

NPnEOの生分解性の確認と分解副生成物の有無について確認することを目的に以下の試験を行った。

NPnEOの代表として東京化成のポリエチレングリコールモノ-4-ノニルフェニルエーテル（NPnEO、 $n=10$ ）を供試物質とした。生分解性試験方法は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」による方法に準じた。密閉ガラス容器内にNPnEOのみを炭素源とし、標準活性汚泥法で運転している実験プラントの活性汚泥を 30mg/l になるように植種して密閉ガラス容器内で起こる酸素消費量をクーロメータを用いて測定した。また、同時にNPnEOとTOCを測定した。

酸素消費量、NPnEO、TOCの測定結果から以下の方法により分解度を求め分解性を評価した。

①酸素消費量から分解度を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{BOD} - \text{B}) / \text{TOD} \times 100$$

BOD：供試物質 100mg/l の生物化学的酸素要求量（ mg/l ）… 測定値

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量（ mg/l ）… 測定値

TOD：供試物質100mg/lが完全に酸化された場合に必要とされる理論酸素要求量（mg/l）… 計算値

②NP_nEO、TOC直接定量から分解度を算出する方法。

$$\text{分解度 (\%)} = (S_b - S_a) / S_b \times 100$$

S_a：分解度試験終了時のNP_nEO、TOCの残留量（mg/l）… 測定値

S_b：水にNP_nEOのみを添加した空試験におけるNP_nEO、TOCの残留量（mg/l）… 測定値

2. 2 NP、NP_nEO、NPECの底泥からの溶出実験

溶出実験に用いる底泥と河川水は、東京都足立区綾瀬川（内匠橋付近）で採泥及びその直上水を採水した。採泥はエックマンバージ型採泥器で数力所から採泥し混合し試料とした。採水は、川床の直上のもを採水し、以下の試験には1μmのフィルターでろ過したものを使用した。底泥をアクリル製のカラム（φ14.4cm×50cm）18本につめ、河川水を静かに加え、その後の底泥の直上水の水質変化を調査した。本試験は、空気ばっきによりDOを約6mg/lに保った好気条件と窒素ガスばっきによりDOを1mg/l以下に保った嫌気条件で行った。実験は20℃の恒温室で行った。水質測定は、0、1、3、5、7、10、15、20、30日目に各カラムから試料を採取し、水温、DO、TOC、NP、NP_nEO、NPECの分析を行った。光条件は暗条件とした。水試料のサンプリングは底泥の表層から3cmほど残し、直上水のサンプリングを行った。また、溶出実験前後（0日目と30日目）に底泥中のNP、NP_nEO、NPECの測定を行った。

NP、NP_nEOはHPLCで測定³⁾、ノニルフェノキシ酢酸はGC/MSで測定⁴⁾した。

なお、NP_nEOはエチレン鎖が1~4のものをNP_nEO, n=1-4、エチレン鎖が5以上のものをNP_nEO, n≥5として測定した。

3. 実験結果

3. 1 NP_nEOの生分解性試験

酸素消費量、NP_nEO、TOCの経時変化を図-1、図-2に示した。酸素消費量の変化は2日目までは、活性汚泥のみのコントロールとほぼ同じ変化を示しているが、2日目を以降急激に酸素消費が増えている。これは、活性汚泥中の微生物によりNP_nEOが酸化分解を受けていることを示唆している。また、酸素消費量が急激に増加すると同時にNP_nEOは減少している。

10日後の酸素消費量から10日間の分解度を求めると33%となる。また、NP_n

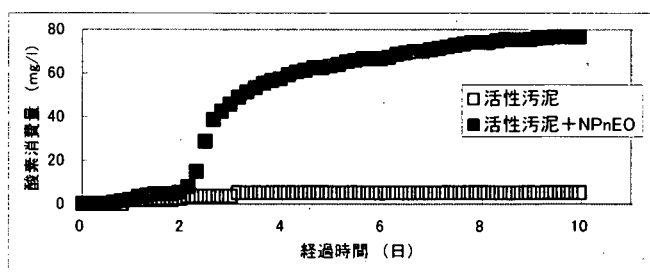


図-1 生分解性試験における酸素消費量の経時変化

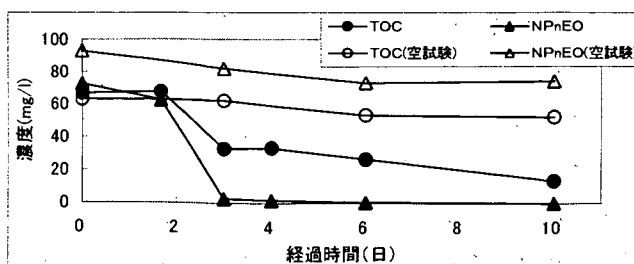


図-2 生分解性試験におけるNPnEO、TOCの経時変化

EO、TOCの測定結果から分解度を求めると100%、74%となるが、酸素消費量から求めた値と異なっている。10日間の生分解性試験においてNPnEOが0mg/lとなってもTOCが12mg/l残留していることから、NPnEOの分解副生成物が生成していることが示唆された。

NPnEOは、好気性条件下で親水基の酸化エチレン鎖の重合度が小さくなり、最終的にノニルフェノールモノエトキシレート、ノニルフェノキシ酢酸まで分解されることが知られている。本試験の試験期間10日間でNPnEOがNP1EO、NP1EC(1:1)まで分解したと仮定して理論酸素消費量を計算すると112mg/lとなる。また、エチレン鎖が2、3、4のように分解が途中で停止する場合を仮定し理論酸素消費量を計算するとその値は更に小さくなる。本試験で得た酸素消費量の72mg/lは後者に近い値となる。このことから、本試験での分解副生成物は、エチレン鎖の重合度の小さいNPnEOの可能性が示唆された。

3.2 NP、NPnEO、NPECの底泥からの溶出実験

一般水質試験結果の水温、DO、TOCの変化グラフを図-3、4、5に示す。水温はいずれの試料とも10.4~19.5℃の範囲内であり、好気、嫌気条件ともほとんど同じ変化をしている。DOは好気条件では6.9mg/lから8.4mg/l、嫌気条件では実験開始直後を除き1mg/l以下を保っており、設定条件である、好気条件(DO:6mg/l以上)、嫌気条件(DO:1mg/l以下)をほぼ満足していた。TOCは好気条件下では実験開始から3日後までは減少しその後ほぼ一定の値を示している。一方、嫌気条件下では実験開始から大きな変化は見られなかった。

NP、NPnEO、NPECの経時変化を図-6、7、8、9に示す。NPについては、その濃度変化は小さいものの好気条件、嫌気条件とも経時的に濃度上昇がみられ、好気条件では10日目がピーク、嫌気条件では20日目がピークとなった。N

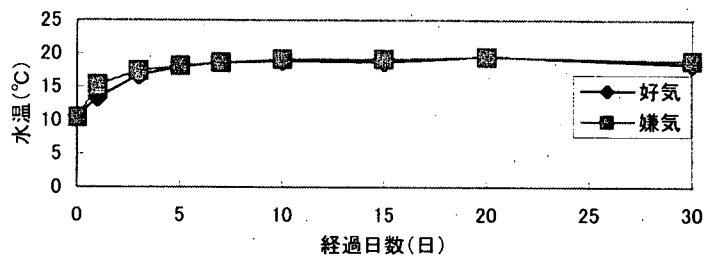


図-3 直上水の水温の経時変化

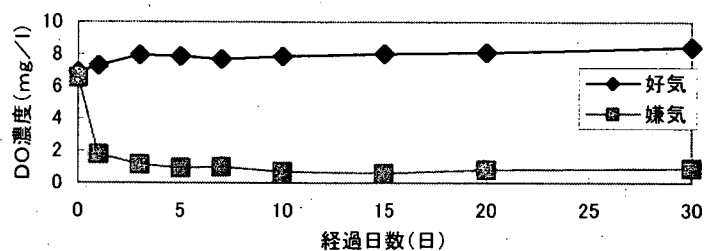


図-4 直上水のDO濃度の経時変化

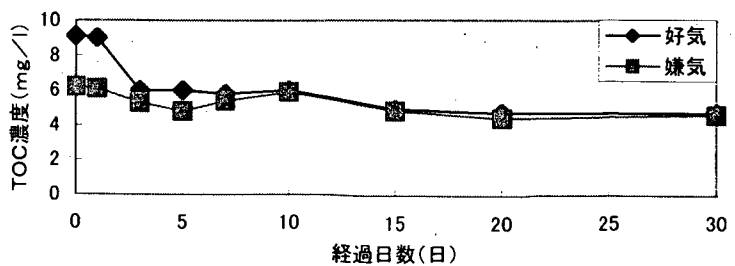


図-5 直上水のTOC濃度の経時変化

Pは底質のNPnEOから分解、溶出してくると推定される。既報告⁵⁾
⁶⁾によるとNPnEOからNPEC
 までは好気条件、NPの生成は嫌気
 条件によると言われているが、好気
 条件より嫌気条件でより多くのNP
 の溶出が見られたことは興味深い。
 NPの水中濃度は、嫌気条件の方は
 高く、NPの生成量は嫌気条件の方
 が多い。この結果は、NPの生成が
 嫌気条件で進行するという報告と一
 致している。

NPnEO, n=1-4は、好気、嫌気
 とも同様の傾向を示しており、7日
 目に急激に増加し、その後漸減した。
 NPnEO, n \geq 5は、多少の増減は
 見られるものの経時的に減少した。
 底泥からの溶出量よりも水中での分
 解量が多いことが示唆された。

NPECは、20日目を除いて、
 好気、嫌気のいずれもほぼ同様の挙
 動を示した。ほぼ15日目にピーク
 があり、その後若干減少した。NP
 ECは、NPnEOの分解物でNP
 に至る中間体であり、NPnEOの
 分解速度、NPの生成速度の両方の
 影響があり、両者に関与する微生物
 が異なると、NPECの濃度は複雑
 な変化をする可能性がある。

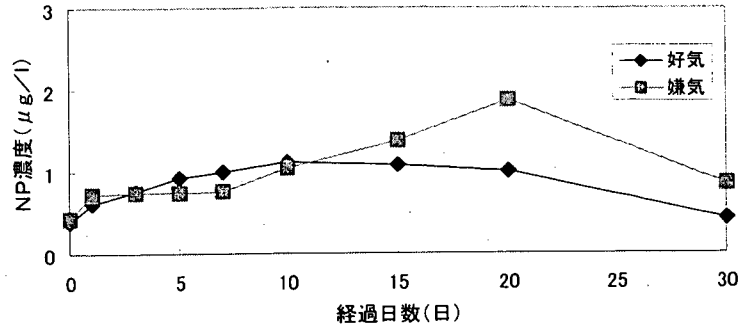


図-6 直上水のNP濃度の経時変化

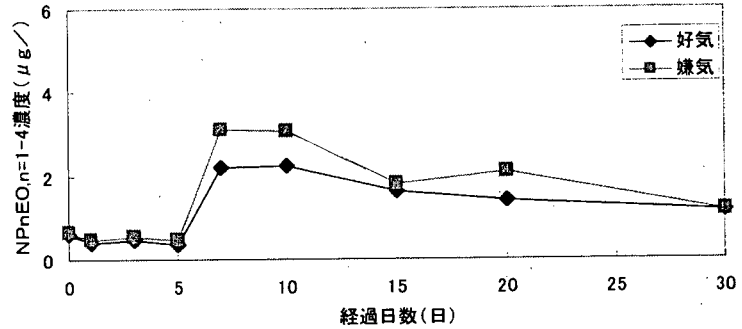


図-7 直上水のNPnEO, n=1-4濃度の経時変化

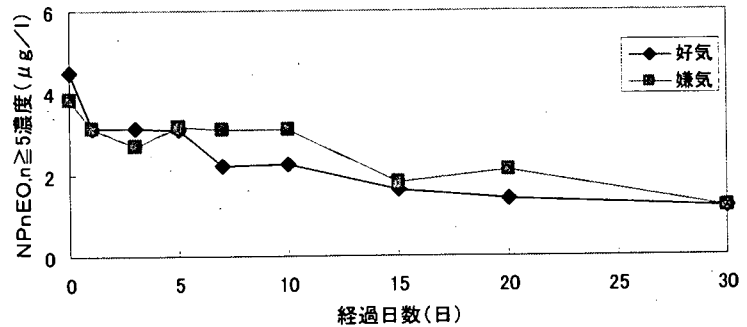


図-8 直上水のNPnEO, n \geq 5濃度の経時変化

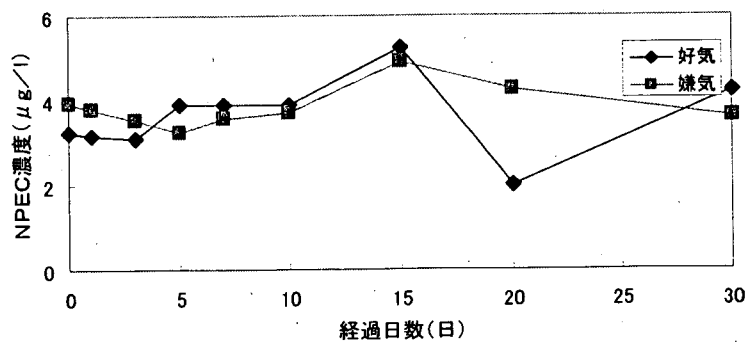


図-9 直上水のNPEC濃度の経時変化

溶出実験の実験開始前0日目と実験終了時の30日目に底泥分析を行った。その結果を図-10及び11に示す。実験終了時の測定は、好気、嫌気両条件のそれぞれの試料について、底泥を深さ方向に5cm間隔の4つに分け、それぞれの層に含まれる各測定対象物質の測定を行った。

NPは、好気、嫌気とも同様の結果を示しており、実験開始前の値に比べ少し高い値を示した。5cm間隔に分けた層別の値を見ても大きな違いは見られず、表層から深層までわずかに増加していた。底泥内は嫌気化していることが考えられることから、NPnEO、NPECが嫌気分解を受けて生成したものと思われる。

NPnEO, n=1-4 は、好気では少し減少しているのに対し嫌気では増加している。ただし、好気条件であっても15~20cmの層では増加していた。NPnEO, n=5では好気、嫌気とも同様の傾向を示している。0~15cmの層では実験開始前後でほぼ同じ値を示しているが、15~20cmの層では実験終了時に高くなっている。NPnEOは、15~20cmの深層で増加しているが、その原因については時間の経過に伴う底泥の厚密による物理的なものか、深さ方向での溶存酸素濃度の違いによって分解傾向が異なるためであるのか、さらに詳しい調査が必要である。

NPECは好気、嫌気でその傾向が異なっている。好気では、表層より深層の方が高い値を示しているが、嫌気では逆に深層より表層が高い値を示している。また、グラフでもNPECのみ単位が3桁変えてあるように、環境水での比較に比べ極端に存在量が少ないことが判った。

4. まとめ

4.1 NPnEOの生分解性試験

10日間の生分解性試験においてNPnEOが0mg/lとなってもTOCが12mg/l残留していることから、NPnEOの分解副生成物が生成していることが示唆された。

NPnEOは、好気性条件下で親水基の酸化エチレン鎖の重合度が小さくなり、最終的にノニルフェノールモノエトキシレート、ノニルフェノキシ酢酸まで分解されることが知られているが、本試験の試験期間10日間ではエチレン鎖が2、3、4のように分解途中の可能性が示唆された。

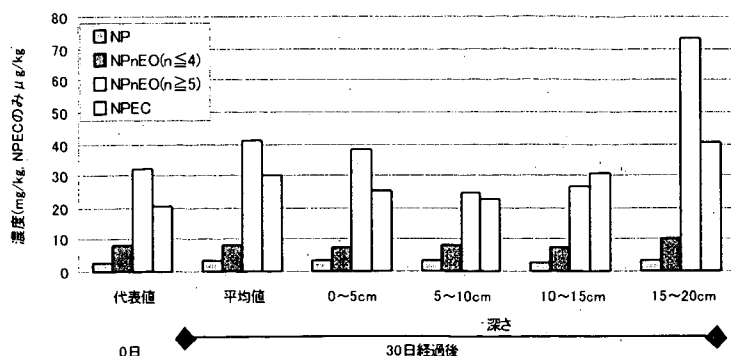


図-10 好気条件での底泥中のNP, NPnEO, NPEC濃度

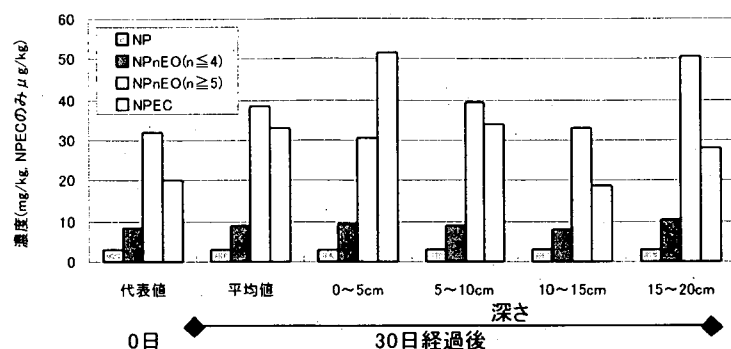


図-11 嫌気条件での底泥中のNP, NPnEO, NPEC濃度

4. 2 NP、NP_nEO、NPECの底泥からの溶出実験

NPは、その濃度変化は小さいものの好気条件、嫌気条件とも経時的に濃度上昇がみられ、底質のNP_nEOから分解、溶出してくると推定された。NP_nEOからNPECまでは好気条件、NPの生成は嫌気条件によると言われているが、本実験においても好気条件より嫌気条件でより多くのNPの溶出が見られた。

NP_nEO, n=1-4 は、好気、嫌気とも7日目に急激に増加し、その後漸減した。NP_nEO, n≥5 は、経時的に減少しており底泥からの溶出量よりも水中での分解量が多いことが示唆された。

NPECは、NP_nEOの分解物でNPに至る中間体であり、NP_nEOの分解速度、NPの生成速度の両方の影響があり、両者に関与する微生物が異なると、NPECの濃度は複雑な変化をする可能性がある。

溶出実験前後のNP、NP_nEO、NPECの測定において、NPは、好気、嫌気とも実験開始前の値に比べ底泥中で濃度がわずかに増加した。底泥内は嫌気化していることが考えられることから、NP_nEO、NPECが嫌気分解を受けて生成したものと思われる。NP_nEO, n=1-4 は、好気では少し減少しているのに対し嫌気では増加していた。NP_nEO, n≥5 では好気、嫌気とも0~15 cmの層では実験開始前後でほぼ同じ値を示していたが、15~20 cmの層では実験終了時に高くなっていた。NPECは好気、嫌気でその傾向が異なっていた。好気では、表層より深層の方が高い値を示し、嫌気では逆に低層より表層が高い値を示していた。また、NPECは間隙水中に主に存在するためか、泥中の存在量はきわめて少なかった。

底泥からのNP、NP_nEO、NPECの溶出は、底泥からの溶出の他に対象物質の水中での分解もありこれらを総合的に解明するためには、さらに詳しい検討が必要である。

【参考文献】

- 1) 環境庁, 外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98—, 環境庁, 1998
- 2) 例えば, 建設省河川局・都市局下水道部, 平成11年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(春期・夏期調査), 建設省河川局・都市局下水道部, 1999
- 3) 日本下水道協会, 下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル, 日本下水道協会, 2000
- 4) 小玉, アルキルフェノール関連物質の測定方法の検討, 第16回環境測定技術事例発表会
- 5) Ahel M. et al., Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-1, Occurrence and transformation in sewage treatment, Water Research, Vol. 28, No. 5, pp. 1131-1142, 1994
- 6) 小森行也 他, 活性汚泥処理プロセスにおけるNP、NPEOの挙動, 第37回下水道研究発表会講演集, 日本下水道協会, 2000