

大腸菌群数迅速計測手法による高速
オゾン消毒システムの効率化
に関する研究

2009年2月

守川 彰

目次

第1章 序論	1
第1節 概説	1
第2節 微生物迅速計測技術の既往研究と課題	3
第3節 本論文の目的と構成	7
参考文献	10
第2章 大腸菌群数の迅速計測技術に関する基礎的研究	13
第1節 概説	13
第2節 大腸菌群数計測フローの迅速化の実現と高感度化	14
2-2-1 概論	14
2-2-2 研究方法	18
2-2-3 結果および考察	27
第3節 大腸菌数計測に関する基礎的検討	49
2-3-1 概論	49
2-3-2 研究方法	50
2-3-3 結果および考察	50
第4節 結語	52
参考文献	53
第3章 大腸菌群数計測法の装置化と性能評価に関する研究	55
第1節 概説	55
第2節 大腸菌群数計測法の装置化	55
3-2-1 概論	55
3-2-2 装置構築	56
3-2-3 装置動作	56
3-2-4 基本性能の確認	68
第3節 実証装置の性能実証	69
3-3-1 概論	69
3-3-2 研究方法	69
3-3-3 実験結果および考察	78
第4節 結語	87
参考文献	88
第4章 雨天時未処理下水のオゾン消毒に関する基礎的研究	90
第1節 概説	90
第2節 フィールド実験装置による高速オゾン消毒	91
4-2-1 概論	91
4-2-2 研究方法	92

4-2-3 結果および考察	99
第3節 オゾン消毒への各種水質項目の与える影響と安全性	117
4-3-1 概論	117
4-3-2 研究方法	118
4-3-3 結果および考察	119
第4節 結語	129
参考文献	130
第5章 大腸菌群数計測装置による高速消毒システムの開発	131
第1節 概説	132
第2節 二次処理水の消毒シミュレーション	132
5-2-1 概論	132
5-2-2 シミュレーションモデルの構築	132
5-2-3 シミュレーション計算方法	141
5-2-4 計算結果および考察	141
第3節 雨天時未処理下水の消毒シミュレーション	147
5-3-1 概論	147
5-3-2 シミュレーションモデルおよび計算方法	148
5-3-3 シミュレータの妥当性評価	149
5-3-4 シミュレーション計算方法	153
5-3-5 計算結果および考察	156
第4節 結語	163
参考文献	164
第6章 結論	166

本論文に関連のある主な報告
謝辞

第1章 序論

第1節 概説

我が国においては、急速な人口増加、都市化の発展、生活水準の向上、産業の発展等により、生活排水や産業排水が増大しており、そのため下水道の普及および老朽化した下水道施設の改修が以前から継続して実施されている。下水処理場において活性汚泥処理後の二次処理水は、放流直前に塩素による消毒が行われているが、塩素は残留性があるため、河川や海域の生態系に影響を及ぼすことが懸念されており、生態系に優しい消毒方法が求められている。消毒は大腸菌群数を指標として規制されており、下水試験方法で定められている大腸菌群数の測定方法の一つであるデソキシコレート寒天培地法により培養操作によって計数する方法で定期的に試験が実施されている。しかし、本方法は測定に18時間以上必要であることから、大腸菌群数の測定値に応じて消毒剤の注入量をリアルタイムで制御することは困難である。そのため、二次処理水の消毒に際して消毒剤は経験則により、どちらかという安全側に過剰に注入されてきた。しかし、放流先の環境影響やランニングコストを考慮すると、今後は放流基準である大腸菌群数 3,000 CFU/mL (個/cm³) 以下を実現しながら、消毒剤の残留量がほとんどない、すなわち過不足の無い消毒を行なうことが望ましい。

一方、古くから下水道の普及に取り組んできた都市では、汚水と雨水を同一の管きよで速やかに排除する合流式下水道が採用されている。合流式下水道の整備区域では、雨天時に遮集管きよ能力を超える雨水と汚水が混合した未処理下水が公共用水域に放流され（いわゆる「越流水」の問題）、公共用水域における生態系への影響や衛生学的安全性に係る影響が懸念されるようになった。これに対応し、平成14年度に国土交通省のリードにより「下水道技術開発プロジェクト（SPIRIT21）」がスタートし、「消毒技術に関する開発研究」に関しては、開発目標として、「ポンプ場等からの排水について大腸菌群数を 3,000 CFU/mL 以下とし、かつ消毒の能率化がはかられ、および消毒により下流側水域に影響

を与えないような工夫がなされている技術」を目標と設定された。この場合、二次処理水の場合と同様に、排出水の状況に応じた過不足の無い消毒を行った方が望ましいのは、言うまでもないことである。

これまでに知られている迅速微生物計測法としては ATP（アデノシン-3-リン酸）の活性を測定する方法があり、非常に高速に測定可能であるが、大腸菌群数を直接測定するものではないため、適正に消毒制御することは困難である問題がある。また、他に提案されている迅速測定法についても現場において安定的に測定可能なものは実用化されていない現状である。

そこで筆者らは、培養を行わず、大腸菌群が所持している酵素の活性を利用して測定する蛍光酵素法に着目した。その第一の理由として、30分以内の迅速測定が実現可能である点である。これは従来の培養による操作を行うのではなく、大腸菌群が所持する、もともとの酵素活性を測定することに起因する。第二の理由としては、装置を構成するための機構が非常に単純化が可能である点である。具体的には大腸菌群を含んだサンプルに試薬を混合し、一定温度に保温した上で、蛍光を測定するというものであり、連続測定可能な自動装置を構築する上で有利である。第三の理由としては 10^2 CFU/mL \sim 10^6 CFU/mLという広い大腸菌群数の範囲で測定することができるため、サンプルを希釈または濃縮操作を行うことなく大腸菌群数の変動に対応して測定できる点である。

国内、海外を問わず、大腸菌群数を迅速に測定する方法や迅速測定装置を用いた消毒方法について検討された事例や報告は非常に少ない。これまでは実験室内の清浄な環境では良好に再現性高く測定できても、実環境である二次処理水や雨天時の未処理下水には測定を妨害する物質の混入などの要因が予想されるため、適用は困難と考えられてきた。従って筆者らは、蛍光酵素法を利用した迅速大腸菌群数測定の原理実証を行った上で、実際の二次処理水や雨天時の未処理下水への適用にあたっての問題点を解決した上で、大腸菌群数迅速測定装置を構築し、さらには大腸菌群数迅速測定装置を利用したオゾン消毒システ

ムを想定した場合の消毒効果および消毒剤節減効果について一連の研究を行った。

以下の第2節では、微生物数の迅速計測方法に関するこれまでの研究経緯から、これまでの課題と纏める。さらに自動計測装置についてこれまでの既往研究について、その特性について示す。続いて第3節では、本研究の目的と構成を記す。

第2節 微生物迅速計測技術の既往研究と課題

1-2-1 微生物数の迅速計測方法

大腸菌群に限らず、微生物の定量方法には伝統的に培養法^{1) 2)}が用いられてきた。これは栄養基質が含まれている液体培地または寒天培地に、微生物を含んだ液体サンプルを植菌し、通常15時間以上培養した後に、推定試験や確定試験を行った後、液体培地ではMPN法（最確数法）、寒天培地では形成されたコロニーをカウントすることで微生物数を求めるというものである。

この方法は微生物の増殖現象を利用するため、測定に長時間必要であり、例えば下水試験方法¹⁾で規定されているデソキシコレート寒天培地法は、18時間必要である。しかし現実には、測定の現場などでは直ちに微生物数を知りたい場合も多く、培養法では間に合わない場合も多い。下水処理場の二次処理水をデソキシコレート寒天培地法で18時間後に得られた測定値を用いて、制御を行っても測定結果が得られた時点では既に二次処理水の水質は変化しており、この時点で制御を行うことは、あまり意味が無いものと考えられる。

これに対し、可能な限り迅速に微生物数を測定するために過去に研究されてきたが、大きく分けて二つの手法に分かれる。一つはこれまでと同様に培養法を利用しながらも培養時間をできるだけ短くしようというものであり、他方は培養以外の全く異なる原理を利用するというものである。

培養時間を短縮する方法については、例えば、微生物の増殖と代謝によって生じる生化学変化を、培地の電気的特性の変化として検出する報告例³⁾が存在する。これは具体的には、検体中に最初に存在した微生物数の対数と、インピーダンスとコンダクタンスの変化の検出所要時間との間に直線的な関係が存在することを利用するものであり、この方法によれば 10^5 CFU/mLのレベルの生菌数を7~8時間以内に検出できたという。しかし、それでも測定に数時間必要であり、通常は微生物の生化学反応には立ち上がり時間が1時間程度必要とされていることから、これ以上の迅速化は原理的に困難であるものと考えられる。

微生物、特に大腸菌群の酵素反応に着目して測定する方法は、培養、非培養を問わず、研究されてきた。培養法で短時間で測定する方法の他の例として、KilianとBulow⁴⁾は腸内細菌科の簡易迅速な同定法の研究を行った結果、大部分の大腸菌群の細菌と大腸菌が β -ガラクトシダーゼ活性が陽性であり、大腸菌は β -グルクロニダーゼ活性が陽性となることを見出した。この成果を利用して、迅速に大腸菌群数または大腸菌を測定する手法として、上水試験方法²⁾で採択されているMMO-MUG法（特定酵素基質培地法）が開発された。これは大腸菌群および大腸菌に対する必要最低限の基質として、ONPG（オルト-ニトロフェリル- β -ガラクトピラノシド）とMUG（メチルウンベリフェリル- β -グルクロニド）を利用し、18~24時間で検出する手法で、定量にはMPN法が利用されている。この手法は、推定試験や確定試験を必要とせず、またデソキシコレート寒天培地法のようにコロニーのカウントに経験を要することもなく、簡易的に大腸菌群数と大腸菌数を測定可能であるが、1時間以内に測定することは以前と同様に困難であり、迅速に測定できない課題は依然として残されている。

Fiksdalら⁵⁾は、非培養操作により迅速に大腸菌群数を測定するため、前述の特定酵素基質法の変法として、ONPGではなくメチルウンベリフェリル- β -ガラクトピラノシドを基質とした大腸菌群の迅速測定法（蛍光酵素法）について研究した。それによれば、培養操作なしで大腸菌群の β -ガラクトシダーゼの酵素活性を利用することで25分間で計測できたものの、誤差要因も多く特に下水中

の測定は β -ガラクトシダーゼ活性を持つ非大腸菌群の微生物が 10%程度含まれており、それが大腸菌群数測定の誤差要因となることを示した。

また Tryland ら⁶⁾ は、Fiksdal らの研究を継続し、蛍光酵素基質を含んだ栄養培地を添加、培養後に β -ガラクトシダーゼ活性を測定する装置をテムズ川の現場に設置して、河川水をサンプルとした 8 ヶ月間連続測定を実施し、特定酵素基質法との相関を調べた。その結果、夏の 7 月において特定酵素基質法の測定値よりも過大になる結果となったが、大腸菌群以外の微生物や光損傷などで培養不可の大腸菌群が増加したことが原因と推測した。

また、非培養法で酵素の活性を利用した方法以外では、同様に微生物の持つ特異的物質を利用するもので、抗原、ATP、ファージ DNA に着目した方法が検討されている。

福岡、野瀬、高瀬ら^{7)~9)}は、大腸菌の持つ抗原として、 β -ガラクトシダーゼに注目し、これを元に作製した抗体を利用して、大腸菌群を高感度に測定している。これはいわゆる抗原・抗体反応を利用するものであるが、微生物の細胞から β -ガラクトシダーゼを抽出する前処理が必要であることから、超音波処理による前処理、フィルタ濃縮+液相への回収、洗浄というプロセスが必要である。また試薬も冷蔵保管が必要な物質が多く自動装置の構成は複雑なものとなっている。測定時間については最低 2 時間程度必要であり、培養法に比べれば高速であるが、更なる高速化という点で課題が残る。

矢野、野上、鳥羽ら^{10)~12)} は、大腸菌の細胞に特異的に感染する T4 ファージの DNA をアクリジンオレンジで蛍光標識しておき、感染後の大腸菌細胞内ファージ DNA の蛍光をフローサイトメトリで検出する方法について検討した。フローサイトメトリーの非常に細い管に細胞を一つ一つ流し、レーザー+光電子増倍管により蛍光を検出する仕組みであるため、原理的には細胞 1 つから検出可能であるが、下水等に含まれる微粒子や芥雑物の影響を除くことは困難であり、

フローサイトメトリの配管と SS の大きさが同程度であることから、閉塞防止の対策が必須であり、この問題を解決するのは困難であると考えられる。

また、下水処理分野に限らず、一般的に知られている迅速微生物測定の手法として ATP 法³⁾が存在する。これは全ての生物細胞が持っている ATP（アデノシン-3-リン酸）を化学発光（ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応系）により測定する方法である。ATP の反応自体は数秒で完了するため、迅速測定という意味では問題ないが、大腸菌群以外の全ての生細胞が ATP を所持しており、しかも各細胞の持つ ATP 量が一定ではないため、大腸菌群の特異的検出に向かないものと考えられる。この課題に対し、ルシフェリンの代替として、ルシフェリン-ガラクトシドを用いて、大腸菌群を特異的に検出する方法¹³⁾が検討されているが、ルシフェリン-ガラクトシドが不安定な物質であり、長期に連続で安定的に測定する面で問題があるものと考えられる。

以上の比較検討結果を 1 つにまとめたものとして表 2-1 に示す。

表 2-1 微生物数迅速測定方法の比較

測定方法	蛍光酵素法	抗原抗体法	蛍光標識ファージ感染+フローサイトメトリ-法	ATP によるルシフェリンルシフェラーゼ発光
測定時間	45 分	2 時間	15 分	5～30 分
測定下限値	200 CFU/mL	100 CFU/mL	原理的には 1CFU/mL 以下可能	1000 CFU/mL
大腸菌群の特異的検出				
濃縮操作	○（不要）	×	○（不要）	×（低濃度では必要）
測定前処理自動化	○（SS 分除去が必要）	（自動化しても濃縮洗浄操作等複雑）	×（妨害要因除去）	×（オンラインで自動化することは困難）

比較した結果、大腸菌群を高速に測定するために、Fiksdal ら⁵⁾が検討した、培養無しで酵素活性を利用して大腸菌群数に換算する、蛍光酵素法に着目した。ただし、文献で報告された課題が多く存在することから、これらを解決した上で、下水中の大腸菌群数の迅速検出の実現および連続測定装置の構築に向けて研究を行なうこととした。

1-2-2 化学反応を利用した自動計測装置

微生物に限らず、化学的ないし生化学反応を用いた自動計測装置の既往研究の調査を行った。自動計測装置は大きく分けて回分方式と、連続方式に分かれる。

回分方式はある反応場で全ての化学反応または生化学反応を行わせて、生成した物質を測定する方式であり、例えば BOD センサ^{16),17)}が挙げられる。回分方式は構成が比較的平易であるが、複数の反応を伴う場合には向かないことが知られている。

これに対し、連続方式として知られている手法として、フローインジェクション方式が多用されている。この手法はもともとはラボ分析用として開発されたものであるが、連続、メンテナンス容易、安価等の特長を有しているため、最近では連続監視用モニターなどにも用いられている。例えば T-N・T-P 自動測定装置が市販されており、すでに下水処理場で実際に稼動している。

また、生化学反応にフローインジェクション方式を適用した例として、小林ら^{14) 15)}による *umu* 測定を検討した例が知られているが、下水処理場に設置して、連続的に運用した例は報告されていない現状であることから、本研究においては、現場の測定に関する問題点の解決に重点を置いた。

第3節 本論文の目的と構成

本研究では、培養法ではなく大腸菌群が所持している酵素の活性を利用して測定する蛍光酵素法を利用した大腸菌群計測方法に着目し、迅速測定のための条件の検討と装置構成を試みた。さらに実際の下水処理場に設置して性能を確認した上で、さらには大腸菌群数迅速測定装置を利用したオゾン消毒システムを想定した場合の消毒効果および消毒剤節減効果についてシミュレーション計算により検討し、その有効性を明確化した。以下に本論文の構成を示す

第2章では4節から成り、30分以内の迅速測定を実現するために、大腸菌群数の迅速計測技術の実現に向けて、培養操作を行わない蛍光酵素法の構築を目的とする。第1節は、概論であり、これまでに報告されている大腸菌群数の迅速測定法に関する情報を整理する。第2節では、培養操作無しの蛍光酵素法を実現するために、大腸菌群が所持する酵素 β -ガラクトシダーゼによる酵素反応に着目し必要な反応試薬と反応プロセスを最適化した測定方法を提案した。さらに、下水二次処理水と流入下水について従来の培養法による測定結果との相関について検討した。第3節では、将来的に下水の水質項目が大腸菌群から大腸菌になることを想定して、大腸菌の迅速測定について検討を行なった。そして第4節で得られた成果を纏める。これらによって、培養操作無しの蛍光酵素法による大腸菌群数の測定の実現が可能となり、大腸菌群数を迅速に自動で測定する装置が構成することができる。

第3章は、4節から成り、第2章で作成した蛍光酵素法の反応プロセスを用いて、大腸菌群数を自動で計測する装置を構築し、フィールド実験による性能評価を目的とする。第1節は概論であり、自動装置化の構成について文献から得られた情報を整理する。第2節ではフローインジェクション法を用いた装置化について実験を行い、連続フローとストップ・フローについて比較し、配管フロー系の材質および内径について配管の閉塞防止と配管内壁にSSの付着の防止の観点から調べた。次に、第2章で測定を妨害することが分かったSSを除去する前処理フィルタについて仕様について検討した。第3節では、第2節で得ら

れた成果により製作した試作機を下水処理場に設置して、二次処理水および流入下水をサンプルとしたフィールド実験を行った。そして第 4 節で得られた成果について纏める。これらによって、大腸菌群数の迅速計測装置に必要なスペックを把握でき、長期間にわたって安定した計測が可能な試作機の設計が可能となる。

第 4 章は 4 節からなり、雨天時の未処理放流水を消毒対象とした場合のオゾンによる高速処理についての基礎データを得ることを目的とする。第 1 節は概論であり、流入下水や二次処理水を対象としたオゾン消毒について文献から得られた情報を纏める。第 2 節では、これは雨天時の未処理放流水を対象とした高速オゾン消毒について、ビーカー実験および連続の消毒実験を行った結果について纏める。第 3 節では、雨天時の未処理放流水を対象とした場合の、オゾン消毒に影響を与える因子について解析した結果を明らかにし、さらに、オゾン処理後の処理水の安全性について検証した。第 4 節では得られた成果を纏める。これらによって、雨天時の未処理放流水のオゾン消毒に関する基礎的なデータを得ることができ、さらには高速消毒に必要なオゾン消費率や消毒に影響する因子を把握することが可能となる。

第 5 章は 4 節からなり、既存の二次処理水や雨天時の未処理下水に関する公開データ及び、第 4 章で得られた雨天時の未処理放流水のオゾン消毒に関するデータを用いて、大腸菌群数迅速測定装置を利用した消毒システムについて、シミュレーションによりオゾン消毒の有効性を明確化することを目的とする。第 1 節は概論であり、本章の構成について纏める。第 2 節では、文献および第 4 章で得られたオゾン消毒に関するデータを用いて、オゾン消毒モデルを構築し、実データとの比較することでシミュレータの妥当性について評価を行い、さらに二次処理水を対象とし大腸菌群数迅速計測装置を利用したフィードバック制御によるモデルを構築してシミュレーションによる計算を行い、従来の流量比例制御方式と比較を行い、有効性を明確化する。第 3 節では、第 4 章で得られた結果を利用して、大腸菌群数迅速計測装置を利用したフィードフォワード制

御によるモデルを構築し、雨天時の未処放流水を対象とした場合の未処理下水の消毒を想定したシミュレーションによる計算を行い、流量比例制御による消毒制御と比較を行い、同様にその有効性を明確化する。そして第 4 節で得られた成果を纏める。

これらの検討によって、大腸菌群数迅速計測装置によるオゾン消毒システムの有効性を明らかにする。

最後に、以上により得られた結果を第 6 章にまとめる。

第 1 章 参考文献

- 1) 日本下水道協会編「下水試験方法－1997 年版」(1997) .
- 2) 日本水道協会、「厚生省生活衛生局水道環境部監修 上水試験方法－2001 年版」(2001) .
- 3) 工業技術会編「食品微生物検査の簡易・迅速・自動化最新技術」(1995) .
- 4) Kilian, M, .P. Bulow Acta: ”path. microbial. scand. Sect.B, 84; 245-251(1976)
- 5) Fiksdal ,L., Pommepuy, M., Caprais, M.P. and Midttum,I :”Monitoring of Fecal Pollution in coastal Waters by use of Rapid Enzymatic Techniques”, Applied and Environmental Microbiology , 54, 2118-2122(1994).
- 6) I. Tryland, S. Surman and J.D Berg :”Monitoring faecal contamination of the Thames estuary using a semiautomated early warning system”, Water Science & Technology , Vol.46 ,No 3, 25-31(2002).
- 7) 福岡正芳、長崎進、野瀬勝利、高瀬長武、川上博行、高橋敏行、中山明夫、「酵素免疫分析法による大腸菌群の測定方法」、第 29 回日本水環境学会年会講演集、Vol.29、86(1995).
- 8) 野瀬勝利、福岡正芳、長崎進、高瀬長武、川上博行、高橋敏行、中山明夫、「大腸菌群の自動測定方法」、第 32 回下水道研究発表会講演集、Vol.32, 906-908 (1995) .
- 9) 高瀬長武、福岡正芳、長崎進、野瀬勝利、川上博行、高橋敏行、中山明夫、「大腸菌自動測定装置」、第 33 回下水道研究発表会講演集、994-996 (1996) .
- 10) 野上尊子、矢野理江、明賀春樹、「バクテリオファージを利用した特定細菌迅速検出技術の開発」、第 49 回全国水道研究発表会、548-549 (1998).
- 11) 矢野理江、野上尊子、明賀春樹、大戸時喜雄、平岡睦久、野田直広、「バクテリオファージを利用した特定細菌迅速検出技術の開発()」:第 50 回全国水道研究発表会、626-627(1999).
- 12) 鳥羽裕一郎、野上尊子、矢野理江、明賀春樹、平岡睦久、野田直広、大戸時喜雄、「バ

- クテリオフェージを利用した大腸菌迅速検出技術の開発」、第 51 回全国水道研究発表会講論集、592-593(2000).
- 13) I.Masuda-Nishimura, S.Fukuda, A.Sano, K.Kasai and H.Tatsumi: "Development of a Rapid Positive/Absent Test for Coliforms using Sensitive Bioluminescence Assay" ,Letters in Applied Microbiology , 30. 130-135(2000).
- 14) 小林麗、小野芳朗、宗宮功、毛利紫乃「フロー式反応装置による *umu test* の自動化に伴う測定条件」、水環境学会誌、Vol.20、NO.11、730-737 (1997)
- 15) 小林麗、小野芳朗、毛利紫乃、宗宮功「*umu-test* 自動分析装置の構築と性能評価」、水環境学会誌、Vol.22、No.10、833-838 (1999) .
- 16) 長塩尚之、岡崎和也、「BOD センサーを用いた活性汚泥プロセスの制御」、環境システム計測制御学会誌、Vol.2、No.2、27-33(1997)
- 17) 伊藤富也、法 貴進、棧敷康男、「BOD センサーを用いた活性汚泥プロセス制御について」、第 33 回下水道研究発表会講演集、Vol.33、996-998(1996).
- 18) I.Tryland and L.Fiksdal: "Enzyme Characteristics of β -D-Galactosidase- and β -D-Glucuronidase- Positive Bacteria and Their Interference in Rapid Methods for Detection of Waterborne Coliforms and *Escherichia coli* ".Applied And Environmental Microbiology , Mar, 1018-1023 (1998).
- 19) 春田三佐夫、森地敏樹：乳技協資料、Vol.33、No.3、(1983) .
- 20) 三瀬勝利、井上富士男編、「食品中の微生物検査法解説書」、講談社サイエンティフィック、(1996).
- 21) J W.Woollen: "The Fluorimetric Estimation of N-Acetyl β -Glucosaminidase and β -galactosidase in blood " ,plasma ClinicaChimica Acta (1965).
- 22) Xiaolin L.Huang: "Simultaneous isolation and immobilization of streptavidin- β -galactosidase :Some kinetic characteristics of the immobilized enzyme and regeneration of bioreactor", Enzyme and Microbial Technology, Vol.19 ,378-383(1996).
- 23) Stephen A.Kuby and Henry A.Lardy :, "Purification and Kinetics of β -D-Galactosidase from *Escherichia coli* , Strain K-12:Contribution from Department of Biochemistry the Institute for Enzyme Research ,(1952).
- 24) Wallenfels,K and Weil,R: " β -galactosidase in *The Enzymes* " , (P.D.Boyer,ed.),3rd edition, vol.7 ,617-663.Academic Press NY(1972).
- 25) 古畑勝則、「水中の細菌検査技術の現状と問題点」、第 31 回日本水環境学会講論集、542(1997).
- 26) 平田強、土佐光司、田口勝久「新しい大腸菌群試験方法「MMO-MUG 法」の大腸菌群検出能力の実験的検討」水道協会誌、No.61、27-33(1993).
- 27) 古畑勝則、「水道水の大腸菌群試験方法として新たに採用された特定酵素基質培地につ

- いて」、防菌防黴、Vol.22、109-116(1994).
- 28) 平田強、土佐光司、田口勝久、「特定酵素基質培地法における培養時間と検出菌数」、第28回日本水環境学会講論集、Vol.28、180(1994).
- 29) Stefan Van Poucke and Michael Brailsford: “Solid Phase Cytometry as a Single Analytical Platform for Detecting Pathogens and Indicator Organisms in Drinking Water”, American Water Works Association, Water Quality Technology Conference Proceedings, (2000).
- 30) Van Poucke, S, L. Gille, A. Maeyninx, H. Nelis, and W. Van Craenenbroeck: “Development and field application of 3-5-hour *E. coli* test using the Chemscan RDI”, 1st World Water Congress of the International Water Association (IWA), Paris, July(2000).
- 31) Peter C.S. Feng and Paul A. Hartman: “Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of *Escherichia Coli*”, Applied and Environmental Microbiology, June, 1320-1329(1982).
- 32) A. H. Farnleitner, L. Hocke, C. Beiwl, G. G. Kavka, R. L. Mach: “Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide in Diffuse Sample Fractions of River Waters and its Implication for the Detection of Fecal Pollution”, Water Research, 36, 975-981(2002).
- 33) K.F. Chilvers, J.D. Perry, A.L. James and R.H. Reed: “Synthesis and Evaluation of Novel Fluorogenic Substrates for the Detection of Bacterial β -galactosidase”, Journal of Applied Microbiology, 91, 1118-1130(2001).
- 34) 石原ともえ、高橋智恵子、北原節子、「酵素基質培地を用いた大腸菌・大腸菌群の検出-第一報 検出性能の評価」、用水と廃水、Vol.44, No.8, 685-691(2002).
- 35) Oyvin Ostensvik: “Comparison of Methods Based on the Fermentation of Lactose and Methods Based on the Activity of Specific Enzymes”, American Water Works Association, Water Quality Technology Conference Proceedings(2000).
- 36) P. Bouvrette, J.H.T. Luong: “Development of a Flow Injection Analysis(FIA) Immunosensor for the detection of *Escherichia Coli*”, International Journal of Food Microbiology, 27, 129-137(1995).
- 37) Fiksdal, L and Tryland, I: "Rapid detection of coliform bacteria and influence of non-target bacteria", Water Science Technology. Vol.35, No.11-12, 415-418 (1997).

第2章 大腸菌群数の迅速計測技術に関する基礎的研究

第1節 概説

本研究は、大腸菌群数の迅速計測方法を開発し、装置化した上で性能を実証し、実際の二次処理水や雨天時の未処理放流水の効率的なオゾン消毒を実現することが目的である。大腸菌群の迅速な計測を実現するためには、測定を妨害する要因を排除し、可能な限り従来の培養法の測定値に近い値を迅速に得るための技術を構築することが必要である。

大腸菌群数、微生物数の迅速測定に関する研究はこれまでに数多くなされている¹⁾。しかし、数時間で測定可能という報告は存在するものの数十分単位で測定可能な計測手法については報告はほとんど無い。微生物の生化学的な反応原理から考えると、迅速化の律速となっている要因としては培養過程にあることが明らかなことから、時間のかかる培養操作をすることなく、測定を実現するスキームを考案することが迅速化のポイントであるものと考えられる。

本研究においては、培養操作無しで迅速に測定する方法として、培養操作を行わずに、大腸菌群がもともと所持しており誘導状態となっている酵素である β -ガラクトシダーゼの活性量として蛍光の変化を測定する蛍光酵素法を利用した。その理由は以下の4点である。

- (1) 酵素反応が数十分程度と比較的迅速であり、高速化が期待できること。
- (2) 酵素反応で生成した蛍光物質は高感度に測定可能であること。
- (3) 反応が試薬の混合と加温のみであり、シンプルであることから自動フローの連続測定装置の構築に向いていること。
- (4) 用いる試薬が比較的安全で、環境に悪影響を及ぼすものではなく、常温においても安定であること。

酵素活性を測定する方法は蛍光物質を測定する方法の他に、発色を検出する

方法^{2),3)}や発光を検出する方法^{1),4)}が存在するが、高感度で基質が安定であることを条件として考えた場合、蛍光を測定する方法がもっとも現場において適していると考えられる。

本章では、蛍光酵素法において、高感度となる測定条件の探索のため、測定に影響を及ぼす条件について検討を行った。具体的には測定に際しての試薬の種類、濃度、プロセスについて最適化し、迅速化を達成しつつ測定の高感度化すなわち測定下限値の向上を目的とする。さらに実際の二次処理水をサンプルとした実験を行ない、測定妨害要因の影響について調べた上で、解決策を見出していった。

また、将来的に下水の消毒の指標が大腸菌群数から大腸菌に取って代わる可能性が高いことから、大腸菌に着目した場合についても検討を行なった。

第2節 大腸菌群数計測フローの迅速化の実現と高感度化

2-2-1 概論

本節では大腸菌群数を迅速に測定する方法として蛍光酵素基質を利用する蛍光酵素法について述べると共に、迅速化の実現と高感度化のための改良について検討を行った。

蛍光酵素法の測定原理は、大腸菌群が特異的に保持している酵素である β -D-ガラクトシダーゼ（以下「 β -ガラクトシダーゼ」とする）に着目し、蛍光酵素基質に対して β -ガラクトシダーゼが特異的に反応する触媒酵素反応により生成した蛍光物質の量を測定し、蛍光物質の生成量または生成速度が大腸菌群数と比例していることを利用して大腸菌群濃度を演算する方法である。

しかし、蛍光酵素法は一般的には感度を上げる目的で、予め数時間の培養操作を行うことで大腸菌群を増殖させて計測しているため、時間がかかる欠点が

ある。そのため本研究では、1時間以内の測定を実現するために培養操作を省略し、大腸菌群の細胞が元々保持している酵素活性から大腸菌群数を推定する方法を採用した⁵⁾。ミハエリス=メンテン式によると基質が十分多量に存在する時の酵素反応による生成物質の増加速度は酵素活性に比例し、酵素活性が大腸菌群数に比例すると仮定できる。すなわち蛍光基質であるβ-ガラクトシダーゼと4-メチルウンベリフェリル β-D-ガラクトピラノシド (4-MUG) を添加、混合して反応させた後のサンプルに 360~380nm の光を照射したときの蛍光強度の増加速度を大腸菌群の酵素活性とみなし、大腸菌群数に換算する。蛍光強度の絶対値を直接大腸菌群数に換算するものではないため、希薄な大腸菌群の濃度を培養操作なしで測定できると期待される。

β-ガラクトシダーゼは厳密には大腸菌群のみが保有しているわけではなく、例えばカビや酵母や藻類等も保有しているが、下水中では腸内細菌と大腸菌群が中心的に保有していると考えられる³⁾。図 2-1 に β-ガラクトシダーゼと蛍光酵素基質である 4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトピラノシド(以下「4-MUG」)の反応式を示す。反応後に生成した蛍光物質である 4-メチルウンベリフェロン (以下「4-MU」) は紫外線 (360nm 付近) を照射すると 450nm の蛍光を発する。蛍光の測定に影響を与える要因としては pH、温度、粘性係数、溶媒種類、濁度成分、ミセル濃度 (蛍光増感効果)、クエンチング (消光) 要因等多くのパラメータが存在する⁶⁾。

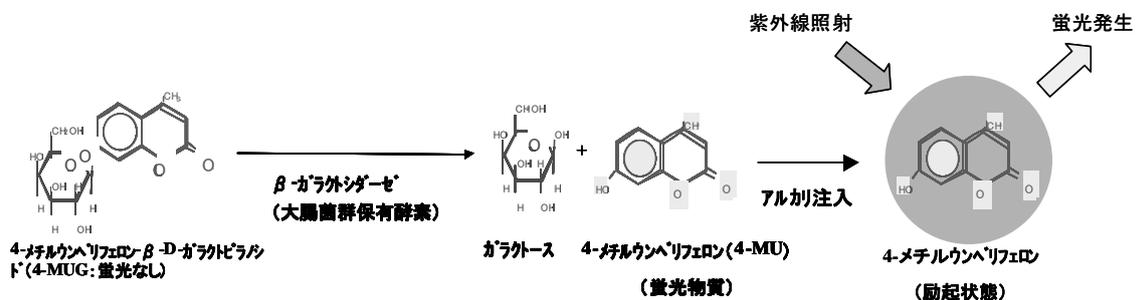


図 2-1 β-ガラクトシダーゼと 4-メチルウンベリフェリル β-D-ガラクトピラノシドの反応

図 2-2 に反応時間と 4-MU の濃度変化の一例を示す。これは全体の酵素反応時間を 30 分とし、0、10、20、30 分時点で蛍光強度を測定し、蛍光強度の値を予め作成した検量線（蛍光強度と 4-MU 濃度）から 4-MU 濃度 ($\mu\text{g/L}$) が求めて得たものである。経過時間を横軸に 4-MU 濃度を縦軸にしプロットしたグラフはほぼ直線になるため、その傾きを求め 4-MU 増加速度 ($\mu\text{g/L/min}$) とし、その値を「 β -ガラクトシダーゼ活性値」と定義する。図で見られるように大腸菌群数（図では *Escherichia.coli* 溶液）の大小により、4-MU の増加速度が変化している。ここで、この直線の傾きが酵素活性の強弱すなわち、大腸菌群数と比例している。

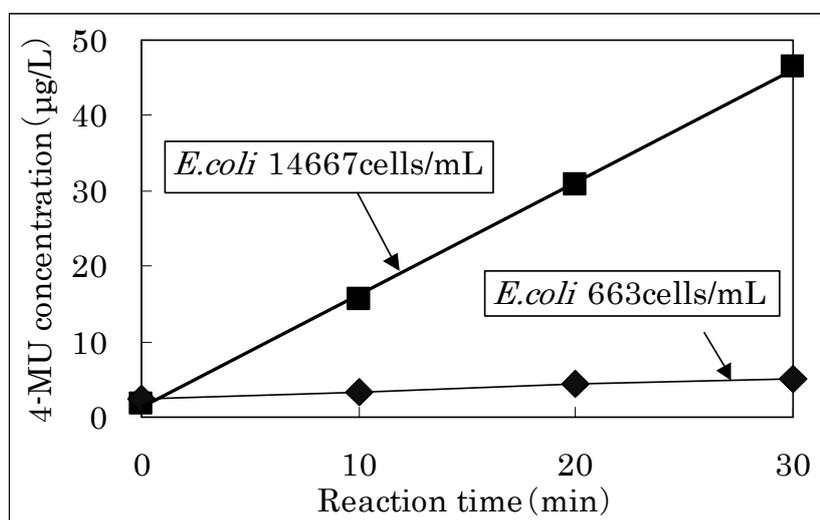


図 2-2 酵素反応時間と 4-MU 濃度変化の一例

β -ガラクトシダーゼが反応する蛍光酵素基質としては、すでに示した 4-MUG (4 - methylumbellyferyl - β - D - galactopyranoside)^{7),8)}の他に 4 - TFMUG (4 - trifluoromethylumbellyferyl - β - D- galactopyranoside)^{9),10)}などが知られている。4-TFMUG から生成した 4-トリフルオロメチルウンベリフェロン (4-TFMU) は、励起光 490nm、蛍光は 530nm の蛍光特性を持つ。現在、光源として容易に活用できるものは比較的波長が長いものが多いため、装置構成の面では 4-TFMUG の方が有利であるが、試薬の入手のしやすさとコスト面 (4-MUG の 10 倍以上) で 4-MUG の方が有利であるため、本研究では 4-MUG を採用した。

また大腸菌群 (Coliforms) の中に含まれる大腸菌 (*Escherichia.coli*) のみを特異的に測定する方法として、基質に 4-メチルウンベリフェリル- β -グルクロニドを用いる方法も存在する。この場合は β -ガラクトシダーゼではなく、大腸菌にほぼ特異的な β -グルクロニダーゼの活性に着目することになる。この大腸菌の定量測定については、1 章で述べたように培養した上で最確数 (MPN) 法と組み合わせた試験方法として、上水試験方法²⁾ や下水試験方法³⁾ の公定法 (MMO-MUG 法) として採用されている。

平成 15 年に上水の水質基準項目が改定された結果、従来用いられてきた大腸菌群ではなく、大腸菌が水質項目に採用され、MMO-MUG 法 (特定酵素基質培地法) が公定法として推奨されている^{11)~14)}。平成 21 年 1 月現在、下水においては、大腸菌群が指標のため、本研究においては β -ガラクトシダーゼに着目した方法を用いているが、将来的に水質項目として大腸菌が採用されても、蛍光基質を変更するだけで対応することが可能である。

本研究において用いている試薬は以下の通りである。

4-メチルウンベリフェリル β -ガラクトピラノシド (4-MUG)

β -ガラクトシダーゼが特異的に反応する蛍光酵素基質であり、そのものには蛍光性はないが、酵素触媒反応による加水分解を受け、蛍光物質の 4-MU (4-メチルウンベリフェロン) とガラクトースを生成する (図 2-1 参照)。4-MUG は粉体の形態で市販されているため、実際に使用する場合には液状にする必要があるが、4-MUG が水に難溶性の物質であるため、ジメチルホルムアミド (DMF) を溶媒として用いている。

リン酸緩衝液

酵素反応時の pH を安定化するために必要である。緩衝液としては様々なものが存在するが、ここでは蛍光測定の際に消光作用が少なく中性付近でよく用いられるリン酸緩衝液 (ナトリウム塩) を用いている。

ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)

SDS は界面活性剤であり細胞内に存在する β -ガラクトシダーゼに対して、

細胞体外に存在する基質や生成物質、塩分などが細胞体内と自由に透過可能にするように細胞壁を軟化するために加えている。

アルカリ溶液

アルカリ溶液には二つの役割があり、一つは酵素触媒反応を停止させる役割であり、もう一つは蛍光測定時の量子収率を上昇させ、蛍光強度を上げる役割である。後者については、一般に蛍光強度を測定する時は中性付近では量子収率が低く蛍光強度はきわめて低いため、酸性またはアルカリ条件にする必要がある。本研究では蛍光強度を測定する直前にアルカリ側にするため水酸化ナトリウム溶液またはグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を加えている。

4-メチルウンベリフェロン (4-MU)

前述のように4-MUGが酵素加水分解を受けた後に生成する蛍光物質であるが、装置のスパン校正を定期的に行う際に必要である。

上記のうち①～③は、酵素反応に必要な混合溶液の試薬として、④と⑤はそれぞれ単体で水溶液の試薬として装置に供される。

2-2-2 研究方法

ここでは大腸菌群の迅速測定の可能性と、測定手順の最適化を図ることを目的として実験を行った。

(1) 基礎検討

ここでは、大腸菌群の測定が蛍光酵素法で原理的に測定可能かについて検討を行うため、サンプルとして人工的に調整した菌液、および下水処理場の二次処理水をサンプルとした実験を行った。

人工調整菌液の場合は、大腸菌 (*Escherichia.coli*) K12 株を、(財)発酵研究所から入手したものの他に、A 処理場の二次処理水で、デソキシコレート寒天培地で育成したコロニーを釣菌し、バイオメリュエ社の微生物同定キット API 20 を

用いて同定したもののうちの 7 種類、合計 8 種類を用いた。細菌株の種類を表 2-1 に示す。

表 2-1 人工調整菌液サンプルに用いた菌株

名前	種類
<i>Escherichia.coli</i> K12 株	大腸菌群
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	大腸菌群
<i>Klebsiella oxytoca</i>	大腸菌群
<i>Enterobacter clocae</i>	大腸菌群
<i>Citrobacter freundii</i>	大腸菌群
<i>Kluyvera spp</i>	腸内細菌（非大腸菌群）
<i>Aer.hydrophila 1</i>	腸内細菌（非大腸菌群）
<i>Aer.hydrophila 2</i>	腸内細菌（非大腸菌群）

菌液のサンプルは TSB 培地（without グルコース：Difco 社）に β -ガラクトシダーゼの誘導剤である IPTG (isopropyl thiogalactoside) を 0.006% 添加した液体培地により、細菌を 18~20 時間 37°C で培養後に孔径 0.2 μ m のメンブレンフィルターに捕捉した後、菌体の洗浄を 2 回実施し、0.85 %滅菌生理食塩水に回収して、適宜希釈することで得た。

次に二次処理水のサンプルであるが、神戸市の A 処理場の最終沈殿池からの流出水を採水して実験室に持ち帰り、およそ 1 回/2 週の頻度で/1 年間に亘り、測定を行なった。

サンプルの水温、SS 濃度、吸光光度、大腸菌群数、一般細菌数の測定も同時に行った。サンプル試料水の各種指標についての、およその傾向を示すものとして以下の表 2-2 に示す。

表 2-2 A 処理場の二次処理水の指標

採水時間	水温 (°C)	SS (mg/L)	吸光光度 (at 660nm)	大腸菌群数 (テッキシコレート寒天培地法 : CFU/mL)	一般細菌数 (標準寒天培地法 : CFU/mL)
10 時付近	20~25	3~15	0.004~0.025	100~30,000	150~30,000

β -ガラクトシダーゼ活性値の測定は手分析で行った。測定のプロチャートを図 2-3 に示す。手分析の場合は大腸菌群を含んだサンプルの β -ガラクトシダーゼ活性を求める手順と、サンプルに溶解しているバックグラウンドの β -ガラクトシダーゼの活性を求める手順に分かれるが、基本的な操作は同様である。なお、人工的に作製した菌液の β -ガラクトシダーゼ活性を求める場合は、微生物以外の水中に溶解している β -ガラクトシダーゼの酵素活性は無視できるほど小さいため、測定を行わなかった。

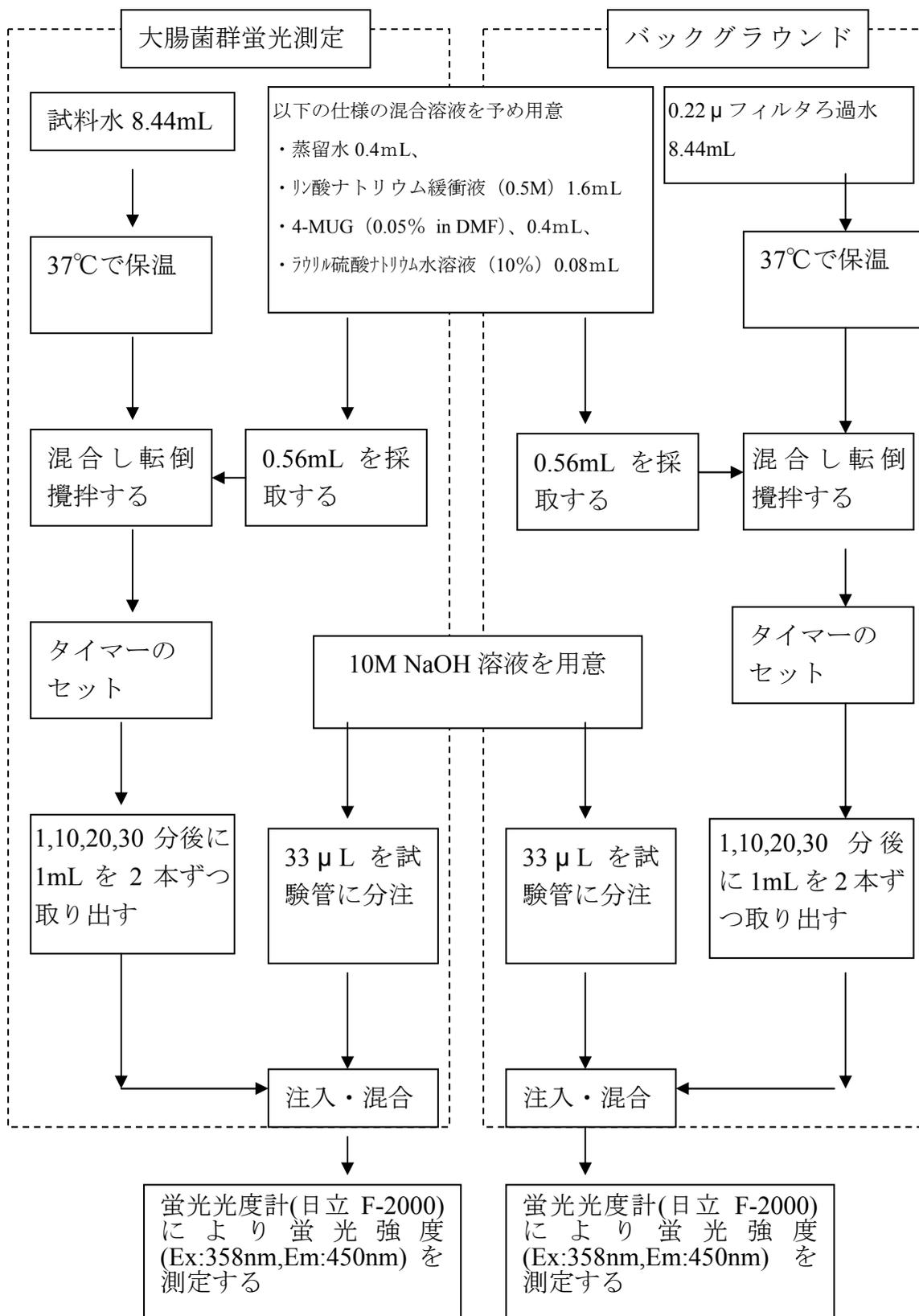


図 2-3 β-ガラクトシダーゼの活性測定の手順（手分析法）

(2) 基質濃度の最適化

酵素反応は酵素濃度が一定の場合、以下の Michaelis- Menten 式に従うことが知られている¹⁵⁾。

$$v=V_{\max} / (1+K_m/[S]) \dots\dots\dots(A)$$

ここで、

V : 反応速度、V_{max}:最大速度、K_m : Michaelis (ミハエリス) 定数、
[S]:基質濃度

横軸に基質濃度を取り、縦軸に反応速度を取ると、図 2-4 に示す概念図となる。最大速度 V_{max} の 1/2 の速度である V_{max}/2 の時の基質濃度が K_m と計算される。

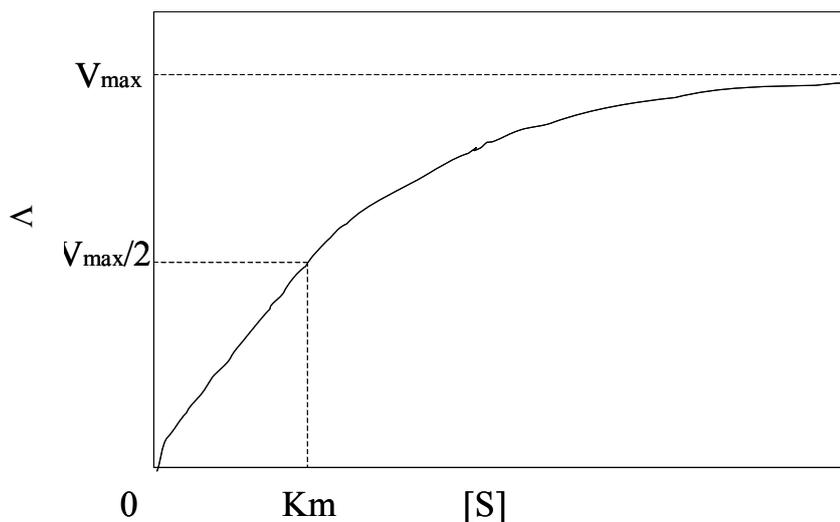


図 2-4 V と[S]の関係

この系において反応速度が大きければ、蛍光物質生成速度が比例して大きくなるため、感度が高くなり測定に有利である。また基質濃度を高く設定するにつれて、反応速度が基質濃度に依存せず一定になるため、測定での安定性という観点からも望ましいと考えられる。

4-MUG の V_{max} 、 K_m を求めるために Lineweaver-Burk プロットを利用した。

即ち式(A)を変形した

$$1/v = 1/V_{max} + K_m/V_{max} \cdot 1/[S] \dots \dots \dots (B)$$

から $1/V$ と $1/[S]$ を軸として傾きと切片を求める。

2000年9月21日にA処理場で採取した二次処理水（塩素消毒前）をサンプルとして実験を行った。実験条件を以下の表 2-3 に示す。

表 2-3 4-MUG 濃度の最適化実験条件

項目	仕様
試料	2000年9月21日 A処理場にて10時頃採取
4-MUG 濃度	0.005、0.01、0.025、0.05（標準状態）、0.1%
リン酸緩衝液濃度	pH 7.0、40mM ナトリウム塩
SDS 濃度	標準状態 0.02%
NaOH 水溶液	1M
実験方法	各 4-MUG 濃度について、0.22 μ m のろ過有無のそれぞれについて行い、ろ過有りをバックグラウンドとして差し引き、予め作成した蛍光強度と 4-MU 濃度の検量線から 4-MU 増加速度（単位は μ g/L/min）を求め、 β -ガラクトシダーゼ活性値とした。

(3) 酵素反応時の pH 依存性

リン酸緩衝液は酵素反応の安定化のために必要であるが、緩衝能は下水よりも大きく設定して季節による pH 変動にも対応可能とし、さらに β -ガラクトシダーゼ活性をもっとも大きくするという点から最適化すべきものと考えられる。

大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼの場合は表 2-4 に示すように中性付近が望ましいとされている。しかし、大腸菌群に含まれる微生物種の種類により特性が異なることが考えられる。

表 2-4 各種大腸菌群の β -ガラクトシダーゼの pH 依存性 (文献調査)

文献	由来	最適 pH	条件
文献 16)	<i>Escherichia coli</i>	6.8	Mg イオン存在下
文献 17)	血小板	4.8	37 °C クエン酸バッファー 基質：メチル-ウンベリフェリル-アセチル-グルコザミナイド。
文献 18)	<i>Escherichia coli</i>	7.5	10 mM トリスバッファー 37°C、ONPG を基質

実験はサンプルを菌液とするよりも、実際の二次処理水を調べた方が実際に即していることから、A 処理場の二次処理水をサンプルとして、表 2-5 に示す 3 つの条件で実験を行った。なお pH 条件は注入する緩衝液の値であり、実際に注入した時の最終 pH 値は異なる。他の試薬濃度や実験方法などは図 2-2 に示す条件と全く同じである。

表 2-5 実験条件

サンプル二次処理水 下水 (A 処理場)	pH 設定条件	リン緩衝液最終濃度 (mM)
2000/9/4 採水	7.0	20
同上	6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、7.89	40
2001/2/5 採水	6.0、6.5、7.0、7.5	40

(4) SDS 濃度の最適化

SDS は、細胞体外に存在する基質や生成物質、塩分などが細胞体内と自由に透過可能にするように細胞壁を軟化させ、蛍光増感現象により蛍光強度が増加させる役割がある。従って濃度が高いほど感度が増大するものと予想される。実験は標準法において 0.02 (標準)、0.05、0.12、0.32% と変化させて β -ガラクトシダーゼ活性値の変化を調べた。

(5) 蛍光測定時のアルカリ濃度

前述のようにアルカリである水酸化ナトリウム溶液を蛍光測定の直前に加え

ているが、これには酵素触媒反応を停止させる役割と量子収率を上げることにより蛍光強度を上げる役割を持つ。注入するアルカリ量は酵素反応時に添加しているリン酸緩衝液と下水自体の緩衝能を上回る量を注入する必要がある。一方、極端な強アルカリ条件では生成した 4-MU 自体が分解する可能性が考えられ逆に感度が低下し、測定値が安定しないことが予想される。これらのことから、最適なアルカリ注入量が存在することが考えられた。これを検証するために表 2-6 に示す実験を行った。

表 2-6 アルカリ注入量最適化実験

注入 NaOH 濃度	10M	1M	0.2M	0.1M	蒸留水
注入時の最終 pH	13.5	12.4	10.8	7.6	6.9
実験操作	標準法で試験を行い、蛍光測定は日立 F-2000（励起波長 358nm、 蛍光波長 450nm）で蛍光強度 (F.I) の経時変化を観察する。試験操作は 3 回行い、その平均値を取った。				

(6) 光学的な影響要因

蛍光酵素法においては、蛍光物質を励起させる際の励起波長とその蛍光を測定する蛍光波長の光が測定値に影響を及ぼすことは判明しているが、下水に含まれる処理水が、どの程度影響を及ぼすかについて検証する目的で以下の二つの実験を行った。

A. 実験 1

二次処理水（2000 年 9 月 4 日に A 処理場にて採取サンプル）について、励起波長を固定しておき、蛍光波長を変化させながら、蛍光強度を測定した。励起波長の設定範囲は 345～380nm とした。

B. 実験 2

実験 1 と同じ A 処理場のサンプル（2000 年 8 月 28 日採水）で、図 2-2 に示す

β -ガラクトシダーゼ活性値を測定する手順を行い、アルカリを注入後のサンプルについて、光学特性を調べた。光学特性の調べる手順については実験 1 と同様である。ただし添加するアルカリの量のみを変化させ、pH 9.62、11.45、12.45、13.45 の間で設定した。

(7) 酵素の誘導状態の影響

大腸菌群が所持している β -ガラクトシダーゼは常時、活性状態にあるのではなく、必要に応じて活性が高まっていることが知られている。 β -ガラクトシダーゼはラクトースを分解する酵素であり、ラクトースが存在しない環境においては、ほとんど活性が無い。つまり誘導状態とはなっていない¹⁵⁾。二次処理水に含まれる大腸菌群が常に誘導状態であるとは限らないため、ラクトース以外の誘導剤として知られている、IPTG (Isopropyl thiogalactoside) を用い、その存在の有無で活性が変化するかについて実験を行った。実験条件を表 2-7 に示す。

表 2-7 誘導剤 IPTG の有無の検証実験方法

サンプル	最終 IPTG 濃度	実験手順
二次処理水 (2000 年 9 月 21 日 A 処理場にて採水)	1.1mM	サンプルに 100mM IPTG 溶液を 0.01mL 入れ、図 2-2 の左側のフローを実行する

(8) 反応時の温度

酵素反応時の温度については、酵素反応が触媒化学反応であるため一般には温度が高い方が有利であるが、あまり高い温度では酵素そのものが分解する可能性があるため、適当な最適温度が存在する。ここでは図 2-2 に示す手順において酵素反応時の温度を変化させた場合の β -ガラクトシダーゼ活性値の変化を実験的に検証した。実験は、2つのサンプルについて行った表 2-8 に実験条件を示す。なお、菌液サンプルは表 2-1 に示されている種類の一部とし、また作成手順は(1)と同様である。

表 2-8 実験仕様

サンプル下水	酵素反応温度
2000/10/2 採水	37、40、42、45、50
2001/2/5 採水	35、37、40、42、45

(9) 測定下限値の検討

測定下限については、下水の放流基準値である 3,000 CFU/mL 以下であるものの、実際の下水処理場における消毒前の二次処理水の大腸菌群数が 3,000 CFU/mL 以下で数百 CFU/mL のレベルの場合も多いことから、この付近で下限値が確保されれば、消毒剤の注入量を制御する上で問題ないものと考えられる。

実験は A 処理場において 2000 年 10 月 16 日に採水したサンプルを原水とし、滅菌生理食塩水で 2、5、10、50 倍に順次希釈していき、それらのサンプルについて最適化された標準測定方法で酵素活性を求め、バックグラウンド値（孔径 0.22 μ m フィルタろ過水の値）を差し引いた値を求めた。測定は 3 回行い平均値を取った。また各希釈後のサンプル水についてデソキシコレート寒天培地法で大腸菌群の濃度を把握した。

2-2-3 結果および考察

(1) 基礎検討

人工調整菌液、および二次処理水をサンプルとした場合の β -ガラクトシダーゼ活性値を求めた。図 2-2 に示すように酵素反応時間に従い 4-MU の濃度が直線的に増加しており、4-MU 増加速度から β -ガラクトシダーゼ活性値を求めても問題なく、また菌体数の大小に応じて傾きも変化していることが確認された。次に β -ガラクトシダーゼ活性値を菌体数で除した「単位菌数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値」を各サンプルごとに図 2-5 に示す。

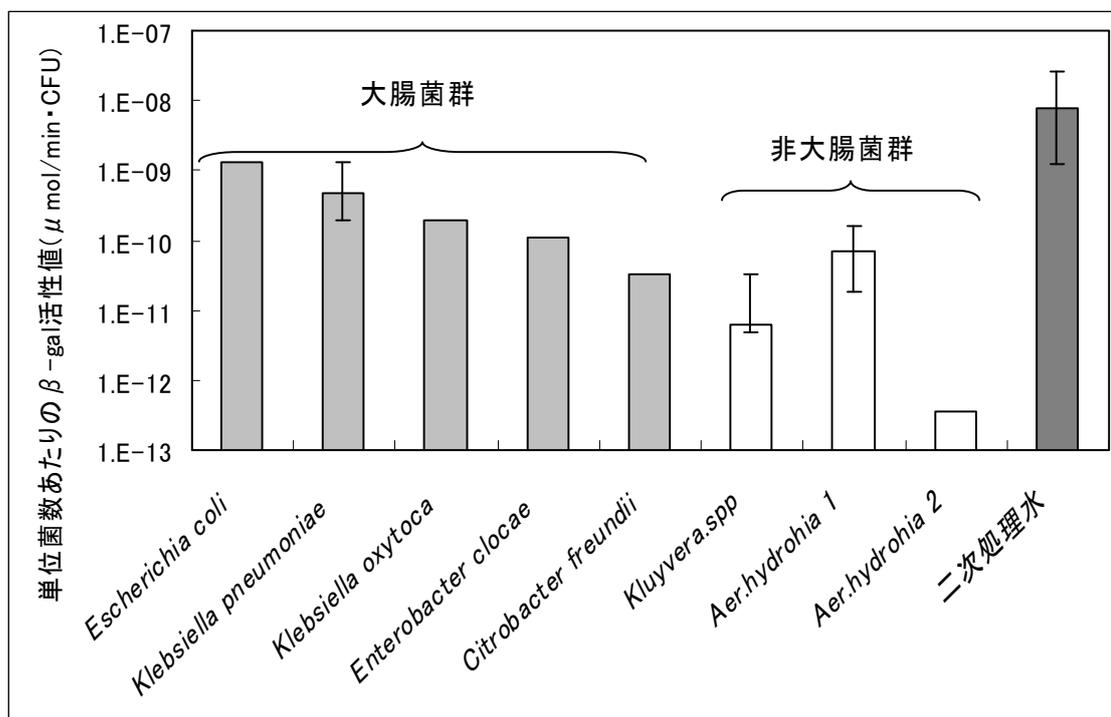


図 2-5 単位菌数あたりのβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) 活性値

図から、大腸菌群と非大腸菌群を比較すると全体的には大腸菌群 (図 2-5 で横軸で左から 5 項目) と非大腸菌群 (*Kluyvera.spp* および *Aeromonas.hydrophila*) を比較するとのほうがβ-ガラクトシダーゼ活性は高いと考えられる。しかし非大腸菌群である *Aer.hydrophila 1* はややバラツキがあるものの活性が高い場合もあり、活性が低い場合でも数が多いときは無視できない影響と考えられる。また実サンプルと人工菌液のβ-ガラクトシダーゼ活性値を比較すると実サンプルの方が、約 1 オーダー以上活性が高いことがわかった。この原因について以下のように考察した。

二次処理水にはβ-ガラクトシダーゼ活性を持ちながらも、デソキシコレート寒天培地に育成できない微生物が存在する。*Aer.hydrophila*, *Kluyvera.spp* の他に酵母などの微生物も考えられる。

二次処理水中に蛍光を増幅させる物質または酵素反応を促進させる物質の存在する可能性。

二次処理水では大腸菌群が損傷して培養不可の状態になっている (VBNC: viable but not culture) 大腸菌群の割合が大きくなっている。大腸菌群が活性汚泥中で損傷したか、溶菌して酵素活性のみが残存している状況も考えられる。

二次処理水では大腸菌群が集塊化して、SS に付着している。すなわちデソキシコレート寒天培地法で一つのコロニーとカウントされても実際には集塊化した SS の塊一個から生成したコロニーを測定している可能性が考えられる。

①については β -ガラクトシダーゼ活性を持つ非大腸菌群である *Aer. hydrophila*, *Kluyvera spp* の割合が大きい場合に問題となる。しかし、これらの微生物数の割合が二次処理水中で極端に濃度が高くなることは無いこと³⁾ および、図 2-3 で上記 2 種類の β -ガラクトシダーゼ活性値がやや低めであることから、主要原因とは考え難い。

については蛍光強度そのものは増加するものの、本研究では蛍光強度の絶対量ではなく、蛍光強度の変化量を測定する点から、影響は少ないものと考えられる。

については熱、紫外線等によるストレス印加や酸・アルカリ、有害物質の混入、捕食、溶菌により、微生物細胞がデソキシコレート寒天培地等の選択培地では培養できないが、 β -ガラクトシダーゼ活性を所持している状態を意味する。これは一般に損傷状態と呼ばれており、損傷の影響については培地法においても影響が見られることから、根本的な解決は困難であるが可能な限り影響を除外してことが、培養法との相関を保つ上で重要であると考えられる。

④についてはデソキシコレート寒天培地法の前処理としてブレンダー処理を実施するも、サンプル中に完全に分散化させることは困難な状況であり、仮にこれが原因とすれば根本的な解決は困難であると考えられる。

(2) 基質濃度の最適化

基質濃度の依存性に関して、4-MUG の濃度を横軸にとり、縦軸に傾きの差 (β -ガラクトシダーゼ活性値を示す) とし図 2-6 に示す。また Lineweaver-Burk プロットを示したものを図 2-7 に示す。

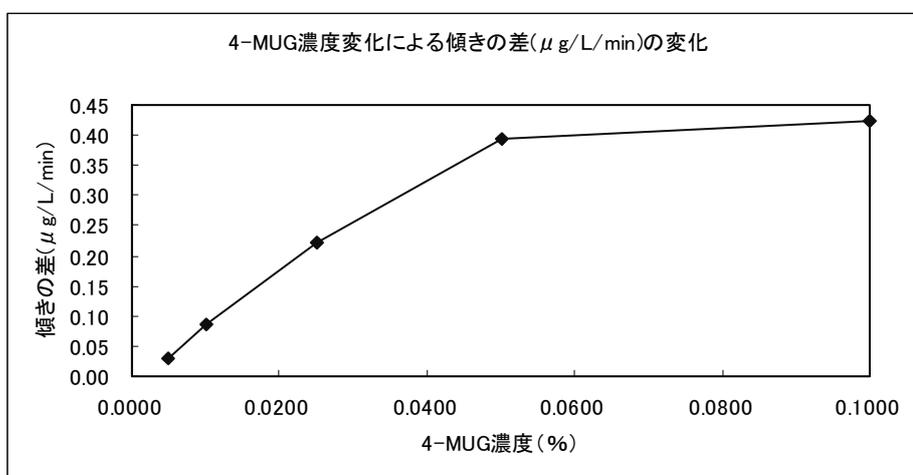


図 2-6 4-MUG 濃度と β -ガラクトシダーゼ活性の関係

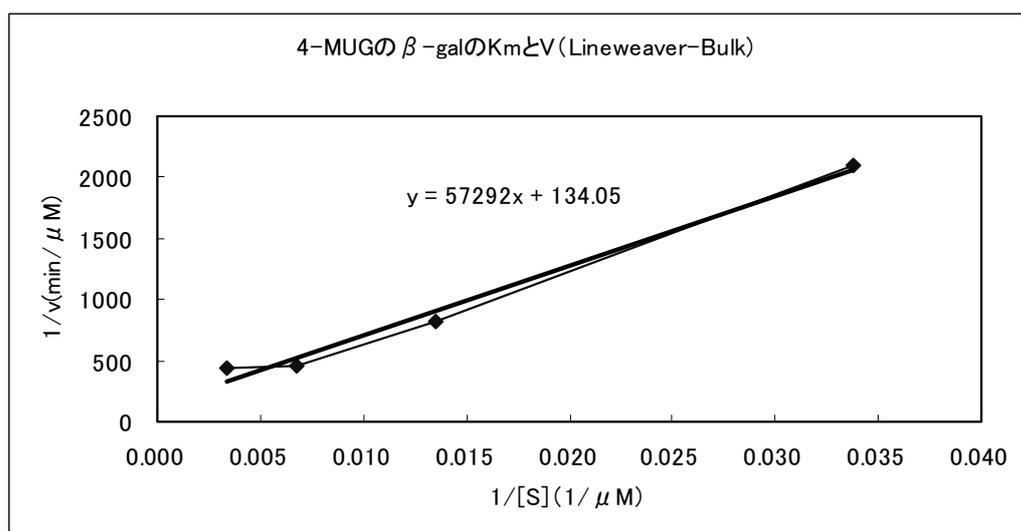


図 2-7 4-MUG 濃度と傾きの差の関係 (Lineweaver-Burk)

図 2-7 から基質濃度[S]が高濃度になると (つまり $1/[S]$ が小さくなると) 回帰

直線から外れてくることがわかる。図 2-8 の回帰直線及び式(2) から K_m 、 V_{max} を求めて以下の結果を得た。

$$K_m = 427 \text{ (}\mu\text{M)}$$

$$V_{max} = 7.46 \text{ (nM/min)}$$

求めた K_m の値 $427 \mu\text{M}$ と図 2-3 に示す 4-MUG 濃度である $148 \mu\text{M}$ と比較すると、この系は一定反応速度の範囲内に無い、つまり反応速度が基質濃度の変化に依存する範囲内にあることが分かる。図 2-3 に示す手順においては 4-MUG の濃度を厳密に設定しておく必要がある。この問題を解消するためには基質濃度をさらに上げることも考えられるが、4-MUG が水に比較的溶けにくい性質であることから、困難であった。

(3) 酵素反応時の pH 依存性

実験結果を図 2-8 と図 2-9 に示す。サンプルが二次処理水の場合は $0.22 \mu\text{m}$ のフィルタろ過したものをバックグラウンドとして差し引いた値を β -ガラクトシダーゼ活性値としている。

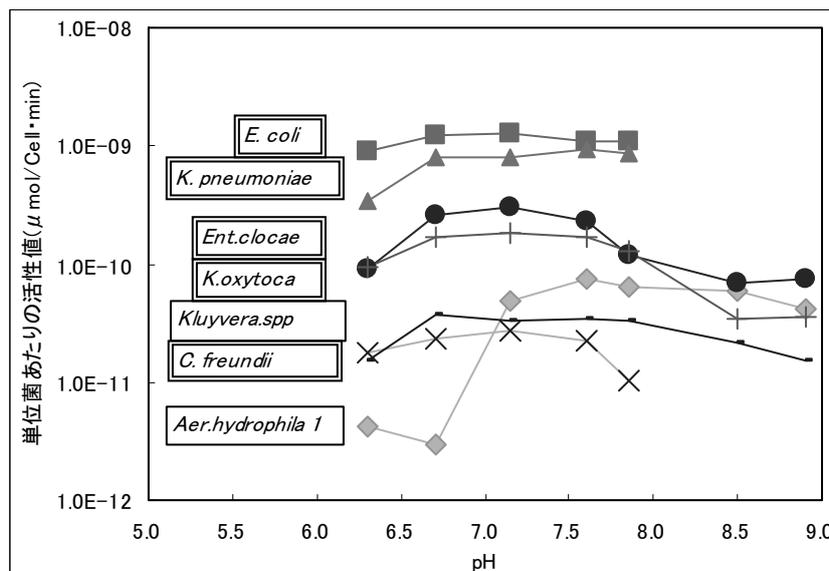


図 2-8 各菌の単位菌数当りの β -ガラクトシダーゼ活性値の pH 依存性

図 2-8 に示されている細菌類で主要な大腸菌群については pH 7.0 とすれば、問題なく β -ガラクトシダーゼ活性を求めることができることが分かった。

次に二次処理水の pH 依存性について図 2-9 に示す。

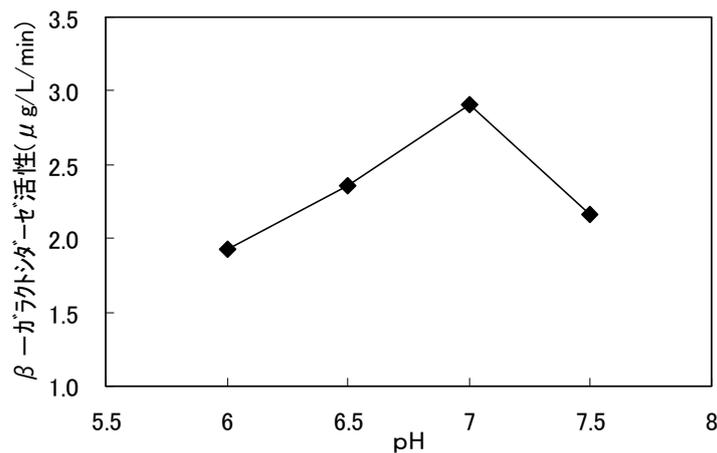


図 2-9 pH 変動に対する β -ガラクトシダーゼ活性値 (2001/2/5 採水)

図 2-9 より、二次処理水の場合でも pH 7.0 を最大値としていることから、試薬混合後において pH 7.0 付近になるような緩衝液を用いれば高感度に測定可能であることが分かった。

(4) SDS 濃度の最適化

SDS 濃度を変化させた場合の実験結果を図 2-10 に示す。

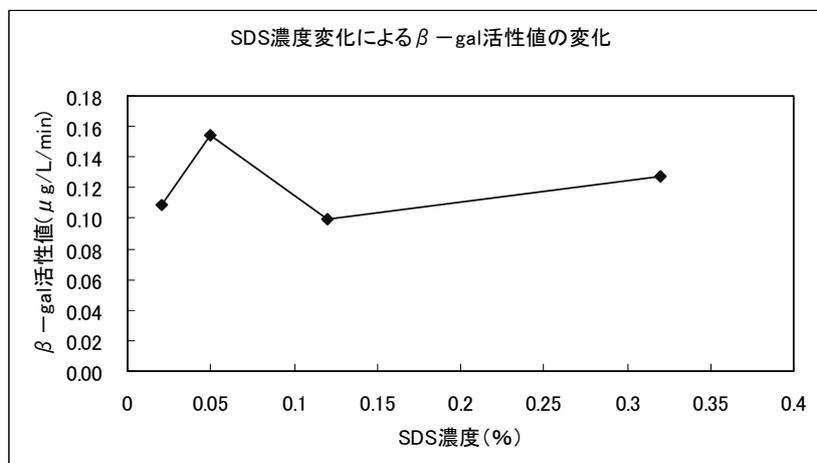


図 2-10 SDS 濃度変化に対する β -ガラクトシダーゼ活性値の変化

図 2-10 から β -ガラクトシダーゼ活性値と SDS の濃度変化との明確な関係はみられず、ばらついた傾向を見せている。この原因は現時点では詳細は不明であるが、SDS はタンパク質変性剤であることから 0.1%以上の濃度において、 β -ガラクトシダーゼの変性または活性の阻害の原因となったことが考えられる。この実験結果から、図 2-3 の測定フローに示す濃度のまま、変化させない方が望ましいと考えられる。

(5) 蛍光測定時のアルカリ濃度

表 2-6 に示した実験条件の実験結果を図 2-11 に示す。ここでは、アルカリを注入した後の蛍光強度の経時的な変化について示している。

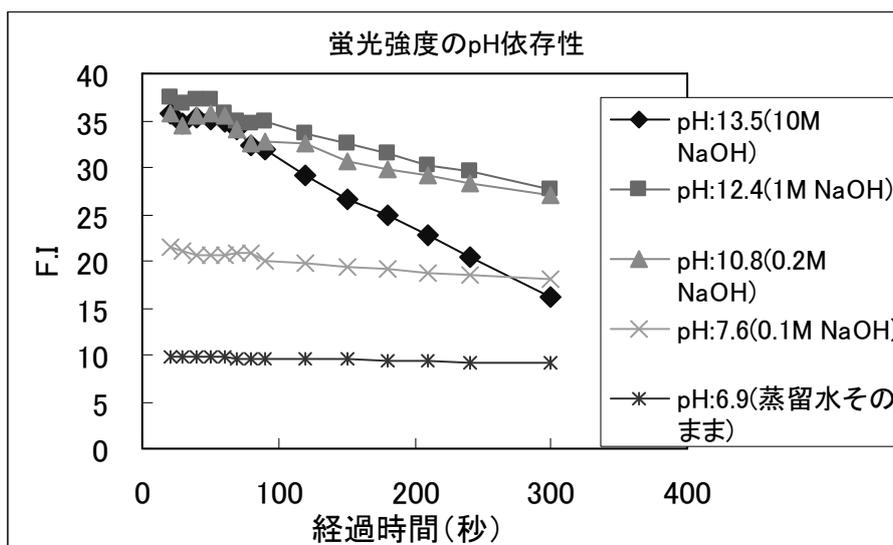


図 2-11 アルカリ注入量に対する蛍光強度の変化

図 2-11 から pH 10.8 以上のときは初発の蛍光強度はほぼ変わらず、また pH 13.5 の時は経過時間と共に蛍光強度の著しい低下が見られる。

従って、最適な最終 pH 値としては 10.8 程度が適当であることが分かった。実際の下水には緩衝能が存在し、また酵素反応時のリン酸緩衝液の pH 緩衝能があることから、それらよりも大きい緩衝能ないし、アルカリ強度となるよ

うに設定する必要がある。高 pH 条件での蛍光強度の低下は蛍光物質が分解している可能性が高い。図 2-9 によれば pH 13.5 の条件下では、300 秒放置することで、蛍光強度が半分以下になっている。また pH 10.8 以上 12.4 以下では 5 分放置で 20% 程度低下しているが、60 秒以内では 10% 以下の変動で抑えられていることがわかる。このことから、pH を 10~12 程度とし、アルカリ注入後に直ちに蛍光を測定することが望ましいことが分かった。

(6) 光学的な影響要因

光学的な影響を調べた 2-2-2 の(6)の A.実験 1 の実験結果を、以下の図 2-12 に示す。

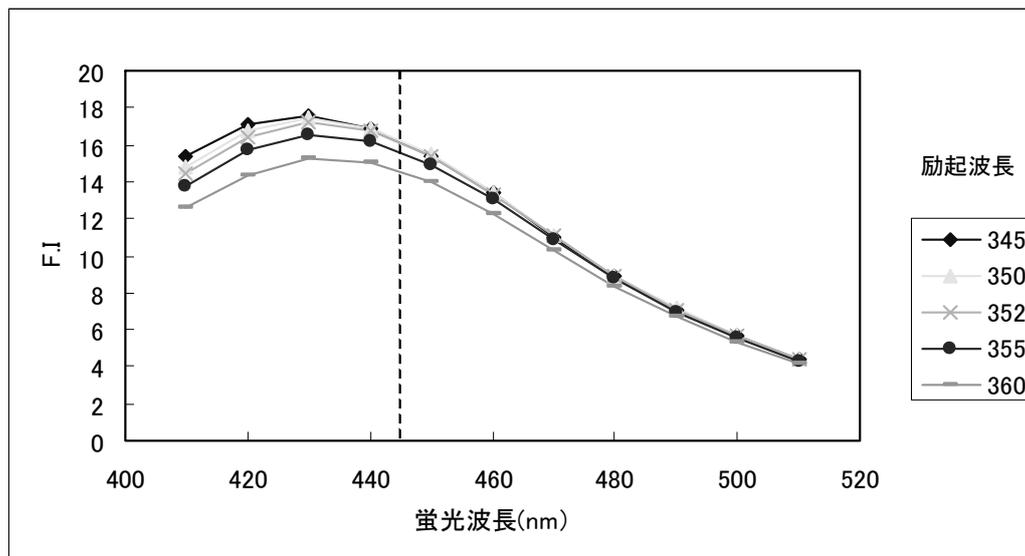


図 2-12 二次処理水の励起、蛍光スペクトル

実験結果から明らかのように、二次処理水そのものについても蛍光特性が認められる。これは下水中に含まれる洗剤由来の蛍光増白剤が原因と考えられる。ただし、大腸菌群の数値を求める時に最終的に必要な値は蛍光強度である F.I ではなく、F.I の増加速度（即ち 4-MU の生成速度）であり、なおかつバックグラウンド（0.22 μ m のフィルタろ過水の蛍光増加速度）を差し引いた値を用いるため、下水そのものの蛍光スペクトルは値が大きく変動しない限り、蛍光酵素法の測定にはほとんど影響を及ぼさないと考えられる。

次に蛍光測定のアルカリ注入直後のサンプルの励起蛍光スペクトルの実験すなわち 2-2-2 の(6)の B.実験 2 の結果を以下の図 2-13 に示す。

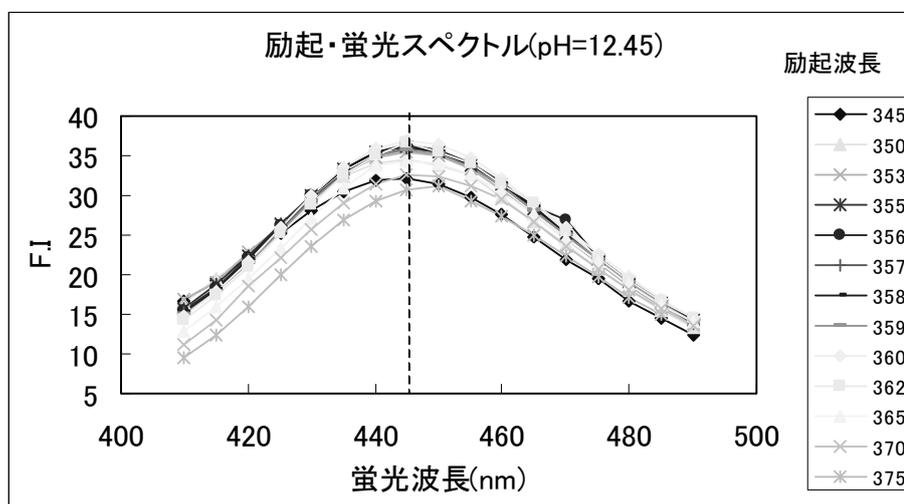


図 2-13 励起蛍光スペクトル変化 (pH 12.45)

実験結果から励起波長および蛍光波長が $\pm 5\text{nm}$ 程度振れても測定にはほとんど影響は無いことがわかった。励起波長が 345~375nm で最適な励起波長は 360nm であり、この範囲内では変動誤差は最大 6%程度であり、大きな誤差にならないことが分かった。

(6) 誘導剤の影響

誘導剤である IPTG の影響について実験した結果を図 2-14 に示す。

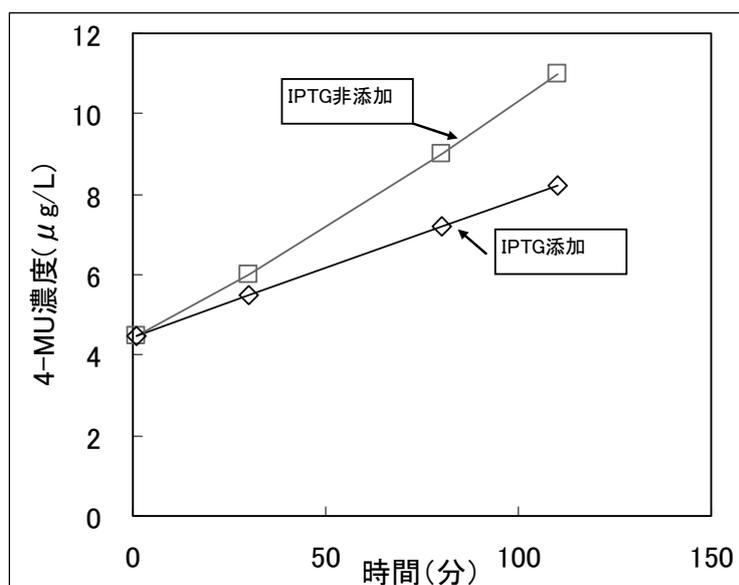


図 2-14 誘導剤 IPTG の影響

図 2-14 によれば、IPTG を添加しない場合と比較すると添加した場合は約 38% β -ガラクトシダーゼ活性値が低下する結果が得られた。これは IPTG が β -ガラクトシダーゼと結合し、競争阻害剤として働いているためと考えられる。つまり、二次処理水での大腸菌群は既に誘導状態にあり、あえて誘導剤を加える必要がないことが分かった。

(7) 酵素反応時の温度依存性

人工的に調整した菌液をサンプルとした実験結果を図 2-15 に示す。大腸菌および *Citrobacter* 属は温度が上昇するにつれて活性が上昇する一方、非大腸菌群である *Aeromonas* 属は 37 以上で活性が低下していることが分かる。その他の大腸菌群については 37 を極大とする特性となっている。大腸菌群以外の β -ガラクトシダーゼ活性を最小にし、大腸菌群由来の β -ガラクトシダーゼ活性が最大になるようにする必要がある点、また培養法の多くの培養温度が 37 前後を採用していることから 37 を最適温度と判断できる。

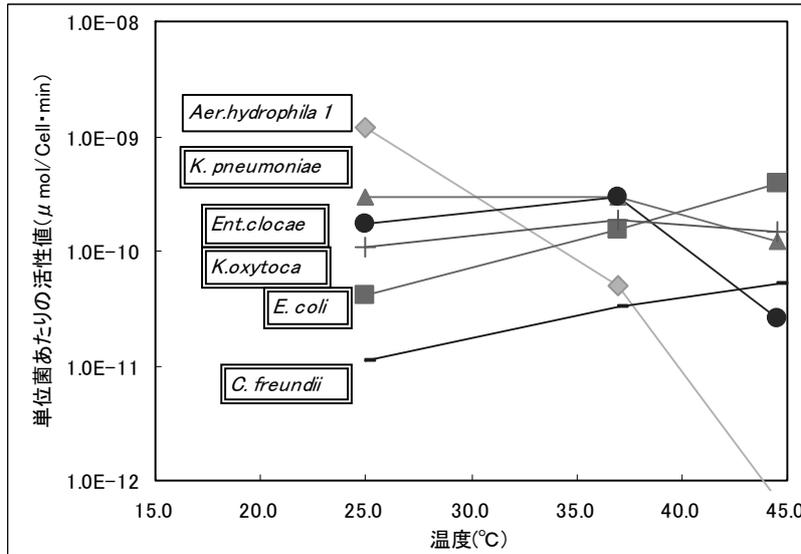


図 2-15 各菌の単位菌数当りの β -ガラクトシダーゼ活性値の温度依存性

二次処理水をサンプルとした場合の実験結果を図 2-16 に示す。図から明らかのように、42°Cを最大値とした特性が得られており、37°Cでは β -ガラクトシダーゼ活性値 (=4-MU 生成速度) は約 12%程度低下している。図 2-15 と比較すると明らかなように *Enterobacter clocae* の特性に類似している。二次処理水に支配的な大腸菌群の菌相は季節により変化すると予想されるが、12%程度の活性低下と菌相変化の可能性を双方を勘案すると、37 の保温が望ましいものと考えられた。

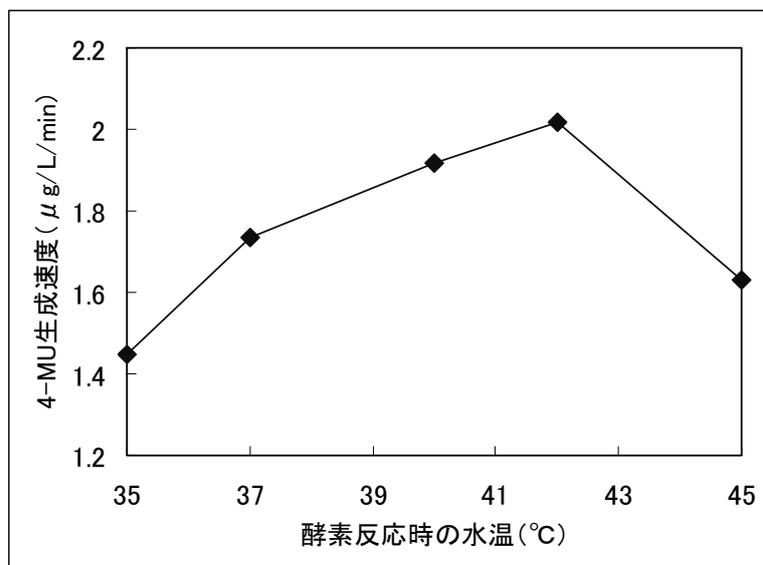


図 2-16 2001/2/5 二次処理水サンプルの温度依存性

(8) 測定下限値の検討

二次処理水を用いた場合の実験結果を図 2-17 に示す。

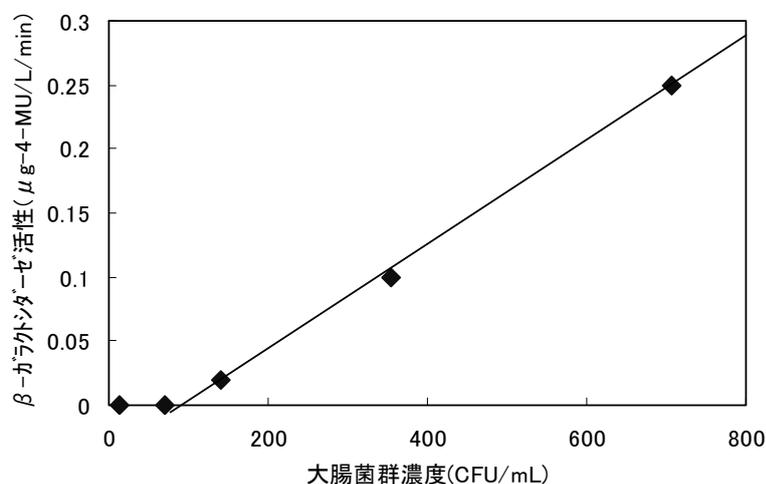


図 2-17 検出下限値の実験結果

図 2-17 からわかるように大腸菌群濃度 100 CFU/mL 以下では、バックグラウンドノイズに埋もれており定量は困難であるが、150 CFU/mL 以上ではデソキシコレート培地法のカウント数と β-ガラクトシダーゼ活性値はほぼ直線的に比例しているのが分かった。従って 200 CFU/mL 以上では定量可能で分解能があることが判明した。

(9) 測定妨害要因

大腸菌群数計測装置の出力値がどの程度の大腸菌群であるかを計算するためにはデソキシコレート寒天培地法などの測定方法で得られた値との相関を取り、検量線を求める必要がある。しかし実際には下水試験方法で下水中の大腸菌群濃度測定として定められている方法は最確数法 (LB 培地法、MMO-MUG 法など) と平板培養法 (デソキシコレート寒天培地法が含まれる)、メンブレンフィルタ法 (Endo 培地など) が存在し、しかも、それらの測定結果が異なることが指摘されている²⁾。また大腸菌群の定義そのものが何種類か存在することもあり、明確な真値は存在しないのが実情である。

上水の分野では、従来よく用いられた LB 培地法+最確数法に代わって MMO-MUG 法が利用されているが²⁾が、下水の分野ではデソキシコレート寒天培地法が多用されている現状である。この状況を踏まえ、今回は関連の検証については、従来から良く用いられ、しかも測定が容易なデソキシコレート寒天培地法による測定結果との相関を観察することとした。ただし将来的には消毒指標、大腸菌群の定義、測定方法が変更される可能性があり、その時点で適宜対応していく必要がある。

図 2-18 に A 処理場において 2000 年 8 月～2001 年 6 月までの単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値とデソキシコレート寒天培地法の大腸菌群数を示す。単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値が一定であれば、デソキシコレート寒天培地法との相関は高くなる。

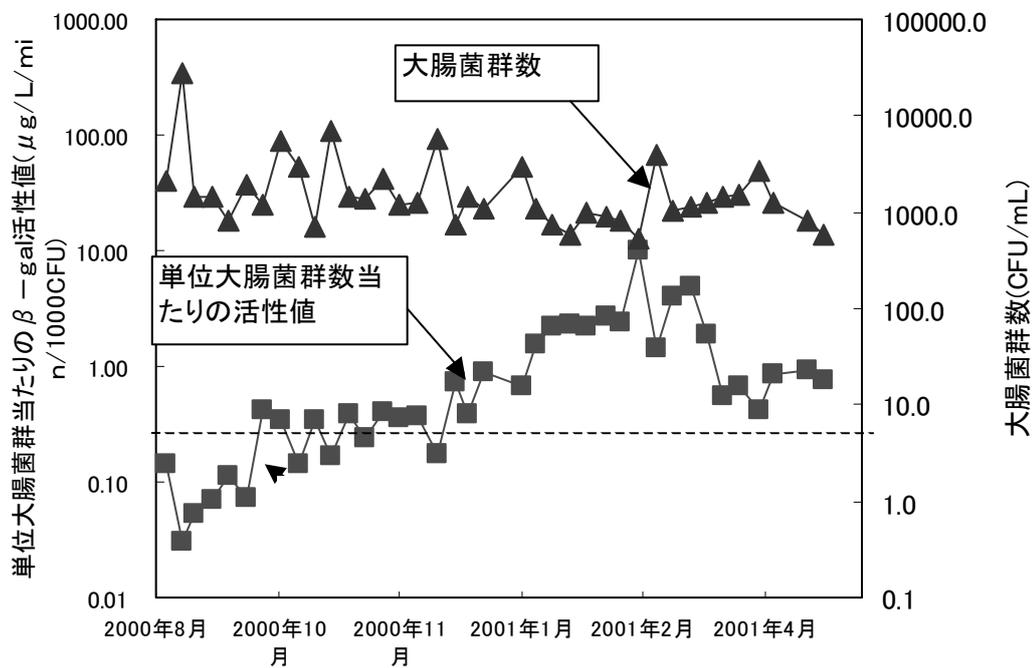


図 2-18 単位大腸菌群数当たりの β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性値の変化

図 2-18 に示すように、2000 年 8 月までの単位大腸菌群数あたりの β -ガラクト

シダーゼ活性値は $0.1 \mu\text{g/L}\cdot\text{CFU}\cdot\text{mL}$ と低いが、2000年8～12月までは図中の点線で示すように、ほぼ一定であった。しかし、2000年12月末から2001年4月まではデソキシコレート法による大腸菌群数に対して β -ガラクトシダーゼ活性が異常に上昇する現象が見られた。

この現象は何らかの妨害要因が関与していると推測した。詳細な水質分析として、COD、アンモニア性窒素濃度、SS、OD660の測定を実施したところ、同じサンプルでSSおよびOD660に顕著な上昇傾向が見られた。比較した例として表2-9にA処理場の冬季の2月と春の5月のデータを示す。両者はデソキシコレート寒天培地法では同程度の大腸菌群であるにも関わらず β -ガラクトシダーゼ活性値は2月の方が10倍以上高かった。また2月のサンプルは5月のサンプルと比較してOD660が7倍以上であり、濁質成分濃度が高い傾向であった。

表 2-9 A 処理場の水質比較

項目	2000年2月26日 サンプル	2001年5月18日 サンプル
下水採水時温度	20	21.5
大腸菌群数(デソキシコレート寒天培地法 CFU/mL)	526	570
β -ガラクトシダーゼ活性値 ($\mu\text{g/L}/\text{min}$)	5.37	0.46
吸光光度 (at:660nm)	0.029	0.004
SS 濃度(mg/L)	6.0	4.0

SS または OD660 が上昇するにつれて、単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値が上昇する原因として、以下の仮説を立てた。

- 菌相の変化すなわち大腸菌群に含まれる菌群のうち β -ガラクトシダーゼ活性の強い菌が支配的になっている可能性
- 濁質に β -ガラクトシダーゼそのものが吸着している可能性
- 濁質が蛍光測定に影響を及ぼしている可能性

大腸菌群以外の β -ガラクトシダーゼ活性を持つ微生物が存在する可能性

以上の仮説はいずれも文献でほとんど報告がないものであり、すべてを明らかにするのは困難であるが、これまでに得られた知見から以下のように原因を推定した。

まず①であるが、図 2-5 で示すように、各処理場の二次処理水での単位大腸菌群あたりの 4-MU 生成速度は菌株から調整した人工菌液よりも高い値となっている。二次処理水よりも高い β -ガラクトシダーゼ活性を持つ大腸菌群が存在すれば、①が原因と考えられるが、大腸菌群の中で大腸菌の他に β -ガラクトシダーゼの活性を数百倍高く所持する大腸菌群の存在は考えにくい。

次に③であるが、今回の二次処理水の SS 濃度が高々 15mg/L と低く、吸光光度も最大で 0.025 とさほど高くない。仮に SS が蛍光を発するとしても蛍光強度のベースアップとなっていることは考えられるが、蛍光強度の時間的変化すなわち傾きに影響するとは考えにくいことから、③が原因である可能性は低いと考えられる。

次に④であるが、既に述べたように β -ガラクトシダーゼを所持する微生物は酵母、カビ、藻類が考えられる³⁾が、下水処理場の通常の処理プロセスで、これらの微生物が大量に増殖したという報告は知られていないことから、可能性は低いと考えられる。

以上の点から、本研究では②の可能性に着目した。すなわちデソキシコレート寒天培地法ではカウントできない、 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ損傷状態の大腸菌群が SS に付着している可能性について、以下に実験的に検証を行なった。

<実験 1>

神戸市 A 処理場の冬季のサンプルとして 2002 年 1 月～2 月の 7 サンプルの消

毒前二次処理水を用いて、孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルタ（ADVANTEC 社 K800A047A）および 5 種 A フィルタでろ過を行い、大腸菌群数の変化を調べた。ADVANTEC 社の K800A047A は、材質がポリカーボネート製で電子銃による孔が空いており、孔径の分布が比較的小さい。一方、5 種 A フィルタは、繊維を織ったものであり、公称の保留粒子径は $7\mu\text{m}$ であるが、 $8\mu\text{m}$ フィルタよりも孔径分布が大きいと推測される。

この二種類のフィルタによるろ過前後の大腸菌群数の変化を図 2-19 に示す。

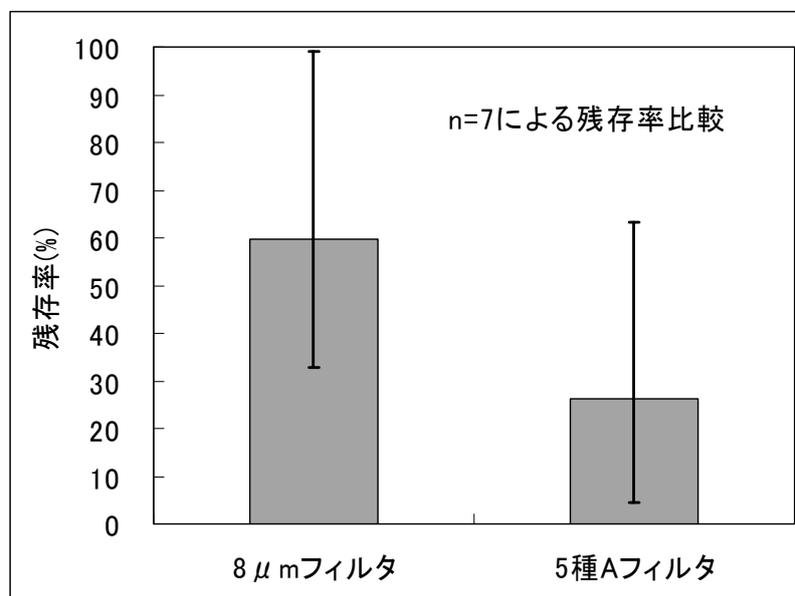


図 2-19 フィルタろ過後の大腸菌群数の変化

図 2-19 より 5 種 A フィルタよりも $8\mu\text{m}$ フィルタの方が大腸菌群数の残存率が小さいことから、大腸菌群は $8\mu\text{m}$ 以上の孔径のフィルタではあまり除去されない特性であるが、繊維状フィルタには除去されやすい傾向があることが分かった。

<実験 2>

ろ過実験 1 で用いた $8\mu\text{m}$ フィルタを用いて、ろ過水およびフィルタに捕捉された SS を滅菌生理食塩水に回収し、その大腸菌群数（デソキシコレート寒天培

地法) と β -ガラクトシダーゼ活性値 (図 2-3 のフロー) を求め、元のサンプルの濃度に換算した結果を図 2-20 に示す。なお、このサンプルのもともとの大腸菌群数は 729CFU/mL、 β -ガラクトシダーゼ活性値は $0.8 \mu\text{g/L}\cdot\text{min}$ であった。

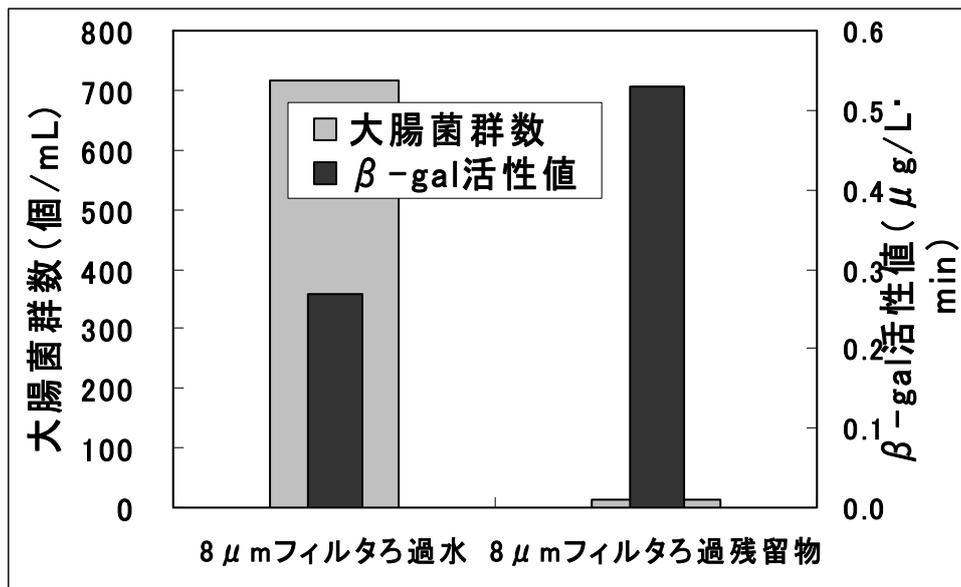


図 2-20 8 μm フィルタろ過水とろ過残留物の大腸菌群数と β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性値の変化

図 2-20 から 8 μm ろ過水は大腸菌群数はほとんど変わらないにも関わらず、 β -ガラクトシダーゼ活性値が大きく減少し、一方ろ過残留物には大腸菌群はほとんど含まれていないにも関わらず、強い β -ガラクトシダーゼ活性が認められることが分かった。

<実験 3>

実験 2 で SS に強い β -ガラクトシダーゼ活性が認められることが分かったが、このような現象が起きる原因として、活性汚泥槽の曝気時間の大小が影響していると考え、以下の実験を行なった。

- (1) 2002 年 2 月に大阪府の T 処理場の活性汚泥 400mL を採取し、実験室に持ち帰った。

- (2) 2 時間以内に活性汚泥を室温 (20°C) 条件でしんとう攪拌 (約 60rpm) する。
- (3) 各時間毎に 50m 採取して遠心分離機にて分離する (2000rpm 1 分+自然沈降 5 分)
- (4) 上澄み液の β -ガラクトシダーゼ活性値と OD660 と pH を測定する
- (5) 上澄み液と汚泥をそれぞれ分散させた上でデソキシコレート寒天培地法で大腸菌群数を測定する

以上の実験で得た β -ガラクトシダーゼ活性値と単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値の変化を図 2-21 に、OD660 と pH の変化を図 2-22 に示す。

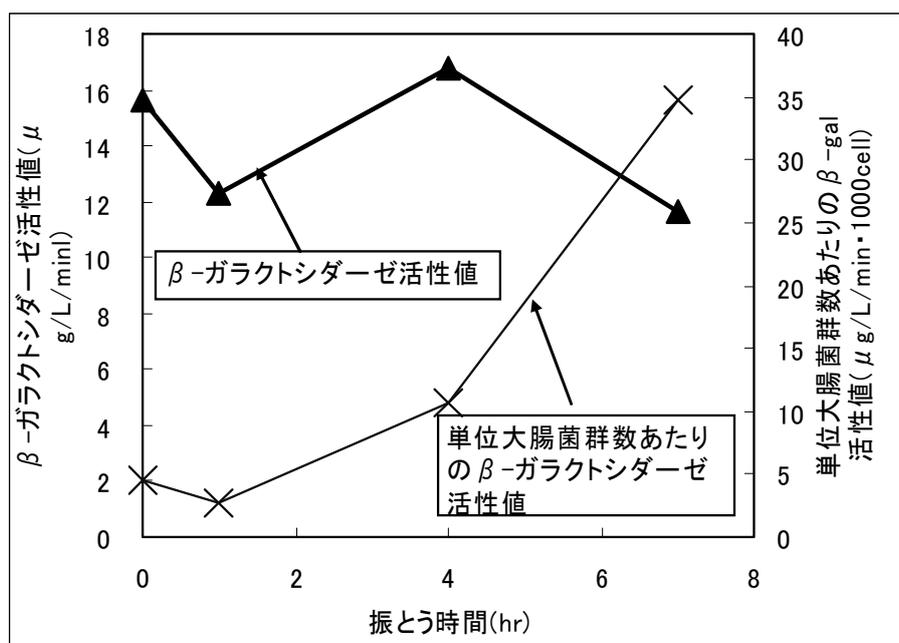


図 2-21 β -ガラクトシダーゼ活性値と単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値の時間変化

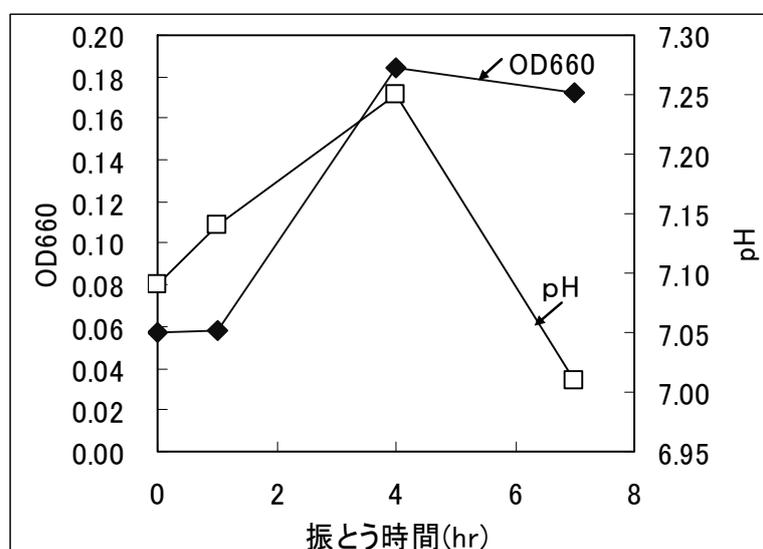


図 2-22 OD660 と pH の時間変化

図 2-21、図 2-22 より以下のことが分かった

- (1) 振とう時間が増加するにつれ、大腸菌群数が減少し、 β -ガラクトシダーゼ活性値はほとんど変化しないことから、単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値が増加する。
- (2) OD660 は増加するが 4 時間以降は変化が少ない。pH はいったん大きくなるも最終的には低下する。

図 2-21 から、トータルの酵素活性に変化はないものの振とうするにつれ大腸菌群が SS に付着し、培地法で SS の塊 1 つが大腸菌群 1 つと計測されている可能性が高いと考えられる。冬季の活性汚泥法は曝気時間を比較的長く取ることから、この傾向は SRT（汚泥滞留時間）が大きいと傾向が強まるものと考えられる。

以上の 3 つの実験結果から、デソキシコレート寒天培地法でカウントできない SS 付着の大腸菌群の存在があることが明らかになり、消毒指標であるデソキ

シコロート寒天培地法による大腸菌群数で消毒制御しようとするれば、この妨害要因を制御する必要があることが分かった。デソキシコロート寒天培地法で計測できない大腸菌群は比較的大きいSSに付着していることが判明したことから適切なフィルタで除去すれば、デソキシコロート寒天培地法に対する相関が改善すると考えた。

冬季のサンプルのSS成分には強い β -ガラクトシダーゼ活性が存在している可能性が高いことから、これらを物理的に除去する方法としてフィルタ法を検討した。大腸菌および大腸菌群は $0.5\sim 2\mu\text{m}$ の大きさであり、浮遊状態の大腸菌または大腸菌群の細胞を捕捉しないためには、フィルタの孔径はこれより大きい必要がある。また孔径は可能な限り均一であることも必要である。

しかし、フィルタの孔径が大きすぎるとSSを除去できず、フィルタろ過を行なう意味がなくなる。その観点から孔径が $8\sim 30\mu\text{m}$ 程度のフィルタを用いて前処理のろ過を行なうことに着目した。前述の孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルタは図2-19、2-20で示すように大腸菌群の除去を最小限にしながらSS成分を除去可能なフィルタであることから、これを用いて以下の実験を行なった。

A処理場の二次処理水として28回分をサンプルとし、孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルタつまりADVANTEC社のK800A047Aを前処理としてろ過した場合とろ過しない場合をそれぞれサンプルとして、 β -ガラクトシダーゼ活性値の測定を行った結果を図2-23、2-24に示す。

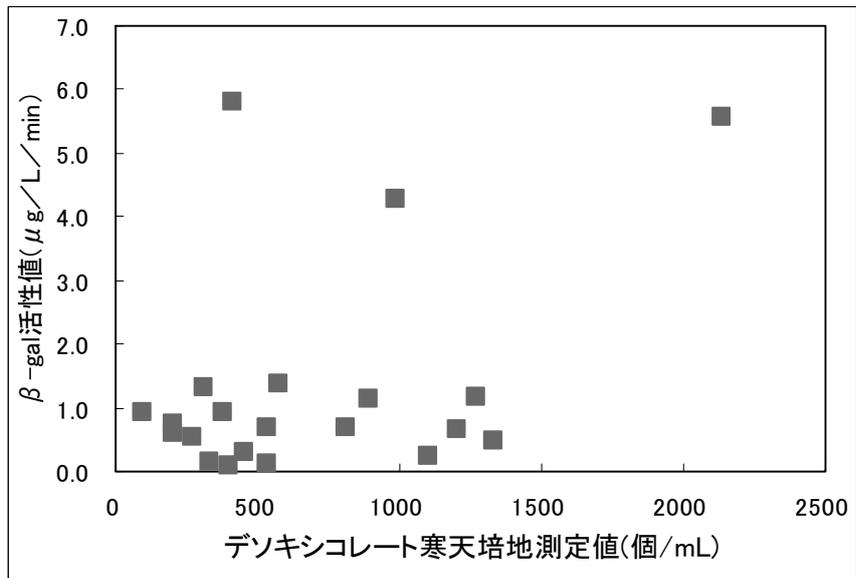


図 2-23 ろ過なしの A 処理場のデソキシコレート寒天培地法と β -ガラクトシダーゼ活性値の比較

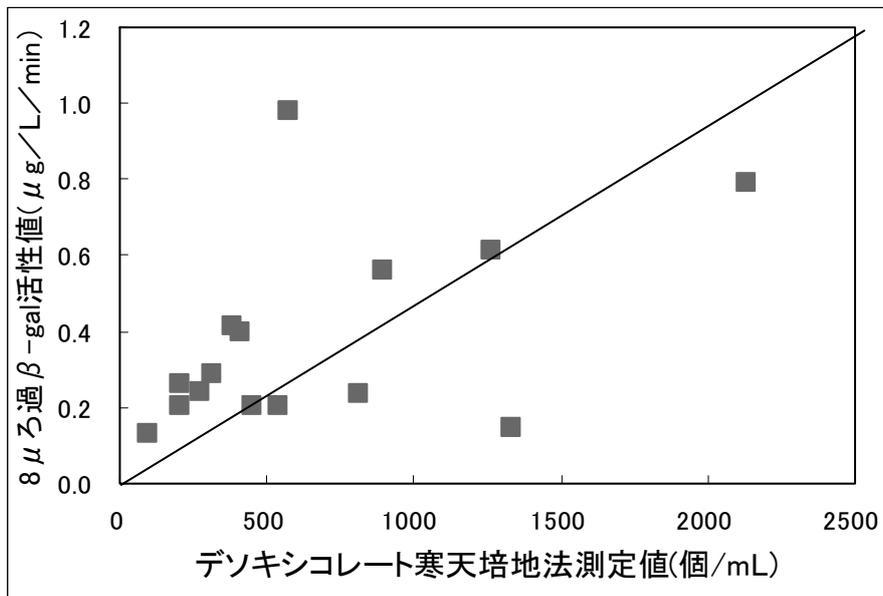


図 2-24 ろ過前処理実施時の A 処理場のデソキシコレート寒天培地法とフィルタろ過後の β -ガラクトシダーゼ活性値の比較

図 2-23 と図 2-24 を比較すると、孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルタろ過を実施することで、相関が改善したことが明らかである。

次にその他の処理場として、大阪府 O 処理場についても同様に検討を行なった。測定サンプルの状態について表 2-10 に示す。

表 2-10 O 処理場の測定サンプル

	対象データ	データ点数
O 処理場	2002 年 3 月～2002 年 8 月	9 点

単位大腸菌群数当りの β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性値 (単位: $\mu\text{g}/\text{L} \cdot \text{min} \cdot 1000\text{CFU}$) を求め、その変動範囲を計算した。図 2-25 に単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性値の変化をフィルタ有無のそれぞれについて示す。

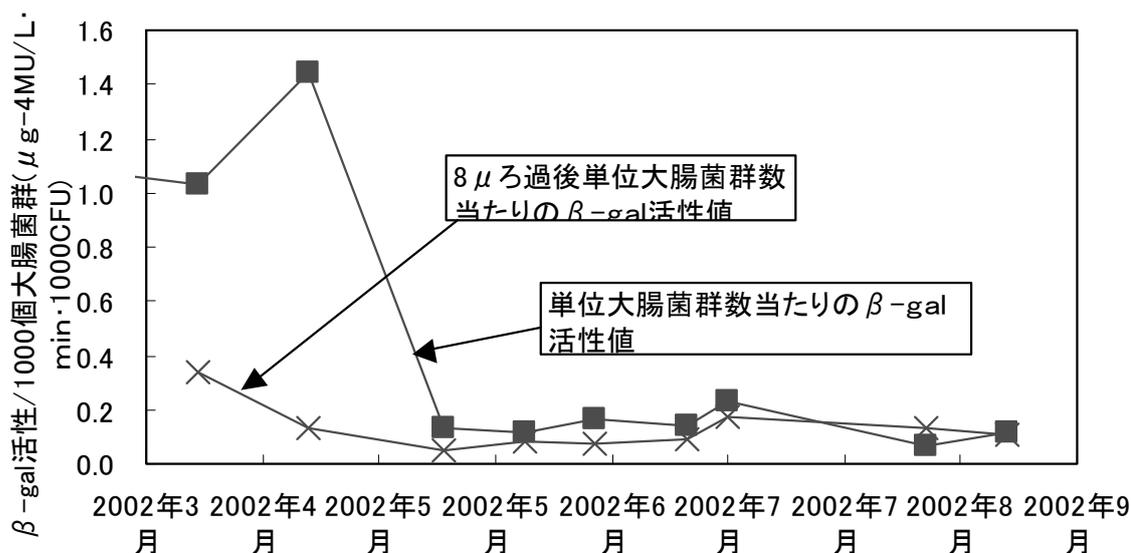


図 2-25 単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性値の変化

8 μm ろ過を実施することにより、単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値は同様に減少し、かつ平均化していることが分かる。またろ過前のサンプルにおいて単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値が低い時 (約 $0.1\mu\text{g}/\text{L}/\text{min} \cdot 1000\text{CFU}$) は孔径 8 μm フィルタろ過による測定値に与える影響はほとんど無いことが分かる。次に単位大腸菌群数あたりの β -ガラクトシダーゼ活性値の逆数を求め、最大値、最小値、平均値、測定差異の範囲について

計算した結果を表 2-11 に示す。

表 2-11 各処理場における β -ガラクトシダーゼ活性値／大腸菌群数

処理場	条件	最大値	最小値	平均値	最大値 / 最小値	測定差異の範囲
A 処理場	フィルタ無し	16.67	0.114	1.078	147	-95.7%,+537%
	8 μ m フィルタ処理	20.0	1.632	4.739	12.3	-78.6%,+162%
O 処理場	フィルタ無し	14.71	0.694	2.618	21.2	-73.5%,+462%
	8 μ m フィルタ処理	21.74	2.959	7.634	7.3	-61.2%,+185%

最大値、最小値、平均値の単位：1000 CFU/ (μ g/L/min)

表 2-12 から 8 μ m フィルタ処理により誤差範囲が改善され、A 処理場では測定差異の範囲が-95.7%, +537%から-78.6%, +162%へと、O 処理場では-73.5%, +462%から-61.2%, +185%まで改善されることが判明した。

第 3 節 大腸菌数計測に関する基礎的検討

2-3-1 概論

本節ではこれまで検討してきた大腸菌群数ではなく、公衆衛生面での指標の一つである、大腸菌を迅速に計測する方法について実験的な検討を行った。第 2 節で既に述べたように、大腸菌は大腸菌群の中の一つの細菌であり、特異的な酵素として β -グルクロニダーゼを所持していることが知られている。この β -グルクロニダーゼに着目して大腸菌を選択的に測定する測定の基本的な考え方は、これまでの大腸菌群数の測定に対する β -ガラクトシダーゼの測定と同様である。

2-2-1 で述べたように、平成 21 年 1 月現在、下水においては、大腸菌群が指標

のため、本研究においては β -ガラクトシダーゼに着目した方法を用いている。しかし、上水の水質基準項目が既に大腸菌となっているなど、公衆衛生学的な指標としては大腸菌が望ましいことから、下水の方も将来的に水質項目として大腸菌に変更される可能性が高い。その場合でも蛍光基質を変更するだけで対応することが可能かどうか実験的に調べることを目的とする。

2-3-2 研究方法

ここでは大腸菌の迅速測定の可能性と、測定手順の最適化を図ることを目的として実験を行った。

大腸菌の測定が蛍光酵素法で原理的に測定可能かについて検討を行うため、サンプルとして三ヶ所の下水処理場（A、O、T 処理場）の消毒前の二次処理水をサンプルとした実験を行った。

測定は図 2-2 に示す手分析による手順に準ずるが、基質は 4-MUG ではなく、4-メチルウンベリフェリル- β -グルクロニドである点異なる。ただし酵素反応後に生成する蛍光物質は同じ 4-メチルウンベリフェロンであることから試薬が異なる以外は手順としては同様である。

一方、大腸菌数の測定は特定酵素基質培地法すなわち MMO-MUG 法^{2) 3)}により行ない、市販の測定キット（コリラート：アスカ純薬）により、24 時間培養後の紫外線照射時に青い蛍光を発するサンプルについて MPN 法（n=5）により判定を行なった。

2-3-3 結果および考察

(1) β -グルクロニダーゼ活性の基本特性

大腸菌数 340 CFU/mL の場合の 4-MU 濃度変化を調べた結果を図 2-26 に示す。

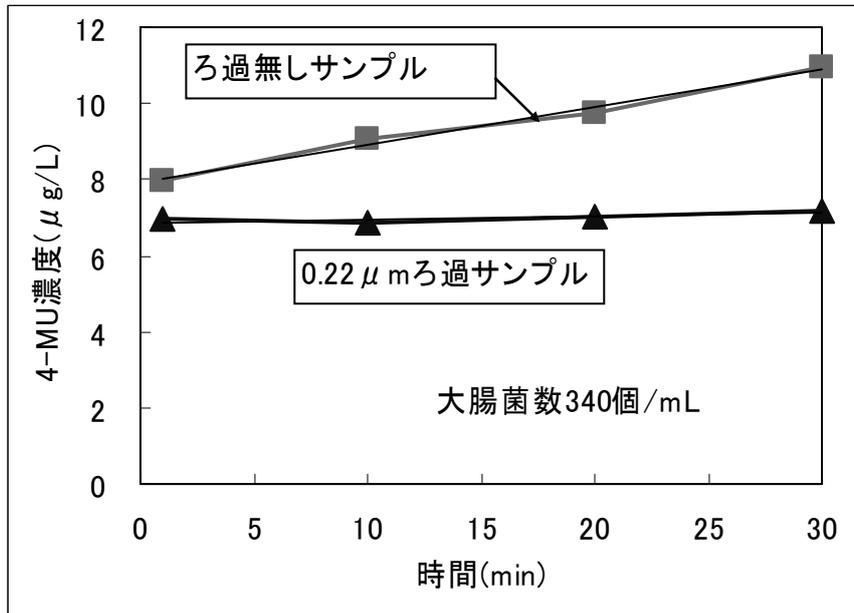


図 2-26 二次処理水の β -グルクロニダーゼ活性の測定の例

図 2-26 から、ろ過なしサンプルの 4-MU 濃度の変化はほぼ直線であり、 β -ガラクトシダーゼ活性と同様に β -グルクロニダーゼ活性も傾きから酵素活性値を求めることが可能であることが分かった。また $0.22 \mu\text{m}$ ろ過サンプルの傾きは十分小さい値であり、溶解性の β -グルクロニダーゼの活性は十分小さいものと推測される。

(2) MMO-MUG 法との相関

大腸菌の測定として下水試験方法に記されている MMO-MUG 法による大腸菌数との相関を調べた結果を図 2-27 に示す。

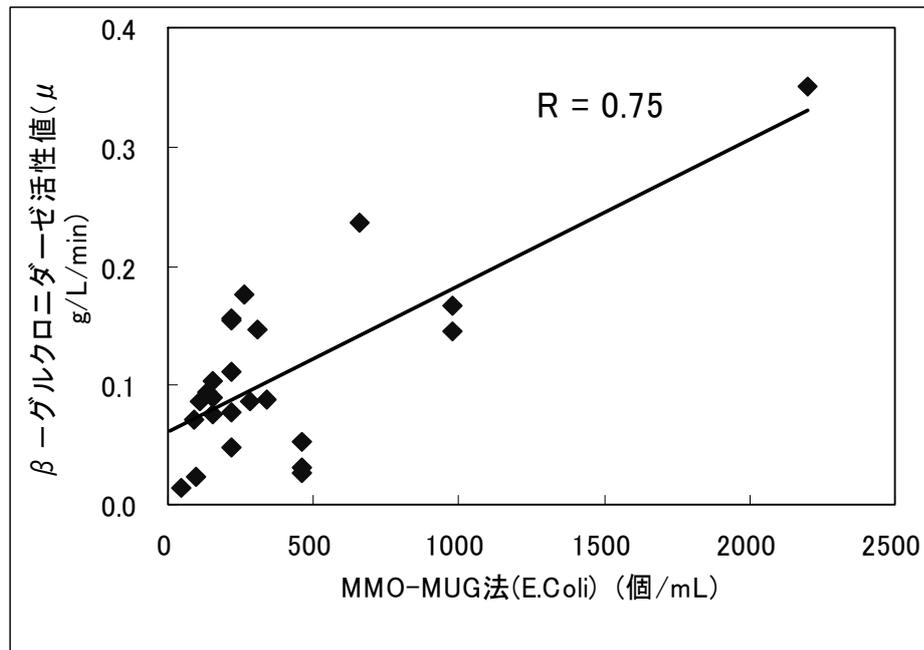


図 2-27 β-グルクロニダーゼ活性値と大腸菌数の相関

図 2-27 から β-グルクロニダーゼ活性値と MMO-MUG 法による大腸菌数との相関が見られ、相関係数は 0.75 であった。大腸菌群数の相関を示す図 2-20 と比較すると、過剰な処理でも相関が良好であることが分かる。これは β-グルクロニダーゼ活性を求める蛍光酵素法が、酵素の活性を測定するものであり、MMO-MUG 法と測定原理が近いと考えられる。

この実験においては β-ガラクトシダーゼ活性値で相関が改善された過剰操作は実施していないが、β-グルクロニダーゼ活性値の場合でも、過剰な処理を実施することで同様に改善が期待されるものと考えられる。

第4節 結語

本章では自動・迅速・高感度な大腸菌群測定装置の開発のために、蛍光酵素法を利用した測定において、その迅速化の可能性と測定手順の最適化について実験を行った。その結果、以下の結論を得た。

- (1) 各種測定用試薬の濃度、pH（反応時、アルカリ注入時）、蛍光のスペクトルを調べ、最適化を図った結果、二次処理水など数百 CFU/mL オーダーの大腸菌群数であれば、30分程度の測定時間で測定可能であることが示唆された。
- (2) 測定下限を検証した結果、下水の放流基準値である 3,000 CFU/mL を十分確保する 200 CFU/mL を測定可能であることが明らかになった。
- (3) 測定に影響を及ぼす原因として SS 成分の存在が明らかとなり、これを除去する手法として孔径 8 μ m のフィルタ除去を前処理として実行することで、デソキシコレート寒天培地法との相関が大きく改善した。
- (4) 大腸菌の迅速測定の検討を行なった結果、 β -グルクロニダーゼ活性に着目することで、大腸菌の迅速測定が可能であることが明らかになった。

第2章 参考文献

- 1) 工業技術会編「食品微生物検査の簡易・迅速・自動化最新技術」(1995) .
- 2) 日本水道協会編、「上水試験方法 1993年版」、(1993).
- 3) 日本下水道協会編、「下水試験方法 1997年版」、(1997).
- 4) I.Masuda-Nishimura, S.Fukuda, A.Sano, K.Kasai and H.Tatsumi:”Development of a Rapid Positive/Absent Test for Coliforms using Sensitive Bioluminescence Assay” , Letters in Applied Microbiology , 30, 130-135(2000).
- 5) Fiksdal .L, Tryland, I. and Nelis, H.: "Rapid detection of coliform bacteria and influence of non-target bacteria", Water Science Technology, Vol.35, No.11-12, 415-418 (1997).
- 6) 蛍光測定の原理と生態系への応用－蛋白質核酸酵素 編集部編
- 7) I.Tryland and L.Fiksdal: "Enzyme Characteristics of β -D-Galactosidase- and -D-Glucuronidase- Positive Bacteria and Their Interference in Rapid Methods for Detection of

- Waterborne Coliforms and *Escherichia coli*" , Applied and Environmental Microbiology, Mar, 1018-1023 (1998).
- 8) 古畑ら、「水中の細菌検査技術の現状と問題点」、第 31 回日本水環境学会講論集、(1997).
 - 9) 平田ら、「MMO-MUG 法の大腸菌群と *Escherichia coli* の検出能力-従来法との比較」、第 26 回日本水環境学会講論集、(1992).
 - 10) 平田ら、「上水試験方法の改訂に伴う試験方法の検討 (X II)」、第 44 回全国水道協会発表講論集、(1993).
 - 11) 平田ら、「特定酵素基質培地法における培養時間と検出菌数」、第 28 回日本水環境学会講論集 (1994).
 - 12) Xiaolin L.Huang, et.al: "Simultaneous isolation and immobilization of streptavidin - β - galactosidase:Some kinetic characteristics of the immobilized enzyme and regeneration of bioreactor", Enzyme and Microbial Technology 19:378-383 (1996).
 - 13) Peter C.S. Feng and Paul A Hartman, "Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of *Escherichia coli*" , Applied and Environmental Microbiology ,June (1982).
 - 14) I.Tryland, I.D.Samset, L.Hermansen, J.D.Berg and H.Rydberg"Early Warning of faecal Contamination of Water a dual mode, automated system for high-(<1 hour) and low-levels(6-11 hours)", Water science & Technology, Vol.43, No.12, 217-220(2001).
 - 15) I.George,M.Petit and P.Servais: "Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in fresh waters", Journal of Applied Microbiology, 88, 404-413(2000).
 - 16) Liv Fiksdal, Monique Pommepuy, Marie-Paule Caprais and Ingunn Midttun: "Monitoring of fecal Pollution in Coastal Waters by Use of Rapid Enzymatic Techniques", Applied and Environmental Microbiology, May, 1581-1584(1994).

第3章 大腸菌群数計測法の装置化と性能評価に関する研究

第1節 概説.

第2章において、大腸菌群数を迅速に測定する手法について検討した結果、蛍光酵素法 (β -ガラクトシダーゼ活性利用) において培養を行わない方法を採用することで、原理的に大腸菌群数が30分以内に測定可能であることを示した。

下水処理場の現場において、自動で連続的に測定するために、可能な限り人の手間を必要としない装置が必要である。特に消毒を自動で行う場合は、時々刻々と変化する測定値を把握するための自動計測装置の実現が不可欠である。

第1章で示したように計測装置で実用化されている例として、回分方式により反応を実現する方法と、連続で反応を実現する方法の二法に分かれるが、連続式であるフローインジェクション法はT-N、T-P計、アンモニア性窒素濃度計のように実際に市販されており、稼動している例^{1),2)}が存在している。この点から本研究ではフローインジェクション方式を採用し、第2章で構築した測定フローの適用を行った。

また構築した実証機を、大阪府T処理場、神戸市A処理場、および横浜市C処理場に設置して、フィールド実験により性能評価を行った。

第2節 大腸菌群数計測法の装置化

3-2-1 概論

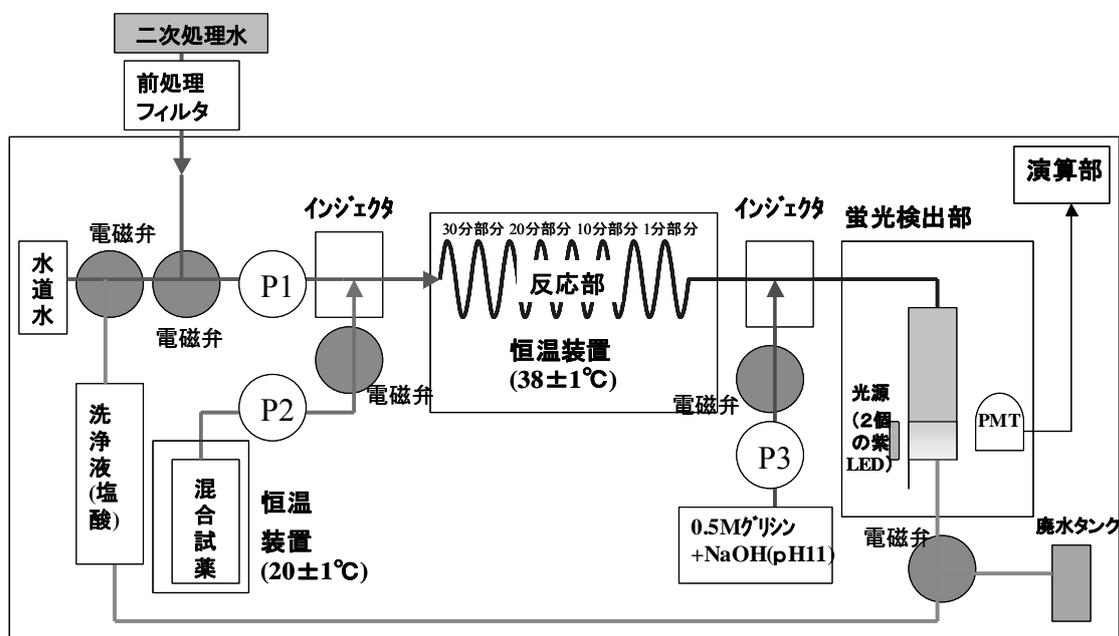
本研究では、安定した計測が期待できるフローインジェクション方式を採用したが、下水処理場など環境条件が厳しい場所では長期間にわたる運転に不安がある。また、第2章で構築した蛍光酵素法の測定フローでは酵素反応が10～30分程度と測定時間に対して明らかに律速となっており、これ以上の迅速化が

困難であると予想されることから、サンプル導入などの動作について可能な限り迅速化を図る必要がある。本節ではこれらの課題の解決に重点を置いて検討を行なった。

3-2-2 装置構築

大腸菌群計測装置の実証機の構成について以下に説明する。図 3-1 に全体構成図を示す。また図 3-2～4 に実証機（一号機）の写真を示す。前処理フィルタによって SS が除去された二次処理水はインジェクタで混合試薬と混合され、反応部分において酵素反応が行われる。その後、後段のインジェクタにおいてアルカリ（0.5M グリシン+NaOH）が注入された後、蛍光検出部において蛍光をフォトマルチプライヤー（PMT）で検出する機構となっている。

また配管経路を常に清浄化するために洗浄液（塩酸）を注入する機構および回収するためのループ回路を設けた。



P1、P2.....ポンプ、PMT：光電子増倍管（photo multiplier）。

図 3-1 大腸菌群計測装置の実証機の構成図

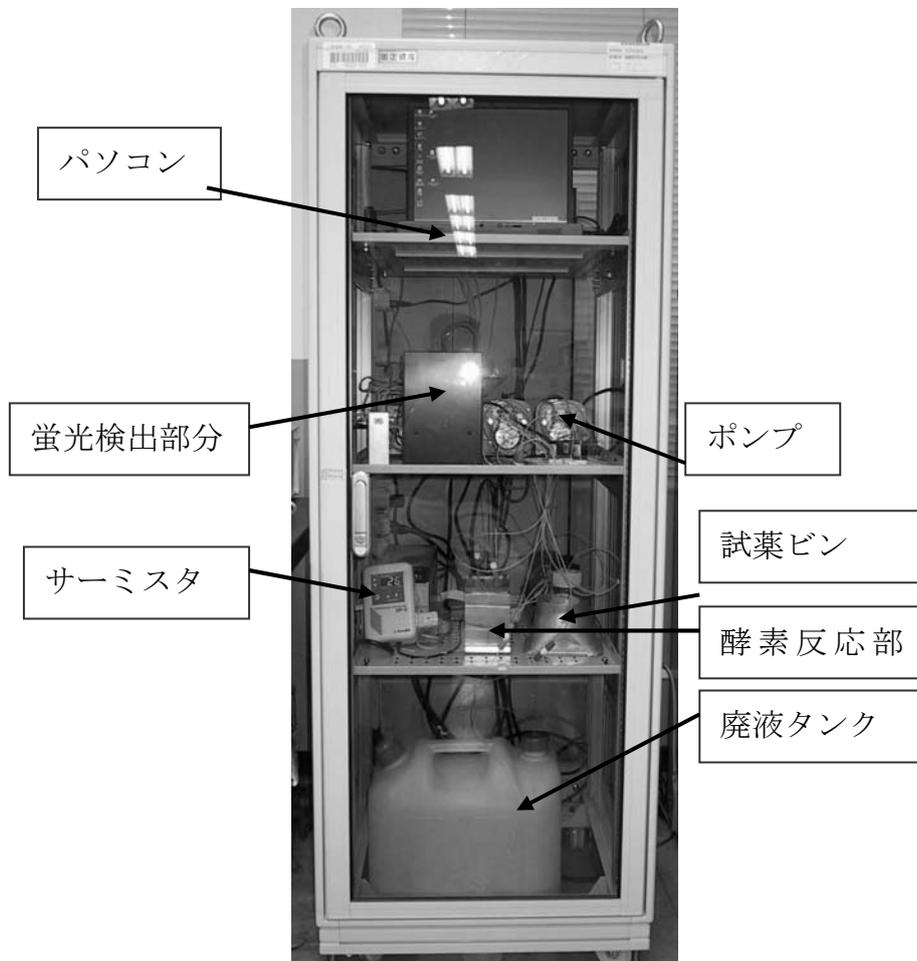


図 3-2 実証機一号機

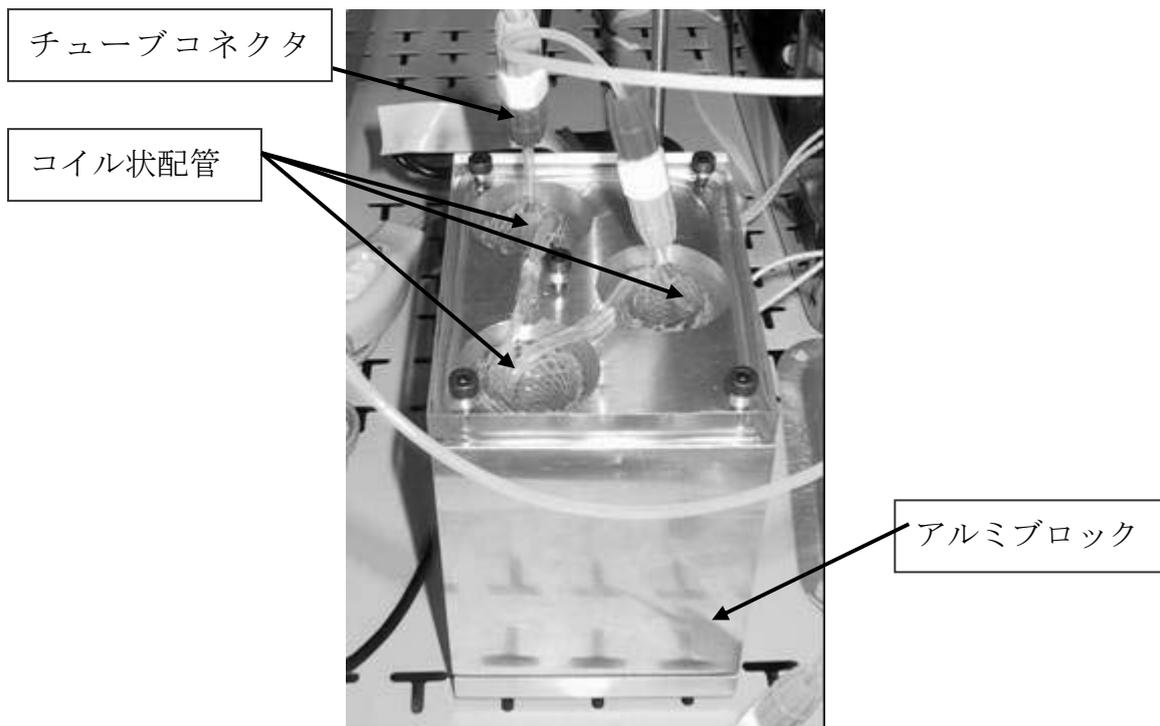


図 3-3 酵素反応部分
(実際は断熱材で梱包されている)

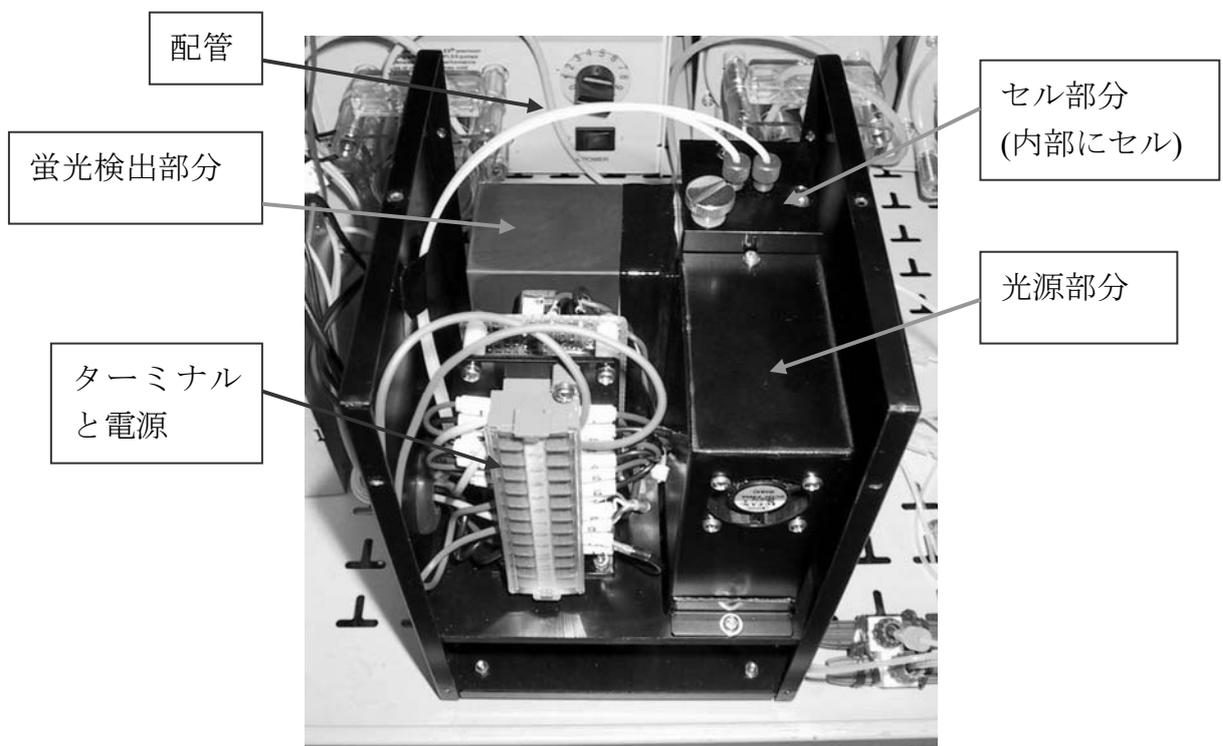


図 3-4 蛍光検出部分内部

(1) 構成部品

図 3-1 の実証機を構築するにあたり、用いた主な部品の一覧を表 3-1 に示す。

表 3-1 実証装置の構成部品

用途	名称	略称	仕様	型番	メーカー	必要量
送液部	ポンプ	P1, P2		Master flex No.7533-70	Cole-Palmer Instrument	2 個
	ポンプ	P3		Master flex L/S	同上	1 個
	ポンプ	P4		PMD-121B7B1	三相電機	1 個
	二方電磁弁	同左	耐圧 300 k Pa	MTV-2-M6	TAKASAGO	2 個
	三方電磁弁	同左	耐圧 300 k Pa	MTV-3-M6	TAKASAGO	2 個
配管部	フッ素樹脂チューブ		内径 1.35mm 外径 1.95mm	PFA	任意	-
	タイゴンチューブ			Master flex 用	Cole-Palmer Instrument	-
	ファーマドチューブ(アルカリ用)			Master flex 用	Cole-Palmer Instrument	-
	チューブコネクタ		二方コネクタ	5-6030	SUPELCO	3 個
反応部	インジェクタ		三方コネクタ	5-6032	SUPELCO	2 個
	フッ素樹脂コイル状配管	反応部分	内径 2mm、外径 4mm、巻数 20	PFA42	志生理化学器械	3 個
	アルミブロック				特注品	1 個
	シリコンラバーヒーター		ヒーター部分 10cm×cm		イウチ	1 個
	セル		セル長 10mm 蛍光用	FLFM200F-B-3.5	GL サイエンス	1 個
測定部 (蛍光検出部分)	紫 LED		中心波長 385nm	E1L5M-4P0A 2-01	豊田合成	2 個
	光電子増倍管			R105	浜松フォトニクス	1 個
	光電子増倍管用ソケット			C7246-01	浜松フォトニクス	1 個
	光電子増倍管用高電圧電源			C4900-01	浜松フォトニクス	1 個
	12V 電源		交流 100V 入力 直流 12V 出力	EAK12-1R3G	TDK	2 個
	フィルタ 1(紫外線透過バンドパスフィルタ)		径 30mm に加工	SCF-50S-42 L	シグマ光機	1 個
	フィルタ 2(紫外線除去フィルタ)		径 30mm に加工	UTVAF-50S-36U	シグマ光機	1 個
	シーケンサ	同左		FX2N-64MR	三菱電機	1 個
制御部	パソコン	同左	Windows2000	AL シリーズ	三菱電機	1 個
	AD 変換器	同左	12bit、サンプルホールド、周波数 50KHz	REX-5054B	RATOC	1 個
	サーミスタ制御装置			DP-3	イウチ	1 個

・試薬

今回使用した試薬を表 3-2 に示す。 β -ガラクトシダーゼ活性値を求めるために必要な試薬群の他に、装置を長期的に安定して動作させる目的で希塩酸が加わっている。第 2 章で示している薬品群と異なる点としてアルカリは NaOH 溶液ではなく、グリシン-NaOH 緩衝溶液を用いている点である。これは、測定の安定性を維持するためには緩衝溶液の方が望ましいと考えたためである。

表 3-2 試薬一覧

	調整時での濃度	サンプルと混合時の濃度
リン酸ナトリウム緩衝液	0.17 M	10 mM
4-メチルウンベリフェリル- β -ガラクトピラジド (4-MUG)	0.08 %	0.005% (148 μ M)
ラウリル硫酸ナトリウム	0.005%	0.0013 %
グリシン-NaOH 緩衝溶液 (pH 10.5)	0.5 M	0.08 M
希塩酸 (配管洗浄用)	1 M	-

(2) 設計仕様

・フローインジェクションの構成

酵素である β -ガラクトシダーゼの活性を測定するため、蛍光物質の増加速度すなわち蛍光強度の傾きを求める必要がある。培養操作を省略しているとはいえ、酵素反応は一般の化学反応に比較すると数十分というリアルタイムとは言えない反応時間であり、これを考慮した上で連続かつ自動で動作させる必要がある。装置を構成する上でのアルゴリズムとして以下の 3 法を比較した。

- A. ストップ・フロー法：酵素反応など、時間が必要とされる場面ではポンプを停止させ、必要時にポンプを動作させる方式である。この場合、ポンプの流量はある程度大きくても問題ないと考えられる。
- B. 連続法：通常のフローインジェクションは本方法が多用されている。ポンプを連続的に A よりもゆっくり動作させ、同時に蛍光強度を連続的

に測定し、蛍光強度の増加速度を求める方法である。連続的にポンプを動作させるため、数 mL/min という低流量のポンプが必要となる

C. パルス連続法：A と B の中間的な方法で、例えば数秒おきにパルス的にポンプを動作させる方式である。

上記 3 法の長短所を比較するために、まとめたものを表 3-3 に示す。

表 3-3 蛍光強度の増加速度を求めるアルゴリズム比較表

	方法	プログラム構成	測定精度	ポンプ要求性	ポンプ寿命、チューブメンテナンス時間
A	ストップ・フロー法	平易	低い	低い	長い
B	連続法	平易	高い	高い	短い
C	パルス連続法	複雑	普通	低い	普通

連続法を採用するためには低流量 (0.1mL/min 程度) のポンプが必要であるが、極低流量で高精度のポンプは高コストであり、長期に亘る連続測定では不安が残る。このことから構成の容易な点を重視して、A のストップ・フロー法を採用した。

本研究では蛍光強度の絶対値ではなく、蛍光強度の増加速度が必要であるため、例えば酵素反応時間を 30 分とすれば、予め蛍光強度測定に必要な容量について、トータルで酵素反応を行わせておき、適当な時間が経過した後、例えば 0、10、20、30 分後にポンプを間欠的に動作させて必要分量の反応液を蛍光検出部分に送り、順次蛍光強度を測定し、最小二乗法により近似直線の傾きを求めることとなる。酵素反応時間はどの程度必要かという点は酵素量すなわち大腸菌群数に依存する。すなわち大腸菌群数が少なければ、酵素反応時間が長く必要であるが、多ければ酵素反応時間は短くて済む。

このとき、酵素反応を行わせる部分の容量は、配管が内径 2mm とし 660cm の長さとしたため、約 20.7mL の容量とした。また蛍光検出部分のセルの容量は 0.4mL であり、セルの内容物を全て入れ替えるためには送液量はセル容量の 2 倍の 0.8mL 以上は最低限必要と考えられることから、ここでは安全側を見込んで蛍光測定一回分の送液量はセル容量の 7 倍程度の 2.76mL と設定した。したがって例えば、1、10、20、30 分後の酵素反応後の溶液の蛍光強度を測定するとすれば、2.76mL の 4 倍の約 11mL が必要であり、前述の酵素反応を行わせる部分の容量の 20.7mL 以下となっており、問題ないことが分かった。

流量については実際に実験的に変化させて検証した結果、ポンプ動作時の流量を 30mL/min 以上に設定すると、主に接続部において水漏れが起きやすいことが実験的に分かっているが、迅速測定を実現するためには、ある程度大きな流速が必要なこともあり、22mL/min と設定した。

反応部分以外の配管については、通常フローインジェクション方式では 0.5mm 程度の径のものが用いられているが、本研究では二次処理水や雨天時の未処理下水がサンプルのため、SS による配管内部の詰まりが懸念される。一方、配管はなるべく短くして容量が小さい方がデッドボリュームは少ない方が、応答性が良くなるが、配管径を小さくすると上記の SS による閉塞が起き易くなる。

以上の検討結果から、反応部分以外の配管については内径 1.35mm のチューブを用いた。配管の材質は、切断・曲げ加工が容易で、熱伝導性が高く、耐酸性（配管内の酸洗浄を行うため）、微生物や酵素の内壁付着が少ない、すなわち表面形状がなるべく平滑なものが条件となるが、これらをほぼ満足させる材料としてフッ素樹脂（PFA）を選択した。一方、シリコンチューブは内壁に汚れ付着が起りやすいことから、使用は好ましくない。

・反応部分の恒温の実現

反応部分の配管の加温手段は水やミネラルオイルによる浸漬による方式で行

う方法と、空気加温で行う方法の二種類がある。本研究では、安定な酵素反応を確保するために、安定性の高い水による浸漬方式を採用し、温度は 37 に設定した。

・前処理フィルタ部分

第 2 章で既に検討したように、二次処理水や雨天時の未処理下水には大腸菌群以外に SS 分や夾雑物が混入しているため、これらが混入すると測定値に悪影響を及ぼし、また配管や電磁弁の詰まりの原因となる可能性があるため、これらを除去するフィルタが必要となる。第 2 章で検討したように、公称孔径 8 μm 程度のフィルタでろ過するのが好ましいが、連続でろ過可能とするために、クロスフロータイプで孔径が均一なセラミックフィルタを用いた。

・蛍光検出部分

蛍光を検出する手段として市販の蛍光光度計を用いる方法があるが、実際に装置として構成する場合、そのまま流用することは適当ではないため、必要最小限の機能を備えた装置を設計し製作を行った。大きく分けて 4 つの部分で構成されている。

- (1) 紫外線発生部：紫 LED により 370~380nm 付近の紫外線を発生させる。
- (2) セル部分：蛍光用セルを中心として、遮光する構成としている。光導入部分の入口には紫外線のみを透過するバンドパスフィルタ、蛍光を光電子増倍管部分に導入する出口部分には紫外線をカットする UV カットフィルタが組み込まれている。
- (3) 検出部分：光電子増倍管を中心としてソケット及び遮光用の筐体部分で構成される。光電子増倍管は電磁波の影響を受けやすいため、筐体内面に防磁シートを貼付した。
- (4) 電源：紫 LED と光電子増倍管用の高圧電源を備えている。

また設計に際し、以下の点を留意した。

- (1) 光学系はできるだけ簡単な構成とした。すなわち蛍光光度計で用いられているモノクロメーターの代わりに光学フィルタを用いて機械的動作部分が無い仕様とした。
- (2) 紫外線発生部 セル部分 検出部分のそれぞれの距離はなるべく短くし、5cm とした。これはコンパクトな大きさを実現し、かつなるべく高感度にするためである。

蛍光を測定するセルについては高感度の測定を実現するため、石英ガラス製の光路長が 10mm のものを選択した。

光を検出するセンサとして、現在一般的に使われているものを大別すると、光電子増倍管とフォトダイオードであり、それぞれ測定対象とする光波長毎に異なる特性をもつ物が多数市販されている。光電子増倍管は分光光度計や蛍光光度計等の分析計といった、分析装置や計測用によく用いられるが、フォトダイオードは光センサとして工業用監視機器に使われ、また小型、集積化を行うことによって、CCD として画像解析装置やデジタルカメラにも用いられている。両者を比較すると、光電子増倍管の方が高感度（一般的にはフォトダイオードの 100 倍以上とされている）であるが、小型で扱いやすさという点でフォトダイオードが有利である。今回の検討では感度が最優先とされると予想したため、光電子増倍管を用いた。

・光源の選定

本研究で必要な光源としては 4-MU が蛍光を発するための励起波長として 350～380nm 付近に十分な光強度を持つものが必要である。この波長を持つ小型の光源としては、UV ランプ、キセノンランプ、キセノンフラッシュランプ、紫 LED を比較した。それらの光源の特性をまとめたものを以下の表 3-4 に示す。なお、寿命については、センサ用途での正確なデータについての報告が見当たらないが、初期特性から 50% の出力となった場合を想定して算出した。

表 3-4 励起光源一覧

	大きさ	寿命	出力	備考
UV ランプ (ブラックライト)	4mmφ×10cm (本体部分)	1 万時間	7mW	<ul style="list-style-type: none"> ・熱対策が必要（空冷ファンなど）。 ・高圧電源が必要
キセノンランプ	10mmφ×10cm (本体部分)	最大 1000 時間	数十 W	
キセノンフラッシュランプ		最大 2000 時間	同上	
紫 LED	5mmφ×6.2mm (本体部分で端子を含まず)	5 万時間程度	1.5mW	<ul style="list-style-type: none"> ・熱発生が無し ・高圧電源が不要

本研究においては表 3-4 の光源のうち、小型で長寿命であるという特徴を持つ紫 LED を光源として採用した。今回用いたものは狭指向性タイプ（豊田合成 E1L5M-4P0A2-01）である。これはチップの先端にレンズを取り付けることにより指向性が鋭くなるように構成されているものである。

紫 LED は高圧電源が不要で消費電力も小さく熱も発生しないため、複雑な機構を要さない点も長所である。ただし紫 LED の発光波長は 380nm 付近であり、4-MU の最適励起波長の 360nm からは差異があり効率が低下することから、感度不足を補うために、二個を並列的に組み込んだ。

・光学フィルタの選定

蛍光測定を高感度とするために適切な光学フィルタを選定する必要がある。第 2 章での検討により、4-MU 測定に必要な励起波長 370nm、蛍光波長 450nm 付近に二次処理水には含まれていないことが分かったため、その他のスペクトルを排除すれば十分であると考えた。その観点からフィルタは以下の三種類を用いた。

- A：光源⇄セル間については 350nm 以下をカットし、さらに迷光による可視光（400nm 以上）をカットするバンドパスフィルタ
- B：セル⇄光電子増倍管の間には 400nm 以下の主に紫外光をカットするハイパスフィルタ
- C：同じくセル⇄光電子増倍管の間には 550nm 以上をカットするローパスフィルター

3-2-3 装置動作

ここでは 3-2-2 で構成した実証機一号機の動作を、図 3-1 を用いて説明する。

(1) 測定時

以下に測定する時の動作を示す。ここでは二次処理水をサンプルとした場合について例示する。

三方電磁弁を切り替えることで、「前処理フィルターP1ーインジェクターー反応部ーインジェクターー蛍光検出部ー廃水タンク」となるように設定する

混合試薬側の二方電磁弁（P2 とインジェクタの間）を開け、ポンプの P1、P2 を動作させる。

反応部の配管内部がサンプルと混合溶液で置換されたら、P1、P2 を停止させ、混合試薬側の二方電磁弁を閉じる

1、10、20、30 分後に、アルカリ側の二方電磁弁を開き、P1、P3 を動作させる。動作時間については蛍光検出部の蛍光セルの容量の 3 倍程度の量に相当するものとした。

の各時間の 30 秒後に、蛍光検出部分の出力から AD 変換器を介して出力電圧をパソコンで取り込む。データは 1 秒間隔の 18 点を間欠的に

取り込み、単純平均値を求める。

1、10、20、30分のデータを用いて最小二乗法による演算プログラムから4-メチルウンベリフェロン生成速度(=β-ガラクトシダーゼ活性値)を算出する。

サンプルとして二次処理水の代わりに、大腸菌群数が高い雨天時の未処理放流水などの場合は、β-ガラクトシダーゼ活性値が高いため、④と⑥の蛍光測定時間として、例えば1、5、7、10分でトータルの酵素反応時間を10分と設定する。

(2) 洗浄時の動作

(1)の測定時の終了後に配管内を洗浄する動作を行っている。以下にその動作を示す。

三方電磁弁を切り替えることで、「配管用塩酸－P1－インジェクター－反応部－インジェクター－蛍光検出部－廃水タンク」とする。

P1を動作させ、配管洗浄液を配管内に注入し、サンプルと置換を行う。

1分間静置する

三方電磁弁を切り替えることで「洗浄液－P1－インジェクター－反応部－インジェクター－蛍光検出部－洗浄液」のループとする。

P1を動作させ、洗浄液を回収する

三方電磁弁を切り替えることで、「水道水－P1－インジェクター－反応部－インジェクター－蛍光検出部－廃水タンク」となるように設定する

P1を動作させ、水道水を注入する

三方電磁弁を切り替えることで、「前処理フィルター－P1－インジェクター－反応部－インジェクター－蛍光検出部－廃水タンク」となるように設定し、測定が再開されるまで待機する。

上記の洗浄動作から明らかなように配管洗浄液を繰り返し使っていることから、配管洗浄液の洗浄能力が低下した時には交換する必要がある。

3-2-4 基本性能の確認

以上のように構成した実証機一号機の基本性能を確認するために、以下の調整および試験を行った。

(1) キャリブレーション調整

イオン交換水を溶媒とした 500 nM の 4-MU 溶液をサンプルとして、実証機一号機で測定を行い、出力電圧を見ながら、光電子増倍管のアンプを調整することで、MAX 出力電圧の 80% の電圧となるように設定した。

(2) 感度特性の確認

以下の 4-MU 濃度の溶液を作成する。溶媒はイオン交換水を用いた。

0, 10, 20, 40, 100, 200, 500 nM

(0, 1.76, 3.52, 7.05, 17.62, 35.23, 88.09 $\mu\text{g/L}$)

0.5M-グリシン+NaOH 溶液 (pH10.5) を各サンプル 1000 に対し 33 の容量割合で混合する

各試料を実証機一号機に導入し、出力電圧を測定する。なお試料の導入は低い濃度の試料から順番に行った。

測定結果の一例を以下の図 3-5 に示す。

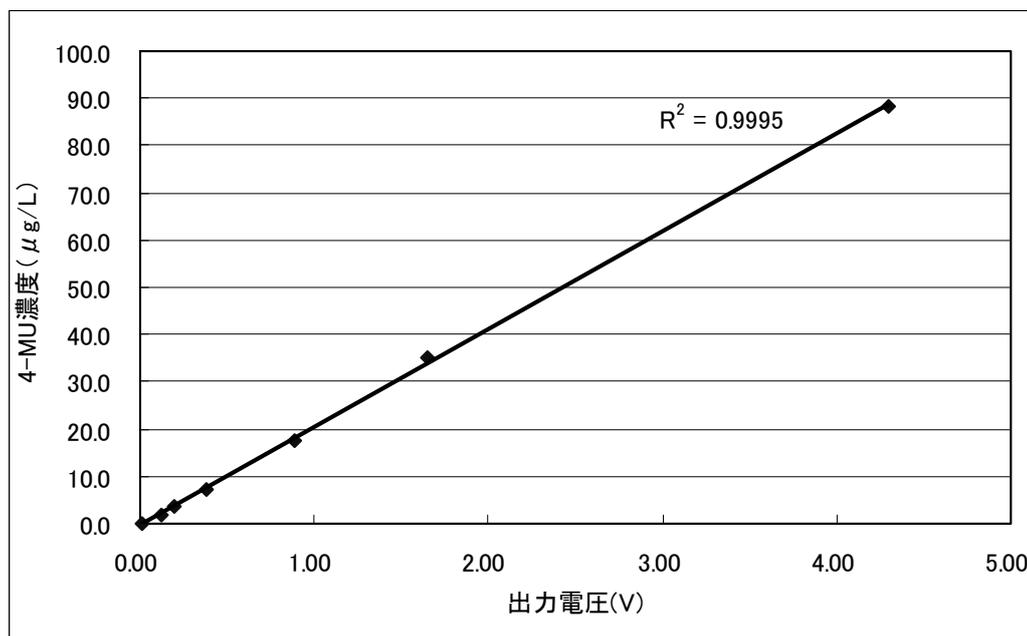


図 3-5 4-MU 濃度と出力電圧の関係

図 3-5 に示すように 4-MU 濃度と出力電圧との間には良好な直線関係が得られた。従って出力電圧と 4-MU 濃度は比例しているものと考えてよいため、出力電圧の変化から 4-MU の増加速度を求めても問題ないことが分かった。

第 3 節 実証装置の性能検証

3-3-1 概論

第 2 節で構築した実証機一号機の性能を、大腸菌の菌液および下水の二次処理水、流入下水をサンプルとして測定し、大腸菌群数の迅速測定の可能性について検討した。また連続測定に関わる装置や試薬の安定性についても確認を行った。

3-3-2 研究方法

実証機一号機を用いて、人工的に調整した大腸菌菌液をサンプルとした実験

と、下水処理場の現場に設置して実際の二次処理水をサンプルとして測定した実験を行なった。下水処理場は二箇所を設置して実施した。以下それぞれについて説明する。

(1) 大腸菌液による評価

大腸菌の菌液の応答性を調べるために人工的に調整した大腸菌の菌液のサンプルを装置に供給し、大腸菌濃度依存性を求めた。大腸菌の菌液のサンプルの作成方法は第2章で既に述べた方法と同様である。すなわち TSB 培地 (without グルコース : Difco 社) に β -ガラクトシダーゼの誘導剤として IPTG (isopropyl thiogalactoside) を 0.006% 添加した液体培地により、大腸菌 (*Escherichia.coli* K12 株) を 18~20 時間培養後に菌体洗浄、希釈することで得た。

一般の TSB 培地にはグルコースが添加されているが、ここでは含有されていない培地を用いた。これはグルコースが大腸菌の β -ガラクトシダーゼの誘導を妨害するためである。

得られた菌液を 0.85% 滅菌生理食塩水で 100 倍に希釈し、孔径 0.4 μm のフィルタを用いて吸引ろ過を実施することにより菌体を捕集し、生理食塩水でフィルタ付着の菌体の洗浄を行う。その後のフィルタを 50mL の生理食塩水に入れボルテックスターラにて 2 分間処理を行い、菌体を液相に移行させ、処理水を生理食塩水でさらに 100、1000 倍希釈する。この時点で菌液の濃度はそれぞれ 10^4 、 10^5 CFU/mL のオーダーとなる。この希釈液をサンプルとして、手分析法、実証機一号機で測定を行う。用いた試薬については既述の β -ガラクトシダーゼの場合と同様である。

比較対照となる培地法による大腸菌群数の評価は、下水試験方法⁽¹⁾に記載のデソキシコレート寒天培地法により行い 37℃ で 20 時間培養後、形成された紅~淡紅色の直径 0.5 mm 以上のコロニーを目視でカウントした。

また、同様に調製した大腸菌の菌液を装置に供給して、同一サンプルの繰り返し連続試験を実施した。大腸菌の菌液は 2 日以上放置すると酵素活性が低下するため、最大 60 回（1.7 日相当）の測定回数を目処にサンプルを交換した。

(2) フィールド実験

実証機一号機を下水処理場に設置して、測定を行った。設置した場所は、三箇所であり、大阪府 T 処理場、神戸市 A 処理場、横浜市 C 処理場である。それぞれの設置状況について説明する。

＜ 大阪府 T 処理場の場合＞

実証機一号機は T 処理場の塩素消毒棟の一室に設置し、採水は既設の UV 計の採水ライン（終沈から揚水ポンプで通水されている）を分岐させて、前処理フィルタ本体に接続した。また洗浄用として、水道水のラインを前処理フィルタに接続した。

前処理フィルタのフィルタ部分は、セラミックフィルタ（長さ 500mm、外径 30mm、内径 22mm の筒状断面、ろ過面積 0.03m^2 ）を製作した。第 2 章において大腸菌群を除去せず SS のみを除去する孔径としては $8\ \mu\text{m}$ 程度としたが、ここでは公称孔径 $15\ \mu\text{m}$ のものを用いている。セラミックフィルタの断面は円筒状である。セラミックフィルタは図 3-6 に示すようにクロスフロータイプであり、ろ過水は装置内臓のポンプで自動的に装置に供給した。セラミックフィルタに供給されるサンプル流量は装置に通水するろ過流量に比べて十分大きく、ろ過流量は $20\ \text{mL}/\text{min}$ と一定値を維持した。

長期的にフィルタを連続使用するとフィルタ表面に SS が付着し、フィルタ性能に影響を及ぼす。これを防止するためにフィルタの逆洗浄を行っている。具体的には、図 3-6 において水道水を利用してフィルタの逆方向（外側から内側）から洗浄を実行する。この逆洗は本来は自動で行うのが望ましいが、今回のフ

フィールド実験においてはバルブの手動開閉による操作を定期的（週に一回）に行った。図 3-7～3-9 に前処理フィルタ、実証機本体、サンプル取水部分の様子をそれぞれ示す。

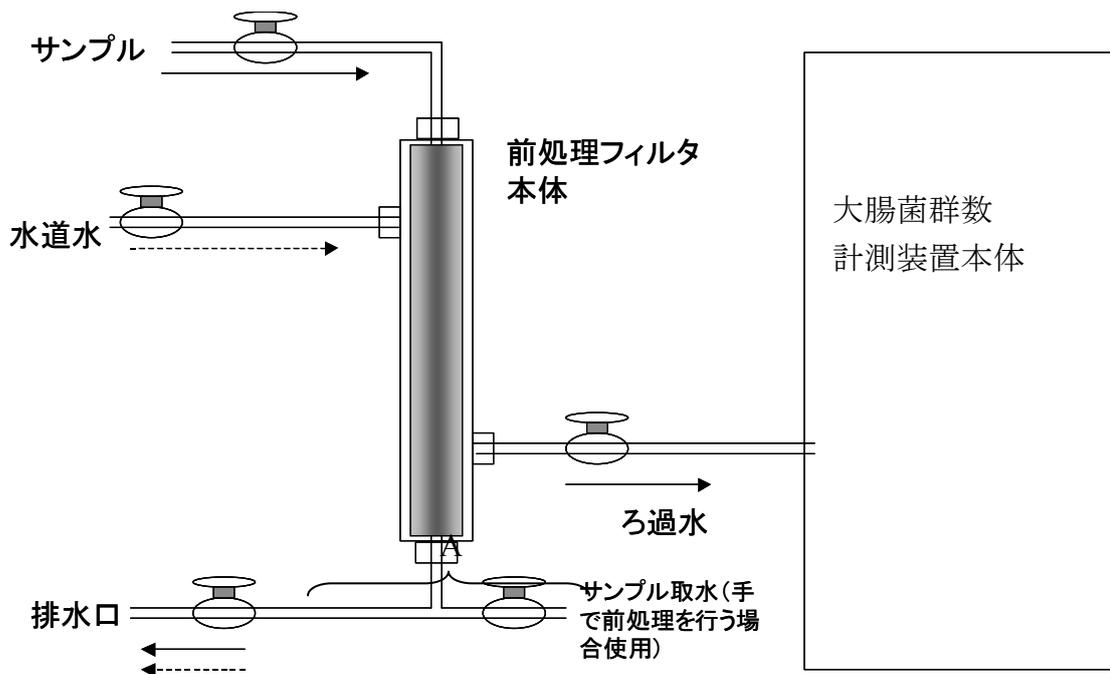


図 3-6 実証機一号機のフィルタ構成

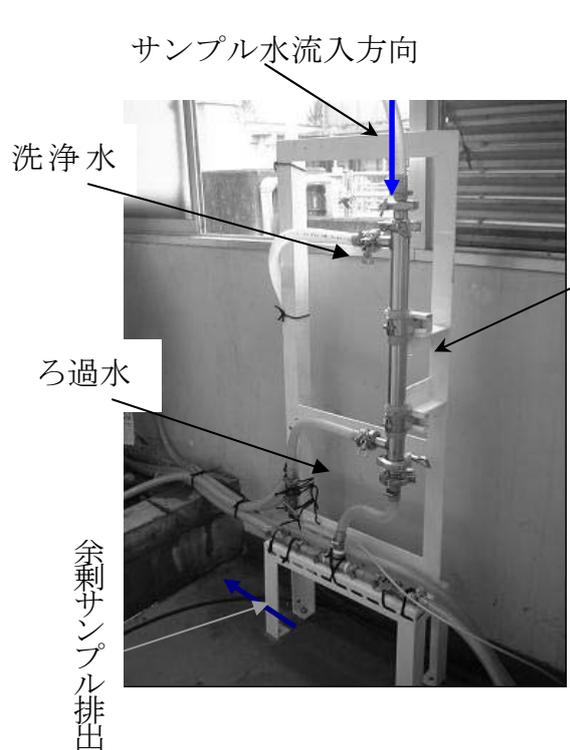


図 3-7 前処理フィルタ

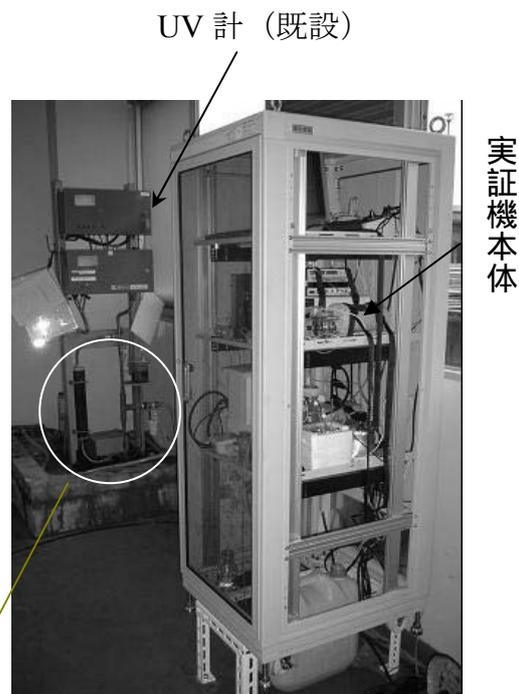


図 3-8 実証機本体



図 3-9 サンプル取水付近 (接続前)

この付近から配管を分岐して前処理フィルタに配管を接続した

＜神戸市 A 処理場の場合＞

実証機一号機を改良した実証機二号機を用いた。実証機二号機の構成は、前処理フィルタやポンプなどを除いては、T 処理場で実験した実証機一号機と全く同様の構成である。図 3-10 に外観写真を示す。



図 3-10 実証機二号機

前処理フィルタは T 処理場の場合にはセラミックフィルタを用いたが、A 処理場においては、ポリプロピレン製の円筒型のフィルタをカートリッジに収めたものを用いた。フィルタ本体の寸法は長さ 225mm、外径 25mm、内径 20mm であり、フィルタの公称孔径は 10 μm である。前処理フィルタは、装置本体へのサンプル導入が完了し測定が開始された時点で、水道水+バブリングによる逆洗を行っている。逆洗終了後は水を抜くことでフィルタ表面の汚れの蓄積を防ぎ、その状態を保持したまま次の測定まで待機する動作とした。

また図 3-11 に設置箇所付近の図面を図 3-12 に前処理部分に接続するまでの配管系の構成を示す。

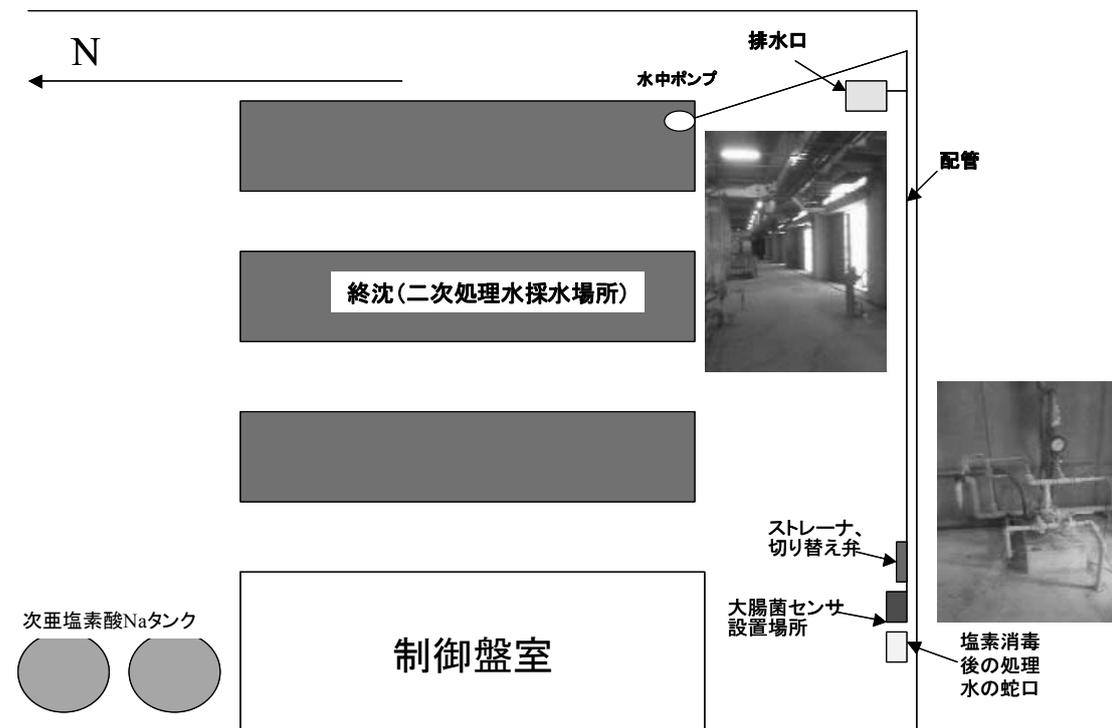


図 3-11 終沈周辺の図面

配管の操作方法について下記に示す。

終沈に設置した水中ポンプは常時動作させ、バルブ 1 から バルブ 2、バルブ 3、排水口までの配管内には常時、サンプルが通水するようにした。

夾雑物除去の目的でストレーナをバルブ 1 とバルブ 2 の間に設置した。

消毒前後のサンプルの導入はバルブ 1 とバルブ 4 を開閉することで切り替える設定とした。

バルブ 2 からバルブ 5 の間の距離が 3m と長く、配管によるデッドボリュームが大きいため、実証機二号機のサンプル通水時間を 5 分に設定した。

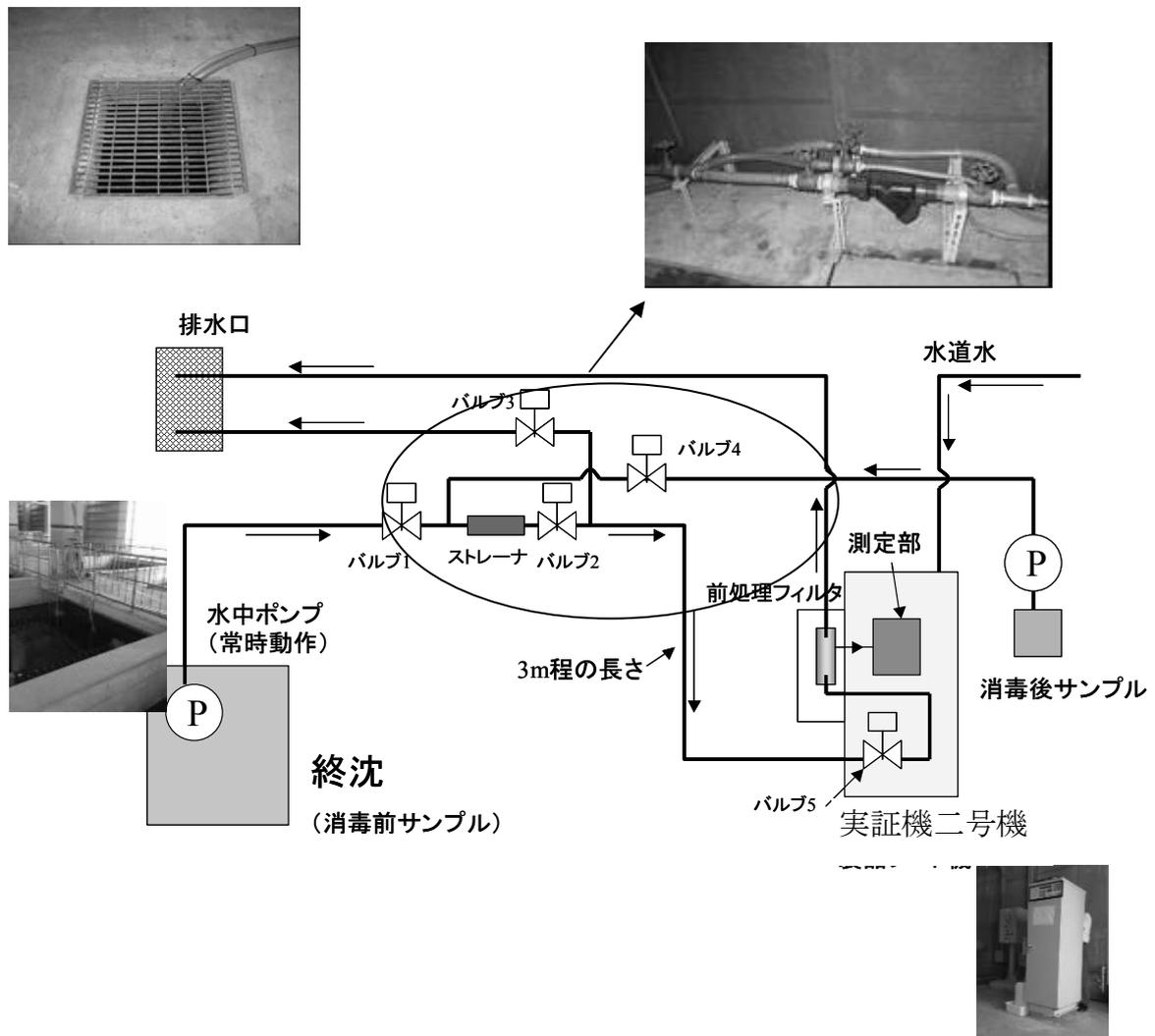


図 3-12 実証機二号機の配管構成

消毒前の二次処理水を測定する場合は、終沈に設置した水中ポンプにより揚水した二次処理水を、バルブ 1 からストレーナ、バルブ 2、実証機二号機内部のバルブ 5 を介して前処理フィルタ（クロスフロータイプ）へ通水する。この前処理フィルタの側面からクロスフィルタのろ過水を実証機二号機に測定サンプルとして導入するように構成した。また、前述のとおりバルブ 2 からバルブ 5 までの距離が 3m 程度と長いため、バルブ 2 からバルブ 5 の間の流量を可能な限り大きくなるように調整した。また実証機二号機内の配管内部の洗浄のために洗浄水入り口に水道水の配管を接続している。水道水についてはフィールド実

験開始前にあらかじめ水質調査を実施したところ、鉄分の含有はほとんどなく逆洗浄に用いる水として特に問題は観察されなかった。

<横浜市 C 処理場の場合>

実証機一号機を C 処理場に設置して、流入下水をサンプルとして連続的に測定可能とするように構成した。前処理フィルタおよび装置構成は T 処理場の実証機一号機の場合と同様であるが、流入下水の β -ガラクトシダーゼ活性が大きいため、測定時間を 10 分に短縮する設定としている点が異なる。

次に現場において大腸菌群計測装置の性能を評価するための実験について以下に説明する。

・測定手順

処理場の消毒前の二次処理水を採水後、4 時間以内に測定を妨害する SS を除去する目的で、二次処理水を手動または自動でフィルタろ過して、サンプルとして供した。手動の場合は、ADVANTEC 社の K800A047A を用いた。自動の場合は既述のクロスフロータイプのフィルタろ過水を自動的に通水するよう設定した。

実験は T 処理場の場合は、2004 年 5 月から 9 月、A 処理場の場合は 2004 年 9 月から 2005 年 4 月まで実施し、実証機の動作は 45 分間を 1 回の測定単位（酵素反応時間は 30 分）、C 処理場の場合では 15 分を一回の測定単位（酵素反応時間は 10 分）とした連続運転とした。

一方、(1)の大腸菌菌液の場合と同様にデソキシコレート寒天培地法による大腸菌群数の測定を同時に行い、装置の測定値と比較した。デソキシコレート寒天培地法については下水試験方法¹⁾に準拠して行った。測定は可能な限り現場でリアルタイムに測定するのが望ましいと考え、処理場の分析室において、サンプル採取から 2 時間以内に行った。デソキシコレート寒天培地法はサンプル

を分注後の 18 時間後に培地上に育成したコロニーをカウントする必要があるため、翌日に処理場でカウントが可能な場合は処理場の恒温槽にて培養した。休日などによりカウントが不可能な場合は実験室に持ち帰り、部屋内の恒温槽にて培養して翌日にカウントした。

3-3-3 実験結果および考察

(1) 大腸菌液による評価結果

大腸菌の菌液濃度 633、14,667CFU/mL のサンプルの 4-MU 時間変化を求めた結果を図 3-13 に示す。低濃度、高濃度いずれの大腸菌濃度においても、良好な時間応答直線が得られた。また直線の傾きすなわち β -ガラクトシダーゼ活性値は大腸菌群数に応じて増減する結果が得られており、培養を用いない酵素蛍光法により 30 分程度で大腸菌群数を計測可能であることが実証機においても確認された。

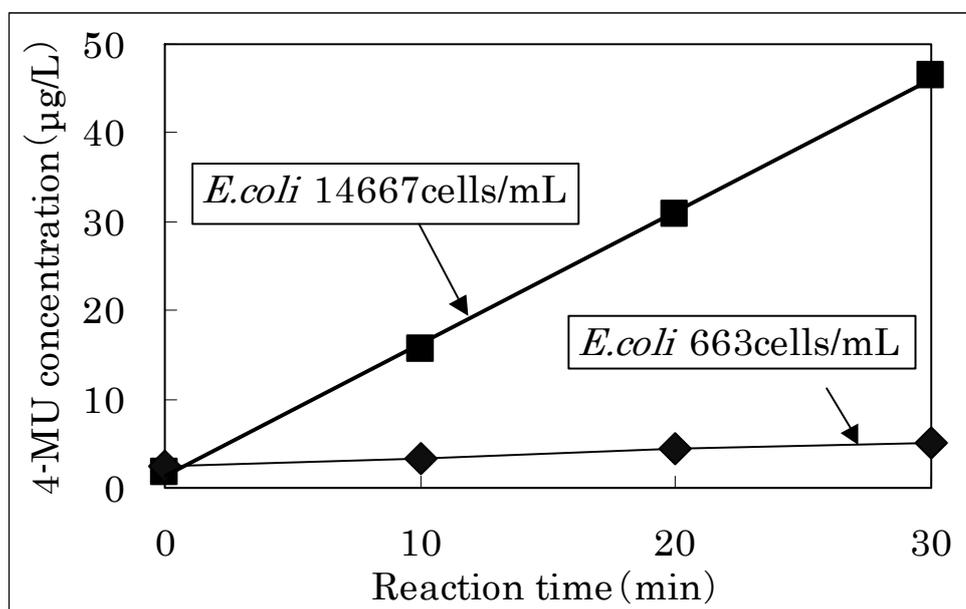


図 3-13 大腸菌菌液による 4-MU 濃度増加速度

(2) 二次処理水および流入下水による評価結果

T 処理場において、大腸菌群数 1,553CFU/mL の二次処理水を、前処理フィル

タを通さずに装置に供給して、3回の繰り返し測定を行った場合の4-MU濃度の時間変化を図3-14に示す。このように二次処理水の場合でも再現性ある直線応答が得られ、30分程度での迅速な大腸菌群数測定が可能であることが分かった。

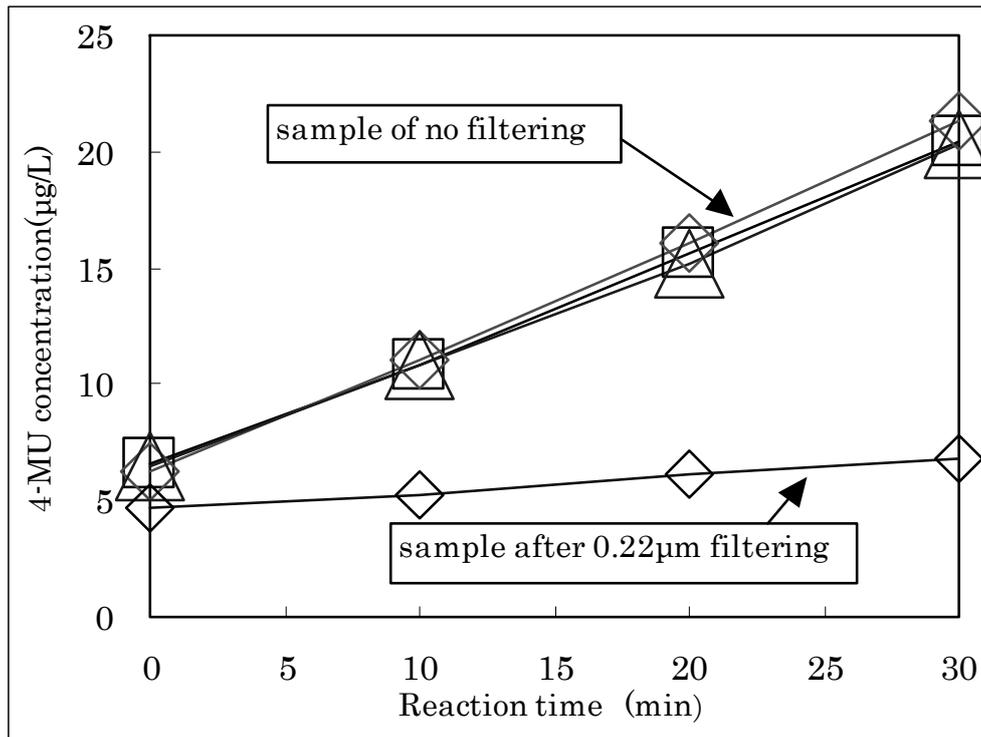


図3-14 T処理場の二次処理水による実験結果

ここで単位大腸菌群数あたりのβ-ガラクトシダーゼ活性値を求めたところ $3.0 \sim 3.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/L} \cdot \text{min} \cdot \text{CFU}$ の範囲であった。(1)の大腸菌菌液および大腸菌群数 $9.6 \times 10^4 \text{CFU/mL}$ の流入下水について同様に求めて比較した結果を図3-15に示す。

図3-15より二次処理水は大腸菌の菌液を用いた結果よりも2.7倍大きく、流入下水よりも60%ほど小さい値であった。第2章で述べたようにSSには大腸菌群由来でないβ-ガラクトシダーゼや、β-ガラクトシダーゼ活性を有するがデソキシコレート寒天培地法では増殖しない損傷状態すなわちVBNC (Viable But Non-Culturable) 状態の大腸菌群が吸着していると推定される。大腸菌菌液には

これらが少なく、逆に流入下水には多量に存在することが、上記の差異の原因と考えられる。このことから、第2章で既に考察したように、SSに付着した過剰測定分のβ-ガラクトシダーゼを除去することで、測定精度が改善すると考えられる。

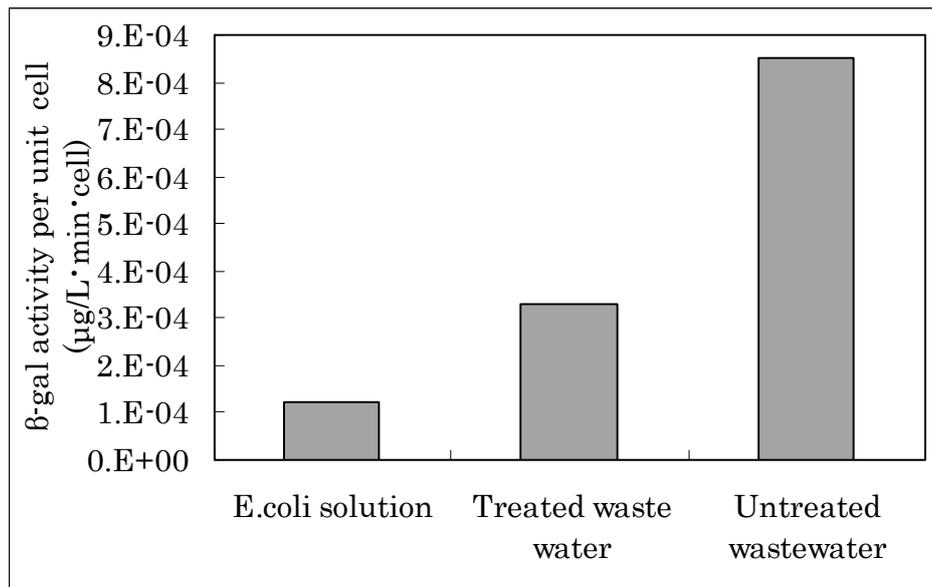


図 3-15 単位大腸菌群数あたりのβ-ガラクトシダーゼ活性値の比較

二次処理水をサンプルとして用い、第2章で用いた孔径8μmのポリカーボネート製のフィルタでろ過前処理を行った場合の装置のβ-ガラクトシダーゼ活性値とデソキシコレート寒天培地法測定値をプロットした結果を図3-16、3-17に示す。図3-16から大腸菌群数とβ-ガラクトシダーゼ活性値がほぼ連動していることが確認された。

また図3-17から相関係数は0.90と高く、β-ガラクトシダーゼ活性値から換算した大腸菌群数の推定値と、デソキシコレート寒天培地法による測定値との差異は、-40~+16%の範囲内に収まる良好な結果であった。第2章で検証したように、SS付着の過剰分のβ-ガラクトシダーゼ活性を適正なろ過で除去した上で測定することにより、高い相関を得たものと考えられる。

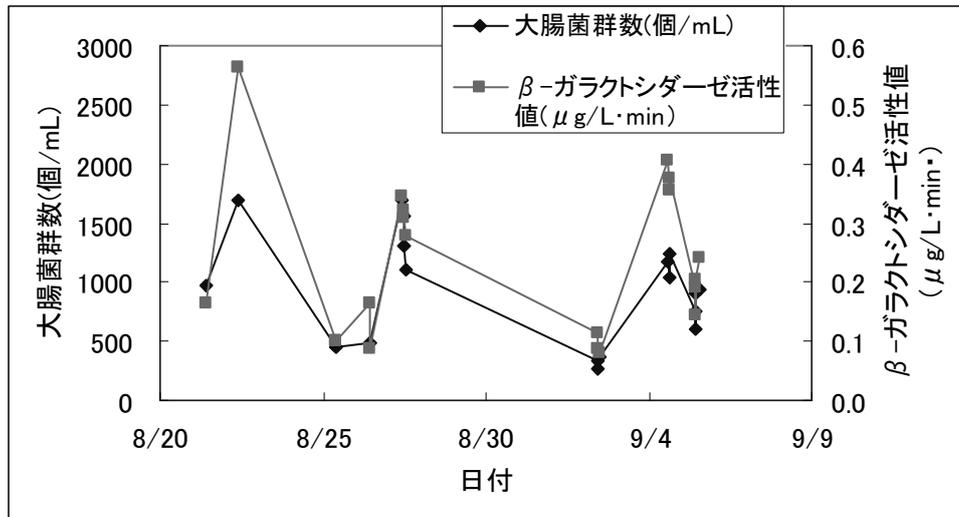


図 3-16 大腸菌群数と β-ガラクトシダーゼ活性値の変動

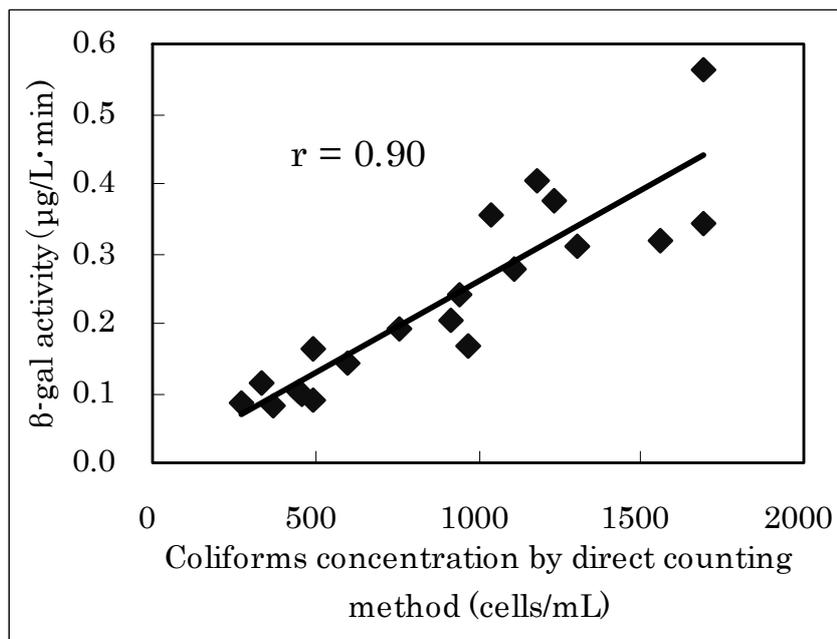


図 3-17 大腸菌群数と β-ガラクトシダーゼ活性値の相関

図 3-18 に A 処理場の場合の大腸菌群数 275 CFU/mL をサンプルとした場合の 4-MU 濃度の時間変化の測定例を示す。T 処理場と同様に良好な直線関係が得られた。

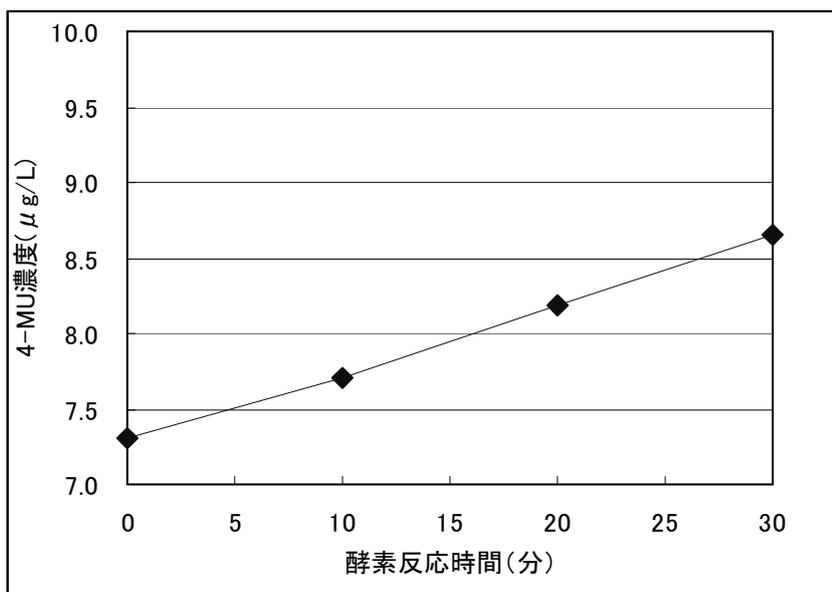


図 3-18 A 処理場の測定結果の一例

次に C 処理場で流入下水をサンプルとした場合の大腸菌群数の対数と β -ガラクトシダーゼの対数の相関を図 3-19 に示す。サンプルが流入下水の場合は SS を含む夾雑物が多く含まれている関係で、相関は二次処理水の場合よりも悪化しているが、デソキシコレート寒天培地法との差異は $\pm 0.5\log$ 以下であることが確認された。

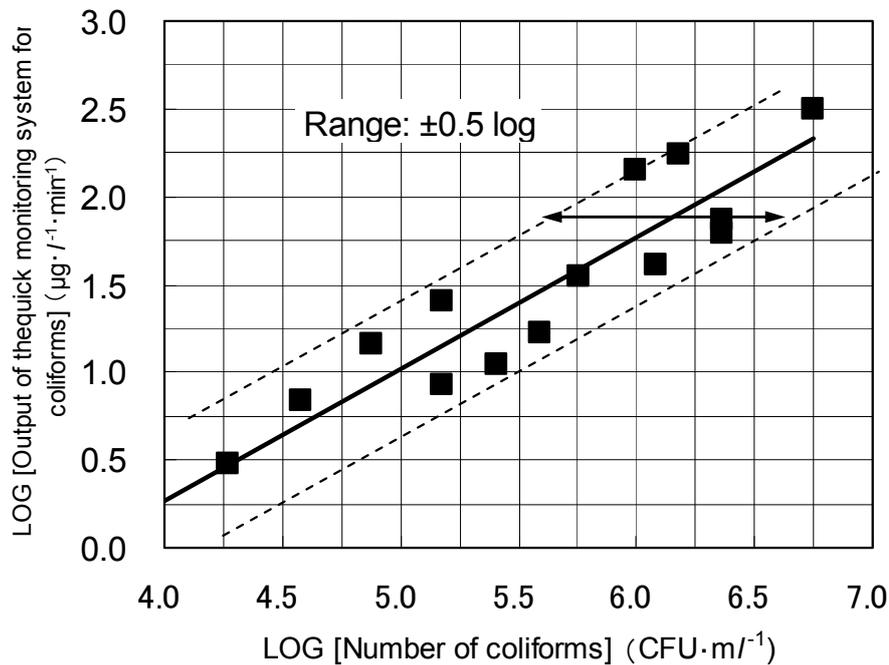


図 3-19 C 処理場での大腸菌群数と計測装置の相関

(3) 連続実験結果

大腸菌の菌液を用いた場合の測定結果を図 3-20 に示す。測定開始直後は測定値が不安定であるが、3 回目以降は大腸菌濃度に応じて高い再現性が得られた。この結果から、150 回の連続測定すなわち 40 分/1 回計測として 4 日間の連続測定において、 β -ガラクトシダーゼ活性値が高い信頼性を持って計測可能であることが分かった。図 3-21 に大腸菌濃度に対する変動係数 CV (coefficient of variation) の変化を示す。大腸菌菌液濃度が低いほど変動係数は大きくなるが、二次処理水中の濃度として一般的な値である大腸菌群数 1,000 CFU/mL の場合でも良好な繰り返し再現性能の目安となる CV 6%以下を達成した。

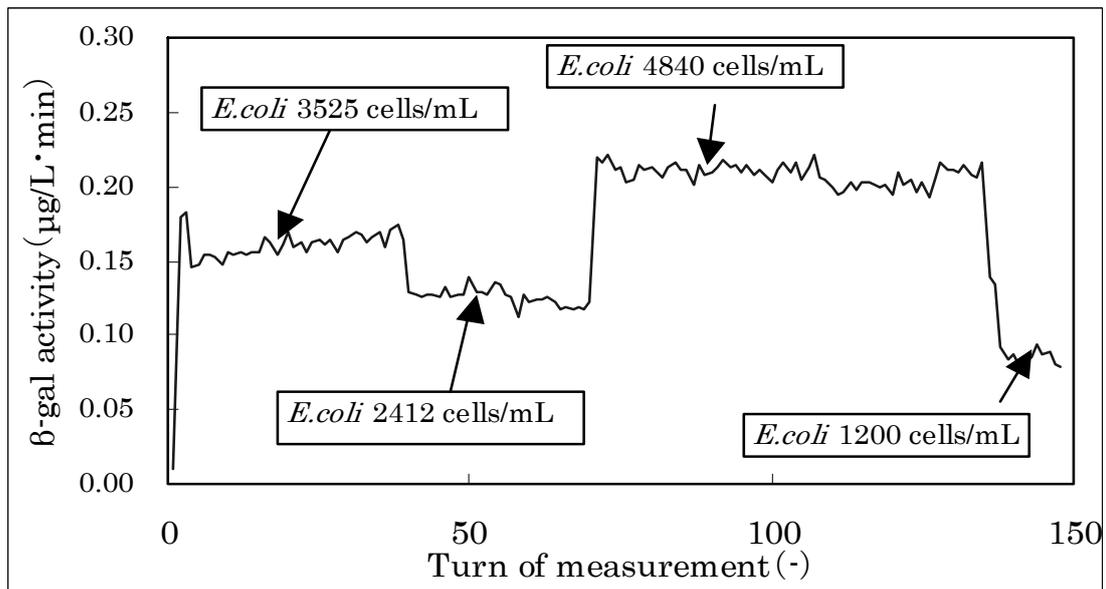


図 3-20 大腸菌菌液による連続実験結果

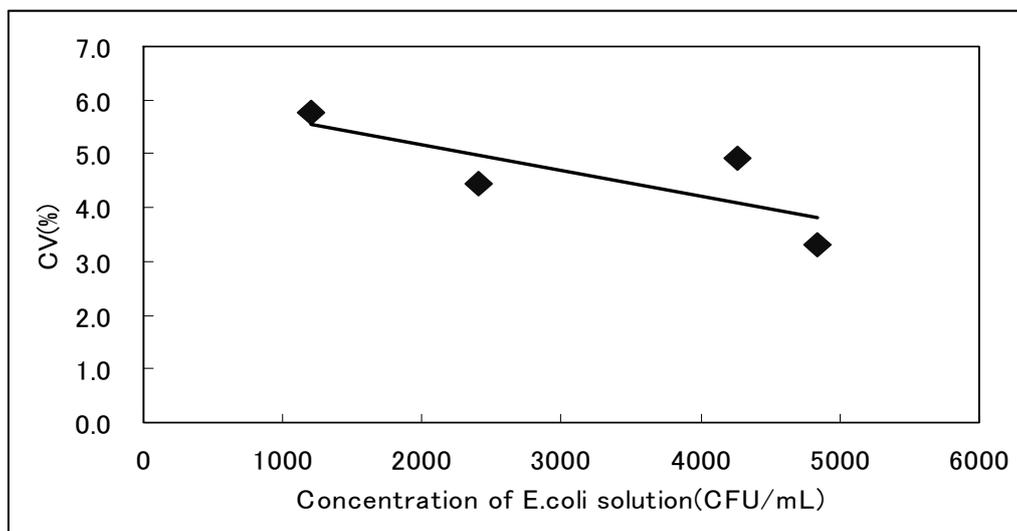


図 3-21 大腸菌菌液による変動係数の変化

T 処理場の二次処理水について約 3.5 日間の繰り返しの連続自動連続運転を行った結果をそれぞれ図 3-22 に示す。図から明らかなように、日中は漸減し夕方から夜間にかけて上昇する時間変動が毎日再現されている。図 3-22 において初発の大腸菌群数および β -ガラクトシダーゼ活性値と 3 日後の同時刻のデソキシ

コレート寒天培地法による分析値とを比較したところほぼ同じ測定値（約 500 CFU/mL）を示したことから、120 回の連続測定ではセラミックフィルタのろ過特性は維持されており、問題なく連続測定が可能であることが示唆された。

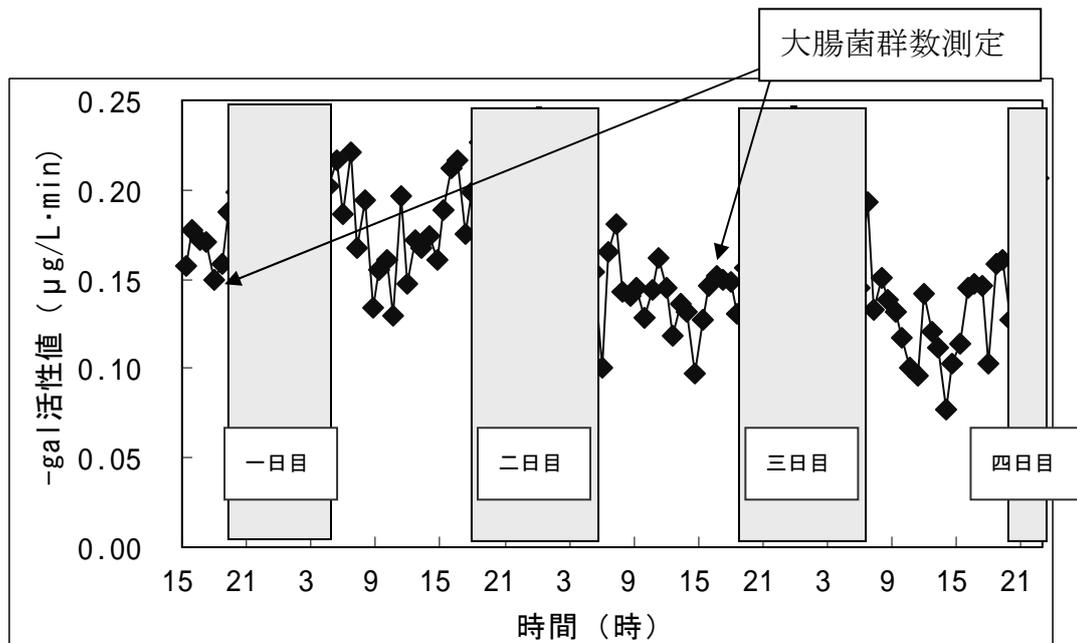


図 3-22 3.5 日間の連続実験結果

(4) 試薬の安定性

一般に4-MUGに限らず酵素基質は高温に対して不安定で分解し易いものも多く、通常は冷蔵保存が必要である。しかし装置を簡素化したい考えから、アルカリ（水酸化ナトリウム水溶液）以外の全ての試薬を混合した混合試薬（表 3-2 でグリシン-NaOH 溶液を除いた混合溶液）の酵素反応活性の保存条件に対する依存性を実験的に調査した。試験操作は試薬を混合してポリプロピレン製の密閉容器に入れ3段階の温度環境（室温、5、37）で保管し、20日、4ヵ月後のβ-ガラクトシダーゼ活性値を調べた。得られた各温度条件のβ-ガラクトシダーゼ活性値を、新品調製試薬でのβ-ガラクトシダーゼ活性値を1.00とする時の相対値として表 3-5 に示す。

表 3-5 試薬の安定性の試験結果（相対値）

経過時間	室温（10~22℃）	37	新品調製試薬での β-ガラクトシダーゼ活性値(単位は μg/L/min)
20 日	1.01	1.06	2.68
4 ヶ月	1.02	0.83	2.32

なお表 3-5 には 5℃の結果を記載していないが、これは保存開始の数日後に沈殿が発生したため、測定するのは不適と考えたためである。

表 3-5 からわかるように、37℃、20 日後の β-ガラクトシダーゼ活性値がやや上昇しているが、これは測定誤差の範囲内と考えられ、問題無いと考えられる。

データは示さないが 37℃、4 ヶ月後の 4-MU 濃度の生成直線のベースラインが 20 日後と比較して上昇しており、相対値は他の条件より低くなっているが、これは 4-MUG の一部が分解して、試験前にすでに 4-MU が生成しているためと考えられる。

室温条件については 20 日後、4 ヶ月後ともに、ほぼ問題ない値であると考えられる。

以上 3 点から夏季や寒冷地では試薬の保管性に課題が残るが、10~20℃前後の温度条件においては問題が無いが、それ以外の温度条件においては影響が予想されるため、交換時期を短くするか、恒温保存する必要があると考えられる。例えば、二次処理水の水温は季節を問わず、20℃前後であることから、これを利用した恒温槽に浸漬することも考えられる。

(5) 前処理フィルタのろ過性能の変化

A 処理場における、前処理フィルタのフィルタ前後の二次処理水の大腸菌群数をそれぞれ求め、フィルタ透過率の変化としてまとめたものを図 3-23 に示す。3/16 に 60%近くまで低下する異常値が出現しているが、全体的にはフィルタ透過率は 1 ヶ月の連続使用時においてもほとんど変化無いことから、フィルタの

閉塞はほとんど起きていないことが分かる。従って前処理フィルタの交換インターバルとしては数ヶ月以上確保できる見通しとなった。ただし、処理場の二次処理水にSSが多く含まれている場合は、閉塞するまでの時間が短くなる可能性も考えられる。

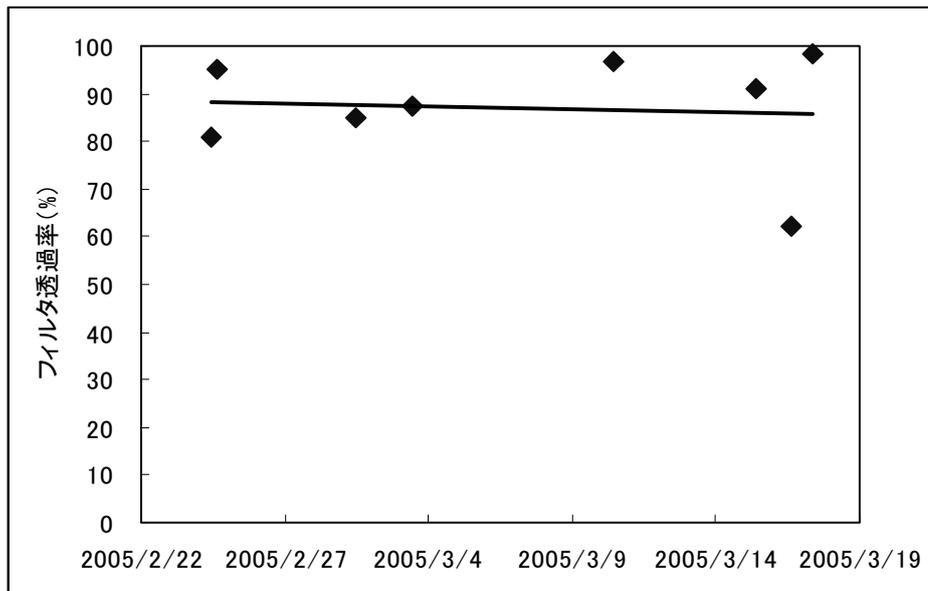


図 3-23 A 処理場のフィルタ透過率の経時変化

第4節 結語

本章では、培養操作を省略した蛍光酵素法を利用した自動測定を目的とした実証機を構築、製作を行い、実験的に仕様の最適化を行った上で、さらに下水処理場の現場に設置して、フィールド実験を行うことで性能評価を行った。検討結果を以下に示す。

- (1) 装置構成は、連続測定が可能であり、装置構成が簡易なフローインジェクション方式を用いた。ただし、酵素反応速度および測定の安定性を考慮して、完全な連続方式ではなくストップ・フロー方式を採用した。
- (2) 大腸菌群数計測装置の実証機一号機、二号機を三箇所の下水处理場に設置してフィールド実験を行った結果、二次処理水を用いた A、T 処理場に

において実証機の大腸菌群数と β -ガラクトシダーゼ活性値を比較したところ、相関係数が 0.90 と高い相関であり、デソキシコレート寒天培地法との差異についても ± 181 CFU/mL の範囲 ($\pm 40\%$) であることを確認した。一方、C 処理場においてサンプルを流入下水とした場合は ± 0.5 log の範囲の差異であった。

- (3) 連続測定の実験を行った結果、大腸菌菌液では二次処理水中の濃度として一般的な値である大腸菌群数 1,000 CFU/mL の場合でも良好な繰り返し再現性能の目安となる CV 6%以下を達成した。測定の再現性および日変動について安定した計測が行われていることを確認した。
- (4) 試薬および前処理フィルタについては1~3ヶ月の連続使用時においても問題ないことから、交換期間としては数ヶ月以上確保できることが判明した。

本章の検討により、大腸菌群数迅速測定装置としての実用化の目処が立ったものと判断される。

第3章 参考文献

- 1) 樋口慶郎、「水質分析に用いられる FIA」、J.Flow Injection Anal.、Vol.20、No.2 (2003) .
- 2) 久住ら、「FIA (フローインジェクション) 法・化学発光法を用いたアンモニア計の開発」、環境システム制御学会誌、Vol.5、No.1、(2000).
- 3) K.Grudpan, P.Ampan, Y.Udnan, S.Jayasvati, S.Lapanantnoppakhum, J.Jakmune, G.D. Christian, J.Ruzucka: "Stopped-Flow Injection Simultaneous Determination of Phosphate and Silicate Using Molybdenum Blue", Talanta, No.58, 1319-1326(2002).
- 4) Amanda J.Lyddly-Meaney, Peter S.Ellis, Paul J. Worsfold, Edward C.V. Butler, Ian D.Mckelvie: "A Compact Flow Injection Analysis System for Surface Mapping of Phosphate in marine Waters", Talanta, No.58,1043-1053(2002).
- 5) 明電舎ホームページ「大腸菌自動測定装置」
<http://www.meidensha.co.jp/pages/prod12/prod12-101-10.html>
<http://www.meidensha.co.jp/pages/prod12/prod12-302-01.html>

- 6) 山根孝夫、「FIA (フローインジェクション分析法) を用いた環境計測機器」、NKK 技報、No.174、80-81(2001)
- 7) 上水試験方法 1993 年版 日本水道協会
- 8) 下水試験方法 1997 年版 日本下水道協会
- 9) 小林麗、小野芳朗、宗宮功、毛利紫乃、「フロー式反応装置による *umu* test の自動化に伴う測定条件」、水環境学会誌、20(11)、730-737 (1997) .
- 10) 小林麗、小野芳朗、毛利紫乃、宗宮功、「*umu*-test 自動分析装置の構築と性能評価」、水環境学会誌、22(10)、833-838 (1999) .
- 11) ITABASHI et al, A Novel Flow Injection Technique: All Injection Analysis, ANALYTICAL SCIENCES, JANUARY 2001, VOL17,
- 12) 小川ら「攪拌・混合技術」、攪拌・混合技術編集委員会、アイピーシー(1988).
- 13) P.Bouvrette, J.H.T.Luong, "Development of a flow injection analysis (FIA) immunosensor for the detection of *Escherichia coli*", International Journal of Food Microbiology 27 , P129-137(1995).
- 14) 河上聖人、庄司良、田中良春、田口和之、平井正名、今枝孝夫、山田正人、毛利紫乃、「発光 *umu* センサを用いた迅速・簡便な遺伝子毒性試験」、環境システム計測制御学会誌、Vol.10、No.3、.63-70 (2005) .
- 15) 野瀬勝利、福岡正芳、長崎、進、高瀬長武、川上博行、高橋敏行、中山明夫、「大腸菌群の自動測定方法」、第 32 回下水道研究発表会講演集、906-908(1995).
- 16) 高瀬長武、野瀬勝利、福岡正芳、長崎、進、川上博行、高橋敏行、中山明夫「大腸菌自動測定装置」、第 33 回下水道研究発表会講演集、994-996(1996).
- 17) 矢野理江、野上尊子、明賀春樹、大戸時喜雄、平岡睦久、野田直広、「バクテリオファージを利用した特定細菌迅速検出技術の開発」、第 32 回日本水環境学会年会講演集、40(1998).
- 18) 鳥羽裕一郎、野上尊子、矢野理江、明賀春樹、平岡睦久、野田直広、大戸時喜雄、「バクテリオファージを利用した大腸菌迅速検出技術の開発」、第 51 回全国水道研究発表会講演集、592-593(2000).

第4章 雨天時未処理下水のオゾン消毒に関する基礎的研究

第1節 概説

我国において、古くから下水道の普及に取り組んできた都市では、汚水と雨水を同一の管きよで速やかに排除する合流式下水道を採用し、公衆衛生の向上と浸水防除を同時に行うことを目的とした整備が進められた。

しかし、合流式下水道の整備区域では、雨天時に遮集管きよ能力を超える雨水と汚水が混合した未処理下水が公共用水域に放流され、公共用水域における生態系への影響や衛生学的安全性に係る影響が懸念されるようになった。このため、いくつかの都市では合流式下水道の改善対策に取り組んできたが必ずしも十分ではなかった。

平成14年度に国土交通省のリードにより「下水道技術開発プロジェクト(SPIRIT21)」がスタートし、その最初の課題として「合流式下水道の改善に関する技術開発」が選定され、(1)効率的な処理技術、(2)消毒技術、(3)計測・制御、(4)その他の技術の4つの開発研究課題が設定された。このうち(2)の消毒技術に関して、「ポンプ場等からの排出水について大腸菌群数を3,000 CFU/mL以下にでき、かつ消毒の能率化がはかられ、および消毒により下流側水域に影響を与えないような工夫がなされている技術」を目標とした。

この目標を達成するためには、雨天時に発生した多量の未処理放流水を迅速かつ効率的に消毒する技術の確立が必要であり、従来用いられている次亜塩素酸ナトリウムによる消毒では迅速性で限界があり、原理的に高速消毒が可能なオゾンに適している技術と考えられる。

堺ら^{1,2)}は初沈水をサンプルとした、オゾン消毒実験を行っており、オゾン注入率20mg/L程度で、大腸菌群数3000 CFU/mL以下を達成できたことを報告している。しかし、雨天時の未処理放流水についてオゾン消毒を行った報告は

見当たらない。そこで、本章では、雨天時の未処理放流水について、フィールド実験を行い、オゾンによる消毒性能及び影響する要因についてまとめた結果を報告する。この結果を利用することで、雨天時の未処理放流水の消毒を行う際に、大腸菌群数計測装置を用いて、シミュレーション計算を実行することが可能となり、さらに、どのように最適制御すべきかが明らかとなる。

第2節 フィールド実験装置による高速オゾン消毒

4-2-1 概論

オゾン消毒技術は、高濃度オゾン発生装置を適用し、これで発生させた高濃度オゾンを用いて未処理下水等の放流水をオゾン溶解ポンプで吸い込み、ポンプの強力な攪拌作用を利用することにより、オゾン消毒前の未処理下水に溶解させオゾンの消毒効果によって放流水の大腸菌群数を放流基準値の 3,000 CFU/mL 以下とするものである。オゾンによる消毒は、その強い酸化力により、細菌の細胞壁を直接破壊することによって生じるとされている。これは塩素等ハロゲン系の消毒剤が細胞壁を通過して細胞内に浸透し、酵素系を破壊して不活化する作用機序とは異なるため、強力な消毒効果を期待できる。表 4-1 に各種消毒剤の 2Log 不活化 CT 値を示す。

表 4-1 各種消毒剤の 2Log 不活化 CT 値(mg・min /L)²⁾

消毒剤	腸内菌	ウイルス	芽胞菌	アメーバシスト
オゾン水	0.01	1	2	10
次亜塩素酸	0.2	5	100	100
次亜塩素酸イオン	20	>200	>1000	1000
モノクロラミン	50	1000	5000	200

次に、雨天時の未処理下水の消毒の具体的な目標として以下の三点を設定した。

(1) 処理性能

消毒前の未処理下水は、合流式下水道における雨天時の未処理下水を対象と

し、処理水の大腸菌群数が常時、すなわち大腸菌群数がもっとも高くなると予想されるファーストフラッシュ時においても 3,000 CFU/mL 以下となるようにした。

(2) 迅速消毒性能の確保

ポンプ場等、塩素混和池の無い施設で、放流水路または放流管内の滞留時間のみでの消毒を行うことを想定し、消毒効果を得るための時間(大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下となるための時間) は 2 分以内とした。

(3) 下流側水域の安全性

umu 試験(遺伝毒性)において、消毒前の未処理下水及び次亜塩素酸ナトリウムで消毒を行った場合と比較し、同等またはそれ以上に安全であることを確認する。

4-2-2 研究方法

(1) 実験場所・実験期間

フィールド実験装置を横浜市 C 処理場に設置し、実証実験を行った。消毒の対象としては未処理下水(沈砂池流入水)を消毒対象とした。表 4-2 にフィールド実験概要を示す。

表 4-2 フィールド実験概要

実験場所	横浜市 C 処理場
実験期間	平成 15 年 6 月～平成 16 年 8 月
実験装置概要	
消毒消毒前の未処理下水	未処理下水（沈砂池流入水）
処理水量	3m ³ /h（最大）
オゾン注入率	200mg/L（最大）
オゾン消費率	120mg/L（最大）

(2) 実験装置概要

図 4-1 にフィールド実験装置フロー図、図 4-2 にフィールド実験装置写真、表 4-3 にフィールド実験装置仕様をそれぞれ示す。

高濃度オゾン発生装置により発生させた高濃度オゾンをおらかじめ定めたオゾン消毒条件（オゾン注入率、反応時間）にて溶解ポンプの吸い込み側の配管等から注入しポンプの強力な攪拌作用を利用することにより、オゾンをお効率的に溶解させ未処理下水中の大腸菌群を消毒する構成としている。

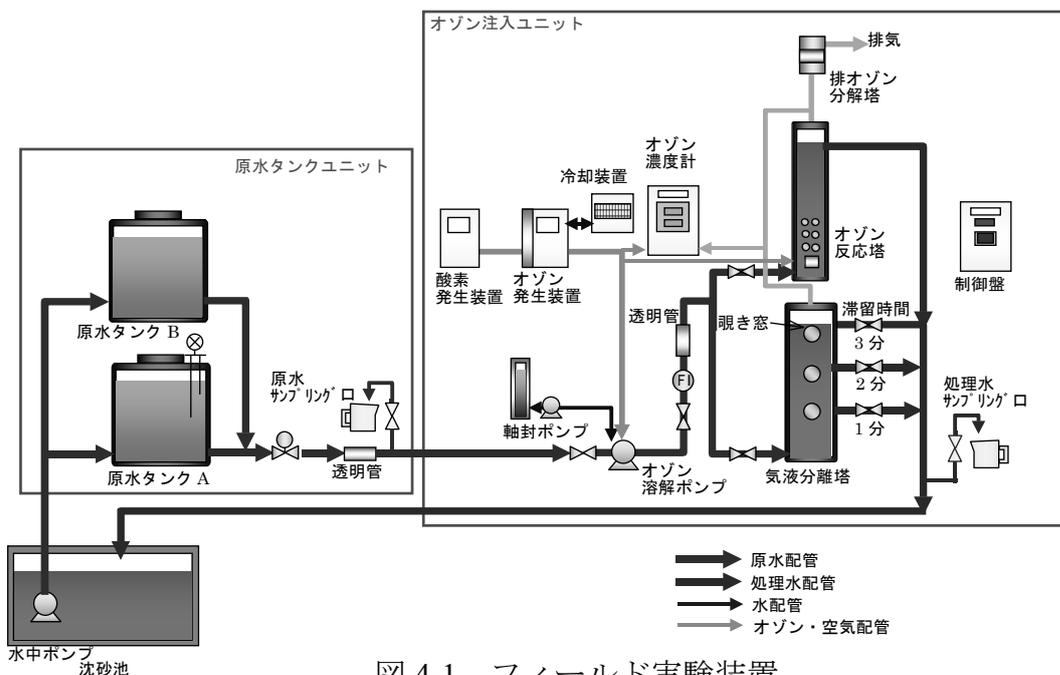


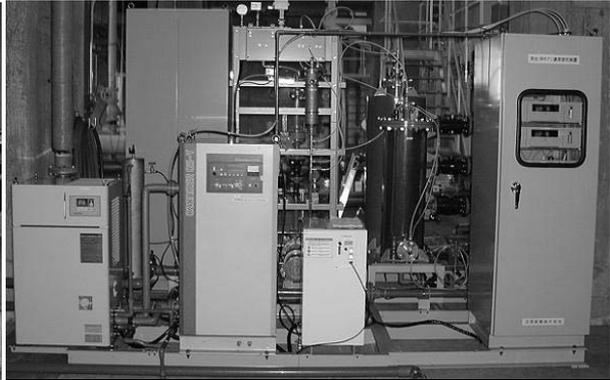
図 4-1 フィールド実験装置



オゾン反応



水中ポンプ



オゾン発生装置及び周辺機器



沈砂池取水



未処理下水タンク



制御盤・オゾン溶解ポンプ

図 4-2 フィールド実験装置写真

表 4-3 フィールド実験装置仕様

項目	仕様
設置面積	W3050×D2450×H2400 (メンテナンススペース含まず)
電源	3相 200V 50Hz 8.0kVA (最大)
消毒前の未処理下水用のタンク容量	1 m ³ /タンク、2槽
反応塔容量	150 L (有効容量)
処理水量	3m ³ /h (最大)
オゾン注入率	200mg/L (最大)
オゾン消費率	120mg/L (最大)
溶解ポンプ気液比 G/L	0.4 以下
消毒時間	連続系 : 1~3分

(3) 実験フロー

図 4-3 に本章で実施した実験項目についてのフローチャートを示す。

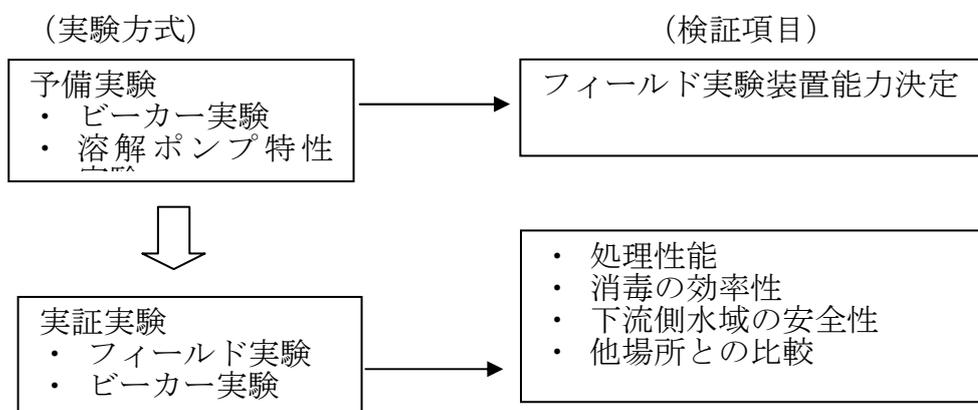


図 4-3 検証フローチャート

まずは未処理下水をサンプルとした予備実験としてビーカー実験を行なうことで、フィールド実験装置の実験仕様を策定した。

次に雨天時の実証実験でフィールド実験装置により処理性能・消毒の性能の連続実験を行い、同時にビーカー実験により、消毒前の未処理下水水質の変化の大きい時の消毒前の未処理下水を採水し、目標に達するときのオゾン注入率を確認した。

さらに、他の下水処理場の未処理下水について、予備実験と同様なビーカー実験を行なうことでより性能目標に達するときのオゾン注入率を確認し、フィールド実験での結果と比較した。また、フィールド実験では下流側水域の安全性についても検証を行った。

(4) ビーカー実験

雨天時の未処理下水は降雨時に発生するものであり、サンプルがいつ得られるか不明瞭であることから、実験効率がよいとはいえない。そのため予備実験であるビーカー実験においては雨天時の未処理下水の代替として横浜市 C 処理

場の流入下水をサンプルとして、目標値（大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下）に達するときのオゾン注入率を把握する実験を行った。

ビーカー実験は採取した未処理下水にオゾンを注入し、一定時間経過後のオゾン消費率と大腸菌群数を測定することで、オゾンの注入率と消毒効果の関係を確認した。図 4-4 にビーカー実験概要図、表 4-3 にビーカー実験方法概要、表 4-4 にビーカー実験の水質分析項目を示す。

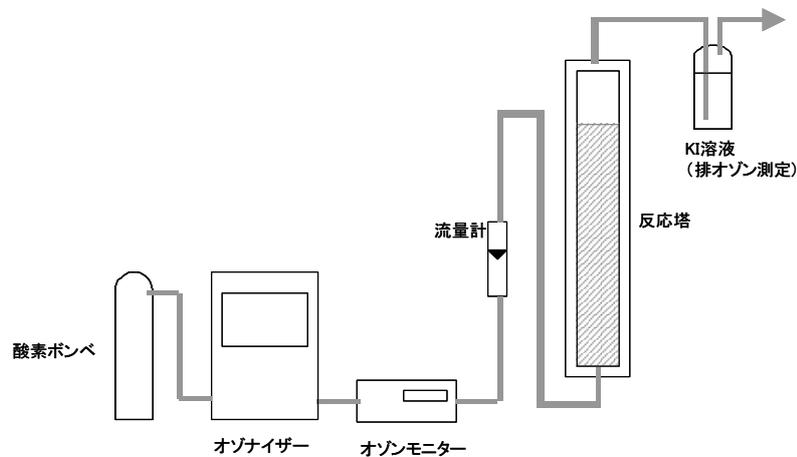


図 4-4 ビーカー実験概要図

表 4-3 ビーカー実験方法概要

サンプル	未処理下水
オゾン注入率	700mg/L (最大)
オゾン消費率	150mg/L (最大)
消毒時間	5 分以下

表 4-4 ビーカー実験の水質分析項目

分析対象水の種類	分析項目
消毒前の未処理下水	大腸菌群数、COD _{Mn} 、pH、SS、水温、よう素消費量、ORP
オゾン処理水	大腸菌群数、COD _{Mn} 、pH、SS、水温、よう素消費量、ORP、発生オゾン濃度、排オゾン濃度、溶存オゾン濃度

(5) フィールド実験

晴天時および雨天時にフィールド実験装置を運転し、消毒前の未処理下水および消毒処理水の大腸菌群数、SS、COD_{Mn} 等の水質分析を行った。

降雨初期（降り始めから 2 時間以内の時点）には 10～20 分毎に消毒前の未処理下水と処理水を採水し、各種水質分析を行った。また降雨後期（降り始めから 2 時間以上経過した時点）からは約 1 時間毎に採水し、同様に水質分析を行った。

表 4-5 にフィールド実験の採水要領、表 4-6 にフィールド実験の水質分析項目を示す。

表 4-5 フィールド実験の採水要領

採水箇所	・消毒前の未処理下水（ポンプにより汲上げ採水） ・オゾン処理水（オゾン反応槽出口にて採水）
採水間隔（目安）	降雨初期（降り始めから 2 時間以内）：10～20 分毎 降雨後期（降り始めから 2 時間以降）：約 1 時間毎

表 4-6 フィールド実験の水質分析項目

分析対象水の種類	分析項目
消毒前の未処理下水	大腸菌群数、糞便性大腸菌群数、COD _{Mn} 、pH、T-N、NH ₄ -N、SS、水温、よう素消費量、溶存酸素、ORP、色度、臭気強度
オゾン処理水	大腸菌群数、糞便性大腸菌群数、pH、水温、発生オゾン濃度、排オゾン濃度、溶存オゾン濃度、(COD _{Mn} 、T-N、NH ₄ -N、SS、濁度、よう素消費量、ORP、色度、臭気強度) *

*（ ）内は参考として適宜分析した。

雨天時の未処理下水を対象とした実験は、雨天時に 3 回実施した。表 4-7 にフィールド実験時の降雨状況を示す。なお、同表に示した降雨データは横浜市 C 処理場の雨量計データを使用した。

表 4-7 降雨状況

サンプル	実験ケース	採水日	先行無降雨日数(日)	総降雨量(mm)	最大降雨量(mm/h)	降始め時刻	実験継続時間(h)
未処理下水	N-1	H16.6.21	7	8.0	5.5	15 : 00	6.0
	N-2	H16.7.15	4	17.0	16.5	18 : 00	5.5
	N-3	H16.8.15	17	23.0	8.5	6 : 00	12.0

(6) 水域安全性の検証

オゾン在未処理下水に注入した場合における安全性について表 4-8 に示す項目の試験を行った。

表 4-8 安全性試験の項目と方法

試験項目		方法
遺伝毒性試験	<i>umu</i> 試験	下水試験法 ⁴⁾
消毒副生成物等の分析	臭素酸測定	イオンクロマトグラフ法
オゾンの残留性	溶存オゾン濃度測定	よう化カリウム滴定法

以下に本実験での実験条件を示す。

umu 試験

雨天時の未処理下水におけるオゾン処理水について、消毒副生成物の遺伝毒性を評価した。*umu* 試験法は下水試験方法⁴⁾に準拠して行った。

臭素酸測定

雨天時の未処理下水におけるオゾン処理水について、臭素酸の測定を行った。臭素酸測定の方法はイオンクロマトグラフ法に準拠して行った。

オゾン残留性

オゾン処理後の未処理下水中における溶存オゾン濃度の経時変化について、よう化カリウムを用いて測定した。

4-2-3 研究結果

雨天時の未処理下水の消毒性能の確認を行うため、未処理下水を対象に、ピーカー実験およびフィールド実験を実施した実験結果を以下に示す。

(1) 予備実験結果

横浜市 C 処理場の晴天時の未処理下水にオゾンを注入し、オゾン消毒特性を調べた。表 4-9 に供試した未処理下水の水質試験結果を示す。

表 4-9 消毒前の未処理下水の性状（採水日：H16.1.19）

サンプル	未処理下水
大腸菌群数 (CFU/mL)	3.3×10^5
COD _{Mn} (mg/L)	93
SS (mg/L)	132
NH ₄ -N (mg/L)	14.0

図 4-9 に未処理下水のオゾン処理結果を示す。オゾン消費率は 0～150mg/L（オゾン注入率 0～450mg/L）の範囲で実験を行った。同図よりオゾン消費率が 50mg/L を超えると消毒効果が現れており、堺ら初沈水の検討結果¹⁾と比較するとオゾンの無効消費がかなり多いサンプルであることが分かる。そのため、大腸菌群数を 3,000 CFU/mL 以下にするために必要なオゾン消費率が 100 mg/L 程度となる結果となった。

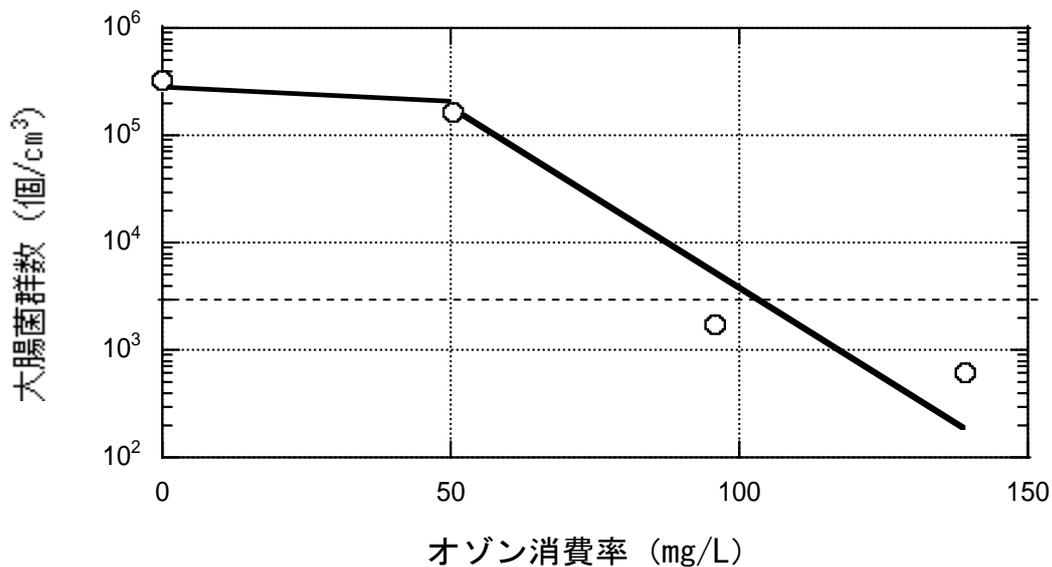


図 4-9 未処理下水のオゾン処理結果

一方、このときの大腸菌群数まで消毒するために必要な反応時間は 2 分以内であることを確認し、高速消毒が達成できていることを確認した。

図 4-10 に溶存オゾンと大腸菌群数の関係を示した。同図から溶存オゾン濃度が約 6 mg/L 以上になると大腸菌群数が性能目標である 3,000 CFU/mL 以下に消毒されることが分かった。

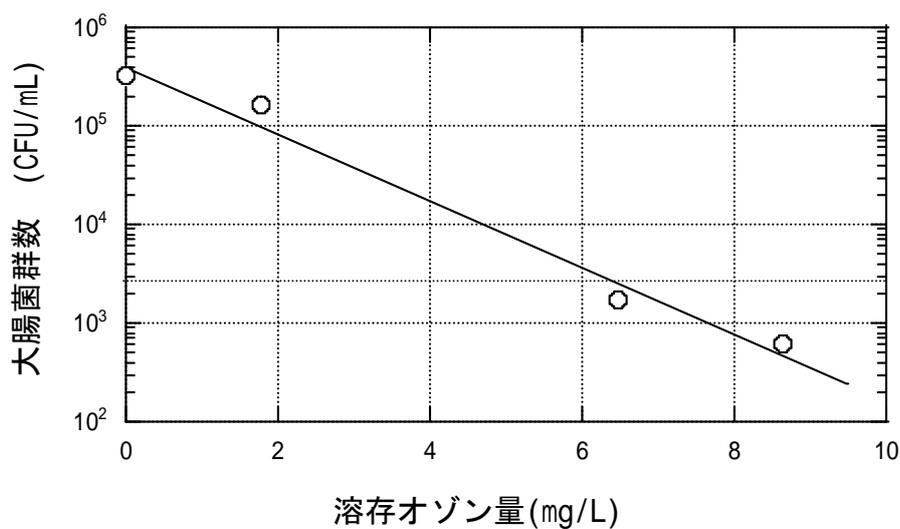


図 4-10 溶存オゾンと大腸菌群数の関係

(2) フィールド実験結果（晴天時）

消毒前の未処理下水の性状

表 4-10 に晴天時（H16.6.2）におけるフィールド実験における消毒前の未処理下水の性状を示す。水質項目は大腸菌群数の他、消毒効果やオゾン消費に対する影響が考えられる項目として、COD_{Mn}、NH₄-N、臭気強度、色度、よう素消費量を考えた。

表 4-10 消毒前の未処理下水の性状（採水日：H16.6.2・晴天時）

項目	範囲
大腸菌群数（CFU/ mL）	1.0×10 ⁵ ～ 1.9×10 ⁶
COD _{Mn} （mg/L）	85 ～ 180
NH ₄ -N(mg/L)	10.0 ～ 36.0
臭気強度(TON)	2,000 ～ 2,500
色度(度)	22 ～ 180
よう素消費量(mg/L)	23.9 ～ 45.5

表から COD_{Mn}、NH₄-N、色度については比較的大きな経時変化が存在することが分かった。

消毒結果

表 4-11 に晴天時のフィールド実験での結果のまとめを、図 4-11 に消毒前の未処理下水と処理水の消毒経時変化を示す。同表より大腸菌群数、臭気強度、色度、よう素消費量において低減効果があり、大腸菌群数を 3,000 CFU/mL 以下にするために必要なオゾン量が 100 mg/L 程度となっていることが確認された。

その結果と比較すると、本結果の大腸菌群数の経時変化は消毒前の未処理下水・処理水とも比較的小さいと考えられる。

表 4-11 消毒結果（採水日：H16.6.2・晴天時）

項目	消毒前の未処理下水	処理水
消毒前の未処理下水	未処理下水	
消毒時間(分)	1.7	
オゾン消費率 (mg/L)	91~100	
オゾン注入率(mg/L)	155~165	
溶存オゾン濃度 (mg/L)	5.8~7.8	
大腸菌群数 (CFU/mL)	$1.0 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^6$	$1.1 \times 10^2 \sim 2.8 \times 10^3$
臭気強度(TON)	2,000 ~ 2,500	500 ~ 700
色度(度)	22 ~ 180	1 ~ 36
よう素消費量(mg/L)	23.9 ~ 45.5	7.9 ~ 13.5

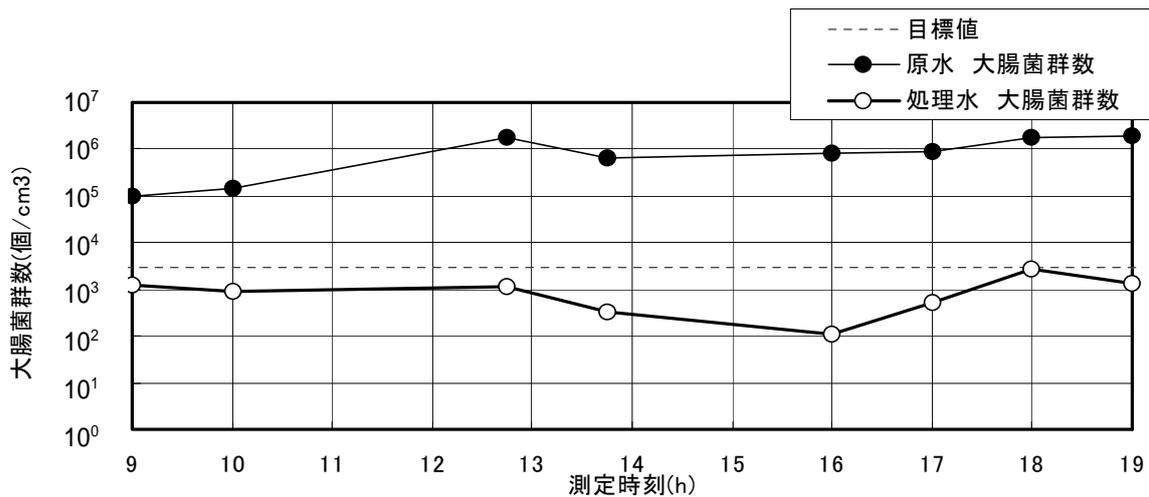


図 4-11 消毒前の未処理下水・処理水の経時変化（採水日：H16.6.2、晴天時）

(3) フィールド実験結果（雨天時）

雨天時の未処理下水を対象とした消毒に関する実証実験結果を以下に示す。

消毒前の未処理下水の性状と経時変化

表 4-12 にフィールド実験における消毒前の未処理下水の性状を、図 4-12a~c に実験ケース N-1~N-3 の消毒前の未処理下水の水質経時変化を示す。水質項目は大腸菌群数の他、消毒効果やオゾン消費に対する影響が考えられる項目として、COD_{Mn}、BOD、SS、NH₄-N、臭気強度、色度、よう素消費量とした。各項

目の経時変化は後述のオゾン処理結果と併記し、消毒効果を確認した。

表 4-12 雨天時の消毒前の未処理下水の性状

項目	範囲
大腸菌群数 (CFU/ mL)	3.1×10^4 ~ 2.9×10^6
糞便性大腸菌群数 (CFU/	1.0×10^3 ~ 2.8×10^5
COD _{Mn} (mg/L)	41 ~ 200
BOD (mg/L)	26 ~ 380
SS(mg/L)	40 ~ 450
NH ₄ -N(mg/L)	1.6 ~ 23.0
臭気強度(TON)	250 ~ 4000
色度(度)	44 ~ 200
よう素消費量(mg/L)	5.0 ~ 45.0

大腸菌群数・糞便性大腸菌群数については共に降り始めから若干の上昇が見られるものの、大きな変動は見られない。

SSについては降り始め前は約 80~150mg/L で推移しているが、降雨開始後上昇し、降り始め 1.0~1.5 時間経過時点で最大値に達した後、降り始め前の値以下に減少する傾向を示している。

COD_{Mn}は降り始め前は 50~140 mg/L で推移しているが、降雨開始後上昇し、降り始め 0.5~2.0 時間経過時点で最大値に達した後、降り始め前の値に戻っている。

BODは降り始め前は 45~80 mg/L で推移しているが、降雨開始後上昇し、降り始め 0.5~2.0 時間経過時点で最大値に達した後、降り始め前の値に戻っている。

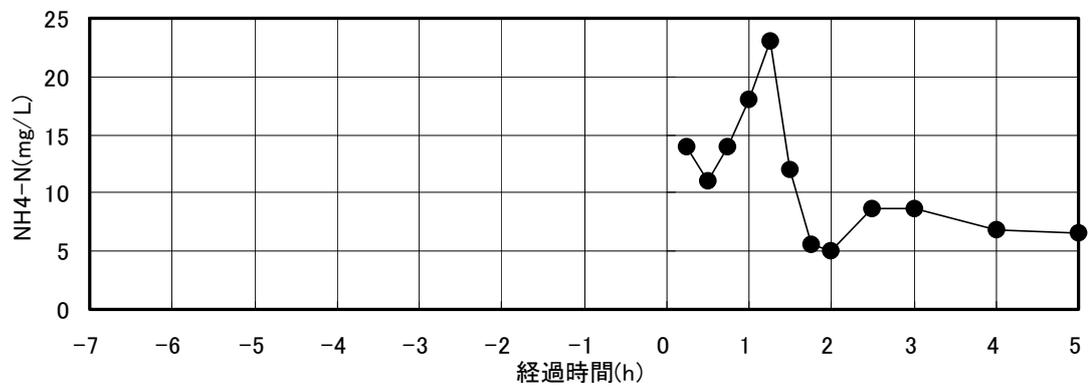
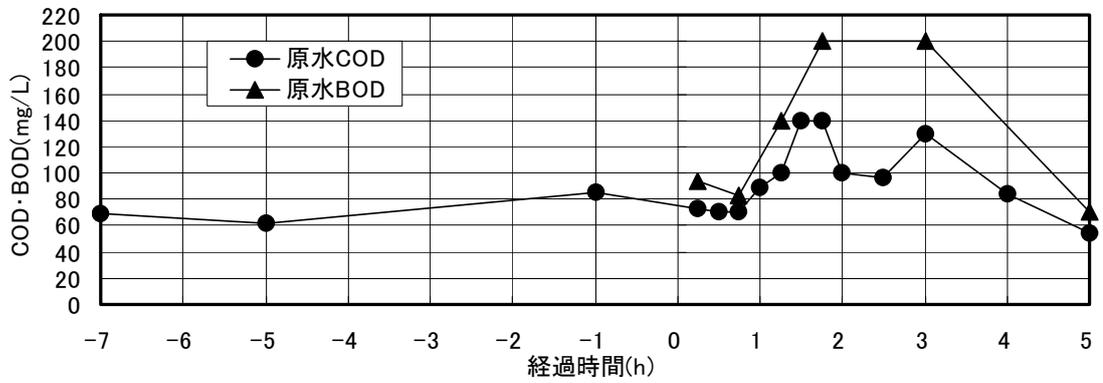
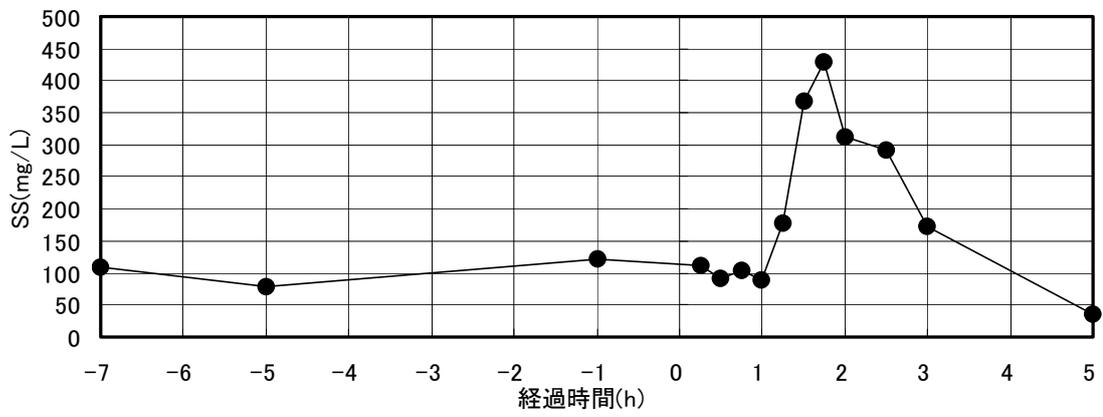
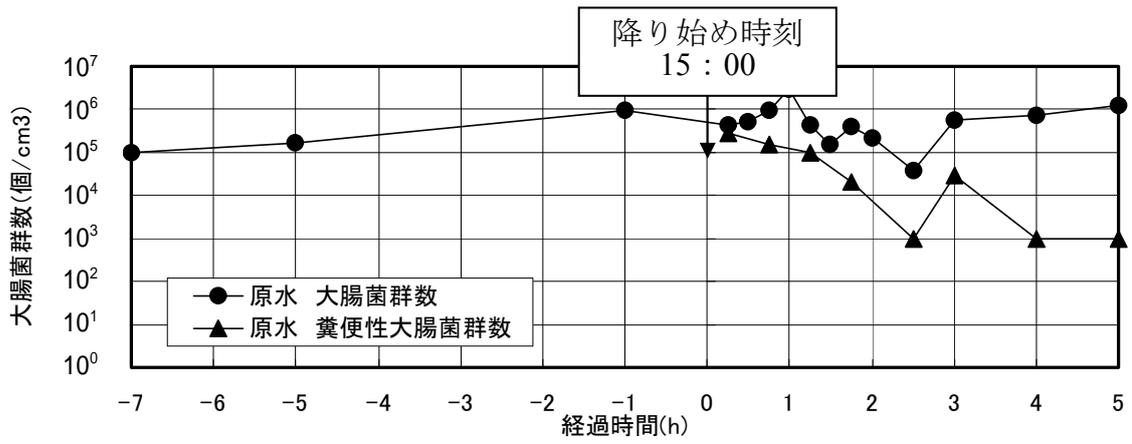
NH₄-Nは降り始め前は約 15.0 mg/L 前後で推移しているが、降雨開始後上昇し、降り始め 0.5~1.5 時間経過時点で最大値に達した後、1.5~10.0 mg/L に減少する傾向を示した。

色度は降り始め前は約 20~70 度で推移しているが、降雨開始後上昇し、降り

始め 1.0～1.5 時間経過時点で最大値に達した後、降り始め前の値またはそれ以下に減少する傾向を示した。

臭気強度は降り始め前は 250～3,000 TON で推移しているが、降り始め 2 時間経過後において 1,500～4,000 TON の範囲にまで上昇する傾向を示した。

よう素消費量は降り始め前は約 5～30 mg/L で推移しているが、降雨開始後上昇し、降り始め 1.0～2.0 時間経過時点で最大値に達した後、降り始め前の値以下に減少する傾向であった。



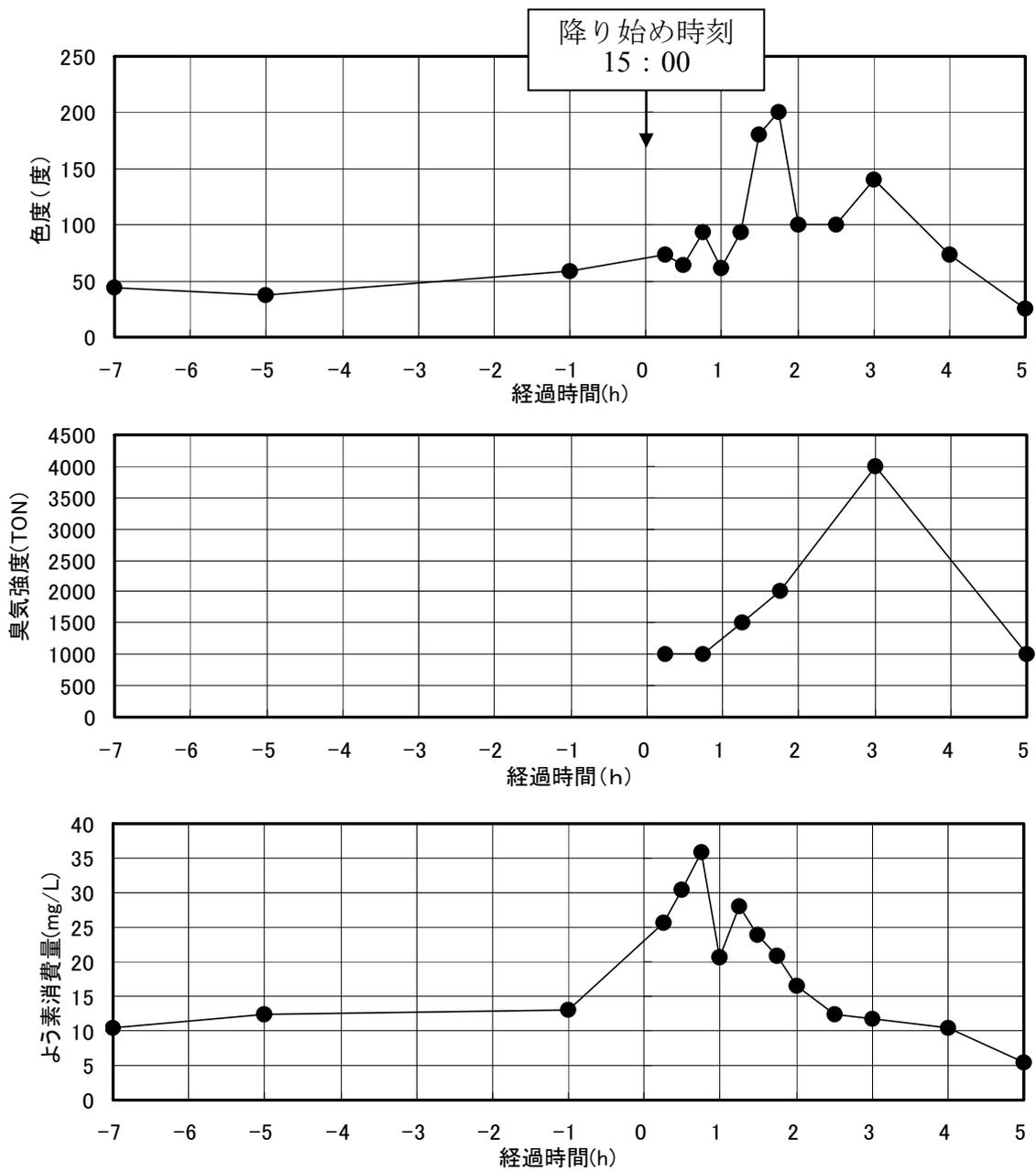
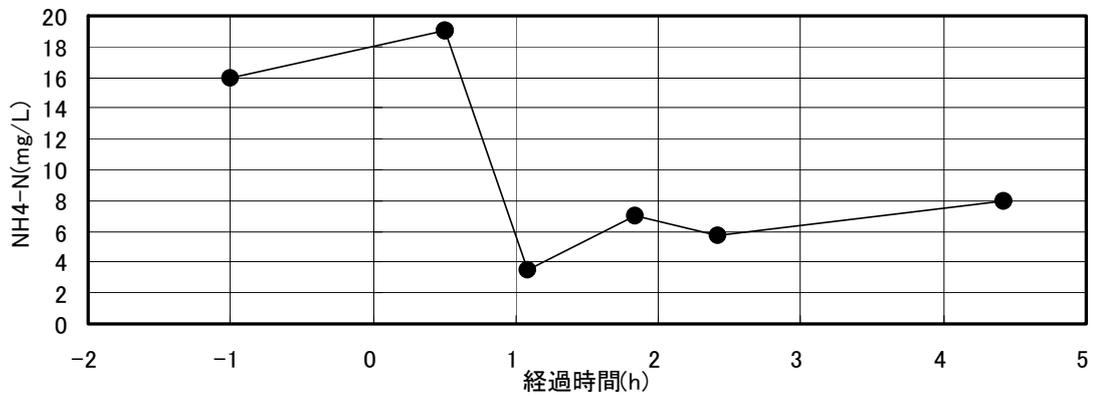
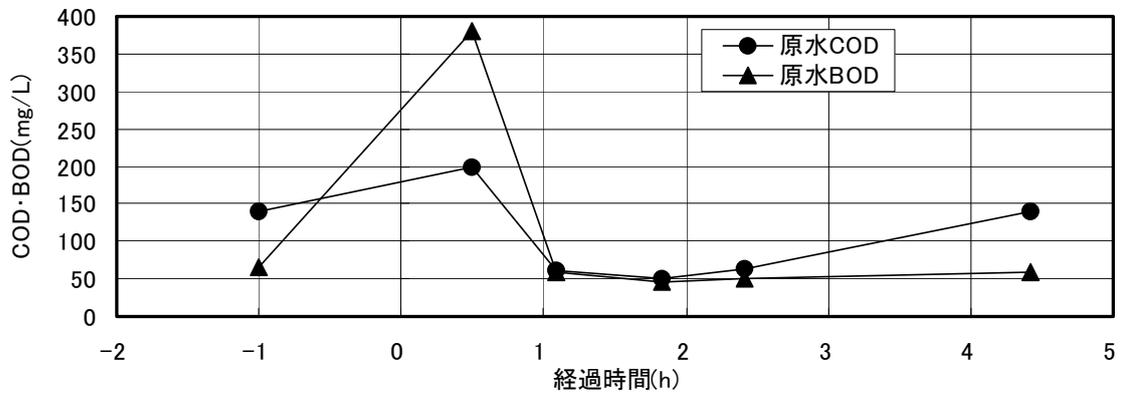
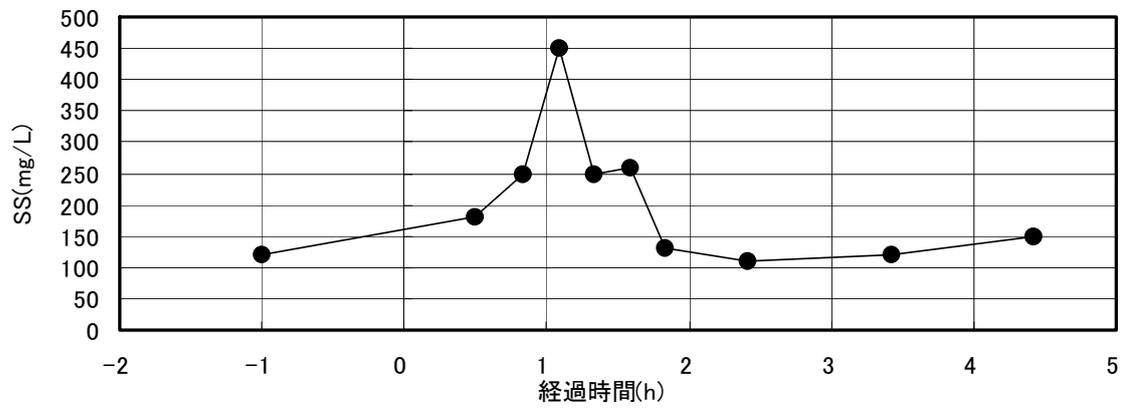
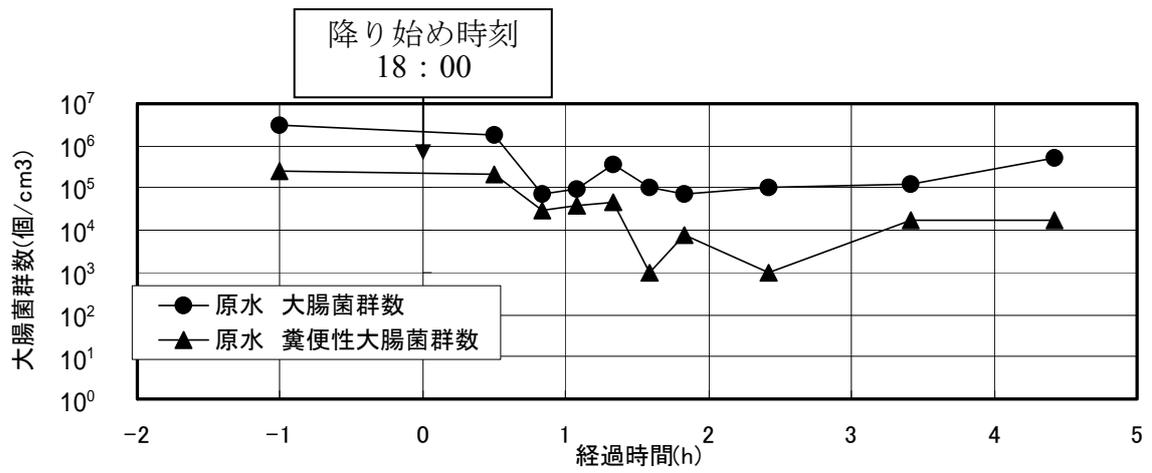


図 4-12a 消毒前の未処理下水水質の経時変化 (実験ケース N-1)



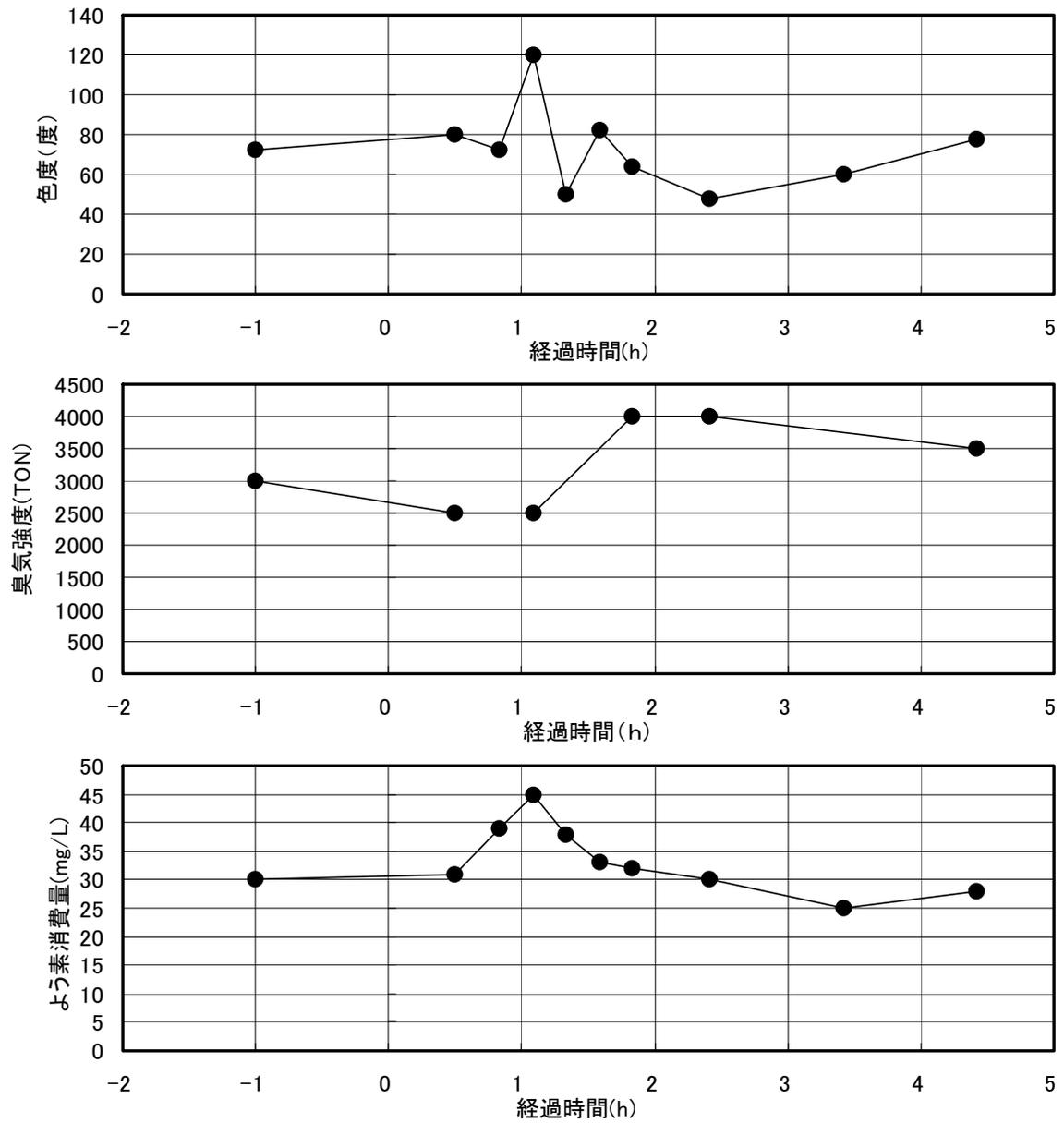
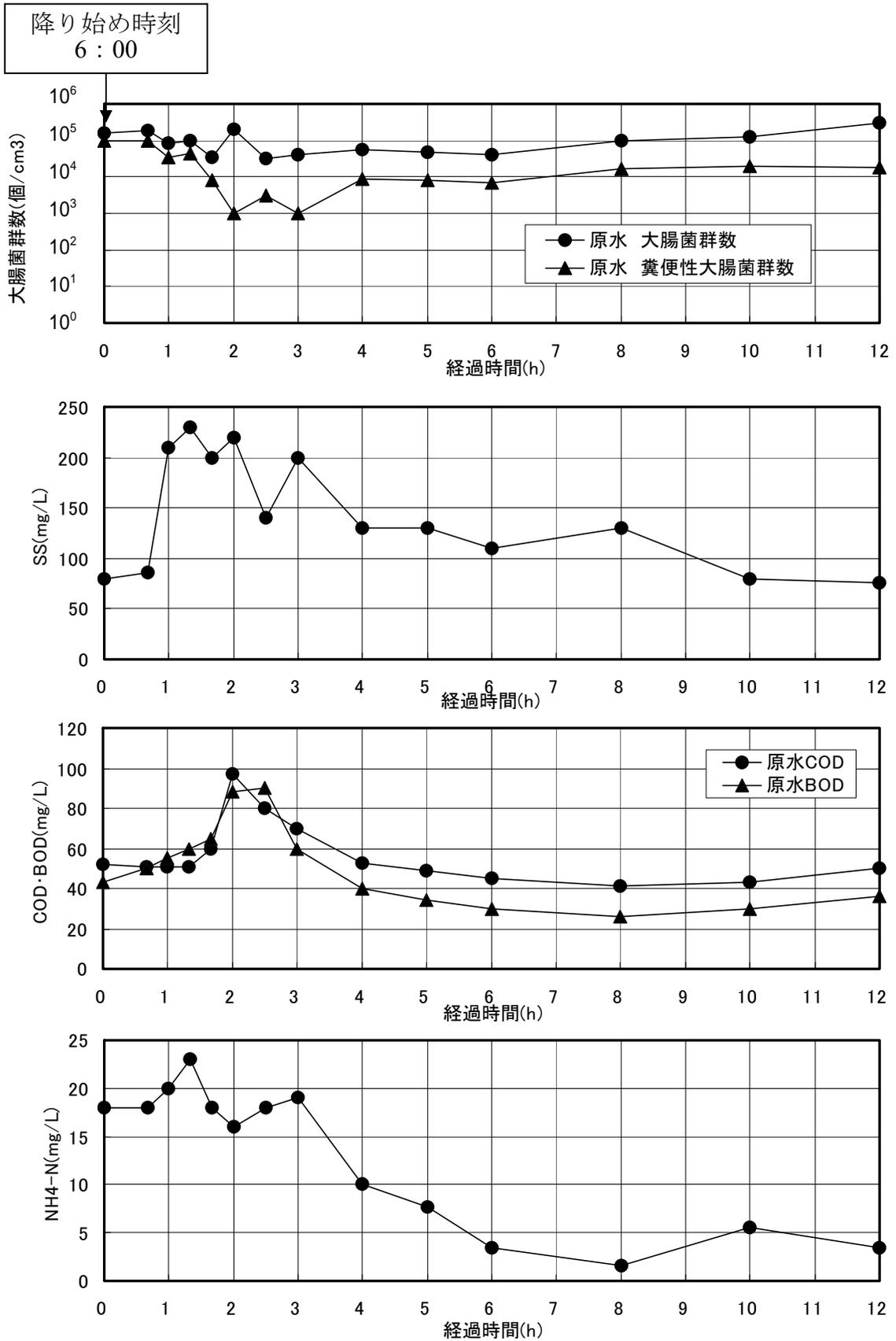


図 4-12b 消毒前の未処理下水水質の経時変化 (実験ケースN-2)



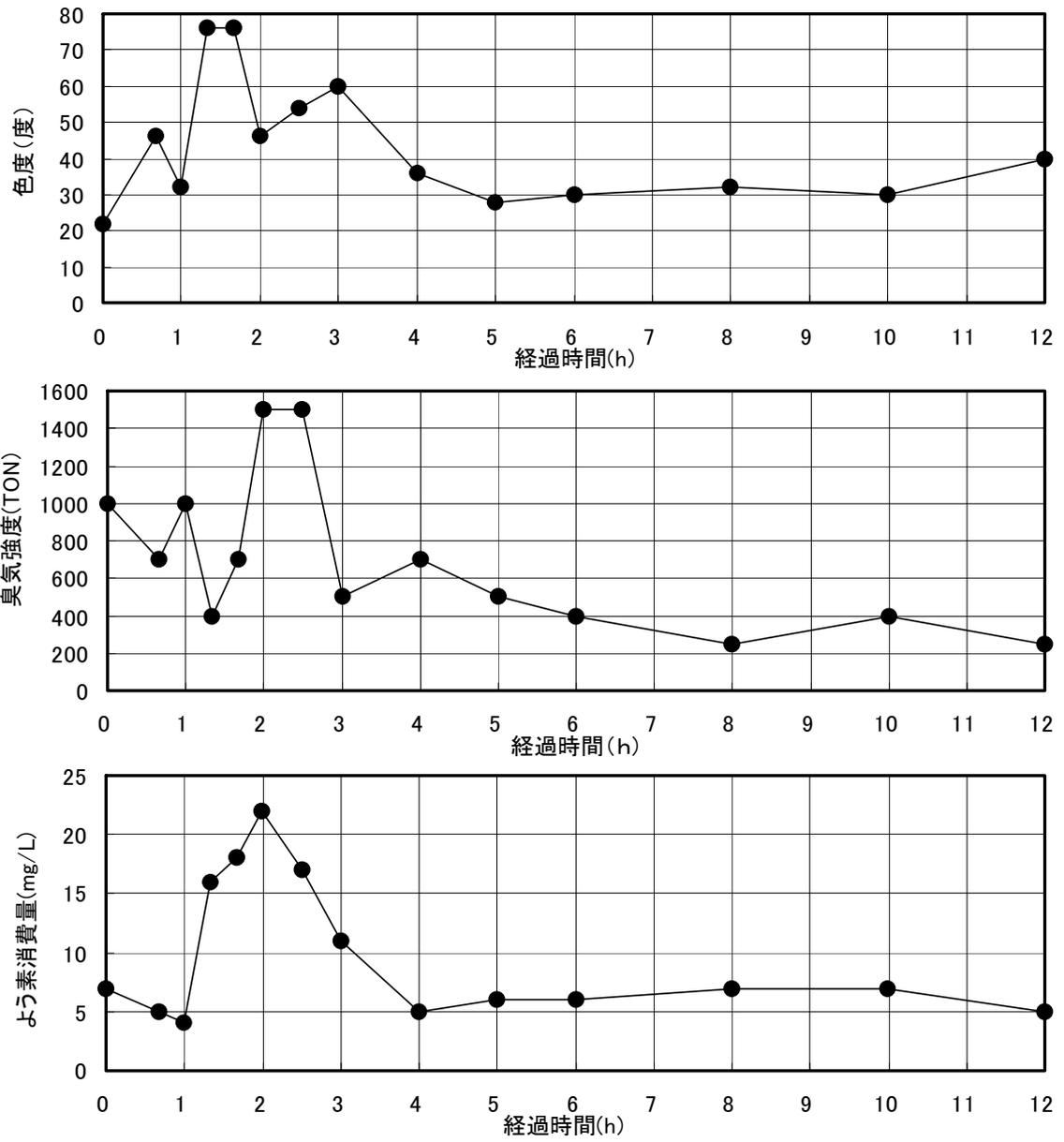


図 4-12c 消毒前の未処理下水水質の経時変化 (実験ケースN-3)

消毒結果

表 4-13 にフィールド実験結果のまとめを、図 4-13a～c に実験ケース N-1～N-3 の消毒前の未処理下水の水質経時変化を示す各雨天時の水質分析結果を示す。

実験ケース N-1 では消毒時間 1.7 分の条件で、オゾン消費率約 100 mg/L となるようにオゾン注入することにより、オゾン処理水の大腸菌群数を $1.0 \times 10^0 \sim 2.2 \times 10^3$ CFU/mL にまで消毒することができた。なお、このときの消毒前の未処理下水の大腸菌群数は $3.9 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^6$ CFU/mL であった。

実験ケース N-2 では消毒時間 1.7 分の条件で、オゾン消費率約 100 mg/L となるようにオゾン注入することにより、オゾン処理水の大腸菌群数を $1.0 \times 10^0 \sim 2.8 \times 10^3$ CFU/mL にまで消毒することができた。なお、このときの消毒前の未処理下水の大腸菌群数は $7.3 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6$ CFU/mL であった。

実験ケース N-3 では消毒時間 1.7 分の条件で、オゾン消費率約 100 mg/L となるようにオゾン注入することにより、オゾン処理水の大腸菌群数を $1.0 \times 10^0 \sim 2.1 \times 10^3$ CFU/mL にまで消毒することができた。このときの消毒前の未処理下水の大腸菌群数は $3.1 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6$ CFU/mL であった。

以上の結果から、オゾン消費率が 89～109 mg/L において目標である 3,000 CFU/mL 以下となることが確認された。このときの消毒時間は 1.7 分間であった。

表 4-13 フィールド試験結果のまとめ

実験ケース		N-1	N-2	N-3
調査日		H16.6.21	H16.7.15	H16.8.15
先行無降雨日数(日)		7	4	17
最大降雨量 (mm/h)		5.5	16.5	8.5
総降雨量(mm)		8	17.0	23.0
サンプル		未処理下水		
反応時間(分)		1.7	1.7	1.7
オゾン消費率 (mg/L)		97~109	89~102	96~104
オゾン注入率 (mg/L)		169~171	153~164	151~155
大腸菌群数 (CFU/mL)	消毒前未処理下水	$3.9 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^6$	$7.3 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6$	$3.1 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^5$
	処理水	$1.0 \times 10^0 \sim 2.2 \times 10^3$	$1.0 \times 10^0 \sim 2.8 \times 10^3$	$1.0 \times 10^0 \sim 2.1 \times 10^3$
糞便性大腸菌群数 (CFU/mL)	消毒前未処理下水	$1.0 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^5$	$1.0 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^5$	$1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$
	処理水	$1.0 \times 10^0 \sim 4.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^3$
溶存オゾン濃度 (mg/L)		5.0~15.3	6.0~9.0	7.6~12.3

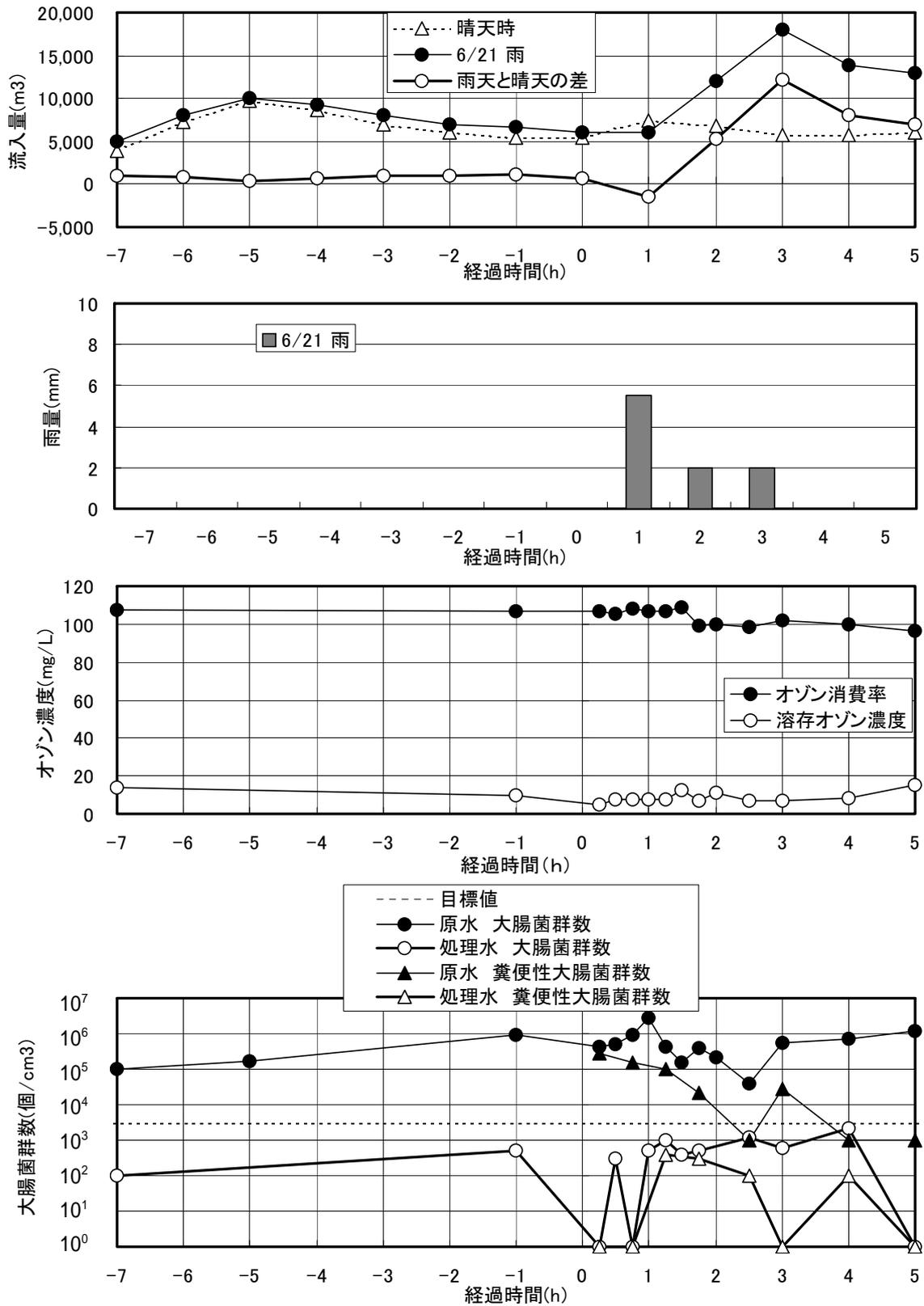


図 4-13a 雨天時の水質分析結果 (実験ケース N-1)

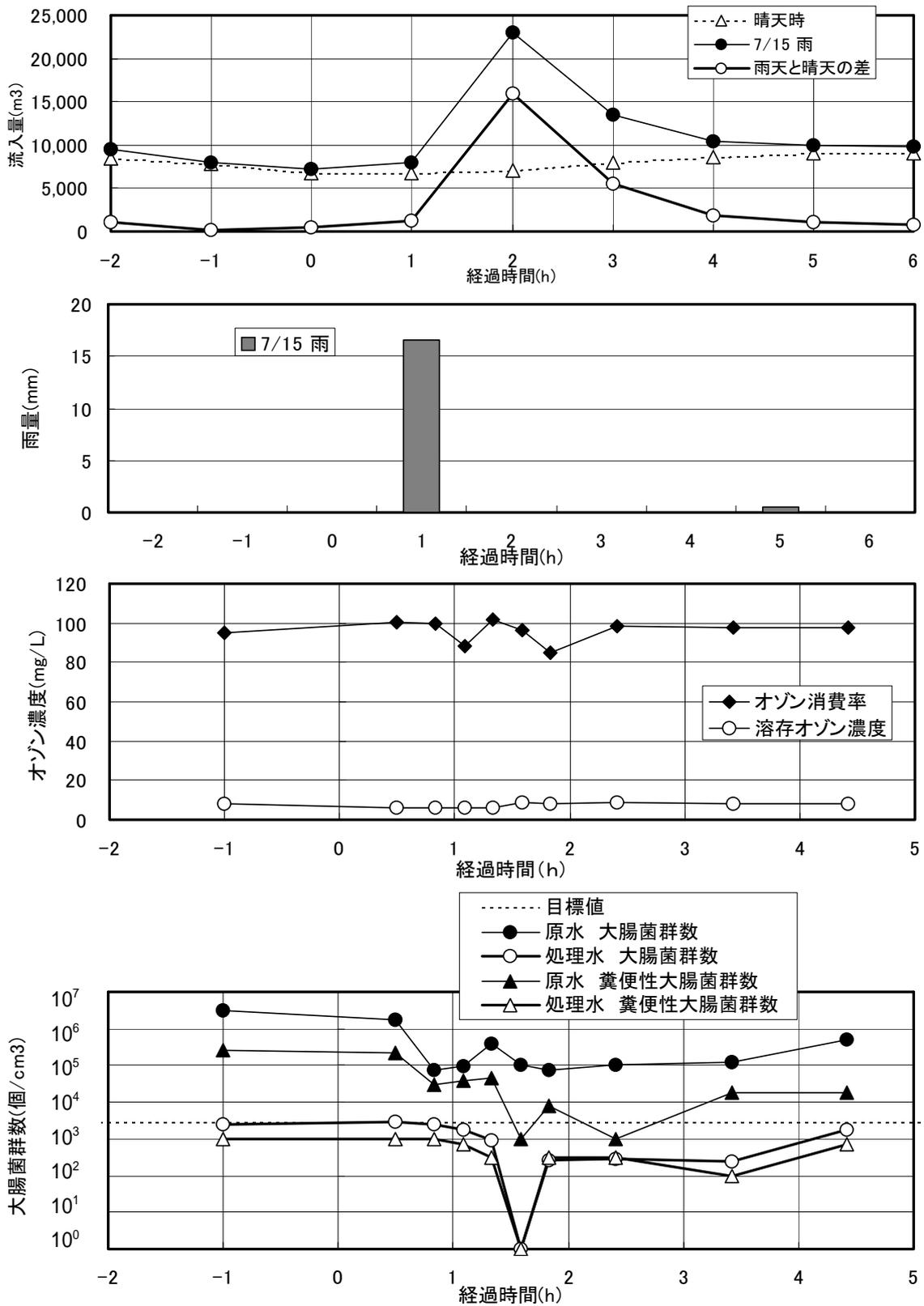


図 4-13b 雨天時の水質分析結果 (実験ケースN-2)

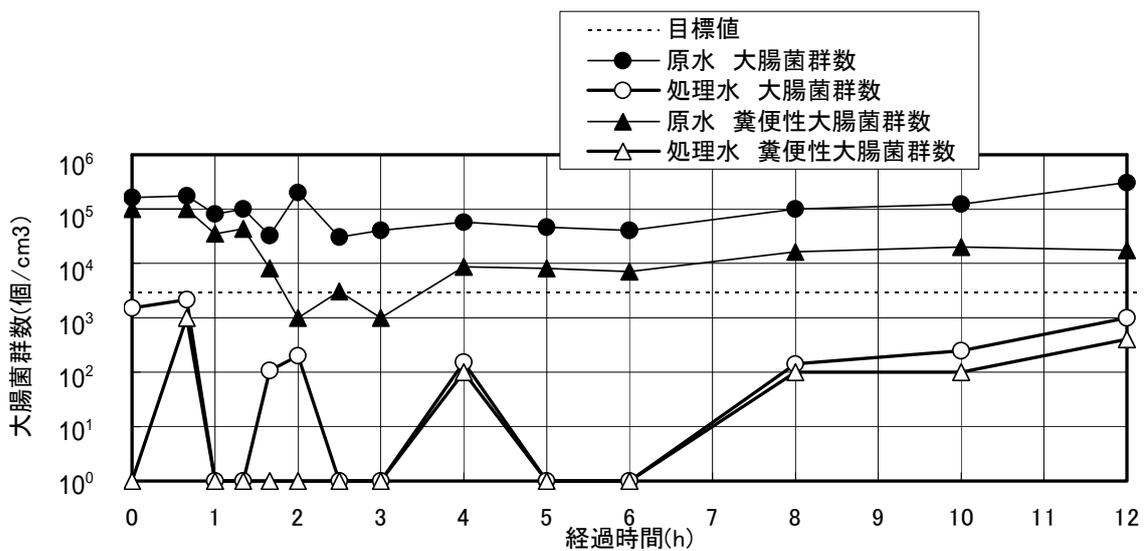
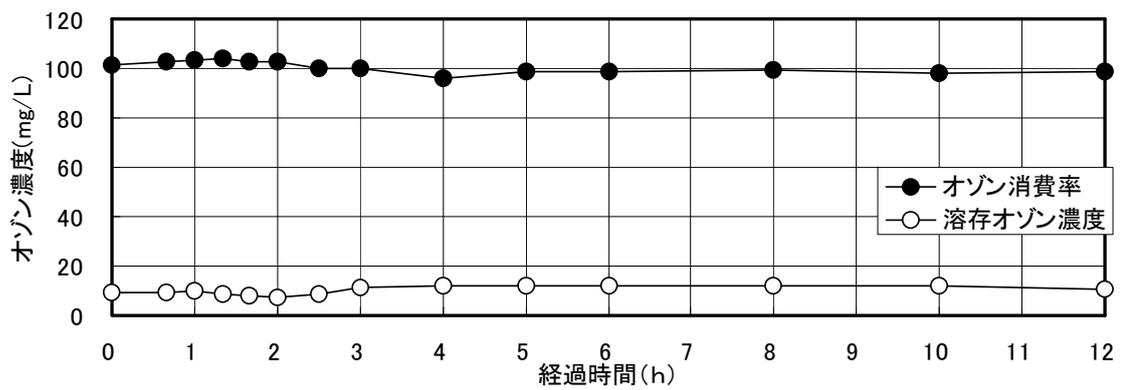
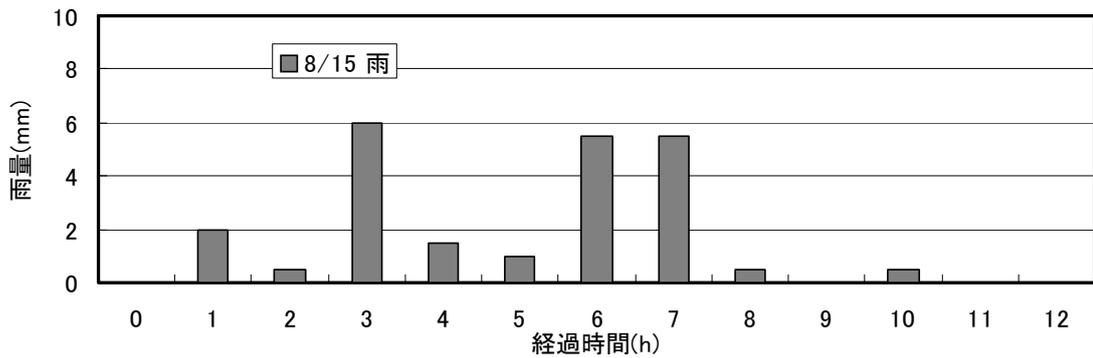
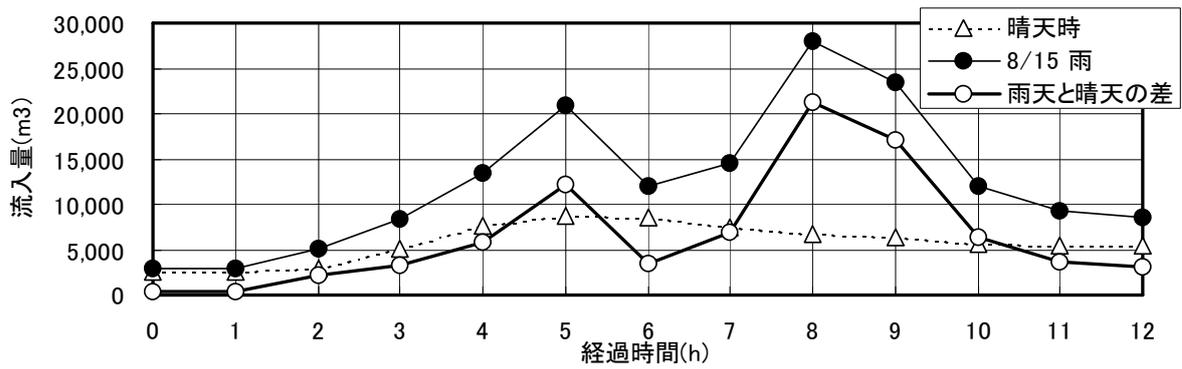


図 4-13c 雨天時の水質分析結果 (実験ケース N-3)

(4) オゾン消費率と消毒の関係

実験ケースN-1を代表ケースとしてビーカー実験を実施した。フィールド実験時に、降雨前と降雨期間中に試料水を採水してビーカー実験を行ない大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下にするために必要なオゾン消費率を確認した。

採水は、降雨前（8：30）に1回、降雨期間中（16：00～20：00の間）に3回採水した。表 4-14 にビーカー実験における消毒前の未処理下水水質、図 4-16 にビーカー実験における大腸菌群数結果を示す。水質が最も悪化した 1.5 時間後の消毒前の未処理下水の場合、オゾン消費率が約 85 mg/L で大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下となった。一方、降雨期間終盤の 5 時間後の消毒前の未処理下水の場合、オゾン消費率が約 60 mg/L で大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下となった。ファーストフラッシュ時の最大オゾン消費率に対し、降雨後期のオゾン消費率は約 70%程度で 3,000 CFU/mL 以下となっている。

表 4-14 ビーカー実験における消毒前の未処理下水水質

経過時間 (h)	大腸菌群数 (CFU/mL)	よう素消費 量 (mg/L)	SS (mg/L)
-6.5	7.0×10^4	19.1	68
1.0	2.3×10^6	27.9	118
1.5	7.3×10^4	34.5	328
5.0	5.8×10^5	9.9	92

採水日：H16.6.21、雨天開始時を 0h としている

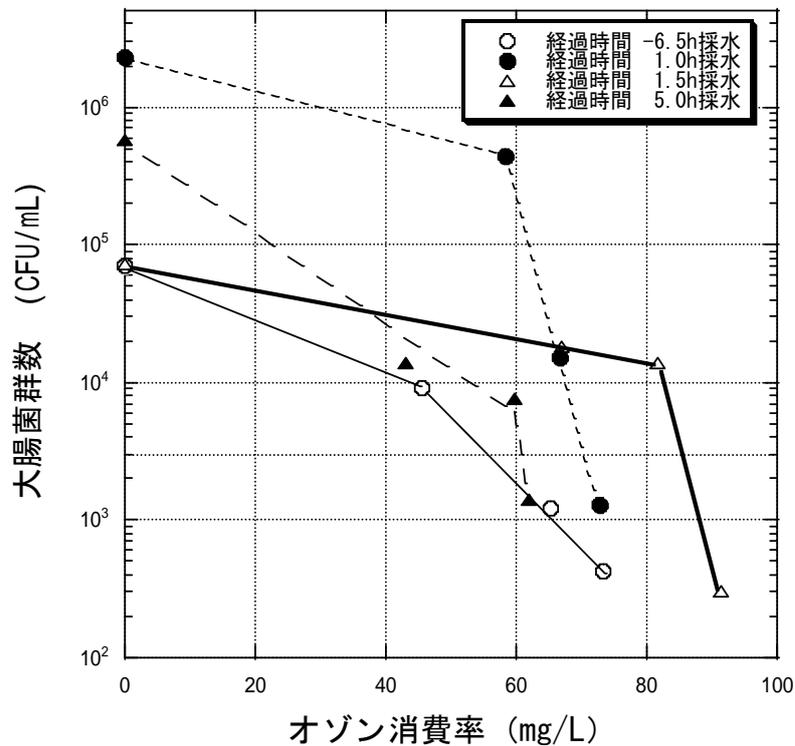


図 4-16 ビーカー実験における大腸菌群数結果

第 3 節 オゾン消毒への各種水質項目の与える影響

4-3-1 概論

前節では雨天時未処理下水のオゾン消毒に必要なオゾン消費率について実験結果を示した。本節ではオゾン消毒効果に影響を与える因子について考察する。消毒以外に消費されるオゾンの無効消費が考えられる。このようなオゾンの無効消費の原因となる物質の混入は下水処理場の立地条件（流入区域の地域性）に大きく依存すると考えられるため、各地の下水処理場の流入下水をサンプルとして、各種指標となる水質項目に対するオゾン消毒の依存性について検証を行った。

4-3-2 研究方法

(1) 水質試験

国内 9 処理場の未処理下水を用いたオゾン消毒性能試験を前節で述べたビーカー実験により行った。処理目標を達成するのに必要なオゾン消費率をビーカー実験により求めた。測定した水質項目は表 4-4 と同じである。表 4-15 に各処理場の採水日一覧を示す。

表 4-15 各処理場の採水日一覧

処理場名	採水日	天候	主な流入	汚泥返送水有無
D 処理場	H16.5.10	雨	家庭排水	無し
E 処理場	H16.5.11	晴れ	市街地排水	無し
F 処理場	H16.5.11	晴れ	家庭排水	無し
G 処理場	H16.5.12	晴れ	家庭排水	無し
H 処理場	H16.5.13	雨	家庭排水	有り
I 処理場	H16.5.18	曇り	家庭・工場排水	有り
J 処理場	H16.5.19	曇り	家庭・工場排水	無し
K 処理場	H16.5.19	曇り	家庭・工場排水	無し
L 処理場	H16.5.31	晴れ	家庭・工場排水	有り

(2) オゾン消費率と水質項目の相関分析

大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下にするために必要なオゾン消費率に寄与する要因を調べるために、オゾン消費率に影響する水質項目として COD_{Mn}、よう素消費量、SS を選定した。これはオゾンが酸化性の物質であることから、COD_{Mn}、SS が水中で大腸菌群と競争反応となる可能性が高く、また、よう素消費量は還元性物質の指標であることから、オゾンが容易に反応することが想像されること、という理由によるものである。表 4-15 の処理場で測定した水質試験結果を利用して、オゾン消費率と各水質項目との相関を求めた。

(3) 安全性の検証

オゾン処理水の安全性について検証するため遺伝毒性を調べる目的で、*umu* 試験および臭素酸濃度の測定を行った結果を示す。

umu 試験については、実験ケース N-2 の雨天時のオゾン処理後の水をサンプルとし分析を行った。採水は水質がもっとも悪いと考えられる経過時間 1.5 時間のサンプルについて実施した。消毒前の未処理下水及びオゾン注入率 50 mg/L、100 mg/L 処理後の計 3 つのサンプルとした。試験実施の際には代謝活性化法による場合 (S9(+)) と代謝活性化法によらない場合 (S9(-)) のそれぞれについて実施した。

一方、臭素酸はオゾン消毒における消毒副生物であるが、臭素酸濃度をイオンクロマトグラフ法で分析した。

4-3-3 結果および考察

(1) 水質試験結果

表 4-16 に消毒前の未処理下水の水質測定結果を示す。なお、オゾン注入率は 0~700 mg/L の範囲で実験を行った。

さらに、図 4-17 に各処理場のオゾン処理効果（オゾン消費率と大腸菌群数の関係）を、表 4-17 に大腸菌群数 3,000 CFU/L 以下にするのに必要なオゾン消費率を示す。

表 4-16 各処理場の消毒前の未処理下水水質測定結果一覧

処理場名	よう素消費量(mg/L)	大腸菌群数(CFU/mL)	COD _{Mn} (mg/L)	色度(度)	NH ₄ -N(mg/L)	SS(mg/L)
D 処理場	8.1	4.0×10 ⁵	56	30	13.0	93
E 処理場	19.3	3.4×10 ⁵	130	75	23.0	233
F 処理場	14.7	6.2×10 ⁵	50	15	11.0	56
G 処理場	9.4	4.5×10 ⁶	66	40	17.0	71
H 処理場	6.9	2.2×10 ⁵	66	29	9.1	129
I 処理場	8.6	3.1×10 ⁵	36	28	17.0	58
J 処理場	17.8	8.2×10 ⁵	140	136	25.0	224
K 処理場	18.3	5.6×10 ⁴	88	98	24.0	170
L 処理場	27.7	2.7×10 ⁵	150	130	27.0	311

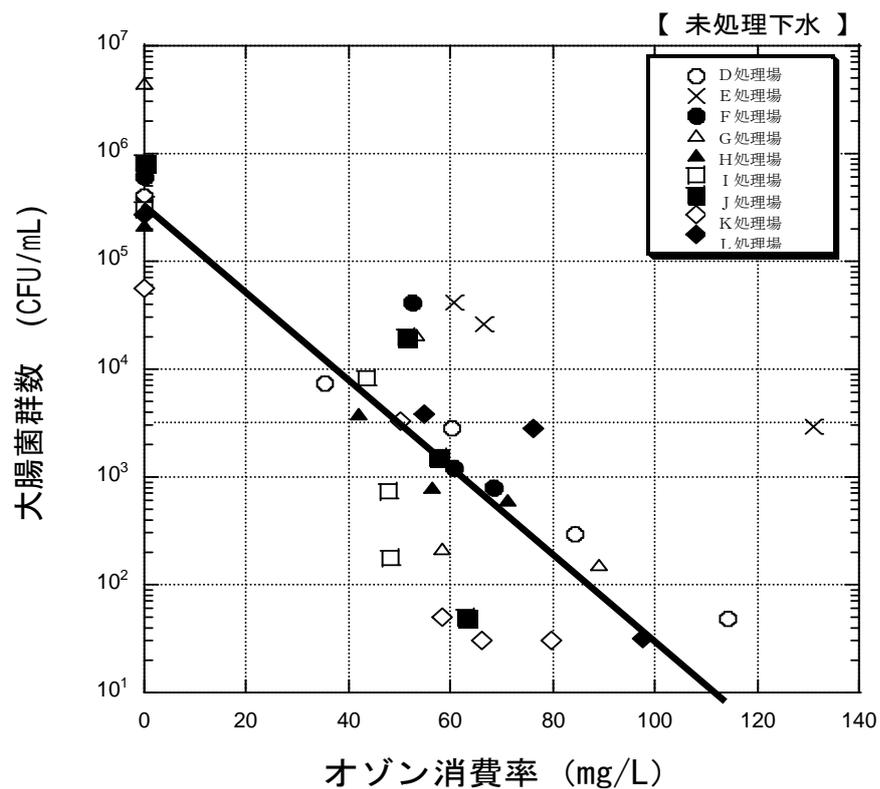


図 4-17 各処理場のオゾン消費率と大腸菌群数の関係

表 4-17 3,000 CFU/mL 以下にするのに必要なオゾン消費率

処理場名	3,000 CFU/mL 以下にするのに必要な値	
	オゾン消費率 (mg/L)	オゾン注入率 (mg/L)
D 処理場	56	420
E 処理場	130	700
F 処理場	60	420
G 処理場	56	520
H 処理場	47	160
I 処理場	45	160
J 処理場	56	470
K 処理場	50	470
L 処理場	98	420
横浜市 C 処理場	105	550

ビーカー実験の結果をまとめた表 4-1-1 から、大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下にするのに必要なオゾン消費率は、未処理下水の場合は 45~130 mg/L の範囲にあり平均は 65 mg/L であった。

このうちオゾン消費率の多かった処理場は、工場排水の負荷が大きい実証場所である横浜市 C 処理場・L 処理場と、市街地排水が主でほとんど家庭排水が無い E 処理場であった。この 3 処理場を除いた場合の大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下にするのに必要なオゾン消費率の平均は 50 mg/L 以下となり、立地条件がオゾン消費率に大きな影響を与えている可能性が高いと考えられる。

(2) オゾン消費率と水質項目の相関分析

大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下にするために必要なオゾン消費率に寄与する要因を調べるために、COD_{Mn}、よう素消費量、SS を選定し、オゾン消費率と各水質項目との相関を求めた結果を図 4-18~4-20 に示す。

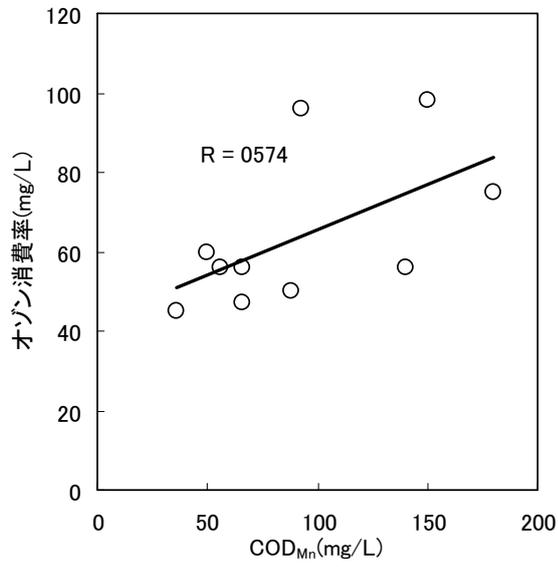


図 4-18 COD_{Mn} とオゾン消費率の相関

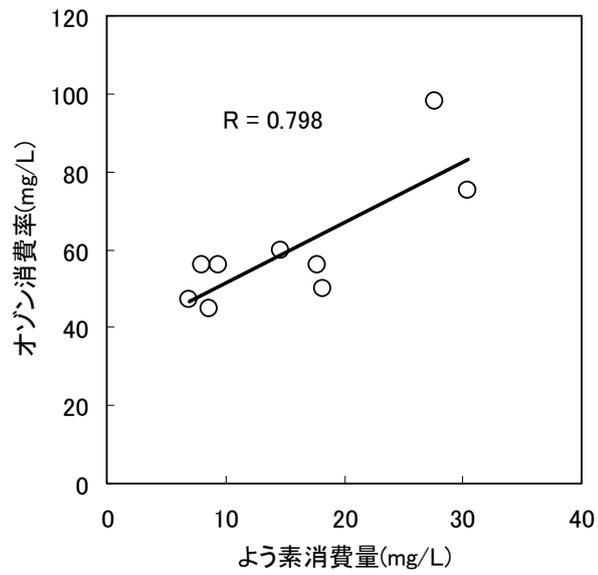


図 4-19 よう素消費量とオゾン消費率の相関

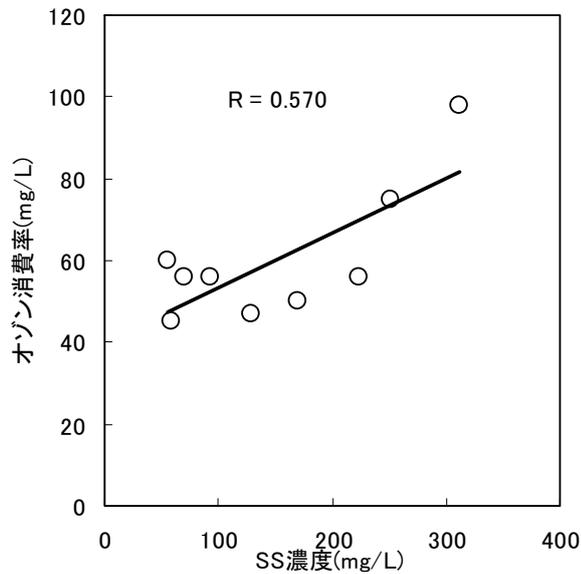


図 4-20 SS とオゾン消費率の相関

図に示すように、オゾン消費率はよう素消費量との間に比較的良好な相関が認められた。「下水試験方法」⁴⁾によれば、よう素消費量は硫化物、鉄()塩、不安定な有機物、不飽和結合を有する有機物等の還元性物質によって消費されるよう素の量であることから、工場廃水の流入割合によって大きく変化するものと推定される。

一方、COD_{Mn}、SSについては共に相関が認められるものの、よう素消費量より低い相関であった。以上の結果を用いてオゾン消費率に対する各水質項目を説明変数とする重回帰分析を行った。得られた回帰式を以下に示す。

大腸菌群数 3,000CFU/mL を達成するために必要なオゾン消費率(mg/L) : Y	
COD _{Mn} (mg/L)	: X1
よう素消費量 (mg/L)	: X2
SS (mg/L)	: X3
$Y = -0.205 \times X1 + 1.560 \times X2 + 0.115 \times X3 + 37.12$	

上記の式を利用したオゾン消費率の予測値と実測値の相関を図 4-21 に示す。

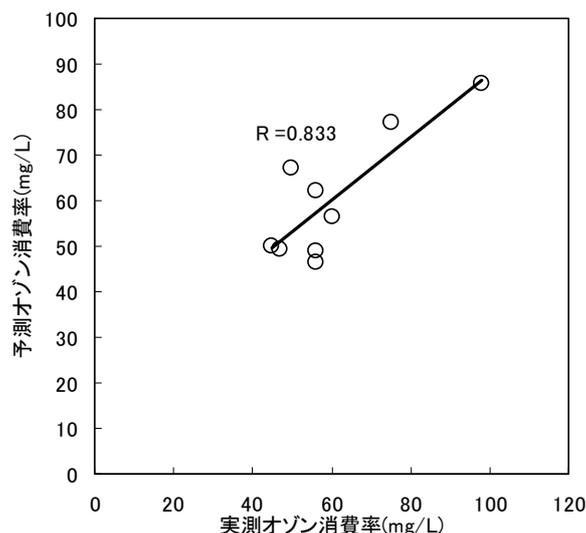


図 4-21 実測値と予測値の相関

未処理下水については、図 4-19 と図 4-21 を比較すると相関係数はそれぞれ 0.798 と 0.833 で、パラメータを増やしても顕著に増加しない結果となった。したがって、オゾン消費率と比較的良好な相関がある要因はよう素消費量、 COD_{Mn} 、SS であり、オゾン消毒が適用可能な処理場の選定を行う場合の水質項目としてこれらが妥当と考えられる。しかし、よう素消費量は現実には実測していないケースも多いため、この場合は COD_{Mn} と SS のみで判断することも必要であると考えられる。

(3) 下流側水域の安全性の検証

オゾン処理水の安全性について検証した結果を以下に示す。

[umu 試験による検証]

発色基質として X-GAL (5-ブロム-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド) を利用した時の、 β -ガラクトシダーゼ活性に伴う吸光度測定 ($\lambda=620\text{nm}$) 結果を表 4-18 に示す。

なお同表には大腸菌群数の測定結果を併記する。

表 4-18 *umu* 試験結果 (吸光度 : 波長 620nm)

試料 濃縮倍率 (倍)	消毒前の 未処理下水		O ₃ (50mg/L) 処理水		O ₃ (100mg/L) 処理水	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
1000	0.391	0.496	0.215	0.320	0.197	0.283
500	0.285	0.375	0.218	0.285	0.218	0.270
250	0.316	0.315	0.227	0.300	0.221	0.267
125	0.269	0.289	0.238	0.261	0.229	0.255
62.5	0.248	0.290	0.236	0.282	0.243	0.243
31.3	0.232	0.259	0.227	0.272	0.249	0.239
15.6	0.223	0.258	0.231	0.303	0.242	0.249
陰性対照	0.247	0.273	0.242	0.248	0.260	0.268
大腸菌群数 (CFU/mL)	3.0×10 ⁵		8.4×10 ³		3.1×10 ²	

ここで遺伝毒性を評価する指標として、下記の判定値を定義する。

$$\text{判定値} = (A - B) / B$$

ここで A はサンプルの吸光度測定値、B は陰性対照の吸光度測定値である。表 4-18 の各サンプルについてそれぞれ判定値を計算し、以下の判定基準により判定した。

$$\text{陰性 (-)} : 1 > (A - B) / B$$

$$\text{陽性 (+)} : 2 > (A - B) / B > 1$$

$$\text{中陽性 (++)} : 5 > (A - B) / B > 2$$

$$\text{強陽性 (+++)} : (A - B) / B > 5$$

判定結果は表 4-19 に示すように全てのサンプルについて陰性であった。また、横軸に濃縮倍率を、縦軸に $(A - B) / B$ を取って、プロットした結果を図 4-22 に示す。

同図により消毒前の未処理下水は全て陰性の範囲内であるが、濃縮倍率が高まるに連れて判定値が上昇する傾向があり、特に S9(+)において相対的に大きな傾向となった。一方、オゾン処理したサンプルについては、その傾きが小さく

なり、オゾン注入率の依存性もわずかであるが観察された。

以上の結果から、本試験における 3 つのサンプルの遺伝毒性はいずれも陰性であると結論した。またオゾン処理を行ったサンプルについては、オゾン注入率が上昇するにつれて判定値が低下することも確認された。

表 4-19 *umu* 試験結果 (判定値)

試料 濃縮倍率 (倍)	消毒前の 未処理下水		O ₃ (50 mg/L) 処理水		O ₃ (100 mg/L) 処理水	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
1000	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
500	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
250	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
125	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
62.5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
31.3	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
15.6	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

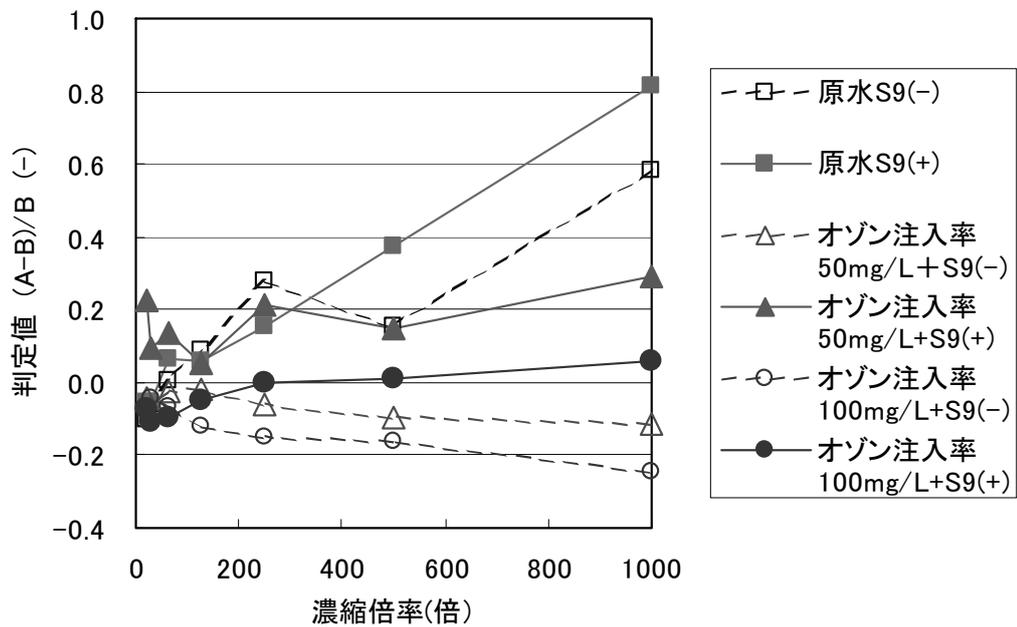


図 4-22 判定値の用量依存性

[臭素酸測定による検証]

オゾン消毒における消毒副生物として臭素酸濃度をイオンクロマトグラフ法で分析した。その結果を表 4-20、表 4-21 に示す。オゾン消費率が 100 mg/L を超えても臭素酸の生成が認められない場合と、オゾン消費率が 40 mg/L を超えると臭素酸の生成が認められるという二つの結果が得られた。

表 4-20 臭素酸生成量分析結果 (1)

No	オゾン消費率 (mg/L)	臭素酸濃度 (mg/L)	臭化物イオン濃度 (mg/L)
1	0	0.001 >	—
2	97	0.001 >	—
3	104	0.001 >	—

表 4-21 臭素酸生成量分析結果 (2)

No	オゾン消費率 (mg/L)	臭素酸濃度 (mg/L)	臭化物イオン濃度 (mg/L)
1	0	0.001 >	2.8
2	44	0.001 >	2.7
3	82	0.041	2.7
4	118	0.090	2.6

臭素酸の生成が認められたデータをさらに詳しく検討するため、図 4-23 にオゾン消費率と臭素酸濃度の関係を示す。同図より臭素酸の生成はオゾン消費率 45 mg/L の辺りより生じていることが分かる。このことは、臭素酸の生成が臭化物イオン存在時に溶存オゾン濃度がある領域で臭素酸が生成することを示唆している。

図 4-23 より、雨天時最大オゾン消費率 109 mg/L の時、生成する臭素酸濃度は約 0.08 mg/L であり、上水水質基準の 0.01 mg/L を越えているが、河川水での希釈効果（10 倍）を考慮すると上水水質基準以下となると予想される。未処理下水のオゾン処理水が放流されるのは、通年の中でわずかな日数であることも考慮すると、臭素酸による放流水系へのリスクは小さいものと推測されるが、上水水質基準値に近い値まで達する可能性もあることから、処理水放流先の河川下流部に上水道施設がある場合は、この点を考慮した慎重な検討が必要である。

オゾン消毒の対象として、国内処理場 9 ヶ所の平均的未処理下水水質に適用するオゾン消費率 50 mg/L の場合、臭素酸濃度は上水水質基準 0.01 mg/L 以下となり、さらに河川水での希釈効果を考え合わせると、下流側流域の安全性が問題となる量ではないと考えられる。

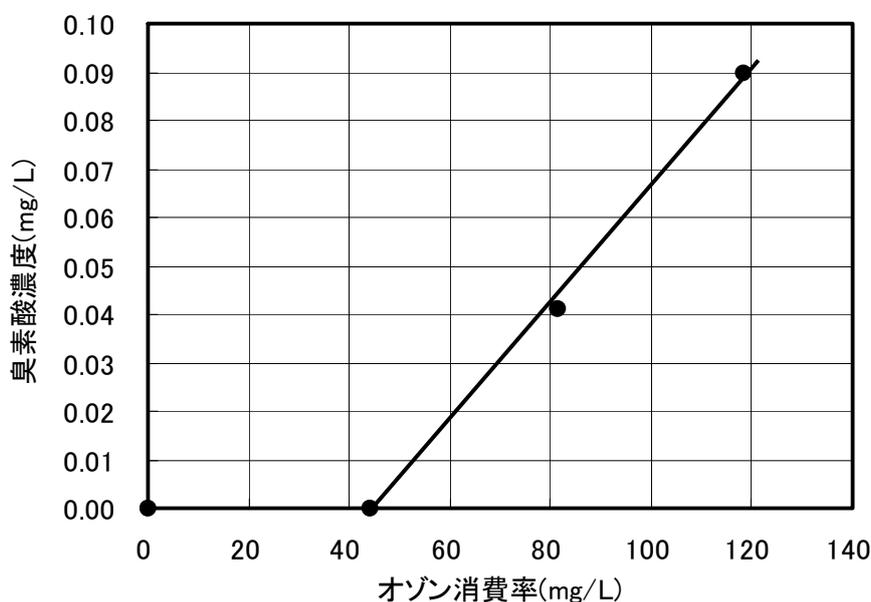


図 4-23 オゾン消費率と臭素酸濃度

第 4 節 結語

本章では、合流式下水道において雨天時に公共流域に流出する未処理下水の消毒を目的として、高速オゾン消毒技術の適用について検討を行い、さらにオゾン消毒に影響を与える因子について確認した。以下に得られた結果をまとめる。

- (1) オゾン消費率が 90～110 mg/L において消毒時間 1.7 分で、未処理下水の大腸菌群数を 3,000 CFU/mL 以下にすることが可能であった。
- (2) 大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下にするのに必要なオゾン消費率と水質項目の相関関係を調べた結果、よう素消費量との相関関係（相関係数 0.798）が比較的大きいことがわかった。
- (3) 下流側水域の安全性については、遺伝毒性評価の一種である *umu* 試験により、オゾン処理水の毒性評価は陰性であった。また臭素酸については水質条件等により生成するケースもあったが、生成濃度、雨天時の河川水の希釈を考慮すると下流側流域の安全性としては特に問題では無いと判断された。

本章の検討結果により、高速オゾン消毒に必要なオゾン注入条件や消毒に影響を与える要因が明らかとなり、雨天時の未処理下水のオゾンによる迅速消毒の実現の可能性が示唆された。

第4章 参考文献

- 1) 堺 好雄、中尾彰夫、布施達雄、「一次処理水のオゾン消毒」、第27回下水道研究発表会講演集、420-422(1990).
- 2) 堺 好雄、国島康成、中尾彰夫、布施達雄、本田一好、「オゾンの下水処理への適用」、用水と廃水、34(4)、25-30 (1992).
- 3) 「オゾン利用浄化技術の実際」、サンヨー書房、P9 (1999) .
- 4) (社)日本下水道協会、「下水試験方法－1997年度版－」、(1997).
- 5) 大垣眞一郎、「オゾン処理特集:オゾンによる消毒」、水道協会雑誌、Vol.64、No.10、14-17、(1995).
- 6) 稲村、新飯田、長谷川、府中、吉田、「臭素系消毒剤による下水の消毒技術」、第38回下水道研究発表研究会講演集、(2001).
- 7) 東京都下水道局、「合流式下水道の雨天時越流水についての調査」、東京都下水道局技術調査報告書、(1986).
- 8) 下水道協会監修、「合流式下水道改善対策指針と解説」、(2002)

第 5 章 大腸菌群数計測装置による高速消毒システムの開発

第 1 節 概説

第 3 章までに大腸菌群数を迅速に測定する手法について検討した結果、培養操作を行わない蛍光酵素法 (β -ガラクトシダーゼ活性利用) を利用し、フローインジェクション法を用いた自動測定による装置構成とすることにより、下水中の大腸菌群数を迅速かつ高感度で測定可能であることを示した。

また第 4 章において、雨天時の未処理放流水に対して高速オゾン消毒を行なう際のオゾン注入条件や消毒に影響を与える因子について明らかとなり、放流水の安全性についても確認することができた。

下水の大腸菌群数を測定し、その測定結果を用いて消毒剤の制御を検討した例としては福岡ら¹⁾の報告がある。これは抗原抗体法を原理とする大腸菌群数計測装置、有機物・アンモニア自動測定装置の測定値から次亜塩素酸ナトリウムの注入率を変化させる制御を方式するものである。しかしながら、大腸菌群数の測定が 2 時間と比較的長いため数分以内に時々刻々と大腸菌群数が変化する場合については、適正に消毒剤を制御できるとは言いがたい。

これに対し、第 3 章での検討により、大腸菌群数 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL の二次処理水の測定は酵素反応時間 30 分 (測定間隔 45 分)、 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL では酵素反応時間 10 分 (測定間隔 15 分) と迅速に大腸菌群数を測定可能であることが分かったため、精度の高い消毒システムを構築できると期待できる。

本章では、第 3 章で構成した大腸菌群数迅速計測装置を用いて下水消毒システムを構築し、これまで消毒の対象としてきた二次処理水の他に第 4 章で検討した雨天時の未処理放流水についても、消毒結果を用いて、シミュレーションにより計算し、大腸菌群数迅速計測装置の仕様にフィードバックするとともに、大腸菌群数迅速計測装置を組み込んだ消毒システムとして、高速オゾン消毒の

有効性について、消毒剤の節減と CO₂ 排出量の両面から評価することで、下水消毒システムの有効性を評価することを目的とする。

なお、本研究では消毒剤としてオゾンを用いた場合について検討したが、他の高速消毒が可能な消毒剤、例えば臭素系消毒剤については、同様の結果が得られるものと推測される。

第2節 二次処理水の消毒シミュレーション

5-2-1 概論

本節では、消毒対象を二次処理水とした場合のオゾン消毒システムについて検討を行なった。すなわち、30分で大腸菌群数数の測定が可能な大腸菌群数計測装置を用いてオゾン消毒によるシステム構成を行い、その消毒性能を評価するとともに、最適なオゾン注入制御方法について評価を行なった。

5-2-2 シミュレーションモデルの構築

下水消毒システムを構築した場合のオゾン節減率をシミュレーションで算出するためには、消毒槽のモデル化が必要である。ここでは下水の二次処理水をオゾンで消毒する時の殺菌モデルを構築することを目的とする。

(1) オゾン吸収、溶解モデル

気中で発生したオゾンを水中に溶解させるオゾン吸収、溶解モデルについては山口ら²⁾の報告で示されているモデルを利用した。その概要を以下に示す。

オゾンを用いた水処理では、オゾンと被処理物質を反応させるために、オゾンを被処理水中に溶解させる必要がある。散気板を通して被処理水にオゾン注入した場合、オゾンの液相への移動が起こる。ただし全てのオゾンが液相へ移動するわけではなく、液相に移動しなかったオゾンは水面より気泡として排出

される。被処理水に散気されたオゾンの溶解速度式として以下の式が導出されている。

$$dC/dt=KLa(C^*-C)-k_{dx} \cdot C[X]$$

C:液相溶存オゾン濃度 (g/m³)、C* : 液相の飽和オゾン濃度 (g/m³)

KLa : 総括物質移動容量係数(1/hr)

[X] : 被処理物質 X の濃度 (mg/l)、k_{dx} : X のオゾン消費速度定数(1/mg/hr)

(C*-C)は溶解の推進力を表す。C*は飽和オゾン濃度であるからヘンリーの法則から求められ、気液分配係数を K (m³-水/m³-ガス)、気相オゾン濃度を C_G (g/m³) とすると、C*は以下の式で表される。

$$C^*=K \cdot C_G$$

また、K は水温 Tw (°C) 及び水深 Hw (m) の関数として以下の式で表せる。

$$K=(0.604(1+Tw/273))/(1+0.063Tw) \times (Hw/20.6)$$

KLa は気液接触槽のガス吸収特性の評価に用いられ、この値が大きいほどガス吸収速度が大きくなる。また KL 及び a はガスホールドアップ h (無次元) と平均気泡径 d (mm) を用いて以下の式で表される。

$$K_L=(0.23 \pm 0.01) \times \{1+0.026(Tw+273)\}$$

$$a=6h/0.001d$$

ガスホールドアップは気液混相における気相容積比で、ガス空塔速度 U_G(m/hr) と水深の関数として以下の式で求められる。

$$h=(2.32 \times U_G^{0.89} \times 10^{-3}) / (1+Hw/10.3)$$

これらの式を用いて、①式のオゾン消費物質の濃度及びオゾン消費速度定数

を設定すれば液相オゾン濃度が得られる。また①式におけるオゾンの被処理物質を特定することによりオゾン処理槽におけるオゾン吸収・溶解現象をシミュレーションすることが可能となる。

(2) オゾン反応モデル

大腸菌は、オゾンの酸化力により細胞壁が破壊されて不活化するが、その不活化が擬一次反応式で表現可能であるとされる。すなわち COD_{Mn} 、SS の反応が一次反応で表現可能と仮定する、Chick モデルを採用した³⁾。その仮定に基づいて以下の式

$$dN/dt = -k_N \cdot C \cdot N$$

が得られる。ここで N は大腸菌濃度、 C は溶存オゾン濃度、 k_N は大腸菌のオゾン反応速度定数である。これは Chick のモデルと称され、1 単位の消毒剤が細胞の一箇所の活性部位に結合することによって効果が生じることを仮定したものである。また下水処理水に含まれる COD 成分と SS 成分はオゾンにより酸化される反応が存在する。これらのオゾン反応速度定数 k_{COD} 、 k_{SS} を用いて、オゾン反応速度式を下式で表した。

$$dCOD/dt = -k_{COD} \cdot C \cdot COD$$

$$dSS/dt = -k_{SS} \cdot C \cdot SS$$

これらはオゾン濃度と各濃度の積に依存する反応である。またオゾンは大腸菌、COD 成分、SS 成分と反応して消費されるため、オゾン消費速度は消毒シミュレーションに影響を及ぼす。それぞれのオゾン消費速度定数を $N \cdot k_N$ 、 $COD \cdot k_{COD}$ 、 $SS \cdot k_{SS}$ とし、オゾン消費量を C とすると、オゾン消費速度は以下の式で表される。ここで C_N 、 C_{COD} 、 C_{SS} はそれぞれ大腸菌、COD 成分、SS 成分によるオゾン消費量である。

$$d(C)/dt = d(C_N)/dt + d(C_{SS})/dt + d(C_{COD})/dt$$

$$= N \cdot k_N \cdot C \cdot N + SS \cdot k_{SS} \cdot C \cdot SS + COD \cdot k_{COD} \cdot C \cdot COD$$

これらのオゾン反応速度定数とオゾン消費速度定数については、報告されたものは過去の報告でも少ない。各処理場ごとの処理水を個別に実験することが理想的であるが、すべての処理場について求めるのは現実的ではない。そのため、ここでは山口らの報告²⁾を参考にして安全側に数値を設定した。なお、単位は全てSI単位系に変換した。

表 5-1 オゾン反応速度定数とオゾン消費速度定数

	オゾン反応速度定数	オゾン消費速度定数
大腸菌	540((l/mg)/min) 9000 (m ³ /(kg・s))	1.0 × 10 ⁻⁵ (ml/CFU/min) 1.7 × 10 ⁻¹³ (m ³ /(CFU・s))
COD	30 ((l/mg)/hr) 8.33 (m ³ /(kg・s))	90 ((l/mg)/hr) 25 (m ³ /(kg・s))
SS	12 ((l/mg)/hr) 3.3 (m ³ /(kg・s))	60 ((l/mg)/hr) 17 (m ³ /(kg・s))

本章では大腸菌群と大腸菌については区別を行わなかった。大腸菌や腸内細菌に対するオゾン消毒効果のデータについては文献⁴⁾でいくつか報告されているが、大腸菌群についてのデータは見当たらない。大腸菌以外の大腸菌群に属する細菌としては、例えばクレブシエラ属(*K.pneumonia* 等)が存在する。しかし、大腸菌群に属する菌群は大腸菌とは類縁であるため殺菌特性も類似しているものと予想されることが区別しなかった理由である。従って、下水の季節による菌相の変化についても、モデルを簡単にするため無視し、一定であると仮定している。

(3) パラメータ設定

シミュレーションする上で必要である二次処理水（消毒前）の入力関数を決定するため、実際の下水処理場のデータ（2000年4月～2001年3月末）を利用した。第4章で示したように、オゾン消毒に影響を与える因子としては大腸菌群、SS、よう素消費量であるが、よう素消費量のデータが得られなかったこと

から COD を代替として用いた。以下、各指標について述べる。

<大腸菌群数の変化>

消毒前の二次処理水の変化について、図 3-23 の β -ガラクトシダーゼ活性値の変化を図 3-19 の相関を用いて大腸菌群数に換算し、二次処理水の大腸菌群数の変動とした。

<COD の変化>

COD は流入水、二次処理水（消毒前の水）、放流水（消毒後の水）について神戸市 A 処理場の経時変化を図 5-2-1 に示す。

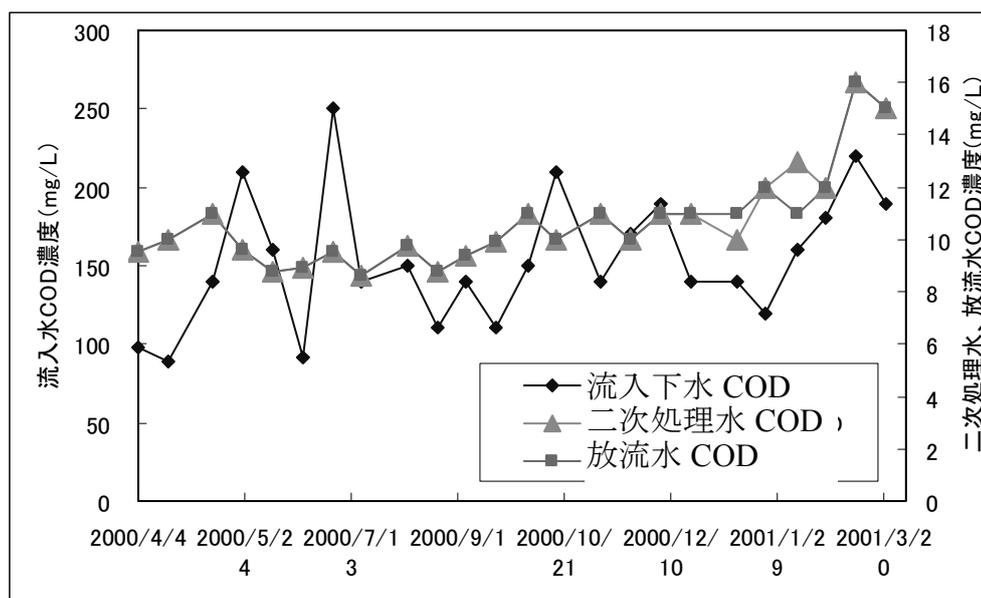


図 5-2-1 COD の各処理水の変動

図 5-2-1 によれば、二次処理水の COD は 9~16 mg/L の範囲（平均 10.6）であることが分かった。

<SS の変化>

図 5-2-2 に A 処理場における SS の変動を示す。

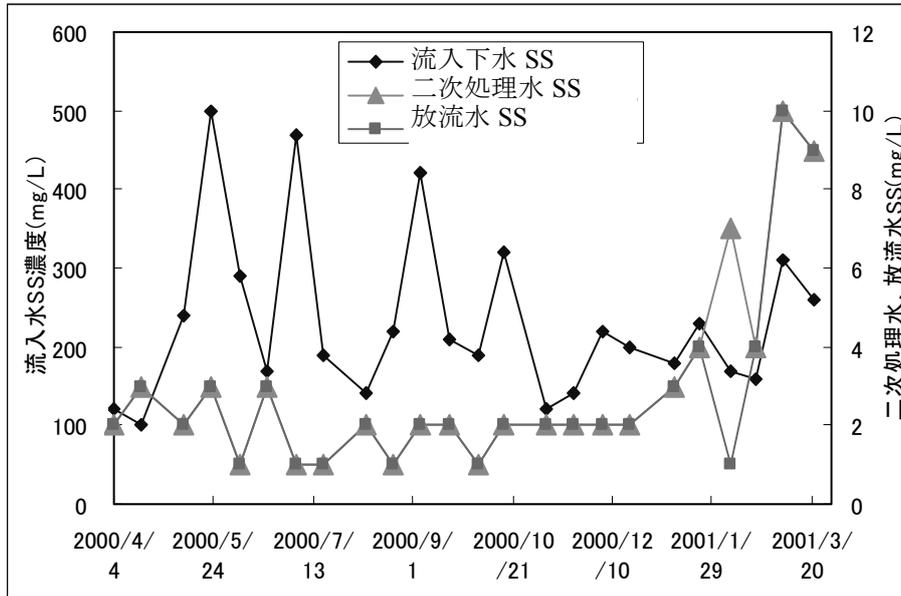


図 5-2-2 SS の各処理水の変動

図から二次処理水の SS については、1~7 mg/L の範囲であることが分かった。

(4) 反応槽モデル

本節で検討した下水処理場の二次処理水の消毒モデルを以下の図 5-2-3 に示す。沈澄槽の後段において流量を測定し、流量からフィードフォワード制御 (FF 制御) を行い (大腸菌群数迅速計測装置が無い場合の通常の流れ制御に相当する)、さらにオゾン反応槽の後段に大腸菌群数迅速計測装置を接続して、大腸菌群数からフィードバック制御 (FB 制御) とすることでオゾンガス濃度を決定する。オゾン反応槽においては完全混合槽モデルを想定した。

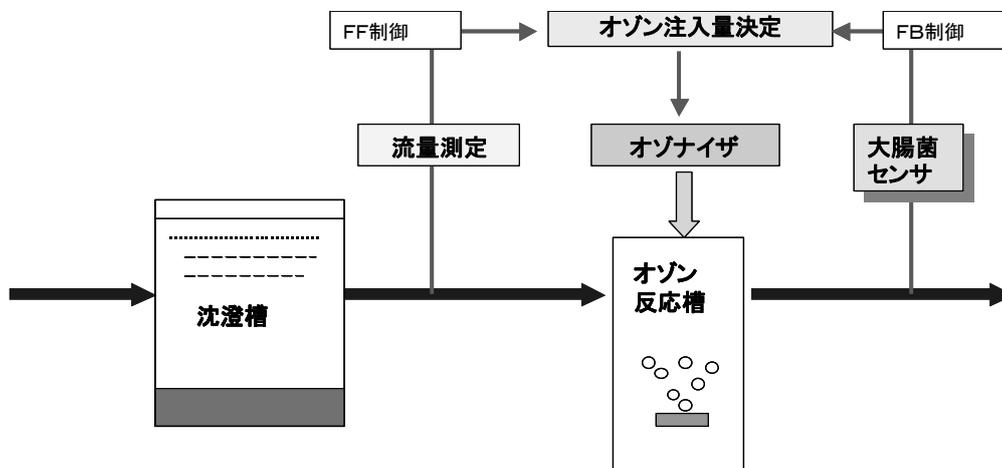


図 5-2-3 二次処理水の消毒制御システム

反応槽に関する条件として以下の表 5-2-1 のように設定した。

表 5-2-1 モデルの設定条件一覧

項目	仕様
オゾン反応槽	完全混合槽で 2,700 m ³
平均処理水量	16,200 m ³ /hr
流量変動	16,200 m ³ /hr から ±50% の範囲で日変動
平均処理水量時のオゾン処理時間	10 分
大腸菌群数迅速計測装置の仕様	45 分間隔で測定し、測定時間 30 分、デソキシコレート寒天培地法との測定差異 ±1%、±20%、±50%、-50%+100% (この範囲で乱数を発生させて測定値とみなした)
オゾン注入の制御方法	流量による FF 制御 + 大腸菌群数迅速計測装置の FB + PI 制御で気中オゾン濃度を制御
節減率を求める際に対照とした全オゾン注入率	流量制御のみでオゾン注入率は一定値

オゾン注入量の制御は、流量による FF 制御と大腸菌群数迅速計測装置による大腸菌群数測定値を利用した FB 制御法を組み合わせたシステム構成とした。図

5-6 に示す FF+FB 制御による供給オゾンガス濃度の制御方法としては一般的に用いられている PID 制御法において「D」に相当する微分項を省略した PI 制御法を用いた。具体的には以下の式で与えられる。

$$O_{3air}=k_1 \cdot Q+ k_2 \cdot (C^*-C) + k_3 \cdot (C^*-C)$$

O_{3air} : オゾン発生機からの供給オゾンガス濃度 (kg/m^3)

k_1 : 流量項の係数

Q : 流量 (m^3/s)

k_2 : 偏差項の係数

C^* : 大腸菌群数の目標値 (CFU/m^3)

k_3 : 積分項の係数

C : 大腸菌群数の測定値 (CFU/m^3)

目標値である C^* は、測定誤差が無い場合は放流基準値である $3,000 \text{ CFU/mL}$ を本来与えるべきと考えられるが、大腸菌群数迅速計測装置の測定値とデソキシコレート寒天培地法の測定値には差異が存在するため、そのままでは放流水の基準値を超えてしまう可能性がある。また実際の二次処理水は消毒前で既に $3,000 \text{ CFU/mL}$ 以下となっており、一般的には数百 CFU/mL 程度であることから、ここでは目標値を 200 CFU/mL とし、放流基準値の $1/10$ である 300 CFU/mL を放流時に超えない基準値として設定した。一方、係数である k_1 、 k_2 、 k_3 の算定については、理論的に決めるのは困難なため、実際にシミュレーションを実行した上で値を適宜決定した。その手順は以下のとおりである。

FF 流量比例制御の注入量を決定する。 k_2 、 k_3 を 0 とおいて、 k_1 を変化させ、 C の最大値が 300 CFU/ml となるように O_{3air} を求める。その結果、注入率では 0.28 mg/L となった。以下、この値 (0.28 mg/L のオゾン注入率一定制御) を対照としてオゾン削減率を求める。

k_1 を変化させ、 Q の平均値における k_1 を求める。

k2 を変化させ決定する。C の最大値が 300 CFU/mL 付近となるような値を求める。

k3 を変化させ決定する。k2 の場合と同様に消毒後の大腸菌数の変化とオゾン注入率（オゾン発生量）の変化を見て、オゾン発生量の最大値が FF 流量制御の場合の発生量とほぼ同等となり、かつ全体としてハンチングが起さないような係数を選択した。

このようにして計算した結果、SI 単位系における各係数 k1～k3 は以下のようになる。

表 5-2-2 PI 制御に関する係数

	測定誤差範囲	k1	k2	k3
FF 流量制御	単独の場合	8.0×10 ⁻⁴	0.0	0.0
FF+FB 制御	±1%		1.0×10 ⁻¹²	5.0×10 ⁻¹³
	±20%		5.0×10 ⁻¹³	3.0×10 ⁻¹³
	±50%		5.0×10 ⁻¹³	3.0×10 ⁻¹³
	-50%、 +100%	3.0×10 ⁻¹³	3.0×10 ⁻¹³	

計算する際には、オゾン出力が算術的に負の値が計算される場合があるが、これに対してはオゾン発生無として 0 を与えた。

COD、SS、pH の変化は流量に連動させ、その範囲は(3)の結果から、以下の表 5-2-3 のように設定した。

表 5-2-3 二次処理水の各パラメータ設定

	変動幅
流量の日変動	0.33～1.0 m ³ /s
COD の日変動	5～10mg/L
SS の日変動	2～5mg/L
pH の日変動	7.2 とし時間変動は無いものとした

注：日変動については流量の変動と連動させた。

5-2-3 シミュレーション計算方法

5-2-2において決定した反応速度定数を用いて、下水消毒シミュレーションの計算を行った。大腸菌群数迅速計測装置とデソキシコレート寒天培地法との測定差異に応じて、以下の4通り設定して使用オゾン量の削減効果を検討した。

±1%

±20%

±50%

−50%、 +100%

大腸菌群数迅速計測装置の測定値としては、それぞれの測定差異の間において乱数を発生させるという方法で測定値を与えた。シミュレーション計算はルンゲクッタ・ギル法により実施した。

またCO₂排出量の計算に当たっては、単位電力あたりのオゾン生成量および電力のCO₂排出係数から計算し、オゾンのCO₂排出原単位を4.12kg-CO₂/kg-O₃とした。

5-2-4 計算結果と考察

78時間における、各測定差異に対する計算結果をそれぞれ以下の図5-2-4～5-2-11に示す。

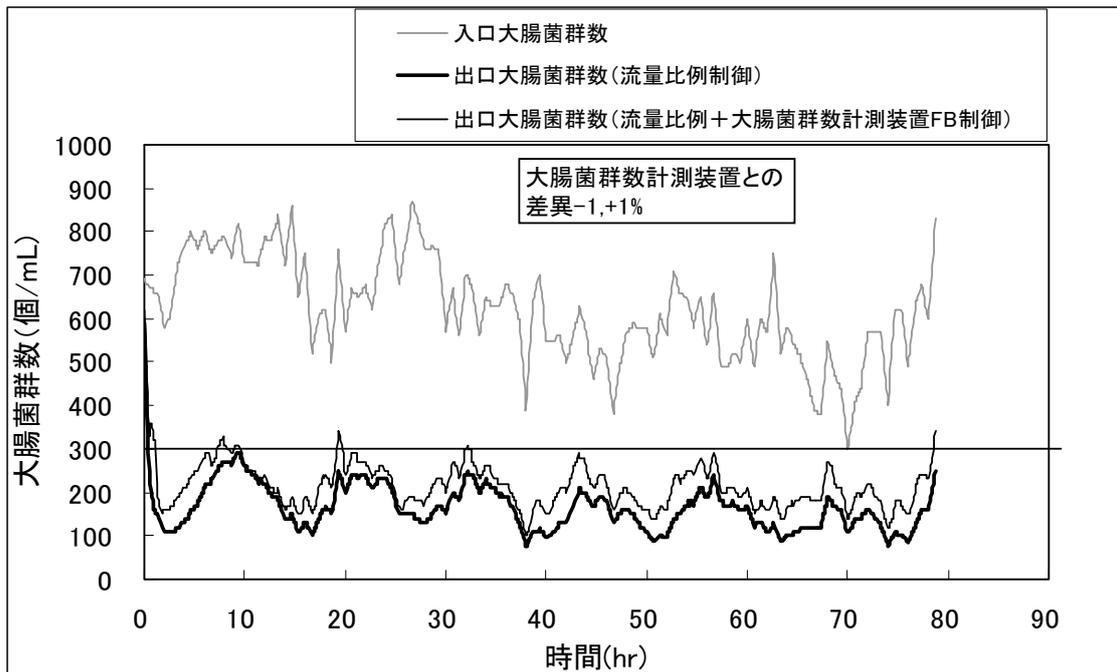


図 5-2-4 消毒前後の大腸菌群数の変化 (差異±1%)

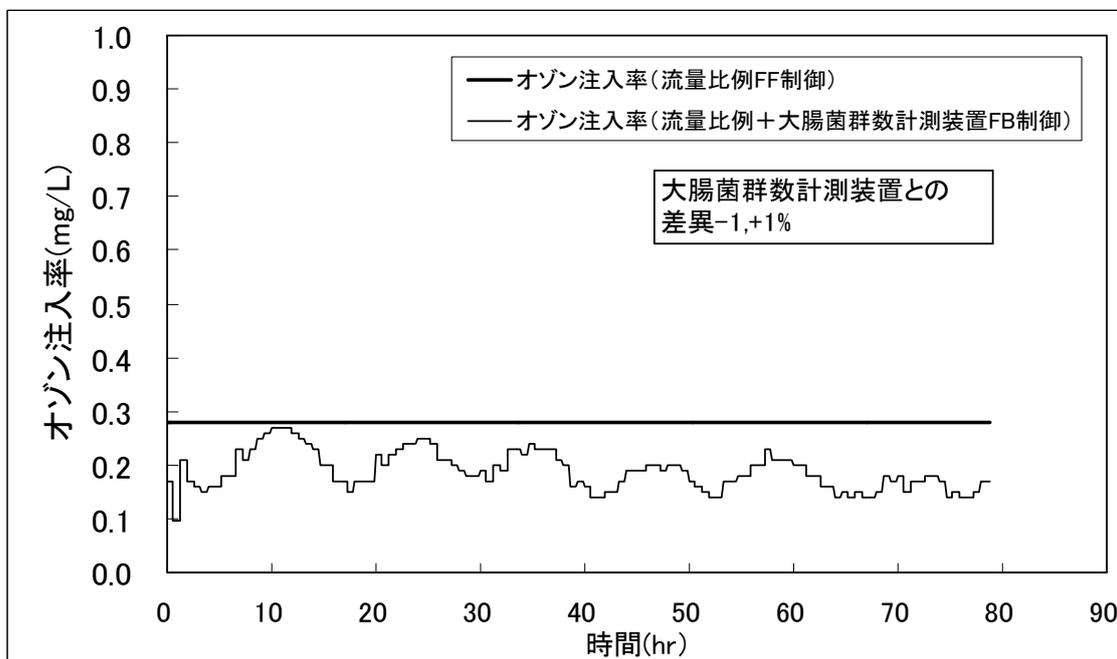


図 5-2-5 オゾン注入率の変化 (差異±1%)

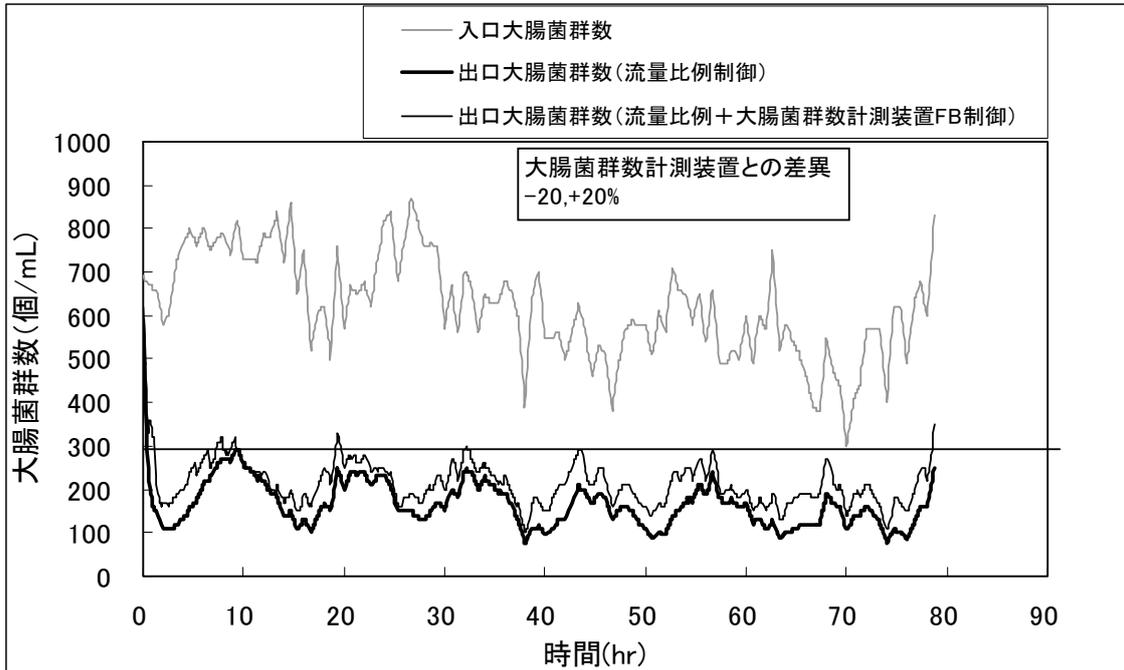


図 5-2-6 消毒前後の大腸菌群数の変化 (差異±20%)

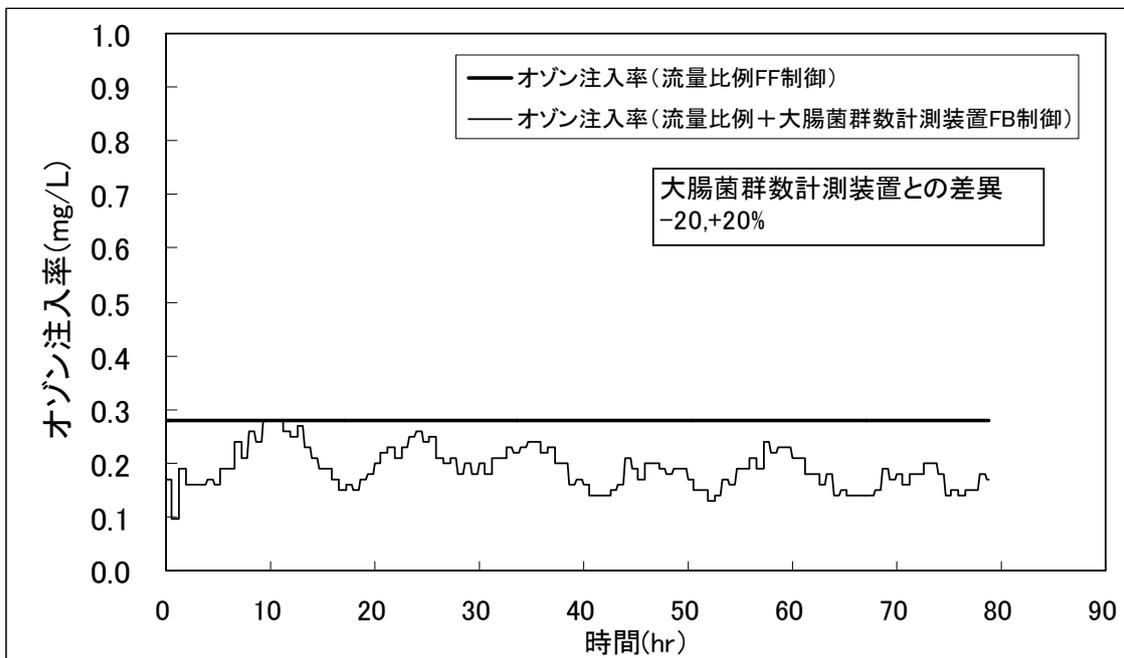


図 5-2-7 オゾン注入率の変化 (差異±20%)

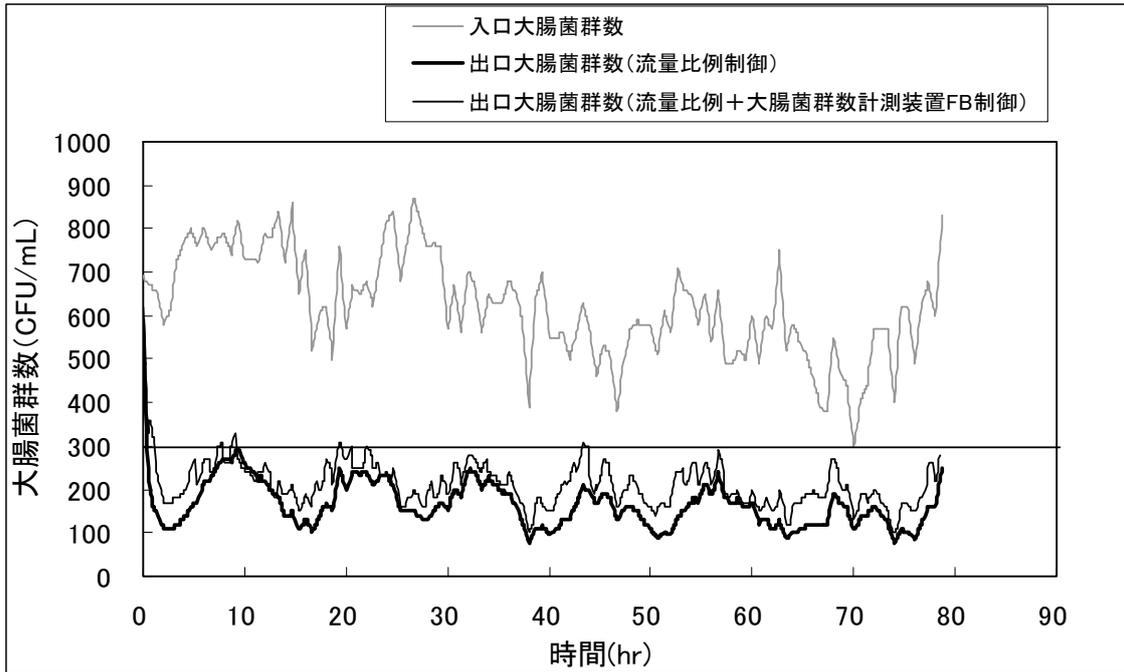


図 5-2-8 消毒前後の大腸菌群数の変化 (差異 ± 50%)

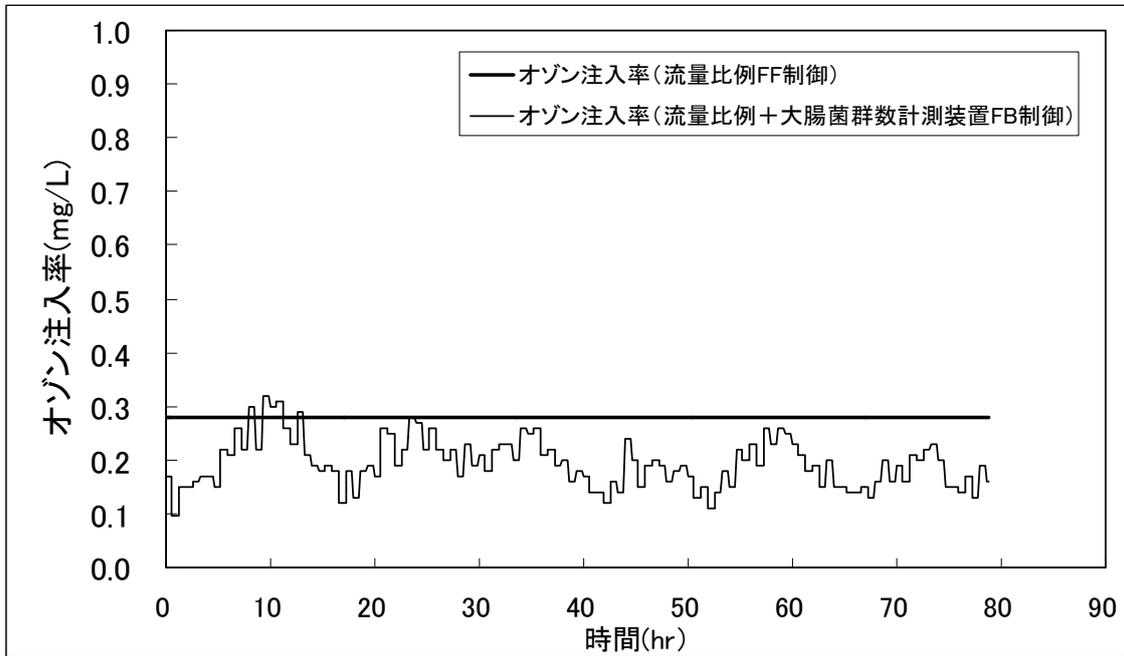


図 5-2-9 オゾン注入率の変化 (± 50%)

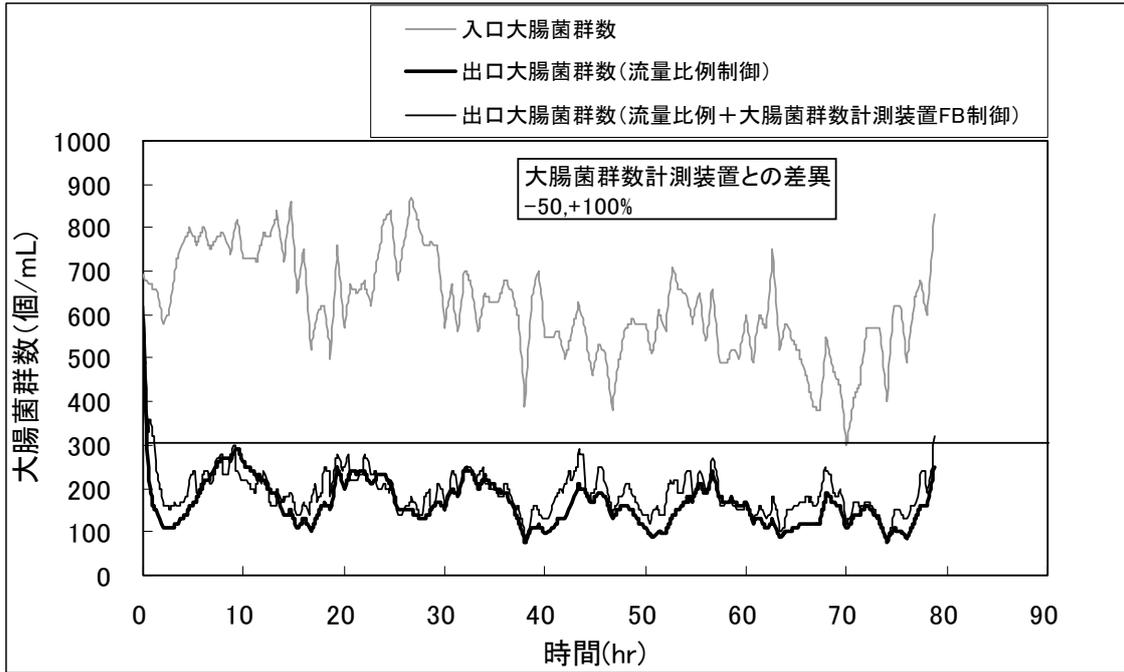


図 5-2-10 消毒前後の大腸菌群数の変化 (差異-50%、 +100%)

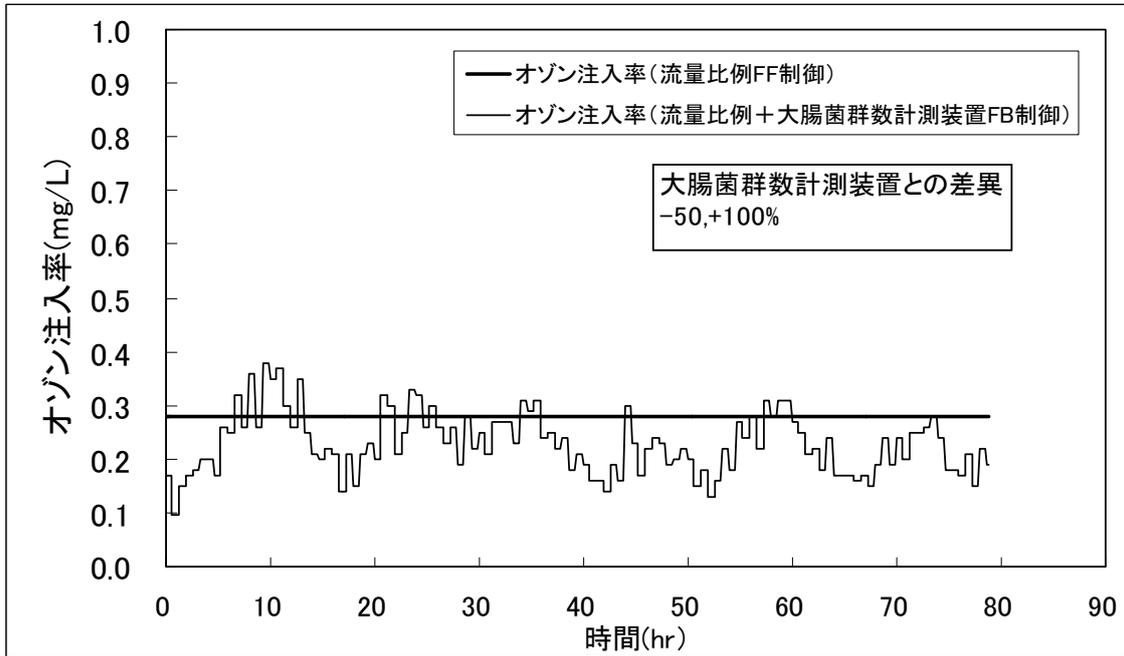


図 5-2-11 オゾン注入率の変化 (差異-50%、 +100%)

測定差異を変化させた場合について、FF 流量制御を対照とした場合のオゾン節減率と CO₂ 排出削減量を計算した結果を表 5-2-4、図 5-2-12 に示す。

表 5-2-4 オゾン節減率の計算結果

デソキシコレート寒天培地法測定値との差異	節減量 (FF 流量制御と比較した場合)	CO ₂ 排出削減量 (kg-CO ₂ /年)
±1%差異	31.1%	9,423
±20%差異	30.2%	9,168
±50%差異	28.3%	8,582
-50、+100%差異	15.4%	4,672

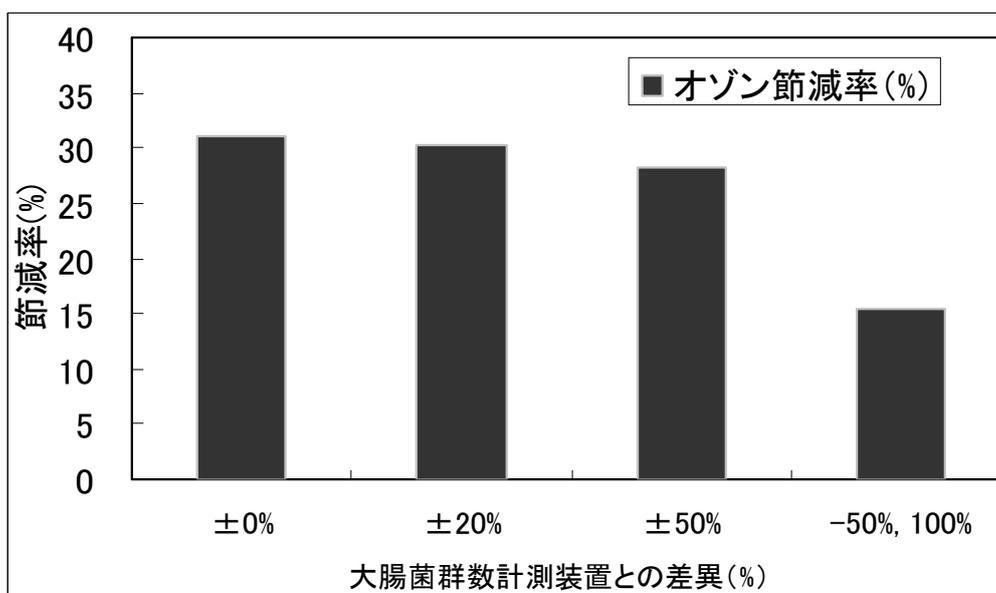


図 5-2-12 大腸菌群数迅速計測装置の差異によるオゾン節減

表 5-2-4、図 5-2-12 から以下のことが分かった。

オゾンの節減効果は、大腸菌群数迅速計測装置とデソキシコレート寒天培地法との測定差異により、影響を受けることが分かった。図 5-2-12 から、オゾン注入率一定制御を対照とした場合、測定差異によって節減率

は 15.4～31.1%の範囲であり、±50%を越えると節減率は悪化する傾向であった。

第3章の二次処理水のフィールド実験の結果すなわち図3-19から考えると、デソキシコレート寒天培地法との差異が±50%の範囲内であることから、約30%程度の節減効果が期待できると考えられる。

本研究においては、FF 流量制御（オゾン注入率一定制御）を対照としてオゾン節減率の計算を行っている。しかし実際の処理場においては、オゾンや塩素注入率は大腸菌群数、有機物濃度、アンモニア性窒素濃度（塩素の場合のみ）、SS 濃度から経験的に設定しており、多くの場合過剰注入である。二次処理水のオゾン消毒の場合、通常注入率は2～3 mg/L 程度⁵⁾であるため、これを流量比例制御の対照とした場合は、節減効果はより大き目の値となると考えられる。ただし実際は処理場により、ケースバイケースで注入率を決めており、処理場共通の一定の数値として提示することは困難であると考えられる。

第3節 雨天時未処理下水の消毒シミュレーション

5-3-1 概論

第4章で示したように、合流式下水道において雨天時に発生する未処理下水による公共水域の汚濁がかねてから懸念されていることに対応し、平成14年度より国土交通省のリードにより下水道技術開発プロジェクト（SPIRIT21）「合流式下水道の改善に関する技術開発」が発足し、複数名の研究グループによる技術開発が推し進められた。従来用いられてきた塩素消毒に対して、オゾン消毒は、よりも高速で接触時間2分以内の消毒が実現可能であることが第4章の研究により明らかになっている。

しかし、未処理下水は雨天時において時々刻々と水質が変化し、また実測し

たデータは極めて少ないため、オゾンを経験的に適正に注入することは困難である。このため、未処理下水の消毒も二次処理水と同様に消毒剤は安全側に過大に注入されてきた。しかし、二次処理水の場合と同様に、放流先の環境影響やランニングコストを考えると、過不足のない注入量制御が望ましいと考えられる。

リアルタイムの消毒を実現するためには放流基準値である大腸菌群数を可能な限り迅速に測定する必要があることから、本章では、第 2 章、第 3 章で示した大腸菌群数計測装置の迅速計測が可能な点に着目し、高濃度の大腸菌群数を含んだサンプルの場合は約 10 分で測定可能であることから、この大腸菌群数計測装置を利用してオゾン消毒システムを導入した場合の消毒効果および消毒剤節減効果をシミュレーション計算を行なうことで、消毒システムの効率性を明確化する。

5-3-2 シミュレーションモデルおよび計算方法

オゾン消毒モデルは第 2 節の二次処理水の場合と同様である。一方、消毒剤制御モデルについては、未処理下水の場合、大腸菌群数の時間変動が大きいと予想されることから、変動への対応を考慮する必要がある。そのためフィードバック制御ではなく、消毒前の未処理下水の測定結果からオゾン注入率に反映するフィードフォワード制御を用いた。図 5-3-1 に概略を示す。

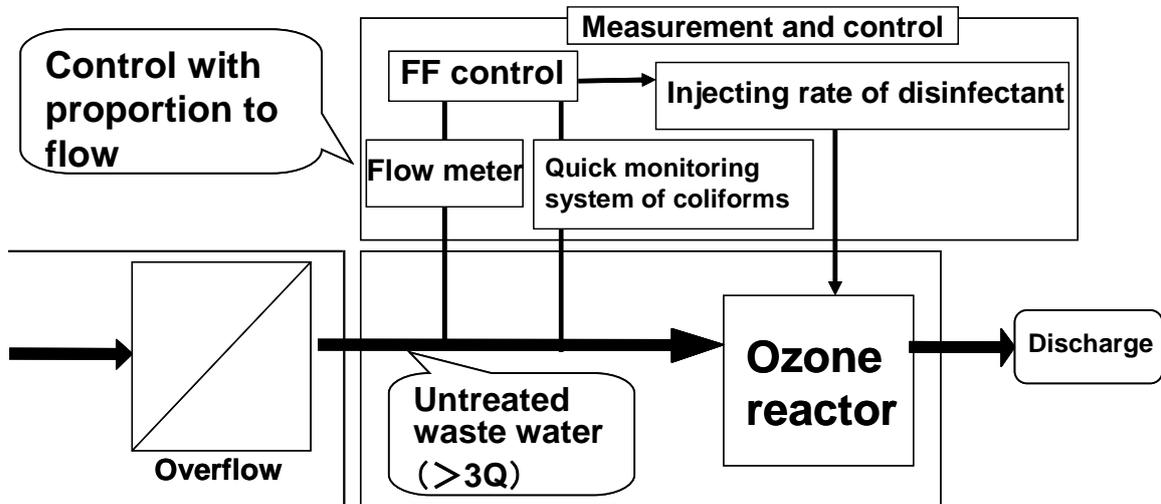


図 5-3-1 未処理下水の消毒剤制御モデル

第 3 章から、大腸菌群数計測装置は大腸菌群数が $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL と比較的高濃度の場合は測定に 10 分程度でよい。また測定後に配管の汚れ付着防止のために内部洗浄を 5 分間実行している。この結果から、測定時間 10 分、測定間隔 15 分を FF 制御の標準方式として設定した。一方、比較対照としては流量比例制御方式を想定し、このオゾン注入率は、放流が発生した時間範囲で常に大腸菌群数の放流基準値を下回る条件設定で、シミュレーションにより決定した。なお、オゾン反応槽の消毒時間は最低 2 分以上とし、第 2 節と同様に完全混合モデルを想定した。

5-3-3 シミュレータの妥当性評価

5-2-2 で示したオゾン消毒モデルについては二次処理水など比較的汚れの負荷が小さいケースについては、検討例が存在する²⁾が、雨天時未処理下水など汚れ負荷が非常に高いケースについて、本モデルが適用可能かについては明らかになっていないことから、消毒剤節減効果の検討に先立ち、反応モデルの各係数を求め、モデルの妥当性の評価を行った。

モデルの妥当性を評価する目的で、第4章で検討したC処理場における実験データを用いて実施した。2004年7月15日（実験ケースN-2）および8月15日（実験ケースN-3）の実施した流入下水によるオゾン消毒実験のデータを利用し、シミュレーションおよびパラメータフィッティングを行った。この時の実験条件は4-2-2に示している。

また、大腸菌群数計測装置による測定を実施し、デソキシコレート寒天培地法による大腸菌群数と測定値を比較し、デソキシコレート寒天培地法および大腸菌群計測装置は共に3回の繰り返し測定を行い、単純平均により測定値を得た。このときの降雨量と大腸菌群数、COD_{Mn}、SSの変化について実験ケースN-3についてのみ、図5-3-2、5-3-3に示す。

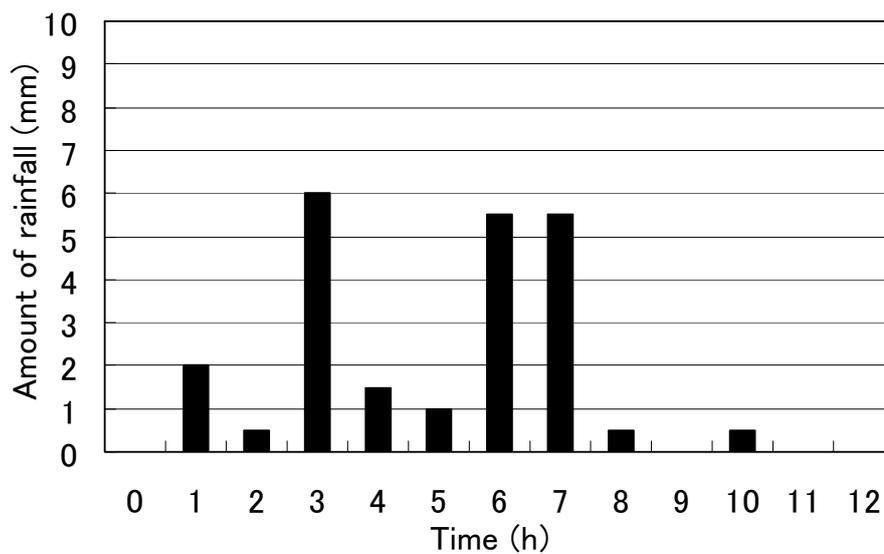


図 5-3-2 K 処理場の実験ケースN-3の降雨量

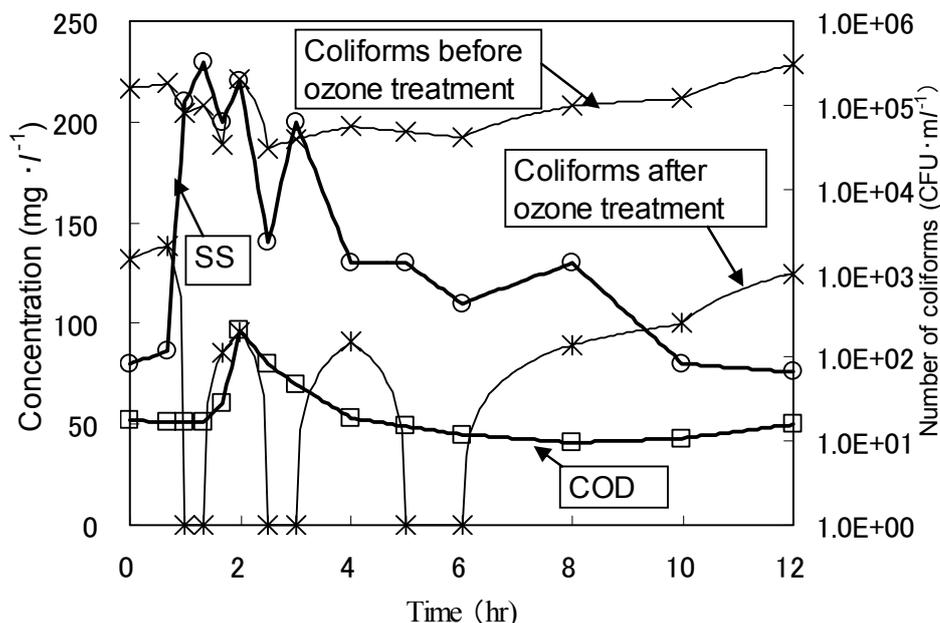


図 5-3-3 K 処理場の実験ケース N-3 の消毒前後の大腸菌群数、消毒前の COD、SS の変化(8/15)

また、第 3 章の図 3-20 で既に示しているように大腸菌群数計測装置の測定値 (3 回繰り返し測定の前平均値) はデソキシコレート寒天培地法と比較すると、± 0.5log の範囲内で収まっていることが確認されている。

次に 5-2-2 の ~⑩式のおゾン反応速度定数とおゾン消費速度定数を表 5-1 に示した値を基本としながらも、シミュレーションによるパラメータフィッティングにより最適化して決定した値を表 5-3-1 に示す。

表 5-3-1 シミュレーションに必要な定数

水質項目	オゾン反応速度定数大腸菌群数	オゾン消費速度定数
大腸菌群数	2250 ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	1.7×10^{-13} ($\text{m}^3 \cdot \text{CFU}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
COD _{Mn}	0.28 ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	0.83 ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
SS	3.3 ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	8.33 ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

表5-3-1の定数を用いたシミュレーション計算値と実測値を図5-3-4 (7/15)と図5-3-5 (8/15)に示す。実験開始後1~2時間までは計算値と実測値の間にずれが見られる。これはオゾン消毒において、実験開始直後は消毒槽が不均一状態であったなど、不安定であったことに起因すると考えられる。しかし、それ以後は 10^2 CFU/mL以上の範囲で両者は概ね合致した結果が得られた。図5-13に示したように大腸菌群数が 10^2 CFU/mL以下となっている時間領域内では、SSが大きく変化している時間領域と変化していない時間領域の両方のケースがあることから、COD_{Mn}、SS以外のオゾン無効消費成分の流入や、COD_{Mn}、SSのオゾンの反応性に差異が生じていることが乖離の理由として考えられる。

以上の結果から、本モデルにおいて、表5-3-1で用いた定数によるシミュレーションモデルは大腸菌群数では 10^2 CFU/mL未満の領域では再現性に問題があるが、 10^2 CFU/mL以上の大腸菌群数に対しては概ね再現可能と判断される。

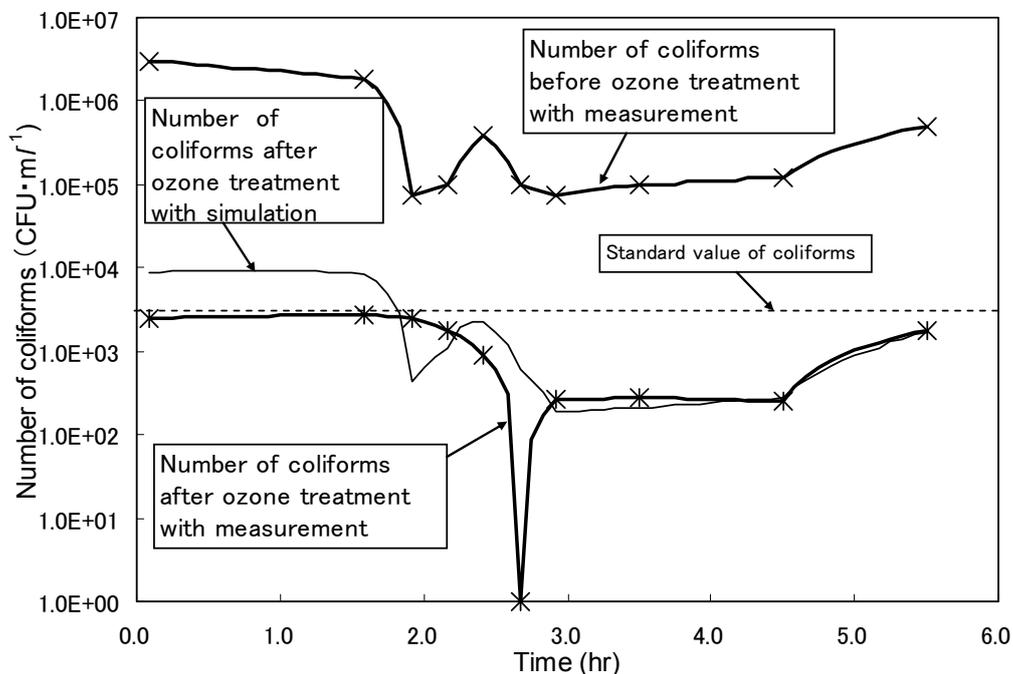


図 5-3-4 オゾン消毒前後の大腸菌群数の実測値と計算値の比較 (7/15).

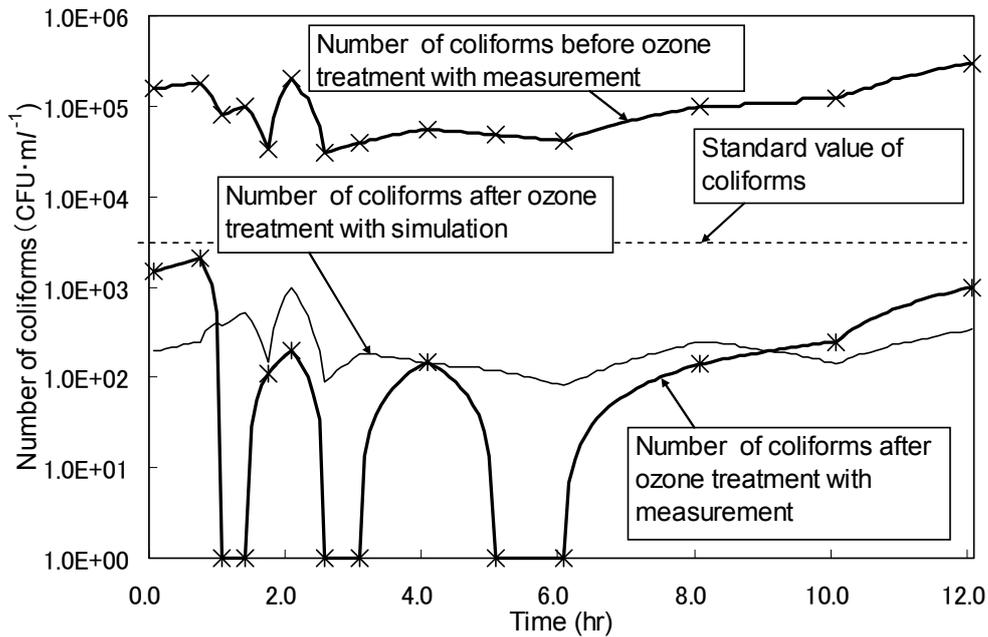


図 5-3-5 オゾン消毒前後の大腸菌群数の実測値と計算値の比較 (8/15).

5-3-4 シミュレーション計算方法

消毒剤節減効果を求める目的でシミュレーション計算を行った。計算には既報^{6,7)}のデータを用いた。これらは実在する二地点 (St.1 および St.2) の雨天時の下水配管内から採取したサンプルについて、大腸菌群数、 COD_{Mn} 、SS 等を測定したものである。測定時の情報を表 5-3-6 に、流量と大腸菌群数の経時変化を図 5-3-6 (St.1) および図 5-3-7 (St.2) に示す。晴天時最大流量 Q の 3 倍の $3Q$ を越えた未処理下水を処理対象と想定した場合、その時間領域では大腸菌群数は $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL オーダーであった。

表 5-3-6 サンプル採取時の状況^{6,7)}.

天候	雨
日付	2000/10/20
先行無降雨日数 (日)	5
全降雨量 (mm)	45.5
水温 ()	17- 23

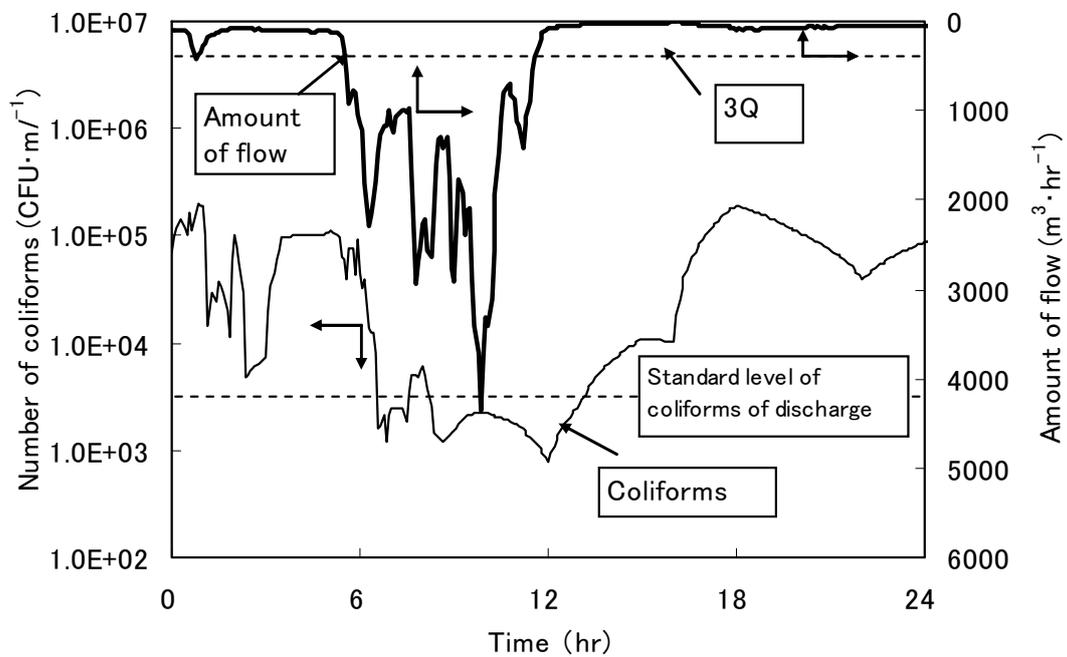


図 5-3-6 未処理下水の大腸菌群数の変化 (St.1).

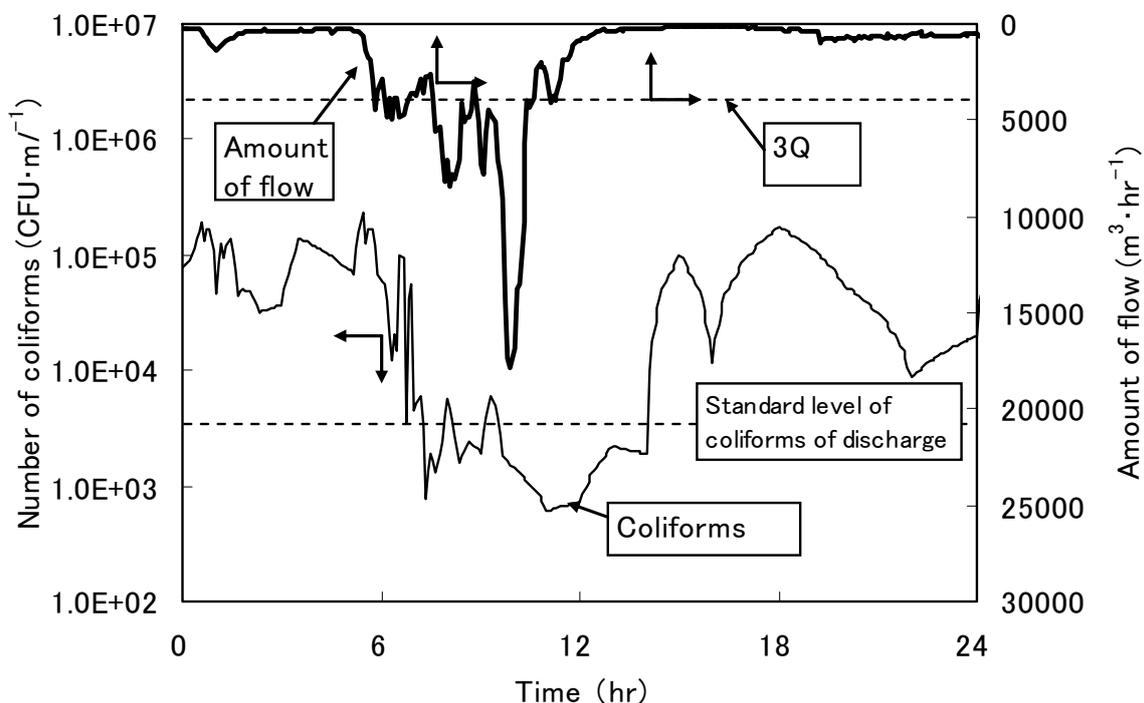


図 5-3-7 未処理下水の大腸菌群数の変化 (St.2).

シミュレーション計算については二次処理水の5-2-3に示した方法と同様である。すなわち流量比例制御すなわち注入率一定方式および大腸菌群数計測装置を付加した消毒剤制御の二方式についてシミュレーション結果を比較して、節減効果を求めた。流量比例制御の場合は、越流時の未処理下水の初期の汚濁負荷が高く、その後は低下する実情を考慮し、越流開始後30分で注入率を変化させた。具体的な値はシミュレーションにより放流基準値の3,000 CFU/mLを超えないことを確認しながら設定した。シミュレーション計算条件を表5-3-7に示す。

表 5-3-7 シミュレーション計算条件

サンプル採取場所	St.1	St.2
水温 ()	25	
pH	7.0	
越流条件	>3Q	
オゾン反応槽の大きさ (m ³)	200	700
トータルの未処理下水量 (m ³)	8571	10860
越流開始時から 30 分までのオゾン注入率 (mg/L)	110.0	17.0
越流開始時から 30 分以後のオゾン注入率 (mg/L)	37.0	5.8

大腸菌群数計測装置を用いた場合のオゾン注入率については、大腸菌群数に連動する以下の式で算出した。

$$O3 = KQ + KP \cdot N_m$$

ここで $O3$ はオゾン注入率 (mg/L)、 KQ と KP は制御係数、 N_m は大腸菌群数計測値により得られる測定値 (CFU/mL) である。制御係数 KQ 、 KP については、シミュレーション計算を実施し、大腸菌群数の放流基準値 3,000 CFU/mL を超えず、制御によりハンチングが発生しない条件で最適化を行った。その結果から、 KQ は表 5-5 の流量比例制御のオゾン注入率の 45% の値、 KP は 3.5×10^{-4} (mg/CFU) と設定した。また、大腸菌群数計測装置で 1,000 CFU/mL 以下と測定された場合は、消毒不要と考えオゾン注入率を 0 mg/L とした。なお、シミュレーションにおいては、前節の二次処理水の場合と同様に COD と SS によるオゾン消費も考慮した。また大腸菌群数計測装置の測定値とデソキシコレート寒天培地法との差異については、標準状態では $\pm 0.5 \log$ とした。

5-3-5 結果および考察

(1) 消毒剤の節減効果

St.1 におけるシミュレーション結果として、3Q を越えた未処理下水の流量、及びオゾン処理前の未処理下水、流量比例制御によるオゾン処理、大腸菌群数計測装置を用いた FF 制御によるオゾン処理後のそれぞれの大腸菌群数の変化を図 5-3-8 に示す。また流量比例制御および大腸菌群数計測装置を用いた FF 制御によるそれぞれのオゾン注入率の変化を図 5-3-9 に示す。同様に St.2 についても、それぞれ図 5-3-10、図 5-3-11 に示す。

図 5-19、図 5-21 により、大腸菌群数計測装置を用いて FF 制御を行った場合、流量比例制御の場合と比較すると、越流初期ではオゾンの過剰注入が見られるが、St.1 の場合はオゾンが 41%、St.2 の場合は、オゾンの過剰注入の時間領域が多いものの、全体としては 21% の節減効果であった。未処理下水を消毒制御する場合、流量比例制御方式が一般的に行われているが、今回のケースのようにファーストフラッシュ後で消毒前に既に 3,000 CFU/mL を下回っている時間領域が多い場合は、大腸菌群数計測装置による制御方法が有効であると考えられる。

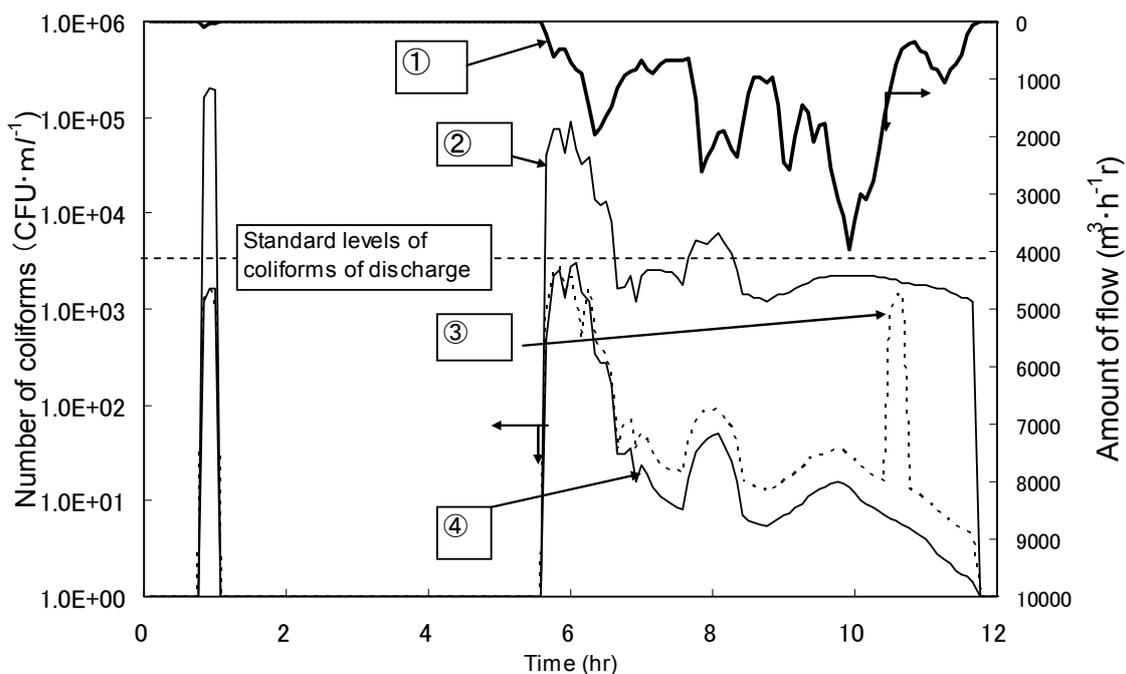


図 5-3-8 未処理下水の大腸菌群数の変化 (St.1).

- : 降雨量
- : デソキシコレート寒天培地法による消毒前の大腸菌群数
- : シミュレーション計算によるオゾン処理後の大腸菌群数計測装置の計算値
- : シミュレーション計算による流量比例制御のオゾン処理後の大腸菌群数

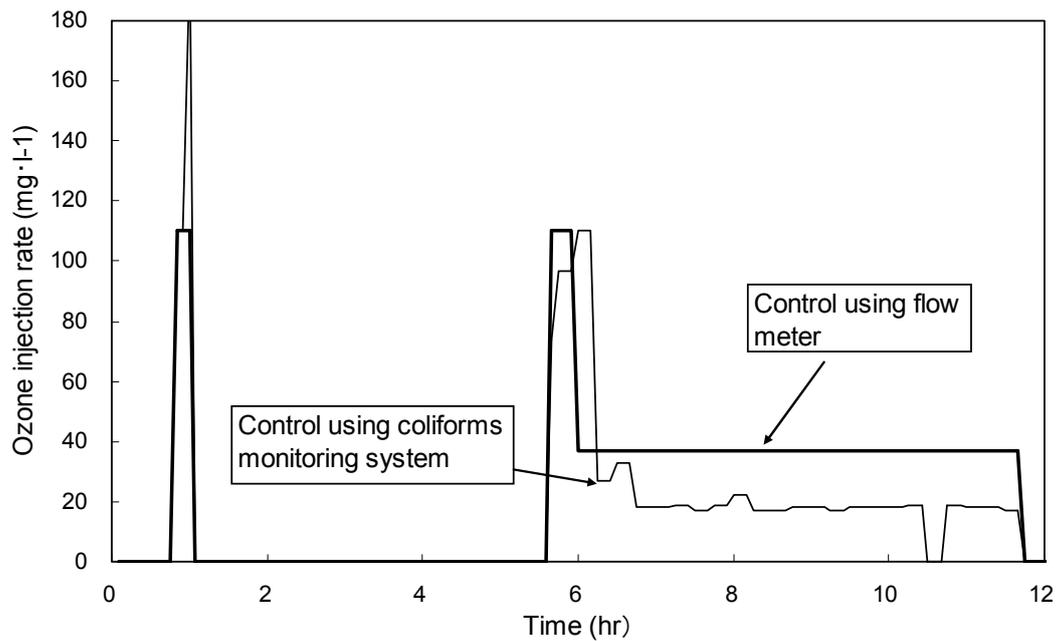


図 5-3-9 未処理下水のオゾン注入率の変化 (St.1).

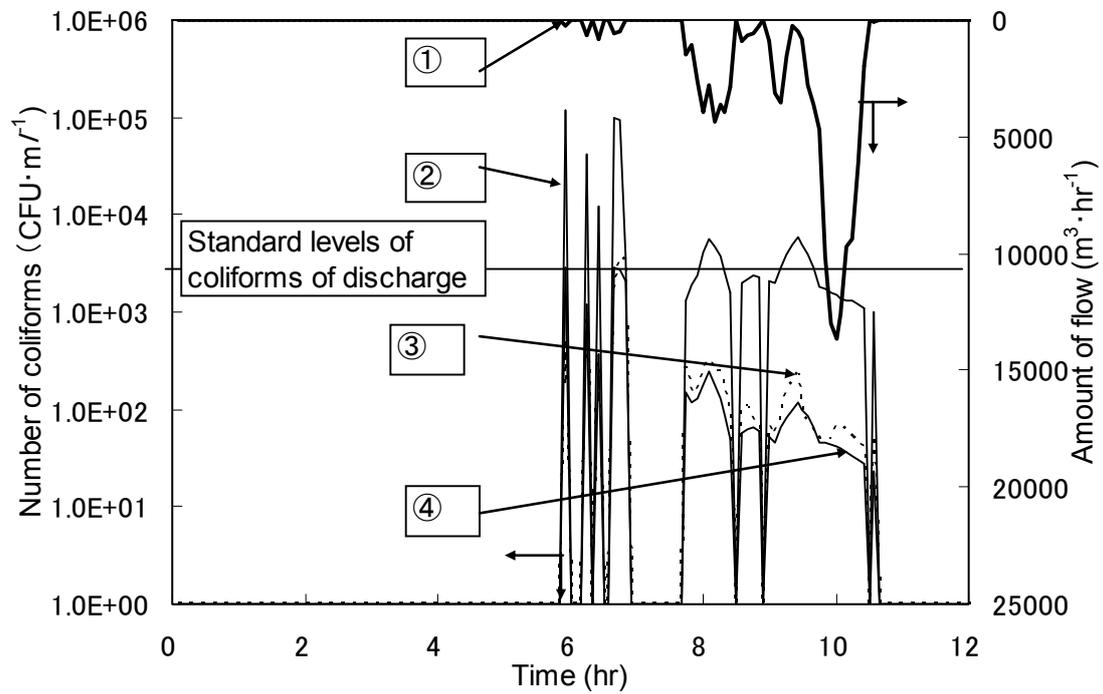


図 5-3-10 未処理下水の大腸菌群数の変化 (St.2).

- ① : 降雨量
- ② : デソキシコレート寒天培地法による消毒前の大腸菌群数
- ③ : シミュレーション計算によるオゾン処理後の大腸菌群数計測装置の計算値
- ④ : シミュレーション計算による流量比例制御のオゾン処理後の大腸菌群数

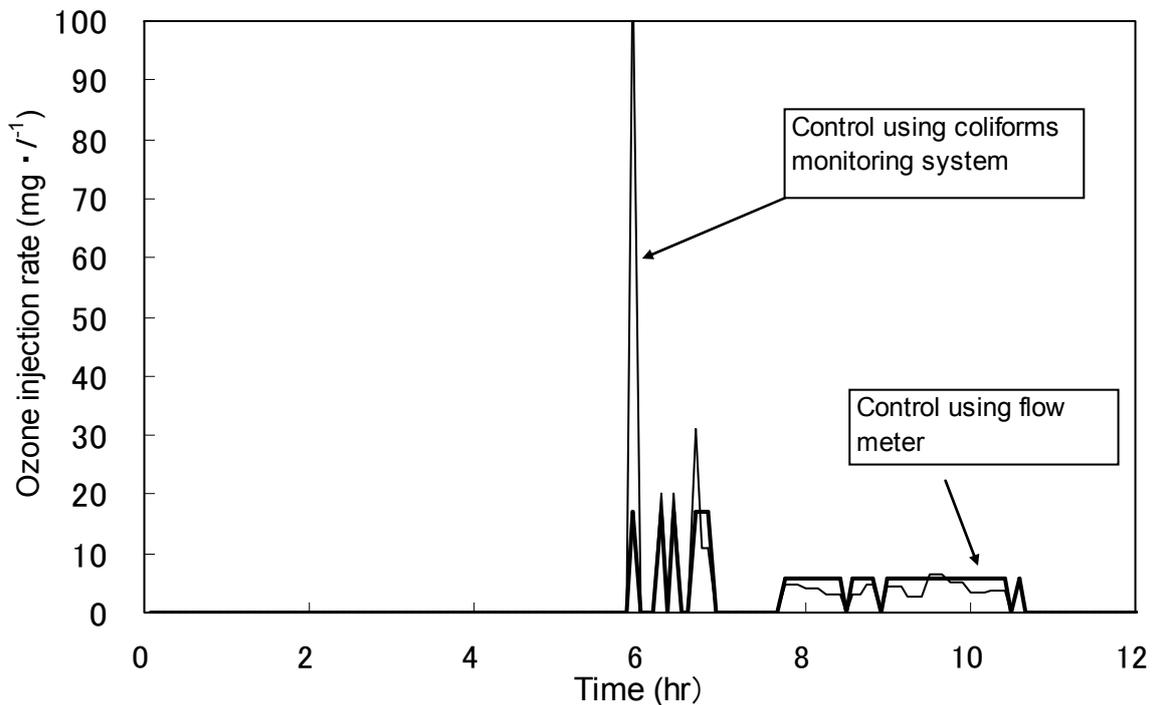


図 5-3-11 未処理下水のオゾン注入率の変化 (St.2).

(2) デソキシコレート寒天培地法との差異の影響

図 3-12 に示したように未処理下水をサンプルとした場合は、大腸菌群数計測装置の計測値とデソキシコレート寒天培地法の大腸菌群数と比較して $\pm 0.5 \log$ の範囲の差異で収まっていることが分かったが、大腸菌群数計測装置の測定値のデソキシコレート寒天培地法の値に対する差異が変化する場合について検討を行った。ここでは $\pm 0 \log$ 、 $\pm 0.2 \log$ 、 $\pm 0.3 \log$ 、 $\pm 0.5 \log$ 、 $\pm 0.7 \log$ 、 $\pm 1.0 \log$ とした場合のそれぞれのケースについて、比較した。なお差異の範囲内で均一に測定値がばらつくものと仮定し、乱数を発生させて大腸菌群数測定装置の計測値として与えた。結果を図 5-3-12 に示す。

図より St.1、St.2 のいずれにおいても差異が $\pm 0.5 \log$ の範囲内では 21~47% の節減効果が得られることが分かった。差異が小さいほど節減効果が大きくなる傾向であるが、 $\pm 0.5 \log$ より大きい範囲では St.1 と St.2 で節減効果に相違が見

られる。これは表 5-7 に示すように、St.2 では流量比例制御のオゾン注入率が低めに設定されているため、デソキシコレート寒天培地法との差異の影響を受けやすくなるためと考えられる。

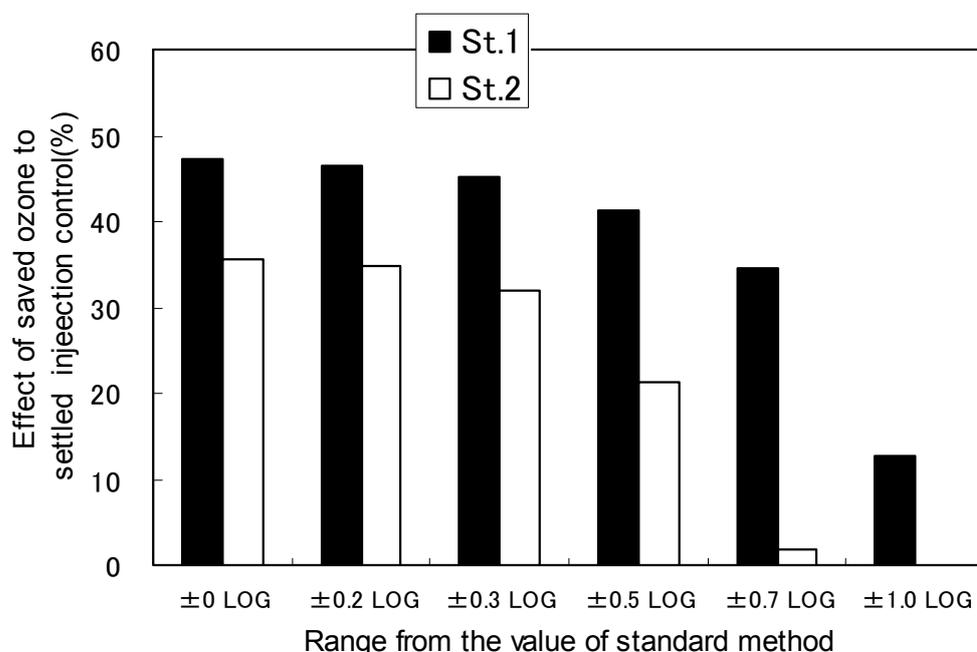


図 5-3-12 大腸菌群数計測装置のデソキシコレート寒天培地法に対する差異の影響について比較流量比例制御に対する節減効果の比較

(3) 消毒時間の影響

オゾンにより高速消毒が可能であることを示すために、未処理下水の流量の変化に対し、想定したオゾン反応槽における消毒時間を1～5分まで変化させた時の消毒効果への影響を調べた。図 5-3-13 に消毒時間を変化させた時の必要オゾン量を計算した結果 (St.1) を示す。流量比例制御の場合は、消毒時間によりオゾン量が大きく変化するが、大腸菌群数計測装置による制御の場合はあまり変化しないことが分かった。第 4 章で述べているとおり、消毒時間を 2 分以上確保すれば実データ上でも放流基準値を達成できているため、消毒時間 2 分以上となるオゾン反応槽の設置により、対応可能と推測される。

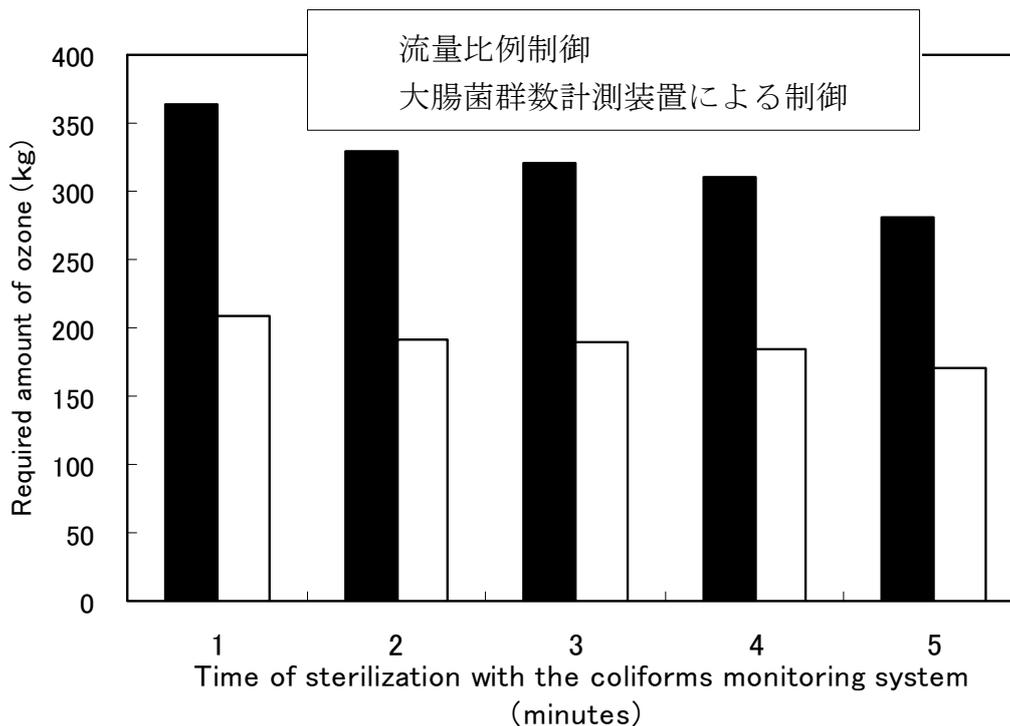


図 5-13 消毒時間の長さに対する消毒剤節減効果比較

(4) 大腸菌群数計測装置の測定間隔の影響

大腸菌群数計測装置の測定時間が長い場合、未処理下水の水質変化が大きいケースでは消毒剤の制御が困難となる可能性がある。それを評価するために標準状態の 10 分から、5、15、20、30 分と変化させた場合について同様にシミュレーションを実施し、比較を行った。図 5-3-14 に大腸菌群数計測装置の測定時間を変化させた時の消毒剤の節減効果の変化を示す。測定時間が 20 分（測定間隔 25 分）以上となると、必要オゾン量が増加し、流量比例制御の必要オゾン量に近づいていく結果が得られた。これは大腸菌群数計測装置の測定時間が長いと、水質の変化に対して追従できないため、オゾン注入率が過大に設定されるためである。測定時間が短ければより安定な消毒システムを構築可能であることは明らかであるが、今回の結果からは 10～15 分程度の測定時間では問題なく、未処理下水の水質変化に対応して消毒可能であることが示された。

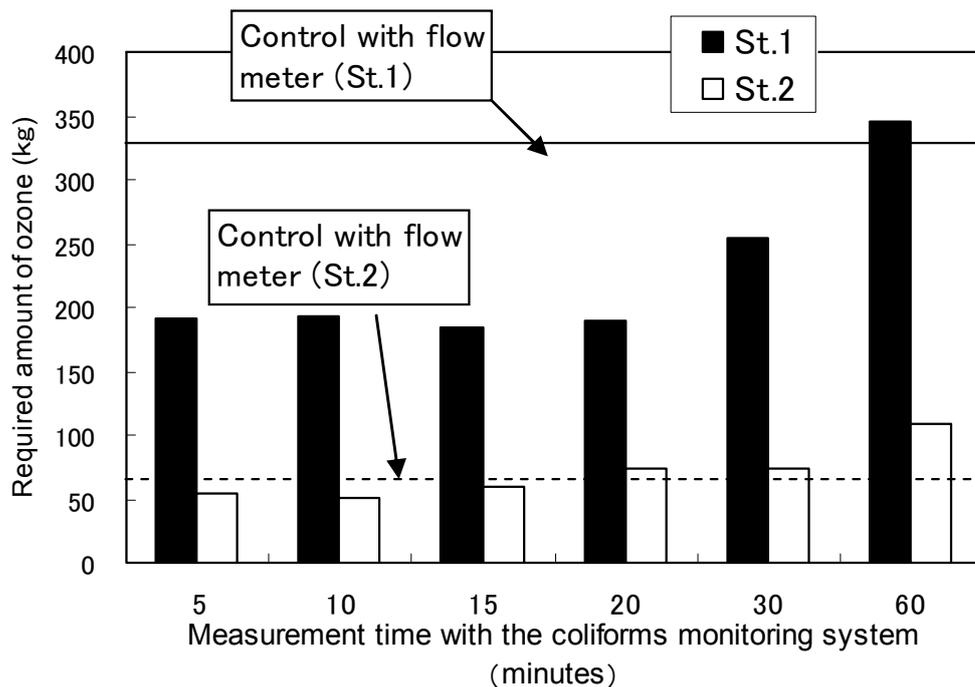


図 5-3-14 大腸菌群数計測装置の測定時間の影響に対する節減効果の比較

第4節 結語

本章では、大腸菌群数迅速計測装置を用いて下水消毒システムを構成した場合のオゾン消毒の可能性および節減効果について検証を行なった。検討結果を以下に示す。

- (1) Chick のモデルによるオゾン消毒モデルにより、二次処理水、雨天時の未処理放流水の両方について大腸菌群数の変化についてシミュレーション可能であることが分かった。
- (2) 二次処理水の場合は流入大腸菌群数が 300~900 CFU/mL の日変動の条件で、オゾン注入率一定の流量制御を対照とした場合、大腸菌群数迅速計測装置とデソキシコレート寒天培地法との測定値の差異が $\pm 50\%$ では節減率は約 30%期待でき、処理流量 16,200m³/hr の処理場では CO₂ 排出量は約 8,600kg/年節減できることが分かった。

- (3) 雨天時の未処理下水については、二次処理水と同様にシミュレーション計算を実施した結果、雨天時の未処理下水の消毒に必要となるオゾン量は流量比例制御による注入率一定方式と比較して、21～41 %の節減効果が得られることが示された。
- (4) 大腸菌群数計測装置のデソキシコレート寒天培地法との差異のオゾン節減効果に対する影響を評価した結果、現状の差異($\pm 0.5 \log$)の範囲内では、(3)の節減効果が確保できることが分かった。
- (5) 大腸菌群数計測装置の測定時間の変化の影響を調べた結果、現状の装置仕様である測定時間 10 分では放流基準値を達成しつつ、未処理下水の水質変化に対応して消毒可能であることが分かった。

第 5 章 参考文献

- 1) 福岡正芳、長崎進、野瀬勝利、高瀬長武、青木精二、中村義行、「大腸菌自動測定装置による滅菌制御システム」、第 35 回下水道研究発表会講演集、Vol.35、1060-1062(1998)。
- 2) 山口昌二、メッサウディ・ブラヒム、中崎幸一、廣辻淳二、「オゾンによる下水消毒の一次モデル」、オゾン協会発表講演集、Vol.7、33-36 (1998)。
- 3) 大垣眞一郎、「オゾンによる消毒」、用水と廃水、Vol.32、No.4、22-26 (1990)。
- 4) 金子光美 編、「水質衛生学」、技報堂出版、(1996)。
- 5) 「オゾン利用による水の蘇生技術」、サンユース書房 (1997)。
- 6) 千葉市下水道局建設部下水道再整備課、(財)下水道新技術推進機構、「千葉市中央雨水幹線合流改善計画に関する調査」、(2002)。
- 7) 松原 誠、森田弘昭、森田 巖、村上孝雄、「合流式下水道からの大腸菌群の雨天時流出特性」、第 39 回下水道研究発表会講演集、Vol.39、392-394 (2002)。
- 8) (社)日本下水道協会、「下水試験方法—1997 年度版—」、(1997)。
- 9) 守川 彰、稲富健一、「フローインジェクション法を用いた迅速大腸菌群計測装置」、環境システム計測制御学会講演論文集、Vol.6、No.1、21-26 (2001)。
- 10) 守川 彰、上山智嗣、廣辻淳二、「蛍光酵素法とフローインジェクション法を用いた迅速大腸菌群計測装置の開発」、第 40 回下水道研究発表会講演集、Vol.40、1117-1119 (2003)。
- 11) 守川 彰、古川誠司、土方健司、「大腸菌群数迅速計測装置を用いた下水二次処理水の

- リアルタイム計測の検討」、第 41 回下水道研究発表会講演集、Vol.41、1134-1136 (2004)。
- 12) 守川 彰、古川誠司、「蛍光酵素法を用いた大腸菌群数計測装置の開発、環境システム計測制御学会誌、Vol.9、No.2、127-132 (2004)。
 - 13) 下水道技術開発プロジェクト (SPIRIT21) 委員会、「合流式下水道の改善に関する技術開発-高濃度オゾンを応用した高速消毒技術に係る技術評価書」、(2004)。
 - 14) 堺 好雄、国島康成、中尾彰夫、布施達雄、本田一好、「オゾンの下水処理への適用」、用水と廃水、Vol.34、No.4、25-30 (1992)。
 - 15) 建設産業調査会編、「実務家のための最新下水道ハンドブック」、(1997)。
 - 16) 日本下水道協会編、「下水道維持管理指針ポンプ場・処理場施設編」(1991)。
 - 17) ウェーバー、「水質制御の物理化学的プロセス」、朝倉書店、(1981)。
 - 18) 中村栄一、「合流式下水道対策の検討 (第Ⅱ法) -汚濁流出シミュレーション」、第 16 回衛生工学研究会講演論文集、154-59(1980)。

第 6 章 結論

本研究においては、大腸菌群が所持している酵素の活性を利用して測定する蛍光酵素法に着目し、大腸菌群数の迅速測定の原理実証を行った上で、実際の下水処理場のサンプルにより、測定フローを改善し自動測定装置を構築した。さらには大腸菌群数迅速測定装置を利用したオゾン消毒システムを想定し、合流式下水道の雨天時の未処理下水への適用検討を行うために、消毒に影響を与える因子について解析し、更に大腸菌群数計測装置による消毒制御システムの消毒効果および消毒剤節減効果についてシミュレーション計算により明確化した。

本章では本研究で得られた主な結論をまとめて述べる。

第 2 章では、大腸菌群数の 30 分以内の迅速測定を実現するために、培養操作を行わない蛍光酵素法について研究した。培養操作無しで蛍光酵素法を実現するために、大腸菌群が所持する酵素 β -ガラクトシダーゼによる酵素反応が Michaelis- Menten 式に従うものとして必要な反応試薬と反応プロセスを最適化した測定方法を提案し、従来の培養法による測定結果との相関について検討した。その結果を以下にまとめる。

- ・ 蛍光酵素法の反応プロセスについて、迅速化を目的とした検討を行った。その結果、蛍光基質、界面活性剤、pH 緩衝剤を含んだ試薬を用いることにより、大腸菌群数 200 CFU/mL の下水二次処理水が、測定可能であることを実証した。また、 β -ガラクトシダーゼの生産を活性化させる誘導剤について検討したが、誘導剤の有無によって酵素活性にほとんど差が見られないことが分かった。
- ・ 下水二次処理水と流入下水を対象として、蛍光酵素法と培養法との相関を調べた結果、二次処理水に SS が混入すると両者の測定値の相関が悪化することが分かった。この結果から、大腸菌群を通過させ SS を除去する前処理フィルタの導入が必要であると考え、実験的に検討したところ、孔径 8 μm のフィル

タを前処理ろ過として用いることで、二次処理水を対象として高い相関が得られることが分かった。

以上により、培養操作無しの蛍光酵素法による大腸菌群数の測定の実現の可能性が示唆され、大腸菌群数を迅速に自動で測定する装置が構築可能であるという結果を得た。

第 3 章では、第 2 章で開発した蛍光酵素法の反応プロセスを用いて、大腸菌群数を自動で計測する装置を構築し、フィールド実験による性能評価について研究した。その結果を以下にまとめる。

- ・大腸菌群数を迅速計測する目的でフローインジェクション法を用いた装置化について実験的な検証を行い、連続フローとストップ・フロー法について比較を行った。以下の①～④に要点をまとめる。

装置を構成するためには、試薬混合部分、酵素反応部分、酵素反応を停止させるアルカリ注入部分、蛍光検出部分、内部洗浄機構が最低限必要であった。

β -ガラクトシダーゼの酵素反応が数分～数十分と比較的遅く、連続反応にするためにポンプの低流量運転を行うと流量の安定性が低いため、装置構成が困難であった。従って、連続法ではなくストップ・フロー方式の方が装置構成が容易であった。

測定は 10～40 分毎に測定結果が得られるフローとした。また配管の材質および内径については配管の閉塞防止と配管内壁に SS の付着の防止を両立するため、材質と内径をパラメータとして各種配管を比較した結果、フッソ樹脂製で内径 1.3 mm および 2 mm を使い、部位により使い分ける構成とした。

長期間にわたる測定の安定性を実現するために、蛍光の光源としてこれまでに知られている UV ランプの代替として、長寿命の紫 LED を採用するこ

となどにより、下水処理場の現場のメンテナンスについても配慮した設計を行った。

- ・測定を妨害する SS を除去する前処理フィルタについて検討を行った。前処理フィルタは逆洗浄が可能で閉塞が少なく、均一の孔径を持つフィルタとするために、セラミックまたはポリプロピレンを材料とし、閉塞を考慮して孔径が 10~30 μm のクロスフロー方式とした。これによりフィールド実験により長期間の連続測定が実現可能であることを実証した。
- ・以上の結果を反映して製作した試作機を下水処理場に設置して、二次処理水および流入下水をサンプルとしたフィールド実験を行った。その結果、サンプルを二次処理水とした場合は、従来の培養法の測定値に対して-19~+50%の範囲で収まる良好な結果を得ることができた。一方、流入下水の場合は、SS の影響を完全に除外することが困難であったが、 $\pm 0.5 \log$ の範囲内で収まる結果が得られた。また同一サンプルの繰り返し試験を行った結果、二次処理水、流入下水共に、変動係数が 6%以下となり、安定した計測が達成できていることが分かった。

以上により、大腸菌群数の迅速計測装置に必要なスペックを把握でき、長期間にわたって安定した計測が可能な試作機的设计が可能となった。

第 4 章では、雨天時の未処理下水を消毒対象とした場合のオゾンによる高速消毒について研究した。これは雨天時の未処理下水をサンプルとしてオゾン消毒を行った既往研究が皆無であり、さらには後述する消毒システムのシミュレーション計算に必要な基礎データを得ることがシステム構成上、必要不可欠であると考えたためである。その結果を以下にまとめる。

- ・雨天時の未処理下水に対するオゾン消毒の基本特性を把握する目的で、実処理場の流入下水をサンプルとして用いて、オゾン注入率を変化させたピーカ

一実験を実施した。オゾン消費率は 0~150 mg/L (オゾン注入率 0~450 mg/L) の範囲で実験を行った結果、オゾン消費率が 50 mg/L を超えると消毒効果が現れることから、オゾンの無効消費成分が多く含まれていることが分かった。放流基準値である大腸菌群数を 3,000 CFU/mL 以下にするために必要なオゾン消費率が 100 mg/L 程度であった。

- ・ 実際の雨天時の未処理下水によるオゾンによる連続の消毒実験を行った。その結果、3 回の雨天時のいずれにおいても、降雨開始時から 30 分程度でファーストフラッシュが見られたことから、その前後の未処理下水をサンプルとして連続実験を行い、 $3.9 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^6$ CFU/mL の大腸菌群数である未処理下水に対し、反応時間 1.7 分間、オゾン消費率が 89~109 mg/L の条件により放流基準値である大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下を達成できていることが確認された。
- ・ オゾン消毒に影響を与える因子について検討を行った。消毒以外に消費されるオゾンの無効消費について調べるため、国内 9 処理場の未処理下水の消毒性能をビーカー実験により調べた。その結果、工場排水の負荷が大きい処理場では大腸菌群数 3,000 CFU/mL を達成するために必要なオゾン消費率が約 100 mg/L と高くなるが、工場排水の負荷が小さい処理場の場合は 50 mg/L となり、立地条件がオゾン消費率に大きな影響を与えている可能性が示唆された。また各種水質項目の中でオゾン消費率とよう素消費量との間には強い相関が認められたことから、オゾン消費率は工場廃水の流入割合に依存している可能性が高いと推測された。

以上により、雨天時の未処理下水のオゾン消毒に関する基礎的なデータを得ることができ、さらには高速消毒に必要なオゾン消費率や消毒に影響する因子を把握することができた。

第 5 章では、既存の二次処理水や雨天時の未処理下水に関する公開データ及び、第 4 章で得られた雨天時の未処理下水のオゾン消毒に関するデータを用いて、大腸菌群数迅速測定装置を利用した消毒システムの効率性について、シミュレーションによる研究を行った。その結果を以下にまとめる。

- ・第 4 章で得られたオゾン消毒に関するデータを用いて、一次反応によるオゾン消毒モデルを構築し、これまで明らかとなっていなかった雨天時の未処理下水について本モデルが適用可能性について明らかにするために、実データと比較することでシミュレータの妥当性について評価を行った。その結果、大腸菌群数 10^2 CFU/mL 以上の範囲で計算値と実測値は概ね合致した結果が得られた。両者が乖離する原因としては、COD_{Mn}、SS 以外のオゾンが無効消費させる成分の流入の有無などが考えられた。
- ・二次処理水をターゲットとして大腸菌群数迅速計測装置を利用したフィードバック制御によるモデルを構築し、これまでに多く行われている流量比例制御方式と比較を行った。大腸菌群数が 300~900 CFU/mL の日変動を想定した条件でシミュレーションした結果、オゾン量は約 30% 節減でき、処理流量 16,200m³/hr の処理場では CO₂ 排出量は約 8,600kg/年節減できることが分かった。
- ・大腸菌群数迅速計測装置を利用したフィードフォワード制御によるモデルを構築し、雨天時の未処理下水の消毒を想定したシミュレーションによる計算を行い、流量比例制御による消毒制御と比較した。その結果、大腸菌群数迅速計測装置による消毒制御方法によるオゾン量は流量比例制御による注入率一定方式と比較して、汚濁負荷に応じて 21~41% の節減効果が得られることが分かった。
- ・雨天時の未処理下水をターゲットとした場合の大腸菌群数迅速計測装置に影響する各種因子による節減効果への影響を調べた。まず大腸菌群数迅速計測

装置と公定法との差異がオゾン節減効果に及ぼす影響を評価した結果、現状の差異 ($\pm 0.5 \log$) の範囲内では第二の検討による節減効果が確保できることが分かった。また消毒時間の影響を調べた結果、大腸菌群数迅速計測装置を用いた時は、2 分以上の消毒時間となるオゾン反応槽を設置することにより、大腸菌群数の放流基準値 3000 CFU/mL の達成と高速消毒の両立が可能であることが分かった。さらに大腸菌群数迅速計測装置の測定時間の変化の影響を調べた結果、測定時間の影響は大きいものの、現状の装置仕様である測定時間 10 分では放流基準値を満足し、未処理下水の水質変化に対応して消毒可能であることが分かった。

以上により、大腸菌群数迅速計測装置によるオゾン消毒法の有効性を明確化することができ、さらには従来の流量比例制御と比較して、オゾン量が 21~41% 程度の節減が可能となることが分かった。

本研究では、蛍光酵素法を利用した迅速な大腸菌群数測定の実験原理検証を行った上で実際の二次処理水や雨天時の未処理下水への適用検討および迅速測定装置を開発した。さらに大腸菌群数迅速測定装置を利用したオゾン消毒システムを想定した場合の消毒効果および消毒剤節減効果について、その有効性を明確化した。以下に本研究の特色を明らかにする。

まず第 1 点は、大腸菌群数の迅速測定について、従来の培養による方法ではなく、大腸菌群が所持する酵素の活性に着目した点である。これより従来は困難であった大腸菌群数の迅速化が可能となり、大腸菌群数迅速測定装置の実用化の目処が立った。

続いて第 2 点は、雨天時に発生する未処理下水、いわゆる越流水をサンプルとして高速オゾン消毒を行ったときの消毒特性を把握し、これを基に消毒モデルを構築した点である。これにより、大腸菌群数迅速計測装置を用いた消毒システムにおいてシミュレーションすることが可能となり、その有効性を示すこ

とが可能となった。

最後に第 3 点は、大腸菌群数迅速測定装置を開発し、これを利用した消毒システムの有効性を明確化した点である。これにより従来の消毒方法に対して、過不足のない効率的な消毒システムを提案することが可能となった。

今後、自然環境・生態系の維持の必要性がますます求められていく中で、公衆衛生学的な観点から、安全に消毒を行う技術はこれまでと同様に重要なものである。こうした中で、さらに環境に配慮した上で、省エネルギー化を実現していく姿勢が、地域環境および地球環境の両者を共に保全し、持続可能な高度福祉社会・生活圏を形成していく意味で必要となると考えられる。迅速かつ効率的な消毒システムを可能とする本研究で取り上げた本技術は、これらの諸問題に対応可能であり、工学的に重要であると考えられる。

さらに、本研究で行った大腸菌群数迅速計測技術に関して今後の課題を以下に挙げる。

まず第 1 点は、上水の水質基準に対応し、大腸菌群ではなく大腸菌の検出の高感度化 (1 CFU/mL) についての検討である。今後下水についても、指標が大腸菌に取って代わることが予想されることへの対応である。

続いて第 2 点は、測定の更なる迅速化である。現在は測定時間が 10~30 分で可能であるが、これをより迅速化を実現する技術を開発することで、消毒システムの更なる効率化を図ることができる。

最後に第 3 点は装置の小型化である。現在の装置の仕様は下水処理場に設置し、基本的には移動することを想定しないものである。これを軽量・小型化し、可搬性を持たせるようにして任意の場所の測定データを取得して集積化することで、システム全体としてより効率的に消毒することができるものと考えられる。

本論文に関連のある主な報告

2004年9月発行

環境システム計測制御学会誌、Vol.9、No.2、127-132頁に掲載
酵素蛍光法を用いた大腸菌群計測装置の開発

2006年3月発行

Water Science & Technology、Vol.53、523-532頁に掲載
Development of a Monitoring System for Coliforms using an Enzymatic Fluorescence Method

2007年3月発行

水環境学会誌、Vol.30、No.3、139-144頁に掲載
大腸菌群数計測装置を用いた高効率オゾン消毒システムの開発

下水道協会誌（投稿中）

大腸菌群数計測装置を用いた二次処理水の消毒剤の節減量 CO₂削減効果

2001年9月発行

環境システム計測制御学会講演論文集、Vol.6、No.1、21-26頁に掲載
フローインジェクション法を用いた迅速大腸菌群計測装置

2001年11月発行

2nd World Congress of IWA in Berlin、CD-ROMに掲載
Rapid Fluorogenic Detection of Coliforms in Water by Flow Injection Analysis Method

2003年6月発行

第40回下水道研究発表会講演集、Vol.40、1117-1119頁に掲載
酵素蛍光法とフローインジェクション法を用いた迅速大腸菌群計測装置の開発、

2004年6月発行

第41回下水道研究発表会講演集、Vol.41、1134-1136頁に掲載

大腸菌群数迅速計測装置を用いた下水二次処理水のリアルタイム計測の検討

2004年10月発行

電気学会産業応用部門大会講演論文集、CD-ROMに掲載

下水消毒システム用大腸菌センサ

2005年3月発行

IWA/ICA (Instrumentation, Control and Automation) Busan 講演論文集、

Development of a Monitoring System for Coliforms using an Enzymatic Fluorescence Method

2005年6月発行

第42回下水道研究発表会講演集、Vol.42、936-938頁に掲載、

雨天時流入下水に対するオゾン高速消毒技術（合流式下水道の改善技術）

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、多大なるご指導、ご鞭撻、ご助言を賜りました京都大学工学研究科都市環境工学教授 津野 洋博士に深く感謝いたします。

京都大学工学研究科都市環境工学教授 田中 宏明博士には、本論文の査読、校閲を賜りました。深く感謝いたします。

京都大学工学研究科都市環境工学教授 米田 稔博士には、本論文の査読、校閲を賜りました。深く感謝いたします。

また京都大学工学研究科都市環境工学准教授 西村 文武博士、助教 日高 平博士にも博士課程在学時に大変お世話になりました。深く感謝いたします。

本研究は、著者が三菱電機（株）において行った研究成果をまとめたものがあります。

本研究の遂行ならびに本論文の作成に当たり、始終熱心にご指導を賜りました三菱電機（株）の廣辻淳二博士に深く感謝いたします。また三菱電機（株）先端技術総合研究所 環境システム技術部の葛本 昌樹博士、古川 誠司博士、上山 智嗣氏、宮本 誠博士、平敷 勇博士および水質制御グループ員の方々にも、いろいろご指導をいただき感謝の念に堪えません。

また三菱電機（株）先端技術総合研究所 河相 好孝氏、三菱電機（株）神戸製作所 小沢 建樹氏、花里 善夫博士、石田 稔郎氏、電力システム製作所 土方 健司氏にも実験、分析方法その他多数のことをご指導いただきました。深く感謝いたします。

また本研究の一部は、財団法人下水道新技術推進機構の「下水道技術開発プロジェクト（SPIRIT21）」により実施されたものです。関係者の方々に深く感謝申し上げます。

その他にも、本研究の遂行および論文の作成には多くの方々のご助力を得ました。これら多くの皆様に厚く御礼を申し上げます。