

11. その他の予算による研究
[リサイクルチーム]

1. 下水汚泥有効利用に伴うリスク評価に関する研究

国土交通省

(委託先) 独立行政法人 土木研究所
材料地盤研究グループ リサイクル

鈴木 穰
諏訪 守
五十嵐 勲

研究期間 平成 13 年度～ 15 年度

平成 15 年度当初予算額 17,737 千円

Study on Risk Assessment for Reuse of Sewage Sludge

(FY2001～2003)

Yutaka SUZUKI, Mamoru SUWA, Isao IGARASHI

Recycling Research Team, Material and Geotechnical Engineering Research Group
Independent Administrative Institution Public Works Research Institute

It is necessary to promote the reuse of the sewage sludge in order to form the recycling-based society. At present, the sewage sludge is recycled as construction material and fertilizer. In addition, the sludge safety is important in order to promote the reuse.

PRTR (Pollutant Release and Transfer Register) law was enforced in 2001. The sewerage manager must measure and reported the behavior of the heavy metal in the sewage treatment process. The goal of this study is to clarify the behavior of the heavy metal in the sewage treatment process and the elution amount of heavy metal from the sludge reuse product.

Optimization of analytical methods of heavy metals (Zn, Sb, Cd, Ag, Cr, V, Co, Se, Cu, Ni, Pb, Ba, As, Be, B, Mn, Mo, In, Tl, Te), which are included in PRTR law, were investigated, and survey on the behavior of the metals in several sewage treatment plants was carried out in fiscal 2001.

Sewage sludge which contained PRTR heavy metals could be decomposed with HNO₃/HF microwave for the analysis by ICP-MS. In the analysis of solid standard sample, 80%-120% recovery rate was obtained. For liquid samples, only HNO₃ was sufficient.

Samples of influent, effluent, dewatered sludge, incinerated ash, molten slag and compost taken from 22 sewage treatment plants in Japan were analyzed by optimized decomposition technique. As the result, B, Mo, Mn, As existed as dissolved in influent sewage, and B, Mo were not hardly removed in sewage treatment plants. V, Cr, Cu, Zn, Se, Ag, Cd, Ba, Pb, Ni existed as solid in influent sewage and, they were accumulated in the dewatered sludge. Be, In, Co, Sb, Se, Cd, Hg of the influent sewage was under the detection limit, but these heavy metals were detected in the sludge. Te, Tl were not detected in influent sewage and sludge sample

Material balance of the heavy metal (Zn, Sb, Cd, Ag, Cr, V, Co, Se, Cu, Ni, Pb, Ba, As, Be, B, Mn, Mo, In, Tl, Te), which are included in PRTR law, in the sewage treatment process was clarified in fiscal 2002. Influent load fluctuation of Ba, B, Zn, Ni, Cu was large, but that of other elements was small. The behavior of inflow load fluctuation of Ba, B, Zn, Ni, Cu resembled each other. The removal ratio of heavy metal fluctuated, but the same behavior was observed for V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag, Sb, Ba, and Pb. The ratios of the heavy metals remaining in the ash were also obtained, showing high ratios of more than 60% for V, Cu, Ag, Cd, Sb, Ba, and Pb and small ratios of smaller than 20% for B, Ni, Se and Mo. The side stream loads of the heavy metals except for Se were in the range of 9~28 % of the influent loads, but that of Se reached almost the same amount of influent load.

Elution amounts of heavy metals were examined using two elution test methods which differed mainly in pH conditions of elution water. Different elution characteristics were obtained for burnt construction materials, non-burnt construction materials and compost. From the elution results, health risks associated with heavy metal elution were calculated, and they showed that almost all of hazard ratios of reusing sludge for construction materials and compost were very low but those of As and Pb when the sludge is reused for fertilizer exceeded the value of 1. Further research is needed to clarify the fate of eluted heavy metals in the environment and the amount of human exposure to the heavy metals.

1 はじめに

下水汚泥は平成14年度において211万トン(DS)発生しており、緑農地還元や建設資材利用による有効利用の推進が求められている。一方、PRTR(Pollutant Release and Transfer Register、環境汚染物質排出移動登録)制度は、人の健康や生態系に有害な影響を及ぼす可能性のある化学物質について、事業者等から環境中(大気、水域、土壌)への排出量及び廃棄物に含まれての事業所外への移動量を、事業者が自ら把握し行政機関に対して届け出ると共に、行政機関は届出データや推計に基づき、排出量・移動量を推計し、公表する制度である。我が国においては1999(平成11)年、「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」(PRTR法)により制度化され、平成13年4月より施行、平成15年3月より集計結果の公表が行われている¹⁾。

下水道事業者も本制度の対象となっている。届出対象物質は下水道法の規定に基づく水質検査の対象となる第一種指定化学物質の排出量であり²⁾、重金属に限定するとZn, Cd, Cr, Cr(VI), Hg, Se, Cu, Pb, As, B, Mnの11物質(ほう素は重金属ではないが本研究の対象に含む)である。しかしながら平成9~13年度に実施されたパイロット事業において届出対象外の重金属であるSb, Ag, Co, Ni, Ba, Moが他の事業者から下水道へ移動していることが報告されている^{3) 4) 5) 6) 7)}。下水道事業者の説明責任の観点から、これらの重金属の下水処理プロセスおよび下水汚泥有効利用における挙動を明らかにする必要がある。

本研究は、PRTR法で指定されている重金属の流入実態と処理過程での挙動を解明し、汚泥有効利用製品への移行量推定手法を検討すると共に、汚泥有効利用製品の環境に対する重金属の負荷量を把握することを目的としている。

2 平成13、14年度の研究成果^{8) 9)}

2-1 PRTR対象重金属の分析条件および前処理方法の検討

分析対象は、PRTR法における第1種および第2種指定化学物質のうち、重金属を主体とした無機化学物質として表2-1-1に示すもの(以下、PRTR対象重金属と呼ぶ)とした。なお、スズについては平成14年度から対象に追加した。

また分析装置は、多元素同時分析および微量の定量が可能である高周波誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いるものとし、土木研究所所有

のICP-MS(横河電機製:PMS2000)を使用した。ただし水銀(Hg)のみ、他元素との同時分析が困難なため、別途水銀分析計(PERKIN ELMER製:FIMS400、還元気化原子吸光法)を用いて分析した。

分析検体として流入下水、放流水、脱水汚泥、焼却灰などの液状および固形状下水試料を想定し、重金属類一斉分析向けの試料前処理方法を表2-1-2に示す通り決定した。

表2-1-1 PRTR対象重金属

名 称	元 素 記 号	名 称	元 素 記 号
亜鉛	Zn	ニッケル	Ni
アンチモン	Sb	バリウム	Ba
カドミウム	Cd	砒素	As
銀	Ag	ベリリウム	Be
クロム	Cr	ほう素	B
バナジウム	V	マンガン	Mn
コバルト	Co	モリブデン	Mo
水銀	Hg	スズ	Sn
セレン	Se	インジウム	In
銅	Cu	タリウム	Tl
鉛	Pb	テルル	Te

2-2 下水処理施設におけるPRTR対象重金属実態調査

下水処理場におけるPRTR対象重金属の分布の実態を把握するため、前項で最適化された分析条件の下で、全国各地の22下水処理場から取り寄せた試料(流入下水、放流水、脱水汚泥、焼却灰、熔融スラグ、コンポストの6種類)の分析を行った。その結果、流入・放流水試料に関しては、Be, Co, Se, Cd, In, Sb, Te, Tl, Hgはほとんど検出されていないが、汚泥中に濃縮されることにより、脱水汚泥をはじめ、各汚泥試料中からこれらの元素が定量下限値を超え検出されている。また、各元素の水処理工程での除去率および汚泥への移行率は、処理場毎によって異なることが推定された。

2-3 下水処理施設におけるPRTR対象重金属の挙動詳細調査

PRTR対象重金属の負荷変動状況や、水処理プロセスにおける除去率および汚泥への移行率を詳細に検討するため、某下水処理場において5ヶ月に渡り継続的な調査を行った。その結果、一次処理におけるSS分画割合と各元素の除去率については、明確

な相関関係は見られなかった。一次処理を経た二次処理では、Moを除き、SS分画割合と除去率で概ね正の相関関係が得られており、固形物に由来する元素は生物処理により比較的除去されやすいものと考えられた。汚泥処理系等から返流水負荷の高い元素はCr, Ni, As, Seであり、その割合は約20~40%

であった(約13~45%:補正值)。特にSeは排水への戻り量が非常に多く処理場内を循環している割合が高いことが考えられる。焼却灰への移行割合が60~80%程度と比較的高い元素は、V, Cu, Ag, Cd, Sb, Ba, Pbであった。

表2-1-2 試料の前処理方法

試料の性状	ICP-MS分析の前処理方法		水銀分析の前処理方法	
	固体試料	液体試料	固体試料	液体試料
試料量	約0.2g(乾燥重量)を定量	200mlを定量	約0.2g(乾燥重量)を定量	200mlを定量
分解用試薬の量	HNO ₃ 5ml HF 1ml ミQ 9ml	HNO ₃ 5ml — —	HNO ₃ 1ml HCl 3ml イオン水 5ml	HNO ₃ 5ml H ₂ SO ₄ 10ml KMnO ₄ (50g/l) 20ml
分解方法	マイクロ波分解後水冷し、ヒータプレートに少量のミQで分解液を全て洗い流し、ホットプレートで乾固(180℃)	ホットプレートで残量が1mlになるまで加熱濃縮(180℃)	マイクロ波分解	ペルオキシ二硫酸カリウム溶液(50g/l)10mlを加え、約95℃の水浴中に浸漬して2時間加熱後、室温まで冷却した後、塩化ビツトシアンモニウム溶液(200g/l)10mlを加えて、過剰な過マンガン酸カリウムと生成した酸化マンガンを(IV)を還元
定容方法	放冷後、乾固した試料を1%HNO ₃ で溶解させ、100mlメスフラスコ(PP)に入れ、1%HNO ₃ を加え全量を100mlに定容	放冷後、試料をミQで溶解し、ロート(PP)を使用し、5Bろ紙でろ過したろ液を50mlメスフラスコ(PP)に入れ、内標準物質とミQを加え全量を50mlに定容	分解後水冷し、分解液を50ml比色管に入れ、イオン水を加え全量を50mlに定容	分解液を250mlメスフラスコに入れ、イオン水を加え全量を250mlに定容
ろ過方法	定容した分解液を5Bろ紙でろ過	—	定容した分解液をGF/Bろ紙でろ過	—
検液の保存	100mlポリビン		50mlガラスビン	

3 汚泥製品中のPRTR対象重金属類の含有実態および溶出挙動に関する研究

3-1 目的

今年度の研究は汚泥有効利用製品を対象に溶出試験および含有試験を行うことにより、汚泥有効利用製品におけるPRTR対象重金属類の含有量・溶出傾向、溶出量の実態を明らかにし、それに伴うリスクを評価することを目的とした。

3-2 試験方法

試験対象とした汚泥有効利用製品を表3-2-1に示す。試料は溶出挙動などを把握するための詳細検討用の試料5種類(通し No.1~5)と実態調査用の試料21種類(建設資材:通し No.6~17、肥料:通し No.18~26)とした。詳細検討用の焼却灰、スラグを除いて市販もしくは市民への配布が行われている製品を対象とした。

溶出試験は再生資材評価法¹⁰⁾¹¹⁾、含有量試験は平成13年度に本研究で確立したマイクロ波加熱分解法⁸⁾⁹⁾を用いた。また、汚泥有効利用製品の溶出試験方法として代用されることが多い環境庁告示第46号で定める溶出試験法、ならびに近年制定された環境省告示第19号で定める含有量試験法を比較のため実施した。本研究で用いた溶出試験および含有量試験の概要を表3-2-2に示す。各検体は前述の方法で前処理を行った後、分析に供した。

暴露試験はコンテナの上に編み目状のバスケットを載せ、このバスケットに試料を置いたものを屋外にて風雨に晒し、コンテナに貯まった水を回収し分析する方法で行った。装置の概要を図3-2-1に示す。コンテナ及びバスケットは対象とする重金属類の含有がほとんどないPP製とした。

また、雨水溶出試験は溶出液を雨水とする以外は前述の再生資材評価法により試験を行った。

表 3 - 2 - 1 調査対象とする汚泥有効利用製品

通し No.	製品の種類	品名	地域	原料	汚泥混合率	主要な特有混合物	
1	(焼却灰)	焼却灰	関東	-	-	-	
2	(熔融スラグ)	熔融スラグ	近畿	-	-	-	
3	レンガ (焼成品)	レンガA	近畿	焼却灰	100%	-	
4		レンガB	中部		100%	-	
5	肥料(高分子系コンポスト)	肥料・土壌改良材A	北海道・東北	脱水ケーキ	50%	モミガラ(50%)	
6	骨材	骨材	近畿	スラグ	100%	-	
7	タイル (焼成品)	タイルA	近畿	スラグ	55%	廃ガラス(25%)	
8		タイルB	関東		50~70%	-	
9	透水性レンガ(焼成品)	透水性レンガ	中部	焼却灰	56%	セメント(36%),工場排泥(4%)	
10	レンガ (焼成品)	レンガC	中部	焼却灰	100%	-	
11		レンガD	関東		100%	-	
12		レンガE	関東		100%	-	
13		レンガF	近畿		100%	-	
14		インタロックブロックA	近畿		焼却灰	20%	-
15		インタロックブロックB	近畿		スラグ	30~75%	一般ゴミスラグ
16	インタロックブロック (非焼成品)	インタロックブロックC	近畿	22%	-		
17		インタロックブロックD	近畿	35%	-		
18	肥料	肥料	北海道・東北	脱水ケーキ	100%	-	
19	肥料・土壌改良材 (高分子系コンポスト)	肥料・土壌改良材B	関東	脱水ケーキ	76%	オガクズ(24%)	
20		肥料・土壌改良材C	関東		69%	破碎樹皮	
21		肥料・土壌改良材D	四国		25%	廃棄材(パルパ) (75%)	
22		肥料・土壌改良材E	中国		84%	米ぬか(8%),粉殻(8%)	
23		肥料・土壌改良材F	九州・沖縄		60%	有機性汚泥(10%),おがくず(15%),牛糞(15%)	
24		肥料・土壌改良材G	九州・沖縄		100%	-	
25		土壌改良材	土壌改良材A		北海道・東北	石灰系脱水ケーキ	100%
26	土壌改良材B		九州・沖縄	焼却灰	100%	-	

表 3 - 2 - 2 本研究で用いる溶出・含有量試験方法

溶出試験			含有量試験			
試験名	環境庁告示第46号	再生資源抽出試験(再生資源抽出率)	試験名	環境省告示第19号	一斉分析法(固体試料:マイクロ波加熱分解法)	
適用対象	土壌	再生建設資材成型品	対象	土壌(Cd,Hg,Se,Pb,As,B)	固体試料(Hg以外)	固体試料(Hg)
試料性状(粒径)	<2mm	50mm未満:有姿 50mm以上:20-50mm粉砕	試料性状(粒径)	<2mm	有姿(乾燥)	有姿(乾燥)
試料量[g]	>50	>50	試料量[g]	>6	0.2	0.2
溶媒	HCl/NaOH	CO2飽和脱イオン水	分解液	HCl	HNO3/HF	HNO3/HCl
溶媒初期pH	5.8~6.3	4	分解液濃度 or 量	1mol/L	5 mL / 1 mL	1 mL / 3 mL
試験中pH調整	未調整	未調整				
液固比(L/S比)	10	10	液固比(L/S比)	(33)	-	-
溶出方法 (接触方法及び時間)	水平振とう(200回/分)	攪拌(200 rpm)	溶解・分解方法	水平振とう(200回/分)	マイクロウェーブ分解	マイクロウェーブ分解
	6hr×1回	24hr×1回				
固液分離	3000rpm×20分 0.45 μ mMF	0.45 μ mMF (3000rpm)	固液分離	0.45 μ mMF	5種Bろ紙	GF/Bろ紙

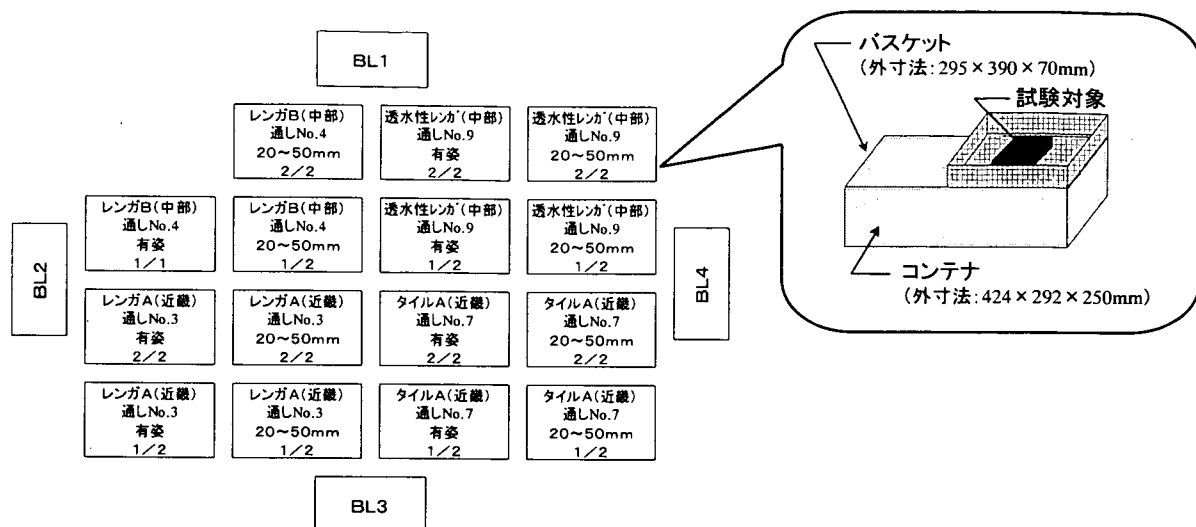


図3-2-1 曝露試験装置概要

3-3 建設資材向け汚泥有効利用製品の溶出試験

3-3-1 汚泥有効利用製品からの溶出挙動

建設資材向け汚泥有効利用製品（通し No.1~4）について再生資材評価法を用い、繰り返し溶出試験を行った結果を図3-3-1~18に示す。Be, In, Teについては全ての試料において分析値が定量限界値未満であったため除外している。溶出をメカニズム面からみた場合、溶出現象は表面洗浄溶出、拡散溶出および拡散律速溶出の溶出現象の組合せで表現される。

表面洗浄溶出：初期に重金属が溶出する

拡散溶出：持続的に等量の重金属が溶出する

拡散律速溶出：時間経過とともに、重金属溶出量が低下する

この溶出現象の組合せのうち特徴が比較的明確である下記の組合せについて、該当する重金属類がどうか確認を行った。

- ① 表面洗浄・拡散溶出が主であり、拡散律速溶出はほとんど確認できないもの
- ② 表面洗浄溶出、拡散律速溶出はほとんど無く表面拡散溶出が主であるもの
- ③ 表面洗浄溶出はほとんど無く、穏やかな表面拡散溶出、拡散律速溶出が続くもの
- ④ 当初は表面洗浄・拡散溶出が主であるが、後に表面拡散溶出又は拡散律速溶出に移行するもの

焼却灰において各々に該当する重金属類は、①：Ag, Cd, Tl、②：該当無し、③：V, Mn, Co, Se, Sb, Ba、④：B, Cr, As, Se, Moであった。同様にレンガにおいては、①：(Pb)、②：Cu、③：Mn, Co, Cd, Ba, (Pb)、④：Zn, Mo, Ag

であった。なお、Pbについては2カ所に分類してあるが、これは試験対象により傾向が異なったためである。また今回試験に供したスラグは水砕スラグであり、検体毎における溶出傾向のばらつきが比較的大きいことが予想されるが、参考として同様の分類を行うと、①：該当無し、②：Cr, Mn, Cu, Zn, Ag, Sn, Ba, Pb、③：Co, Ni、④：該当無しであった。スラグの②において途中で見かけ上の溶出速度が上昇しているものがある。これについては目視による確認ではあるが溶出試験を繰り返すにつれ微細な懸濁体が増加していたことより、破碎や摩耗により溶出面積が増加したことが推測される。全般的に、焼却灰からの溶出量が多い傾向にあったが、Co, Ni, Cu, Sn, Cd, Pbについてはスラグから、Zn, Ag, Baについてはレンガからの溶出が多いなど、重金属の種類によって、再生資材からの溶出のしやすさが異なっていた。

3-3-2 汚泥有効利用製品における固液分離時孔径差の影響検討

建設資材向け汚泥有効利用製品（通し No.1~4）について、固液分離時のろ過孔径を $1.0\mu\text{m}$ および $0.45\mu\text{m}$ として溶出試験を行った。溶出試験はろ過孔径以外は再生資材評価法に従った。試験結果を図3-3-19~22に示す。焼却灰およびレンガにおいてはろ過孔径 $1.0\mu\text{m}$ と $0.45\mu\text{m}$ の差が溶出量にほとんど影響を及ぼさないことが分かる。スラグにおいては Cu, Zn, Ag, Sn, Pb といった重金属類において、ろ過孔径 $1.0\mu\text{m}$ 時の溶出量が $0.45\mu\text{m}$ 時の溶出量より多いがその他の重金属類についてはほとんど溶出量に差がないことが分かる。

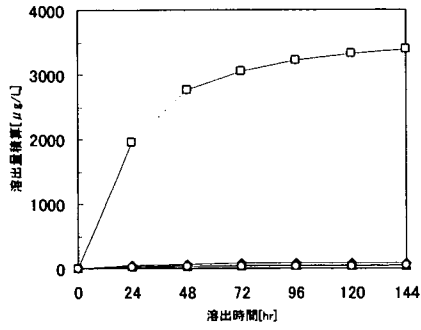


図 3-3-1 Bの溶出挙動

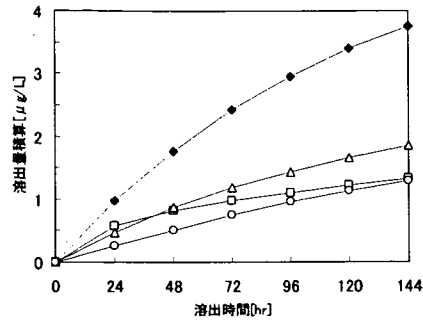


図 3-3-5 Coの溶出挙動

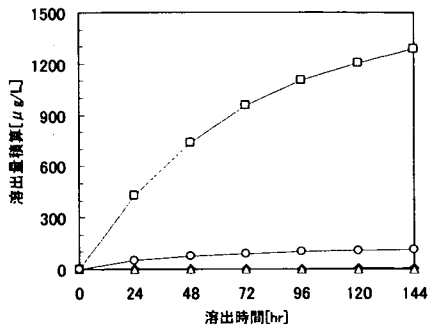


図 3-3-2 Vの溶出挙動

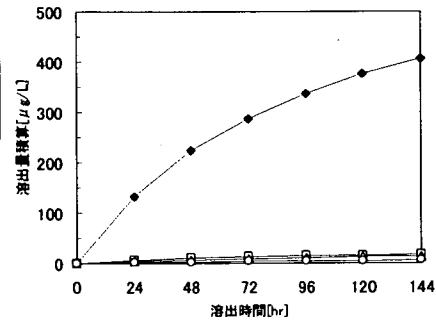


図 3-3-6 Niの溶出挙動

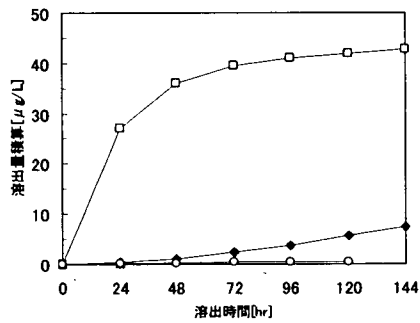


図 3-3-3 Crの溶出挙動

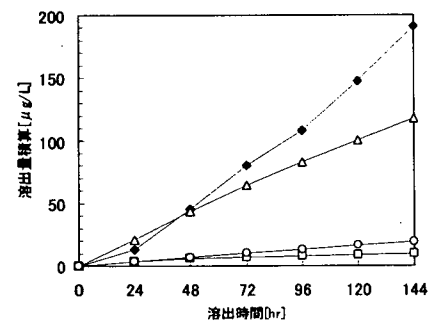


図 3-3-7 Cuの溶出挙動

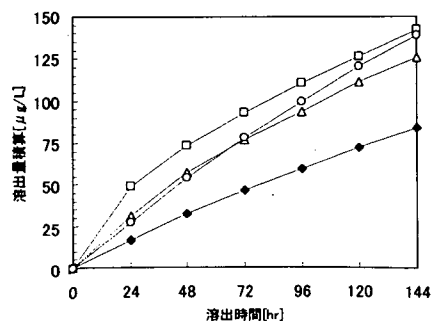


図 3-3-4 Mnの溶出挙動

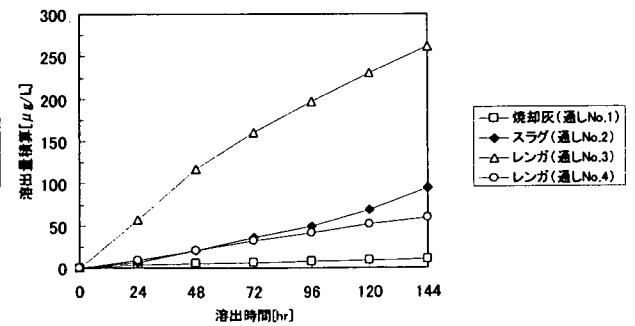


図 3-3-8 Znの溶出挙動

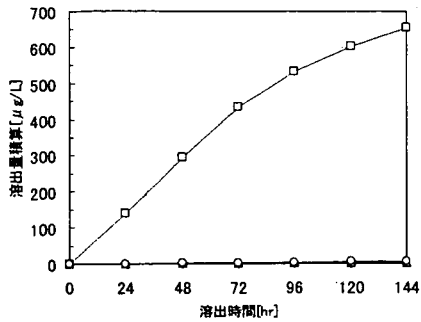


図 3-3-9 Asの溶出挙動

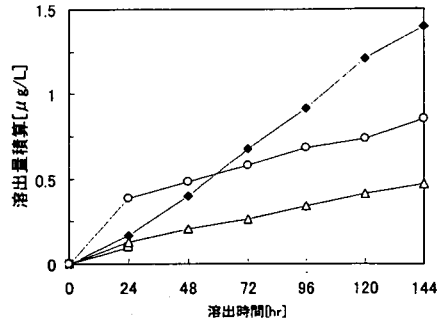


図 3-3-13 Cdの溶出挙動

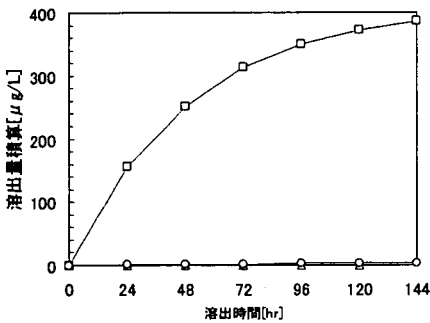


図 3-3-10 Seの溶出挙動

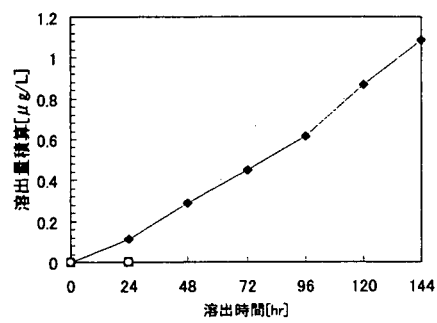


図 3-3-14 Snの溶出挙動

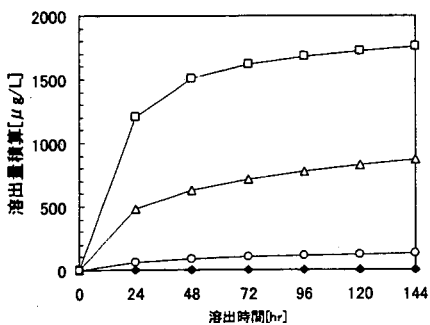


図 3-3-11 Moの溶出挙動

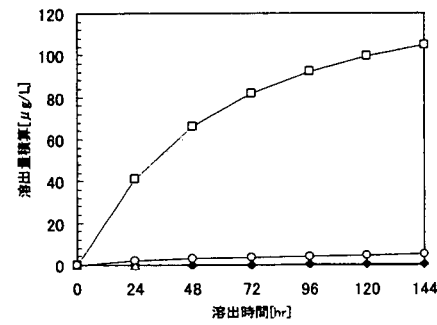


図 3-3-15 Sbの溶出挙動

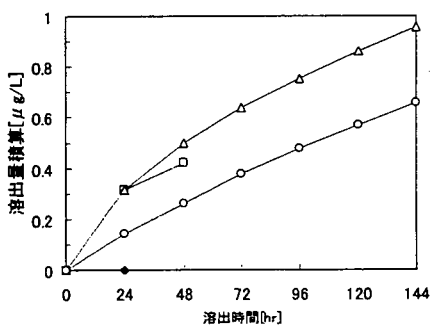


図 3-3-12 Agの溶出挙動

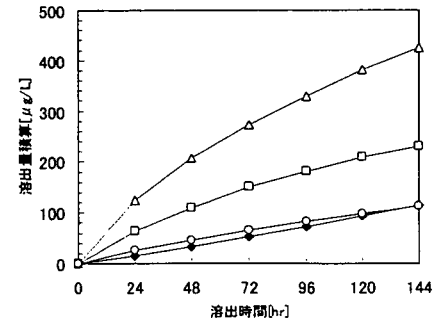


図 3-3-16 Baの溶出挙動

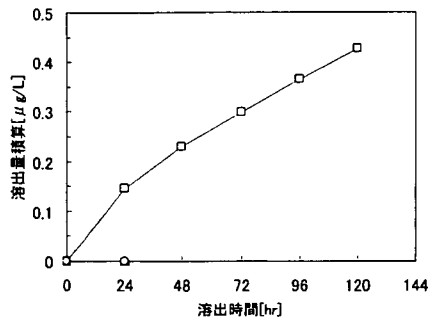


図 3-3-17 Tl の溶出挙動

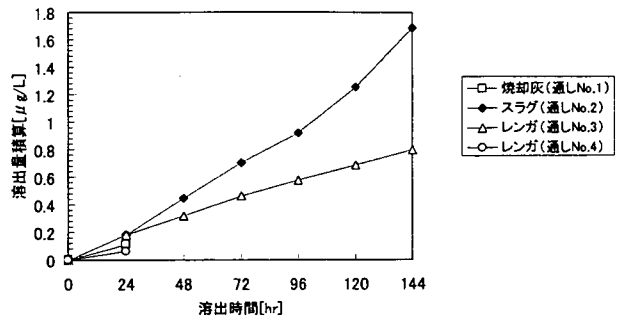
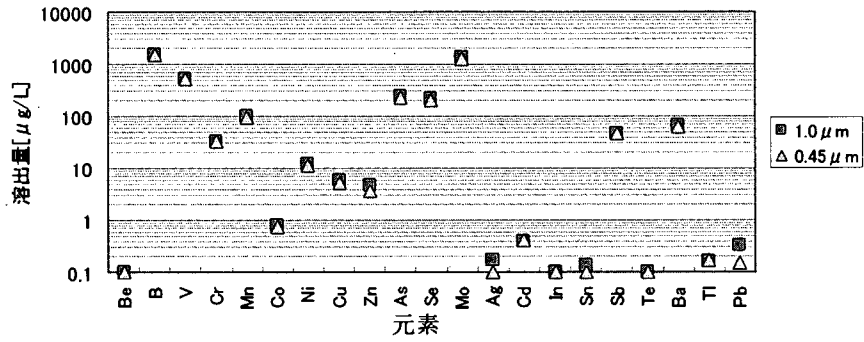
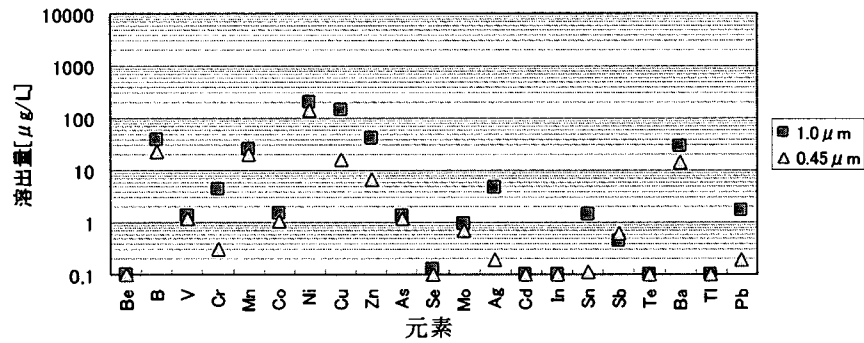


図 3-3-18 Pb の溶出挙動



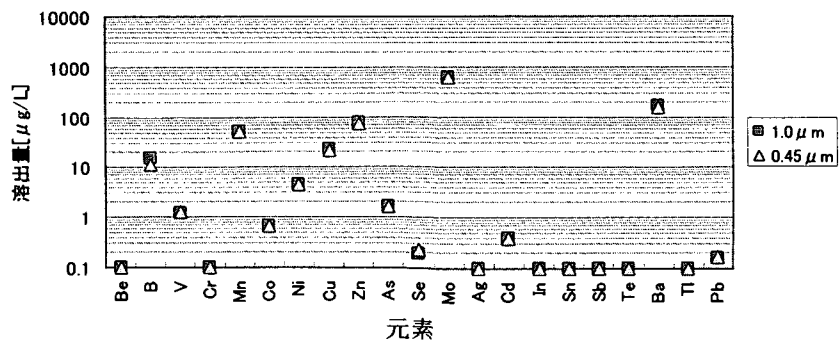
(Be, Ag, In, Sn, Te については定量下限値未満)

図 3-3-19 ろ過孔径と溶出量の関係 (焼却灰：通し No.1)



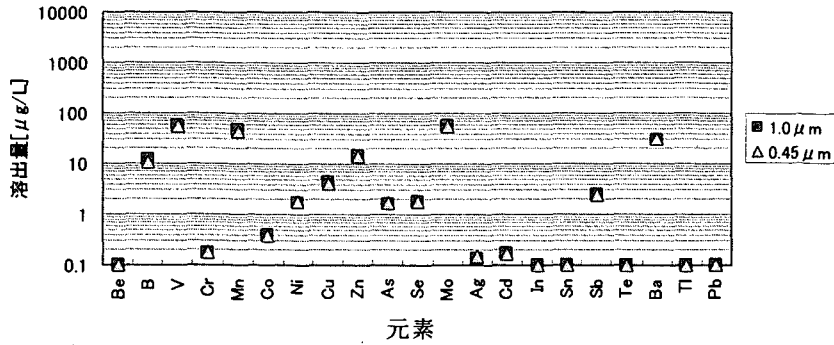
(Be, Cd, In, Te, Tl については定量下限値未満)

図 3-3-20 ろ過孔径と溶出量の関係 (スラグ：通し No.2)



(Be, Cr, Ag, In, Sn, Sb, Te, Tl については定量下限値未満)

図 3-3-21 ろ過孔径と溶出量の関係 (レンガ：通し No.3)



(Be, In, Sn, Te, Tl, Pb については定量下限値未満)

図3-3-2 ろ過孔径と溶出量の関係 (レンガ：通し No.4)

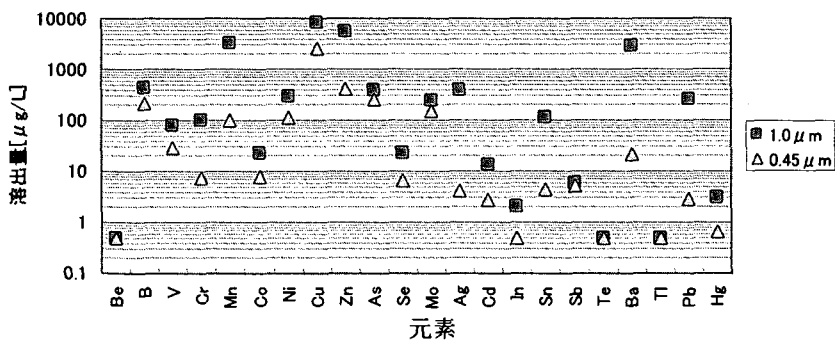
3-4 肥料向け汚泥有効利用製品における詳細検討結果

3-4-1 ろ過孔径及び液固比の検討

肥料についても汚泥有効利用製品の1つとみなし溶出量を目安とした安全性評価を行うことを考え、ろ過孔径および液固比について基礎的検討を行った。ろ過孔径の検討では、肥料向け汚泥有効利用製品(通し No.5,18,25)を用い固液分離時のろ過孔径を $1.0\mu\text{m}$ および $0.45\mu\text{m}$ として溶出試験を行った。溶出試験はろ過孔径以外は再生資材評価法に従った。試験結果を図3-4-1~3に示す。ほとんどの重金属類において、ろ過孔径 $1.0\mu\text{m}$ 時の溶出量が $0.45\mu\text{m}$ 時の溶出量より多いことが分かる。逆に溶出量の差があまり無い重金属類は、乾燥汚泥肥料では V,Co,Ni,As,Se,Mo,Sb、石灰系コンポストでは Co,Ni,As,Se,Mo,Sb、ならびに高分子系コンポストでは Sb であった。これら一部の重金属類における溶出傾向の差より、乾燥汚泥肥料、石灰系コンポストと高分子系コンポストで肥料中の重金属類存在形態などが異なることが考えられる。一方、操作面から考えると下水汚泥を利用した肥料はその構成成分の半分以上が有機質であるため、ろ過孔径が小さいほどろ過に時間を要する。今回ろ過孔径を $0.45\mu\text{m}$ として吸引ろ過を実施した際、分析に必要な量を確保

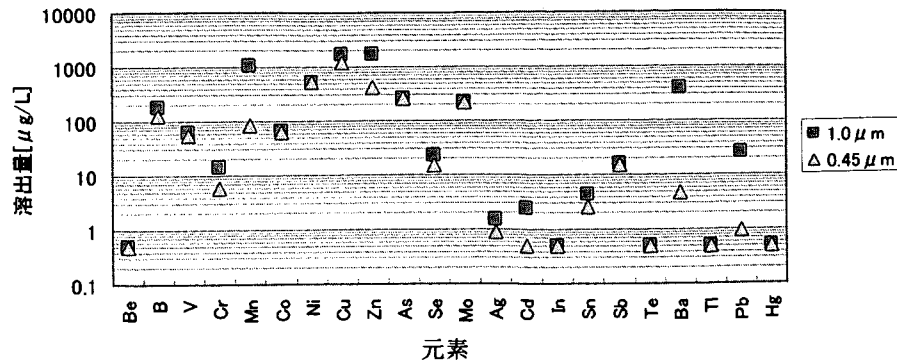
するためのろ過時間は最長で合計十数時間を要した。現行の分析方法のほとんどにおいて、有機質を含む溶液を試料とした場合、ろ過孔径を約 $1.0\mu\text{m}$ 以上、もしくはろ過困難な場合における対応を示している。このような操作面における実状、ならびに前述の溶出結果にて $0.45\mu\text{m}$ ろ過時の溶出量が $1.0\mu\text{m}$ ろ過時の溶出量を上回ることがなかったことを加味し、以後における肥料向け汚泥有効利用製品の固液分離操作時ろ過孔径は $1.0\mu\text{m}$ とした。

液固比の検討では液固比を 10,20,50,100 と変えて溶出試験を行った。溶出を抑制する要因が無い場合、溶出量は液固比が低いほど多いことが予想される。しかしながら、図3-4-4に示すように B, V, Mo, Sb といった一部の重金属類は液固比が高いほど溶出量が多い傾向を示す。これらの重金属類については、他の重金属類およびマトリクス元素が多いと溶出が抑制される可能性が考えられる。また、平衡濃度に達することにより溶出量の上限が現れることも想定したが、今回の液固比の範囲では Ag が若干その傾向がみられるのを除いて確認されなかった。これらの溶出傾向および液固比を多くした場合のばらつきを考慮し、以後に用いる肥料向け汚泥有効利用製品試験時の液固比は 50 とした。



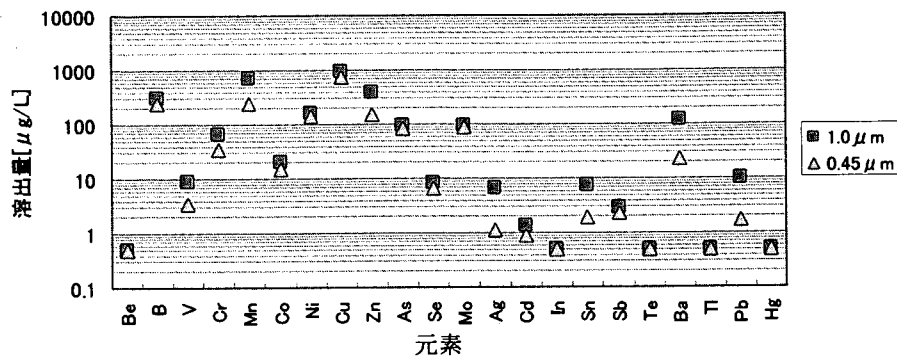
(Be, In(0.45), Te, Tl については定量下限値未満)

図3-4-1 ろ過孔径と溶出量との関係 (高分子系コンポスト：No.5)



(Be, In, Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図 3-4-2 ろ過孔径と溶出量との関係 (乾燥汚泥肥料: No.18)



(Be, In, Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図 3-4-3 ろ過孔径と溶出量との関係 (石灰系コンポスト: No.25)

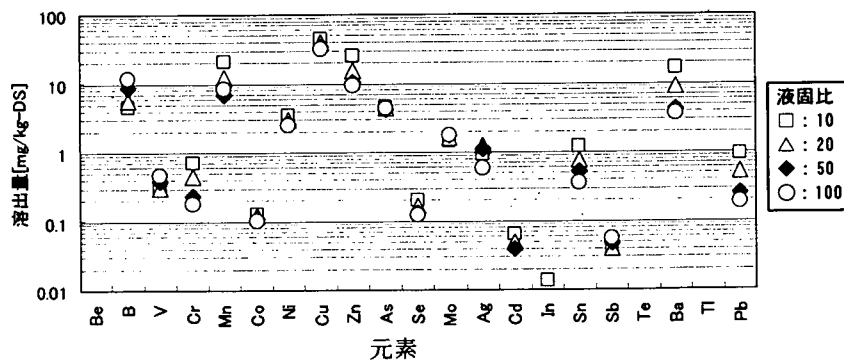


図 3-4-4 液固比と溶出量との関係 (高分子系コンポスト: No.5)

3-4-2 肥料向け汚泥有効利用製品からの溶出挙動

肥料向け汚泥有効利用製品 (通し No.5) について溶出試験を行った結果を図 3-4-5 ~ 21 に示す。試験方法は前述の液固比、ろ過孔径以外は再生資材評価法に従い、試験時間を振って溶出挙動を確認した。なお、肥料向け汚泥有効利用製品はその性状から検体毎のばらつきが生じる恐れがあったため検体数は 2 として試験を行った。Be, In, Te, Tl については分析値が定量限界以下であったため除外している。前述の溶出現象の組合せ (①~④) による分類を

用いると、該当する重金属類は、①: As, Sb、②: Ba、③: Sn, Pb、④: V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Cd, であった。建設資材向け汚泥利用製品の溶出傾向に比べ④の溶出傾向をもつ重金属類が多いことが分かる。

B や Mn といった重金属類は建設資材向け汚泥利用製品の溶出にはみられない溶出量の減少などの傾向がみられた。今回の溶出試験結果のみではその理由までは分からないが、溶出試験時の溶液において建設資材を試料とした場合に比べ懸濁体が極めて多いため、吸着・再溶出、凝集などの作用が働いたのではないかと推測される。また、As, Sb は②に分類

してあるが、前述の液固比試験にて溶出量に差がほとんど無いことより、1回目の溶出にて平衡量に達

している可能性も考えられる。

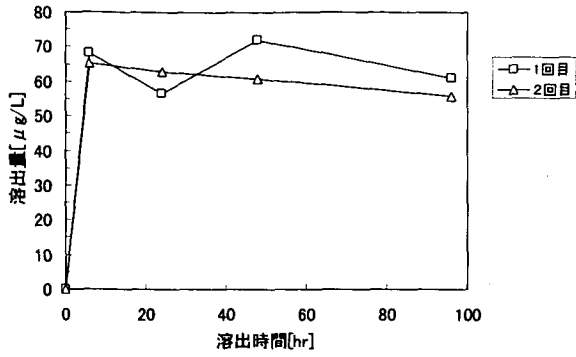


図 3-4-5 Bの溶出挙動

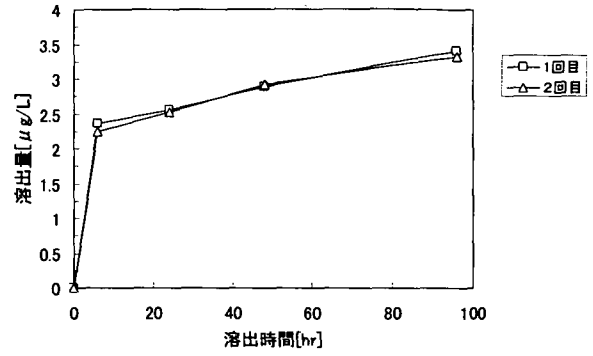


図 3-4-9 Coの溶出挙動

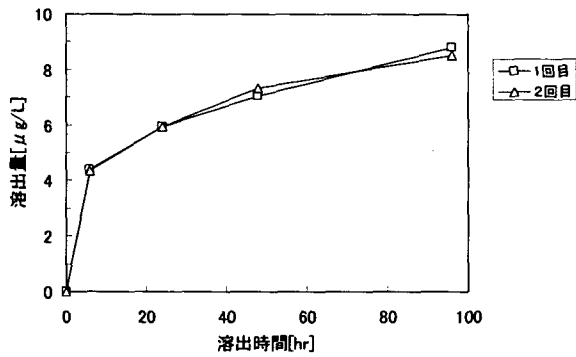


図 3-4-6 Vの溶出挙動

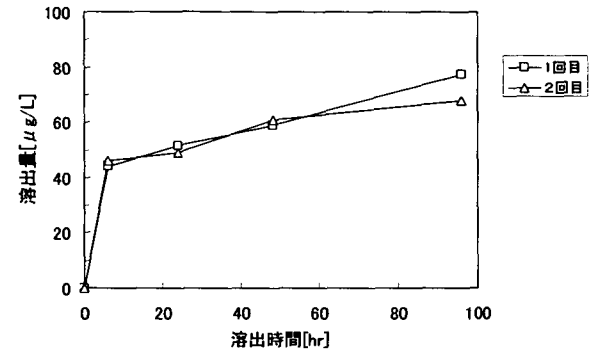


図 3-4-10 Niの溶出挙動

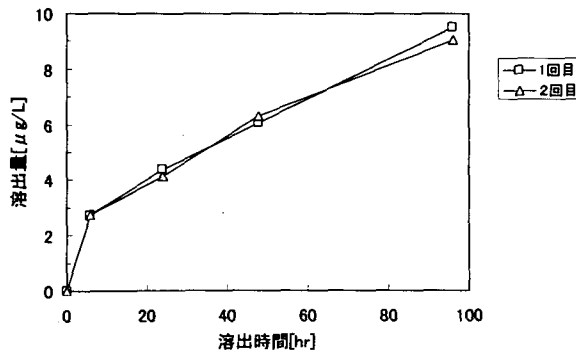


図 3-4-7 Crの溶出挙動

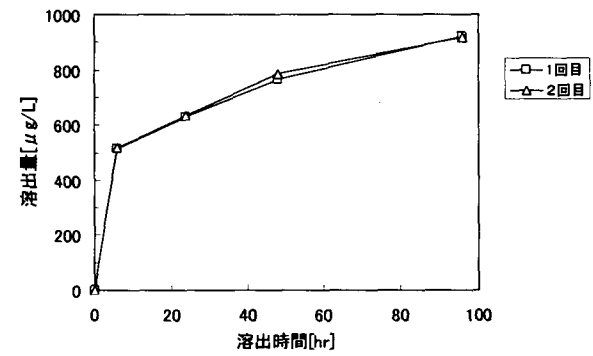


図 3-4-11 Cuの溶出挙動

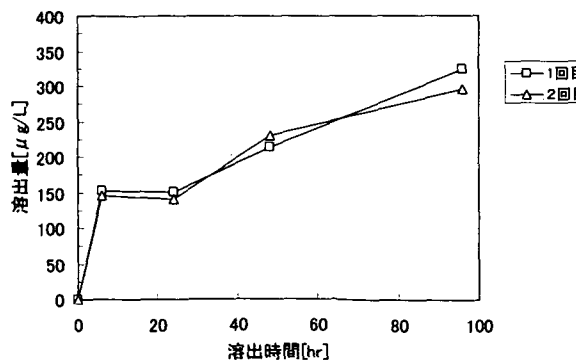


図 3-4-8 Mnの溶出挙動

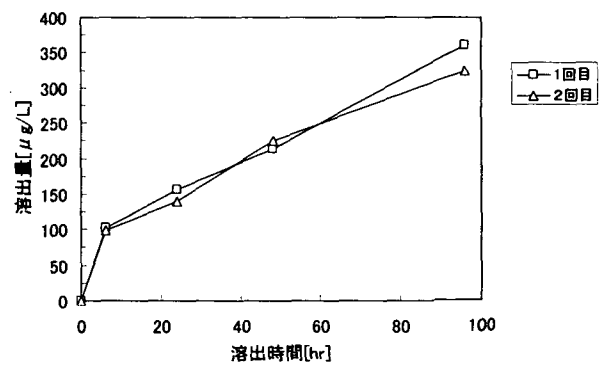


図 3-4-12 Znの溶出挙動

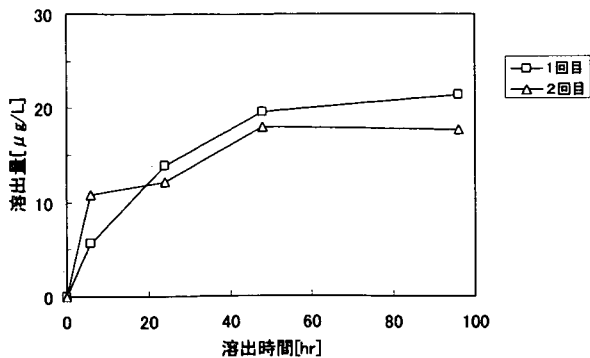
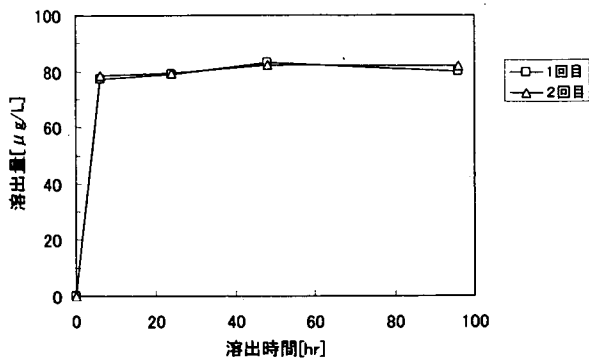


図 3-4-17 Ag の溶出挙動

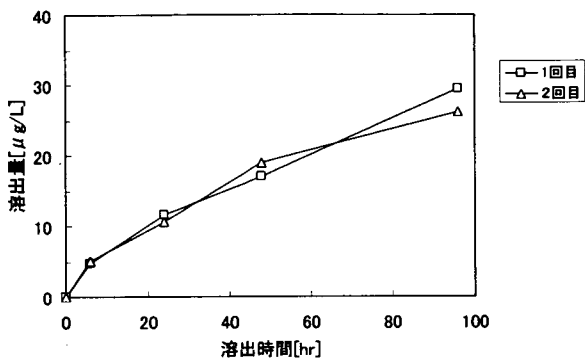
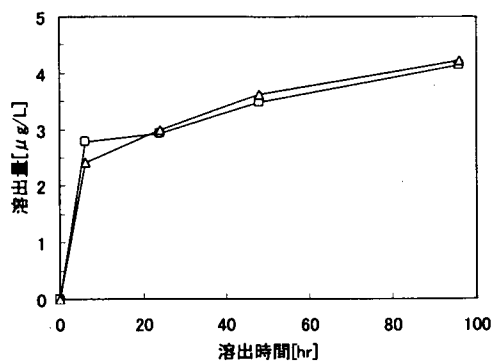


図 3-4-18 Sn の溶出挙動

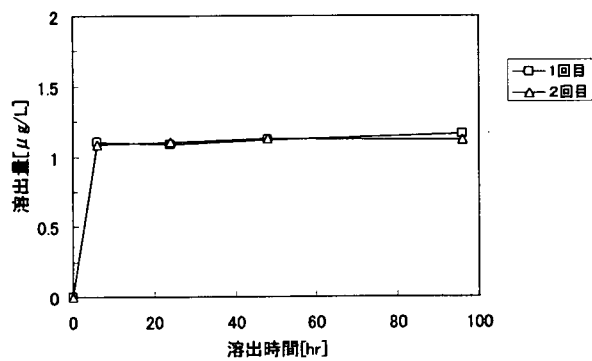
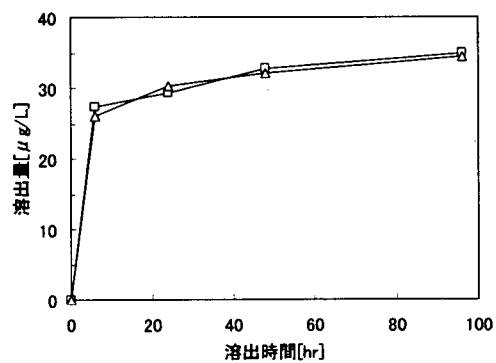


図 3-4-15 Mo の溶出挙動

図 3-4-19 Sb の溶出挙動

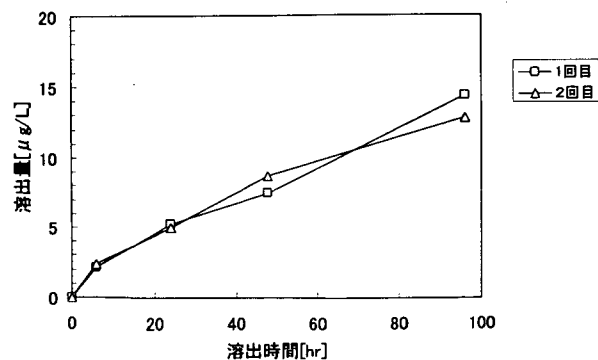
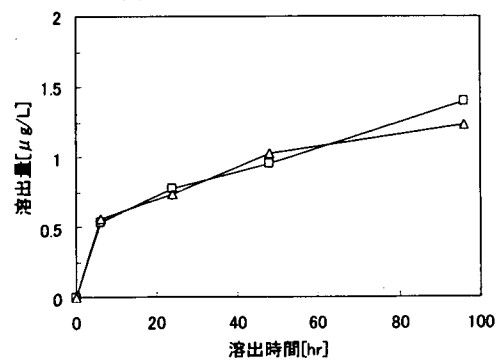


図 3-4-16 Cd の溶出挙動

図 3-4-20 Ba の溶出挙動

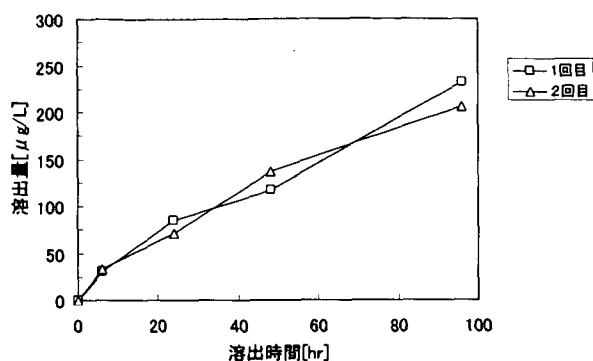


図3-4-21 Pbの溶出挙動

3-5 汚泥有効利用製品における重金属類実態調査

3-5-1 溶出量および含有量調査結果

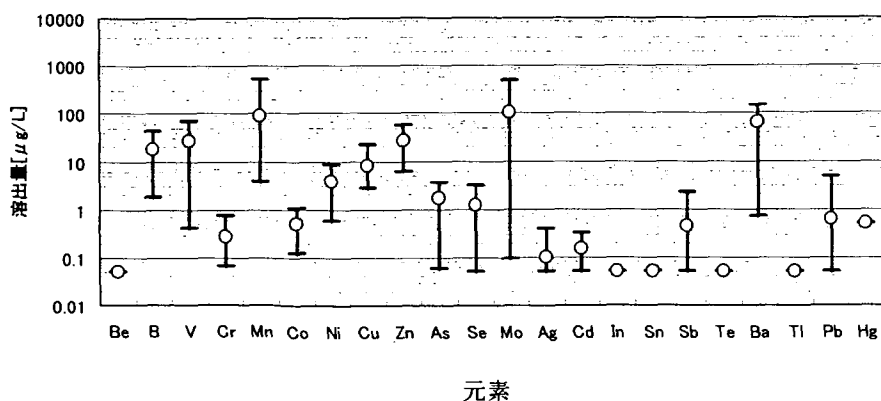
調査対象は、詳細検討用の試料も含めた建設資材向け汚泥有効利用製品14種（通し No.1,4,6~17）、肥料向け汚泥有効利用製品10種（通し No.5,18~26）とした。実施した溶出試験は再生資材評価法および環境庁告示46号に基づく方法を用いた。また、含有量試験はマイクロ波加熱分解法および環境省告示19号に基づく方法を用いた。試験結果を図3-5-1~12に示す。本図では汚泥有効利用製品を製造方法から大きく、建設資材（焼成品）、建設資材（非焼成品（水和反応利用製品））および高分子系コンポジットの3つに分類し、分類毎に溶出量、含有量の範囲を示してある。

再生資材評価法における溶出量が環告46法における溶出量を上回っている重金属類は、建設資材（焼成品）：Mn, Co, Ni, Cu, Zn、建設資材（非焼成品）：V, Mn, As、高分子系コンポジット：Cr, Mn, Zn, Ag, Ba,

Pb, Hgであった。逆に環告46法における溶出量が再生資材評価法における溶出量を上回っている重金属類は、建設資材（焼成品）：V, Cr, Mo, Sn, Sb、建設資材（非焼成品）：Cr, Co, Ni, Se, Mo, Sn, Sb, Ba, Pb、高分子系コンポジット：該当無しであった。両溶出試験の大きな差は試験に使用する溶出液が炭酸水であるか中性水であるかである。攪拌方法が異なるため正確な溶出量の比較はできないが、大まかな傾向としては、前者は炭酸による酸性で溶出しやすいで状態存在し、後者は炭酸による酸性よりも中性の方が溶出しやすい状態で存在していることが推測される。なお、建設資材（非焼成品）において後者（再生資材評価法の溶出量<環告46法の溶出量）である重金属類が多い。試験後のpHが環告46法ではpH10~13、再生資材評価法ではpH6~10であることを考えると、環告46法溶出試験では一部の重金属類においてアルカリ側溶出が進行したためと推測される。

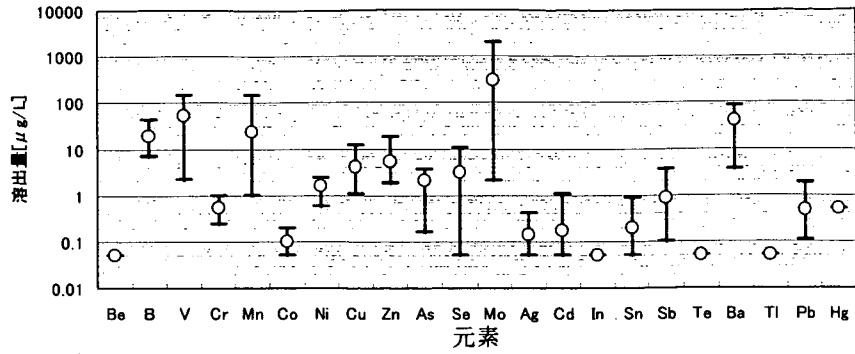
含有量においては、定量限界値未満の重金属類を除いた全ての重金属類で、環告19法における含有量はマイクロ波加熱分解法における含有量の同等以上であった。建設資材向け汚泥有効利用製品に比べると高分子系コンポジットでは比較的含有量の差が小さい重金属類があった。これらの重金属類は建設資材向け製品中では焼成や水和などの処理を得て溶出し難い状態で存在していることが推測される。

マイクロ波加熱分解法における含有量を100%とし、他の各試験法における溶出（含有）量を割合で表すと、重金属類毎の差はあるものの再生資材評価法と環告46法では建設資材：12%以下、高分子系コンポジット：45%以下であり、環告19法では建設資材：84%以下、高分子系コンポジット：95%以下であった。



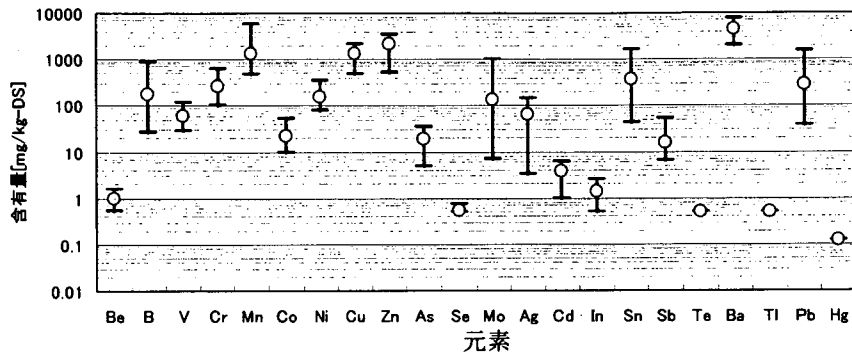
(Be, In, Sn, Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図3-5-1 建設資材（焼成品）向汚泥有効利用製品における溶出量「再生資材評価法」



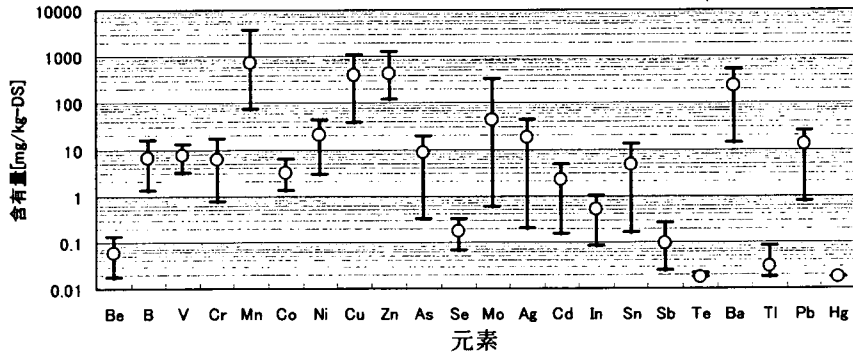
(Be, In, Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図 3-5-2 建設資材（焼成品）向汚泥有効利用製品における溶出量「環告 46 法」



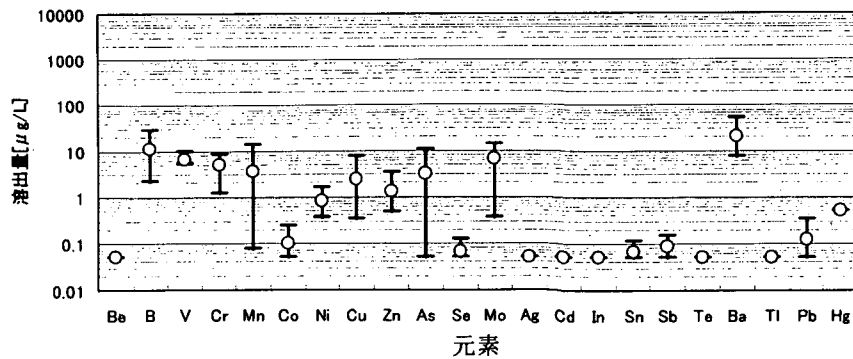
(Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図 3-5-3 建設資材（焼成品）向汚泥有効利用製品における含有量「マイクロ波加熱分解法」



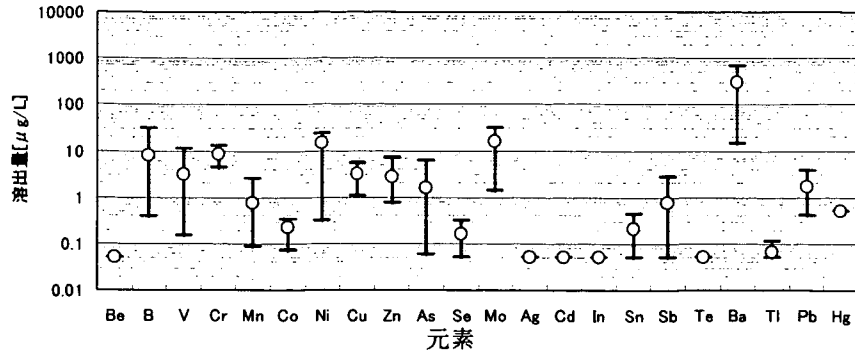
(Hg については定量下限値未満)

図 3-5-4 建設資材（焼成品）向汚泥有効利用製品における含有量「環告 19 法」



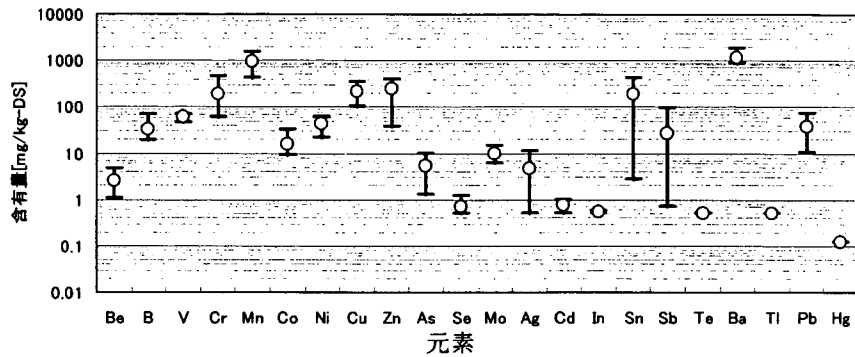
(Be, Ag, Cd, In, Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図 3-5-5 建設資材（非焼成品）向汚泥有効利用製品における溶出量「再生資材評価法」



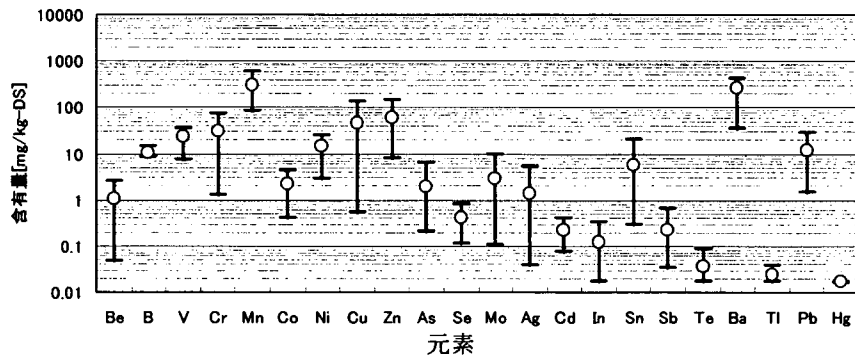
(Be, Ag, Cd, In, Te, Hg については定量下限値未満)

図 3-5-6 建設資材 (非焼成品) 向汚泥有効利用製品における溶出量「環告 46 法」



(Te, Tl, Hg については定量下限値未満)

図 3-5-7 建設資材 (非焼成品) 向汚泥有効利用製品における含有量「マイクロ波加熱分解法」



(Hg については定量下限値未満)

図 3-5-8 建設資材 (非焼成品) 向汚泥有効利用製品における含有量「環告 19 法」

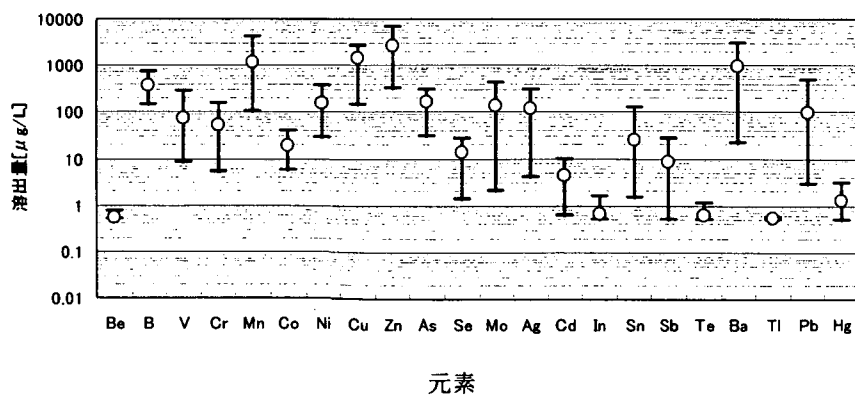
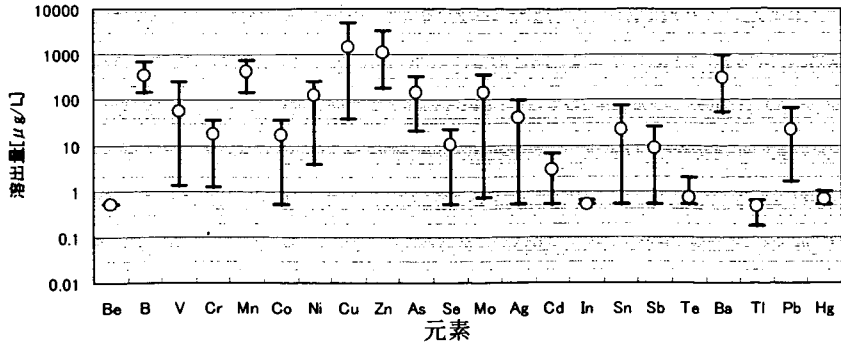
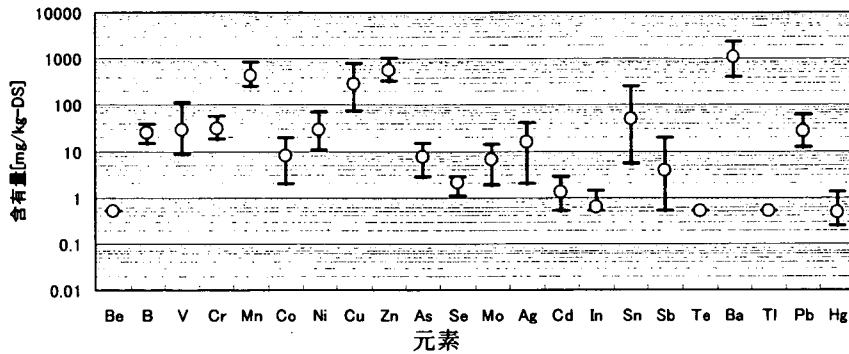


図 3-5-9 高分子系コンクリート向汚泥有効利用製品における溶出量「再生資材評価法」



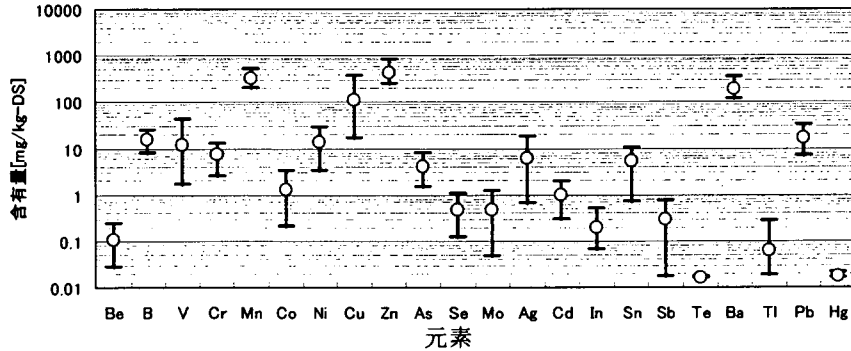
(Beについては定量下限値未満)

図3-5-10 高分子系コンクリート向汚泥有効利用製品における溶出量「環告46法」



(Be, Teについては定量下限値未満)

図3-5-11 高分子系コンクリート向汚泥有効利用製品における含有量「マイクロ波加熱分解法」



(Teについては定量下限値未満)

図3-5-12 高分子系コンクリート向汚泥有効利用製品における含有量「環告19法」

3-6 雨水による曝露・溶出試験

3-6-1 雨水溶出試験

再生資材評価法は地域や季節などによらず自然界に存在する空気中の二酸化炭素が溶け込んだ水を想定し制定された溶出試験法である。一方、建設資材向け汚泥有効利用製品のうち、成型品は屋外露出で使用されることが多く、雨水による曝露の可能性が高い。雨水には二酸化炭素以外の物質も多数溶解しているため、本研究では雨水による溶出量と再生資材評価法による溶出量の比較を行った。

雨水溶出試験は溶出液が雨水であること以外、再

生資材評価法の試験方法に従った。試験対象は建設資材向け汚泥有効利用製品(通し No.3,4,20,22)とした。前述にあるように、通し No.3,4の試料については再生資材評価法における溶出挙動も確認しているため、これらの試料について再生資材評価法と雨水溶出試験における結果を1つのグラフに表したものを図3-6-1~16に示す。常に再生資材評価法における溶出量が雨水溶出試験における溶出量を上回った重金属類にはB,V,Mn,Coであり、逆に常に雨水溶出試験における溶出量が再生資材評価法における溶出量を上回った重金属類にはCrであった。そ

他の重金属類については、試料や試験対象により様々な挙動を示した。このことより溶出には二酸化炭素以外の要因も多く関与していることが推測される。しかしながら、桁が異なるような溶出量の差は

無く、雨水曝露時の定性あるいは半定量的なリスク評価を行う場合、指標として再生資材評価法の結果を用いることによる有意な差は生じないものと考えられる。

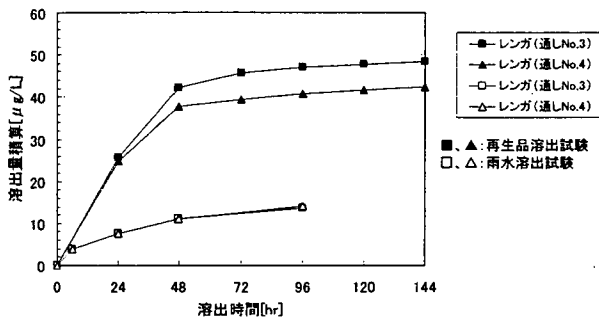


図 3-6-1 B の溶出挙動

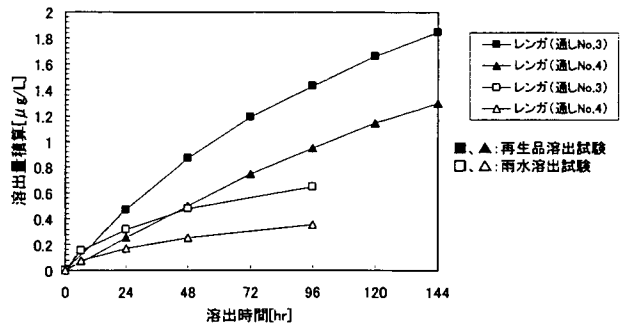


図 3-6-5 Co の溶出挙動

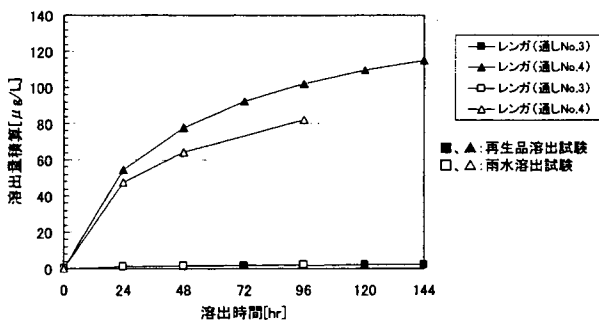


図 3-6-2 V の溶出挙動

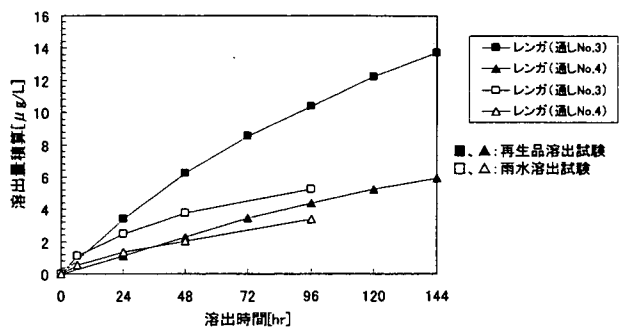


図 3-6-6 Ni の溶出挙動

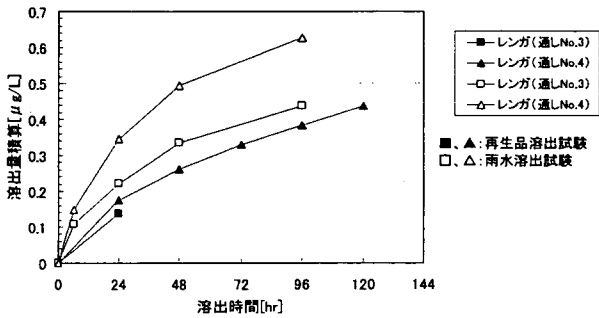


図 3-6-3 Cr の溶出挙動

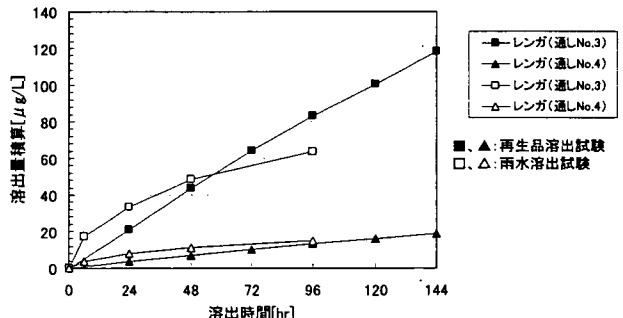


図 3-6-7 Cu の溶出挙動

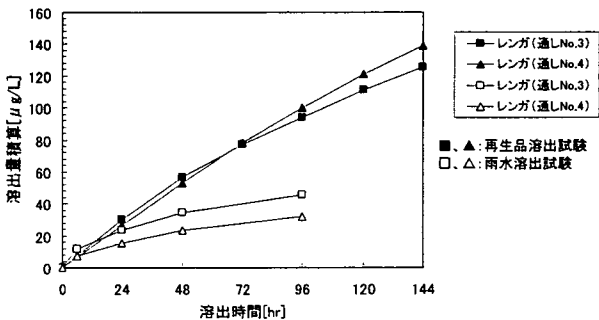


図 3-6-4 Mn の溶出挙動

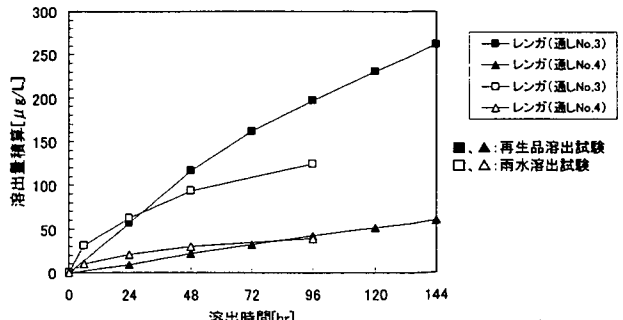


図 3-6-8 Zn の溶出挙動

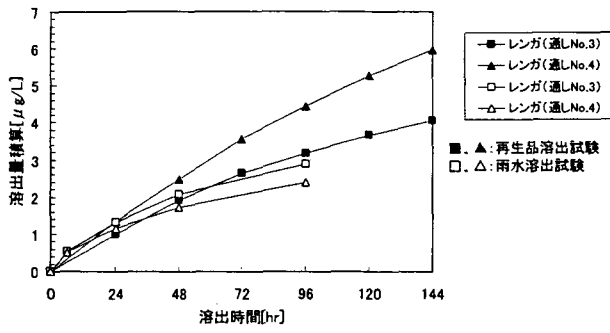


図 3-6-9 As の溶出挙動

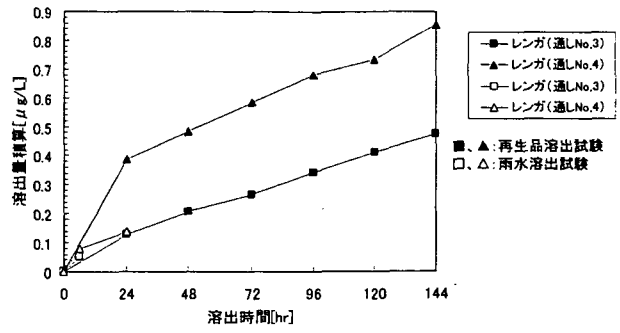


図 3-6-13 Ag の溶出挙動

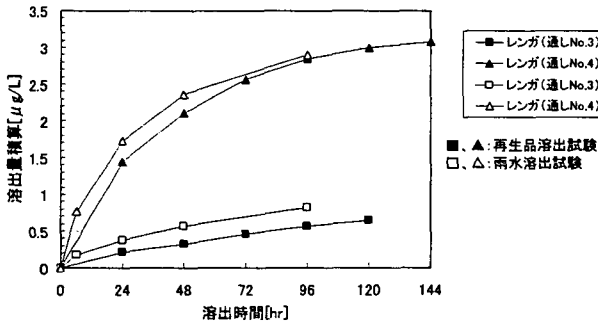


図 3-6-10 Se の溶出挙動

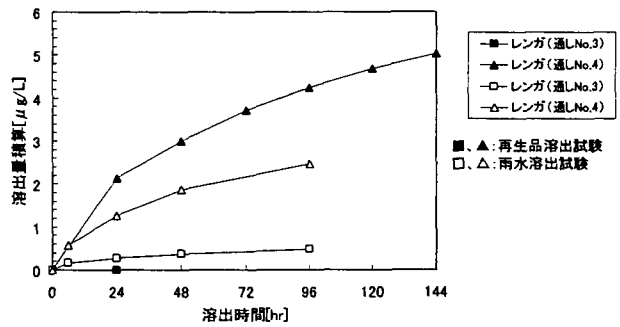


図 3-6-14 Sb の溶出挙動

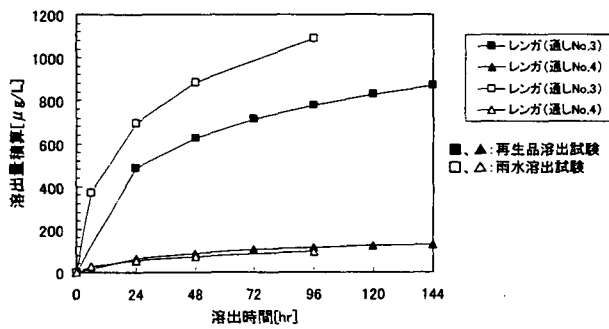


図 3-6-11 Mo の溶出挙動

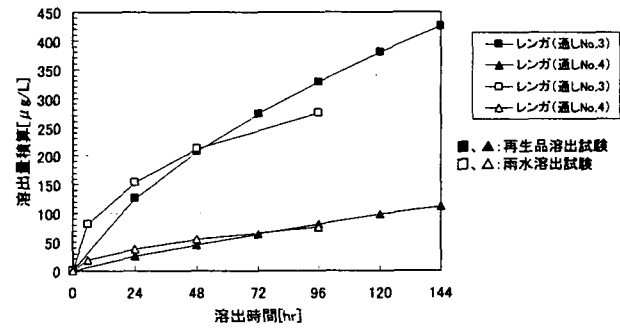


図 3-6-15 Ba の溶出挙動

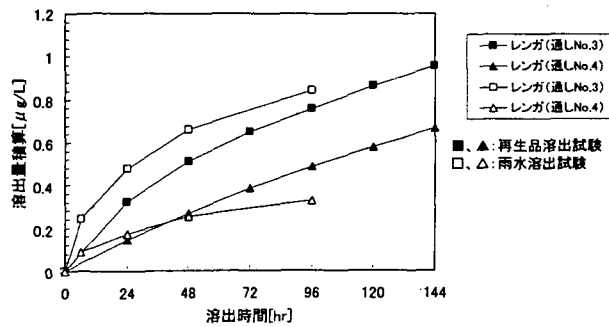


図 3-6-12 Cd の溶出挙動

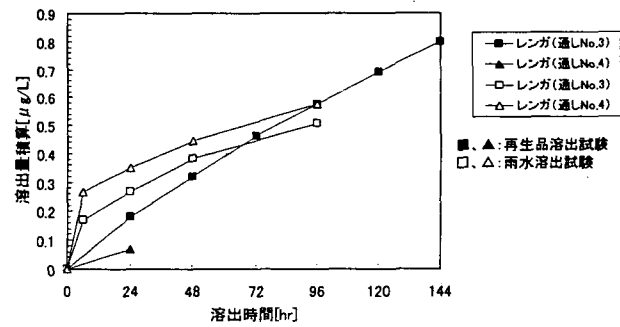


図 3-6-16 Pb の溶出挙動

3-6-2 屋外曝露試験

雨水溶出試験と同じ試料を用い、屋外曝露試験を行った結果を図3-6-17~24に示す。実際の試験は検体数2で行っているが、特定の重金属類を除くと試料毎の溶出傾向には大きな差がないため、図上では1検体分を示している。特定の重金属類には、ブランクも含め特定の方向のみ溶出量が高いB, V, Zn, Moがあった。これらの重金属類については試料の設置方向で見た場合に溶出量についてある傾向があったことにより、風と共に曝露試験場所に入ってきたことが考えられる。降水量にばらつきがあるため、分析は1検体に対

し1回目降水分とそれ以降の降水におけるコンポジット分で行った。1回目溶出分と2回目以降溶出分の差は試料や重金属類毎に異なり一定の傾向はみられなかった。一方成型品の有姿状態と20-50mm 破碎状態の比較では、前述の特定重金属類を除き、20-50mmの溶出量が有姿の溶出量の同等以上であった。これらの結果より、舗装後にレンガなどの汚泥有効利用製品（成型品）の一部が割れるなどした場合、溶出量が増加する可能性があることが推測される。本曝露試験での溶出量の高い元素は、再生資材評価法や雨水溶出試験でも比較的溶出量が高い傾向が見られた。

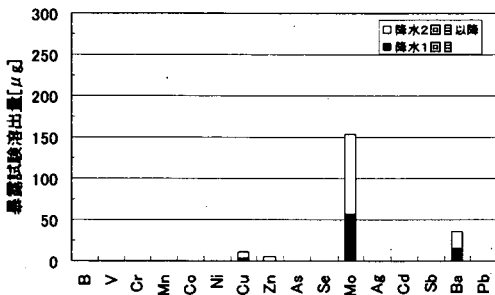


図3-6-17 曝露試験結果
(通し No.3,有姿)

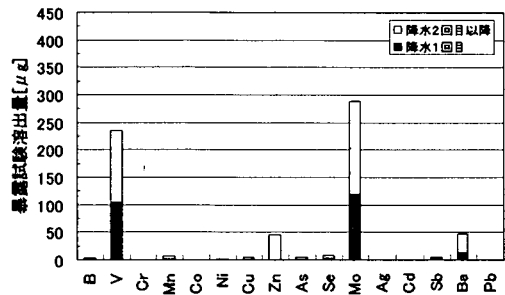


図3-6-20 曝露試験結果
(通し No.4,20-50mm)

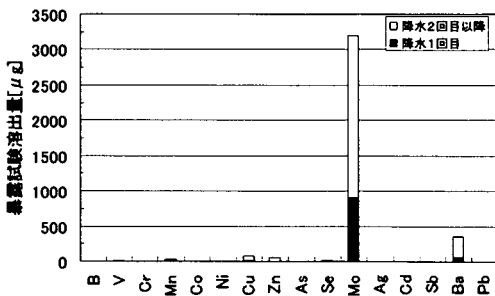


図3-6-18 曝露試験結果
(通し No.3,20-50mm)

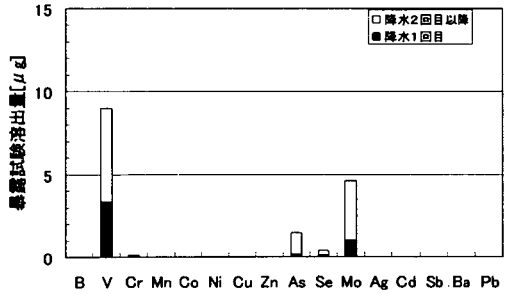


図3-6-21 曝露試験結果
(通し No.20,有姿)

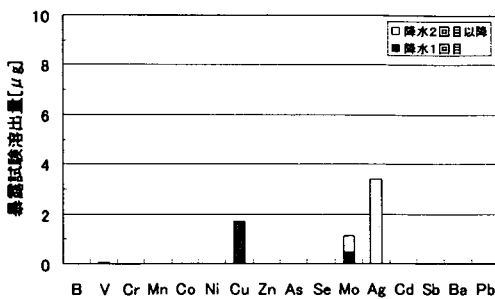


図3-6-19 曝露試験結果
(通し No.4,有姿)

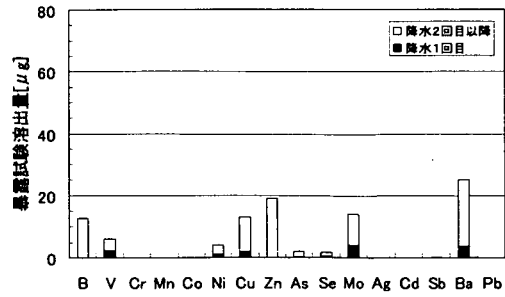


図3-6-22 曝露試験結果
(通し No.20,20-50mm)

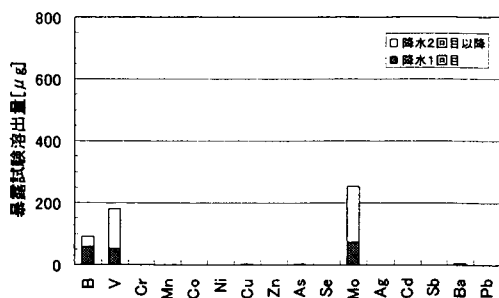


図3-6-23 曝露試験結果
(通し No.22,有姿)

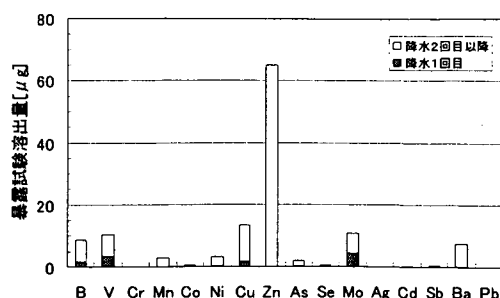


図3-6-24 曝露試験結果
(通し No.22,20-50mm)

4 リスク評価

4-1 溶出におけるリスク評価

リスク評価を行う際は、ハザード評価および曝露評価を行う必要がある。しかしながら現時点にて、汚泥有効利用製品使用時に溶出する物質について曝露評価を行うためには各種の情報が不足している。また、ハザード評価に関する情報についても同様である。そこで、本研究では環境媒体を水、対象をヒト、対象との接触経路を経口とした場合に最大量の曝露条件と考えられる再生資材評価法時の溶出液を直接飲むという条件でリスク評価を行うことにする。使用するハザード指標には日本国内において環境法などの見直し、制定時に資料として提示された TDI (もしくは TDI 相当値) を用いた。ヒトの体重を 50kg、飲水量を 2l/day とした場合のハザード比 (= 曝露量/TDI) を前述の汚泥有効利用製品における溶出試験結果を元に算出した結果を表 4-4-1~3 に示す。

建設資材(焼成品)および建設資材(非焼成品)ではハザード比は1を超えることがなかった。また、高分子系コンポストにおいてもハザード比はほとんどの重金属類で1を超えることは無かったものの、As と Pb においては平均値で1を超えるものが存在した。これらの重金属類については、前述の媒体、経路およびハザード情報などの条件を元のみ判断した場合は、比較的優先的に対処が望ましい重金属類と考えられる。

汚泥有効利用製品から溶出した重金属類は、実際の環境中では様々な希釈、濃縮、形態変化を経てヒトに接触する。さらに発ガン性や内分泌攪乱作用など今回の評価に含まれていない様々な有害可能性を持つ重金属類も存在する。曝露評価およびハザード評価に必要な各種情報のさらなる蓄積を経て、より実状に近いリスク評価が行われることが望まれる。

また、リスク評価情報の公表だけではなく、その有益性も合わせて公表していくことが望ましいと考えられる。

表4-1-1 建設資材(焼成品)のハザード比

元素	建設資材(焼成品)		
	max	min	average
B	1.7E-02	7.3E-04	7.6E-03
Mn	2.8E-01	2.1E-03	4.9E-02
Ni	6.6E-05	4.5E-06	3.0E-05
As	6.9E-02	1.1E-03	3.4E-02
Se	3.1E-02	5.0E-04	1.2E-02
Ag	1.5E-09	2.0E-10	3.9E-10
Cd	1.3E-02	2.0E-03	5.8E-03
Sn	8.0E-04	8.0E-04	8.0E-04
Sb	1.4E-02	3.3E-04	3.0E-03
Pb	5.2E-02	5.7E-04	6.8E-03

表4-1-2 建設資材(非焼成品)のハザード比

元素	建設資材(非焼成品)		
	max	min	average
B	1.2E-02	9.3E-04	4.7E-03
Mn	7.3E-03	4.2E-05	1.9E-03
Ni	1.2E-05	2.9E-06	6.3E-06
As	2.0E-01	1.0E-03	6.2E-02
Se	1.2E-03	5.0E-04	6.8E-04
Ag	2.0E-10	2.0E-10	2.0E-10
Cd	2.0E-03	2.0E-03	2.0E-03
Sn	1.8E-03	8.0E-04	1.1E-03
Sb	9.9E-04	3.3E-04	5.6E-04
Pb	3.8E-03	5.7E-04	1.4E-03

表4-1-3 高分子系コンポストのハザード比

元素	高分子系コンポスト		
	max	min	average
B	3.0E-01	5.8E-02	1.5E-01
Mn	2.2E+00	5.4E-02	6.4E-01
Ni	2.9E-03	2.3E-04	1.3E-03
As	5.8E+00	6.0E-01	3.3E+00
Se	2.6E-01	1.4E-02	1.3E-01
Ag	1.2E-06	1.7E-08	4.6E-07
Cd	4.0E-01	2.5E-02	1.7E-01
Sn	1.9E+00	2.4E-02	4.0E-01
Sb	1.7E-01	3.3E-03	5.6E-02
Pb	5.5E+00	3.3E-02	1.1E+00

5 まとめ

市販もしくは市民への配布が行われている汚泥有効利用製品を収集し、溶出試験および含有量試験を行った結果、以下の知見が得られた。

- ・焼却灰、焼成レンガを対象とし、再生資材評価法におけるろ過孔径を変えた場合、0.45 μ m と 1.0 μ mでの分析値に差は生じなかった。
- ・肥料向け汚泥有効利用製品に再生資材評価法を適用させる場合の液固比、ろ過孔径は、溶出傾向および操作性を考慮し 50, 1.0 μ m とした。
- ・建設資材向け汚泥有効利用製品の1つである焼成レンガを再生資材評価法に供した場合、溶出傾向は異なるものの Cu, Mn, Co, Cd, Ba, Pb, Zn, Mo, Ag にて継続的な溶出が確認された。
- ・高分子系コンポストを対象とし、再生資材評価法による溶出試験を行った場合、建設資材向け汚泥有効利用製品に比べ段階的に溶出する重金属類が多い傾向がみられた。
- ・製造方法から汚泥有効利用製品を大まかに、建設資材（焼成品）、建設資材（非焼成品）、高分子系コンポストの3つ分類したところ、重金属の溶出傾向に差がみられた。
- ・マイクロ波加熱分解法に対する溶出（含有）量は、再生資材評価法と環告46法では建設資材：12%以

下、高分子系コンポスト：45%以下であり、環告19法では建設資材：84%以下、高分子系コンポスト：95%以下であった。

- ・雨水と二酸化炭素を溶解させた純水を用い溶出試験を行ったところ、重金属類毎に溶出挙動が異なる傾向がみられた。
- ・暴露試験の結果から、経年劣化などにより汚泥有効利用製品が破損した場合、溶出量が高まる可能性が考えられた。
- ・媒体を水、ヒトへの接触経路を経口ならびに溶出液の直接摂取を想定してリスク評価を行ったところ、ハザード比は建設資材においては $10^{-1} \sim 10^{-2}$ 、高分子系コンポストにおいては $10^{-7} \sim 10^0$ の範囲にあった。高分子系コンポストにおいてはハザード比が1を超えたのはAsおよびPbであった。
- ・汚泥製品から溶出した重金属の環境中での挙動やヒトへの暴露評価をさらに行い、より実状に近いリスク評価を行う必要がある。

なお、本調査研究は、環境省からの受託業務費により実施されたものである。

6 参考文献

- 1) 環境省:"PRTR", 2003,
<<http://www.env.go.jp/chemi/prtr/risk0.html>>
(H16.03.29 更新)
- 2) 内閣府・財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・国土交通省・環境省:
特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律施行規則, 2001
- 3) PRTR 技術検討会: PRTR パイロット事業評価報告書, 1998
- 4) 環境庁環境保健部環境安全課: 平成 10 年度 PRTR パイロット事業報告書, 1999
- 5) 環境庁環境保健部環境安全課: 平成 11 年度 PRTR パイロット事業報告書, 2000
- 6) 環境省環境保健部環境安全課: 平成 12 年度

PRTR パイロット事業報告書, 2001

- 7) 経済産業省製造産業局化学物質管理課・環境省環境保健部環境安全課: 平成 13 年度 PRTR パイロット事業報告書, 2002
- 8) 鈴木 穰、北村 友一: 平成 13 年度環境保全成果集, 課題番号 63, 2002
- 9) 鈴木 穰、北村 友一、峰松 亮: 平成 14 年度環境保全成果集, 課題番号 57, 2003
- 10) 建設省、財団法人国土開発技術研究センター: 平成 8 年度建設副産物の発生抑制・再生利用技術の開発報告書[参考資料], 1997
- 11) 尾崎正明、久保忠雄: 下水汚泥を原料とする建設資材の安全性評価手法, 土木技術資料 40(1), 1998

2. 病原性微生物の同定方法および挙動に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 鈴木穂
 研究員 諏訪守
 交流研究員 陶山明子

【要旨】

下水試料中の *Cryptosporidium* オーシストを簡便かつ迅速に検出するため、Real Time PCR 法による *Cryptosporidium* の定量検出方法の適用性について評価するとともに、濃縮・分離操作および下水性状の違いが検出感度に及ぼす影響について検討を行った。その結果、Real Time PCR 法は顕微鏡観察と比較して、高濃度域においても同程度の検出感度であると考えられたが、試料中の有機物濃度の違いによる影響や濃縮・分離操作により回収効率の損失があるため、改善策を講ずる必要があることが明らかになった。ウイルスの検出では、下水試料に適した濃縮法について検討を行い、流入下水では、超遠心処理法や PEG 沈殿法により約 60%、二次処理水、砂ろ過水試料ではセルロース吸着・凝集法により約 60~100%のウイルス回収率が得られることが明らかとなった。

キーワード： *Cryptosporidium*、ウイルス、Real Time PCR 法

1. はじめに

下水処理水が関与した病原微生物による集団感染を未然に防止するため、下水処理水に含まれる病原微生物に関する安全性確保が求められている。下水処理水の衛生学的安全性を評価するためには、下水中の極微量の病原微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発と、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動を解明することが重要である。

本課題では上記の要請を踏まえ、分子生物学的手法（特に PCR (Polymerase Chain Reaction) 法）により、下水中・環境水中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出できる手法を提案し、また下水処理過程や環境中でのウイルスおよび原虫の挙動を解明することを目的としている。

本研究で研究対象としている病原ウイルスは *Norovirus*、原虫は *Cryptosporidium* であり、本年度は以下の研究を行った。

1) Real Time PCR 法の下水試料への適用性評価および濃縮・分離操作や下水性状の違いが Real Time PCR 法による *Cryptosporidium* オーシストの検出感度に及ぼす影響

2) 下水試料に適したウイルス濃縮法の提案

2. 研究内容

2.1 目的

Real Time PCR は、PCR により増幅される DNA を蛍光シグナルにより Real Time で検出するものであり、本法により、試料中の DNA を簡便に定量することが可能となる。即ち、既知試料について DNA の対数直線増殖領域の蛍光強度を連続測定し、ある蛍光強度に到達するサイクル数と初期 DNA 濃度の関係をスタンダードとすることにより未知試料中の標的 DNA が定量される。

前年度の研究では、高感度検出が可能と考えられる 18S リボソーム RNA 遺伝子（以下では 18SrDNA とする）を標的遺伝子とすることで検出感度を約 1 個にするすることが可能となった。今年度は検出の前処理として、濃縮・分離・操作および下水性状の違いが検出感度に及ぼす影響を把握した。

ウイルスの検出に関しては、モデルウイルスとして Q β フェージを使用して、各種濃縮法により回収率を測定し、下水試料に適した濃縮法の提案を目指した。

2.1.1 濃縮・分離操作および下水性状の違いが *Cryptosporidium* オーシストの検出感度に及ぼ

す影響

Real Time PCR 法によるオーシストの検出では、18SrDNA を標的遺伝子とすることで検出感度を約1個とすることができた。しかし、下水中のオーシストは通常、低濃度であることから検出の前処理として濃縮・分離操作が必要となる。濃縮法としてはフィルターによるろ過濃縮、濃縮試料からのオーシストの分離方法としては免疫磁気ビーズ法などが用いられている。

本実験の目的は、このような濃縮・分離操作を行い試料中のオーシストを測定した、測定対象とする下水性状の違いがオーシストの検出感度に及ぼす影響を把握することである。

2.1.2 下水試料に適したウイルス濃縮・誘出法の提案

Cryptosporidium の測定と同様に、下水中のウイルスは通常、低濃度であることから、検出の前処理として濃縮・誘出操作が必要となる。濃縮法としては膜、凝集剤、超遠心法など、誘出法としては牛肉エキスやグリシン緩衝液、NaOH 溶液などを利用するものがある。

本実験では、モデルウイルスとしてQβファージを利用し各種の濃縮・誘出法により回収率を求め、下水試料に適した濃縮・誘出法の提案を目的とするものである。

2.1.3 Real Time PCR 法によるウイルス定量感度の評価

今後、Real Time PCR 法により下水処理過程や水環境中でのウイルス調査を行うのにあたり、信頼性のある定量範囲を明らかにする必要がある。

本実験では、ノロウイルス、エンテロウイルスおよびQβファージのクローニングしたcDNAを用いて、Real Time PCR 法の定量感度を評価した。

2.2 実験方法

2.2.1 オーシストの検出感度に及ぼす影響

実験では Roche 社製の Real Time PCR 装置 (LightCycler) を使用した。はじめに検量線を作成するためにオーシスト (HNJ-1 株) の希釈系列試料に対してリアルタイム PCR を行った。DNA の

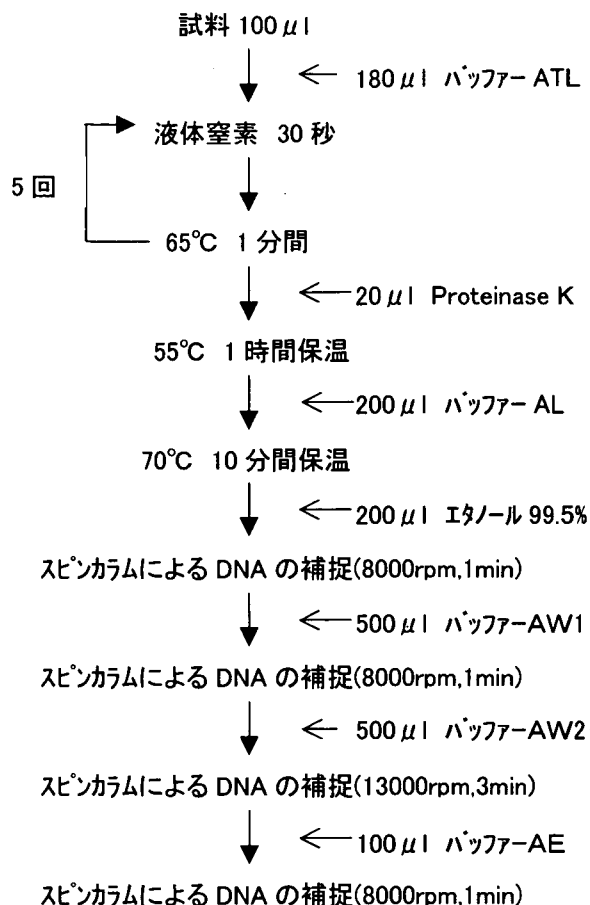


図-1 DNA 抽出手順
(凍結融解と Dneasy Tissue Kit(Qiagen)を組み合わせた方法)

表-1 Hybridization Probe法の試薬濃度

試薬の種類	最終濃度
H ₂ O	適宜
Forward Primer	0.5 μM
Reverse Primer	0.5 μM
Fluorescein Probe	0.2 μM
LCRed Probe	0.4 μM
QuantiTect Probe PCR Master Mix	2 ×

表-2 Real Time PCR条件

初期	95°C 15分
変性	95°C 1秒
アニーリング	62°C 30秒
エクステンション	72°C 30秒
サイクル数	55回

抽出は図-1の手順により行った。

次に、流入下水 60ml、下水処理水(砂ろ過水)、ミリQ水に各々5 lにオーシストを添加し、ポリカーボネート製メンブランフィルター(公称孔径 2.0 μm)でオーシストを濃縮した後、免疫磁気ビーズにより濃縮試料からオーシストを分離し、図-1の方法によりDNAを抽出しReal Time PCR法により定量を行った。

本実験でのReal Time PCR法によるオーシストの検出は、Hybridization Probe法により行い、反応試薬には、QuantiTect Probe PCR Kit(Qiagen)を使用した。本実験で用いたReal Time PCR試薬濃度を表-1、Real Time PCR条件を表-2に示す。

2.2.2 ウイルスの各種濃縮・誘出法

本実験により検討を行ったウイルスの濃縮・誘出法を以下に示す。ここでは、ともに一本鎖RNAを遺伝子として持ち、形態や大きさなどがノロウイルスと類似したQ β ファージをモデルウイルスとして実験に用いた。また、ファージの定量法は大腸菌 K12F⁺株を宿主菌としたブラック法とした。

①セルロース濃縮・凝集法

試料水 20 lに対し DEAE-セルロース、アニオン系高分子凝集剤を各々10ml 添加、攪拌混合し DEAE-セルロースを凝集させた。凝集処理した試料を不織布バックでろ過して DEAE-セルロースを回収し、pH9.5の牛肉エキス溶液(10mL)でウイルスを誘出させ、この誘出液をメンブランフィルターでろ過した後、pH7.0に補正しウイルス濃縮液とした。

②陽電荷膜法

試料水に塩酸を添加し pH3.5 に調整した後、AlCl₃溶液(終濃度 0.05mM)を添加しウイルス凝集塊を形成させた。これを陽電荷膜に通水させウイルスを捕捉させた後、pH11.5のグリシン緩衝液(10mL)でウイルスを誘出させた。この誘出液をメンブランフィルター(孔径 0.2 μm)でろ過した後、pH7.0に補正しウイルス濃縮液とした。

③陰電荷膜法²⁾

試料水に MgCl₂を添加(終濃度 2.5mM)した後、陰電荷膜(HA 膜)に通水させウイルスを捕捉させ

た後、pH10.5の水酸化ナトリウム溶液(10mL)でウイルスを誘出させた。この誘出液をメンブランフィルター(孔径 0.2 μm)でろ過した後、pH7.0に補正しウイルス濃縮液とした。

④超遠心法

試料水を粗遠心処理(3,000 \times g,20 分間)して上澄液を回収、この上澄液を30%ショ糖溶液を入れた遠心管に重層し、超遠心処理(160,000 \times g,2 時間)を行い沈査を回収した。この沈査をRNase-Free水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。

⑤ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法

試料水に PEG6000(終濃度 8%)および NaCl(終濃度 0.4M)を添加攪拌し完全に溶解させた。4 $^{\circ}\text{C}$ で一夜静置した後、遠心処理(10,000 \times g,30 分間)を行い沈査を回収した。この沈査をRNase-Free水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。

2.2.3 Real Time PCR法によるウイルスの定量感度

①ウイルス遺伝子(RNA)の抽出

ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Kit(QIAGEN 社)を用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN 社)でウイルス RNA を精製した。

②上記で抽出したウイルス RNA 試料 1 μg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社)を用いた逆転写反応により cDNA を作製し 2.5 μl を Real Time PCR に供した。Real Time PCR は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN 社)を用いて行った。

2.3 実験結果と考察

2.3.1 オーシストの検出感度に及ぼす影響

オーシストの検量線試料に対してリアルタイム PCR 結果を図-2、3に示す。図-2は PCR サイクル数に対する蛍光強度、図-3はその検量線を示している。

次に流入下水、砂ろ過水(下水処理水)、ミリQ

水にオーシストを添加し、濃縮・分離・DNA抽出の一連の操作を行った後、Real Time PCR法によりオーシストを定量し回収率を把握した。各試料毎のオーシストの回収率を表-3に示す。オーシストの回収率を高い順に並べるとミリQ水、砂ろ過水、流入下水となるが、約20~70%の範囲で推移していることから、試料中の有機物濃度の違いによる影響や濃縮・分離操作による損失があるものと考えられた。しかし、顕微鏡観察によるオーシストの回収率試験結果でも、同様な回収率¹⁾が得られており(表-4)、高濃度域においてもリアルタイムPCR法でも顕微鏡観察と同程度の検出感度であるものと考えられた。

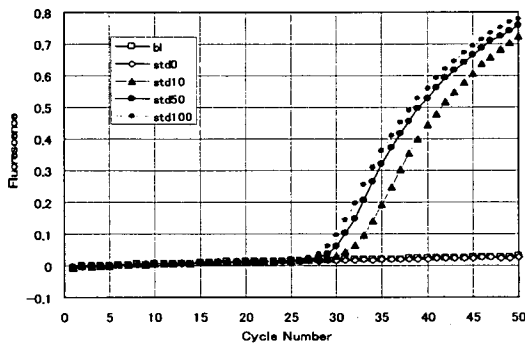


図-2 クリプトスポリジウムの検量線

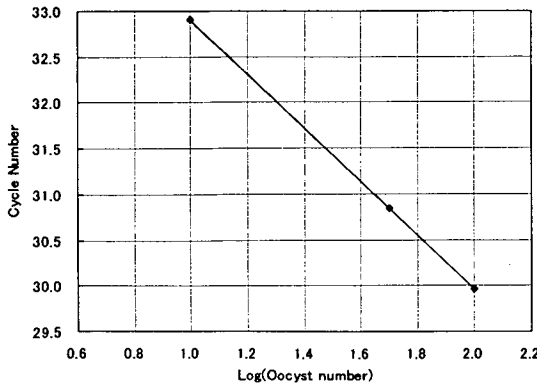


図-3 クリプトスポリジウムの検量線

表-3 各試料毎のオーシストの回収率

	流入下水	砂ろ過水	ミリQ水
回収率の範囲 (%)	19-22	23-47	39-72

表-4 顕微鏡観察によるオーシストの回収率

	流入下水	下水処理水	河川水
回収率の範囲 (%)	20-25	20-30	40-50

2.3.2 各種濃縮・誘出法によるウイルスの回収率

表-5にセルロース吸着・凝集法によるファージの回収率を示す。本手法では、多量の試料水の濃縮を想定しており、流入下水試料についての適用は想定していない。ファージ無添加の系では、砂ろ過水から約100%、二次処理水については約60%の回収率を得た。二次処理水において回収率が低下する理由は、セルロース担体に二次処理水中の懸濁物が吸着してファージの回収を妨害したためと推定される。また、ファージを添加した場合に二次処理水、砂ろ過水とも回収率が低下しているが、これは、添加したファージの量に対してセルロース担体量が少なかったためであると推定される。このため、高濃度のウイルスが含まれる試料に対しては、最適なセルロース担体の添加量を検討しなければならないと考えられた。

他の方法である陽電荷膜法、陰電荷膜法、超遠心処理法、PEG(ポリエチレングリコール)沈殿法によるファージの回収率を表-6に示す。陽電荷膜、陰電荷膜法では、ファージの回収率は非常に低い結果となった。データは示していないが各々の電荷膜への吸着率は95%以上であり、膜に吸着したファージの大部分が誘出されていないため回収率が低いものと考えられた。陰電荷膜方では、酸洗浄、アルカリ誘出を行っているが、これらの工程によりファージの感染能力が低下し回収率が低くなっていることも予想される。このため、誘出液中のファージについてリアルタイムPCR法により定量を行ったが、プラーク法と同程度の濃度であった。一方、同様な手法によるウイルスの回収率は60%程度であるとの報告²⁾もあり、誘出操作を含めこの原因を究明する必要があると考えられた。PEG沈殿法では、超遠心処理法に比較して全体的に若干高い回収率が得られた。これはポリエチレングリコールを添加することで、より低い遠心力で効率良くファージを回収できることを示唆している。超遠心処理法では、試料中の懸濁物量の増加に伴いファージの回収率が向上する傾向が見られることから、懸濁物とウイルスの共沈作用が影響しているものと考えられた。

表-5 セルロース吸着・凝集法によるQβファージの回収率

	2次処理水		3次処理水	
	Qβ添加	Qβ無添加	Qβ添加	Qβ無添加
回収率(%)	5.9	56	4.3	98

表-6 各種濃縮法によるQβファージの回収率

濃縮法	回収率(%)		
	流入下水	2次処理水	3次処理水
陽電荷膜法	0.68	2.3	13
陰電荷膜法	5.5	1.7	0.6
超遠心法	59	30	20
PEG沈殿法	58	36	38

2.3.3 リアルタイムPCR法によるウイルスの定量感度

リアルタイムPCR法によるウイルスの定量感度を把握するため、ノロウイルスG1型⁴⁾、G2型⁴⁾、エンテロウイルス⁵⁾ およびQβファージについて各々の高度保存領域をクローニングしたコントロールcDNAを作製し、TaqManプローブを用いて、その希釈系列に対してリアルタイムPCRを行った。ノロウイルスG2型のみ結果について示すが、図-4は各希釈系列についてPCRサイクル数に対する蛍光強度、図-5は各希釈系列について蛍光強度が指数的に増加し始めるサイクル数と希釈濃度の対数値に対してプロットし得た検量線である。ノロウイルス(G1、G2)型、エンテロウイルス、Qβファージともに5~10¹⁰コピーの間で蛍光強度と相関性があり、この範囲で定量測定が可能であると推定された。また、この反応系におけるPCRの増幅効率⁶⁾は93.8%であった。

一方、リアルタイムPCR法によるウイルスの検出・定量を行う上で一般的に利用されているグアニジン法を適用し、Qβファージの遺伝子(RNA)抽出を行った。ファージ濃度と遺伝子抽出量の関係を図-6に示す。ファージ濃度が10²以上となることで、抽出される遺伝子量は平衡状態となっており、本抽出法については、適用可能なウイルス濃度の範囲を把握するとともに、高濃度のウイルスが含まれる試料に対しては、他の抽

出法の適用を考慮しなければならないと考えられた。

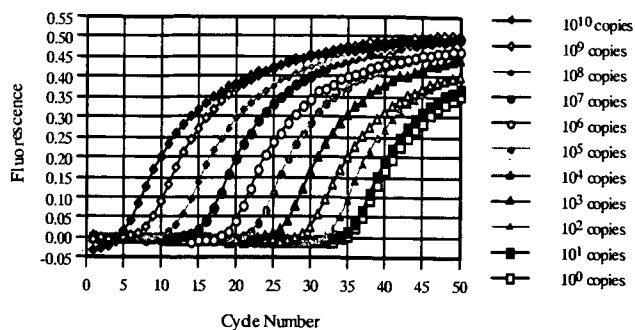


図-4 リアルタイムPCR法によるノロウイルス標準試料の検出

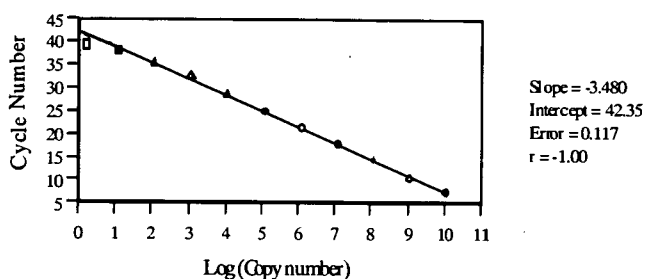


図-5 各希釈系列とPCRサイクル数の関係

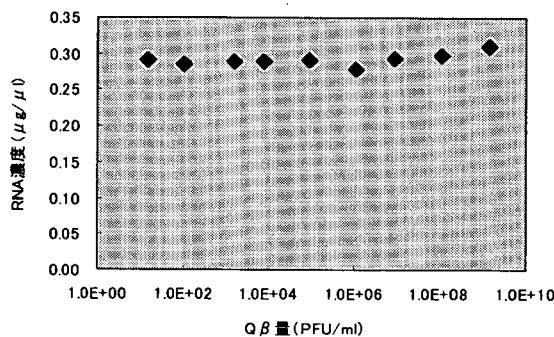


図-6 ファージ量と抽出遺伝子量の関係

3. まとめ

本年度は、オーシストの検出の前処理として濃縮・分離操作および下水性状の違いが検出感度に及ぼす影響を明らかにした。また、ウイルスの検出に関しては、モデルウイルスとしてQβファージを利用して各種濃縮・分離法により回収率を測定し下水試料に適した濃縮法を提案した。以下に結果を示す。

1) ミリQ水、砂ろ過水、流入下水に添加したオーシストの回収率は、約20~70%の範囲であったことから、リアルタイムPCR法は顕微鏡観察と比較して、高濃度域においても同程度の検出感度で

あると考えられた。

2) 流入下水のウイルス濃縮・誘出法では、超遠心処理法や PEG 沈殿法により約 60%の回収率が得られたことから、これらの方法は流入下水試料からウイルスを検出する上で適しているものと考えられた。

3) 二次処理水、砂ろ過水試料に対しては、セルロース吸着・凝集法により約 60~100%の回収率が得られたことから、この方法は二次処理水、砂ろ過水試料からウイルスを検出する上で適しているものと考えられた。

4) リアルタイム PCR 法によるウイルスの最小検出感度は、5 コピーであった。

今後は、リアルタイム PCR 法を適用して下水処理過程や環境水中でのオーシストやウイルスの挙動解明を進めるとともに、測定精度を向上させるための課題を解決する予定である。ウイルスの測定では高濃度のウイルスが含まれる試料に対しては、最適なセルロース担体の添加量や遺伝子抽出法についての課題を解決しなければならない。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) 諏訪守、鈴木穰(2000) 下水処理過程におけるクリプトスポリジウムの除去効果等、土木研究所資料第 3733 号
- 2) 片山浩之、嶋崎明寛、大垣眞一郎(2002) 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 Vol. 25 (8) p469-475.
- 3) 高度処理会議(2001) ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案)
- 4) 篠原美千代、影山努(埼玉県衛生研究所、R&D Center. BML) (2002) 蛍光プローブを用いた RT-PCR 法 日本臨床. Vol. 60(6)p. 1181-1187.
- 5) 影山努、小嶋慈之、福士秀悦、片山和彦(2001) 蛍光プローブを用いた Norwalk virus (NV) の高感度検出法の開発. Vita. Vol.18 (1)

p. 42-49

- 6) M. Nijhuis, N. van Maarseveen, R. Schuurman, S. Verkuijlen, M. de Vos, K. Hendriksen and A.M. van Loon. (2002). Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Defferenet Clinical Specimens by Real-Time PCR. J. Clinical. Microbiol. Vol.40(10) p. 3666-3670

3. 下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 鈴木 穰

専門研究員 金 時俊

1. はじめに

地域から発生し、流量および水質が安定している下水処理水は、都市地域の代替水資源として様々な用途へ活用されているが、今後地球温暖化等の気候変動により、起こりうる水資源不足に対応するためにも、活用の幅を広げることは重要であると考えられる。

しかしながら下水処理水には低濃度ではあるものの、残存有機物が存在し、送水管内での微生物再増殖による水質劣化や、放流先生物相の中腐水性化などの問題を引き起こしている¹⁾。それへの対応方法として、前者については、塩素添加による微生物発生を抑制する手法が採られているが、配管の腐食や閉塞の事故も発生している²⁾。逆浸透 (RO) などの物理化学的方法で有機物を除去する手法もあるが、設備、運転コストが高いというデメリットが挙げられる^{3,4)}。

したがって残存有機物に由来する潜在的な障害を取り除き、下水処理水の水資源としての価値を高め、良好な水循環を創造するには、残存有機物を安価かつ効率的に除去する手法が必要となっている。

これまで下水処理水中の残存有機物の性状等についての研究は行なわれているものの⁵⁻⁷⁾、下水処理水の有機物分画を行い、特定の有機物画分における微生物再増殖可能性についての研究は少ない。

本研究では、総合固定化法 (以下固定化法) および膜分離活性汚泥法 (以下 MBR 法) による下水処理水の残存有機物除去実験を行い、有機物画分ごとの処理特性と微生物増殖量から処理水の微生物再増殖可能性を比較評価した。

2. 実験

2.1 実験装置

微生物による高度処理法として、図-1 に示す固定化法および MBR 法を用いた。固定化法は、三角フラスコ (2 l) に表-1 に示す担体 (外径: 4mm, 長さ: 5mm) を 30%V/V の割合で充填し、散気を行なうものである。初期に活性汚泥を植種のため投入し、fill ad draw の回分式により実験を行なった。MBR 法は、アクリル製反応槽 (4 l) に平膜型の精密ろ過膜 (孔径: 0.4 μm, 膜面積: 0.11m², 材質: ポリオレフィン, Kubota 製) を浸漬し、散気を行なうものである。初期に下水二次処理水で馴致させた活性汚泥を植種のため投入し、週 1 回のペースで 24 時間連続吸引ろ過を行い、同時に槽内水位検知により試料水を供給した。実験期間中膜洗浄は行わなかった。

2.2 実験方法

供試試料水としての下水二次処理水および固定化法・MBR 法の植種に用いた活性汚泥は、茨城県霞ヶ浦流域下水道霞ヶ浦浄化センターに設置されている標準活性汚泥法パイロットプラントから採水した。実験原水となる下

水二次処理水の浮遊物質（SS）およびアンモニア性窒素濃度はそれぞれ 1mg/l および 5mg/l 以下であった。

固定化法では、固定化反応槽内の水量を 2l として連続ばっ気と攪拌を行い、週末を除く 1 回/日、槽内水 2l の引き抜きと下水処理水 2l の投入を行った。固定化処理水は 0.45 μm メンブランフィルター（Advantec 製）ろ過後、分析に供した。このため平均の水理学的滞留時間（HRT）は約 33 時間である。固定化反応槽は A, B, C の 3 基を用い、各反応槽への供給水は、それぞれ下水二次処理水、固定化反応槽 A の処理水、MBR 処理水とした。

MBR 法では、HRT を 3 時間に設定して吸引ろ過を行い、水位制御方式によって反応槽に下水二次処理水を注入し吸引ろ過により得た膜処理水分析に供した。MBR 法において反応槽下部からのばっ気は反応槽内の溶存酸素（DO）濃度を維持するだけでなく、運転時間の経過とともに膜表面の付着物質を剥離させる効果もある。各室内実験は 20℃ の恒温室で行なった。

供試試料水は全有機炭素計（Shimadzu 製）により総有機炭素（TOC）および溶存有機炭素（DOC）をそれぞれ測定した。

表-1 固定化担体の性状

Materials	Polypropylene
Specific gravity	1.025 g·cm ⁻³
Configuration	Empty cylinder
Specific surface area when packed densely	1410 m ² ·m ⁻³

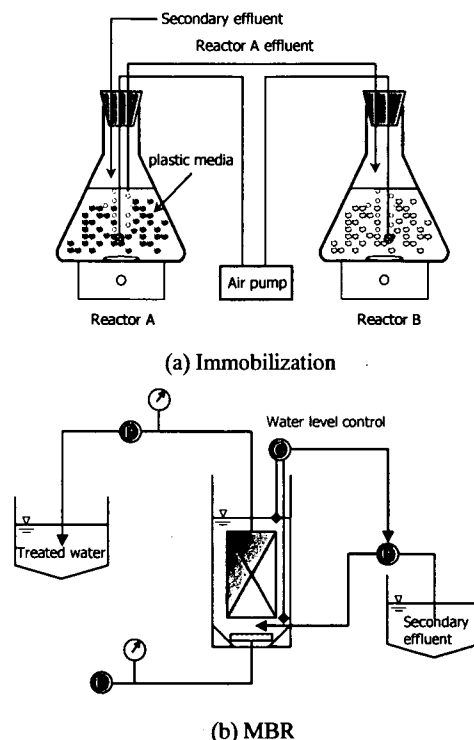


図-1 固定化法および膜分離活性汚泥法（MBR）実験装置

2.3 溶存有機物（DOM: dissolved organic matters）分画

非イオン性樹脂（XAD-7HP）、強酸性イオン交換樹脂（AGMP-50）、強塩基性イオン交換樹脂（A-21）を利用し、疎水性物質（HoF: hydrophobic fraction）、親水性塩基（BHiF: base hydrophilic fraction）、親水性酸（AHiF: acid hydrophilic fraction）

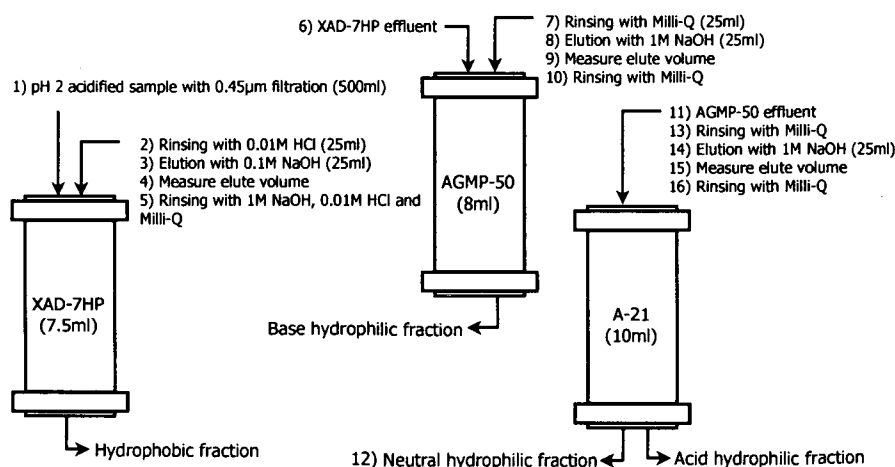


図-2 残存有機物分画方法

hydrophilic fraction) および親水性中性物質 (NHIF: neutral hydrophilic fraction) に分画した⁸⁾。

XAD-7HP, AGMP-50 および A-21 樹脂は, 0.1M NaOH に 24 時間浸漬させた後, 微粒子を除去するため Milli-Q 水 (Millipore 製) 洗浄を行った。続いて 24 時間ソックスレー (Soxhlet) 抽出洗浄をメタノール, アセトニトリル, ジエチルエーテルの順序で行い, 各樹脂を精製した。カラムに充填した樹脂容量は, 容量ファクター (k') 50 の条件下で, 500ml の供試試料水を使用するために調節した^{8,9)}。XAD-7HP (7.5ml) は, カラム通過液の DOC 濃度が 0.2mg/l 以下になるまで Milli-Q 水洗浄を行った。AGMP-50 (8ml) および A-21 (10ml) は, カラム通過液の伝導度が $10\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以下になるまでそれぞれ 1M HCl および 1M NaOH 洗浄を行った。図-2 に溶存有機物 (DOM) 分画手順を示す。

カラム分画で得た各供試試料水は 1M HCl を 2-3 滴添加して pH 2 に調整し, 純空気を 2 分間通気し無機炭素を除去した後, DOC 測定を行い, 各画分の DOC 濃度を算出した¹⁰⁾。

2.4 分子量分画

分子量分画においては, 供試試料水を $0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過し, その後限外ろ過 (UF) に供した。分画に用いた限外ろ過膜 (Millipore 製) は, 分子量分画 10000, 5000 および 1000 の 3 種である。限外ろ過膜は使用前に, あらかじめ限外ろ過装置 (Advantec 製) に Milli-Q 水 300ml を投入し, 窒素減圧 (0.1MPa) により 1-2 時間洗浄ろ過した。その後 100ml の供試試料水を投入し, ろ過初期に得られた 10ml のろ過水は捨て, その後 25ml のろ過水が得られるまでろ過した。この操作により, $0.45\mu\text{m}$ 以下の溶存有機物を含むろ液, MW<10000 の溶存有機物を含むろ液, MW<5000 の溶存有機物を含むろ液 および MW<1000 の溶存有機物を含むろ液に分けられる。これらそれぞれの画分について DOC 濃度測定した。上記両分画は 2003 年 9 月から 2003 年 12 月の実験期間中の試料を分析に用いた。

2.5 ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 分画

供試試料水は, 先ず $0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルターろ過後, ロータリエバポレーター (EYELA 製) で 10 倍濃縮を行い, 示差屈折器 (Shodex RI-71S) を検出器とし, ポリヒドロキシメタクリレート系を充てん剤とした GPC により分子量分布を測定した。分子量分画の標準物質にはポリエチレングリコール (PEG) を用いた。

2.6 微生物増殖量

各固定化反応槽 A, B, C から一定量の担体を取り出し, Milli-Q 水を加え, 30 分間の超音波処理により, 担体から剥がれた微生物を含む浮遊溶液の総窒素 (TN) を測定し,

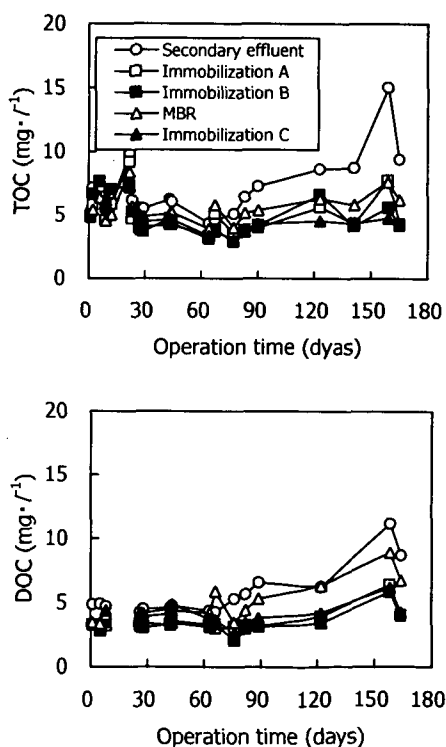


図-3 固定化法および MBR による下水二次処理水の残存有機物除去

付着微生物量を求めることにより、微生物増殖可能性を評価した。TN は、供試試料水にペルオキソ二硫酸カリウムのアルカリ性溶液を加え、高圧蒸気滅菌器（120℃）に加熱して窒素化合物を硝酸イオンに変え、TRAACS 2000（BRAN + LUEBBE 製）により測定した¹¹⁾。

3. 結果および考察

3.1 生物高度処理による下水二次処理水の残存有機物除去

固定化法および MBR 法による下水二次処理水中の残存有機物除去を図-3 に示す。固定化法（反応槽 A）および MBR 法によって、下水二次処理水中の TOC は下水二次処理水の平均 6.9mg/l に対し、それぞれ 4.9mg/l、5.5mg/l と、2.0mg/l、0.4mg/l 除去された。その内訳としての DOC の除去はそれぞれ 2.0mg/l、0.8mg/l であった。また、固定化 A および MBR の処理水を処理した固定化 B および固定化 C では、TOC、DOC がそれぞれ 0（除去されていないことを意味する）、0.3mg/l および 0.9、0.7mg/l 除去されたが、その値は小さく、有機炭素の濃度から見れば、最初の固定化 A および MBR によって、処理はほぼ終了していた。

ゲルろ過クロマトグラフィー分画により、下水二次処理水、固定化 A 処理水および MBR 処理水の分子量分布を図-4 に示す。下水二次処理水の分子量分布は MW>6000、MW1000~700、MW700~200 および MW<200 の 4 つのピークに分画された。このうち、MW<1000 画分は、示差屈折器で測定されたピーク面積値として全体の約 75% を占めており、微生物による高度処理では除去が困難であった。

MBR の MLSS、ろ過差圧および透過フラックスの変化を図-5 に示す。MLSS は種汚泥として投入した初期活性汚泥濃度 30mg/l から緩やかに増加し、実験終了時には約 130mg/l であった。低い MLSS 濃度での膜処理操作は膜の閉塞を起こしやすいと報告されている¹²⁾。しかし、透過フラックスは実験期間中膜洗浄を行っていないにも関わらず、46l/d から実験終了時には 37l/d と、その低下率は 20% に留まった。ろ過差圧は操作開始からのデータを得ることができなかったが、実験終了時には 75kPa であった。これは、膜の目詰まりの恐れがある溶解性有機物あるいは微生物由来有機物が系内に蓄積し、膜表面への付着による抵抗からろ過差圧が増加したと考えられた¹³⁾。

3.2 下水二次処理水の残存有機物分画および分子量分画

下水に占める有機物分画は DOC 濃度として、親水性中性物質（74%）、疎水性酸（12%）、親水性塩基（9%）、親水性酸（5%）の割合であった。下水二次処理水に占める残存有機物分画は、親水性中性物質（60%）、疎水性酸（23%）、親水性塩基（9%）、親水性酸（8%）の割合であった。活性汚泥処理により下水中溶解性有機物の約 85% が除去され

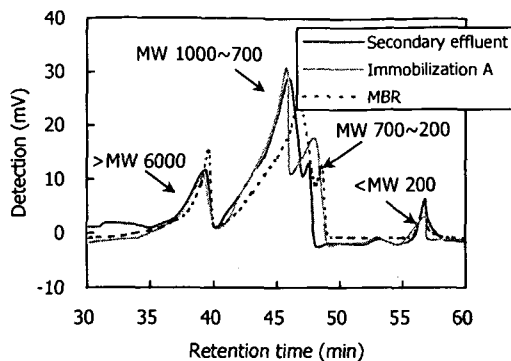


図-4 下水二次処理水の GPC 分画

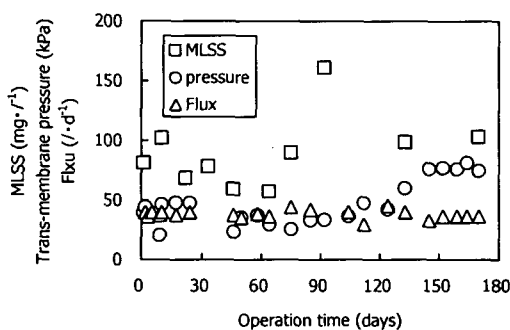


図-5 MBR の MLSS、ろ過差圧およびフラックス変化

た。また疎水性酸画分の割合が増加していることから、下水処理における難分解性有機物の増加が示唆された。

固定化 A, B の 2 段および MBR, 固定化 C の 2 段それぞれの直列生物高度処理法による下水二次処理水中の残存有機物分画を図-6 に示す。疎水性酸 (HoF) は、下水二次処理水の 1.0mg/l に対し固定化 A によって 20%ほど減少したが、MBR ではほとんど減少しなかった。さらに上記両処理水をそれぞれ原水とする固定化 B および固定化 C によっても減少

しなかった。親水性塩基 (BHIF) は、固定化 A, B によって下水二次処理水の 0.4mg/l から 0.1mg/l まで減少したが、MBR ではほとんど除去されず、固定化 C による減少は小さい。親水性酸 (AHIF) は、疎水性酸および親水性塩基とは異なり、固定化 A を除いて MBR, 固定化 B および固定化 C では増加の傾向であった。親水性中性物質 (NHIF) は、下水二次処理水の 2.6mg/l が固定化 A および MBR によってそれぞれ 1.7mg/l まで除去された。固定化 A を原水とする固定化 B では 1.1mg/l と、さらに 0.6mg/l 減少したが、MBR を原水とする固定化 C では 1.6mg/l と、ほとんど変わらなかった。親水性中性物質は残存有機物画分の 60%を占めており、また固定化 B においてさらに除去が確認されたため、微生物の主なエネルギー源となり、後述する微生物再増殖に影響を及ぼす可能性が示唆された。

限外ろ過による分子量分画を図-7 に示す。固定化 A, B による低分子量画分 (MW<1000) の DOC 濃度は 2.9mg/l から 2.2mg/l と、0.7mg/l 減少した。MBR, 固定化 C による低分子量画分の DOC 濃度はそれぞれ 2.1mg/l であった。これらの値は図-6 の親水性中性物質の DOC 濃度とほとんど一致し、MW<1000 であることが示唆された。固定化 A および MBR による高分子量画分 (MW>10000) の減少は、担体に付着した有用微生物および膜によって反応槽内に蓄積された有用微生物によって高分子量画分が分解され、低分子量画分に変換したためと考えられる。しかし上記両処理水を原水とする固定化 B および固定化 C の高分子量画分は固定化 A

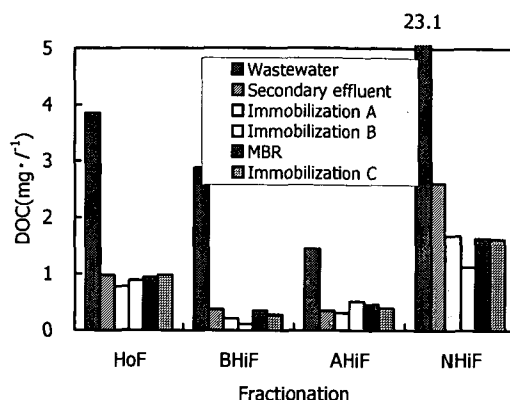


図-6 固定化法および MBR 法による下水二次処理水およびその処理水の DOC 分画

HoF: 疎水性酸, BHIF: 親水性塩基, AHIF: 親水性酸, NHIF: 親水性中性物質

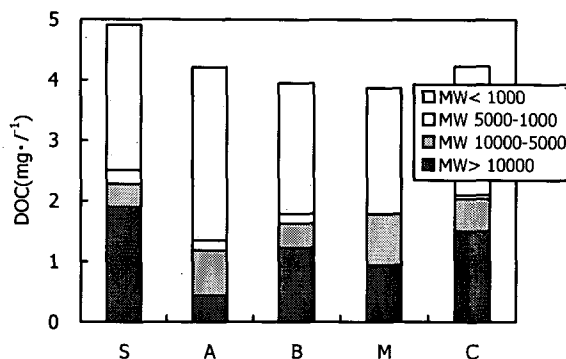


図-7 固定化法および MBR 法による下水二次処理水およびその処理水の分子量分画

S: 下水二次処理水, A: 固定化 A, B: 固定化 B, M: MBR, C: 固定化 C

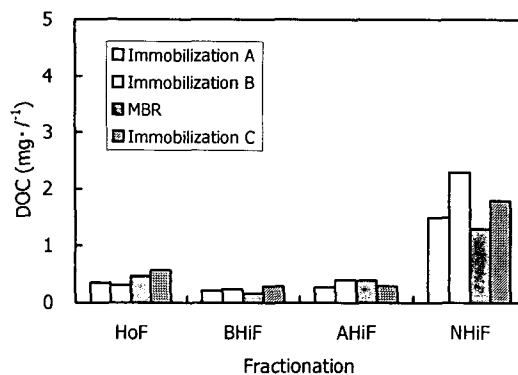


図-8 固定化法および MBR 法による下水二次処理水およびその処理水を限外ろ過 (分子量分画 MW<1000) した試料水の有機物分画

および MBR に比べ増加していた。これは微生物由来有機物生成によると推測しているが、さらに研究を必要とする。

限外ろ過 (MWC0 1000) した各処理水の疎水性酸、親水性塩基、親水性酸および親水性中性物質の DOC 濃度を図-8 に示す。固定化 A 処理水は 0.4, 0.2, 0.3 および 1.5mg/l であり、固定化 B 処理水は 0.3, 0.2, 0.4 および 2.3mg/l であった。また MBR 処理水は 0.5, 0.2, 0.4 および 1.3mg/l であり、固定化 C 処理水は 0.6, 0.3, 0.3 および 1.8mg/l であった。疎水性酸は微生物分解が困難

なフミン質成分を含んでいたため、限外ろ過分画により高分子物質が排除され DOC 濃度が減少したと考えられる。親水性塩基および親水性酸の DOC 濃度変化は限外ろ過分画によりほとんど認められなかった。親水性中性物質は固定化 B 処理水 (1.1mg/l) を除き、限外ろ過による分子量分画以前の親水性中性物質の DOC 濃度 1.7mg/l, 1.6mg/l および 1.6mg/l と同程度であった。上記 3 有機物画分は主に MW<1000 の低分子量画分から構成されていると考えられた。

3.3 微生物再増殖可能性

固定化 A, B の 2 段および MBR, 固定化 C の 2 段それぞれの直列生物高度処理法により微生物再増殖可能性を評価した。下水二次処理水の平均 DOC 濃度 5.2mg/l に対し、固定化 A および MBR 処理水の平均 DOC 濃度はそれぞれ 3.3mg/l, 4.5mg/l であった。さらに上記両処理水をそれぞれの原水とする固定化 B および固定化 C 処理水の平均 DOC 濃度はそれぞれ 3.1mg/l, 3.9mg/l と、除去されていない。これは固定化 A および MBR 処理により微生物成長および増殖に関わる残存有機物が除去されたため、固定化 B および固定化 C 担体への付着微生物が少なく、微生物再増殖可能性が低いと考えられた。

固定化 A, B, C の担体付着微生物量を図-9 に示す (固定化 C は 2003 年 9 月から実験開始)。付着微生物はばつ気にもなう摩擦等により常に剥離され、同時に担体表面の微生物増殖、または付着微生物の浮遊微生物の補足などが継続的に進行され正常的状态となる。固定化 B 担体の付着微生物量は 0.23mg-N/m² (ブランク) から 1.08mg-N/m² (10/23/03) まで増加し、微生物再増殖が示唆された。しかし 2 ヶ月後には 0.83mg-N/m² (12/24/03) と増加していないことから、微生物再増殖が抑制されていると考えられた。また固定化 C 担体の付着微生物量は 0.18mg-N/m² (ブランク) から 0.68mg-N/m² (10/23/03) に増加し、固定化 B と同様微生物再増殖が示唆されたが、2 ヶ月後には 0.57mg-N/m² (12/24/03) と増殖が抑えられている。一方系内から流出した SS としての微生物保持量は、微生物量計算式より系内からの微生物流出量は無視できる数値 (0.001mg-N/cm² 以下) であった¹⁴⁾。

下水二次処理水には低分子量画分から微生物由来有機物に至るまでの様々な残存有機物を含んでいるため、その性状およびそれによる微生物再増殖可能性を把握することは、下水処理水再利用のため重要である。一方、生物高度処理水には微生物の栄養源となる有機物量は少ない。しかしこのような水環境を本来の生殖環境とする微生物は、低濃度の有機物を栄養源として利用するのに適応している。本実験で用いた固定化法および MBR 法では

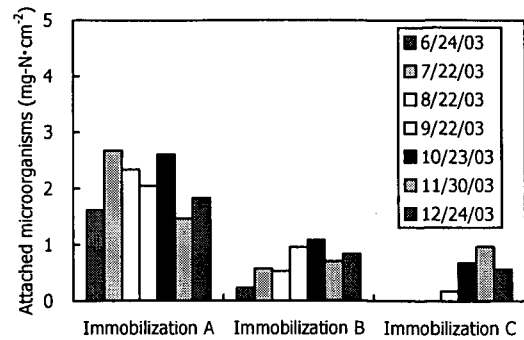


図-9 固定化担体 A, B, C のそれぞれの付着微生物量

このような有用微生物が担体に付着し系内に集積され、その処理水の微生物再増殖可能性を抑えていると考えられる。

4. 結論

下水処理水再利用において、固定担体法および膜分離活性汚泥法（MBR）による下水処理水の残存有機物の処理特性およびその処理水の微生物再増殖可能性について得られた知見を以下にまとめた。

1. 下水二次処理水の残存有機物除去は TOC および DOC 濃度から、最初の固定化 A および MBR によって大部分処理された。一方上記両処理法によって除去されなかった残存有機物はゲルクロマトグラフィー分画により MW<1000 の低分子量画分が占めていた。
2. MBR 法において、低い MLSS 濃度における膜の閉塞は認められなかった。また実験期間中には膜洗浄を行っていないにも関わらず、透過フラックスの低下率は小さく、一定量の膜処理水を得た。
3. 下水二次処理水に占める残存有機物画分は DOC 濃度として、親水性中性物質（60%）、疎水性酸（23%）、親水性塩基（9%）、親水性酸（8%）の割合であった。限外ろ過分画により、親水性塩基、親水性酸および親水性中性物質はほとんど分子量分画（MW）<1000 の低分子物質から構成されていた。
4. 微生物再増殖可能性は、固定化 B 担体および固定化 C 担体の付着微生物量の増加が抑えられたため、生物高度処理により下水二次処理水の水資源としての価値を高められると考えられる。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) 濱本哲郎（2002）福岡市内河川の水生底生動物に関する調査研究－瑞梅寺川－，福岡市保健環境研究所年報第 27 号
- 2) 有働健一郎，小越真佐司，鈴木稔（2000）再生水の配管に及ぼす腐食に関する影響について，第 37 回下水道研究発表会講演集，755-757
- 3) 例えば，東京都下水道局，<http://www.gesui.metro.tokyo.jp>
- 4) 例えば，神戸市建設局，<http://www.city.kobe.jp/cityoffice>
- 5) Rebhun M. and Manka J. (1971) Classification of organics in secondary effluent, *Environmental Science and Technology*, **5**, 606-609
- 6) Gary L. A., Curtis W. B. Jr. and Mosen B. (1987) Molecular weight distributions of soluble organic matter in various secondary and tertiary effluent, *Wat. Sci. Tech.*, **19**, Rio, pp.529-538
- 7) Dignac M-F., Ginestet P., Rybacki D., Bruchet A., Urbain V. and Scribe P. (2000) Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter, *Wat. Res.*, **34**(17), 4185-4194
- 8) Namour Ph. and Müller M.C. (1998) Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: a physical-chemical method for measurement of the

refractory part of effluent, *Wat. Res.*, **32**(7), 2224-2231

- 9) Leenheer. J.A. (1981) Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters, *Environmental Science and Technology*, **15**, 578-587
- 10) 今井章雄, 福島武彦, 松重一夫, 井上隆信, 石橋敏昌 (1998) 琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画, *陸水雑*, **59**, 53-68
- 11) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部監修 (1997), 下水道試験方法 [上巻, 下巻] - 1997年度版一, 社団法人日本下水道協会
- 12) 武村清和, 大西真人, 奥野裕, 若山正憲, 碓井次郎 (2001) 膜分離活性汚泥法の実用化に関する研究, 第38回下水道研究発表会講演集, 595-597
- 13) 柳 根勇, 桃井清至, 小松俊哉 (1997) 膜分離活性汚泥法における膜透過性能に対する生物代謝成分の影響, *水環境学会誌*, **20**(7), 473-480
- 14) Hall R. E and Murphy L.K. (1970) Estimation of nitrifying biomass and kinetics in wastewater, *Wat Res.*, **14** 297-304

4. 底泥中の有機性有害物質の実態および挙動に関する研究

独立行政法人土木研究所材料地盤研究グループリサイクルチーム

首席研究員 鈴木 穰

主任研究員 南山 瑞彦

1. はじめに

近年、有機性有害物質による環境汚染が懸念されている。閉鎖性水域には、その流域内で発生・使用された有機性有害物質が河川等を経由して集まることが予想されるため、それらの物質による汚染が懸念されている。特に、多環芳香族炭化水素類（Polycyclic aromatic hydrocarbons、以下、PAHs）による底泥の汚染が指摘されている^{1, 2)}。

PAHs は、複数の環が縮合している有機化合物の総称とされている。2～6環の主なPAHsの構造を図-1に示す。PAHsは、オクタノール-水分配係数が大きく、疎水性を示す^{2~5)}。また、大気環境中では2～3環はほとんどがガス状、4環はガス状と粒子状の両方、5環以上は粉塵に吸着した状態で存在している⁶⁾とされている。PAHsは、古くから発ガン性等、問題のある物質群として注目されている^{7~9)}。

PAHsには、NaphthaleneやAnthracene等のように工業的に用いられる物質もあるが、多くは「コールタール、アスファルト中の成分で、非意図的生成物としてガソリン及びディーゼルの排ガス、たばこの煙、石炭などの燃焼ガスに含まれる²⁾」とされている。そのため、PAHsによる底泥汚染の経路としては、油の漏出による経路とともに燃焼に基づく大気経由の汚染が懸念される。

閉鎖性水域の底泥のPAHsによる汚染状況に関する報告が公表されている。特に、BaPについては、前述の通り古くから注目されたことから、公的機関でも多くの調査が行われている。主な既往文献中^{1, 10~12)}

の、淡水域および汽水域におけるBaPによる底泥の汚染調査結果によると、240ng-BaP/g-dry程度以下の汚染が報告されており、この約10年では横ばい～減少傾向が見られる。

環境省の調査^{1, 2)}によると、PAHsは水試料での検出頻度は低い一方で底泥試料からの検出頻度が高く、PAHs全体としてのリスク評価を行うことが必要であるとされている。また、PAHsの中には閉鎖性水域の河川流入部近傍での局所的な高濃度域の存在が報告されている物質もある¹³⁾。これらのことから、閉鎖性水域の底泥におけるPAHsの分布状況の把握等、存在実態を明らかにすることが必要である。15年度は、閉鎖性水域の底泥中のPAHs等の有機性有害物質の存在実態に関する研究

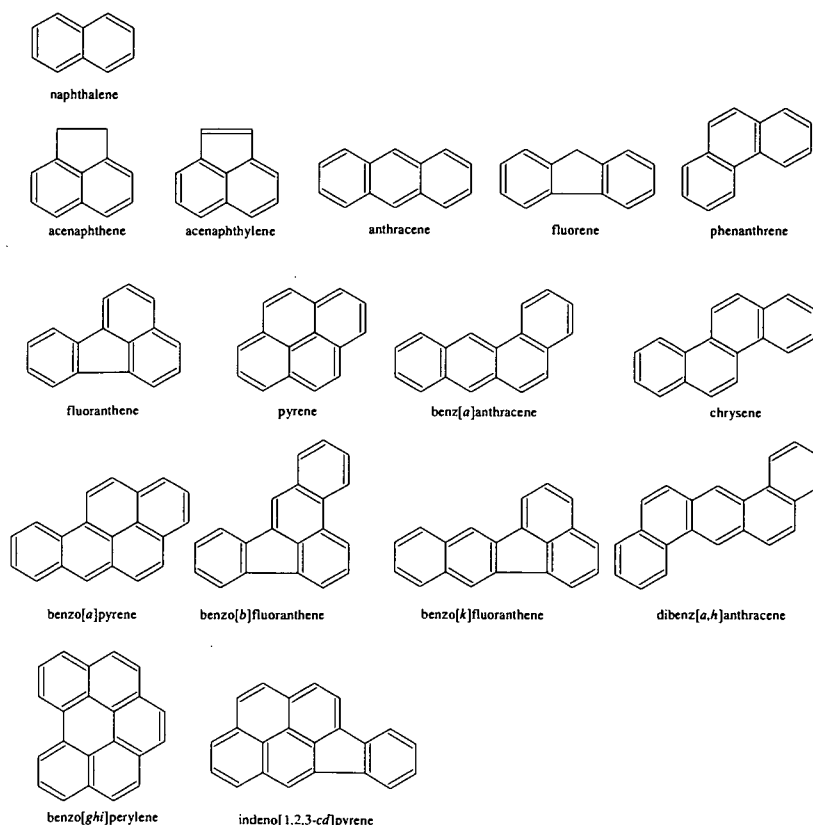


図-1 多環芳香族炭化水素類（PAHs）の例

を行うとともに、閉鎖性水域の底泥中のベンゾ[a]ピレン（BaP）等の有機性有害物質の挙動に関する研究に着手した。

2. 閉鎖性水域の底泥中の多環芳香族炭化水素類（PAHs）等の有機性有害物質の存在実態

閉鎖性水域の底泥中のPAHsの存在実態の把握のため、比較的人為的な汚染が進んでいる閉鎖性水域と進んでいないと予想される閉鎖性水域の底泥を採取し、PAHsの含有量を調査した。

2.1 比較的人為的な汚染が進んでいる閉鎖性水域

(1) 調査方法

調査対象とした湖沼は関東地方の平野部にあり、生活排水により汚染が進んでいるとされている水域である（以下、水域A）。水域Aの概略と採泥地点を図-2に示す。水域Aの面積は約410haである。また、水域Aへの大きな流入河川である河川AA、ABの流域面積はそれぞれ3,130ha、3,669haとされている¹⁴⁾。なお、水域Aでは水質浄化対策を目的の一つとして、比較的清潔な河川より導水が行われている。

水域Aでは春期（4月）に予備調査を行った。予備調査ではPAHsの主な流入源となりうる流入河川や橋等から離れた地点（ポイントAD）の底泥表層試料を、ほぼ同じ箇所でも3検体採取して測定した。結果を表-1に示す。BaPに関しては、

これまでに日本で測定されている値の範囲内であり、より汚染程度が低いと思われる水域と同程度であった。水域Aと同じ関東地方にある手賀沼、印旛沼の値と比較しても、より低濃度であった。BaP以外のPAHsについても、既に報告されている底質の調査結果（河川、海域を含む）²⁾の範囲内の値であった。

予備調査の結果をうけ、水域AへのPAHsの流入源と考えられる流入河川や橋に比較的近い点で試料を採取した。試料採取は春期（3月）に行った。試料は図-2の中で○で

表-1 底泥中のPAHs含有量（水域A：予備調査）

	Concentration of PAHs [ng/g-dry]				Reference Concentration Observed in Japan
	Point AD			CV(%)	
Naphthalene	84	61	81	16	
Acenaphthylene	22	19	26	15	
Acenaphthene	6	5	6	15	240 (max) in 1999 *
Fluorene	34	25	41	24	
Phenanthrene	109	81	75	20	260 (max) in 1999 *
Anthracene	12	10	12	10	130 (max) in 1999 *
Fluoranthene	80	62	95	21	
Pyrene	70	54	80	19	540 (max) in 1999 *
Benz[a]anthracene	14	11	16	21	550 (max) in 1999 *
Chrysene	24	18	29	23	
Benzo[b]fluoranthene	17	13	20	19	
Benzo[k]fluoranthene	7	6	8	18	
Benzo[a]pyrene	12	9	14	20	42 (Teganuma Lake), 31 (Inbanuma Lake) in 2002**
Dibenz[a,h]anthracene	1	0	1	31	88 (max) in 1999 *
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	24	18	27	20	
Benzo[ghi]perylene	7	4	7	24	420 (max) in 1999 *

*: 文献2（河口、港湾等の底泥が対象）、**: 文献12

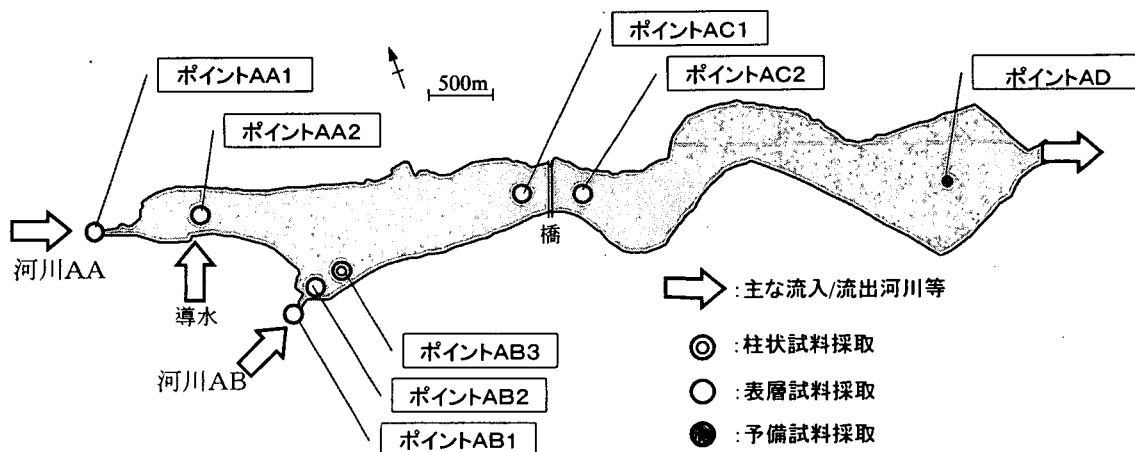


図-2 水域Aにおける採泥点

示した6点で表層試料を、◎で示した1点ではアクリルパイプを用いて柱状試料を採取した。ポイントAA1～AA2、AB1～AB3は流入河川近傍でのPAHs堆積状況を把握することを目的として設定した。ポイントAA1とAB1は河川の採泥ポイントあり、他は水域Aの中である。ポイントAA2は河川AAの河口から約1kmで導水流入部の近くであり、AB2は河川ABの河口から約200m、AB3は約400mの位置である。また、自動車起源の負荷の流入・降積が予想される橋の上下流約300mの地点にポイントAC1、AC2を設定した。

底泥試料中のPAHsの分析は、環境庁のBaPの分析方法¹⁵⁾を準用した。分析方法の主な流れを図-3に示す。この方法は、底泥試料を加熱還流アルカリ分解し、液々抽出した後、クリーンアップし、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で検出する方法である。クリーンアップにはフロリジルを用いた。

定量対象物質は図-1に示した16種のPAHsとした。

(2) 調査結果

表層におけるPAHsの測定結果を表-2に示す。全体的な傾向として、2～3環のPAHsの濃度は低かった。

流入河川からの流入負荷の影響を比較すると、河川ABでは、流入河川の底泥(AB1)と比べて水域Aに入った後の底泥(AB2、AB3)はPAHsの含有量が高かった。特に、4環以上のPAHsの含有量が高くなっており、流入河川からもたらされるPAHsが、粒子に吸着した状態で河口近傍で沈積している可能性が示唆された。一方、河川AAについては、流入河川の底泥(AA1)と比べ底泥AA2のPAHs含有量はほぼ同程度か、低くなっていた。これは、ポイントAA2がやや河口から離れていたこと、また、導水の影響により明確な傾向が得られなかったものと考えられる。

ポイントAB3における鉛直分布の測定結果を図-4に示す。深さは、柱状試料から切り出した各試料の中央の深さを用いた。今回の調査では、4環以上のPAHs

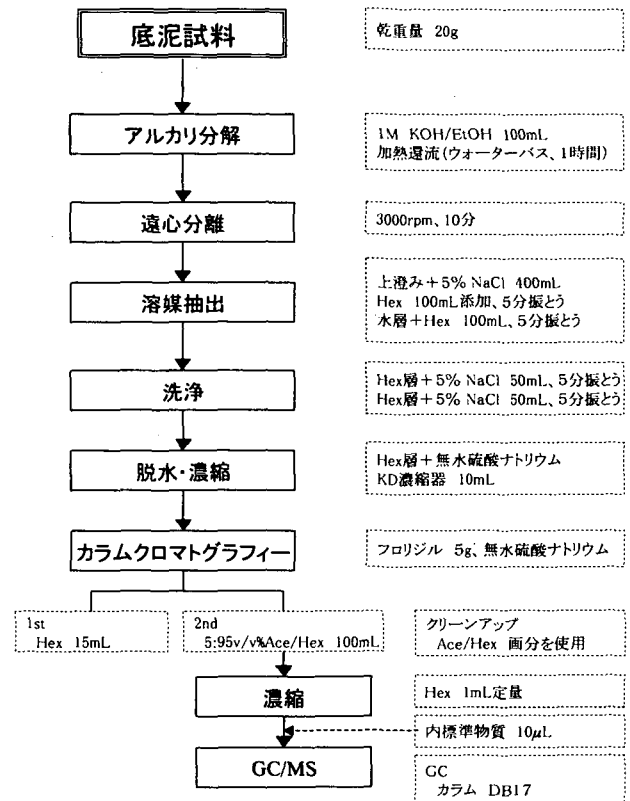


図-3 底泥中PAHs分析の主な流れ(水域A)

表-2 底泥中のPAHs含有量(水域A表層)

Sampling Points	Concentration of PAHs [ng/g-dry]						
	River AA and Near the River		River AB and River Mouth			Near the Bridge	
	AA1	AA2	AB1	AB2	AB3	AC1	AC2
Naphthalene	7	0.9	0.5	0.3	4	0.3	1
Acenaphthylene	3	4	2	10	6	0.7	5
Acenaphthene	2	0.8	0.9	0.9	5	1	23
Fluorene	8	8	7	10	41	3	28
Phenanthrene	33	32	29	144	203	7	63
Anthracene	7	11	6	7	22	2	14
Fluoranthene	59	65	62	336	256	15	185
Pyrene	65	59	54	268	238	15	154
Benz[a]anthracene	29	14	24	88	80	3	45
Chrysene	45	30	37	192	146	8	95
Benzo[b]fluoranthene	30	17	32	148	113	6	76
Benzo[k]fluoranthene	15	7	12	71	46	2	31
Benzo[a]pyrene	29	11	18	110	87	3	43
Dibenz[a,h]anthracene	3	1	2	13	9	0.4	5
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	38	18	40	163	122	7	81
Benzo[ghi]perylene	11	6	10	36	32	2	25

の含有量が、表層から 60cm 程度までは増加する傾向にあった。独立行政法人土木研究所水質チームが、同じ地点で採取した柱状試料について実施した ^{210}Pb による年代測定によると、表面から 20cm 程度まではかく乱されている可能性があり、40cm で 1960 年代後半、60cm で 1950 年代、90cm で 1930 年頃との結果が得られた¹⁶⁾。この結果から、1960 年代から PAHs の蓄積が減少傾向にある可能性があることが示唆された。また、かく乱されている可能性の高い層においては、底泥表面に近いほど PAHs 含有量が高くなる傾向にあった。かく乱されている可能性の高い表層では、底泥表面に近いほど粒径が小さい粒子が多いと考えられる。PAHs は小粒径の粒子に多く含有されていると報告されている¹⁷⁾ ことから、底泥表面近傍の PAHs が高めの値を示したものと考えられる。

自動車起源の負荷の流入・降積が予想されるため、橋の近くで採取した試料については PAHs が相当高い含有量で検出されると考えていたが、下流側に相当するポイント AC2 での PAHs 含有量が高かったものの、河川流入部の AB3 での値と同等以下であった。これは、ポイント AC1 および AC2 が橋から 300m 程度離れていたことにより、PAHs の高含有域をとらえきれていないものと考えられた。自動車起源の負荷の把握に関しては、橋の直下での採泥等、より詳細な調査が必要である。

2. 2 比較的人為的な汚染が進んでいないと予想される閉鎖性水域

(1) 調査方法

調査対象とした湖沼は北陸地方の山間部（標高 1,100m 程度）にあり、比較的人為的な汚染が進んでいないと考えられた水域である（以下、水域 B）。水域 B の概略と採泥地点を図-5 に示す。水域 B は、交通量の少ない道と山林に囲まれている。人家、工場等は流域内に存在しない。図-5 によると、水域 B の面積は 5 ha、流域面積は 36ha 程度と推定される。試料採取は夏期（7 月、梅雨期）に行い、表層試料を 3ヶ所（ポイント B1～B3）で、柱状試料を 2ヶ所（ポイント B4～B5）で採取した。採取はダイバーが行い、柱状試料はアクリルパイプを貫入して、また表層試料は直接すくいとることによ

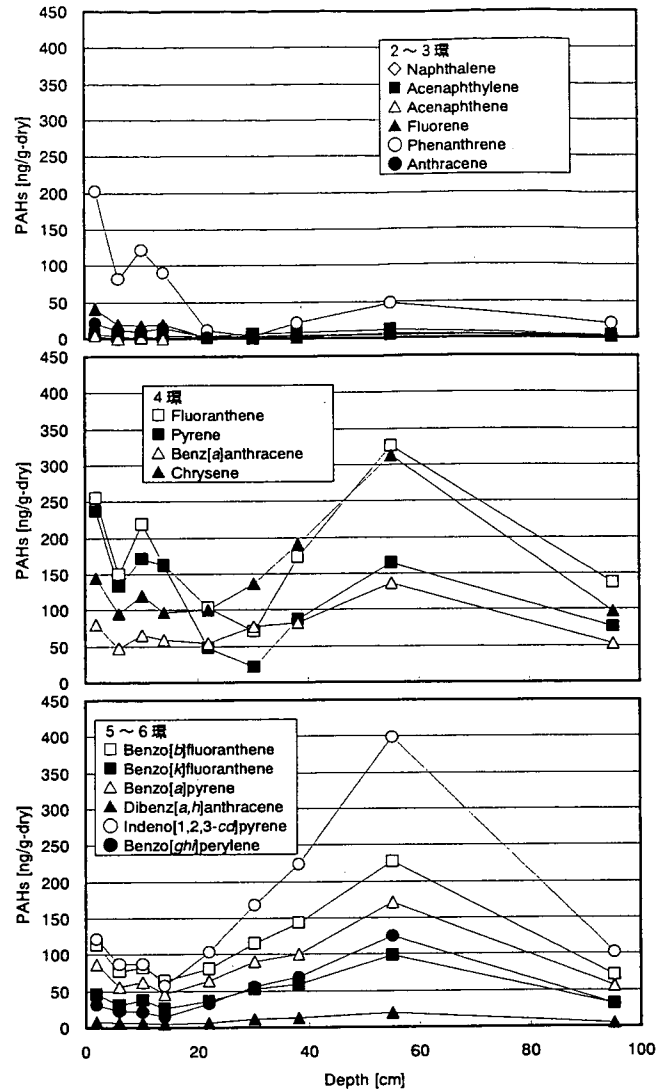


図-4 底泥中の PAHs 含有量 (水域 A 鉛直)

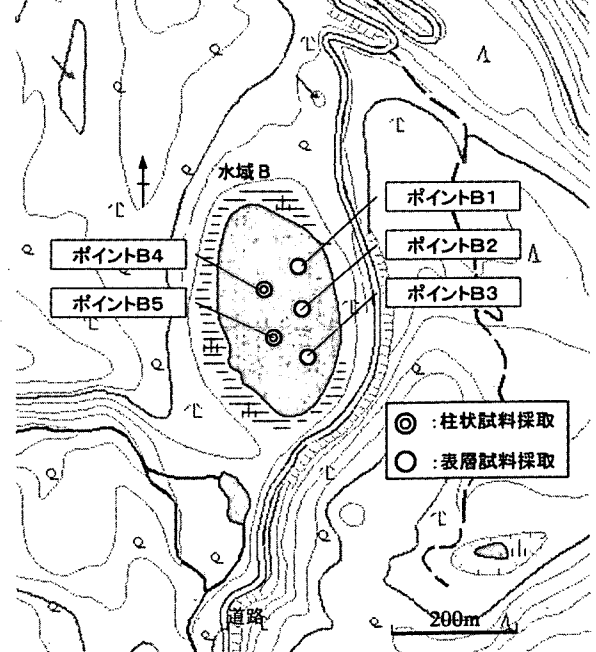


図-5 水域 B における採泥点

て行った。水深は1.5~2mであった。

水域Bは人為的な汚染が進んでおらず、沈殿物の堆積が非常に遅いことが予想されたので、表面近傍の極薄い層に最近数十年の底泥が堆積していることが予想された。そのため、柱状試料については、深さ30mmまでは5mm毎に、30~50mmは10mm毎、50~110mmは20mm毎、110mmからは40mm毎に試料を切り出し、一部を分析試料とした。

底泥試料中のPAHsの分析方法は、本調査の底泥試料に水域Aの試料で用いた方法を適用したところ回収率が不安定であったため、クリーンアップにシリカゲルを用いるように変更した。また、分離カラムをDB17から分析対象物質に関する既往のデータが多いDB5に変更した。分析フローの概略を図-6に示す。

定量対象物質は図-1に示した16種のPAHsとした。なお、分離カラムを変更したことにより、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[k]フルオランテン、ベンゾ[j]フルオランテンが分離できなくなったため、これらは一括して定量した。

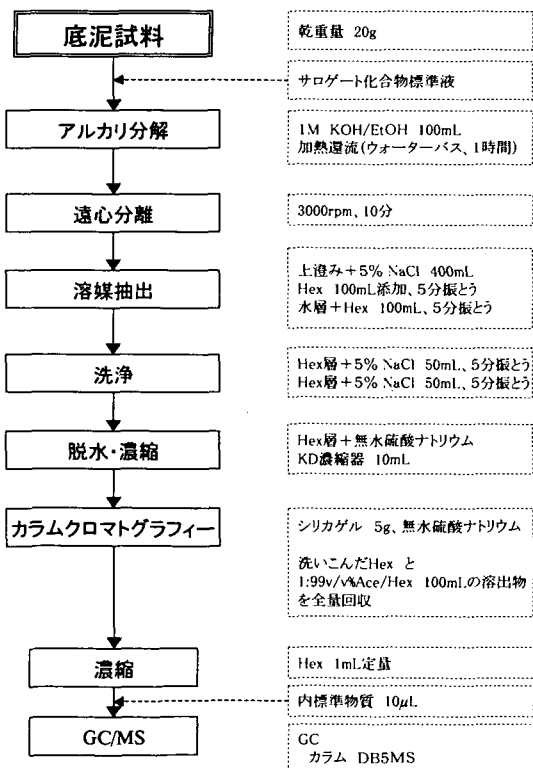


図-6 底泥中PAHs分析の主な流れ(水域B)

表-3 底泥中のPAHs含有量(水域B表層)

Sampled Depth from Sediment	Concentration of PAHs [ng/g-dry]				
	Approx. 0 - 5cm, Scooped by a Diver			Layer of 0.5 - 1cm of Core Sample	
	Sampling Points	B1	B2	B3	B4
Naphthalene	13	14	24	42	123
Acenaphthylene	2	7	3	3	37
Acenaphthene	tr	tr	2	2	7
Fluorene	5	3	10	7	21
Phenanthrene	27	25	65	59	121
Anthracene	2	2	4	3	7
Fluoranthene	39	40	104	84	178
Pyrene	19	20	56	48	103
Benz[a]anthracene	7	7	22	16	34
Chrysene	39	42	102	81	162
Benzo[b+k+j]fluoranthene	24	27	68	51	108
Benzo[a]pyrene	20	20	55	43	107
Dibenz[a,h]anthracene	4	3	11	6	14
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	30	36	140	68	145
Benzo[ghi]perylene	25	32	78	58	131

tr: 定量下限未満

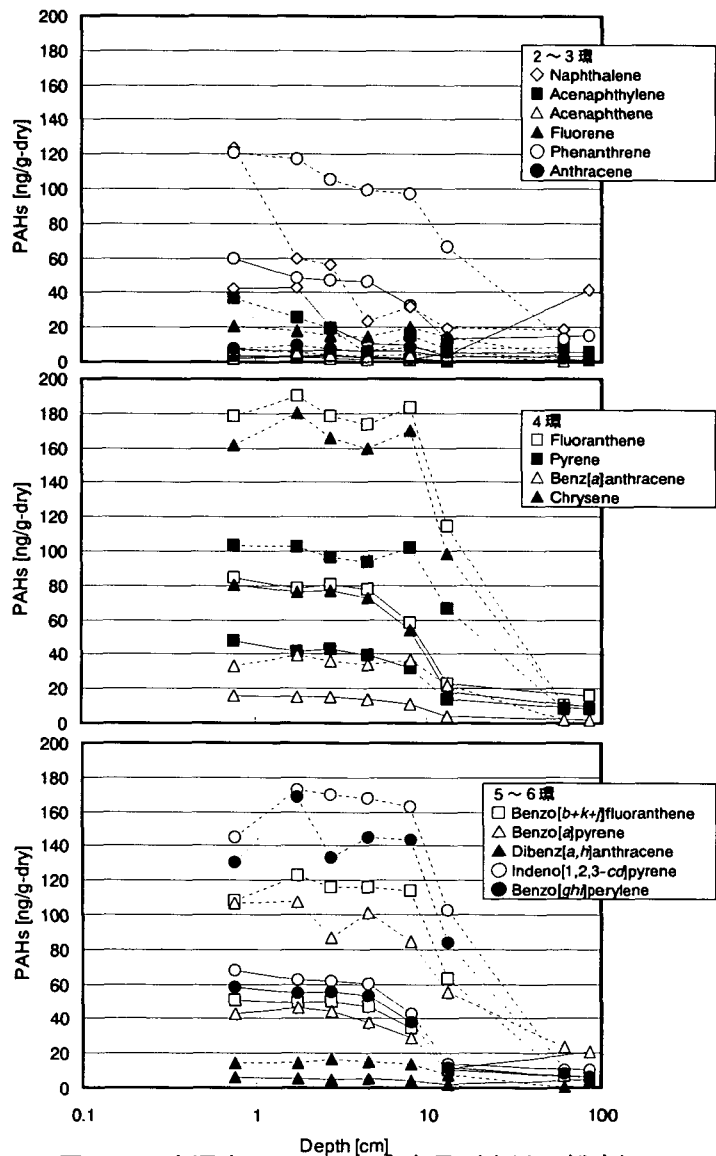


図-7 底泥中のPAHs含有量(水域B鉛直)

実線: ポイントB4, 点線: ポイントB5

(2) 調査結果

表層におけるPAHsの測定結果を表-3に示す。水域Aと同様に、全体的に、2~3環のPAHsの濃度は低かった。また、水域AのポイントAA2とポイントB1、B2を比較すると、ほぼ同程度のPAHs含有量であった。

水域Bは流入河川がないため、PAHs濃度の平面分布は小さいものと予想されたが、B1~B3で得られた結果によると、4倍程度の差があるPAHsが存在した。

ポイントB4、B5における鉛直分布の測定結果を図-7に示す。深さは、柱状試料から切り出した各試料の中央の深さを用いてプロットした。表層から7~9cmの試料より深い箇所から採取された試料で、含有量が減少したPAHsが多かった。

²¹⁰Pbと¹³⁷Csによる年代測定によると、底泥の堆積速度は、ポイントB4で0.3cm/year、ポイントB5で0.337cm/yearと算出された。これらの値を用い、PAHs堆積速度を堆積年代で整理し、水域AのポイントAB3での結果とともに図-8、9に示す。図-8については全データを、図-9については、堆積年代1800年以降のデータのみを示した。なお、試料採取時の観察によると、水域Bの底泥表面近くは植物の根等によるかく乱を受けている可能性があるが図-9では考慮していない。また、堆積速度の算出にあたり、土中の4環

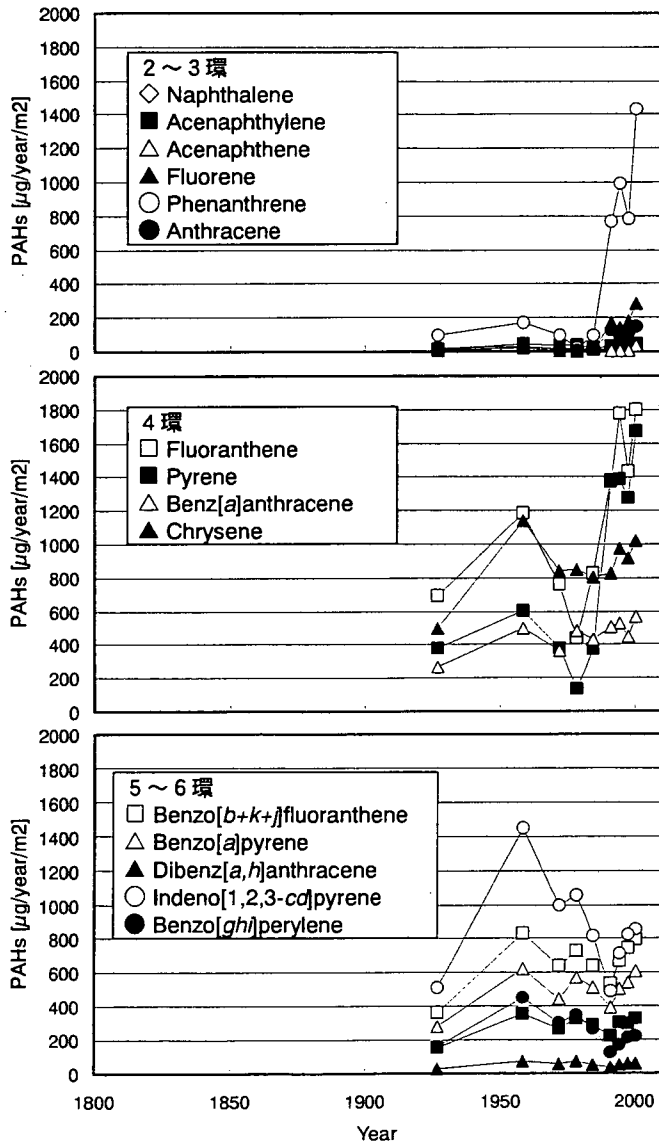


図-8 底泥へのPAHs堆積速度(水域A)
ポイントAB3、年代は土木研究所調査¹⁶⁾に基づき算出

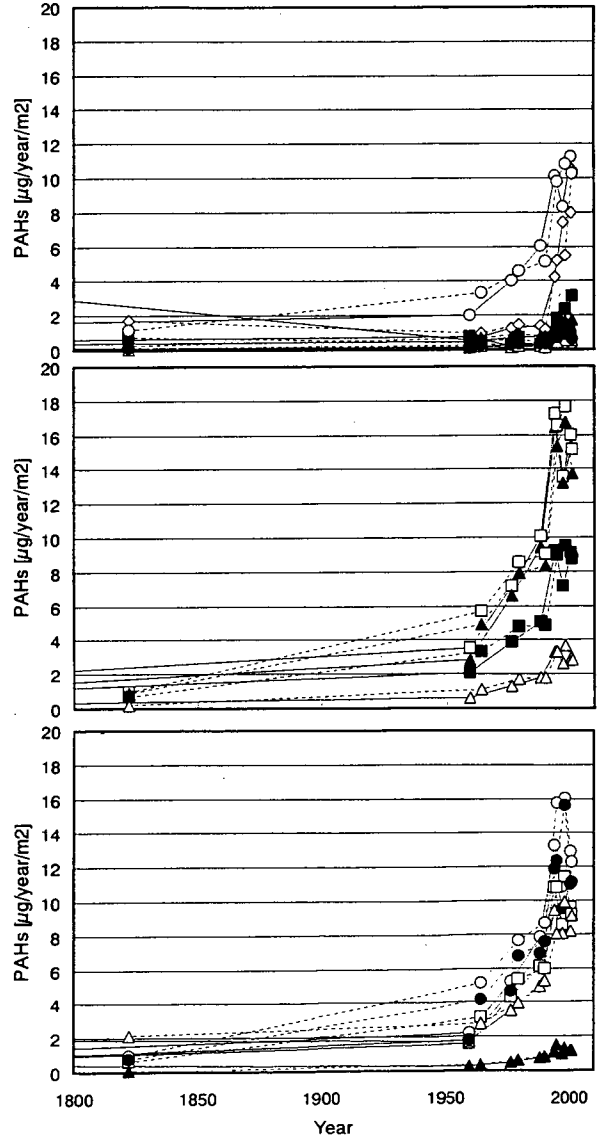


図-9 底泥へのPAHs堆積速度(水域B)
実線:ポイントB4、点線:ポイントB5

以上のPAHsの微生物分解は遅く¹⁸⁾、底泥中で確認されているPAHs分解微生物の多くは好気性菌である¹⁹⁾ことから、底泥中でのPAHsの分解速度が非常に遅いと考えられるため、堆積したPAHsの分解は考慮していない。

水域AでのPAHs堆積速度は、1960年頃がピークとなる傾向にあり、特に5環以上のPAHsでこの傾向が顕著にあらわれた。一方、水域Bでは1960年頃から堆積速度が上昇する傾向があり、1950年代以前ではほぼ $1\mu\text{g/year/m}^2$ 程度であったものが、2000年代では $10\mu\text{g/year/m}^2$ 程度となっていた。水域BへのPAHsの流入は主に大気からであると考えられるため、水域Bでは1960年代のPAHs汚染を経験していない一方で、1960年代以降、大気由来のPAHs負荷が上昇している可能性が示唆された。また、堆積速度の絶対値は流域面積、流達率、水域内の堆積分布等の違いがあるため単純には水域AとBを比較できないが、水域BのPAHs堆積速度を日本全国に基底的に存在する大気由来負荷と仮定すると、都市域にある水域Aにおいてはこれを上回る負荷が流域、大気から流入したものと考えられ、結果的に堆積速度は2桁ほど大きな値となっていた。

3. 閉鎖性水域の底泥中のベンゾ[a]ピレン (BaP) 等の有機性有害物質の挙動

有機性物質による底泥汚染への対策を検討するにあたっては、その物質による汚染状況の把握に加え、水域中での挙動を解明する必要がある。閉鎖性水域の汚染対策としては、流入経路の遮断および汚染底泥自体の対策(分解、系外搬出)が考えられる。15年度は流入経路の遮断のための基礎調査を開始した。

3.1 調査方法

調査対象とした人工内湖(以下、湖内湖C)は関東地方にある湖沼Cに流入する河川Cの河口部に設置されている人工内湖である。湖内湖Cの概略と採泥地点を図-10に示す。既往の文献²⁰⁾では、湖内湖Cの流域は、蓮畑を主体とする水田・田畑が42%、山林・原野が39%を占め、流域人口1,300人であり、家畜負荷とノンポイント負荷が主たる汚濁原因であるとされている。湖内湖Cは、流入河川Cの河口近傍での流入負荷の沈殿除去を意図して設置された水深の深い沈殿ピットと、それ以外の水深の浅い一般沈殿池に分かれている。ポイントCA1は流入河川C、ポイントCA2~4は沈殿ピット、ポイントCA5~6、CB5は一般沈殿池に設定し、採泥を行った。ポイントCB5は陸化したヨシ帯の近傍に設定した。ポイントCC1は近辺の農業用排水路に設定した。水深はポイントCA1が35cm、CC1が40cm、他は50cm~1mであった。調査時点では沈殿ピットに泥や砂が貯まっていたため、一般沈殿池と比較し、必ずしも深いということはない。なお、

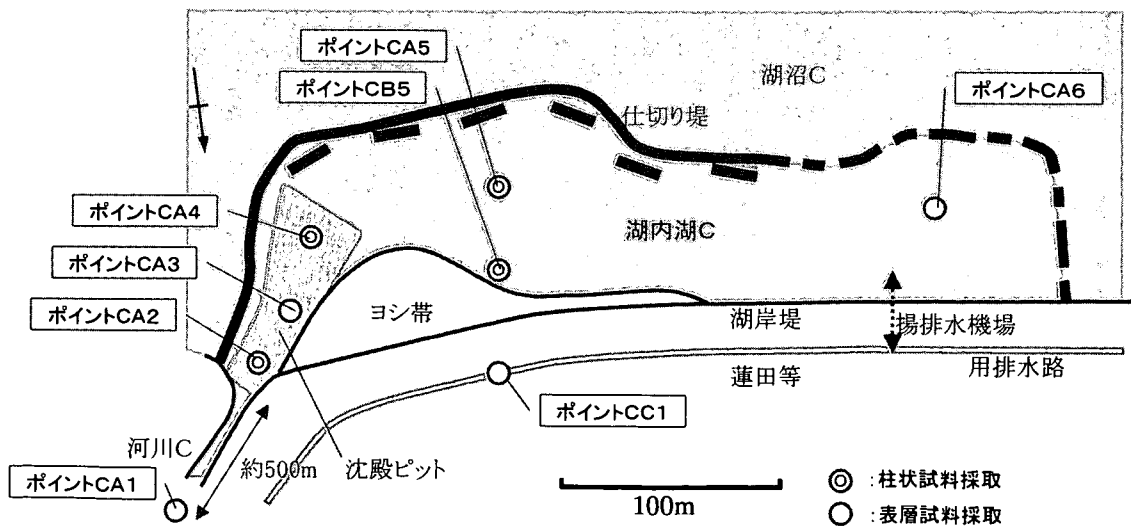


図-10 湖内湖Cにおける採泥点

湖内湖Cに流入した河川水の流出先である湖沼Cでは、湖内湖C近辺に泥が堆積していなかったため、PAHs分析用の底泥試料の採取は行わなかった。試料採取は冬期（12月）にダイバーにより、水域Bと同様の方法で行った。

底泥試料中のPAHsの分析には、水域Bで用いた方法を使用した。また、定量対象物質も水域Bでの調査と同様とした。

3.2 調査結果

表層におけるPAHsの測定結果を表-4に示す。湖内湖Cは建設されて日が浅く、過去の蓄積に関する情報が得られないため、分析対象試料は表層の試料のみとした。柱状試料については表面から2cmの層を分析対象とした。

流入河川のポイントCA1から湖内湖Cの沈殿域のうちポイントCA5まではほぼ同程度のPAHs含有量を示したが、ポイントCA6では含有量が減少していた。これは、湖内湖C内の上中流部で比較的PAHs含有量の高い粒子が沈積し、ポイントCA6まで到達していない、または、波浪にともなう湖沼Cとの交換により希釈されている可能性があることを示している。なお、湖沼Cに関してはBaPに関する調査結果があり¹²⁾、湖心付近ではBaPが検出されていない。湖沼Cは比較的面積が広い湖沼であり、全体的にはPAHsの流入負荷の影響を受けにくいものと考えられる。

ヨシ帯近傍に設定したポイントCB5では、流れが比較的遅いと予想されたため、PAHs含有量が比較的多いと考えられる小粒径の粒子が堆積することが予想されたが、必ずしもPAHs含有量が多いわけではなかった。これは、湖内湖CのポイントCA5程度まではほぼ全幅にわたり、同様の粒子の堆積傾向があることを示唆しているものと考えられる。

また、蓮田の中を流れる農業用排水路に設定したポイントCC1では、3環以上のほとんどのPAHs含有量が高くなっており、耕耘機等の原動機の利用等がPAHs発生源の一つである可能性が示唆された。

これらの結果から、河川河口部近傍に湖内湖等を設け、PAHsを含む粒子の沈降をすすめ、湖内湖にPAHsを集積させることにより、閉鎖性水域本体へのPAHsの流入負荷を減少させるとともに、湖内湖に集積させたPAHsを対象とした除去、分解等の対策を施す可能性が示唆された。今後、河川流入負荷にしめる湖内湖での沈殿除去割合等、より詳細な沈殿効果の把握と、制御のための堆積底泥の管理手法の検討、光や沿岸に生育する植物を用いた湖内湖内での分解の可能性の検討等を行う必要がある。

表-4 底泥中のPAHs含有量（湖内湖C表層）

Sampling Points	Concentration of PAHs [ng/g-dry]							
	River	Sedimentation Pit			Shallow Zone Following the Pit		Near the Shore	Canal in the Lotus Field
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6	CB5	CC1
Naphthalene	95	116	50	117	161	34	132	91
Acenaphthylene	32	40	16	37	48	12	39	28
Acenaphthene	6	8	3	9	7	3	6	18
Fluorene	19	29	11	30	21	10	15	48
Phenanthrene	90	190	89	259	190	41	98	312
Anthracene	14	18	7	80	18	7	13	27
Fluoranthene	117	228	104	267	223	58	136	423
Pyrene	90	191	83	217	182	49	99	329
Benz[a]anthracene	29	44	20	40	44	14	29	109
Chrysene	59	109	44	125	110	27	58	215
Benzo[b+k+j]fluoranthene	34	57	23	57	54	15	33	110
Benzo[a]pyrene	25	52	21	48	48	15	32	118
Dibenz[a,h]anthracene	8	11	5	7	8	4	6	26
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	98	126	40	58	67	37	50	237
Benzo[ghi]perylene	36	60	24	56	55	18	37	105

4. まとめ

本研究は、閉鎖性水域内の底泥におけるPAHsの分布状況の把握等、存在実態を明らかにすることを目的としている。15年度は、閉鎖性水域の底泥中のPAHs等の有機性有害物質の存在実態に関する研究を行うとともに、閉鎖性水域の底泥中のBaP等の有機性有害物質の挙動に関する研究に着手した。その結果、以下が明らかとなった。

- ① 比較的人為的な汚染が進んでいる閉鎖性水域の底泥中のPAHsの定量を行ったところ、4環以上のPAHsの含有量が高くなっており、流入河川からもたらされると考えられるPAHsが、河口近傍で沈積している可能性が示唆された。
- ② 比較的人為的な汚染が進んでいないと予想された閉鎖性水域の底泥中のPAHsの定量を行ったところ、1960年代以降、大気由来のPAHs負荷が上昇している可能性が示唆された。
- ③ 河川河口部近傍に湖内湖等を設け、PAHsを含む粒子の沈降をすすめ、湖内湖にPAHsを集積させることにより、閉鎖性水域本体へのPAHsの流入負荷を減少させるとともに、湖内湖に集積させたPAHsを対象とした除去、分解等の対策を施す可能性が示唆された。

今後は、複数の閉鎖性水域を対象とし、水域内での分布等、底泥の有機性有害物質汚染の実態を把握するとともに、流域の土地利用形態と汚染実態との関係等の検討をさらに行う必要がある。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) 環境庁環境保健部保健調査室：化学物質と環境，平成2年版，1990.12.
- 2) 環境省環境保健部環境安全課：化学物質と環境，平成12年度版，2001.3.
- 3) Agency for Toxic Substances and Disease Registry：Toxicological Profile for Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2-Methylnaphthalene, pp.117-119, 1995.8.
- 4) Agency for Toxic Substances and Disease Registry：Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, pp.209-221, 1995.8.
- 5) Oak Ridge National Laboratory：Toxicity and Chemical-Specific Factors - Nonradionuclides, Risk Assessment Information System, as of April 2003.
- 6) 木津良一，鳥羽陽，早川和一：多環芳香族炭化水素（PAH）の環境残留とヒトへの曝露，内分泌かく乱物質研究の最前線，季刊化学総説，No.50, pp.187-192, 2001.9.
- 7) U.S.Environmental Protection Agency：Integrated Risk Information System, as of April 2003.
- 8) 環境庁：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－，1998.5.
- 9) UNECE：Annex III, The 1998 Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs).
- 10) 環境省（旧環境庁）：化学物質と環境，平成4年版～平成13年版.
- 11) 環境省（旧環境庁）：水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査（平成10年12月）、平成11年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果、平成12年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果、平成13年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果の概要.
- 12) 国土交通省河川局：平成13年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果（資料集），2002.12.
- 13) 原田淳，山敷庸亮，山下尚之，清水芳久，松井三郎：湖沼底質中の微量有機汚染評価のための指標物質の検出－琵琶湖赤野井湾を対象として－，環境工学研究論文集，Vol.33, pp.341-348, 1996.12.
- 14) 中村栄一，田中宏明，高島英二郎：閉鎖性水域における栄養塩負荷削減の効果評価に関する調査，平成2年度下水道関係年次報告書集，pp.109-116, 土木研究所資料第3030号，建設省土木研究所，1991.10.
- 15) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物），pp.VI-1 - VI-8, 1998.10.

- 16) 田中宏明, 小森行也, 津森ジュン: 都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究, 平成 15 年度重点プロジェクト研究報告書, pp.90-98, 独立行政法人土木研究所, 2004.3.
- 17) 村上道夫, 中島典之, 古米弘明: 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 含有率とそのプロファイルに基づく粒径画分ごとの道路・屋根堆積塵埃の識別, 水環境学会誌, Vol.26, pp.837-842, 2003.12.
- 18) Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, pp.252-254, 1995.8.
- 19) Hohzoh Kiyohara, Noboru Takizawa, Kazutaka Nagao: Natural Distribution of Bacteria Metabolizing Many Kinds of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, J. Fermentation and Bioengineering, Vol.74, pp.49-51, 1992.1.
- 20) 中村圭吾, 森川敏成, 島谷幸宏: 河口に設置した人工内湖による汚濁負荷制御, 環境システム研究論文集, Vol.28, pp.115-123, 2000.10.

5. 草木廃材の緑化資材としての有効利用技術に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 鈴木 穰
主任研究員 落 修一
南山 水彦
研究員 宮本 綾子
交流研究員 長沢 英和

1. はじめに

土木工事を初め、道路や河川、海岸、空港、公園等の緑地管理からは大量の木質材や刈草が発生している。しかし、これらの草木に代表される有機質廃材のリサイクル手法は限られており、資源としての利用拡大に繋がる技術開発が求められている。他方、掘削や盛土などの土木工事にともなう法面保護や緑化、緑地造成のために多くの有機質資材が投入され、中には海外からの天然材に依存しているものもある。

本研究は、大量に発生する草木を法面保護や緑化、緑地造成、保全のための資材化技術を開発するとともに、地域や流域などにおける広域的な資源化・循環システムの構築を目指すものである。

2. 研究方法

本研究では発生する草木を資源と位置付ける。そして、発生量および発生形態をから個々に発生する草木の資源的価値を評価し、資源化利用に繋げるデータベース構築の基礎を得るための調査を行う。資源化利用に関しては大きく2つに分けた技術開発を行う。一つは土木工事に伴い発生する伐採、抜根材の現地における完全利用・還元を図るための技術であり、他の一つは公園や緑地などのように同一地点から定期・定期的に発生してくるものの資源化・利用技術である。なお、後者に関しては、既に資源化利用技術・システムが存在し、機能している地域にあっては、その保全を図るとともに、残余草木がある場合の資源化利用技術の開発が対象となる。

3. 研究結果

平成 15 年度は、データベース構築のための草木材発生量調査をダム流木、法面管理除草、公園管理草木について行うとともに、法面緑化のための吹付け材の開発を行った。

3. 1 草木材発生量調査

3.1.1 ダム流木発生量調査

1) 調査方法

調査は、財団法人ダム水源環境整備センターの協力のもと、流木発生実績に関するアンケート調査を実施した。調査では、全国を9ブロックに分け、各ブロックで2ダムずつ、計18ダムを選定した。アンケートは、内、16ダムについて、郵送によりダム・貯水池の流況諸元、過去10年間にける流木発生量および年間総降雨量、流木の取り扱い方法、今後の課題・意見などを問う記述方式を取り、比較的流木発生量が多いと考えられた2ダムについては同様の内容についてより精密なヒヤリング・アンケート調査を行った。

2) 調査結果

流木量の回答は15ダムから得られた。対象流域面積と年間の降雨量データに基づき、総降雨・水

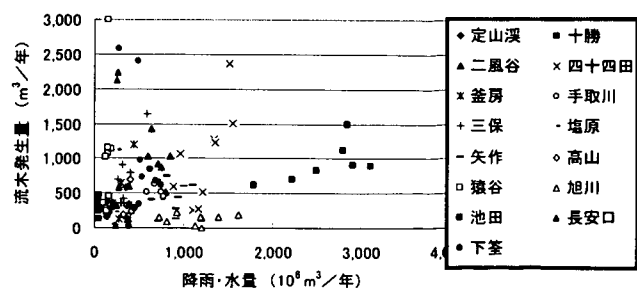


図-1 年間の降雨・水量と流木発生量の関係

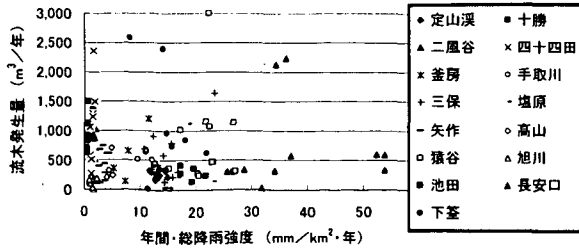


図-2 年間の総降雨強度と流木発生量の関係

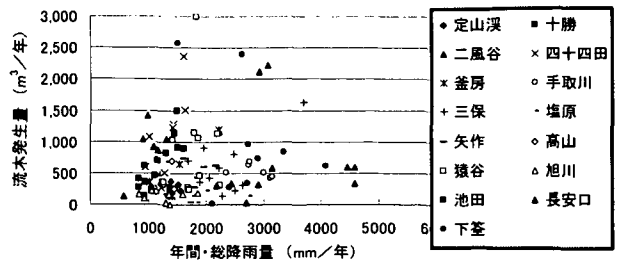


図-3 年間の総降雨量と流木発生量の関係

量 ($10^6 \text{ m}^3/\text{年}$) と流木発生量の関係を図-1に、総降雨強度 ($\text{mm}/\text{km}^2 \cdot \text{年}$) との関係を図-2に、総降雨量 ($\text{mm}/\text{年}$) との関係を図-3に示した。現段階では、全国を網羅的に表現できる関係付けはできていない。しかし、個々のダムにおいては、総降雨・水量 ($10^6 \text{ m}^3/\text{年}$) や総降雨強度 ($\text{mm}/\text{km}^2 \cdot \text{年}$) との関係があることが伺われ、今後は、さらに多くのデータ集積

表-1 調査ダムにおける発生流木への取り組み状況

No.	ダム名	流木の扱い			流木の利・活用法				その他・利用法
		処分	利・活用	併用	チップ化	堆肥化	薪材	炭	
1	定山溪			○	○				H15より、全体の13%ほどを一般に無料提供 炭化所を持っている 小割り・無料配布しており、利用者は薪材の他、彫刻などに活用 中間処理施設へ搬入し、チップ化後に堆肥化している
2	十勝	○							
3	二風谷			○	○				
4	四十四田			○					
5	釜房		○		○	○			
6	手取川		○		○				
7	三保		○		○				
8	塩原		○		○				
9	小洪		○		○				
11	矢作			○	○				
12	高山			○	○				
13	猿谷		○		○	○			
14	旭川	○			○				
15	魚切			○	○				
16	池田			○	○				
17	長安口			○	○				
18	下笠	○			○				

を図りつつ、流木発生メカニズムから流況を表現する指標開発を進める必要がある。各ダムの発生流木への取り組み状況をまとめて表-1に示す。利・活用へ取り組まれている様子が読み取れる。

3.1.2 法面管理刈草発生量調査

1) 調査方法

調査は、国土交通省関東地方整備局管内の3箇所の河川事務所と1箇所の国道事務所、日本道路公団およびつくば市内の主要道を管理している企業1社に対して、河川堤防や道路法面の管理から発生する除草材の年間発生量についてヒヤリングを行った。

2) 調査結果

調査結果を表-2に示す。今後は、さらに全国規模に広げた調査を行い、より正確な把握手法を検討していく必要がある。

表-2 河川堤防および道路管理から発生する除草材、剪定材の調査結果

管理種別	施設名	面積 (m^2)	樹木			雑草			植物発生材	
			内、焼却 (t)	内、堆肥化 (t)	内、堆肥化 (t)	(m^3)	内、焼却 (t)	内、堆肥化 (t)	(m^3)	内、有効利用 (m^3)
河川管理	荒川下流河川事務所 H14-笹目橋-岩淵	1,062,000								
	H14-小名木-西新井	453,200							139.31	
	H13-管内	1,679,000							23.75	
	H12-管内	1,542,200							125.5	
	H11-管内	2,378,400							180.9	
	H10-管内	1,693,000							219.3	
	H14-管内	1,693,000							197.8	
	霞ヶ浦河川事務所 H14-鉢田(右岸)	651,200							1,340	
	鉢田(左岸)	784,000							1,380	
	潮来(右岸)	1,285,000							1,620	
	潮来(左岸)	832,000							1,140	
	土浦(右岸)	955,000							880	
	土浦(中岸)	957,000							880	
	麻生	820,000							900	
波崎	1,947,000							1,380		
江戸川河川事務所 H14-全体	6,197,700									
野田										
古川										
中川左岸										
道路管理	常陸河川国道事務所 H14-全体	170,879	173.52	74.36	99.16				1,779.87	762.65
	低木植栽	119,553								
	芝生地	11,211								
	地被類	9,835								
	植え込み地	31,280								
日本道路公団	H12-全体									
	北海道								319,630.1	233,059
	東北								7,909.0	
	関東								24,412.6	
	北陸								96,978.5	
	中部								55,404.0	
	関西								34,615.0	
中国								24,423.0		
四国								22,290.0		
九州								7,817.0		
筑波新都市開発(株) H15-つくば街路樹	51.15 km 13,388 本		941.775						342,395(内、 24,365芝)	

3.1.3 公園管理草木発生量調査

1) 調査方法

調査は、つくば市内に存在する全ての公園の管

表-3 つくば市内公園緑地管理発生材調査結果

公園・緑地 箇所数 (箇所)	面積 (m ²)	落ち葉 (t)	剪定枝 (t)	草 (t)	芝 (t)
1	79,926	4.9	6	7.15	11
2	66,509	2.95	21.8	10.48	10.48
1	40,719		3	7.5	4.5
1	50,715			3.84	8.96
4	45,347	25.35	5.07	12.675	7.605
5	30,649	0.805	4.025	0	3.22
5	33,912	0.6	1.8	3.72	2.48
3	36,594	1.6	1.08	2.7	1.62
1	70,775	16	10.26	20.15	39
6	42,800	4.4	12	9.1	5.2
6	24,215	1.42	2.3		1.96
4	22,926	3.73	1.13	6.47	0.72
2	19,377	6.69	3.16	6.24	11.03
5	19,896	6.65		4.275	8.55
1	38,349	6.6	9	6.3	4.8
1	38,288	3.2	1.5		5.4
1	12,277	1.8	2	0.5	1
1	17,780	3.0	4.5	2.0	1.2
1	40,407	2.5	3	4	4
3	38,447	4	18.41	5.39	1.6
3	20,269	2.1	14	2.4	3.6
3	30,922	7.6	4.435	1.415	3.35
4	38,652	2	1.3	1.2	1.5
4	13,332	0.5	0.8	0.2	0.1
3	28,252	1.125	1.125	2.14	6.49
6	18,755	4.2	1.39	6.02	
12	153,306 + α	4.805	9.218	20.516	4.236
6	88,897	6.5	23.76	4.1	6.44
6	36,953	6	4	9.3	3.1
2	91,700	13.2	9.88	4.9985	4.9985
8	60,845	18	54	54	43.2
4	48,926	5.7	1.5	1.6	0.4
6	136,634	9	5	4.9	11.25
5	63,330	1.65	14.77	11.28	2.78
7	72,711	16.5	5.84	9	3

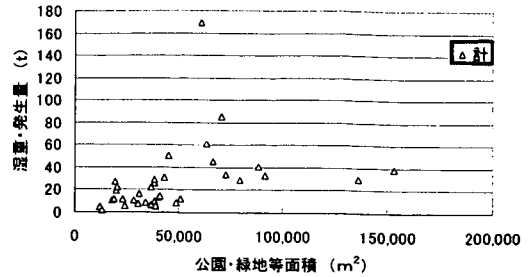


図-4 面積と総発生量の関係

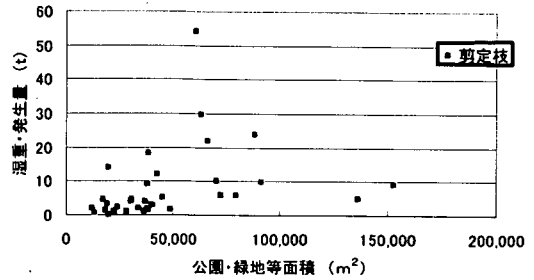


図-5 面積と剪定枝発生量の関係

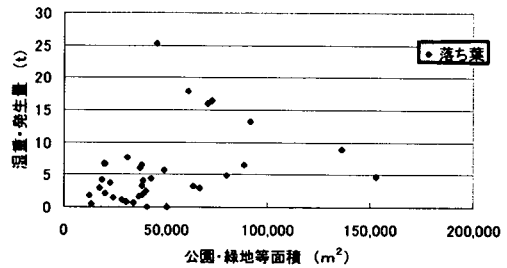


図-6 面積と落ち葉発生量の関係

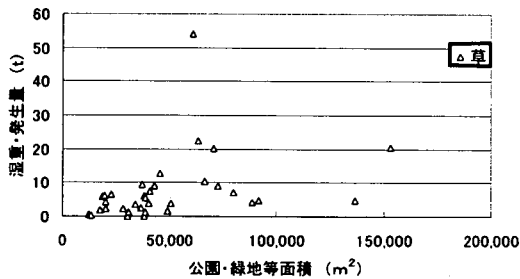


図-7 面積と草発生量の関係

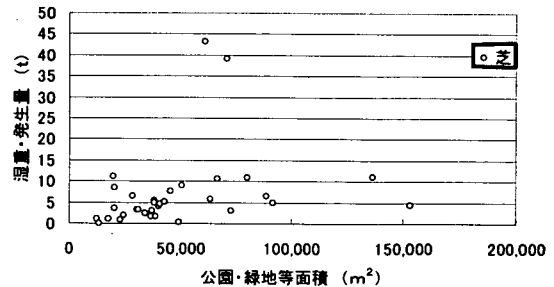


図-8 面積と芝発生量の関係

理から発生する草木量を、管理を受託している業者へのヒヤリングにより調査した。調査内容は、平成15年度における剪定枝、刈り芝、雑草、落ち葉の発生量とした。調査では、公園管理が150箇所近くの公園を40近い業者で行われており、各業者においては大規模公園の場合は公園毎の発生量が把握されているが、中小規模公園に関しては個々の公園毎の発生量までは把握されていないケースが多いため、その場合は、各業者が受託管理する複数の公園一式を単位として、そこからの発生量について調べた。また、市内の主要道路の街路樹管理からの剪定枝発生量についても調べた。

2) 調査結果

調査結果を表-3に示す。また、公園面積とそれぞれの発生量との関係を図-4～図-8に示す。今後は、公園の

形態とも関連付け、より正確な把握手法を検討していく必要がある。

3. 2 吹付け材の開発

吹付け工に用いられている天然輸入材に替わる資材を伐採、抜根材から生産する技術を開発するために、東興建設株式会社、日本植生株式会社並びにライト工業株式会社と「草木廃材を用いる法面吹付け材料の開発」に関する共同研究を行っている。

3.2.1 開発の経緯と方法

研究では、まず、爆砕物の吹付け材への物理的な適合性を観るために、平成14年12月3日に、ライト工業株式会社宇都宮試験場にて試験吹付けを行った。その結果、吹付けに際して支障となるような物性ではなく、また、吹付け歩留まりも良く、耐降雨流亡性にも優れた堅固な吹付けが可能な資材となることが示された。しかし、欠点が一つあった。吹付け材に混合した植物種子が殆ど発芽しなかった。

発芽に重点を置いた粹実験を平成15年7月8～9日に、日本植生株式会社津山研究所で行った。結果は、配合方法に留意すれば植物種子の発芽、成長には問題ないことが示された。

平成15年9月25日には、平成14年12月3日ライト工業株式会社宇都宮試験場にて行った試験吹付けの現地調査を行った。その結果、法面には試験区外から飛来着床した雑草が繁茂し、また、吹き付けられた爆砕物による法面は十分な強度を持って維持され、良好な緑化が達成されていた。更に、吹き付けた爆砕物の内部は微少動物の住処と化し、雑草の繁茂と合わせて新たな生態系が形成され、専門技術者が目指す緑化工法が達成されていた。

実用化を前提とした大々的な試験が必要となり、吹付け実験を平成16年3月1～4日に独立行政法人土木研究所の屋外実験ヤードで実施した。吹付けは非常に円滑且つ良好に行えた。植物種子の発芽や生長観察はこれからである。

3.2.2 発芽に関する実験

独立行政法人土木研究所は、発芽に関する室内実験を行った。実験に用いた種子は、小松菜：アブラナ科アブラナ属[一年または二年草]、メドハギ：マメ科ハギ属[日本全国の痩せ地に生育する多年生草本]、トールフェスク：イネ科ウシノケグサ属 [別名オニウシノケグサ、永年性牧草、暖地・温暖地の草地における基幹的な草種]、の3種である。

(1) 爆砕物を直接に用いた発芽実験

1) 実験方法

実験は、爆砕物に2.5MPa・3minで蒸煮・爆砕した広葉樹系(B-4)と3.0MPa・5minで蒸煮・爆砕した針葉樹系(N-4)を用い、さらに、中和剤に炭酸カルシウム、凝集剤にポリシリカ鉄凝集剤PSI-50の5倍希釈液と塩化第二鉄(FeCl₃・6H₂O)21.29g/L液を用いて、下記の【元試料】の調整・準備手順に従い【元試料】を準備し、②で調整した混合物と、④の上澄み液を培地として、発芽試験を実施した。それぞれの方法を下記の【固形培地】による試験手順と【液体培地】による試験手順に示した。

【元試料】の調整・準備手順

①：2種の爆砕物を、それぞれ200gずつ、17個ずつ、ビニル袋に計量する。②：炭酸カルシウム、PSI-50、塩化第二鉄液を表-4に示す量で添加し、十分に攪拌混合する。③：それぞれ、十分に攪拌・混合されたものから、20gを、250mL広口ポリビンに分取し、これにイオン交換蒸留水46mLを加えて十分に混合30分間静置する。④：全てについてGA-100濾紙で、50mLスクリュウ管に濾過し、pHとECを測定する。

【固形培地】による試験手順

①：1種の固形培地に対して、シャーレを3枚準備し、それぞれに1/3高さまで固形培地を入れ、均一にならす。②：3枚のそれぞれのシャーレに、3種類の種子を別々に、20個ずつ、面的に均等なるように蒔く。③：その上に、固形培地を重ね、均一にならし、蓋をする。水分が不足している場合は、イオン交換蒸留水で補充する。④：所定の場所に静置する。⑤：毎日1回決められた時間に発芽状況を観察・記録する。

表-4 爆砕物への中和・凝集剤の添加量の設定

CaCO ₃ のみを0, 1, 2, 3, 5gずつ添加する5つのケースを設定
1g-CaCO ₃ と、更にPSI-50の5倍希釈液を、それぞれ0.5, 1, 3mLずつ添加する3つのケースを設定
3g-CaCO ₃ と、更にPSI-50の5倍希釈液を、それぞれ0.5, 1, 3mLずつ添加する3つのケースを設定
1g-CaCO ₃ と、更に21.29g/LのFeCl ₃ 液を、それぞれ0.5, 1, 3mLずつ添加する3つのケースを設定
3g-CaCO ₃ と、更に21.29g/LのFeCl ₃ 液を、それぞれ0.5, 1, 3mLずつ添加する3つのケースを設定

【液体培地】による試験手順

①：シャーレの内径に合った濾紙に、面積が3等分になるような線を鉛筆で記入する。②：濾紙をシャーレに敷き、液体培地を注ぐ。③：3種類の種を、それぞれ10個づつ、線で区切られた濾紙上に、均等に置き、蓋をする。④：所定の場所に静置する。⑤：毎日1回決められた時間に発芽状況を観察・記録する。

また、実験では、爆砕物中の水溶性物質の発芽への影響を調べる発芽試験を行った。試験用の検体は、爆砕物 500g にイオン交換蒸留水 500mL を加え、攪拌・混合後 30min 間静置したものを、GA-100 濾紙でろ過し、ろ液を NaOH 溶液で pH6.5 に調整した。発芽試験は、試験用検体をイオン交換蒸留水で、1倍～10,000 倍 の間で 14 段階に希釈したものを培地とし、プラスチック製滅菌シャーレにろ紙を敷き、前述の培地を 5～7mL 加え、小松菜、メドハギ、トールフェスクの種子を、別々に、それぞれ 10 粒ずつ播種し、毎日 1 回、決められた時間に発芽状況を観察・記録した。

2) 実験結果

i) 爆砕物に直接播種した発芽実験

爆砕物に直接播種したものは、全てにおいて発芽しなかった。一方、種子の健全度合いを観るために、近隣土壤に同様の方法で播種したものは全て健全に発芽・生育した。

ii) 凝集・中和剤を用いた爆砕物水抽出液の発芽実験

実験の結果を図-9に示す。結果は、用いた溶液に対して、相対的にトールフェスクは強く、小松菜とメドハギは相対的に弱いことが現れている。また、針葉樹系(N-4)よりも広葉樹系(B-4)での発芽阻害が大きい。実験における中和剤や凝集剤の違いによる効果発現は、トールフェスクについては取った全てが効果があったと言えるが、他については針葉樹系(N-4)においてのみ Ca1-Fe0.5(▲)のケースが幾分かの効果発現があったと言える。

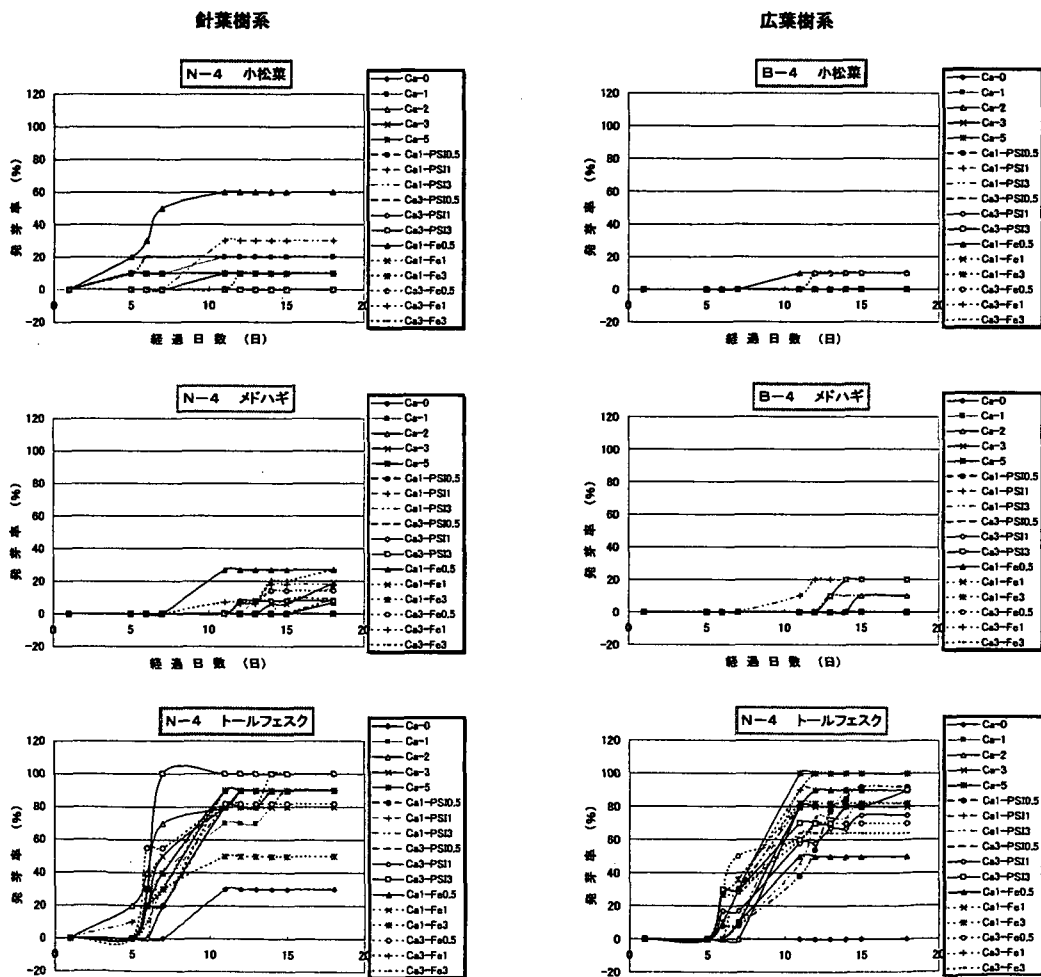


図-9 凝集・中和剤を用いた爆砕物水抽出液の発芽実験結果

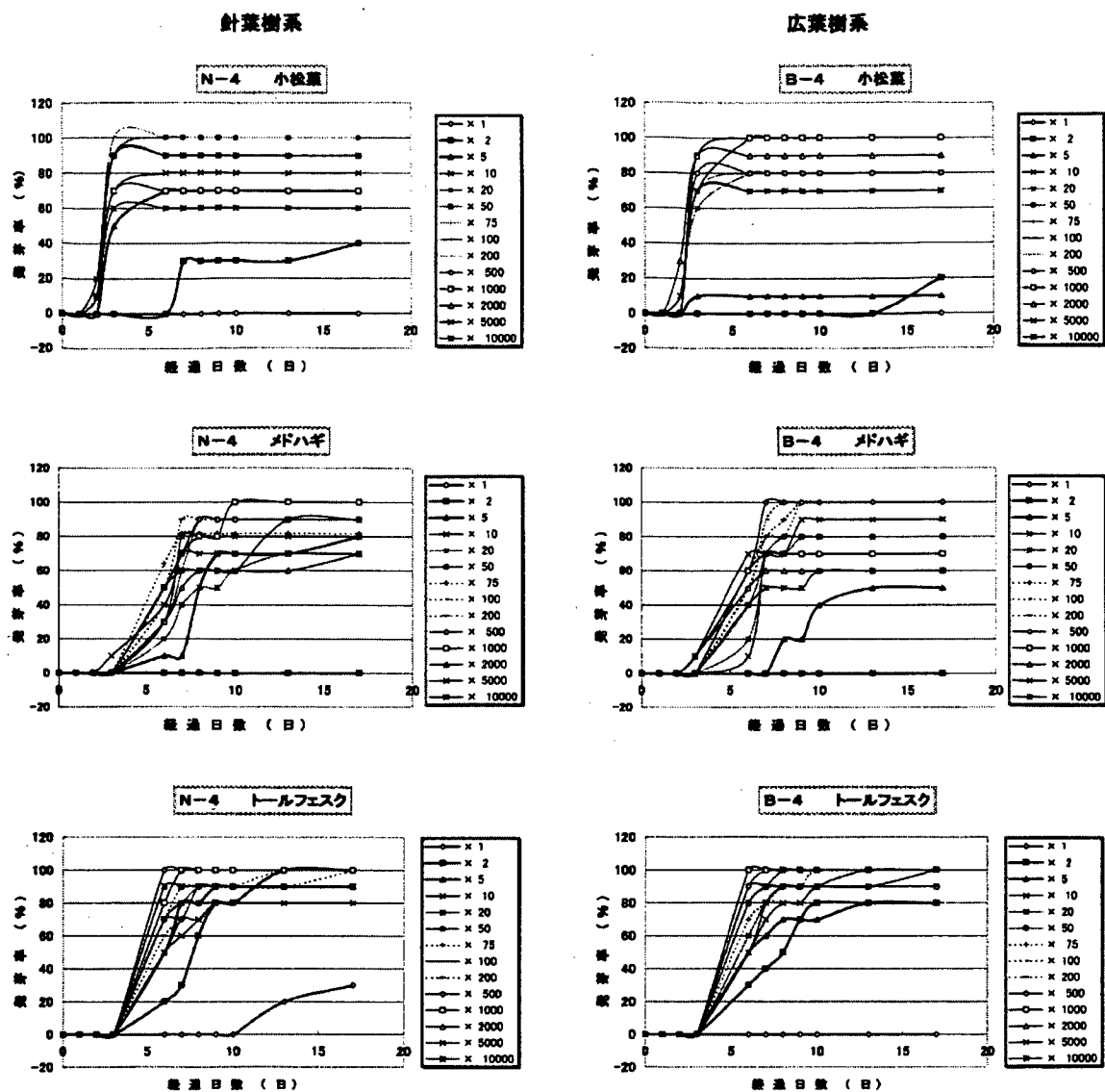


図-10 爆砕物水抽出液の発芽実験結果

iii) 爆砕物水抽出液の発芽実験

実験の結果を図-10に示す。結果は、明らかに抽出液が発芽阻害を起こしていることが分かる。その阻害の強さは前項ii)の結果と同様に、針葉樹系(N-4)よりも広葉樹系(B-4)で強くなっている。

(2) 揮発性脂肪酸の試薬を用いた発芽実験

爆砕物を用いた発芽実験からは発芽障害が認められた。その原因として、2つが考えられ、一つは低いpHであり、一つは高濃度で存在する揮発性脂肪酸であった。このために、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の5種類の試薬を用いた実験を行った。

1) 揮発性脂肪酸の各種濃度下における発芽実験

i) 実験方法

実験は、各試薬を0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000mg/Lになるよう水道水中に溶解し、それぞれの水溶液を水酸化ナトリウム溶液と塩酸溶液でpH7とpH3.5に調整したものを準備し、これらを、ろ紙をセットしたシャーレ上にろ紙が十分に濡れるよう注ぎ、3種類の種子をそれぞれ別々のシャーレに10個づつ載せ、20℃恒温室において蛍光灯照射下に静置し、発芽・成長状況を観察した。

ii) 実験結果

小松菜での結果を図-11に、トールフェスクでの結果を図-12に、メドハギでの結果を図-13に示す。植物種では小松菜が最も影響を受けやすく、次いでトールフェスク、メドハギの順である。また、pHの影響が大きく、pH3.5

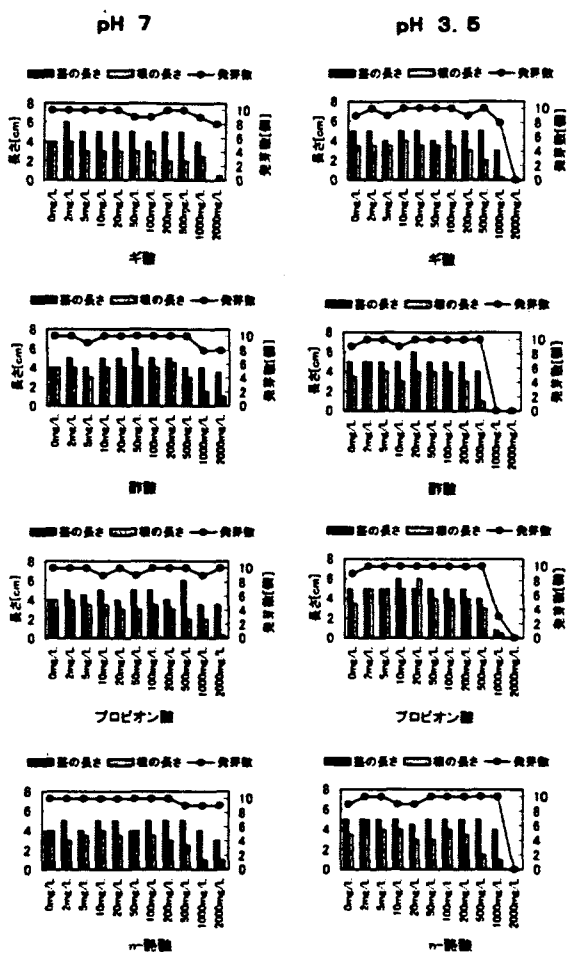


図-11 小松菜の発芽・成長に及ぼす揮発性脂肪酸濃度の影響

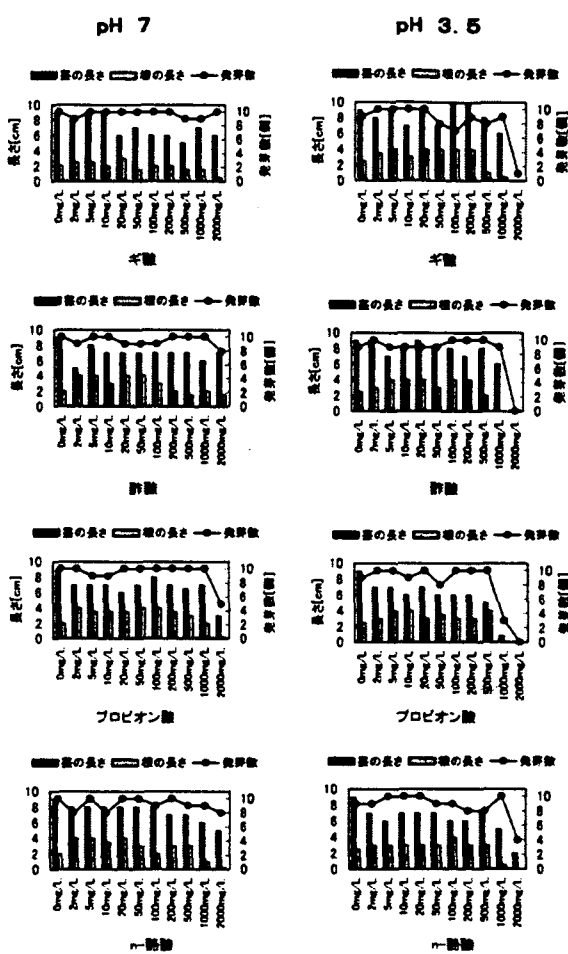


図-12 トールフェスクの発芽・成長に及ぼす揮発性脂肪酸濃度の影響

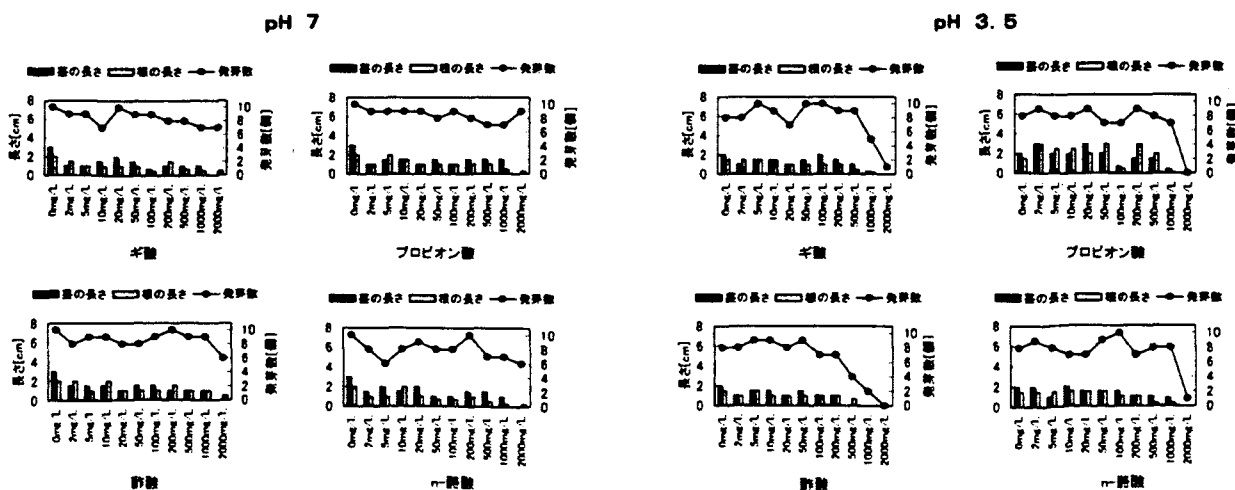


図-13 メドハギの発芽・成長に及ぼす揮発性脂肪酸濃度の影響

よりもpH7のケースでは遙かに影響発現が緩和されている。

また、揮発性脂肪酸の種類においては、酢酸>プロピオン酸>ギ酸>n-酪酸の順で影響が大きかった。

表-5 各種濃度の揮発性脂肪酸溶液への浸漬・曝露時間と発芽の実験結果

		pH7			pH3.5		
		発芽	茎	根	発芽	茎	根
小松菜	ギ酸	影響なし	・500mg/Lから影響あり ・2000mg/Lでは未成長	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
	酢酸	影響なし	影響なし	・500mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり	・200mg/Lから影響あり
	プロピオン酸	影響なし	影響なし	・1000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
	n-酪酸	影響なし	・1000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
トルフェスク	ギ酸	影響なし	影響なし	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
	酢酸	影響なし	影響なし	・500mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
	プロピオン酸	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり
	n-酪酸	影響なし	・1000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり
メドハギ	ギ酸	影響なし	・2000mg/Lから影響あり	影響なし	・1000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり
	酢酸	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
	プロピオン酸	影響なし	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・1000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり
	n-酪酸	影響なし	・2000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・2000mg/Lから影響あり	・500mg/Lから影響あり

2) 各種濃度の揮発性脂肪酸溶液への浸漬・曝露時間と発芽の実験

i) 実験方法

実験は、各試薬を 0, 1,000, 5,000, 10,000mg/L になるよう水道水中に溶解し、それぞれの水溶液を水酸化ナトリウム溶液と塩酸溶液で pH7 と pH3.5 に調整したものを準備し、これらに、密閉容器下で 3 種類の種子をそれぞれ別々に浸漬し、20℃恒温室に静置しながら経日的に種子を 10 個づつ取り出し、直ちに水道水で洗浄して、ろ紙をセットしたシャーレ上にろ紙が十分に濡れるよう水道水を注いだものに移し、20℃恒温室において蛍光灯照射下に静置して発芽・成長状況を観察した。

ii) 実験結果

実験より得られた発芽および茎と根の成長に関する結果を整理して表-5 に示す。揮発性脂肪酸液への浸漬に対しては、小松菜がもっとも弱く、次にメドハギ、トルフェスクの順であった。また、全ての種子について、pH7 の方が、pH3.5 よりも影響は少なく、長い浸漬に耐えられた。さらに、各種子とも共通して、酸の種類に対しては影響の大きい順に、酢酸>ギ酸>プロピオン酸>n-酪酸であった。小松菜は、水そのものの浸漬にも弱く、pH7 での高濃度の揮発性脂肪酸への長期の浸漬は、種子の保存としての効果発現も観られた。

4. まとめ

平成 15 年度に行った調査・研究の成果は以下のとおりまとめられる。

- (1) データベース構築化のための草木材発生量調査をダム流木、法面管理除草、公園管理草木について実施した。今後は更に調査を継続してデータの蓄積を図る必要がある。
- (2) 法面緑化のための吹付け材の開発を行い、木質材チップに爆砕を施したものは良好な物性を有するものであった。しかし、それは発芽障害を持っていたが、吹付け材の配合を工夫することにより解決できた。
- (3) 爆砕物の発芽抑制の原因を探るための実験を行った結果、発芽障害は、低 pH 条件化での揮発性脂肪酸の存在が大きく関係していた。揮発性脂肪酸の種類では酢酸>ギ酸>プロピオン酸>n-酪酸の順で、影響が大きかった。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

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

リサイクルチーム	上席研究員	鈴木穰
水質チーム	上席研究員	田中宏明
リサイクルチーム	研究員	諏訪守
	交流研究員	陶山明子

1. 要約

発展途上国では、一般的にラグーンにより下水処理が行われている。本研究では病原微生物を細菌、ウイルス、原虫に分類しラグーン実験施設において、その除去特性を調査した。ラグーンによる各々の除去率は大腸菌群数、ファージ（細菌ウイルス）70～80%、ウイルス90%、原虫類のジアルジアで80～90%程度であった。原虫類のクリプトスポリジウムは流入下水から1～4個/Lの範囲で検出される場合もあったが、ラグーン処理水からは検出されていない。降雨により各指標微生物の除去率には大きな影響は見られなかったが、降雨に伴うラグーン施設からの流出流量は設定流量に対し10%程度増加した。このため、病原微生物としての流出汚濁負荷量は若干上昇するものと考えられた。

植生浄化法では、大腸菌群数、ジアルジアは1ヶタ程度の濃度レベルが低下したが、ファージについては大きな濃度レベルの減少は見られなかった。

ラグーンでのSS除去率は低く、植生浄化法でも30%程度であるため、ラグーンでの固液分離を良好に行えば、さらに各々の微生物の除去率を向上させられるものと推定される。

2. 研究目的

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

本研究の目的は、病原微生物を細菌、原虫、ウイルスに分類し、各々の分類毎に指標となる微生物の評価を行うとともに、ラグーン施設の運転条件が病原微生物の除去に及ぼす影響を把握し、水系での消長を解明するものである。また、植生浄化法による病原微生物の除去特性を解明する。

3. 研究計画

15年度は、発展途上国での代表的な下水処理方式のラグーンなどによる病原微生物の除去特性を解明するため、以下の調査を沖縄県A浄化センター内にあるラグーン実験施設において実施した。

- 1) ラグーンにおける降雨、流出SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響を調査
- 2) ラグーン処理水の処理レベルの高度化を図るため、植生浄化法による病原微生物の消長調査

平成16年度以降は、タイのバンコクおよびコンケンにおけるラグーン処理施設で実態調査を行う予定である。

4. 研究方法および対象微生物

本研究では、ラグーンにおける降雨、流出SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響やまた、ラグーン処理水の処理レベルの高度化を図るため、植生浄化法による病原微生物の除去特性を調査した。ラグーンによる病原微生物の除去特性調査は、沖縄県A浄化センター内に設置してあるラグーン実験施設において実施した。ラグーン実験施設の概要を図-1に示す。ラグーンの容量は100m³、水深は2mであり、ラグーン実験施設の後段には処理水の高度処理を目的とした施設面積約0.09m²、水深30cmのアシを植生した浄化施設を有する。

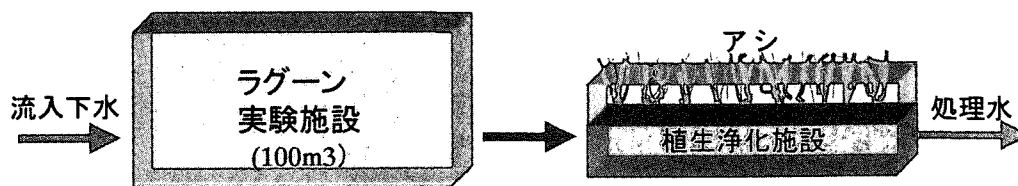


図-1 ラグーン実験施設等の概要

調査対象とした病原微生物の細菌、原虫、ウイルスは、大腸菌群数、ジアルジア、クリプトスポリジウム、エンテロウイルス、ノロウイルス、大腸菌ファージとした。各々の病原微生物の測定法を以下に示す。

大腸菌群数法は、デソキシコール酸塩培地を用いた平板培養法とした。

原虫類のジアルジア、クリプトスポリジウムは試料をポリカーボネート製フィルター（公称孔径 2.0μm）によりろ過濃縮を行い、超音波によりフィルターから原虫類を剥離させ、剥離させた試料中の原虫類を免疫磁気ビーズ法により回収した。回収した原虫類は間接蛍光抗体染色処理し、落射蛍光顕微鏡にて観察・定量を行った。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズ GC-コンボキット、間接蛍光抗体染色にはHYDORO-FLUOR-Combo キット、ENSYS INC.を用いた。

大腸菌ファージは、大腸菌 K12F⁺株を宿主菌とした重層寒天によるプラーク法とした。

ウイルスの濃縮法は、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法によるもので、試料中に PEG6000（終濃度 8%）および NaCl（終濃度 0.4M）を添加・攪拌し完全に溶解させた。4℃で一晩静置した後、10,000×g、30分間遠心分離して沈査を回収した。この沈査を RNase-free 水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。濃縮液中のウイルスは、リアルタイムPCR法により定量を行った。また、リアルタイムPCR法によるウイルスの定量感度を把握するため、ノロウイルスG1型¹⁾ G2型¹⁾、エンテロウイルス²⁾ およびQβファージについて各々の高度保存領域をクローニングしたコントロール cDNA を作製し、TaqMan プロブを用いて、その希釈系列に対してリアルタイムPCRを行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN 社)を用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN 社)でウイルス RNA を精製した。

上記で抽出したウイルス RNA 試料 1μg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社)を用い全量 20μl の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 2.5μl を Real Time PCR に供した。Real Time PCR は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN 社)を用いて行った。

ノロウイルス G 2 型のみについて示すが、図-2 は各希釈系列について PCR サイクル数に対する蛍光強度、図-3 は各希釈系列について蛍光強度が指数的に増加し始めるサイクル数と希釈濃度の対数値に対してプロットし得た検量線である。ノロウイルス (G 1、G 2) 型、エンテロウイルス、Q β フェージともに $5 \sim 10^{10}$ コピーの間で蛍光強度と相関性があり、この範囲で定量測定が可能であると考えられた。また、この反応系における PCR の増幅効率は 93.8% であった。

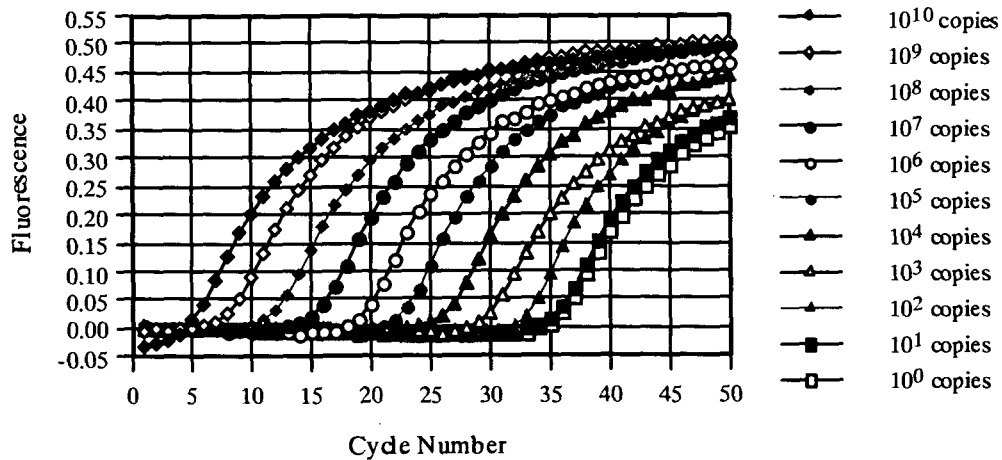


図-2 リアルタイム PCR 法によるノロウイルス標準試料の検出

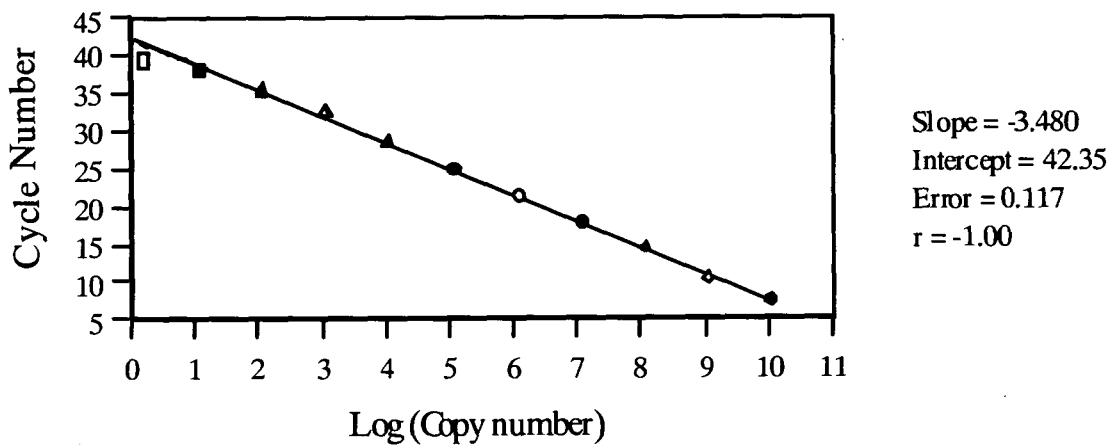


図-3 各希釈系列と PCR サイクル数の関係

5. 研究結果および考察

各指標微生物の降雨時および晴天時における日間変動を図-4~7に、濃度と除去率について整理したものを表-1に示す。降雨時の調査期間における近郊の降水量は 36mm であった。降雨時と晴天時における流入下水中の各指標微生物の濃度は、大腸菌群数、大腸菌フェージと比較してその変動幅はウイルスおよびジアルジアで大きい傾向が見られた。ラグーンによる大腸菌群数の除去率は 80% 程度であり、降雨時、晴天時でもラグーン処理水の濃度に大きな違いはなく日間変動も小さかった。大腸菌フェージ除去率は、降雨時および晴天時も日間平均値で 70% 程度であった。しかし、降雨時においてラグーン処理水の濃度はほぼ一定であるが、晴天

時の調査では、夜中から朝方にかけて若干の濃度上昇が見られた。図-8~10に水温、pH、DOの推移を示すが、この時のラグーン処理水の17時と14時のpHは8.4、溶存酸素濃度は14~18mg/l、0時と9時にはpHは7.2、溶存酸素濃度は0mg/lであった。酸化池内の溶存酸素濃度とコリファージの藻類等の浮遊状粒子への吸脱着現象についての報告³⁾もあるが、ラグーン処理水ウイルス濃度は晴天時の調査においてファージの挙動と比較して異なっていた。このため、今後データの蓄積を図りこれらの要因を解明する予定である。ウイルスの除去率は、降雨時および晴天時とも日間平均値で90%程度であった。原虫類のジアルジアでは、降雨時と晴天時の流入下水の濃度で大きな違いがあり、降雨時と晴天時において若干除去率に差があるものの、ラグーン処理水の平均濃度はほぼ同じであった。クリプトスポリジウムは、流入下水で1~4個/lの範囲で検出される場合もあったが、ラグーン処理水からは検出されていない。

一方、降雨に伴うラグーン施設からの流出流量は設定流量に対し10%程度の増加が見られたことから、病原微生物としての流出汚濁負荷量は若干上昇するものと考えられた。

植生浄化法では、大腸菌群数、ジアルジアは1ヶタ程度濃度レベルが減少したが、ファージについては、大きな濃度レベルの減少は見られなかった。

ラグーンでのSS除去率は低く、また植生浄化法でも30%程度であるため、ラグーンでの固液分離を良好に行えれば、さらに各指標微生物の除去率を向上させられるものと推定される。

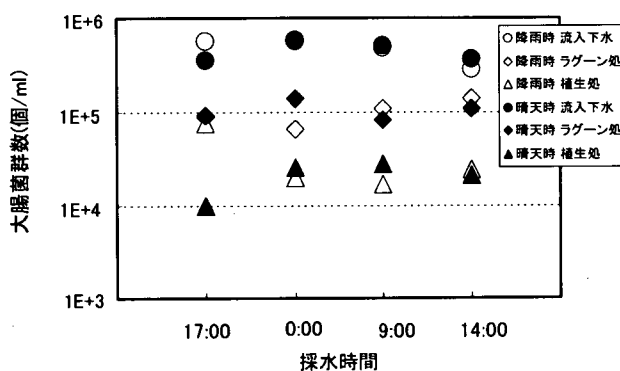


図-4 大腸菌群数の日間変動

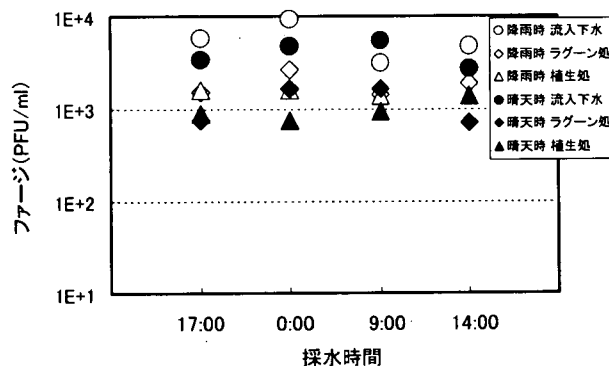


図-5 大腸菌ファージの日間変動

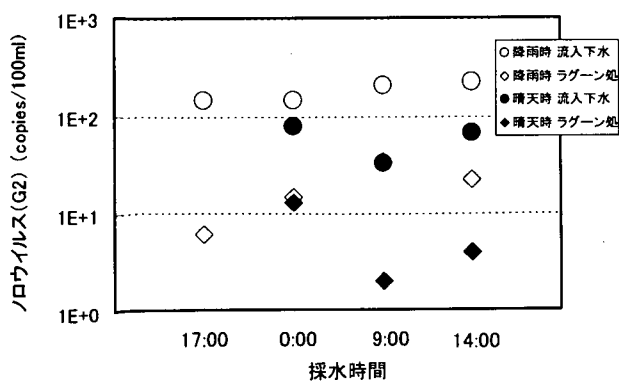


図-6 ウイルスの日間変動

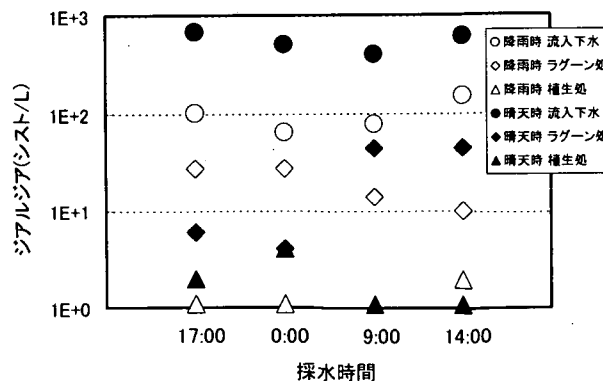


図-7 ジアルジアの日間変動

表-1 各指標微生物の濃度と除去率

		大腸菌群数 (個/mL)	ウイルス (上澄液) (copies/100ml)	ファージ (Pfu/mL)	ジアルジア (個/L)	SS (mg/L)
降雨時 ()内:除去率%	流入下水	4.9E+5	1.8E+2	5.8E+3	1.0E+2	73
	ラグーン処 理水	1.0E+5 (79%)	1.9E+1 (90%)	1.9E+3 (68%)	2.0E+1 (80%)	67 (8%)
	植生浄化 処理水	3.6E+4 (93%)	(-)	1.5E+3 (74%)	1.0E+0 (99%)	52 (29%)
晴天時 ()内:除去率%	流入下水	4.6E+5	6.1E+1	4.1E+3	5.6E+2	98
	ラグーン処 理水	1.1E+5 (77%)	6.3E+0 (90%)	1.2E+3 (71%)	2.4E+1 (96%)	108 (-)
	植生浄化 処理水	2.1E+4 (95%)	(-)	1.0E+3 (76%)	1.5E+0 (98%)	63 (36%)

(滞留時間:ラグーン10日間・植生浄化12時間)

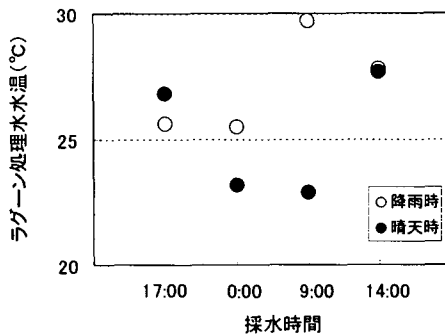


図-8 水温の推移

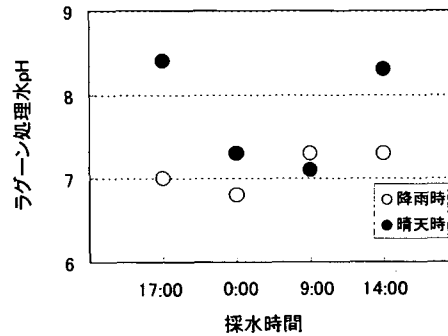


図-9 pHの推移

6. おわりに

平成15年度では、ラグーンにおける降雨、流出SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響やまた、ラグーン処理水の処理レベルの高度化を図るため、植生浄化法による病原微生物の除去特性を把握した。今回の調査は10月に実施したことから、藻類による光合成活性が高い状況であるとは言えないため、アジア・モンスーン当該地域における調査を継続実施する予定である。

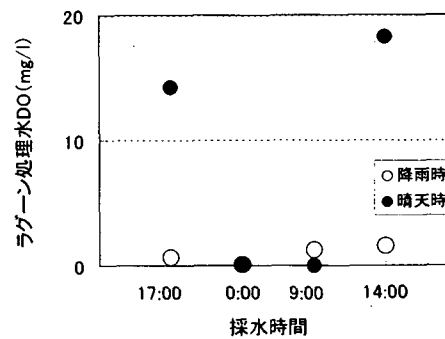


図-10 DOの推移

本調査の実施にあたり、沖縄県土木建築部下水道課、国土交通省国土技術政策総合研究所の関係各位および東和科学株式会社の佐藤恵一氏、舟田卓見氏には多大なるご協力を頂いた。ここに記して深く感謝いたします。

なお、本調査研究は、文部科学省からの受託業務費により実施されたものである。

参考文献

- 1) 篠原美千代、影山努(埼玉県衛生研究所、R&D Center.BML)(2002)蛍光プローブを用いた RT-PCR 法 日本臨床. Vol. 60(6)p.1181-1187.
- 2) 影山努、小嶋慈之、福士秀悦、片山和彦(2001)蛍光プローブを用いた Norwalk virus (NV) の高感度検出法の開発. Vita. Vol.18 (1) p.42-49
- 3) 大垣眞一郎、アウラピン・ケラタナク、ウタイパン・プラセソム(1986) 酸化池内でのコリファージの挙動に及ぼす日射の影響、衛生工学研究論文集、Vol. 22, pp163-172.