

土木研究所資料

下水処理水の滅菌及び消毒に関する研究報告書

平成2年3月

建設省土木研究所
三次処理研究室

「Copyright © (1990) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Director General of P.W.R.I.

この報告書は、土木研究所長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、土木研究所長の承認を得ずしてこれを行ってはならない。」

下水処理水の滅菌及び消毒に関する研究報告書

三次処理研究室 佐藤和明
小越真佐司
諏訪守

要 旨

下水処理水再利用にあたって、処理水の衛生学的安全性について検討を行い、衛生学的基準のあり方の整理を行った。さらに、塩素、紫外線、オゾンの耐性実験を行い、各々の消毒指標微生物の消毒耐性を把握した。

キーワード：大腸菌群、バクテリオファージ、ウイルス、塩素、紫外線、オゾン

下水処理水の減菌及び消毒に関する研究報告書

目次

第1章 緒論	1
第2章 下水処理水の消毒の現況	2
2-1 塩素消毒の現況	2
2-2 塩素消毒の原理	3
2-3 塩素消毒の問題点	4
2-4 代替消毒技術	6
第3章 下水処理水の衛生学的指標	7
3-1 衛生学的基準のレビュー	7
3-2 細菌指標	9
3-3 下水中のウイルスの課題	10
3-4 存在可能性のある細菌及びウイルス	11
第4章 下水中の細菌・ファージの実態調査	13
4-1 調査目的	13
4-2 調査方法	13
4-3 試料の前処理	16
4-4 調査結果	20
第5章 各種菌株、ファージ、ウイルスの塩素耐性実験	31
5-1 実験目的	31
5-2 使用菌株、ファージ及びウイルス	31
5-3 実験方法	31
5-4 実験結果	32
5-5 二次処理水中の消毒指標細菌及びファージの塩素耐性実験	35
第6章 各種菌株、ファージ、ウイルスの紫外線耐性実験	38
6-1 実験目的	38
6-2 紫外線消毒の原理	38
6-3 使用菌株、ファージ及びウイルス	38
6-4 実験方法	38
6-5 実験結果	39
第7章 各種菌株、ファージ、ウイルスのオゾン耐性実験	45
7-1 実験目的	45
7-2 使用菌株、ファージ及びウイルス	45

7-3	実験方法	45
7-4	実験結果	46
第8章	下水中のファージの特性及び近縁性	49
8-1	下水中のRNA ファージの存在割合	49
8-2	ファージの近縁性	50
第9章	不活化実験についての考察	51
第10章	総論	52
	今後の課題	53
	参考文献	54
	謝辞	55

第1章 緒論

近年、生活の高度化にともない、水の使用量は増大する傾向があり水不足が危惧されている。

そこで注目されているのが、下水処理水の水資源としての有効利用である。我が国で発生する下水処理水量は¹⁾年間約80億 m^3 であり、そのうち下水処理場外において再利用される水量は年間約0.68億 m^3 といわれている。下水処理水は都市域における安定した供給源でもあるため、これからの需要の増大が見込まれている。

こうした下水処理水再利用及び水環境利用の高度化にともない、下水処理水に対する衛生学的安全性の関心は今日、高いものとなってきた。下水処理水の病原性細菌の衛生学的問題は、大腸菌群数を指標として管理されてきており、我が国の場合、大腸菌群数3000個/ml以下という基準が与えられ、ほとんどの下水処理場は塩素消毒技術によりこれに対応してきているのが現状である。

本研究においては、まず下水処理水再利用にあつたての現行の大腸菌群数指標と処理水の衛生学的安全性について検討を行い、現行指標の問題点の衛生学的基準のあり方の整理を行った。特にウイルス汚染などに対して大腸菌群指標が適切であるのかについての問題に関しては、ウイルス代替指標としてバクテリオファージを用い、その有用性についてウイルスと比較検討を行った。また、現行の塩素消毒技術の不足を補う代替技術として、紫外線、オゾン消毒技術をとりあげ、これらについての調査検討を行った。

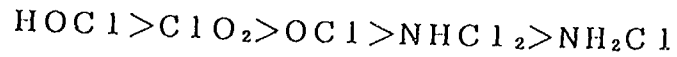
以上、本研究報告書は既存の下水処理水の消毒技術について、その問題点をまとめると共に、下水処理水再利用に当たってより高度の安全性を確保するための種々の課題の一部を調査した結果を示すものである。

なお、本研究は昭和63年度から平成2年度までの期間、試験研究費「下水処理水の減菌及び消毒に関する研究」の課題により実施しているものであり、本報告書はその調査結果を中間的にとりまとめたものである。

第2章 下水処理水の消毒の現況

2-1 塩素消毒の現況

塩素消毒は残留効果があり、比較的安価、安全、取扱いが容易であるといったメリットがあり、現状では、他の消毒法に比べ費用対効果で優位であると考えられている。塩素消毒での形態別消毒効果の順位は J.C. Hoffら²⁾ (1981)によれば大腸菌群99%不活化の場合として



といった報告がある。

下水道統計（下水道協会、昭和62年度）によれば、公共、流域、特定あわせて680カ所以上の処理場で使用されている消毒剤の種類とその使用割合は表-1に示す通りであり、実際に消毒剤が注入された消毒作業日数の分布は表-2に示すような頻度となっている。

表-1 消毒剤の使用割合

液体塩素	25.2%
次亜塩素酸ナトリウム	60.8%
次亜塩素酸カルシウム	10.1%
三塩化シアヌル酸	1.6%
さらし粉	2.3%

表-2 消毒作業日数

0~49日	5.0%
50~99日	2.0%
100~199日	5.9%
200~299日	4.1%
300日以上	83.0%

表-1 から次亜塩素酸ナトリウムを使用している処理場は全体の60%以上を占めており、液体塩素と合わせると90%近くとなり、この2種類の消毒剤の使用が主流となっている。

また、消毒作業日数は、300日以上というのが80%以上を占めており、下水処理プロセス中の重要度がわかる。

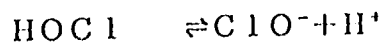
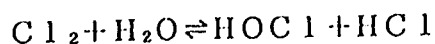
さらに、塩素平均注入濃度の割合を示したのが表-3である。2mg/l以下の注入濃度の割合は70%近くを占めているが、それ以上が30%以上であり、4mg/l以上が6.2%となっている。

表-3 塩素平均注入濃度

1mg/l以下	27.9 %
1~1.9mg/l	38.3 %
2~2.9mg/l	17.7 %
3~3.9mg/l	9.9 %
4mg/l以上	6.2 %

2-2 塩素消毒の原理

下水処理水の消毒には塩素消毒が用いられている。塩素消毒に用いられる薬剤にはすでに述べたように液体塩素、次亜塩素酸ナトリウム、次亜塩素酸カルシウムなどがある。これらは水溶液中で次亜塩素酸あるいは次亜塩素酸イオンを生成する。



生成された次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンは遊離残留塩素と呼ばれ、ともに殺菌力はあるが、次亜塩素酸イオンよりも次亜塩素酸の方が殺菌力が強い。各pHにおける次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンの生成量の関係を図-1³⁾に示す。よって、殺菌効果はpHが低いほど高くなることわかる。

水中にアンモニアが存在すると、次亜塩素酸はアンモニアと結合してクロラミンを生成する。

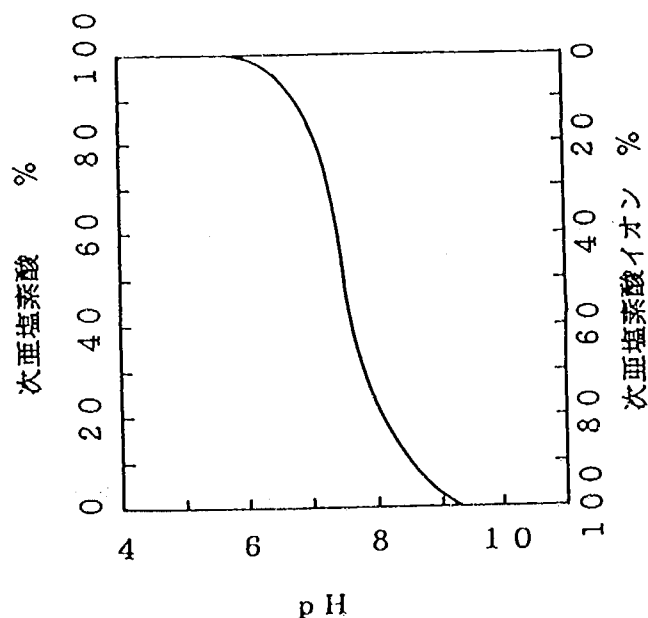
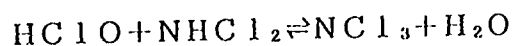
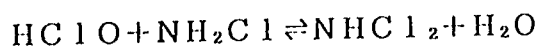


図-1 生成割合

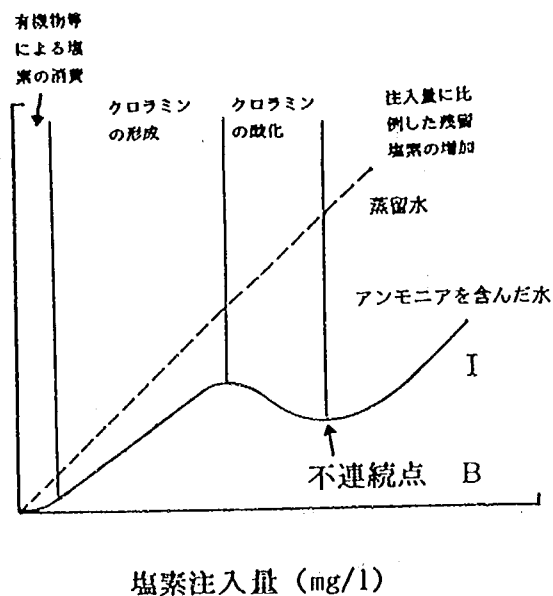


図-2 クロラミンの生成過程

これらクロラミンとして水中に存在する塩素を結合残留塩素という。なお、三塩化窒素には殺菌力はない。塩素注入量と残留塩素生成量を図-2⁴⁾に示す。Iの曲線はアンモニアを含んだ水で、B点のことを不連続点 (break point) という。B点まで塩素を注入する方法を不連続点塩素処理法といい、最も確実な消毒法である。

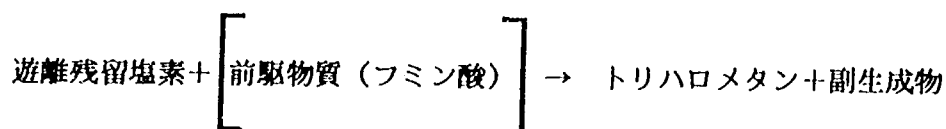
2-3 塩素消毒の問題点

残留塩素の毒性は、遊離型と結合型でほぼ同じであるといわれている。魚類のふ化率は低濃度の残留塩素で影響を受ける。EPAは残留塩素の基準について、水生生物をまもるためには0.003mg/l以下にする必要があるとしている。なお、日本水産資源保護協会が示した残留塩素の生物への影響を表-4に示す。⁵⁾

表-4 残留塩素の生物への影響

供 試 生 物	実 験 結 果 (ppm)		
コイ	12~16日間25%斃死	遊 離	0.15~0.2
ヤマメ 9~12cm	致死極量	遊 離	0.2
ヤマメ 9~12cm	嫌忌極量	遊 離	0.02
コアユ 7.8cm	24時間100%致死	遊 離	0.28~0.3
海産稚アユ 1.3g	16時間致死濃度	遊 離	2.3
海産稚アユ 1.3g	50時間致死濃度	遊 離	0.56
ミジンコ	72時間致死濃度	遊 離	0.5
藻 類	繁殖規制に用いる濃度	遊 離	0.25~0.3

さらに、遊離残留塩素と水中の前駆物質（フミン酸）や臭素などが反応し、有害な物質であるトリハロメタンが生成される。生成メカニズムを示す。



南カルフォルニア広域水道では、トリハロメタンの制御目標値0.1mg/l（日本では近い将来0.03mg/l）を超えることが多いため、代替消毒法としてクロラミン処理法を採用している。米国では現在70箇

所以上の浄水場で使用されており、さらに、いくつかの浄水場ではクロラミン処理法に変更することを検討している。

また、病原性微生物の塩素に対する抵抗力には大きな差があるといわれている。消化器系病原細菌は大腸菌に比べて抵抗力が小さいので、大腸菌群数は安全指標として用いられてきたが、ウイルスや寄生虫などは大腸菌より抵抗力が大きいものもあるので、大腸菌群が所定の基準以下であるとしても衛生学的危険性が全くないとは言えないと考えられる。図-3⁹⁾ 参照。

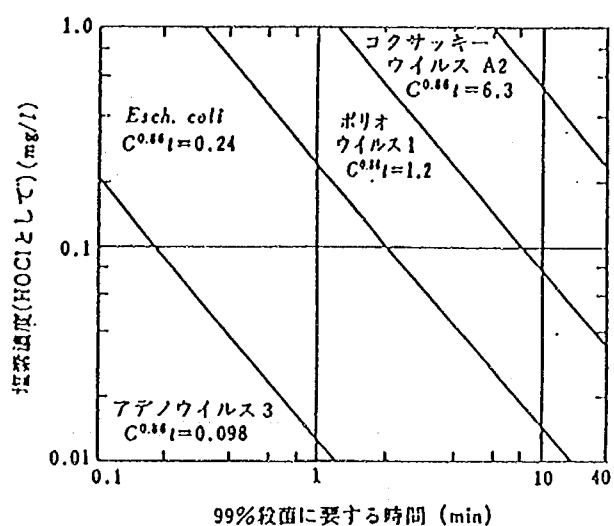


図-3 E. coliとウイルスの消毒の時間と濃度の関係

2-4 代替消毒技術

塩素代替消毒技術として注目されつつあるのが、オゾン、紫外線消毒技術などである。我が国においては採用されている事例はあまりみられないが、下水処理水再利用あるいは下水処理水放流先のレクリエーション利用が大きく考慮されることとなった現在、これまでの塩素消毒による対策のみでは解決できない課題も出てきている。従ってこれからは代替塩素消毒の適用が考えられる機会も多くなるものと想定される。

各消毒法の特徴を以下に述べる。

(1) 塩素消毒

塩素消毒技術は殺菌力が強く、大量の水に適用でき、定量注入が容易である。また、消毒効果が残留し、存在の確認、定量が容易で、安価であるといった利点を有する。欠点はカルキ臭がし、有機塩素化合物の生成、放流先における水生生物への影響がある。

(2) 紫外線消毒

紫外線消毒技術は殺菌力が強く、操作が簡単で、維持管理が容易である。水環境への影響がないといった利点がある。欠点は残留効果がなく、SS分や水厚の増減により効果が著しく変動する。ランプ表面の汚れ等で下水への適用には課題が残されている。

(3) オゾン消毒

オゾン消毒技術は殺菌力が強く、脱臭、脱色等の効果を伴う利点がある。欠点はオゾン酸化物の生成、残留効果がなく、高価である。

第3章 下水処理水の衛生学的指標

3-1 衛生学的基準のレビュー

わが国における下水放流水の排水基準のうち、衛生学的項目では大腸菌群数があり、その基準値は3000個/ml以下と定められている。又、処理水再利用時における同種の基準は、建設省の「下水処理水循環利用技術指針（案）」（昭和56年3月）により、大腸菌群数について、水洗用水では1ml当たり10個以下、散水、修景用水では検出されないこととなっている。さらに水質環境基準等を表-5に示す。例えば河川類型A A、A、Bについて、それぞれ大腸菌群数50、1000、5000MPN/100ml以下の基準値が与えられている。その他、飲料水については大腸菌群が“検出されないこと”、又

表-5 細菌に係わる基準値一覧

	飲 料 水	下水処理場放流水	再利用関連
	大腸菌群数	大腸菌群数	大腸菌群数
細菌	検出されない(水道法昭和52年)こと	3,000/ml(下水道法施行令昭和56年)	(水洗便所) 10/ml(厚生省 昭和56年)
	" (インドネシア)	" (総理府 排水基準)	(水洗、雑用)
	" (西ドイツ)	(ふん尿)	10/ml(建設省、厚生省、通産省、東京都)
	" (フランス)	3,000/ml(建設省告示233、昭和47年)	(風呂、洗濯)
細菌	50 MPN/100ml(オクラホマ)		検出されないこと(住宅公団)
	10 MPN/100ml(WHO)		(洗車、散水、便所)
	" (ユーゴスラビア)	(注) 公共用水域	1/ml(住宅公団)
	病原菌がない(チェコスロバキア)こと	・生活環境基準(環境庁 昭和57年)	(かんがい用)
細菌	2 MPN/100ml(スウェーデン)	(河川)	2.2/100ml(食用作物)
	月間サンプル中、(+)が5%(アメリカ、メキシコ)	A A 50 MPN/100ml	23/100ml(家畜、牧草)
		A 1,000 MPN/100ml	(カルフォルニア 1975年)
		B 5,000 MPN/100ml	(飲料水)
細菌	一般細菌数		0 (ウィンドフーク)
	100/ml(水道法、昭和52年)	・水浴場	(プール)
	" (スウェーデン)	快適 100/100ml以下	サンプル5点中陽性2(厚生省)
	" (インドネシア)	適 100~1,000/100ml	検出されないこと(サンテプロジェクト)
細菌		不適 1,000/100ml以上	(リクレーション)
			500~1,000 (オクラホマ)
			(流水)
			200/100ml (デラウェア)
細菌			一般細菌数
			(風呂、洗濯)
			100/ml(住宅公団)
			(プール)
細菌			200/ml(サンテプロジェクト)

、自然水の水浴場適正判定基準では100MPN/100ml以下を「快適」、100～1000MPN/100mlを「適」、1000MPN/100ml以上を「不適」としている。以上のように、本邦における衛生学的な基準は、概ね大腸菌群数により定められており、そのレベルは、飲料水等の“検出されないこと”から、下水放流水の3000個/ml以下の範囲にあるものと考えられる。

一方、下水処理水の消毒について外国の基準をみると⁷⁾、米国では現在、EPAのガイドラインに基づき、消毒の基準は州あるいは地方公共団体が地域の状況に応じてこれを定めている。そのEPAの示すガイドラインの主旨は、消毒による便益が明らかでない場合は、消毒を行なう必要のないこと、また、公衆衛生および水生生物への影響の両者を考慮しなければならない場合には、塩素以外の代替消毒技術あるいは脱塩素を考慮すべきであるというものである。これを受けて、多くの州の場合、基準としてはふん便性大腸菌群数200個/100mlが用いられている。他方、欧州諸国では、西独のように下水放流水に消毒規定のない国もある。

残留塩素の基準値について表-6に示す。飲料水は日本、WHOなどでは0.1mg/l以上であり上限がみられない。アメリカでは0.05～0.1mg/l、フランスなどでは0.1mg/l以下となっている。再利用関連では保持されていること、0.4mg/l以上などの基準値がある。⁸⁾

表-6 残留塩素に係わる基準値一覧

	飲 料 水	下水処理場放流水	再利用関連
活 性 残 留 塩 素	0.1mg/l以上 (日本)	0.1mg/l程度(下水道施設設計指針)	(散水用)
	〃 (WHO)	(イギリス)	0.4mg/l以上 (建設省)
	〃 (ヨーロッパ)	1mg/l以下(Seven Trent)	(水洗便所)
	0.05～0.1mg/l(アメリカ)	10mg/l以下 (Great London Council)	保持されていること(建設省、厚生省、東京都)
	0.3mg/l以下 (西ドイツ)	(アメリカ)	(風呂、洗濯、洗車、散水)
	0.1mg/l以下 (フランス)	0.75mg/l以下 (イリノイ州)	0.2mg/l以上 (住宅公団)
		0.02mg/l以下 (ケンタッキー州)	(プール)
		0.05mg/l以下 (ニューヨーク州)	0.4mg/l以上 (サンテプロジェクト)
		ただし、サケの水域に放流する場合、0.005mg/l	(注) 厚生省では、 総残留塩素 1.0mg/l以下 遊離残留塩素 0.4mg/l以上
		0.5mg/l以下 (オハイオ州)	(リクレーション)
		0.01mg/l以下 (ウェストバージニア州)	0.5～2.5mg/l (カリフォルニア)
		ただし、サケの水域は0	(ランボンタン水質汚濁防止部)

3-2 細菌指標

下水試験方法では⁹⁾、細菌学的試験として、一般細菌、大腸菌群、ふん便性大腸菌群、腸球菌群の項目を挙げている。この内大腸菌群の定量試験方法としては、①デゾ培地による平板培養法、②最確数法(MPN法)、③メンブランフィルター法が記載されている。この内、下水の排水基準に係わる公定法は平板培養法となっており、水質汚濁に係わる環境基準は、最確数法(MPN法)が公定法として定められている。

大腸菌群(Total coliform)とは、グラム陰性、無芽胞の短かん菌で一定期間内に乳糖を分解して酸とガスを発生する細菌群をいい、この中には大腸菌(*Escherichia coli*)以外に[Aerogenes](#)型や中間型の細菌が含まれている。しかし、人間のし尿や家庭下水中の大腸菌群の80~95%は、一般に真正の大腸菌であると言われている。大腸菌群試験の衛生学上の意義をもっと高めるために、大腸菌群から、特に人間のし尿に由来するもののみを検出しようとする試みが数多く行なわれており、大腸菌群における高温培養法がその一例である。下水試験法においても、44.5℃での培養を基本とするふん便性大腸菌群の測定方法を示している。上記の大腸菌群とふん便性大腸菌群数の関連については、特に人為汚染の少ない清澄な水系で、その数値に大きな乖離があることが認められており、水質環境基準値に大腸菌群数を用いることの不合理を指摘している報文¹⁰⁾もある。

腸球菌群(*Faecal streptococcus*)は、変種を含め7種の連鎖球菌が含まれており、ふん便性連鎖球菌とも呼ばれている。双球菌状または短連鎖状を呈するグラム陽性菌で、ブドウ糖とマルトースを分解して酸を生成する。腸球菌群は、人畜の腸管内に常在し、自然界では増殖しないので、ふん便汚染の指標として利用することができる。腸球菌群は大腸菌群に比較して体外では急速に死滅するが、塩素消毒に対しては大腸菌群よりも強い耐性を示す。

3-3 下水中のウイルスの課題

水利用の高度化に伴い、ウイルス性の感染症についてもその病原微生物の除去が将来的には求められるようになることが予想される。下水中に存在する可能性のあるウイルスは、腸管系ウイルスのアデノ、レオ、ポリオ、エコー、コクサッキー、ロタウイルス等（現在の分離培養法で検出可能なもので、よって水中のウイルス濃縮、検出、消毒などの研究方向もこれらを目標）である。これらのウイルスの流入下水中の濃度については、一部の地方公共団体の衛生研究所で測定がなされているが¹¹⁾、現時点では極めて限られたデータであり、そのデータも定量性の観点からは十分でないように考えられる。現在、ウイルス指標として有望視されているものにバクテリオファージ (Bacterio phage) がある。細菌性ウイルスとも呼ばれており、細菌に感染し増殖するウイルスの一群である。ファージはその核酸の構造からRNA型、DNA型ファージに分類される。一般的に熱、紫外線、化学物質などに対して、細菌よりも抵抗性があり、さらに、測定が簡易、人体への安全性、経済的などの利点を有する。最近、わが国の衛生工学の研究者も、バクテリオファージを用いて衛生学的観点からの研究に着手している。バクテリオファージが下水処理を含めた水系において腸管系ウイルスとどの程度その挙動を同じくするかは、未だ十分に解明されていないようであるが、水系ウイルスの研究手法として大いに注目されよう。また、下水処理水の再利用にあたって、ウイルス学的安全性と大腸菌群指標の関係を論じた報文¹²⁾も最近出されている。

3-4 下水中に存在の可能性のある細菌、寄生虫、ウイルスを表-7、8に^{13) 14)}に示す。

表-7 存在の可能性のある細菌、寄生虫

生 物	病 名	主として感染する器官
(1) 細菌 *Salmonella typhi Salmonella choleraesuis Salmonella enteritidisと 他のセロタイプ *Shigella sp. (赤痢菌) *Vibrio cholerae *腸内病原性大腸菌 Francisella tularensis Leptospira icterohemorrhagiae Mycobacterium tuberculosis	腸チフス 腸チフス、胃腸炎 赤痢 コレラ 胃腸炎 ツラレミア症 レプトスピラ症 結核	胃腸管 胃腸管 胃腸管 腸 胃腸管 呼吸気管、胃腸管、リンパ腺 広範 肺や他の器官
(2) 原生動物 *Entamoeba histolytica Giardia lamblia Naegleria gruberi	アメーバ症 ランブルベン毛虫症 髄膜脳炎	胃腸管 胃腸管 中枢神経
(3) 寄生虫 *Taenia saginata *Ascaris lumbricoides *Schistosoma mansoni S. japonica S. haematobium Necatos americanus Ancylostoma duodenale Diphylobothrium latum Echinococcus granulosus Anisakis sp.	ウシさなだ虫症 回虫症 住血吸虫症 十二指腸虫病 魚さなだ虫症 イヌさなだ虫症 アニサキス症	胃腸管 小腸 膀胱 胃腸管 胃腸管 肝臓、肺臓 胃腸管

注) *よく起こる病気

表-8 存在の可能性のあるウイルス

ウイルス	発病器管	症 状
(エンテロウイルス 6'7) Poliovirus 1, 2, 3型 Coxsackieviruses A, B群 Echovirus Reovirus 1, 2, 3型 Adenovirus 各型 Infection hepatitis virus Hepatitis B. antigen virus 伝染性下痢症ウイルス 泉熱 ウイルス 仮性小児コレラウイルス	鼻、口、腸管 呼吸器、腸 呼吸器、扁桃腺 肝臓 肝臓 腸管、神経系 腸管 呼吸器、神経系、腸管	神経系、呼吸器 腸管障害、発疹 あまりない 呼吸器病、咽頭炎 伝染性肝炎 伝染性肝炎 腸管障害 発熱、発疹、下痢 乳児急性胃腸炎、発疹

第4章 下水中の細菌・ファージの実態調査

4-1 調査目的

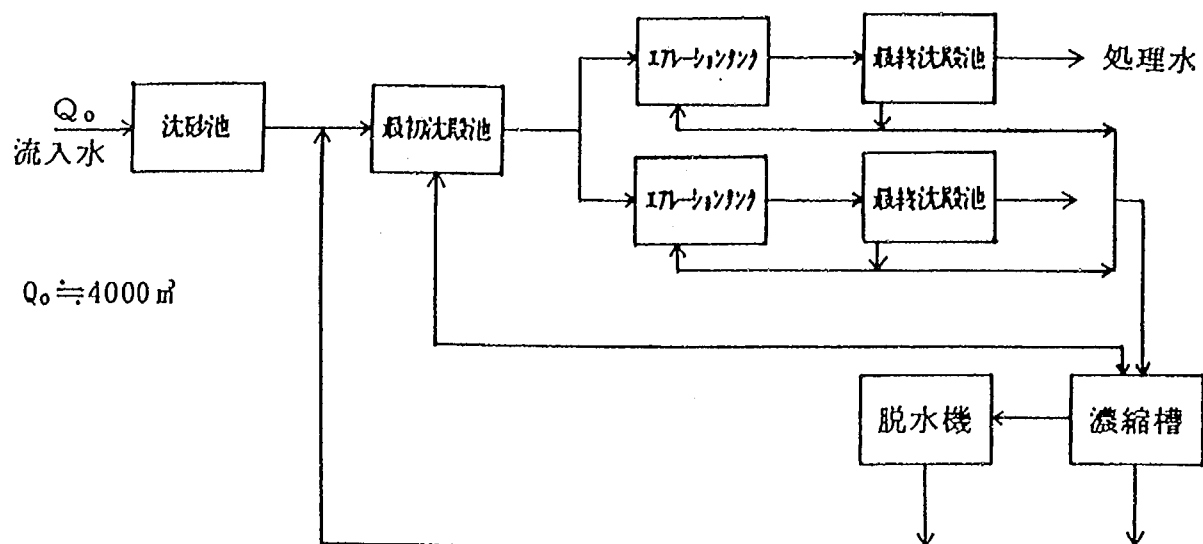
下水処理水再利用の高度化にともない、衛生学的安全性に対する要望は昨今、ますます高いものとなってきている。特にウイルス感染症にあつては臨床医学、検査技術、生態等に未知な部分があり解決すべき問題点は多々ある。水系伝染病の病原性ウイルスの下水処理プロセスでの挙動については自治体の衛生研究所で一部測定がなされているが、現時点では極めて限られたデータであり、そのデータも定量性という観点からは不十分なものである。そこで、改めて下水道サイドでデータを蓄積することが望まれるが、ウイルスの分析定量については、その分析を専門とする特別な機関に委託するより他に手段がなく、1検体当たりの分析単価もかなり高価である。また消毒効果等の調査に当たって直接病原性ウイルスを取り扱うことは不可能である。

そこで、ウイルス代替指標として検討されているのがバクテリオファージ (Bacterio phage) である。ファージは病原性ウイルスより一般的に耐性があると言われており、短時間で容易に測定ができ、人体への危険性がなく、さらに、ファージを下水処理水中に注入し消毒効率の判定を行うことも可能であるメリットを有している。

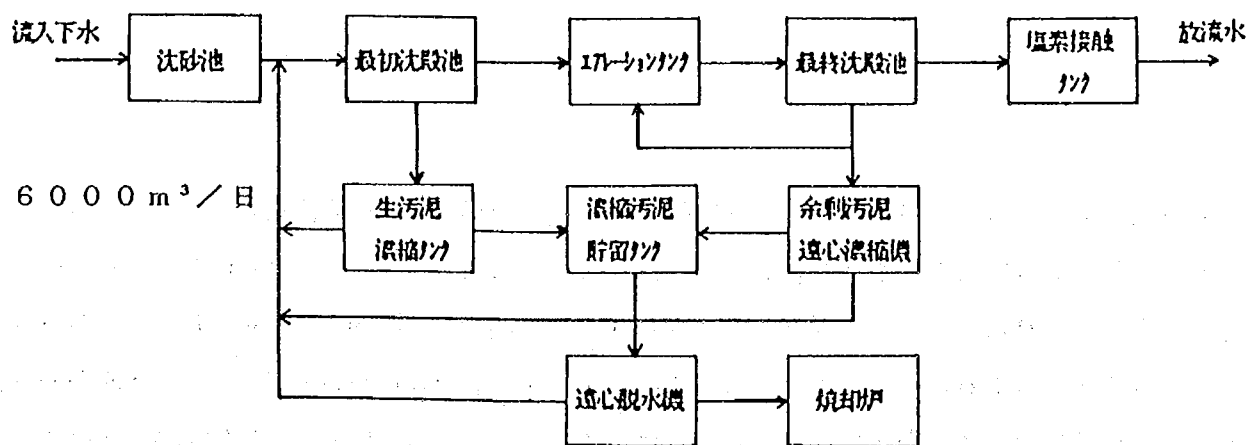
本調査は下水処理場における大腸菌群数等、ふん便汚染の指標となる細菌群とバクテリオファージの測定については、これまでに類似した調査例は少なく、大腸菌等を宿主菌とする各種バクテリオファージのプロセス中の挙動を比較測定することを目的として行なったものである。

4-2 調査方法

調査は茨城県内のB下水処理場、および県外のC下水処理場（ともに分流式）について行った。採水方法はB処理場は24時間採水（3時間間隔）で行い、さらに、B処理場、C処理場について各下水処理プロセスの高負荷時のコンポジットサンプル（採水時間は滞留時間より推定）についても行った。B、C処理場のそれぞれの処理フローを図-4に示す。各サンプルについてファージ、大腸菌群数、ふん便性大腸菌群数、腸球菌群数を測定した。測定法はファージは、軟寒天培地中に宿主菌株の1晩培養液とサンプルを混ぜ、寒天培地平板上に拡げて培養する重層寒天法、大腸菌群数はデソ培地、ふん便性大腸菌群数はM-F C培地、腸球菌群数はK F培地を用いた平板培養法とした。なお、細菌数の測定で細菌数の少ない放流水についてはメンブランフィルター法を用いた。ファージ数の測定の際に用いた宿主菌株を表-9に示す。これらの7種類の宿主菌株は、容易にヒト、温血動物から検出されるもので、下水中にも多量に存在しかつ、病原性のないもの（不明も含む）とした。また、ファージ測定の際の培地組成を表-10に示す。



B 処理場 処理フロー



C 処理場 処理フロー

図-4 各処理場の処理フロー

なお、本調査において使用した宿主菌株及び純粋株ファージについては、東海大学医学部古瀬浩介博士、理化学研究所、発酵研究所より分与されたものである。

水質分析項目は水温、pH、電導度、BOD、COD_{Cr}、SS、K-N、NH₄-N、NO₂-N、NO_x-Nとした。なお、放流水については残留塩素も測定した。

表-9 ファージ測定に用いた7種類の菌株

<u>E. cloacae</u>	JCM1232	東海大学 医学部
<u>E. aerogenes</u>	JCM1235	
<u>E. faecalis</u>	JCM5803	
<u>C. freundii</u>	IFO12681	
<u>E. coli K12 (F⁺)</u>		
<u>E. coli B</u>		
<u>E. coli C</u>		

表-10 培地組成

ポリペプトン	1%
酵母エキス	0.5%
NaCl	0.5%
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.02%
MnSO ₄ ・4H ₂ O	0.005%
ブドウ糖	0.15%
pH	7.0±0.2
寒天培地は上の培地に寒天を1.1%添加。	
上層寒天培地は寒天を0.7%としたもので、	
CaCl ₂ を添加したものを使用。	

4-3 試料の前処理の検討

4-3-1 細菌・ファージの超音波前処理実験

細菌の測定の際においては、流入下水などの比較的SS分の多いサンプルについては、細菌がSS分に付着し、菌塊となっている場合が多く、正確な細菌数が測定できない。正確に細菌数を測定するには、塊っている細菌を超音波処理等によって分散させる必要があると考えられる。そこで、初めに超音波処理における最適な処理時間を検討した。実験に用いたサンプルは、A下水処理場の分流式流入下水（水温28.1℃、pH6.87、SS 163mg/l）である。超音波破碎器は周波数9KHz ±200Hzのものを使用、約100mlのサンプルを処理した。図-5は、超音波処理時間と大腸菌群数、ふん便性大腸菌群数、腸球菌群数の関係について示したものである。図-5より超音波出力100Wにおいては、約1～2分程度の処理時間が適当であると考えられる。もちろん、SS量の多少によってこれらの時間の長短は考えなければならないと思われる。

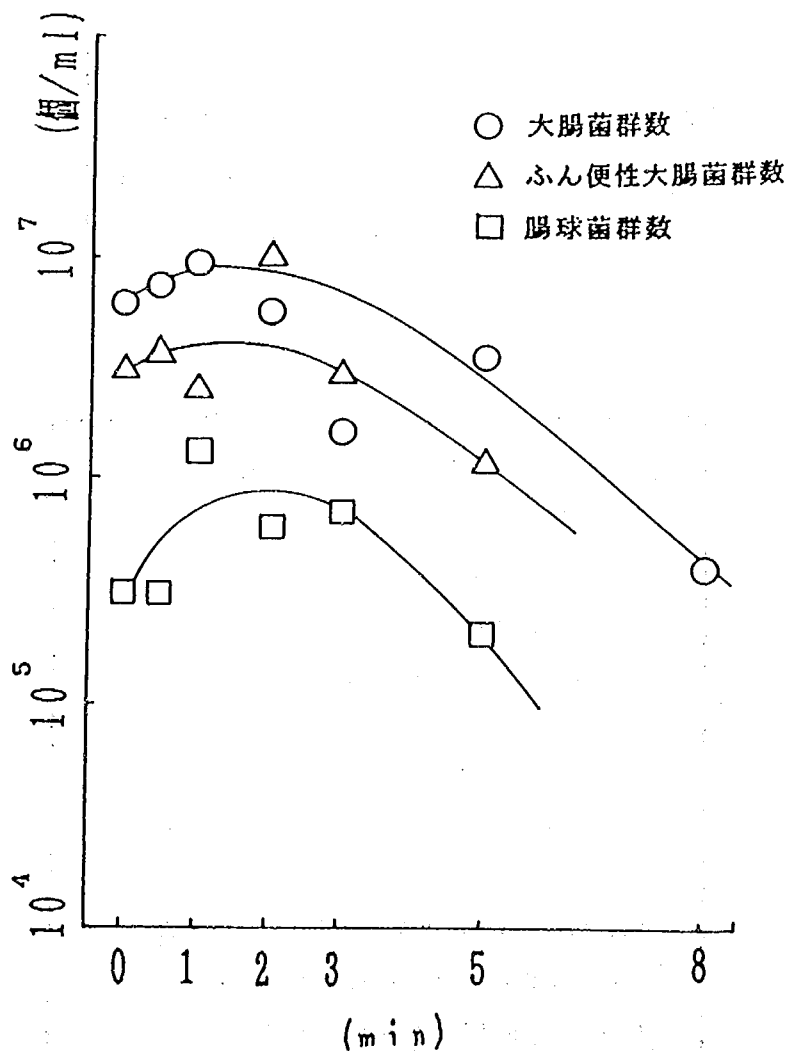


図-5 生下水の超音波前処理実験

次に、ファージの測定においても超音波前処理実験を行ってみた。実験に用いたサンプルは、A下水処理場の分流式流入下水（水温21.2℃、pH7.07、SS256mg/l）である。超音波前処理時間とファージの検出量の増加の関係は、図-6に示すように時間の経過にともなうファージ数の減少がみられ、細菌のときとは異なり、初期の増加もみられない。この結果から、ファージの測定においては超音波処理は、必ずしも必要ではないと考えられる。

尚、C. freundii、E. coli B、E. coli K12 ファージは、超音波8分処理で死滅率約80~90%であるのに対し、E. coli C ファージは約50%である。したがって、E. coli C ファージは他のファージに比べ、超音波耐性があることがわかる。

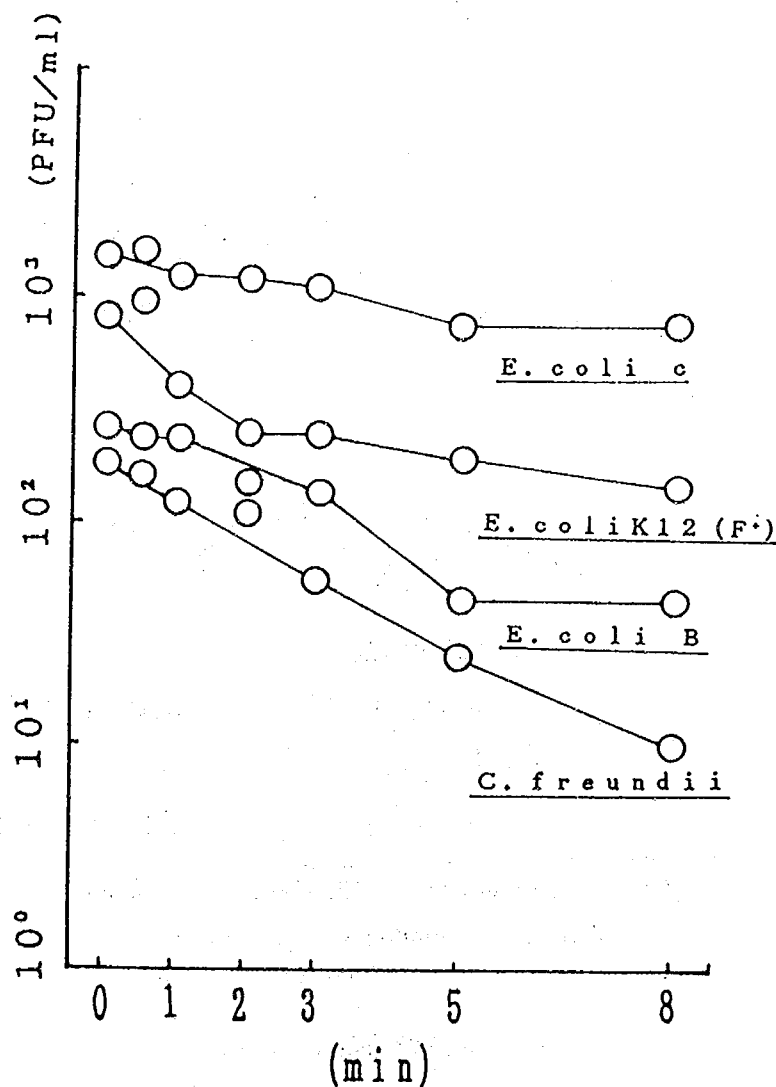


図-6 ファージ超音波前処理実験

4-3-2 ファージ測定時前処理検討実験

流入下水中、一次処理水中ではSS分や雑菌が多いため、ファージを測定する際、雑菌の繁殖によりプラークの形成を阻害することが考えられる。そこで、雑菌を除菌しSS分や菌体の破片を沈殿させ、その上澄みまたは、その濾過水を測定用サンプルとした場合、ファージ測定値に与える影響を検討したのが図-7の遠心・クロロホルム・フィルター処理実験である。実験に用いたサンプルは、A下水処理場の分流式流入下水（水温18.9℃、pH7.60、SS206mg/l）である。

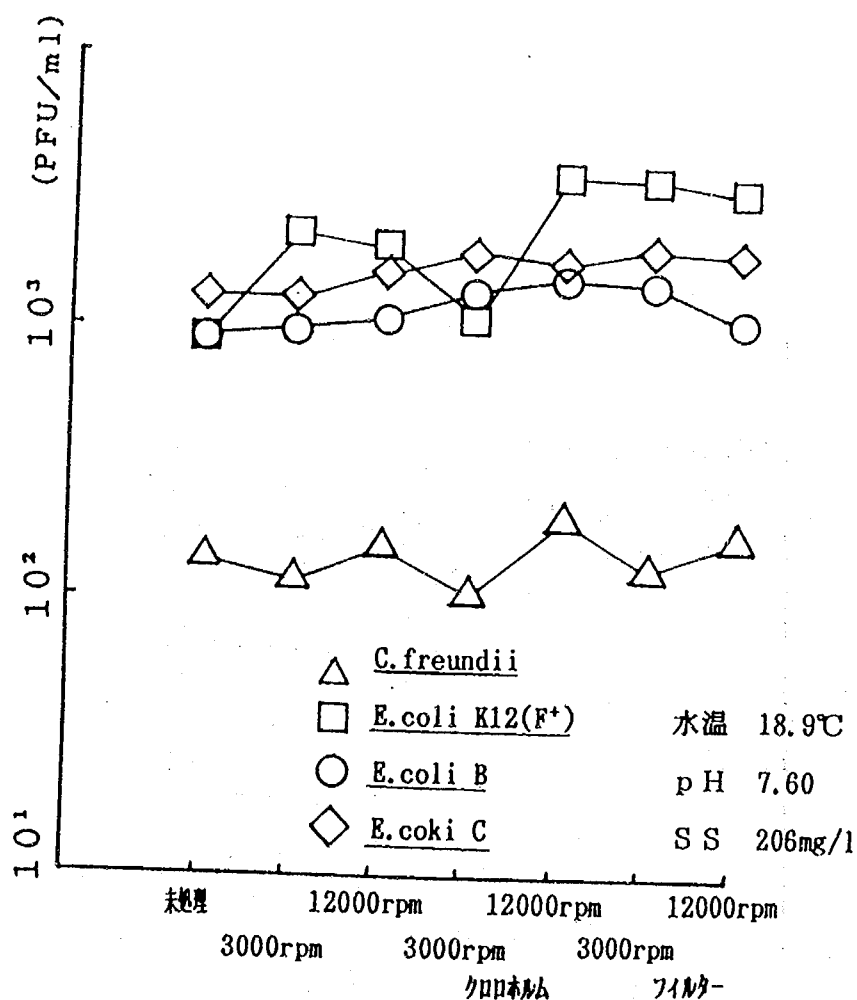


図-7 ファージ測定時前処理検討実験

実験方法は、未処理のサンプルについてはそのまま測定。遠心処理は約20mlの遠心管に試料を入れ、3000rpmの低速回転と12000rpmの高速回転のそれぞれ4℃、10分間とし、遠心・クロロホルム処理は、遠心処理の各条件にクロロホルムを1～2滴加えたもの、フィルター処理は、遠心処理の各条件の上澄水を0.45μmのフィルターで濾過したものをを用いた。

実験結果は、未処理のサンプルに比べ各条件で処理したサンプルのファージの検出量の増加が認められる。低速回転または高速回転処理による検出量の差はあまり認められていないが、低速回転処理のものは高速回転処理のものに比べ若干雑菌の繁殖が多いことが観察され、ファージのブランクのカウントに支障をきたす可能性がうかがえた。また、クロロホルムを加えたものと加えないものとは同様なことが言えるが、遠心・フィルター処理においては、完全に雑菌の繁殖が抑えられおり、しかも全体的に検出量の増加がみられる。よって、遠心・フィルター処理がファージ自体のカウント等に影響がなく、かつ他の雑菌の繁殖を十分コントロールできることから前処理方法として適当であることが確認された。

以上の検討実験の結果から、本調査では前処理として細菌測定では1～2分程度の超音波処理を行なうこととし、ファージ測定では4℃で10分間の遠心分離(12000rpm)の後、0.45μmのメンブレンフィルターによる濾過処理を行なうこととした。

4-4 調査結果

4-4-1 ファージ優占種調査結果

B処理場において実施した、下水処理場における流入下水及び一次、二次処理水中のファージの調査結果を図-8に示す。図中の数値は24時間調査結果の平均濃度の割合(%)を表したものである。流入下水中最も多く検出されたものとしてE.coli C、E.coli K12(F⁺)、E.coli B ファージで全体の70%近くを占めており、他にEnterobacter型で約20%、C.freundii型で約10%であった。一次処理水中でも流入下水と同様な傾向がうかがえるが、処理過程の進んだ二次処理水中ではE.coli C型が全体の60%以上を占めており、なおかつE.coli型では全体の80%以上を占めていることがわかる。

2回目の調査では、新たに腸球菌群の構成菌であるE.faecalis株を加え、E.faecalis株を宿主菌とするファージが若干量検出された。調査結果を図-9に示すが、全体的にE.coli型で80~90%を占めている。E.coli型別でみると、流入下水、一次処理水中ではE.coli C型は全体の約40%、E.coli B型は約30%、E.coli K12(F⁺)型は約10%である。二次処理水中ではE.coli C型が全体の80%以上を占めており、次いでC.freundii型が多いものとなっている。前回の調査と同様E.coli C型のファージは他のファージに比べ二次処理水中に多く存在していることより、活性汚泥処理法においてE.coli C型のファージは比較的除去されにくいものとなっている。

次に、二次処理水中の大腸菌群数(TC)、ふん便性大腸菌群数(FC)、腸球菌群数(FS)、比較的多く検出されたE.coli Cファージの1日の推移を図-10に示す。 FC/TC は約80%とふん便汚染の高いことがわかる。さらに、二次処理水中のファージの存在割合結果と合わせると、ふん便性大腸菌であるE.coli型のファージは全体の約87%でほとんどそれと近い値となっていることがわかる。ちなみに、 FS/TC は約30%、 FS/FC は約40%となっている。E.coli CファージとFCの比は約3%で推移しており、それぞれの関係を図-11に示すが、良い相関関係であることがわかる。

4-4-2 水質性状と指標細菌との関係

水質性状との関係でみた場合、B処理場24時間調査の二次処理水の各細菌数とK-N、 NH_4-N 濃度の関係を示したのが図-12、13である。二次処理水中のK-N、 NH_4-N 濃度の上昇に伴い、各細菌数の上昇もうかがえる。10mg/lの濃度上昇で各細菌群数は約5~10倍の増加がみられた。

尚、今回の調査の水質分析結果を表-11に示した。

流入下水

<u>C. freundii</u>		<u>En. aerogenes</u>	<u>E.coli K12(F⁺)</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli C</u>
9	8	1 4	3 0	1 1	2 8

1450PFu/ml

En. Cloacae

一次処理水

<u>C. freundii</u>		<u>En. aerogenes</u>	<u>E.coli K12(F⁺)</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli C</u>
1 4	2	1 6	2 2	1 5	3 1

970PFu/ml

En. Cloacae

二次処理水

<u>C. freundii</u>		<u>En. aerogenes</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli C</u>
2	1 4	9	1 4	6 1

E.coli K12(F⁺)

65PFu/ml
(%)

図-8 各下水処理プロセスにおけるPhageの存在割合 (I)

流入下水

<u>C. freundii</u>	<u>E. coli K12(F⁺)</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli C</u>	<u>En, faecalis</u>
7	4	1 4	3 4	2
				3250PFu/ml

En, Cloacae

一次処理水

<u>C. freundii</u>	<u>E. coli K12(F⁺)</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli C</u>	<u>En, faecalis</u>
9	2	1 2	3 1	4 3
				1770PFu/ml

En, Cloacae

二次処理水

<u>C. freundii</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli C</u>
1 3	4	8 3

24PFu/ml
(%)

図-9 各下水処理プロセスにおけるPhageの存在割合 (II)

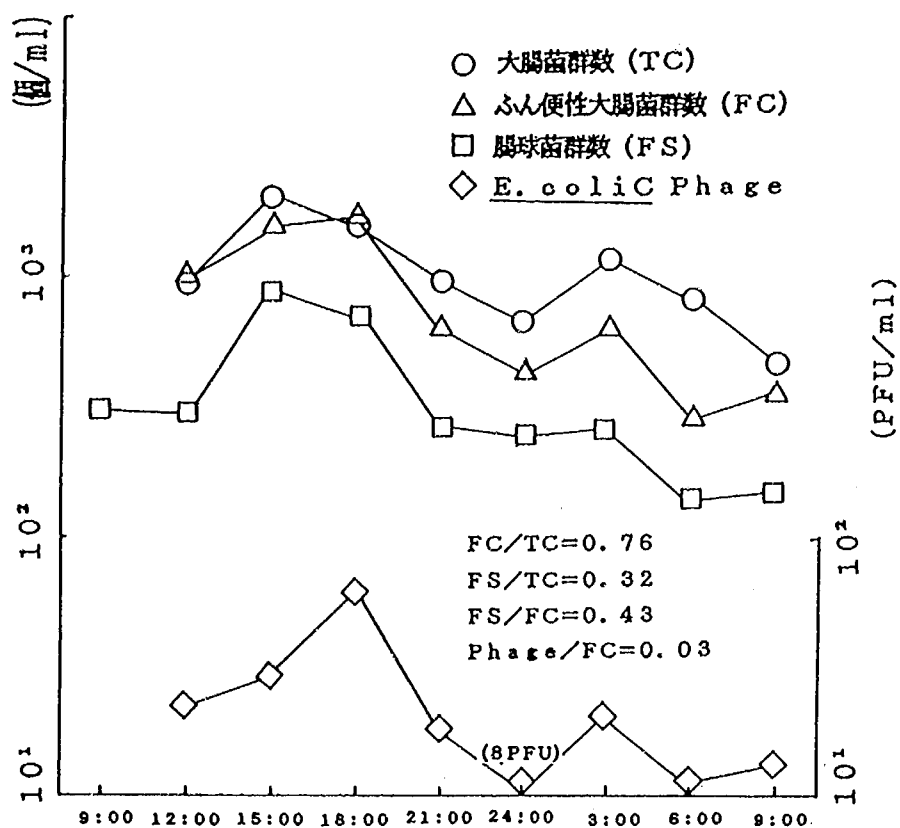


図-10 2次処理水中の大腸菌群数、ふん便性大腸菌群数、腸球菌群数、
E. coli C Phageの推移

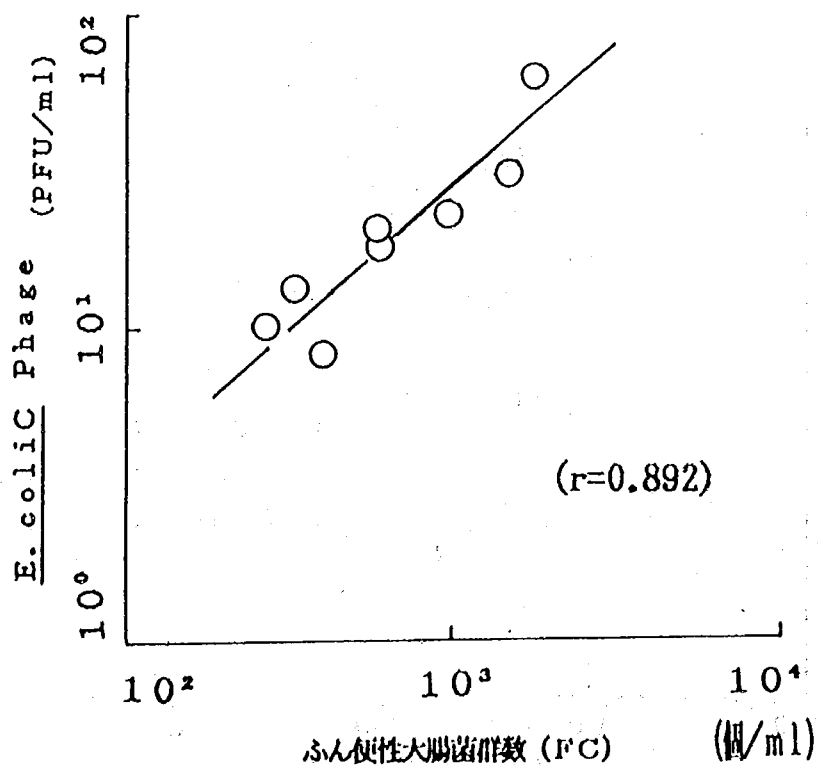


図-11 ふん便性大腸菌群数とE. coli C Phage数との関係

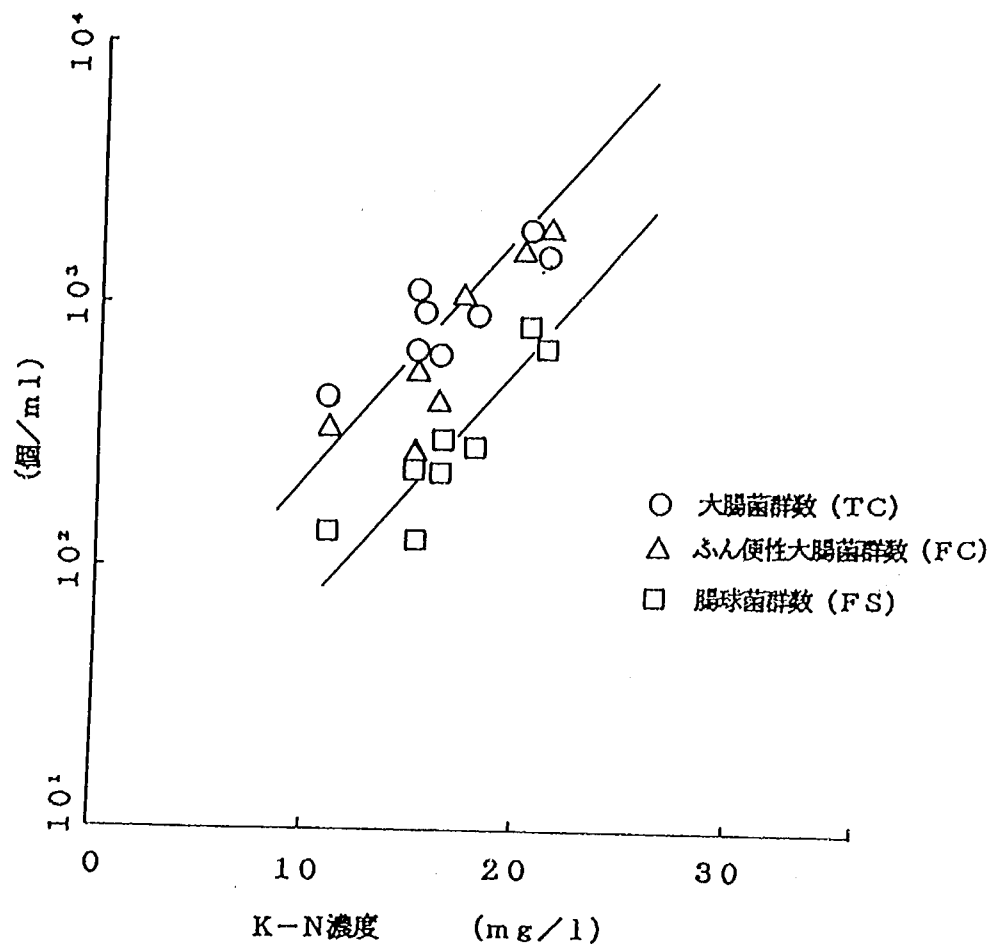


図-12 二次処理水のK-N濃度とTC、FC、FSの関係

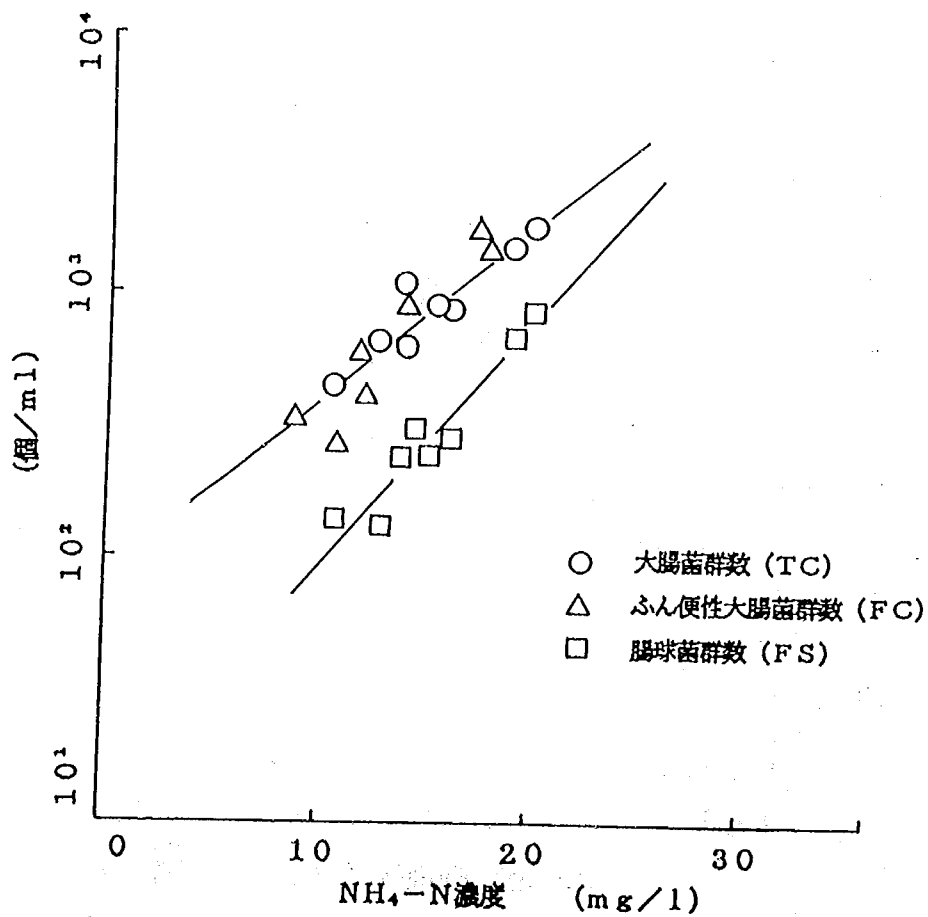


図-13 二次処理水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度とTC、FC、FSの関係

表-11 水質分析結果表

(B処理場24h)

	水温 ℃	pH	電導度 ms/cm	BOD (T)	BOD (D)	SS	NO ₂ -N	NO _x -N	NH ₄ -N	K-N	COD _{cr} (D)
流入下水	13.3	7.71	0.443	107	44	93	tr	tr	14.6	23.7	49.3
	~ 15.7	~ 8.33	~ 0.759	~ 239	~ 116	~ 274	~ 0.25	~ 1.87	~ 40.6	~ 59.5	~ 112
一次処理水	13.2	7.17	0.553	97	49	116	tr	tr	18.3	27.9	47.3
	~ 15.0	~ 7.88	~ 0.771	~ 204	~ 116	~ 325		~ 0.01	~ 38.6	~ 73.5	~ 102
二次処理水	14.1	7.35	0.544	2	1	7	0.64	1.44	10.5	10.8	19.8
	~ 16.4	~ 7.65	~ 0.699	~ 6	~ 6	~ 14	~ 2.55	~ 5.73	~ 19.6	~ 21.0	~ 24.0

(mg/l)

4-4-3 直接プラーク法による二次処理水中のファージの定量実験

下水処理水の再利用が各種の形態で行われるのに伴い、衛生学的安全性に対する声も高くなってきている。バクテリオファージはその構造、性質等の類似、測定の簡易、安全性により、ウイルス代替指標として有望視されている。しかし、二次処理水中などにおいては、その測定法の限界から多数検出されず、消毒指標細菌との関連性や、塩素による消毒耐性など明確な傾向がつかめない。

そこで、本実験では、ファージの測定法を重層寒天法から直接プラーク法¹⁶⁾に改め、塩素処理水試料100ml中の消毒指標細菌、ファージの存在量を測定することにより、各消毒指標微生物の消毒耐性の明確な関連性の把握を目的として行なったものである。

(1) 定量方法

Grabow¹⁶⁾らの飲料水100ml中のファージの定量法を、下水処理水に適用するため培地組成、宿主菌の培養液添加量を修正して用いた。ファージ培養液を用いた培地組成の検討結果を表-12に示す。

表-12 平均検出量

	表-10の培地	Grabow培地
Q β	49PFU/10ml	18PFU/10ml
T ₄	128PFU/10ml	113PFU/10ml

同一試料を用いた検討結果から表-10の培地は、Grabowらの培地に比べ、Q β ファージの検出量が約2.7倍、T₄ファージで約1.1倍であり、特にRNAファージの検出に優れていることがわかった。

菌株培養液の添加量検討実験結果を表-13に示す。

表-13 平均検出量

添加量	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	8.0	10
検出量	53	68	60	69	72	53	61	50	49	58

(添加量はml、検出量はPFU/10ml)

E.coli K12(F⁺)株を用いた添加量検討実験結果は、培地量100ml、サンプル量10mlに対し1.0～2.5

mlの添加範囲が適当と考えられた。

直接ブランク法の試験操作は表-10の培地1000mlにサンプル100ml、菌株培養液15ml、塩化カルシウム溶液をそれぞれ加えた後、ただちにシャーレ(230×80の角シャーレ)15枚に分注し、固化させ37℃で1晩培養を行い、翌日培地中に形成されたブランクを計数する。E.coli K12(F⁺)株を用いた二次処理水中のファージの定量結果を表-19に示したが、40PFU/100ml程度で比較的多数のファージが検出された。少量の検水を用いて測定した結果でないため正確であり二次処理水中のファージの定量に利用できると考えられる。

4-4-4 高負荷時における調査結果

高負荷時における実態調査の結果を表-14、15に示す。B、C処理場の大腸菌群数の推移は流入下水、一次処理水で 10^5 濃度、二次処理水で $10^2 \sim 10^4$ 濃度であり、放流水は両処理場とも0.1mg/lの残留塩素濃度において若干量検出されている。B、C処理場の各処理過程での大腸菌群数に対するふん便性大腸菌群数、腸球菌群数の割合は、昨年度の実態調査と大きく数値が異なるため、あえて比較は行わず、各処理過程での除去効果を示す。この数値の違いについては、培地、測定上の問題なのか、または流入下水などの性状変化に伴うものなのかは不明であり、今後の検討課題としたい。ファージについてはE.coli K12(F⁺)ファージが流入下水、一次処理水で $10^1 \sim 10^3$ 濃度で推移しており、二次処理水では100ml中約200~600PFUである。同様にE.coli Bファージは流入下水、一次処理水で $10^2 \sim 10^3$ 濃度、二次処理水で100ml中約30~700PFUであった。

次に、各処理過程での除去効果について述べる。B、C両処理場とも、一次処理の沈殿除去では、あまり期待できず、細菌の除去率は1ケースを除き約5~40%の範囲内である。ファージの場合は、1ケースを除き逆に流入水よりも上昇している。これは、汚泥処理系からの返流水の影響を受け、一度活性汚泥に吸着していたファージが脱離し上昇したものと考えられる。活性汚泥処理水である二次処理水に着目するとB、C処理場とも細菌、ファージの除去率はそれぞれ96.3~99.7%、91.2~99.9%の範囲内であり、だいたい一致するものであった。最終的な放流水に着目すると、両処理場の残留塩素は0.1mg/lであり大腸菌群、ふん便性大腸菌群の塩素消毒による不活化率は99.6~99.8%、腸球菌群で94.5~98.7%となっており、腸球菌群は大腸菌群などよりも塩素耐性がやや高いことがわかる。ファージについては5.8~73.5%の不活化率であり、細菌より塩素耐性が高いことがわかる。

尚、表-16、17に水質分析表を示す。

表一 14 B処理場 (高負荷時)

	流入下水	一次処理水	二次処理水	放流水
大腸菌群数 (M-FC) TC	86×10^4	89×10^4	12×10^3	24
糞便性大腸菌群数 FC	51×10^4	31×10^4	65×10^2	15
腸球菌数 FS	12×10^4	90×10^3	45×10^2	60
<u>E. coli K12</u> (F ⁺)株ファージ	17×10^2	21×10^2	199/100ml	77/100ml
<u>E. coli B 株</u> ファージ	43×10^1	79×10^1	34/100ml	9/100ml

(個, PFU/ml)

表一 15 C処理場 (高負荷時)

	流入下水	一次処理水	二次処理水	放流水
大腸菌群数 TC	20×10^4	19×10^4	59×10^1	2
糞便性大腸菌群数 FC	10×10^4	88×10^3	50×10^1	2
腸球菌数 FS	29×10^3	24×10^3	11×10^1	6
<u>E. coli K12</u> (F ⁺)株ファージ	71×10^0	11×10^1	622/100ml	586/100ml
<u>E. coli B 株</u> ファージ	10×10^2	49×10^1	753/100ml	411/100ml

(個, PFU/ml)

表-16、17 水質分析結果表 (高負荷時)

表-16 (B処理場)

	水温 ℃	pH	電導度 ms/cm	BOD (T)	SS	NO ₂ -N	NO _x -N	NH ₄ -N	K-N	残留塩素
流入下水	17.3	8.20	0.519	433	260	0.04	0.04	35.3	56.6	-
一次処理水	17.8	7.68	0.532	-	146	0.02	0.06	31.6	51.7	-
二次処理水	17.8	7.24	0.464	3	5	0.13	2.46	10.8	10.6	-
放流水	17.7	7.47	0.622	9	5	0.12	2.71	10.4	10.7	0.1

(mg/l)

表-17 (C処理場)

	水温 ℃	pH	電導度 ms/cm	BOD (T)	SS	NO ₂ -N	NO _x -N	NH ₄ -N	K-N	残留塩素
流入下水	17.9	7.56	1.482	※151	70	0.01	0.01	22.3	29.2	-
一次処理水	18.1	7.09	1.267	※163	72	0.01	0.01	26.9	36.0	-
二次処理水	18.3	6.96	1.069	※7	5	0.23	0.74	17.5	18.2	-
放流水	18.3	7.07	1.011	※8	5	0.23	1.06	16.5	18.5	0.1

※は、翌日採水し分析したデータである。

(mg/l)

4-4-5 下水中の腸球菌群の優占種把握調査

ヒトの腸球菌群の優占種はE. faecalis 及び E. faecium と言われており、下水中の腸球菌群の測定にはKF培地、EF培地、PSE培地などが用いられる。その中でもEF培地は、寒天培地中に生成したコロニーからE. faecalis、E. faecium を色別計数できる特性がある。そこで、下水中に存在するこれらの菌種の概略値を推定するため、EF培地を使用した調査を行なった。

調査結果を表-18に示す。流入水ではE. faecalisが53%と若干E. faeciumより多く、一次処理水ではE. faecalis が57%、二次処理水中では61%となり、流入水、一次、二次処理水と処理過程が進むにつれE. faecalis の割合が高くなってきていることがわかり、若干量ではあるがE. faecalisはE. faeciumを上回る結果であった。

表-18 下水中の E. faecalis, E. faecium の存在比率

	流入水	一次処理水	二次処理水
<u>E. faecalis</u>	53%	57%	61%
<u>E. faecium</u>	47%	43%	39%
TOTAL コロニー数 (個/ml)	$66 \times 10^3 / \text{ml}$	$58 \times 10^3 / \text{ml}$	$100 / \text{ml}$

第5章 各種菌株、ファージ、ウイルスの塩素耐性実験

5-1 実験目的

我が国における下水処理水の消毒の現況は、その費用の安価、殺菌力が強く、取り扱いが容易であるといったことから、ほとんどの処理場は塩素消毒技術を用いている。

しかし、下水処理水再利用の高度化にともない、ウイルスに対する不活化効果への疑問等の衛生学的問題点が新たためて議論されてきている昨今では、大腸菌群指標の適切さが問われてきている。

本実験は、ウイルス代替指標としてバクテリオファージを用い、その塩素耐性を把握し、さらに、大腸菌群をはじめとする各種菌株やウイルスとの比較を行い塩素消毒指標微生物の検索を行うことを目的とするものである。

5-2 使用菌株、ファージ及びウイルス

使用菌株は、MS 2、Q β ファージの宿主菌である E.coli K12(F⁺) 株、T₄ ファージの宿主菌である E.coli B 株、E.faecalis 株の純粋株、ファージはRNAファージのMS 2、Q β ファージ、DNAファージのT₄ ファージ、ウイルスはポリオ 1、ポリオ 2 型の合計 8 種類の微生物を用いた。

5-3 実験方法

各種菌株の 1 晩培養液、ファージ及びウイルスの調整液を生理食塩水 (0.85%) で $10^3 \sim 10^4$ 濃度に希釈したのち実験用サンプルとした。サンプルを滅菌した三角フラスコに約 200 ~ 300ml 分注し、次亜塩素酸ナトリウムを所定の濃度になるよう注入、スターラーによって攪拌を行った。15 分間接触させた後、約 100ml を残留塩素測定用サンプルとし、残りのサンプルにはただちに亜硫酸ナトリウムを添加し塩素の中和を行い測定用サンプルとした。塩素の定量は、よう素滴定法またはオルトトリジン比色法によった。

微生物の定量は E.coli 株が M-F C 培地、E.faecalis 株が K F 培地の平板培養法、ファージが重層寒天法、ポリオウイルスが BGM 細胞を用いたプラーク法によった。

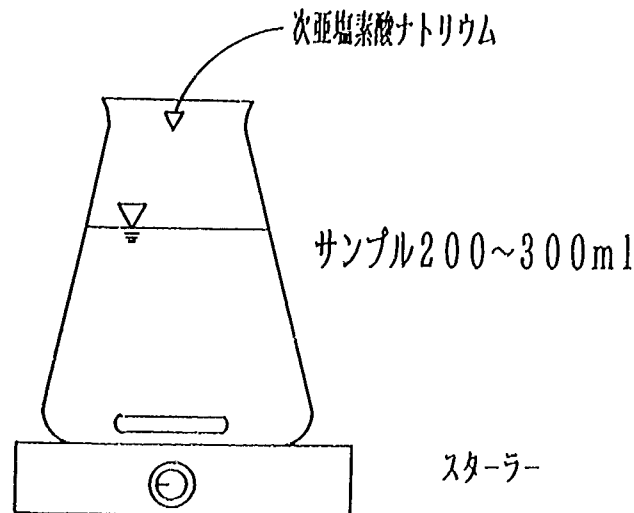


図-14 塩素耐性実験装置

5-4 実験結果

実験結果を図-15～18に示す。図中の（ ）内の数字は残留塩素濃度を示している。数字のないものは、測定限界以下である。

E. coli K12(F⁺)株、E. coli B株については0.3mg/lの塩素濃度（15分間接触）により99.9%以上の不活化率であるが、E. faecalis株だけは0.5mg/lで約99.9%の不活化であり、他の菌株よりも塩素に対して耐性があることがわかる。一般的に腸球菌群は大腸菌群に比べ塩素耐性があるとされており、この実験からも、ヒトの腸球菌群の主要構成菌と言われているE. faecalis株は大腸菌群の主要構成菌であるE. coli 株よりも強い塩素耐性を有することが裏付けられた。

ファージについてはT₄ファージが最も強い耐性を示しており、1.5mg/lの塩素濃度で約60%の不活化率である。MS 2、Q β ファージはそれぞれ80～90%の不活化率であり、菌株に比べ強い塩素耐性を示している。

ウイルスについてはポリオ1、2型とも0.1mg/l、15分間接触では100%不活化されてしまうため、接触時間を短くしてプロットした結果が図-17、18である。塩素濃度0.1mg/lの5分間接触で両ウイルスとも0.1%以下の生存率となってしまう。ポリオウイルスなどはE. coli 株などよりも塩素耐性があるという一部の報告もあるが、本実験の結果は反対の結果となっており今回使用した細菌株などはポリオウイルスよりも塩素耐性のあるものであった可能性がある。また、ウイルスの種類によってはNaCl、CaCl₂、KClなどの無機塩類の添加により塩素耐性の減少がみられるもの、あるいは逆に無機塩類による塩素消毒効果の阻害が認められる場合があると言われているため、さらに

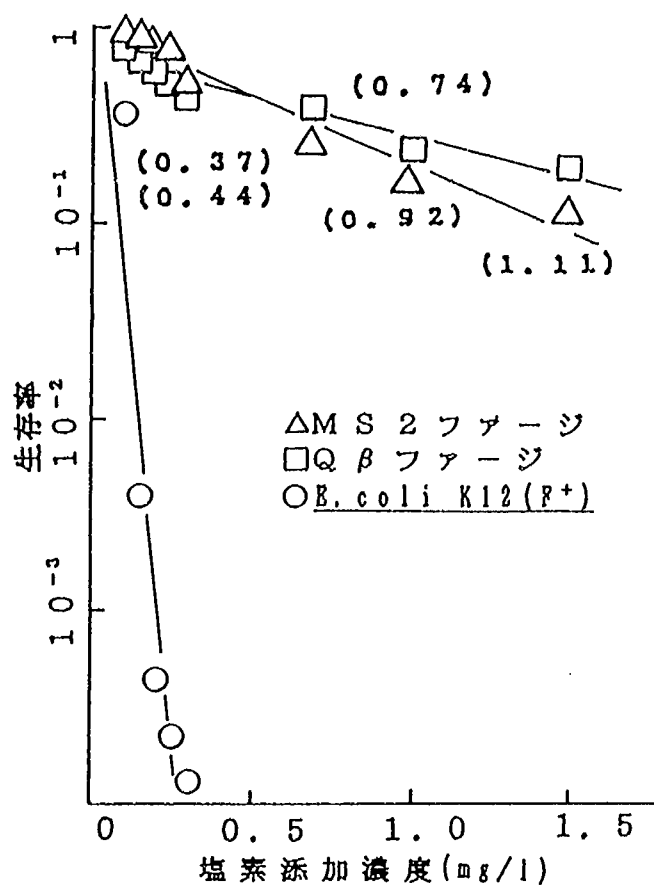


図-15 塩素耐性実験結果

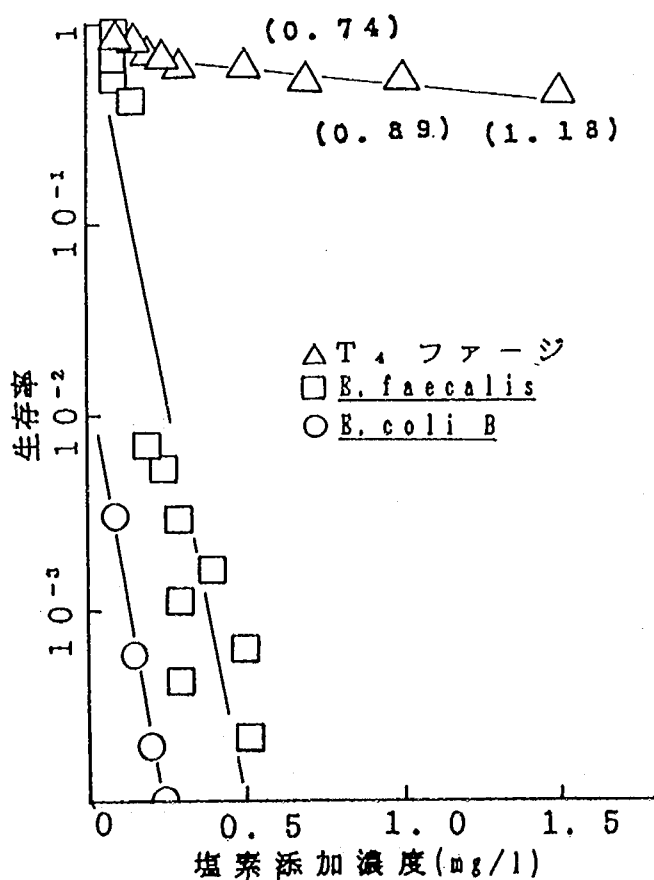


図-16 塩素耐性実験結果

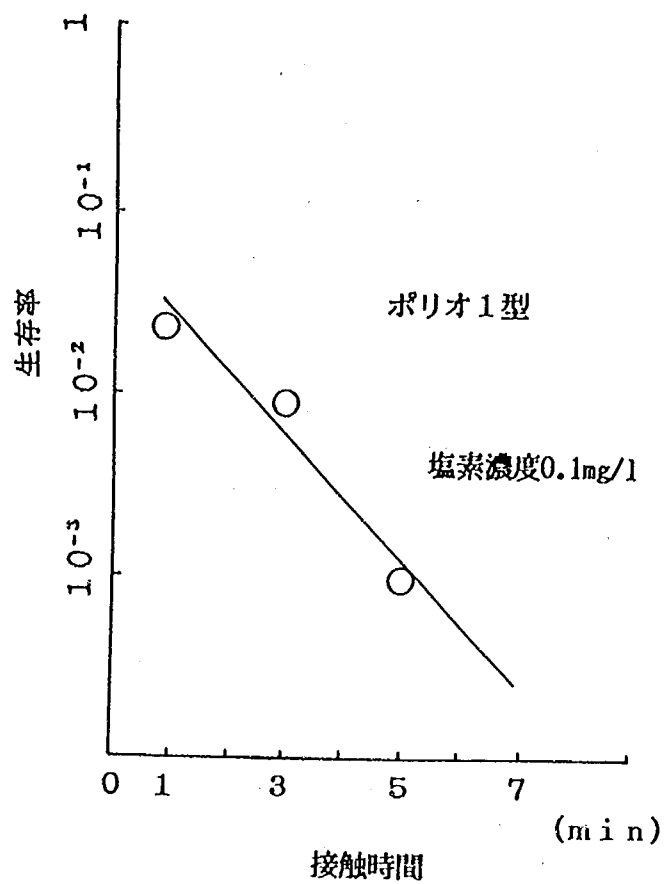


図-17 塩素耐性実験結果

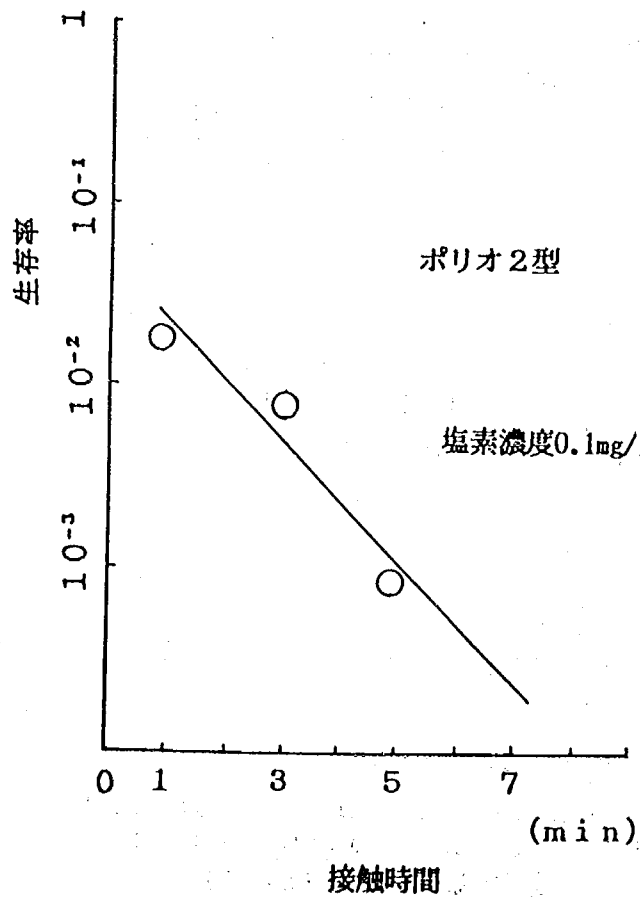


図-18 塩素耐性実験結果

詳細な検討が必要であることが考えられた。

今回の塩素耐性実験では耐性の強さはファージ、*E. faecalis* 株、*E. coli* 株、ポリオウイルスの順であった。塩素消毒に関しては、ウイルスに対する不活化効果の疑問から大腸菌群数指標の適切さが問われているが、今回の実験結果によれば、使用する細菌株やウイルス株の違いにより耐性が異なることが考えられるため、一概にそのようなことは言えないと思われる。

5-5 二次処理水中の消毒指標細菌及びファージの塩素耐性実験

(1) 実験目的

室内実験においてファージは、純粋株を用いて消毒耐性実験を行なうことができるが、実下水中、特に二次処理水中に存在する野性のファージは、重層寒天法による検出限界以下の濃度であるため、消毒指標細菌との関連性や塩素による消毒耐性など明確な傾向の把握が困難であった。そこで、直接ブランク法によりサンプル量を多くして二次処理水、塩素滅菌放流水中のファージ量の検出限界を高めることによって、二次処理水中の消毒指標細菌とファージの塩素消毒耐性の関連性を明確に把握することを目的として行なった。

(2) 実験方法

B下水処理場（分流式）の二次処理水を採水し、ただちに実験室に持ち帰り実験用サンプルとした。滅菌三角フラスコにサンプル1000mlを入れ、次亜塩素ナトリウムを所定の塩素濃度なるよう添加する。15分間接触させた後ただちにオルトトリジン法により残留塩素を測定すると共に、亜硫酸ナトリウムによって塩素の中和を行なった。各細菌群については、大腸菌群（M-FC培地、37℃）、ふん便性大腸菌群（M-FC培地、44.5℃）、腸球菌群（KF培地、37℃）を平板培養法又は、メンブランフィルター法により測定、さらに、*E. coli* K12 (F⁺)株を宿主菌とするファージを直接ブランク法により測定した。ファージ測定に用いた培地の組成は表-10と同様であり、操作手順はすでに述べたように培地1000ml中にCaCl₂を添加し、サンプル100ml、菌株1晩培養液を15mlをそれぞれ加えた後、ただちにシャーレ（230X80の角シャーレ）に分注し、固化させ37℃で1晩培養を行ない、翌日培地中に形成されたブランクを計数する。

水質分析項目は、水温、pH、電気伝導度、BOD、SS、NH₄-N、NO₂-N、NO_x-N、K-N、COD_{Cr}を測定した。

(3) 実験結果

直接ブランク法による二次処理水中のファージの定量結果を表-19に示す。RNAファージを感染させられる*E. coli* K12(F⁺)株を用いた定量結果は40PFU/100ml程度で比較的多数のファージが検出された。少量の検水を用いて測定した結果でないため正確であり、二次処理水中のファージの定量に利

表-19 定量結果	
採水日	E. coli K12(F ⁺)ファージ
8 / 1 5	4 5 PFU/100ml
9 / 1 2	4 0 PFU/100ml
9 / 1 9	3 7 PFU/100ml

表-20 水質分析表	
水温(°C)	26.7~ 27.3
pH	6.71~ 7.01
電導度(ms/cm)	0.421~ 0.545
SS(mg/l)	5 ~ 6
BOD(mg/l)	2.8~ 3.8
COD(mg/l)	12.9~18.2
NH ₄ -N(mg/l)	6.4~11.6
K-N(mg/l)	7.0~12.4

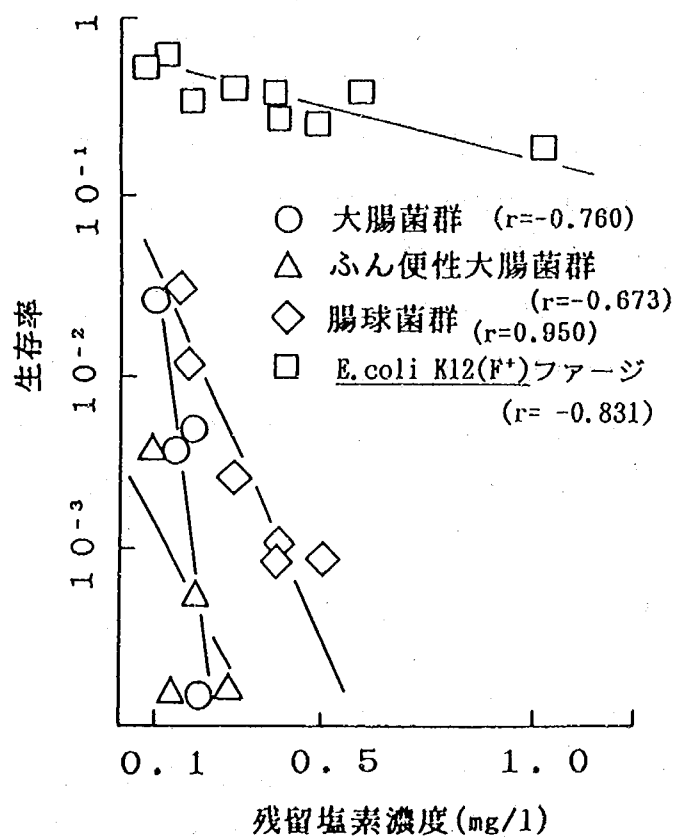


図-19 塩素耐性実験結果

用できると考えられる。

二次処理水中の消毒指標細菌及びファージの塩素耐性実験結果を図-19に示す。各々の塩素添加濃度は1~6 mg/lの範囲とし、残留塩素濃度は約0.1~1.0 mg/lとなった。なお水質分析結果を表-20に示す。大腸菌群、ふん便性大腸菌群とも残留塩素濃度0.3mg/l（接触時間15分）で0.01%程度の生存率となっている。それに対し、腸球菌群数をそれと同程度の生存率にするためには約0.6mg/lの残留塩素濃度が必要であり、大腸菌群などよりも塩素耐性があることがうかがえる。ファージについては、残留塩素濃度1.0mg/lで約20%の生存率となっており、消毒指標細菌よりも桁違いに塩素耐性が高いことがわかる。

二次処理水中の消毒指標微生物の塩素耐性実験から、それらの消毒耐性を把握することができた。すなわち不活化されにくい順にコリファージ、腸球菌群、大腸菌群、ふん便性大腸菌群であった。

純粋株を用いた塩素耐性実験結果と比較すると、それぞれ残留塩素濃度の微生物の不活化の程度は同様ではあるが、遊離型残留塩素と結合型残留塩素の殺菌効果を考慮すると、室内実験で用いた純粋株は実下水中に存在する同様な微生物よりも塩素耐性があると考えられる。

第6章 各種菌株、ファージ、ウイルスの紫外線耐性実験

6-1 実験目的

紫外線消毒技術は残留物質の生成などがなく、取り扱いが容易で、二次処理水の消毒には極めて有効であると言われている。

本実験は、紫外線消毒による各種菌株、ファージ、ウイルスの耐性を把握し、紫外線消毒指標微生物の検索を行うことを目的とするものである。

6-2 紫外線消毒の原理

細胞の核酸に紫外線が照射されると、化学変化によって損傷を受ける。この損傷は細胞にとって非常に有害であり、増殖不能になる。これが紫外線の消毒効果であり、波長260nm付近の紫外線で最も効率的に細胞の核酸が損傷される。核酸に対する紫外線の効果の代表的な例としては次のようなものがあると言われている。^{18) 19)} DNAの鎖上にチミン塩基が配列されており、紫外線照射されるとこれらの塩基に結合が生じる。この結果DNAの複製が難しくなる。RNAはチミン塩基を含まないため、上述したようなことはあてはまらないと考えられるが、RNA中のウラシル塩基の含有量が紫外線感受性と密接な関係があると言われている。

6-3 使用菌株、ファージ及びウイルス

第5章で使用した *E. coli* K12(F⁺) 株、*E. coli* B 株、*E. faecalis* 株の純粋株、ファージはRNAファージのMS 2、Q β ファージ、DNAファージのT₄ファージ、ウイルスはポリオ1、ポリオ2型の合計8種類の微生物を用いた。

6-4 実験方法

各種菌株1晩培養液、ファージ、ウイルスの調整液を生理食塩水(0.85%)で $10^3 \sim 10^4$ 濃度に希釈した後、実験用サンプルとした。サンプル約10mlを内径約9cmの滅菌シャーレに分注(水深約2mm、完全混合と仮定)し、紫外線照射を行った。紫外線強度は $200 \sim 500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ とした。紫外線強度測定は紫外線強度センサー(ウルトラバイオテック)を用いて測定した。

微生物の定量方法は第5章で用いた方法と同一である。

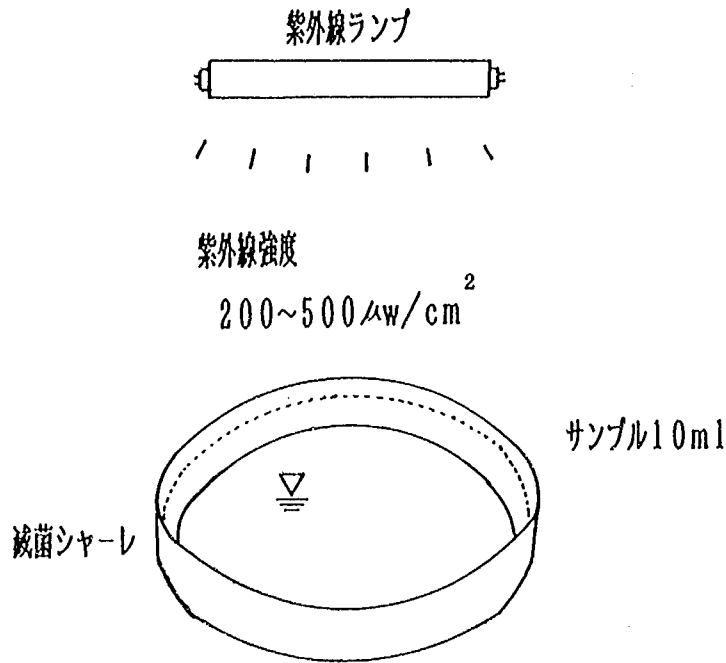


図-20 紫外線耐性実験装置

6-5 実験結果

紫外線耐性実験結果を図-21~26及び、表-21に示す。それぞれのファージは宿主菌に比べ、紫外線に対して耐性のあることがわかるが、 T_4 ファージだけは耐性が小さい。ポリオ1型、2型で比較した場合、同程度の耐性を示している。E.coli K12(F⁺) 株、E.coli B 株などは、紫外線量 $10 \text{ mW} \cdot \text{S} / \text{cm}^2$ において約0.01%の生存率であり、同様にE.faecalis 株は0.1%、MS2、Q β ファージは約10%、 T_4 ファージは $4 \text{ mW} \cdot \text{S} / \text{cm}^2$ で0.01%の生存率であった。ポリオウイルスにおいては $10 \text{ mW} \cdot \text{s} / \text{cm}^2$ で約1%の生存率である。

回分式実験のバクテリアの紫外線照射による不活化は一次式で近似されとしている。¹⁸⁾

$$N = N_0 \cdot \exp(-W \cdot t / K)$$

ここに、 N_0 : 初期濃度

N : 照射後の濃度

W : 紫外線強度 ($\mu \text{W} / \text{cm}^2$)

t : 照射時間(sec)

K : 速度定数 ($\text{mW} \cdot \text{S} / \text{cm}^2$)

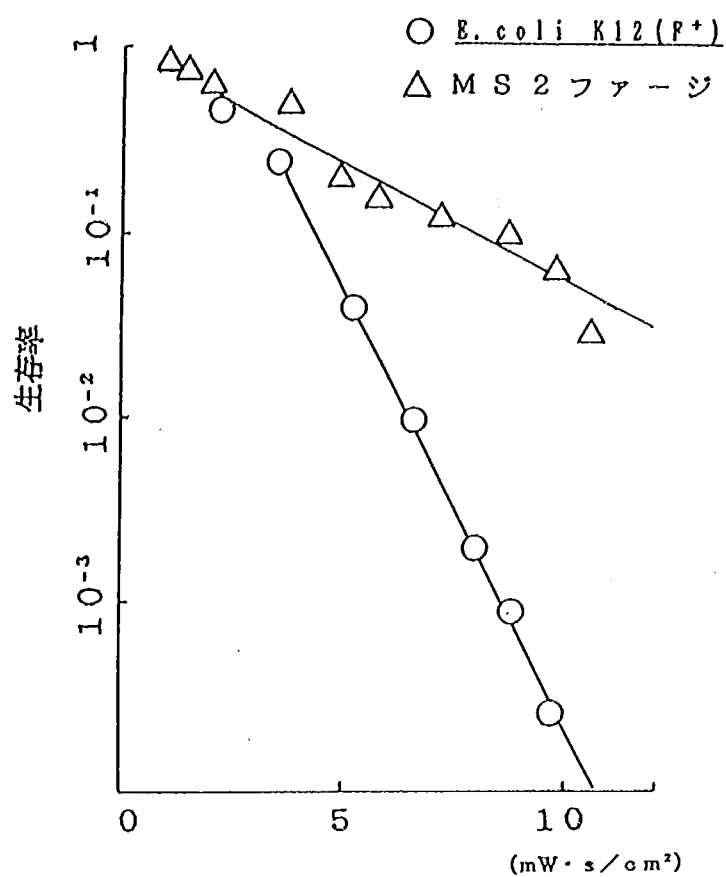


図-21 紫外線耐性実験結果

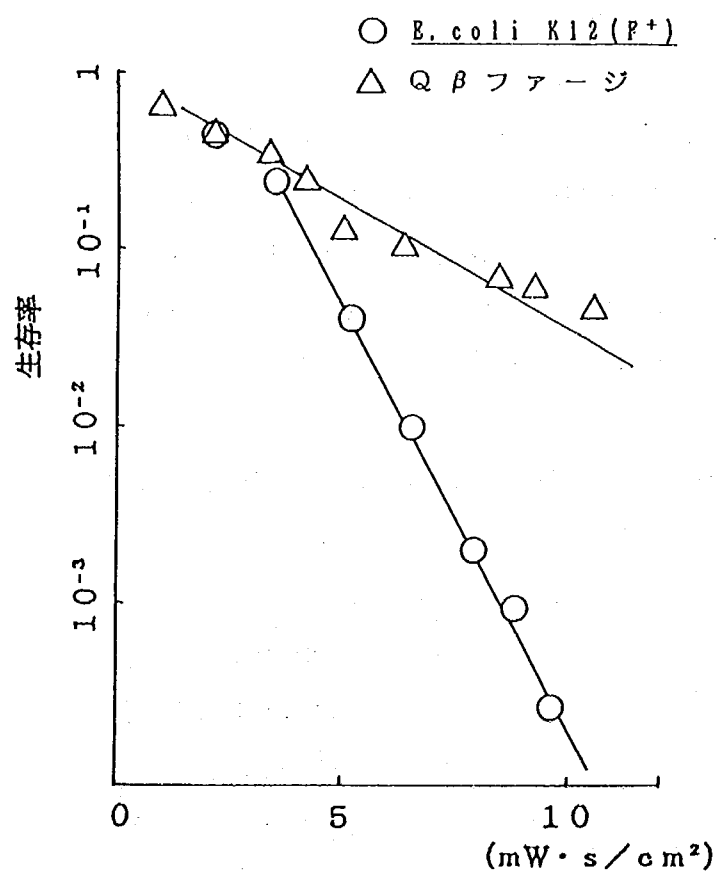


図-22 紫外線耐性実験結果

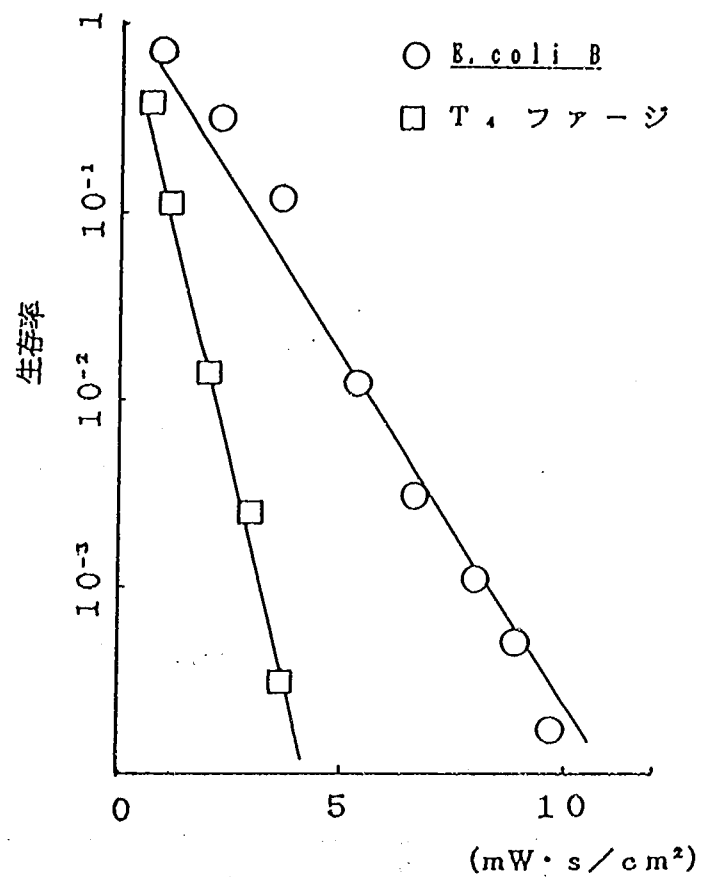


図-23 紫外線耐性実験結果

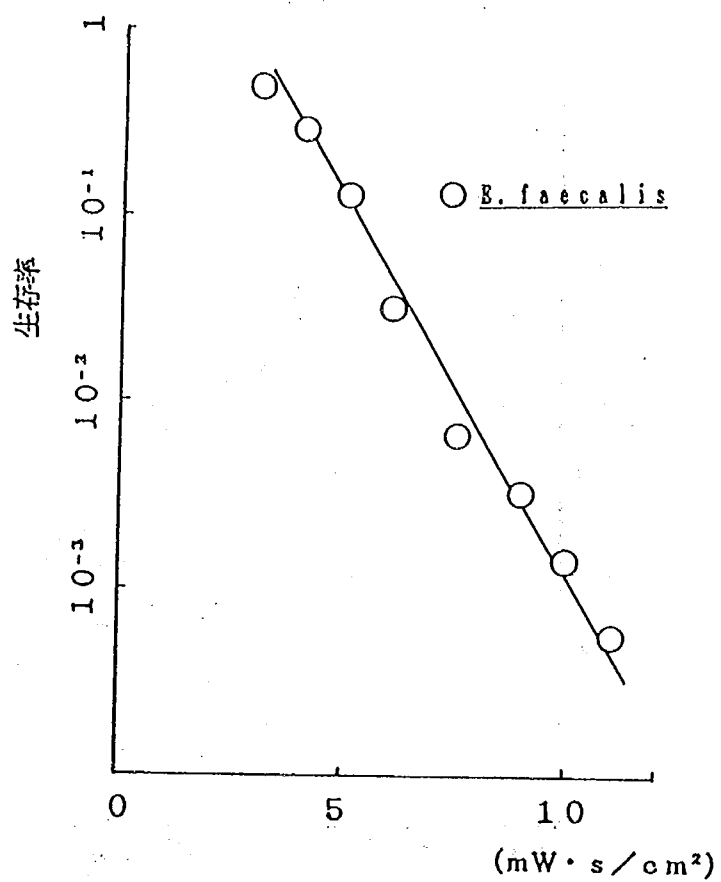


図-24 紫外線耐性実験結果

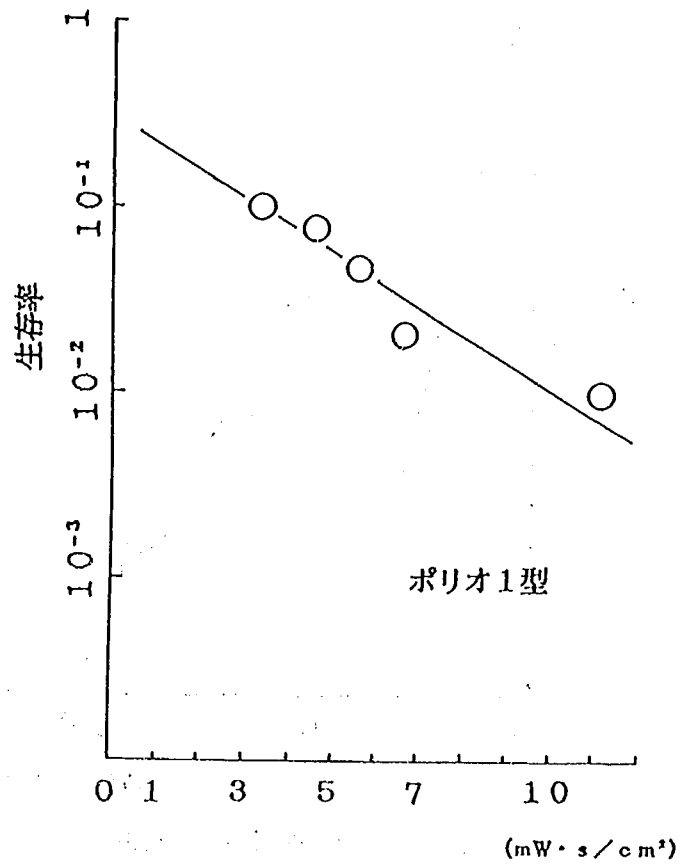


図-25 紫外線耐性実験結果

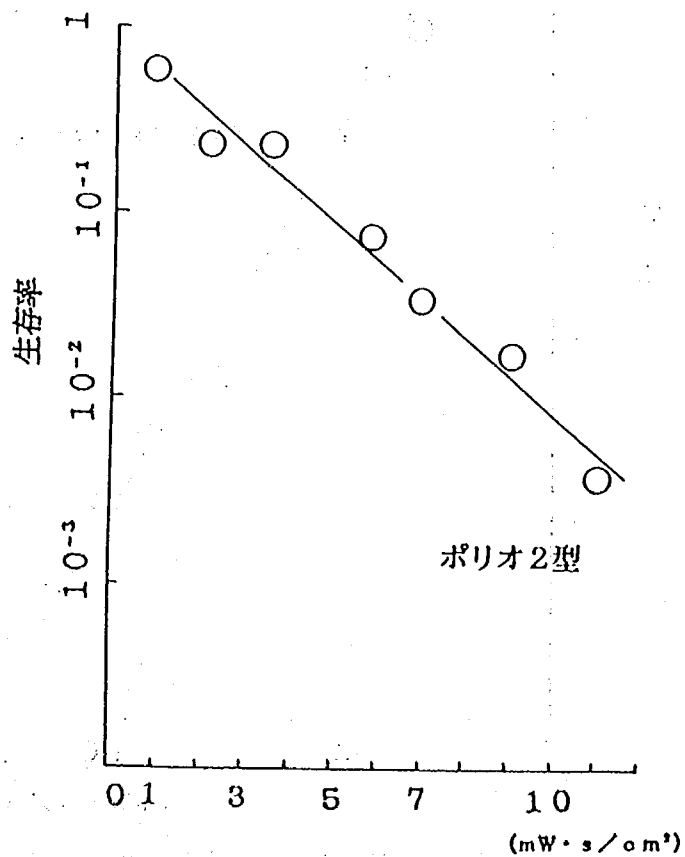


図-26 紫外線耐性実験結果

表-21 速度定数及び速度定数から求めた単位線量あたりの生存率

	<u>E.coli K12</u> (F ⁺)株	<u>E.coli B</u> 株	<u>E.faecalis</u> 株	MS 2 ファージ	QB ファージ	T ₄ ファージ	ポリオ1 ウイルス	ポリオ2 ウイルス
速度定数 ($\text{mW} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$)	1.48	1.43	1.90	3.77	3.04	0.44	1.96	2.01
生存率	0.51	0.50	0.59	0.77	0.72	0.10	0.60	0.61

不活化式から求めた速度定数及び単位紫外線量あたりの生存率を表-21に示す。細菌株の中ではE. faecalis 株が最も紫外線耐性があり、単位線量($1\text{mW}\cdot\text{S}/\text{cm}^2$)あたり約60%の生存率を示している。ファージについてはMS 2、Q β ファージが用いた8種類の微生物中最も紫外線耐性があり、単位紫外線量あたり約70~80%の生存率を示している。ウイルスはだいたい60%の生存率であり、E. coli 株よりも紫外線耐性はあるが、MS 2、Q β ファージよりも耐性は小さい。DNAファージであるT₄ ファージは宿主菌であるE. coli B 株よりも紫外線感受性が強く、すみやかに不活化されてしまっている。一般的にDNAを遺伝子として保持しているバクテリアはRNAを遺伝子として保持しているバクテリアよりも紫外線感受性が強いと言われており、ここでもその傾向がうかがえた。

第7章 各種菌株、ファージ、ウイルスのオゾン耐性実験

7-1 実験目的

近年、脱色、脱臭にその利用が注目されているオゾンには強い殺菌力があり、フランスなどでは水道水の消毒法として用いられている。

本実験は、オゾン消毒による各種菌株、ファージ、ウイルスの耐性を把握し、オゾン消毒指標微生物の検索を行なうことを目的とするものである。

7-2 使用菌株、ファージ及びウイルス

各耐性実験と同様に *E. coli* K12(F⁺) 株、*E. coli* B 株、*E. faecalis* 株の純粋株、ファージはRNAファージのMS 2、Q β ファージ、DNAファージのT₄ファージ、ウイルスはポリオ1型、ポリオ2型ウイルスの合計8種類の微生物を用いた。微生物の定量方法は第5、6章の場合と同一である。

7-3 実験方法

実験装置の概要を図-27に示す。実験方法は、各耐性実験と同様に $10^3 \sim 10^4$ 濃度に希釈したサンプル

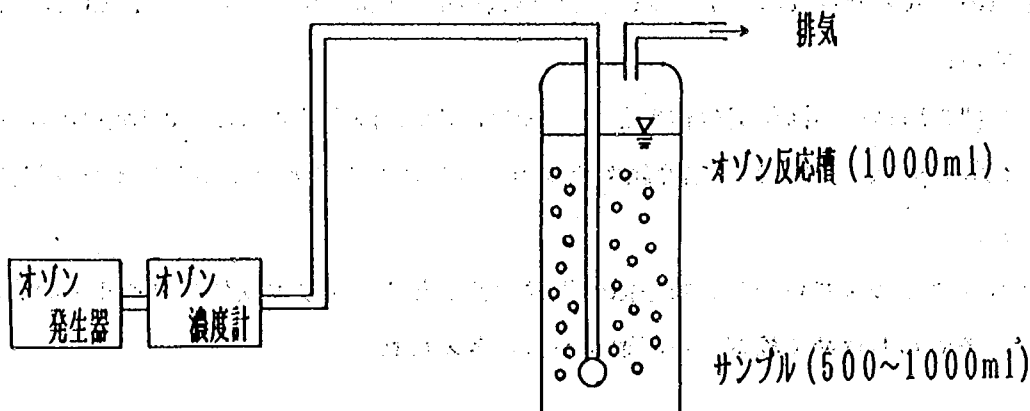


図-27 オゾン耐性実験装置

ル500～1000mlをガラス製反応槽に注入し、オゾンを経接触反応させた。オゾン注入濃度は0.1～1.0mg/lとし、オゾンガス濃度の測定はオゾン濃度計を用いると同時に、オゾン検知管によっても測定した。

7-4 実験結果

オゾン耐性実験結果を図-28～29に示す。オゾン注入率は、液相での低濃度のオゾン濃度測定が困難なため、気相のオゾン濃度から次式により注入率を求めた。¹⁶⁾

$$\text{注入率(mg/l)} = C \times t \times 2 \times 48 \times 10^{-3} / 22.4 \times 1$$

ここに、C：気相オゾン濃度(mg/l)

2：1分間のオゾン吹込み量(l)

10^{-3} ：(mg/l)単位に換算

1：反応槽の容量

t：接触時間(分)

48：オゾンの分子量

22.4：気体定数

なお、オゾンの吹込み濃度は約100～200mg/lとした。

すべての細菌株において、オゾン注入率0.4mg/lの濃度により、約99%の不活化率となっており、塩素、紫外線耐性実験とは違いE. coli株とE. faecalis株との明確な耐性の差があまり現われておらず、E. faecalis株のオゾン耐性は他の菌株と同様であることがわかった。ファージにおいては、オゾン0.3mg/lの注入率では生存率が約70～80%と菌株などと同様であるが、注入率の増加にともない耐性を現わし、1.0mg/lの注入率で各々のファージの生存率は約20～50%となっており、菌株に比べ強いオゾン耐性を示している。

ポリオ1、2型を用いた不活化実験結果を表-22に示すが、両ウイルスとも0.1mg/lのオゾン注入率で0.2%程度の生存率であり、消毒指標細菌やファージに比べポリオウイルスはオゾン耐性が小さい結果となった。

しかし、ポリオウイルスだけをを用いた不活化実験であるため、ポリオ以外のウイルスの使用が可能であるならば、それらも含めて検討する必要があると考えられる。

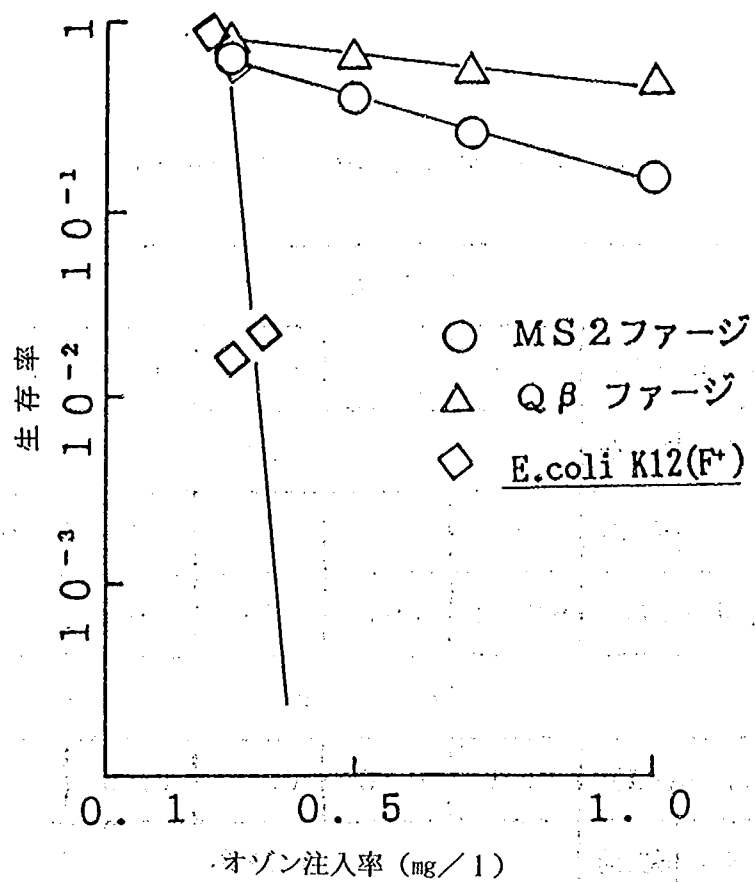


図-28 オゾン耐性実験結果

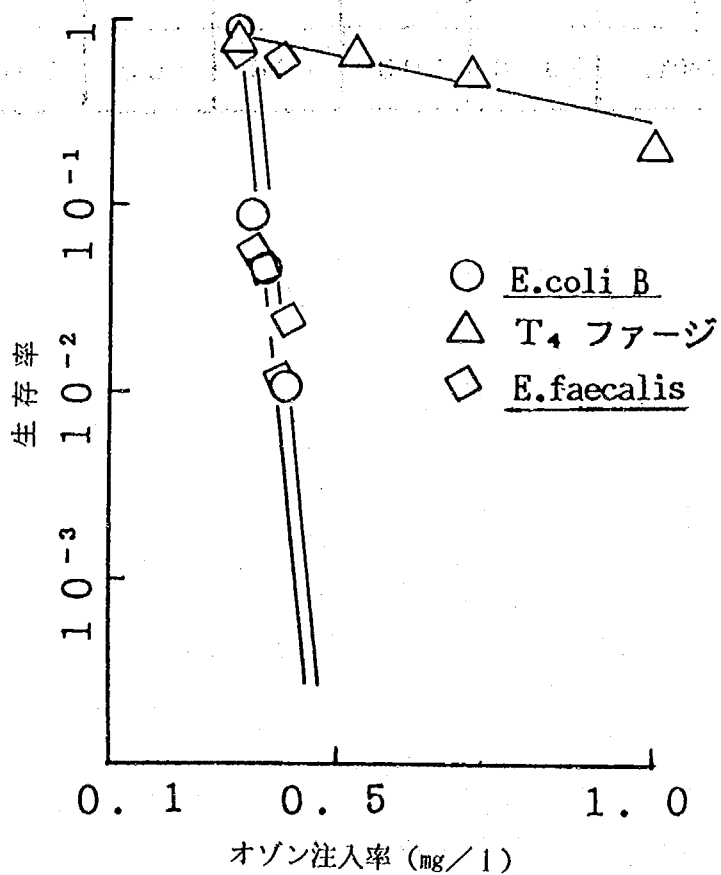


図-29 オゾン耐性実験結果

表- 22 オゾンによるポリオウイルス不活化表

Polio I					
注入率 (mg/ℓ)	0. 1	0. 2	0. 3	0. 5	1. 0
ウイルス	吹込前	1 2 6 0			
PFU/ml	接触後	2	0	0	0
不活化率 (%)	99. 8	100	100	100	100
Polio II					
注入率 (mg/ℓ)	0. 1	0. 2	0. 3	0. 5	1. 0
ウイルス	吹込前	1 5 2 3			
PFU/ml	接触後	3	0	0	0
不活化率 (%)	99. 8	100	100	100	100

第8章 下水中のファージの特性及び近縁性

8-1 下水中のRNA ファージの存在割合

塩素、紫外線、オゾンの耐性実験により、RNA ファージは各種菌株、各種ファージ、ウイルスよりも耐性があった。そこで下水中のRNA ファージの存在割合を調べたのがR Nase (RNA 分解酵素) 添加実験である。E. coli K12 (F⁺)株はRNA ファージが感染する特異的な菌株であるが、感染するファージ全量がRNA ファージであるとは限らない。そこで、RNAファージを不活化する作用を有するR Naseを添加した場合と添加しない場合の差し引きによって、RNAファージ量を推定した。調査結果を図-30に示す。それぞれB、C処理場の流入下水、一次処理水を用いた結果より、だいたいE. coli K12(F⁺) 株に感染するファージの50～60%程度がRNA ファージであることが確認された。

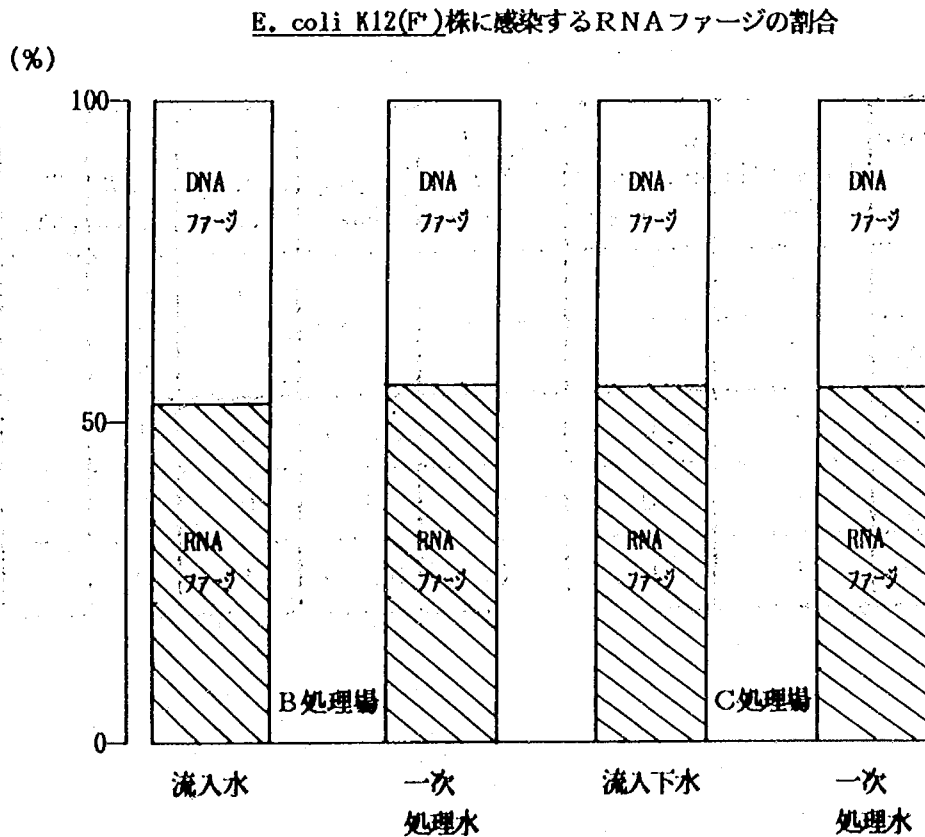


図-30 R Nase添加実験

8-2 ファージの近縁性

各実験に用いたファージの近縁性および純粋性を確認するため、各種菌株に対し各々のファージを接種する実験を行った。表-23の値はそれぞれ対応菌に対するプラーク形成数を100% (1としたとき) と考えたときのプラーク数比である。MS2、Q β 、T₄ファージ以外のファージは下水中より分離培養した野性のファージである。E. coli B ファージとT₄ ファージ以外のファージは対応菌とのプラーク形成のみであることがわかる。E. coli B ファージはT₄ファージのE. coli K12(F⁺)株とE. coli C株の感染割合からT系ファージと推測される。

E. coli B ファージ、T₄ ファージは E. coli K12(F⁺) 株、E. coli C 株にも感染する性質を持っている。よってE. coli K12(F⁺) ファージ、E. coli C ファージもE. coli B 株にも感染することが考えられるが、実際には感染しない。これは、E. coli K12(F⁺) 株、E. coli C 株で作られたファージは修飾制限酵素の働きにより、他の菌株には感染できなくなることによるものである。E. coli B 株でつくられるファージについては、修飾制限酵素の働きがないため、E. coli B 株以外のE. coli K12(F⁺) 株、E. coli C株にも感染できると考えられる。¹⁷⁾

表-23 ファージの近縁性

Phage 菌 株	<u>C. freundii</u> Phage	<u>E. aerogenes</u> Phage	<u>E. coli K12</u> (F ⁺) Phage	<u>E. coli B</u> Phage	<u>E. coli C</u> Phage	Q β Phage	MS2 Phage	T ₄ Phage
<u>C. freundii</u>	1	0	0	0	0	0	0	0
<u>E. aerogenes</u>	0	1	0	0	0	0	0	0
<u>E. coli K12(F⁺)</u>	0	0	1	0.88	0	1	1	0.86
<u>E. coli B</u>	0	0	0	1	0	0	0	1
<u>E. coli C</u>	0	0	0	0.18	1	0	0	0.13

第9章 不活化実験についての考察

細菌株、ファージ及びウイルス合わせて8種類の微生物を使用し塩素、紫外線、オゾンの耐性実験を行なった。本実験の結果は、特に塩素、オゾン消毒法に対し、細菌株及びウイルスの不活化率とファージの不活化率の程度が大きく異なる可能性を示している。ウイルスなどにおいては、ウイルスの種類によって NaCl 、 CaCl_2 、 KCl などの無機塩類の添加により塩素耐性の減少のみられるものや、逆に塩素消毒効果の阻害が認められる場合などがあると言われており、さらに詳細な実験検討が必要であると考えられる。

多少実験条件が異なるかもしれないが、文献値¹⁰⁾のポリオ1型ウイルスの塩素、オゾン耐性と、本実験のMS2ファージを比較したのが図-31である。MS2ファージの塩素、オゾン耐性は、ポリオ1型ウイルスを上回る可能性を示している。

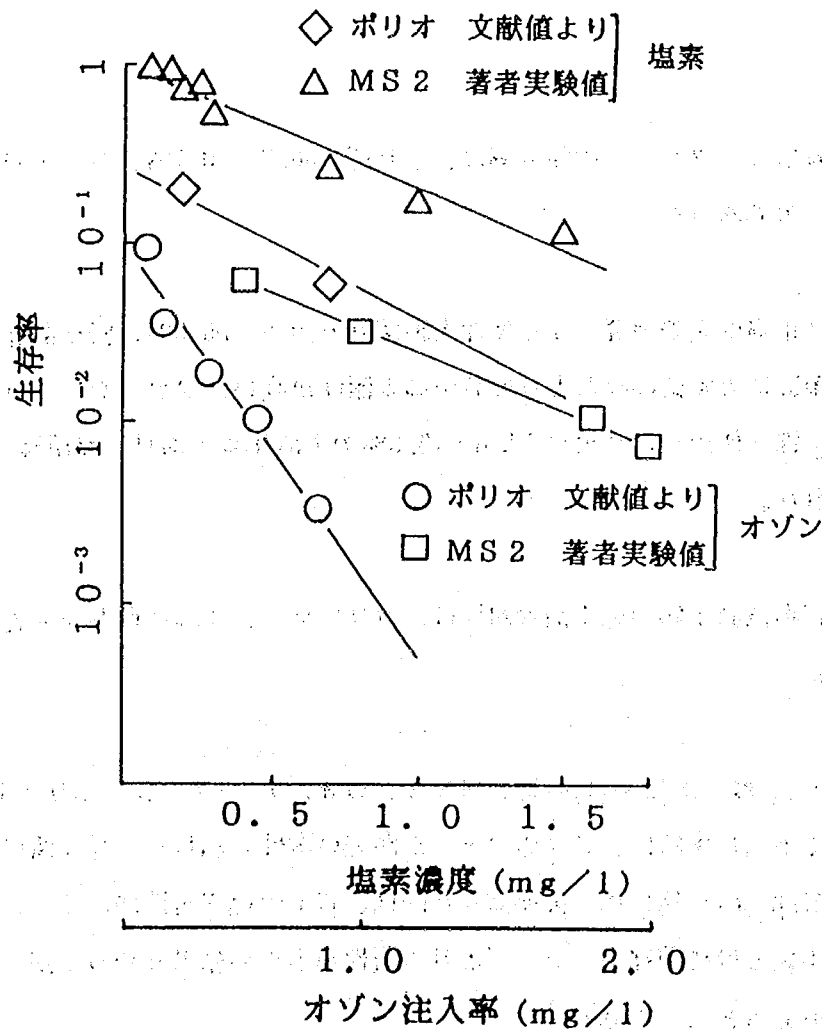


図-31 耐性比較図

本研究を総括すると次のようになる。

- 1) わが国における水の衛生学的基準は、概ね大腸菌群数により定められており、そのレベルは、飲料水等の“検出されないこと”から、下水放流水の3000個/ml以下の範囲にある。また、ふん便汚染の指標として、大腸菌群を補完するものとして、ふん便性大腸菌群、腸球菌群がある。また、水中ウイルスの指標として有望視されているものにバクテリオファージがある。
- 2) 下水中のファージの優占種は、調査対象とした E.coli 型、C.freundii 型、E.cloacae 型、E.aerogenes 型、E.faecalis 型の中では E.coli 型であった。
- 3) 二次処理水及び放流水中のファージの定量に直接プラーク法を用いた結果、100ml中およそ30～700PFUのファージが検出できた。よって、直接プラーク法は処理水中のファージの定量に利用できると思われる。
- 4) 活性汚泥処理での細菌と、ファージの除去率は、それぞれ96.3～99.7%、91.2～99.9%の範囲内にあり、ほぼ一致するものであった。
- 5) 塩素消毒による不活化率は大腸菌群、ふん便性大腸菌群で99.6～99.8%、腸球菌群で94.5～98.7%となっており、腸球菌群は大腸菌群などよりも若干塩素耐性が高い。ファージについては、E.coli K12(F⁺) 株、E.coli B 株を使用した結果から5.8～73.5%の不活化率であり、細菌株より、塩素耐性が高いことが確認された。
- 6) 二次処理水中の消毒指標微生物の塩素消毒耐性は、コリファージ≫腸球菌群>大腸菌群>ふん便性大腸菌群の順であった。
- 7) 8種類の純粋株 E.coli 株、E.faecalis 株、MS 2、Q β 、T₄ファージ、ポリオ1、2型ウイルスを用いた塩素による不活化実験は、各々のファージが強い耐性を示した。腸球菌群の構成菌の一種である E.faecalis 株は E.coli 株に比べ実態調査と同様、若干の塩素耐性があった。ポリオ1、2型ウイルスは、今回の実験では細菌株やファージよりも耐性が小さい結果となったが、実験条件等さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

文献値との比較によれば、MS 2ファージは、ポリオ1型ウイルスよりも塩素耐性があるものと考え

えられる。

8) 紫外線による消毒耐性は、MS 2、Q β ファージ>ポリオウイルス>E. faecalis 株>E. coli 株>T ϕ ファージの順であった。

9) オゾンによる耐性実験では、各々のファージは細菌株に比べ強いオゾン耐性を示した。しかし、ポリオ1、2型ウイルスは0.1mg/lのオゾン注入率で99.8%の不活化率であった。

塩素耐性実験と同様、文献値との比較によれば、MS 2ファージは、ポリオ1型ウイルスよりもオゾン耐性があると考えられる。

10) コリファージの特徴から、E. coli K12(F⁺) 株、E. coli C 株でつくられたファージは修飾制限酵素の働きにより、他の菌株には感染できなくなる。しかし、E. coli B 株でつくられるファージについては、修飾制限酵素の働きがないため、E. coli B 株以外のE. coli K12(F⁺) 株、E. coli C 株にも感染できる。純粋株ファージ、下水中に存在する野性株ファージについても、ファージの近縁性実験から同様な結果が得られた。

11) 下水中のRNAファージの存在量を推定するため、RNAase添加実験を行い、その結果から、E. coli K12(F⁺) 株に感染するファージの50~60%のファージがRNAファージであることがわかった。

今後の課題

これらの不活化実験の結果については、なお詳細な実験例を重ねて行く必要があると考えられる。さらに、各消毒プロセスの組合せによる消毒効果の検討を行なうとともに、代替消毒技術を処理水消毒法として適用する際の問題点についても、今後検討を加える予定である。

<参考文献>

- 1) 建設省下水道部監修、日本の下水道、平成元年
- 2) J.C. Hoff, et al. " Comparison of the Biocidal Efficiency of Alternative Disinfections " J.AWWA 73(1) 1987.
- 3) 合田 健 編、水質工学応用編、丸善
- 4) 内藤、藤田共著、改訂 上水道工学演習、学献社
- 5) 日本水産保護協会、「水産環境水質基準」1972.
- 6) 丹保、南部監訳、「ウェーバー水質制御の物理化学的プロセス」、朝倉書店 1974.
- 7) 大垣 眞一郎、「下水処理水の消毒、水質汚濁研究」Vol.11, No.5 1988.
- 8) 杉木 昭典、「水質汚濁—現象と防止対策—」、技報堂出版 1975.
- 9) 日本下水道協会、下水道試験法、1984年版
- 10) 芦立 徳厚、「水質環境基準項目としての大腸菌群の評価」用水と廃水、Vol.30, No.3 1988.
- 11) 例えば、矢野 一好ら、「下水中のウィルスの消毒とその不活化に関する研究」用水と廃水、
Vol.27, No.5 1985.
- 12) 金子 光美、「下水処理水活用の衛生学的課題」下水道協会誌、Vol.24, No.279 1987.
- 13) Dart. R. K. Stretton (市川 邦介他訳)、「環境問題と微生物」講談社、1979.
- 14) 善養寺、斎藤編、「腸炎—成因と臨床」納谷書店、1986.
- 15) W. O. K. Grabow, P. Coubraugh, " Practical Direct Plaque Assay for Coliphages in
100ml Samples of Drinking Water "
Applied and Environmental Microbiology, Vol.52, No.3 1986.
- 16) 矢野 一好ら、「下水中のウィルスの消毒とその不活化に関する研究、第3報、第4報」
用水と廃水、Vol.27, 1985.
- 17) J. チャーファス著 (鈴木 堅之訳)「人工生命—2章—制限酵素」培風館
- 18) U.S.EPA, "Design Manual, Municipal Wastewater Disinfection" EPA/625/1-86/021 Oct.1986.
- 19) 岡田、石浜編「遺伝子としてのRNA—第1章—遺伝子RNAの起源と進化」講談社
- 20) 微生物研究法懇談会編、微生物学実験法
- 21) 富沢 純一著、「バクテリオファージの実験法」岩波書店
- 22) 諏訪 守ら、「下水処理水の消毒指標微生物の検索」土木学会第44回年次学術講演会講演集、
1989.
- 23) 土木研究所資料、第2787号、昭和63年度、「下水道関係調査・研究年次報告書集」
- 24) 諏訪 守、土木研究所発表会、講演集 1989.

謝辞

研究を進めるにあたって、A、B、C下水処理場の諸氏には下水の採水等に関して、東海大学医学部古瀬浩介博士、横須賀市下水道部村田省平氏には細菌株などの分与に関して、それぞれ多くの協力を得た。ここに記して感謝いたします。

下水処理水の滅菌及び消毒に関する
研究報告書

ISSN 0386--5878
土研資料 第2859号
平成2年3月(1990)

三次処理研究室 佐藤 和明
小越真佐司
諏訪 守

要 旨 下水処理水再利用にあたって、処理水の衛生学的安全性について検討を行い、衛生学的基準のあり方の整理を行った。さらに、塩素、紫外線、オゾンの耐性実験を行い、各々の消毒指標微生物の消毒耐性を把握した。

キーワード：大腸菌群，バクテリオファージ，ウイルス，塩素，紫外線，オゾン

○

郵便はがき

3 0 5 - □ □

四十一円切
手をはって
下さい。

建設省土木研究所

三次処理研究室 行

茨城県つくば市旭一番地

No. _____

No. _____

配布先住所

配布先氏名

○

○

土木研究所資料 第 2 8 5 9 号 部

上記のとおり受領しました。

所 属 (住所)

氏 名 印

○