

B-23 復旧過程における被災した宮城県内4下水処理場および周辺環境における衛生微生物の調査

稲葉 愛美^{1*}・端 昭彦¹・片山 浩之¹・古米 弘明²

¹東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻（〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1）

²東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター（〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1）

* E-mail: m_inaba@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

2011年3月の東日本大震災に伴う津波により、沿岸部に位置する多くの下水処理場が被災し稼働停止となった。被災した下水処理場は、本復旧に必要なとする時間に応じて応急復旧を行う段階的応急復旧が国土交通省により提言され対応が進められている。復旧段階の過程は、沈殿+塩素消毒の初期復旧期、簡易曝気+塩素消毒の水質改善期 (I)、接触酸化法や部分的な活性汚泥処理+塩素消毒の水質改善期 (II)、および完全復旧期の4つに分かれている。復旧過程の完全復旧期に至るまでの期間は、通常の状態に比べ処理が不十分な状態であった。

活性汚泥による下水に含まれる有機物除去が行われていない状態での塩素処理では、従来の消毒効果が得られるかは不明である。特に、衛生指標である細菌に比べ、腸管系ウイルスは塩素耐性が高いため、通常よりも高濃度で周辺環境に排出されていることが懸念される。

現在、下水処理場および周辺水環境での病原微生物の評価には、細菌指標である大腸菌群 (Total coliforms, TC) や大腸菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) が用いられているが、ウイルスや原虫の評価には不適切であることが示唆されている。近年、ウイルスに対する評価には大腸菌ファージやウイルス自体を指標含め、さまざまな指標が提案されている。被災した下水処理場や周辺水環境における病原微生物の汚染レベルを正確に評価することは、復旧過程の下水処理場において、衛生影響の軽減および健全性の復興につなげるために重要だと考えられる。

そこで本研究では、段階復旧期～完全復旧期の病原微生物の評価を目的とし、宮城県内の4下水処理場と周辺環境で指標細菌、ファージおよび腸管系ウイルスの検出・定量を行った。

2. 材料および方法

(I) 4下水処理場および周辺環境における試料採取

被災した宮城県内の4下水処理場、石巻東部浄化センター、仙塩浄化センター、および南蒲生浄化センター、県南浄化センターにおいて、また、処理下水の放流先である沿岸海域で、2012年9月～2013年6月の期間に、それぞれ3～7回の試料を採取を行った。下水処理場試料は、処理過程ごとで試料を採取した。採取した試料は、滅菌プラスチック容器に回収後、研究室まで水上および冷蔵で輸送した。

(2) TCと*E. coli*の測定

a) 下水処理場試料

TCと*E. coli*は、クロモカルトコリフォーム寒天 (Merck, USA) を用いた単層寒天法で、37℃、24時間培養した。

b) 沿岸海域試料

試料1～50 mLを滅菌済みフィルター (37mm Monitor Unit, ADVANTEC) で濾過し、フィルター上に細菌を補足した。続いて、m-ColiBlue24® Broth (HACH) を培地として添加後ろ過し、37℃、24時間培養した。

(3) Somatic coliphage (SMP) および F-specific coliphage (F-phage) の測定

SMPおよびF-phageは、それぞれ*E. coli* WG5と*Salmonella typhimurium* WG49を宿主に用い測定した。

(4) ウイルス濃縮

ウイルス濃縮は、片山ら (2002) の陰電荷膜吸着法・酸洗浄・アルカリ誘出に従って行った。

a) ウイルス一次濃縮

滅菌プラスチックパックに採取した試料のうち、下水処理場試料は100 mL、沿岸海域試料は1000～2000 mLをウイルス一次濃縮に供した。下水処理場試料および塩濃度が1.5%以下の沿岸海域試料に対し、終濃度が25 mMとなるように2.5 M MgCl₂を添加・攪拌し、直径90 mm、孔径0.45 μmのHA膜 (Millipore) で濾過した。フィルターを200 mLの

0.5 mM H₂SO₄ (pH 3.0) で濾過し、10 mL の 1 mM NaOH (pH 10.5 - 10.8) でウイルスを誘出し、50 μL の 100 mM H₂SO₄ (pH 1.0) および 100 μL の 100x Tris-EDTA buffer (pH 8.0) で中和した。

b) ウイルス二次濃縮

一次濃縮液は、Centriprep YM-50 (Millipore) に添加後、遠心分離を行い、約 650 μL の二次濃縮液を回収した。二次濃縮液は、次の処理を行うまで -20 °C で保存した。

(5) ウイルス DNA および RNA の抽出と逆転写反応

二次濃縮液からの DNA および RNA の抽出は、それぞれ 200 μL と 140 μL の試料から、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) と QIAamp RNA minikit (QIAGEN) を用いた。抽出 RNA の逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い cDNA を合成した。合成した cDNA は、RT-qPCR による定量に供した。

(6) RT-qPCR によるウイルスの定量

cDNA、または DNA の濃度は、ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた RT-qPCR で、アイチウイルス (AiV)、エンテロウイルス (EV)、GI および GII ノロウイルス (GI NV, GII NV)、およびアデノウイルス (AdV) を既報に従い定量した (Heim et al. 2003, Katayama et al. 2002, Kageyama et al. 2003, Kitajima et al. 2013)。

3. 結果

(1) 下水処理場試料での指標細菌、ファージの測定および RT-qPCR 法によるウイルスの定量結果

図 1 に 4 下水処理場の簡易曝気処理後、生物処理後、塩素処理後から採取した試料の指標微生物、ファージ、腸管系ウイルスの検出・定量結果をまとめた。値は幾何平均値を示し、各検出・定量対象が検出限界以下だった試料は、検出限界値の 1/10 の値を与えた。

調査を開始した 2012 年 9 月の復旧段階は、全ての下水処理場で水質改善期 (II) だった。また、2013 年 6 月時点で 3 下水処理場が完全復旧期に移行していた。4 下水処理場での試料採取回数は合計 17 回で、9 回が水質改善期 (II) で、8 回が完全復旧期で採取した。

流入下水試料の TC、*E. coli* 濃度は、 $10^{8.0 \pm 0.6}$ CFU/L と $10^{7.5 \pm 0.7}$ CFU/L であり、試料ごと、また復旧前後で差は確認されなかった。同じ傾向は、SMP と F-phage でも確認された (それぞれ $10^{6.5 \pm 0.8}$ PFU/L、 $10^{6.1 \pm 0.7}$ PFU/L)。一方でウイルス陽性試料の濃度幅は AiV、AdV 共に狭かったが (それぞれ、 $10^{5.4 \pm 0.9}$ Copies/L、 $10^{5.7 \pm 1.2}$ Copies/L)、AiV は 6 試料で検出限界以下だった。AdV は全ての下水流入水試料から検出された。EV、

GI NV、GII NV は試料の半数以上が検出限界以下だった (データ省略)。

改善期の簡易曝気後の試料と流入下水試料との比較で、簡易曝気では全ての対象微生物がほとんど減少していなかった (<1.0 log)。また、生物処理後を復旧前後をで比較した結果、細菌指標とファージは簡易曝気処理が行われていない復旧後でより高い消毒効果が確認された。塩素消毒後は、細菌指標の濃度減少で復旧前後での差はなく両方とも著しく減少していた。一方で、塩素消毒後のファージとウイルス濃度減少は、復旧前後共に確認されなかった。

(2) 放流先沿岸海域での指標細菌、ファージの測定および RT-qPCR 法によるウイルスの定量結果

図 2 に、4 下水処理場の放流先沿岸海域における指標細菌、ファージ、ウイルスの調査の結果を示した。放流水の流下拡散方向に採取しており、採取開始地点からそれぞれの採取地点の距離は約 180~2000m である。

2013 年 6 月試料では、*E. coli*、F-phage、SMP、AiV、AdV は流下方向に減少する傾向が確認された。特に、*E. coli* と F-phage は最遠方地点で、それぞれ 10^1 CFU/L と検出限界以下で著しい減少が確認された。一方、TC は安定した濃度で検出された。

しかし、2012 年 9 月試料では、TC と *E. coli* が全地点で検出され、それぞれ $1.9 \log$ -CFU/L と $1.2 \log$ -CFU/L 減少したが、F-phage と AiV は全地点で、SMP と AdV は遠方の地点で検出限界以下だった。逆に TC と *E. coli* が検出されない 2013 年 1 月において、SMP、AiV、AdV が安定な濃度で検出された。

4. 考察

本研究において、復旧過程での病原微生物の評価として、宮城県内の 4 下水処理場と周辺沿岸海域からの指標細菌および腸管系ウイルスの検出・定量を行った。

水質改善期 (II) に行われていた簡易曝気後の試料では細菌指標、ファージ、ウイルス濃度が流入下水と比べ減少しなかった。指標細菌は、塩素消毒後に著しく減少していたが、SMP が $2 \log$ PFU/L 減少した以外、F-phage、AiV、AdV 濃度は殆ど減少なかった。完全復旧期でも同様の傾向が確認された。このことから、水質改善期 (II) 以降の復旧段階において、塩素消毒は細菌指標に対して効果が確認されたが、ファージやウイルスには効果がないことが確認された。

沿岸海域での細菌指標の低減傾向は、ファージとウイルスと一致してなかった。また、ファージやウイルスに対し、細菌指標の検出状況が一致しない現象も確認された。このように海域においても細菌指

標とファージ、ウイルスの挙動は一致しておらず、細菌指標で腸管系ウイルスを評価することは不適切であることが示唆された。一方で、ファージとウイルスは流下に向かって減少することが確認され、希釈による低減傾向が確認された。このことから、海域のファージとウイルスの濃度は処理場からの放流水に依存するものの、低減傾向は地形や海流、干満などの海域環境に依存することが示唆された。ファージとウイルスでは、ファージ、特に F-phage が放流海域においてより早く減少することが確認された。これは検出方法の違いによるものと考えられる。感染力のあるものを測定しているファージの方が海域での挙動を正確に反映していると考えられ、海域における評価や挙動を明らかにするのに有効であることが示唆された。

本研究において、復旧前後での消毒効果や沿岸海域における検出状況・低減傾向が細菌指標とウイルス・ファージでは一致しなかった結果は、細菌指標で復旧段階の移行に伴う病原微生物の挙動を評価することは不適切であることが示された。今後、腸管系ウイルスに対して有効な指標が求められる。

謝辞：本研究は、環境省の環境研究総合推進費「水系感染微生物による水環境汚染への指標生物管理の有効性と消毒技術の検討（研究代表者：田中宏明）」の助成を受けて実施した。

参考文献

Katayama et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (3), 1033-1039, 2002
 Heim et al. *J. Med. Virol.*, 70, 228- 239, 2003
 Kageyama et al. *J. Clin. Microbiol.*, 41(40), 1548- 1557, 2003
 Kitajima et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (13), 3952- 3958, 20

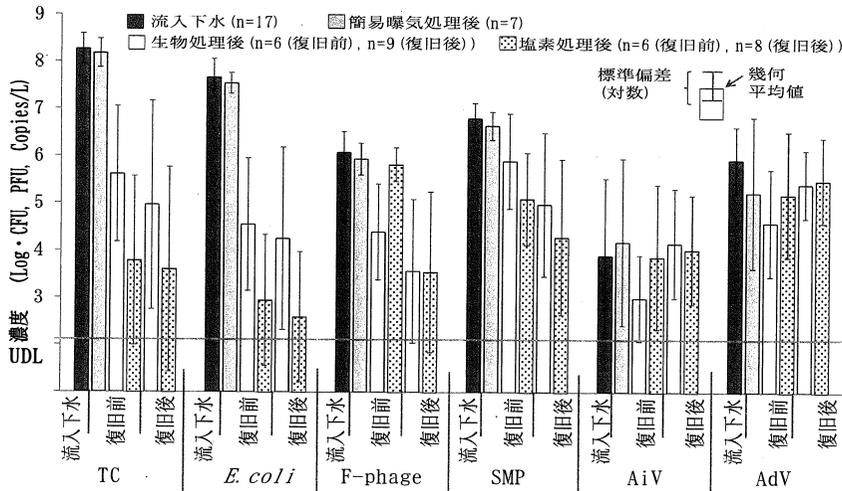


図1: 復旧前後における各処理段階での細菌指標、ファージ、ウイルスの濃度

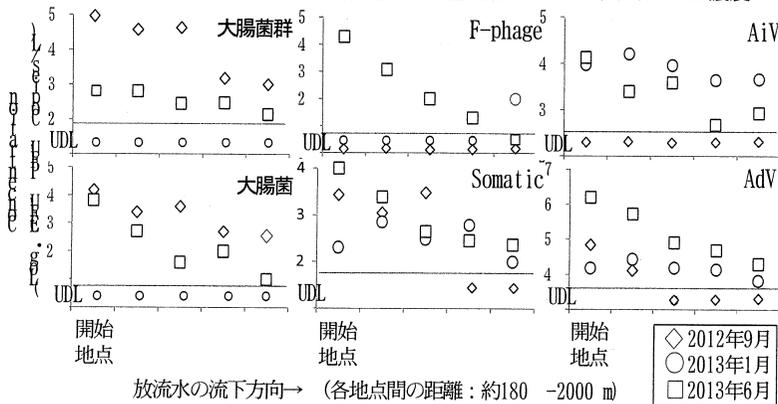


図2: 放流先沿岸海域での放流水流下方向で採取した試料中の細菌指標・ファージ・ウイルスの濃度