

土木研究所

平成30年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2018 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

令和2年3月

国立研究開発法人 土木研究所

National Research and Development Agency
Public Works Research Institute

令和2年3月

平成30年度下水道関係調査研究年次報告書集

材料資源研究グループ

水環境研究グループ

水質チーム

概要

本報告書集は、平成30年度に国立研究開発法人土木研究所において実施された下水道に関係する調査研究の成果を集約して資料としてとりまとめたものである。

キーワード：下水道、下水処理、高度処理、汚泥、水質浄化、リサイクル

目 次

I 材料資源研究グループ

		頁
1	官民連携による下水資源・エネルギーを活かした植物栽培技術の研究 (受託業務費)	3
2	下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究 (運営費交付金)	12
3	河川事業等に由来するバイオマス の下水処理場内利用に関する研究 (運営費交付金)	19
4	公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究 (運営費交付金)	35
5	再生水の利用促進に向けた病原微生物と消毒副生成物の制御手法に関する研究 (運営費交付金)	45
6	資源回収型下水処理技術に関する研究 (運営費交付金)	49
7	遺伝子情報を活用した病原微生物の早期検出に関する研究 (運営費交付金)	56
8	貧毛類による下水汚泥の減容化技術の開発 (運営費交付金)	61

II 水質チーム

9	公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究（影響が懸念される物質のモニタリングと定量的リスク評価手法の構築） (運営費交付金)	65
10	公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の管理手法に関する研究（水質リスクを軽減するための処理技術） (運営費交付金)	72
11	底層環境に着目した停滞性水域における水環境管理技術に関する研究（簡易的な藻類定性定量方法の開発） (運営費交付金)	79
12	底層環境に着目した停滞性水域における水環境管理技術に関する研究（藻類増殖に関与する水質項目の影響評価） (運営費交付金)	84
13	気候変動による停滞性水域の熱・物質循環と水質環境への影響評価と適応策に関する研究（気候変動にともなう流域からダム貯水池・湖沼に流入する土砂量・栄養塩負荷量の変化の把握、ダム貯水池・湖沼の水質予測手法の構築と水質への影響評価、適応策の検討） (運営費交付金)	88
14	土砂供給に伴う河川環境影響評価およびダムからの土砂供給技術の運用手法に関する研究 (運営費交付金)	102
15	生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究 (運営費交付金)	108
16	下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究 (運営費交付金)	148
17	小規模下水処理場における未規制化学物質の挙動と除去特性に関する研究 (運営費交付金)	153
18	仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の慢性影響評価法の開発 (運営費交付金)	156

*受託業務費とは、国土交通省からの受託によるものである。

I . 材料資源研究グループによる研究

官民連携による下水資源・エネルギーを 活かした植物栽培技術の研究

研究予算：受託研究費（下水道応用研究）

研究期間：平 30～令 1

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、山崎廉予

1. はじめに

下水処理場が有する豊富な栄養塩を利用した微細藻類培養・燃料化技術の開発が近年盛んに行われている¹⁾。本研究は、下水処理水を用いて土着藻類を培養し、エネルギーを生産することを目的としている。2015 年から昨年度まで行っていた国土交通省の下水道技術研究開発（以下、GAIA）プロジェクトでは、「下水道資源・エネルギーを最大限に活用した希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産」と題して、屋外での藻類培養における膜分離 CO₂ の有用性の検証、藻類培養が困難になる冬季における、下水熱利用による藻類培養の検証、冬季の培養量向上および使用敷地面積の削減を目的として、密閉した縦型藻類培養装置における藻類培養の検証を行ってきた²⁾。GAIA プロジェクト後は、下水道資源利用の効率化、事業性の検討、装置のスケールアップを目的として、2018 年より、「官民連携による下水資源・エネルギーを活かした植物栽培技術の研究」と題して、国土交通省の下水道応用研究のもと、2020 年 3 月まで研究を実施している³⁾。

2. 屋外連続藻類培養装置のスケールアップの検証

2. 1. 実験概要

本章では、藻類培養に有用である 50L の密閉縦型培養装置において、培養量の増量が可能か検証することを目的に、装置のスケールアップによる屋外での連続藻類培養実験を実施し、藻類培養量、水質等への影響調査を行った。

A 下水処理場内に設置した藻類培養装置を用いて、藻類培養検証を行った。培養槽は、有効容積 50L (高さ 0.5 m、横 0.5m、幅 0.5m) の密閉縦型槽を使用した。藻類培養装置の 1 ユニットの図-1 左側に示す。GAIA (下水道技術研究開発) プロジェクトにおいて、本装置による藻類培養の有用性を示したため²⁾、本研究では、装置を直列に配置することで、スケールアップを行った。2018 年 10 月から 2019 年 1 月までは、装置を 3 ユニット設置し、150L で藻類培養を行った(図-1 真ん中)。2019 年 1 月から 2 月までは、装置を 5 ユニット設置し、4 ユニットで藻類培養を行い、後段の 1 ユニットの沈殿槽として用いた(図-1 右側)。

藻類培養に用いた基質(以下、流入水とする)は、A 下水処理場の塩素混和池通過後の処理水とし、培養槽に連続的に供給した。HRT は、12 月までは約 2 日とし、1 月以降は 3 日とした。また、培養槽内の藻類濃度が均一になるように、攪拌機による攪拌を常に行った。太陽エネルギーは、主に一面(0.5m×0.5m)から取り入れることを期待した。屋外設置のため、降雨、降雪の影響の排除および、水温保持の目的で蓋をした密閉型とした。

A 下水処理場の下水処理水の熱を熱交換器により採熱して約 40℃に加温した水道水を、培養装置内に設置したステンレス製のパイプ中に流し、1 月～2 月の冬期間、培養槽の保温を行った。培養槽の水温は、保温を行う最後段が

25℃に維持するように、熱交換水の流量を制御しながら流した。A 処理場の施設で回収した膜分離 CO₂ は、藻類の炭素源として、適宜制御しながら添加した。培養槽の後段には、培養槽と同じ 50L のタンクを設置し、沈殿タンクとした。この上澄み水を処理水として排水した。流入ポンプ、攪拌機等の動力は、A 処理場の施設に設置した消化ガス発電機より供給した。よって、外部からのエネルギー投入を行わない、下水道資源のみを活用した藻類培養装置となっている。連続式密閉型藻類培養装置の全体図を、図-2 に示す。

流入水、培養槽の水(第 1 槽、第 2 槽、第 3 槽、第 4 槽)、沈殿槽、沈殿タンクから排水される水(処理水)を週 1 回サンプリングし、SS、TS、VS、クロロフィル a、リン、窒素を適宜測定した。IC、DOC、TOC、POC は、培養期間中に3度測定を行った。藻類の成分、水質測定の間隔は平成 30 年 10 月から平成 31 年 2 月の約 4 カ月間とした。



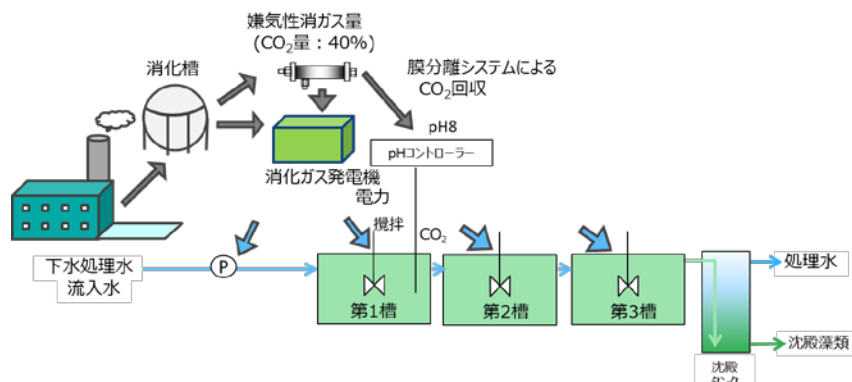
(50L)



(150L) (2018 年 10 月～2019 年 1 月) (200L、保温有)(2019 年 1 月～2 月)



図-1 密閉縦型藻類培養装置



(150L) (2018 年 10 月～2019 年 1 月)

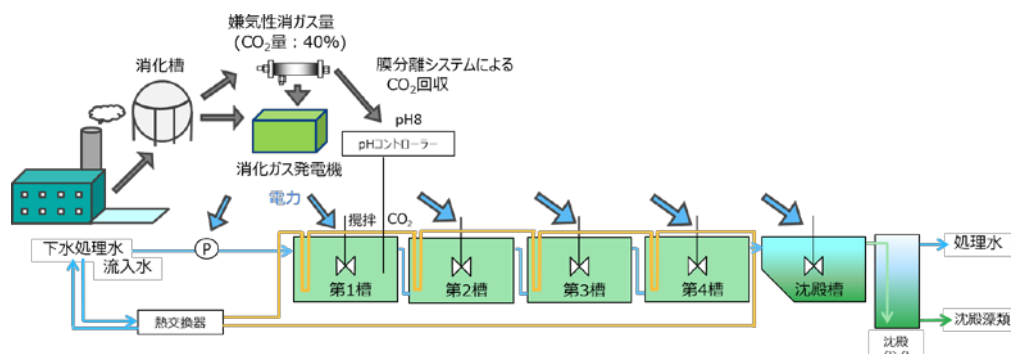


図-2 連続式藻類培養装置の全体図(200L、保温有)(2019 年 1 月～2 月)

2. 2. 藻類培養実験結果(150L) (2018 年 10 月～2019 年 1 月)

2018 年 10 月～2019 年 1 月における、150L 培養槽での流入水、第 1 槽、第 2 槽、第 3 槽、放流水の SS、クロロフィル a、各水質項目の経時変化を図-3 に示す。また、培養槽内の水温および外気温の経日変化を図-4 に示す。図-3 (a)より、藻類培養装置の水質測定開始後、バイオマス濃度の指標となる SS は、1 カ月後までに増加傾向を示し、11 月 21 日は、第 1 槽で 538 mg/L に増殖した。このとき、第 2 槽は 498 mg/L、第 3 槽は 251 mg/L であり、培養槽の後段になるにつれ、培養量が減少する結果となった。Fig6-1-6(b)より、藻類濃度の指標となるクロロフィル a においても、SS と同様の挙動を示していた。Fig6-1-6(c)、(d)より、窒素、リンの枯渇が時折みられた。これが原因の一つとして、藻類の枯死、解体が起これ、培養量が減少したものと考えられる。HRT は、約 2 日 (流量約 70 L/日)であったため、後段での栄養塩の枯渇を防ぐため、HRT を短くすることで解決できるものと考えられる。処理水の SS は、培養量が多い期間は、流入水の SS よりも高く、放流するためには、沈殿槽の後段において、さらなる処理が必要であることが示された。窒素、リンは、前段での枯渇、後段での放出がみられることが多いが、処理水の水質としては、流入水よりも低い値で放流できていた。図-3(e)に、11 月 12 日の第 1 槽の藻類構成種と、50L の密閉型培養槽 1 槽のみで培養した、昨年度の冬季(1 月 3 日)の藻類構成種を示す。その結果、どちらも 98%以上が緑藻綱であり、中でも 20%程度がイカダモ科であり、同様の藻類構成であることが示された。気温が下がる冬季では、珪藻綱の割合が数 10%程度存在する傾向があるが、密閉型にすることで、ほぼ緑藻綱となることの再現性が得られた。

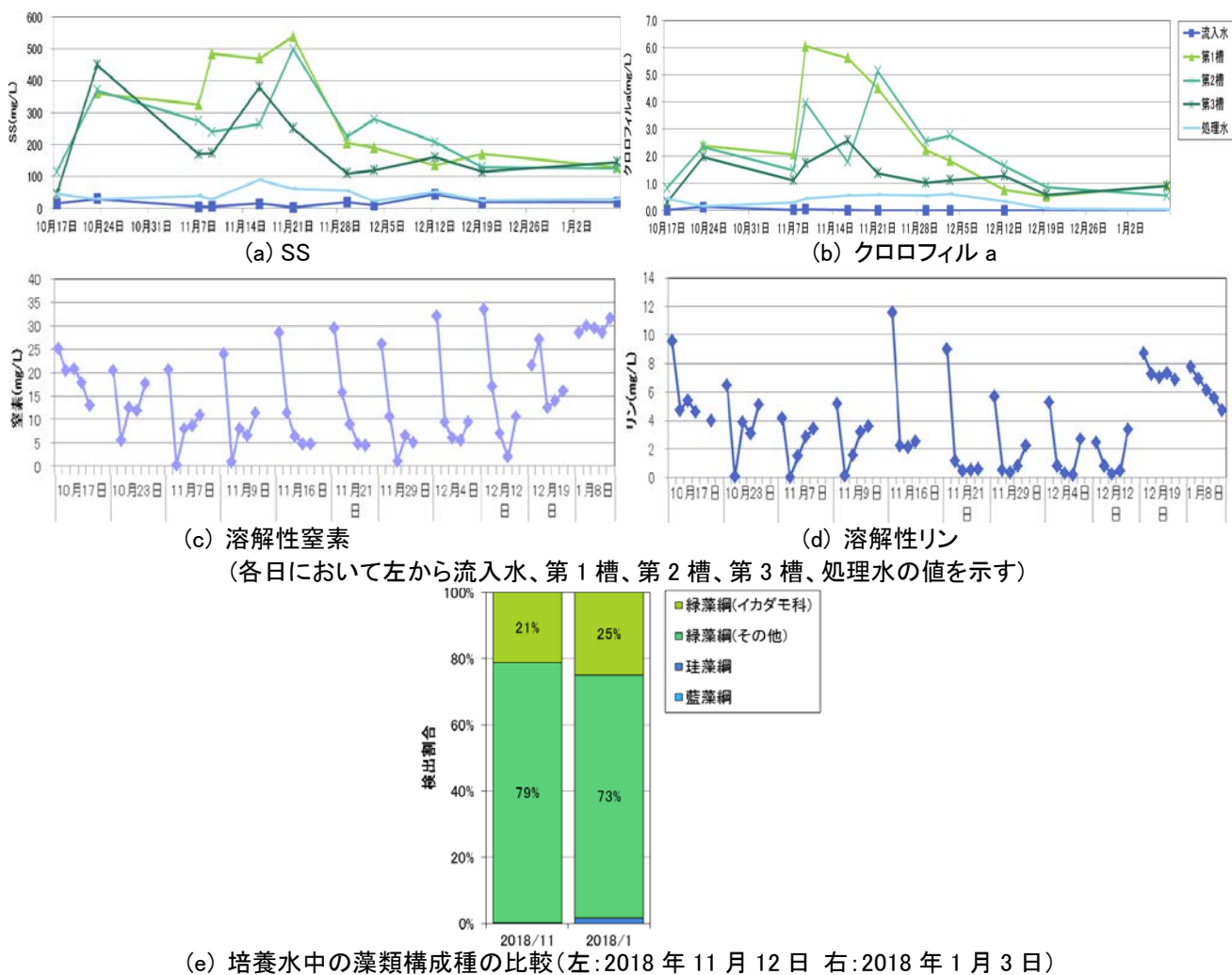
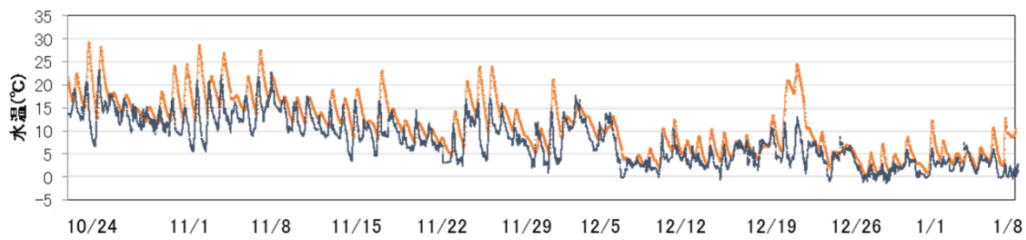
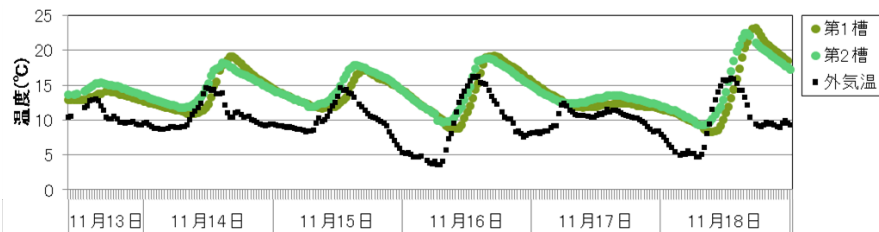


図-3 流入水、培養水、処理水の各成分、水質の経時変化



(a) 第1槽の水溫(橙色)と外氣溫(黒色)の経時変化



(b) 第1槽、第2槽の水溫および外氣溫(2018年11月13日～18日)

図-4 密閉縦型培養槽の水溫と外氣溫

図-4より、培養槽の水溫は、外氣溫よりも高く維持できていることがわかる。図-4(b)より、11月13日から18日の期間において、培養槽の水溫は、10℃から23℃の間で維持できている、特に夜間、外氣溫が5℃程度まで低下しても、15℃で維持できている、密閉槽にするだけでも、外氣溫より10℃高い水溫で培養槽を維持できることが示された。これらの結果より、50L培養槽を連結した150Lでの藻類培養は可能であり、容積を増やすことで、流量をあげることができ、培養量の増加が見込めることが示された。しかし、培養槽の後段での栄養塩濃度の枯渇により、藻類培養量への影響が大きいことが想定された。簡易な解決方法として流量をさらに増加させることが挙げられるが、リン酸センサーやアンモニアセンサーなどの設置により、枯渇しない流量での制御も検討する必要があると考えられる。

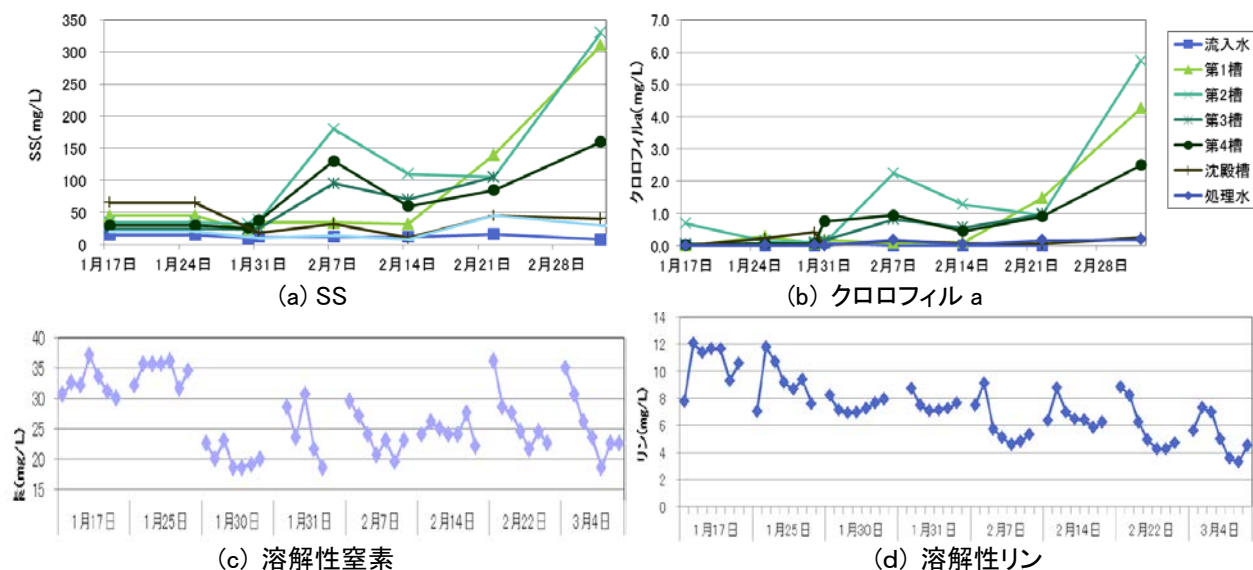
2. 3. 冬季における藻類培養実験結果(200L、保温有)(2019年1月～2月)

2019年1月より、50Lの培養槽を5つに増設し、4槽を培養槽、後段の1槽を沈殿槽とし、藻類培養を開始した。冬季のため、HRTを長くする目的で流量は変更しなかった。よって、この期間のHRTは2.9日であった。また、2.2の結果を受け、後段への培養藻類の移動を考え、各槽の接続方法を変更した。

2019年1月～2019年2月における、200L培養槽での流入水、第1槽、第2槽、第3槽、第4槽、沈殿槽、処理水のSS、クロロフィルa、各水質項目の経時変化を図-5に示す。またこの期間は、培養槽内にステンレス製パイプを設置し、下水処理水熱で加温した水道水による培養槽の保温を試みている。培養槽内の水溫および外氣溫を図-6に示す。図-5(a)より、藻類培養装置の水質測定開始後、バイオマス濃度の指標となるSSは、2カ月後の3月4日に第1槽で310 mg/L、第2槽で330 mg/L、第3槽は170 mg/L、第4槽は160 mg/Lであった。藻類の培養は見られるものの、後段に行くにつれて培養量の増加がみられず、培養液の滞留やHRTの長さが原因で、前段での培養量が高かったと考えられる。処理水のSSは、流入水とほぼ同程度の濃度であり、沈殿槽を追加したことによる沈降効果があったと考えられる。2月7日までに藻類培養がみられなかった原因としては、図-6に示した通り、培養槽の水溫の低さが考えられる。藻類濃度の指標となるクロロフィルaについても、SSと同様に推移していた。図-5(c)より、窒素は、1月30日以降に除去傾向がみられた。藻類培養による窒素除去率は、2月7日以降で、約29%であると考えられ、残りは、硝化による減少であると考えられる。図-5(d)より、リンも1月30日以降に除去傾向がみられ、2月7日に26%、2月22日に46%と、徐々に除去率が上がっていった。

図-6より、培養槽の保温がある程度正常に行えたと考えられるのは、1月31日から2月7日と2月13日、14日、19日、21日である。1月31日から2月7日の期間は、第1槽から第3槽に順番に加温水を流して保温しており、第3槽

の水温を25℃に制御するよう温水の流入を調整した。また、第2槽において、約10mの保温用の配管を設置しており、他の槽の10倍程の長さであった。このとき、第1槽が約10～15℃で変動しており、第2槽が約25℃で安定、第3槽が約20℃で安定、第4槽以降は外気温とほぼ同じ挙動を示していた。配管の長さが長い第2槽で最も保温性が高く、温水の流入が最も遅い第3槽では、25℃まで上昇させることができなかった。2月14日以降は、第1槽から第4槽に加温水を順番に流下させて加温しており、第4槽の水温を25℃に制御するよう流量を調整した。また、第2槽、第4槽において約3m、第1槽、第3槽で約1mの長さの配管とした。2月21日の夜間において、第1槽で約21℃、第2槽では約30℃、第3槽、第4槽では約25℃、沈殿槽では約5℃であり、第4槽を25℃に制御できている期間もあるが、配管の漏れなどもあり、今後も配管の整備、調査が必要である。



(各日において左から流入水、第1槽、第2槽、第3槽、第4槽、沈殿槽、処理水の値を示す)

図-5 流入水、培養水、処理水の各水質項目の経時変化

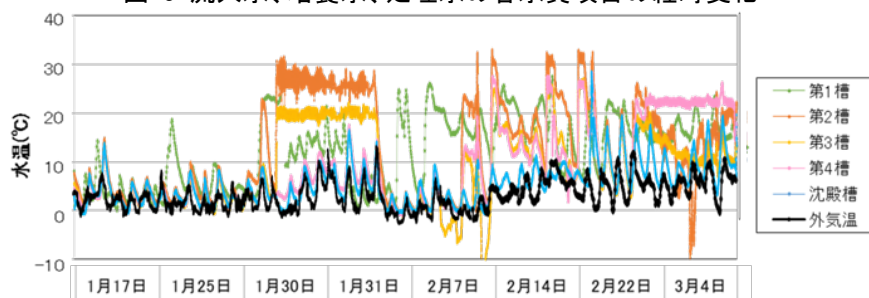


図-6 密閉縦型培養槽の水温と外気温

3. 培養藻類の回収方法の検証

本節では、培養した藻類の回収方法の検証を目的として、重力濃縮、遠心濃縮、凝集剤添加による回収を検討した。10月23日の培養藻類について、回収方法の検討を行った。培養槽、処理水のSS共に、測定期間中でも安定している日の培養藻類を用いた。重力濃縮は、500ml メスシリンダーを用いた沈降試験により判断した。0.5時間、1時間、2時間、3時間、24時間での上澄み液を採取し、上澄みのSSを測定した。培養藻類のSSは400mg/L程度と汚泥と比べて低く、沈殿した藻類の界面で沈降性を判断することは難しいため、上澄みに残存する藻類量で、沈降性を判断した。遠心濃縮は、3,000 rpm、5分で行い、上澄みのSSを測定した。凝集剤は、藻類のTSに対して、0.5%、1.0%を添加し、自然沈降後、上澄みのSSを測定した。図-7に、第1槽と第3槽の培養藻類で回収実験を行った結果を示す。その結果、0.5時間で、上澄みのSSは第1槽では、1/2、第3槽では、1/4程度まで減少し、24時間静置後、それぞれ55mg/L、75mg/Lまで減少したが、放流するには濃度が濃く、培養藻類の重力濃縮は難しいことが示された。

このときの様子として、上澄み中に粒子はほぼ見えないが、薄い黄緑色の着色があり、それ以上静置しても沈降は難しいと考えられた。遠心、凝集剤添加では、どちらの槽においても、上澄みの SS は低く、いずれかの方法で、確実に培養藻類を回収できると考えられる。

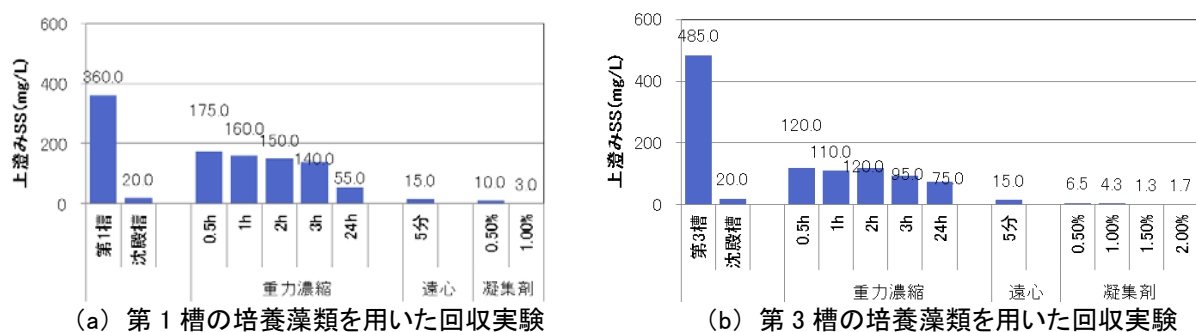


図-7 培養藻類の回収実験(10月23日)

4. 培養藻類のエネルギー化評価

本節では、A 下水処理場をモデルケースとして想定した上で、藻類培養システム導入のフィージビリティならびに培養藻類の有効利用によるエネルギー生産量を計算し、システム導入効果を示すとともに、システムの導入に必要な要件を提案することを目的とした。

4.1. 下水処理場における温熱供給量からみた冬季の藻類培養のフィージビリティ

温熱供給量を律速として、冬季の藻類培養のフィージビリティを行った。図-8に、ヒートポンプの送り水温と戻り水温の温度差を示す。この温度差が、培養槽で消費された温度となる。図-9に、培養槽への温水供給流量の1分間ごとの瞬時値を示す。また、図-10には、2月1日の3時間分を抜粋して示す。図-9(a)において、1月31日から2月7日および2月13日、14日の値が正常値として解析する。この期間のヒートポンプの温度差は、約1~2℃、流量は約10~35 L/minであった。また、図-10より、夜間の加温水の供給は、約1時間継続、約20分停止を繰り返していることがわかる。稼働率は、約60%であった。温度差と、流量から算出される消費熱量を、図-11に示す。

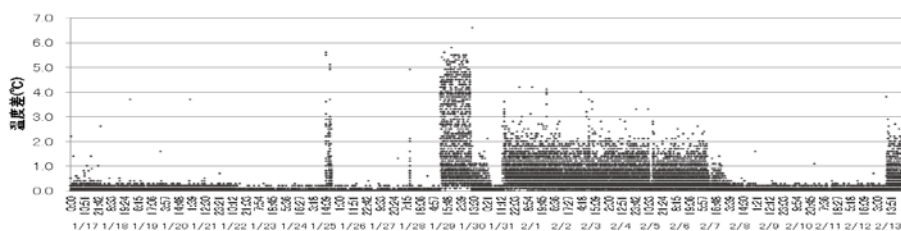


図-8 熱交換器の送り水温と戻り水温の差

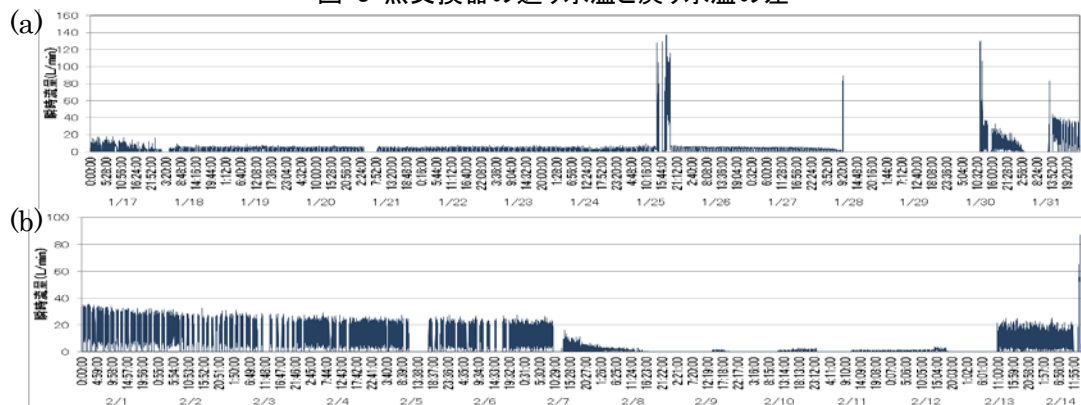


図-9 培養槽への温水供給流量 (a) 1月17日~1月31日(b) 2月1日~2月14日

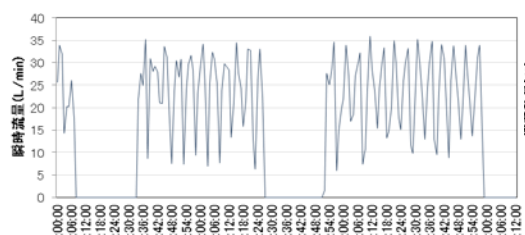


図-10 培養槽への温水供給流量(2019/2/1)

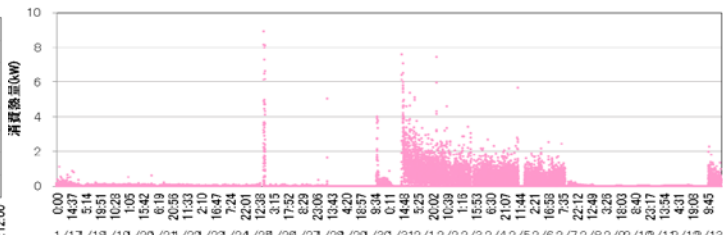


図-11 温水供給時の消費熱量

消費熱量は 0.006 から 7.4 kW であり、平均は 0.67kW であった。よって、200L の培養槽を加温するための 1 日の消費熱量は、9.65 kWh であり、34.7 MJ/日と試算された。密閉縦型培養槽の 1 面を保温槽として使用した場合、50L 培養槽を加温するための消費熱量は 0.275kWh²⁾であり、1 日 6.6 kWh、23.8 MJ/日と概算される。よって、1L あたりの消費熱量で比較すると、本研究で加温方法による消費熱量は、1 面を保温する場合の約 1/3 であると試算された。冬季に利用可能な温熱量は、256 GJ/日であるため²⁾、1,475.5 m³ の培養槽の保温が可能である概算とあった。HRT を 2 日とすると、流量は、737.8 m³/日となり、A 下水処理場の下水処理水の流量(22,000 m³/日)の約 3.6 %を使用する試算となった。また、培養槽の高さを 2m、厚さを 0.25m の密閉槽にすると、約 3km の敷地幅が必要であり、A 下水処理場では、約 0.5 %の敷地を使用する試算となった。厚さ 0.5m の密閉槽にすると、約 1.5 km の敷地幅が必要となり、高さと厚さをどの程度で培養可能かが重要となる。以上より、下水処理場での導入が非現実的ではないことが示された。

4. 2. 培養藻類の嫌気性消化への投入における有用性の検証

下水処理水で培養した藻類は、嫌気性消化への投入バイオマスとしての利用が考えられる。本節では、密閉縦型藻類培養装置の培養藻類が、嫌気性消化への投入において、有用性があるか否か検証した。

4. 2. 1. 実験方法

培養藻類の利用方法について、嫌気性消化への投入の有用性を検証した。有効容量 500mL の嫌気性消化反応器 (Bioprocess Control 社製) を用いて、培養藻類の濃縮液と下水汚泥の混合による嫌気性消化の回分実験を行った。各リアクターでの運転条件を表 1 に示す。消化汚泥に濃縮汚泥のみ投入した系、投入汚泥と縦型藻類培養装置から遠心濃縮で回収した培養藻類を投入した系、凝集剤により濃縮した培養藻類を投入した系、各藻類のみを投入した系を作製し、消化汚泥の VS に対して投入 VS が合計 10%または 20%になるように、投入割合を設定した。

消化汚泥は、B 下水処理場の消化槽の消化汚泥を用い、濃縮汚泥は、B 処理場の消化槽に投入される濃縮汚泥を用いた。濃縮汚泥の組成は、初沈汚泥の重力濃縮汚泥と余剰汚泥の機械濃縮汚泥が 1 対 1 程度で混合したものである。培養藻類は、12 月 12 日の培養藻類を用いた。遠心分離機により濃縮後、濃度を調整して投入した。バイオマスを投入後、窒素ガスでパージし、運転を開始した。発生したバイオガスは、強アルカリ溶液を通過させることで二酸化炭素を除去し、メタンガスの精製量として計測した。温度は 35℃程度に制御し、運転期間は約 1 カ月とした。回分実験開始前と終了後に、汚泥の性状分析、有機酸濃度の測定を行った。

表 1 メタンガス発生ポテンシャル試験の条件

系列	名称	消化汚泥 ml	濃縮汚泥	投入バイオマス	
			投入 VS(%) ^{*1}		種類
1	DS+ES(1)	400	10	—	—
2	DS+AI濃縮(1)	400	—	10	濃縮藻類
3	DS+AI凝集(1)	400	—	10	凝集藻類
4	DS+ES(2)	400	20	—	—
5	DS+ES(1)+AI 濃縮(1)	400	10	10	濃縮藻類
6	DS+ES(1)+AI 凝集(1)	400	10	10	凝集藻類

4. 2. 2. 実験結果

図-12 に、投入バイオマスの VS あたりのメタンガス発生量を示す。各投入バイオマスを投入した際のガス発生量から、消化汚泥のみのガス発生量を差引くことで、投入バイオマスによるガス増加量とした。その結果、藻類を凝集した場合、凝集剤によるメタン菌の活動阻害や、攪拌の不均一などから、ガス発生量が低くなる可能性が示された。遠心濃縮した培養藻類と濃縮汚泥では、同程度のメタン発生ポテンシャルがあることが示された。また、藻類のみの投入で、わずかに値が大きく、メタンガス発生量のポテンシャルは大きい可能性も考えられた。図-13 に、メタン転換率を示す。メタン転換率においても、藻類は汚泥と同程度であった。図-14 に、試験開始時の消化液中に含まれる有機酸濃度を示す。酢酸、プロピオン酸、i-酪酸以外の、ギ酸、n-酪酸、i-吉草酸、n-吉草酸は検出されなかった。藻類には、i-酪酸は含まれず、酢酸は汚泥より濃度が低い傾向を示した。プロピオン酸は、汚泥と同程度であった。これらから、藻類と汚泥は、有機酸の成分、濃度もほぼ同じであり、藻類を消化槽に投入することによる有機酸組成への影響は少ないと考えられる。図-15 に、試験終了後の消化液中のアンモニア性窒素濃度、リン濃度を示す。藻類を投入した系において、アンモニア性窒素やリン濃度が高くなる傾向は見られず、消化液の返流水への影響は大きくないと考えられる。

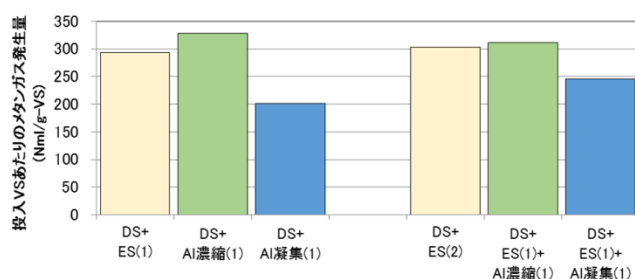


図-12 投入 VS あたりのメタンガス発生量

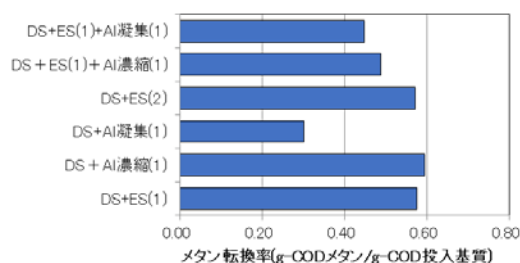


図-13 メタン転換率の比較

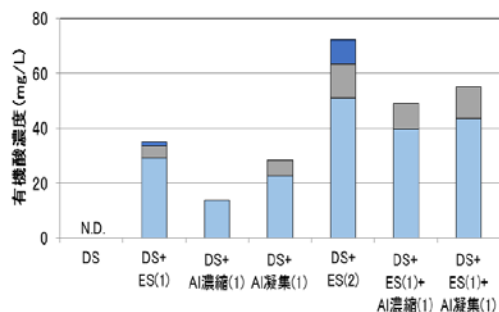


図-14 試験開始時の消化液中の有機酸濃度

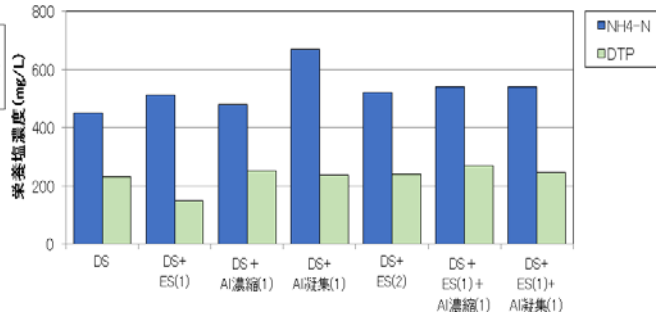


図-15 試験終了後の消化液中の栄養塩濃度

4. 3. 縦型藻類培養装置における培養藻類のエネルギー化評価

縦型藻類培養槽の培養藻類について、脂肪酸メチルエチルエステル化、固形燃料化、嫌気性消化への投入の3種類への利用におけるエネルギー収支を試算した。消費エネルギー、生産エネルギーに関わる項目を、表 2 に示す。なお、設備導入などにかかる初期費用は考慮していない。また、流量は、4. 1. で試算した 737.8 m³/日、嫌気性消化におけるエネルギー転換率は、4. 2. で算出した、汚泥と藻類を投入した場合で 0.49、藻類のみを投入した場合で 0.6 とした。図-16 に、A 処理場における縦型培養装置での培養藻類を利用したエネルギー生産システム導入のエネルギー収支を示した。その結果、嫌気性消化への投入が、メタン転換率 0.6 の場合、2,207MJ/day、0.49 の場合、1,651MJ/day、固形燃料化では 1,812MJ/day、脂肪酸メチルエステル化は-6,103MJ/day となり、培養した藻類を固形燃料化、嫌気性消化への投入で利用することにより、藻類培養槽を導入しても、エネルギー収支がプラスになることが示された。

表 2 培養藻類の利用方法におけるエネルギー収支算出項目²⁾

項目（エネルギー±）	計算式
藻類培養	
藻類生産エネルギー	培養藻類量 × 単位当たり高位発熱量 (16.2kJ/g-dry)
攪拌	単位水当たり攪拌エネルギー (144kJ/m ³ /d) × 培養槽体積
CO ₂ 吹き込み	使用可能 CO ₂ 量 × CO ₂ 吹き込み単位エネルギー (79.9kJ/kg-CO ₂)
回収（重力濃縮）	
濃縮後藻類容積	藻類回収量【培養藻類量 × 回収率 (0.76)】／藻類回収濃度【藻類 SS 濃度 × 濃縮効率 (58)】
かき寄せ機	単位かき寄せ消費電力 (144kJ/m ³) × 濃縮後藻類容積
脱水※嫌気性消化は除く	
脱水後藻類容積	藻類回収量／脱水後藻類濃度【藻類回収濃度 × 濃縮倍率 (31.7)】
回収（遠心濃縮）	
濃縮後藻類容積	藻類回収量【培養藻類量 × 回収率 (0.99)】／藻類回収濃度【藻類 SS 濃度 × 濃縮効率 (46)】
遠心機	遠心機消費電力 (360kJ/m ³) × 濃縮後藻類容積
① 脂肪酸メチルエステル化	
乾燥	藻類回収量 × {ベルト乾燥熱 (13.8kJ/g-dry) + ベルト乾燥電力 (1.44kJ/g-dry)}
エネルギー化	藻類回収量 × {脂質抽出消費エネルギー (1.2kJ/g-dry) + 脂質抽出電力 (0.25kJ/g-dry) + オイル交換量 (0.15kJ/g-dry)}
生産エネルギー	オイル生産量【藻類回収量 × 藻類オイル含有率 (0.021g-oil/g-dry)】× オイル中高位発熱量 (42kJ/g-oil)
② 固形燃料化	
消費電力	消費電力 + 消費重油エネルギー【単位消費重油 (34L/m ³) × 脱水後藻類容積 × 重油中高位発熱量 (45.2MJ/L)】
エネルギー生産量	エネルギー回収量【藻類生産エネルギー × 回収率 (0.76)】× 固形燃料化によるエネルギー収率 (0.75)
③ 嫌気性消化	
消費電力	濃縮後藻類容積 × 単位消費電力 (19,080kJ/m ³)
エネルギー生産量	エネルギー回収量 × 嫌気性消化におけるエネルギー転換率 (0.1、0.3、0.46)

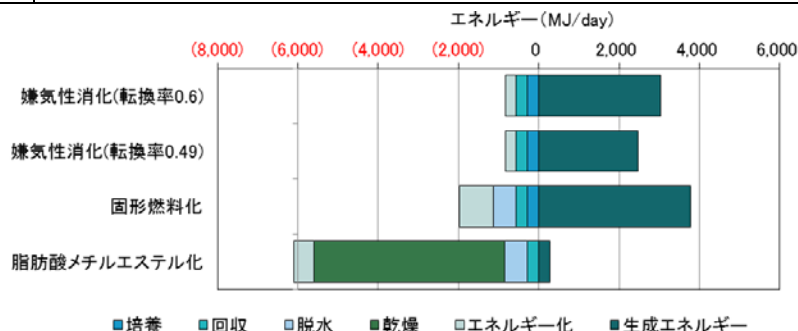


図-16 A 処理場における縦型培養装置での培養藻類を利用したエネルギー生産システム導入のエネルギー収支

本調査研究は、国土交通省下水道応用研究からの受託業務費により実施されたものである。

謝辞

長岡技術科学大学 環境社会基盤工学専攻 資源エネルギー循環研究室 姫野修司准教授、A、B 処理場の皆様には、本研究において多大なるご協力を頂きました。ここに記して、謝意を表します。

参考文献

- 1) Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J.: The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. Water Res., 70, 9–26, 2015.
- 2) 国立大学法人 長岡技術科学大学、国立研究法人 土木研究所: 平成 29 年度 下水道技術研究開発報告書、下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産、2018
- 3) 山崎廉予、岡安祐司、重村浩之、佐々木聖弥、石川隆世、姫野修司、下水道資源を活用した微細藻類培養システムの開発、第 55 回下水道研究発表会、N-4-4-8、pp.575-577、2018
- 4) 山崎廉予: 下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産に関する研究、土木技術資料 平成 31 年 1 月号、p54、2019

下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 28～令 3

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、山崎廉予

【要旨】下水道を核とした資源回収、エネルギー生産およびエネルギー利用技術の開発を目指し、下水道資源を用いた藻類培養技術の高効率化や、培養藻類の回収技術、メタン発生ポテンシャル等に関して調査・研究を行った。初沈流出水を用いた上部開放レースウェイ培養槽による屋外での連続藻類培養において、下水処理水の熱を利用した簡易的な加温でも、通年での藻類培養が可能であることが示された。このときの沈殿藻類の VS/TS、高位発熱量は、下水汚泥と同程度であり、嫌気性消化への投入が有効である可能性が示された。重力濃縮のみでも、沈殿藻類の回収と処理水の SS の低下が一定程度見込めることが示された。嫌気性消化汚泥の脱水分離液を用いた藻類培養では、下水で希釈した溶液を基質として、HRT を 16.8 日に設定した 2 系列（攪拌機による攪拌を行う系列、および曝気による攪拌を行う系列）のカラム型藻類培養水槽を用いて、3 月～10 月の間、回分式継代藻類培養を実施した。実験期間中の各系列の溶解性窒素の平均除去率は 77%、96%、溶解性リンの平均除去率は 94%、98%、藻類培養液 1L あたりの平均余剰藻類生産速度は 14.4mg-SS/L・d、22.0mg-SS/L・d であった。また秋季に得られた各系列の培養藻類のメタン発生ポテンシャルは、それぞれ 882NmL/g-VS、362NmL/g-VS、培養期間中に得られた各系列の培養藻類の凍結乾燥物の高位発熱量は 18.0～22.4MJ/kg-DS であった。

キーワード：下水道資源、藻類培養、消化汚泥の脱水分離液、バイオマス、混合嫌気性消化、高位発熱量

1. はじめに

新下水道ビジョンでは、下水処理場での資源集約・エネルギー供給拠点化・自立化が中期目標として示されている¹⁾。下水汚泥中には食品残渣並びにその代謝物として高濃度の栄養塩が存在しており、これらを回収して資源利用する手法を検討する必要がある。また、下水処理水中の低濃度の栄養塩についても、閉鎖性水域など高濃度の栄養塩が問題となっている地域においては、除去することで放流先の公共用水域の水質改善につながることから、極力有効利用することが望ましいと考えられる。これらに対し、下水汚泥と他のバイオマスとの混合処理や、下水に含まれる栄養塩類を用いた有用藻類の培養、培養藻類からのエネルギー抽出等の新たな技術開発を推進することで、対策が可能であると考えられる。

これらの達成に向け、本研究では、「下水処理水を利用した藻類培養の高効率化、培養藻類の回収、濃縮、脱水技術の開発」、「下水処理水放流先に生育する水草の、下水汚泥と混合処理技術の開発」、「汚泥処理工程で発生する排水を利用した藻類培養技術の開発」、「培養藻類・水草と下水汚泥の混合物について、石炭代替固形燃料化への適用性調査およびメタン発酵（嫌気性消化）の特性解明調査」を目的とする。

2. 下水処理水を利用した藻類培養の高効率化、培養藻類の回収、濃縮、脱水技術の開発

2.1 目的

化石燃料の枯渇への懸念、化石燃料利用にともなう地球温暖化を背景に、再生可能エネルギーの利用が推進される現代において、藻類を用いたエネルギー生産に大きな注目が集まっている。近年では、都市下水や工場排水に豊富に含まれる窒素、リンといった栄養塩を用いた藻類培養の試みが実施されてきている^{2)・3)}。日本のように下水道システムが広く普及している国々では、下水処理場内に流入してくる栄養塩や、焼却炉や消化ガス由来 CO₂、下水熱など下水処理場が有する資源および下水処理場における土地や施設などのストックを活用した藻類培養によるエネルギー生成が期待される。

既往研究において^{4)・5)・6)}ボトリオコッカスやクロレラなどのオイル含量の高い特定藻類や、ユーグレナなどの高機能物質を生産する特定藻類などを対象に、下水処理水等を用いた培養が実施されているが、これら特定の藻類の培養は、実環境下での適用性、大規模化に課題が残る。これに対し本研究では、特定藻類の接種は行わず、下水処理水を直接培養液として用い、与えられた環境条件で優占する土着藻類（以下、藻類

と記述)の培養技術の確立および培養藻類のエネルギー利用手法の検討を行ってきた。その結果、下水の最初沈殿池流出水（以下、初沈流出水という）や二次処理水による藻類培養が可能であることなどを示してきた^{7,8)}。本研究では、下水道資源による藻類培養の高効率化を目的とし、栄養塩や有機物量の多い初沈流出水を基質とした藻類培養の検討を行った。また、通年の藻類培養を目指し、冬季において、下水処理水での加温が有効であるか検討を行った⁹⁾。

2. 2 実験方法

藻類培養には、380L 上部開放レースウェイ型培養槽(図-1)を用いた。培養基質は、A 処理場の流入水を A 下水処理場内の実験施設に設置した沈殿池を通過した後の初沈流出水とした。培養槽の後段には、32L の沈殿槽を設置し、重力濃縮により沈殿藻類の回収を行った。沈殿槽からの排水は「処理水」と定義した。光合成のために供給する CO₂ は、純炭酸ガスポンプを使用し、pH コントローラーで pH8 に制御しながら添加し

た³⁾。培養期間は、2017 年 6 月から 2018 年 2 月とした。冬季の期間(11 月～2 月)は、培養槽内に設置した配管に A 処理場の下水処理水を通し、下水処理水の熱を利用した、簡易的な培養槽の加温を行った。この間、系列 1、系列 2 の 2 系列で培養を行い、加温の有無および HRT が藻類培養へ与える影響を調査した。分析は、流入水、培養液、処理水の SS、流入水、培養液のクロロフィル、水質(COD_{Cr}、PO₄-P、NH₄-N)を、週 1 回行った。また、週 1 回、沈殿槽から沈殿藻類の引き抜きを行い、TS(固形物濃度)、VS(有機物濃度)を測定した。9 月と 1 月には、沈殿藻類の高位発熱量を測定した。

2. 3 実験結果

冬季における加温及び水理学的滞留時間(HRT)の藻類培養への影響評価の結果(SS、水温)を図-2 に示す。系列 1 は、11 月中旬から加温し、系列 2 は、12 月中旬から加温した。また、2 系列とも 11 月中旬から HRT を 4 日から 8 日に変更し、12 月下旬から 4 日に戻した。

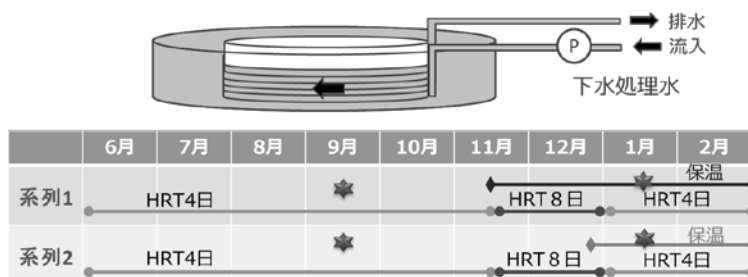


図-1 上部開放レースウェイ型培養槽

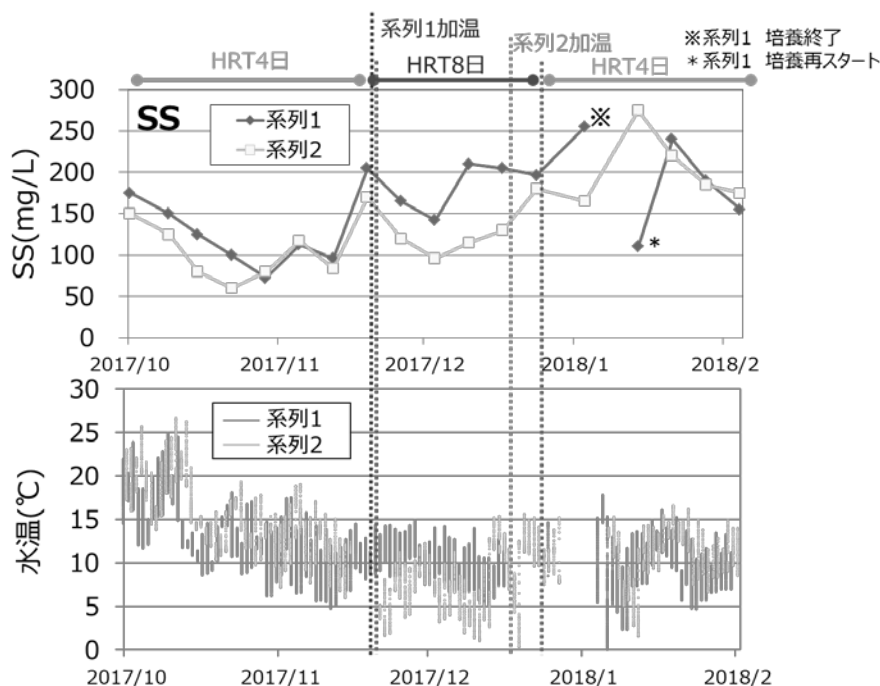


図-2 冬季における加温及び HRT の藻類培養への影響

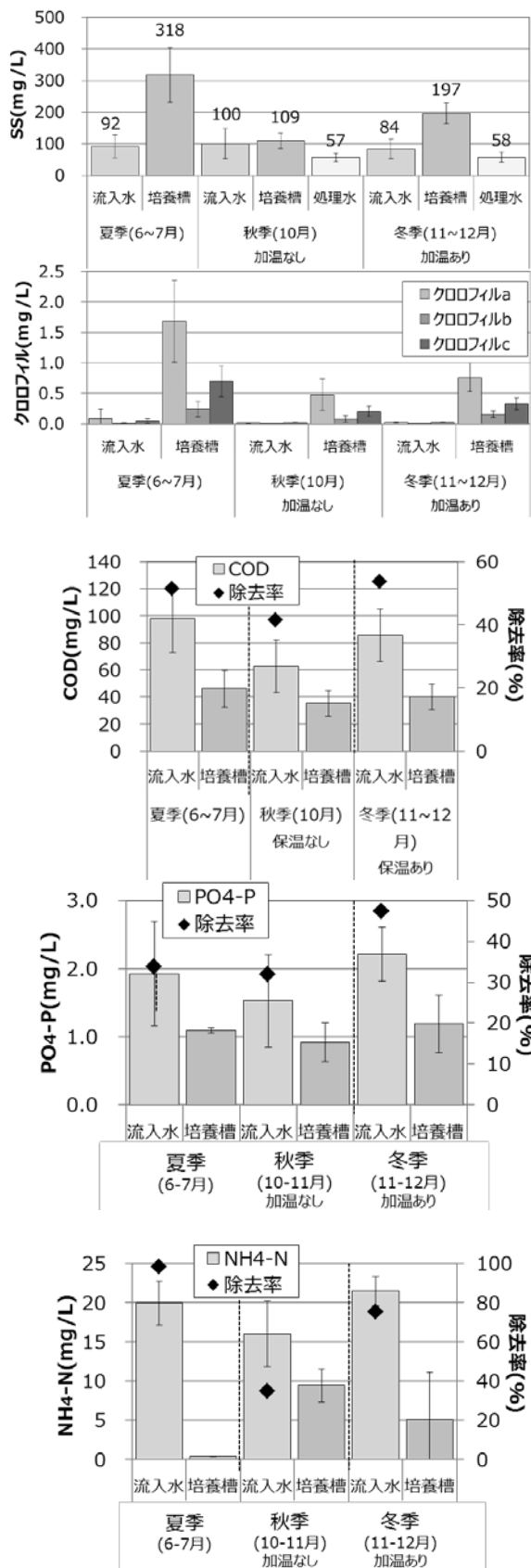


図-3 流入水、培養液、処理水の SS および、流入水、培養液のクロロフィル a、水質

図-2 より、11 月中旬～12 月中旬の間、加温により、系列 1 では、系列 2 よりも 5℃程度水温が高く、昼間は 15℃程度で培養できていたことがわかる。SS は 1.5 ～2 倍程度濃度が高かった。下水処理水を培養槽中の配管に通すだけの簡易的な加温であるが、藻類培養量増加への効果がみられた。HRT を 4 日に戻したあとも、藻類培養が安定して行われていることが示された。

系列 1 の夏季、秋季、冬季におけるバイオマス量、水質分析結果を図-3 に示す。夏季では、水温が 20～30℃と高いこともあり、SS は平均 300mg/L 程度で培養できていた。クロロフィル a は、1.5mg/L 程度であった。秋季は、夜間の水温が 5℃程度まで下がることもあり、流入水に対して、培養槽での培養液の SS の増加は見られなかった。クロロフィル a も、0.5mg/L 程度まで減少した。一方、冬季において、培養槽の簡易的な加温を行ったことにより、200mg/L 程度での藻類培養が可能であることが示された。

沈殿槽は、重力濃縮のみであるが、処理水の SS は、秋季においては、培養液の SS の 1/2、冬季の培養液の SS の 1/3 程度の約 60mg/L の濃度まで下げられた。しかし、いずれも処理場外へ排水できる濃度まで減少しなかったため、後段処理または、水処理系への返送が必要であると考えられる。藻類培養における水質の変化について、夏季の COD、PO₄-P、NH₄-N の除去率は、それぞれ 51%、34%、98%程度であり、加温を行った冬季では、それぞれ 54%、47%、75%程度であった。過去の研究では、下水処理水による藻類培養において COD 除去は見込めなかったが、初沈流出水での藻類培養により、夏季、冬季とも、栄養塩の除去に加え、処理水よりも細菌類が多く存在しており、細菌類の培養も想定され、有機物の除去もある程度は見込めることが示された。冬季において、培養液および沈殿槽での沈殿藻類 (1 週間で沈殿した分) の TS は、それぞれ 0.05(±0.013)%、0.42(±0.21)%であった。このとき沈殿藻類は、10～20L 回収できていたことから、1 週間で、約 8.5 倍に濃縮された藻類が培養槽 1L あたり、0.03L～0.05L 回収できる計算であった。また、沈殿藻類の VS/TS は、75 (±6.8) %であった。沈殿藻類を汚泥との混合嫌気性消化に利用することを考えると、沈殿藻類の VS/TS は汚泥と同等であるが、TS は低いと考えられ、消化槽に投入する濃縮汚泥と同程度の TS1%～3%にするためには、さらに 2～7 倍の濃縮が必要であると考えられる。これに対しては、沈殿槽の表面積を大きくすることや、回収頻度を下げることなどで濃縮効率を上げる等の対応が必要であると考え

られる。沈殿藻類の高位発熱量は、9月、1月でそれぞれ 16,100kJ/kg-DS、19,800kJ/kg-DS であり、下水汚泥と同程度であった。

初沈流出水を用いた上部開放レースウェイ培養槽による屋外での連続藻類培養において、下水処理水の熱を利用した簡易的な加温でも、通年での藻類培養が可能であることが示された。沈殿藻類の VS/TS、高位発熱量は、下水汚泥と同程度であり、嫌気性消化への投入が有効である可能性が示された。重力濃縮のみでも、沈殿藻類の回収と処理水の SS の低下がある程度見込めることが示された。下水処理場へ導入する場合は、初沈流出水の一部を藻類培養に用い、培養後の、上澄み水は活性汚泥を用いた元の水処理系へ返送し、処理することが想定される。そのため、元の水処理系で処理する全水量は減らせることができ、栄養塩、有機物濃度についても、負荷をそれほど大きくすることなく、処理することができると考えられ、藻類培養系を導入する利点はあると考えられる。今後、藻類培養系、活性汚泥を用いた水処理系での全体のシステムとして、負荷、エネルギー等含めてさらに検討する必要がある。

3. 汚泥処理工程で発生する排水を利用した藻類培養技術の開発

3. 1 目的

本研究では、汚泥処理工程で発生した汚泥からの分離液を用いて培養した藻類を、下水処理場にて下水汚泥と混合し、嫌気性消化によりエネルギーを回収する手法の開発を目的としている。

既往の調査研究の結果、下水処理水による藻類培養が可能であることが示された⁷⁾。下水処理場には、下水処理水以外にも、窒素やリンなどの栄養塩を豊富に含む工程水が存在する。そこで本研究では、これらを対象とした藻類培養技術について検討する。まず、手始めとして、汚泥の減容化のために用いられている消化工程で発生する消化汚泥を脱水した際に得られる脱水分離液を対象とした藻類培養技術の開発について検討した^{10)・11)・12)}。新たに開発する技術の概略を図-4に示す。

3. 2 汚泥処理工程での排水を利用した藻類培養

3. 2. 1 実験方法

消化汚泥の脱水分離液は、下水処理方式：標準活性汚泥法、汚泥処理方式：中温嫌気性消化を採用している B 下水処理場より採取し用いた。なお、脱水分離液は、藻類培養への阻害を考慮し、他の工程水を用いて希釈することとし、一部合流式を含む分流式の B 下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、さらに、部分循環式嫌気性ろ床実験装置にて処理を行った処理水を希釈水として用いた¹¹⁾。藻類培養は、内径 20cm、厚さ 1cm、長さ 1m の透明アクリル管を鉛直に立て、底面部分に排出口を設けた上部開放型のカラム型藻類培養装置 2 系列を用い、茨城県つくば市内の温室内で実施した。藻類培養方法は回分式とし、培養開始時に、消化汚泥の脱水分離液と嫌気性ろ床流出水の混合液と、前回の培養終了時の培養液の一部を、

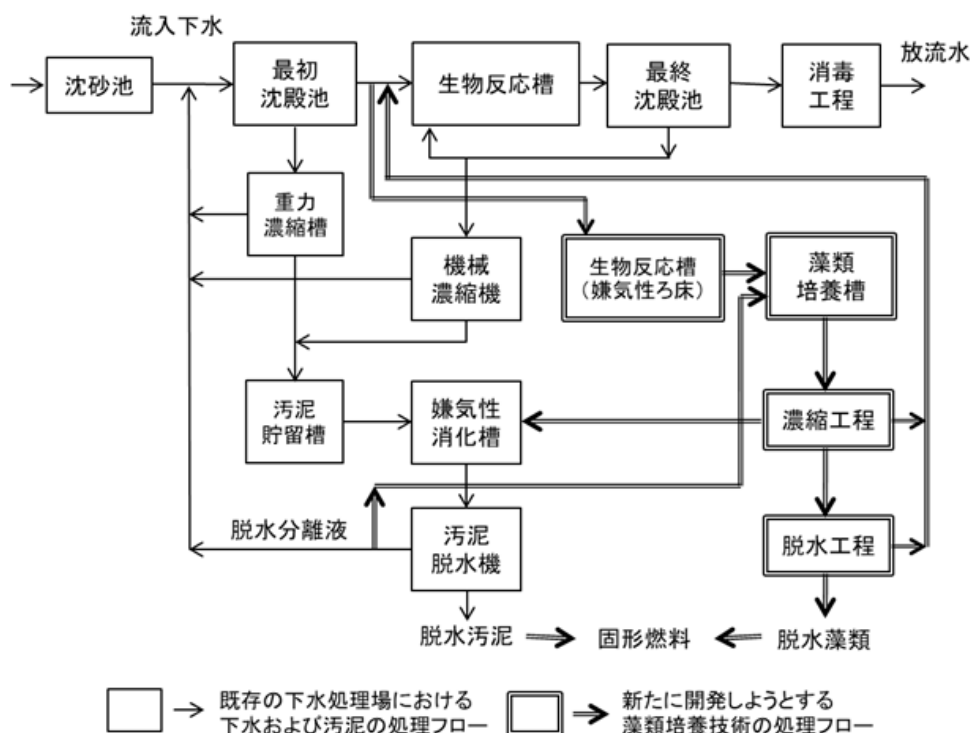


図-4 消化汚泥の脱水分離液を用いた藻類培養によるエネルギー生産のイメージ

カラム型藻類培養装置に投入し、その後は、一定の系列の攪拌は、系列1では攪拌機により、系列2では小型のエアレーション装置による曝気により行った。また、2系列ともHRTを16.8日に設定した。消化汚泥の脱水分離液と嫌気性ろ床流出水の混合比は、あらかじめ各溶液中の溶解性りん濃度を測定し、混合液の濃度が4mg-P/Lになるように設定した。前回の培養終了時の培養液は、混合液に対して、1/5の容積の溶液を投入し、合計で30Lになるように調整した。温室での実験に先立ち、室温15～20℃の実験室内に、蛍光灯により1日あたり12時間、側面から光（光量子密度：約165 μ mol/m²/s）を照射する5Lのビーカー2系列を設置し、消化汚泥の脱水分離液、嫌気性ろ床流出水、および別の実験で、下水処理水を用いて培養した藻類培養液を投入し、1週間の培養後、温室内で実施する実験と同様の要領で、培養期間1週間の回分式藻類継代培養を3回実施し、得られた培養液を、温室での実験に用いた。さらに、分析開始前に4か月間の馴致期間を設けた。分析は、2018年3月から開始し、培養開始時および終了時の培養液の性状（溶解性各態窒素、溶解性りん、浮遊物質）を分析した。

3. 2. 2 実験結果

温室内で実施した2018年3月～10月の間の実験期間中における、2系列（系列1—攪拌機による攪拌、系列2—曝気による攪拌）の培養装置内培養液の水質分析結果の平均値を表-1、表-2に示す。培養液中の溶解性窒素濃度、溶解性りん濃度は、培養前後を比較すると、藻類に取り込まれる等の結果、低下した。溶解性窒素は、消化汚泥の脱水分離液中、嫌気性ろ床流出水中とも、大部分がアンモニア性窒素の形態であった。一方、培養終了時の培養液中の溶解性窒素は、系列1では実験の経過に伴い、亜硝酸性窒素が残留する傾向がみられたが、系列2では、同様な傾向はみられなかった。

表-1 系列1の培養液の分析結果（平均値、単位 mg/L）

	培養開始時	培養終了時
溶解性窒素	36.1	8.34
溶解性りん	3.37	0.20
浮遊物質	63.1	242

表-2 系列2の培養液の分析結果（平均値、単位 mg/L）

	培養開始時	培養終了時
溶解性窒素	35.0	1.5
溶解性りん	3.30	0.05
浮遊物質	76.5	369

3. 3 培養藻類のメタン発生ポテンシャル評価

3. 3. 1 実験方法

嫌気性消化槽へ培養藻類を投入した際の効果を確認するために、消化汚泥、濃縮汚泥および培養藻類を用いて、消化汚泥のみを添加する系列（ブランク）、消化汚泥に濃縮汚泥のみを添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥と系列1で得られた培養藻類を添加する系列、ならびに、消化汚泥に濃縮汚泥と系列2で得られた培養藻類を添加する系列について、中温条件（35℃）にて回分式嫌気性消化実験を行った。実験に使用した消化汚泥、濃縮汚泥は、茨城県内の、下水処理方式として標準活性汚泥法、汚泥処理方式として中温消化を行っているA下水処理場より採取して使用した。実験に使用した培養藻類は2018年9月に得られたものを冷蔵保存して使用した。なお、回分式嫌気性消化実験は、2018年10月に実施した。

回分式嫌気性消化実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥400mLを投入し、表-3に示す所定量の濃縮汚泥、濃縮培養藻類を添加し、沸騰後冷ました水道水を加えて500mLとした。その後、反応器内を窒素ガスで十分に置換し密栓後、35℃に調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。

表-3 回分式嫌気性消化実験における基質の組成

系列名	投入消化汚泥	投入基質（g-VS）		
		濃縮汚泥	濃縮培養藻類	
			系列-1	系列-2
I-1	400mL	—	—	—
I-2	400mL	—	—	—
II-1	400mL	0.323	—	—
II-2	400mL	0.323	—	—
III-1	400mL	0.323	0.065	—
III-2	400m+	0.323	0.065	—
IV-1	400mL	0.323	—	0.065
IV-2	400mL	0.323	—	0.065

3. 3. 2 分析方法

消化汚泥、濃縮汚泥、系列1で得られた濃縮余剰培養藻類濃縮液、系列2で得られた培養藻類の濃縮液の性状分析は、下水試験方法に従って行った。なお、COD_{Cr}の分析は、吸光光度計（DR2400、HACH社）により、COD試薬を用いた。アンモニア性窒素濃度の測定には、自動比色分析装置（TRAACS2000、BRANLUEBBE社）を用いた。発生メタンガス量の測定には、水上置換方式のガス流量計（BioReactor Simulator AMPTS II、Bioprocess Control）を用いた。

3. 3. 3 結果および考察

回分式嫌気性消化実験におけるメタン生成量（2 系列の平均値）の経時変化を、図-5 に示す。なお、本実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、系列 1 で得られた培養藻類の濃縮液、系列 2 で得られた培養藻類の濃縮液の TS は 1.1%、2.8%、1.7%、1.6%、VS は 0.8%、2.4%、1.3%、1.2% であった。濃縮汚泥と系列 2 の培養藻類を投入した系列 IV では、実験開始後 1 週間程度の間は、メタン発生速度が大きかったが、その後は、基質を投入しなかったブランクの系列と同程度にまで、発生速度が低下した。一方、濃縮汚泥と系列 1 の培養藻類を投入した系列では、実験開始後 1 週間程度および実験開始後 12 日目～16 日目にかけてメタン発生速度がやや増加し、その後はブランクの系列と同程度にまで、発生速度が低下する傾向がみられた。本実験では、実験期間を 21 日間に設定した。各系列における累積メタン発生量、他の系列でのメタン発生量を差し引いて計算される濃縮汚泥、培養藻類由来のメタン発生量を整理したものを表-4 に示す。

本実験における、投入基質の単位 VS あたりのメタン発生量は、濃縮汚泥のみを投入した場合で、 $91.5 / 0.323 = 283 \text{ mL/g-VS}$ であった。既往の調査研究で示されている一般的な下水処理場における中温消化での数値 (0.36 NL/g-VS) に比べてやや小さかった。また、

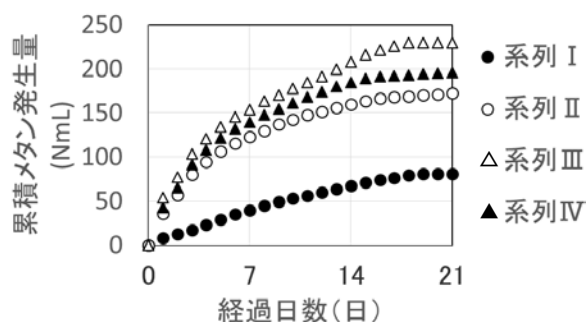


図-5 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量の経時変化

表-4 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量
(単位：NmL)

系列名	累積メタン発生量	メタンガスの由来			
		消化汚泥	濃縮汚泥	培養藻類	
				系列 1	系列 2
I	80.8	80.8	—	—	—
II	172.3	80.8	91.5	—	—
III	217.6	80.8	91.5	57.3	—
IV	208.7	80.8	91.5	—	23.5

投入基質として、濃縮汚泥のみを投入した場合（系列 II）と、濃縮汚泥および培養藻類を投入した場合（系列 III～IV）を比較し、投入した培養藻類の単位 VS あたりのメタン発生量を算出すると、系列 1 の培養藻類は $57.3 / 0.065 = 882 \text{ NmL/g-VS}$ 、系列 2 の培養藻類は $23.5 / 0.065 = 362 \text{ NmL/g-VS}$ となった。系列 1 の培養藻類の単位 VS あたりのメタン発生量は、一般的な下水処理場における中温消化での下水汚泥のメタン転換率 (360 NmL/g-VS) に比べて、2 倍以上大きい数値であった。一方、系列 2 の培養藻類の単位 VS あたりのメタン発生量は、一般的な下水処理場における中温消化での下水汚泥のメタン転換率 (360 NmL/g-VS) と同程度の結果となっていた。以上の結果より、藻類培養の方法によって、得られる培養藻類のメタン発生ポテンシャルは大きく異なることがわかった。

3. 4 培養藻類の凍結乾燥物の高位発熱量測定

実験期間中に、1 か月に 1 回程度の頻度で、得られた培養藻類の凍結乾燥試料の高位発熱量を測定した。測定方法は JIS M 8814 により行った。測定結果を表-5 に示す。測定結果は $18.0 \sim 22.4 \text{ MJ/kg-DS}$ の範囲であった。石炭の高位発熱量 ($25 \sim 30 \text{ MJ/kg-DS}$) には及ばないものの、未消化の下水汚泥の乾燥物¹²⁾ ($16 \sim 20 \text{ MJ/kg-DS}$) と比較すると同程度であり、固形燃料化への適用可能性が考えられる結果であった。今後、培養により得られた藻類に対して、濃縮・脱水・乾燥または炭化を施した藻類燃料化物について、湿重量基準の低位発熱量を測定し、有効発熱量を評価していく。

表-5 培養藻類の凍結乾燥試料の高位発熱量測定結果
(単位：MJ/kg-DS)

日付	系列-1	系列-2
4 月 13 日	20.3	—
4 月 20 日	—	22.4
5 月 11 日	19.6	—
5 月 18 日	—	21.1
6 月 15 日	—	20.4
6 月 22 日	19.2	—
7 月 13 日	—	18.5
7 月 20 日	18.0	—
8 月 17 日	18.4	—
8 月 24 日	—	18.3
9 月 14 日	18.6	—
9 月 21 日	—	18.5
10 月 19 日	—	20.3
10 月 26 日	21.1	—
11 月 23 日	18.6	—
11 月 30 日	—	21.1

4. まとめ

本年度、下水を利用した藻類培養の高効率化技術の開発、培養藻類の回収技術、汚泥処理工程で発生する排水を利用した藻類培養技術の開発について調査した。以下に、得られた成果を示す。

1. 初沈流出水を用いた上部開放レースウェイ培養槽による屋外での連続藻類培養において、下水処理水の熱を利用した簡易的な加温でも、通年での藻類培養が可能であることが示された。
2. 沈殿藻類の VS/TS、高位発熱量は、下水汚泥と同程度であり、嫌気性消化への投入が有効である可能性が示された。重力濃縮のみでも、沈殿藻類の回収と処理水の SS の低下が一定程度見込めることが示された。
3. 消化汚泥の脱水分離液を下水で希釈した溶液を基質として、水理学的滞留時間を 16.8 日に設定した 2 系列（攪拌機による攪拌を行う系列、および曝気による攪拌を行う系列）のカラム型藻類培養水槽を用いて、3 月～10 月の間、太陽光の下で、回分式継代藻類培養を実施した。実験期間中の各系列の溶解性窒素の平均除去率は 77%、96%、溶解性りんの前平均除去率は 94%、98%、藻類培養液 1L あたりの平均余剰藻類生産速度は、それぞれ、14.4mgSS/L・d、22.0mgSS/L・d であった。
4. 秋季（9 月）に得られた、消化汚泥の脱水分離液を用いて培養した藻類と下水汚泥の混合回分式嫌気性消化実験を実施し、培養藻類のメタン発生ポテンシャル評価を行った。投入した培養藻類 VS あたりのメタンガス発生量は、攪拌機による攪拌を行う系列、および曝気による攪拌を行う系列の場合、それぞれ、882NmL/g-VS、362NmL/g-VS であり、藻類培養の攪拌方法により大きく異なることがわかった。
5. 消化汚泥の脱水分離液を用いて培養した藻類を凍結乾燥した試料について、高位発熱量を測定したところ、藻類培養が可能な 3 月～11 月の期間を通じて、18.0～22.4MJ/kg-DS の範囲であり、下水汚泥の乾燥物と同程度となることがわかった。

参考文献

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道政策研究委員会 報告書 新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～、2014。

- 2) J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton: Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond, *Water Research*, Vol.45, pp.6637-6649, 2011.
- 3) S. Chinnasamy, A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das: Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biodiesel application, *Bioresource Technology*, Vol.101, pp.3097-3105, 2010.
- 4) S. Cho, T.T. Luong, D. Lee, Y.K. Oh, T. Lee: Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production, *Bioresource Technology*, Vol.102, pp.8639-8645, 2011.
- 5) E.B. Sydney, T.E. da Silva, A. Tokarski, A.C. Novak, J.C. de Carvalho, A.L. Woiciechowski, C. Larroche, C.R. Soccol: Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, Vol.88 (10), pp.3291-3294, 2011.
- 6) 鈴木秀幸ら：下水処理場から発生する「未利用資源」を利活用したユーグレナ培養技術の実証研究、第 53 回下水道研究発表会講演集、p.184-186、2016
- 7) 国立研究開発法人土木研究所：下水道を核とした資源回収・生産・利用技術に関する研究、平成 27 年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4347 号、pp.26-51、2017.
- 8) 岡安祐司、山崎廉予、桜井健介、重村浩之：下水汚泥の嫌気性消化脱離液を用いた藻類培養における水理学的滞留時間の影響について、第 52 回日本水環境学会年会講演集、p.160、2018.
- 9) 山崎廉予、重村浩之：下水を用いた自然発生型藻類培養技術の検討、第 21 回水環境学会シンポジウム、pp.84-85、2018.
- 10) 岡安祐司、山崎廉予、重村浩之：消化脱離液を用いて培養した微細藻類の嫌気性消化に関する基礎的研究、第 55 回下水道研究発表会講演集、pp.1139-1141、2018
- 11) 岡安祐司、山崎廉予、重村浩之：消化汚泥の脱水分離液を用いて培養した藻類の燃料化物としてのポテンシャルについて、環境システム計測制御学会誌、Vol 23, No.2/3、pp. 94-100、2018.
- 12) 岡安祐司、山崎廉予、重村浩之：消化汚泥の脱水分離液を用いた藻類培養における攪拌方法の影響について、第 53 回日本水環境学会年会講演集、p.371、2019.
- 13) 国土交通省水管理・国土保全局：下水汚泥のエネルギー化ガイドライン改訂版一、p.47、2015.

河川事業等に由来するバイオマスの下水处理場内利用に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 28～令 3

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、桜井健介、山崎廉予

【要旨】下水道施設を活用したバイオマスの資源・エネルギー有効利用方法の開発を目指し、河川・道路等の管理で生じる草木バイオマスを下水処理場内で利用する方法に関して調査・研究を行った。剪定枝を下水污泥焼却炉で補助燃料として活用する技術について、2 種類の外気条件を設定して、白煙防止空気の利用可能量と、乾燥可能な剪定枝廃材の量を算出し、それらを下水污泥と混焼することによる化石燃料削減量を算定した。植物系バイオマスを污泥脱水助剤として適用する技術において、イネ科以外の種類でも下水污泥の脱水助剤としての有用性の可能性があり、バイオマスの TS が脱水性に影響する可能性があることが明らかとなった。また、遠心脱水以外にも、模擬ベルトプレス脱水でも効果があることが示された。さらに、バイオマス混合による脱水の際の污泥の剥離、ろ液の水質への影響はほぼないものと考えられた。河川事業等の公共事業に由来する刈草の部位（葉、茎、根）ごとのメタン転換ポテンシャルを評価したところ大きな差異が見られ、刈草中の葉や茎や根などの部位の含有比率について配慮する必要があると考えられた。また、メタン転換効率を増加させるためには、特定の部位を選択または排除する方法が有効である可能性が考えられた。

キーワード：バイオマス、剪定枝、刈草、污泥脱水助剤、混合嫌気性消化

1. はじめに

下水道整備の進展にともない、平成 27 年度末時点で下水道人口普及率は約 77.8%、管路延長は約 47 万 km、処理場数は約 2,200 箇所など下水道ストックは増大してきた¹⁾。循環型社会形成推進基本計画（平成 25 年 5 月、閣議決定）²⁾では、「循環資源・バイオマス資源のエネルギー源への利用」のために、下水処理場を地域のバイオマス活用の拠点としてエネルギー回収等を行う取り組みを推進する方向性が示されている。また、国土交通省河川砂防技術基準維持管理編（河川編）³⁾では、伐木や刈草について、リサイクル及びコスト削減の観点から有効利用に努めることとされるなど、河川事業等で発生するバイオマスも有効利用が求められている。

下水処理場は、全国に点在し、かつ、エネルギー消費施設であり、また、河川事業等に由来するバイオマス（剪定枝や刈草）の発生源に近接している場合もあり、効率的なバイオマス利用が期待できる。このような背景を踏まえて、本研究では、河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用を促進することを目的とする。

2. 剪定枝を木質バイオマスとして下水污泥焼却炉で活用する技術の検討⁴⁾

過年度⁵⁾示したように、河川、道路、公園、ダムなどの管理のため日頃より剪定枝が発生しており、収集体制が確立していることから、剪定枝は比較的利用しやすいバイオマスであると考えられる。これらで発生した剪定枝等の木質バイオマスを、下水污泥焼却炉における補助燃料として利用できれば、地球温暖化対策として貢献可能と考えられる。しかし、剪定枝は含水率が 45%-59%(湿量基準)⁶⁾程度であり、補助燃料として活用する際は、チップを乾燥して利用するのが望ましいと考えられる。一方で、下水污泥焼却炉の白煙防止空気は、白煙の防止に必要な熱量以上の熱を大気中へ放出しており、一部が利用可能である⁵⁾。

本稿では、下水污泥焼却炉における排熱を活用した剪定枝廃材の補助燃料利用システムについて、実用性の検討に資するため、まず、現状の下水污泥焼却炉における白煙防止空気の利用可能量を算出し、それで乾燥可能な剪定枝廃材の量を算出した。そして、その剪定枝廃材を補助燃料として利用した時の化石燃料削減量を算定した。下水污泥焼却炉は、処理能力 50t/d 規模を想定した。なお、本稿における含水率は、特に記述の無い場合は、材料の湿潤重量に占める水分重量の割合（湿量基準）で表した。

本稿における剪定枝廃材の補助燃料利用システム（以下、「本システム」と呼ぶ）のフローは、図-1 に

示したとおり、ヤードに収集された剪定枝廃材を、バックホーで破碎機に投入してチップ化し、下水汚泥焼却炉の近傍で白煙防止空気を用いた乾燥機で乾燥させ、貯留槽において短時間貯留後、混練機を用いて下水汚泥と混練し、下水汚泥焼却炉へ投入することを想定した。なお、白煙防止空気は貯留せずに、乾燥機の稼働時のみ、発生している白煙防止空気の一部を使用することとした。

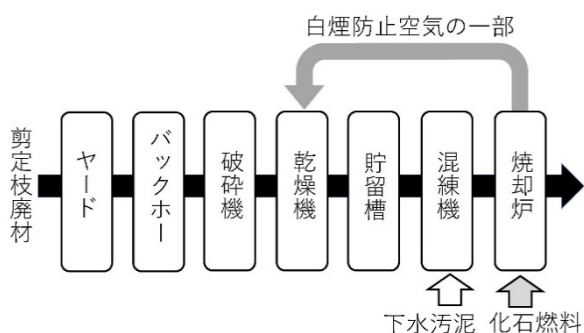


図-1 剪定枝廃材の補助燃料利用システムにおける剪定枝廃材のフロー

2. 1 方法

2. 1. 1 白煙防止空気の利用可能量

生じた白煙防止空気のうち、白煙の防止に必要な量を引いた余剰分は、他の目的に利用可能であり、これを白煙防止空気の利用可能量として算出した。白煙は、排気ガス中の水蒸気が凝縮したものであり、白煙防止空気と排ガスが混合されて煙突から排出され、外気温度まで温度が低下する過程で、絶対湿度が飽和水蒸気量よりも低ければ白煙は生じない。このことから、飽和水蒸気曲線を描いたグラフを用いて、白煙の発生の有無を判定することができる^{6) 7)}。白煙を防止する条件として想定する外気温度及び湿度は、白煙を防止する条件として、外気温度 5℃、湿度 50%程度が一般的である⁸⁾とされていることから、「外気温度 5℃、湿度 50%」（以下、「外気条件 A」と呼ぶ）と、冬季のより厳しい条件を想定した「外気温度 0℃、湿度 100%」（以下、「外気条件 B」と呼ぶ）の 2 種類の外気条件を設定して、白煙防止空気の利用可能量を試算した。

排ガスと製造された白煙防止空気 a%を混合した時の計算条件を図-2 に示した。白煙防止空気は、下水汚泥焼却炉の排ガスを冷却させるため、白煙防止熱交換器を通じて 1.8GJ/h⁹⁾が外気と熱交換されて 350℃まで昇温し、製造されるものとした。絶対湿度は外気と等しく、外気条件 A、B において、それぞれ、2.7、3.8 g/kg-DG（乾きガス重量）とした。この白煙防止空気

の比エンタルピーは 358 kJ/kg-DG であることから、白煙防止空気の製造量は 5030 kg-DG/h と設定した。排煙処理後の排ガス量は、文献¹⁰⁾の計算方法に従って 4280 kg-DG/h と設定した。ここで、焼却炉の空気比は、流動焼却炉で一般的な 1.30¹¹⁾とし、排煙処理後の燃焼排ガスの温度は 40℃⁹⁾とし、下水汚泥の組成は文献¹²⁾の値を用いた。排ガスと白煙防止空気は、煙突内において標準気圧下で混合されるものとし、それらの混合気体（以下、「混合排煙」と呼ぶ）の温度 T_M [K] を、エネルギー保存則を用いて以下の式(1)から計算した。

$$C_a n_a (T_M - T_a) + C_b n_b (T_M - T_b) + \frac{a}{100} \{ C_c n_c (T_M - T_c) + C_d n_d (T_M - T_d) \} = 0 \quad \cdots (1)$$

ここで、式(1)中の下付きの a、b、c、d は、それぞれ、排ガス中の乾きガス、排ガス中の水分、白煙防止空気中の乾き空気、白煙防止空気中の水分を表す。 $C_{a,b,c,d}$ ：定圧モル熱容量[J/(mol・K)]、 $n_{a,b,c,d}$ ：物質質量[mol/h]、 $T_{a,b,c,d}$ ：温度[K]、a：白煙防止空気の利用率[%]を表す。 C_a 及び C_c は、30 J/(mol・K)、 C_b 及び C_d は、33 J/(mol・K)として計算した。なお、物質量は、各成分の重量を分子量で除したものである。

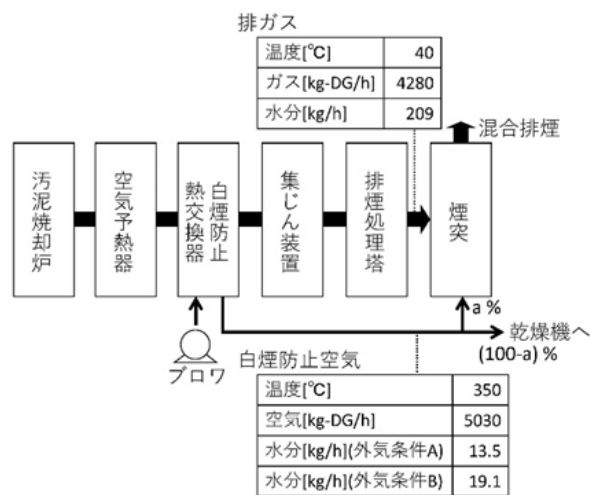


図-2 排ガスと白煙防止空気の混合条件

2. 1. 2 白煙防止空気乾燥可能な剪定枝廃材量

外気条件 A、B において、下水汚泥焼却炉における白煙防止空気を熱源とした際に、連続式熱風乾燥機により乾燥可能な剪定枝廃材量を算出した。乾燥機に供給される熱量は、製造された白煙防止空気の熱量

1.8GJ/h に、前節で算出された利用可能な割合を乗じて計算した。利用可能な白煙防止空気を外気と混合して標準気圧、温度 100℃で利用することを想定した。その熱風の絶対湿度は外気と同等とした（表-1 参照）。乾燥機は、バンドによる材料移送型の対流伝熱乾燥機を用いることとし、文献¹³⁾から、熱効率（＝乾燥に使用される熱量/乾燥機に供給される熱量）は 0.5 と設定した。剪定枝廃材の含水率は、乾燥開始時 50%、乾燥終了時 20%と設定した。乾燥に使用される熱量 Q [J/h] と乾燥可能な材料の供給速度 F_s [kg/h] の関係は、湿球温度において全ての水分が蒸発するものとして、概算で以下の式(2)¹³⁾で示される。

$$Q = F_s \{ (C_s + W_1 C_L)(T_W - T_{M1}) + (W_1 - W_2)(\Delta h_v)_W + (C_s + W_2 C_L)(T_{M2} - T_W) \} \quad \text{---(2)}$$

ここで、 C_s ：材料の比熱容量（＝1250[J/(kg・K)]¹⁴⁾）、 W_1 ：乾燥開始時の平均含水率[kg/kg-dry]、 C_L ：水の比熱容量（＝4200[J/(kg・K)]）、 T_W ：湿球温度[K]、 T_{M1} ：乾燥開始時の材料温度[K]（外気温と同じ）、 W_2 ：乾燥終了時の平均含水率[kg/kg-dry]、 $(\Delta h_v)_W$ ：湿球温度 T_W における蒸発潜熱[J/kg]、 T_{M2} ：乾燥終了時の材料温度[K]（熱風温度と同じ）を示した。式(2)中の含水率は、材料の乾燥重量に占める水分重量の割合（乾量基準）である。湿球温度 T_W は、湿度図表¹⁵⁾から求めた。湿球温度 T_W における蒸発潜熱 $(\Delta h_v)_W$ は、文献¹³⁾の以下の式(3)から求めた。

$$(\Delta h_v)_W = 2500 - 2.44(T_W - 273) \quad \text{---(3)}$$

表-1 外気条件別の乾燥用熱風の設定温度と絶対湿度

外気条件			乾燥用熱風	
名称	温度 [°C]	絶対湿度 [g/kg-DG] (相対湿度)	温度 [°C]	絶対湿度 [g/kg-DG]
A	5	2.7 (50%)	100	2.7
B	0	3.8 (100%)		3.8

2. 1. 3 剪定枝廃材の混焼による化石燃料削減量

外気条件 A、B において、白煙防止空気で乾燥可能な剪定枝廃材を利用した際の、下水污泥焼却炉における化石燃料削減量を算定した。化石燃料削減量は、その低位発熱量が、投入した剪定枝廃材の低位発熱量と等しいものとして計算した。剪定枝廃材の高位発熱量、水素含量は、土木研究所の調査¹⁶⁾における剪定枝の平

均から、19.2 MJ/kg-dry、0.059 kg-H/kg-dry とした。低位発熱量 LHV_{wet} [MJ/kg-wet] は、文献¹⁷⁾から以下の式(4)、(5)で計算した。

$$LHV_{wet} = HHV_{wet} - 2.44\{9H(1 - M_W) + M_W\} \quad \text{---(4)}$$

$$HHV_{wet} = HHV_{dry}(1 - M_W) \quad \text{---(5)}$$

ここで、 HHV_{wet} ：高位発熱量[MJ/kg-wet]、 H ：水素含量[kg-H/kg-dry]、 M_W ：含水率、 HHV_{dry} ：高位発熱量[MJ/kg-dry]である。

2. 1. 4 消費エネルギー量の試算

消化脱水汚泥 14,600 トン/年（50 トン/日、年間稼働日数 292 日）の従来システムに、本システムを導入することを想定し、年間消費エネルギー量を試算して、従来システムとの比較を行った。本システムの主な電力使用機器を表-2 に示した。機器は、剪定枝廃材は、含水率 50%で 5 トン/日を想定して動力値を設定した。その他に磁選機、コンベア等として、日消費電力 100kWh 計上した。これらの機器の負荷率は 70%とした。また、電力は、1 次エネルギー換算係数 9.76MJ/kWh を用いて、エネルギー量へ換算した。焼却炉の電力消費量は、簡易算定式¹⁸⁾を用いて計算した。従来システムの補助燃料消費量は、文献⁵⁾から A 重油で 40L/トンとした。

表-2 本システムの主な電力使用機器

	動力 [kW]	日稼働時間 [h]	日消費電力 [kWh]
破砕機	120	5	600
乾燥機	22	7	154
混練機	5.5	24	132

2. 2 結果と考察

2. 2. 1 白煙防止空気の利用可能量

混合排煙が、外気条件まで温度及び絶対湿度が低下しても、白煙を防止可能な条件（以下、「白煙防止限界点」と呼ぶ）を算出するため、外気条件 A、B における、飽和水蒸気曲線、白煙防止境界、混合排煙（a=0-100%）の温度及び絶対湿度を図-3、図-4 に示した。白煙防止境界とは、外気条件を表す点を通る飽和水蒸気曲線の接線（図中の破線）で表される。白煙防止限界点は、その白煙防止境界と、混合排煙（a=0-100%）の直線（図

中の点線)の交点から求められる。外気条件 A の時、白煙が防止されるのは、混合排煙が温度 59℃以上、絶対湿度 42g/kg-DG 以下の時であった。この条件を満たすのは、式(1)から、表-3 の値を用いて、白煙防止空気の利用率 6%以上の時であり、利用可能量は残りの 94%と試算された。外気条件 B の時、白煙が防止されるのは、混合排煙の温度 116℃以上、絶対湿度 34g/kg-DG 以下の時であった。白煙防止空気の利用率は、30%以上の時であり、白煙防止空気の利用可能量は 70%であった。

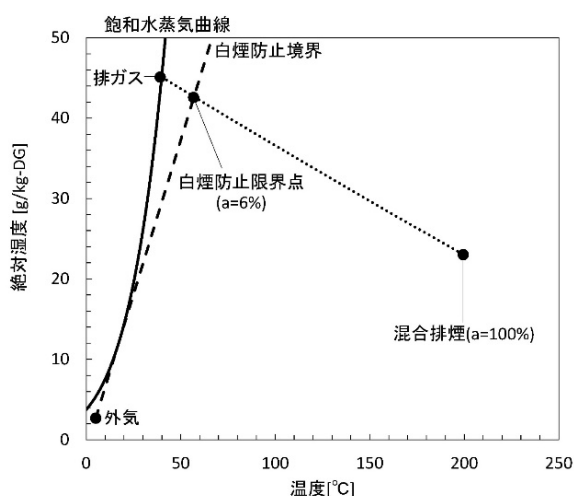


図-3 飽和水蒸気曲線（実線）と外気条件 A における白煙防止境界（破線）と混合排煙（点線）から求めた白煙防止限界点

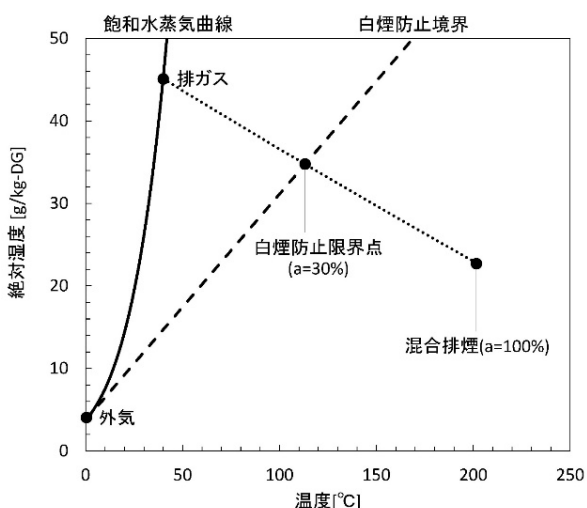


図-4 飽和水蒸気曲線（実線）と外気条件 B における白煙防止境界（破線）と混合排煙（点線）から求めた白煙防止限界点

2. 2. 2 白煙防止空気で乾燥可能な剪定枝廃材量

表-3 式(1)において余剰空気利用率を求めた際の各成分の物質質量及び温度

外気条件	A	B
n_a [kmol/h]	149	149
n_b [kmol/h]	12	12
n_c [kmol/h]	175	175
n_d [kmol/h]	0.8	1.1
T_a [K]	313	313
T_b [K]	313	313
T_c [K]	623	623
T_d [K]	623	623

外気条件 A、B において、湿球温度は 32、33℃で、蒸発潜熱は式(3)より共に 2420 kJ/kg であった。乾燥に使用される熱量 Q は、外気条件 A、B において、それぞれ、 $0.85(=1.8 \times 0.94 \times 0.5)$ GJ/h、 $0.63(=1.8 \times 0.7 \times 0.5)$ GJ/h であった。乾燥可能な材料の供給速度(式(2)の F_S)は、表-4 の値を用いて式(2)から計算して、外気条件 A、B において、それぞれ、399 kg-dry/h、293 kg-dry/h であり、乾燥機が週 5 日、1 日につき 7 時間稼働する場合、1 週間あたり、それぞれ、14.0 t-dry、10.3 t-dry であった。地方公共団体における剪定枝廃材の発生量は、冬季は秋季の半分程度となる事例もあるが¹⁹⁾、年間を通じて同量の剪定枝廃材を搬入するものと見なした。剪定枝廃材の年間発生量を地方公共団体の面積で除して、一般に 60 kg-wet/($d \cdot km^2$)程度⁵⁾であり、剪定枝廃材の含水率を 50%とし、1 週間あたりでは、 $210(=60 \times 0.5 \times 7)$ kg-dry/ km^2 である。このことから、本節の剪定枝廃材の乾燥可能量は、外気条件 A、B において、それぞれ、 $66.5(=14.0/210 \times 1000)$ km^2 、 $48.8(=10.3/210 \times 1000)$ km^2 の地域から 1 週間に発生する剪定枝廃材の量に相当した。

表-4 乾燥可能な材料の供給速度を求めた際の含水率及び温度

外気条件	A	B
W_1 [kg/kg-dry]	1.00	1.00
W_2 [kg/kg-dry]	0.25	0.25
T_w [K]	305	306
T_{M1} [K]	278	273
T_{M2} [K]	373	373

2. 2. 3 剪定枝廃材の混焼による化石燃料削減量

計算の結果、含水率 20%の乾燥された剪定枝廃材の低位発熱量は、13.9 MJ/kg-wet であった。乾燥された剪定枝廃材を、前節で計算されたとおり、399 kg-dry/h、又は、293 kg-dry/h で供給する時、化石燃料の削減効果は、それぞれ、 $6930(=399/0.8 \times 13.9)$ MJ/h、 $5090(=293/0.8 \times 13.9)$ MJ/h であった。なお、剪定枝廃材に含まれる灰が、熱を系外へ持ち出すこととなるが、剪定枝の灰分は平均で約 5%¹⁶⁾であり、持ち出し熱量は、灰分の比熱 0.84 kJ/(kg・℃)、温度 850℃と仮定する時、剪定枝廃材の発熱量の 0.2%($=0.05 \times 850 \times 0.84/13.9 \times 0.8/1000$)であり、算定結果への影響が少ないことからカットオフした。

乾燥機が週 5 日、1 日につき 7 時間稼働する場合、外気条件 A、B における、化石燃料削減量は、それぞれ、1 週間あたり 243 GJ、178 GJ となった。これは A 重油（低位発熱量 37.1MJ/L²⁰⁾）にして、6550L、4800L に相当した。従来型の下水汚泥焼却炉において直接脱水汚泥を焼却する時の補助燃料消費量の平均は、593 MJ/t⁵⁾であり、処理能力 50t/d の下水汚泥焼却炉において、1 週間あたり 208 GJ 消費される。剪定枝廃材を活用することにより削減可能な化石燃料は、外気条件 A、B において、従来消費されていた補助燃料の、それぞれ、117%、86%に相当した。なお、今回の検討では化石燃料代替効率（＝削減された化石燃料の低位発熱量/投入した剪定枝廃材の低位発熱量）を考慮しなかったが、実際の利用においては、考慮が必要な可能性が考えられ、留意が必要である。

本稿で想定した剪定枝廃材の補助燃料利用システムにおいて追加的に生じる化石燃料消費の中で、大きなものは、破碎工程のバックホーと破碎機である。文献²¹⁾によると、バックホーと破碎機で、軽油が 0.033 L/kg-dry 消費される。軽油の低位発熱量は 35.8 MJ/L²⁰⁾であるので、外気条件 A、B において乾燥可能な剪定枝廃材を、チップ化するのに、週 5 日、1 日につき 7 時間稼働する場合、それぞれ、1 週間あたり 16.3 GJ、11.9 GJ 要する。これらを加味しても、剪定枝廃材の補助燃料利用システムは、十分な化石燃料削減効果が期待された。

2. 2. 4 年間消費エネルギー量の試算

外気条件 A における従来システムと本システムの年間消費エネルギー量の試算結果を図-5 に示した。本システムは、従来システムと比べて 8,300GJ/年(15%)の減少が見込まれた。

■ 破碎機等電力 □ 補助燃料 □ 焼却炉電力

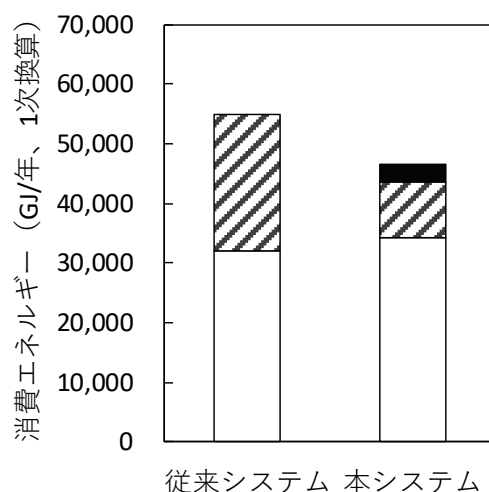


図-5 従来システムと本システムの年間消費エネルギー量

2. 3 結論

本稿では、下水汚泥焼却炉における排熱を活用した剪定枝廃材の補助燃料利用システムの実用性の検討に資するため、2 種類の外気条件を設定して、白煙防止空気の利用可能量と、乾燥可能な剪定枝廃材の量を算出し、それらを下水汚泥と混焼することによる化石燃料削減量を算定した。得られた結論は、以下の通りである。

- A) 外気条件 A（気温 5℃、相対湿度 50%）の時、白煙防止空気の 6%を排ガスと混合すれば白煙が防止され、利用可能量は残りの 94%と試算された。外気条件 B（気温 0℃、相対湿度 100%）の時、白煙防止空気の利用可能量は 70%であった。
- B) 外気条件 A、B において、処理能力 50t/d の下水汚泥焼却炉の白煙防止空気の利用可能量で乾燥可能な剪定枝廃材の供給速度は、乾燥重量で、それぞれ、399 kg/h、293 kg/h と算定された。下水汚泥と混焼することによる化石燃料の削減効果は、それぞれ、6930 MJ/h、5090 MJ/h と算定された。
- C) 処理能力 50t/d の下水汚泥焼却炉において、乾燥機が週 5 日、1 日につき 7 時間稼働する場合、剪定枝廃材を活用することにより削減可能な補助燃料は、外気条件 A、B において、それぞれ、従来消費されていた補助燃料の、117%、86%に相当した。

3. 刈草を汚泥脱水助剤として適用する技術

1. で示した課題について、河川等で発生する刈草を下水道事業で受け入れ、汚泥の脱水助剤として活用する技術を開発する。これにより、河川事業においては、刈草の処分にかかる費用の削減、下水道事業においては、凝集剤添加や汚泥処理費用の削減が可能となり、かつ刈草のリサイクルシステムが確立できる。

本研究では、これまで、裁断したイネ科の刈草を様々な性状の汚泥と混合し、汚泥の脱水性が向上するか否か、実験室レベルで遠心脱水試験を行った。その結果、刈草の混合により、脱水時の汚泥の含水率の低減化が見込まれることが明らかとなった²¹⁾。また、本研究提案技術を導入した際の河川事業における刈草処分費、下水処理場における汚泥処分費の試算を行い、経済的な有意性の有無を検証した結果、河川事業における刈草処分費は、焼却処理するよりも破碎処理後に下水処理場へ受け渡す方が削減できる可能性が示された。下水道事業における汚泥処分費は、下水処理場外での焼却処分を想定した場合、凝集剤 1.0%、刈草 10%を混合して脱水を行うことで、汚泥処分費が削減できる可能性が示された²²⁾。

本研究では、本提案技術がイネ科以外のバイオマスでも有用であることを示すため、様々な植物系バイオマスを用いたバイオマス混合脱水試験を行った²³⁾。また、遠心脱水以外の脱水機での有用性を確認するため、模擬ベルトプレスによる脱水試験を実験室レベルで行った²⁴⁾。

また、脱水汚泥の処分方法として、下水処理場内で焼却処分した場合における、汚泥処分費の試算を行った。

3. 1 様々な植物系バイオマスを混合した下水汚泥の脱水試験による脱水性評価

3. 1. 1 植物系バイオマス混合汚泥脱水試験方法

植物系バイオマスを下水汚泥に混合して脱水することで、汚泥の脱水性が向上するか検証を行った。実験に用いた植物系バイオマスの種類、採取場所、採取方法、前処理方法、汚泥の全固形物 (Total Solids : TS) を表-5 に示す。実験に用いた植物系バイオマスは、イネ科、水草、松剪定枝、竹の 4 種類、種類や前処理方法の違いを含めると 7 種類である。脱水試験に用いた汚泥は、A 処理場の最初沈殿池の重力濃縮汚泥と、余剰汚泥の機械濃縮汚泥を 1 対 1 で混合した汚泥 (以下、標準(A))、A 処理場の消化汚泥 (以下、消化(A))、B 処理場の OD 汚泥の重力濃縮汚泥 (以下、OD(B))、D 処理場の消化汚泥 (以下、消化(D)) の 4 種類であ

る。それぞれの植物系バイオマスにおいて、表-5 に示すように、それぞれ異なる汚泥を用いて脱水試験を行った。植物系バイオマスの混合率は、下水汚泥の TS に対して植物系バイオマスの TS で 0%~50%の範囲で検討した。凝集剤は、カチオン系の高分子凝集剤を用いた。凝集剤添加率は、実下水処理場での添加率が 1~2 %程度であることを考慮して、下水汚泥の TS に対して 0 %~2.0 %の範囲で検討した。脱水方法は、実処理場での脱水方法として最も多く使われている遠心脱水とした。脱水試験は、「脱水セル法遠沈管試験」を参考に、50ml 容の 100 メッシュのろ過筒に凝集剤と刈草を混合した汚泥を投入し、遠心分離機で 3,000rpm、20 分間の遠心分離を行った²²⁾。

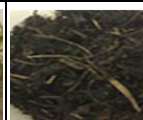
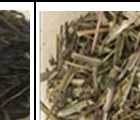
3. 1. 2 植物系バイオマス混合汚泥脱水試験結果

刈草裁断と標準 (A) の混合脱水試験における含水率の結果を図-6 に示す。図-6 左には、試験値である、植物系バイオマス混合脱水汚泥の含水率を示す。下水汚泥よりも含水率が低い植物系バイオマスを混合することで、脱水汚泥の含水率は物理的に減少する。そのため、植物系バイオマスの重さと水分量を、混合脱水汚泥から差し引くことで、脱水後の汚泥のみの含水率を試算した。その結果を図-6 右に示す。この試算値により、脱水汚泥中に含まれる水分が、植物系バイオマスの混合によって減少したか否かが検証できる。

図-6 右より、凝集剤 0%では、刈草混合率の増加にほぼ比例して汚泥のみの含水率が低下していることから、刈草の混合により、脱水汚泥の脱水量が増加することが示された。従来の脱水条件に近い、凝集剤 2.0%、刈草 0 %と比較すると、凝集剤 2.0%、刈草 10 %または 30%および凝集剤 1.0%、刈草 30%で、含水率はそれぞれ-2.2%、-1.7%、-0.3%低減した。刈草の混合割合によっては、脱水汚泥の含水率の低減効果がみられ、刈草が脱水助剤として有用であることが示された。

図-7 に、各植物系バイオマスと各汚泥の混合脱水試験の結果を示す。縦軸は、バイオマス混合率 0%で、各試験における凝集剤添加率が最も大きい条件での汚泥のみの含水率と比較したときの、各条件での汚泥のみの含水率の差を、含水率ポイント差として示している。ここでは、それぞれの植物バイオマス混合実験において、含水率ポイント差がマイナスとなる、特に含水率が低いケースに着目して考察を行う。また、結果の配置は、汚泥の種類、TS の大小、植物系バイオマスのサイズ、TS の大小で分類して並べている。この結果より、脱水汚泥の含水率の低減効果が見えやすい条件を考察した。

表-5 実験に用いた植物系バイオマスおよび汚泥の諸元

表記	刈草裁断	刈草粉末	水草（ヒシ）	水草（ヒエ）	松（新）	松（枯死）	竹
種類	イネ科未同定		オニビシ	スズメノヒエ	クロマツ		
採取場所	土木研究所敷地内		C 処理場内のストックヤード		D 処理場内のクロマツ林		—
写真							
採取方法	ハサミで裁断後、2～3日 放置		琵琶湖南湖の敷地周縁部で 表層刈取り後1カ月程度天日干し		高枝バサミで 剪定	落下した枯死 葉を回収	破砕機(GS150, ohashi)で 5mm 程度 に裁断
前処理方法	ハサミで 10mm 程 度に裁断	粉砕機で 1～5mm 程度 に粉砕	破砕機 (MGS-1510Si, ミナト)で 30～ 50mm 程度に裁 断	ハサミで 10mm 程度に裁断	破砕機 (G283D, ohashi)で 10～ 30mm 程度に 裁断	ハサミで 10mm 程度に 裁断	
バイオ マスの TS(%)	87.5	97.7	48.9	92.8	49.4	89.8	
*汚泥 種類 (TS(%)) ， 採取処 理場	標準汚泥 (2.85),A 処 理場	—	標準汚泥(2.53) A 処理場	標準汚泥 (2.34) A 処理場	消化汚泥 (1.22), A 処理場	消化汚泥 (1.35), D 処理場	消化汚泥 (1.22), A 処理場
	消化汚泥(1.88), A 処理場						
	OD 汚泥(1.05), B 処理場						

*標準汚泥、OD（オキシデーションデッチ）汚泥は濃縮したものを使用

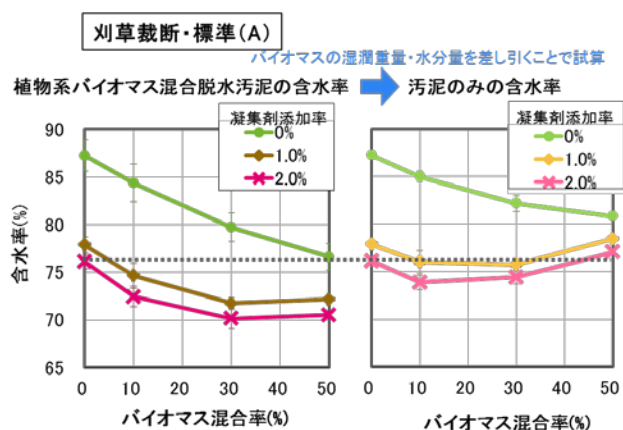


図-6 植物系バイオマス混合脱水汚泥と汚泥のみの含水率

図-7 より、各結果において、バイオマス混合率の条件は異なるが、少なくとも1条件以上は、含水率のポイント差がマイナスになる条件があることがわかる。

これより、本研究の範囲においては、どのような種類の植物系バイオマスも、脱水助剤としての素質を持っている可能性が示された。混合率が低い場合は、含水率の低減効果が見えにくいだけだが、高すぎる場合は、脱水汚泥の総重量が上昇する懸念がある。そのため、使用したい植物系バイオマスと汚泥の組み合わせにおいて、事前に最適な混合率を評価する必要がある。次に、刈草裁断 10%、凝集剤 2.0%の条件において、汚泥の種類で結果を比較すると、標準 (A) で最も含水率ポイント差が低くなっており、次いで消化 (A)、OD (B) の順で低いことがわかる。刈草粉末を用いた場合も、OD (B) より、消化 (A) で、含水率の低減効果が見えやすい傾向がある。これより、汚泥の TS が大きいほど、脱水汚泥の含水率の低減効果が見えやすい傾向があることが示された。

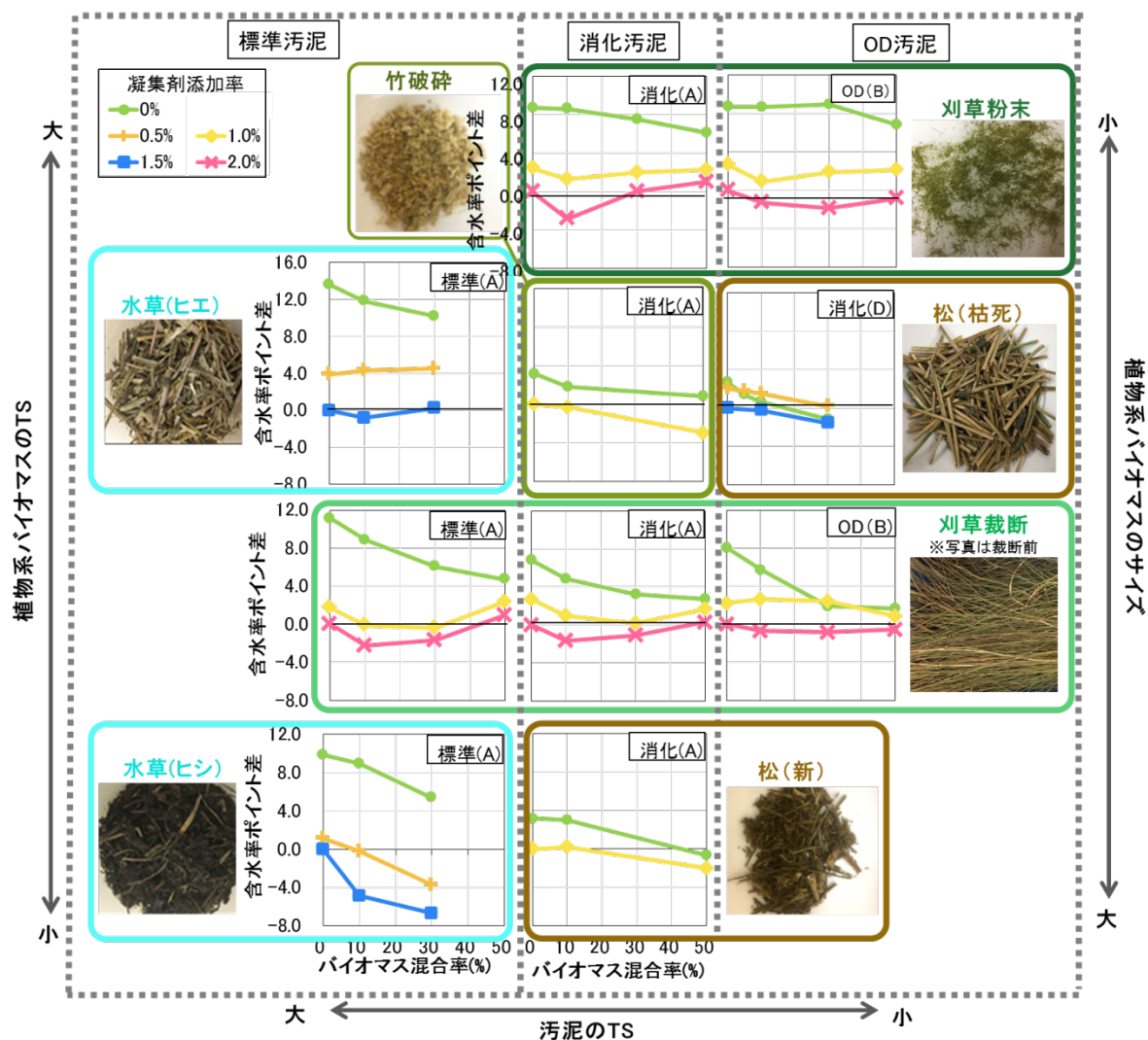


図-7 各植物系バイオマスと汚泥の混合脱水試験から試算した汚泥のみの含水率のポイント差
(バイオマス混合率 0%, 凝集剤添加率最大時の汚泥のみの含水率と比較)

刈草裁断と刈草粉末の結果を比較すると、消化 (A) において、刈草粉末 10%、凝集剤 2.0%において、含水率ポイント差が最も低いが、全体としてみると、刈草裁断の方が、刈草粉末よりも含水率ポイント差が低い傾向にあり、マイナスになる条件も多いことがわかる。また、標準汚泥において、バイオマス 10%時の結果を各植物系バイオマスで比較すると、水草 (ヒシ) が最も含水率ポイント差が低く、次いで刈草裁断、水草 (ヒエ) の順で低い結果であった。これより、植物系バイオマスの破碎後のサイズが大きく、TS が小さいほうが、脱水汚泥の含水率の低減効果が見えやすい傾向があることが示された。

3. 2 模擬ベルトプレスを用いた下水汚泥の植物系バイオマス混合脱水試験による脱水性評価

3. 2. 1 模擬ベルトプレスを用いた脱水試験方法

3. 2. 1. 1 実験に用いた汚泥および植物系バイオマスの種類と性状

実験に用いた汚泥の種類、性状を表-6 に示す。標準活性汚泥法の汚泥として、A 処理場の最初沈殿池の重力濃縮汚泥と余剰汚泥の機械濃縮汚泥の 1 対 1 混合汚泥 (以下、標準)、消化汚泥として A 処理場の消化汚泥を用いた。松の剪定枝は、D 処理場で採取し、標準汚泥では、樹木粉碎機 (GS283D、株式会社大橋) で破碎後、6mm スクリーンに通し、チップサイズを均一にしたもの (松 1 と表記)、消化汚泥では、樹木粉碎機 (GS150D、株式会社大橋) で破碎し、5mm スクリーンに通し、チップサイズを均一にしたもの (松 2 と表記) を使用した。竹チップは、樹木粉碎機 (GS283D、株式会社大橋) で破碎後、6mm スクリーンに通し、チップサイズを均一化したものを株式会社大橋より提供いただき、使用した。凝集剤は、カチオン系高分子 (カチオン度: 強、分子量: 3 百万、溶解液粘度 (25 °C、30 rpm、0.5 %) : 1400) を用いた。

表-6 実験に用いた下水汚泥、植物系バイオマスの種類、性状

下水汚泥			
表記	標準汚泥		消化汚泥
種類	A 処理場の最初沈殿池の重力濃縮汚泥と 余剰汚泥の機械濃縮汚泥の 1 対 1 混合汚泥		A 処理場の消化汚泥
固形物濃度(%)	2.8		1.2
試験に用いたバイオマス	松 1、竹		松 2、竹
植物系バイオマス			
表記	松 1	松 2	竹
種類	D 処理場内に生息する松の剪定枝		竹チップ
固形物濃度(%)	89	89	46
備考	樹木粉碎機(GS283D)で破碎 後、6mm スクリーンを通して	樹木粉碎機(GS150D)で破碎 後、5mm スクリーンを通して	樹木粉碎機(GS283D)で破碎 後、6mm スクリーンを通して

3. 2. 1. 2 脱水試験方法

脱水試験に供した凝集剤添加率は、汚泥の固形物量に対して、1.0 %、1.5 %、2.0 %とした。松および竹の混合率は、汚泥の固形物量に対して、松または竹の固形物量で、0 %、10 %、30 %、50%とした。凝集剤の混合は、急速攪拌(120 rpm)1 分、緩速攪拌(30 rpm)5 分で行った。約 500mg の汚泥を簡易脱水試験キット(東京都下水道サービス株式会社)を用いて、模擬的なベルトプレス脱水試験を実施した。凝集汚泥に松または竹を定量混合し、ろ布上に設置した型枠内に流し込み、加圧を行った。その後、型枠を外し、汚泥をろ布ではさみ、約 3kg の重石を手動でローリングさせ、圧搾脱水を行った。ろ布上に残った汚泥を脱水汚泥とし、含水率を測定した。刈草混合によって含水率は物理的に減少するため、刈草の重さを差し引くことで、汚泥の含水率を算出した。また、脱水前と脱水後の汚泥の湿潤量、ろ液量を測定し、脱水前後での汚泥の湿潤重量の変化を調査した。

3. 2. 2 脱水試験結果

各汚泥の脱水試験における、刈草量を差し引いて算出した汚泥中の含水率の結果を図-8 に示す。標準汚泥では、バイオマスを混合しない、バイオマス混合割合 0 %の結果と比較して、バイオマスを 10 %または 30 %で混合した場合、脱水後の汚泥の含水率が 1.0~3.0 %程度低下した。松では、1~3 %程度の含水率の低下であり、松の混合割合が高いほど効果がみられる傾向であった。竹では、1.5 %程度の含水率の低下であり、竹の混合割合や凝集剤添加量での差は、ほぼ見られなかった。消化汚泥では、バイオマス混合割合 0 %と比較して、バイオマスを 10、30 %混合した場合、脱水後の汚泥の含水率は 0.5~3 %程度低下した。松では、0.5~2.0 %の含水率の低下であり、竹では、2.0~3.0 %程度の含水率の低下がみられ、いずれもバイオマスの混合割合を増加させるほど、含水率の低減効果がみられた。竹においては、凝集剤 2.0%の条

件で、50 %まで混合率を増やしたが、含水率の低減効果は 30 %とほぼ同程度であった。

標準汚泥では、竹よりも松の方が含水率の低減効果がみられ、消化汚泥では、竹の方が含水率の低減効果がみられる傾向であった。これは、汚泥の種類の差や、松の破碎方法の差が影響しているものと考えられる。図-9 に、標準汚泥の脱水試験において、凝集剤 1.0 %、松の混合割合 0%および 30%時の脱水前後の汚泥の湿潤重量を示す。

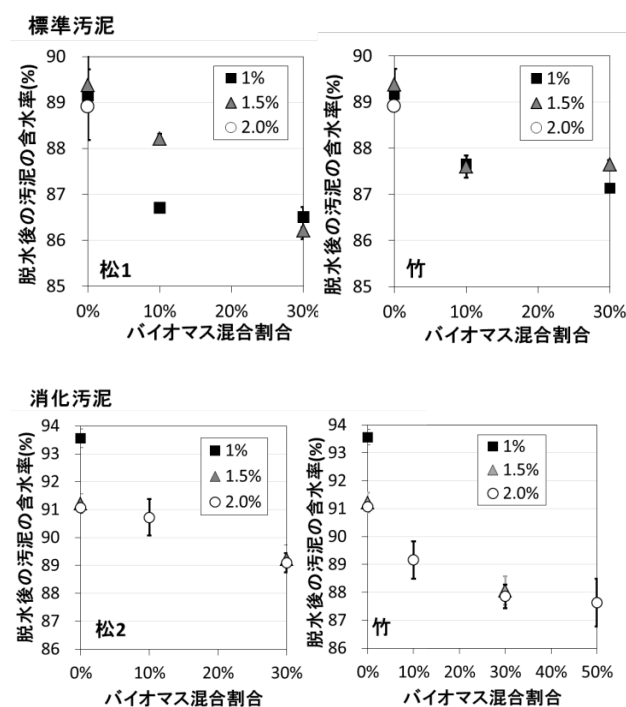


図-8 脱水汚泥の含水率(バイオマス量を差し引いた計算値)

また、図-10 に、標準汚泥の脱水実験における、脱水前の汚泥の湿潤重量に対する脱水後の汚泥の湿潤重量の割合を示す。図-9 において、バイオマスは、汚泥の固形物量に対して 30%で混合しているため、脱水前と、脱

水前(松混合後)を比較すると、汚泥の湿潤重量は、わずかに増加していることがわかる。バイオマス混合 0%と30%の脱水後の汚泥の湿潤重量とろ液の割合を比較すると、バイオマスを混合した方が、脱水後の汚泥の湿潤重量の割合が少ないことがわかる。

図-10 より、他の条件も含めて脱水前後の汚泥の湿潤重量の変化をみると、バイオマスを混合して脱水することによって、脱水後の汚泥の湿潤重量は、8~9 割程度に減容していることがわかる。バイオマスの混合割合が増えることで、脱水後の汚泥の湿潤重量は増加するが、凝集剤 2%と比較した場合、同程度以下には削減できる可能性が示唆された。バイオマスを混合することによって、脱水前の総重量はわずかに増加するが、水分量の低減効果が大きいことで、脱水後の汚泥重量は削減できることが示された。

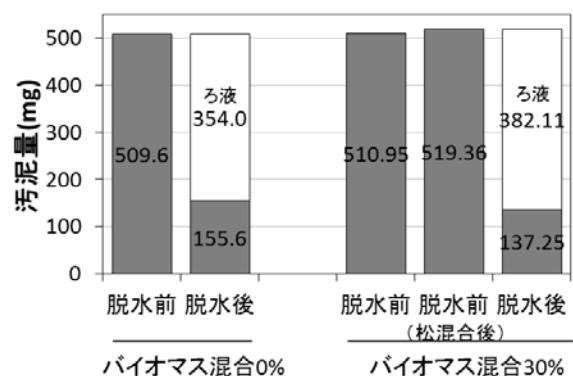


図-9 松混合での脱水前後の汚泥の湿潤重量(標準汚泥、凝集剤 1%)

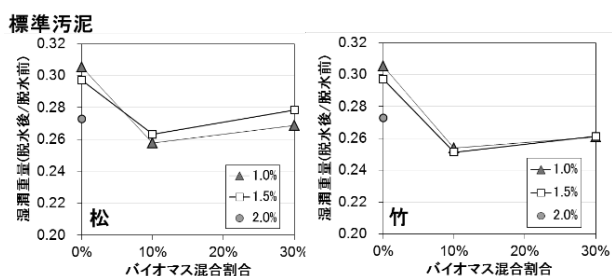


図-10 脱水前に対する脱水後の汚泥の湿潤重量(標準汚泥)

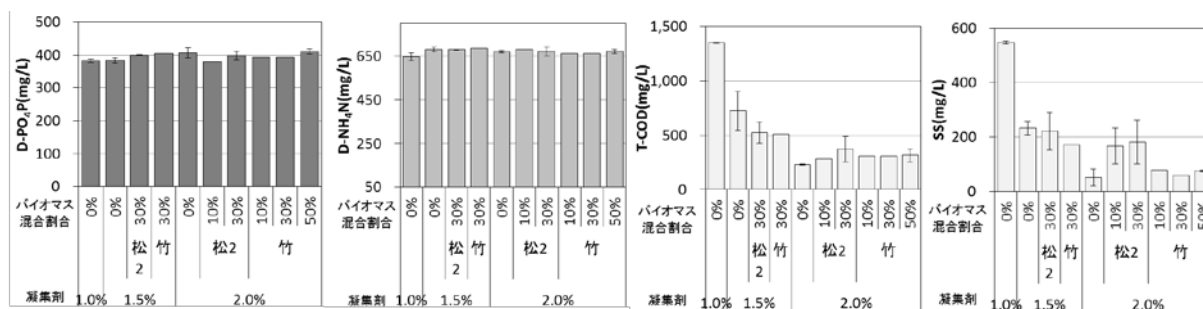


図-12 消化汚泥の脱水試験におけるろ液の性状(溶解性リン、溶解性アンモニア性窒素、全 COD、SS)

図-11 に、標準汚泥の脱水試験において、凝集剤 1.0 %、バイオマス混合割合 0%、松 30%、竹 30%の条件における、脱水後の汚泥、ろ布の様子を示す。ろ布への汚泥の付着状況は、どの条件でもほぼ変化はなく、バイオマスを混合することによって、汚泥の剥離には影響がないものと考えられる。汚泥へのバイオマスの混合状況を比較すると、汚泥中に均一に混合されていることがわかる。

図-12 に、消化汚泥の脱水試験におけるろ液の溶解性リン、溶解性アンモニア性窒素、全 COD の水質分析結果、SS 測定結果を示す。溶解性リン、溶解性アンモニア性窒素においては、バイオマス混合による変化はほぼないことが示された。全 COD については、わずかに上昇する傾向がみられた。SS は、松を混合した場合に上昇する傾向を示すが、竹を混合した場合は、ほぼ影響がないことが示された。

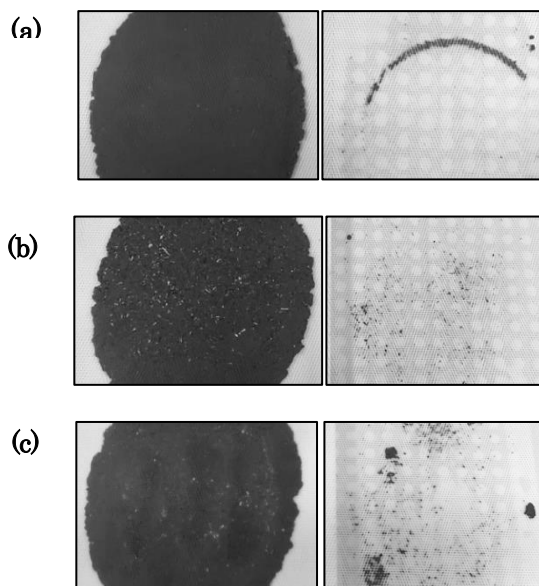


図-11 標準汚泥の脱水後の汚泥、ろ布の様子 ((a) バイオマス 0%、(b) 松 30%、(c) 竹 30%)

3. 2. 3 模擬ベルトプレスを用いたバイオマス混合脱水試験のまとめ

本研究では、バイオマスとしての活用が求められている木竹草類等のなかで、松、竹に着目し、下水汚泥の脱水助剤としての有用性を実験室レベルの模擬ベルトプレス脱水試験で検証した。その結果、標準活性汚泥法の濃縮汚泥、消化汚泥において、バイオマス混合により、脱水効率の向上が見られることが明らかとなった。脱水後の汚泥量は、バイオマスを混同しない場合と同等レベル、またはそれ以下となり、汚泥を処理場外に搬出する場合のコスト削減が見込まれることが示された。また、バイオマス混合による脱水の際の汚泥の剥離、ろ液の水質への影響はほぼないものと考えられた。有効利用があまりなされていない松や竹において、下水道事業で受け入れて利用することで、バイオマスリサイクルの確立や汚泥処分コスト削減に寄与できる可能性があることが示された。

3. 3 下水処理場内の焼却施設におけるバイオマス混合脱水汚泥の処分費の試算

3. 3. 1 試算方法

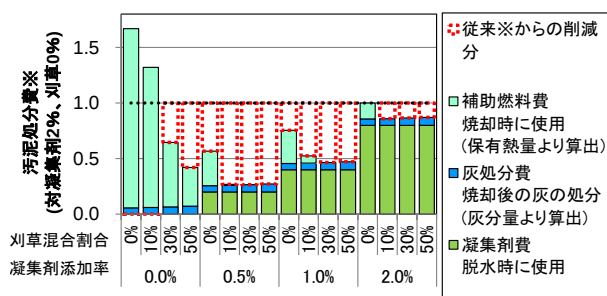
植物系バイオマスを汚泥に混合することで、脱水時の凝集剤使用量や発生する脱水汚泥量の変化によって、脱水汚泥処分費が変化する可能性がある。そこで、刈草、標準(A)(3. 1参照)を用いた場合の汚泥処分費を試算した。脱水汚泥の処分方法は、下水処理場内の焼却炉での焼却とした。

刈草の受入れの費用は、実質0円とした。汚泥脱水設備に投入する汚泥量は、高分子凝集剤を使用した濃縮汚泥または消化汚泥の脱水を行っている1,212か所の下水処理場における、平成26年度の一カ月あたりの脱水設備投入汚泥量の平均値である4,762t/月とした²²⁾。

汚泥処分費としては、脱水時の凝集剤費(820円/kg)、補助燃料費(A重油、80円/L)、焼却灰処分費(8,000円/t)²²⁾の合計とした。補助燃料量は、刈草混合脱水汚泥の有機物含有量、保有熱量より、自燃限界を試算²²⁾し、算出した。

3. 3. 2 試算結果

図-13より、凝集剤 0%、刈草 30~50%および凝集剤 0.5~2.0%、刈草 10~50%において、従来よりも汚泥処分費用が安くなる可能性を示した。刈草を混合することで脱水ケーキの保有熱量が上昇し、補助燃料費が削減され、灰分量の増加による灰処分費が増加しても、汚泥処分費が低減されることが示された。



※凝集剤添加率2.0%、刈草混合割合0%時の結果を従来として比較

図-13 刈草混合脱水汚泥の処理場内での焼却処分費用の試算結果(汚泥量:4,762トン/月)

4. 下水汚泥と植物系バイオマスの混合嫌気性消化の効率向上技術

4. 1 はじめに

河川事業等の公共事業に由来する植物系バイオマスの有望な利用方法の一つとして、下水処理場での下水汚泥との混合による嫌気性消化が考えられ、新潟市での検討事例²⁵⁾・²⁶⁾も報告されており、また、土木研究所においても、既往の調査研究²⁷⁾・²⁸⁾で、刈草(草の葉や茎)について検討し、特殊な前処理を行わなくても裁断のみで、ある程度のメタン転換が期待できることを示してきたところである。一方で、実際の公共事業から発生する、一般的に刈草と呼ばれているバイオマスの中には、性状が大きく異なる葉や茎や根等が混在しており、これらの比率の違いによりメタン発生量が異なることが考えられる。

本研究では、公共事業に由来する植物系バイオマス(刈草)の葉、茎、根の差に注目し、一例として、クズ(葛)について部位ごとの、下水汚泥との混合消化によるメタン転換ポテンシャルについて検討を行った。また、下水処理場の敷地内や、海辺等に生息している松(クロマツ)の剪定枝の処理として、下水汚泥との混合嫌気性消化に着目し、葉と枝の各部位と下水汚泥との混合嫌気性消化によるメタン転換ポテンシャルについて検討を行った²⁹⁾。

4. 2 下水汚泥とクズの混合嫌気性消化

4. 2. 1 実験方法

嫌気性消化槽での、濃縮汚泥およびクズ投入による効果を確認するために、消化汚泥、濃縮汚泥およびクズを用いて、消化汚泥のみを添加する系列(ブランク)、消化汚泥に濃縮汚泥のみを添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥とクズの葉を添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥とクズの茎を添加する系列、ならびに、消化汚泥に濃縮汚泥とクズの根を添加する系列について、中温

条件（35℃）にて回分式嫌気性消化実験を行った。実験に使用した消化汚泥、濃縮汚泥は、茨城県内の、下水処理方式として標準活性汚泥法、汚泥処理方式として中温消化を行っている下水処理場より採取して使用した。実験に使用したクズ（*Pueraria montana* var. *lobata*）は、2018年9月に、茨城県つくば市の国土技術政策総合研究所敷地内にて刈り取り、葉、茎、根を分離し、それぞれ含水率が3%程度となるように、超純水を加え、ミキサーでペースト状になるまで破碎して使用した。なお、回分式嫌気性消化実験は、2018年10月に実施した。

回分式嫌気性消化実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥 400mL を投入し、表-7 に示す所定量の濃縮汚泥、クズを添加し、沸騰後冷ました水道水を加えて 500mL とした。その後、反応器内を窒素ガスで十分に置換し密栓後、35℃に調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。

表-7 回分式嫌気性消化実験における基質の組成

系列名	投入消化汚泥	投入基質 (g-VS)			
		濃縮汚泥	クズ		
			葉	茎	根
1	400mL	—	—	—	—
2	400mL	0.323	—	—	—
3	400mL	0.323	0.065	—	—
4	400mL	0.323	—	0.065	—
5	400mL	0.323	—	—	0.065

4. 2. 2 分析方法

消化汚泥、濃縮汚泥、クズの葉ペースト、クズの茎ペースト、クズの根ペースト、実験終了後の培養液の性状分析は、下水試験方法に従って行った。なお、COD_{Cr}の分析は、吸光光度計（DR2400、HACH 社）により、COD 試薬を用いた。アンモニア性窒素濃度の測定には、自動比色分析装置（TRAACS2000、BRANLUEBBE 社）を用いた。発生メタンガス量の測定には、水上置換方式のガス流量計（BioReactor Simulator AMPTS II、Bioprocess Control）を用いた。

4. 2. 3 結果および考察

回分式嫌気性消化実験におけるメタン生成量の経時変化を、図-14 に示す。なお、本実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、クズの葉ペースト、クズの茎ペースト、クズの根ペーストの TS は 1.1%、2.8%、2.7%、

2.2%、2.7%、VS は 0.8%、2.4%、2.4%、2.0%、2.5% であった。濃縮汚泥とクズの葉、根を投入した系列では、実験開始後 1 週間程度の間は、メタン発生速度が大きかったが、その後は、基質を投入しなかったブランクの系列と同程度にまで、発生速度が低下した。一方、濃縮汚泥とクズの茎を投入した系列では、実験開始後 4 日目～8 日目にかけてメタン発生速度が低下し、その後回復する傾向がみられた。本実験では、実験期間を 21 日間に設定した。各系列における累積メタン発生量、他の系列でのメタン発生量を差し引いて計算される濃縮汚泥、クズの各部位由来のメタン発生量を整理したものを表-8 に示す。

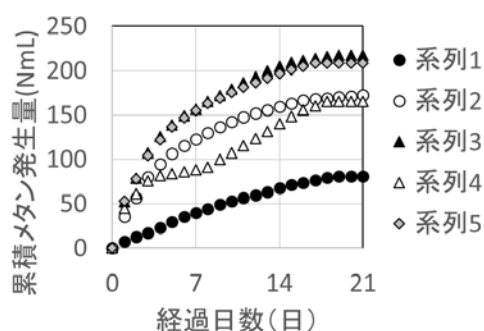


図-14 クズを用いた回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量の経時的変化

表-8 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量
(単位：NmL)

系列名	累積メタン発生量	メタンガスの由来				
		消化汚泥	濃縮汚泥	クズ		
				葉	茎	根
1	81	81	—	—	—	—
2	172	81	91	—	—	—
3	218	81	91	45	—	—
4	165	81	91	—	-7	—
5	209	81	91	—	—	36

本実験における、投入基質の単位 VS あたりのメタン発生量は、濃縮汚泥のみを投入した場合で、91/0.323=282NmL/gVS であった。既往の調査研究で示されている一般的な下水処理場における中温消化での数値 (0.36NL/gVS) に比べてやや小さかった。また、投入基質として、濃縮汚泥のみを投入した場合 (系列 2) と、濃縮汚泥およびクズを投入した場合 (系列 3～5)

を比較し、投入したクズの単位 VS あたりのメタン発生量を算出すると、葉は $45/0.065=692\text{NmL/gVS}$ 、茎は $-7/0.065=-108\text{NmL/gVS}$ 、根は $36/0.065=554\text{NmL/gVS}$ となった。クズの葉および根の数値は、既往の調査研究結果²⁷⁾で示されている、濃縮汚泥および刈草（葉と茎の混合物）を投入した、中温条件での回分式嫌気性消化実験結果から得られた、投入刈草の単位 VS あたりのメタン発生量（ 118NmL/gVS ）や、一般的な下水処理場における中温消化での下水汚泥のメタン転換率（ 360NmL/gVS ）に比べて大きい数値であった。一方、クズの茎の数値はマイナスの値となり、嫌気性消化における生物反応を阻害するなどの理由により、メタン転換を減少させる結果となっていた。

4. 3 下水汚泥と松の混合嫌気性消化

4. 3. 1 実験方法

D 下水処理場内のクロマツ林から採取した松枝葉を用いて、3種類の前処理により、下水汚泥との混合嫌気性消化実験を行った。それぞれの前処理における投入バイオマスの様子を図-15に示す。1種類目は、葉を枝と分離後、松葉を 10 mm程度にハサミで裁断したもの(図-15①)、2種類目は、葉と分離した枝を、裁断機で裁断し、2～3 cm程度にしたもの(図-15②)、3種類目は、松枝葉を、分離せず粉碎機で粉碎したもの(図-15③)である。



① 松葉 10mm ②松枝破砕機 ③松枝葉粉碎

図-15 投入バイオマス

嫌気性消化実験は、中温条件(35℃)の回分式とし、表-9に示す4つの系で行った。消化汚泥、濃縮汚泥は、A下水処理場で採掘した。実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥 400mL を投入後、表-9に示す所定量の濃縮汚泥、投入バイオマスを添加し、滅菌した水道水を加えて全量を 500mL とした。反応器内を窒素ガスで十分に置換して密栓後、35℃に調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。実験期間は、18日間とした。消化汚泥、濃縮汚泥、投入バイオマス、実験終了後の消化汚泥の性状分析(TS(固形物量)、VS(有機物量))は、下水試験方法に

従って行った。発生メタンガス量の測定は、水上置換方式のガス流量計(BioReactor Simulator AMPTS II、Bioprocess Control)を用いた。また、実験終了後の消化汚泥について、脱水性の評価を行った。高分子凝集剤を添加(濃縮汚泥のみの TS に対して 1.5 %)した消化汚泥を、遠心脱水(3,000rpm、20 分)した。脱水前と脱水後の汚泥について、含水率を測定した。

表-9 回分式嫌気性消化実験における消化汚泥、濃縮汚泥、バイオマスの投入量

系 列	名 称	消 化 汚 泥 ml	濃縮 汚泥	投入バイオマス	
			投入湿重量 (g)		備 考
1	消化汚泥+濃縮汚泥	400	11.38	—	—
2	消化汚泥+濃縮汚泥+松葉	400	11.38	4.21	濃縮汚泥の VS に対して、 500 % 投入
3	消化汚泥+濃縮汚泥+松枝	400	11.38	3.53	
4	消化汚泥+濃縮汚泥+松枝葉	400	11.38	3.89	

4. 3. 2 結果および考察

回分式実験における累積メタン生成量の経時変化を、図-16に示す。なお、回分式実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、投入バイオマスの VS 濃度は、それぞれ 0.99 %、3.48 %、松葉 47.0 %、松枝 56.0 %、松枝葉 50.9 %であった。濃縮汚泥のみを投入した系と比較して、松枝葉を投入した3つの系において、実験開始直後からメタン発生速度が速くなり、累積メタンガス発生量も高かった。測定期間中の累積メタン発生量は、松葉を投入した系では、濃縮汚泥のみの約 1.8 倍、松枝葉を投入した系では、約 1.9 倍と安定して高かった。松枝を投入した系では、実験開始の翌日は、約 1.3 倍であったが、18日後には、約 1.5 倍まで増えていた。これは、枝が固形物として大きいため、メタン転換に時間がかかっているものと考えられる。培養期間を延ばすことで、メタン生成速度はさらに上昇するのではないかと考えられる。松枝葉バイオマスを投入した系、および水草や刈草の混合嫌気性消化等における、投入 VS あたりのメタンガス発生量を図-17に示す。投入 VS あたりのメタンガス発生量は、松枝葉を投入した系から濃縮

汚泥のみの系の、18 日後のメタン発生量を差し引き、松枝葉投入によるメタン発生量の増加分を算出し、松枝葉の各 VS で除した値とした。図-17 より、松葉を投入した系は、刈草や水草と同程度の発生量であり、濃縮汚泥の 40 %程度であった。松枝葉を投入した系は、松葉を投入した系の約 64 %、松枝を投入した系は、約 41 %の発生量であった。松枝葉を粉碎することで、メタンガス発生量の増加を期待したが、枝が含まれることで、メタンガス発生量が低くなってしまった可能性が考えられる。

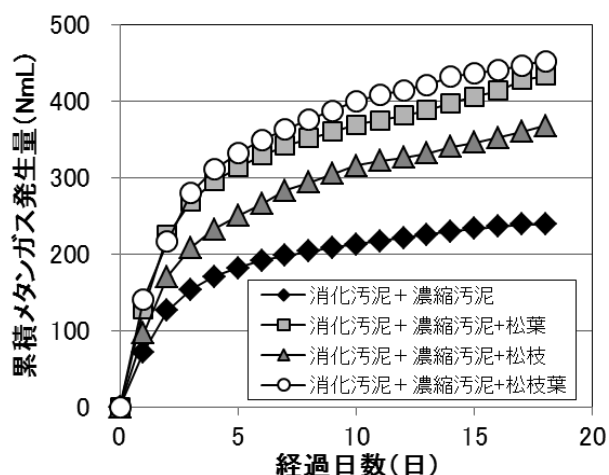


図-16 松を用いた回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量の経時的変化

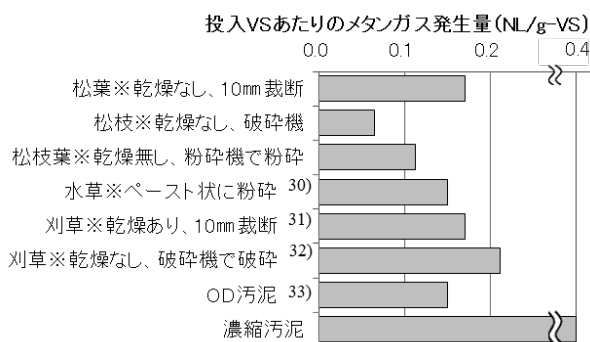


図-17 投入 VS あたりのメタンガス発生量 30)・31)・32)・33)

次に、実験終了後の消化汚泥の脱水性の評価を行った結果を図-18 に示す。なお、松枝を投入した系では、枝を抜いて評価を行ったため、参考値として示している。4 系列の消化汚泥について、脱水前の含水率は、98.6～98.9 % とほぼ同じであったが、脱水後の含水率は、松葉の系は、濃縮汚泥のみと比較して 2.9 %、松枝葉は 4.5 % 含水率が低かった。これにより、裁断や粉碎をした松枝葉を混合することで、消化後の汚泥の脱水性が向上する可能性が示された。

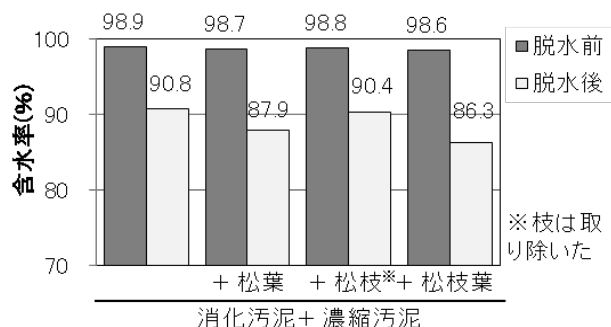


図-18 実験終了後の消化汚泥の脱水性の評価

4. 4 下水汚泥と植物系バイオマスの混合嫌気性消化の効率向上技術のまとめ

以上の結果より、公共事業に由来する植物系バイオマス（刈草）の下水汚泥との混合消化によるメタン転換ポテンシャルを評価する際には、刈草中の葉や茎や根などの部位の含有比率について配慮する必要があると考えられた。また、メタン転換効率を増加させるためには、葉や根の部分を選択し、茎部分を排除する方法が有効であると考えられた。

松枝葉の有効利用方法の一つとして考えられる下水処理場での嫌気性消化技術導入に必要な基礎的知見を収集するために、松枝葉と下水汚泥の混合嫌気性消化に関する実験を行った。その結果、松枝葉は刈草と同程度のメタンガス発生ポテンシャルを持つことが示された。松枝は、松葉よりもメタンガス発生量が低かったが、培養期間を延ばすことで、発生量の増加が期待できる可能性が示された。また、松枝葉混合により、消化後の汚泥の脱水性の向上が可能となることが示された。

5. まとめ

本年度、木質バイオマスを下水汚泥焼却炉で活用する技術、刈草を汚泥脱水助剤として適用する技術、下水汚泥と刈草の混合嫌気性消化の効率向上技術について調査した。以下に得られた成果を示す。

1. 下水汚泥焼却炉における排熱を活用した剪定枝廃材の補助燃料利用システムについて、白煙防止空気の利用可能量と、乾燥可能な剪定枝廃材の量を算出し、それらを下水汚泥と混焼することによる化石燃料削減量を算定した。
2. 活用が求められている河川等で発生する植物系バイオマスに着目し、下水処理場における汚泥の脱水助剤としての有用性を実験室レベルの遠心脱水試験で検証した。その結果、植物系バイオマスは、従来検討していたイネ科以外の種類でも下

水汚泥の脱水助剤としての有用性の可能性があること、植物系バイオマスの破碎後のサイズが大きく、TS が小さいほど、脱水助剤としての効果が見えやすい傾向を示すこと、汚泥の TS が大きいほど脱水助剤の効果が見えやすい傾向を示すことが明らかとなった。

3. 松、竹を用いた模擬ベルトプレス脱水試験の結果、脱水後の汚泥量は、バイオマスを混同しない場合と同等レベル、またはそれ以下となり、汚泥を処理場外に搬出する場合のコスト削減が見込まれることが示された。また、バイオマス混合による脱水の際の汚泥の剥離、ろ液の水質への影響はほばないものと考えられた。
4. 河川事業等の公共事業に由来する刈草の有望な利用方法の一つとして、下水処理場での下水汚泥との混合による嫌気性消化が考えられているが、刈草中の有機物のメタンへの転換率は、下水汚泥に比べて小さく、何らかの対策が必要であると考えられる。本年度は、刈草の部位（葉、茎、根）ごとのメタン転換ポテンシャルを評価したところ、部位ごとに大きな差異が見られ、刈草中の葉や茎や根などの部位の比率について配慮する必要があると考えられた。また、メタン転換効率を増加させるためには、特定の部位を選択または排除する方法が有効である可能性が考えられた。
5. 松の剪定枝は刈草と同程度のメタンガス発生ポテンシャルを持つことが示された。松枝は、松葉よりもメタンガス発生量が低かったが、培養期間を延ばすことで、発生量の増加が期待できる可能性が示された。また、松枝葉混合により、消化後の汚泥の脱水性の向上が可能となることが示された。

参考文献

- 1) 公益社団法人日本下水道協会：平成 28 年度下水道白書 p.50、2016。
- 2) 閣議決定：循環型社会形成推進基本計画、2015 http://www.env.go.jp/recycle/circul/keikaku/keikaku_3.pdf (参照：2017.2.27)
- 3) 国土交通省河川砂防技術基準維持管理編（河川編）、平成 27 年 3 月改定、2015、http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/gijutsu/gijutsukijunn/ijikanri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf (参照 2017.2.27)
- 4) 桜井健介、重村浩之：下水汚泥焼却炉の排熱で乾燥した剪定枝廃材と下水汚泥の混焼による補助燃料削減効果の算定、第 46 回環境システム研究論文発表会講演集、pp. 123-129、2018。
- 5) 国立研究開発法人土木研究所：河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用に関する研究、平成 28 年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4370 号、pp.27-35、2018。
- 6) 大高誠、姚金海：大型工業用節水機能付き冷却塔、エバラ時報、pp.20-22、2017。
- 7) 伊藤章：身のまわりの化学工学煙突の煙は CO₂? - 白煙防止のはなし -、化学工学、75、7、p.474、2011。
- 8) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部廃棄物対策課：廃棄物処理施設の発注仕様書作成の手引き（標準発注仕様書及びその解説）エネルギー回収推進施設編ごみ焼却施設（第 2 版）、https://www.env.go.jp/recycle/waste/3r_network/7_misc/man_wtfspec/1-1_hrf.pdf (参照：2018. 5. 18)、2013。
- 9) 資源のみち委員会：資源のみちの実現に向けて報告書、p. 30、<http://www.mlit.go.jp/common/000038167.pdf> (参照：2018. 5. 18)、2007。
- 10) 公益社団法人全国都市清掃会議：ごみ処理施設整備の計画・設計要領 2017 改訂版、2017。
- 11) 社団法人日本下水道協会：第 4 章汚泥処理第 7 節汚泥焼却、下水道施設計画・設計指針と解説後編 2009 年版、pp.413-429、2009。
- 12) 建設省都市局下水道部、日本下水道事業団：汚泥焼却炉の省エネルギー化に関する調査報告書、1988。
- 13) 中村正明、立元雄治：第 8 章乾燥機的设计、初歩から学ぶ乾燥技術第 2 版—基礎と実践—、pp.120-147、2013。
- 14) 独立行政法人森林総合研究所：木質ペレット成型機構の解明、森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集 28、p.16、<https://www.affrc.go.jp/pubs/koufufu-pro/documents/seikasyu28.pdf> (参照：2018. 5. 18)、2010。
- 15) 公益社団法人化学工学会：改定七版化学工学便覧、p.32 5、2011。
- 16) 独立行政法人土木研究所：草木系バイオマスの組成分析データ集、土木研究所資料第 4095 号、<https://www.pwri.go.jp/team/recycling/pwri4095a.pdf> (参照：2018. 5. 22)、2008。
- 17) 公益社団法人化学工学会、一般社団法人日本エネルギー学会：バイオマスプロセスハンドブック、p.76、2012。
- 18) 国総研資料 第 859 号、B-DASH プロジェクト No.9 脱水・燃焼・発電を全体最適化した革新的下水汚泥エネルギー転換システム導入ガイドライン(案)、2015、<http://www.nilim.go.jp/lab/bcg/siryou/tnn/tnn0859pdf/ks085912.pdf>

- 19) 町田市環境資源部資源循環課：2016 年度剪定枝搬入量及びたい肥搬出量実績、町田市ホームページ、https://www.city.machida.tokyo.jp/kurashi/kankyo/gomi/shiryo/shisetu/new_senteisi_sigenka_centar.files/CMS2016nendozisseki.pdf (参照：2018. 7. 9)。
- 20) 環境省：オフセット・クレジット (J-VER) 制度における温室効果ガス算定用デフォルト値一覧 Ver. 5. 0 (平成 26 年 7 月 10 日版)、http://offset.env.go.jp/document/j-ver/default_list.pdf (参照：2018. 5. 18)、2014。
- 21) 藤原宣夫：植栽樹木の二酸化炭素固定量からみた都市緑化施策の評価に関する研究、博士論文 (千葉大学)、2005。
- 22) 山崎廉予、重村浩之：刈草の汚泥脱水助剤としての利用検討、環境工学フォーラム論文集、Vol.73、No.7、pp.365-373、2017。
- 23) 山崎廉予、重村浩之：バイオマス資源の事業間連携活用～植物系バイオマスを活用した下水汚泥の脱水技術～、平成 30 年度国土交通省国土技術研究会、自由課題 一般部門＜活力＞、pp.3-69 - 3-74、2018。
- 24) 山崎廉予、重村浩之：植物バイオマス混合による下水汚泥脱水への影響評価、第 56 回日本下水道研究発表会講演集、Vol. 56、pp.1166-1168、2018。
- 25) 山本茂浩：新潟市における再生可能エネルギーの取組み、第 50 回下水道研究発表会講演集、pp.916-918、2013。
- 26) 山本茂浩：下水汚泥と刈り草等の混合消化実証実験、第 51 回下水道研究発表会講演集、pp.937-939、2014。
- 27) 独立行政法人土木研究所：平成 24 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料、第 4275 号、2013。
- 28) 栗田雄佑、小松俊哉、姫野修司：異なる下水汚泥を用いた刈草と混合嫌気性消化における分解特性の把握、第 51 回下水道研究発表会講演集、pp.940-941、2014。
- 29) 山崎廉予、重村浩之：松枝葉と下水汚泥の混合嫌気性消化に関する基礎的研究、平成 30 年度土木学会全国大会第 73 回年次学術講演会プログラム、V-II-099、pp.197-198、2018。
- 30) 岡安祐司、山崎廉予、植松龍二：水草と下水汚泥の混合嫌気性消化に関する基礎的研究、第 54 回下水道研究発表会講演集、N-10-7-7、pp.1093-1095、2017。
- 31) 日高平、王峰、津森ジュン：下水汚泥と刈草の混合嫌気性消化、第 17 回日本水環境学会シンポジウム講演集、p.153、2014。
- 32) 竹田悠人、栗田雄佑、小松俊哉、姫野修司：下水汚泥と刈草の混合嫌気性消化特性、土木学会論文集 G(環境)、71、pp.19-26、2015。
- 33) 戸荻丈仁、池本良子、古婷婷、小野紘、日高平、津森ジュン、柳井敦、木野下裕茂、清水浩之：OD 汚泥と廃油揚げを主体とする 7 種類の廃棄物系バイオマスの高濃度混合消化、土木学会環境工学論文集 G(環境)、70、pp.425-432、2014。

公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究

研究予算 : 運営費交付金

研究機関 : 平 28~令 3

担当チーム : 材料資源研究グループ (資源循環担当)

研究担当者 : 重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

本研究は、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。30 年度は、上記①の達成目標に関わる調査・研究として、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている大腸菌ファージの F 特異 RNA ファージ (FRNAPH) 遺伝子群 (GI~GIV) を対象に、下水処理における存在実態および除去効果を評価し、ノロウイルス (NoV) と比較することで下水処理によるウイルスの除去効果を評価する指標としての利用可能性を評価した。その結果、下水処理による FRNAPH 遺伝子群の除去効果は GI が最も低く、次に GII であり、GIII と GIV は同程度で最も低かった。下水処理による NoV の除去効果は、FRNAPH GI と GII と同程度であり、FRNAPH GII と NoV GII との間には有意な相関関係が確認された。以上の結果から、下水処理によるウイルスの除去効果を評価する指標として、NoV の指標としては FRNAPH GII を、ウイルス除去における安全側の評価としては FRNAPH GI を指標として利用できる可能性が示された。上記②、③の達成目標に関わる調査・研究としては、実態調査に基づき合流式下水道越流水対策技術の 1 つである雨天時活性汚泥法のノロウイルス (Norovirus: NoV) 削減効果を明らかにした。また、活性汚泥法による NoV の除去効率向上要因の解明のため、活性汚泥中に存在するタンパク質量が NoV の除去効果に及ぼす影響を評価した。次いで、膜分離活性汚泥法 (Membrane Bioreactor: MBR) による NoV の除去率向上効果に関して調査を行った。その結果、雨天時活性汚泥法による NoV 負荷の削減効果は、過年度分を含めた 9 回の調査の平均で 95% であった。活性汚泥処理による NoV の除去効果に活性汚泥中のペプチド量 (タンパク質) が深く関与している可能性が示唆された。MBR による NoV の除去効果は、通常の活性汚泥法と比較して 2~3 オーダー程度向上していた。

キーワード : 下水処理、F 特異 RNA ファージ、ノロウイルス、合流式下水道、タンパク質、膜分離活性汚泥法

1. はじめに

グローバル化にともなう多様な感染症を含め水系感染症拡大防止に貢献できる下水道システムの構築は、社会的優先度の極めて高い課題として、評価、対策技術を早急に確立する必要がある。従来、大腸菌、一部のウイルスを指標として衛生学的評価を行ってきたが、多種多様な病原微生物の出現により、検出・対策技術の評価が困難となることが予想される。分子生物学的手法の発展により、社会活動に重大な影響を及ぼす病原微生物の知見が集積されつつあり、新興感染症の病原微生物として一部のウイルスや、再興感染症として多剤耐性菌などが大きな社会問題^{1,2)}となっているが、対策手法構築のために必要な除去・消毒感受性の体系化された研究・調査は進んでいない。公共用水域の水質管理のためには、その水質に大きな影響を及ぼす下水処理場にて、多様化する重大な感染症要因である消毒耐性病原微生物への効率的な対応を図る必要があり、包括的な観点に基づく評価手法を構築した上で、対策手法を提案することが必要である。

本研究では、上記を踏まえ、様々なリスク要因に対応した包括的な観点に基づく評価手法の構築と、放流先水利用や異常時・災害時に対応した水処理・消毒技術の開発を目的とするものである。30 年度は、達成目標①である消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案に関わる調査・研究として、近年、ヒト腸管系ウイルスの指標として最も注目されている F 特異 RNA ファージ遺伝子群の下水処理場における存在実態および除去効果を評価し、ノロウイルスと比較することで指標としての利用可能性を評価した。また、達成目標②である公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案に関わる調査・研究として、越流水の対策技術の 1 手法である雨天時活性汚泥法による NoV の削減効果を評価した。達成目標③の高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価に関しては、活性汚泥中のタンパク質量が NoV の除去効果へ及ぼす影響や、MBR による NoV の除去率向上効果について調査を行った。

2. 研究目的および方法

2.1 消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案

2.1.1 代替指標としての F 特異性 RNA Phage の評価

多様な病原微生物が検出される中で、各々の微生物に特化した検出対応は費用や労力の面から困難であるため、消毒耐性、存在実態、定量性（PCR 法、培養法）観点から、代表的な指標を選定し評価することができれば、病原微生物の効率的な管理に資することができると考えられる。上記の観点を踏まえた代替指標の 1 つとしては、大腸菌ファージの存在が挙げられる。その中でも特に F 特異 RNA ファージ (F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH) は大きさ（直径約 20~40 nm）や構造（正二十面体）がノロウイルス (Norovirus; NoV) などのヒト腸管系ウイルスと類似しているため、指標ウイルスとしての有用性について下水中での存在実態、消毒耐性の評価例³⁾、細菌、腸管系ウイルスとの塩素消毒に対する耐性比較などに関する報告^{4) 5) 6) 7)}があり、また、ウイルス不活化手法の評価⁸⁾や下水再利用プロセスにおけるモデルウイルスとしての利用例⁹⁾がある。一方、FRNAPH は GI から GIV の遺伝子群に分けられ、それぞれの遺伝子群は下水処理や凝集や膜処理などの水処理において耐性が異なるとの報告がなされている^{10) 11) 12)}。そのため、下水処理場にてウイルスに対する指標として FRNAPH 遺伝子群を用いる場合には、下水処理場における FRNAPH 遺伝子群の存在実態と除去効果を明らかにし、NoV などのヒト腸管系ウイルスとの関連性を調べ、安全側の評価やより関連性がある遺伝子群を選定する必要があると考えられる。

本項では、FRNAPH GI~GIV を対象として、下水処理場における存在実態と活性汚泥処理による除去効果を調

査し、NoV との関連性を評価することで NoV の代替指標としての利用可能性を検討した。

2.1.2 下水処理場における FRNAPH 遺伝子群の調査方法

調査は、A 下水処理場内に設置されている標準活性汚泥処理装置（図-1）の流入水および処理水を平成29年5月から平成31年3月の間に計61回採水した。流入下水と処理水中の FRNAPH と NoV を定量し、活性汚泥処理による除去効果を算出した。FRNAPH 遺伝子群 (GI~GIV) と NoV GI, GII は、リアルタイム RT-qPCR 法 (PCR) により試料中の遺伝子濃度を定量した。定量ではポリエチレングリコール沈殿法によりサンプルを濃縮した。濃縮液からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN) および QIAcube (QIAGEN) にて抽出した。なお、ウイルス濃縮液を RNA 抽出カラムに通水し遺伝子を捕捉させる際、検出感度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたりの SS 負荷量が 0.05 mg-SS 以下となるようにウイルス濃縮液の通水量を調整した¹³⁾。抽出した RNA は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて RT 反応を行い、cDNA を得た。この合成した cDNA を TaqMan[®] プローブを用いた PCR により定量した。TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、QuantStudio[™] 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により検出した。FRNAPH 遺伝子群と NoV のプライマー、TaqMan プローブの配列およびアニーリング温度は Wolf ら¹⁴⁾ のと Kageyama ら¹⁶⁾ 報告をそれぞれ参考にした。PCR における検出下限値は約 1000 copies/L (約 3 log[copies/L]) 程度となる。さらに、RNA 抽出効率および RT-qPCR 阻害の影響を把握する目的で RNA 抽出に用いる濃縮後のサンプルにマウスノロウイルス高濃度液を添加して回収率を評価した。なお、da Silva ら¹⁶⁾ は、回収率が 10% を下回った場合は検出阻害が生じたと判断し、1% を下回った場合は深刻な検出阻害が生じたと判断すると報告している。本調査では全てのサンプルの回収率が 10% を上回っており大きな検出阻害は見られなかったため、ここでは PCR による定量値において回収率による補正は行っていない。

また、ブラック形成法による感染力を有している総 FRNAPH 濃度 (Plaque) と、培養法と PCR を組み合わせた IC-PCR (Integrated Culture-PCR; IC-PCR)^{10) 11)} による感染力を有している FRNAPH 遺伝子群 (GI~GIV) 濃度の定量も行った。PCR は遺伝子をターゲットとしていることから、感染力の有無に関係なく試料中の遺伝子情報を検出するため、下水処理中に不活化され感染力を失ったもの



図-1 標準活性汚泥処理装置

まで検出してしまふ。このことから、FRNAPH遺伝子群（GI~GIV）においては、IC-PCR（感染力を反映している）とPCR（感染力を反映していない）の両手法を用いて定量し、下水処理場での存在実態を詳細に把握した。

2.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

下水道の普及に早くから取り組んできた一部の自治体においては、下水と雨水の排除を同一の管渠とした合流式下水道を採用している。合流式下水道では降雨時において、雨水量が増加し下水処理場において処理対応が困難になる場合には、未処理下水が公共用水域へ放流されることから、衛生学的な安全性を担保するため合流式下水道越流水の対策技術の構築が必要となる。本研究においては、越流水対策技術の1つである雨天時活性汚泥法によるNoVの負荷削減効果を明らかにすることを目的に、H市の下水処理場（嫌気好気法を導入：処理フローの概略は図-2）において実態調査を行った。晴天時の受け入れ可能な流入水量である1Q分に対し、降雨時には最大の受け入れ流入水量を3Qとし、2Q分の流入下水を反応タンクの後段にバイパス流入させ処理を行うことができる。本調査では、降雨時の雨天時活性汚泥法の運転直後から終了時まで、流入下水、最初沈殿池流出水、二次処理水を採水しNoV濃度を測定することで、その削減効果を明らかにした。

NoVの測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮はPEG沈殿法とした。PEG沈殿法により回収した沈渣をRNase-free水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイムRT-PCR法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社）の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Cleanup Kit（QIAGEN社）でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料0.5μgをランダムプライマー、Omniscript RT Kit（QIAGEN社）を用い全量50μLの系で逆転写反応によりcDNAを作製し5μLをリアルタイムPCRに供した。NVの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」¹⁷⁾に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantiTect Probe PCR Kit（QIAGEN社）を用い、リアルタイムPCR装置はQuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）を使用

した。逆転写反応に使用する抽出RNA量はSpectrophotometer（NanoDrop社製）により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した¹⁸⁾。他の水質分析項目は濁度、SSとした。



図-2 雨天時活性汚泥法の概略図

2.3 活性汚泥中のタンパク質とNoV除去効果の関係

NoVは、活性汚泥法により2log程度の除去効果が得られるが、活性汚泥法の変法である生物学的高度処理法では3log程度に向上する報告がある¹⁹⁾。感染性胃腸炎の流行により、流入下水中のNoV濃度が高まることから、放流先の水利用の状況によっては、下水処理場においてより高度な除去効果が必要となることも予想される。

本項では、活性汚泥法によるNoVの除去効果を高めるための1要因を明らかにすることを目的に、昨年度に引続き吸着効果に関与が推定される活性汚泥中のタンパク質とNoVの除去能力との関係性を評価した。

処理プロセスが異なる活性汚泥を評価対象として、生物学的高度処理法を導入しているI下水処理場のA²/O法の好気槽（A²/O法）、I下水処理場内の活性汚泥処理プラントの反応タンクから活性汚泥（標準法）を各々採取した。各々採取した活性汚泥は、静置沈殿させ上澄液などの取り除き流入下水を15L添加することで、MLSS濃度が500、1,000、2,000mg/Lとなるように30Lの反応系を6ケース（2種類の活性汚泥×MLSS濃度が3ケース）作成した。この30Lの反応系を利用し回分実験として7時間の曝気混合後に混合液を採取、その後静置沈殿させ上澄液を採水した。回分実験から得られた上澄液についてはNoVとSSを測定した。NoVの測定法は上記2.2と同様である。タンパク質については、20mLの試料を2,400×G、15分間、4℃にて遠心分離を行い上澄液と沈渣に分別し、上澄液には滅菌蒸留水を加え20mLとしタンパク質測定用試料とした。沈渣からのタンパク質の抽出は抽出液を添加、超音波処理による手法を参照した²⁰⁾。抽出液として50mMりん酸緩衝液+1%SDSを20mLになるまで添加、攪拌混合の後、10分間の超音波処理、その後、遠心分離により上澄液と沈渣に分別、同様の操作を繰り返すことで2回の抽出操作を行った。最終的には、遠心分離・抽出処理後に得られた全ての上澄液をタンパク質測定用試料

として Bicinchoninic Acid (BCA 法) により測定を行った²¹⁾。BCA 法における標準タンパク質としては、牛血清アルブミンを希釈して利用した。また、上澄液は透析膜により 3KDa 以下、3~10KDa 以下、10KDa 以上に分子量分画を行った後にタンパク質を測定した。

2.4 MBR による NoV 除去効果の向上評価

活性汚泥処理水や再生水の水質向上などを目的として膜分離技術の導入が徐々に行われつつある。除去対象物質に応じて膜の公称孔径は精密 (MF 膜)、限外 (UF 膜)、逆浸透 (RO 膜) など到大別されるが、MF 膜が多く用いられている MBR の適用事例は平成 23 年 3 月時点で 16 箇所となっている²²⁾。SS や細菌類の除去により良好な水質が得られるとともに、ウイルスの除去効果が高いとの報告事例²³⁾があるが、限られた知見である。

本項では、下水の高度処理法などによる病原微生物の

不活化・除去の向上評価の一環として、MBR による NoV の除去効果を把握した。

除去効果を把握するため、I 下水処理場内の活性汚泥処理プラントの生物反応槽に MF 膜 (無機系/平幕/孔径 0.1 μ m) を浸漬させ膜ろ過水を得た。HRT を約 8 時間とした連続処理により MLSS 濃度を徐々に高め 3,300~7,400mg/L の範囲で評価を行った。また、NoV とともに大腸菌を測定した。NoV の測定法は上記 2.2 と同様であり、大腸菌は QT トレイによる MPN 法とした。

3. 研究結果および考察

3.1 消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案

3.1.1 流入下水と処理水における FRNAPH と NoV の存在実態

A 下水処理場内に設置されている標準活性汚泥処理装

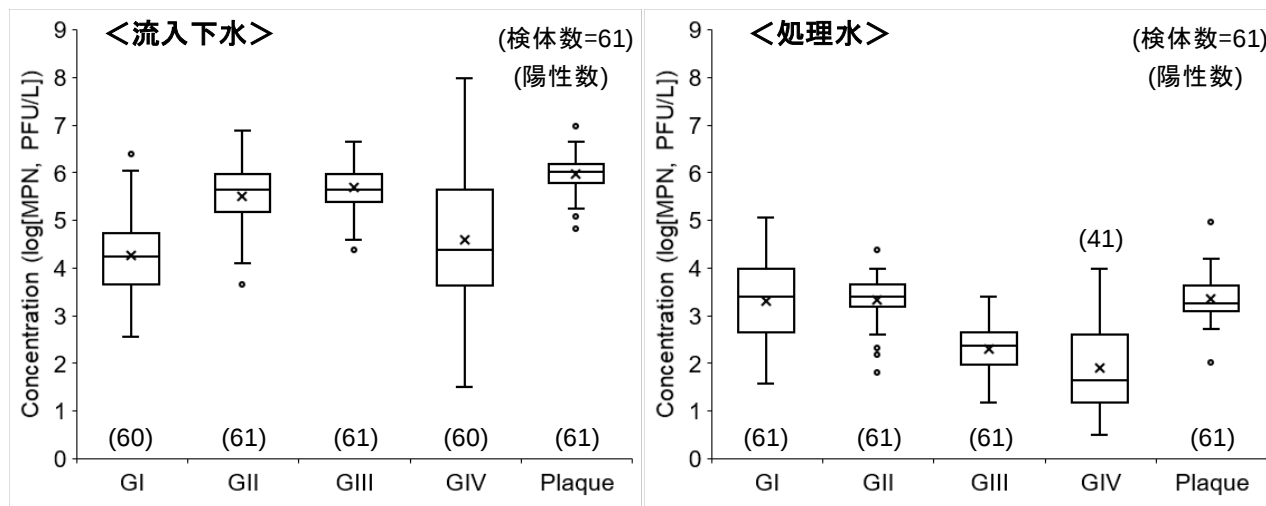


図-3 流入下水 (左) と処理水 (右) における IC-PCR と Plaque による感染力を有した FRNAPH の存在濃度

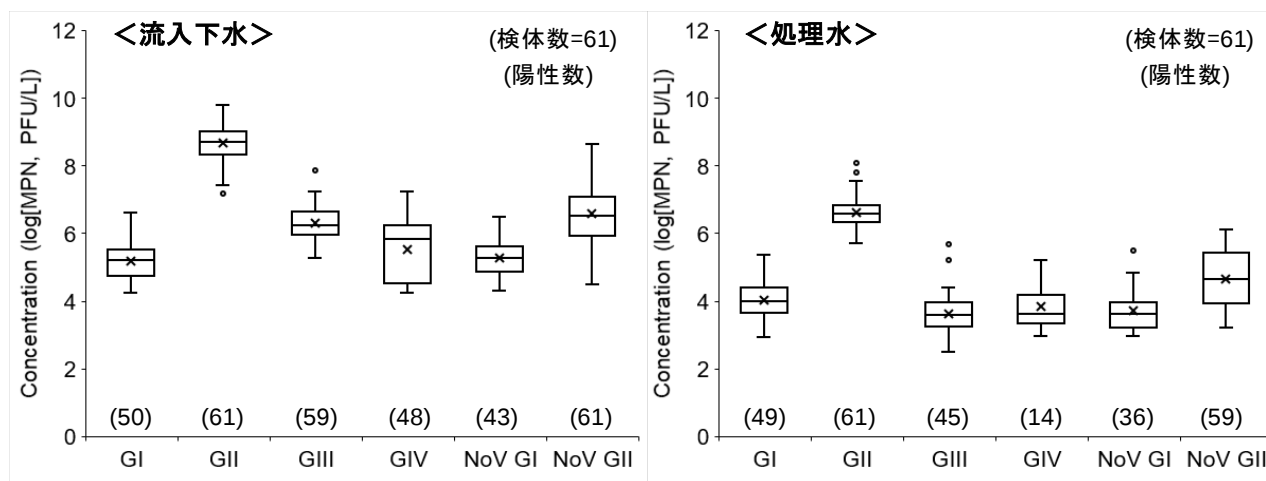


図-4 流入下水 (左) と処理水 (右) における PCR による FRNAPH 遺伝子群と NoV の存在濃度

置の流入下水および処理水の感染力を有するFRNAPHの存在濃度を図-3に示す。流入下水ではGI（陽性数：60）とGIV（陽性数：60）を除いて他の遺伝子群（GIIとGIII）が全ての試料（ $n=61$ ）で検出された（陽性数：61）。平均濃度では、GIIとGIIIが同程度で最も高く、その次にGIとGIVであった。総FRNAPH濃度（Plaque）は最も濃度が高く、GIIとGIIIと同程度であった。また、GIVは流入下水中の濃度にばらつきが大きかった。処理水では、GIV（陽性数：41）以外のFRNAPH遺伝子群（GI、GII、GIII）が全ての試料（ $n=61$ ）で検出された（陽性数：61）。平均濃度では、GIとGIIが同程度で最も高く、その次にGIII、GIVの順であり、GIVが最も低かった。総FRNAPH濃度（Plaque）は流入下水と同様に最も濃度が高かったGIとGIIの濃度と同程度であった。

PCR（感染力を反映していない）による流入下水と処理水のFRNAPH遺伝子群とNoVの存在濃度を図-4に示す。流入下水における平均濃度では、FRNAPH GIIが最も高く、その次にNoV GII、FRNAPH GIII、FRNAPH GIV、NoV GI、FRNAPH GIの順であった。処理水における平均濃度では、流入下水と同じくFRNAPH GIIが最も高く、その次にNoV GIIであり、その他の濃度は同程度であった。

FRNAPH遺伝子群においてGIとGIVは主に動物の糞便由来であり、GIIとGIIIは人の糞便由来であることが報告されており²⁴⁾、GIIとGIIIは下水処理場の流入水と二次処理水で高頻度および高濃度で検出されることが報告されている^{25),26)}。また、GIも流入下水で高頻度に検出

されており、下水処理での除去効果が他の遺伝子群と比べて低いことから二次処理水中でも高頻度および高濃度で検出されると報告されている^{25),26)}。本研究でも流入下水中ではGIIとGIIIが高濃度で検出されており、処理水ではGIもGIIとともに高濃度で検出されているため、既往の研究結果と一致している。下水処理場での調査報告では^{10),14),25)}、GIVが検出された事例が少なく報告例も限られている。しかし、本研究では、流入下水において感染力を有するGIVが高頻度（60/61）で検出された。この理由としては、本研究で用いた活性汚泥処理装置の原水として用いているA下水処理場の流入下水には家畜排水が混入しているため、動物の糞便由来であるGIVが高濃度で存在していたことが考えられる。ブラック形成法による感染力を有している総FRNAPH濃度（Plaque）は、全てのFRNAPH遺伝子群を検出するため、流入下水と処理水において濃度が最も高かった遺伝子群の濃度と同程度であったことが考えられた。

3.1.2 下水処理によるFRNAPHとNoVの除去効果

流入下水および処理水の濃度から算出した下水処理によるFRNAPHとNoVの除去効果を図-5に示す。感染力を含めたFRNAPHの除去効果（IC-PCR、Plaque）は、 $GI < GII = Plaque < GIII = GIV$ の順であり、GIは下水処理による除去・不活化効果が最も低かった。下水処理によるFRNAPHとNoV遺伝子の除去効果（PCR）は、 $FRNAPH GI = NoV GI \leq FRNAPH GII = FRNAPH GIV = NoV GII < FRNAPH GIII$ の順であり、FRNAPH GIとNoV GIが最も低かった。また、FRNAPH GIとNoV GI、FRNAPH GIIと

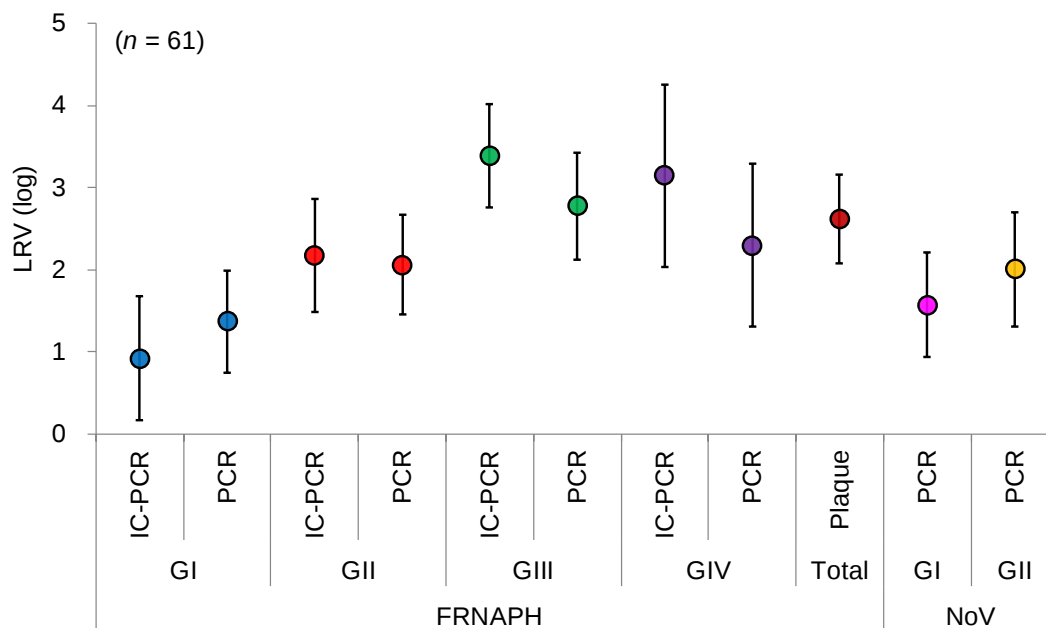


図-5 下水処理によるFRNAPHとNoVの除去効果

NoV GI, NoV GII の間に有意な差はなかった (t -test, $P > 0.05$)。さらに、FRNAPH 遺伝子群の IC-PCR と PCR の除去効果を比較した結果、GIV のみ PCR と IC-PCR の間に有意差があった (t -test, $P < 0.05$)。

全ての FRNAPH と NoV の除去効果に対して相関分析を行った結果、不活化効果を含めた FRNAPH の除去効果 (IC-PCR、Plaque) の間およびその他の除去効果 (PCR) との間で相関関係はあまり見られなかった。しかし、PCR による不活化効果を含めない FRNAPH GII と NoV GII の除去効果の間に高い相関関係が見られた (図-6)。

近年、FRNAPH GII は下水処理場での挙動²⁶⁾や牡蠣における存在実態²⁷⁾において NoV との関連性が報告されている。本研究においても下水処理での除去効果において高い相関関係が示されたことから、NoV の指標ウイルスとしての利用可能性が確認された。そのため、今後、下水処理場での FRNAPH GII の存在実態を、感染力を含めてより詳細に調べることで、感染力の評価ができない NoV の下水処理場での挙動を推測することができると考えられる。一方、FRNAPH GI は本研究で対象としたウイルスの中で、下水処理により最も除去されにくかった。既往研究においても、NoV のみならずエンテロウイルスやサポウイルス、アデノウイルスなどのヒト腸管系ウイルスおよび大腸菌などの細菌と比べても下水処理による除去効果が著しく低いことが報告されている^{25, 26)}。このことから、下水処理によるウイルスの除去効果を評価する上で、FRNAPH GI を指標ウイルスとすることで、より安全側の評価が行える可能性も示唆された。

以上の結果から、下水処理によるウイルスの除去効果を評価する指標として、NoV の指標としては FRNAPH GII を、ウイルス除去における安全側の評価としては FRNAPH GI を指標として利用できる可能性が示された。今後は、塩素や紫外線などの消毒処理や膜分離活性汚泥法などの異なる下水処理において、ウイルス除去・不活化の指標としての FRNAPH 遺伝子群の利用可能性を評価する予定である。

3.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

降雨時に越流水対策として雨天時活性汚泥法 (嫌気好気法) を導入している H 市下水処理場における NoV 負荷の削減効果の調査結果を図-7 に示す。これはお過去に得られた調査データを加え整理した結果である。全調査時における降雨状況は、時間最大降雨量が 2.0~18.5mm、累積降雨量は 9.5~54mm であった。また、最大バイパス流量

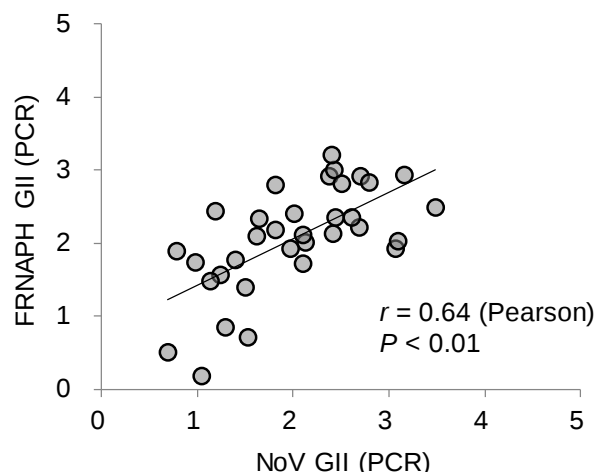


図-6 下水処理による FRNAPH GII と NoV GII の除去効果の相関関係

は 0.3~1.7Q であった。雨天時活性汚泥処理時における NoV 負荷の削減効果は、流入負荷量を 1 とし流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ 0.016~0.115 であった。雨天時活性汚泥処理を実施しなかったとすると、晴天時の受け入れ可能な流入水量である 1Q 分を超過した NoV の負荷が公共用水域へ直接放流されることとなることから、雨天時活性汚泥処理により放流先河川水への負荷を大幅に低減しているものと考えられた。処理水の負荷量比に大きな違いが見られたことから、その要因を推定するため雨天時活性汚泥処理時における反応タンク内の MLSS や雨天時活性汚泥処理の継続時間と NoV 流出負荷の関係について、各々整理した結果を図-8、9 に示す。雨天時活性汚泥処理開始当初の反応タンク内 (バイパス流入槽の前段での評価) の MLSS は約 1,300~1,700mg/L で推移しており、MLSS が高まることで NoV の流出負荷が若干低くなる傾向が見られるものの、明確な関連性はない状況であった。併せて、雨天時活性汚泥処理の継続時間との関係では、3.3~13.8 時間の間において累積降雨量が 9.5~25mm の 10 時間以内であれば処理継続時間と NoV の流出負荷に関連が見られたが、50mm 程度であった 10 時間以上では NoV の流出負荷が低下傾向を示した。一方、反応タンク内の MLSS の上昇は、雨天時活性汚泥処理時における SS の流出が懸念されることから、MLSS と処理水の平均 SS を整理し図-10 に示す。全体的には MLSS が高くなっても処理水の平均 SS 濃度は上昇傾向を示しておらず、SS の観点から処理水質へ及ぼす影響は小さいものと考えられた。

全 9 回の降雨時調査における NoV 流出負荷の平均は 0.052 であり流入負荷量に対する除去効果は約 95% であ

った。

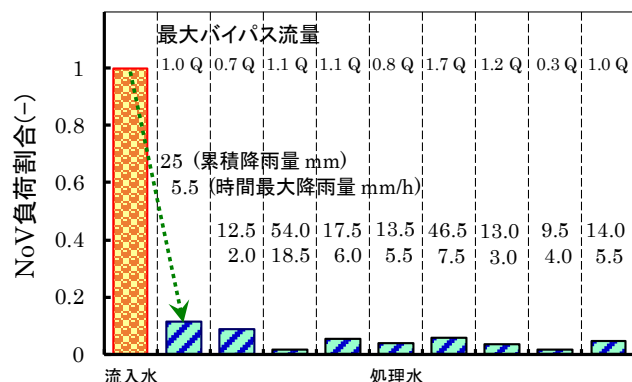


図-7 雨天時活性汚泥処理法によるNoV負荷の削減効果

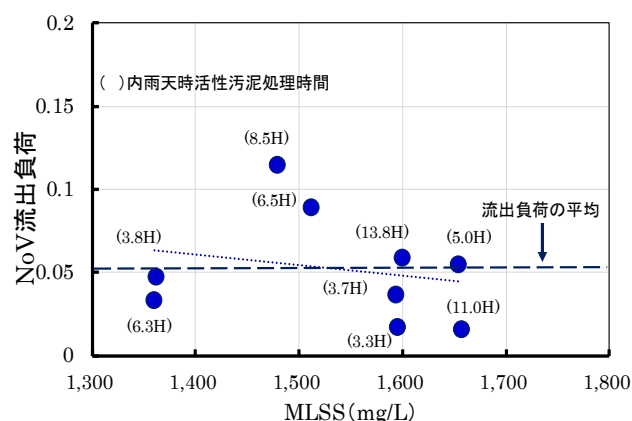


図-8 反応タンク内MLSSとNoV流出負荷との関係

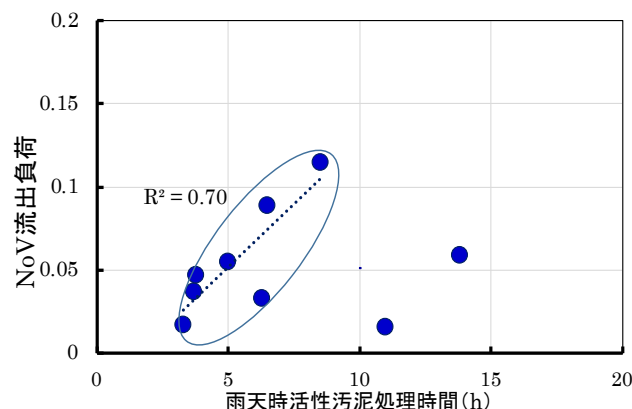


図-9 雨天時活性汚泥処理時間とNoV流出負荷との関係

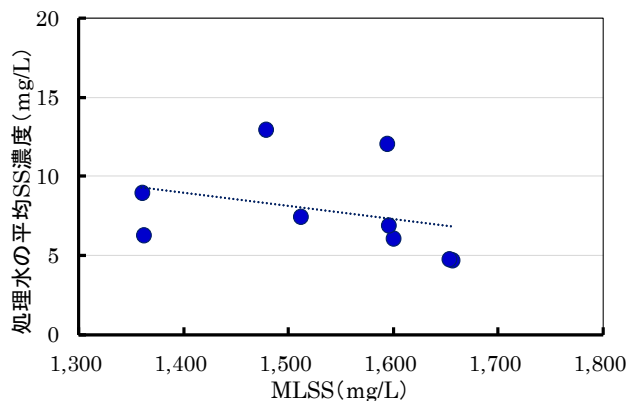


図-10 反応タンク内MLSSと処理水のSSとの関係

3.3 活性汚泥中のタンパク質と NoV 除去効果の関係

過年度に実施した3回分の回分実験結果を含め整理した結果を図-11に示す。なお、分子量分画において10KDa以下のものをペプチド、10KDa以上をタンパク質として整理した。単位水量あたりの活性汚泥中には10KDa以上のタンパク質が最も多く、次いで、3KDa以下、3～10KDa以下のペプチドの順であり、かつ、A²/O法の活性汚泥は標準法に比較してタンパク質、ペプチド量ともに多い状況であった。活性汚泥中のタンパク質やペプチド量と回分実験後における上澄液中のNoV濃度との間には高い相関関係があり、活性汚泥中のタンパク質・ペプチド量の増加に伴ってNoV濃度が低くなる傾向が見られた。

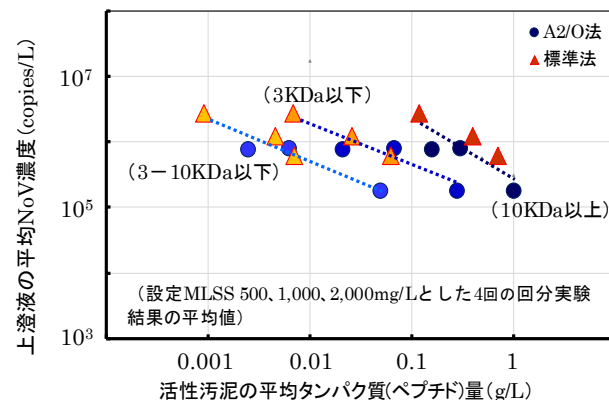


図-11 活性汚泥のタンパク質(ペプチド)量とNoV濃度の関係

次いで、図-11に示した活性汚泥中のタンパク質、ペプチド量についてA²/O法と標準法ごとに整理した結果を表-1に示す。設定MLSS濃度を500、1,000、2,000mg/Lとした4回の回分実験結果の平均値を示したものであり、平均値の最小値は設定MLSSを500mg/L、平均値の最大値は設定MLSSが2,000mg/Lとしたものである。3KDa以下のペプチド量は標準法に比較してA²/O法では最大4.5

倍量、同様に3～10KDa以下のペプチド量は7.1倍量の違いが見られた。10KDa以上のタンパク質に関しては1.4倍量多かった。

A²/O法の活性汚泥は、標準法に比較してペプチドやタンパク質の含有量が多く、特にペプチド量に大きな違いが見られた。これらの結果から、活性汚泥によるNoVの吸着除去効果にペプチドが深く関与している可能性が示唆された。

今後、次世代シーケンサーなどを活用し標準法とA²/O法の活性汚泥中に存在するペプチド生成能に関与する細菌叢の違いを解明することで、NoVの除去効果向上要因の1つを明らかにできるものと考えられる。

表-1 タンパク質量とペプチド量の比較

	実験1～4の平均値 (g/L)		A ² /O法／標準法の比
3KDa以下 (ペプチド)	A ² /O法	0.021～0.28	} 3.0～ <u>4.5</u>
	標準法	0.0069～0.062	
3-10KDa以下 (ペプチド)	A ² /O法	0.0025～0.05	} 2.7～ <u>7.1</u>
	標準法	0.00092～0.007	
10KDa以上 (タンパク)	A ² /O法	0.16～1.0	} 1.3～ <u>1.4</u>
	標準法	0.12～0.7	

設定MLSS濃度500、1,000、2,000mg/Lとした4回の回分実験結果の平均値。平均値の最小値 (g/L)は設定MLSSを500mg/L、平均値の最大値は設定MLSSが2,000mg/Lとしたものである。

3.4 MBRによるNoV除去効果の向上評価

MBRによるNoVの除去効果の向上評価に関わる調査結果を図-12に示す。調査期間中の流入下水のNoV濃度は $10^6 \sim 10^8$ copies/Lレベルで推移しており、夏季と冬季において2オーダー程度の違いが見られた。MBR処理水のNoV濃度は $10^2 \sim 10^3$ copies/Lレベルで推移しており、流入下水に比較して濃度の変動幅は小さい。MBRの実験装置の立上げ時から現状までの濃度推移について、MLSSのデータと併せ整理した結果を図-13に示す。MLSSは3,300～7,400mg/Lで推移したが、MLSSが低い状態でのNoVの除去効果は約3.2logであるのに対し、MLSSの上昇に伴い除去効果は向上し、最大の除去効果は5.2logとなった。MLSSとNoVの除去効果には相関関係が見られたが、MLSSが6,000mg/L以上となることで、NoVの除去効果にやや変動があるものの、除去効果の向上が見込めない状況であった。今回のMBRでのMF膜は公称孔径が0.1 μ mの平膜であり、ウイルスが通過できる孔径ではあるが、MLSSの上昇とともにNoVの除去効果が向上していることから、活性汚泥のフロック形成時にウイルスが取り込まれ、粒径の大きいフロックが膜に捕捉されることでNoVの除去効果が向上するものと推定された。また、MLSS上昇による膜透過流速の低下や膜面におけるケー

キ層の形成なども考えられる。本調査期間中における

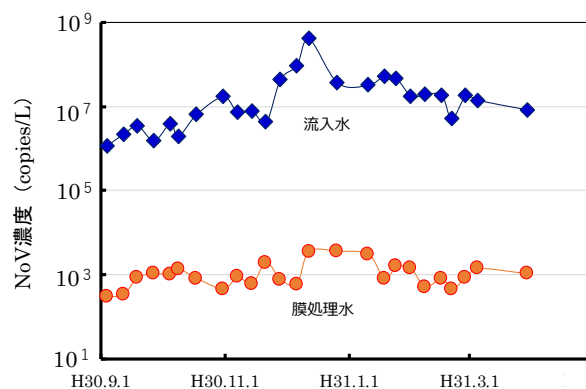


図-12 MBRでのNoV濃度の推移

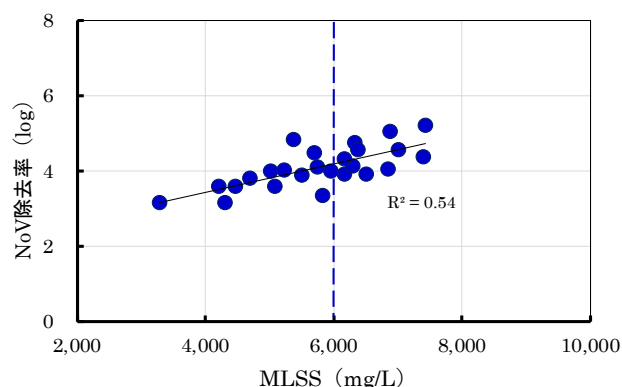


図-13 反応タンク内MLSSとNoV除去率の関係

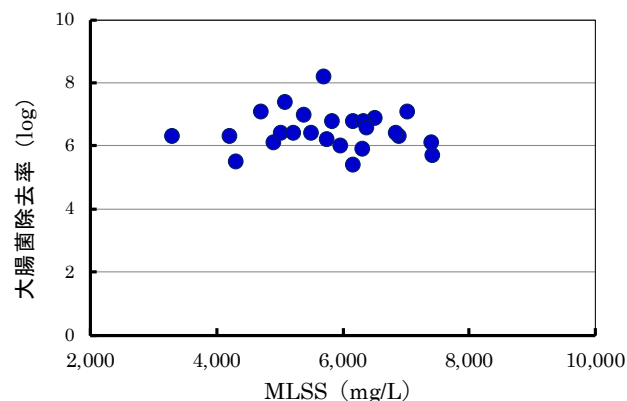


図-14 反応タンク内MLSSと大腸菌除去率の関係

NoVの最大除去効果は5.2log、MLSSが6,000mg/L以上の条件における平均除去効果は4.4log、同様に7,000mg/L以上では4.7logであった。MBRによるNoVの除去効果は通常の活性汚泥法と比較して2～3オーダー程度向上していた。

併せて測定を行った大腸菌の除去率の推移について図-14に示す。大腸菌は膜の公称孔径よりも大きいため過捕捉されることからNoVの除去効果よりも高い状況にあった。流入下水の大腸菌濃度に影響を受け除去率が変動しているが、多くのデータは6log以上でありMBR処

理水中の大腸菌濃度は定量限界値以下あるいは、採水時等において極微量の汚染の可能性があったことから、それに近い値となった。

4. まとめ

本研究は、様々なリスク要因に対応した包括的な観点に基づく評価手法の構築と、放流先水利用や異常時・災害時に対応した水処理・消毒技術の開発を目的とするものである。平成30年度は、消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案に関わる調査・研究として、近年、ヒト腸管系ウイルスの指標として最も注目されている F 特異 RNA フェージ遺伝子群の下水処理場における存在実態および除去効果を評価し、ノロウイルスと比較することで指標としての利用可能性を評価した。また、実態調査に基づき合流式下水道越流水対策技術の1つである雨天時活性汚泥法の NoV 削減効果を明らかにした。活性汚泥法による NoV の除去効率向上要因の解明のため、活性汚泥中に存在するタンパク質量が NoV の除去効果に及ぼす影響を評価した。さらに、MBR による NoV の除去率向上効果に関して調査を行った。以下に得られた結果を示す。

「消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案」

- 1) 流入下水や処理水において FRNAPH 遺伝子群は高頻度・高濃度で存在していることが確認され、ヒト腸管系ウイルスの指標として利用できる可能性が示された。
- 2) 下水処理による FRNAPH 遺伝子群 (GI~GIV) の除去効果は GI が最も低く、次に GII、GIII と GIV は同程度であった。
- 3) 下水処理による NoV の除去効果は、FRNAPH GI と GII と同程度であり、FRNAPH GII と NoV GII との間に有意な相関関係が確認された。
- 4) 下水処理によるウイルスの除去効果を評価する指標として、NoV の指標としては FRNAPH GII を、ウイルス除去における安全側の評価としては FRNAPH GI を指標として利用できる可能性が示された。

「公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案」

- 1) 雨天時活性汚泥法による NoV 負荷の削減効果は、反応タンク内の MLSS が高まることで NoV の流出負荷が若干低くなる傾向が見られるものの、明確な関連性はない状況であった。
- 2) 全9回の降雨時調査における NoV 流出負荷の平均は 0.052 であり流入負荷量に対する除去効果は約 95% であ

った。

「高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価」

- 1) 活性汚泥による NoV の吸着除去効果にペプチドが深く関与している可能性が示唆された。
- 2) MBR による NoV の除去効果は通常の活性汚泥法と比較して 2~3 オーダー程度向上していた。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした H 市下水処理場、I 下水処理場の下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 外務省：G7 伊勢志摩首脳宣言、平成 28 年 5 月 27 日、<https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000160267.pdf> (2019 年 9 月 24 日閲覧)
- 2) CDC：ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013, <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013> (2019 年 9 月 24 日閲覧)
- 3) Schaper, M., Dura'n, A. E., Jofre, J. : Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68 (8), pp. 3702-3707, 2002
- 4) Sobsey, M.D. : Inactivation of Health-Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 21(3), pp. 179-195, 1989
- 5) Snead, M.C., Olivieri, V.P., Kawata, K. and Kruse, C.W. : The Effectiveness of Chlorine Residuals in Inactivation of Bacteria and Viruses Introduced by Post-Treatment Contamination, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 14, pp. 179-195, 1980
- 6) Tree, J.A., Adams, M.R. and Less, D.N. : Virus Inactivation During Disinfection of Wastewater by Chlorination and UV Irradiation and the Efficacy of F+ Bacteriophage as a Viral Indicator, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 35(11-12), pp. 227-232, 1997
- 7) Rippey, S.R. and Watkins, W.D. : Comparative Rates of Disinfection of Microbial Indicator Organisms in Chlorinated Sewage Effluents, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 26 (9-11), pp. 2185-2189, 1992
- 8) 李善太、諏訪守、重村浩之：紫外線によるノロウイルスの不活化とその効果の推定手法、*土木技術資料*, Vol.61(2), pp.40-43, 2019
- 9) Lee, S. Ihara, M., Yamashita, N., Tanaka, H. : Improvement of virus removal by pilot-scale coagulation-ultrafiltration process for wastewater reclamation: Effect of optimization of pH in secondary

- effluent, *Water Res.*, Vol. 114, pp. 23–30, 2017
- 10) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N. and Tanaka, H. : Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 82, pp. 4244–4252, 2016
 - 11) Lee, S., Tasaki, S., Hata, A., Yamashita, N. and Tanaka, H. : Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes, *Environ. Technol.*, Vol. 40(19), pp. 2527–2537, 2019
 - 12) Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jos- sent, J., Bakanga, F., Amal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S. and Gantzer, C. : Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale, *Water Res.*, Vol. 46, pp. 2651–2664, 2012
 - 13) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子 : 下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、Vol. 46(561)、pp. 91-101, 2009
 - 14) Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M. and Greening, G. E. : Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, *J. Virol. Methods*, Vol. 149, pp. 123–128, 2008
 - 15) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N. and Katayama, K. : Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 41(4), pp. 1548–1557, 2003
 - 16) da Silva, A. K., Le Saux, J. C., Pamaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M. and Le Guyader, F. S. : Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 73, pp. 7891–7897, 2007
 - 17) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 : ノロウイルスの検出法について, 2007, <https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html> (2019年9月24日閲覧)
 - 18) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子 : 下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、Vol. 46(561), pp. 91–101, 2009
 - 19) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 : ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、Vol. 47 (571)、pp. 103–111, 2010
 - 20) Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Sperandio, M., Lefebvre, D. : Protein extraction from activated sludge: An analytical approach, *Water Res.*, 42, pp. 1867–1878, 2008
 - 21) Instruction of Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).
 - 22) 下水道膜処理技術会議: 下水道への膜処理技術導入のためのガイドライン第2版、pp19、平成23年3月
 - 23) 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会 : 報告書、pp.11、平成22年3月
 - 24) Cole, D., Long, S. C. and Sobsey, M. D. : Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 69 (11), pp. 6507–6514, 2003
 - 25) Hata, A., Kitajima, M. and Katayama, H. : Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 114, pp. 545–554, 2013
 - 26) Lee, S., Suwa, M. and Shigemura, H. : Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, *J. Water Health*, Vol. 17 (1), pp. 50–62, 2019
 - 27) Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N. and Gantzer, C. : F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 84 (1), pp. 1–14, 2018

再生水の利用促進に向けた病原微生物と 消毒副生成物の制御手法に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 28～令 1

担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）

研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

下水処理水再生水（再生水）利用の促進のため、安全性評価や再生利用技術、再生水利用による環境負荷やエネルギー削減効果の検証、水質管理手法の向上に関わる研究開発の推進が望まれている。気候変動などの影響により、渇水のリスクは潜在的に存在していることから、安定した水資源として再生水利用促進に繋がる再生処理技術を確立する必要がある。一方、我が国における再生水の再利用率は現在 2%未満であり、その向上のためには安心、安全の確保や維持管理費の低減について両立させる必要がある。

本研究は、平成 28～令和 1 年度にかけ、①再生処理水質と生物膜生成要因の解明、②水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明、③消毒効果の観点での再生処理技術の評価、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。30 年度は、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける消毒副生成物として N-ニトロソアミン類や同化性有機炭素（AOC: Assimilable Organic Carbon）を対象とした実態調査を行った。

その結果、二次処理水の AOC は約 60～70μg/L で推移、生物膜処理やオゾン+担体処理により約 20%の低減効果があるものの、UV、オゾン処理を経ても濃度の違いは見られなかった。MBR 法の処理水の AOC は 20μg/L 程度と評価対象試料中、最も低濃度であった。吸着材等を利用した低減手法により、AOC を概ね 10μg/L 以下とすることができた。二次処理水では塩素処理の有無に関わらず N-ニトロソアミン類の顕著な生成は認められなかった。オゾン処理水に関しては N-ニトロソアミン類の生成があり、その後の塩素処理の有無に関わらず生成濃度は高い状況にあり、低減化策の考慮が必要である。オゾン処理後において易分解有機物を後段の担体処理で分解することで、N-ニトロソアミン類の生成濃度は低下した。

キーワード：AOC、ノロウイルス、Phage、消毒、N-ニトロソアミン類

1. はじめに

再生水は安定した水資源であるため、再利用への関心が高まっている一方で、現状の再利用率は 2%未満である¹⁾。再生水の利用にあたり、衛生的安全性を確保するため、責任分界点における残留塩素濃度を維持する必要があるが、再生処理水質などの影響で塩素が消費されることから、塩素を高濃度で注入する必要がある。このため、維持管理費や消毒副生成物、施設管路の腐食等の課題が懸念される。特に、消毒剤を消費する生物膜生成要因の 1 つと推定される再生水中の AOC の存在、あるいは消毒副生成物である N-ニトロソアミン類などについては下水再生処理プロセスでの調査、研究例は少ない。再生水の利用促進のためには、維持管理費の低減、かつ消毒副生成物の制御、消毒効果維持の観点から再生処理水質を安定化させる必要があり、消毒剤の消費要因の解明とその制御手法を提案することが必要である。

本研究は、再生処理水質が消毒剤消費や消毒効果に及ぼす影響を評価し、消毒剤の消費要因および消毒副生成物を制御することで、維持管理費の低減と、再生水の安全性の確保の両立を図り、再生水利用の促進に資することを目的とする。30 年度は、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、各種下水試料を対象とした AOC と消毒副生成物として N-ニトロソアミン類の実態調査を行った。

2. 研究方法および結果

2.1 再生処理水質と生物膜生成要因の解明

2.1.1 各種下水試料の AOC の実態

1) 調査目的

再生水利用における水質基準項目としての残留塩素濃度は遊離 0.1～結合 0.4mgCl/L 以上であるが²⁾、水質性状などにより塩素が消費されることで、注入濃度を高める課

題がある。消費要因の1つには施設配管内などの生物膜の生成が推定され、その生成要因としては再生水中のAOCの存在が考えられる。

本項では、再生処理施設などにおけるAOCの実態把握を目的としているが、昨年度までの調査結果では試料中に残存している栄養塩類が検出濃度に影響を与えている可能性が示唆された。30年度は、各種下水試料を対象としたAOCと消毒副生成物としてN-ニトロソアミン類の実態調査を行った。

2) 調査方法

調査はA下水処理場の流入下水、活性汚泥二次処理水、生物膜処理水（HRT約80分間）、紫外線消毒水（中圧）、B下水処理場の活性汚泥パイロットプラント二次処理水、オゾン処理水（注入濃度2.5～3mg/L、HRT20分間）および膜分離活性汚泥処理水を対象とした。また、吸着材等を利用した回分実験によりAOCの低減効果を評価した。回分実験はB下水処理場のオゾン処理水を原水として、試料水1Lに対し多孔質炭素材料（吸着材）、活性炭を0.1gあるいは0.5g添加し10～120分間接触させた。

AOCの測定法は、下水試験方法に準拠した³⁾。試験用の菌株は *Pseudomonas brenneri* (P17: ATCC49642) 株、*Herminiimonas* sp. (NOX: ATCC49643) 株を利用し、各々の試験用菌液を調整した。酢酸ナトリウムを添加した塩類溶液に各菌液を接種、培養しコロニー数と酢酸ナトリウムに由来する有機炭素の濃度との関係を求め、収率係数を算出した。収率係数はP17株が 4.05×10^6 CFU/酢酸-C μ g、NOX株が 9.95×10^6 CFU/酢酸-C μ gであった。AOC値はP17+NOXの総AOC値とした。

3) 調査結果

各種下水試料の総AOCの推移を図-1に示す。各下水試料の総AOCの構成はP17株によるものが約80～90%を占めていた。流入下水では約220 μ g/Lであるのに対し二次処理水は約60～70 μ g/Lで推移、生物膜処理やオゾン+担体処理により約20%の低減効果があるものの、UV、オゾン処理を経ても濃度の違いは見られなかった。一方、B下水処理場内に設置した膜分離活性汚泥PP.

(MBR法)の処理水は20 μ g/L程度と評価対象試料中、最も低濃度であった。

バクテリアの増殖防止にはAOC濃度を10 μ g/L以下にする必要があるとの報告⁴⁾があるが、上記の評価対象試料の全てで超過した値となった。昨年度までの評価では、試料中に残存しているNH₄-NがAOCに影響を及ぼしている可能性があり、これらの栄養塩類の制御にも留意が必要であると考えられたが、MBR法の処理水のNH₄-N濃度はほぼ0.1mg/L以下であるため、栄養塩類

の制御によりAOCの低減を図ることは難しい。このため、AOCのより低濃度化のため吸着材等を利用した低減手法を評価した。評価結果を図-2に示す。原水（オゾン処理水）中のAOCは約80 μ g/Lであったが、吸着材、活性炭の添加量を0.1g、0.5gとし接触時間を60分間以上とすることで概ね10 μ g/L以下となった。

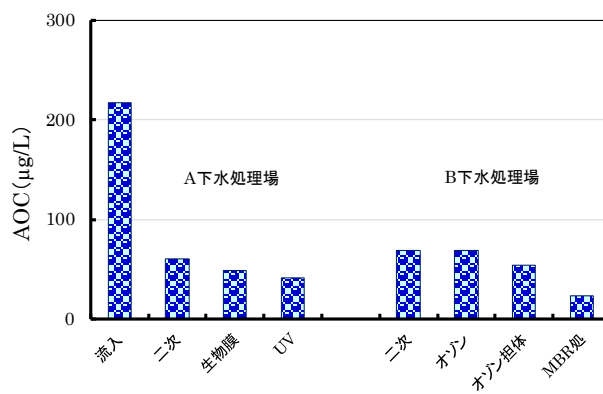


図-1 各種下水試料の総AOCの推移

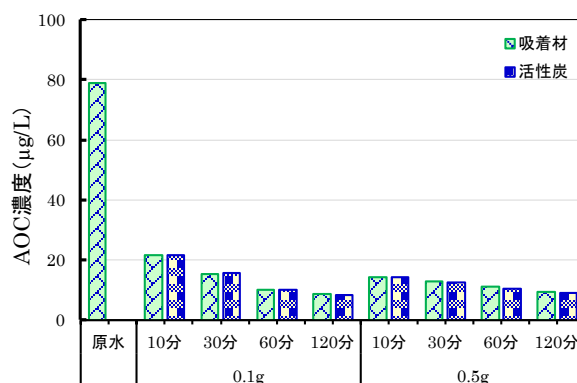


図-2 吸着材等によるAOCの低減効果

2.1.2 ニトロソアミン類の実態調査

1) 調査目的および方法

N-ニトロソアミン類は消毒副生成物として、その1部は発がん性が指摘されているが再生水での調査例は少ない。本項では、A下水処理場の活性汚泥二次処理水、生物膜処理水（HRT約80分間）、紫外線消毒水（中圧）、B下水処理場の活性汚泥パイロットプラント二次処理水、オゾン処理水（注入濃度2.5～3mg/L、HRT20分間、気液対向方式）、オゾン処理後の担体処理水（ポリプロピレン製中空円筒担体4×3×5mm/個、担体容量81L、接触時間約2時間）を対象に、塩素処理の有無やオゾン処理後の易分解有機物の低減によるN-ニトロソアミン類の定量評価を行った。塩素処理条件は塩素添加濃度を2、10mgCl/L、接触時間を20分間とした。評価対象としたN-ニトロソアミン類は、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）、N-ニトロソメチルエチルアミン（NMEA）、N-ニトロソジエチルアミン（NDEA）、N-ニトロソジ-n-プロピルアミン（NDPA）、

N-ニトロソピロリジン (NPYR)、N-ニトロソモルホリン (NMOR)、N-ニトロソピペリジン (NPIP)、N-ニトロソジ-N-ブチルアミン (NDBA) の8物質とした。

測定法は上水試験方法⁵⁾を基としたが、Yoon ら⁶⁾、中田ら⁷⁾測定法を参照にしてN-ニトロソアミン類の抽出量の増加を目的に固相抽出溶媒をメタノールからジクロロメタンに変更した。測定法の概略は以下のとおりである。試料 300mL を GF/B ろ紙によりろ過を行い、ろ液に内部標準物質メタノール混合溶液を添加した。固相カートリッジ利用し加圧型固相抽出装置により固相抽出を行い、ジクロロメタン溶出液を窒素気流下で乾固直前まで濃縮し、メタノール、ミリ Q 水溶液 (2:8) 1mL で定容した後、LC/MS/MS による定性・定量を行った。

2) 調査結果

各種下水試料に対する塩素処理の有無やオゾン処理後の易分解有機物の低減による N-ニトロソアミン類の定量評価について図-3、4 に示す。A、B 下水処理場の二次処理水では塩素処理の有無に関わらず N-ニトロソアミン類の顕著な生成は認められなかった。しかし、オゾン処理水に関しては N-ニトロソアミン類の生成があり、その後の塩素処理の有無に関わらず生成濃度は高い状況にあったが、オゾン処理後において易分解有機物を後段の担体処理で分解することで、N-ニトロソアミン類の生成濃度は低下した。各種下水試料およびオゾン処理によって顕著な生成が認められた物質は NPYR であり、N-ニトロソアミン類の8物質の全生成量に対して約 70～80%を占めていた。

その他の生成物質として発がん性が懸念⁸⁾されている NDMA や NMOR について改めて整理した結果を図-4 に示す。本調査での NDMA の生成濃度は約 33～170ng/L でありオゾン処理後や、紫外線消毒後水、B 下水処理場の二次処理水に塩素添加濃度を 10mgCl/L とした条件にて生成濃度が高まった。NMOR では、A 下水処理場の試料にてやや生成濃度が高く 40～80ng/L であったが、B 下水処理場のオゾン、塩素処理による生成濃度の大幅な上昇傾向は見られなかった。

米国環境保護庁では生涯発がんリスクを 10^{-5} に相当する水道水中の NDMA 濃度として 7ng/L を示している⁹⁾。また、WHO の飲料水水質ガイドライン値¹⁰⁾や厚生労働省の水道水質基準の要検討項目の目標値¹¹⁾として 100ng/L が定められている。本調査では、オゾン処理により水道水質基準の要検討項目の目標値を上回る生成濃度が認められたため、NDMA の低減化策の考慮が必要である。

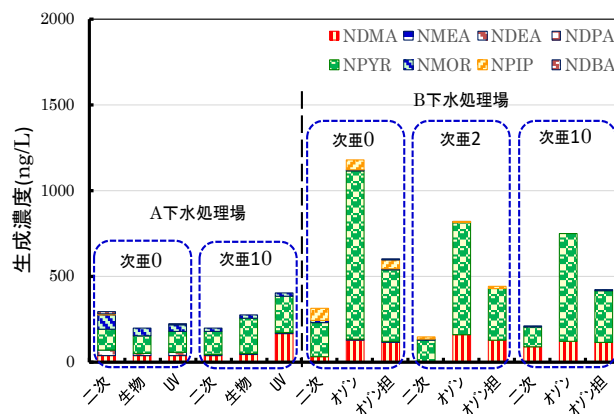


図-3 各種試料のニトロソアミン類の生成濃度

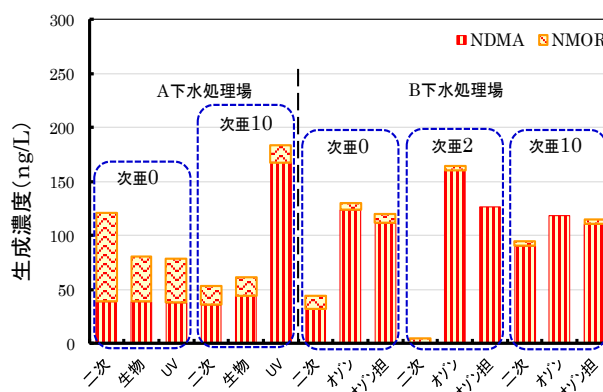


図-4 NDMAとNMORの生成濃度

3. まとめ

本研究は、再生処理水質が消毒剤消費や消毒効果に及ぼす影響を評価し、消毒剤の消費要因および消毒副生成物を制御することで、維持管理費の低減と、再生水の安全性の確保の両立を図り、再生水利用の促進に資することを目的とする。30年度は、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける消毒副生成物として N-ニトロソアミン類や AOC を対象とした実態調査を行った。以下に得られた結果を示す。

- 1) 二次処理水の AOC は約 60～70μg/L で推移、生物膜処理やオゾン+担体処理により約 20%の低減効果があるものの、UV、オゾン処理を経ても濃度の違いは見られなかった。
- 2) MBR 法の処理水の AOC は 20μg/L 程度と評価対象試料中、最も低濃度であった。
- 3) 吸着材等を利用した低減手法により、AOC を概ね 10μg/L 以下とすることができた。
- 4) 二次処理水では塩素処理の有無に関わらず N-ニトロソアミン類の顕著な生成は認められなかった。
- 5) オゾン処理水に関しては N-ニトロソアミン類の生成があり、その後の塩素処理の有無に関わらず生成濃度は高い状況にあり、低減化策の考慮が必要である。

6) オゾン処理後において易分解有機物を後段の担体処理で分解することで、N-ニトロソアミン類の生成濃度は低下した。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした A 下水処理場、B 下水処理場の下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- 1) (公社) 日本下水道協会、日本の下水道、平成 24 年度下水道白書。
- 2) 下水処理水の再利用水質基準等 マニュアル、国土交通省都市・地域整備局下水道部、国土交通省国土技術政策総合研究所、平成 17 年 4 月。
- 3) (公社) 日本下水道協会、下水試験方法 (下巻)、387-389。
- 4) Dirk van der Kooij (1992), Assimilable Organic Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth, JOURNAL of AWWA pp.57-65.
- 5) 日本水道協会上水試験方法 (2011 年版) IV.有機物編、212-214。

6) Suchul Yoon, Norihide Nakada, Hiroaki Tanaka (2012) A new method for quantifying N-nitrosamines in wastewater samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, Talanta 97, 256-261.

7) 中田典秀、板井周平、楊永奎、鈴木裕識、田中修平 (2016) 工業用化学物質の酸化処理過程における副生成物生成能試験法の提案、土木学会論文集 G (環境)、72 (7) III_95-III_116。

8) IARC: Some N-Nitroso Compounds IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 17.Lyon France : International Agency for Research on Cancer.365,1978.

9) US EPA: N-Nitrosodimethylamine (CASRN 62-75-9) Integrated Risk Information system(IRIS),1993.

10) WHO: Concise International Chemical Assessment Document, 38, World Health Organization, Geneva, N-Nitrosodimethylamine, 2002.

11) 厚生労働省健康局水道課 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>.

資源回収型下水処理技術に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 30～平 33

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、桜井健介

【要旨】実下水を対象に、ラボスケールの連続式実験装置を用いて、高速活性汚泥法の水温（15 および 20℃）・送風倍率（1 および 5 倍）を変化させて、COD 除去量への影響を調査した。また、回分式試験により、初沈汚泥投入後の経過日数と COD 除去量の関係を調査した。高速活性汚泥法の運転について、水温及び送風量の COD 除去への影響に関する知見が得られた。高効率なリン回収方法の検討として、実下水に対して、最初沈殿池、部分循環式嫌気性ろ床装置、さらに後段に嫌気 HRT 2.3h、好気 HRT 3.7h の仕上げ嫌気好気処理装置を適用した結果、溶解性有機物、溶解性リンの安定した除去を達成し、流入下水あたりの余剰汚泥の発生量は、0.0214kg-DS/m³、余剰汚泥の乾燥物、焼成物中のリン含有率はそれぞれ、3.61%、17.69%であった。

キーワード：高速活性汚泥法、有機物回収、嫌気性ろ床、生物学的リン除去

1. はじめに

下水道は我が国の年間消費電力量の約 0.7%を占める大口需要家である。下水道施設での電力使用量のうち、水処理工程での使用が約 5 割を占めており、平成 17 年以降、水処理に係る電力使用量原単位は若干悪化している¹⁾。一方で下水道事業は、人口減少による使用料収入減少など経営管理への影響が懸念されており²⁾、水処理工程の省エネルギー化による下水道事業の維持管理コスト削減が期待されている。

また、下水道事業は、地方自治体の事業のなかで、温室効果ガスの排出量の大きな事業であり、省エネルギー化によって下水道事業に伴う温室効果ガスの排出量を抑制することは、地域の実質的な排出抑制に寄与することができる³⁾。

本研究は、下水中に多く含まれるが十分に回収されていない有機物やリン等の資源に着目し、資源回収可能、かつ、省エネルギーの水処理プロセスの開発を目的とした。

2. 高速活性汚泥法による有機物回収の基礎的調査

水中に含まれるエネルギーを高効率で回収する方法として、高速活性汚泥（High-rate activated sludge）法が注目されている⁴⁾。高速活性汚泥法は、高い有機物負荷、HRT30 分未満、SRT1 日未満で運転される活性汚泥法の一つであり、従来の活性汚泥法の前段に使われることが多い。SRT を短くすることで、細菌が主体の汚泥となり、水処理工程で除去された有機物の多くが、二酸化炭素へ変換されず汚泥として回収される。しかしながら、国内の下水処理場において導入実績は無く、導入可能性

は不明である。また、水温低下における有機物回収量への影響は不明である。常温および低水温における導入可能性の検討のため、ラボスケールの実験装置を用いて、実下水を連続的に処理し、有機物回収に関する基礎的な調査を行った。本調査は、最終的に有機物回収量の向上を目指すものであるが、基礎段階として、まず有機物の除去量を調査した。また、有機物回収効率の安定および向上に資するため、生物凝集の指標の一つとして、曝気汚泥の細胞外高分子物質（EPS）に着目し、有機物除去量との関係を調査した。さらに、汚泥滞留日数がやや長い時の、有機物除去量への変化を把握するため、回分式試験を行った。

2.1 方法

2.1.1 連続式試験の装置諸元および方法

連続式試験装置は、曝気槽と沈殿槽で構成した（図 1）。曝気槽の諸元は、容量 5L、水理学的滞留時間 30 分とした。沈殿槽は、容量 12L、水面積負荷 5.7 m³/(m²・d)とした。汚泥返送比は、100%とし、SRT が約 0.4 日になるように汚泥を引き抜いた。本装置は建屋内に 2 系列（RUN-A、B）設置し、並行して、水面積負荷が同じ沈殿槽のみの系列（RUN-C）を設けた。運転期間を 2 期に分け、RUN-A、B は、表 1 のとおり、送風倍率および水温を変化させて運転した。RUN-A の 1 期は、以下、「RUN-A1」の様に表記した。実下水処理場の沈砂池末端から流入下水をポンプで実験系列（RUN-A、B、C）に連続的に送水した。試験は、気温・水温が比較的低い 2 月中旬から 1 期につき 2 週間運転し、採水および水質測定を行った。

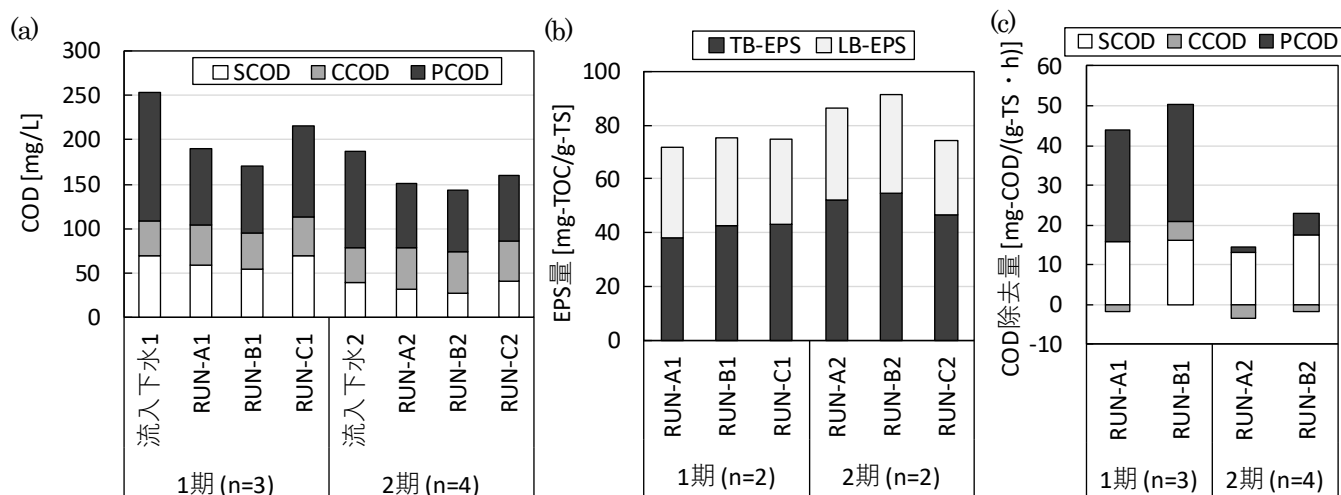


図4 各試料の(a)各態 COD、(b)EPS 量、(c)TS・時間当たりの COD 除去量

ここで、 $COD_{RUN-A,B}$: RUN-A または B 処理水の $COD[mg/L]$ 、 COD_{RUN-C} : RUN-C は処理水の $COD[mg/L]$ 、である。沈殿槽のみの処理と比べた際の、向上した処理能力が重要であるため、式のとおり、それらの差を評価した。1 期、2 期共に RUN-B の方が、RUN-A よりも COD 除去量が多く、水温が高いほうが、COD 除去量が多かった。また、RUN-A、B 共に 2 期の方が 1 期よりも COD 除去量が少なく、送風倍率が高いほうが、COD 除去量は少なかった。EPS 量と COD 除去量について、相関は見られなかった。各態 COD の除去量に着目すると、SCOD 除去量は、いずれの条件も約 $15 mg/(g \cdot h)$ であり、条件により変化が少なく、CCOD 除去量は、いずれの条件も $5 mg/(g \cdot h)$ 以下であった。PCOD 除去量は、1 から $29 mg/(g \cdot h)$ までで、差が大きく、特に送風倍率が高い時に低かった。これらの結果から、COD 除去量の最大化には、CCOD および PCOD 除去量を大きくすることが重要であると考えられた。EPS 量とその目安となることを期待したが、EPS 量と CCOD および PCOD 除去量に相関は見られなかった。

2.2.2 回分式試験

表 2 に、回分式試験における経過日数別の COD 除去量を示した。1 日経過時点で、PCOD や SCOD 除去量には劣るが、CCOD 除去が生じていた。連続式の場合でも、汚泥中の有機物の酸化による回収量減を考慮しながら、SRT を少し長くすることで CCOD 除去量が向上する可能性が考えられた。

表 2 回分式試験における経過日数別の各態 COD 除去量 $[mg/(g \cdot h)]$

	経過日数		
	1日	2日	3日
PCOD	8.3	9.7	10.0
CCOD	4.7	6.4	6.5
SCOD	7.0	8.0	7.1

2.3 まとめ

実下水を対象に、ラボスケールの連続式実験装置を用いて、高速活性汚泥法の水温 (15 および $20^{\circ}C$) ・送風倍率 (1 および 5 倍) を変化させて、COD 除去量への影響を調査した。また、回分式試験により、初沈汚泥投入後の経過日数と COD 除去量の関係を調査した。これらから、以下の結果を得た。

- 1) 高速活性汚泥法処理水は、沈殿槽処理水よりも COD が低く、高速活性汚泥を採用したことによる、処理能力の向上が確認された。
- 2) 高速活性汚泥法の曝気汚泥は、水温および送風倍率が高い方が、EPS 量が多かった。
- 3) 高速活性汚泥法の TS・時間当たりの COD 除去量は、水温が高い方が、多かった。また、送風倍率が高い方が、それは少なかった。EPS 量と COD 除去量について、相関は見られなかった。
- 4) 高速活性汚泥法の TS・時間当たりの COD 除去量は、各態に着目すると、SCOD 除去量は、いずれ

の条件も約 $15 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ であり、条件により変化が少なく、CCOD 除去量は、いずれの条件も $5 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 以下であった。PCOD 除去量は、1 から $29 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ までで、差が大きく、特に送風倍率が高い時に低かった。

- 5) 回分式試験において、初沈汚泥投入後、1 日経過時点で、CCOD 除去が生じていた。

3. 部分循環式嫌気性ろ床・嫌気好気活性汚泥法によるリン回収の検討

3.1 研究内容

流入下水中に含まれる溶解性有機物は、曝気槽にて酸化されて二酸化炭素として大気中に放出されるのが一般的である。下水処理場での電力消費の約 50%は水処理が占めており⁸⁾、曝気のために必要な電気エネルギーは無視できない。曝気槽への負荷削減手法として、最初沈殿池で凝集剤を添加し、溶解性有機物の一部を最初沈殿池汚泥として回収する前凝集処理⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾や、浮上担体を用いて、最初沈殿池での浮遊性物質回収効率を向上させる手法¹²⁾が実証されているものの、最初沈殿池で分離できない溶解性易分解性有機物の処理は必要である。こうした溶解性有機物の除去手法として、本研究では附着性嫌気性細菌による処理に注目した。最初沈殿池流出水を、附着性嫌気性細菌を保持する担体を充填した嫌気性ろ床にて処理し、さらに、後段で仕上げ嫌気好気処理した場合の、負荷削減効果およびリン回収特性について検討した。

3.2 実験方法

連続実験は、一部合流式を含む分流式の下水処理場へ流入した下水を、下水処理場内の屋内に設置した最初沈殿池実験装置、部分循環式嫌気性ろ床実験装置および嫌気好気活性汚泥処理実験装置に適用して行った。

最初沈殿池実験装置は、図 5 に示すような、内径 400mm の塩ビ製円筒状で、底部から水面までの高さは 700mm である。底部から 500mm までの部分はコーン状とし、低速で常時回転するピケットフェンスと沈殿物の排出口を装着し、流入下水は中心下部より下方向へ流入する構造とした。この最初沈殿池実験装置に、流入下水を 480L/d の流量で、常時流入させ、沈殿処理を行った。本装置における水面積負荷は $0.38 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ 、水理学的滞留時間 (HRT) は 2.25h である。沈殿汚泥の排出は、底部より 1 時間に 1 回の頻度で、1 回あたり 1L 引き抜き実施した。また、本実験装置を 2 式並行して運転し、1 日あたり合計 960L の流入下水を処理した。

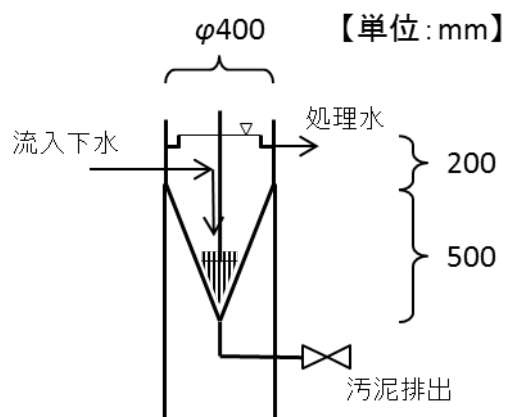


図 5 最初沈殿池実験装置の概略図

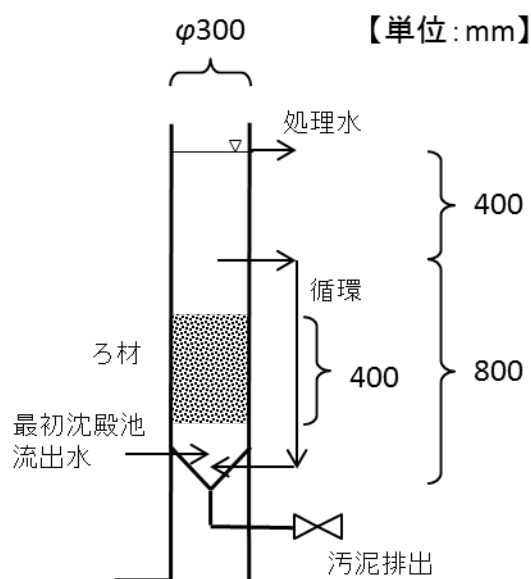


図 6 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の概略図

部分循環式嫌気性ろ床実験装置は、図 6 に示すような、内径 300mm の塩ビ製の円筒状で、底部から水面までの高さは 1200mm である。底部から 200mm～600mm の間（図の網掛け部分）にプラスチック担体（BIO-15、ゼビオプラスト社、寸法(mm)15φ×12L、比表面積 $450 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ）を充填し、ろ層厚を 400mm とした。ろ材の上端部分には直径 5mm の穴を 20mm 間隔に空けた塩ビ板を固定し、ろ材の流出を防止した。この部分循環式嫌気性ろ床実験装置に、最初沈殿池実験装置流出水を 510L/d の流量で流入させ、線速度が 5mm/min.となるように設定した。また、ろ材を通過した液を、底部から 800mm 地点から底部付近へ、流入水の流量に対して 2 倍の流量で液を循環した。ろ材部分における通過速度は 15mm/min.、底部から 800mm～1200mm 部分での通過速度は 5mm/min.、装置全体の水理学的滞留時間

(HRT)は 4h である。余剰汚泥の排出は、底部より 1 週間に 1 回、1L 引き抜くことで行った。

次に、嫌気性ろ床実験装置の後段の仕上げ嫌気好気活性汚泥処理実験装置の概要を述べる。反応槽は、攪拌機を付属した内径 370mm、有効水深 372mm、有効容量 40L の円筒状で、底面上に設置したエアストーンを通じて、大気を水中へ送り込み、曝気した。この実験装置を 6 時間サイクルで回分式運転を行った。嫌気性ろ床実験装置の処理水を、6 時間に 1 回、30L/h の流量で 1 時間ポンプで注入した。嫌気性ろ床実験装置の処理水の流入時およびそれに引き続く 45 分間、連続的に攪拌機を稼働し、嫌気工程とした。1 時間 45 分後～4 時間 30 分後までの 2 時間 45 分間は、攪拌および曝気を行い、好気工程とした。4 時間 30 分後以降は攪拌、曝気ともに停止し、活性汚泥混合液を静置し固液分離を行った。5 時間 15 分後から 5 時間 58 分後までの間、容量 10L の水位に設置した取水口から上澄水を排出し、嫌気好気処理実験装置の処理水を採取した。本実験装置における嫌気工程、好気工程、の HRT はそれぞれ、2.33h、3.67h となる。また、沈殿工程における水面積負荷、HRT はそれぞれ $8.93\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{日}$ 、1h となる。余剰汚泥の排出は、好気工程の終了直前に混合液を 1 日あたり 1.4L 採取することで行った。嫌気好気処理実験装置の反応槽における固形物滞留時間 (SRT) は約 29 日となる。なお、実験に先立ち、種汚泥として、標準活性汚泥法の下処理場の反応槽より採取した混合液を投入し、馴致期間として約 3 か月設定し、実験は 4 月～翌年の 1 月の期間で行った。

3.3 実験結果

流入下水、最初沈殿池流出水、部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流出水、仕上げ嫌気好気処理実験装置の流出水中の全化学的酸素要求量 (T-COD_{Cr})、溶解性化学的酸素要求量 (S-COD_{Cr})、溶解性リン濃度の平均値と、流入下水から各工程の流出水の間の除去率を表 3～表 5 に示した。なお、試料は 1 週間に 1 回程度の頻度でグラブサンプルを採取した。T-COD_{Cr} の流入下水からの除去率は、最初沈殿池流出水、嫌気性ろ床流出水、嫌気好気処理流出水で、それぞれ 27%、51%、90%であった。一方、S-COD_{Cr} の除去率は、T-COD_{Cr} の除去率に比べて低く、それぞれ 18%、42%、85%であった。仮に COD_{Cr} と BOD の関係式 ($\text{COD}_{\text{Cr}} = 1.34 \times \text{BOD} + 48.4$)¹³⁾を用いた場合、わが国の下水処理場放流水に求められる BOD の基準 15mg/L は、COD_{Cr} 68.5mg/L に換算されるが、本研究で得られた嫌気好気処理流出水では、この数字を下回っていた。また、嫌気好気処理水中の溶解性リン濃

度は、流入下水に比べて 77%程度低減されていた。嫌気工程終了時の嫌気好気処理槽混合液中では、高濃度の溶解性リン濃度が検出されており、生物学的リン除去が達成されていたと考えられる。なお、好気工程における混合液中の亜硝酸性窒素、硝酸性窒素濃度は低く、硝化抑制型の処理となっていた。嫌気好気処理槽混合液の MLSS/MLVSS の平均値は 1834/1465mg/L であった。流入水量あたりの嫌気好気処理実験装置から排出された汚泥の固形物量は、0.0214kg-DS/m³であった。

嫌気好気処理実験装置の好気工程の終了直前に採取した混合液のうち、分析用に分取した後の残りについて、定性ろ紙を用いて固液分離し、ろ紙上に残った固形物を採取し、冷蔵貯蔵した試料の乾燥物および焼成物 (850℃、90 分間) について、主要な元素の組成分析を行った結果を表 6～7 に示す。乾燥物のリン含有率は 3.61% (P₂O₅ 換算で 8.27%)、焼成物のリン含有率は 17.69% (P₂O₅

表 3 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 T-COD_{Cr} 濃度とその除去率

	T-COD _{Cr} (mg/L)	除去率 (%)
流入下水	282.1	—
最初沈殿池流出水	205.7	27.1
嫌気性ろ床流出水	137.8	51.1
嫌気好気処理流出水	28.6	89.8

表 4 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 S-COD_{Cr} 濃度とその除去率

	S-COD _{Cr} (mg/L)	除去率 (%)
流入下水	134.1	—
最初沈殿池流出水	109.5	18.3
嫌気性ろ床流出水	78.2	41.6
嫌気好気処理流出水	19.5	85.3

表 5 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均溶解性リン濃度とその除去率

	溶解性リン (mgP/L)	除去率 (%)
流入下水	2.24	—
最初沈殿池流出水	2.18	2.5
嫌気性ろ床流出水	2.17	2.8
嫌気好気処理流出水	0.50	77.3

表 6 嫌気好気処理実験装置から得られた余剰汚泥の乾燥物および焼成物の元素組成分析結果(その 1)

(単位：%)

汚泥種類 元素名	乾燥物	焼成物
炭素	38.57	0.08
水素	6.65	0.08
窒素	8.30	N.D.
ナトリウム	0.21	0.90
マグネシウム	0.93	4.78
アルミニウム	0.15	1.09
ケイ素	<1	<1
リン	3.61	17.69
硫黄	N.D.	N.D.
カリウム	1.36	5.80
カルシウム	1.03	6.39

表 7 嫌気好気処理実験装置から得られた余剰汚泥の乾燥物および焼成物の元素組成分析結果(その 2)

(単位：mg/kg-DS)

汚泥種類 元素名	乾燥物	焼成物
鉄	1610	5867
亜鉛	300	2200
銅	210	1300
ヒ素	4.7	8.6
カドミウム	0.37	1.3
水銀	0.17	<0.01
ニッケル	12	53
クロム	6.1	38
鉛	6.7	39

換算で 40.54%) であった。焼成物中のリン含有率は、下水汚泥の焼却灰中のリン含有率の全国平均値¹⁴⁾ (P₂O₅ 換算で 18.9%)¹⁴⁾ に比べて大きかった。

3.4 まとめ

本研究で得られた結果を以下にまとめる。

1. 下水処理の最初沈殿池で分離回収できない溶解性易分解性有機物の低減を目的として、実下水に対して、最初沈殿池実験装置および部分循環式嫌気性ろ床実験装置を連続的に適用した結果、嫌気性ろ床流出水の T-COD_{Cr} 濃度は、流入下水に対して 51% 減少した。

2. さらに後段に設置した嫌気 HRT 2.33hr、好気 HRT 3.67h の仕上げ嫌気好気活性汚泥処理実験装置においては、溶解性有機物、溶解性リンの安定した除去を達成し、流入下水量あたりの余剰汚泥の発生量は、0.0214kg-DS/m³、余剰汚泥の乾燥物、焼成物中のリン含有率はそれぞれ 3.61%、17.69% であった。

謝辞

下水試料採取などでお世話になりました下水処理場関係各位に謝意を表します。

参考文献

- 1) 下水道における資源・エネルギー施策の現状分析、第 3 回下水道政策研究会委員会議資料、平成 26 年 1 月 16 日、2014.
- 2) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道長期ビジョン実現に向けた中期計画、新下水道ビジョン、p.4.2、平成 26 年 7 月、2014.
- 3) 下水道における地球温暖化防止対策検討委員会：下水道における地球温暖化防止推進計画策定の手引き、平成 21 年 3 月、pp.4-5、2009.
- 4) Rahman A., et al. (2016) Water Research, 104, 485-496.
- 5) Mamaïs D., et al. (1993) Water Research, 27(1) 195-197.
- 6) Li H., et al. (2012) Bioresource Technology, 114, 188-194.
- 7) Niu, M., et al. (2013) Bioresource Technology, 144, 337-343.
- 8) 日本下水道協会：下水道統計 (平成 23 年度版) (第 68 号)、2013.
- 9) 高岡昌輝、廣田淳一、武田信生、藤原健史：前凝集沈殿汚泥の嫌気性消化特性、土木学会論文集、No.685/VII-20、pp.17-26、2001.
- 10) 宗宮 功、津野 洋、貫上 佳則、長谷川 明巧、木下 巖、日高 平：前凝集沈殿・浮遊微生物処理法による都市下水の高度処理に関する研究、下水道協会誌論文集、Vol.36、No.436、pp.87-97、1999.
- 11) 日高 平、津野 洋、鄭 晋宇、岸本 直之、織田 稔幸：生物膜ろ過反応器での前凝集汚泥活用に関する研究、下水道協会誌論文集、Vol.40、No.487、pp.103-116、2003.
- 12) 国土交通省 国土技術政策総合研究所：B-DASH プロジェクト No.1 超高効率固液分離技術を用いたエネルギーマネジメントシステム導入ガイドライン (案)、国土技術政策総合研究所資料 No.736、2013.
- 13) 後藤雅子、甘長准：下水処理における窒素除去と放流先の窒素挙動を加味した温室効果ガス排出量の一考察、第 50 回

下水道研究発表会講演集、pp.565-567、2013.

14) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：下水道におけるリン資源化の手引き、p.21、2010.3.

15) 岡安祐司、繁村浩之：部分循環式嫌気性ろ床・嫌気好気活

性汚泥処理による下水中のリン除去特性、第21回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp.163-164、2018.

遺伝子情報を活用した病原微生物の早期検出に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 30～令 3

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

本研究では、次世代シーケンス (Next-Generation Sequencing, NGS) を用いて下水処理場における病原ウイルスを網羅的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症を網羅的にモニタリングできるかを評価した。その結果、ノロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、パレコウイルス、アイチウイルス (以上、感染性胃腸炎原因ウイルス)、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス (以上、ヘルパンギーナ、手足口病原因ウイルス) が流入下水試料で検出された。対象地域の感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病患者報告数の推移と下水流入水中の病原ウイルスの網羅的検出結果を比較したところ、同様な傾向を示した。このことから、NGS により網羅的に検出された下水中に存在する感染症原因ウイルスの存在割合は、地域で流行している感染症の消長を反映していることが確認された。さらに、検出されたノロウイルス GII の遺伝子型まで解析した結果、日本全国の月別の感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス GII 遺伝子型検出報告状況と類似していた。このことから、NGS により下水中で検出した病原ウイルスの遺伝子型まで解析することで、流行している感染症の原因ウイルス遺伝子型まで把握できる可能性が示された。

キーワード：抗生物質耐性大腸菌、紫外線消毒、ノロウイルス、F 特異 RNA フェージ

1. はじめに

下水処理場の流入水には、その地域の人々が流した様々な情報が含まれており、特に感染者から排出される病原微生物の情報はその地域の感染症の流行状況を反映していると考えられる。実際に日本国内における感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルスの下水処理場の流入水中濃度と、その地域の感染性胃腸炎の患者数と相関があることが報告されている¹⁾²⁾。ノロウイルスを含む多くのヒト病原ウイルスは培養法が確立されていないため PCR 法により検出されるが、この手法は同定したいウイルスを選定して個別に検出しなければならないため、新たな感染症やグローバル化にともなう輸入感染症などの想定外の複数ウイルスの同時検出には適していない。しかし、近年、次世代シーケンス (Next-Generation Sequencing, NGS) により試料中に含まれる遺伝子配列を網羅的に解読することが可能となり、下水中に存在するウイルスの同時検出および同定が可能となった³⁾⁴⁾。このことから、NGS により下水中のヒト病原ウイルスを網羅的にモニタリングすることで、地域の様々な感染症の流行状況を同時に把握することが可能であると考えられる。本研究では、NGS を用いて下水処理場にお

ける病原ウイルスを網羅的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症を網羅的にモニタリングできるかを評価した。

2. 研究方法

2. 1 試料の採取と前処理

A 下水処理場の流入水を 2018 年 7 月から 2019 年 1 月の間に月 1 回採取した。次世代シーケンスによるメタゲノム解析の前処理として、ウイルスより大きな生物 (細菌、藻類等) を取り除くため、採取した流入水を 0.45 μ m のメンブレンフィルターによりろ過し、ポリエチレングリコール (PEG) 濃縮法⁵⁾により濃縮を行った。この前処理 (ろ過+PEG 濃縮) における回収率を検討するため、前処理前後でのノロウイルス (GII) の濃度を PCR 法⁵⁾により定量し、回収率を算出した (n=3)。

2. 2 病原ウイルスのメタゲノム解析

2.1 で濃縮した試料中の浮遊 RNA を RNase ONE (Promega) を用いて分解した後、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (Qiagen) および QIAcube (Qiagen) にて RNA を抽出した。抽出した RNA 液中の残存 DNA

表-1 前処理のろ過とPEG濃縮過程におけるノロウイルスGIIの回収率検討結果 (n=3)

ろ過	PEG濃縮	ろ過+PEG濃縮	既往研究 ⁴⁾ (PEG濃縮)
44%	7%	3%	9%
35%	15%	5%	5%
11%	5%	1%	12%

表-2 各月の流入水中のメタゲノム解析結果

	調査期間(2018年-2019年)						
	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月
総リード数	1,291,975	1,275,625	983,620	1,403,449	435,987	757,364	613,773
Contig数	33,779	7,053	5,911	7,119	3,541	2,945	2,068

を Baseline-Zero DNase (Arbrow) により分解した後、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) を使用してライブラリ調製を行った。このライブラリを3%アガロースゲル電気泳動に供して、300-650 bp のバンドを切り出し、MonoFas DNA Purification Kit (GL Sciences) を使用して切り出し産物の精製を行った後、次世代シーケンサーの Miseq (Illumina) に供した。

得られたシーケンスデータは、Trimmomatic によるトリミングと FastQC によるクオリティチェックを行い、Trinity による *de novo assembly* を行って contig (得られたシーケンスの断片配列を重ね合わせ連結させた配列) を得た。得た contig は NCBI の塩基配列データベース (nt) を用いた BLASTn 解析 (Ver. 2.7.1+) により相動性が一番高かった種を同定した。また、BLASTn 解析により得た結果を MEGAN (Ver. 6.12.0) により分類した。

3. 研究結果

3.1 前処理 (ろ過+PEG 濃縮) における回収率検討結果

次世代シーケンスの前処理の前 (流入下水) 後 (ろ過+PEG 濃縮後) でのノロウイルス GII の濃度を定量し、回収率を算出した結果を表-1 に示す。その結果、ろ過と PEG 濃縮による回収率は、それぞれ 11%-44% と 5%-15% であり、既往の研究⁴⁾と同程度であった。また、後述するメタゲノム解析結果において、前処理を行った全ての試料で成功的に RNA ウイルスが検出された。このことから、次世代シーケンスを用いたウイルス検出の前処理として、本研究で用いた手法 (ろ過+PEG 濃縮) は有効であったことが示された。

3.2 病原ウイルスのメタゲノム解析結果

各試料のメタゲノム解析の結果、次世代シーケンス

表-3 各月の流入水中に検出された配列の割合

	割合			
	細菌	真核生物	ウイルス	Not hit
7月	22%	8%	3%	67%
8月	6%	16%	4%	74%
9月	6%	13%	5%	76%
10月	7%	18%	4%	71%
11月	8%	19%	5%	68%
12月	11%	14%	6%	69%
1月	13%	17%	7%	63%

表-4 ウイルスに同定された配列の宿主の割合

	ウイルス宿主の割合			
	ヒト	植物	昆虫	その他
7月	13%	34%	6%	47%
8月	18%	22%	14%	46%
9月	13%	15%	19%	52%
10月	22%	19%	7%	53%
11月	20%	32%	5%	43%
12月	23%	29%	3%	45%
1月	45%	19%	2%	34%

により得た配列 (総リード数: 60 万-140 万) に対してトリミングおよびクオリティチェックと *de novo assembly* を実施し、2,068-33,779 の contig を得た (表-2)。各試料から得られた contig に対して BLASTn 解析を行った結果、23%-37% が nt データベース上の配列に同定された (表-3)。同定された配列は、6%-22% が細菌、8%-19% が真核生物であり、ウイルスは 3%-7% であった。ウイルスに同定された配列 (152-994 配列) において、検出されたウイルスの宿主の割合を表-4 に

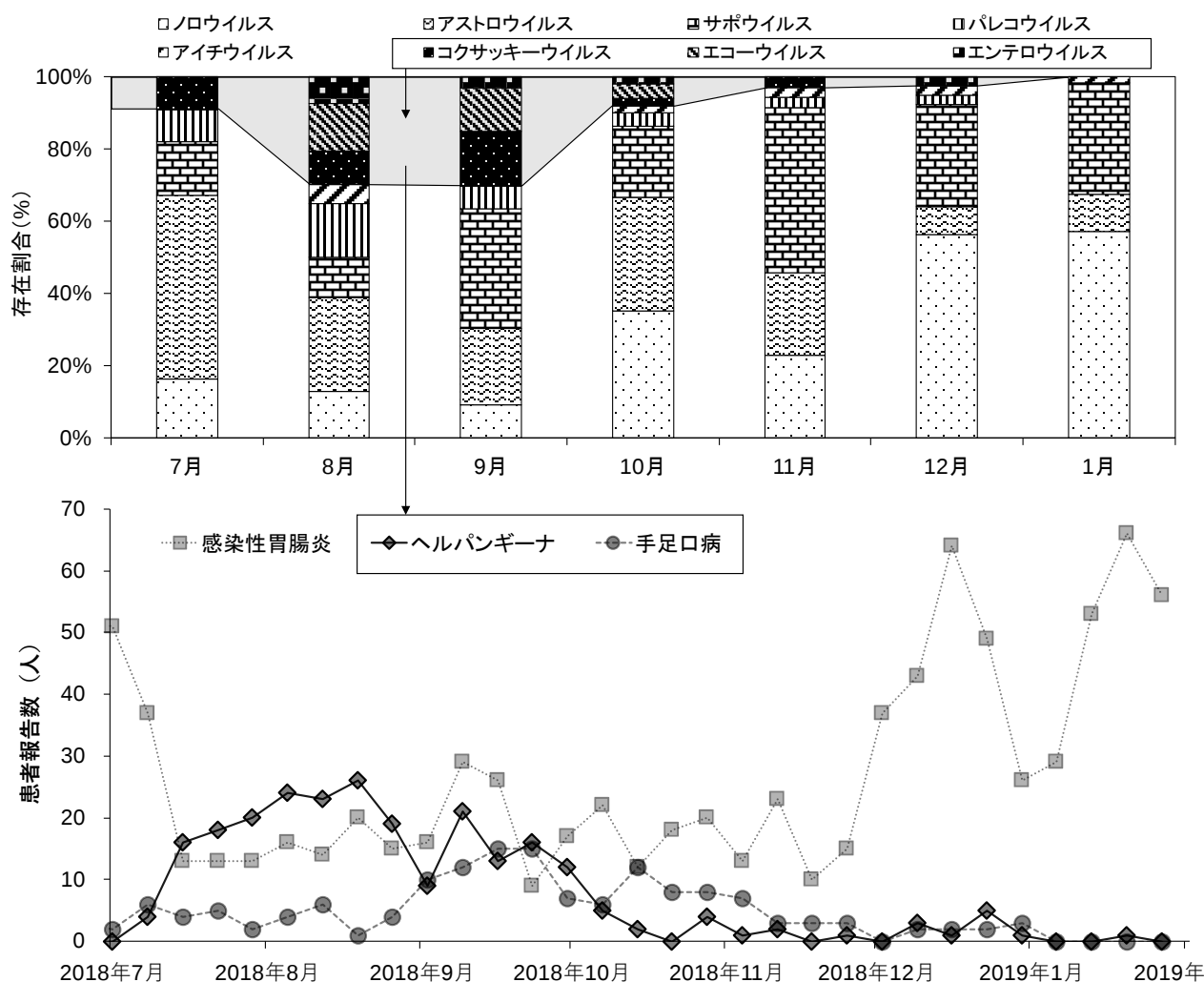


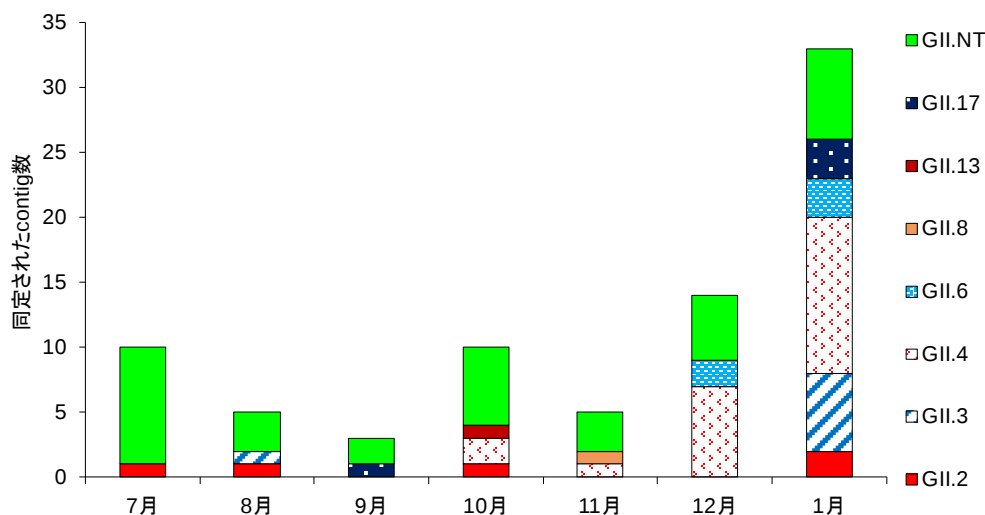
図-1 下水流入水中の病原ウイルスの網羅的検出結果（上）と、対象地域の感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病患者報告数の推移（下）

示す。検出されたウイルスの中でヒトを宿主とするウイルスは13%–45%であり、ウイルス性感染症が流行する冬季（12月、1月：23%、45%）が夏季（7月、8月：13%、18%）と比べて割合が高かった。植物と昆虫を宿主とするウイルスは、それぞれ15%–34%と2%–19%であった。検出されたウイルスの中でその他の割合（34%–53%）が最も多く、その中でも未分類の環境試料由来のウイルス（Laverivirus, Marine RNA virus, Brinovirus, Cilio virus, Husavirus など）が多かった。

ヒトを宿主とするウイルスでは、ノロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、パレコウイルス、アイチウイルス（以上、感染性胃腸炎原因ウイルス）、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス（以上、ヘルパンギーナ、手足口病原因ウイルス）が検出された（図-1上）。

3.3 メタゲノム解析結果と地域の感染症情報との照合

ヒトに感染する病原ウイルスに同定された配列数の月毎の合計に対して、それぞれのウイルスに同定された配列数の割合を図-1（上）に示した。感染性胃腸炎原因ウイルスの中でノロウイルスは流行期となる冬季に割合が一番大きく（12月：56%、1月：57%）、アストロウイルスは7月（39%）と8月（26%）、サポウイルスは9月（33%）と11月（44%）に割合が一番大きかった。ヘルパンギーナ、手足口病原因ウイルス（コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス）は、8月と9月に割合が大きくなったが、10月から減少し、1月には同定されなかった。本研究の調査期間において、採取した下水処理場の処理区域の保健所における感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病の患者報告数



月別ノロウイルスGII遺伝子型検出報告数, 2015/16-2018/19シーズン

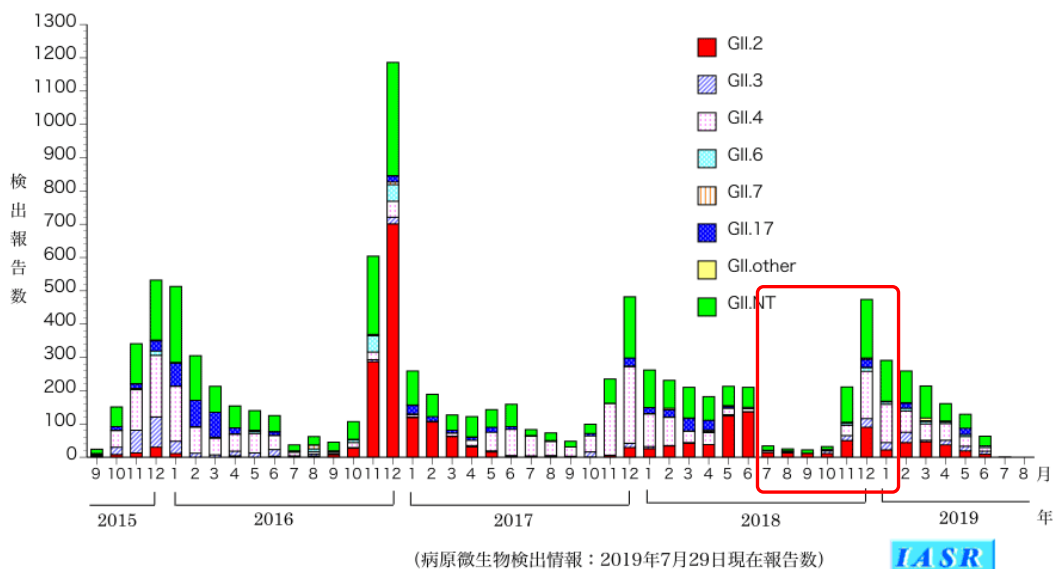


図-2 本研究のメタゲノム解析により検出されたノロウイルスを遺伝子型別に整理した結果（上）と、日本全国の月別の感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルスGII遺伝子型検出報告状況⁹⁾（下）

の推移を図-1（下）に示す。ヘルパンギーナ、手足口病の患者報告数は7月から上昇し始め、8月と9月にピークになり、10月から減少したことから、メタゲノム解析結果と一致していた。また、感染性胃腸炎の推移も感染性胃腸炎原因ウイルスの存在割合と同様な傾向を示した。このことから、NGSにより網羅的に検出された下水中に存在する感染症原因ウイルスの存在割合は、地域で流行している感染症の消長を反映していることが確認された。

本研究のメタゲノム解析により検出されたノロウイルスを遺伝子型別に整理した結果を図-2（上）に、国立感染症研究所の日本全国の月別の感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルスGII遺伝子型検出報

告状況⁹⁾を図-2（下）に示した。本研究で検出されたノロウイルスGII遺伝子型としては、7月–11月までは遺伝子型が不明だったGII.NTの割合が高かったが、冬季（12月、1月）にはGII.4の割合が最も高くなった（図-2、上）。国立感染症研究所の日本全国の月別の感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルスGII遺伝子型検出報告状況⁹⁾（図-2、下）でも、冬季（12月、1月）にはGII.4の割合が最も高くなっている。また、本研究で流入水中に検出されたGII.2、GII.3、GII.6、GII.17も、同様に感染性胃腸炎患者から検出された。これら結果から、NGSにより下水中から検出された感染症原因ウイルスの遺伝子型まで解析することで、地域で流行している感染症の消長

のみならず、流行している感染症の原因ウイルス遺伝子型まで把握できる可能性が示された。今後、継続してデータを蓄積していくことで、日本国内で流行している感染症を網羅的にモニタリングできる、有効な手法となることを期待している。

4. まとめ

本研究では、NGS を用いて下水処理場における病原ウイルスを網羅的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症を網羅的にモニタリングできるかを評価した。以下に得られた結果を示す。

- 1) 次世代シーケンスを用いたウイルス検出の前処理として本研究で用いたろ過+PEG 濃縮の方法は、回収率および病原ウイルスの検出結果から有効であったことが示された。
- 2) 流入下水試料のメタゲノム解析の結果、ヒトを宿主とする、ノロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、パレコウイルス、アイチウイルス（以上、感染性胃腸炎原因ウイルス）、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス（以上、ヘルパンギーナ、手足口病原因ウイルス）が検出された。
- 3) 地域の感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病患者報告数の推移と、下水流入水中の病原ウイルスの網羅的検出結果と比較した結果、同様な傾向を示したことから、NGS により網羅的に検出された下水中に存在する感染症原因ウイルスの存在割合は、地域で流行している感染症の消長を反映していることが確認された。
- 4) 日本全国の月別の感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス GII 遺伝子型検出報告状況と、下水流入水中に検出されたノロウイルス GII 遺伝子型を比較した結果、同じ遺伝子型が検出され、その割合も類似していた。このことから、NGS により下水中から検出された感染症原因ウイルスの遺伝子型まで解析することで、地域で流行している感染症の消長のみならず、流行している感染症の原因ウイルス遺伝子型まで把握できる可能性が示された。

今後、DNA ウィルスも含めたより広い感染症の網羅的モニタリングを可能とする手法の確立を検討して行きたい。

参考文献

- 1) Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases, *Water Res.*, 92, pp. 244–253, 2016
- 2) Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(9), e03406-16, 2017
- 3) Aw, T.G., Howe, A., Rose, J.B.: Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater, *J. Virol. Methods*, 210, pp. 15–21, 2014
- 4) 風間 しのぶ, 真砂 佳史, 沼澤 聡, 大村 達夫: 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウィルスの選択的メタゲノム解析手法の検討, *環境工学研究論文集*, 71(7), pp. III_339-III_349, 2015
- 5) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H.: Occurrence and reduction of F-speci fi c RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, *J. Water Health*, 17(1), pp. 50–62, 2019
- 6) 国立感染症研究所: 月別ノロウイルス GII 遺伝子型検出報告状況, 2015/16-2019/20 シーズン, https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/160920/norogm_191218.gif (2020 年 1 月 21 日閲覧)

貧毛類による下水汚泥の減容化技術の開発

研究予算：運営費交付金、科研費

研究期間：平 29～令 1

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、山崎廉予

1. はじめに

下水処理場における汚泥の発生量削減や有効利用方法の開発は、常に課題とされている。有効利用対策の一つである堆肥化は、有効利用方法の中でも 30%程度の普及にとどまり、必ずしも全国的に進んでいるわけではない(平成 26 年度下水道統計)。

本研究では、下水汚泥の減容化および有効利用の対策として、貧毛類に着目した。下水汚泥を貧毛類の餌として利用することで、汚泥・廃棄物の処理と堆肥化といった資源循環を低エネルギーかつ低コストで行う技術の開発を目指している。

貧毛類を用いた汚泥処理に関する研究は、国内外において数十年前から知見が蓄積されているが¹⁾²⁾、生物の管理の難しさや、生物濃縮の懸念などの問題から、広く普及するには至っていないのが現状である。小動物を用いた廃棄物処理は、循環型社会において必要な技術であり、本研究では、過去の知見をもとに新しい技術を開発するため、下水汚泥を用いた貧毛類の飼育について、改めて基礎的情報の収集を行った。

2. 実験方法

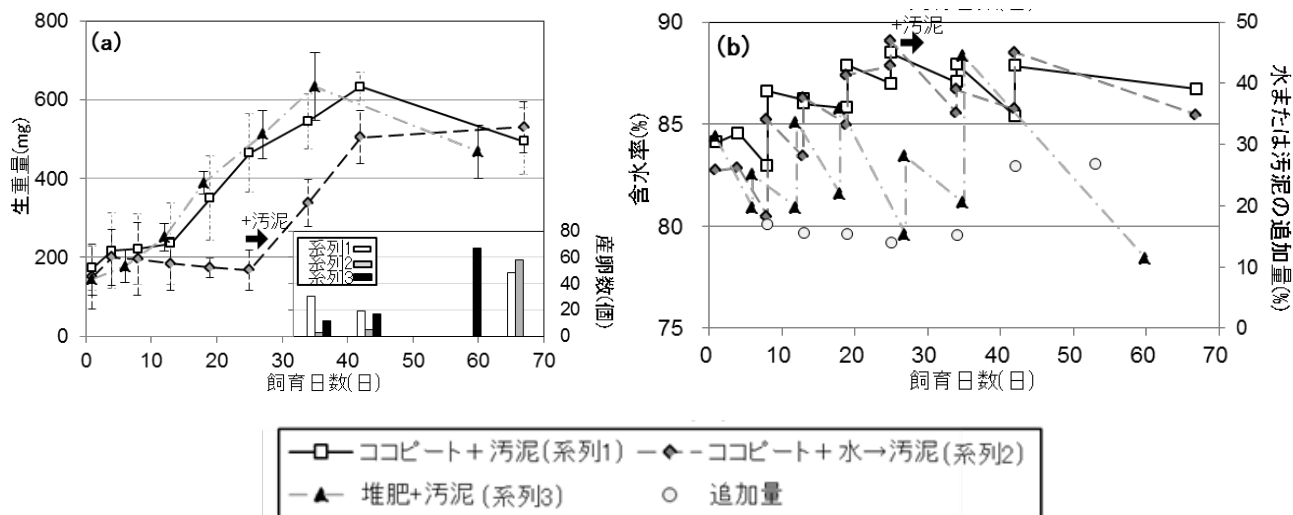
貧毛類は、ツリミミズ科のシマミミズ(*Eisenia foetida*)を用いた。人工気象器内において、25℃、暗所の環境で、1000mL 容の PP 製びんを用いて、約 300g の土中でシマミミズ 5 匹を飼育し、土の性状やシマミミズの成長過程を観察した。飼育の土は、ココピートと本研究室で事前に作製したミミズ堆肥の 2 種類を用意し、ココピートに水または A 下水処理場の最初沈殿池の重力濃縮汚泥(以下、汚泥という)を添加する系(系列 1, 2)、ミミズ堆肥に汚泥を添加する系(系列 3)の 3 系列を用意した。定期的に、水または汚泥の追加を行い、土の含水率の測定を行った。シマミミズは、定期的に取り出し、個々の生重量、産卵数を測定した。

3. 実験結果および考察

図-1 に、3 系列におけるシマミミズの飼育結果を示す。汚泥は脱水せずに添加したため、土の含水率が 80%以上と高いが、系列 1, 3 では、安定した成長がみられた。汚泥の追加量を増やすと、急に成長がみられなくなったため、汚泥の添加量は調整が必要であることが示された。系列 2 では、生重量の増加がみられないため、途中から汚泥に変更し、その後成長がみられたため、初沈汚泥がミミズの餌として有用であることが示された。産卵数についても、系列 1~3 で同程度であった。しかし含水率は、系列 1, 2 で上がる傾向を示したため、含水率の安定には、堆肥を用いる方がよいことが示された。

4. まとめ

初沈濃縮汚泥を餌として、貧毛類の飼育を行った。脱水汚泥でなくても、混合量の調整により飼育が可能であることが示された。飼育の土は、ココピートでも利用可能であるが、ミミズ堆肥を用いた方が、含水率の安定には有用であることが示された。



(a) 生重量と産卵数

(b) 土の含水率と追加量

図-1 シマミミズの飼育結果

本研究は一部日本学術振興会科研費 (18K14550) の助成を受けて実施した。

参考文献

- 1) C.Elvira *et al.*: Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: A pilot-scale study, *Biores. Technol.*, Vol.63, No.3, pp.205-211, 1998
- 2) 森忠洋ら, シマミミズによる汚泥処理の可能性に関する研究(I), *水質汚濁研究*, No.1, Vol.2, pp.127-132, 1978
- 3) 川下好則ら, 一般廃棄物を資源としてミミズに給餌するシステムの開発研究, *環境技術*, Vol.23, No.2, pp.92-94, 1994

Ⅱ. 水質チームによる研究

公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究（影響が懸念される物質のモニタリングと定量的リスク評価手法の構築）

研究予算： 運営交付金
研究期間： 平 28～平 33
担当チーム：水質チーム
研究担当者：小川文章、北村友一、
對馬育夫、鈴木裕識、小森行也

【要旨】

ヒト用医薬品は都市域を負荷源として発生し下水処理場を主要な経由点として都市河川へ排出される微量汚染物質の一つである。都市から下水道、河川までの流域全体における医薬品の効率的な削減対策やリスクの管理を行う上で、河川流下過程における医薬品の消長を的確に把握する必要がある。本年度は、多摩川中流域を対象に、水系暴露解析モデル AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いた 250m メッシュの非定常解析により、流域全体における医薬品の暴露濃度の網羅的予測を試みた。流域への azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 3 種医薬品の排出量として、既存の下水処理場調査実測データと下水処理人口に基づく推定式から多摩川流域内の下水処理場からの放流負荷量を推定してモデル計算に適用した。その結果、3 種医薬品の全てでモデル計算濃度が野外実測濃度と比べ低く算出される傾向があったが、clarithromycin については両者の間に良好な相関関係が示された。また、シミュレーション結果から流域全体の濃度マッピングが達成された。本研究でモデルにより得られた推定値の誤差範囲には留意する必要があるが、水系暴露解析モデルと毒性データを併せて検討することで、流域の生態リスクを包括的に評価できる可能性が示唆された。

キーワード：医薬品、下水道、公共用水域、水系暴露解析モデル、濃度予測、生態リスク

1. はじめに

近年、生活で使用され下水道を通して河川水中に流出する微量化学物質による河川環境への影響が懸念されている。国内河川では、環境リスク初期評価により、一部の化学物質のリスクが示唆されている^{1) 2)}。そのため、河川水環境において微量化学物質の効率的な削減対策やリスクの管理を検討する必要がある。このような背景のもと、本研究課題では、水生生物およびヒト健康への影響が懸念される化学物質のモニタリングと定量的リスク評価手法の構築を目的としている。

過年度では、下水道が水環境への主たる排出源であると考えられている医薬品を対象に、都市河川である多摩川流域において、既往の野外調査結果に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量から、調査区間に流入する負荷量および調査区間の最下流地点での負荷量に対する下水処理場の寄与率を推計し、下流地点の医薬品濃度に対して寄与率の高い下水処理場を把握した。また、河川水中の濃度をより正確に予測することを目指し、水中の濃度変化に影響を及ぼす因

子として底質への収着に着目して野外調査や室内実験を行った結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が河川底質に蓄積されやすいことや、azithromycin と levofloxacin の底質への収着は主に陽イオン交換反応によるものであることを明らかにした³⁾。このように、水環境中での医薬品の存在実態や挙動に関する知見は集積されつつある。一方で、回数が限られた野外水質調査や室内実験による挙動の検証のみでは流域全体の健康・生態リスクを的確・迅速に把握することは困難である。そこで本年度は、水系暴露解析モデルを用いたシミュレーションにより、流域全体における医薬品の暴露濃度の網羅的予測を試みた。

2. 方法

2.1 対象流域（多摩川流域）

多摩川は、山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本川である(延長138km、流域面積：1240km²、流域人口：約380万人（2005年）⁴⁾）。代表的な都市河川であり、高度成長期の急激な流域の都市化の影響を

表-1 AIST-SHANEL Ver. 3.0に内蔵されていたデータおよびそのソース

モデルに既登載の河川流域属性項目	データソース	対象年
標高	国土数値情報 標高・傾斜度3次メッシュデータ	2011
土地利用	国土数値情報 土地利用3次メッシュデータ	2006
人口	平成22年地域メッシュ統計	2010
産業中分類別工業出荷額	平成20年工業統計メッシュデータ	2008
自治体コード	総務省データ	2011
下水処理場	下水道統計(平成23年度版)	2011
気象官署毎の気象データ	気象庁データ	2011

受けて水質が悪化した、下水道整備や河川浄化施設の設置などに伴い改善が進み、近年では中流域(多摩川原橋)の水質は、BOD 2 mg/L程度で推移している。一方で、人口増加および下水道普及率の上昇に伴い、中流域においては河川流量の5割以上を下水処理水が占める。本研究では、①下水処理場を経由して排出される医薬品負荷量が多いと予想され、②シミュレーションの妥当性の検証に適している、と考えられた多摩川流域をモデル計算の対象とし、河川流域を単位メッシュサイズに分割してメッシュ毎の濃度推定を行い、流域全体の生態リスク評価を試みた。

2.2 適用したシミュレーションモデル

日本国内において、環境中化学物質の環境動態予測を試みることができるモデルとして G-CIEMS (Grid-Catchment Integrated Environmental Modeling System) ⁵⁾ などがあり、流域を単位メッシュサイズに分割し水・熱輸送統合解析を実施できるモデルとして WEP(Water and Energy transfer Process)モデル ⁶⁾ などがある。しかしながら、医薬品のような微量化学物質について河川流域全体を単位メッシュサイズに分割してシミュレーションを実施できるモデルは多くみられない。国立研究開発法人産業技術総合研究所(以下、産総研)の産総研-水系暴露解析モデル(AIST-SHANEL (Standardized Hydrology-based Assessment tool for chemical Exposure Load) Ver.3.0 は一定の入力データを準備することで、空間解像度を 250 m、時間解像度を日単位とした非定常解析により流域全体の濃度推定を可能としている ⁷⁾。本研究では、AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いて多摩川流域の 250 m メッシュによる非定常解析を行うこととした。モデルに内蔵されていたデータとその引用元情報を表 1 に示す。データの対象年は 2006 年～2011 年であり、後述のように本研究で検証する野外調査実測データの取得年が 2011 年～2015 年であったが、適用範囲内であると考えそのま

表-2 入力パラメーターの一覧

デフォルトパラメーターを使用した項目	単位
空隙率	-
容積分率-気相	-
容積分率-液相	-
容積分率-固相	-
粗度係数	$m^{-1/3} \cdot s$
懸濁物質SS沈降速度	m/D
限界摩擦速度	m/s
掃流式指数	-
懸濁物質SS巻上げ速度定数	$G/m^2/s$
河川底泥孔隙率	m^3/m^3
有機性炭素含有率	-
土壌気相分解速度	-
月別定常解析の計算日数	day
空間差分間隔	m
時間差分間隔	s
連立常微分方程式の元の数	-
水路液相の容積分率	-
水路液相の相当コンパートメント番号	-
水路底泥の相当コンパートメント番号	-
水路液相の堆積所要日数	day
水路底泥の負荷流出係数	1/m
大気湿性沈着量の投入先(0:土壌_水域:1)	-
大気乾性沈着量の投入先(0:土壌_水域:1)	-

対象化学物質の物性に基づいて設定した項目	単位	
蒸気圧	Pa	
分子量	g/mol	
水溶解度	g/m^3	
有機炭素水分分配係数	m^3/t	
分解速度	土壌A層液相	1/h
	土壌A層固相	1/h
	土壌B層液相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌B層固相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌C層液相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌C層固相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌D層液相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌D層固相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	河川水相	1/h
	河川底泥液相	1/h
河川底泥固相	1/h	

表-3 シミュレーション対象医薬品3種の物性に基いた入力データ

項目	単位	Azithromycin	Clarithromycin	Levofloxacin	情報元
蒸気圧	Pa	3.5E-22	3.1E-23	1.3E-10	EPI Suite version 4.1で計算
分子量	g/mol	749	748	361	ChemSpider
水溶解度	mg/L	514	217	54	PubChem (Sanford-Burnham Center for Chemical Genomics)
有機炭素水分配係数(<i>K_{oc}</i>)	m ³ /t	3,135	149	12	EPI Suite version 4.1で計算(MCI method)
河川水半減期					文献 ⁸⁾ に記載のデータを用いて計算
河川底泥液相半減期					
河川底泥固相半減期	day	0.16	57.8	0.20	河川水と同じと仮定し、文献 ⁸⁾ を採用
土壌A層液相半減期					
土壌A層固相半減期					

まの情報を利用した。次に、AIST-SHANEL Ver.3.0 で求められる入力パラメーターを表2に示す。水理条件、大気降水量など 23 項目についてデフォルトパラメーターを用いた。一方で、蒸気圧、分子量、水溶解度、有機炭素水分配係数分解速度については、シミュレーション対象化学物質の物性に基いて設定した。計算期間は4か月の助走期間を含め、487日間で設定し、2011年1月1日から2011年12月31日までの365日分の各メッシュにおける化学物質濃度を濃度解析することとした。なお、多摩川流域を250mメッシュで分割したところ、合計19,784メッシュであった。

2.3 対象医薬品の選定と関連する入力データ

本研究では、下水処理水中に残存しやすく、また、生態リスクが懸念されている¹⁾、azithromycin、levofloxacin、clarithromycinの3種の医薬品を濃度解析対象とした。これらの物質の物性に基いてあらかじめ準備した入力データを表3に示す。蒸気圧と有機炭素水分配係数(*K_{oc}*)はEPI Suite version.4.で計算した。分子量はChemSpiderで、検索し入力した。水溶解度はPubChemの情報を基に入力した。分解速度に関わる河川水半減期は、azithromycin、clarithromycin、levofloxacinに対し、既往研究からデータを引用して各々0.16 day、57.8 day、0.20 dayと入力し⁸⁾、その他の半減期の項目に対しても河川水と同様と仮定して同値を代入した。

2.4 調査実測データを用いた下水道からの排出量推計

AIST-SHANEL Ver.3.0 では、化学物質の濃度推定シミュレーション対象流域への流入データ元として、「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」に基づく化学物質排出・移動量届出制度(PRTR 制度)により把握が図られている情報を用いている。つまり、PRTR 制度の第一指定化学物質については、排出元である個別事業者の所

在地情報を組み込むことで、対象物質の点源負荷量を与えている、あるいは、流域内の土地利用情報を利用して届出対象条件に満たない事業者からの「裾切り以下の移動・排出量」を面的に与えている。一方で、azithromycin、clarithromycin、levofloxacinのような医薬品はPRTR 第一指定化学物質とは異なり、移動・排出量情報が把握されていないので、二次情報からは流域への流入量データを用意できない。そのため、解析対象とする3種医薬品については水環境への主要な排出源が下水道であること、また、これらの医薬品はほぼ全てヒトに消費されていることを踏まえて、3種医薬品の河川流域への排出源を下水処理場のみと仮定することとした。まず、過年度に実施した下水処理場での調査実測データ(放流負荷量(kg/year)に変換)と下水処理場の処理人口との関係から式(1)を作成した。使用したのは2011年~2015年の間に多摩川流域内の6か所の下水処理場で調査した $n=55$ のデータセットである。放流負荷量の算出には下水道統計から晴天時の日下水量(m³/day、年平均)を引用した。

$$L = aP + b \quad (1)$$

ここで、

- L : 下水処理場からの放流量(kg/year)
- a : 排出係数(kg/人・year)
- P : 流域人口(人)
- b : 排出定数(kg/year)

次に、得られた変数を用いて流域内の13か所の下水処理場に対して処理人口との関係から医薬品放流負荷量を算出し、モデル解析に入力した。

3. 結果と考察

3.1 下水処理場調査実測データと人口情報を用いた下水処理場からの排出係数の算出

3 種医薬品について放流負荷量と処理人口との関係をプロットしたグラフを図-1 に示す。決定係数 R^2 で比較すると azithromycin では 0.757、clarithromycin では 0.697、levofloxacin では 0.591 であり、azithromycin において最も良好な相関関係が得られた。他の 2 種の医薬品の相関係数も概ね良好であり、下水処理人口を用いた放流負荷量の推定が適用できる可能性が示唆された。今回 55 の異なるデータを用いたが、処理場数としては 6 か所と少ないため、より多くの下水処理場のデータを使用して検証することで、広範囲の濃度域にも適した推定式を設定できることが示唆された。

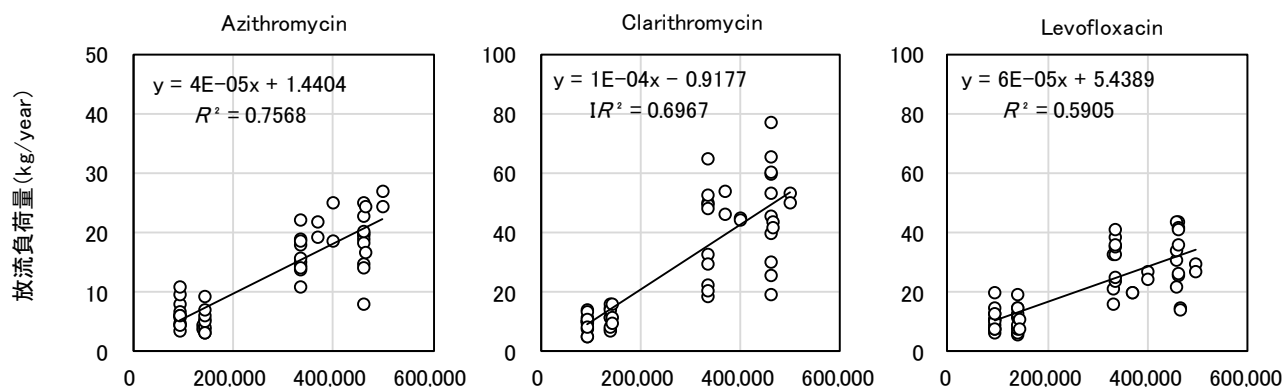


図-1 3種医薬品の放流負荷量と下水処理人口との関係 ($n = 55$)

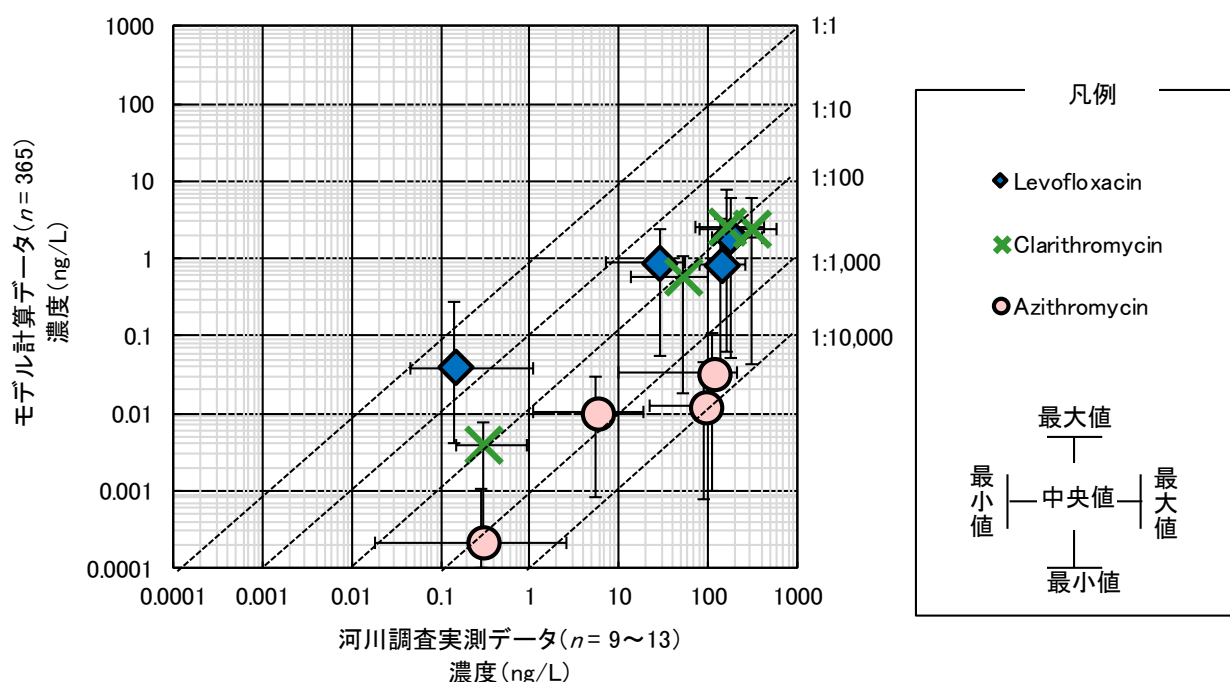


図-2 同一メッシュ中の医薬品濃度におけるSHANEL Ver. 3. 0計算値と河川調査実測値の比較

3.2 モデル計算値と河川調査実測データとの比較

3 種医薬品について、前節で得られた式 (1) に基づく変数を用いて、多摩川流域内の 13 か所の下水処理場に対して処理人口との関係から放流負荷量を算出して AIST-SHANEL Ver.3.0 に入力し、モデル解析を実行した。その結果、多摩川流域全体の 19,784 メッシュ(250m メッシュ) に対し、2011 年 1 月 1 日～12 月 31 日の 365 日間分の河川水量および 3 種医薬品の負荷量と濃度が計算された。このうち、過年度の河川調査実測データがある多摩川の上流点 (八高線鉄橋)、中流点 (日野橋)、下流点 (関戸橋) そして支川 (浅川高幡橋) の 4 地点について、シミュレーションの計算結果と実測データをプロットしたグラフを図-2 に示す。Clarithromycin の場合、計算結果と実測結果の中央値を順に示すと、上流では 0.0037 ng/L と 0.30 ng/L

(78.9 倍差)、中流では 2.42 ng/L と 308.4 ng/L (127.7 倍差)、下流では 2.6 ng/L と 162.2 ng/L (62.6 倍差)、支流では 0.59 ng/L と 52 ng/L (88.3 倍差) であり、2 オーダー程度の差があった。Levofloxacin の場合、計算結果と実測結果の中央値を順に示すと、上流では 0.039 ng/L と 0.14 ng/L (3.7 倍差)、中流では 1.9 ng/L と 180.2 ng/L (95.9 倍差)、下流では 0.8 ng/L と 140.0 ng/L (172 倍差)、支流では 0.87 ng/L と 29.0 ng/L (33.3 倍差) であり、1~2 オーダー程度の差があった。Azithromycin の場合、計算結果と実測結果の中央値を順に示すと、上流では 0.0002 ng/L と 0.29 ng/L (1,319 倍差)、中流では 0.033 ng/L と 115.0 ng/L (3,463 倍差)、下流では 0.012 ng/L と 90.4 ng/L (7,303 倍差)、支流では 0.0103 ng/L と 5.6 ng/L (541 倍差) であり、3~4 オーダー程度の差があり、3 種医薬品の中で最も的確に推定できていない結果であった。3 種の医薬品全てで、実測値の方が計算値よりも高い傾向があり、また、下水処理場が多数存在する多摩川中流域以降では差が大きくなる傾向があった。一方で、clarithromycin については計算値と実測値の誤差の程度が類似しており、プロットにおいても比較的良好な相関が得られていた。

今回のモデル計算では、デフォルトパラメーターをそのまま入力した項目が多く、物性に基づく入力項目も物質によっては環境での挙動を十分に考慮できていなかった可能性がある。そのため、推定精度の向上のためには、環境での挙動や条件等を精査しながら入力データを検討するとともに、測定データを蓄積してキャリブレーションを行う必要があると考えられた。

3.3 多摩川流域における濃度解析結果のマッピング

計算終了となる 487 日目（助走期間終了後 365 日目）のデータを使用して、多摩川流域全体のメッシュに河川水流量と clarithromycin の負荷量および濃度をマッピングした結果を図-3 に示す。まず、河川水の流量は、奥多摩湖の出口時点での 45.6 m³/day と比較して、流域最下流端のメッシュでは 2.5×10^6 m³/day であり、約 55,400 倍の流量となっていた。なお、この時下水処理水由来の流量は全流量の 20.7% を占めていた。次に、clarithromycin の日負荷量をみてみると、最初に負荷量が算出された八高線鉄橋の下流地点付近での 2.70 g/day と比較して、流域最下流端のメッシュでは 53.4 g/day であり、約 19.8 倍の負荷量となっていた。この結果は、同一地点間の河川水流量増加率（1.70 倍）と比較して 1 オーダー程度高く、河川流下

過程における分解や底質への吸着による水中からの減少量よりも都市域からの排出量の方が大きいことを示すものであった。最後に、clarithromycin の濃度に着目してみると、最大濃度であった場所は支川流域に位置する某下水処理場の下流地点で 33.2 ng/L であり、流域最下流端のメッシュでは 21.1 ng/L であった。本研究グループでは過年度に、clarithromycin に対する初期リスク評価として、ムレミカヅキモを用いた藻類生長阻害試験で得られた EC₅₀ 値⁹⁾を基にして PNEC を 20 ng/L と算出している¹⁰⁾。この値を超過しているメッシュは全 19,784 メッシュのうち 78 メッシュ存在し、全体の 0.39% であった。また、河道範囲に限った全メッシュと比較すれば 5.14% であった。今回得られた推定濃度と PNEC との単純比較によるハザード比の結果を極端に信頼することはできないが、水系暴露解析モデルと毒性データを併せて検討することで、流域の生態リスクを包括的に評価できる可能性が示唆された。一方で、本研究で実施した濃度推定では、詳細なパラメーターの検討やキャリブレーションをせずに既存のシステムのデフォルト設定を採用している点が多かったことから、濃度が的確に推定されなかった疑いがある。そのため、得られた推定濃度と PNEC との単純比較によるハザード比の結果を極端に信頼することは避けなければならない。

今後、水系暴露解析モデルのようなシミュレーションモデルを適用して流域全体の濃度をなるべく精度良く推定して実測データを補うことができれば、潜在的な汚染を迅速に把握しつつ、視覚的にも理解しやすい形で生態リスク評価が実施できるようになると考えられた。

4. まとめ

本研究では、水系暴露解析モデルを用いたシミュレーションにより、多摩川流域全体での医薬品の暴露濃度の網羅的予測を試みた。主要な成果を以下に示す。

○azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 3 種の医薬品について、下水処理場における実測データを基に計算した処理場からの放流負荷量と下水処理人口との間には良好な相関があった。下水処理人口に基づいた 3 種医薬品の放流負荷量の推定式が得られ、未調査の下水処理場からの 3 種医薬品の放流負荷量が推定された。

○下水処理場からの放流負荷量推定値を適用し、AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いた 250m メッシュの

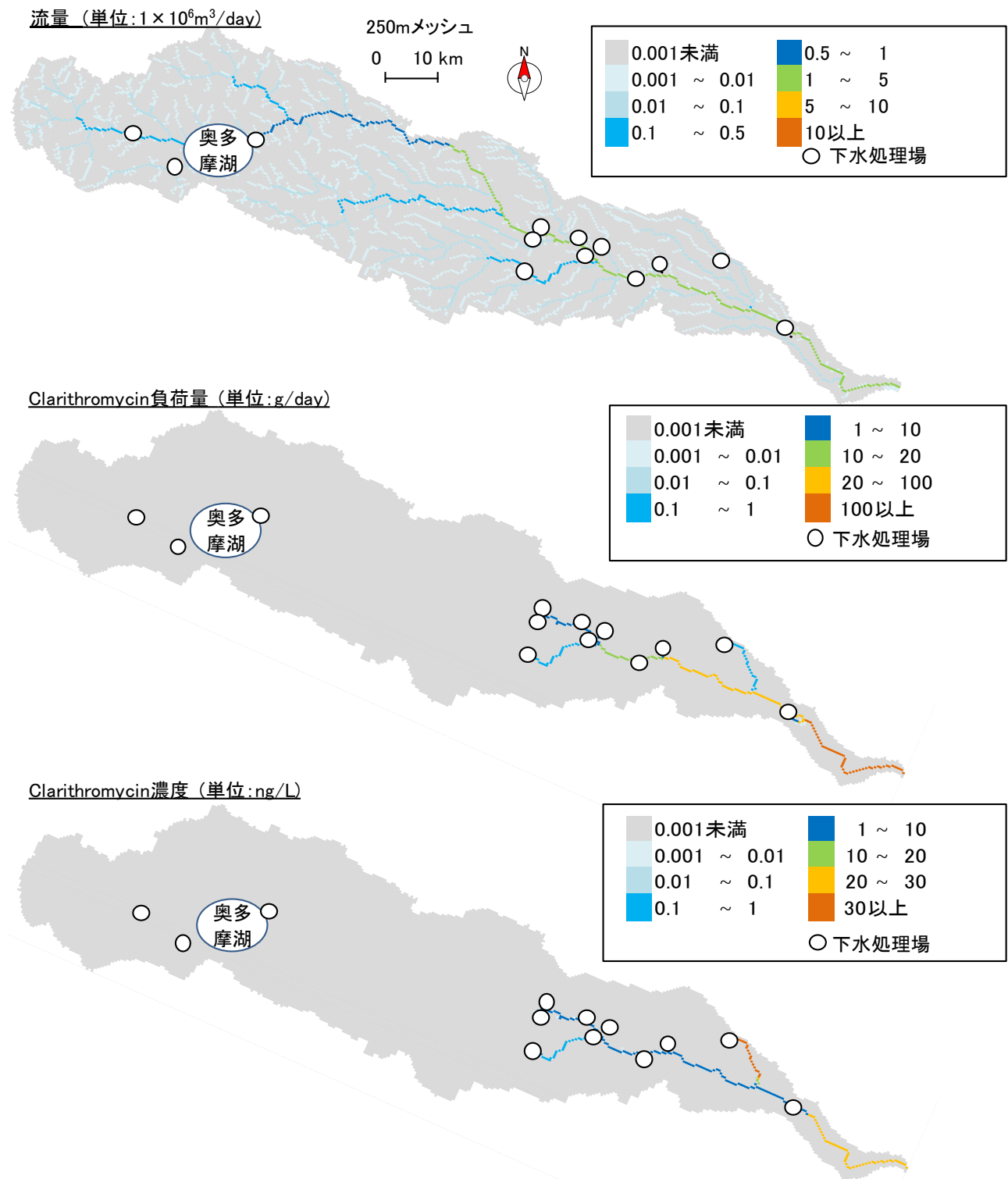


図-3 AIST-SHANEL Ver. 3.0による計算値を用いた
多摩川流域における河川水流量およびclarithromycinの負荷量と濃度のマッピング結果

非定常解析を実行した。検討した3種医薬品の全てでモデル計算濃度が野外実測濃度と比較して低く算出される傾向があったが、clarithromycinについては、モデル計算濃度と野外実測濃度の間に良好な相関関係が示された。

○モデルによる推定濃度データを用いて流域全体の濃度マッピングが達成された。本研究でモデルにより得られた推定値の誤差範囲には留意する必要があるが、水系暴露解析モデルと毒性データを併せて検討することで、流域の生態リスクを包括的に評価できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 平成27年度重点研究成果報告書：水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-project/2015/pdf/ju-10.pdf> (2019年6月確認)
- 2) 花本征也、真野浩行、南山瑞彦：多摩川と桂川における抗生物質の減衰の差異とその要因、第51回日本水環境学会年会、熊本、pp.165、2017年3月
- 3) 平成29年度研究開発プログラム報告書「13.1.1 公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究」、pp.1-4、2017
- 4) 国土交通省：一級水系における流域等の面積、総人口、一般資産額等について、http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/ryuiki.pdf (2019年6月確認)
- 5) Suzuki, N., Murasawa, K., Sakurai, T., Nansai, K., Matsushashi, K., Moriguchi, Y., Tanabe, K., Nakasugi, O. and Morita, M.: Geo-Referenced Multimedia Environmental Fate Model (G-CIEMS). Model formulation and comparison to the generic model and monitoring approaches, *Environ. Sci. Technol.* 38, pp. 5682-5693, 2004
- 6) Jia, Y., Ni, G., Kawahara, Y., & Suetsugi, T.: Development of WEP model and its application to an urban watershed. *Hydrological Processes*, 15 (11), pp. 2175-2194, 2001
- 7) 石川百合子、川口智哉、& 東野晴行：国内の任意水系を対象にした化学物質リスク評価のための産総研-水系暴露解析モデル (AIST-SHANEL) Ver. 3.0、水環境学会誌、40 (5)、pp.199-208、2017
- 8) 花本征也、杉下寛樹、山下尚之、田中宏明、宝輪勲、& 小西千絵：淀川水系における医薬品類の挙動に関する検討、環境工学研究論文集、45、pp. 29-37、2008
- 9) Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., Parrella A.: Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.*, 346(1-3), pp. 87-98, 2005.
- 10) Mano, H., and Okamoto, S.: Preliminary ecological risk assessment of 10 PPCPs and their contributions to the toxicity of concentrated surface water on an algal species in the middle basin of Tama River. *J. Water Environ. Technol.*, 14(6), pp.423-436, 2016

公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究（水質リスクを軽減するための処理技術）

研究予算： 運営交付金

研究期間： 平 28～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、北村友一、
鈴木裕識、小森行也

【要旨】

現在、環境省では水生生物の保全に係る水質環境基準項目へのアンモニア性窒素の追加を検討している。下水放流水からアンモニア性窒素が検出される場合もあり、下水放流先に環境基準点がある場合や、排水基準値が設定された場合に対応するため、下水処理過程でのアンモニア性窒素の低減法を提案しておく必要がある。平成 30 年度は、微生物保持担体を用いて下水処理水中に残存するアンモニア性窒素の低減効果をプラント実験から調査した。その結果、微生物保持担体処理は、硝化活性が低下する冬季（水温 10～15℃）、原水中アンモニア性窒素濃度約 12 mg/L において、約 45～60 分の処理時間でアンモニア性窒素を 1/10 に低減できること明らかにした。本実験で得られた硝化速度は 18.8 mg-N/L・h であった。

地震等の災害時に下水処理場が被災し処理機能停止となった場合は、応急復旧として簡易沈殿処理が行われている。簡易沈殿処理における有害物質等の除去特性については知見が不十分であることから実下水を用いた簡易沈殿処理実験により排水基準項目の金属類を対象として除去特性を調査した。その結果、下水処理において処理困難物質とされている有害物質等の Pb、As、B、Cu、Zn、Mn は、簡易沈殿処理における除去率は 30%以下であり除去が困難な物質であることがわかった。しかし、Fe は、沈殿処理によって 71%が除去された。

キーワード：アンモニア性窒素、微生物保持担体、簡易沈殿

1. はじめに

環境省では水生生物の保全に係る水質環境基準項目へのアンモニア性窒素（以下、 $\text{NH}_4\text{-N}$ とする）の追加を検討している。下水放流水から $\text{NH}_4\text{-N}$ が検出される場合¹⁾もあり、下水放流先に環境基準点がある場合や、排水基準値が設定された場合に対応するため、下水処理過程での $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減法を提案しておく必要がある。平成 30 年度は、過年度の調査で LAS、医薬品の

低減効果が認められた微生物保持担体を用いて、下水処理水中に残存する $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減効果をプラント実験により明らかにした。

また、地震等の災害時に下水処理場が被災し処理機能停止となった場合は、応急復旧として簡易沈殿処理が行われている。簡易沈殿処理における有害物質等の除去特性に関する知見は未だ十分とはいえない状況にあることから実下水を用いた簡易沈殿処理実験を行い

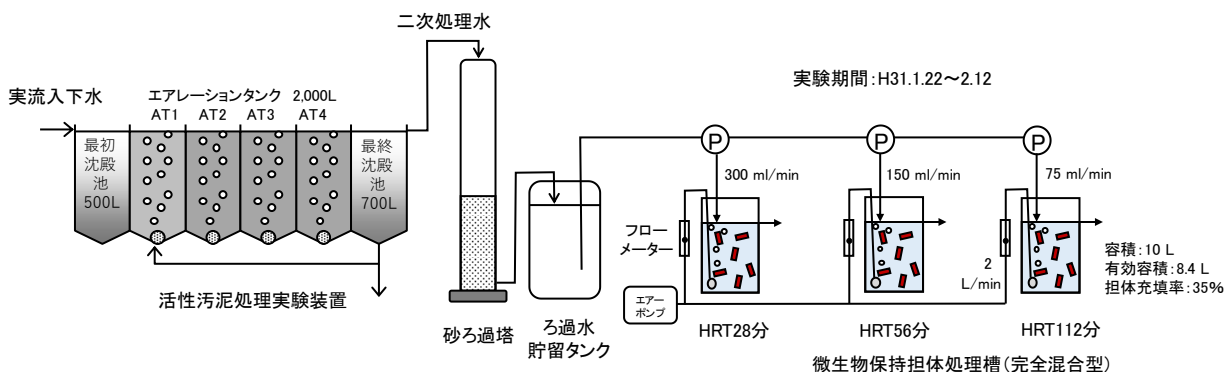


図-1 活性汚泥処理装置と微生物保持担体処理槽（完全混合型）の概要

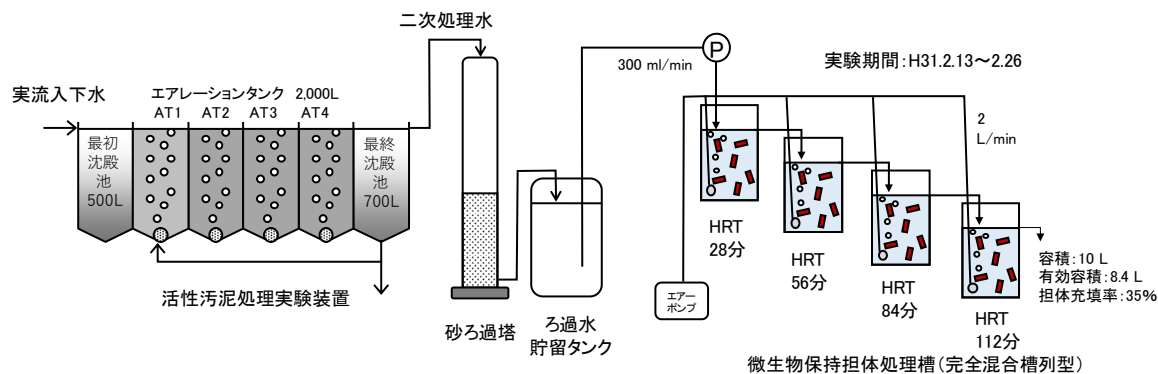


図-2 活性汚泥処理装置と微生物保持担体処理槽（完全混合槽列型）の概要



写真-1 完全混合型微生物保持担体処理槽



写真-2 完全混合槽列型微生物保持担体処理槽

排水基準項目の金属類を対象として除去特性の調査を行った。

2. 実験方法

2.1 担体による下水処理水中 $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去実験

下水処理水中に残存する $\text{NH}_4\text{-N}$ が微生物保持担体処理によりどの程度の滞留時間で、どの程度低減できるかを明らかにするための基礎実験を行った。図-1,2 に本実験で使用した活性汚泥処理装置と微生物保持担体処理槽の概要を、写真-1,2 に微生物保持担体処理槽の外観を示した。微生物保持担体処理実験は、完全混合型（図-1、写真-1）と完全混合槽列型（図-2、写真-2）の2条件で検証した。微生物保持担体処理槽（10L）は、活性汚泥処理実験装置の後段に3または4台設置し、各処理槽にはポリプロピレン製の中空円筒状の微生物保持担体（ $4\text{mm}^{\text{OD}} \times 3\text{mm}^{\text{ID}} \times 5\text{mm}^{\text{L}}$ ）を添加率35%（嵩比率）で充填した。微生物保持担体処理のための原水は、活性汚泥処理実験装置を硝化抑制で運転し、処理水中に $\text{NH}_4\text{-N}$ を残留させたものである。本実験では、冬季の低水温期の $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減効果を明らかにするため、微生物保持担体槽の水温制御は行っていない。H30年12月下旬から試験処理水のみで担体の馴致を

行い、H31年1/22～2/12は完全混合型、2/13～2/26は槽列型で連続運転を行った。完全混合型では1/22、1/29、2/5、2/12の4回、完全混合槽列型では2/19、2/21、2/26の3回、原水と各反応槽の流出水をスポット採水した。水質分析は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ を自動流れ分析（ビーエルテック QuAAtro2-HR）で、TOCをNPCO方式（島津製作所 TOC-V）で測定した。その他に採水時に、pH、DO、水温を測定した。

2.2 簡易沈殿処理における金属類の除去実験

実験は、過年度に作製した下水の簡易沈殿処理実験装置（図-3、写真-3）を用いて行った。実験装置は、最初沈殿池（29L）、曝気槽（146L）、最終沈殿池（44L）で構成され、流入水量500L/dにおける水面積負荷、滞留時間は表-1のとおりである。実験装置の作製にあたってこれらの諸元は下水道維持管理指針²⁾を参考に設定したものである。

実験は、同型の装置を2系列運転し、同一条件の平行再現実験とした。実下水処理場の流入下水を実験装置に流量500L/d（約350mL/min）で通水し、流入水、処理水（A）、処理水（B）を1回/週の間隔で5週間にわたって5回採取した。通常、曝気槽はエアレーショ

ンが行われ生物処理の主要部分となる重要施設であるが、災害時に被災しその機能が損なわれることがある。本実験では、曝気槽が機能停止したことを想定し、実験装置を構成する最初沈殿池、曝気槽、最終沈殿池すべてを沈殿池とした。また、実験期間中、汚泥の引抜は行わなかった。なお、本実験における実験装置全体の沈殿時間は10.4時間となる。

試料採取時に水温、pH、ORPを測定するとともに、採取試料は分析室に持ち帰りBOD、COD、SS、DOC、TN、TPの他、有害物質等として金属類を分析した。分析した金属類は一律排水基準項目の有害物質からCd、Pb、As、Se、B、その他の項目からCu、Zn、Fe、Mn、Crの計10元素とした。

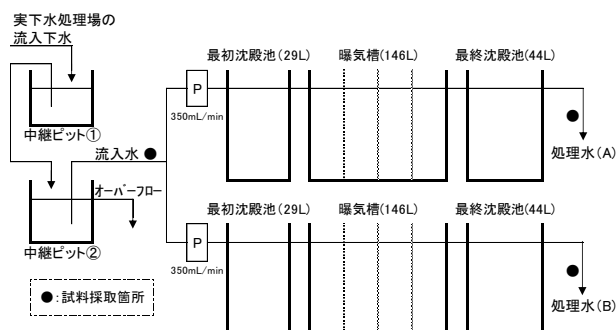


図-3 簡易沈殿処理実験装置

表-1 簡易沈殿処理実験装置の諸元

	最初沈殿池	曝気槽	最終沈殿池
水面積負荷 ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{d}$)	33	—	22
滞留時間 (h)	1.4	7.0	2.1
W (m)	0.15	0.15	0.15
L (m)	0.10	0.50	0.15
H (m)	1.96	1.95	1.94



写真-3 簡易沈殿処理装置の写真

BOD、COD、SS、DOCの分析は、河川水質試験方法(案)³⁾により行った。TN、TPは、水酸化ナトリウム-ペルオキシ二硫酸カリウム溶液による分析前処理を行った後、自動比色分析装置を用いて分析した。

金属類の分析は、分析前処理として試料50mLに硝酸1mL添加し加熱分解処理した。放冷し5Bろ紙でろ過した後、50mLに定容しICP質量分析計を用いて各元素濃度を測定した。

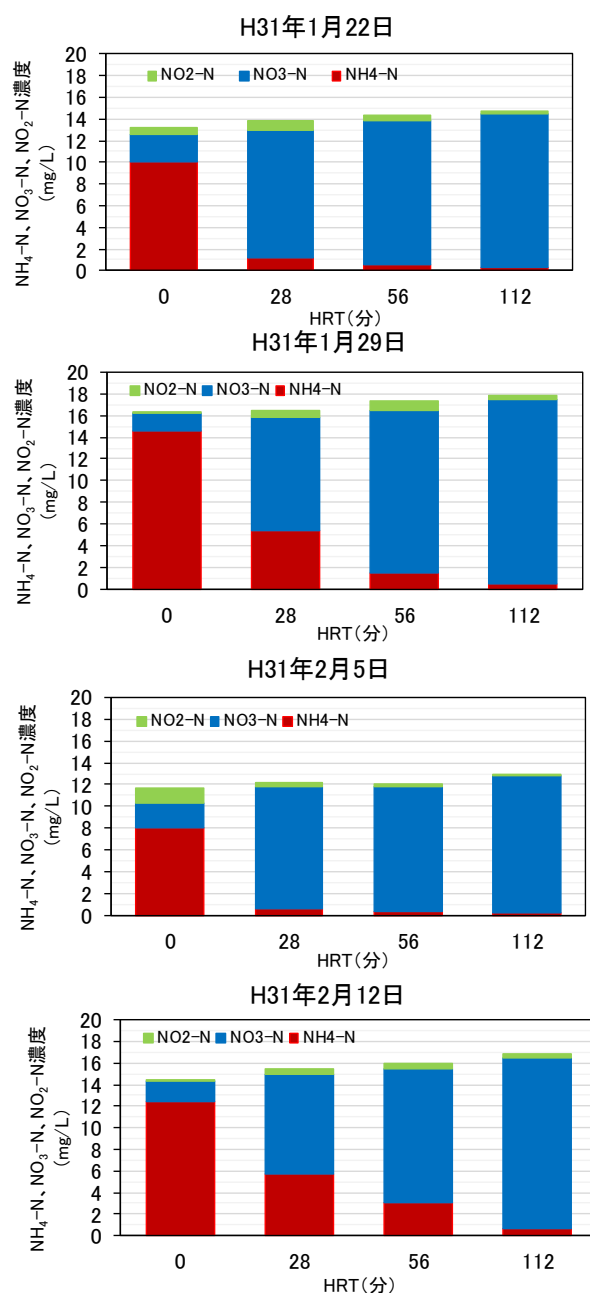


図-4 完全混合型実験中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の測定結果

3. 結果と考察

3.1 担体による下水処理水中 $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去特性

図-4 は完全混合型処理実験中の 1/22、1/29、2/5、2/12

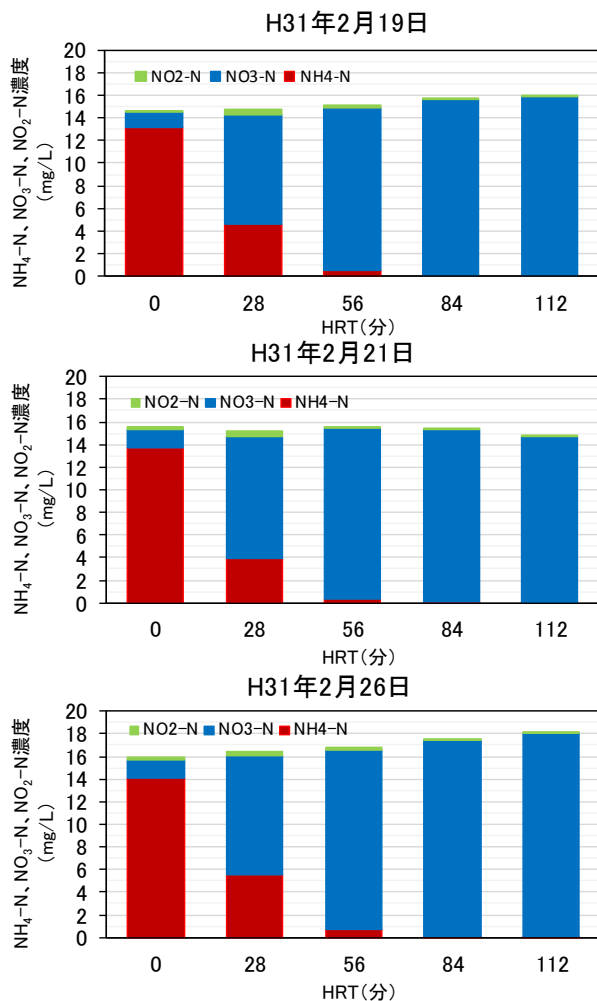


図-5 完全混合槽列型実験中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の測定結果

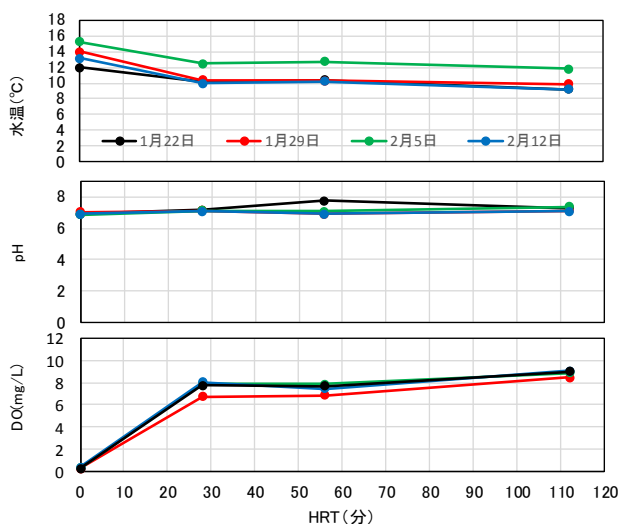


図-6 完全混合型実験中の水温、pH、DO の結果

の各担体処理槽流出水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の結果である。図-5 は完全混合槽列型処理実験中の 2/19、2/21、2/26 の結果である。完全混合型、完全混合槽列

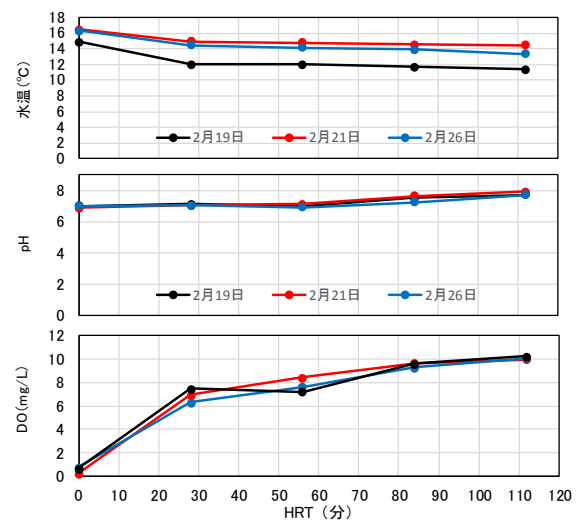


図-7 完全混合槽列型実験中の水温、pH、DO の結果

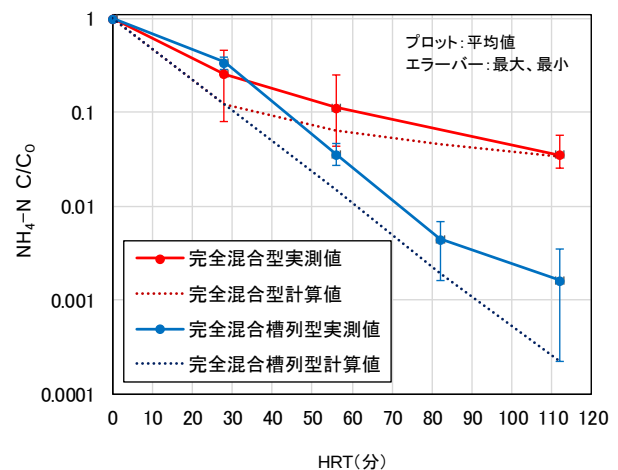


図-8 HRT と $\text{NH}_4\text{-N } (C/C_0)$ の関係

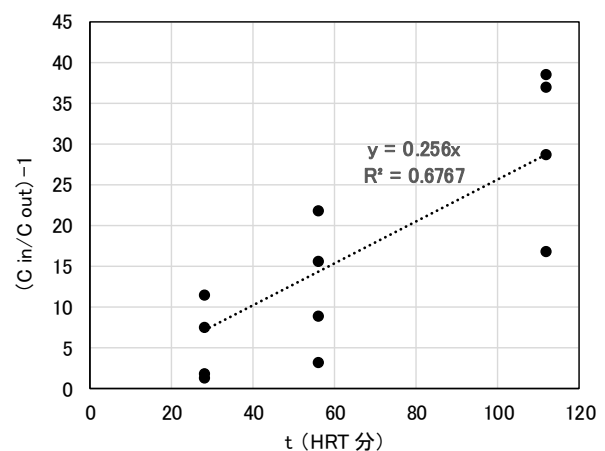


図-9 完全混合実験における t (HRT) と $(C_{in}/C_{out}) - 1$ の関係

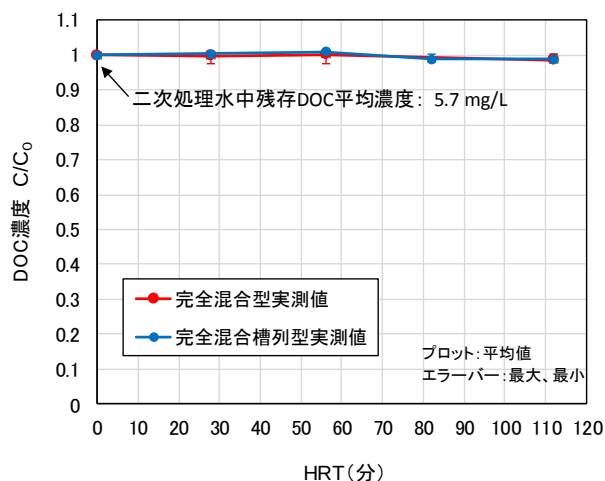


図-10 HRTとDOC(C/C0)の関係

型のいずれも HRT 56 分の条件で、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の約 90% 以上が $\text{NO}_3\text{-N}$ に変化していた(ただし 2 月 12 日は除く)。

図-6、7 に各担体処理槽流出水の水温、pH、DO の測定結果を示した。完全混合型と完全混合槽列型の HRT 56 分の処理水の平均水温は 10.9°C 、 13.7°C で、完全混合槽列型処理水が約 3°C 高い条件であった。pH は 7 付近で硝化に伴う低下は見られなかった。DO は完全混合型、完全混合槽列型とも 6 mg/L 以上あった。

原水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度を C_0 、微生物保持担体処理水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度を C として C/C_0 を算出し、HRT と C/C_0 の関係を図-8 に示した。図より $\text{NH}_4\text{-N}$ 低減率 90% を得るのに必要な処理時間 (HRT) は 45~60 分、99% の低

減率は槽の混合特性によって大きく異なる結果となったが、完全混合型では約 120 分以上、完全混合槽列型では、約 70 分となった。

完全混合型と完全混合槽列型の HRT 28 分の全条件で、 $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ の生成量から平均硝化速度を算出すると、硝化速度は $18.8\text{ mg-N/L}\cdot\text{h}$ ($0.45\text{ kg-N/m}^3\cdot\text{d}$) となった。硝化脱窒運転を行っている活性汚泥法での単位活性汚泥当たりの硝化速度は、 $3\text{ mg-N/mg-SS}\cdot\text{h}$ 程度⁴⁾であることから、本実験の微生物保持担体は、 6.3 g/L 相当の活性汚泥に匹敵していることとなる。微生物保持担体上に高濃度の硝化細菌が存在していたことがわかる。嫌気-無酸素-好気法の好気槽に担体を添加したパイロットプラントの実験で、水温 15°C 時の好気槽での最大硝化速度が $0.4\text{ kg-N/m}^3\cdot\text{d}$ であったとの報告⁵⁾があり、本研究で得られた硝化速度と近い値であった。

担体処理槽の混合特性で $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減効果を比較すると、HRT 60 分以降で完全混合槽列型の $\text{NH}_4\text{-N}$ 低減効果が高いことがわかる。以下で、これが妥当かどうかを理論的観点から検証する。

完全混合槽列型の処理水中の濃度は、反応速度定数を 1 次反応とすると以下の式で表される。

$$C_{\text{out}} = C_{\text{in}} / (1 + k t / N)^N \quad \cdots \text{式(1)}$$

ここで、 C_{in} : 流入濃度(mg/L)

C_{out} : 流出濃度(mg/L)

k : 反応速度定数(1/min)

表-2 簡易沈殿処理実験結果と排水基準

	流入水			処理水(A)			処理水(B)			排水基準
	最小値	平均値	最大値	最小値	平均値	最大値	最小値	平均値	最大値	
水温 ($^\circ\text{C}$)	19.2	20.5	22.0	13.9	15.8	17.0	13.7	16.0	17.3	-
pH (-)	7.2	-	7.4	7.3	-	7.3	7.2	-	7.3	$5.8 - 8.6^{*1}$
ORP (mV)	-175	-166	-156	-276	-268	-260	-272	-267	-262	-
BOD (mg/L)	37	66	108	41	63	88	38	64	105	160^{*2}
COD (mg/L)	35	48	69	37	41	45	37	41	43	160^{*3}
SS (mg/L)	44	70	120	25	32	39	23	29	36	200
DOC (mg/L)	17	22	28	21	26	31	23	27	31	-
TN (mg/L)	24	30	36	21	24	26	22	24	26	120^{*4}
TP (mg/L)	2.6	3.2	3.8	2.1	2.4	2.6	2.2	2.4	2.6	16^{*4}
Pb ($\mu\text{g/L}$)	0.31	0.42	0.65	0.27	0.35	0.40	0.27	0.33	0.39	100
As ($\mu\text{g/L}$)	0.72	0.81	0.92	0.68	0.74	0.80	0.62	0.72	0.82	100
B ($\mu\text{g/L}$)	58	61	73	60	61	62	59	60	62	10,000
Cu ($\mu\text{g/L}$)	13	18	24	15	17	18	15	16	18	3,000
Zn ($\mu\text{g/L}$)	25	34	50	24	25	28	22	26	30	2,000
Fe ($\mu\text{g/L}$)	2,300	2,700	4,200	570	780	920	550	770	880	10,000
Mn ($\mu\text{g/L}$)	73	77	86	49	55	60	48	55	58	10,000
通水量 (mL/min)	-	-	-	330	354	375	305	346	370	-
沈殿時間 (hr)	-	-	-	11.1	10.3	9.8	12.0	10.6	9.9	-

※1: 海域以外の公共用水域に排出

※2: 海域及び湖沼以外の公共用水域に排出

※3: 海域及び湖沼に排出

※4: 湖沼植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれがある湖沼として環境大臣が定める湖沼、海洋植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれがある海域として環境大臣が定める海域及びこれらに流入する公共用水域に排出

t : 滞留時間(min)

N : 槽数

式(1)を、 $N=1$ とし、 $y=ax$ 型に、変形すると式(2)が得られる。

$$(C_{in}/C_{out}) - 1 = kt \quad \cdots \text{式(2)}$$

t に対して、 $(C_{in}/C_{out}) - 1$ をプロットすると k を得ることができる。図-9 は、完全混合型の実験データをプロットし、k を近似法で算出した結果である。その結果、ばらつきが大きいものの、 $k = 0.256$ (1/min) が得られた。得られた k を用いて、完全混合型と完全混合槽列型の C/C_0 を計算した結果を、図-8 内に点線で示した。

本計算結果からも、完全混合槽列型は、完全混合型よりも同滞留時間でも処理水濃度を低くすることができる。例えば、HRT 56 分で 1 槽型と 2 槽型の処理水濃度を比較すると、2 槽型は、1 槽型の 1/3 (計算値では 1/4) まで低減できることがわかる。この結果から、高濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ が残留する処理水や流入量変動が大きい場合は、完全混合型槽列型が有効になる可能性がある。

図-10 に DOC について HRT と C/C_0 の関係を示した。二次処理水中残存 DOC 濃度は約 5.7mg/L であったが、DOC は微生物保持担体処理ではほとんど低減しない結果となった。微生物保持担体による DOC の低減効果は前年度⁶⁾と同様の結果であった。

3.2 簡易沈殿処理における金属類の除去特性

実験結果と各項目の排水基準を表-2 に示す。流入水の平均水温は 20.5℃、処理水 (A)、処理水 (B) の平均水温はそれぞれ 15.8℃、16.0℃であり、約 10 時間の沈殿で水温が約 4℃低下した。流入水、処理水の pH の値はほぼ同じであった。また、流入水の ORP は -166mV、処理水 (A)、処理水 (B) の ORP はそれぞれ -268mV、-267mV であり、約 10 時間の沈殿処理により流入水は、より強い還元状態に変化していた。

本実験の流入水は、図-3 に示したとおり、実下水処理場の流入下水を用いているが、幾つかのピットを経由していることもあり、一般的な流入下水の水質⁷⁾に比べ低い値となっており、BOD、COD、SS、DOC、TN、TP の平均値は、それぞれ 66 mg/L、48 mg/L、70 mg/L、22 mg/L、30 mg/L、3.2 mg/L であった。分析した金属類の Pb、As、B、Cu、Zn、Fe、Mn の平均値は、それぞれ 0.42 μg/L、0.81 μg/L、61 μg/L、18 μg/L、34 μg/L、

2,700 μg/L、77 μg/L であり、Cd、Se、Cr の 3 元素は不検出であった。本実験では、排水基準項目を対象としたこともあり調査対象金属類の添加による濃度調節は行っていない。比較的高濃度で検出された Fe は排水基準値の約 1/4、他の金属類は排水基準値の約 1/60 以下であった。

表-2 に示すとおり、処理水 (A) の BOD、COD、SS、DOC、TN、TP の平均値は 63 mg/L、41 mg/L、32 mg/L、26 mg/L、24 mg/L、2.4 mg/L であった。同一条件で行った処理水 (B) の値は、処理水 (A) とほぼ同じ値であり実験は再現されていたことが分かる。

これらの結果から約 10 時間の沈殿処理による除去率を算出すると BOD は 4~6%、COD は 14~15%、SS は 55~58%、TN は 18~19%、TP は 23~24% であった。これらに対し DOC は沈殿処理することにより、その濃度が 17~19% 増加する結果となった。BOD、COD、SS、TN、TP の除去は、浮遊物質の沈降により除去されたものと考えられる。DOC の増加は、約 10 時間の沈殿処理による強い還元状態のなかで嫌気性分解により一部の有機物が可溶化したものと考えられる。

金属類は、排水基準値に比べ低い濃度ではあるが沈殿処理による除去率を算出した。Pb 除去率は 17~23%、As は 9~11%、B は 1~2%、Cu は 8~9%、Zn は 23~24%、Fe は 71%、Mn は 29% であった。本実験で対象とした金属類は、下水処理において処理困難物質とされている物質であるが、簡易沈殿処理における除去率は 30% 以下であり除去が困難な物質であることがわかった。しかし、比較的高濃度の Fe は、沈殿処理によって 71% が除去されていた。還元状態の強い嫌気性条件下において硫化鉄となり沈殿除去されたものと考えられる。

4. まとめ

微生物保持担体を用いて下水処理水中に残存するアンモニア性窒素の低減効果をプラント実験から調査した。また、流入下水の簡易沈殿処理実験を行い排水基準項目の金属類を対象として除去特性の調査を行った。

本研究で得られた知見は以下のとおりである。

- 1) 微生物保持担体処理は、硝化活性が低下する冬季 (水温 10~15℃、原水中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度約 12 mg/L) においても、45~60 分の処理時間 (HRT) で $\text{NH}_4\text{-N}$ を 1/10 に低減できることを明らかにした。
- 2) 本実験での硝化速度は 18.8 mg-N/L・h であった。

- 3) 完全混合槽列型による微生物保持担体処理は、完全混合型単独槽よりも $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減効果は大きくなることを実験および計算から確認した。
- 4) 下水処理において処理困難物質とされている有害物質等の Pb、As、B、Cu、Zn、Mn は、簡易沈殿処理における除去率は 30%以下であり除去が困難な物質であることがわかった。しかし、Fe は、沈殿処理によって 71%が除去された。

5. 今後の予定

微生物保持担体による $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減技術の開発については、曝気量削減による省エネルギー化および実用化に向けた検討を重点研究「下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減技術と水生生物の影響評価に関する研究（R 元～3）」中で行う予定である。微生物保持担体処理による微量有害物質の低減効果については、最新の網羅的分析手法を導入し、引き続き、調査していく予定である。

参考文献

- 1) 小川文章、小森行也、村田里美、鈴木裕識：下水処理工程における化学物質等の除去特性及び生物影響に係る検討業務、平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、p.83-84、2018
- 2) 日本下水道協会、下水道維持管理指針 2003 年版、pp.20-49、平成 15 年 8 月
- 3) 河川水質試験方法（案）[2008 年版]、平成 21 年 3 月、国土交通省水質連絡会、http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html（令和元年 9 月 12 日確認）
- 4) 高橋正宏、小越真佐司、鈴木穰：下水道高度処理施設設計指針改訂の考え方、北海道大学第 1 回衛生工学シンポジウム論文集、p.261、1993
- 5) 高橋正宏、鈴木穰：固定化微生物を用いた高度処理プロセスの実用化に関する研究、平成 6 年度、下水道関係調査研究年次報告書集、p.173-174、1995
- 6) 小川文章、對馬育夫、小森行也：公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御に関する研究、平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、p.89-91、2018
- 7) 日本下水道協会、平成 28 年度版下水道統計、第 73 号、平成 30 年 12 月

底層環境に着目した停滞性水域における水環境管理技術に関する研究（簡易的な藻類定性定量方法の開発）

研究予算：運営交付金

研究期間：平 28～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、對馬育夫

【要旨】

本研究では、湖沼・ダム貯水池の水質改善に向け、並列型高速塩基配列決定装置（次世代シーケンサー）を用いた 16S rRNA 遺伝子および 18S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物モニタリングの開発に取り組んだ。次世代シーケンサーを用いて得られた結果は、光学顕微鏡を用いて得られた結果をほぼ網羅していた。プランクトンの優占種はダム貯水池によって異なっており、年間を通じて優占種がシフトしていた。細菌叢解析においては、ダム貯水池毎に特徴的な構成になっていることが明確となり、地理的要因より水温等の影響を受け変化することが示唆された。

キーワード：湖沼・ダム貯水池、次世代シーケンサー、細菌、プランクトン

1. はじめに

環境負荷の増大による湖沼やダム貯水池における水質の悪化が長らく問題となっており、生物多様性国家戦略に基づいて「豊かな生態系の確保」の視点から河川・湖沼等の水質改善に関する調査・取り組みが実施されている。しかしながら、湖沼における環境基準達成率は約 50%と低い。国土交通省および独立行政法人水源地機構が管理するダム貯水池においても、約 3 割が環境基準を満たしておらず、約 4 割の貯水池において、アオコやカビ臭等の富栄養化現象が確認されている¹⁾。現在まで、流域における流入負荷の削減の取り組みや湖沼底泥の浚渫等様々な取り組みが行われているが、依然としてアオコ・カビ臭発生等の問題は解決されていない。

さらに、湖沼水質を把握する上で、藻類等の植物プランクトンのモニタリングは非常に重要である。藻類の中にはカビ臭物質や毒性物質を生産するものもあり、水の安全性確保の観点からも湖沼・ダム貯水池における藻類のモニタリングは非常に重要である。従来、ダム貯水池の動植物プランクトンのモニタリングは、「河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】V.動植物プランクトン調査」²⁾に準じて行われ、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われている。しかしながら、同定には熟練した技術が必要で、対応できる技術者も限られており、形態により判断しているため、形態が非常に似通った植物プランクトンは判断が困

難である場合がある。また、カビ臭物質産生プランクトンやアオコの原因となる植物プランクトンは、主にシアノバクテリア（藍藻）に属す細菌であり、一般的な植物プランクトンより小さく、光学顕微鏡での同定が困難である。

一方、近年、ゲノム解析技術の急速な発展により、次世代シーケンサーを使った大規模 DNA 塩基配列データの取得がより手軽に行えるようになった。本研究では、ダム貯水池水質の維持管理に有効な手法の開発を目指し、次世代シーケンサーを用いた DNA 塩基配列に基づく藻類モニタリング解析手法の確立に取り組む。次世代シーケンサーを用いることにより、藻類の精度の高い同定が実現可能となる。また、検鏡では同定が困難だった細菌も同定も可能となる。H28～29 年度は、細菌が持つ 16S rRNA 遺伝子に着目し、検出方法の検討等を行った。H30 年度は、真核生物が持つ 18S RNA 遺伝子にも着目し、ダム貯水池や湖沼から採取した水試料を用い、月別の動植物プランクトン及び細菌を検出した結果について報告する。

2. 実験方法

本研究では、北海道にある 4 箇所のダム貯水池（A ダム、B ダム、C ダム、D ダムと表記）を対象に、次世代シーケンサー（Miseq, Illumina）を用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物分類を行った。採水はダムサイトで行い、表層水（表層から 50 cm 水深）を採水

した。DNA 抽出操作の前処理として、採水した試料は、500 mL を 0.2 μ m フィルターでろ過し、STE バッファー (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH8) 30 mL にフィルターを一晩浸漬させた (4°C)。浸漬後、激しく混合することにより、フィルターに捕集された残渣を剥離させ、遠心分離 (3,000 g で 20 分間) で 0.5 mL にまで濃縮した。

また、一部の試料においては、ろ液に含まれるプランクトン・細菌を確認するため、ろ液を遠心分離 (14,000 g で 5 分間) し濃縮した沈殿物から DNA を抽出した。濃縮した懸濁物は、Nucleo Spin® Soil (MACHEREY-NAGEL) を用いて DNA を抽出した。

本研究では、18S rRNA 遺伝子を対象としたプライマー TAREuk454FWD1 および TAREukREV3³⁾ (V4-V5 領域を対象) で検出される真核生物をプランクトンとし、16S rRNA 遺伝子を持つ藍藻類 (Cyanobacteria) については細菌と区別した。細菌、古細菌の解析に、16S rRNA 遺伝子を対象としたプライマー Pro341F および Pro805R (V3-V4 領域を対象) を使用した⁴⁾。PCR 反応条件は初期変性を 94°C で 30 秒行った後、乖離温度を 94°C で 5 秒、アニーリング温度を 60°C から 58°C で 30 秒間に設定し、10 サイクル毎に 1°C 下げるタッチダウン方式を採用し、伸長温度を 72°C で 30 秒に設定し、合計 30 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics) を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3 (600 サイクル, Illumina) を用い、塩基配列を決定した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU) -picking およびクラスター解析は QIIME2 を用い、97% 以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13_8 および SILVA132 をリファレンスとした。

3. 結果と考察

3.1 モニタリング試行

フィルターに捕集された残渣サンプルについて、1 サンプル当たり 10 万~30 万リードの塩基配列を取得した。QIIME2 を用いた塩基配列のクラスタリングより、プランクトンは約 1,100 OTU、細菌は約 930 OTU に分類され、それぞれの OTU をデータベースと照合した結果、近縁な種がプランクトンで 107 種類、細菌・古細菌で 360 属が同定された。同定されなかった OTU は、本研究で増幅した遺伝子領域では候補となる種が複数種あり種レベルでは分離できず、その上位階級

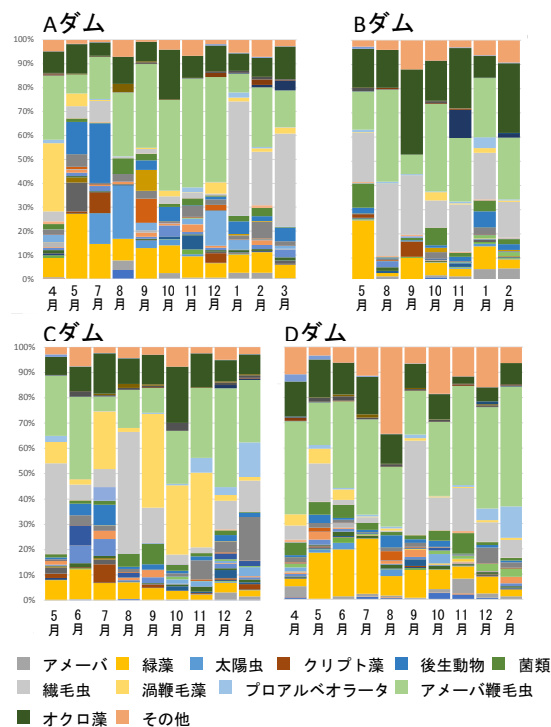


図 1 各ダム貯水池において検出されたプランクトン (門レベル)

(門、綱、目、科、属) で分離が留まった可能性と既存のデータベースに含まれてない未知の遺伝子配列を持つ新種の可能性が考えられる。一方、河川水辺の国勢調査では、同ダム貯水池において約 30~70 種のプランクトンが同定されており、次世代シーケンサーを用いて得られた結果は河川水辺の国勢調査で同定されたプランクトンをほぼ網羅していた。

3.2 プランクトン

各ダム貯水池におけるプランクトンの検出結果 (門レベル) を図 1 に示す。優占種はダム貯水池によって異なっており、年間を通じて優占種がシフトしていた。A ダムでは、優占種が渦鞭毛藻 (主に *Scrippsiella* sp. が検出)、緑藻 (*Mychonastes* sp.)、後生動物、太陽虫、アメーバ繊毛虫 (*Heteromita* sp.)、繊毛虫 (*Hypotrichia* sp.) と次々とシフトした。B ダムは、主に緑藻 (*Chlamydomonas* sp.)、繊毛虫 (*Anteholosticha* sp.)、アメーバ繊毛虫 (*Heteromita* sp.)、オクロ植物 (*Dinobryon* sp.) から構成されていた。特に、オクロ植物が他ダム貯水池に比べ多く検出される傾向にあった。また、菌類は、10%前後ではあるが、比較的多く検出された (主に *Cryptomycota*, *Kappamycetaceae*)。C ダムは、優占種が繊毛虫 (*Cryptocaryon* sp.)、渦鞭毛藻 (*Ceratium* sp., *Thoracosphaeraceae*)、アメーバ繊毛虫 (未分離種) と

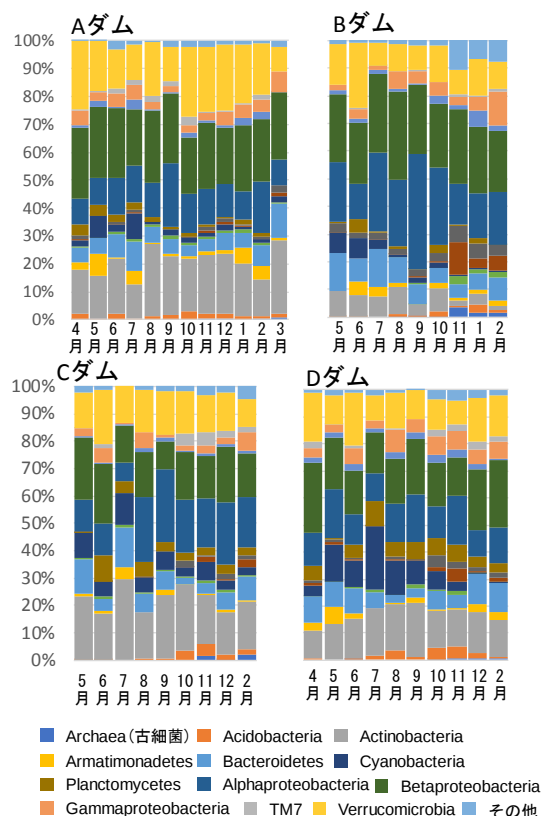


図2 各ダム貯水池において検出された細菌・古細菌 (門レベル(Proteobacteriaは綱レベル))

月によって変遷していた。D ダムは、優占種がアメーバ絨毛虫 (未分離種)、緑藻 (*Mychonastes* sp.)、絨毛虫 (*Frontonidae* sp.) などが優占していた。また、8 月は「その他」に含まれる *Discostella* 属 (ホシノタイコケイソウ属) が約 10% 検出された。属・種レベルでみると、どのダム貯水池においても一年を通じて継続的に検出されたものではなく、検出されるプランクトン種は水質の状態等に変動して大きく異なることが示唆された。

3.3 細菌

各ダム貯水池における細菌・古細菌の検出結果 (門レベル (Proteobacteria に関しては綱レベルで表示)) を図 2 に示す。門レベルの分類では、どのダム貯水池から も Actinobacteria、Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Verrucomicrobia が多く検出された。また、D ダムでは Cyanobacteria 門が多く検出されていたことが特徴的であった。A ダム、C ダム、D ダムで多く検出された Actinobacteria は標高の高い淡水域で比較的良好に検出される未分離の ACK-M1 属や C111 属

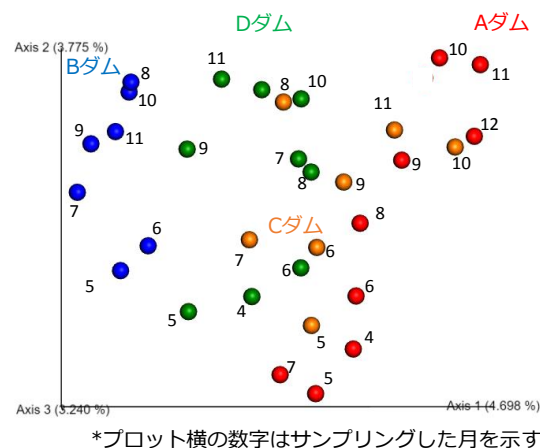


図 3 各ダム貯水池から検出された細菌構成の類似度比較 (各サンプルの細菌構成の類似度は各プロット間のユークリッド距離で示される。)

であった。Actinobacteria 門 Actinomycetales 目は「放線菌」と認識されることが多いが、Actinomycetales 目は 42 科約 200 属で構成されており、様々な種が存在している。ダム管理において、カビ臭が確認された場合において、一般的なカビ臭産生菌である *Anabaena* sp.、*Aphanizomenon* sp.、*Oscillatoria* sp.、*Phormidium* sp. 等が検出されなかった場合、放線菌が原因種とされることが多いが、ACK-M1 属や C111 属がカビ臭を産生するかは不明である。今後、より詳細に生理生態を調査すべき細菌であると考えられる。Alphaproteobacteria では、紅色非硫黄細菌である *Rhodobacter* sp.、環境中に広く分布する *Sphingobium* sp. が比較的多く検出された。Betaproteobacteria では、Burkholderiales 目に属す *Limnohabitans* sp. が多数検出された。*Limnohabitans* sp. は淡水の湖沼、ダム貯水池、河川から検出される細菌である。Verrucomicrobia では好気性で非運動性の細菌である *Luteolibacter* sp. やそれに近縁な未分離の種が頻繁に検出された。また、D ダムにおいては、Cyanobacteria が夏季に比較的多く検出された。Cyanobacteria については、3.3 で詳細に記述する。各ダム貯水池において検出された細菌の種類は図 2 に示したよう門レベルで比較すると一見大きな差がないように思えるが、属レベルの構成データを用い UniFrac distance を計算し、主座標分析を行うと、図 3 に示すように、各プロットは、ダム貯水池ごとにまとまってプロットされ、それぞれのダム貯水池に由来した特徴的な構成を示していることが示唆された。また、細菌構成は、年間を通じて一定ではなく、徐々に推移

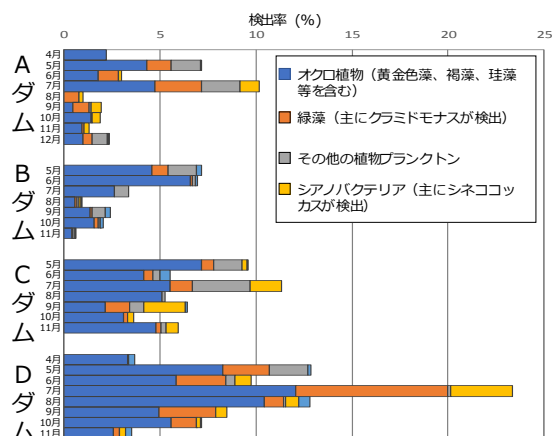


図 4 各ダム貯水池から検出された Cyanobacteria の内訳

していることがわかる。すなわち、各ダム貯水池の細菌構成は、地理的要因および水温の影響等の季節的要因を受け変化していくことが示唆された。

3.4 Cyanobacteria (シアノバクテリア；藍藻)

各ダム貯水池から検出されたデータベース上 Cyanobacteria と区別されるものの内訳を詳しくみると、分類された Cyanobacteria のうち、実際の Cyanobacteria の DNA は 0~30%ほどに過ぎず、残りは、植物プランクトンの葉緑体 DNA 由来であった(図 4)。真核生物である植物プランクトンは 18S rRNA 遺伝子を含む染色体 DNA の他に、葉緑体の中に 16S rRNA 遺伝子を含む葉緑体 DNA を持っているため、細菌をターゲットとするプライマーで増幅され、細菌の解析に混ざって検出された。葉緑体 DNA は塩基配列が Cyanobacteria と類似しているため、データベース上では Cyanobacteria として検出される。データベース上でも目 (order) 以下の分類では、緑藻やオクロ植物由来の葉緑体と区別されているが、同定精度に不明な点も多いため注意が必要である。その他、検出された Cyanobacteria は主に *Synechococcus* sp. で、アオコやカビ臭の原因となる *Microcystis* sp. や *Anabaena* sp. はほとんど検出されなかった。*Synechococcus* sp. は光学顕微鏡では同定されないため、これまでダム貯水池で注目されることはあまりなかったが、相当数存在していることが明らかになった。実際、D ダムは富栄養化が進行しているダム貯水池であり、Cyanobacteria の検出率が他のダム貯水池よりも高かったため、富栄養化もしくはアオコ発生の指標となる可能性が考えられ、今後、引き続き、詳細な検討をする予定である。

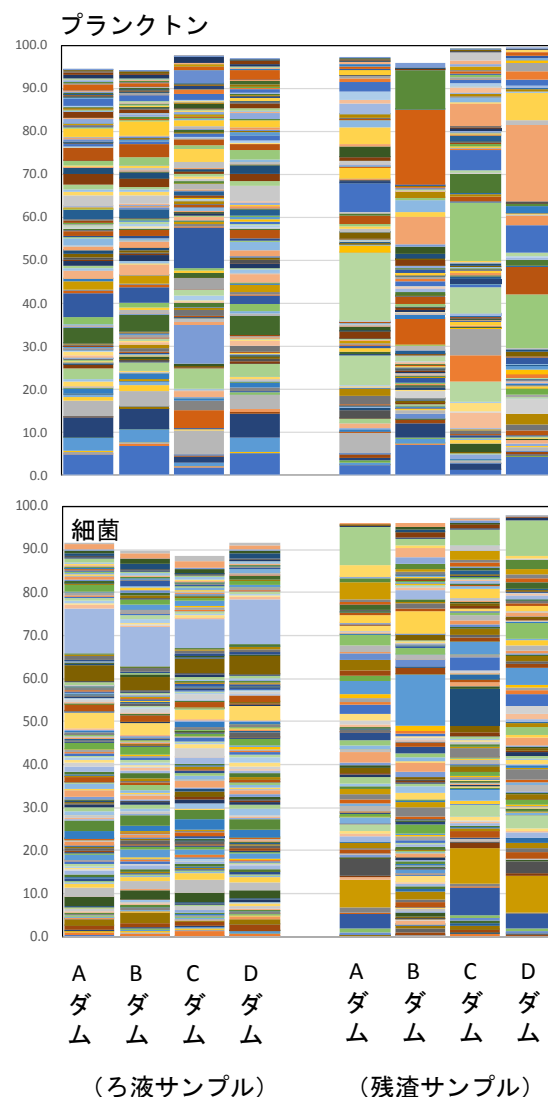


図 5 ろ液沈殿物とろ紙残渣から抽出した DNA の比較(それぞれのバーは検出された OTU に相当する)

3.5 ろ液に含まれるプランクトン・細菌

DNA 抽出の前処理として、サンプルをろ過する際、ろ液に含まれる DNA について調査を行った。図 5 は、ろ液に含まれる DNA とろ紙上に残った残渣に含まれる DNA から検出されたプランクトン種および細菌種について示している。その結果、ろ紙上の残渣由来の DNA サンプルでは、ダム貯水池毎に検出されたプランクトン種・細菌種の種類、検出率は大きく異なっていたのに対し、ろ液から抽出した DNA には、ダム貯水池に関わらずほぼ同様のプランクトンおよび細菌がほぼ同程度の割合で検出された。細菌は通常 1.0-10 μm ほどの大きさのため、0.2 μm のフィルターを通過

することはないと考えられるが、圧力がかかった状態では、比較的サイズの小さい細菌がフィルターを通過することが知られている。近年、浄水場においてピコプランクトン（細胞径が $0.2\text{--}2\ \mu\text{m}$ のプランクトン）による濁度障害が問題となっている⁵⁾が、今後、サイズの異なるフィルターを複数組み合わせ、プランクトンサイズの分画を行うことにより、光学顕微鏡では同定が困難なピコプランクトンの同定およびデータベース上でのスクリーニングが可能となると考えられる。ピコプランクトンが引き起こす濁度障害の潜在的なポテンシャルを指標化することができれば、ダム貯水池を管理する上で、次世代シーケンサーの適用は強力なツールとなると考えている。

4. まとめ

本研究では大規模 DNA 塩基配列解析装置である次世代シーケンサーを用い、ダム貯水池におけるプランクトンおよび細菌を含む微生物解析を試みた。その結果、光学顕微鏡を用いた藻類モニタリングの結果を網羅しつつ、それ以上の種を同定することが可能であった。今後は、アオコ、カビ臭、ピコプランクトン等の問題が発生しているダム貯水池を対象にモニタリングを行い、水質と検出されるプランクトン・細菌構成

の両面から評価するとともに、次世代シーケンサーで得られた結果に、どの程度、死細胞が含まれているか着目し研究することが重要であると考えている。

参考文献

- 1) ダム貯水池水質改善の手引き、国交省、2018 年 3 月
- 2) 河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル【ダム湖版】、国交省、2016 年 1 月
- 3) Stoeck T., Bass D., Nebel M., Christen R., Jones M. D., Breiner H. W., Richards T. A. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, **19**, 21–31.
- 4) Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, **9** (8) : e105592
- 5) 今本博臣、遠本和也、一柳淳一、古里 栄一 (2012) ダム貯水池におけるピコプランクトン実態調査-曝気循環による抑制効果- ダム工学、**22** (4)、244-254.

底層環境に着目した停滞性水域の水環境管理技術に関する研究（藻類増殖に関与する水質項目の影響評価）

研究予算：運営交付金

研究期間：平 28～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、對馬育夫、村田里美、服部啓太

【要旨】

日本の多くのダム湖や湖沼でアオコの発生が確認されており、近年の研究では窒素・リンの栄養塩類に加えて Fe や Mn などの微量金属もアオコ発生に寄与することが報告されている。本研究では、アオコ発生の主要な原因藻類と考えられる *M. aeruginosa* を用いて微量金属が藻類の生長におよぼす影響を検討した。微量金属は MA 培地に含まれる 5 種類の金属 (Fe、Mn、Zn、Co、Mo) を対象とし、これらの金属をダム湖水に添加した 32 種の培地を用いて生長試験を行った。4 つのダム湖水と MilliQ 水を用いて生長試験を行った結果、*M. aeruginosa* の生長に対して Fe が第一制限物質となること、Mn と Co が *M. aeruginosa* の第二制限物質となることが示唆された。一方、Zn を含む培地では含まない培地に比べ *M. aeruginosa* の生長が阻害される傾向がみられた。これらの結果より、アオコの発生には Fe や Mn、Co などの微量金属が関与している可能性が示唆された。

キーワード：湖沼・ダム湖、アオコ、*M. aeruginosa*、微量金属、藻類生長試験

1. はじめに

日本の多くのダム湖や湖沼において富栄養化が確認され、アオコや淡水赤潮などの植物プランクトンの異常増殖が全国の水域で発生している¹⁾。植物プランクトンの生長は窒素やリンなどの栄養塩の不足によって制限を受けると考えられているが、近年の研究では窒素・リン以外に鉄 (Fe) やモリブデン (Mo) などの微量金属も生長に必須な物質であることが示唆されている²⁾。ゆえに、窒素やリンに加え、Fe などの微量金属も湖沼やダム貯水池におけるアオコ発生を左右する重要な要因であることが考えられる。

これまでの検討においては、マンガン (Mn) は *Microcystis aeruginosa* (以下 *M. aeruginosa*) に対する生長促進効果を持つことが明らかにされた³⁾。

そこで本年度は *M. aeruginosa* の飼育・継代に使用される MA 培地中 (表-1) に含まれる 5 種の金属 (Fe、Mn、亜鉛 (Zn)、コバルト (Co)、Mo) に着目した。これらの金属が *M. aeruginosa* の生長に対する影響を明らかにすることを目的とし、ダム湖水に金属を添加した培地を用いて *M. aeruginosa* の生長試験を行った。

2. 実験方法

2.1 使用したダム湖水と培地の作成方法

本実験では、既往研究²⁾で対象とした北海道の 4 つのダムからダム湖水を採取し (2018 年 9 月採水) 生長試験に供した。4 つのダム湖水に加えて、対象区は水道水を超純水製造装置 (Merck 製) により精製した超純水 (以下で MilliQ 水と称す) を供した。それぞれのダム湖水は 5 種金属 (Fe、Mn、Zn、Co、Mo) を測定した。金属分析では硝酸を用いた前処理操作を行い、

表-1 MA 培地成分表

MA 培地成分一覧 (mg/L)			
栄養塩類成分 (No Metal 培地成分)		金属成分	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	50	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.5
KNO ₃	100	MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.0
NaNO ₃	50	ZnCl ₂	0.5
Na ₂ SO ₄	40	CoCl ₂ · 6H ₂ O	5.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	50	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.8
β-Na ₂ glycerophosphor · 5H ₂ O	100		
Bicine	500		
H ₃ BO ₃	20		
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5.0		

表-2 培地の金属パターン

	金属種数																											
	0	1				2								3								4				5		
Fe		○					○	○						○	○			○	○	○	○		○		○	○	○	○
Mn			○				○		○	○					○	○		○	○			○	○	○	○	○	○	○
Zn				○				○	○		○	○				○	○	○		○	○			○	○	○	○	○
Co					○					○	○		○	○			○	○	○	○		○	○		○	○	○	○
Mo						○					○	○		○	○			○	○	○	○		○	○		○	○	○

測定は ICP-MS (X7CCT、Thermo Fisher Scientific 製) を用いた。

培地の作成においては、ダム湖水または *MilliQ* 水に MA 培地の栄養塩類成分を添加したものを No Metal 培地とした。No Metal 培地を基に各金属成分を一種類ずつ添加し、表-1 に示す濃度に調整した。1 つのダム湖水につき 32 パターン (表-2) の金属を含む培地を作成し、作成した培地は 0.22 μm ポアサイズのメンブレンフィルターにより濾過滅菌を行い、生長試験に用いた。

2.2 藻類生長試験

生長試験に供した藻類株は、国立環境研究所 NIES Collection より分譲された *M. aeruginosa* (NIES-87 株) を使用し、継代培養には MA 培地を用いた。

生長試験では多数の培地の検討を簡易に可能とするために、96 穴のマイクロプレート上で *M. aeruginosa* を培養し生長試験を行った³⁾。生長試験では各培地 200 μL と約 2.2×10^6 cells/mL に濃度調整した藻類細胞懸濁液 20 μL をウェルに添加し、温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光強度 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 連続照射の条件下で培養した。*M. aeruginosa* の生長の定量には、波長 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (CHROMATE 製) で測定し、生長の指標とした。予備試験の結果より、試験開始から 8 日目で吸光度の増加が収束する傾向が見られたため、生長の傾向が明確に表れる 3、5、7 日目に吸光度の測定を行った。培地は一つのパターンに対して 5 ウェルを用いて培養を行い、以下では測定した吸光度は平均値 ($n=5$) で評価した。CV は 10%程度であったため統計的な評価は本研究では行わなかった。

また、生長試験におけるプレート間の誤差を補正するため、各プレートに金属 5 種を含む培地に *M. aeruginosa* を添加した系 (Control) と金属 5 種を含む培地に *M. aeruginosa* を添加していない系 (Blank) を加え、生長試験を行った。それらの吸光度を用いて次

表-3 ダム湖水の金属濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

	Mn	Fe	Co	Zn	Mo
A ダム	1.11	DL	DL	DL	0.76
B ダム	DL	8.16	DL	DL	0.69
C ダム	DL	DL	DL	DL	0.78
D ダム	DL	DL	DL	DL	0.75

※DL：測定限界 (各 DL の値は Mn:0.27、Fe:7.1、Co:0.16、Zn:2.0)

の式に示す生長指数により、各培地の生長を評価した。

$$\text{生長指数} = \frac{\text{Sample吸光度}_{450\text{nm}} - \text{Blank吸光度}_{450\text{nm}}}{\text{Control吸光度}_{450\text{nm}} - \text{Blank吸光度}_{450\text{nm}}}$$

3. 結果と考察

ダム湖水の金属分析の結果を表-3 に示す。4 つのダム湖水の金属濃度は低く、今回測定対象とした 5 種の金属はほとんどが測定限界値以下であった。

生長の傾向が明確に表れた 7 日目の生長指数を図-1 に示す。4 つのダム湖水と *MilliQ* 水すべてにおいて、Fe を含まない培地では、7 日目の生長指数が 0.1 以下と *M. aeruginosa* の生長が制限された。この結果より、本実験系では *M. aeruginosa* の生長に対して Fe が第一制限物質となることが示唆された。Fe を含む培地を比較した場合、Mn と Co をどちらも含まない培地では生長指数がすべて 0.4 以下であった。一方、Mn と Co の両方を含む培地では、すべての培地で生長指数が 0.8 以上となり、Control と同程度の値を示した。これらの結果から、*M. aeruginosa* の生長に対して Mn と Co が第二制限物質となることが示唆された。Mn の効果は我々の既往研究と同様の結果が得られた³⁾。また、Co は *Anabaena* の生長に対して制限物質となることも報告されている⁴⁾。*M. aeruginosa* も Co により生長が促進される効果があると考えられる。

また、Fe と Fe+Zn や Fe+Co と Fe+Co+Zn などの Zn を含まない培地と Zn を含む培地を比較した場合、Zn

は見られなかった。いずれのダム湖水も金属濃度は低く、成長に影響を与える微量金属はいずれも不足していたため、明確な違いは現れなかったと考えられる。

4. まとめ

本研究ではダム湖水を基に5種の微量金属を添加した32種類の培地を用いて *M. aeruginosa* の生長試験を行い、微量金属が *M. aeruginosa* の生長に与える影響を調べた。実験の結果から以下の結果が得られた。

- ・Fe、Mn、Co は *M. aeruginosa* の生長に対して制限物質となることが示唆された。

- ・Zn は *M. aeruginosa* の生長を阻害する効果があることが示唆された。

本実験では微量金属の濃度による生長への影響の変化は考慮できなかった。今後は影響を持つ金属の濃度を変化させた藻類生長試験を行う予定である。

参考文献

- 1) 藤本尚志、福島武彦、稲森悠平、須藤隆一：全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子

との関係、水環境学会誌、18 巻 11 号、pp.901-908、1995

- 2) 中島進、八木正一：Oscilla teunis の増殖と 2-メチルイソボルネオール の産生に及ぼす微量金属の影響、日本水処理生物学会誌、Vol.26、No.2、pp.44-55、1995
- 3) 土木研究所：平成 28 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料、No.4370、pp.90-95、2018
- 4) 山下尚之、福永彩、田中宏明：緑藻類、珪藻類および藍藻類を供試藻類としたマイクロプレートを用いる AGP 試験の検討と河川水および下水処理水の水質評価、環境科学会誌 30(4)、pp.250-260、2017
- 5) 南條吉之、永美敏正、若林健二、道上隆文、森明寛、奥田益算：湖山池でアオコを形成する増殖試験結果について、鳥取県衛生環境研究所報、第 43 号、pp.45-48、2004
- 6) Haiming Wu, Li Lin, Guangzhu Shen, Ming Li : Heavy-metal pollution alters dissolved organic matter released by bloom-forming *Microcystis aeruginosa*, RSC adv, 7, pp.18421-18428, 2017

気候変動による停滞性水域の熱・物質循環と水質環境への影響評価と適応策に関する研究（気候変動にともなう流域からダム貯水池・湖沼に流入する土砂量・栄養塩負荷量の変化の把握、ダム貯水池・湖沼の水質予測手法の構築と水質への影響評価、適応策の検討）

研究予算：運営交付金

研究期間：平 28～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、對馬育夫、服部啓太

担当チーム：水理チーム

研究担当者：石神孝之、宮川仁、中西哲

【要旨】

本研究では、気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える影響についての将来的な予測に取り組んでいる。今年度は、仮想ダム貯水池における気候変動による前提条件の変化が水質に与える影響および将来予測等について検討し、富栄養化および底層貧酸素化の適応策に関する検討を行うとともに、現地データを基にしたアオコ発生予測モデルの構築を試みた。ダム貯水池における気候変動の適応策を検討した場合、表層放流が富栄養化対策として有効であること、異高同時取水が底層貧酸素化に有効であることを示した。またアオコ発生予測モデルはアオコレベルの算出には一定の精度が得られることを示した。

キーワード：地球温暖化、湖沼、貯水池、水質変動予測モデル、水質保全

1. はじめに

地球温暖化が水環境に与える影響は徐々に顕在化しており、現在における全ての温室効果ガス排出とその他の強制力因子は、今後数十年にわたる気候変動の速度及び程度に影響を及ぼすと報告されている¹⁾。そのため、温暖化影響の緩和策とともに適応策の検討が重要であり、精度の高い影響予測に基づく適応策の評価と、その実施に向けた取組が必要となっている。平成 27 年 11 月、「気候変動の影響への適応計画²⁾」が閣議決定され、これに伴い、国土交通省が「国土交通省気候変動適応計画³⁾」を公表し、実施予定の適応策について整理した。気候変動による地球温暖化が生じる場合、気温上昇に伴う表層水温の上昇、湖沼の温度分布の変化、生物反応や物理化学反応速度の変化、降雨量や降雨パターンの変化に伴う湖沼流入負荷量や水量の変化が予想されるが、気候変動に伴う湖沼の水質変化を定量的に示した研究は少ない。

これらを踏まえて本研究は、流域から湖沼に流入する栄養塩、SS などの負荷量算出の高度化、貯水池内流動モデルの高度化、簡略化および気候変動によるダム貯水池水質問題に対応する適用策について検討を行う。

これまでは、東北地方に位置する御所ダムにおける気候変動による気温・降水量の変化がダム貯水池の水質・濁質に与える影響について検討するとともに、ダム湖に流入する SS 等の推定の高度化について検討を行った。今年度は、仮想ダム貯水池における気候変動による前提条件の変化が水質に与える影響および将来予測等について検討し、富栄養化および底層貧酸素化の適応策に関する検討を行うとともに、現地データを基にしたアオコ発生予測モデルの構築を試みた。

2. 貯水池規模を変化させた仮想貯水池による水質計算 2.1 貯水池規模・形状を変化させた感度分析

貯水池の規模を変化させた仮想貯水池 5 ケース（Case 0: 0.53 億 m³（回転率：23 回/年）、Case 1-1: 0.8 億 m³（15 回/年）、Case 1-2: 1.2 億 m³（10 回/年）、Case 1-3: 2.4 億 m³（5 回/年）、Case 1-4: 6.0 億 m³（2 回/年））を作成し、昨年度検討を行った御所ダムでの検討に使用した 1993-1997 年の流入条件を用い、5 年間の水質計算を行った。なお、Case 0 をベースとし、縦断距離を 8 km 程度、横断幅を上流で 100 m、下流で 700 m、水深を約 25 m とし、他の Case では、相似的に形状を調整した。また、貯水池の形状を変化させた仮想貯水

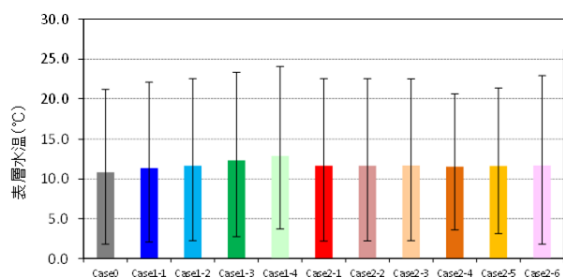


図1 表層および下層の水温 5ヶ年平均値・月最大値・月最小値

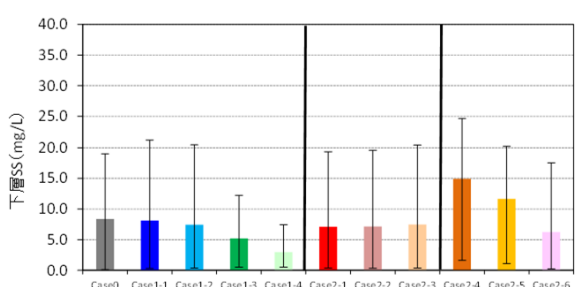
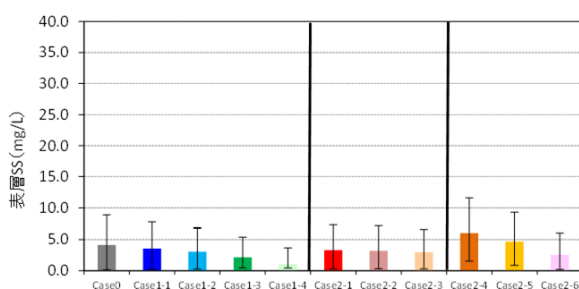
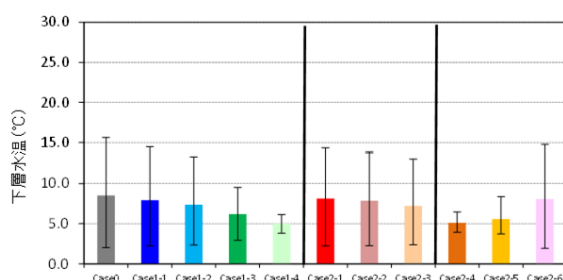


図2 表層および放流水の SS 濃度 5ヶ年平均値・月最大値・月最小値

池 6 ケース (Case 1-2 を基準として、Case2-1：縦横比 50、Case2-2：縦横比 25、Case2-3：縦横比 5、Case2-4：最大水深 125 m、Case2-5：最大水深 75 m、Case2-6：最大水深 25 m) を作成し、計算を実施した。

その結果、貯水容量が増加すると、表層水温が増加する傾向が確認された (図 1)。特に最も回転率の小さい Case1-4 (回転率 2 回/年) では、7 月以降の表層水温が 2°C~3°C ほど高くなる傾向がみられた。下層の水

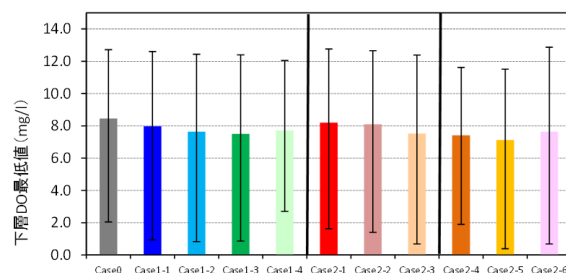


図3 下層 DO の最低値の 5ヶ年平均値・月最大値・月最小値

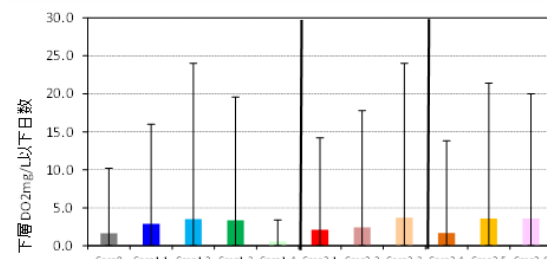


図4 貯水池下層 DO2 mg/L 以下日数の 5ヶ年平均値・月別最大値・月別最小値

温に着目すると、貯水容量を増加させた場合に、水温上昇の感度が鈍くなる傾向が確認された。特に最も回転率の低い Case1-4 (回転率 2 回/年) では、成層期となる 4 月~11 月において、水温変化がほとんど生じていなかった。貯水池の縦横比を変化させたケース (Case 2-1 ~ 2-3) では、表層の水温に大きな変化はなかったが、下層の水温に関しては、縦横比が小さくなるにつれて若干低下する傾向がみられた。貯水池の鉛直・縦断方向を変化させたケース (Case 2-4 ~ 2-6) では、表層の水温に関して、大きな変動はなかったが、下層の水温は、最大水深が浅いほど、上昇した。

図 2 に表層および放流水の SS の 5ヶ年平均値・月最大値・月最小値を示す。貯水池規模が大きくなるにつれ、表層および放流水の SS 濃度が低下した。これは、貯水池規模の増加に伴い、洪水前の清水の量が相対的に増えていることや、ダム地点に到達する前に濁質が沈降しダム地点に到達する SS 量が減少し、放流水 SS も低下したと考えられる。

図 3 に下層 DO の最低値の 5ヶ年平均値・月最大値・月最小値を、図 4 に下層 DO が 2 mg/L 以下となる日数を示す。貯水池規模の増大に伴い、年回転率が 5 回となる Case 1-3 までは下層 DO はわずかに減少した。下層 DO が 2 mg/L 以下となる日数は、回転率 10 回/年 (1.2 億 m³、Case1-2) までは増加するが、それ以下の回転率になると低下した。これは、鉛直混合が生じる時期のずれ込みと下層の容量増加との関係で変化し

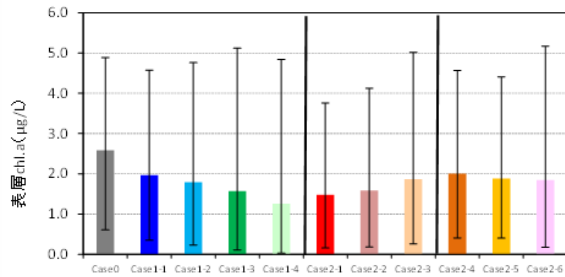


図5 貯水池表層 Chl-a の5ヶ年平均値・年最大値・年最小値

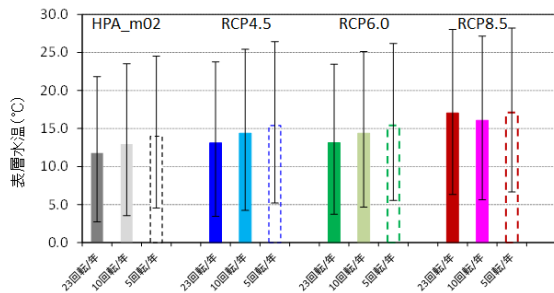


図6 表層水温の年平均値・月平均最小値・月平均最大値

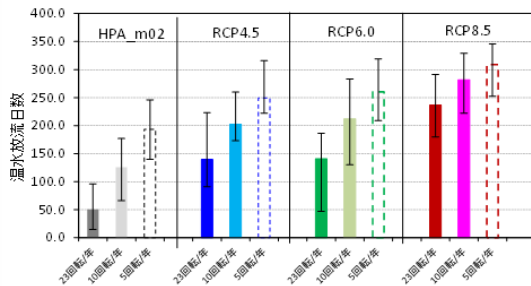


図7 温水放流日数の年平均値・月平均最小値・月平均最大値

ているものと推察される。貯水池の縦横比を変化させたケース（Case 2-1～2-3）では、縦横比が小さくなるにつれ、下層 DO が減少し、下層 DO が 2 mg/L 以下となる日数も増加した。これは、縦断距離の変化に伴う流速変化により、下層の滞留性が変化したことによるものと推察される。貯水池の鉛直・縦断方向を変化させたケース（Case 2-4～2-6）では、最大水深が 125m と最も深い Case 2-4 で下層 DO が高かった。下層で水温が一定となる層が増えたことで、混合し得る容量が増加したためと考えられる。

図5に貯水池表層 Chl-a の5ヶ年平均値・年最大値・年最小値の結果を示す。貯水池規模を変化させたケース（Case 1-1～1-4）では、貯水池規模が大きくなると、表層 Chl-a が減少した。これは、表層水温の上昇や流

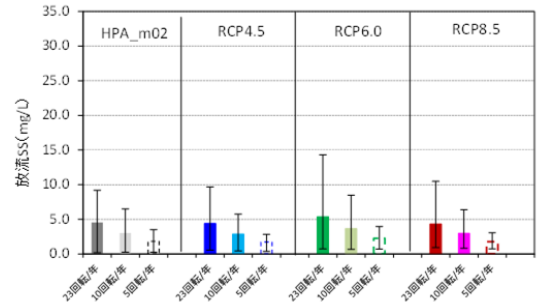


図8 放流水 SS の年平均値・月平均最小値・月平均最大値

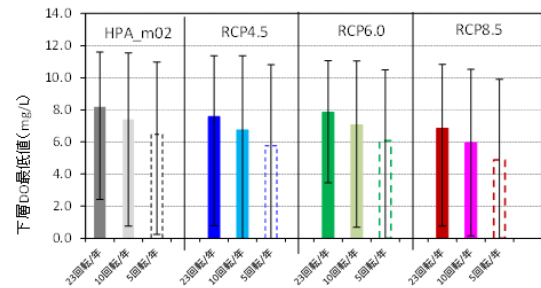


図9 貯水池下層 DO の最低値の年平均値・年最小値・年最大値

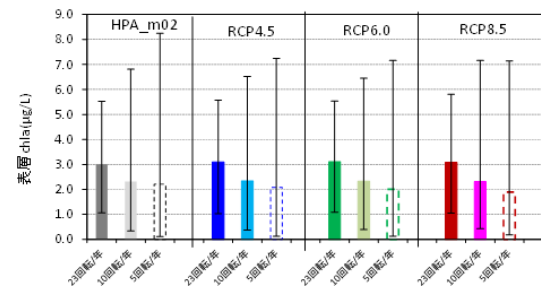


図10 貯水池表層 Chl-a の年平均値・月平均最小値・月平均最大値

入河川水の希釈等のバランスで、現行条件において植物プランクトンが増殖しにくい状況になっていた可能性が考えられる。一方、最大値に着目すると、増加しているケースもあり、滞留性や表層水温、栄養塩の供給状況によって変化している可能性が考えられた。

2. 2 仮想貯水池による将来予測計算

貯水池規模を変化させた場合の将来予測計算を実施した。用いた気候変動シナリオは、現在気候（HPA_m02）1 ケース、将来気候を RCP_4.5_c1、RCP_6.0_c1、RCP_8.5_c1 の3 ケースとした。また、貯水池規模は Case0 (0.53 億 m³ (23 回/年))、Case 1-2 (1.2 億 m³ (10 回/年))、Case 1-3 (2.4 億 m³ (5 回/年)) の3 ケースとした。

図6に貯水池表層水温の年平均値・月平均最小値・

月平均最大値を示す。その結果、気温の上昇が大きい RCP8.5 シナリオで最も大きく、回転率の違いに大きな変化はなかった。

図 7 に温水放流日数の計算結果を示す。温水放流日数は、回転率が大きく影響していた。これは、貯水池規模が大きいほど滞留性が高く、水温が上昇しやすい条件だったためと考えられる。

図 8 に放流水の SS の計算値を示す。その結果、出水頻度の多く、規模の大きい出水がある RCP6.0 シナリオで SS の辺平均値及び月平均最大値は高かった。また、気候変動シナリオの変化よりも、回転率の変化の方が計算結果に及ぼす影響がより大きかった。

図 9 に貯水池下層 DO の計算結果を示す。下層 DO 濃度は、回転率が小さく、気温上昇が大きいシナリオほど低下した。また、本計算においては、回転率と気候変動シナリオによる影響度は同程度であった。比較的流況がよく、出水頻度の高い RCP6.0 シナリオでは、貯水池規模によらず現在気候と同程度の濃度だった。

図 10 に貯水池表層 Chl-a の計算結果を示す。貯水池表層 Chl-a 濃度は、各気候変動シナリオで大きな変化はなく、気候変動の変化に伴う感度が小さかった。

3. 流入負荷レベル・パラメータを変化させた場合の水質変化試算

3.1 富栄養化に関する流入負荷レベル・パラメータを変化させた水質変化試算

境界条件で使用する T-P 濃度を 0.005、0.010、0.015、0.025、0.050 mg/L の 5 段階の濃度（負荷量）レベルを設定して感度分析を行った。分析ケースを表 1 に示す。貯水池規模を 0.53 億 m³（回転率 25 回/年）、1.2 億 m³（回転率 10 回/年）、2.4 億 m³（回転率 5 回/年）の 3 パターンを設定した。なお、N/P 比は固定して、N、P の負荷量を等倍することで条件を作成した。

図 11 に Chl-a の階級別発生日数を示す。貯水池規模 0.53 億 m³（回転率 23 回/年）の Case4-1～4-5 より貯水池規模 1.2 億 m³（回転率 10 回/年）の Case4-6～4-10 や 2.4 億 m³（回転率 5 回/年）の Case4-11～4-15 の方が Chl-a 濃度が高濃度になる日数が多く、長期的に植物プランクトンが存在していた。また、流入する T-P 平均濃度が上昇すると、Chl-a 濃度が 25 µg/L を超過する日数が増加した。これらの結果を踏まえて、最も平均的なケースの条件（回転率 10 回/年、平均流入 T-P 濃度 0.015 mg/L）と最も富栄養化が進行するケースの条件（回転率 5 回/年、平均流入 T-P 濃度 0.050 mg/L）を設定し、2 ケースで将来予測計算を実施した。気候変

表 1 計算ケース

計算ケース	貯水池規模			平均 T-P 濃度 (mg/l)				
	0.53 億 m ³ (23 回/年)	1.2 億 m ³ (10 回/年)	2.4 億 m ³ (5 回/年)	0.005	0.010	0.015	0.025	0.050
Case4-1	●			●				
Case4-2	●				●			
Case4-3	●					●		
Case4-4	●						●	
Case4-5	●							●
Case4-6		●		●				
Case4-7		●			●			
Case4-8		●				●		
Case4-9		●					●	
Case4-10		●						●
Case4-11			●	●				
Case4-12			●		●			
Case4-13			●			●		
Case4-14			●				●	
Case4-15			●					●

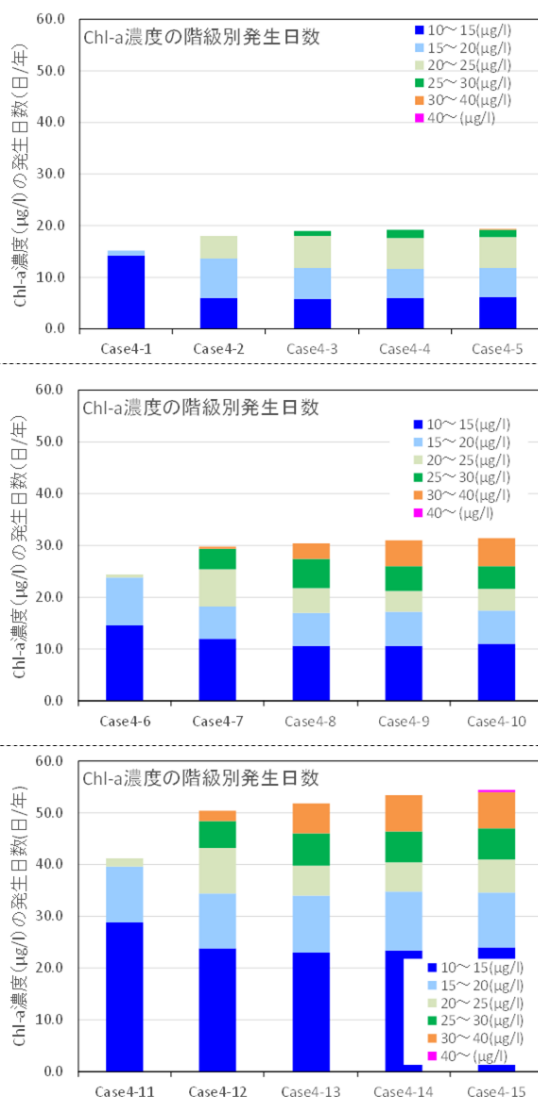


図 11 Chl-a 濃度の階級別発生日数

動シナリオは現在気候（HPA_m02）1 ケース、将来気候を RCP_4.5_c1、RCP_6.0_c1、RCP_8.5_c1 の 3 ケースとした。

図 12 に気候変動シナリオ毎の Chl-a 濃度の階級別

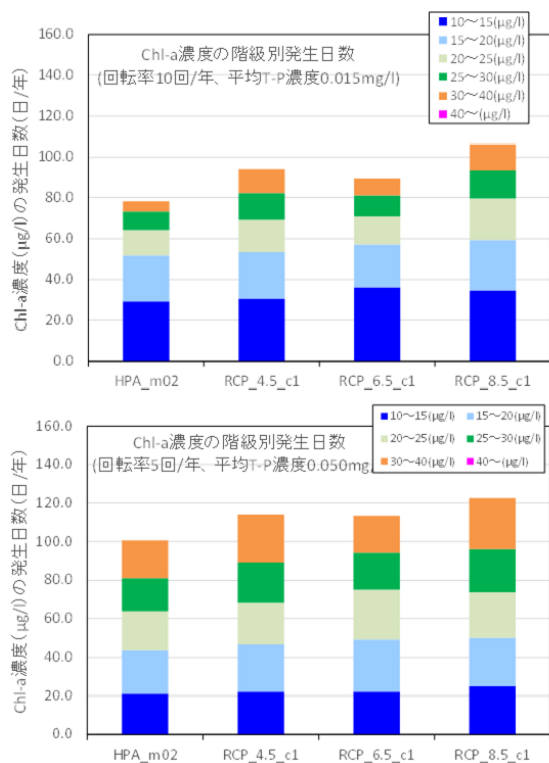


図 12 気候変動シナリオ毎の Chl-a 濃度の階級別発生日数

発生日数を示す。平均的な条件に対して気候変動が進行すると、富栄養化が進むことが確認された。特に、RCP8.5 では、富栄養化が進行したケースの現在気候並みに Chl-a 濃度が上昇している。富栄養化が進行した条件に対して気候変動が進行すると、さらに Chl-a 濃度が上昇し、超過日数も増加する傾向が見られた。

3.2 濁水長期化に関する流入負荷レベル・パラメータを変化させた水質変化試算

境界条件で使用する平均流入 SS 濃度を 0.005、0.010、0.015、0.025、0.050 mg/L の 5 段階の濃度（負荷量）レベルを設定して感度分析を行った。分析ケースを表 2 に示す。貯水池規模を 0.53 億 m³（回転率 25 回/年）、1.2 億 m³（回転率 10 回/年）、2.4 億 m³（回転率 5 回/年）の 3 パターンを設定した。

図 13 に SS 濃度の階級別発生日数を示す。各放流 SS は、概ね流入 SS 濃度が大きくなるにつれて、超過日数が多くなった。また、貯水池規模の変化よりも流入濃度の変化の影響の方が大きかった。放流 SS が 25 mg/L 以上となる日数は、回転率が高く、平均流入 SS 濃度が高いほど増加した。

上記の結果を踏まえて、最も平均的なケースの条件（回転率 10 回/年、平均流入 SS 濃度 15 mg/L）と濁水長期化が進行するケース（回転率 5 回/年、平均流入 SS

表 2 計算ケース

計算ケース	貯水池規模			平均SS濃度 (mg/l)				
	0.53億m ³ (23回/年)	1.2億m ³ (10回/年)	2.4億m ³ (5回/年)	5	10	15	20	30
Case5-1	●			●				
Case5-2	●				●			
Case5-3	●					●		
Case5-4	●						●	
Case5-5	●							●
Case5-6		●		●				
Case5-7		●			●			
Case5-8		●				●		
Case5-9		●					●	
Case5-10		●						●
Case5-11			●	●				
Case5-12			●		●			
Case5-13			●			●		
Case5-14			●				●	
Case5-15			●					●

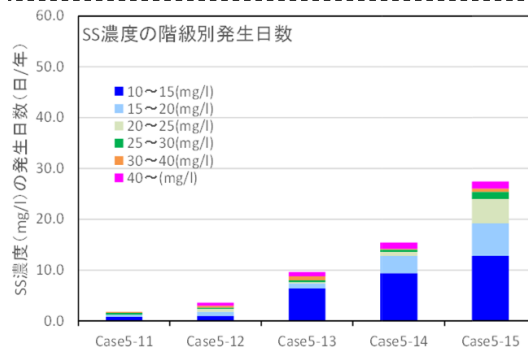
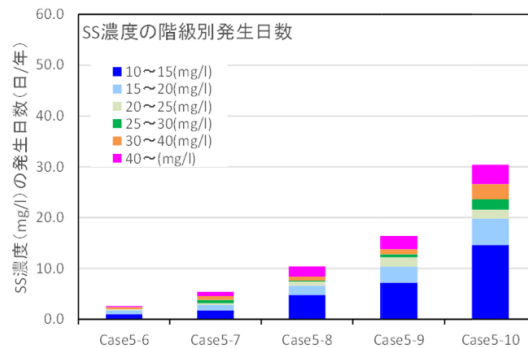
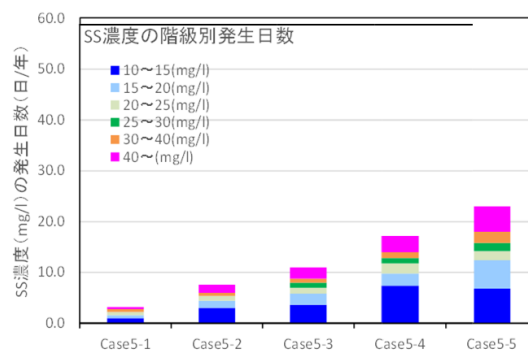


図 13 放流 SS 濃度の階級別発生日数

濃度 30 mg/L) の 2 ケースで将来予測計算を実施した。また、気候変動シナリオは現在気候 (HPA_m02) 1 ケース、将来気候を RCP_4.5_c1、RCP_6.0_c1、RCP_8.5_c1

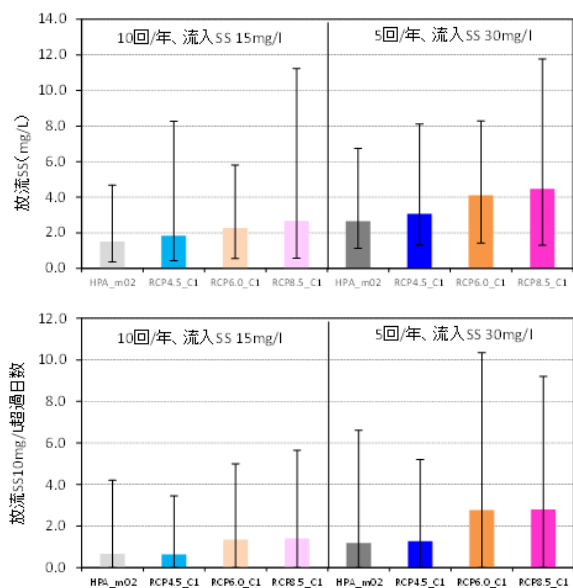


図 14 放流 SS 濃度の将来予測値および 10 mg/L 超過日数の年平均値・月平均最小値・月平均最大値

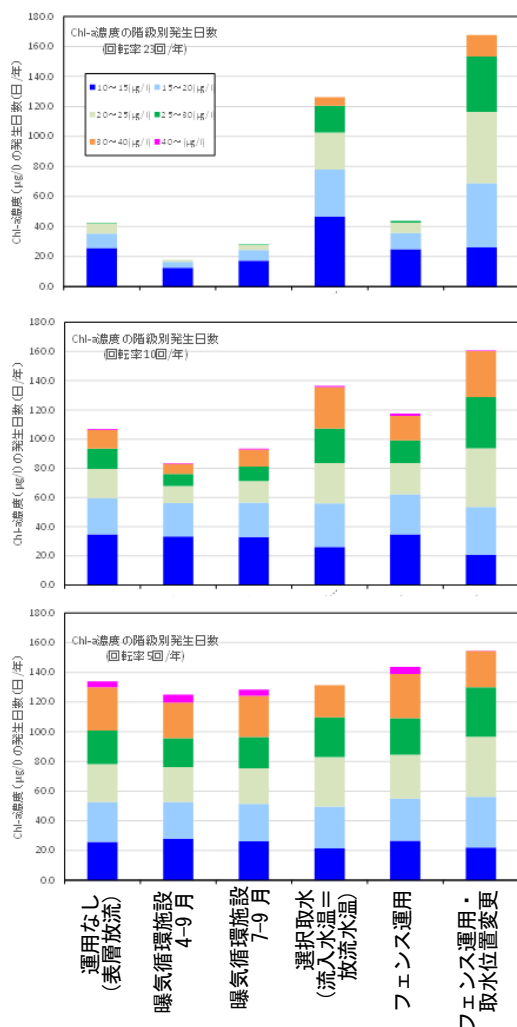


図 15 貯水池規模別の Chl-a の階級別発生日数

の 3 ケースとした。

図 14 に放流 SS 濃度の将来予測値および 10 mg/L 超過日数を示す。RCP6.0 および 8.5 シナリオで濁水長期化がより進行するような結果となった。RCP8.5 シナリオでは現在気候よりも 2 倍ほど長期化が進行した。

4. 適応策に関する水質変化試算

4.1 富栄養化対策に関する適応策の検討

富栄養化対策として一般に考えられる対策として、①曝気循環施設、②選択取水施設、③流入水制御フェンスが挙げられる。これらの対策については、既に水質保全対策として設置されているダムも多く存在し、気候変動による適応策として活用できる可能性がある。なお、今回の仮想貯水池の計算では、表層付近の条件変化が与える影響が大きいと考えられるため、深層曝気は対策から外した。また、その他の対策として、プロペラ式循環も考えられたが、詳細なメカニズムが把握されておらずモデル化が困難であることから今回の検討からは除外した。

図 15 に貯水池規模別の Chl-a の階級別発生日数を示す。曝気循環に関して、本計算では曝気施設を 5 基設置した場合の計算を実施した。その結果、貯水池規模が小さいほど、曝気効果が大きいことが確認された。Chl-a 濃度が 25 µg/L 以上となる日数に着目すると、回転率 23 回/年では半減し、回転率 10 回転では 2~3 割軽減していた。運用期間を 7~9 月に限定したケースでは、やや効果が薄れており、回転率 10 回/年以下では、Chl-a 濃度が 25 µg/L 以上となる日数に大きな変化は見られなかった。これは、6 月以前にも 25 µg/L を超過する日があり、夏季のみの運用では不十分であったと考えられる。選択取水施設に関して、放流水温=流入水温とした場合、いずれの貯水池規模でも Chl-a 濃度が 25 µg/L を超過する日数が増える傾向が見られた。また、回転率が 23 回/年のダム貯水池で、Chl-a 濃度が 25 µg/L を超過する日数が少なくなる傾向が見られた。よって、現行で放流水温=流入水温としている貯水池では、表層放流を行うことで表層の水温上昇、ならびに、Chl-a 濃度の上昇を抑制でき、気候変動の適応策として有効であると考えられた。流動フェンスに関して、フェンスを設置したことにより、いずれの貯水池規模でも Chl-a 濃度が 25 µg/L を超過日数が若干多くなる傾向が見られた。流動フェンスと選択取水を組み合わせたケースに関して、Chl-a 濃度が 25 µg/L 以上となる日数が他のケースと比べ大きかった。選択取水と同様に、現行操作で行っている表層取水の効果が大きいもの

と推察される。

関する結果をまとめる。

図 16 に本研究で検討した富栄養化対策の適応策に

	基本運用 (表層放流)	曝気循環	選択取水 (流入＝放流)	対策通用	流入水制御フェンス	流入水制御フェンス＋選択取水
概念図						
概要	・表層水を取り出すことで、温水の早期放流することや表層の滞留性を改善する効果が期待される。 (・一般的な選択取水運用との比較を行う。)	曝気により湖内に循環流を発生させることで、表層水温を低下させ、アオコ等の発生を抑制する。	・一般的に水温躍層が形成されている貯水池において冷水・温水放流や濁水の長期化を低減するために設置される。 ・基本操作(表層放流)の比較として実施		・フェンスによって栄養塩に富んだ流入水を深部に導入し、植物プランクトンへの栄養塩類の供給を抑制する。 ・放流は基本運用(表層放流)とする。	・フェンスによって栄養塩に富んだ流入水を深部に導入し、選択的にその層を取水することで貯水池表層部への栄養塩類の供給を抑制する。
施設諸元・運用	散気量：3700 L/min 導入基数：5基 設置水深：15 m 運用時期：ケース1 4月～9月 ケース2 7月～9月 (夏期限定)		・流入水温と同等の水温層の深度から取水	フェンス高：5m 設置位置：制限水位時の縦断距離2/3程度 選択取水位置：表層から5m	フェンス高：5m 設置位置：制限水位時の縦断距離2/3程度 選択取水位置：表層から5m	フェンス高：5m 設置位置：制限水位時の縦断距離2/3程度 選択取水位置：表層から5m
適応策の効果	【容量小】大 【容量中】中 【容量大】なし	【容量小】大 【容量中】中 【容量大】小	【容量小】(基準) 富栄養化の抑制困難 【容量中】(基準) " 【容量大】(基準) "	【容量小】ほとんどなし (一部あり) 【容量中】" 【容量大】"	【容量小】富栄養化の抑制困難 【容量中】" 【容量大】"	【容量小】富栄養化の抑制困難 【容量中】" 【容量大】"
経済性	IC：中 RC：小 (取水施設運用で対応可)	IC：中 RC：大 (初期コスト・ランニングコストが多くなる)	IC：大 RC：中 (選択取水を新設の場合、初期コスト大)	IC：小 RC：小 (フェンスの初期コストがかかる)	IC：大 RC：中 (フェンスの初期コストがかかる。選択取水の新設の場合、初期コスト大)	IC：大 RC：中 (フェンスの初期コストがかかる。選択取水の新設の場合、初期コスト大)
管理負担	運用日数：通年 (自動制御可)	運用日数：ケース1 約180日/年 ケース2 約90日/年	運用日数：通年 (自動制御可)	運用日数：通年 (特に設置後の対応はないが、水位低下時に取り外すなど場合によって対応あり)	運用日数：通年 (選択取水については自動制御可)	運用日数：通年 (選択取水については自動制御可)
下流河川への影響	【現在気候】温水放流日数が1.0-1.2倍 【将来気候】温水放流日数が1.6倍	【現在気候】温水放流日数が1.1倍 【将来気候】温水放流日数が1.6倍	【現在気候】温水放流が220～260日/年 【将来気候】温水放流が60～140日/年	【現在気候】温水放流日数が1.2倍 【将来気候】温水放流日数が1.6倍	【現在気候】温水放流日数が1.1-1.2倍 【将来気候】温水放流日数が1.1-1.6倍	【現在気候】温水放流日数が1.1-1.2倍 【将来気候】温水放流日数が1.1-1.6倍
適応策としての評価	○ (下流への温水放流が増加するものの、小～中規模貯水池への適用性が高い。経済面・管理面の負担も比較的小さく、適用策としての実現性が比較的高い。)	○～△ (小～大規模貯水池で効果が認められるが、経済面・管理面での負担が比較的大きい。適用策としての新設は困難。)	× (下流河川への影響は対策メニューの中で最も小さいが富栄養化減少の抑制は難しい)	△ (フェンス上流で効果はあるが、ダムサイト付近での効果は確認できない。経済面、管理面の負担は小さい。)	×	×

図 16 富栄養化対策の適応策に関する検討結果

4.2 底層貧酸素化対策に関する適応策の検討

底層貧酸素化対策として、①高濃度酸素供給装置、②選択取水施設（異高同時取水）について検討した。また、深層曝気施設も対策として考えられたが、高濃度酸素供給装置と比較し、供給酸素濃度がそれほど高くないため、検討から除外した。

図 17 に下層 DO の計算値を示す。高濃度酸素供給装置に関して、7~9 月の夏期に稼働させた場合、回転率 23 回/年ではある程度効果が確認できるが、回転率 10 回/年以下のケースでは大きな改善効果が確認できなかった。DO 濃度が 2 mg/L 以下となる場合のみに稼働させた場合では、各貯水池規模で貧酸素化を抑

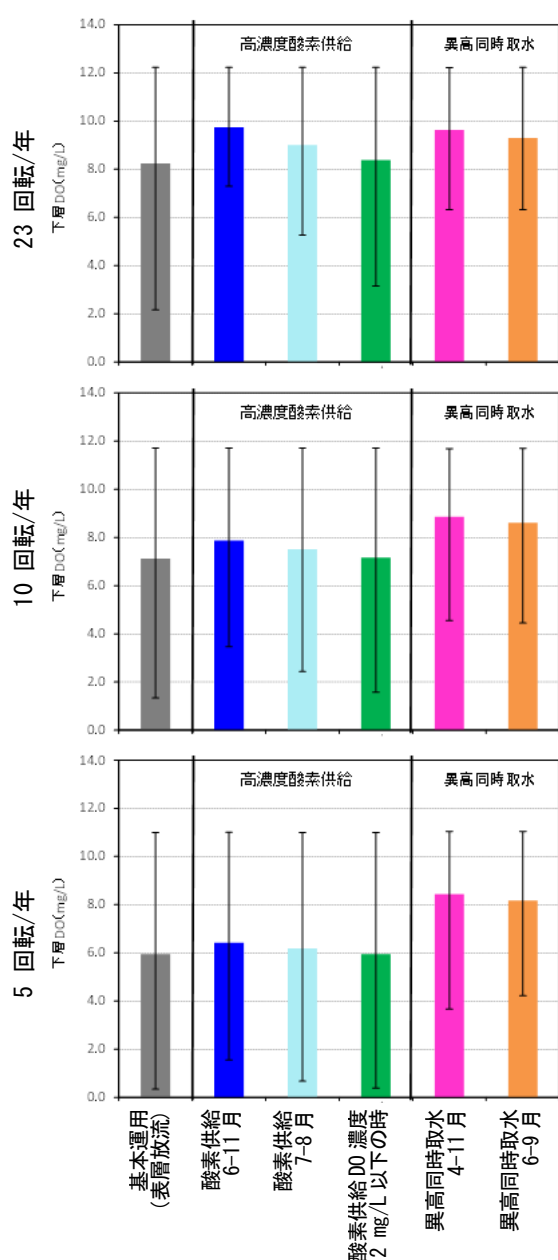


図 17 下層 DO の年平均値・月最大値・月最小値

制・防止することは困難であった。選択取水施設（異高同時取水）に関して、異高同時取水は、4~11 月、夏期の 6~9 月の運用時期にかかわらず、同程度の改善効果が確認された。また高濃度酸素供給装置よりも底層貧酸素化の改善効果が大きいと考えられる。

図 18 に本研究で検討した富栄養化対策の適応策に関する結果をまとめる。

5. 現地データを基にしたアオコ発生予測モデルの構築

5.1 機械学習手法を用いたアオコ発生予測モデル

富栄養化が進行したダム貯水池では夏期にアオコが発生することが懸念され、アオコは景観の悪化や異臭の原因となり、ダム管理者にとって重大な問題となりえる。貯水池の水質管理を目的として水質・生態系シミュレーションモデルを用いてアオコ発生を予測する試みは多くなされているが、アオコ発生は物理的・生物学的に未解明な点も多く、従来の生態系シミュレーションモデルでは十分な予測精度が得られていない。近年では、機械学習手法を用いた統計学的モデルが様々な研究分野で検討されており、機械学習手法による予測は物理的・化学的なプロセスを考慮しないという欠点を有するが、過去のデータが十分に得られている現象については、パラメータ推定により複雑な現象に対しても予測が可能というメリットを有する。長濱らは霞ヶ浦におけるアオコ発生について機械学習手法を用いたモデルによる検討を行い、優れた予測精度が得られることを示している⁴⁾。そこで本検討では中国地方のダムを対象として、過去の気象・水象・水質データを整理し、それらのデータをもとに機械学習手法を用いたアオコ発生予測モデルの構築を試みた。

5.2 検討に用いたデータ

5.2.1 解析対象としたダム

本検討ではアオコの発生が確認されている中国地方の 4 つのダムを対象として解析を行った。

4 つのダムのアオコ発生に関する状況を以下に示す。

A ダムでは 2012 年の竣工から 6 年間のうち 3 年間でアオコの発生が確認されている。データが適切に管理されている 2012 年 1 月から 2017 年 2 月を解析対象期間とした。

B ダムでは 2011 年の竣工から 7 年間のうち 5 年間でアオコの発生が確認されている。データが適切に管理されている 2011 年 3 月から 2017 年 12 月を解析対象期間とした。

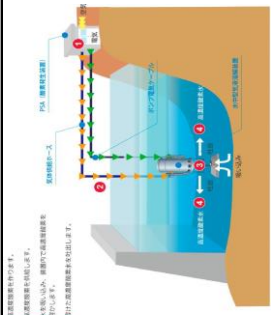
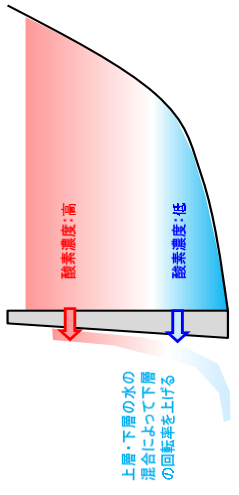
対策運用		選択取水施設での異高同時取水	
概念図	 出典：松江土研株式会社・IP、WEP システム		
	概要	貯水池底層に設置した装置から高濃度の酸素水を供給することで直接的に底層のDO濃度の改善を図る対策である。深層曝気とは異なり、酸素を溶かし込んだ水を供給するため、曝気よりも消費電力が小さく、効率的とされている。	
施設諸元 ・運用	酸素水供給量：80m³/h 吐出DO濃度：30mg/l 導入基数：1基 実施時期：6月～11月（貧酸素化進行時期）	酸素水供給量：80m³/h 吐出DO濃度：30mg/l 導入基数：1基 実施時期：底層DO2mg/lを基準としてそれを下回った時期に実施	運用時期：6月～9月（貧酸素化が進行する時期） 取水深・取水量：表層・深層で同量取水
	【容量小】大 【容量中】中 【容量大】小	【容量小】小 【容量中】小 【容量大】ほとんどなし	【容量小】大 【容量中】中～大 【容量大】中～大
適応策の 効果	IC: 中 RC: 小		IC: 大 RC: 小
経済性	(初期コストがやや高いが、ランニングコストは比較的小さい)		(新規設置・改良の場合、初期コスト大)
管理負担	運用日数：約180日 ・影響を及ぼさない	運用日数：約60日 ・影響を及ぼさない	運用日数：約120日 (水温、DOのモニタリングが必須) 【現在気候】「流入水温＝放流水温」操作とほぼ同程度の温水放流日数が発生。 【将来気候】「流入水温＝放流水温」操作とほぼ同程度の温水放流日数が発生。冷水放流日数が増加。
下流河川 への影響	O		O
適応策としての評価	(小～中規模貯水池で効果が認められる。放流水温に影響を及ぼさない。経済面の負担が比較的小さく、小～中規模貯水池への適応策として実現性がある。)	△× (夏期だけの対応では、貯水池規模が大きくなると対応できない)	△ (小～大規模の幅広い貯水池規模に対して効果が認められるが、年間の2/3で運用するため管理面で負担が大きい)
適応策として の評価	O		O

図 18 富栄養化対策の適応策に関する検討結果

C ダムに関しては少なくとも 1998 年よりアオコの発生が確認されている。(1998 年以前についても現在確認中) なお、C ダムは 2008 年 2 月以降、アオコ対策施設としてフェンスと表層水移送装置が設置されており、水質改善対策の前後でアオコ発生の特性が変化することが考えられるため、解析対象期間は 2000 年 1 月から 2007 年 12 月までとした。

D ダムでは 2004 年の竣工から 14 年間のうち 5 年間でアオコの発生が確認されている。データが適切に管理されている 2005 年 1 月から 2016 年 8 月を解析対象期間とした。

5. 2. 2 気象・水象・水質データ

モデルの学習に用いたデータを表 3 に示す。

入力データは主に気象・水象・貯水池水質・流入水質の 4 分類であり、気象データはそれぞれのダムに最も近い気象庁観測所の観測データを整理し、入力変数に用いた。水象・貯水池水質・流入水質については各ダムで観測が行われていたため、それらのデータを入力変数に用いた。T-N と T-P の栄養塩については各ダムで月に 1 回の定期観測で測定されるデータであるため、線形補完を行い日データとした。

出力データは主に表層の Chl-a とアオコレベルの観測値が存在し、アオコ発生・非発生の 2 値データはア

表 3 解析に用いたデータ

項目			観測・算出	正規化手法	単位	備考	Aダム	Bダム	Cダム	Dダム
気象	気温	日平均気温	観測	実数	°C		●	●	●	●
		前5日平均気温	算出	実数	°C		-	-	-	-
		前10日平均気温	算出	実数	°C		-	-	-	-
		前20日平均気温	算出	実数	°C		-	-	-	-
		前30日平均気温	算出	実数	°C		●	●	●	●
	日射	日平均日射量	観測	実数	MJ/m ²		●	●	●	●
		前5日平均日射量	算出	実数	MJ/m ²		-	-	-	-
		前10日平均日射量	算出	実数	MJ/m ²		-	-	-	-
		前20日平均日射量	算出	実数	MJ/m ²		-	-	-	-
		前30日平均日射量	算出	実数	MJ/m ²		●	●	●	●
	風速	日平均風速	観測	対数	m/s		●	●	●	●
	雨量	ダム地点雨量	観測	対数	mm		●	●	●	●
水象	流量	ダム流入量	観測	対数	m ³ /s		●	●	●	●
		前5日平均流入量	算出	対数	m ³ /s		-	-	-	-
		前10日平均流入量	算出	対数	m ³ /s		-	-	-	-
		前20日平均流入量	算出	対数	m ³ /s		-	-	-	-
		前30日平均流入量	算出	対数	m ³ /s		●	●	●	●
	運用	ダム放流量	観測	対数	m ³ /s		●	●	●	●
		貯水位	観測	対数	m		●	●	●	●
		貯水量	算出	対数	m ³	H-V式から算出	●	●	●	●
		灌水面積	算出	対数	m ²	H-A式から算出	●	●	●	●
貯水池水質	水温	水深0.5m水温	観測	実数	°C	自動観測データ	●	●	●	●
		水深1m水温	観測	実数	°C		-	-	-	-
		水深3m水温	観測	実数	°C		-	-	-	-
		水深5m水温	観測	実数	°C		●	●	●	●
		水温勾配	算出	対数	°C		●	●	●	●
	濁度	水深0.5m濁度	算出	対数	度	自動観測データ	●	●	●	●
	栄養塩	貯水池上層T-P	観測	対数	mg/L	※1	●	●	●	●
		貯水池上層T-N	観測	対数	mg/L	※1	●	●	●	●
流入水質	水温	流入水温	観測	実数	°C		●	●	※2	●
	栄養塩	貯水池上層T-P	観測	対数	mg/L	※1	●	●	●	●
		貯水池上層T-N	観測	対数	mg/L	※1	●	●	●	●
出力	Chl-a	水深0.5mChl-a	観測	対数	μg/L		●	●	●	●
	アオコ	アオコレベル	観測	実数	区分		●	●	※2	●
		アオコ発生	算出	0-1	区分		●	●	※2	●

※1 月 1 回の定期観測データであるため、観測日間を線形補完することで日データとした

※2 C ダムでは流入水温のデータが観測されておらず、アオコレベルも記載されていなかった。

オコレベルが3以上の時にアオコ発生と定義し、これらの3つの変数を出力変数として解析に用いた。

モデル解析では入力・出力データを規格化する必要があるが、今回の検討では入力・出力データに偏りを有するデータも存在したため、以下で示す二つの正規化手法を用いて、データの規格化・正規化を行った。(実数形)

$$A_1 = \frac{(q_{\max} - q_{\min})p + q_{\min} p_{\max} - q_{\max} p_{\min}}{p_{\max} - p_{\min}}$$

(対数形)

$$A_2 = \frac{(q_{\max} - q_{\min})\log p + q_{\min} \log p_{\max} - q_{\max} \log p_{\min}}{\log(p_{\max}/p_{\min})}$$

※ A1:変換後の入力値、A2:変換後の入力値(対数)、 p :入力値、 $p_{\max}, p_{\min}$:入力データの最大値と最小値、 $q_{\max}, q_{\min}$:変換値の最大値(0.95)と最小値(0.05)である。

正規化においては、実数形と対数形の二つがあるが、指標ごとに二つの手法を行ったうえで分布の偏りがより少なくなる手法を、入力変数の値として用いた。

5.3 ニューラルネットワークモデルによる解析

5.3.1 ニューラルネットワークモデルの概要

本検討では機械学習手法として代表的なニューラルネットワークモデル(以下、NNモデル)を用いて解析を行った。本研究では、簡易な検討として、入力層、中間層、出力層の3層からなるNNモデルにより解析を行った。モデルに組み込まれた活性化関数を以下に示す。

$$f(u_i) = \frac{1}{1 + \exp(-u_i)}, \quad u_i = \sum_{i=1}^n \omega_i \cdot x_i - \theta$$

※ $f(u_i)$:ニューロンの出力値、 x_i :入力値、 ω_i :重み付け係数、 θ :しきい値、 n は入力層のユニット数である。

解析においてはネットワーク構造による精度の変化を検討するために、中間ニューロン数を変化させた解析を行い、NNモデルの構造について感度分析を行った(Case-1~4)。またCase-1~4の結果を基に、入力変数群を変化させた解析を行い、入力変数の項目によるNNモデルの感度分析を行った(Case-5~8)。またNNモデルの各解析パターンの精度を評価するために、Chl-aではRMSE(二乗平均平方根誤差)と相関係数を算出し、アオコレベルではRMSE、的中率(アオコレベル1以上の際の的中率)、相関係数の3指標を算出し、アオコ発生ではRMSEと的中率(アオコ発生時の

的中率)を算出した。

5.3.2 NNモデルによる各個別ダムの解析結果

AダムにおけるNNモデルの中間ニューロン数を変化させた感度分析結果を表4に示す。AダムにおいてはCase-3、4でChl-aやアオコレベルの相関係数が高くなる傾向が見られた。ニューロン数が増加することによりモデルの表現力が向上したため、相関係数が高くなったと考えられる。

表4 Aダム NNモデル解析結果

項目	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4
設定条件	出力変数	3	3	3
	中間ニューロン数	6	10	15
Chl-a	RMSE	3.97	5.51	3.45
	相関係数	0.491	0.666	0.683
アオコレベル	RMSE	1.00	1.06	1.01
	的中率	34.8%	14.9%	21.5%
	相関係数	0.855	0.915	0.917
アオコ発生	RMSE	0.34	0.43	0.49
	発生的中率	94.7%	87.4%	86.3%

表5 Bダム NNモデル解析結果

項目	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4
設定条件	出力変数	3	3	3
	中間ニューロン数	6	10	15
Chl-a	RMSE	2.84	3.06	2.89
	相関係数	0.55	0.443	0.536
アオコレベル	RMSE	0.91	0.84	0.70
	的中率	45.8%	39.0%	58.5%
	相関係数	0.890	0.942	0.901
アオコ発生	RMSE	0.59	0.45	0.43
	発生的中率	78.9%	81.1%	92.2%

表6 Cダム NNモデル解析結果

項目	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4
設定条件	出力変数	3	3	3
	中間ニューロン数	6	10	15
Chl-a	RMSE	2.11	2.30	2.14
	相関係数	0.541	0.362	0.557
アオコレベル	RMSE	0.91	0.90	1.40
	的中率	58.5%	57.8%	0.0%
	相関係数	0.816	0.873	0.795
アオコ発生	RMSE	0.58	0.61	0.81
	発生的中率	74.8%	62.2%	49.6%

表7 Dダム NNモデル解析結果

項目	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4
設定条件	出力変数	3	3	3
	中間ニューロン数	6	10	15
Chl-a	RMSE	3.27	3.17	3.04
	相関係数	0.252	0.306	0.296
アオコレベル	RMSE	1.33	1.17	1.42
	的中率	22.2%	20.6%	0.0%
	相関係数	0.481	0.740	0.648
アオコ発生	RMSE	1.00	0.81	0.98
	発生的中率	0.0%	62.2%	49.6%

B ダムにおける NN モデルの中間ニューロン数を変化させた感度分析結果を表 5 に示す。B ダムにおいても A ダムと同様に Case-3、4 においてアオコレベル的中率もしくは相関係数が高くなる傾向が見られた。

C ダムにおける NN モデルの中間ニューロン数を変化させた感度分析結果を表 6 に示す。C ダムにおいては Case-1、2 がアオコレベルの再現性が高く、Case-3、4 では再現性が低下した。

D ダムにおける NN モデルの中間ニューロン数を変化させた感度分析結果を表 7 に示す。D ダムにおいてはアオコ発生時や Chl-a の値が 100 $\mu\text{g/L}$ を超えるような学習データが少ないため、再現性が十分に確保できていないと考えられる。

4 つのダムにおける解析結果を比較した場合、Chl-a の相関係数は A ダムにおける Case-3 で最も高い値を示した。A ダムにおける Chl-a の変動を図 19 に示す。相関係数が比較的高い値を示した Case-3、4 においては冬季の低 Chl-a の傾向は十分に再現できていたが、春季～夏期は再現性が不十分であった。Case-2 においては春季～夏期の Chl-a のピークを一部再現できているものの、全体的に Chl-a を過大に算出しており RMSE

が大きくなった要因と考えられる。他のダムの解析においても冬季の低 Chl-a は十分に再現できていたが、春季～夏期は再現性が不十分であり植物プランクトンのブルームを再現するにはデータ数や入力変数の不足が原因であると考えられる。

アオコレベル的中率は C ダムにおける Case-1 で最も高い値を示した。C ダムにおけるアオコレベルの変動を図 20 に示す。C ダムにおいてはアオコの発生は夏期の短期間のみで発生しており、アオコ発生時のアオコレベルは再現性が見られた。Case-3、4 では 2017 年夏季のアオコレベル 0 の時期にアオコの出現を予測しているため、的中率が減少していると考えられる。

一定の予測精度が得られたと考えられる A ダムと C ダムにおいて気象、水象、貯水池水質、流入水質の 4 分類の入力変数をそれぞれ一つずつ除いた解析を行い、入力変数の感度分析を試みた。A ダムにおいては Chl-a とアオコレベルでともに高い相関を示した Case-4 を基準に、中間ニューロン数を 20 に固定して感度分析を行った。C ダムにおいてはアオコレベルで最も高い中率を示した Case-1 を基準に、中間ニューロン数を 6 に固定して感度分析を行った。それぞれの結果

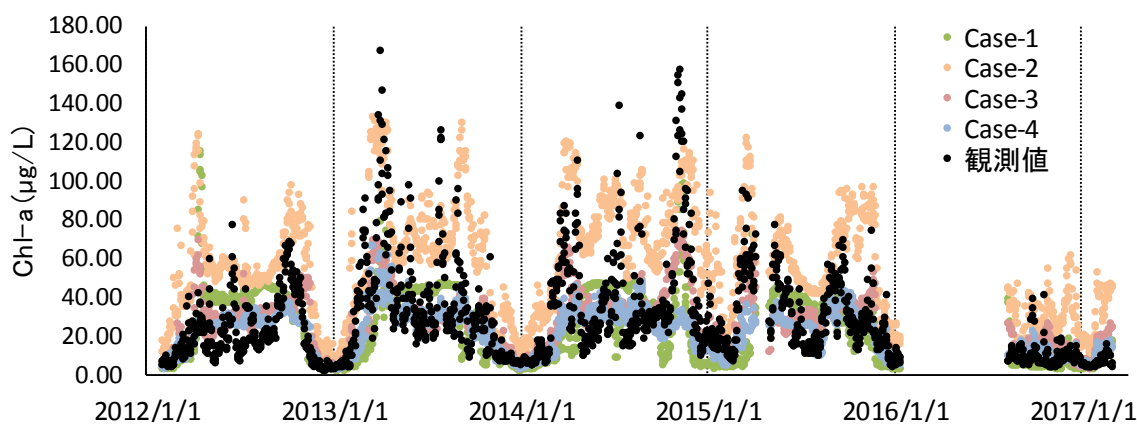


図 19 A ダムにおける Chl-a の変動

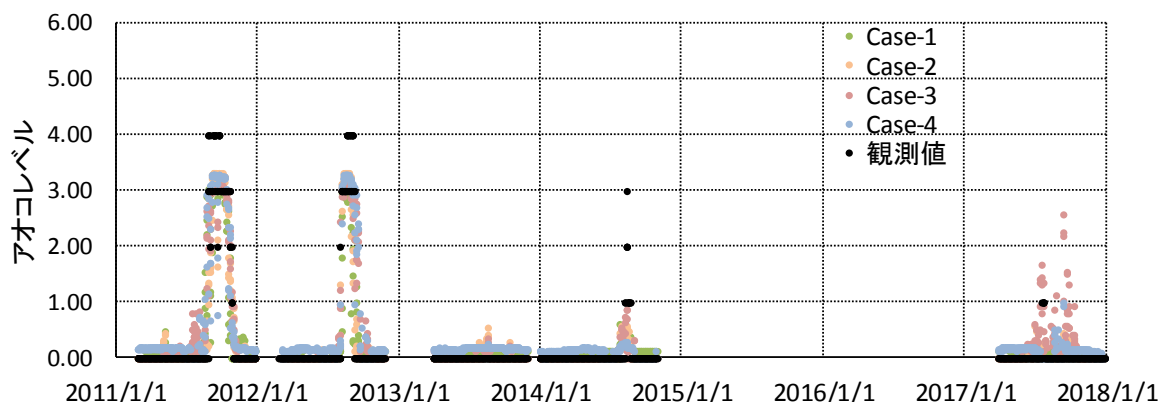


図 20 C ダムにおけるアオコレベルの変動

表 8 A ダム入力変数感度分析結果

項目		Case-4	Case-5	Case-6	Case-7	Case-8
設定条件	出力変数	3	3	3	3	3
	中間ニューロン数	20	20	20	20	20
入力層項目	気象	●		●	●	●
	水象	●	●		●	●
	貯水池水質	●	●	●		●
	流入水質	●	●	●	●	
Chl-a	RMSE	3.50	3.59	3.45	3.88	3.61
	相関係数	0.637	0.660	0.680	0.559	0.597
アオコレベル	RMSE	0.90	1.26	1.24	0.89	1.03
	的中率	40.3%	13.8%	5.5%	40.9%	26.5%
	相関係数	0.933	0.805	0.884	0.844	0.901
アオコ発生	RMSE	0.37	0.56	0.45	0.54	0.40
	発生の中率	87.4%	70.5%	82.1%	60.0%	87.4%

表 9 C ダム入力変数感度分析結果

項目		Case-1	Case-5	Case-6	Case-7	Case-8
設定条件	出力変数	3	3	3	3	3
	中間ニューロン数	6	6	6	6	6
入力層項目	気象	●		●	●	●
	水象	●	●		●	●
	貯水池水質	●	●	●		●
	流入水質	●	●	●	●	
Chl-a	RMSE	2.11	2.16	2.37	2.36	2.41
	相関係数	0.541	0.506	0.190	0.371	0.188
アオコレベル	RMSE	0.91	0.89	1.12	1.45	1.68
	的中率	58.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	相関係数	0.816	0.779	0.775	0.731	0.079
アオコ発生	RMSE	0.58	0.53	0.59	0.83	1.00
	発生的中率	74.8%	87.4%	83.0%	0.0%	0.0%

(Case-5~8) を表 8、9 に示す。

A ダムの Chl-a の予測は気象データと水象データを除いた場合は相関係数が向上し、貯水池水質データと流入水質データを除いた場合は相関係数が低下した。一方でアオコレベルの予測は気象データと水象データを除いた場合は的中率が大きく低下した。貯水池水質データを除いた場合は的中率に変化は見られず、流入水質データを除いた場合は的中率が低下した。

C ダムの Chl-a の予測は気象データを除いた場合は大きな変化が見られなかったが、その他の三つの入力変数群を除いた場合は相関係数が大きく低下した。アオコレベルの予測においては気象、水象、貯水池水質、流入水質すべての入力変数群において的中率が低下した。

A ダムと C ダムにおける入力変数群の感度分析結果より、Chl-a の予測には貯水池水質データと流入水質データが大きく寄与していることが示唆された。湖山池における NN モデルを用いた検討においても Chl-a の予測には T-N、T-P を入力変数に加えることで予測精度が向上することが報告されており⁵⁾、Chl-a の高精度予測には T-N と T-P 濃度が必要不可欠であると考え

られる。また、アオコレベルの予測には気象データと水象データが大きく寄与していることが示唆された。

6. おわりに

仮想ダム貯水池における気候変動による前提条件の変化が水質に与える影響および将来予測等について検討し、富栄養化および底層貧酸素化の適応策についてそれぞれの対策方法をモデルの計算により検討した。また、現地データを基にしたアオコ発生予測モデルの構築を試みた。主な成果は以下の通り。

- ・貯水池規模を変化させた仮想貯水池では、貯水池規模の増大により表層水温が増加した。また、下層 DO 濃度が 2.0 mg/L 以下になる日数は回転数の上昇に応じて増加や減少が起きるなど、各水質指標に大きな変化が確認された。
- ・貯水池形状を変化させた仮想貯水池では、水温分布や下層 DO に変化が見られたが、変化程度については、貯水池規模の変化と比較して小さかった。
- ・気候変動シナリオを用いた将来予測計算の結果、貯水池規模により、水温・SS・DO の変化が大きかった。
- ・特に、水温については貯水池規模が小さいほど、DO については貯水池規模が大きいほど、気候変動の影響を大きく受ける結果となった。
- ・富栄養化に関する感度分析の結果、平均流入 T-P 濃度が貧栄養～中栄養の場合（0.005～0.015 mg/L の範囲）で回転率が小さいほど、Chl-a 濃度の上昇が比較的大きかった。
- ・濁水長期化に関する感度分析の結果、RCP6.0 および RCP8.5 シナリオで濁水長期化がより進行する結果が得られた。RCP8.5 シナリオでは現在気候よりも 2 倍ほど長期化が進行した。
- ・富栄養化の適応策を検討した結果、最も効果があったのは曝気循環であり、どの貯水池規模でも対策効果が確認された。また基本操作として設定していた表層放流が、貯水池内の表層水温や Chl-a 濃度の低下に寄与することが確認され、気候変動への適応策として有効である可能性が示された。
- ・底層嫌気化の適応策を検討した結果、高濃度酸素供給装置の導入により、底層貧酸素化が改善及び軽減される効果が確認された。異高同時取水については、4 月～11 月の水温成層期の運用により、底層貧酸素化改善の効果が大きいことが確認された。
- ・機械学習手法を用いたアオコ発生予測モデルの構築を行い、解析の結果より一部のダムでは Chl-a の変

動傾向やアオコレベルで一定の精度が得られた。

・NN モデルの入力変数を変化させた感度分析の結果から、Chl-a の変動は貯水池水質データと流入水質データによる寄与が大きく、アオコレベルの変動は気象データや水象データによる寄与が大きいことが示唆された。

今後は、濁水長期化の水質障害が発生する仮想貯水池に対して、考えられる適応策を検討する予定である。また、機械学習手法を用いたアオコ発生予測モデルについてさらなる検討を行い、再現精度の向上や短期間の将来発生を予測可能なモデルの構築を試みる予定である。

参考文献

1) 文部科学省、経済産業省、気象庁、環境省：IPCC 第 5 次

評価報告書統合報告書政策決定者向け要約（翻訳）、2015

2) 環境省：気候変動の影響への適応計画
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/28593.pdf>、2015（2019年9月確認）

3) 国土交通省：国土交通省気候変動適応計画
<https://www.mlit.go.jp/common/001264212.pdf>、2015（2019年9月確認）

4) 長濱祐美、阿部真己、松本俊一、福島武彦：霞ヶ浦土浦入を対象に構築したアオコ予測システムの紹介、17th World Lake Conference、pp. 339-341、2018

5) 斎幸治、原田昌佳、吉田勲、平松和昭、森牧人：ニューラルネットワークモデルを用いた富栄養湖のクロロフィル a 濃度の推定、農業農村工学会論文集、250、pp. 57-64、2007

土砂供給に伴う河川環境影響評価およびダムからの土砂供給技術の運用手法に関する研究

研究予算：運営交付金

研究期間：平28～平33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、平山孝浩、
鈴木裕識、村田里美

【要旨】

国土形成計画等において、山地から海岸までの一貫した総合的な土砂管理の推進等が謳われており、これらを推進していくためには、土砂動態のモニタリング、環境影響評価、対策技術を統合した流砂系における持続可能な土砂管理システムの構築が求められている。本研究では、土砂供給時の下流河川水中の化学物質濃度および形態別存在比率の的確な把握を目的として、パッシブサンプリング手法の適用可能性を検討した。金属類6種（Al、Mn、Fe、Ni、Zn、Pb）を対象に、底質試料を使用して実験室内で模擬的に作成した濁水に対しDiffusive Gradient Thin Films（DGT）法を用いたパッシブサンプラーを使用し、浸漬時間中の平均的濃度を算出した。その結果、スポット採取測定で得られた濃度との間に良好な相関が得られた。土砂供給イベント時のようにGrabサンプリング手法の適用に困難が予想される場合、本手法を用いて水質データを獲得し、環境中濃度を予測することで、より現場に即した生態リスク評価に繋がることが期待される。

キーワード：生態リスク評価、金属類、形態別存在比率、パッシブサンプリング

1. はじめに

ダムの維持管理において、ダム貯水池に堆積する土砂は大きな問題の1つであり、さまざまな排砂の方法が検討・実施されている¹⁾。排砂の方法として、採取した土砂をダムの下流の河川に投入する場合、投入された土砂は河川の土砂地形環境や生物相を改善させる正の効果が期待される。一方で、投入した土砂には、ダム貯水池に堆積した後に吸着した化学物質が含まれるため、ダム下流の河川に投入された土砂から溶出した化学物質が、その河川に生息する生物に影響する可能性が考えられる。そのため、土砂をダム下流の河川に投入する際には、供給土砂から溶出した化学物質による水生生物への影響の可能性を評価する必要がある。また、供給した土砂により、溶存酸素や濁度などの河川の水質項目が変化することで、河川に生息する水生生物に影響を与えることが考えられる。

本研究課題では、土砂供給が下流河川水質等に与える影響項目（金属類、貧酸素等）について、室内外の試験等により水質の応答特性を把握するとともに、評価対象種について影響項目に関する毒性情報の収集や生物試験を実施することにより、生態影響評価を行い、土砂供給に伴う水域環境のレスポンスの解明と予測・評価技術の開発を目的とする。

本研究で検討している土砂供給時における実環境を考慮した化学物質による環境リスクの評価フローを図-1に

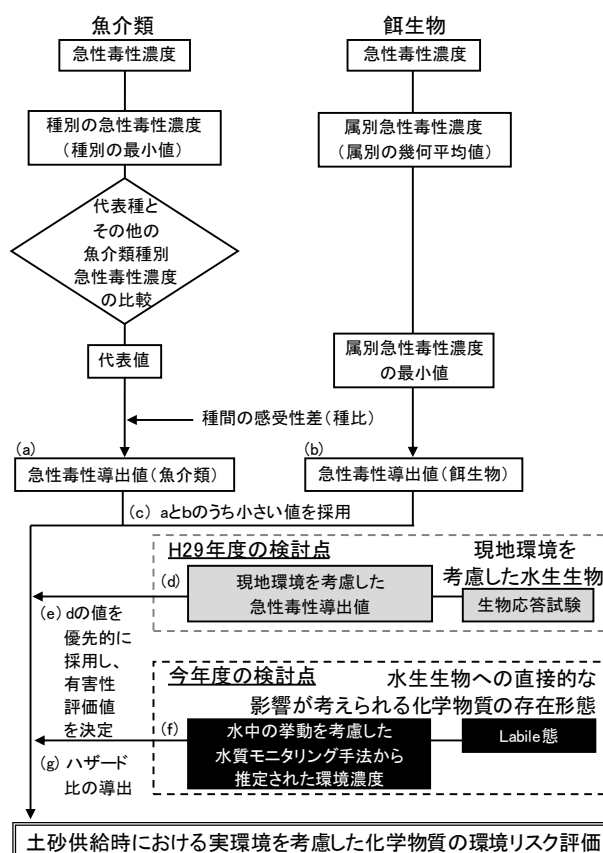


図-1 土砂供給時における実環境を考慮した化学物質による環境リスクの評価フローと今年度の検討点

示す。過年度は、まず、マンガン、亜鉛、鉛、ヒ素の4種の金属類を対象として、ダム貯水池の底質を用いた溶出試験を実施して土砂供給時の河川水中濃度を推定し、その結果を既報の有害性の文献情報から導出した有害性評価値で除してハザード比を求め、生物影響の可能性を判定した²⁾。次に、文献情報を用いた有害性評価では評価対象地の土砂供給に伴う生態影響を適切に評価できないケースを想定し、現地の環境を考慮した有害性評価値の導出フローを検討・構築して、ケーススタディーとして、矢作ダムにおける土砂供給時のマンガンの有害性評価値の導出に適用した²⁾ (図-1のH29年度の検討点を参照)。

今年度は、土砂が供給される下流河川水中の化学物質の濃度をより的確に推定するために、水中の挙動を考慮した水質モニタリング技術の構築を目的として検討を進めた。金属類が存在形態により生物に及ぼす影響が異なる点³⁾を踏まえ、水生生物が利用可能と考えられる形態、すなわち、水生生物に直接影響を及ぼすとされる形態 (以下、**Labile** 態) の濃度把握を試みた (図-1の今年度の検討点を参照)。

4.2 方法

4.2.1 パッシブサンプリング手法について

過年度の研究では、土砂供給時における金属類の予測環境濃度は、事前に採取した現場のダム貯水池の底質を用いて室内溶出試験を実施し、そのデータをもとに土砂から河川水への溶出率を推計した後に、算定しておいた河川流量と土砂濃度を外挿して推定した。しかしながら、出水を伴う土砂供給イベント時には、水量や土砂量の変動が激しいため、室内試験データ等の外挿をなるべく避け、実際に現場でモニタリングすることで、河川水中の的確な濃度把握を試みる必要があると考えられる。

一方で、水中の化学物質濃度把握の際に一般的に行われる採水 (Grabサンプリング、アクティブサンプリング)

は土砂供給イベント時には危険が伴うケースが想定される。さらに、リアルタイムで状況が変化する土砂供給を受けた河川の現場環境を捉えるためには複数回の採水が必要であることを踏まえると、Grabサンプリング手法の適用には限界があると考えられる。

以上の背景から、パッシブサンプリング、すなわち、捕集剤を充填したサンプラーを水中に一定期間設置し、分析対象物質を吸着させる手法に着目することとした。金属類の形態別分析として実績のあるパッシブサンプリング法には薄膜拡散ゲル (Diffusive Gradients in Thin-films、以下DGT) 法⁴⁾がある。DGT法は固相抽出法の一つで、充填した樹脂に反応速度論的に**Labile**な金属を吸着させる方法であり、ゲル層を用いて水中での金属成分の拡散を制御することでフラックスを求め、浸漬時間中の平均的濃度を算出できる⁵⁾。また、採水や試料の前処理が必要なく、多元素同時分析が可能であるという利点がある。

本研究では上述の手法 (以下、DGTパッシブサンプリング法) の適用可能性の基礎検討として、底質試料を使用して実験室内で模擬的に作成した濁水を用いて金属類モニタリング実験を行った。

4.2.2 室内実験の方法

使用したDGTサンプラーと実験の様子を図-2に示し、実施した実験の概要を表-1に示す。DGTサンプラーにはDGT Research社のLSNM Loaded DGT device for metals (A) in solution (cations)を用いた。このサンプラーは、孔径0.22 μm のメンブレンフィルター、拡散ゲル層、そして充填剤のChelex-100樹脂層の三層構造となっている。実験は某ダムおよび周辺から入手した3種の土砂 (貯砂ダム底質 (Run1)、ダム上流河川底質 (Run2)、貯水池底質 (Run3)) を用いた。土砂混合水の作成には、実験室で作成した超純水 (*Milli-Q*水) を用い、土砂投入濃度が



図-2 使用したDGTサンプラーと実験の様子

表-1 実験の概要

ID	土砂 試料種	試験水	土砂 投入 濃度 (mg-wet)	投入 土砂 含水率 (%)	攪拌器の 回転 速度 (rpm)	平均 水温 (°C)	実験 中の pH	測定 元素	測定 形態	測定 時間 (h)
Run1	貯砂ダム底質			5.5		19.5	6.2~7.5	Al, Mn, Fe, Ni, Zn, Pb	DGT-labile態濃度*,	0, 0.5,
Run2	貯水池底質	超純水 8L	37,500	6.9	350	20.1	5.0~7.7		総濃度,	1, 3,
Run3	ダム上流 河川底質			18.9		17.3	7.1~8.8		Labile態濃度	6, 24

*この形態は24時間後のみ

37,500 mg/L-wet となるよう調整した。これは、極端に大きな出水時を想定した調査事例では、SS濃度が高い場合で数千~数万mg/Lであったという報告があり⁵⁾、DGTユニットの適用可能性を検討するという観点から、SS濃度が極端に高い場合を想定して設定したものである。なお、投入土砂は実際のイベント時を模擬することを考慮して、乾燥操作等を避け、湿潤状態で試験に供した。各土砂の含水率は貯砂ダム底質で5.5%、ダム上流河川底質で6.9%、貯水池底質で18.9%であり、乾燥重量での投入量は35,437 mg-dry /L、34,912 mg-dry /L、30,423 mg-dry /Lであったため、各々の実験結果の比較が可能な範囲と考えた。実験時の水温は17.3°C (Run3) ~ 20.1°C (Run2) であり、後述のDGT-Labile態濃度算出方法に従い、データ補正に使用した。

測定対象はAl、Mn、Fe、Ni、Zn、Pbの6種金属とし、サンプラーを用いた24時間の平均的なDGT-labile態濃度の算出に加えて、実験開始後の6段階 (0、0.5、1、3、6、24時間後) で採水をして総濃度とLabile態濃度の測定を行うことで、従来のグラブサンプリングにより得られるLabile態濃度とDGT-labile態濃度との比較を行った。なお、実験開始後0時間とは、厳密には攪拌直後という意味である。土砂混合前の水試料中の濃度サンプラーは、マニュアルに記載された方法⁶⁾に従いコンディショニングをした後に、できる限り流水方向にWindowが向くように図-21の写真中に示されたように取り付けた。

4.2.3 金属類の分析方法

24時間経過時に実験系から取り出されたDGTサンプラーは直ちに分解してゲル層を取り出し、マニュアルに記載された方法⁶⁾に従って、前処理した。各経過時間で採水した試料は、マイクロウェーブ酸分解法で前処理したものを総濃度測定用とした。Labile態測定用試料は、孔径0.45μmのニトロセルロースろ紙(GEヘルスケア ライフサイエンス社製) でろ過して得られたろ液をキレート樹脂

(MetaSEP CH-1、GLサイエンス社製) に通液し、硝酸で溶出後、ホットプレート分解に供して前処理して測定に供した。全ての前処理済み試料の測定においてICP-MS (X7CCT、Thermo Fisher Scientific) を使用した。Sc、Rh、Biを内部標準として装置導入前に添加し、回収率を算出して、測定値を補正した。回収率 ($n = 45$) はScで95.3%、Rhで82.7%、209Biで81.5%であり良好であった。

4.2.4 DGT-labile態濃度の算出

水中のLabile態金属濃度は、DGT Research社のマニュアルに記載の通り、以下の式(1)~(5)に従って計算された²⁹⁾。詳細について、以下に示す。

移動性イオンのゲル層通過フラックス J はFickの拡散第一則により式(1)に従う。またDGT樹脂は無限にイオン態の金属を吸着可能と考えた場合、水中と樹脂の濃度差は $dC_{DGT-Labile} = C_{DGT-Labile}$ と仮定される。拡散ゲル層とメンブレンフィルターの厚さの合計を Δ_g とおくと式(2)がえられる。

$$J = D \frac{dC_{DGT-Labile}}{d_x} \quad (1)$$

$$J = D \frac{C_{DGT-Labile}}{\Delta_g} \quad (2)$$

ここで、

$C_{DGT-Labile}$: 水中のDGT-Labile態濃度 (ng/mL = μg/L)

D : 拡散係数 (cm²/s)

$dC_{DGT-Labile} / dx$: 濃度勾配

Δ_g : 拡散ゲル層の厚さ (0.08 cm) メンブレンフィルターの厚さ (0.014 cm) の合計値 (0.093 cm)

さらに吸着されたイオンの総量はゲル層通過フラックス J の積分値 $\int J da$ であるため、DGT樹脂に蓄積された金

属量を M (ng) とおくと、 $M=JA t$ となりゲル層通過フラックス J は式 (11) で表される。また、DGT樹脂に吸着された金属量 M は式 (12) で表される。

$$J = \frac{M}{A t} \quad (3)$$

$$M = \frac{C_{elu}(V_{gel} + V_{acid})}{f_e} \quad (4)$$

ここで、

C_{elu} : 測定試料中濃度 (ng/mL)

V_{acid} : 測定試料作成時の溶液量 (5 mL)

用いたサンプラーにおいて、

A : ゲル拡散層の面積 (3.14 cm²)

V_{gel} : 樹脂の体積 (0.16 mL)

f_e : 溶出係数 (マニュアルに従い、統一的に0.8を採用)

実施した実験条件において

t : DGT の浸漬時間 (24h = 86,400 s)

上記の仮定より式 (13) によって $C_{DGT-Labile}$ が計算される。

$$C_{DGT-Labile} = \frac{M \Delta_g}{D A t} \quad (5)$$

4.3 結果と考察

4.3.1 総金属濃度の推移

実験期間中の総金属濃度の推移を図-3に示す。対象とした金属類のほとんどが実験開始直後から総濃度が増加し、24時間経過するまでにやや増加して、終了までには安定する傾向にあった。ダム上流河川底質 (Run3) のNiについては、比較的濃度変動が大きかったが、土砂中に存在するNi量自体が少なかったためであると推察された。実験終了後の濃度を土砂試料種別に比較すると、6種全ての金属で貯水池底質 (Run2) が最も高く、Alが80,640 µg/L、Mnが2,499 µg/L、Feが71,240 µg/L、Niが17 µg/L、Znが229 µg/L、Pbが257 µg/Lであった。次いで濃度が高い傾向にあったのは貯砂ダム底質 (Run1) で、Alが18,520 µg/L、Mnが819 µg/L、Feが36,200 µg/L、Niが6.5 µg/L、Znが109 µg/L、Pbが31 µg/Lであり、Znを除いて2番目に高い濃度であった。ダム上流河川底質では、Alが5,614 µg/L、Mnが191 µg/L、Feが4,707 µg/L、Niが0.4 µg/L、Znが157 µg/L、Pbが4.0 µg/Lであり、Znを除くと、他2種の停滞水域の底質と比べて1~2オーダー程度濃度が低かった。Znは他の金属と異なり、3つの実験での挙動に大きな違いがみられず、金属の種類によって底質への蓄積のされ方が異なることが示唆された。また、今回用いた貯砂ダムや貯水池の底質の起源となる土砂が必ずしも使用したダム上流河川の底質由来とは限らないことを考慮する必要があるものの、停滞水域であるか流水域であるかによって、底質への金属類の蓄積のされ方が異なることが示唆された。

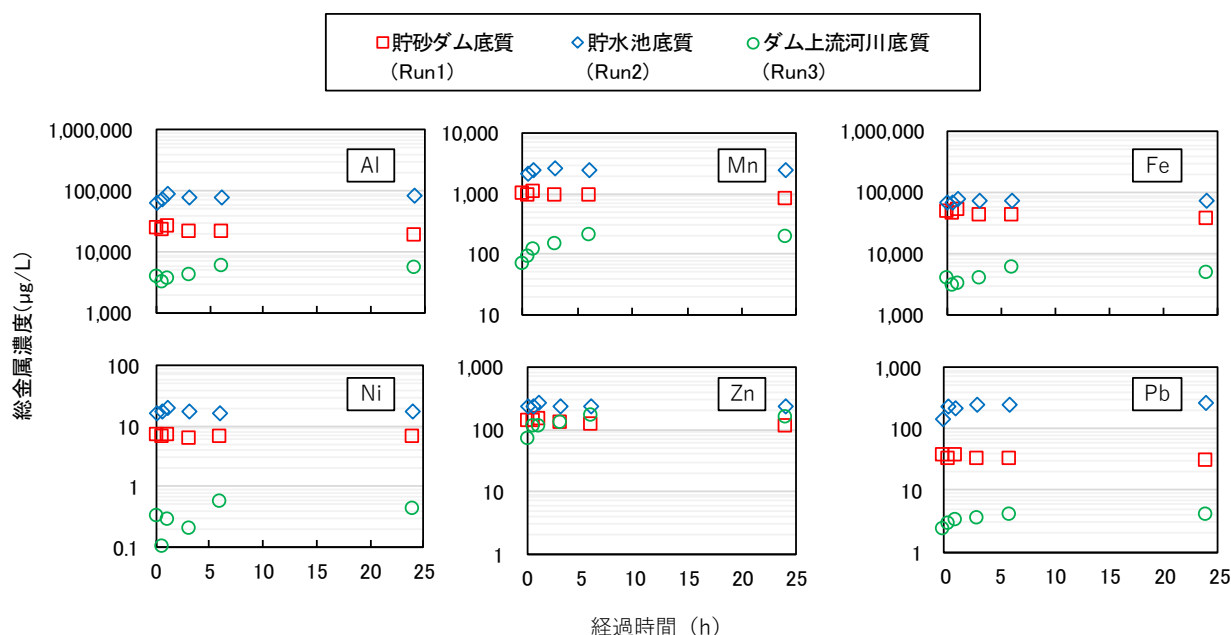


図-3 実験期間中の総金属濃度の推移

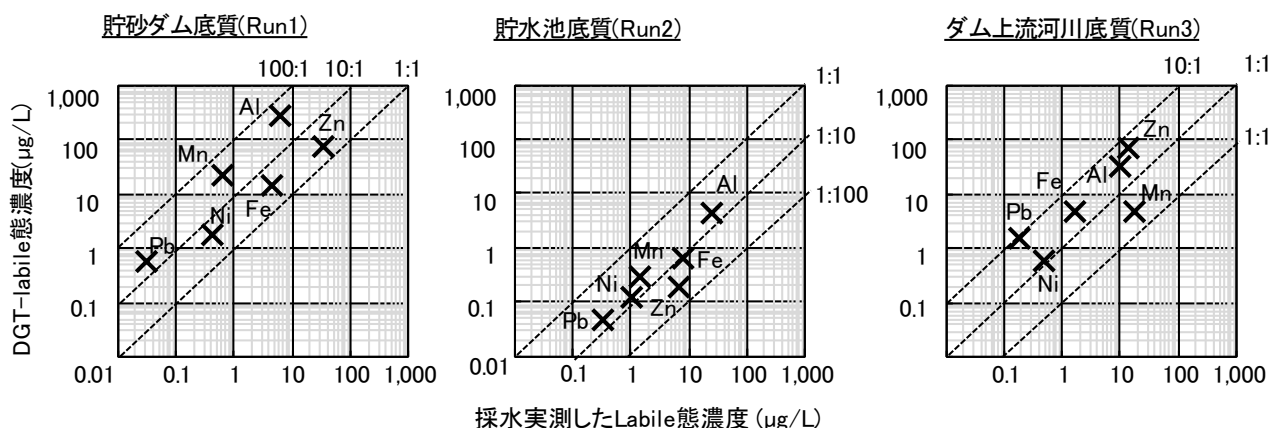


図-4 採水測定法とDGT-パッシブサンプリング法で得られたLabile態金属濃度の比較

4.3.2 採水測定法とDGT-パッシブサンプリング法の比較

採水測定法とDGT-パッシブサンプリング法で得られたLabile態金属濃度をプロットしたグラフを図-4に示す。なお、DGT-Labile態濃度はDGTサンプラーを試験環境に浸漬していた24時間の平均的濃度である。比較対象である採水実測したLabile態濃度については、試料採水の時間間隔が異なることを考慮した平均値を算出して求めた。Run1ではDGT-Labile態濃度はAlが293.4 $\mu\text{g/L}$ 、Mnが22.2 $\mu\text{g/L}$ 、Feが14.8 $\mu\text{g/L}$ 、Niが1.8 $\mu\text{g/L}$ 、Znが76.1 $\mu\text{g/L}$ 、Pbが0.6 $\mu\text{g/L}$ であった。採水測定値と比較すると各々47.3倍、37.5倍、3.4倍、4.6倍、2.3倍、19.4倍であり、全体的に高い傾向にあった。Run2ではDGT-Labile態濃度はAlが4.8 $\mu\text{g/L}$ 、Mnが0.3 $\mu\text{g/L}$ 、Feが0.7 $\mu\text{g/L}$ 、Niが0.1 $\mu\text{g/L}$ 、Znが0.2 $\mu\text{g/L}$ 、Pbが0.05 $\mu\text{g/L}$ であった。採水測定値と比較すると各々0.2倍、0.22倍、0.09倍、0.12倍、0.03倍、0.15倍であり、全体的に低い傾向にあった。Run3ではDGT-Labile態濃度はAlが31.8 $\mu\text{g/L}$ 、Mnが4.6 $\mu\text{g/L}$ 、Feが4.9 $\mu\text{g/L}$ 、Niが0.6 $\mu\text{g/L}$ 、Znが66.4 $\mu\text{g/L}$ 、Pbが1.6 $\mu\text{g/L}$ であった。採水測定値と比較すると各々3.1倍、0.26倍、2.96倍、1.21倍、4.66倍、8.12倍であり、全体的にオーダーが一致する傾向にあった。全ての実験系で相関は得られていた。実験に使用した土砂の種類によって採水実測値との大小関係が異なっていたが、DGT Research社のマニュアルに記載のパラメーターが、定常状態の流れを想定して与えられていることから、本研究目的のように、流れが速く、土砂濃度が高い河川環境中での適用の際には、室内試験によるキャリブレーションを重ねつつ別途式を与えて補正する必要があると考えられた。

4.3.3 DGTサンプラーへのLabile態金属捕集量の考慮

Run1～3では、DGTサンプラーを設置した装置から実測用試料を採水したために、サンプラーへ取り込まれた分

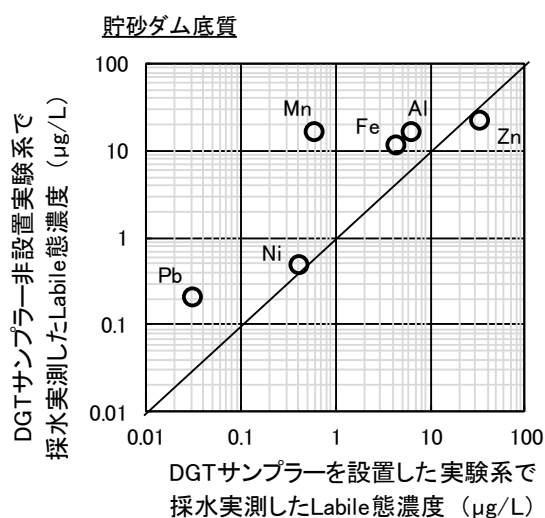


図-5 DGTサンプラーによるLabile態金属の取り込み

のLabile態金属存在量を採水実測値で過小評価していた可能性がある。そこで、Run1の条件からDGTサンプラーの設置をしない点だけ変更した系で実験を行い、DGTサンプラーの有無の影響を比較した。貯砂ダム底質を土砂試料とした場合の結果を図-5に示す。DGTサンプラー非設置系の採水実測値は設置系 (Run1) と比較して、Alで2.6倍、Mnで27.9倍、Feで2.6倍、Niで1.2倍、Znで0.7倍、Pbで6.6倍となった。上記を踏まえ、Run1のDGT-labile態金属濃度をDGTサンプラー非設置系で得られた採水実測Labile態金属濃度と比較すると、Alで18.1倍、Mnで1.3倍、Feで1.3倍、Niで3.9倍、Znで3.4倍、Pbで2.9倍となり、相関関係が良好に得られていることが示された。以上を踏まえると、より正確な比較やキャリブレーションを行うためには、DGTサンプラー非設置系を別途準備してデータ取りをする必要があることが示された。

表-2 各実験系における総金属濃度に対するDGT-Labile態金属の存在比率

		Al	Mn	Fe	Ni	Zn	Pb
DGT-Labile 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	貯砂ダム底質 (Run1)	293.4	22.2	14.8	1.8	76.1	0.6
	貯水池底質 (Run2)	4.8	0.3	0.7	0.1	0.2	0.05
	ダム上流河川底質 (Run3)	31.8	4.6	4.9	0.6	66.4	1.6
DGT-labile態 存在比率* (%)	貯砂ダム底質 (Run1)	1.4	2.5	0.0	28.4	64.2	1.8
	貯水池底質 (Run2)	0.0	0.0	0.0	0.8	0.1	0.02
	ダム上流河川底質 (Run3)	0.6	2.5	0.1	N.A	43.2	39.7

*DGT-labile濃度に対し、採水時間間隔が異なることを考慮した平均総濃度で割ることで算出

N.A:算出不可

4.3.4 総金属濃度に対するDGT-labile態の存在比率

各実験系におけるDGT-Labile態金属の存在比率を表-2に示す。なお、ダム上流河川底質を用いたRun3ではNiの測定濃度自体が全般的に低く、ここでは算出不可とした。DGT-Labile態金属の総濃度に対する存在比率が1%を超えていたのは、貯砂ダム底質 (Run1) では、Al (1.4%)、Mn (1.5%)、Ni (28.4%)、Zn (64.2%)、Pb (1.8%) であり、ダム上流河川底質 (Run3) では、Mn (1.5%)、Zn (43.2%)、Pb (39.7%) であった。貯水池底質では最も高い場合でもNiの0.8%であった。金属の種類によって水生生物に直接影響を及ぼすとされるLabile態の存在比率が異なることが示され、ほとんどの場合で、Labile態として水中に溶出される金属の存在比率が低く、土砂中の金属存在量だけでは生態リスクの評価が適切にできない可能性が示唆された。また、Labile態としての存在濃度および存在比率が高い傾向にあったZnについても、貯水池底質 (Run2) では存在濃度および存在比率が低く、供給される土砂によって金属類の水中での挙動が異なることが示唆された。既報の調査報告によると、底質中の粒度分布によって金属の蓄積量が異なる⁷⁾とされているが、蓄積量だけではなく、Labile態の存在比率に影響を及ぼす土砂の特性について検討することにより、土砂供給の下流環境における生態リスクをより的確に評価できる可能性がある。

5. まとめ

本研究では、土砂供給に伴う土砂・水質の動態、そして土砂供給が陸域における生物および水域における生物に及ぼす影響について調査を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

○金属類6種 (Al、Mn、Fe、Ni、Zn、Pb) を対象に、水

生生物に直接影響を及ぼすとされる形態 (Labile態) のモニタリング手法として、Diffusive Gradient Thin Films (DGT) ・パッシブサンプリング法の適用可能性を室内実験により検討した。その結果、スポット採水測定で得られた濃度との間に良好な相関が得られた。

○底質への金属類の蓄積のされ方は停滞水域であるか流水域であるかによって異なること、また、土砂供給に用いる土砂によって、水中に溶出されるLabile態金属の存在量および存在比率が異なることが示唆された。

参考文献

- 1) 栗津陽介ら：排砂バイパスを導入したダム下流における河床環境と底生動物群集、京都大学防災研究所年報、Vol.58 (B)、pp. 527-539、2015
- 2) 平成 29 年度研究開発プログラム報告書「12.2.1 土砂供給に伴う河川環境影響評価およびダムからの土砂供給技術の運用手法に関する研究」、2018
- 3) 永井孝志：環境水中重金属のスペシエーションと生物利用性、環境毒性学会誌、Vol.14 (1)、pp.13-23、2011
- 4) Zhang, H. & Davison, W. : Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. Analytical chemistry, 67(19), pp. 3391-3400, 1995
- 5) 坊野聡子ら：出水時のダム貯水池における濁質観測、水工学論文集、Vol.42、pp.715-720、1998
- 6) DGT Research Ltd., Practical guide for using DGT for metals in waters.
- 7) 多田史ら：都市河川底質中の重金属分布の特性、陸水学雑誌、Vol.45(4)、pp.296-303、1984

生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 30

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、南山瑞彦、小川文章、
北村友一、真野浩行、武田文彦、
村田里美、服部啓太、藤村幸裕

【要旨】

下水処理場には家庭排水や工場排水等が流入するため、流入下水中には多数の化学物質が存在する。そのため下水処理水の水生生物に関する安全評価を行う場合、分析機器を用いた個別の化学物質の存在評価手法より、生物を用いた安全評価手法が適当であると考えられる。一方、生物応答を用いた全排水毒性試験（Whole Effluent Toxicity 試験：WET 試験）は、主に工場排水の安全評価法として確立されているが、下水処理水の評価法としての報告は未だ少ない。そこで本研究では、藻類、甲殻類、魚類を用いた下水に対する生物影響評価と、毒性同定評価（TIE：Toxicity Identification Evaluation）を行った。その結果、流入下水より下水処理水では生物影響が軽減されること、生物種により化学物質の感受性が異なることを明らかにした。

キーワード：全排水毒性（WET）試験、下水処理、ムレミカヅキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ、ヒメダカ

1. はじめに

近年、排水の毒性評価において、毒性を有する個別の化学物質の存在を評価するのではなく、生物応答から毒性判定を行う生物応答試験が世界的に注目されている。生物応答試験は、個別の化学物質の定量などによる従来の物理化学分析方法と比べて、①試験水中に含まれる化学物質の影響を複合的に評価できる、②生物への直接的な影響を評価するため、一般市民が評価結果を実感しやすいなどの特長が挙げられる。海外では、排水中の化学物質の生物影響について、米国で導入された全排水毒性（Whole Effluent Toxicity：WET）試験¹⁾など、生物応答を用いた試験により評価が行われている。日本では環境省が 2019 年に自主管理規制案として生物応答試験を用いた排水の評価手法（仮称）とその活用の手引き²⁾を公表するなど、生物応答に基づく排水管理の制度化と導入が検討されている。

下水処理水は主要排水のひとつであるが、国内で公表された試験法に基づき試験した研究例^{3,4)}は極めて少ない。そのため、下水処理水に対する生物応答試験を行い、下水処理により生物影響を低減できるかなどの知見を収集することが必要であると考えられる。また、生物影響が確認された場合、生物影響を引き起こした化学物質を明らかにし、影響物質の除去の可能性も含めた対策手法を検討することが必要になる。しかし、

公表された試験法に基づき下水に含まれる影響物質を評価した知見⁴⁾は少なく、情報収集が必要であると考えられる。

そこで本研究では下水処理場から得た実下水を対象に、ムレミカヅキモの生長阻害試験、ニセネコゼミジンコによる繁殖試験、胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験（ゼブラフィッシュまたはメダカ）を行うことで、下水試料に対する生物影響の試験法（WET 試験）の適用性の検討と、種々の処理方式の処理水について毒性データ収集を行った。また、影響が見られた排水に対して毒性同定評価（Toxicity Identification Evaluation：TIE）による生物影響物質の推定、処理の高度化の組みあわせによる、その影響の軽減の試行を行った。

本研究の成果は以下の 4 つの観点で取りまとめた。

I：下水に対する WET 試験の適用と TIE

2. 藻類、甲殻類、魚類を用いた WET 試験による下水処理水の影響評価

II：下水の藻類に対する影響解明

3. 藻類を用いた WET 試験による下水処理水の季節影響評価

4. 各種処理方式の下水処理水に対する藻類を用いた WET 試験

III：下水の甲殻類に対する影響解明

5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ 2 種への影響評価

6. ニセネコゼミジンコに対する下水処理水中のニッケルの影響とその影響に関係する金属について

7. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水が放流先の水生生物へ及ぼす影響の評価

8. 金属濃度の高い二次処理水が持つ生物影響と凝集沈殿処理による生物影響改善の検討

IV：下水の魚類に対する影響解明

9. 下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚類（ゼブラフィッシュとヒメダカ）の検討

10. 下水処理水を対象としたメダカ多世代試験による魚類個体群存続評価

2. 藻類、甲殻類、魚類を用いた WET 試験による下水処理水の影響評価

2.1 目的

下水処理場から得た実下水を対象に、ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いて WET 試験を行い、下水に対する生物影響の評価を行った。また、影響が見られた排水に対して TIE 試験を行い、排水中の生物影響物質の推定を行った。

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 下水試料の採水

2014 年 11 月に生活排水を主とする下水を標準活性汚泥法で処理する A 下水処理場から採水を行った。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ、合計 24 リットル採水した。採水箇所は生物反応タンクの流入口および塩素混和池の出口付近で実施し、それぞれ沈砂池越流水（流入下水）、放流水とした。それぞれの排水は、採水後等量混合した。これらの流入下水、放流水に対し水質分析を行った（表-1）。また、流入下水と放流水は 60 μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、ろ液を 4℃の冷暗所で保管した。ろ液は試験試料として以下に示す生物応答試験に用いた。

2.2.2 WET 試験

WET 試験は、生物応答を用いた排水試験法（検討案）²⁾に基づき実施した。

2.2.2.1 藻類生長阻害試験

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法（検討案）²⁾の推奨種となっている単細胞緑藻ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*、NIES-35 株）を用いた。下水試料に対して蒸留水を用いて 5 段階（試料割合 80%、40%、20%、10%、5%）希釈し、試験試

表-1 A 処理場の流入下水、放流水の水質

項目	単位	流入下水	放流水
水温	℃	21.2	21.3
pH		7.17	6.98
電気伝導度	mS/cm	0.457	0.429
DO	mg/L	1.72	8.17
塩分濃度	%	0.0	0.0
TRC	mg/L	—	0.08
水の硬度	mg/L	96	91
T-N	mg/L	27.3	13.7
T-P	mg/L	2.47	0.286
NH ₄ -N	mg/L	16.8	8.10
NO _x	mg/L	0.093	1.46
PO ₄ -P	mg/L	1.26	0.134
TOC	mg/L	26.4	10.7

* 試料は採取後に等量混合した。

DO：溶存酸素濃度（Dissolved Oxygen）、TRC：総残留塩素濃度（Total Residual Chloride）、TOC：全有機炭素濃度（Total Organic Carbon）、—：未測定。

料を作製した。各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22 μm ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行った。容量は 30 mL/容器とし、対照区は 6 連、各 1.0×10⁴ cells/mL、温度 24℃、光強度 3000 Lux 連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に粒子計数分析装置（CDA-1000B、100 μm アパチャー、Sysmex 社）を用いて対照区と各下水試料での細胞濃度を求め、その結果に基づき各試験水での生長速度を算出した。下水試料による生長阻害率は、以下の式(1)により算出した。

$$\text{生長阻害率 (\%)} = (\text{対照区の生長速度} - \text{下水試料での生長速度}) \div \text{対照区の生長速度} \times 100 \quad \cdots (1)$$

2.2.2.2 オオミジンコ繁殖試験

本試験では、OECD テストガイドライン No.211⁶⁾を参考に、初産ではない親個体から 24 時間以内に生まれたオオミジンコ（*Daphnia magna*）を用いて実施した。本試験には 4 段階希釈（試料割合 80%、40%、20%、10%）の下水試料および対照区を用意した。容量は 50mL/容器とし、試験連数は 10 連/試験区とした。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、脱塩素水道水を用いた。試験区ごとに生後 24 時間以内

表-2 試験水に対する各種前処理により生物影響が変化する物質の一覧⁵⁾

	b) チオ硫酸 ナトリウム	c) EDTA	d) ばっ気	e) pH調整	g) SPE カラム	備考
酸化物(塩素を含む)	○		○			4℃保存で時間とともに生物影響消失
アンモニア				○ ¹⁾		
無極性有機物					○	SPEカラムのメタノール溶出物に生物影響ある
界面活性剤			○		○	4℃保存で時間とともに生物影響消失
陽イオン金徳	○	○			○	
総溶解固形分(TDS)	△	△		△	△	

* b～gの項目で○印がひとつでも付くと、右カラムの物質に該当する可能性があることを示す。

○:生物影響が低下

SPE: 個相抽出

○¹⁾: pHが低いと生物影響が低下

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

△: 生物影響は低下しない

の個体を10匹(1容器1匹)曝露し、曝露期間を17日間とした。曝露方式は半止水式(少なくとも週3回、2日または3日ごとに換水)とし、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は21±1℃とした。餌としてクロレラ(*Chlorella vulgaris*)を使用し、試験個体ごとに炭素含有量が0.15 mgのクロレラを1容器ごとに毎日与えた。曝露終了後まで、試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、下水試料の試料割合ごとに生存率と累積産仔数を求めた。

2.2.2.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

国立環境研究所より分譲されたゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)を使用し、実施した。試験には5段階希釈(試料割合80%、40%、20%、10%、5%)の下水試料および対照区を用意した。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、脱塩素水道水を用いた。容量は50 mL/容器とし、試験連数は4連/試験区とした。試験区ごとに受精4時間以内の胚を40個(1容器10個)曝露し、曝露期間を9日間(対照区の生存胚の半数以上がふ化した日をふ化日とし、ふ化日から5日後まで)とした。曝露方式は半止水式(少なくとも週3回、2日または3日ごとに換水)とし、ふ化率と生存率を求めた。照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間とし、水温は26±1℃とした。

2.2.3 TIE試験

2.2.2.1-2.2.2.3の試験において影響が見られた流入下水に対し、米国環境保護庁(USEPA)の毒性削減評価指針⁵⁾の短期慢性毒性同定評価方法を参考にTIE試験を行った。表-2に、各前処理と生物影響に寄与する化学物質(群)との関係を示す。流入下水に対し、無処理、チオ硫酸ナトリウム添加(5 mg/L)、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)添加(0.25 mg/L、EDTA二水

素二ナトリウムを使用)、ばっ気(流入下水100% 1L/1L air、1時間、ばっ気後に20%に希釈)、pH調整(pH約6.5に調整)の前処理を行った。また、SPE(Solid Phase Extraction、固層抽出)カラム(Sep-Pak C18、Waters社)を用い、試料を1.0 μmポアサイズフィルターでろ過後にSPEカラムに通水したもの(SPEカラム通過水)、及びSPEカラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの(メタノール溶出物)を前処理水として試験した。

藻類試験では、全ての試験水を0.22 μmフィルターでろ過することから、ろ過試験は実施しなかった。藻類でのTIE試験では、流入下水20%に対し各処理を行った。各試料にAAP培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22 μmフィルターでろ過滅菌を行ったものを藻類試験に供した。対照区はAAP培地とし、試験条件は2.2.2.1 藻類生長阻害試験と同一とした。

ゼブラフィッシュ胚・仔魚を用いたTIE試験では、流入下水80%に対し各前処理を行った。ろ過処理は1.0 μmポアサイズフィルターを用いて行った。対照系には脱塩素水道水を用い、曝露期間は8日、それ以外の試験条件は2.2.2.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験と同一とした。なお、オオミジンコでは下水試料が多量に必要であり、試験期間が長期にわたるため、TIE試験を実施しなかった。

2.2.4 統計解析

各試験でのエンドポイント(藻類:0-72時間の生長速度、オオミジンコ:累積産仔数、ゼブラフィッシュ:ふ化率と生存率)について、Bartlett検定(有意水準 $\alpha=0.05$)により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett検定による多重比較(有意水準 $\alpha=0.05$)で対照区と下水試料との比較を実施した。等分散が棄却された場合はSteel検定(有意水準 $\alpha=0.05$)で

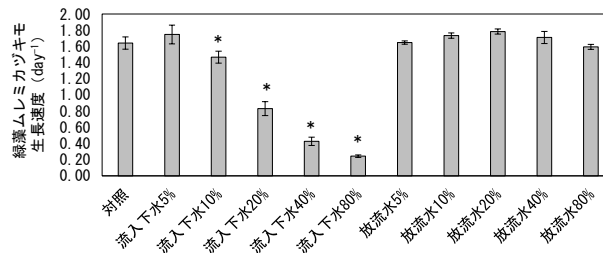


図-1 流入下水、放流水に曝露した緑藻ムレミカツキモの生長速度

* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

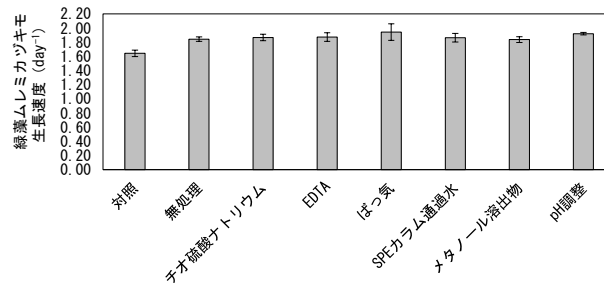


図-2 流入下水（20%排水濃度）に対する緑藻ムレミカツキモを用いたTIE試験

対照系と下水試料との生長速度の比較を実施した。これらの解析にはフリーの統計解析ソフト R⁷を用いた。対照系と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) として求めた。全ての下水試料割合で対照系と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合を NOEC とした。TIE 試験においては、各試料での生長速度、ふ化率および生存率について、Bartlett 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定による多重比較 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区との比較を実施した。TIE 試験では、無処理区と比較して統計学的に生長速度、ふ化率あるいは生存率の有意な増加が認められた場合、前処理による生物影響の改善が見られたと評価した。メタノール溶出物の試験はメタノールのみを AAP 培地 (藻類)、脱塩素水道水 (ゼブラフィッシュ) に添加して対照区とした。対照区と比較を行い、生長速度、ふ化率、生存率の有意な低下が見られた場合は、メタノール溶出物による影響があったと評価した。

2.3 実験結果

2.3.1 藻類生長阻害試験

図-1 に各下水の試料割合に対する藻類の生長速度を示す。流入下水は、10%以上の試料割合で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$)。放流水では最

大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられなかった。これらの結果から NOEC は流入下水で 5%、放流水で 80%と求められた。流入下水 (割合 20%) に対する TIE 試験の結果を図-2 に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加する前処理区はなかった。一方、メタノール溶出物でも生長速度に対する悪影響は確認されなかったため、無極性有機物は藻類に対して無影響であると分かった。TIE 試験は排水試験の 3 週間後に実施したが、排水試験 (図-1) で見られた影響が、TIE 試験 (図-2) では影響が確認されなかった。このことから、流入下水を 4℃暗所で保管している間に生物影響が低下したことが推察された。

2.3.2 オオミジンコ繁殖試験

図-3 に、オオミジンコの累積産仔数と生存率を示す。対照区の死亡率は 20%以下で、かつ試験個体あたりの産仔数の平均値は 60 を超えたことから、試験条件を満たした。流入下水は 20%以外の区では産仔数が対照区に比べて有意に低下した ($p < 0.05$)。流入下水 20%では対照区と同等 ($p > 0.05$) であったことから、累積産仔数に関する流入下水の NOEC は 20%と判断した。一方、放流水での累積産仔数は全ての試験区において対照区よりも多く、放流水によるオオミジンコの産仔数への生物影響は検出されなかった。よって累積産仔数に関する放流水の NOEC は 80%と求められた。生存率は累積産仔数と類似した変化を示し、流入下水では 10~80%の範囲で低下していた。放流水では 40%以上で低下する傾向にあったが、総じて高い生存率を示し

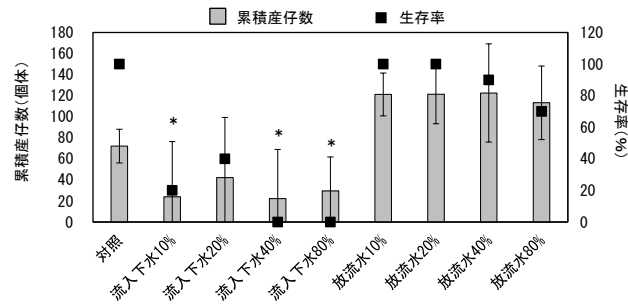


図-3 流入下水、放流水に曝露したオオミジンコの累積産仔数と生存率

* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

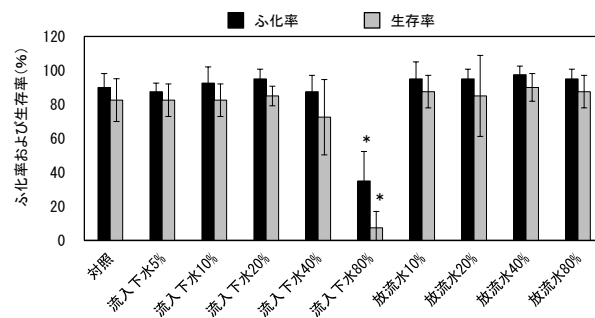


図-4 流入下水、放流水に曝露したゼブラフィッシュのふ化率と生存率

* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

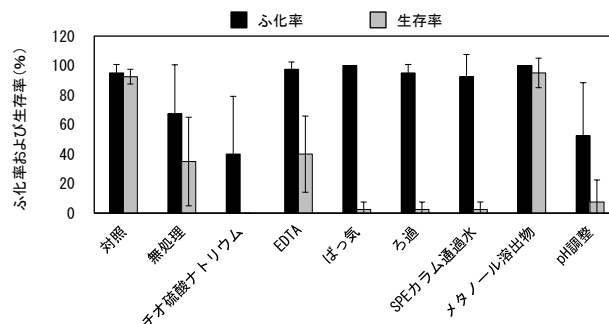


図-5 流入下水（80%排水濃度）に対するゼブラフィッシュ胚・仔魚を用いたTIE試験

た。

2.3.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

図-4に各試料におけるゼブラフィッシュのふ化率と生存率を示す。流入下水の割合が80%の場合のみ、ふ化率と生存率は対照区よりも有意に低下した ($p < 0.05$)。このため両指標に対する流入下水の NOEC は 40%と求められた。一方、放流水では全ての試験区でふ化率および生存率は対照区と有意差はなく ($p > 0.05$)、影響は見られなかった。よって両指標に対する放流水の NOEC はいずれも 80%と求められた。

流入下水 80%に対し TIE 試験を実施した結果を図-5に示す。ふ化率では全ての系で対照系と同等であった ($p > 0.05$)。メタノール溶出物では、ふ化率と生存率が対照と同等になり、無極性有機物は影響しないことが推察された。一方ばっ気処理では、無処理区に比べ

ふ化率が有意に改善された ($p < 0.05$)。以上の結果から、ばっ気処理でふ化率が改善されることが明らかになったが、生存率を改善する前処理は導出できなかった。

TIE 試験は排水試験より 2 週間後に実施したが、各試験での対照区のふ化率と生存率は t 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) より有意差がなく ($p > 0.05$)、試験生物の性状として同等であると判断した。また、排水試験での流入下水 80% (図-4) と TIE 試験での無処理 (流入下水 80%、図-5) におけるふ化率と生存率に有意差がないことが確認され ($p > 0.05$)、藻類とは異なり、4℃暗所保管の間に生物影響が低下しなかったことが推察された。

2.4 考察

藻類に対する TIE 試験は排水試験の 4 週間後に実施し、その間、下水試料を 4℃冷暗所で保管した。表-2 よ

り酸化物と界面活性剤は 4℃保存で生物影響が消失すると思われる。一方、「PRTR けんさくん」⁸⁾から平成 25 年度のデータでは、A 下水処理場で界面活性剤であるポリ＝（オキシエチレン）＝アルキルエーテルの年間推定移動量が極めて多いと推定された。ここから、流入下水で見られた藻類の生長速度に対する影響（図-1）は、界面活性剤が原因物質であると推察された。

ゼブラフィッシュに対する TIE 試験は排水試験の 2 週間後に実施した。ばっ気処理でふ化率が改善したこと、また TIE 試験において無処理のふ化率と生存率の平均値（図-5）が、排水試験（80%流入下水、図-4）より大きいことから、藻類と同様にゼブラフィッシュに対しても界面活性剤が影響を引き起こした可能性が推察された。一方、藻類と異なり、4℃保存下で生物影響が完全に消失しないこと、他の前処理でほとんど改善が見られないことから、ゼブラフィッシュに対し生物影響を引き起こす化学物質は複数存在することが推定された。

表-3 に各試験生物に対する流入下水、放流水の NOEC を示す。いずれの試験生物においても流入下水では低い値を示したが、放流水では排水割合 80%を示した。これらの結果は、A 下水処理場における標準活性汚泥処理により、試験生物に対する影響を削減できることを示している。NOEC が 80%から、1.25 倍以上の希釈で生物影響が見られなくなると判定される。通常、下水処理場では環境水中に処理水を放流しており、この程度の希釈倍率は確保され则认为られる。そのため、本試験結果から、放流水の水生生態系への影響は見られないと推察される。一方、生物影響物質の種類や量、また処理場の排水処理能力は季節において変動すると考えられるため、生物応答試験を行い、情報を蓄積することが重要であると考えられる。

2.5 まとめ

標準活性汚泥法を用いた下水処理による生物影響の低減効果を明らかにするとともに、生物影響を引き起こす化学物質を推定するために、本研究では流入下水と塩素消毒した放流水に対して藻類、オオミジンコ、

表-3 各試験生物に対する流入下水、放流水の無影響濃度 NOEC のまとめ

試験生物	評価指標	NOEC (%)	
		流入下水	放流水
ムレミカツキモ	生長速度	5	80
オオミジンコ	累積産仔数	20	80
ゼブラフィッシュ	ふ化率	40	80
	生存率	40	80

ゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を実施した。得られた結果を以下に示す。

1) 藻類生長阻害試験により、流入下水の割合が 10%以上の場合において生長速度への影響がみられた。放流水による生長速度への影響はいずれの試料割合においても検出されなかった。よって下水処理により藻類生長への影響の低減が確認できた。流入下水中の主要な生物影響物質は界面活性剤であると推察された。

2) オオミジンコ繁殖試験により、流入下水は 10、40、80%において累積産仔数が低下し影響が見られた。放流水ではいずれの試料割合においても産仔の低下は確認されなかった。生存率は流入下水の場合は全ての試料割合で大きく低下したが、放流水では総じて高かった。よって、下水処理によりオオミジンコの産仔・生存への影響の低減が確認できた。

3) ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験により、ふ化率、生存率は流入下水 80%のみ影響があり、放流水ではいずれの試料割合においても影響がなかった。よって下水処理によりゼブラフィッシュのふ化・生存への影響の低減が確認できた。流入下水中の主要な生物影響物質は界面活性剤であると考えられるが、複数の化学物質群が影響していると推定された。

3. 藻類を用いた WET 試験による下水処理水の季節影響評価

3.1 目的

冬季など水温が低下する時期には排水中の有機物等を除去する能力が低下する傾向にあるため、生物影響を及ぼす物質の削減能力も同様に低下する可能性が考えられる。一方、我が国の既往研究において各季節における下水処理の生物影響削減効果を評価した研究例はない。そこで本研究ではムレミカツキモを用いて各季節における下水処理による生物影響削減効果を評価した。

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 下水試料の採水

合流式の単独公共下水道であり、嫌気好気活性汚泥処理を行っている B 下水処理場で、2015 年 1 月、4 月、7 月、10 月に採水した。B 処理場には生活排水のみならず産業排水も流入している。PRTR けんさくん⁸⁾の公開情報によると、平成 25 年度に事業場から届出された PRTR 第一種対象物質の B 処理場に対する流入化学物質種数は約 30 種であり、主に界面活性剤、疎水性化学物質、金属類、酸化物の流入が多いことが推定さ

表-4 B 処理場の流入下水、下水処理水の水質

項目	単位	流入下水				下水処理水			
		1月	4月	7月	10月	1月	4月	7月	10月
水温	℃	7.2	6.8	11.9	15.2	8.4	5.9	11.5	14.0
pH		6.77	6.73	6.65	6.77	6.73	6.98	6.62	6.89
電気伝導度	mS/cm	1.39	1.32	1.33	1.47	1.31	1.18	1.10	1.43
溶存酸素濃度	mg/L	0.002	1.15	0.00	0.00	10.3	8.67	8.11	9.00
塩分濃度	%	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
水の硬度	mg/L	155	140	145	150	160	150	145	150
全窒素	mg/L	23.7	22.4	18.3	21.2	11.7	11.7	10.6	11.6
全リン	mg/L	2.61	3.26	4.32	1.87	0.442	0.468	0.592	0.132
NH ₄ -N	mg/L	13.6	13.2	11.6	13.8	1.03	9.17	0.257	2.20
NO _x	mg/L	0.131	0.083	8.73	0.111	7.91	1.06	0.040	7.93
PO ₄ -P	mg/L	0.48	1.00	6.12	0.618	0.056	0.153	0.96	0.063
全有機炭素濃度	mg/L	25.5	22.8	16.3	19.0	13.7	13.1	8.69	9.30

れた。採水は最初沈殿池の流入口付近および最終沈殿池の流出口付近で実施し、それぞれ流入下水、下水処理水とした。B 処理場では施設の構造上、塩素消毒後の放流水が得られなかったため、塩素消毒前の下水処理水を採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、24 リットル採水 (1L 採水 / 1 時間、24 時間採取) した。これらの排水は等量混合し、各排水サンプルに対して水質分析を行った (表-4)。また、流入下水と下水処理水は 60 μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、WET 試験を行うまで 4℃冷暗所で保管した。

3.2.2 排水の藻類生長阻害試験

2.2.2.1 藻類生長阻害試験に準じて行った。

3.2.3 TIE 試験

2.2.3 TIE 試験に準じて行った。

3.2.4 統計解析

2.2.4 統計解析に準じて行った。

3.3 実験結果

3.3.1 排水試験

図-6 に各下水試料割合における藻類の生長速度をまとめた。以下、各下水試料の結果の詳細について示す。

・1 月試料 (図-6 (a))

流入下水は、40%以上の排水濃度で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。下水処理水では割合が 80%の場合に、生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。これらの結果から、NOEC は流入下水で 20%、下水処理水で 40%と求められた。

・4 月試料 (図-6 (b))

流入下水は 80%以上の排水濃度で、対照区より生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。下水処理水では最大の試料割合の 80%でも生長速度の低下がみられず、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 40%、下水処理水では 80%以上と求められた。

・7 月試料 (図-6 (c))

流入下水は 40%以上の排水濃度で、対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。下水処理水では最大の試料割合の 80%でも生長速度が低下せず ($p>0.05$)、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水では 80%以上と求められた。

・10 月試料 (図-6 (d))

流入下水は 40%以上の排水濃度で、対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。下水処理水では最大の試料割合である 80%でも生長速度が低下せず ($p>0.05$)、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水では 80%以上と求められた。

3.3.2 TIE 試験

3.3.1 排水試験で影響が確認された排水試料に対して各前処理を行い、TIE 試験を行った (図-7)。以下結果の詳細について示す。

・1 月の流入下水、下水処理水 (図-7 (a)、(b))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-7(a)に示す。無処理に比べ、SPE カラム通過水で生長速度が有意に増加した ($p<0.05$)。また、メタノール溶

出物では対照区より生長速度が有意に低下し ($p<0.05$)、影響が見られた。表-2 よりメタノール溶出物は無極性有機物とされる。よって、流入下水中の主な影響物質は、無極性有機物であると推定された。

下水処理水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-7(b)に示す。対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった ($p>0.05$)。無処理に比べて生長速度が有意に増加した前処理区はなかった。下水処理水に対する TIE は排水試験より 8 日後に実施したが、図-6(a)の下水処理水 80%と図-7(b)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 16.9%、4.7%であった。生長阻害率は TIE 試験時の方で小さくなったことから、4℃暗所の保管により生物影響が低下したと判断した。4℃保存で生物影響が低下する物質は酸化物あるいは界面活性剤である (表-2)。よって、下水処理水中の主な影響物質は酸化物、あるいは、界面活性剤であると推定された。

・4月の流入下水 (図-7(c))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、pH 調整のみ生長速度が有意に増加した ($p<0.05$)。また、対照区とメタノール溶出物では

有意差がなかった ($p>0.05$)。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、図-6(b)の流入下水 80%と図-7(c)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 38.3%、27.1%であった。生長阻害率は TIE 試験時で小さくなったことから、4℃暗所で保管したことにより生物影響は低下したと判断した。

pH 調整で生物影響が改善する物質はアンモニアであり、4℃保存で生物影響が低下する物質は酸化物あるいは界面活性剤である (表-2)。よって、流入下水中の主な影響物質はアンモニアおよび酸化物、あるいは、界面活性剤であると推定された。

・7月の流入下水 (図-7(d))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加 ($p<0.05$) したのは pH 調整であった。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり ($p>0.05$)、影響が無かった。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、図-6(c)の流入下水 80%と図-7(d)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 37.3%、42.5%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、

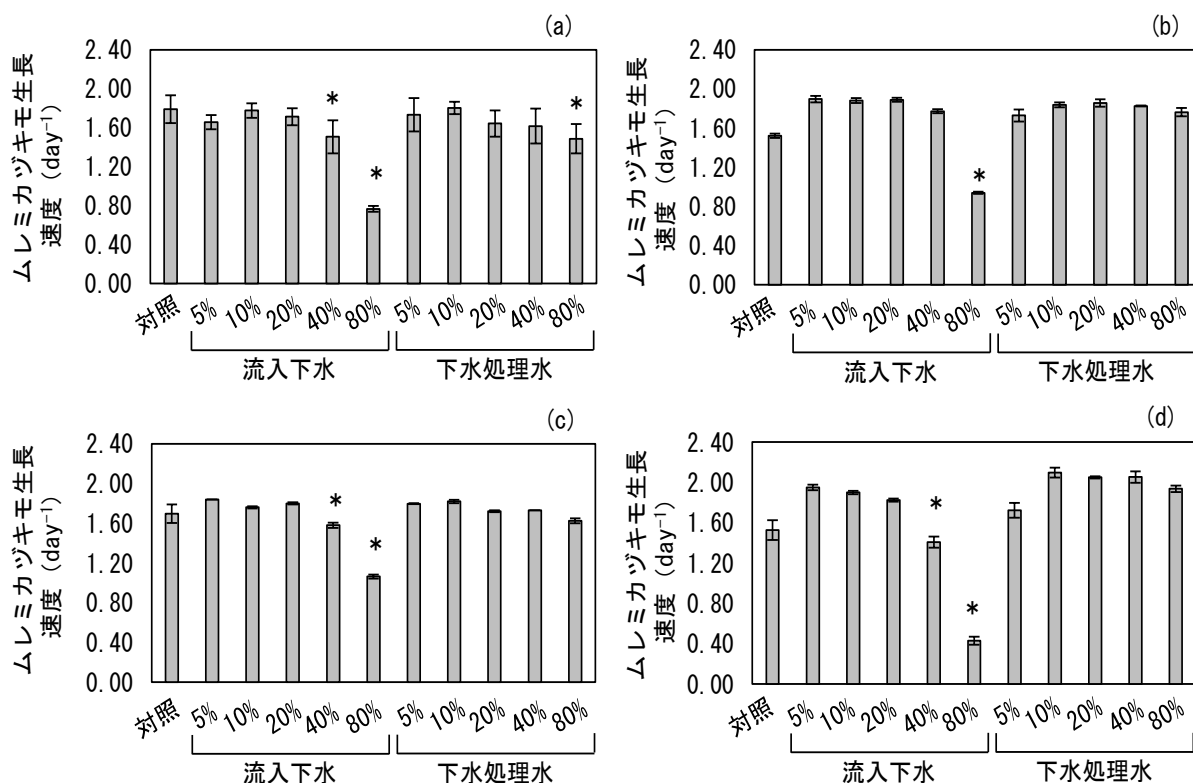


図-6 流入下水、下水処理水に曝露したムレミカツキモの生長速度

(a) 2015 年 1 月試料、(b) 2015 年 4 月試料、(c) 2015 年 7 月試料、(d) 2015 年 10 月試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

* : 対照区よりも有意に低下 ($p<0.05$)

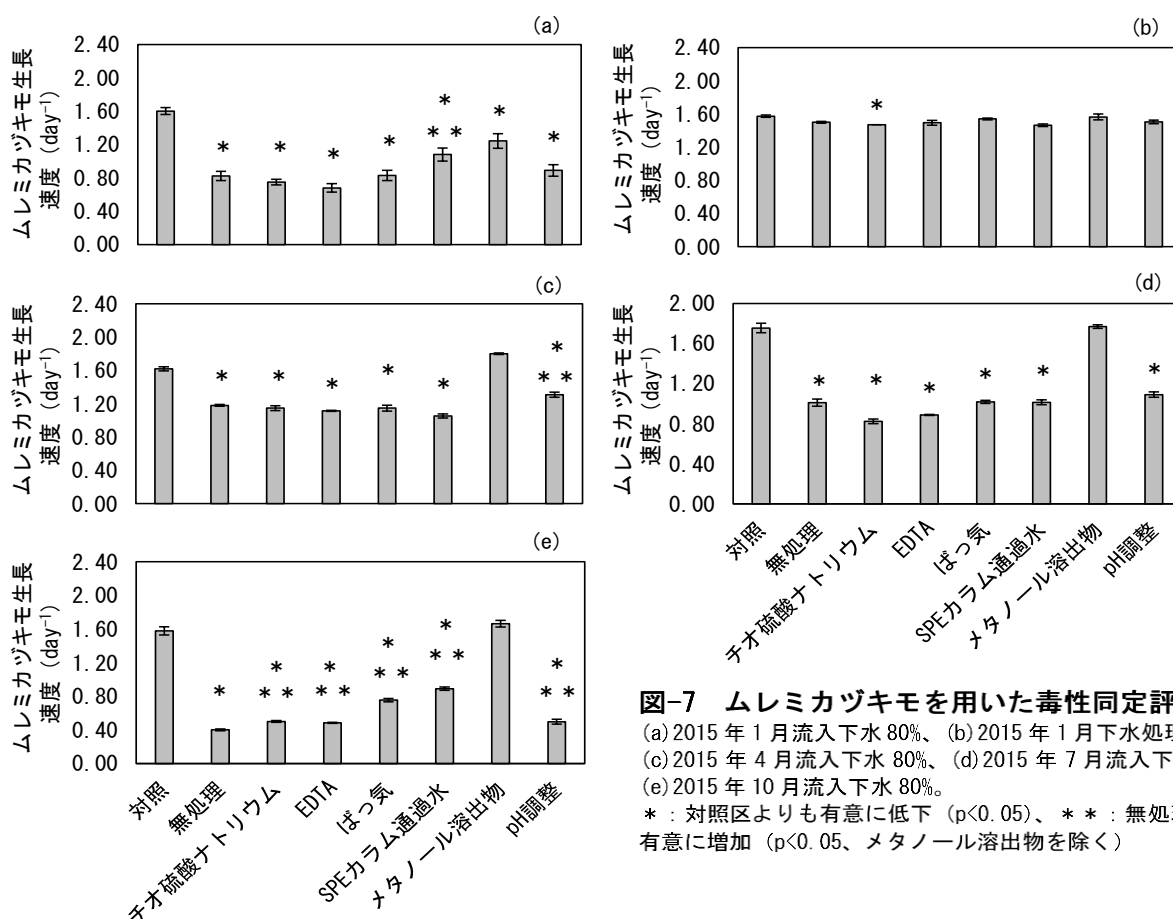


図-7 ムレミカツキモを用いた毒性同定評価

(a) 2015 年 1 月流入下水 80%、(b) 2015 年 1 月下水処理水 80%、
(c) 2015 年 4 月流入下水 80%、(d) 2015 年 7 月流入下水 80%、
(e) 2015 年 10 月流入下水 80%。
* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)、* * : 無処理よりも有意に増加 ($p < 0.05$ 、メタノール溶出物を除く)

4℃暗所保管でも生物影響は低下しなかったと判断した。表-2 より pH 調整で生物影響が改善する物質はアンモニアである。ただし、本試験において pH 調整による生長速度の改善はわずかであることから、流入下水中の主な影響物質はアンモニアの他に、別の化学物質も複合的に作用していることも推定された。

・10 月の流入下水 (図-7(e))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、全ての前処理区で生長速度が有意に増加した ($p < 0.05$)。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり、影響は見られなかった。流入下水に対する TIE は排水試験より 13 日後に実施したが、図-6(d)の流入下水 80%と図-7(e)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 71.8%、74.6%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所の保管でも生物影響は低下しなかったと判断した。メタノール溶出物を除く全ての前処理で対照区より生物影響が改善したことから、流入下水中の主な影響物質は酸化物、アンモニア、界面活性剤、陽イオン金属などが推定された (表-2)。

3.4 考察

表-5 に各試験生物に対する流入下水、下水処理水の

NOEC、TIE 試験により推定された生物影響化学物質をまとめた。表中の推定影響物質について、生物影響が見られず TIE を実施する必要がなかった下水試料については「なし」とした。

NOEC をみると、いずれの採取時期においても流入下水より下水処理水の NOEC の値が大きい、または試験における最高の試料割合でも影響がないことが明らかになった。これらの結果は、B 処理場での下水処理により、生物影響が削減されたことを示している。また、流入下水から種々の生物影響化学物質が推定されたが、下水処理水では生物影響の低減あるいは消失が確認された。これらの結果は、B 処理場での下水処理によって、これら化学物質に起因する生物影響が削減されたと考えられた。PRTR けんさく⁸⁾の公開情報によると B 処理場には界面活性剤、疎水性化学物質、金属類、酸化物等が流入することが示されており、TIE で推定された生物影響物質と類似していた。このような公開情報は下水試料中の生物影響物質の推定や同定を行う上で参考になることが推察される。本研究で実施した PRTR 情報の活用、生物応答試験、毒性同定評価の一連の調査研究手法は、下水道における新しい排

水管理手法になり得ると考えられた。

下水処理水においては1月試料のみ生物影響が確認された。2015年1月、2015年4月、7月、10月でのB処理場の下水処理水の月間平均水温は約18℃、約19℃、約28℃、約27℃であり、1月に最も水温が低かった。1月の下水処理水のみムレミカツキモに対する生物影響が見られたのは、水温低下によって生物活性が他の時期より低下し、それが原因となり生物影響物質の除去能が低下したことが推定された。また本調査では、B処理場の他に標準活性汚泥処理を行う2箇所の処理場でも流入下水と放流水を採水し、同様の試験を行った。その結果2処理場ともB処理場と同様に、冬季の水温低下期のみ放流水でムレミカツキモに対する生物影響が確認された。水温低下により、生物影響の削減能の低下が、活性汚泥処理で生じやすいことが示唆される。他の処理方式でも同様の現象が起こるか、またそのメカニズムについて今後検討する必要があると考えられた。

3.5 まとめ

下水処理による生物影響削減能の季節変化を評価するため、嫌気好気活性処理を行うB処理場において流入下水と下水処理水を採水し藻類生長阻害試験を実施した。結果として、流入下水では計4回のいずれの時期においても供試藻類に対する生物影響が見られた。下水処理水では春（4月）、夏（7月）、秋（10月）に

表-5 ムレミカツキモに対する流入下水、下水処理水のNOECと毒性同定評価により推定された生物影響物質のまとめ

	下水試料	NOEC (%)	推定された生物影響物質
1月	流入下水	20	無極性有機物
	下水処理水	40	酸化物あるいは界面活性剤
4月	流入下水	40	・酸化物あるいは界面活性剤 ・アンモニア
	下水処理水	≥80	なし
7月	流入下水	20	・アンモニア ・それ以外にも複数の物質が影響？
	下水処理水	≥80	なし
10月	流入下水	20	酸化物、アンモニア、界面活性剤、陽イオン金属など
	下水処理水	≥80	なし

*NOEC: 無影響濃度 (No Observed Effective Concentration)

得たものは生物影響がなかったが、冬（1月）の下水処理水のみ影響が確認された。その原因として、冬季には下水の水温低下に伴う生物活性の低下に起因して生物影響物質が除去しきれずに残存してしまうことが推定された。

4. 各種処理方式の下水処理水に対する藻類を用いたWET試験

4.1 目的

本研究では各種下水処理方法について、藻類に対する下水の生物影響の有無、および生物影響削減能力を検討することを目的とした。複数の下水処理場において生物処理前後の下水を採水し、WET試験を実施した。生物影響が確認された下水については、TIE試験を行い、生物影響原因物質の推定を行った。

4.2 実験材料および実験方法

4.2.1 下水試料の採水

C下水処理場（標準活性汚泥処理法）、D下水処理場（OD法）、E下水処理場（嫌気好気ろ床法）を対象とした。いずれの処理場も主に生活排水が流入している。流入下水及び塩素消毒後の放流水を2015年6月（C処理場）、2016年7月（D処理場）、2016年8月（E処理場）に採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は24時間とし、1時間ごとに1リットルずつ、合計24リットル採水した。これらの排水はそれぞれ等量混合し、流入下水（流出口付近で採取）、放流水に対して水質分析を行った（表-6）。また、流入下水と放流水は60 μm ポアサイズのメッシュでろ過し、ろ液を4℃の冷暗所で保管した。これらのろ液は下水試料として生物応答試験に用いた。

4.2.2 藻類生長阻害試験

2.2.2.1 藻類生長阻害試験に準じて行った。

4.2.2 毒性同定評価

2.2.3 TIE試験に準じて行った。

4.2.3 統計解析方法

2.2.4 統計解析に準じて行った。

4.3 実験結果

4.3.1 排水試験

図-8に各下水試料割合における藻類の生長速度をまとめた。以下、各下水試料の結果の詳細について示す。

・C処理場（図-8(a)）

流入下水は、割合が40%以上の場合に対照区より生長速度が有意に低下した（ $p<0.05$ ）。放流水では最大の試料割合である80%でも生長速度の低下がみられず、藻類の生長速度の影響はなかった。よってNOECは流

表-6 採水後に等量混合した流入下水、放流水の水質

項目	単位	C処理場		D処理場		E処理場	
		流入下水	放流水	流入下水	放流水	流入下水	放流水
水温*	°C	24.6	24.3	25.5	25.6	16.2	16.8
pH		7.16	6.83	6.87	7.25	6.91	7.25
電気伝導度	mS/cm	0.496	0.406	1.424	1.105	0.469	0.455
DO	mg/L	0.008	5.88	0.018	6.7	2.45	8.81
塩分濃度	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TRC	mg/L	—	0.03	—	0.05	—	0.1
水の硬度	mg/L	82	87	78	85	50	50
TN	mg/L	22.8	9.24	36.4	8.64	34.1	29.2
TP	mg/L	2.21	1.01	4.45	1.81	4.73	3.78
NH ₄ -N	mg/L	14.4	1.12	18.8	0.157	18.8	19.5
NO _x	mg/L	0.014	6.92	0.045	6.53	0.218	5.54
PO ₄ -P	mg/L	1.00	0.976	1.63	1.78	1.86	3.15
TOC	mg/L	15.7	5.34	34.6	4.90	19.1	12.1

*コンボジット時の水温

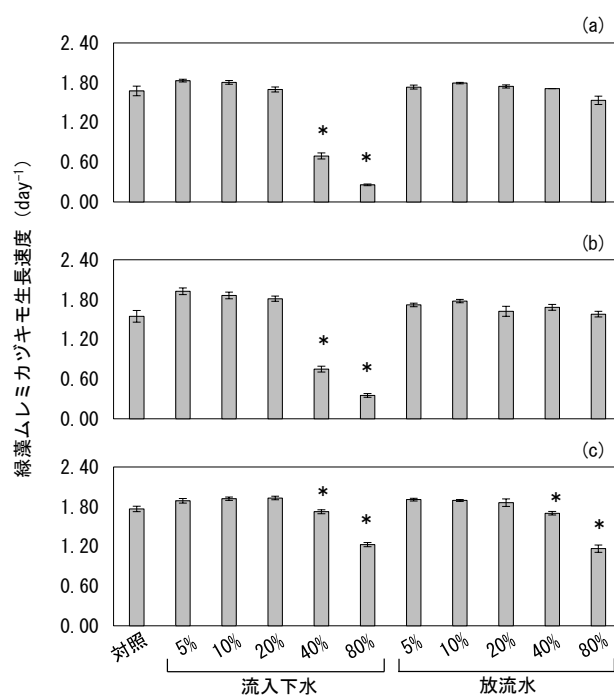


図-8 流入下水、放流水に曝露したムレミカツキモの生長速度

(a)C 処理場、(b)D 処理場、(c)E 処理場の下水試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

* : 対照区よりも有意に低下 (p<0.05)

入下水では 20%、放流水では 80%以上と求められた。

・D 処理場 (図-8(b))

流入下水は、割合が 40%以上で対照区よりも生長速

度が有意に低下した (p<0.05)。放流水では最大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられず、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入

下水では 20%、放流水では 80%以上と求められた。

・E 処理場 (図-8(c))

流入下水、放流水いずれも割合が 40%以上で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。よって NOEC は両試料とも 20%と求められた。

4.3.2 TIE 試験

4.3.1 排水試験で放流水に影響が見られた E 処理場の流入下水と終沈流出水について、各前処理試料における藻類の生長速度を検討した (図-9)。以下、各水試料の結果の詳細について示す。

・E 処理場の流入下水 (図-9(a))

流入下水 (試料割合 80%) に対して試験を行った。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整であった ($p<0.05$)。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ($p<0.05$)、影響が見られた。流入下水に対する TIE は排水試験より 26 日後に実施したが、図-8(c)の流入下水 80%と図-9(a)の無処理における生長阻害率は、それぞれ 30%、28%であった。生長阻害率がほぼ同等だったことから、4℃暗所の保管でも、生物影響は低下しないと判断した。

表-2 より pH 調整で生物影響が改善する物質はアンモニアであり、メタノール溶出物は生物影響が見られたが、SPE 通過水では生物影響の改善は見られなかった。ここから無極性有機物とはいえないが、何らかの疎水性化学物質が生物影響物質であったと推定される。以上から流入下水中の主な影響物質は、アンモニア、疎水性化学物質であると推定された。

・C 処理場の放流水 (図-9(b))

放流水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整、EDTA であった ($p<0.05$)。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ($p<0.05$)、影響が確認された。流入下水に対する TIE 試験は排水試験より 14 日後に実施したが、図-8(c)の放流水 80%と図-9(c)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 34%、29%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

表-2 より pH 調整、EDTA 添加で生物影響が低下する物質はアンモニア、陽イオン金属である。メタノール溶出物では生物影響が見られたが、SPE 通過水では生物影響が削減されなかった。これらの結果から無極性有機物とはいえないが、何らかの疎水性化学物質が生物影響物質であったと推察される。以上の結果から、放流水中の主な影響物質はアンモニア、陽イオン金属、疎水性化学物質であると推定された。

4.4 考察

排水試験から、C、D 処理場においては流入下水には生物影響があり (NOEC 20%)、放流水では最大の試料割合である 80%でも影響がない (NOEC $\geq 80\%$) ことが明らかになった。よって C、D 処理場の下水処理によってムレミカヅキモに対する下水の生物影響の削減が可能であることが示唆された。

一方、E 処理場では流入下水、放流水の NOEC はいずれも 20%であり、生物影響が削減できなかったことが明らかになった。TIE 試験により推定された生物影

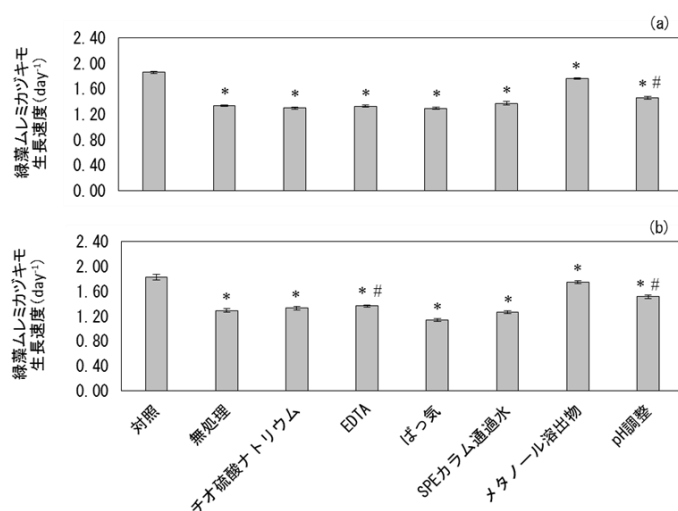


図-9 ムレミカヅキモを用いた毒性同定評価

(a) E 処理場の流入下水 80%、(b) E 処理場の放流水 80%

* : 対照区よりも有意に低下 ($p<0.05$)、# : 無処理よりも有意に増加 ($p<0.05$ 、メタノール溶出物を除く)

響物質は流入下水では疎水性化学物質とアンモニア、放流水では疎水性化学物質、アンモニアと陽イオン金属であり、その組成もほぼ同一であったことが示唆された。E 処理場の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は、流入下水で 18.8 mg/L、放流水で 19.5 mg/L であり、放流水でも濃度が高かった（表-6）。また、各処理場の DOC 除去率を比較すると C、D、E 処理場それぞれ 66%、86%、37%であり、E 処理場では除去率が低いと考えられた。よって、E 処理場では何らかの対策により硝化促進および生物処理を強化できれば放流水の生物影響の削減にもつながる可能性があると考えられた。

4.5 まとめ

3 種の下水処理方式における藻類ムレミカツキモに対する下水の生物影響削減能力を評価した。標準活性汚泥法を導入した C 処理場、OD 法を導入した D 処理場、嫌気好気ろ床法を導入した E 処理場において流入下水、放流水を採水し、それらに対し藻類生長阻害試験を実施した。C、D 処理場においては、流入下水には生物影響があり、放流水では影響が無かったことから、各処理場の処理によって生物影響が削減できたことが分かった。一方、E 処理場においては、流入下水と放流水に同等の生物影響が確認され、生物影響が削減できなかった。下水処理による生物影響削減能力の実態把握のため、今後も様々な処理場の下水を用いて同様の評価を行い、知見を収集する必要がある。

5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ 2 種への影響評価

5.1 目的

事業場排水に由来する金属が比較的多く流入する下水処理場の二次処理水に対して、ニセネコゼミジンコとオオミジンコを用いた排水試験を実施し、それらの感受性を比較した。また影響が確認された二次処理水に対して毒性同定評価試験を行い、下水処理水中の生物影響の原因物質の推定を行った。水質分析の結果も合わせ、ニセネコゼミジンコの下水処理水の TIE 試験の適用性を検討した。

5.2 実験材料および実験方法

5.2.1 下水試料の採水

PRTR けんさくくん⁹⁾の公開情報に基づき、金属類の流入負荷量が多い下水処理場 B を対象とした。この下水処理場 B では、処理方式に嫌気好気活性汚泥処理を採用し、日平均で約 150,000 m³/日の下水を処理して河川に放流している（平成 26 年度）。表-7 は、平成 24、

表-7 下水処理場 B への金属の年間移動量（kg）

第一種指定化学物質名	平成24年度		平成25年度	
	移動量*	中央値 (下水処理場数**)	移動量	中央値 (下水処理場数)
亜鉛の水溶性化合物	80	10 (84)	81	16 (86)
クロム及び三価クロム化合物、六価クロム化合物	113.4	5.9 (69)	144.2	9 (65)
セレン及びその化合物	0.4	-	3.5	-
銅水溶性塩（錯塩を除く）	43	15 (65)	7	13 (62)
鉛化合物	0.4	-	3.5	-
ニッケル、ニッケル化合物	807	20 (119)	167	20 (123)
砒素及びその無機化合物	0.7	-	0.3	-

*PRTRけんさくくん¹⁰⁾の公開情報に基づいて集計した

**PRTRけんさくくん¹⁰⁾の公開情報から、事業場からの移動が確認された全国の下水処理場の数を示す

表-8 二次処理水および対照区の水試料の水質分析 TIE 項目

水質項目	二次処理水				対照区	
	1月	4月	7月	10月	ニセネコゼミジンコ	オオミジンコ
T-N (mg/L)	11.7	11.7	10.6	11.6	1.63	0.33
T-P (mg/L)	0.442	0.468	0.592	0.132	0.152	N.D.
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/L)	1.03	9.17	0.257	2.2	0.04	N.D.
Cu (μg/L)	7.28	2.5	3.13	2.48	0.22	-
Ni (μg/L)	88.39	55.03	38.88	35.67	0.44	0.41
Zn (μg/L)	63.55	24.16	50.96	35.76	4.8	3.14

N.D.は不検出を示す

脱塩素水道水のCuは未測定

25 年度における下水処理場 B への金属およびその化合物の年間移動量を示す。全国の下水処理場の移動量の中央値と比較して、この下水処理場への亜鉛（Zn）、クロム（Cr）、銅（Cu）およびニッケル（Ni）の移動量が多いと考えられた。

2015 年の 1、4、7、10 月に二次処理水を採水した。採水は塩素添加前の最終沈殿池の流出口付近で実施した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ採水した。採水した二次処理水をコンポジットして、24 リットルの下水試料を得た。この下水試料をすぐに実験室に持ち帰り、孔径 60 μm のメッシュでろ過し、試験を実施まで、ろ液を遮光したガラス瓶に入れ、4℃冷暗所で保管した。

5.2.2 水質項目分析

採水した下水試料および生物試験の対照区に用いた水試料の水質を把握するため、各試料の一般水質項目（アンモニア性窒素（ $\text{NH}_4\text{-N}$ ）、全りん（T-P）、全窒素（T-N）および下水処理場 B に多く流入していると考えられる金属のうち Cu、Ni、Zn の溶存態濃度を測定した。アンモニア性窒素、全リンおよび全窒素の分析は下水試験方法¹⁰⁾に従い、連続流れ分析装置（TRAACS2000, Bran+Luebbe）を用いて定量を行っ

た。また溶存態の金属の分析は河川水質試験方法¹¹⁾に従った。孔径 0.45 μm のフィルター (Millipore 社) でろ過した試料の硝酸分解を行った後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置 (X7CCT、サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて定量を行った。

5.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた排水試験

本試験は、生物応答を用いた排水試験法 (検討案)²⁾ に基づき、国立環境研究所より分譲されたニセネコゼミジンコを用いて実施した。採取した二次処理水に対して 4 段階の割合 (試料割合 40%, 20%, 10%, 5%) の希釈溶液及び対照区を用意した。二次処理水の希釈及び対照区に使用する試験水として、市販のミネラルウォーターを用いた。50 mL のガラス容器に試験溶液 15 mL を入れ、試験連数を 10 連/試験区とした。試験区ごとに生後 24 時間以内の個体を 10 匹 (1 容器 1 匹) 曝露し、曝露期間は最大で 8 日間とした。餌として、クロレラ (*Chlorella vulgaris*)、ムレミカヅキモ (*P. subcapitata*) および YCT (Yeast, Cerophyll and Trout Chow) を使用した。曝露方式は半止水式 (1 日おきに換水) とし、照明は白色蛍光灯で明期 16 時間、暗期 8 時間、水温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。曝露終了後まで試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、試験個体ごとに累積産仔数を算出し、試験溶液ごとに生存率を求めた。また、曝露期間中の水換え前後に、pH、水温、溶存酸素 (DO, Dissolved Oxygen) の測定を行った。本試験は、

採水した全ての二次処理水を対象とした。

5.2.4 オオミジンコを用いた排水試験

本試験は、二次処理水に対するニセネコゼミジンコの生物応答と比較するため、曝露期間中のオオミジンコの累積産仔数に対する下水試料の慢性毒性を調査した。実験方法は 2.2.2.2 オオミジンコ繁殖試験を基に行い、曝露期間は 17 日間とした。曝露方式、照明、観察および水質項目の測定はニセネコゼミジンコを用いた試験と同様の条件とした。本試験は 2015 年 1 月に採水した二次処理水を対象とした。

5.2.5 ニセネコゼミジンコを用いた下水試料の毒性同定評価試験

本研究では、ニセネコゼミジンコの累積産仔数に影響がみられた 7 月と 10 月の二次処理水に対して、米国の TIE 試験の方法¹²⁾を参考に、Tier 1 の特性評価試験 (Characterization test) を行った。二次処理水の割合を 40% とした希釈水に対し、無処理、ろ過、チオ硫酸ナトリウム添加、EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 添加、ばっ気、pH 調整の各前処理を行った。

試験は 2.2.3 TIE 試験に準じて行い、下記の項目については変更した。ろ過処理は、二次処理水 200 mL を孔径 1 μm のフィルターでろ過した後に、希釈水を 500 mL 作成した。EDTA 添加処理は、希釈水 500 mL に EDTA 濃度が 3 mg/L になるように、試験開始前に EDTA 二水素二ナトリウムを添加した。pH 調整処理

表-9 ニセネコゼミジンコの排水試験における試験溶液の DO、水温、pH (平均値 $\pm$ 標準偏差)

採水月	Sample	二次処理水の割合 (%)	曝露前			曝露後		
			DO (mg/L)	水温 ($^\circ\text{C}$)	pH	DO (mg/L)	水温 ($^\circ\text{C}$)	pH
1月	対照区	-	7.85 $\pm$ 0.23	25.8 $\pm$ 0.1	8.16 $\pm$ 0.15	7.58 $\pm$ 0.16	25.3 $\pm$ 0.2	8.10 $\pm$ 0.16
		5	7.94 $\pm$ 0.15	25.7 $\pm$ 0.2	8.15 $\pm$ 0.09	7.50 $\pm$ 0.40	25.2 $\pm$ 0.5	8.38 $\pm$ 0.47
		10	7.99 $\pm$ 0.14	25.7 $\pm$ 0.1	8.12 $\pm$ 0.05	7.69 $\pm$ 0.35	24.8 $\pm$ 0.7	8.32 $\pm$ 0.32
		20	8.08 $\pm$ 0.28	25.4 $\pm$ 0.1	8.06 $\pm$ 0.03	6.93 $\pm$ 0.62	25.4 $\pm$ 0.3	7.97 $\pm$ 0.31
		40	8.34 $\pm$ 0.33	25.4 $\pm$ 0.0	7.86 $\pm$ 0.06	7.45 $\pm$ 0.16	25.4 $\pm$ 0.1	8.13 $\pm$ 0.04
4月	対照区	-	9.05 $\pm$ 1.65	25.7 $\pm$ 0.3	7.81 $\pm$ 0.45	8.66 $\pm$ 1.28	25.1 $\pm$ 0.4	8.12 $\pm$ 0.20
		5	9.08 $\pm$ 1.76	25.5 $\pm$ 0.4	7.90 $\pm$ 0.36	9.06 $\pm$ 1.48	25.0 $\pm$ 0.7	7.98 $\pm$ 0.23
		10	9.07 $\pm$ 1.73	25.5 $\pm$ 0.4	7.88 $\pm$ 0.30	8.60 $\pm$ 1.04	24.9 $\pm$ 0.5	7.99 $\pm$ 0.24
		20	8.97 $\pm$ 2.10	25.4 $\pm$ 0.6	7.97 $\pm$ 0.27	9.49 $\pm$ 0.63	25.0 $\pm$ 0.5	7.96 $\pm$ 0.34
		40	10.32 $\pm$ 1.45	25.4 $\pm$ 0.7	7.66 $\pm$ 0.15	8.65 $\pm$ 0.98	25.2 $\pm$ 0.5	7.97 $\pm$ 0.25
7月	対照区	-	8.99 $\pm$ 1.48	25.7 $\pm$ 0.3	7.95 $\pm$ 0.89	7.89 $\pm$ 0.68	25.0 $\pm$ 0.4	7.81 $\pm$ 0.55
		5	8.67 $\pm$ 1.33	25.6 $\pm$ 0.4	7.75 $\pm$ 0.67	8.16 $\pm$ 0.87	24.8 $\pm$ 0.3	7.79 $\pm$ 0.57
		10	8.75 $\pm$ 1.29	25.5 $\pm$ 0.4	7.73 $\pm$ 0.66	8.27 $\pm$ 1.01	24.9 $\pm$ 0.3	7.95 $\pm$ 0.48
		20	8.87 $\pm$ 1.25	25.4 $\pm$ 0.3	7.71 $\pm$ 0.59	8.24 $\pm$ 1.26	24.7 $\pm$ 0.5	8.02 $\pm$ 0.38
		40	9.10 $\pm$ 1.14	25.3 $\pm$ 0.3	7.65 $\pm$ 0.50	8.03 $\pm$ 0.51	24.5 $\pm$ 0.4	8.03 $\pm$ 0.33
10月	対照区	-	8.04 $\pm$ 0.19	25.6 $\pm$ 0.2	7.81 $\pm$ 0.47	7.49 $\pm$ 0.10	25.5 $\pm$ 0.2	8.00 $\pm$ 0.34
		5	8.11 $\pm$ 0.17	25.6 $\pm$ 0.2	7.85 $\pm$ 0.52	7.62 $\pm$ 0.55	25.2 $\pm$ 0.2	7.79 $\pm$ 0.41
		10	8.22 $\pm$ 0.14	25.5 $\pm$ 0.2	7.84 $\pm$ 0.51	7.36 $\pm$ 0.52	25.1 $\pm$ 0.2	7.85 $\pm$ 0.38
		20	8.34 $\pm$ 0.15	25.4 $\pm$ 0.3	7.82 $\pm$ 0.47	7.41 $\pm$ 0.40	25.4 $\pm$ 0.1	7.87 $\pm$ 0.33
		40	8.60 $\pm$ 0.22	25.3 $\pm$ 0.5	7.76 $\pm$ 0.43	7.42 $\pm$ 0.49	25.2 $\pm$ 0.3	7.89 $\pm$ 0.29

として、換水ごとに希釈水に塩酸を添加し、pH6.2～6.5に調整した。試験連数は5連/試験区とした。

5.2.6 データ解析

排水試験では、累積産仔数について Bartlett 検定(有意水準 $\alpha=0.05$)により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定(有意水準 $\alpha=0.05$)による多重比較で対照区と下水試料での累積産仔数の違いを調査した。等分散が棄却された場合は Steel 検定(有意水準 $\alpha=0.05$)で対照区と下水試料での累積産仔数の違いを調査した。排水試験では、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い各前処理区の累積産仔数を対照区または無処理試料割合を、無影響濃度 NOEC として求めた。

TIE 試験では、排水試験と同様の統計手法により、区の累積産仔数と比較した。無処理区と前処理区の間で累積産仔数に有意差が認められ、無処理区よりも前処理区の累積産仔数が多い場合、その前処理による生物影響の改善がみられたと判定した。SPE 溶出物については対照区と比較し、累積産仔数の有意差がある場合は SPE 溶出物による影響があると判定した。

5.3 実験結果と考察

5.3.1 水質項目分析

表-8 に採取した二次処理水および二次処理水の希釈や対照区に用いた水試料の水質項目分析結果を示す。全窒素、全リンは調査回間で同程度の値を示した。アンモニア性窒素は4月に比較的高い値で検出された。金属について、Zn は1月と7月で比較的高い濃度で検出され、Ni は1月に比較的高い濃度で検出された。Ni について、江藤らは2000年度に全国の13下水処理場の放流水中の Ni 濃度を測定しており、平均値は $34 \mu\text{g/L}$ と報告している¹³⁾。また磯崎らは、2005年に4都市下水処理場の標準活性汚泥処理水中の溶存態 Ni を測定しており、溶存態の Ni 濃度は $2.6\sim13 \mu\text{g/L}$ と報告している¹⁴⁾。これらの値に比べて、本研究で対象とした下水処理場の二次処理水中の Ni は高い濃度で検出された。

5.3.2 下水試料の排水試験

ニセネコゼミジンコの試験期間中の各試験溶液の水温は、全ての試験区で $25\pm1^\circ\text{C}$ 以内を維持した。平均 pH および DO を表-9 に示す。曝露試験期間中の平均 pH は、全ての試験区で $7.65\sim8.38$ の範囲であった。

DO は、曝露前後において全ての試験区で飽和 DO 濃度の60%以上に達していた。

図-10 にニセネコゼミジンコを用いた二次処理水の試験結果を示す。全ての調査回で二次処理水の生物影

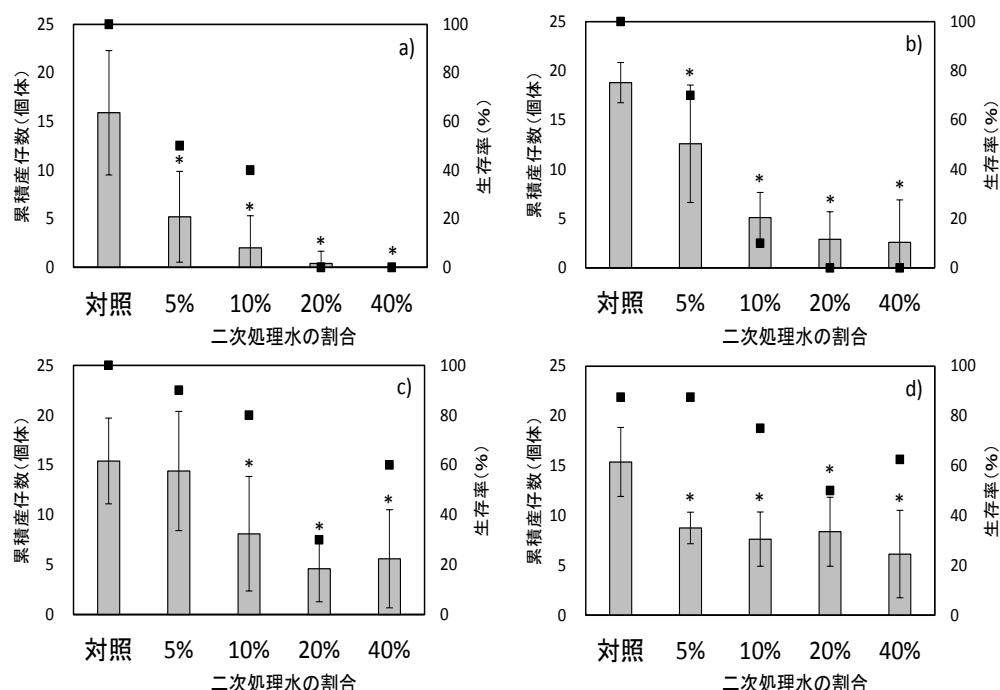


図-10 ニセネコゼミジンコを用いた二次処理水の排水試験における累積産仔数と生存率

a) 2015年1月試料、b) 2015年4月試料、c) 2015年7月試料、d) 2015年10月試料

■ : 生存率を示す。* : 累積産仔数が対照区と有意な差を示し ($p<0.05$)、対照区よりも少ないことを示す。

表-10 オオミジンコの排水試験における試験溶液の DO, 水温, pH (平均値±標準偏差)

Sample	二次処理水の割合 (%)	曝露前			曝露後		
		DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH
対照区	-	8.16 ± 0.62	21.7 ± 0.2	7.01 ± 0.12	7.41 ± 0.96	22.0 ± 0.2	7.52 ± 0.42
二次処理水	10	8.32 ± 0.78	21.7 ± 0.2	7.04 ± 0.12	6.89 ± 0.87	21.8 ± 0.2	7.55 ± 0.38
	20	8.56 ± 0.90	21.6 ± 0.3	7.06 ± 0.07	7.02 ± 0.80	21.8 ± 0.4	7.59 ± 0.23
	40	9.08 ± 0.97	21.4 ± 0.3	7.04 ± 0.05	6.87 ± 0.86	21.9 ± 0.2	7.60 ± 0.18
	80	10.30 ± 0.65	21.3 ± 0.4	6.99 ± 0.05	7.04 ± 0.99	22.0 ± 0.3	7.58 ± 0.16

表-11 TIE 試験における試験溶液の DO, 水温, pH (平均値±標準偏差)

採水月	Sample	曝露前			曝露後		
		DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH
7月	対照区	9.47 ± 0.94	25.3 ± 0.5	8.08 ± 0.18	7.05 ± 0.98	25.1 ± 0.4	7.55 ± 0.40
	無処理	9.52 ± 0.47	25.2 ± 0.2	7.83 ± 0.08	7.68 ± 0.77	25.1 ± 0.3	7.41 ± 0.38
	ばっ気	9.74 ± 0.59	25.1 ± 0.3	7.91 ± 0.12	7.31 ± 0.77	24.9 ± 0.5	7.71 ± 0.17
	EDTA 3mg/L	9.75 ± 0.70	25.1 ± 0.4	7.81 ± 0.06	7.10 ± 0.67	25.1 ± 0.3	7.84 ± 0.11
	チオ硫酸 10mg/L	9.92 ± 0.62	25.1 ± 0.2	7.74 ± 0.05	7.10 ± 0.86	24.8 ± 0.3	7.92 ± 0.07
	ろ過	9.64 ± 0.67	25.2 ± 0.2	7.76 ± 0.07	7.43 ± 0.20	24.4 ± 0.5	7.83 ± 0.22
	SPE通過	9.51 ± 0.69	25.0 ± 0.3	7.79 ± 0.06	6.89 ± 0.61	24.8 ± 0.2	7.99 ± 0.07
	SPE溶出	8.79 ± 0.41	25.1 ± 0.3	7.61 ± 0.14	7.08 ± 1.02	24.8 ± 0.4	8.07 ± 0.07
	低pH	9.57 ± 0.92	25.2 ± 0.2	6.44 ± 0.07	7.40 ± 1.03	24.7 ± 0.4	7.96 ± 0.06
10月	対照区	9.60 ± 0.95	25.0 ± 0.4	8.08 ± 0.03	7.83 ± 1.61	24.9 ± 0.3	7.97 ± 0.53
	無処理	9.77 ± 0.41	24.5 ± 0.5	7.83 ± 0.08	8.38 ± 1.19	25.0 ± 0.4	7.96 ± 0.37
	ばっ気	10.24 ± 0.34	24.7 ± 0.6	7.78 ± 0.06	8.10 ± 1.32	24.9 ± 0.6	8.02 ± 0.29
	EDTA 3mg/L	9.99 ± 0.59	24.7 ± 0.4	7.75 ± 0.08	7.74 ± 0.90	25.1 ± 0.5	8.07 ± 0.25
	チオ硫酸 10mg/L	9.93 ± 0.64	24.9 ± 0.2	7.77 ± 0.13	7.33 ± 1.05	24.9 ± 0.6	8.11 ± 0.14
	ろ過	9.97 ± 0.72	24.7 ± 0.4	7.80 ± 0.03	7.96 ± 1.28	24.9 ± 0.7	8.08 ± 0.21
	SPE通過	10.23 ± 0.37	24.7 ± 0.3	7.82 ± 0.03	7.93 ± 0.41	25.3 ± 0.6	8.13 ± 0.19
	SPE溶出	8.62 ± 0.69	24.9 ± 0.5	7.53 ± 0.08	7.49 ± 0.74	25.1 ± 0.4	8.20 ± 0.14
	低pH	9.42 ± 0.36	25.1 ± 0.4	6.19 ± 0.05	7.23 ± 0.96	24.5 ± 0.5	8.08 ± 0.19

響がみられた。1、4、7、10月の二次処理水の NOEC は全て 5%未満と求められた。安田らは、都市部の下水処理場の処理水に対してニセネコゼミジンコの排水試験を実施しており、NOEC は 10%と報告している¹⁵⁾。NOEC の比較により、既報の二次処理水に比べて本研究で対象とした二次処理水によるニセネコゼミジンコ

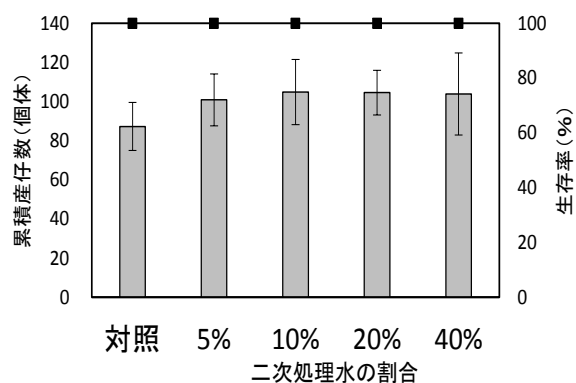


図-11 オオミジンコを用いた1月の二次処理水の排水試験における累積産仔数と生存率

■：生存率を示す。

への影響が大きいことが考えられた。また生存率は、希釈試料中の二次処理水の割合の増加と共に低下する傾向を示した。特に1、4月の二次処理水の希釈系列は、7、10月の二次処理水の希釈系列に比べて生存率が低い傾向を示した。

オオミジンコの試験期間中の各試験溶液の水温、pH および DO を表-10 に示す。曝露実験期間中の平均水温は、全ての試験区で 21±1°C以内を維持した。平均 pH は、全ての試験区で 6.99~7.60 の範囲であった。DO は曝露前後において全ての試験区で飽和 DO 濃度の 60%以上に達していた。

図-11 に1月に採取した二次処理水に対するオオミジンコの排水試験結果を示す。オオミジンコの繁殖と死亡に対する1月の二次処理水の生態影響はみられなかった。この結果から1月の二次処理水の NOEC は 40% 以上と求められた。

1月に採取した二次処理水の排水試験結果では、ニセネコゼミジンコへの生物影響が検出されたのに対し

表-12 7月と10月に採取した二次処理水の割合が5、10、20 および 40%の試験溶液に含まれる陽イオン
金属3物質の推定濃度

	40%試験溶液		20%試験溶液		10%試験溶液		5%試験溶液		無影響 濃度	最低影響 濃度
	7月	10月	7月	10月	7月	10月	7月	10月		
Cu (μg/L)	1.38	1.12	0.80	0.67	0.51	0.45	0.33	0.37	6.3	9.9
Ni (μg/L)	15.82 **	14.53 **	8.13 *	7.49 *	4.28	3.96	3.17	2.36	5.3	9.9
Zn (μg/L)	23.26 *	17.18 *	14.03 *	10.99	9.42	7.90	5.77	7.11	13	25.1

**ニセネコゼミジンコに対する最低影響濃度よりも高い金属濃度を示す

*ニセネコゼミジンコに対する無影響濃度よりも高く、最低影響濃度よりも低い金属濃度を示す

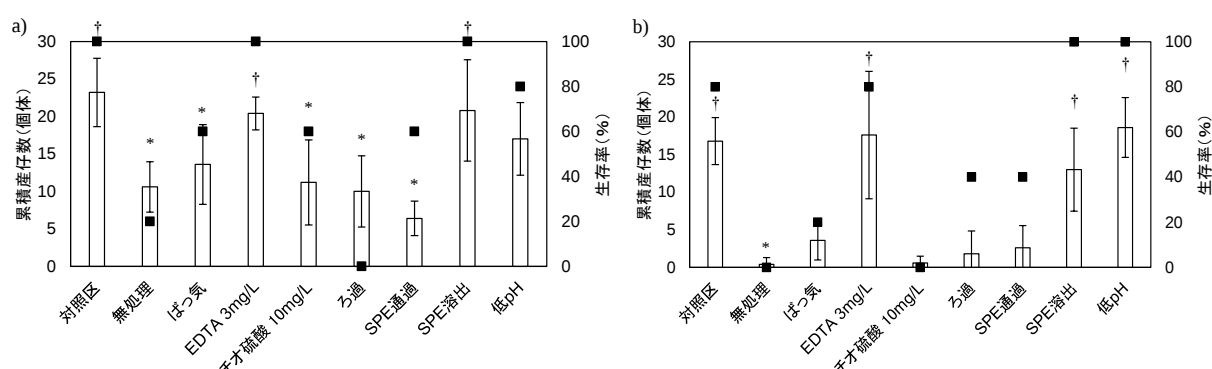


図-12 TIE 試験におけるニセネコゼミジンコの累積産仔数と生存率

a) 2015 年 7 月二次処理水 40%, b) 2015 年 10 月二次処理水 40%. 棒グラフは累積産仔数の平均値、バーは標準偏差を示す。■：生存率を示す。*：累積産仔数が対照区と有意差 ($p < 0.05$) を示し、対照区に比べて少ないことを示す。†：累積産仔数が無処理区と有意差 ($p < 0.05$) を示し、無処理に比べて多いことを示す。

て、オオミジンコへの生物影響は検出されなかった。下水処理水に対するミジンコ種間の感受性を調査した先行研究¹⁶⁾では、オオミジンコとニセネコゼミジンコの感受性は同程度であることが報告されているが、本研究で対象とした二次処理水に対して、ニセネコゼミジンコはオオミジンコよりも高い感受性を示した。先
先行研究および本研究の結果から、ニセネコゼミジンコを用いて下水処理水の生物影響を調査する場合、オオミジンコを用いるより安全側の結果となる可能性が示された。

5.3.3 下水試料の TIE 試験

試験期間中の各試験溶液の水温、pH および DO を表-11 に示す。水温、pH、DO は試験条件を満たしていた。7 月に採取した二次処理水（試料割合 40%）に対する TIE 試験の結果を図-12 a) に示す。生物応答試験と同様に、無処理区で生物影響がみられた。EDTA 処理による生物影響の改善がみられた。

表-2 のように、EDTA 処理により生物影響が低下する物質は陽イオン金属と判断されることから、陽イオン金属が 7 月の二次処理水中の主な生物影響の原因物質であると推定された。また SPE 通過水で生物影響が

検出され、SPE 溶出液で生物影響が検出されなかったことから、有機物ではなく金属等のイオン物質による生物影響への寄与が考えられた。

TIE 試験により、7 月と 10 月に採水された二次処理水の生物影響の原因物質として推定されたアンモニアと陽イオン金属について、原因物質であるかどうかを検討した。水質分析結果から推計された試験溶液中の濃度と既報文献²⁰⁻²³⁾から得られた慢性毒性の値を比較し、試験溶液の濃度で、これらの化学物質がニセネコゼミジンコに影響を引き起こすかどうか調査した。

はじめに、アンモニアによるニセネコゼミジンコへの影響を検討した。二次処理水と対照区の水試料のアンモニア性窒素の濃度に基づいて、二次処理水の割合が 40%の試験溶液に含まれるアンモニア性窒素濃度を推計した。7 月および 10 月に採取した二次処理水の割合が 40%の試験溶液中のアンモニア性窒素の濃度はそれぞれ、0.13、0.90 mg/L と推計された。アンモニアの毒性値として、平均水温 24.5℃、平均 pH8.59 の試験環境下で、アンモニア性窒素濃度で示された 25%阻害濃度は 1.99 mg/L と報告されている¹⁷⁾。アンモニアの毒性は pH に依存して変化するため¹⁸⁾、以下の pH に

よる慢性毒性値の標準化式¹⁹⁾を用いて、TIE 試験における平均 pH でのアンモニアの慢性毒性値に換算した。

$$CV_x = CV_{pH8} \times \left(\frac{0.0676}{1+10^{7.688-x}} + \frac{2.91}{1+10^{x-7.688}} \right) \cdots (2)$$

CV_x は pH が x での慢性毒性値を示し、CV_{pH8} は pH8 での慢性毒性値を示す。

7 月および 10 月の二次処理水の毒性同定評価試験の平均 pH の下で推計されたアンモニアの毒性値は、アンモニア性窒素濃度でそれぞれ 8.29、6.03 mg/L と推計された。7 月および 10 月の二次処理水の 40%試験溶液のアンモニア性窒素濃度の推計値は、推計されたアンモニアの慢性毒性値よりも低い値を示した。このことから、7 月および 10 月の二次処理水の生物影響にアンモニアは寄与しなかったことが推察された。

次に陽イオン金属によるニセネコゼミジンコへの影響を検討した。表-12 に、各希釈試料の陽イオン金属濃度の推定値を示す。推計は、二次処理水と対照区の水試料の陽イオン金属に基づいて行った。ニセネコゼミジンコの繁殖に対する Cu の無影響濃度と最低影響濃度は、硬度 94.1 mg/L で 6.3 µg/L と 9.9 µg/L²⁰⁾、Ni の無影響濃度と最低影響濃度は硬度 113 mg/L で 5.3 µg/L と 9.9 µg/L²¹⁾、Zn の無影響濃度と最低影響濃度は硬度 82.4 mg/L で 13 µg/L と 25.1 µg/L²²⁾と報告されている。最低影響濃度に比べて、毒性同定評価試験で用いた二次処理水の割合が 40%の試験溶液中の Ni 濃度の推計値が高いことから、Ni はこの試験溶液の生物影響に大きく寄与していたことが考えられた。一方、オオミジンコの最低影響濃度は 250 µg/L と報告されており²³⁾、二次処理水中の Ni によるオオミジンコへの影響はなかったと考えられた。Cu については、二次処理水の割合が 40%の試験溶液の濃度の推計値が最低影響濃度よりも低いことから、Cu はこの試験溶液の生物影響に寄与しなかったことが考えられた。また Zn については、二次処理水の割合が 40%の試験溶液中の濃度の推計値が最低影響濃度よりも低いが無影響濃度よりも高い値を示しており、この試験溶液の生物影響に寄与していた可能性が考えられた。

以上の結果から、陽イオン金属のうち Ni が主要な影響原因物質として 7 月と 10 月に採水された二次処理水の生物影響に寄与していると考えられた。

10 月の二次処理水を用いた毒性同定試験では、低 pH 処理によりニセネコゼミジンコへの影響が改善された。ニセネコゼミジンコに対する Ni の毒性は、低

pH 条件下で低下することが報告されている^{12,24)}。これは、Ni イオンが低 pH 処理により増加した水素イオンと競合し、ニセネコゼミジンコの鰓に結合しにくくなるためと考えられている²⁵⁾。このことから、低 pH 処理によりニッケルの毒性が低下し、10 月に採水された二次処理 40%の試験溶液の生物影響が低下したと考えられた。

また、7 月および 10 月に採水した二次処理水の排水試験では、ニセネコゼミジンコで影響がみられた二次処理水の割合の最小値はそれぞれ、10%と 5%であった。これらの試験溶液の陽イオン金属 3 物質の濃度の推計値は慢性毒性値よりも下回っており、個別の陽イオン金属によるニセネコゼミジンコへの影響は小さいことが考えられた(表-12)。そのため、これらの試験溶液によるニセネコゼミジンコへの影響は、陽イオン金属の複合的な影響による可能性が考えられた。また本研究では、対象下水処理場への移動量が高い Cr について検討していないため、今後 Cr による影響についても調査が必要である。

以上の結果から、本研究で用いた二次処理水では、毒性同定評価試験により二次処理水に含まれる溶存態の陽イオン金属の生物影響を検出できた。また 7 月と 10 月に採水した二次処理水の生物影響の主要な原因物質として、Ni が推察された。Ni は金属製品製造業の排水において、ニセネコゼミジンコに影響を引き起こす原因物質の 1 つとして報告されている^{26,27)}。溶存態の Ni を比較的多く含む排水が流入する下水処理場において、二次処理水によるニセネコゼミジンコへの影響が考えられるため、今後他の下水処理場で採取された溶存態金属の濃度が高い二次処理水に対して排水試験および毒性同定評価試験を実施し、Ni による生物影響に関する知見を収集する必要がある。また水生生物に対する金属の毒性は、遊離イオンや無機錯体として存在する金属によって引き起こされるとされている²⁸⁾。そのため Ni が生物影響原因物質であることを確認するためには、遊離イオンや無機錯体の Ni 濃度が毒性同定評価の前処理により減少することを確かめる必要がある。

5.4 まとめ

溶存態金属の濃度が高い下水処理水に対して、ミジンコ種の生物応答を用いた排水試験を適用するとともに、対象とした下水処理水に TIE 試験を適用することで生物影響の原因物質を推定した。また水質分析の結果に基づいて、毒性同定評価試験により推定された原因物質の生物影響を個別に調査し、下水処理水に対する

TIE 試験の適用性を検討した。得られた結果を以下に示す。

- 1) PRTR データに基づいて溶解性金属負荷が高い下水処理場を選定し、その二次処理水を用いてニセネコゼミジンコを用いた排水試験を実施したところ、ニセネコゼミジンコに対する二次処理水の影響が検出された。
- 2) ニセネコゼミジンコと個別化学物質の毒性試験に使用されるオオミジンコの、下水処理水に対する感受性を比較した。その結果、ニセネコゼミジンコはオオミジンコに比べて高い感受性を示した。
- 3) TIE 試験により生物影響の原因物質として推定された陽イオン金属とアンモニアについて、水質分析の結果と既報文献²⁰⁻²³⁾に基づいて推定された慢性毒性値とを比較した。その結果、ニセネコゼミジンコへの影響を引き起こした原因物質として陽イオン金属の Ni が推定された。
- 4) TIE 試験は二次処理水に含まれる溶存態の陽イオン金属の生物影響の検出に使用できると考えられた。
- 5) 7 月および 10 月に採水した二次処理水の排水試験では、ニセネコゼミジンコで影響がみられた二次処理

水の割合の最小値はそれぞれ、10%と 5%であり、これらの試験溶液の陽イオン金属 3 物質 (Cu, Ni, Zn) の濃度の推計値は慢性毒性値よりも下回っていた。そのため、試験溶液によるニセネコゼミジンコへの影響は、これら陽イオン金属の複合的な影響による可能性が考えられた。

6. ニセネコゼミジンコに対する下水処理水中のニッケルの影響とその影響に関係する金属について

6.1 目的

我々の既往研究では、実下水処理場の流入下水に Ni を添加し、馴致した活性汚泥処理装置の流入下水とその終沈流出水を用いてニセネコゼミジンコの影響を検討した結果、流入下水より終沈流出水で生物影響が高くなることを明らかにした²⁹⁾。本研究ではその原因究明のため、特に流入下水中に含まれる金属に着目して検討を行った。

6.2 実験材料および実験方法

6.2.1 Ni 排水サンプルの調製

実下水処理場の流入下水で連続運転している活性汚泥処理実験装置の流入下水に Ni (塩化ニッケル：最終

表-13 Ni で馴致された標準活性汚泥処理実験装置の流入下水と終沈流出水の一般水質項目

試料名	水温 °C	pH mg/L	DO mg/L	DOC mg/L	BOD mg/L	COD mg/L	SS mg/L	VSS mg/L	TN mg/L	TP mg/L
流入下水	24.8	7.25	0.11	20.7	134	191	473	347	58	9
終沈流出水	24.3	6.92	5.54	5.3	1	10	1	2	16	1

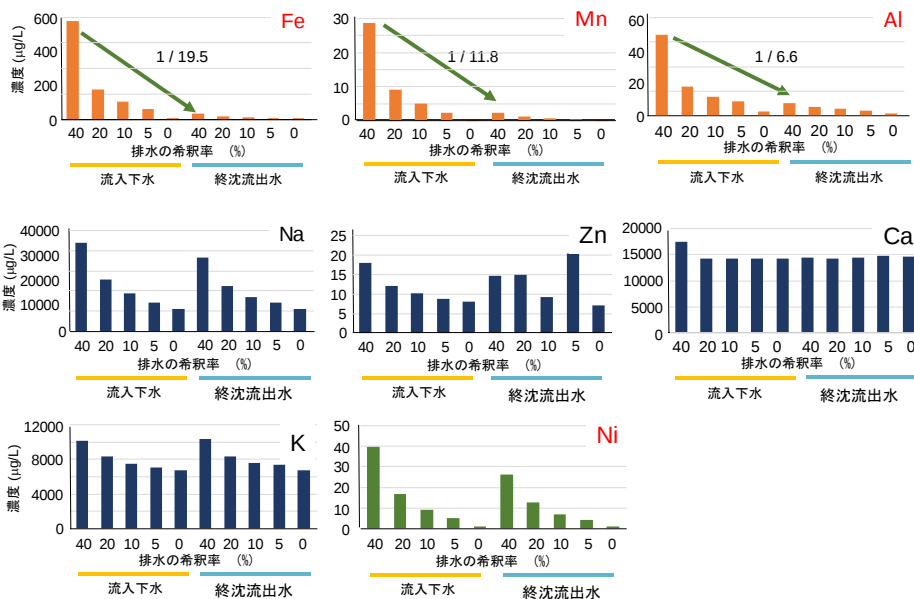


図-13 Ni で馴致された活性汚泥処理実験装置の流入下水と終沈流出水の溶存態金属濃度

濃度 100 µg/L) を添加し 40 日間馴致させた後、流入下水と終沈流出水を採取した(採取日 2017 年 10 月 13 日)。一般水質項目を表-13 に示す。採取した排水試料は 60 µm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、金属分析まで褐色瓶に入れて 4℃、冷暗所で保管した。

6.2.2 金属試験水の調製

ニセネコゼミジンコに対する金属影響試験には、塩化鉄 III・6 水和物、塩化マンガ・4 水和物、塩化アルミニウム・6 水和物を用いた。それぞれの試薬は流入下水の 20%濃度に相当する金属量(Fe: 200 µg/L、Mn: 10 µg/L、Al: 20 µg/L)をミネラルウォーターに懸濁し、試験に用いた。金属の組み合わせとして、①Ni (0、5、7.5、10 µg/L)、②Ni (5 µg/L) +Al (20 µg/L)、③Ni (5 µg/L) +Mn (10 µg/L) を検討した。全ての対照区はミネラルウォーターとした。

6.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた各サンプルの影響試験

生物応答を用いた排水試験法(検討案)²⁾に基づき、(国研)環境研より分譲されたニセネコゼミジンコを用いた。各試験試料で生後 24 時間以内の個体を 10 匹(1 匹/15 mL/容器)曝露し、曝露期間を最大 8 日間とした。金属影響試験にはミネラルウォーターを用いた。曝露方法は半止水式(1 日おきに換水)とし、照明は白色蛍光で明期 16 時間、暗期 8 時間、水温 25±1℃とした。餌はクロレラ、YCT を用いた。曝露終了後まで試

験個体の生存と産仔数を毎日観察し、各試料の生存率と 3 日間の平均産仔数を算出した。

6.2.3 データ解析

ニセネコゼミジンコの影響試験の結果は、5.2.6 データ解析に準じて検討した。

6.2.4 金属分析

各排水サンプルをフィルター(孔径 0.2 µm、Millipore 社)濾過した試料を硝酸分解した後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置(X7CCT、Thermo Fisher Scientific)を用いて 8 種金属(Fe、Mn、Al、Na、Zn、Ca、K、Ni)の定量を行った。

6.3 結果と考察

6.3.1 Ni で馴致された流入下水と終沈流出水の金属濃度

40 日間 Ni で馴致された活性汚泥処理実験装置から流入下水と終沈流出水を採取し、8 種金属の溶存態金属濃度を測定した(図-13)。Ni は流入下水 40%希釈濃度で 39.2 µg/L、終沈流出水 40%希釈濃度で 25.8 µg/L となり、処理過程で 34.2%の減少が確認された。Ni 以外の 7 種金属のうち、流入下水より終沈流出水で濃度減少が顕著に確認された金属は、Fe (95%減)、Mn (92%減)、Al (85%減)であった。一方、Na、Zn、Ca、K では下水処理過程で濃度の大きな減少は確認されなかった。これらの結果は下水処理により除去される金属は、種類により異なることを示している。

下水処理過程で Fe、Mn、Al の濃度減少が顕著に確認されたことから、ニセネコゼミジンコに対する Ni の影響がこれら金属の存在下で変化するか、検討を行った。Ni を含む飼育水(ミネラルウォーター)に Fe、Mn、Al をそれぞれ添加し、ニセネコゼミジンコの生存率と 3 日間の平均産仔数を検討した。本試験では、流入下水 20%希釈濃度に含まれる金属濃度にあわせて、Fe: 200 µg/L、Mn: 10 µg/L、Al: 20 µg/L で検討した。

ニセネコゼミジンコに対する Fe の影響は、対照区に比べて生存率 80%、3 腹分の平均産仔数は 65%の影響が確認された(図-14a、b))。Ni 濃度 5 µg/L の場合、Fe の非存在下では生存率が 10%だったが、Fe 存在下では 60%まで回復した。また Fe 存在下での平均産仔数は、Fe 非存在下に比べ 8.6 倍増加した。以上の結果から、Fe が Ni と共存する場合、Ni 濃度 5~10 µg/L ではいずれも Fe が無い場合に比べて生残数、産仔数ともに影響が軽減されることが明らかになった。

ニセネコゼミジンコに対する Mn (10 µg/L) と Al (20 µg/L) の影響は対照区と比べて、生存率は 100%と 70%、3 腹分の平均産仔数は両者とも 75%であった。

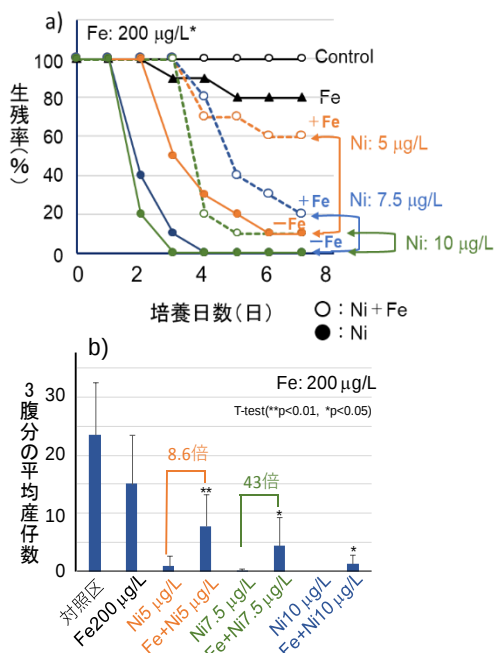


図-14 Fe 存在下における Ni がニセネコゼミジンコに及ぼす影響

a) 生存率、b) 産仔数、Fe は 200 µg/L で添加した。

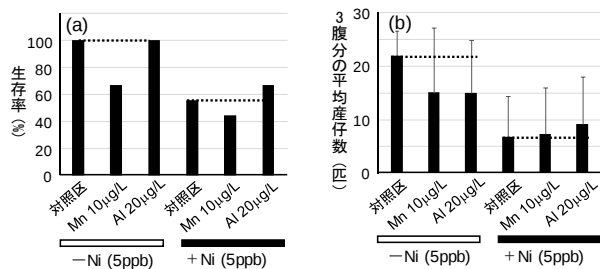


図-15 Mn、Al 存在下における Ni がニセネコゼミジンコに及ぼす影響

a) 生存率、b) 産仔数、Fe は 200 μg/L で添加した。

一方、Mn と Al が Ni: 5 μg/L と共存する場合、ニセネコゼミジンコに対する生存率と産仔数の影響は、Ni 単独の場合に比べ、ほとんど差は見られなかった (図-15)。Fe に比べ Mn と Al は流入下水に含まれる量は少なかったが、本実験では流入下水において Mn と Al がニセネコゼミジンコに対する Ni の影響に関与しないと推察される。

以上の結果から、流入下水より終沈流出水でニセネコゼミジンコに対する影響が高く見られる要因の 1 つとして、Fe の減少が要因の 1 つであることが推察される。今後は、Fe 存在下でのニセネコゼミジンコに対する Ni の作用機構について、検討する必要があると考えている。

6.4 まとめ

Ni を添加した流入下水とその終沈流出水を用いてニセネコゼミジンコの影響を評価したところ、流入下水より終沈流出水で影響が高くなることもある。本研究ではその原因究明のため、特に流入下水中に含まれる金属に着目して実験を行った。

- 1) ニッケルを添加した流入下水と終沈流出水中の 8 種類の金属濃度を比較した結果、流入下水より終沈流出水で Fe、Mn、Al で顕著な濃度減少が確認された。
- 2) Fe が存在するとニセネコゼミジンコに対する Ni の影響が軽減されることが明らかになった。

以上の結果から、流入下水より終沈流出水でニセネコゼミジンコに対する影響が高く見られる要因の 1 つとして、Fe の減少が推察された。

7. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水が放流先の水生生物へ及ぼす影響の評価

7.1 目的

5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ 2 種への影響評価では、Ni を比較的多く含む事業場排水が流入する B 下水処理場の二次処理水に対して、排水希釈濃度 5% でもニセネコゼミジンコの生存率と産仔数に影響が生じることを明らかにした。そこで 2017 年度に B 処理場の放流水を採取し、同時に放流口水と河川水を採取することで放流水が河川水に及ぼす生物影響を検討した。B 処理場は海から 1km 程度の場所にあることから海水が流入する汽水域と考え、海洋性のミジンコであるシオダマリミジンコを用いて影響評価を行った。

7.2 実験材料および実験方法

7.2.1 下水試料の採水

2018 年 1 月 18～19 日に B 処理場の①放流水、②放流口水 (B 処理場から河川への放流口)、③河川水 (放流水口から 150 m 程度下流、海に流入) の採水を行った (図-16)。放流水の採水はオートサンプラーを用いた。採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ、合計 24 リットル採水し、等量混合とした。放流口水と河川水は、海の潮位が最も低い干潮時にそれぞれバッチ採取した (20 L)。これら水試料は 60 μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、試験まで、ろ液を 4℃の冷暗所で保管した。

7.2.2 シオダマリミジンコを用いた影響試験

本試験は海産生物毒性指針³⁰⁾を参考に実施し、試験生物には、水産庁海産生物毒性試験指針で推奨されているシオダマリミジンコ (*Tigriopus japonicus*) を用いた (図-17)。各排水試料 (原液を 100% とする) に対して、それぞれ放流水を 5 段階希釈 (80%、40%、20%、10%、5%) した。各下水試料の希釈に使用する試験水は、蒸留水に人工海水のもと (テトラ (製) マリンソルトプロ) を添加して塩分濃度 32 に調製したものを用了。①放流水、②放流口水、③河川水にそれぞれ既定の塩分濃度に合わせてマリンソルトプロを添加し、

表-14 各サンプル水中の一般水質項目

	DO	pH	水温	SS	VSS	DOC	Na+	NH ₄ ⁺	K+	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
	(mg/L)		(℃)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
①放流水	10.1	6.9	10.9	4.2	3.9	8.3	132.8	1.5	10.2	17.9	37.9	156.8	3.2	22.6	158.4
②放流口水	9.7	7.0	13.2	5.4	1.9	3.0	3776.6	-	129.8	475.9	179.1	6769.4	-	11.2	991.5
③河川水	9.6	7.2	12.1	7.1	1.5	3.2	2027.5	-	67.0	180.3	100.1	3627.8	-	8.5	526.4

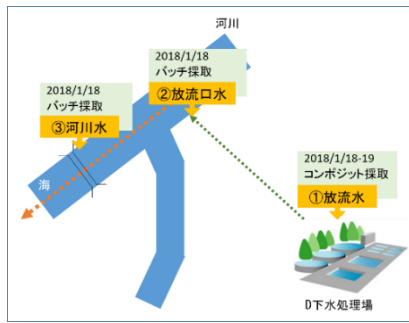


図-16 各水試料の採取場所

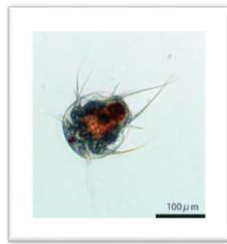


図-17 シオダマリミジンコの顕微鏡写真

試験を行った。対照区は天然海水を用いた。試験前日に継代培養している個体群の中から卵嚢を有する雌のみを取り出し、別容器に収容して試験開始まで飼育した。試験開始時に 200 μm のメッシュで幼生と親を分離し、幼生を希釈水で洗浄後試験に用いた。各試験の容量は 5 mL/試験容器とし、試験連数は 4 連/試験区とした。曝露方式は止水式とし、照明は白色蛍光灯で明期 16 時間、暗期 8 時間、水温は 22±1℃とした。試験区ごとに幼生を 20 匹（1 容器 5 匹）曝露し、開始から 24 時間後に遊泳阻害及び異常な挙動の有無を観察した。15 秒間に一度も遊泳できない場合を遊泳阻害とみなした。遊泳阻害率(%)は各試験区の遊泳阻害個体数から求めた。

7.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた影響試験

5.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた排水試験に準じて行った。ニセネコゼミジンコは淡水生物であるため①放流水のみ試験を行った（放流水口と河川は塩分濃度が高いため、ニセネコゼミジンコの生育は困難と考えた。）。

7.2.4 試料水の一般水質項目と金属イオンの測定

一般水質項目として、溶存酸素 (DO)、pH、水温、溶存性有機炭素 (DOC)、浮遊物質 (SS)、揮発性浮遊物質 (VSS)、Na⁺、NH₄⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻を測定した。pH と水温の測定は HM-31P（東亜-DKK 製）で測定した。金属イオンはガラス製ろ紙 (GF/B、Whatman 製) でろ過したろ液をホット

プレート分解に供して前処理し、ICP-MS（7700x、Agilent 社製）により行った。

7.3 結果と考察

試験に用いた各水サンプルの一般水質項目を比較した（表-14）。その結果、①放流水に比べ②放流口水と③河川水の Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cl⁻、SO₄²⁻濃度は 3.3～43 倍に増加することが明らかになった。採取時間は干潮の時刻であったことから、海水が放流口水と河川水に流入し、海水中の成分が混入することで上記のイオン成分が増加したと考えられた。次に、各水サンプルの金属 (Ni、Mn、Zn、Fe、Al) 濃度を比較した（図-18）。その結果、Ni、Mn、Zn 濃度は放流水から河川水にかけて減少することが明らかになった。特に Ni は放流水では 21.25 μg/L が、放流水口ではその 1/2、河川水では 1/10 まで減少することが明らかになった。これらの現象は放流水が河川水に流れ込む過程で希釈されることが要因であると推察された。一方、Fe の濃度は変動せず、Al は放流水より河川水で濃度が高くなる現象が確認された。

各水サンプルに対するニセネコゼミジンコとシオダマリミジンコを用いた生物影響評価を行った。ニセネコゼミジンコを用いて①放流水を試験した場合、対

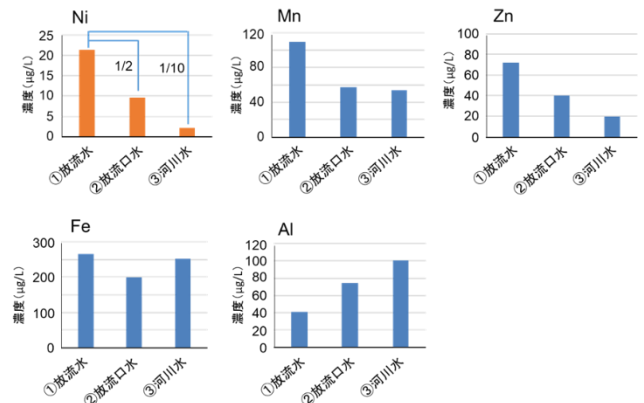


図-18 各サンプル水中の金属濃度

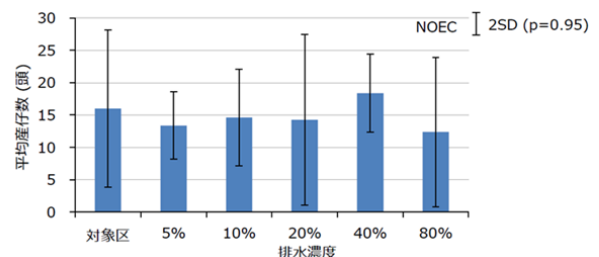


図-19 ニセネコゼミジンコの産仔数に対する放流水の影響評価

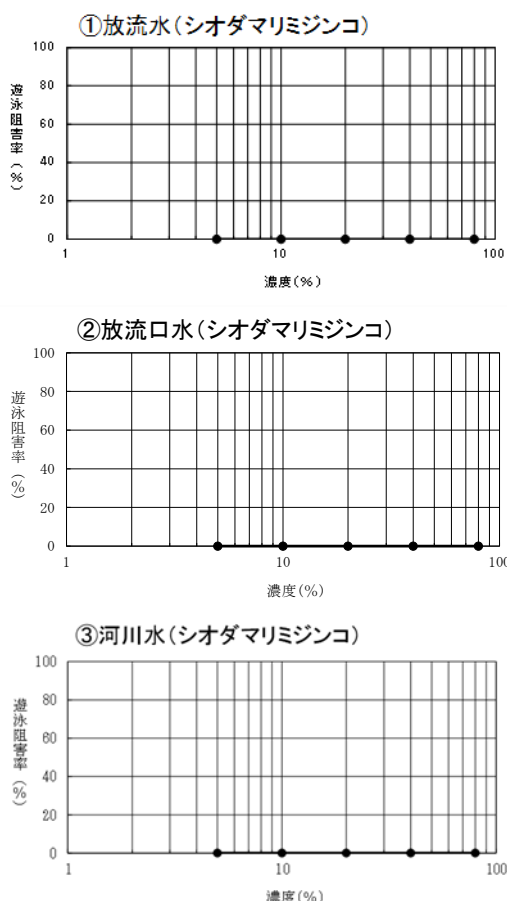


図-20 放流水、放流口水、河川水に対するシオダマリミジンをういた影響評価

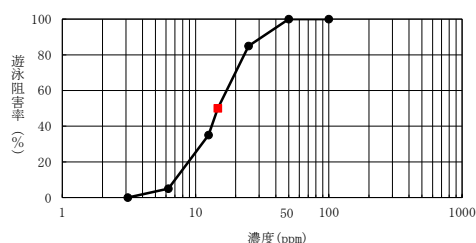


図-21 塩化ニッケルに対するシオダマリミジンの影響評価

照区に比べ全試験濃度区の平均産仔数の影響は見られず（図-19）、また生存率にも影響が見られなかったことから、NOEC $\geq$ 80%であることが明らかになった。一方、2015年の放流水5%希釈濃度ではニセネコゼミジンコに影響が見られたが、本実験では排水濃度80%で有意な影響は見られなかった（5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ2種への影響評価）。既存の報告では、NiのNOECとLOECは硬度113 mg/Lで5.3 μ g/Lと9.9 μ g/L²¹⁾と報告されているが、今回の実験で用いたニセネコゼミジンコのNiのNOECは20 μ g/Lと高い値を示した（データには示し

ていない）。放流水（80%希釈濃度）中のNi濃度が17 μ g/L（推定値）であったことから（図-18）、①放流水におけるニセネコゼミジンコの有意な影響が見られなかったと考えられる。

シオダマリミジンコを用いて①放流水、②放流口水、③河川水を試験した結果、対照区に比べ全試験濃度区において遊泳阻害の影響は見られず、NOEC $\geq$ 80%であることが明らかになった（図-20）。一方、塩化ニッケルに対するシオダマリミジンコの半数遊泳阻害濃度EC₅₀は14.7 mg/Lであった（図-21）。本研究の結果から、シオダマリミジンコを用いて下水処理水の生物影響を調査する場合、ニセネコゼミジンコを用いるよりNiの影響が低く評価される可能性が示された。またB処理場は合流式であり、採取日の前日が雨天であったことから雨水が流入し、流入下水が希釈されたことも要因の一つとして考えられる。

7.4 まとめ

5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ2種への影響評価において、ニセネコゼミジンコに影響が見られたB処理場の放流水が河川水に及ぼす影響を調査した。B処理場は海から1km程度の場所にあることから放流先は海水が流入する汽水域と考え、海洋性のミジンコであるシオダマリミジンコを用いて影響評価を行った。放流水の放流口水と河川水に対する影響を調査した結果、いずれもシオダマリミジンコのNOEC $\geq$ 80%であり、放流水が海産甲殻類に及ぼす影響は小さいことが推察された。放流水のNi濃度は河川水により1/10程度まで希釈されていたことから、水生生物に対する影響は更に低減することが推定された。

8. 金属濃度の高い二次処理水が持つ生物影響と凝集沈殿処理による生物影響改善の検討

8.1 目的

5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ2種への影響評価では、下水処理水中に残存する金属が生物に対して毒性影響を持ち、特にNiが

表-15 G処理水一般水質項目

一般水質項目 (mg/L)				
BOD	COD	SS	VSS	DOC
3.00	25.3	22.8	15.2	10.9
TN	NH ₄ -N	NO ₂₊₃ -N	TP	PO ₄ -P
10.6	2.80	5.60	2.63	2.18

ニセネコゼミジンコに対する毒性の原因であることが推察された。そこで本研究では金属含有濃度が高い実二次処理水に対してポリ塩化アルミニウム (PAC) を用いた凝集沈殿処理の実験を行い、二次処理水中に残存する金属の除去を試みた。また、凝集沈殿処理を行った処理水サンプルを用いて生物試験を行い、生物影響の低減効果を評価した。

8.2 実験材料および実験方法

8.2.1 生物試験に用いた二次処理水

本研究で用いた二次処理水は事前の調査で約 100 $\mu\text{g/L}$ の Ni 含有濃度が確認された G 処理場の二次処理水 (以下 G 処理水と称す) である (採取日 2018 年 11 月 26 日)。F 処理水の一般水質項目を表-15 に示す。採取後の G 処理水は孔径 60 μm のナイロンメッシュ (ASTM 230-62、SEFER 製) を用いてろ過を行い、褐色瓶に入れ試験まで冷暗所 (4 $^{\circ}\text{C}$) で保管した。

また後述の凝集沈殿処理を施した G 処理水を用いて生物影響の低減効果を検証した。試験には G 処理水に PAC 6.4 ml/L を添加後、凝集沈殿処理を行い、24 時間静置後上澄み液を採取したものを使用した。

8.2.2 凝集沈殿処理実験

PAC を用いた凝集沈殿処理の手順を図-22 に示す。Ni 除去能を検証するために二次処理水のサンプルは以下の 2 種類を用いて実験を行った。

- ① G 処理水
- ② A 処理場の流入下水を連続的に処理している活性汚泥処理実験装置から得られた二次処理水に、Ni 濃度が 80 $\mu\text{g/L}$ 程度になるように塩化ニッケルを添加したサンプル (以下 A 処理水と称す)

本研究では Al 含有濃度が約 5.6% である PAC (多木化学株式会社製) を使用し、PAC の注入率を変化させ

て実験を行った。PAC 注入率は塩化アルミニウムを使った金属除去の既往研究³⁰⁾を参考に以下の通りに設定した。Ni 濃度が 164 $\mu\text{g/L}$ であった G 処理水での PAC 凝集沈殿処理では PAC と NaOH 水溶液を加えた処理水サンプル 250 ml をガラス製の 500 ml ビーカーに分注し、2 連式のジャーテスター (JMD-2E、宮本理研工業株式会社製) を用いて急速攪拌 (245 rpm、15 分) と緩速攪拌 (50 rpm、5 分) を行った。その後 15 分以上静置沈降を行い、懸濁液と上澄み液を分離させた。上澄み液を慎重に採取し、孔径 4 μm のセルロース製ろ紙 (No.5B、ADVANTEC 製) を用いてろ過を行った。これらの処理を施した水試料を金属分析に供した。

8.2.3 生物試験

本研究では生物を用いた排水試験法 (検討案)²⁾に従い、WET 試験で推奨される水生生物 3 種、ムレミカヅキモ (*P. subcapitata*)、ニセネコゼミジンコ (*C. dubia*)、ゼブラフィッシュ (*D. rerio*) を用いて生物試験を行った。以下で各生物の試験条件・概要を述べる。

8.2.3.2 藻類生長阻害試験

G 処理水を 5 段階濃度 80%、40%、20%、10%、5% に調製して試験した。他の試験条件は 2.3.1 藻類生長阻害試験に準じて行った。

8.2.3.3 ニセネコゼミジンコ繁殖試験

G 処理水をミネラルウォーターを用いて二段階濃度 10%、5% に調製して試験に用いた。他の試験条件は 5.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた排水試験に準じて行った。

8.2.3.4 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

G 処理水を脱塩素水道水を用いて 4 段階濃度 80%、40%、20%、10% に調整して試験に用いた。2.3.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験に準じて行った。

8.2.4 データ解析

2.2.4 と 5.2.6 の統計解析に準じて行った。ミジンコの生存率については、10 個体の生存数であり、分散が計算されないため統計解析の対象とはしなかった。

8.2.5 金属分析

生物影響の原因推定のため、F 処理水中の 14 種の金属分析 (Al、V、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Sr、Cd、Sb、Te、Ba、Pb) を行った。6.2.4 金属分析に準じて行った。

8.3 結果と考察

8.3.1 F 処理水の生物影響試験

レミカヅキモを用いた試験の結果を図-23 に示す。ムレミカヅキモは対照区 (0%) に対して、20%排水濃度以上で有意差 ($p < 0.05$) が確認された。

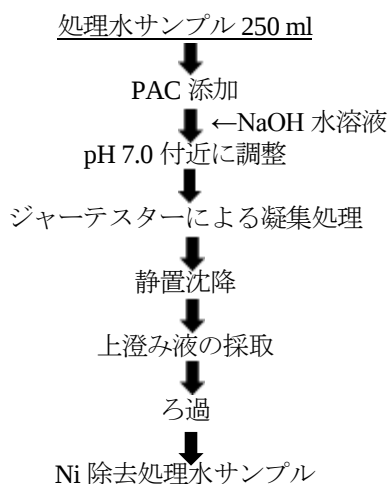


図-22 凝集沈殿処理手順

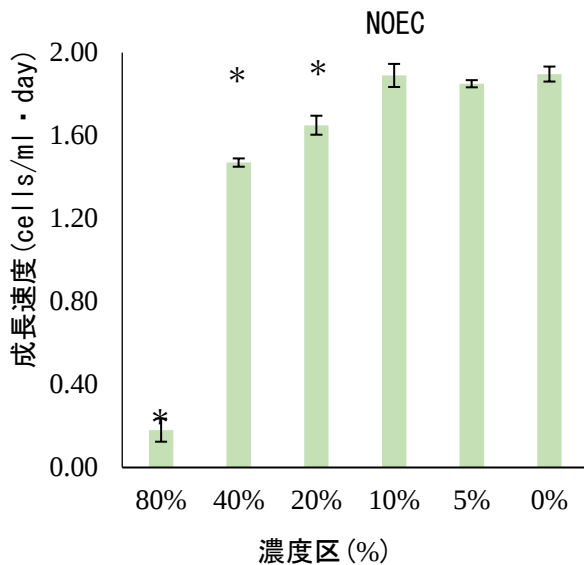


図-23 ムレミカツキモの生長試験結果

*:Steel 検定で対象区より優位に低下($p<0.05$)

ニセネコゼミジンコを用いた試験の結果を図-24 に示す。ニセネコゼミジンコの試験では対照区に異常個体が 1 匹存在したため、9 連の試験結果を示す。二次処理水の最低希釈濃度の 5%排水濃度で平均産仔数に有意差($p<0.05$)が確認された。また生存率においても二次処理水の 5%排水濃度で対照区と比べて著しく生存率が減少した。ここから NOEC<5%となった。

ゼブラフィッシュを用いた試験の結果を図-25 に示す。ふ化率を対照区と比較した際に有意差を示した濃度は確認されなかった。生存率では対照区 (0%) に対して 80%排水濃度で有意差が確認された。

8.3.2 G 処理水の金属成分と毒性原因に対する考察

二次処理水の毒性原因を推定するため、処理水中の金属濃度を測定した。分析の対照とした 14 種の金属 (Al、V、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Sr、Cd、Sb、Te、Ba、Pb) 濃度を表-16 に示す。既往研究ではニセネコゼミジンコに対する二次処理水中 Ni の NOEC は $5.3 \mu\text{g/L}$ 、最低影響濃度 (LOEC) は $9.9 \mu\text{g/L}$ であることが報告されており²¹⁾、今回用いた二次処理水の Ni 濃度は $166 \mu\text{g/L}$ であった。5%排水濃度では Ni 濃度は $8.3 \mu\text{g/L}$ と推定され、ニセネコゼミジンコへ生物影響が考えられる濃度であった。

Ni の藻類に対する LOEC は $100 \mu\text{g/L}$ であることが報告されており³²⁾、有意差が確認された 80%排水濃度、40%排水濃度、20%排水濃度それぞれの Ni 濃度は約 $166 \mu\text{g/L}$ 、 $66.4 \mu\text{g/L}$ 、 $33.2 \mu\text{g/L}$ であることが推察された。

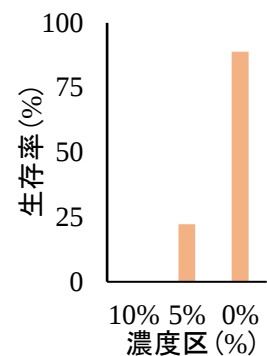
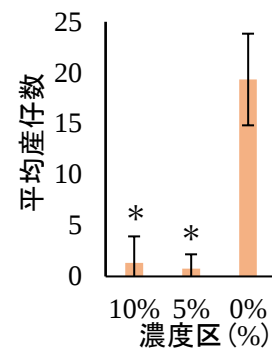


図-24 ニセネコゼミジンコの繁殖試験結果

*:Steel 検定で対象区より優位に低下($p<0.05$)

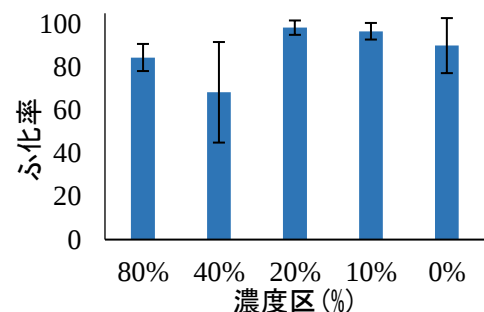
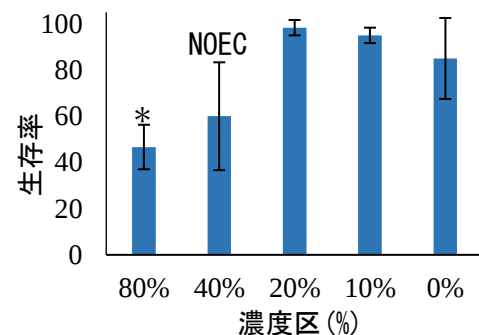


図-25 ゼブラフィッシュの短期毒性試験結果

*:Steel 検定で対象区より優位に低下($p<0.05$)

表-16 G 処理水金属濃度

重金属濃度 (μg/L)													
Al	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Sr	Cd	Te	Ba	Pb
13.0	58.1	1.05	164	25.4	3.05	164	3.18	4.31	3016	2.76	4.07	92.3	0.27

表-17 PAC 注入濃度と Ni 除去率

PAC 注入率 (ml/L)		0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4
Ni 除去率 (%)	F 処理水	-	22.9	37.8	67.5	72.8	80.5
	A 処理水	50.0	61.4	63.7	72.7	87.2	-

報告された LOEC 値よりも低い 40%排水濃度以下で影響が確認されたことから、ムレミカヅキモでは Ni による影響と Ni 以外の他の物質による複合影響が生じていると考えられる。

ゼブラフィッシュの Ni に対する感度は、後述の 9. 下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚類（ゼブラフィッシュとヒメダカ）の検討にて NOEC 濃度が 6.79 mg/L であることが判明したため、Ni の影響は考えられなかった。

8.3.3 凝集沈殿処理実験

生物試験の結果より、F 処理水はムレミカヅキモとニセネコゼミジンコに影響を有し、それらの原因の一つは Ni であることが推察された。そこで、二次処理水中に残存する Ni 除去手法の検討として凝集沈殿処理の実験を行った。PAC 注入率と Ni の濃度の関係を図-26 に、除去率を表-17 に示す。F 処理水の Ni 濃度は PAC の添加量に応じて減少し、PAC 注入率 6.4 ml/L で Ni 濃度は 31.9 μg/L となり、無処理と比べ 80.5%の濃度減少が見られた。A 処理水でも PAC の添加量に応じて Ni 濃度は減少し、無処理と比べ PAC 注入率 3.2 ml/L で Ni 濃度は 10.0 μg/L となり、87.2%の濃度減少が見られた。PAC 注入率 0.4 ml/L での Ni 除去率は F 処理水で 22.9%、A 処理水で 61.4%であり、除去率に大きな差が生じた。

PAC 処理前後の 14 種金属の濃度比較（PAC 注入率 3.2 ml/L）を図-27 に示す。F 処理水と A 処理水のどちらも Al 濃度の大幅な増加が確認されたが、この原因として PAC 添加が起因したと考えられる。他の金属においては除去率が 90%を超えたものは A 処理水における Fe、F 処理水における Zn のみであった。Fe の濃度は F 処理水で 25.4 μg/L、A 処理水で 476 μg/L、それぞれの除去率は 68%と 97%であり濃度の高い A 処理水で高い除去効果が得られた。同様に Zn の濃度は F 処理水で 4.31 μg/L、A 処理水で 30.8 μg/L、それぞれの除

去率は 77%と 97%であり濃度の高い A 処理水で高い除去効果が得られた。

これらの結果より、金属の除去効果は排水の状態や金属の種類によって変動することが考えられ、PAC をいた凝集沈殿処理は Ni だけではなく Fe や Zn などの除去にも有効である可能性が示唆された。

8.3.4 凝集沈殿処理を施した二次処理水を用いた生物影響試験

PAC を用いた凝集沈殿処理による生物影響の低減効果を評価するため、8.3.2 G 処理水の金属成分と毒性原因に対する考察で影響が確認されたムレミカヅキモとニセネコゼミジンコを対象として生物試験を行った。ムレミカヅキモを用いた生物試験の結果を図-28 に示す。40%と 80%排水濃度で対照区（0%）と有意差が確認された。処理前後の試験結果を比較すると凝集沈殿処理前の生物影響（図-22）は 20%排水濃度で有意差が確認されたが、処理後では 20%での有意差は確認されなかった。試験の結果から凝集沈殿処理により二次処理水のムレミカヅキに対する生物影響に改善傾向が見られたが、凝集沈殿処理による明確な生物影響の改善は 80%濃度と 40%排水濃度では確認されなかった。処理前後の Ni 濃度を比較すると、80%排水濃度では処理前で約 131 μg/L から処理後に約 25.5 μg/L に低下し、40%排水濃度では処理前で約 65.6 μg/L から処理後に約 12.8 μg/L に低下した。処理前の 10%排水濃度では Ni 濃度が約 16.4 μg/L で NOEC を示しているが、処理後の 40%排水濃度では 16.4 μg/L 以下の Ni 濃度で生物影響を有するため、ムレミカヅキモに対しては Ni 以外の他の物質も生物影響の要因であることが推察された。

ニセネコゼミジンコを用いた生物試験の結果を図-29 に示す。ニセネコゼミジンコの平均産仔数は 10%排水濃度で有意差が確認された。処理前後の試験結果を比較すると、凝集沈殿処理前の生物影響（図-23）は

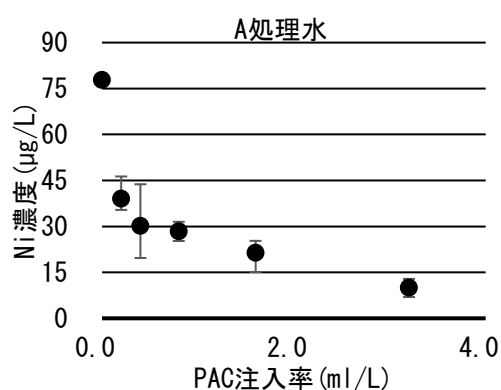
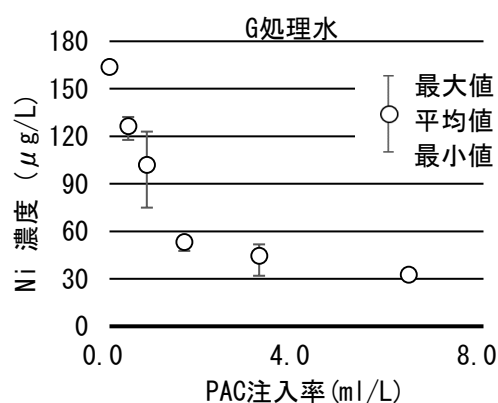


図-26 PAC 処理前後の Ni 濃度

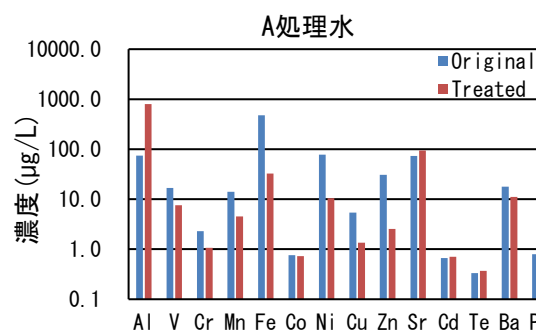
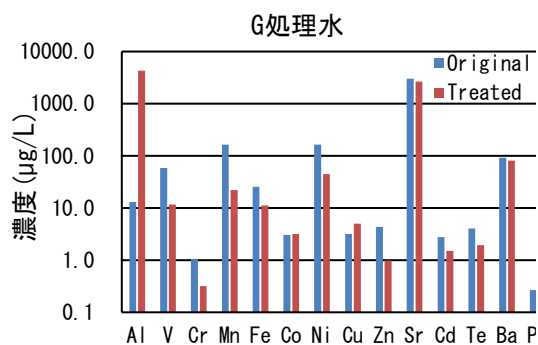


図-27 PAC 処理後の金属濃度

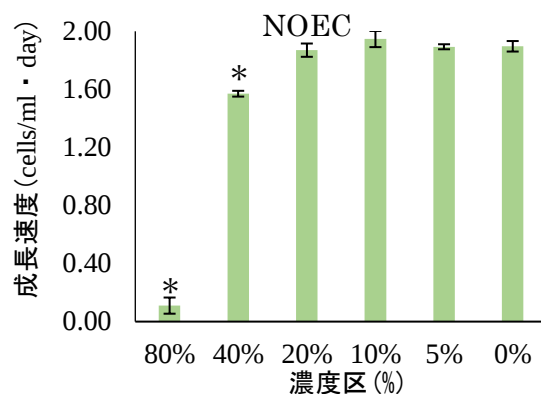


図-28 F 処理水に対する PAC 処理後のムレミカツキモに対する影響評価

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

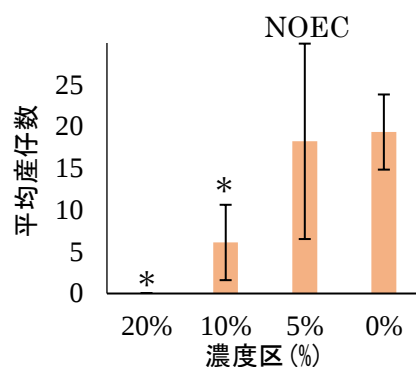


図-29 F 処理水に対する PAC 処理後のニセネコゼミジンコに対する影響評価

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

5%排水濃度で平均産仔数に有意差が確認されたが、処理後では 5%排水濃度で平均産仔数に有意差が確認されなかった。

また生存率においても、処理前では 5%排水濃度で 22.2%であったものが、処理後では 55.6%まで向上した。試験の結果から 5%排水濃度では凝集沈殿処理によりニセネコゼミジンコの平均産仔数と生存率に改善傾向が見られることが明らかになった。

8. 4 まとめ

5. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ 2 種への影響評価において、工場排水などを受け入れる下水処理場では、下水処理水中に残存する金属が生物に対して毒性影響を持つこと、特に Ni がニセネコゼミジンコに対する毒性の原因であることが考えられた。本研究では金属含有濃度が高い二次処理水に対し、PAC を用いた凝集沈殿処理の実験を行い、二次処理水中に残存する金属の除去を試みた。また凝集沈殿処理を行った処理水サンプルを用いて生物試験を行い、生物影響の低減効果を評価した。

1) 下水処理水に PAC 処理を行う事で、Fe、Zn、Ni を最大で 90%以上除去することができたが、除去率は排水の状態により異なった。

2) Ni 等の金属を多く含む下水処理水に対し PAC 処理を行い、処理後の金属濃度が低減された水試料についてムレミカヅキモとニセネコゼミジンコを用いて影響評価を行った。その結果、PAC 処理により処理水の生物影響が軽減されることが明らかとなり、Ni 等の金属の除去が寄与していると推察された。

9. 下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚類（ゼブラフィッシュとヒメダカ）の検討

9.1 目的

生物応答を用いた排水試験において、胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験では、ゼブラフィッシュとヒメダカが推奨されているが、下水試料に適用できる種を選定する必要がある。そこで実際の流入下水と終沈流出水を用いてゼブラフィッシュとヒメダカの WET 試験を行い、下水処理水の評価に適した魚種の検討を行った。

9.2 実験材料および実験方法

9.2.1 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する化学物質の曝露実験

本試験は国立研究開発法人国立環境研究所より分譲されたゼブラフィッシュ (*D. rerio*) 及びヒメダカ (*Oryzias latipes*) を使用し、生物応答を用いた排水試験法（検討案）²⁾に基づき実施した。

試験に用いた化学物質と濃度区を表-18 に示す。また、ゼブラフィッシュとヒメダカの試験条件の概要を表-19 に示す。試験には 50 mL のガラスビーカーを使用し、試験連数は 4 連/濃度区とした。濃度区ごとに受精 4 時間以内のゼブラフィッシュの胚、または受精 10 時間以内のヒメダカの胚をそれぞれ 60 個 (15 個/連)、40 個 (10 個/連) 曝露した。曝露期間は対照区の生

表—18 試験に用いた化学物質と濃度区

曝露物質	化学物質	試験濃度 (mg/L)
ニッケル	塩化ニッケル	3.75, 7.5, 15, 30
アンモニア	塩化アンモニウム	12.5, 25, 50, 100, 200
塩素*	次亜塩素酸 ナトリウム	0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0

* 塩素濃度は全塩素濃度 (mgCl/L) を示す。

存胚の半数以上が孵化した日を孵化日とし、孵化日の 5 日後までとした。曝露方式は半止水式（少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）とし、孵化率及び生存率を求めた。照明は白色蛍光灯で明期 16 時間、暗期 8 時間とし、ゼブラフィッシュの水温は $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、ヒメダカの水温は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。試験条件成立の確認のため、水質測定項目として、換水前・後の試料の pH、水温、溶存酸素 (DO) を測定した次亜塩素酸ナトリウムを曝露した試験では、最大濃度区の換水前試料についてポケット残留塩素計 (HACH 社製) を使用して全塩素濃度及び遊離塩素濃度を測定した。

9.2.2 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する下水処理水の影響評価

実下水処理場の流入下水を連続処理している活性汚泥処理実験装置から、2017 年 11 月 13 日にスポット採水した流入下水と終沈流出水を排水試料として用いた。排水試料は 60 μm ポアサイズのメッシュ (SEFER 社製) でろ過を行い、褐色瓶に入れ、試験まで冷暗所 (4°C) で保管した。終沈流出水に塩素 (次亜塩素酸ナトリウム、2.5 mg-Cl/L) を試験直前に添加し、30 分間接触した試験試料を疑似放流水として実験に使用した。試料の希釈と対照区には脱塩素水道水を用いた。各下水試料は脱塩素水道水を用いて 80%、40%、20%濃度に希釈し、脱塩素水道水のみを対照区 (0%) として実験に用いた。試験条件は 9.2.1 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する化学物質の影響評価と同条件で行った。

9.2.3 統計解析方法

2.2.3 統計解析に準じて行った。

9.2.4 発達異常卵からの微生物の分離と検証

終沈流出水中で曝露した際に発達異常が確認されたヒメダカの卵をそれぞれ 1 つずつ R2A 培地 (日本製薬株式会社製、3 mL/試験管) に添加し、 25°C で 2 日間

静置培養した。白濁した培養液は R2A 寒天培地上に塗布し、2 日間培養後コロニーを形成させ、微生物株として単離した。コロニーは色、大きさ、形状の違いにより区別した。単離した微生物は定常期まで増殖させ、脱塩素水道水に 200 μ L/50 mL 添加し、曝露用試験水とした。受精 10 時間以内のヒメダカの胚（卵、n=10）をそれぞれの微生物培養液が入った試験水に添加し（最終濃度 OD₆₅₀=0.0008）、対照区が孵化するまでの 8~9 日間曝露した。換水は 1 日置きに行った。培養期間中、実体顕微鏡（MC170HD、Leica 社製）を用いて経時的に胚発生を観察し、早孵化や奇形等の異常が確認された胚が曝露された微生物を該当微生物とした。

9.3 実験結果と考察

9.3.1 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する化学物質の影響評価

ゼブラフィッシュとヒメダカを用いて塩化ニッケル、塩化アンモニウム、次亜塩素酸ナトリウム（塩素）が孵化率、生存率に及ぼす影響を試験した。特にゼブラフィッシュとヒメダカの孵化率と生存率に対する NOEC を比較すると、化学物質の種類により違いは見られたが、孵化率、生存率のどちらを見ても 2 倍程度の差であった。これらの結果は、使用した化学物質に対する感受性が両魚種で類似していることを示している。使用した化学物質は異なるが、我々の結果は既報の魚類における急性毒性試験（96 時間、50%効果濃度：EC₅₀）の結果と類似していた³³⁾。

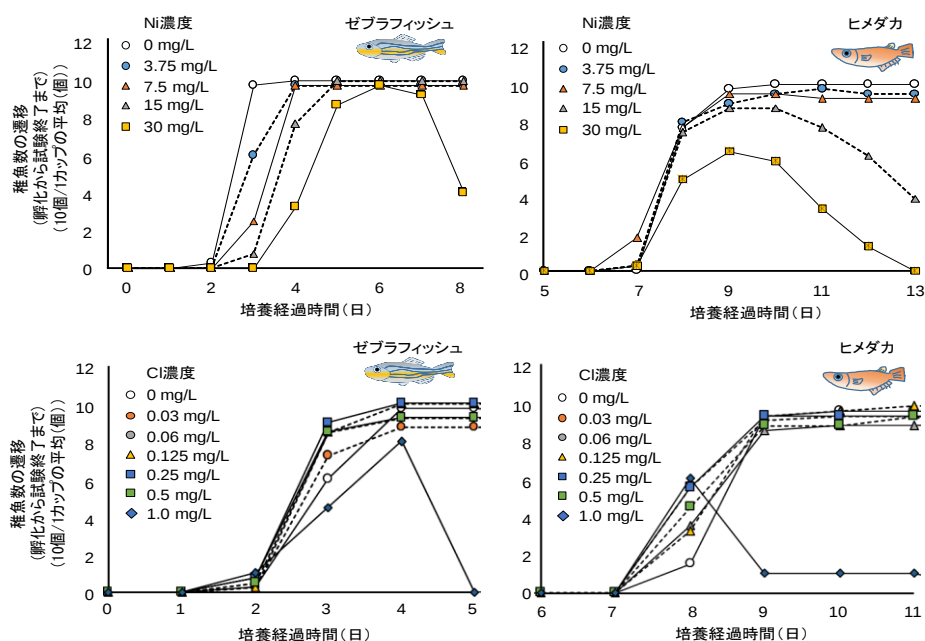
表—19 ゼブラフィッシュとヒメダカの試験条件

試験魚種	ゼブラ フィッシュ	ヒメダカ
試験水	脱塩素水道水	
連数	4 連/濃度区 (15 個/連)	4 連/濃度区 (10 個/連)
受精卵数	10 個/連	
曝露期間	8—9 日	13—14 日
曝露方式	半止水式（2・3 日ごとに換水）	
照明	白色蛍光灯	
	明期 16 時間、暗期 8 時間	
水温	26±1℃	24±1℃
評価項目	孵化率 ¹ 、生存率 ²	

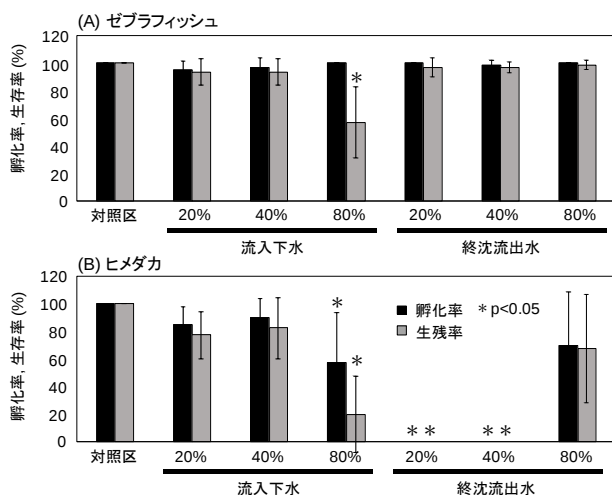
※¹孵化率 = 最大孵化所要日数での総孵化仔魚数 / 供試卵数 × 100

※²生存率(%) = (曝露終了時の生存胚体数 + 生存仔魚数) / 供試卵数 × 100

一方、個々の化学物質における孵化後の稚魚の生残数を経時的に検討した場合、それぞれの化学物質に特徴的な影響が確認された（図—30）。例えばゼブラフィッシュでは塩化ニッケルを曝露すると、3.75~15 mg/L



図—30 ゼブラフィッシュとヒメダカに対するニッケルと塩素の経時的影響評価



図—31 流入下水と終沈流出水に対するゼブラフィッシュメダカを用いた WET 試験

までは最終的な稚魚の生残数は減少せず影響は見られなかったが、濃度に比例して孵化の遅延が確認された。一方ヒメダカでは 15~30 mg/L で孵化数の減少が確認されたが、3.75~15 mg/L 以下で孵化の遅延は確認されなかった。これらの結果から、ニッケルによる孵化遅延がゼブラフィッシュに特異的であることが推察される。一方塩素を曝露した場合、ゼブラフィッシュとヒメダカで共に 1.0 mg/L で孵化数の減少が確認されたが、0.125~0.5 mg/L では塩素濃度の増加に伴い、孵化の促進が確認された。これらの結果は NOEC では示されない化学物質の影響が、魚の孵化時間で確認されることを示唆している。魚の WET 試験では、孵化日から 5 日後までの孵化率と生存率に基づいて安全性を評価しているが²⁾、本実験結果から孵化の促進・遅延なども水質評価の判断材料になることが推察される。

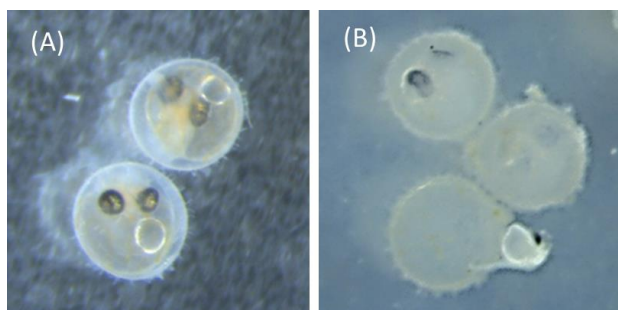


図-32 終沈流出水で飼育したヒメダカ卵

(A) 脱塩素水で飼育したヒメダカ卵（対照区）、(B) 40%希釈濃度の終沈流出水で飼育したヒメダカ卵。いずれも培養 4 日目の実体顕微鏡写真

9.3.2 ゼブラフィッシュとヒメダカを用いた下水処理水の影響評価

実下水を連続処理している活性汚泥処理実験装置から採取した流入下水と終沈流出水（模擬放流水として塩素 2.5mg/L を添加し 30 分間接触）を排水試料として使用し、ゼブラフィッシュとヒメダカを用いて WET 試験を行った。その結果を図-31 に示す。流入下水における孵化率での NOEC は、ゼブラフィッシュでは 80% 希釈濃度以上、ヒメダカでは 40%希釈濃度であり、生存率での NOEC はゼブラフィッシュとヒメダカで共に 40%希釈濃度であった。終沈流出水では、ゼブラフィッシュの孵化率と生存率に対する NOEC は 80%希釈濃度以上と影響は見られなかった。一方、ヒメダカでは 80%希釈濃度の終沈流出水を曝露した場合、約 70%の生存率と孵化率を示したが、20%と 40%希釈濃度の終沈流出水を曝露した場合では、孵化前に卵が全て死滅したため、NOEC を求めることができなかった。これら死亡したヒメダカの卵を実体顕微鏡で観察すると、曝露 4~7 日目の卵の周りに微生物の増殖が観察され、魚が未発達のまま早孵化する、もしくは卵の中で死亡する現象が確認された（図-32-B）。

この現象が微生物に起因するか明らかにするため、同様な現象が観察された卵を R2A 培地で培養し、原因となる微生物の単離を試みた。その結果、5 菌株の微生

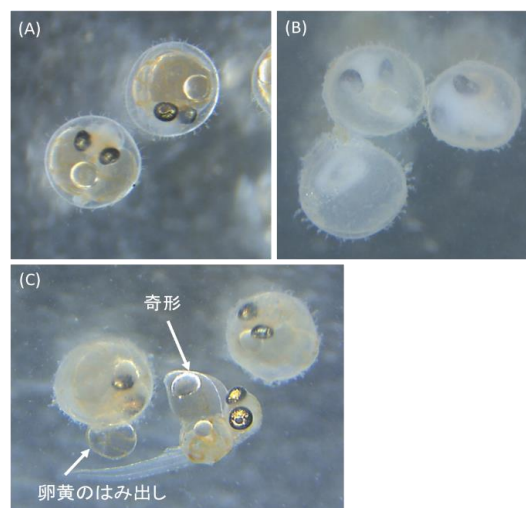


図-33 分離菌株 (Type-A と B) で飼育したヒメダカ卵の実体顕微鏡写真

(A) 脱塩素水道水で飼育したヒメダカ卵（対照区、4 日間培養）、(B) Type-A の分離菌株を添加した脱塩素水道水で培養したヒメダカ卵（4 日間培養）、(C) Type-B の分離菌株を添加した脱塩素水道水で培養したヒメダカ卵（6 日間培養）。

80%希釈濃度の終沈流出水でヒメダカ卵への微生物の発生・死亡率が低かったことは、添加した塩素濃度が高く（約 2 mg/L）、それにより微生物の発生が抑制されたと推察される。一方、40%と 20%希釈濃度では、塩素濃度が低くなる（それぞれの塩素濃度：約 1 mg/L、

以上の結果を考慮すると、下水処理水の WET 試験では、ゼブラフィッシュを用いる方が、処理水中の微生物の影響を受けにくく、化学物質等の影響を安定して評価できると考えられる。

下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚種の選定を目的とし、ゼブラフィッシュとヒメダカを用いた化学物質と下水試料の曝露実験から、以下の点を明らかにした。



1) 3種の化学物質（ニッケル、アンモニア、塩素）による影響は、ゼブラフィッシュとヒメダカの孵化率と生存率を比較すると、それぞれの化学物質に対する感受性として2倍以内の差であった。

2) 下水処理水に対して WET 試験を行った場合、ヒメダカは処理水中に含まれる化学物質の他に微生物から影響を受ける可能性があった。

3) WET 試験における各魚種の曝露期間は、ゼブラフィッシュで8～9日間、ヒメダカで13～14日間であり、飼育期間がゼブラフィッシュで短いことも考慮すると、下水処理水を対象とした WET 試験では、ヒメダカよりゼブラフィッシュを用いる方がより簡便にデータが得られることが推察された。

10. 下水処理水を対象としたメダカ多世代試験による魚類個体群存続評価

10.1 目的

魚種の個体群存続に影響を与える恐れのある女性ホルモン、女性ホルモン様物質などの未規制化学物質が下水処理水から検出される場合がある。河川水に占める下水処理水の割合が高くなっている水域もあり、こうした水域では、魚種の個体群存続への影響が懸念される。魚種は水生生物の代表種、経済生物であり、下水処理水放流先の魚類保全のためには、下水処理方式とその処理水が魚種個体群存続に与える影響を把握し、魚種への影響が少ない処理方法を選択することも重要となる。魚種の個体群存続への影響は、繁殖（産卵、孵化、稚魚の成長、二世世代目の産卵、性比など）で評価す

る必要があるが、生物応答を用いた試験法（検討案）の胚・仔魚期の魚種を用いる短期毒性試験²⁾では評価できない。排水を対象とした多世代魚種試験は確立されていない。本研究では、二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水でメダカの多世代繁殖実験を行い、魚種個体群存続評価への適用可能性を調査した。

10.2 実験方法

10.2.1 下水処理実験装置とメダカ曝露水槽

図-34、写真-1 に本実験で用いた下水処理実験装置と流水式メダカ曝露水槽の関係を示す。下水処理実験装置は、活性汚泥処理実験装置、砂ろ過塔、オゾン処理実験装置から構成され、活性汚泥処理実験装置は、最初沈殿池（500L）、活性汚泥処理槽（500L×4槽）、最終沈殿池（700L）、からなる。流入下水は、主に生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用いた。活性汚泥処理槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行う標準活性汚泥法とした。水理学的滞留時間（HRT）は約7時間である。二次処理水はアンスラサイトによりろ過した後、オゾン処理実験装置に送られる。オゾン処理実験装置は、オゾン反応塔とその後段に中空円筒状担体（ポリプロピレン製4mm^{OD}×3mm^{ID}×5mm^L）を充填したろ床から構成される。メダカへの曝露水は、活性汚泥二次処理水を砂ろ過したもの（以降、砂ろ過水）、それをオゾン処理したもの、オゾン処理水を担体ろ床でろ過したものと、コントロール区とした脱塩素水道水である。

曝露期間中は曝露水槽内の水質分析（水温、pH、DO、



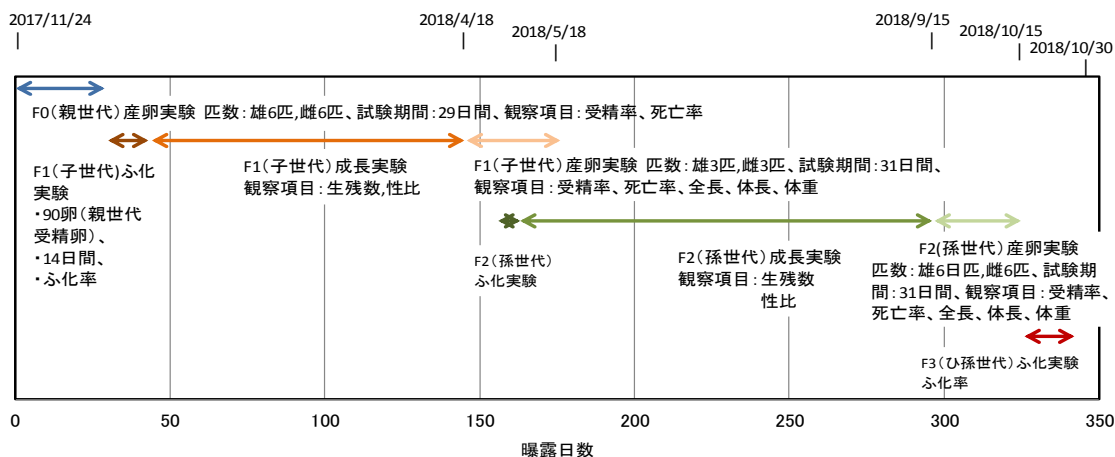


図-35 メダカ多世代試験の曝露スケジュールと曝露条件

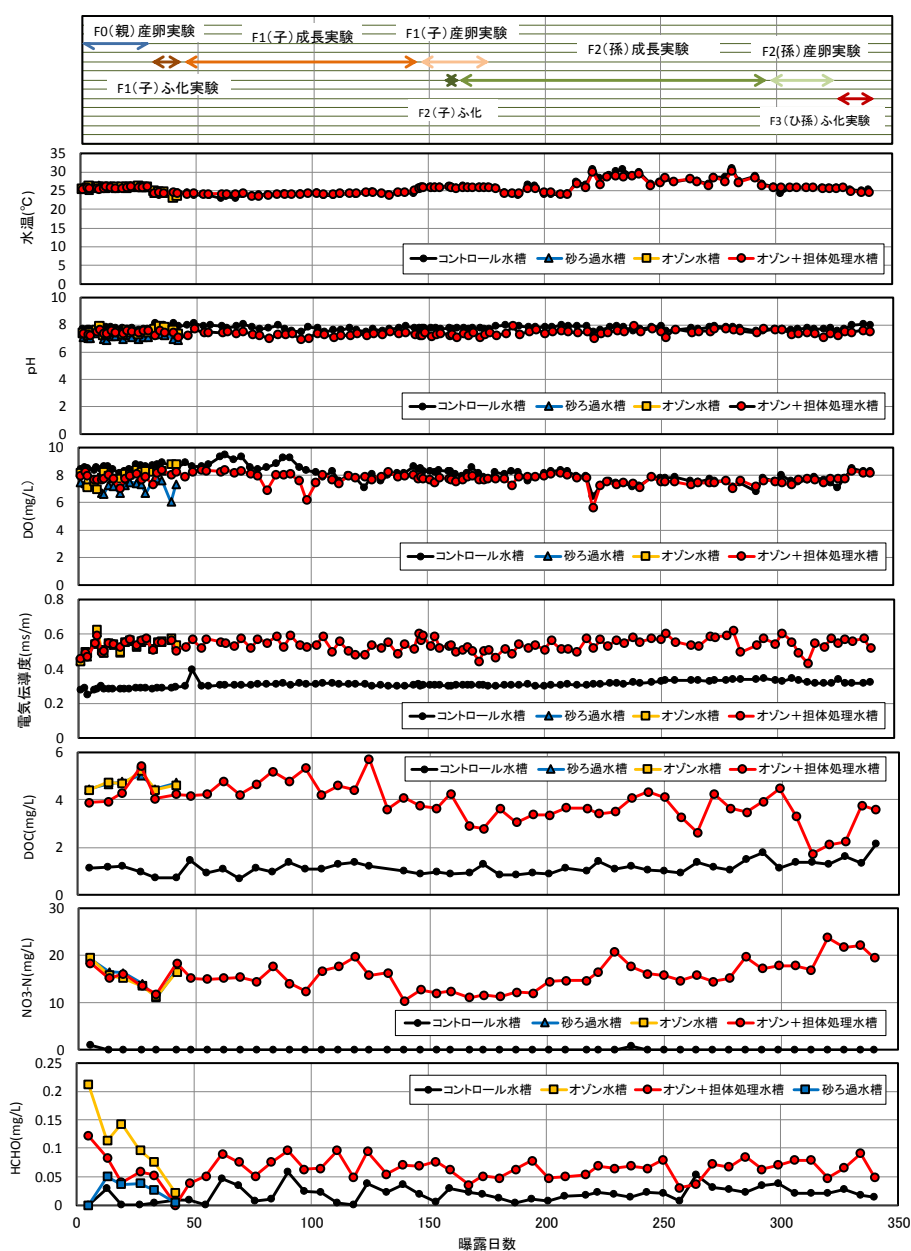


図-36 メダカ多世代試験の実験条件と各曝露水槽の簡易水質分析の結果

注) 砂ろ過水槽、オゾン水槽の分析値は、0～43日目までのみ

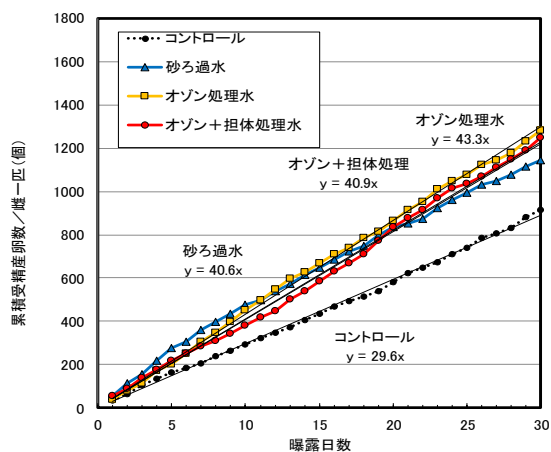


図-37 F0（親）世代の産卵実験の結果

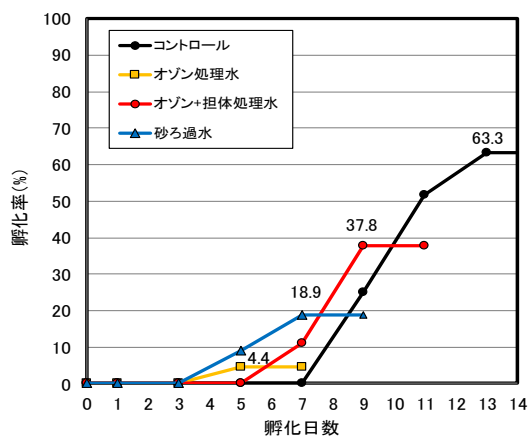


図-40 F1（子）世代のふ化実験の結果

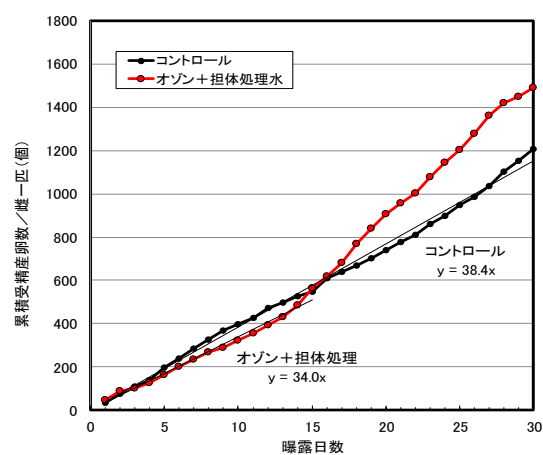


図-38 F1（親）世代の産卵実験の結果

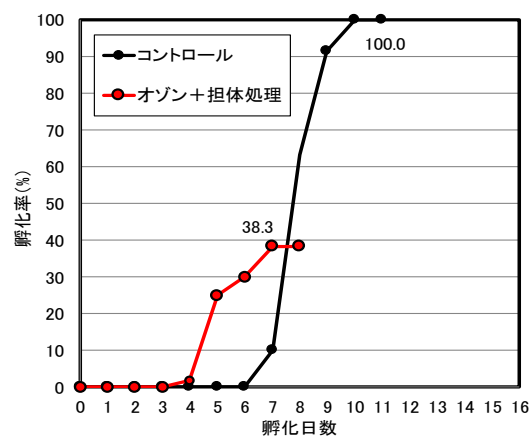


図-41 F3（ひ孫）世代のふ化実験の結果

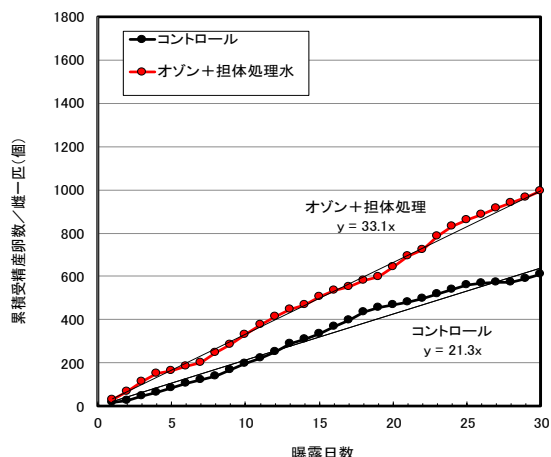


図-39 F2（孫）世代の産卵実験の結果

電気伝導度、DOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、ホルムアルデヒド（HCHO）を週 1～3 回行い、水質の安定性を確認した。

10.2.2 メダカ曝露実験

メダカの曝露実験は、2017 年 11 月 24 日～2018 年

10 月 29 日の間で行った。曝露実験は、成魚（F0:親世代）の産卵実験から始まり、F1（子）世代のふ化実験、成長実験、産卵実験を経て、F2（孫）世代のふ化実験、成長実験、産卵実験、F3（ひ孫）世代のふ化実験からなる。図-35 に曝露スケジュール、実験条件を示した。

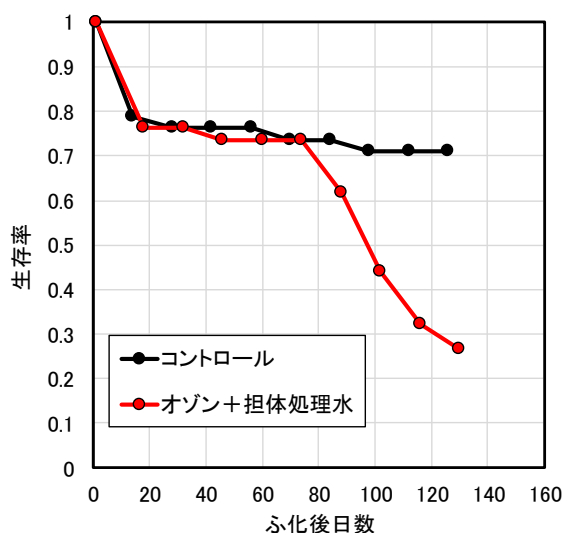


図-42 F1 (子) 世代の生存率

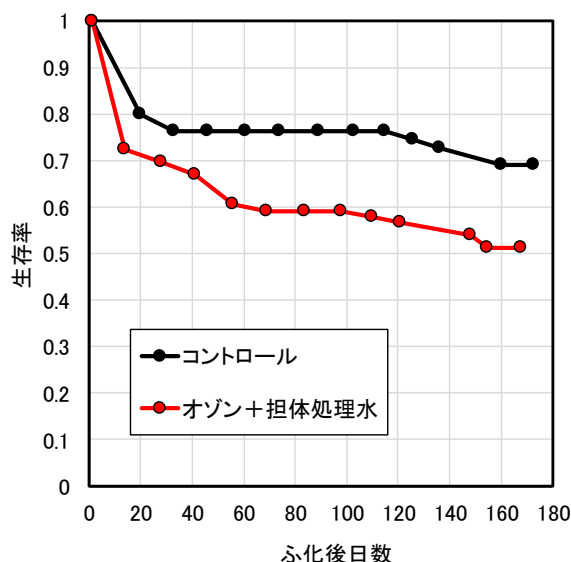


図-43 F2 (孫) 世代の生存率

メダカはヒメダカ（系統：NIES）を用いた。曝露方式は、流水式とし、各曝露水当たり 1 連とした。給餌は各水槽で同量の餌量となるように調整した自動給餌機で粉末試料（おとひめ B2）を 1 日 3 回（8:00、13:00、18:00）、飽食量を与えた。

10.2.3 メダカの繁殖影響の評価法

下水処理水がメダカの個体群存続に与える評価には、化学物質が魚類個体群存続に与える影響の評価としても利用されるレスリー行列による個体群存続評価³⁸⁾を適用した。今回の曝露実験で得られた、受精卵数、ふ化率、生存率、性比を用いて、シミュレーションおよび最大固有値（ λ ）を算出し、個体群存続可能性を評価した。

10.3 実験結果と考察

10.3.1 曝露水の水質分析の結果

10.3.1 曝露水の水質分析の結果

図-36 に曝露期間中の各曝露水槽内の水質分析の結果を示す。コントロール、オゾン+担体処理水槽の水温は、冷却制御を行わなかった夏季を除き、産卵実験中は 26℃、成長、ふ化実験中は 24℃に維持されていた。pH は 7～8 程度、DO は概ね 7～8 mg/L と各曝露区で顕著な違いはなかった。下水処理水曝露区の電気伝導度は、約 0.5 s/m、DOC 濃度は約 4 mg/L、NO₃-N 濃度は概ね 10～20 mg/L、オゾン+担体処理水槽の HCHO は 0.05～0.1mg/L であった。オゾン+担体処理水の水質は曝露期間中、概ね安定していた。

10.3.2 多世代繁殖実験の結果

本多世代繁殖実験では、F1（子）世代のふ化実験において、砂ろ過水と、オゾン処理水曝露区の水化率が低下した。これは受精卵にカビが発生し、死亡個体が多くなったためである。これにより、多世代試験に必要な次世代の個体を確保できなかったため、砂ろ過水とオゾン処理水曝露区の実験は、F1 世代のふ化実験までとした。オゾン+担体処理水曝露区の水化率は継続して続けた。

図-37～39 に F0（親）、F1（子）、F2（孫）世代の産卵実験の結果を示す。図-37 より、砂ろ過水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水曝露区では、雌一匹一日当たりの受精卵数は、40 個程度と同程度であることがわかる。受精卵数は、コントロール区より上回っており、本実験での砂ろ過水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水は成魚の産卵に与える悪影響はないと考えられた。

図-40、41 に F1（子）、F3（ひ孫）世代のふ化実験の結果を示す。図-40 の F0（親）世代のふ化実験より、砂ろ過水、オゾン処理水曝露区の水化率が低いことがわかる。これらの下水処理水曝露区では、受精卵にカビが発生し死亡に至りやすく、正確なふ化率を得ることが困難であった。

オゾン+担体処理水曝露区の水化率は、概ね 38% であった。なお、F2（孫）世代のふ化は、孵化仔魚をできるだけ多く得るため、産卵した受精卵を計数せずに 1 容器の半止水式でオゾン+担体処理水に投入しつづけたため、水化率は正確に算出していない。

図-42、43 に F1（子）、F2（孫）世代の生存率を示す。オゾン+担体処理水曝露区の生存率がコントロール区より、低くなる傾向を示した。図-42 より、F1（子）世代のオゾン+担体処理水曝露区で、80 日目以降、生存率の低下が見られた。この原因は明らかではないが、

孫世代では見られていないことから、曝露水槽の管理に問題があった可能性もあり、このような現象が引き続き起こるか調査していく必要がある。

図-44 は、F2（孫）世代の産卵実験終了後の体長、体重、生殖腺重量指数、肥満度の結果である。オゾン+担体処理水曝露区は、コントロール曝露区と比較して有意（有意水準 1%）に低下している指標はなく、オゾン+担体処理水の成長に与える悪影響は見られなかった。

10.3.3 レスリー行列による個体群存続評価

表-20 はメダカ多世代繁殖実験で得られた結果をまとめたものである。多世代繁殖実験からは各世代で、産卵数、ふ化率、性比、生存率が得られ、これらの値を用いると個体群存続評価が可能となる。本研究では個体群存続の評価に利用されることが多く、簡易なレスリー行列による解析を試みた。解析に使用したパラメータは、表-20 の白黒反転の値である。解析に用いたレスリー行列を式(1) に示した。なお、本解析では、14 日間を 1 期、9 期（126 日）以降を成魚と仮定し計算を行った。

図-45 は、レスリー行列によるシミュレーション結果で、700 日間曝露を継続した時の雌成魚の総数の推移を示している。オゾン+担体処理水曝露区の総数は、コントロール区より低くなる傾向を示したが、個体数

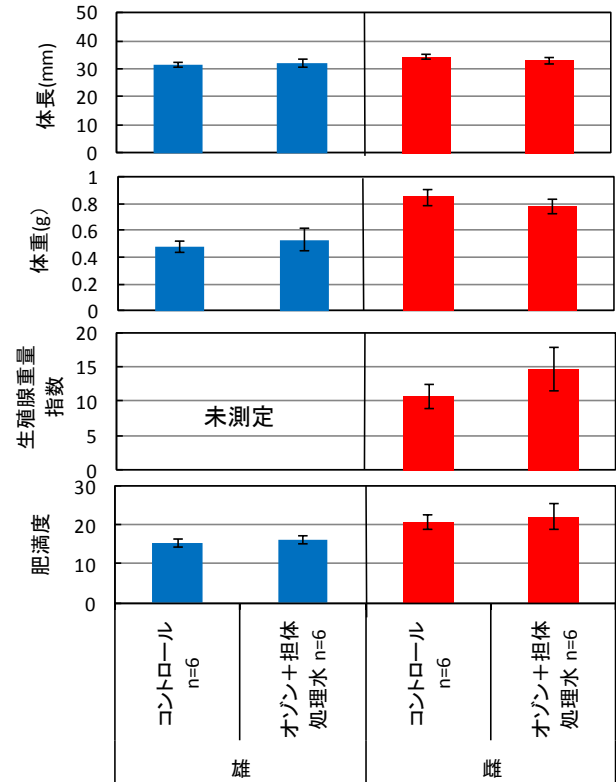


図-44 F2（孫）世代の体長、体重、生殖腺重量指数、肥満度

表-20 メダカ多世代繁殖実験から得られた評価結果の一覧

世代	F0(親)世代		F1(子)世代		F2(孫)世代		F3(ひ孫)世代	
曝露区	コントロール	オゾン+担体処理	コントロール	オゾン+担体処理	コントロール	オゾン+担体処理	コントロール	オゾン+担体処理
雌1匹・14日当たり受精卵数…(A)	414	573	538	476	298	463	—	—
ふ化率(%)…(B)	—	—	63.3	37.8	—	—	100	38.8
雌の割合(%)…(C)	—	—	44.4	20.0	47.4	35.9	—	—
14日当たりの生残率(仔魚期)…P仔	—	—	0.794	0.818	0.860	0.726	—	—
14日当たりの生残率(稚成魚魚期)…P稚	—	—	0.990	0.991	0.992	0.982	—	—

繁殖率…F繁=A×B×C

(レスリー行列)

0期の1期経過時匹数

1期

2期

3期

4期

5期

6期

7期

8期

9期以降の

=

0 0 0 0 0 0 0 0 0 F_繁F_繁

P_仔 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

0 P_稚 0 0 0 0 0 0 0 0 0

0 0 P_稚 0 0 0 0 0 0 0

0 0 0 P_稚 0 0 0 0 0 0

0 0 0 0 P_稚 0 0 0 0 0

0 0 0 0 0 P_稚 0 0 0 0

0 0 0 0 0 0 P_稚 0 0 0

0 0 0 0 0 0 0 P_稚 0 0

0 0 0 0 0 0 0 0 P_成P_成

0期の匹数

1期

2期

3期

4期

5期

6期

7期

8期

9期以降

…式(1)

は増加することがわかる。

コントロール区とオゾン+担体処理水曝露区についてレスリー行列から算出された最大固有値 λ は、1.85と1.60となった。最大固有値 λ が1以上のときは個体群増加、0のときは個体群維持、1以下のときは個体群減少と評価される。オゾン+担体処理水曝露区の最大固有値は、コントロール区よりも低い値となったが、1以上であり、個体群増加と判断された。オゾン+担体処理水は個体群存続への悪影響はないと判断された。

10.4 まとめ

オゾン+担体処理水を評価対象としてメダカ多世代繁殖実験を行い、個体群存続評価に必要なパラメータとなる雌一匹当たりの受精卵数、ふ化率、生存率、性比についてのデータ取得を行った。得られたこれらの値を用いてレスリー行列による個体群存続評価を試みた。その結果、多世代繁殖実験においてオゾン+担体処理水曝露区では、ふ化率の低下が見られたが、その他のパラメータ値は、コントロール区と比較しても顕著な違いは見られなかった。得られたパラメータ値を用いたレスリー行列による個体群存続解析でも、オゾン+担体処理水曝露区の最大固有値 λ は1以上を示し、オゾン+担体処理水は個体群存続への悪影響はないと考えられた。多世代繁殖試験の実施には、試験期間が1年近く要するが、排水の魚類個体群存続評価への適用は可能であると考えられた。

11. おわりに

以下に本研究で得られた知見を4つの観点からまとめた。

I：下水に対するWET試験の適用とTIE

本研究では、ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いて、6処理場の流入下水と処理水に対して全排水毒性(WET)試験を用い、下水処理水の生物影響評価と、毒性同定評価を行った。全WET試験の結果を表-21に示す。流入下水では無影響濃度が80%以下となるケースが多く見られたが、処理水では80%でも生物影響は見られないケースが増加しており、毒性は下水処理過程で低減することが明らかになった。毒性原因物質は、酸化物、アンモニア、界面活性剤と推察された。

II：下水の藻類に対する影響解明

ムレミカヅキモを用いた生物影響試験では、流入下水は下水処理工程を経て、毒性が低減されることが明らかになった。一方、気温の低い冬季では生物処理活性の低減により、下水処理水に生物影響が残存すること、また下水処理方法の違いにより、下水処理水の生

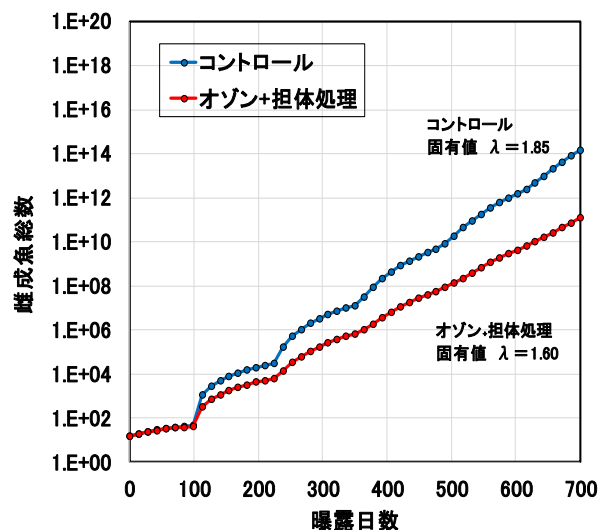


図-45 レスリー行列による個体群存続評価の結果

物影響の結果が異なることを明らかにした。

III：下水の甲殻類に対する影響解明

ニセネコゼミジンコを用いた生物影響試験では、金属排水が多く含まれる下水処理水において影響が残存し、特にNiを含む処理水で顕著に影響が確認されることを明らかにした。これらの結果は、ニセネコゼミジンコがNiに対する感受性が高いことを示している。一方、処理水中に含まれるFeにより、ニセネコゼミジンコに対するNiの影響が軽減されることが明らかになった。これら下水処理水はPAC等の凝集沈殿処理を行うことで金属が除去され、それに伴い、ニセネコゼミジンコの影響も軽減されることが明らかになった。溶存態金属濃度が高い下水処理水が放流されている汽水域の河川水に対し、シオダマリミジンコを用いて影響評価を行ったが、本試験では影響はみられなかった。Ni濃度は放流水が河川水と混ざることによって1/10程度まで希釈され、水生生物に対する影響は低減されることが推察される。陽イオン金属が多く流入する下水処理場では、PAC処理を用いて金属を除去することにより生物影響が軽減されることが明らかになった。

IV：下水の魚類に対する影響解明

魚類を用いたWET試験では一般的にヒメダカとゼブラフィッシュを用いるが、下水処理水の試験では、ヒメダカが微生物の影響を受けるため、ゼブラフィッシュが適していることを明らかにした。ただし、ヒメダカとゼブラフィッシュでは化学物質に対する感受性が異なることに留意が必要であった。また、ヒメダカを用いて下水処理水の多世代繁殖試験を行った結果、オゾン+担体処理水では孵化率の低下が見られたものの、ひ孫世代まで成長への影響が生じないことを明ら

表-21 各下水処理場の流入下水と放流水に対する WET と TIE の結果

(A) 流入下水

場所	処理法	年	月	WET				TIE																	
				NOEC				酸化物			アンモニア			非揮発性有機物			界面活性剤			陽イオン金属			全溶解固形分(TDS)		
				P	C	D ^H	D ^S	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D
A	標準毒性汚泥法	2014	10	≧80	/	≧80	40						○												
		2015	1	10	≧40	40	40	○		○				○			○		○						
			2	20	≧40	≧80	40			○	○		○	○					○						
B	嫌気好氧活性汚泥法	2015	1	20	20	40	40		/	○				○	/			/	○		/			/	
			4	40	≧40	≧80	≧80	○			○					○									
			7	20	≧40	40	40			○	○							○							
			10	20	≧40	≧80	40	○			○						○		○	○					
C	標準毒性汚泥法	2014	9	42	/	≧80	5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
			12	40	/	≧80	40		/	○		/			/			/	○		/		/		
		2015	3	20	≧40	20	20			○	○					○	○		○						
			6	20	≧40	20	20			○				○			○		○						
D	オキシ化・デニトリフICATION法	2016	1	20	≧40	≧80	40				○			○		○	○		○			○			
			7	20	≧40	40	20											○					○		
E	嫌気好氧活性汚泥法	2016	2	20	≧40	≧80	≧80	○									○								
			8	20	≧40	≧80	≧80				○			○											
F	標準毒性汚泥法	2014	11	5	/	40	40	○	/	○		/		○	/		○	/	○		/			/	
			2	10	≧40	≧80	40			○				○				○							
		2015	5	20	≧40	≧80	40			○	○			○					○						
			8	20	≧40	≧80	40			○								○		○					

(B) 放流水

場所	処理法	年	月	WET				TIE																	
				NOEC				酸化物			アンモニア			非揮発性有機物			界面活性剤			陽イオン金属			全溶解固形分(TDS)		
				P	C	D ^H	D ^S	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D
A	標準活性汚泥法	2014	10	≧80	/	≧80	≧80		/			/			/			/			/			/	
		2015	1	40	<5	≧80	≧80	○									○								
			2	40	≧40	≧80	≧80	○			○						○								
B	嫌気好氧活性汚泥法	2015	1	40	<5	≧80	≧80	○	/			/			/		○	/			/			/	
			4	≧80	<5	≧80	≧80		/			/			/			/			/			/	
			7	≧80	<5	≧80	≧80												○						
			10	≧80	<5	≧80	≧80				○								○						
C	標準活性汚泥法	2014	9	≧83	/	≧80	≧80		/			/			/		/			/			/		
			12	≧80	/	≧80	≧80		/			/			/		/		/			/			
		2015	3	10	≧40	≧80	≧80	○			○														
		6	≧80	≧40	≧80	≧80																			
D	オキシ化・デニトリフICATION法	2016	1	40	≧40	≧80	≧80																		
			7	≧80	≧40	≧80	≧80																		
E	嫌気好氧活性汚泥法	2016	2	20	≧40	≧80	≧80	○																	
			8	20	≧40	≧80	≧80				○			○					○						
F	標準活性汚泥法	2014	11	≧80	/	≧80	≧80		/			/			/			/			/			/	
			2	40	≧40	≧80	≧80	○			○														
		2015	5	≧80	≧40	≧80	≧80																		
		8	≧80	≧40	≧80	≧80																			

WET：全排水毒性試験(Whole Effluent Toxicity)、NOEC：無影響濃度、TIE：毒性同定評価

P：ムレミカヅキモ、C：ニセネコゼミジンコ、D^H：ゼブラフィッシュ（卵のふ化率）、D^S：ゼブラフィッシュ（稚魚の生存率）

かにした。レスリー行列による個体群存続解析でも悪影響がなく、存続可能と評価された。WET 試験は亜慢性試験のため、下水処理水の慢性影響は評価できないが、本手法を用いると長期的な影響評価をすることが可能であると考えられる。

参考文献

1) USEPA: “Draft National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance”, EPA832-B-4-003, 2004

- 2) 環境省:「生物応答試験を用いた排水の評価手法(仮称)とその活用の手引き(中間とりまとめ案)」, 2019
- 3) 山本裕史、安部香緒里、池幡佳織、安田侑右、田村生弥、中村友紀、鑑迫典久:「徳島県内の下水処理施設放流水を対象にした WET 試験」、環境工学研究論文集、Vol.47、pp727-734、2010
- 4) 山本裕史、矢野陽子、森田隼平、西家早紀、安田侑右、田村生弥、鑑迫典久:「下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価」、土木学会論文集 G (環境)、Vol.69、No.7、pp.375-384、2013

- 5) USEPA : “Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants”, EPA/833B-99/002, 1999
- 6) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) : “*Daphnia magna* Reproduction Test”, No. 211, OECD, Paris, France, 2012
- 7) R Core Team: R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austraria. <http://www.r-project.org/>, accessed on May 2015
- 8) PRTR けんさくくん、経済産業省ホームページ、http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、2015 年 5 月参照
- 9) PRTR けんさくくん、経済産業省ホームページ、http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、2014 年 6 月参照
- 10) 社団法人日本下水道協会 : 「下水試験方法 1997 年版試験方法編」、社団法人日本下水道協会、1997.
- 11) 国土交通省水質連絡会 : 「河川水質試験方法 (案) [2008 年度版] 河川管理者のために」、http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html、2009
- 12) U.S.EPA: “Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents”, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992
- 13) 江藤隆、栗林栄、新海幸男、野尻希守 : 「下水道施設における微量化学物質に関する現状と対策についての調査研究」、2000 年度下水道新技術研究所年報、pp.75-80、2000
- 14) 磯崎雄一、中島典之、古米弘明 : 「下水処理工程水及び放流先河川水における亜鉛・銅・ニッケルの形態分析」、環境科学会誌、Vol.19、No.5、pp445-452、2006
- 15) 安田侑右、澤井淳、中本貴士、岡村哲郎、増崎優子、宮本信一 : 「生物応答を用いた下水処理水の毒性原因の特微化」、第 18 回日本水環境シンポジウム講演要旨集、pp.159-160、2015
- 16) 松原正明、原田新、南山瑞彦、田中宏明 : 「水生生物を用いた各種のバイオアッセイの下水試料に対する感受性の比較」、環境工学研究論文集、Vol.35、pp.305-312、1998
- 17) Johnson, C. G. : “Effects of pH and hardness on acute and chronic toxicity of un-ionized ammonia to *Ceriodaphnia dubia*”, M.S. Thesis, University of Wisconsin, Stevens Point, WI, 1995
- 18) 若林明子 : 「化学物質の毒性や濃縮性に影響を与える因子」、環境毒性学会誌、Vol.1、No.2、pp.27-40、1998
- 19) U.S.EPA: “1999 Update of Ambient Water Quality Criteria For Ammonia”, EPA-822-R-99-014, pp.34, 1999
- 20) Belanger, S. E , Farris, J. L. and Cherry, D. S. : “Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*”, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol.18, No.4, pp.601-611, 1989
- 21) Keithly, J. , Brooker, J. A. , DeForest, D. K. , Wu, B. K. and Brix, K. V. : “Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella azteca*)”, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.23, No.3, pp.691-696, 2004
- 22) Cooper, N. L., Bidwell, J. R. and Kumar, A.: “Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*”, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.72, No.5, pp.1523-1528, 2009
- 23) Pavlaki, M. D. , Pereira, R. , Loureiro, S. , Soares, A. M. V. M. : “Effect of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*”, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.74, No. 1, pp.99-110, 2011
- 24) Schubauer-Berigan, M. K. , Dierkes, J. R. , Monson, P. D. and Ankley, G. T. : “pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*”, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.12, No.7, pp.1261-1266, 1993
- 25) De Schampelaere, K. A. C. , Van Laer, L. , Deleebeeck, N. M. E. , Muyssen, B. T. A. , Degryse, F. , Smolders, E. and Janssen, C. R. : “Nickel speciation and ecotoxicity in European natural surface waters: Development, refinement and validation of bioavailability models”, Report prepared for the Nickel Producers Environmental Research Association, Gent University, Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Gent, Belgium, <https://biblio.ugent.be/publication>

- /5785290, accessed in August 2016
- 26) 藤原尚美、野中信一、豊久志朗、鑑迫典久：「金属製品製造工場のWETを用いた排水中毒性要因の推定とその改善例」、環境化学、Vol.25、No.1、pp.35-42、2015
 - 27) 板津靖之、高野智弘、金俊、福富真実子、楠井隆史：「事業所排水の生態毒性学的評価：毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響」、環境化学、Vol.25、No.1、pp.19-26、2015
 - 28) 永井孝志：「環境水中重金属のスペシエーションと生物利用性」、環境毒性学会誌、Vol.14、No.1、pp.13-23、2011
 - 29) 小川文章、小森行也、村田里美、鈴木裕識：「下水処理工程における化学物質等の除去特性及び生物影響に係る検討業務」、土木研究所 平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.83-84、2018
 - 30) 水産庁：「魚介類水質環境基準検討調査総合報告書（海産生物毒性試験指針）」、2000
 - 31) A.G El Samrani, B.S. Lartiges, F. Villieras.: “Chemical co-agulation of combined sewer overflow: Heavy metal removal and treatment optimization”, Water Research., Vol.42, No.2, pp.951-960, 2008
 - 32) 大曲遼、竹内彩乃、勝又政和、中村勝、有菌幸司、石橋康弘：「緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) の遅延発光による重金属類の毒性評価」、環境と安全、Vol.8、No.3、pp.141-148、2017
 - 33) 環境省ホームページ、生態毒性の生物種間の比較、https://www.env.go.jp/council/05hoken/y053-02/ref_03.pdf
 - 34) Cao N, Yang M, Zhang Y, Hu J, Ike M, Hirotsuji J, Matsui H, Inoue D, Sei K: “Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays”, Sci Total Environ, 407, pp.1588-1597, 2008
 - 35) 田中麻記子、深津和彦、高橋徹：「ヒメダカ (*Oryzias latipes*) 卵における卵膜軟化症」、第 37 回日本水環境学会年会講演集、p.340、2003
 - 36) Liu Y, de Bruijn I, Jack AL, Drynan K, van den Berg AH, Thoen E, Sandoval-Sierra V, Skaar I, van West P, Diéguez-Urbeondo J, van der Voort M, Mendes R, Mazzola M, Raaijmakers JM: “Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases”, ISME J, 10, pp.2002-2014, 2014
 - 37) Thoen E, Evensen O, Skaar I: “Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs”, J Fish Dis, 10, pp.601-608, 2011
 - 38) 林 他：「魚類個体群レベルにおける生態リスク評価手法の提案、4-ノニルフェノールによるメダカ個体群評価のケーススタディ」、水環境学会誌 Vol.26、No.9、pp.575-582、2003

下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究

研究予算：運営交付金

研究期間：平 29～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、對馬育夫、北村友一、
鈴木裕識、村田里美

【要旨】

本研究では、まず、下水道への流入が懸念される繊維状マイクロプラスチックについて、本研究グループで構築した蛍光染色観察法により下水処理場における通日調査を実施した。その結果、流入水中に存在していた 13 億 5,000 万本/日の蛍光発光繊維が、最初沈殿池流入までに（主に沈砂池で）70.35%、最初沈殿池流出までに 98.20% が除去されていることを確認するなど、下水処理過程でどれくらいのサイズの繊維状 MPs がどのように存在し除去されているかを把握することができた。また、マイクロプラスチックの藻類生育阻害試験では、大きさや種類の異なる 7 種の MPs を用いて、藻類のモデル生物であるムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した。その結果、ブロック状と比較して粒子状の MPs の影響が大きいこと、また、粒子状の MPs では Ny6-P>PET>Ny12 の順でムレミカヅキモの増殖に影響を与えることが明らかになった。

キーワード：下水処理場、繊維状マイクロプラスチック、簡易検出法、藻類生育阻害実験、ナイロン 6、材質

1. はじめに

近年、ナノテクノロジーの進歩により、炭素粒子や金・銀、チタン等の金属粒子の特性を利用したナノ粒子工業品が年間数%の生産量の伸び率で増加し、下水道を経由する等により、水環境中へ放出され得ることが懸念されている。また、プラスチック製品が劣化し細かくなったものや洗顔料などに使用されるマイクロビーズなどのマイクロプラスチックも、水生生物の成長等に影響を及ぼす等の研究結果が報告されている。G7(2016 年 5 月富山)環境大臣会合では海洋ゴミ（マイクロプラスチック）について、「陸域を発生源とする海洋ゴミの発生抑制と削減」「マイクロプラスチックの生態系への影響評価のための科学的な研究」などの施策の実施が約束された。

これらの物質の中にはラボ実験において高い毒性が確認されているものもあるが、様々な物質が共存する自然環境中における影響は明らかにされていない。特に、下水に含まれるナノ物質・マイクロプラスチックの挙動や影響については、研究手法すら確立されていない。下水道の技術開発に関する中長期的な計画・方向性を示す「下水道技術ビジョン」ロードマップに「環境中における微量汚染物質の測定技術の確立と影響評価」が示されており、学術的にも行政的にも研究開発が求められている。

本研究は、平成 29 年度から平成 33 年度までの計画

で、下水に含まれるナノ物質やマイクロプラスチック等の微小粒子の定性・定量方法を構築し、それらの下水や放流先での挙動、水生生物やヒト細胞に与える影響を確認することを目的とする。

平成 29 年度は、ナノ物質の研究対象として、家庭や工場等で使用され下水処理場を経由して一部は水環境に到達することが想定される銀ナノ粒子に着目し、サイズ分画を行った下水流入水および処理水に銀ナノ粒子を添加した培地でムレミカヅキモを用いた藻類増殖阻害試験を実施した。その結果、10 kDa より大きい画分では、銀ナノ粒子が下水中に含まれる溶存化合物と共存することで、銀ナノ粒子の持つ毒性が軽減される傾向を確認し、下水中には相殺効果を引き起こす化学物質が存在していたと考察された。また、マイクロプラスチックの研究対象として、家庭等における洗濯工程から発生し、下水道に流入していることが懸念されている繊維状マイクロプラスチックの検出方法を検討した結果、簡易検出法として Nile Red 試薬を用いた蛍光染色観察法を構築した。

本年度は、近年注目度が高まっているマイクロプラスチックに関する研究に力点を置き、昨年度見出した繊維状 MPs の簡易検出法を用いて下水処理場調査を実施するとともに、MPs が及ぼす水生生物への影響を検討することを目的として、藻類（ムレミカヅキモ）を用いた生育阻害試験を実施した。

2. 繊維状マイクロプラスチックの下水処理場調査

2.1 はじめに

MPs は人間活動由来であり、特に都市域では、下水道を経由して水環境へ到達する MPs について、その重要性や環境負荷全体に占める割合等の把握が必要である。MPs の一種である繊維状 MPs については、これまでも洗濯工程における発生量調査結果を報告した論文¹⁾などが確認できるが、これらの文献は発生量等の推計に留まり、繊維状 MPs に特別に着目して下水処理場を調査した例はみられない。この理由の一つとして、繊維状 MPs に対する適切な検出法が提示されてこなかった点が挙げられる。本研究では、昨年度に構築した繊維状 MPs の簡易検出法である蛍光染色観察法を用いて下水処理場を調査し、下水処理工程における存在実態と挙動を検討した。

2.2 調査及び実験の方法

2018 年 6 月 14-15 日に関東地方の下水処理場において、一部合流式、嫌気・無酸素・好気法+急速ろ過法の処理系列で通日調査を実施した。流入下水、放流水、各下水工程の試料を採取し、既報²⁾の手法を一部改良して前処理した。具体的には、試料に 30% H_2O_2 を加え 60℃で 1 時間加熱する操作を繰り返すことで、効率的な夾雑有機物除去を試みた。前処理後の試料は Nile Red 溶液で染色し、落射蛍光観察下で短軸径 100 μm 以下を目安に確認された繊維状物質を計測した。蛍光顕微鏡で観察されるナイルレッド染色を施した各種プラスチック材質の蛍光色を図-1 に示す。ポリエチレンテレフタレート (PET) やナイロン等は赤、ポリスチレン等は黄、ポリプロピレン (PP) や (PS) ポリエチレンは緑色に発光してみえることが分かる。この他、ポリエステルは赤色発光を確認している。

2.3 結果および考察

2.3.1 観察工程の半自動化による測定の効率化

本調査では、得られた下水試料を観察する前に、昨年度構築した検出法をベースに観察工程についてさらなる効率化を図った。具体的には、本調査の観察では、実体顕微鏡に蛍光ユニット (BioTools 社製) を組み合わせて使用し、撮影画像サイズを調整することにより、一試料あたりの計測時間を短縮した。本研究で現在使用している蛍光ユニットを装着した実体顕微鏡の様子を図-2 に示す。蛍光顕微鏡は用途が非常に限られるために、繊維状 MPs の測定のためだけに導入することは現実的ではない。多目的に使用できる実体

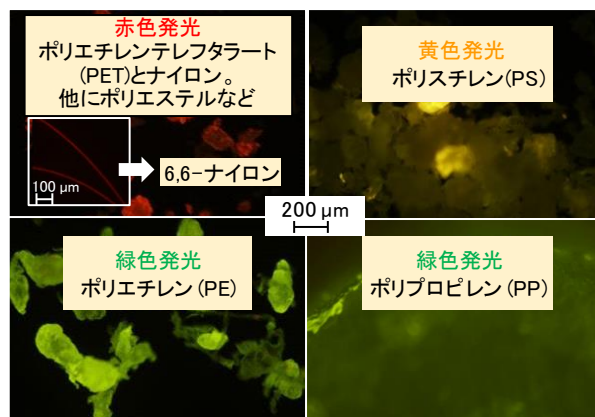


図-1 蛍光顕微鏡で観察されるナイルレッド染色を施した各種プラスチック材質の蛍光色

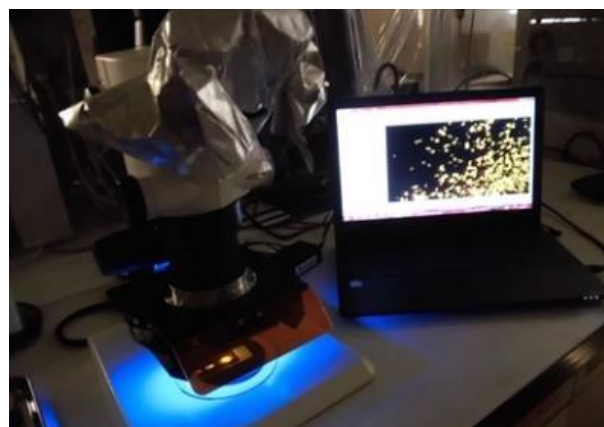


図-2 本研究で現在使用している蛍光ユニットを装着した実体顕微鏡

顕微鏡に取り外しが可能な蛍光ユニットを装着するというアイデアにより、多くの研究機関が本手法を簡易に導入できるように工夫した。さらに、本手法の検討開始当初は 1 検体あたり数百枚の撮影画像を個別に結合して処理をしていたが、結合操作だけで数日を要していた。加えて、試料中の MPs 数の計測は人力で行っており、その他のサイズや形等の二次的情報の整理が煩雑であった。そこで、フリーの画像処理ソフトである Image J や Inkscape と独自のプログラムを組み合わせる半自動計数機能を開発し、実際に本手法を用いる研究者の作業時間の短縮に結びつく簡易かつ効率的な手法を構築した。

2.3.2 通日調査結果

各蛍光発光繊維の下水処理場への流入状況の比較を図-3 に示す。各色発光繊維の日平均数は赤が 195 本/L、黄が 17 本/L、緑が 5 本/L であり、赤が全時間帯

で黄、緑より多く検出された。赤発光繊維は流入数の時間変動が大きく、15:00と1:00で最大6.9倍の差がみられた。また、放流水中の各色発光繊維の日平均数は赤が0.3本/L、黄が0.2本/L、緑がN.D.（不検出）であった。以降は3つの蛍光発光繊維の合計値で議論を進める。

調査した処理系列の日負荷量の算出結果を図-4に示す。流入水量は6,173 m³/日であった。調査した処理系列の日負荷量を赤、黄、緑色発光繊維の合計値で算出したところ、流入水中には13億5,000万本/日の蛍光発光繊維が存在しており、最初沈殿池流入までに（主に沈砂池で）70.35%、最初沈殿池流出までに98.20%が除去されていた。最終沈殿池では9,620万本/日まで減少し、放流時には流入時の99.8%が除去されていた。一方で、生物反応槽では202億本/日となり、最初沈殿池流出水と返送汚泥からの反応槽流入時と反応槽流出時の前後の収支は合わなかった。

各下水処理工程で検出された蛍光発光繊維の長さ分布を図-5に示す。初沈汚泥中には全体的に大きな繊維が多く（中央値530 μm）、比較的大きなものは最初沈殿池でトラップされやすいことが示された。一方で、生物反応槽流出水には長さ150 μm程度の細かな繊維が多く検出された（中央値180 μm）。人工のプラスチック繊維は日常で使用されているサイズのものであ

ても、元は細くて短い繊維が互いに撚って構成されていることが知られている。一般的に下水処理場の現地調査における物質収支は変動等により一致しにくいことに留意が必要ではあるが、本調査結果から、生物処理中の曝気等で繊維状MPsの撚りが解れ、より微細化することで本数が増加していた可能性が示唆された。

本調査のように、各処理工程の下水試料を同一の手法で測定することにより存在実態や挙動、除去特性の検討が可能となる。本研究で効率化を図った簡易検出法は、多検体の処理が比較的短時間で可能であり、繊維状マイクロプラスチックの流入実態を把握する一次スクリーニングとして有用であると考えられた。

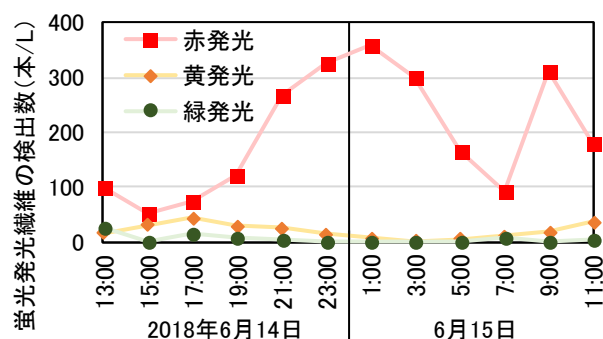


図-3 各蛍光発光繊維の下水処理場への流入状況の比較

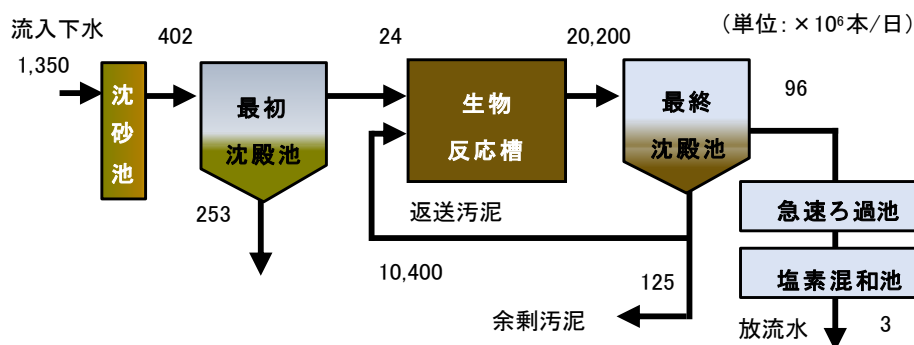


図-4 下水処理工程における蛍光発光繊維の日負荷量(数値は赤、緑、黄色の蛍光発光繊維の合計値)

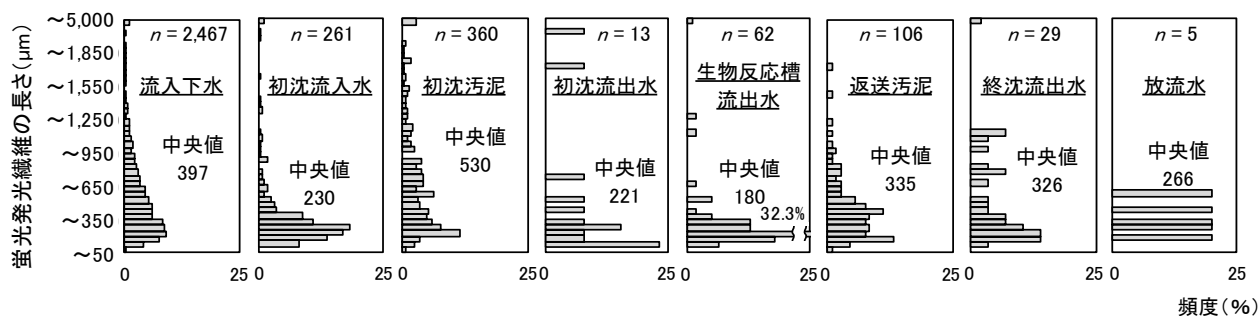


図-5 各下水処理工程から検出された蛍光発光繊維の長さ分布

3. マイクロプラスチックの藻類生育阻害試験

3.1 はじめに

環境中に排出された MPs が水生生物に与える影響について、魚類や甲殻類等に関する知見が多数報告されている。餌と間違えて MPs を捕食すること、それによって MPs に吸着した化学物質が体内に取り込まれて水生生物に影響を与えること等が報告されている。一方、MPs が及ぼす藻類への影響は明らかにされていない。例えば、MPs 存在下で藻類を培養すると、外的損傷を受けること等が報告されているが、既報で検討された MPs はポリスチレンやポリ塩化ビニルに留まっている。藻類は食物連鎖の底辺に位置しており、MPs が藻類に与える影響を明らかにすることは、MPs が環境に与える影響を考える上で重要である。本研究では、大きさや種類の異なる 7 種の MPs を用いて、藻類のモデル生物であるムレミカヅキモの増殖に及ぼす影響を検討した。

3.2 実験方法

3.2.1 使用したプラスチック

粉末状の MPs は、ポリエチレン (LDPE)、ポリスチレン (PS)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリエチレン-U.H.M.W (UHPE)、ナイロン 6 (Ny6-P) とナイロン 12 (Ny12) を用いた。PE、PS、PET、UHPE は最大粒径が 300 μm 程度であったことから、振るいを用いて粒径を①300~212 μm 、②212~106 μm 、③106~53 μm 、④53 μm 以下、の 4 段階に分けて実験に供した。ナイロン 6 (Ny6-P) とナイロン 12 (Ny12) は、平均粒径が 15~20 μm と 25~30 μm であったことから、振るいをかけず、そのまま実験に用いた。ブロック状の MPs は、ポリプロピレン (PP、直径 3 mm) とナイロン 6 (Ny6-B、一辺 3 mm) を用いた。何れの MPs も Goodfellow 社から購入した。

3.2.2 ムレミカヅキモの生育阻害実験

PE、PS、PET、UHPE は、粒形ごとに 15 mg/20mL 濃度で AAP 培地に添加後 (750 mg/L)、ムレミカヅキモ (初期細胞濃度 1×10^4 cells/mL) を 24℃、光強度 2000 Lux 連続照射、回転振とう速度 100 rpm で 72 時間培養した。Ny6-P と Ny12 は 1~15 mg/20L 濃

度で AAP 培地に添加後、ムレミカヅキモを培養した。ブロック状の MPs は、それぞれ 150 mg ずつ AAP 培地 20ml に添加し (7500 mg/L)、ムレミカヅキモの培養を行った。3 日間培養した後、フィルターを用いてフラスコ中のムレミカヅキモを回収し、クロロフィル (a) 量とフィオフィチン (a) 量を測定した。

3.3 結果と考察

使用した MPs の実体顕微鏡写真を図-6 に示す。いずれも透明または白色だった。また粉末状の MPs はいずれも不定形であった。

4 種 MPs (PET、PS、LDPE、UHPE、15mg/20mL) を用いて、粒形の大きさとムレミカヅキモの増殖について検討した (図-7)。PET は粒径が小さいほどクロロフィル (a) 量が減少し、106-53 μm 粒形で 79.5%

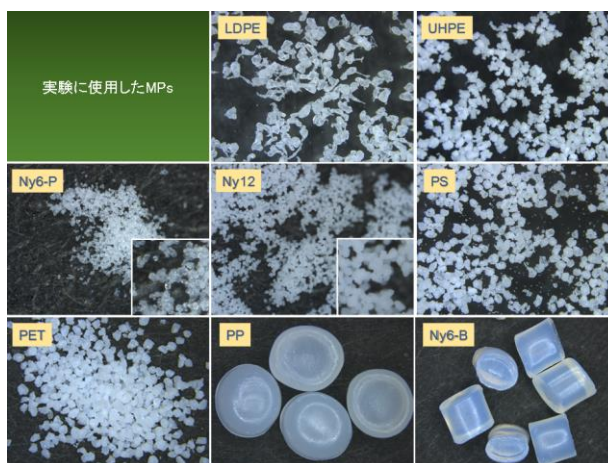


図-6 使用したマイクロプラスチックの実体顕微鏡像

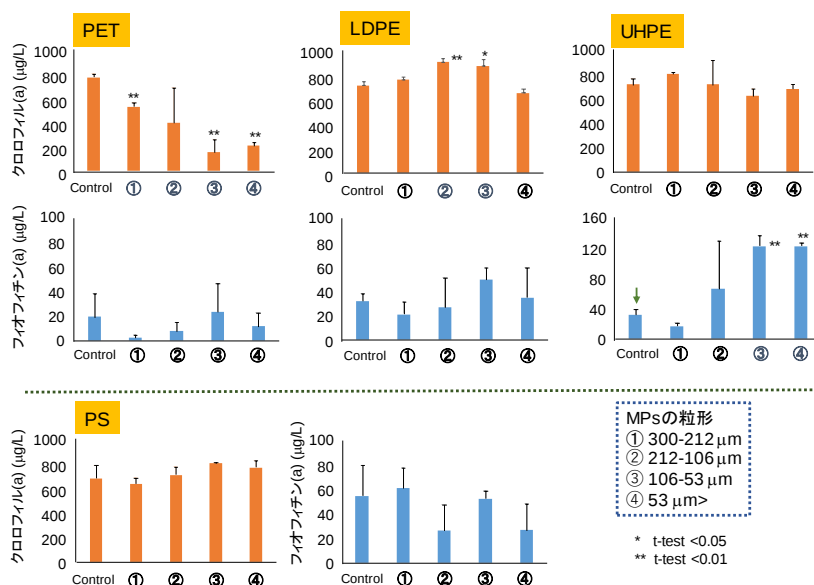


図-7 ムレミカヅキモの増殖に対する PET, LDPE, UHPE, PS の影響

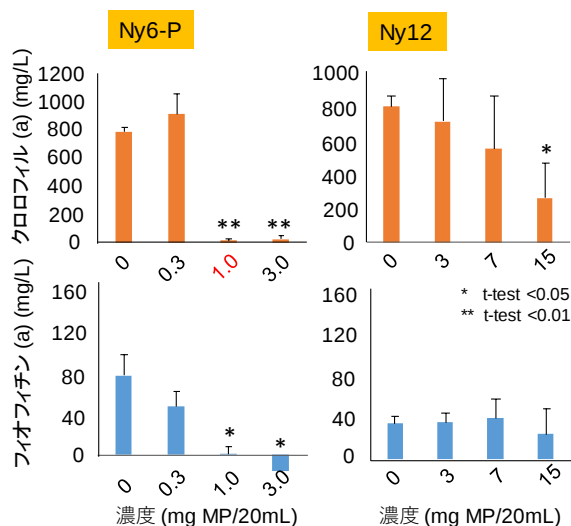


図-8 ムレミカヅキモの増殖に対する Ny6-P と Ny12 の影響

の阻害を示したが、LDPE と PS ではクロロフィル(a)量の減少は見られなかった。その際、フィオフィチン量は、いずれも変動は見られなかった。一方、UHPE はクロロフィル (a) 量の変動は見られなかったが、粒形が小さいほどフィオフィチン量が増加した (106-53 μm 粒形で 384%増加)。

Ny12 と Ny6-P は粒形が小さいため (30 μm $\leq$) 粒形を分けず、添加量を変えた検討を行った。その結果、両 MPs とともに添加量が増加するにつれてクロロフィル (a) 量が減少し、Ny12 は 15 mg / 20L で 67.5%阻害、Ny6-P は 1 mg / 20L で 99.5%阻害が確認された (図-8)。これらの結果は、MPs の材質によって、ムレミカヅキモの増殖に与える影響が異なることを示している。

一方ブロック状の PP と Ny6-B ではクロロフィル (a) 量とフィオフィチン (a) 量の変化はみられなかった (図-9)。パウダー状の Ny6-P とブロック状の Ny6-B を比較すると、Ny6-P は 1 mg / 20L で 99.5%阻害であったが、Ny6-B はその 150 倍の添加量でも、ほとんどムレミカヅキモの増殖に影響は見られなかった。これらの結果から、MPs は同じ材質でも粒径の大きさによって、ムレミカヅキモの増殖に与える影響がことなることが明らかになった。

4 まとめ

本研究では、まず、繊維状マイクロプラスチックについて、本研究グループで構築した蛍光染色観察法に

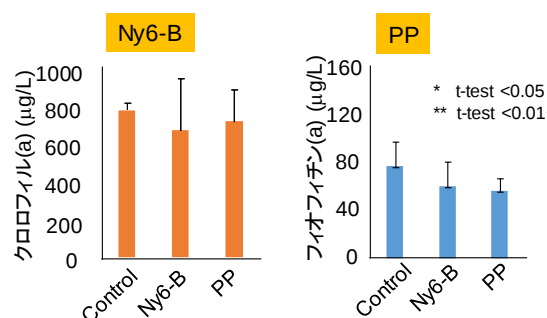


図-9 ムレミカヅキモの増殖に対する Ny6-B と PP の影響

より下水処理場における通日調査を実施した。その結果、下水処理場への流入状況を確認し、各下水処理工程の日負荷量および検出された蛍光発光繊維の長さ分布の比較から、どれくらいのサイズの繊維状 MPs が下水処理過程でどのように存在し除去されているかを把握することができた。今後は、検出前処理手法の改善、他の検出方法とのバリデーション、そして本手法のマニュアル化を検討し、下水道事業者の方々が本手法を簡易に活用できる近い未来を目指して、研究活動を進めていく。

次に、マイクロプラスチックの藻類生育阻害試験では、大きさや種類の異なる 7 種の MPs を用いて、藻類のモデル生物であるムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した。その結果、ブロック状と比較して粒子状の MPs の影響が大きいこと、また、粒子状の MPs では Ny6-P > PET > Ny12 の順でムレミカヅキモの増殖に影響を与えることが明らかになった。今後はムレミカヅキモの増殖に影響がみられた 3 種 MPs について、阻害原因を検討する予定である。

参考文献

- 1) De Falco, F *et al.*: Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics, *Environmental Pollution*, Vol. 236, pp. 916-925, 2017
- 2) 垣田ら (2017) 下水処理場の各処理工程における粒径 100 μm 以上のマイクロプラスチックの存在実態調査, 第20回日本水環境学会シンポジウム講演集, 20, 52-53

小規模下水処理場における未規制化学物質の挙動と除去特性 に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 29～平 31

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、平山孝浩

鈴木裕識、小森行也

【要旨】

水生生物保全に係る要監視項目は、現時点において、下水処理場放流水が規制を受けることはないが、将来の環境基準化・排水規制化への対応の一つとして下水処理場での挙動及び除去特性把握が必要と考える。本研究では、下水試料を対象とした分析方法の検討と数ヶ所の下水処理場において要監視項目の挙動・除去特性把握調査を行い、下水試料に適した分析方法の提案と要監視項目 6 物質の流入下水、二次処理水の濃度レベルを明らかにした。クロロホルム、ホルムアルデヒド、4-t-オクチルフェノール、アニリン、2,4-ジクロロフェノールの 5 物質の流入下水の濃度は指針値を下回っており、フェノールは流入下水から指針値を超える濃度で検出されたが下水処理により 90%以上除去された。

キーワード：水生生物保全、要監視項目、分析方法、下水処理、除去特性

1. はじめに

水生生物保全に係る要監視項目として、クロロホルム、フェノール、ホルムアルデヒド、4-t-オクチルフェノール、アニリン、2,4-ジクロロフェノールが設定されている。これら 6 物質は、公共用水域における検出状況等からみて、現時点では直ちに環境基準項目とはせず、引き続き環境中の検出状況等に関する知見の集積に努めるべきとされているもので、今後、環境基準項目への追加が検討される予定である。現時点において、下水処理場放流水が規制を受けることはないが、将来の環境基準化、排水規制化への対応の一つとして下水処理場での挙動及び除去特性把握が必要と考える。我が国の下水処理場、特に小規模下水処理場では、これらを含む未規制化学物質等の挙動及び除去特性についてのデータが少ない。また、これらの要監視項目のうち幾つかの物質については、下水道での調査を実施する際に必要となる下水試料を対象とした分析方法が未確立である。本研究は、下水処理場における要監視項目の挙動と除去特性把握を目的としており、研究初年度の平成 29 年度は下水試料を対象とした分析法について検討し、下水試料に適した分析方法を提案した。研究 2 年目の平成 30 年度は、10 ヶ所の下水処理場において要監視項目 6 物質の除去特性調査を実施した。

2. 調査方法

調査は、2018 年 9 月～10 月に現有処理能力 1,000～140,000m³/d、下水の排除方式は分流又は分流一部合流の下水処理場で行った。処理方式は、標準活性汚泥法（4 ヶ所）、オキシデーショディッチ法（3 ヶ所）、嫌気好気ろ床法（3 ヶ所）の処理場である。流入下水と二次処理水をスポット採取し、クーラーボックスに入れ氷で保冷し分析所に運搬した後、要監視項目、SS、BOD、COD、DOC、NH₄-N、NO₂-N、NO_x-N、T-N、T-P を分析した。また、試料採取時に現場において水温、pH を測定した。

3. 調査結果

調査結果を表-1、図-1 に示す。水温は 15.6～26.3℃、pH は流入下水が 7.1～7.8、二次処理水が 6.5～7.8 であった。また、調査 10 処理場の二次処理水の SS は 3mg/L 以下、BOD は 8.1mg/L 以下であり良好な処理が行われていた。要監視項目 6 物質の調査結果については、以下のとおりであった。

クロロホルムの検出濃度は、流入下水は LOQ 以下～

2.2μg/L（中央値 1.4μg/L）、二次処理水は LOQ 以下～0.58μg/L（中央値 LOQ 以下）であった。二次処理水の濃度レベルは、水生生物保全に係る要監視項目の指針値/淡水域/生物特 A（以下、指針値という）6μg/L の約 1/10 又はそれ以下であった。

フェノールは、流入下水 3.3～88μg/L（中央値 12μg/L）、二次処理水 0.022～0.32μg/L（中央値 0.081μg/L）であった。流入下水の濃度レベルは、指針値 10μg/L を超える濃度であったが、各調査処理場の下水処理により 90%以上除去された。二次処理水の濃度レベルは指針値の約 1/30 又はそれ以下であった。フェノール¹⁾は、化学物質審査規制法に基づく好氣的生分解性試験では、被験物質濃度 100mg/L、活性汚泥濃度 30 mg/L、試験期間 4 週間の条件

において、生物化学的酸素消費量 (BOD)測定での分解率は 85%であり、良分解性と判定されている。なお、全有機炭素 (TOC) 測定での分解率は 95%、紫外線吸光光度 (UV) 測定での分解率は 100%である。本調査において、フェノールは各調査処理場の下水処理により 90%以上除去されるという結果が得られたが、前述の好氣的生分解性試験

結果を比較して考えると下水処理におけるフェノール除去は活性汚泥又は担体付着生物による生物分解が主体であると推測される。

ホルムアルデヒドは、流入下水 1.4～13μg/L（中央値 2.7μg/L）、二次処理水 0.13～0.93μg/L（中央値 0.35μg/L）であった。二次処理水の濃度レベルは、指針値 1,000μg/L の約 1/1,000 又はそれ以下であった。

4-t-オクチルフェノールは、流入下水 0.053～0.17μg/L（中央値 0.068μg/L）、二次処理水 0.027～0.14μg/L（中

表-1 調査結果

	LOQ	流入下水			二次処理水			指針値 (生物特A)
		最小値	中央値	最大値	最小値	中央値	最大値	
水温 (°C)	-	15.6	21.0	26.3	16.4	21.6	27.3	-
pH (-)	-	7.1	7.5	7.8	6.5	7.1	7.8	-
クロロホルム (μg/L)	0.39	LOQ以下	1.4	2.2	LOQ以下	LOQ以下	0.58	6
フェノール (μg/L)	0.0068	3.3	12	88	0.022	0.081	0.32	10
ホルムアルデヒド (μg/L)	0.003	1.4	2.7	13	0.13	0.35	0.93	1,000
4-t-オクチルフェノール (μg/L)	0.0016	0.053	0.068	0.17	0.027	0.034	0.14	0.7
アニリン (μg/L)	0.062	0.26	0.68	1.1	LOQ以下	LOQ以下	0.24	20
2,4-ジクロロフェノール (μg/L)	0.017	0.036	0.058	0.26	LOQ以下	LOQ以下	0.024	3
SS (mg/L)	1	49	160	870	LOQ以下	2	3	-
BOD (mg/L)	0.5	62	100	240	0.8	1.7	8.1	-
COD (mg/L)	0.5	57	110	180	5.2	6.9	15	-
DOC (mg/L)	1.0	20	27	44	1.9	3.5	9.5	-
NH ₄ -N (mg/L)	0.05	5.8	18	26	0.05	0.44	22	-
NO ₂ -N (mg/L)	0.05	LOQ以下	0.07	0.11	0.06	0.09	0.30	-
NO _x -N (mg/L)	0.025	0.049	0.088	0.29	1.3	4.6	12	-
T-N (mg/L)	0.8	27	37	56	5.8	17	35	-
T-P (mg/L)	0.4	1.7	3.6	8.8	0.7	2.7	3.4	-

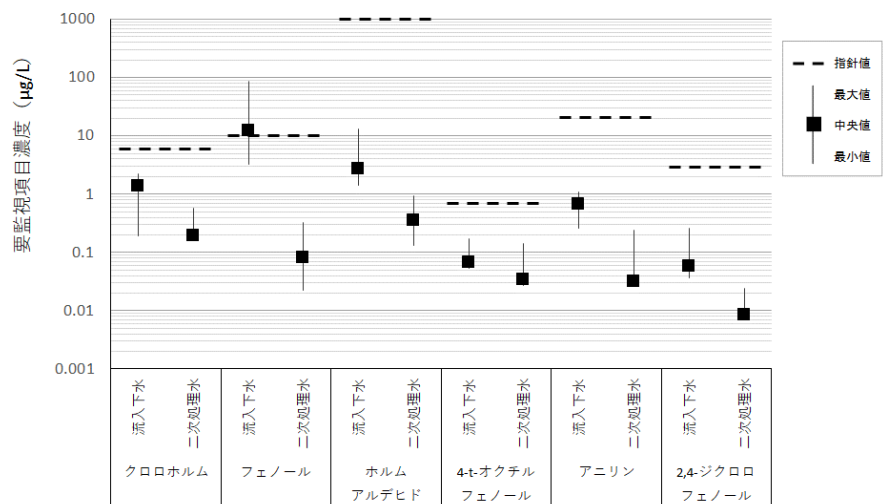


図-1 要監視項目調査結果

央値 0.034 μ g/L) であった。二次処理水の濃度レベルは、指針値 0.7 μ g/L の約 1/5 又はそれ以下であった。

アニリンは、流入下水 0.26～1.1 μ g/L (中央値 0.68 μ g/L)、二次処理水は LOQ 以下～0.24 μ g/L (中央値 LOQ 以下) であった。二次処理水の濃度レベルは、指針値 20 μ g/L の約 1/80 又はそれ以下であった。

2,4-ジクロロフェノールは、流入下水 0.036～0.26 μ g/L(中央値 0.058 μ g/L)、二次処理水は LOQ 以下～0.024 μ g/L (中央値 LOQ 以下) であった。二次処理水の濃度レベルは、指針値 3 μ g/L の約 1/120、又はそれ以下であった。

4. まとめ

水生生物保全に係る要監視項目 6 物質の二次処理水の濃度レベルは、それぞれの指針値に比べクロロホルムは 1/10 以下、フェノールは 1/30 以下、ホルムアルデヒドは 1/1,000 以下、4-t-オクチルフェノールは 1/5 以下、アニリンは 1/80 以下、2,4-ジクロロフェノールは 1/120 以下と低いことが分かった。また、流入下水からフェノールが指針値を超える濃度で検出されたが下水処理により 90%以上除去された。

研究最終年度の令和 2 年度は、流入下水から指針値を超える濃度で検出されたが下水処理により 90%以上除去されたフェノールについて、下水処理過程での除去機構について検討する計画である。

【謝辞】本調査の実施にあたってご協力を頂いた自治体、関係各位に感謝申し上げます。

なお、本調査研究は、運営交付金（一般勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) 財団法人化学物質評価研究機構、CERI 有害性評価書、フェノール、
http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/hazard_assessment_report_03.html (平成 31 年 3 月 14 日確認)

仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の慢性影響評価法の開発

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 29～平 31

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：小川文章、北村友一、服部啓太

【要旨】

高度処理による魚類遺伝子発現への影響低減効果を明らかにするため、二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水について胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を行った。続いて、生残した仔魚の遺伝子発現を網羅解析し、オゾン処理またはオゾン+担体処理による遺伝子レベルでの影響低減効果を調査した。その結果、ふ化率、生残率を指標とした生物応答試験では、二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水への影響は見られなかったが、遺伝子発現解析から、二次処理水に曝露された仔魚では、約 530 個の遺伝子で発現変動が見られた。オゾン処理水曝露区の発現変動遺伝子数は約 140 個となり、オゾン処理により低減することがわかった。発現変動遺伝子の機能解析の結果、二次処理水曝露は、免疫、応答、代謝などに影響を及ぼすことがわかった。オゾン処理ではこれらへの影響は低減することがわかった。

キーワード：ゼブラフィッシュ、仔魚、下水処理水、遺伝子発現解析

1. はじめに

排水の毒性評価には、毒性を有する個別の化学物質の機器分析による濃度測定と生物応答を用いた総毒性試験がある。生物応答を用いた試験は、直接、毒性を評価でき、米国では魚類、ミジンコ、藻類の 3 種を用いた WET（Whole Effluent Toxicity）試験が導入されている。日本でも環境省が生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾を公表し、生物応答に基づく排水管理の制度化と導入が検討されている。排水試験法の中で魚類については、胚・仔魚期の曝露により、胚のふ化率と仔魚の生残率から亜慢性影響を評価する試験となっている。平成 31 年 3 月時点では、事業者の自主的な取り組み²⁾として中間とりまとめが行われた。

一方で、次世代シーケンサーなどの網羅的遺伝子発現解析技術の普及により、遺伝子レベルで生体影響を詳細に解析することが可能となっている。また、OECD を中心に、化学物質の曝露から、分子レベル、細胞レベル、臓器レベル、個体および個体群レベルへの影響についての反応経路（Adverse Outcome Pathway ; AOP³⁾）を整理する取り組みが進められており、AOP の一部である遺伝子発現の知見の充実や遺伝子発現レベルと個体レベルの影響の関係解明が重要となっている。

毒性学や分子生物学の分野で蓄積されてきた遺伝子発現とその機能に関するデータベースを活用し、胚・仔魚期の魚類の様々な機能遺伝子を網羅的に解析することで、遺伝子レベルでの影響評価が可能になると考えられる。

本研究では、WET 試験に網羅的遺伝子発現解析を追加した魚類慢性影響の試験法と評価法の

開発を行っている。H29 年度の研究より、下水二次処理水の魚類の遺伝子発現に与える影響を捉えることができたことから、H30 年度は、高度処理（オゾン処理）過程での遺伝子発現影響の低減効果の解析を試みた。

2. 実験方法

図-1 に本研究で用いた活性汚泥処理実験装置とオゾン処理実験装置の概要を、図-2 にオゾン処理装置の外観、処理条件を示す。実験装置は、最

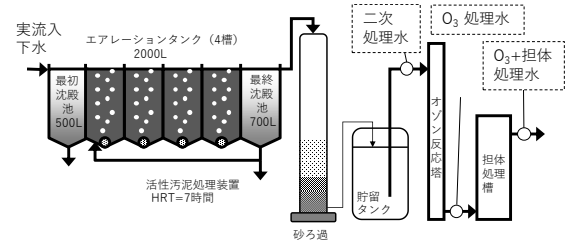


図-1 活性汚泥・オゾン処理実験装置の概要

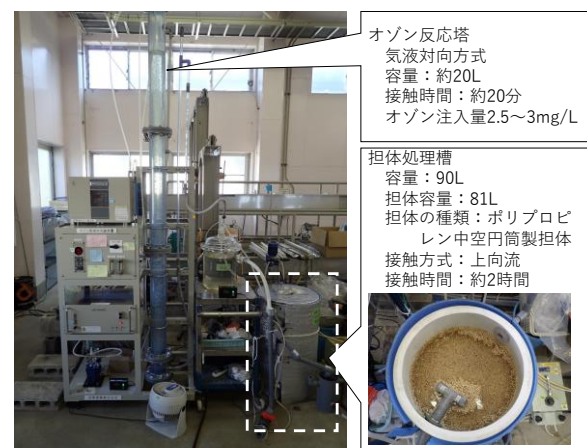


図-2 オゾン処理実験外観と処理条件

初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L × 4 槽）、最終沈殿池（700L）、砂ろ過装置と、その後段のオゾン反応塔、担体処理槽から構成される。流入下水は、主に、分流式下水道として整備され生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用いた。生物反応槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行う標準活性汚泥法による処理を行った。オゾン反応塔ではオゾン注入量約 3 mg/L、接触時間約 20 分で、砂ろ過水のオゾン処理を行った。担体反応槽ではポリプロピレン製担体を充填率 90%（嵩）で充填したろ床にオゾン処理水を通水し、接触時間約 2 時間で処理した。なお、実験装置は、曝露水採水の約 1 カ月前から連続運転した。

採水は、平成 29 年 12 月 7～8 日に二次処理水（砂ろ過水）、オゾン処理水、オゾン+担体処理水を 24 時間採水し、13 日から 22 日にかけて曝露試験を実施した。

曝露条件を表-1 に示す。二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水の曝露濃度は、生物応答試験¹⁾の最大排水濃度の 80 %に設定した。曝露水の希釈には活性炭処理した脱塩素水道水を用い、Control 区は脱塩素水道水 100%とした。

曝露水が入ったカップを 1 曝露区 4 連で用意し、それぞれにゼブラフィッシュの受精卵を 15 粒ずつ入れ、9 日間（ふ化後 5 日目まで）曝露した。水交換は 2,4,6,8 日目に実施した。曝露試験中は生存個体数と孵化個体数を毎日記録し、死亡個体は取り除いた。曝露水の水温、溶存酸素濃度、pH は、曝露開始日と終了日および換水の前後に測定した。

表-1 曝露条件

試験魚種	ゼブラフィッシュ
曝露水	二次処理水(80%) オゾン処理水(80%) オゾン+担体処理水(80%) 脱塩素水道水(Control)
曝露期間	9日間、胚～仔魚期 (受精後4時間～ふ化後5日目)
曝露方式	半止水式(2, 4, 6, 8日目に換水)
連数	4連/試験区
供試卵数	15粒/連
温度	26℃
明暗周期	明 16h / 暗 8h
給餌	なし
観察項目	生存数、孵化数
RNA抽出	Qiagen RNeasy Mini Kit
ライブラリ調整	Illumina Truseq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit
シーケンサー	Miseq, Reagent kit v3 150cycle

曝露終了時に生存していた仔魚は、氷冷麻酔し、1.5mL チューブに移して液体窒素で急速凍結し、RNA 抽出するまで-80℃で保存した。

冷凍保存した仔魚の RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、1 連最大 15 匹をまとめて 1 検体として抽出した。RNA 試料は、Bioanalyzer (Agilent) を用いて、分解を受けていないことを確認し、Truseq Stranded mRNA prep kit (Illumina) を用いてライブラリ調製後、次世代シーケンサー Miseq (Reagent kit v3, 150cycle, Illumina) により、1 ラン 2 検体でシーケンシングを実施した。81 塩基のペアエンドで 1 検体につき約 1,600 千万リードの塩基配列を取得した。

遺伝子発現解析はセルイノベーション(国立遺伝学研究所のデータ解析拠点)⁴⁾にリードデータをアップロードして実施した。Tophat2 を用いてゼブラフィッシュゲノム (DanRer7) にマッピング後、Cufflinks2 を用いて遺伝子の構造を推定し、Cuffdiff を用いて遺伝子発現量計算と発現変動判定を行った。遺伝子発現量の単位は FPKM

(Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped) で表した。遺伝子の配列は、NCBI に登録されているヒトのタンパク質配列 (Refseq Protein)⁵⁾に対して Blastx による相同性検索を行い、E-value と Bit score から最も相同性が高い Refseq ID を得た。そして、UniProt⁶⁾および UniProt-GoA⁷⁾のデータベースを用いて各遺伝子の Refseq ID に対応した遺伝子機能情報 (Gene Ontology, GO) を取得した。統計処理は R ver 3.4.2 および Excel を使い、Fisher の正確確率検定により発現変動遺伝子と関連が強い機能を抽出した。

遺伝子発現と水質の関係を調べるために、曝露実験に用いた脱塩素水道水、二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水は、溶存有機炭素濃度 (DOC)、NH₄-N、NO₃-N、色度、三次元蛍光スペクトルを測定した。

3. 実験結果

3.1 下水処理水の水質測定結果

図-3 に脱塩素水道水 (Control)、二次処理水 (2nd)、オゾン処理水 (O3)、オゾン+担体処理水 (O3+担体) の水質分析結果を示す。DOC 濃度は、二次処理水と比較すると、オゾン処理水と担体処理水で若干低下していた。二次処理水中の NH₄-N、NO₂-N 濃度は低く硝化が進んだ状態であった。NO₃-N 濃度は二次処理水、オゾン処理

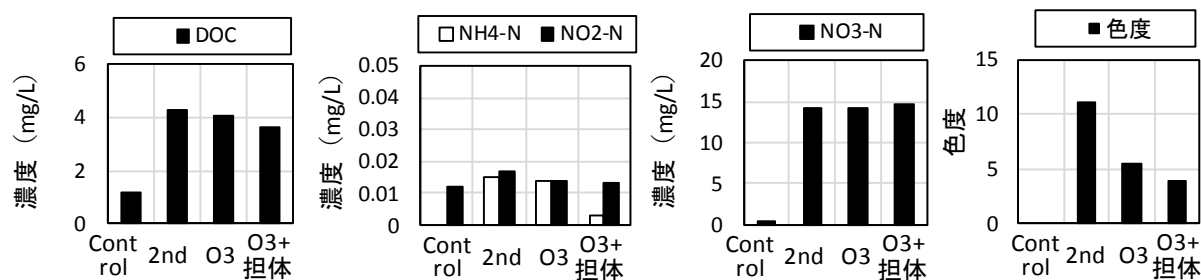


図-3 DOC、NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N 濃度と色度

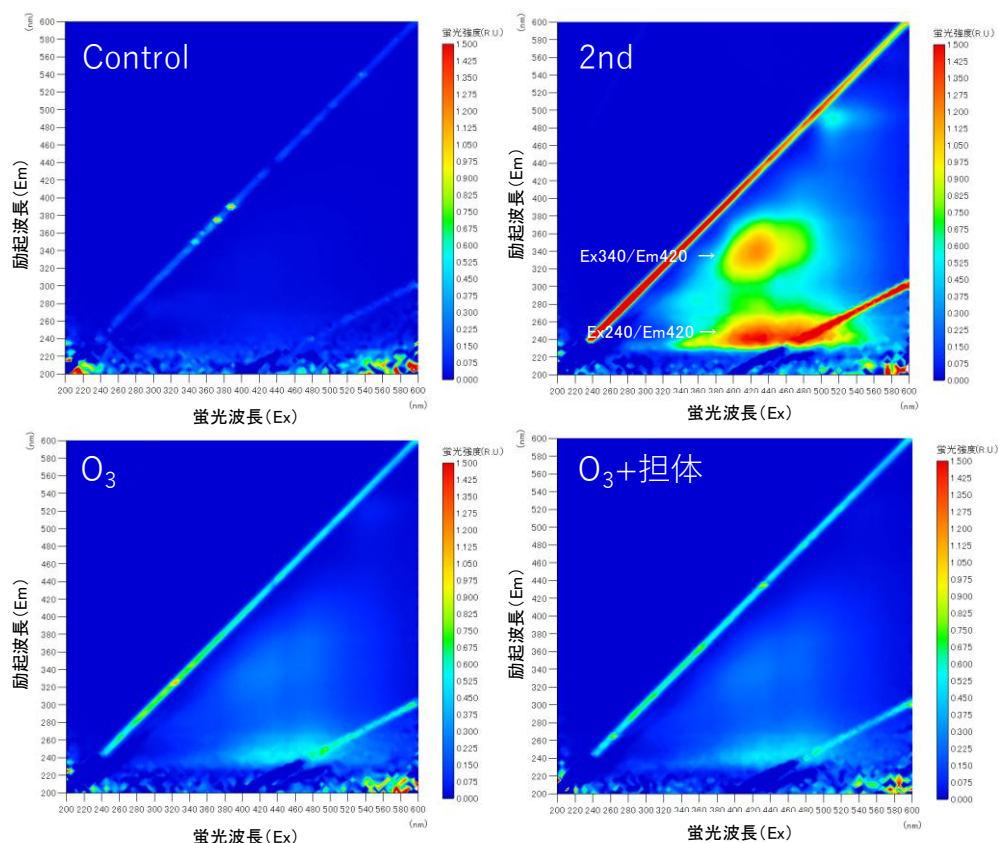


図-4 三次元蛍光分析の結果

水、オゾン+担体処理水で同等であった。色度は、オゾン処理水で低下し、担体処理水でもわずかに低下した。図-4は三次元蛍光スペクトルの結果である。二次処理水では、Ex 240 nm / Em 420 nm、Ex 340 nm / Em 420 nm 付近の蛍光強度が高いことがわかるが、オゾンとオゾン+担体処理水ではこれらの蛍光強度は大きく低下していた。

3.2 生物応答試験の結果

図-5 はふ化がほぼ完了した試験 4 日目のふ化率と、最終日の生存率の、各曝露区の平均値と標準偏差である。ふ化率と生存率の平均値は、Control 区はそれぞれ 95%、92%であり、いずれの曝露区でも 80%を超えていた。Dunnett の

多重比較法を用いて、対照区と各濃度区とのふ化率

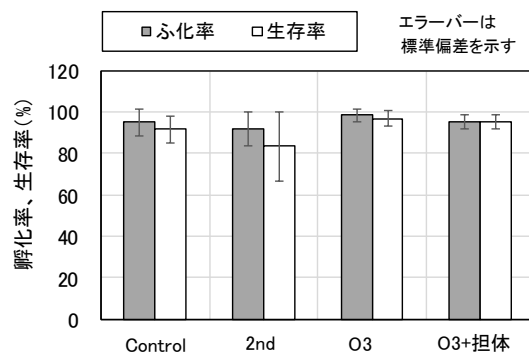


図-5 ふ化率、生残率の結果

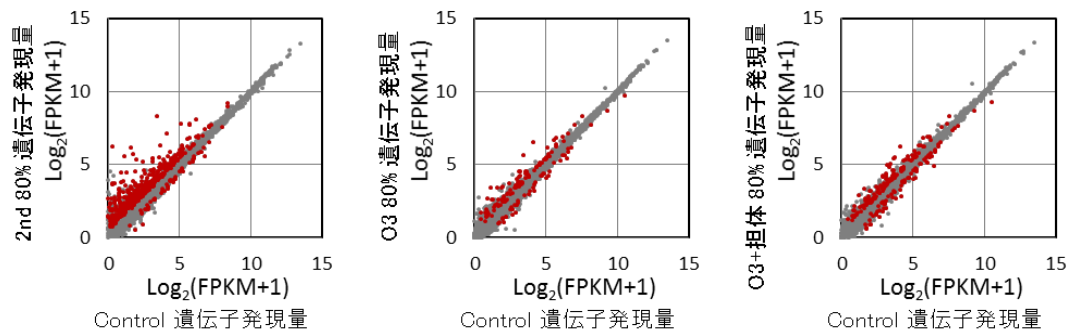


図-6 Control 区に対する二次、オゾン、オゾン+担体処理水曝露区の各遺伝子発現の散布図

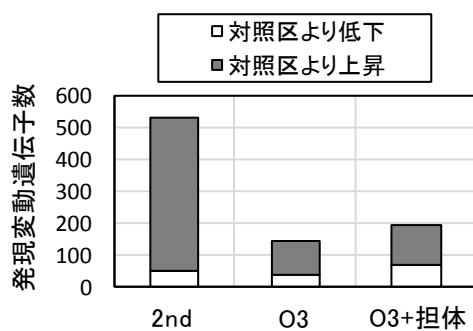


図-7 発現変動遺伝子数

の平均値の差を検定したところ、いずれの濃度区でも有意にならなかった（有意水準 5%）。生存率についても対照区と各濃度区で統計的に有意な差は認められなかった。

3.3 遺伝子発現解析の結果

(1) ゲノムマッピングによる遺伝子の検出と発現変動解析の結果

次世代シーケンサーにより、1 検体あたり約 1 千 6 百万本のリードペアが得られ、そのうち 95% が Tophat によってゼブラフィッシュゲノムにマッピングされた。Cufflinks の結果は、ゲノム上に 26,508 個の遺伝子領域が検出された。検出遺伝子とヒトの Refseq Protein 配列の同源性検索の結果、ヒトの Refseq が 20,635 本に、遺伝子機能（Gene Ontology, GO）が 16,563 本に付与された。

図-6 は、Control 区に対する二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水曝露区の遺伝子発現プロファイルを散布図で比較したものである。赤いプロットは CuffDiff で発現変動していると判定された遺伝子である。Control vs 2nd 80% 遺伝子発現量の図（左図）は、対角線上から外れる遺伝子が他の曝露条件より多いことがわかる。すなわち、多くの遺伝子に発現変動が生じていることがわかる。

図-7 は、Control 区に対する各曝露区の発現変動遺伝子数を上昇と低下に分けて示したものである。Control 区に対する発現変動遺伝子数は、二次処理水曝露区で 531 個と多く、そのうち 482 個は上昇した遺伝子であった。オゾン処理水とオゾン+担体処理水では、144 個（上昇:103、低下:41）、198 個（上昇:128：低下:70）と二次処理水曝露区より上昇する遺伝子数が減少していた。

(2) ヒトの機能情報を用いた機能解析結果

発現変動遺伝子の機能解析をヒトの機能情報を用いて実施した。図-8 は、Biological Process 関連の GO を、二次処理水曝露区で p 値（帰無仮説の下で起きる確率）が低かった上位 50 個まで示したものである。図より二次処理水曝露区では、免疫（neutrophil degranulation：好中球の脱顆粒（白血球の異常））、応答（inflammatory response：炎症反応）、代謝（proteolysis：蛋白質の分解）などへの影響が大きいことがわかる。オゾン処理、オゾン+担体処理水ではこれらの p 値の値は高くなっており、影響は顕著に低減していた。二次処理水曝露区では、他にも遺伝子レベルで様々な影響が見られたが、オゾン処理により概ね低減していることが図より判断できる。オゾン処理は二次処理水の魚類の遺伝子レベルでの影響を低減できることがわかった。

魚の遺伝子発現への影響と曝露水質との関係解明は困難であるものの、発現変動遺伝子数と三次元蛍光スペクトル強度の傾向が類似しており、三次元蛍光スペクトル強度が魚類の影響の指標になる可能性がある。水質分析項目と遺伝子発現の関係については、引き続き、解析を進めていく。

4. おわりに

下水処理水の高度処理による魚類の遺伝子発現への影響低減効果を明らかにするため、二次処理水を対象としたオゾン処理、オゾン+担体処理実験を行い、実験から得られた二次処理水、オゾ

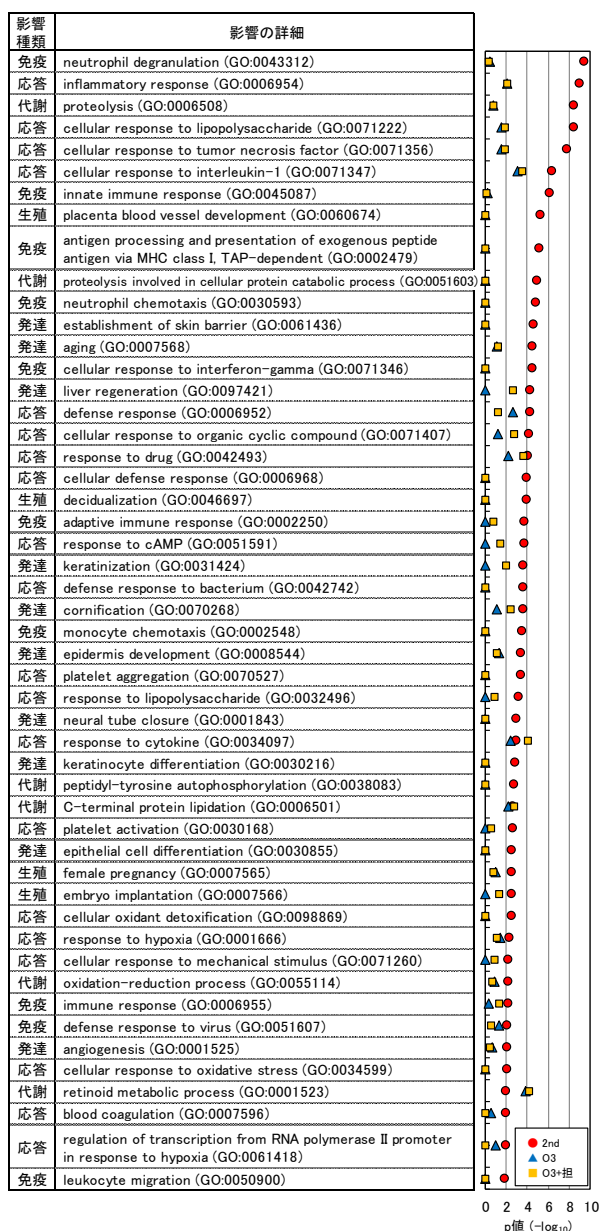


図-8 ヒト機能情報を用いた各曝露区の Fisher の正確確率検定の結果 (p 値が小さいほど偶然には起こりにくい。)

ン処理水、オゾン+担体処理水について胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を行った。続いて、生残仔魚の遺伝子発現を網羅解析し、オゾン処理またはオゾン+担体処理による遺伝子レベルでの影響低減効果を明らかにした。本研究で得られた知見を以下に示す。

- (1) ふ化、生残率を指標とした生物応答試験では、二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水への影響は見られなかった。
- (2) 遺伝子発現解析から、二次処理水に曝露さ

れた仔魚は約 530 個の遺伝子が発現変動を示した。

- (3) オゾン処理により発現変動遺伝子数は約 140 個まで低減することがわかった。
- (4) 発現変動遺伝子の機能解析の結果、二次処理水曝露は、免疫、応答、代謝などに影響を及ぼすことがわかった。
- (5) オゾン処理により、二次処理水で見られた免疫、応答、代謝などへの影響は、低減することがわかった。

下水放流先の魚類の保全のためには、下水処理水に曝露された仔魚の遺伝子発現レベルの「意味づけ」が必要となってくる。そこで、H31 年度は様々な河川水を用いた曝露試験を行い、河川水の遺伝子発現レベルと相対比較を行うことを予定している。

参考文献

- 1) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案）、2014
- 2) 生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会：生物応答試験を用いた排水評価とその活用の手引き（中間とりまとめ）、平成 31 年 3 月
- 3) OECD: GUIDANCE DOCUMENT ON DEVELOPING AND ASSESSING ADVERSE OUTCOME PATHWAYS, Series on Testing and assessment No. 184, ENV/JM/MONO(2013)6
- 4) セルイノベーション（国立遺伝学研究所データ解析拠点）<https://cell-innovation.nig.ac.jp/members/index.html>
最終利用日：2018/9/28
- 5) Refseq-Protein データベース, National Center for Biotechnology Information (NCBI), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
データベース利用日：2017/2/2
- 6) The UniProt Consortium; UniProt: the universal protein knowledgebase, Nucleic Acids Res. 45: D158-D169 (2017), <http://www.uniprot.org/>
データベース利用日：2017/2/7
- 7) Barrell D, Dimmer E, Huntley RP, Binns D, O'Donovan C, Apweiler R. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. Nucleic Acids Res. 2008 Oct 27. [Epub ahead of print] <http://www.ebi.ac.uk/GOA>
データベース利用日：2017/2/3