

I S S N 0386-5878

土木研究所資料 第4370号

土木研究所資料

平成28年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2016 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

平成30年1月

国立研究開発法人 土木研究所

National Research and Development Agency  
Public Works Research Institute

Copyright © (2018) 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。

# 平成28年度下水道関係調査研究年次報告書集

材料資源研究グループ

水環境研究グループ

水質チーム

## 概要

本報告書集は、平成28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	水質リスクの低減効果に関する調査 (受託業務費)	3
2	下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産 (受託業務費)	11
3	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)	17
4	河川事業等に由来するバイオマス of 下水処理場内利用に関する研究 (運営費交付金)	27
5	公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究 (運営費交付金)	36
6	再生水の利用促進に向けた病原微生物と消毒副生成物の制御手法に関する研究 (運営費交付金)	43
7	新規省エネルギー型下水処理技術の開発 (運営費交付金)	48
8	震災時の機能不全を想定した水質リスク低減手法の構築に関する研究 (運営費交付金)	52
9	多様化する感染症に応じた下水処理水の高度な消毒手法の構築に関する研究 (運営費交付金)	60
10	下水中の病原微生物の網羅的検出法の開発に関する研究 (運営費交付金)	68
11	遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発 (運営費交付金)	75

## II 水質チーム

12	下水処理工程における化学物質の除去特性及び生物影響に係る検討業務 (受託業務費)	83
13	公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の管理手法に関する研究 (運営費交付金)	85
14	底層環境に着目した停滞性水域における水環境管理技術に関する研究 (運営費交付金)	90
15	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 (運営費交付金)	96
16	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)	105
17	生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究 (運営費交付金)	112
18	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 (運営費交付金)	118
19	下水処理水が両生類の変態に及ぼす影響に関する基礎的研究 (運営費交付金)	122
20	オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価法の開発 (科研費)	130

\*受託業務費とは、国土交通省からの受託によるものである。

\*下水処理水が両生類の変態に及ぼす影響に関する基礎的研究は、平成 26 年度から平成 28 年度の成果を取りまとめたものである。

## I . 材料資源研究グループによる研究

## 水質リスクの低減効果に関する調査

研究予算：受託研究費（下水道事業調査費）

研究期間：平 28

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：植松龍二、諏訪守、安井宣仁

### 【要旨】

冬季における感染性胃腸炎の大流行に際し、感染者から排出されるノロウイルス（NV）による水系感染症拡大が懸念されるなか、病原微生物のリスク低減の観点から下水処理場で適切に消毒等を行い、水質を管理していくことが重要である。しかしながら、消毒プロセスでの NV 感染価（不活化効果）の低減効果を評価できないことから、目標とすべき消毒レベルの設定が困難である課題が生じている。一方、目標水質としての二次処理水の NV 濃度を考慮するにあたり、ゼロとするには現実的には困難であり、当面の目標値としては、夏季における感染性胃腸炎の非流行期での濃度が 1 つの案として考えられる。冬季の感染性胃腸炎の流行期においては、下水試料中の NV 濃度は夏季の非流行期と比較して 2～3 オーダー上昇することから、目標水質を非流行期における処理水の濃度レベルとすれば、3 log 以上の低減効果が得られる消毒条件を明らかにする必要がある。

本調査は上記の課題を踏まえ、二次処理水から単離した野生株大腸菌ファージ（Phage）を NV 代替指標として利用し、塩素、紫外線の消毒実験により標的遺伝子と感染価の減少割合を評価し、NV の感染価を 3 log 以上低減させられる消毒条件を明らかにすることを目的に実施した。具体には、塩素、紫外線消毒による Phage の消毒感受性から NV 感染価の低減割合を類推した。

その結果、二次処理水から単離した宿主菌 *E.coli* K12 (A/λ) 株由来の Phage は、その構成の大半が F 特異性 RNA 大腸菌ファージのグループ I およびグループ II であると考えられた。塩素、紫外線消毒による NV と Phage の標的遺伝子の減少傾向はともに同様であり、Phage の消毒感受性から NV の感染価を 3 log 以上低減させるための消毒条件を類推すると、塩素消毒では Ct 値が 20mg・min/L 以上、紫外線消毒では 40mJ/cm<sup>2</sup> 以上の照射線量が必要であると考えられた。塩素、紫外線消毒は、処理水の水質性状により消毒効果が左右されるため、水質変動を考慮したデータの蓄積が今後必要であると考えられる。

キーワード：ノロウイルス、塩素消毒、紫外線消毒、野生株大腸菌ファージ、感染価

### 1. はじめに

冬季における感染性胃腸炎の大流行に際し、感染者から排出される NV による水系感染症拡大が懸念されることから、下水道管理者に対し国土交通省は、処理水の消毒を適正に行うなど、終末処理場における水質管理の徹底を図るよう通達を行っている。しかしながら、消毒プロセスでの NV 感染価の低減効果を評価できないことから、目標とすべき消毒レベルの設定が困難である課題が生じている。消毒による感染価の低減効果を評価することが困難な状況にあるが、NV や大腸菌ファージ MS2 (MS2) の標的遺伝子の増幅域を拡張した遺伝子定量法を適用することで、実際の感染価に近似できる可能性を示した報告<sup>1)</sup>がある。その結果によれば、3 log 程度の感染価を低減させるためには、塩素消毒の Ct 値で 40mg・min/L、紫外線照射量で 40mJ/cm<sup>2</sup>が必要であった。実際には、代替指標とした MS2 の存在濃度が低かったため、それ以上の効果が得られていたと推定され、MS2 の検出濃度が高い状態で評価ができれば、より実態に近い NV 感染価の低減効果を評価できる可能性があるとしている。

現在、次亜塩素酸ナトリウムにより塩素消毒を実施している下水処理場は約 1,000 箇所ある。その平均添加濃度について、下水道統計<sup>2)</sup>をもとに計算すると、2.2mgCl/L、平均接触時間は 19 分間であるが、水質性状の影響により塩素の消費量等が変動するため、実際に 40mg・min/L の Ct 値を確保するには、添加濃度を現状よりも増加させるか、接触時間を長時間とする必要があると考えられる。

一方、目標水質としての二次処理水の NV 濃度を考慮するにあたり、ゼロとするには現実的には困難であり、当面

の目標値としては、夏季における感染性胃腸炎の非流行期での濃度が1つの案として考えられる。冬季の感染性胃腸炎の流行期においては、下水試料中のNV濃度は夏季の非流行期と比較して2~3オーダー上昇することから、目標水質を非流行期における処理水の濃度レベルとすれば、3 log以上の低減効果が得られる消毒条件を明らかにする必要がある。

本調査は上記の課題を踏まえ、二次処理水から単離したPhageをNV代替指標として利用し、塩素、紫外線の消毒実験により標的遺伝子と感染価の減少割合を評価し、NVの感染価を3 log以上低減させられる消毒条件を明らかにすることを目的に実施した。具体的には、塩素、紫外線消毒によるPhageの消毒感受性からNV感染価の低減割合を類推した。

## 2. Phageの消毒実験

既往の調査例では<sup>1)</sup>、塩素消毒や紫外線消毒によるNVの感染価を推定するために、二次処理水に予め存在している野性株のMS2を代替指標とし、標的遺伝子の増幅域を拡張した遺伝子定量法を用い評価を行っている。

その結果、3 log程度の感染価を低減させるためには、塩素消毒のCt値で40mg・min/L、紫外線照射線量では40mJ/cm<sup>2</sup>が必要であった。実際には、代替指標としたMS2の存在濃度が低かったため、それ以上の効果が得られていたと推定された。このため、本調査では、Phageを単層寒天培地法にて二次処理水より検出して再増殖させ高濃度のファージ液を作成し、試験水中に添加することで存在濃度を高め、塩素、紫外線消毒実験による3 log以上の低減効果が得られる消毒条件を評価した。以下に塩素、紫外線消毒実験の評価手順を示す。

### 2.1 試験水

実験に供した試験水には、A下水処理場に設置された標準活性汚泥法のパイロットプラントの二次処理水を用いた。試験水の水質分析は下水試験方法に準拠し、その水質性状を表-1に示す。また、処理水中に予め存在しているPhageは宿主菌として*E.coli* K12(A $\lambda$ )株(NBRC:106373)を用いた単層寒天培地法により定量した。

### 2.2 高濃度Phage液の調整

上記試験水1000mLに、文献<sup>3)</sup>を参照とした2倍濃度の塩化カルシウム含有培地1000mLと37°Cで3~4時間培養した宿主菌*E.coli* K12(A $\lambda$ )株の培養液15mLを添加、混合させ滅菌シャーレ中に撒き寒天が固化した後、37°Cで18~24時間培養した。培養後に培地上に発現した大小異なる溶菌斑(plaque)をランダムに1シャーレあたり10個、計500個程度を切り取り、液体培地に添加した後、ボルテックスにより攪拌した。次いで、寒天および宿主菌を除くため、12000rpm、4°Cで20分間遠心分離し、その上澄液を0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過した。さらに、ファージの高濃度化を図るため上記手順により得られた溶液に*E.coli* K12(A $\lambda$ )株を添加し37°Cで24時間培養し、Phageを再増殖させた。培養後は宿主菌を除くため、12000rpm、4°Cで20分間遠心分離し、その上澄液を0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過した。なお、高濃度のファージ液を消毒実験用試験水に直接添加すると、培地成分により試験水の水質性状が大きく変化するため、ファージ液を試験水に添加する際には限外ろ過膜(分画分子量30KDa, Merck社製)を用い培地成分を除いた。

表-1 試験水の水質性状

	塩素消毒実験用	紫外線消毒実験用
懸濁物質(SS) (mg/L)	4.3	4.8
化学的酸素要求量CODcr (mg/L)	18	11
全窒素(T-N) (mg/L)	19.9	15.8
全リン(T-P) (mg/L)	5.4	3.8
アンモニア性窒素(NH <sub>3</sub> -N) (mg/L)	0.04	0.13
濁度(NTU)	1.71	0.37
吸光度( $\lambda$ =254nm) (cm <sup>-1</sup> )	0.10	0.12
大腸菌群(CFU/mL)	350	1332
大腸菌(CFU/mL)	37	76
野生株大腸菌ファージ(K12株由来)(PFU/L)	5300	800

## 2.3 塩素消毒実験

塩素消毒実験は、図-1 に示す回分式にて行った。試験水 1000mL に対して、2.2 で作成した高濃度ファージ液を初期濃度で約  $10^8$  PFU/mL となるように添加し、初期投入塩素濃度を 1, 2, 4, 5.5mg-Cl/L とし、接触時間を 20 分間とすることで、設定 Ct (残留塩素濃度×接触時間) 値で 0~80mg・min/L に調整した。塩素の添加直後から 5 分間隔で遊離塩素濃度および全塩素濃度を適宜モニタリングした。接触時間が 20 分間に達した試料は、残留塩素を中和するためチオ硫酸ナトリウム溶液を添加した。塩素消毒後の Phage の感染価は、宿主菌を *E.coli* K12(A/λ) 株とした重層寒天培地法<sup>4)</sup> により評価した。なお、*E.coli* K12 (A/λ) 株は RNA ファージ全般の測定が可能であるため、得られた感染価のデータは、全 RNA ファージの評価であることに留意が必要である。

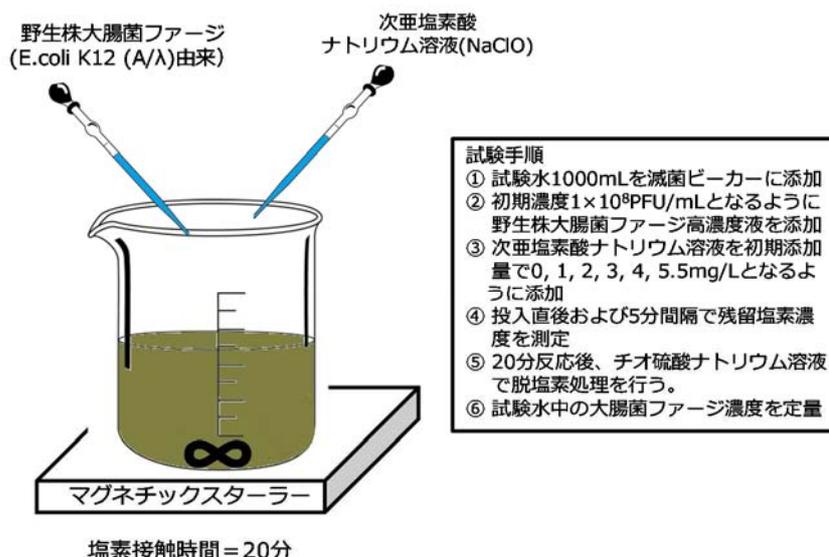


図-1 回分式塩素消毒実験

## 2.4 紫外線消毒実験

塩素消毒実験と同様に試験水に高濃度ファージ液を添加し、図-2 に示す光化学反应用実験装置(ウシオ電機社製)を用い紫外線消毒実験を行った。紫外線ランプは6Wの低圧紫外線ランプ(ULO-6DQ、ウシオ電機社製)を使用した。設定紫外線量が 0, 10, 20, 30, 40, 60mJ/cm<sup>2</sup> となるように照射時間を設定した。紫外線量はヨウ素/ヨウ素酸イオン<sup>5)</sup> による指標化学物質を用いた化学線量計により算定した。線量の算定方法は参考文献<sup>5)</sup> に準拠し、式(1)にて各照射時間での紫外線量を求め、実照射時間と紫外線量の回帰直線より反応装置内の紫外線照度を算定した(図-3 参照)。すなわち図-3の傾きが装置内の紫外線照度(mW/cm<sup>2</sup>)となり、その値に照射時間を乗じた値が紫外線量(mW/cm<sup>2</sup>・s=mJ/cm<sup>2</sup>)となる。

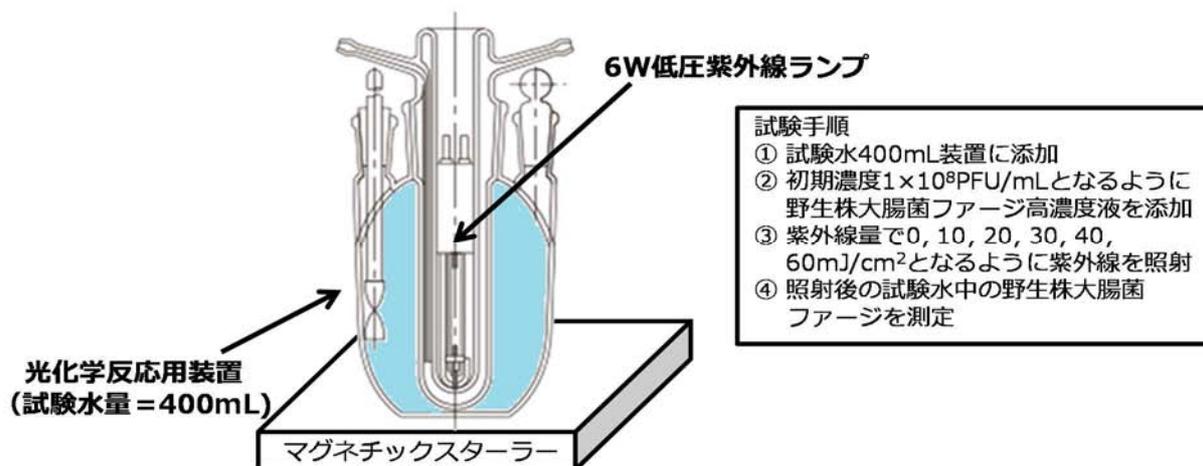


図-2 紫外線照射装置

$$UV\ dose(mJ/cm^2) = \left[ \left\{ \frac{(A_{352} - A_{blank_{352}})}{\epsilon} \times V \right\} / \phi \right] / Area \quad (1)$$

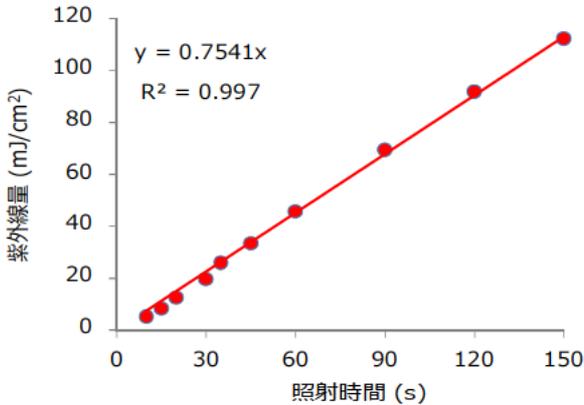


図3 化学光量計による反応装置内の紫外線照度

ここで、UV dose は紫外線量(mJ/cm<sup>2</sup>)、A<sub>352</sub>は任意の照射時間での波長 352nm のヨウ素/ヨウ素酸イオンの吸光度(cm<sup>-1</sup>)、A<sub>blank<sub>352</sub></sub>は照射前の波長 352nm のヨウ素/ヨウ素酸イオンの吸光度(cm<sup>-1</sup>)、ε はヨウ素/ヨウ素酸イオン溶液のモル吸光係数(=27636M<sup>-1</sup>)、Vは容積(0.4L)、φは量子収率(-)、Area は照射面積(456cm<sup>2</sup>)である。

図-3 に光化学反应用装置内の紫外線照度の算定結果を示す。図中の横軸は照射時間、縦軸は紫外線量であり、任意の照射時間後のヨウ素/ヨウ素酸イオン溶液中の波長 352nm の吸光度から式(1)を用いて算定した紫外線量を示している。すなわち、図中の回帰直線の傾きが装置内の紫外線照度(mW/cm<sup>2</sup>)を示しており、本調査にて用いた反応装置内の紫外線照度は0.754mW/cm<sup>2</sup>であった。

### 3. 評価結果

#### 3.1 塩素消毒実験

塩素消毒による Phage の感染価 (不活化) の減少割合を図-4 に示す。横軸は Ct 値として水中での塩素の形態が遊離塩素と結合塩素の総和とした全塩素濃度 C<sub>total</sub> (濃度) × t (接触時間) および遊離塩素濃度のみで評価した C<sub>free</sub> × t とした。Ct 値は 5~10 分間の経過時間ごとの平均残留塩素濃度にその時の接触時間を乗じ、最終的に 20 分間における積により算出した。塩素は水中に存在している形態により大きく消毒力が異なるため、Ct 値での評価を行う際、塩素濃度(C)の形態を明確にしておくことが重要である。図-4 から Phage の感染価の減少割合は、Ct 値に応じて減少する傾向が確認され、全塩素での C<sub>total</sub> 値が 20mg・min/L、あるいは遊離塩素濃度の C<sub>free</sub> 値が 5.0mg・min/L で 3 log 以上の不活化効果が見込まれた。

#### 3.2 紫外線消毒実験

紫外線消毒による Phage の感染価の減少割合を図-5 に示す。Phage の感染価は紫外線量に比例して減少する傾向が確認された。この結果は純粋株を用いた大腸菌ファージ MS2 や QB 等の既往の研究結果<sup>6)</sup>と同様な傾向であり、紫外線量を 40mJ/cm<sup>2</sup> とすることで概ね 3 log の不活化効果が見込まれた。

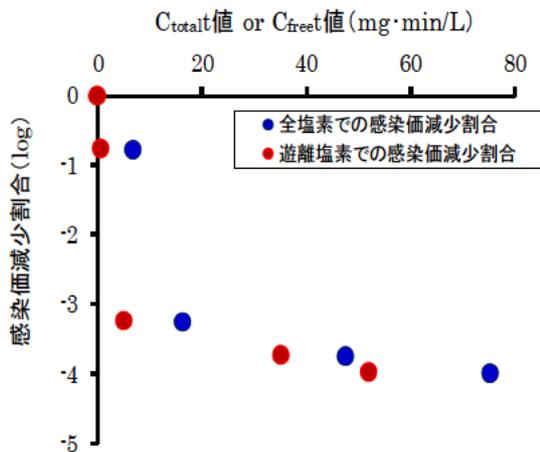


図-4 塩素消毒による Phage の不活化

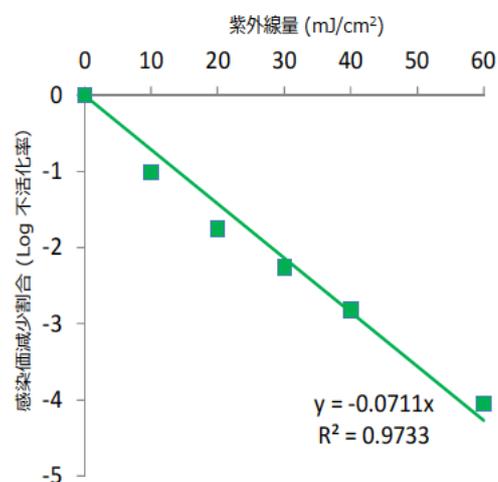


図-5 紫外線消毒による Phage の不活化

#### 3.3 遺伝子定量に基づく Phage と NV の関連性評価

既往の調査例では<sup>1)</sup>、NV の代替指標として予め二次処理水中に存在している MS2 を利用し、その感染価ならびに遺伝子減少割合から NV の感染価の低減効果を類推している。その結果、塩素、紫外線消毒ともに MS2 の遺伝子減少割合と NV 遺伝子の減少割合が同様である傾向が示されているが、二次処理水中に存在した MS2 が低濃度であったため、明確な評価には至っていない。

このため本項では、二次処理水中から単離、再増殖させた Phage を試験水に添加し、塩素、紫外線消毒を試みることで、的確に消毒効果を評価できると考えた。上記 2.3、2.4 における試験に基づき、塩素、紫外線消毒を行ったサンプルについて、NVGII および F 特異性 RNA 大腸菌ファージ (GI~GIV) の遺伝子減少割合を qPCR 法 (遺伝子定量法) にて定量するとともに、Phage の感染価との関連性を評価することで、NVGII の感染価の低減割合を類推した。以下に評価手順を示す。

2.3、2.4 において塩素および紫外線消毒を行ったサンプル 200mL に、ポリエチレングリコール (PEG #6000 : 終濃度 8%) と NaCl (終濃度 0.4M) を添加・攪拌し完全に溶解させた。4°C で 1 夜静置の後、10,000×G で 30 分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣を 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た。ウイルス濃縮液からの核酸抽出は、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。なお、ウイルス濃縮液をウイルス遺伝子抽出カラムに通水し NV 遺伝子を捕捉させる際、検出感度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたりの濃縮試料の通水量は、SS 負荷量を基準とし全ての測定試料で抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した<sup>7)</sup>。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理した後、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN 社) を用いウイルス RNA を精製した。精製した RNA 試料 0.1µg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 40µL 系で逆転写を行い、cDNA を得た。RT 反応はサーマルサイクラー (T-100, Biorad 社製) を用い、37°C60 分間で反応させた後 95°C5 分間反応させた。得られた cDNA は QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo 社製) を用い、PCR 反応を実施した。PCR 反応条件として 95°C15 分、1 サイクル⇒95°C30 秒、56°C90 秒を 50 サイクル実施した。NVGII および F 特異性 RNA 大腸菌ファージの検出用のプライマー、プローブは文献<sup>8)</sup> を参照した。

本調査にて対象とした F 特異性 RNA 大腸菌ファージは遺伝子型でグループ I~IV に分類され、グループ I は MS2 ファージ、f2 ファージ、グループ IV は SP ファージ等が含まれ主に動物糞便に由来するものである。グループ II は GA ファージ、GIII は QB ファージ等が含まれ主にヒト糞便由来による大腸菌ファージである<sup>4)、8)</sup>。

### 3.4 評価結果

#### 1) 試験水中の NVGII 濃度および F 特異性 RNA 大腸菌ファージ濃度

試験水として用いた二次処理水中の NVGII 濃度は、 $1.6 \times 10^4 \sim 5.8 \times 10^5$  (copies/L) であった。また、高濃度 Phage 液を添加後の F 特異性 RNA 大腸菌ファージ濃度は、グループ I が  $4.9 \times 10^{11} \sim 2.0 \times 10^{12}$  (copies/L)、グループ II が  $5.7 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^7$  (copies/L)、グループ III およびグループ IV については不検出 (検出限界値以下) であった。このため、本調査に用いた二次処理水から単離した宿主菌 *E.coli* K12 (A/λ) 株由来の Phage は、その構成の大半が F 特異性 RNA 大腸菌ファージのグループ I とグループ II であると考えられた。

#### 2) 塩素消毒による F 特異性 RNA 大腸菌ファージと NVGII の遺伝子減少割合の比較

塩素消毒による F 特異性 RNA 大腸菌ファージと NVGII の遺伝子減少割合を図-6 に示す。横軸は Ct 値とし、C は全塩素の残留塩素濃度とした。縦軸は、標的遺伝子の減少割合ならびに上記 3.1 で得られた Phage の感染価減少割合 (不活化) を Log で表記した。NVGII と F 特異性 RNA 大腸菌ファージの標的遺伝子の減少割合は同様であり、Ct 値を 20mg・min/L 程度とした場合、F 特異性 RNA 大腸菌ファージおよび NVGII の遺伝子量の減少割合は 1.5 log 程度であったが、Phage の感染価の減少割合は 3 log 以上であった。遺伝子定量法では、標的遺伝子に損傷がなければ定量値が得られるため、感染価の減少割合と遺伝子減少割合で大きな乖離が生じた結果となったが、感染価の減少割合は遺伝子減少割合を大きく上回っていることに加え、NV と F 特異性 RNA 大腸菌ファージの遺伝子減少割合は同様の傾向が確認された。また、既往の調査例においても<sup>1)</sup>、塩素消毒による NVGII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子の減少速度は同程度であることが確認されている (図-7)。このことから、NV と Phage の塩素消毒に対する消毒耐性が同等であると考えられることから、NV の感染価を 3 log 以上低減させるための消毒条件を類推すると、必要となる Ct 値は 20mg・min/L 以上となった。

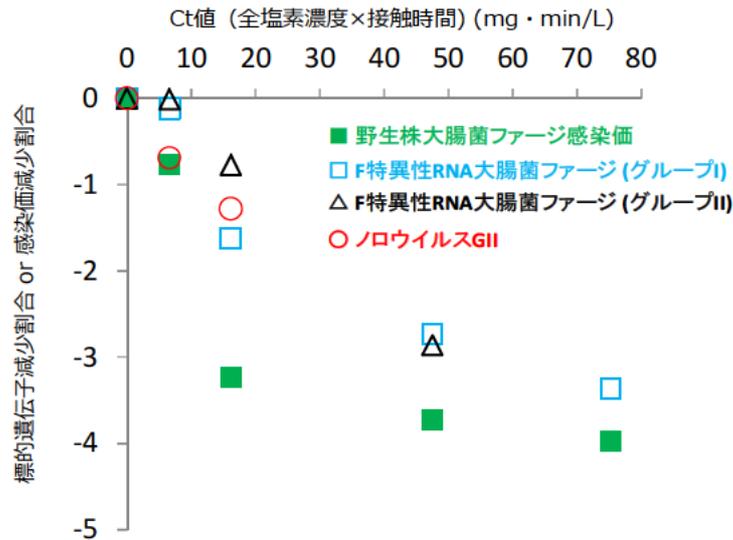


図-6 塩素消毒による NV と F 特異性 RNA 大腸菌ファージの遺伝子減少割合および Phage の感染価減少割合

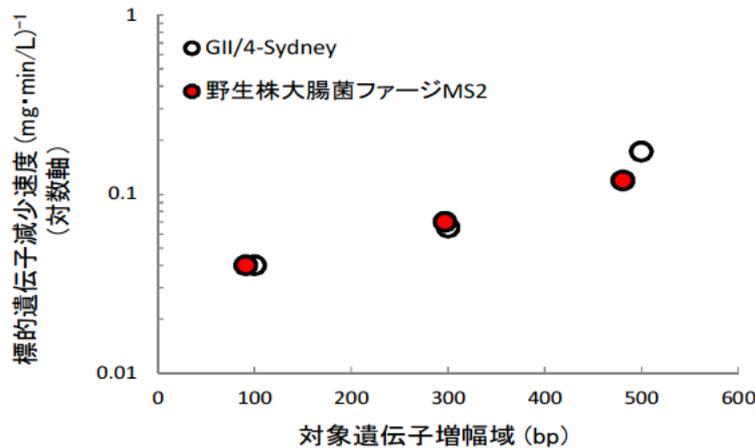


図-7 塩素消毒による GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子の減少速度<sup>1)</sup>

### 3) 紫外線消毒による F 特異性 RNA 大腸菌ファージと NVGII の遺伝子減少割合の比較

紫外線消毒による F 特異性 RNA 大腸菌ファージと NVGII の遺伝子減少割合を図-8 に示す。また、上記 3.2 で得られた Phage の感染価減少割合を追記した。NVGII および F 特異性 RNA 大腸菌ファージの遺伝子減少割合は、Phage の感染価減少割合と同様に紫外線照射線量に比例して減少する傾向が確認された。さらに、F 特異性 RNA 大腸菌ファージのグループ I と、NVGII の標的遺伝子の減少割合は同等であった。F 特異性 RNA 大腸菌ファージのグループ II の標的遺伝子減少割合は、同一の紫外線照射線量で比較すると若干小さい傾向が確認されたが、照射線量を 40mJ/cm<sup>2</sup> とした場合で NVGII と F 特異性 RNA 大腸菌ファージの遺伝子量は概ね 1 log 程度の減少効果が見込まれた。

紫外線照射線量が 40mJ/cm<sup>2</sup> において F 特異性 RNA 大腸菌ファージの遺伝子減少割合は 1 log 程度であるのに対し、Phage の感染価の減少割合は 3 log 程度であり、塩素消毒による結果と同様に感染価の減少割合は遺伝子減少割合を大きく上回っていた。既往の調査例においても<sup>1)</sup>、紫外線消毒による NVGII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子の減少速度は同程度であることが確認されている (図-9)。よって、NVGII と Phage の紫外線感受性が同等であると考えられることから、NV の感染価を 3 log 以上低減させるための消毒条件を類推すると、必要となる紫外線照射線量は 40mJ/cm<sup>2</sup> 以上となった。

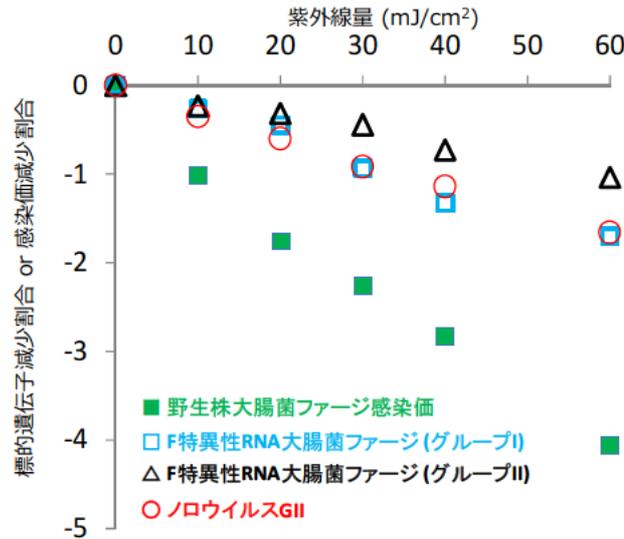


図8 紫外線消毒による NV と F 特異性 RNA 大腸菌ファージの遺伝子減少割合および Phage の感染価減少割合

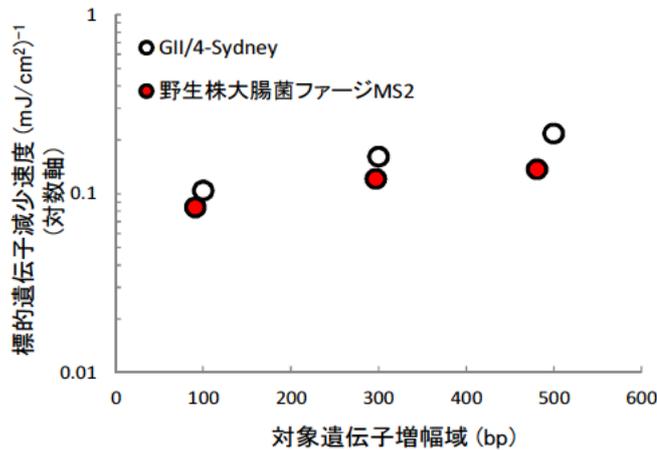


図9 紫外線消毒による GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子の減少速度<sup>1)</sup>

#### 4. まとめ

本調査は、二次処理水から単離した Phage を NV 代替指標として利用し、塩素、紫外線の消毒実験により標的遺伝子と感染価の減少割合を評価し、NV の感染価を 3 log 以上低減させられる消毒条件を明らかにすることを目的に実施した。具体的には、塩素、紫外線消毒による Phage の消毒感受性から NV 感染価の低減割合を類推した。以下に得られた結果を示す。

- 1) 本調査に用いた二次処理水から単離した宿主菌 *E.coli* K12 (A/λ)株由来の Phage は、その構成の大半が F 特異性 RNA 大腸菌ファージのグループ I およびグループ II であると考えられた。
- 2) 塩素、紫外線消毒による NV と Phage の標的遺伝子の減少割合はともに同様であった。
- 3) Phage の消毒感受性から NV の感染価を 3 log 以上低減させるための消毒条件を類推すると、塩素消毒では Ct 値が 20mg・min/L 以上、紫外線消毒では 40mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射線量が必要であると考えられた。

塩素、紫外線消毒は、処理水の水質性状により消毒効果が左右されるため、水質変動を考慮したデータの蓄積が今後必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) ウイルス感染価の推定手法に関する調査、平成 27 年度下水道関係調査研究報告書、土木研究所資料第 4347 号、pp.3-11.
- 2) 平成 25 年度版下水道統計、(公社) 日本下水道協会.
- 3) 大瀧雅寛, 大腸菌ファージ測定法, <http://www.eng.ocha.ac.jp/enveng/theme/coliphage.html>  
(2016.02.15 アクセス)
- 4) 土木学会 衛生工学研究委員会 (1993), 環境微生物工学研究法, 技報堂出版, pp.309-312.
- 5) Bolton J.R., Stefan M.I., Shaw P.S., and Lykke K.R., 5<sup>th</sup> Ultraviolet World Congress in Amsterdam (2009): Determination of the Quantum Yield of the Ferrioxalate and KI/KIO<sub>3</sub> Actinometers and a Method for the Calibration of Radiometer Detectors (Proceedings)
- 6) Hijnen W. A., E. F. Beerendonk, G. J. Medema: Inactivation Credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water a review, Water Res., Vol. 40, pp.3-22, 2006.
- 7) 諏訪守, 岡本誠一郎, 尾崎正明, 陶山明子 (2009)、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、46(561), 91-101.
- 8) Hata A., Kitajima M., and Katayama H.: Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan, Journal of Applied Microbiology, 114, pp.545-554, 2013.

# 下水道資源・エネルギーを最大限に活かした 希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産

研究予算：受託業務費

研究期間：平 27～平 29

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、岡安祐司、山崎廉予

## 1. はじめに

下水処理場が有する豊富な栄養塩を利用した微細藻類培養・燃料化技術の開発が行われている<sup>1)</sup>。本研究は、下水処理水を用いて土着藻類を培養し、エネルギーを生産することを目的としている。昨年度は、室内実験により、下水処理場から生産する嫌気性消化ガスの膜分離精製での副産物である膜分離 CO<sub>2</sub> での土着藻類培養の有効性を示し、CO<sub>2</sub> の挙動を表現したモデルの構築を行った<sup>2)</sup>。今年度は、屋外での藻類培養における膜分離 CO<sub>2</sub> の有用性の検証、藻類培養が困難になる冬季における、下水熱利用による藻類培養の検証を行った。

## 2. 嫌気性消化ガス由来 CO<sub>2</sub> の藻類培養への有効性検討

### 2. 1 実験方法

藻類培養実験は、土木研究所が利用している B 処理場内の屋外実験施設にて、連続的に下水処理水を流入させる連続培養により行った (HRT2～4 日)。藻類培養に用いた下水処理水は、B 下水処理場内の実験施設に設置された標準活性汚泥処理装置 (曝気槽有効容積: 100 L) より供給した。CO<sub>2</sub> は、pH コントローラー (日伸理化、日本) による pH 制御により添加した。pH8 以上になった際にポンプが稼働し、pH7.9 以下になった際、ポンプが停止するよう設定した<sup>3)</sup>。添加した CO<sub>2</sub> は、膜分離 CO<sub>2</sub>、比較対象のための市販 CO<sub>2</sub> (体積比率: 99.95%) の 2 種類である。膜分離 CO<sub>2</sub> は、新潟県 A 下水処理場内の中温嫌気性消化タンクから採取した嫌気性消化ガスを対象として、膜分離手法により回収した<sup>4)</sup>。嫌気性消化ガスの組成は、CH<sub>4</sub> 58.6%、CO<sub>2</sub> 39.9% であるのに対し、膜分離 CO<sub>2</sub> の組成は、CO<sub>2</sub> 95.3%、CH<sub>4</sub> 0.691 % であり、CO<sub>2</sub> が高濃度に精製された。また、H<sub>2</sub>S は、嫌気性消化ガスでは 3.1 ppm であったのに対して、膜分離ガスでは <0.2 ppm まで低下している。膜分離 CO<sub>2</sub> を 47 L 容量のガスボンベに約 1 MPa で充填し、ガスボンベを土木研究所内実験施設に搬送した。それぞれの CO<sub>2</sub> を別の反応槽に投入し、藻類培養状況に相違がみられるか否か検証した。実験期間は平成 28 年 10 月 25 日～平成 28 年 11 月 22 日の約一カ月間であり、380L レースウェイ型培養槽 (有効水位 25 cm) で培養を行った。下水処理水および各培養装置での培養水を定期的に採取し、浮遊性物質 (Suspended solids: SS)、クロロフィル a、溶存態リン (Dissolved total phosphorus: DTP)、溶存態窒素 (Dissolved total nitrogen: DTN)、リン酸態リン (PO<sub>4</sub>P) を測定した。クロロフィル a 測定の際のろ過は、孔径 1.2 μm の GF-C (Whatman、アメリカ) を用い、それ以外のろ過は孔径 1.0 μm の GF-B (Whatman、アメリカ) を用いた。SS は Standard method<sup>5)</sup>、クロロフィル a は河川水質試験方法 (案)<sup>6)</sup> に従い測定を行った。DTN、DTP および PO<sub>4</sub>-P の測定は吸光度法により測定した<sup>7)</sup>。

## 2. 2. 実験結果

380L レースウェイ型培養槽において、膜分離 CO<sub>2</sub> および市販 CO<sub>2</sub> で培養した藻類培養水の各水質項目の経時変化を図-1、その際の気候（平均気温、日照時間、合計全天日射量、水温）の経時変化を図-2 に示す。藻類培養におけるバイオマス濃度の指標となる SS は、培養初期には膜分離 CO<sub>2</sub> では約 100 mg/L、市販 CO<sub>2</sub> では約 150 mg/L で推移したが、30 日後までには減少し、50mg/L 程度になった。藻類濃度の指標となるクロロフィル a についても、両培養槽とも培養初期には 1.0mg-Chl a/L 以上あったが、徐々に減少していった。リン、窒素の除去率においても、培養初期と 30 日後では、膜分離 CO<sub>2</sub> ではそれぞれ 21%から 6%、45%から 20%に減少し、市販 CO<sub>2</sub> ではそれぞれ 65%から 62%、55%から 35%に減少した。2 種類の CO<sub>2</sub> で藻類培養水の水質に差がみられたが、これは初期 SS 量の相違が原因であると考えられる。培養日数 1 日目の SS 量を 1 と仮定した時の SS 変化量は、同程度の-0.01/日であったため、藻類培養状況は同程度であったと考えられ、藻類培養に添加する CO<sub>2</sub> について、膜分離 CO<sub>2</sub> の利用には問題ないと考えられる。藻類が増殖しなかった理由として、培養期間中の水温が低いことが一因として挙げられる。培養期間中、水温は 15℃以下であり、7℃まで低下することもあった。また、図-2 より、水温は平均気温とほぼ同じであると考えられ、期間中の水温は減少傾向にあると考えられ、一般的な藻類培養の至適温度は 25℃とされていることを考慮すると<sup>8)</sup>、藻類は減少していくと考えられる。

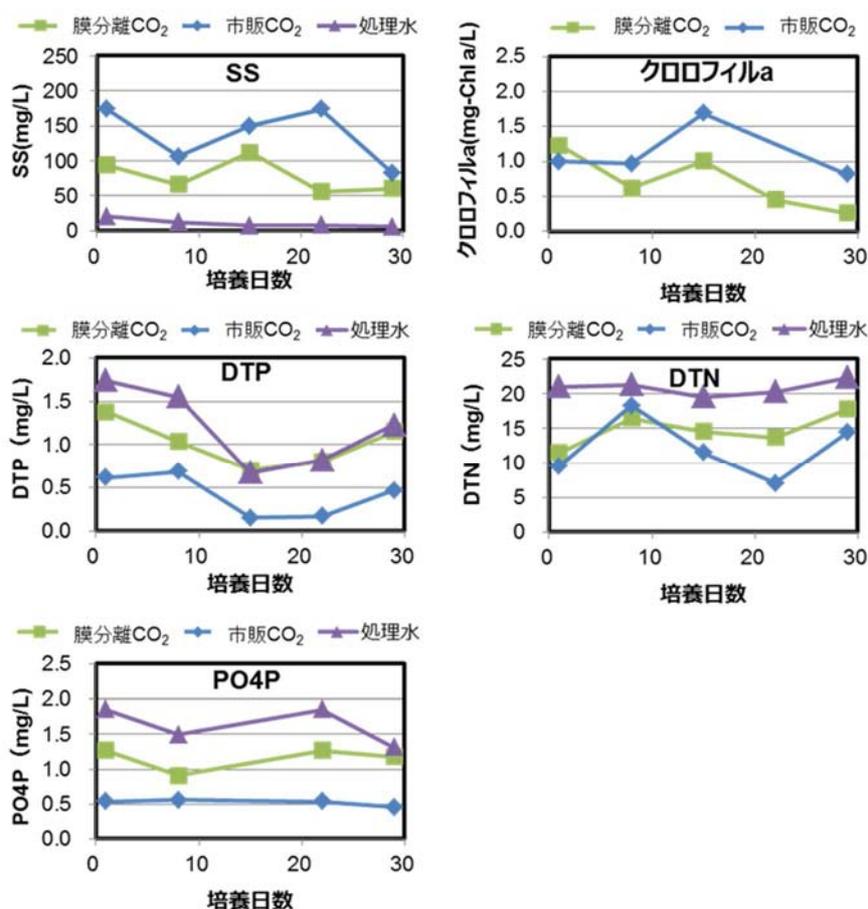


図-1 膜分離 CO<sub>2</sub> および市販 CO<sub>2</sub> で培養した藻類反応槽（380L レースウェイ）内の各水質項目の経時変化

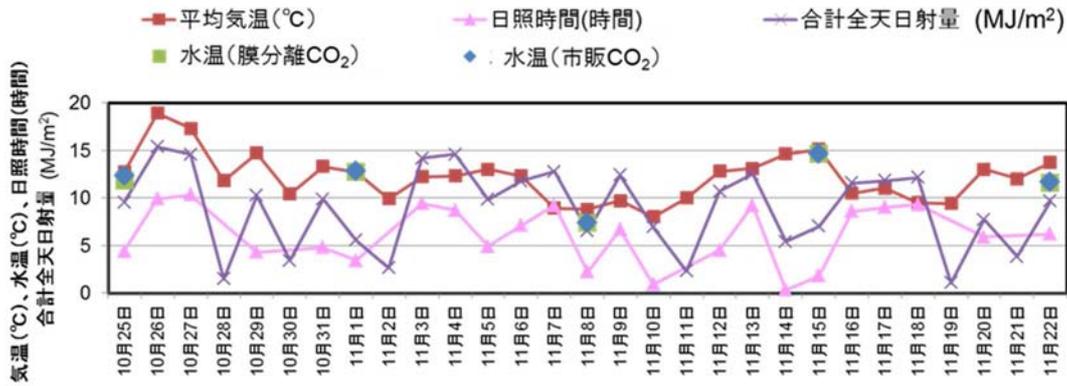


図-2 380L レースウェイ型培養槽で藻類培養実験を実施した期間の気候

### 3. 藻類培養における下水熱利用の検証

#### 3. 1 実験方法

2と同様のB処理場内の屋外実験施設にて、冬季の藻類培養検証を行った。培養槽は、有効容積20L(直径0.6m、高さ0.25m)の円形型を使用した。藻類培養装置を図-3に示す。下水処理水は、夏は25°C程度、冬は10°C程度と、気温よりも温度差が少なく<sup>9)</sup>、培養槽の周囲に下水処理水をかけ流すことで、保温効果が得られると考えた。約200Lの恒温槽を用意し、B処理場の下水処理水を4L/分でかけ流した。培養期間中の下水処理水の水温は、17.5°C(±1.3°C)であった。藻類培養方法は、2と同様である。HRTを1.5~2日程度での連続運転を行った。実験期間は平成28年12月6日~平成29年1月31日の約2カ月間であり、1カ月ごとに区切って2回検証(保温実験I、保温実験II)を行った。下水熱を利用した藻類培養における膜分離CO<sub>2</sub>の有用性を実証するため、膜分離CO<sub>2</sub>と市販CO<sub>2</sub>の比較を行った。培養水は、定期的にサンプリングし、SS、クロロフィルa、DTP、DTN、PO<sub>4</sub>P、無機炭素(Inorganic Carbon: IC)、溶解性有機炭素(Dissolved organic Carbon: DOC)、全有機炭素(Total Organic Carbon, TOC)を測定した。IC、TOC、DOCは、TOC-V CPH(島津製作所、日本)で測定した。また、各槽の水温を定期的に自動または手動で測定した。

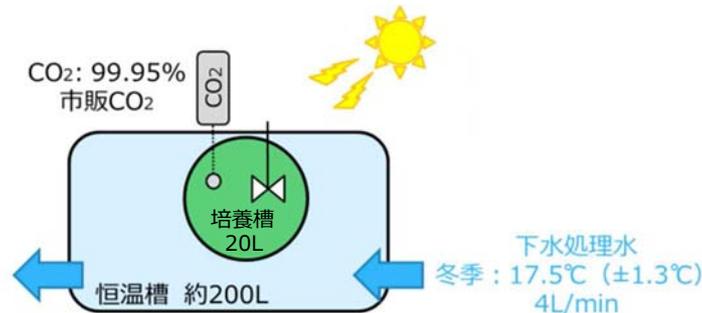


図-3 下水熱利用による藻類培養装置

#### 3. 2 実験結果

図-4に、各ポイントにおける水温の経時変化を示す。保温無培養槽の水温は、外気温とほぼ同じであり、12月初めには15°Cの時もあったが、ほぼ10°C以下で推移しており、1月には5°Cまで下がった。一方、B処理場の下水処理水は、測定した期間においては、15°C~20°Cを保っており、この熱を用いて保温した保温有培養槽の水温は、12月では20°C、1月でも15~20°Cに保たれていた。仮に、電気を利用して保温した際にかか

る電力量を概算した。用いた計算式<sup>10)</sup>は、表-1の通りである。温度差は、実験期間中の保温有培養槽水温から保温無培養槽水温を差し引いた平均値である10℃とし、加温にかかる時間は便宜的に1時間とした。水温加温にかかる電力量、培養槽表面から出ていく放熱量を考慮し、培養槽加温に要する電力は、0.3kWと試算された。24時間稼働とすると、培養槽加熱にかかる電力量は約7.2kWhとなる。電気代にすると、1日当たりおよそ140円(1kWh:19.52円<sup>11)</sup>)と試算された。

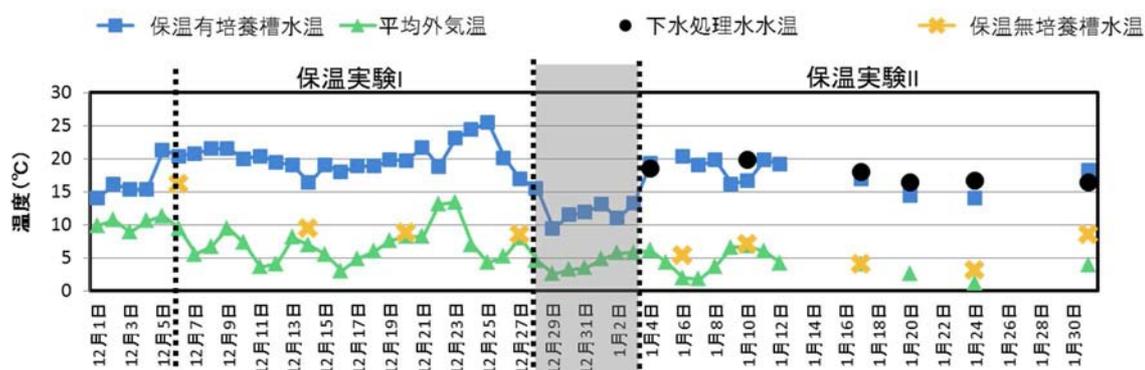


図-4 各水温の経時変化

表-1 培養槽加熱に要する電力

項目	計算式	計算値
水温加温	$P1 = 0.278^{*1} \times \text{比熱}^{*2} \times \text{密度}^{*3} \times \text{体積} \times \text{温度差} \div \text{加温にかかる時間}$	0.23 kW
放熱量	$P2 = \text{放熱損失係数}^{*4} \times \text{表面積}$	0.008 kW
合計量	$\times \text{安全率 } 1.25$	0.30 kW

\*1 熱量の換算:  $1 \text{ J} = 0.278 \times 10^{-6} \text{ kWh}$  \*2 24.18 (20℃における水の比熱) \*3 1 kg/L  
 \*4  $100 \text{ W/m}^2 : ((\text{物体表面の温度} - \text{周囲の温度}) \times \text{外気への対流熱伝導率}) + ((\text{物体表面の温度} + 273.15)^4 - (\text{周囲の温度} + 273.15)^4) \times \text{物体表面の放射率} (0.5) \times \text{定数} (5.6 \times 10^{-8})$  <sup>12)</sup>

下水処理水により保温した、各CO<sub>2</sub>における培養水の水質の経時変化を図-5に示す。培養日数約20日以前が保温実験I、培養日数約30日以降が保温実験IIを示している。図で示した培養日数0日より前は、どちらの系も保温無による培養を行っていたため、SS、クロロフィルaがともに低く、培養開始後に増加がみられた。初期SS量の値は異なっているが、培養20日後には、SS量、クロロフィルa量ともに同様の濃度である、350mg/L程度、5mg-Chl a/Lまで増殖した。また、保温実験IIにおいては、初期増殖後、SS量、クロロフィルa量は安定しており、約300mg/L、約4mg-Chl a/Lであった。DTP、DTN、PO<sub>4</sub>Pについても、保温培養開始後に減少がみられ、それぞれの除去率は、保温実験IIにおいて、約90%、約46%、約95%、約80%であり、藻類による栄養塩の利用が確認された。図-6に、培養最終日におけるそれぞれのCO<sub>2</sub>での培養藻類構成種、炭素構成、ガス袋に充填したCO<sub>2</sub>の減少量から算出したCO<sub>2</sub>利用速度を示した。どちらのCO<sub>2</sub>で培養した場合も、緑藻類、珪藻類でほぼ構成され、構成比も珪藻類が緑藻類の2倍程度とほぼ同じであった。藻類中の炭素は、POC(懸濁性有機炭素)で現される。培養26日間で、膜分離CO<sub>2</sub>、市販CO<sub>2</sub>ともに0.1mg/Lから0.43mg/L、0.23mg/Lから0.63mg/Lに濃度が上昇しており、同程度の炭素の蓄積がみられた。また、CO<sub>2</sub>利用速度についても、4mg/L/dと同様であった。2種類のCO<sub>2</sub>での培養において、炭素利用に大きな差は見られないことが示された。以上の結果より、冬季における下水熱を利用した藻類培養において、膜分離CO<sub>2</sub>の有用性を示すことができた。

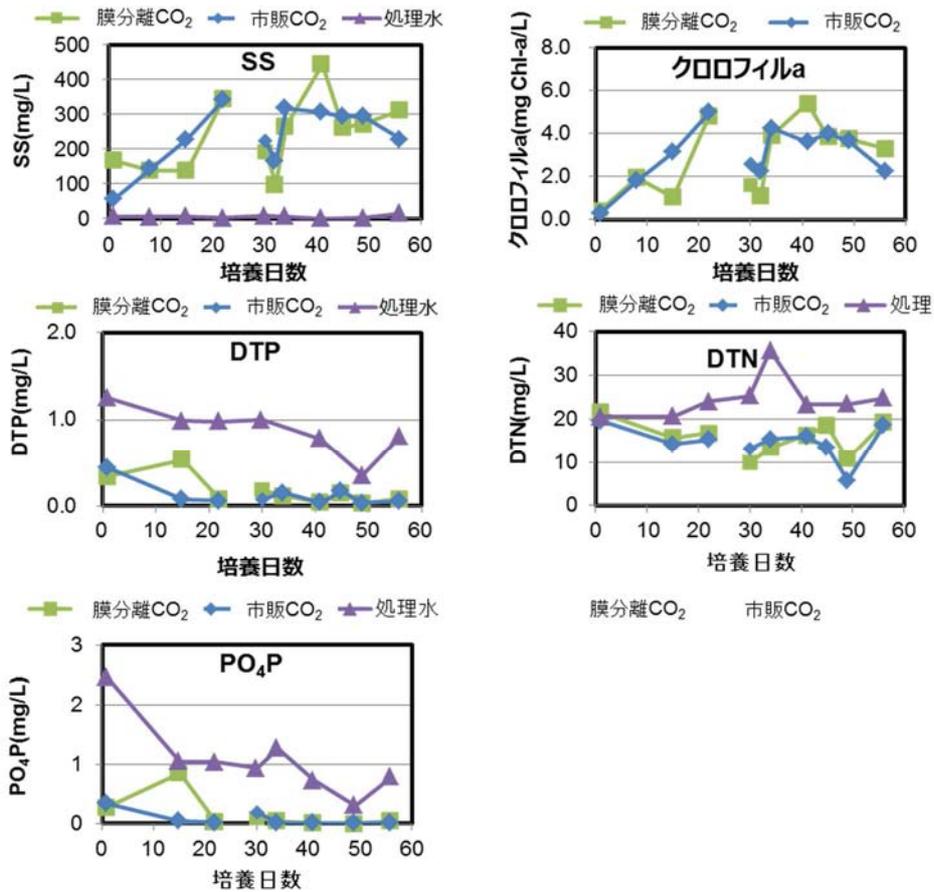


図-5 冬季保温による各 CO<sub>2</sub> での藻類培養における水質の経時変化

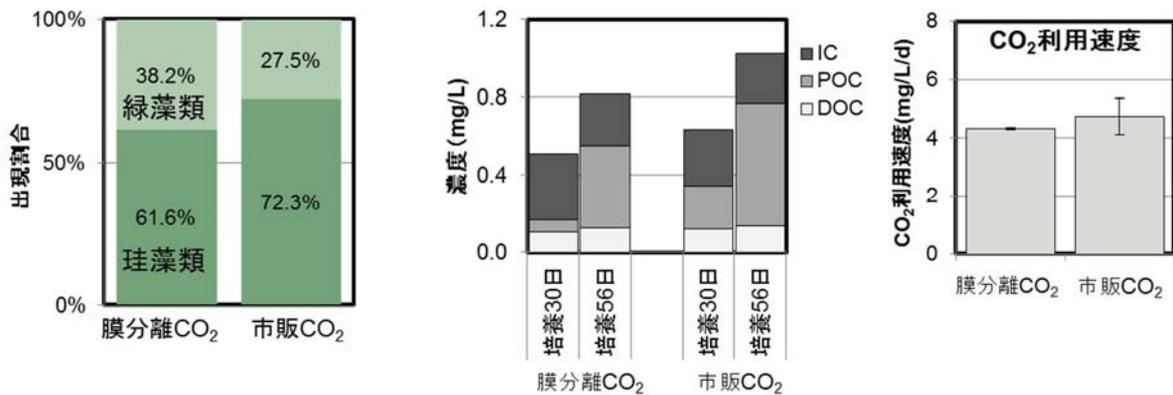


図-6 膜分離 CO<sub>2</sub>、市販 CO<sub>2</sub> での培養藻類構成種、炭素構成、CO<sub>2</sub> 利用速度

なお、本調査研究は、国土交通省下水道技術研究開発(GAIA)からの受託業務費により実施されたものである。

### 謝辞

長岡技術科学大学 環境・建設系 資源エネルギー循環研究室 姫野修司准教授には、膜分離 CO<sub>2</sub> の提供を頂きました。ここに記して、謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J.: The effects of CO<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water Res.*, 70, 9–26, 2015.
- 2) 平成 27 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 4347 号, pp.12-15, 2017.
- 3) 高部祐剛、日高平、津森ジュン、南山瑞彦: 炭酸添加が下水処理水を用いた藻類培養に与える影響に関する研究、第 52 回下水道研究発表会講演集, 2015
- 4) 佐々木星弥、姫野修司、小松俊哉、南條公平、本間康弘: CO<sub>2</sub>利用のためのバイオガス精製技術の開発、第 53 回下水道研究発表会講演集、181-183、2016.
- 5) American Public Health Association Publication (APHA): Standard methods for the examination of water and wastewater, nineteenth ed. Washington, DC, USA, 2005.
- 6) 建設省技術管理業務連絡会水質部会: 河川水質試験方法 (案), 1997
- 7) 公益社団法人日本下水道協会: 下水試験方法 下巻, 2012
- 8) Tsuno. H., Hidaka. T., Jorgensen. S.E.: 2-Layer Model Development, Planning and Management of Lakes and Reservoirs, Models for Eutrophication Management, *J. Jpn. Soc. Waer Environ.*, 2001
- 9) 下水熱に係る国土交通省の取組状況, 下水熱利用推進協議会, 2012
- 10) <http://www.nippon-heater.co.jp/designmaterials/calculation/>, 2016 年 12 月検索
- 11) 東京電力エナジーパートナー株式会社ホームページ, 料金単価表, 従量電灯 A, <http://www.tepco.co.jp/ep/private/plan/chargelist01.html>, 2016 年 12 月検索
- 12) 株式会社八光電機ホームページ, Q&A キット, <http://www.hakko.co.jp/qa/qakit/html/s01050.htm>, 2016 年 12 月検索

## 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～平 33

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、岡安祐司、山崎廉予

【要旨】下水道を核とした資源回収、エネルギー生産およびエネルギー利用技術の開発を目指し、下水道資源を用いた藻類培養技術の高効率化や、水草と下水汚泥の混合消化特性に関して調査・研究を行った。下水処理水を用いた藻類培養では、二次処理水よりも前段の処理水を基質とすること、SS 分を含んだ基質を用いること、攪拌の効率化により、藻類培養量の高効率化が見込まれることが示唆された。下水処理場の放流先水域に発生する水草について、水草と下水汚泥の混合回分式嫌気性消化実験を行い、メタン転換特性を把握したところ、投入水草の VS ベースのメタン転換率は、大きな変動があることがわかった。下水処理場における工程水（消化脱離液）を対象とした藻類培養技術の検討を行い、投入液中の溶解性リン・窒素をほぼ全量、藻類等の懸濁態物質に変換することが可能となる方法について検討を行った。

キーワード：下水道資源、藻類培養、水草、バイオマス、混合嫌気性消化

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

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

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

化石燃料の枯渇への懸念、化石燃料利用にとまなう

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<sup>2)3)</sup>。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<sub>2</sub>、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<sup>4)5)6)</sup>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。これに対し本研究室では、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、前中期計画で行ってきた。その結果、下水処理水による藻類培養が可能であることが示された。本研究では、下水処理水による藻類培養の高効率化、培養藻類の回収、濃縮、脱水技術の開発を目的とした。

#### 2. 1. 藻類培養基質の検討

##### 2. 1. 1. 培養基質の種類の検討

藻類培養の高効率化において、投入基質の種類を検討した。本研究室ではこれまで、下水道資源である二次処理水を用いて、屋外に設置した 380L レースウェイ型培養槽において、土着藻類の培養が可能であることを明らかにしてきた<sup>7)</sup>。本研究では、最初沈殿池流出水(初沈流出水)や活性汚泥装置反応槽前段の処理水など、二次処理水よりも前段階の下水道資源を用いた、土着藻類の培養を試みた。二次処理水よりも、前段の処理工程の水には、窒素やリンなどの栄養塩、金属類など様々な物質が多く含まれているため、藻類培養の効率化に何らかの影響を与えると考えたためである。

### (a) 室内実験

室内実験において、藻類培養の基質の種類検討を行った。検討したのは3種類であり、初沈流出水、活性汚泥装置内反応槽の前段の上澄み水(以下、反応槽の上澄み水)、二次処理水である。それぞれの基質を用いて、1L ビーカーで藻類を培養した。培養には、人工

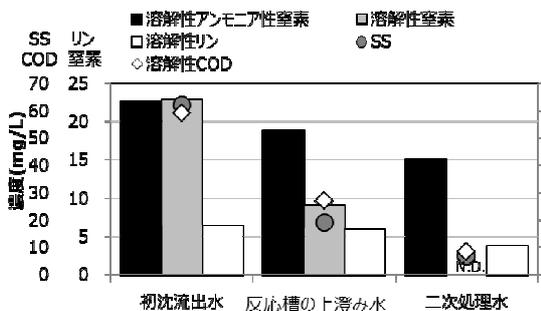


図-1 藻類培養基質の水質およびSS

気象器を用い、20°C、光量 130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  に設定した。培養期間は、28 日間であり、HRT が 4 日になるよう、定期的に基質の交換を行った。CO<sub>2</sub> の供給、攪拌は、エアレーションポンプにより行った。基質、藻類培養液の成分分析項目は、溶解性 COD、溶解性リン、溶解性窒素、溶解性アンモニア性窒素 (HACH、東亜ケイディーディー社)、SS (ガラス繊維ろ紙法, JIS-K-0102) とした。また、藻類培養液については、クロロフィル a (アセトン抽出-吸光度法)<sup>8)</sup> も測定した。

それぞれの基質における水質、SS の測定結果を図-1 に示す。初沈流出水、反応槽の上澄み水、処理水の順番で、基質の栄養塩濃度が低くなっている。特に窒素形態が各基質で大きく異なっており、初沈流出水ではほぼすべてがアンモニアの形態であるが、処理水では、アンモニア性窒素が 0mg/L であり、硝酸態窒素の状態になっていると考えられる。SS は、初沈流出水が、処理水の約 9 倍の 60mg/L であった。

それぞれの基質を用いた、藻類培養液の、SS、クロロフィル a、水質の経日変化を、図-2 に示す。SS は、7 日後まではすべての基質の種類で同様に増加したが、21 日後では、初沈流出水、反応槽の上澄み水と処理水で 100mg/L 程度の濃度差が出た。クロロフィル a については、基質の種類によって濃度の差が大きく現れた。14 日後、初沈流出水での培養では二次処理水の培養の 2 倍の濃度となった。水質の結果では、21 日後から、溶解性窒素が 1mg/L 以下、溶解性リンが 0.2mg/L 以下となり、SS、クロロフィル a の減少傾向の要因となっ

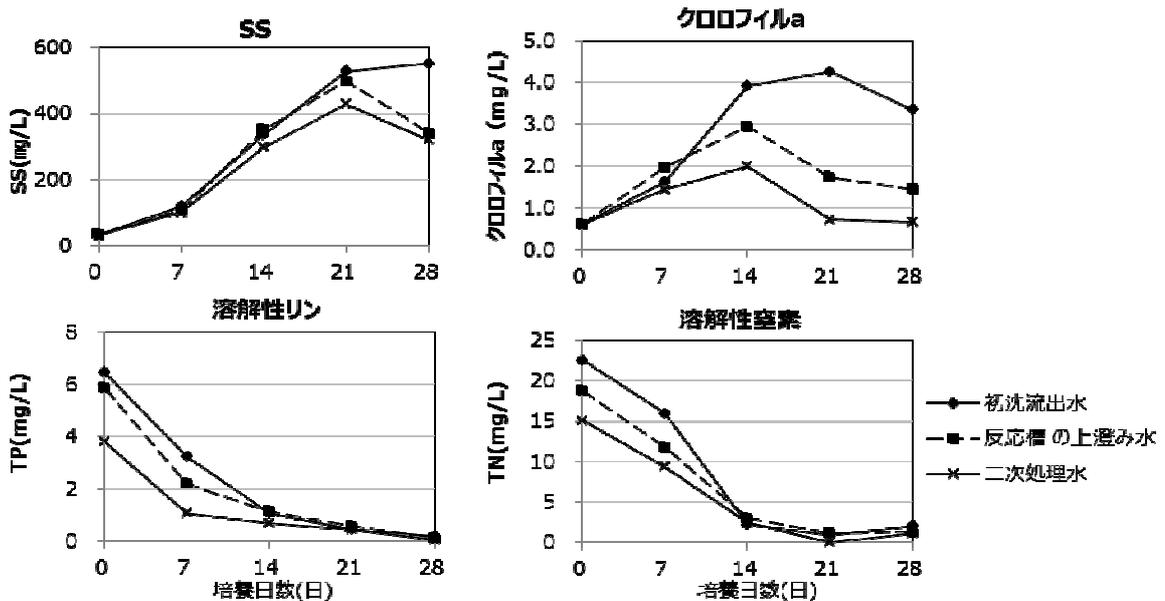


図-2 異なる基質で培養した藻類培養液の SS、クロロフィル a および水質

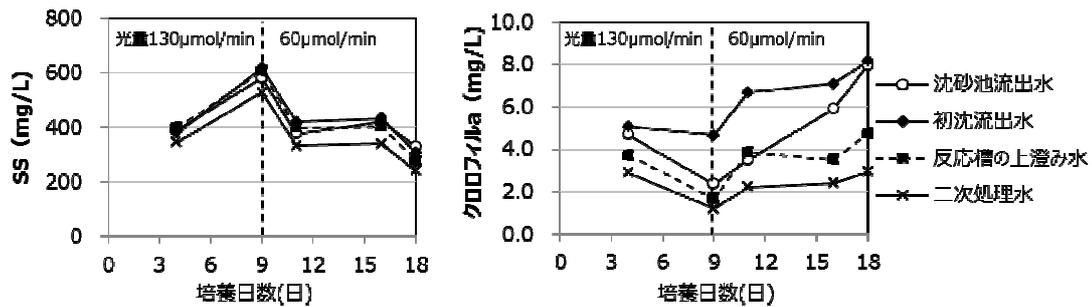


図-3 光量を変化させたときの異なる基質で培養した藻類培養液の SS、クロロフィル a

たと考えられる。

初沈流出水では、SS が高いために光の透過量が少なくなるという懸念がある。そこで、次に、光量を落とした場合の検証も行った。用いた基質は、4 種類であり、沈砂池流出水、初沈流出水、反応槽内の上澄み水、二次処理水である。培養量は 1L、人工気象器内、20℃で行った。光量は、 $130 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  で初期培養を行った後、9 日後に半分の  $60 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  にし、合計 18 日間培養を行った。 $60 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  は、日射量に換算すると、おおよそ  $1.4 \text{MJ}/\text{m}^2$ <sup>9)</sup> となり、曇りの日でも日射量が少ない時に相当する。測定項目は、SS およびクロロフィル a とした。結果を図-3 に示す。SS は、光量が落ちると減少傾向を示し、半分程度の濃度まで下がってしまうが、クロロフィル a は、増加傾向がみられた。また、基質によって、SS の差はほとんどみられなかったが、二次処理水よりは、前段の処理水での培養がよいと考えられる。クロロフィル a は、初沈流出水、沈砂池流出水が、反応槽の上澄み水の 2 倍、二次処理水の 2.5 倍程度の濃度であった。以上の 2 回の検証の結果、藻類培養には、二次処理水よりも前段の処理水を使用した培養量、特にクロロフィル a 量が多くなることが示された。また、光量が低くなった場合でも、同様のことが言えると示された。

### (b) 屋外実験

屋外での基質の違いによる藻類培養量の比較実験は、土木研究所が利用している A 処理場内の屋外実験施設にて行った。用いた装置は、380L レースウェイ型装置であり、HRT4 日になるよう、連続的に基質を流入させる連続培養により行った。藻類培養に用いた基質は、初沈流出水と二次処理水である。初沈流出水、および二次処理水は、A 下水処理場内の実験施設に設置された標準活性汚泥処理装置 (曝気槽有効容積: 100 L) より供給した。CO<sub>2</sub> は、市販 CO<sub>2</sub>(体積比率: 99.95%)を用い、pH コントローラー (NPH-660NDE、日伸理化、日本)による pH 制御を行いながら添加した。pH8 以上

になった際にポンプが稼働し、pH7.9 以下になった際、ポンプが停止するよう設定した<sup>10)</sup>。培養期間は、2016 年 6 月から 2017 年 2 月である。分析項目は、培養液の SS、クロロフィル a とした。分析頻度は、基本的に週 1 回とした。また、1 月に 1 回、高位発熱量の測定を行った。1 週間に一度、沈殿池から引き抜きを行っており、高位発熱量は、そこで引き抜いた濃縮藻類で測定を行った。なお、高発熱総量を測定するために、濃縮藻類の TS (全蒸発残留物) も同時に測定を行った(初沈流出水培養: 0.41%、二次処理水培養: 0.26%)。各基質での培養における、SS とクロロフィル a の変化の結果を図-4 に示す。夏季、秋季、冬季の 3 つの期間に分けて、8~9 月 (期間 A)、10 月 (期間 B)、1~2 月 (期間 C) それぞれの平均値として示した。また、窒素、リンでは各期間中の平均の除去率も示した。水質の平均値は全水質データの平均値を示し、平均除去率は測定日ごとの除去率の平均値を示しているため、図-4 のグラフ上の各水質の平均値と平均除去率の値には、ずれが生じており、留意が必要である。

結果より、初沈流出水での培養の方が、二次処理水での培養より、SS、クロロフィル量ともに高くなる結果であった。また、期間 B、C では藻類培養量(SS)が夏季の 50%程度落ちてしまうが、初沈流出水での培養では、夏季の二次処理水培養よりも、培養量が確保できる結果が示された。水質の結果では、測定期間中の活性汚泥の状態が悪く、初沈流出水と二次処理水で水質の差があまり見られなかったにもかかわらず、藻類培養量に差があったことから、栄養塩以外の要因も、藻類培養量に影響を与えていることが示唆された。藻類培養によって、窒素、リンがある程度除去されているが、期間 C においては、水温の低下により、窒素の除去率が悪化する傾向がみられた。初沈流出水、二次処理水それぞれの培養における濃縮藻類の高位発熱量は、17,000kJ/kg、17,800kJ/kg と同程度であった。濃縮藻類の TS は、それぞれ 0.41%、0.26%と初沈流出水培

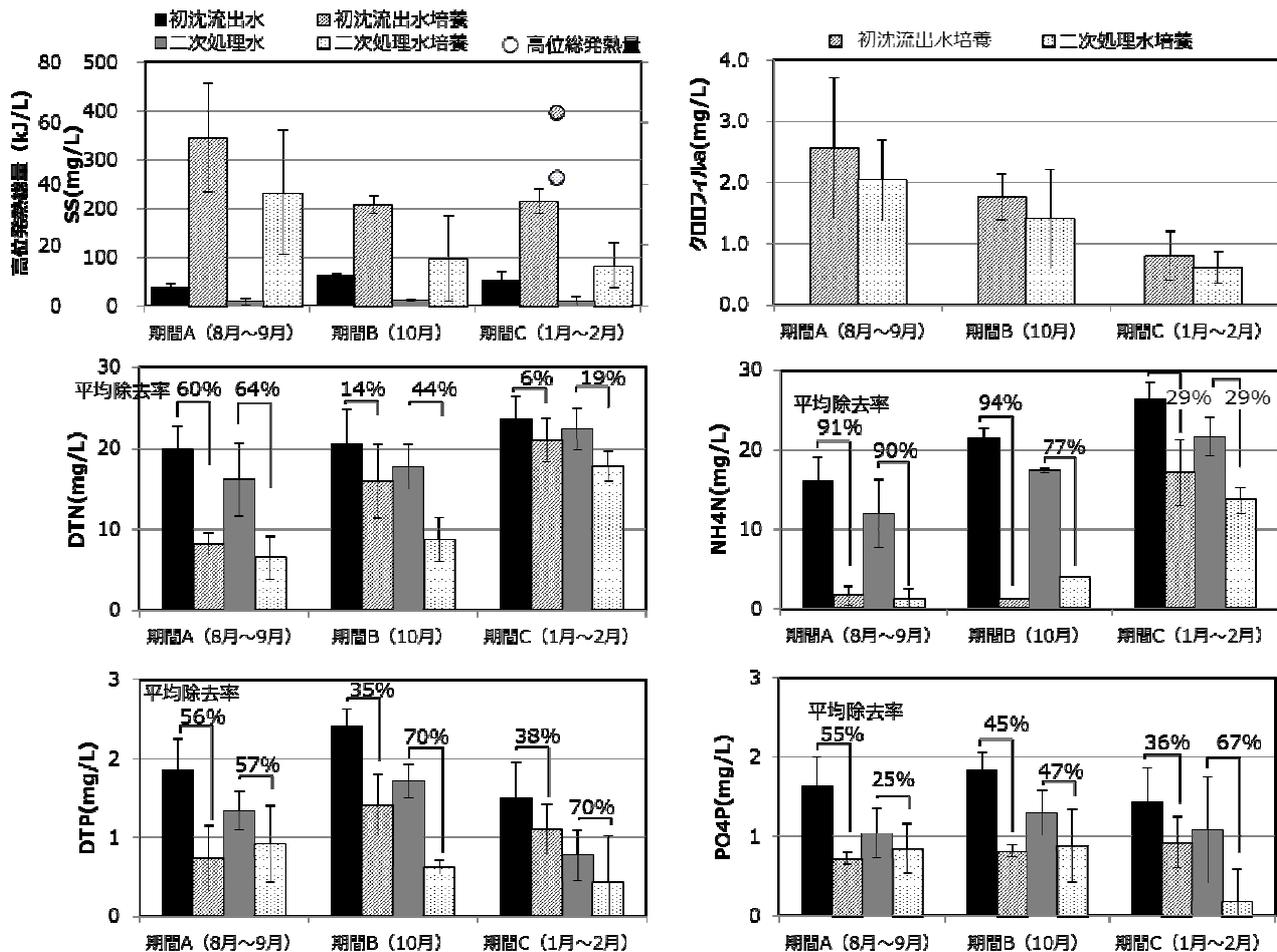


図4 屋外装置における異なる基質で培養した藻類培養液の SS、クロロフィル a、水質、高位発熱総量

養の方が多く、高位発熱総量は、1.5 倍程度、初沈流出水での培養で高くなる結果となった。図-5 に、各基質で培養した藻類中の脂肪酸を示す。ステアリン酸、オレイン酸、EPA が初沈流出水培養において、二次処理水培養の 1.5~2 倍程度多かった。一方、アラキドン酸は、二次処理水において、12 倍程度多かった。それぞれの基質において、抽出できるオイルの種類に相違があることが示された。

以上の結果より、室内培養、屋外培養どちらにおいても、二次処理水よりも前段の処理水である、初沈流出水を利用することで、藻類培養量を増加させることができると示された。この要因としては、栄養塩濃度の高さの他にも、窒素がアンモニア形態であることや、その他の微量物質の存在、形態の違いなど様々な要因が考えられる。これらについては、今後調査していく予定である。

2. 1. 2. 培養基質中の SS 成分の存在の影響

藻類培養の高効率化において、投入基質の SS 量を検討した。活性汚泥の初期吸着と同様の原理で、藻類

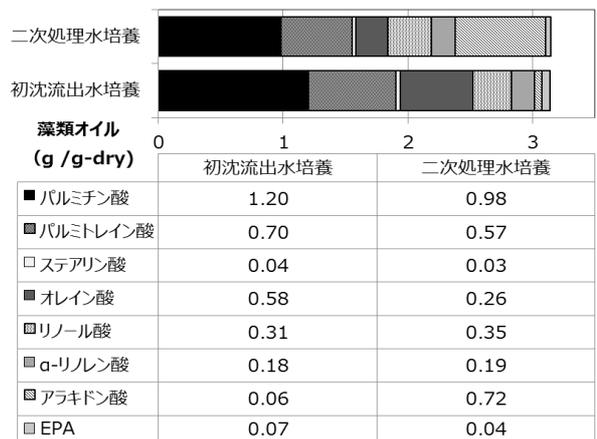


図-5 各藻類培養液中の脂肪酸構成

も SS に付着し、藻類が系内に定着する量が増殖するのではないかと考えたためである。

藻類の培養は、人工気象器内で行った。培養条件は、20℃、光量 60μmol/m<sup>2</sup>/s、培養量は 1L とした。培養方法は、半連続式とし、HRT4 日になるよう、定期的に藻類の引き抜き、基質の投入を行い、10~30 日間培養

を行った。

基質の SS 濃度は、分析値で 30mg/L~1136mg/L の範囲で 8 種類を検証した。基質の種類は、A 下水処理場内の実験施設に設置した 100L 活性汚泥装置における、初沈流出水と余剰汚泥を混合したものを使用した。培養藻類に対して、SS、クロロフィル a を定期的に測定し、経時変化を追った。

結果を図-6 に示す。SS の結果では、投入 SS 濃度が高い方が、SS 濃度が高くなる傾向を示した。しかし、2 週間程度培養を続けると、SS が減少傾向になったり、SS 濃度の増加が見られなくなったりと、投入 SS 濃度の相違の影響が見えにくくなった。本条件での培養における溶液の SS 濃度の上限は、800mg/L 程度であると推定され、それよりも多くなる条件での培養では、SS 濃度は減少傾向になることが示された。投入 SS 濃度 1136mg/L の条件では、培養初日から SS 濃度が減少する傾向を示した。検討した条件の中では、100~200mg/L 程度の投入 SS 濃度であれば、SS を 600mg/L 程度と高く維持できることが示された。クロロフィル a の変化は、投入 SS 濃度 100mg/L 以上で、初期の急激な濃度上昇がみられた。しかし、1 週間以上培養を続けると、減少傾向を示す条件が多かった。以上より、投入 SS 濃度 100~200mg/L で、流入水と余剰汚泥を投入することで、SS を投入しないときと比較して、藻類の増殖量増える可能性が示された。

この要因として、汚泥中に吸着している含まれる微量物質の影響や、汚泥の吸着能の影響など様々な要因が考えられる。また、SS 濃度の上昇により、光の透過度や、細菌の増殖の影響なども考えられる。これらについて、今後も調査して予定である。

## 2. 2. 藻類培養環境の検討

### 2. 2. 1. 攪拌の有無が培養に与える影響

藻類培養においては、活性汚泥と違い、エアレーションを基本的には行わないため、槽内の藻類濃度を均一にするためには、攪拌機での攪拌が必要となる。また、藻類培養濃度が上昇するにつれ、反応槽下部の藻

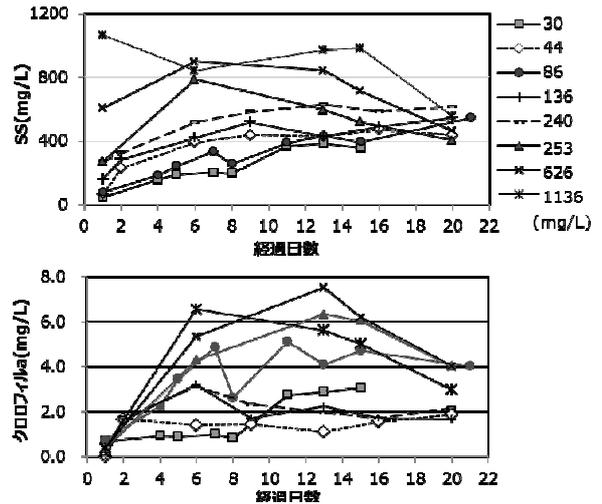


図-6 投入 SS 濃度が異なる藻類培養における SS およびクロロフィル a

類ま光が透過しにくくなるため、背面からの光の供給を期待しない反応槽においては、藻類培養における攪拌が、藻類への光の供給の意味でも重要である。一方、屋外装置における夜間では、光の供給がないため、攪拌の必要性は低い。夜間の攪拌の必要性がなくなれば、攪拌にかかるコストやエネルギーの消費にもつながる。そこで本研究では、夜間の攪拌の有無による藻類培養量の違いを検証した。

屋外に設置した 20L タンクにおいて、処理水を基質とした藻類培養を行った。HRT は 4 日程度で連続運転を行った。攪拌を 24 時間行う系と、夜間 (18 時~6 時の 12 時間) 停止させる系の 2 系列を同時に運転し、SS、クロロフィル a、窒素除去率、リン除去率を比較した。培養期間は、2016 年 10 月の 1 カ月間とした。結果を図-7 に示す。SS、クロロフィル a ともに、攪拌なしの方が、培養期間中の濃度が高いことが示された。特にクロロフィル a は、2 倍程度の差となった。これは、攪拌を停止することで、藻類が沈殿し、夜間の流出が防げたからであると考えられる。一方、水質を見ると、窒素除去率、リン除去率ともに同程度であり、夜間の攪拌を停止することで、水質が悪化することはない

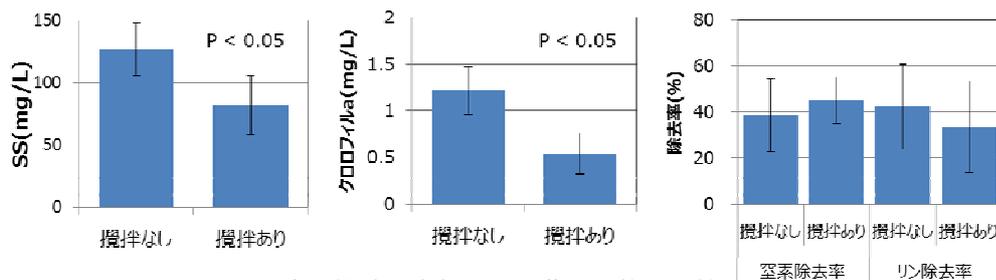


図-7 夜間攪拌の有無による藻類培養の比較

示された。以上の結果より、攪拌を必要とする形状の藻類培養装置においては、光の供給がない夜間の攪拌を停止することで、反応槽内の藻類培養量を高く維持できるとともに、攪拌にかかるエネルギーやコスト削減が見込まれることが示された。

### 3. 下水汚泥と培養藻類・水草の混合物のメタン発酵(嫌気性消化)特性の解明

#### 3. 1. 目的

本研究では、下水を用いて培養した藻類や、下水処理場の放流先水域に発生する水草を、下水処理場にて下水汚泥と混合し、嫌気性消化によりエネルギーを回収する手法の開発を目的としている。本年度は、下水処理場の放流先水域に発生する水草について、水草と下水汚泥の混合嫌気性消化の実験を行い、特性を把握した。

#### 3. 2. 実験方法

##### 3. 2. 1. 回分式実験

嫌気性消化槽での、濃縮汚泥および水草投入による効果を確認するために、消化汚泥、濃縮汚泥および水草を用いて、消化汚泥のみを添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥のみを添加する系列ならびに消化汚泥に濃縮汚泥と水草の混合比を変化させて添加する系列について、中温条件(35°C)にて回分式嫌気性消化実験を行った。実験に使用した消化汚泥は、茨城県霞ヶ浦浄化センターの濃縮汚泥を基質として、中温条件(35°C)、HRTを20日に設定した嫌気性反応器を連続運転し、そこから得られた余剰消化汚泥とした。実験に使用した濃縮汚泥は、A処理場で採取したものとした。実験に使用した水草は、2016年6月に、滋賀県琵琶湖において刈り取られた後、1か月程度天日乾燥された水草(主にオニビシの茎部分)を、ペースト状になるまで粉砕したものを用いた。

回分式嫌気性消化実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥400mLを投入し、表-1に示す所定量の濃縮汚泥、水草を添加し、沸騰後冷ました水道水を加えて500mLとした。その後、反応器内を窒素ガスで十分に置換し密栓後、35°Cに調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。

##### 3. 2. 2. 分析方法

消化汚泥、濃縮汚泥、投入水草、実験終了後の培養液の性状分析は、下水試験方法に従って行った。なお、CODCrの分析は吸光度計(DR2400、HACH社)により、COD試薬を用いた。アンモニア性窒素濃度は、

自動比色分析装置(TRAACS2000、BRAN LUEBBE社)を用いた。発生メタンガス量の測定は、水上置換方式のガス流量計(BioReactor Simulator AMPTS II、Bioprocess Control)を用いた。

表-1 回分式嫌気性消化実験における基質の組成

系列名	投入消化汚泥	投入基質 (gVS)	
		濃縮汚泥	水草
1	400mL	—	—
2	400mL	0.670	—
3	400mL	0.670	0.134
4	400mL	0.670	0.336
5	400mL	0.670	0.670

#### 3. 3. 結果および考察

回分式実験におけるメタン生成量の経時変化を、図-8に示す。なお、回分式実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、水草のVSは、1.1%、2.7%、9.4%、TSは、2.0%、3.4%、29.3%であった。濃縮汚泥や水草を投入した系列では、実験開始後1週間程度の間は、メタン発生速度が大きかったが、その後は、基質を投入しなかったブランクの系列と同程度にまで発生速度が低下した。

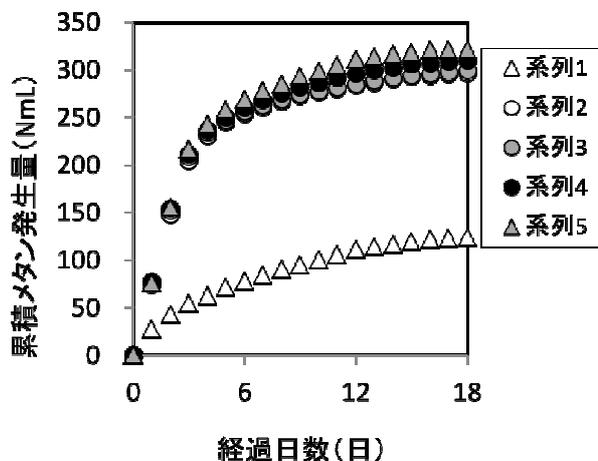


図-8 回分式嫌気性消化実験におけるメタン生成量の経時的変化

表-2 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量 (単位: NmL)

系列名	累積メタン発生量	メタンガスの由来		
		消化汚泥	濃縮汚泥	水草
1	125.6	125.6	0	0
2	296.7	125.6	171.1	0
3	301.4	125.6	171.1	4.8
4	309.1	125.6	171.1	12.5
5	320.7	125.6	171.1	24.1

本実験では実験期間を 18 日間に設定し、累積メタン発生量を整理した。表-2 に、各系列における累積メタン発生量、他の系列でのメタン発生量を差し引いて計算される水草由来のメタン発生量を示す。

また、本実験における、投入基質の VS ベースのメタン転換率は、消化汚泥の場合 0.028NL/gVS、濃縮汚泥の場合 0.26NL/gVS、水草の場合、0.035～0.037NL/gVS であった。

水草に関しては、昨年度も、琵琶湖の水草（主にオニビシ）を対象に同様の実験を実施した<sup>11)</sup>が、その際に得られた投入基質の VS ベースのメタン転換率 0.15NL/gVS と比べて、本年度の結果は 1/4 程度と小さかった。天候の状況や採取時期が異なり、また、同じオニビシでも採取部位（茎や葉）が異なる可能性もあり、一概には比較できないが、水草に関しては、VS ベースのメタン転換率に、かなり大きな変動幅があることがわかった。なお、昨年度と本年度の水草の性状の違いとしては、昨年度の水草の TS、VS は 19.3%、16.9% (VS/TS=0.88) であったのに対して、本年度の水草の TS、VS は 29.3%、9.4% (VS/TS=0.32) であり、VS/TS 比が、メタン転換率を推定する指標となり得る可能性が考えられたが、今後、データを蓄積して、検証していきたいと考えている。

#### 4. 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

##### 4. 1. はじめに

2. で述べたように、既往の調査研究の結果、下水処理水による藻類培養が可能であることが示された。下水処理場には、下水処理水以外にも、窒素やリンなどの栄養塩を豊富に含む工程水が存在する。そこで本研究では、これらを対象とした藻類培養技術について検討する。まず、手始めとして、汚泥の減容化のために用いられている消化工程で発生する消化汚泥を脱水した際に得られる消化脱離液を対象とした藻類培養技術の開発について検討することとした。新たに開発する技術の概略を図-9 に示す。

消化脱離液は、原液のままでは、藻類培養には高濃度すぎることから、他の工程水を用いて希釈することとし、希釈水には、藻類培養の際に太陽光を遮断する浮遊物質を含まず、また、藻類の基質となる栄養塩が可溶化されて含まれている条件を考慮し、最初沈殿池流出水をさらに嫌気的な条件（部分循環式嫌気性ろ床）で生物処理された処理水を適用することを検討する。また、藻類培養後の培養液に対しては、濃縮工程を適用し、濃縮藻類と上澄水に分離し、濃縮藻類は嫌気性消化工程へ、上澄水は、希釈水を採取した箇所へ返流させる方法を検討する。

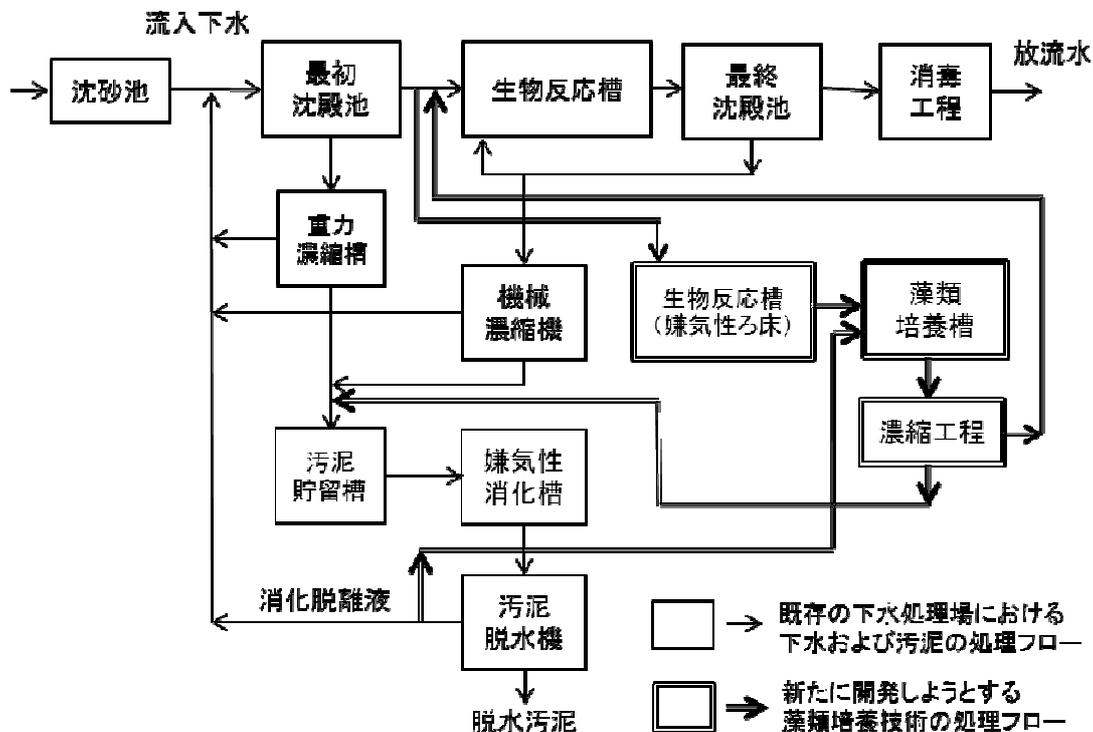


図-9 新たに開発する技術の概略

本年度は、消化脱離液と嫌気性ろ床流出水を用いた藻類培養方法について検討を行った。

## 4. 2. 方法

### 4. 2. 1. 藻類培養方法

消化脱離液は、下水処理方式として標準活性汚泥を、汚泥処理方式として中温消化を採用しているB下水処理場の消化汚泥の脱離液を採取し利用した。嫌気性ろ床流出水は、一部合流式を含む分流式のA下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、さらに、部分循環式嫌気性ろ床実験装置にて処理を行った処理水を利用した。藻類培養は、内径 20cm、厚さ 1cm、長さ 1m の透明アクリル管を鉛直に立て、底面部分に排出口を設けたカラム型藻類培養装置を用い、茨城県つくば市の国土技術政策総合研究所温室内にて実施した。藻類培養装置の上部は、温室内の大気に開放する型とした。藻類培養方法は回分式とし、培養開始時に、消化脱離液と嫌気性ろ床流出水の混合液と、前回の培養終了時の培養液の一部を、カラム型藻類培養装置に投入し、その後は、一定の培養期間（1 週間または 2 週間）を設定し放置した。培養液の攪拌は、常時、小型のエアレーション装置にて行った。消化脱離液と嫌気性ろ床流出水の混合比は、あらかじめ各溶液中の溶解性リン濃度を測定し、混合後に溶解性リン濃度が 4mg-P/L になるように設定した。前回の培養終了時の培養液は、消化脱離液と嫌気性ろ床流出水の混合液に対して、1/5 の容積の溶液を投入し、合計で 30L になるように調整した。

実験に先立ち、室温 15～20℃の実験室内に、蛍光灯により 1 日あたり 12 時間、側面から光（光量子密度：約 165  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>/s）を照射する 5L のピーカー2 系列を設置し、消化脱離液、嫌気性ろ床流出水および 2. で示した 380L 屋外レースウェイ培養槽で採取した培養液を投入し、1 週間の培養後、温室内で実施する実験と同様の要領で、培養期間 1 週間の回分式藻類継代培養を 3 回実施し、得られた培養液を、温室での実験に使用した。なお、温室での実験は、2017 年 1 月より開始した。

### 4. 2. 2. 分析方法

培養開始時および培養終了後の培養液、培養期間を 2 週間に設定した系では、中間時（1 週間後）の培養液についても、性状分析を行った。分析項目は、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P、溶解性各態窒素、SS とした。分析は、下水試験方法に従って行い、窒素・リンの濃度測定には、自動比色分析装置（TRAACS2000、BRAN LUEBBE 社）を用いた。

## 4. 3. 結果および考察

2017 年 1 月～3 月の間の実験期間中における、2 系列（培養期間：1 週間、2 週間）の培養装置内培養液の水質分析結果を図-10 に示す。なお、SS の分析については、実験開始後 14 日目以降に行った。

消化脱離液中の PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 濃度は 50～60mg-P/L、嫌気性ろ床流出水中の PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 濃度は 1.7～2.5mg-P/L の範囲であり、結果として、消化脱離液を嫌気性ろ床流出水で 20～25 倍に希釈する格好となった。培養水中の PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 濃度は、培養前後を比較すると、藻類に取り込まれる等の結果、低下した。実験期間中は、日射量が徐々に大きくなっていく時期であったことから、低下の幅は、徐々に大きくなり、培養期間 2 週間の系列では、培養終了時に、培養液中の PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 濃度は、定量下限値程度にまで低下したが、培養期間 1 週間の系列では、0.8mg-P/L までにしか低下しない状態で推移した。溶解性窒素の形態は、消化脱離液中、嫌気性ろ床流出水中いずれも、大部分がアンモニア性窒素であった。培養液中の溶解性窒素濃度は、培養前後を比較すると、藻類に取り込まれる等の結果、低下した。実験期間中は、リンと同様に、低下の幅は、徐々に大きくなり、培養期間 2 週間の系列では、培養終了時に、培養水中の濃度は定量下限値程度にまで低下したが、培養期間 1 週間の系列では、10～20mg-N/L までにしか低下しない状態で推移した。培養終了時の培養液中の溶解性窒素の形態は、アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素が大部分を占めたが、それらの比率について、明確な傾向はみられなかった。培養液中の SS 濃度は、培養前後を比較すると、藻類が増殖した結果、増大した。増大の幅は、実験期間中、徐々に大きくなり、培養期間 1 週間の系列では、培養終了時に 300mg/L に程度まで、培養期間 2 週間の系列では、培養終了時に 480mg/L 程度にまで、増加する状況となった。

今後は、高水温期も含めた年間を通じた検討を行い、日射量や水温、水質等と藻類増殖速度の関係を整理し、最適な培養条件について検討する予定である。また、攪拌方法の改善や、CO<sub>2</sub> 添加等についても検討していきたいと考えている。

## 5. まとめ

本年度、下水処理水を利用した藻類培養の高効率化技術の開発、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、水草と下水汚泥の混合物のメタン発酵（嫌気性消化）の特性解明調査について調査した。以下に、得られた成果を示す。

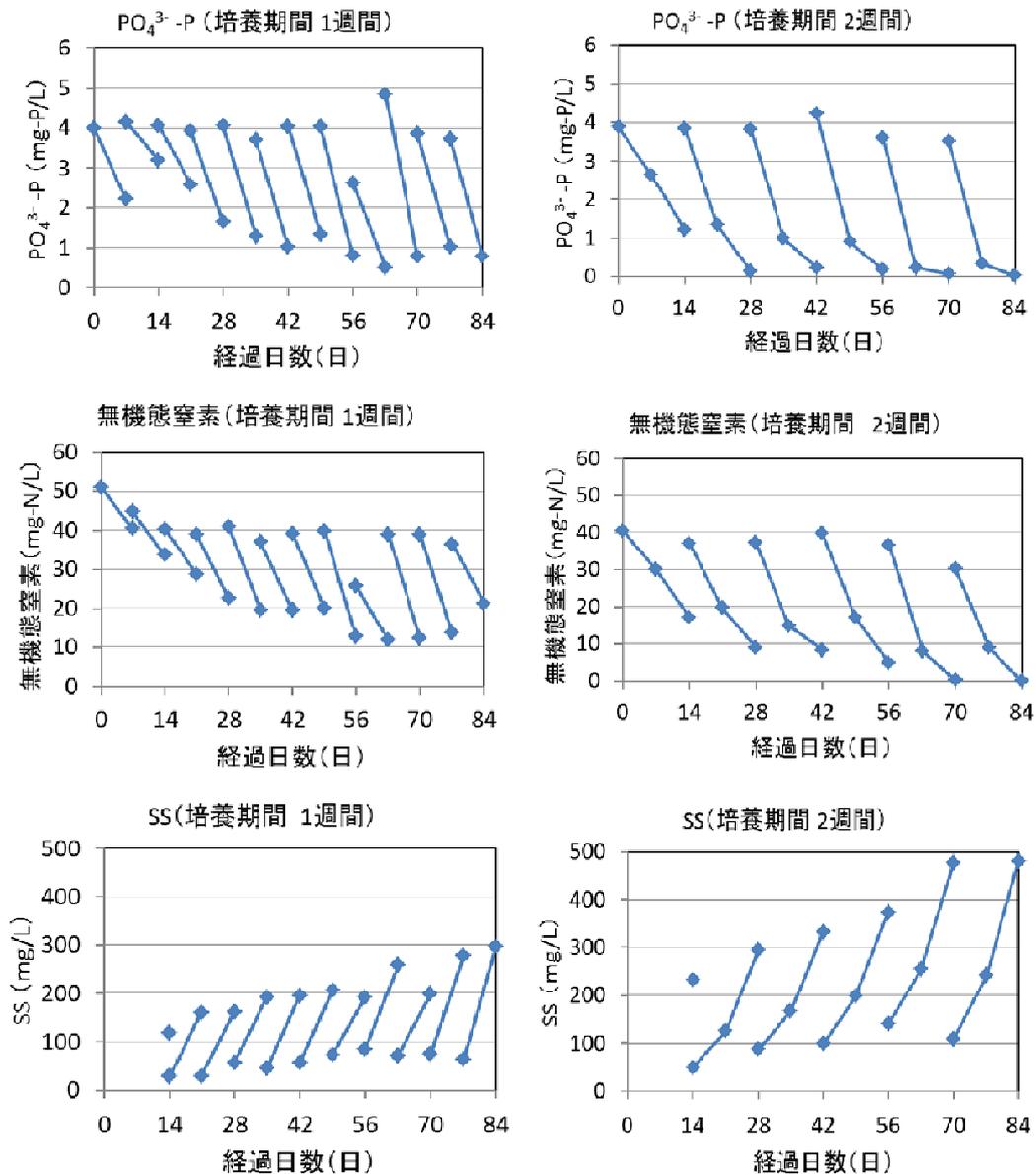


図-10 回分式藻類培養実験における培養液中の水質変化

- 下水処理水を用いた藻類培養において、初沈流出水などの、二次処理水よりも前段の処理水を用いることで、培養量の増加が見込まれることが明らかとなった。
- 藻類培養において、投入基質に 100~200mg/L の SS 分が存在することで、培養量の増加が見込まれることが明らかになった。
- 攪拌を必要とする藻類培養において、光の供給が見込まれない時間帯に、攪拌を停止することで、藻類回収量の増加が見込まれることが示された。
- 下水処理場の放流先水域に発生する水草について、水草と下水汚泥の混合回分式嫌気性消化実験を行い、メタン転換特性を把握した。
- 投入水草の VS ベースのメタン転換率は、0.035~0.037NL/gVS であり、昨年度実施した同様の実験の結果 (0.15NL/gVS) に比べて小さく、大きな変動幅があることがわかった。
- 下水処理場における工程水を対象とした藻類培養技術の開発を行うことを目的として、消化脱離液を嫌気性ろ床処理水で希釈した溶液を用いて、温室内のカラム型藻類培養装置にて回分式藻類培養を実施した。
- 培養期間を 2 週間に設定した場合、投入液中の溶解性リン・窒素をほぼ全量、藻類等の懸濁態物質に変換することが可能であった。

## 参考文献

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道政策研究委員会 報告書 新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～、2014.
- 2) J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton: Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond, *Water Research*, Vol.45, pp.6637-6649, 2011.
- 3) S. 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. Woiciehowski, C. Larroche, C.R. Soccol: Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*. Vol.88 (10), pp.3291-3294, 2011.
- 6) 鈴木秀幸ら：下水処理場から発生する「未利用資源」を利活用したユーグレナ培養技術の実証研究、第53回下水道研究発表会講演集、p.184-186、2016
- 7) 南山瑞彦、高部祐剛：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、p.26-51,2017
- 8) 日本水道協会：上水試験方法、2001
- 9) 稲田勝美：人工光と植物の生育。「光と植物生育-光選択利用の基礎と応用-」、養賢堂、東京、1984
- 10) 高部祐剛、日高平、津森ジュン、南山瑞彦：炭酸添加が下水処理水を用いた藻類培養に与える影響に関する研究、第52回下水道研究発表会講演集、2015
- 11) 国立研究開発法人土木研究所：平成27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4347号、2017.

# 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～平 33

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、岡安祐司、桜井健介、山崎廉予

【要旨】下水道施設を活用したバイオマスの資源・エネルギー有効利用方法の開発を目指し、河川・道路等の管理で生じる草木バイオマスを下水処理場内で利用する方法に関して調査・研究を行った。剪定枝を下水汚泥焼却炉の補助燃料として活用した時の効果の試算等を行い、従来の化石燃料使用量を削減できる可能性が示唆された。刈草の汚泥脱水助剤としての活用に関して、実験室レベルでの検証を行った結果、10 mm程度に裁断した刈草を汚泥 TS に対して 10%程度混合することにより、脱水後の汚泥の含水率の低減化が見込まれる可能性が示唆された。また、公共事業に由来するバイオマス中に混在する種子や堅果（どんぐり）に注目し、堅果と下水汚泥との混合消化（中温消化）によるメタン転換ポテンシャルを評価したところ、刈草（葉や茎）を投入基質とした場合に比べて大きく、堅果のポテンシャルについて配慮する必要があると考えられた。

キーワード：バイオマス、剪定枝、刈草、脱水助剤、混合嫌気性消化、堅果

## 1. はじめに

下水道整備の進展にともない、平成 25 年度末時点で下水道人口普及率は約 77.0%、管路延長は約 46 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<sup>1)</sup>。循環型社会形成推進基本計画（平成 25 年 5 月、閣議決定）<sup>2)</sup>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）<sup>3)</sup>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、エネルギーを比較的多く消費する施設であり、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. 木質バイオマスを下水汚泥焼却炉で活用する技術

### 2.1 河川・道路等管理に由来する伐木・流木・剪定枝の現状

河川、道路、公園、ダムなどの管理のため、毎年

定期的に樹木の伐採、流木の回収等が行われている。例えば、全国の道路緑化樹木の本数は、2011 年度末時点で、高木 675 万本、中低木 14,016 万本が存在し<sup>4)</sup>、定期的に剪定が行われている。国土交通省の 109 国道事務所、102 河川事務所、17 公園事務所、25 ダム事務所に対して実施したアンケート結果によれば、これらの事務所から、剪定枝葉は 170TJ/年相当が発生していると推算されている<sup>5)</sup>。また、国内の 199 ダムからは、概算で 230TJ/年相当の流木が発生している<sup>6)</sup>。一般に、バイオマスは「広く、薄く」存在している上、水分含有量が多い、かさばる等の扱いづらいという特性のために収集が困難であることが、バイオマスが十分に活用されていない原因の一つである<sup>7)</sup>が、河川、道路、公園、ダムなどの管理のため日ごろより草木が伐採、収集されており、収集・利用が容易であることから、比較的利用しやすいバイオマスであると考えられる。

### 2.2 地方自治体における剪定枝の発生量

地方自治体で実際に発生する剪定枝量の一例を表-1 にまとめた。地方自治体がとりまとめる際に、「草木」として草を含めて集計している場合が多く、剪定枝量として集計している場合は限られていた。家庭から発生するものを含まない場合もあったが、発生量はいずれも約 60 kg/(日・km<sup>2</sup>)であった。

### 2.3 剪定枝の含水率、高位発熱量等の性状

土木研究所は、国土交通省の河川または国道事務

表-1 地方自治体で発生している剪定枝量の例

地域	対象物	発生量 (トン/年)	自治体面積 (km <sup>2</sup> ) <sup>13)</sup>	計算された1日・ 1km <sup>2</sup> あたりの発生 量(kg/(日・km <sup>2</sup> ))
八王子市 <sup>8)</sup>	街路樹、公園緑化木(推計)	3,644	186	54
町田市 <sup>9)</sup>	剪定枝資源化センターに搬入されたもの	1,728	72	66
浜松市 <sup>10)</sup>	家庭及び街路樹、公園緑化木	33,962	1558	60
堺市 <sup>11)</sup>	環境系剪定枝	3,470	150	63
東京都区部 <sup>12)</sup>	緑被地全般(推計)	13,620	627	60

表-2 剪定枝の性状の測定例<sup>14)</sup>

	水分含量 (kg/kg-wet)	高位発熱量 (MJ/kg-dry)	水素含量 (kg-H/kg-dry)	灰分 (kg/kg-dry)
最小値	0.447	17.9	0.0571	0.017
最大値	0.590	19.8	0.0631	0.132

所等で採取した草本類の組成を調査した<sup>14)</sup>。そのデータのうち、剪定枝に該当する14種の試料の水分含量、高位発熱量、水素含量、灰分の最小値と最大値を表-2に示した。

## 2. 4 下水汚泥焼却炉における補助燃料の使用実態

補助燃料とは、「主燃料だけでは、燃焼温度が低いあるいは燃焼が継続できない場合に付加する燃料」<sup>15)</sup>であり、下水汚泥焼却炉における脱水汚泥燃焼時の補助燃料には、一般に重油、灯油、消化ガス、都市ガスが用いられている<sup>16)</sup>。

平成26年度下水道統計<sup>17)</sup>を元に作成した直接脱水汚泥と消化脱水汚泥の含水率と投入汚泥量あたりの補助燃料使用量の関係を図-1に示した。直接脱水汚泥の平均含水率は76.9%であり、流動焼却炉における補助燃料使用量は直接脱水汚泥1kgあたり593kJ(A重油で16.0mL相当)であった。消化脱水汚泥の平均含水率は80.3%であり、流動焼却炉における補助燃料使用量は消化脱水汚泥1kgあたり1,485kJ(A重油で40.0mL相当)であった。直接脱水汚泥の計算にあたっては、消化施設を有していない又は稼働しておらず、流動焼却炉を持つ下水処理場を抽出し、焼却炉への投入汚泥量、含水率、補助燃料使用量が記載された74処理場(156基)のデータを用いた。消化脱水汚泥の計算にあたっては、消化施設が稼働し、流動焼却炉を持つ下水処理場を抽出し、焼却炉への投入汚泥量、含水率、補助燃料使用量が記載された25処理場(36基)のデータを用いた。脱水汚泥量あたりの補助燃料使用量は、補

助燃料使用量の総和を投入脱水汚泥量の総和で除して計算した。各種の補助燃料(特A重油、A重油、灯油、都市ガス、プロパンガス、消化ガス)は低位発熱量<sup>18),19)</sup>に換算して計算した。

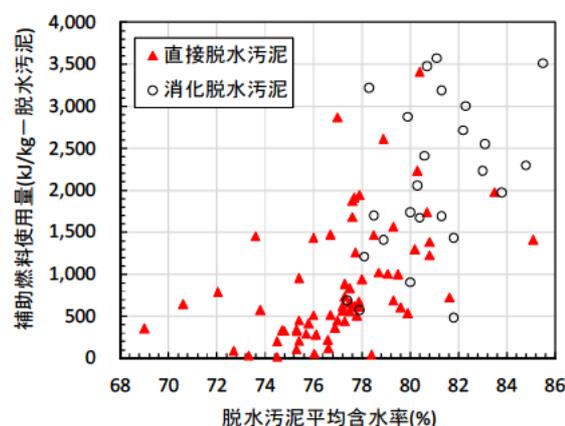


図-1 直接脱水汚泥と消化脱水汚泥の含水率と脱水汚泥量あたりの補助燃料使用量の関係

## 2. 5 剪定枝を下水汚泥焼却炉の補助燃料として活用した時の効果の簡易試算

### 2. 5. 1 試算方法

前節のとおり下水汚泥焼却炉には、補助燃料が利用されるが、消化ガス以外は、化石燃料であり、地球温暖化対策の観点から、使用量削減が期待される。剪定枝等の木質バイオマス、下水汚泥焼却炉における補助燃料として利用できれば、それに貢献可能と考えられる。

土木研究所は、平成17年から平成20年に、共同

研究により、混合装置、圧送ポンプ等を用いた実証試験において、汚泥と木質バイオマス(広葉樹のチップやバーク)等を予め混合してから、過給式流動焼却炉へ投入できることを実証した<sup>20),21)</sup>。しかし、剪定枝は対象としていなかった。

剪定枝は含水率が高いので、補助燃料として活用する際には、乾燥して利用するのが望ましいと考えられるが、現在、導入事例は見当たらない。そこで、剪定枝を乾燥させて下水汚泥焼却炉の補助燃料として活用するシステムを導入した時の効果を簡易的に試算した。試算対象は、システム導入による化石燃料削減量、システム導入後の化石燃料使用量とした。

剪定枝は、下水処理場近辺から収集し、破碎、乾燥させてから利用することを想定した。試算条件は、以下のとおりとした。

- 剪定枝の受入能力：5,000kg-wet/日
  - 収集された剪定枝の水分含量：0.5kg/kg-wet
  - 乾燥後の水分含量：0.2kg/kg-wet
  - 収集された剪定枝の高位発熱量：19MJ/kg-dry
  - 収集された剪定枝の水素含量：0.06kg-H/kg-dry
  - 剪定枝の化石燃料代替効率：50-100%
  - 下水汚泥焼却炉の処理能力：100t-脱水汚泥/日
  - 消化工程：無し
  - 導入前の化石燃料使用量：593kJ/kg-脱水汚泥
- なお、剪定枝の受入能力は、剪定枝発生量は60kg-wet/(日・km<sup>2</sup>)、収集範囲は5km圏内を想定して設定した。剪定枝の含水率、高位発熱量、水素含量は、土木研究所の調査<sup>14)</sup>を参考に設定した。化石燃料代替効率は、文献<sup>22)</sup>を参考に、焼却炉に投入した剪定枝の熱量あたりの化石燃料の削減熱量と定義した。導入前の化石燃料使用量は、前節の直接脱水汚泥の平均値を利用した。剪定枝の乾燥には、下水汚泥焼却炉の廃熱を用いることとし、追加的なエネルギーの消費は無いものとした。剪定枝を下水処理場まで運搬するためのエネルギーは、従来からごみ処理場等へ運搬されていたものと同等とみなし、追加的な消費はないものとした。破碎や乾燥の動力は、エネルギーを要するがシステムの構成により異なるので、試算には含めなかった。

投入剪定枝熱量は以下の式で求めた。

$$\text{投入剪定枝熱量(MJ/日)} = \text{乾燥剪定枝投入量(kg-wet/日)} \times \text{剪定枝低位発熱量(MJ/kg-wet)}$$

$$\text{乾燥剪定枝投入量(kg-wet/日)} = \text{剪定枝受入量}$$

$$(\text{kg-wet/日}) \times \{1 - \text{収集剪定枝水分含量(kg-H}_2\text{O/kg-wet)}\} / \{1 - \text{乾燥剪定枝水分含量(kg-H}_2\text{O/kg-wet)}\}$$

低位発熱量は、文献<sup>23)</sup>を元に以下の式で計算した。

$$\text{低位発熱量(MJ/kg-wet)} = \text{高位発熱量(MJ/kg-wet)} - 2.44 \times \{9 \times \text{水素含量(kg-H/kg-dry)} \times (1 - \text{水分含量(kg-H}_2\text{O/kg-wet)}) + \text{水分含量(kg-H}_2\text{O/kg-wet)}\}$$

$$\text{高位発熱量(MJ/kg-wet)} = \text{高位発熱量(MJ/kg-dry)} \times \{1 - \text{水分含量(kg-H}_2\text{O/kg-wet)}\}$$

化石燃料削減量は以下の式で求めた。

$$\text{化石燃料削減量(MJ/日)} = \text{剪定枝投入熱量(MJ/日)} \times \text{化石燃料代替効率(\%)} / 100$$

システム導入後の化石燃料使用量は、以下の式で求めた。

$$\text{導入後の化石燃料使用量(kJ/kg-wet)} = \text{下水汚泥焼却炉の処理能力(t-wet/日)} \times \text{従来の化石燃料使用量(kJ/kg-wet)} - \text{化石燃料削減量(MJ/日)}$$

## 2. 5. 2 試算結果

剪定枝(高位発熱量19MJ/kg-wet、水素含量0.06kg-H/kg-dryを仮定)の水分含量が変化した時の、低位発熱量は、表-3のとおりとなった。

補助燃料削減量は、21.4~42.8GJ/日(A重油で580~1,150L/日相当)と試算された。化石燃料使用量については、導入前は59.3GJ/日(A重油で1,600L/日相当)であり、導入により16.5~37.9GJ/日(A重油で450~1,020L/日相当)へ削減された。

表-3 剪定枝(高位発熱量19MJ/kg-wet、水素含量0.06kg-H/kg-dryと仮定)の水分含量と低位発熱量

水分含量(kg/kg-wet)	低位発熱量(MJ/kg-wet)
0.00	17.7
0.10	15.7
0.20	13.7
0.30	11.6
0.40	9.6
0.50	7.6
0.60	5.6

### 3. 刈草を汚泥脱水助剤として適用する技術

1. で示した課題について、河川等で発生する刈草を下水道事業で受け入れ、汚泥の脱水助剤として活用する技術を開発する。これにより、河川事業においては、刈草の処分にかかる費用の削減、下水道事業においては、凝集剤添加や汚泥処理費用の削減が可能となり、かつ刈草のリサイクルシステムが確立できる。本研究では、裁断したイネ科の刈草を様々な性状の汚泥と混合し、汚泥の脱水性が向上するか否か、実験室レベルで検証を行った。

#### 3. 1. 材料

用いた汚泥の種類、性状を表-4に示す。標準活性汚泥法の汚泥として、A処理場の混合汚泥（以下、標準）、消化汚泥としてA処理場の消化汚泥（以下、消化）、オキシデーショディッチ法（OD法）の汚泥として、B、C処理場の濃縮汚泥（以下、OD1、OD2）を用いた。標準の汚泥は、初沈汚泥の濃縮汚泥と余剰汚泥の濃縮汚泥を、重量比で1対1に混合したものを用いた。A処理場は、消化工程があり、標準活性汚泥法の脱水前の濃縮汚泥が存在しないため、自作した濃縮汚泥を用いた。B、C処理場の汚泥は、濃縮方法が異なるため、汚泥濃度が2.5倍程度異なっている。

標準法の汚泥は、初沈汚泥中に含まれる繊維質によって比較的脱水しやすい汚泥である。消化汚泥は、通常固形物濃度が低く、難脱水性を示すという特徴がある。OD法を採用している処理場は、処理区域が小さく、分流式の排除方式の場合が多いことから、発生汚泥の有機分は70~85%となっており、難濃縮性、難脱水性を示すことが多い<sup>24)</sup>という特徴がある。季節変動による汚泥の性状の相違を考慮し、10月

(秋季)と1月(冬季)の2回採取した。

刈草は、土木研究所敷地内に生息しているイネ科植物を用いた。河川での除草は、多くの地域で5月~7月頃と8月~10月頃の年2回行われており、今回の実験では、10月に収集した刈草を用いた。刈った後、通常の河川での除草と同様、2~3日放置し、その後、刈草の長さが10mm程度になるように、ハサミで裁断した<sup>25)</sup>。刈草の全固形物濃度（Total Solids：TS）は85~87%、有機物濃度（Volatile Solids：VS）は92%程度であり、刈草のTSは、過去の知見<sup>26)</sup>と同程度であった。凝集剤は、カチオン系高分子凝集剤（カチオン度：強、分子量：3百万、溶解液粘度（25度、30rpm、0.5%）：1400）を用いた。

#### 3. 2. 脱水試験方法

凝集剤添加率は、実下水処理場での添加率を考慮して、汚泥のTSに対して、なし、0.5%、1.0%、2.0%とした。刈草混合率は、汚泥TSに対して、0%、10%、30%、50%とした。刈草は、凝集剤と同時に混合した。攪拌にはJarテスターを用い、急速攪拌（120rpm）、1分、緩速攪拌（30rpm）、5分で脱水した。脱水試験は、脱水セル法遠沈管試験を参考に実施した<sup>26)</sup>。50ml容の100メッシュのろ過筒に刈草混合凝集汚泥を投入し、遠心分離機で3,000rpm、20分間の遠心分離を行った。ろ過筒に残った汚泥を脱水汚泥とみなし、下水試験方法<sup>27)</sup>に従って、TSを測定し、含水率を算出した。

刈草は、汚泥よりもTSが高いため、混合するとTSが増加し、見かけ上の含水率は減少する。刈草の混合が、汚泥中の水分量減少に寄与したか否かを確認するため、刈草混合脱水ケーキのTSと水分量から、刈草のみのTSと水分量を差し引くことで、脱

表-4 実験に用いた汚泥の種類、性状

表記	標準*1		消化	OD1	OD2	
	A処理場					B処理場
汚泥の種類	初沈汚泥	標準活性汚泥法の余剰汚泥	消化汚泥	OD法汚泥	OD法汚泥	
濃縮方法	重力	遠心	—	重力	遠心	
TS(%)*2	秋季*3	2.50	2.95	1.03	1.23	2.98
	冬季*3	3.10	3.2	1.13	1.18	2.98
脱水方法	—		遠心	スクリュープレス	ベルトプレス ロータリープレス	
凝集剤添加率(%)*2	秋季	—		1.63	1.36	1.77
	冬季	—		1.47	1.47	1.91
脱水ケーキ含水率(%)*2	秋季	—		77.9	83.0	83.3
	冬季	—		78.9	83.1	83.8

\*1初沈汚泥と余剰汚泥を、重量比1対1混合で作製

\*2標準、消化のTS、凝集剤添加率、脱水ケーキ含水率は、H27年度の月報、OD1、OD2は、H28年度の日報を参照

\*3秋季は、9月~11月、冬季は、12月~2月(OD1、OD2は、12月~1月)の平均値

水ケーキのみの含水率を試算した。

### 3. 3. 実験結果および考察

秋季の TS の実測値は、標準は 2.85 %、消化は 1.33%、OD1 は 1.05%、OD2 は 3.33%、冬季における TS の実測値は、順番に 3.20 %、1.42 %、0.93 %、2.54 %であった。表—1 の実績値と比較して、ほぼ同程度の値で測定できていると考えられる。各汚泥における、秋季、冬季の刈草混合脱水ケーキの含水率、および刈草の TS と水分量を除いた脱水ケーキのみの含水率の結果を図-2 に示す。凝集剤 2 %、刈草混合 0 %での各汚泥の含水率を、実処理場における現状の脱水ケーキの含水率とみなし、表4 での脱水ケーキの含水率の実績値と比較した。秋季における、脱水ケーキの含水率の測定値は、標準は 87.3%、消化は 86.5 %、OD1 は 90.3 %、OD2 は 88.3 %であり、冬季における測定値は、それぞれ順番に 86.0 %、

90.0%、89.8%、90.0%であった。どの汚泥においても、脱水ケーキの含水率は、実績値よりも測定値の方が高かった。実験室レベルでの 50 ml 程度の少量の脱水試験であるため、脱水効果が見えにくく、含水率が高くなった可能性が考えられる。本実験においては、効果の過小評価になっていることが懸念されるが、刈草混合率の変化による含水率の変化の傾向としては、評価可能であるという前提のもと議論することとする。

図-2 より、凝集剤なしの時の刈草混合脱水ケーキ、脱水ケーキのみの含水率は、どの汚泥でも刈草混合率にほぼ比例して低下する傾向を示し、刈草が脱水性を向上させることは示されたと考えられる。刈草混合による脱水性向上の原理は、繊維質等を脱水助剤とした場合<sup>28)</sup>と同様、汚泥中の空隙確保による、汚泥中の水分の抜けが良好に行われるためであると

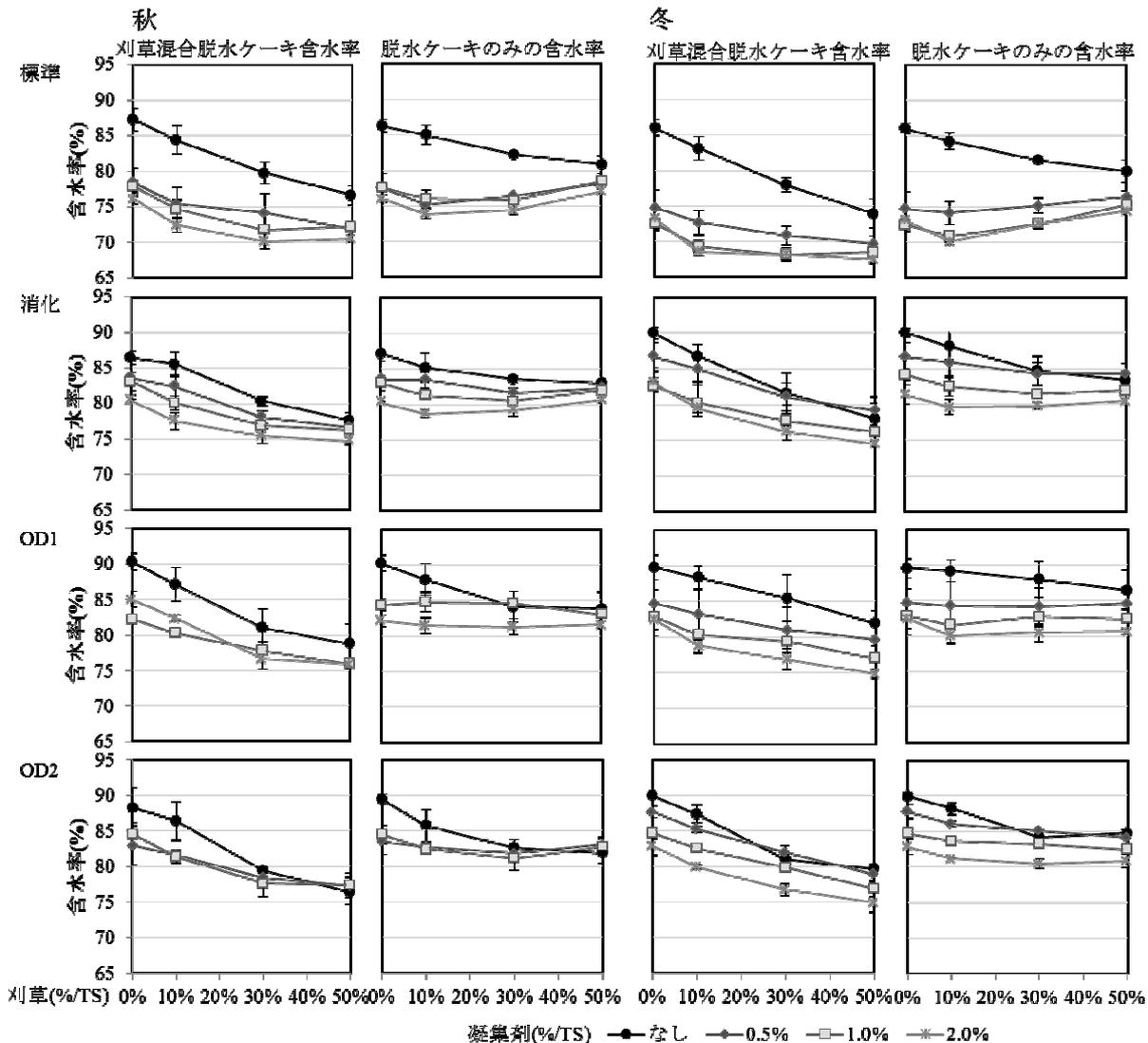


図-2 刈草混合脱水ケーキの含水率と脱水ケーキのみの含水率 (秋季, 冬季)

考えられる。

凝集剤を添加した時の標準では、秋季の脱水ケーキは含水率70%で低減化が頭打ちになっており、凝集剤1%以上、刈草混合30%以上では、効果が変わらない結果となった。冬季の脱水ケーキでは、凝集剤1%以上、刈草混合10%以上で含水率が68%となり、秋季と同様の脱水傾向を示した。脱水ケーキのみの含水率として見ると、秋季、冬季とも凝集剤0.5%以上、刈草混合10%で含水率の低減化が最も良いことが示された。刈草混合10%以上で、含水率が上昇していくのは、刈草混合による脱水効果がみられないことにより、刈草混合率が上昇するほど、脱水ケーキのみの含水率が計算上、上昇するためと考えられる。消化では、脱水ケーキのみの含水率をみると、秋季、冬季とも凝集剤0.5%、1.0%では、刈草30%混合まで含水率の低減化がみられ、凝集剤2.0%では、刈草10%までが効果がある結果となった。OD1においては、冬季において、凝集剤2%のときに、刈草混合0%と比較して、刈草混合10%以上の時に、2.5%程度の低減効果がみられた。OD2では、凝集剤を添加した場合、秋季において、刈草混合50%では、脱水ケーキのみの含水率が上昇した。また、冬季においては、刈草混合50%では、30%と比較して脱水ケーキのみの含水率は変わらなかった。よって、刈草混合30%以下において、含水率の低減効果がみられることが示唆された。

秋季、冬季の季節で比較すると、冬季の方が刈草混合による含水率の低減効果が見えやすい傾向が示された。冬季の汚泥の方が秋季の汚泥よりも有機物含有率が高く、難脱水性を示す傾向があるため、このような結果になった可能性が考えられる。

#### 4. 河川事業等に由来するバイオマスと、下水汚泥との混合嫌気性消化の効率向上技術

河川事業等の公共事業に由来するバイオマスの有望な利用方法の一つとして、下水処理場での下水汚泥との混合による嫌気性消化が考えられ、新潟市での検討事例<sup>29)30)</sup>も報告されており、また、土木研究所においても、既往の調査研究<sup>31)32)</sup>で、刈草(草の葉や茎)について検討し、特殊な前処理を行わなくても裁断のみで、ある程度のメタン転換が期待できることを示してきたところである。一方で、実際の公共事業から発生する、一般的に刈草と呼ばれているバイオマスの中には、草の葉や茎のみならず草の種子や、樹木の堅果(どんぐり)が混在しており、

これらに由来するメタン発生量についても無視することができないと考えられる。

本研究では、公共事業に由来するバイオマス中に混在する種子や堅果に注目し、一例として、堅果(どんぐり)について、下水汚泥との混合消化によるメタン転換ポテンシャルについて検討を行った。

#### 4.1. 実験方法

嫌気性消化槽での、濃縮汚泥および堅果投入による効果を確認するために、消化汚泥、濃縮汚泥および堅果を用いて、消化汚泥のみを添加する系列(ブランク)、消化汚泥に濃縮汚泥のみを添加する系列、ならびに、消化汚泥に濃縮汚泥と堅果を添加する系列について、中温条件(35℃)にて回分式嫌気性消化実験を行った。実験に使用した消化汚泥は、茨城県霞ケ浦浄化センターの濃縮汚泥を基質として、中温条件(35℃)、HRTを20日に設定した嫌気性反応器を連続運転し、そこから得られた余剰消化汚泥とした。実験に使用した濃縮汚泥は、茨城県霞ケ浦浄化センターで、2017年2月に採取したものとした。実験に使用した堅果は、2016年11月~12月にかけて、茨城県つくば市の国土技術政策総合研究所敷地内にて採取したマテバシイ(*Lithocarpus edulis*)の堅果を用いた。なお、採取した堅果は、殻斗を除去し、水道水を満たした容器に投入し、沈降しないものを除去後、ざるを用いて水洗いし、水切りした後、冷蔵保存した。冷蔵保存した堅果は、回分式嫌気性消化実験を行う際に、含水率が60%程度となるように、超純水を加え、ミキサーでペースト状になるまで破碎して使用した。なお、回分式嫌気性消化実験は、2017年2月~3月にかけて実施した。

回分式嫌気性消化実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥400mLを投入し、表-5に示す所定量の濃縮汚泥、堅果を添加し、沸騰後冷ました水道水を加えて500mLとした。その後、反応器内を窒素ガスで十分に置換し密栓後、35℃に調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。

#### 4.2. 分析方法

消化汚泥、濃縮汚泥、冷蔵保存堅果、破碎堅果、実験終了後の培養液の性状分析は、下水試験方法に従って行った。なお、COD<sub>Cr</sub>の分析は、吸光光度計(DR2400、HACH社)により、COD試薬を用いた。アンモニア性窒素濃度の測定には、自動比色分析装置(TRAACS2000、BRANLUEBBE社)を用

表-5 回分式嫌気性消化実験における基質の組成

系列名	投入 消化汚泥	投入基質 (gVS)	
		濃縮汚泥	堅果
1-1	400mL	—	—
1-2	400mL	—	—
2-1	400mL	0.670	—
2-2	400mL	0.670	—
3-1	400mL	0.670	0.132
3-2	400mL	0.670	0.132

いた。発生メタンガス量の測定には、水上置換方式のガス流量計 (BioReactor Simulator AMPTS II, Bioprocess Control) を用いた。

#### 4. 3. 結果および考察

回分式嫌気性消化実験におけるメタン生成量の経時変化を、図-3 に示す。なお、本実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、冷蔵保存堅果、粉碎堅果の TS は 1.8%、3.2%、70.0%、39.5%、VS は 1.1%、2.5%、68.8%、38.9% であった。濃縮汚泥や堅果を投入した系列では、実験開始後 1 週間程度の間は、メタン発生速度が大きかったが、その後は、基質を投入しなかったブランクの系列と同程度にまで、発生速度が低下した。本実験では、実験期間を 18 日間に設定し、各系列における累積メタン発生量、他の系列でのメタン発生量を差し引いて計算される濃縮汚泥、堅果由来のメタン発生量を表-6 に示す。

本実験における、投入基質の単位 VS あたりのメタン発生量は、濃縮汚泥のみを投入した場合で、 $213.3/0.670=318\text{NmL/gVS}$  であった。既往の調査研究で示されている一般的な下水処理場における中温消化での数値 ( $0.36\text{NL/gVS}$ ) に比べてやや小さかったが、これは、濃縮汚泥を採取した下水処理場が窒素・リンの除去を行う高度処理運転を実施していることによるものと考えられる。

また、投入基質として、濃縮汚泥のみを投入した場合 (系列 2) と、濃縮汚泥および堅果を投入した場合 (系列 3) を比較し、投入堅果の単位 VS あたりのメタン発生量を算出すると、 $36.2/0.132=274\text{NmL/gVS}$  となった。この数値は、既往の調査研究結果<sup>31)</sup>で示されている、濃縮汚泥および葉や茎のみの刈草を投入した、中温条件での回分式嫌気性消化実験結果から得られた、投入刈草の単位 VS あたりのメタン発生量 ( $0.118\text{NL/gVS}$ ) と比較すると大きく、一般的な下水処理場における中温消化での

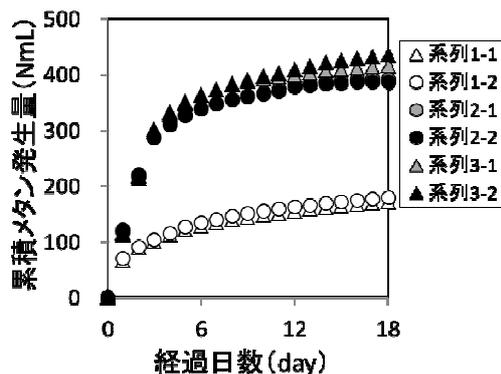


図-3 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量の経時的変化

表-6 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量 (単位: NmL)

系列名	累積メタン発生量	平均値	メタンガスの由来		
			消化汚泥	濃縮汚泥	堅果
1-1	171.7	175.5	175.5	—	—
1-2	179.2				
2-1	391.0	388.8	175.5	213.3	—
2-2	386.6				
3-1	415.6	425.4	175.5	213.3	36.2
3-2	435.2				

下水汚泥のメタン転換率 ( $0.36\text{NL/gVS}$ ) には及ばないものの、既往の調査研究結果<sup>33)</sup>で示されている畜産廃棄物 (牛糞尿  $0.29\text{NL/gVS}$ 、豚糞尿  $0.30\text{NL/gVS}$ ) や食品廃棄物 (じゃがいも  $0.30\text{NL/gVS}$ )、木質廃棄物 (爆砕コナラチップ  $0.21\sim 0.28\text{NL/gVS}$ ) に匹敵する数値であった。

以上の結果より、公共事業に由来するバイオマスの下水汚泥との混合消化によるメタン転換ポテンシャルを評価する際には、刈草中に混在している種子や堅果のポテンシャルについて配慮する必要があると考えられた。

#### 5. まとめ

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

1. 地方自治体における剪定枝の発生量は、一般的に約  $60\text{ kg}/(\text{日}\cdot\text{km}^2)$ が見込まれると考えられた。

2. 直接脱水汚泥と消化脱水汚泥の平均含水率はそれぞれ、76.9%、80.3%であり、流動焼却炉における補助燃料使用量は、それぞれ、脱水汚泥 1kg あたり 593kJ、1,485kJ であった。
3. 簡易的な試算から、剪定枝 5,000kg-wet/日を収集して、乾燥により含水率を 50%から 20%へ削減して、下水汚泥焼却炉で補助燃料として活用することで、化石燃料削減量が、21.4～42.8GJ/日削減される可能性が示唆された。ただし、破碎や乾燥の動力は、試算には含まれていない。
4. 標準活性汚泥法の濃縮汚泥、消化汚泥、OD 法の濃縮汚泥において、刈草混合により脱水ケーキの含水率が低減することが示された。汚泥の TS に対して、10 %程度までの刈草混合では、どのような性状の汚泥でも、汚泥中の含水率が低減する可能性が高いことが示唆された。
5. 公共事業に由来するバイオマス中に混在する種子や堅果に注目し、一例として、マテバシイ堅果（どんぐり）について、下水汚泥との混合消化（中温消化）によるメタン転換ポテンシャルについて検討を行った。回分式嫌気性消化実験の結果、投入堅果の単位 VS あたりのメタン発生量は 0.27NL/gVS と算出され、刈草（葉や茎）を投入基質とした場合のメタン転換率（0.12NL/gVS）に比べて大きかった。
6. 公共事業に由来するバイオマスの下水汚泥との混合消化によるメタン転換ポテンシャルを評価する際には、刈草中に混在している種子や堅果のポテンシャルについて配慮する必要があると考えられた。

## 参考文献

- 1) 公益社団法人日本下水道協会：平成 26 年度下水道白書 p.48、2015
- 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](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/ijikamri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf](http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/gijutsu/gijutsukijunn/ijikamri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf) (参照 2017.2.27)
- 4) 国土交通省国土技術政策総合研究所：わが国の街路樹 VII、国土技術政策総合研究所資料第 780 号、2014
- 5) 独立行政法人土木研究所：公共事業由来バイオマスの資源化・利用技術に関する研究、平成 20 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 4157 号、2009
- 6) 牧孝憲、高橋正人、落修一、三宅且仁、尾崎正明：「全国のダム流木発生量調査」、土木学会論文集 G, Vol.63 No.1, 22-29, 2007.
- 7) バイオマス・ニッポン総合戦略、平成 18 年 3 月 31 日閣議決定
- 8) 八王子市：「剪定枝等のエネルギー化実証事業」報告書、2010、<http://www.city.hachioji.tokyo.jp/kurashi/life/004/a546973/a871645/p007136.html> (参照：2017.3.30)
- 9) 町田市：2015 年度剪定枝資源化センター年間集計表、[https://www.city.machida.tokyo.jp/kurashi/kankyo/gomi/shiryo/shisetu/new\\_senteisi\\_sigenka\\_cenar.files/2015senteisi.pdf](https://www.city.machida.tokyo.jp/kurashi/kankyo/gomi/shiryo/shisetu/new_senteisi_sigenka_cenar.files/2015senteisi.pdf) (参照：2017.3.30)
- 10) 浜松市：浜松市バイオマス活用推進計画、平成 25 年 12 月、2013、<https://www.city.hamamatsu.shizuoka.jp/shin-ene/biomass/documents/bio-keikaku.pdf> (参照：2017.3.30)
- 11) 堺市：堺市一般廃棄物処理実施計画（平成 28 年度）、[https://www.city.sakai.lg.jp/shisei/gyosei/shishin/kankyogomi\\_recy/haikibutsu\\_jisshi/index.files/H28jishi-keikaku.pdf](https://www.city.sakai.lg.jp/shisei/gyosei/shishin/kankyogomi_recy/haikibutsu_jisshi/index.files/H28jishi-keikaku.pdf) (参照：2017.3.30)
- 12) 小濱翔馬、川崎正博、高口洋人：「東京 23 区における剪定枝を活用した木質系バイオマスエネルギー導入に関する研究」、空調和・衛生工学会大会学術講演論文集、2010.
- 13) 国土地理院：平成 28 年全国都道府県市区町村別面積調、<http://www.gsi.go.jp/KOKUJYOHO/MENCHO201610-index.html> (参照：2017.3.30)
- 14) 独立行政法人土木研究所：草木系バイオマスの組成分析データ集、土木研究所資料第 4095 号、平成 20 年 2 月、2008、<https://www.pwri.go.jp/team/recycling/pwri4095a.pdf> (参照：2017.4.3)
- 15) 財団法人日本下水道協会発行：下水道用語集 2000 年版、p.366、2000
- 16) 社団法人日本下水道協会発行：下水道施設計画・設計指針と解説 後編 2009 年版、p.422、2009
- 17) 公益社団法人日本下水道協会発行：平成 26 年度版下水道統計、2016
- 18) オフセット・クレジット（J-VER）制度における温室効果ガス算定用デフォルト値一覧、[http://www.j-ver.go.jp/document/jver\\_default\\_list.pdf](http://www.j-ver.go.jp/document/jver_default_list.pdf) (参照：2017.4.3)
- 19) 社団法人日本下水道協会発行：下水道施設計画・設計

- 指針と解説 後編 2009年版、p.359、2009
- 20) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構：平成 17 年度～平成 19 年度成果報告書「都市バイオマス収集システムを活用するためのエネルギー転換要素研究開発」、2008
  - 21) 独立行政法人土木研究所、独立行政法人産業技術総合研究所、月島機械株式会社、三機工業株式会社：高含水バイオマスの熱化学的エネルギー直接変換技術に関する共同研究報告書、土木研究所共同研究報告書第 423 号、2011
  - 22) 国土交通省国土技術政策総合研究所：B-DASH プロジェクト No.4 廃熱利用型低コスト下水汚泥固形燃料化技術導入ガイドライン（案）、p.123、2014、<http://www.nilim.go.jp/lab/bcg/siryou/tnn/tnn0803pdf/ks0803.pdf>（参照：2017.4.4）
  - 23) 公益社団法人化学工学会、一般社団法人日本エネルギー学会編集：バイオマスプロセスハンドブック、p.76、2012
  - 24) 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 年度版、2014
  - 25) 南山 瑞彦、岡安 祐司、桜井 健介：平成 27 年度下水道関係年報、土木研究所資料第 4347 号、p.16-25、2017.
  - 26) 平松達生 武川幸一：脱水セル法遠沈管試験による遠心脱水機のケーキ含水率推定、第 31 回下水道研究発表会講演集、Vol.48、p.604-606、1994
  - 27) 公益社団法人日本下水道協会：下水試験方法 上巻、2012
  - 28) 碓井 次郎、細川 恒：下水汚泥由来繊維利活用システムについて、第 53 回下水道研究発表会講演集、Vol.53、p.1076-1078、公益社団法人日本下水道協会、2016
  - 29) 山本茂浩：新潟市における再生可能エネルギーの取り組み、第 50 回下水道研究発表会講演集、pp 916-918、2013.
  - 30) 山本茂浩：下水汚泥と刈り草等の混合消化実証実験、第 51 回下水道研究発表会講演集、pp/937-939、2014.
  - 31) 独立行政法人土木研究所：平成 24 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料、第 4275 号、2013.
  - 32) 栗田雄佑、小松俊哉、姫野修司：異なる下水汚泥を用いた刈草と混合嫌気性消化における分解特性の把握、第 51 回下水道研究発表会講演集、pp.940-941、2014.
  - 33) 岡安祐司：嫌気性消化を評価する有機物指標について、再生と利用、No. 153、pp 46-47、2016.

## 公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究

研究予算 : 運営費交付金

研究機関 : 平 28～平 33

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 : 植松龍二、諏訪守、安井宣仁

### 【要旨】

社会活動に重大な影響を及ぼす新たな感染症の発生に伴い、法改正による監視強化や水循環基本計画に基づく新たな衛生微生物指標等に着眼した環境基準等の目標に関わる調査研究、合流式下水道について必要に応じた対策の実施、さらには感染症拡大を防止するなど地域に貢献できる下水道システムの構築が望まれている。こうした中で、消毒耐性を有する新興・再興病原微生物への対応が課題となるが、塩素消毒の強化は放流先生態系への影響が懸念される一方、内水面漁業の振興に関する法律が成立し、残留塩素の水生生物への影響から放流水の規制のあり方が検討されるなど、地域における水利用のための病原微生物に関連した水質管理の重要性が増々高まっている。多様化する新興・再興感染症のリスク要因となる病原微生物に対応した管理技術を構築するためには、体系化された除去、消毒感受性の評価や消毒強化にともなう影響評価が必要である。

本研究は、平成 28～33 年度にかけ、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。具体には、様々なリスク要因に対応した包括的な観点に基づく評価手法の構築と、放流先水利用や異常時・災害時に対応した水処理・消毒技術の開発を目的とするものである。28 年度は、上記①の達成目標に関わる調査・研究として、ふん便汚染の基本的な指標である大腸菌について、下水試料に適した測定法の提案を行うため、複数の特定酵素基質培地を利用した検出定量等に関し比較評価を行った。また、消毒耐性病原微生物に対応した代替指標の提案に関しては、比較的測定が容易かつ下水中に存在、消毒耐性を有すると考えられる大腸菌ファージ (Phage) を対象に、活性汚泥処理水の連続モニタリングを実施することで、代替指標としての利用可能性について検証した。上記②に関わる調査・研究では、実態調査に基づき合流式下水道越流水対策技術の 1 つである雨天時活性汚泥法のノロウイルス (NV) 削減効果を明らかにした。

その結果、複数の特定酵素基質培地を利用した大腸菌の定量評価では、一部の培地では検出濃度比が低くかつ、検出コロニーの疑陽性の割合が若干高かったことから、これらの培地においては下水試料への適用には更なる検証が必要であると考えられた。F 特異性 RNA Phage G1～G4 (Phage G1～G4) を対象とした連続モニタリングの結果では、Phage G2 は検出率、検出濃度がともに高く、また、Phage G3 は検出率と NV 濃度との類似性などの観点から代替指標としての展開の可能性があるものと考えられた。雨天時活性汚泥法による NV 負荷の削減効果は、反応タンク内の MLSS 濃度に依存している可能性が示唆された。

キーワード : 病原微生物、大腸菌ファージ、ノロウイルス、合流式下水道越流水

### 1. はじめに

グローバル化にともなう多様な感染症を含め水系感染症拡大防止に貢献できる下水道システムの構築は、社会的優先度の極めて高い課題として、評価、対策技術を早急に確立する必要がある。従来、大腸菌、一部のウイルスを指標として衛生学的評価を行ってきたが、多種多様な病原微生物の出現により、検出・対策技術の評価が困難となることが予想される。分子生物学的手法の発展により、社会活動に重大な影響を及ぼす病原微生物の知見が集積されつつあり、新興感染症の病原微生物として一部のウイルスや、再興感染症として多剤耐性菌などが大きな社会問題<sup>1) 2)</sup> となっているが、対策手法構築のために

必要な除去・消毒感受性の体系化された研究・調査は進んでいない。公共用水域の水質管理のためには、その水質に大きな影響を及ぼす下水処理場にて、多様化する重大な感染症要因である消毒耐性病原微生物への効率的な対応を図る必要があり、包括的な観点に基づく評価手法を構築した上で、対策手法を提案することが必要である。

本研究では、上記を踏まえ、様々なリスク要因に対応した包括的な観点に基づく評価手法の構築と、放流先水利用や異常時・災害時に対応した水処理・消毒技術の開発を目的とするものである。

28 年度は、達成目標である消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、公共用水域へ及ぼす越流

水の影響評価と対策技術の提案に関わる調査・研究として、下水試料に適した大腸菌の測定法の評価をはじめ、Phage の実態調査および越流水の対策技術として雨天時活性汚泥法による NV の削減効果を把握した。

## 2. 研究目的および方法

### 2.1 消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案

#### 2.1.1 衛生的な基本指標である大腸菌の測定法の評価

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、環境基準項目の 1 つである大腸菌群が大腸菌への変更について検討中であることから、下水処理場における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検討が必要である。大腸菌数の見直しにあたっては、定量評価を行うための測定法を考慮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異なることなど、下水試料への適用にあたっては比較検討を行う必要があると考えられる。

本項では、下水試料に適した大腸菌の測定法を考慮するために必要となるデータの取得を目的に、複数の特定酵素基質培地を利用した定量評価などに関し比較を行った。

#### 1) 特定酵素基質培地

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 5 種類 (培地 A~E) とした。定量法は培地 A、C、D、E は培地中に寒天が含まれていることから混濁法、培地 B では測定試料と試薬混合による発色状況の陽性数を基にした MPN 表から求める最確数法である。評価対象試料は活性汚泥法の二次処理水、二次処理水を  $0.22\mu\text{m}$  のメンブランフィルターでろ過した滅菌ろ過水に大腸菌株を添加したものとし、処理水中の野生の大腸菌、処理水に添加した大腸菌株について各々定量評価を行った。添加した大腸菌は ATCC 25922 株であり、トリプトソイブイオン培地にて増殖させた後、4,000 rpm・10 分間の遠心分離によって菌体を沈殿させ、上澄液を除去し滅菌ミリ Q 水で洗浄を行い再度遠心分離の後、菌体を回収し滅菌ろ過水に添加した。各培地による大腸菌の定量は、同一試料について同時測定、同一人物による操作とした。

#### 2) 希釈水の影響

菌数の定量操作においては、シャーレ中などに形成されるコロニー数が多くなるとコロニーの大きさが全体的に小さくなるため、雑菌との区別が困難となる可能性が

あり、適切な判定を行う上で適量のコロニーを形成させるために測定試料を希釈する場合がある。希釈水としては生理食塩水 (生食)、りん酸塩希釈水 (りん酸)、ペプトン水 (ペプトン)、一部滅菌ミリ Q 水 (ミリ Q) などが利用されており、ここでは、各種希釈水の違いが大腸菌の定量値に及ぼす影響を評価した。対象試料は、上記の滅菌ろ過水に大腸菌株を添加したものと流入下水とした。

#### 3) 検出コロニーの同定

各培地に形成される典型的なコロニー (培地 B は液体培地の発色) は、基本的に大腸菌と推定されるが、疑陽性を示すことも考えられる。また、培地の違いによりコロニーなどの発色状況が異なるが、選定の判断に迷うこともある。このため、各培地によって形成された典型的なコロニーなどを対象に、菌種の簡易同定を行った。試料は二次処理水とし同定における釣菌操作では、他の雑菌等の汚染を防ぐためメンブランフィルター法によりフィルター上に形成されるコロニー数を極力少なくすることで釣菌を容易とした。液体培地では、大腸菌の陽性反応を示した液体試料 (10 と 1 セル分) をペプトン培地上に塗布、培養しコロニーを形成させ釣菌を行った。簡易同定には、ID テスト EB-20 (日水製薬社製) を利用した。

#### 2.1.2 代替指標としての F 特異性 RNA Phage の評価

多様な病原微生物が検出される中で、各々の微生物に特化した検出対応は費用や労力の面から困難であるため、消毒耐性、存在実態、定量性 (PCR 法、培養法) 観点から、代表的な指標を選定し評価することができれば、病原微生物の効率的な管理に資することができると考えられる。上記の観点を踏まえた代替指標の 1 つとしては、ファージの存在が挙げられる。腸管系ウイルスの代替指標としての有用性について下水中での存在実態、消毒耐性の評価例<sup>3)</sup>、細菌、腸管系ウイルスとの塩素消毒に対する耐性比較などに関する報告<sup>4) 5) 6) 7)</sup>があり、また、ウイルス不活化手法の評価<sup>8)</sup>や下水再利用プロセスにおけるモデルウイルスとしての利用例<sup>9)</sup>がある。

本項では、測定が簡易かつ下水中に存在、また、消毒耐性を有すると考えられる Phage を対象に、活性汚泥処理水の連続モニタリングを実施することで、優占種や NV との関連性を把握した。優占種を把握するにあたり、測定した Phage は *E.coli* K12 F<sup>+</sup>(A/λ) 株を宿主菌とした F 特異性 RNA Phage G1~G4 (Phage G1~G4) としたが、これらはヒトおよび動物のふん便由来するものである<sup>8)</sup>。さらに、腸管系ウイルスに関しては感染性胃腸炎の原因ウイルスの 1 つである NV を対象に GI、GII、GIV を併せて測定した。モニタリングは G 下水処理場の二次処理水について、6~1 月の 8 ヶ月間にわたり 32

試料を対象に実施した。Phage、NV の測定は、処理水中のウイルスをポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法で濃縮し、カラム負荷量<sup>10)</sup>を 0.05mg-SS とし て QIACUBE を用いて遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子を逆転写反応量を 0.2 $\mu$ g とし Real-time PCR を全量 50 $\mu$ L に対して 5 $\mu$ L とし て、Taqman プローブと鋳型 DNA を用いた検量線による絶対定量により検出を行った。

## 2.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

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

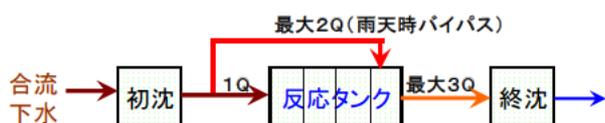


図-1 雨天時活性汚泥法の概略図

NV の測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮は PEG 沈殿法としたが、その後の前処理法は上記の 2.1.2 の方法とは若干異なる。PEG 沈殿法により回収した沈渣を RNase-free 水 (遺伝子分解酵素を除去した水) に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイム RT-PCR 法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute 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 0.5 $\mu$ g をランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN

社) を用い全量 20 $\mu$ L の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 2 $\mu$ L をリアルタイム PCR に供した。NV の検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」<sup>11)</sup> 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 LightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を使用した。逆転写反応に使用する抽出 RNA 量は Spectrophotometer (NanoDrop 社製) により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した<sup>10)</sup>。他の水質分析項目は濁度、SS とした。

## 3. 研究結果および考察

### 3.1 消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案

#### 3.1.1 衛生学的な基本指標である大腸菌の測定法の評価

##### 1) 特定酵素基質培地

滅菌ろ過水に大腸菌株を添加した試料に対する各培地の定量評価結果を図-2 に示す。培地 A の定量値を基準とした検出濃度比として整理した。6~10 ケースの測定を行いケースごとに n=2~9 とした定量値の平均値から算出し、この時の大腸菌の定量範囲は 10~300 CFU/mL 程度であった。培地 C を除けば概ね各培地で定量される値に大きな違いは生じていなかった。また、培地 B を除く各培地は寒天培地による混濁法であり、培地 B の最確数法とは測定法が異なるが、培地 A、D、E と比較して検出濃度比に大きな差はなかった。図中に示した変動係数 (CV) は、一部の培地を除き数%~30%以内であり、比較的安定しているものと考えられた。滅菌ろ過処理水に大腸菌を添加した条件において、各種の特定酵素基質培地による定量評価を行ったが、一部の培地で相対的に定量値が低くなっており、培地の違いにより定量値の違いが生じる可能性があった。図-3 は直接に二次処理水中の

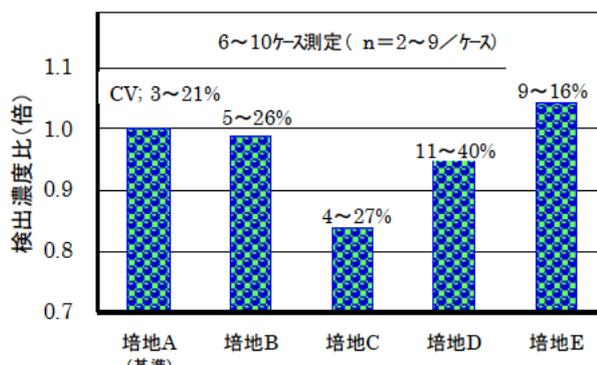


図-2 大腸菌利用による各培地の検出濃度比

大腸菌を定量した結果について示した。上記と同様に、培地 A の定量値を基準とした検出濃度比とした。3 ケースの測定を行いケースごとに n=3~9 とした定量値の平均値であり、各ケースの大腸菌の定量範囲は 50~100CFU/mL 程度であった。大腸菌株利用による測定評価の結果と同様に、培地 C の検出濃度比はやや低い状況にあったが、最確数法による培地 B では、検出濃度比が若干高めであった。全体的には最大の変動係数は概ね 30%以内であったが、最小値は 10%程度と大腸菌株を利用した定量結果と比較して若干上昇していた。

検出定量値が若干高めであれば衛生学的指標として安全側に考慮できる可能性はあるが、野生株の大腸菌と大腸菌株の定量にて、培地 C では他の培地と比較して定量値がやや低かったため、下水試料への適用については更なる検証が必要である。

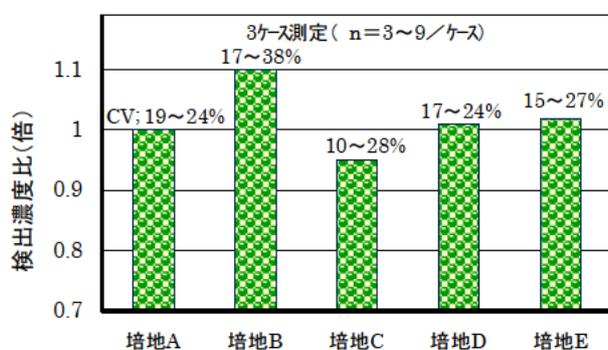


図-3 二次処理水の大腸菌の検出濃度比

## 2) 希釈水の影響

滅菌ろ過水に大腸菌株を添加した試料の定量結果を図-4に示す。培地 A の生食の検出濃度を基準として検出濃度比を整理した。各ケースの大腸菌の定量範囲は 20~90CFU/mL 程度であった。培地 A、E に関しては、りん酸、ペプトン、ミリ Q を希釈水とすることで生食と比較して検出濃度比がやや高くなる傾向が見られ、最大の検出濃度比は同程度であった。培地 C、D では希釈水の違いによる検出濃度比に大差はなかったが、培地 A、E に

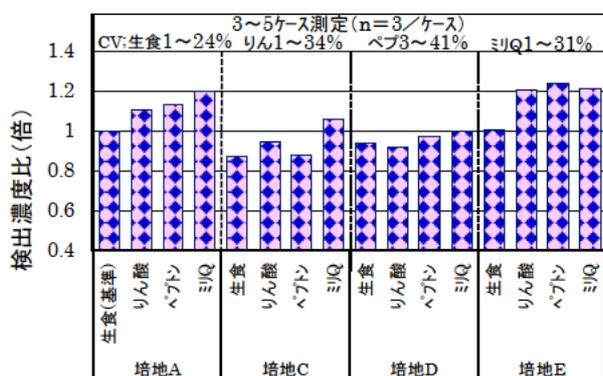


図-4 希釈水の違いによる大腸菌の検出濃度比

比較して検出濃度比がやや低い状況にあった。一方、流入下水を対象とした希釈水の影響評価結果を図-5に示す。各ケースの大腸菌の定量範囲は約 10~130 CFU/mL 程度であった。培地 C を除く他の培地ではりん酸、ミリ Q の検出濃度比が低くなっており、希釈水が検出濃度に及ぼす影響は大きいものと考えられたが、生食やペプトンを利用することで検出濃度比は、培地 A~E ともに同程度となった。CV が 30%を超えるケースが見られたが、この時の検出濃度は概ね 20 CFU/mL 以下であり、低濃度域の定量値にバラツキが見られた。希釈水の影響評価では対象試料や培地が異なることで、大腸菌の検出濃度比に乖離が生じたため、対象試料などの範囲を広げたデータの蓄積が必要であるが、流入下水試料に対してりん酸、ミリ Q を希釈水として利用することで顕著な影響が見られたことから、これらの希釈水の利用は現状では課題があるものと考えられた。

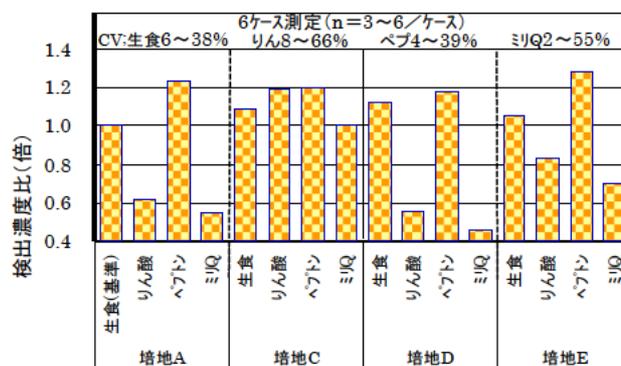


図-5 流入下水を対象とした希釈水の違いによる大腸菌の検出濃度比

## 3) 検出コロニーの同定

各培地による検出コロニーなどの同定結果を表-1に示す。各培地から得られた 20~40 のコロニーを対象とし、釣菌にあたっては他の大腸菌群等のコロニーと重なりが無い独立したコロニーを選定した。培地 A、E における典型コロニーの大腸菌 (*E.coli*) の陽性率は 90%であり、10%のコロニーが疑陽性を示し、培地 C、D では、大腸菌の陽性率はやや低く 80%程度、疑陽性の割合が約 20%であった。培地 B では大腸菌の平均陽性率は 23% (10セルと 1セル評価で大差無) と低い状況であり、陽性試料 1セルの液中約 1.8mL に大腸菌を含めたそれ以外の細菌が存在していた可能性が推定され、陽性率へ影響を及ぼしたことが想定される。各培地で疑陽性を示したコロニーの大部分は腸内細菌科に分類されている種であり、大腸菌を含めた腸内細菌の陽性率としては 83~100%を示していた。大腸菌群用培地を含め特定酵素基質培地を利用しても、腸内細菌の一部が擬陽性を示すとされているが<sup>12)</sup>、培地が異なることで擬陽性の割合に違いが生じる可能性

があった。特に培地 B では他の培地と比較して大腸菌と腸内細菌の陽性率の割合に開きがあったため、評価手法を再検討し今後データを蓄積する必要があると考えられた。

表-1 各培地における検出コロニーなどの同定結果

培地	同定数	同定結果	<i>E. coli</i> 陽性率(%)	腸内細菌陽性率(%)
培地A	20	<i>E. coli</i> (18), <i>Y. frederiksenii</i> (1), その他(1)	90	95
培地B	20(10セル) 20(1セル)	<i>E. coli</i> (6,3), <i>K. pneumoniae</i> (4,0), <i>K. oxytoca</i> (2,0), <i>E. cloacae</i> (4,14), その他(4,3)	23	83
培地C	30	<i>E. coli</i> (24), <i>C. amalonaticus</i> (2), <i>S. liquefaciens</i> (1), <i>S. odorifera</i> (1), その他(2)	80	93
培地D	30	<i>E. coli</i> (25), <i>Y. frederiksenii</i> (1), <i>C. freundii</i> (3), その他(1)	83	97
培地E	20	<i>E. coli</i> (18), <i>C. freundii</i> (1), <i>Kozaena</i> (1)	90	100

( ) 内は同定株数

### 3.1.2 代替指標としての F 特異性 RNA Phage の評価

活性汚泥処理水の連続モニタリングによる Phage と NV の調査結果を図-6 に示す。NV GI、GII は冬季と比較して夏季では 3 オーダー程度の検出濃度の減少傾向が見られたことから、下水処理区域を含めた流域での感染性胃腸炎の流行状況を反映しているものと推定された。モニタリング期間中の NV GI、GII の検出率は 84~100%であったが、NV GIV については、初冬にかけ一部の試料のみの検出となり、多くが検出限界値以下であったため検出率としては 9%と低い状況であった。一方、Phage G1 は 6~9 月の間における検出率は 40%であったが、10 月以降の検出率は 100%となり、秋季から冬季にかけ検出率の上昇傾向が見られた。Phage G2 では NV と同様に検出率が高い状況であったが、他の指標と比較して検出濃度が常に高い状況で推移しており、NV の検出濃度と 2~3 オーダー程度の違いが見られた。Phage G3 は NV と同様に検出率 (94%) が高いことに加え、検出濃度とその推移が NV GI、GII と類似していたが、Phage G4 については、モニタリング期間中の全ての試料

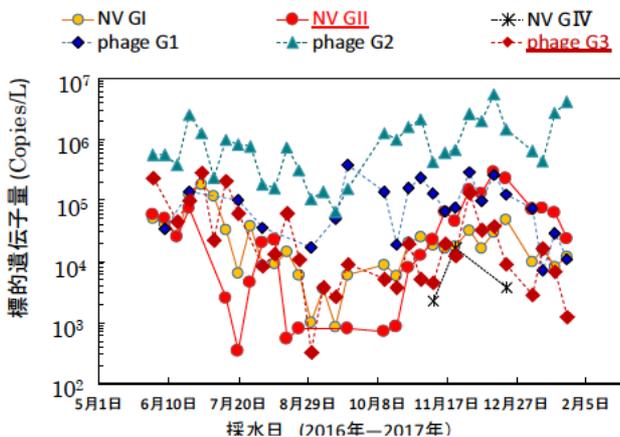


図-6 下水処理水のNVおよびPhage濃度の推移

で検出限界値以下であったため、検出率は極めて低い状況であった。これらの結果から、Phage G2 は検出率、検出濃度がともに高く、また、Phage G3 は検出率と NV 濃度との類似性などの観点から代替指標としての展開の可能性のあるものと考えられた。なお、Phage G2 は GA Phage 等、Phage G3 には Q8 Phage 等が含まれており、ともにヒトふん便由来であることから<sup>8)</sup>、これらの純粋株の適用も考慮する必要がある。

### 3.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

降雨時に越流水対策として雨天時活性汚泥法 (嫌気好気法) を導入している F 市下水処理場における NV 負荷の削減効果の調査結果を図-7 に示す。2 回の調査時の降雨状況は、時間最大降雨量が 5.5mm、7.5mm、累積降雨量は 13.5mm、46.5mm であった。本調査時の雨天時バイパス流入量は最大で 1Q 分であり、晴天時の最大流量に比較して 2Q 分であった。雨天時活性汚泥処理時における NV 負荷の削減効果は、流入負荷量を 1 とし流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ 0.037~0.059 であった。雨天時活性汚泥処理を実施しなかったとすると、晴天時の受け入れ可能な流入水量である 1Q 分を超過した NV の負荷が公共用水域へ直接放流されることとなることから、雨天時活性汚泥処理により放流先河川水への負荷を大幅に低減しているものと考えられた。

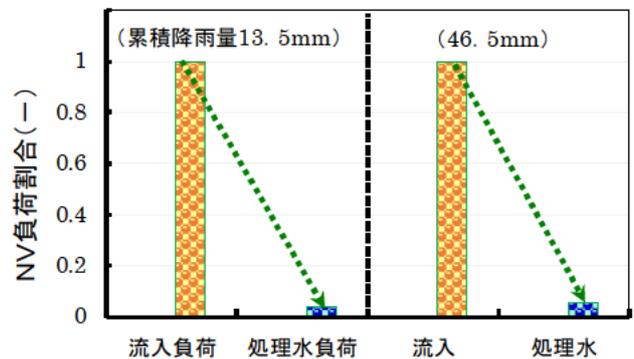


図-7 雨天時活性汚泥処理法のNV負荷の削減効果

また、雨天時活性汚泥処理時における反応タンク内の MLSS と NV 流出負荷の関係について、過去に得られた調査データを加え整理した結果を図-8 に示す。今回の調査結果を含め、雨天時活性汚泥処理開始当初の反応タンク内 (バイパス流入槽の前段での評価) の MLSS は約 1,500~1,700mg/L で推移していたが、NV の流出負荷は MLSS に依存している傾向が見られ、MLSS を若干高めると NV 負荷の削減効果が高まる可能性が明らかとなった。併せて図中に雨天時活性汚泥処理時間を記したが、3.7~13.8 時間の間で NV 流出負荷との関連性は認め

られないため、処理時間の長短よりも反応タンク内の MLSS が NV の除去性に影響を及ぼすものと考えられた。一方、MLSS を若干高めることで雨天時活性汚泥処理時における処理水の SS の変動が懸念されたため、MLSS と処理水の平均 SS を整理し図-9 に示す。MLSS を高めても処理水の SS は上昇傾向を示しておらず、SS の観点から処理水質へ及ぼす影響は小さいものと考えられた。

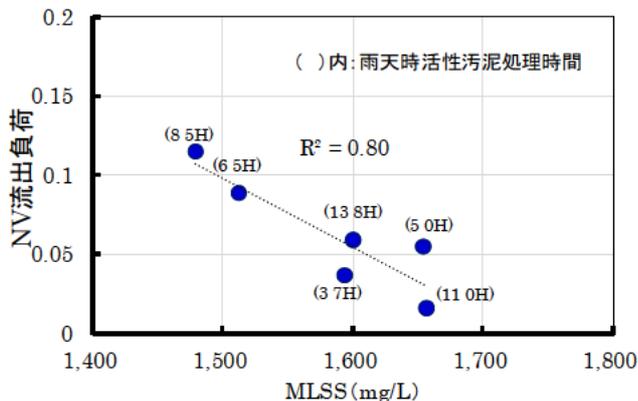


図-8 反応タンク内MLSSとNV流出負荷との関係

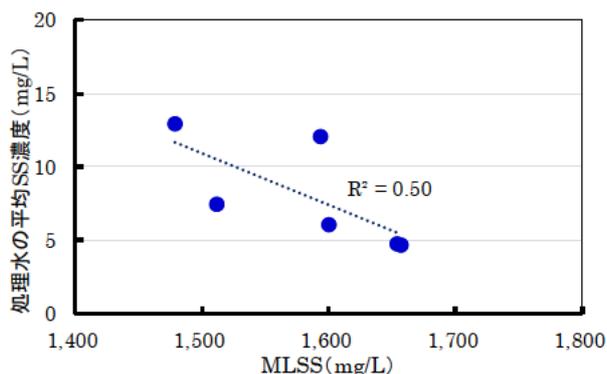


図-9 反応タンクのMLSSと処理水のSSとの関係

他の水質項目との関連として、現地にて簡易かつ迅速な測定が可能である濁度指標と NV 濃度の関係を整理し、図-10、11 に示す。NV 濃度と濁度との間に高い相関関係が見られたことから、濁度を指標とすることで NV 濃度の推移把握が簡易に行える可能性が示唆された。

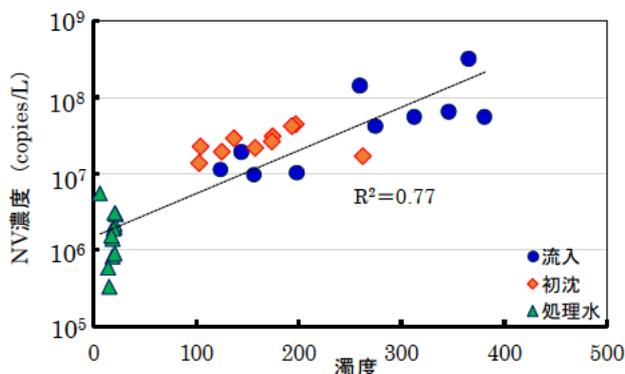


図-10 濁度とNV濃度の関係(調査 I)

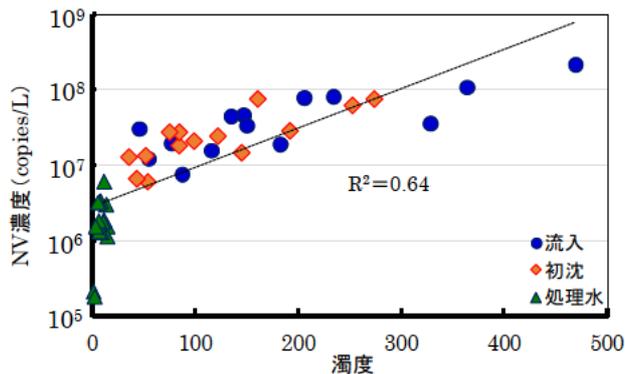


図-11 濁度とNV濃度の関係(調査 II)

#### 4. まとめ

本研究は、様々なリスク要因に対応した包括的な観点に基づく評価手法の構築と、放流先水利用や異常時・災害時に対応した水処理・消毒技術の開発を目的とするものである。28年度は、消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案に関わる調査・研究として、大腸菌の測定法の評価をはじめ、Phage の実態調査や越流水の対策技術として雨天時活性汚泥法による NV の削減効果を評価した。以下に得られた結果を示す。

##### 「消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案」

- 1) 複数の特定酵素基質培地を利用した大腸菌の測定法では、一部の培地で検出濃度比が低くかつ、検出コロニーの疑陽性の割合が若干高かったことから、これらの培地においては下水試料への適用には更なる検証が必要であると考えられた。
- 2) 希釈水の評価結果では、対象試料や培地が異なることで検出濃度比に乖離が生じたため、対象試料の範囲を広げたデータの蓄積が必要であると考えられた。
- 3) 希釈後の大腸菌定量値が概ね 20CFU/mL 以下となることで CV が 30% を超えるケースが見られたため、安定した定量値が得られるよう希釈操作を考慮する必要がある。
- 4) F 特異性 RNA Phage G1~G4 の連続モニタリング結果から、Phage G2 は検出率、検出濃度がともに高く、また、Phage G3 は検出率と NV 濃度との類似性などの観点から代替指標としての展開の可能性があるものと考えられた。

##### 「公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案」

- 5) 雨天時活性汚泥法による NV 負荷の削減効果は、反応タンク内の MLSS 濃度に依存している可能性が示唆さ

れた。

- 6) NV 濃度と濁度との間に高い相関関係が見られたことから、濁度を指標とすることで NV 濃度の推移把握が簡易に行えるものと考えられた。

#### 謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした F 市下水処理場、G 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) G7 伊勢志摩首脳宣言、平成 28 年 5 月 27 日。
- 2) ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- 3) 下水処理水の滅菌及び消毒に関する研究報告書 (1990)、土木研究所資料第 2859 号。
- 4) Sobsey M.D. (1989), Inactivation of Health-Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes, *Wat. Sci. Tech.*, 21(3), 179-195.
- 5) M.C. Snead, V.P. Olivieri, K. Kawata, and C.W. Kruse (1980), The Effectiveness of Chlorine Residuals in Inactivation of Bacteria and Viruses Introduced by Post-Treatment Contamination, *Wat. Sci. Tech.*, 14, 179-195.
- 6) J.A. Tree, M.R. Adams, and D.N. Less (1997) Virus Inactivation During Disinfection of Wastewater by Chlorination and UV Irradiation and the Efficacy of F+ Bacteriophage as a Viral Indicator, *Wat. Sci. Tech.*, 35(11-12), 227-232.
- 7) S.R. Rippey and W.D. Watkins (1992) Comparative Rates of Disinfection of Microbial Indicator Organisms in Chlorinated Sewage Effluents, *Wat. Sci. Tech.*, 26 (9-11), 2185-2189.
- 8) ウイルス不活化手法の大腸菌ファージによる評価(1993)、土木学会衛生工学委員会編、環境微生物工学研究法。
- 9) 「21 世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価」に関する研究調査報告書 (2016)、土木研究所資料第 4313 号。
- 10) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子(2009)、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*, 46(561), 91-101.
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について。
- 12) (公社) 日本下水道協会、下水試験方法下巻 (2012 年版)、252-253.

# 再生水の利用促進に向けた病原微生物と 消毒副生成物の制御手法に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 28～平 31

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：植松龍二、諏訪守、安井宣仁

## 【要旨】

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

本研究は、平成 28～31 年度にかけ、①再生処理水質と生物膜生成要因の解明、②水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明、③消毒効果の観点での再生処理技術の評価、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。具体には、再生原水を含め再生水中の同化性有機炭素（AOC：Assimilable Organic Carbon）等の実態調査により、その現状と変動要因を明らかにし、生物膜との関係を把握する。また、再生処理プロセス等による AOC 等の低減にともなう、消毒効果の向上効果を大腸菌とウイルスで評価するとともに、消毒副生成物の生成への影響を評価する。それらの結果を踏まえ、再生水の利用用途に応じた再生処理技術の提案を行うものである。28 年度は、我が国における再生水利用の実態を整理した。次いで、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける AOC とノロウイルス（NV）や大腸菌 Phage（Phage）の消長把握を行った。

その結果、再生処理法は塩素処理、砂ろ過、ストレーナ、オゾン、紫外線などの順で多かった。消毒プロセス別に再生水の利用用途を整理すると、塩素処理単独の場合には散水利用、オゾン併用処理では水洗トイレ用水、紫外線併用処理では修景用水利用の箇所数が多くを占めていた。下水再生処理施設などにおける AOC の実態調査では、生物膜処理や生物学的高度処理法などを経ることで AOC の低減化が図られていたが、オゾン処理により一部の試料で上昇傾向が見られた。再生水中に残存している  $\text{NH}_4\text{-N}$  や  $\text{PO}_4\text{-P}$  も AOC に影響を及ぼしている可能性があることから、これらの栄養塩類の制御にも留意が必要であると考えられた。生物膜・オゾン・塩素処理を行った再生水中からは NV、Phage とも検出されなかった（除去率 4.1log 以上）。

キーワード：再生水、AOC、ノロウイルス、消毒

## 1. はじめに

再生水は安定した水資源であるため、再利用への関心が高まっている一方で、現状の再利用率は 2%未満である<sup>1)</sup>。再生水の利用にあたり、衛生学的安全性を確保するため、責任分界点における残留塩素濃度を維持する必要があるが、再生処理水質などの影響で塩素が消費されることから、塩素を高濃度で注入する必要がある。このため、維持管理費や消毒副生成物、施設管路の腐食等の課題が懸念される。特に、再生水中の AOC の存在は、消毒剤を消費する生物膜生成要因の 1 つと推定されるが、下水再生処理プロセスでの調査、研究例は少ない。再生水の利用促進のためには、維持管理費の低減、かつ消毒副生成物の制御、消毒効果維持の観点から再生処理水質を安定

化させる必要がある。消毒剤の消費要因の解明とその制御手法を提案することが必要である。

本研究は、再生処理水質が消毒剤消費や消毒効果に及ぼす影響を評価し、消毒剤の消費要因および消毒副生成物を制御することで、維持管理費の低減と、再生水の安全性の確保の両立を図り、再生水利用の促進に資することを目的とする。28 年度は、我が国における再生水利用の実態を整理した。次いで、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける AOC と NV や Phage の消長把握を行った。

## 2. 研究方法および結果

## 2.1 再生処理水質と生物膜生成要因の解明

### 2.1.1 再生水利用の実態

再生水利用の実態把握を目的に、下水道統計を基にして各再生処理法の導入箇所数や、各消毒法における再生水の利用用途について整理を行った。下水道統計26年度版によると<sup>2)</sup> 下水再生水を場外利用している処理場は約280か所あり、用途別再利用状況としては、修景用水、河川維持用水、融雪用水、事業所等への直接給水、水洗トイレ用水、親水用水などに大別される。再生処理プロセスは塩素処理、砂ろ過、ストレーナ、オゾン、紫外線の順で多かった(図-1)。図-2には各消毒法における再生水の利用用途を示す。消毒プロセスに限って見た場合、塩素処理単独の処理施設は33箇所であるが、その再生水の利用用途の多くが散水利用によるものであった。また、他の消毒法としてオゾンの導入施設は21箇所、紫外線消毒は16箇所があり、それらの多くは他の処理プロセスとの併用処理であるが、オゾン処理での利用用途は水洗トイレ用水、紫外線消毒では修景用水利用が多くを占めていた。衛生的安全性の向上に加え、オゾン処理では再生水の色や臭いへの対応、紫外線では放流生態系への影響などを考慮して導入しているものと推定される。

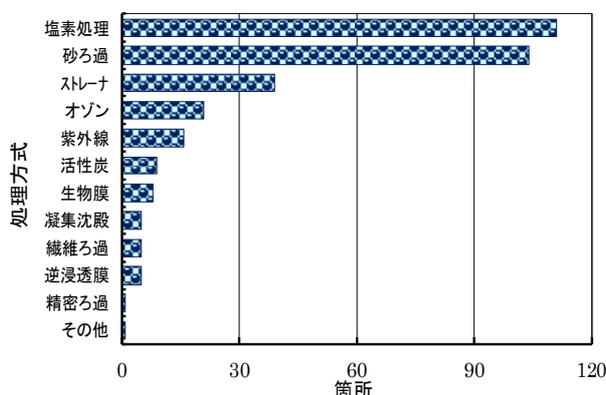


図-1 各再生処理法の導入箇所数  
(下水道統計のデータを基に作成)

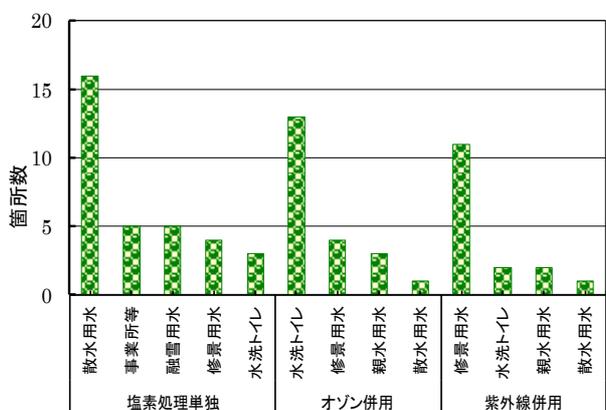


図-2 各消毒法における再生水の利用用途  
(下水道統計のデータを基に作成)

### 2.1.2 下水再生処理施設における AOC の実態

#### 1) 調査目的

下水再生水利用における水質基準項目としての残留塩素濃度は遊離 0.1~結合 0.4mgCl/L 以上であるが<sup>3)</sup>、水質性状などにより塩素が消費されることで、注入濃度を高める課題がある。消費要因の1つには施設配管内などの生物膜の生成が推定され、その生成要因としては再生水中の AOC の存在が考えられる。

本項では、再生処理施設などにおける AOC の実態把握を目的として、再生処理プロセスごとに、その消長調査を行った。

#### 2) 調査方法

調査は A 下水処理場内の B 再生処理施設を対象とした。再生処理法は活性汚泥二次処理水を原水として、生物膜ろ過 (HRT6 時間)、オゾン処理 (HRT3 時間、オゾン注入量 6mg/L)、塩素処理 (ライン注入、約 14~16mgCl/L) を行っており、再生水の利用用途は場外施設の水洗トイレや修景用水である。各プロセス前後の試料を採水することで AOC の消長を把握した。また、比較対象として C 下水処理場の二次処理水および生物学的高度処理水を含めた。

AOC の測定法は、下水試験方法に準拠した<sup>4)</sup>。試験用の菌株は *Pseudomonas fluorescens* (現名: *Pseudomonas brenneri* (P17: ATCC49642)) 株、*Aquaspirillum* sp. (現名: *Herminiimonas* sp. (NOX: ATCC49643)) 株を利用し、各々の試験用菌液を調整した。酢酸ナトリウムを添加した塩類溶液に各菌液を接種、培養しコロニー数と酢酸ナトリウムに由来する有機炭素の濃度との関係を求め、収率係数を算出した。収率係数は P17 株が  $4.17 \times 10^6$  CFU/酢酸-C $\mu$ g、NOX 株が  $1.02 \times 10^7$  CFU/酢酸-C $\mu$ g であった。

その他の水質分析項目は水温、pH、窒素 (NH<sub>4</sub>-N)、りん (PO<sub>4</sub>-P)、残留塩素などを測定した。NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P の測定は自動比色分析装置 (ピーエルテック社製 QuAAtro2-HR) により測定した。

#### 3) 調査結果

再生処理施設における AOC の実態調査結果を表-1 に示す。各試料の AOC の構成は P-17 株によるものが 82~99%以上を占めていた。再生水の原水である二次処理水の総 AOC 濃度は約 120~240 $\mu$ g/L であるのに対し、生物膜処理水では約 80~100 $\mu$ g/L に半減していた。オゾン処理後の試料では約 15~230 $\mu$ g/L で推移しており、一部上昇傾向が見られた。生物膜処理水、オゾン処理水を実験的に 0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過した試料では、生物膜処理水で約 2~11 $\mu$ g/L となっており、ろ過

表-1 再生処理プロセスにおけるAOCの実態

試料		AOC-P17 ( $\mu\text{g/L}$ )	AOC-NOX ( $\mu\text{g/L}$ )	総AOC ( $\mu\text{g/L}$ )
B再生処理施設	活性汚泥法処理水(滞)	196.6	42.2	238.8
	生物膜処理水(滞)	67.1	12.4	79.5
	オゾン処理水(滞)	12.3	2.65	14.9
	再生水(塩素処理(滞))	12.7	0.18	12.9
	活性汚泥法処理水	110.3	13.7	124.0
	生物膜処理水	86.3	17.6	104.0
	オゾン処理水	220.6	6.47	227.1
	再生水(塩素処理)	12.3	0.05	12.3
	生物膜処理水(0.45 $\mu\text{m}$ ろ過)	1.53	0.24	1.77
	オゾン処理水(0.45 $\mu\text{m}$ ろ過)	10.8	0.15	10.9

(滞)は施設滞留時間を考慮し、その他はスポット採水による

処理を行うことで AOC の低減効果の可能性が見込まれた。

比較対象として C 下水処理場の二次処理水および生物学的高度処理水の測定結果を表-2 に示す。各試料の AOC の構成は P-17 株によるものが約 60~80%を占めていたが、B 再生処理施設の試料と比較して若干割合が低い状況であった。流入下水の総 AOC 濃度は約 310 $\mu\text{g/L}$  であるのに対し、各処理水では 10 $\mu\text{g/L}$  以下に低減しており、B 再生処理施設の活性汚泥処理水と比較して大きな違いが見られた。

表-2 他のプロセスにおけるAOCの実態

試料		AOC-P17 ( $\mu\text{g/L}$ )	AOC-NOX ( $\mu\text{g/L}$ )	総AOC ( $\mu\text{g/L}$ )
C下水処理場	流入下水	232.6	76.5	309.1
	A <sup>2</sup> O法	0.02	0	0.02
	循環式硝化脱窒法	1.61	1.08	2.69
	修正Bardenpho法	1.27	0.33	1.60
	凝集剤添加活性汚泥法	6.95	2.45	9.41
	活性汚泥法処理水	1.03	0.48	1.51

このため、細菌の増殖に関与する物質の1つと考えられる  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  と総 AOC の関係について整理を行い図-3、4に示す。再生水中(処理水)の  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度が 5 $\text{mg/L}$  を超えることで総 AOC が上昇傾向を示しており、密接な関係があるものと考えられた。また、 $\text{PO}_4\text{-P}$  との関係については、 $\text{NH}_4\text{-N}$  と比較して若干のパラツキが見られたが、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度が 0.2 $\text{mg/L}$  程度を超えることで総 AOC の上昇傾向が示されており、 $\text{NH}_4\text{-N}$  に加え  $\text{PO}_4\text{-P}$  が再生水中の AOC に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

本調査から再生処理施設や生物学的高度処理法における再生水中(処理水)の AOC の実態が明らかとなり、生物膜処理や生物学的高度処理法などを経ることで AOC の低減化が図られる可能性があった。バクテリアの増殖防止には AOC 濃度を 10 $\mu\text{g/L}$  以下にする必要があると

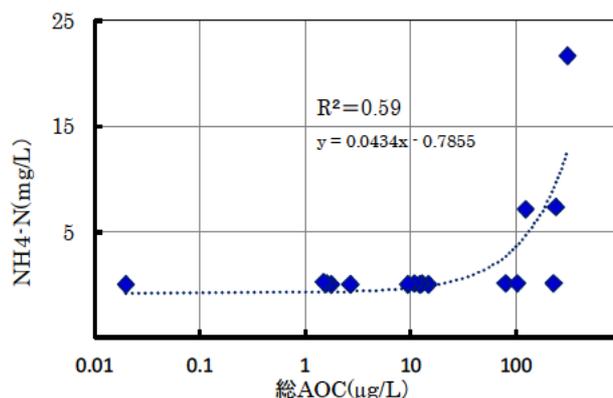


図-3 総AOCと $\text{NH}_4\text{-N}$ の関係

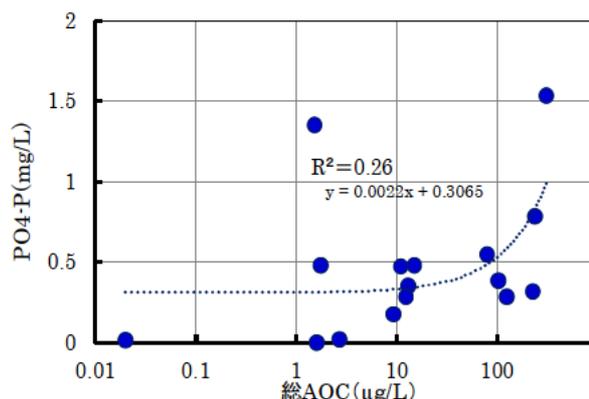


図-4 総AOCと $\text{PO}_4\text{-P}$ の関係

の報告<sup>5)</sup>があるが、一部のオゾン処理後水や再生水において超過していた。オゾン処理後における AOC の濃度上昇への課題とともに再生水中等に残留している  $\text{NH}_4\text{-N}$  や  $\text{PO}_4\text{-P}$  も AOC に影響を及ぼしている可能性があることから、これらの栄養塩類の制御にも留意が必要であると考えられた。

### 2.1.3 再生処理施設における NV、Phage の消長

#### 1) 調査目的

再生水を水洗、散水、親水利用する際には衛生的安全性を担保するために、大腸菌濃度や残留塩素濃度が設定されているが<sup>3)</sup>、大腸菌に比較して塩素消毒耐性があるウイルスの存在が危惧される。より衛生的安全性を高めるためには、ウイルスも含めた評価が必要であると考えられる。本項では、衛生的指標である大腸菌よりも塩素消毒耐性があり、集団感染発生要因となる NV を対象に、上記の再生処理施設における低減効果の把握を目的として実態調査を行った。また、消毒耐性を有すると考えられる Phage を含めて測定を行った。

#### 2) 調査方法

上記 B 再生処理施設における AOC の測定試料を対象に NV と Phage の定量を行った。NV の測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮はポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法とし、PEG 沈殿法により回収した沈渣

を RNase-free 水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。濃縮液中のウイルスは、リアルタイム RT-PCR 法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute 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、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 20µL の系で逆転写させ cDNA を作製し 5µL をリアルタイム PCR に供した。NV の検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」<sup>6)</sup> 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 製) を使用した。逆転写反応に使用する抽出 RNA 量は Spectrophotometer (NanoDrop 社製) により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した<sup>7)</sup>。また、NV と併せて調査した Phage は、E.coli K12 F+(A/A)株を宿主菌とした直接プラークにより測定を行った。

### 3) 調査結果

B 再生処理施設における NV と Phage の消長把握結果を図-5 に示す。活性汚泥二次処理水を原水とした生物膜処理による NV と Phage の除去率は低く Phage で最大 0.5log 程度であった。生物膜処理後のオゾン処理では NV の除去率は最大 2log 程度、Phage は 3.5log に向上した。さらに、オゾン処理後の塩素処理水（再生水）では全て

の試料において NV、Phage とともに不検出であった。この時の PCR の実測値を 1copy（検出限界値）と仮定して除去率を算出すると NV は約 3.1~3.5log、Phage では 4.1log 以上となった。NV と Phage の除去率に差が見られたが NV は遺伝子定量法、Phage は感染価による評価であるため、実際の除去率は Phage の値に近似しているものと推定される。なお、採水時における再生水の残留塩素濃度は、滞留時間考慮した試料で遊離 7.2mg/L、結合 10.4 mg/L、スポット試料では遊離 5.2mg/L、結合 6.4 mg/L であった。

### 3. まとめ

本研究は、再生処理水質が消毒剤消費や消毒効果に及ぼす影響を評価し、消毒剤の消費要因および消毒副生成物を制御することで、維持管理費の低減と、再生水の安全性の確保の両立を図り、再生水利用の促進に資することを目的とするものである。28 年度は、我が国における再生水利用の実態を整理した。次いで、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける AOC と NV や Phage の消長把握を行った。以下に得られた結果を示す。

- 1) 再生処理法は塩素処理、砂ろ過、ストレーナ、オゾン、紫外線などの順で多かった。
- 2) 消毒プロセス別に再生水の利用用途を整理すると、塩素処理単独の場合には散水利用、オゾン併用処理では水洗トイレ用水、紫外線併用処理では修景用水利用の箇所数が多くを占めていた。
- 3) 生物膜処理や生物学的高度処理法などを経ることで AOC の低減化が図られていたが、オゾン処理後水では一部の試料で上昇傾向が見られた。
- 4) 再生水中に残存している NH<sub>4</sub>-N や PO<sub>4</sub>-P も AOC に影響を及ぼしている可能性があることから、これらの栄養塩類の制御にも留意が必要であると考えられた。
- 5) 生物膜・オゾン・塩素処理を行った再生水中からは NV、Phage とともに検出されなかった（除去率 4.1log 以上）。

### 謝辞

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

### 参考文献

- 1) (公社) 日本下水道協会、日本の下水道、平成 24 年度下水道白書。
- 2) (公社) 日本下水道協会、平成 26 年度下水道統計。

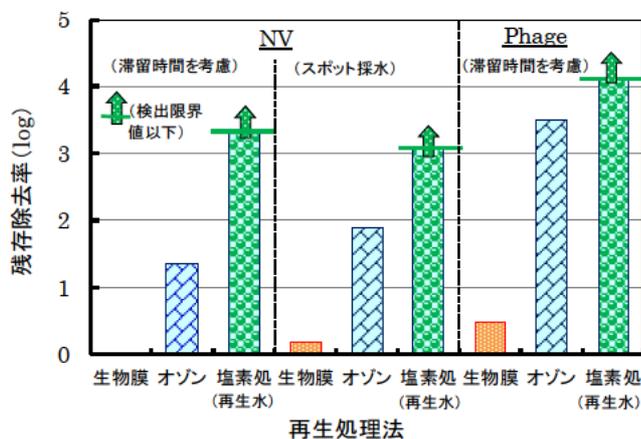


図-5 再生処理プロセスごとのNVとPhageの除去率

- 3) 下水処理水の再利用水質基準等 マニュアル、国土交通省都市・地域整備局下水道部、国土交通省国土技術政策総合研究所、平成 17 年 4 月.
- 4) (公社) 日本下水道協会、下水試験方法 (下巻)、387-389.
- 5) Dirk van der Kooij (1992), Assimilable Organic Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth, JOURNAL of AWWA pp.57-65.
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について.
- 7) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2010)、ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、47(571),pp.103~111.

## 新規省エネルギー型下水処理技術の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 26～平 29

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、岡安祐司、桜井健介

【要旨】省エネルギー型下水処理技術の開発を目指し、下水処理場へ流入した下水を用いて、散水負荷  $20\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$  で、散水ろ床実験装置を連続的に運転した結果、 $\text{T-COD}_{\text{Cr}}$ 、 $\text{H-COD}_{\text{Cr}}$ (沈澱池で除去が困難な  $100\mu\text{m}$  以下の粒子に由来する  $\text{COD}_{\text{Cr}}$ )、 $\text{S-COD}_{\text{Cr}}$ ( $1\mu\text{m}$  以下の粒子に由来する  $\text{COD}_{\text{Cr}}$ )の平均除去率は 61%、61%、47%であった。平均  $\text{H-COD}_{\text{Cr}}$ は、全 7 回採水したうち、5 回は目安として設定した  $68.5\text{mg/L}$  を下回った。また、最初沈澱池流出水に対して、部分循環式嫌気性ろ床装置を連続的に適用した結果、嫌気性ろ床部分（最初沈澱池流出水～嫌気性ろ床流出水）における  $\text{T-COD}_{\text{Cr}}$ の除去率は、流入下水に対して 19%であった。さらに後段に設置した曝気槽 HRT 4hr の仕上げ好気処理装置においては、溶解性有機物の安定した除去を達成し、余剰汚泥の発生量は、標準活性汚泥法に比べて 1/7 程度であった。

キーワード：散水ろ床、活性炭、溶解性有機物、担体、嫌気性処理

### 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>。

本研究は、従来の消費電力の多い浮遊性微生物法（オキシデーションディッチ法や標準活性汚泥法等）とは異なる、担体や付着性微生物を活用した省エネルギー型下水処理技術の開発を行うことを目的とする。

平成 28 年度は、下水処理場へ流入した下水を用い、昨年度から散水負荷を高めて、散水ろ床実験装置を連続的に運転し、流出水の性状把握を行った。また、最初沈澱池流出水を、付着性嫌気性細菌を保持する担体を充填した嫌気性ろ床にて処理し、さらに、後段で仕上げ好気処理した場合の、負荷削減効果を検討した。

### 2. 散水ろ床法の流出水の性状把握

#### 2.1 目的

散水ろ床法に要する電力消費量は、一般に標準活性汚泥法の 1/2～1/4 程度であり<sup>4)</sup>、消費エネルギーの観点からは優れた下水処理方法である。しかし、処理水の透視度が劣るなどの課題が指摘されている<sup>5)</sup>。本研究では、処理水質を把握するため、連続的に最初沈澱池越流水を散水し、流出水の性状を分析した。有機物指標( $\text{COD}_{\text{Cr}}$ )の分析にあたっては、全体の  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  ( $\text{T-COD}_{\text{Cr}}$ )および溶解性  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  ( $\text{S-COD}_{\text{Cr}}$ )に加えて、Schubert と Gunthert<sup>6)</sup>が、散水ろ床流出水中の直径  $100\mu\text{m}$  以上の粒子は、最終沈澱池で除去されたことを報告していることから、沈澱池で除去が困難な  $100\mu\text{m}$  以下の粒子に着目し、 $100\mu\text{m}$  ろ紙でろ過した試料の  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  (本研究では  $\text{H-COD}_{\text{Cr}}$  と呼ぶ)も測定した。

#### 2.2 実験方法

製作した散水ろ床実験装置の断面図を図 1 に示した。本装置は、直径 300mm の円筒状であ

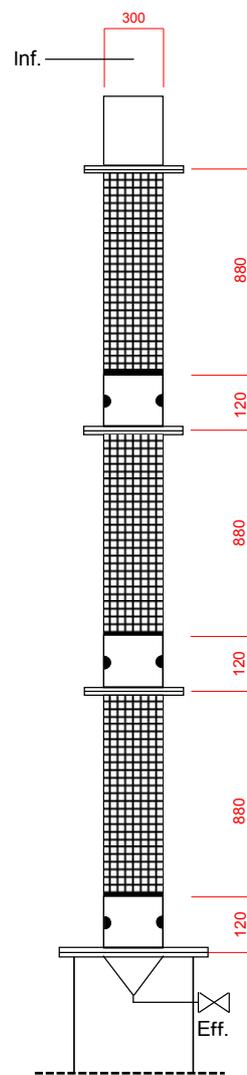


図 1 散水ろ床実験装置の断面図(単位は mm)

る。図1中の網掛け部分は、プラスチック担体(BIO-15、ゼビオプラスト社)を充填したエリアを示し、有効高さは2.64mとした。プラスチック担体の大きさは、直径15mm、高さ15mm、厚さ1mmの円筒状であり、比表面積は450m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>である。また図1中の黒色で着色された半円(6箇所)は、内径20mmの通気口を示す。

本装置を屋内に設置し、一部合流式を含む下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、越流水を、散水ろ床実験装置の流入水としてポンプで送水し、上部から連続的に散水した。また、散水ろ床実験装置の下部から流出水を採取した。散水ろ床実験装置への散水負荷は、昨年度<sup>7)</sup>の2倍となる20m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>・d)とし、低水温期を中心に11月から翌年3月まで運転した。

流入水と流出水を月に1~2回の頻度で計7回、採取し、水温、T-COD<sub>Cr</sub>、H-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub>を測定した。分析方法は、次のとおり行った。水温の測定にはポータブルpH計(東亜DKK株式会社、HM-30P)を使用した。T-COD<sub>Cr</sub>、H-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub>の測定は吸光光度計DR3900および試薬(ともにハック社)を用いた。H-COD<sub>Cr</sub>の測定は、孔径100μmのナイロンネットフィルター(メルクミリポア社)のろ過試料を用いた。S-COD<sub>Cr</sub>の測定は、ガラス繊維ろ紙(ワットマン社、GF/B)のろ過試料を用いた。

### 2.3 実験結果

散水ろ床実験装置の流入水と流出水の平均T-COD<sub>Cr</sub>、H-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub>とそれらの除去率を表1に示した。それぞれの除去率は、61%、61%、47%であった。昨年度実施した散水負荷10m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>・d)の時<sup>7)</sup>と比べて、散水負荷を20m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>・d)に高めても、T-COD<sub>Cr</sub>、H-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub>のいずれの項目も除去率が低下することはない。また、最終沈殿池を付加しても除去が困難なH-COD<sub>Cr</sub>について、目標値の目安を68.5mg/L(COD<sub>Cr</sub>とBODの関係式<sup>8)</sup>を用いた時のBOD15mg/Lに相当)とする時、全7回採水したうち、5回は目安を下回った。

表1 散水ろ床実験装置の流入水と流出水の平均COD<sub>Cr</sub>とその除去率(11月~翌年3月)

	T-COD <sub>Cr</sub>	H-COD <sub>Cr</sub>	S-COD <sub>Cr</sub>
流入水(mg/L)	164	146	63
流出水(mg/L)	63	57	34
除去率(%)	61	61	47

## 3. 都市下水処理工程からの有機物回収効率向上に関する検討

### 3.1 研究内容

流入下水中に含まれる溶解性有機物は、曝気槽にて酸化されて二酸化炭素として大気中に放出されるのが一般的である。下水処理場での電力消費の約50%は水処理が占めており<sup>9)</sup>、曝気のために必要な電気エネルギーは無視できない。曝気槽への負荷削減手法として、最初沈殿池で凝集剤を添加し、溶解性有機物の一部を最初沈殿池汚泥として回収する前凝集処理<sup>10) 11) 12)</sup>や、浮上担体を用いて、最初沈殿池での浮遊性物質回収効率を向上させる手法<sup>13)</sup>が実証されているものの、最初沈殿池で分離できない溶解性易分解性有機物の処理は必要である。こうした溶解性有機物の除去手法として、本研究では附着性嫌気性細菌による処理に注目した。最初沈殿池流出水、附着性嫌気性細菌を保持する担体を充填した嫌気性ろ床にて処理し、さらに、後段で仕上げ好気処理した場合の、負荷削減効果を検討した。

### 3.2 実験方法

嫌気性処理実験に用いた部分循環式嫌気性ろ床実験装置の概念図を図2に示す。内径300mmの円筒状で、底面から水面までの高さは1200mmである。図の網掛け部分(底面から200mm~600mmの間)にプラスチック担体(BIO-15、ゼビオプラスト社)を充填し、ろ層厚を400mmとした。ろ材の上端部分には直径5mmの穴を20mm間隔に空けた塩ビ板を固定し、ろ材の流出を防止した。本装置を屋内に設置し、一部合流式を含む下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、処理水をポンプで底部より連続的に注入した。流量は、線速度が5mm/min.となるように設定した。また、ろ材を通過した液を、800mm地点から底面付近へ、流入水の流量に対して2倍の流量で液を循環した。ろ材部分における通過速度は15mm/min.、底面から800mm~1200mm部分での通過速度は5mm/min.、装置全体の水理学的滞留時間(HRT)

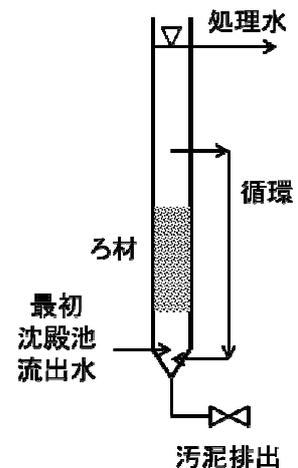


図2 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の概念図

は 4h である。余剰汚泥の排出は、底部より 1 週間に 1 回、1L 引き抜くことで行った。次に、嫌気性ろ床実験装置の後段の仕上げ好気処理実験装置の概念図を図 3 に示す。曝気槽は、内径 370mm、有効水深 372mm、有効容量 40L の円筒状で、底面上に設置したエアストーンを通じて、大気を水中へ送り込み、曝気した。曝気槽の後段には、400mm、有効水深 750mm の円形沈殿池を設け、活性汚泥と処理水の固液分離を行った。この実験装置に、嫌気性ろ床実験装置の処理水をポンプで連続的に注入した。流量は 10L/h とし、曝気槽における HRT は 4h、沈殿池における水面積負荷、HRT はそれぞれ  $1.91\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{日}$ 、4h とした。余剰汚泥の排出は、曝気槽における混合液を 1 日あたり 1L 採取することで行った。なお、実験に先立ち、馴致期間として約 4 か月設定し、実験は 3 月～6 月の期間で行った。

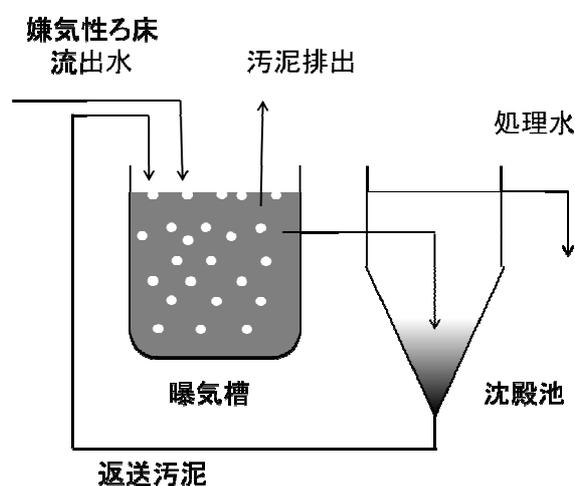


図 3 仕上げ好気処理実験装置の概念図

### 3.3 実験結果

流入下水、最初沈殿池流出水、部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流出水、仕上げ好気処理実験装置の流出水の T-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub> の平均値と、流入下水から各工程の流出水の間除去率を表 2、表 3 に示した。なお、試料は 1 週間に 1 回程度の頻度でグラブサンプルを採取した。T-COD<sub>Cr</sub> の流入下水からの除去率は、最初沈殿池流出水、嫌気性ろ床流出水、好気処理流出水で、それぞれ 21%、40%、84% であった。また、嫌気性ろ床部分（最初沈殿池流出水～嫌気性ろ床流出水：差分 43.2mg/L）における T-COD<sub>Cr</sub> の除去率は、流入下水に対して 19% であった。一方、S-COD<sub>Cr</sub> の除去率は、T-COD<sub>Cr</sub> の除去率に比べて低く、それぞれ 2%、22%、77% であった。仮に、COD<sub>Cr</sub> と BOD の関係式 ( $\text{COD}_{\text{Cr}} = 1.34 \times \text{BOD} + 48.4$ )<sup>8)</sup> を用いた場合、わが国の下水放流水に求め

られる BOD の基準 15mg/L は、COD<sub>Cr</sub> 68.5mg/L に換算されるが、本研究で得られた好気処理流出水では、この数字を下回っていた。また、好気処理流出水中の、亜硝酸性窒素、硝酸性窒素は低く、硝化抑制型の処理となっていた。曝気槽混合液の MLSS/MLVSS の平均値は 1360/1160mg/L であり、実験期間中、大きな変動はなかった。流入水量あたりの好気処理実験装置から排出された汚泥の固形物量は、 $0.0057\text{kg-DS}/\text{m}^3$  で、標準活性汚泥法を採用している下水処理場における、流入水量あたりの発生余剰汚泥の固形物量  $0.040\text{kg-DS}/\text{m}^3$  程度に比べると、約 1/7 であった。

表 2 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 T-COD<sub>Cr</sub> とその除去率

	T-COD <sub>Cr</sub> (mg/L)	除去率 (%)
流入下水	235.1	—
最初沈殿池流出水	185.5	21.1
嫌気性ろ床流出水	142.3	39.5
好気処理流出水	38.3	83.7

表 3 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 S-COD<sub>Cr</sub> とその除去率

	S-COD <sub>Cr</sub> (mg/L)	除去率 (%)
流入下水	108.3	—
最初沈殿池流出水	105.9	2.2
嫌気性ろ床流出水	84.4	22.0
好気処理流出水	25.5	76.5

### 4. まとめ

本研究の実施内容を、以下にまとめる。

- 下水処理場へ流入した下水を用いて、散水負荷  $20\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$  で、散水ろ床実験装置を連続的に運転した結果、T-COD<sub>Cr</sub>、H-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub> の平均除去率はそれぞれ、61%、61%、47% であった。平均 H-COD<sub>Cr</sub>（沈殿池で除去が困難な  $100\mu\text{m}$  以下の粒子に由来する COD<sub>Cr</sub>）は、全 7 回採水したうち、5 回が目安として設定した 68.5mg/L を下回った。
- 最初沈殿池で分離回収できない溶解性易分解性有機物の低減を目的として、最初沈殿池流出水に対して、部分循環式嫌気性ろ床装置を連続的に適用した結果、嫌気性ろ床部分（最初沈殿池流出水～嫌気性ろ床流出水）における T-COD<sub>Cr</sub> の除去率は、流入下水に対して 19% で

あった。さらに後段に設置した曝気槽 HRT 4hr の仕上げ好気処理装置においては、溶解性有機物の安定した除去を達成し、余剰汚泥の発生量は、標準活性汚泥法に比べて 1/7 程度であった。

今後は、部分循環式嫌気性ろ床における担体充填方法・循環方法、好気処理における運転の最適化を検討し、省エネルギー型下水処理技術の開発を行う予定である。

## 謝辞

下水試料採取などでお世話になりました下水処理場関係各位に謝意を表します。

## 参考文献

- 1) 下水道における資源・エネルギー施策の現状分析、第3回下水道政策研究委員会会議資料、平成26年1月16日、2014.
- 2) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道長期ビジョン実現に向けた中期計画、新下水道ビジョン、p.4.2、平成26年7月、2014.
- 3) 下水道における地球温暖化防止対策検討委員会：下水道における地球温暖化防止推進計画策定の手引き、平成21年3月、pp.4-5、2009.
- 4) Water Environment Federation : Energy use in wastewater treatment process, Energy Conservation in Water and Wastewater Facilities, Manual of Practice (MOP) No. 32, p.162, McGraw Hill, New York, 2010.
- 5) 社団法人日本下水道協会：下水道施設設計指針と解説 1984年版、p.376、1984.
- 6) Schubert, W. and Gunthert, W., Particle size distribution in effluent of trickling filters and in humus tanks, Water Research, 35(16), pp.3993-3997, 2001.
- 7) 南山瑞彦、岡安祐司、桜井健介：新規省エネルギー型下水処理技術の開発、平成27年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料 No.4347、pp.102-105、2017.
- 8) 後藤雅子、甘長准：下水処理における窒素除去と放流先の窒素挙動を加味した温室効果ガス排出量の一考察、第50回下水道研究発表会講演集、pp.565-567、2013.
- 9) 日本下水道協会：下水道統計(平成23年度版)(第68号)、2013.
- 10) 高岡昌輝、廣田淳一、武田信生、藤原健史：前凝集沈殿汚泥の嫌気性消化特性、土木学会論文集、No.685/VII-20、pp.17-26、2001.
- 11) 宗宮 功、津野 洋、貫上 佳則、長谷川 明巧、木下 巖、日高 平：前凝集沈殿・浮遊微生物処理法による都市下水の高度処理に関する研究、下水道協会誌論文集、Vol.36、No.436、pp.87-97、1999.
- 12) 日高 平、津野 洋、鄭 晋宇、岸本 直之、織田 稔幸：生物膜ろ過反応器での前凝集汚泥活用に関する研究、下水道協会誌論文集、Vol.40、No.487、pp.103-116、2003.
- 13) 国土交通省 国土技術政策総合研究所：B-DASH プロジェクト No.1 超高効率固液分離技術を用いたエネルギーマネジメントシステム導入ガイドライン(案)、国土技術政策総合研究所資料 No.736、2013.

## 震災時の機能不全を想定した水質リスク低減手法の構築に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 25～平 28

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：植松龍二、諏訪守、安井宣仁

### 【要旨】

東日本大震災では、沿岸部に位置する下水道施設が津波被災により機能不全に陥り、完全な復旧には長時間を要した。被災地域の他のインフラが復旧するに従い、家庭などから排出される下水が継続して下水道に流入することになるが、下水道が機能不全となった場合には、放流水質の悪化は水系感染症拡大防止に重大な影響を及ぼす。今回の震災では、被災下水処理場は沿岸部に集中したが、水道水源の上流に位置する内陸部の処理場が被災した例もあり、下流域における浄水・利水施設に対し病原微生物の感染リスクが格段に高まることになるため、応急的な対応においても可能な限り水系感染リスクを低下させる手法を明らかにすることが求められている。

本研究は、大規模災害による下水処理システムの機能不全に対して、他施策等による緊急対策の実施可能性を整理した上で、下水道において病原微生物の感染リスクを低減させる手法を構築することを目的に、①緊急対策の実施の可能性を分析、②水質悪化が消毒効果へ及ぼす影響、③衛生学的管理手法の構築とした3つの達成目標を掲げ調査、実験を実施した。

その結果、壊滅的被災を想定した緊急対策として、応急復旧段階の簡易沈殿処理による衛生学的指標の評価では、大腸菌群（TC）、ノロウイルス（NV）の安定した除去は期待できないため、放流先の利水状況によっては追加対策が必要であると考えられた。水質悪化が消毒効果へ及ぼす影響としては、簡易沈殿処理水に残存する $\text{NH}_4\text{-N}$ などは消毒剤の消費を促進するため、簡易沈殿処理水や水道施設での消毒への影響が懸念された。衛生学的管理手法の構築に関しては、下水処理場の被災後の電力供給前は、PAC添加や塩素消毒を組み合わせた複合処理を実施し、電力が回復次第、紫外線消毒を導入することで下流域への浄水原水に及ぼす病原微生物リスクの大幅な低減が見込まれた。

キーワード：震災、機能不全、消毒、水系感染リスク

### 1. はじめに

東日本大震災の発生に際しては、下水道が被災して機能不全に陥り、既存の水質管理システムの脆弱性が明らかとなった。被災規模が甚大な場合には、復旧にも長時間を要するとともに、復旧段階での処理水質悪化は消毒機能にも影響を及ぼす。

東日本大震災では、被災下水処理場は沿岸部に集中したが、水道水源上流に位置する内陸部の処理場が被災した例もあり、病原微生物の感染リスクが格段に高まることになる。水系水質リスクに対する施策として、これまで、下水道施設の耐震化や平常時の河川流況を勘案した取水、排水系統の再編成などの提言がなされているが<sup>1)</sup>、被災による下水道施設の機能不全により、感染リスクは1万倍以上に上昇すると推定されることから、それに応じたリスク低減手法の開発が必要である。

本研究は、大規模災害による下水処理システムの機能不全に対して、他施策等による緊急対策の実施可能性を整理した上で、下水道において病原微生物の感染リスクを低減させる手法を構築することを目的としている。

このため、機能不全に陥った際の処理水質悪化が消毒効果に及ぼす影響評価、応急対策手法の構築、段階的復旧における課題への解決策の提案を行い、衛生学的リスク管理手法を構築するものである。また、衛生学的な指標として、これまでの評価対象である TC に加えて、塩素消毒に耐性があり集団感染発生要因となるウイルスや原虫類を含める。

下記の 1)～3)の達成目標ごとに得られた成果について、とりまとめを行った。

- 1) 緊急対策の実施の可能性を分析
- 2) 水質悪化が消毒効果へ及ぼす影響
- 3) 衛生学的管理手法の構築

### 2. 研究目的および方法

#### 2.1 緊急対策の実施の可能性を分析

##### 2.1.1 緊急対策としての簡易沈殿処理による TC や NV の除去効果

東日本大震災による津波被災下水処理場では、段階的な復旧の緊急対策として、導入の容易さから簡易沈殿処

理が多く用いられた。簡易沈殿処理水の水質は、通常の最初沈殿池を経た一次処理レベルと推定されるとともに、被災の規模や復旧の進展状況によっては、簡易沈殿処理の適用が長期間に及ぶ可能性がある。このため、病原微生物の除去能力の低下や、沈殿池に堆積した汚泥が処理水に及ぼす影響による水質悪化が懸念される。実際の被災下水処理場でも、簡易沈殿処理を長期間にわたり行うことで、沈殿池下層へ堆積した汚泥が塩素消毒効果へ影響を及ぼす可能性を指摘する報告<sup>2)</sup>がある。

簡易沈殿処理による TC、NV、有機物などの除去効果や継続した処理が処理水質に及ぼす影響把握を目的に、パイロットプラントを利用し評価を行った。パイロットプラントは最初沈殿池（初沈）50L、反応タンク 100L、最終沈殿池（終沈）50L で構成されたもので、沈殿汚泥の引き抜きや反応タンクでの曝気混合は行わず流入下水を継続して流入させた。初沈から終沈までの滞留時間は 16 時間とした同一条件にて 3 系列を稼働させた。評価対象試料は、流入下水と施設滞留時間を考慮して採水した終沈越流水とした。

水質測定項目は TC の他、NV とした。TC はデソキンコレート培地による平板培養法によって定量した。NV は、ポリエチレングリコール沈殿法により試料を濃縮し、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、濃縮液中のウイルスは、リアルタイム PCR 法により定量<sup>3)</sup>を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出試料を DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN 社) でウイルス RNA を精製した。RNA 試料 0.5 $\mu$ g をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 100 $\mu$ L の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 10 $\mu$ L をリアルタイム PCR に供した。ノロウイルス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」<sup>4)</sup> 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 LightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を使用した。逆転写反応に使用する抽出 RNA 量は Spectrophotometer (NanoDrop 社製) により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した<sup>3)</sup>。

## 2.2 水質悪化が消毒効果へ及ぼす影響

### 2.2.1 簡易沈殿処理水の水質性状の評価

簡易沈殿処理による処理水質は、初沈流出水と同程度と考えられ、特に TC や NV の高度な除去効果は期待できないと推定され、また、その処理水に残存する有機物

などによって塩素などの消毒剤が消費される課題もある。このため、2.1.1 の実験条件を基にして水質評価を行った。

水質測定項目は SS、COD<sub>Cr</sub>、NH<sub>4</sub>-N とした。SS は下水試験方法に準拠して、また、COD<sub>Cr</sub> は HACH による比色法、NH<sub>4</sub>-N は自動比色分析装置（ビーエルテック社製 QuAAtro2-HR）により測定した。

### 2.2.2 凝集剤の添加効果の評価

簡易沈殿処理での病原微生物の除去性や消毒効果を向上させる必要性から、攪拌工程を導入した凝集剤 (PAC) の添加効果の評価を目的に、プラントを利用した連続通水実験を行った。適切な攪拌により凝集反応を促進させる必要があると考えられるが、被災直後の下水処理場で攪拌を伴う効果的な凝集処理を実現することは困難であることが想定される。管内などでの攪拌力を利用して凝集を促進させる手法が解決策の一つであると考えられるため、被災現場での導入を容易にするという観点も踏まえ、図-1 に示すような実験系を考案した。実験装置は反応容器内に砂利を充填した簡易なもので、流入下水と PAC を混合させ (5mg-Al/L)、凝集効果の評価することとした。凝集効果の評価においては、最初沈殿池 (初沈) 50L、反応タンク 100L、最終沈殿池 (終沈) 50L で構成された 3 系列のプラントを用い、PAC の簡易攪拌方式を取り入れ、凝集混合水を初沈へ流入させた系、直接 PAC を初沈へ添加した系、および PAC の無添加系の計 3 条件を比較した。簡易攪拌のための反応容器は、容量が 500mL で砂利の充填量を考慮した滞留混合時間は 1 分間程度であった。また、プラントの反応タンクでは曝気混合は行わず、初沈から終沈までの滞留時間を 16 時間として簡易沈殿処理を行った。実験終了時にはプラントの各系列に堆積した SS を測定し、その収支を把握した。

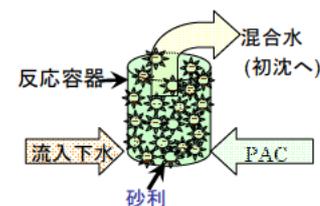


図-1 簡易攪拌方式

評価対象試料は、流入下水と施設滞留時間を考慮して採水した終沈越流水とした。併せて、各処理条件で得られた上澄液試料を用いて塩素消毒実験を行った。塩素消毒条件は、次亜塩素酸ナトリウムを 0~15mg-Cl/L の範囲で添加、接触時間を 15 分間とし、チオ硫酸ナトリウムの添加により残留塩素を中和した。

水質測定項目、測定方法は 2.1.1、2.2.1 と同様である。

### 2.2.3 代替消毒法としての紫外線消毒による NV 低減効果の評価

簡易沈殿処理を含めた段階的復旧技術による各種処理水に残存する有機物や NH<sub>4</sub>-N により、塩素などの消毒剤

が消費される課題がある。これらの課題に対処するためには、消毒剤消費物質の影響を受けにくい紫外線消毒法の適用も考えられる。緊急対応時となることから、電源の確保等に課題を有するが、復旧の進展状況に応じて適用の可能性が高まることや、塩素などの消毒剤の不足時にも対応できる利点を有する。

このため、流入下水を対象に紫外線消毒による NV 遺伝子の低減効果を把握した。具体的には、上記 2.1 におけるプラントへの流入下水と流入下水へ PAC を添加したその上澄液に対し、低圧紫外線ランプにより 0~100mJ/cm<sup>2</sup> の線量を照射し、NV の定量を行った。PAC の添加濃度は 4mg-Al/L とした。

## 2.3 衛生学的管理手法の構築

### 2.3.1 段階的復旧技術による NV の低減効果

被災直後の緊急対策としての簡易沈殿処理や、段階的な復旧として、被災地域ではガレキなどの廃材が発生していることから、それらの有効活用を想定した散水ろ床法、また、簡易曝気により低濃度の活性汚泥が維持できる接触酸化法の適用が考えられる。これらの生物処理では有機物等の除去が期待でき、余剰汚泥の発生量が少ない利点を有する。上記の段階的復旧技術による NV の除去効果の把握を目的に、各々の実験装置により評価を行った。さらに、各種の段階的復旧技術による処理水を利用した塩素消毒実験を実施するとともに、除去、消毒効果の向上を目的として PAC の添加効果についても評価した。

散水ろ床実験装置は、直径 300mm の円筒状の容器にプラスチック担体を 2.64m 充填した。担体の大きさは直径 15mm、高さ 15mm、厚さ 1mm の円筒状、比表面積は 450m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> であり、散水負荷を 10m<sup>3</sup>/ (m<sup>2</sup>・d) とし流入下水を通水した。

接触酸化法の実験装置は、嫌気槽 (内径 36mm、高さ 1,200mm の円筒状の容器にプラスチック担体をろ層厚として 400mm 充填：滞留時間 4h) と好気槽 (10L の反応タンクにプラスチック担体を 3L 充填：4h)、沈殿槽 (20h) より構成され、沈殿下水を通水した。調査期間中の好気槽の MLSS は 50~120mg/L 程度であった。

### 2.3.2 段階的復旧技術による病原微生物リスクの低減効果

下水処理場下流域の水利用に対する病原微生物リスクの上昇割合を評価することを目的に、定量的微生物リスク評価手法を用いて正常の運転時 (標準活性汚泥法) による放流水と、段階的復旧技術の放流水について試算を行い比較した。定量的微生物リスク評価を障害調整生存年数 (DALY) に基づき試算するにあたり、評価の前提条件として下記事項を勘案した。

i) 上流域の下水処理場において正常運転 (通常の下水処理工程) で処理された放流水が河川水中に放流され、

下流域の浄水場の水源として利用されることを想定し、通常運転下で病原微生物リスクは無いものと想定した。浄水処理工程での NV 除去率の変動は無いものとし一定と仮定した。

ii) 上流域の下水処理場が正常に機能している場合は、下流域の浄水場への放流水の病原微生物リスクの影響は無いと仮定し、飲料水の摂取による病原微生物リスクが WHO のガイドライン値の 10<sup>-6</sup> (DALY/人・年) を満たすものとする。

iii) 上流域の下水処理場が震災等により被災し、機能が停止および段階的復旧により処理された放流水が下流域の浄水場への水源となる場合、浄水場の被災状況は軽微または正常運転を保っているものとする。

次いで、以下の手順に従い、病原微生物リスクの試算を行った。

iv) 流入下水中の NV 濃度は、実測値に基づき流行期 (冬場) の濃度変動から対数正規分布に従うと仮定し、設定した。

v) 各段階的復旧技術における NV の除去率は実測値より平均除去率および標準偏差を算出し、Log 除去率が対数正規分布に従うと仮定した。

vi) 段階的復旧技術として紫外線消毒を用いた際は、40、100mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線量を平均値として、水質変化による照射紫外線量の変動を考慮し、線量分布を勘案した。なお、照射紫外線量は正規分布に従うと仮定し、標準偏差(σ)を 20mJ/cm<sup>2</sup> とした。

vii) 河川での放流水の希釈効果は、放流先の河川流量等が異なるため、希釈率平均を 1/10、標準偏差を 1/50 の正規分布に従うと仮定した。

viii) v~vii) により処理、希釈された河川水に含まれる NV が下流域の浄水場の水源に存在すると仮定した病原微生物リスクとして、DALY 値を試算した。式(1)に従い、モンテカルロシミュレーション (試行回数=100,000) により DALY<sub>pppy</sub> の分布を算出した。

$$DALY_{pppy} = \{1 - (1 - P_{inf}(D))^n\} \times R_{inf} \times DB \quad \text{式(1)}$$

$$P_{inf}(D) = 1 - \exp\left[-\frac{\ln 0.5}{ID_{50}} \times D\right] \quad \text{式(2)}$$

ここで、DALY<sub>pppy</sub> は 1 人 1 年あたりの疾病負荷 (DALY/人・年)、P<sub>inf</sub>(D) は感染確率<sup>5)</sup>・(容量反応モデル式(2))<sup>6)</sup>、R<sub>inf</sub> は発症確率 (0.8)<sup>7)</sup>、DB は疾病負荷 (9.0×10<sup>-4</sup>年)<sup>5)</sup>、n は曝露日数 (365 日)、D は摂取 NV 量 (copies/L)、ID<sub>50</sub> は 50% の確率で発症する摂取 NV 量である。

ix) 各段階的復旧技術による放流水が下流域の浄水場へ及ぼす影響として、viii) の DALY<sub>pppy</sub> の試算結果と、下水処理場が正常運転時の DALY<sub>pppy</sub> (10<sup>-6</sup>(DALY/人・年)) との相対値で比較し、段階的復旧技術による NV のリスク低減効果の評価を行った。

なお、本リスク評価方法は、流入下水のNV濃度変動、処理水の除去変動を考慮していることから、不確実性を勘案したものとなっており、信頼性の高い評価方法であると考えられる。また、本試算ではNVの遺伝子定量値(copies数)を用いていることから、実際の感染価を反映させた場合よりも安全側での試算になっている点に留意が必要である。

### 3. 研究結果および考察

#### 3.1 緊急対策の実施の可能性を分析

##### 3.1.1 緊急対策としての簡易沈殿処理によるTCやNVの除去効果

簡易沈殿処理によるTCとNVの除去効果の推移を図-2、3に示す。なお、以下に示す沈殿処理水のTCを含めた全ての指標は、同一条件で稼働させた3系列のパイロットプラントの平均値である。流入下水と簡易沈殿処理水のTCに差がなく、平均除去率は4% (流入と処理後で濃度が逆転の場合は0%とした)と除去効果は期待できないことが明らかとなった。放流水質基準のTC3,000 CFU/mL以下の達成には、その後の消毒対応となるが、簡易沈殿処理水であることから、通常の生物処理後に行われている塩素消毒の薬剤添加濃度よりも高めた対応が必要であると考えられた。

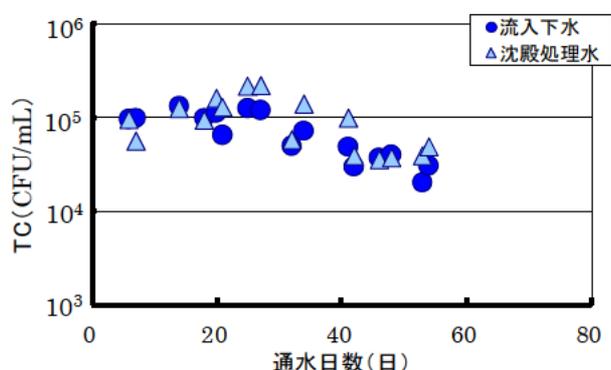


図-2 簡易沈殿処理によるTCの推移

NVの濃度推移について図-3に示す。流入下水に比較して沈殿処理水は若干の濃度低下が見られたが、平均除去率は36%であり、TCよりも若干高いものの、簡易沈

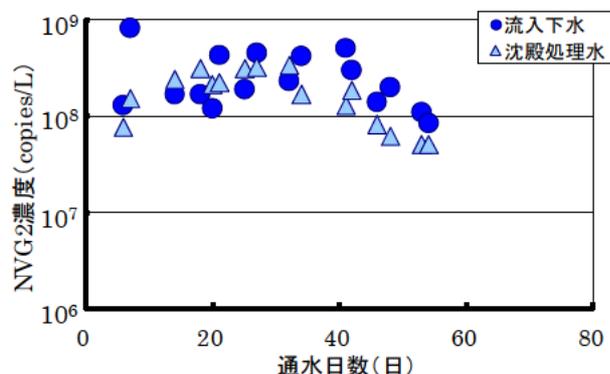


図-3 簡易沈殿処理によるNVG2濃度の推移

殿処理によって高度に安定したウイルス除去は難しいと考えられた。簡易沈殿処理により高い除去率が得られないため、放流先の利水状況によっては応急的な追加対策の構築が必要である。

### 3.2 水質悪化が消毒効果へ及ぼす影響

#### 3.2.1 簡易沈殿処理水の水質性状の評価

簡易沈殿処理によるSS、COD<sub>Cr</sub>、NH<sub>4</sub>-Nの濃度推移について図-4~7に示す。流入下水のSS濃度が変動しても簡易沈殿処理水のSS濃度は比較的安定しており、73%の平均除去率が得られ、TCやNVよりも除去効果が高い傾向が見られた。また、有機物指標として測定したT-COD<sub>Cr</sub>は流入下水の変動状況に応じた濃度推移を示し、簡易沈殿処理による平均除去率は38%であった。D-COD<sub>Cr</sub>については、流入下水と簡易沈殿処理水の濃度に差がなく平均除去率は8%、NH<sub>4</sub>-Nも同様に3%と除去効果は低かった。

段階的な復旧の緊急対応として、簡易沈殿処理のSS、COD<sub>Cr</sub>、NH<sub>4</sub>-Nを指標とした導入効果を評価した。その結果、D-COD<sub>Cr</sub>、NH<sub>4</sub>-Nの除去効果が低いため、処理水に残存する溶解性有機物などは消毒剤の消費を促進し、簡易沈殿処理後の消毒や水道施設での消毒への影響が懸念されることから、これらの物質の除去効果を高める工夫が必要であると考えられた。SSについては、一定の除去効果を示されたことから、沈殿池内でのフロックの形成が促進されれば、TCやNVの除去効果が高められるとともに、有機物の低減効果から消毒剤の消費抑制が図られると考えられる。

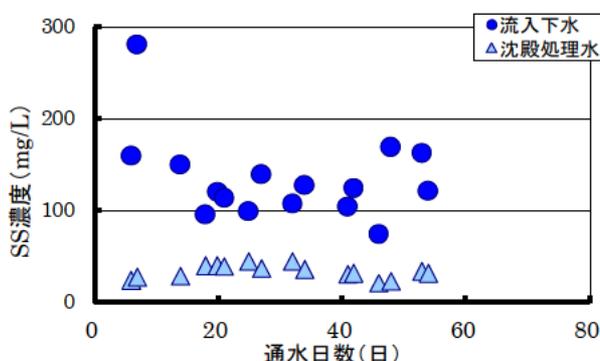


図-4 簡易沈殿処理によるSSの推移

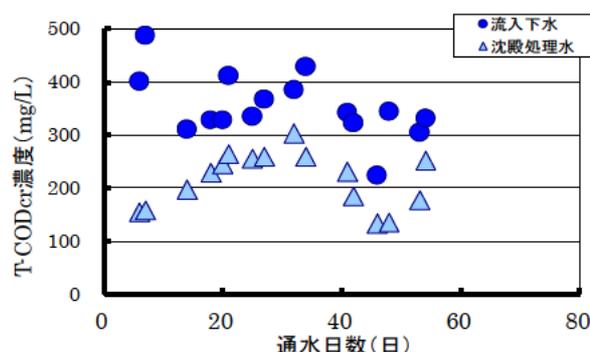


図-5 簡易沈殿処理によるT-CODcrの推移

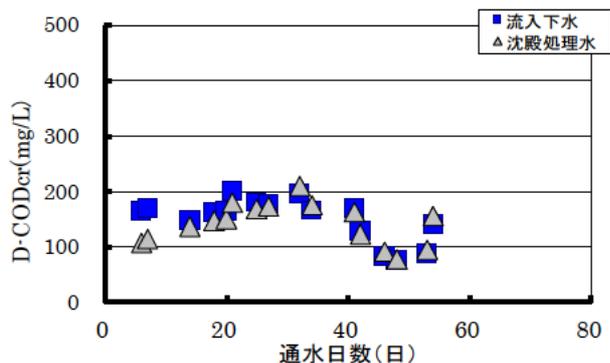


図-6 簡易沈殿処理によるD-CODcrの推移

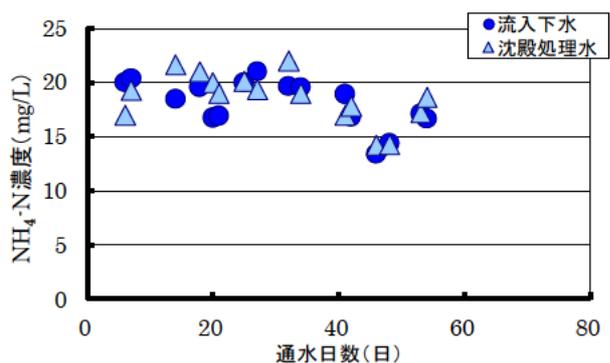


図-7 簡易沈殿処理によるNH<sub>4</sub>-Nの推移

### 3.2.2 凝集剤の添加効果の評価

簡易沈殿処理による攪拌工程を導入した PAC の添加効果として、濁度と NV の推移を図-8、9 に示す。図中標記の I 系は PAC 無添加、II 系は添加攪拌工程有、III 系は添加有の攪拌工程無しである。PAC の添加前では各系列処理水の濁度に違いが見られなかったが、PAC の添加後には無添加系と比較して処理水の濁度が低くなり、かつ、攪拌工程を取り入れた II 系は III 系よりもやや安定していた。また、系内に堆積した汚泥を引抜くことにより、各系列処理水の濁度は引抜き前と比較して引抜き直後において低く推移しており、堆積汚泥の引抜き管理は処理水質の観点から重要であると考えられた。

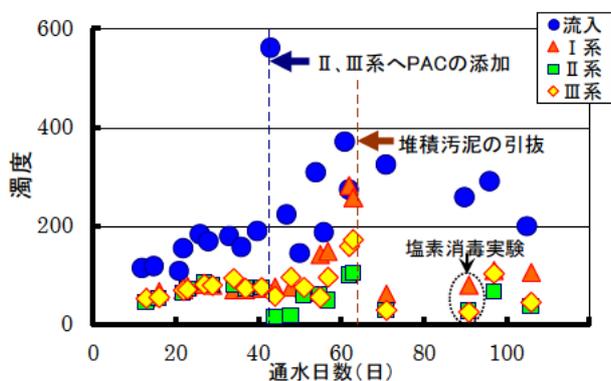


図-8 簡易沈殿処理による濁度の推移

NV の濃度推移について図-9 に示す。PAC の添加前では各系列の NV 濃度に差は見られなかったが、添加後は特に II 系での NV 濃度が低下傾向を示した。添加後の各

系列の NV 平均除去率は、I 系が 50%、II 系は 85%、III 系は 72% であり、攪拌工程を導入した PAC の添加系では、他の系列と比較して NV の低減効果がより向上した。

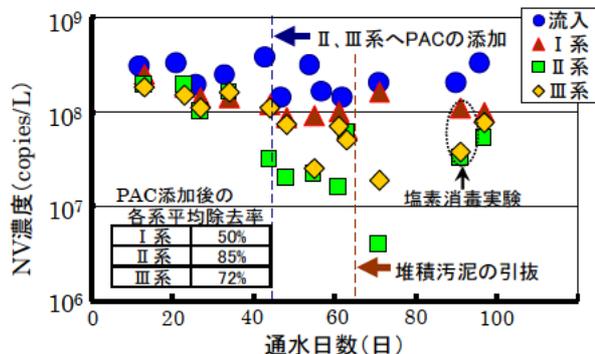


図-9 簡易沈殿処理によるNVの推移

次いで、塩素消毒に及ぼす影響評価結果を図-10 に示す。図-8、9 中に塩素消毒実験と記した試料を対象とした。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度に応じて NV の低減効果が高まっており、流入下水の NV 濃度に対する 15mg Cl/L 添加時 (接触時間は 15 分間) の低減効果は I 系が 0.8log、II 系は 1.5log、III 系は 1.2log となった。

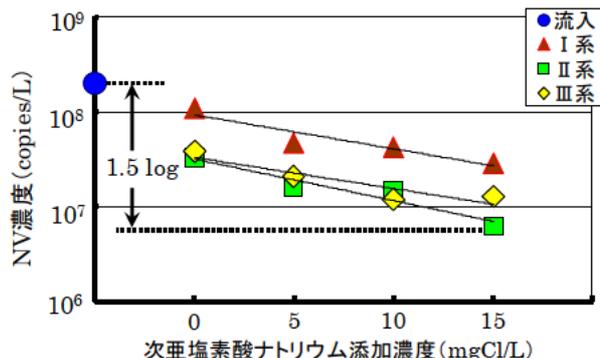


図-10 塩素消毒によるNVの低減効果

攪拌工程を導入した PAC の添加条件とし、添加塩素濃度を高めることで、平常時における活性汚泥処理の除去レベルである 2log 程度と同等の効果が得られる可能性があるものと考えられた。同様に、TC を対象とした塩素消毒実験結果を図-11 に示す。PAC の添加系列である II、III 系では、添加塩素濃度が 5mg Cl/L で放流水質基準値以

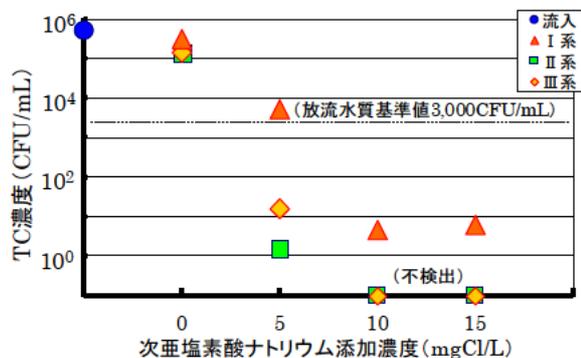


図-11 各系列処理水のTCの不活化効果

下となった。攪拌工程を導入したⅡ系では、塩素消毒によるTCの不活化効果や添加塩素濃度に対する残留塩素濃度の割合がより高まった(図-12)。

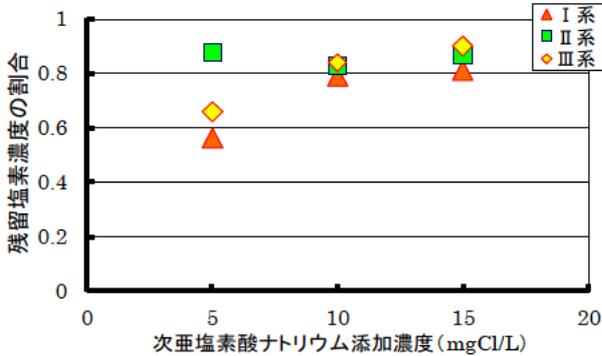


図-12 添加塩素濃度に対する残留塩素濃度の割合

TC、NV 以外の水質項目の結果を図-13～15に示す。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、D-COD<sub>Cr</sub>については、流入下水と各系列の処理水に大きな違いが見られず、PACの添加による溶解性物質の除去効果は期待できない。また、T-COD<sub>Cr</sub>についても、PAC添加により若干の改善傾向が見られたものの、D-COD<sub>Cr</sub>の影響により改善効果は限定的であると考えられた。より消毒効果を高めるためには消毒剤を消費する物質の濃度をさらに低減させなければならないが、その手法については別途に考慮する必要がある。

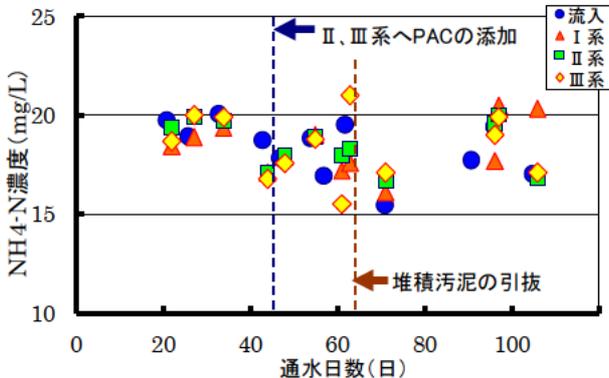


図-13 簡易沈殿処理による $\text{NH}_4\text{-N}$ の推移

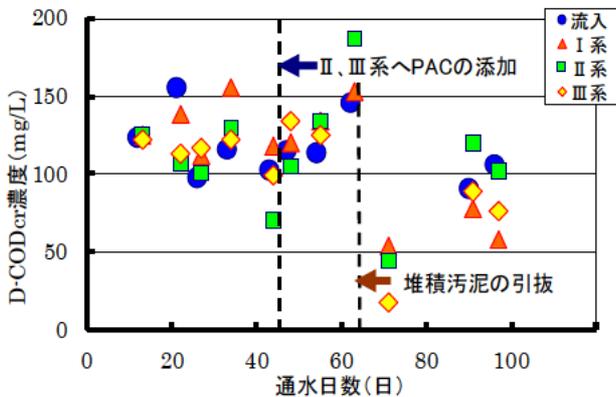


図-14 簡易沈殿処理によるD-COD<sub>Cr</sub>の推移

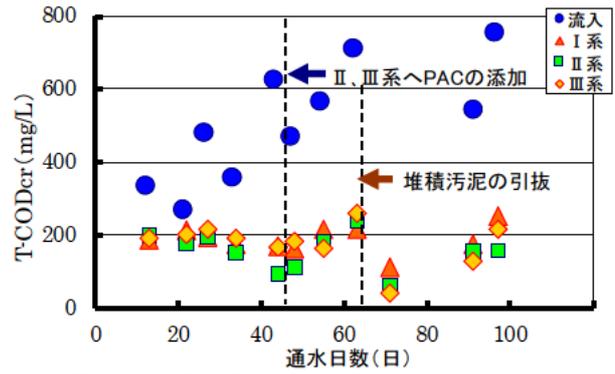


図-15 簡易沈殿処理によるT-COD<sub>Cr</sub>の推移

一方、図-16は通水日数が63日目における堆積汚泥の引抜き時から実験終了時にかけて各系列のプラント内に堆積したSS量を測定し、その物質収支の把握を行ったものである。PACの添加有無に関わらず各系列の初沈での堆積SS量はほぼ同じであったが、反応タンク以降に大きな違いが生じていた。Ⅰ系のPAC無添加系列では流入するSSの多くが初沈に堆積していたが、反応タンクから終沈へ移行するにつれ、堆積SS量は減少傾向を示した。しかし、PACの添加系列では反応タンク内での堆積SS量は初沈よりも多くなっていることから、反応タンク内においてフロックが生成し堆積することで、堆積SS量が増加したものと推定された。また、流入SS負荷に対して各系列内で堆積していたSSの割合は、Ⅰ系では約40%、Ⅱ、Ⅲ系では約80%と大きな違いが見られた。

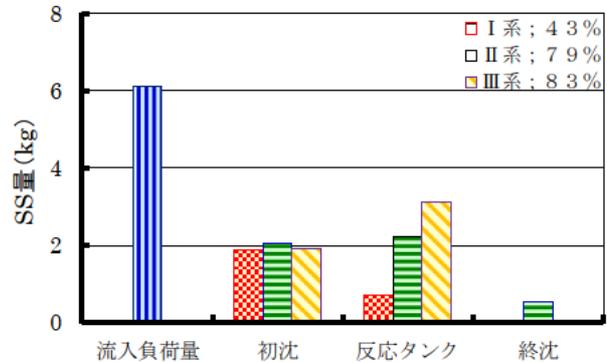


図-16 各系列のプラント内の堆積SS量

### 3.2.3 代替消毒法としての紫外線消毒によるNV低減効果の評価

上記3.2.2の結果から、簡易沈殿処理時におけるPACの添加によってもD-COD<sub>Cr</sub>や $\text{NH}_4\text{-N}$ などの除去効果は低く、処理水に残存するこれらの溶解性物質などは消毒剤を消費すると思われる。消毒剤を消費する物質の低減策については、別途に考慮する必要があるとともに、耐塩素性病原微生物であるウイルスや原虫類に対する課題がある。これらの課題に対処するために、紫外線消毒法の適用について評価した。

結果を図-17に示す。流入下水に対し100mJ/cm<sup>2</sup>程度の紫外線照射で、NVの低減効果は0.9logであった。PAC

の添加濃度を 4mg-Al/L とした流入下水の上澄液に対しては 30mJ/cm<sup>2</sup>程度の紫外線照射と凝集沈殿による効果により、流入下水の NV 濃度と比較して 1.3log の低減効果が得られた。通常の活性汚泥処理水に対しては 40mJ/cm<sup>2</sup>の紫外線照射で、NV の低減効果は 1 log 程度であることから<sup>8)</sup>、流入下水へ PAC を添加することで通常の活性汚泥処理水に対する紫外線照射効果と同レベルの低減効果が得られていた。また、100mJ/cm<sup>2</sup>程度とした紫外線照射においては、PAC を添加することで NV の低減効果が 0.9log から 2.5log に向上した。

一方、20mJ/cm<sup>2</sup>の紫外線照射にて原虫類のクリプトスポリジウムに対し 4log 程度の不活化効果が得られる報告<sup>9)</sup>があることから、紫外線消毒法の適用はウイルスに加え原虫類への有効な対策となる。

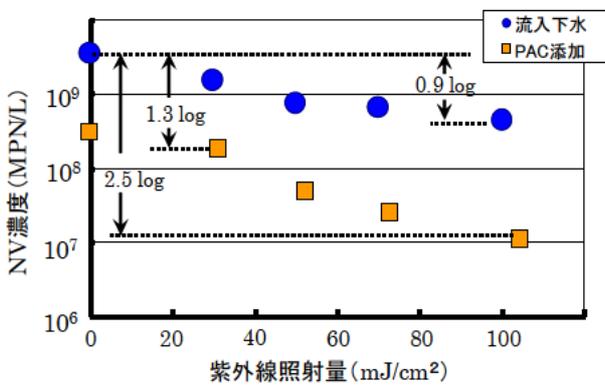


図-17 紫外線によるNVの低減効果

### 3.3 衛生学的管理手法の構築

#### 3.3.1 段階的復旧技術による NV の低減効果

有機物等の除去が期待でき、余剰汚泥の発生量が少ない利点を有する散水ろ床法と接触酸化法による NV の除去効果について図-18 に示す。流入下水の NV 濃度が 10<sup>7</sup> copies/L レベル時において、両法の処理水の NV 濃度は 10<sup>6</sup> copies/L レベルで推移しており、除去効果 (1log 程度) に大差が見られず、標準的な活性汚泥法の NV 除去率の 2log 程度<sup>3)</sup>と比較して低い状況にあった。

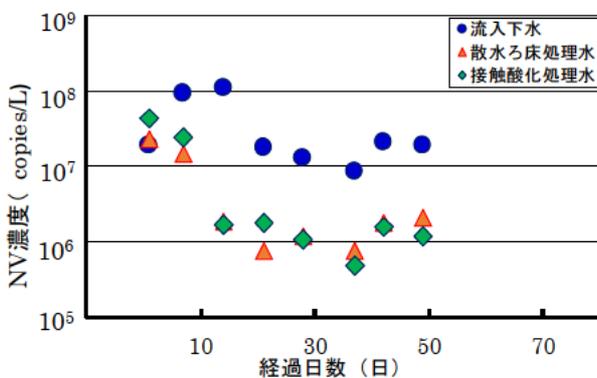


図-18 散水ろ床と接触酸化処理水のNV濃度の推移

被災直後の緊急的措置対応としての簡易沈殿処理および簡易沈殿処理への PAC 添加、その後の復旧の進展に応じて適用の可能性がある中級処理としての散水ろ床法、接触酸化法、さらには紫外線消毒法などを対象とした NV の除去効果を評価した。それらの結果として Log 除去率の平均値および標準偏差を整理し表-1 に示す。これら段階的復旧技術による NV の除去率は、流入下水と各復旧技術による処理水の実測値から除去率の変動を考慮し算定した。また、各復旧技術による NV の除去率は対数正規分布に従うと推定された。なお、塩素、紫外線消毒での除去率は回分実験によるデータを基に算出した。

簡易沈殿処理法では、NV の除去率は平均値で 0.22log であったのに対し、後段に PAC 添加、塩素処理を適用することで、除去率が 1.38log に向上することが確認された。同様に散水ろ床法、接触酸化法、紫外線消毒でも後段または前段に追加処理を加えることで NV 除去率の向上が確認された。特に生物処理後や PAC 添加による凝集沈殿後に紫外線照射を行うことで、NV の除去効果がより向上した。

表-1 各段階的復旧技術によるNVの除去率

段階的復旧技術	Log除去率	
	平均値(μ)	標準偏差(σ)
簡易沈殿処理法	0.22	0.33
簡易沈殿処理+PAC (5mgAl/L)	0.72	0.46
簡易沈殿処理+PAC+塩素 (5mgAl/L、225mgCl <sup>-</sup> ·min/L)	1.38	0.62
散水ろ床法	0.99	0.50
散水ろ床法+塩素(225mgCl <sup>-</sup> ·min/L)	1.24	0.62
接触酸化法	0.84	0.63
接触酸化法+塩素(225mgCl <sup>-</sup> ·min/L)	1.14	0.71
接触酸化法+紫外線消毒 (100mJ/cm <sup>2</sup> )	2.10	0.76
紫外線消毒(100mJ/cm <sup>2</sup> )	1.21	0.46
紫外線消毒(40mJ/cm <sup>2</sup> ) +PAC(4mgAl/L)	1.97	0.50
紫外線消毒(100mJ/cm <sup>2</sup> ) +PAC(4mgAl/L)	2.58	0.50

#### 3.3.2 段階的復旧技術による病原微生物リスクの低減効果

表-1 に示した処理条件による NV の除去率を基に、各段階的復旧技術による放流水が放流先下流域へ及ぼす病原微生物リスクの比較結果を図-19 に示す。縦軸は下水処理場が正常運転時において下流域の浄水原水に及ぼす病原微生物リスクの DALY<sub>pppy</sub> の 10<sup>-6</sup>(DALY/人・年)を基準 (相対値を 1) として、各段階的復旧技術の放流水が及ぼす影響割合を表している。すなわち、DALY<sub>pppy</sub> (各段階的復旧技術) / DALY<sub>pppy</sub> (正常運転) を示している。図中の縦軸値が高いほど、段階的復旧技術による放流水が下流域に対して病原微生物リスクの影響が大きくなることを表している。簡易沈殿処理では、正常運転時と比較

して NV による病原微生物リスクが約 80 倍に増大した。簡易沈殿処理の後段に PAC 添加と塩素消毒を適用することで、リスクが半分程度に低減されたが、正常運転と比較して約 40 倍のリスクが存在している可能性が試算された。散水ろ床法、接触酸化法では、簡易沈殿処理と比較してリスクの低減割合が向上したが、正常運転よりも約 50~60 倍と依然高い値であり、塩素消毒を追加しても大幅なリスクの低減効果が得られなかった。一方、紫外線消毒を適用することで、PAC (4mgAl/L) 添加による凝集沈殿効果と紫外線消毒 (照射線量 100 mJ/cm<sup>2</sup>) により、正常運転と比較して 1.7 倍程度までリスクの低減効果が見込まれた。

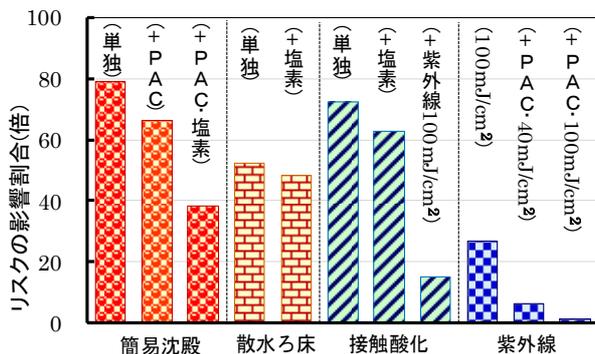


図-19 各復旧技術の放流水が下流域へ及ぼす病原微生物リスクの比較 (下水処理場の正常処理を1とした場合)

以上より、下水処理場が被災し正常運転が行えない状況に陥った場合には、電力供給前は PAC 添加や塩素消毒を組み合わせた複合処理を実施し、電力が回復次第、紫外線消毒を導入することで、下流域の浄水原水に及ぼす病原微生物リスクを低減できると考えられた。

#### 4. まとめ

本研究は、大規模災害による下水処理システムの機能不全に対して、他施策等による緊急対策の実施可能性を整理した上で、下水道において病原微生物の感染リスクを低減させる手法の構築を目的に調査、実験を実施した。以下に得られた結果を示す。

- 1) 緊急対策としての簡易沈殿処理では、TC、NV の高い除去率が得られないため、放流先の利水状況によっては応急的な追加対策の構築が必要である。
- 2) 簡易沈殿処理では D-COD<sub>Cr</sub>、NH<sub>4</sub>-N の除去効果が低いため、処理水に残存する溶解性有機物などは消毒剤の消費を促進し、簡易沈殿処理後の消毒や水道施設での消毒への影響が懸念された。
- 3) 攪拌工程を導入した PAC の添加効果により、簡易沈殿処理による NV の除去効果や TC に対する塩素消毒効果を高められると考えられた。
- 4) 簡易沈殿池内に堆積した汚泥を引抜くことで、処理水の濁度は低く推移したことから、堆積汚泥の引抜き

管理は処理水質の観点から重要であると考えられた。

- 5) 簡易沈殿池内に堆積した SS 量は、流入 SS 負荷量に対し、PAC の無添加系で約 40%、添加系で約 80%であった。
- 6) 100mJ/cm<sup>2</sup>程度とした紫外線照射においては、PAC を添加することで NV の低減効果が 0.9log から 2.5log に向上した。
- 7) 病原微生物リスクの低減効果について NV を指標とし試算した結果、簡易沈殿処理では PAC を添加し塩素消毒を行うことで、単独処理と比較してリスクを半減できる可能性が示された。
- 8) 散水ろ床、接触酸化法では、簡易沈殿処理と比較してリスクの低減割合が向上したが、塩素消毒を追加しても大幅なリスクの低減効果が得られなかった。
- 9) 各種段階的の復旧技術による病原微生物リスクの低減効果を比較した結果、PAC 添加による凝集沈殿効果と紫外線消毒を適用することで、大幅なリスクの低減効果が見込まれた。

#### 参考文献

- 1) 緊急時水循環機能障害リスク検討委員会報告書、平成 19 年 3 月。
- 2) 諏訪守、安井宣仁、鈴木穰、岡本誠一郎、桜井健介 (2013)、津波被災下水処理場の段階的復旧対策技術による水質改善効果、下水道協会誌論文集、50(614)、111-120。
- 3) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介：ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、47(571)、pp.103~111,2010。
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について。
- 5) 安井宣仁、諏訪守、桜井健介、鈴木穰、小林憲太郎、高畠寛生：農業利用を想定した UF 膜処理による下水再生水の定量的微生物リスク評価：ノロウイルスを対象とした事例的研究、土木学会論文集 G(環境)、69(7)、pp.647-656,2013。
- 6) Masago et al.: Quantitative risk assessment of Noroviruses in drinking water based on qualitative data in Japan, Environ.Sci.Tech., 40(23),pp.7428-7433,2006。
- 7) Moe C.L.: Preventing Norovirus Transmission: How Should We Handle Food Handlers? Clin Infect Dis, (48), pp.38-40, 2009。
- 8) 安井宣仁、諏訪守、桜井健介、津森ジュン (2014)、下水処理水を対象とした紫外線照射におけるノロウイルスの除去特性、第 17 回日本水環境学会シンポジウム講演集、141-142。
- 9) USEPA (1999) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in Drinking Water, EPA/600/R-98/160,May。

## 多様化する感染症に応じた下水処理水の 高度な消毒手法の構築に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 27～平 29

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、諏訪守、安井宣仁

### 【要旨】

水系感染症防止の観点から新たなリスク要因に関わる対策が必要である。本研究は、その対策技術の一つとして紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、ウイルス不活化評価技術を確立するものである。

28年度は、病原微生物に対する紫外線消毒の効果を把握するために、下水処理水を原水とした連続通水による長期運転下での紫外線消毒実験を実施した。対象病原微生物はノロウイルス (NoV) GI、GII、GIV (NoVGI、NoVGII、NoVGIV) とし、また病原微生物指標として野生株の大腸菌 phage として F 特異 RNA phageGI～GIV (Fphage-G1、Fphage-G2、Fphage-G3、Fphage-G4) も測定対象とし、これらを遺伝子定量法により定量した。また、野生株の大腸菌、大腸菌群は感染価の定量を行い、大腸菌 phage は遺伝子定量と同時に感染価を定量した。

その結果、低圧紫外線装置 (低圧装置)、高出力型紫外線装置 (高出力装置) とともに流量が 40～140m<sup>3</sup>/day の範囲では、NoV と F 特異性 RNA phage の標的遺伝子減少割合の違いは把握できなかった。この時の高出力装置による大腸菌群の不活化効率、装置内滞留時間を考慮すると低圧装置と比較して 1.4 倍、大腸菌では 1.7 倍向上すると推定された。NoV と F 特異性 RNA phage の標的遺伝子減少割合は概ね 0.3～1.0 Log であった。さらに、NoVGI、NoVGII の消毒効率は低圧装置よりも高出力装置の方が 1.6～1.7 倍程度、Fphage-G1 は同等、Fphage-G2 と-G3 は 2 倍程度消毒効率が向上すると推定された。

キーワード：低圧紫外線装置、高出力型紫外線装置、ノロウイルス、F 特異性 RNA phage、大腸菌 (群)

### 1. はじめに

昨今、検出技術の向上に伴い環境水をはじめ下水や下水処理水等から様々な病原微生物が検出<sup>1)</sup>されてきている。さらに、新興ウイルスの出現や再興感染症としての抗生物質耐性菌の出現と蔓延が世界的に問題視されてきており<sup>2)</sup>、水系感染症を引き起こす可能性のある病原微生物は、検出技術の向上にともない多様化してきていると考えられる。公共用水域の衛生学的安全性を担保するため、水系感染リスクを引き起こす可能性のある病原微生物を低減させる必要がある。特に下水からは様々な病原微生物が検出される可能性があり、下水処理場において効果的な病原微生物対策を講ずる必要がある。その対策技術の一つとして紫外線消毒の適用が考えられる。

近年、紫外線ランプの高出力に伴い、放流先の生態系および水産資源の保全のため、下水処理場への利用拡大が期待されている。紫外線消毒は、次亜塩素酸ナトリウ

ム等の薬剤を使用しないことから、消毒の残留性はないものの、塩素消毒に比較して消毒副生成物生成能が低い利点を持つ。また、紫外線波長が 200～280 nm 領域の UV-C が核酸塩基に吸収されることで核酸を損傷させ、微生物等を不活化させる効果がある<sup>2) 3)</sup>。これは、核酸塩基の主要構成成分であるチミン、アデニン、シトシン、グアニンの UV-C 吸収が大きいためである<sup>4)</sup>。これらのことから、紫外線は直接病原微生物の遺伝子に作用し感染価を失わせることから、NoV 等の病原微生物の不活化に対しても効果が期待できると推定される。さらに、次亜塩素酸ナトリウム等の薬剤を使用する消毒手法と比較して、消毒剤消費物質などの水質変動に対して柔軟に対応が出来ると考えられる。

下水道統計によれば、下水処理場における消毒手法の多くが塩素消毒 (導入率 94%) であり、紫外線消毒を導入している施設は約 6%に留まっている<sup>5)</sup>。このため、

下水処理場での紫外線消毒による病原微生物の不活化効果についてのデータは十分に蓄積されていないとともに、長期連続運転におけるデータ蓄積による、水質変動に伴う紫外線消毒の効果が明確となっていないと考えられる。

本研究は、塩素消毒の代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の確立を目的とするものである。28年度は、病原微生物に対する紫外線消毒の効果を把握するために、下水処理水を原水とした連続通水による長期運転下での紫外線消毒実験を実施した。

## 2. 調査概要

### 2.1 流水式紫外線照射装置の概略

本研究では、紫外線ランプの出力が異なる2種類の内照式の紫外線照射装置を用いた。従来広く一般的に用いられている紫外線ランプである低圧水銀灯(65W・1灯)を用いた照射装置(低圧装置)と、近年、開発が進んできている高出力型の紫外線ランプ(60W・1灯)を用いた装置(高出力装置)を用いた。

低圧装置は、内径108mm、照射有効長1023mm、装置容積8.7L、高出力装置は、内径108mm、照射有効長508mm、装置容積4.3Lである。(\*低圧装置、高出力装置ともに紫外線ランプは65W、60Wとほぼ同出力であるが、高出力装置は、低圧装置の約半分程度の大きさであるため、装置をコンパクト化できる、または従来の低圧装置と同じ装置形状にすると出力が120W程度に拡張できる特徴を有している)。

### 2.2 採水方法

標準活性汚泥処理を実施しているA下水処理場の二次処理水を砂ろ過した処理水(原水)を紫外線消毒の原水として図-1に示すように原水を24時間連続的に紫外線照射装置に通水し、採水ポートより適宜、紫外線照射後の試料(処理水)を採水した。なお低圧装置への通水した系をRUN-1、高出力装置の系をRUN-2と設定した。

調査期間は平成28年6月～平成29年1月であり、原水の連続通水を実施した。水質変動に伴う紫外線消毒の効果を把握するために、2カ月間隔で通水流量を段階的に減少させた。流量を変化させる際には、紫外線ランプスリーブの濁質等の汚れを一度、酸-アルカリにより洗浄を行った。採水間隔は毎週1回実施し、同流量で採水回数n=7～8(総数n=32)とした。装置流入側に流量センサー(FD-Q50C, KEYENCE社製)を取り付け、24時間1分間置にデータ取得を行った。

### 2.3 測定項目

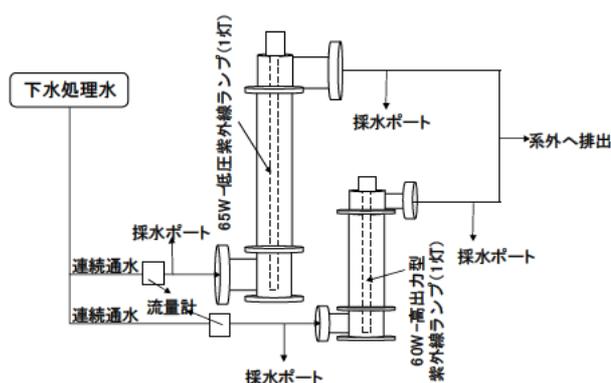


図-1 長期連続通水実験 装置概略

本調査における対象病原微生物は NoVGI、NoVGII、NoVGIV、Fphage-G1、Fphage-G2、Fphage-G3、Fphage-G4 とし、Real-time PCR 法により標的遺伝子の定量を行った。Fphage-G1 は主に MS2 phage や  $\lambda$ 2 phage 等、Fphage-G2 は GA phage 等、Fphage-G3 には Q $\beta$  phage 等、Fphage-G4 は SP phage 等が含まれており、Fphage-G1、G4 は主に動物糞便由来、Fphage-G2、G3 は主にヒト糞便由来である<sup>6)</sup>。

また同時に野生株の大腸菌 phage、大腸菌、大腸菌群の感染価の定量を行った。

その他、一般水質として SS、濁度、COD<sub>Cr</sub>、全窒素、全リン、波長 254nm の紫外線吸光度の測定を行った。

## 2.4 定量方法

### 2.4.1 標的遺伝子の定量方法

原水および紫外線照射後の試料は、PEG 沈殿法により濃縮(濃縮水量 400mL に統一)し、濃縮後の試料を核酸自動抽出装置(QIACUBE、QIAGEN 社製)により核酸を抽出し、DNase 処理後、核酸の Cleanup を実施した。Cleanup 後の核酸を RT 反応に供し cDNA を得た。抽出方法、DNase 処理、RT 反応は文献<sup>7)</sup>に準拠し調整した。得られた cDNA を 5 $\mu$ L 用い、全量 50 $\mu$ L 系とし QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher 製)により鋳型 DNA による絶対定量を行った。なお、Real-time PCR における反応条件は文献<sup>7)</sup>に従った。

### 2.4.2 一般水質の定量方法

SS は下水試験法<sup>8)</sup>に準拠し測定した。pH および濁度は、ポータブル pH 計(LAQUAact, 堀場製作所)、高感度濁度計 (TR-55、笠原理化)を用い定量した。

COD<sub>Cr</sub>、全窒素、全リンの測定は HACH 社製の試薬を用い吸光度計 (DR-3900、HACH)により定量した。

大腸菌および大腸菌群は、クロモカルトコリフォーム寒天培地 (Merck Millipore)を用いた平板法により定量

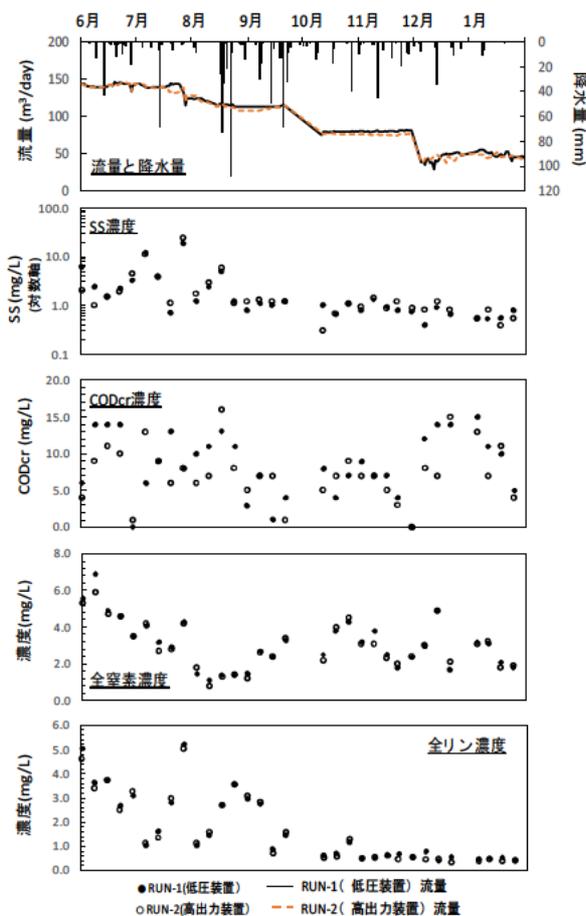


図-2 調査期間中(2016/6~2017/1)の流入原水の水質変動

し、F 特異性大腸菌 phage の感染価は、宿主菌として *E.coli*k12+(A/λ)を用いた重層寒天培地法にて定量した。

### 3. 調査結果

#### 3.1 一般水質データ

調査期間中の流入原水の流量変動、SS 濃度、CODcr 濃度、全窒素濃度、全リン濃度を図-2 に示す。併せて採水当日の降水量を棒グラフで示した。同様に図-3 には紫外線照射後の水質を示す。調査期間中を通して、原水、処理水ともに SS 濃度の変動係数 (CV) は 150~170%、CODcr の CV は 50%、全窒素および全リンの CV は 80% 程度で原水中の水質変動が大きい。一方、紫外線照射前後で顕著な水質の変化は確認されなかった。なお pH は調査期間中では、照射前後で大きな変化はなく、概ね pH=6.4~7.2 の範囲で推移していた。

#### 3.2 大腸菌群、大腸菌、F 特異性 RNA phage 濃度

図-4-1 に低圧装置 (RUN-1)、図 4-2 に高出力装置 (RUN-2) の紫外線照射前後の大腸菌、大腸菌群、野生株の大腸菌 phage 濃度を示す。各図より、流入原水中の大腸菌群濃度は概ね 10<sup>3</sup> CFU/mL、大腸菌は約 10<sup>1</sup>~

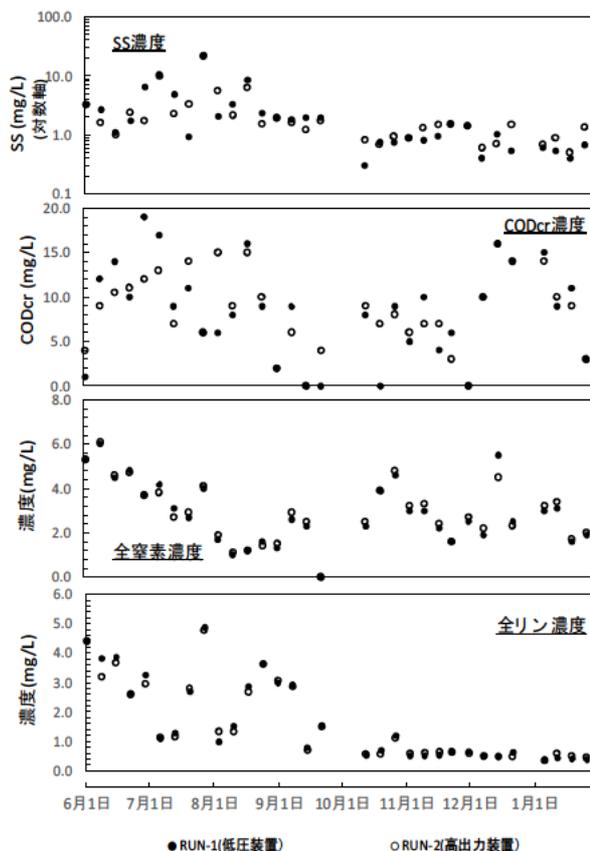


図-3 調査期間中(2016/6~2017/1)の紫外線照射後の処理水の水質変動

10<sup>2</sup>CFU/mL で推移しており、F 特異性 RNA phage は数~数十 PFU/mL で検出され、検出率は 96.8%であった。

低圧装置における処理水中の大腸菌群の検出率は 100%で、その平均不活化率は約 1.7Log であった。同様に大腸菌の検出率は 78%であり、平均不活化率は約 2.2Log であった。一方、高出力装置では、大腸菌群の平均不活化率は 1.2Log (検出率 100%)、大腸菌は約 1.8Log (検出率 97%) であった。

本調査で使用した低圧装置と高出力装置とでは、容積が異なるため、装置内の平均滞留時間に違いが生じるが、装置内の流動特性、すなわち装置内の混合拡散状態と滞留時間分布が同一であると仮定した。(1) 式より双方の装置の紫外線照射前後の大腸菌および大腸菌群濃度から、同一条件における不活化効率の違いを検討した。

$$\frac{C_{t-L}}{C_{0-L}} = \frac{(I_{avg-L}/65W) \cdot V_L \cdot Q}{D_{10}} \quad (1)$$

$$\frac{C_{t-H}}{C_{0-H}} = \frac{(I_{avg-H}/60W) \cdot V_H \cdot Q}{D_{10}}$$

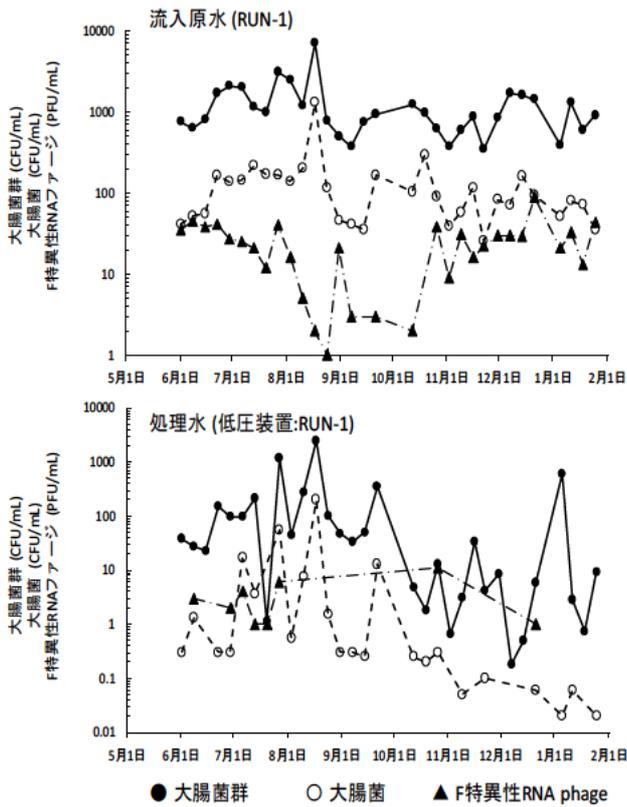


図-4-1 紫外線照射前後の大腸菌群、大腸菌、  
F 特異性 RNA phage の濃度推移 (低圧装置)  
(不検出のデータは図に表示していない)

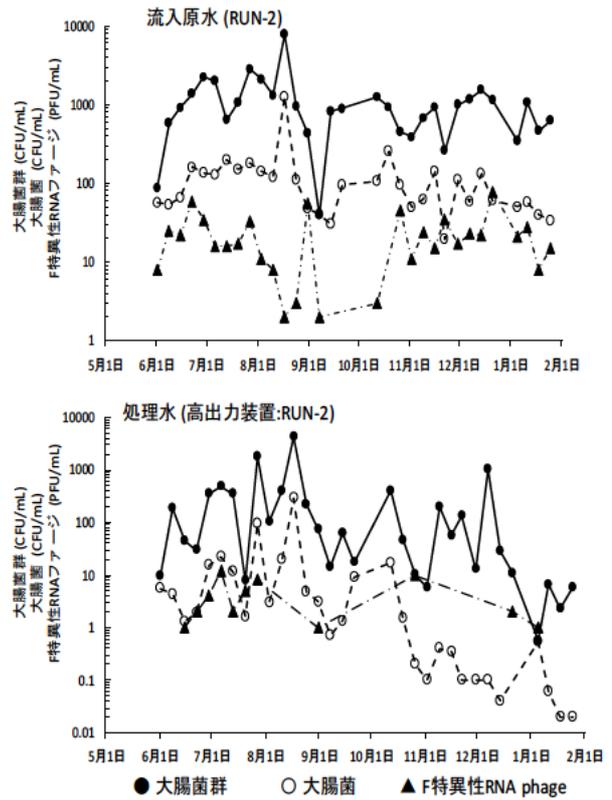


図-4-2 紫外線照射前後の大腸菌群、大腸菌、  
F 特異性 RNA phage の濃度推移 (高出力型装置)  
(不検出のデータは図に表示していない)

ここで、 $C_{0H}$ 、 $C_{0L}$ は高出力および低圧装置の微生物初期濃度、 $C_{tH}$ 、 $C_{tL}$ は高出力および低圧装置の紫外線照射後の微生物濃度、 $I_{avgH}$ 、 $I_{avgL}$ は高出力および低圧装置の平均紫外線照度、 $V_H$ 、 $V_L$ は高出力および低圧装置の容積、 $Q$ は流量、 $D_{10}$ は対象微生物が1Log不活化するのに必要な紫外線量である。

式(1)において双方の装置における出力  $W$  数が異なるため、単位  $W$  数あたりの平均紫外線照度( $I_{avg}$ )の比が直接不活化率に対応している。また式(1)の  $D_{10}$  は対象となる微生物が1Log不活化するのに必要な紫外線量となるため、同微生物で比較した場合は同値となる。

以上より、高出力装置による大腸菌群の不活化効率は低圧装置に比較して1.4倍、大腸菌では1.7倍と試算された。

原水中のF特異性RNA phageは低濃度であったが約95%と高い検出率であり、概ね数PFU/mL~90PFU/mLの範囲で推移していた。低圧装置の処理水においては調査期間中の検出率は28.3%、高出力装置で38.5% (不検出のデータも考慮)であり、平均除去率は各々、1.1Log、1.0Logであった。高出力装置のF特異性RNA phageに対する紫外線消毒効率は装置内流動特性が同一である

と仮定し、式(1)で示した試算と同様に算出すると、低圧装置の約2倍の消毒効率であると試算された。

### 3.3 原水と紫外線照射後の遺伝子定量データ

図5に原水、各RUNの紫外線照射後のNoV濃度を示す。原水においては、NoVG1は通年を通して検出された(検出率100%)。NoVG2は6月中旬、8月下旬~9月中旬を除き検出された(検出率84.3%)。NoVG4は11月に2回、12月に1回検出されたのみであった(検出率9.4%)。

図6には、各RUNのF特異性RNA phage濃度を示した。Fphage-G1は6月~9月中の原水の検出率は約40%であったが、10月以降の検出率は100%に上昇した。原水中の検出濃度は、NoVG1、NoVG2よりも1~2オーダー程度高かった。Fphage-G2はNoVG1と同様に通年を通して検出され、検出濃度はNoVG1、G2と比較して2~2.5オーダー程度高い値であった。Fphage-G3の検出率も94%と高く、検出濃度およびその濃度推移がNoVG2と同様な傾向を示していた。一方、Fphage-G4は紫外線照射前後で全ての試料で不検出(Not detected = N.D)であった。

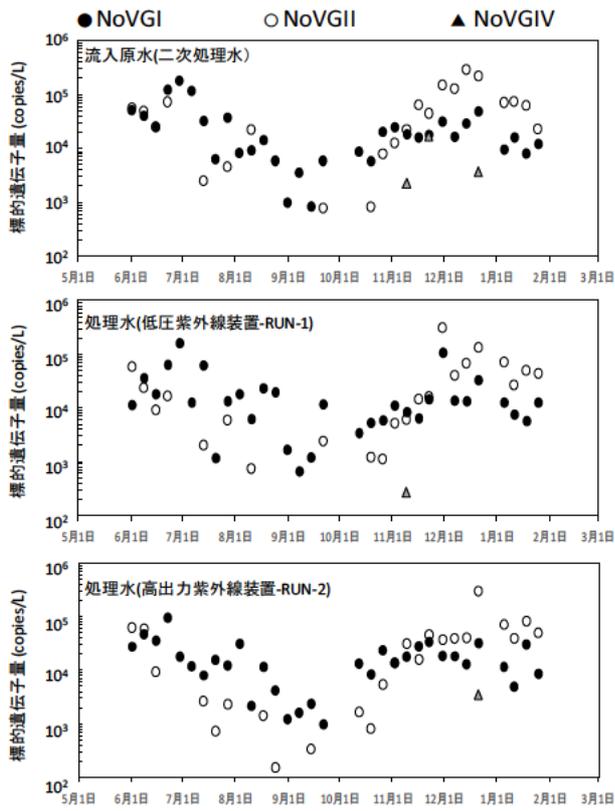


図-5 流入原水、紫外線照射後の処理水のNoV濃度推移

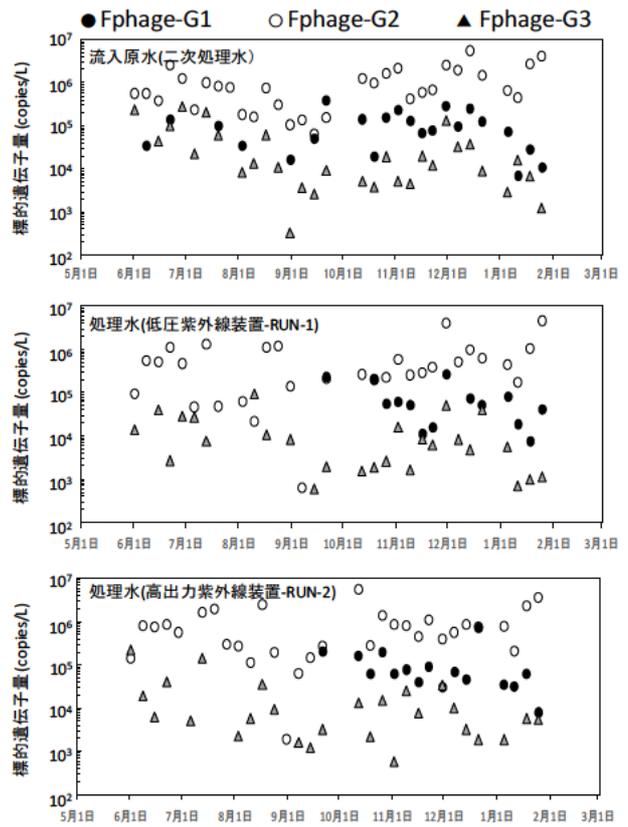


図-6 流入原水、紫外線照射後の処理水のFphage濃度推移

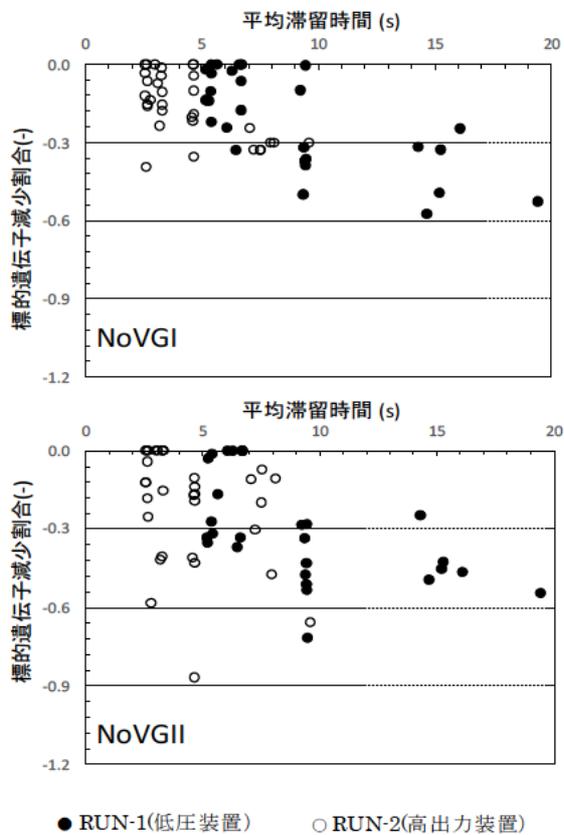


図-7 NoV標的遺伝子減少割合

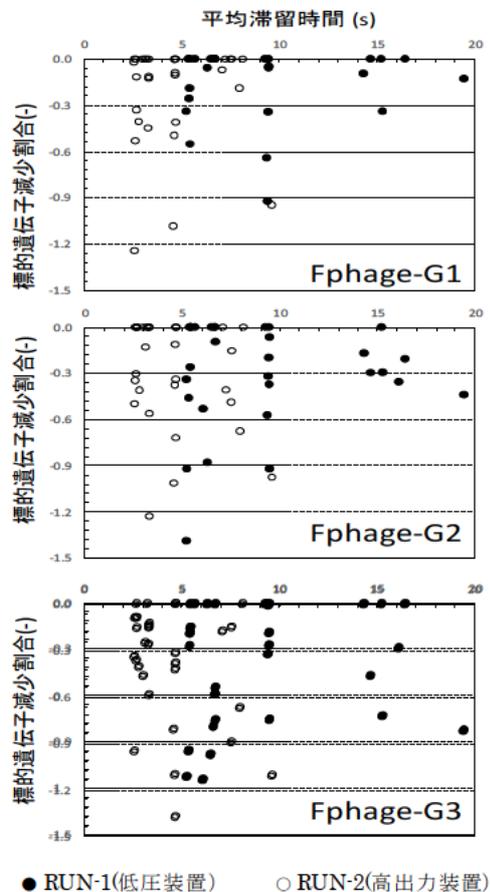


図-8 FphageG1-G3標的遺伝子減少割合

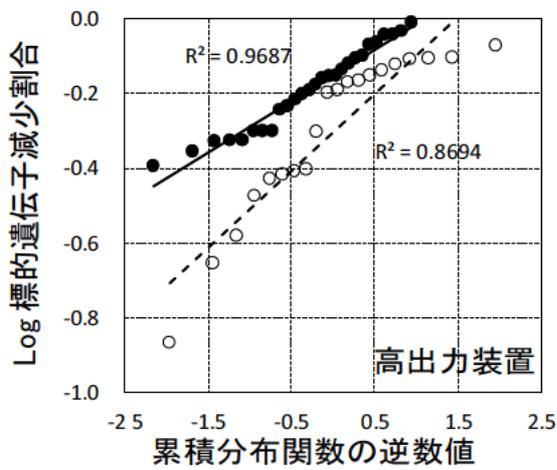
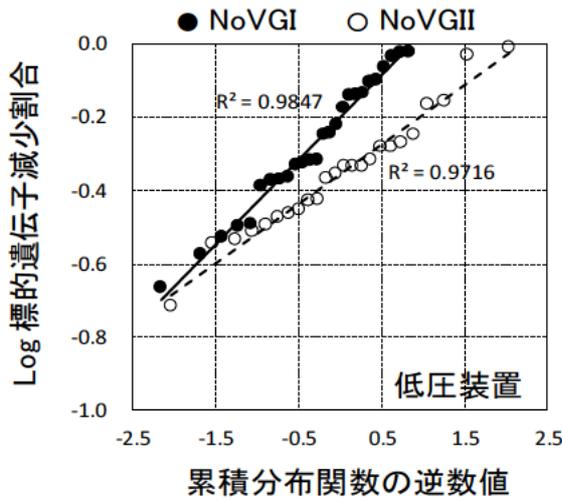


図-9 NoVGI, GIIの標的遺伝子減少割合のQ-Qプロット

表-1 低圧・高出力装置における各標的遺伝子減少

対象 標的遺伝子	低圧紫外線装置		高出力紫外線装置	
	平均 Log減少割合	標準偏差	平均 Log減少割合	標準偏差
NoVG I	0.20	0.23	0.15	0.14
NoVG II	0.36	0.17	0.30	0.21
Fphage-G1	0.96	0.93	0.52	0.53
Fphage-G2	0.60	0.53	0.62	0.47
Fphage-G3	0.65	0.43	0.59	0.51

### 3.4 標的遺伝子減少割合の分布と照射線量の推定

図-7 に NoVGI、NoVGII、図-8 に Fphage-G1~G3 の標的遺伝子の減少割合を示す。横軸は便宜上、装置の

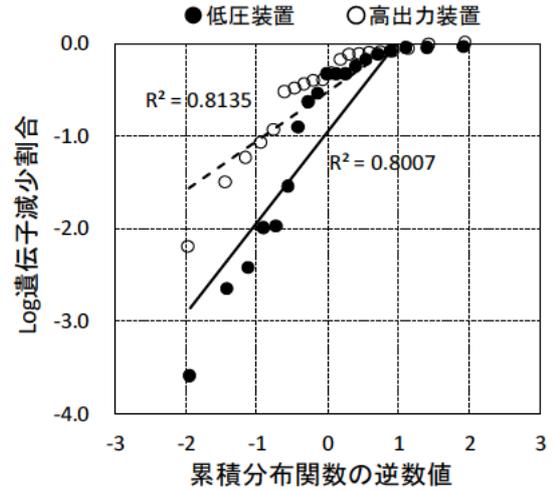


図-10-a) 大腸菌phage GIの標的遺伝子減少割合のQ-Qプロット

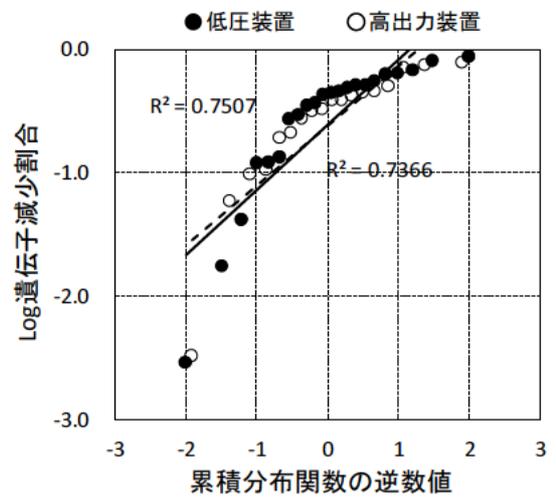


図-10-b) 大腸菌phage GIIの標的遺伝子減少割合のQ-Qプロット

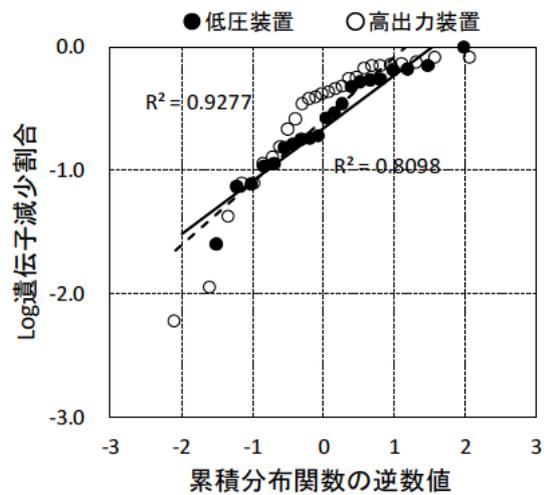


図-10-c) 大腸菌phage GIIIの標的遺伝子減少割合のQ-Qプロット

平均滞留時間とした。標的遺伝子の減少割合は、概ね0.3～1.0 Logであった。NoVについては、滞留時間の増加に伴い、標的遺伝子減少割合が増加している傾向が確認されたものの、変動が大きく明確に流量変化に伴う標的遺伝子減少割合の変化は把握できなかった。一般的に、流量が少なれば装置内の滞留時間が増加するため、紫外線量も増加するはずである。しかしながら、実験結果からは異なる結果が得られた。これはランプスリーブへの濁質等の蓄積の可能性により生じたものと考えられた。

図-7,8よりNoVおよびFphageとも流量変化に伴う、明確な標的遺伝子の減少割合が把握できなかったため、本項では、調査期間中に得られた実測値より算出した標的遺伝子減少率を一つの母集団と捉え、低圧装置および高出力装置の除去率分布の推定を試みた。具体的には下記手順に従い推定を行った。

#### 推定方法

- ① 実測値から得られた標的遺伝子減少割合から分位数プロット (Q-Q プロット) を作成。
- ② 縦軸を Log 標的遺伝子減少割合、横軸を標準正規分布の累積分布関数の逆関数の値とする。
- ③ 作図したグラフから Log 標的遺伝子減少割合と累積分布関数の逆関数値に線形性が確認された場合、Log 標的遺伝子減少割合が正規分布に従う。

上記の推定方法により、低圧装置および高出力装置のNoVGI、NoVGII、Fphae-G1～G3のLog標的遺伝子減少割合を試算した。なおFphage-G4は原水、処理水ともに不検出 (N.D) であったため遺伝子の減少割合の試算は行わなかった。

図-9にNoVGI、GII、図-10(a)～(c)にFphage-G1～G3の各標的遺伝子減少割合のQ-Qプロットを示す。図中の横軸は累積分布関数の逆数値、縦軸はLog標的遺伝子減少割合を示す。各図より概ね低圧装置、高出力装置ともに各標的遺伝子のLog減少割合は正規分布に従うと推定され、各々Log減少割合は表-1の通りであった。低圧装置と高出力装置ともに各標的遺伝子の平均減少割合と標準偏差はほぼ同程度であった。紫外線の消毒効率を考えた際、本調査で使用した装置は低圧装置と高出力装置で通水容積、紫外線ランプの出力が異なるので、同一照射W数および装置内平均滞留時間あたりのLog標的遺伝子減少率を算定した、算定方法は、大腸菌および大腸菌群の不活化率と同様の検討方法、すなわち式(1)に基づき評価した。その結果、消毒効率はNoVGI、NoVGIIは低圧装置よりも高出力装置の方が1.6～1.7倍程度、Fphage-G1は同等、Fphage-G2と-G3は2倍程度向上

すると推定された。

一方、装置内の紫外線量の推定には流動解析ソフト等を用い、装置内の紫外線照度分布を算出し求める方法<sup>9)</sup>、または指標微生物、例えば純培養した大腸菌ファージMS2やQβ等を装置内に添加した生物線量計によるものがある<sup>9)</sup>。流動解析ソフトでの推定は熟練度や境界条件等の諸条件の設定に関する知識および解析ソフトが高価であるため実用性に欠ける。生物線量計では純培養したファージ等を実装置に添加するため、連続運転下では測定や試験そのものの実施が困難となる可能性がある。

このため本研究では、簡易的に実測値から装置内の紫外線量の推定を試みた。回分式による紫外線照射実験の既往の研究結果<sup>10)</sup>では、NoVGIIの標的遺伝子を1Log減少させるのに必要な紫外線量は概ね40mJ/cm<sup>2</sup>である。この値を基に各装置内の紫外線量を算定した結果、装置内流量が40～140m<sup>3</sup>/dayの範囲では、低圧装置の紫外線量は、8.2(5%値)～23(95%値)mJ/cm<sup>2</sup> (平均15.6mJ/cm<sup>2</sup>)、高出力装置では、4(5%値)～22(95%値)mJ/cm<sup>2</sup> (平均13mJ/cm<sup>2</sup>)と推定された。

本推定は既往の実験結果に基づいて試算したものであるため、データ数を蓄積しより詳細な検討が必要不可欠である。

#### 4. まとめ

28年度は、病原微生物に対する紫外線消毒の効果を把握するために、下水処理水を原水とした連続通水による長期運転下での紫外線消毒実験を実施した。以下に得られた結果を示す。

- 1) 高出力装置による大腸菌群の不活化効率は、装置内滞留時間を考慮すると低圧装置と比較して1.4倍、大腸菌では1.7倍向上すると推定された。
- 2) 低圧装置、高出力装置ともに流量が40～140m<sup>3</sup>/dayの範囲では、NoV、F特異性RNA phageの標的遺伝子減少割合の変化の傾向は把握できなかった。
- 3) 低圧装置、高出力装置によるNoV、F特異性RNA phageの標的遺伝子の減少割合は、概ね0.3～1.0Logであった。
- 4) 装置内滞留時間を考慮するとNoVGI、NoVGIIの消毒効率は低圧装置よりも高出力装置の方が1.6～1.7倍程度、Fphage-G1は同等、Fphage-G2と-G3は2倍程度消毒効率が向上すると推定された。

## 参考文献

- 1) Rosario K., Nilsson C., Lim YW., Ruan Y., Breitbart M., Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water, *Environmental Microbiology*, Volume 11, Issue 11, PP.2806-2820, 2009.
- 2) 創薬促進検討委員会・抗微生物薬適正使用推進委員会提言第2弾, 世界的協調の中で進められる耐性菌対策, <[http://www.kansensho.or.jp/news/gakkai/pdf/1603\\_resistant\\_bacteria\\_measures\\_02.pdf](http://www.kansensho.or.jp/news/gakkai/pdf/1603_resistant_bacteria_measures_02.pdf)> [参照 2016-04-21]
- 3) 武部啓, DNA修復, 東京大学出版会, pp.2, 20-26, 1983.
- 4) USEPA, Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule, <http://www.epa.gov/safewater/disinfection/lt2/compliance.html>, pp2-7,2-21, 48-45, 2006.
- 5) 公益社団法人 日本下水道協会, 平成 23 年度版下水道統計 第68号 (CD-ROM), 2013.
- 6) ウイルス不活化手法の大腸菌フェージによる評価 (1993)、土木学会衛生工学委員会編、環境微生物工学研究法
- 7) 安井宣仁, 諏訪守, 桜井健介, 鈴木穰, 小林憲太郎, 高島寛生, 農業利用を想定した UF 膜処理による下水再生水の定量的微生物リスク評価: ノロウイルスを対象とした事例的研究, 土木学会論文集 G (環境), Vol. 69, No. 7 p. III\_647-III\_656, 2013.
- 8) 公益社団法人 日本下水道協会, 下水試験方法 上巻 2012 年, CD-ROM.
- 9) 平田強 編, 岩崎達行, 大瀧雅寛, 片山浩之, 神子直之, 木村憲司, 土佐光司, 松本直秀, 本山信行, 森田重光, 紫外線照射一水の消毒への適用性一, 技報堂出版, 2008.
- 10) 文部科学省科学研究費補助金, 若手研究(B), 下水再生水の紫外線消毒による病原微生物の感染リスク評価と適用管理手法に関する研究, 平成 25-27 年度報告書, 2015.

## 下水中の病原微生物の網羅的検出法の開発に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 27～平 28

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、諏訪守、安井宣仁

### 【要旨】

本研究は、感染症発生情報を提供出来るシステムを構築するために必要となる基礎データの集約とデータベース化を図るため、下水試料を対象とした病原微生物の網羅的検出法の開発を目的とするものである。網羅的検出法により得られる下水中の病原微生物のデータは、今後、下水処理プロセスでの病原微生物のリスク制御を評価する上で、有効な情報となり得ると考えられる。網羅的な検出には、近年の遺伝子解析技術の向上により医学分野で検討事例がある次世代シーケンサー（NGS）を適用した。下水試料を対象とした NGS による網羅的な病原微生物の検出に関する検討事例は国内外でも極めて少ないため、最適化された測定手法などはない。NGS による分析には、前処理として対象試料の核酸を抽出する必要があるが、感度よく精度の高いデータを得るためには核酸抽出効率を高め、最適な純度を得ることが重要である。

本研究では、下水試料を対象に異なる核酸抽出方法を検討し、NGS 分析に最適な前処理方法を評価した。また、NGS 分析用の流入下水、二次処理水を隔週で計 48 サンプル採水し、開発した抽出方法を用いて 48 サンプルの NGS 分析および解析を行い生物種の分類を試みた。

その結果、0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで試料を補足し、ビーズを用いてフィルター表面上で処理することで、最適な核酸濃度および純度を得られ、下水試料を対象とした際の NGS 分析に適した核酸抽出方法が確立できた。NGS の分析・解析では、流入下水は全体を通して約 30～50%、処理水は 15～20% の遺伝子の配列情報がヒットし生物種を分類することができた。流入下水は 90% 以上が細菌 (Bacteria) であったのに対して、二次処理水は植物と真菌 (Plants and Fungi) の割合が増加している傾向が確認された。

キーワード：病原微生物、次世代シーケンサー、遺伝子配列情報、核酸抽出

### 1. はじめに

近年、医学領域では病原微生物、主にウイルスや細菌等の検出・測定技術が向上してきており、疾患原因となるウイルス等の検知が可能になってきている。それに伴い、環境分野でも河川水や海域、下水試料等から様々な病原微生物が検出可能となり、それらの存在実態が徐々に明らかとなってきている<sup>1) 2)</sup>。これらの検出・測定技術等を応用して、流入下水中の病原微生物を迅速に測定し、ヒトへの健康被害拡大防止のための感染症発生情報を提供出来るシステムの開発が望まれている<sup>3)</sup>。

様々な病原微生物が検出・測定可能になってきているなか、下水に着目すると原虫、腸管系ウイルス、細菌、その他の感染性ウイルス等が感染者あるいは不顕性感染者の糞便から下水中に混入する可能性がある。これらの病原微生物の検出の現状については、混入する可能性がある全ての病原微生物を検出することが望ましいが、現状では主に遺伝子解析手法 (PCR 法等) により、個々の病原微生物を定量測定

することに留まっているため、特定の病原微生物を対象とした情報しか得られない。感染症発生情報を提供出来るシステムの開発には、測定対象とした試料中に混入可能性のある病原微生物の存在種や、その割合などの基本的なデータが必要となる。このため、現在顕在化している個々の病原微生物のみならず、新たに問題となる可能性のある病原微生物などを含め、網羅的に複数の病原微生物の存在実態を把握できる検出法を開発する必要がある。また、網羅的検出法により得られる下水中の病原微生物のデータは、下水処理プロセスにおいて病原微生物のリスクを制御、評価する上で有効な情報となり得る。

本研究では、感染症発生情報を提供出来るシステムの構築に必要な基礎データの集約とデータベース化を図るため、病原微生物の網羅的検出法の開発を目的とするものである。具体には、医学分野で検討事例のある NGS を下水試料に適用するための最適な前処理方法の提案と、その成果を基に下水試料に含まれる生物種等の解析・評価を行った。

## 2. 研究方法および研究結果

下水試料を対象とした NGS による網羅的な病原微生物の検出に関する検討事例は、国内外でも極めて少ないため、網羅的検出法に関する最適化された測定手法はない。

NGS による分析には、前処理として対象試料の核酸を抽出する必要があるが、感度よく精度の高いデータを得るためには核酸抽出効率を高め、最適な純度を得ることが重要である。しかしながら、現状では下水試料を対象とした最適な核酸抽出方法が確立されていない。

本研究では、既往の研究成果等で示されている抽出方法ならびに本研究で開発した抽出方法を下水試料に適用し、NGS 分析に最適な前処理方法を評価した。

次いで、前処理方法の評価結果を基にした核酸抽出方法を適用し、NGS 分析装置(Miseq, Illumina 社製)により対象試料の全 48 サンプル中の塩基配列データを取得し、下水および処理水に含まれる生物種等の解析・評価を行った。

### 2.1 NGS 前処理：核酸抽出方法の評価

NGS に使用できる核酸の状態は、二本鎖の DNA (dsDNA: double-stranded DNA) である必要があり、抽出後の後段の分析において精度良く行える最低濃度として dsDNA 濃度が 25ng/μL 以上必要である。また dsDNA の純度が 1.8~2.0 の範囲であることが望ましい。これらの条件を満たすことが可能な抽出方法を検討した。

A 下水処理場の流入下水を抽出検討用試料とし、以下に示す 4 種類の異なる核酸抽出方法で検討を行った。

#### 抽出方法 ①

ポリエチレングリコール沈殿法 (PEG 沈法) により濃縮した下水試料を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社製) を用い、手順書に従い核酸の抽出を行った。

#### 抽出方法 ②

抽出方法①と同様に PEG 沈法により濃縮した試料を、ウイルスの抽出に最適化された kit である QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN 社製) を用い、手順書に従い核酸の抽出を行った<sup>4) 5)</sup>。

#### 抽出方法 ③

懸濁物質や粒子内に付着している濁質から効率的に核酸を抽出するために、濃縮方法を抽出方法①、②の PEG 沈法から変更し、0.45 μm メンブレンフィルターで下水をろ過し、フィルターに捕捉された試料から QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN 社製) を用い核酸の抽出を行った。

#### 抽出方法 ④ (本研究で開発した手法)

抽出方法③における前処理と同様に 0.45 μm のメンブレンフィルターで下水をろ過し、フィルターに捕捉された試料をビーズが入ったチューブに入れ、フィルター表面上をビーズで剥がす工程を追加した。具体的にはビーズ入のチューブにフィルターを充填し専用のボルテックスで 5 分間混合させ、フィルター表面上に捕捉した濁質を効果的に剥がし核酸の抽出を行った。

核酸の精製は PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO 社製) を用い手順書に従った。

各抽出方法で得られた抽出液は、Nanodrop 2000c (ThermoFisher 製) を用い、核酸(DNA)純度を測定し、dsDNA 濃度は Qubit3.0 (ThermoFisher 製) を用い定量した。

### 2.2 核酸抽出方法の評価結果

図-1 に各抽出方法における dsDNA 濃度および純度を示す。抽出方法①、②では抽出後の後段分析が精度良く行える最低濃度である dsDNA 濃度が 25ng/μL 未満であり、DNA の純度が 3~3.5 と非常に高かった。純度が高すぎる場合、夾雑物の影響があると考えられ、抽出方法①および②は下水試料を対象とした際の NGS 分析の抽出方法としては不向きであると判断した。一方、抽出方法③では濃縮方法を PEG 沈法から 0.45 μm フィルターに通水しフィルター上に捕捉された試料を用いて抽出を行ったが、抽出方法①、②と比較して、DNA の純度も後段の分析に最適な 1.9 程度であり、dsDNA 濃度は数倍程度増加した。しかしながら、NGS 分析における後段分析の精度が良く行える最低濃度の 25ng/μL には達しなかった。本研究で開発した抽出方法④は、dsDNA 濃度が約 140ng/μL、DNA 純度も 1.8~1.9 と良好であった。抽出方法④はフィルターに捕捉された試料をビーズによりフィルター表面上から剥がし取るため、抽出効率が他の抽出方法と比較して向上した可能性が考えられた。

以上より抽出方法④を用いることで、核酸抽出効率が向上し、分析可能な最適な純度の DNA が得られることから、下水試料を対象とした際の NGS 分析に適した核酸抽出方法が確立できた。

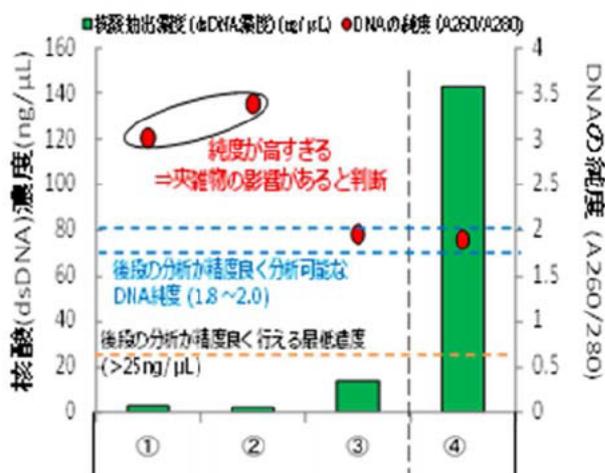


図-1 異なる抽出方法による dsDNA 濃度と DNA 純度

## 2. 3 実処理施設での NGS 用試料の採水

本研究では、A 下水処理場の流入下水と凝集剤添加活性汚泥法および A2/O 法の処理方式が異なる二次処理水を対象試料とした。採水は H.27 年 7 月～H.28 年 6 月の期間において、季節変動を考慮するために隔週で行うとともに、各々の二次処理水は滞留時間を考慮し、NGS 分析用試料として 48 サンプルを得た。この 48 サンプルについて上記 2.1 で開発した抽出方法により、NGS を用い病原微生物を網羅的に検出することを試みた。

採水した試料は直ちに分析室へ持ち帰り SS、濁度、T-N、T-P、pH、COD<sub>Cr</sub>、大腸菌、大腸菌群を測定した。併せて NGS 用の前処理として 0.45 μm のフィルターに試料を通水し、抽出方法④により核酸の抽出を行った。なお分析を即座に行えない試料は、フィルターを -80℃ で保管し 1 ヶ月以内に抽出作業を実施した。

## 2. 4 NGS による分析・解析方法

### 分析方法

上記 2.3 で採水した試料について、本研究で開発した核酸抽出方法により前処理を行い、NGS 装置

(Miseq, Illumina 社製) を用い、試料水中に含まれる生物種の遺伝子解析を実施した。核酸抽出した試料は Nextera XT DNA Library Preparation kit

(Illumina 社製) を用い、ライブラリー調整を行った後、kit の手順書に従い調整を行い NGS に供した。

なお NGS は 1 RUN で異なる 96 サンプルの遺伝子情報 (塩基配列データ) を取得できるため、従来の qPCR 法やその他のシーケンス解析法よりも簡便かつ迅速に大量のデータが取得可能なツールである。

### 解析方法

NGS により取得した塩基配列データはサンプル毎に膨大な塩基配列データが無作為に得られるため、NGS により取得したデータの情報処理を行う必要がある。本研究では以下の手順によりデータの解析を試みた。

#### (1) データの加工および配列抽出

##### ① Illumina アダプター配列のトリミング

NGS では、サンプルを一度にスプールするためサンプルを識別できるようにサンプル毎に異なるアダプターが付加されているため、リード配列末端で該当配列:Read 1 3' 末端側

```
CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC
```

Read 2 3' 末端側

```
CTGTCTCTTATACACATCTGACGCTGCCGACGA
```

と最低 5 塩基以上オーバーラップする領域をミスマッチ許容率 20% でトリミングを行った。

##### ② 低 QV (クオリティー) 領域のトリミング

上記①処理後のリードデータについて、20 塩基の window を 5' 側から差スライドさせていき、平均 QV が 20 未満となった領域をトリミングした。トリミング後、Read 1/Read 2 とともに 50 塩基以上残存したリードのみを出力する。

##### ③ Read 1/Read 2 の結合

②処理後のリードデータを、Read 1/Read 2 配列の 3' 側末端で最低 6 塩基以上オーバーラップする領域を検索 (ミスマッチ許容率 8%) し、オーバーラップ部分を連結する。

##### ④ BLAST 解析用クエリ配列の抽出

連結処理を行ったデータより配列長の長い順に1サンプルあたり 10,000 配列、合計 480,000 配列 (10,000 配列×48 サンプル分) の配列を抽出し、データベース上に登録されている検索用のクエリ配列セットを作成する。

## (2) 抽出塩基配列の BLAST 解析

上記(1)にて作成したクエリ配列セットをインプットデータとして、指定配列データベース：NCBI NR(non-redundant nucleotide) Database に対する BLAST 検索を行い、ヒット情報を出力する。

## 2. 5 解析結果

表-1 に 48 試料分の NGS により取得リード数、解析方法(1)における工程①、②の処理後の残ったリード数、結合処理後のリード数、取得リード数に対する結合リード数の割合、結合配列の平均長(bp)を示す。

本研究で用いた流入下水、下水処理水中の塩基配列数として平均 712,715 リード数が得られ、解析方法に従い加工し、結合して得られたデータ数は取得データの約 60~80%であった。本研究で開発した抽出方法を用いることで良好な結果が得られた。

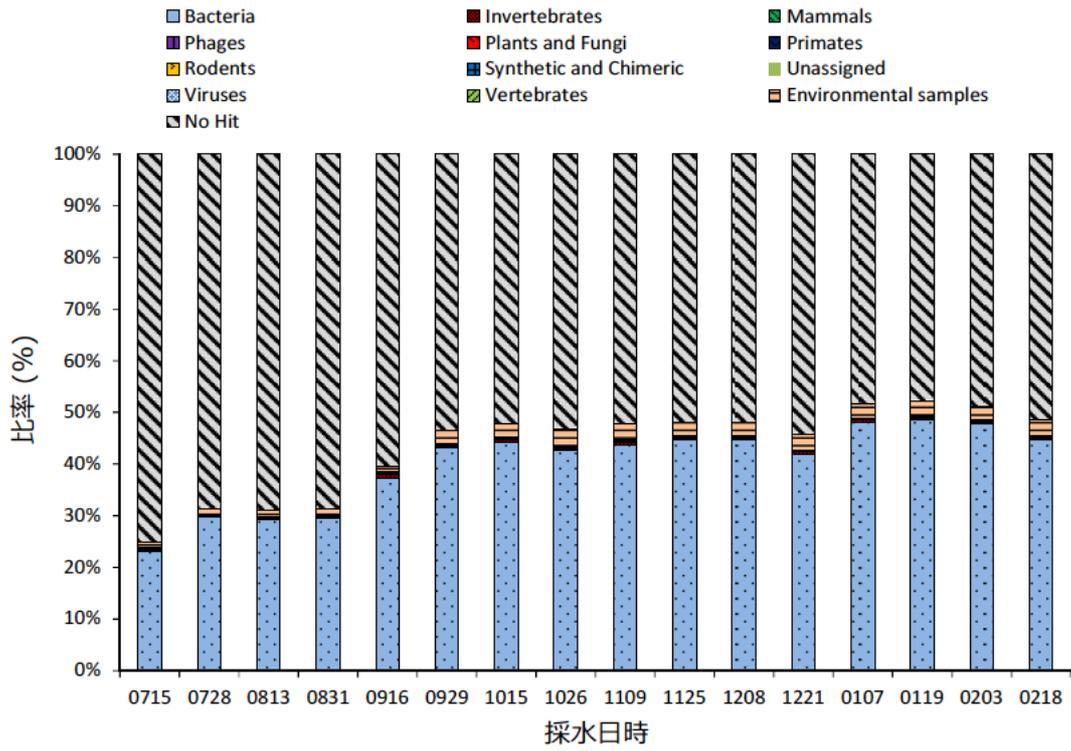
得られた結果を基に結合されたリード数から配列長の長い順に 10,000 配列を抽出し、BLAST 解析を行った結果を図-2、3 に示す。

結合した塩基配列を細菌(Bacteria)、無脊椎生物(Invertebrates)、哺乳類(Mammals)、ファージ(Phage)、植物と真菌(Plants and Fungi)、霊長類(Primates)、げっ歯類(Rodents)、キメラ合成(Synthetic and Chimeric)、ウイルス(Virus)、脊椎生物(Vertebrates)、環境試料<sup>\*1</sup>(Environmental Samples)、割り当てなし<sup>\*2</sup>(Unassigned)の計 12 種に分類し、各下水および下水処理水中に存在する生物種を同定した。(\*1 は環境試料(Environmental Samples)は環境から直接クローニングされた無名配列を示す。\*2 は割り当てなし(Unassigned)はデータベース上でヒットするが、12 種の分類に割り当てられない配列である)

表-1 各試料の NGS により取得/トリミング/結合リード数

Sample ID	Date	Sample Name	取得リード数	トリミング後リード数	結合リード数	結合割合 (%)	結合配列の平均長 (bp)
1	7月15日	流入下水	567,058	549,941	432,124	76.20	288.96
2	7月16日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	601,119	582,792	462,763	76.98	282.60
3			360,579	348,600	279,515	77.52	279.56
4	7月28日	流入下水	683,692	662,763	558,356	81.67	263.55
5	7月29日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	878,322	855,104	710,424	80.88	260.21
6			755,832	735,448	620,518	82.10	260.28
7	8月13日	流入下水	585,510	566,841	450,171	76.89	286.14
8	8月14日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	693,051	668,787	542,285	78.25	267.05
9			1,038,152	1,000,393	772,300	74.39	289.38
10	8月31日	流入下水	563,067	548,396	438,898	77.95	287.32
11	9月1日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	800,533	782,323	644,261	80.48	270.46
12			720,501	700,012	566,534	78.63	276.91
13	9月16日	流入下水	455,727	431,575	352,315	77.31	257.88
14	9月17日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	306,755	290,965	233,670	76.17	265.71
15			292,741	272,508	207,149	70.76	278.75
16	9月29日	流入下水	323,581	308,740	251,518	77.73	267.85
17	9月30日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	1,024,041	987,514	866,404	84.61	223.20
18			645,899	601,873	465,723	72.10	252.90
19	10月15日	流入下水	691,242	669,915	582,472	84.26	245.60
20	10月16日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	652,665	611,575	436,861	66.93	276.32
21			421,130	392,120	293,648	69.73	252.32
22	10月26日	流入下水	380,929	354,646	263,000	69.04	229.45
23	10月27日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	372,725	342,073	240,844	64.62	229.68
24			402,045	372,289	270,847	67.37	229.25
25	11月9日	流入下水	1,538,067	1,498,784	1,296,511	84.29	250.81
26	11月9日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	1,116,415	1,081,030	862,763	77.28	264.99
27			18,470	14,530	13,868	75.08	138.17
28	11月25日	流入下水	836,946	806,705	686,930	82.08	244.47
29	11月26日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	1,179,564	1,123,529	913,416	77.44	238.64
30			961,426	908,489	660,421	68.69	253.49
31	12月8日	流入下水	862,634	840,791	719,995	83.46	261.16
32	12月9日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	524,529	497,546	348,575	66.45	295.45
33			1,287,760	1,249,457	965,330	74.96	298.70
34	12月21日	流入下水	593,390	577,975	483,475	81.48	273.19
35	12月22日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	556,871	527,777	355,661	63.87	283.17
36			746,339	720,551	580,789	77.82	256.78
37	1月7日	流入下水	648,965	617,088	495,599	76.37	269.83
38	1月8日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	718,029	666,407	500,474	69.70	268.82
39			836,621	796,468	636,108	76.03	268.09
40	1月19日	流入下水	910,915	860,285	694,159	76.20	258.39
41	1月20日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	933,813	851,667	560,002	59.97	300.49
42			905,628	852,733	672,546	74.26	260.53
43	2月3日	流入下水	963,087	922,307	711,834	73.91	289.71
44	2月4日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	732,819	692,817	533,106	72.75	273.08
45			783,663	754,639	607,109	77.47	274.46
46	2月18日	流入下水	503,879	482,138	384,493	76.31	278.86
47	2月19日	凝集剤添加 活性汚泥法処 理水	837,924	795,134	599,055	71.49	285.06
48			995,693	957,304	791,381	79.48	263.63

## 流入下水



## 二次処理水 (凝集剤添加活性汚泥法 (1系)、A2/O法 (2系))

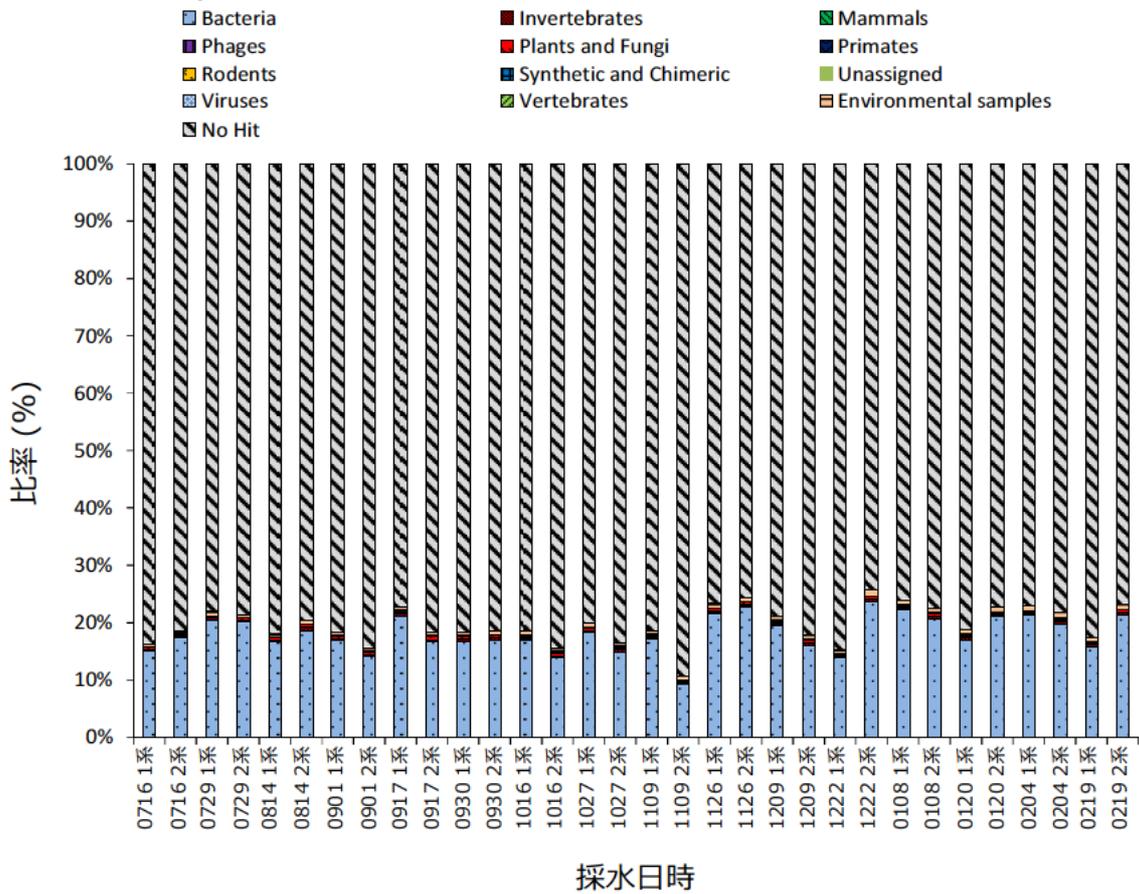
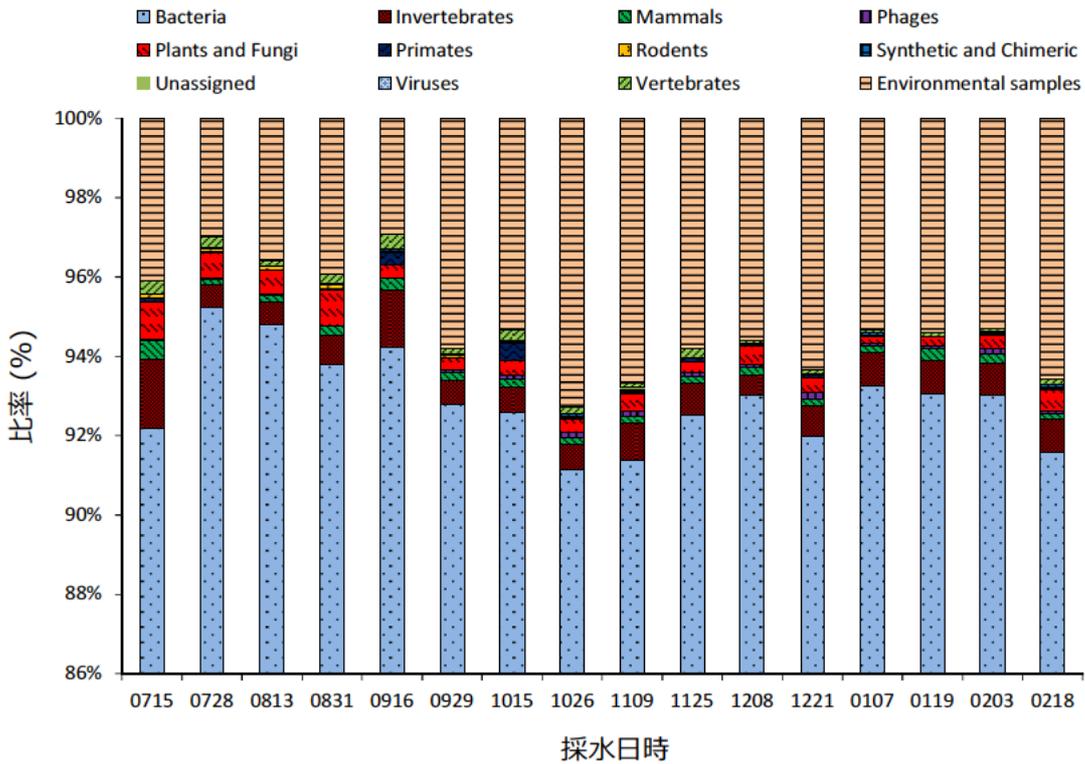


図-2 抽出配列の BLAST 解析結果 (流入下水/処理水中の生物種の同定結果)

### 流入下水



### 二次処理水 (凝集剤添加活性汚泥法 (1系)、A2/O法 (2系))

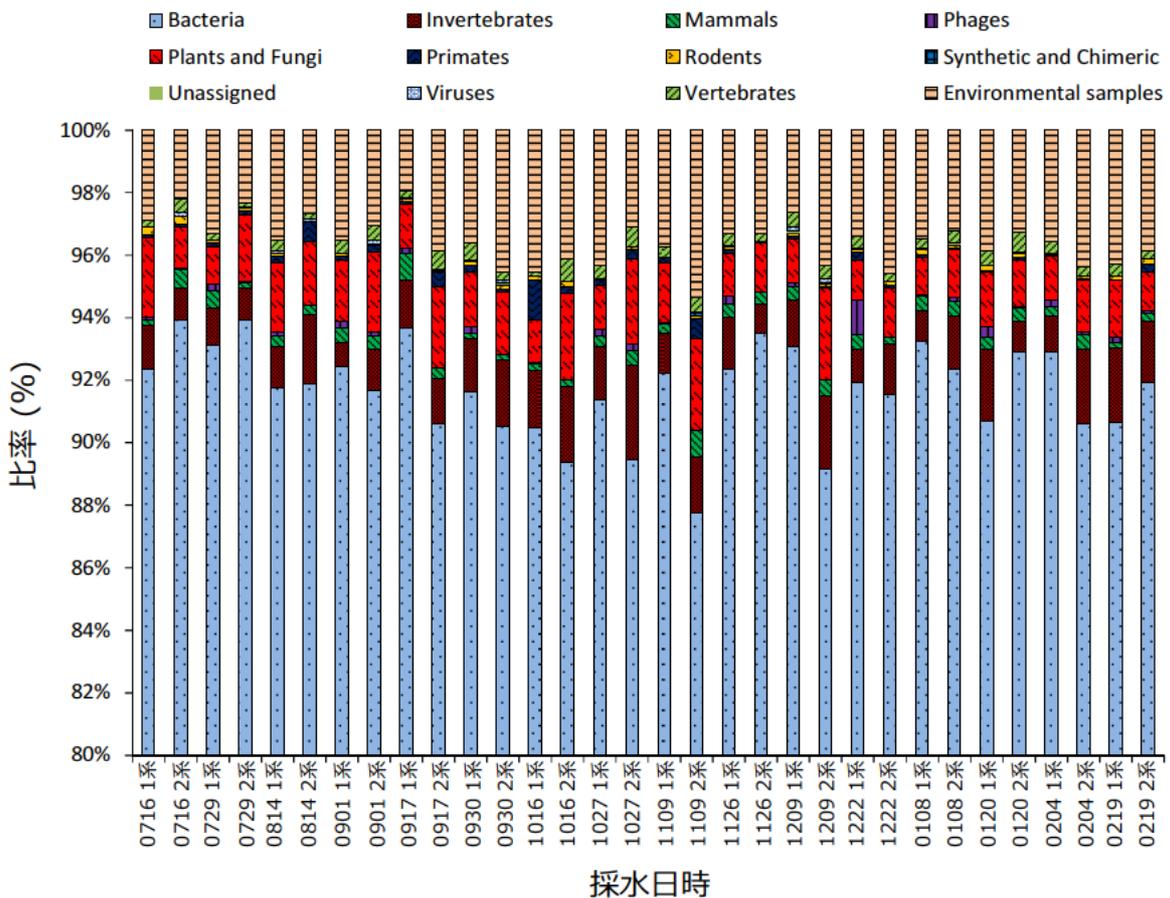


図-3 抽出配列の BLAST 解析結果 (流入下水/処理水中の生物種の同定結果) (ヒット情報のみ抽出)

図-2には、得られた塩基配列全ての割り当てを示したが、流入下水は全体を通して、約30～50%の遺伝子の配列情報がヒットし生物種を分類することができた。また7、8月の夏場より9月～翌年1月の秋から冬にかけて同定率が増加する傾向が確認された。一方、二次処理水は季節的、処理方式で大きな生物種の変化は確認できず、概ね15～20%の遺伝子配列情報がヒットした。既往の研究報告では、下水再生水からDNAを抽出してデータベース上で検索した結果、配列情報のヒット率が約30%であったことから、本研究で開発した手法によるNGS解析は既往の報告と比較しても遜色がないと考えられた。

図-3においては、ヒットした情報のみを整理した結果、流入下水は90%以上が細菌(Bacteria)であったのに対して、二次処理水は植物と真菌(Plants and Fungi)の割合が増加している傾向が確認された。また、流入下水とは異なり、処理水中に存在する可能性のある生物種として細菌類が減少し、その他生物種が占める割合が増加している傾向が確認された。

### 3. 今後の検討課題

下水および下水処理水中に含まれる病原微生物を網羅的に検出する手法の開発を試みた結果、各試料から約20～50%の生物種を同定することが可能であった。今後は、同定された種から病原微生物、主にウイルスを対象として精度よく検出、同定できる手法と解析方法を検討していくことで、下水中に混入可能性のあるウイルス種や、その割合を評価できるものと考えられる。

### 4. まとめ

本研究では、下水試料を対象に異なる核酸抽出方法を検討し、NGS分析に最適な前処理方法を評価した。また、開発した抽出方法を用いて下水試料のNGS分析および解析を行い生物種の分類を試みた。以下に得られた結果を示す。

- 1) 抽出方法として、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで試料をろ過し、フィルター上に捕捉した試料をビーズにより剥がす工程を経ることで、NGS分析に最適な核酸濃度および純度を得ることが出来た。
- 2) 1)で確立した抽出方法を用い、実処理場で下水および処理水を採水し、NGS分析を行った結果、

流入下水は全体を通して約30～50%、処理水は15～20%の遺伝子の配列情報がヒットし生物種を分類することができた。

- 3) ヒットした情報のみを整理した結果、流入下水は90%以上が細菌(Bacteria)であったのに対して、二次処理水は植物と真菌(Plants and Fungi)の割合が高くなる傾向が確認された。

### 謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象としたA下水処理場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) 津森ジュン、日高平、對馬育夫：遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発、No.4309, ISSN:0386-5878、土木研究所資料、2015。
- 2) Rosario K., Nilsson C., Lim YW., Ruan Y., Breitbart M., Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water, Environmental Microbiology, Volume 11, Issue 11, PP.2806-2820, 2009.
- 3) 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：下水道政策研究員委員会報告書、新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～、2014年7月, p.4.85-4.105.
- 4) 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、下水道協会雑誌、46(512), pp.91-101, 2009.
- 5) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介：下水道におけるウイルス対策手法に関する検討調査、平成22年度下水道関係調査研究年次報告書集、No.4191, ISSN 0386-5878、土木研究所資料、2010。

## 遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 26～平 28

担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）  
水環境研究グループ（水質チーム）

研究担当者：植松龍二、對馬育夫、山崎廉予

### 【要旨】

近年、下水汚泥に地域から発生するバイオマスを加える集約混合嫌気性消化が増えている。投入バイオマス条件の複雑化により、適切な維持管理手法が求められてきている。本研究では、地域バイオマス等の集約混合消化が消化汚泥の菌叢に与える影響を明らかとするため、濃縮汚泥と生ゴミの混合消化実験を行い、投入バイオマスおよび消化汚泥の菌叢についての遺伝子解析を行った。その結果、投入バイオマスが消化槽内の菌叢に影響を与えていることが示された。また、アーキア（メタン生成菌）、細菌（酸生成菌）の菌叢の多様性とメタン生成に相関がみられ、菌叢解析により、メタン生成のモニタリングができる可能性が示された。

キーワード：嫌気性消化、地域バイオマス、次世代シーケンス、菌叢解析

### 1. はじめに

低炭素・循環型社会構築のため、都市や農村で発生するバイオマスを、資源やエネルギーとして地域で有効活用する技術開発が求められている<sup>1)</sup>。有用なエネルギー資源の一つとして注目を集める下水汚泥が発生する下水処理場は、嫌気性消化槽といったバイオマスからのエネルギー回収を可能とする施設を有しており、下水処理場を地域の中で、エネルギーの集約・自立・供給拠点化することが目標として掲げられている<sup>2)</sup>。

下水処理場での嫌気性消化について、地域から発生するバイオマスを含めた集約混合嫌気性処理を想定した上で、下水汚泥に生ごみ、食品系廃棄物、間伐材等のバイオマスを加え、その消化特性の把握が試みられている<sup>3)</sup>。一方、集約混合嫌気性処理では、投入バイオマス条件が複雑になり、嫌気性消化槽の維持・管理について、これまで蓄積した現場の経験やノウハウでは対応できない懸念があり、適切な維持管理手法が求められている。

本研究では、集約嫌気性消化が消化汚泥の菌叢に与える影響を明らかとするため、濃縮汚泥と生ゴミの混合消化実験を行い、投入バイオマスおよび消化汚泥の菌叢についての遺伝子解析を行い、新たな維持管理手法の情報収集を試みた。また、実処理場において、汚泥以外の投入バイオマスを混合している消化汚泥、高温消化汚泥の菌叢についても遺伝子解析を行った。

### 2. 研究方法

#### 2.1 生ゴミ混合消化実験

混合消化実験は、有効容積 2 L のリアクター計 6 系列で実施した。各リアクターでの運転条件を表-1 に示す。投入バイオマスとして、汚泥のみを投入する系、模擬生ゴミ (TS (固形物濃度)3%)のみを投入する系、濃縮汚泥と模擬生ゴミを混合して投入する系 2 種類、35°C で 1 週間発酵させた模擬生ゴミを混合する系 2 種類の、合計 6 種類を用いた。生ゴミは、発生後すぐに回収され、消化槽へ投入されるということではなく、発生から消化槽へ投入されるまでにブランクがある。これを考慮したのが、発酵生ゴミの系である。濃縮汚泥は A 下水処理場で採取し、固形物 (TS)濃度を 3%となるように調整した。生ゴミは、実生ゴミ組成に関する調査結果<sup>4)</sup>を参考に作成した。種汚泥は、土木研究所で運転している実験室レベルの中温嫌気性消化装置内消化汚泥を用いた。各リアクター内水理学的滞留時間 (HRT)が 20 日となるよう、汚泥の引き抜き、投入を随時行った。温度は 35°C 程度に制御し、運転期間は、2 か月間とした。各実験系におけるガス発生量の測定、各汚泥の 16SrRNA 遺伝子配列に基づく微生物群集解析を定期的に測定した。

#### 2.2 菌叢解析

DNA 抽出には、Extrap SoilDNAKit Plus ver.2 (日鉄住金環境)を用い、V3-V4 領域を対象としたプライ

表一 濃縮汚泥と生ゴミとの混合嫌気性消化実験

実験系名称 項目	汚泥のみ	生ゴミのみ	+生ゴミ 30	+生ゴミ 80	+発酵生ゴミ 30	+発酵生ゴミ 80
濃縮汚泥	3%	添加なし	3%	3%	3%	3%
生ゴミ(対汚泥 TS)	添加なし	100%	30%	80%	*発酵 30%	*発酵 80%
投入 TS(%)	3.0	3.3	3.8	5.6	3.9	5.7
VS/TS	0.78	0.93	0.81	0.86	0.82	0.86
投入 COD <sub>cr</sub> (g/L)	39	45	55	67	54	74

\*発酵：35℃で1週間保存

マーセット (Bac341 および Bac850)<sup>9)</sup>を用い、PCR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、解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH<sup>6)</sup>を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking および PCoA 解析は QIIME<sup>7)</sup>を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13\_8 をリファレンスとした。

メタン生成に関わる菌種である、細菌 (酸生成菌) とアーキア (メタン生成菌) のそれぞれにおいて、解析結果を用いて、Shannon 指数<sup>8)</sup>により菌種の多様性の統計解析を行った。

実処理場の消化汚泥は、生ゴミ、下水汚泥や農業集落排水、し尿を混合消化している消化汚泥、および投入バイオマス、畜産廃棄物を処理している消化汚泥、および投入バイオマス、高温消化を行っている2か所の処理場の消化汚泥について、菌叢解析を行った。2か所の処理場は、同地方に立地するが、消化の HRT がそれぞれ 42 日、22 日と倍近く異なっているという違いがある。また、比較として、土木研究所内で運転しているラボスケールの中温消化、高温消化汚泥の菌叢解析も行った。

### 3. 研究結果

#### 3. 1 菌叢解析結果

図-1 に、各消化汚泥と投入バイオマスの門レベルの細菌叢解析結果、図-2 に、各消化汚泥と投入バイオマスの属レベルのアーキア叢解析結果を示す。細菌叢解析結果より、中温消化では、*Bacteroidetes* 門が 15~30%、*Firmicutes* 門が 10~25%、WWE1 門が 10~25%程度と上位の占有率を占めていた。高温消化では、*Firmicutes* 門が 45~60%、*Thermotogae* 門が 15%、*Proteobacteria* 門が 10%程度と上位の占有率を占めていた。これらの結果は、他の知見と同

等レベルの占有率であった<sup>9)</sup>。また、中温消化では、種汚泥の消化汚泥よりも、投入バイオマスである濃縮汚泥の細菌叢の影響を強く受けていることがわかる。生ゴミのみ、畜産廃棄物実処理場の結果は、他の中温消化の結果と比較して、*Firmicutes* 門の占有率が高く、占有率の偏りが大きい一方、生ゴミ混合実処理場の結果は、種類が多く、占有率の偏りが少ない結果であった。生ゴミのみ、畜産廃棄物実処理場と比較して、生ゴミ混合実処理場では投入バイオマスの種類が多いため、このような結果になったと考えられる。しかし、投入バイオマスに存在する菌種の影響を受けているわけではなく、他の中温消化の細菌叢ではほとんど存在していない、OP9 門や *Actinobacteria* 門の存在割合も高かった。OP9 門は、家畜糞尿と生ごみのメタン発酵槽での存在が確認されている<sup>10)</sup>が、投入バイオマス中にはほぼ存在していなかった。一方、濃縮汚泥や、ラボスケールの高温消化で検出された。*Actinobacteria* 門では、*Corynebacterium* 属が 20%近くを占めており、3種類投入バイオマス中にも同レベルで存在していた。*Corynebacterium* 属には、グリセロールを資化する種も含まれるが、検出された種が該当するかまではわからない。また、WWE1 門は、生ゴミ混合実処理場の消化槽中には存在するが、投入バイオマスにはほぼ存在していなかった。同様に、畜産廃棄物実処理場の消化槽内に存在するが、投入バイオマス中ではほぼ存在していない。近年、消化槽中での存在が明らかになり、アミノ酸分解やプロピオン酸酸化経路を有する WWE1 門<sup>11)</sup>であるが、投入バイオマス中に存在しなくても、消化槽内で定着できる増殖力が強い細菌種であると考えられる。

アーキア叢解析結果を見ると、細菌叢解析結果と比較して、各汚泥における占有率のばらつきが大きいことがわかる。ほとんどの消化汚泥には *Methanosaeta* 属 (酢酸資化メタン細菌) が存在して

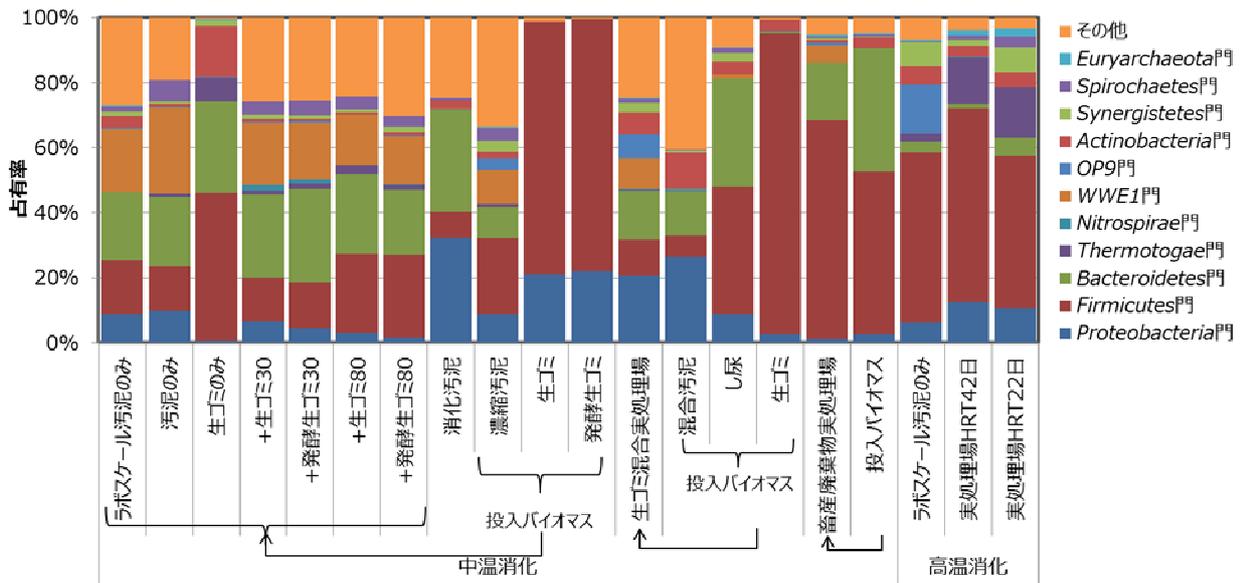


図-1 各消化汚泥と投入バイオマスの細菌叢解析（門レベル）

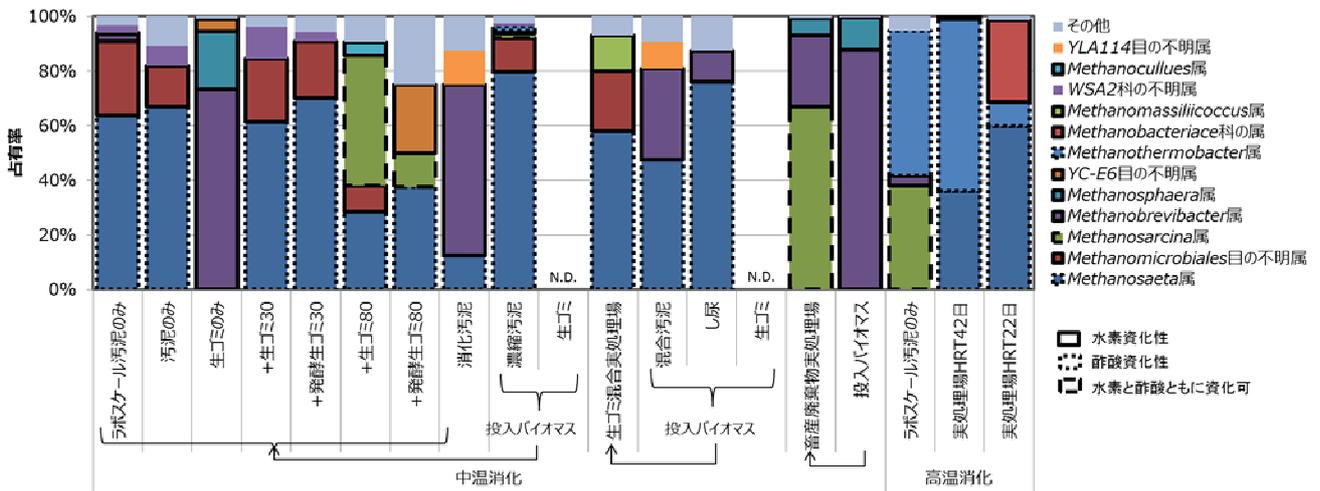


図-2 各消化汚泥と投入バイオマスのアーキア解析（属レベル）※N.D. : Not Detected

いたが、30%~80%とその存在割合は大きく異なっていた。投入バイオマスである生ゴミには、アーキアは存在せず、生ゴミのみの消化槽では、アーキア叢が他と比較して全く種類が異なっていた。*Methanobrevibacter* 属、*Methanosphaera* 属、YC-E6目の不明属が存在しているが、いずれも種汚泥である消化汚泥には存在しない種であり、空気中に存在していた種が定着したと考えられる。また、+生ゴミ80、+発酵生ゴミ80においても、生ゴミを30%投入した消化汚泥や、生ゴミのみを投入した消化汚泥とも異なり、それぞれ異なるアーキア叢であった。生ゴミ混合処理場の結果においても、投入バイオマスである混合汚泥やし尿に存在しない*Methanomicrobiales* 属や、*Methanomassiliococcus* 属が

存在しており、畜産廃棄物実処理場の消化汚泥においても、投入バイオマスに存在しない*Methanosarcina* 属が、投入バイオマスに存在する*Methanobrevibacter* 属や、*Methanophaera* 属よりも占有率が高い結果となった。これらの結果より、投入バイオマスに存在するアーキアの種類の、消化槽内のアーキア種になるわけではない可能性が考えられる。そこで、水素資化と酢酸資化の、どちらの経路でメタン生成を行う種であるかに着目した。その結果、生ゴミのみ、畜産廃棄物実処理場は、水素資化経路がほぼすべてであり、生ゴミ80%投入では、水素資化と酢酸資化が半分程度、生ゴミ混合実処理場では、酢酸：水素が2：1程度、汚泥を主に投入する消化汚泥は、酢酸：水素が3：1程度、高温消化汚泥

では、ほとんどが酢酸資化であることが示された。これらの結果より、生ゴミの投入割合、消化温度が、酢酸資化・水素資化のアーキア種の存在割合に大きく影響する可能性が示された。

### 3. 2 統計解析結果

図-3 に、メタン発生が安定した運転開始 30 日後からの生ゴミ混合嫌気性消化実験の各消化汚泥におけるメタン転換率とメタン発生量の平均値を示す。汚泥のみでは、メタン転換率が 4 割程度であり、実処理場での平均的なメタン転換率である 6 割よりは、低い結果であった。汚泥のみと比較すると、生ゴミのみ、生ゴミ混合 80%が高いメタン転換率であった。生ゴミ混合 30%でも、メタン発生量は汚泥のみより多いが、転換率で見るとほぼ変わらない結果であった。次に、メタン発生量と、消化汚泥の菌叢の関係をみた。図-4 において、各実験系における細菌、アーキアの多様性指数と、メタン発生量を比較した。細菌は、主要な 13 種の門 (*Acidobacteria* 門、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、*Nitrospirae* 門、OD1 門、OP9 門、*Proteobacteria* 門、*Spirochaetes* 門、*Synergistetes* 門、*Thermotogae* 門、WWE1 門) の多様性指数を解析した。アーキアは、主要な 7 種の属 (*Methanobrevibacter* 属、*Methanospaera* 属、WSA2 科の不明属、*Methanomicrobiales* 目の不明属、*Methanosaeta* 属、*Methanosarcina* 属、YC-E6 目の不明属) の多様性指数を解析した。細菌は、その結果、アーキア多様性指数が高い方が、メタン発生量が多くなる結果が示された。一方、細菌の多様性においては、メタン発生量が高い方が、低くなる結果が示された。多様性指数は、各菌種の占有率の偏りが少ない方が高い値を示す。これらの結果より、アーキアは、様々な種類が同程度存在した方がメタン発生量が高く、細菌は、特定の菌種が多い方が、メタン発生量が高いと考えられる。

### 4. まとめ

嫌気性消化汚泥の菌槽解析を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 細菌叢解析の結果、投入バイオマスの種類が多いほど、消化槽内の細菌叢の種類が多く、占有率の偏りも少なくなることが示されたが、消化槽内の

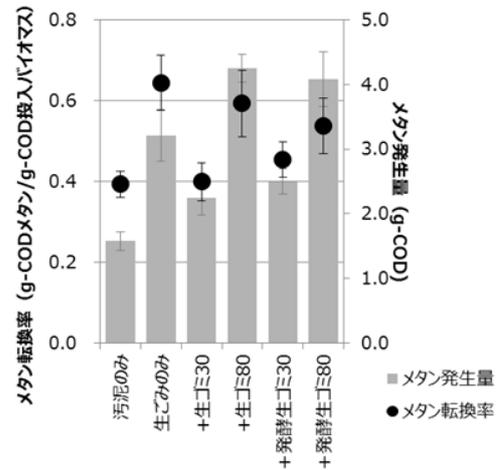


図-3 生ゴミ混合嫌気性消化実験の各消化汚泥におけるメタン転換率とメタン発生量

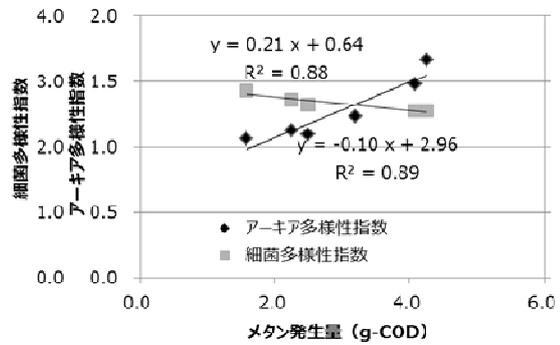


図-4 生ゴミ混合嫌気性消化実験の各消化汚泥におけるメタン発生量と菌叢多様性指数の関係

菌種が投入バイオマスの菌種に強く影響を受けるわけではないことも明らかとなった。特に WWE1 門は、投入バイオマス中に存在してなくても消化槽内に定着する種であることが示された。

- 2) アーキア叢解析の結果、菌種やその占有率は、消化汚泥ごとに大きく異なるが、メタン生成において、酢酸資化、水素資化のアーキア種の存在割合は、生ゴミ投入割合や消化の温度に大きく影響を受けることが示された。
- 3) 統計解析の結果、細菌の多様性とメタン発生量は、負の関係、アーキアの多様性とメタン発生量は、正の関係があることが示された。消化汚泥の菌叢を解析することで、メタン発生量のモニタリングが可能になる可能性が示された。

### 謝辞

下水処理場の方々には、汚泥試料採取にご協力頂きました。ここに記して、謝意を表します。

## 参考文献

- 1) 日高平ら：下水汚泥のリサイクルと小規模下水処理場向け高濃度混合メタン発酵技術、日本エネルギー学会誌、日本エネルギー学会、94、705-714、2015.
- 2) 国土交通省：新下水道ビジョン、3・17、2014.
- 3) 日高平ら：回分式実験による下水汚泥と有機性廃棄物の嫌気性消化特性調査、土木学会論文集 G (環境)、69、III\_605-III\_614、2013.
- 4) 谷川昇ら：生ごみの細組成、都市清掃、50、116-119、1997.
- 5) Klindworth A.ら：Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, Nucleic Acids Research, 41, 1-11, 2013.
- 6) Edgar R.: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, Bioinformatics, 26(19), 2460-2461, 2010.
- 7) Caporaso J.G.ら：QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, Nature Methods, 7, 335-336, 2010.
- 8) Shannon, C.E.ら：A mathematical theory of Communication. Uni. Press, Illinois. Urbana, 101- 107, 1949.
- 9) Goux X.ら：Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery, Biotechnology for Biofuels, 8(122), 1-18, 2015.
- 10) 重松 亨ら：メタン発酵プロセスに関与する微生物群集、生物工学会誌、87(12)、570-596、2009.
- 11) Pelletier E.ら：Candidatus Cloacamonas Acidaminovorans: Genome Sequence Reconstruction Provides a First Glimpse of a New Bacterial Division, Journal of Bacteriology, 190, 2572-2579, 2008.

## Ⅱ. 水質チームによる研究

# 下水処理工程における化学物質の除去特性及び生物影響 に係る検討業務

水質チーム 上席研究員 南山 瑞彦  
 研究員 眞野 浩行  
 研究員 武田 文彦  
 研究員 金子 陽輔

水質リスクをもたらす可能性のある化学物質のうち、環境省において環境基準化、排水規制化が検討されている化学物質について、下水の排除の規制値等を検討するため、下水処理工程における化学物質の除去特性を調査するとともに、生物応答手法により生物影響を調査し、下水道における適切な評価及び対応を図ることを目的とし、以下の調査を行った。

## 1. 下水処理工程における化学物質の除去特性に係る調査

### 1. 1 アンモニアに関する挙動調査

水生生物保全水質目標検討の基礎資料とするため、有害性情報の整理が行われているアンモニアの活性汚泥処理プロセスにおける挙動把握実験を行い、以下の結果を得た。

TN の流入フラックス (IN : 流入下水) に対する排出フラックス (OUT : 生汚泥+余剰汚泥+エアレーション+二次処理水) は 74.5%であった。また、エアレーションによる大気中へのアンモニア排出量は非常に小さく、流入フラックスの 0.14%であった。

### 1. 2 ニッケルに関する挙動調査

水生生物保全水質目標検討の基礎資料とするため、有害性情報の整理が行われているニッケルの、活性汚泥処理プロセスにおける挙動把握実験を行い以下の結果を得た。

ニッケル添加 21 日後、23 日後、24 日後に活性汚泥処理プロセスにおけるニッケルの物質収支を求めた。流入フラックス (IN : 流入下水) に対する排出フラックス (OUT : 二次処理水+生汚泥+余剰汚泥) は、ニッケル添加 21 日後が 88%、ニッケル添加 23 日後が 121%、ニッケル添加 24 日後が 77%であった。

## 2. 生物応答手法による生態影響に係る調査

### 2.1 ゼブラフィッシュを用いたアンモニア毒性の評価

既往研究では、下水中に含まれるアンモニアによるゼブラフィッシュに対する生物影響について良く分かっていない。そこで本調査では以下に示す業務報告書本文 2. 1 で得られた流入下水、二次処理水に対してゼブラフィッシュ胚・仔魚試験を行い、下水中のアンモニアによる生物影響について評価した。結果として、流入下水では生物影響が確認されたが二次処理水では影響がなかった。このため本装置の活性汚泥処理によってゼブラフィッシュに対する生物影響を削減できることが分かった。この際の流入下水にpH調整を組み合わせた胚・仔魚試験では、流入下水における生物影響はアンモニアに起因しないことが推定された。試験した流入下水における非イオンアンモニア濃度は0.15mgNH<sub>3</sub>/Lと推定され、この濃度以下の場合にはアンモニアによるゼブラフィッシュへの生物影響は発現しないと考えられた。

### 2.2 ニセネコゼミジンコを用いたニッケル毒性の調査

標準活性汚泥処理によるニッケルの生物影響の削減効果および下水処理水に含まれるニッケルの毒性を明らかにすることを目的として調査した。まず、以下に示す業務報告書本文 2. 2 で得られたニッケルを添加した活性汚泥処理装置から得られた流入下水と二次処理水、およびニッケルを添加していない活性汚泥処理装置から得られた流入下水に対してニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験を行った。この結果、ニッケルを添加した活性汚泥処理装置から得られた流入下水と二次処理水ではニセネコゼミジンコへの影響が検出され、ニッケルを添加していない活性汚泥処理装置から得られた流入下水では影響が検出されなかった。このことから、ニッケルを添加した際に、本装置の活性汚泥処理によるニセネコゼミジンコへの影響の削減は十分ではなかったことが分かった。次に、ニッケルを添加していない活性汚泥処理装置から採取した流入下水と二次処理水に異なる量のニッケルを添加し

て、ニセネコゼミジンコの繁殖に対するニッケルの毒性試験を実施し、下水試料ごとにニッケルの毒性値を求めた。その結果、流入下水を用いた試験では、設定したニッケルの濃度範囲で、ニッケルによるニセネコゼミジンコへの影響は検出されなかった。一方で、二次処理水を用いた試験では、設定したニッケルの濃度範囲で、ニッケルによるニセネコゼミジンコの繁殖への影響が検出された。流入下水と二次処理水の間での生物影響の違いについて、生物が利用可能な金属の存在形態である無機態に着目し、フミン物質と金属イオンの結合モデルを組み込んだ化学平衡計算モデルである Visual MINTEQ を用いて、試験溶液中の無機態ニッケル濃度を推定した。その結果、溶存態ニッケル濃度が同等の処理区において、二次処理水に比べて流入下水では無機態のニッケル濃度が低い傾向が示された。このことから、流入下水では、試験溶液中に含まれる高い濃度の溶存有機物がニッケルイオンと結合して有機錯体を形成し、生物に利用される無機態イオンが低くなるため、ニッケルによる毒性が低下することが示唆された。

また、上記内容は調査の概要を記述したものであり、詳細は、「下水処理工程における化学物質の除去特性及び生物影響に係る検討業務報告書、平成 29 年 3 月 21 日、国土交通省水管理・国土保全局下水道部（編集・発行：国立研究開発法人土木研究所）を参照されたい。

「なお、本調査研究は、国土交通省水管理・国土保全局からの受託業務費により実施されたものである。」

**(水質リスク軽減のための処理技術の開発)****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**

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一、對馬育夫、  
真野浩行、武田文彦、金子陽輔、  
小森行也**【要旨】**

都市河川で検出される微量化学物質の中には、下水道を經由して到達したものが存在すると考えられる。河川水中に存在する微量化学物質を効率的に削減するためには、下水処理水中に存在する微量化学物質の除去技術開発が必要である。本年度は、下水処理水中の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) やノニルフェノール (NP) の微生物担体処理による削減について検討した。また、異常時・災害時に下水処理場で微量物質負荷を削減するための緊急対策手法について検討を行った。

キーワード：LAS、ノニルフェノール、微生物担体処理、微生物叢解析、簡易沈殿

**1. はじめに**

環境中で検出される多様な化学物質による汚染の実態や環境影響に対する関心、懸念が高まっており、安全で快適な水環境の実現・保全に向けた取り組みが求められている。生活排水、工場排水等を受け入れている下水道は、生態リスクが懸念される化学物質の流入が報告されているが、下水道における化学物質の環境負荷削減の寄与を明らかにするため除去特性把握が必要である。また、水質事故又は地震、水害等の異常時・災害時に下水処理場や放流先水域が受ける影響の把握と緊急対策に関する知見は未だ十分とは言えない状況にあることから課題の整理と緊急対策手法の検討が必要である。

具体的な事例として下水道には直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) やノニルフェノール (NP) といった生態リスクが懸念される化学物質の流入が報告されており、水処理方法によっては、これらの化学物質が水生生物へ影響を与えることが懸念される濃度レベルとなり得る二次処理水が存在すると報告されている<sup>1)</sup>。平成 28 年度は、これらの化学物質の更なる低減を目的として、実下水を処理する活性汚泥処理実験装置の二次処理水にこれらの物質を添加し、微生物担体処理での処理性について検討した。また、微生物担体処理における化学物質の低減に寄与する因子を解明する参考とするため、微生物担体に付着している微生物叢を解析し、反応槽の滞留時間の影響や反応槽内における分布を整理した結

果を報告する。

また、異常時・災害時の下水処理場での緊急対策手法の検討では、異常時・災害時に下水処理場に有害物質が流入した場合、放流先に影響の恐れがある処理場のリストアップの考え方を示すとともに、異常時・災害時の緊急放流をイメージし、簡易沈殿処理による水質変化を調査するための下水処理実験装置を作製した。

**2. 活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける微量化学物質の除去特性****2.1 調査方法****2.1.1 微生物担体処理実験**

実下水を処理している活性汚泥処理実験装置の終沈出口で LAS 含有洗剤と NP の混合液を添加し、微生物担体処理槽の原水として用いた (図-1)。担体にはスポンジ状担体を使用した。既往調査において、曝気を行った担体処理により LAS の除去が確認できていることから<sup>2)</sup>、省力化の検討のため、曝気を行う処理槽 (A) と曝気を行わない処理槽 (B) ~ (F) を設定し、LAS、NP の除去特性を調査した。それぞれの槽の実験条件を表-1 に示す。処理槽 (B) では装置に担体を敷き詰め、固定層とした。処理槽 (C) ~ (E) では担体量の違いによる処理性を比較することとした。担体は一つずつ糸に吊るし、処理槽から流出しないようにした。なお、処理槽 (F) には担体を入れず、処理槽 (C) ~ (E) の対照実験とした。

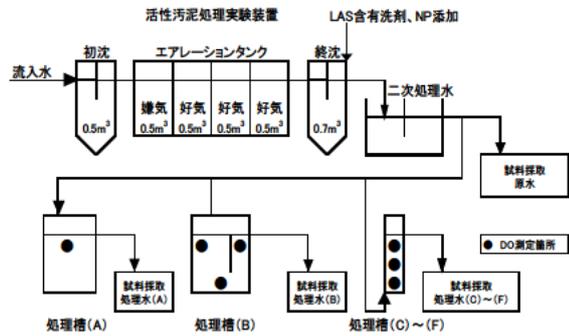


図-1 実験装置の概要と試料採取箇所

試料採取は平成 28 年 6 月から 12 月にかけて行った。LAS、NP の分析については、「水質汚濁に係る環境基準」(平成 26 年 11 月 17 日環境省告示第 126 号) 付表 11 (NP の分析方法) 及び 12 (LAS の分析方法) に示す方法により行った。

### 2.1.2 微生物叢の解析

処理槽内の細菌について、16S rRNA 遺伝子配列に基づき細菌群集構造解析を行った。曝気を行わない処理槽の菌叢に着目し、担体投入量の多い処理槽 (B) および (E) の流入部、中間、流出部から 2 週間に一度スポンジ状担体を採取した。採取した担体は液体窒素により凍結させ、粉碎した後、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (日鉄住金環境) を用いて DNA 抽出を行った。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にオーバーハングアダプター配列を付加したプライ

マーを用い、PCR 増幅を行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics) を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3 (600 サイクル、Illumina) を用いて解析した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking およびクラスター解析は QIIME を用い、97%以上の相同性を持つ配列を同一 OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13\_9 をリファレンスとした。また、処理槽 (E) 内の微生物分布を把握するため、糸で吊るした担体を取り出し、63 個の担体を全て (流れ方向に対し #1-#63 とナンバリング) 解析した。

## 2.2 実験結果と考察

### 2.2.1 微生物担体処理実験

原水 (LAS、NP 添加後) と処理水 (A)、(B) の LAS、NP 濃度を図-2 に示す。処理水 (A) について、LAS 除去率は 73~99%、NP 除去率は 46~84%であった (LAS と NP の混合槽内で、NP の溶解が充分ではなかった 6 月 17 日のデータを除く)。一方で、処理水 (B) の LAS 除去率は 42~80%、NP 除去率は 81~88% (原水の SS が 120mg/L と高い値であった 12 月 9 日のデータを除く) であった。処理槽 (B) の DO は装置の流入部分で 2.2~4.2mg/L で、装置の中心部と流出部分は DO が残っておらず、DO の低い条件においても担体処理によって LAS と NP が低減できる可

表-1 実験条件と DO 測定結果

		調査日	6/17	7/7	10/25	10/27	11/1	11/16	11/30	12/9
処理槽 (A) 試験装置: 8L 担体添加率: 40%	担体を処理槽に投入し、曝気循環	滞留時間(分)	60							測定なし
		曝気の有無	有							
		DO (mg/L)	飽和状態							
処理槽 (B) 試験装置: 6L 担体添加率: 100%	担体を処理槽に敷き詰め、水の流れにより担体が浮かないように、上部をプラスチックで固定	滞留時間	30				60			
		曝気の有無	無							
		DO (mg/L)	流入部	2.3	1.9	4.2	2.2	2.4	2.3	
			中心	0	0	0.6	0	0	0	
			流出部	0	0	0	0	0	0	
処理槽 (C) 試験装置: 9.4L 担体添加率: 2.8%	担体を糸につるして流出防止	滞留時間	30				60			
		曝気の有無	無							
		DO (mg/L)	流入部	測定なし				測定なし		
流出部	3.1				4.6					
処理槽 (D) 試験装置: 9.4L 担体添加率: 5.5%	担体を糸につるして流出防止	滞留時間	30				60			
		曝気の有無	無							
		DO (mg/L)	流入部	測定なし				測定なし		
流出部	3.7				3.1					
処理槽 (E) 試験装置: 9.4L 担体添加率: 11%	担体を糸につるして流出防止	滞留時間	30				60			
		曝気の有無	無							
		DO (mg/L)	流入部	測定なし				測定なし		
			中心	3.8				3.5		
			流出部	3				2.5		
処理槽 (F) 試験装置: 9.4L 担体添加率: 0%	処理槽 (C)~(E)と同じ装置であるが、担体を投入せず	滞留時間	60							
		曝気の有無	測定なし							
		DO (mg/L)	測定なし							
										4.5

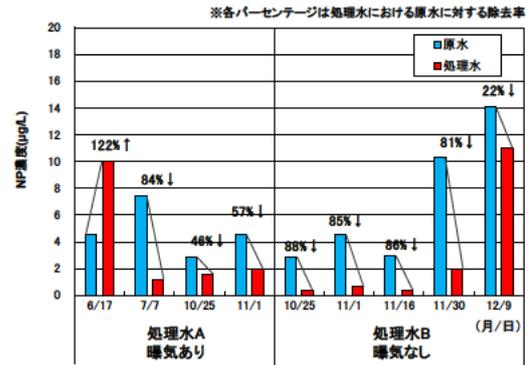
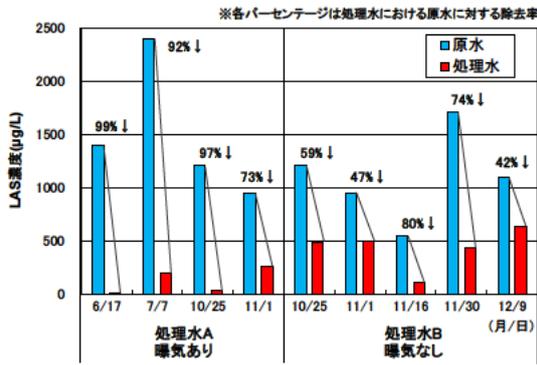


図-2 原水と処理水 (A)、(B) の LAS、NP 分析結果

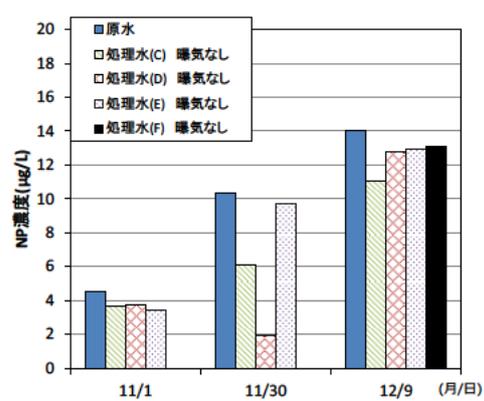
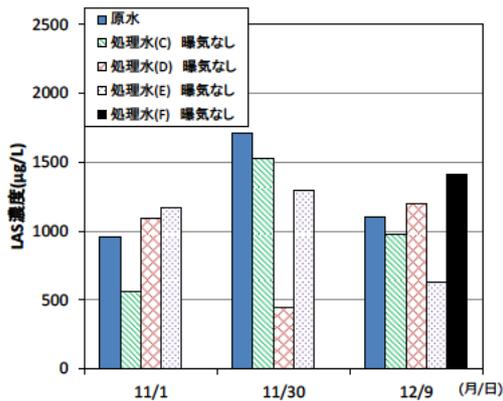


図-3 原水と処理水 (C) ~ (F) の LAS、NP 分析結果

能性が示された。また、原水と処理水 (C) ~ (F) の LAS、NP 濃度を図-3 に示す。なお、槽に担体を投入していない処理水 (F) (対照実験として行った) の LAS、NP 濃度と原水の濃度には差があり、流入水の濃度変動が要因と考えられた。この変動が処理水 (C) ~ (E) の濃度に影響している可能性も踏まえた上で、処理槽 (C) と、(C) より担体の量が多い (D)、(E) の LAS、NP 濃度について、今回の実験結果では一定の傾向は見られず、担体量を増やすことで LAS、NP が更に低減できるとは言えなかった。今後は、引き続き処理条件の最適化に向けた更なる調査が必要である。

### 2.2.2 微生物叢の解析

塩基配列解析の結果、各サンプルから取得した約 1 ~ 3 万リードの塩基配列から、約 1,000 個の OTU が得られ、近縁な細菌種が同定できた。図-4~図-7 に検出された上位 16 Class の検出割合と各サンプル間における類似度の主座標分析結果を示す。処理槽 (B) および処理槽 (E) において、サンプリングした位置やサンプリング時期に関わらず、菌叢を構成する主な門は Proteobacteria、Bacterodes、Actinobacteria 等で変わらず、特に、Alphaproteobacteria や Betaproteobacteria がそれぞれ平均 27%、16% と高頻

度で検出された。また、図-5 に示す主座標分析の結果から、滞留時間が 30 分の場合と 60 分の場合で、菌叢構成が大きく 2 分されていることがわかる。滞留時間の変更が、細菌群集構造に影響したと思われる、LAS、NP の低減に起因する担体の菌叢が滞留時間により異なる可能性がある。一方、処理槽内部の生物担体を流れ方向に 1 つずつ採取した結果 (図-6 および図-7) では、最も流入側に近い位置にあった生物担体において、Alphaproteobacteria が 40% 以上検出され、それ以降

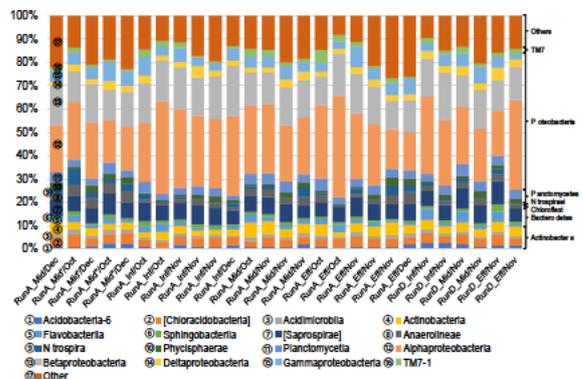


図-4 経日サンプルの細菌群集構造解析結果

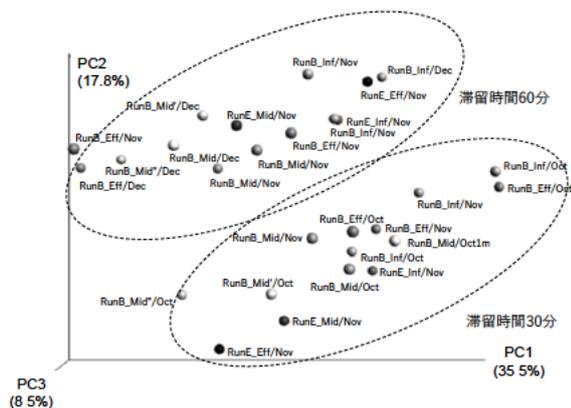


図-5 経日サンプルの主座標分析結果

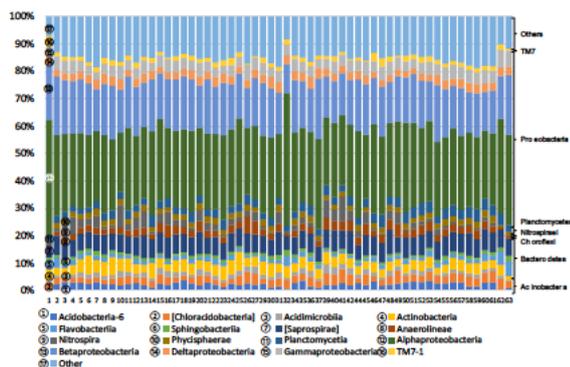


図-6 部位別サンプルの細菌群集構造解析結果

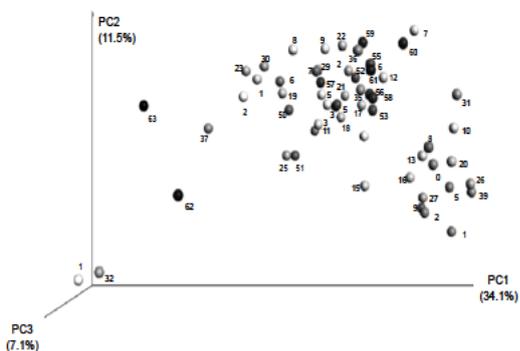


図-7 部位別サンプルの主座標分析結果

は DO が流れ方向に伴い徐々に減少するものの、#32を除き、出口付近までほぼ一定の割合を保ち構成していた。また、出口付近にあった生物担体 (#62 および #63) は、他の大部分の生物担体とは異なる群集構造となっていた。

### 3. 異常時・災害時の下水処理場での緊急対策手法の検討

#### 3.1 異常時・災害時に放流先に影響を及ぼす可能性のある下水処理場のリストアップ

下水道は、生活排水、工場排水を受け入れ下水処理

場で下水に含まれる汚濁物質を処理した後、その処理水を河川・湖沼・海域等へ放流している施設であり、水環境への汚濁負荷削減にとって重要な施設である。しかしながら、水質事故又は地震、水害等の異常時・災害時には、下水処理場が機能停止に陥ることも予想され、放流先水域に影響を及ぼす可能性がある。

下水道地震・津波対策技術検討委員会報告書<sup>3)</sup>によれば、平成 23 年 3 月の東日本大震災では、120 ヶ所の下水処理場が被災し、内 48 処理場は稼働停止となった。また、ポンプ場では 112 ヶ所、管路 135 ヶ所が被害を受けた。震災直後にはマンホールからの溢水がみられたが、これらは概ね数週間で復旧されていた。しかしながら、下水処理場が被災した場合は、復旧まで数ヶ月を要し、簡易沈殿処理のみを行い河川へ放流する事例も見られた。放流先への影響把握のため pH、DO、BOD、SS 等の水質モニタリングが行われた。

事故・災害時に下水道が被災した場合、放流先への影響は計り知れなく、緊急対策が必要となる。特に放流先に甚大な影響を及ぼす可能性のある下水処理場をリストアップしておく必要がある。

下水処理場の放流先への影響として上水道の取水が考えられる。そこで、下水道統計<sup>4)</sup>より下水処理場の放流口の下流に上水道の取水口がある処理場を整理した。その結果を表-2 に示す。下水処理場総数 2,182 の内 435 の処理場について下流に上水道の取水口がある。下水処理場放流口から 10km 以内に上水取水口

表-2 下水処理場の放流口の下流に上水取水口のある処理場数

処理場施設直近の上水道取水口位置(下流)	処理場数
10km 以内	164
10.1 ~ 20km	106
20.1 ~ 30km	48
30.1 ~ 40km	29
40.1 ~ 50km	25
50.1 ~ 60km	20
60.1 ~ 70km	10
70.1 ~ 80km	9
80.1 ~ 90km	6
90.1 ~ 100km	8
100.1 ~ 110km	5
110.1 ~ 120km	3
120.1 ~ 130km	1
130.1 ~ 140km	0
140.1 ~ 150km	0
150.1 ~ 160km	0
160.1 ~ 170km	1
170km 以上	0
情報なし	1,747
合計	2,182

がある下水処理場が 164 ヶ所、20km 以内とすると 270 ヶ所あった。また、50km 以内に拡大すると 372 ヶ所となり下水放流口と上水取水口の位置関係が把握されている下水処理場の約 86%となる。放流先河川での希釈・拡散等の流況にもよるが、下水処理場放流口から近いところにある上水取水口では事故・災害時に放流水が及ぼす影響の度合いを推定しておく必要がある。

### 3.2 下水の簡易沈殿処理実験装置の作製

水質事故又は地震、水害等の異常時・災害時には、下水処理場が被災し処理機能停止に陥ることが考えられる。東日本大震災においても処理機能停止となった処理場が多く見られ、中には機能停止が長期化した処理場もみられた。応急復旧として簡易沈殿処理が行われた。これまで、簡易沈殿処理による BOD、COD 等の有機物、大腸菌群数については調査データが見られるが、有害物質の簡易沈殿処理における処理特性については不明である。本研究では、実験的にデータ取得することを目的とした実験装置を作製した。作製にあたり、実処理場の最初沈殿池、エアレーションタンク、最終沈殿池の水面積負荷、沈殿時間、エアレーション時間等の諸元は、下水道維持管理指針<sup>5)</sup>を参考(表-3)に設定した。作製した下水処理実験装置の諸元を表-4に示す。今後は、実験装置全体を沈殿池とした場合の簡易沈殿処理における微量化学物質の処理特性に関

表-3 実下水処理場の諸元

	最初沈殿池	曝気槽	最終沈殿池
水面積負荷 (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ・d)	35~70 (合流) 25~50 (分流)	—	20~30
沈殿時間 (h)	3.0 (合流) 0.5以上 (合流・雨天) 1.5 (分流)	—	—
エアレーション時間 (h)	—	6~8	—

表-4 下水処理実験装置の諸元

	最初沈殿池	曝気槽	最終沈殿池
水面積負荷 (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ・d)	33	—	22
滞留時間 (h)	1.4	7.0	2.1
W (m)	0.15	0.15	0.15
L (m)	0.10	0.50	0.15
H (m)	1.96	1.95	1.94

するデータ取得を行う予定である。

## 4. まとめ

### 4.1 活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける微量化学物質の除去特性

下水の二次処理水に LAS と NP を添加し、微生物担体処理での除去と処理条件の関係を検討し、以下の結果を得た。

- ・ DO が低い条件下において、LAS 除去率は 42~80%、NP 除去率は 81~88%となり、これらの化学物質が除去できる可能性が示された。
- ・ 今回の実験結果からは、担体量を増加させることで、LAS、NP が更に低減できるとは言えず、処理条件の最適化に向けた更なる調査が必要である。
- ・ 微生物叢解析の結果、滞留時間により微生物叢は大きく変化するものであることがわかった。

### 4.2 異常時・災害時の下水処理場での緊急対策手法の検討

- ・ 異常時・災害時に下水処理場が機能停止となった場合を想定し、下水処理水の放流先への影響を考慮し、下流にある上水取水口までの処理場を整理したところ、10km 以内に 164 ヶ所あることがわかった。
- ・ 簡易沈殿処理における微量化学物質の処理特性の実験的データ取得を目的とした実験装置を作製した。今後は、実下水を用いた簡易沈殿処理実験を行う予定である。

## 参考文献

- 1) 小森他, 実下水処理場における直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) の除去特性, 第 51 回下水道研究発表会講演集, pp307-309, 2014
- 2) 中村他, 生物担体を用いた下水処理水の微量化学物質高度処理実験, 第 53 回下水道研究発表会講演集, pp497-499, 2016
- 3) 下水道地震・津波対策技術検討委員会、下水道地震・津波対策技術検討委員会報告書、平成 24 年 3 月
- 4) 日本下水道協会、下水道統計 (平成 25 年度版) CD-ROM 付 (第 70 号)、平成 27 年 11 月
- 5) 日本下水道協会、下水道維持管理指針 2003 年版、pp.20-48、平成 15 年 8 月

「なお、本調査研究は、運営交付金 (一般勘定) により実施されたものである。」

## 底層環境に着目した停滞性水域における水環境管理技術に関する研究（簡易的な藻類定性定量方法の開発及び藻類増殖に関与する水質項目の影響評価）

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、對馬育夫、武田文彦、金子陽輔

### 【要旨】

本研究では、湖沼・ダム貯水池の水質改善に向け、並列型高速塩基配列決定装置（次世代シーケンサー）を用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づく菌叢モニタリングに取り組んだ。また、マンガン添加・無添加の 4 種のダム湖水に対し藍藻類 *M. aeruginosa* を用いて藻類生長試験を実施し、マンガン負荷による藻類生長の促進の有無について評価した。菌叢モニタリングでは、ダム湖水の菌叢は、地理的要因より水温等の影響を受け変化することが示唆された。また、夏季に異臭等の水質問題が生じているダムでは、多様性が比較的高い菌叢になっていた。藻類生長試験では、一部のダム湖水を用いた場合、マンガン添加により *M. aeruginosa* の生長が促進されることが明らかになった。

キーワード：湖沼・ダム貯水池、水質改善、藻類モニタリング、藻類生長試験

### 1. はじめに

環境負荷増大による湖沼やダム貯水池の水質の悪化が長らく問題となっている。生物多様性国家戦略に基づいて、河川・湖沼などにおける水質の改善について「豊かな生態系の確保」の視点から調査が実施されているが、湖沼における環境基準達成率は約 50%と低い水準で推移している。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。本研究では、プログラム達成目標の一つである「流域の水環境を的確・迅速に把握するための影響評価、モニタリング手法の開発」達成のため、湖沼・ダム貯水池などの停滞性水域を主な対象とし、底層の生態系保全や底泥からの溶出物質による水質汚濁の抑制を中心に対策手法の構築を目指す。研究の構成として、ラン藻や植物プランクトンの簡易的なモニタリング手法の開発とアオコ発生抑制手法の開発から成っている。

### 2. 簡易的な藻類定性定量方法の開発

#### 2.1 研究背景

気候変動に伴い、藻類の異常増殖の発生頻度の増加が懸念されている。湖沼水質を把握する上で、藻類等の植物プランクトンを定性・定量することは非

常に重要である。藻類の中にはカビ臭物質や毒性物質を生産するものもあり、水の安全性確保の観点からも湖沼・ダム貯水池における藻類のモニタリングは非常に重要である。従来、藻類モニタリングは、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われているが、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。さらに、厳しい財政状況や省力化の観点からも、効率的なモニタリング手法の構築が急務となっている。したがって、本研究は DNA 塩基配列に基づく藻類モニタリング解析手法の確立を目指し、ダム貯水池水質の維持管理に有効な手法の開発に取り組んでいる。プログラム研究初年度にあたる今年度は、ダム貯水池からサンプリングした水試料を用い、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づき微生物分類を行い、分析方法の確認を行った。

#### 2.2 ダム貯水池におけるカビ臭、アオコの現状

現在、国内のダム貯水池では地域に寄らず半数以上のダム貯水池でカビ臭等による異臭味障害やアオコ等による景観障害が起こっている。また、曝気装置等の水質保全施設を有しているダム貯水池においても、これらの障害が引き続き生じている箇所が少

なからず存在する。

ダム貯水池において、カビ臭を引き起こす原因は、主に、①ラン藻の湖水中での増殖、②ラン藻の底泥での増殖、③放線菌の底泥での増殖/死滅があると考えられる。①では、Anabaena 属、Aphanizomenon 属が主に Geosmin を産生し、Oscillatoria 属や Phormidium 属が主に 2-MIB を産生する。②では、Oscillatoria 属や Phormidium 属が主に 2-MIB を産生する。大型の付着性ラン藻である Phormidium Tergestinum 等は2-MIBを産生するとしてよく知られている。③では、放線菌の代謝により 2-MIB や Geosmin を産生する。どちらも放出する種もあれば、どちらかしか放出しない種もあり、環境因子により、産生する成分や量が異なるという報告がある<sup>1)</sup>。また、嫌気条件下では死滅し、菌体内のカビ臭物質を放出する。これら以外にも、カビそのものが増殖し、カビ臭原因物質を産生していることも考えられる。

アオコに関しては、アオコを構成する種はラン藻と植物プランクトンに大別される。ラン藻では Microcystis 属、Anabaena 属、Aphanizomenon 属、Oscillatoria 属、Planktothrix 属等が原因で、植物プランクトンでは、珪藻である Synedra 属、Asterionella 属、Cyclotella 属、Melosira 属、緑藻である Closterium 属、Pediastrum 属、Scenedesmus 属、Botryococcus 属、ユーグレナ藻である Trachelomonas 属、Euglena 属、渦鞭毛藻である Peridinium 属、Gymnodinium 属、黄緑色藻である Uroglena 属が原因で引き起こされる。

### 2. 3 実験方法

本研究では、北海道にある4箇所のダム貯水池(Aダム、Bダム、Cダム、Dダムと表記)を対象に、次世代シーケンサー(Miseq, Illumina)を用いた16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物分類を行った(写真1)。湖水を採取した日を表1に示す。採水はダムサイト、湖心、上流で行い、表層、中層、底層の3箇所から採取した。本報告では、それぞれ採取したサンプルを混合した代表サンプルの例を示す。



写真1 次世代シーケンサー(左:装置本体、右:検出基盤)

表1 湖水採水日(-はサンプルなし)

	Aダム	Bダム	Cダム	Dダム
4月	2016/4/27	-	-	2016/4/25
5月	2016/5/17	2016/5/24	2016/5/26	2016/5/23
6月	2016/6/8	2016/6/30	2016/6/22	2016/6/8
7月	2016/7/12	2016/7/19	2016/7/22	2016/7/13
8月	2016/8/3	2016/8/16	2016/8/29	-
9月	2016/9/20	2016/9/20	2016/9/15	2016/9/14 2016/9/28
10月	2016/10/12	2016/10/24	2016/10/18	2016/10/12
11月	2016/11/21	2016/11/8	2016/11/15	2016/11/1
12月	2016/12/1	-	-	-
1月	2017/1/18	2017/1/25	2017/1/24	2017/1/17
2月	-	-	-	2017/2/2

ダム湖水 2L を遠心分離で 50 mL にまで濃縮し、懸濁したものから Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2(日住金環境)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー(S-D-Bact-0341-b-S-17 および S-D-Bact-0785-a-A-21)にオーバーハングアダプター配列を付加したものを用い、PCR 増幅を行った。PCR 反応条件は初期変性を 95°C で 3 分行った後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒のサイクルを 25 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit(Beckman Coulter Genomics)を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3(600 サイクル, Illumina)を用い、塩基配列を決定した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking およびクラスター解析は QIIME を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13\_8 をリファレンスとした。

### 2. 4 結果と考察

標的とする 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域について、各サンプルにつき 10 万~30 万リードの塩基配列を明らかにした。 $\alpha$  多様性解析の結果、各ダムサンプルから検出された OTU は、各ダムの年間平均を比較した場合、Dダムにおいて若干(約 10%)高かったのみで、ダム間における差はほとんどなかった(図1上)。サンプリング採取月で  $\alpha$  多様性を比較した場合、水温が高くなる 8 月、9 月で高くなり、冬季から春季にかけて種類が減少していき、夏季の 20%程度まで種の選択が起こることが示された(図1中)。サンプル別で  $\alpha$  多様性を比較した場合、高い  $\alpha$  多様

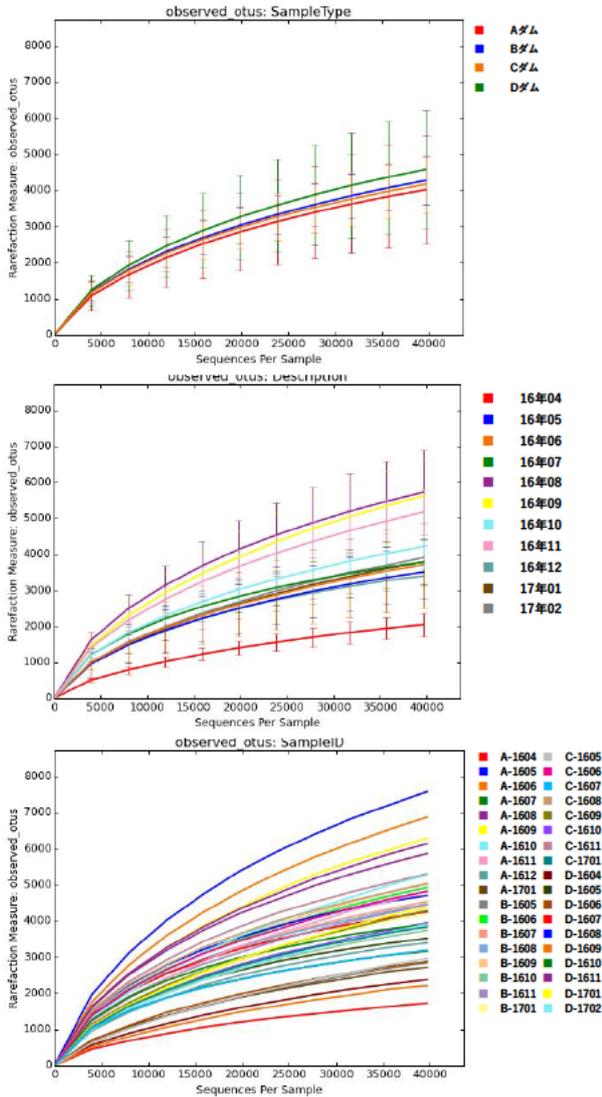


図1 α多様性解析の結果(各ダム比較(上図)、各月比較(中図)、各サンプル比較(下図))

性を示した順に、Dダム8月、Dダム9月、Aダム9月、Dダム11月、低いα多様性を示した順に、Aダム4月、Aダム6月、Dダム4月、Aダム1月であった(図1下)。Dダムでは夏季のカビ臭が発生しており、細菌の多様性もその一因になっているかもしれない。また、AダムおよびCダムは、これまでに水質問題が生じたことがなく、Bダムは過去に大規模なカビ臭が発生したが現在では富栄養化が進行しつつも顕著な水質問題は生じていない。

β多様性解析の結果について、門レベルの分類結果を図2に、属レベルの分類結果を図3に示す。その結果、門レベルの分類ではAダムの4月、6月、Cダムの5月、Dダムの4月、6月で、Actinobacteriaが30%以上優占化していた。これら Actinobacteria

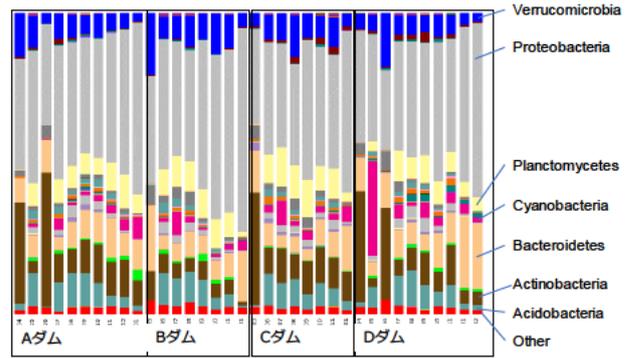


図2 β多様性解析の結果(門レベル)

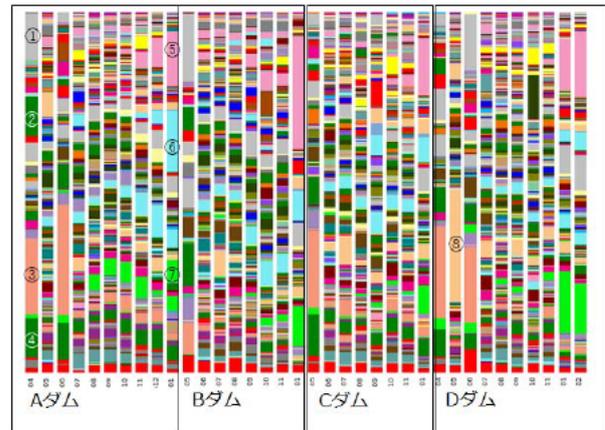


図3 β多様性解析の結果(属レベル)

門に含まれていた細菌は Actinomycetales 目 ACK-M1 属(図中の③)や C111 属(図中の④)が主であったが、機能は未知で、これらの細菌がカビ臭を産生するかは不明である。また、Dダムの5月のサンプルにおいて、Cyanobacteria が30%検出された。Cyanobacteria 門に含まれていた細菌は Chloroplast 網 Stramenopiles 科(図中の⑧)、Cryptophyta 科(図中の⑦)、Synechococcophycidae 網 Synechococcus 属、Oscillatoriophycidae 網 Phormidium 属が主に検出された。これらのラン藻がカビ臭を産生していることも考えられる。従来の藻類モニタリングでは、カビ臭が産生される状況で、検鏡結果としてラン藻が確認されなければ、便宜的に放線菌によるカビ臭と結論付けられることが一般的だったが、今回のDダムでは放線菌である Actinobacteria もラン藻も検出される場合があり、むしろ、その場合が多い。その他、菌叢解析の結果から、Verrucomicrobia 門に含まれる Cerasicoccaceae 属(図中の①)はAダムの4月、Bダムの5月、Dダムの6月に比較的多く検出される傾向があった(それぞれ13%、19%、16%)が、全

く検出されない月もあり、検出割合の変動が大きいことが示唆された。Betaproteobacteria 綱に含まれる Polaromonas 属 (図中の②) もまた A ダムの 4 月、B ダムの 5 月、D ダムの 4 月から比較的多く検出され (11%、7%、4%)、これらのダムの菌叢は互いに類似しているものと推察される。一方、鉄酸化細菌として知られる Gammaproteobacteria 綱に含まれる Crenothrix 属 (図中の⑤) はどのダムにおいても水温が低下する冬季にかけて検出割合が増加しており、4 月から 11 月までの検出割合の平均値は 1.2% だったのに対して、12 月および 2 月の平均値は 16.2% だった。紅色非硫黄細菌である Betaproteobacteria 綱に含まれる Rhodoferrax 属 (図中の⑥) も水温が低下する冬季にかけて検出割合が増加しており、4 月から 11 月までの検出割合の平均値は 0.9% だったのに対して、12 月および 2 月の平均値は 6.4% だった。また、C ダムの 9 月は 5.4% と例外的に高い割合で検出されたことから C ダムにおける菌叢が他のダムと若干異なっていたことが推察される。

各サンプルの種レベルの主座標分析の結果を図 4 に示す。各サンプルの菌叢の類似度は各プロット間の距離で示される。この結果、各ダムの菌叢は、時間経過に伴い、同様の傾向を示しつつ推移する傾向が観察された。つまり、ダム湖水の菌叢は、地理的要因より水温等の影響を受け、変化していくことが示唆された。また、どのダムも時期的な差はあるものの春季から夏季にかけて菌叢が大きく変化していることが明らかになった。

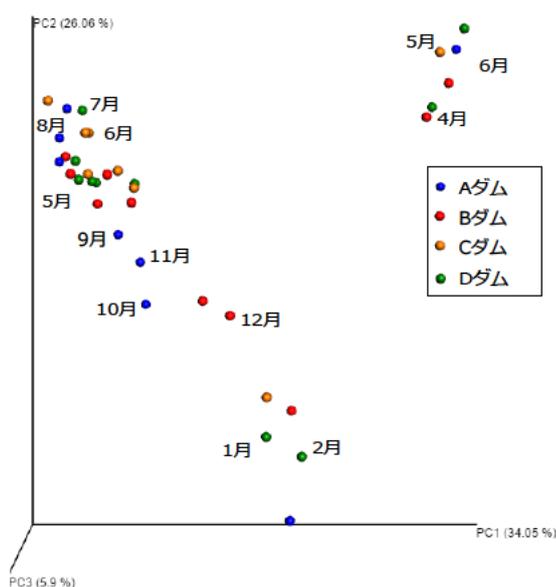


図 4 各サンプルにおける菌叢類似度の主座標分析結果 (種レベル)

## 2. 5 結論と今後の予定

本研究では、ダム貯水池からサンプリングした水試料を用い、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づき菌叢解析を行った。その結果、採取したダム湖水では、菌叢は、地理的要因より水温等の影響を受け、変化していくことが示唆された。また、夏季に異臭等の水質問題が生じているダムでは、検出される細菌の種類が多いことが示唆された。今後は、定量方法に関して、DNA 濃度とクロロフィル等の光合成色素との相関による各細菌量の推定を試みる。また、植物プランクトンに関して、PCR 増幅等の実験方法の検討から始め、既知の調整サンプルを用いた検鏡結果との比較を試みる予定である。また、簡易的なモニタリング手法が確立されれば、これまで明らかにされてこなかった各細菌の微生物ループの中での機能・役割について解明についても寄与できるだろう。

## 3. 藻類増殖に関する水質項目の影響評価

### 3. 1 研究背景

これまで、湖沼等において、窒素及びリンの挙動・濃度管理が富栄養化対策として実施されてきている。一方、Cudowski ら<sup>2)</sup>は実湖沼での水質調査から DRMn (dissolved reactive manganese) のような溶存態のマンガンが湖沼における trophic status の決定に寄与する一因子であることを提案している。また、藍藻類 *Synechocystis* の生長について、鉄源として Fe-EDTA を与えた藻類培養培地においてマンガン欠乏の状況下ではほとんど生長しないが、マンガン共存下ではよく生長するとの知見がある<sup>3)</sup>。土木研究所においても、Fe 制限とした藻類培養培地で培養した藍藻類 *Microcystis aeruginosa* の生長はマンガン無添加に比べてマンガン共存下の方が良いという結果が得られている。これらの結果は、マンガンは藻類の鉄摂取を促進させ藻類生長を増大させる作用があることを示唆している。しかしながら、既往研究の培養試験で用いられたのは藻類培養培地であり、実湖沼水においても同様の結果が得られるか否かを検証した研究はない。そこで本研究では、北海道の 4 ダム湖水に対しマンガン添加・無添加での藻類培養試験を行い、マンガン負荷による藻類生長の促進の有無について評価した。

### 3. 2 実験方法

#### 3. 2. 1 ダム湖水

ダム湖水として、2. 3 で用いた A~D ダム (2016 年 9 月採水) を試験に供した。それぞれ採水場所は水面から 0.5 m とした。水質項目として T-N、T-P、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>x</sub>-N(NO<sub>2</sub>-N と NO<sub>3</sub>-N の総和)、PO<sub>4</sub>-P、T-Fe、D-Fe、T-Mn、D-Mn、DOC を測定した。これらの湖沼水は藻類培養試験に供するまで 4℃暗所で保管した。

### 3. 2. 2 藻類生長試験

供試藻類として藍藻類 *Microcystis aeruginosa* を用いた。*M. aeruginosa* の継代培養には富栄養培地である CB 培地を使用した。

オートクレーブで加熱滅菌 (121℃、15 分) した 50 mL 三角フラスコに対し、0.22 μm ポアサイズのメンブレンフィルターでろ過滅菌した上記 4 種のダム湖沼水を 30mL 分注した。それぞれのダム湖水に対し、マンガン添加・無添加系を用意し、マンガン添加系には溶存態マンガン濃度が 30 μg/L 上昇するように MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O を添加した。この濃度は CB 培地におけるマンガン濃度を参考に決定した。

マンガン添加・無添加の各ダム湖水に対し、初期細胞濃度が 1.0 × 10<sup>4</sup> cells/mL となるよう *M. aeruginosa* を接種した。培養条件は光強度 40 μmol/m<sup>2</sup>/s 明暗 12 時間周期、25 ± 1℃、90 rpm 回転振とうとし、人工気象機内で単藻培養した。各培養系はいずれも 4 連とした。培養開始から 3 日あるいは 4 日おきに細胞濃度を測定した。これらの条件は Algal Growth Potential (AGP) 試験<sup>4)</sup>を参考にした。各培養系において、AGP 試験<sup>4)</sup>に基づき 1 日あたりの平均細胞濃度増加率が 5%未満となった場合に培養を終了した。マンガン添加・無添加における最大細胞濃度について、有意差の有無を t 検定 (有意水準 α=0.05) により評価した。

## 3. 3 結果と考察

### 3. 3. 1 ダム湖沼水の水質

各水質項目を表 2 に示す。全般的に、A ダム、D ダムは B ダムや C ダムに比べて各水質項目の濃度が高い傾向にあることが分かった。

### 3. 3. 2 マンガン添加がダム湖沼水での藻類生長に及ぼす影響

図 5 に各ダム湖水におけるマンガン添加・無添加時の *M. aeruginosa* の生長曲線を示す。C ダムの水では、マンガン添加系の方が培養開始時から生長速度

が大きく、最大細胞濃度も有意に増大した。A ダムの水では培養開始から 7 日目まではマンガン添加系の方が細胞濃度が高く、マンガン添加により初期の生長速度が増加した。一方、最大細胞濃度はマンガン無添加系の方が有意に大きかった。B ダム、D ダムの水ではマンガン添加の有無に関係なくほぼ同じ生長曲線を描いたが、最大細胞濃度は B ダムではわずかながらマンガン無添加の方が有意に高く、D ダムではマンガン添加・無添加系で同等となった。

結果として、A ダムと C ダムの水ではマンガン添加による *M. aeruginosa* の生長が促進され、B ダムと D ダムでは促進しないことが確認された。表 2 に示した各水質項目をみると、例えば A ダムの水は D-Fe、D-Mn いずれも他のダム湖水より高い傾向にもあるにもかかわらず Mn 添加による生長促進が確認され、一方でそれらの濃度が最も低い B ダムでは Mn 添加による生長促進がないなど、一貫性のある傾向が見られなかった。本研究では既往の研究<sup>3)</sup>を参考に鉄とマンガンの関係に着目して評価を行ったが、マンガン存在下において摂取能力が向上する微量元素は鉄以外にもあると推定され、その微量元素の解明とダム湖水中の濃度測定が重要であると考えられた。また、A ダムの水ではマンガン添加系の方が最大細胞濃度が低下し、見かけ上はマンガン添加により生長が阻害された。既往の知見や土木研究所の先行研究ではこれまでにそのような事例はなく、原因は不明である。今後も知見を収集し、そのメカニズムについて検討する予定である。

これまでマンガンは水質管理、富栄養化対策として重要視されてこなかったが、本研究成果によりアオコ形成メカニズム解明、富栄養化抑制においてマンガンのような微量元素の挙動の把握・制御も重要な一因子となりうることが示唆された。

### 3. 4 結論と今後の予定

本研究ではマンガン添加・無添加の 4 種のダム湖水に対し藍藻類 *M. aeruginosa* を用いて藻類生長試験を実施した。その結果、一部のダム湖沼水ではマンガン添加により *M. aeruginosa* の生長が促進されることが明らかになった。

今後は同ダム湖での繰り返し試験や他ダム湖水を用いて同様の実験を行い情報を蓄積し、実環境における藻類生長やアオコ形成に及ぼすマンガンの影響についてより詳細に評価する予定である。

表2 各サンプルにおける菌叢類似度の主座標分析結果 (種レベル)

	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N + NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	T-Fe (μg/L)	D-Fe (μg/L)	T-Mn (μg/L)	D-Mn (μg/L)	DOC (mg/L)
A ダム	0.355	0.140	0.014	0.155	0.018	2663	43.7	141	35.2	1.10
B ダム	0.266	0.025	0.010	0.173	0.007	96.1	14.0	12.9	ND	0.24
C ダム	0.232	0.017	0.012	0.168	ND	61.8	15.5	24.0	0.32	0.85
D ダム	1.225	0.149	0.009	0.867	0.018	3274	61.9	135	4.86	1.02

ND: Not Detected

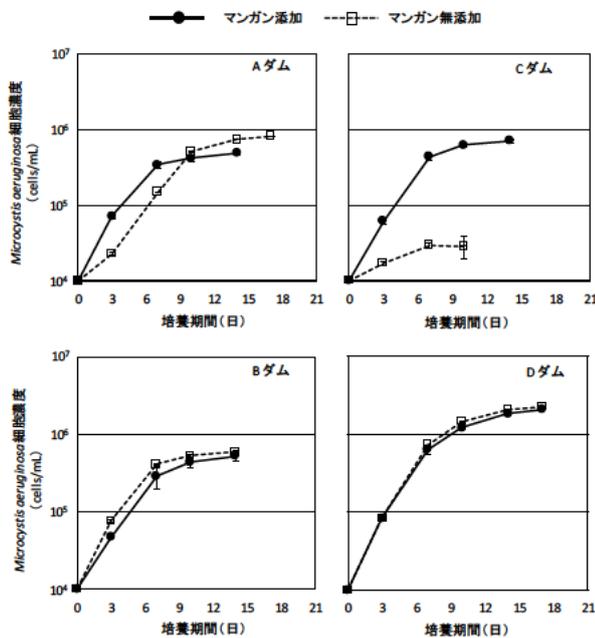


図5 ダム湖沼水を用いた藍藻 *Microcystis aeruginosa* の生長に及ぼすマンガン添加の影響

#### 4. まとめ

本研究では、湖沼・ダム貯水池の水質改善に向け、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づく菌叢モニタリング、および、マンガン添加・無添加の 4 種のダム湖沼水に対し藍藻類 *M. aeruginosa* を用いて藻類生長試験を実施し、マンガン負荷による藻類生長評価を行い、以下の結果を得た。

- ・ダム貯水池からサンプリングした水試料を用い、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づき菌叢解析を行った結果、採取したダム湖水では、菌叢は、地理的要因より水温等の影響を受け、変化していくことが示唆された。
- ・また、夏季に異臭等の水質問題が生じているダムでは、検出される細菌の種類が多いことが示唆された。
- ・マンガン添加・無添加の 4 種のダム湖水に対し藍藻類 *M. aeruginosa* を用いて藻類生長試験を実施した。その結果、一部のダム湖沼水ではマンガン添加により *M. aeruginosa* の生長が促進されることが明らかになった。

#### 参考文献

- 1) 矢挽哲也、中津川誠：カビ臭による水質障害について- 既往知見のレビュー-、北海道開発土木研究所月報、615号、33-43、2004年8月
- 2) Cudowski A. : Dissolved reactive manganese as a new index determining the trophic status of limnic waters. *Ecol. Indic.* Vol. 48, pp.721-727, 2015
- 3) Sharon S., Salomon E., Kranzler C., Lis H., Lehmann R., Georg J., Zer H., Hess W. R. & Keren N. : The hierarchy of transition metal homeostasis: Iron controls manganese accumulation in a unicellular cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol.1837, pp.1990-1997, 2014
- 4) 日本下水道協会：下水試験方法上巻、pp.554-562、1997

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

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、平山孝浩、對馬育夫、金子陽輔

担当チーム：水工研究グループ（水理）

研究担当者：石神孝之、櫻井寿之、中西哲

### 【要旨】

本研究では、気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える影響についての将来的な予測に取り組んだ。計画初年度である今年度は、東北地方にある御所ダムを対象に、水質変動予測モデルを構築し、現在気候および将来気候 6 ケースの全 7 ケースについて、20 年間の水質予測シミュレーションを行った。主な結果として、放射強制力の変化が大きいシナリオほど、底層の貧酸素化が進行する傾向が確認されたが、降雨パターンによっては、貯水池内部の温度成層を破壊するため、底層の貧酸素化が抑制される傾向も確認された。今後は、本研究で構築した水質変動予測モデルの精度向上に資する検討を行うとともに、気候変動に対応する適応策の評価に関する検討等を行う予定である。

キーワード：地球温暖化、湖沼、貯水池、水質変動予測モデル、水質保全

### 1. はじめに

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

これまで土木研究所では、本課題の先行研究にあたる『地球環境の変化が河川湖沼水質に及ぼす影響に関する調査(H21～H25)』の中で、地球温暖化に伴う水温の上昇が湖沼における NO<sub>3</sub> の上昇、藻類種の変化(珪藻→藍藻)を引き起こす可能性を、1Box モデルを作成

することにより導き出した。しかしながら、将来の降雨パターンを検討するには、より詳細な検討ができる水質モデルを利用する必要がある。本研究では、水環境における地球温暖化の影響予測の精度向上を目指し、流域における適応策とその効果、優先度を評価することを目的とし、地球温暖化が湖沼や貯水池等の水環境に与える影響とその適応策について検討する。

今年度は、東北地方に位置する御所ダムを検討対象とし、気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える影響について検討した。

### 2. 検討ダムの選定および各種パラメータの設定

#### 2.1 検討ダムの選定

気候変動の影響が大きいと考えられる東北地方の国土交通省管理の 18 ダム貯水池から、ダムの諸元・地形条件・流域状況・水質障害の発生状況を基に、「現在水質障害が生じていないダム」、「10 年以上前に竣工されたダム」に着目し、1 次選定を実施し、浅瀬石川ダム、御所ダム、四十四田ダム、湯田ダム、七ヶ宿ダム、玉川ダム、月山ダム、白川ダム、摺上川ダムの 9 ダムを選定した。次いで、ダムフォローアップ資料等に記載されている貯水池や下流河川の水質を確認し、「気

候変動の影響で将来水質問題（冷温水放流、底層貧酸素化、濁水長期化、富栄養化等）が顕在化する可能性のあるダム」の観点から2次選定を行い、さらに、データの存在状況等を確認し、検討対象ダムとして御所ダムを選定した。

## 2.2 御所ダム緒元

御所ダムは、岩手県盛岡市に位置する国土交通省管理ダムである。流域形状は南北に長く東西に比較的狭く、流域面積は635 km<sup>2</sup>である。御所ダムの諸元を表1に、容量配分図を図1に示す。

表1 ダム諸元

項目	内容	
ダム	位置	岩手県盛岡市
	形式	コンクリート・ロックフィル複合ダム
	目的	洪水調節、灌漑、発電、上水道
	堤高	52.5 m
	堤長	327.0 m
	堤体積	フィル：980.0 千 m <sup>3</sup> コンクリート：220.0 千 m <sup>3</sup>
	計画高水量	2,450 m <sup>3</sup> /s
	計画調節量	1,250 m <sup>3</sup> /s
	放流設備	洪水吐：ラジアルゲート（オリフィス）3門 洪水吐：ラジアルゲート（クレスト）4門 利水放流：ホロ-ジェットバルブ 1門 表層取水：鋼製2段式ローラーゲート
貯水池	流域面積	635 km <sup>2</sup>
	湛水面積	6.4 km <sup>2</sup>
	総貯水量	65,000 千 m <sup>3</sup>
	有効貯水量	45,000 千 m <sup>3</sup>
	地形	

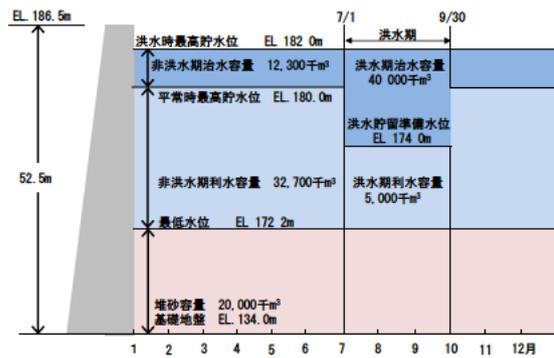


図1 容量配分図

## 2.3 将来予測シナリオからの気象データの作成

### 2.3.1 将来予測シナリオ選定

気候変動による御所ダムの水質変化予測を実施するため、環境省が公表している気象予測データを収集・整理し、計算条件としての設定を行った。環境省が2014年6月6日に日本国内における気候変動による影響のための気候変動予測に供することを目的に公表したRCPシナリオに基づく地域気候モデル(MRI-NHRCM20: 水平格子20km)の出力結果を用いた。RCPシナリオは、政策的な温室効果ガスの緩和策を前提として、将来の温室効果ガスを安定化レベルとそこに至るまでの経路のうち代表的なものを選択し作成されたシナリオである。RCPシナリオには、放射強制力の変化が大きい順に、RCP8.5、RCP6.0、RCP4.5、RCP2.6の4つのシナリオが存在する。本研究では、現在気候を基にしたケースをHPA\_m02（現在気候）、RCP2.6、RCP4.5、RCP6.0、RCP8.5のうち海面水温をSST1、積雲対流スキームのうちYSを使用したケースをRCP2.6\_C1、RCP4.5\_C1、RCP6.0\_C1、RCP8.5\_C1とした。また、これらに加え、RCP8.5のシナリオのうち積雲対流スキームYSを使用し、海面水温をSST2、SST3を使用したケースをRCP8.5\_C2、RCP8.5\_C3とし、差分法を用いたバイアス補正を行い、各予測シナリオの変化を確認した。

### 2.3.2 気温データの作成

各予測シナリオの月別平均気温の比較を図2に、予測シナリオ毎の平均気温と月平均気温の最大値・最小値の比較を図3に示す。月別の平均気温では、最も気温の低い1月において現行気候からの変化幅が大きく、現在気候では-2.8℃であるのに対し、中位の排出シナリオのRCP4.5\_C1で-0.9℃(+1.9℃)、高位の排出シナリオのRCP6.0\_C1で-0.5℃(+2.3℃)、さらに高位の参照シナリオRCP8.5\_C3においては2.9℃(+5.7℃)

となっていた。平均気温においては、RCP2.6\_C1～RCP6.0\_C1では1-2°Cの上昇であるが、RCP8.5\_C1～C3で4-5°Cと上昇量が大きかった。

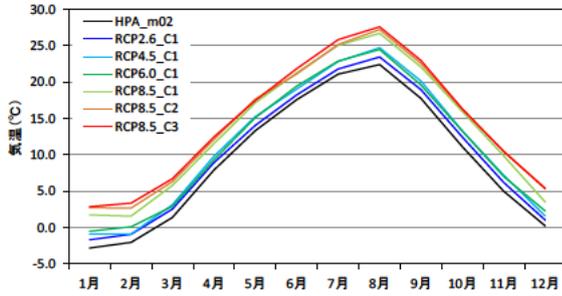


図2 予測シナリオ毎の月別平均気温の比較

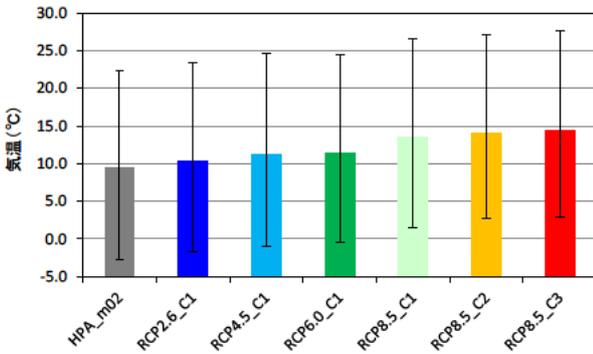


図3 予測シナリオ毎の平均気温と月平均気温

### 2. 3. 3 雨量データの作成

各予測シナリオの月別平均雨量の比較を図4に、年総雨量の平均値・最大値・最小値の比較を図5に示す。月別雨量では、高位のシナリオほど、1月-3月の雨量が多くなる傾向が見られた。また6月-10月においてはシナリオ毎の変化幅が大きく、特にRCP6.0シナリオで7月の降水量が多かった。年間総雨量では、各シナリオとも大きな差はなかった。ただし、RCP8.5\_C2では、年間総雨量の最大値が約3,000mmと比較的多い年があった。

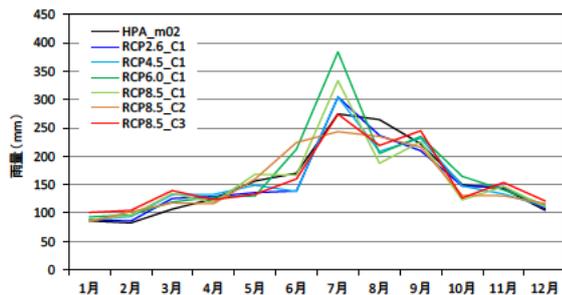


図4 予測シナリオ毎の月別雨量の比較

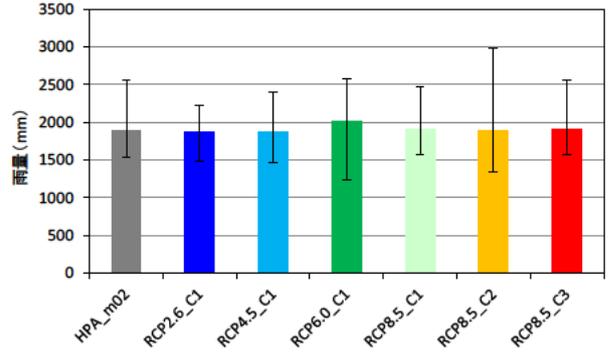


図5 予測シナリオ毎の年総雨量の平均値

## 2. 4 モデルの作成

### 2. 4. 1 流出モデル

降雨からダム貯水池に流入する流量を算出するための分布型流出モデルとして、本研究ではWEP(Water and Energy transfer Process)モデルを用いた。WEPモデルとは土木研究所が開発したメッシュベースモデルであり、流域スケールで水・エネルギー量の分析を行うことができる<sup>4)</sup>。一方、春季の融雪による流入量の増加を考慮するにあたっては別途、御所ダム流域における既存の積雪の観測所のデータを用いて分布傾向を分析し、融雪量を計算した(図6)。なお、降雨による積雪の融解については二次的な因子と見なし、本研究では省略した。今後、予測精度を向上する場合、検討する必要があると考えられる。

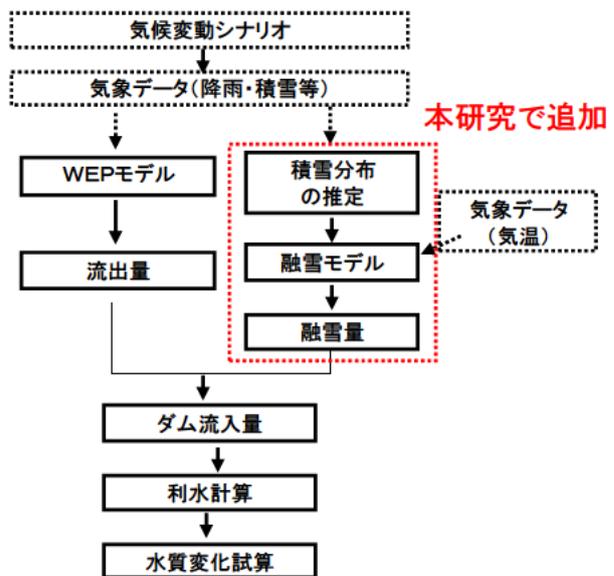


図6 融雪を考慮したダム流入量予測の流れ

## 2. 4. 2 利水モデル

利水モデル作成にあたり、下流の利水基準点や取水地点、治水基準点における確保水量を確認した。また、御所ダムのダム操作規則における貯水池利用状況と貯留された流水の放流および発電放流に関連する条文や過去の運用時の特徴を考慮した。構築した利水モデルは実測値を良好に再現可能だったことを確認した。

## 2. 4. 3 水質予測モデル

水質予測モデルは、流れの場と富栄養化現象の両方を精度良く予測するために広く用いられる鉛直2次元モデルを使用した。生態系モデル（概念図を図7に示す）は、有機態物質は懸濁態、溶存態に分割し、無機態窒素はアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の3態で計算した。また、動物プランクトンを含むモデルとした。予測項目としては、貯水池内の流速、貯水池および放流水の水温、SS、植物プランクトン、動物プランクトン、POC（懸濁態有機炭素）、POP（懸濁態有機リン）、PON（懸濁態有機窒素）、DOC（溶存態有機炭素）、DOP（溶存態リン）、DON（溶存態窒素）、PO<sub>4</sub>-P（リン酸塩）、NH<sub>4</sub>-N（アンモニア態窒素）、NO<sub>2</sub>-N（亜硝酸態窒素）、NO<sub>3</sub>-N（硝酸態窒素）、DO、COD

であり、予測可能な現象としては、ダム貯水池の断続的な流動、水温による成層流、濁水の流動、各水質項目の変化、放流水質が挙げられる。

## 3. 気候変動による土砂量、栄養塩負荷量の推定

### 3. 1 USLE 式を用いた推定

貯水池に流入する栄養塩負荷量や土砂量の算出に関して、既往の検討では、L-Q 式（流入負荷と流量の関係式）が広く用いられているが、L-Q 式は個別の河川ごとに現地観測のデータが必要なため、L-Q 式がない場合も多い。したがって、本研究では、L-Q 式に頼らず、より簡易に気候変動の影響を反映した栄養塩負荷量と土砂量の流入量を設定する方法を検討するため、USLE 式を用いた検討を行った。USLE 式は農地を対象とした土壌流出の経験式として用いられるが、式中に降雨強度に関する係数 R が含まれており、ダム流域における気候変動に伴う降雨特性の変化による負荷量への影響を予測できると考えられる。

$$A = R \cdot K \cdot LS \cdot P \cdot C \quad (1)$$

ここで、A：単位面積当たりの流出土砂量（ton/ha）、R：降雨係数（ton・m<sup>2</sup>/ha/h）、K：土壌係数（h・m<sup>2</sup>）、LS：地形係数、C：作物係数、P：保全係数

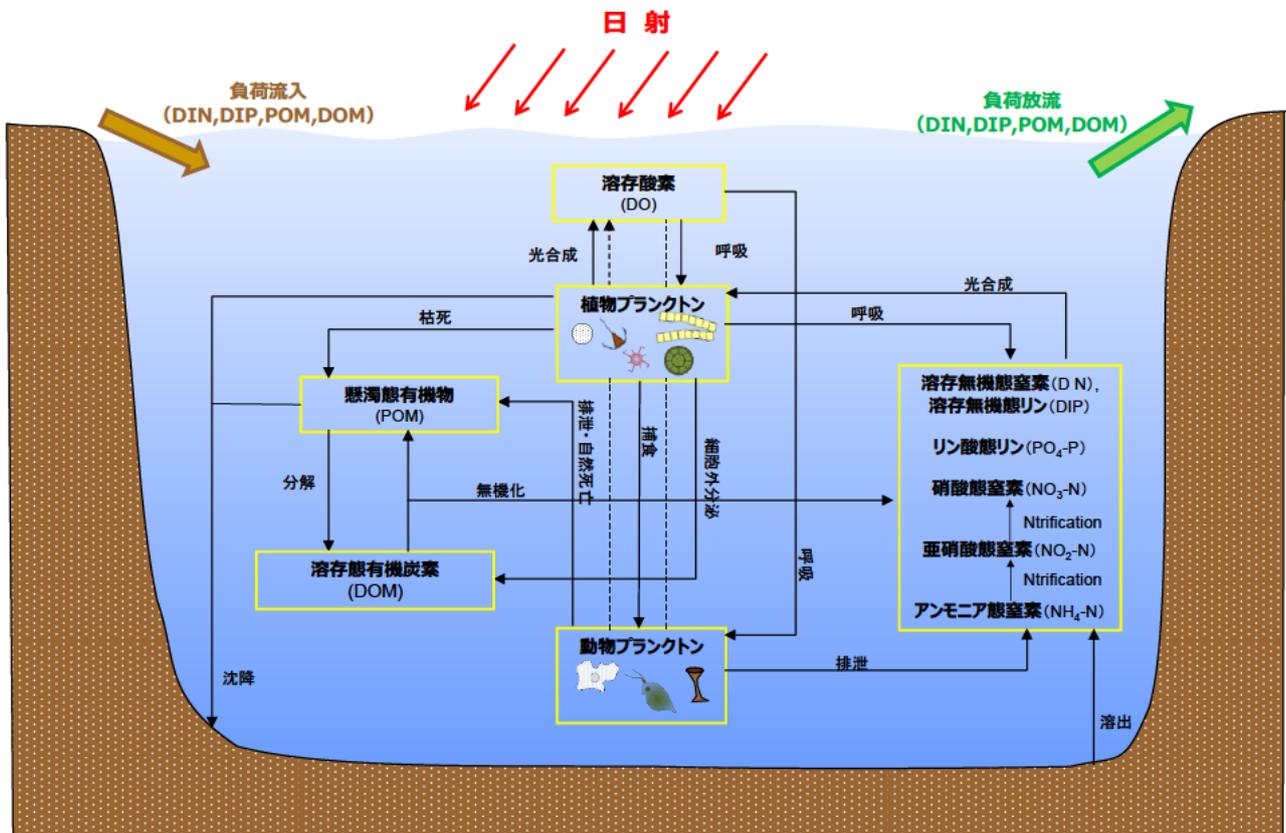


図7 生態系モデルの概念図

USLE 式によって気候変動による将来の年間流入土砂量を推定し、最終的に水質予測に使用可能な時系列データへの変換を行った。

### 3. 2 推定結果

上記の USLE 式を用いて、対象期間における年間流出土砂量の推定を行った。その結果、推定値は年間 30-80 (千 ton/年) となった。これは、御所ダムの年堆砂量の 1-2 割程度にしか相当しないが、過年度に実施された堆砂ボーリング調査に基づく粒径比率では、堆砂量の約 2 割が粘土分で占められており、年間負荷量のオーダーとしては概ね推定できていると考えられる。また、御所ダムの L-Q 式と年間負荷量の比較を行った結果を図 8 に示す。この結果から、両者の相関性は高いものの、USLE 式による負荷量は L-Q 式の 2-6 倍大きかった。L-Q 式に関しては大きな出水時の観測結果が反映されていないため、全体的に過小評価されている可能性がある。したがって、USLE 式による推定値の妥当性について、年間負荷量での推定精度を検証するためには、L-Q 式の推定精度を高めるか、ボーリング調査結果と堆砂の経年変化を基にして年間の粒径別堆砂量を算出するなどの手法によって検証することが必要であると考えられる。

以上から、USLE 式による推定について量的な精度には多少の課題は残るものの、L-Q 式が存在しない場合でも USLE 式に基づく手法によって年間負荷量の経年変化を推定できる可能性があることがわかった。

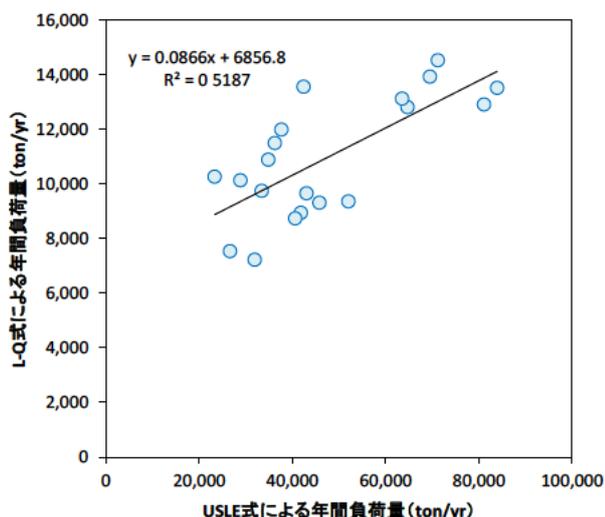


図 8 USLE 式と LQ 式による年間負荷量の比較

USLE 式は土砂量の推定式であるため、栄養塩負荷量を直接的に計算することはできない。そこで、本研究では、定期水質調査結果から SS と PON、POP の相関式 (図 9 および図 10) を作成し、USLE 式で算出した SS を説明変数として与え、栄養塩負荷量とした。

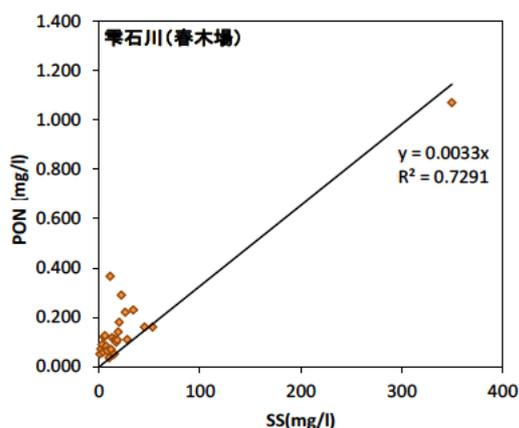


図 9 御所ダムの SS と懸濁態窒素 (PON) の相関式

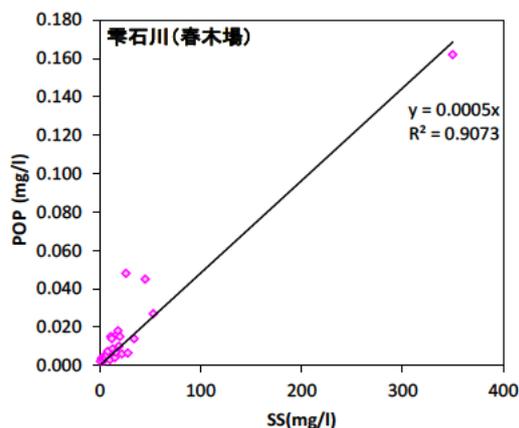


図 10 御所ダムの SS と懸濁態リン (POP) の相関式

## 4. 計算条件の設定

### 4. 1 ダム流入水量

各予測シナリオを用いた月別のダム流入量の比較を図 11 に、各予測シナリオの年間総流入量の平均値・最大値・最小値の比較を図 12 に示す。月別流入量では、融雪期の流入量が高位のシナリオほど小さくなっていった。これは気候変動によって積雪量が小さくなったことで、融雪期の流入量が小さくなったことが理由と考えられる。また、年間総流入量も、同様の傾向があった。興味深いことに、7 月の流入量が最も多かったのは、影響度の最も大きい RCP8.5 シナリオではなく、RCP6.0 シナリオであった。その理由として、RCP6.0 では 7 月の月間雨量が多いことが考えられる (図 4)。

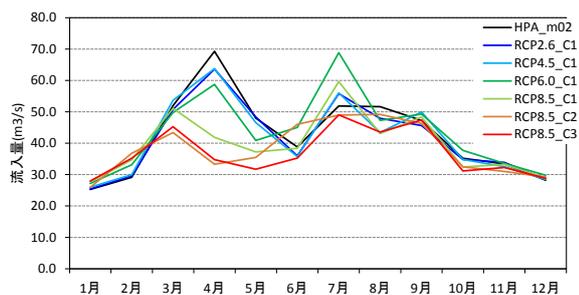


図 11 予測シナリオ毎の月別流入量の比較

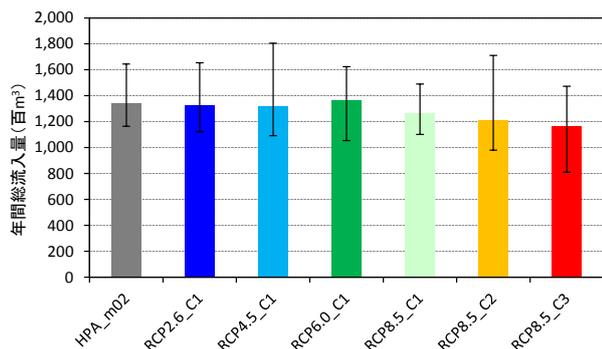


図 12 予測シナリオ毎の年間総流入量の平均値

## 4.2 利水計算

各予測シナリオの月平均貯水位の比較を図 13 に示す。3月-5月にかけての月平均貯水位は、高位のシナリオほど貯水位が低くなっていることがわかる。これは、融雪前に低下させた貯水位が、融雪量が減少したため、十分に回復できなかったためと考えられる。また、8月-12月の平均貯水位は概ね同程度であり、どの予測シナリオにおいても現行の貯水位運用を行うだけの流入量があると考えられた。

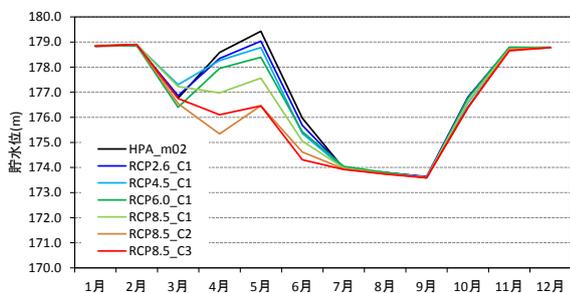


図 13 気候変動シナリオ毎の月平均貯水位の比較

## 4.3 流入水質データ

各気候変動シナリオから算出した気象データとダム流入量より、流入水温、流入 DO、L-Q 式および USLE 式により、各予測シナリオにおける流入 SS、TN、TP の時系列データを作成した。流入水温は、気温との相関で算出されていることから、月別や年平均の変動の傾向は気温と同様であった。平均流入水温は、RCP2.6\_C1~RCP6.0\_C1 では 0.5-1°C 程度の上昇であり、RCP8.5\_C1~C3 では 2-3°C 上昇していた。月別流入 SS は、高位のシナリオにおいて融雪期で流入量が少なくなることから、高位のシナリオほど流入 SS は低下していた (図 14)。流入 DO は、高位シナリオほど低下していた。気温が上昇すると流入 DO 濃度が低下するためであると考えられる。平均流入 DO は、RCP2.6\_C1~RCP6.0\_C1 では 0.1-0.3 mg/L 程度の低下であり、RCP8.5\_C1~C3 では 0.5-0.6 mg/L 低下していた。流入 TP、TN は、SS と同様に高位のシナリオにおいて融雪期で流入量が少なくなることから、融雪期でシナリオ毎のバラつきが大きく、高位のシナリオほど少なくなる傾向が見られた。

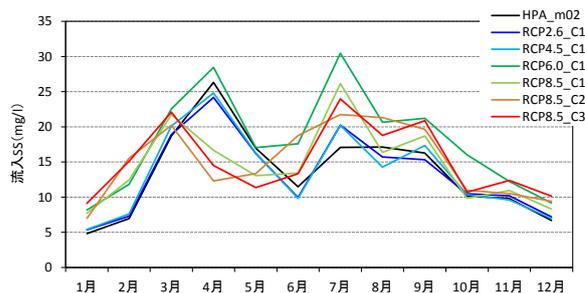


図 14 予測シナリオ毎の月別流入 SS (USLE 式) の比較

## 5. 水質変化予測

### 5.1 水温

各シナリオにおける年平均水温と月平均水温の最大値・最小値の比較を図 15 に示す。貯水池水温の上昇は、気温・流入水温の上昇の傾向と同様の変動を示していた。表層の年平均水温は現在気候と比較し、RCP2.6 シナリオで 0.8°C、RCP4.5 と RCP6.0 で 1.3°C、RCP8.5\_C1~C3 で 2.9-3.5°C の上昇が見られた。

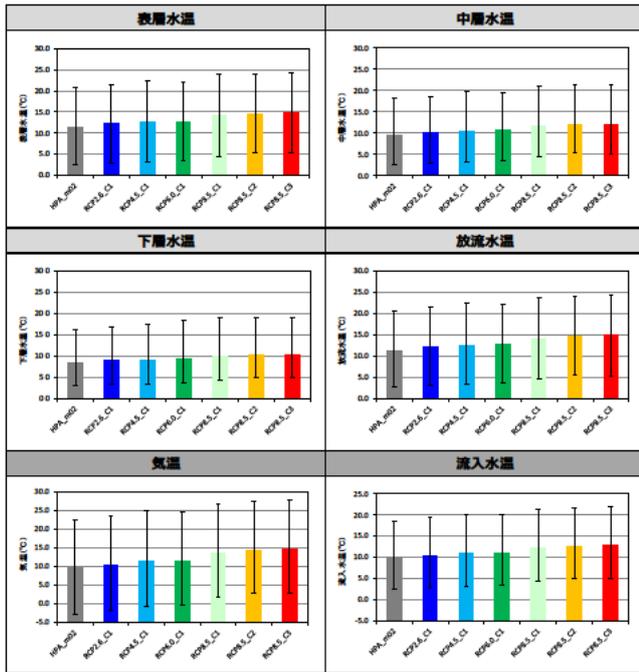


図 15 各シナリオにおける平均水温と月平均水温の最大値・最小値の比較

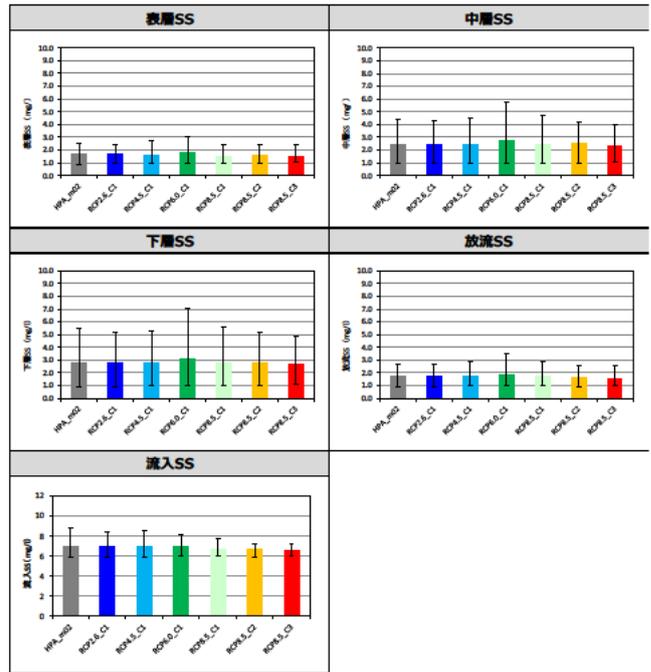


図 16 各シナリオにおける平均 SS 濃度と月平均 SS 濃度の最大値・最小値の比較

## 5. 2 SS

各シナリオにおける年平均 SS と月平均 SS の最大値・最小値の比較を図 16 に示す。貯水池の平均 SS 濃度は、出水頻度の高い RCP6.0 シナリオで相対的に高い値を示したが、どのシナリオも概ね同程度の変動幅となっていた。SS 濃度は表層よりも中層・下層が高く、下層で変動幅が大きかった。御所ダムでは表層放流を行っており、放流 SS は表層 SS の変動と類似していた。

## 5. 3 DO

各シナリオにおける年平均 DO と月平均 DO の最大値・最小値の比較を図 17 に、年最小 DO 濃度の平均値・最大値・最小値の比較を図 18 に示す。貯水池の平均 DO 濃度では、表層・中層・下層ともに高位の排出シナリオほど DO が低下した。しかし、出水頻度の高い RCP6.0 シナリオでは、下層 DO において RCP2.6 シナリオと同程度の値となっていた。下層 DO の最小値 (図 19) では、RCP4.5 と RCP8.5 で下層 DO が 0.0 mg/L となる年があるのに対して、RCP6.0 では最低で

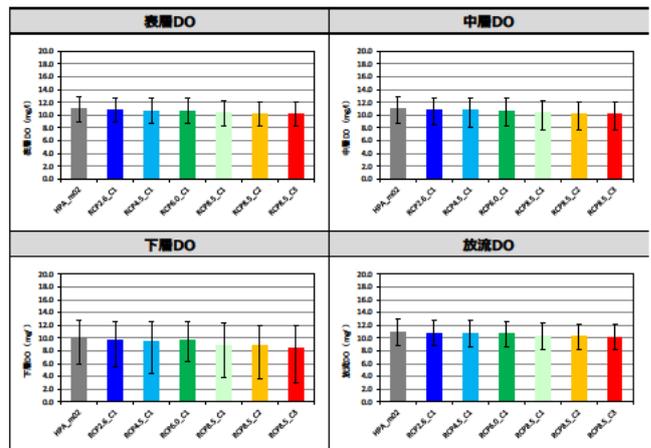


図 17 各シナリオにおける平均 DO 濃度と月平均 DO 濃度の最大値・最小値の比較

も 0.9 mg/L となっていた。RCP6.0 シナリオでは、気温上昇よりも出水頻度の増加によって貧酸素化が生じにくくなっていると考えられる。

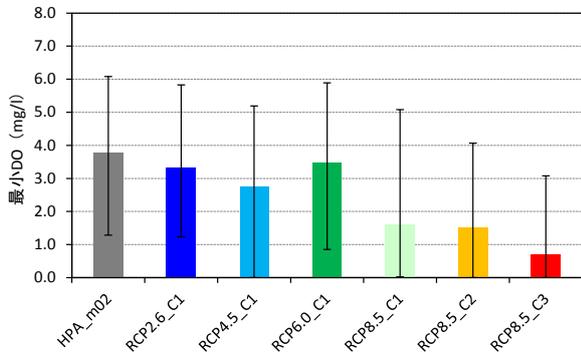


図 18 年最小 DO 濃度の平均値・最大値・最小値の比較

#### 5. 4 クロロフィル a

各シナリオにおける平均クロロフィル a 濃度と月平均クロロフィル a の最大値・最小値の比較では、各シナリオとも概ね同程度の値を示していた。

### 6. 気候変動が水質変化現象に与える影響

#### 6. 1 温水放流

気温上昇に伴う温水放流の発生状況を把握するため、シナリオ毎の温水放流日数を計算した。温水放流日数の定義として、現在気候の流入水温をベースに 20 年間の日々の流入水温の最大値と最小値を変動範囲として設定し、最大値を上回る日数をカウントした。シナリオ毎の年間温水放流日数の平均値・最大値・最小値の比較を図 19 に示す。年間の温水放流日数は、気温上昇が大きいシナリオほど、日数が多くなる傾向がみられ、RCP2.6~6.0 で現在気候の 2 倍程度に増加すると予想された。

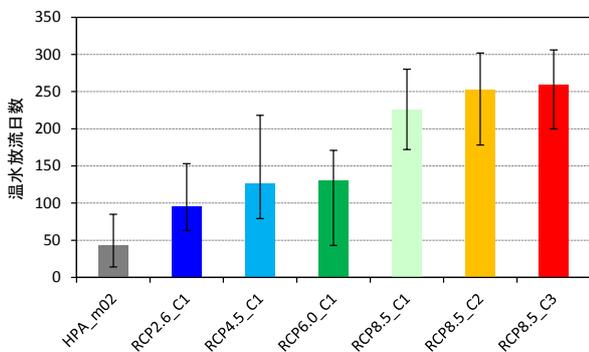


図 19 各シナリオにおける年間温水放流日数の平均値・最大値・最小値の比較

#### 6. 2 貧酸素化

貧酸素化の傾向を把握するために、各シナリオにおいて、下層 DO 濃度が 2.0 mg/L 以下の日数をカウントした (図 20)。下層 DO 濃度が 2.0 mg/L 以下の発生日数の平均値・最大値・最小値の比較を図 20 に示す。下層 DO 濃度が 2.0 mg/L 以下になる日数の最大値は、RCP2.6、RCP6.0 では 12 日であるのに対し、RCP4.5 で 50 日と比較的大きかった。RCP4.5 では出水頻度が高い RCP6.0 よりも成層が破壊される頻度が少なく、鉛直混合が生じにくく、貧酸素化が生じやすいためと考えられた。また、貧酸素化が生じやすいのは、8 月、9 月であり、それ以外の月では、ほとんど貧酸素化は生じないという結果であった。

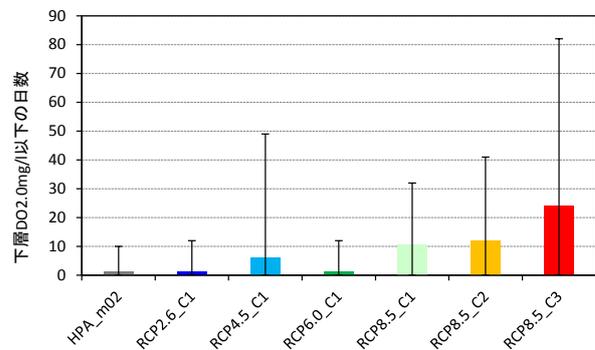


図 20 下層 DO 濃度 2.0mg/L 以下の年間発生日数の平均値・最大値・最小値の比較

#### 6. 3 濁水長期化

濁水長期化の傾向を把握するため、各シナリオの放流 SS 濃度が 10 mg/L 以上の日数をカウントした。放流 SS 濃度 10 mg/L 以上の年間日数の平均値・最大値・最小値の比較を図 21 に示す。年間の平均発生日数を見ると、RCP6.0 では現在気候の 2 倍程度発生日数が増加しているが、他のシナリオは現在気候の変動幅と概ねにおいて同程度であった。

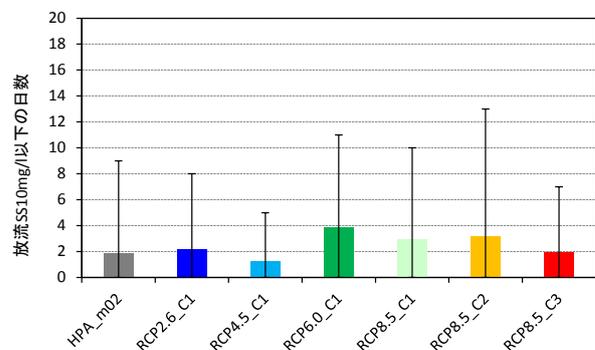


図 21 放流 SS 濃度 10 mg/L 以上の年間発生日数の平均値・最大値・最小値の比較

## 6. 4 USLE 式と LQ 式の比較

L-Q 式および USLE 式を使用した場合の各シナリオの水質予測計算結果を図 22 に示す。USLE 式を使用したことで、L-Q 式よりも流入 SS 負荷量が増加したことから (4-5 倍程度)、貯水池内の SS 濃度が 3-4 倍程度増加した。また、SS の境界条件を変化させたことによる貯水池水温、DO の変化は小さかった。このことから、御所ダムの貯水池特性として流入量や流入水温の方が流入 SS より貯水池の混合形態に影響を及ぼしている可能性が考えられた。SS、TN、TP の境界条件を変化させたことによるクロロフィル a の変化はほとんど見られなかった。これは、懸濁態の影響は溶存態と比較し感度が小さいことや、懸濁態は一度沈降して溶出することで湖内水質に影響すると考えられるが、本モデルでは底泥の増加に伴う栄養塩類の溶出速度の増加といったメカニズムまではモデル化されていないことが影響していると考えられる。

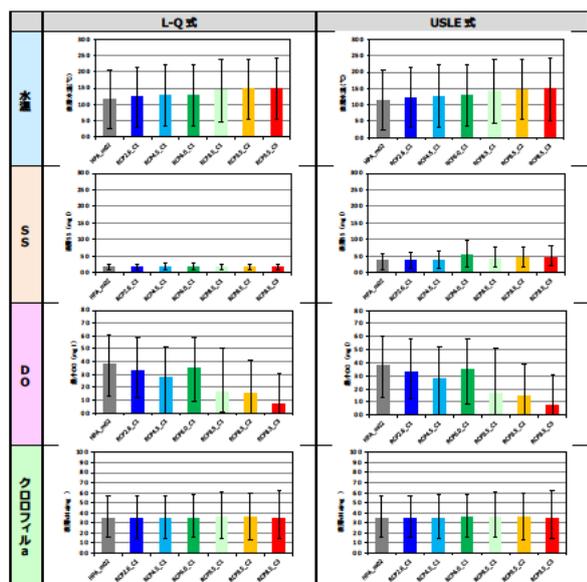


図 22 L-Q 式を使用した場合と USLE 式を使用した場合の各水質項目の計算結果の比較

## 7. まとめ

本研究では、気候変動が御所ダムの水質に与える影響について水質変動予測モデルを構築し検討を行った。本研究での検討結果を以下にまとめる。

- ・流出モデルとして、WEP モデルに融雪を考慮したモ

デルを構築した。利水モデルは直接取水や下流河道での取水を考慮し構築し、貯水位運用データを作成した。

- ・御所ダムにおける現在気候及び将来気候 6 ケース、全 7 ケースの 20 年間の将来予測計算を実施した。御所ダムでは検討対象ダム選定時に貧酸素化に伴う底層嫌気化が進行すると推定しており、予測計算結果からも高次のシナリオになるにつれて貧酸素化が進行する傾向が確認された。また流況の比較的良い RCP6.0\_C1 シナリオでは現在気候と同程度の変化であった。
- ・水質試算の結果、既往の L-Q 式を使用した計算と USLE 式を使用した計算では、SS については流入土砂濃度の変化によって湖内の SS 濃度に大きな変化が生じたが、クロロフィル a や DO といった水質項目にはほとんど変化が見られなかった。これは、懸濁態の影響は溶存態と比較し感度が小さいことや、懸濁態は一度沈降して溶出することで湖内水質に影響すると考えられるが、本モデルでは底泥の増加に伴う栄養塩類の溶出速度の増加といったメカニズムまではモデル化されていないことが影響していると考えられた。

今後は、本研究で構築した水質変動予測モデルの精度向上に資する検討を行うとともに、気候変動に対応する適応策の評価に関する検討等を行う予定である。

## 参考文献

- 1) 文部科学省, 経済産業省, 気象庁, 環境省: IPCC 第 5 次評価報告書統合報告書政策決定者向け要約 (翻訳), 2015.
- 2) 環境省: 気候変動の影響への適応計画, 2015.  
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/28593.pdf>
- 3) 国土交通省: 国土交通省気候変動適応計画, 2015.  
<http://www.mlit.go.jp/common/001111532.pdf>
- 4) Jia, Y., Ni, G., Kawahara, Y. and Suetsugi, T.: Development of WEP model and its application to an urban watershed. *Hydrological Processes* 15, 2175-2194. 2001.
- 5) 鶴木啓二, 多田大嗣, 細川博明: USLE による畑地流域からの土砂流出解析, 第 53 回北海道開発技術研究発表会, 2010.

## (土砂動態変化に伴う水域・陸域環境影響予測・評価技術、並びに、それらを踏まえた土砂管理技術の開発)

### 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

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、武田文彦、真野浩行

#### 【要旨】

国土形成計画等において、山地から海岸までの一貫した総合的な土砂管理の推進等が謳われており、これらを推進していくためには、土砂動態のモニタリング、環境影響評価、対策技術を統合した流砂系における持続可能な土砂管理システムの構築が求められている。

本研究では、土砂供給による河川水質への応答特性を把握するとともに、評価対象項目に関する毒性情報の収集や生物試験の実施により、生態リスク評価を目的とした。2016 年度では、金属類 4 物質を対象として、ダム底質の溶出試験結果をもとに土砂供給時の河川水中の濃度を推定し、既報の有害性の文献情報から導出した有害性評価値と比較することで、土砂供給に伴う対象金属類による生物影響の可能性を評価することを試みた。評価結果から、対象金属類 4 物質による生物影響の可能性が低いことが示された。

キーワード：土砂動態、急性毒性、生態リスク、曝露評価

#### 1. はじめに

河道改修やダムの建設といった流域の開発や治山・砂防による山地の安定によって、河川を流下する土砂の量が減少している、いわゆる **hungry water** の状態となっている<sup>1)</sup>。流下土砂量の減少により、河川では河床低下による横断形状の二極化や沖積層の減少による岩盤の露出が顕在化し、河川内構造物への影響や瀬・淵といった河川が本来持つリーチスケールの微地形の減少などが懸念されている。また、沿岸域では供給土砂量の減少による海浜の後退など、土砂成分の減少は河川・沿岸域で問題となっている。一方、ダムや堰などの河川横断構造物では、流下土砂の分断化による堆砂問題が進行している。このように流域全体を俯瞰すると、土砂量が過剰な箇所と窮乏している箇所が局在化するアンバランスな状態となっている。

このような背景を受け、平成 20 年に策定された国土形成計画では、「総合的な土砂管理の取り組みの推進（以下、総合土砂管理）」、いわゆる流域一貫の土砂管理の必要性が謳われ、その解決策として土砂動態のモニタリン

グ、環境影響評価、対策技術を統合した流砂系における持続可能な土砂管理システムの構築が求められている<sup>2)</sup>。

しかし、現状としては総合土砂管理を実施するための総合的な手段や手引きなどは策定されていない。この理由について、山本<sup>3)</sup>は総合土砂管理の困難さについて、5 つの理由を挙げて説明している。①土砂動態に関する経験的・科学的知見の不足と不確実性。②全体と部分の不調和。③総合土砂管理計画に関わる計画（調整）主体の不在。④受益と負担の調整の困難性。⑤流域計画の不在。中でも①の理由は、総合土砂管理の根幹に関わる問題である。河川における土砂動態は主に実験室レベルで蓄えられた知見をもとに、数値計算の技術を現地に適用して将来を予測するものである。しかし、河道内の土砂動態や流入土砂量といった境界条件は不確実性を大いに伴う。そのため、これらの要因についての検証等が必要である。

また、②の理由は、ダム、河川や沿岸域といった個別の部分空間が持つ特性と利用形態が各々異なるために生じる問題である。河川環境まで目を広げると、一般的な土砂動態の予測の空間スケールと環境を評価するための

空間スケールが大きく異なることが挙げられる。概して、土砂動態の空間スケールが大きいのに対して、環境を評価するための空間スケールは小さくなる。この空間スケールのギャップもまた全体と部分の不調和に含められるだろう。

上記の総合土砂管理の困難性に鑑み、本研究では以下の三つの点に着目し、研究を実施する。一つ目は、ダム建設により土砂供給が激減した河川を対象とした土砂供給による河床変動予測技術の開発である。二つ目は、土砂供給に伴うダム下流の陸域および水域のレスポンスの解明である。三つ目は、置土などに含まれる、河川生態系へ影響を及ぼすおそれがある重金属性物質の安全性の検討である。これらのうち、本報告書では、三つ目の項目について、本年度実施した研究内容を報告する。

## 2. 背景

ダムの維持管理において、ダム貯水池に堆積する土砂は大きな問題の1つであり、さまざまな排砂の方法が検討・実施されている<sup>3)</sup>。排砂の方法として、採取した土砂をダムの下流の河川に投入する場合、投入された土砂は河川の土砂地形環境や生物相を改善させる正の効果も期待される。一方で、投入した土砂には、ダム貯水池に堆積した後に吸着した化学物質が含まれるため、ダム下流の河川に投入された土砂から溶出した化学物質が、その河川に生息する生物に影響する可能性が考えられる。そのため、土砂をダム下流の河川に投入する際には、供給土砂から溶出した化学物質による水生生物への影響の可能性を評価する必要がある。また、供給した土砂により、溶存酸素や濁度などの河川の水質項目が変化することで、河川に生息する水生生物に影響を与えることが考えられる。本研究課題では、土砂供給により水質等に与える影響項目（金属類、貧酸素等）について、室内外の試験等により河川水質への応答特性を把握するとともに、評価対象種について影響項目に関する毒性情報の収集や生物試験を実施することにより、生態影響評価を行い、土砂供給に伴う水域環境のレスポンスの解明と予測・評価技術の開発を目的とする。

本年度は、矢作ダムを対象として、矢作ダムの底質から溶出する金属類による水生生物への影響の可能性を評価する方法について検討した。矢作川の上流にある矢作ダム貯水池では、これまでに豪雨時に大量の土砂が流入してきており、治水や利水機能への影響が懸念されている<sup>4)</sup>。そのため、ダム貯水池に堆積する土砂をダム下流の矢作川に排砂することで、滞積する土砂を管理するた

めの検討が進められている<sup>5)</sup>。ダム貯水池内の土砂をダム下流の河川に排出する際の、土砂供給による水質変化が水生生物に与える影響の可能性が検討されている。この検討では、供給土砂に含まれる化学物質の含有量調査の結果に基づいて、化学物質の河川水中濃度を推定し、対象化学物質による生物影響の可能性が評価されている。この評価では、底質中に含まれる化学物質の全量が河川水中に溶出することを仮定し、河川水中濃度を推定している。しかしながら、底質中に含まれるすべての量の化学物質が河川水に溶出するわけではない。河川水中濃度を過大に推定することで、水生生物への化学物質が影響する可能性が過大に評価されていることが考えられる。より現実的な評価を行う上で、対象とする化学物質の溶出量を測定し、その結果に基づいて土砂供給時の河川水中濃度を推定し、水生生物への影響の可能性を評価する必要がある。

本研究では、矢作ダム貯水池の底質を採取し、金属類についてダム底質の溶出試験を実施した。その結果をもとに土砂供給時の河川水中の濃度を推定し、既報の有害性の文献情報から導出した有害性評価値と比較することで、土砂供給に伴う金属類による生物影響の可能性の評価を試みた。

## 3 材料と方法

### 3.1 矢作ダム底質の採取と乾燥減量の分析

本研究では、矢作ダムを対象とした。矢作ダムは愛知県と岐阜県にまたがり、矢作川の上流部に建設されたダムである。矢作ダムの上流 3.5km 付近のダム貯水池において、2016年11月2日に、エグマンバーズを用いて底質を採取した（図1）。ダム貯水池の底質が河川に供給された時の河川水中濃度を推定するために、底質調査方法に従って、採取した底質の含水率を測定した。

### 3.2 底質からの金属類溶出試験

矢作ダム貯水池から採取した底質から溶出する金属類の量を調査するために、溶出試験を実施した。本研究では、溶出試験の溶媒として、矢作ダム貯水池の水を使用した。なお、矢作ダム貯水池の水は、2016年11月2日に矢作ダム貯水池中心の表層で採取した。

ダム貯水池の水を溶媒に用いた溶出試験は、環境庁告示第46号<sup>6)</sup>を参考に実施した。環境庁告示第46号で提示されている分析方法では底質試料と溶媒との重量体積比を10%として溶出試験を実施するが、本研究では、重量体積比と溶出量の関係を調査するために、重量体積比を表1に示すとおり5通り設定した。また、溶媒のみの

表1 重量体積比、底質試料量と溶媒量

重量体積比 (%)	試料 (g-dry)	溶媒 (mL)
3	15	500
5	25	500
10	50	500
20	100	500
25	125	500

処理区をブランクとして設定した。重量体積比ごとに繰り返しを3回、合計15回の溶出試験を実施した。試験後に、検液を前処理し、亜鉛、マンガン、鉛、ヒ素の検液中濃度をICP-MSにより定量した。

### 3.3 底質からの金属類溶出量の算出

溶出試験結果から、底質から溶媒に溶出した金属量を以下の式から算出した。

$$\text{溶出量}(\mu\text{g}) = (\text{検液中の濃度}(\mu\text{g/L}) - \text{ブランク濃度}(\mu\text{g/L})) \times \text{溶媒量(L)}$$

検液中の濃度がブランク濃度を下回っていた場合、溶出量を0とした。求めた溶出量を底質乾燥重量で割り、底質乾燥重量あたりの溶出量 ( $\mu\text{g/g} \cdot \text{Dry Solid}$ ) を求めた。

### 3.4 ダム底質から溶出した金属類による生物影響の可能性の評価

溶出試験で対象とした金属類について、ダム貯水池の底質の溶出試験結果をもとに土砂供給時の河川水中の濃度を推定し、既報の有害性の文献情報から導出した有害性評価値と比較することで、土砂供給に伴う金属類による生物影響の可能性の評価を試みた。

#### 3.4.1 河川水中濃度の推定

平成28年度に実施された給砂実験において投入した土砂量と河川流量、およびダム貯水池の底質の溶出試験から得られた溶出量に基づいて、土砂供給後の河川水中の金属類濃度を推計した。

平成28年度矢作川水系総合土砂管理検討委員会資料<sup>5)</sup>を参考に、河川流量と土砂量および土砂の比重から土砂濃度を算定し、これに各金属量を乗ずることで、各金属類の水中濃度を算出した。給砂実験での投入土砂量は  $0.14 \text{ m}^3/\text{s}$  で河川流量は  $177.9 \text{ m}^3/\text{s}$  と報告されている。また、土砂の比重として、間隙水を含む一般的な土砂の単位体積重量  $1.6 \text{ t/m}^3$  を採用し、土砂濃度を以下の式の通り算定した。

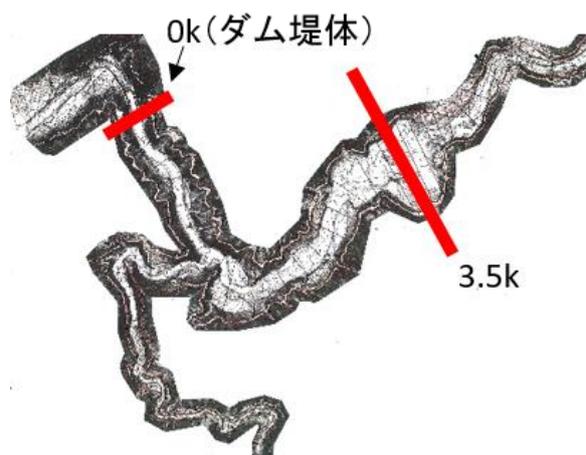


図1 矢作ダム貯水池の図（中部地方整備局より提供いただいた図を修正）ダム堤体および底質を採取した矢作ダムの上流3.5kmを実線示す

$$\begin{aligned} (\text{g/L}) &: 0.14(\text{m}^3/\text{s}) \times 1.6(\text{t/m}^3) \times 10^6 \\ &: (0.224(\text{m}^3/\text{s}) \times 100000) : 1.2249 \end{aligned}$$

また、乾燥土砂濃度を以下の式の通り算出した。

$$\begin{aligned} \text{乾燥土砂濃度}(\text{g} \cdot \text{Dry Solid} / \text{L}) \\ = 1.259 \times (1 - \text{含水率}(\%) \div 100) \end{aligned}$$

算出した乾燥土砂濃度に乾燥底質重量あたりの溶出量を乗ずることで、河川水中濃度 ( $\mu\text{g/L}$ ) を推計した。

#### 3.4.2 有害性評価値の導出

ダム下流の河川に供給したダム貯水池の底質から溶出する金属類について、生物影響の可能性を評価するために、既存の文献情報をもとに、対象金属類の有害性評価値を導出した。

有害性の評価にあたり、本研究では、矢作川に生息する生物を考慮して、水生生物保全の環境基準の水域類型に基づいて有害性評価を実施した。矢作ダム下流の矢作川は、比較的高温の水域を好む生物が生息するB型の水域類型とされている。そのため、有害性評価を実施する場合、この類型の水域に生息する生物を対象とすることが望ましい。そこで、既報の対象金属類の毒性情報を用いて、水生生物保全に係る水質目標値の導出方法<sup>7)</sup>を参考に、淡水域の生物B類型の河川に対する有害性評価値を導出した。

水生生物保全に係る水質目標値は、水生生物の個体群の存続への影響を防止することを目指して設定するため、長期間で引き起こる生物の繁殖等への慢性的な毒性に着目している。一方で、土砂供給による水質の変化は比較的短時間で生じると考えられるため、本研究では、短時間で引き起こる水生生物の影響に着目し、有害性の評価

を実施する必要がある。そこで本研究では、比較的短時間に生じる水生生物個体の生存にかかわる影響を防止する観点から有害性評価値を設定することとし、生物の生存等への急性的な毒性に着目した。

図 2 で示すフローに従い、有害性評価値を導出した。以下に有害性評価値の導出方法を簡潔に説明する。矢作ダム下流の矢作川の水生生物の保全に係る水質環境基準の水域類型は B 類型と指定されていることから、B 類型の魚介類と餌生物の生存等への急性毒性値（半数致死濃度や半数影響濃度等）を収集した<sup>8, 9, 10, 11</sup>。魚介類として、日本の淡水域に生息し、漁獲・放流あるいは養殖の対象となっている魚介類（魚類、甲殻類、貝類、藻類など）、および、元来わが国に生息する水生生物で、かつ、通常の実験等に供される水生生物種（例：化審法、農薬取引法および OECD TG の推奨種であるメダカ）を対象とした。また、餌生物として、日本の淡水域に生息している全ての生物のうち、上記魚介類を除く生物、および、魚介類に該当する生物の同属種、または通常に実験などに供される魚類以外の種類（例：化審法、農薬取引法、OECD TG の推奨種）を対象とした。その他、魚介類および餌生物の両グループについて、矢作川に生息する生物種と同属の生物種を対象に急性毒性値を収集した。また、上記の生物について、繁殖または成長への慢性毒性値（無影響濃度）も収集した。本研究では、急性毒性に着目するため、収集した慢性毒性値は、係数「10」をかけることで急性毒性の推定値とした。

収集した毒性値について、魚介類では、まず、種別の急性毒性濃度を算出した。種ごとに複数の急性毒性値があった場合、最小の毒性値を急性毒性濃度とした。また、種別急性毒性濃度が当該水域の代表種のみであった場合、ほかの生物種との感受性の相違（種比）として、係数「10」をかけて魚介類の急性毒性導出値とした。

餌生物では、属別の急性毒性濃度を算出した。属ごとに複数の急性毒性値があった場合、属別の幾何平均値を求め、急性毒性濃度とした。その際に、慢性毒性値から求めた急性毒性値と急性毒性試験から求められた急性毒性値が存在していた場合、急性毒性試験から求めた値を優先し、慢性毒性値から求めた急性毒性値を幾何平均の計算から除いた。次に、属別の急性影響濃度の最小値を餌生物の急性毒性導出値とした。その際に、慢性毒性値から求めた急性影響濃度と急性毒性試験から求められた急性影響濃度が存在していた場合、急性毒性試験から求めた急性影響濃度を優先した。上記で求めた魚介類の急性影響導出値と餌生物の急性影響導出値を比較し、小さい値を採用

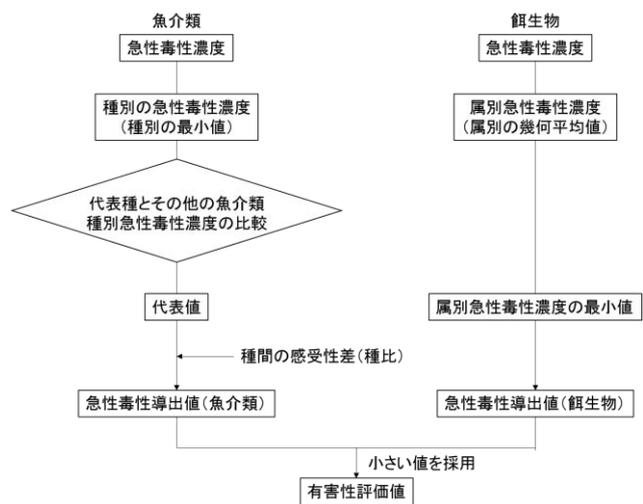


図 2 有害性評価値の導出フロー

い値を水域 B 類型の有害性評価値とした。

### 3.4.3 生物影響の可能性の判定

ハザード比を用いて、ダム底質から溶出した金属類による生物影響の可能性を判定した。ハザード比は河川水中濃度の推定値を有害性評価値で除して求められる<sup>12)</sup>。この判定方法ではハザード比の値がある一定の基準値を上回っているかどうかで各化学物質のリスクの有無を明確化できる利点がある。本研究では、ハザード比が 1 を超えた金属類を生物に影響する可能性のある物質として判定した。

## 4 結果

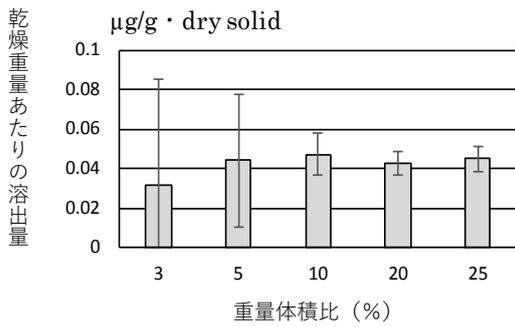
### 4.1 乾燥減量と溶出試験

乾燥減量の分析により、採取したダム底質の含水率は 71.8%であった。また、図 3 に、溶出試験結果から得られたダム底質の乾燥重量当たりの溶出量を示す。亜鉛は重量体積比にかかわらず、乾燥重量当たりの溶出量は 0.04  $\mu\text{g/g}\cdot\text{dry solid}$  程度であった。鉛は重量体積比が 3% から 5% に増加するとともに乾燥重量当たりの溶出量が増加し、その後、頭打ちとなる傾向を示した。ヒ素は重量体積比が 3% から 5% に増加するとともに底質の乾燥重量当たりの溶出量が増加した後、重量体積比の増加とともに底質の乾燥重量当たりの溶出量は減少した。また、マンガンは、重量体積比とともに、底質の乾燥重量当たりの溶出量が低下した。

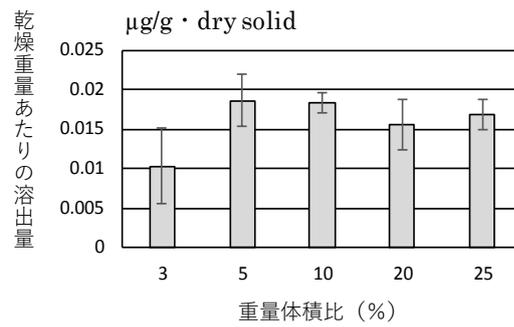
### 4.2 河川水中の金属類濃度

ブランクとして用いたダム貯水池水中の金属類濃度と溶出試験結果に基づいて推定した河川水中の金属類濃度を図 4 に示す。溶出試験結果に基づいて推定した亜鉛、

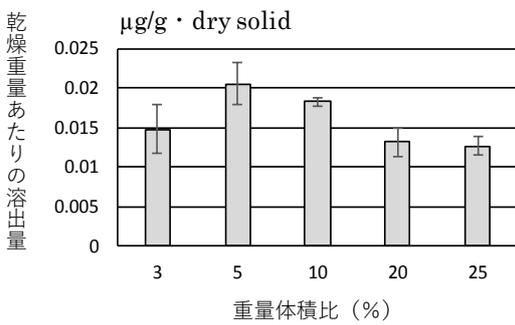
a) 亜鉛



b) 鉛



c) ヒ素



d) マンガン

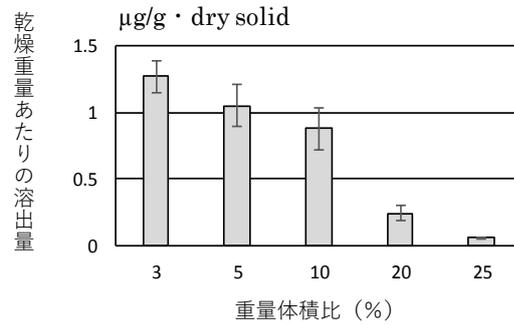
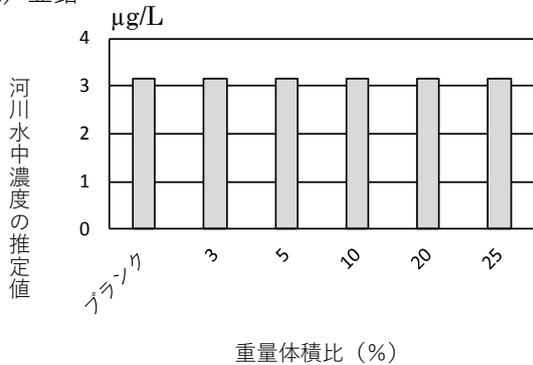
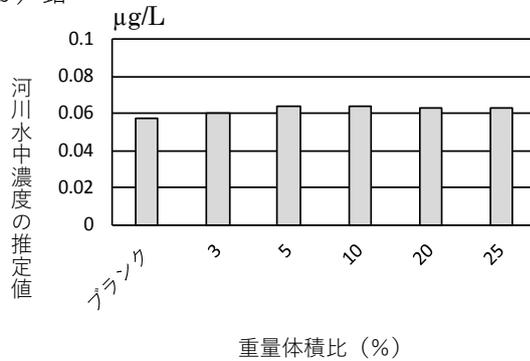


図3 ダム底質の溶出試験結果から求めた底質の乾燥重量あたりの溶出量 (µg/g · dry solid)

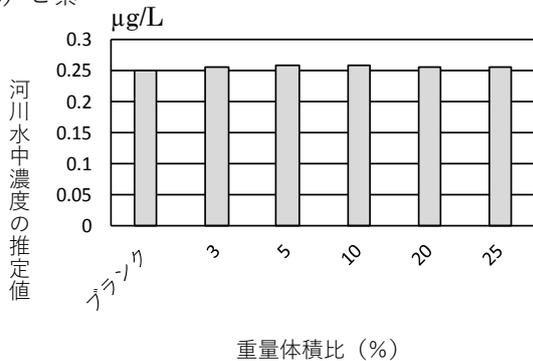
a) 亜鉛



b) 鉛



c) ヒ素



d) マンガン

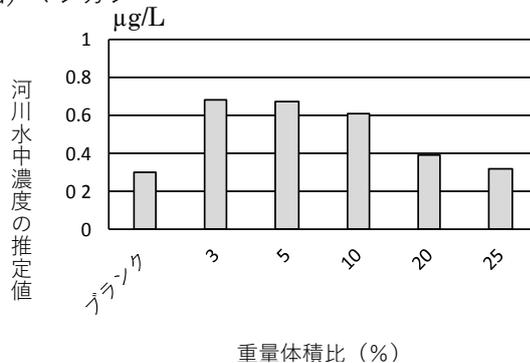


図4 溶出試験結果に基づいて推定した河川水中濃度 (µg/L)

鉛、ヒ素、マンガンの河川水中濃度は、それぞれ、

3.17-3.18 µg/L、0.06 µg/L、0.26 µg/L、0.32-0.68 µg/Lであった。亜鉛、鉛、ヒ素はダム底質からの溶出による河川水中濃度の変化はほとんど見られなかった。一方で、マンガンは、重量体積比が小さいほど、河川水中濃度の推定値は高い値を示し、重量体積比が3-10%の時に、ブランクの2倍程度の河川水中濃度を示した。重量体積比が小さい処理区で、マンガンの河川水中濃度が増加した要因として、溶出量の増加が考えられる。溶出試験において、重量体積比が小さくなると、土砂が溶媒と接触する表面積が増加し、その結果、溶出量が多くなったことが考えられる。

#### 4.3 有害性評価値

対象とした金属類について導出した有害性評価値を表2に示す。亜鉛と鉛の有害性評価値は餌生物の *Ceriodaphnia* 属、ヒ素は餌生物の *Chironomus tentans* (ユスリカ科)、マンガンは餌生物の *Chironomus plumosus* (オオユスリカ) の毒性値をもとに導出された。

#### 4.4 生物影響の可能性の判定

対象とした金属類について、各重量体積比の溶出試験から推定した河川水中濃度を有害性評価値で除して求めたハザード比を図5に示す。対象としたすべての金属類でハザード比は1未満であった。これらの結果より、対象とした金属類による生物影響の可能性は低いと考えら

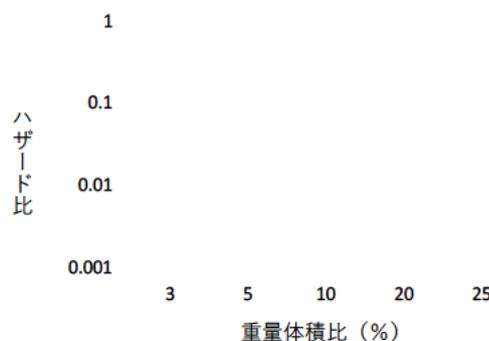
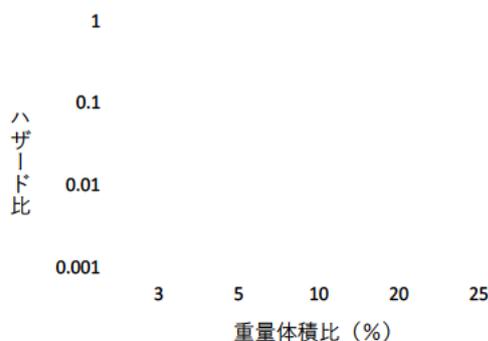
れた。

以上の通り、ダム底質の溶出試験結果をもとに土砂供給時の河川水中の濃度を推定し、既報の有害性の文献情報から導出した有害性評価値と比較することで、土砂供給に伴う金属類による生物影響の可能性を評価した。本研究では、矢作ダム貯水池の1地点から採取した底質をもとに金属類の生態影響評価を実施した。ダム底質は地点間で金属類の含有量に違いがあり、溶出量も異なる可能性がある。そのため、今後、複数の調査地点で底質を採取し、溶出試験を実施することで、底質から溶出した金属類の生物影響を評価する必要がある。

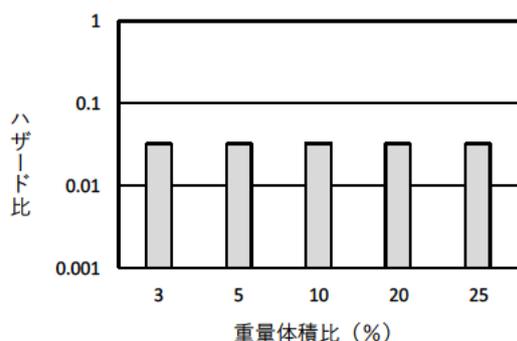
また、平成28年9月21日に実施された給砂実験における供給土砂と河川水との重量体積比は0.126%と推計

表2 対象とした金属類4物質について導出した有害性評価値

化学物質名	有害性評価値 (µg/L)
亜鉛	65
鉛	26.4
ヒ素	680
マンガン	55



c) ヒ素



d) マンガン

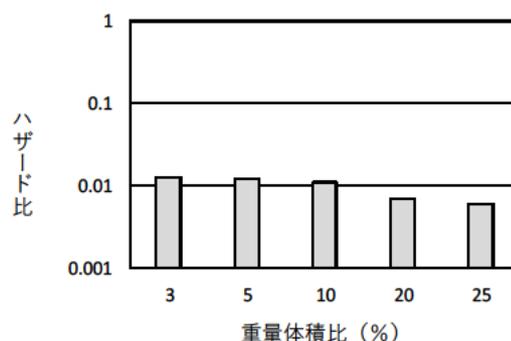


図5 各重量体積比の溶出試験から推定した河川水中濃度を有害性評価値で除して求めたハザード比

された。この値は、本研究で実施した溶出試験で設定した重量体積比の範囲よりも小さい値であった。土砂が供給された時のマンガンの河川水中濃度は重量体積比が小さいほど高い値を示した。この結果から、給砂実験での重量体積比のもとで土砂が供給される時の河川水中濃度の推定値は、本研究で推定した河川水中濃度の最大値よりも高くなる可能性が考えられる。そのため、より小さい重量体積比でマンガンの溶出試験を行い、河川水中濃度を推定した後に、生物影響の可能性を評価する必要がある。

さらに、本研究では、河川水中濃度の推計において、乾燥土砂濃度を求める際に、ダム貯水池内で採取した底質の含水率を用いて計算を行った。実際に、ダム下流の河川に排出する底質は、排出前に、長期間、置土されることが考えられる。置土の期間中に底質の脱水が起こり、含水率が本研究で採用された値よりも低くなる場合、河川水中に投入される土砂濃度が高くなり、その結果、置土した底質を投入した時の河川水中の金属類の濃度は、本研究で推定した値よりも高くなる可能性がある。そのため、今後、より詳細な金属類の生態影響の可能性を評価するために、置土したときの底質の含水率に基づいて河川濃度の推計する必要がある。

本研究では、既報の金属類の有害性データを用いて、有害性の評価を実施した。評価対象となる河川には、その河川特有の生物が生息している可能性がある。そのため、今後、河川特有の水生生物を考慮した有害性評価を検討する必要がある。さらに、金属類の毒性は溶存有機物や pH、カチオン等の水質によって影響することが報告されている<sup>13)</sup>。そのため、金属の毒性を適切に評価するために、今後、水質を考慮した有害性評価を検討する必要がある。

## 5. まとめ

本研究では、金属類 4 物質を対象として、ダム底質の溶出試験結果をもとに土砂供給時の河川水中の濃度を推定し、既報の有害性の文献情報から導出した有害性評価値と比較することで、土砂供給に伴う対象金属類による生物影響の可能性の評価を試みた。その結果、対象金属類 4 物質による生物影響の可能性が低いことが示された。

## 参考文献

- 1) Kondolf G.M. : Hungry Water: Effects of Dams and Gravel Mining on River Channels, Environmental Management Vol. 21, No. 4, pp. 533-551, 1997.
- 2) 国土交通省：国土形成計画（全国版），2015.
- 3) 栗津陽介ら：排砂バイパスを導入したダム下流における河床環境と底生動物群集、京都大学防災研究所年報、58 号 B、527-539、2015 年 6 月
- 4) 渡邊守、田島健：ダムにおける堆砂対策の現状と課題—矢作ダムを事例として—、水産工学、46 (2)、169-174、2009 年 11 月
- 5) 国土交通省中部地方整備局豊橋河川事務所矢作ダム管理書：平成 28 年度第 1 回矢作川水系総合土砂管理検討委員会資料、2016 年 12 月、<http://www.cbr.mlit.go.jp/toyohashi/kaigi/yahagigawa/dosyakanni/H28/index.html>
- 6) 環境庁：環境庁告示第 46 号、1991 年 8 月
- 7) 中央環境審議会水環境部会 水生生物保全環境基準専門委員会：水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について（第二次報告）、2012 年 12 月
- 8) 新エネルギー・産業技術総合開発機構：化学物質の初期リスク評価書 Ver. 1.0 No.130 砒素及びその無機化合物、2008 年 6 月
- 9) (財) 化学物質評価研究機構：CERI 有害性評価書 マンガン及びその化合物、2008 年 3 月
- 10) 環境省：化学物質の環境リスク評価第 8 巻 II 化学物質の環境リスク初期評価 (III) 化学物質の生態リスク初期評価 (7 物質：追加実施分) の結果 [3] 鉛及びその化合物、<http://www.env.go.jp/chemi/report/h22-01/pdf/chpt1/1-2-3-03.pdf>、2010 年 3 月
- 11) 長野県：第 3 回水生生物保全水質環境基準類型指定専門委員会資料 環境基準項目（全亜鉛）の設定について、<https://www.pref.nagano.lg.jp/mizutaiki/kurashi/shizen/suishitsu/inkai/documents/07zn.pdf>、2012 年
- 12) 環境省：化学物質の環境リスク評価第 14 巻 2.化学物質の環境リスク初期評価 (I) 化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン（平成 26 年度 12 月版）、<http://www.env.go.jp/chemi/report/h27-01/pdf/chpt1/1-2-1.pdf>、2016 年 3 月
- 13) 加茂将史、林岳彦 (2011) 金属の生態毒性予測モデル: Biotic Ligand Model の発展史と展望、刊強毒性学会誌、14 (1)、25-38、201

## 生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 30

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一、真野浩行、  
武田文彦、小森行也

### 【要旨】

わが国でも生物応答に基づく排水管理の導入が検討されており、下水道においても下水の生物影響に関する知見の収集が求められている。下水処理による生物影響削減能力は処理方法によって異なる可能性が考えられるが、わが国ではそのような評価を行った事例は見られない。そこで本研究では標準活性汚泥処理法、オキシデーションディッチ法（以下 OD 法）、嫌気好気ろ床法を採用する下水処理場において、処理前後の下水試料を用いて藻類生長阻害試験を実施し、生物影響削減効果を比較した。標準活性汚泥処理法、OD 法では影響を削減できたが、嫌気好気ろ床法では削減できないなど、処理方式により削減能力が異なることが示された。

キーワード：全排水毒性（WET）試験、下水処理、生物影響、ムレミカヅキモ

### 1. はじめに

わが国の下水道処理人口普及率は平成 28 年で約 78%<sup>1)</sup>に達しており、下水道には生活あるいは産業由来の多種多様な化学物質が流入していると考えられる。下水中に含まれる化学物質は下水処理プロセスを経て水環境中へと放流されるが、下水処理は必ずしも全ての化学物質を処理対象としているわけではない。生物難分解性有機物など一部の化学物質は除去しきれずに処理水中に微量に残存する可能性があり、それらの残存微量化学物質が水生生物に何らかの影響を及ぼすことが懸念される。よって下水の生物影響に関する知見の収集は重要課題であると考えられる。

Zhang ら<sup>2)</sup>は中国の下水処理場において、回分式活性汚泥法、担体投入活性汚泥法、標準活性汚泥法を導入した処理場で得た生物処理前後の下水の生物影響について藻類 *Scenedesmus obliquus* を用いて評価したところ、いずれの処理においても生物影響が削減され、標準活性汚泥法で最も削減能力が高かったことを報告している。このことは下水処理方法によって生物影響削減能力は異なる可能性を示唆している。一方、わが国で導入している各種下水処理方法における生物影響削減の可否については分かっていない。種々の処理方法の生物影響削減能力の理解のためには、複数の処理場から得た下水を用いた生物応答試験の実施が不可欠である。

本研究では各種下水処理方法について、藻類に対する下水の生物影響の有無および生物影響削減能力の評

価を行うことを目的とした。複数の下水処理場において生物処理前後の下水を採水し、生物応答試験を実施した。生物影響が確認された下水については、毒性同定評価 TIE（Toxicity Identification Evaluation）<sup>3),4)</sup>に基づき生物影響原因物質の推定を行った。

### 2. 実験材料および実験方法

#### 2. 1 下水試料の採水

A 下水処理場（標準活性汚泥処理法）、B 下水処理場（OD 法）、C 下水処理場（嫌気好気ろ床法）を対象とした。いずれの処理場も主に生活排水が流入している。流入下水及び塩素消毒後の放流水を 2015 年 6 月（A 処理場）、2016 年 7 月（B 処理場）、2016 年 8 月（C 処理場）に採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ、合計 24 リットル採水した。これらの排水は採水後すぐに土木研究所に持ち帰り、それぞれの 24 リットルの排水をコンポジットした。コンポジットした流入下水、放流水に対し水質分析を行い、表-1 に示す結果が得られた。また、流入下水と放流水は 60 $\mu$ m ポアサイズのメッシュでろ過を行い、ろ液を 4 $^{\circ}$ C の冷暗所で保管した。これらのろ液は下水試料として以下に示す生物応答試験に用いた。

#### 2. 2 藻類生長阻害試験

##### 2. 2. 1 排水試験

本試験は藻類を下水試料に一定期間曝露し、対数増

表-1 採水後にコンポジットした流入下水、放流水の水質

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

\*コンポジット時の水温

殖期における生長速度を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生長に対する下水試料の影響を明らかにする。

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>1)</sup>の推奨種となっている単細胞緑藻ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*、NIES-35株）を用いた。各試料に対して蒸留水による希釈で5段階の割合（試料割合80%、40%、20%、10%、5%）の試料を作製し、各試料にAAP培地作製時と同等の栄養塩を添加した。対照区はAAP培地とした。これらの試料は細胞濃度の測定に支障がないよう、0.22μmポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行った。容量は30mL/容器とし、生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>1)</sup>に基づき対照区は6連、各下水試料は3連とした。培養条件は初期細胞濃度1.0×10<sup>4</sup> cells/mL、温度24°C、光強度3000 Lux連続照射、回転振とう速度100 rpmとした。開始から72時間後に粒子計数分析装置（CDA-1000B、100μmアパチャー、Sysmex社）を用いて対照区と各下水試料での細胞濃度を求め、その結果に基づき各試験水での生長速度を算出した。下水試料による生長阻害率は、以下の式(1)により算出した。

生長阻害率 (%) = (対照区の生長速度 - 下水試料での生長速度) ÷ 対照区の生長速度 × 100 ……(1)

## 2. 2. 2 毒性同定評価

2. 2. 1の試験で影響が見られた流入下水と下水処理水に対し、米国環境保護庁（U.S.EPA）が公布する慢性毒性同定評価<sup>3),4)</sup>を参考に毒性同定評価TIE（Toxicity Identification Evaluation）を行った。表-2

に、各前処理と生物影響に寄与する化学物質（群）との関係を示す。流入下水、放流水いずれも生物影響が確認されたC処理場の流入下水および放流水（試料割合80%）に対し、無処理、チオ硫酸ナトリウム添加（5mg/L）、EDTA[エチレンジアミン四酢酸]添加（0.5mg/L、EDTA二水素二ナトリウムを使用）、ばっ気（下水試料100% 1L/1L air、1時間、ばっ気後に20%に希釈）、pH調整（pH約6.5に調整）の前処理を行った。また、SPE [Solid Phase Extraction、固層抽出] カラム（Sep-Pak C18、Waters社）を用い、試料を1.0μmポアサイズフィルターでろ過後にSPEカラムに通水したもの（SPEカラム通過水）、及びSPEカラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したものの（メタノール溶出物）も前処理水として同様に試験した。各試料にAAP培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22μmポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行ったものを藻類試験に供した。対照区はAAP培地とし、試験条件は2. 2. 1と同一とした。

## 2. 3 統計解析方法

排水試験では、生長速度について、Bartlett検定（有意水準α = 0.05）により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnnett検定による多重比較（有意水準α = 0.05）で対照区と下水試料との比較を実施した。等分散が棄却された場合はSteel検定（有意水準α = 0.05）で対照系と下水試料との生長速度の比較を実施した。これらの解析には統計解析ソフトR<sup>5)</sup>を用いた。排水試験では、対照系と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影

表-2 前処理によって生物影響が変化する化学物質のまとめ。  
 (\*本表は米国環境保護庁 (U.S.EPA) の資料<sup>3),4)</sup>の記述をもとに作成)

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

○ : 生物影響が低下

○<sup>1</sup> : pHが低いほど生物影響小

△ : 生物影響が低下しない

SPE : 固相抽出 (Solid Phase Extraction) 、 EDTA : エチレンジアミン四酢酸

響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) として求めた。全ての下水試料割合で対照区と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合を NOEC とした。

毒性同定評価では、各試料での生長速度について Bartlett 検定 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定による多重比較 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) で対照区と比較した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) で対照区と比較した。無処理区と比較して統計学的に生長速度の有意な増加が認められた場合、前処理による生物影響の改善が見られたと評価した。メタノール溶出物については対照区と同様に AAP 培地にメタノール溶出物を添加して試験しているため、対照区との比較を行い、生長速度の有意な低下が見られた場合はメタノール溶出物による影響があったと評価した。

### 3. 実験結果

#### 3. 1 排水試験

図-1 に各下水試料割合における藻類の生長速度をまとめた。以下、各下水試料の結果の詳細について示す。

##### 3. 1. 1 A 処理場

流入下水は、割合が 40%以上の場合に対照区よりも生長速度が有意に低下した ( $p < 0.05$ 、図-1(a))。放流水では最大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられず ( $p > 0.05$ )、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水では 20%、放流水で

は 80%以上と求められた。

##### 3. 1. 2 B 処理場

流入下水は、割合が 40%以上で対照区よりも生長速度が有意に低下した ( $p < 0.05$ 、図-1(b))。放流水では最大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられず ( $p > 0.05$ )、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水では 20%、放流水では 80%以上と求められた。

##### 3. 1. 3 C 処理場

流入下水、放流水いずれも割合が 40%以上で対照区よりも生長速度が有意に低下した ( $p < 0.05$ 、図-1(c))。よって NOEC は両試料とも 20%と求められた。

#### 3. 2 毒性同定評価

図-2 に各前処理試料における藻類の生長速度をまとめた。以下、各前処理試料の結果の詳細について示す。

##### 3. 2. 1 C 処理場の流入下水に対する試験

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(a)に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整であった ( $p < 0.05$ )。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ( $p < 0.05$ )、影響が見られた。流入下水に対する TIE は排水試験より 26 日後に実施したが、図-1(c)の流入下水 80%と図-2(a)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 30%、28%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4°C暗所で保管しても生物影響は低下しな

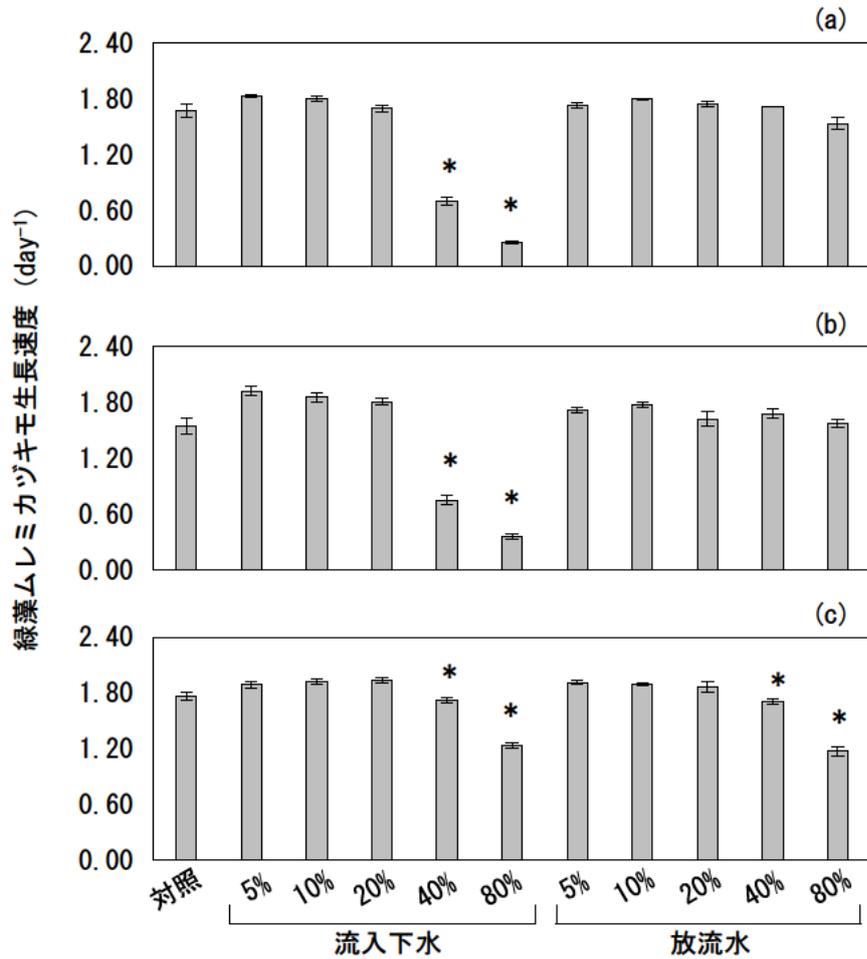


図-1 流入下水、放流水に曝露した緑藻ムレミカヅキモの生長速度。  
 (a)A 処理場、(b)B 処理場、(c)C 処理場の下水試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。  
 \* : 対照区よりも有意に低下 ( $p < 0.05$ )

かったと判断した。

表-2 より pH 調整で生物影響が低下する物質はアンモニアであり、メタノール溶出物は生物影響が見られたものの、SPE 通過水では生物影響が削減されなかったことを鑑みると、無極性有機物とはいえないものの何らかの疎水性化学物質が生物影響物質であったと推定される。よって流入下水中の主な影響物質はアンモニア、疎水性化学物質であると推定された。

### 3. 2. 2 C 処理場の放流水に対する試験

放流水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(b)に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整、EDTA であった ( $p < 0.05$ )。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ( $p < 0.05$ )、影響が見られた。流入下水に対する TIE は排水試験より 14 日後に実施したが、図-1(c)の放流水 80%と図-2(b)の無処理における生長阻害率はそれぞれ

34%、29%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4°C暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

表 2 より pH 調整、EDTA 添加で生物影響が低下する物質はアンモニア、陽イオン金属である。メタノール溶出物は生物影響が見られたものの、SPE 通過水では生物影響が削減されなかったことを鑑みると、無極性有機物とはいえないものの何らかの疎水性化学物質が生物影響物質であったと推定される。よって放流水中の主な影響物質はアンモニア、陽イオン金属、疎水性化学物質であると推定された。

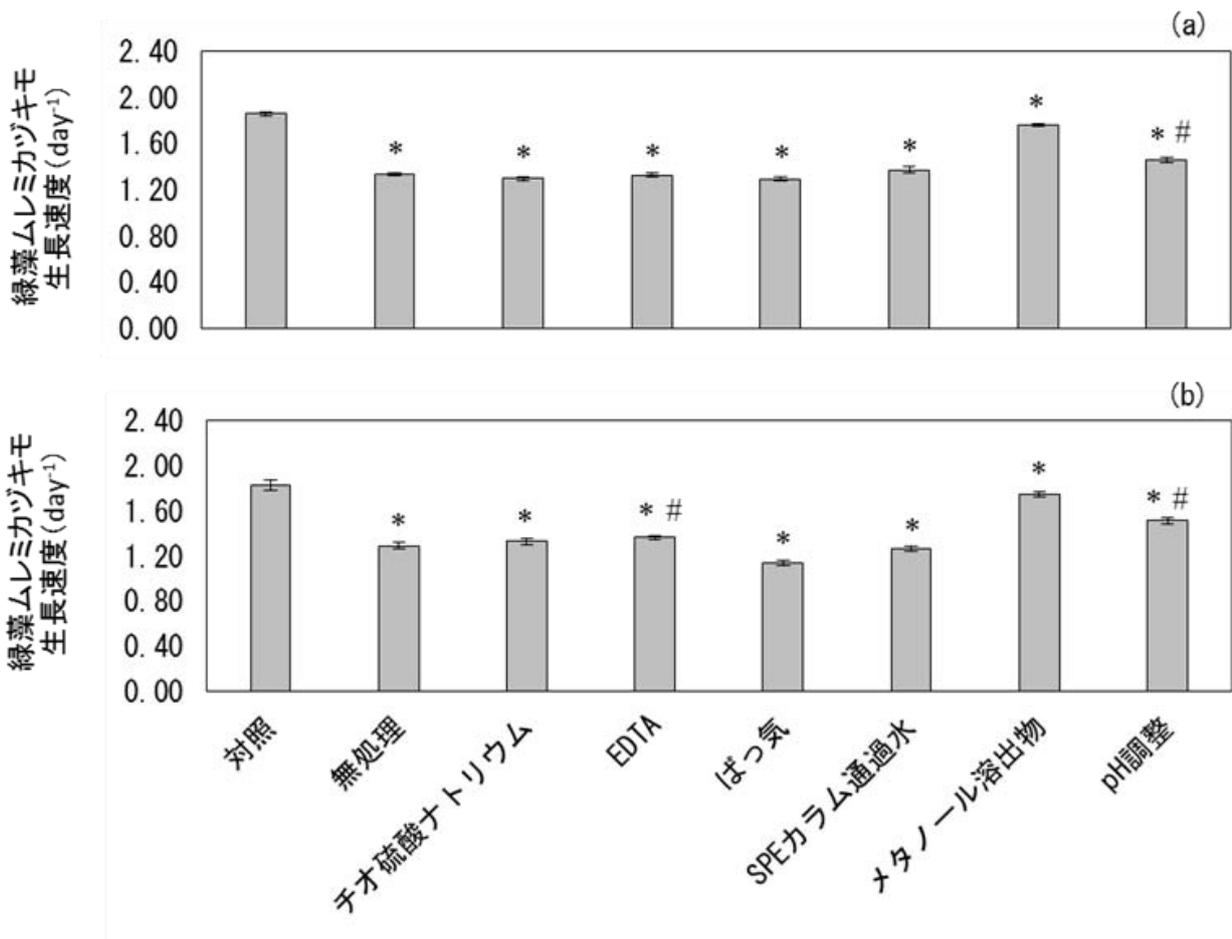


図-2 緑藻ムレミカヅキモを用いた毒性同定評価。

(a)C 処理場の流入下水 80%、(b)C 処理場の放流水 80%。\* : 対照区よりも有意に低下 ( $p<0.05$ )、# : 無処理よりも有意に増加 ( $p<0.05$ 、メタノール溶出物を除く)

#### 4. 考察

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

一方、C 処理場では流入下水、放流水の NOEC はいずれも 20%であり、生物影響が削減できなかったことが分かった。TIE により推定された生物影響物質は、流入下水では疎水性化学物質とアンモニア、放流水では疎水性化学物質とアンモニア、陽イオン金属であり、その組成もほぼ同一であったことが示唆された。C 処理場では  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度は表-1 に示したように流入下水で 18.8mg/L、放流水で 19.5mg/L であり、放流水でも濃度が高かった。また、各処理場の DOC 除去率を比較すると A、B、C 処理場それぞれ 66%、86%、37%であり、C 処理場では除去率が低いと考えられた。よ

って、C 処理場では硝化促進および生物処理を強化することにより放流水の生物影響を削減できると考えられた。

本調査から、処理場あるいは処理方式によってはムレミカヅキモに対する生物影響を削減できていない場合があることが明らかになった。今後は様々な処理場、様々な処理方式 (回転生物接触法、高速散水ろ床法等) を導入した処理場において生物影響削減能力を更に評価し、データを蓄積することが必要であると考えられる。また並行して対策方法も検討することが重要であると考えている。

#### 5. まとめ

本調査では 3 種の下水処理方式における藻類ムレミカヅキモに対する下水の生物影響削減能力を評価した。標準活性汚泥法を導入した A 処理場、OD 法を導入した B 処理場、嫌気好気ろ床法を導入した C 処理場において流入下水、放流水を採水し、それらに対し藻類生

長阻害試験を実施した。A、B 処理場においては、流入下水には生物影響があり、放流水では影響が無かったことから、各処理場の処理によって生物影響が削減できたことが分かった。一方、C 処理場においては、流入下水と放流水に同等の生物影響が確認され、生物影響が削減できなかった。下水処理による生物影響削減能力の実態把握のため、今後は様々な処理場の下水を用いて同様の評価を行い知見を収集する必要があると考えられた。

#### 参考文献

- 1) 公益社団法人日本下水道協会ホームページ：下水道処理人口普及率、<http://www.jswa.jp/rate/>、2017 年 3 月確認
- 2) Zhang, Y., Sun, Q., Zhou, J., Masunaga, S., Ma, F. : Reduction in toxicity of wastewater from three treatment plants to alga (*Scenedesmus obliquus*) in northeast China, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 132-139, 2015
- 3) U.S.EPA, Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 1999
- 4) U.S.EPA, Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992
- 5) R Core Team : R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>, accessed on May 2015

## 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

研究予算：運営交付金

研究期間：平 26～平 28

担当チーム：水質チーム

研究担当者：南山瑞彦、小森行也

### 【要旨】

下水処理水の多くは塩素消毒した後、公共用水域へ放流されることから、塩素消毒副生成物についても注意が必要である。また、下水処理場の放流水が浄水場の取水の上流に放流されるケースもみられることから、消毒副生成物の水環境中での挙動把握も重要である。そこで本研究では、塩素消毒副生成物の前駆物質として HMT、TMA、TMEDA の 3 物質について、下水道の塩素消毒による消毒副生成物の確認、消毒副生成物の HCHO の水環境中での挙動把握について実験的検討を行った。

キーワード：消毒副生成物、下水処理、ホルムアルデヒド、ヘキサメチレンテトラミン

### 1. はじめに

平成 24 年 5 月に、利根川水系の浄水場で水道水質基準を上回るホルムアルデヒド(HCHO)が検出され、取水停止による断水が発生するという水質事故が発生した。この事故の原因は、HCHO が直接流出したのではなく、利根川の上流で流れ出した化学物質(HCHO 前駆物質)と浄水場の消毒用塩素が反応して HCHO が生成し、水道水質基準を超過したものと推定された。その後の原因調査により、河川に排出されたヘキサメチレンテトラミン(HMT)が下流に流下し、利根川水系の広範囲の浄水場において、浄水過程で注入される塩素と反応し、消毒副生成物として HCHO が生成されたと推定されている<sup>1)</sup>。

下水処理水の多くは塩素消毒した後、公共用水域へ放流される。HCHO 前駆物質が下水処理水中に残存する場合、浄水処理の塩素消毒と同様に HCHO が生成する可能性が否定できないことから、下水処理の塩素消毒における HCHO 生成についても検討が必要である。

また、下水処理場の放流水が浄水場の取水の上流に放流されるケースがみられることから、下水処理水の塩素消毒で生成した HCHO の河川流下過程における挙動把握は重要である。

そこで本研究では、塩素消毒副生成物として HCHO に絞ってその前駆物質の選定を行った後、下水道の塩素消毒による消毒副生成物の確認、消毒副生成物 HCHO の河川流下過程での挙動について実験的検討を行った。

### 2. 調査方法

#### 2.1 消毒副生成物の前駆物質

一般的に下水処理水の消毒には、塩素消毒、オゾン消毒、紫外線消毒が用いられる。我が国の下水処理場での消毒は、下水道統計(H25)のデータから薬品による消毒が約 92%、オゾンによる消毒が約 1%、紫外線による消毒が 6%である。下水処理水の消毒で最も多い薬品による消毒のほとんどが次亜塩素酸ナトリウムを用いる塩素消毒であることから、本研究においては塩素消毒により副生成物を生じさせる前駆物質を選定し、下水道の塩素消毒による消毒副生成物の確認実験を行うこととした。

本研究では、既往報告<sup>2)3)4)</sup>を参考に塩素消毒により HCHO を生成する化学物質として表-1 に示す 3 物質を選定した。

表-1 塩素消毒副生成物の前駆物質

	化学物質名	CAS No.	化学式	分子量	副生成物
1	ヘキサメチレンテトラミン	100-97-0	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	140.19	ホルムアルデヒド (HCHO)
2	トリメチルアミン	75-50-3	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N	59.11	
3	テトラメチルエチレンジアミン	110-18-9	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	116.20	

#### 2.2 下水道の塩素消毒による消毒副生成物の確認

本研究では、表-1 に示す 3 物質のヘキサメチレンテトラミン(HMT)、トリメチルアミン(TMA)、テトラメチルエチレンジアミン(TMEDA)について以下の実験を行った。

実験に供する水は、実下水を流入水とする活性汚泥処理実験装置の二次処理水から SS を除いた急速ろ過水(以下、ろ過水)とした。ろ過水を採取し実験室に持ち帰った後、直ちに 20℃恒温水槽内に沈め、

実験直前まで 20℃ で保温した。実験は 20℃ 恒温室で行った。実験手順を以下に示す。

- (1) ろ過水 500 mL を 500 mL 容三角フラスコに移し、化学物質 (HMT、TMA、TMEDA) を所定の濃度段階となるように添加。
- (2) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (遊離塩素 : 1,000 mg/L) を二次処理水の塩素消毒<sup>9)</sup>における塩素の注入率を参考に添加。
- (3) マグネチックスターラー (攪拌子 ; テフロン被覆) を用い、30 分間 300rpm で攪拌。
- (4) 攪拌 30 分後、残留塩素測定用試料として試料 50 mL をねじり瓶に分取した後、残った試料にチオ硫酸ナトリウム水溶液を添加。
- (5) 塩素消毒後のろ過水 50 mL を 100 mL 容分液漏斗に分取し、上水試験方法 2011 年版「5.アルデヒド」の方法<sup>9)</sup>に従い各試料 2 検体ずつ前処理を行ない、抽出試料中の HCHO を GC/MS により測定。

本研究で実施した実験ケースを表-2 に示す。実験 1 では、HMT についてアンモニア性窒素 (NH<sub>4</sub>-N) の存在と HCHO 生成の関係、実験 2 では、TMA と TMEDA について NH<sub>4</sub>-N の存在有無と HCHO 生成の関係について検討した。

表-2 実験ケース

	化学物質	供試水	塩素注入量
実験1	HMT	ろ過水	4mg/L
		ろ過水 (5)*	
		ろ過水 (15)*	
実験2	TMA	ろ過水	4mg/L
		ろ過水 (5)*	
	TMEDA	ろ過水	
		ろ過水 (5)*	

\* ( )内の数値はNH<sub>4</sub>-N濃度、mg/L

## 2.3 消毒副生成物の水環境中での挙動把握

本研究では、下水道の塩素消毒で生成した HCHO の水環境中での挙動把握を目的として、図-1 に示すステンレス製の実験水路を用いた実験を行った。実験水路は、プレハブ建屋内に設置され窓からの自然光を受けている。水路幅は約 0.2m、水路長は 30m を折り返す全長 60m であり、水路の底はステンレス材のままである。活性汚泥処理実験装置の二次処理水 (又は水道水) 2.4L/min に約 260mg/L の HCHO 溶液を 12mL/min で連続添加し、約 20 時間経過後に図-1 に示す No.0、3、5、

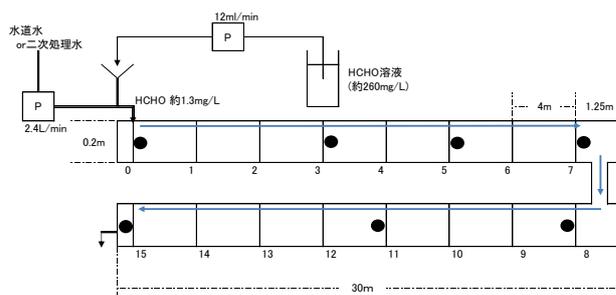


図-1 実験水路 (概要)

7、8、11、15 の地点でスポット採取した試料の HCHO を分析した。各試料採取地点までの流下時間は、小さな浮子を流して測定した。また、流量 2.4L/min での各試料採取地点の水深は、0.5~3.5cm であった。HCHO の分析は、前述の上水試験方法 2011 年版「5.アルデヒド」の方法<sup>9)</sup>に従った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 水道の塩素消毒による消毒副生成物の確認

#### (1) 実験 1

残留塩素測定結果を表-3、HMT 添加濃度と HCHO 生成濃度の関係を図-2 に示す。表-3 よりろ過水では、遊離塩素が 1.1~1.2mg/L であった。この時、全塩素は 1.8~2.0mg/L であり、添加塩素濃度の約 50% であった。ろ過水 (NH<sub>4</sub>-N5mg/L)、ろ過水 (NH<sub>4</sub>-N15mg/L) では遊離塩素が 0.1~0.2mg/L であり、殆んど消費されていた。この時、全塩素は 3.3~4.4mg/L であり、添加塩素濃度の 72~86% であった。次亜塩素酸ナトリウムは、水と反応し次亜塩素酸、次亜塩素酸イオンを形成し、殺菌効果を示すことが知られているが、水中に NH<sub>4</sub>-N や有機性窒素が存在する場合には結合塩素のクロロミンを形成<sup>9)</sup>する。NH<sub>4</sub>-N が 5mg/L、15mg/L 存在するろ過水では、塩素添加 30 分後の残留塩素の多くはクロロミン等の結合塩素と考えられる。

図-2 より各実験結果とも HMT 添加濃度と HCHO

表-3 残留塩素測定結果 (mg/L)

		HMT濃度 (mg/L)				
		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
ろ過水	遊離塩素	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2
	全塩素	1.9	2.0	1.9	1.8	1.8
ろ過水 (NH <sub>4</sub> -N5mg/L)	遊離塩素	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	全塩素	3.6	3.5	3.3	3.7	3.5
ろ過水 (NH <sub>4</sub> -N15mg/L)	遊離塩素	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
	全塩素	4.3	4.4	4.2	4.3	4.4

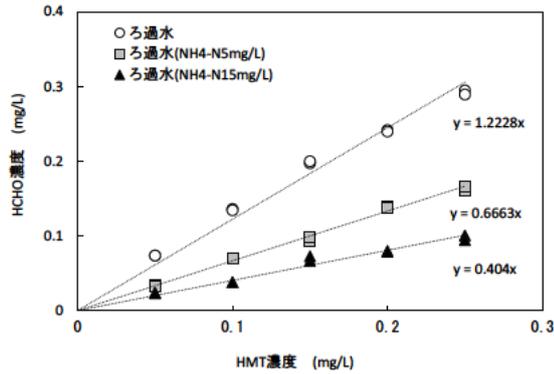


図-2 HMT 濃度と HCHO 濃度の関係

生成濃度に高い相関関係が確認できた。これらの関係から 1g の HMT から生成する HCHO は、ろ過水が 1.2g、ろ過水(NH<sub>4</sub>-N5mg/L)が 0.67g、ろ過水(NH<sub>4</sub>-N15mg/L)が 0.40g となった。1g の HMT は塩素と反応して理論上最大で 1.29g の HCHO を生成<sup>3)</sup>する。HCHO 生成濃度 / 理論上生成する HCHO 濃度を「HCHO 生成率」と定義すると、本実験の HCHO 生成率は、ろ過水で 93%、ろ過水(NH<sub>4</sub>-N5mg/L)で 52%、ろ過水(NH<sub>4</sub>-N15mg/L)で 31%となり、NH<sub>4</sub>-N 残存濃度が増すに従い、HCHO 生成率が小さくなる傾向がみられた。

## (2) 実験 2

残留塩素測定結果を表-4、アミン類添加濃度と HCHO 生成濃度の関係を図-3 に示す。表-4 より、ろ過水 (NH<sub>4</sub>-N0.1mg/L) にアミン類を添加したケースでは遊離塩素が 0.1~0.9mg/L であった。この時、全塩素は 1.0~1.7mg/L であり、添加塩素濃度の 50%以下であった。ろ過水に NH<sub>4</sub>Cl を加え NH<sub>4</sub>-N 濃度を 5mg/L としたケースでは遊離塩素は 0.1mg/L であり、殆んど消費されていた。この時、全塩素は 3.5~4.0mg/L であり、添加塩素濃度の 76~89%であった。

図-3 より各実験結果ともアミン類添加濃度と HCHO 生成濃度に高い相関関係が確認できた。ろ過水を用いたケースでは、1g の TMA、TMEDA から生成する HCHO はそれぞれ 0.5g、0.9g となった。しかしながら、NH<sub>4</sub>-N5mg/L 含有のろ過水を用いたケースでは、1g の TMA、TMEDA から生成する HCHO は、それぞれ 0.05g、0.06g であり NH<sub>4</sub>-N0.1mg/L のケースの 10% 以下であった。

NH<sub>4</sub>-N0.1mg/L のろ過水を用いたケースに比べ NH<sub>4</sub>-N5mg/L 含有ろ過水のケースで HCHO 生成が小さくなったのは、添加塩素が HCHO 生成に寄与する前に試料中の NH<sub>4</sub>-N と反応し消費されたことが原因と考えられる。

表-4 残留塩素測定結果 (mg/L)

	TMA (0.1)	TMA (5)	TMEDA (0.1)	TMEDA (5)
遊離塩素	0.3~0.9	0.1	0.1~0.7	0.1
全塩素	1.0~1.7	3.6~4.0	1.1~1.4	3.5~3.9

注：( ) 内の数値はNH<sub>4</sub>-N濃度

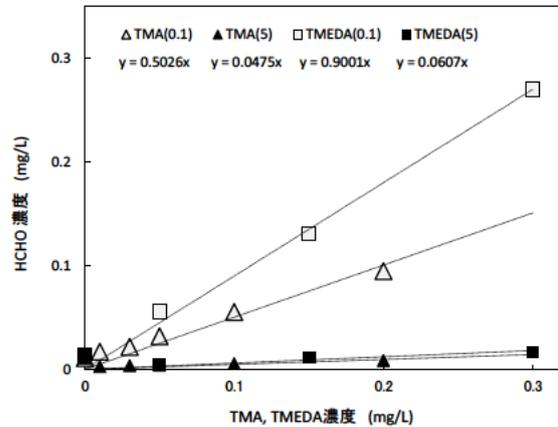


図-3 TMA、TMEDA 濃度と HCHO 濃度の関係

## 3.2 消毒副生成物の水環境中での挙動把握

水路実験の結果を図-4 に示す。水路に二次処理水を流量 2.4L/min で流した後、HCHO 溶液を添加開始し、連続的に流下させてから約 20 時間後に採取した No.0 地点の HCHO 濃度は、1.4mg/L であり設定濃度とほぼ同じ値であった。水路流下過程における HCHO 濃度は、図-4 に示すとおりバラツキは見られるものの大きな減少はみられなかった。本結果より、二次処理水に含まれる HCHO は、約 45min の流下時間では大きく減少することはなかった。岡本らが多摩川の中流域 11km 区間において実施した調査<sup>7)</sup>でも、ホルムアルデヒドの多摩川での減少係数は低く、流下過程で減衰しにくいことが示されている。HCHO は経済産業省の化学物質安全性点検結果等 (分解性・蓄積性) において

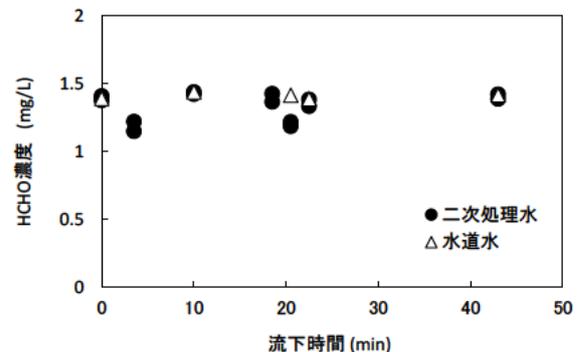


図-4 流下に伴う HCHO 濃度変化

「良分解性」<sup>8)</sup>と判定されている物質であるが、河川の流下過程において大きく減衰することがない領域が存在すると予想されることから、前駆物質の流入を抑制する等、塩素消毒による生成を防ぐ必要がある場合があると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では、塩素消毒により消毒副生成物の HCHO を生成する HMT、TMA、TMEDA の 3 物質について下水道の塩素消毒による HCHO 生成の確認と HCHO の河川流下過程での挙動について実験的検討を行い以下の結果を得た。

- ・ HMT について NH<sub>4</sub>-N の存在と HCHO 生成の関係を検討したところ、NH<sub>4</sub>-N がほぼ 0mg/L のろ過水に比べ、ろ過水に NH<sub>4</sub>-N を 5mg/L、15mg/L 添加した場合には、NH<sub>4</sub>-N 濃度が増すに従い、HCHO 生成率が小さくなる傾向がみられた。
- ・ TMA と TMEDA について NH<sub>4</sub>-N の存在有無と HCHO 生成の関係について検討したところ、NH<sub>4</sub>-N 5mg/L 含有のろ過水を用いたケースでは、NH<sub>4</sub>-N が 0.1mg/L とほとんど存在しない場合に比べ HCHO 生成率は大きく低下し 10%以下であった。
- ・ 二次処理水にホルムアルデヒド (HCHO) を添加し、流下過程における挙動を調査した結果、約 45 分の流下時間では HCHO の減衰はみられなかった。

#### 参考文献

- 1) 環境省：利根川水系における取水障害に関する今後の措置に係る検討会中間取りまとめ、平成 24 年 8 月、[http://www.env.go.jp/water/conf/tonegawa\\_intake/interim\\_re.pdf](http://www.env.go.jp/water/conf/tonegawa_intake/interim_re.pdf) (平成 29 年 6 月確認)
- 2) 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「水道水源の新たな水質危機と対応の最新動向」講演資料集、平成 26 年 2 月、pp.9-19
- 3) Kosaka et al., Formaldehyde formation from tertiary amine derivatives during chlorination, Science of the Total Environment, 488-489, pp.325-332 (2014)
- 4) 小林憲弘也：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未規制物質の管理における今後の課題、日本水質リスク研究学会誌、23(2)、pp.65-70 (2013)
- 5) 下水道維持管理指針-実務編-2014 年版：公益社団法人日本下水道協会、平成 26 年 9 月 12 日発行、pp.662-672
- 6) 上水試験方法 2011 年版：公益社団法人日本水道協会、平成 23 年 3 月
- 7) 岡本誠一郎他：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
- 8) 経済産業省：化学物質安全性点検結果等 (分解性・蓄積性) [http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip\\_search/srhIn](http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/srhIn) put、(平成 29 年 6 月確認)

「なお、本調査研究は、運営交付金 (一般勘定) により実施されたものである。」

## 下水処理水が両生類の変態に及ぼす影響に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 28

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一

**【要旨】** アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、実下水処理水中で飼育し、変態と生殖腺への影響について調査した。その結果、下水処理水曝露による変態停止や顕著な変態遅延は見られなかった。変態後の生殖腺組織観察でも異常は見られなかった。水田に生息している野生のアマガエルを用いた変態試験でも変態への影響は見られなかったことから、下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす悪影響はないと考えられた。

**キーワード：** アフリカツメガエル、アマガエル、変態、下水処理水

### 1. はじめに

生体の内分泌をかく乱する化学物質は内分泌かく乱化学物質(Endocrine disrupting chemicals; EDCs)と呼ばれ、EDCs による水質汚濁は、健全な水生生態系維持に悪影響を与える問題として認識されている。たとえば、英国では下水放流水に女性ホルモンや女性ホルモン様物質が残存し、河川水による希釈が望めない場合、魚の性ホルモン作用がかく乱され、雄魚で雌特有のタンパク質の産生や精巣に卵母細胞が形成されることが報告されている<sup>1)</sup>。

近年、水中の微量化学物質の分析技術の進展も相まって、医薬品等の生理活性物質の中には下水放流水中の検出が報告されている物質がある<sup>2)</sup>。公共用水域に到達した生理活性物質は、EDCs として水生生物の存続に影響を与える可能性が否定できない。我が国は世界的に見て医薬品等の生理活性物質の使用量が比較的多い<sup>3)</sup>といわれており、今後、高齢化に伴い医薬品の使用量が増加する可能性もあることから、これらの生理活性物質が公共用水域の水生生態系に影響を及ぼすことが懸念される。

これまで EDCs が水生生物に与える影響は、現実に水系で起こった現象を踏まえ、主に、魚類を対象とした性ホルモンのかく乱作用が研究されてきた<sup>1)</sup>。一方、生物体内では恒常性維持のため、様々なホルモンが絶妙にコントロールされ分泌されており、EDCs の女性ホルモン作用以外のホルモンかく乱影響については未解明な点が多い。

健全な水生生態系を維持するためには、下水放流水

が様々な水生生物に与える影響について現況を把握し、評価することが必要である。

両生類であるカエルは環境中で変態（オタマジャクシがカエルになること）し、その後、性成熟（精巣や卵巣の発達）する。この変態と性成熟を指標とすることにより、2 種類のホルモンかく乱影響の評価が可能であり、カエルはホルモンかく乱作用を検出できる優れた試験生物の一つである。2015 年には OECD（経済協力開発機構）からカエルの成長と発達を指標とする化学物質のホルモンかく乱作用等を評価する試験法<sup>4)</sup>が公表され、カエルに対する EDCs の影響解明が期待されている。

下水放流水がカエルに与える影響は未解明であり、その実態把握も重要と考えられることから、下水処理水がオタマジャクシの変態や生殖腺に与える影響を把握するため、実下水処理水を用いたアフリカツメガエルオタマジャクシの長期間曝露実験と野生アマガエルの変態試験を行った。

### 2. アフリカツメガエルの長期間曝露実験方法

実際の下水処理水に孵化後のアフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、下水処理水中で飼育し、オタマジャクシの変態への影響と生殖腺組織の変化を評価する実験を行った。

実験方法は以下のとおりである。

#### 2.1 供試オタマジャクシ

本実験では、浜松生物教材から購入したアフリカツメガエルを、人工的に交尾・産卵させ試験に供するオ

タマジャクシを得た。交尾・産卵の手順は以下のとおりである。プラスチック製コンテナ 70L に、カゴ(コンテナ内に丁度収まる程度の大きさ)を合わせて底を2重にした水槽を用意した。これに卵を包んでいるゼリーが水槽の壁へ付着するのを防ぐため、0.2% NaClの水を水槽の7分目まで入れ、さらに、カゴの外からエアポンプで十分にエアレーションをおこなった。1mlの注射器でカエルの背部リンパ嚢にヒト胎盤性 gonadotrophin (1,000u/mL)を雄には 250  $\mu$ L、雌には 500  $\mu$ L を投与し、プラスチックコンテナに一晩入れた。翌日、産卵した卵を駒込ピペットで回収し、卵を包むゼリー状物質の除去は行わず、脱塩素水道水の流水式水槽に移し、孵化後2~3日のオタマジャクシを下水処理水曝露試験に供した。

## 2.2 下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽

下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要を図-1に示す。下水処理実験装置は、最初沈殿池(500L)、生物反応槽(500L×4槽)、最終沈殿池(700L)から構成されている。

流入下水は、分流式下水道として整備され主に生活排水が流入する下水処理場の生下水を用いた。生物反応槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行う、標準活性汚泥法による処理を行った。水学的滞留時間(HRT)は、7時間となるように流入水量を制御した。二次処理水は砂ろ過を行い、砂ろ過水をオタマジャクシの曝露水とした。オタマジャクシの曝露は流水式とし、水槽は10L、1水槽とし、2.1に記したオタマジャクシを50匹投入した。対照区として脱塩素水道水曝露区を設置した。

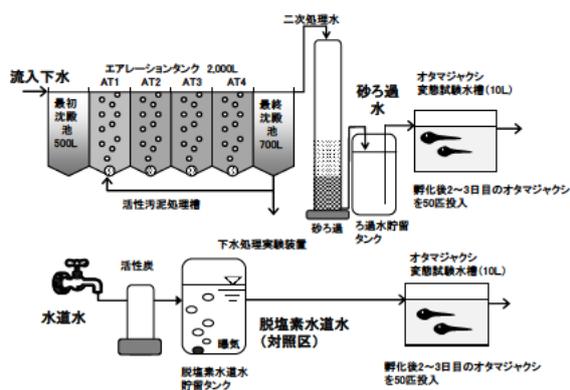


図-1 下水処理装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要

## 2.3 オタマジャクシの飼育と変態の観察

オタマジャクシの曝露条件は、水温: 23°C、明暗周期: 明期 16h、暗期 8h、給餌: 1日1回オタマジャクシ

シ用餌(浜松生物教材)を給餌した。オタマジャクシの変態観察は、変態が始まった頃から1匹ずつP.D.Nieuwkoop and J.Faberの発達ステージ表<sup>5)</sup>と比較し、発達ステージを目視判定し記録した。

## 2.4 水質分析

曝露期間中の水質の安定性を把握するため、各曝露水槽の水温、pH、DO、EC、DOC、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-Nの分析を週1回行った。

## 2.5 遺伝子レベルでの性決定の方法

全曝露期間は6か月弱となり、各曝露水でカエルに変態した後、生残した対照区7個体、下水処理水曝露区19個体について、遺伝子レベルでの性の決定と生殖腺組織の観察を行った。

各個体は、0.02% MS222 (3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩)を入れたビーカーに1個体ずつ投入し、動きが止まるまで静置して麻酔をかけた。指先をメスで切除し、DNA分析用の被験試料とし、分析に供するまで-80°Cで冷凍保存した。DNA分析用の各被験試料に10 mg/mLプロテインナーゼKを2  $\mu$ L、PCRバッファー(10×HS buffer)を2.5  $\mu$ L、滅菌した超純水を22  $\mu$ L加え、56°Cで60分、95°Cで3分インキュベートした後、滅菌した超純水50  $\mu$ Lを加え、PCR反応用の鋳型DNA溶液とした。

遺伝子レベルでの性決定のために用いたPCRプライマー配列を表-1に示した。遺伝子レベルでの性決定は、常染色体上遺伝子であるDMRT1遺伝子および雌のW染色体上遺伝子であるDM-W遺伝子を性判別用マーカーとしている。遺伝子レベルでの性の判定は、DMRT1遺伝子(203 bp)のバンドのみが確認された個体は遺伝的な雄、DMRT1遺伝子およびDM-W遺伝子(259 bp)両方のバンドが確認された個体は遺伝的な雌と判定される<sup>4)</sup>。

表-1 PCRプライマーの配列<sup>4)</sup>

Target	Primer sequence
gene	
DMRT1	
Forward	: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'
Reverse	: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'
DM-W	
Forward	: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'
Reverse	: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

PCR反応用の鋳型DNA溶液を0.5  $\mu$ L、TaKaRa Ex Taq(HS)を0.1  $\mu$ L、各プライマーを0.2  $\mu$ Lずつ、2.5

mM dNTP を 0.8  $\mu$ L、10 $\times$ HS buffer を 1  $\mu$ L、滅菌した超純水を 6.8  $\mu$ L 混合し、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて PCR を実施した。

(step 1)	94 $^{\circ}$ C	2 min
(step 2)	94 $^{\circ}$ C	30 sec
(step 3)	62.5 $^{\circ}$ C	30 sec
(step 4)	72 $^{\circ}$ C	10 sec
(step 2-4: 40 cycles)		
(step 5)	72 $^{\circ}$ C	5 min

PCR で得られた増幅産物は、ローディング dye と混和後、3%のアガロースゲルで電気泳動(100 V、60 分)を行い、その後、SYBR Gold で染色し、UV 照射下でバンドの有無を確認した。

## 2.6 生殖腺組織観察の方法

各個体を 0.02% MS222 (3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩) で麻酔後、解剖用はさみを用いて開腹した。生殖腺と生殖腺と近く除去の難しい腎臓と脾臓は残し、他の不要な臓器は除去して生殖腺を露出させ、表現型の観察および生殖腺の組織標本作成に供した。

表現型の性は、露出した生殖腺を肉眼で観察し、形状から精巣と判断された試料の表現型を雄、卵巣と判断された試料の表現型を雌とした。

生殖腺の組織切片の作成法は以下のとおりである。生殖腺を含む頭部から胴体部分を Davidson 液に 72 時間浸漬し、その後、固定液を 10%中性緩衝ホルマリン溶液に置換して、生殖腺組織を固定した。

試料中の骨、軟骨組織を柔らかくするために、次の脱灰処理をした。10%中性緩衝ホルマリンに保存した試料をイオン交換水で水洗後、10%ギ酸に入れ、24 時間静置した。その後、試料を 70%エタノールで洗浄後、同液に入れ保存した。

すべての試料について、メスを用いて脾臓より上部を切除した。その後、図-2 に示すようにトリミングした。背骨に対して垂直に生殖腺の中央部を切断し、試料を頭部側 (以降、前半部とする) と肛門側 (以降、後半部とする) に二分した。ただし、生殖腺が小さい試料は、中央部の切断を行わずに組織標本作製に供した。また、左右の生殖腺の大きさや位置が異なっている試料は、左右どちらかの生殖腺の中央を切断した。トリミングした各試料は、パラフィン包埋に供するまで 70%エタノールに入れて保存した。

トリミングした各試料は、表-2 に示す手順で、脱水、透徹および溶融パラフィンの浸透処理を施した。

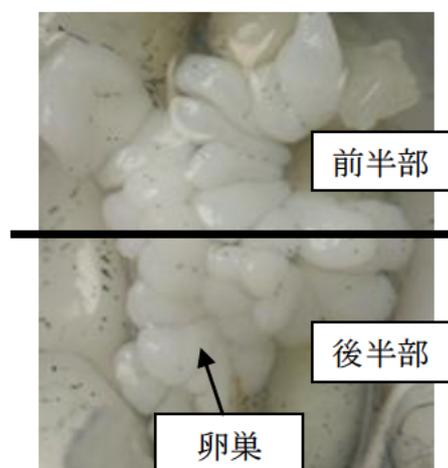
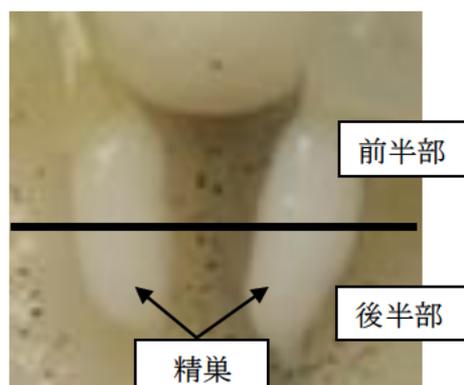


図-2 生殖腺の切断箇所

60 $^{\circ}$ Cで溶融させたパラフィンを金枠に流し入れ、金枠に試料を投入し、室温で表面が硬化するまで静置した。その後、冷水に金枠ごと投入し、完全にパラフィンを硬化させパラフィンブロックとした。

各試料を包埋したパラフィンブロックは、生殖腺中央切断面側から腎臓が露出するまでパラフィンを荒削りしてから、マイクローム(PR-50)を用いて薄切した。試料は、背骨と垂直となる面を、生殖腺中央部の切断面側から生殖腺の端部に向かって、8  $\mu$ m で薄切した。各試料の前半部において生殖腺中央部および前半部中央の2か所から、後半部において後半部中央の1か所から、計3か所の切片を取得した。作製した各切片は、適量のイオン交換水を載せたスライドガラス (MATSUNAMI MICRO SLIDE GLASS S7214、松浪硝子工業株式会社) に載せ、43 $^{\circ}$ Cのホットプレート上で切片を伸展させてから、イオン交換水を除きスライドガラスに添付した。切片を添付したスライドガラスは、ホットプレート上で1晩おいて完全に風乾させてから染色に供した。

スライドガラスに添付した切片は、表-3 に示す手順

表-2 パラフィン包埋の工程

Process (reagent)	温度	処理時間
(1) 90% ethanol	RT <sup>*3</sup>	12 hr
(2) Ethanol (>99.5%) (1st)	RT	60 min
(3) Ethanol (>99.5%) (2nd)	RT	60 min
(4) Absolute ethanol <sup>*1</sup>	RT	60 min
(5) Hemo-Clear <sup>*2</sup> (1st)	RT	3 min
(6) Hemo-Clear (2nd)	RT	50 min
(7) Hemo-Clear (3rd)	RT	50 min
(8) Paraffin Wax II60 (1st)	60°C	60 min
(9) Paraffin Wax II60 (2nd)	60°C	60 min
(10) Paraffin Wax II60 (3rd)	60°C	12 hr
(11) 包埋		

\*1 Ethanol (99.5%)を合成ゼオライト A-3 (和光純薬工業)で脱水処理したもの

\*2 Absolute Ethanol を Hemo-Clear で洗浄する工程

\*3 RT; 室温

表-3 染色の工程

Process (reagent)	処理時間
(1) Xylene (1st)	2 min
(2) Xylene (2nd)	2 min
(3) Xylene (3rd)	2 min
(4) Ethanol (>99.5%) (1st)	1 min
(5) Ethanol (>99.5%) (2nd)	1 min
(6) 80% ethanol	1 min
(7) 50% ethanol	1 min
(8) Deionized water (1st)	3 seconds
(9) Deionized water (2nd)	1 min
(10) Mayer's hemalum solution	3 min
(11) Deionized water	3 seconds
(12) Tap water <sup>*1</sup>	10 min
(13) Deionized water	1 min
(14) 1% Eosin Y solution	4 min
(15) 90% ethanol	1 min
(16) Ethanol (>99.5%) (1st)	1 min
(17) Ethanol (>99.5%) (2nd)	1 min
(18) Ethanol (>99.5%) (3rd)	1 min
(19) Xylene (1st)	3 min
(20) Xylene (2nd)	3 min
(21) Xylene (3rd)	3 min
(22) Coverslipping	

\*1 縦24 cm×横32 cm×高さ11 cmの平型バットに水道水を水深55 cmとなるように入れ、スターラーナーにより流水を生じさせてスライドガラスを洗浄する。

で、脱パラフィンおよびヘマトキシリン・エオシンの二重染色を施した後、封入剤 (Entellan new) を滴下し、カバーガラス (NEO MICRO COVER GLASS, 24x60mm, MATSUNAMI GLASS IND.,LTD.)で封入した。

OECD ガイダンス文書「Histopathology Guidance Document for the Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), (2015)」<sup>9)</sup>の生殖腺組織観察の評価基準に従い、各試料の生殖腺組織標本を評価した。

### 3. アフリカツメガエルの長期間曝露実験結果

#### 3.1 曝露水質分析の結果

曝露水の各水質項目の分析結果を図-3に示す。水温は下水処理水曝露区、対照区とも概ね23°Cに維持されていた。pH、DOは対照区が高目となっていた。活性汚泥処理が硝化抑制運転となっていたため、下水処理水曝露区のNH<sub>4</sub>-Nが高かった。雨の影響や流入下水ポンプの故障により性状が変動することがあったが、下水処理水の水質は概ね安定していた。

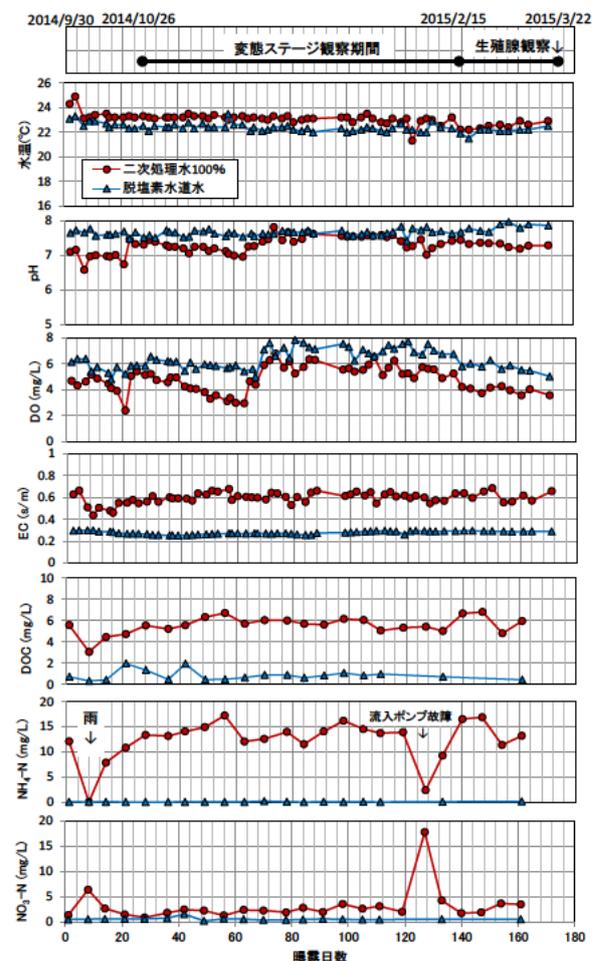


図-3 オタマジヤクシ曝露水槽の水質

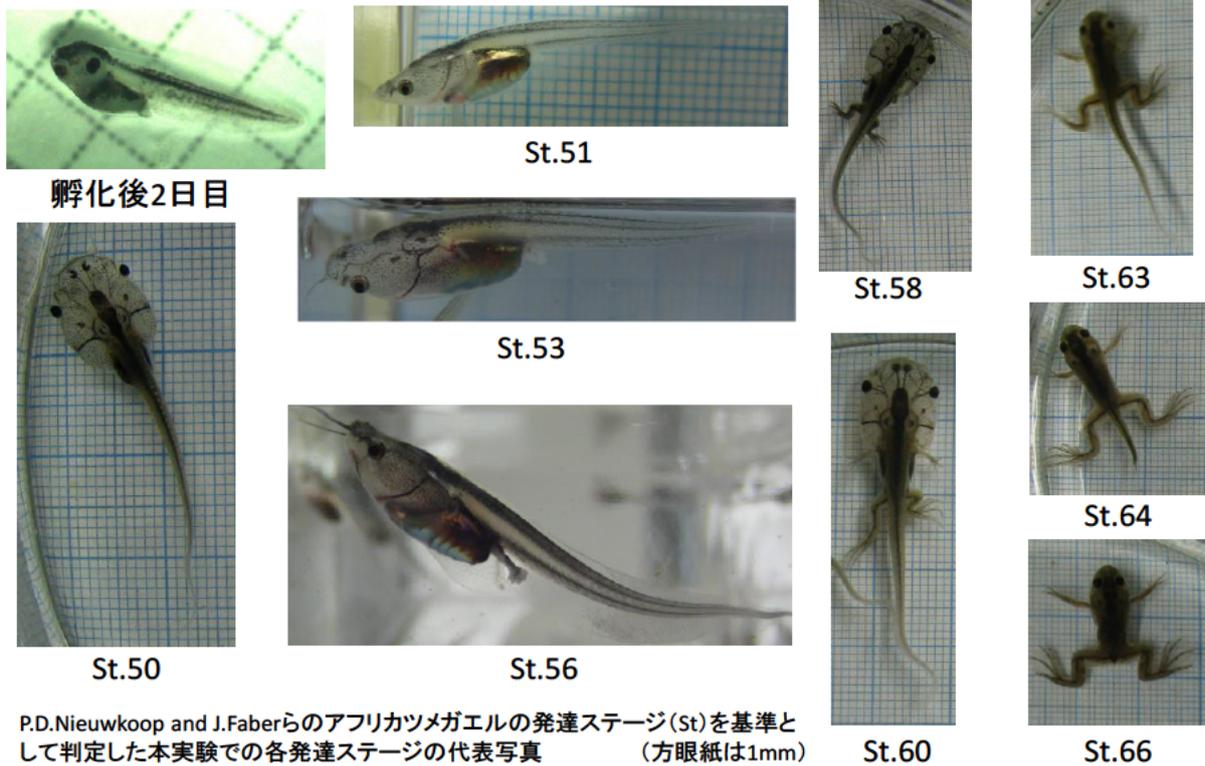
### 3.2 オタマジャクシの変態試験の結果

図-4に、本実験の変態観察時に撮影した、各発達ステージの代表的な写真を示す。P.D.Nieuwkoop and J.Faberのアフリカツメガエルの発達ステージ表<sup>5)</sup>と比較し、ステージ番号を付記した。P.D.Nieuwkoop and J.Faberらの発達ステージ表によると46ステージから後ろ足が出始め、66ステージで変態が完了する。

対照区と下水処理水曝露区のおタマジャクシの46ステージ以降の変態の進行結果を図-5に示す。図には

各水槽の生残率も合わせて示した。脱塩素水道水と下水処理水曝露区で変態が完了した時点での生残率は、それぞれ16%、35%となった。下水処理水曝露区で変態中に死亡する個体が見られているが、対照区でも見られており、死亡の原因は下水処理水に起因するものではないと考えられる。

下水処理水曝露区は、対照区よりオタマジャクシの成長が早く、変態が始まる時期が早くなった。一方で、変態に要する時間は、中央値で見ると対照区では約60



P.D.Nieuwkoop and J.Faberらのアフリカツメガエルの発達ステージ(St)を基準として判定した本実験での各発達ステージの代表写真 (方眼紙は1mm)

図-4 アフリカツメガエルの各発達ステージの代表写真

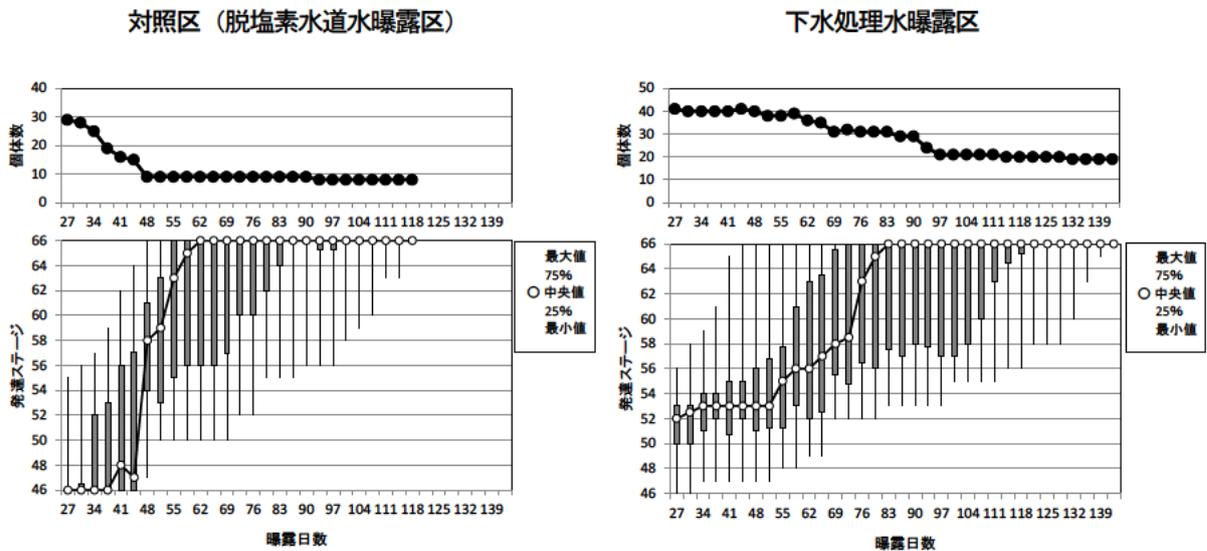


図-5 対照区と下水処理水曝露区の変態期間の生残率と変態ステージの経日変化

日、下水処理曝露区で約80日となり、下水処理水曝露区で変態遅延の傾向が見られた。ただし、図-5で示した試験結果のとおり変態ステージの個体差が大きかったこと、対照区はオタマジャクシ期の死亡数が多かったことから、下水処理水がオタマジャクシの変態速度に与える影響については、再実験による検証が必要と考えられる。再実験に当たっては、飼育密度の均一化や各個体の発達ステージが同調する近交系のカエルの使用など、実験条件の見直しも必要と考えられた。

### 3.3 変態後のカエルの雌雄の判定結果

図-6にPCR試料の電気泳動のバンドの一例を示す。下水処理水曝露区の試料については、1つの試料につき1つのレーン(1列)にDMRT1遺伝子およびDM-W遺伝子の2種類のプライマーを用いてPCRを実施した試料を電気泳動させた(図-6(a))。対照区の試料については、DMRT1およびDM-Wのバンドが不鮮明であったため、DMRT1遺伝子のプライマーを用いてPCRを実施した試料を1つのレーンに、DM-W遺伝子のプライマーを用いてPCRを実施した試料をもう1つのレーンに添加して電気泳動させた(図-6(b))。

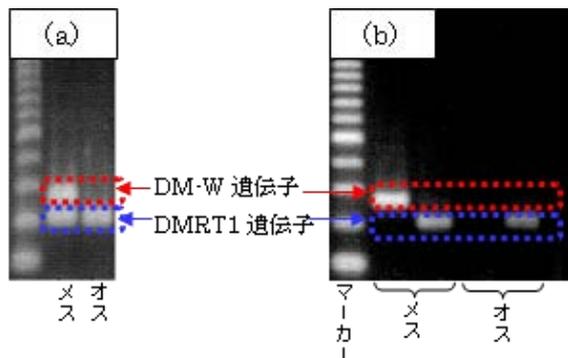


図-6 電気泳動した試料のバンドの一例

その結果、対照区7個体のうち、遺伝的雄は3個体、遺伝的雌は4個体で、性比(雄/雌)は0.75、下水処理水曝露区19個体のうち、遺伝的な雄は11個体、遺伝的な雌は8個体で、性比(雄/雌)は1.38であった。各曝露区とも性比に顕著な偏りは見られなかった。

### 3.4 生殖腺組織観察の結果

対照区と下水処理水曝露区の雄と雌の代表的な生殖腺の外観およびその組織標本像を図-7,8に示す。

対照区、下水処理水曝露区とも生殖腺の表現型から判定した雌雄と、遺伝的な雌雄は、すべての検体において一致していた。また、精巣における精巣卵や、卵巣における精巣の構成要素などは確認されなかった。精巣と卵巣の発達段階についても、対照区と下水処理

水曝露区との間に顕著な差は見られなかった。

### 4. アフリカツメガエルの長期間曝露試験のまとめ

下水処理水に曝露したオタマジャクシは変態が始まる時期が対照区より早くなった。下水処理水曝露区の生残個体は全てカエルに変態し、変態停止や顕著な変態遅延は見られなかった。

対照区と下水処理水曝露区の変態後のカエルの遺伝子レベルでの雌雄と、生殖腺観察から判定した雌雄は、すべての個体において一致し、精巣と卵巣の発達段階についても、対照区と下水処理水曝露区との間に顕著な差は見られなかった。

以上のことから、本実験においては下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす悪影響はないものと考えられた。

### 5. 下水処理水が野生アマガエルの変態に及ぼす影響

カエルのモデル生物であるアフリカツメガエルのオタマジャクシの下水処理水への長期間曝露試験から、下水処理水は変態、性成熟に顕著な悪影響はないと考えられた。国内の生態保全のためには、日本に生息するカエルでも下水処理水がオタマジャクシの変態に与える影響を確認しておく必要がある。

水田に生息している野生のオタマジャクシを採取し、下水処理水に曝露し変態への影響を調査した。

#### 5.1 アマガエルのオタマジャクシの変態実験の方法

オタマジャクシは、2016年5月中旬につくば市の水田から採取し、脱塩素水道水で6月1日まで飼育し、生残していたオタマジャクシを実験に供した。写真-1は、実験に用いたオタマジャクシである。

オタマジャクシの変態試験は、図-1の下水処理実験装置とオタマジャクシの曝露水槽を用いた。曝露水は、下水処理水と脱塩素水道水とし、各水槽にオタマジャクシを3匹投入した。オタマジャクシの曝露実験は6月1日から開始した。その後、変態状況を毎日観察した。

#### 5.2 アマガエルのオタマジャクシの変態実験の結果

写真-2は、オタマジャクシの観察の様子である。下水処理水と脱塩素水道水に曝露したオタマジャクシは全てアマガエルに変態した。表-4は、変態が完了した日付である。両曝露区で変態に要する期間に顕著な違いは見られなかった。アマガエルのオタマジャクシでも下水処理水が変態に及ぼす悪影響は観察されなかった。



図-7(a) 対照区の雄カエルの精巢



図-7(c) 対照区の雌カエルの卵巢

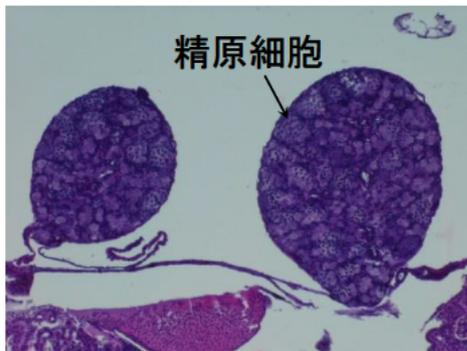


図-7(b) 対照区の雄カエルの精巢の組織像

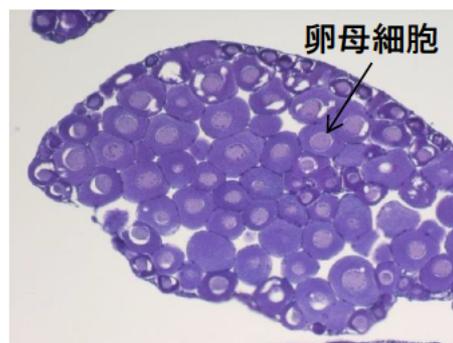


図-7(d) 対照区の雌カエル卵巢の組織像

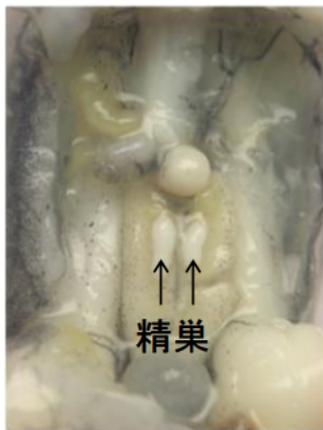


図-8(a) 下水処理水曝露区の雄カエルの精巢

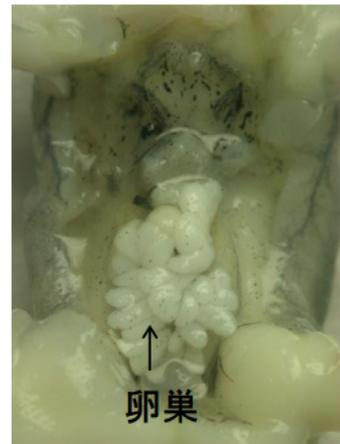


図-8(c) 下水処理水曝露区の雌カエルの卵巢



図-8(b) 下水処理水曝露区の雄カエル精巢の組織像

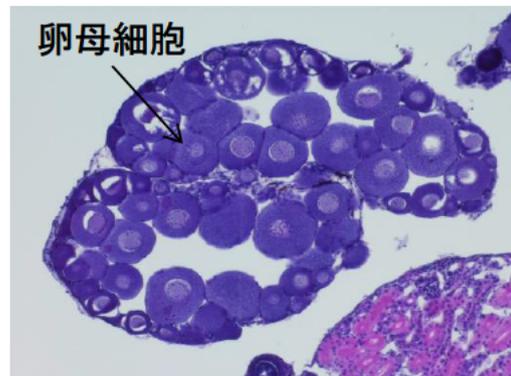


図-8(d) 下水処理水曝露区の雌カエル卵巢の組織像



写真-1 アマガエルのオタマジャクシ (5月22日)



写真-2(a) 下水処理水曝露区のオタマジャクシ (6月16日)



写真-2(b) 脱塩素水道水曝露区のオタマジャクシ  
(6月16日)



写真-2(c) 脱塩素水道水曝露区で変態したアマガエル  
(6月16日)

表-4 オタマジャクシの変態が完了した日付

個体番号	脱塩素水道水	下水処理水
#1	6月13日	6月16日
#2	6月20日	6月19日
#3	6月21日	6月27日

## 6. おわりに

健全な水生生態系を維持するためには、下水放流水が、様々な水生生物に与える影響について現況を把握し、評価する必要がある。海外ではすでにその影響が顕在化しているホルモンかく乱影響も、その科学的な知見の集積が必要な水質問題の一つである。

本研究では、ホルモンかく乱影響を検出できる優れた試験生物であるカエルを対象とし、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、実下水処理水中で飼育し、変態と生殖腺組織への影響について調査した。さらに、国内に生息している野生のアマガエルのオタマジャクシの変態試験も行った。いずれも、本研究では、下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす顕著な悪影響は見られなかった。

下水処理水は塩素消毒され公共水域に放流されている場合が多い。塩素化合物の中には甲状腺ホルモンの働きに影響する物質もある<sup>7)</sup>ことから、今後は、下水処理水の塩素消毒水がオタマジャクシの変態に与える影響について調査していく予定である。

## 参考文献

- 1) Charles Tyler: 魚類における内分泌かく乱作用の重要性について理解する, 環境省 平成25年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー資料, <https://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/seminar/seminar2013.html>
- 2) 成宮 他: 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, 環境工学研究論文集, 46, pp.175-186, 2009
- 3) 厚生労働省: 医薬品産業ビジョン2013, p.7, 平成25年6月26日
- 4) OECD: The Larvae Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), 28-July-2015
- 5) P.D.Nieuwkoop and J.Faber: Normal table of Xenopus laevis (Daudin), Routledge, pp.VII-X, 1994
- 6) OECD: Guidance Document on Histopathology Techniques and Evaluation for The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), p21, 2015
- 7) 環境省: 化学物質の環境リスク評価 第9巻, 過塩素酸, p.11-14, 平成23年3月

## オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価

研究予算：科学研究費助成（基盤研究 C）  
 研究期間：平 28～平 30  
 担当チーム：水環境研究グループ（水質）  
 研究担当者：北村友一

### 【要旨】

下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、二次処理水と総残留塩素濃度 0.07, 0.04, 0.03, 0.02 mg/L の二次処理水の塩素消毒水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体観察から調査した。その結果、総残留塩素濃度 0.07mg/L で、オタマジャクシ期の死亡個体が他の曝露区より多くなる傾向となったが、全ての曝露区で生残したオタマジャクシはカエルに変態し、変態停止や変態遅延の影響は観察されなかった。

キーワード：アフリカツメガエル、変態、下水処理水

### 1. はじめに

流入下水には、女性、男性、甲状腺ホルモンを攪乱する物質が含まれている可能性があり<sup>1)</sup>、下水処理が不十分な場合、下水処理水放流先の水生生物の存続に影響が生じる可能性がある。さらに、下水処理水は塩素消毒後、河川に放流されることが多いが、塩素消毒剤の中には甲状腺に異常を生じる塩素化合物<sup>2)</sup>が含まれる可能性も指摘されている<sup>3)</sup>。

著者らは、これらの生物影響を評価できる生物としてカエルに着目している。両生類であるカエルは、甲状腺のホルモンの分泌によりオタマジャクシからカエルに変態する。甲状腺ホルモンの分泌に異常が生じるとカエルに変態できない、または、変態遅延などの影響が生じる。オタマジャクシの変態と性成熟後の生殖腺組織の異常を指標とすることで、下水処理水のホルモン攪乱の影響を評価できると考えられる。

本研究では、下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、活性汚泥二次処理水とその塩素消毒水中でオタマジャクシがカエルに変態し、性成熟するまで飼育し、オタマジャクシが正常なカエルに変態できるかどうかを、形体と甲状腺や生殖腺組織観察から調査する。

本年度は、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、二次処理水と総残留塩素濃度を数段階に設定した二次処理水の塩素消毒水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体観察から調査した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 供試オタマジャクシ

本実験で使用するアフリカツメガエルのオタマジャクシは以下の方法で得た。アフリカツメガエルの成体の産卵を誘導するため 1ml の注射器でカエルの背部リンパ嚢にヒト胎盤性 gonadotorophin (1,000u/mL) を雄に 250 mL、雌に 500 mL を注射した。カエルをペアにして一晩置き、翌日、産卵された卵

を脱塩素水道水の流水式水槽に移し、そこで孵化した 2 日後のオタマジャクシを曝露実験に供した。

#### 2.2 下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽

図-1 に下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要を示した。下水処理実験装置は、最初沈殿池 (500L)、生物反応槽 (500L×4 槽)、最終沈殿池 (700L)、砂ろ過塔から構成されている。流入下水は、主に生活排水が流入する下水処理場の生下水を用いた。生物反応槽は、第 1 槽から第 4 槽まで全面エアレーションを行う、活性汚泥法による処理を行った。水理的滞留時間は、10 時間となるように流入水量を制御した。二次処理水は SS 分を取り除くため砂ろ過を行った。砂ろ過水は、接触時間約 20 分で次亜塩素酸ナトリウムにより塩素消毒を行った。塩素混和池での総残留塩素濃度は約 0.2 mg/L、遊離塩素濃度は約 0.06 mg/L である。砂ろ過した二次処理水と塩素消毒水をオタマジャクシの曝露水とした。

曝露条件は塩素濃度勾配をつけた次の 5 条件とし、二次処理水 100% (塩素消毒水 0%)、塩素消毒水 50%、塩素消毒水 25%、塩素消毒水 12.5%、塩素消毒水 6.25% とした。塩素消毒水の希釈水は、本来、脱塩素水道水が望ましいが、脱塩素水道水で飼育したオタマジャクシに死亡個体が多数観られたため、二次処理水で行った。

オタマジャクシの曝露方式は流水式とし、水槽は 5L、各曝露区 1 水槽、滞留時間 1.4 時間とし、2.1 で記したオタマジャクシを 35 匹投入した。

#### 2.3 オタマジャクシの飼育と変態の観察

オタマジャクシの曝露条件は、水温：21℃、明暗周期：明期 12h、暗期 12h、給餌：1 日 1 回オタマジャクシ用餌（浜松生物教材）を飽食量、給餌した。オタマジャクシの変態観察は、変態が始まった曝露後 21 日目から、週 2 回 1 匹ずつ曝露水槽から取り出し、P. D. Nieuwkoop and J. Faber の発達ステージ表<sup>4)</sup>と比較し、発達ステージを目視判定し記録した。また、甲状腺組織の観察のため、ステージ 62 (写真-1)

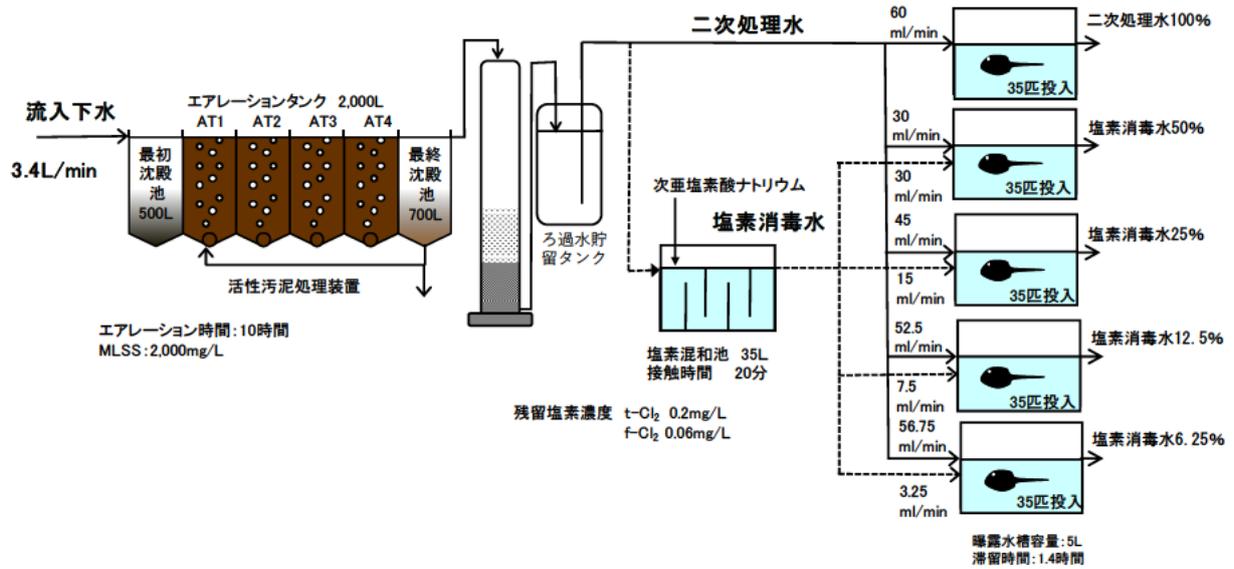


図-1 活性汚泥処理装置とオタマジャクシの曝露水槽の概要

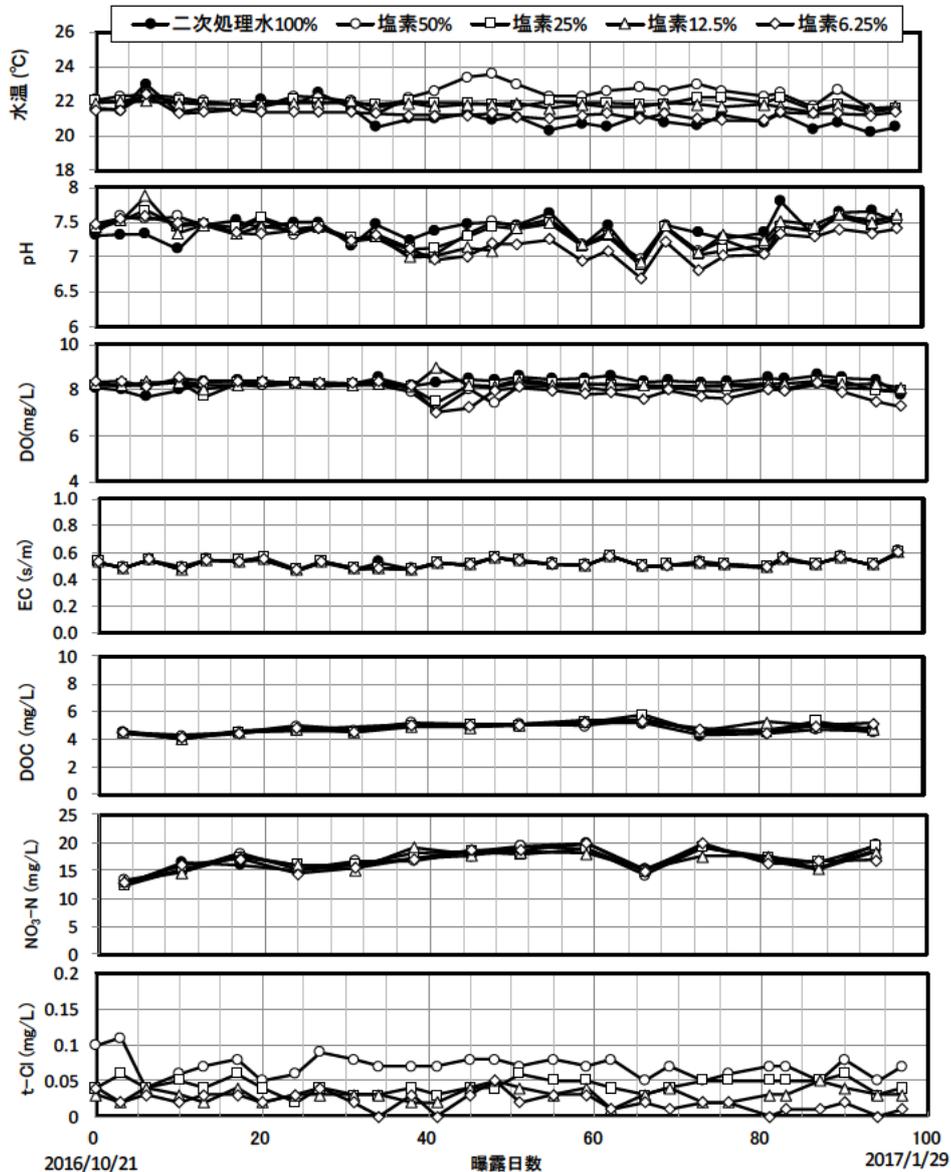


図-2 各曝露水槽内の水質測定結果

に達したオタマジャクシを塩素消毒 50%曝露区は 3 匹、他の曝露区は 5 匹間引いた。



写真-1 ステージ 62 のオタマジャクシ

### 2.4 水質分析

曝露期間中の水質の安定性を把握するため、各曝露水槽の水温、pH、DO、EC、DOC、NO<sub>3</sub>-N、残留塩素濃度（HACH 社ポケット残留塩素計）の分析を週 1 または 2 回行った。

## 3. 実験結果

### 3.1 曝露水水質

曝露期間中の各曝露水の水質項目の分析結果を図-2 に示す。水温は各曝露区とも概ね 22℃に維持されていた。pH、DO、EC、DOC、NO<sub>3</sub>-N とともに各曝露区間で顕著な違いはみられなかった。各塩素曝露区の総残留塩素濃度の平均値を表-1 に示した。塩素処理水 50%曝露区が最も高く 0.07 mg/L で、希釈倍率の増加とともに塩素濃度は低下していた。

表-1 各塩素曝露区の平均総残留塩素濃度(mg/L)

塩素処理水 50%	塩素処理水 25%	塩素処理水 12.5%	塩素処理水 6.25%
0.07	0.04	0.03	0.02

### 3.2 オタマジャクシの変態観察の結果

図-3～7 に各曝露区のオタマジャクシの 46 ステージ以降の変態の進行結果を示す。図には各水槽の生残率も合わせて示した。

各曝露区とも変態は 100 日までに完了した。曝露後 100 日目での生残率と中央値から読み取ったステージ 62 に要する日数を表-2 に示した。各曝露区ともオタマジャクシ期に死亡個体が見られたが、特に塩素消毒水 50%曝露区（総残留塩素濃度 0.07mg/L）でオタマジャクシ期での死亡個体が多くなった。塩素濃度 25%曝露区（総残留塩素濃度 0.04mg/L）の死亡個体数は、二次処理水 100%曝露区と同等であった。

ステージ 62 に要する日数は、塩素消毒水 50%曝露区が 55 日と他の曝露区より早くなる傾向がみられたが、これは、オタマジャクシ期に死亡した個体が多かったため、見かけ上、早くなったことによると考

えられる。

各曝露区とも、変態停止や顕著な変態遅延は観られなかったことから、本実験範囲では、変態に与える影響はないものと考えられる。ただし、塩素処理水 50%曝露区でオタマジャクシ期の死亡個体が見られたことから、塩素の添加量には注意を要すると考えられる。

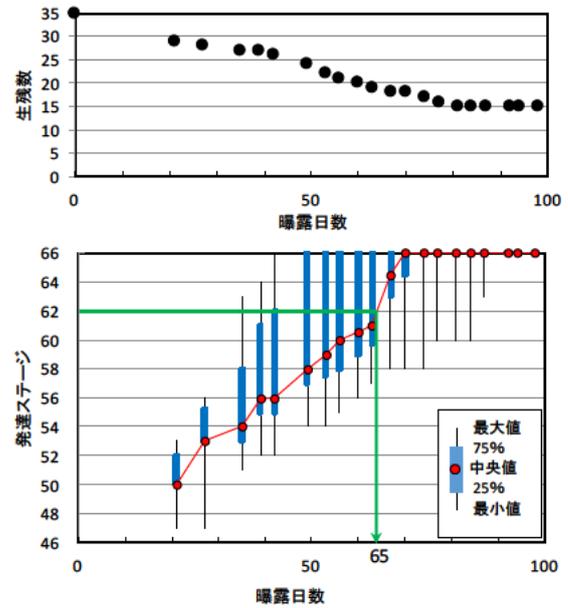


図-3 二次処理水 100%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

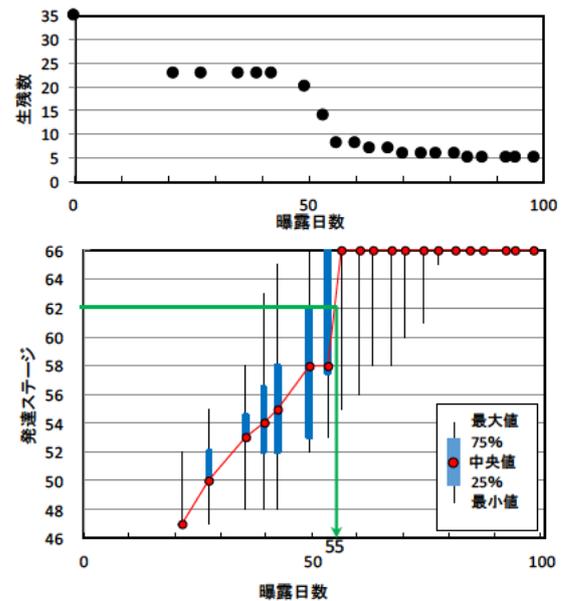


図-4 塩素消毒水 50%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

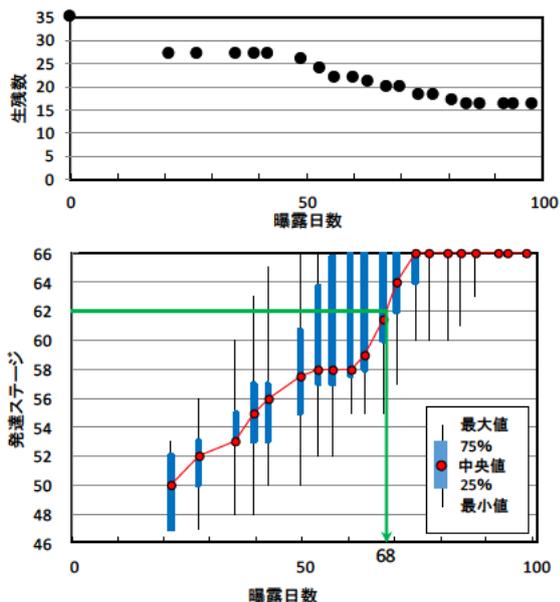


図-5 塩素消毒水 25%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

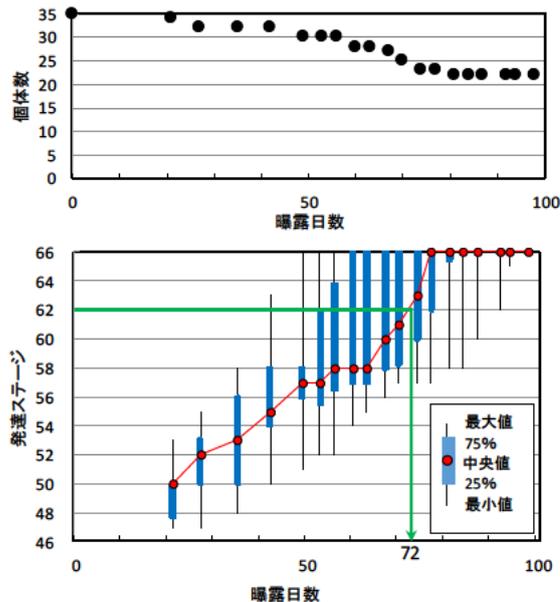


図-7 塩素消毒水 6.25%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

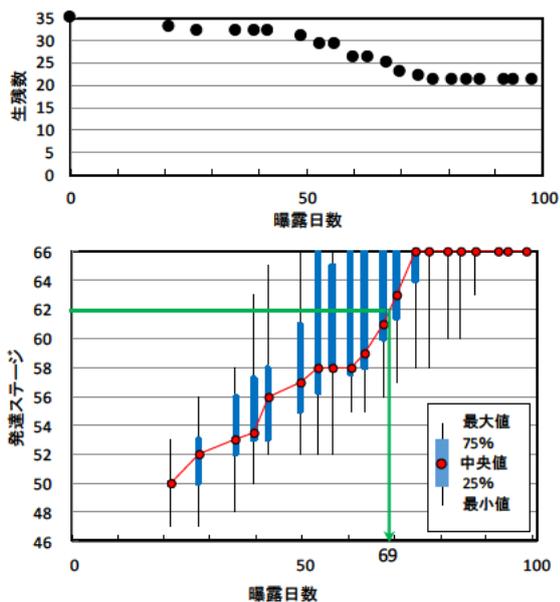


図-6 塩素消毒水 12.5%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

表-2 各曝露区の生残率とステージ62に要する日数

	二次処理水 100%	塩素処理水 50%	塩素処理水 25%	塩素処理水 12.5%	塩素処理水 6.25%
生残率*	57%	23%	60%	74%	77%
St. 62 に要する日数	65日	55日	68日	69日	72日

\*甲状腺組織観察のために間引いた個体も生残に計数

#### 4. おわりに

下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、活性汚泥二次処理水と総残留塩素濃度 0.07, 0.04, 0.03, 0.02 mg/L の二次処理水の塩素消毒水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体観察から調査した。

その結果、総残留塩素濃度 0.07mg/L で、オタマジャクシ期の死亡個体が他の曝露区より多くなる傾向となったが、全ての曝露区で生残したオタマジャクシはカエルに変態し、変態停止や変態遅延の影響は観察されなかった。

来年度は、甲状腺組織観察のため間引いたステージ 62 のオタマジャクシの甲状腺組織の観察を行い、下水処理水が甲状腺組織に与える影響を明らかにする予定である。

#### 参考文献

- 岡本誠一郎、北村友一：レポータージーンアッセイを用いた再生水の安全性評価に関する研究、平成 27 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 No. 4347、pp. 240-251、2016
- 環境省：化学物質の環境リスク評価 第 9 巻、過塩素酸、pp. 11-14、平成 23 年 3 月
- 高野敬志、伊藤八十男、千葉真弘、泉敏彦：次亜塩素酸ナトリウム溶液保存中における過塩素酸イオン濃度の増加、道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 61, pp. 11-13、2011
- P. D. Nieuwkoop and J. Faber: Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), Routledge, pp. VII-X, 1994

(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)

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

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一、對馬育夫、  
真野浩行、武田文彦、金子陽輔、  
小森行也

【要旨】

下水処理場は、都市河川で検出される医薬品類の発生源の 1 つであり、河川水環境における医薬品類の効率的な削減対策やリスクの管理を行う上で、河川における医薬品類の量に対する下水処理場の寄与を明らかにすることは重要である。本年度では、多摩川中流域を対象に、河川に流入する負荷量および下水処理場の放流水が流入する地点における負荷量に対する下水処理場の寄与率を、野外調査に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量に基づいて算出することを試みた。

キーワード：医薬品類、下水処理場、減衰速度係数、都市河川、負荷量

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医薬品類や化粧品などの微量化学物質による河川水環境への影響が懸念されている。我が国の河川において、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<sup>1,2)</sup>。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する。本研究では、都市部の河川流域を対象に、モニタリングや文献調査による河川水中化学物質に対する下水道の寄与率を推定することにより、下水道における対象化学物質の管理可能性を把握する。また、河川水中の挙動を考慮したヒト健康および生態影響評価手法を構築し、下水道での化学物質の排出削減シナリオに沿った影響評価を実施する。

本年度は、都市河川に流入する負荷量や下水処理場の放流水が流入する地点での負荷量に対する下水処理場の寄与を把握することを検討した。多摩川中流域における下水処理場を対象に、水生生物への影響が懸念される医薬品類について、この流域に流入する医薬品類の負荷量および下水処理場が流入する地点での医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率を算出することを試みた。

2. 調査方法

2.1 調査対象の医薬品類

本研究チームではこれまで、医薬品類等生理活性物質を対象として、水環境中における実態把握、生態リスクの検討などを進めてきた。本研究では、過年度の研究成果を基に、多摩川において水生生物に対する生態リスクの懸念が指摘されている医薬品類 5 物質<sup>3)</sup>を調査対象に選定した（表 1）。

2.2 対象地域

本研究では、多摩川中流域を対象とした。多摩川は、山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本川である（流域面積：1240 km<sup>2</sup>、流域人口：約 400 万人<sup>3)</sup>）。代表的な都市河川であり、高度成長期の急激な流域の都市化の影響を受けて水質が悪化したが、下水道整備や河川浄化施設の設置などに伴い改善が進み、近年では中流域（多摩川原橋）の水質は、BOD2mg/L 程

表 1 調査対象の医薬品類

物質名	主な効用
Azithromycin	マクロライド系抗生物質
Clarithromycin	マクロライド系抗生物質
Ketoprofen	消炎・鎮痛・解熱剤
Levofloxacin	フルオロキノロン系合成抗菌剤
Triclosan	殺菌剤

度で推移している(2001年以降の環境基準はB類型、BOD 3mg/L)。一方で、人口増加および下水道普及率の上昇に伴い、中流域においては渇水期に河川流量の5割以上を下水処理水が占めることもある。

### 2.3 寄与率の算出方法

本研究チームでこれまでに算出した医薬品類の減衰速度係数に基づき、多摩川中流域に設定した調査区間に流入する医薬品類の負荷量および下水処理場の放流水が流入する地点での医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率を算出することを試みた。

本研究における調査地点を図1に示す。本研究チームでは、これまでに多摩川中流域の約11kmの調査区間を設定し、2012年の1/31、2/16、8/22、2013年の1/30、9/30、12/17、2014年の12/16の合計7回、10地点(St.1~St.6、A処理場~D処理場)における河川水と下水処理放流水中の医薬品類の実態調査を実施するとともに、多摩川本川の2地点と支川の4地点において、「河川砂防技術基準(案)」に準じた流量観測を行ってきた。ただし、根川のSt.4では、2012年の1/31、2/16、8/22、2013年の1/30において流量観測を行わなかったため、東京都より入手した調査日と同じ月の流量データを採用した。また、東京都下水道局から調査日の下水処理場の放流量データを入手した。さらに、得

られたデータを基に、対象医薬品類が流下過程において、一次反応式に従って減少するという仮定の下で、花本ら<sup>4)</sup>の方法を参考に、以下の式から減衰速度係数 $k$ を算出した。

調査区間の最下流地点での負荷量

$$= \sum \text{調査地点}i\text{の負荷量} \times e^{(-k \times \text{調査地点}i\text{から最下流地点 St.5 までの流下時間})} \quad (1)$$

式(1)中の調査地点 $i$ の負荷量は調査地点ごとに医薬品類の濃度と調査日における一日当たりの流量の積から算出された。また、調査地点 $i$ から最下流地点St.6までの流下時間はGoogle mapを用いて計測した流下距離を流量観測時に得られた平均流速で除して求めた。算出結果を図2に示す。Ketoprofenは他の医薬品に比べて、高い減衰速度係数を示した。本研究では、下水処理場の寄与率を算出するために、各調査地点の負荷量と減衰速度係数の値を使用した。

河川水中の医薬品類の負荷量に対する下水処理場から放流された処理水の寄与率として、調査区間に流入する負荷量(St.1~St.5とA処理場~D処理場における負荷量の和)に対する各下水処理場の負荷量の割合を算出した。また、下水処理放流水が流入する地点における医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄

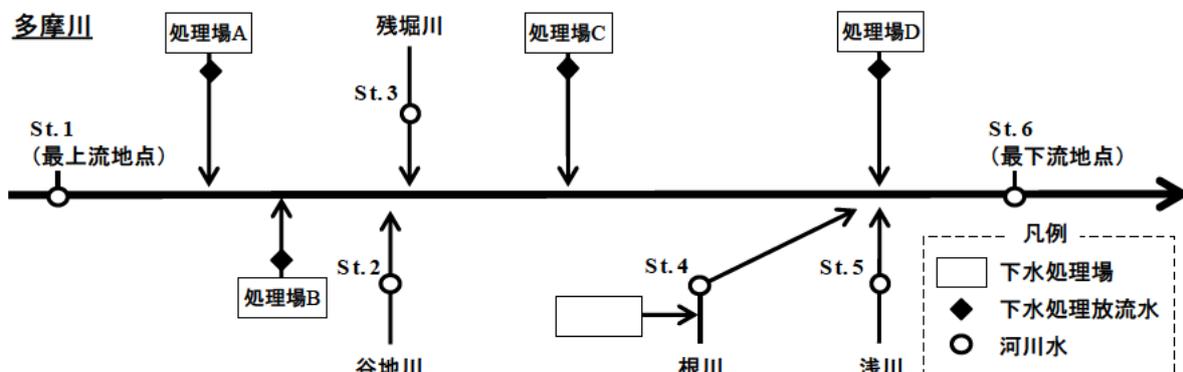


図1 多摩川の調査地点図

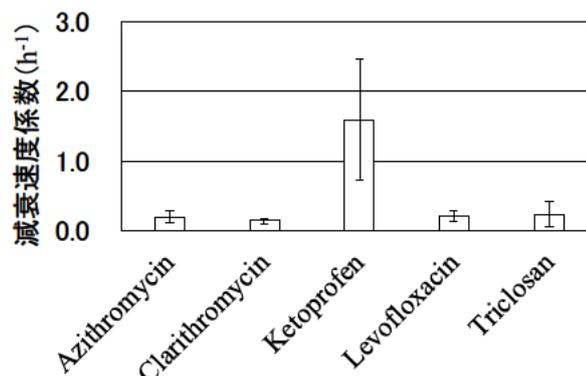


図2 多摩川の調査区間において算出した減衰速度係数

与率として、最下流地点 St. 6 を対象に、各下水処理場の寄与率を以下の式から算出した。

下水処理放流水<sub>i</sub>の寄与率(%)

$$= \frac{\text{負荷量}_i \times e^{-\text{減衰定数} \times \text{下水処理場 } i \text{ から St.6 までの流下時間}}}{\text{最下流地点 St.6 での負荷量}} \times 100 \quad (2)$$

寄与率が高い処理場ほど、最下流地点 St. 6 での負荷量に対する寄与の割合が高いことを示す。本研究では、処理場 A～処理場 D および下水処理場直下の根川(多摩川の支川)の St. 4 における寄与率を算出した。

### 3. 結果と考察

対象とした医薬品類 5 物質について、調査区間に流入する各下水処理水の寄与率を図 3 に示す。処理場 A、処理場 B、St. 4 の上流に位置する下水処理場は、処理

場 C、処理場 D と比べ、対象医薬品類の流入負荷量に対する高い寄与率を示した。医薬品類 5 物質の調査区間における合計流入負荷量に対する処理場 A、処理場 B、St. 4 の寄与率の平均値の範囲は、それぞれ、22.9～33.1%、16.4～25.4%、24.4～38.1%であった。

調査区間の最下流地点 St. 6 での医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率についてみると、Ketoprofen 以外の医薬品類 4 物質では、上流にある処理場 A と処理場 B において、合計流入負荷量に対する寄与率と比較して低い値を示した。これは、St. 6 までの流下距離が長い上流の下水処理場から河川に流入した医薬品類が、流下過程で減衰するため、これらの下水処理場の寄与が相対的に低くなったためであると考えられる。一方で、下流側に位置する St. 4 と処理場 D においては、St. 6 での負荷量に対する下水処理

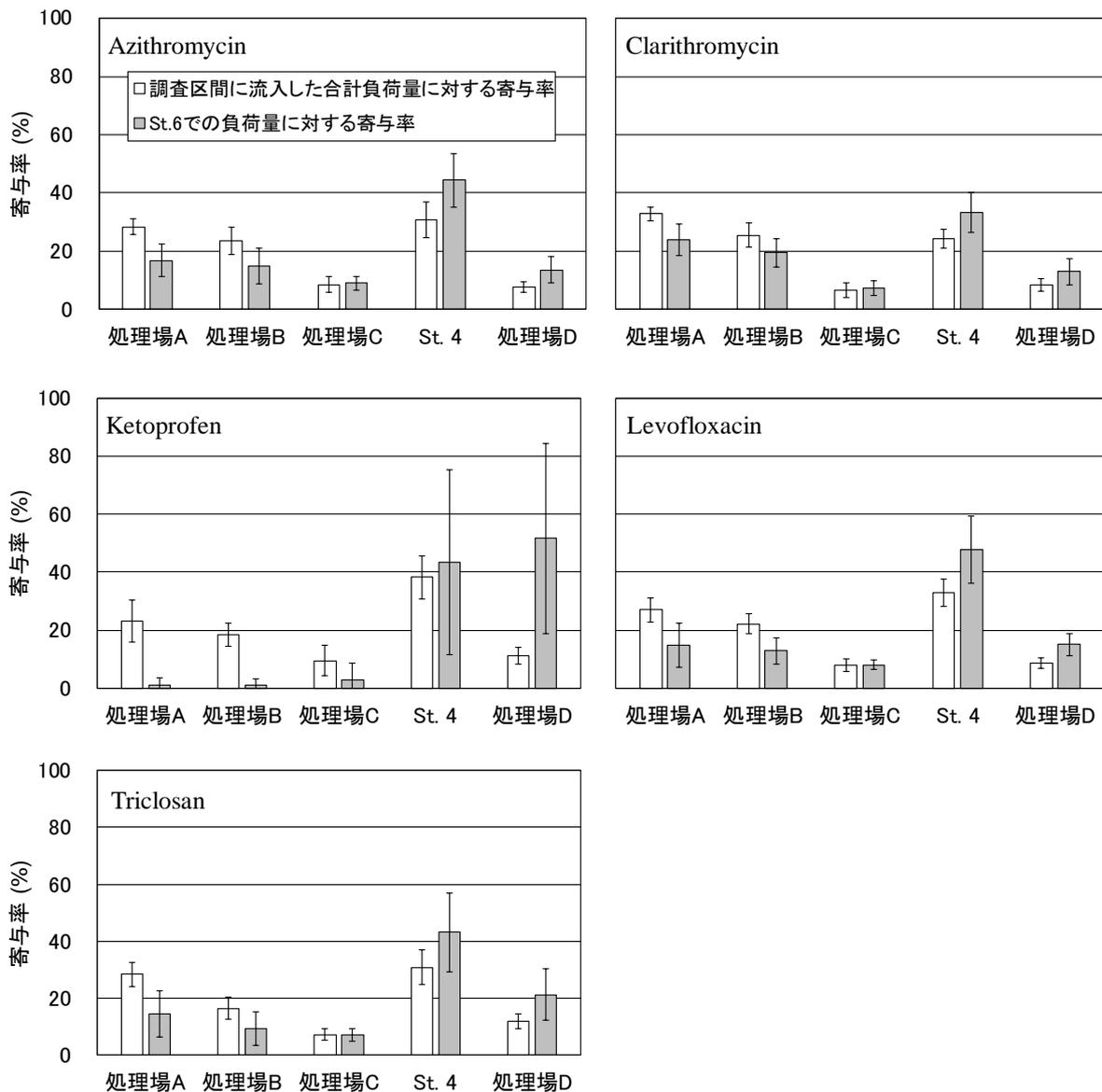


図 3 医薬品 5 物質の調査区間合計負荷量と St. 4 での負荷量に対する下水処理場の寄与率

場の寄与率は、合計流入負荷量に対する寄与率と比較して高い値を示した。また、Ketoprofen について、St.6 での負荷量に対する下水処理場の寄与率は、合計流入負荷量に対する寄与率に比べて、上流の処理場 A、処理場 B、処理場 C で著しく低い値を示し、St.4 と処理場 D での寄与率がほとんどを占めた。さらに、処理場 D において、St.6 での Ketoprofen の負荷量に対する寄与率は、他の医薬品類 4 物質に比べて、高い値を示した。この違いは、Ketoprofen の流下過程での減衰速度が他の医薬品類に比べて高いために、最下流地点までの流下距離の短い下流の下水処理場の寄与率が高くなったためである。以上の結果のように、多摩川中流域において、流入負荷量および多摩川本川での負荷量に対する下水処理場の寄与率を示すことができた。

調査地点 St. 6 での医薬品類の負荷量に対する寄与率が高い下水処理場は、St. 6 での医薬品類の生態リスクへの寄与率が高いと考えられる。過年度の調査研究で実施した生態リスク初期評価により、調査地点 St. 6 において、本研究で対象とした医薬品類のうち Azithromycin、Clarithromycin、Triclosan の生態リスクが懸念されている<sup>1, 5)</sup>。Azithromycin、Levofloxacin、Triclosan については、生態リスクに対して St.4 の寄与率が高く、Clarithromycin については、生態リスクに対して処理場 A、処理場 B、処理場 C の寄与率が高いと考えられる。そのため、上記の医薬品類について、これらの下水処理場で負荷量の削減対策を実施し、例えば、St.4 での負荷量の寄与率を下げることで、調査地点 St. 6 での生態リスクを効果的に下げることができると期待される。今後、下水処理場での医薬品類の削減対策やリスク管理を検討していくために、生態リスク初期評価で使用されているハザード比などを指標として、下水処理場の放流水が流入する調査地点での負荷量に対して高い寄与率を示す下水処理場から排出される負荷量が低下した時に、下水処理場の放流水が流入する調査地点で生態リスクがどの程度低減するのかを検討する必要がある。

#### 4. まとめ

本研究では、多摩川中流域において、河川中の医薬品類の物質質量に対する下水処理場の寄与を把握することを目的とした。野外調査に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量から、調査区間に流入する負荷量および調査区間の最下流地点での負荷量に対する下水処理場への寄与率を推計した。その結果、寄与率の高い下水処理場を把握することができた。今

後、対象の医薬品類による下水処理場の放流水が流入する地点での生態リスクを考慮して、下水処理場での医薬品類の削減対策やリスク管理を検討していく予定である。

#### 参考文献

- 1) Mano, H. and Okamoto S. (2016)、 Preliminary ecological risk assessment of 10 PPCPs and their contributions to the toxicity of concentrated surface water on an algal species in the middle basin of Tama River. *J. Water Environ. Technol.*、 **14**(6)、 423-436
- 2) 真野浩行、村山康樹、鈴木穰、中田典秀、南山瑞彦：PRTR 情報等を活用した下水処理水中に含まれる化学物質の環境リスク初期評価、下水道協会誌、50、85-93、2013 年 10 月
- 3) 国土交通省：一級水系における流域等の面積、総人口、一般資産額等について、[http://www.mlit.go.jp/river/toukei\\_chousa/kasen/ryuiki.pdf](http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/ryuiki.pdf) (2017 年 3 月確認)
- 4) 花本征也：確率論的モデルと現地調査とに基づく河川流下過程における医薬品類の光分解に関する研究、博士論文、2013 年 3 月
- 5) 池田茂、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 24 年度研究成果報告書、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-project/2012/pdf/zyu-08.pdf> (2017 年 3 月確認)

---

土 木 研 究 所 資 料  
TECHNICAL NOTE of PWRI  
No.4370      January 2018

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