ＩＳＳＮ　　0386-5878
土木研究所資料　第4423号

土木研究所資料

令和2年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2020 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

令和4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

Copyright © (2022) by P.W.R.I.
All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、国立研究開発法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、国立研究開発法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

令和2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、令和2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	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）	3
2	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）	11
3	消化ガスの効率的運用に関する基礎的研究	（運営費交付金）	22
4	資源回収型下水処理技術に関する研究	（運営費交付金）	30

Ⅱ　水質チーム

5	下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発	（下水道応用研究）	39
6	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）	45
7	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）	（運営費交付金）	62
8	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（下水試料に適した大腸菌の定量法の提案）	（運営費交付金）	67
9	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（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および災害時に対応した水処理･塩素消毒の評価）	（運営費交付金）	72
10	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（簡易的な藻類定性定量方法の開発）	（運営費交付金）	77
11	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（機械学習手法を用いたダム貯水池におけるアオコ発生予測の検討）	（運営費交付金）	89
12	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）	94
13	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	（運営費交付金）	99
14	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）	115
15	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）	120
16	PRTR データを活用した化学物質の排出管理手法の構築 排出量への寄与が大きい業種における排出量推定手法の高度化	（環境研究総合推進費）	128

付録　令和２年度　下水道関係刊行報告書一覧　129

＊下水道応用研究とは、国土交通省からの受託によるものである。

＊環境研究総合推進費とは、（独）環境再生保全機構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

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、山﨑廉予

【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、汚泥分離液処理施設での流入水および処理水を利用した藻類培養技術の開発について調査した。汚泥分離液処理施設での流入水および処理水を利用した藻類培養について、自然光下に設置した 200 L の上部から光を受け入れるカラム型培養槽での適用可能性を調査した結果、流入水と処理水を 6 対 4 で混合し、培養藻類を培養槽の半分投入して培養開始することで、藻類の増殖が可能であることを示した。培養開始時の藻類が少ない場合は、間欠攪拌等によって、培養槽内への光量を増やしつつ攪拌を行うことで、藻類培養が可能であることを示した。藻類培養量の指標としているクロロフィル *a* の測定について、前処理を行わない簡易的な測定が可能であることを示した。上部からのみ光を取り入れられるカラム型培養槽を用いて、高栄養塩濃度で透過率が低い汚泥処理工程の水を基質とした藻類培養において、1,000 m^3 程度の藻類培養槽であれば、嫌気性消化槽を保有する処理場において、敷地面積の 5%以下で設置可能であり、そのうち約 6 割において、培養藻類の投入量は、現在の汚泥投入量の 5 %~10 %に相当し、下水処理場での藻類培養および嫌気性消化への適用可能性が高いと想定された。
キーワード：下水道資源、藻類培養、汚泥処理工程水、カラム型培養槽、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. 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 CO_2、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)]。

平成 30 年度[9)、10)]は、栄養塩や有機物量の多い初沈流出水、および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た上部開放レースウェイ培養槽による屋外での藻類培養の検討を行った。また、初沈流出水での藻類培養では、通年で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。その結果、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。また、沈殿藻類の VS/TS(volatile to total solids)、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(Suspended Solids)の低下が一定程度見込めることが示された。

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（撹拌機による撹拌を行う系列、および曝気による撹拌を行う系列）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結果、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 1 L あたりの平均余剰藻類生産速度は、それぞれ、14.4 mgSS/L・d、22.0 mgSS/L・d であった。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により、培養藻類のメタン発生ポテンシャル評価を行った結果、投入した培養藻類 VS あたりのメタンガス発生量は、撹拌機による撹拌を行う系列、および曝気による撹拌を行う系列の場合、それぞれ、882 NmL/g-VS、362 NmL/g-VS であり、藻類培養の撹拌方法により大きく異なることがわかった。高位発熱量は、藻類培養が可能な 3 月～11 月の期間を通じて、18.0～22.4 MJ/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。

令和元年度[11)、12)]は、下水道資源による藻類培養の高効率化を目的とし、初沈流出水に下水汚泥を混合した基質を用いた上部開放レースウェイ培養槽による屋外での藻類培養、消化汚泥の脱水分離液を希釈せずに基質として用いたカラム型培養槽での藻類培養、および汚泥分離液処理施設の流入水と処理水を混合した基質を用いて、上部からのみ光が取り入れられるタンク型培養槽を想定した、ビーカー試験による、藻類培養を行った。

屋外に設置した 380 L レースウェイ培養槽において、最初沈殿池流出水および余剰汚泥との混合液を用いて、微細藻類培養を行った結果、余剰汚泥を基質に添加すると、回収微細藻類量が増加することが示された。藻類培養において、最初沈殿池流出水や余剰汚泥を用いることで、沈殿池における沈降性が良好となり、排水中の SS および水質のレベルが低下することが示された。採取した微細藻類を用いたメタン発生ポテンシャル試験では、微細藻類に混合汚泥と同等以上の有機酸が含まれており、メタン発生量の増加に寄与する可能性が示された。汚泥処理工程で発生する排水を用いた微細藻類培養において、屋外に設置した温室内における自然光を用いた 30 L カラムにおいて、脱水ろ液を希釈せずに用いた藻類培養が可能であることが示された。また、ディスクセパレーターによる回収により約 96 %の藻類を回収することができた。高位発熱量は、22.1 MJ/kg-DS であり、未消化の下水汚泥の乾燥物よりも高い熱量であることが示された。汚泥分離液処理施設の流入水と処理水による微細藻類培養が可能か、実験室内においてビーカー試験による調査を行った結果、本研究の範囲では、処理水 40 %と流入水 60 %で混合して培養することで、最適な藻類培養が行えることが示された。回分式の嫌気性消化を行った結果、メタンガス発生量は、藻類を混合することで増加し、藻類が持つメタンガス発生ポテンシャルは、汚泥と同等であることが示唆された。消化後の汚泥の脱水試験では、ろ液の水質への藻類混合の影響はほぼないものと考えられた。

令和 2 年度は、藻類培養量の指標としているクロロフィル *a* の測定について、簡易的な測定方法の適用可能性を調査した。また、下水処理場の反応槽等を想定した、上部からのみ光を取り入れられるタンク型培養槽において、汚泥分離液処理施設の流入水と処理水の混合液を基質とした藻類培養において、昨年度、実験室レベルでの藻類培養が確認できたが、スケールアップ（200 L）および太陽光下での培養が可能か、評価を行った。タンク型培養槽を用いた培養藻類において、利用可能性のポテンシャルを調査した。さらに、下水処理場内における、カラム型培養槽での藻類培養における必要面積の試算および、培養藻類量の嫌気性消化

槽への投入量の試算を行い、本方法による藻類培養の実現可能性を調査した。

3. 下水処理場の反応槽の活用を想定した藻類培養の適用性評価

3. 1 実験方法

藻類培養には、200 Lの上部開放タンク型培養槽（直径600 mm×深さ1010 mm）(写真-1)を用いた。培養基質には、A市の処理センター内にある汚泥分離液処理施設の流入水および処理水を用いた。実験期間中の流入水、処理水のSS、水質（COD；Chemical Oxygen Demand、NH_4N；アンモニウム態窒素、T-P；全リン）の平均値を、表-1に示す。令和元年度に行った実験室レベルでの試験の結果を元に、流入水と処理水を6対4の割合で混合したものを、藻類の培養基質とした。事前培養した微細藻類を40 L（培養槽の1／5）混合した系、100 L（培養槽の1／2）混合した系を用意した。



写真-1　上部開放タンク型培養槽(200 L)

表-1　流入水と処理水の水質

	流入水	処理水
SS (mg/L)	1,500	9
COD (mg/L)	520	39
NH_4N (mg/L)	259	19
TP (mg/L)	88	34

微細藻類を100L混合した系では、微細藻類が沈降しない程度の強い攪拌強度で混合する系と、微細藻類の沈降をある程度許容する弱い攪拌強度で混合する系の2種類を用意した。微細藻類を40L混合した系では、強い攪拌強度で混合する1種類で培養を行った。それぞれの系において、基質および培養液中の藻類量を、クロロフィル*a*の測定により、定量した。クロロフィル*a*の測定は、三波長吸光光度法[13), 14)]および、本研究で検討した吸光度計を用いた簡易的な方法で行った。

クロロフィル*a*の定量は、通常吸光度法によって測定されるが、ろ過や、アセトン、ジメチルホルムアミド等による抽出、静置等の前処理に数時間の時間がかかる[14)]。藻類の懸濁液について、吸光度と藻体濃度の関係から、検量線を作成することで定量が可能であることが提案[15), 16)]されており、これを参考に、本研究で培養した藻類培養液について、簡易的な測定方法が適応可能か検証を行った。

3.2 クロロフィル*a*の簡易測定

純粋な藻類の懸濁液において、400 nm～900 nm前後の吸光波長の間で吸光スペクトルを測定すると、430 nm～470 nmおよび680 nm付近にクロロフィル*a*のピークが来ることが知られている[16)]。そのため、680 nm付近のピークから、藻類の細胞密度が測定可能であるとされている。

図-1に、本研究で用いた基質、本研究で培養された微細藻類培養液(1)、微細藻類培養液(2)の3種類において、吸光度波長400 nm～800 nmの間で5 nm間隔で測定した結果の一例を示す。基質では、波長が長くなるにつれ、吸光度の減少がみられた。微細藻類培養液(1)、(2)では、波長が長くなるにつれ、吸光度が減少するとともに、400～470 nm付近での吸光度の上昇と、685 nmのピークが見られた。本研究では、微細藻類培養液中には、微細藻類のほかに、懸濁物や細菌類など様々な物質が存在しており、吸光スペクトルにもこれら物質の吸光が混在した状態で現れている。そのため、藻類培養液の685 nm付近の吸光度と、既存の手法に則って前処理を行った吸光光度法[14)]による685 nm付近の吸光度に相関関係は見られない。そこで、藻類培養液における懸濁物等による吸光度（図-1基質の吸光スペクトルに相当する部分）を差し引くことによって、クロロフィル*a*由来の吸光を算出することとした。

懸濁物等による吸光度は、波長が長くなるにしたがって直線的に減少するものとし、吸光スペクトルの形から、微細藻類の吸光度に影響されないと判断した550 nmと740 nmの吸光度で一次直線を引くことで、その間の減少傾向をみるものとした。この直線の式を算出し、685 nm時の懸濁物等による吸光度を推定し、685 nmの吸光度から差し引いた分を、クロロフィル*a*由来の吸光とみなした。本研究で培養した、38種類の培養時期が異なる微細藻類培養液において、三波長吸光光度法によりクロロフィル*a*濃度を算出し、上記の方法により算出したクロロフィル*a*由来の吸光度と比較したところ、これらに相関関係がみられ、式(1)によ

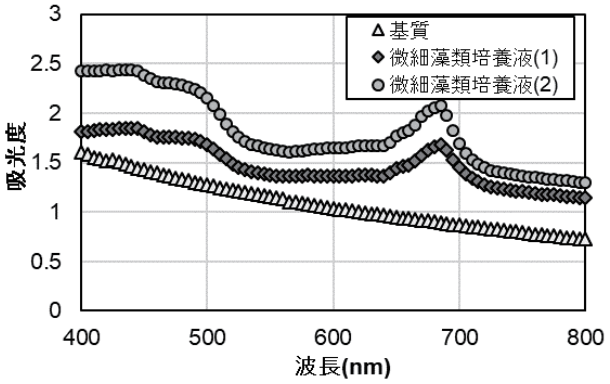


図-1　微細藻類培養液、基質における
吸光スペクトル(400 nm～800 nm)の一例

り表されることがわかった（R^2=0.90）。この式(1)を用いて、簡易的に算出する推定クロロフィル*a*を測定することとした。

推定クロロフィル*a*
= 23.6 × クロロフィル*a*由来の吸光＋0.27　(式1)

上記の38種類以外の微細藻類培養液において、簡易測定法と、三波長吸光光度法によりクロロフィル*a*を算出し、値の相関関係を調査した結果を図-2に示す。図-2より、2方法によるクロロフィル*a*には相関関係が見られ、値はほぼ同じであることが示された。よって、本方法により、懸濁物を含む微細藻類培養液において、クロロフィル*a*の簡易的な推定が可能であることが示された。

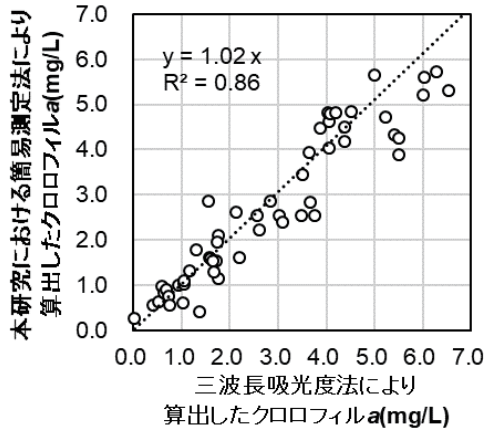


図-2　三波長吸光度法と簡易測定法により算出した
クロロフィル*a*の相関曲線

3.3 基質濃度と攪拌強度の違いによる藻類培養量の比較

図-3に、200 L培養槽での微細藻類培養における、クロロフィル*a*の経時変化を示す。図-3(a)は、微細藻類を100 L混合し、弱い攪拌強度で培養した系である。図-3(b)は、微細藻類を100L混合し、強い攪拌強度で培養した系である。図-3(c)は、微細藻類を40 L混合し、強い攪拌強度で培養した系である。培養開始後、(a)(b)では、クロロフィル*a*の増殖が見られたが、(c)では見られなかった。(a)(b)では、基質の光透過性が低いが、混合した微細藻類量が多かったため、光を吸収できる藻類が存在し、増殖できた一方で、(c)では、基質の透過性が低く、最初に混合した微細藻類の量が少ないため、光を吸収できる藻類が少なく、増殖できなかったと考えられる。そこで(c)では、途中から、10分攪拌、50分攪拌停止の間欠攪拌に切り替えた。間欠攪拌に切り替え後、クロロフィル*a*の増加が見られ、切り替え後、約1週間で、微細藻類を100 L混合した系と同程度のクロロフィル*a*量に達した。これは、攪拌停止中に、懸濁物が沈降し、槽内に届く光量が増加したからだと考えられる。

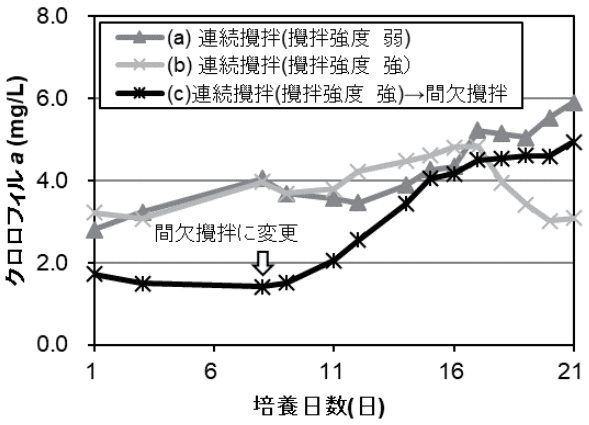


図-3　異なる基質濃度、攪拌強度による藻類培養液のクロロフィル*a*の経時変化((a)(b):微細藻類を100L混合した系、(c):微細藻類を40L混合した系)

図-4に、培養期間中の晴天時における、各培養槽の深さ方向の光の量を示す。藻類培養タンク内の光の量は、指数関数的に減少する傾向がみられた。これは、湖や沼地の水中の光量の減衰を表すランベルトベールの法則（式2）にあてはめ、表すことができた（図-4、点線）。

$A = B \cdot \exp(-kz)$ (式2)

A : 水深 z における水中光量

B : 水面直下の水中光量

k : 減衰係数

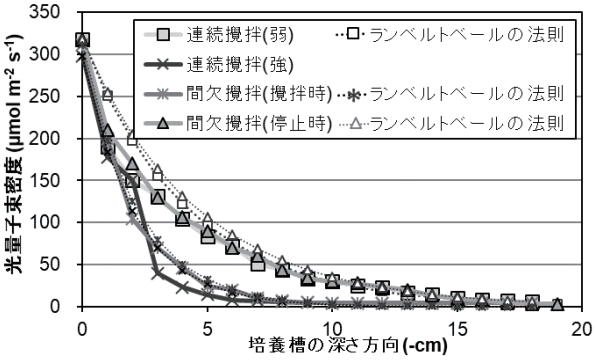


図 - 4　培養期間中の晴天時における、
各培養槽の深さ方向の光量子束密度

攪拌強度の強い系では、約 6 cm で光がほとんど届かなくなったが、攪拌強度の弱い系および、間欠攪拌（停止時）では、約20 cm まで光量がゼロにならなかった。光量が届く深さの違いは、微細藻類の培養量に影響を与えたことがわかる。

以上の結果より、光を上部からのみ取り入れられる反応槽等を活用したタンク型での微細藻類培養では、微細藻類の初期濃度を高い状態にするか、間欠的に攪拌することによって、微細藻類が光と接触する機会を増やすことができ、微細藻類の培養量を増やすことができることが示唆された。

3.4 下水処理場における藻類培養ポテンシャル

3. 4. 1 培養藻類のエネルギーポテンシャル

本研究において、上部からのみ光が取り入れられるタンク型培養槽を用いて、汚泥分離液処理施設の流入水と処理水の混合液を基質として培養した藻類について、JIS M 8814に従って、高位発熱量を測定した。攪拌弱、攪拌強、間欠攪拌による各培養系における培養藻類の高位発熱量は、それぞれ17,2、15,8、16,4 MJ / kg-DSであり、未消化汚泥と同様であった。しかし、光の透過量が大きい、カラム型培養槽を用いた、消化汚泥の脱水分離液を基質とした培養した藻類の高位発熱量での藻類培養では、18~22 MJ / kg-DSの高位発熱量であった[10)12)]ため、それよりは低い結果であった。今回の培養藻類のエネルギーは低いが、培養量や、培養にかかるコスト等では、カラム型培養槽よりも有利な可能性がある。今後、各培養槽における藻類培養について、各項目での比較検討を行う予定である。

次に、培養藻類のメタンガス発生ポテンシャルを評価した。培養藻類を、カチオン系の凝集剤0.75 %添加後、沈降させることで濃縮して回収し、A市の処理センターの消化槽への投入汚泥（濃縮汚泥）と混合して、回分式の嫌気性消化を行った。消化汚泥は、上記の消化槽のものを用いた。消化汚泥400 ml、濃縮汚泥を消化汚泥のVS（Volatile Solids；強熱減量物）（1.8 %）の10 %、培養藻類を濃縮汚泥のVS（3.6 %）の20%で混合し、全量を500 mlに調整し、36 ℃、15日間の嫌気性消化を行った。

藻類は、TS1.7~2.1%に濃縮でき、上澄み液のSSは、20 mg/L～90 mg/L程度であった。上澄み液は、汚泥分離液処理施設の流入水に返送されるか、下水処理場の流入水として、施設から送水されるかのいずれかで処理されることになるため、上記程度のSSであれば、上澄み液の処理についても問題ないと考えられる。

嫌気性消化を行った結果では、汚泥のみに対して、藻類を添加した系では、ガス発生量が3～4%増加し、今回の培養方法における培養藻類の添加によるメタンガス発生量の増加が確認できた。

3. 4. 2 下水処理場における藻類培養導入可能性の試算

A 市の処理センターの敷地内において、重力濃縮槽を活用して微細藻類を培養し、消化槽へ投入する場合を想定し、メタンガス発生量を試算した。重力濃縮槽は、容積 1,000 m^3（深さ 4 m）、4 基を活用すると想定した。培養藻類の TS（Total Solids；全蒸発残留物）は 2 %、回収量は 4 分の 3、濃縮藻類は TS3 %と仮定した。培養日数を 14 日とすると、1 日あたり約 14 m^3 の藻類を消化槽に投入できる試算となる。A 市の処理センターの消化槽への投入汚泥を、1 槽あたり約 200 m^3/日と仮定すると、投入藻類量は、投入汚泥量の 7 %と試算され、藻類培養によるガス発生量の増加は、数 %程度と想定される。

全国の嫌気性消化を行っている下水処理場において、培養藻類の投入可能性を調査した。図-5 に、平成 30 年度の下水道統計のデータ[17)]を用いて、全国の嫌気性消化槽における、消化槽容積と投入汚泥量の差から試算した、投入可能な容積の割合を示す。約半数の消化槽では、消化槽の容積いっぱいを活用して運転されている状態である。その他 41 基では、約 1 %程度、40 基程度では、5 %~20 %、投入可能な容積があるとの試算であった。約半数の消化槽においては、藻類を培養して投入することで、消化ガス発生量の増量が見込

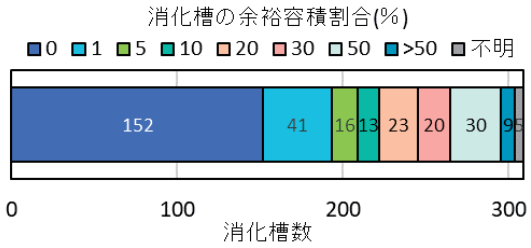


図-5　全国の嫌気性消化槽における、消化槽容積に対する投入可能容積の割合別の消化槽数

めることが想定された。

そこで、これらの処理場を対象として、タンク型培養槽を設置し、脱水分離液を基質とした微細藻類培養を行った場合を想定し、敷地面積、消化槽への投入藻類の増加割合について、適用可能性の試算を行った。1,000 m³、5,000 m³、10,000 m³の藻類培養槽を、それぞれ深さ 1 m、2 m、4 m の 3 ケースで設置、培養日数は、14 日と仮定し、敷地面積の 5 %以下で設置できる処理場数を算出した。また、それぞれの処理場での 1 日当たりの投入汚泥量に対する、培養藻類の投入量の割合を試算した。対象とした処理場は、データを取得可能であった 131 処理場とした。

これらの試算結果を図-6 に示す。容積 1,000 m³程度の培養槽（培養槽面積 250～1,000 m²）は、対象とした処理場では、大半の処理場において、5%以下の敷地面積で設置可能である試算結果であった。また、このとき、6 割以上の処理場において、投入できる藻類量は、投入汚泥の 5 %～10 %程度であった。この結果は、対象外とした嫌気性消化槽を保有する処理場においても、同様であった。また、培養槽の深さを深くすることで、容積 5,000 m³以上の培養槽が 5 %以下の敷地面積で設置可能な処理場数は増えるが、藻類の投入割合も半数近くが投入汚泥に対して 20 %以上と大きくなることが示された。一方、今後数十年で、人口減少に伴う投入汚泥量の減少が想定され、培養藻類投入が可能な処理場数や、可能な投入割合が増える可能性がある。藻類の投入割合が増えるほど、消化汚泥の細菌叢への影響が大きくなり、一時的に消化率が悪化する可能性があるため、この点は、今後の動向により調査が必要である。

安定的な培養のためには、培養槽の高さを 1m 程度にすることが望ましく、この場合、敷地面積 5 %以下で 5,000m³以上の培養槽を設置できる処理場数は、40 以下と限られるが、これらのほとんどでは、5 %~10 %の投入割合となり、現状では、実現可能性が高いと想

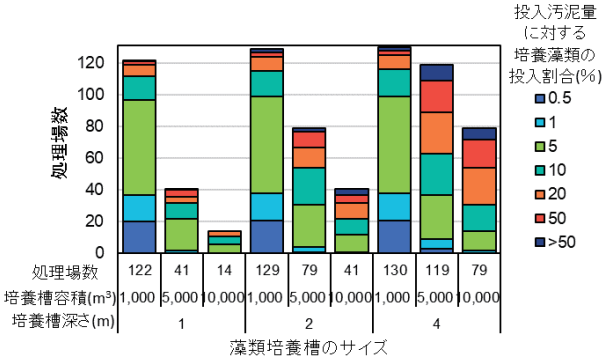


図-6　嫌気性消化槽を保有する下水処理場における、各面積のタンク型培養槽が敷地面積5%以下で設置可能な処理場数および各消化槽への投入汚泥量に対する培養藻類の投入割合

定される。

以上の結果より、タンク型の藻類培養槽を用いた藻類培養および嫌気性消化槽への投入によるバイオガス発生量の増量について、処理場の敷地面積面、投入割合ともに、現状の下水処理場の状況において、実現可能な処理場は一定数存在することが示された。

タンク型の藻類培養槽では、光の透過量が他の形状の培養槽よりも少なく、培養量は少ない傾向にあるが、培養槽の建設や運転では、他の形状の培養槽よりも安価であり、導入も容易であると考えられる。また、休止中の重力濃縮槽や反応槽がある下水処理場では、それを活用した藻類培養を行えば、初期投資はほぼなしで、培養を開始することが可能である。

一方、大都市等にあり、投入汚泥量が多い消化槽においては、培養藻類の投入量が 0.5%以下となるところもあり、その場合は、本研究で検討した培養方法による培養藻類の投入によるバイオガス発生量の増加は顕著には見られない。その場合は、カラム型培養槽内に光源を設置することや、光の透過量が多く、設置面積が少なくて済むカラム型を活用すること、タンク型よりも培養速度を上げられるレースウェイ型培養槽を活用することなど、藻類培養設備を充実させ培養量を増やすことで、培養藻類の消化槽への投入適用性が考えられる。

4. まとめ

令和 2 年度には、汚泥分離液処理施設での流入水および処理水を利用した藻類培養について、上部から光を受け入れるカラム型培養槽の適用性の調査、藻類培養の指標としているクロロフィル *a* の簡易測定の検証、培養藻類の下水処理場での利用可能性の試算を行った。

以下に、得られた成果を示す。

1. 藻類培養量の指標としているクロロフィル *a* の測定について、前処理を行わない簡易的な測定方法が適用可能か調査した。その結果、藻類培養液の 400 nm ~800 nm の吸光スペクトルを測定し、事前に作成した検量線を活用することで、簡易的にクロロフィル *a* が推測できることが示された。
2. 汚泥分離液処理施設での流入水および処理水を利用した藻類培養について、自然光下に設置した 200L の上部から光を受け入れるカラム型培養槽での適用可能性を調査した結果、流入水と処理水を 6 対 4 で混合し、培養藻類を培養槽の半分投入して培養開始することで、藻類の増殖が可能であることを示した。培養開始時の藻類が少ない場合は、間欠攪拌等によって、培養槽内への光量を増やしつつ攪拌を行うことで、藻類培養が可能であることを示した。
3. 上部からのみ光を取り入れられるカラム型培養槽を用いて、高栄養塩濃度で透過率が低い汚泥処理工程の水を基質とした藻類培養において、実下水処理場での適用可能性を調査した。1,000 m^3 程度の藻類培養槽であれば、嫌気性消化槽を保有する処理場において、敷地面積の 5 %以下で設置可能である試算であり、そのうち約 6 割において、消化槽への培養藻類の投入量は、現在の汚泥投入量の 5 %~10 %に相当し、下水処理場での藻類培養および嫌気性消化への適用の実現性が高いと想定された。

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～、p.3.17、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. Chinnasmy, 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. Woiciecohwski, C. Larroche, C.R. Soccol：Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. Applied Energy. Vol.88, No.10, pp.3291-3294, 2011
6) 鈴木秀幸、武田誠也、渡辺翔太、横山一樹、鈴木健吾、平岩良太、峰哲哉、梅田優一、佐野和裕、塚原純哉、宮内大樹、細川恒、岡健太郎、田鴈淳 ： 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、pp.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、山﨑廉予、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) 山﨑廉予、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) 国立研究開発法人土木研究所 ：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、平成 30 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.12-18、2020
11) Y. Yamasaki, H. Shigemura：Natural Microalgal Cultivation Systems Using Primary Effluent and Excess Sludge, Environmental Technology, pp.1-13, 2020.
12) 国立研究開発法人土木研究所 ：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、令和元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 4402 号、pp.10-25、2021
13) S.W. Jeffrey et al.: New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Vol.167, No.2, pp.191-194, 1975
14) 建設省河川局 ： 河川水質試験方法（案）［1997 年版］試験方法編、技報堂出版、pp.916-927、1997
15) 西澤一俊、千原光雄 ： 藻類研究法、共立出版、pp.278-280、 1979

16) 川崎琢真、清水洋平、多田匡秀 ： 吸光光度計を利用した餌料用微細藻培養密度の簡易推定法、水産技術、Vol.9、No.1、pp.27-31、2017

17) 日本下水道協会 ： 平成 30 年度版　下水道統計　第 75 号、2021

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

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（資源循環担当）
研究担当者：重村浩之、宮本豊尚、山﨑廉予、谷藤渓詩、大本拓

【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。剪定枝等の草木系バイオマスを下水汚泥焼却炉で補助燃料として活用する技術について、し渣搬送ラインを用いた供給手法について検討するため、実施設を想定した機器で破砕・搬送し、草木破砕物等の物性及び機器の運転状況を調査した。その結果、適切に破砕した草木破砕物の供給は実現可能性が高いことが確認された。実下水処理場のベルトプレス脱水機を用いて、刈草及び水草と、消化汚泥の混合脱水試験を行い、下水処理場外に搬出処分した場合における、汚泥処分費の試算を行った。その結果、通常の脱水時における薬注率では、バイオマス混合脱水において、脱水ケーキの含水率が 0.4～0.7 ポイント低減することが示され、薬注率を凝集が確認できる最低値まで下げた場合も、含水率の低減が確認できた。脱水後の湿ケーキ量は、バイオマス添加により減少することが示された。また、汚泥処分費は、バイオマスを混合しない場合と比較して８％～21％減少する可能性が示された。
キーワード：バイオマス、剪定枝、刈草、下水汚泥焼却補助燃料、汚泥脱水助剤

1.　はじめに

下水道整備の進展にともない、令和元年度末時点で下水道人口普及率は約 79.7 %、管路延長は約 48 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縮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汚泥焼却炉で活用する技術の検討

過年度 [4]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草木系バイオマスを、下水汚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)[5]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、実処理場において導入を考える場合、既存の施設を評価し、最大限活用することが重要である。令和元年度は、下水汚泥焼却炉における剪定枝等の補助燃料利用システムについて、実施設への導入手法や課題抽出を行うため、モデル都市・処理場におけるバイオマスの発生量や焼却炉での混焼上限値等について机上による検討を行い、混焼にあたってはバイオマスの焼却炉への供給能力が律速になることを明らかとした [6]。

令和２年度は、バイオマスの供給手法として令和元年度に想定した「し渣の混焼ライン」の利用について検討を行った。具体的には、①全国におけるし渣の混焼状況をアンケートにより把握するとともに、②バイオマス破砕時におけるし渣破砕機の挙動、破砕物の物性及びコンベアによる搬送特性について調査した。

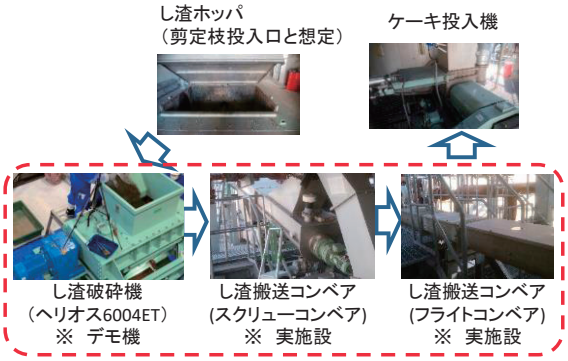


図-1 し渣混焼ラインの機器構成例と令和 2 年度検討範囲（赤枠内）

2. 1 方法

2. 1. 1 全国のし渣混焼状況調査

し渣は、下水道用語集（2000 年版)によると、「スクリーンかすと同義」とされ、「流入下水中のごみ、木片等の浮遊性のきょう雑物を、スクリーンで除去したもの」とされている[7),8)]。下水道施設計画・設計指針と解説（2019 年版)によると、「近年、廃棄物の最終処分場の確保が困難なことから、処理場内で発生するスクリーンかすや沈砂等を脱水汚泥と混合し、焼却するケースもある」とされ、混焼を想定する焼却炉の構造に関する留意点についても言及されている[9)]。

しかしながら、実際に混焼を実施している処理場数や混焼率については調べられていない。そこで今回想定しているし渣の混焼ラインからのバイオマス供給システムについて、適用可能な処理場を把握するため、全国の下水汚泥焼却炉を有している下水道事業者に対してアンケート調査を実施し、令和元年度のし渣の混焼状況を整理した。

2. 1. 2 実施設におけるバイオマス搬送特性の調査

実施設のし渣混焼ラインを想定したバイオマスの搬送特性の調査を行った。今年度検討したのは①バイオマス破砕時におけるし渣破砕機の挙動調査、②破砕物の物性調査、③コンベアによる破砕物の搬送特性調査である。

①バイオマス破砕時におけるし渣破砕機の挙動調査

実処理場で導入されているし渣破砕機（ヘリオス 6004ET）のデモ機（図-2）を用い、破砕の可否及び破砕時における電流値の変化について調査した。

この破砕機の能力は、最大処理量が 0.5t/h であり、カッターは刃巾 25mm、30 列である。動力は 7.5kW、三相 4 線式、200V、50Hz のインバーター制御である。

実験に供した試料は、X 処理場で発生するし渣（汚泥系統のスクリーンかす）及び草木混合物（あらかじめ 20mm 以下に破砕・調製したもの）である。

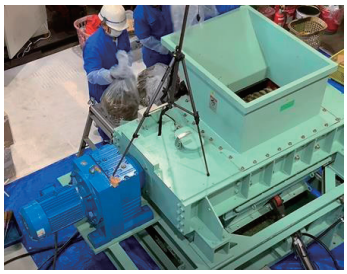


図-2 実験に供したし渣破砕機

②破砕物の物性調査

バイオマスをコンベアで搬送するにあたって、搬送路の閉塞やバイオマスの飛散が懸念される。

このうち閉塞については、コンベアの乗り継ぎ等で搬送物を落下させる際、搬送物が積み重なって「高い山」が形成されてしてしまうと次のコンベアに円滑に送ることができなくなる。そこで安息角を指標として、破砕物の物性を評価した。安息角の測定は、所定量の試料を、床から筒底の高さが 40cm の位置に設置した筒(直径 12cm、筒長 15cm)を通して、床に落下させ、その時にできた試料堆積物の山の写真を撮影し、画像解析ソフト(imageJ)で解析することにより測定した。安息角は左右の角度の平均値とした。この試験を 3 回繰り返し、それらの平均値を採用した。

また、し渣の搬送はフライトコンベア等の閉鎖空間で実施されるよう設計されているが、飛散しやすい搬送物を対象とすると、フライトのチェーンなどに付着し、搬送時の抵抗増加、異音及び異常発熱等の原因にもなりかねない。そこで飛散性について確認するため、Wills らが示した式[10)]を用いて評価した。Wills らが区分した「コンパクト」な物体の場合、飛散条件は式(Ⅰ)で表現される。

$$\frac{1}{2}\rho_a U^2 C_F > \rho_m l g I \quad \cdots (\mathrm{I})$$

ここで、lはコンパクトな物体の代表長さ、ρ_aは空気の密度、ρ_mは物体の密度、C_Fは空気力係数、Uは飛び出すときの風速、gは重力加速度である。Iは広い定義の摩擦係数で、置かれているだけの「ルーズ」な物体では$I \approx 1$とされる[11)]。物体の密度についてはかさ密度を採用し、風速をコンベアの搬送速度と同値と仮定し、速度に応じた舞い上がる可能性のある代表長さを求めた。密度については、安全側の観点から、湿潤条件におけるかさ密度を採用した。かさ密度の測定は以下により求めた。まず所定量のサンプルをバケツにとり、これを逆さまにしてペール缶(直径 28.5cm、高さ 38cm)に移した。その時のペール缶内に存在する試料

の高さを定規により最長部と最短部を測定し、その平均値から求めたかさ体積で所定量を除した。

③コンベアによる破砕物の搬送特性調査

X 処理場で実際に供用されているスクリューコンベア（定格搬送能力 300kg/h、定格出力 1.5kW、定格電圧 400V）及びフライトコンベア（定格搬送能力 300kg/h、定格出力 0.75kW、定格電圧 400V）を用い、搬送の可否及び搬送時における電力消費量の変化について調査した。実験に供した試料は、①で破砕したスクリーンかす及び草木破砕物であり、現在の運転条件である 100kg/h の搬送速度でバイオマスを供給した。

実験の評価は、実際の運搬の可否のほか、電流値の変動からみた抵抗の変化、及び搬送可能な草木破砕物のエネルギー量と使用電力量で行った。

2. 2 結果と考察

2. 2. 1 全国のし渣混焼状況

令和元年度に供用されている焼却炉は 120 処理場の 244 炉であった。このうちし渣を混焼しているのは 44 処理場と全体の約 1/3 の処理場であった。

44 カ所の処理場のうち、スクリーンかすのみを混焼しているのが 24 処理場であり、沈砂池のスクリーンかすのみを混焼しているのが 11 処理場、主に最初沈殿池と濃縮設備の中間（以下汚泥処理系統）に設置されたスクリーンかすのみを混焼している処理場が 4 処理場であった。また、し渣単独ではなく沈砂も同時に焼却している処理場は 20 処理場であった。なお、汚泥処理系統のスクリーンは、4-5mm 程度の目巾であり、沈砂池の細目スクリーンが概ね 20mm となっている。そのため、回収比率は処理場によって異なるものの概ね汚泥処理系統のスクリーンかすが沈砂池のスクリーンかすよりも多く回収される傾向にある。

表-2 スクリーンかすの発生比の例

	A処理場	B処理場	C処理場	D処理場	E処理場
沈砂池細目ｽｸﾘｰﾝ巾	20mm	20mm	25mm	25mm	25mm
初沈汚泥系統ｽｸﾘｰﾝ巾	4mm	8mm	4mm	5mm	5mm
回収比	6.2	16.2	1.6	1.4	15.8

※ 回収比は、初沈汚泥系統に設置されたスクリーンの回収量を沈砂池のスクリーン回収量で除した値

スクリーンかす及び沈砂の令和元年度の混焼量は全国で約 1 万 t/年となっていた（図-3 参照）。全国で見れば混焼量の約 8 割がスクリーンかす、約 2 割が沈砂となった。し渣等の汚泥に対する混焼率（湿潤重量ベース）は図-4 に示すヒストグラムとなった。中央値は 3.8%、平均値は 4.6%、最大値は 12.5%であった。下水道事業団の機械設備標準仕様書においては、し渣混焼は下水道施設から発生するし渣を対象とし、混焼率を通常 5 質量%以下（最大 10 質量%）とすることが示されており [12]、概ねこの仕様を踏襲している処理場が多いことが分かった。

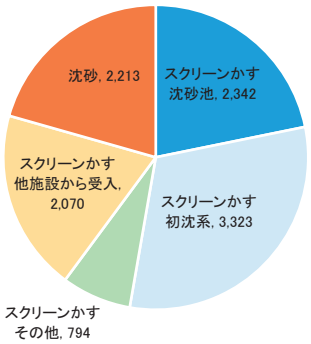


図-3 混焼物の割合（単位：t）

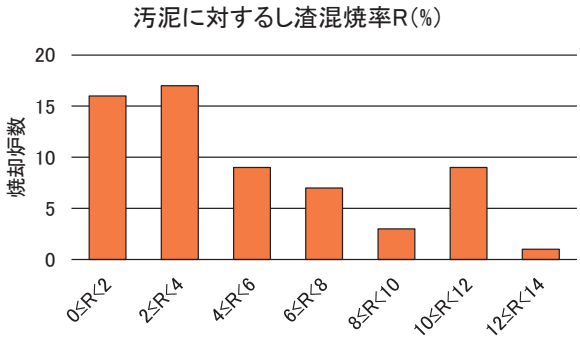


図-4 汚泥に対するし渣混焼率のヒストグラム

2. 2. 2 実施設におけるバイオマス搬送特性の調査

①バイオマス破砕時におけるし渣破砕機の挙動調査

し渣破砕機は、破砕物が存在しない無負荷状態であったとしても、刃を回転させるため等に一定の電流が必要であり、本装置では 13A であった。

元来の目的であるし渣（汚泥系スクリーンかす）の投入時は、電流はほとんど変化しなかった。し渣はトイレットペーパーや毛髪等の繊維分と油脂分から構成されており、これらは柔らかく、厚みがあるものではない。そのため破砕機の通過には負荷がかからなったと考えられる。

一方草木破砕物の投入時は、電流値は増加し、最大で 21A まで上昇した。草木破砕物の中に含まれている剪定枝等の木質は硬さや厚みがあるため、破砕機の通過に際してより大きな力でつぶしあるいは切断が必要となる。しかし今回使用した破砕機の定格電流値（29.3A）に対して最大でも約 70%の負荷となり、今回の条件では草木破砕物をし渣破砕機に投入することは問題とならないことが示唆された。

②破砕物の物性調査

（1）安息角の評価

①のし渣破砕機通過後の、し渣及び草木破砕物の安息角の測定状況を図-5(a),(b)に示す。いずれもほぼ同等（40～45°）であり、シュート部における閉塞の可能性は低いことが確認できた。

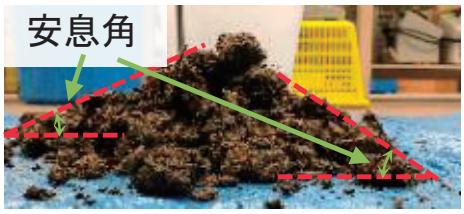


図-5（a）破砕機通過後し渣の安息角



図-5（b）破砕機通過後草木破砕物の安息角

（2）飛散性の評価

し渣と草木破砕物のかさ密度は湿潤状態で0.68g/cm³、0.18g/cm³であった。この値をもとに、飛散に必要な風速を（Ⅰ）式より求めた。破砕物の長さは破砕後の20mm以下の範囲で、粒径の条件を変化させた計算結果を表-3に示す。概ね草木破砕物はし渣の半分の風速で飛散することがわかる。一方、し渣搬送におけるバケットコンベアの搬送速度は5m/min(=0.083m/s)以下とする[13]とされており、1μm程度以上の大きさであれば、コンベアの搬送に伴う飛散について発生しにくいと考えられる。

表-3 飛散に必要な風速

代表長さL（mm）		0.001	0.01	0.1	1	10	20
風速U（m/s）	し渣	0.10	0.3	1.0	3.2	10.2	14.4
	草木破砕物	0.05	0.2	0.5	1.7	5.2	7.4

次に、コンベアの乗り継ぎやシュート部における粉塵発生について検討するため、ストークス数と粒径の関係を調べた。ストークス数とは、粒子の流れに対する追従性を示す指標であり、大気中での落下現象は（Ⅱ）式で表現される[14]。

$$S = \frac{\rho_p d^2 \mathrm{u}}{\mu L} \cdots (\mathrm{II})$$

ここで、Sはストークス数、ρ_pは物体の密度、dは粒径、uは代表速度、μは空気の粘度（20℃として1.82×10^{-5}Pa・s）[15]、Lは代表長さである。代表長さについてはコンベアの乗り継ぎ高さを想定して1mと仮定し、代表速度を粒子の最大速度である終末沈降速度とするとuは（Ⅲ）式で表現できる[14]。

$$u = \sqrt{\frac{4}{3}\frac{(\rho_p - \rho_a)g}{\rho_a}\frac{d}{C_D}} \cdots (\mathrm{III})$$

ここで、ρ_aは空気の密度、gは重力加速度、C_Dは抗力係数である。抗力係数はレイノルズ数Reを用いると（Ⅳ）式で示される[14]。

$$C_D = \begin{cases} \frac{24}{Re} : Re < 2 \\ \frac{10}{\sqrt{Re}} : 2 < Re < 500 \\ 0.44 : Re > 500 \end{cases} \cdots (\mathrm{IV})$$

ただしRe $= \frac{\rho_a d u}{\mu}$

粒径に対するストークス数の計算結果を図-6に示す。ストークス数が1より十分大きければ粒子は流体（ここでは空気）の動きに関係なく運動する[14]。ストークス数が十分に大きい場合(ここではS>10と仮定)、その粒子はし渣・草木破砕物ともに1mm程度以上のオーダーとなる。逆に言えば、1mm程度以下のオーダーの粒子については、空気の動きなどの影響を受けた飛散が発生する可能性があり、留意する必要がある。

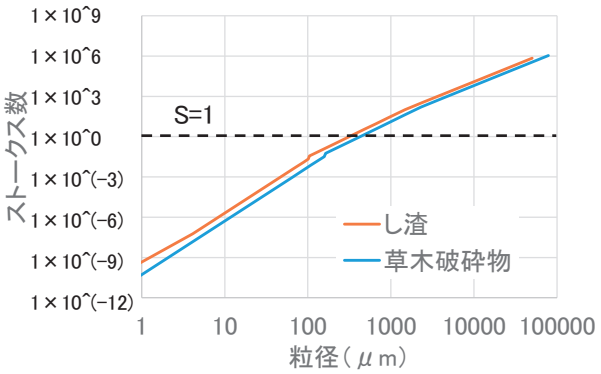


図-6 粒径とストークス数

③コンベアによる破砕物の搬送特性調査

X処理場で供用されているスクリューコンベア及びフライトコンベアは、し渣及び草木破砕物の閉塞や付着が生じることなく搬送することができた。消費電力については、無負荷状態も含めていずれも実験期間中一定の値（スクリューコンベアは3.7A、フライトコンベアは2.15A）を示しており、付着等による抵抗の増

大は発生せず、消費電力は増加しなかった。

また、かさ密度より単位時間当たりの搬送可能体積について評価した。本研究では、し渣と比べて草木破砕物は単位時間当たりの搬送可能質量は小さくなることが明らかとなった。すなわち、し渣のかさ密度（0.68g/cm^3）に比べて草木破砕物（0.18g/cm^3）は小さく、し渣の設計搬送能力である 300kg/h(し渣として 441.2L/h)と同等の体積を搬送するとすれば、草木破砕物の搬送量は約 79kg/h にとどまる。なお、本実験においてはこの能力以上の草木破砕物の搬送を行ったが、特に問題は生じなかった。

また低位発熱量を求めたところ、し渣は 1.7MJ/kg、草木破砕物は 8.7MJ/kg であった。し渣の設計最大搬送能力 300kg/h では、し渣が供給できる低位発熱量は 5.1×10^{2}MJ/h、体積が制限となる場合には草木破砕物が供給できる低位発熱量は 6.9×10^{2}MJ/h となり、草木破砕物のほうがより大きな熱量を供給できることが分かった。なお X 処理場でのし渣搬送系に要する機器の総容量は約 40kW（=1.4×10^{2}MJ/h）であるので、機器の運転に必要なエネルギーよりも供給するエネルギーのほうが大きくなっており、し渣及び草木破砕物のコンベア搬送による焼却炉での燃焼は合理的であるといえる。

2. 3 結論

本稿では、バイオマスの供給手法として想定した「し渣の混焼ライン」の利用について、全国におけるし渣の混焼状況をアンケートにより把握し、バイオマス破砕時におけるし渣破砕機の挙動、破砕物の物性及びコンベアによる搬送特性について調査した。得られた結論は、以下の通りである。

A) 全国の焼却を実施している 120 処理場のうち、し渣を混焼しているのは 44 処理場であった。混焼しているし渣は処理場によって異なっており、し渣の混焼率は、中央値で 3.8%、平均値で 4.6%、最大値は 12.5%であった。

B) バイオマス破砕時におけるし渣破砕機の挙動を調査した。バイオマス破砕時は消費電力が増加したものの、今回の条件では最大でも定格の約 70%の負荷となり、草木破砕物をし渣破砕機に投入することは問題とならないことが示唆された。

C) し渣破砕機通過後の破砕物の物性については、し渣と草木破砕物の安息角はほぼ同等（40～45°）であり、シュート部における閉塞の可能性は低い。また、1μm 程度以上の大きさであればコンベアの搬送に伴う飛散は発生しにくいと考えられる。コンベアでの乗り継ぎでは、1mm 程度以下のオーダーの粒子について飛散が発生する可能性があり、留意する必要がある。

D) X 処理場に設置されているスクリューコンベア及びフライトコンベアを用いて搬送試験を行ったところ、草木破砕物はいずれも問題なく搬送でき、追加の電力は発生しなかった。

E) かさ密度から単位時間当たりの搬送可能体積について評価すると、し渣と比べて草木破砕物は単位時間当たりの搬送可能質量は小さくなった。供給できる熱量は、草木破砕物のほうがし渣より大きくなった。

F) A）～E）の結果から、あらかじめ適切に破砕した草木破砕物であれば、実処理場におけるし渣破砕機～搬送用コンベアを用いたバイオマス供給は実現可能性が高いと考えられる。

3. 草木系バイオマス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等の草木系バイオマスを下水道事業で受け入れ、下水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、凝集剤添加量や汚泥処分費用の削減が可能となり、草木系バイオマスのリサイクルシステムの確立が可能となる。

平成 28 年度の研究において、10 mm 程度に裁断したイネ科の刈草を、様々な性状の汚泥（標準活性汚泥法の最初沈殿池重力濃縮汚泥と余剰汚泥機械濃縮汚泥の混合汚泥、消化汚泥、オキシデーションディッチ法の濃縮汚泥）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 [4)16)]。

平成 29 年度には、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砕処理後に下水処理場へ受け渡す方が削減できる可能性を示した。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 [17)]。

平成 30 年度の研究においては、従来検討していたイネ科の刈草以外のバイオマス種類（水草であるオニ

ビシ、スズメノヒエ、クロマツの剪定枝、竹粉）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砕後のサイズが大きく、植物の 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（固形物濃度）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[18)19)]。また、クロマツの剪定枝、竹粉では、模擬ベルトプレス脱水試験を行った。その結果、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。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[19)]。

令和元年度の研究においては、1 m³／h 程度処理が可能なパイロットスケールの圧入式スクリュープレス脱水機を用いて、イネ科の刈草、クロマツの剪定枝、竹粉と、消化汚泥の混合脱水試験を行った。また、本技術導入による経済的な有意性を明らかにすることを目的とし、下水処理場外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。その結果、10、30、50 %のバイオマス添加率において、最適薬注率では、バイオマス混合脱水において、脱水ケーキの含水率が 1.5～14 ポイント低減することが示された。また、バイオマス添加率が高いほど、脱水効果が高い傾向を示した。薬注率を凝集する最低濃度まで下げると、バイオマス添加による脱水ケーキの含水率低減効果は見られなかった。脱水後の湿ケーキ量は、バイオマス添加により減少することが示された。これは、バイオマス添加による脱水ケーキの含水率の低減効果が影響していることが示唆された。脱水時における汚泥から分離された排水の水質について、全リン、アンモニア性窒素、全 CODcr ともに、バイオマスを混合することで、減少する傾向を示した。バイオマスを下水処理場で破砕し、バイオマス混合脱水を行った後、処理場外の焼却場で焼却処分を行う場合、松および草を 10 %程度混合して脱水を行うと、脱水ケーキの処分費がバイオマスを混合しない場合と比較して 2～6 %減少することが示された[6)20)]。

本研究では、これまでの成果に基づき、実下水処理場（A 下水処理場）のベルトプレス脱水機において、数種の草木系バイオマス（イネ科の刈草、水草であるナガエツルノゲイトウ）と消化汚泥の混合脱水の実証試験を行った。水草は、湖沼での刈り取り後、乾燥および破砕の前処理が必要であるため、下水処理場内での前処理について敷地面積の点での可能性を試算した。また、本技術導入による経済的な有意性を明らかにすることを目的とし、下水処理場外で脱水ケーキを処分した場合における、汚泥処分費の試算を行った。

3. 1　実下水処理場のベルトプレス脱水機による草木系バイオマス混合脱水試験

3. 1. 1　実証試験概要

バイオマス混合脱水試験は、A 下水処理場で冬季に実施した。本処理場は、1 日あたりの流入水量が約 15,000 m³ の中規模処理場であり、汚泥処理工程には消化設備を有しており、1 日あたり約 100 m³ の消化汚泥（汚泥濃度 1.6～1.8 %程度）を、ベルトプレス脱水機により脱水している。

本試験で用いたバイオマスの性状を表-4 に示す。刈草①および刈草②は土木研究所内で採取し、刈り取りの当日または翌日に破砕処理を行った。水草は、A 下水処理場と同じ市内にある B 湖において管理業者が刈り取ったものを使用し、屋根付きの風通しがよい倉庫で、約 17 日間乾燥後、破砕処理を行った。バイオマスは、樹木破砕機(GS131GH、10 mm スクリーン、大橋製[21)])で 10 ㎜程度に破砕後、5 mm のふるいにかけ、破砕しきれなかった分を取り除いた。脱水試験は 3 日間で、表-5 に示す 13 ケースを実施した。薬注率は、通常、本処理場で使用している薬注率である 1.1 %および、試験直前にビーカー試験により検討した凝集する最低薬注率である 0.96 %の 2 種類で検討した。使用

表 - 4　実験に用いた草木系バイオマスの性状

表記	刈草①		刈草②		水草	
種類	イネ科の刈草（主にススキ）		イネ科の刈草（主にクマザサ）		ナガエツルノゲイトウ	
	破砕前	破砕後	破砕前	破砕後	破砕前	破砕後
写真						
含水率 (%)	13. 1	8. 1	30. 0	10. 6	87. 0	19. 2

した凝集剤は、カチオン系の高分子凝集剤である。

バイオマスの投入は、凝集混和槽の上部から行い、各混合割合となるよう、1 分間に一定量の投入を 30 分間程度行った。投入開始から約 50 分～1 時間後に脱水ケーキを採取し、TS、VS（有機物濃度）を測定し、含水率、バイオマス混合割合を算出した。

表-5　脱水試験の実験ケース(13 系列)

実験日	サンプル名	薬注率(%)	バイオマス種類	混合割合*(%)
1日目	系列1	1.1	なし	
	系列2	1.1	水草	10.0
	系列3	1.1	刈草②	10.0
	系列4	1.1	なし	
2日目	系列5	0.96	なし	
	系列6	0.96	刈草①	10.0
	系列7	0.96	刈草②	10.0
	系列8	0.96	水草	10.0
	系列9	0.96	なし	
3日目	系列10	1.1	なし	
	系列11	1.1	刈草①	10.0
	系列12	1.1	刈草①	20.0
	系列13	1.1	なし	

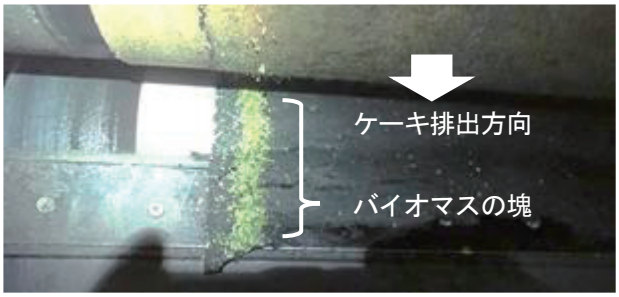
*汚泥の固形物量に対するバイオマスの固形物量

3. 1. 2　バイオマス混合脱水試験

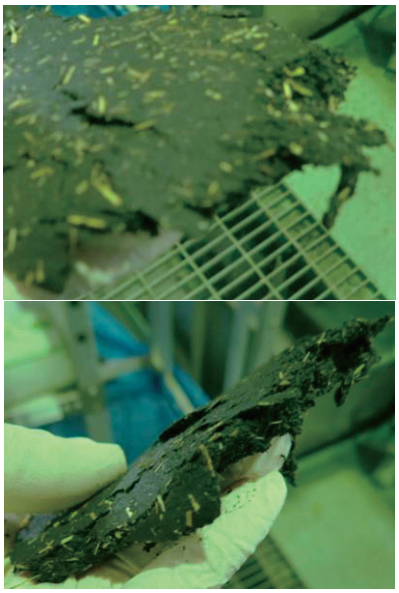
①　バイオマスの混合

凝集混和槽におけるバイオマスの投入において、目視での確認ではあるが、攪拌機の回転数が 68.5 rpm（周速度 3.7 m/s）以上で、バイオマスが汚泥中に混合された。バイオマスを完全に混合するためには、回転数を上げる必要があり、薬注率 1.1 %では 1.1 倍、0.96 %では 1.3 倍、バイオマスを混合しない通常時よりも上げる必要があった。

凝集混和槽において混合されたバイオマス混合汚泥が、ベルトプレス脱水機のろ布に乗るまでの過程を観察した。実験で使用したベルトプレス脱水機では、投入トラフが脱水機入口の中央に設置してあり、凝集剤と混和した汚泥は、両端に向かって広がりながらろ布に均一に乗り、脱水される仕組みであった。そのため、汚泥中に混合しきれていないバイオマスは、ろ布の両端に流れ、脱水ケーキの両端 5cm 位に塊になる傾向がみられた。両端以外の部分においては、バイオマスは汚泥中に均一に混合されていた（図-7）。バイオマス混合の偏りによるサイドリーク等の脱水機への不具合はみられなかった。また、薬注率を下げた系列では、バイオマスがろ布の端によってしまう現象に、解消傾向がみられた。これは、汚泥の凝集が弱くなったことで、バイオマスが汚泥中に混合しやすくなったためだと考えられる。



(a) 排出部のろ布サイドの脱水ケーキの様子
（バイオマスが端にたまっている）



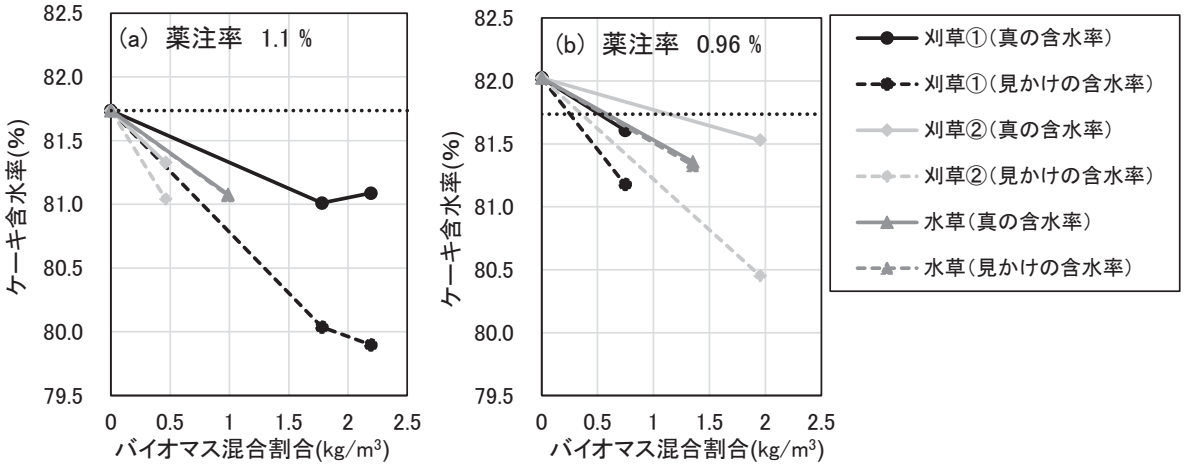
(b) 脱水ケーキ中にバイオマスが混合されている様子

図-7　脱水ケーキの様子

②ケーキ含水率

各試験ケースにおける、バイオマス込みの見かけの脱水ケーキ含水率およびバイオマス量を差し引いた真の脱水ケーキ含水率の結果を図-8 に示す。横軸は、汚泥 1m³ に対するバイオマスの湿潤混合量を示している。見かけのケーキ含水率は、バイオマス混合により、0.7~1.8 ポイント低減した。真の含水率では、0.4～0.7 ポイント低減した。また、薬注率を下げても、バイオマスを混合することにより、薬注率が通常時のケーキ含水率（図-8(a) 0 kg/m³ 時のケーキ含水率 81.7%）よりも下がることが示された（図-8(a)、(b)の点線以下）。バイオマス混合による、凝集剤使用量の削減が可能であることが示された。

バイオマスは、汚泥の固形物量に対して 10 %、20 %で混合したため、約 2 kg/m³、4 kg/m³ の混合割合となるはずであったが、**3.1.2** ①で示した通り、ろ布の位置によって、バイオマス混合に偏りがみられたため、ケー



(a) 薬注率　1.1 %　　(b) 薬注率　0.96 %

図-8　脱水ケーキの含水率

(真の含水率：バイオマス量を差し引いた計算値、見かけの含水率：バイオマス込みの含水率)

キを採取したろ布中央部分ではバイオマスの混合割合が低くなる傾向であった。

③ケーキ発生量

ケーキ発生量は、各実験系列で測定することは困難なため、バイオマス混合脱水の実証実験を行った脱水機と通常の脱水を行った脱水機において、1 日当たりのケーキ発生量をホッパー重量から比較した。結果を表-6 に示す。バイオマス混合脱水を実施した場合、単位時間当たりのケーキ発生量が削減できる結果であった。また、薬注率を下げた 2 日目においても、ケーキ発生量は同様に削減できた。ろ布速度、上下のろ布圧力、ケーキ厚みは、脱水方法による差はみられなかった。なお、試験期間中の各日において、バイオマス投入の総時間は、脱水機稼働時間の約 3 分の 1 であった。今回は、ホッパー重量での算出であったため、ケーキ発生量の削減分は概算量であるが、バイオマス混合脱水により、少なくとも発生量の削減は可能であることが示された。

3. 2　実施設におけるバイオマス前処理の可能性検討

水草は、刈取り時の含水率が 87 %と高く、本研究で使用した破砕機で処理するためには、可能な限り乾燥させることが望ましい。水草の乾燥は、水草の飛散を防ぐため、屋内の風通しのよい環境で、30 cm 程度の塀で囲ったスペースにおいて自然乾燥で行った。乾燥時間を短縮させるため、水草を薄く並べた平干しと、乾燥スペースを削減するため、水草を 30 cm 程度に積重ねた方法で、乾燥にかかる日数を検証した。乾燥期間中の平均気温は 7.2 ℃(最低-5.2 ℃、最高 14.7 ℃)、平均湿度は 58 %であった。

表-6　各実験日におけるケーキ発生量

項目	単位時間あたりのケーキ発生量	
脱水方法	バイオマス混合脱水	通常脱水
単位	t/h	t/h
1日目	0.74	0.85
2日目	0.74	0.85
3日目	0.76	0.85

各乾燥条件における含水率の変化を図-9 に示す。平干しでは、7 日以上の乾燥で含水率が 20 %を下回り、破砕機での破砕が可能となった。積重ねた場合、上部は平干しと比較して乾燥が遅いものの、10 日以上の乾燥で約 20 %の含水率となった。積重ねた場合、下部では乾燥が進まなかったため、3 日後に上下を反転させたところ（図-9 ）、含水率の低下が確認できたため、乾燥途中での切り返しが必要であることがわかった。積重ねた場合では、切り返しを行うことで、17 日以上の乾燥で含水率が 30%になった。試算の結果、本研究で実施した乾燥方法において、水草の乾燥に必要な敷地面積は、平干しで約 136 m²/t、積重ねで約 44 m²/t であった。

全国の中規模処理場（水処理量 10,000～50,000 ㎥/日）のうち、消化汚泥を脱水している処理場において、バイオマスを汚泥の固形物比に対して 10%混合して脱水すると仮定した場合、1 日に必要な水草の湿潤量は約 2.9 t、刈草は約 0.5 t であった。平干し、積重ねのそれぞれにおいて、水草乾燥に必要な敷地面積は、各中規模処理場の敷地面積（平均約 67,000 m²）に対して、平均で 8 %、4 %であった。実証実験を実施した

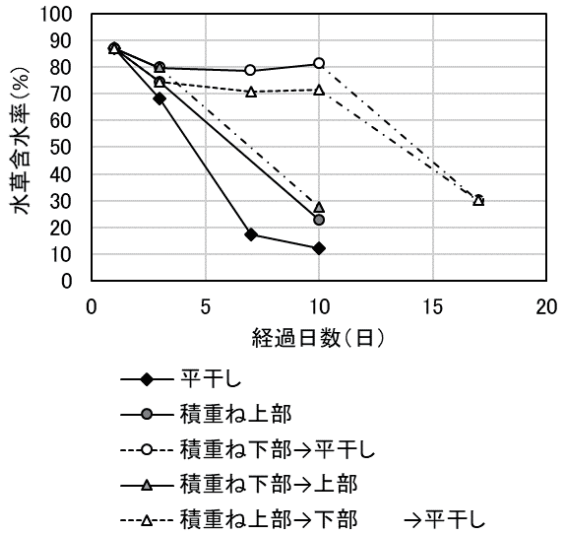


図-9　水草乾燥時の含水率の変化

A 下水処理場においては、それぞれ 2 %、1 %であった。本研究では、日光が直接当たらない場所での乾燥であったため、天日乾燥が可能な施設とすれば、さらに乾燥にかかる日数、スペースは削減できると想定される。一方、刈草においては、冬季の場合はもともとの含水率が低く、刈取り直後に破砕可能であり、乾燥スペースは不要で、ストック、作業スペースのみで、水草よりも必要な敷地は少なくなる。本試算では、乾燥に必要なスペースのみを試算したが、作業、乾燥したバイオマスのストックスペースを考慮しても、バイオマス前処理スペースは、下水処理場において十分に確保できるものと想定される。また、夏季においては、刈草の含水率や湿度、気温等の乾燥環境が変わるため、再度検討が必要である。

3. 3　バイオマス混合脱水導入におけるコスト評価

表-7 に、バイオマス混合脱水による費用対効果の結果を示す。**3. 2** で示したバイオマス必要量の試算と同じ条件において、試算した。ケーキ発生量は 11 t/日、ケーキ処分費は 16,000 円/t-脱水ケーキ [17]、凝集剤費用を 820 円/kg[17]と設定し、バイオマス受入れ費用を 10,000 円/t-バイオマス、発生量の削減を **3.1.2**③で概算量として算出された削減量の約半分の 6 %と仮定した。バイオマス混合脱水により、通常脱水と比較して、年間で約 5,400 千円～15,400 千円の便益が見込める結果であった。また、バイオマス受入れ時の収入がない場合においても、年間約 3,800 千円～4,800 千円の便益が見込める。本試算で想定したケースでは、バイオマス混合脱水において、バイオマス受け入れ費用、発生ケーキの処分費用による試算の結果、通常脱水と比較して、8 %～21 % 、費用が削減できる可能性が示された。本試算には、バイオマスの破砕機、投入機、保管施設等の初期費用が含まれていないが、これらを考慮しても、数年以内に便益が見込めることが想定された。

3. 4　結論

本研究では、バイオマスとしての活用が求められている刈草、水草（ナガエツルノゲイトウ）において、下水汚泥の脱水助剤としての有用性を、実下水処理場のベルトプレス脱水機による実証実験で検証した。実験は、冬季に行った。水草は、面積的に、下水処理場の敷地内での前処理が可能か、試算を行った。また、本技術導入による経済的な有意性を明らかにすることを目的とし、下水処理場外で脱水ケーキを処分した場

表-7　バイオマス混合脱水による費用対効果

試算項目		脱水方法	通常脱水	バイオマス混合脱水		
				刈草①	刈草②	水草
バイオマス必要量		t/日	-	0.43	0.54	2.90
バイオマス受け入れによる収入	(a)	千円/年	-	1,579	1,962	10,565
凝集剤費用(薬注率通常)	(b)	千円/年	7,602	7,602	7,602	7,602
ケーキ処分費	(c)	千円/年	64,240	60,386	60,386	60,386
-(a)+(b)+(c)		千円/年	71,842 (100)	66,409 (92)	66,026 (92)	57,423 (80)
凝集剤費用(バイオマス混合時薬注率13%削減)	(c)'	千円/年	7,602	6,635	6,635	6,635
-(a)+(b)+(c)'		千円/年	71,842 (100)	65,442 (91)	65,058 (91)	56,455 (79)

合における、汚泥処分費の試算を行った。得られた結果は以下の通りである。

A) 凝集混和槽におけるバイオマスの投入では、バイオマスを完全に混合するために、薬注率 1.1 %では 1.1 倍、0.96 %では 1.3 倍、バイオマスを混合しない通常時よりも、回転数を上げる必要があった。

B) ベルトプレス脱水機において、バイオマスは、ろ布の中央部分では、均一に汚泥中に混合されるが、ろ布の両サイドに一部流れ、塊ができる傾向であった。薬注率を下げることで、ろ布の両サイドでの塊は解消される傾向がみられた。

C) 10 mm 程度に破砕したバイオマスを、添加率 10、20 %で消化汚泥に混合した場合、通常の薬注率（1.1 %）では、バイオマス混合脱水において、脱水ケーキの含水率が 0.4～0.7 ポイント低減することが示された。また、薬注率を凝集が確認できる最低値に下げても（0.96 %）、バイオマスを混合することにより、薬注率が通常時のケーキ含水率よりも下がることが示された。

D) 各実験日における 1 日当たりのケーキ発生量をホッパー重量から試算したところ、バイオマス混合脱水を実施した場合、単位時間当たりのケーキ発生量が削減できることが示された。

E) 水草乾燥において、平干し、積重ねのそれぞれに必要な敷地面積は、中規模処理場の敷地面積に対して、平均で 8 %、4 %であった。実証実験を実施した A 下水処理場においては、それぞれ 2 %、1 %であった。作業、乾燥したバイオマスのストックスペースを考慮しても、バイオマス前処理スペースは、下水処理場において十分に確保できるものと想定された。

F) バイオマス混合脱水において、バイオマス受け入れ費用、発生ケーキの処分費用による試算の結果、通常脱水と比較して、8 %～21 %、費用が削減できる可能性が示された。バイオマスの破砕機、投入機、保管施設等の初期費用を考慮しても、数年以内に便益が見込めることが想定された。

以上の結果より、草木系バイオマスと汚泥の混合脱水は、脱水ケーキの含水率の低減、湿ケーキ量の減少、費用の削減において利点がある可能性が、実下水処理場の脱水機を用いた実証実験により示された。また、試算の結果、受け入れバイオマスは、下水処理場内の敷地面積で前処理可能であることが示された。

参考文献

1) 国土交通省　下水道：https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/index.html（参照：2021.4.13）
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) 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
5) 中田友三：下水汚泥焼却炉の閉塞危険性評価方法及び閉塞防止方法、東京都下水道局技術調査年報 2016、Vol..40、pp.135-148、2016
6) 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、令和元年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4402 号、pp.26-35、 2021
7) 日本下水道協会：下水道用語集　2000 年版、pp.167、2000
8) 日本下水道協会：下水道用語集　2000 年版、pp.210-211、2000
9) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説　後編　2019 年版、pp.571-572、2019
10) Wills, J., Wyatt, T. and Lee, B.E.：Warnings of high winds in densely populated areas, 54p., 1998
11) 西村宏明、谷口徹郎、丸山敬：飛散物の軌跡の解析と建材の耐衝撃試験、日本建築総合試験所機関紙 GBRC、135 号、Vol.34、No.1、pp.14-24、2009
12) 地方共同法人日本下水道事業団：機械設備標準仕様書　平成 31 年度、pp.13-1、2019
13) 地方共同法人日本下水道事業団：機械設備標準仕様書、平成 31 年度、pp.13-23 - 13-24、2019
14) 粉体工学会：粉体層の操作とシミュレーション、pp.74-81、2009
15) 国立天文台：理科年表、平成 30 年度、p.396、2017
16) 山﨑廉予、重村浩之：刈草を下水汚泥の脱水助剤として活用するための基礎的研究、第 54 回下水道研究発表会講演集、pp.1012-1014、2017
17) 山﨑廉予、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
18) 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 30 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.19-34、2020
19) 山﨑廉予，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 回下水道研究発表会講演集、pp.1166-1168、2019
20) 山﨑廉予、重村浩之:草木系バイオマスの活用による下水汚泥の脱水性向上とその効果、下水道協会誌、54、698、pp.98-107、2020
21) 大橋 HP：http://www.ohashi-inc.com/pdf/GS130GH&GS130GHB_171226.pdf（参照 2020.6.1）

消化ガスの効率的運用に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金
研究期間：令 2～令 4
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：重村浩之、宮本豊尚、
谷藤渓詩、大本拓

【要旨】消化ガスのさらなる有効利用を目的に、消化ガス発生量及び需要量の季節変動を解明するため、全国の消化槽を有する処理場を対象にアンケートを実施した。全国のガス発生量やガス処分量は、ガス発生規模と季節変動による影響が確認されたが、ガス発生と処分の季節変動は一致しなかった。嫌気性消化を評価する上で重要となる下水汚泥中の脂質について、簡便かつ環境負荷を低減した分析手法として酢酸エチル/エタノール抽出の適用性を検討し、従来法と同等の定量値であることを確認した。汚泥の組成分析結果から消化ガス発生量の推定が可能であり、消化の高効率化には脂質の与える影響が重要であることが分かった。回分式メタン発酵試験の結果から、炭水化物が脂質やタンパク質の生物的な分解を促進し、メタン生成に相乗的な効果があることが示された。
キーワード：消化ガス、アンケート、脂質分析、酢酸エチル/エタノール抽出、回分式メタン発酵

1. はじめに

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、省エネルギー化や創エネルギー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と考えられる[1)]。下水汚泥の嫌気性消化の工程で発生する消化ガスは、カーボンニュートラルなエネルギー資源であり、利用促進により温室効果ガス排出削減が期待されている。我が国では、消化ガスは古くから消化槽の加温に使用されているが、昭和 50 年代から消化ガスを用いた発電システムの検討が本格化した[2)]。近年では、発電機の小型化・低廉化だけでなく、再生可能エネルギーの導入促進政策である固定価格買取制度が導入されたこと等により、消化ガス発電設備を有する処理場が増加している。

平成 24 年以降の全国でのガス発生量は、概ね増加傾向にある[3)]（図-1）。発電利用されているガス量は毎年順調に増加しており、平成 30 年度には平成 24 年度の約 2 倍に達している。しかし、熱エネルギー利用や発電として利用されず、単純に焼却処分されるガス処分量も増加しており、この有効利用が望まれる。本研究は、消化ガスのさらなる有効利用を目的に、下水汚泥等からの消化ガス発生量及び需要量の季節変動を解明するとともに、利用可能な地域バイオマスの実態把握、消化ガス回収の最大化手法の提案を行うものである。

R2 年度は全国の消化槽を有する処理場を対象にアンケートを実施し、消化ガス発生量及び需要量の季節変動を把握するとともに、下水汚泥中の有機物の構成成分（炭水化物・蛋白質・脂質）の分析方法及びこれらの消化特性について調査を行った。

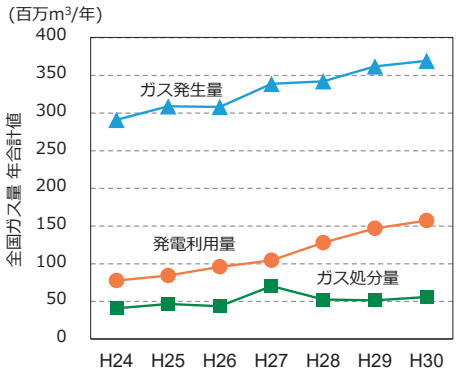


図-1　全国ガス量の変遷

2.全国の消化ガス発生量及び需要量の季節変動

2.1　研究内容

消化ガス発生量は季節により変動する[4)]とされ、これが有効利用されない要因の一つと考えられる。また、ガス発生規模にも影響を受けることが想定される。本研究では、消化ガスの発生・利用・処分状況について、季節及びガス発生規模等の影響を調査し、さらなるガス有効利用促進のための基礎的知見を得ることを目的とした。

嫌気性消化に関する全国の現状を把握するため、令和元年度時点で消化を行っている全処理場を対象にアンケートを実施し、全 276 処理場から回答が得られた。調査項目は、令和元年度（2019 年 4 月～2020 年 3 月）における

月別投入汚泥量、月別投入 TS(固形物)・VS(有機物)、月別ガス発生量、コージェネレーションシステムの導入有無、月別ガス利用量(ガス発電、消化槽加温、焼却炉補助燃料、焼却処分、その他)、月別ガス発電量、ガス発電機の発電容量などである。

2.2 研究結果

2.2.1 月別の消化槽投入汚泥と消化ガスの発生・処分状況(全国の総和)

全国における投入汚泥量・VS 量、ガス発生量・処分量・処分率(ガス処分量÷ガス発生量×100)の季節変動を把握するため、各処理場における月別日平均値(月合計値を各月の日数で除した値)の総和を算出した。図-2 に投入汚泥量・VS 量の月別日平均値の総和を示す。投入汚泥量は 12ヶ月分のデータが全て揃っている処理場(203 処理場)、VS 量は投入汚泥量で対象とした処理場(203 処理場)を対象とし、VS が未測定の月は、年度平均値を代用した。また、図-3 にガス発生量・処分量の月別日平均値の総和及びガス処分率を示す。ガス発生量・処分量・処分率は、12ヶ月分のデータが全て揃っている処理場(266 処理場)を対象とした。

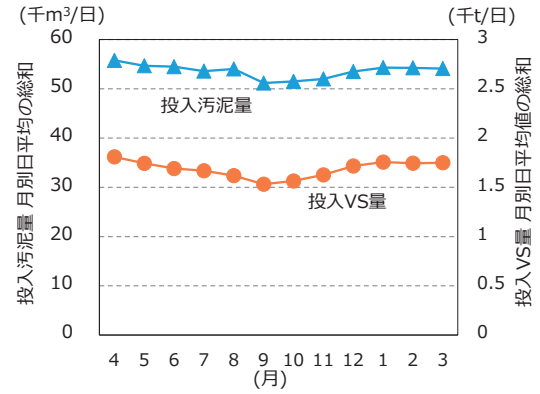


図-2 投入汚泥量・VS 量

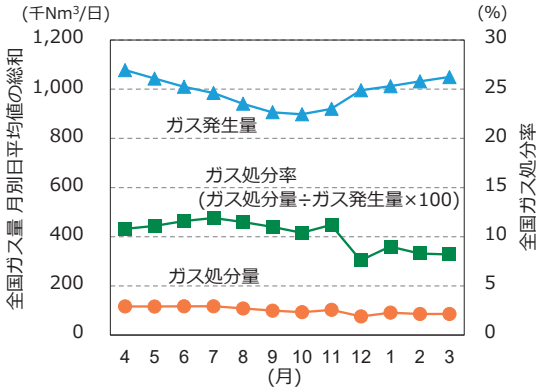


図-3 ガス発生量・処分量・処分率

投入汚泥量と投入 VS 量は、いずれも 4 月に最大値、9 月に最小値となった。投入汚泥量は年度平均値に対し約+4～−6%の変動が、投入 VS 量は、年度平均値に対し約+6～−12%の変動があった。ガス発生量は、4 月に最大値約 1100 千 Nm³/日、10 月に最小値約 900 千 Nm3/日、年度平均値約 990 千 Nm³/日を示し、年度平均値に対し約+11～−9%の変動があった。ガス処分量は、7 月に最大値約 120 千 Nm³/日、12 月に最小値約 76 千 Nm³/日、年度平均値約 101 千 Nm³/日を示し、約+19～−25%の変動となった。ガス処分量はガス発生量の変動割合よりも大きく、12 月から 3 月にかけて少なくなる傾向があり、ガス発生量とガス処分量の最大・最小月は異なる。ガス処分率は、7 月に最大値 11.9%、12 月に最小値 7.6%、年度平均値 10.2%を示した。

2.2.2 季節・規模別におけるガス発生・利用・処分状況

処理場の規模別の現状を把握するため、ガス発生規模により、処理場を 3 つの属性(0～100、100～1000 及び 1000 千 Nm3/年以上)に分類した。また、ガス発生量及び処分量の夏季と冬季における差異を把握するため以下の条件に従い夏季に発生または処分が多いもの(夏季)、冬季に多いもの(冬季)及び通年で変わらないものに分類した。

①「夏季」:夏季月平均値÷年度平均値≧1.05 かつ 冬季月平均値÷年度平均値≦1.00

②「冬季」:冬季月平均値÷年度平均値≧1.05 かつ 夏季月平均値÷年度平均値≦1.00

③「通年」:上記①②に該当しない場合

なお、処分量については、ガスが発生しているが処分していない処理場や、設備点検等に伴い臨時処分していると想定される処理場は、④「処分無し・臨時処分」とした。また本研究では、発生量及び処分量について①～③に分類したグループ名の後に、「発生」及び「処分」をつけて表記する(「夏季発生」など)。また、全国の平均的な消化日数(約 40 日)の遅れも考慮し、夏季を 7～10 月、冬季を 1～4 月と設定した。夏季月平均値は 7～10 月の月平均値、冬季月平均値は 1～4 月の月平均値、年度平均値は令和元年度 12 ヶ月分の月平均値を示す。

ガス発生規模別のガス発生状況を図-4 に示す。全国合計では、約 52%の処理場が「通年発生」に該当し、次いで、「冬季発生」が約 38%、「夏季発生」が約 10%となっている。規模によらず「夏季発生」に比べ「冬季発生」が多いが、規模が大きくなるに従い、「夏季発生」は減少し、「冬季発生」は概ね一定で、「通年発生」の割合が多くなる傾向がみられる。これは、処理場の規模が大きくなるほ

ど、変動を受けにくく、ガス発生量が安定しやすいことが一因であると考えられる。

ガス発生規模別のガス処分状況を図-5 に示す。ガス発生規模が 0～100 千 Nm³/年では約 70%の処理場、100～1000 千及び 1000 千 Nm³/年以上では約 50%の処理場が「処分無し・臨時処分」に該当している。処分を実施している処理場（「夏季処分」、「冬季処分」及び「通年処分」）

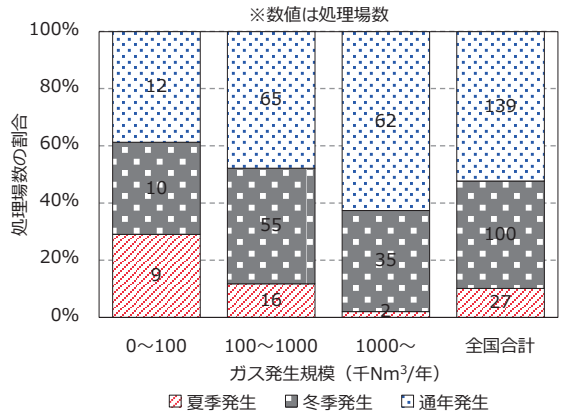


図-4　ガス発生状況

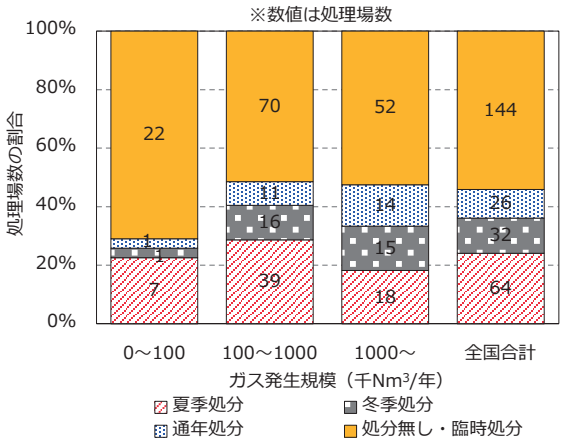


図-5　ガス処分状況

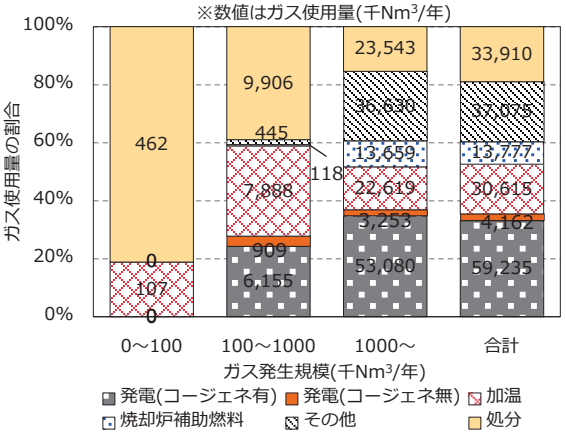


図-6　ガス利用状況
（処分を実施している処理場）

は、ガス発生規模によらず「冬季処分」に比べ「夏季処分」が多かった。しかし、規模が大きくなるに従い「冬季処分」が増加している傾向が見られた。ガス発生は規模によらず「夏季発生」に比べ「冬季発生」が多く、ガス処分は「冬季処分」に比べ「夏季処分」が多いため、ガス発生とガス処分の季節変動は一致しなかった。

図-6 に処分を実施している処理場における用途別のガス利用状況を示す。0～100 千 Nm³/年の処理場の有効利用用途は、加温のみであり、ガス発生量の約 8 割が処分されていた。ガス発生規模が大きくなるに従って有効利用の割合が増加し、処分される割合が減少している。これは小規模の処理場では、加温以外の有効利用に必要なガス量が得られないケースや、有効利用の費用対効果が得られないケースなどが考えられる。

2.2.3 ガス発電とガスの処分状況

ガスが有効利用されれば、処分量は減少すると想定される。そこで主な有効利用方法であるガス発電と処分量との関係を調査した。図-7 にガス発電の実施有無とガス処分率を示す。約半数の処理場は発電の実施有無に関わらず処分率が 0%となり、発電無しでも、発電以外の有効利用が図られている。一方で、ガス処分を実施している場合で、発電している処理場は発電無しに比べて処分率が低く、発電機の導入により、処分されるガス量の削減とガス有効利用の促進が期待される。

図-8 にガス発電を実施している処理場における、季節別の発電機の設備利用率（{年度発電量(kWh)÷366(日)÷24(hr/日)}÷発電容量(kW)）を示す。処分を実施している処理場（「夏季処分」、「冬季処分」及び「通年処分」）は、「処分無し・臨時処分」と比較し、設備利用率が高い傾向にあった。これは、発電機の利用率が高い処理場は、ガス発生量に対し発電機の能力が不足することがあり、余剰となったガスが多く処分されていることが想定される。

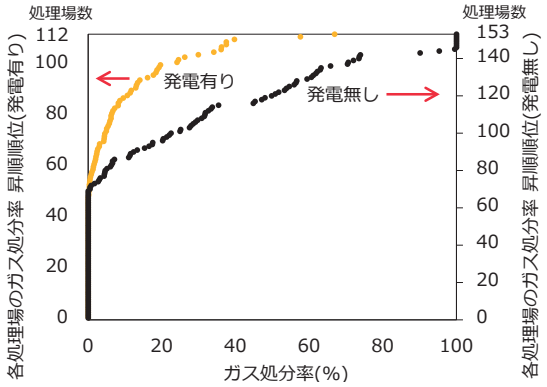


図-7　発電の実施有無とガス処分率

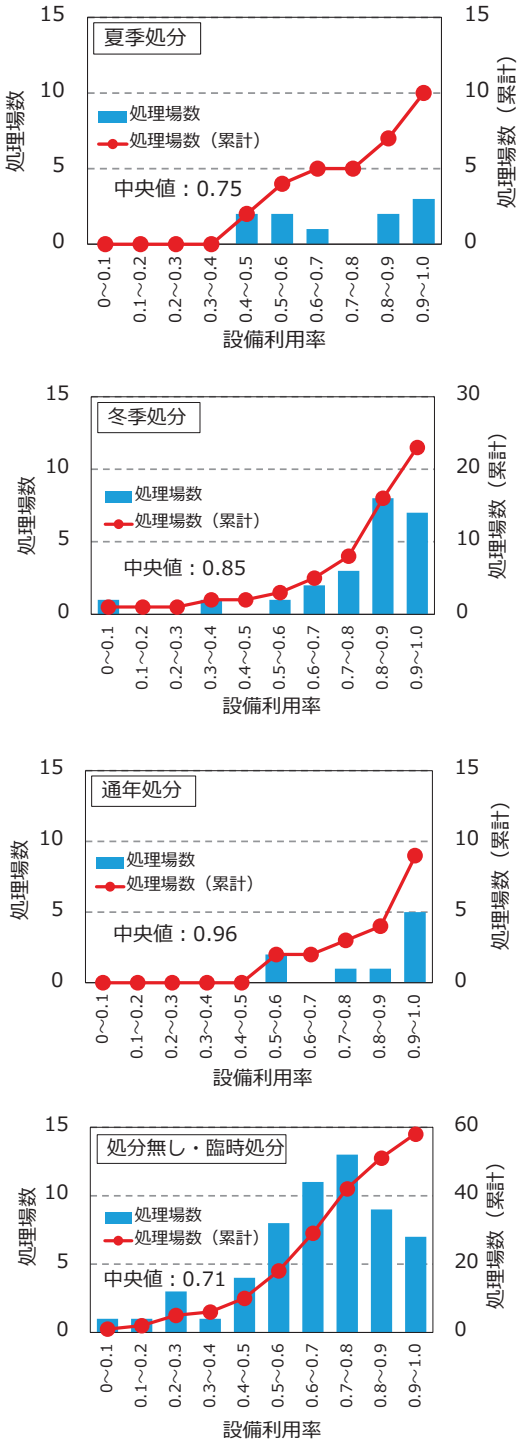


図-8　季節別 発電機の設備利用率の分布

2.3 まとめ

本研究結果から以下の結果を得た。

1) 全国のガス発生状況について、約 52%の処理場が「通年発生」に該当し、次いで、「冬季発生」が約 38%、「夏季発生」が約 10%となった。その割合はガス発生規模が大きくなるに従って「夏季発生」が減少、「通年発生」が増加、「冬季発生」は概ね一定となる傾向がみられた。

2) ガス処分状況について、ガス発生規模が 0～100 千 Nm^3/年では約 70%の処理場、100～1000 千及び 1000 千 Nm^3/年以上では約 50%の処理場が「処分無し・臨時処分」に該当した。処分を実施している処理場は、ガス発生規模によらず「冬季処分」に比べ「夏季処分」が多かったが、ガス発生規模が大きくなるに従い「冬季処分」の増加傾向がみられた。

3) ガス発生規模が 0～100 千 Nm^3/年の小規模な処理場では、主に加温にのみ有効利用されており、ガス処分をしている割合が高い。100～1000 千及び 1000 千 Nm^3/年以上の処理場では、ガスは発電等に利用されていた。

4) 処分を実施している場合において、ガス発電を行っている処理場は、発電無しの処理場に比べて処分率が低い傾向にあった。「処分無し・臨時処分」の処理場と比較し、処分を実施している処理場は発電機の設備利用率が高い傾向にあった。

3.下水汚泥の構成成分とそのメタン発酵特性

3.1　研究内容

下水中の有機物の主要な成分として、脂質、炭水化物及びタンパク質がある[5]。脂質は生物体や食品に含まれるものの中で、水に溶けず、有機溶媒(クロロホルム、ジエチルエーテル、n-ヘキサンなど)に溶けるもののことである[6]。脂質は炭水化物及びタンパク質に比べて嫌気性消化におけるガス発生倍率が高く[7]、消化ガスを利用した発電等のエネルギー利用においては重要な成分である。一方で、下水処理設備で発生するスカムには、油脂類を主成分とし、その周りに比較的小さな浮遊物が付着して成長した形態があり[8]、脂質はスカム発生にも影響を与えるため、脂質含有量を簡便な手法で把握することが望ましい。

下水道分野では、n-ヘキサンを用いた抽出が一般的に行われる。汚泥を塩酸酸性とし、硫酸マグネシウムで脱水した後、4 時間のソックスレー抽出により汚泥のヘキサン抽出物質を定量することが下水試験方法[9]に記載されている。ソックスレー抽出器を用いたヘキサン抽出法では多量の溶媒が必要となり、操作も煩雑である。また、簡便な脂質分析法として、クロロホルム/メタノール(1：2 v/v)で抽出を行う方法(Bligh-Dyer 法)[10]が分野を問わず広く用いられている。しかし、クロロホルムは発がん性が疑われており、低毒性で環境負荷も低い溶媒への代替が望まれる。

Lu ら[11]は、様々な有機溶媒を用いた藻類から脂質の抽出を検討し、クロロホルムでは糖脂質、リン脂質及び中性

脂肪のいずれも抽出量が高いのに対し、酢酸エチルを用いた場合ではリン脂質の、エタノールを用いた場合では中性脂肪の、n-ヘキサンを用いた場合ではいずれの脂質も抽出量が低くなることを示した。さらに、酢酸エチル/エタノール (1 : 1 v/v)とした場合はこれらの脂質をよく抽出し、抽出時間・温度の増加に伴って抽出量が増加することを明らかにした。

そこで R2 年度は、酢酸エチル/エタノール抽出を下水汚泥中の脂質分析に適用することを目的とした。さらに、様々な下水汚泥の脂質分析及びその他の化学組成分析により、下水処理場におけるガス発生量の推定が可能であるか検討した。そして、脂質等の化学成分がメタン発酵に与える影響について評価した。

3. 2 酢酸エチル/エタノールによる抽出手法の検討

3. 2. 1 実験方法

藻類には土木研究所内で既報 [12]において培養した雑藻の凍結乾燥物を使用した。下水汚泥は、X 処理場より採取した初沈汚泥の凍結乾燥物を用いた。抽出は、試料約 100 mg と酢酸エチル/エタノール(1 : 1 v/v) 1mL を共栓付き試験管に加え、ボルテックスミキサーで時々攪拌しながら、所定温度のウォーターバス内で所定時間行った。抽出終了後、試験管内の液温を室温まで冷却した後、n-ヘキサンを 2 mL 加え、よく攪拌した。これに水を 2 mL 加えてよく攪拌し、2 層に分離するまで静置し、上層の有機層をパスツールピペットで回収した。試験管内に残った水層には、さらに n-ヘキサンを加え、再び 2 層となるまで静置後、同様に有機層のみを回収した。この操作を 2 回繰り返した。回収したすべての有機層はナス型フラスコに移し、60℃以下の温度でロータリーエバポレーターにて減圧乾固し、試料 TS (g)あたりの抽出量(%)を求めた。比較として、Bligh-Dyer 法 [10]による抽出及び n-ヘキサン抽出 [9]を実施した。

3. 2. 2 実験結果

まず、藻類を用いて Lu ら [11]の手法を再現し、酢酸エチル/エタノールを用いて抽出を行う場合の最適な抽出温度及び抽出時間について検討した。図-9 に藻類の抽出における抽出時間及び抽出温度が抽出量に与える影響を示す。室温で 150 分の抽出を行った場合、抽出量は 2.3%であった。抽出温度を 60℃、60 分とすると、抽出量は 5.2%となり、60℃で 150 分での条件においては 11.8%に増加した。抽出温度を高くし、抽出時間を長くすると抽出量が増加する傾向となり、これは、Lu ら [11]の報告とよく一致した。また、Bligh-Dyer 法の定量値は 13.1%であり、これは酢酸エチル/エタノールでの抽出を 60℃及び 150 分行った値と近い値であった。よって本報の以降の検討では、酢酸エチル/エタノール抽出をこの条件で行うことにした。

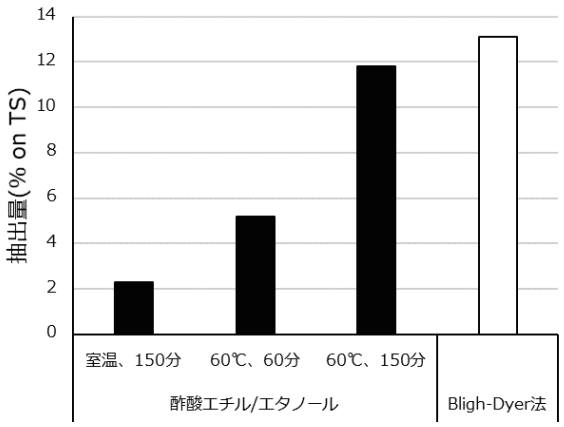


図-9 藻類の酢酸エチル/エタノールの抽出条件と Bligh-Dyer 法との比較

次に、下水汚泥の脂質分析に酢酸エチル/エタノール抽出が適用できるかを検討するため、Bligh-Dyer 法及び n-ヘキサン抽出との定量値の比較を行った。その結果を 表-1 に示す。Bligh-Dyer 法及び n-ヘキサン抽出の定量値はほとんど同じ(それぞれ 14.6%及び 14.2%)であったが、酢酸エチル/エタノール抽出はやや高い値(17.0%)であった。河川水質試験方法 [13]によると、抽出溶媒は n-ヘキサンの他、クロロホルム、ジエチルエーテル等のいずれの溶媒も同一値が得られるが、ジエチルエーテルは重金属塩化物が溶解するとある。そのため、極性の高い溶媒を用いる酢酸エチル/エタノール抽出はジエチルエーテルを用いる場合と同様に、重金属塩化物の影響があったと考えられる。しかし、Bligh-Dyer 法及び n-ヘキサン抽出と酢酸エチル/エタノール抽出の差は 3%以内であり、酢酸エチル/エタノール抽出は下水汚泥中の脂質分析に適用できると判断した。また本法は、n-ヘキサン抽出よりも溶媒使用量が少なく短時間の処理が可能であり、クロロホルムのような毒性の高い溶媒を用いないため、簡便で環境負荷を低減した下水汚泥の脂質分析手法であると言える。

表-1 初沈汚泥の各種溶媒での定量値(%)

	酢酸エチル/エタノール	n-ヘキサン	Bligh-Dyer
初沈汚泥	17.0	14.2	14.6

3. 3　下水処理場におけるガス発生量の推定

3. 3. 1　実験方法

消化工程におけるガス発生に脂質が及ぼす影響を調査するため、X 処理場より採取した初沈汚泥、余剰汚泥及び消化汚泥の凍結乾燥物の酢酸エチル/エタノール抽出による脂質量を比較した。併せて、炭水化物及びタンパク質の比較を行った。炭水化物及びタンパク質の分析は次のように行った。

・炭水化物：試料 2.5 mg に 72%硫酸 250 μL を共栓付き試験管に加え、時々攪拌しながら、2.5 時間室温で反応させた。これに 7.0 mL の水を加え、硫酸濃度を 4%とし、121℃で 1 時間反応させた [14]。反応後の液を適宜希釈し、希釈液 0.5 mL を別の試験管に加え、5%フェノール水溶液を 0.5 mL と混合した。これに濃硫酸 2.5 mL を加えて呈色させ、20 分静置後に 490nm の吸光度を測定することで、全糖量を測定した [15]。検量線作成にはグルコース水溶液を標準とした。

・タンパク質：試料 10 mg と 1.0 mol/L NaOH 水溶液 1 mL を PP 製遠沈管に加え、120 分間、煮沸ウォーターバス内で反応させた。反応終了後、遠心分離により、上澄を回収した。これを 3 倍希釈した液 100 μL を別の試験管にとり、DC™ プロテインアッセイキット A 液 500 μL と混合した。これに同キット B 液 4.0 mL を加え、呈色させた。室温で 15 分静置した後、750 nm の吸光度を測定することにより、タンパク量を求めた [15]。検量線作成には同キット付属のウシγグロブリン溶液を標準とした。

3. 3. 2　実験結果

表-2 に初沈汚泥、余剰汚泥及び消化汚泥の化学組成を示す。各種汚泥の比較において、脂質は初沈汚泥が最も高く(17.0%)、次いで余剰汚泥(13.5%)及び消化汚泥(10.7%)の順となることが分かった。また、炭水化物も同様の順で減少する傾向を示し、灰分は逆に初沈汚泥が最も低く(15.0%)、消化汚泥が最も高い値(25.6%)を示した。

次に、H29 年の下水道統計 [16]を基に、X 処理場の各成分のマテリアルバランスを評価し、嫌気性消化における各成分の分解率からメタン発生量を推定した。表-3 にその結果を示す。嫌気性消化における脂質の分解率は 65%であり、これは炭水化物(81%)に比べると少なく、タンパク質(44%)よりも分解されることが分かった。脂質、炭水化物及びタンパク質の 1 t 当たりのガス発生倍率 [7]をそれぞれ 1.43、0.83 及び 0.76 千 m^3 としてガス生成量を推定した。脂質のガス発生倍率は他の成分と比べて高く、推定したガス発生量も脂質(191.2 千 m^3/年)が他の成分に比べて高かった。また、各成分の分解率から推定したガス発生量は 414.7 千 m^3/年であり、統計にある実際のガス発生量(491.6 千 m^3/年)と比べるとやや低い値であったが、これは算出に用いた発生倍率と実際の発生倍率との違いや、本実験で評価されなかった成分(フミン類等)の影響があるものと考えられる。しかし、推定したガス発生量は実際のガス発生量と概ね近い値であることから、嫌気性消化におけるガス発生量は化学組成から推定が可能であることが示された。さらに、嫌気性消化の高効率化においては、脂質の挙動把握が重要であることが示された。

表-2　各種汚泥の化学組成　(%　対 TS)

	脂質	炭水化物	タンパク質	灰分	合計
初沈汚泥	17.0	21.3	11.6	15.0	64.9
余剰汚泥	13.5	10.7	22.3	22.1	68.6
消化汚泥	10.7	6.0	19.0	25.6	61.3

表-3　X 処理場における嫌気性消化の推定値

	TS	脂質	炭水化物	タンパク質
初沈汚泥 (t/年)	678	115	144	79
余剰汚泥 (t/年)	731	91	73	151
初沈＋余剰 (t/年)	1408	206	217	230
消化汚泥 (t/年)	432	73	41	129
分解率 (%)	69	65	81	44
推定ガス発生量 (千 m^3/年)	414.7* (491.6)**	191.2	146.3	77.2

*：脂質、炭水化物及びタンパク質の推定値の合計、

**：括弧内は統計にある実際のガス発生量

3. 4　脂質と他の化学成分のメタン発酵特性の比較

3. 4. 1　実験方法

前述の通り、脂質が嫌気消化におけるエネルギー利用において重要な成分であることが分かったため、脂質と他の成分(炭水化物及びタンパク質)の回分式メタン発酵試験を行い、各成分の分解挙動を把握するとともに、メタン生成ポテンシャルを評価した。実験は Y 処理場より採取した消化汚泥を種汚泥(TS 1.16%、VS　0.83%)とした。表-4 に消化汚泥の化学組成を示す。脂質、炭水化物及びタンパク質のモデル物質は、それぞれサラダ油、トイレットペーパー及びペプトンとした。サラダ油とトイレットペーパーについてはジュースミキサーで蒸留水とよく混合し、ペプトンについては 121℃で 15 分処理して溶解したものを用いた。調製した分散液または水溶液 100mL を消化汚泥 400mL に加え、35℃で 2 週間の回分式メタン発酵試験を

行った。添加量は消化汚泥の VS に対してそれぞれの成分の VS が 10 : 1 となるように調製した。コントロールには蒸留水を 100mL 加えた。それぞれの系については 1 つの系列について 4 バッチの同一試料を調製し、そのうちの 1 バッチについては TS の経時変化の測定に用いた。残りの 3 バッチについては、メタン生成挙動の測定に用い、発酵終了後に TS、VS、脂質、炭水化物及びタンパク質の測定に用いた。

表-4　消化汚泥の化学組成 (% 対 TS)

脂質	炭水化物	タンパク質	灰分	合計
8.4	8.6	29.4	28.3	70.1

3. 4. 2　実験結果

図-10 に回分式メタン発酵試験における TS の変化とメタン生成の挙動を示す。炭水化物を添加した系では発酵の初期においても TS が減少し、発酵終了後の TS 残存率は全ての系の中で最も低い値となった。一方で、メタンガスの発生は脂質を添加した系が最も高い値を示し、次いでタンパク質、炭水化物及びコントロールの順であった。

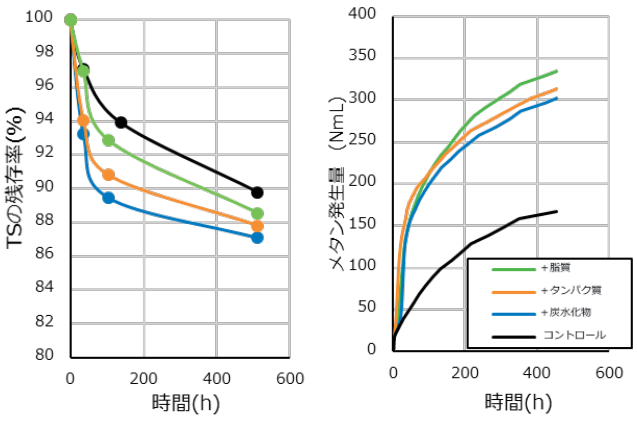


図-10　回分式メタン発酵試験における TS の変化(左)とメタン生成挙動(右)

表-5 モデル物質を添加した回分式メタン発酵試験の結果

	分解率 (%)			メタン生成ポテンシャル (NmL/VS- g)
	脂質	炭水化物	タンパク質	
コントロール	61.6	29.6	10.4	-
+脂質	84.6	11.9	9.9	1268
+炭水化物	68.5	51.3	23.4	585
+タンパク質	58.7	10.1	17.0	662

表-5 に、各成分のメタン生成ポテンシャルと、発酵における各成分の分解率を示す。メタン生成ポテンシャル (NmL/VS-g) は脂質(1268)>タンパク質(662)>炭水化物(585)の順であり、これは既往の知見 (それぞれ 980、527 及び 415 NmL/VS-g) [7]とも類似し、脂質からのメタン生成が効率的であることが確認された。また、回分式メタン発酵試験終了後に汚泥を採取し、脂質、炭水化物及びタンパク質の含有量を測定し、発酵前の含有量に対する分解率を求めた。脂質及びタンパク質を添加した系では、添加した成分(例えば脂質を添加した系では脂質)の分解率がコントロールに比べて大きくなったが、加えた成分以外のもの(脂質であれば炭水化物とタンパク質)の分解率が小さくなる傾向が見られた。一方で、炭水化物を添加した系では、炭水化物の分解のみならず、脂質及びタンパク質の分解も促進された。炭水化物を構成する糖類は様々な微生物が容易に資化・分解できるため、他の成分の分解にも寄与したものと考えられる。一方で、脂質やタンパク質は炭水化物に比べると難分解性であるとされるため、微生物相が難分解性成分の分解に偏り、他の成分の分解が抑制されたと考えられる。以上の結果から嫌気性消化において炭水化物の存在が脂質やタンパク質の分解を促進し、メタン生成に相乗的な効果があると期待された。よって、嫌気性消化におけるガス発生及びエネルギー利用の効率化のためには、脂質だけではなく、炭水化物の挙動も重要であることが示された。

3. 5　まとめ

本実験結果から以下の結果を得た。

1) 本報では、簡便で環境負荷を低減した下水汚泥の脂質分析手法である酢酸エチル/エタノール抽出を提案した。汚泥の脂質の分析に酢酸エチル/エタノール抽出が適用できることが明らかとなった。本実験での最適条件は、抽出温度 60℃及び 150 分であった。
2) 汚泥の組成分析結果から消化ガス発生量の推定が可能であり、消化の高効率化には脂肪の与える影響が重要であることが分かった。
3) 回分式メタン発酵試験の結果から、炭水化物が脂質やタンパク質の生物的な分解を促進し、メタン生成に相乗的な効果があることが示された。嫌気性消化におけるガス発生及びエネルギー利用の効率化のためには、脂質と共に、炭水化物の挙動の把握も重要であることが示された。

4. おわりに

本研究で得られた結果及び今後の方針を、以下にまとめる。

1. 全国の嫌気性消化を実施している処理場を対象にアンケート調査を行い、発生量及び処分量に与える影響因子について知見を得た。引き続き排除区分等、他の因子についても引き続き解析を行う予定である。
2. 簡便で環境負荷を低減した下水汚泥の脂質分析手法である酢酸エチル/エタノール抽出を提案した。嫌気性消化の現象を把握する上で重要な有機物の形態を把握し、引き続き消化の高効率化検討を行う予定である。

謝辞

本研究の実施に際しては全国の嫌気性消化を実施している処理場の皆様にアンケートのご協力を賜った。また実験に際しては X 処理場、Y 処理場のご協力を得た。ここに記して謝意を示す。

参考文献

1) 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
2) 佐藤和明：下水汚泥の嫌気性消化と消化ガスの有効利用、環境技術、Vol.10、No.3、pp.254-258、1981
3) 公益社団法人日本下水道協会 下水道統計（H24～H30 年度版）
4) 下水道施設計画・設計指針と解説（後編 2019 年版）、pp.505
5) Met calf & Eddy., Inc.(原著)：廃水処理工学 2、pp. 9、1977
6) 菊川清見、油脂・脂質とは何か、オレオサイエンス 1 巻、pp.75-82、2001
7) 野池達也：メタン発酵、pp. 20、2009
8) 日本下水道協会：下水道維持管理指針 実務編 2014 年版、pp.502、2014
9) 日本下水道協会：下水道試験方法 上巻 2012 年版、pp.759-760、2021
10) Bligh E. G. and Dyer W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. Vol 37, pp. 911-917. 1959
11) Lu W., et al.: Characteristics of lipid extraction from *Chlorela* sp. cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production, Bioresource Technol. Vol. 191, pp. 433-437. 2015
12) 岡安祐司、山﨑廉予、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
13) 建設省河川局(監修)：河川水質試験方法(案) 1997 年版 試験方法編、pp. 585、1997
14) 谷藤渓詩、大井洋、中平泰輔、村井克之：モノ過硫酸添加による広葉樹 ECF 漂白パルプの収率向上、紙パルプ技術協会誌 74 巻、pp. 1109-1115、2020
15) 宮本豊尚、重村浩之、鈴木石根、浦野涼太：流入下水で培養した緑藻 *Monoraphidium* のメタン発酵特性、第 57 回下水道研究発表会講演集、pp. 211-213、2020
16) 公益社団法人日本下水道協会、下水道統計（平成 29 年度版）

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～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、宮本豊尚、谷藤渓詩

【要旨】PCOD の回収促進のため、同様の挙動を示す SS の回収促進を図るべく、沈殿処理の冷却による効果について検証した。今回の条件では、低温処理では流入下水 SS の平均で約 70%が汚泥に回収され、常温処理に比べて高い回収率であった。低温処理は沈殿槽での流入下水の SS 除去、最初沈殿池汚泥の増加及び有機物の回収に効果があることが示唆された。また下水道資源を用いた固形化物による海域施肥効果を検討するため、寒天の種類や濃度を変化させて溶出傾向の違いを把握するほか、被固化材料中の TN の違いによる溶出傾向について調査を行った。寒天の種類や濃度、被固化材料に関わらず、今回使用した上面・底面・高さが各 5cm 程度の円錐台の寒天からは、いずれも概ね 24-48 時間で溶出が終了した。
キーワード：最初沈殿池、冷却処理、有機物回収、海域施肥、溶出試験、寒天

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縮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、省エネルギー化や創エネルギー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等の資源に着目し、資源回収可能、かつ、省エネルギーの処理プロセスの開発を目的とした。

2. 一次処理水に与える低温沈殿処理

2. 1　研究内容

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、H30 年度には高速活性汚泥（High-rate activated sludge）法[4]に注目して実験を行った。高速活性汚泥法は、高い有機物負荷、HRT 30 分未満、SRT 1 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。H30 年度においては、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。高速活性汚泥法の TS・時間当たりの COD 除去量が大きい条件について整理した。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、溶存態 COD（SCOD）除去量は、いずれの条件も約 15 mg/(g・h)であり、条件により変化が少なく、コロイド態 COD（CCOD）除去量は、いずれの条件も 5 mg/(g・h)以下であった。懸濁態 COD（PCOD）除去量は、1 から 29 mg/(g・h)までで、差が大きく、特に送風倍率が高い時に低かった。

一方、高速活性汚泥法と類似した技術として、1990 年代以前に整備された処理場で導入がなされた予備エアレーションタンク（前曝気槽・プリエアレーションタンク）がある。1972 年、84 年、94 年の下水道施設計画・設計指針（以下「指針」と呼ぶ）に記載があり、最初沈殿池（初沈）の前に設け、必要に応じて余剰活性汚泥の返送設備を設けることもあるとされている[5),6),7)]。指針では、予備エアレーションタンクの目的は、エアレーションにより下水の嫌気化を防止するとともに、油脂の除去、臭気発生の防止等について役立つものであり、また余剰活性汚泥を返送することによって、BOD、SS を活性汚泥フロックに吸着させて、最初沈殿池における沈殿効率を向上させることに役立つものとされている。R1 年度は、余剰汚泥を返送している処理場に実際に設置されている予備エアレーションタンクついて、前後の処理水の性状変化を把握した。併

せて、予備エアレーションタンクが存在しない条件や余剰汚泥の返送を行わない条件についても疑似的に再現を行い、それぞれを比較することで処理水の改質効果について確認した。予備エアレーションタンクの前後で、SCOD についてはいずれも 2 割程度減少、CCOD はほとんど変化していなかった。流入水中の COD において PCOD が支配的な場合、SS の除去による PCOD の回収を検討することが下水中の有機物資源の回収に有効であることが示唆された。

以上の検討結果から、R2 年度は PCOD の回収促進のため、PCOD と同様の挙動を示す SS の回収促進について検討を行った。下水道維持管理指針によると、初沈での汚泥の引抜きに際して、気温の高い季節では腐敗しやすいので注意する旨が記載されており[8]、初沈の温度が高いと沈降性の悪化が懸念される。そこで初沈での温度を下げることにより、汚泥の沈降性向上による SS の回収促進を試みた。R2 年度は、初沈での低温沈殿処理を検討し、この処理が一次処理水の水質及び初沈汚泥に与える影響を調査した。

2.2 実験方法

X 処理場の流入下水を用い、最初沈殿池を想定した実験装置(図-1)を用いて実験を行った。低温系は、氷で 5℃に冷却した水道水と流入下水を混合槽で混合して冷却し(低温処理)、対照系は冷水の代わりに常温の水道水を用いて実験を行った(常温処理)。実験は 2020 年 8 月に別日で 2 回行った。

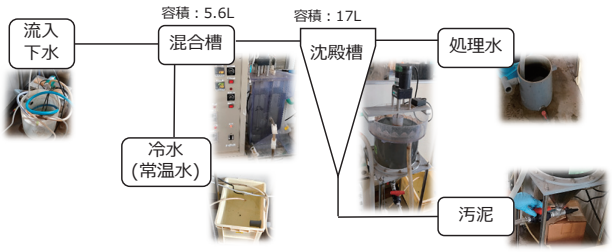


図-1　実験装置の概略フロー

本実験において、流入下水と処理水の採水は各 3 回（1 回目では 1 回／60 分、2 回目では 1 回／30 分）実施した。処理水の採水は流入下水を採取してから装置全体の HRT(約 2.5 h)経過後に実施した。流入下水及び処理水の分析項目は、全 COD、 PCOD、 コロイド＋溶存態 COD(C+SCOD)、TS、VS、SS とした。COD の測定は、有機物捕捉率の高い二クロム酸カリウムによる方法を用い、吸光光度計 DR3900 と測定試薬（HACH 社）を使用した。C+SCOD は、孔径 1.5μm のガラス繊維ろ紙のろ過試料の COD とし、PCOD は全 COD から C+SCOD の値を引いて求めた。

また実験終了時に沈殿槽の汚泥を約 2L の水とともに引き抜き、発生した汚泥量および汚泥中の SS を測定した。

表-1　実験条件および沈殿槽の温度変化

	流量 (mL/min)			HRT (h)		沈殿槽温度 (℃)	
	流入下水	冷水 (常温水)	合計	混合槽	沈殿槽	常温処理	低温処理
1 回目	100	70	170	0.57	1.68	28.0	23.7
2 回目	110	70	180	0.52	1.55	26.1	21.5
平均	105	70	175	0.55	1.62	27.1	22.6

2.3 実験結果・考察

本実験における沈殿槽の温度変化を表-1 に示す。1 回目および 2 回目の実験における低温処理の沈殿槽の平均水温はそれぞれ 23.7℃および 21.5℃であり、常温処理(それぞれ 28.0℃および 26.1℃)に比べて約 4.5℃低くなった。

図-2 に冷水または常温水を混合した流入下水と処理水の COD 分析結果を示す。常温処理と低温処理では、処理水の全 COD に違いは見られなかったが、流入下水の全 COD に比べると両者とも低い値となった。また、常温処理・低温処理では C+SCOD は流入下水の値と変わらなかったが、PCOD は減少した。これは、懸濁態の有機物が沈殿槽の効果により除去される一方で、沈殿・分離しない溶存態およびコロイド態の有機物は一次処理水として流出しやすいことを示している。

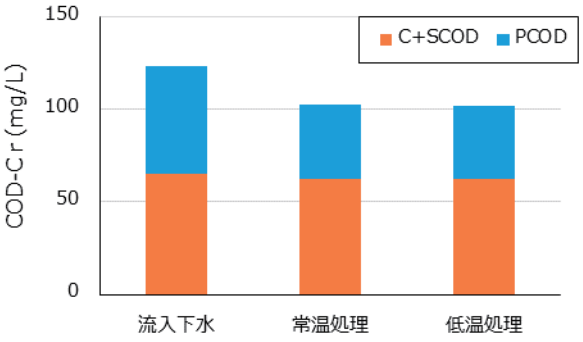


図-2　流入下水と処理水中の COD

図-3 に処理水の TS・VS および SS の変化を示す。縦軸は流入下水の濃度に対する処理水の濃度の百分率で示した。処理水の TS および SS は常温処理・低温処理ともに、流入下水の濃度に対してそれぞれ約 86%および約 64%であり、低温処理と常温処理の違いは見られなかった。

一方で処理水の VS は流入下水に対して低温処理が 79%と、常温処理(96%)に比べて低い値となっており、低温処理では有機物の除去に効果があることが示された。

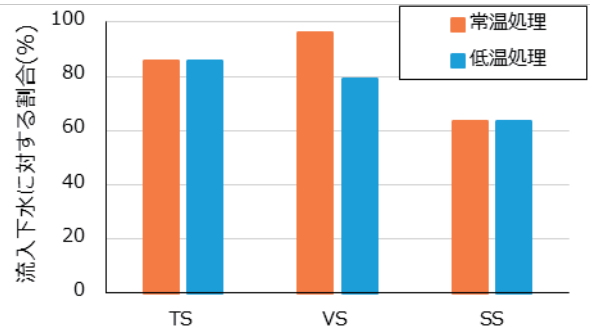


図-3　流入下水に対する処理水の TS、VS 及び SS

表-2 に本実験終了時に沈殿槽から回収した汚泥の分析結果を示す。それぞれの値は実験に要した時間で除し、1 時間当たりに回収した TS、VS、灰分及び SS として示した。1 時間当たりに回収した汚泥の TS は常温処理(平均で 62 mg/h)に比べて、低温処理(82 mg/h)の方が高くなった。SS も、低温処理では 2 回の平均で 36 mg/h であり、常温処理(29 mg/h)に比べて高かった。また灰分と VS を比較すると、VS は低温処理(62 mg/h)が常温処理(43 mg/h)に比べて高かったのに対し、灰分は両者の違いはほとんどなかった(それぞれ 20 及び 19 mg/h)。この結果は図-3 で示した処理水の VS の挙動とも類似する。これらの結果から、流入下水中の無機物回収は沈殿処理の温度にはあまり依存せず、有機物は沈殿時の水温が低い時に汚泥としてよく回収されることが分かった。

表-2　1 時間当たりの汚泥回収量(mg/h)

		TS	VS	灰分	SS
1 回目	常温処理	35	20	15	15
	低温処理	59	43	16	23
2 回目	常温処理	89	67	22	43
	低温処理	106	80	26	49
平均	常温処理	62	43	19	29
	低温処理	82	62	20	36

本実験では流入下水に冷却水を加えることで沈殿槽の温度を低下させたため、処理水は冷却水(または常温水)で希釈される。図-2 及び図-3 で示した通り、処理水の COD、TS 及び SS の変化は低温処理及び常温処理で大きな違いが見られなかったが、これは希釈の影響により、処理水の分析では微小な変化を捉えることが難しかったと考えられる。そこで、全ての実験時間を反映した結果と想定される汚泥の SS 量と流入下水の SS 量を基に、処理水の SS を計算によって求めた。その結果を図-4 に示す。低温処理では処理水には流入下水の約 30%の SS が含まれるのに対し、常温処理では約 43%の SS が含まれることが分かった。この結果より、低温処理は処理水の SS を約 3 割減少させることが想定された。

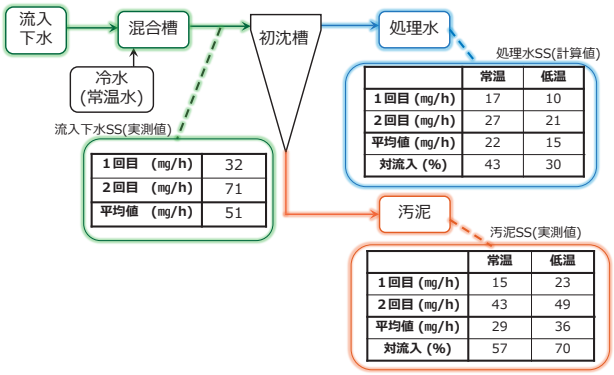


図-4　本実験における SS バランス

2.4　まとめ

初沈での低温沈殿処理を検討し、処理水の水質及び初沈汚泥に与える影響を調査した。これから、以下の結果を得た。

1）流入水と処理水を比較すると、常温処理・低温処理ともに PCOD が除去されたが、C+SCOD はほとんど変化しなかった。本実験では一次処理水の TS 及び SS の実測値では、低温処理および常温処理の明確な差は見られなかったが、VS は低温処理が低い値を示した。

2）回収された汚泥の VS は低温処理が常温処理に比べて高かったが、灰分は両者の違いはほとんどなかった。流入下水中の無機物回収は沈殿処理の温度にはあまり依存せず、有機物は沈殿時の水温が低い時に汚泥としてよく回収されることが分かった。

3）低温処理は初沈での汚泥の沈殿を促進し、汚泥の SS 量を増加させることが分かった。今回の条件では、低温処理では流入下水 SS の平均で約 70%が汚泥に回収され、常温処理(平均で約 56%)に比べて高い回収率であった。低温処理は初沈での流入下水の SS 除去、初沈汚泥の増加及び有機物の回収に効果があることが示唆された。

3.　下水道資源中の窒素を用いた海域施肥の検討

3.1　研究内容

H30 年度まではリン回収について検討がなされていた

が、下水道はリン以外にも資源としての可能性があり、R1年度より回収可能性のある資源として窒素について着目し検討を行った。

一部の水域では、夏季に赤潮や貧酸素水塊が発生し、冬季は栄養塩不足等の要因によりノリの色落ち等が問題とされている[9]。特にノリやワカメ、コンブといった藻類養殖において施肥技術の検討が実施されてきている[10),11),12)]。

水中での拡散を抑制するよう工夫した肥料により、栄養塩類を徐々にかつ継続して溶出することで、藻場を再生したい場所に対してスポット的に栄養塩を供給できる可能性がある。ノリ等の養殖場や再生させたい藻場周辺では、藻類の増殖に必要な栄養塩の需要が高く、一部の栄養塩は藻体として再度陸上に回収されることも想定される。そのため、閉鎖性水域を除けば、水域への水環境の立場からは水域全体を汚染する可能性は、栄養塩濃度の高い放流水を流す等の面的（海域全体）な栄養塩の供給と比べて相対的に低いと考えられ、さらには生産の立場からは長期間の肥効継続等の点から施肥頻度が減少するため効率的な投資となりえる。

R1年度は、藻類等の養殖を行っている限られた海域への栄養塩の供給剤として下水汚泥肥料等の活用の可能性を検討するため、液状試料や粉体試料を固化した模擬固化肥料について溶出速度の検討を行ったところ以下の結果が得られた[13)]。寒天による固化は、溶出速度の抑制効果が期待されたほか、最終的な溶出量には影響を与えなかった。溶媒に河川水を想定した超純水と海水を想定した3%NaCl水溶液の2種類を用いて比較を行ったが、TNの溶出傾向に大きな違いがみられなかった。また、モデル化を行い、溶媒中のTN濃度をワイブル分布の累積分布関数で近似したところよくフィッティングできた。

R2年度は、処理水及び消化汚泥そのものの利用に着目し、寒天の種類や濃度を変化させて溶出傾向の違いを把握するほか、被固化材料中のTNの違いによる溶出傾向について調査を行った。

3.2. 寒天試験体の作成と寒天濃度の脱型に与える影響

実験に供した寒天固化試料は、R1年度と同様に円錐台の容器に対し、寒天4g（もしくは2g）を被固化材料（本実験ではY処理場の下水処理水もしくは消化汚泥）100mlに添加し、加熱後攪拌しながら冷却して作成した。得られた供試体の写真を図-5に示す。

試験体の大きさは、上面の直径が約58mm、底面の直径が約47mm、高さが約45mm、表面積は約120cm^2、体積は約100cm^{3}である。寒天の濃度を下げたところ、2%の場合は、脱型時に供試体が崩壊する事象が発生した。逆に5%を超えると寒天粉末の一部が処理水に溶解しなかった。すなわち混合濃度としては一定の強度が期待できる、水溶液に対して4%が適当であることが確認できた。

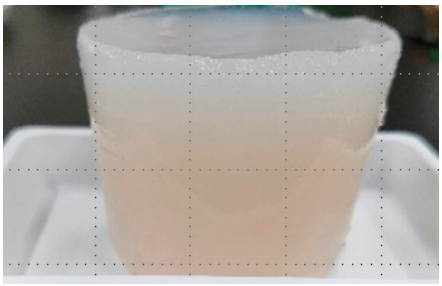


図-5　実験に用いた供試体

3.3　溶出試験

3.3.1.　試験方法

本実験では、寒天のゲルの骨格をなすアガロースの違いと濃度に着目し、重合度及び製造方法の異なる寒天を用いて供試体を作製した。溶出試験の供試体は3.2で示す手法でいずれも作成し、条件を表-3に示す。

表-3　実験に用いた供試体の作成条件

	使用寒天	寒天濃度	被固化材料
No,1	A社	4%	二次処理水（標準法）
No,2	B社（重合度大）	4%	二次処理水（標準法）
No,3	B社（重合度大）	2%	二次処理水（標準法）
No,4	B社（重合度小）	4%	二次処理水（標準法）
No,5	B社（重合度小）	2%	二次処理水（標準法）
No,6	B社（混合）	4%	二次処理水（標準法）
No,7	B社（混合）	4%	消化汚泥

実験開始時における試料の窒素含有量は、実験に使用した下水処理水及び消化汚泥のTNより算出した。溶媒は、海水を模し、3%塩化ナトリウム水溶液（以下NaCl水溶液）を使用した。実験では、各溶媒が5L入った容器に対して、回転子が直接触れないように供試体を不織布ネットで上部から吊り下げ、実験期間中の溶媒濃度が一定となるようマグネチックスターラーにより250rpmで実験期間中連続攪拌を行った。概ね室温が15-20℃の環境で7日間溶出試験を実施し、試験開始から5分後、10分後、15分後、30分後、1時間後、3時間後、6時間後、24時間後、48時間後、7日後に各50mlを採水した。採水したサンプルは適宜希釈し、水酸化ナトリウム - ペルオキソ二硫酸カリウム溶液により分解後 、銅・カドミウムカラム還元-N-(1-ナフチル)エチレンジアミン法によりTNを求めた。なお、24時間後から7日後の間は、溶媒の蒸発が想定され

たため、適宜超純水を加えて蒸発の影響を無視できるよう調整を行った。溶出試験の装置については図-6 に示す。

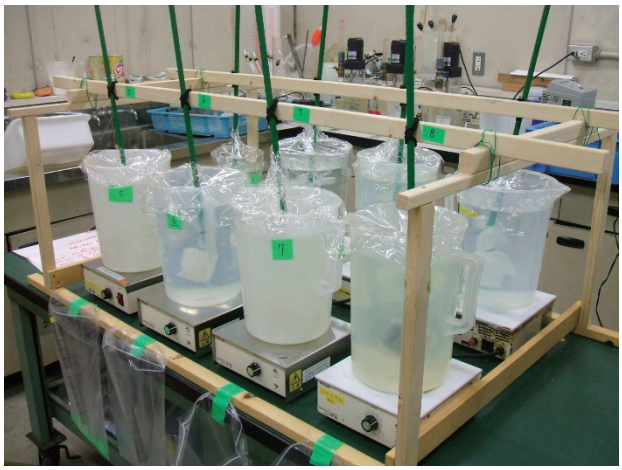


図-6　溶出試験装置

3. 3. 2　試験結果

図-7 に寒天の種類や重合度を変化させた場合における溶出傾向を示す。概ね 24～48 時間以降については TN 濃度が一定になっており、今回使用した寒天では、種類を問わず概ね 1-2 日程度で溶出が終了することが分かった。また、溶出の傾向については寒天濃度 4%の場合、寒天の種類及び分子量によらず大きく変化しなかった。次に図-8 に寒天濃度を変化させた場合の溶出傾向を示した。B 社の 2 種類の寒天では、寒天濃度の違いによる溶出傾向への影響は確認できなかった。以上から、寒天の濃度、種類及び分子量は溶出傾向に大きな影響を与えるものではないことが明らかとなった。

続いて、B 社寒天の混合物（質量比で 1:1）を用い、下水処理水と消化汚泥の溶出試験結果を図-9 に示す。実験に供した下水処理水の TN は約 27mg/L 及び消化汚泥の TN は約 1600mg/L であり、約 60 倍の違いがあった。溶媒中の TN 増加速度は、値の大きくなる 1 時間から 6 時間の区間では下水処理水では 0.09mg/L/h、消化汚泥では 1mg/L/h と必ずしも被固化材料の TN 濃度と単純な比例関係は示されなかった。一方で、概ね 24～48 時間以降では TN 濃度が概ね一定となっており、溶出継続時間は、被固化材料の違いに関わらないことが分かった。さらに昨年度実施した検討においても、寒天を使用した場合は、概ね 24 時間後には終局状況（1 か月経過後）と同じ溶出状況にあった[13]。以上のことから、寒天からの溶出速度は、寒天の種類、分子量、濃度及び被固化材料の TN 濃度で制御することは困難である。既往の文献より、養殖に利用する場合は少なくとも 1-2 週間の継続した溶出が求められることから、実用化に際しては溶出を抑制する手法の検討が必要である。具体的には、海水と接触する面積を制限する等の物理的な因子を変化させる等の対策が必要であると想定された。

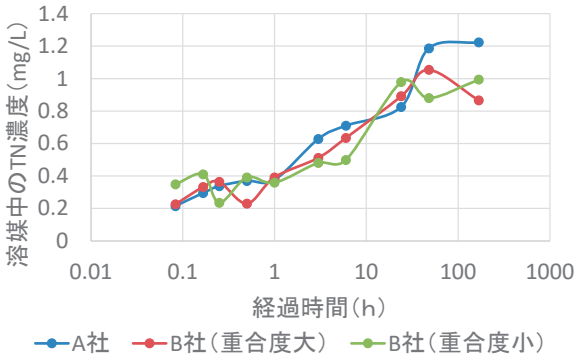


図-7　溶媒中の TN 濃度変化（4%濃度の寒天試験体）

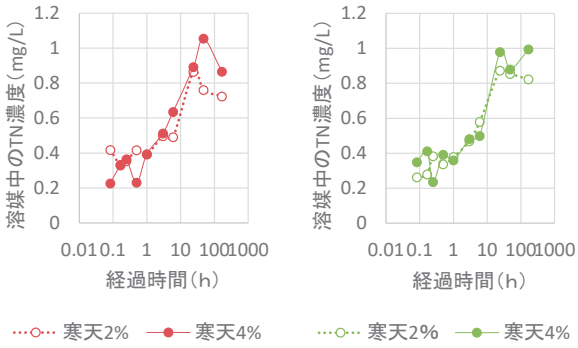


図-8　溶媒中の TN 濃度変化（寒天濃度の違い）
（左：重合度大　右：重合度小）

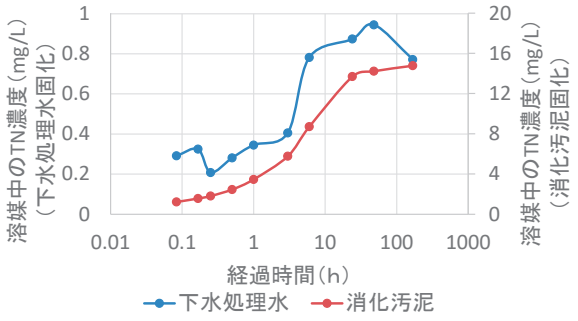


図-9　溶媒中の TN 濃度変化（下水処理水と消化汚泥）

3. 4　まとめ

本実験結果から、以下の結果を得た。

1）寒天濃度は供試体の強度に影響する。濃度として 4％が適当であった。

2）寒天の種類、分子量、濃度及び被固化材料によらず、今回使用した上面・底面・高さが各 5 ㎝程度の円錐台の寒天からは、概ね 24-48 時間で溶出が終了した。既往の文献より、養殖に利用する場合は少なくとも 1-2 週間の継続した溶出が求められることから、実用化に際しては溶出を抑制する手法の検討が求められる。

4. おわりに

本研究で得られた結果及び今後の方針を、以下にまとめる。

1. 沈殿槽での低温沈殿処理を検討し、処理水の水質及び初沈汚泥に与える影響を調査した。流入水中の COD の回収に向けて、引き続き検討を進める予定である。
2. 下水道資源を用いた固形化物による海域施肥効果を検討するため溶出試験を行い、寒天の特性に関する知見を得た。引き続き溶出抑制技術等、海域施肥に資する技術の開発を行う予定である。

謝辞

本研究の実施に際しては X 処理場、Y 処理場のご協力を得た。ここに記して謝意を示す。

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 回下水道政策研究委員会会議資料、平成 25 年 12 月 17 日、https://www.mlit.go.jp/common/001022698.pdf
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.: Bioflocculation management through high-rate contact-stabilization: A promising technology to recover organic carbon from low-strength wastewater, Water Research, Vol.104, pp.485-496, 2016
5) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 1972 年版、pp.276-277
6) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 1984 年版、pp.291-294,1984
7) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 1994 年版（後編）、pp.179,1994
8) 日本下水道協会：下水道維持管理指針 2014 年版 (実務編)、pp. 449, 2014
9) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部：栄養塩類の循環バランスに配慮した運転管理ナレッジに関する事例集 (2014)，http://www.mlit.go.jp/common/001033458.pdf
10) 福吉晴生、三島悠一郎、花島勲、牟田英司、陣内聖太、松尾保成、不動寺正臣、野本晋児: 佐賀市下水浄化センターにおける季別運転の実績とその効果、下水道研究発表会講演集、No.56、pp.1073-1075、2019
11) 池脇義弘、牧野賢治、西岡智哉、平野匠、上田幸男: ゼラチンを用いた藻類養殖用施肥剤の開発、日本水産学会誌、Vol.82、No.6、pp.917-922、2016
12) 輪島雅治:藻場再生の挑戦、再生と利用、Vol.43、No.162、pp.90-93、2019
13) 国立研究開発法人土木研究所：資源回収型下水処理技術に関する研究、令和元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 4402 号、pp.59-68、2021

Ⅱ．水質チームによる研究

下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発

研究予算：下水道応用研究
研究期間：令和元～令和２年度
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、對馬育夫、村田里美、鈴木裕識

【要旨】
下水処理場では、処理の異常等によりアンモニア性窒素が平常時より高濃度で残留（硝化阻害）して水質問題が生じることがある。本研究では硝化阻害物質の高効率探索システムの開発を主目的とし、当チームでは２つの課題を担当している。課題 1（硝化阻害の実態把握）では、硝化阻害への対策方針の策定に資するため、阻害実態のある７件の下水処理場に対しヒアリング調査を実施した。その結果、硝化阻害からの復旧の期間や水質目標（NH_4-N 濃度）は様々であり、処理場ごとの経験に基づいて復旧対応がなされているため、画一的な対策の共通指針よりも、対策事例を体系的に整理したマニュアルが有用と考えられた。また、硝化阻害物質の高効率探索システムへの需要が確認できた。課題 2（硝化阻害物質の阻害活性評価）では、活性汚泥と硝化菌（アンモニア酸化細菌）を用いて、30 化学物質の硝化阻害試験の結果を比較検討した。その結果、クロロフェノール系の化学物質を除くと両実験で得られた阻害率は高い相関を示し（相関係数 R=0.85）、硝化菌による試験手法の有用性を確認できた。また、次世代シーケンサーを用い、実処理場の活性汚泥の菌叢解析を行い、硝化菌の種類や存在割合を把握し、硝化阻害物質の推定技術の適用性を明らかにした。アンモニア酸化細菌に対する硝化阻害の作用要因を検討した結果、酵素阻害と殺菌作用の２つの要因の関与が推察され、効果的な対策につながる知見が得られた。

キーワード：下水処理場、硝化阻害物質、アンケート調査、アンモニア酸化細菌、次世代シーケンサー

1. はじめに

下水道における長年の課題として、硝化阻害物質への対策をあげることができる。とくに、高度処理による窒素除去を求められる処理場では生物学的硝化脱窒プロセスの安定化、標準法の処理場でも硝化促進運転の安定化の観点で重要である。一方、硝化阻害については、下水処理場で実際に阻害を及ぼしている主要な原因物質がほとんど明らかにされていないことが課題としてあげられる。平成 31 年度下水道応用研究から、鹿児島大学、いであ株式会社、土木研究所が研究共同体を形成し、流入下水中に含まれる硝化阻害物質を予測するシステムを開発するとともに、下水処理場における硝化阻害対策の指針を作成することを目的に研究を行っている。当チームでは本プロジェクトの中で、「下水処理場への硝化阻害実態のヒアリング調査」、「硝化菌を用いた硝化阻害物質の活性評価」を担当しており、本報告書では、これら 2 つの課題について、令和２年度における研究結果を報告する。

2. 下水処理場におけるアンケート・ヒアリング調査と硝化化阻害への対策方針の検討

2. 1. 背景と目的

下水処理場における化学物質に起因する硝化阻害については、基礎的研究事例は多く見られるものの、実際の現場で発生している問題については、まとまった報告例が少ない。実際の下水処理場で発生している硝化阻害の実態について、化学物質が原因でない事例も含めて情報を収集することで、現実的な対応策について原因別に具体的に検討することが可能となる。

昨年度の研究では、まず、実下水処理場における硝化阻害の発生実態の把握を目的として、硝化阻害の発生状況、発生原因ならびに発生時の対応方法等について、全国の下水処理場に対して幅広くアンケート調査を実施した。その結果、1,556 件の下水処理場より回答協力が得られ、硝化阻害の経験がある事例は 261 件であった。平均的発生頻度（1 回/年）を把握するとともに、処理運転条件よりも環境条件や流入下水の水質が阻害原因と想定されている傾向を確認した。また、硝化阻害は復旧に 1 日～数週間を要し、主な対応策として、DO の適正な管理に加え MLSS 濃度の調整や活性汚泥の入れ替えが行われていることを把握した。一方で、化学物質が硝化阻害の原因であると想定した下水処理場の割合は全体に対して高くないことが示唆され、アンケート調査のみでは実態の詳細把

握は容易ではなかった。そこで、本年度は、対策方針の策定に資する知見の獲得を目的として、ヒアリング調査を実施し、現場における硝化阻害発生時の詳細情報を収集、整理することとした。

2. 2 調査の方法

アンケート調査で収集した情報に加え、さらに聞き取りすべき内容として、大別して7種類の設問と、1種類のその他の設問の計 8 つの設問を整理し、調査票を作成した。設問内容を**表-1** に示す。ヒアリング対象は、前年度のアンケート調査での「研究調査対象（ヒアリングによる詳細調査等）とすることへの可否」において、「積極的に詳細調査を受けたい」、「問題ない」、「調査の内容による」との回答があった処理場から候補を選出した。実際の対応可否を確認し、7件の処理場（本研究ではA～G処理場とする。）を対象とした。これらの処理場の主な処理方式は標準活性汚泥法が4件（A、B、F、G処理場。うちF処理場は硝化促進型嫌気好気法による運転）、嫌気無酸素好気法が2件（C、E処理場）、長時間エアレーション法が1件（D処理場）であり、日平均処理水量は一万 m^3/日～数十万 m^3/日程度と処理規模は多様であった[1]。ヒアリングはコロナ禍である点を考慮して、オンラインの会議システムあるいは電話による聞き取りによって実施した。

2. 3 結果と考察

本研究では、全国の下水処理場に対して硝化阻害の発生実態に関するアンケート調査を実施し、それに基づいて、ヒアリング調査を行った。アンケート調査の回答概要を**図-1** に示す。同じ処理場での硝化阻害の発生状況は年による大きな変化はなく、昨年度実施したアンケート結果全般についても、概ね信頼性があり、傾向に大きな違いはないことが示された。

特定の化学物質の流入による硝化阻害発生を認識している下水処理場では、複数の処理系統で同時に同様の阻害が発生する傾向があった。一方で、気温・水温等の環境条件が要因で発生する硝化阻害については、処理方式によって発生傾向が異なる事例もみられた。

各処理場での硝化阻害発生状況や、復旧の期間や復旧すべき水質目標（NH_4-N 濃度）は様々であるため、画一的な復旧対策を指針として示すことは最適でないと考えられた。現場では処理場ごとの経験に基づく対応で硝化阻害は概ね解決されているため、対策を共通化した指針よりも、事例を体系的に整理したマニュアルを作成することにより、ベテラン技術者の知見の伝承・共有を図り、各処理場での対策ノウハウを充実させることが有効であると考えられた。

予防対策としては、過去に化学物質の流入を検知し、物質の特定に成功している処理場も見られ、その場合には幾つかの対策がなされていたが、稀なケースであり、その他で一般的に有効、かつ、実行可能と認識される対策事例はみられなかった。新たな対策技術として、「バイオセンサーによる流入下水の常時監視による異常流入検知」は維持管理性・実用性等を踏まえた検討が必要との意見があり、「処理水中の NH_4-N 濃度の低減を目指した追加処

表-1 アンケート調査の設問内容

設問	内容
（問1）	アンケート回答内容への更新の有無
（問2）	同じ流入下水に対して異なる系統による処理を実施している場合の、処理方式による阻害発生の傾向の違いの有無
（問3－1）	硝化阻害の原因を想定されている場合、阻害発生状況の改善のために、原因解明や（発生後の対応とは異なる）予防的対策の実施の有無
（問3－2）	発生後の復旧対応の際、参考にした資料や知見の有無
（問3—3）	併発する問題として、NH_4-Nが二次処理水に残留した場合の、塩素消毒への影響の有無
（問4－1）	硝化阻害発生について、困っている、あるいは、困っていないが解決に向けて対策をしたい場合、水質面、コスト面、労力面を踏まえた現場としての目標
（問4－2）	その他の化学物質の流入による問題や困っていることについて、問4-1と同様に現場としての目標
（問5—1）	質量分析技術と生物影響評価技術を駆使した「下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システム」（以下、探索システム）により、原因物質を探索し推定できるのであれば活用したいかどうか
（問5—2）	探索システムを利用する際、阻害発生時の流入下水の質量分析データが必要になる場合の費用の支出条件
（問5—3）	探索システムがWebサイト上で運用される際、分析データをWebサイト上のシステムにアップロードする上での障害等の有無
（問6）	（探索システムとは別に）流入下水でいち早く毒物（処理影響物質）を検出できるバイオセンサーが利用可能であれば、導入したいか否か
（問7）	（探索システムとは別に）二次処理水にNH_4-Nが残留する場合、追加処理法が利用可能であれば導入したいか否か
（問8）	処理阻害時の処理場での応急対応方法のマニュアルの要否
（その他）	コロナ禍での下水処理に影響の有無、その他化学物質の流入での諸問題等

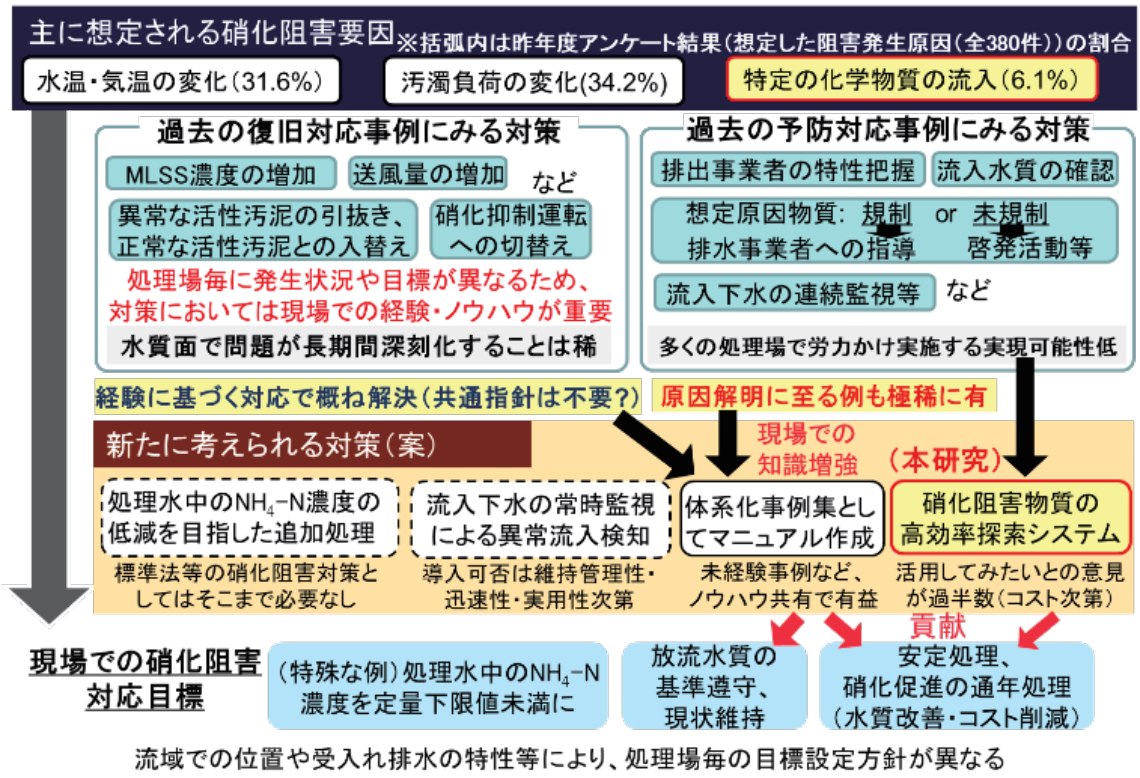


図-1　アンケート調査の回答概要

理」は、一般的な標準活性汚泥法の処理場の硝化阻害対策として現時点でそこまで必要性が見いだされない状況であった。一方で、本研究で提案する「下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システム」は、コスト次第ではあるが、活用してみたいとの意見が多く、原因物質を特定し、硝化阻害物質の流入を防止することへの需要があることが示された。

本研究では硝化阻害についてアンケート・ヒアリング調査を実施したが、調査中では、現場で発生している下水処理機能不全は硝化阻害だけではないことから、化学物質の流入による影響全般への対策について議論されることが多々あった。今後も、本研究の成果を踏まえつつ、化学物質の流入による下水処理機能不全について調査、研究を継続し、知見を蓄積していくことが重要であると考えられる。

3. アンモニア酸化細菌を用いた下水中の硝化阻害物質の探索に関する研究

3. 1　背景と目的

下水処理過程における長年の問題の１つである硝化阻害に効率的に対処するため、阻害物質の探索方法を検討した。昨年度は、培養可能な代表的な硝化菌であるアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* を用いて、下水処理場で硝化阻害要因と考えられる化学物質の網羅的検討を行い、その構造から硝化阻害物質を効率的に推定できる可能性を報告した。一方、硝化阻害物質のアンモニア酸化細菌に対する影響には酵素阻害と殺菌作用の 2 つの要因が考えられるため、その作用機構によっては活性汚泥処理における効果的な対処方法が異なることが考えられる。このため、今年度は、活性汚泥とアンモニア酸化細菌を用いた硝化阻害試験の結果を比較するとともに、代表的な阻害物質の作用要因について検討した。また、試験方法の実下水処理場への適用性を検討するため、硝化阻害活性の評価を行った硝化促進運転を行っている下水処理場の活性汚泥について、次世代シーケンサーによる菌叢解析を行い、活性汚泥中の菌叢および活性汚泥中に存在するアンモニア酸化細菌の同定を行った。

3. 2　実験材料および実験方法

3. 2. 1　アンモニア酸化細菌と活性汚泥を用いた硝化阻害試験の比較

一週間培養した *N. europaea* 培養液を 3,000 rpm、室温、10 分間遠心分離し、上清を捨てた後、等量の新しい培地に懸濁した。細胞懸濁液を 24 穴プレートに 2 mL ずつ添加し、各試験化学物質を最終濃度、10 ppm と 1 ppm として添加後、18 時間、28℃で静置培養した。培養後、各ウェ

ルの培養液 1 μL を Greiss Reagent A 溶液（50 μL）を入れた 96 穴プレートに添加し、更に Greiss Reagent B 溶液（50 μL）を添加した[2]。15 分間室温で放置後、マイクロプレートリーダー（SpectraMax M2、モレキュラーデバイスジャパン株式会社）を用いて、吸光度 545 nm を測定した[2]。培養液に試験化学物質を添加せず DMSO のみを 0.1%添加して同様に培養したサンプルをコントロールとし、Greiss Reagent A 溶液と Greiss Reagent B 溶液を等量混合したサンプルをネガティブコントロール（NC）とした。各化学物質に対する亜硝酸生成率は、以下の式で求めた。実験は各化学物質に対し 3 連で行った。

$$\text{亜硝酸生成率（\%）} = \frac{\text{化学物質添加培養(吸光度 545nm)} - \text{NC(吸光度 545nm)}}{\text{コントロール(吸光度 545nm)} - \text{NC(吸光度 545nm)}} \times 100$$

活性汚泥の硝化阻害試験は共同研究者である、いであ株式会社が行い、そのデータを用いてアンモニア酸化細菌を用いた硝化阻害試験結果と比較した。活性汚泥の硝化阻害試験は ISO 9509[3]に準じて行った。両試験の対象化学物質は図-2 に示す 30 種を用い、最終濃度 1 ppm として硝化阻害試験を行った。

3. 2. 2 アンモニア酸化細菌に対する硝化阻害物質の作用要因の検討

実験では 4 種の硝化阻害物質（2,5-ジクロロフェノール、4-クロロフェノール、アリルチオ尿素、チオアセトアミド）を用いた。各化学物質は、使用前日に DMSO を用いて 1,000 ppm に希釈し、実験に供した。一週間前培養した *N. europaea* 培養液を 3,000 rpm、室温、10 分間遠心し、上清を捨てた後、等量の新しい培地に懸濁した。細胞懸濁液を 10 mL ずつ、換気フィルター付き 50 mL プラスチック試験管に分注し、各試験化学物質を最終濃度 1 ppm になるように添加後、7 日間、28℃、85 rpm、暗下で振とう培養した。7 日間培養後の培養液は、酵素阻害評価試験と殺菌評価試験に用いた。実験は各試験化学物質において 3 連で行った。

3. 2. 2. 1 酵素阻害評価試験

各試験化学物質で 7 日間培養した *N. europaea* 培養液を 3,000 rpm、室温、10 分間遠心し、上清を捨てた後、等量の新しい培地に懸濁した。細胞懸濁液を 24 穴プレートに 2 mL ずつ添加し、 28℃で静置培養後、経時的（0、1、2、3、5 日目）に亜硝酸生成量を測定した[2]。実験は各化学物質に対し 3 連で行った。

3. 2. 2. 2 殺菌評価試験

各学物質曝露下で 7 日間培養した *N. europaea* 培養液を、アンモニア酸化細菌用培地を用いて 1～6 乗まで希釈し、ゲランガム培地[2]を用いて 28℃、4 週間、暗所で培養させ、コロニーを形成させた。コロニー数をカウントし、生細胞数を求めた。実験は各化学物質に対し 3 連で行った。

3. 2. 3 活性汚泥の菌叢解析

硝化促進型の標準法を採用している下水処理場を対象に活性汚泥を約 50 mL 採取したものを実験に供した。実験室に持ち帰った試料は遠心分離にて濃縮し、上澄水を捨てることにより 10 倍濃縮を行った。DNA 抽出は、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境）を用いた。抽出した DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマーPro341F および Pro805R（V3-V4 領域を対象）を用い、PCR 増幅を行った。DNA シーケンシングには、イルミナ社製 MiSeq 用の Miseq reagent Kit v3 （600 サイクル、Illumina）を用いた。解析で得た各リードの同定および統計解析は QIIME2 を用いた。

3. 3. 結果と考察

3. 3. 1 アンモニア酸化細菌と活性汚泥を用いた硝化阻害試験の比較

アンモニア酸化細菌を用いた硝化阻害試験と、活性汚泥を用いた硝化阻害試験の関連性を検討した。化学構造と硝化阻害の強さに偏りがないよう 30 化学物質を選抜し、それぞれの硝化阻害試験の結果に対する相関関係を求めた。図-2 は、各化学物質 1 ppm 濃度下で、アンモニア酸化細菌と活性汚泥の硝化阻害試験における硝化活性阻害を比較した結果を示している。クロロフェノール系の化学物質を除くと両実験で得られた阻害率の相関係数は R=0.85 であり、高い相関を示した。本研究結果から、ア

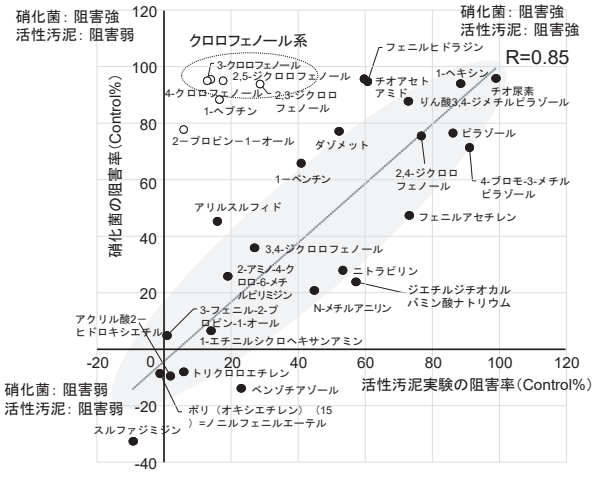


図-2 アンモニア酸化細菌と活性汚泥の硝化阻害試験における硝化活性阻害の比較

ンモニア酸化細菌 *N. europaea* を用いた硝化阻害実験を行うことで、活性汚泥に対する硝化阻害物質の推測が可能であることが考えられる。クロロフェノール系の化学物質は、活性汚泥試験においては硝化阻害があまり確認されなかったが、アンモニア酸化細菌を用いた実験では高い硝化阻害が確認された。この原因として、クロロフェノール系の化学物質は活性汚泥に吸着されやすい、もしくは分解されやすいことが推察された。

3. 3. 2　アンモニア酸化細菌に対する硝化阻害物質の作用要因の検討

硝化阻害物質のアンモニア酸化細菌に対する影響には酵素阻害と殺菌作用の2つの要因が考えられる。そこで、硝化活性阻害を示す4物質（2,5-ジクロロフェノール、4-クロロフェノール、アリルチオ尿素、チオアセトアミド）を用いて、硝化阻害要因の検討を行った。7日間硝化阻害物質を曝露させた後、化学物質が入っていない新しいアンモニア酸化細菌用培地に置換し、*N. europaea* を生育させた際の亜硝酸生成量を検討した（**図-3**）。アリルチオ尿素とチオアセトアミドを曝露した場合、培養2日目ではそれぞれコントロールの72.8%と80.8%まで亜硝酸生成量が復活し、培養5日目にはコントロールとほぼ等量の亜硝酸生成量（アリルチオ尿素：95.9%、チオアセトアミド：97.5%）が確認された。一方、2,5-ジクロロフェノールと4-クロロフェノールは、培養2日目でそれぞれコントロールの32.1%と24.8%の亜硝酸生成量を示し、培養5日目でも73.1%と57.0%までの回復しか確認されなかった。

図-4 は硝化阻害物質を7日間暴露させた後の *N. europaea* のコントロールに対す生菌数の割合を示している。2,5-ジクロロフェノールと4-クロロフェノールを *N. europaea* に曝露した場合の生菌数の割合は、それぞれ0.01%と0.23%であった。一方、アリルチオ尿素とチオアセトアミドを *N. europaea* に曝露した場合の生菌数の割合は、それぞれ29.5%と0.96%であった。2,5-ジクロロフェノールは殺虫剤や除草剤、4-クロロフェノールは殺虫剤や染料中間体として用いられることが報告されている。一方アリルチオ尿素は硝化抑制剤、チオアセトアミドは染料、 医薬・医薬中間体として用いられることが報告されている。以上の結果を考察すると、アリルチオ尿素は酵素阻害が硝化阻害の要因であり、2,5-ジクロロフェノールと4-クロロフェノールは殺菌作用が硝化阻害の要因であることが推察される。一方、チオアセトアミドは酵素阻害と殺菌作用の両方が要因として推察される。これらの結果から、硝化阻害物質は物質により、阻害機構が異なること

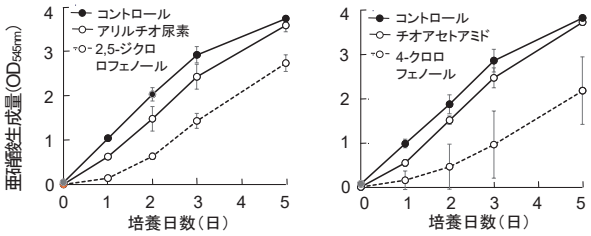


図-3　7日間硝化阻害物質を曝露した後のアンモニア酸化細菌の亜硝酸生成量（酵素阻害の検討）

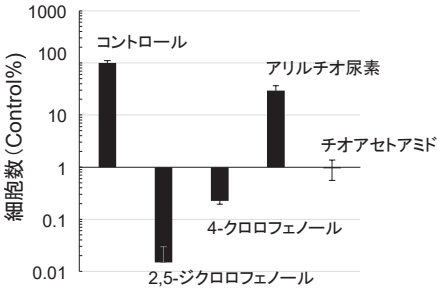


図-4　7日間硝化阻害物質を曝露した後のアンモニア酸化細菌の菌数（殺菌作用の検討）

が推察された。

本成果の現場への適用の観点で考えると、例えば下水処理場の硝化阻害実態として、「復旧まで1日～1週間程度」というヒアリング回答があり、この場合は硝化酵素阻害を引き起こす化学物質の関与の可能性が考えられる。一方、硝化活性の復活が遅い場合は、殺菌作用の影響の可能性が考えられる。このように、アンモニア酸化細菌を用いて硝化阻害物質を推定し（3. 3. 1 の成果）、作用機構も把握できることにより、硝化阻害を生じた活性汚泥に対して、化学物質の作用機構に応じて効果的な対処方法を提案できる可能性が見いだされた。

3. 3. 3　活性汚泥の菌叢解析

3. 2. 1 で硝化阻害試験に供した下水処理場の活性汚泥について、菌叢解析を行った結果を**図-5** に示す。解析の結果、約26万リード分の塩基配列情報が得られ、約1,200種類に分類することができた。そのうち、検出率が0.01%以下のリードについて、それぞれ近縁なものをまとめると、約 240 種類にまで絞ることができた。その結果、Bacteroidetes、Chloroflexi、Betaproteobacteriales が比較的多く検出され、検出率（相対的存在比）はそれぞれ25.8%、13.5%、9.7%であった。本研究で検出されたアンモニア酸化細菌（検出率0.55%）は全て *Nitrosomonas* sp. NP1 に近

縁であり、**3. 2. 1　アンモニア酸化細菌と活性汚泥を用いた硝化阻害試験の比較**で用いられた *N. europaea* とは異なる種のアンモニア酸化細菌が検出された。また、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira*.sp の検出率は 1.7%であった。このように硝化に関与する細菌の存在状況が確認されている活性汚泥を用いた硝化阻害試験と *N. europaea* を用いた硝化阻害試験において高い相関が得られたことから、*N. europaea* を用いた本手法は、必ずしも *N. europaea* と同一種が存在していない実際の処理場においても、硝化阻害を引き起こす化学物質の推定技術として利用可能であると期待される。

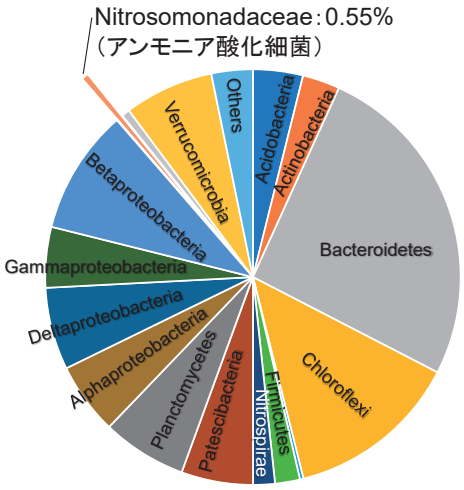


図-5　硝化阻害試験に供した下水処理場から採取した活性汚泥中の菌叢

4. まとめ

(1) 硝化阻害の実態把握

硝化阻害への対策方針の策定に資するため、阻害実態のある 7 件の下水処理場に対しヒアリング調査を実施し、主に次の知見が得られた。

1) 硝化阻害からの復旧の期間や水質目標（NH_4-N 濃度）が様々であるため、画一的な復旧対策を指針として示すことは最適でないと考えられた。また、処理場ごとの経験に基づいて復旧対応がなされているため、対策を共通化した指針よりも、対策事例を体系的に整理したマニュアルが有用と考えられた。

2) 本研究で提案する「下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システム」について、コスト次第で活用してみたいとの意見が多く、原因物質を特定し、硝化阻害物質の流入を防止することへの需要があることが示された。

なお、現場で発生している下水処理機能不全は硝化阻害だけではないことから、今後も、化学物質流入の影響について、調査研究の継続、知見の蓄積が重要である。

(2) 硝化阻害物質の阻害活性評価

アンモニア酸化細菌を用いた下水中の硝化阻害物質の探索に関する検討を行い、硝化阻害試験と菌叢解析の結果から、主に次の知見が得られた。

1) アンモニア酸化細菌を用いた硝化阻害試験から活性汚泥の硝化阻害物質の推定が可能であることを明らかにした。

2) 硝化阻害物質の影響は、酵素阻害と殺菌作用の 2 つの要因を考慮する必要があることを明らかにした。

3) アンモニア酸化細菌を用いて硝化阻害物質を推定し、作用機構も把握できることにより、硝化阻害を生じた活性汚泥に対して、化学物質の作用機構に応じて効果的な対処方法を提案できる可能性が見いだされた。

謝辞

本研究は平成 31 年度下水道応用研究（下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発）により実施した。活性汚泥試料を提供して下さった処理場に感謝の意を表する。またアンケート調査では、国土交通省水管理・国土保全局下水道部の協力の元、各地方整備局、北海道開発局、沖縄総合事務局を経由して、各都道府県下水道および各政令指定都市下水道へ調査票を配布した。アンケートにご回答頂いた自治体・事業体の方々をはじめ、ご協力頂いた皆さまに謝意を表する。

参考文献

1) 日本下水道協会、平成 28 年度版下水道統計（CD-ROM 版）、2018

2) 山崎俊正、西ヶ谷有輝、酸化還元酵素の活性測定方法、特許 WO2017126542A1、2017

3) ISO (International Organization for Standardization). (2006). ISO 9509: 2006

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：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、北村友一、對馬育夫、鈴木裕識、村田里美、小森行也、髙沢麻里

【要旨】

令和 2 年度は、下水処理水中での消毒副生成物等としての存在および公共用水域への影響可能性が懸念される化学物質として有機ハロゲン化合物類に着目し、1) 懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物（TOX）のうち全有機塩素化合物（TOCl）の分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に塩素消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*）に対する影響評価を実施した。その結果、1) 下水試料中の TOCl 測定では、試料水の速やかな冷凍ならびに迅速な解凍作業により、1-2 ヶ月程度の冷凍保存が可能であり、通水後の活性炭カラムであれば 15 日程度冷蔵保存しても測定値に影響しないことが示唆された。また、高 SS 濃度水試料の TOCl 分析前処理方法として、メタノールと $NaNO_3$（0.012mol/L）で事前洗浄をした酢酸セルロースろ紙を用いてろ過し、溶存態と懸濁態の形態別に分析する手法を見出した。2)反応時間 20 分で塩素注入率 5～20mg/L の範囲において塩素注入率と生成 TOCl 濃度、残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の間に強い正の相関がみられた。塩素注入率 15mg/L で反応時間 10～80 分の範囲では反応時間と消毒副生成物の TOCl 生成に関係性は認められなかった。下水処理水の放流先河川において、TOCl、HCHO の放流負荷量は放流先河川の 1/10～1/16 であり、希釈倍率が高い場合は、放流水の放流先河川への影響は小さかった。また、放流口から下流約 22km 区間における河川水中の TOCl 濃度、HCHO 濃度の減少はみられなかった。3) ムレミカヅキモを用いて、応急復旧段階を模した下水試料：①塩素混和池流入水（試験水①）、②塩素混和池流出水（試験水②）、③塩素混和池流出水＋チオ硫酸 Na（試験水③）に対する影響評価を行ったところ、試験水②で最も影響が強く、試験水③で影響が軽減された。この結果から、消毒後に残留塩素を中和することで、藻類への影響が改善されることが推察された。試験水②に含まれる塩素消毒副生成物として、クロロホルム、トリクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドが検出されたが、ムレミカヅキモの増殖に影響を与える濃度は検出されなかった。ムレミカヅキモに対する影響が試験水③で検出された原因として、上記以外の副生成物の影響が推察された。

キーワード：モニタリング、全有機ハロゲン、下水、形態別分析、塩素消毒副生成物、藻類、影響評価

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、分析技術を含む既往情報が充実している個別物質群に対し、環境中の挙動やそのメカニズムに関する知見を集積しつつ、それらを活用したモニタリングの高度化を試みてきた。また、公共用水域中に存在する多様な化学物質に対し、効率的かつ網羅的なモニタリング手法を検討してきた。具体的には、医薬品類を対象として、都市流域の河川水中濃度に対する下水処理水の寄与の検討[3)]、河川水中の濃度変化に影響を及ぼす環境因子としての底質への収着メカニズムの検討[4)]、水系暴露解析モデルを用いた非定常解析による流域全体における医薬品の暴露濃度の網羅的予測[5)]実施した。また、液体クロマトグラフ-四重極飛行

時間型質量分析装置 LC-QTOF-MS で取得した精密質量測定データを用いた分析方法を検討し、多成分の簡易一斉スクリーニングを行う上で重要となる測定対象物質のデータベースの構築手順や、未知物質の探索を可能とするデータ解析手順を示した[6]。

下水処理水中での消毒副生成物等としての存在および公共用水域への影響可能性が懸念される化学物質として有機ハロゲン化合物類がある。フッ素、塩素、臭素を含む多様な有機化合物であり、水環境中における各々の存在実態に関する知見は十分でない。下水道では、流入水にも含まれる可能性があり、消毒プロセスでの副生成物発生と合わせて、多様な発生源と種類が想定しうることから、個別の把握は費用労力面からも難しく、全有機ハロゲン化合物（TOX）等の包括的指標の活用した把握・評価が有効と考えられる。本年度は TOX に着目し、1) 懸濁物質を含む水試料中の TOX 分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に塩素消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモ（Raphidocelis subcapitata）に対する影響評価を実施した。

2. 懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物の分析方法の検討

2.1 背景と目的

河川水質試験方法（案）によれば、有機ハロゲン化合物は発ガン性、変異原性、肝毒性等、様々な生体影響を持った化合物群であるといわれており、全有機ハロゲン化合物（Total Organic Halide, 以下 TOX とする）を測定することは、有機化合物による水の汚染度を示す指標として重要であるとされている[7]。

PRTR 制度では、現在、人の健康や生態系に有害なおそれのある化学物質として全 462 物質が第一種指定化学物質に指定されているが、この中でハロゲンを構造内に持つ物質数は有機塩素化合物類として 82 種（全 462 種の 17.7%）、有機フッ素化合物類として 29 種（同 6.3%）、有機臭素化合物類として 18 種（同 3.9%）であり、合わせると全体数の 1/4 以上を占める。その中には、炭素とハロゲンが直接結合しているペルフルオロオクタン酸（PFOS）[8]やジウロン（除草剤の一種）[9]のように難分解性でありながら河川水中での検出報告例があるものも存在する。

以上のことを踏まえると、TOX 分析は、全てではないものの環境水中に存在する幅広い影響懸念物質群の簡易定量手法として活用できる可能性がある。しかしながら、これまでの TOX 分析では、浄水処理における消毒副生成物の発生挙動の評価を中心とした適用事例[10]がほとんどであり、懸濁物質を含む環境水の分析方法の検討事例はみられない。そこで本研究では、環境水としては夾雑物が多い下水試料を対象として、比較的懸濁物質（SS）濃度が高い水試料に適用可能な TOX 分析手法を検討した。

2.2 実験の方法

2.2.1 燃焼イオンクロマトグラフィーの適用

本研究では代表的な TOX として全有機塩素化合物（TOCl）について検討することとし、TOCl の分析は既報の燃焼イオンクロマトグラフィー手法[11]を基本として検討した。装置は自動試料燃焼装置（イオンクロマトグラフ用前処理装置、AQF2100H、日東精工アナリティック製、以下 TOX 計）を用いた。TOX 計はオートボートコントローラー、燃焼ユニット、吸収ユニットで構成され、ボートコントローラーにより燃焼ユニットに導入された試料は、アルゴンガス雰囲気下で熱分解された後、酸素と反応し、燃焼によりハロゲン化水素およびハロゲンガスを発生させる。吸収ユニットでは、発生したガスが吸収液（過酸化水素）により捕集され、ハロゲン化物イオンを含む水溶液として、イオンクロマトグラフ（IC）への導入試料となる。IC には ICS-1100（Thermo Fisher Scientific 製）を用い、塩化物イオン（Cl-）濃度を測定することで、試料中の TOCl 濃度とした。定量は絶対検量線法により行った。IC 測定における Cl-の *IDL*（装置検出下限値）は 14 µg/L、*IQL*（装置定量下限値）は 47 µg/L であった。なお、吸収ユニットで吸収液量が変動することにより生じる濃度誤差は、吸収液に予め添加したリン酸イオンの測定濃度を用いて、補正した。

2.2.2 TOX 計導入前処理の検討

液体試料の TOX 計導入前処理としては、活性炭吸着-無機ハロゲン除去法[11]がある。具体的には、水試料に対し、試料の 5%量の硝酸ナトリウム（0.2 mol/L）を添加して活性炭プリパックドカラム（TXAPPC、日東精工アナリティック製）に通水した後、硝酸ナトリウム（0.012 mol/L）を適量通水し、無機態ハロゲンを除去するものである。一方で、本手法について、

1)下水試料のように夾雑物が多い試料の保存性に関する検討事例、2)下水試料のように SS 濃度の高い試料に適した前処理方法に関する検討事例が見られない。本検討では、1)および 2)について検討実験を行い、より適切な前処理の提案を試みた。なお、予備実験として TOCl を含まないイオン交換水に 4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzene（Sigma-Aldrich 製）を 500 µg/L となるよう添加し（n=10）、前処理後に測定した時の回収率の平均値は 72.3%、変動係数は 10.8%であった。

1）TOCl 分析用下水試料の保存性の検討

試料採取から前処理を実施して測定するまでの間における TOCl 濃度の変化の有無を検証することを目的とし、水試料およびカラム通水後試料の保存性を検討した。具体的な実験条件を表-1 に示す。保存条件として、冷蔵（4℃）と冷凍（-20℃）を設定した。

冷蔵実験では、TXAPPC に通水するまでの保存期間を 0 日（採取当日）、1 日、3 日、7 日、15 日、の 5 通りとし、また、通水後のカラムをパラフィルムとアルミホイルで包んで冷蔵保存し、燃焼操作まで保存する期間を 0 日（通水当日）または 1 日、6 日、から 8 日、14 日または 15 日の 3 通りに設定した。

冷凍実験では、TXAPPC に通水するまでの保存期間を 0 日（採取当日）、14 日、28 日、56 日、84 日の 5 通りを設定した。試料は沈殿させた流入下水の上澄み（以下、消毒処理なし試料。SS 濃度 32 mg/L）および同試料に塩素消毒処理を行ったもの（以下、消毒処理後試料。SS 濃度 26mg/L）を各 100 mL 準備し、それぞれの実験に供した。なお、塩素処理では、塩素注入率を 10 mg/L、反応時間を 20 分として処理した後、残留塩素を中和するために飽和濃度に調整したチオ硫酸ナトリウム溶液を試料に加え、5 分間反応させた。燃焼後の試料が IC で測定されるまでは 3 日以内であった。

2）高 SS 濃度水試料の TOCl 分析前処理方法の検討

試料に多くの懸濁物が含まれる場合、TXAPPC に十分な量の通水ができず、試料定量下限値が悪化して低濃度までの測定ができなくなるだけでなく、適切な濃度評価ができなくなる恐れがある。また、試料をろ別し、ろ液を溶存態試料、ろ紙上の残渣を懸濁態試料として各々分析することで得られる形態別分析データは、環境中の挙動の把握や水処理の処理操作の評価において有効となる。

本検討では、ろ過後のろ紙上の残渣を懸濁態試料として燃焼イオンクロマトグラフィーに供するために

表-1 下水試料の保存性検討実験の概要

実験	試料（流入下水の沈殿上澄液）	試料量（mL）	試料保存期間（日） TXAPPC 通水まで	試料保存期間（日） TXAPPC通水後、燃焼まで
冷蔵保存（4℃）実験	消毒処理なし	100	0, 1, 3, 7, 15	0, 1, 6, 7, 8, 14, 15
	消毒処理後			

実験	試料（流入下水の沈殿上澄液）	試料量（mL）	TXAPPC通水までの試料保存期間（日）
冷凍保存（−20℃）実験	消毒処理なし	100	0, 14, 28, 56, 84
	消毒処理後		

TXAPPC: 活性炭プリパックドカラム

重要な検討項目として、ろ紙材の選定、無機ハロゲン除去操作の検討、前処理後試料の保存を含めた一連の操作における精度と確度の確認を行った。

ろ紙材の検討では、SS 濃度測定で一般的に使用されるガラス繊維ろ紙（GF/B, Φ47mm, Whatman 製）、セルロース混合エステルろ紙（MCE, Φ47mm, ADVANTEC 製）、酢酸セルロースろ紙（CA, Φ47mm, ADVANTEC 製）の 3 種に対し、ろ紙由来のコンタミネーションの有無と測定の再現性を確認した。

無機ハロゲン除去の検討では、液体（水）試料と同様に硝酸ナトリウム（0.012 mol/L）を用いることとし、ろ紙の洗浄量を 0,30,60,90,120 mL の 5 段階設定し、適切な洗浄量を検討した。また、使用するろ紙中の TOCl 除去を目的として、比較的極性の低いトルエンと比較的極性の高いメタノールによる事前洗浄操作を検討した。実験に用いた試料は、流入下水を沈殿させた上澄み液を塩素消毒処理後に NaCl を 60mg-Cl/L となるよう添加して調整し、各々50 mL ずつろ過した残渣を用いた。

最後に、SS 濃度が 224 mg/L の流入下水を用いて各 25 mL をろ過した懸濁態試料を準備し、標準添加回収試験を実施した。標準物質には 4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzene を用い、前処理実施前に 1250 µg/試料となるよう添加した試料と無添加試料を準備した。前処理ではまず、見出したろ紙を用いたろ過と洗浄方法を施した。次に、燃焼操作までの試料保存と効率的な燃焼のために試料の乾燥処理が必要であることを考慮して、上述の前処理を経た試料を凍結乾燥させてから TOX 計に供した。なお、高 SS 濃度の水試料に対する分析手法全体としての精度と確度を確認するため、ろ液についても TXAPPC 通水前の試料に同条件で標準添加を行い、測定時の回収率を算出した。また、凍結乾燥による測定への影響を確認するため、凍結乾燥前

後の懸濁態試料への標準添加回収試験も同条件で実施した。全ての試験を n=5 で実施した。

2.3 結果

2.3.1 下水試料の TOCl 分析試料の保存性の検討

水試料および通水後カラム試料の冷蔵保存実験の結果を図-1 に示す。なお、試料準備日に冷蔵保存をせずに TXAPPC に通水し、当日中に燃焼操作を終えた試料の測定データ（消毒処理なし:15.9 μg/L、消毒処理後試料: 37.0 μg/L）の測定データをそれぞれ TOCl 残存率 100%として、保存期間ごとの残存率を算出した。各冷蔵保存期間（n =6）の残存率の平均値は 112.6%（0 日後）、80.4%（1 日後）、71.0%（3 日後）、79.0%（7 日後）、79.8%（15 日後）であり、開始日～1 日後にかけて顕著な減少傾向がみられた。一方で、通水後に TXAPPC として保存したデータに着目すると、水試料としての冷蔵保存期間が 0 日、あるいは 7 日、15 日では若干のばらつきはあったものの、カラムでの保存期間による残存率への大きな影響はみられなかった。

水試料の冷凍保存実験の結果を図-2 に示す。TOCl 残存率の算出方法は上述通りである。また、本実験は n=3 で行ったが、全ての保存条件で測定値の変動係数が 10%以下（最大で 9.5%（消毒なしの 28 日冷凍保存試料））であり、同じ試料群の再現性は良好であったため、グラフには平均値をプロットした。平均残存率は、消毒処理なし試料では 67.6%（14 日後）、73.8%（28 日後）、82.7%（56 日後）、68.7%（84 日後）、消毒処理後試料では 59.9%（15 日後）、73.3%（28 日後）、80.6%（56 日後）、50.4%（84 日後）であった。実験開始日とその他の保存試料の残存率の差の要因は、冷凍試料の解凍操作等に半日程度の作業時間がかかり、TOCl 濃度に変化が生じたためであると推察された。一方で、解凍操作中の濃度減少を除けば、56 日（約 2 ヶ月）程度の保存であれば残存率への顕著な影響はないことが示唆された。

以上の結果を整理すると、試料中の TOCl 濃度をより適切に測定するためには、試料取得後速やかに TXAPPC への通水を開始することが望ましいことが示唆された。一方で、試料取得から実験室での通水作業までには 1 日程度を要することも想定されるため、水試料の速やかな冷凍ならびに迅速な解凍作業により、1-2 ヶ月程度の冷凍保存が可能となることが示された。また、通水後の TXAPPC を 15 日程度冷蔵保存しても

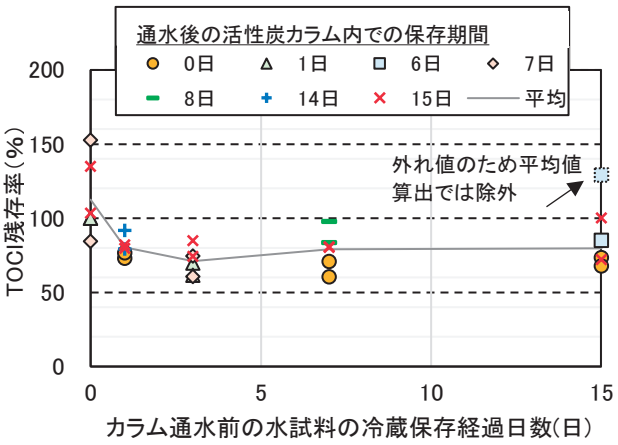


図-1 冷蔵保存試料の TOCl 残存率の推移

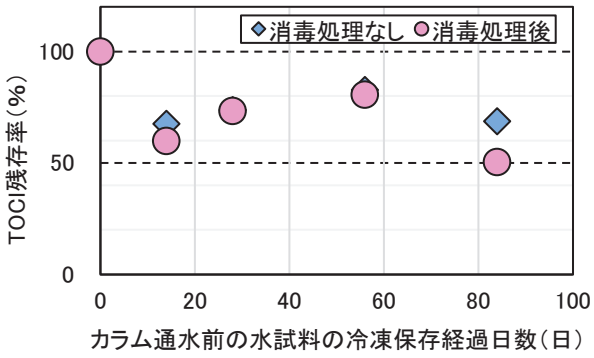


図-2 水試料の冷凍保存後の TOCl 残存率

測定値に影響しないことが示唆された。

2.3.2 懸濁態試料中の低濃度 TOCl 測定を目指したろ紙材と洗浄法の検討

SS 濃度が高い水試料中の TOCl 測定方法として適した条件を検討するために、異なるろ紙材と洗浄方法を用いてコンタミネーションの有無を確認した。その結果を図-3 に示す。まず、MCE ろ紙を検討した結果、無洗浄での吸収液（5mL 程度）の濃度が平均値（n=3）で 670 μg/L、$NaNO_3$ による洗浄後で 435 μg /L 検出された。GF/B ろ紙の場合には、$NaNO_3$ による洗浄後で 158 μg/L 検出された。これらの濃度は、装置定量下限値（*IQL*）の 47 μg/L よりも顕著に高く、ろ紙に含まれる塩素化合物によるコンタミネーションが示唆された。また、GF/B ろ紙の場合には燃焼後にも燃焼ボートにガラス塊が残留してしまう課題もあった。一方、CA ろ紙では、無洗浄の場合でも 60.0 μg/L の検出に留まり、MCE ろ紙や GF/B ろ紙と比べ、バックグラウンド濃度が大幅に改善した。また、$NaNO_3$ による洗浄後では 50.9 μg/L であった。さらにトルエン＋

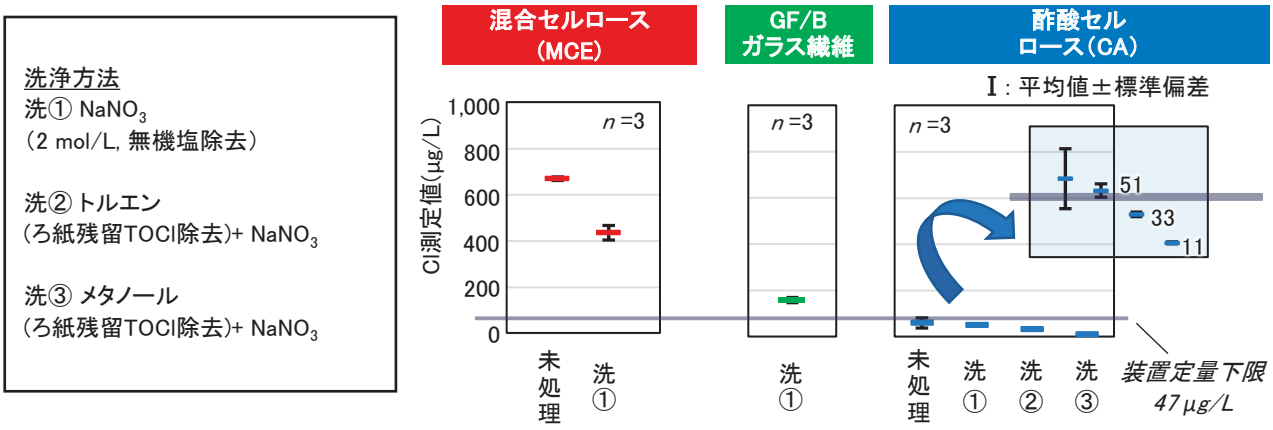


図-3 懸濁態試料中の低濃度 TOCl 測定を目指したろ紙材と洗浄法の検討

$NaNO_3$洗浄後では 32.8 μg/L、メタノール＋$NaNO_3$洗浄後では 10.9 μg/L の検出に留り、*IQL* の 47 μg/L よりも低くなった。以上より、メタノールと $NaNO_3$ による事前洗浄をした CA ろ紙を採用することで、試料中 TOCl が数 μg/L～数十 μg/L の低濃度域まで測定できる可能性が示された。

見出した洗浄方法で準備した CA ろ紙を用いて、下水試料をろ過した残渣を含むろ紙に対して無機ハロゲン除去に必要な $NaNO_3$（2.0 mol/L）洗浄液量を検討した。結果を図-4 に示す。$NaNO_3$液量が 0, 30, 60, 90, 120 mL の時の TOCl 濃度はそれぞれ、99.4, 58.3, 34.7, 31.2, 36.5 μg/L であり、60 mL 以上では大きな差はみられなかった。60 mL の洗浄液量があれば作業が非効率化せずに、十分に無機ハロゲン（無機塩素化合物）が除去されることが示唆された。

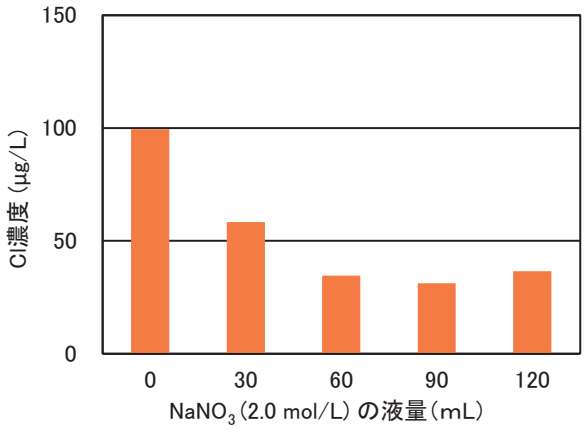


図-4 無機ハロゲン除去のための
$NaNO_3$洗浄における液量別の Cl 測定濃度

2.3.3 下水懸濁態試料への標準添加回収試験結果と凍結乾燥による TOCl 測定への影響の確認

実下水試料を用いた標準添加回収試験の結果を図-5 に示す。本研究で見出して 2.3.1 及び 2.3.2 に示した前処理方法（試料水の冷凍保存期間、通水後カラムの冷蔵保存期間、ろ紙の洗浄方法）で処理した後に凍結乾燥した上で TOX 計に供した懸濁態試料中の TOCl 標準添加回収率は 62.3%であり、その変動係数は 11.4%であった。また、溶存態試料を既往の手法で前処理し TOX 計に供した時の回収率は 62.1%であり、その変動係数は 3.4%であった。これらを比較すると、回収率の再現性は懸濁態試料でやや誤差が大きかったが、回収率自体は懸濁態と溶存態とで同様であった。一方、標準非添加試料の測定値から算出した試料中に元々含まれていた TOCl 濃度に着目すると、溶存態試料では

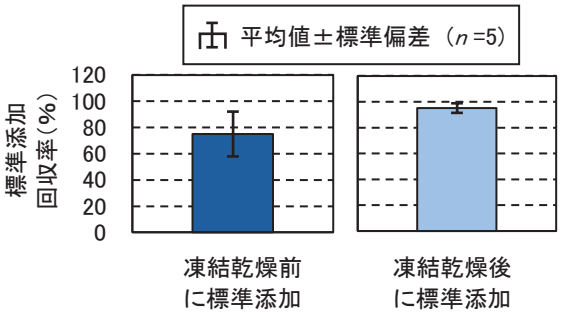


図-5 標準物質 4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzene
を用いた下水試料への添加回収試験結果と
同試料中に元々含まれていた TOCl 濃度

平均値 27.5 μg/L（濃度の変動係数 3.4%）であったのに対し、懸濁態試料では平均値 118 μg/L（濃度の変動係数 33.8%）と変動が顕著に大きかった。この要因の一つには、標準添加試料中の TOCl 濃度（25 mL 試料換算値で 8,460 μg/L)に対して、実試料中の TOCl 濃度が 2 オーダー程度低かったことが考えられた。

懸濁態試料において分析値の変動係数が比較的高かった結果を受け、前処理の後段で行う凍結乾燥処理による TOCl 測定結果への影響を検討した。結果を図-6 に示す。凍結乾燥後に標準添加した試料では、回収率は 95.4%であり、その変動係数は 3.7%であった。一方で、凍結乾燥前の添加試料では回収率は 75.0%であり、その変動係数は 22.9%であった。この結果から、凍結乾燥処理により懸濁態試料中 TOCl のロスや測定誤差を生じていることが示唆された。一方で、凍結乾燥処理を除いて試料への影響が少ない乾燥操作は現状では提案は容易ではなく、凍結乾燥操作に対する対象方策の検討が必要であることが示された。

以上の検討結果より本研究で見出した TOCl の測定手順を図-7 に示す。本手法では、50 mL の水試料を前処理した場合、TOCl の LOQ（試料定量下限値）は 4.7 µg/L となるが、現状の懸濁態分析手法では濃度が数十 µg/L 程度以下の低い下水試料の分析では測定結果が一定のバラつきを含むため、複数試料の分析による誤差の確認が重要であると考えられた。また、全有機フッ素化合物類（TOF）や、有機臭素化合物類（TOBr）についても定量可能なことを確認しており、今後の活用を検討していく。

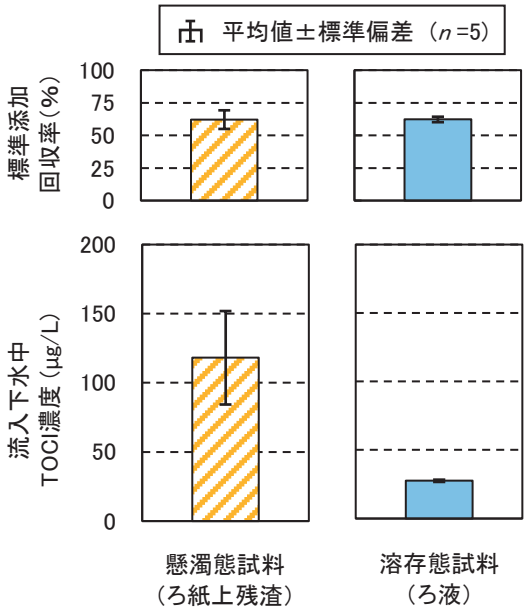


図-6 ろ紙試料の凍結乾燥処理の有無による TOCl 回収率の比較

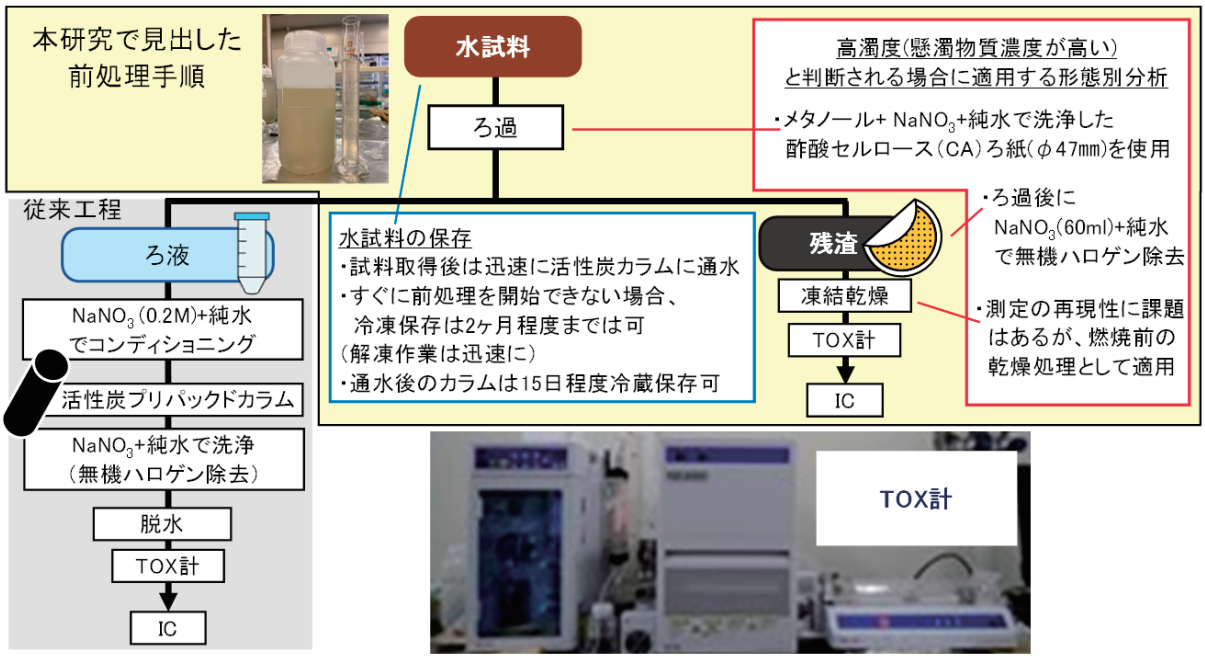


図-7 本研究で見出した TOCl の測定手順

3. 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動把握

3.1 背景と目的

下水処理場が地震、豪雨等により被災しその処理機能が喪失した場合、被災後の緊急措置として未処理下水の消毒放流が行われ、また、応急復旧段階においては沈殿や簡易生物処理を行った後、消毒放流されている。これらの消毒放流についてはこれまでの知見から衛生学的な安全を確保するために必要な主要消毒技術の一つとして塩素消毒[12]が用いられている。塩素注入率は放流水の大腸菌群数を 3,000 個/cm³以下に保ちつつ消毒塩素の放流先への影響を考慮し、残留塩素 0.1mg/L 程度が目安となっている。残留塩素が 1.0mg/L を超えた場合には、放流先の水生生物への影響懸念から還元剤による脱塩素や海水、環境水等による希釈が必要となる場合もある。また、下水処理の消毒の他、浄水処理の消毒においても用いられている塩素消毒は、有害なトリハロメタン、ニトロソアミン類、ホルムアルデヒド、全有機ハロゲン等の消毒副生成物を生成する反応を起こしうることが知られている[13)~18)]。

応急復旧段階の下水の塩素消毒は、通常の下水処理水の塩素消毒に比べ、塩素注入率が高いことから消毒副生成物の生成濃度が高くなることが予想されるが、応急復旧段階の消毒副生成物に関する調査・研究報告はみられず、その実態は不明である。また、これら消毒副生成物の放流先河川における挙動の調査報告は少なく、応急復旧段階の消毒放流を対象とした調査報告はみられない。

本研究は、応急復旧段階を模した下水を用い、消毒副生成物の生成メカニズム検討として塩素注入率と副生成物の関係、反応時間と副生成物の関係について室内実験を行った。また、消毒副生成物の放流先河川における挙動について応急復旧段階の下水処理場の放流先河川における現地調査を行った。

3.2 方法

3.2.1 消毒副生成物の生成メカニズム検討

塩素消毒における消毒副生成物の生成メカニズム検討については、塩素注入率、反応時間をパラメータとした消毒副生成物の生成実験を行った。消毒副生成物として全有機ハロゲン（TOX）、ホルムアルデヒド（HCHO）、ニトロソアミン類の N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）、N-ニトロソジエチルアミン（NDEA）を分析した。HCHO は公共用水域における水生生物保全の要監視項目でその淡水域の指針値は 1mg/L 以下とされている化学物質であり、水道水質基準の基準値が 80 μg/L 以下と設定されている。NDMA は水道水の要検討項目としてその目標値 0.1 μg/L が示されている化学物質である。

TOX の分析は、前述した 2.3.3 項に示す方法により行った。本研究は、塩素消毒副生成物の検討を主眼としていることから TOX 化合物のなかでも塩素化有機物について測定し TOCl 濃度として「μg-Cl/L」で示した。また、HCHO は、化学物質と環境 平成 27 年度化学物質分析法開発報告書[19)]の方法により、ろ過無しで分析した。NDMA、NDEA は、試料を孔径 1 μm のガラス繊維ろ紙で自然ろ過した後、ろ液を上水試験方法 -2011 年版・有機物編[20)]の方法により分析した。また、供試下水について水温、pH、ORP、SS、DOC、NH_4-N を測定した。

1）塩素注入率と副生成物生成の関係

塩素注入率と副生成物生成の関係把握は、図-8 に示す 2L のポリビンに pH 計、ORP 計をセットした実験装置を 4 組用いて行った。塩素注入率は、流入下水の消毒において大腸菌群数を 3,000 個/cm³以下にするために必要な 7～12mg/L[21),22)]を参考に 5～20mg/L とし、また、反応時間は一般的な消毒槽の接触時間が 15 分以上[22)]を標準としていることを参考に 20 分に設定した。添加する塩素は、有効遊離塩素約 1,000mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液とした。各装置に塩素注入率 5、10、15、20mg/L で塩素添加し、20 分撹拌した。残留塩素を測定した後、直ちに L-アスコルビン酸を 1g/L 加え残留塩素の中和を行った。残留塩素中和後の試料について消毒副生成物（TOCl、HCHO、NDMA、NDEA）を分析した。

実験は実処理場の流入下水を用いて 2 回行った。実験 1 回目の試料は、ピット表層水を簡易沈澱下水の模擬下水として用いた。実験 2 回目は、ピット下水を採

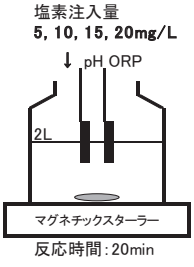


図-8 実験装置（塩素注入率の影響実験）

取し嫌気化させる目的で 3 日間室温で放置し、再混合した後 1 時間静置した上澄液を還元性簡易沈澱下水の模擬下水とした。それぞれの供試下水の水質を表-2 に示した。実験 1 回目に供した模擬簡易沈澱下水の水質は、ORP-125 mV、SS91mg/L、DOC26mg/L、NH_4-N16mg/L であった。また、実験 2 回目の供試下水は、3 日間室温放置により ORP が-225mV と還元は進行し、模擬還元性簡易沈澱下水とすることができた。

2) 反応時間と副生成物生成の関係

反応時間と副生成物の関係把握は、前述の 1）と同様に図-8 の装置を 4 組用い、それぞれの塩素注入率を 15mg/L とし塩素添加から 10、20、40、80 分経過後に各試料の残留塩素を測定した後、直ちに L-アスコルビン酸を 1g/L 加え残留塩素の中和を行った。残留塩素中和後の試料について消毒副生成物（TOX、HCHO、NDMA、NDEA）を分析した（実験①）。

また、別々の装置による実験①では、バラツキがみられたことから同一ボトルを用い所定の反応時間経過後に分析試料を採取する方式の実験②を行った（図-9 参照）。実験②では消毒副生成物は TOCl のみ分析した。実験は試料 6L、塩素注入率 15mg/L とし、塩素添加から 10 分経過後に試料約 300mL を採取し残留塩素測定後、直ちに L-アスコルビン酸を 1g/L 加え残留塩素の中和を行い TOCl 分析に供した。20 分経過後、40 分経過後、80 分経過後においても 10 分経過後同様に試料採取、残留塩素測定、残留塩素中和を行い TOCl 分析した。

供試下水の水質を表-3 に示した。実験①の試料は実処理場の流入下水を午前中に採取し、直ちに実験に供し、実験②の試料は午後採取したピット表層下水を翌日まで室温保存したものを実験に供した。

3.2.2 消毒副生成物の放流先河川における挙動

消毒副生成物の放流先河川における挙動調査は、K 浄化センターの放流先河川（A 川）において実施した。分析試料は、下水処理場の放流口と放流先河川 5 地点（放流口の上流約 0.7km、下流約 3km、約 7.5km、約 11.5km、約 22km）で採取した。採取地点において水温、pH、ORP、EC、濁度、DO、TDS、残留塩素（遊離、全）を測定した。また、採取試料は、冷蔵状態で分析所に持ち込み、一般項目（SS、DOC、T-P、NH_4-N、NO_X-N、NO_2-N）の測定と消毒副生成物（TOCl、HCHO、NDMA、NDEA）を分析した。TOCl 測定は、試料の SS 濃度が低いことから未ろ過試料をそのまま活性炭カラムに通水した。

表-2 供試下水の水質（塩素注入率の影響実験）

	水温 (℃)	pH (－)	ORP (mV)	SS (mg/L)	DOC (mg/L)	NH_4-N (mg/L)
1回目	22	7.0	-125	91	26	16
2回目	16	6.9	-225	28	39	26

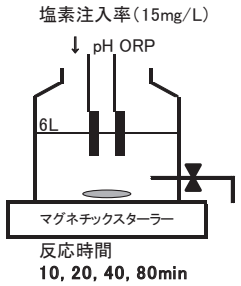


図-9 実験装置（反応時間の影響実験）

表-3 供試下水の水質（反応時間の影響実験）

	水温 (℃)	pH (－)	ORP (mV)	SS (mg/L)	DOC (mg/L)	NH_4-N (mg/L)
実験①	21	7.1	-220	165	24	17
実験②	10	7.3	-74	103	41	26

表-4 塩素消毒後の水質（塩素注入率の影響実験）

	塩素注入率 (mg/L)		残留塩素 (mg/L) Free	残留塩素 (mg/L) Total	水温 (℃)	pH (－)	ORP (mV)
1回目	5	添加20分後	0.20	0.02	22	7.1	−37
		中和後	−	−	22	4.1	64
	10	添加20分後	0.21	4.0	21	7.1	450
		中和後	−	0.00	21	4.2	74
	15	添加20分後	0.09	7.2	21	7.1	499
		中和後	−	0.00	21	4.3	67
	20	添加20分後	0.48	13	21	7.1	519
		中和後	−	0.00	21	4.3	68
2回目	5	添加20分後	0.06	0.00	17	7.1	−78
		中和後	−	−	17	4.6	−2
	10	添加20分後	0.06	1.1	16	7.0	349
		中和後	−	−	16	4.6	62
	15	添加20分後	0.12	5.0	16	7.1	430
		中和後	−	−	16	4.7	40
	20	添加20分後	0.16	11	16	7.1	450
		中和後	−	−	16	4.8	92

3.3 研究結果

3.3.1 消毒副生成物の生成メカニズム検討結果

1) 塩素注入率と副生成物生成の関係

塩素消毒後の水質を表-4 に示した。各実験とも残留塩素は、遊離残留塩素の存在は少なく、ほとんどが結合残留塩素であった。結合残留塩素としてクロラミン（モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミン）が知られているが、本研究ではクロラミンの形態につ

いては確認していない。また、いくつかの中和試料の残留塩素測定を行い、中和後に残留塩素が不検出であることを確認した。

pH は、塩素添加前後の変化はほとんど見られないが、残留塩素の中和剤として 1g/L の濃度で L-アスコルビン酸を添加した後は 4.1～4.8 と酸性を示した。また、ORP の変化から、還元状態の供試下水試料（表-2）が塩素添加後に酸化状態となっていることがわかる。還元剤としての作用をもつ L-アスコルビン酸の添加により ORP の値が少し低下しているが、残留塩素が中和されことによる。消毒副生成物の分析は、中和後の試料を用いた。

塩素無添加の TOCl 濃度、塩素注入率を 5、10、15、20mg/L で添加し反応時間 20 分とした試料の TOCl 濃度を図-10、HCHO 濃度を図-11 に示した。実験 1 回目の TOCl 測定は、孔径 1μm のミックスセルロースエステル（MCE）ろ紙、実験 2 回目は、孔径 0.8μm のセルロースアセテート（CA）ろ紙によりろ過したろ液（溶存態）とろ紙上残渣（懸濁態）に分けて行った。また、HCHO 測定は懸濁態を含む試料を PFBOA 誘導体化後、ヘキサン抽出し GC/MS により測定した。図-10 より塩素消毒により TOCl の生成がみられ、その生成濃度は、塩素注入率に比例し高くなる傾向がみられた。1 回目、2 回目の結果を比較すると、溶存態と懸濁態の比率が異なる結果となったが、懸濁態を捕捉するろ紙の孔径が 1 回目 1μm、2 回目 0.8μm と違うことが一因を考えられる。また、図-11 の HCHO については、塩素注入率との間に強い相関は認められなかった。塩素消毒の副生成物としての HCHO は、ヘキサメチレンテトラミン、トリメチルアミンの他種々の化学物質の存在下で生成することが報告[17),18)]されている。本試料においてもこれら前駆物質が一定程度含有されていたものと考えられる。

ニトロソアミン類の NDMA は、1 回目の塩素注入率 5mg/L の試料が 0.024μg/L であった他は、どの試料においても定量下限値（0.018μg/L）未満であった。また。NDEA はいずれの試料においても定量下限値（0.045μg/L）未満であった。本実験では、人健康の懸念となるレベルのニトロソアミン類の生成は認められなかった。

図-12 に塩素注入率と TOCl 生成濃度、図-13 に残留塩素と TOCl 生成濃度、図-14 に塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係を示した。懸濁態の TOCl 測定については、測定結果の再現性に課題がみられることから、

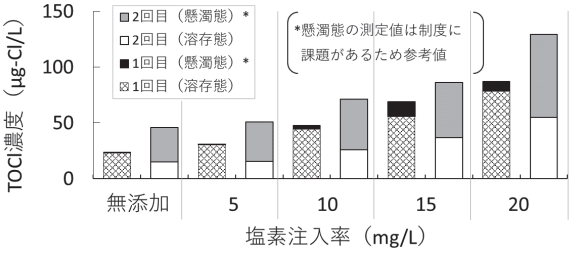


図-10 TOCl 測定結果（塩素注入率の影響実験）

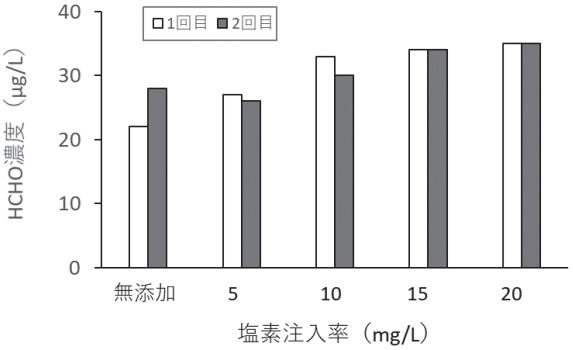


図-11 HCHO 測定結果（塩素注入率の影響実験）

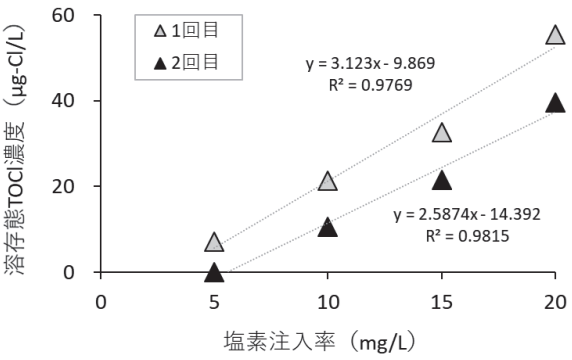


図-12 塩素注入率と生成 TOCl 濃度の関係

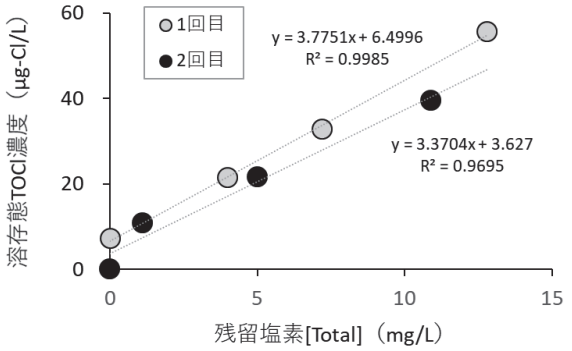


図-13 残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の関係

図-12、13、14 の塩素注入量、残留塩素、塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係については溶存態の測定デー

タを用いて図示した。縦軸の TOCl 濃度は、塩素添加後の試料の分析値から塩素無添加の値を減じた濃度とした。図-12、13 からわかるように塩素注入率と生成 TOCl 濃度、残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の間に強い正の相関がみられた。また、図-14 に示した塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係は、塩素消費量に比例し生成 TOCl 濃度が高くなる傾向は認められるが、塩素注入率、残留塩素に比べるとその相関は低い傾向であった。注入された塩素は、消毒副生成物生成に使われる他、還元性物質の酸化にも消費されることが原因と考えられる。

2) 反応時間と副生成物生成の関係

塩素消毒後の水質を表-5 に示した。残留塩素は、前述の 1）同様、遊離残留塩素の存在は少なく、ほとんどが結合残留塩素であった。実験①は、それぞれ別のボトルを用いた実験だったこともあり残留塩素濃度のバラツキがみられる。実験②は、所定時間経過後に試料採取する方式としたことから大きな変動はみられなかった。pH は、L-アスコルビン酸の添加で酸性に変化すること、ORP は、供試下水試料（表-3）の還元状態から塩素添加後に酸化状態となっていること、還元剤の L-アスコルビン酸の添加後に値が少し低下するなど、前述の 1）と同様であった。

消毒副生成物の分析結果については、実験①、実験②の TOCl 測定結果を図-15、HCHO 測定結果を図-16 に示した。バラツキが大きい結果となったが、反応時間 10 分～80 分では TOCl 濃度が大きく異なることはなかった。この結果から、TOCl 生成反応は 10 分の反応時間で既に平衡に達していると考えられる。

HCHO、NDMA、NDEA は、実験①のみ分析した。図-16 に示すとおり、HCHO は反応時間が 10 分、20 分、40 分までは反応時間が長くなるに従い高くなり、80 分の値は 40 分とほぼ同じであった。反応時間と HCHO 生成の関係の明確化には再試験による確認などデータ蓄積が望ましいと考えられた。また、NDMA は、0.020～0.027μg/L と低濃度で定量されたがバラツキが大きく反応時間との関係はみられなかった。NDEA はいずれの試料も定量下限値（0.045μg/L）未満であった。

なお、本項で得られた TOCl 濃度は、塩素消毒前が約 25μg-Cl/L、塩素消毒試料は最大約 130μg-Cl/L であった。これらの値は、山根らの調査研究[23]で報告されている流入下水の TOCl 濃度、高橋らの研究[24]で報告されている塩素消毒下水の TOCl 濃度と同レベルであった。

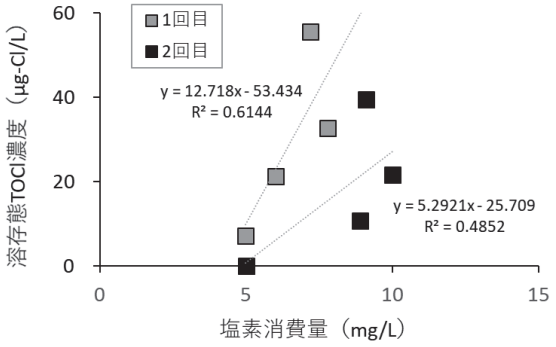


図-14 塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係

表-5 塩素消毒後の水質（反応時間の影響実験）

	反応時間（10分）		残留塩素（mg/L） Free	残留塩素（mg/L） Total	水温（℃）	pH（－）	ORP（mV）
実験①	10	添加後10分	0.26	8.7	20	7.2	429
		中和後	－	0.00	20	4.4	35
	20	添加後20分	0.19	6.3	20	7.2	443
		中和後	－	0.00	20	4.3	40
	40	添加後40分	0.24	7.3	20	7.3	480
		中和後	－	0.00	20	4.4	56
	80	添加後80分	0.19	6.3	20	7.4	487
		中和後	－	0.00	20	4.3	79
実験②	10	添加後10分	0.08	12	11	7.4	414
	20	添加後20分	0.08	11	11	7.5	416
	40	添加後40分	0.11	12	11	7.5	416
	80	添加後80分	0.07	11	11	7.6	415

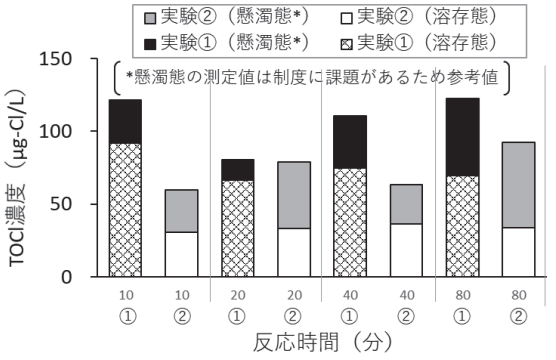


図-15 反応時間と TOCl 濃度の関係

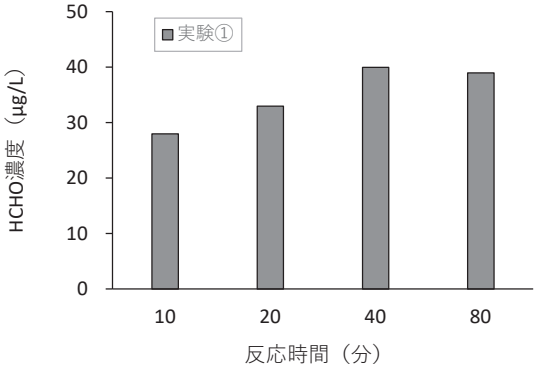


図-16 反応時間と HCHO 濃度の関係

3.3.2 消毒副生成物の放流先河川における挙動調査結果

河川調査結果一覧を表-6 に示した。放流口上流約 0.7km、下流約 3km～22km の各地点の一般水質項目（SS、DOC、T-P 等々）の数値は概ね同じ値であった。放流口で採取した放流水の水質は、SS が河川水の約 3 倍、DOC が約 10 倍、T-P が約 20 倍であったが、放流水流入前後の河川水質にほとんど変化はみられず放流水の河川水質への影響は小さかった。放流水量が放流先河川水量の約 1/180 であったことなど放流負荷量が放流先河川の負荷量に比べ小さいことによると考えられる。他の一般水質項目についても同様であった。

TOCl、HCHO 濃度変化図を図-17 に示した。消毒副生成物の TOCl 濃度は、放流先河川水濃度は 1.2～1.9μg-Cl/L、放流口で採取した放流水は 21μg-Cl/L であった。放流水の TOCl 濃度は、放流先河川の 10～17 倍であったが、水量が 1/180 であったことから、負荷量では約 1/10～1/16 であり、放流先河川への影響は小さいと考えられる。

HCHO についても放流先河川水の濃度は、2.2～5.0μg/L、放流水の濃度は 16μg/L であり、TOCl 同様に放流水の放流先河川への影響は小さい。また、ニトロソアミン類の NDMA、NDEA は、放流水及び河川のどの地点においても定量下限値（0.018μg/L、0.045μg/L）未満であった。

なお、TOCl、HCHO の調査結果から放流口から下流約 22km の区間における濃度は減少することなく概ね同じ値であったことから、これらは河川水中において保存性が高いことがわかった。HCHO については、岡本ら[25]が多摩川の中流域 11km 区間において実施した調査で減少係数は小さく、流下過程で減衰しにくい化学物質であることが報告されている。また、南山ら[26]は HCHO 添加の二次処理水を用いた水路実験を行い、約 45 分の流下時間では減衰がみられなかったと報告している。今回の調査結果は、これらの既往知見と一致していた。

TOCl、HCHO は、現時点で環境基準や排水基準における規制項目ではない。HCHO は、水生生物の保全に係る要監視項目として、環境中の指針値が淡水域で 1mg/L とされており、今回の現地調査における放流水濃度および河川水濃度、ならびに模擬排水実験における生成濃度は、いずれも指針値を大幅に下回っていた。また、TOCl には同じく水生生物の保全に係る要監視項目であるクロロホルムが含まれるが、TOX 全体としては他のトリハロメタン類も含めた極めて多様な有機塩素化合物の包括指標であり、個別物質はその一部に過ぎないため、水環境影響の評価への包括指標の活用方策も含めて、今後検討していくことが望ましいと考えられた。

表-6　河川調査結果一覧

		上流 約0.7km	放流口 (放流水)	下流 約3km	下流 約7.5km	下流 約11.5km	下流 約22km
水温	(℃)	19	22	18	17	17	17
pH	(-)	7.4	7.2	7.2	6.9	6.8	6.6
ORP	(mV)	150	360	170	140	150	190
EC	(mS/cm)	0.21	0.46	0.19	0.20	0.22	0.21
濁度	(NTU)	9	50	12	14	14	16
DO	(mg/L)	9.6	11	8.0	9.4	9.6	9.7
SS	(mg/L)	8.9	30	8.7	12	12	13
DOC	(mg/L)	1.7	22	2.0	1.6	1.7	1.8
T-P	(mg/L)	0.08	2.1	0.08	0.09	0.09	0.09
PO_4-P	(mg/L)	0.04	1.5	0.04	0.04	0.04	0.05
NH_4-N	(mg/L)	0.06	17	0.15	0.13	0.14	0.11
NO_X-N	(mg/L)	0.85	0.23	0.83	0.84	0.84	0.84
NO_2-N	(mg/L)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

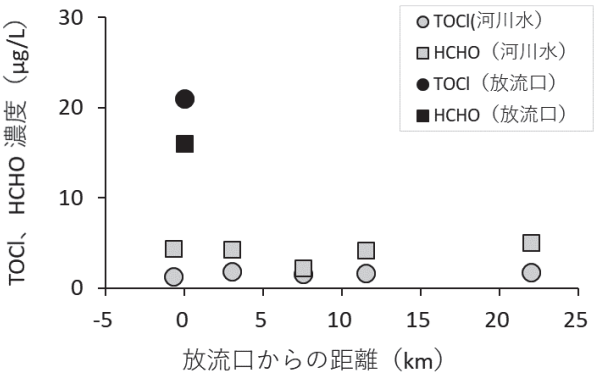


図-17　放流先河川における TOCl、HCHO 濃度

4. 応急復旧段階における下水処理水の水生生物に及ぼす影響評価

4.1 背景と目的

近年、震災や豪雨被害により下水処理施設の被災が増加しており、汚水処理機能の一次停止や復旧が長期間に及ぶ被害が報告されている。応急復旧段階では、流入下水を沈殿や簡易生物処理を行った後、消毒放流することが一般的であるが、この状態での処理水は有機物やアンモニア性窒素濃度が高く、また消毒の塩素添加量が平常時よりも多いため、消毒副生成物の生成も促進されることが考えられる[26]。一方、応急復旧下における処理水の生物影響に関する調査報告は少なく、特に消毒副生成物の影響観点から考えると、影響

を受けやすいとされる藻類を用いて評価する必要があると考えられる。そこで本研究では、応急復旧段階を模した下水を用い、ムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*）に対する影響評価を行った。

4.2 実験材料および実験方法

4.2.1 試験水の採取と調製

試験水は、2021 年 3 月 1 日、K 浄化センターからバッチ採取した。使用した試験水は、①塩素混和池流入水（試験水①）、②塩素混和池流出水（試験水②）、③塩素混和池流出水＋チオ硫酸 Na（試験水③）の 3 種である（図-18）。②の消毒用塩素には次亜塩素酸 Na が用いられていた。事前にムレミカヅキモの生育に影響がないことを確認したチオ硫酸 Na（1.1mM）を採取直後の試験水②に添加し、残留塩素を中和した水試料を試験水③とした。各サンプルは低温下で速やかに土木研究所に搬入し、試験に用いるまで 4℃冷暗所に保管した。採取された各処理水は一般水質、消毒副生成物を測定し、ムレミカヅキモの影響試験に用いた。

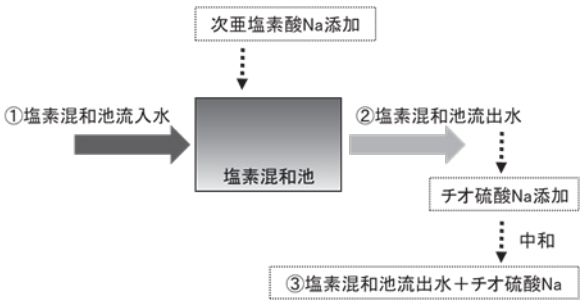


図-18　試験水採取場所の概略図

4.2.2 藻類を用いた処理水の影響試験

試験には国立研究開発法人国立環境研究所から分譲されたムレミカヅキモ（*R. subcapitata*; NIES-35 株）を用いた。保存飼育時は AAP 培地を用いてフラスコで培養し、25℃、3000 lx（白色蛍光灯下）で明期 16h/暗期 8h で培養を行い、1 週間おきに継代培養を行った。

本試験は OECD201 を基に、96 穴平底プレートを用いて検討を行った[27)]。超純水を用いて各処理水を 0（Control）、1、5、10、20、40%濃度となるよう希釈調製し、10 倍濃度の AAP 培地を最終濃度 1 倍量になるよう添加して試験溶液を作製した。フィルター滅菌した各試験溶液と前培養したムレミカヅキモ（最終濃度 $1x10^4$ cells/ml）を全量 200 μL になるよう 96 穴平底プレートに添加し、1 週間静置培養を行った。培養条件は 25℃、4,000 lx で連続照射とした。藻類の増殖はクロロフィル a を指標とし、そこから比増殖速度を算出した。クロロフィル a はプレートリーダー（SoftMax® Pro、モレキュラーデバイスジャパン）を用いて、励起 435/ 蛍光 685nm を測定した。試験は各濃度 6 連で行った。

4.2.3 一般水質項目の測定

試験水①と②は、水温、pH、ORP、EC、DO、残留塩素（全塩素、遊離塩素）、SS、DOC、NH_4-N、NO_X-N、NO_2-N を測定した。残留塩素は、採水翌日にも全サンプルにおいて測定を行った。

4.2.4 TOX と消毒副生成物の測定

試験水①と②について、TOX と消毒副生成物を測定した。消毒副生成物は、揮発性有機化合物（クロロフォルム、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、ブロモホルム、ブロモクロロメタン、ジブロモメタン、トリクロロブロモメタン、テトラブロモメタン、クロロピクリン）、ハロアセトニトリル（ジクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、ブロモアセトニトリル、ジブロモアセトニトリル）、抱水クロラール、ハロ酢酸（クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸）、アルデヒド（ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、イソブチルアルデヒド、イソバレルアルデヒド）を測定した。

TOX の測定は、前述した 2.3.3 項に示す方法により行い、水中に含まれる塩素の有機ハロゲン化合物の総量を TOCl として示した。

揮発性有機化合物、ハロアセトニトリル、抱水クロラール、ハロ酢酸測定用の試験水には、採取直後にアスコルビン酸ナトリウム（最終濃度 1 g/L）を添加し、アルデヒド測定用の試験水には、採取後に 0.1mL チオ硫酸ナトリウム（0.3w/v%）を添加した。揮発性有機化合物の測定は、パージ・トラップガスクロマトグラフ質量分析法を用いた。ハロアセトニトリルと抱水クロラールの測定は、溶媒抽出ガスクロマトグラフ-質量分析法を用いた。ハロ酢酸の測定では、溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法を用いた。またアルデヒドの測定には、溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ-質量分析法を用いた。

4.2.5 有機化学物質の精密質量分析

試験水①、②、③について、髙沢ら [28] の方法で固相抽出を行った。無添加の超純水をコントロール試料とした。前処理した各試料を液体クロマトグラフ―精密質量分析装置で測定し [28]、各試料から検出された全スペクトル（m/z）を抽出した。抽出したスペクトルは、**解析（A）**と**解析（B）**で検討を行った。

解析（A）：抽出した全スペクトルのうち、コントロール試料におけるスペクトル強度が低く（<100）、かつ試験水①～③では高い（>1000）スペクトルのみをカウントした。

解析（B）：試料①で検出されたスペクトル強度に対し、試験水②および③においてスペクトル強度が 10 倍以上または以下のものをカウントした。

4.3 結果と考察

4.3.1 使用した処理水の水質の特徴

試験水①と②の一般水質を表-7に示す。試験水②でDOC の増加が見られたが、他の一般水質項目では試験水①と②で大きな差は見られなかった。応急復旧段階の下水であるため、いずれも NH_4-N 濃度が高く、試験水①で 23 mg/L、試験水②で 26 mg/L が検出された。また塩素消毒を行った試験水②では残留塩素が確認され、遊離塩素 0.25 mg/L、全塩素 1.55 mg/L が検出された。

4.3.2 ムレミカヅキモに対する処理水の影響評価

採水翌日にそれぞれの試験水を用いて、ムレミカヅキモの影響評価を行った。始めに、各試験水の残留塩素の測定を行った（表-8）。全ての試験水で遊離塩素はほとんど検出されず、全塩素は試験水②のみ 0.15mg/L 検出されたが、前日の測定値の約 10%であった。次に各試験水がムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した（図-19）。試験水①では処理水濃度 40%でもムレミカヅキモに対する影響は見られなかった。試験水②における阻害率は処理水濃度 40%で 61.9%、処理水濃度 20%で 12.3%を示した。この結果は、消毒を目的として添加された塩素または消毒副生成物が試験水中に残存し、ムレミカヅキモの増殖に影響を与えたことが推察される。一方、試験水③における阻害率は処理水濃度 40%で 40.2%であり、処理水濃度 20%では影響が見られなかった。試験水②と比べて試験水③の増殖阻害の影響が改善されたことから、残留塩素がチオ硫酸 Na により中和され、ムレ

表-7 試験水①と②の一般水質項目

試料名		試験水①	試験水②
採水時間		13:45	13:25
水温（℃）		16.3	17.4
pH（-）		7.85	7.74
ORP（mV）		-19.2	-20
EC（mS/cm）		469	500
DO（mg/L）		6.8	7.5
残留塩素（mg/L）	遊離塩素	―	0.25
	全塩素	―	1.55
SS（mg/L）		42	46
DOC（mg/L）		14	27
NH_4-N（mg/L）		23	26
NO_X-N（mg/L）		1.12	0.59
NO_2-N（mg/L）		0.45	0.23

表-8 各試験水で検出された残留塩素

サンプル	遊離塩素(mg/L)	全塩素(mg/L)
試験水①	0.03	0.04
試験水②	0.03	0.15
試験水③	0.02	0.00

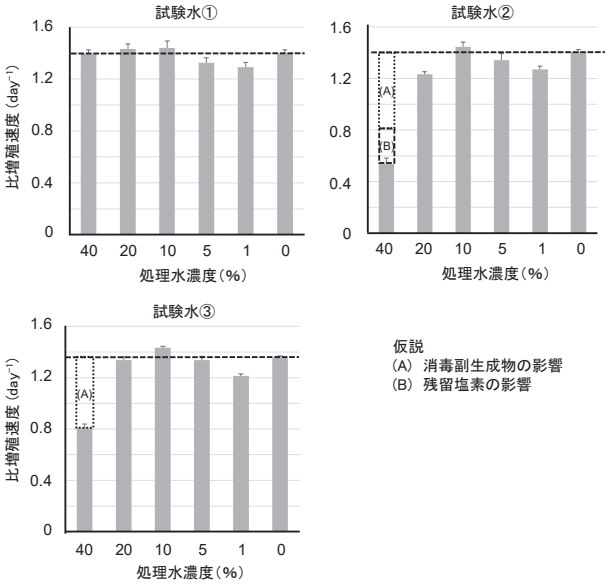


図-19　各水試料がムレミカヅキモの生育速度に及ぼす影響

ミカヅキモに対する影響が軽減されたことが推察される。本研究では、残留塩素としてのクロラミン類（モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミン）の測定は行わなかったが、試験水②で検出された全塩素（0.15 mg/L）の一部はモノクロラミンであることが考えられる。ムレミカヅキモに対するモノクロラミンの影響は 0.018 mg/L（EC_{50}）であることが報告されており [29]、ここから、試験水②に含まれるモノクロラミンがムレミカヅキモに影響を与える可能性が推察された。一方、塩素中和後の試験水③において、試験水濃度 40%でも影響が完全に軽減されなかった理由としては、何らかの消毒副生成物が残留することが推察された。

4.3.3 消毒副生成物の検出状況と影響検討

高濃度の有機物が含まれる流入水を塩素消毒した場合、塩素と有機物が反応し、消毒副生成物が生成されることが推察される。そこで試験水①と②の消毒副生成物について検討を行った。TOX 計を用いた溶存態 TOCl の測定では、試験水①で 26.9 μg-Cl/L、試験水②で 30.7 μg-Cl/L を示した。揮発性有機化合物、ハロアセトニトリル、抱水クロラール、ハロ酢酸の測定において、試験水①より試験水②で多く検出された消毒副生成物は、22 化学物質中、クロロホルム、トリクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのみであり、最も検出濃度が高いアセトアルデヒドは、試験水②で 0.03 mg/L であった（表-9）。これらの化学物質が藻類に及ぼす影響は、クロロホルム： 437 mg/L（EC_{50}、*Skeletonema costatum*）[30]、トリクロロ酢酸：3 mg/L（無影響濃度 NOEC、*Pseudokirchneriella subcapitata*）[31]、ホルムアルデヒド：0.1 mg/L＞（NOEC、*Phyllospora comosa*）[32]、アセトアルデヒド：236.6 mg/L（5 日間半数生存濃度 TLm、*Nitzschia linearis*）[33] であることが、報告されている。今回検出された濃度はこれらの既往報告の値より大幅に低いことから、今回検出された消毒副生成物はムレミカヅキモの生育に影響を与える可能性が低いことが推察された。

4.3.4 下水消毒で生成される副生成物の検討

試験水①ではムレミカヅキモに対して影響は見られなかったが、試験水②、③では影響が確認された。しかし、今回測定した TOCl や表-9 に示す物質の影響とは考えられず、下水の消毒過程において、表-9 以外の副生成物を生じることが要因の一つとして考えられる。そこで原因物質同定のための初期解析として、液体クロマトグラフ―精密質量分析装置を用いて、検出された質量スペクトルの整理を行った。試験水②と③でのみ共通して検出された質量スペクトルはポジティブモード（Posi）では 7,287 種、ネガティブモード（Nega）では 2,089 種であった（図-20）。その中で、試験水①に比べ試験水②と③でスペクトル強度が 10 倍以上・以下を示す質量スペクトルは Posi では 1,258 種、Nega では 842 種検出された。これらの結果から、下水の消毒過程で、様々な副生成物が生成している可能性が推察された。今回の結果では、藻類に影響する化学物質の特定は行っていないが、今後下水中の消毒副生成物の影響を考える上で、さらに知見の蓄積が必要であると考えられる。

表-9 試験水①と②で検出された消毒副生成物

(mg/L)

	化学物質	①塩素混和池流入水	②塩素混和池流出水
揮発性有機化合物	クロロホルム	0.0013	**0.0033**
	ブロモジクロロメタン	0.0002	0.0002
	ジブロモクロロメタン	0.0001	0.0001
	ブロモホルム	<0.0001	<0.0001
	ブロモクロロメタン	<0.0001	<0.0001
	ジブロモメタン	<0.0001	<0.0001
	トリクロロブロモメタン	<0.0001	<0.0001
	テトラブロモメタン	<0.0001	<0.0001
	クロロピクリン	<0.0001	<0.0001
ハロアセトニトリル 抱水クロラール	ジクロロアセトニトリル	<0.001	<0.001
	トリクロロアセトニトリル	<0.001	<0.001
	ブロモアセトニトリル	<0.001	<0.001
	ジブロモアセトニトリル	<0.001	<0.001
	抱水クロラール	<0.001	<0.001
ハロ酢酸	クロロ酢酸	<0.002	<0.002
	ジクロロ酢酸	<0.002	<0.002
	トリクロロ酢酸	<0.001	**0.003**
アルデヒド	ホルムアルデヒド	<0.001	**0.006**
	アセトアルデヒド	0.01	**0.03**
	プロピオンアルデヒド	<0.02	<0.02
	イソブチルアルデヒド	<0.01	<0.01
	イソバレルアルデヒド	<0.004	<0.004

5. まとめ

本研究では、有機ハロゲン化合物類に着目し、1)

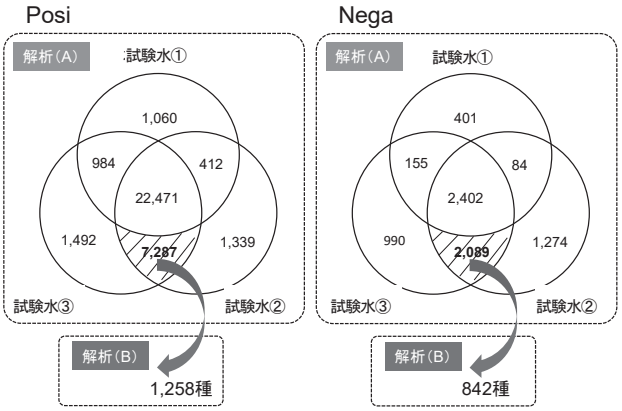


図-20　液体クロマトグラフー精密質量分析装置を用いた、各水試料中の副生成物の検討

懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモに対する影響評価を実施した。得られた主な知見を以下に示す。

1) TOCl 分析用下水試料の保存性を検討した結果、

- 下水試料中の TOCl 濃度の適切な測定には、試料取得後速やかに活性炭カラムへの通水を開始することが望ましいが、試料水の速やかな冷凍ならびに迅速な解凍作業により、1-2 ヶ月程度の冷凍保存が可能となることが示された。また、通水後の活性炭カラムを 15 日程度冷蔵保存しても測定値に影響しないことが示唆された。

高 SS 濃度水試料の TOCl 分析前処理方法を検討し、

- メタノールと $NaNO_3$（0.012 mol/L）による事前洗浄をした酢酸セルロースろ紙を採用して下水試料をろ過し、残渣を $NaNO_3$（2 mol/L）洗浄することで無機ハロゲンを除去する手法を見出した。
- 本研究で見出した高 SS 濃度水試料の溶存態と懸濁態の形態別分析手法では、両形態の回収率は概ね良好であったものの、懸濁態 TOCl 分析においては、濃度が数十 μg/L 程度の低い下水試料の分析では測定結果が一定のバラつきを含むため、複数試料の分析による誤差の確認が重要であると考えられた。

2) 模擬簡易沈澱下水を用いた消毒副生成物の生成メカニズム検討実験から、

- 反応時間 20 分で塩素注入率 5～20mg/L の範囲において塩素注入率と生成 TOCl 濃度、残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の間に強い正の相関がみられた。
- 塩素注入率 15mg/L で反応時間 10～80 分の範囲において TOCl 濃度に大きな違いはなく反応時間と消毒副生成物の TOCl 生成に関係性は認められなかった。

消毒副生成物の放流先河川における挙動調査から、

- 放流口から下流約 22km 区間における消毒副生成物の挙動調査において河川水中の TOCl 濃度、HCHO 濃度の減少はみられず、これらは河川水中において保存性が高いことがわかった。また、TOCl、HCHO の放流負荷量は放流先河川の 1/10～1/16 であり、放流先河川との流量比により希釈倍率が高い場合は、放流水の放流先河川への影響は小さかった。

3) 応急復旧段階を模した下水を用いたムレミカヅキモに対する影響評価から、

- ムレミカヅキモを用いて、①塩素混和池流入水（試験水①）、②塩素混和池流出水（試験水②）、③塩素混和池流出水＋チオ硫酸 Na（試験水③）に対する影響評価を行ったところ、試験水②で最も影響が強く、試験水③で影響が軽減された。この結果から、消毒後に残留塩素を中和することで、藻類への影響が改善されることが推察された。
- 試験水②に含まれる消毒副生成物として、クロロホルム、トリクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドが検出されたが、ムレミカヅキモの増殖に影響を与える濃度は検出されなかった。
- ムレミカヅキモに対する影響が試験水③で検出された原因として、上記以外の副生成物の影響が推察された。

参考文献

1)　土木研究所平成 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、2016

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講演集、p.165、2017

3)　土木研究所平成 28 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.4-7、

2017

4) 土木研究所平成 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、2018

5) 土木研究所平成 30 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.4-10、2019

6) 土木研究所令和元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.5-14、2020

7) 田中周平、藤井滋穂、野添宗裕、木村功二.：世界 10 カ国 21 都市の水環境における PFOS・PFOA 汚染の現況、水環境学会誌、31(11)、pp.665-670、2008

8) 佐久川弘、田原康作、青木一兼、荒井直朋、中谷暢丈、竹田一彦： 広島県河川水中における除草剤ジウロンの濃度, 分解速度, 半減期, 分解産物に関する研究、地球化学、44(1)、pp.1-15、2010

9) Echigo, S, Itoh, S, Natsui, T, Araki, T, Ando, R.: Contribution of brominated organic disinfection by-products to the mutagenicity of drinking water. *Water Sci. Technol.*, 50(5), pp. 321−328, 2004

10) 国土交通省水質連絡会: 河川水質試験方法、2009 https://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html (令和 3 年 6 月 1 日確認)

11) 鈴木裕識：全有機ハロゲン分析手法を用いた未知の有機フッ素化合物類の汚染分布調査、 平成 28 年度水質保全研究助成、成果報告書 No.8、2017

12) 国土交通省国土技術政策総合研究所：災害時における下水の排除・処理に関する考え方（案）、pp.43-51、2012

13) 竹田茂、浅野寛子、岩堀恵祐：生活排水の塩素処理副生成物生成能の高度処理による低減効果、水環境学会誌、23(3)、pp.155-160、2000

14) 伏見絵里、深澤達矢、工藤憲三、清水達雄：下水処理水における塩素消毒副生成物の生成、第 9 回衛生工学シンポジウム論文集、pp.245-249、2001

15) 伊藤禎彦：消毒副生成物に関する国内外の研究動向、水環境学会誌、31(9)、pp.8-13、2008

16) 尹水鐵、中田典秀、山下尚之、田中宏明：下水処理場における *N*-ニトロソアミン類及びそれらの生成能の挙動、土木学会論文集 G（環境）、68(7)、pp.351-358、2012

17) 小林憲弘、杉本直樹、久保田領志、野本雅彦、五十嵐良明：ホルムアルデヒド水質汚染の原因物質の特定に至る経緯と水道水中の未規制物質の管理における今後の課題、日本リスク研究学会誌、23(2)、pp.65-70 、2013

18) 浅見真理：水道水質リスク管理に関する日本の検討状況および海外の事例、第 59 回日本水環境学会セミナー講演資料集、pp.9-19、2014

19) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：平成 27 年度 化学物質分析法開発調査報告書、化学物質と環境、平成 28 年 10 月、https://www.nies.go.jp/kisplus/images/bunseki/pdfs/kurohon/2015/adoc2015_v2.pdf （令和 3 年 2 月 10 日確認）

20) 公益社団法人日本水道協会：上水試験方法-2011 年版・Ⅳ有機物編、pp.212-216 、2011

21) 公益社団法人日本下水道協会：下水道維持管理指針（実務編）-2014 年版-、pp.662-672、2014

22) 公益社団法人日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 後編-2019 年版-、pp.234-243 、2019

23) 山根昭、横川佳重、木町元康、平野裕司：下水道施設における微量化学物質に関する現況と対策についての調査研究、1997 年度下水道新技術研究所年報（1/2 巻）、pp.105-110 、1998

24) 高橋正宏、鈴木穣：塩素消毒技術の高度化に関する研究、平成 7 年度下水道関係調査研究年次報告書集、建設省土木研究所、pp.53-58 、1996

25) 岡本誠一郎、小森行也、北村友一、真野浩行：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、平成 27 年度下水道関係調査年次報告書集（土木研究所資料第 4347 号）、pp.194-206、2017

26) 南山瑞彦、小森行也：消毒副生成物の水環境中での挙動とその影響に関する研究、平成 28 年度下水道関係調査年次報告書集（土木研究所資料第 4370 号）、pp.118-121、2018

27) Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006

28) 髙沢麻里、鈴木裕識、小森行也、對馬育夫、山下洋正、小口正弘：液体クロマトグラフ―精密質量分析計を用いた PRTR 物質の簡易スクリーニング手法の構築と下水試料への適用、環境科学誌、33、pp.114-125、2020

29) 金俊：生物応答試験を用いた下水道放流水の生態影響の評価、富山県立大学大学院博士論文、pp.36-38、

2019
30) 環境省：クロロホルム、Ⅱ）化学物質の環境リスク初期評価（13 物質）の結果、2003、https://www.env.go.jp/chemi/report/h15-01/pdf/chap01/02-2/07.pdf
31) 環境省：［2］トリクロロ酢酸、http://www.env.go.jp/chemi/report/y052-[24]/1_2_3_02%20Trichloroacetic%20acid.pdf
32) 環境省：［37］ホルムアルデヒド、化学物質の環境リスク初期評価（平成 9～12 年度）結果[39 物質]、https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/37.pdf
33) 環境省：[2］アセトアルデヒド、化学物質の環境リスク初期評価（平成 9～12 年度）結果[39 物質]、https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/02.pdf

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：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、北村友一、對馬育夫、鈴木裕識、小森行也、厚朴大祐、髙沢麻里

【要旨】
令和 2 年度は、令和元年度の調査に使用した流動型担体処理実験装置の担体流動用曝気を機械攪拌に変更し、風量削減を行った条件での NH_4-N 並びに医薬品 4 物質（アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン）の除去性能を調査した。その結果、担体の流動機能を機械攪拌に変更した場合でも、NH_4-N の除去率は 92%が得られ、このときのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン平均除去率は、令和元年度と同等の 15%、13%、51%、75%となった。活性汚泥処理の後段に流動型担体処理を追加することにより、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの下水処理工程での除去率を 36%、51%、59%、96%程度まで向上できることがわかった。

キーワード：下水処理水、医薬品、アンモニア性窒素、微生物保持担体

1. はじめに

アンモニアの水生生物への影響が報告されており [1]、今後、水生生物の保全の観点からアンモニア性窒素（以下、NH_4-N とする）の濃度の低減について議論される可能性がある。濃度の目標値が低く設定された場合に対応するため、特に、硝化の促進運転が難しい下水処理方式に対応可能な NH_4-N の低減法を検討しておく必要がある。NH_4-N の他にも、下水放流水中に含まれる医薬品についても水生生物への影響が懸念されており、環境省では医薬品の有害性についての検討が行われている。医薬品の中で抗生物質であるクラリスロマイシンの予測無影響濃度(PNEC)が 69 ng/L という低濃度となることが報告 [2] され、下水処理水からこれを上回る濃度で検出される場合 [3][4][5] もあることが明らかとなってきた。そこで、下水処理水放流先の水生生物保全のため、下水処理過程での NH_4-N と医薬品の双方に対応した低減法の開発を進めている。

硝化時は一部の医薬品の除去率が向上するとの報告もあり [6]、NH_4-N の除去と医薬品の低減が同時に進行できれば有効な処理法となる。令和元年度は流動型担体処理での NH_4-N と医薬品の除去効果を調査した。その結果、流動型担体法では NH_4-N を 1mg/L まで低減するのに 3 時間程度の HRT が必要であることがわかった。令和 2 年度は、流動型担体実験装置の担体流動用曝気を機械攪拌に変更し、風量削減を行った条件での、NH_4-N と医薬品の同時除去効果を調査した。

2. 実験方法

本実験で用いた流動型担体処理装置の概要を図-1 に、外観を写真-1 に示した。表-1 は運転条件である。容量 60 L のステンレス製反応槽を 2 つ連結し，各反応槽にポリプロピレン製中空円筒状担体（4 mm^{OD}×3 mm^{ID}×5 mm^{L}）を嵩比率 35%で充填した。各反応槽には、攪拌装置を設置し、充填した担体が軽く流動する程度の回転数（80 rpm）に設定した。原水は、実流入下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、下水二次処理水中に NH_4-N を残留させたものである。本実験では、NH_4-N 濃度のオンラインモニタリングと NH_4-N 負荷変動に応じた曝気量制御運転のために、アンモニアセンサーを下水二次処理水貯留槽および各担体処理槽に設置した。また、DO モニタリング用にオンライン DO

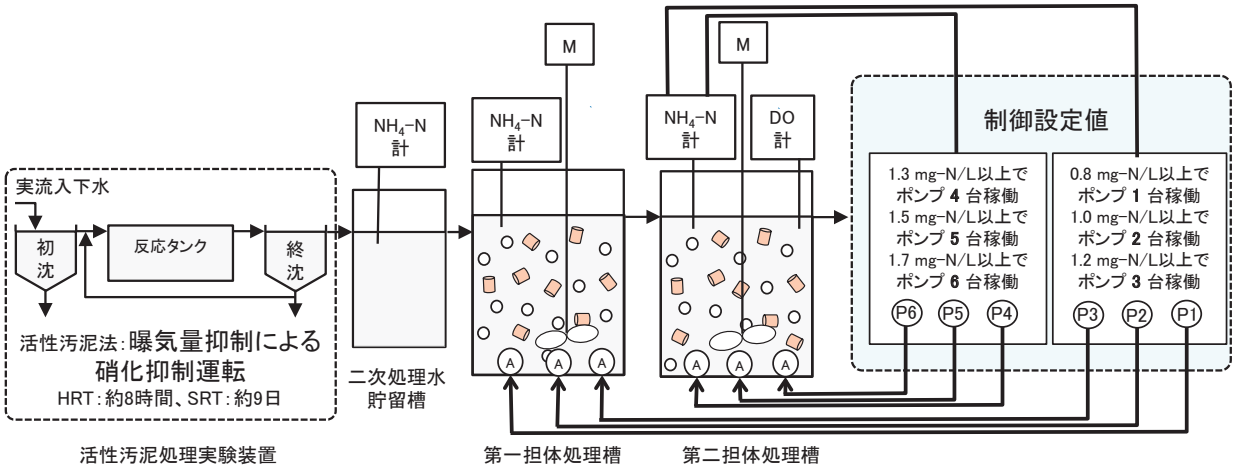


図-1 活性汚泥処理装置と流動型担体処理実験装置（機械攪拌）の概要

表-1　微生物保持担体の処理条件

HRT（2槽当たり）	実験期間	二次処理水流量（L/分）	第一担体槽曝気量（L/分）※			第二担体槽曝気量（L/分）※		
			ポンプ1	ポンプ2	ポンプ3	ポンプ4	ポンプ5	ポンプ6
180分	2020年10月9日 ～2021年2月10日	0.61	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

※曝気量は第二担体処理槽のNH_4-N濃度に応じた制御

センサーを第二担体処理槽に設置した。曝気量制御方法はフィードバック方式で図-1 中に記載した。

分析対象とした医薬品は、PNEC が低く[2)5)]、下水処理水中に残存すると考えられる[3)4)5)]アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンである。原水と担体処理槽流出水をスポット採水し、医薬品の分析を行った。測定頻度は実験期間中、週一回とし、採水回数は 17 回となった。医薬品測定の前処理は、遠心分離（3500 rpm、5 分）のみとし、その上澄水を分析試料とした。分析法は、LC/MS（Waters 製 Xevo G2-XS）による MS^E モードでの同位体希釈法である。分析試料はメタノールで 1 : 1 に希釈したものを 60 μL 分析装置に注入した。医薬品の他に、担体処理時の NH_4-N と有機物の除去能を確認するため、NH_4-N、NO_{2+3}-N、NO_2-N を自動流れ分析（ビーエルテック製 QuAAtro2-HR）で、DOC を全有機炭素計（島津製作所 TOC-5000）で測定した。



写真-1 流動型担体処理実験装置の概要

3. 結果と考察

3.1 機械攪拌を設置した流動型担体処理による NH_4-N の除去

実験期間中、第二担体処理槽水中のアンモニアセンサーの値は 1.3 mg-N/L 程度で安定していた。図-2 に原水と担体処理水の NH_4-N、NO_3-N、NO_2-N の濃度を、図-3 に NH_4-N 除去率を示す。二次処理水の NH_4-N 濃度は約 16.5 mg/L で、機械攪拌方式での除去率は、令和元年度の曝気攪拌と同等の 92%が得られた。図-4 は担体処理水中の DOC 濃度で約 5 mg/L が残存していた。DOC 除去率の平均値は 8.7%であり、令和元年度同様に DOC の顕著な低減は見られなかった。図-5 は第二担体処理槽の DO 濃度である。DO 濃度は令和元年度の曝気攪拌では 2.3 mg/L であったが、機械攪拌方式では 1.2 mg/L と低めの値となった。

3.2 機械攪拌を設置した流動型担体処理による医薬品の除去効果

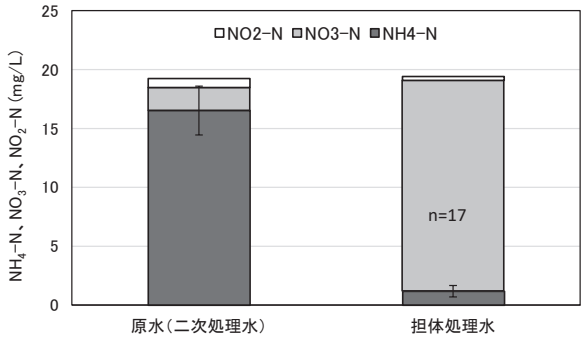


図-2　原水と担体処理水（機械攪拌）の NH_4-N、NO_3-N、NO_2-N 濃度

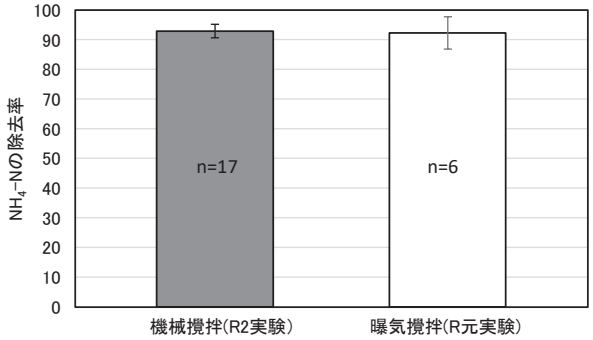


図-3　機械と曝気攪拌方式での NH_4-N の除去率

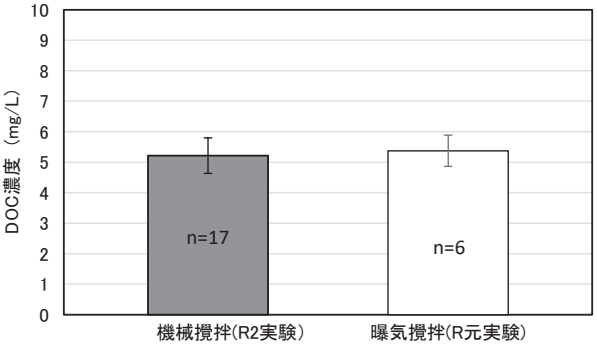


図-4　機械と曝気攪拌方式での処理中 DOC 濃度

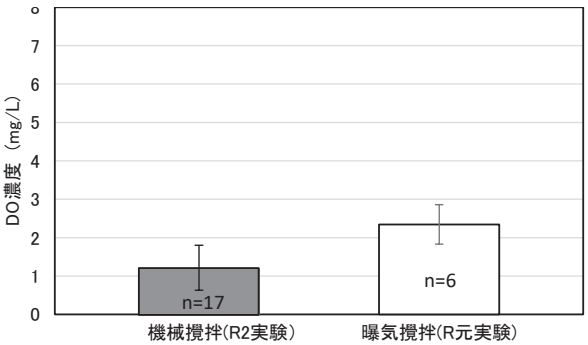


図-5　機械と曝気攪拌方式での第二担体処理槽の DO 濃度

図-6 に令和 2 年度の実験原水と担体処理水中の各医薬品の平均濃度、図-7 に各医薬品の除去率を示した。図-7 には令和元年度の曝気攪拌方式による流動型担体法での医薬品の除去率も掲載した。

原水中のアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン濃度の平均値は、約 0.34、0.24、1.37、0.45 μg/L、処理水では約 0.27、

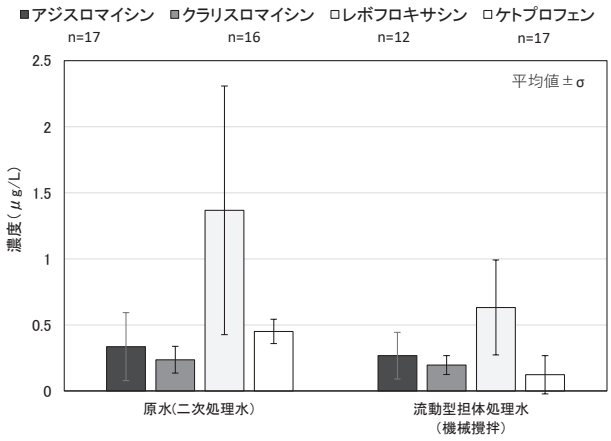


図-6 原水と担体処理水中の医薬品濃度

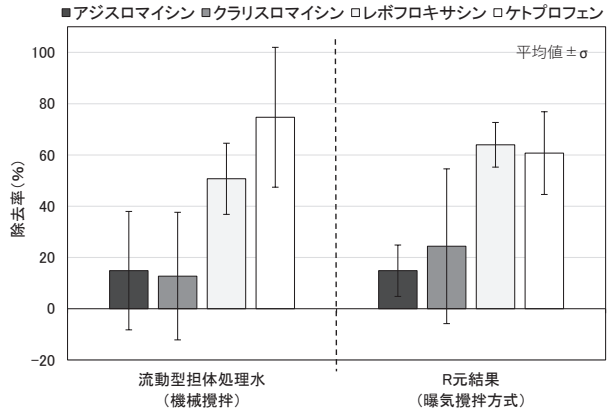


図-7 機械攪拌と曝気攪拌方式での医薬品の除去率

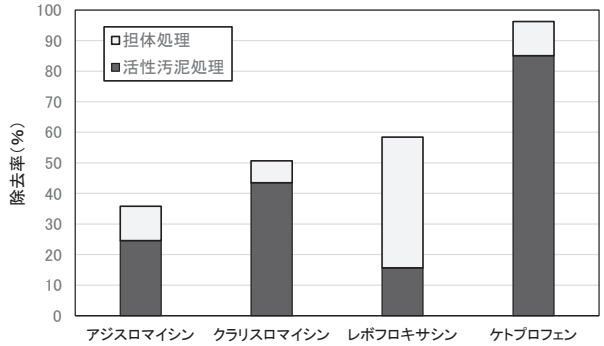


図-8 活性汚泥処理（硝化抑制）の後段に担体処理を追加した時の全処理工程での除去率

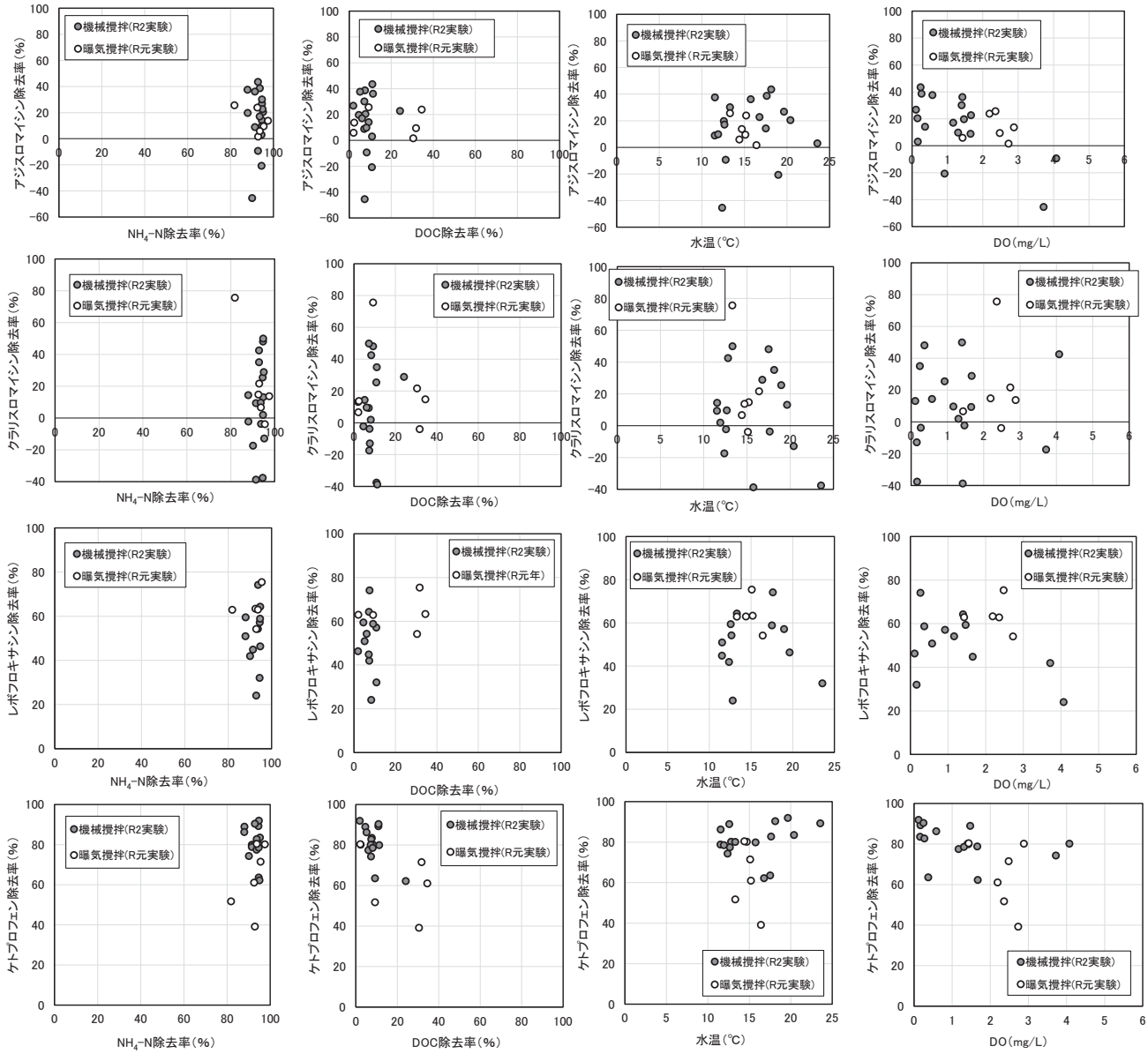


図-9 流動型担体処理での NH_4-N 除去率、DOC 除去率、第二担体処理槽水温と DO と各医薬品の除去率の関係

0.20、0.63、0.12 μg/L となった。毎回の採水から得られた除去率を平均すると 15%、13%、51%、75%となった。

令和 2 年度の曝気攪拌方式の流動型担体でのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン平均除去率は、15%、24%、64%、61%であったが、機械攪拌方式でも同等の除去率を得ることができた。機械攪拌方式では第二担体処理槽で DO の低下が見られたが、医薬品の除去率への悪影響を生じないことがわかった。

図-8 に担体処理の前段で硝化抑制運転をしていた活性汚泥処理と機械攪拌方式での流動型担体処理でのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの除去率を積み重ねて示した。活性汚泥処理での各医薬品の除去率は 25%、44%、16%、85%であった（濃度測定は 1 回（2021/3/2 24 時間連続採水）のみ）が、担体処理の追加により、下水処理過程での各医薬品の除去率を 36%、51%、59%、96%程度まで向上できることがわかった。図より、特に、レボフロキサシンは、担体処理で除去率を向上できる可能性があることがわかる。レボフロキサシンの除去率が向上した理由は、本実験からは明らかではないが、硝化抑制運転での活性汚泥処理での除去率が 16%と低く、担体処理による硝化運転時の除去率が 64%と高かったこと、硝化が進行した二次処理水を原水とした担体処理実験では、除去率が低い[7]ことから、

硝化により除去が促進された可能性はあると考えられる。

図-9 に NH_4-N 除去率、DOC 除去率、第二担体槽の水温、DO と各医薬品除去率に関係を示した。図には令和元年度の曝気攪拌の結果も合わせてプロットした。医薬品の中で特にアジスロマイシン、クラリスロマイシン除去率の変動が大きく、各水質項目と医薬品除去率の間に明確な関係性は見いだせなかった。除去率の向上や安定した除去率を得るためには、除去に寄与する因子の解明が重要となる。

今後は、NH_4-N の処理のさらなる効率化を可能とする担体の選定および当該条件での医薬品の除去特性、除去率に関連する水質因子についての調査を継続する予定である。

4. まとめ

令和 2 年度は、令和元年度の調査に使用した流動型担体処理実験装置の担体流動用曝気を機械攪拌に変更し、風量削減を行った条件での NH_4-N 並びに医薬品 4 物質（アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン）の除去性能を調査した。その結果、担体の流動を機械攪拌に変更した場合でも、NH_4-N の除去率は 92%が得られ、このときのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン除去率は、15%、13%、51%、75%が得られた。これらの結果は令和元年度と同等の除去率であった。活性汚泥処理の後段の流動型担体を追加することにより、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの下水処理工程での除去率を 36%、51%、59%、96%程度まで向上できることがわかった。

参考文献

1） U.S. EPA: Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia – Freshwater 2013

2） 環境省環境リスク評価室 : 化学物質の生態リスク初期評価（1 物質 : 追加実施分）の結果、クラリスロマイシン、化学物質の環境リスク評価 第 16 巻、平成 30 年 3 月 https://www.env.go.jp/chemi/report/risk30-01/1-2-3-01.pdf

3） 八十島誠，小林義和、中田典秀、小森行也、鈴木穣、田中宏明 : 下水処理場における人用抗生物質の挙動、土木学会環境工学研究論文集、42、pp.357-368、2005

4） 成宮正倫、奥田隆、中田典秀、山下尚之、田中宏明、佐藤和志、末岡峯数、大岩俊雄 : 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動、土木学会環境工学研究論文集、46、pp.175-186、2009

5） 南山瑞彦、小森行也、北村友一、鈴木穣、岡安裕司 : 下水道における生理活性物質の実態把握と制御に関する調査、平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.199-212、土木研究所資料 第 4212 号、2011

6） Ngoc HanTran, Taro Urase, Osamu Kusakabe: The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds, Journal of Hazardous Materials, 171, 1-3, pp.1051-1057, 2009

7） 小森行也、岡本誠一郎 : 運転条件の異なる微生物担体処理における医薬品の除去特性、EICA、19、2.3、pp.15-17、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

（下水試料に適した大腸菌の定量法の提案）

研究予算：運営費交付金
研究期間：平28～令3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、諏訪守

【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。令和２年度は、上記①の達成目標に関わる調査・研究として、環境基準の見直しにより大腸菌群から大腸菌指標への移行が検討されていることを踏まえ、排水基準および下水道放流水質基準の見直しを含めた行政的対応に資するため、下水試料に適した大腸菌の定量法の提案を目的に、複数の特定酵素基質培地における回収率の把握、希釈水の違いが変動係数（CV）に及ぼす影響についての評価を行った。また、従来指標との関連性を評価するため、下水試料における大腸菌群に占める大腸菌の割合を把握した。

その結果、各種培地・手法における大腸菌の回収率は、混釈法が 81～93%、フィルター法が 86～95%の範囲内であった。各種培地・手法と希釈水の違いが変動係数（CV）に与える影響は小さく、CV の平均値は混釈法、フィルター法ともに許容値である 30%以下であった。過年度の評価結果を含め、CV、回収率とも許容値を満たす測定法を提示できた。

大腸菌群に占める大腸菌の割合については、流入下水、二次処理水ともに水温が 23℃付近を境として高まっており、その平均割合は 23℃以上において流入下水が 37%、二次処理水が 18%、23℃以下では各々17%、7%であった。二次処理水の大腸菌割合が高まる要因の 1 つは、流入下水の大腸菌/群の割合が高まっていることによる可能性が示唆された。従来指標との関連性として、大腸菌群（デソキシコール酸塩培地）に占める大腸菌（特定酵素基質培地）の平均割合は二次処理水が 14%、残留塩素の平均濃度が 0.25mg/L の放流水では 12%であり、放流水質の技術上の基準値を検討するための知見が得られた。

キーワード：大腸菌、大腸菌群、特定酵素基質培地、回収率、希釈水

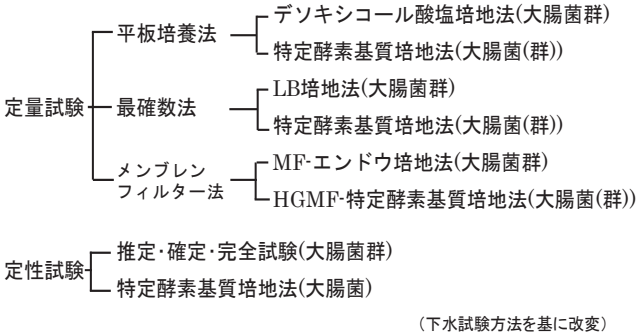
１．はじめに

特定酵素基質培地を利用することで大腸菌の検出定量が容易となった。ふん便汚染指標として大腸菌指標が優れていることもあり、水道水質基準や下水処理水の再利用水質基準等マニュアルで採用されていることに加え、現在、環境基準項目でも大腸菌群から大腸菌指標への変更が検討されている。このため、下水道からの放流水質の技術上の基準項目である大腸菌群に関しても大腸菌への見直しについて今後検討が行われることが予想される。大腸菌への見直しにあたっては、基準値への適合を判断するため下水試料に適した測定法を検討して決定しなければならないが、複数の特定酵素基質培地が市販され培地組成が製造元により若干の違いがあり、また、平板培養法（混釈法）、メンブレンフィルター法（フィルター法）など測定手法の違いも存在する。このため、公定法の検討に必要な基本的なデータ（測定手法ごとの精度等）を取得する必要がある。また、大腸菌指標への移行にあたっては、下水道からの放流水質の技術上の基準値を検討する上で、下水中の大腸菌の存在実態を把握するとともに、長い間に蓄積されてきた大腸菌群数のデータとの関連性の評価が必要である。

令和２年度は、下水試料に適した大腸菌の測定法の提案を目的に、各種の特定酵素基質培地における大腸菌回収率を把握するとともに、希釈水の違いが変動係数に及ぼす影響評価を行った。また、大腸菌群から大腸菌指標への移行にあたり、従来指標との関連性を評価するため、下水試料の大腸菌群に占める大腸菌の割合を把握し、その関連性を明らかにした。

２．大腸菌等の測定法の現状

大腸菌、大腸菌群の定量・定性試験について下水試験方法[1)]を参考に整理したものを図-1 に示す。下水の水質の検定方法に関する省令(環境大臣が定める排水基準に係る検定方法告示でも同じ)で定める大腸菌群の検定方法は、



(下水試験方法を基に改変)

図-1 大腸菌(群)の定量・定性試験

デソキシコール酸塩培地による平板培養法が、水質汚濁に関わる大腸菌群の環境基準では、乳糖ブイヨン-ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法(LB-BGLB)による最確数法が公定法として定められている。下水再生水利用に関しては、再生水の用途別に水洗、散水、親水利用では特定酵素基質培地法による大腸菌指標[2)]、修景利用では暫定的にエンドウ培地によるフィルター法の大腸菌群指標[3)]が採用されている。特定酵素基質培地はMMO-MUG 培地、IPTG 添加 ONPG-MUG 培地、XGal-MUG 培地、ピルビン酸添加 XGal-MUG 培地のいずれかの培地を用いるものとされ、検水量を 100 mL とした定性試験（大腸菌の有無判定）としている[4)]。下水試料等に関わる大腸菌群、大腸菌の定量法は公定法として上記の 4 手法である。現状では特定酵素基質培地による大腸菌の試験法は定性試験法が定められているのみであるが、環境基準の告示案として、大腸菌のメンブレンフィルター法（特定酵素基質培地）が提示、パブリックコメントがなされたところであり、今後、放流水質基準項目を大腸菌へ変更する際の基準値に対応した公定法についてもこれらの既存の手法を考慮しつつ検討する必要があると考えられる。

3．評価方法

3.1 各種特定酵素基質培地による回収率評価

評価対象とした特定酵素基質培地は、国内、海外メーカーから市販されている培地 A~F の 6 種類とし、混釈法とフィルター法にて、各々定量を行った。培養温度・時間については各培地の取り扱い説明書に従った。回収率試験は、A 下水処理場の二次処理水を公称孔径が 0.2μm のメンブレンフィルターでろ過を行い、無菌状態とした試料に大腸菌濃度が 30CFU/mL 程度となるよう菌株（バイオボール:ビオメリュー・ジャパン(株)製造・販売）を添加し、各培地・手法にて定量し回収率を評価した。試験は 3 回行いその平均値から回収率を求めたが、1 試料あたりの定量数は 5 連（n＝5）とした。

3.2 希釈水の違いが変動係数に及ぼす影響評価

処理水や放流水中の大腸菌濃度等が高い場合には、定量精度を確保するため、測定試料の希釈が必要となる。希釈水としては生理食塩水やりん酸塩希釈水などがあるが、特定酵素基質培地の利用時において、希釈水の違いが大腸菌の定量精度に及ぼす影響に関する知見は少ない。このため、各培地・手法にて希釈水として生理食塩水、りん酸塩希釈水および滅菌蒸留水の 3 種類を利用した際の変動係数（CV）を比較評価した。二次処理水の大腸菌濃度が 30CFU/mL 程度となるよう各希釈水で希釈し、各培地・手法にて定量値を得て CV を求めた。試験は 2 回行いその平均値から CV を求めたが、1 試料あたりの定量数は 5 連（n＝5）とした。

3.3 大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価

大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価は、A 下水処理場にてほぼ通年（7～翌 3 月）にわたり下水試料を採水し大腸菌/群を定量することにより行った。対象試料は流入下水、二次処理水（生物学的高度処理水）、放流水とし、定量法は特定酵素基質培地の D 培地とデソキシコール酸塩培地の混釈法とした。

なお、各培地・手法による大腸菌等の定量は、同一試料について同時測定、同一人物による操作とした。

4．評価結果および考察

4.1 各種特定酵素基質培地による回収率評価

各種培地・手法による大腸菌の回収率の評価結果を図-2 に示す。各培地・手法にて概ね 90%程度の回収率が得られており、混釈法が 81～93%、フィルター法が 86～95%の範囲内であった。

水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン[5)]によれば、細菌試験を含めた機器分析によらない検査方法は本ガイドラインの対象外としているが、1 つの尺度として農薬類の定量に関わる目標値は、繰り返し精度（変動係数）が 30%以内、真度（回収率）が 70～120%とされている。

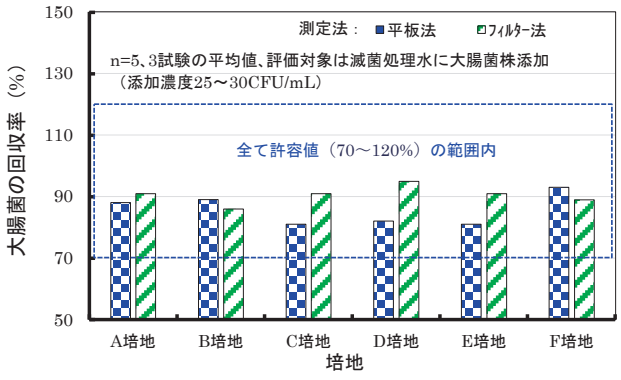


図-2 異なる培地・手法における大腸菌の回収率

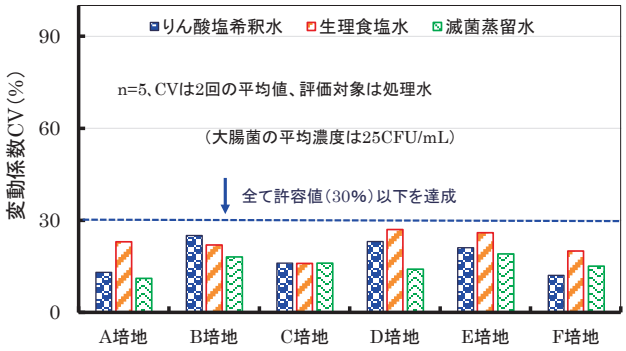


図-3 異なる培地と希釈水における大腸菌測定値のCV（混釈法）

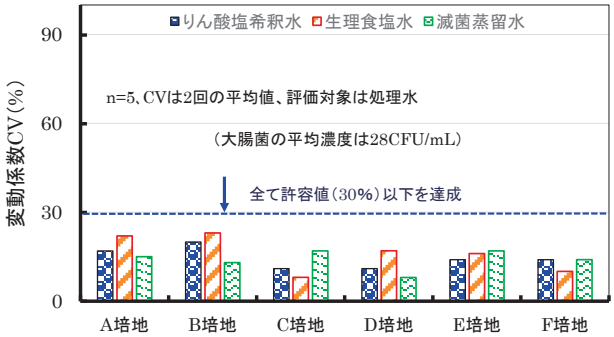


図-4 異なる培地と希釈水における大腸菌測定値のCV（フィルター法）

大腸菌の定量法に関わる回収率や変動係数の目標値について確立された基準はないが、上述の目標値を参考として許容値とすると、本試験結果による真度（回収率）は培地・手法が異なっても概ね 90%で推移しており、許容値を満足するものと考えられた。

4.2 希釈水の違いが変動係数に及ぼす影響評価

培地・手法と希釈水の違いが大腸菌数測定値のCVに与える影響について図-3、4 に示す。混釈法の各培地間において、りん酸塩希釈水を利用した際の CV の範囲は 12～25%（平均値 18%）、生理食塩水は 16～26%（22%）、滅菌蒸留水では 11～19%（16%）であった。

フィルター法（図-4）では各培地間において、りん酸塩希釈水の CV の範囲は 11～20%（平均値 15%）、生理食塩水が 8～23%（16%）、滅菌蒸留水は 8～17%（14%）であり、培地・手法と希釈水の違いが CV に与える影響は小さいものと考えられた。本試験結果における繰り返し精度（変動係数：CV）の平均値は混釈法、フィルター法ともに許容値である 30%以下であった。また、過年度に実施した各培地・手法間の繰り返し精度の評価[7)]では、塩素消毒により大腸菌濃度を 20CFU/mL 程度とした無希釈試料で定量を行った結果として、混釈法では 12～20%、フィルター法が 13～18%であったことから、希釈水の利用による変動係数への影響は小さいものと考えられた。過年度の評価結果[7)]を含め、CV、回収率とも許容値を満たす測定法を提示できた。

なお、上記の回収率試験、希釈水の影響評価では、各培地・手法において回収率やCVは許容値の範囲内であったが、大腸菌やその他の雑菌等が高濃度の場合には、フィルター法では大腸菌のコロニーとその他の菌が重なることでコロニーの発色が滲み、その発色状況から大腸菌であることの判断が難しくなる可能性が生じた。

4.3 大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価

特定酵素基質培地のD培地による大腸菌/群割合の評価結果について図-5、6 に示す。過年度の調査結果[7)]では水温が上昇することで大腸菌群に占める大腸菌の割合が上昇傾向を示したことから、水温と大腸菌/群の比の関係を整理した。過年度の調査結果[7)]（H31.4～R2.3 月）を含め整理を行ったが、流入下水、二次処理水ともに水温が 23℃付近を境として割合が高まり、その平均割合は 23℃以上において流入下水が 37%、二次処理水が 18%であった。23℃以下では各々17%、7%となっており、割合の変動要因として季節の影響が見られ、夏季の高水温期では割合が高く、冬季では低い状況であった。この時の流入下水の大腸菌濃度は、大腸菌/群の割合が 37%以上とそれ以下で平均濃度を整理すると 9.1×10^4CFU/mL に対し 7.2×10^4CFU/mL であり、高水温期は約 30%の濃度上昇が見られた。20℃の水温では大腸菌が増殖するとの報告[6)]があることから、高水温期では流入下水の流下過程において大腸菌が増殖することで割合が上昇したものと考えられた。また、流入下水と二次処理水の大腸菌/群の割合を整理した結果を図-7 に示す。相関関係があり水温の上昇により、二次処理水の大腸菌割合が高まる要因の 1 つは、流入下水の大腸菌/群の割合が高まっていることによる可能性が示唆された。一方、全国 54 箇所の下水処理場を対象にした既往の調査例では、各種下水試料の大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は概ね 20%であったとする報告例[8)]がある。本調査の処理水等の平均割合と比較してやや高い状況にあるが、調査の継続期間の違いや、地域ごとに下水試料の水温等が異なることが要因となり、割合に違いが生じたものと推定される。

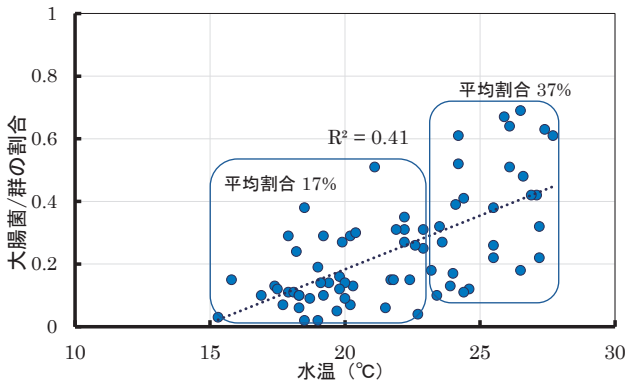


図-5 流入下水の水温変動と大腸菌/群割合の関係

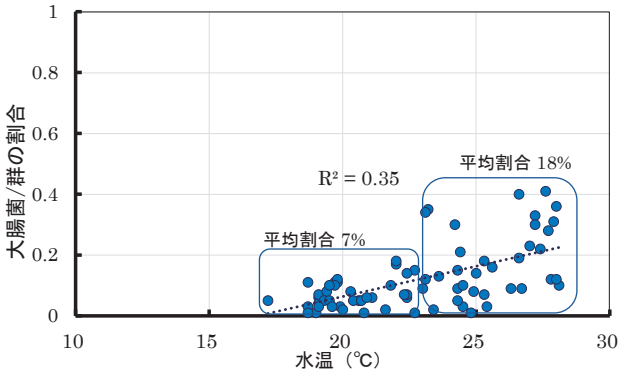


図-6 二次処理水の水温変動と大腸菌/群割合の関係

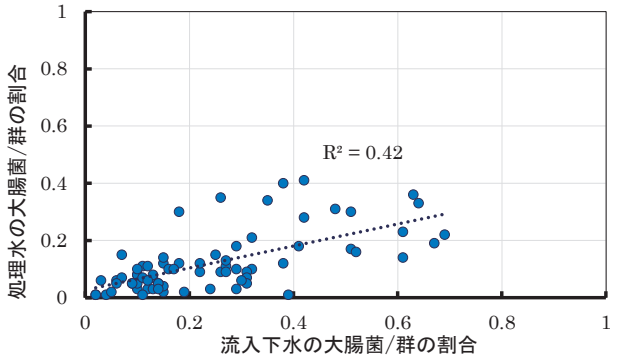


図-7 流入下水と処理水の大腸菌/群の割合

次いで、従来指標との関連性として二次処理水の大腸菌（特定酵素基質培地）と大腸菌群（デソキシコール酸塩培地）について整理した結果を図-8 に示す。やや弱い相関関係が見られており、大腸菌群に占める大腸菌の割合は2～35%の範囲内であり、平均割合は14%であった。また、放流水では相関関係が見られ、大腸菌群に占める大腸菌の割合は 1～33%の範囲内であり、平均割合は12%であった（図-9）。この時の結合残留塩素濃度は0.13～0.51mg/L の範囲内であり、平均濃度は0.25mg/L であり、放流水質の技術上の基準値を検討するための知見が得られた。

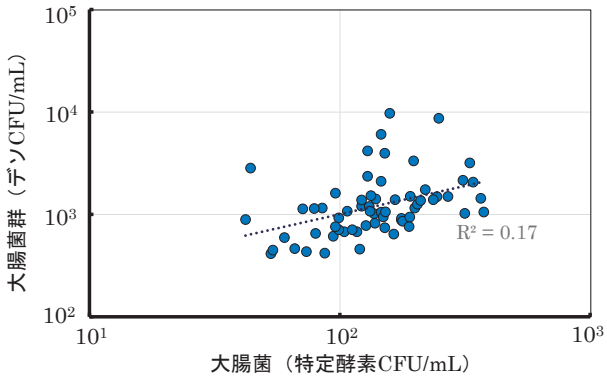


図-8 二次処理水の大腸菌と大腸菌群の関係

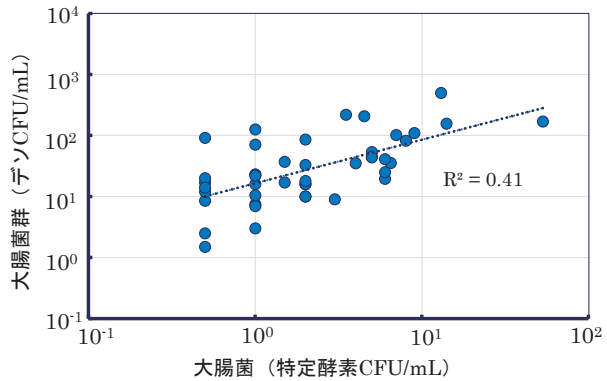


図-9 放流水の大腸菌と大腸菌群の関係

5．まとめ

令和 2 年度は、下水試料に適した大腸菌の定量法の提案を目的に、各種の特定酵素基質培地における大腸菌回収率の把握と、希釈水の違いが変動係数に及ぼす影響評価を行い、CV、回収率とも許容値を満たす測定法を提示できた。また、大腸菌群から大腸菌指標への移行にあたり、従来指標との関連性を評価するため、下水試料における大腸菌群に占める大腸菌の割合を把握し、その関連性を明らかにし、放流水質の技術上の基準値を検討するための知見が得られた。以下に得られた結果を示す。

1) 各種培地･手法における大腸菌の回収率は、混釈法が81～93%、フィルター法が 86～95%の範囲内であった。
2) 各種培地･手法と希釈水の違いが CV に与える影響は小さく、CV の平均値は混釈法、フィルター法ともに許容値である 30%以下であった。
3) 大腸菌群に占める大腸菌の割合については、流入下水、二次処理水ともに水温が 23℃付近を境として高まっており、その平均割合は 23℃以上において流入下水が37%、二次処理水が18%、23℃以下では各々17%、7%であった。
4) 水温上昇時に二次処理水の大腸菌の割合が高まる要因の 1 つは、流入下水の大腸菌/群の割合が高まってい

ることによる可能性が示唆された。

5) 従来指標との関連性として、大腸菌群（デソキシコール酸塩培地）に占める大腸菌（特定酵素基質培地）の平均割合は二次処理水が 14%、残留塩素の平均濃度が 0.25mg/L の放流水では 12%であった。

謝辞

本調査を実施するにあたり、調査対象とした A 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) 下水試験方法下巻、(公社) 日本下水道協会、2012 年版、pp225.
2) 平成 20 年国土交通大臣告示第 334 号.
3) 建設省高度処理会議、下水処理水の修景・親水利用水質検討マニュアル（案）、平成 2 年 3 月.
4) 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、下水処理水の再利用水質基準等マニュアル、平成 17 年 4 月.
5) 厚生労働省、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン（最終改正:平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 号第 1 号）.
6) 諏訪守、安井宣仁、南山瑞彦：下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の実態、下水道協会誌論文集、Vol. 54(652)、pp. 89–96、2017.
7) 土木研究所資料第 4402 号、令和元年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.36-49.
8) 諏訪守、李善太、重村浩之：下水試料に対する大腸菌定量手法の評価と下水処理場における大腸菌と大腸菌群の実態調査、下水道協会誌論文集、Vol. 56(676)、pp. 85–92、2019.

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（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および災害時に対応した水処理･塩素消毒の評価）

研究予算：運営費交付金
研究期間：平28～令3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、諏訪守、小森行也

【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。令和２年度は、上記②の達成目標に関わる調査･研究として、降雨時の実態調査に基づく合流式下水道越流水による放流先水域への影響評価を行った。また、③に関わる調査･研究では、台風で浸水被災した下水処理場にて暫定的な水質改善効果による消毒効果と消毒副生成物の抑制効果を評価した。

その結果、越流水放流負荷の分流化並み、越流回数の半減とした暫定的な対策目標である合流改善事業後において、ノロウイルス（Norovirus:NoV）の流出抑制にも一定の効果があるものと推定されたが、降雨の状況に応じて越流水による放流先水域への影響が懸念された。合流改善事業においてNoVの放流負荷に関わる目標値は定められていないが、放流先水域が重要影響水域である場合には、将来的には衛生学的な観点からウイルスに対する安全性の確保に関する検討を行うことも考えられ、その参考となる知見が得られた。越流水影響下によるNoVの汚染状況を簡易に把握するため、濁度およびSSとの関連性を評価した結果、代替指標としてNoV汚染を簡易にモニタリングできる可能性が示唆された。越流水の影響下による河川水中のNoV濃度は、ろ過により90%程度低下することが明らかとなったことから、越流水対策として高濁度水を対象としたろ過プロセスの導入により、ウイルス負荷の低減が図れるものと考えられた。被災下水処理場において段階的な復旧対策技術による水質改善に伴う消毒効果および消毒副生成物抑制の向上効果を明らかにし、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。

キーワード：合流式下水道越流水、ノロウイルス、濁度、SS、復旧対策技術

1. はじめに

下水道は公衆衛生の向上に寄与することを目的の一つとしていることから、グローバル化にともなう多様な感染症を含めた水系感染症拡大防止にも貢献することが期待[1)]されている。公衆衛生をめぐる社会情勢の変化へ対応するため、感染拡大防止に資する下水道システムを確立することが求められている。従来、公衆衛生の観点では、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、現在、新型コロナウイルスの世界的流行例もあることから、今後、多種多様な病原微生物の出現も予想される。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[2)、3)]となっているが、対策手法構築のために必要な研究･調査は途上段階にある。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。令和２年度は、合流式下水道越流水の影響評価を目的として、NoVを指標とした汚染実態を把握した。併せて、被災下水処理場の応急復旧段階における水質改善が消毒効果向上および消毒副生成物の生成抑制に及ぼす影響を評価した。

2. 研究目的および方法

2.1 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大都市を中心に、下水と雨水の排除を同一の管渠とした合流式下水道が採用されてきた（全国191都市）。合流式下水道では降雨時において、雨水量が増加し下水道施設において対応が困難になる場合には、未処理下水等が公共用水域へ放

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。平成15年の下水道施行令改正を踏まえ、合流式下水道緊急改善事業（以下、合流改善事業という）が実施され、処理区域の面積が1,500ヘクタール未満（流域関連は5,000ヘクタール未満）の都市は平成25年度までに、それ以上の規模の都市は令和5年度までに対策を完了すべく進められてきている。合流式下水道緊急改善計画における当面の改善目標としては、汚濁負荷量の削減、公衆衛生上の安全確保、夾雑物の削減の3つが挙げられている。合流改善事業の具体の対策としては、雨水浸透施設の設置、完全（部分）分流化、下水処理場の処理能力の増強（遮集容量の増強、雨天時活性汚泥法の適用など）、雨天時下水の貯留などである[4)]。一方、公共用水域の衛生学的な指標として主に大腸菌群数が用いられているが、越流水の影響調査にて適切なリスク評価の観点から、ウイルスの直接計測が必要との報告[5)]がある。また、雨天時の簡易処理放流の大腸菌、F特異大腸菌ファージの排出負荷量は、年間負荷量の半分以上を占めることから放流先水域への衛生学的安全性確保のため、簡易処理放流対策が必要との報告があるが[6)]、これらウイルス等を対象とした調査・研究事例は限られている。

このような背景から本研究では、ウイルス指標としてNoVを対象に、合流改善事業による低減効果や越流水が放流先水域へ及ぼす影響評価を目的として、降雨時において実態調査を行った。

令和元年度からは、公共用水域へ及ぼす越流水の影響を明らかにするため、A市を対象として実態調査を行った。A市での主な合流改善事業としては合流下水の貯留施設の建設であり、その期待される効果をシミュレーションした結果は、雨天放流時のBOD負荷を分流式並み、越流回数の半減である。

雨天時調査は1降雨あたりの総降雨量が約10～120mmの4降雨時（過年度の3回の降雨時調査を含む）において、2箇所の雨水吐き地点（採水箇所から上流約1,000mと約4,000mに位置）の下流にて河川水を採水した。調査の実施は3～10月であったことから、冬季の感染性胃腸炎の流行期ではなかったと考えられる。ウイルス指標としてNoV、他の水質項目として濁度、SSを測定した。また、越流水影響下での河川水中のNoVの存在形態を推測するため、SS濃度が異なる一部の河川水試料を用いてろ過（GF/B）によるNoV濃度の低減効果を把握した。

2.2 NoVの測定法

試料のNoVは、PEG沈殿法により濃縮し、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、リアルタイムRT-PCR法により定量を行った。詳細は次のとおりである。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 Clean up 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。NoV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」[7)]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、PEG沈殿法では、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料のSS負荷量を低減させることで、陰電荷膜法に比較してNoVの検出濃度を高められることから、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、抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した[8)]。他の水質分析項目の濁度は現地にてポータブル濁度計による計測、SSはGF/Bろ紙による定量とした。

2.3 応急復旧段階における水質改善が消毒効果向上および消毒副生成物の生成抑制に及ぼす影響評価

東日本大震災や台風では津波・浸水により下水処理場は壊滅的な被害を受け、水・汚泥処理の復旧に長期間を要した。簡易沈殿処理や簡易生物処理などの応急復旧段階を経て本復旧へ至るが、応急復旧段階の下水の消毒は、通常の塩素消毒に比べ塩素注入濃度を高める必要がある。応急復旧段階で処理水質が悪化している状況において、塩素注入濃度を高めることは、消毒副生成物の生成を促進することが懸念されるが、応急復旧段階の消毒副生成物に関する調査・研究例は少なく、その実態は不明である。

このような背景から本研究では、段階的な復旧対策技術による水質改善効果が消毒効果および消毒副生成物の生成へ及ぼす影響評価を目的に、台風による浸水被害を受けたB下水処理場を対象として復旧段階ごとの下水試料を採水し塩素消毒実験を行った。消毒実験は大腸菌群数が基準値以下となるよう次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を変動させ、接触時間を20分間とした。消毒効果は

大腸菌群数（デソキシコール酸塩培地の平板培養法）、消毒副生成物はTOCl（前述の45～61ページに示す方法）を指標とした。

3. 研究結果および考察

3.1 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

過年度の調査結果を含めた調査時の降雨状況を図-1、2に示す。時間最大降雨量は2.5、9.5、14、20mm/h、累積降雨量は概ね10、30、60、120mmであり、全て異なった降雨状況での実態調査となった。雨天調査時のNoV濃度の推移を図-3、4に示す。1降雨あたりの累積降雨量が10mm程度であればNoV濃度の顕著な上昇は認められず、概ね10^4copies/Lレベルで推移しており、調査開始

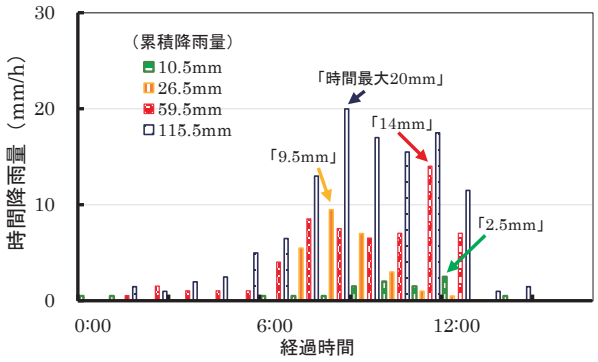


図-1 調査時の時間降雨量

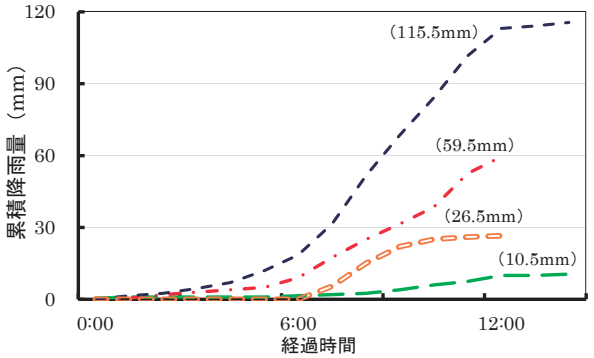


図-2 調査時の累積降雨量

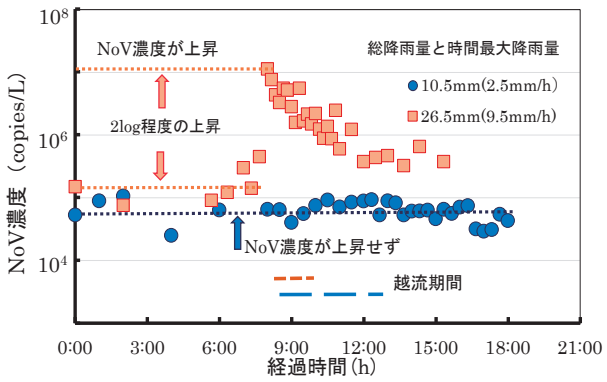


図-3 越流水影響下による河川水のNoV濃度の推移
（総降雨量約10～30mm）

当初から大きな変動は見られなかった。しかし、累積降雨量が約30mm以上となったケースにて放流先河川水のNoV濃度は上昇しており、降雨初期の調査開始時と比較して2オーダーの濃度上昇が認められ、その最大濃度は10^6～10^7copies/Lとなった。

当面の暫定的な達成目標である雨天放流時のBOD負荷を分流式並み、越流回数の半減としたA市における合流改善事業後において、NoVの流出抑制にも一定の効果があるものと推定されたが、降雨の状況に応じて越流水による放流先水域への影響が懸念された。合流改善事業においてNoVの放流負荷に関わる目標値は定められていないが、放流先水域が重要影響水域である場合には、将来的には衛生学的な観点からウイルスに対する安全性の確保に関する検討を行うことも考えられ、その参考となる知見が得られた。

次いで、越流水の影響下によるNoVの汚染状況を簡易に把握するため、水質指標として濁度とSSとの関連性を評価した結果を図-5、6に示す。累積降雨量が10mm程度では河川水のNoV濃度の顕著な上昇が見られなかったため、濁度等との明確な関連性は見出せなかった。その他の降雨状況（約30～120mm）として、越流水越流前後の河川水のNoV濃度では、越流水の影響を受け濁度、SSの顕著な上昇が認められることで、NoV濃度が高ま

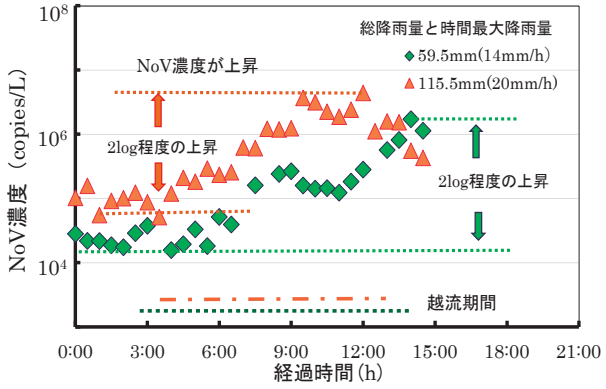


図-4 越流水影響下による河川水のNoV濃度の推移
（総降雨量約60～120mm）

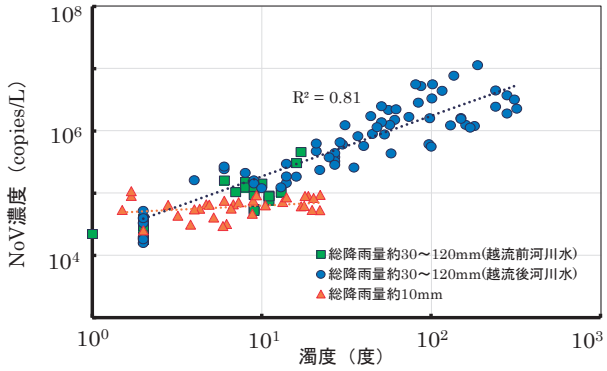


図-5 河川水の濁度とNoV濃度の関係

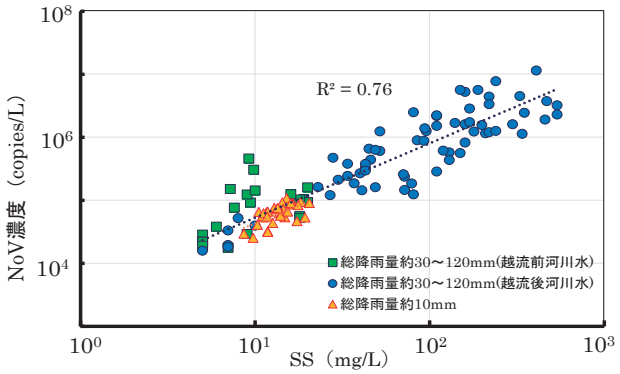


図-6　河川水のSSとNoV濃度の関係

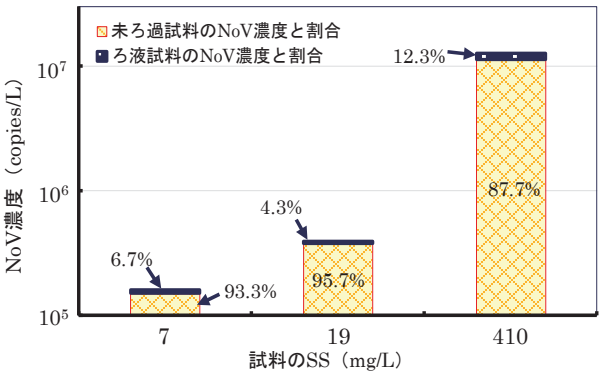


図-7 未ろ過試料とろ液試料のNoV濃度と割合

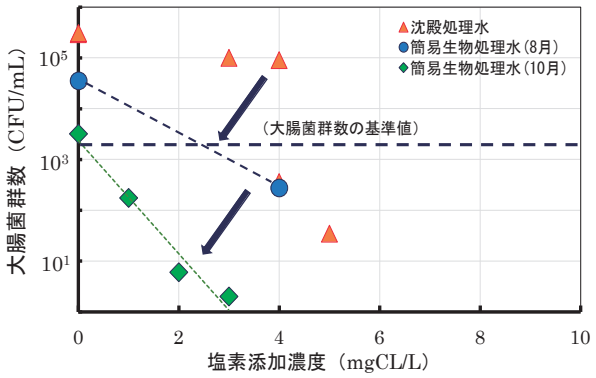


図-8 水質改善による消毒効果の向上

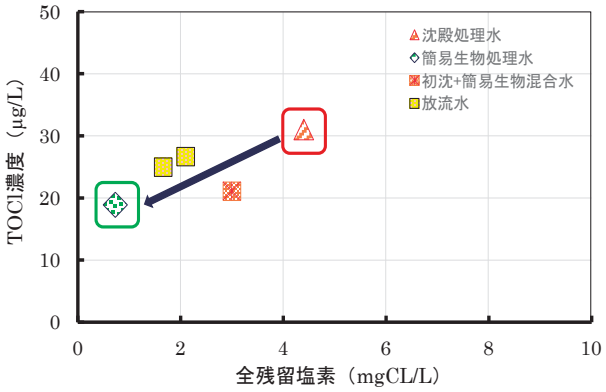


図-9　水質改善による消毒副生成物の抑制

っており、濁度と SS は、代替指標として NoV 汚染を簡易にモニタリングできる可能性が示唆された。

越流水影響下での河川水の濁度、SS と NoV 濃度との関連性が認められたため、越流水の SS 等の制御が NoV 対策に有効となる可能性がある。このため、SS が異なる河川水試料を対象に、ろ過（GF/B）による NoV 濃度の低減効果を評価した。越流水の影響割合が異なる河川水試料として、SS が 7、19、410mg/L の試料を評価対象とした。評価結果を図-7 に示すが、ろ液中の NoV 濃度は未ろ過試料の NoV 濃度に対して概ね 10%程度であり、ろ過によって NoV 濃度を 90%程度低減できることが明らかとなった。

3. 2 応急復旧段階における水質改善が消毒効果向上および消毒副生成物の生成抑制に及ぼす影響評価

B 下水処理場の下水試料を対象とした消毒実験結果より、水質改善による消毒効果の向上について図-8 に示す。応急復旧の初期段階である沈殿処理水では、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を 5mgCl/L 以上としなければ大腸菌群数の基準値を達成できない状況であったが、段階的な復旧として簡易生物処理へ移行することで、基準値達成のための塩素添加濃度を低くすることができた。ただし、簡易生物処理への移行において、基準値達成のための塩素添加濃度をより低減できるまでに約 2 ケ月を要したことから、簡易生物処理へ移行しても処理水質が安定するまで一定の期間を要することが考えられた。

次いで水質改善による消毒副生成物の抑制効果について図-9 に示す。図中のプロットは大腸菌群数の基準値を達成している消毒条件である。沈殿処理から簡易生物処理への移行により、水質が改善することで基準値達成のための塩素添加濃度を低くできるとともに、TOCl の生成が抑制されることが確認できた。消毒効果や消毒副生成物の生成抑制の観点から、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。なお、図中の初沈+簡易生物混合は、沈殿処理水と簡易生物処理水が混合（ほぼ 1:1 の割合）された下水試料、放流水はその混合水を塩素混和池にて消毒した試料である。

4. まとめ

本研究は、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。令和 2 年度は、合流式下水道越流水の影響評価を目的として、NoV を指標とした汚染実態を把握した。併せて、被災下水処理場の応急復旧段階における水質改善が消毒効果向上および消毒副生成物の生成抑制に及ぼす影響を評価した。以下に得られた結果を示す。

1) 越流水放流負荷の分流化並み、越流回数の半減とした暫定的な対策目標である合流改善事業後において、NoV

の流出抑制にも一定の効果があるものと推定されたが、降雨の状況に応じて越流水による放流先水域への影響が懸念された。合流改善事業においてNoVの放流負荷に関わる目標値は定められていないが、放流先水域が重要影響水域である場合には、将来的には衛生学的な観点からウイルスに対する安全性の確保に関する検討を行うことも考えられ、その参考となる知見が得られた。

2) 濁度とSSは、代替指標としてNoV汚染を簡易にモニタリングできる可能性が示唆された。

3) 越流水の影響下による河川水中のNoV濃度は、ろ過により90%程度低下することが明らかとなった。越流水対策として高濁度水を対象としたろ過プロセスの導入により、ウイルス負荷の低減が図れるものと考えられた。

4) 被災下水処理場において段階的な復旧対策技術による水質改善に伴う消毒効果および消毒副生成物抑制の向上効果を明らかにし、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象としたA市、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) 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、新下水道ビジョン、平成26年7月.

2) 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）

3) 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）

4) 国土交通省都市・地域整備局下水道部、効率的な合流式下水道緊急改善計画策定の手引き（案）、2008.

5) 鯉渕幸生、小野澤恵一、中村格之、原本英二、片山浩之、古米弘明、佐藤慎司、岡安章夫、磯部雅彦：東京湾お台場海浜公園における雨天時合流式下水道越流水の影響調査、海岸工学論文集、Vol. 52、pp. 886–890、2005.

6) 西田光希、張浩然、井原賢、田中宏明：下水処理場から水域へ放流される年間微生物負荷量の推定、土木学会論文集G（環境）、Vol.76(7)、III-441-448、2020.

7) 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）

8) 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.

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

（簡易的な藻類定性定量方法の開発）

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、對馬育夫

【要旨】
本研究は、ダム貯水池における動植物プランクトンの省力かつ高度な検出方法の確立のため、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動植物プランクトン等のモニタリング手法の開発と適用ならびに機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に取り組んでいる。令和 2 年度、微生物叢解析に使用するユニバーサルプライマーの網羅性を検討し、現在、広く使用されているプライマーでは、検出率が低い門が存在することを確認するとともに、より網羅性の高いプライマーの開発に繋がる知見を得た。また、高濃度酸素溶解装置（WEP システム）が導入されているダム貯水池において、その効果確認を行った。その結果、WEP システムにより供給される高濃度酸素水の効果により、底層から溶出してきたリンや金属が表層へ移行できず、貯水池表層がリン制限となり藻類増殖の抑制に寄与している可能性を確認した。さらに、機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発を進め、ダム管理所から実務に用いた画像を収集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、認識率が 80-87%の分類モデルを作成することに成功した。
キーワード：ダム貯水池、次世代シーケンサー、WEP システム、プランクトン、自動画像分類

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資源機構が管理するダム貯水池においても、環境基準設定地点の約 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。また、植物プランクトンの大量増殖が湖水の透明度や溶存酸素濃度の低下を引き起こすこともある [2)]。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」[3)] 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、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 [4)]。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（NGS：New Generation Sequencer）を用いた DNA 塩基配列に基づく動植物プランクトン等のモニタリング手法の開発を目指している。平成 28~29 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。平成 30 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した。令和元年度は、ダム貯水池から採取した水試料について、NGS を用いて検出された動植物プランクトンおよび細菌の結果と熟練者が光学顕微鏡を用いて検出した結果を比較し、NGS の有用性を確認した。また、顕微鏡では観察されたが NGS では検出されなかった種が存在したため、令和 2 年度は、解析条件の見直し、改善策の検討を行った。また、高濃度に酸素を溶解させた水を深層に供給できる気液溶解装置（以下、WEP システム）が導入されているダム貯水池における NGS 適用による水質改善効果の把握を行った。さらに、機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に関する研究に関して、令和元年度は、国内のダム貯水池において頻繁に検出される 19 種の植物プランクトンについて、インターネット上から収集した画像を用い、機械学習による画像分類を試みた [5]。令和 2 年度は、ダム管理所から実務に用いた画像を収集し、機械学習による画像分類システムの性能向上を試みた。

2. NGS 解析条件の検討

2. 1 実験方法

本研究では、より汎用性が高く、将来的に Real-time PCR 用に定量に応用可能なプライマーを開発するため、**表 1** に示すプライマーについて、データベース SILVA132_SSURef_Nr99 の登録配列の中から、0～2 ミスマッチ条件(1 プライマーセットにつき 9 条件)に該当する配列情報を抽出し、現行で使用実績のあるプライマーの網羅性を確認した。抽出は解析ソフト mothur の PCR seqs を用いた。

2. 2 実験結果と考察

種を幅広く検出することが可能なユニバーサルプライマーとして使用実績のある 5 種類のプライマーセットについて、データベース SILVA132_SSURef_Nr99 登録配列（**表 2**）に対して、プライマーの配列と適合する登録数を確認した。データベースの中から、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの相補配列と完全に一致する条件（F0R0 と記載）で抽出した。さらに、それぞれ 1～2 ミスマッチを許容した条件でも抽出を行った（例えば、F1R2 は、フォワードプライマーに 1 塩基ミスマッチ、リバースプライマーに 2 塩基ミスマッチを含む条件で抽出を行ったことを意味する）。それぞれの分類に含まれる配列登録数から抽出された配列数の割合を**図 1** に示す。その結果、細菌（Bacteria）および古細菌（Archaea）をターゲットとする 16S rRNA 遺伝子を対象とした場合、Bac341F/850R では、Archaea である Euryarchaeota および Crenarchaeota がマッチした割合（カバー率）はそれぞれ 1.1%、0.1%と小さくほとんどの種が検出されないという結果だった。一方、Pro341F/850R では、Euryarchaeota および Crenarchaeota のカバー率は 85.5%、72.0% と Bac341F/850R と比較し高いものの、Patescibacteria や Planctomycetes については、48.1%、2.5%と低い結果となった。また、Chloroflexi や未分離種を多く含む Armatimonadaetes に関しては、どちらのプライマーセットもカバー率はそれぞれ 39.2%-40.4%、

表 1 本実験で用いたプライマーセット

プライマー名	プライマー配列(5'-3')
16S rRNA遺伝子	
Bac341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
Bac850R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
Pro341F	CCTACGGGNBGCASCAG
Pro850R	GACTACNVGGGTATCTAATCC
18S rRNA遺伝子	
TAReuk454	CCAGCASCYGCGGTAATTCC
TAReukREV3	ACTTTCGTTCTTGATYRA
SSU-F1	TAYCTGGTTGATYCTGCCAGT
SSU-R568	TGCTGGCACCAGACTTGCCCT
SSU-F1289	TGGAGYGATTTGTCTGGTTDATTCCG
SSU-R1772	TCACCTACGGAAACCTTGTTACG

表 2 本実験で用いたデータベースにおける各分類における配列登録数

分類	データベース登録数	分類	データベース登録数
Bacteria		**Bacteria**	
Acidobacteria	14,534	Betaproteobacteriales	43,156
Actinobacteria	60,510	Gammaproteobacteria	119,171
Armatimonadetes	752	Deltaproteobacteria	15,396
Bacteroidetes	55,663	Epsilonbacteraeota	5,422
Chloroflexi	9,245	**Archaea**	
Cyanobacteria	13,970	Euryarchaeota	12,957
Elusimicrobia	435	Crenarchaeota	4,611
Firmicutes	149,757	**Eukarya**	
Fusobacteria	2,216	Amoebozoa	867
Gemmatimonadetes	2,185	Archaeplastida	13,111
Hydrogenedentes	271	Centrohelida	93
Nitrospirae	1,297	Cryptophyceae	364
Patescibacteria	4,521	Excavata	1,326
Planctomycetes	9,014	Haptophyta	370
Spirochaetes	4,253	Incertae Sedis	237
Synergistetes	1,152	Opisthokonta	41,748
Tenericutes	2,561	Stramenopiles	4,329
Verrucomicrobia	4,419	Alveolata	11,651
Alphaproteobacteria	60,871	Rhizaria	3,376

30.9%-31.0%と他の門と比べ低かった。2 ミスマッチまで許容した場合、どちらのプライマーセットでも全体として 95%まで向上した。また、フォワードプライマーの 1 ミスマッチを解消するだけでも大幅にカバー率が上昇することがわかる。したがって、PCR 時のアニーリング温度を下げ、アニーリング率を高めるか、プライマーの混合、または塩基配列の改良をすることで、NGS 解析での網羅性が向上する可能性が示唆された。

一方、真核生物（Eukarya）をターゲットとする 18S rRNA 遺伝子を対象とした場合、TAReuk454/REV3 の組み合わせにおいて、0 ミスマッチ（F0R0）の場合は 63.1%、2 ミスマッチまで許容した場合は 92.2%だった。また、SSU-F1/R568 の組み合わせにおいて、0 ミスマッチの場合は 4.2%、2 ミスマッチまで許容した場合は 51.5%、SSU-F1289/R17720 の組み合わせにおいて、0 ミスマッチの場合は 24.0%、2 ミスマッチまで許容した場合は 24.8%だった。したがって、TAReuk454/REV3 の組み合わせがダム貯水池の真核生物の検出には最も適していることが示唆された。また、TAReuk454/REV3 の組み合わせにおいて、各門のカバー率を比較すると、Excavata と Haptophyta のカバー率が低く、0 ミスマッチの場合は、それぞれ 3.2%、1.1%、2 ミスマッチまで許容した場合は 56.9%、96.2%だった。また、リバースプライマーの 1 ミスマッチを解消するだけでも大幅にカバー率が上昇することがわかる。さらに、Excavata の中の *Euglenozoa* 属に着目すると、データベースに登録されている 865 種のうち、プライマーと一致する配列はなかった。実際、これまでも我々の研究の中で、*Euglenozoa* 属に関しては、顕微鏡では検出されるものの NGS では確認されないケースがあったが、プライマーの改良や PCR 条件の見直しにより、NGS 解析での検出が可能になると考えられる。

2. 3 NGS 解析条件の検討のまとめ

本研究では、NGS 解析で用いるユニバーサルプライマーの網羅性を確認した。16S rRNA 遺伝子を対象とした場合、検討したプライマーセットでは、カバー率の低い門が存在したが、フォワードプライマーの 1 塩基ミスマッチを解消することで、飛躍的に網羅性が向上することが示唆された。また、18S rRNA 遺伝子を対象とした場合、TAReuk454/REV3 の組み合わせが突出して網羅性が高かったが、Excavata と Haptophyta については、カバー率が低かった。このプライマーについても、リバースプライマーの 1 塩基ミスマッチを解消することで、大きく網羅性が向上し、より汎用性の高

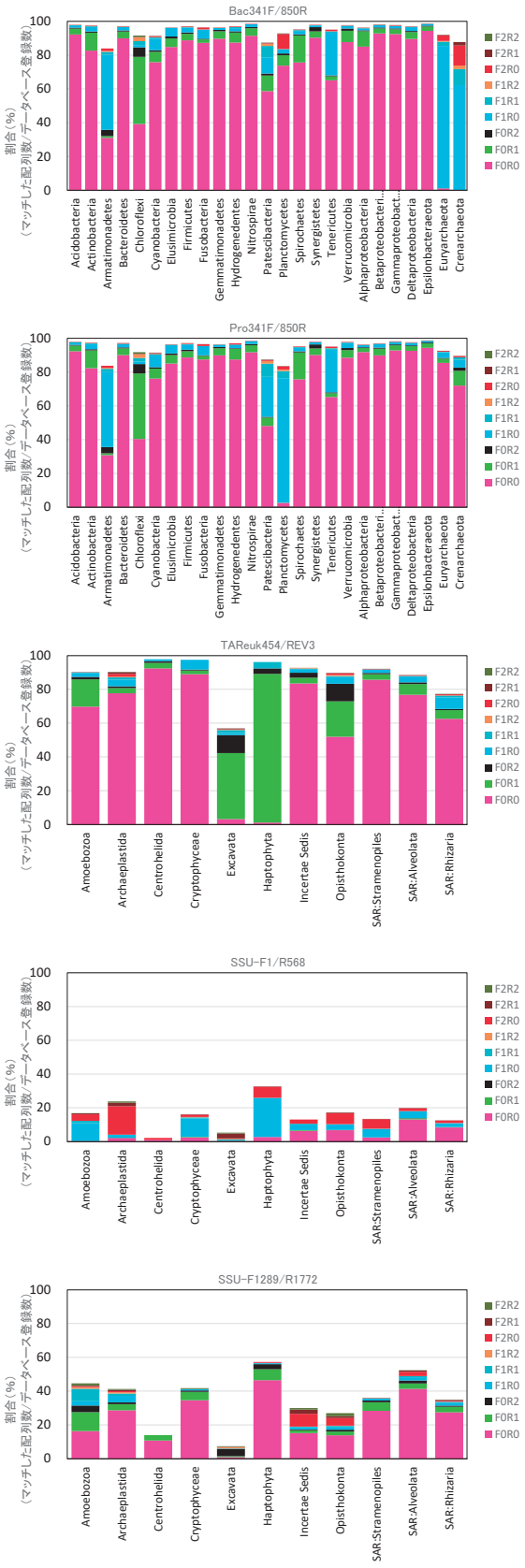


図 1 データベース中の各分類におけるプライマー配列に一致した配列の割合

いプライマーの作成が可能になることが示唆された。

3. WEP システムを導入しているダムにおける水質改善効果の確認

3. 1 実験方法

本研究では、WEP システムを導入しているダム貯水池において、令和 2 年 8 月と 10 月に現地調査および水質分析、検鏡によるプランクトンの同定、NGS を用いた微生物叢解析を行い、WEP システムの水質改善効果の確認を行った。

3. 1. 1 調査概要

現地調査は、令和 2 年 8 月 20 日および令和 2 年 10 月 5 日の計 2 回実施し、湖内 2 地点（St. A と St. B、**図 2**）において多項目水質計を用いて水温、pH、酸化還元電位（ORP）、溶存酸素濃度（DO）、電気伝導率（EC）、濁度について現地観測を行うとともに、St. A では 6 水深（水深 0.5 m、5 m、10 m、15 m、20 m、25 m）、WEP システム設置箇所から約 600 m 離れた St. B では 4 水深（水深 0.5 m、5 m、10 m、13 m）から採水を行い、**表 3** に示す各種分析を行った。

3. 1. 2 水質分析

水試料の NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N、T-N、PO_4-P、T-P はオートアナライザー（Bran Luebbe、TRAACS2000）により測定した。各種金属は ICP - MS（Thermo Fisher SCIENTIFIC、X7CCT）により分析した。

3. 1. 3 光学顕微鏡による同定

水試料を中性ホルマリンで固定し、光学顕微鏡を用いた検鏡試験を行い、種の同定を行った。分析方法は「平成 28 年度版河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】」に従った。実際の同定試験は、専門の業者へ委託して行った。

3. 1. 4 NGS による塩基配列解読

採水後の試料について、ライブラリ調整までのプロセスは、以下の通りで、詳細な手順は使用したキットのマニュアルおよび過去の報告書の記載に従った[6)]。

- 前処理（0.2 μm フィルターによる濃縮）
- DNA 抽出、抽出 DNA の精製、DNA 濃度測定
- ライブラリ調整（Amplicon PCR、PCR 産物の精製、Index PCR、PCR 産物の精製）

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クオリティーチェックおよび分類、統計処理は、QIIME2（version2020.2）を用い、参照データベースには、SILVA132_SSURef_Nr99 を用いた。

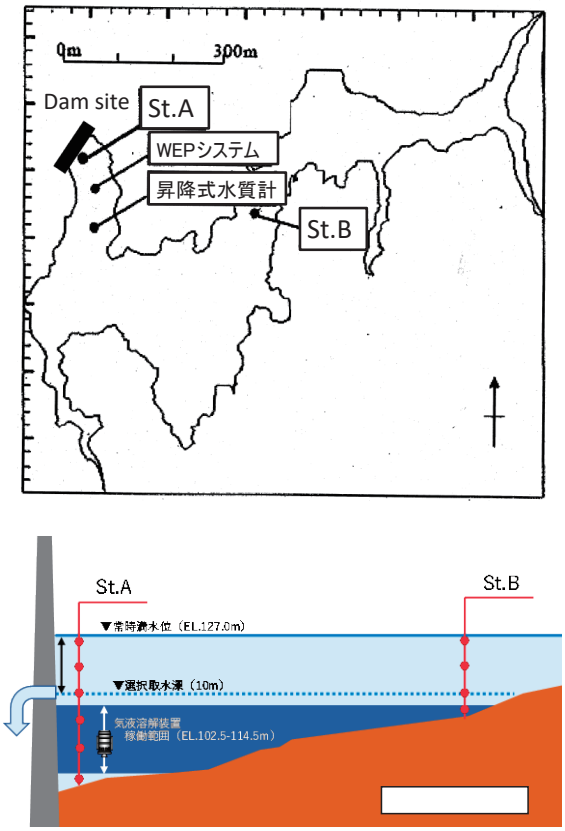


図 2 対象としたダム貯水池における調査地点

表 3 現地調査概要と分析項目

調査実施日	令和2年8月20日、令和2年10月5日
調査地点	St.A及びSt.B（図2参照）
現地観測	多項目水質計による
観測項目	水温、pH、EC、DO、ORP、濁度
観測水深	St.A：0.5m、5m、10m、15m、20m、25m（湖底直上1m） St.B：0.5m、5m、10m、13m（湖底直上1m）
採水地点	St.A：0.5m、5m、10m、15m、20m、25m（湖底直上1m） St.B：0.5m、5m、10m、13m（湖底直上1m）
水質分析	SS、VSS、DOC、各態窒素（NO2+NO3-N、NH4-N及びT-N）と各態リン（PO4-P及びT-P）
金属分析※1	Mg、Al、P、K、Ca、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Ag、Cd、Sn及びPb
顕微鏡分析※2	植物プランクトン、動物プランクトン
NGS解析	16S rRNA遺伝子（原核生物） 18S rRNA遺伝子（真核生物）

※1：St.Bは水深0.5m、5m、13mの3水深のみ分析対象とした

※2：St.Aは水深0.5mと水深25m、St.Bは水深0.5mと13mの各2水深のみ分析対象とした

3. 2 実験結果と考察

3. 2. 1 水温、DO、ORP について

令和 2 年 8 月 20 日および 10 月 5 日調査時の各調査ポイントにおける多項目水質計による水温、DO、ORP の現地観測を**図 3** に示す。8 月調査時の水温分布は、WEP システム設置近傍箇所に位置する St. A では表層から水深 10 m までは 28.4℃～25.7℃と高く、水温躍層

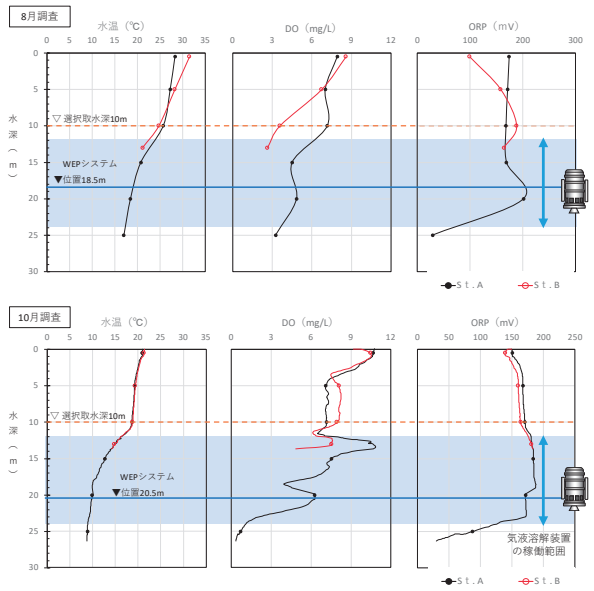


図 3 水温、DO、ORP の現地観測結果

は水深 10 m から 15 m にかけて形成されており、その下層となる水深 15 m 以深から水深 25 m（湖底直上＋1.0 m）では 20.8℃～17.0℃ と緩やかに低下する傾向にあった。St. B の水温分布は、表層 0.5 m および水深 5 m では 31.5℃ および 28.3℃ と St. A と比べて高く、水深 10 m および 13 m では 24.8℃ および 21.2℃ と低い結果となった。10 月調査時の水温分布は、St. A の水温は表層 0.5 m から水深 10 m にかけて 21.0℃～18.7℃ と 8 月調査に比べて低下していたが、水深 15 m 以深から水深 25 m でも 12.7℃～8.9℃ と低下していたため、水温躍層は依然として水深 10 m から 15 m にかけて形成されていた。また、St. B の水温分布は、表層 0.5 m から水深 13 m にかけて St. A と同様の分布傾向にあり、8 月調査時のような地点間での水温分布の違いは認められなかった。

8 月調査時の DO 分布は、St. A では水深 0.5 m で 7.9 mg/L と最も高く、下層に向けて低下する傾向があった。特に水温躍層の上層側となる水深 10 m と下層側となる水深 15 m 間では DO が大きく低下しており、水温躍層下層への酸素供給が遮断されている様子が確認できた。St. B の DO 分布は表層 0.5 m では 8.6 mg/L と St. A よりも高い値が観測されたが、水深 10 m および 13 m では 3.6 mg/L および 2.6 mg/L と St. A の同水深よりも低い値が観測された。10 月調査時の DO 分布は、St. A では表層 0.5 m で 10.7 mg/L と高く、また、水深 10 m 以深でも断続的な DO の増減が認められたが、湖底直上 1 m となる水深 25 m では 0.7 mg/L と 8 月調査時よりも貧酸素化が進行していた。St. B の DO 分布は表層 0.5 m では St. A と同等であったが、水深 5 m と 10 m では約 8 mg/L と St. A の同水深よりも高い値が観測された。

8 月調査時の ORP 分布は、St. A では表層 0.5 m から水深 15 m までは約 170 mV と一定であったが、水深 20 m では 201 mV と高く、水深 25 m では 29 mV と急激に低下した。St. B では、表層 0.5 m では 99 mV と低く、また水深 5 m から 13 m では明確な分布傾向はなく、158 mV～188 mV で推移していた。10 月調査時の ORP 分布は、St. A では表層 0.5 m から水深 23 m 付近にかけて 150～184 mV で推移していたが、水深 25 m では 87 mV と急激に低下した。St. B でも、St. A と同様の分布傾向にあり、表層 0.5m から水深 13m にかけて 139～181 mV で推移していた。

8 月調査において、選択取水深付近（水深約 10 m、EL.117 m）に形成される水温躍層により、その上層と下層の水塊は分断されると考えられる。また、St. B では水深の浅い上流部で受熱した表層水と澪筋を流下する水温の低い流入水の影響により、St. A よりも鉛直方向の水温差が大きかったものと推察される。通常、水温躍層より下層側では酸素供給が遮断されるため、湖底付近から貧酸素水塊が形成され、還元状態へと至る。実際に、St. B では水深 10 m および 13 m では DO が 4 mg/L 以下にまで低下していた。一方、St. A では水深 15 m に比べて 20 m で高い DO 及び ORP 値が観測された。これは、この時期 WEP システムが水深 18.5 m（EL.108.5 m）で運用されていたことから、装置から吐出された高濃度酸素水の効果によるものと考えられる。10 月調査においても、水温躍層は選択取水深付近（水深約 10 m、EL.117 m）に形成されている状態にあった。しかし、8 月調査で確認された St. A と St. B との縦断方向での鉛直水温分布の違いは解消されており、また水深 10 m 以深の複数の水深に WEP システムから供給された高濃度酸素水による影響と考えられる断続的に高い DO が確認された。特に、水深 13 m 付近（EL.114.5 m に相当）には St. A と St. B の双方で前後の水深よりも高い DO が観測されたことから、WEP システムによる酸素供給範囲が少なくとも St. B 近傍まで波及していたと推察される。

3. 2. 2 DOC、窒素、リンについて

各調査ポイントにおける DOC、窒素、リンの測定結果を**図 4** に示す。8 月調査時の DOC は St. A では表層 0.5 m と水深 5 m で高く、水深 20 m にかけて減少傾向を示したのち、水深 25 m で再び高い値が検出された。St. B では表層 0.5 m で他の採水層よりもやや高い値が

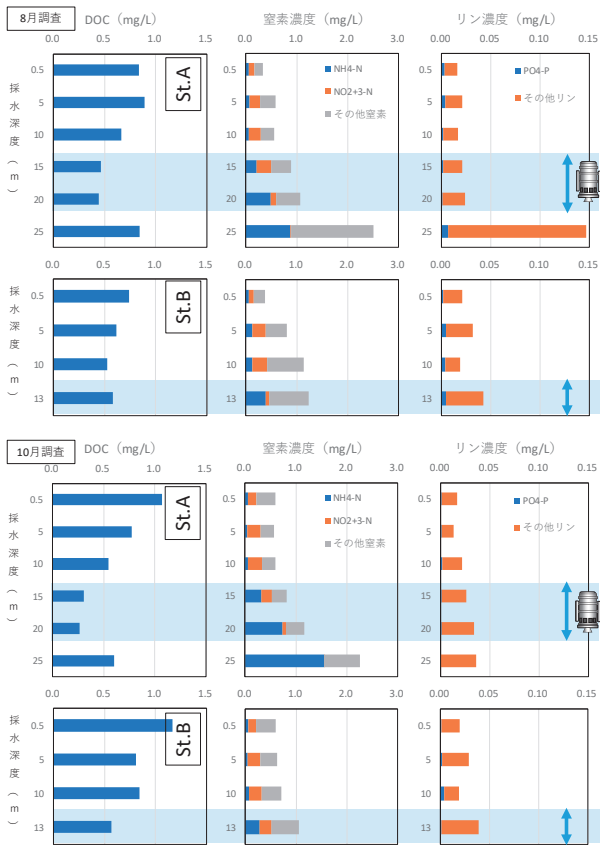


図 4 DOC、窒素、リンの測定結果

検出されたが、それ以外では明確な濃度の違いは認められなかった。10 月調査時において、DOC は、St. A と St. B ともに表層 0.5 m で高く、水深方向で減少傾向を示したのち、St. A では水深 25 m で再び増加する傾向を示した。St. A において、WEP システムの稼働範囲以深である水深 25 m においては、DOC が増加する傾向があった。

8 月調査時の各態窒素は、NH_4-N とその他窒素（T-N から NO_2+NO_3-N と NH_4-N を差し引いた値）は水深方向で増大傾向を示し、NO_2+NO_3-N は表層 0.5 m と湖底直上 1 m（St. A 水深 25 m、St. B 水深 13 m）で低かった。10 月調査時の各態窒素は、St. A と St. B ともに表層 0.5 m から水深 10 m 間で、表層 0.5 m の NO_2+NO_3-N がやや低いことを除き、概ね均一な結果であった。St. A において、水深 15 m 以深では、NH_4-N が増加する傾向が確認された。これは、詳細なメカニズムは不明であるが、嫌気条件下において、タンパク質分解活性の高い嫌気性細菌属が優占し、それに伴い、タンパク質分解によって底質間隙中の NH_4-N 濃度が増加・拡散 [7]、または、底泥中に溜まったガス泡が噴出し、直上水中に NH_4-N が放出されること [8] 等によるものと推察される。

8 月調査時の各態リン濃度は、その大部分がその他リン（T-P から PO_4-P を差し引いた値）であり、PO_4-P は最大でも St. A 水深 25 m で 0.007 mg/L と低く推移していた。10 月調査時の各態リン濃度も、その大部分がその他リンであり、PO_4-P は最大でも St. B 水深 10 m で 0.004 mg/L と全地点で 8 月調査時よりも低濃度で推移していたことから、植物プランクトンは強いリン制限を受けていた可能性が考えられる。

3. 2. 3　金属分析について

本調査では、サンプル水中に含まれる金属について、総量と溶存態濃度をそれぞれ分析した。分析対象とした金属は、Mg、Al、K、Ca、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Ag、Cd、Sn 及び Pb の 18 項目であるが、これらのうち Cr、Co、Zn、Cd、Sn 及び Pb の 6 項目については、全試料が定量限界もしくは検出限界以下であった。また、Mg、K、Ca 及び V は全ての試料から検出されたが、地点間に明確な違いはなく、また大部分が溶解性であることから流水中に含まれるイオン成分を反映しているものと考えられる。したがって、特筆すべき Mn、Fe、As 濃度について整理した結果を**図 5** に示す。8 月調査時および 10 月調査時ともに、Mn や Fe、As は、貧酸素状態にあった St. A 水深 25 m において高濃度で検出されていた。このことは、底質からの溶出による影響を反映していると考えられる。また、水深 20 m では総量が大きく減少していた。これは、水深 20 m では ORP が高く保持されているため、底質から溶出した金属イオンが上層側に拡散しても、酸化を受けて粒子態となり、速やかに沈降するためと推察される。また、Fe と As は水深 20 m ではほとんど溶解性成分が検出されなかったのに対して、Mn は溶解性成分が多く残存していた。これらの違いは、それぞれの金属イオンの酸化速度と物質間の吸着特性を反映しているものと考察される。すなわち、速やかに酸化される Fe は水酸化鉄となり、また As は水酸化鉄に吸着・固定され共沈する一方、酸化を受けにくい Mn はイオン態として水中に残存していたと考えられる。

3. 2. 4　WEP システムの効果について

以上より、本貯水池では、WEP システムにより供給される高濃度酸素水の効果により、底層において貧酸素化に伴い溶出したリンや金属が表層へ移行できず、表層において、藻類増殖に必要な物質が制限されるため、藻類増殖が抑制されていた可能性が考えられる。

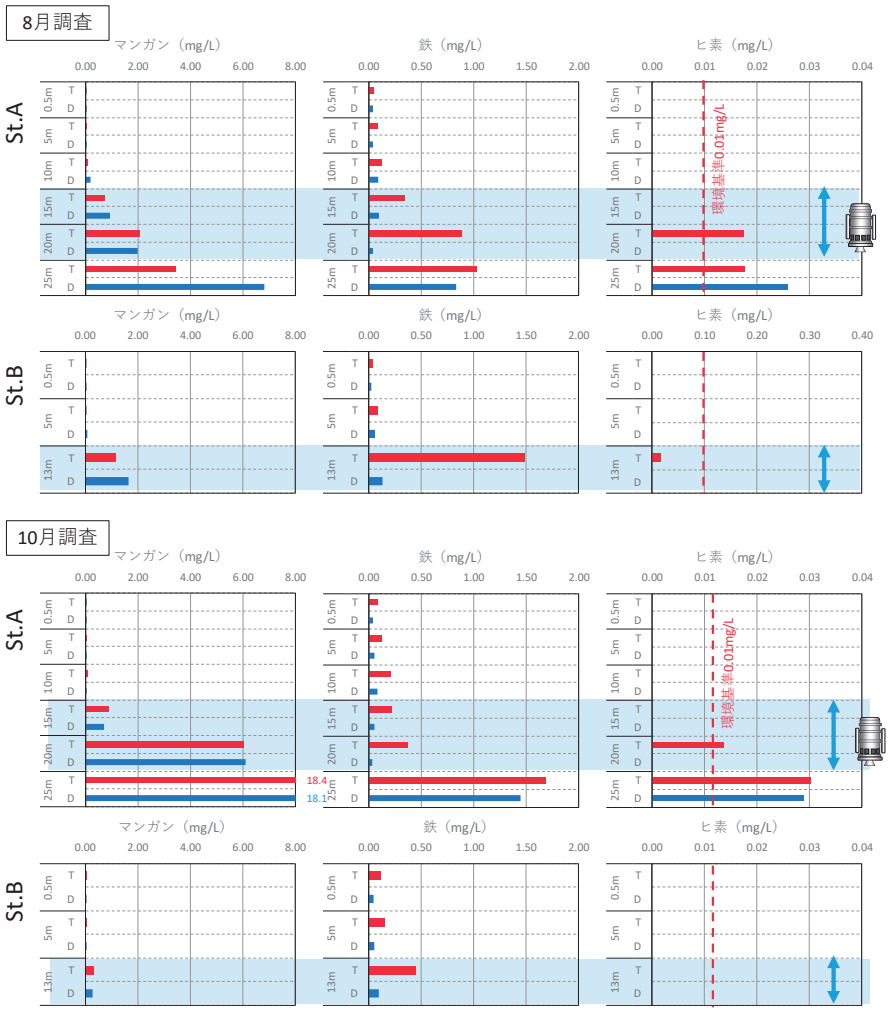


図 5　金属濃度測定結果（縦軸は水深、T は Total、D は Dissolved を意味する）

3. 3　微生物解析

3. 3. 1　顕微鏡との比較

光学顕微鏡での同定の結果、シアノバクテリア門は 2 種、植物プランクトンは 34 種、動物プランクトンは 32 種検出された。一方、同様の水試料の NGS による DNA 塩基配列解読では、データベース SILVA132_SSURef_Nr99 を用いた場合、細菌 2，232 種（うちシアノバクテリア門は 51 種）、古細菌 65 種、植物プランクトン 347 種、動物プランクトン 767 種、分類不明種 13 種が検出された。また、前述のとおり、Excavata に含まれる *Euglena* sp.や *Trachelomonas* sp.は光学顕微鏡による同定では検出されるが NGS では検出されなかった。

3. 3. 2　16S rRNA 遺伝子（古細菌・真正細菌）

16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析の結果を**図 6** に示す。8 月調査時、選択取水深度（10 m）より浅層側では独立栄養細菌であるシアノバクテリア門が多く、下層側では従属栄養細菌が多かった。また、

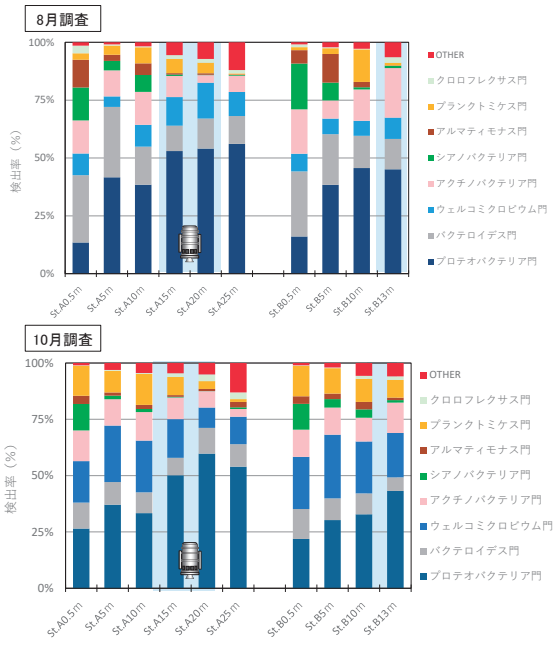


図 6　16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析

底層付近（St. A 25 m）からは、メタン生成古細菌（Methanomicrobia）が検出されており、これらが生成したメタンを利用するメタン酸化細菌（Methylophilaceae）も多く検出されていた。また、全地点で比較的多く検出された放線菌（Sporichthyaceae）は、主に土壌に生息する細菌であり、流域の土壌から流入河川を通じてダム湖に流入した可能性が考えられる。

10 月調査時の微生物叢の構成は、概ね 8 月調査時と類似していた。主な構成の変化としては、独立栄養細菌であるシアノバクテリア門およびバクテロイデス門の検出率が減少した一方、ウェルコミクロビウム門、およびプランクトミケス門の検出率は増加した。シアノバクテリア門はピコシアノバクテリアであるシアノバクテリウム属（Cyanobium PCC-6307）の割合が高く、その変動は季節的な水温低下の影響を反映した可能性がある。また、プランクトミケス門では、Rubinisphaeraceae 科に属す細菌が大きく増加していた。この細菌は、下水処理施設において寒冷な時期に多く検出される分類群であることから、水温低下により有利に増殖できた可能性がある。なお、全地点で検出率が増加したウェルコミクロビウム門は、その生態的機能について十分な理解とまで至っていないものの、多様な炭素源（キシラン、セルロース、ペクチン、糖、メタン）に対して高い分解能を有することが知られている。

シアノバクテリア門を構成する種の内訳を**図 7** に示す。8 月調査時では全調査ポイントから、10 月調査時では St. A の水深 20 m および 25 m を除く全調査ポイントにおいて、Cyanobium PCC-6307 が高頻度で検出された。Cyanobium PCC-6307 は淡水域に存在するピコシアノバクテリアで、高濃度によりろ過障害などの問題を引き起こすがアオコやカビ臭には直接関与しない種である。また、8 月調査時には、St. A の水深 25 m のみで、ジェオスミン産生種である Dolichospermum NIES41 が検出された。同時期、ジェオスミンが 40 ng/L 検出されていたことから、本種はこのダムの主なジェオスミン生産種であると考えられる。また、10 月調査時には、Dolichospermum NIES41 はほとんど検出されず、2-MIB 産生種である Psedanabaena PCC-7429 が全調査ポイントから検出された。特に、St. A 水深 5 m~15 m、St. B 水深 5 m 以深において高頻度で検出された。同時期、2-MIB が 4 ng/L 検出されていたことから、本種はこのダムの主な 2-MIB 産生種である可能性が考えられる。なお、これらのカビ臭産生細菌は光学顕微

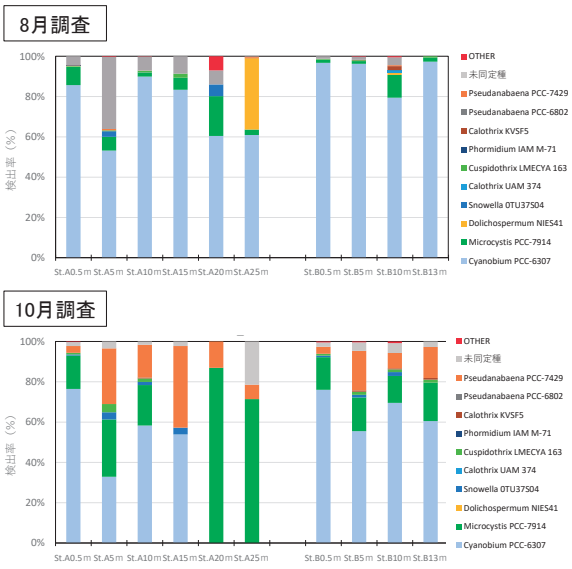


図 7　検出されたシアノバクテリア門の内訳

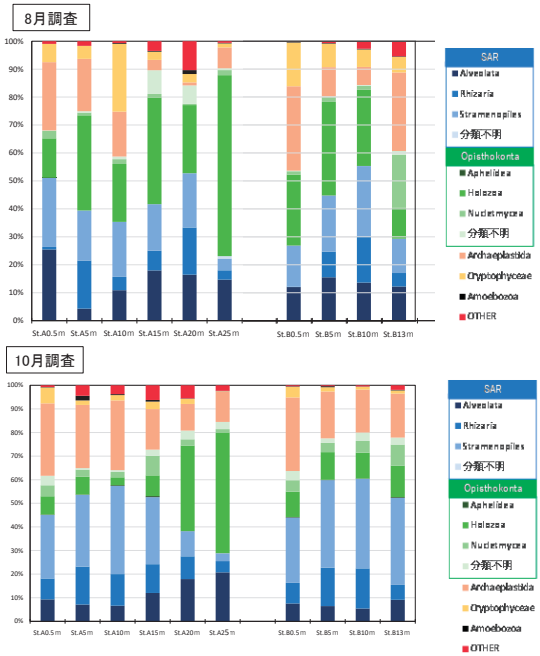


図 8　18S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析

鏡での同定では検出されなかったことから、NGS は水質障害の原因種を特定するために効果的な手法であることが確かめられた。このダム貯水池では、平成 29 年度から令和元年度までの 3 年間において、ジェオスミンはほとんど検出されない年（H30）もあれば、1,000 ng/L を超える月（R1.6 月）もあった。2-MIB も同様に、数 ng/L 検出された月（H30.7 月）もあれば、500 ng/L を超過する濃度で検出された月もあった（H29.9 月）。よって、令和 2 年度はカビ臭物質の発生が比較的少ない年であったと言える。

3. 3. 3　18S rRNA 遺伝子（真核生物）

18S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析の結果を**図 8** に示す。8 月調査時は、ストラメノパイル(Stramenopiles)、アルベオラータ(Alveolates)、リザリア(Rhizaria)を含む系統群である SAR スーパーグループ、動物(Holozoa)、真菌(Nudetmycea)等を含むオピストコンタ(Opisthokonta)、及び緑藻、車軸藻類等を含むアーケプラスチダ(Archaeplastida)の検出率が高かった。SAR スーパーグループは、繊毛虫や渦鞭毛藻等を含むアルベオラータ(Alveolata)は、St. A では表層 0.5 m と湖底直上となる 25 m で検出率が高く、水深 5 m と 10 m では他の水深に比べて大きく減少したのに対して、St. B では水深方向での顕著な違いは認められなかった。また、肉質鞭毛虫（アメーバ鞭毛虫）等を含むリザリア(Rhizaria)は、St. A と St. B ともに中層付近（水深 5～20 m）で多く検出された。珪藻類や黄色鞭毛藻類等を含むストラメノパイル(Stramenopiles)は、St. A 水深 25 m からの検出率が低いものの、水深方向での明確な違いは認められなかった。オピストコンタは、その大部分がホロゾアエによって占められており、St. A と B ともに、表層側ではカイアシ亜綱や単生殖巣綱が多く、選択取水深度（水深 10 m）以深では襟鞭毛虫綱が多く検出される傾向があった。アーケプラスチダは、その大部分が緑藻綱によって占められており、St. A では表層から選択取水水深（10 m）で多く検出されていたのに対し、St. B では表層の検出率は高いものの、水深 5 m と 10 m では少なく、湖底直上となる 13 m からは多く検出された。

10 月調査時は、SAR スーパーグループ、オピストコンタおよびアーケプラスチダ(Archaeplastida)の検出率が全検出率の 90%を占めていた。SAR スーパーグループの検出率は、繊毛虫や渦鞭毛藻等を含むアルベオラータ(Alveolata)が 8 月調査に比べて減少傾向を示したのに対して、ストラメノパイル(Stramenopiles)の検出率は増加傾向を示し、特に St. A 表層 0.5 m～水深 15 m および St. B 全層で顕著であった。ストラメノパイルの検出率の増加は、主に珪藻綱（*Ulnaria* 属及び *Aulacoseira* 属）のリード数の増加と一致していた。オピストコンタは、8 月調査に比べて、St .A 表層 0.5 m から水深 15 m、および St. B 全層においてホロゾアエの検出率が大きく低減したのに対し、St. A 水深 20 m と 25 m では減少幅はわずかであった。この原因は、カイアシ亜綱や単生殖巣綱のリード数が 8 月調査に比べて減少したのに対して、St. A 水深 20 m と 25 m では襟鞭毛虫綱のリード数は 8 月調査と同様に高く維持さ

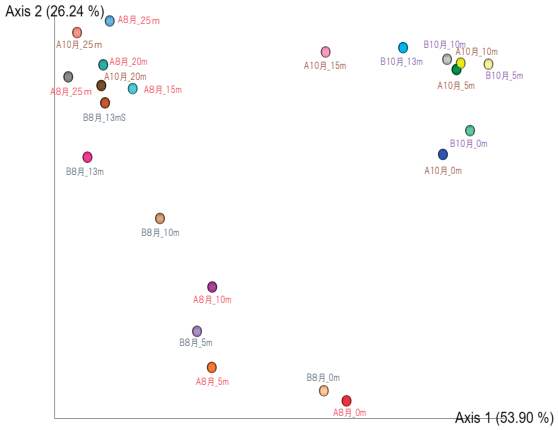


図 9　16S rRNA 遺伝子を対象とした主座標分析

れていたことによるものと考えられる。アーケプラスチダは、St. A と St. B ともに表層 0.5 m で最も検出率が高く、深度方向に減少する傾向が認められた。

3. 3. 4　細菌叢比較

16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢を Weighted UniFrac 解析により類似度比較を行った結果を**図 9** に示す。各試料における細菌・古細菌の群集構造は、第 1 軸により 53.9%、第 2 軸により 26.24%を説明することができた。第 1 軸による試料間の距離に着目すると、8 月調査時は、St. A と St. B ともに水深方向に従ってプロットが分散していることが分かる。10 月調査時は、St. A と B ともに水深 0.5 m から 15 m 付近までは、8 月調査時に比べて右側に移動しているが、St. A 20 m と 25 m は 8 月調査時とプロット範囲に明確な変化はない。すなわち、8 月から 10 月にかけての季節的な気温の低下、それに伴う水温構造の変化、さらには一次生産者であるシアノバクテリアを受けて、表層側（水深 0.5 m～15 m）では、細菌・古細菌の群集構造が大きく変化したと考えられる。一方、水塊が停滞する底層では、表層側のような環境要因の変動が乏しく、また湖底直上では貧酸素環境が継続していたこともあり、細菌・古細菌の群集構造に変化が認められなかったものと考察される。

第 2 軸による試料間の距離に着目すると、8 月調査時は第 1 軸と同様に水深方向に従ってプロットが分散していることが分かる。しかし、10 月調査時は、St. A と St. B はともに第 2 軸（縦方向）でのプロットは上方に集中しており、深度による違いが認められなかった。8 月調査時と 10 月調査時の群集構造を比較すると、8 月には表層付近で高かったバクテロイデス門の検出率が、10 月には水深方向で一様になっており、対

照的にウェルコミクロビウム門は全層で増加するなど、水深方向での違いが解消されている。このことから、第2軸の分散はバクテロイデス門及びウェルコミクロビウム門に属する菌種の存在比の変化により制御されている可能性がある。

3. 4 WEP システムを導入しているダムにおける水質改善効果の確認のまとめ

本研究では、WEP システムを導入しているダム貯水池において、WEP システムの水質改善効果の確認を行った。その結果、WEP システム設置点付近では、最下層で濃度が高かった溶解性のリンや鉄、マンガンが、WEP システムの稼働範囲において、急激に濃度が減少した。これは WEP システムから供給される高濃度酸素水により、底層から溶出した溶解性のリンや金属が粒子化され沈降することで、表層への移動が制限され、表層では植物プランクトンは強いリン制限を受けていた可能性が示唆された。また、WEP システムの効果は、約 600 m 離れた地点においても波及していたことが示唆された。

一方、NGS による微生物叢解析の結果、光学顕微鏡による同定結果と比べ、極めて多くの種類に分類することができた。さらに、光学顕微鏡では同定されなかったカビ臭産生細菌を NGS により検出することができた。このことから、NGS は水質障害の原因種を特定するために効果的な手法であることが示唆された。今後、調査を継続することで、水質が微生物叢に与える影響について、詳しく検討を進めていく予定である。

4. プランクトン自動判別技術の開発

本研究では、ダム管理所におけるプランクトンの定期モニタリング結果を収集し、機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発を試みた。

4. 1. 実験方法

4. 1. 1 画像データ収集

国交省直轄ダムおよび水資源機構ダムから定期モニタリングで取得する直近 1～5 年分のダム貯水池水質調査要領「様式 1-1-14_定期調査_動植物プランクトン写真票」に準ずる画像データを収集した。

4. 1. 2 分類モデル

本研究では、画像の分類に Residual Networks モデル (ResNet-152)を使用した。ResNet モデルは、He らが 2015 年に考案したニューラルネットワークのモデルである[9]。ResNet モデルは、一般的な畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network: CNN) に加えて、基本的な恒等写像を学習することを目的として開発されたショートカット構造が、複数の畳み込み層をスキップするように組み込まれているため、深い層においても、学習が進むという利点を持っている。

表 4 プランクトン画像収集結果

順位	分類	備考	画像数
1	*Coscinodiscineae* (others)	その他の小型コアミケイソウ	577
2	*Cryptophyceae*	クリプト藻	392
3	*Asterionella formosa* complex	Asterionella formosa群	331
4	*Polyarthra vulgaris*	ハネウデワムシ	321
5	*Chrysophyceae* (others)	その他の黄金藻	307
6	*Tintinnopsis*		230
7	*Copepoda* (nauplius)	カイアシ亜綱(ノープリウス)	208
8	*Aulacoseira pusilla complex*	Aulacoseira pusilla群	206
9	Other green flagellate	その他の緑色鞭毛藻	196
10	*Synchaeta*	ドロワムシ属	185
11	*Fragilaria crotonensis*		149
12	*Nitzschia* (others)	その他の*Nitzschia*属	149
13	*Aulacoseira granulata* f. *granulata*		144
14	*Dinobryon*		126
15	*Peridinium* (others)	その他の*Peridinium*属	114
16	*Peridinium bipes*		111
17	*Eudorina*		96
18	*Bosmina longirostris*	ゾウミジンコ	83
19	*Lindavia*		76
20	*Ploesoma truncatum*	スジワムシ	71
21	*Trichocerca*	ネズミワムシ属	70
22	*Pandorina morum*		67
23	*Thalassiosiraceae* (others)	その他のタラシオシーラ科珪藻	67
24	*Diatoma*		61
25	*Naviculaceae* (others)	その他のハネケイソウ科珪藻	54
26	*Bosminopsis deitersi*	ゾウミジンコモドキ	52
27	*Achnanthidium* (sensu lato)	*Achnanthidium*属(広義)	52
28	*Cymbella* (sensu lato)	*Cymbella*属(広義)	52
29	*Dolichospermum-Sphaerospermopsis*		51
30	*Aulacoseira ambigua* f. *ambigua*		51

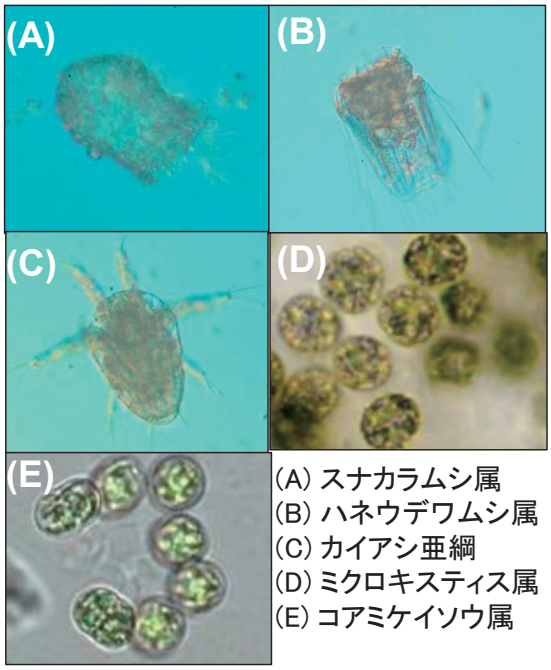


図 10 分類に用いたプランクトン画像の例

4. 2 実験結果と考察

4. 2. 1 画像の収集

各管理所から収集した報告書 356 編からプランクト

ン画像約 6,500 枚を抽出した。抽出された上位 30 位のプランクトン種を**表 4** に示す。そのうち、多くのダムにおいて高頻度で検出される繊毛虫門多膜綱スナカラムシ科スナカラムシ属（*Tintinnopsis* spp.）、輪形動物門ワムシ綱ヒゲワムシ科ハネウデワムシ属（*Polyarthra vulgaris*）、節足動物門カイアシ綱カイアシ亜綱（*Copepoda* sp.）の 3 種、およびアオコの原因となるシアノバクテリア門クロオコッカス目ミクロキスティス属（*Microcystis aeruginosa*）、アオコと形状の似ているオクロ植物門珪藻類コアミケイソウ属（*Coscinodiscus* sp.）について（**図 10**）、深層学習を行い、画像分類を試みた。

4. 2. 2　スナカラムシ属、ハネウデワムシ属、カイアシ亜綱の画像識別

スナカラムシ属とハネウデワムシ属について、深層学習を行った結果について、**表 5** に示す。本研究では、10 回以上学習させても認識率が向上しない場合、学習を打ち切った。No.1～No.3 に関して、訓練画像の枚数を変えず、種類を変えて学習を行った結果、訓練画像の選び方次第で、認識率は 0.85～1.00 と異なった。訓練データ数を 100 とした No.4 は、学習は収束せず、認識率は低かった。この原因として、訓練データの画像の中には、対象が不鮮明のものや小さ過ぎるものが含まれていたことが考えられた。No.5～No.8 では、訓練データの中から、対象が不鮮明なものや小さすぎるものを除外した。その結果、特に、多くの訓練画像を用いた No.8 において、大きく認識率が向上した。しかし、この場合においても、8 回目の学習以降は認識率が低下していった。これは訓練データ数の不足によるものと思われる。カイアシ亜綱（*Copepoda* sp.）を加えた 3 種分類の結果を**表 6** に示す。訓練画像を 30 枚とした No.1～No.5 では認識率が 0.73-0.97 と 2 種分類の場合と比べ、若干低下した。また、訓練データ数を増やした場合は、認識率は 0.80-0.87 となった。認識率としては決して低い値ではないが、実用化を考慮した場合、より高い認識率が求められる。今後、質の高い訓練データ数を増やすことにより認識率は向上するものと思われる。

4. 2. 3　ミクロキスティス属およびコアミケイソウ属の画像識別

ミクロキスティス属とコアミケイソウ属について、深層学習を行った結果について、**表 7** に示す。ミクロキスティス属の収集画像数が少なく 1 パターンしか深層学習を行えなかったが、認識率は 0.83 と本研究における平均的な認識率となった。ミクロキスティス属はアオコ形成の原因となるダム水質管理において極めて重要な種である。また、群体を形成し存在するため、群体の形状が認識率に影響を与えると考えられる。今後は、ミクロキスティス属の自動分類を進める予定である。

表 5　スナカラムシ属とハネウデワムシ属の深層学習結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数(*/20)	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	1.00	0.85	13	0.85	
2	30	10	1.00	1.00	13	0.95	
3	30	10	1.00	0.95	20	0.95	
4	100	10	0.56	0.80	1	0.80	11
5	30	10	0.82	1.00	3	0.75	13
6	30	10	0.98	0.90	13	0.90	
7	30	10	0.97	0.90	6	0.80	16
8	100	10	0.99	0.90	8	0.90	18

表 6　表 5 の検討にカイアシ亜綱を加えた 3 種分類の結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数(*/20)	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	0.94	0.80	7	0.77	17
2	30	10	1.00	0.93	20	0.93	
3	30	10	1.00	0.97	19	0.93	
4	30	10	0.95	0.77	7	0.63	17
5	30	10	0.98	0.73	7	0.67	17
6	99	10	0.97	0.80	3	0.70	13
7	99	10	0.99	0.87	10	0.83	20
8	99	10	1.00	0.87	6	0.87	

表 7　ミクロキスティス属とコアミケイソウ属の深層学習結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数(*/20)	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	0.99	0.83	17	0.83	

4. 3　プランクトン自動判別技術の開発のまとめ

本研究では、ダム管理所が実務で行っているプランクトンの定期モニタリング調査結果からプランクトン画像を抽出することで、効率的に画像データを収集することが可能になった。機械学習によるプランクトンの自動判別を試みた結果、試行したパターンにおける認識率は 0.73-1.00 であった。今後、継続的にダム管理所から画像を収集し、質の高い訓練データ数を増やすことにより、認識率が向上すると思われる。また、今後は、ダム水質管理に重要な種について、重点的に検討を進める予定である。

5. まとめ

本研究では、ダム貯水池水質モニタリングの効率化に資する NGS 解析手法確立のため、微生物叢解析に使用するユニバーサルプライマーの網羅性を検討し、より網羅性の高いプライマーの改良に繋がる知見を得ることができた。また、WEP システムが導入されているダム貯水池において、ダム貯水池表層でリン制限になっており、それが WEP システムにより供給される高濃度酸素水による効果であることが示唆された。また、NGS は水質障害の原因種を特定するために効果的な手法であることが示唆された。機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に関して、ダム管理所から実務に用いた画像を収集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、認識率が 80-87%の分類モデルを作成することができた。今後は、継続的に画像データを収集することで、精度が向上するものと思われる。

今後は、ダム貯水池における低コストで迅速・効率的な動植物プランクトンモニタリング手法の開発、水質障害原因種の検出、効果的な水質保全施設運転方法の提案に向け、研究を進めていく予定である。

参考文献

1）国土交通省 : ダム貯水池水質改善の手引き、pp. 1-105、2018 年 3 月

2） 大杉奉功、谷本茂、天野邦彦：河川水辺の国勢調査の改善に関する研究（プランクトン調査マニュアルの改訂）、一般財団法人 水源地環境センター 平成 26 年度研究論文（所報）、pp. 40-46、2014

3） 国土交通省：河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル【ダム湖版】V 動植物プランクトン調査編、pp. 1-56、2016 年 1 月

4） 野田尚宏、関口勇地 : 次世代 DNA シーケンシング技術による環境中の複合微生物相解析の現状と今後の展望、水環境学会誌、35（9）、pp. 290-297、2012

5） 對馬育夫 : ダム湖周辺の水環境改善に向けた植物プランクトン試験効率化システムの開発、令和 2 年度河川基金研究成果発表会 https://www.kasen.or.jp/Portals/0/pdf_jyosei/%E9%85%8D%E5%B8%83%E8%B3%87%E6%96%99_%E3%82%B3%E3%83%BC%E3%82%B9%E2%91%A0.pdf

6） 對馬育夫、小川文章：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（簡易的な藻類定性定量方法の開発）、平成 30 年度 研究開発プログラム報告書 (13. 地域の水利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発)、国立研究開発法人土木研究所、pp. 17-21、2019

7) 今井章雄 : 湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究、平成 27 年度環境研究総合推進費終了成果報告書、https://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo_report/h27/pdf/5-1304.pdf

8) 中薗孝裕、阿部千雅、鈴木譲 : 霞ヶ浦の底泥表層の巻き上げ時における栄養塩類と鉄・マンガンの溶出特性、EICA、14、pp45-52、2009

9） Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, and Jian Sun. Deep residual learning for image recognition. In Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition, pp. 770–778, 2016

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

（機械学習手法を用いたダム貯水池におけるアオコ発生予測の検討）

担当チーム:水環境研究グループ（水質チーム）
研究担当者：山下洋正、對馬育夫、服部啓太
担当チーム：水工研究グループ（水理チーム）
研究担当者：石神孝之、猪股広典

【要旨】
本研究では、気候変動の影響によりダム貯水池において発生頻度が増大すると考えられているアオコ発生予測手法の開発に向けて、機械学習手法を用いた Chl-a 濃度予測モデルの構築に取り組んだ。モデルの構築においては、機械学習手法として全結合型の NN モデルと LSTM モデルの 2 つを採用し、ダム貯水池の水質や水象等のデータを入力データ、Chl-a 濃度を出力データとするモデルを構築した。モデル構築の結果、最も高い予測精度を示したダムにおけるモデルの相関係数は R＝0.70 であり、藻類の夏季の濃度ピークをある程度再現可能であった。一方で、Chl-a 濃度の変動が複雑なダムでは十分な予測精度が得られなかった。これらの原因は Chl-a 濃度のみでは藻類種に応じた増殖の特性をとらえられていないためと推測され、予測精度の向上には異なった変数の学習データが必要と考えられた。また、最も高い精度が得られたダムを対象として変数群に対する感度解析を行った結果、水象データを除いたモデルで最も精度が低下し、対象としたダムにおいては水象データが Chl-a 濃度予測に大きく影響していることが推察された。これらの結果から、一部のダムでは機械学習手法によってアオコ発生の予測が可能になることが示唆された。
キーワード：気候変動、ダム貯水池、アオコ発生、Chl-a 濃度予測、機械学習

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)]。水環境に対する影響は、気温上昇に伴う水温上昇や、降雨形態の変化による流量・流出負荷量の変化が考えられ、これらの条件変化によりダム貯水池においても水質の変化が発生することが想定される。

昨年度までの研究では、気候変動の水質に与える影響の評価を目的とし、仮想のダム貯水池を対象とした水質シミュレーションをダム貯水池の規模別に行った。ダム貯水池の規模と気候変動シナリオごとにシミュレーションを行った結果、富栄養化の進行が各シナリオで見られ、気温上昇が大きいシナリオではより強い影響を受けることが示唆された。

このような結果から、ダム貯水池ではアオコ発生の頻度や期間が増加することが考えられ、対策を効率的に行うためにもアオコ発生の予測技術が求められる。しかし、従来の物理・化学・生物学的プロセスを基にした生態系モデルではアオコ現象の短期的に再現性の高い予測が難しい。また、貯水池の流動と生態系を計算する水質シミュレーションは高度な専門知識を必要とするため、個々のダム貯水池ごとに独自で実施することは困難である。近年、水質予測の分野においては、統計学的手法を用いた再現・予測モデルが様々な研究で検討されており、霞ヶ浦におけるアオコ発生を検討した既往研究では、機械学習手法を生態系モデルに組み込んだ予測手法の構築を行い、優れた予測精度が得られたことを示している [2)]。このように機械学習手法は、過去のデータが充実している現象に対する再現・予測手法として画期的なアプローチとなることがある。

そこで本研究では、アオコ発生が確認されているダム貯水池を対象として水質や気象、水象、その他データの収集を行い、既存のデータを基にした Chl-a 濃度予測モデルの構築に取り組んだ。

2. 方法

2.1　解析対象としたダムとデータ

本研究においては、アオコの発生が確認されている

中国地方の 5 つのダムを対象として解析を行った。

5 つのダムのアオコ発生に関する諸元と解析対象の期間を以下に記す。

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。本研究では 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 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。本研究では 2012 年 1 月から 2017 年 2 月を解析対象期間とした。

C 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。本研究では 2011 年 3 月から 2017 年 12 月を解析対象期間とした。

D 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。なお、D ダムは 2008 年以降、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、本研究では 2000 年 1 月から 2007 年 12 月までを解析対象期間とした。

E 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。研究では 2004 年 6 月から 2016 年 8 月を解析対象期間とした。

これらのダムで取得・管理されているデータを本研究では解析用のデータとした。検討に用いたデータの一覧を表-1 に示す。湖沼・貯水池における藻類の増殖に強く影響すると考えられる気象・水象・貯水池水質・流入水質の大項目にデータを分類し、それらの中で取得可能なデータを下記の通りに整理して入力変数とした。また、これらの季節に関わる情報が重要であると考えたため季節変数を入力変数に加えた。

2.2 機械学習手法による予測モデルの構築

本研究では、機械学習手法として代表的な手法である全結合型のニューラルネットワークモデル（NN モデル）と時系列データの取り扱いに優れるとされる長短期記憶モデル（LSTM モデル）を用いて Chl-a 濃度予測モデルの構築に取り組んだ。NN モデルや LSTM モデルについては参考文献で詳細が述べられているため [3]、本報では数学的な説明等を省略する。中間層の活性化関数は代表的な関数である ReLU 関数、恒等関数、hard sigmoid 関数の 3 つについて感度解析を行い、最も精度が高く得られた関数をそれぞれのダムにおけ

表-1　解析に用いたデータ

項目			観測・算出	単位	備考
気象	気温	日平均気温	観測	℃	
		前30日平均気温	算出	℃	
	日射	日平均日射量	観測	MJ/m^2	
		前30日平均日射量	算出	MJ/m^2	
	風速	日平均風速	観測	m/s	
	雨量	ダム地点雨量	観測	mm	
水象	流量	ダム流入量	観測	m^3/s	
		前30日平均流入量	算出	m^3/s	
	運用	ダム放流量	観測	m^3/s	
		貯水位	観測	m	
		貯水量	算出	m^3	H-V式から算出
		灌水面積	算出	m^2	H-A式から算出
貯水池水質	水温	水深0.5m水温	観測	℃	自動観測データ
		水深5m水温	観測	℃	
		水温勾配	算出	℃	
	濁度	水深0.5m濁度	算出	度	自動観測データ
	栄養塩	貯水池上層T-P	観測	mg/L	※1
		貯水池上層T-N	観測	mg/L	※1
流入水質	水温	流入水温	観測	℃	
	栄養塩	貯水池上層T-P	観測	mg/L	※1
		貯水池上層T-N	観測	mg/L	※1
季節変数	月	※各データの対応する月を表す変数	観測	-	
出力	Chl-a	水深0.5mChl-a	観測	μg/L	

※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

表-2　各ダムにおけるモデル構築の結果

ダム名	Aダム		Bダム		Cダム		Dダム		Eダム	
モデル	全結合	LSTM	全結合	LSTM	全結合	LSTM	全結合	LSTM	全結合	LSTM
入力変数	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
中間層数	4	1	4	1	1	1	5	1	1	1
ユニット数	32	5	64	10	16	5	64	1	10	2
	32		64				32			
	32		32				32			
	16		32				32			
							32			
学習率	0.0001	0.01	0.001	0.01	0.0001	0.01	0.0001	0.01	0.00001	0.0001
活性化関数	linear	linear	hard_sigmoid	relu	linear	hard_sigmoid	relu	relu	linear	linear
最適化	rmsprop	rmsprop	Adam	Adam	rmsprop	rmsprop	rmsprop	Adam	rmsprop	rmsprop
エポック	100	100	200	100	100	100	100	100	300	100
バッチサイズ	64	32	64	8	16	16	16	256	128	256
平均二乗誤差（RMSE）	7.33	6.66	33.39	33.02	9.12	9.38	11.27	12.93	21.50	20.98
相関係数	0.46	0.70	0.16	0.19	0.57	0.56	0.23	0.01	−0.15	−0.04

るモデルで採用した。また、中間層の層数及び中間層の各ニューロン数については感度解析を行い、最も精度が良かったモデルの形状をそれぞれのダムで用いた。

モデルの構築においては、精度検証のために対象のデータを教師データとテストデータに分割した。教師データで作成したモデルの予測値をテストデータと比較することで、それぞれのモデルの精度を検証した。

加えて、一定の予測精度が得られたダムについて一部の入力データを変化させたモデルの構築を行い、入力変数の種類に関する感度解析を行った。これらの解析では、気象・水象・貯水池水質・流入水質・季節変数の大項目から一つずつ項目を除外し、モデルの精度の変化を確認した。

3. 解析結果

3.1　各ダムにおけるモデル構築結果

表-2 に各ダムにおけるモデルの構築結果を示す。A ダムや C ダムにおいては相関係数が 0.5 を超え、一定の精度を示すモデルが構築されたが、B、D、E ダムにおいては相関係数がすべて 0.3 以下であり、十分な予測精度を得ることが難しかった。

図-1 に各ダムのテストデータ期間における Chl-a 濃度の実測と高い精度示したモデルによる予測値を示す。A ダムにおいては 9~11 月の Chl-a 濃度の上昇傾向を再現することができており、これらは夏~秋季の藍藻由来の植物プランクトンの増殖をある程度表現していると考えられた。C ダムにおいては 6~7 月の Chl-a 濃度の上昇傾向をある程度再現していたが、4~5 月の珪藻由来と考えられる Chl-a 濃度の上昇傾向については再現が難しかった。B、D、E ダムにおいては Chl-a 濃度のピークが年間で複数のタイミングで観測されており、それらの変動傾向を再現することは難しく、十分な予測精度が得られなかった。

表-3　入力変数の項目群の組み合わせによる感度解析の結果

	Case-0	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4	Case-5
気象	○		○	○	○	○
水象	○	○		○	○	○
貯水池水質	○	○	○		○	○
流入水質	○	○	○	○		○
季節変数	○	○	○	○	○	
RMSE	6.66	850.11	inf	7.51	314.64	6.82
相関係数	0.70	0.49	0.01	0.38	0.52	0.61

上記の結果から、A ダムにおいては本手法による Chl-a 濃度予測が有効となる可能性が考えられたが、B、D、E ダムでは適用が難しいことが考えられた。これらの要因として、A ダムにおいては Chl-a 濃度の上昇が 9~11 月の時期に限られており、春季の珪藻由来と考えられる Chl-a 濃度の上昇が起こらないダムであるため濃度変化の予測が容易であると推察された。一方で、B、D、E ダムのような 1 年間を通じて複数のタイミングで Chl-a 濃度の上昇ピークが存在するようなダムでは、珪藻や藍藻等の植物プランクトン種の違いによる複数の濃度ピークが存在すると考えられ、これらの違いに起因する変動傾向を学習することは本研究で使用したデータからは難しいと推察された。

3.2　入力変数を変化させた感度解析の結果

3.1 にて最も高い精度が得られた A ダムを対象として入力変数を変化させた感度解析を行った。それらの結果を表-3 に示す。A ダムにおいては、すべての変数を入力データに使用したモデル（Case-0）に対して、大項目の変数群を一つずつ除いたそれぞれのモデル（Case-1 ~ Case-5）は相関係数が低下する結果となったが、その低下の度合いは除いた変数群に応じて異なっていた。構築したそれぞれのモデルを比較したときに、水象データを除いたモデル（Case-2）は相関係数が 0.01 となり精度の低下が著しく、A ダムの Chl-a 濃

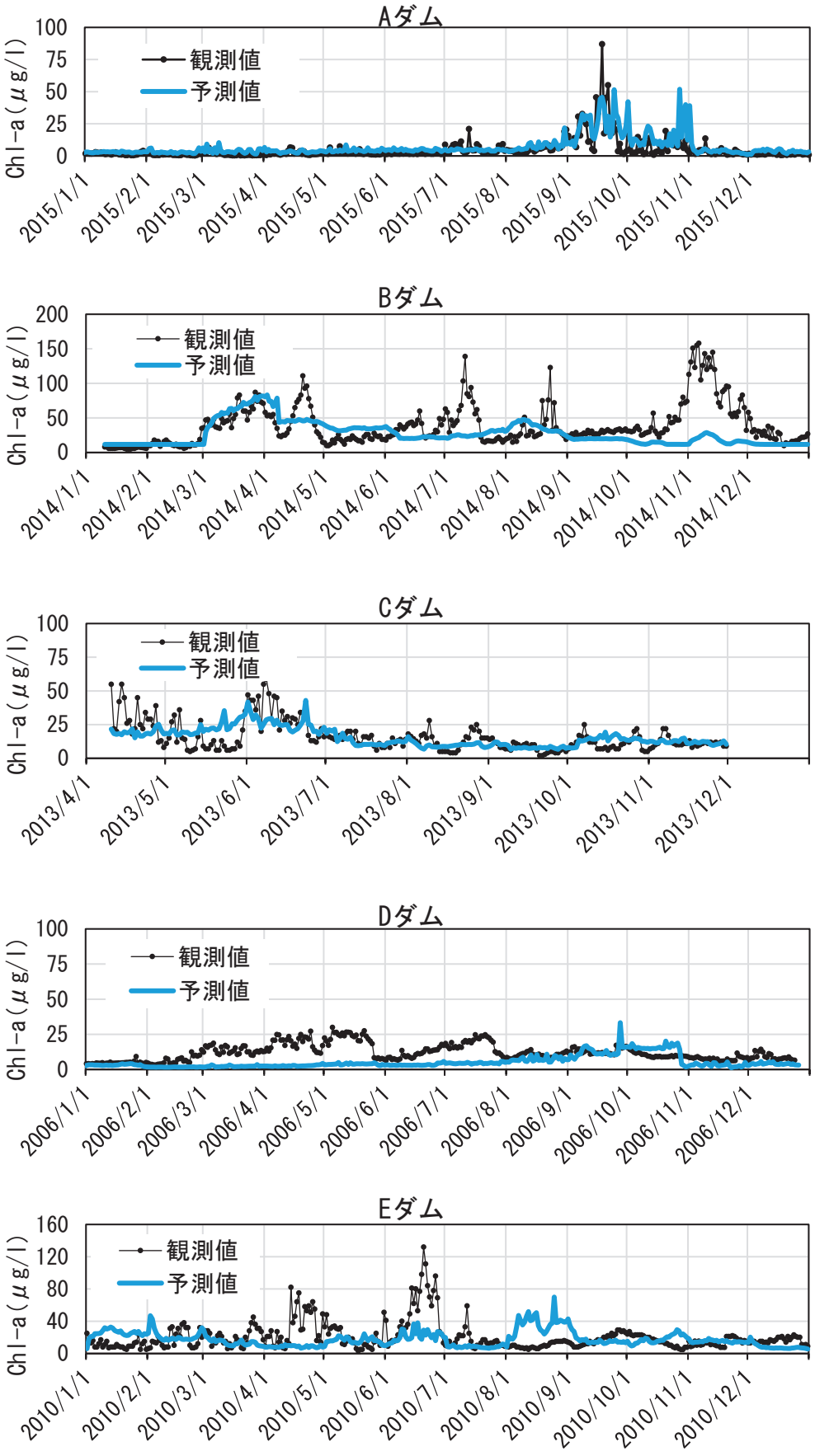


図-1　各ダムにおける Chl-a 予測と実測値の比較

度予測に最も影響を与えている変数群であることが示唆された。一方で、季節変数を除いたモデル（Case-5）の精度低下は限定的であり、気象や貯水池水質などに含まれる気温や水温などのパラメーターが季節変数と同様の役割を果たすため、精度低下が限定的であると考えられた。

4. まとめ

中国地方の 5 つのダムを対象として機械学習手法を用いた Chl-a 濃度予測モデルの構築を試みた。一部のダムでは夏季の Chl-a 濃度のピークを再現できアオコ発生（藍藻類の異常増殖）を予測可能となることが示唆された。一方で、春季の珪藻ブルームのような年間を通じて複数の Chl-a 濃度の上昇ピークが存在するようなダムでは相関係数が低く、予測が難しかった。

また、最も高い予測精度を示したダムにおいて、変数の大項目を一つずつ外したモデルの構築を行い、モデルの入力変数を変化させた感度解析を行った。その結果、対象としたダムにおいては水象データを外した際に予測精度が最も低下し、水象データが対象としたダムの Chl-a 濃度予測に大きな影響を与えている変数群であることが推察された。

今後は、上記の課題を踏まえた効果的な予測手法や精度向上に必要な学習データについて検討していく。また、既存データを用いた統計学的予測手法だけでなく、数理モデルと統計学的なモデルを組み合わせた短期・長期の藻類濃度やアオコ発生の予測手法の可能性についても検討していく。

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) 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
3) 斎藤康毅 : ゼロから作る Deep Learning 2 ―自然言語処理編、オライリージャパン、2018

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：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質チーム）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、村田里美、服部啓太

【要旨】
土砂供給が実施される河川の安全・省力な水質把握方法として薄膜拡散勾配（Diffusive Gradients in Thin-films: DGT）によるパッシブサンプリング手法（以下 DGT―パッシブサンプリング法）を用いた現地調査を実施し、適用性を検討した。置き土による土砂供給を実施する二瀬ダム下流河川を対象とし、土砂の流下が著しいと考えられる高流量時（7 月）と土砂の流下が起こらないと考えらえる低流量時（10 月）に調査を実施した。その結果、Al では高流量時と低流量時ともに DGT―パッシブサンプリング法による推定平均濃度と水試料の分析による濃度の値が近く、濃度把握手法としての適用性が確認された。一方、Mn では濃度を過大評価する傾向が見られ、過大評価を補正するための手法を検討する必要があることが考えられた。これらの結果から、一部の金属については DGT―パッシブサンプリング法を土砂供給が行われる現地河川に適用可能であることが示唆された。
キーワード：土砂供給、ダム下流河川、labile 態金属、DGT―パッシブサンプリング法

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一つであり、さまざまな排砂の方法が検討・実施されている。排砂した土砂をダムの下流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、投入された土砂には、ダム貯水池に堆積した後に吸着したものを含め金属類が含まれるため、ダム下流の河川に投入された土砂から溶出した金属類が、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金属類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。

この評価にあたっては、水中の土砂濃度増加に伴う水質変動をモニタリングすることが求められる。一方で、置き土や排砂バイパスなどの土砂供給手法は雨天時の掃流力によって土砂が流下するため、水質調査を行う場合の多くは降雨時となり、現場河川における人力の採水には安全性の観点から困難が伴う。降雨時に実施可能な調査手法として、自動採水機による採水やセンサー類による水質モニタリングなどが挙げられるが、人力の採水を伴わない調査手法としてパッシブサンプリングが近年注目を集めている。パッシブサンプリングは水環境中にディスク等の捕集剤を一定期間設置することで、捕集された対象物質の時間平均濃度を推定する手法であり、現地における採水を行わずに対象物質の環境中の平均濃度を算出することを目的としている。既往研究では平水時の河川等へ適用例が存在するが [1]、置き土等の手法による土砂供給が実施される河川へ適用した事例は存在しない。

R1 年度では、パッシブサンプリングの雨天時河川における適用性の基礎検討として、薄膜拡散勾配（Diffusive Gradients in Thin-films: DGT）によるパッシブサンプリング手法（以下 DGT―パッシブサンプリング法）を用いて雨天時の恋瀬川（茨城県）にて観測実験を行い、Mn や Cu について現場河川中の平均濃度をオーダーレベルで推定できることを確認し、雨天時河川においても DGT―パッシブサンプリング法が適用可能であることを示した [2]。

R2 年度は、置き土が実施されているダム下流河川にて DGT―パッシブサンプリング法を用いた水質調査を行い、土砂供給が行われる河川における金属濃度の実態を把握するとともに、DGT―パッシブサンプリング法の適用性を検討した。

2. 方法

2. 1 現地調査の概要

本研究では荒川流域の最上流部である二瀬ダム（埼玉県秩父市、国土交通省関東地方整備局管理）の下流河川を対象として現地調査を行った。二瀬ダム周辺の流域概要及び調査地点（P1）を図-1 に示す。二瀬ダムでは 2003 年より約 10,000 m^3 の置き土を毎年実施しており、土砂還元事業の代表例と考えられるため調査流域として選定した。

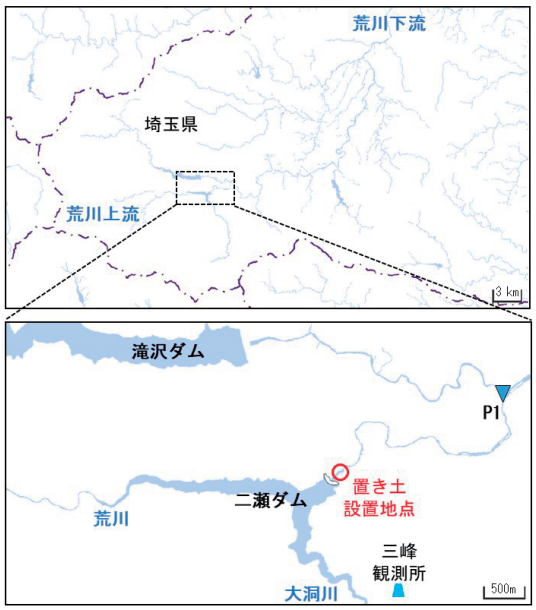


図-1 二瀬ダム流域の概要と調査地点（P1）



図-3 調査地点（P1）付近の様子

2020 年における二瀬ダムの放流量を図-2 に示す。高流量時調査時には 15 m^3/s 以上の放流を行っており、土砂に対して十分な流下能力を有していたと考えられる。二瀬ダムにおける現地調査は、置き土の流下に伴う水質影響が存在すると考えられる高流量時調査（2020 年 7 月 13-15 日、図-2 の調査 1 期間）と置き土による水質影響が小さいと考えられる低流量時調査（2020 年 10 月 1-2 日、図-2 の調査 2 期間）の 2 回を実施した。

本調査では、図-1に示すP1の位置でDGT―パッシブサンプリング法を用いた観測を実施し、平均濃度データの取得を試みた（詳細を**2.3**で記述する）。P1付近は図-3に示すように河川への直接のアクセスが可能であり、降雨の影響で放流量が上昇した際も比較的安全に作業が実施できるため調査地点とした。高流量時調査では、観測期間中にバケツを用いたサンプリング（グラブ法）による水試料の採取を22回行い（観測開始から36時間までは2時間間隔、以降の観測終了までは4時間間隔）、水温をロガー水温計で記録した。低流量時調査では、観測期間中にグラブ法による水試料の採取を6回行った（観測開始から24時間までは6時間間隔、以降の観測終了までは2.5時間間隔）。

2. 2 水試料（グラブ法）の金属分析

現地にて採取した水試料は実験室に持ち帰り、金属の全量と labile 態の 2 形態について分析を行った。全

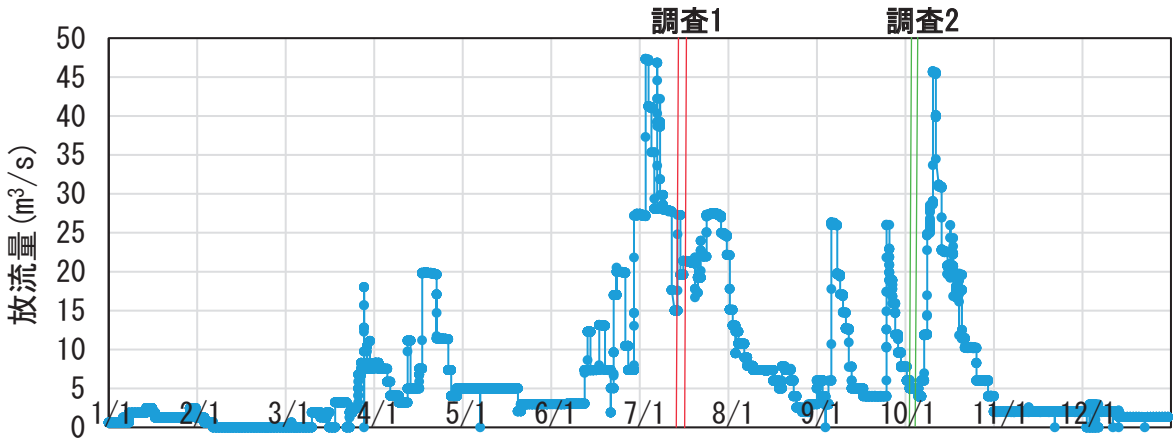


図-2 2020 年における二瀬ダムの放流量（調査 1 が高流量時調査、調査 2 が低流量時調査）

量の分析では硝酸分解による前処理をほどこした。labile 態については現地にて 0.45 µm フィルターを用いてろ過を行い、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、前処理を行い測定に供した。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、14 種（Li、B、Al、Ti、V、Co、Cr、Fe、Mn、Ni、Cu、Ag、Cd、Pb）金属濃度を定量した。

2. 3 DGT－パッシブサンプリング法を用いた濃度推定

本研究で用いた薄膜拡散勾配測定ユニット（DGT ユニット）は DGT Research 製の LSNM-NP である。LSNM-NP の Resin layer（Chelex 樹脂）は 12 種の金属（Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mn、Ni、Pb、Zn、U）の labile 態を対象とした吸着剤である。ICP-MS の分析対象を踏まえて本研究では 9 種金属（Al、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mn、Ni、Pb）を対象に平均濃度データの取得を試みた。DGT—パッシブサンプリング法による観測では、事前にマニュアル [3]に記載された DGT ユニットのコンディショニングを実施した。コンディショニング後の DGT ユニットは、図-4 に示す通水のために穴をあけた塩ビパイプの中に設置した。現場河川ではそれらのパイプを浮体式の観測機材にとりつけ、図-5 に示すように DGT ユニットを河川に浸漬した。DGT ユニットの浸漬時間は 24 時間以上で実施されている既往調査例が多く [1, 4]、高流量時調査では 48 時間、低流量時調査では 26.5 時間の DGT ユニットの浸漬を行った。DGT ユニットは河川より回収後、Resin layer を取り出し、マニュアル [3]に記載された方法に従って、前処理を行った。前処理を行い得られた溶出液は **2.2** の金属分析に供した。

平均濃度の算出においては、Resin layer に吸着された金属量を M（µg）、DGT—パッシブサンプリング法により算出される河川水中の平均濃度 $C_{DGT-labile}$(µg/L)として、下記の式（1）、（2）を用いる。

$$M = \frac{C_{elu}(V_{gel} + V_{acid})}{f_e} \quad (1)$$

$$C_{DGT-Labile} = \frac{M\Delta_g}{DAt} \quad (2)$$

ここで、C_{elu}：測定試料中濃度（µg/L）、V_{acid}：測定試料作成時の溶液量（5 mL）、V_{gel}：Resin layer の体積（0.16 mL）、A：Window の面積（3.14 cm²）、f_e：溶出係数（マニュアルに従い 0.85）、Δ_g：Diffusive gel と Membrane filter の厚さ（0.093 cm）、D：拡散係数（cm²/s）、t：DGT の浸漬時間(s)である。C_{elu} と t は各調査における値を代入し、D は DGT Research より各水温における物質ごとの拡散係数が提供されているため、各調査の水温の平均値からそれらを代入した [5]。

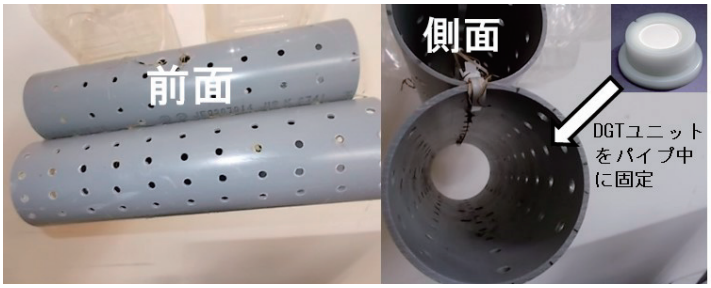


図-4 DGT ユニット取り付け用の観測機材

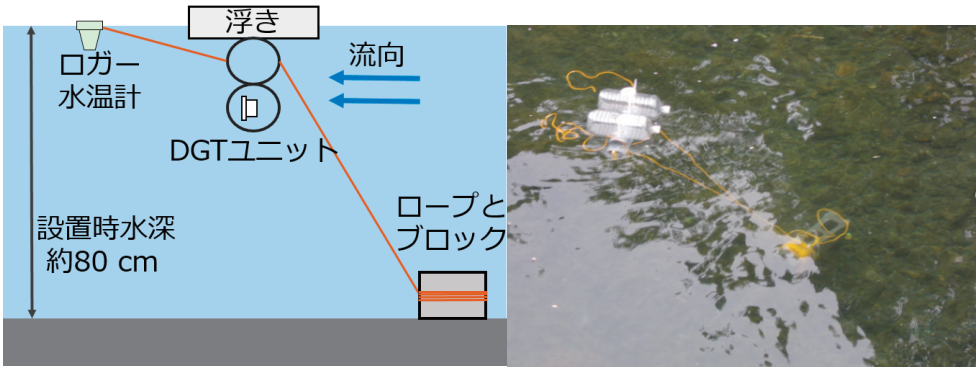


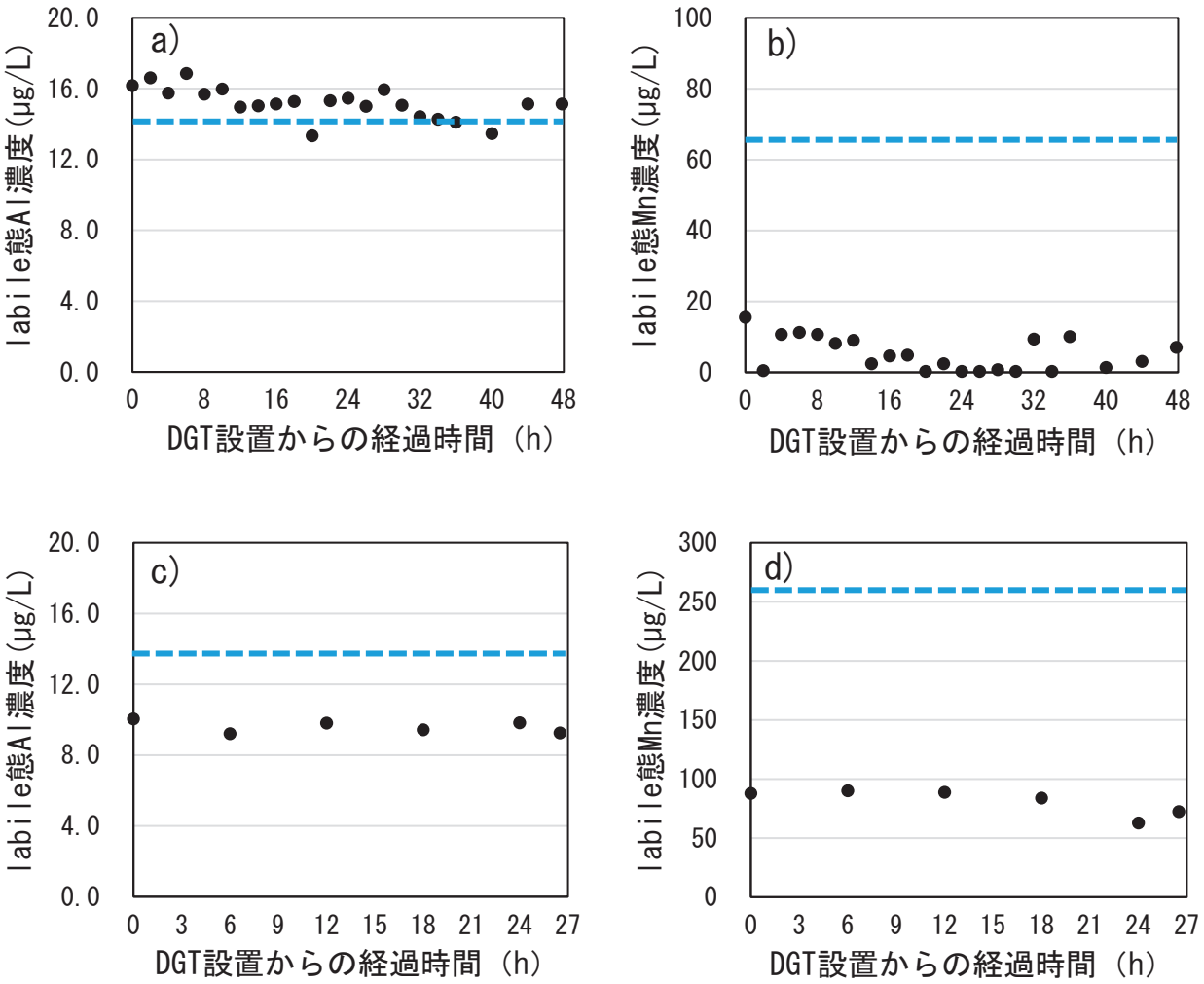
図-5 DGT ユニットの設置模式図と河川浸漬中の様子

他の値は記載した定数値を用いて、Mおよび$C_{DGT-labile}$を算出した。

3. 結果と考察

DGT—パッシブサンプリング法の対象とした 9 種金属（Al、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mn、Ni、Pb）のうち、Al と Mn 以外の対象金属については Resin layer の溶出液の濃度は定量下限値以下であり、$C_{DGT-labile}$に関する情報が得られなかった。高流量時と低流量時でともにグラブ法での labile 態の濃度が安定的に測定された Al と Mn の濃度算出結果を図-6 に示す。

Al については、高流量時調査(図-6 a)で算出された$C_{DGT-labile}$は 14.2 µg/L であり、グラブ法の水試料の時間加重平均濃度は 15.1 µg/L であり、算出濃度と水試料の濃度の比較から濃度推定に十分な妥当性が得られていると考えられた。また、低流量時調査(図-6 c)で算出された$C_{DGT-labile}$は 13.9 µg/L であり、グラブ法の水試料の時間加重平均濃度は 9.58 µg/L であったため、濃度をやや過大に評価していたがオーダーレベルで推定することが十分に可能であった。これらの結果から、DGT—パッシブサンプリング法による labile 態 Al の濃度推定は本調査において十分に適用可能であった。



※●：グラブ法による水試料の濃度、ー：DGT—パッシブサンプリング法による平均濃度 $C_{DGT-labile}$

図-6 河川調査における DGT—パッシブサンプリング法による濃度推定
(a) 高流量時調査（7/13-15）の labile 態 Al 濃度、(b)同 Mn 濃度、
(c) 低流量時調査（10/1-2）の labile 態 Al 濃度、(d)同 Mn 濃度

Mn については、高流量時調査(図-6 b)で算出された $C_{DGT-labile}$ は 65.1 μg/L であったが、グラブ法の水試料の時間加重平均濃度は 4.77 μg/L であったため、水試料の濃度と比較した際に濃度を大きく過大評価していると考えられた。また、低流量時調査(図-6 d)で算出された $C_{DGT-labile}$ は 258 μg/L であり、グラブ法の水試料の時間加重平均濃度は 82.8 μg/L であり、3.1 倍程度の過大評価傾向を示した。他の河川(恋瀬川)で DGT―パッシブサンプリング法の濃度推定を検証した過年度の調査においても labile 態 Mn の濃度推定は水試料の濃度と比較した際に過大評価の傾向が示されており [2]、本調査においても同様に labile 態 Mn の濃度を過大に評価する傾向が見られた。これらの結果から、labile 態 Mn の濃度推定を現地河川で実施するためには、過大評価となる要因を特定し、推定濃度を補正する必要があると考えられた。

高流量時（7 月）と低流量時（10 月）の labile 態金属濃度の比較について、Al はほぼ同程度の濃度オーダーであり濃度に大きな変動は見られなかった。一方で、Mn については低流量時（10 月）の濃度が高流量時（7 月）よりも高く、濃度変化を生じさせている要因があると考えられた。土砂供給による河川水中金属濃度への影響を考えると、河川中の土砂濃度が増加することにより labile 態の金属も同様に増加することが考えられるが、本調査では低流量時に濃度が大きいため、置き土の影響による濃度変化が要因とは考えられなかった。今回の調査地点はダムの放流量によって大きく水位が変化する地点であり、下流水質は貯水池や貯水池流入河川の水質の影響を強く受けることが想定されるため、これらの上流部の水質変化が要因である可能性が考えられた。

4. まとめ

DGT―パッシブサンプリング法による金属濃度推定と採水試料の labile 態金属濃度を比較した結果、labile 態の Al については DGT―パッシブサンプリング法により算出される $C_{DGT-labile}$ がある程度の精度で推定できており、DGT―パッシブサンプリング法を土砂供給が行われる現地河川に適用できる可能性が示唆された。一方で、Mn については既往研究と同様に濃度を過大に評価する傾向が見られ、現地河川の調査手法として適用するためには更に検討する必要があると考えられた。

参考文献

1）益永茂樹：河川水中重金属の生物利用性に与える存在形態と共存物質の影響、河川整備基金助成事業報告書、助成番号 24-1211-011、2013

2）服部啓太、鈴木裕識、平山孝浩、村田里美、山下洋正：雨天時河川中の金属濃度・形態の変動調査と DGT―パッシブサンプリング法による labile 態金属濃度把握に関する検討、土木学会論文集 B1、pp.1345-1340、2020

3）DGT Research Ltd.: Practical guide for using DGT for metals in waters.

4）内藤航、森美和子、岩崎雄一、加茂将史、益永茂樹：薄膜拡散勾配（Diffusive Gradients in Thin-films: DGT）法を用いた河川水における金属類の生物利用性の評価、水環境学会誌、Vol.34、No.2、pp.65-71、2011

5）DGT Research: Diffusion Coefficients, https://www.dgtresearch.com/diffusion-coefficients/

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

研究予算：運営費交付金
研究期間：令元～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、北村友一、村田里美、
服部啓太、厚朴大祐

【要旨】
本研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中アンモニア性窒素について、微生物保持担体とアンモニアセンサーを用いて、異なる担体流動性保持方法におけるアンモニア性窒素処理性能を比較し、効率的な低減方法を検討した。その結果、担体流動性保持を機械撹拌で行うことにより、効率的にアンモニア性窒素を低減できた。また日本河川に優占する淡水性付着藻類（緑藻、珪藻、藍藻）7 種を選抜し、種感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）解析を用いてアンモニア性窒素の影響評価を行った。その結果、*S. aestivale* と *N. pelliculos* は低濃度アンモニア性窒素を栄養塩として利用し、プラスの影響を受けることを明らかにした。また高濃度アンモニア性窒素存在下での影響試験を基に SSD 解析を行った結果、HC_5 は 9.7 NH_4 mg/L であることが明らかになった。また、下水処理水が魚類に与える影響を簡易的に把握するための評価手法として、画像・動画解析を用いた影響評価について基礎的な検討を行った。その結果、下水処理水に連続曝露したヒメダカと脱塩素水道水（Control）に連続曝露したヒメダカの行動の特徴を比較検討できたが、処理水の生物影響と判断することは難しく、実験方法や解析手法についてさらなる検討が必要と考えられた。

キーワード : アンモニア性窒素、微生物保持担体、アンモニアセンサー、付着藻類、SSD 解析、ヒメダカ、画像・動画解析

1. はじめに

下水中のアンモニア性窒素（以下、NH_4-N とする）は主に、し尿、生活排水、工場排水から流入する可能性がある [1]。アンモニアの水生生物影響が報告されており [2,3]、処理水が河川を経由し放流される場合には、NH_4-N が淡水性水生生物に及ぼす影響を把握することが重要である。一方、これまでの水質チームの研究により、小規模下水処理場の処理水中の NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L を超える処理場は 44%であることが明らかになっており [1]、濃度の目標値が低く設定された場合は、多くの処理場で低減対策が必要となる可能性が考えられる。

昨年度の研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、微生物保持担体とアンモニアセンサーを用いて、下水処理水中に残存する NH_4-N の効率的除去法について検討を行った。また、NH_4-N 残存や塩素消毒以外の影響をまず確認するため、藻類（ムレミカズキモ）を用いて下水処理水の慢性的影響評価法の検討を行った。

本年度は、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中 NH_4-N の硝化について微生物保持担体と NH_4-N センサーを用いて、異なる担体流動性保持方法における省エネ効果と水質改善効果を検討した。また、NH_4-N は藻類に対し、栄養塩としてのプラスの影響と毒物としてのマイナスの影響が考えられる。そこで日本の河川で優占する付着藻類種を用いて NH_4-N の影響評価を行った。NH_4-N は藻類に対してだけでなく、魚類に対してもマイナスの影響を及ぼすことが考えられることから、魚類に対する影響を把握する手法として動画解析を用いた影響評価手法の開発のための基礎的な検討を下水処理水に連続曝露したヒメダカを対象として行った。

2. 小規模下水処理場への導入を想定した下水二次処理水に残存するアンモニア性窒素の生物反応槽後担体硝化処理特性の把握

2.1 目的

1．で述べたとおり、アンモニアの水生生物影響が報告されており [2,3]、下水処理水の NH_4-N 濃度の低減について今後議論される可能性がある。濃度の目標値が低く設定された場合は、多くの下水処理場で低減対策が必要となる可能性がある。下水二次処理水に残存

する NH_4-N の低減対策として、活性汚泥法の好気槽への微生物保持担体投入を試みる報告や実用化された報告は数多くあるが[4,5,6,7,8,9]、生物反応槽後段に NH_4-N を低減するための担体処理を追加する報告は数少ない[10]。更に、後段に追加した担体処理装置に対して、下水二次処理水中 NH_4-N の負荷変動に応じた曝気量制御のために、NH_4-N センサーを設置し、NH_4-N センサーを用いた曝気量のフィードバック制御を行った例はない。本研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中 NH_4-N の硝化について微生物保持担体と NH_4-N センサーを用いて、異なる担体流動性保持方法における省エネ効果と水質改善効果を検討した。検討においては、昨年度の結果も含めて整理した。

2. 2 研究方法

2.2.1 実験装置の概要

本研究で用いた微生物保持担体処理実験装置の概要を図-1 に示す。容量 60 L の反応槽を 2 つ連結し、各反応槽には微生物保持担体を投入した。本研究で使用した担体は、事前検討により[11]、NH_4-N 除去性が高く、担体流動性保持が容易なポリプロピレン製中空円筒状（4 mm^{OD} × 3 mm^{ID} × 5 mm^{L}）である。担体充填率は、事前検討により[11]、嵩比率 35%に設定した。反応槽有効容積は 92%となった。微生物保持担体処理のための原水は、実流入下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、下水二次処理水中に NH_4-N を残留させたものを用いた。NH_4-N 濃度のリアルタイムモニタリングと流入負荷変動に応じた曝気量制御のために、NH_4-N センサーを下水二次処理水貯留槽および各担体処理槽に設置し、DO センサーを第 2 担体処理槽に設置した。本実験で使用した NH_4-N センサーの定量下限値は 0.1 mg-N/L であり、測定原理は液膜式イオン電極法である。本研究では、担体流動性保持を曝気撹拌および機械撹拌で行い、担体付着微生物量と菌叢の差異および NH_4-N 処理性能を比較した。

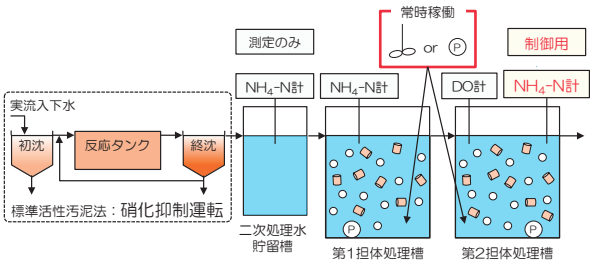


図-1 NH_4-Nセンサーを用いた微生物保持担体処理実験のフロー

表-1 担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験における曝気量制御方法

第2担体処理槽NH_4-N濃度	1槽目曝気量（L/min）	2槽目曝気量（L/min）
0.9 mg-N/L 未満	2.75	2.75
0.9 mg-N/L 以上	4.15	2.75
1.1 mg-N/L 以上	4.15	4.15
1.4 mg-N/L 以上	5.55	4.15
1.7 mg-N/L 以上	5.55	5.55

2.2.2 NH_4-N センサーの校正

各 NH_4-N センサーの測定値に対して、イオンクロマトグラフの分析値を用いた校正を、実験期間中に週に 1 回程度行った。校正手順は次の通りである。NH_4-N センサーの測定瞬時値をセンサーのコントローラー内に記録し、その後、速やかにセンサー設置箇所の採水を行った。採水試料はイオンクロマトグラフによる分析を行い、分析値によるセンサー測定値の校正を行った。NH_4-N センサーの使用期間は、2019 年 10 月 9 日から 2021 年 1 月 13 日である。

2.2.3 NH_4-N センサーを用いた曝気量制御方法

a) HRT の予備的検討実験

HRT（= 反応槽有効容積 / 流入水量 ）の違いが NH_4-N の処理性に及ぼす影響を調べるための予備的検討実験を行った。HRT は 180 分および 120 分に設定し、曝気量制御は第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が 1 mg-N/L を超過すると第 1 担体処理槽の曝気装置が稼働し、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L を超過すると第 2 担体処理槽の曝気装置が稼働する方式とした。担体流動性保持のための曝気は、事前検討により[11]、1 槽当たり送気倍率 4.5 倍で行った。本実験期間は HRT180 分および 120 分の実験それぞれで、2019 年 12 月 3 日から 2020 年 1 月 14 日および 2020 年 2 月 1 日から 2020 年 3 月 14 日である。

b) 担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験

本実験における NH_4-N センサーを用いた曝気量制御方法を表-1 に示す。曝気量制御は、担体流動性保持用に常時稼働の曝気装置とは別に、各担体処理槽に制御用曝気装置を 2 台設置し、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度に応じて、曝気装置を台数制御した。第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度に応じた各担体処理槽の曝気装置の ON/OFF 制御値は、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度を 1-2 mg-N/L で推移させることを目標として、曝気装置の性能・台数および第 2 担体処理槽の NH_4-N センサーの測定精度を考慮し、設定した。本実験期間は 2020 年 7 月 7 日から 2020 年 9 月 15 日である。

c) 担体流動性保持を機械撹拌で行った実験

本実験における NH_4-N センサーを用いた曝気量制御方法を表-2 に示す。担体流動性保持のための撹拌は、

表-2　担体流動性保持を機械撹拌で行った実験における曝気量制御方法

第2担体処理槽NH_4-N濃度	1槽目曝気量（L/min）	2槽目曝気量（L/min）
0.8 mg-N/L 未満	0	0
0.8 mg-N/L 以上	1.85	0
1.0 mg-N/L 以上	3.70	0
1.2 mg-N/L 以上	5.55	0
1.3 mg-N/L 以上	5.55	1.85
1.5 mg-N/L 以上	5.55	3.70
1.7 mg-N/L 以上	5.55	5.55

1 槽当たり回転数 80 rpm で行った。曝気量制御は、各担体処理槽に制御用曝気装置を 3 台設置し、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度に応じて、曝気装置を台数制御した。担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験における曝気量制御では、第 1 担体処理槽の余剰 DO を有効に利用できていないことが示唆されたため、本実験における曝気量制御は、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度に応じて、第 1 担体処理槽の曝気装置を段階的に全て稼働させた後に、第 2 担体処理槽の曝気装置を稼働する制御とした。本実験における各担体処理槽の曝気装置の ON/OFF 制御値は、担体流動性保持に曝気装置を用いた実験と同様の方法で設定した。本実験期間は 2020 年 10 月 14 日から 2021 年 1 月 13 日である。

2.2.4 水質測定

下水二次処理水および各担体処理水に対して、水質測定のための採水を、実験期間中に週に 1 回程度行った。測定項目は、pH、TOC 濃度、SS 濃度およびアルカリ度であり、測定方法は下水試験方法 [12]に従った。

2.2.5 担体付着微生物量の測定

各担体処理槽の担体付着微生物量の測定を、実験期間中に週に 1 回程度行った。測定方法は次の通りである [13]。各担体処理槽から担体 50 mL をビーカーに採取し、純水を 100 mL 加えた後、担体と純水の入ったビーカーを超音波発生器（出力 200 W）に 10 分間接触させ、純水中に担体付着微生物を抽出した。その懸濁液を試料として、下水試験方法 [12]に従い浮遊物質濃度を測定し、その測定結果を担体 1 L 当たりの担体付着微生物量とした。

2.2.6 担体付着微生物の菌叢解析

各担体処理槽の担体付着微生物と活性汚泥処理実験装置反応槽末端の活性汚泥（対照系）について、16S rRNA 遺伝子配列に基づく菌叢解析を行った。各実験終了日である 2020 年 9 月 15 日と 2021 年 1 月 13 日に試料の採取を行った。測定方法は次の通りである [14]。各担体処理槽から採取した担体は液体窒素で凍結させ、粉砕したものから DNA を抽出した。活性汚泥については、10 倍濃縮したものから DNA を抽出した。DNA 抽出には、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境）を用い、抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的としたプライマーを用い、PCR 増幅を行った。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3（600 サイクル、Illumina）を用いて解析した。解析で得た各リードの細菌・古細菌種の同定および統計解析は QIIME2 を用いた。各塩基配列の同定には Silva 132 をリファレンスデータベースとした。

2. 3 結果と考察

2.3.1 NH_4-N センサーの測定精度確認

本実験で使用した NH_4-N センサー測定値とイオンクロマトグラフの分析値の比較結果を**図-2** に示す。NH_4-N センサーを設置した下水二次処理水貯留槽、第 1 担体処理槽および第 2 担体処理槽における、センサー測定値とイオンクロマトグラフの分析値との相関関係を表す一次回帰式はそれぞれ、$y = 0.97x$（$R^2 = 0.97$, $N = 50$）, $y = 0.99x$（$R^2 = 0.99$, $N = 50$）, $y = 0.84x$（$R^2 = 0.88$, $N = 45$）となった。NH_4-N センサー使用期間における水温や水質の変動にも関わらず、NH_4-N センサーの測定精度は安定していたことを確認した。第 2 担体処理槽の NH_4-N センサーの測定精度は、他の NH_4-N センサーに比べて低くなったが、一般的にイオン電極法において、定量下限近くでは、応答時間が長くなることが知られているため [15]、測定した NH_4-N 濃度が定量下限値近くである第 2 担体処理槽の NH_4-N センサーの測定精度は、他の NH_4-N センサーに比べて低くなったと考えられる。

2.3.2 HRT の予備的検討結果

HRT を 180 分と 120 分に設定し、NH_4-N の処理性を検討した実験における、NH_4-N センサーと DO センサーの測定値の経時変化を**図-3** に示す。実験期間中の各槽の水温（最小 - 最大、本論文の - 表記において以下同様）は HRT180 分および 120 分の実験それぞれで、12 - 19℃程度および 10 - 19℃程度であった。平均 NH_4-N 除去率および反応槽容積当たりの硝化速度は HRT180 分および 120 分の実験それぞれで、94%、85%および 2.8 - 6.9（平均 4.7）mg-N/（L・h）、3.7 - 8.4（平均 6.4）mg-N/（L・h）となった。HRT を 120 分に設定した実験における、下水二次処理水中 NH_4-N 濃度の最大値は 22.2 mg-N/L であり、反応槽容積当たりの平均硝化速度から、処理槽末端の NH_4-N 濃度を 2 mg-N/L に低減するために必要な HRT を算出すると 172 分程度であることを確認したため、これ以降の実験では HRT を 180 分に設定した。

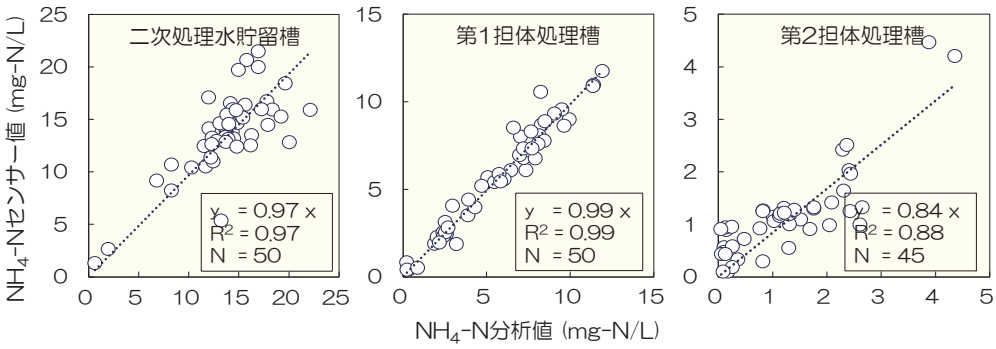


図-2　本実験で使用したNH_4-Nセンサー測定値とイオンクロマトグラフ分析値の比較

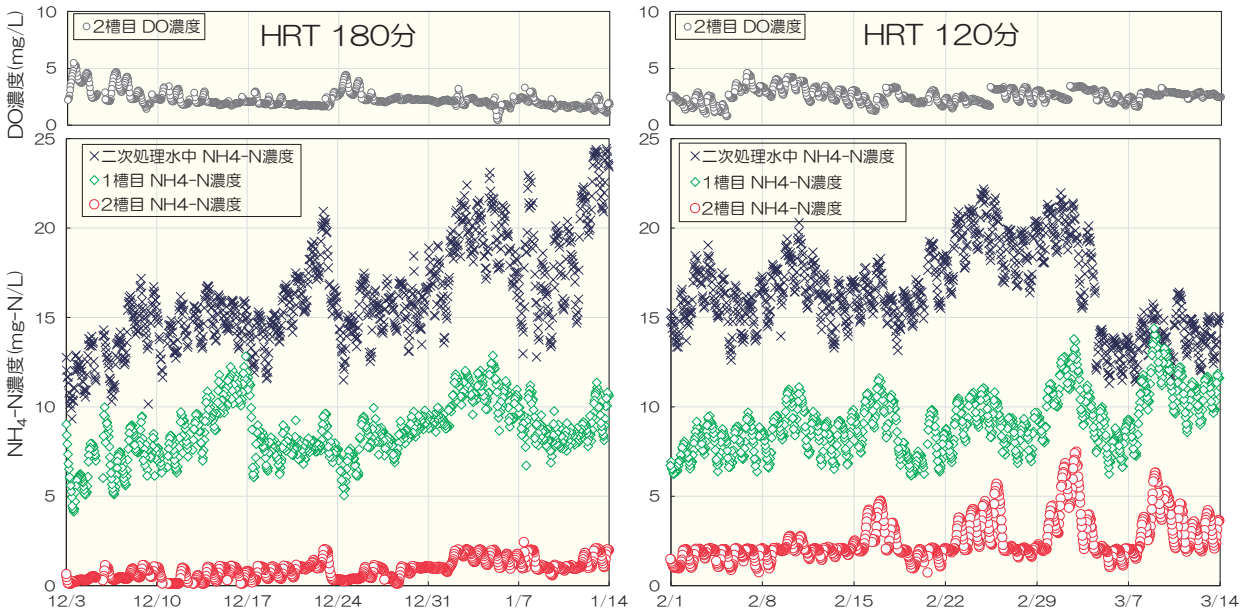


図-3　HRTを180分および120分に設定した実験におけるNH_4-N濃度とDO濃度の経時変化

2.3.3 異なる担体流動性保持方法における担体付着微生物量の比較

担体流動性保持を曝気撹拌および機械撹拌で行った実験における、担体1L当たりの担体付着微生物量の測定結果を**表-3**に示す。担体流動性保持方法の違いによる担体付着微生物量に大きな差異はないことを確認した。このことから、馴致期間および運転期間を考慮すると、担体付着微生物量が飽和に達している可能性が示唆された。

2.3.4 異なる担体流動性保持方法における担体付着微生物の菌叢比較

担体流動性保持を曝気撹拌および機械撹拌で行った実験における、それぞれの門レベルおよび属レベルの微生物菌叢解析結果を**図-4**に示す。塩基配列解析の結果、各サンプルから約6 - 11万本の塩基配列を取得し、約1,600種類に分類することができた。**図-4**には系内に0.1%以上存在する属を示す。活性汚泥処理実験装置反応槽末端の活性汚泥の菌叢を構成する主な門は、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Patescibacteria*であった。各担体処理槽の担体付着微生物の菌叢を構成する主な門は*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Acidobacteria*、*Nitrospirae*、*Chloroflexi*であった。属レベルの分類では、亜硝酸酸化細菌である*Nitrospira* sp.とアンモニア酸化細菌である*Nitrosomonas* sp.が、それぞれ活性汚泥中からはほとんど検出されなかった。一方で、担体処理槽からは*Nitrospira* sp.は10 - 18%程度、*Nitrosomonas* sp.は1 - 10%程度の割合で検出されたことから、本実験で使用した担体には硝化細菌が保持されていたことを確認した。*Nitrospira* sp.と*Nitrosomonas* sp.の検出割合は、担体流動性保持を機械撹拌で行った実験の担体の方が高くなった。担体流動性保持を機械撹拌で行った実験で使用した担体は、担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験で使用した担体を流用したため、より長期間、低有機物濃度高NH_4-N濃度条件下で馴養されたことで、硝化細菌の検出割合がより高くなったと考えられる。硝化促進型標準活性汚泥法の活性汚泥から、*Nitrospira* sp.は10%程度、*Nitrosomonas* sp.は2%程

表-3　異なる担体流動性保持方法における担体1 L当たりの担体付着微生物量の比較（平均±標準偏差）

	曝気撹拌		機械撹拌	
担体採取箇所	第1担体処理槽	第2担体処理槽	第1担体処理槽	第2担体処理槽
担体1 L当たりの担体付着微生物量（mg/L）	673 ± 272（N = 9）	679 ± 207（N = 9）	717 ± 152（N = 8）	803 ± 208（N = 8）

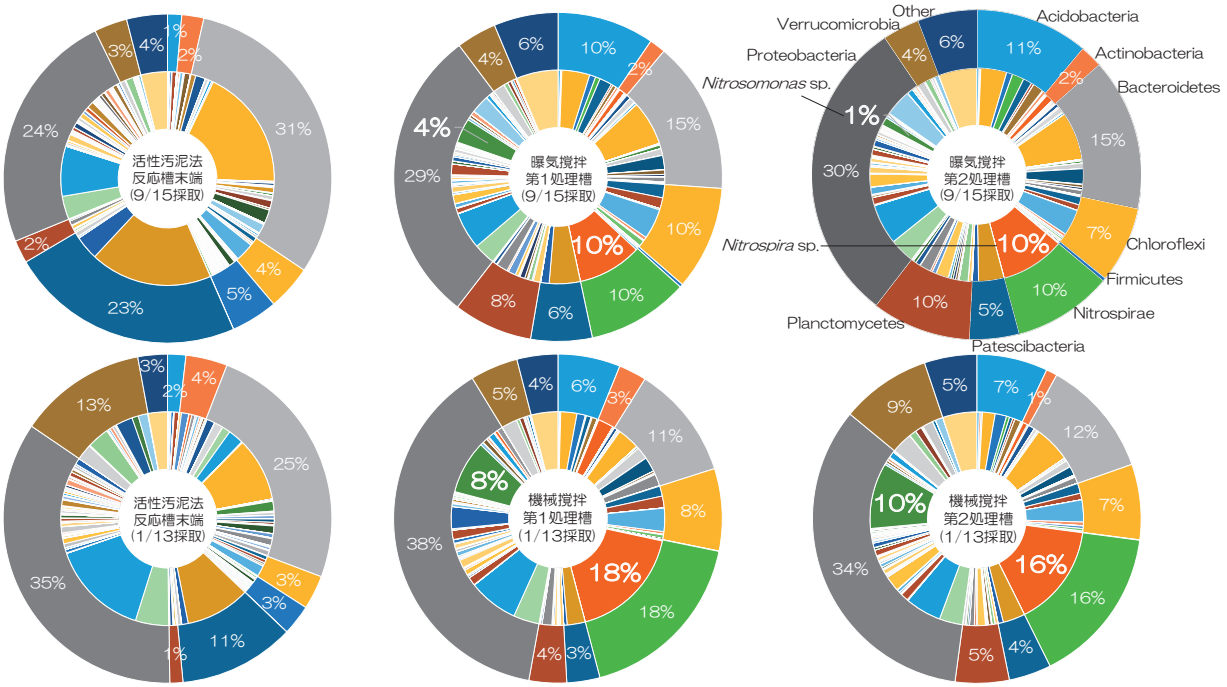


図-4　異なる担体流動性保持方法における担体付着微生物の菌叢比較（外側：門レベル，内側：属レベル）

度の割合で検出された[16]。水道水に NH_4-N と PO_4-P を添加した人工二次処理水を実験原水として用いた、担体処理実験報告において、担体付着細菌から、*Nitrospira* sp.は 20%程度、*Nitrosomonas* sp.は 3 - 6%程度の割合で検出された[10]。この報告では、使用原水の組成が水道水、NH_4-N および PO_4-P のみであったことや、DO 濃度が 7.5 - 8.0 mg/L に維持されていたことにより、硝化細菌が優占化しやすい環境下での実験であった。本実験で得られた硝化細菌の検出割合とこれらの報告における硝化細菌の検出割合を比較した結果を**表-4** に示す。本実験で用いた担体には、硝化細菌が硝化促進型標準活性汚泥法の活性汚泥と同程度以上の割合で存在することが示唆された。

2.3.5　異なる担体流動性保持方法における NH_4-N 処理性能の比較

a）担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験

本実験における NH_4-N センサーと DO センサーの測定値の経時変化を**図-5** に示す。2020 年 8 月 16 日および 2020 年 9 月 8 日から 2020 年 9 月 10 日までは実験施設停電により、センサー測定を行うことができなかった。本実験における水質測定結果を**表-5** に示す。下水二次処理水および第 2 担体処理水の NH_4-N 濃度はそれぞれ 5.2 - 25.8（平均 13.8）mg-N/L、0.1 - 2.5（平均 0.7）mg-N/L であった。本実験における平均 NH_4-N 除去率は 95%となった。第 2 担体処理水における DO 濃度（平均 ± 標準偏差、本論文の ± 表記において以下同様）は 2.5 ± 1.6 mg/L となった。反応槽容積当たりの硝化速度は 1.5 - 7.5（平均 4.0）mg-N/（L・h）となった。雨天時など流入 NH_4-N 低負荷期間（2020 年 7 月 10 日、2020 年 8 月 1 日、2020 年 8 月 27 日）においては、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が測定下限値である 0.1 mg-N/L となった。この期間には担体流動性保持のための曝気のみが行われており、NH_4-N 処理の観点からは過剰なエネルギーが投入されていることを確認した。

b）担体流動性保持を機械撹拌で行った実験

本実験における NH_4-N センサーと DO センサーの測定値の経時変化を**図-6** に示す。2020 年 11 月 17 日から 2020 年 11 月 19 日および 2020 年 11 月 24 日から 2020 年 11 月 26 日までは実験施設停電により、センサー測定を行うことができなかった。本実験における水質測定結果を**表-6** に示す。下水二次処理水および第 2 担体処理水の NH_4-N 濃度はそれぞれ 9.2 - 29.3（平均 17.4）mg-N/L、0.6 - 2.3（平均 1.3）mg-N/L で

表-4　運転方式の違いによる硝化細菌検出割合の比較

運転方式	*Nitrospira* sp. (%)	*Nitrosomonas* sp. (%)	出典
標準活性汚泥法　硝化抑制運転	-	-	-
標準活性汚泥法　硝化促進運転	10	2	山崎ら[16]（2013）
二次処理水 + 担体処理（曝気撹拌）	10	1 - 4	-
二次処理水 + 担体処理（機械撹拌）	16 - 18	8 - 10	-
人工下水 + 担体処理	20	3 - 6	Svobodová et al.[10]（2021）

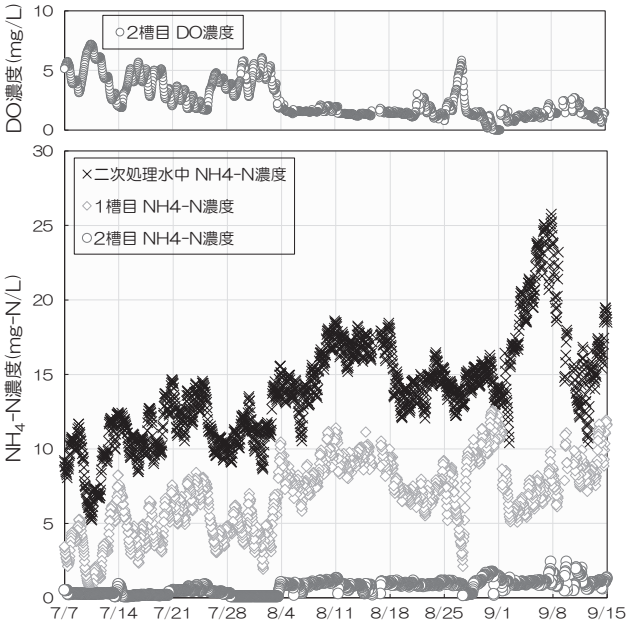


図-5　担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験におけるNH_4-N濃度とDO濃度の経時変化

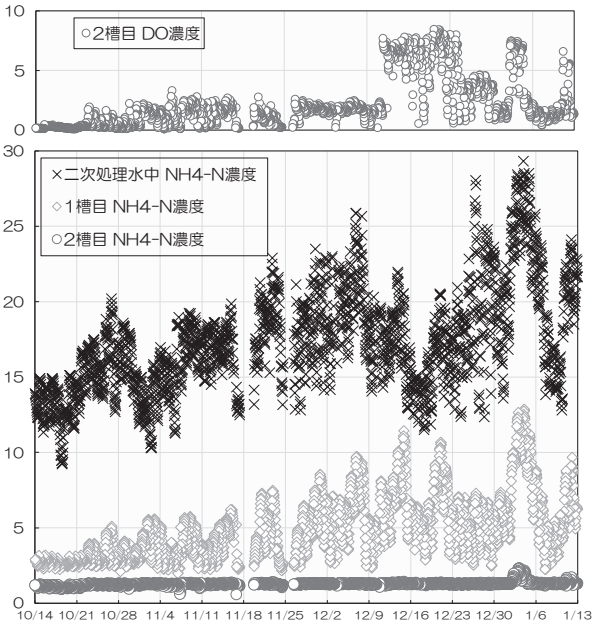


図-6　担体流動性保持を機械撹拌で行った実験におけるNH_4-N濃度とDO濃度の経時変化

表-5　担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験における水質測定結果

水質項目	下水二次処理水	第1担体処理水	第2担体処理水
水温（℃）	23 - 31	23 - 32	23 - 32
pH（-）	7.15 ± 0.02	6.95 ± 0.06	6.67 ± 0.08
TOC濃度（mg/L）	2.1 - 7.3	2.2 - 5.7	2.9 - 5.7
SS濃度（mg/L）	1.3 - 7.5	未測定	1.3 - 6.4
アルカリ度（mg-$CaCO_3$/L）	147 ± 18	84 ± 15	31 ± 5

※　pHおよびアルカリ度以外は，最小 - 最大表記

表-6　担体流動性保持を機械撹拌で行った実験における水質測定結果

水質項目	下水二次処理水	第1担体処理水	第2担体処理水
水温（℃）	13 - 24	11 - 24	10 - 24
pH（-）	7.03 ± 0.09	6.63 ± 0.11	6.52 ± 0.16
TOC濃度（mg/L）	3.1 - 4.1	3.8 - 4.4	4.0 - 4.3
SS濃度（mg/L）	1.3 - 8.8	未測定	未測定
アルカリ度（mg-$CaCO_3$/L）	152 ± 7.8	54 ± 5.3	39 ± 4.7

※　pHおよびアルカリ度以外は，最小 - 最大表記

あった。本実験における平均 NH_4-N 除去率は 93%となり、担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験と同程度の NH_4-N 除去率となった。第 2 担体処理槽における DO 濃度は 2.2 ± 2.1 mg/L となり、担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験に比べて、平均 DO 濃度は 12%程度低くなったことから、雨天時など流入 NH_4-N 低負荷期間における、担体流動性保持のための過剰なエネルギー投入を抑制できたことが示唆された。反応槽容積当たりの硝化速度は 2.5 - 8.3（平均 4.9）mg-N/（L・h）となり、担体流動性保持を曝気撹拌で行った実験に比べて、1.2 倍程度の平均硝化速度となった。嫌気無酸素好気法の好気槽に担体を投入した際の反応槽容積当たりの硝化速度は 3.1 - 5.2 mg-N/（L・h）程度（平均流入 NH_4-N 濃度 19.7 mg-N/L、水温 17 - 20℃、DO 濃度 2 mg/L）であり [4]、循環式硝化脱窒法の好気槽に担体を投入した際の反応槽容積当たりの硝化速度は 6 - 13 mg-N/（L・h）程度（水温 15 - 25℃）との報告から [9]、本実験で得られた反応槽容積当たりの最大

硝化速度 8.3 mg-N/（L・h）は、嫌気無酸素好気法もしくは循環式硝化脱窒法の好気槽に担体を投入した際の硝化速度の 0.6 - 1.6 倍程度であった。本実験期間における下水二次処理水中 NH_4-N 濃度と反応槽容積当たりの硝化速度の関係を硝化細菌の活性が顕著に低下するとされる水温 16℃[9]を境目として整理した結果を**図-7** に示す。本研究における下水二次処理水中 NH_4-N 濃度範囲においては、水温変動に関わらず、下水二次処理水中 NH_4-N 濃度増加に応じて反応槽容積当たりの硝化速度も大きくなることを確認した。このことから本実験における下水二次処理水中 NH_4-N 濃度範囲に対して、本実験装置の硝化能力に余力があることが示唆された。また、水温低下の硝化影響が顕著でない理由として、担体に十分な量の硝化細菌が保持できているため、硝化速度の低下の影響が顕在化しないことが考えられた。また、担体保持により、必要な A-SRT を確保できているため、硝化細菌の wash-out は起こらず、硝化阻害が発生しないためであると考えられた。

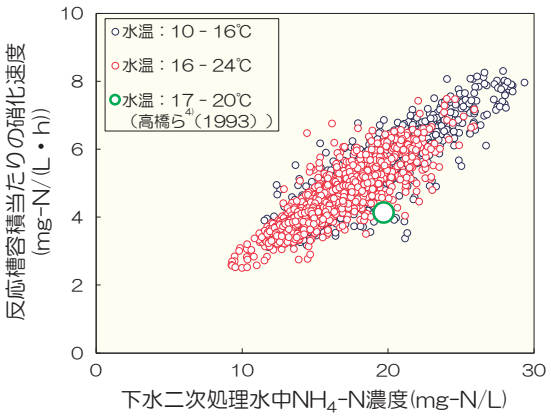


図-7 下水二次処理水中 NH_4-N 濃度と反応槽容積あたりの硝化速度の関係（水温 16℃を境目とする）

表-7 異なる担体流動性保持方法における硝化窒素量当たりの平均曝気量の比較

	曝気撹拌		機械撹拌	
	1槽目	2槽目	1槽目	2槽目
常時曝気量（m^3/d）	3.96	3.96	0	0
制御曝気量（m^3/d）	0.94	0.35	7.54	0.99
曝気量（m^3/d）	9.21		8.53	
処理流量（m^3/d）	0.88			
送気倍率（-）	10.5		9.7	
硝化量（g-N/d）	11.5		14.2	
硝化窒素量当たりの曝気量（m^3/g-N）	0.80		0.60	

2.3.6 異なる担体流動性保持方法における硝化窒素量当たりの曝気量の比較

担体流動性保持を曝気撹拌および機械撹拌で行った実験における、硝化窒素量当たりの平均曝気量の比較結果を**表-7** に示す。担体流動性保持を曝気撹拌で行った場合に比べて、機械撹拌で行った方が硝化窒素量当たりの曝気量を 25%程度削減できることを確認した。機械撹拌による担体流動性保持に係るエネルギーは、曝気撹拌による担体流動性保持に係るエネルギーに比べて微々たるものであることを考慮すると[17]、本実験における下水二次処理水中 NH_4-N 濃度範囲においては、担体流動性保持は機械撹拌で行った方が、より効率的に NH_4-N を除去できることが示唆された。循環式硝化脱窒法の好気槽（本実験装置容積比 2,500 倍）に担体を投入した際の送気倍率は 6 倍程度であるが[9]、スケールメリットを考慮すると、本実験における送気倍率は、スケールアップにより減少する可能性があることが示唆された。

2.3.7 本処理方法の実施設への導入可能性の検討

本処理方法の導入先は、特に小規模下水処理場において、下水二次処理水に残存する NH_4-N を既存の運転方式の変更や機械設備の更新等では低減することが困難な場合が予想される小規模下水処理場を想定している。一例として嫌気好気ろ床法を採用している小規模下水処理場を想定した場合、嫌気槽と好気槽の滞留時間はそれぞれ、22 時間（標準設計値）[18]および 3 時間程度（実施設の例）であるため、本実験装置の必要設置スペースは嫌気好気ろ床法の反応槽容積の 12%程度と試算された。このため、本処理方法は設置スペースの大幅な増加を必要とすることなく導入可能と考えられた。また、硝化に影響する有機物や SS 濃度の観点からは、嫌気好気ろ床法を採用している下水処理場 45 箇所における、処理水中 BOD 濃度および SS 濃度の年間平均値はそれぞれ、1.4 - 13（平均 5.2）mg/L、0 - 17（平均 5.3）mg/L であった[19]。本実験では有機物濃度として BOD ではなく TOC を測定しているため単純比較はできないものの、本実験で処理対象とした二次処理水は、これらの実施設での処理水と水質面で大きく異なっていないと考えられた。このため、本処理方法をこれらの実施設に導入した場合、本実験で得られた硝化性能と同程度に処理可能となると期待できた。以上より、設置スペースおよび処理対象水質の観点で、本処理方法の実施設への導入可能性が示唆された。

3. 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いたアンモニア性窒素の影響評価

3.1 目的

近年、下水道の普及や排水規制の強化等により水質改善が進む海域もある中で、貧栄養化が懸念される場合もあり、下水道でも処理水中の NH_4-N 等の濃度を季節により増加させる運転が試行も含め取り組まれている。一方 NH_4-N は、魚類に及ぼす影響が報告されており [2]、今後、濃度の低減について議論される可能性がある。下水中の NH_4-N は主に、し尿、生活排水、工場排水から流入する可能性があることから [20]、処理水が河川を経由し放流される場合には、NH_4-N が食物連鎖の底辺にある淡水性藻類に及ぼす影響を把握することが重要であると考えられる。藻類を用いた影響評価法は、一般的に浮遊性藻類であるムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*）が使用されているが、日本の河川には生息していない外来種である。日本河川では付着藻類が優占しており、そこに生息する付着藻類を用いて評価を行うことが、より実環境での影響を反映できると考えられる。そこで本研究では、日本河川に生息する淡水性付着藻類（緑藻、珪藻、藍藻）を選抜し、種感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）解析を用い NH_4-N の影響評価を行った。

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 使用藻類と培養方法

使用株の選定条件は、①日本河川で優占的に生息する藍藻、珪藻、緑藻であること、②（国研）国立環境研究所（NIES）から購入可能であること、③生育温度が 20－25℃であること、④扱いが容易であり、安定して培養が可能であることとした。その条件下で付着藻類を選抜し、NIES より分譲された 7 株を用いて実験を行った（**表-8**）。緑藻（3 株）は *Desmodesmus serratus*（NIES-97）、*Desmodesmus subspicatus*（NIES-797）、*Stigeoclonium aestivale*（NIES-531）を用い、C 培地を用いて培養した [21]。珪藻（2 株）は *Navicula pelliculosa*（NIES-4280）と *Achnanthidium minutissimum*（NIES-71）を用い、CSi 培地を用いて培養した [21]。藍藻（2 株）は *Pseudanabaena foetida*（NIES-512）と *Phormidium jenkelianum*（NIES-507）を用い、それぞれ CT 培地と CSi 培地を用いて培養した [21]。保存飼育時は全てフラスコで培養し、22℃、1000-2000lx（白色蛍光灯下）で連続照射を行い、2 週間おきに継代培養を行った。また比較対象株として *R subcapitata*（NIES-35）を用いた。*R*

表-8 実験に使用した付着藻類株

分類群	種名	② NIES No.	使用培地	③ 生育至適温度(℃)	④ 安定培養
緑藻	*Desmodesmus serratus*	97	C	20(25)	○
	Desmodesmus subspicatus	797	C	20(25)	○
	Stigeoclonium aestivale	531	C	20	○
珪藻	*Navicula pelliculosa*	4280	Csi	20	○
	Achnanthidium minutissimum	71	CSi	20	○
藍藻	*Pseudanabaena foetida*	512	CT	20	△
	Phormidium jenkelianum	507	CSi	20	○

subcapitata は C 培地を用いてフラスコで培養し、25℃、3000lx（白色蛍光灯下）で照射を行い（明期 18h、暗期 6h）、2 週間おきに継代培養を行った。

3.2.2 付着藻類の至適増殖照度の検討

OECD201 を基に、96 穴平底プレートを用いて検討を行った [22]。1 週間前培養を行った各株を、各々に適した培地に初期細胞数 20,000～30,000 cells/mL になるよう添加し、23℃、7 日間培養を行った。至適照度の検討は 1000、2000、3000lx 下で行った。藻類の増殖はプレートリーダー（SoftMax® Pro、モレキュラーデバイスジャパン）を用いて測定した。緑藻、珪藻、ムレミカヅキモはクロロフィル a（励起 435/蛍光 685nm）を、藍藻はフィコシアニン（励起 600/蛍光 650nm）を測定した。各藻類の比増殖速度は以下の式から求めた。

$$\text{比増殖速度} = \frac{\ln(Xt) - \ln(Xt')}{t - t'}$$

*t' 日から t 日にかけての増殖速度（/day）

3.2.3 付着藻類を用いたアンモニア性窒素の影響評価

NH_4-N として NH_4Cl を用い、低濃度区（0.03～6.39 NH_4^+ mg/L）と高濃度区（8.38～268 NH_4^+ mg/L）で検討した。各株は 1 週間前培養を行い、各々に適した培地に初期細胞数 20,000～30,000 cells/mL になるよう添加し、至適照度下で 23℃、7 日間培養を行った。藻類の増殖はプレートリーダーを用いて測定した。緑藻、珪藻、ムレミカヅキモはクロロフィル a（励起 435 nm /蛍光 685nm）を、藍藻はフィコシアニン（励起 600 nm /蛍光 650nm）を測定した。

3.2.4 SSD 解析

各株における定常期のクロロフィル a 量とフィコシアニン量から EC_{50} を算出し、SSD 解析を行った。EC_{50} は SigmaPlot 14.5（株式会社ヒューリンクス）を用いて算出し、SSD 解析は SSDcals.xlsx を用いて算出し

た[23]。

3.2.5 解離アンモニアの分析

各培地における解離アンモニア（NH_4^+）濃度は、サンプルを 0.45 μm の親水性 PTFE 膜に通し、イオンクロマトグラフィー(Thermo Fisher SCIENTIFIC 社製）で測定した。

3. 3 結果と考察

3.3.1 付着藻類の選抜

はじめに、試験に使用する付着藻類の選定を行った。内田ら[24]と永井[22]の論文を基に、愛知県矢作川と長野県広井川に生息する付着藻類を優占順にまとめたデータを**表-9** に示す。両河川とも、珪藻類が最も多く、次に藍藻類もしくは緑藻類が優占した。本試験では各藻綱から優占種として 2 属ずつ選抜した。珪藻類において最も優占率が高い株は、矢作川では *Achnanthidium* 属、広井川では *Navicula* 属であり、どちらも両河川で検出されていることから、これら 2 属を選択した。藍藻では両河川で *Homeothrix* 属が検出されたが NIES 寄託株がないことから、矢作川で優占した *Phormidium* 属と、広井川で優占した *Psudanabena* 属を選択した。緑藻類は、矢作川では *Ulothrix* 属が優占種として検出されたが、生育至適温度が 15℃と低いため、広井川で優占している種属から *Demodesmu* 属と *Stigeoclonium* 属を選択した。

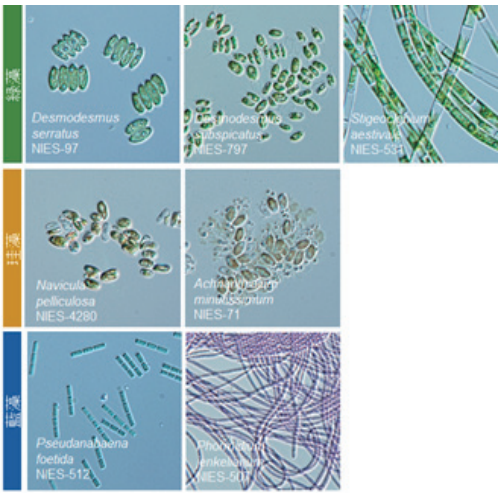


図-8 選抜した付着藻類株

本試験で使用した株を**表-8** と**図-8** に示す。使用した付着藻類は、主に日本の河川から分離された淡水種 7 株とした。珪藻の *N. pelliculosa* と緑藻の *D. subspicatus* は OECD テストガイドライン 201 での

表-9 国内河川に生息する付着藻類の優占順をふまえた試験付着藻類の選定

愛知県矢作川

	順位	属	NIES株	検出率(%)
珪藻綱（79.8%）	1	Achnanthidium	○	38.29
	2	Fragilaria	○	10.86
	3	Encyonema	×	7.27
	4	Nitzschia	○	6.09
	5	Cymbella	×	5.88
	6	Navicula	○	3.00
	7	Gomphonema	○	2.30
	8	Rhoicosphenia	×	1.70
	9	Gomphoneis	×	1.19
	10	Melosira	○	0.90
	11	Achnanthes	○	0.78
	12	Hannaea	×	0.45
	13	Diatoma	×	0.28
	14	Ulnaria	○	0.18
	15	Asterionella	○	0.18
	16	Surirella	×	0.16
	17	Cocconeis	○	0.14
	18	Ampora	×	0.14
	19	Meridion	×	0.04
藍藻綱（19.3%）	1	Homoeothrix	×	15.82
	2	Phormidium	○	3.39
	3	Calothrix	○	0.07
緑藻綱（0.7%）	1	Ulothrix**	○	0.62
	2	Cladophora	×	0.04
紅藻綱		Batrachospermum	○	0.25
		合計		100.00

長野県広井川

	順位	属	NIES株	検出率(%)
珪藻綱（78.5%）	1	Navicula	○	27.57
	2	Nitzschia	○	17.05
	3	Gomphonema	○	7.62
	4	Cymbella	×	3.60
	5	Synedra	○	3.51
	6	Rhoicosphenia	×	3.01
	7	Melosira	○	2.73
	8	Achnanthidium	○	2.67
	9	Surirella	×	2.16
	10	Coccoreis	○	1.97
	11	Diatoma	×	1.84
	12	Pinnularia	×	1.81
	13	Amphora	×	1.00
	14	Frustulia	×	0.95
	15	Meridion	×	0.52
	16	Cosmarium	○	0.45
藍藻綱（10.6%）	1	Pseudanabaena	○	9.13
	2	Lyngbya	×	1.28
	3	Homoeothrix	×	0.22
緑藻綱（10.9%）	1	Desmodesmus	○	4.85
	2	Coleochaete	○	2.73
	3	Stigeoclonium	○	1.71
	4	Ankistrodesmus	○	1.62
		合計		100.00

* 赤字は両河川で検出された藻類を示す。

** 生育温度：15℃

推奨株として報告されている[22]。また 珪藻の *A. minutissimum* と藍藻の *P. foetida* は、「河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル」で使用されている[22]。選択した株はいずれも俵状や糸状の形状であり（**図-8**）、*S. aestivale*（糸状）以外は、細胞を均等に分散させることができた。

選抜した付着藻類株の最適照度条件の検討結果を**表-10** に示す。OECD テストガイドラインでは試験条件として①比増殖速度が 0.92day^{-1} 以上、②日間変動係数が 35%以下、③繰り返し変動係数が 7%以下、であることが条件となっている[25]。検討した 7 株において、②と③の条件は全て満たしていた。一方、①比増殖速度は緑藻と藍藻では条件を満たしていたが（緑藻: 1.21-1.41day^{-1}、藍藻 : 0.94-1.15 day^{-1}）、珪藻は 0.54-0.63 day^{-1} と増殖速度が遅かった。自然界では増殖速度が速い藻類のみが生育することは考えられず、本試験では条件①が満たさない株でも試験に使用した。緑藻の *D. serratus* と *D. subspicatus* は 2000lx 以上の照度で比増殖速度が 0.92day^{-1}以上であったことから、試験条件②と③でデータのばらつきが少ない照度（*D. serratus* : 3000lx、 *D. subspicatus* : 2000lx）を選択した。また藍藻の *P. foetida* と *P. jenkelianum* は比増殖速度が大きい場合でも照度が高いと色抜けする現象が見られたため、至適照度をそれぞれ 2000lx と 1000lx とした。

3.3.2 付着藻類に対するアンモニア態窒素の影響

NH_4-N は藻類に対し、プラス（低濃度区 : 栄養塩）の影響とマイナス（高濃度区 : 毒性）の影響を及ぼすことが考えられる。そこで 7 株に対する低濃度区と高濃度区の NH_4-N の影響を検討した。

図-9 は各培地における NH_4Cl 添加時の解離アンモニア（NH_4^+）の濃度を示す。NH_4-N を含む水溶液においては溶液の pH と温度により NH_4^+濃度が変動し、中性付近ではそのほとんどが NH_4^+として存在することが報告されている[26]。各培地の pH は pH 7.28～8.16 であった。超純水に NH_4Cl を溶解した場合、NH_4Cl 添加量から算出される NH_4^+とほぼ同程度の NH_4^+が測定されたが、C 培地、CSi 培地、CT 培地では添加した NH_4^+量の 0.72～0.78 倍の NH_4^+が測定された。培地の pH が中性であったことから、培地中に含まれるキレート剤が NH_4^+を捕捉していることが推察される。

表-10 選抜した付着藻類株の最適照度条件の検討

	分類群	種名	増殖速度計算期間（day）	①比増殖速度			②至適照度での日間変動係数	③至適照度での繰り返し変動係数	至適照度（lx）
				1000lx	2000lx	3000lx			
付着藻類	緑藻	*D. serratus*	1-5	0.97	1.33	1.21	18%	4%	3000*1
		D. subspicatus	0-3	0.85	1.21	1.44	9%	5%	2000*2
		S. aestivale	1-4	0.61	1.19	1.41	19%	5%	3000
	珪藻	*N. pelliculosa*	0-3	0.63	0.51	0.43	4%	3%	1000
		A. minutissimum	1-4	0.39	0.54	0.50	15%	2%	2000
	藍藻	*P. foetida*	1-4	0.89	1.15	1.21	6%	5%	2000*3
		P. jenkelianum	1-3	0.94	1.13	1.17	2%	1%	1000*4
浮遊藻類	緑藻	*R. subcapitata*	0-3			1.31	28%	3%	3000

赤字 : 至適照度に用いた比増殖速度

選択理由

＊1 : 2000lxより3000lxの方が②と③の条件をより満たしていた

＊2 : 3000lxより2000lxの方が②と③の条件をより満たしていた

＊3 : 2000lxより3000lxの方が比増殖速度が大きいが、色抜けが生じる

＊4 : 1000lxより3000、2000lxの方が比増殖速度が大きいが、色抜けが生じる

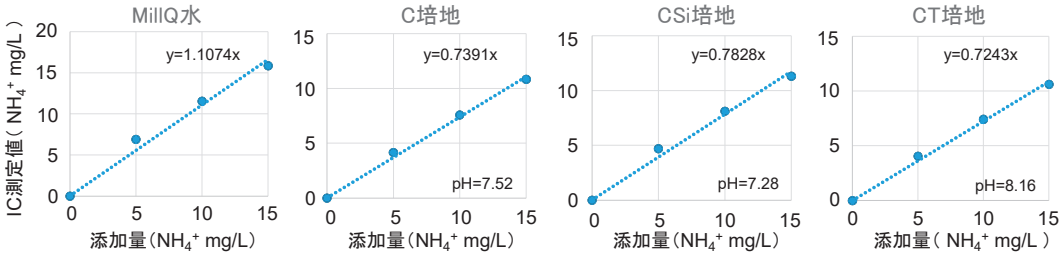


図-9 各培地における NH_4Cl 添加時のアンモニウムイオン濃度

低濃度 NH_4-N 存在下における、各付着藻類株の定常期の細胞数を図-10 に示す。*S. aestivale* と *N. pelliculosa* では、コントロールに比べて 3.02 NH_4^+ mg/L もしくは 6.39 NH_4^+mg/L 濃度までは増加する傾向が確認された。最も影響を受けた NH_4-N 濃度は、*S. aestivale* では 3.02 NH_4^+mg/L（151.1%コントロール比）であり、*N. pelliculosa* では 0.64 NH_4^+mg/L（162.6%コントロール比）であった。使用した培地は KNO_3 が 0.1 g/L 含まれているが、更に NH_4-N が共存する場合は、それを栄養塩として利用することで増殖する株が存在すると考えられる（プラスの影響）。

高濃度 NH_4-N 存在下での各付着藻類の EC_{50} を表-11 に示す。比増殖速度と定常期の細胞濃度（最終濃度法）から EC_{50} を求めた場合、比増殖速度より定常期の細胞濃度から算出した EC_{50} の値が小さいことが明らかとなった。これらの結果から NH_4-N は、付着藻類の生長速度より定常期の細胞濃度に影響を生じる傾向が強いことが推察される。OECD テストガイドライン 201 では指数関数モデルを基本としているが[25]、本試験では以上の結果を考慮して最終濃度法を用いた。定常期の細胞濃度より算出した EC_{50} を用いて、付着藻類 7 種とムレミカヅキモに対する NH_4-N の SSD 解析を行った。その結果、SSD 解析の 5 パーセンタイル

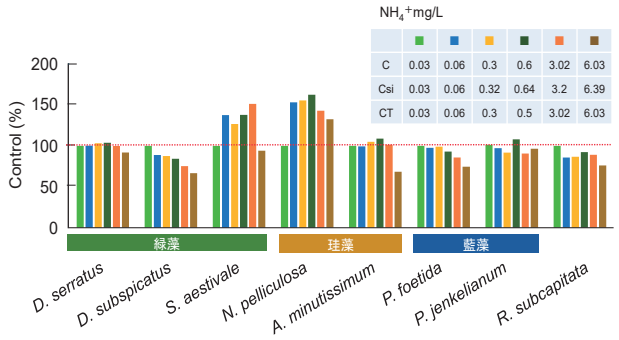


図-10　付着藻類の低濃度アンモニア性窒素に対する定常期細胞数

表-11　付着藻類の高濃度アンモニア性窒素に対する EC_{50}

株	EC_{50} (NH_4 mg/L)	
	比増殖速度	定常期の細胞濃度
D. serratus	268<	16.43
D. subspicatus	268<	90.37
S. aestivale	268<	19.40
N. pelliculosa	284<	66.79
A. minutissimum	21.81	10.54
P. foetida	39.61	25.92
P. jenkelianum	284<	45.00
P. subcapitata	263.79	110.42

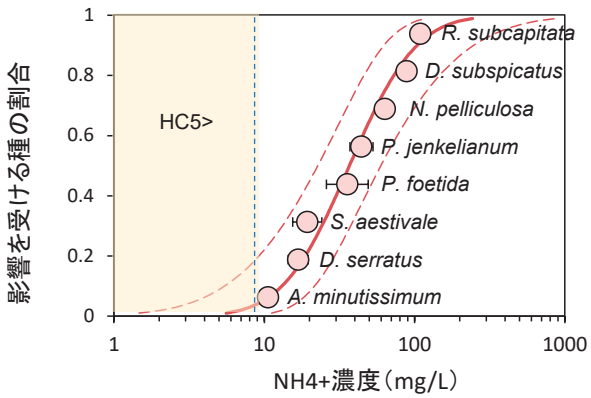


図-11　付着藻類の増殖へのアンモニア性窒素の影響に関する SSD 解析

値に相当する濃度（HC5： Hazardous Concentration 5、95%の種が保護される濃度）は 9.7 NH_4^+mg /L（90% 信頼区間 3.5-17.1 NH_4^+mg/L）であることが明らかになった。付着藻類の分類群間（緑藻、珪藻、藍藻）では NH_4-N に対する感受性に差異の傾向は見られなかったが、ムレミカヅキモは付着藻類に比べて感受性が低いことが推察された。ムレミカヅキモは国際的なモデル藻類として毒性評価に使用されているが、より実環境の影響を踏まえるためには、評価対象の環境で優占している生物種を使用することが必要であると推察される。

4. 魚類を対象とした画像・動画解析による下水処理水の生物影響把握手法に関する検討

4.1　はじめに

下水処理水には様々な化学物質が含まれる可能性があり、水生生物に対する影響が懸念されている。そのため、生物試験等により放流先生態系に対する下水処理水の安全性を確認することが有用と考えられ、OECD テストガイドライン等で水生生物を用いた生物試験方法が各種提案されている。しかし、一般的に魚類を用いた試験は時間・労力がかかり、生死などの指標でしか影響を評価できない。また、排水による魚類への影響は様々な反応（異常行動、摂食量の減少等）が考えられ、それらの行動に対する影響を把握することは難しい。一方で、近年では PC スペックの向上や画像解析技術のオープンソース化に伴い、化学物質や化学物質を含有する排水による生物影響を画像・動画解析を用いて把握する試みが多くなされている[27, 28, 29]。浄水処理においては水質監視として動画撮影による魚類の行動モニタリングを行っている事例は存在するが[30]、下水処理において処理水に曝露した魚類を対

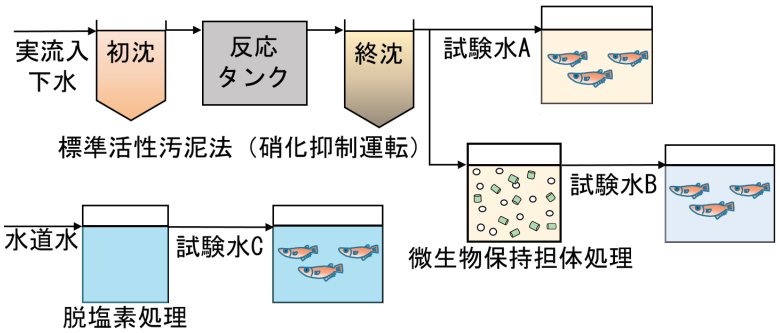


図-12 ヒメダカの連続曝露実験系の概要

象として画像･動画解析を行った事例はほとんどない。そこで、本研究では魚類を対象とした画像・動画解析による下水処理水の生物影響把握手法の開発を目的として、試験方法や解析手法に関する検討を行う。令和2年度は、下水処理水に連続曝露して飼育したヒメダカを試験生物として動画の撮影及び解析を行い、下水処理水がヒメダカの行動に与える影響把握への画像・動画解析手法の適用可能性について検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 ヒメダカの連続曝露実験

本実験では曝露用の試験水として以下を用いた。

A: 実流入下水を活性汚泥処理実験装置により硝化抑制運転で処理し、NH_4-N が高濃度で残存する処理水

B: 試験水 A に対して微生物保持担体を用いた追加の硝化処理を行い（HRT 180 分）、NH_4-N 濃度が低下した処理水（2.2.3 c）の実験で作成された処理水）

C: 脱塩素水道水（Control）

これら 3 つの試験水 A、B、C を飼育用水槽に通水する実験系を作成し、連続曝露を行った。実験系の概要を**図-12** に示す。試験水 A、B についてはアンモニアセンサーによる NH_4-N 濃度の連続測定を実施した。実験期間中は DO と pH についても定期的な測定を行った。また、実験期間中の水温がメダカの生育には低いと考えられたため、試験水 A、B、C の飼育用水槽すべてにおいてヒーターを使用して水温を 25 ℃に保つよう設定した。

4.2.2 動画撮影と画像解析手法

4.2.1 の条件で飼育を行ったヒメダカを対象とし、画像解析用データの取得を試みた。**図-13** に示す画像撮影装置中の 2L 水槽（縦 8.6 cm×横 14.6 cm×高さ 18.0 cm）にヒメダカを 1 匹移動させ、10 分間のじゅん化の後に 20 分間の撮影を行った。撮影は魚類の行動周期の影響をなくすために 10 時から 14 時の間で行い、各試験水について 3 回（1 日 1 回を 3 日間）の撮影を行った。撮影には画素数 960×1200 pixel のカメラ（Basler 社製、daA1280-54uc）を使用し、フレームレート 9.14 fps で動画を取得した。これらの試験・撮影条件は魚類の行動解析に関する既報研究等 [28, 29]

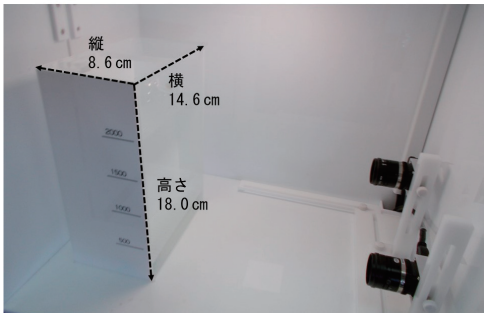


図-13 実験に用いた画像撮影装置

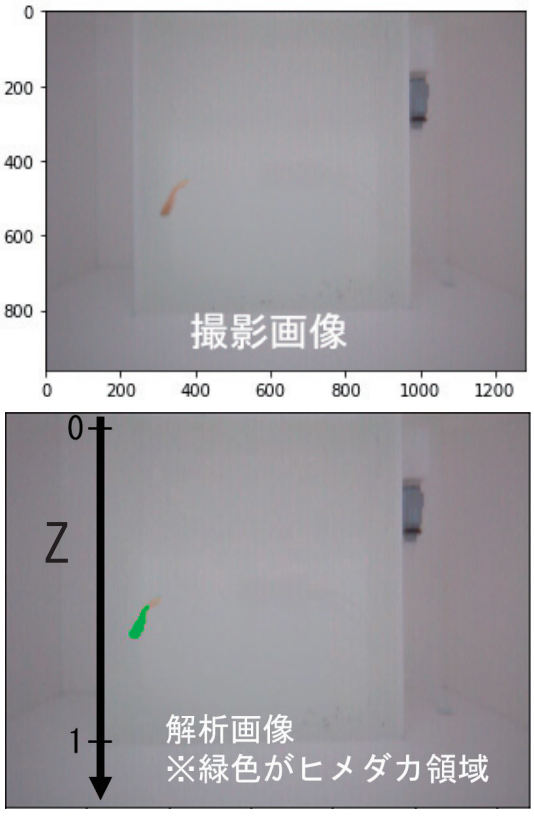


図-14 撮影画像とヒメダカの領域認識

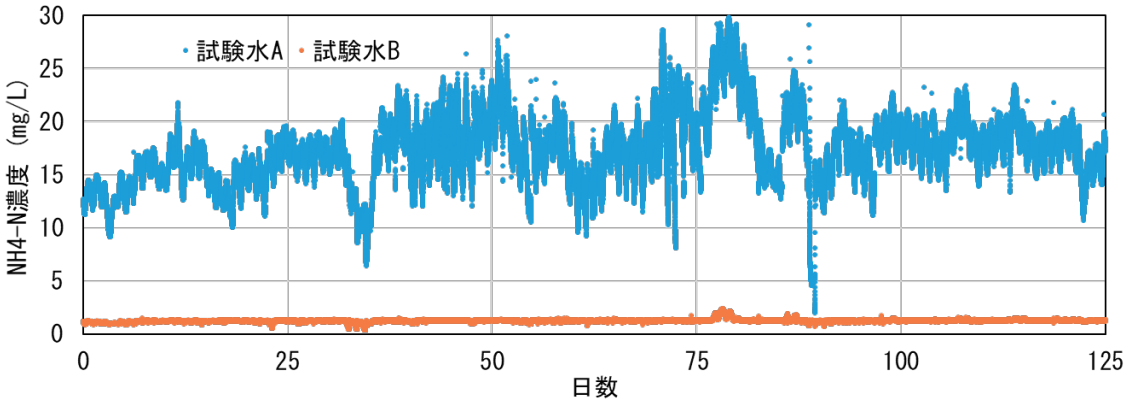


図-15 曝露実験期間中の NH_4-N 濃度（アンモニアセンサーによる測定）の変動

や筆者らの予備検討を基に設定した。

撮影した画像の解析については、背景差分法[31]を用いてヒメダカの領域認識を行い、ヒメダカ領域の重心を算出して各撮影時間における座標とした。撮影した画像のヒメダカの領域認識の例を**図-14** に示す。2 台のカメラで撮影することで同時点の 2 画像の重心からエピポーラ線を計算し、3 次元上の座標を算出した。3 次元座標の算出後、x、y、z 座標をそれぞれ水槽の横・縦・高さを基に 0 - 1 の範囲で規格化した。これらの解析には Python OpenCV を主に使用した。

4.3 結果

曝露期間中の NH_4-N 濃度変動を**図-15** に示す。それぞれの平均値は試験水 A:17.3 mg/L、試験水 B:1.3 mg/L であった。また、DO と pH の濃度範囲を**表-12** に示す。

ヒメダカの z 方向の各試験水の各日の座標と速度の絶対値の箱ひげ図を**図-16** に示す。座標と速度についてどちらも撮影日ごとの差が存在し、撮影時間の長期化や魚の撮影個体数を増加させる必要性が考えられた。

各試験水の 3 日間の結果をまとめた座標及び速度の絶対値のヒストグラムを**図-17、18** に示す。z 方向の座標を比較した際に、試験水 A、B に曝露したヒメダカは底部にとどまっている傾向が見られ、試験水 C に曝露したヒメダカは水面部にとどまる傾向が見られた。このような結果から、下水処理水である試験水 A、B はヒメダカの行動への影響を有する可能性が示唆された。一方で、試験水 A、B 間においては明確な差は見られず、硝化による NH_4-N 濃度低下等の水質変化影響は顕著な行動変化としては検出されなかった。また、z 方向の速度を比較した際には試験水 A、B に曝露したヒメダカは試験水 C に曝露したヒメダカより速度の絶対値が大きい傾向が見られた。座標の比較と同様に下水処理水である試験水 A、B はヒメダカの行動への影響を有する可能性が示唆された。これらの結果より、下水処理水の魚類の行動への影響を定量的に評価する際に利用可能な基本的な動画解析手法を構築することができたと考えられた。

表-12 試験水 A、B、C の DO、pH 濃度

	DO (mg/L)	pH
A	4.9 - 8.5	7.1 - 7.7
B	6.2 - 8.7	6.6 - 7.5
C	8.0 - 8.7	7.2 - 7.8

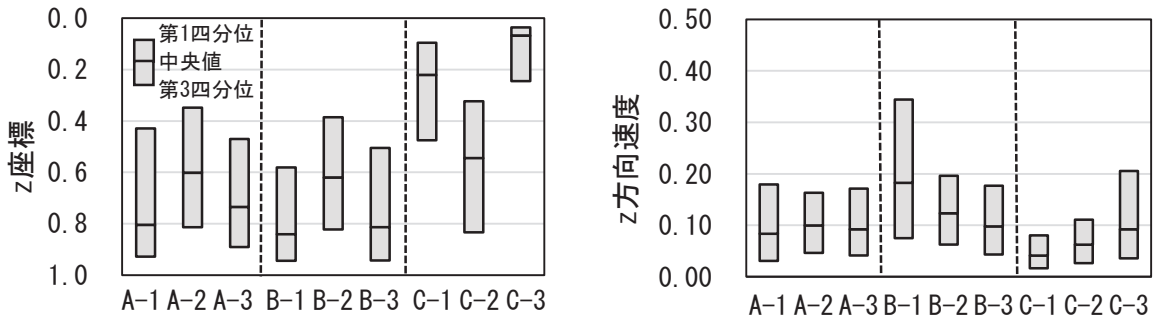
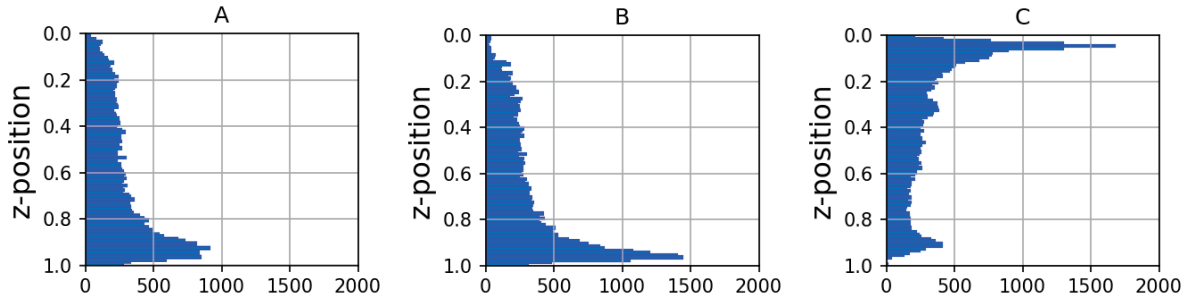
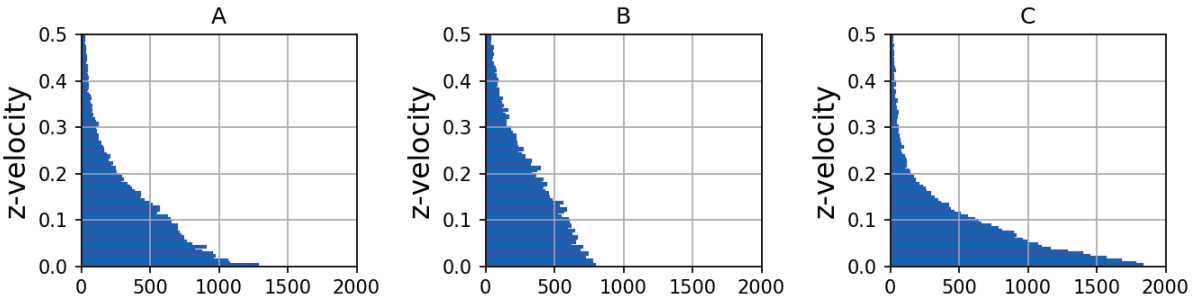


図-16 各試験水の撮影日ごとの z 座標（左図）と z 方向速度（右図）の分布



図–17 ヒメダカの z 方向座標のヒストグラム



図–18 ヒメダカの z 方向速度のヒストグラム

魚類の行動異常を示す一般的な例として鼻上げ行動や行動速度の著しい上昇・低下が挙げられている[30]。本研究では、下水処理水は脱塩素水道水と比較した際に座標についての傾向の違いがみられたが、鼻上げ行動等の行動異常とは判断できなかった。また、速度についても傾向の違いがみられたが、鉛直方向のみの算出では行動の異常性を判断することは難しいと考えられた。

5. まとめ

(1) アンモニア性窒素の担体処理特性把握

小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中 NH_4-N について微生物保持担体と NH_4-N センサーを用いて、異なる担体流動性保持方法における省エネ効果と水質改善効果を検討した。本研究で使用した担体には、硝化細菌が高い割合で存在していることを確認した。反応槽容積当たりの硝化速度は、担体流動性保持を機械撹拌で行った実験において、嫌気無酸素好気法もしくは循環式硝化脱窒法の好気槽に担体を投入した際の最大硝化速度の 0.6-1.6 倍程度であった。担体流動性保持を曝気撹拌および機械撹拌で行った実験における、硝化窒素量当たりの曝気量はそれぞれ、0.80 m^3/g-N、0.60 m^3/g-N となった。本研究における下水二次処理水中 NH_4-N 濃度範囲においては、担体流動性保持は機械撹拌で行った方が、より効率的に NH_4-N を除去できることが示唆された。嫌気好気ろ床法を採用している、小規模下水処理場における、嫌気槽と好気槽の計画滞留時間の合計から、本実験装置の必要設置スペースは嫌気好気ろ床法の反応槽容積の 12%程度となることを確認したため、スペースの大幅な増加を必要とすることなく本処理装置を設置可能であることが示唆された。

(2) 付着藻類の SSD 解析・影響評価

日本河川に生息する淡水性付着藻類（緑藻、珪藻、藍藻）を選抜し、種感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）解析を用いて NH_4-N の影響評価を行った。愛知県矢作川と長野県広井川に生息する付着藻類について、優占状況や培養の安定性等に基づき、緑藻 3 種、珪藻 2 種、藍藻 2 種を選抜した。低濃度 NH_4-N 在下の影響試験では、*S. aestivale* と *N. pelliculos* が NH_4-N を栄養塩として利用し、プラスの影響を受けることを明らかにした。また高濃度 NH_4-N 存在下での影響試験を基に SSD 解析を行った結果、HC5 は 9.7 NH_4 mg/L であることが明らかになった。これらの結果から、付着藻類に対する NH_4-N の影響は、プラスとマイナスの両面から考慮する必要があると推察される。

(3) 魚類動画解析による影響評価手法検討

未硝化または硝化した下水処理水にそれぞれ連続曝露したヒメダカを試験生物として、動画の撮影及び解析を行い、画像・動画解析手法を用いた下水処理水の影響評価手法に関する検討を実施した。動画解析の

結果からヒメダカの行動を定量化し、下水処理水と脱塩素水道水（Control）によるヒメダカの行動への影響について比較検討することができた。しかし、それらの行動の特徴がヒメダカにおける生物影響を表しているかの判断には至らなかった。今後は試験条件や行動解析の評価手法についてさらなる検討を行い、魚類の動画解析を用いた下水処理水の生物影響評価手法を提案する予定である。

参考文献

1）国土交通省水管理・国土保全局下水道部：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報告書、pp.22-30、平成30年3月

2）U.S. EPA: Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia - Freshwater 2013

3）U.S. EPA: Ambient water quality criteria for ammonia (Saltwater)-1989

4）高橋正宏、鈴木穣：「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調査」、平成6年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.169-178、1993

5）社団法人日本下水道協会:高度処理施設設計マニュアル（案)、1994

6）M. Christensson and T. Welander: “Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area”, Water Science and Technology, Vol.49, pp.207-214, 2004

7)Water Environment Federation: Biofilm Reactors, McGraw-Hill, 2010

8）Metcalf and Eddy: Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery, fifth edition, McGraw-Hill Education, 2003

9）日本下水道事業団：包括固定化担体を用いた硝化促進型循環変法「ペガサス」の評価に関する報告書、平成5年4月

10）L. Svobodová, K. Havlíček, M. Nechanická, R. Špánek, B.K. Sirková, I. Lenfeldová, O. Louda, E. Moučková, T. Lederer: “Microfiber structure for enhanced immobilization of nitrifying bacteria in a post-nitrification reactor”, Environmental Technology & Innovation Vol.21, Article 101373, 2021

11）厚朴大祐、北村友一、山下洋正：下水二次処理水に残存するアンモニア性窒素の担体とセンサーを用いた低減法の提案、第57回下水道研究発表会講演集、pp.832-834、2020

12）公益社団法人日本下水道協会：下水試験方法 平成24年度版、2012

13）S.J. Khan, S. Ilyas, S. Javid, C. Visvanathan, V. Jegatheesan: “Performance of suspended and attached growth MBR systems in treating high strength synthetic wastewater”, Bioresource Technology Vol.102, pp.5331-5336, 2011

14）S. Takahashi, J. Tomita, K. Nishioka, T. Hisada, M. Nishijima: “Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing”, PLOS ONE, 9(8): e105592, 2014

15）JIS K 0122：イオン電極測定方法通則、1997

16）山崎廉予、出口浩：5か所の下水処理場における活性汚泥内細菌叢の分類比較、日本水処理生物学会誌第49巻　第4号、pp.123-132、2013

17）S. Longo, B.M. d’Antoni, M. Bongards, A. Chaparro, A. Cronrath, F. Fatone, J.M. Lema, M.M. Iglesias, A. Soares, A. Hospido: “Monitoring and diagnosis of energy consumption in wastewater treatment plants. A state of the art and proposals for improvement”, Applied Energy Vol.179, pp.1251-1268, 2016

18）社団法人日本下水道協会：小規模下水道計画・設計・維持管理指針と解説、2004

19）社団法人日本下水道協会：平成29年度版　下水道統計

20）社団法人日本下水道協会：下水試験方法上巻-2012年版- pp.292-301（2012）

21）(国研) 国立環境研究所　微生物系統保存施設：培地リスト、https://mcc.nies.go.jp/02medium.html#check_medium

22）永井孝志：河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル Ver. 1.0、独立行政法人農業環境技術研究所, 2016

23）永井孝志：農薬の生態リスク評価のための種の感受性分布解析Ver. 1.0、国立研究開発法人農業環境技術研究所

24）内田朝子、洲澤多美枝：早春における矢作川の付着藻類群集（種類組成)、2001-2014年、矢作研究会、No.21：21-43（2017）

25）OECD：Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2011

26）公益社団法人日本水産資源保護協会：53）アンモニア態窒素（2020）
27）川端雅博、亀屋隆志、小林剛、浦野紘平：ヒメダカの活動低下に着目した画像解析による水質異常検知特性、水環境学会誌、Vol.30、No.11、pp.645-650、2007
28）竹内健一郎、加藤信介、金鐘訓、徐長厚、千野聡子、熊谷一清：室内ホルムアルデヒドがメダカに及ぼす影響の検討、日本建築学会環境系論文集、第 74 巻、第 645 号、pp.1237-1242、2009
29） Fatma Khalil, Ik Joon Kang, Suzanne Undap, Rumana Tasmin, Xuchun Qiu, Yohei Shimasaki, Yuji Oshima: Alterations in social behavior of Japanese medaka (Oryzias latipes) in response to sublethal chlorpyrifos exposure, Chemosphere, Vol.92, No.1, pp.125-130, 2013
30） 日本水道協会：上水試験方法 2011 年版 VI. 生物編、2011
31） Gary Bradski, Adrian Kaehler, 松田晃一：詳解 OpenCV―コンピュータービジョンライブラリを使った画像処理・認識、オライリージャパン、2009

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：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、諏訪守

【要旨】 本研究では、次世代シーケンス（Next-Generation Sequencing, NGS）技術を用いて下水処理場における病原ウイルスを網羅的、継続的に検出し、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のモニタリングの可能性を評価した。その結果、流入下水試料の BLAST 解析により、ヒトを宿主とする新型コロナウイルス、ロタウイルス、及び、ヒトとブタを宿主とする E 型肝炎ウイルスの 3 種類のウイルスが検出された。二次処理水及び放流水では、このうちロタウイルスのみが検出された。下水処理場管内における感染症情報と、NGS によるウイルスの網羅的、継続的な検出結果に関連性が見出されたことから、網羅的、継続的なモニタリングにより原因ウイルスの動向を把握できる可能性が示された。

キーワード：次世代シーケンス、ヒト病原ウイルス、網羅的検出、下水、感染症モニタリング

1. はじめに

現在、新型コロナウイルスによる感染症（coronavirus disease 2019; COVID-19）のパンデミックによる問題が深刻化する中で、感染拡大防止と社会経済活動再開に向けた適切な政策決定のための判断材料の一つとして、下水疫学（Wastewater-based epidemiology）の活用が期待されている。下水には、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、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中の存在濃度と、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)]。 新型コロナウイルスに対しても感染者の糞便 [3),4)]や尿 [5)]から検出されたことが報告され、下水中でも検出されたことが日本 [6),7)]のみならずオーストラリア [8)]やアメリカ [9)]、イタリア [10)]、オランダ [11)] など世界各国において報告されている。

複数個所の下水管渠において下水を採取し、アウトブレイクの発生地域を徐々に絞り込むことができれば、公衆衛生当局が感染拡大リスクの高い地域を対象に迅速な感染症拡大防止策を講じることにつながる可能性がある。また、下水処理場では病原微生物の流入状況に応じた水質管理の徹底、適切な消毒の実施により、地域の感染症の拡大防止に貢献できる可能性がある。

一方、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おらず、ウイルス種に応じて個々に PCR 法により検出を行うため、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ウイルスを含めた同時かつ迅速な検出には適していない。しかし、次世代シーケンス（Next-Generation Sequencing, NGS）技術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近年可能となったことから、下水中に存在する複数のウイルスが同時に検出・同定された報告例がある [12), 13)]。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できれば、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できると考えらえる。

本研究では、昨年度に引き続き、NGS 技術により下水処理場の病原ウイルスを網羅的、継続的に検出し、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の網羅的なモニタリングの可能性を評価した。

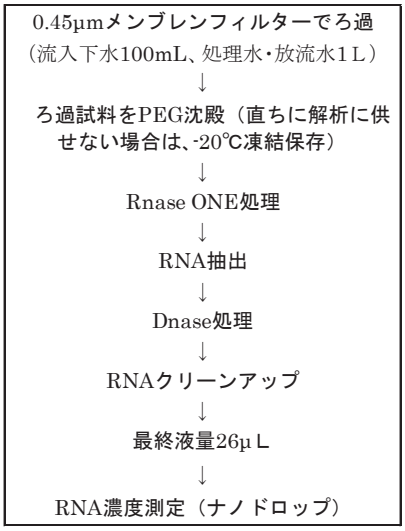
2. 研究方法

2. 1 試料の採取と前処理法

A 下水処理場の流入下水を令和 2 年 7 月から、処理水と放流水を 9 月から、それぞれ令和 3 年 4 月までの間に月 4 回採取した。令和 3 年 3 月から調査対象地域において新型コロナウイルス患者数の増加傾向が見られたため、R3 年度の 4 月までの結果を含めて整理した。処理水は生物学的高度処理の嫌気無酸素好気法(A2O 法)によるものであり、放流水は次亜塩素酸ナトリウムにより消毒されていた。

BLAST（Basic Local Alignment Search Tool：局所的な塩基配列の検索手法）解析のための NGS による下水試料検出の前処理法の概略を図-1 に示す。流入下水は 38

検体、処理水・放流水は各 27 検体の全採取試料について前処理を行った。ウイルスより大きな生物（細菌、藻類等）を取り除くため、採取した下水試料 を 0.45μm のメンブレンフィルターによりろ過し、ろ過水をポリエチレングリコール（PEG）沈殿法 [14]により濃縮を行った。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 を Baseline-Zero DNase（Arbrown）により分解、RNA のクリーンアップをした後、 RNA 濃度の測定を行い試料中の RNA 収量を把握した。なお、直ちに BLAST 解析に供せない場合には、PEG 沈殿法により濃縮した試料を冷凍保存（-20℃）した。



図－1　試料の前処理法

2. 2 各試料のシーケンス及び BLAST 解析

BLAST 解析に供した試料は、全採取試料中より RNA 収量及び下水処理場管内での感染症の流行状況を勘案して選定した。処理水・放流水の多くの試料では RNA 収量が流入下水試料と比較して少なかったため、複数の試料を混合し前処理を行った。結果として、流入下水は 12 試料、処理水・放流水の各 4 試料の計 20 試料とした。20 試料は KAPA mRNA Hyper Prep Kit（日本ジェネティクス）を使用してライブラリ調製を行い、次世代シーケンサーの Miseq（Illumina）に供しシーケンスデータを得た。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、SPAdes 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。次いで、NCBI の塩基配列データベースを基にウイルスのデータベースを作成し、得られた contig を BLAST 解析（Ver. 2. 7. 1+）し、相同性が高かったウイルス種を同定した。

2. 3 感染症情報の把握と照合

採水期間中における感染症の流行状況の把握は、自治体の衛生部局が HP 上で公表している感染症患者数の週報を基に整理を行った。

3. 研究結果

3. 1 各試料の RNA 収量・出力リード数・contig 数

各試料の RNA 収量は 0.07～0.72μg であった。次世代シーケンス により得た配列（出力リード数：72 万–180 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、2～912 の contig が得られた。これらの結果を合わせて表-1 に示した。20 試料の内 3 試料（No.3、14、18）については他の試料と比較して contig 数が 2～30 と極端に低い状況であったが、出力リード数や RNA 収量は他の試料と大きな違いは見られなかった。

表－１各試料のRNA収量・出力リード数・contig数

試料No.		採水日	RNA収量(μg)	出力リード数	contig数
流入下水	1	R2.8.18	0.17	1,223,594	597
	2	R2.9.15	0.22	1,391,250	498
	3	R2.10.20	0.28	1,795,072	21
	4	R2.10/27+11/4(混合)	0.26	1,596,174	598
	5	R2.11.10	0.14	1,306,454	614
	6	R2.11.18	0.27	1,106,687	430
	7	R2.11/24+12/1(混合)	0.31	1,119,610	377
	8	R2.12.22	0.1	1,165,097	538
	9	R3.1.26	0.22	1,102,146	471
	10	R3.2.9	0.23	1,192,007	842
	11	R3.3.2	0.21	1,252,078	437
	12	R3.4.26	0.72	719,080	321
処理水	13	R2.9/16+23+30(混合)	0.38	1,476,842	912
	14	R2.11/11+18+25+12/2+9(混合)	0.42	1,399,788	2
	15	R3.1/6+13+20(混合)	0.28	1,678,937	855
	16	R3.1.27	0.09	1,244,184	516
放流水	17	R2.9/16+23+30(混合)	0.17	1,439,548	756
	18	R2.11/11+18+25+12/2+9(混合)	0.1	1,139,944	30
	19	R3.1/6+13+20(混合)	0.07	1,237,129	403
	20	R3.1.27	0.13	1,734,760	522

3. 2 各試料の BLAST 解析結果

各試料から得られた contig に対して 行った BLAST 解析によるヒト由来ウイルス及びその他のウイルス（ファージや植物性ウイルス等を含む）のヒット数を表-2 に示す。データベース上の配列に同定されたウイルス（上記の全てを含む）のヒット数の合計は流入下水で 6～190、処理水・放流水では 1～154 であったが、contig 数が極端に少ない No.3、14、18 試料では、ヒット数も低い状況であった。同定されたウイルスの内、ヒトを宿主とするものは、新型コロナウイルス、ロタウイルス、及び、ヒトとブタを宿主とする E 型肝炎ウイルスの 3 種類のみであった。

流入下水では 12 試料の内 5 試料から新型コロナウイル

スが検出されヒット数が 1～12 であった。同様にロタウイルスは 11 試料から 3～9 のヒット数、E 型肝炎ウイルスは 2 試料から各々1 ヒット数であった。また、ヒト由来ではあるが未分類（不明）のウイルスが 3～88 ヒット数であり、同定、不明分を合わせたヒト由来のウイルスの割合は、その他のウイルスを含めた全ヒット数に対し 39～54%を占めていた。

処理水･放流水の8検体からは新型コロナウイルスが不検出であったが、ロタウイルスのヒット数は1～3であった。その他、ヒト由来ではあるが未分類（不明）のウイルスが不検出～66 ヒット数であり、同定、未分類を合わせたヒト由来のウイルスの割合は、その他のウイルスを含めた全ヒット数に対し 13～67%で推移していた。

表-2 BLAST解析によるヒト由来ウイルス等のヒット数

試料 No.		ヒト由来			その他のウイルス		ヒト由来･その他のウイルスのヒット数の合計	ヒト由来ウイルスの割合 (%)
		同定		不明	植物性ウイルス等含	ファージ		
		腸管系	コロナ					
流入下水	1	6 (ロタ)	1	72	43	34	156	51
	2	7 (ロタ)	1	64	42(E型1)	26	140	51
	3	N.D	N.D	3	1	2	6	50
	4	4 (ロタ)	N.D	22	16	25	67	39
	5	6 (ロタ)	3	76	77	27	189	45
	6	5 (ロタ)	1	88	75	21	190	49
	7	5 (ロタ)	N.D	32	23	9	69	54
	8	9 (ロタ)	N.D	46	43(E型1)	32	130	42
	9	5 (ロタ)	N.D	33	33	9	80	48
	10	3 (ロタ)	N.D	25	15	21	64	44
	11	5 (ロタ)	12	24	25	23	89	46
	12	4 (ロタ)	N.D	27	25	13	69	45
処理水	13	N.D	N.D	6	27	12	45	13
	14	N.D	N.D	N.D	N.D	1	1	–
	15	N.D	N.D	5	9	8	22	23
	16	3 (ロタ)	N.D	66	65	20	154	45
放流水	17	N.D	N.D	16	13	9	38	42
	18	N.D	N.D	10	2	3	15	67
	19	1 (ロタ)	N.D	43	39	11	94	47
	20	2 (ロタ)	N.D	41	37	18	98	44

（ロタ）ロタウイルス、（E型）E型肝炎ウイルス

3. 3 感染症情報の把握と照合

A 下水処理場管内において採水期間中に多くの患者数が報告された感染症は主に新型コロナウイルスと感染性胃腸炎であった。新型コロナウイルス患者数と流入下水の新型コロナウイルスヒット数の関係を図-2 に示す。流入下水の新型コロナウイルスは、12 試料の内 10 試料が不検出あるいは 1 ヒットであったが、2020 年の第 46 週と翌2021年の第9週にはヒット数が3～12に高まった。このようにヒット数の高まりの後に管内の新型コロナウイルス患者数が 104、46 人/週と増加している場合もあるが、一方で患者数が多い時期でもウイルス検出が低下している場合もあった。このため、感染拡大の正確な把握は難しいものの、網羅的、継続的なモニタリングにより原因ウイルスの動向を把握できる可能性が示された。

次いで、感染性胃腸炎の原因となるウイルスの一種であるロタウイルスヒット数との関係を図-3 に示すが、患者数の多くが 10～20 人程度/週であり新型コロナウイルス患者数と比較して変動幅が小さくほぼ一定数で推移していた。この時の流入下水のロタウイルスは 12 試料中 11 試料においてヒット数が 3～9 であり、一定数の患者が継続して存在することで感染症の原因となるウイルスがヒットするものと考えられた。

一方、本調査では冬季における感染性胃腸炎の主要因であるノロウイルスがヒットされなかった。また、例年流行が生じているヘルパンギーナ、手足口病、RS ウイルスなどの他の感染症の患者報告数が皆無であった。これら他の感染症の非流行要因は手洗い、マスク着用の徹底、3 密の回避などによる新型コロナウイルス感染症対策の効果であると推定された。

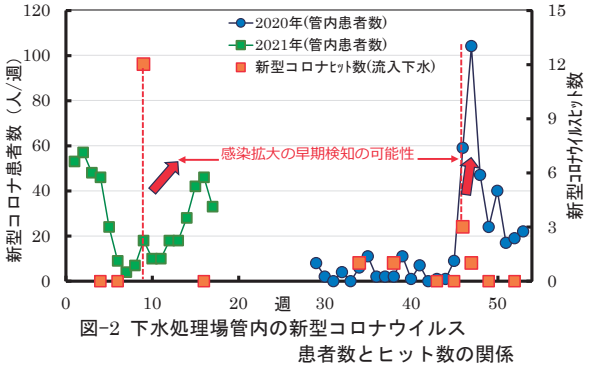


図-2 下水処理場管内の新型コロナウイルス患者数とヒット数の関係

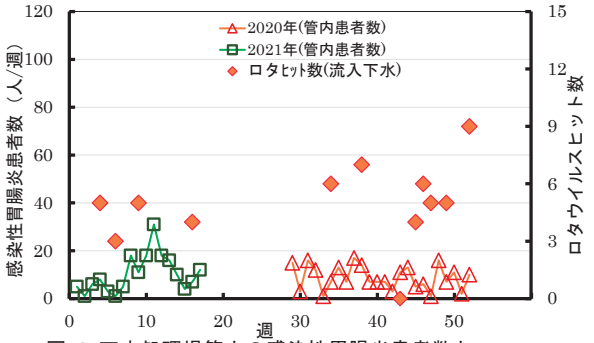


図-3 下水処理場管内の感染性胃腸炎患者数とロタウイルスヒット数の関係

比較対象として、新型コロナウイルスが流行する以前の 2018、2019 年に A 下水処理場で行った調査結果 [15] を図-4 に示す。調査期間中において、全検出ウイルスに対し感染性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスのヒット数が 66～98%を占める状況にあった。感染性胃腸炎の主要因であるノロウイルスでは、冬季に最大で 69%を占める状況も見られ、この時の患者数は最大で約 50～70 人/週にも及び、患者報告数とウイルスの検出ヒット数の傾向が一致していた。また、感染性胃腸炎以外の感染症として手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数と、それらの原因ウイルス

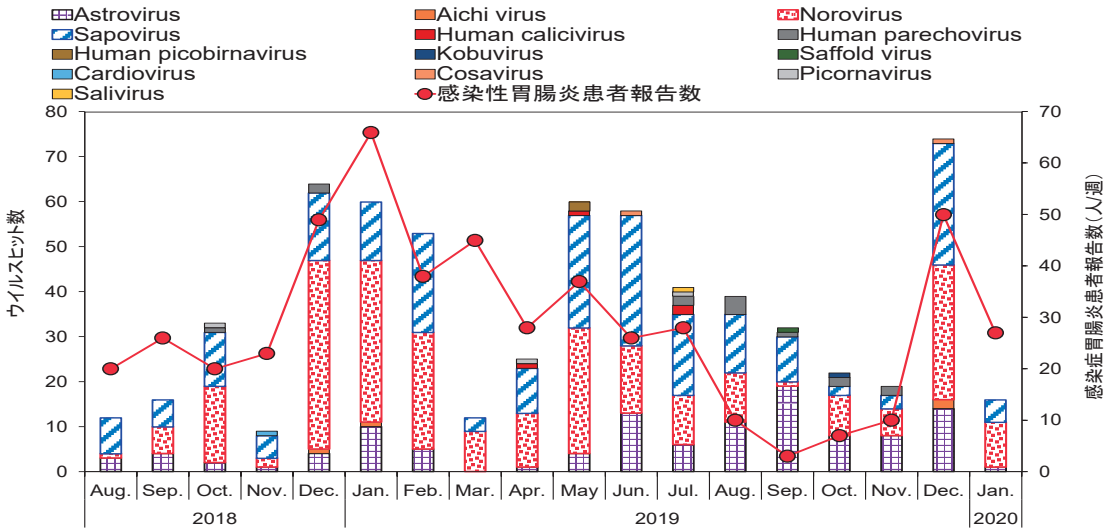


図-4 感染性胃腸炎患者報告数と各種のウイルスヒット数

（一部凡例表示を改変）

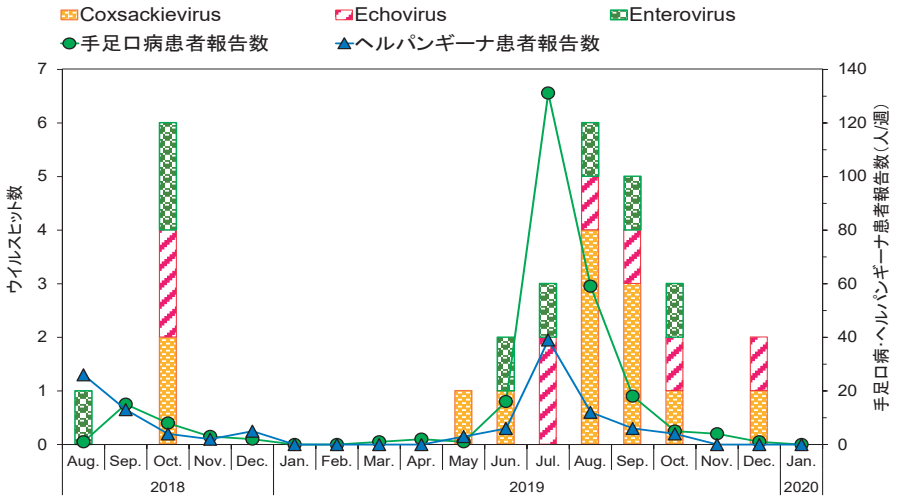


図-5 手足口病・ヘルパンギーナ患者報告数と各種のウイルスヒット数

（一部凡例表示を改変）

としてコクサッキーウイルス、エンテロウイルスなどのヒット数の関係について図-5 に示す。特に、コクサッキーウイルスとエンテロウイルスがヒットした 2019 年の 5、6 月以降に手足口病、ヘルパンギーナ患者数が上昇していた。このように、網羅的、継続的なモニタリングが感染拡大の兆候の検知につながる可能性が示唆された場合もあったが、一方で、ウイルスのヒット数が高まっても患者報告者数が増加していない場合（2018 年 10 月）もあったことから、不顕性感染の影響も含め、複合的な要因があるものと推定された。

本調査期間中では、全国的に新型コロナウイルス感染症が流行し、その拡大防止策として数々の対策が実施されており、下水処理場管内における他の感染症は新型コロナウイルスの流行前と比較して感染性胃腸炎患者報告数は概ね半減、手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数はほぼ皆無であった。断定的な根拠は得られず不明であるが、このような感染症の流行状況下により、流入下水から検出されたヒトを宿主とするウイルスが新型コロナウイルスとロタウイルスに限定されたものと推定された。

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、継続的に検出し、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のモニタリングの可能性を評価した。以下に得られた結果を示す。

1) 流入下水試料の BLAST 解析の結果、ヒトを宿主とする新型コロナウイルス、ロタウイルス、及び、ヒト

とブタを宿主とするE型肝炎ウイルスの3種類のウイルスが検出された。

2) 二次処理水及び放流水からはロタウイルスが検出され、新型コロナウイルス及びE型肝炎ウイルスは不検出であった。

3) 下水処理場管内における感染症情報と、NGS によるウイルスの網羅的、継続的な検出結果に関連性が見出されたことから、網羅的、継続的なモニタリングにより原因ウイルスの動向を把握できる可能性が示された。

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) Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A., Niemeyer, D., Jones, T.C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirglmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C.: Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019, Nature, pp. 1–10, 2020.

4) Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., et al.: Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. Lancet Gastroenterol, Hepatol. 5, pp. 434–435, 2020.

5) Sun, J., Zhu, A., Li, H., Zheng, K., Zhuang, Z., Chen, Z., Shi, Y., Zhang, Z., Chen, S., Liu, X., Dai, J., Li, X., Huang, S., Huang, X., Luo, L., Wen, L., Zhuo, J., Li, Y., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Li, F., Feng, L., Chen, X., Zhong, N., Yang, Z., Huang, J., Zhao, J., Li, Y.: Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient, Emerg Microbes Infect, 9(1), pp. 991−993, 2020.

6) Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., Kitajima, M.: First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan, Science of The Total Environment 737, pp. 140405, 2020.

7) Hata, A., Honda, R., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y.: Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assaysimplication for wastewater-based epidemiology (WBE), medRxiv, 2020.

8) Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., et al.: First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community, Sci. Total Environ., 2020.62

9) Sherchan, S.P., Shahin, S., Ward, L.M., Tandukar, S., Aw, T.G., Schmitz, B., Ahmed, W., Kitajima, M.: First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA, Science of The Total Environment 743, pp. 140621, 2020.

10) La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, A., Bonanno, F., Veneri, Bonadonn, L., Lucentini, Suffredini, E.: First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy, Sci. Total Enviro. 736, pp. 139652, 2020.

11) Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R.: Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands, Environ. Sci. Technol. Lett., pp. 511–516 2020.

12) 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

13) 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 ウイルスの選択的 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

14) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H.: Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, J. Water Health, 17(1), pp. 50–62, 2019

15) 土木研究所資料第 4402 号、令和元年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.69-75, 2021.

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：運営費交付金
研究期間：平成 29～令 3 年度
担当チーム：水環境研究グループ（水質チーム）
研究担当者：山下洋正、北村友一、對馬育夫、村田里美、鈴木裕識

【要旨】繊維状マイクロプラスチック（繊維状 MPs）の発生源の把握に資するため、ポリエステル及びナイロン並びに比較として木綿製のタオルを用いて洗濯繊維の発生実験を行い、繊維状 MPs の発生挙動を検討した。洗濯タオル 1g あたりの繊維状 MPs の発生重量及び発生本数は、ポリエステルでは 0.049 mg/g および 67.0 本/g、ナイロンでは 0.12 mg/g および 66.2 本/g であった。発生本数は両者で同等であったが、繊維長の中央値はポリエステルでは 236 μm、ナイロンでは 575 μm であり、前者でより微細な繊維状 MPs の発生が示唆された。また、木綿製タオルでは、発生重量が 1.3mg/g、発生本数が 24,000 本/g であり人工繊維と比べ顕著に多かった。また、繊維長の中央値が 162 μm であり、より微細な繊維が発生していた。本研究の結果から推算したヒト一人の洗濯由来の繊維状 MPs の発生原単位は 99,300 本/人/日であり、同様の洗濯繊維の発生実験の既報値 97,700 本/人/日や、過去に実施した下水処理場調査による算出値 73,200 本/人/日と類似していた。これら洗濯繊維を用いて、洗濯により発生した繊維状 MPs がムレミカヅキモに及ぼす影響を検討した。その結果、ポリエステル及びナイロンの両方で、流入下水濃度の実測最大値の 100 倍の繊維量（本/L）でもムレミカヅキモの増殖に影響が見られないことが明らかとなり、下水処理場の放流水の繊維状 MPs が藻類に影響する可能性は低いと推察された。

キーワード：繊維状マイクロプラスチック、洗濯、材質、発生原単位、ムレミカヅキモ、影響評価

1. はじめに

プラスチックによる環境汚染について注目が集まっている。2019 年 5 月には有害廃棄物の輸出入を規制するバーゼル条約において、汚れた廃プラスチックを規制対象とする改正条約が採択された。また「海洋プラスチックごみ対策アクションプラン」G20 において、対策実施の基礎として実態把握・科学的知見の充実が求められている。特に、5 mm 以下のマイクロプラスチック（MPs）については水生生物への悪影響が懸念されている。水環境中の MPs の存在実態に目を向けると、海洋、湖沼、河川での検出報告が増加しており、汚染源に関する知見の収集が求められる。

本研究は平成 29 年度から令和 3 年度までの計画で、下水に含まれるナノ物質や MPs 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。昨年度の研究では夾雑物の多い下水試料に対する MPs の測定前処理手法の高度化を検討した。その結果、フェントン反応後に HCl で洗浄する手法が夾雑物除去の向上に有効であった。この前処理後の MPs サンプルについて実体顕微鏡観察と FTIR 分析を行い、材質や形状に影響がないことを確認した。また環境での挙動を考慮した MPs の影響を明らかにするため、紫外線 C 波（UVC）照射されたナイロン 6 粒子（Ny6）がムレミカヅキモに及ぼす影響について検討した。その結果、UVC を照射された Ny6 では、ムレミカヅキモへの吸着量が減少し、それに伴いムレミカヅキモの増殖阻害が減少することを明らかにした。

令和 2 年度では、ポリエステル、ナイロン、木綿製のタオルを用いて洗濯繊維の発生実験を実施し、洗濯における繊維状 MPs の発生挙動を検討した。また実際に洗濯処理を行い調製したポリエステル繊維とナイロン繊維を用いて、繊維状 MPs が藻類へ与える影響について検討を行った。

2．洗濯における繊維状マイクロプラスチックの発生挙動の検討実験

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。

Nile Red 試薬を用いた蛍光染色観察法により下水処理場を通日調査し、流入下水中に含まれる赤発光 MPs 繊維（ナイロンやポリエステルと考えられる繊維）の日平均個数密度が 195 本/L であったと報告した[1]。これらの繊維状 MPs は、家庭から下水道に流入する主要な MPs であると考えられるが、どの材質の繊維製品からどれ程の大きさの繊維状 MPs がどれだけ発生するかについて、知見が必要だが不足している。そこで本研究では、実験用に準備した洗濯機を用いて、繊維状 MPs の発生挙動を検討した。

2.2 実験方法

本研究で実施した、洗濯繊維の発生実験の装置概要を図-1 に示す。洗濯槽（容量 3.6 kg）と脱水槽が分かれたパルセーター式の洗濯機を用い、排水先に目開き 10 μm のメッシュフィルター（ナイロン製）を設けて、発生繊維を回収する仕組みを構築した。対象材質は下水からの繊維状 MPs の検出頻度が高いポリエステルとナイロンとし、各素材 100%製の市販タオルを入手して実験に用いた。また、木綿 100%製のタオルも同様に実験し、微細化した繊維の発生挙動を比較した。

洗濯繊維の発生実験は図-2 に示した操作フローの通り実施した。水道水 10 L を用い、合計約 15 分間の洗いとすすぎの操作（以降、洗濯 1 サイクルとする）を 3 回繰り返し、その後脱水操作を行った。メッシュで受けた発生繊維屑は同水道水を用いて逆洗し、ポリカーボネート製ろ紙（孔径 10μm、Φ47mm、Merck）上で洗浄水をろ過して回収した。なお、対象サンプルの洗濯前に水道水を用いた空洗濯を 5 サイクル実施してコンタミをなるべく排除するとともに、1 サイクルのブランク試料中の繊維の有無を確認する試験を実施した。微細化した繊維の発生量は、乾燥重量の測定により評価した。

発生した繊維の個数（本数）は既報[2]の蛍光染色観察法により計測して評価した。前処理では、分析を阻害する夾雑物がないことから、従来の手法[2]から分解工程を省略して実施した。染色操作では、調製済みの Nile red 溶液を試料に 4 mL 添加し 70℃で 90 分反応させた。乾燥した試料は重量測定後に観察に供した。観察には実体顕微鏡（Leica）に蛍光ユニット（BioTools）を組み合わせた装置を使用し、落射蛍光条件下で短軸径 100 μm 以下、長軸径 100 μm 以上を目安に確認された繊維を計測した。落射蛍光条件下でポリエチレンテレフタラート、ナイロン等が赤、ポリスチレン等が黄、ポリエチレン、ポリプロピレン等が緑色に発光してみ



図-1 洗濯繊維の発生実験の装置概要

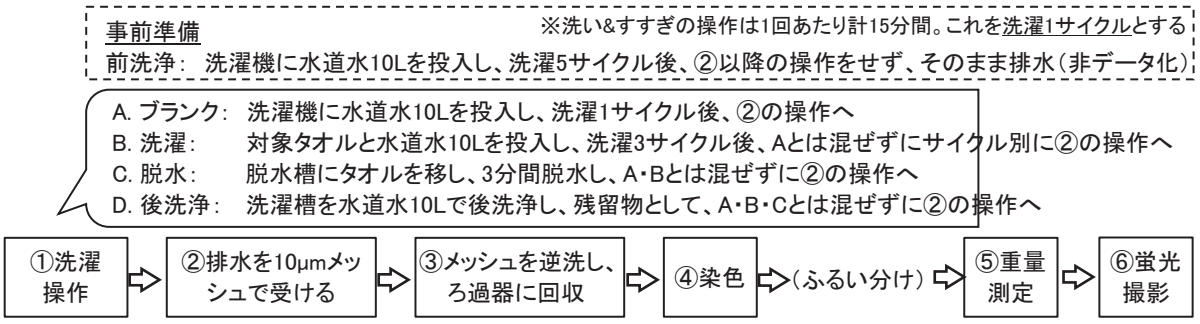


図-2 洗濯繊維の発生実験の操作フロー

表-1 洗濯繊維の発生実験における素材別の発生繊維重量

	ポリエステル			ナイロン			木綿
	第1回	第2回	平均	第1回	第2回	平均	
タオル1枚の投入重量(g)	94.0	91.1	92.6	24.1	24.3	24.2	135.4
洗濯操作ブランク（mg） ＜A＞	0.06			0.09			*N.A.*
洗濯3回により発生した繊維の重量（mg） ＜B＞	2.40	4.27	3.34	1.82	1.11	1.47	148.8
脱水操作で発生した繊維の重量（mg） ＜C＞	0.33	0.11	0.22	0.78	0.24	0.51	6.4
全操作（洗濯3回+脱水1回）で発生した繊維の重量（mg） ＜B+C＞	2.73	4.38	3.56	2.60	1.35	1.98	155.2
洗濯装置内の残留量（mg） ＜D＞	1.73	0.34	1.04	0.86	0.89	0.88	14.9
タオル1gあたりの洗濯発生繊維重量（mg/g） ＜B＋C＋D−A＞/タオルの重量	0.046	0.051	0.049	0.14	0.09	0.12	1.3

N.A.: 重量計測不可

えることは既報[2]に示した通りである。

2. 3. 結果と考察

2. 3. 1 洗濯により各種素材のタオルから発生した微細化繊維の重量の比較

タオル 1 枚を洗濯繊維の発生実験に供した時の素材別の発生繊維屑（以下、微細化繊維とする。）の重量を**表-1** に示す。ナイロンとポリエステルの結果の比較には 2 回の実験の平均値を用いた。なお、投入したタオル 1 枚の重量は、ポリエステルが 92.6 g、ナイロンが 24.2 g、木綿が 135 g であり、ナイロンと木綿では 5.6 倍の差があった。発生した微細化繊維の重量や本数の比較では、洗濯槽へ投入するタオルの重量や枚数の統一が望ましいが、次の理由で行わなかった。同様の重さやサイズの各素材 100%製のタオルの入手が困難であり、裁断等による重量統一では解れが、異なる枚数での重量統一ではタオル同士の擦れが、それぞれ影響すると想定されたためである。

1 枚のタオルから 3 回の洗濯操作で発生した繊維の重量は、ポリエステルでは 3.34 mg、ナイロンでは 1.47 mg、木綿では 148.8 mg であり、その後の脱水操作で発生した重量はそれぞれ 0.22 mg（洗濯操作の 6.6%）、0.51 mg（洗濯操作の 34.8%）、6.4 mg（洗濯操作の 4.3%）であったことから、各素材で繊維の発生量や各操作による発生量の傾向が異なることが示された。

洗濯装置内での残留量に目を向けると、ポリエステルでは 1.04 mg、ナイロンでは 0.88 mg、木綿では 14.9 mg が残留していた。また、洗濯操作ブランク試験で検出された繊維屑は不検出～0.09 mg であり、多い場合ではナイロンの実験の全操作後に検出された微細化繊維重量 2.86mg の 3.2%程度となり無視はできないと考えられた。そのため、洗濯装置中の残留分を含めつつ、ブランク試験で検出された繊維屑の重量を差し引くことで、タオル 1g あたりの 1 回の洗濯による微細化繊維の発生量を求めることとした。その結果、ポリエステルでは 0.049 mg/g、ナイロンでは 0.12 mg/g、木綿では 1.3 mg/g の微細化繊維が発生し、木綿からの発生重量が顕著に大であった（ナイロンの 11.0 倍、ポリエステルの 25.7 倍）。プラスチック繊維間を比較すると、ナイロンの微細化繊維の発生重量はポリエステルに比べ 2.3 倍大であった。自然繊維と人工繊維、また、人工繊維の間で発生挙動が異なることが示唆された。

ある既報では、ポリエステル布地の洗濯繊維の発生実験から 0.025～0.1 mg/g の繊維状 MPs が発生したと報告しており[3]、本研究のポリエステルタオル 1 枚の洗濯からの発生重量 0.049 mg/g と同様であった。一方、他の報告では、フリースジャケットを含むポリエステル製の衣服を洗濯繊維の発生実験した際に洗濯量の 0.3%（3 mg/g）を超える重量の繊維状 MPs が発生したとしており、本研究の結果とは大きく異なった[4]。本研究および既報の実験条件の比較から、同素材であっても、繊維の縫合や衣料品の製造手法によっても洗濯による微細化繊維の発生傾向が異なることが示唆された。

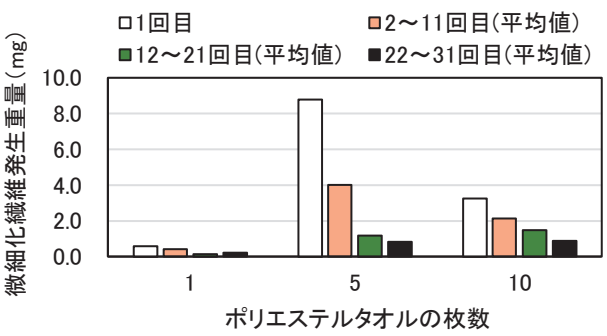


図-3 洗濯装置への投入枚数と洗濯回数別のポリエステルタオルからの発生繊維重量

2. 3. 2 人工繊維製タオルの投入枚数および洗濯回数による発生重量の比較

タオル 1g あたりの微細化繊維の発生量が少なかったポリエステルを対象に、洗濯装置への投入枚数および洗濯回数による発生繊維の重量の変化を比較した。繰り返し洗濯回数は 31 回までとした。その結果を**図-3** に示す。なお、タオル 1 枚の重量（平均値）は 92.9 g であり、5 枚では 464 g、10 枚では 929 g であった。洗濯 1 回の時、洗濯タオル枚数毎の発生繊維重量を比較すると、5 枚洗濯時の発生重量が 8.79 mg と最大であり、10 枚の 3.27 mg よりも 2.7 倍、1 枚の 14.9 倍大であった。洗濯物の洗濯数や重量が増加するほど微細化繊維の発生重量が増加するわけではなく、用いる洗濯装置の大きさや洗濯する衣料品の量との関係によって、微細化繊維が発生しやすい条件が異なることが示唆された。

次に、洗濯回数における発生繊維の重量を比較すると、洗濯枚数 1,5,10 枚のすべてのケースで、1 回目が最も多く、洗濯回数が多くなるにつれて、発生繊維重量が減少する傾向がみられた。例えば、洗濯枚数 5 枚の時、繊維の発生重量は 1 回目の 8.79 mg を基準とすると、洗濯 2~11 回（平均値）では 0.46 倍の 4.02 mg となり、その後 12～21 回（平均値）では 0.14 倍の 1.19 mg、22～31 回（平均値）では 0.09 倍の 0.83 mg であった。つまり新品のポリエステル製タオルは、最初の洗濯での微細化繊維の発生重量が最大で、洗濯を重ねるにつれ発生重量が減少することが示唆された。31 回の洗濯操作による累積繊維発生重量はタオル 5 枚洗濯時が最大で（69.2 mg）、10 枚の時の発生重量 48.5 mg の 1.4 倍、1 枚の時の発生重量 8.5 mg の 8.1 倍であった。

ポリエステルタオルの 31 回繰り返し洗濯繊維の発生実験において微細化繊維の累積発生重量が最大であった投入タオル 5 枚（464 g）の条件に対し、同様の

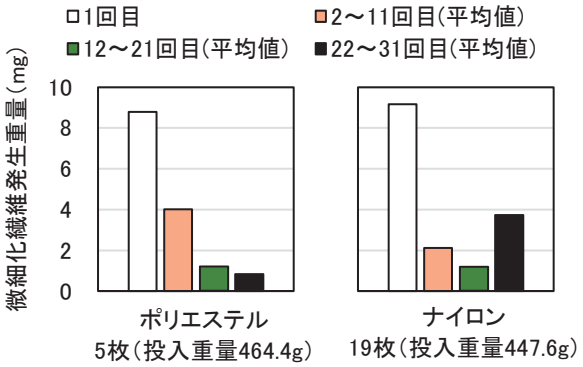


図-4 ポリエステルタオル 5 枚と同様の洗濯量条件におけるナイロンタオルからの微細化繊維の発生重量

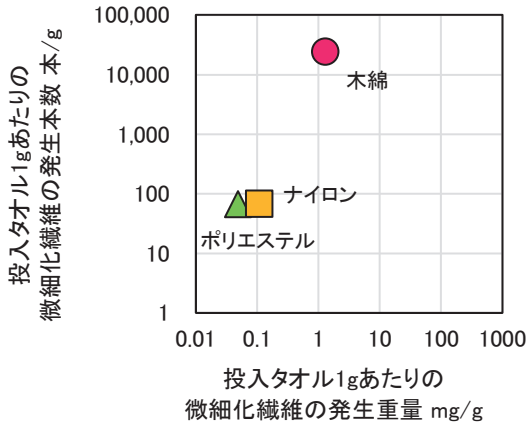


図-5 各素材タオルの投入重量 1g あたりの微細化繊維の発生重量および本数

条件下でのナイロンタオルからの繊維発生挙動との比較を試みた。その結果を**図-4** に示す。なお、投入したナイロンタオルは 19 枚で重量は 448 g であった。1 回の洗濯では微細化繊維が 9.16mg 発生し、ポリエステル（5 枚、464g）からの発生重量 8.79 mg と比べ、1.04 倍であった。一方で、31 回の洗濯における累積繊維発生重量は、ナイロンタオルでは 79.4 mg であり、ポリエステルタオルの 1.15 倍であった。繰り返し洗濯回数に着目すると、ポリエステルと同様に 1 回目の発生重量が最大であったが、洗濯 22～31 回目（平均値）の発生重量 3.73 mg が 2~11 回（平均値）の 2.11 mg や 12～21 回（平均値）の 1.18 mg よりも大であり、ポリエステルとは異なる傾向であった。以上より、洗濯枚数による洗濯槽中での擦れ等の条件が異なることは想定されるものの、材質によって洗濯回数と微細化繊維の発生重量との関係が異なることが示唆された。

2. 3. 3 人工繊維タオル 1 枚から発生した繊維状マイクロプラスチックの本数と長さ分布

検出された赤発光繊維（木綿も前処理をせずに残存していれば赤く染まる）の計測結果を**図-5** に示す。各

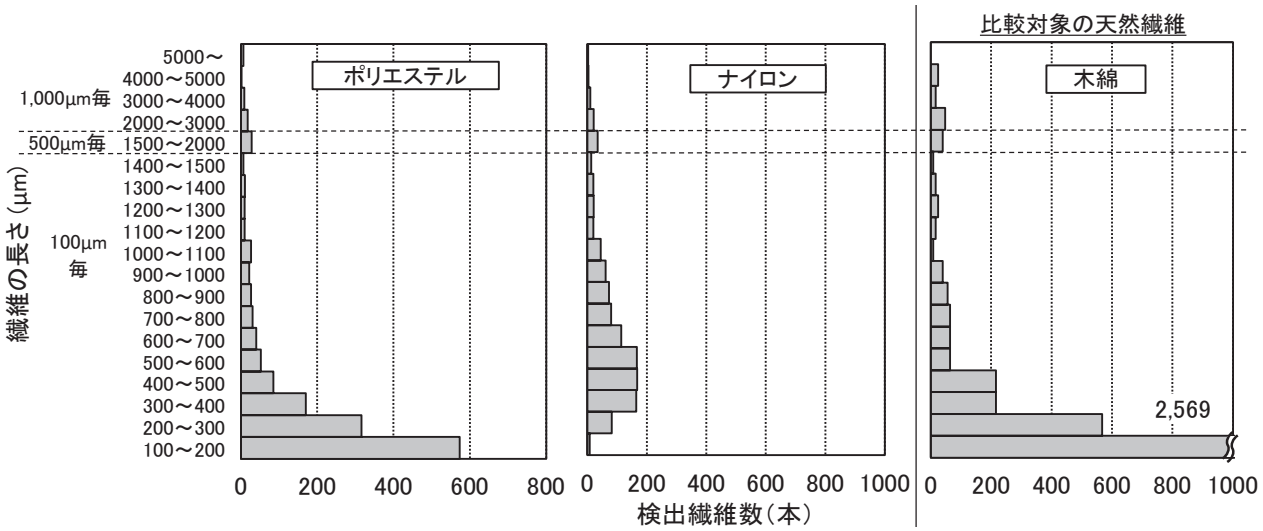


図-6 ポリエステル製、ナイロン製のタオル 1 枚から発生した繊維状マイクロプラスチックの長さ分布

素材のタオルの洗濯で発生した微細化プラスチック繊維（MPs 繊維）について、洗濯タオル 1 g あたりの本数に換算すると、ポリエステルでは 66.2 本/g、ナイロンでは 67.0 本/g であり、同様であった。一方、木綿の場合、洗濯タオル 1g あたりの本数に換算すると 24,000 本/g となり、ポリエステルやナイロンの約 360 倍であり、天然繊維である木綿タオルからの方が微細繊維の本数が 2 オーダー程度多いことが示された。検出された繊維の単位重量あたりの本数は、ポリエステルでは 1,350 本/mg、ナイロンでは 609 本/mg、木綿では 18,500 本/mg であった。

ここで、ポリエステル製、ナイロン製のタオル 1 枚から発生した繊維状 MPs の長さ分布を**図-6** に示す（比較として木綿製タオルの天然繊維も合わせて示す）。検出された繊維の長さの平均値はポリエステルでは 440 μm、ナイロンでは 748 μm、中央値はポリエステルでは 236 μm、ナイロンでは 575 μm であり、ポリエステルの方が全体的に短い繊維が多いことが示唆された。なお、過年度に実施した下水処理場調査において流入下水中から検出された赤発光繊維の長さの中央値は 397μm であり、本実験結果のポリエステルとナイロンの中間程度であった [1]。

ポリエステルでは長さが短くなるにつれて検出割合が高くなり、計測対象の最小範囲 100 μm-200 μm の長さの繊維の検出割合が 39.7%と最も高かった。一方、ナイロンでは検出割合が極大を示したのは 300 μm～600 μm の範囲であり、これらの合計割合は全体の 44.9%であった。つまり、ナイロンよりもポリエステルの方が、より微細な繊維状 MPs が発生しやすいことが示唆された。

木綿の長さ分布をみると、長さの平均値は 324 μm、中央値は 162 μm であり、ポリエステルと同様に、より短い繊維の検出割合が高く、計測対象の最小範囲 100 μm-200 μm の長さの繊維の検出割合が 63.1%と顕著に高かった。検出された繊維 1 本あたりの平均重量がポリエステルでは 0.74 μg/本、ナイロンでは 1.64 μg/本、木綿では 0.05 μg/本であったことからも、木綿タオルからより微細な繊維が発生した傾向が読み取れた。

以上をまとめると、衣料品の一つであるタオルを用いた比較ではあるが、繊維状 MPs の発生本数はポリエステルとナイロンで同様であるものの、ポリエステルの方がより微細な繊維状 MPs が発生することが示唆された。さらに、木綿製タオルと比較すると、人工繊維製タオルでは、微細繊維の発生重量が小さく、本数が少なく、より微細な繊維の割合が低い傾向にあった。

2. 3. 4 洗濯排水からの繊維状マイクロプラスチックの排出原単位の推定

本研究で得られたデータを用いて洗濯排水からの繊維状 MPs の排出原単位の推定を試みた。一人一日の洗濯量を 1.5kg と想定し、洗濯物が全てポリエステルタオルであったと仮定して本研究の実験結果をあてはめたところ、ヒト一人の洗濯により発生する繊維状 MPs を算出すると 99,300 本/人/日となった。この結果は、1 人 1 日分の洗濯物を想定して衣類の洗濯繊維の発生実験を行った既往研究による報告値 97,700 本/人/日 [5]と同程度であった。また、前述の下水処理場調査結果 [1]に対し、流入下水量 80,336 m^3 と処理人口を用いて算出された値 73,200 本/人/日とも同程度であった。

3. 洗濯により発生した繊維状マイクロプラスチックがムレミカヅキモに及ぼす影響

3．1　はじめに

現在 MPs が水生生物に及ぼす影響が問題となっているが、近年粒子状 MPs に加え、繊維状 MPs が及ぼす影響についても注目が集まっている。繊維状 MPs は、家庭からの洗濯排水が水環境への放出の要因の 1 つと考えられており、水生生物に及ぼす影響については、魚類を用いた研究を中心に報告されている [6]。一方、実験に使用された繊維状 MPs は人工的に切断したサンプルが大半であり、実際の洗濯繊維に対する影響は検討されていない。本年度の研究では、ナイロンタオルとポリエステルタオルを洗濯することにより得られた繊維状 MPs を用いて、淡水藻類であるムレミカヅキモへの影響を検討した。

3. 2　実験材料および実験方法

3. 2. 1　洗濯由来の繊維状マイクロプラスチックの作製

市販のナイロンタオルとポリエステルタオル 5 枚をそれぞれ水道水 10～15 L に入れ、15 分間洗濯を行った（**2. 2 実験方法**と同じタオルを使用）。同一試料で 11 回洗濯し、10μm メッシュでナイロン繊維とポリエステル繊維を回収した（**2. 2 実験方法**を参照）。回収した繊維はフィルターでろ過し、MillQ 水で洗浄後、60℃で風乾し実験に用いた。

3. 2. 2　洗濯繊維に対するムレミカヅキモの増殖試験

試験には国立研究開発法人国立環境研究所から分譲されたムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*、NIES-35 株）を用いた。AAP 培地 [7]にナイロン繊維 58.6 mg/L または、ポリエステル繊維 22.6mg/L をそれぞれ添加後、前培養したムレミカヅキモを（1×10^4 cells/mL）添加し、25ºC、4,000 Lux、100 rpm の条件下で、72 時間振とう培養を行った。経時的にセルカウンター（CDA-1000B、シスメックス株式会社）を用いて細胞数を計測し、ムレミカヅキモの増殖を測定した。試験は 3 連で行った。

3. 3.　結果と考察

3. 3. 1　洗濯により発生した繊維状マイクロプラスチックがムレミカヅキモに及ぼす影響の検討

昨年度の研究では、下水処理場に流入する MPs 繊維について通日調査を行った結果、1 日の中で最も高い繊維状 MPs 濃度は 357 本/L であることを明らかにした [8]。そこで流入下水中の繊維状 MPs が最も多い 357 本/L を基本とし、その 100 倍量の繊維状 MPs（35,700 本）がムレミカヅキモの増殖に影響を及ぼすか検討を行った。前章**2．洗濯における繊維状マイクロプラスチックの発生挙動の検討実験**において、ポリエステルタオル 1 枚から洗濯で得られた単位重量当たりの本数は、1350 本/mg であり、ナイロンタオル 1 枚から洗濯で得られた繊維量は、609 本/mg であった。そこで、35,700 本/L に相当するナイロン繊維を 58.6 mg/L、ポリエステル繊維を 22.6mg/L として、ムレミカヅキモに曝露し増殖を検討した。

その結果、ポリエステル繊維とナイロン繊維のどちらにおいても、ムレミカヅキモの増殖に影響は見られなかった（**図-7**）。昨年度での研究では、ナイロン粒子がムレミカヅキモと共存すると互いに吸着し、ムレミカヅキモの増殖に影響を与えることを明らかにした [9]一方、今回の実験では、ナイロン繊維を顕微鏡で観察しても、ムレミカヅキモの吸着は確認されなかった。これらの結果から、洗濯由来の繊維状 MPs は、藻類に対し影響が少ないことが推察された。

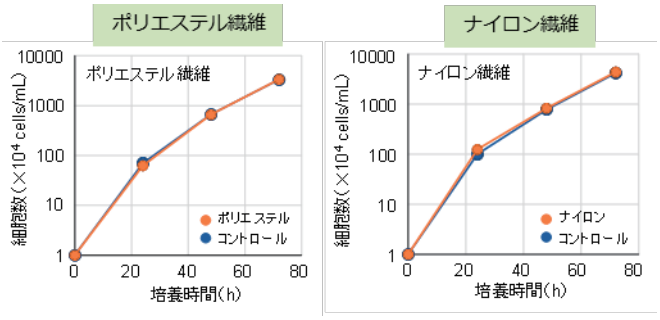


図-7　洗濯により発生した繊維状マイクロプラスチックがムレミカヅキモの増殖に及ぼす影響試験

3. 3. 2　下水処理場の放流水を想定した繊維状マイクロプラスチックの影響の検討

下水処理場では、流入下水と比べて、放流水で大幅に MPs が低減されることが報告されている [8]。下水道へ流入する MPs の主な要因の一つとして洗濯由来の繊維状 MPs が考えられることから [10]、今回の実験では放流水での濃度低減を考慮せずに流入濃度の 100 倍量で安全側の影響評価を行った。結果として藻類への増殖影響が見られなかったことから、下水処理場の放流水における繊維状 MPs の藻類への影響の可能性は低

いと考えられた。

4. まとめ

(1) 繊維状 MPs の発生挙動

ポリエステル、ナイロン、木綿製のタオルを用いて洗濯繊維の発生実験を実施し、洗濯における繊維状 MPs の発生挙動を検討して、主に次の結果を得た。

1) 洗濯 3 回と脱水によるタオル 1g あたりの微細化繊維の発生量はポリエステルでは 0.049 mg/g、ナイロンでは 0.12 mg/g、木綿では 1.3 mg/g であった。自然繊維と人工繊維、また、人工繊維の間で発生挙動が異なることが示唆された。

2) ポリエステルタオルの洗濯枚数を変更した実験の結果、5 枚（洗濯重量 464 g）の投入時の発生重量が 8.79 mg と最も多く、10 枚の 3.27 mg よりも 2.7 倍、1 枚の 14.9 倍多かった。洗濯量が増加するほど微細化繊維の発生量も増加するわけではなく、洗濯装置の大きさや洗濯量との関係により、微細化繊維が発生しやすい条件が異なることが示唆された。

3) 31 回までの繰り返し洗濯繊維の発生実験の結果、ポリエステルとナイロンともに、最初の洗濯での微細化繊維の発生量が最も多かったが、洗濯を繰り返した後の発生量の減少傾向は異なっていた。

4) 洗濯タオル 1g あたりの繊維状 MPs の発生本数はポリエステル（67.0 本/g）とナイロン（66.2 本/g）とで同様であったが、繊維長の中央値はポリエステルでは 236 μm、ナイロンでは 575 μm であり、より微細な繊維状 MPs の発生が示唆された。

5) 木綿製タオルでは、洗濯タオルの単位重量あたりの発生繊維数（24,000 本/g）と繊維長の中央値が 162 μm であり、人工繊維と比べ顕著に多く、また、より微細な繊維が発生していた。

6) 本研究の結果から推算したヒト一人の洗濯により発生する繊維状 MPs は 99,300 本/人/日であり、同様の洗濯繊維の発生実験を実施した既報の 97,700 本/人/日や、過去に実施した下水処理場調査により算出した 73,200 本/人/日と類似していた。

(2) 洗濯由来の繊維状 MPs の藻類増殖影響

ポリエステルタオルとナイロンタオルを実際に洗濯して得た繊維状 MPs を用いて、淡水藻類であるムレミカヅキモへの影響を検討して、主に次の結果を得た。

1) 流入下水中の実測濃度最大値の 100 倍量の繊維状 MPs（ポリエチレン、ナイロン）がムレミカヅキモに及ぼす影響について検討した結果、どちらもムレミカヅキモの増殖に影響は見られなかった。

2) 下水処理場の放流水における繊維状 MPs は、本研究条件よりもはるかに低濃度となると考えられることから、藻類への影響の可能性は低いと推察された。

MPs の水生生物への影響について、本年度までは MPs（粒子状、繊維状）による藻類への影響を検討したが、R3 年度では繊維状 MPs による魚類への影響を検討する予定である。

参考文献

1) 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、平成 30 年度　下水道関係調査研究年次報告書集、p148-152、2020

2) 鈴木裕識, 山下洋正. : 下水道におけるマイクロプラスチックの存在実態に関する研究動向と繊維状マイクロプラスチック簡易検出法の構築に向けた取組み (特集 マイクロプラスチック汚染). EICA: journal of EICA: 環境システム計測制御学会誌, 24 (4), pp. 35-39, 2020

3) Hernandez, E., Nowack, B., & Mitrano, D. M. : Polyester textiles as a source of microplastics from households: a mechanistic study to understand microfiber release during washing. *Environmental science & technology,* 51(12), 7036-7046, 2017

4) Hartline, N. L., Bruce, N. J., Karba, S. N., Ruff, E. O., Sonar, S. U., & Holden, P. A. Microfiber masses recovered from conventional machine washing of new or aged garments. *Environmental science & technology*, 50(21), 11532-11538, 2016

5) 嶋谷ら : パルセーター型洗濯機による繊維状マイクロプラスチックの排出量実験、第 54 回日本水環境学会年会講演集、p37、2020

6) Qiao R, Deng Y, Zhang S, Wolosker MB, Zhu Q, Ren H, Zhang Y. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, 236, 124334, 2019

7) OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS (OECD201), Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2006

8) 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、令和元年度　下水道関係調査研究年次報告書集、pp.129-135, 2021

9) Mizukami-Murata S, Suzuki Y, Sakurai K, Yamashita H. Freshwater alga *Raphidocelis subcapitata* undergoes metabolomic changes in response to electrostatic adhesion

by micrometer-sized nylon 6 particles. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, DOI: 10.1007/s11356-021-15300-8

10) Kelly MR, Lant NJ, Kurr M, BJ. Grant Importance of Water-Volume on the Release of Microplastic Fibers from Laundry. *Environ Sci Technol*, 53, 11735-11744, 2019

PRTR データを活用した化学物質の排出管理手法の構築

排出量への寄与が大きい業種における排出量推定手法の高度化

研究予算：環境研究総合推進費
研究期間：令元～令３
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、對馬育夫、
鈴木裕識、小森行也、髙沢麻里

【要旨】
PRTR 届出データの正確性向上や推計高度化を目標に、下水道事業者へのヒアリングを実施した。得られた回答を整理し、PRTR 届出のされ方等について考察する。併せて、下水試料に含有される PRTR 物質の効率的な把握方法として、令和元年度に提案したスクリーニング手法の強化を行った。スクリーニング対象は 100 物質、うち 81 物質が定量可能となり、これまでより多くの物質挙動を一斉かつ簡易に把握できることが期待される。
キーワード：PRTR、下水道、排出量推定、高度化、スクリーニング分析

1. 背景とプロジェクト概要

「特定化学物質の環境への排出量の把握等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）では、第一種指定化学物質の排出・移動量を毎年把握・公表している。当チームでは、プロジェクト「ライフサイクル全体での化学物質管理に資する PRTR データの活用方策に関する研究」に参画し、サブテーマ「PRTR データを活用した化学物質の排出管理手法の構築」を担当して、下水道を対象に排出量推計手法の高度化に取り組んでいる。本年度は、下水道事業者へのヒアリングと、下水試料中 PRTR 物質の定量対象物質数の拡充を実施した。

2. 下水道事業者へのヒアリング

令和元年度に実施した下水処理施設における流入・放流の実態調査で対象とした施設を中心に、複数箇所にヒアリング調査を実施した。下水道事業者による測定データの取扱い（検出・定量下限値の設定）等について情報収集をすることにより、PRTR制度の見直しに資する意見等を整理するとともに、届出データの正確性向上ならびに推計高度化のヒントとなる知見を得ることを試みた。処理施設によって実測値の取扱い方が一部異なる場合があることが示唆された。

3. 下水試料中 PRTR 物質の定量物質数の拡充

下水試料に含有される化学物質の予見は困難であることから、効率的なデータ取得方法としてスクリーニングの後段に定量を行うことを提案し、令和元年度では、スクリーニング対象は 100 物質、うち 47 物質が定量可能な手法を報告した。本年度では、スクリーニングで検出された物質のうち、できるだけ多くの物質を定量対象とすることを目標に検討を進めた結果、81 物質まで拡充可能であった。本 DB には、PRTR 制度上、下水道への移動量等が得られておらず、挙動把握が難しい物質が含まれている。本 DB の活用により、これまでより多くの物質挙動を一斉かつ簡易に把握できることが期待される。

4. まとめ

下水道事業者へのヒアリングにより、届出データの正確性向上等に係るヒントを得ることを試みた。下水試料中 PRTR 物質の定量可能物質の拡充を検討した結果、81 物質が定量可能となり、これまでより多くの物質挙動を一斉かつ簡易に把握できることが期待される。

謝辞：本研究は（独）環境再生保全機構の環境研究総合推進費（JPMEERF19S20402）により実施された。

付録　令和 2 年度　下水道関係刊行報告書一覧

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

土木研究所資料　第 4409 号（ISSN 0386-5878）

水環境研究グループ水質チーム　上席研究員　山下洋正
元 上席研究員　小川文章※
主任研究員　平山孝浩
元 研究員　鈴木裕識※※
特任研究員　小森行也
専門研究員　髙沢麻里

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、排水規制化の可能性も踏まえ、下水処理場での挙動及び除去特性把握が必要と考えられる。本研究では、要監視項目 6 物質について、下水試料を対象とした分析方法の検討及び複数の下水処理場における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を行うとともに、流入下水、二次処理水中の濃度レベル及び除去特性を明らかにした。また、流入下水から公共用水域での指針値を超える濃度で検出されたフェノールを対象として下水処理場における挙動調査を行った。

その結果、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 物質の流入下水中の濃度は指針値を下回っていること、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%以上除去されて放流水では指針値を下回ることがわかった。フェノールについて、標準活性汚泥法、嫌気好気ろ床法の下水処理場において処理工程での詳細な挙動調査を行い、両処理方式とも生物反応槽で大きく除去されていることを確認した。なお、標準活性汚泥法の活性汚泥を用いた回分式除去実験により、フェノールは活性汚泥により容易に除去されることがわかった。

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

※上席研究員在職期間（平成 29 年 4 月～平成 31 年 3 月）
※※　研究員在職期間（平成 29 年 6 月～令和 2 年 11 月）

土 木 研 究 所 資 料
TECHNICAL NOTE of PWRI
No.4423　　March　2022

編集・発行 © 国立研究開発法人 土木研究所

本資料の転載・複写の問い合わせは

国立研究開発法人　土木研究所　企画部　業務課
〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6　電話 029-879-6754