54. リン化合物

54.1 概要

リンは原子番号15、原子量30.97の元素で、地殻中に広く存在し、その存在量は0.105%である¹⁾。また、炭素や窒素などとともに生物体の主要構成元素として重要なものである。自然界におけるリンは、地殻を構成する岩石や土壌を出発点として雨水や流水中に溶解又は懸濁し、河川水中に移動するが、その大半は沈降して底泥となり水中にとどまるのは一部にすぎない。

水中のリン化合物は無機態と有機態、溶解性と粒子性に区別され、無機態リンはさらに オルトリン酸塩(orthophosphate)と重合リン酸塩(polyphosphate)に分けられる(図 54-1-1参照)。

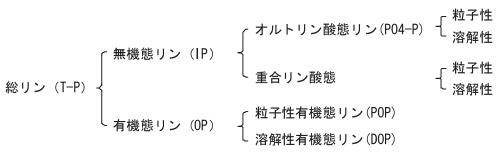


図54-1-1 水中におけるリンの形態

54.1.1 総リン (total phosphorus: T-P)

全リンともいう。

水中の全てのリン化合物を、強酸あるいは酸化剤によってオルトリン酸態リンに分解 して定量したものである。

各種のリン化合物を全て分別して測定することはほとんど不可能なので、通常の水質 分析では主に、無機態リンとしてオルトリン酸態リンが、有機態リンも含めたリンの総 量として総リンが測定される。

54.1.2 オルトリン酸態リン (PO₄-P)

正リン酸あるいは単にリン酸ともいう。

(オルト)リン酸イオン(orthophosphoric ion: PO_4^{3-})として存在するリンで、pHが低くなるにしたがい HPO_4^{2-} 、 $H_2PO_4^{-}$ 、 H_3PO_4 等の形にもなる。水中の無機態リンの大部分はこの形で存在しており、また重合リン酸や有機態リンも、生物的あるいは化学的に次第に分解されて、最終的に PO_4 -Pになる。

溶解性のものは、栄養塩として藻類に吸収利用されるため富栄養化現象の直接的な原因物質となる。

粒子性のものは、カルシウム、鉄、アルミニウム等の金属とリン酸イオンが結合した

不溶性の塩で、藻類に利用されることなく沈殿していくが、ある程度富栄養化が進んで 底層水が嫌気化すると溶出してきて、富栄養化を促進する。

広い意味では、重合リン酸もリン酸のうちであるが、単にリン酸という場合はオルトリン酸をさすのが普通である。

54.1.3 重合リン酸(酸加水分解性リン)

薄い酸を加えて煮沸することによってオルトリン酸に分解されるもので、メタリン酸 $[(PO_3^-) n]$ 、ピロリン酸 $[P_2O_3^{4-}]$ 、トリポリリン酸 $[P_3O_{10}^{5-}]$ 等がある。

これらは、自然水中に存在しないが、合成洗剤や下水処理剤、工場排水等に由来して含まれることがある。

重合リン酸は、特に汚濁した水域以外では少ないので、オルトリン酸態リンだけを測定して無機態リンとみなす場合がある。

54.1.4 有機態リン (organic phosphorus: Org-P又はO-P)

有機態リンは、総リンと無機態リンの差として定量される。

溶解性のものには、有機リン系農薬類の他に、工場排水及び動植物の死骸や排せつ物等に起因する様々な含リン有機化合物(エステル類、リン脂質等)がある。

粒子性有機態リン (POP) は、藻類をはじめとする水中の微生物体やその死骸の成分として存在するものが主体なので、藻類の発生状況の指標として用いられることがある。湖沼などの閉鎖性水域においては、流域の開発が進み人口が集中すると、リンの負荷量が増大して水域におけるリンの流入と流出のバランスが崩れ、富栄養化現象が起こる。水中のリンの起源は、自然的には岩石や土壌からの溶出や動植物の死骸又は排せつ物中の有機態リンであるが、通常の水域ではそれらの寄与はごくわずかなものである。人為的負荷源としては、乱開発によって流出した土壌、森林や農地に過剰散布された肥料や農薬、家庭排水やし尿、工場排水、畜産排水等がある。通常排水処理(いわゆる二次処理まで)ではリンはほとんど除去されないので、し尿処理場や下水処理場からの放流水も大きな負荷源となる。最近では、凝集沈殿等の高度処理や特殊な生物処理を導入してリンも高率に除去している処理場が増えているが、100%除去することは不可能であり、リンはもともと自然水中にはごくわずか(1~100ppbのオーダー)しか含まれておらず、わずかな濃度の変動が藻類の消長を左右するため、そのような高度処理をしてもなお大きな負荷源となる。

家庭排水については、かつては合成洗剤中にビルダー(水の硬度を下げて泡立ちを良くするための助剤)として含まれているリン(主にトリポリリン酸塩)が一定の負荷を占めていたが、現在では一般の家庭用洗剤はほぼ100%無リン製品になっており、負荷量の削減が図られている^{2)、3)}。

湖沼の富栄養化については、水生生物の増加を制限する因子として窒素とリンが重要 視されており、昭和57年に湖 沼における両項目の環境基準が5類型に分けて設定され、 リンは総リンとして0.005~0.1mg/Lと定められた。さらに、昭和60年に富栄養化しやすい湖沼及びこれに流入する公共用水域について排水基準が16mg/L(日間平均8 mg/L)に設定された。閉鎖性海域においても、湖沼同様に富栄養化が問題になり、平成5年に海域における環境基準が設定された。

「今後の河川水質管理の指標について(案)」(国土交通省河川局 河川環境課、平成17年3月)⁴⁾では、水質管理指標項目ではないが、水質管理指標項目に関連する着目すべき項目とされている。

54.2 総リン

54.2.1 概要

リンは岩石中などには種々のリン酸塩化合物(200種以上が知られている)として、 生物中には有機リン化合物として存在する。総リンを測定するには、各種のリン化合物 を強酸あるいは酸化剤で分解してオルトリン酸態リンとして測定する。JISでは、全り んとされている。

リンはカルシウム代謝と関係が深く、カルシウムとのバランスが問題とされる。リンは生物の必要元素であり、人のリンの許容摂取量は70mg/kg/日である。不足すると骨中のリンが欠乏し、過剰摂取すると体内のカルシウム及び歯の損耗を招く。

総リンは窒素とともに湖沼、ダム湖のプランクトンの生長を左右する要因であり、富栄養と貧栄養の限界値は総リン0.02mg/Lとされている50。「水質汚濁防止法に係わる環境基準について」(昭和46年環境庁告示第59号)に「全リン」として定められているが、これは総リンと同じである。

「今後の河川水質管理の指標について(案)」(国土交通省河川局 河川環境課、平成17年3月)⁴⁾では、総リンは水質管理指標項目ではないが、「人と河川の豊かなふれあいの確保」の快適性、「豊かな生態系の確保」の生物の生息、「下流域や滞留水域に影響の少ない水質の確保」に関して着目すべき項目(今後データの蓄積を行い、河川水質管理の指標項目として維持すべきか、あるいは他の項目で代替すべきかを判断するために調査を行う項目)としてあげられている。

湖沼、海域における環境基準の達成状況の評価や閉鎖性水域における富栄養化に関連する水質管理、対策の検討、さらに適切な河川水質管理を推進していくために、総リンの水質測定が必要である。

54.2.2 基準等

総リンの基準等を表54-2-1に示す。他の各種基準等は資料編を参照されたい。

表54-2-1 総リンに関する基準等

基準名	基準値(mg/L)				測定方法	法令等		
	類型 水域	I	II	Ш	IV	V		
生活環境の保全に関する環境基準	湖沼	0.1以下	0.2以下	0.4以下	0.6以下	1.0以下		昭和46. 12. 28環境庁告示第59号
	海域	0. 2以下	0. 3以下	0.6以下	1.0以下		JIS K0102 ⁻¹⁹⁹⁸ 46.3 ペルオキソに硫酸カリウム分解法、硝酸-過塩素酸分解法、硝酸-硫酸分解法	
水質汚濁防止法に基づく排水基準 (リン含有量)	I	120mg/L(目平均60mg/L)						昭和46. 6. 21総理府令第35号

54.2.3 試験方法

総リンの試験方法を表54-2-2に示す。

表54-2-2 総リンの試験方法一覧

	試験方法の名称	定量範囲 (mg/L)	精度 (CV%)	必要検水量 (mL)	出 典
試験法1	ぺルオキソ二硫酸カリウム分解-吸光 光度法	0.025~0.5	2~10	50	JIS K 0102 ⁻²⁰⁰⁸ 46.3.1
試験法2	硝酸-硫酸分解法-吸光光度法	$0.002\sim 0.05^*$	2~10	50~500	JIS K 0102 ⁻²⁰⁰⁸ 46.3.3
試験法3	自動分析法	0.00067~		50	Standard Methods 4500-PG

^{*} 検水量500mLとし、オルトリン酸態リンの定量に54.2.4.1.1の方法を用いた場合

ペルオキソ二硫酸カリウム分解法は、一般の河川水中のリンは十分に分解され、分析時間もかなり短縮できる特徴があり、試験法1とする。硝酸·硫酸分解法は検水量を多くして感度を上げることができ、試験法1に比べて分解力も大きいことが特徴であり、試験法2とする。また、試験法1の原理を応用した自動分析方法を、試験法3とする。

54.2.4 試験方法の概要と選定の考え方

54.2.4.1 試験方法の概要

(1) ペルオキソニ硫酸カリウム分解-吸光光度法

検水中にペルオキソ二硫酸カリウムを加え加熱すると、ペルオキソ二硫酸カリウム は酸素を発生し、検水中のリン化合物をリン酸イオンに分解する。このリン酸イオン を定量し、検水中のリン濃度を算出する。

$$S_2O_8^2 + H_2O \rightarrow 2SO_4^2 + \frac{1}{2}O_2 + 2H^4$$

(2) 硝酸·硫酸分解-吸光光度法

試料に強酸を加え、乾固近くまで加熱蒸発させて有機物、懸濁物などを分解し、すべての形態のリンをリン酸イオンに変える。このリン酸イオンを定量して総リンを求める。

この方法は多量の有機物を含む試料及び分解しにくい有機リン化合物を含む試料に適用する。

(3) 自動分析法

試料に硫酸および過硫酸カリウムを加え加熱した後、紫外線を照射して有機物、懸濁物などを分解し、すべての形態のリンをリン酸イオンに変える。このリン酸イオンを吸光光度法により定量して総リンを求める。この操作を自動分析装置(オートアナライザー)を用いて、自動で行うものである。

54.2.4.2 試験方法の選定の考え方

一般の河川水の場合には、試験法1又は試験法2のいずれを用いてもよい。難分解性 又は多量の有機物を含む試料の場合には試験法2を用いる。分解後のオルトリン酸態リ ンの定量にモリブデン青(アスコルビン酸還元)吸光光度法を用いる。多数の試料を自 動で測定する場合には、試験法3を用いる。

54.2.4.3 試験上の注意事項等

- ・試料は、精製水で洗浄したガラス瓶に採取する。
- ・リンは生化学的な変化等により、有機態-無機態、粒子性-溶解性の状態が変化する場合があるので、試料を冷暗所に保存し、採水後出来る限り速やかに試験することが望ましいが、塩酸または硫酸で、pH2以下で7日間は保存が可能である。

54.2.5 その他

54.2.5.1 生活環境の保全に関する環境基準6)

リンの生活環境の保全に関する環境基準として、湖沼、海域を対象に利用目的毎に類型が区分され、基準値が設定されている。総窒素の項(53.2.5)で、総リンについても、湖沼について基準設定の背景と設定の考え方をまとめているので、参照されたい。

54.2.5.2 水質汚濁防止法に基づく排水基準6)

窒素、リンの排水基準は一般の家庭下水を簡易な沈殿法により処理した後に含まれる窒素及びリンの濃度を基準として設定されている。リンの排水基準は16mg/L(日間平均8mg/L)であり、日間平均値は1日の操作時間のうち操業開始直後と操業終了直前の排水が排水されている時点を含め、3回以上測定した結果の平均値として取り扱うこととされている。この一般排水基準は、一日当たりの平均的な排出水の量が50m³以上である特定事業場を対象としている。

54.2.5.3 水産用水基準7)

水産用水基準も湖沼と海域の基準が設定されているが、湖沼について以下に示す。 窒素・リンの水産用水基準を検討するにあたっては、以下の条件を考慮して検討されている。

- ・対象となる漁業生物の種類を考慮する。
- ・漁業生産を期待する生物について、原則として自然の再生産が行われる条件で考える。
- ・漁場条件としては当然のことながら、貧酸素化による魚介類のへい死が起こるのは好ましくなく、また生物生産層は適度な水深が保されることが望まれる。

上記の諸条件を考慮したうえで、全国湖沼の漁獲量と総リン濃度の分析を行い、基準 値が設定された。

水産1種サケ科、アユ科0.01mg/L水産2種ワカサギ科0.05mg/L水産3種コイ、フナ科0.10mg/L

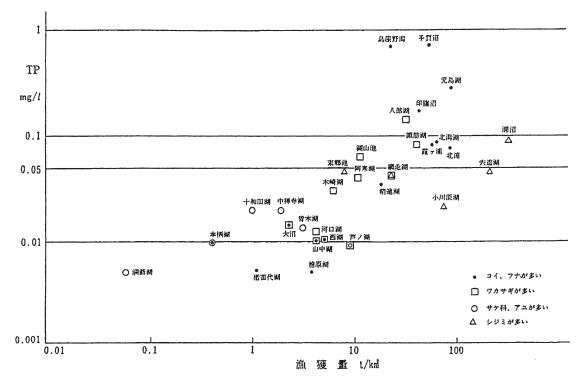


図54-2-1 湖沼の総リンと漁獲量 (昭和55年度)

54.3 オルトリン酸態リン

54.3.1 概要

オルトリン酸態リンは、オルトリン酸イオン(PO_4^{3-} 、単にリン酸イオンとも呼ばれる)の形態で存在するリンのことをいう。純粋なオルトリン酸(H_3PO_4)は、無色の固体で分子量98.00、融点42.35℃、比重1.834の物質である。自然水中のオルトリン酸態リンは、土壌、岩石からの溶出や生物体の分解によって生じる他、農用地からのリン酸アンモニウム肥料の流出、家庭排水(洗剤に含まれるものは減少したが食品添加物などに多く使用されている)、工場排水の流入が考えられる。

54.3.2 基準等

オルトリン酸態リンに係わる基準等は設定されていない。

54.3.3 試験法

オルトリン酸態リンの試験法を表54-3-1に示す。

	試験方法の名称	定量範囲 (mg/L)	精度 (CV%)	必要検水量 (mL)	出典
試験法1	モリブデン青 (アスコルビン酸還元) 吸光光度法	0.03~1.0*	2~1.0	25	JIS K 0102 ⁻²⁰⁰⁸ 46.1.1
試験法2	イオンクロマトク゛ラフ法	0.5~	~10	100	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ VI-2.8.3
試験法3	自動分析法	0.00067~		50	Standard Methods 1995 4500-PG

表54-3-1 オルトリン酸態リンの試験方法一覧

分析方法としては吸光光度法が一般的であるが、この方法によればリン酸イオンの状態で存在するリンを定量することになる。吸光光度法にも各種の発色方法があるが、ここでは広く用いられているモリブデン青法を採用する。この方法はリン酸イオンにモリブデン酸を作用させて錯化合物を生成させ、それに適当な還元剤を作用させて生成する青色化合物の濃度によりオルトリン酸を測定する。還元剤としてアスコルビン酸を用いる方法は、JIS K 0102(工場排水試験方法)に採用されており、発色試薬の添加が1回で済むこと、感潮域の試料にも適用できることなどの利点があり、一般に広く用いられているため試験法1とする。イオンクロマトグラフ法は、検水量が少量でよいこと、他の項目と同時に測定できる利点から試験法2に採用する。また、試験法1と同じ原理を利用した自動分析法を試験法3に採用する。

^{*}基準値0.005mg/Lまで測定する場合は、50mmmセルを用いるか,資料の量と発色試薬の量を増加してモリブデン青を発色させ,2.6-ジメチルーヘプタン(ジイソブチルウトン(DIBK)) 又は、1-プタノールで抽出して定量する。

54.3.4 試験方法の概要と選定の考え方

54.3.4.1 試験方法の概要

(1) モリブデン青 (アスコルビン酸還元) 吸光光度法

七モリブデン酸六アンモニウムと酒石酸アンチモニルカリウム(タルトラトアンチモン(Ⅲ)酸カリウム)は、酸性溶液中でリン酸イオンと反応し、アンチモン-リンモリブデン酸のヘテロポリ化合物を生成する。これをL(+)-アスコルビン酸で還元して生成したモリブデン青の吸光度を測定してリンを定量する。

(2) イオンクロマトグラフ法

イオンクロマトグラフを用いて試料中のオルトリン酸態リンを定量する。また、硝酸態窒素、硫酸イオンなど他の陰イオン類との同時定量が可能である。

本法は、イオン交換体を用いた一種の高速液体クロマトグラフ(HPLC)法である。 試料溶液を競合陰イオンを含む溶離液に注入し、イオン交換樹脂を充填したカラムを 通過させ、カラムに対する親和性の相違によって分離し、電気伝導度を検出器として 定量分析する方法である。電気伝導度に替えて紫外線吸収検出器により波長210nm付 近の吸光度を測定することにより、選択的に低濃度の試料を定量することができる。

(3) 自動分析法

試験法1 (54.3.4.1(1)) を自動分析装置 (オートアナライザー) に用いることにより、自動化したものである。

54.3.4.2 試験方法の選定の考え方

一般の河川水の場合や海域、感潮河川水などの塩分の多い試料の場合には試験法1を用いる。検水量が少量の試料の場合や短時間に数種類の陰イオン項目を同時に測定する場合には試験法2を用いる。ただし、試験法2は定量下限値が高いので注意を要する。 多数の試料を自動で測定する場合には、試験法3を用いる。

54.3.4.3 試験上の注意事項等

- ・試料は、精製水で洗浄したガラス瓶に採取し、速やかに試験する。
- ・リンは生化学的な変化等により、有機態 無機態、粒子性 溶解性の状態が変化する場合があるので、冷暗所に保存し、できるだけ速やかに試験を行う。

54.3.5 その他

オルトリン酸態リンについては水質環境基準等は設定されておらず、総リンについて 各種基準値が設定されているので、総リンを参照願いたい。

参考文献

- 1) 国立天文台:理科年表, 丸善, 1994.
- 2) 今井清: 「琵琶湖の富栄養化の防止に関する条例」の解説、公害と対策、15,12,1979.
- 3) 滋賀県琵琶湖の富栄養化防止に関する条例、公害と対策、16,1,1980.
- 4) 国土交通省河川局河川環境課: 「今後の河川水質管理の指標について (案)」, 2005.
- 5) 日本水道協会:上水試験方法 解説編, 2001.
- 6) (社)日本水環境学会:日本の水環境行政.
- 7) \ \ 日本水產資源保護協会:水產用水基準(2005年版)2006.

55.1 概要

TOCは、Total Organic Carbonの略で、水中に含まれるすべての有機態炭素を濃度表示したもの(全有機態炭素または総有機態炭素)であり、河川、湖沼、海域における有機汚濁の程度を表す一つの指標となっている。水中に含まれる炭素には、溶存状態の炭酸ガスをはじめとする炭酸塩、炭酸水素塩等の無機態炭素及び有機態炭素がある。水中の有機態炭素は、溶存状態のガス、溶解状態、浮遊状態(粒子性有機態炭素)で存在している。1960年にHallとStengerらによりTOC分析装置が開発され、水中の有機態炭素の測定が可能となった。TOC分析装置は、ほとんどの有機物をほぼ完全に酸化することから全有機態炭素を測定できる。これに対して有機汚濁の指標であるBODは、微生物酸化を利用するために各種有機物に対する酸化率が異なる。同じく有機汚濁の指標であるCODは、過マンガン酸カリウムなどの酸化剤により酸化することから有機物により完全に酸化できないものもあり、さらに水中の還元性無機イオンの影響を受ける。

このようにBOD、CODが酸素消費量による有機汚濁の指標であるのに対し、TOCは有機物量そのものを示す有機汚濁の指標として測定されるようになってきている。



図55-1 水中の炭素の形態別区分

55.2 基準等

TOCの基準等を表55-1に示す。

表55-1 基準値等

基 準 名	基準値	測定方法	法令等
水道法に基づく水質基準		平成15.7.22厚労告261別表30 全有機 炭素計測定法	平成15.5.30厚生労働省令第101号

55.3 試験方法

TOCの試験方法を表55-2に示す。

表55-2 TOCの試験方法の一覧

	試験方法の名称	定量範囲 (mg/L)	精度 (CV%)	必要検水量 (mL)	出 典
試験法1	燃焼酸化-赤外線分析法	0.5~25	3~10	10	JIS K 0120 ⁻²⁰⁰⁸ 22
試験法2	燃焼酸化-赤外線自動分析法	0.05~150	3~10	10	JIS K 0120 ⁻²⁰⁰⁸ 22

表55-2に示すようにTOCの試験方法には、燃焼酸化-赤外線分析法(TCとICを別々に測定し、両者の差からTOCを求める)と、燃焼酸化-赤外線自動分析法(あらかじめICを除去した後、直接TOCを測定)、アンプル湿式酸化法及び、湿式紫外線酸化+ガス透過膜式伝導率測定法等がある。

55.4 試験方法の概要と選定の考え方

55.4.1 試験方法の概要

55.4.1.1 燃燒酸化-赤外線分析法

検水を一定濃度の酸素または空気(キャリヤーガス)とともに触媒存在下で酸化燃焼させ、生成する二酸化炭素の濃度を非分散型赤外線ガス分析計で測定し、検水中の総炭素(TC)を求める。次に、150℃の低温燃焼条件で無機態炭素(IC)のみを熱分解し、二酸化炭素として測定する。これらの測定結果よりTC-IC=TOCとしてTOCを算出する。図55-1にTCとICを同時に測定する機種のフローシートの例を示す。酸化触媒としては、TC炉用に粒状四三酸化コバルトCo304、IC炉用としてリン酸(85v/v%)に浸した石英チップ等が用いられている。

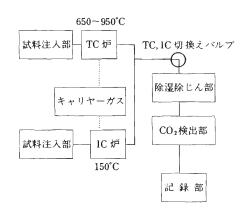


図55-2 TC、IC同時分析法のフローシート

55.4.1.2 燃燒酸化-赤外線自動分析法

水中のTOC濃度を連続的に測定するためのもので、供給した試料に酸を加えてpHを 2以下にし、通気して無機態炭素を除去した後、その一定量をキャリヤーガスとともに 高温の全炭素測定管に送り込み、有機物中の炭素を二酸化炭素とし、その濃度を非分散 型赤外線ガス分析計で測定して、総有機態炭素(TOC)の濃度を求める。

55.4.1.3 アンプル湿式酸化法

検水をアンプルに入れ、酸性化で高純度酸素を通して無機態酸素を除去した後、オートクレーブ中で二硫化カリウムにより有機態炭素を酸化する。生成した二酸化炭素を非 分散型赤外分光計で測定する。

55.4.1.4 湿式紫外線酸化+ガス透過膜式伝導率測定法

水中のTOC濃度を主として連続的に測定するためのもので、検水をリン酸で酸性にして酸化剤を加えた後、無機態炭素(IC)は、直接ガス透過膜式導電率計で計測し、全炭素(TC)は、紫外線リアクターを通過させて、有機物を酸化して CO_2 とした後にガス透過膜式伝導率計で測定する。TOCはTC、ICの差分として計算される。

55.4.2 試験方法の選定の考え方

TOCの測定方法で燃焼酸化-赤外線分析法は、最も普及している方法で、通常の河川水に問題なく適用できる。

燃焼酸化-赤外線自動分析法は連続測定が可能で、排水等の常時監視にも適するが、IC除去の際に低沸点の有機物が失われるため誤差が大きくなるおそれがある。

アンプル湿式酸化法は浮遊物や塩分の多い試料でも精度よく測定できるが、操作は複雑で長時間を要する。

湿式紫外線酸化+ガス透過膜式伝導率測定法は、導電性の高いサンプルに対しても妨害されることがない測定方法であり、低濃度域での適応性が高いといわれており今後の利用が期待される。

一般河川水等の試料に対しては、燃焼酸化-赤外線分析法が適している。ただし、浮遊物質が多く認められる場合、この方法は、事前に超音波破砕機等によって懸濁物質を十分に破砕、分散させておく必要がある。このような浮遊物質が多い試料や感潮域のように塩分が多い試料には、アンプル湿式酸化法が有効である。

JIS K 0805⁻¹⁹⁸⁸ 〔総有機態炭素(TOC)自動計測器〕には、高温燃焼式の他に湿式酸化反応を用いたものがあげられており、TOC計も超純水の測定用等のペルオキソニ硫酸カリウム添加紫外線分解による機種が市販されている。表55-3に各種有機化合物の燃焼方式と湿式分解方式の測定結果¹⁾を、表55-4に天然水による比較試験結果¹⁾を示す。

表55-3 各種有機化合物の燃焼方式と湿式分解方式の比較試験結果1)

有 機 物 質 名	示 性 式	燃焼酸化方式	(TOC mg/L)	湿式分解方式	大(TOC mg/L)	分解率	比(%)
メタノール	CH ₄ O	1.8	3.7	1.71	3.42	95.0	92.4
エタノール	C ₂ H ₆ O	1.7	3.5	1.62	3.28	95.3	93.7
2-プロパノール	C ₃ H ₈ O	1.9	3.8	1.82	3.68	95.8	96.8
クエン酸三ナトリウム	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	2.0	4.0	2.02	3.98	101	99.5
安息香酸	C7H6O2	2.2	4.0	2.03	3.98	92.3	99.5
フタル酸水素カリウム	C ₈ H ₅ O ₄ K	2.0	4.0	2.00	3.99	100	99.8
アセトン	C ₃ H ₆ O	1.9	3.9	1.96	3.83	103	98.2
l-グルタミン酸ナトリウム	C ₅ H ₈ O ₄ NNa	2.0	4.0	1.99	3.98	99.5	99.5
4-アミノベンゼンスルホン酸	C ₆ H ₇ O ₃ NS	2.0	4.1	1.98	3.98	99.0	97.1
p(+)-グルコース	C ₆ H ₁₂ O ₆	1.8	3.8	1.76	3.80	97.8	100
8-キノリノール	C ₉ H ₇ ON	2.0	4.1	2.00	4.02	100	98.0
4-アミノアンチピリン	C ₁₁ H ₁₃ ON ₃	1.9	4.0	2.00	3.96	105	99.0
2,4,6-トリ(2-ピリジル)・1,3,5-	C ₁₈ H ₁₂ N ₆	1.9	3.8	1.61	3.34	84.7	87.9
トリアジン							
1,10-フェナントロリン一水和物	C ₁₂ H ₈ N ₂ · H ₂ O	2.0	4.0	1.92	3.83	96.0	95.8
メチレンブルー	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ CIS	1.8	3.5	1.76	3.52	97.8	101
メチルオレンジ	C ₁₄ H ₁₄ O ₃ N ₃ SNa	2.3	4.4	2.21	4.00	96.0	90.9
オレンジⅡ	C ₁₆ H ₁₁ O ₄ N ₂ SNa	1.5	2.9	1.47	2.84	98.0	97.9
ドデシル硫酸ナトリウム	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ SNa	2.0	4.0	2.04	3.95	102	98.8
テトラデシル硫酸ナトリウム	C14H29O4SNa	2.1	3.9	2.02	3.88	96.2	99.5
ペプトン	-	2.2	4.3	2.02	4.03	91.8	93.7
フミン酸	_	2.7	4.5	0.75	2.31	27.8	51.3
フルボ酸	_	3.2	5.4	1.71	3.08	53.4	57.0

(注) TOC 値は 3~5 回の平均値.

欄の左段は約2 mg/L,右段は約4 mg/L になるように調製した溶液の結果.

分解率比は,湿式分解方式結果/高温燃焼方式結果×100.

表55-4 天然水による比較試験結果1)

試 料 名	高温燃焼方式(TOC mg/L)	湿式分解方式(TOC mg/L)
鹿児島県川内市の湖沼	5.7	2.9
鹿児島県轟川表流水	1.9	0.65
川内市市内の河川水	1.5	0.23

55.4.3 試験上の注意事項等

55.4.3.1 試料の保存

試料は、精製水で洗浄したガラスビンに採取し、速やかに試験を行うことが望ましい。 速やかに試験ができない場合は、 $0\sim10$ の暗所に保存し24時間以内に試験を行う。

55.4.3.2 前処理

試料によっては、粒子性有機態炭素が含まれている。TOCはこの粒子性有機態炭素も測定するので、粒子性有機態炭素を含む試料は、前処理でホモジナイズ処理を行い、できるだけ細かく破砕して均一に分散させる必要がある。ホモジナイズ処理は、できれば専用のホモジナイザー、ミキサー、超音波破砕機(最大出力200W程度で5分間)を使用する。超音波洗浄機では出力が弱いため、破砕処理は期待できない。オートサンプラー付きのTOC計の場合、試料が破砕処理された後でも、待機中に不溶解物が沈降する傾向にあるので、待機中は試料をマグネチックスターラーか通気処理で攪拌することが望ましい。

55.5 その他

有機物の指標として水道水では、長らく「過マンガン酸カリウム消費量」が採用されてきたが、長年にわたり、その指標性及び測定法に関して種々の問題点が指摘されてきた。このため、平成13年度に行われた水道法の基準見直しに際しては、総有機態炭素(TOC)が有機物の指標として採用された。河川水の有機物の指標には、CODがあり、過マンガン酸カリウム消費量とほぼ同一の試験法である。過マンガン酸カリウム消費量、CODの有機物の指標としての問題点は、次のとおりである。

- ① 有機物の種類によって消費される過マンガンカリウムの消費量が異なる
- ② 過マンガン酸カリウムの濃度、反応時間によって消費される過マンガン酸カリウムの量が異なる
- ③ 有機物以外にも過マンガン酸カリウムを消費するものがある
- ④ 滴定法により測定するため測定精度が低い

同じく河川等で有機物の指標となっているBODも、上記の③、④が上げられ、さらに 測定結果を得るのに5日も要する。このような問題を抱える過マンガン酸カリウム消費量、 COD、BODに対し、TOCは、有機物を構成する炭素の量を示すものであり、TOC計を用 いることにより、迅速で精度の高い測定を行うことができる。

このように、過マンガン酸カリウム消費量、COD、BODに比べTOCは有機物の指標性が高いが、依然として公共用水域の指標とされていない。これは、TOCが過マンガン酸カリウム消費量、COD、BODとの間に有意の相関があっても、総有機態炭素に置き換える為の普遍的な関係式を設定することが難しく、過去に蓄積された膨大なデータや今までの規制値との整合性が障害になると考えられているからである。

しかしながら、日本薬局方ではすでに1990年代に有機物指標を総有機態炭素に変更しており、河川の有機物量及び基準値は、TOCで測定され設定されることが望ましい。

参考文献

1) 島津製作所技術試料:OC測定および島津TOC-5000形の性能・機能と応用について.

全般的に次の資料を参考とした。

- 1) JIS K 0102 工場排水試験方法, 2008.
- 2) JIS K 0805 有機体炭素 (TOC) 自動計測器, 1988.
- 3) APHA AWWA WEF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed., 2005.

56. T O D

56.1 概要

TOD(Total Oxygen Demand;全酸素要求量)とは、「化合物中の元素を、それらの最も安定な酸化物にするために必要な酸素量」の意味であり、具体的には、試料を燃焼させたときに消費される酸素の量をいう。有機物の構成元素である炭素、水素、窒素、硫黄、リン等は、高温の燃焼管で酸化され安定した酸化物を生成する。有機汚濁を測定する指標の一つであるTOCが有機態炭素濃度を現わすのに対し、TODは、COD、BODと同じく物質の酸化に必要な酸素量を現しており、汚濁物質の酸素消費量を測定する観点から有用な方法といえる。

TOD測定においては、有機化合物が燃焼により酸素を消費する以外に無機化合物も反応する。無機化合物には酸素を消費する物質(アンモニア等)や酸素を放出する物質(硝酸イオン、硫酸イオン等)等の影響があり、これらの扱い方でTODの意味は異なってくる。

56.2 基準等

環境基準値等は定められていない。

56.3 試験方法

TODの試験方法を表56-1に示す。

表56-1 TODの試験方法一覧

	試験方法の名称	定量範囲 (mg/L)	精度 (CV%)	必要検水量 (mL)	出 典
試験法1	高温燃焼法	10~500	3~10	10	JIS K0102 ⁻²⁰⁰⁸ 23

56.4 試験方法の概要と選定の考え方

56.4.1 試験方法の概要

少量の試料を一定量の酸素を含む不活性気体とともに高温の燃焼管に送り込み、有機物等を燃焼させた後、不活性気体中の酸素の濃度を測定し、その減量から全酸素要求量を求める。

一般に、熱分解及び酸化反応に十分な温度は、900℃程度であると考えられている。 この燃焼反応に必要な酸素をキャリヤーガス中に定量的に供給すれば、燃焼反応のため に酸素ガスの一部が消費されてキャリヤーガス中の酸素濃度が低下する。この減少分を 測定すれば、試料中の有機物酸化に必要な酸素量が求められる。

56.4.2 試験方法の選定の考え方

現在のTOD測定法は、900℃に加熱した燃焼管内に検水を一定量に注入し、燃焼時に消費される酸素の量を測定する方法が採用されている。

56.4.3 試験上の注意事項等

56.4.3.1 試料の保存

試料採取後は、すみやかに試験室へ運搬し、試験に供する。直ちに試験を行えない場合は、 $0 \sim 10^{\circ}$ の暗所で保存し、できるだけ早く試験を行う。

56.4.3.2 前処理

試料に懸濁物質が多い場合は、超音波破砕機で粉砕してから試験する。また、硫酸イオンが共存する場合には、水酸化ナトリウム溶液(200g/L)を加えて、pHを約11に調節してから試験する。海水等塩類を多く含む試料は、あらかじめ薄めて試験をする。

56.5 その他

TOD分析装置による有機物の酸化率は、BODの解説の表9-3のように90~100%程度と考えられ、CODcrと同程度である。

検水量が20 μLと少ないので、SSの影響は大きい。粗大SSは、上述の通りあらかじめ超音波破砕器で細かく粉砕しておく必要がある。これは、サンプリングチューブの目詰り防止だけでなく、試料の均一化にも役立つ。

TOD測定には、無機化合物も影響し、燃焼反応時に酸素を放出する物質の場合には、 TOD値を小さく、還元物質の場合は、TOD値を大きくする。清澄な検水の測定では、負 の効果のある溶存酸素(DO)の影響が大きいので、窒素ガスでバブリングしてから測定 することが望ましい。

試料が酸性で硫酸イオンを含む場合には、高温で加熱すると次のように分解して酸素を 生じ負の誤差となる。

$$2 H_2 SO_4 \rightarrow 2 H_2 O + 2 SO_2 + O_2$$

ただし、試料が蒸発したとき、硫酸がアルカリ金属塩となる試料は、この反応は生じない。このため、硫酸イオンが共存する場合には、上述のとおり水酸化ナトリウム溶液(200 g/L)を加えて、pHを約11に調節してから試験する。また、硝酸イオンが共存する場合には、高温で加熱すると、次のように分解して酸素を生じ負の誤差となる。亜硝酸イオンも類似の反応で負の誤差となる。

 $4 \text{ NaNO}_3 \rightarrow 2 \text{ Na}_2 \text{O} + 4 \text{ NO} + 3 \text{ O}_2$ $\pm \text{tt}$, $2 \text{ NaNO}_3 \rightarrow \text{Na}_2 \text{O} + \text{N}_2 \text{O} + 2 \text{ O}_2$

アンモニウムイオンは、高温で酸化されるため正の誤差を与えるが、酸化率は一定ではなく、 $NO \ge N_2 O$ までの酸化が考えられる。

$$NH_4Cl + 4/5O_2 \rightarrow NO + 3/2H_2O + HCI$$
 \$\tau_4Cl + O_2 \rightarrow 1/2N_2O + 3/2H_2O + HCl

重金属元素を含む試料を長時間測定すると、燃焼管中の触媒が劣化し、酸化率が低下してくる。このような場合には、触媒の交換または再生が必要である。

海水等の塩類を多量に含む場合には、指示値の基線がもとに戻らないことがあるので、 安定した指示値が得られるまで測定を繰り返すか、または上述の通り適当に試料を薄めて から試験する。

参考文献

全般的に次の資料を参考とした。

- 1) 日本下水道協会:下水試験方法, 1997.
- 2) JIS K 0102 工場排水試験方法, 2008.

57. 炭酸水素イオン

57.1 概要

二酸化炭素(CO_2 、炭酸ガスともいう)は、水に溶けやすい気体である。水に溶存する二酸化炭素は、遊離炭酸(CO_2)、炭酸(H_2CO_3)、炭酸水素イオン(HCO_3 ⁻、重炭酸イオンともいう)及び炭酸イオン(CO_3 ²⁻)として存在し、その割合は、主にpHによって変化するが、水温や共存する弱酸等によっても影響を受ける。

57.2 基準等

わが国ではこれまでのところ、炭酸水素イオンに関する環境基準等は設定されてない。

57.3 試験方法

炭酸水素イオンの試験方法を表57-1に示す。

	試験方法の名称	定量範囲* (mgCO ₂ /L)	精度 (CV%)	必要検水量 (mL)	出 典
試験法1	塩化ストロンチウム-塩酸滴定	5~200		200	JIS K 0101 ⁻²⁰⁰⁸ 25.1
試験法2	赤外線分析法	3~450		5	JIS K 0101 ⁻²⁰⁰⁸ 25.2
試験法3	分離滴定法	5~200		200	衛生試験法・注解 ⁻²⁰⁰⁵

表57-1 炭酸イオンの試験方法

炭酸水素イオンの測定法には、滴定または赤外線分析等により全炭酸(CO_2 表示)を測定した後、試料のpH値から算出する方法と、到達pHが異なる 2 種類の滴定値から炭酸水素イオンを算出する方法とがある。

57.4 試験方法の概要と選定の考え方

57.4.1 試験方法の概要

57.4.1.1 塩化ストロンチウム - 塩酸滴定法

水酸化ナトリウム溶液に検水を加えて全炭酸を炭酸イオンに変え、次いで塩化ストロンチウムを加えて炭酸ストロンチウムの沈殿を生成させる。塩酸を加えて過剰の水酸化ナトリウムを中和し、さらに一定量の塩酸を加えて沈殿を溶かす。通気して遊離した二酸化炭素を除去した後、過剰の塩酸を水酸化ナトリウム溶液で滴定して消費された塩酸の量を求め、全炭酸を定量する。この全炭酸と試料のpHから炭酸水素イオン濃度を算出する。

57.4.1.2 赤外線分析法

TOCを測定する際に、無機態炭素 (IC) を求めるが、これと同様に操作して全炭酸を測定する。この全炭酸と試料のpHから炭酸水素イオンを算出する。

^{*} 全炭酸(CO₂表示)としての定量範囲を示す.

炭酸標準液の代わりにIC標準液を使用して検量線を作成した場合は、次式によって全炭酸濃度を算出する。

全炭酸 $(mgCO_2/L) = 無機体炭素 (mgC/L) \times 3.664$ ここで、3.664は炭素の量を全炭酸 (CO_2) 相当量に換算する場合の係数である。

57.4.1.3 分離滴定法

フェノールフタレインとメチルレッド混合指示薬を用いて、0.1mol/L塩酸で滴定し、 両者の滴定値から炭酸水素イオン、炭酸イオン及び水酸イオンを分離定量する。

フェノールフタレイン指示薬での0.1mol/L塩酸消費量(v_1)、メチルレッド混合指示薬での0.1mol/L塩酸消費量(v_2)と水酸イオン、炭酸イオン、炭酸水素イオンの関係を表57–2に示す。この関係は、他の弱酸(H_2 S、 H_2 SiO $_3$ 、 HBO_2)等の共存によって違ってくる。

塩酸消費量	水酸イオン	炭酸イオン	炭酸水素イオン
v ₁ =0, v ₂ =X	0	0	X
$2v_1 \le v_2$	0	$2v_1$	$v_2 - 2v_1$
$2\mathbf{v}_1 = \mathbf{v}_2$	0	$2v_1$	0
$2v_1 > v_2 > v_1$	$2v_1-v_2$	$2(v_2-v_1)$	0
$v_1 = v_2$	\mathbf{v}_1	0	0

表57-2 塩酸消費量とイオンの関係1)

 v_1 :フェノールフタレイン指示薬での塩酸消費量 v_2 :メチルレッド混合指示薬での塩酸消費量

57.4.2 試験方法の選定の考え方

どの方法も他の弱酸や塩類の共存等による影響を受けるため、必ずしも正確な定量法とはいえないが、他に代わるべき適当な方法はない。一般的には試験法1(塩化ストロンチウム-塩酸滴定法)、試験法2(赤外線分析法)が利用される。

57.4.3 試験上の注意事項等

57.4.3.1 試料の保存

採水にあたって、採取容器はポリ容器を用い、ガラス瓶は避ける。試料は満水とし、空気との接触と光を避けて氷を入れたアイスボックス等に保存し、運搬する。氷以外の保冷剤でもよいが、ドライアイスは避ける。保冷の温度は、氷の量を加減してなるべく現場水温に近くなるよう調整する。分離滴定法を使用する場合、夏期においては、現地の水温と比べてあまり冷やし過ぎるのは好ましくない。採水後、遅くとも1日以内に分析所に搬入し、直ちに分析する。採水時、運搬時、分析時を問わず、試料容器を激しく揺さぶったり、激しく撹拌してはならない。

57.5 その他

河川の水質調査で炭酸水素イオンが測定されることは希であるが(古い調査結果では、日本の河川水の平均濃度は30mg/L程度¹⁾と報告されている)、地下水においては最も主要な陰イオンであり、地下水の年代の推定、帯水層の地質との関連、また、地下水流動経路の推定等の手がかりとして重要な項目の一つである¹⁾。

参考文献

1) 堀内清司:陸水の化学,季刊化学総説,No.14,日本化学会編,学会出版センター,1992.

全般的には下記の資料を参考とした。

- 1) JIS K 0101 工業用水試験方法, 1998.
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法・注解, 金原出版, 2005.

58. クロロフィル、フェオフィチン

58.1 概要

閉鎖性水域である湖沼・貯水池では、水の長期滞留により植物プランクトン(藻類)が 異常繁殖して(いわゆる富栄養化現象)、利水や景観等に影響を及ぼすことがある。植物 プランクトンは光合成によって生成するクロロフィル(葉緑素)が体内にあることから、 クロロフィルは水中の植物プランクトンの現存量や光合成による有機物生産力を推定する ための重要な指標の一つである。

クロロフィルには a、b、c、dが知られており、このうちクロロフィルcにはわずかに構造が異なる c_1 と c_2 がある。クロロフィルは図58-1-1に示す複雑な構造をした化合物であり、平面上に並んだ4つの窒素原子にマグネシウム原子が1個囲まれている。

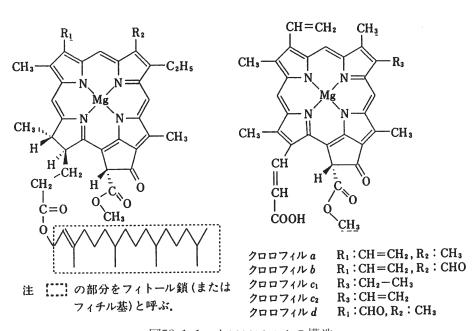


図58-1-1 クロロフィルの構造

クロロフィル中のマグネシウム原子がとれて水素原子 2 個と置き換わったものがフェオフィチンであり、それぞれ a、b、c (c_1 と c_2)、dがある。フェオフィチンは藻類が死滅することによって生成(変化)するものであることから、藻類の死細胞量の指標となる。クロロフィル a、フェオフィチンは富栄養化した湖沼・貯水池における植物プランクトン(藻類)の現存量の評価や現象解明、水質保全対策による富栄養化の改善効果の評価等の指標となるものであり、水質問題の発生している湖沼、貯水池で水質測定が必要となる。

58.2 クロロフィル

58.2.1 概要

クロロフィル(葉緑素)は水中の植物プランクトンの現存量や、光合成による有機物生産力の重要な指標の一つである。クロロフィル(葉緑素)はクロロフィルa、b、c、dが知られており、藻類の種類とクロロフィルa~dの関係¹⁾を表58-2-1に示す。

クロロフィル a は光合成細菌を除く全ての緑色植物に含まれるもので、藻類の存在量を表す指標である。クロロフィル b は高等植物及び緑藻類に、クロロフィル c は褐藻、渦鞭毛藻、珪藻等にクロロフィル a とともに含まれている。クロロフィル d は、紅藻の一部にのみ存在するが、紅藻は植物プランクトンではない。また、光合成細菌には、クロロフィルとやや構造が異なるバクテリオクロロフィルが含まれている。本書では、植物プランクトンとの関連で最も重要なクロロフィル a 及びフェオフィチン a の測定を主眼とし、クロロフィル d やバクテリオクロロフィルは取り扱わないこととした。

		クロロフィル						
	a	b	С	d				
藍藻類	0							
珪藻類	\circ		0					
緑藻類	\circ	\circ						
黄緑藻類	\circ		0					
紅藻類	\circ		0	0				
褐藻類	\circ		0					
クリプト藻類	\circ		0					
黄金藻類	\circ		0					
渦鞭藻類	\circ		0					
ユーグレナ藻類	\circ	0						
ハプト藻類	0		0					

表58-2-1 藻類におけるクロロフィルの分布

透明度を美観上十分に保つためにはクロロフィル a 濃度を $1.0 \mu g$ /Lに保つことが望ましいといわれている 20 。一方、貧栄養した湖沼・貯水池では、クロロフィル a は通常数 μ g/L以下であるが、富栄養化した湖沼・貯水池などでは、植物プランクトンの増殖によってクロロフィル a が $100 \mu g$ /L以上、極端な場合には数百 μg /Lに達することがある $^{3)$, $^{4)}$ 。 クロロフィル自体は、汚染物質ではなく、生物にとって何ら害はないが、その分解物であるフェオフォルバイドは、人体に有害で、光過敏性皮膚炎の原因となる 50 。植物プランクトンは、清冽な水域にもわずかではあるが必ず存在するものであり、河川水からクロロフィル a が数 μg /L程度検出されることは自然な状態である。

クロロフィル a は富栄養化によって水質問題の発生している湖沼・貯水池における植物プランクトン(藻類)の現存量の評価や現象解明、水質保全対策による効果を評価するために重要な指標となる。

また、「今後の河川水質管理の指標について(案)」 6) (国土交通省河川局河川環境課、平成17年3月) では、「人と河川の豊かなふれあいの確保」(川に入った時の快適性) に関する水質管理指標「川底の感触」に関係が深い項目として、「河床付着物のクロロフィル a」があげられており、今後の河川水質管理のために着目すべき項目とされている。

58.2.2 基準等

クロロフィルに係わる基準等はない。

58.2.3 試験方法

クロロフィルの試験方法を表58-2-2に示す。後述するフェオフィチン(58.3フェオフィチン)の試験方法も同じ試験方法である。

	試験方法の名称	定量範囲 (クロロフィルa, μg/L)	精度 (CV%)	必要検水量 (L)	出 典
試験法1	吸光光度法(単波長法)	2~20*1		0.5~3	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ VI-4.27
試験法2	吸光光度法(三波長法)	2~20		0.5~3	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ VI-4.27
試験法3	高速液体クロマトグラフ法	0.2~*2		0.2~1	Standard Methods ⁻¹⁹⁹⁵
試験法4	蛍光光度法	0.2~		0.2~1	海洋環境調査法-1979 9.2.4

表58-2-2 クロロフィルの試験方法一覧

クロロフィルの試験方法は、前処理と測定の2段階から成っている。前処理にはろ過と抽出操作が含まれ、抽出溶媒には、従来90%アセトンが主に使用されていたが、最近は抽出操作が簡単なジメチルホルムアミド(DMF)が注目されている。

測定方法には、大別して吸光光度法と蛍光光度法及び高速液体クロマトグラフ法 (HPLC法) がある。HPLC法は、最近注目されている方法で、各種のクロロフィル分解 物を定量でき、最も正確な分析方法であるが、クロロフィル標準物質を必要とし、分析 時間も他の方法より長時間を要する。

蛍光光度法は、クロロフィルaとフェオフィチンaを高感度(吸光光度法の10~100倍)で分離測定できるが、クロロフィルbが共存する場合には適用できない⁷⁾。

吸光光度法では、クロロフィル a とフェオフィチン a を分離測定できる単波長法 (monochromatic method) と、クロロフィル a、b、cを分離測定できる三波長法 (trichromatic method) がある。ただし、三波長法によるクロロフィル b、cの測定値は、正確ではなく、目安程度に過ぎないし、クロロフィルとフェオフィチンを区別できないため、フェオフィチンが多く共存すると、格段に精度が落ちる。

本書では、比較的簡単にクロロフィル a とフェオフィチン a を分離測定でき、淡水試料の分析にも適する吸光光度法(単波長法)を試験法 1 とし、国土交通省の使用実績とクロロフィル a、b、cを分離測定できる利点から吸光光度法(三波長法)を試験法 2 とする。また、測定に手間はかかるが、最も正確な高速液体クロマトグラフ法を試験法

^{*&}lt;sup>1</sup>検水量1L、最終アセトン量10mL、50mmセル使用時

^{*2}検水0.5Lのとき、使用機器により異なる

3とし、高感度ではあるが、クロロフィルbの妨害を強く受ける蛍光光度法を試験法4とする。

58.2.4 試験方法の概要と選定の考え方

58.2.4.1 試験方法の概要

(1) 吸光光度法(単波長法)

クロロフィル a は酸の作用によって容易にマグネシウムが離脱してフェオフィチン a になり、それに伴って吸光特性が変化する。そこで、検液に酸を加える前後で吸光 度を測定して、665nmにおける吸光度の減少分からクロロフィル a とフェオフィチン a を分離定量する。

前処理について

クロロフィルの抽出方法は、上水試験方法ではアセトン抽出法を採用している。この方法は、ホモジナイズを行った後に遠心分離を行うなど煩雑であるため、抽出溶媒を変えることでこれらの操作を簡略化する方法が検討されている。そのひとつにJIS K $0400-80-10^{-2000}$ に採用されている熱エチルアルコール抽出法がある 9)。

(2) 吸光光度法 (三波長法)

クロロフィルは可視領域において強い吸光特性を持っていて、その吸収極大波長や吸光係数はクロロフィルの種(a、b、c など)によって異なる。そこで前処理によって得た検液中のクロロフィルを吸光光度法により波長750nm、663nm、645nm、630 nmの各吸光度を測定することによって、試料中のクロロフィル濃度を求めることができる。なお、「三波長(trichromatic)」という名称は(散乱光の補正用の750nmを別にして)、上記三波長の吸光度で定量が行われることに由来している。

(3) 高速液体クロマトグラフ法

前処理によって得た抽出液中のクロロフィル及び分解物を逆相高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分離し、蛍光光度計で測定する。

本法はクロロフィルa、b、cを分離して測定することが可能であり、最も精度が高い分析方法であるが、分析に時間と手間がかかり、ルーチン分析には向かない。

(4) 蛍光光度法

クロロフィルに紫外線を照射すると赤色の蛍光を発し、その強度は励起光の強さに 比例するので、強い光源を使用することにより、吸光光度法よりもはるかに高感度の 測定ができる。また、クロロフィルとフェオフィチンの蛍光特性が異なることを利用 して、検液に酸を加える前後の蛍光を測定することにより両者を分離測定できる。し かし、クロロフィルbが多く含まれる試料にはこの方法は適用できない。

58.2.4.2 試験方法の選定の考え方

通常の試料のクロロフィル a とフェオフィチン a を測定するには試験法 1 を用い、クロロフィル a、b、cの概略値が必要な場合は試験法 2 を用いる。正確な分析値を必要とする場合、またはクロロフィル分解生成物を定量する場合には、試験法 3 を用いる。ただし、試験法 3 は、原理的には優れているが、実際の精度は標準物質の良否に左右される。低濃度試料のクロロフィル a とフェオフィチン a の分析には試験法 4 が適する。

58.2.4.3 試験上の注意事項等

- ・試料は、精製水で洗浄したガラス瓶又はポリエチレン瓶に採取し、速やかに試験する8)。
- ・アセトン抽出法に供する場合は、試料がpH7以上の場合に限り、試料をガラス繊維 ろ紙でろ過した後にろ材を凍結保存できる(3週間以内。ただし、早いほどよい。)。 この際、凍結させるのにドライアイスを用いてはならない(その炭酸のためにクロロ フィルがフェオフィチン化されるおそれがある)⁸⁾。

58.2.5 その他

「今後の河川水質管理の指標について(案)」⁶⁾(国土交通省河川局河川環境課、平成17年3月)では、「人と河川の豊かなふれあいの確保」における「川に入った時の快適性」について水質管理の指標項目として「川底の感触」が選定されている。「川底の感触」に関係する水質項目として、藻類の付着量と関連する「河床付着物のクロロフィルa」があげられており、今後のデータの蓄積を行い、河川水質管理の指標項目として継続すべきか、あるいは他の項目で代用すべきかを判断するために、調査を行う項目と位置付けられている。

ここでは、河床付着物のクロロフィルaの調査対象の考え方と採取方法を以下に示す。

58.2.5.1 調査対象 6)

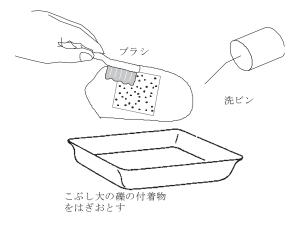
河床付着物のクロロフィルaの測定を行う「川底の感触」に関する調査対象は、川底に足がつけることができる水域で、礫質の水域である。

「川底の感触」は礫に付着した藻類に関するヌルヌル感を対象とし、河床付着物のクロロフィルaの測定は「川底の感触」を測定した地点近傍のある程度の大きさを持つ礫を採取して、その付着物を測定するものである。

58.2.5.2 河床付着物のクロロフィル a の採取方法10

・河床の礫を取り、歯ブラシや金ブラシで表面の付着物をきれいに取り、小型バットの 中に移す。

- ・付着物の採取は以下の2つ方法がある。
 - a. こぶし大の礫を取り、全体の付着物を取る。礫の大きさをメジャーで測定し、表面積を求める。
 - b. 礫の平面的な部分(上面)に5 cm×5cmの方形枠(コドラート) をあて、赤鉛筆を用いて5cm×5 cmの印を付ける。枠外の部分を歯 ブラシ等で取り去った後、枠内の付 着物を全量こすり落とす。この操作 を3回行う。ただし、付着物が少な い場合は採取する面積を大きくする など、現地の状況に応じて測定方法 を工夫する。



・採取した試料を対象に、クロロフィル a の分析を行い、単位面積当たりのクロロフィル a を測定する。

58.3 フェオフィチン

58.3.1 概要

フェオフィチンはクロロフィルの分解生成物で、クロロフィルの中心にあるマグネシウムがとれて水素原子2個と置き換ったものであり、フェオフィチンa、b、c、dがある。藻類が死ぬとクロロフィルはフェオフィチンに変化するため、藻類の死細胞量の指標である。

植物プランクトンに含まれるクロロフィルは、植物プランクトンが死滅したり、動物プランクトン等に捕食されたりすることにより、図58-3-1に示すように分解され、フェオフィチンになる。

通常の吸光光度法による測定ではクロロフィル a とフェオフィチン a を区別できないため、いわば生体と死体を一括して測定していることになる。クロロフィル a とフェオフィチン a を分離測定する方法には、Lorenzen¹⁾の方法などがある。

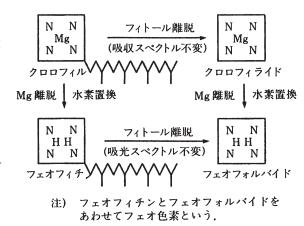


図58-3-1 クロロフィルの分解(模式図)

58.3.2 基準等

フェオフィチンに係わる基準等はない。

58.3.3 試験方法

フェオフィチンの試験法を表58-3-1に示す。フェオフィチンの試験法は、「58.2クロロフィル」の「試験法1 吸光光度法(単波長)」、「試験法3 高速液体クロマトグラフ法」、「試験法4 蛍光光度法」と同様である。試験法1 吸光光度法(単波長)がLorenzenの方法である。詳細は「58.2クロロフィル」の試験法(58.2.3)を参照されたい。

表58-3-1 フェオフィチンの試験方法一覧

	試験方法の名称	定量範囲 (クpp7/Na, μg/L)	精度 (CV%)	必要検水量 (L)	出 典
試験法1	吸光光度法(単波長法)	2~20*1		0.5~3	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ VI-4.27
試験法3	高速液体クロマトグラフ法	0.2~*2		0.2~1	Standard Methods ⁻¹⁹⁹⁵
試験法4	蛍光光度法	0.2~		0.2~1	海洋環境調査法-1979 9.2.4

^{*1}検水量1L、最終アセトン量10mL、50mmセル使用時

58.3.4 試験方法の概要と選定の考え方

フェオフィチンの試験方法と選定の考え方はクロロフィルと同様であり、「58.2クロロフィル」の試験方法の概要と選定の考え方(58.2.4)を参照されたい。

^{*2}検水0.5Lのとき、使用機器により異なる

ここでは58.2クロロフィルの試験法(表58.2) に合わせて,試験法1,試験法3,試験法4と表記した。

58.3.4.1 試験上の注意事項等

試験法1におけるフィオフィチンaの測定方法は、クロロフィルaの単波長吸光光度を用いて、検液に酸を加える前後で吸光度を測定して、665nmにおける吸光度の減少分からクロロフィルaとフェオフィチンaを分離定量する方法であり、必ずクロロフィルaともに測定されるものである。そのため、試料の保存、前処理方法ともにクロロフィルaと同一の方法となる。

詳細は、58.4.2~58.4.3を参照されたい。

参考文献

- 1) 日本水道協会:上水試験方法 解説編, 2001.
- 2) (社)日本水環境学会:日本の水環境行政.ぎょうせい, 1999.
- 3) 沖野外輝夫編著: 富栄養化調査法, 講談社, 1976.
- 4) 岩佐義朗編:湖沼工学, 山海堂, 1990.
- 5) 渡辺正・小林正美:クロロフィル類の精密分析,油化学,38,876,1989.
- 6) 国土交通省河川局河川環境課:今後の河川水質管理の指標について (案), 2005.
- 7) A.E.Greenberg et al.: Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington 1995.
- 8) 日本水道協会:上水試験方法, 2001.
- 9) 日本工業標準調査会:水質-生化学的パラメーターの測定-クロロフィルa濃度の吸光光度定量, JIS K 0400-80-10, 2000.
- 10) 国土交通省河川局河川環境課:今後の河川水質管理の指標について (案), 測定方法・評価方法に関する参考資料, 2005.

59. 細菌試験

59.1 大腸菌群数

59.1.1 概要

大腸菌群とは、大腸菌及び大腸菌ときわめてよく似た性質をもつ細菌の総称である¹⁾。 また、大腸菌群数とは、大腸菌群を数で表したもので、検水1mL中の大腸菌群の集落数(正確には培養後の集落数)または検水100mL中の大腸菌群の最確数(Most Probable Number、略してMPN)で表される。

大腸菌群数試験で示される大腸菌群(Coliform bacteria)とは、細菌分類学上の大腸菌(Escherichia coli)よりも広義の意味で、便宜上、グラム染色陰性、無芽胞性の桿菌で、乳糖を分解して酸とガスを形成する好気性菌または通性嫌気性菌をいう²)。この中には大腸菌以外にAeromonasのような腸内細菌以外の細菌が含まれている。一般に大腸菌群は、人畜の腸管内に常時生息し、健康な人間の糞便1g中に10~100億存在するといわれている。人間のし尿や家庭下水中の大腸菌群の80~95%は、一般に真性の大腸菌とされている。大腸菌群数は水域によりその存在量は大きく変わる。表流水中では全般に多く、上流域では10¹~10⁴MPN/100ml程度、下流域では102~105MPN/100ml程度であるが、流量の変動によっても変化する。湖沼水では流入水よりも少なくなる場合が多いが、一般に10°~10⁴MPN/100ml程度、藻類が繁茂するとその有機物を利用して多くなる場合もある。地下水では全般に少ないが、浅井戸では検出されやすく。周辺の状況にもよるが、不検出~103MPN/100ml程度である。

大腸菌は、普通、非病原性であるが、ときに集団食中毒を引き起こし社会問題となった O157等のような病原性のものもある。水質試験における大腸菌群数試験は、「この試験に 陽性である水は、し尿の汚染を受けた可能性があり、もし、し尿の汚染を受けたとすれば、その水の中には、赤痢菌や腸チフス菌等の病原微生物が存在する可能性をもつ」ということを判断するために行うものである。したがって、大腸菌群数試験は、衛生管理の一手段として行うもので、大腸菌群そのものが直ちに衛生上有害というのではない。大腸菌群の中に含まれる細菌の中には、動物の糞便由来以外に、土壌・植物等自然界に由来するものも多くある(例えばAeromonas等)。また、清浄な河川ほど大腸菌群中に非糞便性の菌数が多い傾向にあり、人為汚染の考えられないような水域でも基準値以上の大腸菌群数が検出され、その値に対応した糞便汚染を意味しないことが多いとも報告されている³)。そこで、これを補う指標として、糞便性大腸菌群(59.2参照)を測定する試験法やより糞便汚染の指標性が高い大腸菌そのものを測定する試験法なども用いられる。

59.1.2 基準等

大腸菌群数に関する基準を表59-1-1に示す。

水質汚濁に係る環境基準(昭和46年12月28日環告第59号)のうち、生活環境の保全に 関する環境基準では、公共用水域の河川、湖沼においてその水の利用目的に応じて大腸 菌群数の環境基準値が定められている。水道法に基づく水質基準については、旧基準省令(平成4年厚生省令第69号)では「大腸菌群数が検出されないこと」であったものが、平成15年5月の厚労省令第101号において「大腸菌が検出されないこと」として指標微生物が改められている。

表59-1-1 大腸菌群数に関する基準

基準名		基準値(個/mL)					
	類型 水域	AA	A	В	測定方法	法令等	
生活環境の保全に関する環境基準	河川	50以下	1000以下	5000以下	環件50月回(主) 具体粉にトッ字	昭和46.12.28環境庁告示第59号	
	湖沼	50以下	1000以下	-	珠石39万別衣2 取傩剱による圧 最注		
	海域	-	1000以下	-	墨広		
水質汚濁防止法に基づく排水基準		日平均3000個/mL以下			昭和37.12.17厚生省/建設省令第	昭和46.6.21総理府令第35号	
処理下水の放流水の水質基準					1号 定型的集落数平均值法	昭和34.4.22下水道法施行令	

59.1.3 試験方法

大腸菌群数の試験方法を表59-1-2に示す。

表59-1-2 大腸菌群数の試験方法

	試験方法の名称	定量範囲	精度 (CV%)	必要検水量	出 典
試験法1	BGLB培地直接MPN法	0∼2400 MPN/100mL			昭和46.12.28環境庁告示第59 号付表2
試験法2	デオキシコール酸塩培地法 (デソオキシコール酸塩培地 法)	1∼ 300 個/mL		約 10mL	昭和37.12.17厚生省・建設省 令第1号別表第1
試験法3	MF-エンドウ培地法	1~ 100 個/mL		50~1000mL	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ Ⅷ 2.1.4
試験法4	特定酵素基質培地法	0∼2400 MPN/100mL		約100mL	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ ₩ 2.1.3

59.1.4 試験方法の概要と選定の考え方

59.1.4.1 試験方法の概要

(1) BGLB培地直接MPN法

大腸菌群は、乳糖を分解して酸とガスを生じるので、検水をBGLB培地に接種して培養し、ガスの発生の有無を調べることにより、大腸菌群数を求めることができる。

(2) デオキシコール酸塩培地法

本試験法では、デオキシコール酸培地を用いて培養し、発生する定形的な暗赤色の 集落を計数して、検水1mL中の大腸菌群数を求める。

(3) MF-エンドウ培地法

メンブレンフィルターを使用して検水をろ過し、ろ過後のメンブレンフィルターをMF-エンドウ培地の浸み込んだ吸収パットに移植し、発育した金属光沢をもった暗赤色の集落(コロニー)を計数して、検水1mL中の大腸菌群数を求める。

(4) 特定酵素基質培地法

この方法は、増殖基質及び酵素基質として培地に含まれるONPG(o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド)が、大腸菌群に存在する酵素(B-ガラクトシダーゼ)によって分解生成する黄色のo-ニトロフェノールの濃度を比色液と比較、陽性反応の有無を判定し、大腸菌群数を求める。

59.1.4.2 試験方法の選定の考え方

試験法1 (BGLB培地直接MPN法) は、水質汚濁に係る環境基準の公定法とされている。本法は大腸菌群数が少ない試料から比較的多い試料まで幅広く対応できることから、通常の河川水の試験に用いられている。試験法2 (デオキシコール酸塩培地法) は、排水基準に係わる検定方法(昭和49年9月30日環告第64号) 及び下水の水質の検定方法に関する省令(昭和37年12月17日厚生建設省令1号)に採用されている。この方法は、操作が簡便であり、比較的少ない試料量で試験を行うことができる。しかし、清浄な水について100mL中の大腸菌群数の有無あるいは個数を評価するような試験には不適当であるので、多量の排水の流入のある河川等に用いる。また、試験法3 (メンブレンフィルター法) は大量の検水量を検査対象にできるため、清澄で大腸菌群数が少ない河川水に用いることができる。試験法4 (特定酵素基質培地法) は、迅速性に優れているが、BGLB培地直接MPN法より多めの値を示す傾向がある。

59.1.4.3 試験上の注意事項等

(1) 試料の保存

採取の際に手等によって試料水が汚染されないように注意しながら、滅菌瓶に無処 理のまま採取する。

採取後直ちにアイスボックス等に収めて試料を保冷して、速やかに試験室に運搬する。直ちに試験できない場合は、一時冷蔵庫(4℃程度)に保存し、速やかに試験する。

59.1.5 その他

59.1.5.1 最確数法

BGLB培地直接MPN法は、大腸菌群の数を最確数で表すために、検水を10倍希釈法によって希釈し、検水10mL、1mL及びその希釈検水1mLを各希釈段階ごとにBGLB培地の入った発酵管にそれぞれ5本ずつ移植する。培養後、ガスの発生した段階ごとの発酵管数を計数し、最確数(MPN)表を用いて検水100mL中の大腸菌群の最確数を求める。

最確数法(Most Probable Number)とは、推計学に基づいた手法で、試料の細菌数を推定する定量方法であり、その結果得られた最尤推定値を最確数という。最確数を算出するには、例えば、次のaに示したように、1 mLを接種した発酵管が5本とも陽性、0.1 mLの接種管においても同様に5本とも陽性、0.01mLでは5本のうち2本が陽性、0.001 mLでは5本全部が陰性であった。この場合に各検水量における陽性管数は、5.5.2.0と

なる^油。これから100mL中の最確数を求めるには520の組合せをとり、最確数表(表59-1-4)から該当するMPN49を求め、これを \square で囲んだ左の上の計算倍率、100倍を乗じて試料の最確数4900を算出する。なお、②~ \bigcirc のような結果が得られた場合に採用する検水量の例を \square で示す(分子は陽性管数、分母は検水接種管数)。

計算倍率	10倍	100倍	1000倍	10000倍
検水量	$1\mathrm{mL}$	0.1mL	0.01 mL	0.001mL
<u>a</u>	5/5	5/5	2/5	5/5
(b)	5/5	4/5	2/5	0/5
©	0/5	1/5	0/5	0/5

©に示したような結果が得られたときは、中間に陽性をおくために最初の3列の値を とる。

次に、①に示すように最小検水量においても陽性であるようなときは、直近上位の検水量の値に1を加えて、②に示したように修正し、②の値を用いて最確数を求める。

計算倍率	10倍	100倍	1000倍	10000倍
検水量	1 mL	$0.1 \mathrm{mL}$	0.01 mL	0.001mL
d	5/5	3/5	1/5	1/5
e	5/5	3/5	2/5	0/5

注)この際、試料は、その最大量を加えたものの全部または大多数が大腸菌群陽性となるように、また、最小値を加えたものの全部または大多数が大腸菌群陰性となるように に希釈する。

表59-1-4 大腸菌群試験の最確数表 5-5-5法

(1)*1		(2)*2		(1)*1		(2)*2		(1)*1		(2)*2	
	1001	95%信!	順限界			95%信:	頼限界		10017	95%信!	頼限界
10, 1, 0. 1	MPN	下限	上限	10, 1, 0. 1	MPN	下限	上限	10, 1, 0. 1	MPN	下限	上限
0	0			100	2.0	0.28	14	200	4.5	1.1	18
001	1.8	0.23	14	101	4.0	0.94	17	201	6.8	2. 1	22
002	3.6	0.80	16	102	6.0	1.7	21	202	9.1	3. 1	27
003	5.4	1.5	20	103	8.1	2.6	25	203	12	4. 1	32
004	7.2	2.3	23	104	10	3. 5	29	204	14	5. 2	37
005	9.0	3. 1	27	105	12	4. 4	34	205	16	6. 2	43
010	1.8	0.24	14	110	4.0	0.95	17	210	6.8	2. 1	22
011	3.6	0.81	16	111	6.1	1.8	21	211	9.2	3. 1	27
012	5.5	1.5	20	112	8.1	2. 7	25	212	12	4. 2	32
013	7.3	2. 3	23	113	10	3.6	29	213	14	5. 2	38
014	9.1	3. 1	27	114	12	4. 5	34	214	17	6.3	44
015	11	3. 9	31	115	14	5. 4	39	215	19	7.3	50
020	3.7	0.82	16	120	6.1	1.8	21	220	9.3	3. 2	27
021	5.5	1.5	20	121	8.2	2. 7	25	221	12	4. 2	33
022	7.4	2. 3	23	122	10	3.6	29	222	14	5.3	38
023	9.2	3. 1	27	123	12	4. 5	34	223	17	6.4	44
024	11	3. 9	31	124	15	5. 4	39	224	19	7.4	51
025	13	4. 7	35	125	17	6.3	44	225	22	8.4	58
030	5.6	1.6	20	130	8.3	2. 7	25	230	12	4. 3	33
031	7.4	2. 3	23	131	10	3.6	30	231	14	5. 4	39
032	9.3	3. 2	27	132	13	4. 6	34	232	17	6. 5	45
033	11	4	31	133	15	5. 5	39	233	20	7.5	52
034	13	4.8	35	134	17	6. 4	44	234	22	8. 5	59
035	15	5.6	40	135	19	7.3	50	235	25	9.4	67
040	7.5	2. 4	20	140	11	3. 7	30	240	15	5. 5	39
041	9.4	3. 2	27	141	13	4. 6	35	241	17	6. 5	45
042	11	4	31	142	15	5. 6	40	242	20	7.6	52
043	13	4.8	36	143	17	6. 5	45	243	23	8.6	60
044	15	5.6	40	144	19	7. 3	51	244	25	9.5	68
045	17	6. 4	45	145	22	8. 2	56	245	28	10	76
050	9.4	3. 2	28	150	13	4. 7	35	250	17	6.6	46
051	11	4. 1	32	151	15	5. 6	40	251	20	7.7	53
052	13	4. 9	36	152	17	6. 5	45	252	23	8. 7	60
053	15	5. 7	40	153	19	7.4	51	253	26	9.6	69
054	17	6.5	45	154	22	8. 3	57	254	29	11	78
055 *1 → FR R	19	7. 2	50	155	24	9. 1	64	255	32	11	87

^{*1} 三段階希釈における陽性管数. *2 100mL中の最確数と信頼限界.

(1)*1		(2)*2		(1)*1		(2)*2		(1)*1		(2)*2	
10 1 0 1) IDM	95%信5	頼限界	10 1 0 1) IDM	95%信	頛限界	10 1 0 1) III) I	95%信	頼限界
10, 1, 0. 1	MPN	下限	上限	10, 1, 0. 1	MPN	下限	上限	10, 1, 0. 1	MPN	下限	上限
300	7.8	2. 5	24	400	13	4. 7	35	500	23	8.8	61
301	11	3.7	30	401	17	6.3	44	501	31	11	87
302	13	5.0	36	402	21	7. 9	54	502	43	14	130
303	16	6. 2	44	403	25	9.5	67	503	58	18	180
304	20	7.5	51	404	30	11	83	504	76	25	230
305	23	8. 7	60	405	36	12	100	505	95	33	280
310	11	3.8	30	410	17	6. 4	45	510	33	12	92
311	14	5. 1	37	411	21	8.1	56	511	46	15	140
312	17	6.3	44	412	26	9. 7	69	512	63	20	200
313	20	7.6	52	413	31	11	85	513	84	28	250
314	23	8.8	61	414	36	13	100	514	110	37	300
315	27	10	72	415	42	14	130	515	130	47	350
320	14	5. 1	37	420	22	8. 2	57	520	49	16	150
321	17	6. 4	45	421	26	9.9	71	521	70	22	220
322	20	7.7	53	422	32	11	88	522	94	32	280
323	24	8.9	62	423	38	13	110	523	120	43	330
324	27	10	73	424	44	15	130	524	150	55	400
325	31	11	85	425	50	16	160	525	180	66	470
330	17	6. 5	45	430	27	10	73	530	79	26	240
331	21	7.8	54	431	33	12	91	531	110	38	310
332	24	9. 1	64	432	39	13	110	532	140	52	380
333	28	10	74	433	45	15	140	533	170	66	470
334	31	11	86	434	52	17	160	534	210	80	560
335	35	12	100	435	59	19	190	535	250	93	680
340	21	7. 9	55	440	34	12	94	540	130	47	360
341	24	9. 2	65	441	40	14	120	541	170	65	460
342	28	10	76	442	47	15	140	542	220	83	590
343	32	12	88	443	54	17	170	543	280	100	760
344	36	13	100	444	61	20	190	544	350	120	1000
345	40	14	120	445	69	22	220	545	430	140	1300
350	25	9.3	66	450	41	14	120	550	240	89	640
351	29	11	77	451	48	16	150	551	350	120	1000
352	32	12	90	452	56	18	180	552	540	160	1800
353	37	13	100	453	64	20	200	553	920	290	2900
354	41	14	120	454	72	23	220	554	1600	540	4800
355	45	15	140	455	81	27	240	555	≥2400		

59.1.5.2 大腸菌群の糞便汚染の指標度

大腸菌群を糞便汚染の指標細菌であるとした場合、次の3つの捉え方がある。

- ① 大腸菌群は、すべて何らかの意味において糞便汚染に関連しているとみなすべきだとする考え方で、1885年にEscherichが人糞からその特徴と思われる細菌を発見し、「水中にその細菌が存在することは、消化器系の伝染病菌が共存する可能性を示す」と述べたことに始まり、現在、日本及び米国の飲料水水質基準はこの考え方が基礎となっている。
- ② 大腸菌群には糞便起源のものと、そうでないものとがあるので、衛生学的に厳密な指標とするためには、その両者を分別しなければならないとする考え方で、Eijkmannによって1904年に提唱され、ヨーロッパの諸都市で受け入れられた後、

現在、米国やカナダにおいても地表水を対象とする試験に導入されつつある。しかし、糞便性と非糞便性とをいかに分別するかに問題があり、正確でかつ簡便な分別方法に関する研究が進められている。

③ 大腸菌群の持つ増殖という性質や糞便性と非糞便性の厳密な分別の難しさからくる指標性の不明確さを大腸菌以外の細菌を利用することによって解決しようとする考え方である。大腸菌群以外の指標細菌としては、腸球菌が最も有力視されている4)。

59.1.5.3 IMViC試験

真性の大腸菌(Coli型)は、糞便由来の大腸菌であって、一般に人畜の腸管内に常在し、外界にあっては増殖することができない細菌である。大腸菌群細菌には、糞便由来の Escherichia coli(大腸菌)の他に、腸管にも寄生するが、土壌や植物にも生息しうる Aerobacter属、Erwinia属等の細菌をも含んでいるため、厳密には大腸菌群の検出によって糞便汚染を直接証明することはできない。もし証明する必要があれば、EMB培地、またはエンドウ培地から独立した菌集落を釣菌してIMViC試験により菌株を種の段階 近くまで分類しなければならない。IMViCとは、Indole test、Methylred test、Voges-Proskauer、Citrate testの頭文字をとったものである。具体的には、インドール産生能、メチルレッド反応(酸産生能)、アセトイン(acetoin=acethyl-methylcarbinol)産生能、唯一の炭素源としてのクエン酸塩の利用能を試験し、それぞれの試験結果の陽性または陰性から分類を行う方法である。

59.1.5.4 水道法に基づく水質基準設定について

わが国の水道水質における大腸菌群に対する基準は、1936年の水道協会第5回大会総会において、「遠藤赤変菌を1cc中に検出すべからず」と定められたのが最初である。1958年の水質基準に関する省令(厚生省令第23号)では、「大腸菌群(グラム陰性の無芽胞性の桿菌であって乳糖を分解して、酸とガスを形成する全ての好気性または通性嫌気性の菌をいう)は、50cc中に検出してはならない」と規定された。塩素消毒が徹底された1966年の水質基準に関する省令(厚生省令第11号)では、「大腸菌群は検出してはならない」となった。このように大腸菌群の基準は徐々に厳しく定められてきた。2003年、WHO飲料水水質ガイドラインが全面改訂され、我が国の水道水質基準も見直された。2003年の水質基準に関する省令(厚労省令第101号)では、これまでの大腸菌群からより糞便性指標を明確にするため、糞便本来の汚染を強く反映する大腸菌へと汚染指標細菌を変更し、「大腸菌は検出されないこと」と定められた。

59.2 糞便性大腸菌群数

59.2.1 概要

大腸菌群の細菌の中には、動物由来のものばかりではなく、自然界由来のものも多く ある。したがって、し尿汚染を受けているかどうかという衛生面の指標としては、大腸 菌群数試験のみでは適切ではない。

糞便性大腸菌群は、Escherichia属の他に、Klebsiella属、Enterobacter属、Citrobacter属等の種からなる。このうち大腸菌(Escherichia coli)は特異的に温血動物の糞便中に大量に常在している。しかし、E. coliを完全同定するのは煩雑で日常の試験には適用できない。公衆衛生上では、糞便性大腸菌群のうち推定的なE. coliとして検出、同定することにより、糞便汚染を評価するのに十分な情報が得られると考えられている。

糞便性大腸菌群は、温血動物の糞便に由来する大腸菌群の多くが44.5℃という高温でも生育するという性質を利用して検出するもので、大腸菌群とは培養温度が異なる。大腸菌群数は36±1℃で培養するのに対し、糞便性大腸菌群数は、44.5±0.2℃で培養する。それゆえ、糞便性大腸菌群数には、大腸菌以外の細菌が若干含まれるが、ほぼ糞便由来の大腸菌とみなすことができる。

糞便性大腸菌群数は、糞便による水の汚染を知る指標になるが、水質汚濁に係る環境 基準の適否の判断は、あくまで大腸菌群数で行なわなければならない。

59.2.2 基準等

糞便性大腸菌群数に係る基準等を表59-2-1に示す。

 基準名
 判定
 基準値
 測定方法
 法令等

 適
 水質A
 不検出(検出限界:2個/100mL)
 水質A
 100個/100mL以下

 水質B
 400個/100mL以下
 上水試験方法-2001
 平成9.4.11環水管第115号

 水質C
 1000個/100mL以下
 上水試験方法-2001
 平成9.4.11環水管第115号

表59-2-1 糞便性大腸菌群数に関する基準

糞便性大腸菌群数は、環境庁(平成9年4月環水管第115号)の水浴場の水質判定基準の指標となる項目の一つである。

59.2.3 試験方法

糞便性大腸菌群数に係る試験方法を表59-2-2に示す。

表59-2-2 糞便性大腸菌群数の試験方法

		試験方法の名称	定量範囲	精度 (CV%)	必要検水量	出典
試験沒	法1	M-FC寒天培地法	0~300 個/100mL		30~100ml	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ ₩ 2.3.2
試験沒	法2 I	EC培地法	0∼2400 MPN/100mL		約 100ml	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ WⅢ 2.3.3

試験法には、M-FC寒天培地法とEC培地法等があるが、いずれも大腸菌群のうち44.5 ±0.2℃でも繁殖しうる菌を対象としている。

59.2.4 試験方法の概要と選定の考え方

59.2.4.1 試験方法の概要

(1) M-FC寒天培地法

メンブレンフィルターを用いてろ過し、このフィルター上に捕集した細菌をM-FC 寒天培地に密着させて44.5±0.2℃で24±1時間培養したとき、発育した青色の集落から菌数を算定する。

本試験法は、大腸菌群のうち主として糞便由来菌である*E. coli*等が44.5℃という高温においても発育し、生成する酸がアニリンブルー色素を青色にする反応を利用した方法である。培養後、メンブレンフィルター上に発育した集落の色調を、拡大鏡または実体顕微鏡を用いて観察する。青色で光沢をもった集落を糞便性大腸菌群数と判定する。また、濃青色集落の他、薄い青色の集落も糞便性大腸菌とする。

本試験法では、ガス非酸性株も陽性とするため、EC培地法よりも数値は多くなると考えられる。また、集落の色調で判定するために個人差が生じやすいので、疑わしい集落については同定試験を行なうことが望ましい。

(2) EC培地法

乳糖ブイヨン培地(LB培地)を用いて推定試験を行ない、陽性判定のものから菌液をEC培地に移植して、44.5±0.2℃で24±2時間培養したとき、ガスの発生の有無を調べることにより、糞便性大腸菌群数を求めることができる。

59.2.4.2 試験方法の選定の考え方

糞便性大腸菌群数の試験方法には、M-FC寒天培地法とEC培地法等があるが、いずれも大腸菌群のうち44.5±0.2℃でも繁殖しうる菌を対象としている。M-FC寒天培地法は、通常の河川水等の試験に用いることができるが、メンブレンフィルターに捕集した細菌を培養するため、濁質が高い水では適用しにくい。無菌室またはクリーンベンチ内で行うことが望ましい。また、EC培地法は測定範囲は広いが、あまり使用されていない。

59.2.4.3 試験上の注意事項等

(1) 試料の保存

59.1.4.3 1)を参照。

59.2.5 その他

59.2.5.1 M-FC寒天培地法について

本試験法は、水浴場等の比較的清浄な水質に有効であるが、以下のような欠点もある。

- ① メンブレンフィルター $(0.45\,\mu\,\mathrm{m})$ を使用しているため、SSの多い試料を大量に ろ過できない。また、SSの多い試料では、コロニーがSSに隠れ計数が困難となる。
- ② 河川中には大腸菌以外にも各種の細菌が存在しており、それらが糞便性大腸菌群よりはるかに多い場合、糞便性大腸菌群の増殖が阻害されるおそれがある。
- ③ 本試験法による糞便性大腸菌群のコロニーの色は、濃青色~淡青色とされているが、糞便性大腸菌群以外のコロニーとの区別は容易ではない。

59.2.5.2 各試験法の比較

大腸菌群数 (BGLB培地法) と糞便性大腸菌群数のM-FC寒天培地法及びEC培地法を 比較した一例を表59-2-3に示す。

表59-2-3 大腸菌群数及び糞便性大腸菌群数5)

		大腸菌群数	糞 便性大	腸菌群数		比 率(%)	<u> </u>
		BGLB培地法	EC培地法	M-FC寒天培地法		- 1 (/0/	
試 料	月	(MPN/100 mL)	(MPN/100mL)	(個/100mL)	B/A	C/A	C/B
					D/A	C/A	C/D
ेन्द्र । । । चेट	4	A 40	В	C	0.0	0.0	90.0
河川水	4	49	4.5	1	9. 2	2. 0	22. 2
	5	33	13	0	99.4	0.0	0.0
	6	23	2	0	8.7	0.0	0.0
	7	110	8	0	7. 3	0.0	0.0
	8	1300	23	3	1.8	0. 2	13. 0
	9	460	6.8	3	1.5	0. 7	44. 1
	10	330	7.8	3	2.4	0.9	38. 5
	11	45	7.8	6	17.0	13. 3	80.0
	12	170	170	10	100.0	5. 9	5. 9
	1	7.8	0	5. 5	0.0	70.5	
	2	110	33	0	30.0	0.0	0.0
	3	270	170	2	63.0	0. 7	1. 2
排水	4	330000	38000	800	10.0	0. 2	2. 1
	5	240000	240000	8000	100.0	3. 3	3. 3
	6	130000	7900	740	6. 1	0.6	9.4
	7	2400000	1300000	5000	54. 2	0. 2	0. 4
	8	1400000	1300	40	0.1	0.0	3. 1
	9	94000	790	0	0.8	0.0	0.0
	10	1300000	790	500	0.1	0.0	63. 3
	11	70000	2400	0	3.4	0.0	0.0
	12	13000	790	210	6. 1	1.6	26. 6
	1	33000	24000	430	72.7	1. 3	1.8
	2	24000	7900	3300	32.9	13.8	41.8
	3	330000	17000	3300	5. 2	1.0	19. 4
河川水	4	330	33	4	10.0	1. 2	12. 1
	5	240	33	4	13.8	1. 7	12. 1
	6	490	14	3	2.9	0.6	21. 4
	7	790	49	12	6. 2	1. 5	24. 5
	8	3400	490	44	14.4	1. 3	9.0
	9	2200	79	16	3.6	0. 7	20. 3
	10	3300	79	11	2.4	0. 3	13. 9
	11	33	2	0	5. 1	0.0	0.0
	12	2200	79	38	3.6	1. 7	48. 1
	1	1300	2	1	0.2	0. 1	50.0
	2	49	0.8	1	13.9	2.0	125. 0
Series to	3	1100	1100	38	100.0	3, 5	3, 5
河川水	4	1300	79	76	6. 1	5. 8	96. 2
	5	33	33	29	100.0	87.9	87. 9
	6	33	5. 8	5	20.5	15. 2	86. 2
	7	790	70	70	8.9	8.9	100.0
	8	3500	23	3	0.7	0.1	13. 0
	9	4900	1700	2400	34.7	49.0	141. 2
	10	24000	4900	520	20.4	2. 2	10.6
	11	4900	170	900	3. 5	18. 4	529. 4
	12	790	49	52	6. 2	6. 6	106. 1
	1	1700	130	1500	7.6	88. 2	1153.8
	2	79	33	53	41.8	67. 1	160.6
	3	110	79	0	71.8	0.0	0.0

季節にもよるが、EC培地法は、BGLB培地法の約20%、M-FC寒天培地法は、BGLB培地法の約10%となっている。また、EC培地法とM-FC寒天培地法を比較すると、EC培地法が高めの値を示し、排水でその傾向が高い。

59.3 一般細菌

59.3.1 概要

一般細菌とは従属栄養細菌のうち、試験方法によって定められた培地に集落を形成する種々の好気性及び通性嫌気性細菌の総称で、ある水域中の有機汚濁の指標となる。一般に有機汚濁が高いほどその数は多くなる。

自然水中には多種多様の細菌が存在しており、これらの細菌は、本来の水生細菌群 (Pseudomonas、Chromobacter、Zoogloea等) の他に、土壌由来細菌群 (Bacillus等) や、 人間生活に伴って発生する下水由来の細菌群(Enterobacteriaceae等)の3群に分けら れる。自然水中の細菌の中には、人間生活に直接関係のないものがきわめて多いが、人 間生活に障害を与えたり、病原性をもつもの等もある。また、生理学的、生態学的にみ ても、無機物を栄養源とするもの (autotrophic)、有機物を栄養源とするもの (heterotrophic) 等があり、その必要栄養素は多種多様である。温度に対しても、好冷 細菌、中温細菌、好熱細菌等があり、これらの発育至適温度は様々である。さらに酸素 に対しても、酸素がなければ発育しない偏性好気性菌、少しでも酸素があると発育しな い偏性嫌気性菌、また、これらの中間で酸素があってもなくても発育する通性嫌気性菌 等がある。さらに、pH、塩濃度、培地成分の種類と濃度等に対する細菌の至適条件は種々 様々である。このように細菌は種類によって生理条件が異なり、使用培地、培養条件に 適したもののみが集落を形成するため、水中に存在するすべての細菌を検出することは できない。通常、細菌の種の同定には、種々の生化学的試験、血清学的試験等が必要で、 大変な手間と時間がかかるため、水の細菌試験では、普通は細菌の種類は問題としない。 大腸菌群がし尿汚染等による衛生上の安全度を示す指標であるのに対して、一般細菌 は水の一般的な汚濁度の指標となる。地下水では一般細菌数の急増は汚染の可能性を強 く示しているが、表流水では水温の変化や降雨によって著しく影響を受けるので、経時 的に菌数が多い値を示したからといって必ずしも新たな汚染を示しているとはいえない。 一般細菌数は、検水1mL中の個数(培地に現れた集落数)で表す。

59.3.2 基準等

一般細菌に係る基準等を表59-3-1に示す。

表59-3-1 一般細菌に関する基準

基 準 名	基準値	測 定 方 法	法令等
水道法に基づく水質基準	100個/mL以下	平成15.7.22厚労告261別表1 標準 天培地法	平成15.5.30厚生労働省令第101号

59.3.3 試験方法

一般細菌の試験方法を表59-3-2に示す。

表59-3-2 一般細菌の試験方法

	試験方法の名称	定量範囲*	精度 (CV%)	必要検水量	出 典
試験法1	標準寒天培地平板法	1~300個/mL		約100mL	上水試験方法 ⁻²⁰⁰¹ Ⅷ 1.1

^{* 1}平板当りの値

59.3.4 試験方法の概要と選定の考え方

59.3.4.1 試験方法の概要

(1) 標準寒天培地平板法

本試験法は、標準寒天培地を用いて、一定量の水を寒天培地で36±1℃、24±2時間培養する。1個の集落(コロニー)は、1個の細菌細胞から発育したと仮定して、培養した検水中から発育した集落数を計数し、原水1mL中の数値を求め、これを検水中の一般細菌数とする。

59.3.4.2 試験方法の選定の考え方

水中の一般細菌数を測定するには、試験法1の標準寒天培地平板法を用い、河川水、湖沼水、飲料水及び排水等の試料を対象とした試験に用いることができる。この他に、一定量の水の中の細菌細胞数を直接顕微鏡下で測定する総菌数測定法がある。総菌数測定法は、試験法1より実際値に近い菌数を知ることができるが、手数がかかること、浮遊物質が多い場合は適用できないことなどから、一般には試験法1が用いられる。

なお、平板培養法による定量方法には、衛生学的な細菌汚染の検出を主眼とする方法と、生態学的な見地から水中の従属栄養型一般細菌の検出及びそれらの推移を調査する方法とがある⁶⁾。前者は、普通寒天培地を用いて、36±1℃で24±2時間培養して形成される集落数を計数する試験方法である。後者は、低濃度培地(普通寒天培地の20%程度)を用いて、15℃から27℃までの一定の温度で3日ないし14日間培養する方法であるが、特殊な調査目的のための試験方法であり、普遍的ではない。

59.3.4.3 試験上の注意事項等

(1) 試料の保存

59.1.4.3 1)を参照。

59.3.5 その他

59.3.5.1 一般細菌と汚濁度の関係

一般細菌は、水に普通に見られる無害な雑菌からなるもので、希に糞便に由来する病原菌が混在していることもある。これらは水中に含まれる有機物をその基質として代謝・ 増殖するものであるから、有機物が多いほど、すなわち水の汚濁度が高いほど菌数が多くなる傾向がある。

59.3.5.2 汚濁の程度と一般細菌数

一般細菌と汚濁度がおおよそ比例関係を示すことから、一般細菌数を測定することによって水の汚濁の程度を推定することができる。例えば、飲料水に供する清澄な水では100個/mL以下であり、汚濁がほとんど進行していない水域の一般細菌数は100~200個/mL以下、中程度に汚濁している水域では、103~104個/mL、強度に汚濁している水域で、104個/mL以上の菌数が検出される。しかし、水中に毒物が一定量以上含まれている場合には、理化学試験によって汚濁の程度が測定されても、細菌数が極端に少ないか全然検出されないこともある。

59.3.5.3 水道水質基準について

水道水質に係る基準において、一般細菌試験の目的は、当初、大都市で採用されていた緩速ろ過池のろ過効率と関連し、かつ大腸菌群と同様、病原細菌に汚染されたことを疑わせる指標としての意味合いが強かった。その後、塩素消毒の徹底や、ろ過方式が緩速ろ過から急速ろ過へ変わってきたことから、その目的は、ろ過効率のチェックよりも病原細菌に対する消毒効果の判断、また、一般的な水質汚染指標へと変わってきた。1958年の水道基準に関する省令(厚令第23号)によって、「一般細菌(普通寒天培地に集落を形成しうる生菌をいう。)は、1 cc中100をこえてはならない。」と定められた。1978年の水質基準に関する省令(厚令第56号)では、基準値は変更されていないが、使用する培地が普通寒天培地から標準寒天培地に変更された。現在では、「1 mL中に100個以下」として定められている(2003年厚労令第101号)。

参考文献

- 1) 国土交通省近畿地方整備局 近畿技術事務所:水質調査の基礎知識, 2003.
- 2) 荒木峻編:環境科学辞典, 東京化学同人, 1995.
- 3) 上野英世: 大腸菌群の周辺, 用水と廃水, 19,1977.
- 4) 芦立徳厚:水質環境基準項目としての大腸菌群の評価,用水と廃水,30(3),229,1988.
- 5) 北海道開発局開発土木研究所: 未発表資料, 1988.
- 6) 桜井善雄:水中の一般細菌数検法に関する2.3の検討,日本水処理生物学会誌,2(2),1967.

全般的には下記の資料を参考とした。

- 1) 日本下水道協会編:下水道試験法, 1997.
- 2) 日本水道協会編:上水試験方法, 2001.
- 3) JIS K 0101 工業用水試験方法, 1991.
- 4) JIS K 0102 工業排水試験方法, 2008.
- 5) 並木博編: 詳解 工場排水試験方法解説, 日本規格協会, 2008.
- 6) 日本分析化学会北海道支部編:水の分析 第5版, 化学同人, 2005.
- 7) 日本薬学会編:衛生試験法・注解,金原出版,2005.
- 8) 北陸技術事務所:水質用語集, 2006.