

## ◆ 水の安全特集 ◆

## 硝化細菌を用いた毒物モニタによる河川水質モニタリング

岡安祐司\* 磯部健介\*\* 豊田忠宏\*\*\* 南山瑞彦\*\*\*\* 田中宏明\*\*\*\*\*

## 1. はじめに

近年では、水利用の複雑化により、公共用水域が油や有害化学物質によって汚染される事故が多発している。建設省の調査では、平成9年に一級水系で発生した水質事故は表-1に示すように427件にものぼり、増加傾向にある。本研究では、公共用水域における、有害化学物質による突発的な水質事故の発生を連続的に監視するため、硝化細菌を固定化したバイオセンサを利用した毒物モニタを開発し<sup>3),5)</sup>、河川における実証試験を行った。その結果、長期間安定して作動することを確認できた。また、実証試験期間中に実際の水質異常を検出したので、併せて以下に報告する。

なお、本検討は、建設省土木研究所及び(株)富士電機が「微生物等を用いた毒物センサーの開発に関する共同研究」の一環として、平成7年度～平成10年度に行ったものである。また、平成11年度～平成12年度には、毒物モニタの下水道への適用について検討する予定である。

## 2. 実験方法

## 2.1 実験装置の設置概要

当研究所にて開発した毒物センサを、水質汚濁の程度が著しく、最も厳しいモニタ設置条件を表-1 水質事故の原因物質による分類

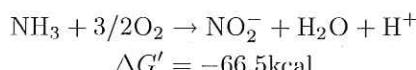
原因物質	平成7年	平成8年	平成9年
① 油類 重油、軽油、 ガソリンなどの流出	199 (77.7%)	259 (77.8%)	331 (77.5%)
② 化学物質 シアン、有機溶剤、 農薬などの流出	20 (7.8%)	16 (4.2%)	24 (5.6%)
③ 油類、化学物質以外 土砂、糞尿等の流出	16 (6.3%)	23 (6.1%)	14 (3.3%)
④ その他*	21 (8.2%)	45 (11.9%)	58 (13.6%)
合計	256 (100%)	379 (100%)	427 (100%)

\*自然現象ではなく、魚の浮上等が確認され、原因物質が特定できなかったもの

有すると考えられる、建設省関東地方建設局江戸川工事事務所管轄の綾瀬川槐戸水質監視所(草加市)内に設置し、水質事故の連続監視を行った。システムの概要を図-1に示す。水質監視所では、綾瀬川岸に設置した水中ポンプより河川水を連続的に調整槽へ導いている。その水を直接センサへ通水すると、配管内の日詰まり等が懸念されたため、新たに除濁装置を開発し、設置した。

## 2.2 毒物センサの検知原理

本実験に使用したセンサは、有害物質により呼吸阻害を受けやすい硝化細菌のうち、*Nitrosomonas europaea*と呼ばれる、アンモニア酸化細菌を使用している。アンモニア酸化細菌は、アンモニア性窒素を酸素を用いて亜硝酸に酸化する。



この細菌を、対象水の下で曝露し、呼吸活性をモニタリングする。有害物質が存在する場合、呼吸活性の低下が見られるため、これをもって有害物質の存在を判定するものである。

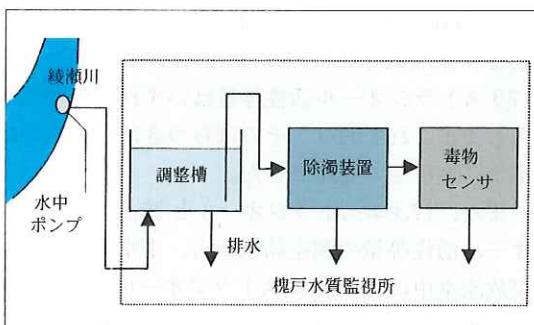


図-1 実験システム概略

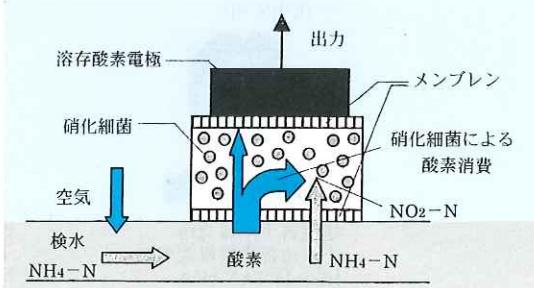


図-2 微生物固定化膜概略

### 2.3 毒物センサの構造

まず、前述の硝化細菌を純粋培養し、一定量を採取し、2枚の膜（ $0.2\mu\text{m}$  孔径）の間に挟み込み、固定化する。さらに、固定化微生物膜に溶存酸素電極を密着させ、微生物呼吸活性検知型のバイオセンサを構成する。（図-2）

さらに、各種溶液を送液するポンプ、配管、運転制御を行うシーケンサ、溶存酸素電極の出力データの表示・解析装置などを組み合わせて、装置を図-3 のように構成した。

### 2.4 毒物センサによる測定

実際の測定を行うに際しては、図-4 に示すように、まず、緩衝液、純水、空気を混合した液を通水した際の膜内の溶存酸素濃度（酸素消費速度）を確認する（ゼロ校正）。この状態は、固定化膜内の硝化細菌が内生呼吸を行っている分だけの酸素消費速度であると考えられる。次に、アンモニア性窒素・緩衝液、純水、空気の混合液を通水し、潜在的な最大酸素消費速度を測定する（スパン校正）。（この際、アンモニア性窒素濃度は十分大きく設定されているので、アンモニア性窒素濃度が反応の律速とはならないと考えられる。）ここで、ゼロ校正時の出力値を酸素消費率 0%、スパン校正時の出力を 100% と定義する。その後、アンモニア性窒素・緩衝液、検水、空気の混合液を通水する。検水中に有害物質が存在する場合、硝化細菌の呼吸活性が低下し、固定化膜内の溶存酸素濃度が上昇するため、溶存酸素電極の出力が変化す

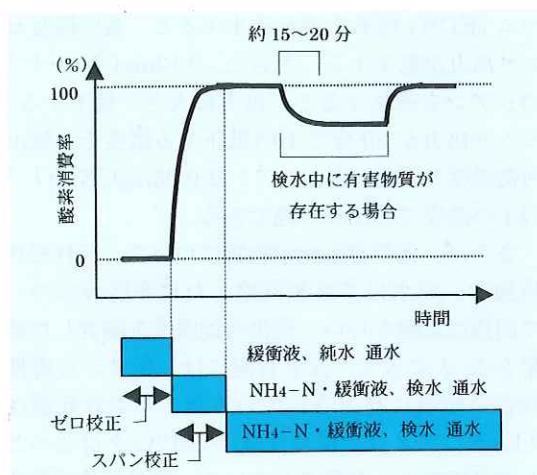


図-4 毒物センサ応答模式図

る。この変化をもって、水中の有害物質を検知する。本検討では、溶存酸素消費率が 10%以上低下した時点で、水質異常と判定し、警報を発するとともに、その際の検水を保存し、その後の精密化分析に供するため、保存するようにシステムを構成した。

なお、ゼロ校正、スパン校正は 1 日に 1 回、45 分間ずつ行い、それ以外の時間は、検水を通水することとした。

### 2.5 毒物センサの各種有害物質への応答

毒物センサの有害化学物質に対する応答性を説明する。図-5 は、過去にたびたび水道原水の取水停止の原因となったシアノに対する応答性を示したものである。 $0.02\text{mgCN}^- \cdot l^{-1}$  のシアノ化カリ

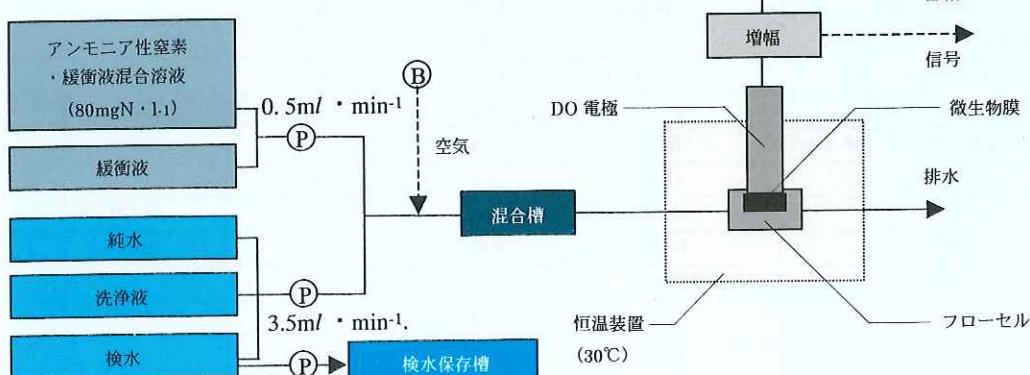


図-3 毒物センサ装置概要

ウム (KCN) 標準溶液を通水すると、数%程度センサ出力が低下する。さらに、 $0.12\text{mgCN}^- \cdot l^{-1}$  のシアンを通水すると、出力は大きく低下する。センサ出力が 20 分で 10% 低下する濃度を、検出可能濃度としたとき、シアンは  $0.05\text{mgCN}^- \cdot l^{-1}$  以上の濃度で検出が可能である。

さらに、他の有害化学物質について、それぞれ単独で、純水にて希釀調整した標準溶液について同様に試験を行い、検出可能濃度を調査した結果を表-2 に示す。表中右側には、従来から毒性物質の監視に利用されている魚の半数致死濃度 TLm<sup>1)</sup>、アメリカ環境保護庁 (EPA) をはじめとして各国でよく利用されている、簡易毒性試験法の、発光細菌を用いた MICROTOX<sup>®</sup> の検出可能濃度の報告値<sup>2)</sup> を示した。また、表中左側には、水質汚濁防止法によって規定されている環境基準値、総理府令により規定されている排水基準値を参考のために示した。硝化細菌を用いたバイオアッセイは、主として人への慢性影響をもとに定められている環境基準の濃度レベルは検出できないが、急性毒性のレベルであれば約 20 分以内の短時間曝露で検出可能である。また、物質ごとによって感度に差はあるものの、魚の半数致死濃度や、MICROTOX<sup>®</sup> のバイオアッセイ手法と比較し、高感度に有害化学物質を検出できると言える。

表-2 毒物センサの検出感度と他のバイオアッセイとの比較 単位 :  $\text{mg} \cdot l^{-1}$

化学物質	環境基準	排水基準	毒物センサ 10% 出力低下時	魚半数致死濃度	MICRO TOX <sup>®</sup>
シアン	検出されないこと	1	0.05*****	0.48~0.78*	8.5
トリクロロエチレン	0.03	0.3	9	45**	960
テトラクロロエチレン	0.01	0.1	6	13**	90
四塩化炭素	0.002	0.02	20		
1,1,2 トリクロロエタン	0.006	0.06	10		110
1,2 ジクロロエタン	0.004	0.04	60	430**	700
1,1 ジクロロエチレン	0.02	0.2	30	74**	
シス 1,2 ジクロロエチレン	0.04	0.4	15	140**	
ジクロロメタン	0.02	0.2	30		
ベンゼン	0.01	0.1	60	46***	
チウラム	0.006	0.06	0.3	10*	
シマジン	0.003	0.03	0.6		
チオベンカルブ	0.02	0.2	80	1.6*	
1,3 ジクロロプロベン	0.002	0.02	4		
フェノール		1****	0.7	24.7*	18
1,1,1 トリクロロエタン	1	3	16	72**	

\*鰐 48hr 値 \*\*ブルーギル 96hr 値 \*\*\*金魚 24hr 値 \*\*\*\*フェノール類として \*\*\*\*\*シアン化カリウムとして曝露

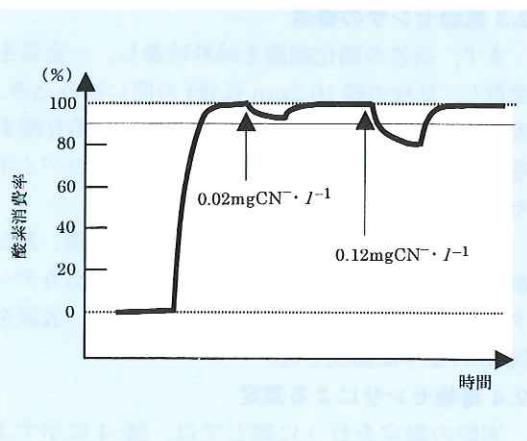


図-5 シアンに対する毒物センサの応答

### 3. 実験結果

#### 3.1 除濁装置の評価

本実験装置では、河川水中の濁質除去のため、中空糸膜 ( $0.2\mu\text{m}$  孔径) を用いた除濁装置を採用した。透過流量は、センサへの検水確保のために  $\text{m}^3 \cdot (\text{m}^2)^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  に設定した。図-6 に中空糸膜の閉塞の指標となる、吸引圧の経時変化を示す。ここでは、1997 年 4 月から 11 ヶ月間、1998 年 4 月から 10 ヶ月間行った実験の結果を示している。なお、実験期間中は、一定間隔で中空糸膜内部より空気を放出し逆洗を行った。実験開始後 300 日

以上経過しても中空糸膜の閉塞は認められず、使用限界である 70kPa 以下で安定して採水できることがわかった。

### 3.2 センサの安定性

#### ①出力の確認

実証実験期間中は、1 日に 1 回の頻度で、校正を行った。図-7 に校正時のセンサ出力の経時変化を示す。図中の S1～S3 はスパン校正、Z1～Z3 はゼロ校正時の出力の変化を示す。実証実験は、1 回当たり約 2 ヶ月の期間行い、再現現性を確認するために 3 回行った。3 回の実験とも、実験開始時に微生物膜を装着し、その後交換は行わなかった。また、約 3 週間に 1 回程度の頻度でフローセルの洗浄を行ったが、微生物膜表面に無機塩が付着し、それに起因すると思われるゼロ校正時出力の低下も見られたため、同様の頻度にて、微生物膜の交換も行うことが望ましいと考えられる。

なお、毒物モニタは、水質研究室が開発した BOD モニタ<sup>4)</sup>と比較した場合、流路内の細菌の繁殖が少なくセンサ出力が安定しているという特長を持つことがわかった。その理由としては、1) 檜水を 0.2 μm 孔径の膜にてろ過しているため、センサ内の流路に雑菌が進入しにくい。2) BOD センサと比較して、酸素消費速度が大きく、出力が大きい。3) BOD センサでは、対象水中の BOD 濃度に応じた酸素消費速度を測定する方式であるため、長期間、希薄な濃度の対象水を通水すると、栄養の欠乏が生じるが、毒物センサでは、校正時以外は、連続的にフィード液が供給されている方式であるため、微生物の状態が安定している。などが考えられる。

#### ②毒物に対する感度

3 回の実験期間中、定期的にアセトンを擬似毒物として感度の確認を行った。その結果を図-8 に示す。図中のセンサ出力低下率は、0.3% アセトン溶液を検水として 15 分間通水した際のセンサ出力低下値を、校正時のスパン幅に対する百分率で表したものである。なお、0.3% アセトン溶液の呼吸阻害率は、シアン 0.05 mg · l<sup>-1</sup> の呼吸阻害率とほぼ同等である。3 回の実験期間中では、それぞれ、出力低下率の絶対値に差は見られたが、実験開始後 40 日目程度までは、常にセンサ出力低下率は 10% (水質異常の判定基準) 以上であり、検出

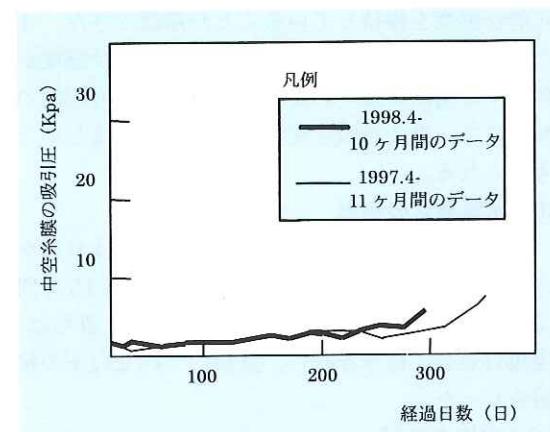


図-6 中空糸膜の微細孔の目詰まりの指標となる吸引圧の経時変化 (使用限界吸引圧は、70kPa)

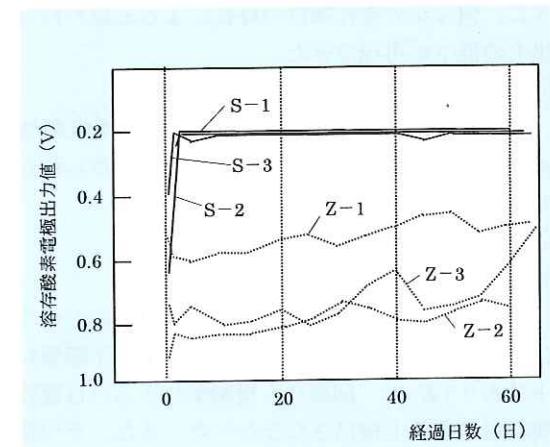


図-7 毒物センサ出力の経時変化  
\* S : スパン校正時出力 Z : ゼロ校正時出力  
添字 1~3 は、1 回目 : 1997.9-2 回目 : 1998.4- 3 回目 : 1998.7- の実験データを意味する

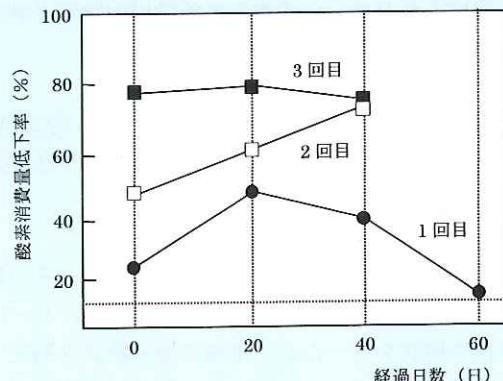


図-8 0.3% アセトン溶液に対する感度の経時変化

可能な感度を維持していることが確認できた。また、さらに実験期間を延長すると、センサ感度が低下する傾向が見られたため、40日に1回程度の頻度にて、微生物膜を交換することが望ましいと考えられる。

### 3.3 水質異常の検出

実験期間中の1997年4月2日～4月24日にかけて、毒物モニタの出力低下(検出開始後15分間で約30%低下)が認められた。そのため、直ちに、現場付近にて採水を行い、試料について以下の検討を行った。

#### ①再現性の確認

並行して、実験室にて運転を行っていた同一の毒物センサに試料を通水した結果、図-9に示すように、何らかの毒性物質の存在によると思われる出力の低下が再現できた。

#### ②生物毒性試験

MICROTOX<sup>®</sup> 及び混合系硝化細菌呼吸阻害試験<sup>5)</sup>を行ったが、いずれも毒性は認められなかった。

#### ③水質分析

##### 1)GC-MS および HPLC による分析

規制項目あるいは要監視項目の VOC については、数種が検出されたが、いずれも定量下限値以下であり(表-3)、同様に、規制項目あるいは要監視項目の農薬も検出されなかった。また、その他にいくつかのピークが検出されたが、物質を同定するには至らなかった。

##### 2)ICP-MS による分析

試料水中の元素を定性的に把握するために、ICP/MS による分析を行った結果、Cr、Ag などが検出されたが、いずれも単独で原因物質と判定できる濃度ではなかった。

##### 3)簡易水質試験

現場での簡易水質試験(ハックテスト)では Ag が検出されたが、単独で原因物質と判定できる濃度ではなかった。

#### ④水質異常の検出についてのまとめ

実証実験期間中に、水質異常を検出し、その際に、現場付近にて採水を行い、当試料について、各種の検討を行ったが、単独の原因物質を特定するには至らなかった。従って、今回検出された水質異常は、複数の有害物質による複合的な効果に起因する可能性が考えられる。

逆に言えば、それぞれの化学物質を分析によって求める方法だけでは毒物の検出が困難な場合にでも、毒物センサは、水質異常の判定を容易にでき、極めて有効な水質モニタリング手段となりうることが示唆される。

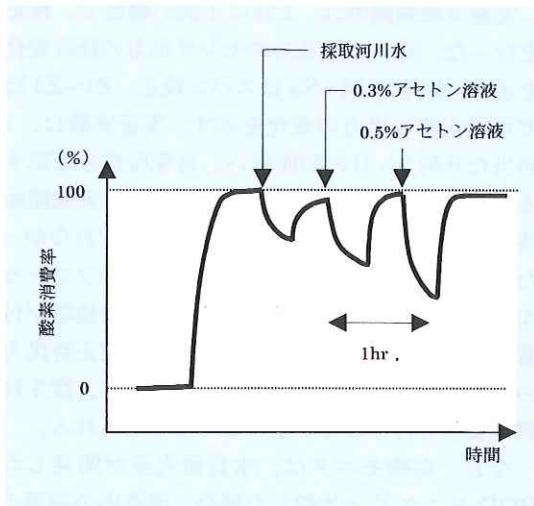


図-9 実験室における再現実験結果

表-3 水質異常検出時のサンプルの VOC の測定結果

物質名	濃度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )
1,1-ジクロロエチレン	nd
ジクロロメタン	0
トランス-1,2-ジクロロエチレン	nd
シス-1,2-ジクロロエチレン	0.3
クロロホルム	0.5
1,1,1-トリクロロエタン	0.2
テトラクロロメタン	0.2
ベンゼン	nd
1,2-ジクロロエタン	nd
トリクロロエチレン	0.2
1,2-ジクロロプロパン	nd
ブロモジクロロメタン	0.2
シス-1,3-ジクロロプロペン	nd
トルエン	0
トランス-1,3-ジクロロプロペン	0.1
1,1,2-トイクロロエタン	0.3
テトラクロロエチレン	0.7
ジブロモクロロメタン	0
m,p-キシレン	0.1
o-キシレン	0.2
ブロモホルム	0.2
p-ジクロロベンゼン	0.1

定量下限値  $1\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

#### 4. 下水道への適用の展望

下水道への有害物質の排出、水質事故は潜在的に発生しており、事故発生時には、下水処理施設で処理工程の重要な部分を生物処理に著しく支障が生じる<sup>6)</sup>。そのため、下水道への有害物質の流入をできる限り早い段階で検知し、有害物質を含む水が下水処理施設へ流下し到達する時刻を予想し、生物反応槽への流入を回避する方策を講じるシステムを確立することが必要であると考えられる。今回開発した毒物モニタのセンサ部分は、硝化細菌を使用しているが、その硝化細菌は下水処理場における生物処理の際に利用される活性汚泥中に普遍的に存在し、窒素除去に不可欠な存在である。硝化細菌の活性をモニタリングすることは、生物処理への影響を評価することと同義であるといえる。下水道施設への毒物モニタの適用(図-10)に当たっては、現状の河川水質監視仕様のセンサ部分の大きな変更は必要なく、周辺装置の下水処理場流入水仕様への変更によって、上記のようなニーズに対応することが可能であると考えられる。なお、本検討で使用した、河川水質監視用の毒物モニタを、現状の仕様のままで流入下水に適用した検討では、除濁装置の部分に問題が生じることがわかっているため、まず、最優先課題として除濁装置の改良検討を行っていきたいと考えている。

#### 5. まとめ

硝化細菌バイオセンサを用いた毒物モニタを河川水質事故の連続監視に適用するための実証実験を行い、長期間安定して作動することが確認できた。実際の水質異常に際しては、化学分析にて個々の化学物質を同定、定量するよりも簡便かつ迅速

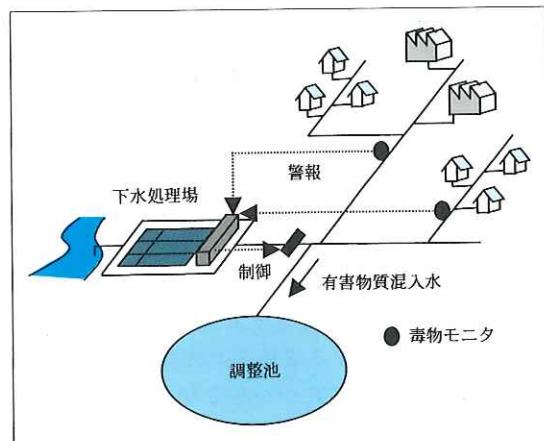


図-10 下水道への適用のイメージ図

に毒性物質を検出することが可能であった。また、毒物モニタは、実施した他の生物毒性試験と比較して高感度であり、多くの有害物質の複合的作用による毒性のモニタリングに有効であることを確認できた。今後は、毒物モニタの感度の向上を図るとともに、下水道施設における流入水質監視システム等への応用を検討する予定である。

#### 参考文献

- 森田、石黒編：新しい水質基準とその分析法環境科学研究会 16-61,(1993)
- Nakamura ,E., Tanaka, H., : Toxicity monitoring by biosensor, proceedings of the 12th US/Japan conference on Sewage treatment technology, UAEPA,(1989)
- H.Tanaka et al., : Proceedings of WEFTEC'98, Water Environmental Federation,71(4)165-180,(1998)
- H.Tanaka et al., :Water Science & Technology,30(4)215-227,(1994)
- H.Tanaka et al., : Proceedings of 6th WEF/JSWA Joint Tech. Seminar on Sewage Treatment Tech.,15-35,(1995)
- 田中、小森、南山：化学物質が下水処理に与える影響、下水道協会誌、34(410)11-16,(1997)

岡安祐司\*



建設省土木研究所  
下水道部水質研究室  
研究员  
Yuji OKAYASU

磯部健介\*\*



同 水質研究室交流  
研究员  
Kensuke ISOBE

豊田忠宏\*\*\*



(前 同 水質研究室  
研究员)  
現 同 水質研究室  
研究员  
Tadahiro TOYODA

南山瑞彦\*\*\*\*



(前 同 水質研究室  
主任研究员)  
現 環境庁企画調整  
局環境計画課長補佐  
Mizuhiko MINAMIYAMA

田中宏明\*\*\*\*\*



同 水質研究室  
Hiroaki TANAKA