ＩＳＳＮ　　0386-5878
土木研究所資料　第4402号

土木研究所資料

令和元年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2019 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

令和3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 © (2021) 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。

土 木 研 究 所 資 料
第4402号　令和3年1月

令和元年度下水道関係調査研究年次報告書集

材料資源研究グループ
水環境研究グループ　　水質チーム

概要

本報告書集は、令和元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

材料資源研究グループ

			頁
1	官民連携による下水道資源・エネルギーを活かした植物栽培技術の研究	（受託業務費）	1
2	下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究	（運営費交付金）	10
3	河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用に関する研究	（運営費交付金）	26
4	公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究	（運営費交付金）	36
5	再生水の利用促進に向けた病原微生物と消毒副生成物の制御手法に関する研究	（運営費交付金）	50
6	資源回収型下水処理技術に関する研究	（運営費交付金）	59
7	遺伝子情報を活用した病原微生物の早期検出に関する研究	（運営費交付金）	69
8	貧毛類による下水汚泥の減容化技術の開発	（運営費交付金）	75

水質チーム

9	下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発	（下水道応用研究）	79
10	公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究（影響が懸念される物質のモニタリングと定量的リスク評価手法の構築）	（運営費交付金）	85
11	公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究　（水質リスクを軽減するための処理技術）	（運営費交付金）	95
12	底層環境に着目した停滞性水域の水環境管理技術に関する研究（簡易的な藻類定性定量方法の開発）	（運営費交付金）	100
13	底層環境に着目した停滞性水域の水環境管理技術に関する研究（藻類増殖に関与する水質項目の影響評価）	（運営費交付金）	106
14	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（ダム貯水池・湖沼の底層貧酸素化要因の整理と気候変動影響の評価）	（運営費交付金）	109
15	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）	115
16	下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減技術と水生生物の影響評価に関する研究	（運営費交付金）	121
17	下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究	（運営費交付金）	129
18	小規模下水処理場における未規制化学物質の挙動と除去特性に関する研究	（運営費交付金）	136
19	仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の慢性影響の評価法の開発	（運営費交付金）	141
20	PRTR データを活用した化学物質の排出管理手法の構築 排出量への寄与が大きい業種における排出量推定手法の高度化	（環境研究総合推進費）	149

＊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。

官民連携による下水道資源・エネルギーを活かした植物栽培技術の研究

研究予算：受託研究費（下水道事業調査費）
研究期間：平 30～令元
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：重村浩之、山﨑廉予

１. はじめに

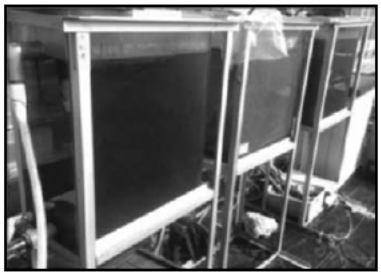
下水処理場が有する豊富な栄養塩を利用した微細藻類培養・燃料化技術の開発が近年盛んに行われている[1]。本研究は、下水処理水を用いて土着藻類を培養し、エネルギーを生産することを目的としている。2015 年から昨年度まで行っていた国土交通省の下水道技術研究開発（以下、GAIA）プロジェクトでは、「下水道資源・エネルギーを最大限に活用した希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産」と題して、屋外での藻類培養における膜分離 CO_2 の有用性の検証、藻類培養が困難になる冬季における、下水熱利用による藻類培養の検証、冬季の培養量向上および使用敷地面積の削減を目的として、密閉した縦型藻類培養装置における藻類培養の検証を行ってきた[2]。GAIA プロジェクト後は、下水道資源利用の効率化、事業性の検討、装置のスケールアップを目的として、2018 年より、「官民連携による下水道資源・エネルギーを活かした植物栽培技術の研究」と題して、国土交通省の下水道応用研究のもと、2020 年 3 月まで研究を実施した[3)5)]。

２．屋外連続藻類培養装置のスケールアップの検証

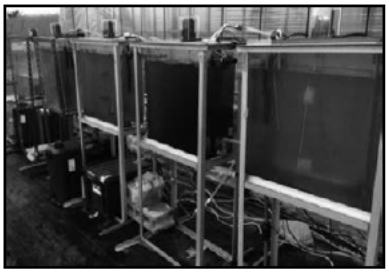
２．１．実験概要

A 下水処理場内に設置した藻類培養装置を用いて、藻類培養検証を行った。GAIA（下水道技術研究開発）プロジェクトにおいて、高さ 0.5 m、横 0.5m、幅 0.2m、有効容積 50L（以下、50L 培養槽）（図-1）による藻類培養の有用性を示した[1]。また、昨年度は、本装置を並列に配置することで、スケールアップを行った。2018 年 10 月から 2019 年 1 月までは、装置を 3 ユニット設置し、150L で藻類培養を行った。2019 年 1 月から 2 月までは、装置を 5 ユニット設置し、4 ユニットで藻類培養を行い、後段の 1 ユニットは沈殿槽として用いた。本研究では、50L 培養槽に加えて、高さ 1m、横 0.5m、幅 0.2m、有効容積 100L（以下、100L 培養槽）を 1 ユニットとした装置での検証を行った。藻類培養量を 200L とし、50L 培養槽は 4 ユニット、100L 培養槽は 2 ユニット連結させて実験を行った（図-1）。培養槽の後段には、有効容積 90L の沈殿槽を設置し、重力濃縮により培養藻類を回収し、沈殿槽の上澄み水は、排水した。実用化の際は、上記のように小スケールの培養槽を複数ユニット連結させることで、設置場所の敷地面積を問わず、それぞれの箇所にあった培養量での藻類培養を可能にすることを想定している。藻類培養に用いた基質（以下、流入水とする）は、A 下水処理場の塩素混和池通過後の処理水とし、培養槽に連続的に供給した。HRT は、昨年度、HRT2 日や 3 日での藻類培養において、栄養塩の枯渇がみられたため、本年度は 0.8～2 日で適宜変更した。培養槽は、攪拌機による攪拌を常に行い、槽内の藻類濃度が均一になるようにした。昨年度および今年度の夏季では、約 460rpm で攪拌を行い、秋季より攪拌強度を下げて、約 230rpm での攪拌とした。藻類培養装置の想定設置場所は、処理場内の建物の壁や外壁等での屋外設置を想定して、降雨等の天候の影響を排除する目的で蓋をした密閉型としており、太陽エネルギーは、一面（0.5m×0.5m または 0.5m×1m）から取り入れるものとしている。冬季の期間において、GAIA プロジェクトでは、培養槽の集光を期待しない一面（0.5m×0.5m）に、幅 0.01m の加温槽を設置し、A 下水処理場の下水処理水の熱を熱交換器により採熱して加温した水道水を流量 3.2L／分で流すことで、培養槽の加温を行った[4]。培養槽の水温は、65 日目までは 25℃、その後は 30℃に維持するように、熱交換水の流量を制御しながら流した。昨年度は、A 下水処理場の下水処理水の熱を熱交換器により採熱して約 40℃に加温した水道水を、保温を行う最後段の培養槽が 25℃に維持されるように、熱交換水の流量を制御しながら流した[2]。本年度は、12 月～1 月の間、A 下水処理場の下水処理水の熱を熱交換器により採熱して約 40℃に加温した水道水を、培養装置内に設置したステンレス製のパイプ中に約 800L／日で一定流量で流し、培養槽の保温を行った。12 月中は、配管の接続等のトラブルのため、保温が安定せず、1 月より安定した保温を行なえた。50L 培養槽では、各槽で約 1m、100L 培養槽では、各槽で約 1.4m の長さの配管とした。A 下水処理場の実験施設で回収した膜分離 CO_2 は、藻類の炭素源として適宜制御しながら添加し

(a)50L 培養槽（GAIA）



(b)150L（2018 年 10 月～2019 年 1 月）

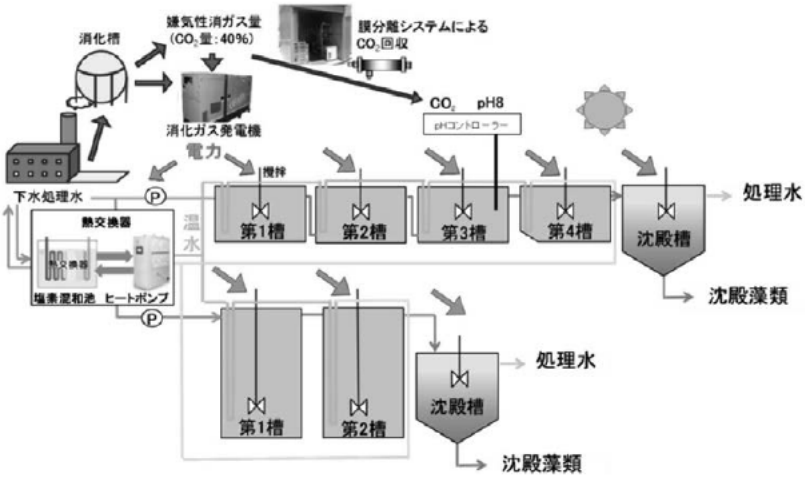


(c)200L、保温有 （2019 年 1 月～2 月）

(d)200L(50L×4 槽)（2019 年 8 月～2020 年 1 月）

(e)200L(100L×2 槽)（2019 年 10 月～2020 年 1 月）

図-1　密閉縦型藻類培養装置



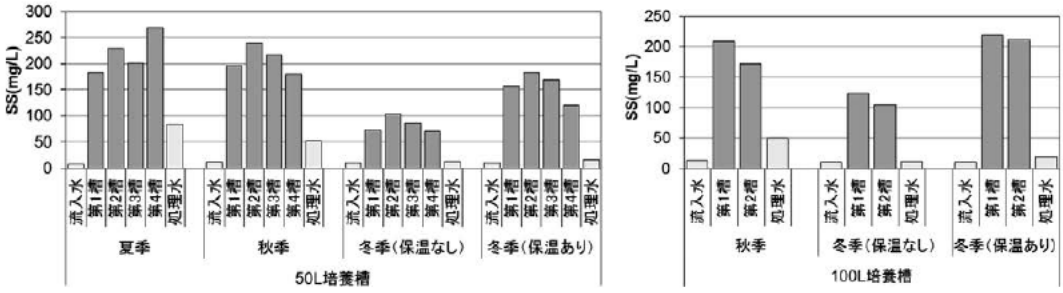
200L （保温なし：2019 年 7 月～2019 年 12 月、保温あり： 2020 年 1 月）

図-2　連続式藻類培養装置の全体図

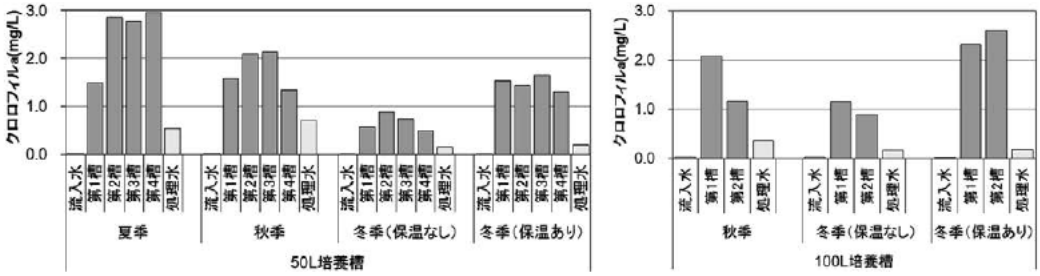
た。流入ポンプ、攪拌機等の動力は、A 下水処理場の施設に設置した消化ガス発電機より供給した。よって、外部からのエネルギー投入を行わない、下水道資源のみを活用した藻類培養装置となっている。連続式密閉型藻類培養装置の全体像を、図-2 に示す。2019 年 12 月は、安定した保温が行えなかったため、"保温なし"の期間に含めた。流入水、50L 培養槽の水（第 1 槽、第 2 槽、第 3 槽、第 4 槽）、沈殿槽、沈殿タンクから排水される水（処理水）、100L 培養槽の水（第 1 槽、第 2 槽）、沈殿槽、沈殿タンクから排水される水（処理水）を 1~2 週間に 1 回程度サンプリングし、SS、TS、VS、クロロフィル a、リン、窒素（全窒素、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素）、CODcr を適宜測定した。50L 培養槽の運転期間は 2019 年 8 月から 2020 年 1 月、100L 培養槽の運転期間は、2019 年 10 月から 2020 年 1 月とした。

２．２．　藻類培養実験結果

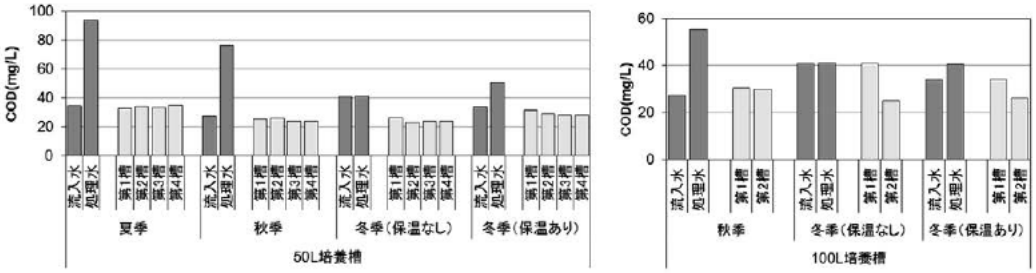
図-3 に、2019 年 7 月～2020 年 1 月における、50L 培養槽の流入水、第 1 槽、第 2 槽、第 3 槽、第 4 槽、放流水および、100L 培養槽の流入水、第 1 槽、第 2 槽の SS、クロロフィル a、各水質項目（CODcr、リン、窒素、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素）を示す。50L 培養槽では、夏季（7 月～9 月、5 回）、秋季（10 月～11 月、4 回）、冬季(保温なし)（11 月～12 月、4 回）、冬季(保温あり)（1 月、3 回）の各期間における平均値、100L 培養槽では、秋季、冬季(保温なし)（11 月～12 月、4 回）、冬季(保温あり)（1 月、3 回）の各期間において、週に 1 回程度測定した結果の平均値を示している。各水質項目について、流入水と処理水は全濃度、各槽では溶解性濃度を示している。培養槽内の水温および外気温を図-4 に示す。図-3（a）より、バイオマス濃度の指標となる SS は、夏季、秋季において、50L 培養槽、100L 培養槽で 200 mg/L 程度で培養できており、冬季の保温なしでは、100mg/L 程度に減少した。その後、冬季でも保温を行ったことで、200 mg/L 程度まで培養量は回復した。各槽での培養量を比較すると、50L 培養槽の夏季では、後段での培養量の増加がみられ、秋季、冬季では、第 2 槽で最も培養量が多くなった。100L 培養槽においても、秋季、冬季で、第 1 槽で培養量が多くなる傾向を示した。図-3（b）よりクロロフィル a は、SS と同様の傾向を示した。流入水の SS は約 10mg/L であり、夏季、秋季の処理水の SS は、約 50～80mg/L と流入水の SS よりも高く、冬季では、約 12～20mg/L の SS で夏季よりは低い濃度で排水される傾向を示した。図-3（c）より、流入水の CODcr 濃度は約 30mg/L であり、培養槽内の溶解性 CODcr の濃度もほぼ同程度であった。処理水は、夏季、秋季では、SS が高くなる傾向を示したことから、CODcr 濃度も 50～100mg/L 程度で流入水より高い傾向を示した。冬季においても、処理水の CODcr 濃度は、流入水と同等かわずかに高くなる程度となった。また、2019 年の冬季において、1 月 20 日に流入水と処理水の BOD を測定したところ、流入水は 33mg/L、処理水は 50L 培養槽で 2.2mg/L、100L 培養槽で 4.6mg/L であり、それぞれ COD の 4%、16%の値であり、処理水中の生物分解性の有機物濃度は低いと考えられる。図-3（d）より、リンは、流入水で 4～8mg/L 程度であり、処理水の濃度は、SS が高いこともあり、同程度かそれ以上であった。各槽の溶解性リンは、後段で減少しており、藻類中に取り込まれるリンは、後段で増える傾向であった。図-3（e）より、窒素は、流入水では 27～39mg/L、処理水は 24～31mg/L であり、夏季～冬季において、12～24%の除去率であった。夏季や冬季（保温なし）よりも、秋季と冬季（保温あり）で除去率が高い傾向を示した。微細藻類培養において、培養槽を複数ユニット連結させる利点として、窒素、リンの除去率を上げる効果があることが示された。



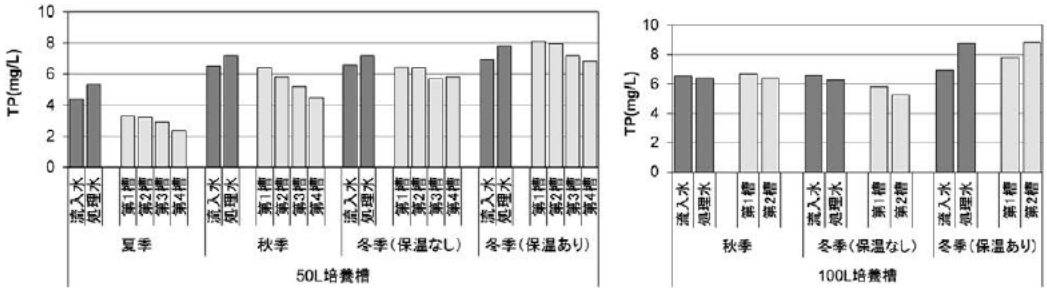
（a）　SS



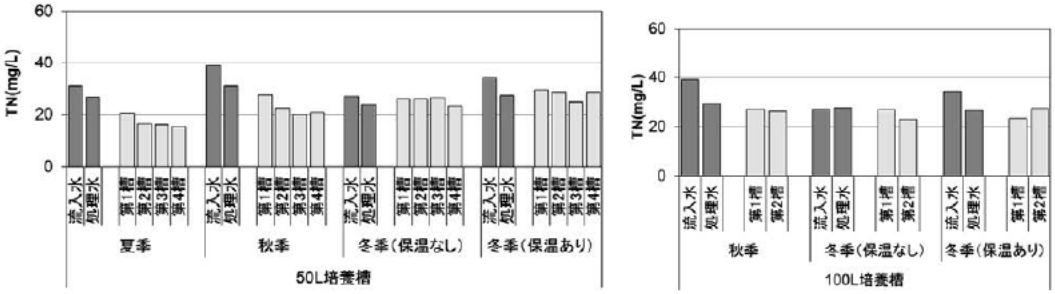
（b）クロロフィル a



(c) CODcr　(流入水、処理水は全濃度、各槽では溶解性濃度を示す)



(d) リン　(流入水、処理水は全濃度、各槽では溶解性濃度を示す)



(e)　窒素　(流入水、処理水は全濃度、各槽では溶解性濃度を示す)

図-3　夏季、秋季、冬季(保温なし)、冬季(保温あり)の各期間における

50L 培養槽および 100L 培養槽の流入水、各槽、処理水の SS、クロロフィル a、各水質の平均値

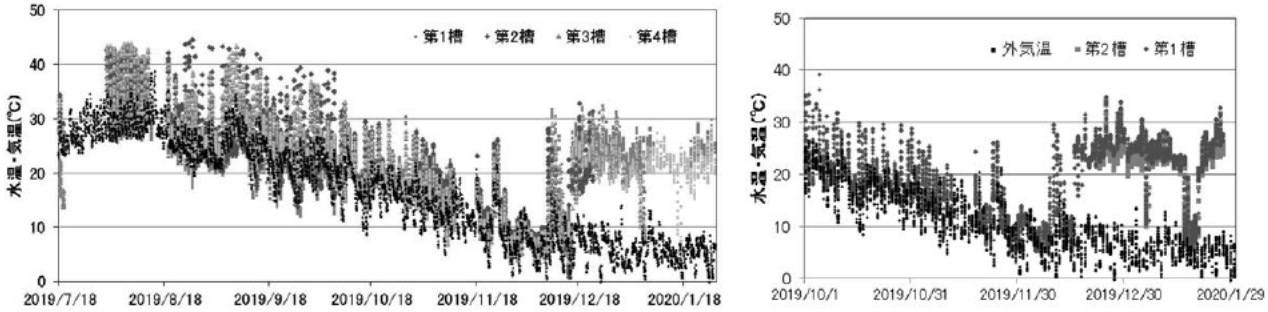


図-4　密閉縦型培養槽の水温と外気温（左：50L 培養槽、右：100L 培養槽）

2．3．培養藻類回収の検討

本研究では、ディスクセパレーター（三菱化工機株式会社）を用いた機械濃縮による藻類回収の検討を行った。ディスクセパレーターの全体像および濃縮の原理を図-5 に示す。また、実験に用いたディスクセパレーターの諸元を表-1 に示す。装置に投入された原液は、回転体中に多層に配置されたディスクの穴を通って濃縮液と清浄液に分離され、濃縮液は装置の外側の壁面に付着し、清浄水は、上部から排水される。濃縮試験は、夏季（2019 年 8 月 12 日）と冬季（2019 年 12 月）の 2 回行った。夏季は、50L 培養槽の第 4 槽および沈殿槽から回収した藻類、冬季は、50L 培養槽の沈殿槽および 100L 培養槽の沈殿槽から回収した藻類を用いた。結果を表-2、濃縮試験の写真を図-6、A 下水処理場の処理水のおよび排水の水質

（CODcr、リン、窒素、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素）およびSSを図-7に示す。装置の標準処理量は1,600L/hであるが、本研究で培養した藻類の沈殿性を考慮して、約10分の1の処理量で処理した。結果として、30～100倍に濃縮された濃縮藻類が回収できた。装置の制限として、1回の回収量が約3Lであるため、原液の濃度により、濃縮液の濃度、処理時間が決まることになる。図-7より、濃縮後の排水の水質およびSSは、A下水処理場の処理水とほぼ同程度の濃度であった。夏季の濃縮実験では、窒素は、A下水処理場の処理水よりも低濃度で排水できることが示された。これらの結果より、ディスクセパレーターを用いた培養藻類の回収は可能であり、排水も放流できるレベルに処理できることが示された。

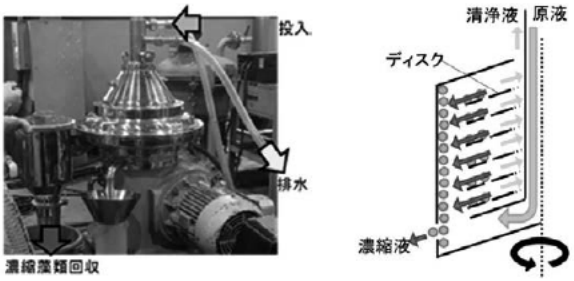


図-5 ディスクセパレーター
（左：全体写真、右：濃縮原理図）

表-1 ディスクセパレーターの諸元

標準処理量	回転体数	電力機出力	外形寸法	重量
L／h	min-1	kW	LxWxH(mm)	kg
1,600	9,000	5.5	1,000x910x1,025	365

表-2 藻類濃縮試験結果

藻類培養槽		50L培養槽		50L培養槽	100L培養槽
藻類回収日		夏季(8／12)		冬季(12／16)	
藻類回収槽		第4槽	沈殿藻類	沈殿藻類	沈殿藻類
処理量	L／h	180	90	180	180
原液	mg/L	94	389	278	470
総量	L	204	65	108	154
濃縮液	mg/L	5,536	7,252	8,000	18,197
回収量	L	3.14	3.12	2.86	3.02

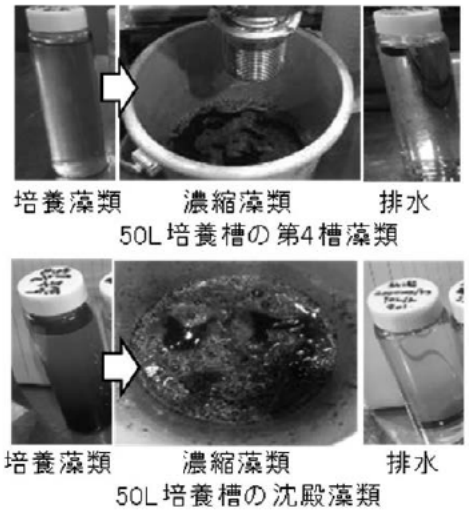


図-6　藻類濃縮試験結果の写真（夏季）

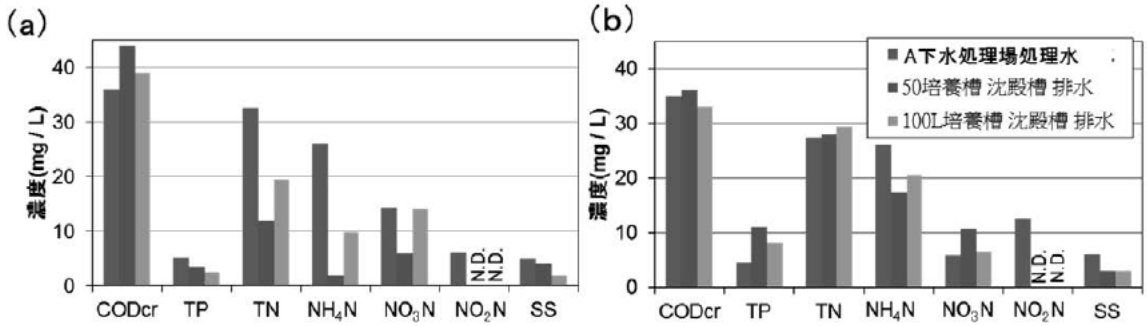


図-7　A下水処理場の処理水および濃縮後の排水の水質およびSS（(a) 夏季、(b) 冬季）

3．培養藻類のエネルギー化評価

本節では、A下水処理場をモデルケースとして想定した上で、藻類培養システム導入によるCO_2排出削減量、ならびに培養藻類の有効利用によるエネルギー生産量を計算し、システム導入効果を示すとともに、システムの導入に必要となる要件を提案することを目的とした。

3．1．培養藻類の嫌気性消化への投入における有用性の検証

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

培養藻類の利用方法について、嫌気性消化への投入の有用性を検証した。有効容量 2000mL の嫌気性消化反応器（Bioprocess Control 社）を用いて、培養藻類の濃縮液と下水汚泥の混合による嫌気性消化の連続実験を行った。各リアクターでの運転条件を表-3 に示す。消化汚泥は、B 下水処理場の消化槽の消化汚泥を用いた。投入する濃縮汚泥は、B 下水処理場の最初沈殿池濃縮汚泥および余剰汚泥の濃縮汚泥を 1 対 1 に混合したものを用いた。濃縮汚泥のみ投入する系、濃縮汚泥と縦型藻類培養装置の 50L 培養槽および 100L 培養槽の沈殿槽から回収した藻類の濃縮液を投入する系の合計 6 系列で、消化実験を行った。投入汚泥は、1 週目から 3 週目は濃縮汚泥のみとし、TS は 3%で投入した。3 週目から 6 週目は、濃縮汚泥のみ、濃縮汚泥の TS に対して藻類を約 0.1%混合したものを TS3.01%で投入した。6 週目から 9 週目までは、濃縮汚泥の TS に対して藻類を約 3%混合したものを作製し、それぞれ TS3.1%で投入した。9 週目から 12 週目は、濃縮汚泥の TS に対して藻類を約 23%混合したものを作製し、それぞれ TS3.3%で投入した。投入および引き抜きは、1 日あたり 100ml になるよう、2 から 3 日に一回まとめて手動で行った。バイオマスを投入後、窒素ガスでパージし、運転を開始した。発生したバイオガスは、水酸化ナトリウム溶液を通したのち、メタンガス量として計測した。温度は 35℃程度に制御し、運転期間は 2019 年 11 月～2020 年 1 月の 12 週間とした。運転期間中、定期的に汚泥の性状分析、有機酸濃度の測定、発生ガス中の組成の測定を行った。また、発生した消化汚泥の脱水性に対して、藻類混合の影響の有無を調査するため、脱水試験を行った。

図-8 に、1～3 週目（投入 TS3.00%）(n=3)、3～6 週目（投入 TS3.01%）(n=8)、6～9 週目（投入 TS3.10%）(n=8)、9～12 週目（投入 TS3.30%）(n=7)における投入 COD あたりのメタン転換率を示す。汚泥のみの系列では、メタン転換率が安定しており、0.6 程度であった。藻類を投入した各系における投入 TS3.01%時は、濃縮汚泥のみを投入した投入 TS3.0%の結果と比較すると、メタンガス量としては上昇していたが、藻類を投入しはじめた期間であることもあり、メタン転換率は低くなる傾向を示していた。投入 TS3.1%、3.3%時では、装置の差により違いはあるものの、濃縮汚泥のみを投入した投入 TS

表-3　メタンガス発生ポテンシャル試験の条件

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
系列		汚泥のみ	汚泥＋50L①	汚泥＋50L②	汚泥＋50L③	汚泥＋100L①	汚泥＋100L②
1 週目～	TS3.00%	濃縮汚泥のみ					
投入バイオマス		濃縮汚泥	濃縮汚泥＋50L 培養槽藻類			濃縮汚泥＋100L 培養槽藻類	
3 週目～	TS3.01%	汚泥 TS3.0%	藻類 TS：0.01%				
6 週目～	TS3.1%	汚泥 TS3.0%	藻類 TS：0.1%				
9 週目～	TS3.3%	汚泥 TS3.0%	藻類 TS：0.3%				

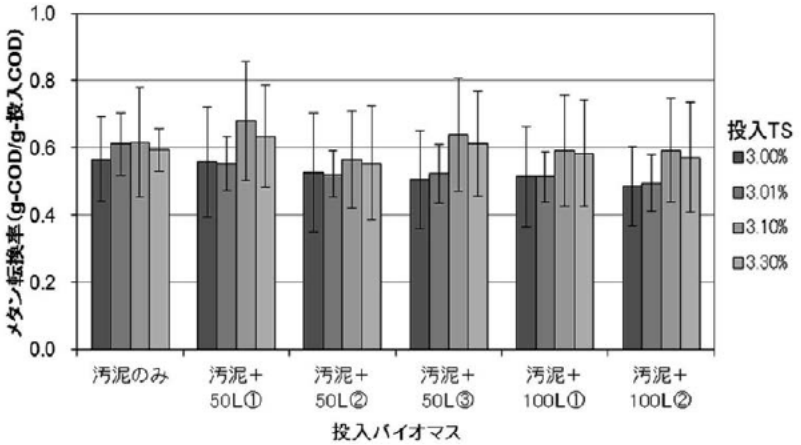


図-8　1～3 週目（投入 TS3.00%）、3～6 週目（投入 TS3.01%）、6～9 週目（投入 TS3.10%）、9～12 週目（投入 TS3.30%）における投入 COD あたりのメタン転換率

0.3%の結果と比較すると、メタン転換率が上昇する傾向であり、藻類の投入が嫌気性消化に悪影響を与えないことが示された。 7週目に発生した消化ガス中のメタン含有率は64～69%であり、汚泥および汚泥+藻類を投入した場合の発生する消化ガス中のメタン含有率は同程度であることがわかる3週目の消化汚泥中の有機酸濃度は、800mg/L程度であり、プロピオン酸が80%程度を占めていたが、5週目では、8～12mg/L程度まで減少し、酢酸がほとんどを占めていた。その後有機酸の蓄積はみられず、安定した運転が行われていた。また、有機酸組成、濃度について、汚泥のみと藻類を投入した系で同等であることから、藻類を消化槽に投入することによる有機酸への影響は少ないと考えられる。

3．2．温熱供給量からみた冬季の藻類培養のフィージビリティスタディ

本節では、A下水処理場をモデルケースとして想定した上で、藻類培養システム導入に必要となる冬季の藻類培養について、温熱供給量を律速として、消費熱量、培養可能量の試算を行った。図-9に、ヒートポンプから50L培養槽、100L培養槽の両培養槽への送水温度および戻り温度を示す。平均41.2℃で送水された温水は、5℃～20℃の間を上下し、平均9.1℃でヒートポンプに戻っている。ヒートポンプの送り水温と戻り水温の温度差は、平均は、32.1℃であった。この温度が、培養槽で消費された温度となる。温度差と、流量から算出される消費熱量を、図－10に示す。50L培養槽の消費熱量は、0.98から1.79kWであり、平均は、1.5kWであった。100L培養槽の消費熱量は、0.69から1.25kWであり、平均は、1.0kWであった。よって、200Lの培養槽を加温するための1日の消費熱量は、50L培養槽で36 kWh、100L培養槽で24kWhであり、それぞれ129.6 MJ／日、86.4MJ／日と試算された。GAIAで検証した、密閉縦型培養槽の1面を保温槽として使用した場合、50L培養槽を加温するための消費熱量は、23.8 MJ／日[2]であり、昨年度検証を行った、25℃制御によるステンレス配管を用いた保温では、200L培養槽を加温するための消費熱量は、34.7MJ／日であった[4]。1Lあたりの消費熱量で比較すると、ステンレス配管で25℃制御が最も低く、ステンレス配管で一定流量、100L培養槽、背面保温、ステンレス配管で一定流量、50L

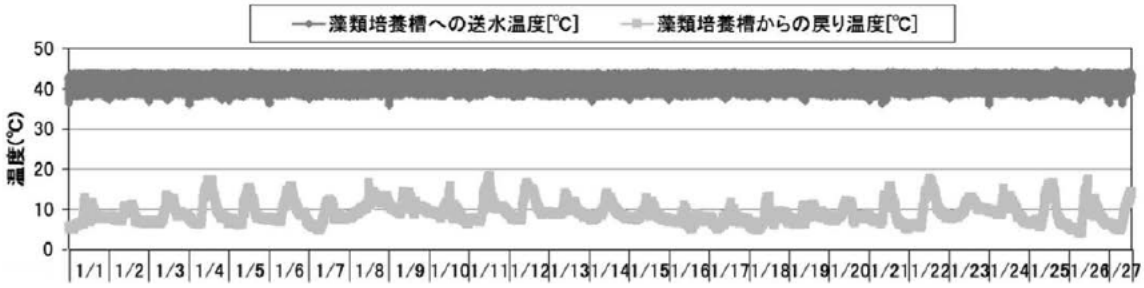


図-9 ヒートポンプから藻類培養槽への送水温度および戻り温度

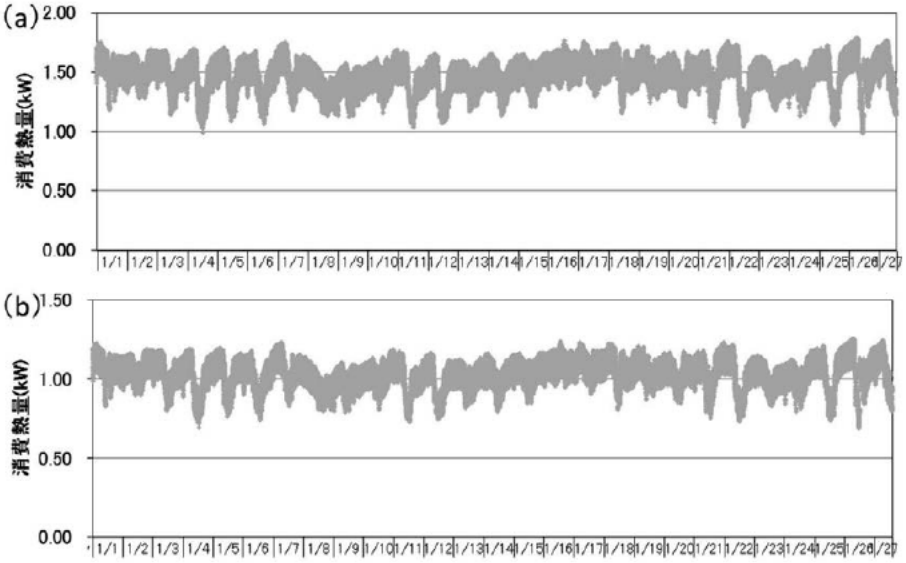


図 - 10 温水供給時の消費熱量 (a)50L培養槽、(b)100L培養槽

培養槽の順で多かった。また、1 槽あたりの培養槽の容積が大きいほど、消費熱量が下がることが示された。以上より、冬季の下水処理水を用いた培養槽の保温では、本研究の範囲では、ステンレス配管で 25℃制御で行うのが消費熱量が最も低いことが示唆された。冬季に利用可能な温熱量は、256 GJ／日であるため、1,475.5 m^3 の培養槽の保温が可能である概算とあった。HRT を 2 日とすると、流量は、737.8 m^3／日となり、A 下水処理場の下水処理水の流量（22,000 m^3／日）の約 3%を使用する試算となった。また、培養槽の高さを 1m とすると、1,475.5 m^2 の面積が必要となり、厚さ 0.25m の密閉槽にすると、約 6 ㎞の敷地幅が必要であり、A 下水処理場では、約 4 %の敷地を使用する試算となった。厚さ 0.5m の密閉槽にすると、約 3 ㎞の敷地幅が必要となり、高さと厚さをどの程度で培養可能かが重要となる。以上より、下水処理場での導入が非現実的ではないことが示された。

３．３．縦型藻類培養装置における培養藻類のエネルギー化評価

縦型藻類培養槽を用いて培養した培養藻類の藻類エネルギー化にかかるエネルギー収支を比較した。①脂肪酸メチルエチルエステル化、②固形燃料化、③嫌気性消化への投入の 3 種類の手法における培養藻類利用について検討した。それぞれにおける消費エネルギー、生産エネルギーにかかわる項目は、表-4 のとおりである。なお、本研究におけるエネルギー収支計算には、設備導入などにかかる初期費用は考慮していない。藻類培養槽への流入量は、昨年度の試算で使用した温水供給律速となる流量である、737.8 m^3／日とした[1)]。HRT は 1 日、培養槽高さは 2m、藻類培養量は、300 mg/L とした。嫌気性消化におけるエネルギー転換率については、３．１．で示した、50L 培養槽における TS 投入量 3.1%時の 0.68 を

表-4　培養藻類の利用方法におけるエネルギー収支算出項目[4)]

項目　（エネルギー±）		計算式
藻類培養		
藻類生産エネルギー	／	培養藻類量×単位当たり高位発熱量（16.2kJ/g-dry）
攪拌	-	単位水当たり攪拌エネルギー(144kJ/m^3/d)×培養槽体積
CO_2 吹き込み	-	使用可能 CO_2 量×CO_2 吹き込み単位エネルギー(79.9kJ/kg-CO_2)
回収（重力濃縮）		
濃縮後藻類容積	／	藻類回収量【培養藻類量×回収率（0.76）】／藻類回収濃度【藻類 SS 濃度×濃縮効率（58）】
かき寄せ機	-	単位かき寄せ消費電力（144kJ/m^3）×濃縮後藻類容積
脱水（嫌気性消化は除く）		
脱水後藻類容積	／	藻類回収量／脱水後藻類濃度【藻類回収濃度×濃縮倍率（31.7）】
回収（遠心濃縮）		
濃縮後藻類容積	＋	藻類回収量【培養藻類量×回収率（0.99）】／藻類回収濃度【藻類 SS 濃度×濃縮効率（46）】
遠心機	＋	遠心機消費電力（360 k J/m^3）×濃縮後藻類容積
ディスクセパレーター	＋	5,538KJ/m^3×使用時間
①　脂肪酸メチルエステル化		
乾燥	-	藻類回収量×｛ベルト乾燥熱（13.8kJ/g-dry）＋ベルト乾燥電力（1.44kJ/g-dry）｝
エネルギー化	-	藻類回収量×｛脂質抽出消費エネルギー（1.2kJ/g-dry）＋脂質抽出電力（0.25kJ/g-dry）＋オイル交換量（0.15kJ/g-dry）｝
生産エネルギー	＋	オイル生産量【藻類回収量×藻類オイル含有率（0.021g-oil/g-dry）】×オイル中高位発熱量（42kJ/g-oil）
②　固形燃料化		
消費電力	-	消費電力＋消費重油エネルギー【単位消費重油（34L/m^3）×脱水後藻類容積×重油中高位発熱量（45.2MJ/L）】
エネルギー生産量	＋	エネルギー回収量【藻類生産エネルギー×回収率（0.76）】×固形燃料化によるエネルギー収率（0.75）
③　嫌気性消化		
消費電力	-	濃縮後藻類容積×単位消費電力（19,080kJ/m^3）
エネルギー生産量	+	エネルギー回収量×嫌気性消化におけるエネルギー転換率（0.68）

用いた。ディスクセパレーターによる回収では、2．3．で使用した実験機器よりも大容量のものを使用するものとした。

試算に用いた機器の流量は 3,900L/h、消費電力は 6kW である。培養できる藻類の全量をディスクセパレーターで回収すると考えると、1 日で培養できる量を回収するのに、1 台で 8 日掛かる計算となり、消費エネルギーが膨大にかかる試算となったため、培養槽の後段には沈殿槽を設置し、藻類を沈殿させ、上澄み液をディスクセパレーターで回収する方法とした。よって、ディスクセパレーターに投入する培養量は、培養量の半分とした。このとき、必要となる台数は、4 台となる。

A 下水処理場における縦型培養装置での培養藻類を利用したエネルギー生産システム導入のエネルギー収支の結果を、図-11 に示す。回収に掛かるエネルギーが増加したため、嫌気性消化への投入によるエネルギー収支が 584MJ/日、固形燃料化によるエネルギー収支が-70MJ/日、脂肪酸メチルエステル化に掛かるエネルギー収支が、-6,717MJ/日となった。嫌気性消化への投入により、エネルギー収支がプラスになる試算結果であった。本試算では、流入量を 737.8 m³／日としているが、夏季においては、温水供給律速がないため、流量および藻類培養量をさらに増加させることが可能である。仮に流入量を倍にした場合、エネルギー収支も倍の 1,169MJ/日となり、得られるエネルギーは増えることになる。

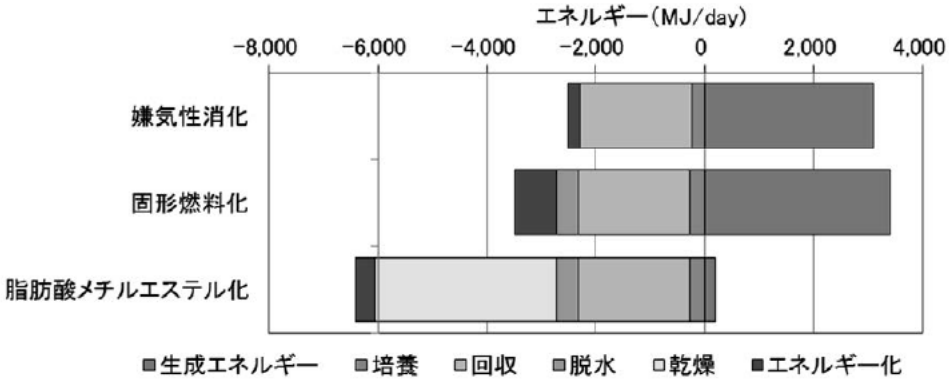


図-11 A 下水処理場における縦型培養装置での培養藻類を利用した
エネルギー生産システム導入のエネルギー収支

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

謝辞

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

参考文献

1) Sutherland, D.L., Howard–Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J.: The effects of CO_2 addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo–physiology, biomass production and nutrient removal. Water Res., 70, 9–26,　2015.
2) 国立大学法人　長岡技術科学大学、国立研究法人土木研究所：平成 29 年度 下水道技術研究開発報告書
下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産、2018
3) 山﨑廉予、岡安祐司、重村浩之、佐々木聖弥、石川隆世、姫野修司、下水道資源を活用した微細藻類培養システムの開発、第 55 回下水道研究発表会、N-4-4-8、pp.575-577、2018
4) 長岡技術科学大学、株式会社大原鉄工所、東亜グラウト工業株式会社、土木研究所：官民連携による下水道資源・エネルギーを活かした植物栽培技術、国土交通省　平成 30 年度下水道応用研究報告書、2019
5) 山﨑廉予、下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産に関する研究、土木技術資料、Vol.61、No.1、2019

下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：重村浩之、山﨑廉予

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

1. はじめに

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

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

2. 目的

化石燃料の枯渇への懸念、化石燃料利用にともなう地球温暖化を背景に、再生可能エネルギーの利用が推進される現代において、藻類を用いたエネルギー生産に大きな注目が集まっている。近年では、都市下水や工場排水に豊富に含まれる窒素、リンといった栄養塩を用いた藻類培養の試みが実施されてきている [2, 3]。日本のように下水道システムが広く普及している国々では、下水処理場内に流入してくる栄養塩や、焼却炉や消化ガス由来 CO_2、下水熱など下水処理場が有する資源および下水処理場における土地や施設などのストックを活用した藻類培養によるエネルギー生成が期待される。

既往研究において [4, 5, 6] ボトリオコッカスやクロレ

ラなどのオイル含量の高い特定藻類や、ユーグレナなどの高機能物質を生産する特定藻類などを対象に、下水処理水等を用いた培養が実施されているが、これら特定の藻類の培養は、実環境下での適用性、大規模化に課題が残る。これに対し本研究では、特定藻類の接種は行わず、下水処理水を直接培養液として用い、与えられた環境条件で優占する土着藻類（以下、「藻類」と記述）の培養技術の確立および培養藻類のエネルギー利用手法の検討を行ってきた。その結果、下水の最初沈殿池流出水（以下、「初沈流出水」という）や二次処理水による藻類培養が可能であることなどを示してきた[7)、8)]。

平成 30 年度[9)、10)]は、栄養塩や有機物量の多い初沈流出水、および消化汚泥の脱水分離液を下水で希釈した溶液を基質とした藻類培養の検討を行った。また、初沈流出水での藻類培養では、通年での藻類培養を目指し、冬季において、下水処理水での加温が有効であるか検討を行った。その結果、初沈流出水を用いた上部開放レースウェイ培養槽による屋外での連続藻類培養において、下水処理水の熱を利用した簡易的な加温でも、通年での藻類培養が可能であることが示された。また、沈殿藻類の VS/TS(volatile solids/ total solids)、高位発熱量は、下水汚泥と同程度であり、嫌気性消化への投入が有効である可能性が示された。重力濃縮のみでも、沈殿藻類の回収と処理水の SS(suspended solids)の低下が一定程度見込めることが示された。

消化汚泥の脱水分離液を下水で希釈した溶液を基質として、水理学的滞留時間を 16.8 日に設定した 2 系列（撹拌機による撹拌を行う系列、および曝気による撹拌を行う系列）のカラム型藻類培養水槽を用いて、3 月～10 月の間、太陽光の下で、回分式継代藻類培養を実施した結果、実験期間中の各系列の溶解性窒素の平均除去率は 77%、96%、溶解性リンの平均除去率は 94%、98%、藻類培養液 1L あたりの平均余剰藻類生産速度は、それぞれ、14.4 mgSS/L・d、22.0 mgSS/L・d であった。消化汚泥の脱水分離液を用いて培養した藻類と下水汚泥の混合回分式嫌気性消化実験により、培養藻類のメタン発生ポテンシャル評価を行った結果、投入した培養藻類 VS あたりのメタンガス発生量は、撹拌機による撹拌を行う系列、および曝気による撹拌を行う系列の場合、それぞれ、882 NmL/g-VS、362 NmL/g-VS であり、藻類培養の撹拌方法により大きく異なることがわかった。高位発熱量は、藻類培養が可能な 3 月～11 月の期間を通じて、18.0～22.4 MJ/kg-DS の範囲であり、下水汚泥の乾燥物と同程度となることがわかった。

令和元年度では、下水道資源による藻類培養の高効率化を目的とし、初沈流出水に下水汚泥を混合した系、消化汚泥の脱水分離液を希釈せずに用いた系および汚泥分離液処理施設の流入水と処理水を混合した系において、藻類培養を行った。

3. 下水汚泥を利用した藻類培養の効率化の検討

3. 1 実験方法

藻類培養には、380 L 上部開放レースウェイ型培養槽(図-1)2 系列を用いた。培養基質には、A 処理場の流入水をA処理場内の実験施設に設置した沈殿池を通過した後の初沈流出水、および A 処理場の標準活性汚泥法の余剰汚泥を用いた。培養期間は、2018 年の春から冬までの 8 カ月間とした。最初の 60 日間は両系列とも初沈流出水を基質とし、藻類培養を行った。その後、系列 1（RWT1）において、余剰汚泥を一定量、初沈流出水に混合したものを基質とした（IN1）。系列 2（RWT2）では、初沈流出水のみを基質とし（IN2）、藻類培養を行った。余剰汚泥の MLSS は、約 8,000 mg/L であった。前半 6 カ月間は、HRT を 2 日で培養し、その後気温が低下したため、HRT を 4 日で培養した。冬季の期間は、下水処理水を培養槽内に流し、培養槽の保温を行った[9)]。光合成のために供給する CO_2 は、純炭酸ガスボンベを使用し、pH コントローラーで pH8 に制御しながら添加した[7)]。培養槽の後段には、32L の沈殿槽を設置し、重力濃縮により沈殿藻類の回収を行った。沈殿槽からの排水を処理水（EW1、EW2）と定義した。

藻類培養槽への流入水（IN1、IN2）、培養液（RWT1、RWT2）、処理水の SS、流入水、培養液のクロロフィル *a*、水質分析(CODcr、TN、NH_4-N、TP)を、週 1 回程度行った。SS は Standard method[11)]、クロロフィル *a* は、河川水質試験方法（案)[12)]に従い、測定を行った。クロロフィル *a* 測定でのろ過は、孔径 1.2 μm の GF/C(Whatman, USA)で、その他の水質項目についての溶存態濃度測定の際のろ過は、原則孔径 1.0 μm の GF/B（Whatman, USA）で行った。水質分析は、HACH(東亜ディーケーケー株式会社)により行った。また、週 1 回、沈殿槽から沈殿藻類の引き抜きを行い、TS(固形物濃度)、VS(有機物濃度)を測定した。

実験期間中に 6 回の培養藻類の沈降試験を行った。培養した微細藻類を 500 mL メスシリンダーに入れ、0.5、1、2、24 時間後に上澄みの SS 濃度を測定した。微細藻類は凝集フロックがほとんどかあるいは全くみ

られないため、沈殿の評価は上澄みの SS 濃度の測定によって行った。植物性プランクトンおよび動物性プランクトンの同定、細菌叢解析を一部の藻類培養液に対して行った。藻類および動物プランクトンの同定は、光学顕微鏡(BH-2、オリンパス、Japan)で行った。0.01ml、0.1ml、1ml の培養液中の細胞数または糸状体を数回測定し、1ml あたりの細胞数を算出した。細菌叢の解析は、次世代シークエンスにより、16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物群集解析を行った。DNA 抽出には、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄環境(株)）を用い、V3–V4 領域を対象としたプライマーセット（Bac341 および Bac850)[13]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[14]を用い、Operational Taxo-nomic Unit (OTU)–picking は QIIME2[3]を用い、97%以上の相同性を持つ配列を一つの菌種として扱うものとした。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。

沈殿槽で回収した藻類は、下水汚泥との嫌気性混合消化によって、エネルギー回収に利用することを想定した。夏と冬に収集された藻類のメタン発生ポテンシャル試験をおこなった。消化汚泥には、B 処理場の消化汚泥（DS）を用いた。投入汚泥には、B 処理場の最初沈殿池の重力濃縮汚泥および余剰汚泥の機械濃縮汚泥を 1 対 1 で混合した濃縮汚泥（CS）を用いた。試験は、6 系列で行った。CS を DS の VS に対して 10%混合した系（DS＋CS（10））、DS に、RWT1 での回収藻類（RWT1A）を 10%混合した系（DS＋RWT1A（10））、RWT2 を 10%混合した系（DS＋RWT2A（10））、CS を DS の VS に対して 20%混合した系（DS＋CS（20））、DS に、CS を 10%、RWT1A を 10%混合した系（DS＋CS（10）＋RWT1A（10））、RWT2 を 10%混合した系（DS＋CS（10）＋RWT2A（10））である。

夏季試験での DS の VS 濃度は 0.82%、CS の VS 濃度は 2.3%、冬季試験での DS の VS 濃度は 0.86%、CS の VS 濃度は 2.2%であった。メタン発生ポテンシャル試験の条件を表-1 に示す。これらの実験は、500 mL 容器中で約 35°C で 30 日間実施した。

3. 2 実験結果

レースウェイ型培養槽中の水温は、夏季で 20~30℃、冬季で 5~20℃であった。夏季では、外気温とほぼ同様の温度であり、冬季では、下水処理水による加温により、外気温よりも高い温度で培養できていた。

図-2 に、流入水、培養槽、処理水における SS とクロロフィル *a* の経日変化、および TN、NH_4-N、TP、CODcr の経日変化を示す。実験中、IN1 および IN2 の平均 SS 濃度は、それぞれ 262±65 および 123±46 mg / L であった。余剰汚泥の添加により、IN1 の SS 濃度は IN2 の SS の約 2.1 倍であった。 RWT1 と RWT2 の SS 濃度は、ほぼ培養期間全体にわたって 200 mg / L を超えたまま藻類培養ができていたことから、冬でも処理水による加温により培養槽の温度が最低でも外気温まで下がらず、藻類を保持しながら培養が維持できたことが示された。60 日目以降の RWT1 と RWT2 の平均 SS 濃度は、それぞれ 391±132 と 262±79 mg / L であった。余剰汚泥を添加した RWT1 の SS 濃度は、RWT2 の SS よりも平均して 1.5 倍高かった。EW1 と EW2 の平均 SS 濃度は、それぞれ 34±19 および 41±26

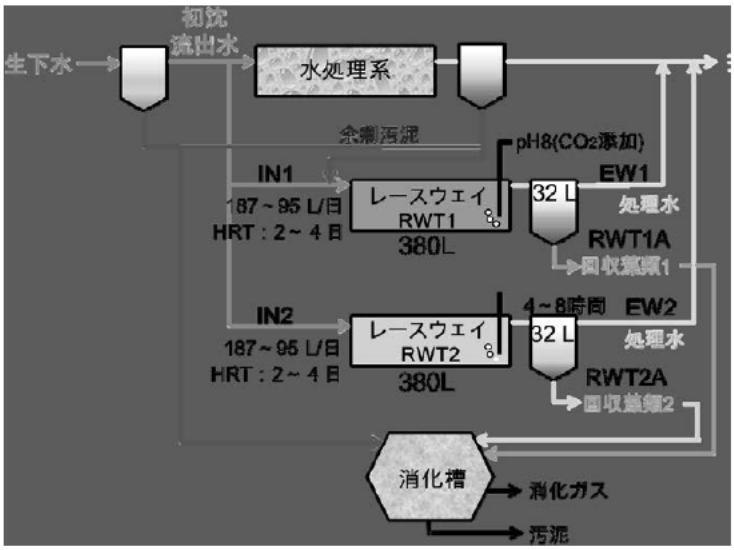


図-1　上部開放レースウェイ型培養槽による実験の概要図

表-1 メタン発生ポテンシャル試験の条件

系列	系列名	混合汚泥(CS)	藻類	夏季試験におけるVS(%)	冬季試験におけるVS(%)
1	DS	−	−	0.82	0.85
2	DS+CS(10)	CS*1(DSのVSの10%)	−	0.90	0.94
3	DS+RWT1A(10)	−	RWT1A*2(DSのVSの10%)	0.90	0.94
4	DS+RWT2A(10)	−	RWT2A*3(DSのVSの10%)	0.90	0.94
5	DS+CS(20)	CS(DSのVSの20%)	−	0.98	1.02
6	DS+CS(10)+RWT1A(10)	CS*1(DSのVSの10%)	RWT1A(DSのVSの10%)	0.98	1.02
7	DS+CS(10)+RWT2A(10)	CS*1(DSのVSの10%)	RWT2A(DSのVSの10%)	0.98	1.02

*1 夏季試験のVSは、2.3 %、冬季試験のVSは、2.2 %
*2 夏季試験のVSは、2.7 %、冬季試験のVSは、2.0 %
*3 夏季試験のVSは、1.2 %、冬季試験のVSは、0.96 %

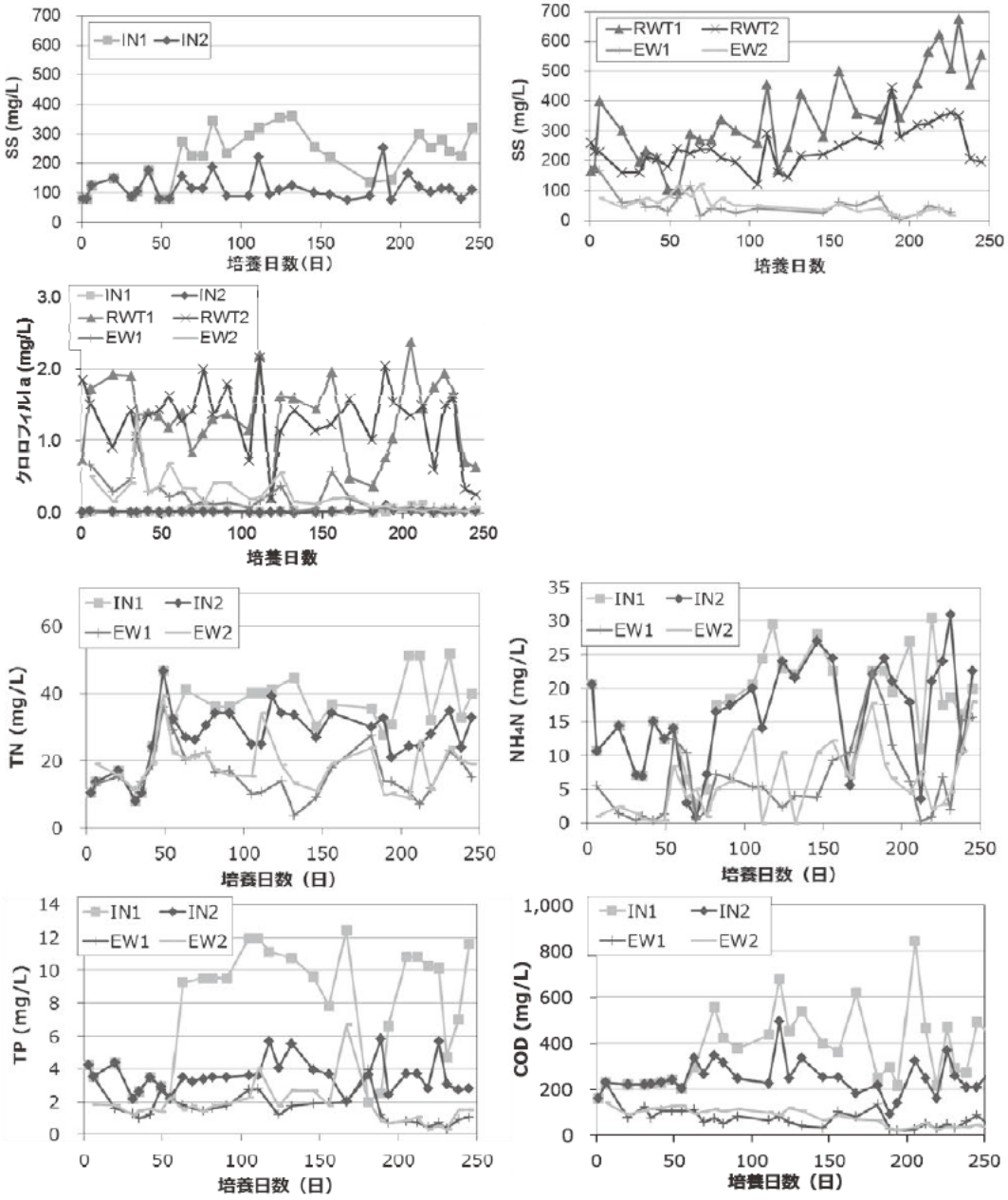


図-2 流入水、培養液、処理水のSS、クロロフィル*a*および、流入水、培養液、処理水の水質の経日変化

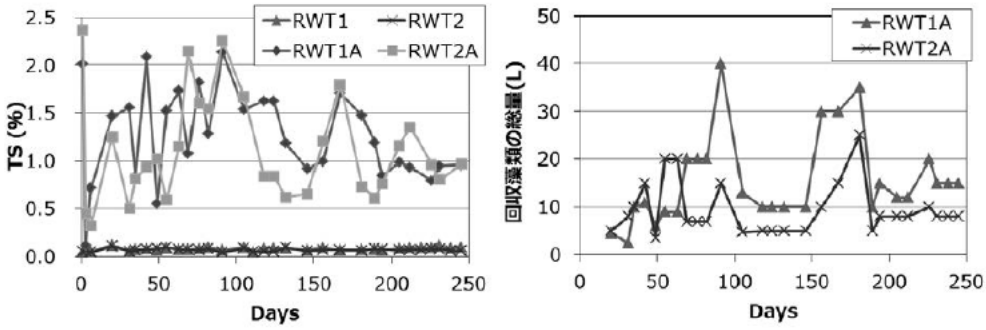


図-3　培養液、回収藻類の TS および回収藻類の総量の経日変化

mg / L であり、同程度の低濃度で排水できていたことから、沈殿槽による培養藻類の沈降が効果的に行われたことが示唆された。実験期間中の RWT1 および RWT2 の平均のクロロフィル *a* の濃度は、それぞれ 1.3±0.6 および 1.3±0.5 mg / L であった。118 日目では、一時的に速い流入速度としたため、クロロフィル *a* の濃度の一時的な減少がみられた。実験中、IN1 および IN2 の平均クロロフィル *a* 濃度は 0 mg / L であり、RWT1 と RWT2 の藻類は余剰汚泥を追加したにもかかわらず、同じレベルで培養槽内で培養されたことが示唆された。EW1 および EW2 の実験期間中の平均のクロロフィル *a* 濃度は、それぞれ 0.23±0.24 および 0.32±0.30 mg / L であり、排水されるクロロフィル *a* の濃度は、同程度に低いことが示された。

実験期間中における、IN1 および IN2 の平均 TN は、それぞれ 39±7.6 および 30±4.9 mg / L であり、EW1 および EW2 の平均 TN は、それぞれ 15±6.1 および 18±6.8 mg / L であった。RWT1 および RWT2 における TN の平均除去率は、それぞれ 63±14%および 43±17%であった。IN1 と IN2 の平均 NH_4-N は約 18 mg / L、EW1 と EW2 の平均 NH_4-N は約 7.5 mg / L であり、RWT1 と RWT2 の NH_4-N の平均除去率は 60%であった。IN1 と IN2 の平均 TP は、それぞれ 9.0±3.0 および 3.8±1.0 mg / L であり、EW1 および EW2 の平均 TP は、それぞれ 1.5±0.9 および 1.8±1.5 mg / L であった。RWT1 および RWT2 における TP の平均除去率は、それぞれ 84±9.5%および 60±18%であった。IN1 および IN2 の平均 CODcr は、それぞれ 430±150 および 260±84 mg / L であり、EW1 および EW2 の平均 CODcr は、それぞれ 59±29 mg / L および 67±33 mg / L であった。 RWT1 と RWT2 の COD の平均除去率は、それぞれ 84±11%と 74±11%であった。これらの結果より、余剰汚泥の添加により、IN1 の栄養素濃度および COD 濃度は、IN2 よりも高かったが、処理水では、同レベルの栄養塩濃度および COD 濃度で排水できており、余剰汚泥添加により除去率としては高くなったことが示唆された。

RWT1、RWT2、RWT1A および RWT2A の TS、および沈殿槽で回収される RWT1A および RWT2A の回収藻類の総量を図-3 に示す。実験期間中、RWT1 および RWT2 の平均 TS は、それぞれ 0.08±0.01%および 0.07±0.01%であり、RWT1A と RWT2A の平均 TS は、それぞれ 1.3±0.4%と 1.3±0.5%であった。RWT1A と RWT2A は沈殿槽で約 15-20 倍に濃縮されていた。RWT1A および RWT2A の回収藻類の総量は、それぞれ平均して 17±8.8 および 9.2±5.2 L であったことから、RWT1 では、RWT2 の約 2 倍の藻類が回収されたことが示された。

汚泥よりも SS 濃度が低く、フロックが軽い微細藻類の場合、効率的かつ低エネルギーで回収することが重要であり、これらに関しては多くの研究が行われてきた。廃水由来の藻類と活性汚泥で構成される藻類-細菌培養実験では、バイオマスの沈降性が汚泥により改善されるとし、藻類と汚泥を 1 対 5 で培養することで、沈降性が良好になることが示されている [15]。また、*Scenedesmus* sp. と *Chlorella vulgaris* の 2 系統の藻類の沈降と生物凝集の調査では、藻類の細胞のサイズと形状、培養密度、および浸出液のタイプ（莢膜と溶解 EPS）の重要性が示されている [16]。このように、適切な濃度の汚泥と細菌類の存在は、微細藻類の沈降によい影響を与える可能性がある。培養槽における培養藻類の沈降試験の結果を、図-4 に示す。沈降速度は平均すると RWT1 と RWT2 で同程度であり、2 時間後の上澄みの SS は 25±12 mg / L 未満であった。本研究における沈殿槽での沈殿時間は 4～8 時間であり、培養微細藻類の沈殿に十分な時間が確保されたことを示している。図-2 において、余剰汚泥を添加した場合と添加しない場合で、同程度のクロロフィル *a* 濃度での

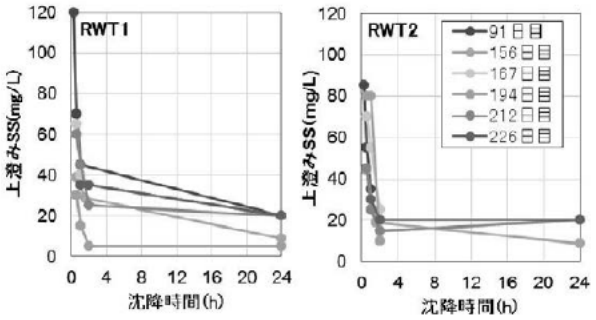


図-4　培養槽での培養藻類の沈降試験

培養であったが、上記の理由から、IN1 の SS 濃度が IN2 の約 2 倍であるため、沈殿槽での回収藻類の総量は RWT1 において、RWT2 の 2 倍になったと考えられる。この時、クロロフィル *a* の平均濃度としては同程度（図-2）であることから、収集された微細藻類量としては、2 倍になることがわかる。

図-5 に、冬季（238 日）における RWT1 と RWT2 のプランクトン数を示す。植物プランクトンは RWT1 と RWT2 で測定し、動物プランクトンは、IN1、RWT1、および RWT2 で測定した。植物プランクトンは、21 種類と 32,522 細胞が RWT1 で検出され、21 種類と 22,529 細胞が RWT2 で検出された。同じタイプの植物プランクトンが RWT1 と RWT2 で観察され、RWT1 では 1.4 倍の植物プランクトン数であった。主要な種は、各槽とも珪藻の *Chlorophyceae* 門と *Thalassiosiraceae* 科であった。珪藻の数が多かったのは、冬季の培養のため、水温が低かったからだと考えられる。次に多く存在していた種は、緑藻類の *Scenedesmus* sp.であった。RWT1 において、RWT2 より 12 倍多く検出された。動物プランクトンは、IN1 では 17 種類、441 細胞、RWT1 では 14 種類、399 細胞、RWT2 では 11 種類、68 細胞が検出された。IN1 の主要な種は *Centropyxis* sp.および *Arcella* sp.であった。対照的に、RWT1 の優占種は、*Vorticellidae* と *Peritrichida* であり、RWT2 の優占種は *Vorticellidae* であった。これは、RWT1 で生存していた動物プランクトンが初沈流出水に由来し、余剰汚泥中に存在する動物プランクトンと異なることを示唆している。

図-6 に、門レベルおよび *Proteobacteria* 門と *Bacteroides* 門の綱レベルでの、夏季から冬季までの数日間にわたる RWT1、RWT2、IN1、および IN2 の細菌叢の経日変化を示す。RWT1 と RWT2 の細菌叢は、*Proteobacteria* 門（それぞれ門群の 31.4%と 25.9%）と *Bacteroides* 門（門群のそれぞれ 17.3%と 18.8%）が優占していた。 *Planctomycetes* 門や *Saprospirae* 綱も、余剰汚泥を追加した微細藻類培養システムにおける、既存の研究で増加していた[17]。以前の研究では、*Proteobacteria* 門（α-*proteobacteria* 綱および β-*proteobacteria* 綱）および *Bacteroidetes* 門（*Sphingobacteria* 綱および *Saprospirae* 綱）は、微細藻類の成長促進細菌として、宿主の微細藻類（*Chlamydomonas reinhardtii*、*Chlorella vulgaris*、および *Euglena gracilis*）の成長を促進する MGPB（microalgae growth-promoting bacteria）であることが示されている[18]。RWT1 の細菌叢では、

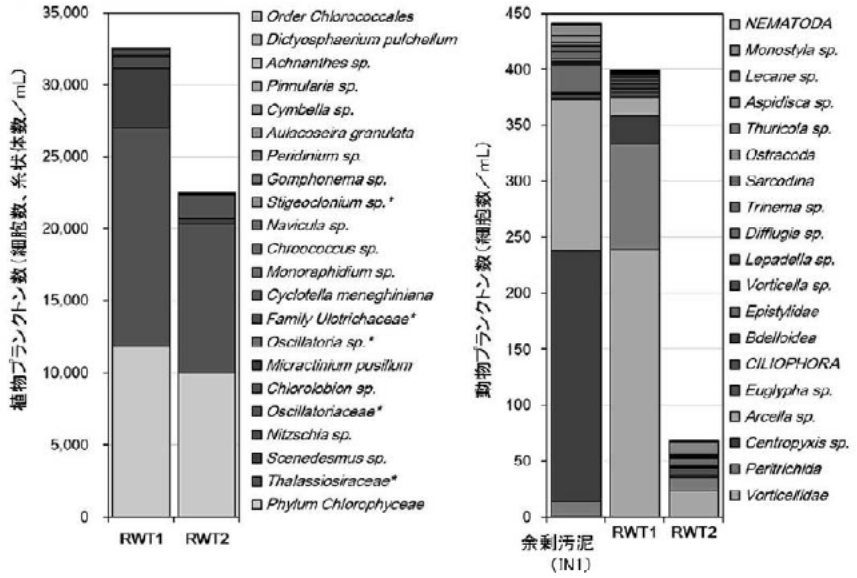


図-5 冬季（238 日）における植物プランクトン数および動物プランクトン数

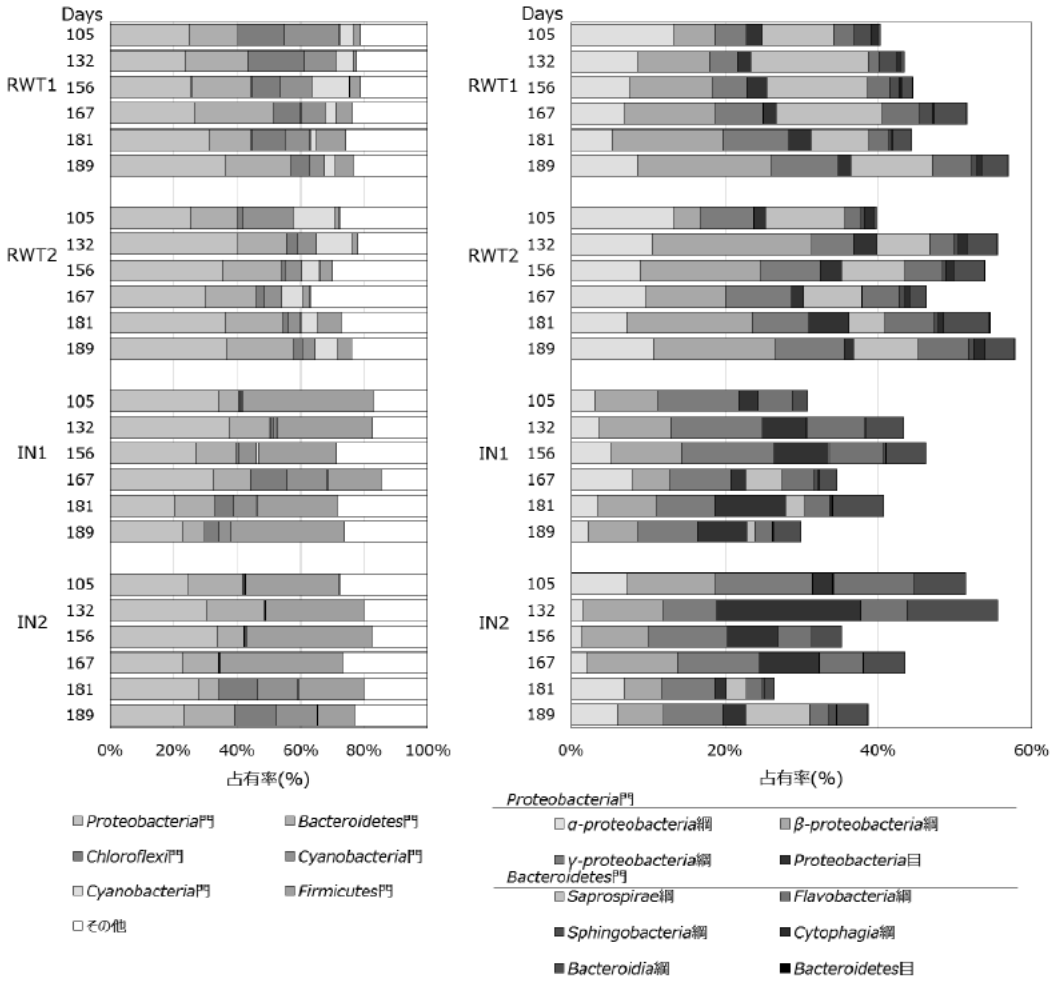


図-6 門レベルおよび *Proteobacteria* 門と *Bacteroides* 門の綱レベルでの RWT1、RWT2、IN1、および IN2 の細菌叢の経過日変化

Saprospirae 綱と *Sphingobacteria* 綱が RWT2 よりも多く、それぞれ平均 1.6 倍と 2.7 倍であった。これらの細菌種は、RWT1 の微細藻類の成長に貢献している可能性が示唆された。

反対に、IN1 と IN2 の細菌叢では、*Firmicutes* 門（それぞれ門群全体の 29.0％と 28.5％）と *Proteobacteria* 門（門群のそれぞれ 21.5%と 22.3%）が優占していた。流入水中の細菌叢では、これらの門が優占種であることがしばしば示されている [19)、20)]。IN1 に余剰汚泥を追加しても、IN2 との細菌叢の組成の違いには影響がなかったことが示された。

図-7 に、メタンガス発生ポテンシャル試験の結果を示す。夏季の結果は、混合汚泥と微細藻類のみを追加した結果を比較することにより、投入 VS あたりで同等のメタンガスが発生したことが示された。また、夏季のメタンガス発生量は冬季よりも低かった。夏季の消化汚泥のみのメタン発生量は冬の 0.7 倍であった。DS の有機物含有量（VS / TS）は夏季で 70%、冬季で 72%であり、CS の VS / TS は夏季で 82%、冬季で 85%であった。夏季では、DS と CS は冬よりも嫌気性消化の状態がわずかに悪かった。分析はしていないが、夏場の活性汚泥法では生分解しやすい有機物が分解され、冬季に比べて生分解しにくい有機物の量が多かった [21)] ため、夏季の試験において、メタンガス生成量が冬季よりも全体的に少なかったと考えられる。冬季において、混合汚泥の系（DS + CS（10））と、微細藻類のみを添加した系（DS + RWT1A（10）または DS + RWT2A（10））を比較すると、微細藻類のみの系において、投入 VS あたりのメタンガス発生量が多かったことがわかる。しかし、混合汚泥と微細藻類を混合した系（DS + CS（10）+ RWT1A（10）または DS + CS（10）+ RWT2A（10））のメタンガス発生量は、混合汚泥のみの系（DS + CS（20））と同等かそれ以下であった。冬季の RWT1 と RWT2 の結果を比較すると、RWT1 でのメタンガス発生量は、微細藻類のみを追加した場合や、混合汚泥と微細藻類を追加し

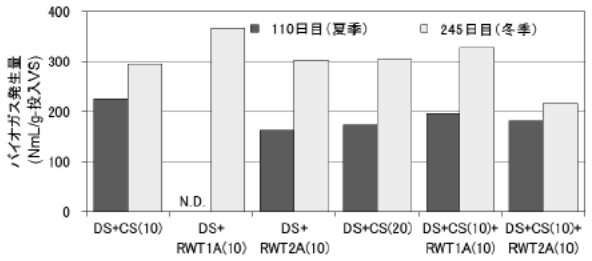


図-7 メタンガス発生ポテンシャル試験の結果

た場合よりも 1.2～1.5 倍高かった。これは、RWT1A が RWT2A より高いメタンガス発生ポテンシャルがあることを示唆している。

図-8 に、メタン発生ポテンシャル試験の終了時の DS + CS に対する溶存 NH_4-N、PO_4-P、および COD 濃度の比率を示す。微細藻類を用いたメタン発生試験において、残存濃度は、微細藻類を含まない試験の 0.8～1.2 倍であった。PO_4-P 濃度は減少する傾向があり、COD 濃度は増加する傾向であった。本研究の微細藻類培養では、初沈流出水と余剰汚泥が使用されたため、微細藻類や微細藻類培養槽による嫌気性消化の排水を活性汚泥処理に戻しても、微細藻類培養システムを導入しない従来の処理に比べて、活性汚泥処理の処理量が増えることはないと想定される。微細藻類の添加により、嫌気性消化排水中の栄養素濃度はわずかに増加する可能性があるが（図-8）、藻類培養後の沈殿槽からの排水中の栄養素濃度は 60%以上減少する可能性がある（図-2）。したがって、活性汚泥法に戻る排水全体の栄養塩濃度はほぼ上昇せず、水処理系への影響は小さいと考えられる。これについては、今後、詳細な分析が必要である。

図-9 に、冬季の実験（238 日）でのメタン発生ポテンシャル試験の開始時の各汚泥の有機酸含有量の比較を示す。DS には有機酸は含まれていないが、CS と RWT1A には酢酸、プロピオン酸、および i-酪酸が含まれており、RWT2A には酢酸のみが含まれていた。他の有機酸はすべての系で検出限界以下であった。また、実験終了時の汚泥では、すべての有機酸は検出限界以下であった。DS + CS (10) と DS + RWT1A (10) の有機酸含有量を比較すると、RWT1A（10）には約 2 倍の酢酸と約 4 倍のプロピオン酸と i-酪酸が含まれていることがわかる。CS と比較して、微細藻類には大量の有機酸が含まれており、バイオガス生産の増加に寄与する可能性が示唆された[22)、23)、24)]。特に、基質に余剰汚泥を添加して培養した RWT1A では効果が顕著であった。また、有機酸の組成は混合汚泥の組成と

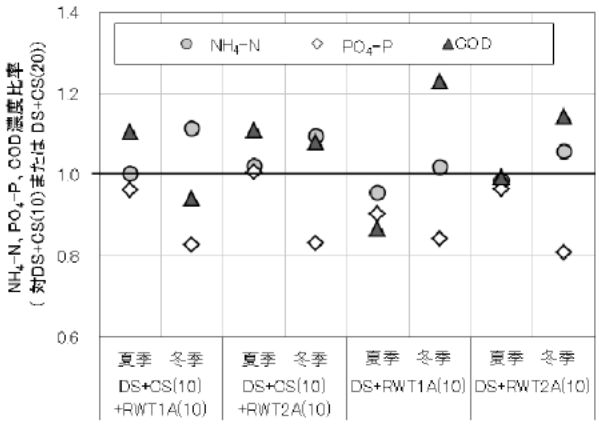


図-8 メタン発生ポテンシャル試験の終了時の DS + CS に対する溶存 NH_4-N、PO_4-P および COD 濃度比率

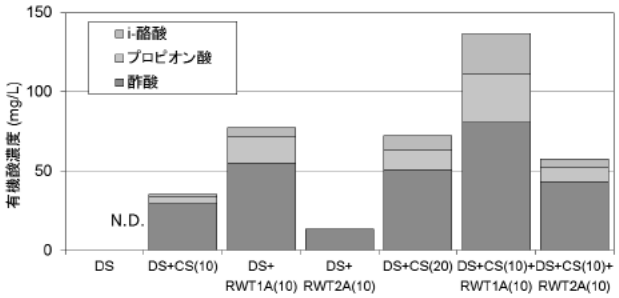


図-9 冬季の実験（238 日）でのメタン発生ポテンシャル試験の開始時の各汚泥の有機酸含有量

ほぼ同じであるため、既存の嫌気性消化に培養微細藻類を追加しても、バイオガス発生には悪影響はないと考えられる。

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

ここでは、汚泥処理工程で発生した汚泥からの分離液を用いて藻類を培養し、エネルギーを回収する手法の開発を目的としている。既存の研究において、嫌気性消化汚泥の脱水分離液を用いた微細藻類培養では、希釈水として最初沈殿池流出水を嫌気的な条件にした部分循環式嫌気性ろ床で生物処理した処理水を用いた。嫌気性消化排水を20～25倍に希釈した培養液を用いたカラム型培養槽による回分式の微細藻類培養では、溶液中の溶解性リン、溶解性窒素をほぼ全量藻類に変換することが可能であることを明らかにした[25)]。

本研究では、嫌気性消化汚泥の脱水分離液による微細藻類培養において、既存の研究よりもより簡易的な運転方法による培養方法の確立を目的とした。上記の分離液は、栄養塩濃度の低減化のため、上澄み液と沈

殿汚泥に分離した。また、希釈水として下水処理場への流入水の使用を検討した。微細藻類の培養は、カラム型培養槽を用いた回分式で行った。

4．1 実験方法

消化汚泥の脱水分離液は、下水処理方式：標準活性汚泥法、汚泥処理方式：中温嫌気性消化を採用しているB下水処理場より採取し用いた。藻類培養は、内径20cm、厚さ1cm、長さ1mの透明アクリル管を鉛直に立て、底面部分に排出口を設けた上部開放型のカラム型藻類培養装置2系列を用い、茨城県つくば市内の温室内で実施した。30 Lのカラム培養槽を用いて、脱水分離液をA処理場の流入水で25倍希釈した系(脱水分離液 4%5L)、脱水分離液のみの系(脱水分離液100%5L)で藻類培養を行った。培養規模を大きくしたこと、屋外の温室内での実験により、気温や光量が一定でないことから、既存の知見[25]に従って藻類培養が確実に行える希釈倍率での培養も比較として行った。

基質、藻類培養液のSS、クロロフィル*a*、有機物含有率(VSS/SS)、CODcr、溶解性リンの溶解性窒素、アンモニア性窒素(NH_4-N)、硝酸性窒素(NO_3-N)、亜硝酸性窒素(NO_2-N)の測定を約1週間に1回程度で適宜測定した。SSはStandard method[11]、クロロフィル*a*は、河川水質試験方法（案)[12]に従い、測定を行った。水質は、いずれも吸光光度計(DR2400，HACH，東亜ディーケーケー株式会社)を用いて測定を行った。クロロフィル*a*の測定では、孔径1.2 μmのGF/Cろ紙(Whatman, USA)で藻類を回収した。その他の水質項目についての溶存態濃度測定の際のろ過は、原則孔径1.0 μmのGF/Bろ紙(Whatman, USA)で行った。屋外の温室内での実験では、任意の水槽に水温計を設置し，水温を常時測定した(SenSu、データテクノロジー株式会社)。外気温は、気象庁よりつくば市の気象データを抽出し、水温との比較を行った[26]。

また、培養藻類はディスクセパレーター(三菱化工機株式会社)による回収実験を行った。ディスクセパレーターに投入された原液は、回転体中に多層に配置されたディスクの穴を通って濃縮液と清浄液に分離され、濃縮液は装置の外側の壁面に付着し、清浄水は、上部から排水される仕組みとなっている(図-10)。回収された培養藻類は、JIS M 8814[27]の手法に従い高位発熱量を測定した。

4．2 結果および考察

図-11に、藻類培養の結果を示す。脱水分離液4%5Lの基質SS濃度は、90 mg/L、脱水分離液100%5Lの

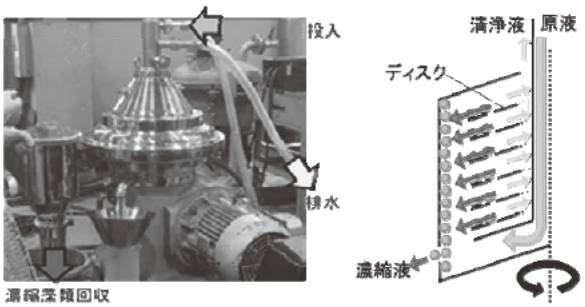


図-10　ディスクセパレーター
（左：全体写真、右：濃縮原理図）

基質SS濃度は、55 mg/Lであった。SSの結果より、どちらの系においても藻類培養が確認されたが、脱水分離液 100%において、培養量が多かった。脱水分離液4%では、1日目に対する8日目のSSが1.9倍であるのに対し、脱水分離液100%では、2.8倍であった。溶解性リンおよびアンモニア性窒素の結果より、脱水分離液4%において、8日目でいずれの除去率も95%であり、栄養塩がほぼ枯渇したことが原因であると考えられる。脱水分離液 100%では、8日目において、溶解性リンの除去率は55%、アンモニア性窒素の除去率は 31%であり、栄養塩は十分に残存していた。CODcrは、脱水分離液100%では上昇がみられた。脱水分離液4%では、CODcrはほぼ変化しなかった。脱水分離液 4%での藻類培養における栄養塩の枯渇およびCODcrの変化は、既存の知見と同様の結果であった[25]。クロロフィル*a*は、いずれの系でも同様の変化であり、1.5 mg/Lから3.5 mg/L程度まで増加した。VSS/SSは、8日目において、1日目と比較してわずかに上昇する傾向を示し、藻類培養による有機物量の増加が確認された。培養期間中の水温は、20℃～35℃程度であり、平均では、26.9℃であった。外気温と比較すると、昼間では10℃程度、夜間でも5℃程度高かった。これは、温室内での培養の効果であるといえる。

脱水分離液 4%の培養藻類について、ディスクセパレーター(三菱化工機株式会社)による回収実験を行った(図-10)。SS濃度175 mg/L、約180 Lの藻類液をディスクセパレーターに投入したところ、65分間でSSが9,800 mg/L、TSが1.0%、VSが0.86%の濃縮液が3.1 L回収できた。このときの排水は、SSが7 mg/Lであり、約96%の藻類を回収することができた。また、消化槽への投入が可能な濃度まで濃縮することができることが確認された。

脱水分離液4%で培養した藻類について、高位発熱量を測定した結果、22.1 MJ/kg-DSであり、未消化の下

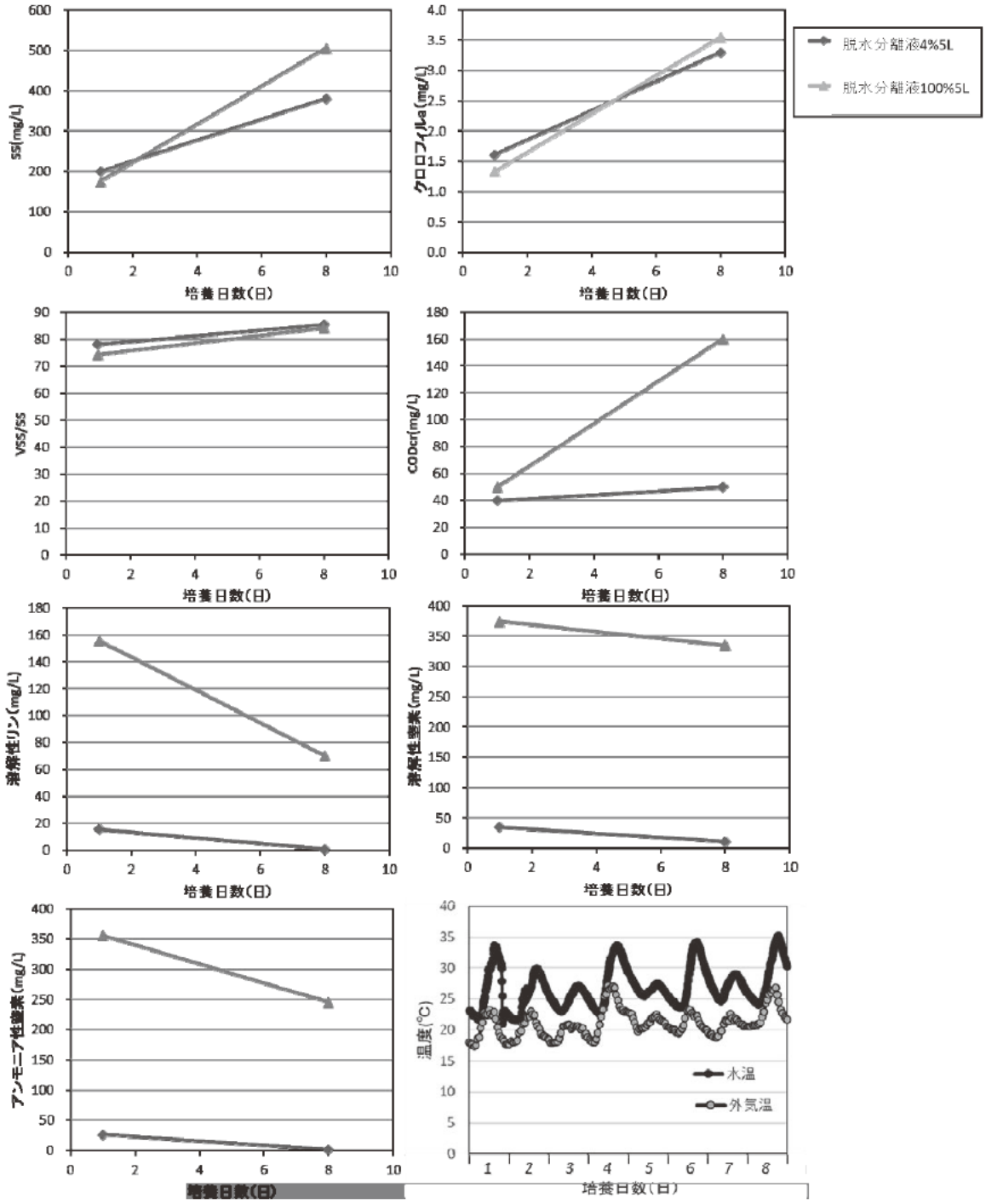


図-11　脱水分離液を用いた藻類培養における SS、クロロフィル a、VSS/SS 、各水質、温度の経時変化

水汚泥の乾燥物(16-20 MJ/kg-DS) よりも高い熱量であることが示された。これらの結果より、屋外に設置した温室内における自然光を用いた30 Lカラムでの藻類培養においても、藻類培養が見込めることが示された。

5. 汚泥分離液処理施設の流入水と処理水を利用した藻類培養技術の開発

ここでは、C処理場の下水汚泥分離液処理施設における流入水および処理水を用いて藻類を培養し、エネルギーを回収する手法の開発を目的としている。汚泥分離液処理施設の流入水、処理水の2018年3月および4月のSS、水質の平均値を、表-2に示す。流入水では、高濃度の窒素やリンが含まれており、藻類培養に有効利用できる可能性がある。しかし、流入水のSSは1,000 mg/L以上であり、光の透過を考慮すると、藻類培養が

表-2 汚泥分離液処理施設の流入水および処理水のSS、水質（2018年3月および4月の平均値）

流入水				(mg/L)
	SS	TN	NH_4-N	TP
3月平均	1,125	350	233	99
4月平均	1,235	373	270	108
処理水				(mg/L)
	SS	TN	NH_4-N	TP
3月平均	18	57	30	45
4月平均	47	42	29	44

難しい可能性がある。そのため、処理水と混合して培養液として使用することで、藻類培養が可能か、調査を行った。

5．1 実験方法

実験Iでは、B処理場の汚泥脱水分離液で前培養した藻類を種藻類として0.5L、汚泥分離液処理施設の流入水(以下、「流入水」)、汚泥分離液処理施設の処理水（以下、「処理水」)、B処理場の汚泥脱水分離液をそれぞれ4.5Lで混合し、藻類培養を行った。25℃程度の実験室内において、植物用蛍光灯4本を照射し、9日間培養を行った。開始時、中間、終了時のSSを測定し、藻類培養が可能か調査した。

次に、実験IIとして、B処理場の汚泥脱水分離液で前培養した藻類を0.5 L、流入水と処理水を0対100、5対95、20対80、60対40で混合した培養液を4.5L混合し、藻類培養を行った。実験Iと同様、25℃程度の実験室内において、植物用蛍光灯4本を照射し、13日間藻類培養を行った。定期的にサンプリングを行い、SS、クロロフィル*a*、溶解性リン、溶解性窒素を測定した。

実験IIIとして、前培養した藻類を0.5L、流入水を60%、処理水を40%の割合で混合した培養液を4.5Lで混合し、エアーと攪拌（300 rpm）の2パターンにおいて、実験I、IIと同様に藻類培養を6日間行った。培養藻類は、C処理場の濃縮汚泥と混合して、C処理場の消化汚泥を用いて、回分式の嫌気性消化を行った。消化汚泥400 ml、濃縮汚泥を消化汚泥のVS（1.9%）の10%、培養藻類を濃縮汚泥のVS（3.9%）の10%で混合し、36℃、21日間の嫌気性消化を行った。また、嫌気性消化後の汚泥の凝集性、脱水ろ液の水質への藻類の影響を調査するために、凝集剤を汚泥のTSに対して1.5%混合し、遠心機による脱水試験（3,000 rpm、10分）を行った。

5．2 結果および考察

実験IのSSの結果を図-12に示す。流入水は、含まれるSS濃度が高く、培養開始時においても700 mg/L以上のSS濃度であった。B処理場の汚泥脱水分離液と比較して、流入水および処理水では、SSの増加がほぼ見られなかった。流入水は、着色がみられたため、光が透過しないことが原因であり、処理水では、窒素とリンの濃度比がほぼ1対1であり窒素が少なく、藻類培養にはあまり適していないことが原因であると考えられる。

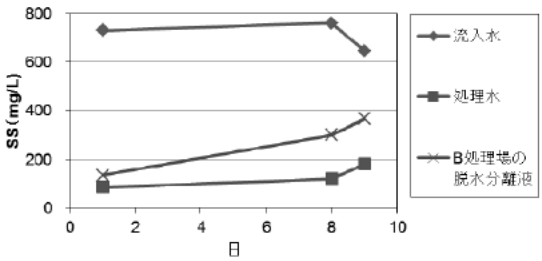


図-12 実験Iにおける藻類培養結果（SS）

実験Iの結果を受けて、実験IIでは、流入水と処理水を混合したものを培養液とし、藻類培養を行った。SS、溶解性リン、アンモニア性窒素の経日変化、および培養1日目と13日目のクロロフィル*a*の結果を図-13に示す。また、培養3日目、7日目、13日目の培養液の様子を図-14に、培養13日目の藻類の顕微鏡写真を図-15に示す。SSの結果より、流入水の混合割合が高い方が、培養開始時のSS濃度も高く、図-14より、培養液の黒色が強いことがわかる。いずれの系においてもSSの増殖は少なからずみられたが、増殖量は、処理水80＋流入水20で最も高く、18 mg/L/日であった。処理水40+流入水60は、増殖量としては10 mg/L/日と処理水80＋流入水20よりも低かったが、最終的なSS濃度としては、490 mg/Lで最も高かった。クロロフィル*a*は、培養1日目において、どの系でも0.5 mg/Lであったが、13日目では、処理水40＋流入水60が最も濃度が高く、7 mg/L程度まで増えており、増殖量としても最も高かった。これは、図-14の写真の緑の濃さからもわかる。また、図-15より、処理水40＋流入水60において、他よりも緑色が強いことがわかる。溶解性リンは、7日目までは全ての系において減少傾向を示したが、その後、処理水80＋流入水20および処理水95＋流入水5の系において、わずかに上昇傾向を示した。処理水40＋流入水60の系では、培養期間中は減少し続け、培養終了時は、55 mg/Lであり、除去率は68%程度であった。表-2の汚泥分離液処理施設の処理水の水質と比較すると、同等レベルまで減少したことが示された。アンモニア性窒素は、いずれの系でも、培養期間中に減少がみられ、13日目では14～29 mg/Lであり、除去率は57～84 %であった。アンモニア性窒素も、処理水と同等

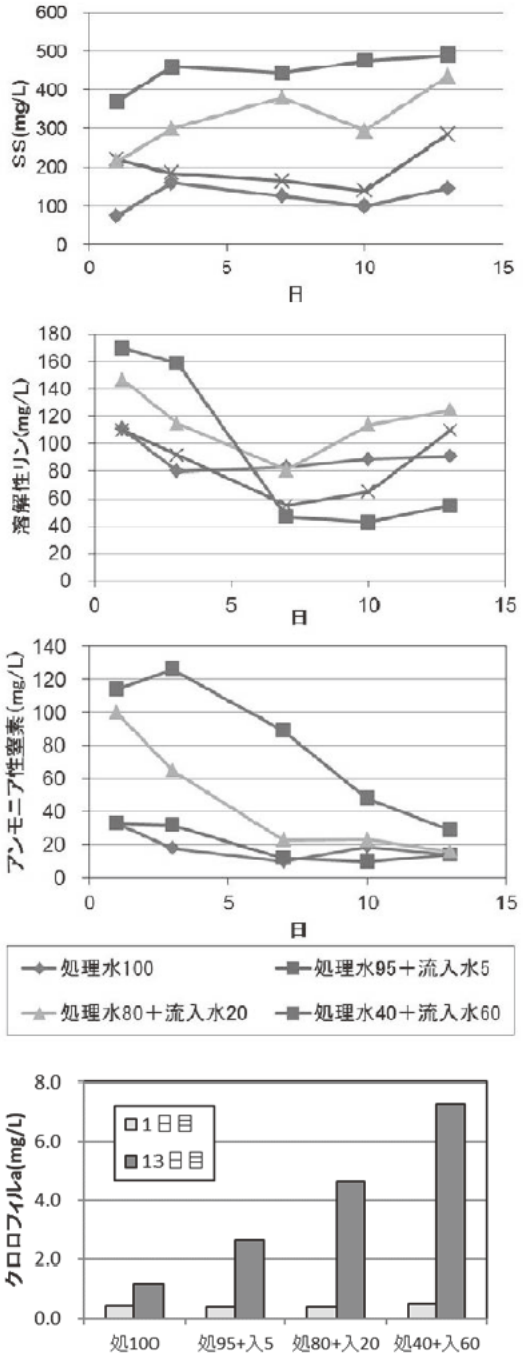


図-13 実験IIにおける藻類培養結果
（溶解性リン、アンモニア性窒素の経日変化
および1日目と13日目のクロロフィルa）

レベル以下まで減少していた。本研究では、クロロフィルa濃度の増加量および溶解性リンやアンモニア性窒素の減少率を考えて、処理水40%および流入水60%での混合による微細藻類培養が最適であると考えた。

以上より、汚泥分離液処理施設の流入水および処理水の混合液は、微細藻類の培養液として利用可能であり、混合割合によっては、藻類培養によって、汚泥分

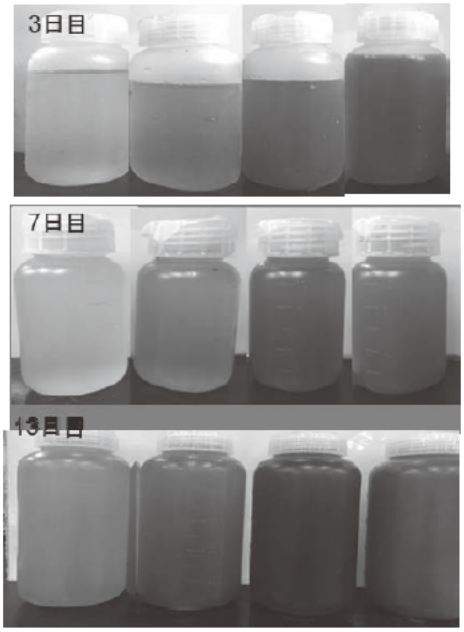


図-14 培養3日目、7日目、13日目の培養液の様子
（左から、処理水100、処理水95＋流入水5、処理水80＋流入水20、処理水40＋流入水60）

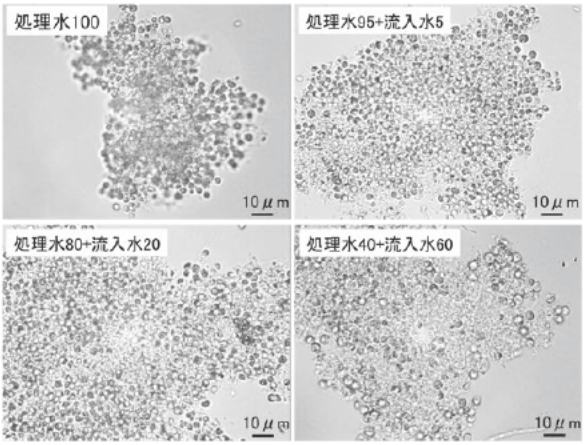


図-15 培養13日目の藻類の顕微鏡写真

離液処理施設の処理水と同等以下のレベルまで栄養塩濃度を減少できる可能性を示した。微細藻類培養に汚泥分離液処理施設の流入水を利用し、処理水以下のレベルまで栄養塩濃度を低下させてから再度処理施設に返流することで、処理施設の処理負荷を下げられる可能性がある。

図-16 に、実験 III における、藻類培養結果（SS）を示す。実験 II と同様、処理水 40＋流入水 60 での培養において、550 mg/L 程度まで SS が増加した。しかし、水温の低さから、藻類の培養状況としては、実験 II よりもよくはなかった。また、実験 III では、攪拌方法として、エアレーションと攪拌での比較を行った

が、同等レベルでの微細藻類培養が確認された。ここで培養した微細藻類を用いて、回分式嫌気性消化の実験を行った。実験に用いた試料の TS、VS を表-3 に示す。藻類の TS、VS は汚泥の 10 分の 1 以下であった。藻類の VS/TS は、攪拌において、エアーよりも高かった。図-17 に、回分式嫌気性消化実験における累積メタンガス発生量を示す。メタンガス発生量は、藻類を投入した系で高くなった。藻類を投入することにより投入 VS 量が約 10%増加し、それにより 21 日間の累積で 10 NmL 以上の増加となった。今回使用した藻類は、培養状況がよくなかったが、藻類は、メタンガス発生の増量に貢献することが考えられる。図-18 に、回分式嫌気性消化実験における投入 VS あたりのメタンガス発生量および VS 分解率を示す。投入 VS あたりのメタンガス発生量や VS 分解率は、汚泥のみ、汚泥＋藻類では同程度であった。この結果により、藻類が持つメタンガス発生ポテンシャルは、汚泥と同程度であることが考えられる。

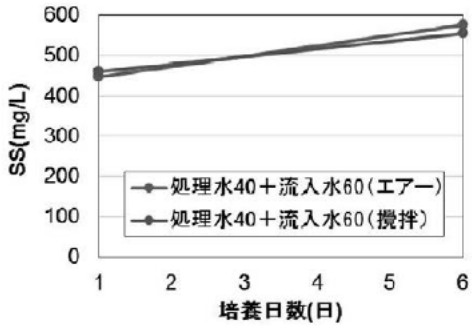


図-16 実験 III における藻類培養結果（SS）

表-3 回分式嫌気性消化実験に用いた試料の TS および VS

表-3 回分式嫌気性消化実験に用いた試料のTSおよびVS

試料	TS(%)	VS(%)	VS/TS
C処理場の消化汚泥	3.23	1.91	59.1
C処理場の濃縮汚泥	4.55	3.93	86.4
処理水40＋流入水60(エアー)	0.287	0.194	67.6
処理水40＋流入水60(攪拌)	0.322	0.24	74.5

表-4 回分式嫌気性消化実験における汚泥と藻類の混合条件

名称	消化汚泥		濃縮汚泥	藻類	投入全VS(g)	全VS(g)
	ml	投入gVS	投入gVS	投入gVS		
濃縮汚泥のみ	400	7.64	0.76	－	0.76	8.40
汚泥+藻類(エアー)	400	7.64	0.76	0.08	0.84	8.48
汚泥+藻類(攪拌)	400	7.64	0.76	0.08	0.84	8.48

※滅菌水で500mlにメスアップ

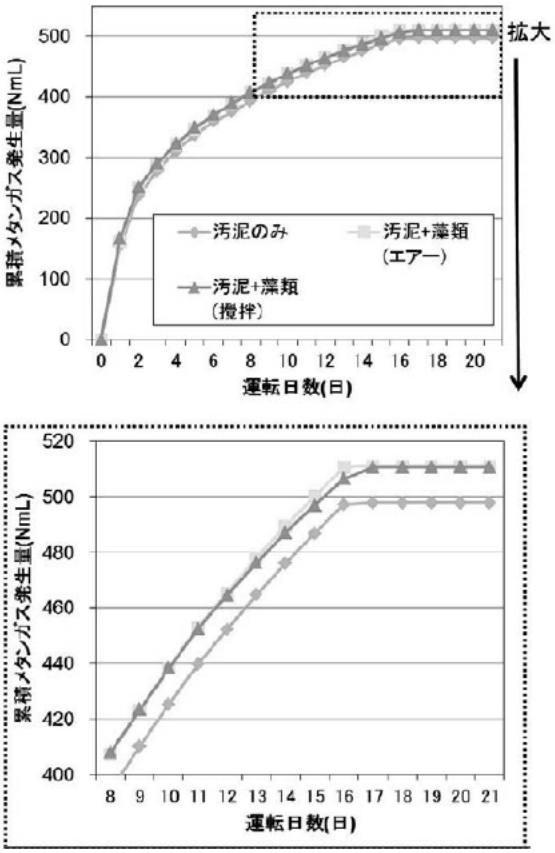


図-17 回分式嫌気性消化実験における累積メタンガス発生量

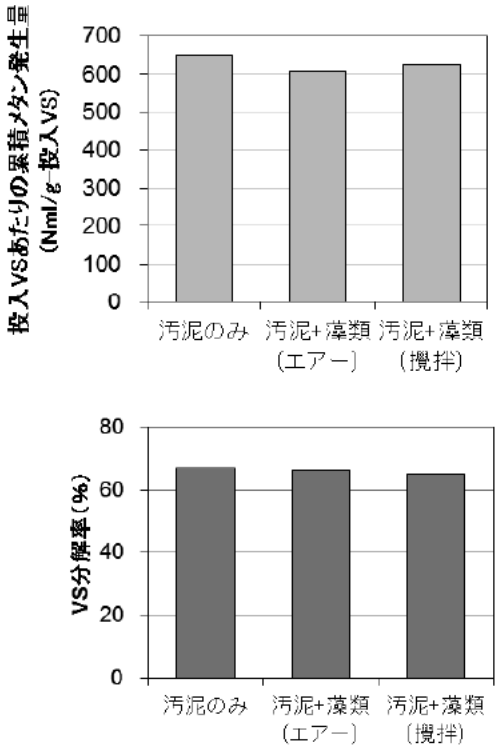


図-18 回分式嫌気性消化実験における投入 VS あたりのメタンガス発生量および VS 分解率

図-19 には、回分式嫌気性消化実験の運転開始時および終了時の溶解性リンおよびアンモニア性窒素の変化を示す。溶解性リン、アンモニア性窒素ともに、汚泥のみと汚泥＋藻類で、ほぼ同程度であった。藻類を混合して嫌気性消化することで、藻類からのリンの溶出量の増加が懸念されたが、藻類中のリンは、汚泥内にとどまる分が多く、溶出量の増加にはそれほど影響がないことが示唆された。

表-5 に、回分式嫌気性消化後の汚泥の脱水試験結果を示す。嫌気性消化後の TS、脱水ケーキの TS、VS、VS/TS は、汚泥のみ、汚泥＋藻類で、いずれもほぼ同程度であった。ろ液の SS、COD は、藻類を混合することでわずかに上昇したが、リン、窒素は、ほぼ同程度であった。藻類を混合して嫌気性消化を行うことで、脱水への影響、脱水ろ液中のリン濃度の上昇が懸念されたが、影響はほぼないと考えられる。

今後は、スケールアップして培養した藻類や、屋外で培養した藻類に対して、嫌気性消化への投入の有用性や脱水ろ液への影響等の調査を行う必要がある。また、今回の嫌気性消化実験では、秋季での短期間培養での藻類を用いたため、水温や光量、培養期間を最適にした場合の培養藻類を用いた消化実験を行う必要がある。また、連続運転によるメタンガス発生量への影響調査が必要である。

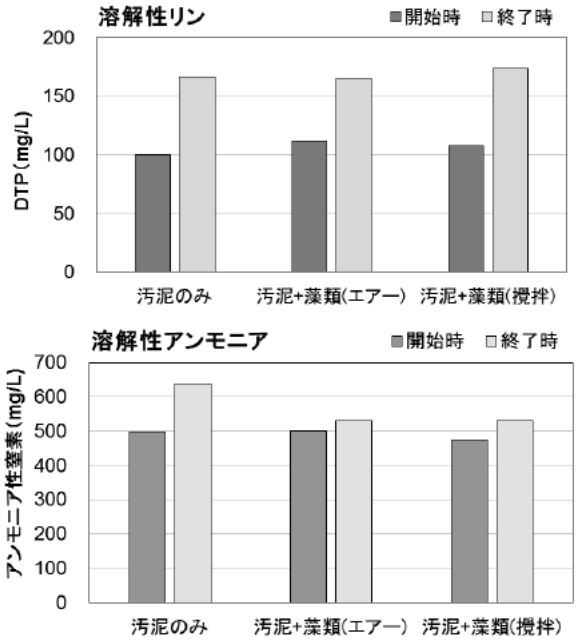


図-19 回分式嫌気性消化実験の
運転開始時および終了時の水質の変化

表-5 回分式嫌気性消化後の汚泥の脱水試験結果

試料	嫌気性消化後の汚泥のTS(%)	脱水ケーキ		
		TS	VS	VS/TS
		%	%	
汚泥のみ	1.9	14	11	77
汚泥+藻類(エアー)	1.9	16	13	80
汚泥+藻類(撹拌)	1.9	13	10	76
試料	上澄みSS,水質			
	上澄みSS	COD	全リン	アンモニア性窒素
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
汚泥のみ	100	292	119	464
汚泥+藻類(エアー)	120	378	118	448
汚泥+藻類(撹拌)	141	296	121	415

＊凝集剤1.5%

6. まとめ

令和元年度には、下水を利用した藻類培養の高効率化技術の開発、培養藻類の回収技術、汚泥処理工程で発生する排水、汚泥分離液処理施設での流入水および処理水を利用した藻類培養技術の開発について調査した。以下に、得られた成果を示す。

1. 屋外に設置した 380L レースウェイ培養槽において、最初沈殿池流出水および余剰汚泥との混合液を用いて、微細藻類培養を 8 か月間実施し、培養基質の影響を調査した。その結果、余剰汚泥を基質に添加すると、基質 SS 濃度が 2 倍に増加し、培養槽内の SS は、最初沈殿池流出水のみよりも高くなり、沈殿槽で回収された微細藻類量は、約 2 倍に増加することが示された。
2. 藻類培養において、最初沈殿池流出水や余剰汚泥を用いることで、沈殿池における沈降性が良好となり、排水中の SS および水質のレベルが低下することが示された。
3. 余剰汚泥を混合した系における微細藻類の培養では、混合していない系と比較して、培養中の動物プランクトンが増加した。また、MGPB（microalgae growth-promoting bacteria）による藻類培養量の増加の可能性も示された。
4. 採取した微細藻類を用いたメタン発生ポテンシャル試験では、微細藻類に混合汚泥と同等以上の有機酸が含まれており、メタン発生量の増加に寄与する可能性が示された。これらの影響は、余剰汚泥を混合して培養した系において、顕著にみられる結果であった。
5. 汚泥処理工程で発生する排水を用いた微細藻類培養において、脱水分離液を処理場流入水で 25 倍希釈した系および脱水分離液のみの系で藻類

培養を行った結果、SS の増加量は脱水分離液のみの系で高く、クロロフィル *a* 濃度は、同程度に増加したことから、脱水ろ液を希釈せずに用いた藻類培養が可能であることが示された。

6. ディスクセパレーターによる回収実験を行ったところ、約 96%の藻類を回収することができた。また、消化槽への投入が可能な濃度まで濃縮することができることが確認された。脱水分離液 4%で培養した藻類について、高位発熱量を測定した結果、22.1 MJ/kg-DS であり、未消化の下水汚泥の乾燥物(16-20 MJ/kg-DS) よりも高い熱量であることが示された。
7. 汚泥分離液処理施設の流入水と処理水による微細藻類培養が可能か調査を行った結果、流入水や処理水のみでの藻類培養は難しいが、流入水と処理水を混合して培養液とすることで、藻類培養が可能であることが示された。本研究の範囲では、処理水 40%と流入水 60%での混合が、SS 濃度、クロロフィル *a* の増加量、アンモニア性窒素や溶解性リンの除去率の観点から、最適混合割合であることが示された。
8. 汚泥分離液処理施設の処理水 60%と流入水 40%で混合した培養液を用いて、エアーと攪拌機による攪拌で藻類培養を行い、培養後の培養藻類を、同施設の濃縮汚泥と混合し、回分式の嫌気性消化を行った。メタンガス発生量は、藻類を混合することで増加することが示された。VS あたりのメタンガス発生量、VS 分解率は、汚泥のみと汚泥＋藻類でほぼ同程度であり、藻類が持つメタンガス発生ポテンシャルは、汚泥と同等であることが示唆された。
9. 汚泥分離液処理施設の処理水 60%と流入水 40%で混合して培養した藻類を用いた嫌気性消化において、消化後の汚泥の脱水試験を行った結果、脱水ろ液の水質は、汚泥のみ、汚泥＋藻類でほぼ同程度であり、藻類を混合して嫌気性消化を行った場合のろ液への影響は、今回の実験結果からは、ほぼないものと考えられた。

参考文献

1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道政策研究委員会 報告書 新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～、2014
2) J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton: Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond, Water Research, Vol.45, pp.6637-6649, 2011
3) S. Chinnasmy, A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das: Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biodiesel application, Bioresource Technology, Vol.101, pp.3097-3105, 2010
4) S. Cho, T.T. Luong, D. Lee, Y.K. Oh. T. Lee: Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production, Bioresource Technology. Vol.102, pp.8639-8645, 2011
5) E.B. Sydney, T.E. da Silva, A. Tokarski, A.C. Novak, J.C. de Carvalho, A.L. Woiciecohwski, C. Larroche, C.R. Soccol: Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. Applied Energy. Vol.88, No.10, pp.3291-3294, 2011
6) 鈴木秀幸ら：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、pp.184-186、2016
7) 国立研究開発法人土木研究所：下水道を核とした資源回収・生産・利用技術に関する研究、平成 27 年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4347 号、pp.26-51、2017
8) 岡安祐司、山﨑廉予、桜井健介、重村浩之：下水汚泥の嫌気性消化脱離液を用いた藻類培養における水理学的滞留時間の影響について、第52回日本水環境学会年会講演集、p.160、2018
9) 山﨑廉予、重村浩之：下水を用いた自然発生型藻類培養技術の検討、第 21 回水環境学会シンポジウム、pp.84-85、2018
10) 国立研究開発法人土木研究所：下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究、平成 30 年度研究開発プログラム報告書、2019
11) American Public Health Association Publication (APHA)：Standard methods for the examination of water and wastewater, nineteenth ed. Washington, DC, USA, 2005
12) 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
13) Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, FO.：Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic. Acids. Res.*, Vol.41, pp.1-11, 2013

14) Edgar R.: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics*, Vol.26, No.19, pp.2460-2461, 2010

15) Su, Y., Mennerich, A. : Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios, Bioresour. Technol., Vol.105, pp.67-73, 2011

16) Manheim, D., Nelson, Y. : Settling and bioflocculation of two species of algae used in wastewater treatment and algae biomass production, Environ. Prog. Sustain. Energy., Vol.32, No.4, pp.946 - 954, 2013

17) 山﨑 廉予、重村 浩之：下水汚泥を利用した自然発生微細藻類培養の効率化の検討、環境工学研究論文集、Vol.74、No.7、pp.73-81、2018

18) Toyama, T., Kasuya, M., Hanaoka, T., Kobayashi, N., Tanaka, Y., Inoue, D., Sei, K., Morikawa, M., Mori, K. : Growth promotion of three microalgae, Chlamydomonas reinhardtii, Chlorella vulgaris and Euglena gracilis, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent, Biotechnol. Biofuels., Vol.11, 176, 2018

19) Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H.P., Greenwood, A.D. : Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing, Sci. Rep., Vol.9, 9673, 2019

20) Ghaju, S. R., Sherchan, S.P., Kitajima, M., Tanaka, Y., Gerba, C.P., Haramoto, E. : Reduction of Arcobacter at Two Conventional Wastewater Treatment Plants in Southern Arizona, USA. Pathogens. Vol.8, 175, 2019

21) LI, Y., NOIKE, T. : Characteristics of the degradation of excess activated sludge in anaerobic acidogenic phase, Japan journal of water pollution research, Vol.10, No.12, pp.729-740, 1987

22) Catalanotti, C., Yang, W., Posewitz, M.C., Grossman, A.R. : Fermentation metabolism and its evolution in algae, Front Plant Sci., Vol.4, 150, 2013

23) Lowe, J., Siewert, A., Scholpp, A., Wobbe, L., Groger, H. : Providing reducing power by microalgal photosynthesis: a novel perspective towards sustainable biocatalytic production of bulk chemicals exemplified for aliphatic amines, Sci. Rep., Vol.8, 10436, 2018

24) Magdalena, J.A., Gonzalez-Fernandez, C. : Microalgae Biomass as a Potential Feedstock for the Carboxylate Platform, Molecules, Vol.24, No.23, 4404, 2019

25) 岡安祐司、山﨑廉予、重村浩之：消化汚泥の脱水分離液を用いて培養した藻類の燃料化物としてのポテンシャルについて、環境システム計測制御学会誌、Vol 23、No.2/3、pp. 94-100、2018

26) 気象庁：気象庁ホームページ、https://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php (2019/12閲覧)

27) 日本工業標準調査会：石炭類及びコークス類—ボンブ熱量計による総発熱量の測定方法及び真発熱量の計算方法、JIS M 8814、2003

河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用に関する研究

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 28～令 2
担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）
研究担当者：重村浩之、宮本豊尚、山﨑廉予

【要旨】
下水道施設を活用したバイオマスの資源・エネルギー有効利用方法の開発を目指し、河川・道路等の管理で生じる草木バイオマスを下水処理場内で利用する方法に関して調査・研究を行った。剪定枝等の草木系バイオマスを下水汚泥焼却炉で補助燃料として活用する技術について、実際の処理場を対象に、混焼可能な草木系バイオマス量を算出し、それらを下水汚泥と混焼することによる焼却灰への影響や経済性について試算した。パイロットスケールの圧入式スクリュープレス脱水機を用いて、イネ科の刈草、クロマツの剪定枝、竹粉と、消化汚泥の混合脱水試験を行い、下水処理場外で焼却処分した場合における、汚泥処分費の試算を行った。その結果、最適薬注率では、バイオマス混合脱水において、脱水ケーキの含水率が 1.5～14 ポイント低減することが示され、脱水後の湿ケーキ量は､バイオマス添加により減少することが示された｡また､汚泥処分費は､汚泥への薬注率を 1.76%とし、松および草を 10%程度混合した場合、脱水ケーキの処分費がバイオマスを混合しない場合と比較して 2～6%減少することが示された。
キーワード：バイオマス、剪定枝、刈草、下水汚泥焼却補助燃料、汚泥脱水助剤

1.　はじめに

下水道整備の進展にともない、平成 30 年度末時点で下水道人口普及率は約 79.3%、管路延長は約 48 万 km、処理場数は約 2,200 箇所など下水道ストックは増大してきた [1]。循環型社会形成推進基本計画（平成 25 年 5 月、閣議決定）[2]では、「循環資源・バイオマス資源のエネルギー源への利用」のために、下水処理場を地域のバイオマス活用の拠点としてエネルギー回収等を行う取り組みを推進する方向性が示されている。また､国土交通省河川砂防技術基準維持管理編（河川編）[3]では、伐木や刈草について、リサイクル及びコスト縮減の観点から有効利用に努めることとされるなど、河川事業等で発生するバイオマスも有効利用が求められている。

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

2.　剪定枝を木質バイオマスとして下水汚泥焼却炉で活用する技術の検討

過年度 [4]示したように、河川、道路、公園、ダムなどの管理のため日頃より剪定枝が発生しており、収集体制が確立していることから、剪定枝は比較的利用しやすいバイオマスであると考えられる。これらで発生した剪定枝等の草木系バイオマスを、下水汚泥焼却炉における補助燃料として利用できれば、地球温暖化対策として貢献可能と考えられる。しかし、剪定枝は含水率が 45%-59%(湿量基準)[5]程度であり、補助燃料として活用する際は、チップを乾燥して利用するのが望ましいと考えられる。一方、実処理場において導入を考える場合、既存の施設を評価し、最大限活用することが重要である。

そこで令和元年度は、下水汚泥焼却炉における剪定枝等の補助燃料利用システムについて、実施設への導入手法や課題抽出を行うため、A 市の B 処理場をモデルに検討を行った。

A 市では、2 つの下水処理場の汚泥を集約し、B 処理場で汚泥の集約処理を行っている。汚泥処理プロセスは初沈汚泥を重力濃縮、余剰汚泥を機械濃縮し、中温消化後に脱水を行い、全量を焼却処理している。また、助燃材としては消化ガスを使用している。

供用中の焼却炉は 2 号炉（50t-wet/日）、3 号炉（100t-wet /日）、4 号炉（70t-wet /日）の 3 基である。現状発生する脱水汚泥は約 120t-wet /日であるた

め、2 号炉と 4 号炉を同時に運転すると効率が良い。しかし定期点検等で 2 号炉もしくは 4 号炉を休ませるときは 3 号炉を運転する必要があり、このときは設計値に対して 70%～80%の負荷となっている(表-1 参照)。消化ガスは焼却炉の助燃材・消化槽の加温として利用しているほか、余剰の消化ガスを用いた消化ガス発電も行っている。

混焼の検討にあたっては、既存施設の最大活用のため、し渣の混焼ラインからの剪定枝等の供給を想定した(図-1 参照)。し渣ホッパの容量は 10m³ であり、3 号炉のし渣搬送能力の設計値は 300kg/h である。

表-1　B 処理場の各焼却炉における処理状況

組合せ	運転日数	平均処理量(t/日)	設計値に対する割合
2号炉	184	39.8	79.6%
3号炉		81.7	81.7%
2号炉	219	47.9	95.7%
4号炉		69.2	98.8%
3号炉	44	72.2	72.2%
4号炉		59.1	84.4%

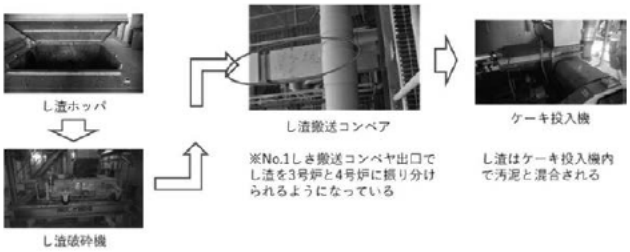


図-1　し渣の混焼ライン構成機器

2．1　方法

2．1．1　A 市の草木系バイオマス発生量

A 市では、一般家庭から発生する刈草・剪定枝は資源ごみとして回収され、処理されている。また、建設部局で管理する河川敷や道路、公園等の公物から発生する刈草や剪定枝についても収集後、市内にて破砕され、主に市外で有効利用が図られている。そこで A 市の全部局に対してアンケート調査を実施し、平成 30 年度の公共事業由来及び一般家庭から回収されたバイオマス量を整理した。

2．1．2　B 処理場における混焼可能量の検討

相対的に運転日数の多い 2 号炉＋3 号炉における運転条件下において、混焼可能な草木系バイオマス量の検討を行った。投入汚泥の条件は現状での同運転条件における投入量とした。混焼可能量を決定する因子として、①焼却炉熱負荷量と②バグフィルタの容量を設定した。焼却炉熱負荷量とは、焼却炉に投入可能な熱量のことで、過負荷となると施設の損傷につながる。また、バグフィルタの容量を超えると、集塵能力を超えてしまい、ばい煙の問題が生じる。

①焼却炉熱負荷量

焼却炉熱負荷量による草木系バイオマスの供給可能量は、近似的に次式で評価できるとする。

焼却炉熱負荷量 ≧
　下水汚泥供給量 × 下水汚泥低位発熱量
　＋消化ガス供給量 × 消化ガス低位発熱量
　＋草木系バイオマス供給量
　　× バイオマス低位発熱量
　＋燃焼用乾き空気の保有熱量
　＋燃焼用空気中の水分が保有する潜顕熱量

②バグフィルタの容量

バグフィルタの容量による草木系バイオマスの供給可能量は、次式で評価できる。なお、消化ガス中には灰分がほとんど含まれていないため、バグフィルタの容量に影響しないと仮定した。

バグフィルタ容量 ≧
　下水汚泥供給量 × 汚泥中の灰分
　＋バイオマス供給量 × バイオマス中の灰分

2．1．3　焼却灰の性状変化に関する検討

流動焼却炉の出側における焼却灰の付着、堆積に起因し、排ガス流路の詰りや亀裂発生が生じる事例が報告されている [5]。これは焼却炉内で焼却灰の少なくとも一部が溶融して粘着性が生じ、粘着性により焼却灰が排ガス流路壁面などに付着し、さらに焼却灰粒子同士が粘着して、堆積してしまうためと考えられている [6]。バイオマス等の混合焼却により焼却灰の性状は変化するため、机上検討により、これらの事象の発生可能性について検討を行った。

検討にあたっては特許：第 5711348 号 [6]の手法を用いた。本法は、脱水汚泥中に含有される各成分の割合を mol 換算して求めた下記のリンに対する総塩基比 X1 もしくは X2 が 1.05 以上であれば、840～900℃の温度域において焼却灰が溶融しにくくなり、より確実かつ安定して付着、堆積を防止し得るというものである。

$$X1=\{Na(mol)+K(mol)+Ca(mol\times 2)+Mg(mol\times 2)+Al(mol\times 3)+Fe(mol\times 3)\}/P(mol\times 3)$$

$$X2=\{Na(mol)+K(mol)+Ca(mol\times 2)+Mg(mol\times 2)+Al(mol\times 3)+Fe(mol\times 3)+Cu(mol\times 2)+Zn(mol\times 2)+Ba(mol\times 2)\}/P(mol\times 3)$$

草木系バイオマスの混焼により、カリウムの増加やリン濃度の低下が期待される一方で、バイオマスに付着している砂分から供給されるケイ素の影響により、X1 及び X2 の値が変化することが見込まれる。

2．1．4　経済性の試算

本システムの導入に伴う経済性のうち、電力について試算を行った。

混焼に必要なし渣混焼系の補器類を動作するのに必要なコンベア等の電力量（合計 12.9kW）を定格の 8 割と仮定して計算した。混焼にともない余剰となった消化ガスによる発電量を計算し、電力単価を乗じて電気料金を想定した。電力単価は簡易計算のため 15 円/kWh と仮定した。また消化ガス発電による発電量は、B 処理場の実績から 1.9kWh/Nm³ とした。

2．2　結果と考察

2．2．1　A 市の草木系バイオマス発生量

平成 30 年度に A 市で発生する草木系のバイオマスのうち、公共事業に由来するものが年間約 6400t、家庭由来が年間約 4500t 回収されていた。月別では、1 月～3 月に家庭から発生するバイオマスは減少しているが、この時期の公共事業由来のバイオマス発生量は継続して 400wet-t/月以上となっている。逆に公共事業由来のバイオマスが減少する 4 月は家庭からの回収量が多くなっている。そのため、両者を組み合わせることで、年間を通じて安定的に 400wet-t/月以上を維持することが可能となる(図-2 参照)。

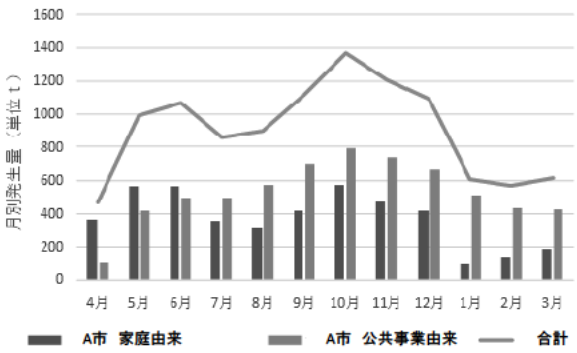


図-2　A 市における月別の草木系バイオマス発生量

2．2．2　B 処理場における混焼可能量の検討

3 号炉の焼却炉熱負荷量 28,753 MJ/h、バグフィルタの容量は 263kg /h（乾灰として）である。また、焼却炉の燃焼温度を 850℃程度、空気過剰率を 30%、空気温度を 20℃、余熱後の空気温度を 650℃と仮定する。

また脱水汚泥の供給量は 81.7t/日と設定し、脱水汚泥と草木系バイオマスの計算諸元は表-2 に示す。

表-2　脱水汚泥と草木系バイオマスの計算諸元

			脱水汚泥	草木系バイオマス
含水率		%	78	50
可燃分率		%	70	78.9
高位発熱量		KJ/kg-DS	16400	17500
可燃分組成	C	%-VS	50.9	59.9
	H	%-VS	8.7	7
	N	%-VS	7.9	1.2
	S	%-VS	1.2	0
	O	%-VS	31.4	31.9
可燃分の理論乾き燃焼空気		kg/kg	7.54829	7.92262

①焼却炉熱負荷量から求められる上限値

概ね焼却炉における入熱と出熱が等しくなる自燃に達するのは、草木系バイオマスを 20wet-t/日混焼する場合であった。このとき汚泥から供給される熱量は、$81.7\times(1-0.78)\times16400\div24=1.23\times10^4$MJ/h、草木系バイオマスから供給される熱量は $20\times(1-0.50)\times17500\div24=7.22\times10^3$MJ/h である。

また、汚泥の理想燃焼空気量が $81.7\times(1-0.78)\times0.70\times7.54829\div24=3.96$t/h、草木系バイオマスの理想燃焼空気量は $20\times(1-0.50)\times0.789\times7.92262\div24=2.60$t/h であることから、供給される燃焼用空気は $(3.96+2.60)\times1.3=8.53$t/h となる。空気の供給熱量の基準温度を 20℃とし、一般的な予熱後の空気温度である 650℃から標準温度 20℃の平均的な乾燥空気の比熱については、アメリカ国立標準技術研究所（NIST）が公開している窒素、酸素、アルゴンの近似式 [7),8),9)] から計算した。まず各分子の 650℃と 20℃の比熱を求めたのち、乾燥空気の組成（質量比）を勘案して 650℃及び 20℃の乾燥空気の比熱を求め、最後にこの二つを単純平均して求めた。その結果、燃焼用乾き空気の保有熱量は、$8.53\times(650-20)\times1.066=5.73\times10^3$MJ/h となる。

続いて、空気中の水分量を 0.01kg-H_2O/kg-DA（20℃で相対湿度が約 70%）と仮定 [10)] とすると、燃焼用空気中の水分は$8530\times0.01=85.3$kg/h である。650℃から 20℃の平均的な水蒸気の比熱は空気と同様に NIST の近似式[11)]（20℃については外挿）から平均して求め、潜熱については飽和蒸気表 [12)] より求めた。その結果 650℃で予熱された空気中の水分の供給熱量は

0.0853× ((650-20)×2.052+2453)=320MJ/h となる。その結果総入熱量は $1.23\times10^4+7.22\times10^3+5.73\times10^3+320=2.56\times10^4$ MJ/h となる。

ここで、焼却炉熱負荷量と総入熱量を比較すると 28,753＞2.56×10^4MJ/h となり、バイオマス混焼量が 20wet-t/日であっても焼却炉熱負荷量には余裕がある。すなわち焼却炉の熱負荷量の限界までバイオマスを混焼する場合、その量は 20wet-t/日以上となることが分かった。

②バグフィルタの容量から求められる上限値

単位時間当たりの脱水汚泥の供給量は 81.7wet-t/日としているため、供給汚泥中の灰分量は表-2 の諸元より81.7×(1-0.78)×(1-0.70)=5.39dry-t/日となる。バグフィルタの容量は 263kg/h=6.31t/日であることから、容量の範囲内で供給可能なバイオマスは (6.31-5.39)÷(1-0.50)÷(1-0.789)=8.7wet-t/日となる。

③混焼可能量

①と②及びし渣の搬送能力から、本条件における 3 号炉での混焼可能量はし渣の搬送能力（300wet-kg/h= 7.2wet-t/日）が限界値となる。実際には B 処理場では一日あたり 1.2wet-t のし渣を焼却処分していることから、バイオマスの混焼可能量は 6.0wet-t/日である。

また、3 号炉＋4 号炉の運転では、3 号炉への汚泥供給量が 72.2t/日と 2 号炉＋3 号炉の運転と比べて減少するため(表-1 参照)、焼却炉熱負荷量及びバグフィルタの容量から求められる上限値は大きくなる。その結果、この場合においても、バイオマスの供給能力が混焼可能量の上限を規定する因子となる。

2．2．3　焼却灰に与える影響

検討の対象とした汚泥は混合汚泥（消化汚泥：初沈重力濃縮汚泥＝7：3）であり、これは実処理場で現在焼却に供されている比率と同等とした。また検討に使用した混合汚泥と草木系バイオマスの組成は ICP 法により分析を行い、表-3 に示す組成であった。

バイオマス添加に伴いリン濃度が低下するため、指標の分母が小さくなる。そのためリンに対する総塩基比は 1.5 以上となり本条件において焼結による閉塞等の問題が発生しないと考えられる。ただし、温度域によっては灰の溶融等が発生する可能性があるため、実際の実験等により確認を行う必要がある。

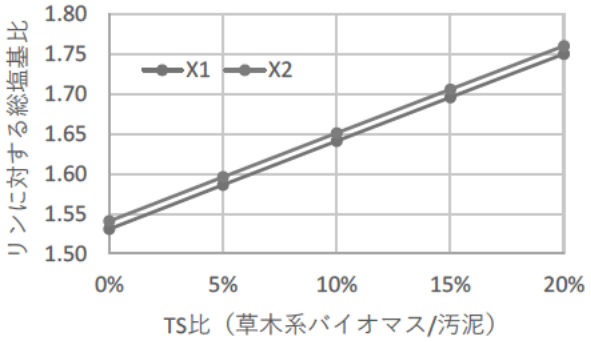


図-3　バイオマス混合比率とリンに対する総塩基比

2．2．4　経済性の検討

バイオマスの購入量を 2.2.2 で求めた最大混焼可能量 6.0wet-t/日とすると、消化ガスの消費量を約 1,500Nm³/日削減することができ、この余剰ガスで一日あたり1500×1.9=約 2800kWh の発電が可能となった。一方でし渣混焼系の補器類の動作に必要な電力量は一日あたり6.0÷0.3×12.9×0.8=約200 kWh となり、消費される電力以上の発電が見込まれる結果となった。この効果は年間約 14 百万円となる。ただし詳細な検討についてはバイオマスの購入費・輸送費・灰処分費についても考慮する必要がある。

なお、6.0wet-t/日の混焼をする場合、一年間では約 2,200wet-t/年のバイオマスを消費することになる。これはA 市で発生している草木系バイオマスの約 2 割相当となる。

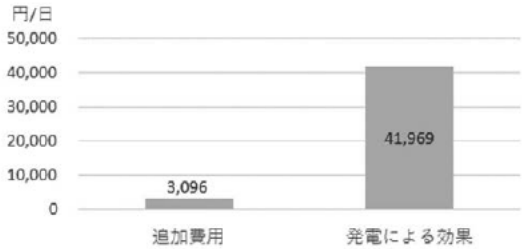


図-4　混焼による追加経費と発電による効果の試算

2．3　結論

本稿では、剪定枝等の草木系バイオマスを下水汚泥

表-3　混合汚泥と草木系バイオマスの組成　(%-dry)

	Na	K	Ca	Mg	Al	Fe	Cu	Zn	Ba	P
混合汚泥	0.29	0.63	0.93	0.53	0.74	2.6	0.010	0.022	0.083	2.3
草木系バイオマス	0.05	0.66	1.6	0.23	0.93	0.80	0.002	0.006	0.004	0.12

焼却炉で補助燃料として活用する技術について、実際の処理場を対象に、混焼可能な草木系バイオマス量を算出し、それらを下水汚泥と混焼することによる焼却灰への影響や経済性について試算した。得られた結論は、以下の通りである。

A) A 市では公共由来のバイオマスが年間約 6,400t、家庭由来のバイオマスが年間約 4,500t 回収されていた。両者の発生量の傾向が異なるため、組み合わせることで安定したバイオマスの確保が可能となる。

B) B 処理場の 100t/日炉についてバイオマスの混焼可能性について検討を行った。し渣の混焼ラインからのバイオマス供給を考えたとき、混焼能力の限界値は、焼却炉熱負荷量とバグフィルタの容量、混焼ラインの供給能力から、6wet-t/日が上限値となった。

C) B 処理場と検討に使用した草木系バイオマを混焼した場合、焼却灰中のリンに対する総塩基比は 1.5 以上となり焼結による閉塞等の問題は発生しないと考えられる。

D) 6.0wet-t/日の混焼を行う場合、消化ガスの消費量を約 1,500Nm^3/日削減し、余剰ガスで約 2,800kWh の発電が可能となった。電気料金の削減額は年間約 14 百万円となったが、バイオマスの購入費・輸送費・灰処分費についても考慮する必要がある。

3. 草木系バイオマスを汚泥脱水助剤として適用する技術

1. で示した課題について、河川等で発生する刈草等の草木系バイオマスを下水道事業で受け入れ、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、草木系バイオマスのリサイクルシステムの確立が可能となる。

平成 28 年度の研究において、裁断したイネ科の刈草を様々な性状の汚泥と混合し、汚泥の脱水性が向上するか否か、実験室レベルで遠心脱水試験を行った。その結果、刈草の混合により、脱水時の汚泥の含水率の低減化が見込まれることが明らかとなった[13]。また、平成 29 年度には、本研究提案技術を導入した際の河川事業における刈草処分費、下水処理場における汚泥処分費の試算を行い、経済的な有意性の有無を検証した結果、河川事業における刈草処分費は、焼却処理するよりも破砕処理後に下水処理場へ受け渡す方が削減できる可能性が示された。下水道事業における汚泥処分費は、下水処理場外での焼却処分を想定した場合、凝集剤1.0%、刈草10%を混合して脱水を行うことで、汚泥処分費が削減できる可能性が示された[14]。

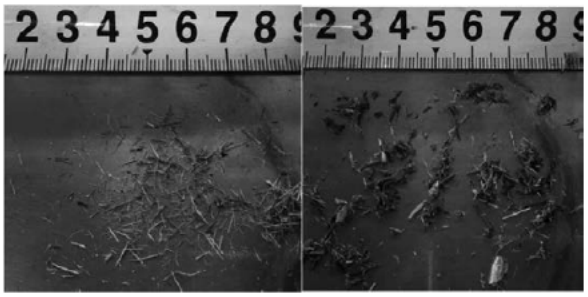
平成 30 年度の研究においては、従来検討していたイネ科以外の種類でも下水汚泥の脱水助剤としての有用性の可能性があること、植物系バイオマスの破砕後のサイズが大きく、植物の TS が小さいほど、脱水助剤としての効果が見えやすい傾向を示すこと、汚泥の TS が大きいほど脱水助剤の効果が見えやすい傾向を示すことが明らかとなった[15]。また、松、竹では、模擬ベルトプレス脱水試験を行った。その結果、脱水後の汚泥量は、バイオマスを混同しない場合と同等レベルまたはそれ以下となり、汚泥を処理場外に搬出する場合のコスト削減が見込まれることが示された。また、バイオマス混合による脱水の際の汚泥の剥離、ろ液の水質への影響はほぼないものと考えられた[15]。

これまで、実験室レベルの遠心脱水およびベルトプレス脱水において、草木系バイオマスの混合により、脱水汚泥の含水率の低減化および汚泥処分費の削減が見込める可能性を示した。本研究では、実規模レベルでの脱水機において、本提案技術が有用であることを示すため、パイロットスケールの圧入式スクリュープレス脱水機を用いて、イネ科の刈草、クロマツの剪定枝、竹粉と消化汚泥の混合脱水試験を行った。また、本技術導入による経済的な有意性を明らかにすることを目的とし、下水処理場外で焼却処分した場合における、汚泥処分費の試算を行った。

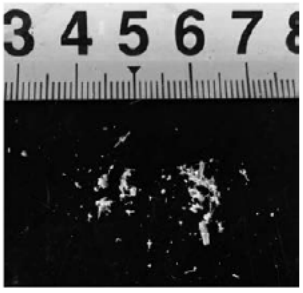
3. 1 パイロットスケール脱水機による草木系バイオマス混合脱水試験

3. 1. 1 試験材料

脱水試験に用いた草木系バイオマスは、イネ科の刈草の破砕物（以下、「草」）、クロマツの松剪定枝の破砕物（以下、「松」）、竹の粉砕物（以下、「竹」）の 3 種類である。イネ科の刈草は、土木研究所の敷地内に自生しているものを、草刈り機で裁断し、翌日、樹木破砕機（GS131GH、10 ㎜スクリーン、大橋製）により、10 ㎜程度に破砕した。破砕後の TS は 51.1%であった。クロマツの剪定枝は、土木研究所内に生育しているものを、高枝ハサミで剪定し、翌日、刈草と同様に 10 ㎜程度に破砕した。破砕後の TS は 49.7%であった。竹は、破砕機(GS150、大橋製)で 5mm



刈草の破砕物　　松の破砕物



竹の粉砕物

図-5 脱水試験に用いた草木系バイオマス

程度に粉砕したものを購入した。TS は 55.8%であった。それぞれの破砕物を、図-5 に示す。

脱水試験に用いた汚泥は、A 処理場の消化汚泥（以下、「消化」）である。実験時の TS は、2.04%、pH は 7.9、アニオン度は 0.6 meq/g-TS、粗蛋白質は、28.5%/TS、繊維状物質（100 メッシュ）は 1.3%/SS、繊維状物質（200 メッシュ）は 3.7%/SS であった。

3．1．2　脱水試験方法

草木系バイオマスの添加率は、下水汚泥の固形物量に対して草木系バイオマスの固形物量で 0%、約 10%、約 50%のいずれかで検討した。凝集剤は、カチオン系の高分子凝集剤（イシフロック ICA-609 U）を使用した。薬注率は、試験直前にビーカー試験により検討した各下水汚泥の最適薬注率および最低薬注率とし、それぞれ 1.76%、1.37%であった。最低薬注率では、松 10%の混合脱水試験を行った。混合脱水試験の条件は、表-4 に示す 8 ケースとした。脱水試験は、ハイブリッド型圧入式スクリュープレス脱水機（脱水部スクリーン径 φ300 ㎜：図-6）を用いたスクリュープレス脱水で行った。脱水試験は、1 条件につき 1 時間程度脱水機を運転させ、その間、草木系バイオマスを凝集混和槽の上部から各添加率となるよう、一定時間に一定量ずつ投入した。バイオマス投入から 30 分程度経った後、脱水ケーキを採取し、TS、VS を測定し、含水率を算出した。バイオマス混合脱水試験において、脱水後には、バイオマスが含まれた脱水ケーキが得られる。含水率の算出時には、バイオマスも含めた脱水ケーキの見かけの含水率の値が得られるが、その値より脱水後のバイオマスの TS および含水率を差し引いて、脱水ケーキのみの含水率を真の含水率として試算した。脱水後のバイオマスの TS の測定、含水率の算出は、脱水ケーキ中に混合されたバイオマスを取り出して行った。また、図-6 に示す濃縮部および脱水部からの排水を採取し、SS の測定および、全リン、アンモニア性窒素、全 CODcr の測定を HACH(東亜ディーケーケー株式会社)により行った。また、一部の汚泥について、ICP-MS により、金属等の分析を行った。

表-4 脱水試験ケース

消化汚泥（薬注率 1.76%/TS*1、1.37%/TS*2）		
	符号	バイオマス（混合率%）
1	-	(0) *1
2	-	(0) *2
3	消化-松、1.76	松(9.7)*1
4		松(49.3)*1
5	消化-松、1.37	松(9.7)*2
6	消化-草、1.76	刈草(9.7)*1
7	消化-竹、1.76	竹粉(9.7)*1
8		竹粉(47.9)*1

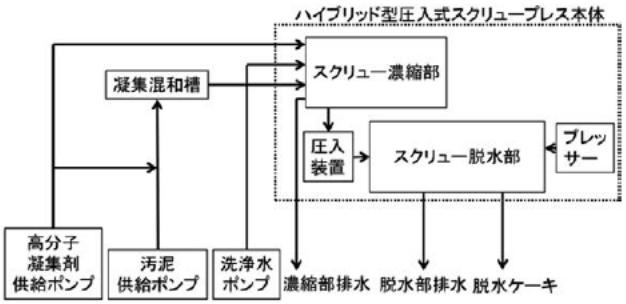


図-6 圧入式スクリュープレス脱水機
（脱水部スクリーン径 φ300 ㎜）

3．2　脱水試験結果

3．2．1　脱水ケーキの含水率

バイオマスの含水率は、下水汚泥に混合する前の含水率と比較して、脱水後では、松は約 8%、草は約 13%上昇し、竹では含水率は変化しなかった。松よりも草の方が、水分の吸収量が高いことが示された。

図-7 にバイオマス混合脱水試験における、バイオマス添加率と脱水ケーキの含水率の関係を示す。破線はバイオマスも含めた脱水ケーキの見かけの含水率を示し、実線はバイオマスの固形物量と脱水後の含水率を差し引いて試算した、脱水ケーキの真の含水率を示している。図-7 より最適薬注率（1.76%）では、バイオマス添加率が上昇するほど、脱水ケーキの見かけの含水率、真の含水率ともに減少することが示された。

松を添加すると、約 10%では 4.6 ポイント、約 50%では 14 ポイント、脱水ケーキの真の含水率が低下した。草では、約 10%の添加で 6.6 ポイント、竹では、約 10%の添加で 2.4 ポイント、約 50%の添加で 11 ポイント、脱水ケーキの真の含水率が低下した。約 10%の添加率で比較すると、草が最も脱水ケーキの含水率の低減効果が高く、次いで松、竹の順であった。約 50%の添加では、竹よりも松のほうが脱水効果が高い結果であった。

図-8 に、バイオマス混合脱水試験における、脱水ケーキの写真を示す。刈草は、松よりも幅が狭く、竹よりも長さが長いため、汚泥中の水分を効率よく抜けさせる効果があると推測される。一方、薬注率を凝集

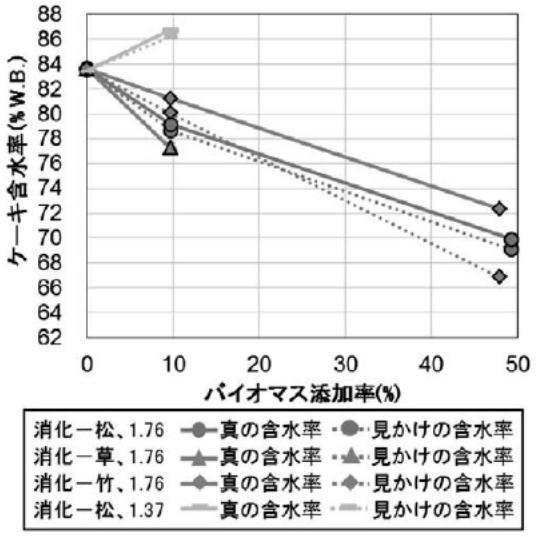


図-7 バイオマス添加率と脱水ケーキ含水率の関係

する最低添加率（1.37%）まで下げた場合、脱水ケー向であった。クロムは、松を混合した場合において、キの含水率は、バイオマスを添加することで上昇した。これは、バイオマスの混合により凝集効果が悪化したことが原因の一つであると考えられる。本研究では、1 ケースしか実験できなかったため、今後、薬注率をどの程度まで削減できるか調査する必要がある。

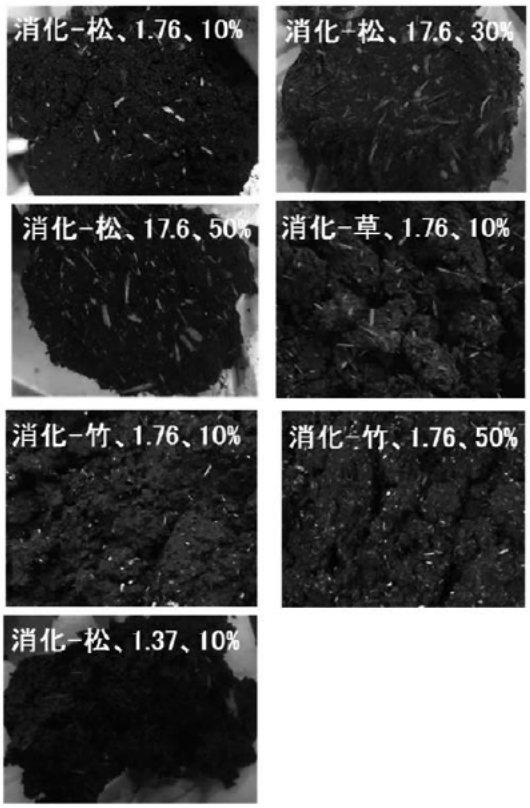


図-8 バイオマス混合脱水ケーキの写真

3．2．2　湿ケーキ量および排水への影響

図-9 に、バイオマス添加率と脱水機運転 1 時間あたりに排出される湿ケーキ量の関係を示す。バイオマス添加により、湿ケーキ量が減少することが示された。薬注率 1.76%の場合、松の添加ではバイオマス添加 0%と比較すると約 0.9 倍、刈草では 0.95 倍、竹では 0.94 倍にそれぞれ湿ケーキ量が減少した。薬注率を下げた場合においても、松の添加により湿ケーキ量が 0.97 倍に減少した。バイオマス混合により固形物量は増えるが、含水率の低減効果によって湿ケーキ量中の水分量が減少し、排出される湿ケーキ量が減少することが示された。

各バイオマスを汚泥に混合することで、重金属濃度への影響がないか調査した。その結果を図-10 に示す。鉛、ヒ素、カドミウム、セレンの脱水汚泥中の濃度は、各バイオマスを混合しない場合と比較して減少する傾減少する傾向であるが、竹を混合した場合は、バイオ

マスを混合しない場合と同程度であり、草を混合した場合は、わずかに上昇する傾向を示した。以上より、草木系バイオマスを混合することで、脱水汚泥中の重金属濃度の大幅な上昇はみられないことが示された。

図-11 に、脱水時の濃縮部および脱水部の排水の全リン、アンモニア性窒素、全 CODcr の濃度を示す。薬注率 1.76%の時、脱水部の全リンは、バイオマスを添加することで減少する傾向を示したが、竹以外は統計的手法による判定では有意な差は見られなかった。アンモニア性窒素は、バイオマスを添加することで脱水部で減少する傾向を示し、松では有意に減少することが示された。全 CODcr は、バイオマスを添加することで、脱水部で減少する傾向を示した。排水中の水質濃度の減少は、排水中の SS 濃度の減少による影響であると推測される。

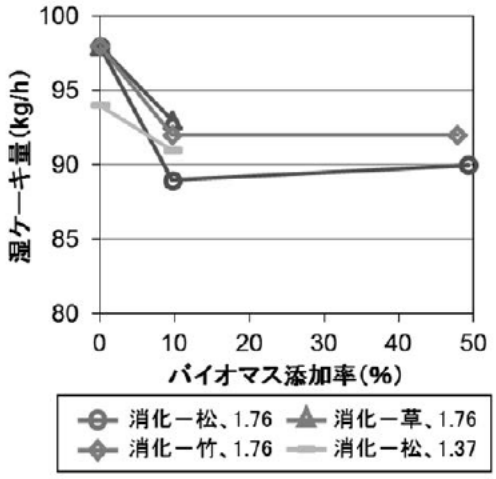


図-9 バイオマス添加率と湿ケーキ量の関係
(凡例の数値は、凝集剤添加率(薬注率)を示す)

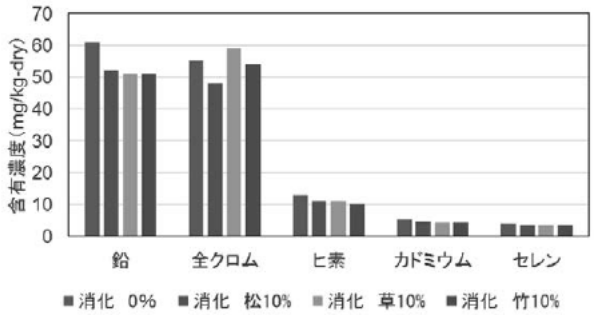


図-10 バイオマス混合による重金属含有量への影響
(凡例の数値は、バイオマス添加率を示す)

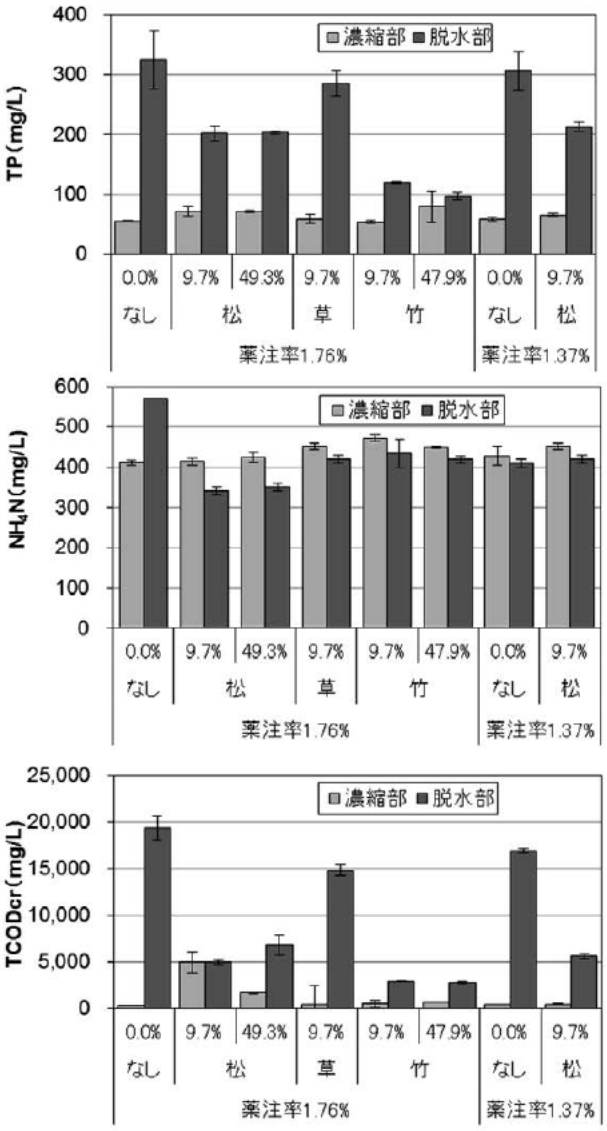


図-11 バイオマス添加脱水における濃縮部および脱水部からの排水の水質（TP、NH_4-N、TCOD）

3．3 バイオマス脱水技術導入における費用

3．3．1 汚泥処分費の試算方法

草木系バイオマスを下水汚泥に混合することで、バイオマスの破砕に掛かる費用が増加し、脱水時の薬注率の変化や湿ケーキ量の変化による脱水ケーキ処分に掛かる費用が変化する。そこで、本研究の各実験ケースについて、汚泥処分全体に掛かる費用を試算し、草木系バイオマスと汚泥の混合脱水により、汚泥処分費の削減が可能であるか検証を行った。

草木系バイオマスの回収および下水処理場への運搬に掛かる費用は、バイオマスが発生した事業体において焼却処分を行っていた費用を下水処理場への運搬費用に変更するものとし、バイオマス発生事業体で負担するものと考えた。よって、下水処理場での資材調

達費は考慮しないものとした。下水処理場では破砕処理を行い、その費用を負担するものとした。松の剪定枝および刈草の破砕は、本研究で用いた樹木破砕機(GS131GH、10 ㎜スクリーン、大橋製)で 10 ㎜程度に破砕するものとした。本破砕機は、最大処理量 2.8 m^3/h、燃料は自動車用無鉛ガソリン，燃費は 2.5 L/h である[16]。時間当たりのバイオマスの処理量は、本研究で実際に処理した量および処理した時間より算出した。松の剪定枝は、114.7kg を 2 時間で処理し、刈草は、13.77kg を 20 分で処理したため、それぞれの処理量を 57 kg/h、41 kg/h とした。刈草は、松の剪定枝よりも柔らかく扱いにくいため、剪定枝よりも処理に時間がかかる傾向であった。竹粉は、購入したものを使用したため、その単価である 150 円/kg[17]を試算に用いた。

本研究において、脱水ケーキの処分方法は、下水処理場外の焼却施設における焼却処分を想定した。下水処理場外での汚泥処分費は、脱水時の凝集剤費、運搬費、最終処分費を含む脱水ケーキ処分費の合計とした。凝集剤費は 820 円/kg、脱水ケーキ処分費は 16,000 円／t[14]とした。汚泥脱水設備に投入する汚泥量は、高分子凝集剤を使用した濃縮汚泥または消化汚泥の脱水を行っている 1,332 か所の下水処理場における、平成 28 年度の一カ月あたりの平均値である 4,989 t とした[18]。脱水前の汚泥の TS と各実験ケースにおける脱水後の湿ケーキ量の値を用いて、一カ月あたりの脱水ケーキ量を試算し、バイオマス破砕/購入費、凝集剤費、脱水ケーキ処分費を合計して汚泥処分費とした。

3．3．2　汚泥処分費の試算結果

図-12 に，各実験ケースにおいて、下水処理場外の焼却処分場で処分した場合の汚泥処分費の試算結果を示す。最適薬注率で松および草を約 10%添加した場合、脱水ケーキ処分費の削減効果がみられ、バイオマス破砕費を追加しても、汚泥処分費が 0.94 および 0.98 倍に削減できる可能性を示した。松では、約 50%添加した場合でも、添加しないときと同じ汚泥処分費で処分できることが示された。例えば、下水処理場内での発生バイオマスを処分する場合は、それぞれの処分費の削減効果が得られるものと考えられる。竹は、既製品を購入した場合の試算であるため、添加することでバイオマス購入費が増加し、汚泥処分費が増加する結果となった。下水処理場で破砕を行うことで、バイオマス購入費は削減できる可能性がある。薬注率を 1.34%にした場合、凝集剤費、脱水ケーキ処分費の削減により、汚泥処分費としては削減できる傾向を示した。

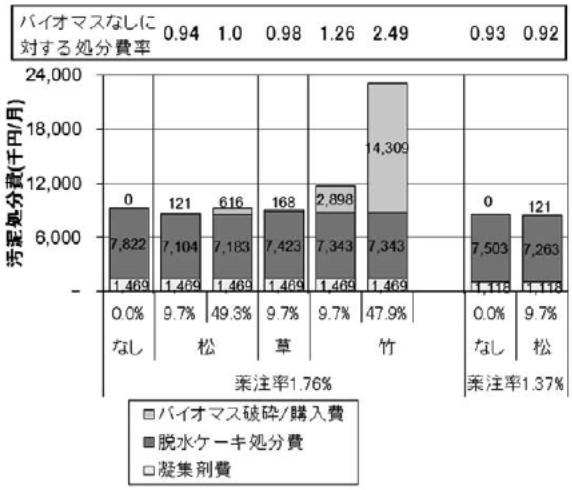


図-12 各実験ケースにおける下水処理場外での焼却処分時の汚泥処分費試算結果

3．4　結論

本研究では、パイロットスケールの圧入式スクリュープレス脱水機を用いて、イネ科の刈草、クロマツの剪定枝、竹粉と、消化汚泥の混合脱水試験を行った。また、本技術導入による経済的な有意性を明らかにすることを目的とし、下水処理場外で焼却処分した場合における、汚泥処分費の試算を行った。得られた結果は以下の通りである。

A)　約 10、50%のバイオマス添加率で実験を行い、最適薬注率（1.76%）では、バイオマス混合脱水において、脱水ケーキの含水率が 1.5～14 ポイント低減することが示された。また、バイオマス添加率が高いほど、脱水効果が高い傾向を示した。薬注率を凝集する最低濃度（1.37%）まで下げると、バイオマス添加による脱水ケーキの含水率低減効果は見られなかった。

B)　脱水後の湿ケーキ量は、バイオマス添加により減少することが示された。これは、バイオマス添加による脱水ケーキの含水率の低減効果が影響していることが示唆された。

C)　脱水時における汚泥から分離された排水の水質について、全リン、アンモニア性窒素、全 CODcr ともに、バイオマスを混合することで、減少する傾向を示した。

D)　バイオマスを下水処理場で破砕し、バイオマス混合脱水を行った後、処理場外の焼却場で焼却処分を行う場合、松および草を 10%程度混合して脱水を行うと、脱水ケーキの処分費がバイオマスを混合しない場合と比較して 2～6%減少することが示された。

以上の結果より、草木系バイオマスと汚泥の混合脱水は、脱水ケーキの含水率の低減、湿ケーキ量の減少、排水中の水質浄化において、利点がある可能性が示された。今後、汚泥の種類、薬注率、バイオマスの添加率について、実機を用いて詳細に検討し、効果の有無を見極める必要がある。また、さらなる長期運転を行うことで、バイオマスの詰まりや機械、維持管理面への影響評価を行うことが必要である。

参考文献

1) 国土交通省　下水道：https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/index.html（参照：2020.6.1）
2) 閣議決定：循環型社会形成推進基本計画、2015、http://www.env.go.jp/recycle/circul/keikaku/keikaku_3.pdf（参照：2017.2.27）
3) 国土交通省河川砂防技術基準維持管理編（河川編）、平成 27 年 3 月改定、2015、http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/gijutsu/gijutsukijunn/ijikanri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf（参照 2017.2.27）
4) 国立研究開発法人土木研究所：河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用に関する研究、平成 28 年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4370 号、pp.27-35、 2018
5) 中田友三：下水汚泥焼却炉の閉塞危険性評価方法及び閉塞防止方法、東京都下水道局技術調査年報 2016、Vol.40、pp.135-148、2016
6) 特許第 5711348 号　下水汚泥の焼却処理方法、下水処理方法、及び下水処理設備
7) NIST Chemistry WebBook, SRD 69 Nitrogen https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=Nitrogen&Mask=1#Thermo-Gas（参照：2020.3.2）
8) NIST Chemistry WebBook, SRD 69 Oxygen https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=oxygen&Units=SI&cTG=on#Thermo-Gas（参照：2020.3.2）
9) NIST Chemistry WebBook, SRD 69 Argon https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=argon&Units=SI&cTG=on#Thermo-Gas(参照：2020.3.2）
10) 一般社団法人火力原子力発電技術協会：火力発電技術必携（第 8 版）、pp.79、2016
11) NIST Chemistry WebBook, SRD 69　Water https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7732185&Units=SI&Mask=1#Thermo-Gas（参照：2020.3.2）
12) 一般社団法人火力原子力発電技術協会：火力発電技術必携（第 8 版）、pp.84、2016
13) 国立研究開発法人土木研究所：河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用に関する研究、平成 28 年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4370 号、pp.27-35、 2018
14) 山﨑廉予、重村浩之：刈草の汚泥脱水助剤としての利用検討、環境工学フォーラム論文集、Vol.73、No.7、pp.365-373、2017
15) 国立研究開発法人土木研究所：下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究、平成 30 年度研究開発プログラム報告書、2019
16) 大橋 HP：http://www.ohashi-inc.com/pdf/GS130GH&GS130GHB_171226.pdf（参照 2020.6.1）
17) NPO 法人竹もりの里 HP：http://takemori.org/（参照 2020.6.1）
18) 公益社団法人日本下水道協会：下水道統計 平成 28 年度版、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
研究期間　：平 28～令 3
担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）
研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

本研究は、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。令和元年度は、上記①に関わる調査・研究として、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている大腸菌ファージの F 特異 RNA ファージ（FRNAPH）遺伝子群（GI～GIV）を対象に、塩素と紫外線消毒による不活化効果を評価することで、消毒によるウイルスの不活化効果において安全側の評価となる遺伝子群を選定した。また、ふん便汚染の基本的な指標である大腸菌群から大腸菌指標への移行が検討されていることにあたり、従来指標との関連性を評価するため、大腸菌群に占める大腸菌の割合を調査した。次いで、下水試料に適した大腸菌の定量法の提案を目的に、放流水を想定して大腸菌を低濃度とした試料を対象に複数の特定酵素基質培地による検出定量に関し比較評価を行った。上記②、③に関わる調査・研究では、実態調査に基づく合流式下水道越流水の影響評価としてノロウイルス（Norovirus: NoV）を指標とした汚染の実態を把握した。次いで、高度処理法などによる病原微生物の除去率向上評価の一環として、膜分離活性汚泥法（Membrane Bioreactor: MBR）による NoV の除去効果について、実験プラント（P.P.）と実下水処理場で稼働している実プラントを対象に評価を行った。

その結果、塩素消毒による FRNAPH の不活化効果は、高濃度に培養・添加した結果では遺伝子群の間に差はなかったが、元々下水処理水中に存在していた FRNAPH では GI と比べて GII～GIV の方が低かったことから、これらを指標として用いることで安全側の評価となることが確認された。また、紫外線消毒による不活化効果は、高濃度培養の FRNAPH 添加有無による結果に顕著な差は無く、GIV が最も高く、GIII、GII、GI の順であり、GI が最も耐性が強かったことから、GI を指標として用いることで安全側の評価となることが示された。大腸菌群に占める大腸菌の割合は、水温による影響を受け変動するものと考えられた。大腸菌濃度を 20 CFU/mL に程度した試料の定量評価では、一部の培地・手法において検出濃度が他と比較して乖離した状況となったが、30～80 CFU/mL 程度であれば、各培地・手法の変動係数の多くは 10%以内で推移し、定量値に関しても大差がない結果となった。合流式下水道越流水の影響評価では、1 降雨あたりの総降雨量が合流式下水道改善事業の降雨条件を超える降雨時では、越流水による放流先水域への NoV 汚染が生じる可能性があった。越流水影響下による NoV の汚染状況を簡易に把握するため、水質指標として濁度と SS との関連性を評価した結果、濁度、SS 指標の活用により NoV 汚染の影響を評価できる可能性が示唆された。MBR による NoV の最大除去率は 4.5～5.2log、平均は概ね 4log 程度であり、標準活性汚泥法（標準法）と比較して 2 オーダー程度向上していた。

キーワード：塩素、紫外線、F 特異 RNA ファージ、大腸菌、合流式下水道越流水、ノロウイルス、膜分離活性汚泥法

1．はじめに

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

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

イルスの指標として最も注目されているF特異RNAファージ遺伝子群の塩素と紫外線消毒による不活化効果を評価し、下水処理場での消毒処理によるウイルスの不活化効果における指標として、安全側の評価となる遺伝子群を選定した。また、大腸菌群から大腸菌指標への移行が検討されていることにあたり、従来指標との関連性を評価するため、大腸菌群に占める大腸菌の割合の調査とともに、放流水を想定して大腸菌を低濃度とした試料を対象に複数の特定酵素基質培地による検出定量に関し比較評価を行った。さらに、実態調査に基づく合流式下水道越流水の影響評価として NoV を指標とした汚染実態を把握した。次いで、高度処理法などによる病原微生物の除去率向上評価の一環として、MBR による NoV の除去効果について、P.P.と実下水処理場で稼働している実プラントを対象に評価を行った。

２．研究目的および方法

２．１ F 特異 RNA ファージ遺伝子群の塩素と紫外線消毒による不活化効果の評価

日本国内における下水処理場の多くは、下水処理水の放流前に塩素を用いた消毒を行っているが、近年では紫外線消毒を採用する処理場数も増加傾向にある [3]。下水処理水の消毒では、放流水の基準項目の一つが大腸菌群であるため、大腸菌群と比べ塩素や紫外線消毒に対して耐性が強いウイルスにおいては消毒効果が十分に得られていない可能性がある。しかし、ノロウイルス等のヒト腸管系ウイルスは培養細胞による評価が確立されていないため [4]、下水処理場での消毒処理によりウイルスが適切に不活化されているか確認できていない状況である。

一方、大腸菌に感染するウイルスである大腸菌ファージの中で、F 特異 RNA ファージ（F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH）は、大きさ（直径約 20～40 nm）や構造（正二十面体）がノロウイルス等のヒト腸管系ウイルスと類似しているため、指標ウイルスとして最も注目されており、多くの研究に用いられている [5)～9)]。人への危険性が無く培養が容易であることから、培養法による感染力の評価が可能であるため、塩素や紫外線を用いた消毒実験にも多く用いられている [7)、10)～14)]。ヒトノロウイルスに近縁で細胞培養可能なマウスノロウイルスやネコ、イヌカリシウイルスと比べてFRNAPHのMS2が、塩素および紫外線消毒に対する耐性がより強いことが多くの研究により確認されている [12)～14)]。また、米国のカルフォルニア州では、下水処理水を高度処理した再生水を農業用水に用いる場合、ウイルスの消毒処理等による除去・不活化の基準として、培養や検出が容易な FRNAPH の MS2 を用いて評価することとなっている [15)]。このことから、今後、下水処理場の放流先での水利用における衛生学的安全性を考えた場合、下水処理場でのウイルスに対する消毒効果を評価する上で、他の近縁なウイルスと比べて強い消毒耐性を有する MS2 を含む FRNAPH を用いる可能性が高いと考えられる。

FRNAPHはGIからGIVの4つの遺伝子群に分けられ、それぞれの遺伝子群により環境水中において異なる生存能力を示し [6)，10)]、また、下水処理場での生物処理、凝集や膜を用いた水処理による除去効果が異なる [8)，9)，11)，16)]。さらに、塩素や紫外線消毒においても遺伝子群の間で異なる耐性を示しており、前述した FRNAPH の MS2 が属する GI が最も耐性が強く、次いで GII、GIII、GIV の順であることが報告されている [7)，10)]。一方、Boudaud *et al.* は [11)]、遺伝子群による評価結果とは異なり、遺伝子群に属する株を用いた評価では塩素消毒において GII に属する株の GA が GI に属する株の MS2 より耐性が強いと報告している。上記の報告例では [10)，11)]、単離した株や実験室株を高濃度に培養し、試験水のイオン交換水に添加した消毒実験にて評価を行っている。しかし、下水試料のように汚泥や濁質等を含む場合、水中での存在形態（汚泥や濁質等への吸着有無）により消毒効果が異なることが報告されており [17)，18)]、特に FRNAPH は遺伝子群により表面特性が違うため水中での存在形態が異なることが報告されている [19)，20)]。そのため、実際の下水処理水を試験水として、また、その中に存在する FRNAPH 遺伝子群を用いた場合とは消毒効果が異なる可能性がある。よって、下水処理場にてウイルスに対する消毒効果の指標として FRNAPH を用いる場合には、実際に下水処理水中に存在する FRNAPH 遺伝子群を用いた検討を行い、安全側の評価となる遺伝子群を選定する必要があると考えられる。

本研究では、ヒト腸管系ウイルスの指標として最も注目されているF特異RNAファージ遺伝子群の塩素と紫外線消毒による不活化効果を評価し、下水処理場での消毒処理によるウイルスの不活化効果における指標として、安全側の評価となる遺伝子群を選定した。また、大腸菌群から大腸菌指標への移行が検討されていることにあたり、従来指標との関連性を評価するため、大腸菌群に占める大腸菌の割合の調査とともに、放流水を想定して大腸菌を低濃度とした試料を対象に複数の特定酵素基質培地による検出定量に関し比較評価を行った。

2.1.1 試験水の採水

本項では、A 下水処理場内に設置されている標準活性汚泥処理装置の最終沈殿池後の処理水を試験水として用いて塩素と紫外線消毒実験を行った。試験水の水質を表-1に示す。塩素、紫外線消毒効果に最も影響する NH_4-N 濃

表-1　試験水の水質

水質項目	試験水 (n = 12)
SS (mg/L)	3.4–6.7
Turbidity (NTU)	0.5–2.8
COD_{cr} (mg/L)	11–27
pH	6.4–7.4
T-N (mg/L)	15–22
NH_4-N (mg/L)	0.05–0.27
T-P (mg/L)	3.5–5.2
UV254 (Abs)	0.093–0.125
UV254 (%)	75–81

度と紫外線（254 nm）の透過率はそれぞれ 0.05～0.27 mg/L と 75～81%でありばらつきが小さかったため、塩素と紫外線消毒に用いた試験水間における水質の差は大きくないと考えられた。

2.1.2　塩素消毒実験

2.1.1 で採水した試験水を用いて回分式塩素消毒実験を 6 回実施した。室温（20～25℃）下でマグネチックスターラーにより完全混合させながら初期投入塩素濃度を 1、2、3、4 mg-Cl/L とし、接触時間は 20 分間とした。しかし、実験で用いた試験水には、感染力を有する野生株の FRNAPH 遺伝子群が消毒後に全て検出されるほど高濃度に存在していない。そのため、試験水に 2.1.4 で培養・精製した高濃度の FRNAPH GI から GIV のそれぞれの遺伝子群を初期濃度で約 10^6～10^9 MPN/L となるように添加し、添加なしと同様な条件にて 6 回の塩素消毒実験を行い、残留遊離塩素濃度（C）と接触時間（t）の積で定義される Ct 値を用いて評価した。塩素消毒実験において、塩素添加直後から 5 分間の経過時間ごとに残留遊離塩素を Pocket Colorime-ter™ II（Hach）を用いた DPD 法により測定し、その平均残留遊離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 Ct 値を算出して評価した。接触時間が 20 分に達した試料は、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加して試験水中の残留塩素を中和し、この試料を用いて FRNAPH を定量した。なお、SS 濃度が 4～7 mg/L の試験水を用いた予備塩素消毒実験により、DPD 法による残留遊離塩素濃度の測定時において、濁質の有無（0.45 μm のメンブレンフィルターによるろ過の有無）による測定値への影響は顕著でなかったため、ろ過を行わずに残留遊離塩素濃度を測定した。また、実験結果には含めていないが、全ての塩素消毒実験において DPD 法により全残留塩素濃度も測定しており、モノクロラミンを含む結合塩素による消毒効果の評価も行っている。しかし、結合塩素による FRNAPH への不活化効果は遊離塩素と比べてかなり低かったことから、全残留塩素濃度からの Ct 値を用いて評価した結果において、Ct 値による不活化効果に明確な傾向が見られなかった。そのため、本消毒実験では残留遊離塩素濃度からの Ct 値による不活化効果の結果のみを示している。

2.1.3　紫外線消毒実験

2.1.1で採水した試験水と光化学反応用装置（ウシオ電機）を用いて回分式紫外線消毒実験を6回実施した。紫外線ランプは6Wの低圧紫外線ランプ（ULO-6DQ、ウシオ電機）を用い、実験開始前に照度を安定させるために30分間以上のウォームアップを行った。光化学反応用装置を4つ用いて試験水をそれぞれ500 mL入れた後、マグネチックスターラーにより完全混合させながら、それぞれ所定の時間、紫外線を照射し、照射前後でのFRNAPH遺伝子群の濃度を定量した。塩素消毒実験と同様に紫外線消毒実験においても高濃度に培養したFRNAPH遺伝子群を添加した試験水を用いて、添加なしと同様な条件にて6回の紫外線消毒実験を実施した。

各試験水を用いた紫外線消毒実験における紫外線照射量は、参考文献[21]に準拠し、実験直後にヨウ素/ヨウ素酸イオン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。

2.1.4　FRNAPHの定量および高濃度FRNAPH液の作製

感染力を有している GI～GIV の FRNAPH 遺伝子群の定量には IC-PCR[6), 7)]を用いた。この方法では、宿主菌の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49（以下、WG49）を用いて、試料中に存在する感染力を有した FRNAPH を液体培養し、PCR 法により増殖を確認する方法である。定量には MPN 法を用いており、0.01～100 mL までの試料を 10 倍段階の 3 連で培養することで定量値を得ており、単位は MPN/L として整理した。本実験での検出下限値は 3 MPN/L（約 0.5 log[MPN/L]）である。

試験水中に存在する感染力を有した FRNAPH 遺伝子群が消毒後において検出率が低くなることが想定されたため、試験水中に存在する FRNAPH 遺伝子群をそれぞれ人為的に培養して高濃度 FRNAPH 液を作製し、実験に用いた。IC-PCR による試験水中の FRNAPH 濃度測定において、段階希釈した試料も含めて FRNAPH の GI–GIV の遺伝子群がそれぞれ高濃度で検出された液体培地を用い、宿主菌の WG49 を含む新たな液体培地に GI–GIV の遺伝子群をそれぞれ添加した。この混合液を 37℃で 24 時間培養して GI–GIV の FRNAPH 遺伝子群をそれぞれ再増殖させた。宿主菌を取り除くため、2000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離し、その上澄液を 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過した。なお、高濃度の FRNAPH 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

性状が変化するため、試験水に添加する直前にAmiconUltra-15（分画分子量 100 kDa、Merck）を用いて培地成分を取り除いた。作製した GI–GIV それぞれの高濃度 FRNAPH 液において、他の遺伝子群は不検出あるいは低濃度になっていることを確認している。

２．２ 大腸菌指標に関わる調査

大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価は、上記 2.1.1 の A 下水処理場にて通年にわたり調査を行った。試料は流入下水、生物学的高度処理水、二次処理水、放流水とし、定量法は XM-G 培地の混釈法、放流水の一部は QT トレイの MPN 法とした。また、大腸菌の検出法の評価では、国内、海外メーカーから市販されている特定酵素基質培地 A~G の 7 種類を用いた。A～F 培地には寒天が含まれていることから混釈法とフィルター法にて、培地 G 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各々定量を行った。培養温度･時間については各培地の取り扱い説明書に従った。対象試料は放流水を想定して二次処理水を次亜塩素酸ナトリウムで塩素消毒しチオ硫酸ナトリウムで中和を行い、大腸菌濃度を 20 CFU/mL 程度とした時の試料を主に評価を行った。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。

２．３ 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。一方、当面の合流式下水道改善事業の目標としては、汚濁負荷量の削減、公衆衛生上の安全確保、夾雑物の削減の 3 つが挙げられており、処理区域の面積が 1,500 ヘクタール未満（流域関連は 5,000 ヘクタール未満）の都市においては、H25 年度を目途に合流式下水道改善事業が進められた。合流式下水道改善事業の具体の対策としては、雨水浸透施設の設置、完全（部分）分流化、下水処理場の処理能力の増強（遮集容量の増強、雨天時活性汚泥法の適用など）、雨天時下水の貯留などである [22]。

本項では過年度において、合流式下水道改善事業の 1 手法である雨天時活性汚泥法による NoV の削減効果を評価した。令和元年度は、公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価を目的に、NoV を指標とした実態調査を行った。調査対象は B 市とし、主な合流式下水道改善事業としては合流下水の貯留施設の建設であり、1 降雨あたりの総降雨量が 20 mm 時の降雨条件にて期待される効果として、雨天放流時の BOD 負荷を分流式並み、放流回数の半減を予測している。雨天時調査は 1 降雨あたりの総降雨量が 10.5～115.5mm の 3 降雨時に 2 箇所ある雨水吐き地点（採水箇所から上流約 1,000m と約 4,000m に位置）の下流にて河川水を採水した。調査の実施は 5～10 月であったことから、冬季の感染性胃腸炎の流行期を過ぎ、非流行期への移行期間であると考えられる。NoV に加え濁度、SS の測定を行った。

NoV の測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮は PEG 沈殿法とした。PEG 沈殿法により回収した沈渣を RNase-free 水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイム RT-PCR 法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN 社）の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit（QIAGEN 社）でウイルス RNA を精製した。上記で抽出したウイルス RNA 試料 0.5μg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit（QIAGEN 社）を用い全量 50μL の系で逆転写反応により cDNA を作製し 5μL をリアルタイム PCR に供した。NoV の検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」[23]に準じた。リアルタイム PCR 反応のための試薬は QuantiTect Probe PCR Kit（QIAGEN 社）を用い、リアルタイム PCR 装置は QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）を使用した。逆転写反応に使用する抽出 RNA 量は Spectrophotometer （NanoDrop 社製）により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないよう抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した [24]。他の水質分析項目の濁度は水質計、SS は GF/B ろ紙による定量とした。

２．４ MBR による NoV 除去効果の向上評価

活性汚泥処理水や再生水の水質向上などを目的として膜分離技術の導入が徐々に行われつつある。除去対象物質に応じて膜の公称孔径は精密（MF 膜）、限外（UF 膜）、逆浸透（RO 膜）などに大別されるが、MF 膜が多く用いられている MBR の適用事例は平成 23 年 3 月時点で 16 箇所となっている [25]。SS や細菌類の除去により良好な水質が得られるとともに、ウイルスの除去効果が高いとの報告事例 [26]があるが、限られた知見である。

本項では、下水の高度処理法などによる病原微生物の不活化･除去の向上評価の一環として、MBR による NoV の除去効果を把握した。

除去効果の評価は、A 下水処理場内の活性汚泥処理プラントの生物反応槽に MF 膜（無機系/平膜/公称孔径 0.1μm）を浸漬させた P.P.とし、HRT を約 8 時間とした連続処理により MLSS 濃度を徐々に高め 2,200～7,400mg/L の範囲での評価となった。また、実下水処理場は堺市泉北水再生センターにて稼動している MBR（有機系/平膜/公称孔径 0.2μm、MLSS 7,500～11,200mg/L）、HRT が 6.8 時間の実プラントを対象とした。併せて、除去率の向上割合を把握するため、P.P.から MF 膜を引き抜いた状態による標準法と泉北水再生センターにて並列処理を行っている標準法の処理水についても対象とした。さらに、P.P.では原因が不明である反応タンク内の発泡現象による活性汚泥の解体状況時についても評価を加えた。採水は P.P.が約 18 ヵ月間（4 回程度/月）、実プラントが約 12 ヵ月間（1 回/月）行ない、NoV の他に大腸菌を測定した。NoV の測定法は上記 2.3 と同様であり、大腸菌は QT トレイによる MPN 法とした。

３．研究結果および考察

3.1　試験水中の FRNAPH 遺伝子群の存在濃度

塩素と紫外線消毒実験で用いた全ての試験水（$n = 6$）で、感染力を有する野生株の FRNAPH 遺伝子群が検出された（表-2、添加なし）。平均濃度では、GII が 3.2 $\log_{10}$(MPN/L)と最も高く、次に GI が 2.8 $\log_{10}$(MPN/L)、GIII が 2.6 $\log_{10}$(MPN/L)、GIV が最も低く 1.9 $\log_{10}$(MPN/L)であった。人為的に高濃度に培養して添加した系の試験水中の FRNAPH 遺伝子群の平均濃度は、7.3～7.9 $\log_{10}$(MPN/L)であった（表-2、添加あり）。

表-2　試験水における FRNAPH 遺伝子群の存在濃度

	FRNAPH 遺伝子群	陽性数/試料数 (陽性率)	平均濃度±標準偏差 ($\log_{10}$ [MPN/L])
添加なし	GI	6/6 (100%)	2.8 ± 1.0
	GII	6/6 (100%)	3.2 ± 0.2
	GIII	6/6 (100%)	2.6 ± 0.4
	GIV	6/6 (100%)	1.9 ± 0.7
添加あり	GI	6/6 (100%)	7.3 ± 0.9
	GII	6/6 (100%)	7.5 ± 0.5
	GIII	6/6 (100%)	7.9 ± 0.7
	GIV	6/6 (100%)	7.6 ± 1.0

3.2　塩素消毒による FRNAPH 遺伝子群の不活化効果

塩素消毒による試験水中に存在する野生株の FRNAPH 遺伝子群（添加なし）の不活化効果（inactivation）を IC-PCR により定量し算出した結果（図-1 の○）、*Ct* 値の増加に伴い、全ての FRNAPH 遺伝子群の不活化効果においてテーリング現象が見られた。不活化結果から近似曲線を求めて *Ct* 値 5 mg・min/L での不活化効果を算出すると、GI は 3.4 $\log_{10}$、GII は 1.7 $\log_{10}$、GIII は 1.7 $\log_{10}$、GIV は 1.4 $\log_{10}$ であり、GI が最も高く、GII、GIII、GIV は同程度であった。また、人為的に高濃度に培養した FRNAPH 遺伝子群を添加した塩素消毒実験での不活化効果は（図-1 の◇）、添加無しの場合と同様に *Ct* 値の増加に伴いテーリングした。不活化結果から近似曲線を求めて *Ct* 値 5 mg・min/L での不活化効果を算出すると、GI は 3.0 $\log_{10}$、GII は 3.4 $\log_{10}$、GIII は 3.1 $\log_{10}$、GIV は 3.4 $\log_{10}$ であり、遺伝子群の間に大きな差はなかった。NGS 解析で用いた塩素①（*Ct* 値：24 mg・min/L）での不活化効果は、GI は 4.8 $\log_{10}$、GII は 4.8 $\log_{10}$、GIII は 4.0 $\log_{10}$、GIV は 4.8 $\log_{10}$ であり、GIII がやや低くその他の遺伝子群は同程度であった。また、塩素②（*Ct* 値：20 mg・min/L）での不活化効果は、GI は 3.8 $\log_{10}$、GII は 4.3 $\log_{10}$、GIII は 3.4 $\log_{10}$、GIV は 4.8 $\log_{10}$ であり、GIV が最も高く、GII、GI、GIII の順であり、GIII が最も低かった。一方、添加なしとありの不活化効果を比較すると、GI は大きな差はなかったが、その他の遺伝子群（GII～GIV）においては添加なしの方が添加ありと比べて低かった。

河川水や下水試料から GI～GIII の遺伝子群に属する 2～4 種類の株を単離・培養して添加し、塩素消毒実験を実施した報告例では、GI～GIII の塩素耐性に差異が小さいことが確認されている（*Ct* 値：0.4 mg・min/L）[27]。本消毒実験において下水処理水中に存在する FRNAPH 遺伝子群を高濃度に培養して添加した結果でも、遺伝子群の間で塩素消毒に対する耐性に大きな差はなかった（図-1 の◇、*Ct* 値：5 mg・min/L）。一方、下水処理水中に元々存在する濃度で消毒実験を行った結果（図-1 の○）と、高濃度に培養して添加した結果（図-1 の◇）を比較すると、GI 以外の遺伝子群（GII～GIV）は添加しない場合において消毒効果が低かった。このような差が生じた理由としては、下水処理水中での存在形態が FRNAPH 遺伝子群により異なることが考えられる。GI は他の遺伝子群と比べて下水処理での吸着・沈殿による除去効果が著しく低いことが報告されており[8),9),16)]、下水処理水中での存在形態としては汚泥や濁質等に吸着せず浮遊して存在している可能性が高い。一方、その他の遺伝子群は GI と比べて下水処理での除去効果が高いため、下水処理水中において多くが汚泥や濁質等に吸着して存在していることが考えられる。塩素消毒では、水中で浮遊しているウイルスと比べて濁質等に吸着している方が不活化効果が低い[17),18)]。そのため、GI と比べてその他の遺伝子群（GII～GIV）

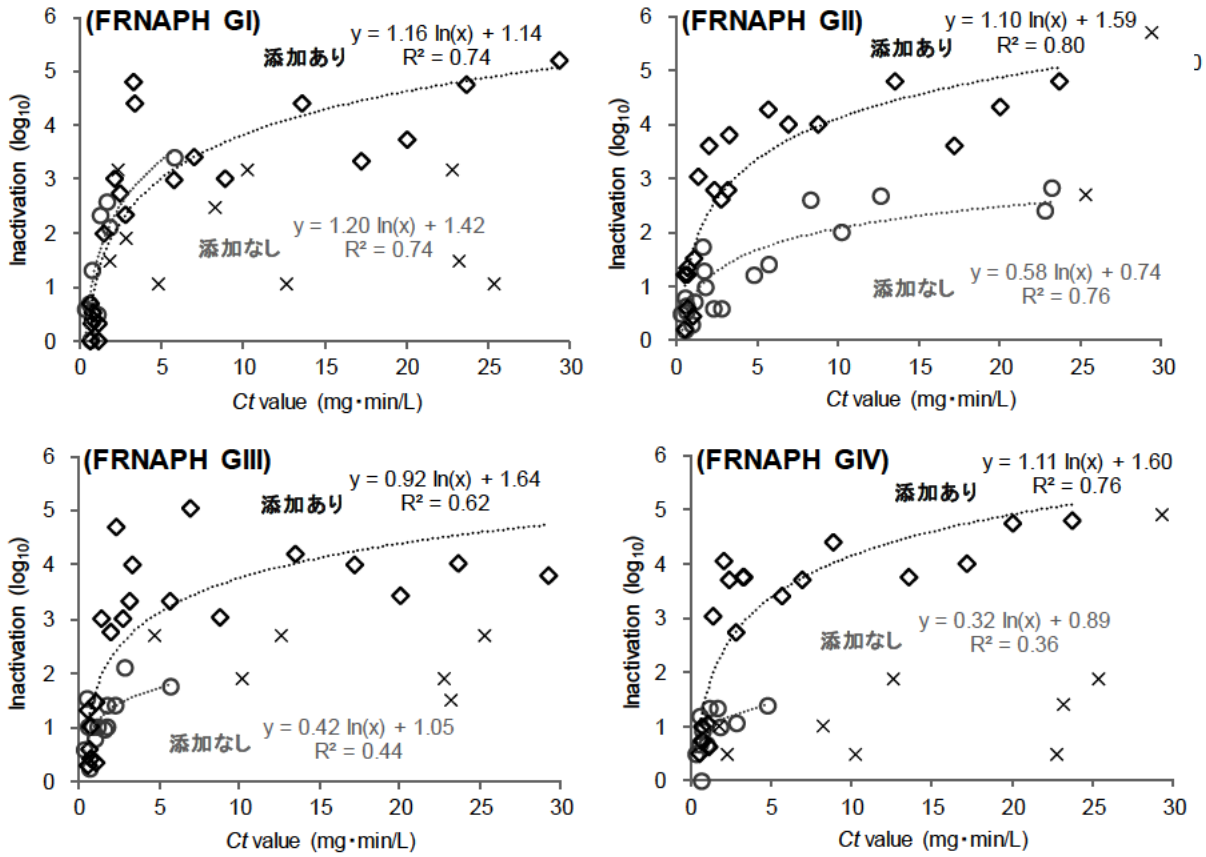


図-1　消毒実験における感染力を有した FRNAPH 遺伝子群の不活化効果の比較
（○：添加なし、◇：添加あり、×：塩素消毒後に検出下限以下であり検出下限値から算出した値）

は塩素による不活化効果が低かったことが考えられる。しかし、添加したケースにおいて遺伝子群の間に差がなかったのは、高濃度にして添加しているため吸着部位が飽和状態になり、ほとんどが浮遊している状態であったことから存在形態に関係なく塩素消毒による不活化効果が得られたことが考えられた。

以上の結果から、下水処理水中の FRNAPH 遺伝子群の不活化効果において、元々存在した濃度で評価した結果、GI と比べて GII～GIV の方が低かったことから、これらを指標として用いる場合、安全側の評価となることが確認された。また、塩素消毒による FRNAPH 遺伝子群の消毒効果の差異は、遺伝子群により耐性が異なるのではなく下水処理水中での存在形態が消毒効果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後、この存在形態による塩素消毒での不活化効果への影響についてより明確にするため、更なる検討が必要であると考えられる。

3.3　紫外線消毒による FRNAPH 遺伝子群の不活化効果

紫外線消毒による試験水中に存在する野生株の FRNAPH 遺伝子群（添加なし）の不活化効果（inactivation）を IC-PCR により定量し算出した結果（図-2 の○）、GIV が最も高く、GII、GI の順であり、GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。近似曲線から不活化速度定数（y＝kix の傾き：ki）を求めると、GI は 0.06、GII は 0.07、GIV は 0.12 であった（GIII は R2 が 0.09 と低かったため除外している）。人為的に高濃度に培養した FRNAPH 遺伝子群を用いて添加した紫外線消毒実験では（図-2 の◇）、添加なしと同様に GIV の紫外線感受性が最も高く、GIII、GII、GI の順であり、GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。同じく近似曲線より添加した FRNAPH 遺伝子群の不活化速度定数（ki）を求めると、GI は 0.06、GII は 0.07、GIII は 0.08、GIV は 0.09 となり、添加なしと比べて大きな差は無かった。NGS 解析で用いた紫外線①（紫外線照射量：61 mJ/cm^2）での不活化効果は、GI は 3.8 $\log_{10}$、GII は 4.2 $\log_{10}$、GIII は 5.0 $\log_{10}$、GIV は 4.8 $\log_{10}$ であり、GI が最も低く、GII、GIV、GIII の順であった。紫外線②（紫外線照射量：56 mJ/cm^2）での不活化効果は、GI は

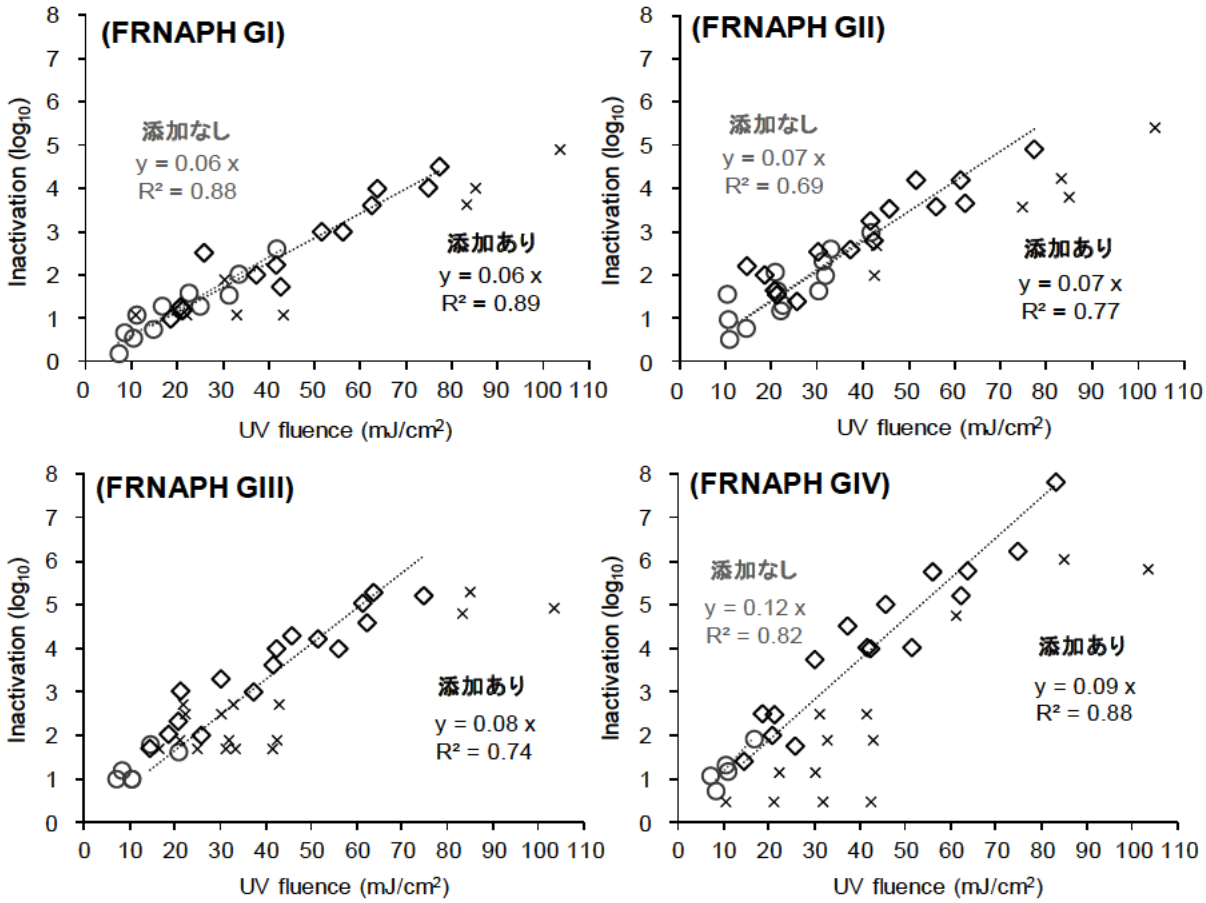


図-2 紫外線消毒実験における感染力を有したFRNAPH遺伝子群の不活化効果の比較

（○：添加なし，◇：添加あり，×：紫外線消毒後に検出下限以下であり検出下限値から算出した値）

3.0 $\log_{10}$、GII は 3.6 $\log_{10}$、GIII は 4.0 $\log_{10}$、GIV は 5.7 $\log_{10}$ であり、GI が最も低く、GII、GIII、GIV の順であり、GIV が最も高かった。

下水処理水を用いた膜と紫外線処理を組み合わせた処理プロセスにおいて、紫外線消毒でGIが最も紫外線に対する耐性が強く（k_i：0.04）、その次がGII（k_i：0.05）であったことが報告されている[7]。また、下水処理場の最初沈澱池越流水中に存在するFRNAPH遺伝子群の紫外線感受性を評価した結果、GIが最も低く（k_i：0.04）、GII（k_i：0.06）、GIII（k_i：0.07）、GIV（k_i：0.09）の順であり[7]、本研究の結果と一致した。この結果から、下水処理水中に存在するFRNAPH遺伝子群の中では、GI が紫外線消毒に対して最も耐性を有していることが確認された。 GIに属する株であるMS2がヒトノロウイルスに近縁のマウスノロウイルスやカリシウイルスのみならず、ポリオウイルス、ロタウイルス、A型肝炎ウイルス、コクサッキーウイルスと比べても紫外線消毒に対する耐性がより強いことが既往研究により報告されている[13), 14), 28)]。そのため、紫外線消毒による下水処理水中のウイルスに対する不活化効果を評価する上で、FRNAPHのGIは安全側の指標となることが考えられた。

一方、下水処理水中に元々存在する濃度で消毒実験を行った結果（図-2 の○）と、高濃度に培養して添加した結果（図-2 の◇）を比較すると、塩素消毒実験の結果とは異なり、FRNAPH 遺伝子群の不活化効果に大きな差は無かった。塩素消毒と同様に紫外線消毒においても試験水中の汚泥や濁質等がウイルスへの不活化効果に影響することが考えられるが[29)]、下水処理場の二次処理水の濁度範囲（0.2～2.5 NTU）では不活化効果に影響しなかったことや[28)]、試験水中の濁質濃度を極端に高く調製した場合（UV254：0.4～4.4%）以外の紫外線透過率条件（UV254：56～70%）では粒子がない場合と不活化効果に有意な差が無かったことも報告されている[30)]。このことから、本消毒実験で用いた試験水において、塩素消毒と比べて紫外線消毒では下水処理水中の FRNAPH の存在形態による不活化効果への影響は顕著でなかったことが考えられた。

以上の結果から、下水処理場でのウイルスに対する紫外線消毒による不活化効果の評価としては、下水処理水中に存在する FRNAPH 遺伝子群の中で GI が最も紫外線に対する耐性が強かったことから、GI を指標と

して用いることで安全側の評価となることが示された。

3.4 大腸菌指標に関わる調査

各種下水試料を対象とした大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価結果について図-3 に示す。流水下水では大腸菌群に占める大腸菌の割合は 0.02～0.83 であり、平均割合は 0.27（中央値：0.23）であった。割合の変動要因は季節性が考慮され、夏季の高水温期では割合が高く、冬季では低い状況であった。その傾向を踏まえ、水温と割合について整理した結果を図-4 に示す。水温

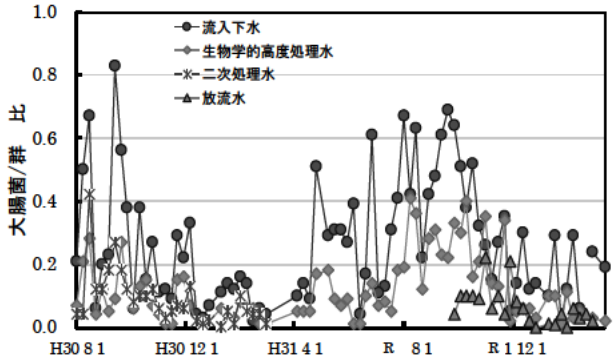


図-3 大腸菌/群比の推移

と割合の相関関係が認められ、水温が 24℃を超えることで割合が 0.4 を超えるケースが多い状況となり、24℃以上のデータで平均割合を整理すると 0.46、24℃以下では 0.2 となった。一定水温の基では大腸菌が増殖する報告[31]もあることから、高水温期では流入下水の流下過程において大腸菌が増殖することで割合が上昇したものと考えられた。生物学的高度処理水と二次処理水の結果では、割合は 0.01～0.42 であり、流入下水と比較して変動幅は小さくなった。平均割合は 0.09～0.12（中央値：0.06～0.08）であり、流入下水と比較して平均割合が 1/2～1/3 に減少した。水温との関係では、26℃を超えると割合が概ね 0.2 を超え、その平均割合は 0.29、26℃以下では 0.1（24℃以上の平均 0.20、24℃以下は 0.09）であり、流入下水と同様に水温の影響を受け割合が変動するものと考えられた。放流水については混釈

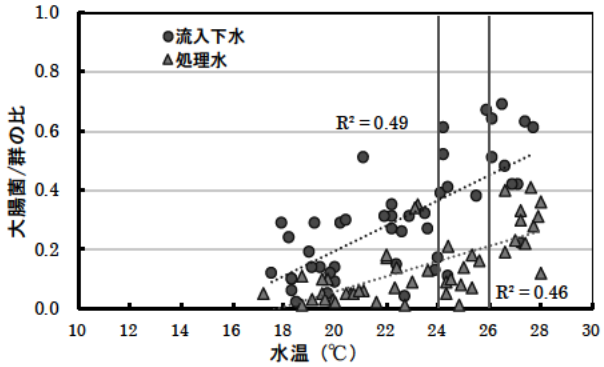


図-4 水温と大腸菌/群の比の関係

法による定量では、大腸菌が不検出であるケースが多々見受けられたため、QT トレイによる MPN 法の結果を示したが、この時の平均割合は 0.07（中央値：0.06）であった。他の試料に比べデータ数が少ないことや、塩素消毒により菌数が低濃度であったことから水温と割合の関係性は見出せていない。

一方、全国 54 箇所の下水処理場を対象にした既往の調査例では、各種下水試料の大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は概ね 20%（0.2）であったとする報告例[32]がある。本調査の処理水等の平均割合と比較してやや高い状況にあるが、調査の継続期間の違いや、地域ごとに下水試料の水温等が異なることが要因となり、割合に違いが生じたものと推定される。

次いで、大腸菌の検出法の評価結果を図-5～9 に示す。放流水の大腸菌濃度を想定し、塩素消毒により 20 CFU/mL 程度とした試料の評価結果を図-5、6 に示す。変動係数の最大値はほぼ 30%以内、その平均値も多くは 20%以内で推移しており、各培地・手法において大差がない状況であった。また、B 培地の定量値を基準（1.0 倍）とし、各培地・手法での検出濃度から求めた検出濃度比の比較結果を図-6 に示す。現状において要因が不明であるが、G 培地の MPN 法が他の培地・手法と比較して平均の検出濃度比が 3 倍以上と高い状況にあった。その他の培地・手法では、フィルター法が全体的に低く、検出濃度比が 0.70～0.98 倍、混釈法は 0.84～1.32 倍の範囲内であった。

一方、大腸菌濃度を 30～80 CFU/mL とやや高めた場合の評価結果を図-7、8 に示す。変動係数の平均値の多くは 10%以内で推移していた。B 培地の定量値を基準（1.0 倍）として各培地・手法の検出濃度比を整理する

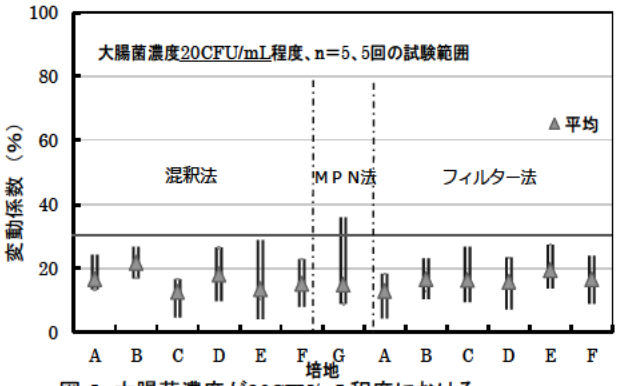


図-5 大腸菌濃度が20CFU/mL程度における各培地・手法の変動係数の比較

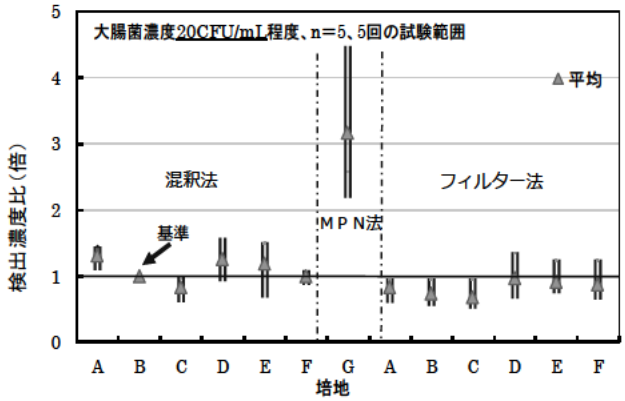


図-6 大腸菌濃度が20CFU/mL程度における
各培地･手法の検出濃度比の比較

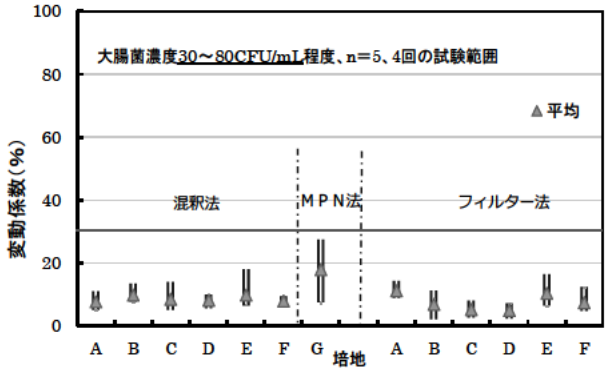


図-7 大腸菌濃度が30CFU/mL以上における
各培地･手法の変動係数の比較

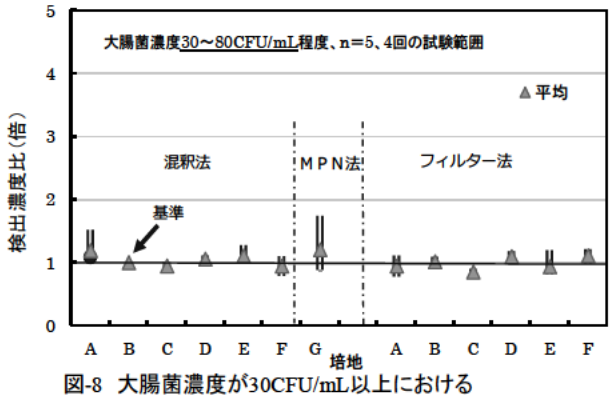


図-8 大腸菌濃度が30CFU/mL以上における
各培地･手法の検出濃度比の比較

と、混釈法では 0.95～1.20 倍、フィルター法は 0.86～1.11 倍となった。特に、G 培地の MPN 法が 1.21 倍となり、他の培地･手法の定量値と比較して大差がない結果となった。試料中の大腸菌濃度が 20 CFU/mL よりも高まることで、安定した定量値が得られるものと考えられた。

本定量結果では、大腸菌濃度が 20 CFU/mL 程度時に G 培地の MPN 法において検出濃度比が他の培地･手法と比較して乖離しており、この要因の解明が課題として生じた。この時の検出濃度比は B 培地の混釈法を基準として最小値で 0.70 倍、最大値が 3.18 倍であった。B 培地の混釈法で得られた定量値を 100%の回収率と仮定すれば、C 培地のフィルター法で 70%、A 培地の混釈法は 132%、G 培地の MPN 法が 300%を超える回収率となる。水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン [33]によれば、細菌試験を含めた機器分析によらない検査方法は本ガイドラインの対象外としているが、1 つの尺度として農薬類の定量に関わる目標値は、繰り返し精度（変動係数）が 30%以内、真度（回収率）が 70～130%としている。大腸菌の定量法に関わる回収率や変動係数の明確な基準はないが、本試験結果による変動係数は概ね 10～20%以内で推移、回収率として仮定した値としては、大腸菌濃度が 20 CFU/mL 程度時に G 培地の MPN 法が 300%を超えたが、その他の培地･手法では概ね目標値を満足するものと考えられた。

今後、標準菌株の既知量添加による回収率試験等を実施し、より詳細な回収率等の評価を行う予定である。

上記以外での大腸菌濃度として 10 CFU/mL 以下での評価結果を図-9 に示す。検水量を 1 mL とした場合、変動係数が 30%を超えたケースが複数見られたが、試験に要する検水量を 3 mL に増量することで、多くの培地･手法にて変動係数の高まりを抑制できた。

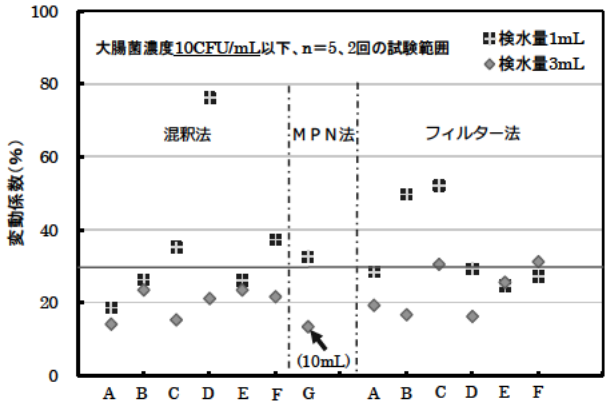


図-9 検水量の違いによる変動係数の比較

3.5 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

調査時の降雨状況を図-10 に示す。時間最大降雨量は 2.5、14、20mm/h、総降雨量は 10.5、59.5、115.5mm であり、3 回の降雨時調査の内 2 回は B 市の合流式下水道改善事業の降雨条件(1 降雨の総雨量 20mm)を超えていた。雨天調査時の NoV 濃度の推移を図-11 に示す。越流水の影響の無い状況での河川水の

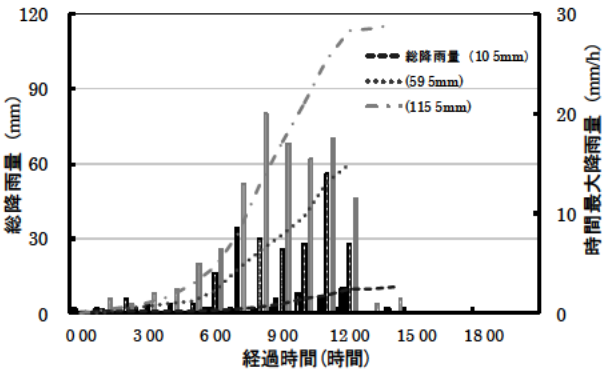


図-10 調査時の降雨状況

NoV 濃度は 10^4～10^5copies/L で推移していた。1 降雨あたりの総降雨量が 10mm 程度であればNoV 濃度の顕著な上昇は認められず、NoV 濃度は調査開始当初から大きな変動は見られなかった。しかし、総降雨量が B 市の合流改善事業の降雨条件を超えるケースにて NoV 濃度は最大 10^6copies/L となり、調査開始当初と比較して 2 オーダーの濃度上昇が認められた。

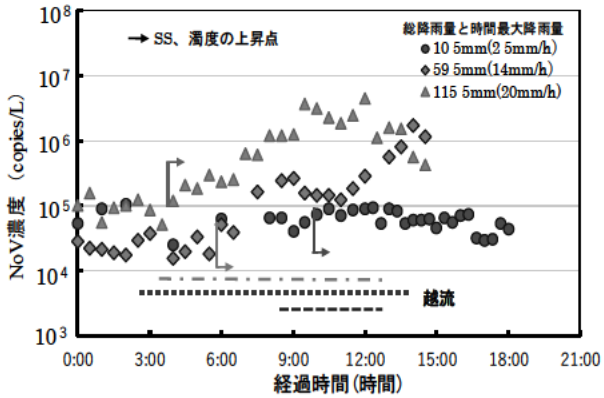


図-11 雨天時調査における河川水のNoV濃度の推移

次いで、越流水の影響下による NoV の汚染状況を簡易に把握するため、水質指標として濁度と SS との関連性を評価した結果を図-12、13 に示す。越流水の影響下において濁度、SS の上昇時からのデータについて整理を行ったが、総降雨量が B 市の合流式下水道改善事業の降雨条件を超えるケースにて濁度と NoV 濃度との関連性が見出された。同様に SS との関連性も高い状況にあったが（図-13）、総降雨量が 10mm 程度時には越流水影響下による NoV、濁度、SS の顕著な上昇はないことから、NoV 濃度との明確な関連性は見出せなかった。合流式下水道改善事業の降雨条件（1 降雨の総雨量 20 mm ）を上回る降雨状況にて、濁度、SS の顕著な上昇が認められることで、NoV 濃度が上昇しており濁度、

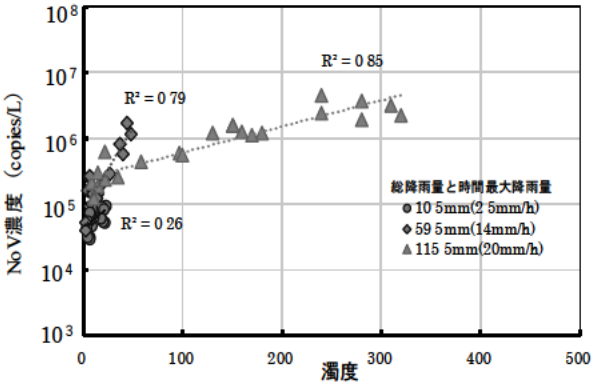


図-12 総降雨量ごとの河川水の濁度とNoV濃度の関係

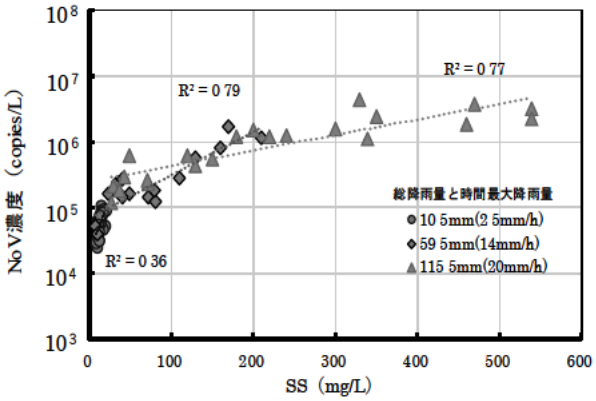


図-13 総降雨量ごとの河川水のSSとNoV濃度の関係

SS 指標の活用により NoV 汚染の影響を評価できる可能性が示唆された。一方、合流式下水道改善事業においてNoV の放流負荷に関わる目標値は定められていないが、合流式下水道改善事業の降雨条件を超える降雨時では、越流水による放流先河川水への NoV 汚染が生じる可能性があった。近年では気候変動に伴う集中豪雨が頻発傾向であることから、越流水の影響評価は今後益々重要となることが予想される。濁度、SS 指標を活用した影響評価が可能となれば、重要影響水域での水利用の安全性向上に寄与できることが想定される。

3. 6 MBR による NoV 除去効果の向上評価

NoV の除去効果の向上評価に関わる調査結果を図-14、15 に示す。調査期間中の流入下水の NoV 濃度は概ね 10^6～10^8copies/L の範囲内で推移しており、夏季と冬季において 2 オーダー程度の違いが見られた。各 MBR 処理水の NoV 濃度は 10^2～10^3copies/L レベルで推移しており、流入下水に比較して濃度の変動幅は小さい状況であった。全期間の NoV 平均除去率は P.P.が 4.0log、実プラントが 3.9log となり概ね 4log と整理された。一方、反応タンク内の MLSS の推移について図-16 に示すが P.P.の運転立上げ時には MLSS が低く 6,000 mg/L 以下の状況では NoV の除去率にバラツキが見ら

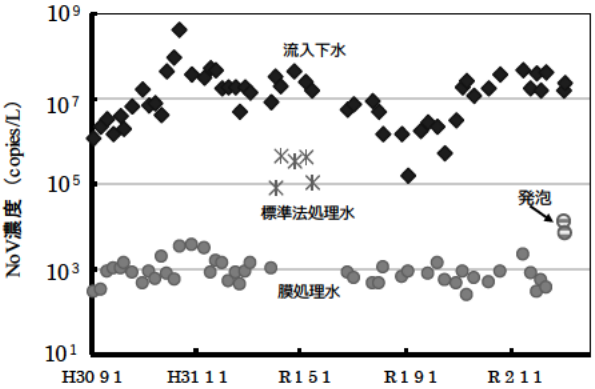


図-14　P.P.でのNoV濃度の推移

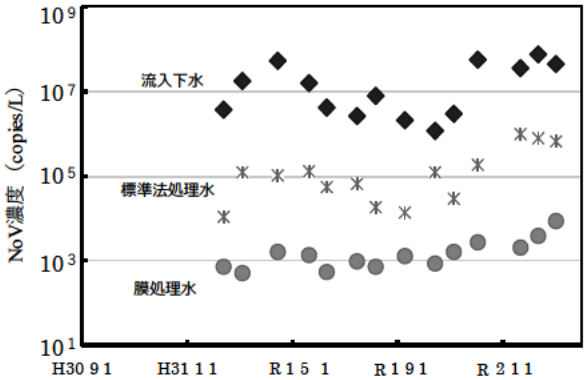


図-15 堺市泉北水再生センターのNoV濃度の推移

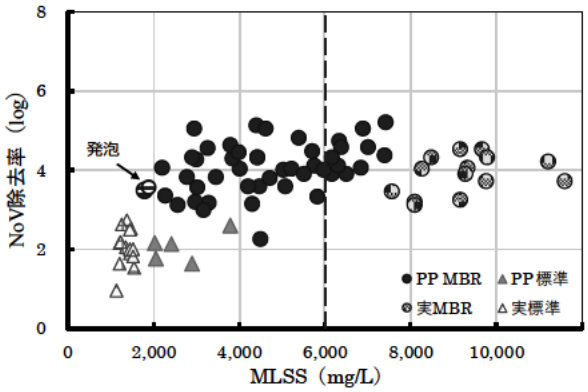


図-16 反応タンク内MLSSとNoV除去率の関係

れ除去率は2.3～5.0log であった。このため、6,000mg/L 以上のデータのみとした除去率で整理を行うと 3.9～5.2log、平均で 4.4log であった。今回の MBR での MF 膜は公称孔径が 0.1 と 0.2μm の平膜であり、ウイルスが通過できる孔径ではあるが、MLSS の上昇とともに NoV の除去率がやや向上傾向を示していることから、活性汚泥のフロック形成時にウイルスが取り込まれ、粒径の大きいフロックが膜に捕捉されることでNoVの除去効果が向上するものと推定された。また、MLSS 上昇による膜透過流速の低下や膜面におけるケーキ層の形成なども考えられる。実プラントでは MLSS が P.P. よりも全体的に高濃度ではあったが、NoV の除去率は 3.1～4.5log で推移しており、P.P.（MLSS 6,000mg/L 以上時）と比較してやや低い状況にあり、公称孔径の違いが影響している可能性が推定された。

標準法の処理水の NoV 濃度は P.P.と実プラントともに 10^4～10^6 copies/L レベルで推移しており、膜処理水と比較して 2～3 オーダー程度高い状況にあった。平均除去率は P.P.が 2.0log (1.6～2.6log)、実プラントで 2.0log（1.0～2.7log）であり、既往の報告例[34]と一致した値であった。

これらの結果から、MBR の NoV 除去率は標準法に比較して 2 オーダー程度向上し、NoV の最大除去率としては 4.5～5.2log であった。

併せて測定を行った大腸菌の除去率の推移について図-17 に示す。大腸菌は膜の公称孔径よりも大きいためろ過捕捉されることからNoVの除去効果よりも高い状況にあった。流入下水の大腸菌濃度に影響を受け除去率が変動しているが、多くのデータは 6log 以上であり MBR 処理水中の大腸菌濃度は定量限界値以下あるいは、採水時等において極微量の汚染の可能性があったことから、それに近い値となった。一方、標準法による P.P.と実プラントの大腸菌の除去率は概ね 2log 程度であり、MBR と比較して大腸菌の除去率に大きな違いが見られた。

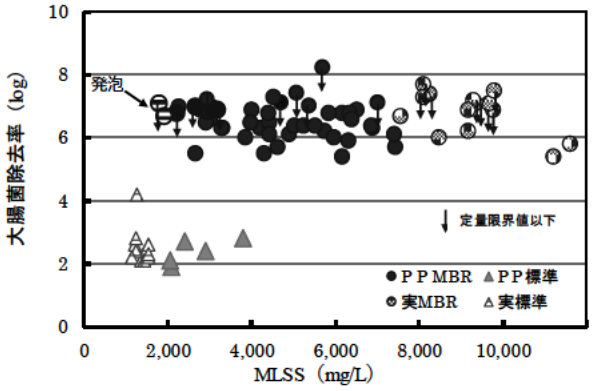


図-17　反応タンク内MLSSと大腸菌除去率の関係

次いで、P.P.反応槽の発泡状況について写真-1 に示す。泡とともに活性汚泥が流出したため、MLSS の低下が見られた（図-16）。曝気を止め汚泥を沈降させても上澄液は濁っており、活性汚泥によるフロックの形成能力は失われていた。図-14、16 に NoV 濃度と除去率について追記したが、処理水の NoV 濃度の上昇が見られ除去率がやや低下した。大腸菌の除去率への影響は見

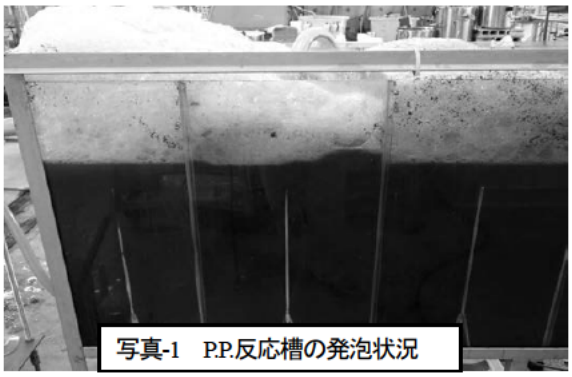


写真-1　P.P.反応槽の発泡状況

られなかったが（図-17）、ろ過水量の減少とともにろ過圧力の上昇が生じたため、MBR 処理の継続は難しい状況となった。発泡の原因は不明である。この時の反応槽の汚泥について、顕微鏡による生物相を観察した結果 *Aspidisca* sp.、*Vorticella* sp.などが確認されたが、個体数は 160～280 細胞/mL であった。これらの活性汚泥性生物量は活性汚泥微生物相の一例[35]と比較して少ない状況であり、浄化の程度が低い時に出現[35]する *Amoebida*（アメーバ目）が 1,360 細胞/mL で優占していた。

4. まとめ

本研究は、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化･除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。令和元年度は、上記①～③に関わる調査･研究にて、以下の成果が得られた。

「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) 塩素消毒による下水処理水中のFRNAPH遺伝子群の不活化効果において、高濃度に培養・添加した結果では遺伝子群の間に大きな差はなかったが、元々存在した濃度での結果では GI と比べて GII～GIV の方が低かった。このことから、これらを指標として用いる場合、安全側の評価となることが確認された。また、高濃度培養の FRNAPH 添加有無による結果に差が生じた理由としては下水処理水中での存在形態が影響している可能性が考えられた。
2) 紫外線消毒による下水処理水中の FRNAPH 遺伝子群の不活化効果は、GIV が最も高く、GIII、GII、GI の順であり、GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。そのため、紫外線消毒による下水処理水中のウイルスに対する不活化効果を評価する上で、FRNAPH の GI は安全側の指標となることが確認された。
3) 大腸菌群に占める大腸菌の割合は、水温による影響を受け変動するものと考えられた。
4) 塩素消毒により大腸菌濃度を 20 CFU/mL 程度した試料の定量評価では、一部の培地･手法において検出濃度が他と比較して乖離した状況となった。
5) 大腸菌濃度が 30～80 CFU/mL 程度であれば、各培地･手法の変動係数の多くは 10%以内で推移し、定量値に関しても大差がない結果となった。

「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」

6) 1 降雨あたりの総降雨量が合流式下水道改善事業の降雨条件を超える降雨時では、越流水による放流先河川水への NoV 汚染が生じる可能性があった。
7) 濁度、SS 指標の活用により、放流先河川水の NoV 汚染の影響を評価できる可能性が示唆された。
8) 総降雨量が合流式下水道改善事業の降雨条件未満の状況であれば、越流水影響下による NoV、濁度、SS の顕著な濃度上昇は認められなかった。

「高度処理法などによる病原微生物の不活化･除去の向上評価」

9) P.P.と実プラントのMBRを対象としてNoVの除去率を評価した結果、標準法に比較して 2 オーダー程度向上し、最大除去率は 4.5～5.2log であった。
10) MBR による大腸菌の除去率は流入下水の大腸菌濃度に影響を受け変動するが、多くは 6log 以上であった。
11) 発泡により活性汚泥のフロック形成能力が失われることで、ろ過水量が減少しろ過圧力の上昇が生じるため、MBR 処理の継続は難しい状況となった。

謝辞

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

参考文献

1) 外務省：G7 伊勢志摩首脳宣言、平成 28 年 5 月 27 日、https://www mofa.go.jp/mofaj/files/000160267.pdf（2019 年 9 月 24 日閲覧）
2) CDC：ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013, http://www.cdc gov/drugresistance/threat-report-2013

(2019 年 9 月 24 日閲覧)
3) 星川珠莉，橋本敏一：下水処理施設における紫外線消毒技術の実態調査，第 55 回下水道研究発表会講演集，pp. 1043–1045，2018
4) Duizer, E , Schwab, K J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P., Estes, M.K.: Laboratory efforts to cultivate noroviruses, *J. Gen. Virol.*, Vol. 85, pp. 79–87, 2004
5) Wolf, S , Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Greening, G.E.: Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, *J. Virol. Methods*, Vol. 149, pp. 123–128, 2008
6) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H.: Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 82, pp. 4244–4252, 2016
7) Lee, S., Tasaki, S , Hata, A., Yamashita, N., Tanaka, H.: Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes, *Environ. Technol.*, Vol. 40, pp. 2527–2537, 2019
8) Hata, A., Kitajima, M., Katayama, H.: Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan, *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 114, pp. 545–554, 2013
9) Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M.: Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant, *Sci. Total Environ.*, Vol. 520, pp. 32–38, 2015
10) Schaper, M., Dura´n, A. E., Jofre, J.: Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, pp. 3702−3707, 2002
11) Boudaud, N , Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C.: Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale, *Water Res.*, Vol. 46, pp. 2651−2664, 2012
12) Lim, M., Kim, J , Ko, G.: Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide, *Water Res.*, Vol. 44, pp. 3243–3251, 2010.
13) Park, G.W., Linden, K.G., Sobsey, M.D.: Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation, *Lett. Appl. Microbiol.*, Vol. 52, pp. 162−167, 2011
14) De Roda Husman, A M., Bijkerk, P., Lodder, W., Van Den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., Duizer, E.: Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 70, pp. 5089–5093, 2004.
15) USEPA: *Guidelines for Water Reuse.* Environmental Protection Agency, Washington, DC., 2012
16) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H.: Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, *J. Water Health*, Vol. 17, pp. 50−62, 2019
17) Narkis, N., Armon, R., Offer, R., Orshansky, F., Friedland, E.: Effect of suspended solids on wastewater disinfection efficiency by chlorine dioxide, *Water Res.*, Vol. 29, pp. 227–236, 1995
18) Zhang, W., Zhang, X.: Adsorption of MS2 on oxide nanoparticles affects chlorine disinfection and solar inactivation, *Water Res.*, Vol. 69, pp. 59–67, 2015
19) Dika, C., Ly-chatain, M.H., Francius, G., Duval, J.F L., Gantzer, C.: Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, Vol. 435, pp. 178–187, 2013
20) Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Gantzer, C.: Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes, *Water Res.*, Vol. 42, pp. 2769–2777, 2008
21) Rahn, R., O., Stefan, M , I., Bolton. J., R., Goren, E , Shaw, P., Lykke, K. R.: Quantum yield of the iodide-iodate chemical actinometer: dependence on wavelength and concentrations, *Photochem. Photobiol.*, Vol. 78, pp. 146–152, 2003
22) 国土交通省都市地域整備局下水道部、効率的な合流式下水道緊急改善計画策定の手引き（案）.
23) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：ノロウイルスの検出法について，2007, https://www mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html（2019 年 9 月 24 日閲覧）
24) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子：下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、Vol. 46(561)、pp. 91–101, 2009
25) 下水道膜処理技術会議、下水道への膜処理技術導入のためのガイドライン第 2 版、pp19,平成 23 年 3 月.
26) 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会報告書、pp.11,平成 22 年 3 月.
27) 堂山貴広，原本英司：塩素消毒処理による大腸菌ファージ野生株の遺伝子型別の不活化効果，第 53 回日本水環境学会年会講演集，pp. 252，2019
28) Hijnen, W A., Beerendonk, E.F., Medema, G.J..: Inactivation

credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review, *Water Res.*, Vol. 40, pp. 3–22, 2006

29) Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R.: Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light, *Water Res.*, Vol. 39, pp. 3487–3500, 2005

30) 小熊久美子，小塩美香，Jenyuk Lohwacharin，滝沢智：水中の懸濁粒子が紫外線消毒効率に及ぼす影響，水環境学会誌，Vol. 40，pp. 59–65，2017

31) 諏訪守，安井宣仁，南山瑞彦：下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の実態、下水道協会誌論文集，Vol. 54(652)，pp. 89–96，2017

32) 諏訪守，李善太，重村浩之：下水試料に対する大腸菌定量手法の評価と下水処理場における大腸菌と大腸菌群の実態調査，下水道協会誌論文集，Vol. 56(676)，pp. 85–92，2019

33) 厚生労働省、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン（最終改正：平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 号第 1 号）.

34) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介：ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、Vol. 47（571）、pp. 103–111, 2010

35) 下水試験方法下巻-2012 年版-、pp.211、pp 204.

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
研究期間：平 28～令元
担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）
研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

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

本研究は、平成 28～令和元年度にかけ、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。

実際の下水処理水再生処理施設の再生処理法の現状を整理した結果、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。生物膜生成要因の 1 つとして、再生水中の同化性有機炭素（AOC）の存在が考えられるが、下水再生処理施設などにおける AOC の実態調査では、生物学的高度処理法や膜分離活性汚泥法などを経ることで AOC の低減化が図られていた。また、NH_4-N 濃度が概ね 5mg/L を超えることで AOC が上昇傾向を示しており、これらの栄養塩類の制御にも留意が必要であると考えられた。塩素消毒とオゾン処理について、その処理レベルに応じた水質性状の変動が、消毒副生成物でありその一部は発がん性が指摘されている N-ニトロソアミン類の生成に及ぼす影響を評価した結果、オゾン処理･塩素消毒の併用処理により生成濃度が高まったが、オゾン処理後に易分解有機物を担体処理、あるいは残留塩素の中和により N-ニトロソアミン類の生成濃度の低減化が図られる可能性が示された。オゾン･塩素消毒を行った再生水中などからはノロウイルス（NoV）、大腸菌ファージとも不検出であり、衛生学的安全性の向上が図られているものと考えられた。

キーワード：AOC、ノロウイルス、大腸菌ファージ、消毒、N-ニトロソアミン類

１．はじめに

再生水は安定した水資源であり再利用への関心が高まっている一方で、現状の再利用率は 2%未満である [1)]。再生水の利用にあたり、衛生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、消毒剤を消費する生物膜生成要因の 1 つと推定される再生水中の同化性有機炭素（AOC）の存在、さらには消毒副生成物である N-ニトロソアミン類などについては下水再生処理プロセスでの調査、研究例は少ない。再生水の利用促進のためには、消毒副生成物の制御、消毒効果維持の観点から再生処理水質を安定化させる必要があり、消毒剤の消費要因の解明と消毒副生成物を含めたその制御手法を提案することが必要である。

本研究は、再生処理水質と生物膜生成要因の解明として、生物膜の生成要因であるAOCの実態把握、水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明として、塩素消毒とオゾン処理について、その処理レベルに応じた水質性状の変動がN-ニトロソアミン類の生成に及ぼす影響を評価した。また、これらの成果や再生処理によるNoV、大腸菌ファージの除去不活化効果から、消毒効果の観点での再生処理技術の評価を行った。

２．研究目的と方法

2．1　再生処理方式と再生水利用用途の現状

再生水利用の実態把握を目的に、下水道統計[2)]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以下に整理を行った。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。再生処理プロセスを図-1 に整理すると塩素処理、砂ろ過、ストレーナ、オゾン、紫外線の順で多かった。図-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みた場合、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。オゾン処理では衛生学的安全性の向上に加え、再生水の色や臭いへの対応、紫外線では残留塩素の放流先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。

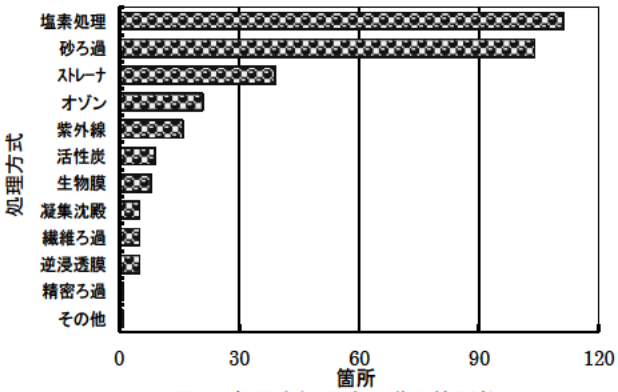


図-1　各再生処理法の導入箇所数
（下水道統計のデータを基に作成）

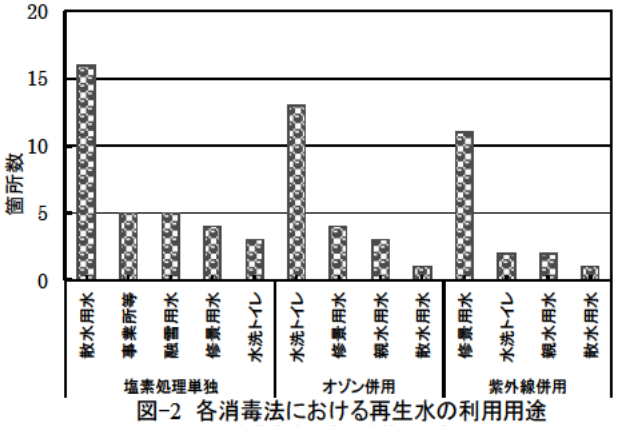


図-2　各消毒法における再生水の利用用途
（下水道統計のデータを基に作成）

2．2　下水再生処理施設等における AOC の実態

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[3)]、水質性状などにより塩素が消費されることで注入濃度が高まる課題がある。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、再生処理水質と生物膜生成要因の解明として、生物膜の生成要因である 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。

調査はＡ下水処理場内のＢ再生処理施設の活性汚泥二次処理水、生物膜処理水（HRT 約 6 時間）、オゾン処理水（注入濃度 6mg/L、HRT 約 3 時間）、オゾン処理後の塩素処理水（再生水：次亜塩素酸ナトリウム注入濃度 10mg/L、ライン注入）と、C 下水処理場の流入下水、二次処理水、オゾン処理水（注入濃度 1～6mg/L、HRT20 分間）、生物学的高度処理水（A^2/O 法）および膜分離活性汚泥処理水を対象とした。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。

AOC の測定法は、下水試験方法に準拠した[4)]。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 4.05×10^6 ～4.26×10^6 CFU/酢酸-Cμg、NOX 株が 9.95×10^6C～1.08×10^7CFU/酢酸-Cμg であった。その他の水質分析項目は水温、pH、NH_4-N、PO_4-P、残留塩素などを測定した。NH_4-N 、PO_4-P の測定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。

2．3　水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明

2．3．1　ニトロソアミン類の実態評価

N-ニトロソアミン類は消毒副生成物として、その一部は発がん性が指摘されているが再生水での調査例は少ない。主に衛生学的安全性の向上を目的とした再生処理法は塩素、オゾン、紫外線、膜処理であるが、その内、消毒副生成物の生成リスクが生じる可能性が高いものは塩素、オゾン処理である。ヒトとの接触が高いと想定される水洗トイレ用水や親水

利用のケースでは、その再生処理法としてオゾン処理と塩素消毒の併用処理が多い状況であった。本項では、水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明として、塩素消毒とオゾン処理について、その処理レベルに応じた水質性状の変動がN-ニトロソアミン類の生成に及ぼす影響を評価した。再生水原水として二次処理水、生物学的高度処理水（A^2/O法、修正バーデンフォ法）、膜分離活性汚泥法処理水（MBR処理水）を対象として、塩素消毒、オゾン処理後にてN-ニトロソアミン類の生成を評価した。オゾン処理では注入濃度を0~6mg/L、接触時間20分間（気液対向方式）とした。また、オゾン処理後の担体処理（ポリプロピレン製中空円筒担体4×3×5mm/個、担体容量81L、接触時間約2時間）による易分解有機物の低減等によるN-ニトロソアミン類の生成抑制についても評価を行った。

塩素処理条件は次亜塩素酸ナトリウムによる塩素添加濃度を2、10mgCl/L、接触時間を20分間とした。また、一部の消毒後水についてはチオ硫酸ナトリウムによる中和処理を行いニトロソアミン類の生成濃度に及ぼす影響を把握した。評価対象としたN-ニトロソアミン類は、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）、N-ニトロソメチルエチルアミン（NMEA）、N-ニトロソジエチルアミン（NDEA）、N-ニトロソジ-n-プロピルアミン（NDPA）、N-ニトロソピロリジン（NPYR）、N-ニトロソモルホリン（NMOR）、N-ニトロソピペリジン（NPIP）、N-ニトロソジ-N-ブチルアミン（NDBA）の8物質である。

測定法は上水試験方法[5]を基としたが、Yoonら[6]、中田ら[7]測定法を参照にしてN-ニトロソアミン類の抽出量の増加を目的に固相抽出溶媒をメタノールからジクロロメタンに変更した。測定法の概略は以下のとおりである。

試料300mLをGF/Bろ紙によりろ過を行い、ろ液に内部標準物質メタノール混合溶液を添加した。固相カートリッジ利用し加圧型固相抽出装置により固相抽出を行い、ジクロロメタン溶出液を窒素気流下で乾固直前まで濃縮し、メタノール、ミリQ水溶液（2 : 8）1mLで定容した後、LC/MS/MSによる定性・定量を行った。

2. 3. 2　再生処理による NoV、大腸菌ファージの除去不活化効果

再生水を水洗、散水、親水利用する際には衛生学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[3]、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。より衛生学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、衛生学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NoVを指標として、生物学的高度処理水とMBR処理水を用い、オゾン、塩素消毒による低減効果を把握した。また、消毒耐性を有する大腸菌ファージを含めて評価を行った。併せて、再生処理として生物膜処理、オゾン、塩素処理を実施している上記2.2に示したB再生処理施設での評価も行った。

NoV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、Omniscript 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」[8]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抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した[9]。NoVと併せて評価した大腸菌ファージは、F特異RNAファージGI～GIV（FRNAPH GI～GIV遺伝子群）を対象とした。定量的タイピング手法[10]による感染力の有無の判断が可能なICC-PCR法（培養法と分子生物学的手法のPCR法を組み合わせた手法）と、Typhimurium WG49を宿主菌としたプラック形成法[10]による感染力を有している総FRNAPH

濃度（Plaque 法）により評価を行った。

３．研究結果

3．1　下水再生処理施設等における AOC の実態

各種下水試料の AOC の定量結果について表-1 に示す。流入下水では AOC-P17 と AOC-NOX の合計値の総 AOC が 200～300μg/L に対し、二次処理水では数 μg～最大 200μg/L、窒素・りんの高度処理を目的とした生物学的高度処理水では数 μg/L～60μg/L 程度、MBR 処理水は数 μg/L～30μg/L となっており、各試料において定量値に変動があるものの、その最大値は処理水質が良好となることで低下傾向を示した。また、オゾン処理水でも総 AOC の定量値に変動が生じており、オゾン処理後において濃度上昇が見られたが、原水となる二次処理水や生物膜処理水の総 AOC 濃度の影響を受けているものと推定された。総 AOC の構成は P17 株によるものが 27～100%（平均値 76%、中央値 79%）を占めていた。水質性状として総 AOC と NH_4-N との関係について図-3 に示す。下水試料中の NH_4-N 濃度が概ね 5mg/L を超えることで総 AOC が上昇傾向を示しており、AOC の制御には NH_4-N の低減化が必要と考えられた。バクテリアの増殖防止には総 AOC 濃度を 10μg/L 以下にする必要性があるとの報告[11] があり、生物学的高度処理水や MBR 処理水では値を満足するものもあったが、流入下水を含め二次処理水や生物膜処理水などの多くの試料は超過した値であった。このため、一部の試料を用いて実験的にろ過処理（公称孔径：0.45μm、材質：ポリエーテルサルフォン）や、吸着材等を利用した回分実験では、多孔質炭素材料（吸着材）、活性炭による総 AOC の低減効果を評価した。回分実験は、試料水 1L に対し吸着材、活性炭を 0.1g あるいは 0.5g 添加し 10～120 分間接触させた。評価結果を図-4、5 に示す。図-4 より、ろ過処理により総 AOC 濃度は平均で約 80%低下しており、ろ過による低減効果の可能性が見込まれた。ろ過処理による NH_4-N の減少傾向が見られないことや、タンパク質低吸着フィルターであることから、フィルターへの AOC の吸着の可能性は低いと推定される。

表-1　各種下水試料のAOCの定量結果

試料		AOC-P17 (μg/L)	AOC-NOX (μg/L)	総AOC (μg/L)
B再生処理施設	二次処理水	1 0～197	0 3～42 2	1 5～239
	生物膜処理水	0 2～86 3	0 3～17 6	0 6～104
	オゾン処理水	5 4～221	0 4～6 5	5 4～227
C下水処理施設等	流入下水	103～233	32 3～92 2	195～309
	二次処理水	1 0～57 5	0 4～17 6	1 5～75 1
	生物学的高度処理水	0 02～53 6	0～5 7	0 02～59 3
	凝集剤添加活性汚泥法	7 0～30 7	1 9～2 5	9 4～32 6
	オゾン処理水	5 5～62 3	0 9～16 7	6 4～78 9
	MBR処理水	0 4～26 3	0 4～2 3	0 9～28 6

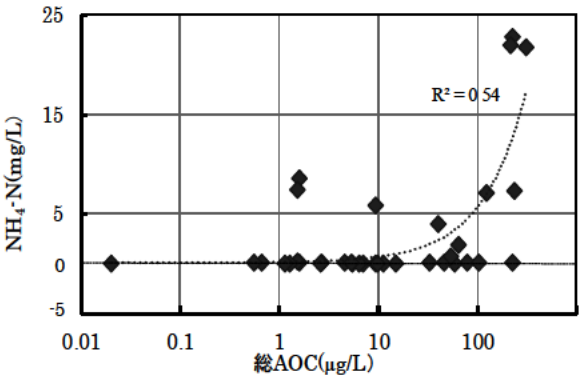


図-3　総AOCとNH_4-Nの関係

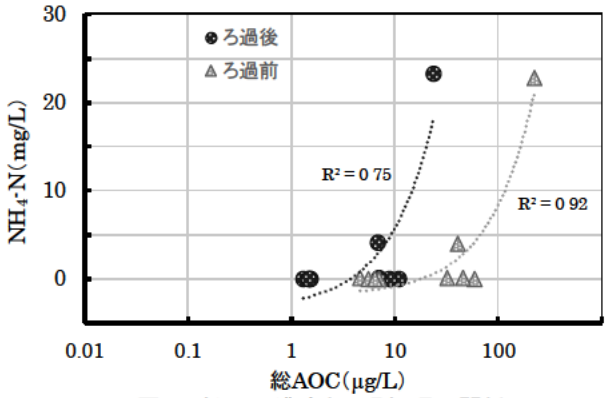


図-4　総AOC濃度とろ過処理の関係

次いで、吸着材等を利用した回分実験の AOC 低減効果の評価結果を図-5 に示す。原水（オゾン処理水）中の AOC は約 80μg/L であったが、吸着材、活性炭の添加量を 0.1g、0.5g とし、接触時間を 60 分間以上とすることで概ね 10μg/L 以下となった。一方、PO_4-P との関係について図-6 に示す。NH_4-N と比較してのバラツキが見られ、相関関係は見られなかった。

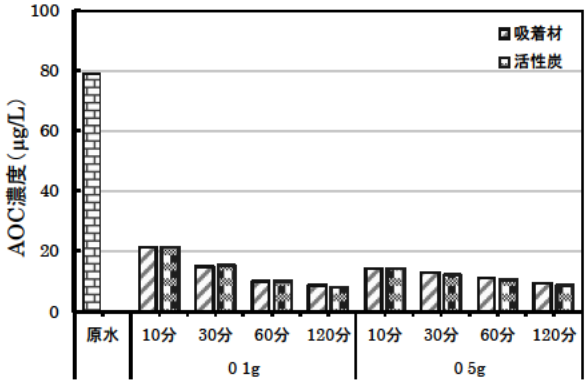


図-5　吸着材等によるAOCの低減効果

以上の調査結果から、処理水中の NH_4-N が 5mg/L を超えることで AOC が上昇傾向を示しており、AOC の制御には NH_4-N の低減化が必要と考えられた。一

部の試料において、生物学的高度処理水や MBR 処理水は総 AOC 濃度が 10μg/L 程度以下であったが、それ以外の下水試料において AOC の抑制には、ろ過処理や吸着材等利用による吸着処理を行う必要があると考えられた。

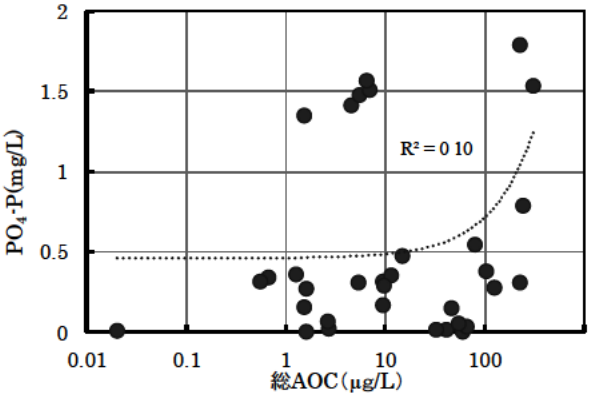


図-6 総AOCとPO_4-Pの関係

3. 2 水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明

3. 2. 1 ニトロソアミン類の実態評価

塩素処理の有無やオゾン処理後の易分解有機物の低減等による N-ニトロソアミン類の定量評価結果を図-7 に示す。評価試料は二次処理水を対象としたが、ケース 1、2 にて採水日、塩素添加濃度および残留塩素の中和処理の有無など実験条件が異なる。原水とした二次処理水の N-ニトロソアミン類の濃度は、物質の合計で約 240～270ng/L であった。その内の約 60%を NPYR が、次いで NPIP が約 20%を占めていた。オゾン処理のみの条件では、8 物質合計の生成濃度は約 700～800 ng/L であり、NPYR と NPIP で約 80%を占めていた。オゾン処理後水に次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を 10mgCl/L とした条件にて、最も生成濃度が高く約 840～1,100ng/L となった。その内訳として NPYR と NPIP の 2 生成物で約 80%

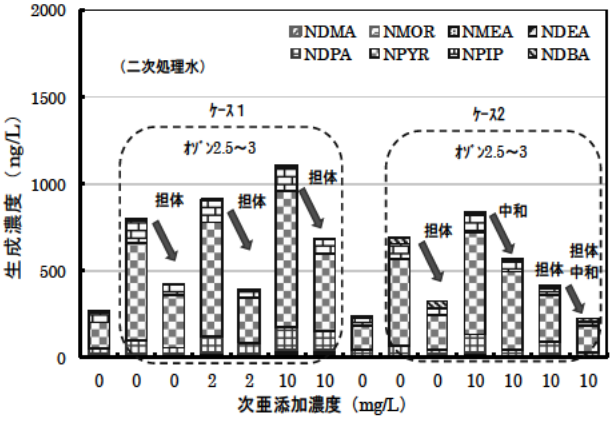


図-7 担体処理等によるﾆﾄﾛｿﾞｱﾐﾝ類の低減効果

を占めていた。一方、N-ニトロソアミン類の生成量の抑制策として、オゾン処理後において易分解有機物を担体処理し塩素処理を行ったケースでは、生成濃度が約 40%低減、残留塩素の中和では約 30%の低減効果が見込まれ、低減効果が高い生成物は NPYR と NPIP であった。

8 生成物の内、発がん性が懸念[12]されている NDMA や NMOR について改めて整理した結果を図-8 に示す。二次処理水の NDMA 濃度は 1.5～1.7 ng/L であったが、オゾン処理後水に次亜塩素酸ナトリウムを 10mgCl/L とした添加条件では、NDMA 濃度は 10.9～13.4ng/L に上昇した。NDMA に比較して NMOR では、オゾン･塩素処理による生成濃度の上昇がなく、その濃度は 7.0～18.7ng/L であった。生成量の抑制策として評価した担体処理と残留塩素の中和処理では、概ね 20～30%（一部の試料は 70%だが定量下限値以下の値で算出）の低減効果が見込まれた。

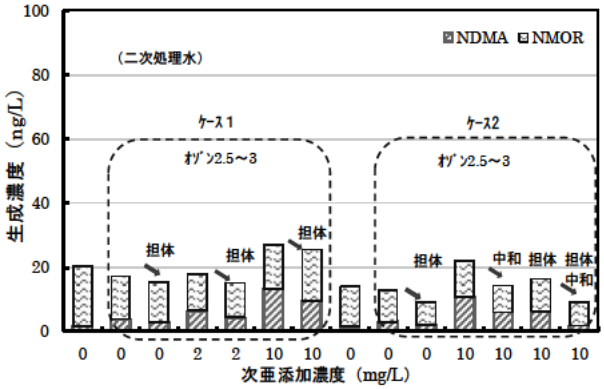


図-8 担体処理等によるNDMAとNMORの低減効果

次いで、採水日が異なる生物学的高度処理水（A^2/O 法）を対象とした評価結果を図-9、10 に示す。二次処理水についてはケース 1 と 3、ケース 2 と 4 で同一試料である。図-9 において、通常の活性汚泥法の二次処理水と生物学的高度処理法の処理水では、次亜塩素酸ナトリウム添加前の試料で N-ニトロソアミン類の濃度に若干の違いが見られ、二次処理水では、8 物質の合計が 240～270ng/L であるのに対し生物学的高度処理水ではやや高く 370～420 ng/L であった。しかし、次亜塩素酸ナトリウムを添加したケースではともに生成濃度は 8 物質の合計で約 600ng/L で大差がなかった。ケース 5 の NH_4-N を残存（センサーによる読取値 17mg/L）させた硝化抑制の二次処理水では、次亜塩素酸ナトリウムの添加により N-ニトロソアミン類の生成濃度が増大しており、処理水中に残存する NH_4-N が N-ニトロソアミン

類の生成能に影響を及ぼすことが考えられた。生成の抑制策としての残留塩素の中和では、約 50～60%の低減効果が見込まれ、低減効果が大きい生成物は NPYR であった。ケース 3、4 では次亜塩素酸ナトリウムの添加のみによる N-ニトロソアミン類の生成状況を示したが、10mgCl/L の添加条件の生成量は添加前と比較して 1.4～2.6 倍に上昇、ケース 1、2 におけるオゾン処理を追加した条件では 3.4～4.1 倍量となった。

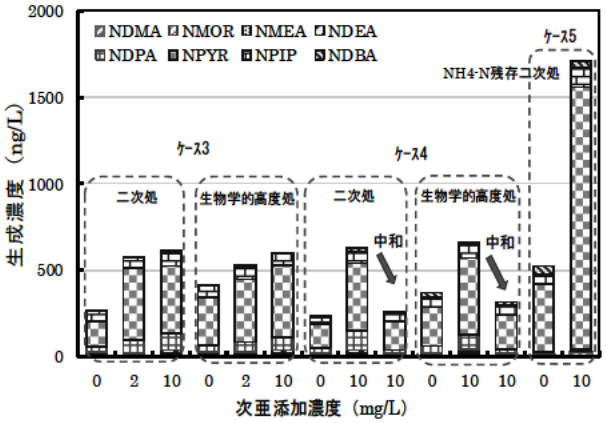


図-9 残留塩素中和によるﾆﾄﾛｿﾞｱﾐﾝ類の低減効果

ケース 3､4 において NDMA と NMOR について改めて整理した結果を図-10 に示す。NDMA と NMOR ともに二次処理水と生物学的高度処理水では次亜塩素酸ナトリウム添加による生成量に大差はなかった。10mgCl/L の添加条件にてやや NDMA の生成濃度が上昇したが 10ng/L 以下であった。また、ケース 3、4 における 10mgCl/L の添加条件にオゾン処理を追加したケース 1、2 では、NDMA の生成濃度が約 2 倍となったが、最大濃度は 13.4 ng/L であった。NMOR に関しては、オゾン処理の追加に伴う顕著な濃度上昇は見られなかった。生成の抑制策としての残留塩素の中和では、NDMA と NMOR ともに低減効果が認められた。ケース 5 での NH_4-N が残存する二次処理水では NMOR の顕著な生成量の増大は見られなかったが、NDMA は生成量が 28.3ng/L に上昇した。

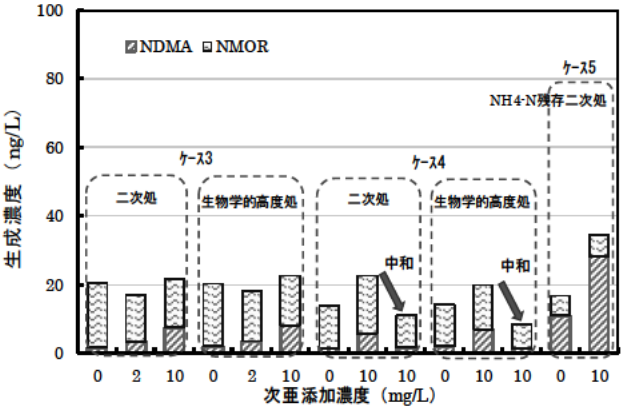


図-10 残留塩素中和によるNDMAとNMORの低減効果

上記の N-ニトロソアミン類の生成評価では、オゾンの注入率を 2.5～3mg/L とした一定の条件であったが、以下の評価においては、注入率を 0～6mg/L に変動させ、対象水は生物学的高度処理水（修正バーデンフォ法）に加え膜分離活性汚泥法（MBR）の処理水とした。生物学的高度水を対象とした評価結果を図-11、12 に示す。オゾン注入率を 6mg/L とした条件にて 8 物質合計の生成濃度が最も高くなったが、1～2mg/L 程度では生成量がやや低下していた。NMOR の生成はほとんど認められなかったが、オゾン注入率が 2～6mg/L の範囲内で NDMA の生成が顕著となり、その濃度は約 34～59 ng/L であった（図-12）。ケース 1～4 における最大生成量は NDMA と NMOR を合せ 20 ng/L 程度であることからも、比較的に高濃度であると考えられた。オゾン注入率を 2mg/L 以下に低下させた場合、次亜塩素酸ナトリウムを高濃度に添加しても NDMA と NMOR の顕著な生成は認められなかった。前述の生物学的高度処理

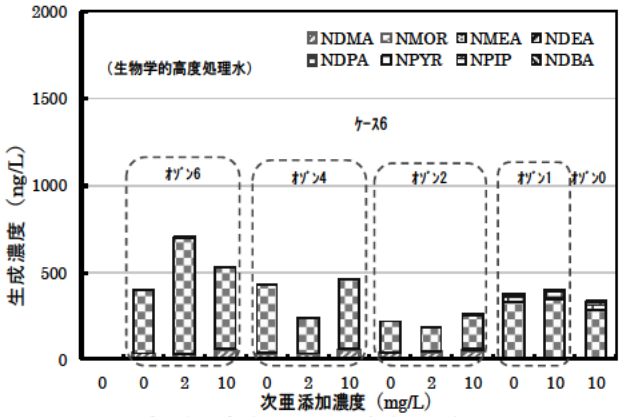


図-11 生物学的高度処理水の塩素とｵｿﾞﾝ処理によるﾆﾄﾛｿﾞｱﾐﾝ類の生成濃度

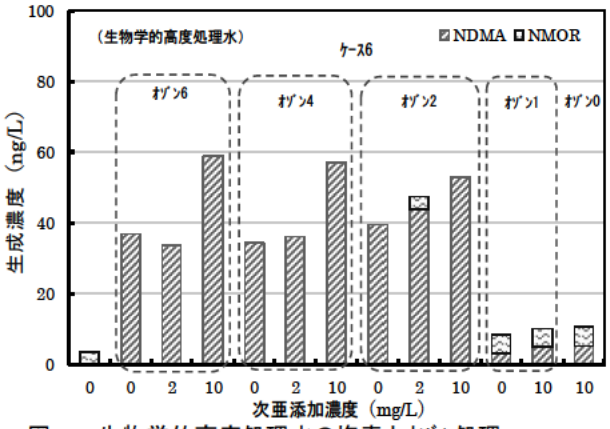


図-12 生物学的高度処理水の塩素とｵｿﾞﾝ処理によるNDMAとNMORの生成濃度

水は A^2/O 法であるのに対し、本評価では修正バーデンフォ法の処理水を利用したが、窒素・りんの高度処理を両手法とも主目的としていることから、処理水質に大差がないことが想定される。採水日等が異なることから水質変動に起因するものなのか否かについて、今後、データの蓄積が必要と考えられた。

MBR 処理水の評価結果について図-13、14 に示す。オゾン注入率に応じた 8 物質の生成濃度の上昇傾向が見られず、8 物質の生成濃度の合計値も他のケースと比較して全体的に低い状況であった。しかし、オゾン注入率が 2～6mg/L の範囲内にて、次亜塩素酸ナトリウムの添加により NDMA の生成がより顕著となり、その濃度は約 24～55 ng/L であった（図-14）。先の生物学的高度処理水と同様に、NMOR の顕著な生成は認められず、また、オゾン注入率が 2mg/L 以下であればNDMA の顕著な生成が認められなかったが、NMOR に関しては生成濃度がやや上昇したものの 10 ng/L 以下であった。

米国環境保護庁では生涯発がんリスクを 10^{-5} に相当する水道水中の NDMA 濃度として 7ng/L を示している [13]。また WHO の飲料水水質ガイドライン値 [14]

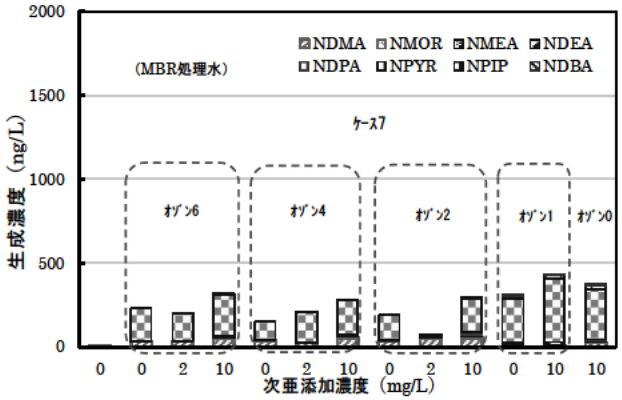


図-13　MBR処理水の塩素とｵｿﾞﾝ処理によるﾆﾄﾛｿﾞｱﾐﾝ類の生成濃度

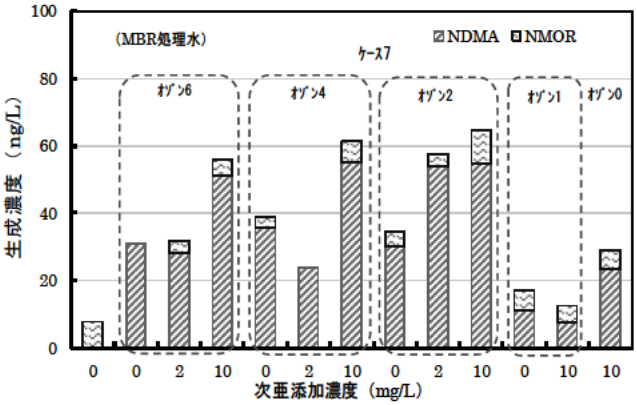


図-14 MBR処理水の塩素とｵｿﾞﾝ処理によるNDMAとNMORの生成濃度

や厚生労働省の水道水質基準の要検討項目の目標値 [15] として 100ng/L が定められている。本評価では、各再生原水に対してオゾン注入率を 2mg/L 以上ならびに次亜塩素酸ナトリウムによる塩素処理により NDMA 濃度が 7ng/L を超過したが、オゾン処理後における易分解有機物の担体処理や残留塩素の中和処理を行うことで NDMA の低減化が図られる可能性が示された。

3. 2. 2　再生処理による NoV、FRNAPH の除去不活化効果

オゾン、塩素消毒による NoV、総 FRNAPH 濃度の低減効果を図-15 に示す。なお、MBR 処理水を用いたケースでは、消毒原水を含めそのオゾン、塩素消毒後の試料からは NoV、総 FRNAPH とも不検出（検出限界値以下）であった。NoV の低減効果はオゾン注入率が 6mg/L 時に 1log 弱、その後の塩素処理により 1.2log となった。NoV は遺伝子の定量結果に基づくため実際の不活化効果はより高いことが推定される。総 FRNAPH については、オゾンの注入率を高めることで低減効果が向上しており、注入率が 6mg/L の低減効果は 1.5log となった。オゾン処理の後に 2mgCl/L の添加条件にて塩素処理を行うことでオゾンの注入率の多少に関わらず全ての試料で不検出となった。この時の実測値を 1 プラーク（検出限界値）と仮定して低減効果を算出すると 2.2log 以上となり不活化が高いことが推定された。図には示していないが 10mgCl/L とした添加条件でも同様な結果が得られている。

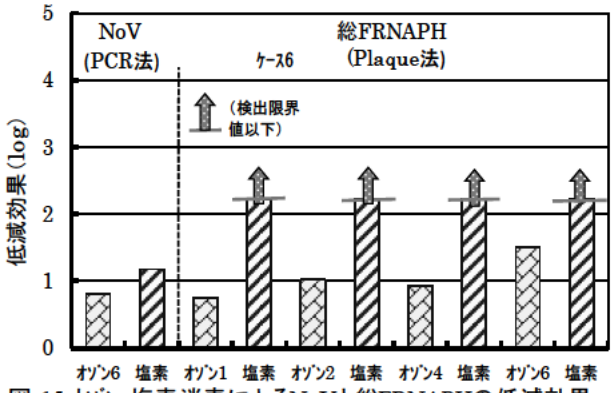


図-15 ｵｿﾞﾝ･塩素消毒によるNoVと総FRNAPHの低減効果（塩素添加濃度2mgCl/L）

採水時における残留塩素濃度は 2mgCl/L の添加条件にて遊離塩素が 0.5～0.7mg/L、全塩素が 1.0～1.2mg/L、10mgCl/L の添加条件では遊離塩素が 6.7～7.1mg/L、全塩素が 8.1～8.5mg/L で推移していた。

次いで、B 再生処理施設における NoV と FRNAPH の低減効果について図-16 に示す。NoV についてのみスポット採水による各 3 試料の平均値である。また、ICC-PCR 法による二次処理水中の FRNAPH は、GⅡが最も高濃度であったことから、その結果のみをグラフ中に記した。

活性汚泥二次処理水を原水とした生物膜処理（HRT 約 6 時間）による NoV と FRNAPH の低減効果は低く PCR 法あるいは Plaque 法での評価で最大で 0.3log 程度であった。生物膜処理後のオゾン処理（注入濃度 6mg/L、HRT 約 3 時間）では NoV の低減効果は 1.6log 程度に対し、ICC-PCR 法や Plaque 法では不検出であった。この時の各実測値を 1copy あるいは 1 プラーク（検出限界値）と仮定して低減効果を算出すると ICC-PCR 法では 3.9log 以上、Plaque 法は 2.9log 以上に向上した。さらに、オゾン処理後の塩素処理水（再生水：次亜塩素酸ナトリウム注入濃度 10mg/L、ライン注入）では全ての試料において NoV、FRNAPH ともに不検出であり、上記と同様に検出限界値を仮定して低減効果を算出すると NoV は 2.3log 以上、FRNAPH GII（ICC-PCR 法）は 3.9log 以上、総 FRNAPH（Plaque 法）は 2.9log 以上となった。NoV と FRNAPH 等の低減効果に差が見られたが、NoV は感染力の有無を反映しない遺伝子定量法であり、FRNAPH は感染力を反映する培養法による評価であるため、実際の低減効果（不活化効果を含む）は FRNAPH の値に近似しているものと推定される。これらの結果から、ウイルスの不活化効果は概ね 4log 以上であることが推定された。

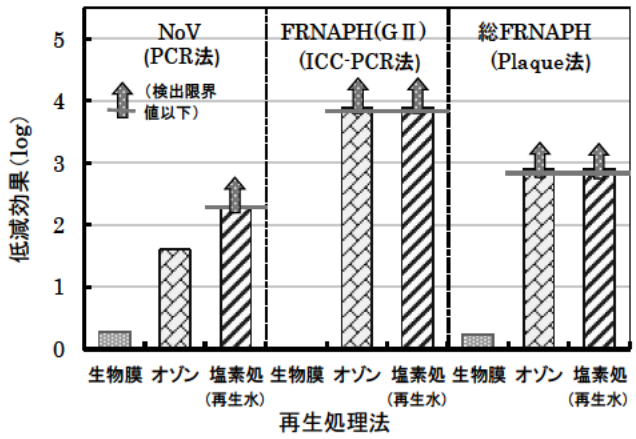


図-16 再生処理ﾌﾟﾛｾｽごとのNoVと総FRNAPHの低減効果

なお、採水時における再生水の残留塩素濃度は、遊離塩素が 4.9～6.5mg/L、全塩素が 6.9～8.7 mg/L で推移しており、添加条件を 10mgCl/L としたケース 6 での残留塩素濃度とほぼ同じであった。

4．消毒効果の観点での再生処理技術の評価

再生水の主な利用用途は、水洗･散水･修景･親水利用に大別されるが、特にヒトとの接触の可能性が高い用途は親水･水洗利用である。主に衛生学的安全性の向上を目的とした再生処理法は塩素、オゾン、紫外線、膜処理であるが、その内、消毒副生成物の生成リスクが生じる可能性が高いものは塩素、オゾン処理である。塩素処理の導入箇所数は 111 箇所であるが、再生処理法として塩素単独処理のみの箇所数は 33 箇所であることから、塩素と他方式の組合せ数は 78 箇所であり、その内の 17 箇所がオゾン処理との併用処理、オゾン単独処理では 4 箇所であり、約 280 箇所の場外再利用施設の内、約半数が塩素、オゾン処理を導入している状況であった。ヒトとの接触が特に高いと想定される水洗･親水利用のケースでは、その再生処理技術としてオゾン･塩素消毒の併用処理の導入事例が多い状況であることから、本研究では、衛生学的安全性の向上の観点からウイルスを指標としたオゾン･塩素消毒による除去、不活化効果を評価した。その結果、室内実験や実再生水処理施設での調査結果から、NoV や大腸菌ファージの高い除去･不活化効果が得られており、消毒効果の観点から衛生学的安全性は担保されているものと考えられた。しかし、塩素消毒とオゾン処理について、その処理レベルに応じた水質性状の変動は N-ニトロソアミン類の生成に影響を及ぼすことが明らかとなり、消毒による衛生学的安全性の担保に加え、消毒副生成物への対応を要する可能性が生じる結果となった。調査対象とした B 再生処理施設ではオゾン注入率が 6mg/L、塩素注入率が 10mgCl/L としており、これらの注入率とした室内実験の結果では、N-ニトロソアミン類の生成が顕著となった。生成の抑制策としては、オゾン処理後における易分解有機物の低減、残留塩素の中和、再生原水の高度化として MBR 処理水の利用等が考慮された。易分解有機物の低減では、現有施設にて生物膜処理プロセスを有する場合、生物膜処理･オゾン処理･塩素消毒としたプロセスを、オゾン処理の後段に生物膜処理を配置することも考えられる。また、限られたデータではあるが、オゾン･塩素の併用処理では、オゾン注入率を 2mg/L 以下、塩素注入率を 2mgCl/L 程度としても NoV、FRNAPH の除去･不活化効果が得られる可能性があり、消毒副生成物の抑制策として注入率の低減化も

考慮できる。この場合、NoV、FRNAPH の除去･不活化効果の割合を評価するにあたり、検出限界値を高め、低減効率の精度向上を図る必要がある。消毒剤の注入率の低減は、消毒副生成物の生成抑制に加え、維持管理費の節減に繋がる利点を有する。

５．まとめ

本研究は、再生処理水質と生物膜生成要因の解明として、生物膜の生成要因である AOC の実態把握、水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明として、塩素消毒とオゾン処理について、その処理レベルに応じた水質性状の変動が N-ニトロソアミン類の生成に及ぼす影響を評価した。また、これらの成果や再生処理による NoV、FRNAPH の除去不活化効果から、消毒効果の観点での再生処理技術の評価を行った。令和元年度が最終年度にあたるため、過年度の結果を含め以下に整理を行った。

1) 生物学的高度処理法や膜分離活性汚泥法などを経ることで AOC の低減化が図られていた。
2) 再生原水中の NH_4-N が概ね 5mg/L を超えることで AOC が上昇傾向を示しており、AOC の制御には NH_4-N の低減化が必要と考えられた。
3) オゾン処理･塩素消毒の併用処理により N-ニトロソアミン類の生成濃度が高まった。
4) オゾン処理および塩素処理によって生成濃度が最も高い物質は NPYR であり、次いで NPIP であった。
5) オゾン処理後に易分解有機物を担体処理、また残留塩素を中和することで、N-ニトロソアミン類の生成濃度の低減化が図られる可能性が示された。
6) オゾン･塩素消毒を行った再生水中などからは NoV、FRNAPH とも不検出であり、衛生学的安全性の向上が図られてい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 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、2012
2) 平成 26 年度版下水道統計、日本下水道協会、2016
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、2005
4) （公社）日本下水道協会、下水試験方法（下巻）、387-389、2012
5) 日本水道協会、上水試験方法（2011 年版）Ⅳ.有機物編、212-214、2011
6) Suchul Yoon, Norihide Nakada, Hiroaki Tanaka, A new method for quantifying N-nitrosamines in wastewater samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, Talanta 97, 256-261, 2012
7) 中田典秀、板井周平、楊永奎、鈴木裕識、田中修平、工業用化学物質の酸化処理過程における副生成物生成能試験法の提案、土木学会論文集 G（環境）、72（7）Ⅲ_95-Ⅲ_116、2016
8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課、ノロウイルスの検出法について、2007
9) 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
10) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. Applied and Environmental Microbiology. 82, 4244–4252, 2016
11) Dirk van der Kooij, Assimilable Organic Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth, JOURNAL of AWWA pp.57-65, 1992
12) IARC: Some N-Nitroso Compounds IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 17.Lyon France : International Agency for Research on Cancer.365,1978.
13) US EPA: N-Nitrosodimethylamine (CASRN 62-75-9) Integrated Risk Information system(IRIS),1993.
14) WHO: Concise International Chemical Assessment Document, 38, World Health Organization, Geneva, N-Nitrosodimethylamine, 2002.
15) 厚生労働省健康局水道課 http://www mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi html.

資源回収型下水処理技術に関する研究

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 30～令 3
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：重村浩之、宮本豊尚

【要旨】実処理場を対象に、高速活性汚泥法に類似した予備エアレーションタンクにおける COD 除去量への影響を調査した。余剰汚泥を返送する予備エアレーションタンクにおいては、SCOD を約 20%除去することが確認された。また流入水中の COD において PCOD が支配的な場合、SS の除去による PCOD の回収を検討することが下水中の有機物資源の回収に有効であることが示唆された。下水道資源を用いた固形化物による海洋施肥効果を検討するため溶出試験を行い、ワイブル分布の累積分布関数で溶出現象を近似し、溶出速度に与える影響を求めた。超純水と塩化ナトリウム水溶液を溶媒として試験を行ったが、溶出には大きな差はみられなかった。また寒天で固化すると、最終的な溶出量には差がみられなかった一方で、溶出速度を大幅に抑制した。
キーワード：予備エアレーションタンク、有機物回収、海洋施肥、溶出試験、ワイブル分布

1. はじめに

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

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

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

2. 予備エアレーションタンクによる有機物回収の基礎的調査

水中に含まれるエネルギーを高効率で回収する方法として、H30 年度は高速活性汚泥（High-rate activated sludge）法 [4]に注目して実験を行った。高速活性汚泥法は、高い有機物負荷、HRT 30 分未満、SRT 1 日未満で運転される活性汚泥法の一つであり、従来の活性汚泥法の前段に使われることが多い。SRT を短くすることで、細菌が主体の汚泥となり、水処理工程で除去された有機物の多くが、二酸化炭素へ変換されず汚泥として回収される。しかしながら、国内の下水処理場において導入実績は無く、導入可能性は不明である。また、水温低下における有機物回収量への影響は不明である。昨年度においては、高速活性汚泥法処理水は、沈殿槽処理水よりも COD が低く、高速活性汚泥を採用したことによる処理能力の向上が確認された。高速活性汚泥法の TS・時間当たりの COD 除去量が大きい条件について整理した。高速活性汚泥法の TS・時間当たりの COD 除去量は、各態に着目すると、溶存態 COD（SCOD）除去量は、いずれの条件も約 15 mg/(g・h)であり、条件により変化が少なく、コロイド態 COD（CCOD）除去量は、いずれの条件も 5 mg/(g・h)以下であった。懸濁態 COD（PCOD）除去量は、1 から 29 mg/(g・h)までで、差が大きく、特に送風倍率が高い時に低かった。

一方、高速活性汚泥法と類似した技術として、1990 年代以前に整備された処理場で導入がなされた予備エアレーションタンク（前曝気槽・プリエアレーションタンク）がある。1972 年、84 年、94 年の下水道施設計画・設計指針（以下「指針」と呼ぶ）に記載があり、最初沈殿池の前に設け、必要に応じて余剰活性汚泥の返送設備を設けることもあるとされている [6),7),8)]。指針では、予備エアレーションタンクの目的は、エアレーションにより下水の嫌気化を防止するとともに、油脂の除去、臭気発生の防止等について役立つものであり、また余剰活性汚泥を返送することによって、BOD、SS を活性汚泥フロックに吸着させて、最初沈殿池における沈殿効率を向上

させることに役立つものとされている。余剰活性汚泥を返送する場合、下水中のBOD,SSの除去率は浮遊性の有機物に対して大きく、溶解性有機物に対して小さいと記載されている。藤井ら[9]の報告によると、前曝気槽における浄化が生物学的吸着にあるとすると曝気時間は下水と活性汚泥が平衡吸着濃度に達する時間が能率的とみなされ、20-30分で平衡吸着濃度に達するとのことであった。また本文献では、前曝気槽ではCODが平均で15%、SSが29.1%除去された事例が報告されている。一方で山口ら[10]によると、予備エアレーションタンクに対して余剰汚泥の投入を行った場合、溶存態のBODが若干除去できたが、それ以外は特に顕著な効果がみられなかったと報告している。2001年度の指針より予備エアレーションタンクの記載が削除されているため、現在では新しい処理場では導入されることは考えにくい。既存の処理場においても増設や改築時に用地の問題があった処理場などでは廃止される傾向にある。

今年度は、余剰汚泥を返送しているA市B処理場に実際に設置されている予備エアレーションタンクついて、前後の処理水の性状変化を把握した。併せて、予備エアレーションタンクが存在しない条件や余剰汚泥の返送を行わない条件についても疑似的に再現を行い、それぞれを比較することで処理水の改質効果について確認した。

2.1 方法

2.1.1 実施設における調査

B処理場（日量12万トン：排水区分 合流）の処理フローを図1に示す。沈砂池を通過した汚水は、予備エアレーションタンクを曝気・攪拌されながら概ね30分かけて通過する。曝気風量は概ね流入汚水の2割相当である。その後最初沈殿池（水面積負荷 1～2m³/(m²・h)、HRT=冬季は約3時間）を経て標準活性汚泥法で処理される。最終沈殿池で固液分離された余剰汚泥は、その一部が返送汚泥として曝気槽に戻されるほか、それを超えた量については予備エアレーションタンクに返送され、最初沈殿池で初沈汚泥と合わせて引き抜かれ、下流のC処理場に送泥されている。

実験にあたっては、この処理（Case3）と比較するため、予備エアレーションタンクのない処理フローを模擬したもの（Case1）、予備エアレーションタンクで曝気のみ行った処理フローを模擬したもの（Case2）を比較した。実験は同日の朝9時と昼12時前の2回実施した。

Case 1とCase2の実験条件を表1に示す。Case1では、流入水を無曝気で30分間マグネチックスターラーにより攪拌したのち、攪拌直後の混合物（模擬最初沈殿池流入水）及び3時間静置後の上澄み（模擬一次処理水）を採水し次項に示す測定を行った。Case2では、流入水を30分間曝気し、攪拌直後の混合物（模擬最初沈殿池流入水）及び3時間静置後の上澄み（模擬一次処理水）を採水した。曝気量は、実処理場での曝気量と同じ比率となるよう調整した。なお、1回目に採水した実験系では、Case2の曝気の設定が不十分であり、考察の対象から外している。

表1　模擬最初沈殿池流入水の調整条件

	Case1	Case2
仕様容器	5Lポリ瓶	5Lポリ瓶
採水量	5L（満水）	3L
曝気量		20ml/分

Case3として、実処理場において予備エアレーションタンク流入水及び返送余剰汚泥を採水後、30分後に最初沈殿池流入水を採水した。調査当日のB処理場における運転状況は表2の通りであった。

あわせて、一連の処理による一次処理水への影響を評価するため、Case1,2の処理を行った各試料及びCase3で採取した最初沈殿池流入水を、ガラス製メスシリンダー（2L）にて最初沈殿池のHRTと同等の3時間実験室内で静置し、上澄み液を分取した。

また、実処理場においてCase3の最初沈殿池流入水を採取してから3時間後に最初沈殿池流出水（一次処理水）を採取しての水質分析を行い、Case1～3における上記の上澄み液の水質と比較した。これら一連の調査における採水の作業フローを図2に示す。

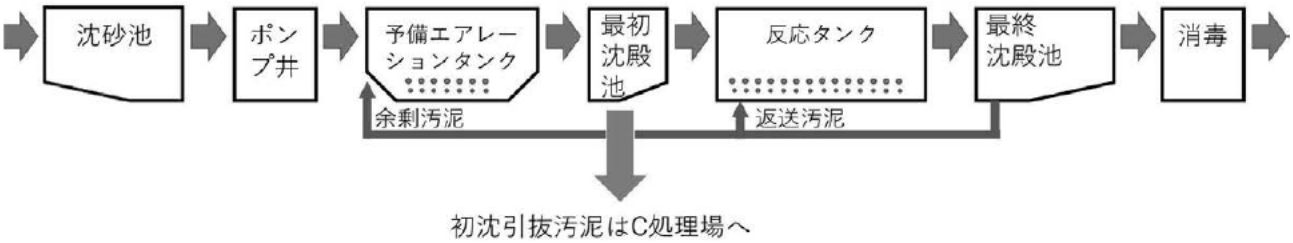


図1　B処理場の水処理フロー

表２　現地調査時におけるＢ処理場の運転状況

	１回目	２回目
流入水採取開始時間	9:35	11:40
流入汚泥量（m³/h）	3500	4500
余剰汚泥返送量（m³/h）	190	120
予備エアレーションタンク滞留時間（min）	45	35
予備エアレーションタンク曝気量（Nm³/h）	1300	1300
無降雨継続時間	７日	

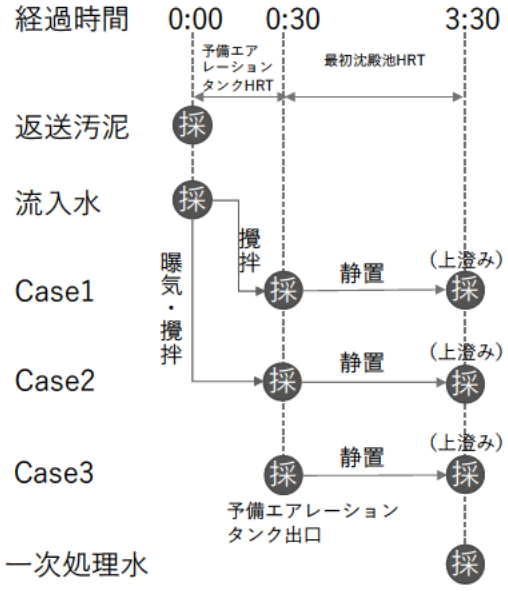


図２　調査における作業フロー

2.1.2　水質測定の項目と方法

図２で示した各時点においてサンプルを採取し、TS、VS、SS 及び各態 COD を測定した。TS、VS、SS は下水試験方法に従って測定した。各態 COD は、既報[4]を参考に、全試料、ろ過試料、凝集－ろ過試料の COD（TCOD、FCOD、FFCOD）を測定し、その結果から、懸濁態、コロイド態、溶存態 COD （PCOD、CCOD、SCOD）を各態 COD として算出した（図３参照）。また、曝気汚泥を採取し、蒸発残留物（TS）を測定した。FCOD は、孔径 1.5μm のガラス繊維ろ紙のろ過試料の COD とした。FFCOD（SCOD と同じ）は、Mamais ら[5]の方法に従った。すなわち、試料に硫酸亜鉛溶液を添加し、pH10.5 で凝集沈殿させ、上澄みを孔径 0.45μm のセルロースアセテートフィルターでろ過し、ろ過された試料の COD とした。PCOD は、TCOD から FCOD を引いた値とした。CCOD は、FCOD から FFCOD を引いた値とした。COD の測定は、有機物捕捉率の高い二クロム酸カリウムによる方法を用い、吸光光度計 DR3900 と測定試薬（HACH 社）を使用した。

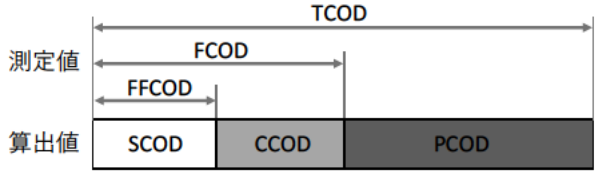


図３　各態 COD の測定値と算出値の関係

2.2　結果

2.2.1　実処理場の処理プロセスにおける COD の変化

図４に実処理場の各処理プロセスにおける COD の変化を示す。それぞれ、流入から各プロセスの HRT 後に採水している。また、図５に SS と PCOD の変化を示す。

流入水の COD は時間変動していることが想定される。今回採水した２回においては、予備エアレーションタンク流入時（流入水+返送汚泥）において、SCOD がいずれも約 100mg/L 程度、CCOD は 20-30mg/L 程度であった。それに対し、PCOD は 740mg/L(1 回目)、180mg/L(2 回目)と大きく、また差も大きくなっている。

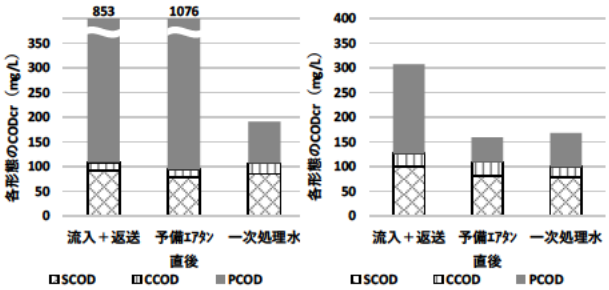


図４　各処理プロセスにおける COD の変化
（左　一回目　右　二回目）

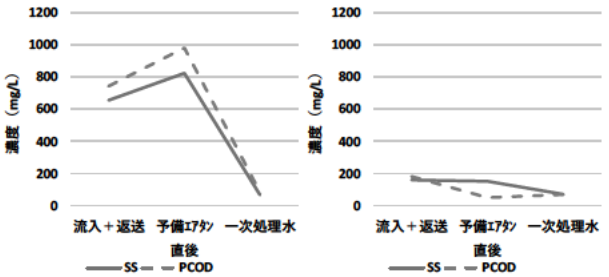


図５　各処理プロセスにおける SS と PCOD の変化
（左　一回目(流入 9:00)　右　二回目(流入 11:40)）

予備エアレーションタンクの前後で、SCOD についてはいずれも２割程度減少、CCOD はほとんど変化してい

なかった。PCOD については、一回目においては740mg/L が 980mg/L と増加している一方で、二回目においては 180 mg/L が 50mg/L と減少しており、SS と概ね同様の挙動をしている。なお PCOD については採水のタイミングによる影響も含まれており、予備エアレーションタンクでの処理による効果は不明確であった。また SS が少ない場合、予備エアレーションタンクの直後と一次処理水の水質に大きな差は見られず、最初沈殿池における COD 除去の効果は不明確であった。

以上から今回調査対象とした処理場のように、流入水中の COD において PCOD が支配的な場合、SS の除去による PCOD の回収を検討することが下水中の有機物資源の回収に有効であることが示唆された。

2.2.2 予備エアレーション手法の違いによる影響

予備エアレーションタンクにおける汚泥の返送及び曝気が一次処理水の水質に与える影響について整理するため、予備エアレーションタンクのない処理フローを模擬したもの（Case1）、予備エアレーションタンクで曝気のみ行った処理フローを模擬したもの（Case2）及び予備エアレーションタンクで余剰汚泥の返送及び曝気を行った実施設の予備エアレーションタンク流入水、流出水及びその上澄み液（Case3）並びに実施設の一次処理水の結果を比較した。ここでは全データが取得できた 2 回目の調査結果について考察する。

表 3　各実験系の水質測定結果　（単位：mg/L）

		流入下水	流入下水＋返送汚泥	予備ｴｱﾚｰｼｮﾝ処理後	沈殿処理後上澄み
SCOD	Case1	102	—	101	98
	Case2	102	—	102	96
	Case3	—	100	81	81
	一次処理水	—	—	—	78
CCOD	Case1	27	—	25	27
	Case2	27	—	25	27
	Case3	—	26	28	23
	一次処理水	—	—	—	21
PCOD	Case1	51	—	65	59
	Case2	51	—	55	57
	Case3	—	182	50	55
	一次処理水	—	—	—	69
SS	Case1	52.5	—	53	51
	Case2	52.5	—	58	54.5
	Case3	—	160	151.5	57.5
	一次処理水	—	—	—	70.5

表 3 に各実験系の COD と SS の測定値、図 6 に除去率を示す。ここで除去率の分母は、Case1 と 2 は流入下水に対して、Case3 と一次処理水は、Case3 の流入下水＋返送汚泥に対してとしている。

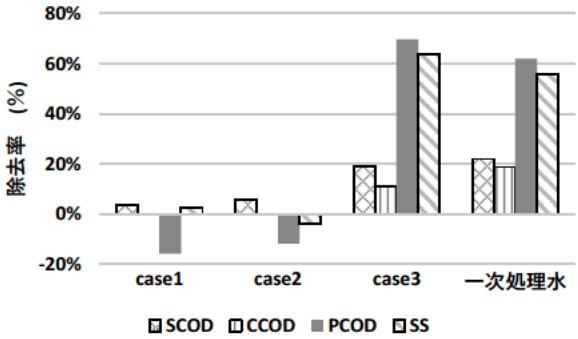


図 6　予備エアレーション＋沈殿による除去率
（Case1-3 沈殿処理後上澄み及び一次処理水）

SCOD は汚泥返送＋曝気では 2 割程度除去されているが、曝気のみや攪拌のみでは変化が見られなかった。CCOD についてはいずれも測定値が小さく、一次処理水を除いて 1 割以内の変化であった。これは山口ら[10]が報告しているように、汚泥返送＋曝気によって溶存態の BOD が 3 割除去されたほかは、全 BOD、COD、SS ではほとんど差がみられなかったという結果と、類似した結果が得られた。また PCOD については定性的ではあるが SS の挙動と類似した傾向がみられた。

続いて予備エアレーションタンク単独での COD 除去量を下の式により、計算した。

$$\text{TS・時間当たりの COD 除去量[mg/(g・h)]} = (\mathrm{COD_{in}} - \mathrm{COD_{out}}) \div (\mathrm{TS[g/L]} \times \mathrm{HRT\ [h]})$$

ここで、$\mathrm{COD_{in}}$：予備エアレーションタンクの流入（汚泥返送を考慮）もしくは模擬試験における試験前の COD[mg/L]、$\mathrm{COD_{out}}$：予備エアレーションタンクの越流もしくは模擬試験における所定時間後の COD[mg/L]、である。またここでの TS は予備エアレーションタンクもしくは模擬試料の TS、HRT は予備エアレーションタンクもしくは模擬試料の曝気・攪拌時間とする。計算結果を図 7 に示す。各態 COD の除去量に着目すると、Case3 のみ SCOD 除去量は約 60 mg/(g・h)であり、昨年度の高速活性汚泥法での実験結果である 15mg/(g・h)よりも大きい。CCOD 除去量は、いずれの条件も 10 mg/(g・h)以下であり、昨年度の結果である 5mg/(g・h)以下とほぼ同等である。PCOD 除去量はばらつきが大きいが、Case3 では約 400mg/(g・h)となっており、昨年度の結果である 1～29 mg/(g・h)よりも大きくなった。

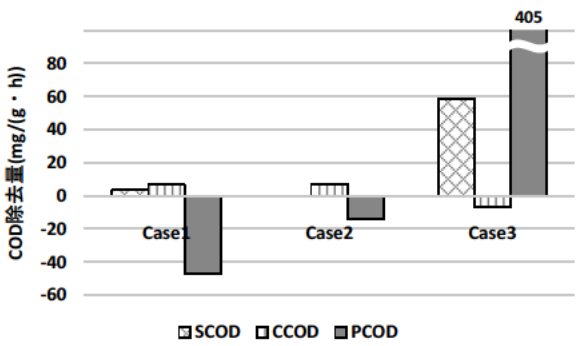


図７　予備エアレーションによる
TS・単位時間当たりの COD 除去量

2.3　まとめ

高速活性汚泥法と類似した予備エアレーションタンクについて、実処理場において COD 除去量への影響を調査した。これから、以下の結果を得た。

1）予備エアレーションタンクの前後で、SCOD についてはいずれも 2 割程度減少、CCOD はほとんど変化していなかった。PCOD については、SS と概ね同様の挙動をしており、予備エアレーションタンクでの処理による効果は不明確であった。

2）模擬的に予備エアレーションタンクなし、および曝気のみの条件を再現して比較したところ、汚泥返送と曝気を行った場合では SCOD が 2 割程度除去されているが、曝気のみや攪拌のみでは変化が見られなかった。

3）TS・時間当たりの COD 除去量は、SCOD では活性汚泥の返送により約 60mg/(g・h)と高速活性汚泥法と比べて大きくなり、CCOD は 10mg/(g・h)以下であった。 PCOD について SS に依存するため、ばらつきが大きい。

3.　下水道資源中の窒素を用いた海洋施肥の検討

3.1　研究内容

昨年度はリン回収について検討がなされていたが、下水道はリン以外にも資源としての可能性があり、今年度はその一つとして窒素について着目した。

一部の水域では、夏季に赤潮や貧酸素水塊が発生し、冬季は栄養塩不足等の要因によりノリの色落ち等が問題とされている海域が存在している[11]。このような水域では、水環境中の栄養塩類のバランスを適切に保つことで、豊かな海を再生し、生物の多様性を保全していくことが重要であり、佐賀市浄化センター[12]をはじめいくつかの地方公共団体の下水処理場では既に季節的な調整運転などの取組が始められている。漁業者サイドにおいても、特にノリやワカメといった藻類養殖において施肥技術の検討が長年にわたって実施されてきており、農業用の化学肥料を用いた検討についても行われている[13]。また、近年では下水汚泥と他の材料を混合・加圧して製造された固化肥料を用いて、コンブの藻場再生に関する試験が実施している事例も報告されている[14]。

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

そこで本年度は、藻類等の養殖を行っている限られた海域への栄養塩の供給剤として下水汚泥肥料等の活用の可能性を検討するため、液状試料や粉体試料を固化した模擬固化肥料について溶出速度の検討を行った。溶出速度が既知となれば、目標とする海域の栄養塩濃度を考慮した施肥量や施肥の頻度を検討することが可能となり、これらを踏まえた事業の採算性や環境影響評価が可能となる。 なお、溶出速度は実スケール・実環境での試験により算出することができるが、本稿ではラボスケールでの溶出試験と結果をモデル化することにより、想定環境における溶出速度の推算を試みた。

3.2.　溶出試験

3.2.1.　試験方法

溶出試験の供試体は、硝酸アンモニウム水溶液（下水処理水や液状肥料を想定）を寒天（Bacto™ Agar）で固化したもの（図８の a）、X 市のコンポスト（下水汚泥を原料にもみ殻を混合し、80℃以上で発酵処理したもの）を寒天（同上）で固化したもの（図８の b）、X 市のコンポストを固化せずにそのまま用いたもの（図８の c）、及び Y 町で使用されている固形肥料（下水汚泥コンポストと固化剤等の他資材を混合・加圧して製造された固形肥料）（図８の d）である 。寒天固化した供試体は、4g の Bacto™ Agar に硝酸アンモニウム水溶液やコンポストを加え、水分が添加資材も含めて 100g になるよう超純水を混合し、加熱後攪拌しながら冷却して作成した。

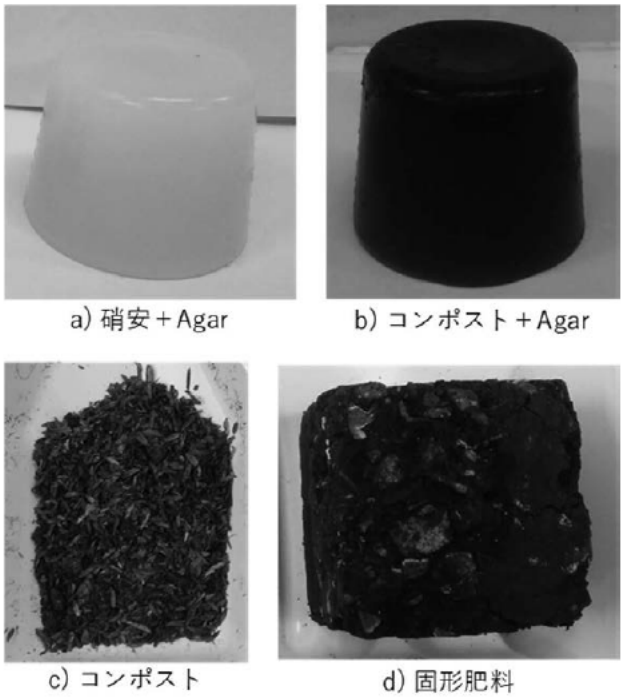


図 8　溶出試験の供試体

表 4　供試体の諸元

		硝安+Agar	コンポスト+Agar	コンポスト	固形肥料
形状		円錐台	円錐台	粒状	立方体
体積　cm^3		101	101		74.1
表面積　cm^2		120	120	1.16×10^5	106
TS		7.4%	7.4%	59%	75%
Agar/総水分(重量比)		4.0%	4.0%		
TN g	超純水	1.29	0.089	0.10	0.29
	NaCl aq	1.28	0.093	0.10	0.28

供試体の諸元（体積、表面積、TS 及び含有窒素量等）については、表 4 に示す。固化したものについては表面の寸法を計測し表面積を求めており、固めていない「コンポスト」のみ、JIS Z 8830（ガス吸着による粉体（固体）の比表面積測定方法)の多点法に準拠して測定した。このため、固めていない「コンポスト」のみ、表面積が突出して大きくなっている。実験開始時における試料の窒素含有量は、硝酸アンモニウム水溶液の固化体については使用した試薬量から、それ以外は CHN 計(Thermo Fisher Scientific 社製 FLASH EA 1112)により測定した。溶媒は、超純水及び 3%塩化ナトリウム水溶液（以下 NaCl 水溶液）の 2 種類を使用し、それぞれ河川水と海水を模した。実験では、各溶媒が 2L 入った約 3L の容器に対して、回転子が直接触れないように供試体を不織布ネットで上部から吊り下げ、実験期間中の溶媒濃度が一定となるようマグネチックスターラーにより 250rpm で実験期間中連続攪拌を行った。概ね室温が 15-20℃の環境で 28 日間溶出試験を実施し、試験開始から 15 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後、8 時間後、12 時間後、24 時間後と 28 日後に各 50ml を採水した。採水したサンプルは適宜希釈し、水酸化ナトリウム - ペルオキソ二硫酸カリウム溶液により分解後 、銅・カドミウムカラム還元-N-(1-ナフチル)エチレンジアミン法により TN を求めた。なお、24 時間後から 28 日後の間は、溶媒の蒸発が想定されたため、適宜超純水を加えて蒸発の影響を無視できるよう調整を行った。溶出試験の装置については図 9 に示す。

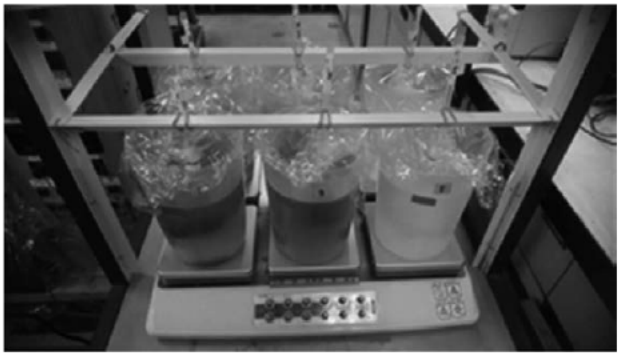


図 9　溶出試験装置

3. 2. 2.　試験結果

各実験系における溶出は、図 10、図 11 に示す通りであった。経過時間及び溶媒中の TN 濃度について両対数グラフで記述すると、コンポスト単独の実験系を除いて概ね 24 時間以内では直線上に乗っており、溶出初期においてはべき乗で濃度が高くなっていく様子が確認できる。また、他より TN 量が多く、液状肥料の固化を想定した肥料「硝安＋agar」は他の肥料と比較して、溶媒中の TN 濃度が常時高かった。

溶媒中の NaCl が与える影響については、図 10 と図 11 を比べるとほとんど差がみられず、不明であった。寒天によるコーティングの効果は、コンポストの実験結果から最終的な溶出量には影響はしないものの、溶出速度を遅くする効果は認められた。

なお、予備実験として寒天に副資材を加えず、超純水を溶媒として 14 時間の溶出試験を行っている。溶媒中の TN は 1.7mg/L であり、図 10 及び図 11 と比較して、実験結果に大きな影響を与える濃度でないと判断し、寒天から溶出する窒素の影響については無視することとした。

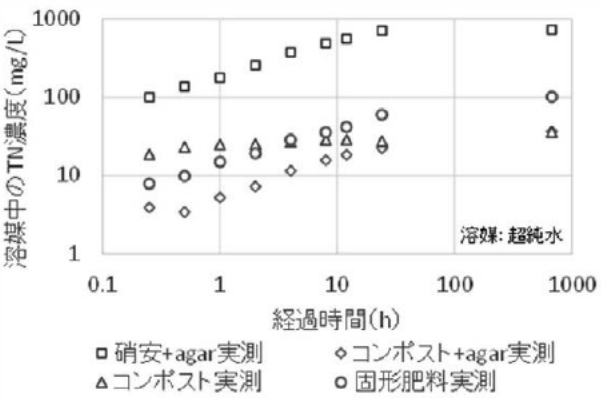


図 10　溶媒中の TN 濃度変化（溶媒：超純水）

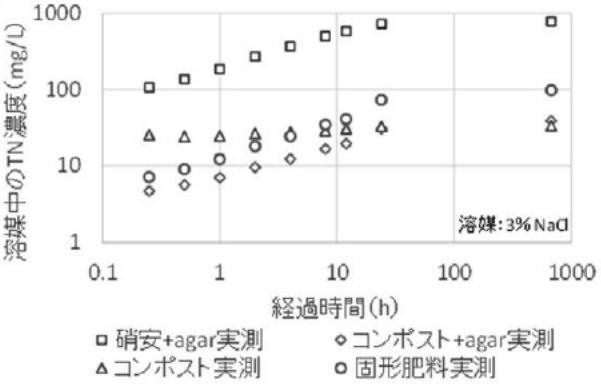


図 11　溶媒中の TN 濃度変化（溶媒：NaCl 水溶液）

3.3.　ワイブル分布を用いたモデル化

3.3.1　ワイブル分布

各実験系で得られた結果について、Itai[15]らの検討を参考に、ワイブル分布の累積分布関数を用いて近似を行った。時間 t における溶媒中の全窒素濃度を$C(t)$とおくと、近似式は次式で表現できる[16]。

$$C(t) = C_0 \times \left[1 - \exp\left\{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^m\right\}\right]$$

ここに

C_0：終局時の溶媒の全窒素濃度(mg/L)、t：経過時間、η：尺度パラメータ、m：形状パラメータ

である。

このとき時間 t における溶媒の TN 濃度変化率$c(t)$はワイブル分布の確率密度関数を用いて下式で示される。

$$c(t) = C_0 \times \frac{m}{\eta} \times \left(\frac{t}{\eta}\right)^{m-1} \times \exp\left\{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^m\right\}$$

ここで、ワイブル分布の適用について言及する。ワイブル分布は機械などが故障するまでの時間の分布、すなわち寿命時間分布として知られている[16]。

ここでは、溶出現象を以下のモデルで仮定する。多数の殻で覆われたカプセルの集合体である固化物は、カプセル内外の TN の濃度による圧力差によって破壊され、破壊されたカプセルから TN が供給される。カプセルの破壊は時間及び溶媒中の TN 濃度に依存する一つの確率分布に従うと考えられるが、溶媒中の TN も時間 t に依存する。そこで時間 t を確率変数と考え、その密度関数を f(t)、分布関数を F(t)、終局状態で破壊するカプセルの総数を N 個とする。溶出試験開始後からカプセルが破壊せずに t 時間経過したという条件で、それに続く Δt 時間以内に破壊するカプセルの期待値はΔt が十分小さいとき次式で与えられる。

$$P(t < T < t + \Delta t | T > t) \times \mathrm{N}$$

$$= \frac{F(t + \Delta t) - F(t)}{1 - F(t)} \times \mathrm{N} \fallingdotseq \frac{f(t)}{1 - F(t)} \Delta t \times N$$

ここで、$h(t) = \frac{f(t)}{1-F(t)}$は、ハザード関数と呼ばれ、ある時間における瞬間的な破壊しやすさを表している[17]。溶出初期で溶媒中の TN 濃度が低い場合にはカプセル内外の TN の濃度による圧力差が大きく、終局状態では固化物中の破壊可能なカプセルがすべて破壊され、$h(t)$ =0 となる。溶媒中の TN が飽和した場合、濃度差は存在するが、平衡反応となるため$h(t)$ =0 となる。そのような条件を満たすハザード関数のうち、簡易な形状である、$h(t) = at^b$（ただし$a > 0, -1 < b < 0$）で近似できると仮定すると、$\frac{f(t)}{1-F(t)} = at^b$となる。この両辺を t で積分すると

$$-\log\left(1 - F(t)\right) = \frac{a}{b+1} t^{b+1} + A$$

$$1 - F(t) = A_1 \exp\left\{-\left(\frac{a}{b+1}\right) t^{b+1}\right\}$$

ここで分布関数の性質から$F(0) = 0$であるので$A_1 = 1$、また$b = m - 1$、$a = m\eta^{-m}$を代入すると

$$F(t) = 1 - \exp\left\{-\left(\frac{a}{b+1}\right) t^{b+1}\right\} = 1 - \exp\left\{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^m\right\}$$

ここで終局状態の溶媒濃度をC_0とすると$C_0 = N \times \frac{w_S}{V}$であるので（ここにカプセル中の TN を$w_S$、溶媒の体積を V とする）、

$$C(t) = \frac{w_S}{V} \times \int_0^t P \times \mathrm{N}\, dt = C_0 \times F(t)$$

$$= C_0 \times \left[1 - \exp\left\{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^m\right\}\right]$$

と先述の式が導出される。すなわち、ある時点の最終溶

出濃度で規格化された溶出速度と最終溶出濃度に対する時点の濃度の割合が時間 t の指数関数で近似できるモデルを採用していることになる。

3.3.2 試験結果と近似式

3.2 溶出試験で得られた試験結果について、ワイブル曲線で近似した結果を図 12、図 13 に、各近似式のパラメータを表 5 に示す。近似曲線は Microsoft Excel のソルバー機能（GRG 非線形エンジン）を用い、近似値と実測値の差分の平方和が最小となるよう、各実験系のC_0、η、m を調整した。

近似曲線は比較的精度よくフィッティングできていると考えられる。C_0については溶媒に関係なく同じ供試体でかなり近い値を示しており、近似式上も終局的な溶出量の差はみられない結果が得られた。また、X 市コンポストにおいて、寒天の有無によらずC_0の値は変わらなかったことも再現できている。形状パラメータである m はいずれも 1 未満となっている。ワイブル分布において、m が 1 未満の場合は、初期的な故障が出尽くして時間が経過するにつれて製品の故障が起きにくくなる曲線を表現しており[16]、これは初期に多くの溶出量が発生する溶出を再現しているといえる。「コンポスト」（単体）については、m=0.14 と 0 に近い値であり、試験直後に急速に溶出したことが表現されている。「固形肥料」については、溶媒の違いにより m の値に差が生じているが、NaCl 水溶液を溶媒としたときの t=24h の値を除くとC_0=99、η=39、m=0.54 となり、超純水を溶媒としたときの近似式と近い値が得られた。

また、表 6 に、実験終了時における供試体からの窒素の総溶出量と総溶出率を示す。なお、表中の「計算値」は近似式による計算結果であり、「実測値」は溶出試験時の水質分析による結果である。また、総溶出率は表中の総溶出量を表 4 の TN 量で割って求めた。1 か月の試験期間で、硝酸アンモニウム水溶液を寒天固化した供試体中に含有した TN はほぼ溶媒に溶出していた。コンポスト（単体）及びコンポストを寒天固化した供試体は約 60～70%が溶出していた。固形肥料については約 60%が溶出した結果となった。

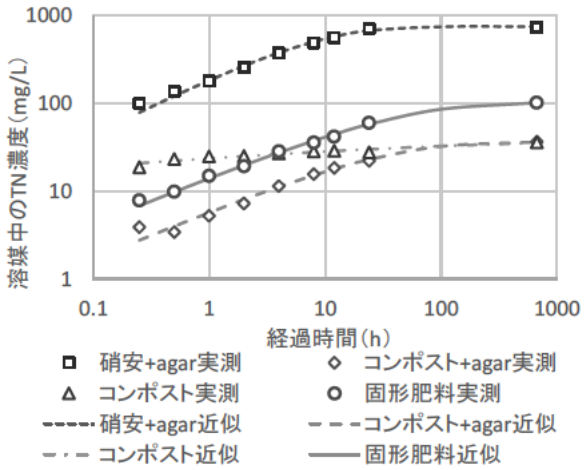


図 12　溶出近似曲線（溶媒：超純水）

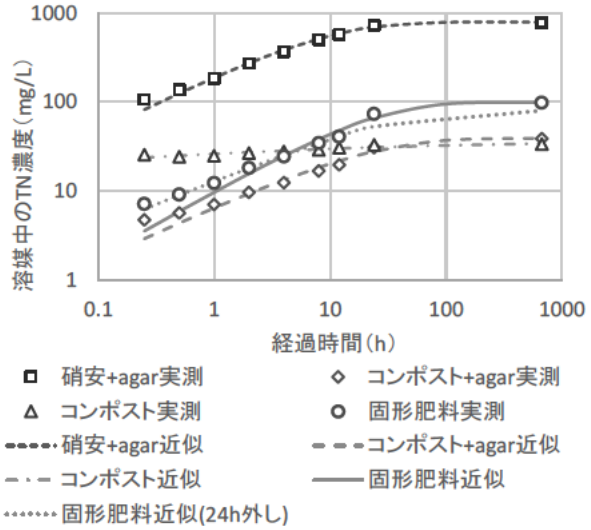


図 13　溶出近似曲線（溶媒：NaCl 水溶液）

表 5　近似曲線のパラメータ

溶媒	供試体	C_0 mg-N/L	η –	m –	残渣平方和	備考
超純水	硝安+Agar	7.5×10^2	6.8	0.67	2.6×10^3	
	コンポスト+Agar	36	25	0.55	3.5	
	コンポスト	40	2.4	0.14	14	
	固形肥料	1.0×10^2	34	0.55	18	
NaCl aq	硝安+Agar	7.9×10^2	7.5	0.65	6.5×10^2	
	コンポスト+Agar	39	17	0.61	22	
	コンポスト	36	0.13	0.14	11	
	固形肥料	99	21	0.75	1.5×10^2	全データで近似
		99	39	0.54	1.6	t=24hを除外

表 6　TN の溶出量と溶出率

	硝安+Agar近似		コンポスト+Agar近似		コンポスト近似		固形肥料近似	
	超純水	NaCl aq	超純水	NaCl aq	超純水	NaCl aq	超純水	NaCl aq
η	6.8	7.5	25	17	2.4	0.13	34	21
m	0.67	0.65	0.55	0.61	0.14	0.14	0.55	0.75
C_0	7.5×10^2	7.9×10^2	36	39	40	36	1.0×10^2	99
総溶出量（計算値）	1.3	1.4	0.056	0.064	0.062	0.063	0.15	0.16
総溶出量（実測値）	1.3	1.4	0.063	0.067	0.068	0.065	0.17	0.17
総溶出率（計算値）	103%	109%	63%	69%	61%	62%	51%	57%
総溶出率（実測値）	102%	108%	70%	72%	66%	63%	60%	59%

C_0の単位はmg/L、総溶出量はg-N

3.3.3　近似式から求められる海域での溶出速度

さて、供試体からの溶出速度は、本実験においては溶媒の量が既知であるため、溶媒の濃度変化率から求めることができる。また、同一供試体に対する溶媒の濃度変化率は溶媒濃度のみに依存すると仮定する。すなわち$C(t)$及び$c(t)$はいずれも t のみの関数であり、C_0、η、m が決定していれば、既知の$C(t)$に対する溶媒中の TN 濃度の変化率$c(t)$から計算は可能である。

海域中の窒素濃度を、海域Ⅱの上限値 0.3mg/L と仮定した場合の窒素溶出速度と、この溶出速度が維持された場合に今回使用した供試体から溶出が継続する時間（溶出継続時間）を表 7 に示す。

表 7　海域における溶出速度と溶出継続時間

供試体	溶出速度	溶出継続時間	備考
	g-N/m²/day	min	
硝安+agar	1.9×10^4	8.2	
コンポスト+agar	1.3×10^2	85	
コンポスト	2.9×10^{12}	4.4×10^{-12}	
固形肥料	8.7×10^2	44	t=24h を除外

溶出速度は、既知の$C(t)$から t を求め、得られた時間 t における $c(t)$に溶媒の体積を乗じ、供試体の表面積で除して求めた。近似式から C(t)=0.3mg/L となる時間 t を求めたところ、遅くても数十秒であり、いずれの実験系でも外挿による近似となった。そのため、ここではあまり精度は期待できないが大まかなオーダーについて議論ができると仮定した。表面積が他の試料よりも大きい「コンポスト」（単体）を除くと、10^2～10^4g-N/m²/day 程度であった。一方でコンポスト（単体）では、10^{12} g-N/m²/day 程度であり、非常に大きな値となった。これについては、コンポストの微粉末が実験初期に溶液全体に拡散するため、その影響が考えられた。同じ供試体を用いた場合における溶出の継続時間は、コンポストを除くと十分程度から数時間となった。なお、本検討の精度の向上においては、実験開始直後の採水頻度や試料と溶媒の比率の調整が必要である。

参考までに、魚かすからの栄養塩供給に関する検討事例[18]では、1 日あたりの発酵魚かす（窒素成分は湿重量の 6.7%）の流出量が 0.25%であったと報告されている。同検討では仮に魚かす（25 kg）の保持に使用したカマスの表面積を 1m² とすると 25 kg × 0.25% × 6.7%/1=4.2g-N/m²/day 程度となり、本実験結果はこれと比較して数十～数千倍のオーダーである 。また、信澤ら[19]の実験によると、横浜港の嫌気性の高い底泥からの TN の溶出速度を最大で 52.9 mg-N/m²/day と報告されている。谷本ら[20]のモデルによると大阪湾の底泥からの DIN（溶存態の無機窒素）の総溶出量が 18.5t/day となっており、湾の面積[21]を約 1,450km² とすると底泥からの溶出は 12.7 mg-N/m²/day となり、今回の実験結果をこれらの底泥からの溶出速度と比較すると、コンポストを除くと概ね 10^4～10^6 倍のオーダーとなった。谷本ら[20]のモデルでは、湾内の堆積物からの溶出量は河川等からの負荷量に対して 35～70%としている。仮に総表面積 1000m² の固化肥料を施肥した場合には 0.1～10t-N/day 程度を海域に供給することになり、大きく見積もると大阪湾に河川等から流入する総負荷量と同程度となる。そのため施肥にあたってはその形状や量については十分な検討が必要である。

3.4　まとめ

本実験結果から、以下の結果を得た。

- 溶媒に超純水と 3%NaCl 水溶液の 2 種類を用いて比較を行ったが、TN の溶出傾向に大きな違いがみられなかった。
- 寒天による固化は、溶出速度の抑制効果が期待され

たほか、最終的な溶出量には影響を与えなかった。

- 溶媒中のTN濃度をワイブル分布の累積分布関数で近似したところよくフィッティングできた。
- 溶媒の濃度に溶出速度が影響すると仮定し、溶出速度をワイブルの確率密度関数から試算したところ、コンポスト（単体）を除くと、10^2～10^4g-N/m^2/dayとなった。ただし、外挿による近似を行っているため精査が必要である。

4. おわりに

本研究で得られた結果及び今後の方針を、以下にまとめる。

1. 予備エアレーションタンクにおけるCODの挙動について知見が得られた。CODの回収に向けて、流入水中のSSの回収効率の向上に関する検討を進める予定である。
2. 下水道資源を用いた固形化物による海洋施肥効果を検討するため溶出試験を行い、溶出速度の推定に向けた知見を得た。今後は、種々の処理水等を用いた固形化物の溶出特性を把握すること等により、海洋施肥に資する資源回収型下水処理技術の開発を行う予定である。

謝辞

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

参考文献

1) 下水道における資源・エネルギー施策の現状分析、第3回下水道政策研究委員会会議資料、平成25年12月17日、https://www.mlit.go.jp/common/001022698.pdf
2) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道長期ビジョン実現に向けた中期計画、新下水道ビジョン、p.4.2、平成26年7月、2014.
3) 下水道における地球温暖化防止対策検討委員会：下水道における地球温暖化防止推進計画策定の手引き、平成21年3月、pp.4-5、2009.
4) Rahman A., et al.: Bioflocculation management through high-rate contact-stabilization: A promising technology to recover organic carbon from low-strength wastewater, Water Research, Vol.104, pp.485-496, 2016
5) Mamais D., et al.: A rapid physical-chemical method for the determination of readily biodegradable soluble COD in municipal wastewater, Water Research, Vol.27, Issue1, pp.195-197. 1993
6) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 1972年版、pp.276-277
7) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 1984年版、pp.291-294,1984
8) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 1994年版（後編）、pp.179,1994
9) 藤井秀夫、今利雄：前ばつ気に関する一考察、水道協会雑誌、No.354、pp.23-28、1964
10) 山口登、日出山勲：予備エアレーションタンクの機能に関する調査、第24回下水道研究発表会講演集、pp.435-437、1987
11) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部：栄養塩類の循環バランスに配慮した運転管理ナレッジに関する事例集(2014)，http://www.mlit.go.jp/common/001033458.pdf
12) 福吉晴生、三島悠一郎、花島勲、牟田英司、陣内聖太、松尾保成、不動寺正臣、野本晋児: 佐賀市下水浄化センターにおける季別運転の実績とその効果、下水道研究発表会講演集、No.56、pp.1073-1075、2019
13) 池脇義弘、牧野賢治、西岡智哉、平野匠、上田幸男: ゼラチンを用いた藻類養殖用施肥剤の開発、日本水産学会誌、Vol.82、No.6、pp.917-922、2016
14) 輪島雅治:藻場再生の挑戦、再生と利用、Vol.43、No.162、pp.90-93、2019
15) S.Itai, M.Nemoto, S.Kouchiwa, H.Murayama and T.Nagai: Influence of Wetting Factors on the Dissolution Behavior of Flufenamic Acid, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Vol.33, pp.5464-5473(1985)
16) 脇本和昌：統計学 見方・考え方、pp.107-109、1984
17) 松原望：入門統計解析－医学・自然科学編、pp312-316、2007
18) 牧田佳巳、山本潤：発酵魚かす投入による海域栄養塩の増加効果について、日本水産工学会学術講演会論文集、pp.65-68、2007
19) 信澤雄一郎、村上和男、北村友裕、小泉俊昌、亀山豊、小松勝久：横浜港の底泥からの栄養塩の溶出と覆砂の効果に関する現地調査と室内実験、海洋開発論文集、Vol.21、pp.737-742、2005
20) 谷本照巳、星加章、三島康史、柳哲雄：大阪湾における懸濁物質・窒素・リンの収支と循環、海の研究、Vol.10、No.5、pp.397-412、2001
21) 大阪湾環境保全協議会HP：大阪湾の概況 https://www.osaka-wan.jp/189/341/193

遺伝子情報を活用した病原微生物の早期検出に関する研究

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 30～令 3
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】
本研究では、次世代シーケンス（Next-Generation Sequencing, NGS）を用いて下水処理場における病原ウイルスを網羅的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症を網羅的にモニタリングできるかを評価した。その結果、ヒトを宿主とするアストロウイルス、アイチウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスなどの 23 種類のウイルスが流入下水試料で検出された。検出されたウイルスの中で感染性胃腸炎原因ウイルスのノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの存在割合が調査期間中 66%–98%であり、ほとんどの割合を占めていた。対象地域の感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病患者報告数の推移と、NGS による下水流入水中のヒト病原ウイルスの網羅的検出結果を比較したところ、同様な傾向を示した。このことから、NGS により網羅的に検出された下水中に存在する感染症原因ウイルスの検出結果は、地域で流行している感染症の消長を反映していることが確認された。
キーワード：次世代シーケンス、ヒト病原ウイルス、網羅的検出、流入下水、感染症モニタリング

1. はじめに

現在、新型コロナウイルスによる感染症（coronavirus disease 2019; COVID-19）のパンデミックによる問題が深刻化する中で、感染拡大防止と社会経済活動再開に向けた適切な政策決定のための判断材料の一つとして、下水疫学（Wastewater-based epidemiology）の活用が期待されている。下水には、その地域の人々が流した様々な情報が含まれており、特に感染者から排出される病原微生物の情報はその地域の感染症の流行状況を反映していると考えられる。実際に日本国内における感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルスの下水中の存在濃度と、その地域の感染性胃腸炎の患者数と相関があることが報告されている [1), 2)]。新型コロナウイルスに対しても感染者の糞便 [3), 4)]や尿 [5)]から検出されたことが報告され、下水中でも検出されたことが日本 [6), 7)]のみならずオーストラリア [8)]やアメリカ [9)]、イタリア [10)]、オランダ [11)]など世界各国において報告された。そのため、下水道網の複数箇所において下水を採取し、アウトブレイクの発生地域を徐々に絞り込むことができれば、公衆衛生当局は感染拡大リスクが最も高い地域に迅速に対応することができると考えられる。

一方、ノロウイルスを含む多くのヒト病原ウイルスは培養法が確立されていないため PCR 法により検出されるが、この手法は同定したいウイルスを選定して個別に検出しなければならないため、新たな感染症やグローバル化にともなう輸入感染症などの想定外の複数ウイルスの同時検出には適していない。しかし、近年、次世代シーケンス（Next-Generation Sequencing, NGS）により試料中に含まれる遺伝子配列を網羅的に解読することが可能となり、下水中に存在するウイルスの同時検出および同定が可能となった [12), 13)]。このことから、NGS により下水中のヒト病原ウイルスを網羅的にモニタリングすることで、地域の様々な感染症の流行状況を同時に把握することが可能であると考えらえる。本研究では、NGS を用いて下水処理場における病原ウイルスを網羅的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症を網羅的にモニタリングできるかを評価した。

2. 研究方法

2. 1　試料の採取と前処理

A 下水処理場の流入水を 2018 年 8 月から 2020 年 1 月の間に月 1 回採取した。次世代シーケンスによるメタゲノム解析の前処理として、ウイルスより大きな生物（細菌、藻類等）を取り除くため、採取し

表-1　各月の流入水中のメタゲノム解析結果

	調査期間 (2018年–2020年)					
	2018 年					2019年
	8月	9月	10月	11月	12月	1月
総リード数	496960	1044339	361977	552006	283652	766001
Contig数	2873	2532	4341	829	2424	1943
	2019 年					
	2月	3月	4月	5月	6月	7月
総リード数	442863	372803	365637	274518	419504	279653
Contig数	2214	940	2272	5037	5317	4868
	2019 年					2020年
	8月	9月	10月	11月	12月	1月
総リード数	436910	306201	403474	654794	717445	342945
Contig数	3477	4019	3093	1567	9156	1436

た流入水を 0.45μm のメンブレンフィルターによりろ過し、ポリエチレングリコール（PEG）濃縮法[14]により濃縮を行った。

2．2　病原ウイルスのメタゲノム解析

2.1 で濃縮した試料中の浮遊 RNA を RNase ONE（Promega）を用いて分解した後、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit（Qiagen）および QIAcube（Qiagen）にて RNA を抽出した。抽出した RNA 液中の残存 DNA を Baseline-Zero DNase（Arbrown）により分解した後、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit（Illumina）を使用してライブラリ調製を行った。このライブラリを 3%アガロースゲル電気泳動に供して、300–650 bp のバンドを切り出し、MonoFas DNA Purification Kit（GL Sciences）を使用して切り出し産物の精製を行った後、次世代シーケンサーの Miseq（Illumina）に供した。

得られたシーケンスデータは、Trimmomatic によるトリミングと FastQC によるクオリティチェックを行い、Trinity による *de novo* assembly を行って contig（得られたシーケンスの断片配列を重ね合わせ連結させた配列）を得た。得た contig は NCBI の塩基配列データベース（nt）を用いた BLASTn 解析（Ver. 2. 7. 1+）により相同性が一番高かった種を同定した。また、BLASTn 解析により得た結果を MEGAN（Ver. 6. 12. 0）により分類した。

3．研究結果

3．1　メタゲノム解析結果

各試料のメタゲノム解析の結果、次世代シーケンスにより得た配列（総リード数 : 27 万–105 万）に対してトリミングおよびクオリティチェックと *de novo* assembly を実施し、829–9,156 の contig を得た（表-1）。各試料から得られた contig に対して BLASTn 解析を行った結果、24%–53%が nt データベース上の配列に同定された（図-1）。同定された配列は、4%–25%が細菌（Bacteria）、11%–32%が真核生物（Eukaryota）であり、ウイルス（Viruses）は 3%–10%であった。ウイルスに同定された配列（56–407 配列）において、検出されたウイルスの宿主の割合を図-2 に示す。検出されたウイルスの中でヒトを宿主とするウイルスは 10%–40%であり、ウイルス性感染症が流行する冬季（2018 年 12 月–2019 年 3 月、2019 年 11 月–2020 年 1 月 : 24%–40%）が、夏季（2018 年 8 月–9 月、2019 年 7 月–9 月 : 10%–13%）と比べて割合が高かった。植物と動物を宿主とするウイルスは、それぞれ 16%–62%と 0%–5%であった。検出されたウイルスの中でその他の割合（28%–58%）が最も多く、その中でも未分類の環境試料由来のウイルス（Laverivirus, Marine RNA virus, Brinovirus, Cilio virus, Husavirus など）が多かった。

3．2　下水中のヒト病原ウイルスのメタゲノム解析結果と地域の感染症情報との照合

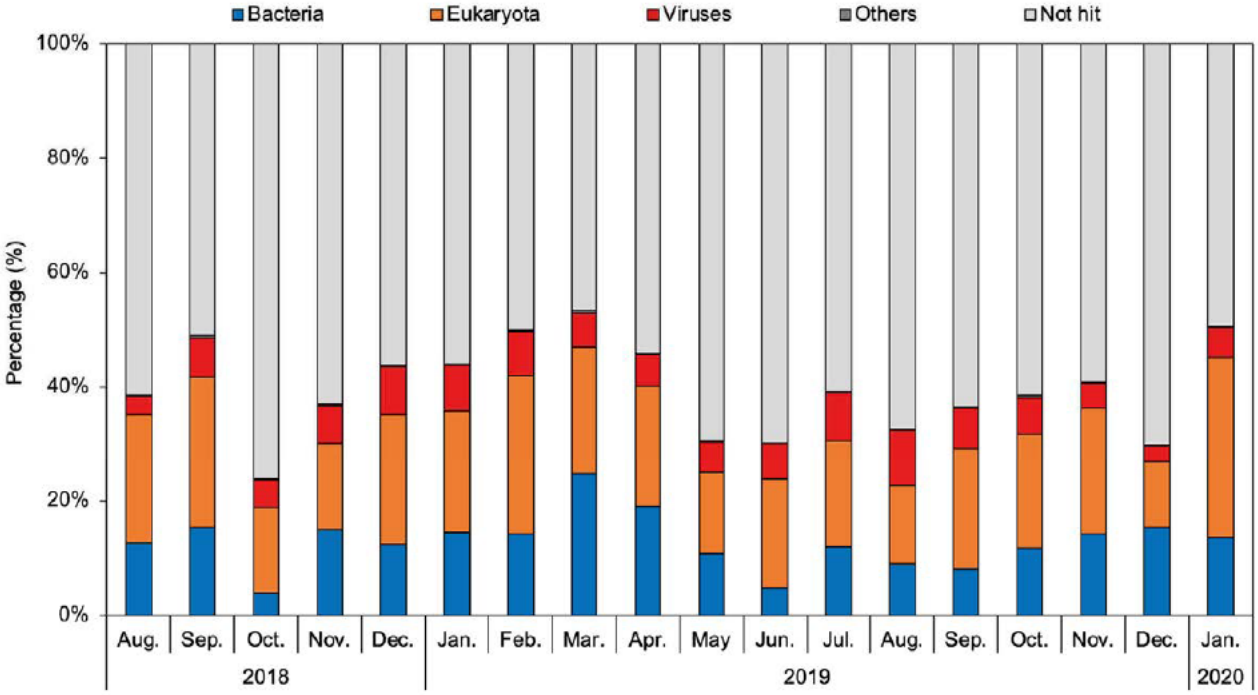


図-1　各月の下水流入水に検出された配列の同定割合

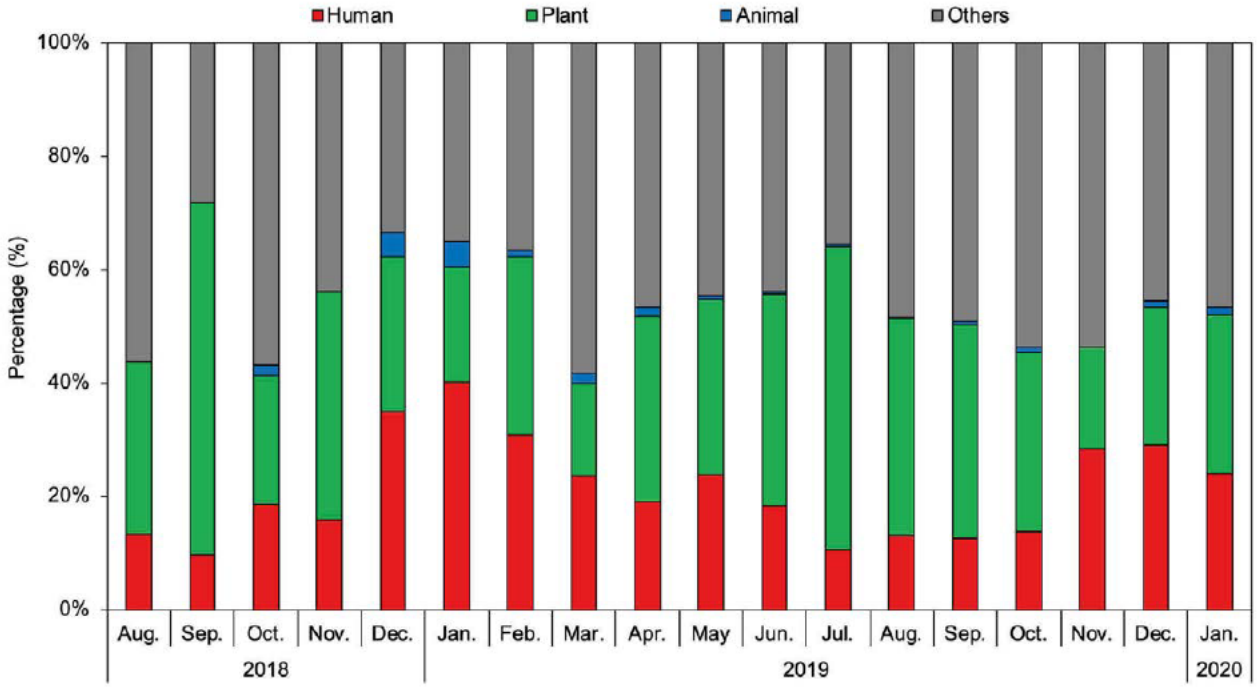


図-2　各月の下水流入水に検出された配列の中でウイルスに同定された配列の宿主の割合

本研究のメタゲノム解析により各月の下水流入水で検出されたヒトを宿主とするウイルスは、アストロウイルス、アイチウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスなどの 23 種類のウイルスが検出された（図-3）。ヒトに感染する病原ウイルスに同定された配列数の月毎の合計に対して、それぞれのウイルスに同定された配列数の割合を図-3（上）に示した。

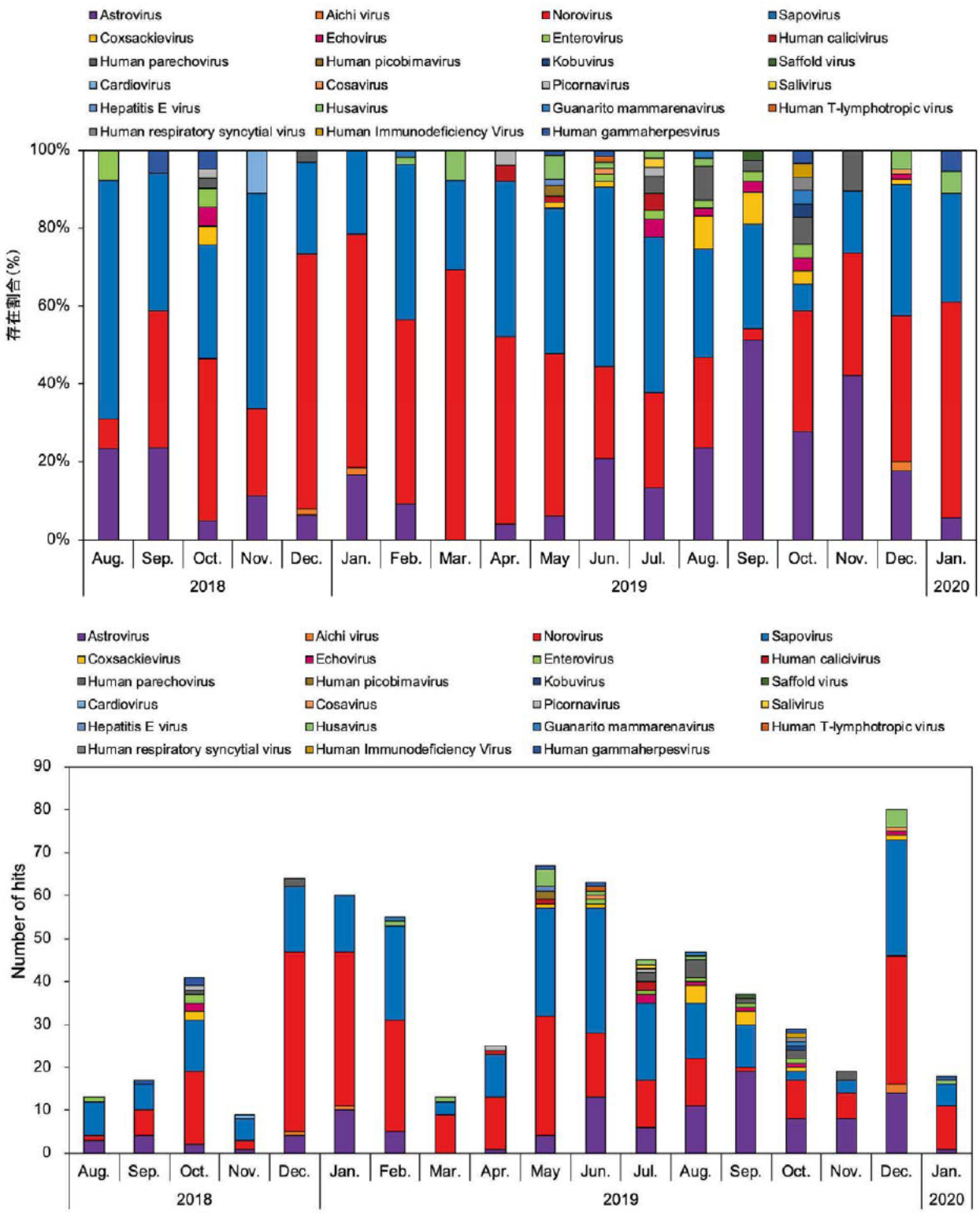


図-3　本研究のメタゲノム解析により各月の下水流入水で検出されたヒトを宿主としたウイルスの検出結果
（上：割合、下：検出数）

検出されたウイルスの中で感染性胃腸炎原因ウイルスのノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの存在割合が調査期間中 66%–98%であり、ほとんどの割合を占めていた。その中でもノロウイルス（図-3 上、赤）は、特に流行期となる冬季に割合が高かった（2018 年 12 月–2019 年 3 月、2019 年 12 月–2020 年 1 月：38%–69%）。サポウイルスは 2019 年 10 月（7%）を除くと 16%–62%の存在割合で検出さ

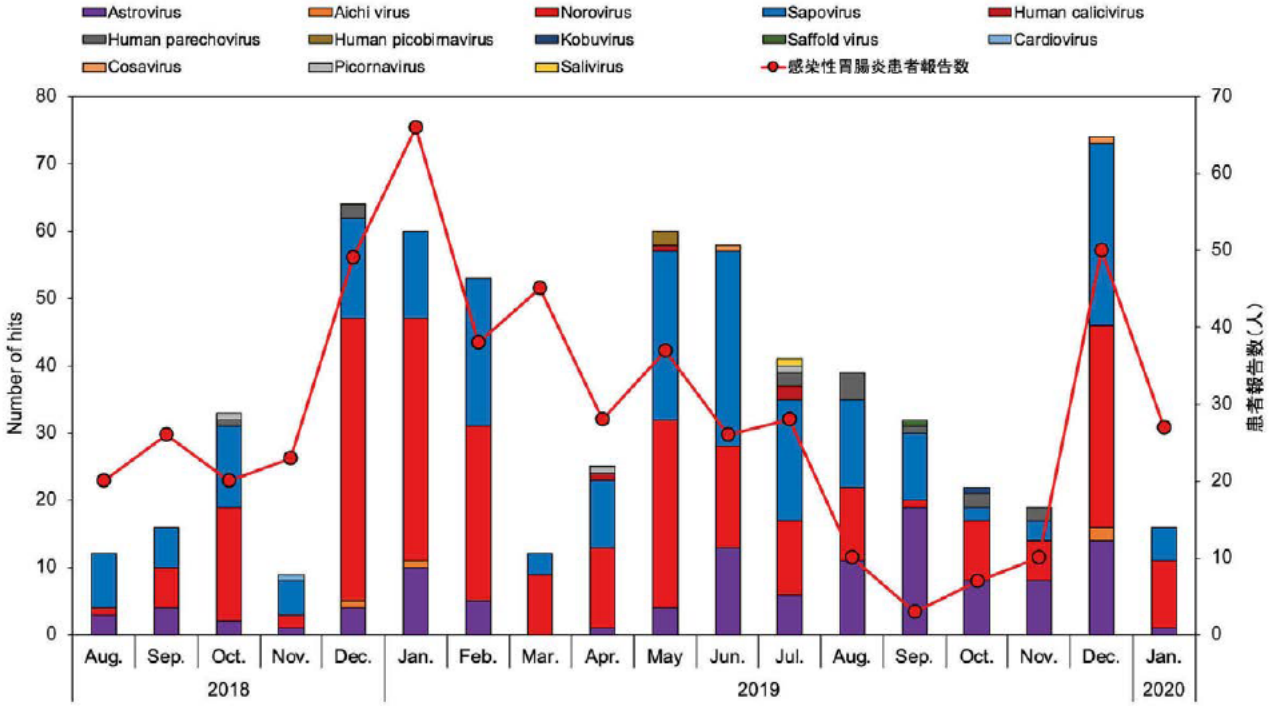


図-4　各月の下水流入水で検出された感染性胃腸炎を引き起こす原因ウイルスの検出結果と、対象地域の感染性胃腸炎患者報告数の推移

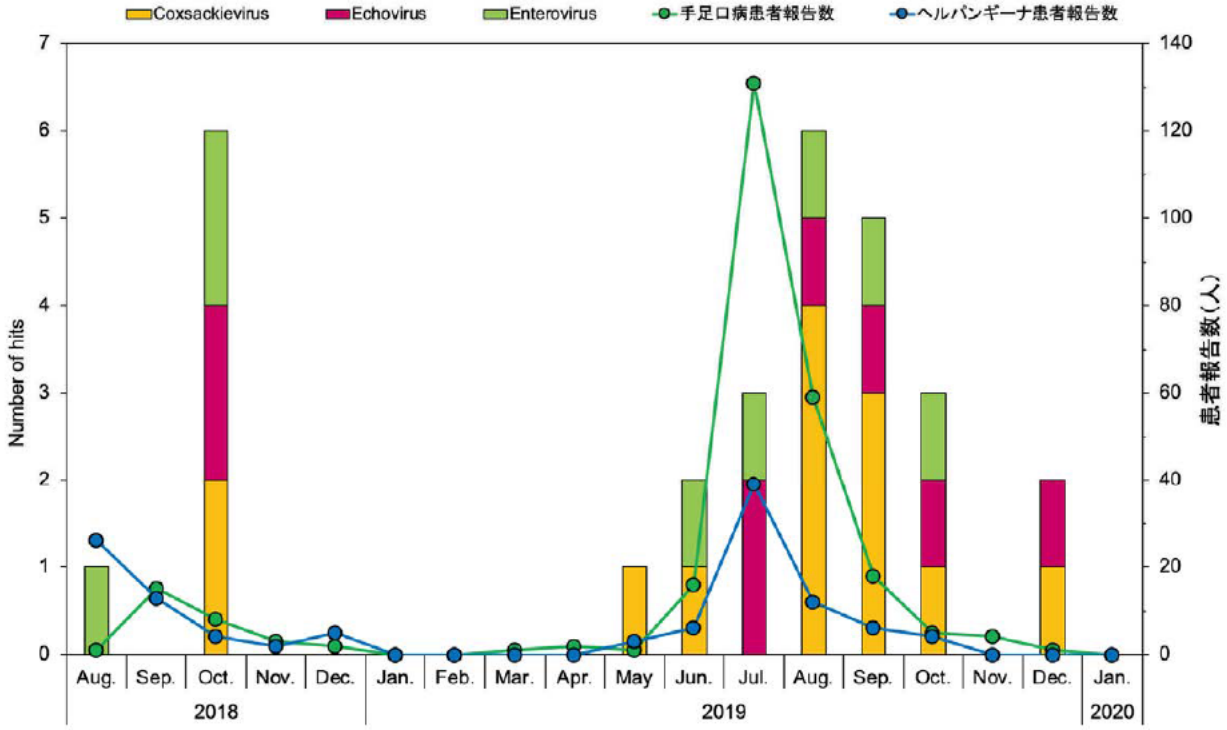


図-5　各月の下水流入水で検出された手足口病とヘルパンギーナを引き起こす原因ウイルスの検出結果と、対象地域の手足口病およびヘルパンギーナ患者報告数の推移

れ、季節性はみられなかった。アストロウイルスは2019年の夏から秋にかけて割合が大きくなっていた（2019年8月–11月：23%–51%）。ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス以外のウイルスでは、ヒトパレコウイルスと手足口病、ヘルパンギーナ原因ウイルスであるコクサッキーウイルス、エ

コーウイルス、エンテロウイルスが 2019 年の夏から秋にかけて割合が大きくなっていた（2019 年 7 月–11 月）。本研究の調査期間において検出された感染性胃腸炎原因ウイルスの検出数と、採取した下水処理場の処理区域の保健所における感染性胃腸炎の患者報告数の推移を図-4 に示す。感染性胃腸炎の患者報告数は 2018 年 12 月から上昇し、2019 年 1 月にピークになり、2019 年 11 月までに減少していった。その後、2019 年 12 月に急激に上昇し、2020 年 1 月は再び減少した。この感染性胃腸炎の患者報告数の推移は、本研究での NGS による感染性胃腸炎原因ウイルスの検出結果と傾向が一致している。また、本研究の調査期間において検出された手足口病、ヘルパンギーナ原因ウイルスの検出数と、採取した下水処理場の処理区域の保健所における手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数の推移を図-5 に示す。この結果でも、手足口病、ヘルパンギーナが流行していた 2019 年 7 月–10 月に、手足口病、ヘルパンギーナ原因ウイルスであるコクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスが検出されていたことから、傾向が一致した。

このことから、NGS を用いて下水中におけるヒト病原ウイルスを網羅的に検出することで、その地域で流行している感染症を網羅的にモニタリングできる可能性が示唆された。今後、継続してデータを蓄積していくことで、日本国内で流行している感染症を網羅的にモニタリングできる、有効な手法となることを期待している。

4. まとめ

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

1) 流入下水試料のメタゲノム解析の結果、ヒトを宿主とするアストロウイルス、アイチウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスなどの 23 種類のウイルスが検出された。
2) 検出されたウイルスの中で感染性胃腸炎原因ウイルスのノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの存在割合が調査期間中 66%–98%であり、ほとんどの割合を占めていた。
3) 地域の感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病患者報告数の推移と、NGS による下水流入水中のヒト病原ウイルスの網羅的検出結果と比較した結果、同様な傾向を示したことから、NGS により網羅的に検出された下水中に存在する感染症原因ウイルスの検出結果は、地域で流行している感染症の消長を反映していることが確認された。

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

参考文献

1) Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases, Water Res., 92, pp. 244–253, 2016
2) Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants, Appl. Environ. Microbiol., 83(9), e03406-16, 2017
3) Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A., Niemeyer, D., Jones, T.C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirglmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C.: Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019, Nature, pp. 1–10, 2020.
4) Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., et al.: Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. Lancet Gastroenterol, Hepatol. 5, pp. 434–435, 2020.
5) Sun, J., Zhu, A., Li, H., Zheng, K., Zhuang, Z., Chen, Z., Shi, Y., Zhang, Z., Chen, S., Liu, X., Dai, J., Li, X., Huang, S., Huang, X., Luo, L., Wen, L., Zhuo, J., Li, Y., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Li, F., Feng, L., Chen, X., Zhong, N., Yang, Z., Huang, J., Zhao, J., Li, Y.: Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient, Emerg Microbes Infect, 9(1), pp. 991−993, 2020.
6) Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., Kitajima, M.: First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan, Science of The Total Environment 737, pp. 140405, 2020.

7) Hata, A., Honda, R., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y.: Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assaysimplication for wastewater-based epidemiology (WBE), medRxiv, 2020.
8) Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., et al.: First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community, Sci. Total Environ., 2020.
9) Sherchan, S.P., Shahin, S., Ward, L.M., Tandukar, S., Aw, T.G., Schmitz, B., Ahmed, W., Kitajima, M.: First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA, Science of The Total Environment 743, pp. 140621, 2020.
10) La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, A., Bonanno, F., Veneri, Bonadonn, L., Lucentini, Suffredini, E.: First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy, Sci. Total Enviro. 736, pp. 139652, 2020.
11) Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R.: Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands, Environ. Sci. Technol. Lett., pp. 511–516 2020.
12) Aw, T.G., Howe, A., Rose, J.B.: Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater, J. Virol. Methods, 210, pp. 15–21, 2014
13) 風間 しのぶ, 真砂 佳史, 沼澤 聡, 大村 達夫: 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖（＋）RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討, 環境工学研究論文集, 71(7), pp. III_339-III_349, 2015
14) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H.: Occurrence and reduction of F-speci fi c RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, J. Water Health, 17(1), pp. 50–62, 2019

貧毛類による下水汚泥の減容化技術の開発

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 29～令元
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：重村浩之、山﨑廉予

【要旨】
本研究では、下水汚泥の減容化および有効利用の対策として、下水汚泥を貧毛類の餌として利用する、低エネルギーかつ低コストの技術の開発を目指した。初沈汚泥とミミズ堆肥の混合物を餌として、シマミミズの飼育を行った結果、汚泥を脱水せずに投入しても、飼育が可能であることが示された。また、ミミズの生育状況や産卵数が良好であり、汚泥減少率が高いことから、汚泥の減容化が達成できる可能性が高いことが示された。
キーワード： 貧毛類、下水汚泥、汚泥減容化、刈草、堆肥化

1. はじめに

下水道の普及に伴い増加していた下水処理場から発生する汚泥量は､約 10 年前からほぼ横ばいとなっており、各地方公共団体において、汚泥の減容化・有効利用への取り組みがなされている。汚泥の減容化過程においては，脱水プロセスが採用されているが、脱水ケーキの含水率は全国で約 80 %と高く [1)]、含水率を低減することにより、その後の汚泥の運搬、焼却、炭化等の維持管理費の削減が期待される。また、下水汚泥の消化において、一般的に有機物の分解は 50%程度であり、スケールメリットが発現しにくいなどの理由により、小規模の下水処理場での採用は多くない。汚泥処理技術の革新のため、汚泥の有機物を分解することに着目し､かつ安価で簡易的な手法を模索した。

本研究では、下水汚泥の減容化対策として、貧毛類に着目した。下水汚泥を貧毛類の餌として利用することで、汚泥・廃棄物の処理を低エネルギーかつ低コストで行う技術の開発を目指している。

貧毛類を用いた汚泥処理に関する研究は、牛糞等の動物性廃棄物を用いた堆肥化に関する研究が多く行われている [2)3)]。貧毛類を用いない場合と比較して、堆肥化の安定化や成熟度が優れており、廃棄物中に存在する人間の病原菌やその他の細菌類は、ミミズ堆肥化後に大幅に減少する可能性がある [4)5)]。また、生ゴミや処理場の脱水汚泥を用いたミミズ堆肥の研究の報告もいくつかあり [6)7)]、国内外において数十年前から知見が蓄積されている [8)]が、生物の管理の難しさや、生物濃縮の懸念などの問題から、広く普及するには至っていないのが現状である。小動物を用いた廃棄物処理は、循環型社会において必要な技術であることから、本研究では、過去の知見をもとに新しい技術を開発するため、下水汚泥を用いた貧毛類の飼育について、改めて基礎的情報の収集を行った。

2. 最初沈殿池汚泥を用いた貧毛類飼育実験

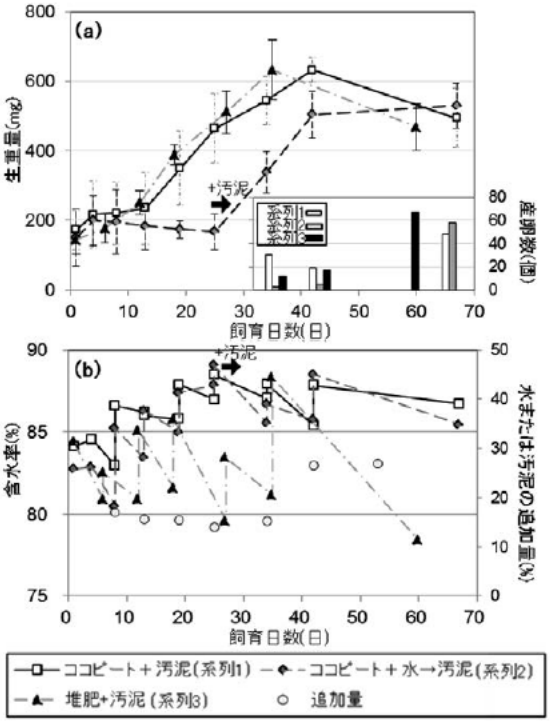
2. 1 実験方法

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

2. 2 実験結果および考察

図-1 に、3 系列におけるミミズの飼育結果を示

す。初沈汚泥は脱水せずに添加したため、土の含水率が 80%以上と高いが、系列 1、3 で、安定したミミズの成長がみられた。40 日以降に初沈汚泥の追加量を増やすと、成長がみられなくなったため、初沈汚泥の添加量は調整が必要であると考えられた。系列 2 では、25 日以降に初沈汚泥の添加に変更した後、成長がみられたことから、初沈汚泥がミミズの餌として有用であることが示された。産卵数は、系列 1~3 で同程度であった。しかし含水率は、ココピートを用いた系列 1、2 で上がる傾向を示したため、含水率の安定の観点から、堆肥と汚泥の混合の方がよいことが示された。



(a) 生重量と産卵数 (b) 土の含水率と追加量

図-1 シマミミズの飼育結果

3. 汚泥種類による貧毛類飼育比較実験

3. 1 実験方法

2.の結果をうけて、初沈汚泥、余剰汚泥の機械濃縮汚泥（以下、「余剰汚泥」）および消化汚泥を餌とした、ミミズの成長比較実験を行った。1000mL 容の PP 製びん内において、ミミズ堆肥約 200～300g に、初沈汚泥、余剰汚泥、消化汚泥をそれぞれ 50～300g を 2 週間に 1 回添加した。それぞれミミズを 10 匹ずつ添加する系を 2 系列(I, II(汚泥投入量に違い))、ミミズを添加しない系を 1 系列（III）用意した。2 と同様のシステムにおいて、約 3 カ月飼育を行った。2 週間に 1 回、全体重量および土の含水率、pH、電気伝導率(EC)を測定した。ミミズは、生重量、産卵数を測定した。

3. 2 実験結果および考察

表-1 に、各汚泥を用いたミミズ飼育の実験結果を示す。汚泥投入量、汚泥減少率、含水率は、2 週間毎の平均値を示している。ミミズの生重量は、初沈汚泥では投入量に関わらず増加傾向を示したが、余剰汚泥や消化汚泥では、投入量で差がみられ、消化汚泥では、終了時に死滅してしまった。含水率は、汚泥を添加後 84～92%まで上昇したが、2 週間後は、汚泥種類や投入量に大きな差はなく、いずれも 79~87%に低下した。生重量増加率は、汚泥添加後および 2 週間後の含水率と高い相関を示しており、本研究の範囲では、含水率が高いほど生重量増加率が高い傾向を示した。また、ミミズを添加した系において、しない場合と比較して、含水率が高く保持される傾向を示した。産卵数は、初沈汚泥において、他の汚泥よりも多く、初沈汚泥がミミズの飼育に適していることが示された。余剰汚泥においては、I 系と II 系で産卵数に大きな差がみられた。産卵数は pH とやや相関がある傾向を示しており、I 系では pH が低いことが、産卵数が低い原因と想定された。消化汚泥では、ミミズの成長が終了時直前までみられたが、産卵はほぼみられなかった。汚泥減少率は、初沈汚泥の I 系、III 系および消化汚泥の I 系で 1 以上であった。また、いずれの汚泥もミミズを投入する方が、汚泥減少率が高い傾向を示し、ミミズの飼育により汚泥減容化の傾向がみられることが示された。

表-1 汚泥種類での貧毛類飼育比較実験結果

	汚泥投入量(g)	汚泥減少率*1	含水率(%) 汚泥添加後	含水率(%) 2週間後	pH 開始時	pH 終了時	EC(mS/cm) 開始時	EC(mS/cm) 終了時	産卵数(個)	生重量増加率*2
初沈I	300	1.16	89	85	7.3	7.6	0.98	1.16	504	1.27
初沈II	200	0.85	87	84	4.6	5.9	0.96	1.52	401	1.37
初沈III	200	1.07	86	84	5.3	6.0	1.99	0.66	—	—
余剰I	120	0.92	87	81	7.1	4.9	＞4	＞4	10	0.87
余剰II	100	0.66	88	83	4.9	5.1	1.81	3.42	134	1.32
余剰III	100	0.83	83	81	5.5	4.1	1.78	1.97	—	—
消化I	150	1.41	92	87	6.3	5.7	3.22	1.23	3	(2.35)*3
消化II	100	0.98	87	79	4.7	6.4	0.92	0.15	2	(0.7)*3
消化III	100	0.98	84	82	5.4	3.5	2.7	1.75	—	—

*1 2週間での汚泥減少量／(投入汚泥量－ろ液量)
*2 終了時の生重量合計／開始時の生重量合計
*3 終了時に死滅していたため、終了時前までの増加率

また、汚泥減少率は、含水率、pH および生重量増加率と比較的相関が強い傾向を示していた。初沈汚泥の系において、実験終了時の EC を比較すると、I、II において、III よりも高く、シマミミズによる堆肥化がみられた。また、余剰汚泥では、I では EC が高すぎて、測定できなかった。II では堆肥の EC として数値に問題なく、ミミズの生育も良好であったことから、余剰汚泥を用いたミミズ飼育においては、汚泥の減容化には不向きであるが、堆肥化には適している可能性が示唆された。消化汚泥では、汚泥減少率は比較的高く、ミミズの生重量の増加も一定期間みられていたため、汚泥投入量や混合方法等を工夫することで、ミミズによる持続的な汚泥減容化の可能性が考えられる。

4. 刈草混合による貧毛類飼育実験

A 処理場の初沈汚泥を遠心脱水したものに、イネ科の刈草を粉末化したもの、10 ㎜にハサミで裁断したものを適量混合し、底に空気穴を開けた 1L のポリビンに、各混合物を 500mg 程度入れ、同程度の大きさのシマミミズを 5 匹ずつ投入し、下部から空気を送り、温度 20±5℃程度において、飼育を 70 日間行った。結果を図-2 に示す。刈草 10 ㎜の系では、ミミズの糞粒が見られるが、刈草の分解は見られなかった。刈草粉末の系では、ミミズの糞粒がみられ、かさも減少していたため、本実験の範囲では、刈草を粉末化して脱水汚泥と混合することで、汚泥の堆肥化および減容化が可能であると示唆された。

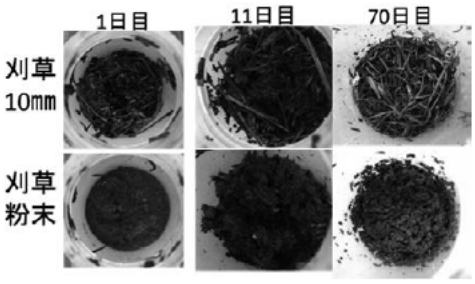


図-2 刈草と脱水汚泥の混合物によるミミズ飼育状況の経時変化

5. まとめ

初沈汚泥とココピートまたはミミズ堆肥の混合物を餌として、シマミミズの飼育を行った結果、汚泥を脱水せずに投入しても、混合量の調整により飼育が可能であることが示された。

また、汚泥の種類によるシマミミズの飼育状況の比較実験を行った結果、初沈汚泥でのミミズ飼育において、ミミズの生育状況や産卵数が良好であり、汚泥減少率が高いことから、汚泥の減容化が達成できる可能性が高いことが示された。消化汚泥では、汚泥減少率は比較的高く、ミミズの生重量の増加も一定期間みられていたため、汚泥投入量や混合方法等を工夫することで、ミミズによる持続的な汚泥減容化の可能性が考えられた。余剰汚泥は、ミミズの餌とすることで、減容化は難しいが、汚泥の混合割合の調整によって、堆肥化が可能であることが示唆された。イネ科の刈草は、粉末化して混合することで、汚泥の堆肥化および減容化が確認できた。

謝辞　汚泥の採取には、各処理場関係者の多大なるご協力を賜りました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

1) 公益社団法人日本下水道協会：平成 29 年度版下水道統計, 2019.
2) Elvira, C., Sampedro, L. , Benftez, E., Nogales, R.: Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with Eisenia andrei: A pilot-scale study, Bioreso. Technol., Vol.63, No.3, pp.205-211, 1998
3) Xie, D., Wu, W., Hao, X., Jiang, D., Li, X., Bai, L. : Vermicomposting of sludge from animal wastewater treatment plant mixed with cow dung or swine manure using Eisenia fetida . Environ. Sci. Pollut. Res. Vol.23, pp.7767–7775, 2016
4) Huang, K., Xia, H., Wu, Y., Chen, J., Cui, G., Li, F., Chen. Y., Wu, N. : Effects of earthworms on the fate of tetracycline and fluoroquinolone resistance genes of sewage sludge during vermicomposting. Bioresour. Technol. Vol.259, pp.32-39, 2018
5) Soobhany, N., Mohee, R., Garg, V.K. : Inactivation of bacterial pathogenic load in compost against vermicompost of organic solid waste aiming to achieve sanitation goals: A review, Waste Manag. Vol. 64, pp.51-62, 2017
6) Fu, X., Cui, G., Huang, K., Chen, X., Li, F., Zhang, X., Li, F. :Earthworms facilitate the stabilization of pelletized dewatered sludge through shaping microbial biomass and activity and community, Environ. Sci. Pollut. Res. Int., Vol.23, No.5, pp.4522-4530, 2016
7) 川下好則ら，一般廃棄物を資源としてミミズに給餌するシステムの開発研究, 環境技術, Vol.23, No.2, pp.92-94, 1994
8) 森忠洋ら，シマミミズによる汚泥処理の可能性に関する研究(I)，水質汚濁研究，No.1，Vol.2，pp.127-132，1978

下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発

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

【要旨】
下水処理場では、処理の異常等によりアンモニア性窒素が平常時と比較して高濃度で残留する（硝化阻害）ことがある。本研究では硝化阻害物質の高効率探索システムの開発を主目的とし、当チームでは 2 つの課題を担当している。課題 1 では、全国の下水処理場を対象に硝化阻害の発生実態についてアンケート調査を実施し、平均的発生頻度（1 回/年）を把握するとともに、処理運転条件よりも環境条件や流入下水の水質が阻害原因と想定されている傾向を確認した。課題 2 では、アンモニア酸化細菌を用いた下水中の硝化阻害物質の探索を検討した。硝化菌 *Nitrosomonas europaea* を用いて、63 化学物質に対する硝化阻害の検討を行った結果、18 種は硝化阻害に、33 種は非硝化阻害の化学物質に該当することが明らかになった。また硝化阻害物質と非硝化阻害物質はそれぞれ特異的な化学構造を持つことを明らかにした。

キーワード：下水処理場、硝化阻害物質、アンケート調査、アンモニア酸化細菌

1. はじめに

下水処理における長年の課題の一つに、生物学的硝化の異常によりアンモニア性窒素が平常時と比較して高濃度で残留する現象（以下、硝化阻害とする）への対策が挙げられる。下水処理過程における硝化阻害の要因の 1 つに、化学物質の流入が言われており、硝化阻害物質に関する研究は古くから行われている。しかし、下水処理場で生じる硝化阻害の原因物質の究明に至らないことが多い。

以上の背景から、我々は、平成 31 年度下水道応用研究において、「下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発」に取り組んでいる。当チームでは、本プロジェクトの中で「下水処理場への硝化阻害実態のヒアリング調査」および「硝化菌を用いた硝化阻害物質の活性評価」を担当している。本報告書では、当チームで担当している 2 つの課題について、平成 31 年度（令和元年度）における研究結果を報告する。

2. 下水処理場における硝化阻害発生実態の全国アンケート調査

2. 1. 背景と目的

下水処理場における化学物質に起因する硝化阻害については、基礎的研究事例は多く見られるものの、実際の現場で発生している問題についてまとまった報告例が少ない。そこで、ヒアリングによる詳細な情報収集に先立って、日本全国の下水処理場を対象にアンケート調査を実施し、硝化阻害の発生実態の把握を試みた。今回は化学物質が原因でない事例も含めた情報収集を行い、幅広く事例を把握することを目的とした。

2. 2 研究方法

アンケート調査の内容は硝化阻害発生における（1）経験の有無と頻度、（2）環境条件と状況、（3）原因と対応方法等を主題とした。アンケートへの回答を求める対象は終末処理場を有する公共下水道および流域下水道とした。なお、平成 28 年度の下水道統計によれば、全国の下水処理場は 2,171 件あり、公共下水道が 1,992 件（そのうち特定公共下水道が 7 件、特定環境保全公共下水道が 895 件）、流域下水道が 179 件であった[1]。回答期限は 2020 年 1 月～2 月の間の約 4 週間とし、E-mail あるいは FAX による調査票の提出を受け付けた。同一の処理場内で複数の異なる処理系で運転していることにより系毎に状況・対応が異なる場合は、処理系列毎の回答を依頼した。

2. 3 結果と考察

アンケートの回答期限から 1 週間後までを対象として集計を行った結果を**表 1** に示す。得られた回答数は 1,624 件であり、有効な回答はそのうち 1,613 件（全体の 99.3%）であった。同一処理場であっても複数の処理系列毎に回

答されたものが 57 件あり、処理場数としては 1,556 件であった。これは、平成 28 年度の下水道統計による全国処理場数 2,171 件の 71.6%に相当するものであった。全国の幅広い下水処理場において多様な環境かつ多様な流入下水の水質がある中で、統計解析する上で充分な回答が得られた。また、最も高い回答率を示した 2 つの県では回答率が 100%（それぞれの処理場数は 12 件と 36 件）であった。以降では、有効データ 1,613 件について結果を整理して述べる。

2. 3. 1　硝化阻害発生経験と頻度

硝化阻害発生事例について、“経験あり”と回答した処理場（複数系統は個別に計数）は全体の 16.2%（261 件/1613 件）であり、“分からない”の回答は全体の 13.1%であった。一定割合で硝化阻害を経験している処理場を確認し 261 件の実態情報が得られた。発生を判断した根拠については、総回答数 314 件（複数回答含む）のうち 209 件（全体の 66.6%）が処理水中のアンモニア性窒素濃度の計測値を基準として判断されていた。その他では、アンモニア性窒素だけではなく、硝酸性窒素や亜硝酸性窒素を含めた窒素濃度の計測値を用いているケースや、pH・アルカリ度・BOD・全リン・臭気・透視度・色相等のその他指標と組み合わせた総合判断、DO 値の異常や DO の自動制御による送風量の低下による判断が挙げられた。

硝化阻害の発生事例を持つ回答者から得られた、硝化阻害の発生頻度についての回答を図 1 に示す。なお、本回答の際に継続期間を考慮することは求めなかった。パターンとして 33 通りの回答（全 305 件）があった。最も高頻度の事例では 96 回/年の回答が 1 件あり、数日に一度発生の事例があることが分かった。最も回答件数が集中していたのは 1 回/年で、全体の約半数（150 件）を占めており、全国の平均的な硝化阻害発生頻度を把握することができた。

2. 3. 2　発生時の環境条件と処理場の状況

硝化阻害発生時の環境条件として、季節、天候、気温について回答を求めた。 季節では、“冬に発生する”と回答した事例が全体（365 件）の 38.4%を占めており、季節は無関係とする回答を含めその他の回答よりも顕著に高かった。天候では、“天候は無関係”とする回答が 150 件（全体 261 件の 57.5%）を占めていたが、快晴・晴れ・曇り（合計 11 件）と比べると雨・雪（合計 34 件）の回答件数が多かった。気温に関する回答結果を図 2 に示す。“どちらかというと寒い”の回答が最も多く（110 件、全 260 件の 42.3%）、次点の“気温は無関係”とする回答（78 件）を上回っていた。発生時間については、顕著な傾向はみられなかった。自由記述による補足説明では、単純な気温の高低ではなく、季節の変わり目、雨天・降雪時、夜間等の気温の変化が硝化阻害の要因と捉えている回答が多くみ

表 1　アンケート調査の回答概要

集計内容	件数
全回答数	1,624
有効回答数	1,613
回答が得られた処理場の数 （同一処理場からの複数回答を整理）	1,556

質問項目	回答件数
・発生経験の有無	261
・発生の判断根拠（複数回答可）	314
・ 発生頻度（複数回答可）	305
発生時の環境条件	
・ 季節（複数回答可）	365
・ 天候	261
・ 気温	260
・復旧に要する時間	260
・発生原因の想定の有無	261
・想定した原因（複数回答）	380
・発生時の対応（複数回答）	549

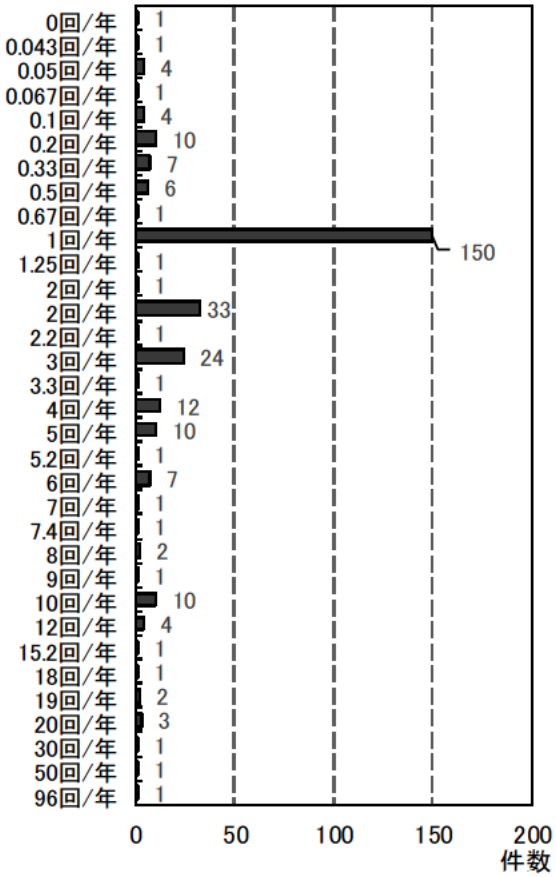


図 1　阻害発生の頻度（合計 305 件）

られ、特に、気温・水温の低下に伴う硝化阻害の発生に関する報告例が複数あった。低水温時に硝化活性が低下することは実務的に広く認識されており、実処理場における降雨による水温低下と硝化阻害による亜硝酸性窒素濃度の上昇と、その蓄積による汚泥解体発生等の調査報告[2]にも示されているとおり、水処理における複合的な影響として硝化阻害が顕在化することが多いと考えられた。

硝化阻害の発生後、復旧までに要する時間の回答結果を図3に示す。回答数は全部で260件あったが、“当日に回復する”と回答した例はほとんどなく（合計19件、全体の7.3%）、1日～数日（91件）や数週間（58件）の回答の合計が全体の57.3%を占めた。一方、“その都度異なる”との回答は30.4%であった。硝化阻害発生時には、現状では回復までに一定の日数を要することが把握された。

2. 3. 3 発生原因とその対応

硝化阻害の発生原因を“想定していた”と回答したのは全体の90.0%であった。想定した原因に関する回答を図4に示す。前述の環境条件に関連する水温・気温の変化を原因とする回答が全体の31.6%あり、汚濁負荷の変化を原因とする回答（34.2%）と共に高かった。運転制御の失敗については、全体の12.1%の回答であり、DOやMLSS濃度の管理の不具合に関する記述が多かった。また、特定の化学物質の流入を原因とした回答は6.1%（23/380件）であった。不明水・異常流入を原因とする自由記述も多くあり、多くの下水処理場が流入水質に起因する硝化阻害を認識していた。上述の低水温等の環境条件を含め、流入下水の水質や活性汚泥の性状変化等の多様で複合的な要因により硝化阻害につながることが示唆された。

硝化阻害発生時の対応についての回答を図5に示す。送風量の増量（回答全体の32.8%）、MLSS濃度の増加（17.5%）の順に回答が多く、硝化細菌を含む微生物群の活性の回復、あるいは、微生物量を増やして処理性を保つための活性汚泥量の増加が目的と考察される操作が実施されていた。一方で、正常な活性汚泥との入れ替え（11.8%）や異常な活性汚泥の引き抜き（11.8%）の実施例も多く、汚泥に収着した有害物質の排除や、阻害を受けた微生物群そのものの排除による水質の影響軽減が目的と考察される操作もみられた。ここで、国土交通省「有害物質等流入事故対応マニュアル」に記載されている「有害物質等が下水処理に及ぼす影響とその対応策」[3]を参照すると、回答の多かった送風量（ばっ気量）の増加に関する記述はみられるものの、MLSS量に関する記述や、活性汚泥への操作の記述はみられない。つまり、硝化阻害への特に水質面における対策として各下水処理場の現場での実際の対応について、本調査で全国から広く情報収集することで、共有可能な有効な知見が見出された。

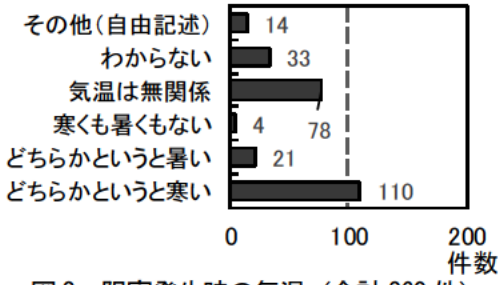


図2　阻害発生時の気温（合計260件）

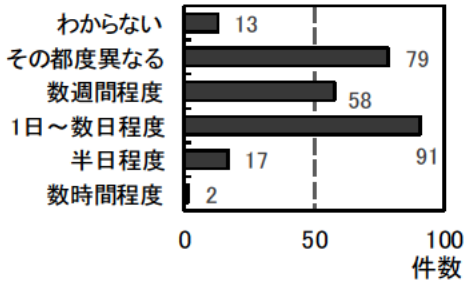


図3　阻害発生後、復旧に要する時間（合計260件）

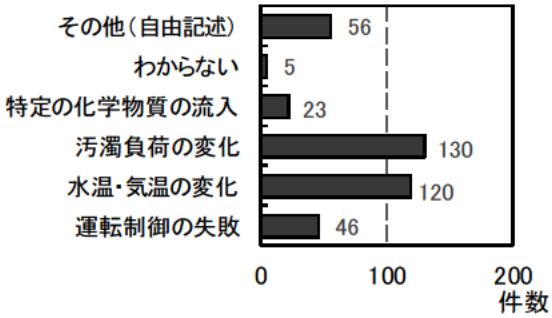


図4　想定した阻害発生原因（複数回答の合計380件）

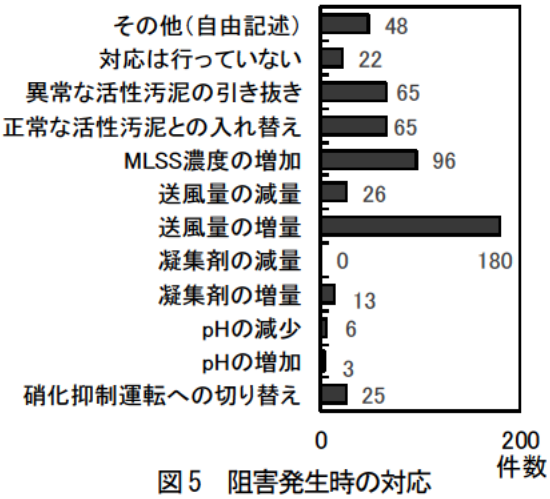


図5　阻害発生時の対応（複数回答の合計549件）

3. アンモニア酸化細菌を用いた下水中の硝化阻害物質の探索に関する研究

3. 1 背景と目的

下水処理過程の課題の一つに、硝化阻害物質への対策があげられる。下水中のアンモニアを硝酸に変換する過程において、アンモニア酸化細菌は重要な働きをしており、その細菌に対する硝化阻害物質の研究は古くから行われている。一方、下水中に含まれる化学物質に特化して網羅的に硝化阻害物質の探索を行った研究は少ない。

「硝化菌を用いた硝化阻害物質の活性評価」の課題においては、下水処理場に流入する可能性がある PRTR や化審法の対象物質を中心に、モデル硝化菌（アンモニア酸化細菌）である *Nitorosomonas europaea* を用いて、下水処理場で硝化阻害を引き起こす可能性がある物質の探索を試みた。従来の基礎的な研究で報告されている硝化阻害物質の多くは、硝化阻害を示す濃度が数 ppm～数十 ppm と高く、実際の下水中における濃度に即していないことが考えられるため、本研究では、1ppm 以下で阻害する物質を対象化学物質とした。また下水処理場での硝化阻害の理解を深めるため、硝化阻害の原因とならない物質の検討も合わせて行った。

3. 2 実験材料および実験方法

3. 2. 1 化学物質の選定と調製方法

本実験で用いられた化学物質は、①文献情報に基づき、阻害活性が高い物質（EC_{50}≦1 mg/L）を選定する、②PRTR 対象物質に対して MOE（Molecular Operating Environment、CCG 社製）を使ったドッキングシミュレーションを行い、影響が強いと推定された物質（親和性が高い物質）を優先的に 25 物質選定する、とした 2 つの方法を組み合わせ、合計 63 種の化学物質を試験対象物質として選定した。各化学物質は、使用前日にジメチルスルホキシド（DMSO）を用いて 10,000 ppm と 1,000 ppm 濃度の溶液を作製して、実験に供した。

3. 2. 2 アンモニア酸化細菌を用いた硝化阻害物質の活性評価

一週間培養した *N. europaea* 培養液を 3, 000 rpm、室温、10 分間遠心分離し、上清を捨てた後、等量の新しい培地に懸濁した。細胞懸濁液を 24 穴プレートに 2 mL ずつ添加し、各試験化学物質を最終濃度、10 ppm と 1 ppm として添加後、18 時間、28℃で静置培養した。培養後、各ウェルの培養液 1 μL を Greiss Reagent A 溶液（50 μL）を入れた 96 穴プレートに添加し、更に Greiss Reagent B 溶液（50 μL）を添加した[4]。15 分間室温で放置後、マイクロプレートリーダー（SpectraMax M2、モレキュラーデバイスジャパン株式会社）を用いて、吸光度 545 nm を測定した。培養液に試験化学物質を添加せず DMSO のみを 0.1%添加して同様に培養したサンプルをコントロールとし、Greiss Reagent A 溶液と Greiss Reagent B 溶液を等量混合したサンプルをネガティブコントロール（NC）とした。各化学物質に対する亜硝酸生成率は、以下の式で求めた。実験は各化学物質に対し 3 連で行った。

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

3. 3. 結果と考察

3. 3. 1 硝化阻害物質の検討

化学物質 63 種に対して、*N. europaeae* を用いた硝化阻害物質の検討を行った。各化学物質 1ppm 濃度において、亜硝酸生成量がコントロールに対し 50%以下を示す化学物質を硝化阻害物質として選抜した。その結果を**図 6** に示す。63 物質中、18 物質が硝化阻害物質として選抜され、化学構造的に 4 グループ（グループ I、II、III、IV）に分類された。

グループ I はアセチレン構造を持つ化学物質であり、5 物質（1-ヘキシン、2－エチニルピリジン等）が含まれた。アセチレン系物質を土壌に添加すると、NH_4^+の硝化が阻害されること、またこれらの物質は AMO 中の Cu_2O_2 の活性サイトに作用して、硝化阻害を生じることが報告されている[5]。これらの結果から、グループ I の化学物質は AMO を阻害する可能性が推察される。

グループ II はクロロフェノール構造を持つ化学物質であり、5 物質（4－クロロフェノール、3－クロロフェノール等）が含まれた。一方、これらの物質は、有機リン系殺虫剤、農薬中間体として利用されるため、*N. europaeae* に対し殺菌作用を及ぼすことも考えられる。Hoshikawa は、硝化細菌センサーにより硝化阻害物質として検出された物質が、マイクロトックス試験（毒性評価試験）においても検出されることを報告している[6]。今後の課題として、これら試薬が硝化阻害として作用するのか、もしくは殺菌剤として作用するか今後検討する必要がある。

グループ III はピラゾール系の構造を持つ化学物質であり、3 物質（りん酸 3,4－ジメチルピラゾール等）が含まれた。ピラゾール系の化学物質は土壌の硝化阻害を生じることが報告されている[7]。一方、今回の試験条件では他

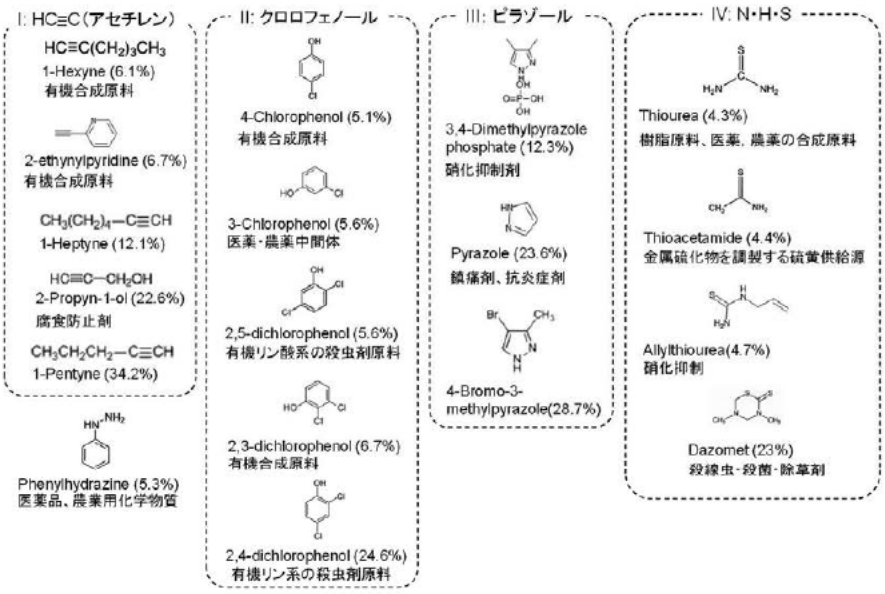


図 6　硝化阻害試験（試験濃度 1ppm、亜硝酸生成率 50%以下）で選抜された化学物質
＊括弧内はコントロールに対する亜硝酸生成率を示す

の化学物質（グループ I、II、IV）に比べて高い硝化阻害は確認されなかった。

グループ IV は S=C-N の構造を持つ化学物質であり、4 物質（チオ尿素、チオアセトアミド等）が含まれた。チオ尿素とアリルチオ尿素は代表的な硝化阻害物質である [8]。

下水処理場に流入する硝化阻害物質を探索する場合、標準化学物質に加え、その化学物質の異性体や分解・代謝産物なども含めて考慮する必要がある。一方、標準物質以外の化学物質は入手が困難であり、実際に硝化阻害試験を行うことは難しい。今回の研究結果において、硝化阻害を生じる化学物質に特異的な構造を明らかにすることができたが、これらの結果を基に、化学物質の構造から硝化阻害物質を効率的に推定できる可能性が見出された。

3. 3. 2　非硝化阻害物質の検討

既報の硝化活性に関する研究として、硝化阻害を生じる物質に対しての報告はあるが、硝化阻害を生じない物質（ネガティブリスト）に対する報告はほとんどない。そこで、10 ppm 濃度で亜硝酸生成量がコントロールに対し 50%以上を示す化学物質を非硝化阻害物質として選抜した。その結果を図 7 に示す。63 化学物質中 33 化学物質が非硝化阻害物質として選抜され、その化学構造から 4 グループ（グループ V、VI、VII、VIII）に分類することができた。

グループ V は長鎖型の学物質であり、8 物質が（ニッコール BL-9EX、Triton X-114 等）が含まれた。いずれも界面活性剤として用いられる物質である。Wendeborn はリノレン酸メチルやステアリン酸を含む長鎖脂肪酸（C18）

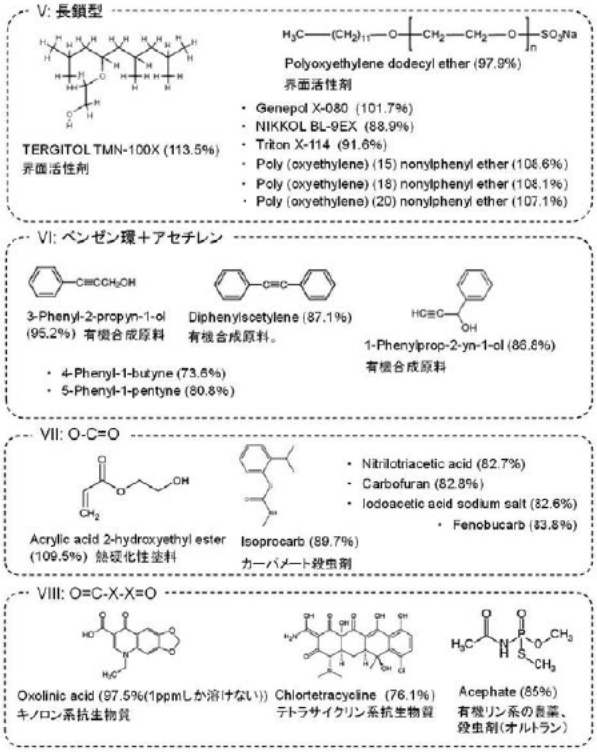


図 7　硝化阻害試験（試験濃度 10ppm、亜硝酸生成率 50%以下）で選抜された化学物質
＊括弧内はコントロールに対する亜硝酸生成率を示す

は、硝化を阻害しないことを報告している[9]。今回検出された長鎖型の化学物質は分子量が大きく（分子量 200 以上と推定される）、*N. europaeae* の細胞膜を透過しにくいことが推察される。これらの結果を考慮すると、下水処理場に流入する界面活性剤は、硝化への直接的な影響が少ないことが推察される。

グループVIはベンゼン環とアセチレン構造が結合した構造を示し、5 物質が（4-フェニル-1-ブチン、5-フェニル-1-ペンチン等）検出された。いずれも有機合成原料として用いられる物質である。3．3．1 硝化阻害物質の検討において、アセチレン系の構造を持つ化学物質（グループ I）は強い硝化阻害が確認されたが、ベンゼン環が結合すると硝化が阻害されないことは、興味深い結果である。

グループ VII は O=C-O 構造を持つ化学物質であり、6 物質（ヨード酢酸ナトリウム、ニトリロ三酢酸等）が検出された。特にイソプロカルブ、カルボフラン、フェノブカルブ はカーバメート系殺虫剤に属する物質である。また、グループ VIII は O=C-X-X=O 構造を持つ化学物質であり、3 物質（クロルテトラサイクリン等）が検出された。今回、非硝阻害物質として検出された 33 化学物質のうち 11 物質は抗菌剤、農薬、殺虫剤に属し、特に 6 種の化学物質はグループ VII と VIII に属していた。これらの結果から、グループ VII と VIII の構造を持つ抗菌剤、農薬、殺虫剤等は、*N. europaeae* に対して 10 ppm 濃度以下であれば、下水処理の硝化に直接に及ぼす影響は少ないことが推察される。

4. まとめ

下水処理場における硝化阻害発生実態の全国アンケート調査では、全国の下水処理場に対して硝化阻害の発生実態に関するアンケート調査を行い、平均的発生頻度（1 回/年）を把握するとともに、処理運転条件よりも環境条件や流入下水の水質が阻害原因と想定されている傾向を確認した。また、硝化阻害は復旧に 1 日～数週間を要し、主な対応策として、DO の適正な管理に加え MLSS 濃度の調整や活性汚泥の入替が行われていた。「有害物質等流入事故対応マニュアル」等への反映等によりこれらの知見が共有されることで、下水処理場における硝化阻害への対応の円滑化に資することが期待される。

アンモニア酸化細菌を用いた下水中の硝化阻害物質の探索に関する研究では、硝化菌 *N. europaeae* を用いて、63 化学物質に対する硝化阻害の検討を行った。その結果 18 化学物質は硝化阻害を生じることが明らかになった。これら化学物質は化学構造的に①アセチレン型、②クロロフェノール型、③ピラゾール型、④S=C-N 型の構造を持つ 4 種に分類された。一方 33 種は非硝化阻害の化学物質に該当し、化学構造的に①長鎖型、②ベンゼン環＋アセチレン型、③O=C-O 型、④O=C-X-X=O 型に分類された。これらの結果から、硝化阻害物質と非硝化阻害物質はそれぞれ特異的な化学構造を持つことを明らかにすることができた。

謝辞

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

参考文献

1) 下水道協会、平成28年度版下水道統計（CD-ROM 版）、2018

2) 横浜市ホームページ、平成 16 年度運転管理に関する調査・研究_汚泥解体を引き起こす運転条件の解析 https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/machizukuri-kankyo/kasen-gesuido/gesuido/shori/sokutei/chosa/untenkanri files/0054_20180827.pdf （2020 年 4 月 1 日確認）

3) 国土交通省ホームページ、有害物質等流入事故対応マニュアルについて、 https://www mlit.go.jp/kisha/kisha05/04/041130_html （2020 年 4 月 1 日確認）

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

5) Hoshikawa H.: 8. Commercial Bioassays and Biosensors. Bioassay and Bio-informatics, pp185-190, 2011

6) McCarty G.W. and Bremner J.M.: Inhibition of Nitrification in Soil by Acetylenic Compounds, Soil Science Society of America. J, 50, pp.1198-1201, 1986

7) Wendeborn S.: The Chemistry, Biology, and Modulation of Ammonium Nitrification in Soil, Angewandte Chemie International Edition, 59, pp.2-23, 2019

8) McCarty G.W. and Bremner J.M.: Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds, Biology and Fertility of Soils, 8, pp.204–211, 1989

9) 山中健生、独立栄養細菌の生化学、pp.73-89、1999

公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究

（影響が懸念される物質のモニタリングと定量的リスク評価手法の構築）

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：水質チーム
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、北村友一、對馬育夫、鈴木裕識、小森行也、髙沢麻里

【要旨】
令和元年度は液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置 LC-QTOF-MS で取得した精密質量測定データを用いた健康・生態リスクが懸念される化学物質のモニタリング手法を検討した。まず、多成分の簡易一斉スクリーニングを行う上で重要となる検出有無判定での見落とし低減に繋がるデータベース（DB）の構築手法を検討し、標準品の多点濃度測定から取得した物質固有の共通スペクトルとそれに紐づくフラグメントイオン情報を整合性の検証を経て DB に登録する手順を示した。次に、膨大な測定データからの未知物質探索手法として、ノイズの除去や探索目的に応じたピークの絞り込み、対象ピークに対する元素組成演算や Chemspider 等の公開化学 DB による実在有無検証と物質固有の MS/MS 情報による構造推定を組み合わせた手法を構築した。本手法を標準活性汚泥処理実験装置（硝化抑制条件下）の下水処理水（n=15）に適用し、全試料に共通して含まれていた物質を探索した結果、ESI(+)測定データ（総ピーク数 28,399）から *N*-Benzyl-*N,N*-dimethyl-1-octanaminium が、ESI(-)測定データ（総ピーク数 21,189）から *p*-cumenesulphonate が物質（候補）として推定された。
キーワード：モニタリング、下水処理水、精密質量分析、簡易スクリーニング、未知物質探索

1.　はじめに

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

過年度では、医薬品類を対象に都市流域で下水処理水および河川水を調査し、河川水中濃度に対して寄与率の高い下水処理場を把握した[3)]。また、水中の医薬品類の濃度変化に影響を及ぼす環境因子として底質への収着に着目して野外調査や室内実験を行った結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が河川底質に蓄積されやすいことや、azithromycin と levofloxacin の底質への収着は主に陽イオン交換反応によるものであることを明らかにした[4)]。次に、河川流下過程における医薬品の消長を効率的に推測することを目的として、水系暴露解析モデルを用いた非定常解析により流域全体における医薬品の暴露濃度の網羅的予測を試みた。その結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 3 種医薬品について、モデル計算濃度が野外実測濃度と比べ低く算出される傾向があったものの、シミュレーション結果から流域全体の濃度マッピングが達成された[5)]。

以上のように、水環境中での医薬品の存在実態や挙動に関する知見は集積されつつあるが、これらは医薬品類について分析技術を含む既往情報が充実していたことによるところが大きく、情報不足が懸念される多くの化学物質については、効率的かつ網羅的に水環境中の存在実態を把握できるモニタリング手法の開発とそれによる実態データの蓄積が望まれる。

本年度は、水環境への主要な経由点の一つである下水処理場の処理水を対象に、精密質量分析技術を用い

た多成分の簡易一斉スクリーニングにおいて重要となる検出有無判定での見落とし低減に繋がるデータベース（DB）の構築手法を検討するとともに、膨大な精密質量測定データからの未知物質探索手法を検討した。

2. 方法

2. 1 試料の採取

下水処理水中の簡易スクリーニングの実施と未知物質の探索手順の検討のために、同様の水質の試料を複数入手することとした。実際の下水処理場の流入下水を原水とする標準活性汚泥処理実験装置（パイロットプラント）の処理水を対象に、2019 年 11 月 28 日から 2020 年 3 月 17 日の間に 15 回試料を採取して化学分析に供した。また、下水採取日に同施設の水道水を採取し、塩素除去したものを分析した。なお、採取期間中、生物処理は硝化抑制条件下で運転されていた。

2. 2 精密質量分析

精度の高い多成分網羅測定には、高分解能で精密質量スペクトルの取得が可能な精密質量分析装置が用いられ、その一つに飛行時間型質量分析装置（Time-of-Flight Mass Spectrometer、以下 ToF-MS）がある。本研究では、液体クロマトグラフ-四重極 ToF-MS（LC-QToF-MS）（ACQUITY UPLC H CLASS Plus および Xevo G2-XS QTof, 共に Waters）を使用して、水試料を分析した。前処理の方法、測定の方法、データ解析の方法をそれぞれ以下に述べる。

2.2.1 分析前処理の方法

下水処理水（100 mL）は固相カートリッジ HLB と AC2 を連結させたものに通液した。通液後のカートリッジは脱水後、HLB と AC2 共に 5mL のメタノールで溶出した。溶出液を窒素吹付装置で濃縮し 1 mL に定容した。調製後の試料を 250 μL 分取し、超純水 250 μL との混合液をろ過機能付きバイアル（ミニユニ、0.2 μm（ポリプロピレン）、GE ヘルスケア）に収め、LC-QToF-MS に供した。試料には安定同位体標識標準 12 物質を添加し、試料間の測定誤差を確認した。

2.2.2 測定の方法

上述の方法に沿って前処理された試料は LC-QToF-MS に導入され測定された。詳細な測定条件は表 1 に示す通りである。各条件はできるだけ多くの物質の測定データを効率的に取得できるよう事前に検討し、設定した。カラムには ACQUITY UPLC HSS T3 を用いた。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法（ESI）により行い、Positive(+)と Negative (-)の両モードを用いた。測定範囲は m/z 50-1200 とし、ロックマスにはロイシンエンケファリンを用いた。本分析装置の特徴として、全測定時間にかけて 10-40 V のコリジョンエネルギーを無段階（ステップレス）でかけて、測定データを取得している（以下、無段階 MS/MS 法）ことが挙げられる。これにより、対象物質を事前に定めなくても、検出の有無判定の際に有効となる個別物質のフラグメントイオン情報の網羅的な収集が可能である。

2.2.3 データ解析の方法①：簡易スクリーニング

簡易スクリーニング手法には、いわゆる「ターゲットスクリーニング分析」[6]を用いることとした。この手法は、未知試料中の網羅的な精密質量測定データを一斉に取得し、目的物質の照合情報が収録された DB と突合することで試料中に含まれる目的物質の有無の一斉把握を行うものである。水環境試料中に含まれる有機物質は物質数が多く、物性が幅広いことが予想されることから、適した方法であると考えられる。スクリー

表-1　LC-QToF-MS の測定条件

HPLC装置	ACQUITY UPLC H CLASS Plus
分析カラム	ACQUITY UPLC HSS T3（1.8 μm, 2.1 x 150 mm）
移動相	A: 水 B: MeOH/ACN (1/9) C: 1% ギ酸水/MeOH/ACN (5/1/4) (Positive分析用) D: 1 mol/L AA水/MeOH/ACN (5/1/4)(Negative分析用)
グラジエント条件（体積比(%)）	min: 0, 3, 23, 31 A: 90, 90, 0, 0 B: 0, 0, 90, 90 C, D: 10, 10, 10, 10
平衡化時間	5分
注入量	30 μL
流速	0.4 mL/min
MS装置	Xevo G2-XS QTof
イオン化法	ESI-Positive/ Negative
イオン取得モード	Sensitivity mode (Continuum)
質量範囲	m/z 50-1,200
キャピラリー電圧	3 kV
コーン電圧	40 V
コリジョン電圧	10 - 40 V (無段階MS/MS)
キャリブレーション条件	ギ酸ナトリウム溶液, 10 μL/min 質量範囲: m/z 50-1,200 (+) m/z 91-1,179 (17点) (−) m/z 113-1,133 (16点)
ロックマス条件	ロイシンエンケファリン, 10 μL/min (m/z 556.2771(+), 554.2615(−))

MeOH: メタノール, ACN: アセトニトリル,
AA: 酢酸アンモニウム

ニングにおいて試料中の目的物質の有無を的確に判定するためには、誤検出や見落としのリスクを極力低減できる照合用 DB を構築する必要がある。本研究では、特に見落としの低減を目指した DB 作成手順について検討し、次に、上述により登録された化学物質を含む DB に対して、実際の下水処理場から採取した下水処理水試料への標準品添加試験(n=11)を実施して、適用可能性を検討した。添加物質は ESI(-)で検出される 9 物質とした。さらに、2.1 で示した下水処理水(n=7)を対象とした簡易スクリーニングを実施した。

簡易スクリーニングにあたっては、DB と測定データの突合に UNIFI Scientific Information System（Waters）を用いた。検出の有無判定では、シグナル強度（>1000）によりスペクトルデータを選抜後、質量許容範囲±100 ppm 以内で対象物質の m/z と一致する物質候補を抽出した。次に、測定データの RT と DB 登録データの RT（本研究の測定結果と比較できるよう補正した保持時間指標（RI））を照合（±1 min）し、さらにフラグメントイオンの一致数（≧1）を元に整合性を確認した。スクリーニング対象とした精密質量値は水素付加体([M+H]+)と脱水素体([M-H]-)である。

2.2.4 データ解析の方法②：未知物質の探索

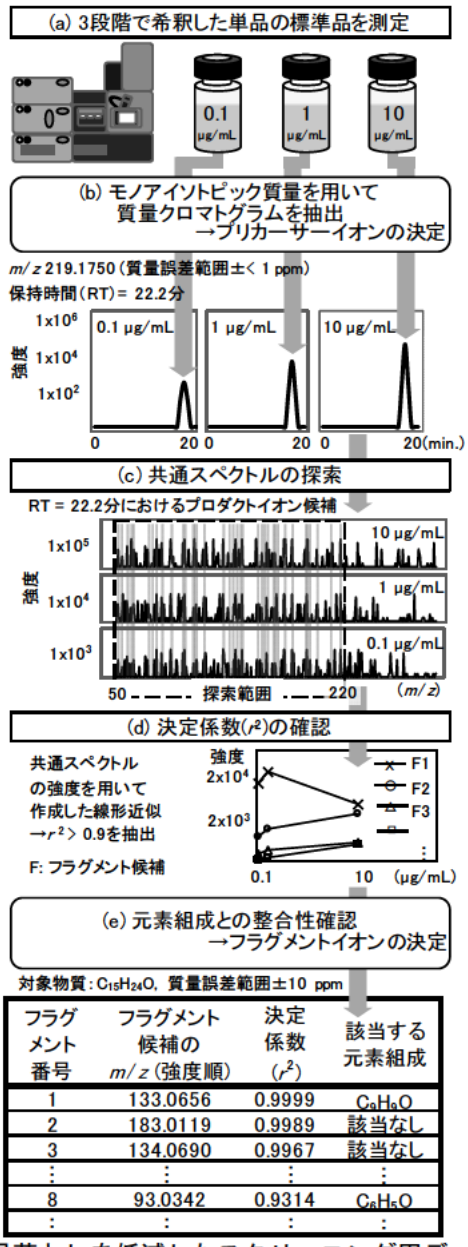
近年、事前に研究対象としていなかった化学物質について、ノンターゲット解析により多成分の精密質量網羅測定結果から予想していない化学物質を探索する技術が発展しつつある。この手法では、将来的に健康生態リスクが懸念されることになった物質についても、振り返って解析し水環境中の存在実態のトレンドを把握することが可能となる。本研究では、下水処理水を用いて、未知物質を探索する手法を検討した。

測定データの解析には Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Waters)を用いた。解析対象試料は、下水処理水と水道水（各 n =15）に加え、前処理後の下水処理水と水道水をそれぞれ全試料等量混合した試料（以下、下水処理水 MIX、水道水 MIX、各 n =1）を含めた合計 32 試料を 1 つのバッチとし、まとめて解析した。Progenesis QI の初期設定でオートアライメントおよびピークピッキングを行い、付加イオンの関連付けを考慮しない設定（$[M+H]^+$、$[M-H]^-$のみを対象精密質量値として選択）でピーク位置と強度の一覧を出力した。得られたデータのさらなる整理と解析には Excel および R を用いた。ピーク強度データは Raw Abundance の値を使用した。

3. 結果と考察

3. 1 スクリーニングデータベース（DB）構築手順の検討

スクリーニング用 DB の構築のための標準品解析手順を検討した。その結果を図-1 に示す。本研究では見落としを低減した汎用性の高い DB 構築を目的として、分析環境および条件の影響を受けにくい、MS 内の真空環境下で発生するプロダクトイオンに着目し、実測値を登録した。標準品の測定に際しては、非対象物質由来の夾雑イオンの発生を極力避けつつ、正確なプロダクトイオン候補を取得し登録するために単品の標準品を用いた。本研究では、健康生態リスクが懸念され



フラグメント番号	フラグメント候補の m/z（強度順）	決定係数（r^2）	該当する元素組成
1	133.0656	0.9999	C_9H_9O
2	183.0119	0.9989	該当なし
3	134.0690	0.9967	該当なし
⋮	⋮	⋮	⋮
8	93.0342	0.9314	C_6H_5O
⋮	⋮	⋮	⋮

図-1 見落としを低減したスクリーニング用データベース作成のための標準品解析手順（解析例：ノニルフェノール）

る化学物質群の一例として PRTR 第一種指定化学物質を取り上げ、標準品を入手した 28 物質を対象とし、DB 登録情報の取得手順を検討した。なお、ここではノニルフェノール（NP）の例を示す。

まず、メタノールを用いて 3 段階で希釈した単品の標準溶液（0.1、 1、 10 μg/mL）を表-1 に示した装置条件で測定し（図-1（a））、DB へ登録する m/z や RT 等の情報を順に取得した。標準品の測定から取得したトータルイオンクロマトグラム（TIC）から、目的物質である NP のモノアイソトピック質量を用いて質量イオンクロマトグラム（EIC）を抽出後、各濃度における 3 つのクロマトグラム上で m/z、RT、ピーク形状が同一であることを確認し、プリカーサーイオンを決定した（質量誤差範囲: <±1 ppm、図-1（b））。次に、プリカーサーイオンと同一の RT に検出されたプロダクトイオン候補（無段階 MS/MS 法で取得:10～40V）を全て抽出し、共通する *m/z* を持つデータのみを抽出した（図-1（c））。3 点の異なる濃度データから得られたスペクトル強度から、最小二乗法を用いて一次方程式の各係数を算出し、その直線近似における決定係数（r^2）を確認した（図-1（d））。それらを強度の高い順に並び替え、精密質量値から組成式を割り出し、プリカーサーイオンと整合性のあるものをプロダクトイオンとして決定した（図-1（e））。ここに示した m/z 93.0342 の例のように、主要なプロダクトイオン候補（NP のフェノール構造）が前段で排除されないよう、登録漏れと誤登録が低減される条件のバランスを考慮した上で、決定係数の閾値を 0.90 以上に設定した。

標準品を入手できた 28 物質それぞれについてみてみると、DB へ登録するプロダクトイオン候補の精査過程で確認できたプロダクトイオンスペクトル数は、共通スペクトルの探索段階（図-1（c））では最小で 9 スペクトル、最大で 97 スペクトルに絞り込まれ、決定係数の確認段階（図-1（d））では最小で 5 スペクトル、最大で 55 スペクトルに絞り込まれた。元素組成との整合性確認では、前段で絞り込まれたイオンを強度の高い順に並べた上で、最大 4 つのプロダクトイオンを確定できるよう照合作業を行い、2～4 スペクトルをプロダクトイオンとして登録した（使用した解析ソフトウェアでの登録上限 4 スペクトル）。登録したプロダクトイオンについて、既報のモニターイオンと照合したところ、主要なプロダクトイオンが取得されていることが確認できた[8-10]。

本研究で構築した手順を用いて作成される DB は、本研究グループ以外で DB が使用された場合に、他機種の装置で取得された測定データとの突合においても、有効な照合指標となることが期待できる。夾雑物が多く含まれることが想定される下水試料中では、同一の RT で溶出され MS 内で生成するイオンが複雑化することで、本来検出されるべき対象物質が不検出となる可能性があるが[11]、本手法では、突合に有力なプロダクトイオンを複数個登録することにより、突合妨害のリスクを低減し、検出漏れを最小限に抑え、汎用性の高い DB を構築することができる。

3. 2 スクリーニング DB の実試料への適用性の検討

上述の手法を用いて DB 情報を収録した 9 種の物質(ESI(-)モードによる測定)について、下水処理水(n=11)を用いて標準添加試験を実施し、検出有無判定の精度を検討した。その結果を表-2 に示す。何も補正せずに DB との突合を実施した結果、全試料で検出「有」と判定されたのは、標準添加を実施した 9 物質のうち、ビスフェノール A、ノニルフェノール、PFOS の 3 物質だけであった。その他の物質の検出不良の要因を検討した結果、DB 構築時の標準品測定時の RT と標準添加した下水試料測定時の RT が分単位で大幅に異なっていたことが確認された。そこで、LC-QTOF-MS 測定用試料に常時添加している安定同位体標識標準品のデータを用いて、RT を補正して、再突合を行った。その結果、テブフェノジド、ブロマシル、ベタナフトールの 3 物質が全試料から検出された。残りの 3 物質のうち、*p*-オクチルフェノールと 2-フェニルフェノールについては、検出が想定される RT 近傍において明瞭なピークが確認できないケースが多く、下水試料によるイオン化の妨害等が原因となり、添加濃度

表-2　下水試料への標準添加試験による実試料へのスクリーニング DB の適用性の検討結果

物質名	DB構築用標準品測定時のRT (min.)	下水試料測定時のRT (min.)	標準添加試料中で検出「有」と判定された試料数（RT許容範囲±1min）	
			RT補正なし	RT補正あり
ビスフェノールA	13.88	14.57	11	11
p-オクチルフェノール	22.34	21.03	2	2
ノニルフェノール	21.21	21.71	11	11
2-フェニルフェノール	18.06	15.67	1	7
フタル酸n-ブチル=ベンジル	18.17	N.A.*	0	0
テブフェノジド	14.06	18.06	0	11
ブロマシル	14.06	12.56	0	11
ベタナフトール	16.11	14.11	0	11
PFOS	16.11	16.74	11	11

＊自動では値が得られず、測定結果の目視が必要であった。　■ 検出不良

(50ng/mL)の範囲では適切に検出判定されなかったことが示唆された。この点を解決するための対応策として、下水中の夾雑物に影響を受けにくいフラグメントイオン情報の DB への追加が考えられた。また、フタル酸 *n*-ブチル=ベンジルは、解析ソフトウェアでは RT 情報が自動で捕捉されなかった。手動で確認したフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの EIC の一例を図-2 に示す。下水試料への標準添加試料の EIC をみたところ、有機溶媒中の標準品試料と同様に、RT=18.0 分の近傍にピークが確認された。また、下水試料への添加試料からは溶媒試料の約 60 倍の強度が確認され、実試料中にフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルが存在していたことが示唆された。つまり、現状のスクリーニング条件ではこの物質の検出を適切に判定できず、存在が見逃されてしまうことになる。この原因を検討したところ、実試料にはフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの異性体が複数存在しており、それによりピークが十分に分離されずに突合条件である RT 許容範囲(±1min)を超えるブロードなピークを形成してしまったことが理由の一つであると示唆され、異性体の分離は本手法における課題の一つであると考えられた。異性体同士を的確に分離するための最新技術として、イオンモビリティー質量分析技術が有力であるとの報告があるが [15]、水環境試料の測定データの蓄積を目指す上では、汎用性に欠けることが懸念される。

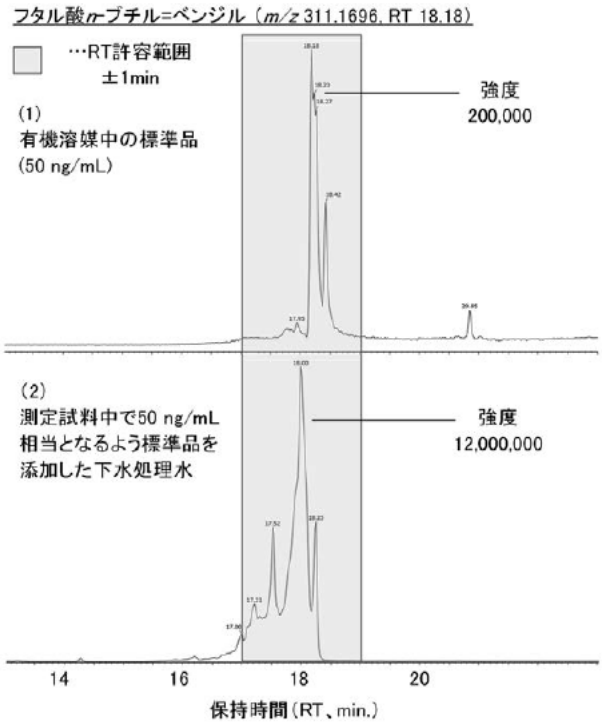


図-2　標準添加した下水試料で検出不良であったフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの質量イオンクロマトグラム

以上より、精密質量測定データを用いたスクリーニングにおいては、実試料中の夾雑イオンによる測定妨害を想定しつつ、RT を補正した RI を登録しておくことの重要性が再確認され、また、異性体の存在に留意しつつ、可能な限り異性体毎の情報を DB に登録しておく必要があることが示唆された。

3．3 下水試料のスクリーニング結果

PRTR 対象物質の簡易スクリーニング結果の一覧を表-3 に示す。簡易スクリーニング DB には、本研究で見出した手法により登録した情報を一部含めて別途作成した PRTR 対象物質（81 物質）の DB を用いた。対象試料は試料採取期間前半の下水処理水(*n*=7)である。解析の結果、いずれかの試料から検出された物質の合計数は 32 種であった。最も高頻度で検出「有」と判定されたのは、ESI(+)測定データではアトラジン、ESI(-)測定データではテブフェノジドであった。アトラジンは、欧州連合では使用が禁止されているが世界で最も多く使用されている除草剤の一つであり [16]、テブフェノジドは昆虫生育制御機能のある殺虫剤として水稲、果樹等の栽培時に広く使用されている [17]。下水処理水から検出「有」と判定された物質については、標準活性汚泥法（硝化抑制運転条件下）では処理水に

表-3　PRTR 対象物質の下水処理水における スクリーニング結果（スクリーニング対象全 81 種）

PRTR 政令番号	化合物名	ESI* イオン化モード	検出m/z の例	検出数（*n*=7 中）
17	oアニシジン	+	124.0760	3
25	メトリブジン	+	215.0878	1
27	メタミトロン	+	203.0931	2
37	ビスフェノールA	−	227.1087	3
46	キザロホップエチル	+	373.1282	1
51	p-オクチルフェノール	−	205.1615	3
52	アラニカルブ	+	400.1401	1
90	アトラジン	+	216.1014	4
091	シアナジン	+	241.1188	1
113	シマジン又はCAT	+	202.0879	1
114	インダノファン	+	341.1083	1
116	ヘキシチアゾクス	+	353.1047	1
119	フェンブコナゾール	+	337.1091	2
124	クミルロン	+	303.1062	1
143	4, 4'－ジアミノジフェニルエーテル	+	201.1034	2
172	オキサジクロメホン	+	376.0784	1
224	*N,N*-ジメチルドデシルアミン=*N*-オキシド	+	230.2490	1
267	チオジカルブ	+	263.0734	2
320	ノニルフェノール	−	219.1752	1
334	4-ヒドロキシ安息香酸メチル*	+	153.0550	3
335	アセトアミノフェン	+	152.0708	2
356	フタル酸*n*-ブチル=ベンジル	−	311.1327	2
358	テブフェノジド	−	351.1847	4
370	ピリダベン	+	365.1709	1
393	ベタナフトール	−	143.0501	1
402	メフェナセット	+	299.0888	1
425	イソプロカルブ*	+	194.1177	1
426	カルボフラン	+	222.1137	1
431	アゾキシストロビン	+	404.1205	1
443	メソミル	+	163.0542	1
444	トリフロキシストロビン	+	409.1466	1
446	4,4'メチレンジアニリン	+	199.1218	1
合計	32種			

残留することが示唆され、健康・生態リスクが懸念される物質群としての側面がある PRTR 対象物質としては、今後も公共用水域での存在実態や健康・生態影響について詳細検討が必要な物質であると考えられた。

以上、本研究で構築したスクリーニング用 DB の構築手法を基に登録された情報を含む PRTR-DB により簡易スクリーニングが実施され、下水試料から効率的に対象物質群の存在実態を把握することが達成された。

3. 4 未知物質探索のためのデータ整理

下水処理水と水道水（各 n=15）、下水処理水 MIX、水道水 MIX(各 n=1）の合計 32 試料を同時にノンターゲット解析にかけたところ、いずれかの試料から確認されたピーク数の合計は ESI(+)測定データでは 29,556、ESI(-)測定データでは 21,222 であった。これらの内訳を表-4 に示す。なお、ピークは強度 1,000 以上であったもののみをカウントした。また、ここでピークとして示されたものは必ずしも固有の物質ではないという点に留意されたい。15 回の採取試料のうち、ESI(+)測定データでは下水処理水から 2,284 ピーク(2020 年 1/17)～14,984 ピーク(3/10)の範囲で確認され、水道水から 755 ピーク(2020 年 1/17)～4,444 ピーク(2/12)の範囲で確認された。また、ESI(-)測定データでは下水処理水から 1,992 ピーク(1/10)～8,192 ピーク(3/17)の範囲で確認され、水道水から 415 ピーク(2020 年 1/10)～2,976 ピーク(2019 年 12/26)の範囲で確認された。下水処理水と水道水を比較すると、ESI(+)測定データでは下水処理水の方が水道水より 2.0 倍(12/18)~4.1 倍(3/4)ピーク数が多く、ESI(-)測定データも同様であった（2.3 倍(11/28)~5.2 倍(3/4)）。試料採取日毎のピーク数の変動については明確な要因の把握には至らず、今後の課題の一つとして考えられた。

各種試料の MIX 試料の測定データと下水処理水 15 試料で共通して確認されたピークを図-3 に示す。ESI(+)測定データでは、下水処理水 MIX から 13,610 ピークが確認され、水道水 MIX から 3,804 ピークが確認された。これらの結果を踏まえ、下水処理水 15 試料に共通して確認され、水道水 MIX からはみられない固有のピーク数をカウントしたところ、901 ピークが見出された。ESI(-)測定データに対し同様の操作を行ったところ、下水処理水 15 試料に共通して確認され水道水 MIX からはみられない固有のピーク数は 802 であった。以上、整理された下水処理水に共通かつ固有なピーク群は今回調査した活性汚泥処理実験装置に平常時に流入しつつ、標準活性汚泥処理後に残留している物質群の探索対象として位置づけることができ、全ピーク数の 3-4%程度にまで探索候補を絞り込むことができた。このように、精密質量分析により網羅的に取得された測定データは、そのままでは膨大であり、未知物質の探索を効率的に行うためには、事前の絞り込みが重要であることが再確認された。

表-4 ノンターゲット解析により確認された各試料中のピーク数

ESI	採取日等 / 試料種	2019 11/28	12/6	12/13	12/18	12/26	2020 1/10	1/17	1/28	2/4	2/12	2/18	2/25	3/4	3/10	3/17	MIX
(+)	下水処理水	6,522	7,563	3,370	3,813	6,376	2,540	2,284	14,512	14,238	11,398	13,387	13,510	13,752	14,984	14,894	13,610
	水道水	3,130	1,841	1,613	1,899	3,021	770	755	3,683	3,573	4,444	4,160	3,924	3,319	3,828	3,670	3,804

ESI	採取日等 / 試料種	2019 11/28	12/6	12/13	12/18	12/26	2020 1/10	1/17	1/28	2/4	2/12	2./18	2/25	3/4	3/10	3/17	MIX
(-)	下水処理水	6,548	4,240	2,375	3,054	7,145	1,992	3,084	7,968	7,127	5,656	7,077	7,155	7,808	7,628	8,192	6,930
	水道水	2,897	977	965	1,130	2,976	415	761	1,594	1,570	1,891	1,797	1,730	1,494	1,576	1,621	1,681

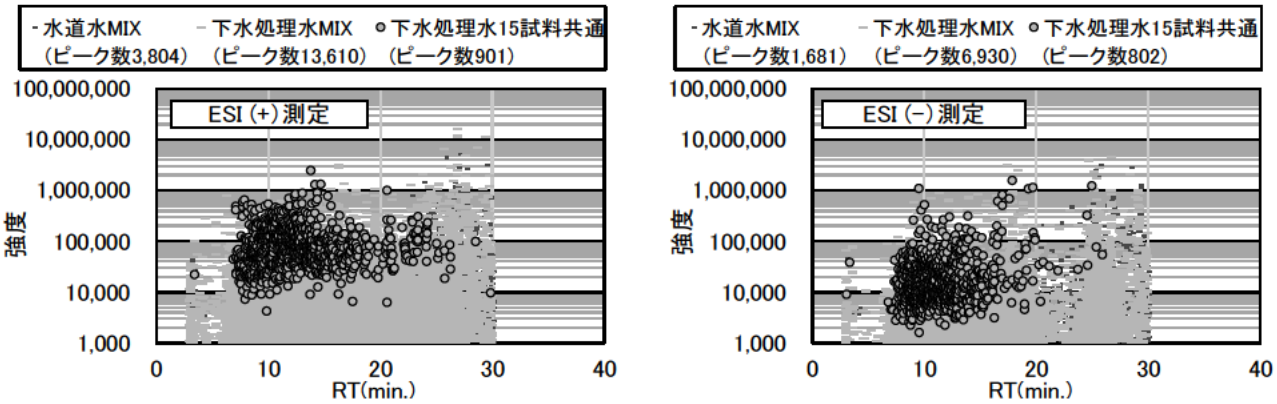


図-3 各種試料の MIX 試料の測定データと下水処理水 15 試料で共通して確認されたピーク

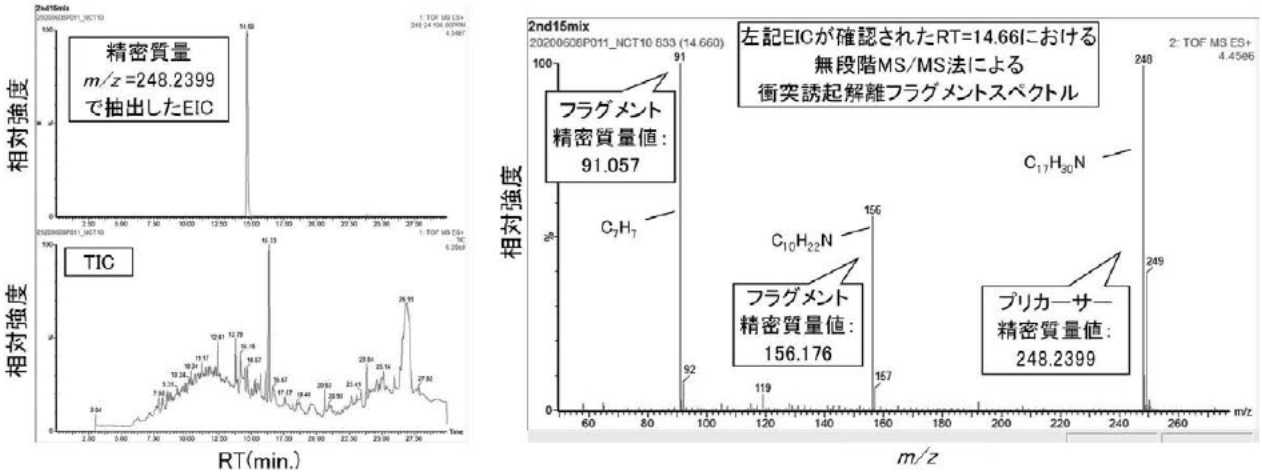


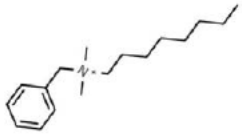
図-4　m/z =248.2399 の精密質量測定データと元素組成演算により推定されたフラグメント組成

3．5 下水処理水からの未知物質の探索

上述 3.4 において絞り込まれたピーク情報を基に未知物質を探索した。検討は ESI(+)と ESI(-)の測定データの 2 通りでそれぞれ行うこととし、さらなる探索条件として、探索の容易さの観点で、検出強度が高く、比較的分子量が低い(つまり、*m/z* 値が低いもの)を優先的に検討することとした。

ESI(+)測定データから絞り込まれた 901 のピークのうち、上述の探索条件に当てはまるデータとして精密質量 *m/z*=248.2399（RT:14.66）を選出し、この情報に基づいて MassLynx V4.2 (Waters) により元素組成演算を行った。その際の条件は *m/z* 値より推定される各元素の最大組成数を考慮して設定し、炭素数：1-20、水素数：1-42、窒素数：0-17、酸素数：0-22、ナトリウム数：0-10、硫黄数：0-7、臭素数：1-10、フッ素数：0-10、塩素数：1-10、リン数：0-10、許容質量誤差範囲 50 ppm とした。その結果、462 の組成候補が選ばれた。この段階では詳細検討のための候補が過大であるため、既報の絞り込み条件である H/C 比率 3.1 以下[18]を導入して選抜したところ、候補組成が 19 種に絞り込まれた。次に、これらについて、多くの化学物質の情報を持つ Chemspider[19]の検索機能を用いて、実在の有無を検証したところ、$C_{17}H_{30}N$(モノアイソトピックマス:248.23727)と $C_{12}H_{30}N_3O_2$（モノアイソトピックマス:248.23216）について情報が得られた。なお、モノアイソトピックマスとは各元素について天然存在比が最大の同位体の質量を用いて計算したイオンまたは分子の計算精密質量（exact mass）を指す[20]。このうち、測定結果の精密質量 *m/z* 248.2399 との質量誤差がより小さい $C_{17}H_{30}N$ を第一候補とし、

表-5　ESI (+) 測定データ *m/z* =248.2399 から推定された化学物質（候補）

物質名	構造式(Chemspider[19]から抜粋)
N-Benzyl-*N,N*-dimethyl-1-octanaminium	

Chemspider から推定構造情報を取り込んだところ、31 種の化学物質が提示された。ここで、*m/z*=248.2399 に関する精密質量測定データを図-4 に示す。本研究で用いた測定装置では、各化学物質（プリカーサーイオン）固有の精密質量データとともに、無段階 MS/MS 法により、衝突誘起解離(CID)によりフラグメントイオンを発生させ、各化学物質に関連する情報として取り込んでいる。この情報を活用して、Chemspider から提示された各化学物質の構造と照合した結果、表-5 に示す化学物質（候補）*N*-Benzyl-*N,N*-dimethyl-1-octanaminium が推定された。この物質は、塩化物塩としては塩化ベンザルコニウムに分類される陽イオン界面活性剤の一種である。塩化ベンザルコニウムは消毒[21]やコンタクトレンズの防腐剤として広く用いられており、下水に含まれている可能性としては十分に想定される物質であった。

ESI(-)測定データについても、ESI(+)測定データと同様に未知物質探索の解析を行った。探索条件に当てはまるデータとして精密質量 *m/z*=199.0476 (RT:9.52) を選出し、この情報に基づいて元素組成演算を行い、H/C 比率 3.1 以下の条件で選抜した結果、候補組成が 46 種に絞り込まれた。次に、Chemspider で実在の有無を確認したところ、依然として候補組成が 8 種あり、

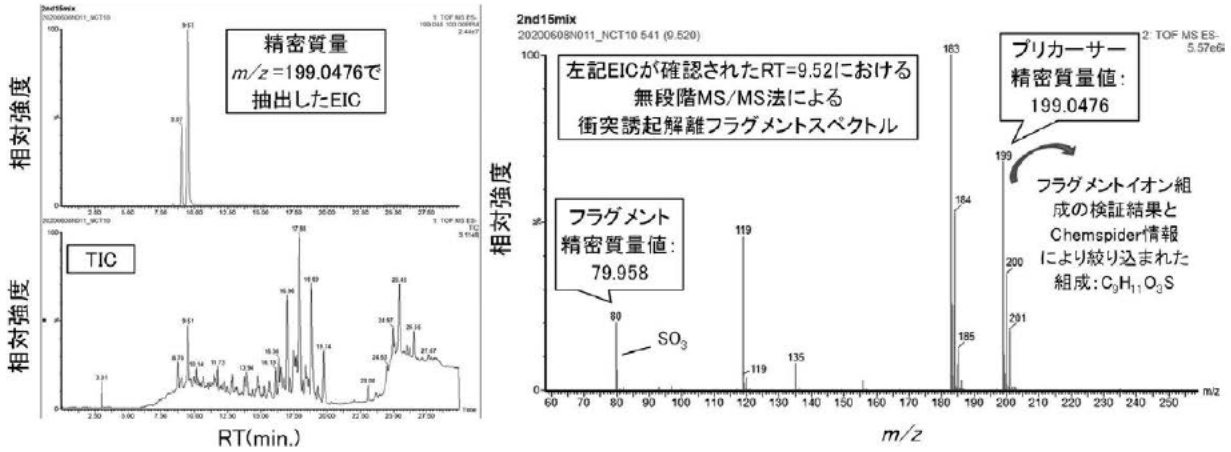


図-5 *m/z*=199.0476 の精密質量測定データとフラグメントイオンの検証から絞り込まれた探索物質の元素組成

この段階での物質推定は容易ではなかった。そこで、他の手がかりを得ることを目的として *m/z* =199.0476 に関する精密質量測定データについて CID 情報を含めて事前に確認することにした。その結果を図-5 に示す。CID によるフラグメントイオン情報から、精密質量 *m/z* =79.958 に相当するフラグメントイオンが SO_3 であることが推定された。この情報を活用し、Chemspider から提示された各化学物質と照合した結果、$C_9H_{11}O_3S$(モノアイソトピックマス: 199.04344)が候補組成であることが示唆された。さらに Chemspider から本組成の推定構造情報を取り込んだところ、9 種の異なる構造異性体が提示された。このうち、実際に下水試料中に存在する可能性のあるものを検討した結果、*p*-cumenesulphonate (*p*-クメンスルホン酸) が考えられた。

以上、2 パターンのデータ解析で最終的に提示された物質（候補）については、約 4 ヶ月の間に 15 回採取した試料全てで確認されていることを考慮すると、今回調査した標準活性汚泥処理(硝化抑制運転条件下)では処理水中に残留する可能性が示唆されるため、今後も調査データを蓄積して検討していく必要があると考えられた。なお、これらが実際に試料中に存在したかどうかを明らかにするためには、各標準品を入手し、本研究で用いた測定機器に導入して確認測定を行う必要がある。一方で、その検討測定を実施できる段階まで物質を絞り込むことに成功したとも言える。

本研究で構築した候補物質の絞り込むためのフローを図-6 に示す。本研究で採用した LC-QTOF-MS により取得された精密質量測定データは、それ自体はビッグデータというべき膨大なデータ量ではあるが、一定の目的を設定し、探索の候補とするデータを絞り

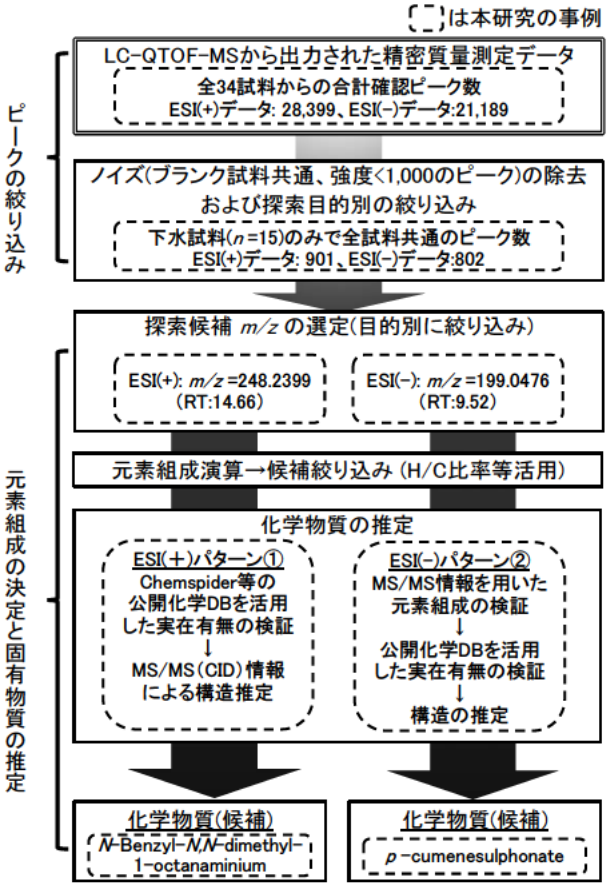


図-6 精密質量測定データを用いた未知物質探索解析における化学物質（候補）絞り込みフロー

込んだ上で、元素組成演算等の既往の探索ツールや Chemspider 等の公開化学 DB、さらに、本手法の特徴の一つである無段階 MS/MS 法により取得したフラグメントイオン情報を有効に活用することにより候補物質をさらに絞り込むことができることを、手順を追って示すことができた。本検討では、複数の下水処理水中の共通データという条件により物質を探索した

が、例えば、水質事故等が発生した際に、その原因物質を探索するような目的にも本手法は有効であると考えられる。精密質量測定データは、取得から時間が経過した後でも、振り返って解析に使用することができるため、整理して保存しておくことで、将来的に水質リスク問題が発生した際にも、速やかな知見提供に繋がることが期待できる。

4. まとめ

本研究で得られた主な知見は以下のとおりである。

LC-QTOF-MS で取得された精密質量測定データを用いた多成分の簡易一斉スクリーニングを行うために重要な、データベース（DB）構築手法を検討し、

1) 標準品の多点濃度測定から取得した物質固有の共通スペクトルとそれに紐づくフラグメントイオン情報を整合性の検証を経て登録することで、見落とし低減に繋がる DB 構築手法を提示した。
2) 9 物質の標準添加試験により DB の適用可能性を検討し、9 物質中 6 物質は良好に適用できることを確認した上で、現状の課題を整理した。
3) 標準活性汚泥処理（硝化抑制運転条件下）を採用しているパイロットプラントから採水した下水処理水 7 試料に対し、簡易スクリーニングを実施した結果、今回対象とした 81 種の化学物質のうち、いずれかの試料から検出された物質の合計数は 32 種であった。

LC-QTOF-MS 測定データを用いた未知物質の探索手法について、下水処理水 15 試料を対象として検討し、

4) 探索解析を効率的に進めるための事前のデータ整理手順を示しつつ、一定の探索目的を設定し、探索候補データを絞り込む重要性を確認した。さらに、既往の探索ツールである元素組成演算や公開化学 DB の Chemspider、さらに、本研究の特徴の一つである無段階 MS/MS 法により取得した物質固有の情報を有効活用することで物質（候補）を推定する手順フローを構築した。
5) 4)で示した手順に従って、下水処理水 15 試料に共通して含まれていた物質を探索した結果、ESI(+)測定データ（総ピーク数 28,399）から *N*-Benzyl-*N,N*-dimethyl-1-octanaminium が、ESI(-)測定データ（総ピーク数 21,189）から p-cumenesulphonate が推定された。

本研究では、環境試料の中でも分析難易度が高い下水試料を対象に、精密質量測定データを用いた簡易スクリーニング用の DB 構築手法と未知物質の探索手法についてそれぞれ手順を示した。各手法について、改善点はあるものの、公共用水域における健康・生態リスクの懸念される化学物質のモニタリング手法として、有効に適用できることが示された。

今後の課題としては、事前に物質情報が把握されているものに対して、簡易スクリーニングによって効率的に蓄積された環境中の存在実態データを用いて、既往の毒性データとのマッチングによる半自動的なリスク評価の手法を検討する。将来的な化学物質リスクへ柔軟に対応するための対策の一つとして、公共用水域における各種水試料の精密質量分析データを獲得しつつ、振り返り解析を行うための DB とその解析環境を整備しておくことが重要であると考えられる。

参考文献

1) 土木研究所平成 27 年度重点研究成果報告書：水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-project/2015/pdf/ju-10.pdf（2019 年 6 月確認）
2) 花本征也、真野浩行、南山瑞彦：多摩川と桂川における抗生物質の減衰の差異とその要因、第 51 回日本水環境学会年会、熊本、p.165、2017 年 3 月
3) 土木研究所平成 28 年度研究開発プログラム報告書：「13.1.1 公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究」、pp.4-7、2016
4) 土木研究所平成 29 年度研究開発プログラム報告書：「13.1.1 公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究」、pp.1-4、2017
5) 土木研究所平成 30 年度研究開発プログラム報告書：「13.1.1 公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究」、pp.4-10、2018
6) Wode, F., van Baar, P., Dünnbier, U., Hecht, F., Taute, T., Jekel, M. and Reemtsma, T.: Search for over 2000 current and legacy micropollutants on a wastewater infiltration site with a UPLC-high resolution MS target screening method, *Water research*, **69**, pp.274-283, 2015

7) 環境省ウェブサイト：PRTR インフォメーション広場, 集計結果 https://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/index.html（accessed 2020-6-1）

8) Takazawa, M., Suzuki, S., Nakano, T., Tsunoi, S. and Shinomiya, M.: Quantitative and Qualitative Analysis of Organic Halogenated Compounds Unintentionally Generated in Wastewater Treatment Plants using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and High-Resolution Mass Spectrometry, *Journal of Environ. Chem.*, **27**(4), pp.137-144, 2017

9) 環境省環境保健部環境安全課：平成 22 年度版化学物質分析法開発調査報告書, https://www.nies.go.jp/kisplus/images/bunseki/pdfs/kurohon/2010/adoc2010-3-486_v2.pdf, 2011（accessed 2020-6-1）

10) Leary, D. B., Takazawa, M., Kannan, K. and Khalil, N.: Perfluoroalkyl Substances and Metabolic Syndrome in Firefighters, A Pilot Study. *J. Occup. Environ. Med.*, **62**(1), pp.52-57, 2020

11) Rogatsky, E. and Stein, D.: Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development, *J. Ame. Soci. Mass Spec.*, **16**, pp.1757–1759, 2005

12) Kadokami, K. and Ueno, D: Comprehensive Target Analysis for 484 Organic Micropollutants in Environmental Waters by the Combination of Tandem Solid-Phase Extraction and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry with Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra Acquisition, *Anal. Chem.*, **91**(12), pp.7749-7755, 2019

13) ICPDR: Joint Danube Survey 3, 2015 www.danubesurvey.org. (accessed 2020-4-1)

14) MassBank Europe ウェブサイト, https://massbank.eu/MassBank// (accessed 2020-4-1).

15) 林明生、佐藤信武、細田晴夫、建田潮：イオンモビリティー質量分析計、*日本農薬学会誌*, **42**(1)、 pp. 187-196、 2017

16) Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. and Wilson, S. P.: Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment, *Environmental pollution*, **157**(11), pp. 2903-2927, 2009

17) 環境省：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料テブフェノジド, https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/251tebufenozide.pdf (accessed 2020-6-1)

18) Kind, T. and Fiehn, O.: Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC bioinformatics*, **8**(1), p.105, 2007

19) ChemSpider ウェブサイト, R. S. C http://www.chemspider.com/ (accessed 2020-6-1)

20) 日本質量分析学会用語委員会: マススペクトロメトリー関係用語集第 3 版（WWW 版）, http://www.mssj.jp/publications/books/glossary_01.html (accessed 2020-6-1)

21) Frank, M. J. and Schaffner, W.: Contaminated aqueous benzalkonium chloride: an unnecessary hospital infection hazard, *Jama*, **236**(21), pp. 2418-2419, 1976

公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究

（水質リスクを軽減するための処理技術）

担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、北村友一、
對馬育夫、鈴木裕識、小森行也、
厚朴大祐、髙沢麻理

【要旨】
令和元年度は平成 30 年度に下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減効果が確認された微生物保持担体処理がアンモニア性窒素の低減と同時に医薬品の除去にも効果があるかどうかを調査した。微生物保持担体処理槽は、ポリプロピレン製中空円筒担体を 35%充填した流動型担体処理槽（60L）を 2 連直列に設置した。水理学的滞留時間（HRT）180 分と 120 分でアンモニア性窒素が残留する二次処理水を連続処理し、微生物保持担体処理によるアンモニア性窒素の低減率とアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの濃度変化、除去率を調査した。その結果、HRT180 分でアンモニア性窒素の低減率 91%が得られ、このときのアジスロマイシン、クラリスロマシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン平均除去率は、15%、24%、64%、61%となった。得られた医薬品の除去率は活性汚泥処理と同等以上であった。HRT120 分では、HRT180 分の条件よりも除去率の低下がみられた。
キーワード：下水処理水、医薬品、アンモニア性窒素、微生物保持担体

1. はじめに

環境省では水生生物の保全に係る水質環境基準項目へのアンモニア性窒素（以下、NH_4-N とする）の追加を検討している。下水放流水から NH_4-N が検出される場合[1]もあり、下水放流先に環境基準点がある場合や、排水基準値が設定された場合に対応するため、特に、硝化の促進が難しい処理方法・運転条件の小規模処理場に適した NH_4-N の低減法を提案しておく必要がある。NH_4-N の他にも、下水放流水中に含まれる医薬品などの水生生物へ影響が懸念されており、環境省では医薬品の有害性についての検討が行われている。医薬品の中で抗生物質であるクラリスロマイシンの予測無影響濃度（PNEC）は、69 ng/L という低濃度となることが報告[2]され、下水処理水からこれを上回る濃度が検出される場合[3)4)5)]もあることが明らかとなってきた。下水処理水放流先の水生生物保全のため、下水処理過程での NH_4-N と医薬品の低減法の開発が求められている。

令和元年度は、平成 30 年度に下水処理水に残存する NH_4-N の低減効果が確認された微生物保持担体処理（以降、担体処理とする）が、NH_4-N の低減と同時に医薬品の除去に効果があるかどうかを調査した。

2. 実験方法

写真-1 に担体処理槽の外観を、図-1 に活性汚泥処理装置と担体処理実験装置の構成概要を示した。担体処理槽は、容量 60L のステンレスタンクを直列に 2 台接続したものとし、活性汚泥処理実験装置の後段に設置

写真-1　微生物保持担体処理槽の外観

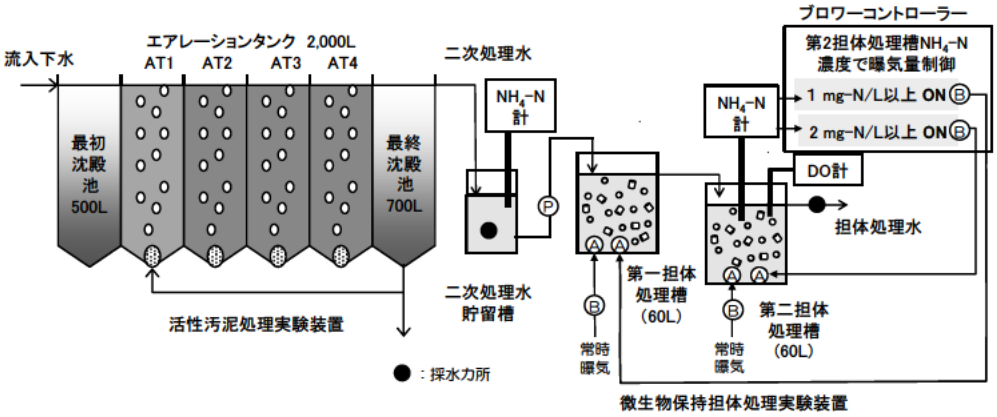


図-1 活性汚泥処理実験装置と微生物保持担体処理実験装置の概要

表-1 微生物保持担体処理実験の実験期間、二次処理水流量と曝気条件

HRT条件（2槽当たり）	実験期間	二次処理水流量（L/min）	常時曝気量（L/min）		追加曝気量（L/min）	
			第1担体槽	第2担体槽	第1担体槽	第2担体槽
HRT180分	2019/11/21～2020/1/23	0.6	3	3	2	2
HRT120分	2020/1/23～2020/3/26	0.9	4	4	2	2

した。各担体処理槽にはポリプロピレン製の中空円筒状の担体（$4mm^{OD}\times3mm^{ID}\times5mm^{L}$）を嵩比率 35%(21 L)で充填した。担体処理実験のための原水は、実下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、処理水中に NH_4-N を残留させたものである。

各担体処理槽は常時曝気と追加曝気装置を設置し、第二担体処理槽に設置したアンモニアセンサーで追加曝気を ON-OFF 方式で制御した。すなわち、第二担体処理槽の NH_4-N 濃度が 1 mg-N/L 以上で第一担体処理槽の追加曝気を ON、NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L 以上で第二担体処理槽の追加曝気を ON となるようにした。担体処理槽の水理学的滞留時間（HRT）は 180 分（90 分/1 槽）と 120 分（60 分/1 槽）の 2 条件とし、各条件で約 2 カ月の連続運転を行った。表-1 に各 HRT 条件の実験期間、二次処理水流量、曝気量の設定条件を示した。

担体処理による硝化運転時の医薬品の除去特性を明らかにするため、各 HRT 条件中に小型流量ポンプによる 24 時間連続採水を HRT120 分条件では 5 回（12/2~3、12/9~10、12/16~17、12/23~24、1/6~7）、HRT180 分条件では 7 回（2/3~4、2/11~12、2/17~18、2/24~25、3/2~3、3/9~10、3/17~18）行い、コンポジット試料の医薬品の分析を行った。分析対象とした医薬品は、PNEC が低く[2)5)]、下水処理水中に残存すると考えられる[3)4)5)]アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンとした。医薬品測定の前処理は、遠心分離（3500 rpm、5 分）のみとし、その上澄水を分析試料とした。分析法は、LC/MS（Waters 製 Xevo G2-XS）による MS^{e} モードでの同位体希釈法である。分析試料はメタノールで 1:1 に希釈したものを 30 μL 分析装置に注入した。医薬品の他に、一般水質分析項目として NH_4-N、NO_{2+3}-N、NO_3-N を自動流れ分析（ビーエルテック QuAAtro2-HR）で、DOC を全有機炭素計（島津製作所 TOC-5000）で、SS をガラス繊維ろ紙法で測定した。第一、第二担体槽内の担体付着物質量は、超音波抽出（200 W、10 分間）し付着物質の重量をガラス繊維ろ紙により週 1 回測定した。

3. 結果と考察

図-2 は HRT 180 分と 120 分条件の第一、第二担体槽の担体付着物質量である。第一と第二担体槽で付着物質量に顕著な差は見られず、各 HRT での処理期間中に大きな変動は見られなかった。また、HRT180 分と 120 分で付着物質量に顕著な差は見られなかった。

図-3 に HRT 180 分と 120 分の 24 時間採水で得られた二次処理水と担体処理水の NH_4-N、NO_3-N、NO_2-N 濃度を示した。図-4 は DOC、図-5 は担体処理水中 SS 濃度である。HRT180 分の二次処理水、担体処理水中

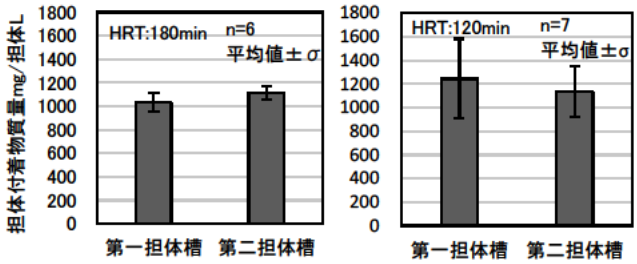


図-2　HRT:180 分と 120 分の第一、第二担体槽の付着物質量

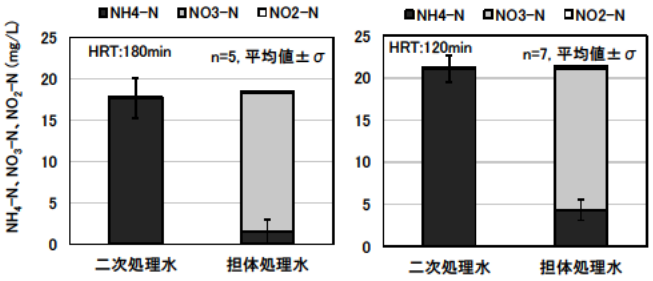


図-3　HRT:180 分と 120 分の二次処理水と担体処理水中の平均 NH_4-N 濃度(エラーバーは NH_4-N のみ)

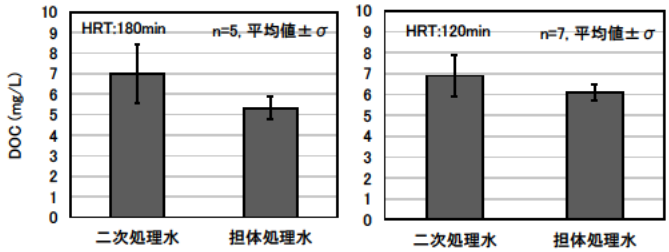


図-4　HRT:180 分と 120 分の二次処理水と担体処理水中の平均 DOC 濃度

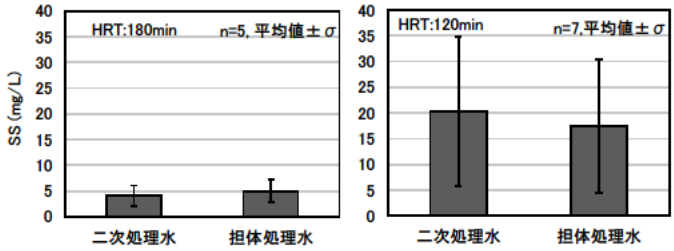
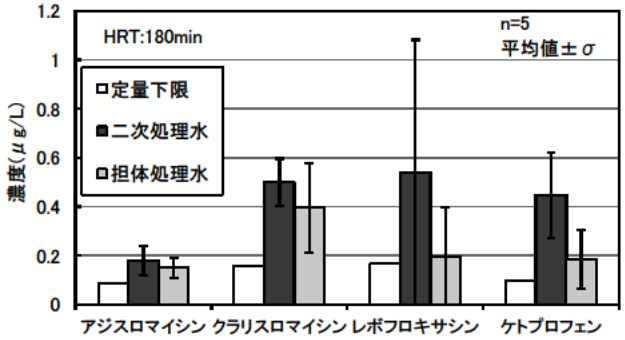


図-5　HRT:180 分と 120 分の二次処理水と担体処理水中の平均 SS 濃度

NH_4-N 濃度の平均値は 17.6、1.51 mg-N/L（低減率：91%）、120 分では 21.0、4.33 mg-N/L（低減率：79%）となった。HRT120 分の担体処理水中 NH_4-N 濃度は HRT180 分条件より高いものの低減率は 79%あり、HRT180、120 分とも担体処理による硝化運転を維持できていた。HRT180 分の二次処理水、担体処理水中の DOC 濃度の平均値は、6.98、5.32 mg/L（低減率：24%）、



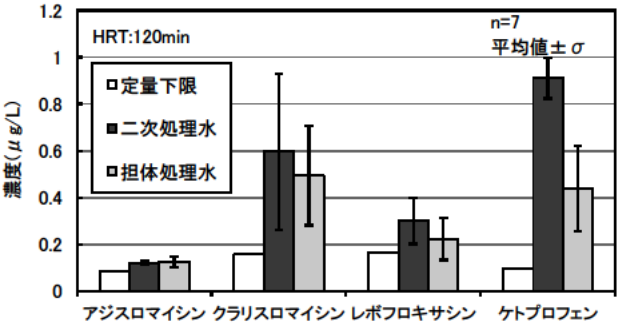


図-6　HRT:180 分（上図）と 120 分（下図）の二次処理水と担体処理水中の医薬品濃度（参考として検出下限を図示）

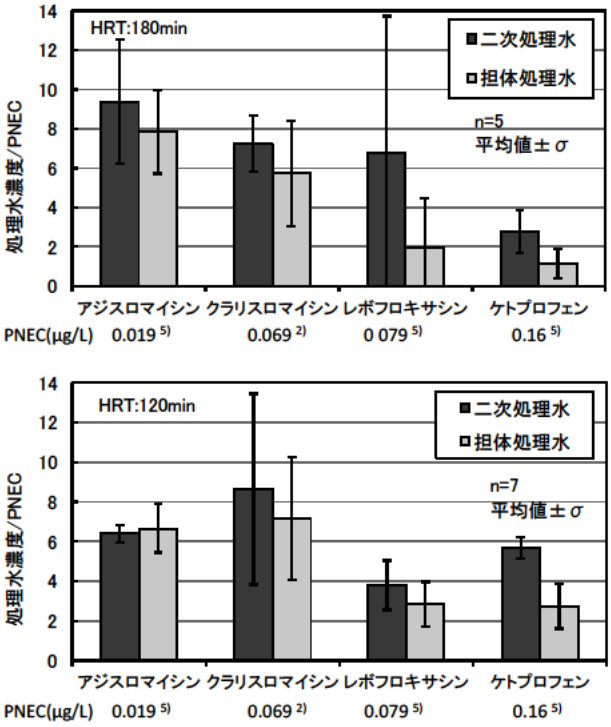


図-7　HRT:180 分（上図）と 120 分（下図）の二次処理と担体処理水中の医薬品濃度/PNEC 比

HRT120 分では 6.89、6.11 mg/L（低減率：11%）となった。担体処理による DOC の顕著な低減は確認されなかった。HRT120 分で二次処理水中の SS 濃度が高く

なっているが、HRT120 分の実験期間に活性汚泥実験装置の活性汚泥の沈降性が悪化したため、活性汚泥が二次処理水に流出したためである。

図-6 に HRT180 分と HRT120 分の二次処理水と担体処理水中の各医薬品の平均濃度を示す。図中には参考として、本分析条件での定量下限（検量線最低濃度 0.1 μg/L を 5 回測定した際の 10σ）を示した。

二次処理水中のアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン濃度は、定量下限を上回る、約 0.15、0.56、0.39、0.72 μg/L であった。本実験での医薬品濃度はこれまでの報告[5] よりも若干低いものの大きくは異なっていない。HRT180 分条件でのレボフロキサシン、HRT120 分条件でのクラ

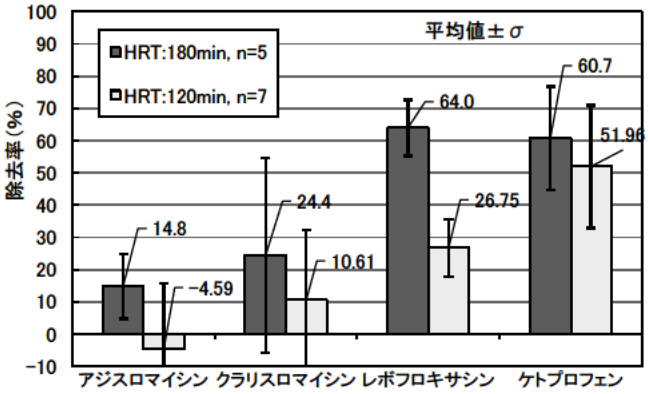


図-8　HRT:180 分と 120 分の二次処理水と担体処理水中の医薬品除去率

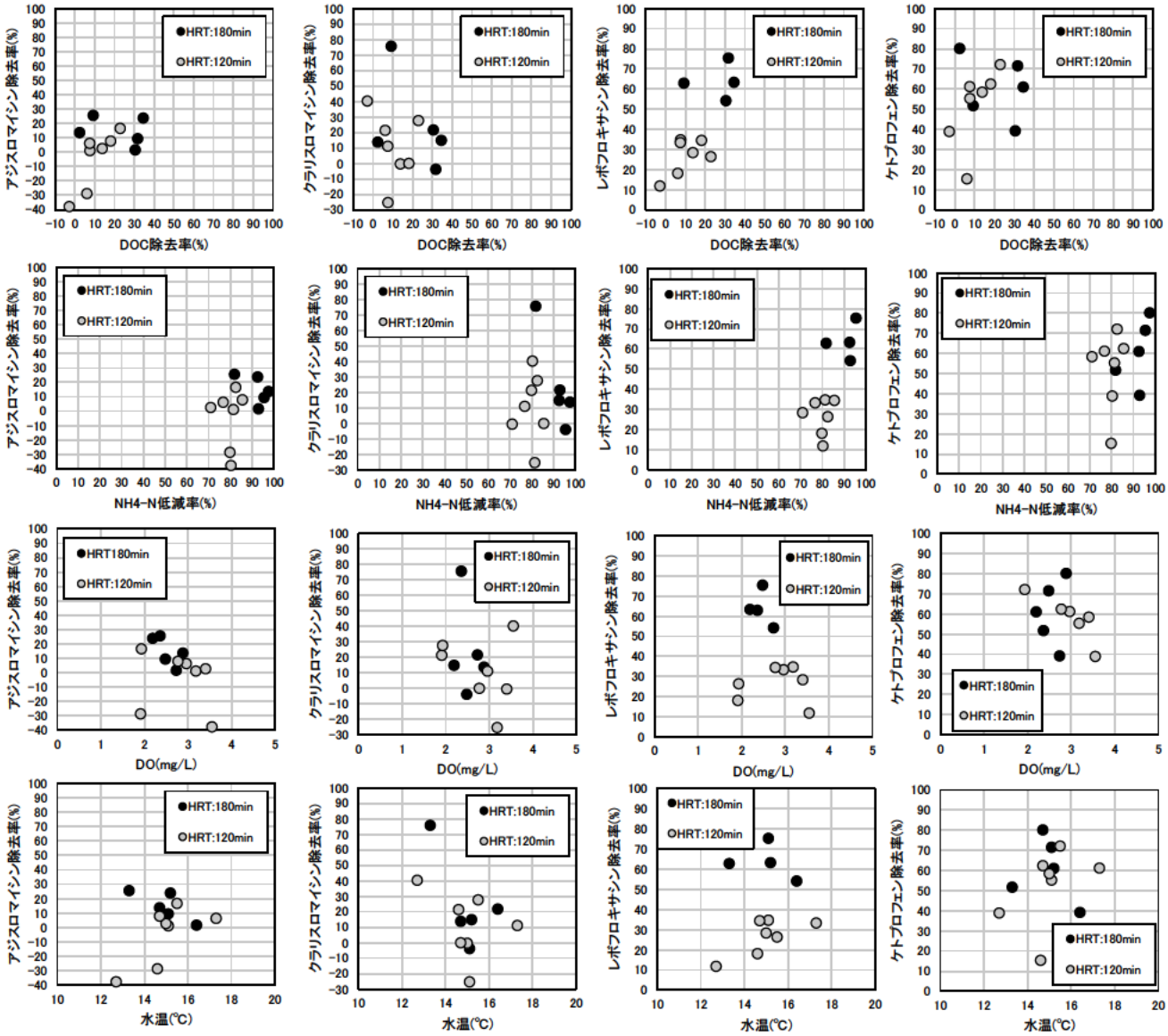


図-9　HRT:180 分と 120 分条件での DOC 除去率、NH_4-N 低減率、第二担体処理槽平均 DO、第二担体処理平均水温と各医薬品の除去率の関係

リスロマイシンの二次処理水中の濃度の変動が大きかったことがわかる。各医薬品の担体処理による除去率は異なったが、HRT180 分と 120 分で比較すると、HRT180 分でより濃度が低下する結果となった。

図-7 は二次処理水、担体処理水中医薬品濃度の実測値を PNEC で除したものである。図よりアジスロマイシン、クラリスロマイシンの二次処理水中の実測値/PNEC 比が高いことがわかる。HRT180 分で担体処理することにより、アジスロマイシン、クラリスロマイシンとも実測値/PENC 比の低下が見られた。これらの医薬品は、担体処理により PNEC 以下にすることは困難であったものの、実測値/PNEC 比は概ね 10 以下となった。

図-8 に HRT180 分、120 分条件でのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの除去率を示す。図中の各医薬品の除去率は、1 回のサンプリング毎に算出し、HRT180 分では 5 回、HRT120 分では 7 回の除去率を平均したものである。

HRT180 分で除去率が高く、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの平均除去率は、それぞれ 15%、24%、64%、61%となった。

活性汚泥処理過程でのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの除去率[5]は、16%以下、21~37%、51~61%、10%以下と報告されており、本実験での HRT180 分での担体処理は、活性汚泥処理と同等以上の除去率が得られることがわかった。実下水処理場 16 カ所の下水放流水中の医薬品の実態調査[5]によると、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンの平均濃度は、0.035、0.44、0.21、0.23 μg/L であった。放流水中の各医薬品濃度は PNEC を上回っており、生態影響低減のためには医薬品の追加処理は必要と考えられる。

図-9 に DOC 除去率と、NH_4-N 低減率、第二担体槽の DO、水温と各医薬品除去率に関係を示した。各水質項目と医薬品除去率の間に明確な関係性は見いだせなかった。医薬品の除去率の変動は大きく、除去率の向上や安定した除去率を得るためには、除去に寄与する因子の解明が重要となる。

4. まとめ

下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減効果が確認された微生物保持担体処理がアンモニア性窒素の低減と同時に医薬品の除去に効果があるかどうかを調査した。

本研究で得られた知見は以下のとおりである。

1) ポリプロピレン製中空円筒担体による流動型担体処理において、下水処理水に残存するアンモニア性窒素と医薬品の同時除去は可能であった。
2) HRT180 分での NH_4-N の低減率は 91%で、本条件でのアジスロマイシン、クラリスロマシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン平均除去率は、15%、24%、64%、61%となった。この値は活性汚泥処理と同等以上であった。

5. 今後の予定

下水処理水に残存するアンモニア性窒素と医薬品の担体処理による低減法については、担体の種類の違いや担体付着細菌叢解析も加えて、医薬品の除去に寄与する要因を解明するとともに、除去率の向上と安定した処理が行える処理法に改良していく予定である。

参考文献

1) 小川 他：下水処理工程における化学物質等の除去特性及び生物影響に係る検討業務、平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.83-84、2018
2) 環境省環境リスク評価室：化学物質の生態リスク初期評価（1 物質：追加実施分）の結果, クラリスロマイシン, 化学物質の環境リスク評価 第 16 巻, 平成 30 年 3 月 https://www.env.go.jp/chemi/report/risk30-01/1-2-3-01.pdf
3) 八十島 他：下水処理場における人用抗生物質の挙動、土木学会環境工学研究論文集、42、357-368、2005
4) 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,土木学会環境工学研究論文集、46、175-185、2009
5) 南山 他：生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究, 平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp.225-258, 土木研究所資料 第 4212 号

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

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

【要旨】
本研究は、ダム貯水池における簡易的な動植物プランクトンの検出方法の確立のため、並列型高速塩基配列決定装置（次世代シーケンサー）を用いた 16S rRNA 遺伝子および 18S rRNA 遺伝子配列に基づく動植物プランクトン等のモニタリング手法の開発に取り組んでいる。R1 年度、2 つのダム貯水池から採取した水試料について、次世代シーケンサーを用いた検出結果と光学顕微鏡を用いた検出結果を比較した。その結果、次世代シーケンサーを用いて得られた結果では、細菌 726 種、プランクトン 522 種が同定できたのに対し、光学顕微鏡による同定では、細菌 1 種、プランクトン 24 種が同定された。また、光学顕微鏡で同定された種のうち、ミドリムシ藻（ユーグレナ藻）である *Trachelomonas* sp.を除く全てにおいて、NGS で検出されたことを確認した。また、アオコや淡水赤潮の原因藻類について、光学顕微鏡観察では捉えきれない低濃度での検出が可能と考えられ、本技術の有用性が示唆された。
キーワード：ダム貯水池、プランクトン、細菌、次世代シーケンサー

1. はじめに

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

さらに、湖沼水質を把握する上で、藻類等の植物プランクトンのモニタリングは非常に重要である。藻類の中にはカビ臭物質や毒性物質を生産するものもあり、水の安全性確保の観点からも湖沼・ダム貯水池における藻類のモニタリングは非常に重要である。また、植物プランクトンの大量増殖が湖水の透明度や溶存酸素濃度の低下を引き起こすこともある [2]。従来、ダム貯水池の動植物プランクトンのモニタリングは、「河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】V. 動植物プランクトン調査」[3] に準じて行われ、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われている。しかしながら、同定には熟練した技術が必要で、対応できる技術者も限られており、形態により判断しているため、形態が非常に似通った植物プランクトンは判断が困難である場合がある。また、カビ臭物質産生プランクトンやアオコの原因となる植物プランクトンは、主にシアノバクテリア（藍藻）に属す細菌であり、一般的な植物プランクトンより小さく、光学顕微鏡での同定が困難である。

一方、近年、ゲノム解析技術の急速な発展により、大規模 DNA 塩基配列データの取得がより手軽に行えるようになった [4]。本研究では、ダム貯水池水質の維持管理に有効な手法の開発を目指し、次世代シーケンサー（NGS：New Generation Sequencer）を用いた DNA 塩基配列に基づく動植物プランクトン等のモニタリング手法の開発を目指している。H28~29 年度は、細菌が持つ 16S rRNA 遺伝子に着目し、検出方法の検討等を行った。H30 年度は、真核生物が持つ 18S RNA

遺伝子にも着目し、ダム貯水池や湖沼から採取した水試料を用い、月別の動植物プランクトン及び細菌を検出した結果について報告した。R1 年度は、ダム貯水池から採取した水試料について、NGS を用いて検出された動植物プランクトンおよび細菌の結果と熟練者が光学顕微鏡を用いて検出した結果を比較し、NGS の有用性を確認した。

2. 実験方法

2. 1 対象試料

本研究では、2 箇所のダム貯水池（A ダム及び B ダムと表記。A ダムは B ダムの約 50 km 上流に位置している。A ダムは清澄、B ダムは比較的富栄養化が進んでいる）を対象に、堤体付近の水深 50cm で採水（2L）した試料を NGS による塩基配列解読及び光学顕微鏡による検鏡試験に供した。採水は 2019 年 4 月から 11 月まで行った（A ダムは 5 月から採水開始）。

2. 2 NGS による塩基配列解読

採水後の試料について、ライブラリ調整までのプロセスは、以下の通りで、詳細な手順は使用したキットのマニュアルおよび過去の報告書の記載に従った[5]。

- 前処理（ろ過による濃縮）
- DNA 抽出、抽出 DNA の精製、DNA 濃度測定
- ライブラリ調整（Amplicon PCR、PCR 産物の精製、Index PCR、PCR 産物の精製）

DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3（600 サイクル、Illumina）を用い塩基配列を決定した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックおよび分類、統計処理は、QIIME2（version2020.2）を用い、参照データベースには、SILVA132_97 を用いた。

2. 3 光学顕微鏡による同定

2019 年 10 月に採水した試料 1L を中性ホルマリンで固定し、光学顕微鏡を用いた検鏡試験を行い種の同定を行った。分析方法は「平成 28 年度版河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】」に従った。実際の同定試験は、専門の業者へ委託して行った。

3. 結果と考察

3. 1 NGS で同定された細菌

NGS を用いて A ダム及び B ダムで採水した試料に含まれる細菌由来の DNA 配列を解析した。解析の結果、それぞれから約 10 万リード（取得データ量）分の塩基配列データを取得することができた。取得した

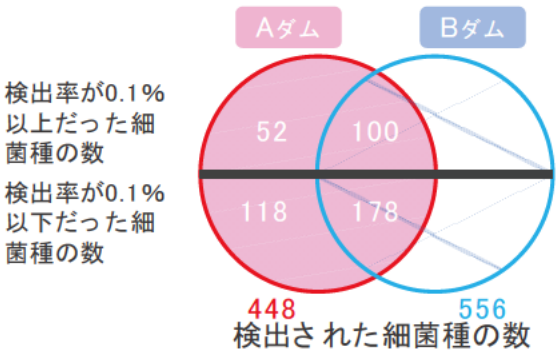


図 1 NGS で同定された各ダムにおける細菌種数

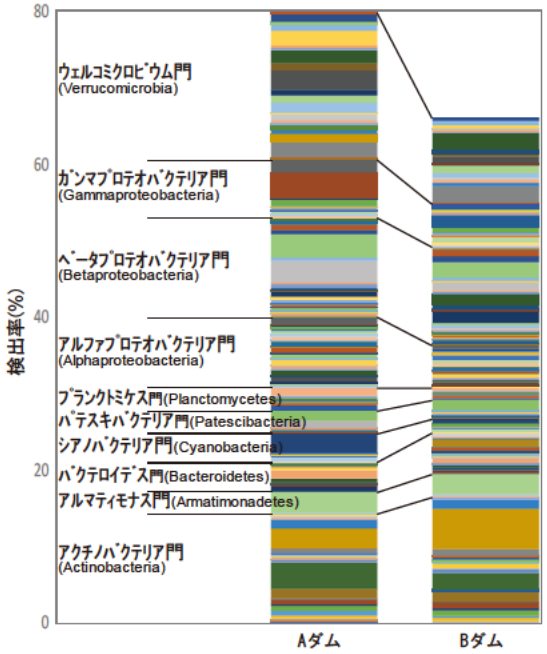


図 2 NGS で同定された各ダムにおける細菌構成（検出率 0.1%以上）

リードを約 20 万種の DNA 配列データが登録されているデータベース（細菌データ：約 17 万種、プランクトンデータ：約 3 万種）と照合し、それぞれの種を同定した。同定の結果、1 リード以上検出された種は A ダムで 448 種、B ダムで 556 種であり、B ダムの方が細菌種の多様性が高かった（図 1）。また、A ダムと B ダムから共通して検出された種は 278 種であった。NGS を使うことで、検出率（検出リード数/全取得リード数）が極めて低い種（0.001%程度）でも検出可能であることが示された。検出率が 0.1%以上だった種は、A ダムで 152 種、B ダムで 154 種、共通して検出された種は 100 種であった（図 1）。

図 2 に各ダムにおいて検出率が 0.1%以上だった細

菌の構成を示す。図の積み上げ棒グラフで色分けされた領域は、検出された種を示している。門レベルの比較において、各ダム貯水池間で検出率に大きな差はなかったが、ウェルコミクロビウム門は、A ダムでは検出率が約 20%を占めたのに対して、B ダムでは検出率が約 10%だった。ウェルコミクロビウムは未分離培養株が多く生理生態が不明な種も多いが、メタン酸化細菌が含まれることが知られている[6]。A ダムからは、同様にメタン酸化細菌として知られるガンマプロテオバクテリア綱メチロバクター属(*Methylobacter* sp.)が比較的多く検出されたことからも、メタン酸化細菌の生育に適した環境になっていることが示唆された[7]。また、シアノバクテリア門からはアオコやカビ臭の原因となる種は検出されず、シネココッカスに近縁な種（*Synechococcus* sp.）が検出された。

3．2　NGS で検出されたプランクトン

細菌と同様、プランクトン種について、試料に含まれるプランクトン由来の DNA 配列を解析した。解析の結果、それぞれから約 30 万リードを取得することができた。同定の結果、1 リード以上検出された種は A ダムで 385 種、B ダムで 365 種とほぼ同数だったが、検出率が 0.1%以上だった種を比較した場合、A ダムの方が若干多い結果となった（A ダム：226 種、B ダム：193 種）（図 3）。図 4 に各ダムにおいて検出率が 0.1%以上だったプランクトン種の構成を示す。検出率が 0.1%以上だった種を合計すると、A ダムでは全体の約 95%、B ダムでは約 70%に相当した。細菌の結果同様、B ダムでは検出率が 0.1%に満たない種が占める割合が A ダムより大きかった。各構成に関して、A ダムからは系統的に門の異なるプランクトンが比較的均衡して検出されていたが、B ダムからは珪藻の一種であるニセコアミケイソウ（*Thalassiosira* sp.）が全体の約 16%の割合で検出された（図 4 の☆印）。

3．3　光学顕微鏡による同定結果と NGS との比較

A ダム及び B ダムにおける光学顕微鏡による同定結果を表 1 に示す。光学顕微鏡による同定では、各ダムから 16 種ずつ、計 25 種の細菌・プランクトン（細菌 1 種、プランクトン 24 種）が同定された。それらの NGS での検出状況もあわせて表 1 に示す。NGS では、細菌を 726 種、プランクトンを 522 種同定できたことから、光学顕微鏡で同定されなかった多くの種が、NGS で検出されたことになる。今回、光学顕微鏡で同定された 25 種のうち、16 種については、NGS で同種が検出された。また、7 種については、解析に用いた

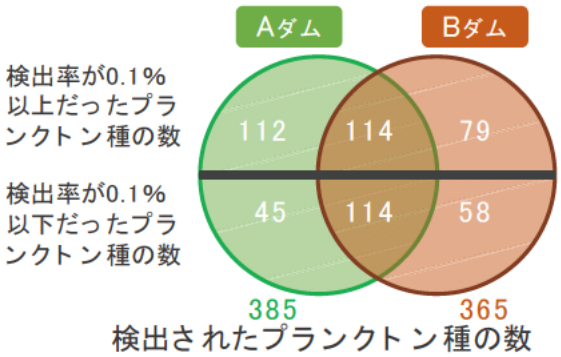


図3　NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン種数

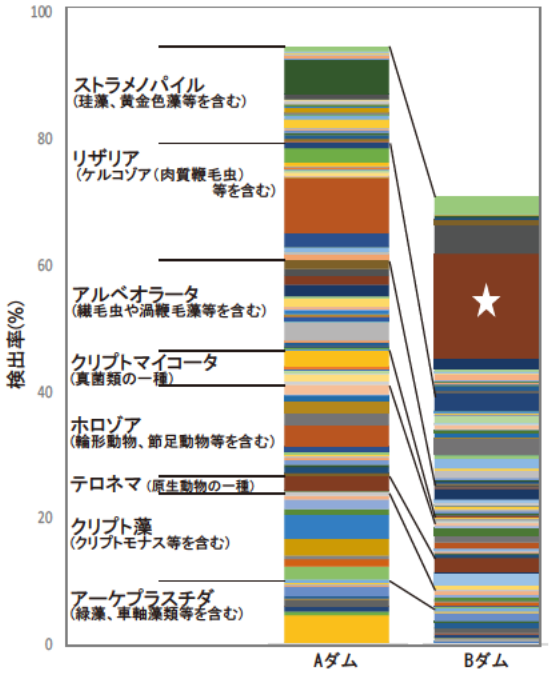


図4　NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン構成(検出率 0.1%以上)

データベース上に登録のない種であったため、同種は検出されなかったが、その近縁種が検出されていたことから、データベースを更新することにより検出されるものと考えられる。珪藻の一種である *Stephanodiscus* sp.に関しては、光学顕微鏡では非常に多く検出されたのに対して、NGS ではわずかしか検出されなかった。一方、NGS では、この珪藻と近縁な *Thalassiosira* sp. が多数検出されていたため、*Thalassiosira* sp.が光学顕微鏡では *Stephanodiscus* sp.と誤同定されていた可能性が考えられる。ミドリムシ藻（ユーグレナ藻）である *Trachelomonas* sp.に関

しては、光学顕微鏡ではある程度観察されたのに対して、NGS では全く検出されなかった。この種はデータベース上にも登録されており、近縁種も検出されていなかったことから、NGS の前処理の段階で、DNA が抽出されなかった、PCR で DNA が増幅されなかった等の問題が生じていた可能性が考えられることから、今後、分離株を入手し試験をする等、詳細な検討を行う予定である。

3．4　NGS による月別の検出結果の比較

各ダムにおいて NGS により検出された月毎のプランクトンおよび細菌の種類（門レベル）と検出率を表 2 に示す。なお、DNA 解析はプランクトンと細菌で別々に行われるため、それぞれの検出率の合計を 100%としている。これらの結果から、肉質鞭毛虫であるケルコゾアや、珪藻や黄金色藻を含むストラメノパイルが 2 つのダムにおいて優占しており比較的どの月においても多く検出されていた。また、緑藻類もどの月においても比較的多く検出されていた。真菌類は採水期間において検出率の変動が大きく、また、A ダムでは 7-8 月で多く検出されているのに対し、B ダムでは 9 月で多く検出されていた。渦鞭毛藻も同様に採水期間において変動が大きく、A ダムでは 5 月、B ダムでは 7 月に多く検出されていた。細菌においては、アクチノバクテリア門、バクテロイデス門、ガンマプロテオバクテリア綱、ウェルコミクロビウム門が優占しており、どの月においても比較的多く検出されていた。シアノバクテリア門は、A ダムにおいて 9 月と 10 月、B ダムにおいて 9 月に比較的多く検出され、それ以外の月ではあまり検出されなかった。また、検出されたシアノバクテリアのほとんどが *Synechococcus* sp.であった。10 月の試料について、光学顕微鏡で観察した結果（表 1）では、シアノバクテリア門である *Synechococcus* sp.は A ダムからは検出されているが、B ダムからは未検出であった。一方、NGS を用いた B ダム 10 月の結果では、検出された全 73,422 リードのうち 639 リードの *Synechococcus* sp.が検出（検出率 0.87%）された。したがって、NGS では、光学顕微鏡では捉えきれない低濃度の生物の検出が可能であることが示唆された。B ダムは、過去に、アオコ・カビ臭の発生が報告されたことのあるダムである

表1　光学顕微鏡により同定された種とそれらのNGSによる検出状況の比較

門・綱	種名	Aダム		Bダム		備考
		顕微鏡	NGS	顕微鏡	NGS	
シアノバクテリア門	*Synechococcus* sp.	○	○		○	
黄金色藻綱	*Chrysococcus* sp.		○	○	○	
珪藻綱	*Discostella stelligera*	○	○		○	
珪藻綱	*Skeletonema* sp.			○	○	
珪藻綱	*Stephanodiscus* sp.		△	○	△	△：検出された*Stephanodiscus* sp.はわずかだが、近縁種である*Thalassiosira* sp.が多数検出
珪藻綱	*Aulacoseira ambigua*	○	○	○	○	
珪藻綱	*Aulacoseira granulata*			○	○	
珪藻綱	*Aulacoseira pusilla*			○	△	△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
珪藻綱	*Melosira varians*			○	○	
珪藻綱	*Acanthoceras zachariasii*	○	○			
珪藻綱	*Asterionella formosa*	○	△	○	△	△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
珪藻綱	*Fragilaria* sp. (cf. *asterionelloides*)	○	○		○	
珪藻綱	*Fragilaria* sp. (single cell)	○				
ミドリムシ藻綱	*Trachelomonas* sp.			○	未検出	未検出：NGSでは検出されなかった
緑藻綱	*Yamagishiella unicocca*			○	△	△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
緑藻綱	*Spondylosium planum*	○	△			△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
肉質鞭毛虫門	*Trinema* sp.	○	○			
繊毛虫門	*Coleps* sp.	○	○		△	△：わずかに検出
繊毛虫門	*Tintinnopsis* sp.		△	○	○	△：わずかに検出
輪形動物門	*Keratella cochlearis* f. *macracantha*	○	△	○	△	△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
輪形動物門	*Polyarthra* sp. (cf. *remata*)	○	△	○	△	△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
輪形動物門	*Synchaeta* sp.	○	○			
輪形動物門	*Filinia longiseta*	○	○			
節足動物門	*Cyclopoida* sp.	○	○	○	○	
節足動物門	*Copepoda* sp.	○	○	○	○	
節足動物門	*Bosmina tanakai*			○	△	△：同種はデータベースに存在していないが近縁種が検出

表2　NGSによって検出された各月のプランクトンおよび細菌の検出割合(%)

			Aダム							Bダム							
			5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月
プランクトン(真核生物)	アメーバ動物		0.4	0.8	0.1	3.2	0.6	0.2	1.7	4.3	14.0	1.7	0.5	8.7	1.1	2.1	0.8
	アーケプラスチダ	車軸藻類	0.0	0.0	0.0	0.1	6.3	6.8	17.7	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1
		緑藻類	7.0	17.7	5.1	7.5	12.3	5.7	12.0	2.3	10.3	8.6	8.3	9.2	12.3	7.2	4.9
		その他	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	クリプト藻	クリプトモナス	0.0	0.3	1.1	4.2	1.1	4.9	0.0	0.0	0.0	0.7	6.6	5.3	2.8	0.2	0.0
		その他	4.6	4.8	13.0	4.6	3.2	3.3	5.1	1.8	4.1	4.2	3.3	2.1	2.2	1.8	3.0
	オピスタコンタ	ホロゾア	0.6	8.9	8.0	3.4	14.7	10.9	7.8	0.8	1.2	6.2	5.9	1.3	8.1	5.6	4.7
		真菌類	1.1	1.1	20.3	19.2	3.1	3.2	2.5	12.6	11.4	3.8	13.2	4.3	24.5	1.7	5.0
		その他	0.3	0.9	0.8	0.8	0.1	4.2	0.3	0.5	0.3	1.1	4.0	1.0	0.9	0.2	0.3
	アルベオラータ	繊毛虫	6.6	4.2	3.8	3.8	12.3	4.0	5.4	16.8	8.0	7.5	12.7	5.4	5.2	3.4	8.6
		渦鞭毛藻	14.7	8.5	8.5	0.9	0.2	7.0	5.7	0.1	2.7	1.0	10.3	3.0	1.5	4.7	4.1
		その他	0.0	0.6	0.6	0.4	6.3	2.0	0.9	1.3	0.2	0.7	0.1	1.3	1.5	1.0	0.8
	リザリア	ケルコゾア	50.4	23.9	15.6	17.4	13.3	25.3	16.4	45.3	31.9	25.0	11.7	23.5	18.4	16.1	14.8
	ストラメノパイル		12.8	21.3	13.2	25.4	24.1	11.0	18.8	8.8	11.9	32.6	16.0	21.8	15.7	45.5	46.0
	その他		1.4	7.0	10.0	9.2	2.2	11.5	5.6	5.3	4.3	6.7	7.4	13.0	5.7	10.2	6.8
細菌・古細菌(原核生物)	古細菌		0.1	0.1	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1
	アクチノバクテリア門		12.3	20.0	9.6	13.8	19.3	14.0	12.7	10.7	12.8	10.3	10.1	12.1	8.6	19.5	9.9
	バクテロイデス門		13.2	19.7	15.1	9.1	11.5	16.9	5.8	15.6	26.0	24.6	22.4	13.3	17.4	29.5	12.9
	シアノバクテリア門		0.0	0.4	2.4	0.9	7.9	8.5	4.2	0.0	0.1	0.2	0.3	2.2	5.4	0.9	0.7
	パテスキバクテリア門		10.0	3.1	0.9	2.7	0.7	3.5	5.6	3.7	4.3	2.6	0.2	2.3	0.5	1.7	2.8
	プランクトミケス門		8.4	6.5	28.9	12.8	9.7	3.8	5.5	4.1	4.2	6.6	13.5	12.2	10.7	3.1	3.3
	アルファプロテオバクテリア綱		9.5	10.1	7.4	5.9	9.1	8.9	9.9	11.6	9.0	9.2	9.9	9.7	11.3	7.2	10.4
	デルタプロテオバクテリア綱		1.2	2.5	1.0	3.6	2.1	4.1	3.1	2.0	1.9	3.6	1.4	2.8	2.8	1.1	4.2
	ガンマプロテオバクテリア綱		25.4	19.5	12.1	21.5	15.3	11.5	27.2	31.6	24.1	21.1	18.1	24.0	18.6	18.6	28.7
	ウェルコミクロビウム門		12.1	16.6	21.5	16.3	21.6	21.5	18.3	9.1	14.8	17.7	20.3	13.7	14.9	13.0	16.0
	その他		7.7	1.5	1.0	11.1	2.7	7.3	7.7	11.5	2.9	4.1	3.9	7.7	9.8	5.3	10.9

が、調査年度においては、アオコやカビ臭は発生していない。また、淡水赤潮の原因となる *Peridinium* sp.が属する渦鞭毛藻もAダム5月、Bダム7月で比較的多く検出されたが、10月の光学顕微鏡観察では検出されておらず淡水赤潮が発生したとの報告はなかった。今後は、これらの水質変化現象の発生が想定されるダム貯水池で原因種のモニタリングを行う予定である。

各検出率からUniFrac distanceを計算し、検出されたリード数および系統学的距離を考慮し主座標分析を行った（図5）。各サンプルの系統関係、検出率を考慮した類似度はプロット間の距離で表され、類似度が高いサンプルは近傍にプロットされる。この結果、Aダムにおいては、5月から8月にかけて種構成が大きく変化していることがわかる。また、Bダムも同様に、4月から8月にかけて、各月の種構成の変動が大きかった。また、8月以降では種構成の変動は小さくなり、特に、Aダムは、Bダムよりも8月以降において、各サンプル間の類似度が高く、種構成に大きな変化がなかったと考えられる。

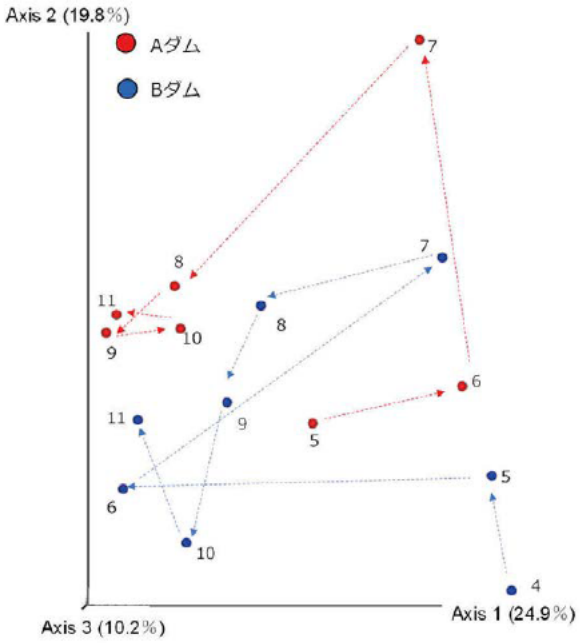


図5　各サンプルから検出された種構成の類似度比較（プロット横の数字はサンプリング月を示す）

4. まとめ

本研究では、ダム貯水池の水試料に含まれる細菌お

よび動植物プランクトンについて、NGS および光学顕微鏡による同定結果を比較した。その結果、光学顕微鏡で同定されなかった多くの種が、NGS で検出されたことを確認した。また、光学顕微鏡で同定された種は NGS でほぼ検出可能であった。さらに、アオコや淡水赤潮の原因藻類について、光学顕微鏡観察では捉えきれない低濃度での検出が可能と考えられ有用性が示唆された。今後、本技術が確立すれば、ダム貯水池における微生物由来の水質変化現象（アオコ、カビ臭、淡水赤潮等）に対して、簡便で迅速、低コストで発生原因や発生箇所を特定することができ、効率的な水質の維持管理が期待される。

今後、他のダム貯水池においても確認を進めるとともに、定量性についても検討を進める必要がある。また、水質改善のための設備が導入されたダム貯水池において NGS を活用することで、水質改善の効果詳細に把握する予定である。

参考文献

1) 国土交通省：ダム貯水池水質改善の手引き、pp. 1-105、2018 年 3 月
2) 大杉奉功、谷本茂、天野邦彦：河川水辺の国勢調査の改善に関する研究（プランクトン調査マニュアルの改訂）、一般財団法人 水源地環境センター 平成 26 年度研究論文（所報）、pp. 40-46、2014
3) 国土交通省：河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル【ダム湖版】 V 動植物プランクトン調査編、pp. 1-56、2016 年 1 月
4) 野田尚宏、関口勇地：次世代 DNA シーケンシング技術による環境中の複合微生物相解析の現状と今後の展望、水環境学会誌、35（9）、pp. 290-297、2012
5) 小川文章、對馬育夫：底層環境に着目した停滞性水域の水環境管理技術に関する研究（簡易的な藻類定性定量方法の開発）、平成 30 年度 研究開発プログラム報告書（13. 地域の水利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発）、国立研究開発法人土木研究所、pp. 17-21、2019 https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-program/2018/pdf/pro-13.pdf
6) 玉木秀幸：培養アプローチで切り拓く未知微生物の新機能、環境バイオテクノロジー学会誌、14（2）、pp. 87-98、2015
7) O. Nercessian, E. Noyes, M. G. Kalyuzhnaya, M. E. Lidstrom, L. Chistoserdova: Bacterial populations active in metabolism of C1 compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake, Applied and Environmental Microbiology, 71(11) pp. 6885-6899, 2005

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

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

【要旨】
本研究では、アオコ発生の主要な原因藻類と考えられる *Microcystis aeruginosa* を用いて Fe 濃度が藍藻類の生長におよぼす影響を検討した。Fe 濃度の違いによる *M. aeruginosa* の生長の変化を調べるため、Fe 濃度を 6 段階に調整した培地を用いて藻類生長試験を行った。試験の結果、Fe 濃度が 20μg/L 以下と 50 μg/L 以上で生長指数の値が明確に変化した。また、既往のダム貯水池における水質調査事例では溶存態の Fe 濃度は 0-60 μg/L で変動することを示しており、Fe はダム貯水池などの水環境において *M. aeruginosa* の生長に対する制限要因となる可能性が示唆された。
キーワード：湖沼・ダム貯水池、アオコ、*Microcystis aeruginosa*、微量金属、藻類生長試験

1. はじめに

日本の多くのダム貯水池や湖沼において富栄養化が確認され、アオコや淡水赤潮などの植物プランクトンの異常増殖が全国の水域で発生している [1)]。植物プランクトンの生長は窒素やリンなどの栄養塩によって制限を受けると考えられているが、近年の研究では、窒素・リン以外に鉄（Fe）などの微量金属も生長に必須な物質であることが示唆されている [2)]。昨年度の研究では、MA 培地の濃度に調整した 5 種の金属（Fe、マンガン（Mn）、亜鉛（Zn）、コバルト（Co）、モリブデン（Mo））が *Microcystis aeruginosa* の生長に与える影響を調べ、Fe、Mn、Co は *M. aeruginosa* の生長を促進させる要因であることを明らかにした [3)]。

令和元年度は、微量金属の中では藍藻類の生長に最も重要であると考えられる Fe に注目し、Fe 濃度の違いによる *M. aeruginosa* の生長速度の変化を調べた。

2. 方法

2. 1 鉄濃度を調整した培地の作成方法

MilliQ 水に MA 培地（表-1）の栄養塩類成分を添加したものを No Metal 培地とした。No metal 培地に生長に影響を与える金属成分である $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ と $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ を 5.0 mg/L ずつ添加し、それらに $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ を 6 段階の Fe 濃度（0、10、20、50、100、200 μg/L）になるように添加した。これら 6 種類の培地と No Metal 培地及び金属 5 種を含む MA 培地を生長試験に供した。

2. 2 藻類生長試験

生長試験に供した藻類株は、国立環境研究所 NIES Collection より分譲された *M. aeruginosa* (NIES-87 株)を

表-1　MA 培地成分表

MA 培地成分一覧（mg/L）			
栄養塩類成分（No Metal 培地）		金属成分	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	50	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.5
KNO_3	100	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5.0
$NaNO_3$	50	$ZnCl_2$	0.5
Na_2SO_4	40	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5.0
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	50	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.8
β-Na_2 glycerophospher・$5H_2O$	100		
Bicine	500		
H_3BO_3	20		
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5.0		

使用した。継代培養にはMA培地を用いて、温度25℃、明暗周期 12 時間、フラスコ振とう培養の条件で株の維持を行った。

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

3. 結果と考察

藻類生長試験の結果を図-1 に示す。試験の結果、0－20 μg/L の範囲では、生長指数が 0.1 以下であり、*M.aeruginosa* の生長がほとんど見られなかった。一方、50 μg/L を超える濃度では、生長指数は 1.0 を超える値を示し、Control（MA 培地）と同等程度の生長が確認された。また、昨年度と同様に、Fe、Mn、Co が存在する培地において、*M.aeruginosa* が十分に生長していたことから、Fe、Mn、Co の存在が生長にとって重要であることが再確認された。

既往研究における培養実験では、*M. aeruginosa* は Growth rate が 0.5 day^{-1} を超える期間において、溶存態 Fe が約 40 μg/L から 5.0 μg/L 以下にまで低下することが確認されている[4]。本研究においても、Fe 濃度が 0－20 μg/L の培地では 7 日間の試験前半に鉄制限を受け、十分な生長を示さなかったと考えられた。

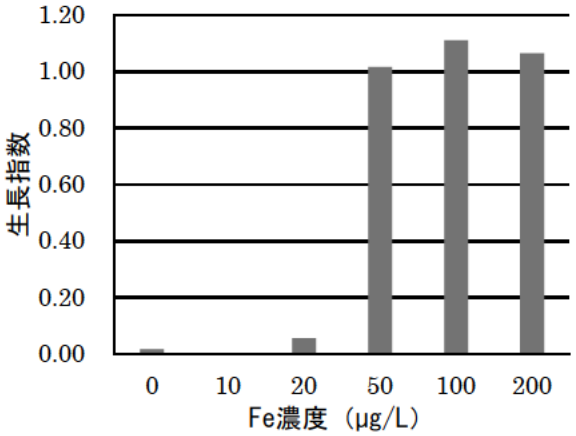


図-1　Fe 濃度と藻類生長指数の関係

また、既往研究において川内ダムでは溶存態 Fe 濃度が 0－60 μg/L の濃度で変動することが報告されている[5]。これらのダム貯水池における水質調査事例と本実験の結果から、Fe 濃度はダム貯水池などの水環境で藍藻類の生長を左右する要因となる可能性が示された。

4. まとめ

マイクロプレートを用いた藻類生長試験を行い、Fe 濃度による *M .aeruginosa* の生長への影響の変化を調べた。その結果、Fe が 20μg/L 以下と 50 μg/L 以上の場合で *M. aeruginosa* の生長に明確な違いが表れた。既往のダム貯水池における溶存態 Fe 濃度を考えると、Fe はダム貯水池などの水環境において藍藻類の生長を左右する要因となる可能性が示唆された。また、昨年度の結果と同様に Fe、Mn、Co を加えた培地で MA 培地と同程度の生長を示すことが確認された。

今後は、Fe の濃度に応じて増殖可能な藻類の細胞数及び藻類増殖時の Fe 使用量の変化を測定する実験や、Mn と Co についても培地中の濃度を変化させた藻類生長試験を行う予定である。また、ダム貯水池や湖沼などの現地の水環境において、金属濃度の測定を行い、水環境中での微量金属濃度が藻類の生長に与える影響を調査することも検討している。

参考文献

1) 藤本尚志、福島武彦、稲森悠平、須藤隆一：全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子との関係、水環境学会誌、18 巻 11 号、pp.901-908、1995

2) 中島進、八木正一：Oscilla teunis の増殖と 2-メチル イソボルネオ―ルの産生に及ぼす微量金属の影響、日本水処理生物学会誌、Vol.26、No.2、pp.44-55、1995

3) 小川文章、對馬育夫、村田里美、服部啓太：底層環境に着目した停滞性水域の水環境管理技術に関する研究（藻類増殖に関与する 水質項目の影響評価）、平成 30 年度土木研究所研究開発プログラム報告書（13 地域の水利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発）、pp.22-25、2019

4) Nagai Takashi, Akio Imai, Kazuo Matsushige, Takehiko Fukushima: Growth characteristics and growth modeling of Microcystis aeruginosa and

Planktothrix agardhii under iron limitation, Limnology, 8, pp.261-270, 2007
5) 箱石憲昭、櫻井寿之：ダム貯水池における物質移動に関する調査①、平成 18 年度 土木研究所成果報告書、8p.、2007

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（ダム貯水池・湖沼の底層貧酸素化要因の整理と気候変動影響の評価）

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 28～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質チーム）
研究担当者：山下洋正、對馬育夫、服部啓太
担当チーム：水工研究グループ（水理チーム）
研究担当者：石神孝之、宮川仁、中西哲

【要旨】
本研究では、気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える影響についての将来的な予測に取り組んでいる。今年度は、全国のダム貯水池を対象として底層溶存酸素の変化要因について整理を行い、過去の水質調査データから底層溶存酸素、気温、流入量の関係性について重回帰分析による統計モデルの構築を試みた。解析の結果、一部のダムでは重回帰分析による R^2 が 0.5 を超え、気温の t 値の絶対値は 10 以上であり、その回帰係数は-0.20 ~ -0.41 の範囲であった。これらの気温による影響が大きいダムでは、将来の気温が上昇した気候では底層貧酸素化が発生する期間が長期化することが考えられ、底泥からの栄養塩溶出による水質影響も懸念された。
キーワード：地球温暖化、ダム貯水池、底層溶存酸素、気温、流入量

1. はじめに

地球温暖化が水環境に与える影響は徐々に顕在化しており、現在における全ての温室効果ガス排出とその他の強制力因子は、今後数十年にわたる気候変動の速度及び程度に影響を及ぼすと報告されている [1]。水環境に対する影響は気温上昇に伴う水温上昇や降雨形態の変化による流量や栄養塩類の流出負荷量の変化が考えられる。

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

このような結果から、多くのダム貯水池で底層 DO の低下が予測され、将来気候における水質をシミュレーションモデルなどを用いて試算することが求められる。しかし、水質シミュレーションは技術的なハードルも大きく、ダム貯水池ごとに独自で実施することは難しい。気候変動による影響を評価する方法として限定的な評価方法ではあるが、既存調査に基づく統計モデルから影響を評価することが可能である。過去の水質調査データからクロロフィル a や DO などの各種の水質指標に相関関係を見出すことにより、富栄養化や底層貧酸素化の傾向を把握可能な場合が存在する。特に底層 DO の低下は水温躍層の形成が原因となることが多いため、躍層形成の要因となる気温や水象データからある程度の予測が可能になると考えられる [2]。

そこで本年度の研究では、国土交通省及び水資源機構が管理する複数のダムを対象として、既存の定期調査データの底層 DO とダムの流入量及び気温データとの関連性について重回帰分析を用いて整理を行った。

2. 方法

2. 1　解析対象としたダムと気象データ

本解析では、国土交通省及び水資源機構が管理する 125 ダムの内、以下の条件を満たす 29 のダムを対象とした。

・底層の DO の値が過去 20 年間の調査で 2.0 mg/L 以下を記録したことがあり、なおかつ深層曝気施設や高濃度酸素供給装置などの底層溶存酸素改善対策を実

施していない。

・水文水質データベースからダムの流入量が取得可能である。

気温データについてはダム近隣の気象庁観測所データを使用した。対象としたダムと解析の対象期間、気温データを使用した気象庁観測所の一覧を表-1 に示す。

各ダムの解析対象期間は水文水質データベースから底層 DO と流入量の両データが入手可能な期間を対象とした。

2. 2 解析方法

本研究では、目的変数に対する説明変数の影響力が定量的に示される重回帰分析を用いて底層 DO と気温、流入量の関係性を整理した。重回帰分析においては各調査における底層 DO を目的変数に、気温と流入量を説明変数に設定した。気温については底層 DO の調査時間から 24 時間前までの平均値を気温データとした。流入量については、底層 DO の調査時間から 24 時間前平均、48 時間前平均、72 時間前平均の三つを流入量データとし、3 通りのデータを代入し解析を行った。重回帰分析は EXCEL を用いて行った。また重回帰分析にて高い相関が得られたダムについては底層 DO 濃度と底層 TN 濃度、底層 TP 濃度を比較し、溶出傾向について整理した。

また、各ダムにおける底層 DO の季節別の変動傾向を整理したところ、季節的な周期性が強いダムが多く存在したため、Lomb-Scargle 法によるフーリエ解析を実施し、パワースペクトルを算出した。Lomb-

表-1 対象としたダムと対応する気象観測所

No	ダム名	所在地	解析対象の期間	観測数	気温観測所	備考
1	金山ダム	北海道	2002-2016	124	幾寅	
2	豊平峡ダム	北海道	2002-2015	123	札幌	
3	鹿ノ子ダム	北海道	2002-2016	123	留辺蘂	
4	滝里ダム	北海道	2002-2016	290	富良野	
5	田瀬ダム	岩手県	2002-2015	160	遠野	
6	御所ダム	岩手県	2002-2016	171	雫石	
7	白川ダム	山形県	2006-2015	87	高峰	
8	浅瀬石川ダム	青森県	2002-2015	110	黒石	
9	相俣ダム	群馬県	2002-2017	180	沼田	
10	薗原ダム	群馬県	2002-2017	154	沼田	
11	五十里ダム	栃木県	2002-2015	159	五十里	
12	二瀬ダム	埼玉県	2002-2015	162	秩父	
13	宮ヶ瀬ダム	神奈川県	2003-2017	164	八王子	
14	下久保ダム	群馬県	2002-2015	162	神流	
15	草木ダム	群馬県	2002-2016	162	桐生	
16	新豊根ダム	愛知県	2002-2016	172	佐久間	
17	青蓮寺ダム	三重県	2002-2015	161	大宇陀	
18	土師ダム	広島県	2002-2010	94	三入	
19	温井ダム	広島県	2002-2015	162	加計	
20	柳瀬ダム	愛媛県	2002-2016	150	四国中央	
21	石手川ダム	愛媛県	2002-2017	177	松山	
22	大渡ダム	高知県	2002-2015	161	久万	
23	中筋川ダム	高知県	2005-2017	114	宿毛	
24	新宮ダム	愛媛県	2002-2015	162	四国中央	
25	鶴田ダム	鹿児島県	2007-2016	115	大口	
26	下筌ダム	熊本県	2002-2017	181	日田	降水量：2004/11/03 以前は「釈迦岳」
27	厳木ダム	佐賀県	2002-2017	90	唐津	気温 ：2010/2/24 以前は「枝去木」、降水量：2010/2/24 以前は「和多田」
28	福地ダム	沖縄県	2008-2015	92	名護	
29	新川ダム	沖縄県	2008-2015	72	名護	

Scargle 法によるフーリエ解析は Python 言語の astropy.timeseries ライブラリを用いて行った[3]。

3. 解析の結果

3. 1 重回帰分析による結果

重回帰分析による相関係数 R^2 の一覧を図-1 に示す。すべてのダムに対して気温と 24 h 流入量、48 h 流入量、72 h 流入量の三つの重回帰分析を行ったところ、3 つの分析に対する R^2 の差はほとんどなく、1−3 日程度の流入量の変化は底層 DO に大きく影響しないことが示唆された。

また、R^2>0.5 を示した 7 つのダムにおける気温—24 h 流入量の重回帰分析に対する回帰係数及び t 値を図-2 に示す。気温に対する回帰係数は-0.20～−0.41 の範囲であり、t 値の絶対値についてもすべて 10 以上であった。流入量に対する回帰係数は新豊根ダムを除いた 6 つで 0.05～0.25 の範囲であり、t 値についてもすべて 2 以上であった。新豊根ダムにおいて流入量は回帰係数が負の値を示し、また t 値の絶対値についても 2 以下であったため、流入量の影響力は小さかった。

気温と流入量の説明変数としての影響を比較すると t 値の絶対値から気温が流入量より影響力が大きいことが示唆された。特に、新豊根ダムにおいては流入量が底層 DO に対する影響力が小さく、気温が底層貧酸素化に対する主たる説明変数であることが明らかになった。これらの結果より、相関が得られたダムでは将来の気温が上昇した気候において底層 DO の低下が予想されることが考えられた。また、流入量は貯水池の回転率等に影響するものの、成層の形成等の水の動きが底層 DO により強く影響するため、単純な重回帰分析では影響の評価は難しいと考えられた。

高い相関を示した 7 つのダムにおける底層 DO と TN、TP に関係性を図-3 に示す。御所ダムや菌原ダムでは DO 濃度 2.0 mg/L 以下の貧酸素状態における TN

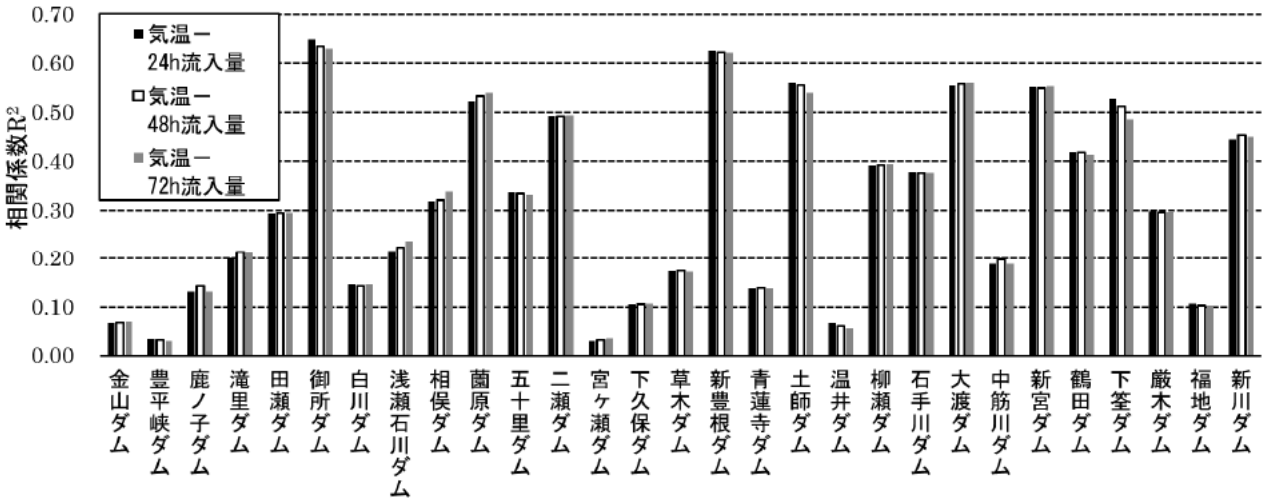


図-1 重回帰分析の相関係数一覧

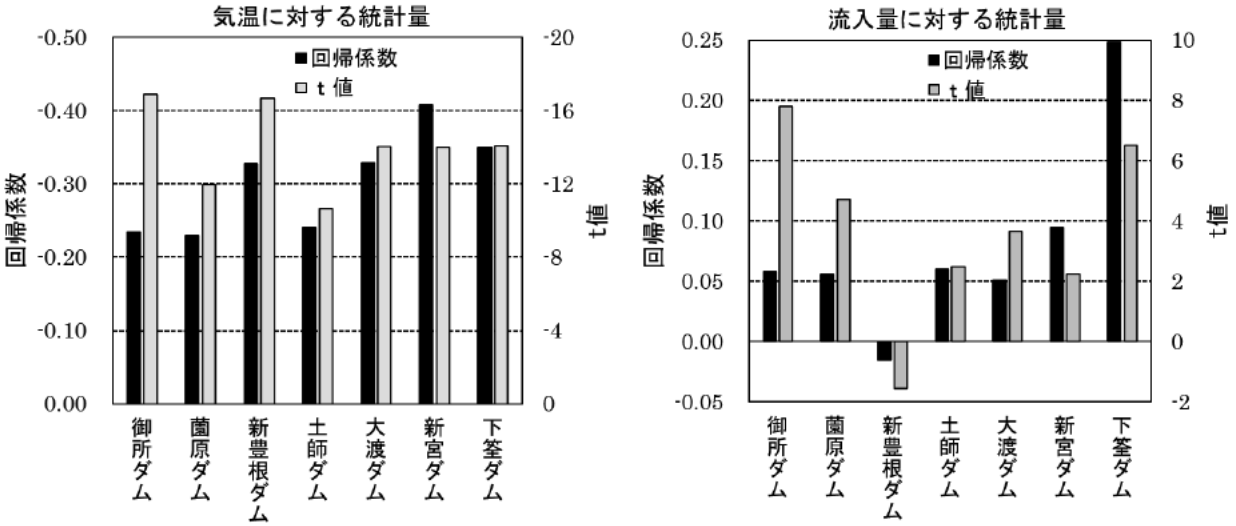


図-2 相関係数が大きかったダムにおける気温と流入量の回帰係数と t 値

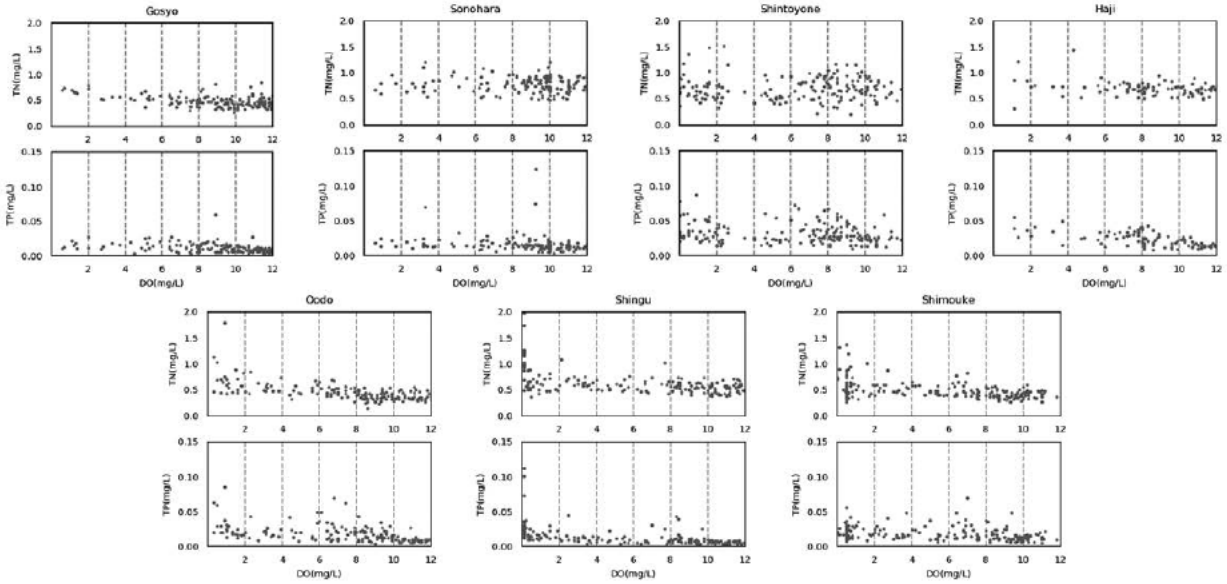


図-3 底層 DO と TN、TP 濃度の関係性

と TP 濃度の著しい増加傾向は見られなかったが、新宮ダムでは DO 濃度 0mg/L 付近で高い値を示す観測プロットが見られた。新宮ダムの流入河川の TN の平均濃度は 0.38 mg/L、TP の平均濃度は 0.0062 mg/L であり、DO 濃度が 0 mg/L 付近では TN は 1.0 mg/L、TP は 0.05 mg/L を超える値が存在し、嫌気状態となった底泥から栄養塩溶出が起きていることが推察された。大渡ダムにおいても DO 濃度 2.0 mg/L 以下で TN 濃度が高くなる傾向が見られた。大渡ダム流入河川の TN 濃度の平均値は 0.36 mg/L であり、DO 濃度 2.0 mg/L 以下の貧酸素状態で TN 濃度が 1.0mg/L を超えるようなプロットでは底泥からの栄養塩溶出が起きていることが推察された。これらのダム貯水池においては水温上昇により底層の貧酸素化が発生しやすくなると同時に栄養塩の溶出も発生しやすくなることが考えられた。

3．2 底層 DO の年変動特性と Lomb-Scargle 法を用いたフーリエ解析の結果

各ダムにおける底層 DO の年変動特性と Lomb-Scargle 法を用いたフーリエ解析により算出されたパワースペクトルを上段下段に整理した一覧を図-4 に示す。特定の時期に調査が実施されていないダムが複数存在したため、それらのパワースペクトルについては解釈が難しいが、365 日波長付近の Power が大きいダムほど年間の周期性が強い傾向が見られた。最大 Power が 0.6 以上のダムでは貧酸素化が発生する期間が限定的であり、特に最大 Power が 0.78 を示した厳木ダムでは 4－8 月にかけて底層の貧酸素化が進行し、9－12 月の貧酸素期間から 1-2 月に循環期に入り

表-2 厳木ダムの 4－9 月のデータによる重回帰分析結果

	回帰係数	t 値	相関係数
気温	-0.51	-12.9	0.69
流入量	-0.35	-0.86	

貧酸素水塊が解消されるという年間の動きが顕著に示されていた。加えて、厳木ダムにおける 4－9 月のデータにおいて底層 DO と水温、24h 流入量を対象として重回帰分析を行った結果を表-2 に示す。相関係数 R^2＝0.69 と高い相関性を示し、気温に対する t 値の絶対値が 12.9 と高いのに対して、流入量に対する t 値の絶対値は 0.86 と低く、気温に対する影響を強く受けると考えられた。厳木ダムにおいては気温が上昇した将来気候での 4－9 月における底層 DO は低下し、貧酸素化期間が長期化することが考えられた。

このように年間での周期性が強いダム貯水池においても、水温躍層の形成により底層 DO が低下しやすい 4－9 月における気温が上昇することで、水温躍層形成の期間が長期化し、底層の貧酸素化が起きる期間も長期化することが予想された。

4．まとめ

日本全国の底層貧酸素化対策を実施していていないダム貯水池を対象として、底層溶存酸素濃度について気温と流入量の関係性について重回帰分析を行った。重回帰分析の結果、一部のダムでは一定の相関関係が得られ、気温上昇によって底層 DO が低下する傾向が

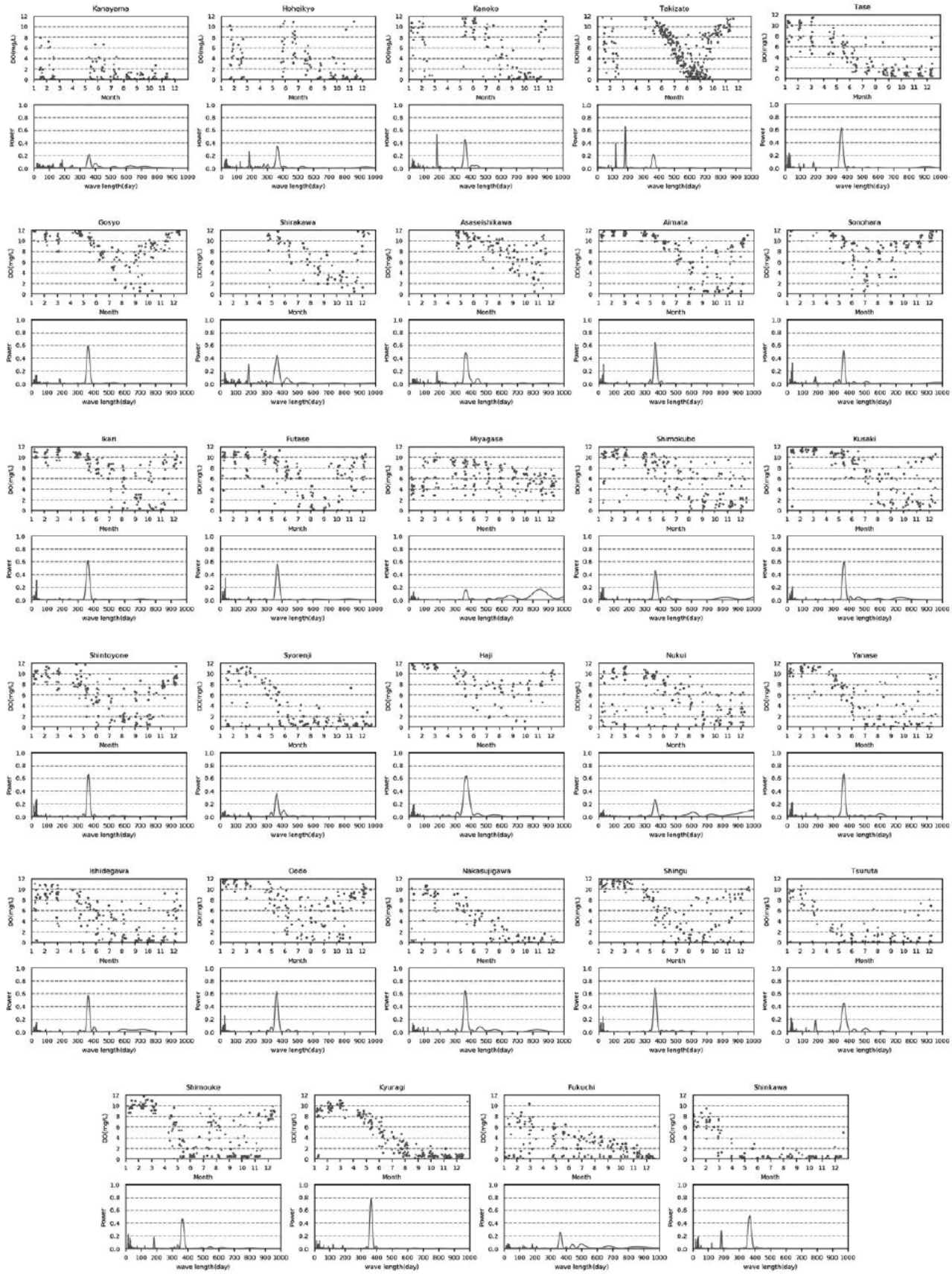


図-4 各ダムの年間における底層 DO の変動と算出されたパワースペクトル

見られた。特に気温の回帰係数は-0.20 ~ -0.41 の範囲であり、4℃上昇の世界では底層貧酸素化の長期化が懸念された。一方で流入量の底層 DO に対する影響力は小さい結果となり、成層の形成等を考慮せずに重回帰分析を行っても流入量の影響を評価することは難しいと考えられた。底層の貧酸素化により、嫌気化した底泥からの栄養塩溶出が起きていることが推察され、水温上昇の水質影響が懸念された。

また、Lomb-Scargle 法を用いたフーリエ解析を実施することで、ダム貯水池の底層 DO の変動に対する周期性を評価することができた。

本解析においては、解析の透明性の観点から気温と流量の時間平均を変数とした重回帰分析を説明モデルとして使用したが、相関関係が得られたダムは限定的であった。相関が得られなかったダムにおいても他の解析モデルを適用することで、底層 DO との関係性についてより深い解析を行うことが可能であることが考えられる。今後は、機械学習モデルなどの他の統計解析手法の適用や、クロロフィル a 濃度などの気候変動によって影響を受けると考えられる他の指標についても解析を行っていく予定である。

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) 池田祐一、中井正則、中村由行、道奥康治、村上和男 : 水圏の環境、東京電機大学出版局、pp.228-275、1998
3) The Astropy Project: Astropy v4.0.1 documentation, https://docs.astropy.org/en/stable/timeseries/lombscargle.html (2020/06 accessed)

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

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

【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、土砂動態のモニタリングや環境影響評価に関する実用的な技術の構築が求められている。本研究では、安全かつ省力的な化学物質濃度の調査方法として期待されるパッシブサンプリング手法の雨天時河川への適用性を検討した。適用可能性の検討として、DGT—パッシブサンプリング法を雨天時の河川で行う観測実験を実施し、labile 態金属の平均濃度を推定した。観測実験の結果、パッシブサンプリングによる推定平均濃度はグラブ法による時間加重平均濃度の 1.0-3.3 倍の範囲であり、オーダーレベルで濃度を推定できることが確認された。これらの結果から、パッシブサンプリング手法の土砂供給時の適用性が示唆された。
キーワード：土砂供給、雨天時河川、DGT—パッシブサンプリング法、labile 態金属、SS

1. はじめに

ダムの維持管理において、貯水池の堆砂は大きな問題の一つでありさまざまな排砂の方法が検討・実施されている。排砂した土砂をダムの下流河川に投入する場合、投入された土砂は河川の河床環境や生物相を改善させる正の効果が期待される。一方で、堆砂土砂には、ダム貯水池に堆積した後に吸着したものを含め金属等の化学物質が含まれるため、下流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負の効果の可能性が考えられる。そのため、土砂を下流河川に供給する際には、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。

土砂供給時には上記の通り、供給土砂から重金属類等の化学物質の溶出が懸念され、水中の土砂濃度増加に伴う水質変動をモニタリングすることが求められる。一方で、置土や排砂バイパスなどの土砂供給手法においては雨天時の掃流力によって土砂が流下するため、水質調査を行う場合は降雨時となり、現場河川における人力の採水（グラブ法）には安全性の観点から困難が伴う。降雨時に実施可能な調査手法として、自動採水機による採水やセンサー類による水質モニタリングなどが挙げられるが、人力の採水を伴わない調査手法としてパッシブサンプリングが近年注目を集めている。パッシブサンプリングは水環境中にディスク等の捕集剤を一定期間設置することで、捕集された対象物質の時間平均濃度を推定する手法であり、現地で採水を行わずに対象物質の環境中の平均濃度を推定することを目的としている。既往研究では平水時の河川等へ適用例が存在するが [1]、流速や SS が増加した雨天時の水環境への適用事例はほとんどない。

H29 年度以前の検討ではダム貯水池底質を用いた金属溶出実験などを行い、土砂供給時の水質変動項目として金属濃度を把握することの重要性を示した。H30 年度では、パッシブサンプリングの土砂供給時河川における適用性の基礎検討として，生物が利用可能な形態である labile 態金属を捕集する薄膜拡散勾配（Diffusive Gradients in Thin-films: DGT）を用いた

パッシブサンプリング手法（以下 DGT—パッシブサンプリング法）による濁水中金属類のモニタリングについて室内実験で検討を行った。実験ではスポット採水測定で得られた labile 態濃度との間に良好な相関が示され、濁水中でのパッシブサンプリングの適用可能性が確認された。

今年度は流速や SS 濃度が増加した雨天時実河川での DGT—パッシブサンプリング法の適用方法及び、DGT—パッシブサンプリング法による平均濃度推定の妥当性について、観測実験を行い検討した。

2. 方法

2. 1 DGT—パッシブサンプリング法の雨天時河川への適用方法について

DGT—パッシブサンプリングに使用した薄膜拡散勾配測定ユニット（DGT ユニット）は図-1 に示す DGT Research 社製 の LSNM-NP を使用した [2]。LSNM-NP は 12 種の金属（Al、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mn、Ni、Pb、Zn、U）を対象として濃度推定が可能である。DGT—パッシブサンプリング法では事前にキレート剤の吸着能を調整する必要があるため、マニュアルに記載された方法に従い DGT ユニットにコンディショニングを実施した [2]。コンディショニング後の DGT ユニットは、図-2 に示す通水のために穴をあけた塩化ビニルパイプの中に設置した。現場河川ではそれらのパイプを浮体式の観測機材にとりつけ、図-3 に示すように DGT ユニットを河川に浸漬した。DGT ユニットの浸漬時間は既往研究では 24 時間で行われている例が多く [3,4]、本研究では現場河川の状況を踏まえつつ、20-80 h を目安に DGT ユニットの浸漬を行った。

2. 2 雨天時河川における観測について

雨天時河川における観測地点は、恋瀬川流域の下川橋付近で行った。観測実施地点を図-4 に示す。この地点は事前の調査で雨天時に流速と SS 濃度の変動を確認して選定した。DGT—パッシブサンプリング法を用いた観測は雨天時に 3 回、平水時に 1 回行った。観測の一覧を表-1 に示す、雨量データは調査地点近隣の気象庁柿岡観測所のデータを用いた。また、現地では DGT—パッシブサンプリング法による濃度算出のために水温と流速の測定を行った。加えて、橋梁上からバケツを用いたグラブサンプリングにより水試料を採取し後述の分析に供した。グラブサンプリングの頻度は観測①では設置時と回収時に採水を行った。事前の

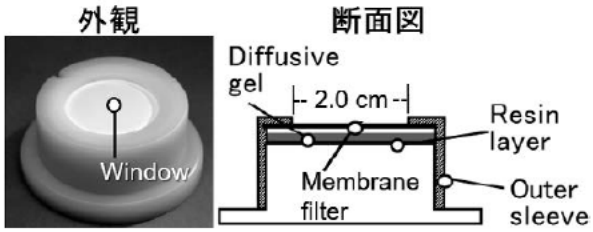


図-1 使用した DGT ユニットの概要

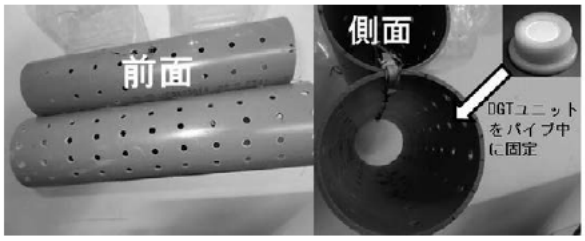


図-2 DGT ユニット取り付け用の観測機材

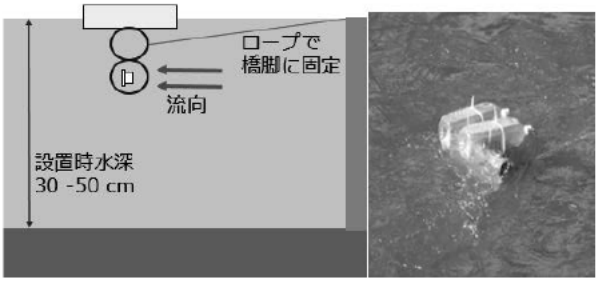


図-3 現場河川での DGT ユニット浸漬の様子

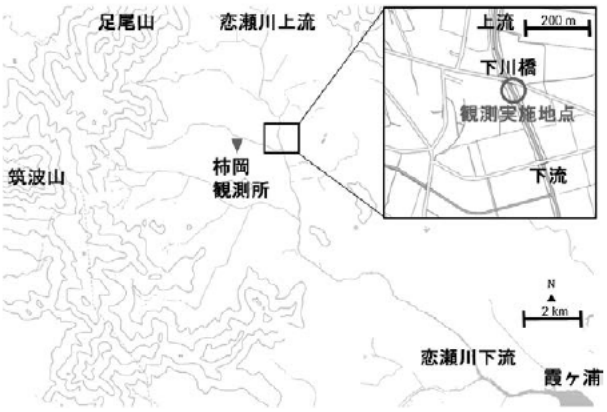


図-4 河川観測実施地点

表-1 実施した河川観測の概要

No	日時	DGT ユニットの設置時間(h)	設置期間中の総降雨量(mm)
①	11/18-19	20.5	9.00
②	11/22-25	73.5	73.75
③	12/2-3	24.0	12.50
④	2/20-21	24.0	0

降雨確率が高かった観測②と③の降雨開始直後は2時間おきに採水を行い、降雨開始から 12 時間後以降は24時間に1回以上の頻度で採水を実施した。観測④では6時間おきに採水を行った。

2．3　水質・金属類の分析方法

現地にて採取した水試料は実験室に持ち帰り、水質項目としてSS、VSS、DOCの測定を行った。また金属については全量態とlabile態の2形態についての分析を行った。全量態の分析では硝酸を用いたホットプレート分解による前処理をほどこした。labile 態については現地にて0.45 μmフィルターを用いてろ過を行い、ろ液をキレート樹脂（MetaSEP CH-1、GLサイエンス社製）に通液し、硝酸を用いて Resin layer から金属を溶出した抽出液を前処理済み試料とした。全ての前処理済み試料の測定においてICP-MS（X7CCT, Thermo Fisher Scientific）を使用し、金属14種（Fe、Li、B、Ti、V、Cd、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Ag、Pb、Sr）の濃度を定量した。

DGT—パッシブサンプリング法による水中の labile 態平均濃度（DGT-labile 態平均濃度）の算出方法は昨年度報告書と同様に行った [3]。DGT—パッシブサンプリング法では LSNM-NP の対象金属と ICP-MS の測定対象金属の設定から8種金属（Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mn、Ni、Pb）について平均濃度データの取得を試みた。

3．結果と考察

3．1　DGT—パッシブサンプリング法の雨天時への適用性に関する結果

雨天時の観測①~③における、降水量と流速の関係を図-5にしめす。今回実施した観測の中では流速及び時間雨量が最も大きかったのは観測②であった。また、観測①~③では DGT ユニットに物理的な機能不全は見られず、後述のとおり必要な金属濃度データが取得できていたことからこれらの観測条件下においてDGT—パッシブサンプリング法が適用可能であることが確認された。

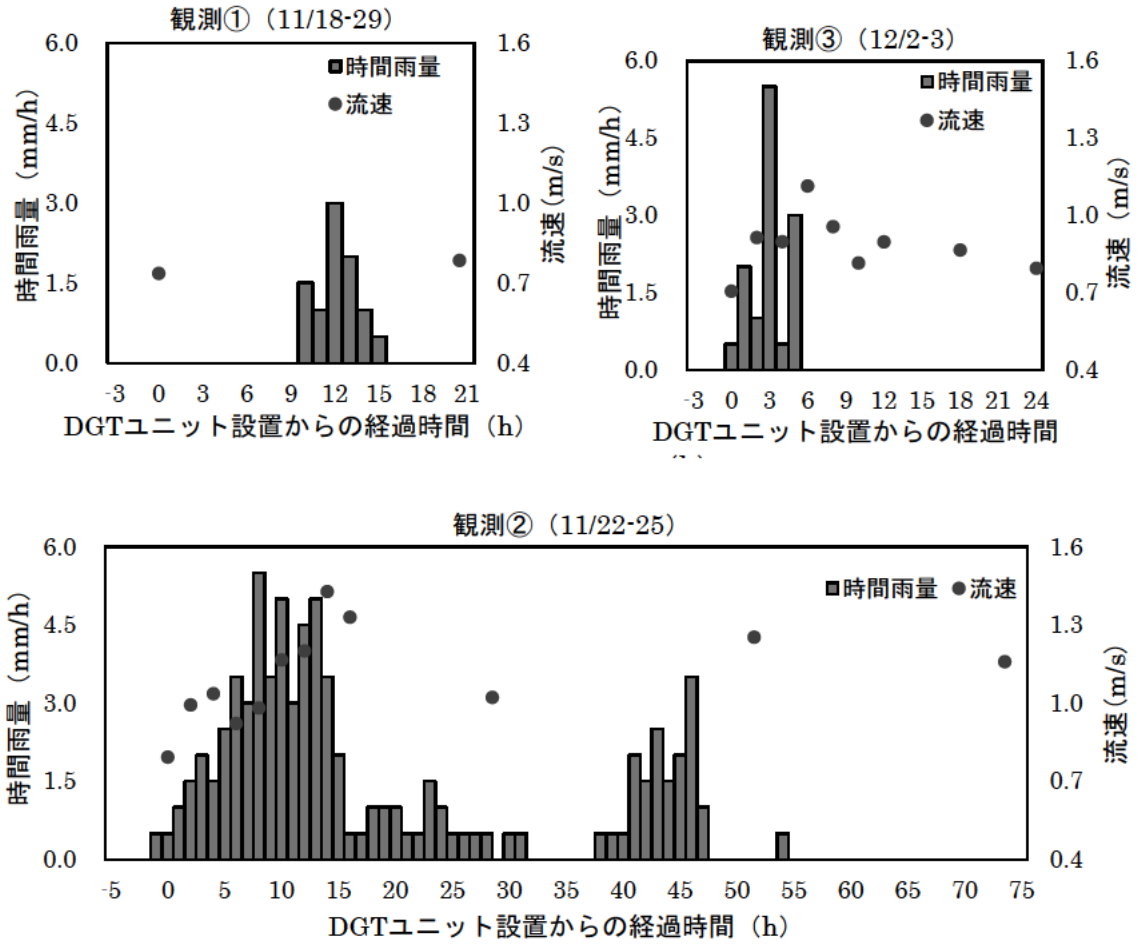


図-5 雨天時河川の観測における雨量と流速の変動

3．2　DGT—パッシブサンプリング法による DGT-labile 態平均濃度の算出

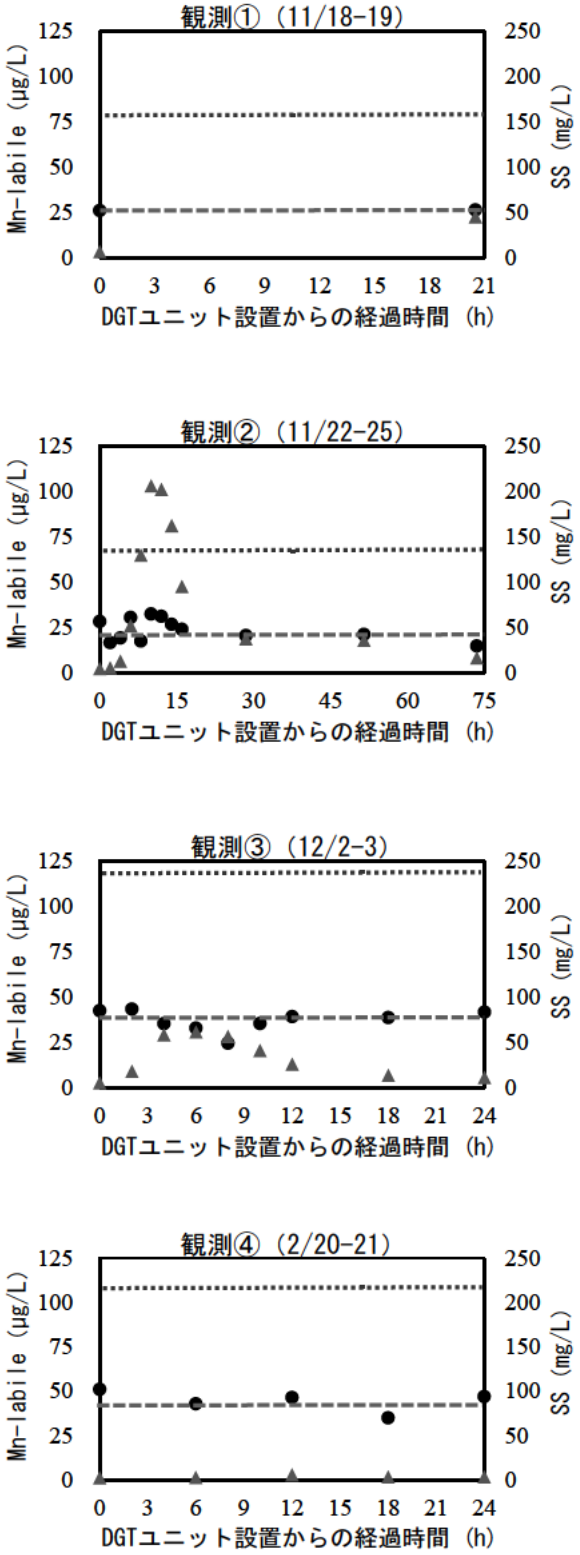
観測の結果、Mn、Cu については Resin layer 抽出液に対して濃度定量が可能であり、これら 2 つの金属を以下では対象とした。Fe は観測②でのみ Resin layer 抽出液の濃度が定量可能であった。また、その他の金属（Cd、Co、Cr、Ni、Pb）についてはすべての観測で Resin layer 抽出液が定量下限値以下であり、採水試料においても定量下限値以上を示すサンプルが多く、本研究で実施した観測においては DGT—パッシブサンプリング法による算出が難しいと考えられた。

3．2．1　Mn 濃度の算出結果

観測①~④における、採水試料の labile 態 Mn 濃度と SS 濃度の関係を図-6 に示す。また、各グラフに算出された DGT-labile 態平均濃度と採水試料の分析値の時間加重平均濃度をそれぞれ破線で示した。観測①~④における labile 態 Mn 濃度は 20-60 μg/L の範囲であり、濃度変化に特徴的な点はみられなかった。DGT-labile 態平均濃度と採水試料の時間加重平均濃度を比較した際には、①~④すべてにおいて DGT-labile 態平均濃度は時間加重平均濃度を上回っており、それらの比率は 2.9・3.2 倍であった。これらの結果から、本研究で実施した DGT—パッシブサンプリング法は labile 態 Mn 濃度を過大評価していると考えられた。また、labile 態 Mn 濃度と SS 濃度の変化に明確な対応は見られなかった。

3．2．2　Cu 濃度の算出結果

観測①~④における、採水試料の labile 態 Cu 濃度と SS 濃度の関係を図-7 に示す。観測①において、溶出液の Cu 濃度が ICP-MS の定量下限値未満であったため、DGT-labile 態平均濃度は算出されなかった。ICP-MS の定量下限値、観測②の平均水温での拡散係数 D 及び浸漬時間 t より観測②の DGT-labile 態平均濃度の定量下限値は 1.11 μg/L と算出された。時間加重平均濃度はこの 1/2 程度のため、DGT-labile 態平均濃度での定量下限値未満は妥当と考えられた。また、観測④においても溶出液の Cu 濃度が ICP-MS の定量下限値未満であり、採水試料の labile 態濃度についても定量下限値以下を示したサンプルが存在した。これらのことから観測④については平均濃度に関する実態を推定することが難しかった。観測②と観測③について Cu の DGT-labile 平均濃度は時間加重平均濃度を上回っており、それらの比率は観測②で 1.1 倍、観測③で 1.5 倍であった。また、観測②と観測③では、SS 濃



●：採水試料の labile 態濃度
▲：採水試料の SS 濃度
…：採水試料の時間加重平均濃度
▫：DGT-labile 態平均濃度

図-6 labile 態 Mn 濃度と SS 濃度の時間変化

度の増加に伴う labile 態 Cu 濃度の増加傾向が見られた。観測②については labile 態濃度の最大値が DGT-labile 態平均濃度を超えており、濃度推定結果は妥当であると考えられた。観測③については labile 態濃度のピークとなる 4-8 h の labile 態濃度が DGT-labile 態平均濃度と同程度であり、labile 態 Cu 濃度を過大評価していることが考えられた。

3. 2. 3　濃度算出に対する考察

Mn と Cu ともに DGT-labile 態平均濃度が採水試料の時間加重平均濃度より高い値を示す傾向が見られ、labile 態濃度を過大評価している可能性が考えられた。濃度算出において Resin layer からの溶出係数 f_e はマニュアルに記載された 0.85 をすべての金属に用いたが、金属種ごとに適切な溶出係数が異なることが考えられる[9]。また、各金属の拡散係数 D は採水時の水温の平均値を基に一定値を採用したが、浸漬時間が長かった観測②では水温変動は 10~18℃であり、拡散係数についても 10~18℃で 1.3 倍程度の変動が存在する。このため金属種ごとの溶出係数や現場の水温変動を考慮した拡散係数の設定について検討する必要があると考えられた。

これらの結果から DGT—パッシブサンプリング法は Mn と Cu では 1.1-3.2 倍程度の過大評価を示したが、生物影響の検討に必要なオーダーレベルの推定が可能であることが示された。拡散係数の設定方法などを検討する必要があるが、本手法を用いることで安全側のリスク評価時に適用できる濃度情報が得られることが示された。

4. まとめ

水生生物に直接影響を及ぼすとされる形態（labile 態）のモニタリング手法として、DGT—パッシブサンプリング法の適用可能性を雨天時河川において検討した。その結果、DGT—パッシブサンプリング法が雨天時河川に適用可能であることが確認された。加えて、採水試料の時間加重平均濃度と DGT-labile 平均濃度の比率は Mn で 2.9-3.2 倍、Cu で 1.1-1.5 倍であり、現場河川中の平均濃度を生物影響の検討に必要なオーダーレベルの推定が可能であり、リスク評価時に使用する濃度情報が得られることが示された。

今後は雨天時の他の河川にて DGT—パッシブサンプリング法を用いた観測を行う予定である。また、本研究における観測は小～中規模の降雨イベントであったため、より強い降雨イベントにおける観測等を実施

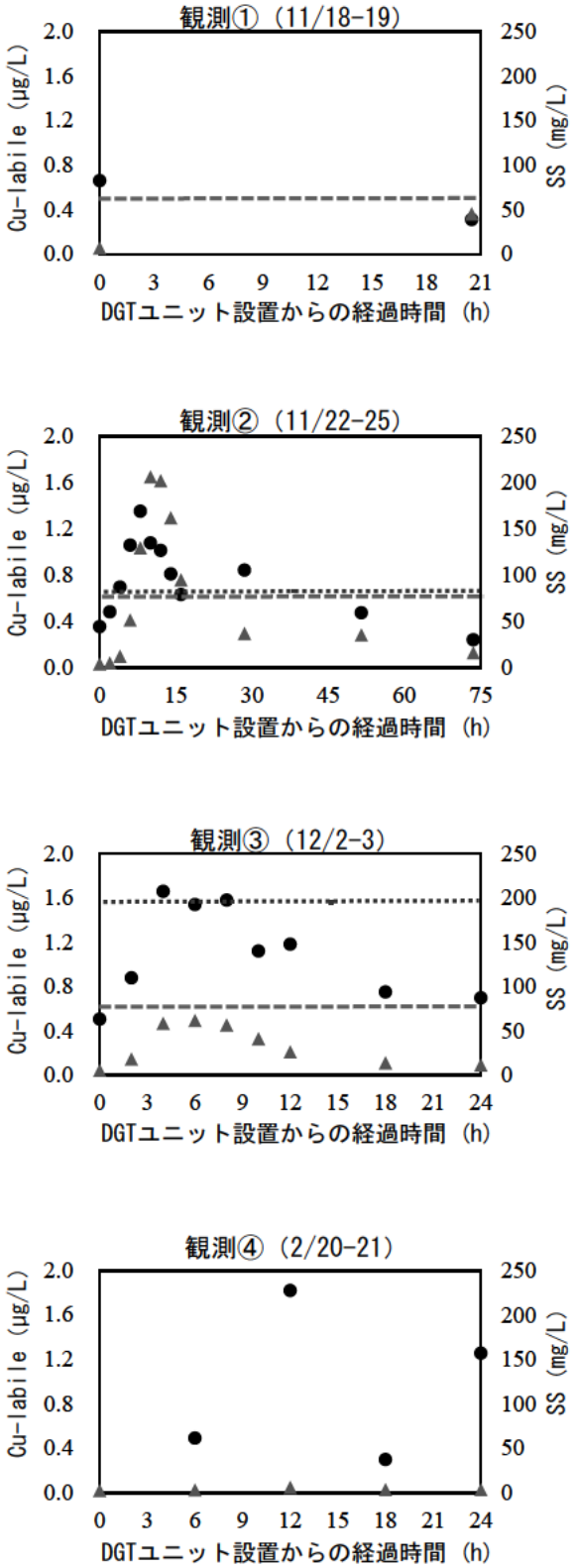


図-7 labile 態 Cu 濃度と SS 濃度の時間変化

し、雨天時における DGT—パッシブサンプリング法について追加の検討を実施していく予定である。

参考文献

1) 益永茂樹：河川水中重金属の生物利用性に与える存在形態と共存物質の影響、河川整備基金助成事業報告書、助成番号 24-1211-011、2013
2) DGT Research Ltd. : Practical guide for using DGT for metals in waters.
3) 内藤航、森美和子、岩崎雄一、加茂将史、益永茂樹：薄膜拡散勾配（Diffusive Gradients in Thin-films: DGT）法を用いた河川水における金属類の生物利用性の評価、水環境学会誌、Vol.34、No.2、pp.65-71、2011
4) 永井孝志、恒見清考、川本朱美：河川水中における重金属のスペシエーション：Diffusive Gradients in Thin-films 法による分析と化学平衡モデルによる推定、陸水学会誌、Vol.68、pp.391-401、2011
5) 土木研究所　平成 30 年度研究開発プログラム報告書：「12.2.1　土砂供給に伴う河川環境影響評価およびダムからの土砂供給技術の運用手法に関する研究」、2019
6) Andreas Kreuzeder, Jakob Santner, Hao Zhang, Thomas Prohaska, Walter W. Wenzel ： Uncertainty Evaluation of the Diffusive Gradients in Thin Films Technique, Environ Sci. Technol, 49, pp.1594-1602, 2015.

下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減技術と水生生物の影響評価に関する研究

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

【要旨】
本研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中アンモニア性窒素について微生物保持担体を用いた低減対策を検討した。その結果、ポリプロピレン製の担体を充填率35%で投入し、曝気量制御のためにアンモニアセンサーを使用することで水質改善と省エネを両立できることがわかった。
また本研究では、ムレミカヅキモを用いて下水処理水の慢性的影響評価を検討した。5%処理水を継続的に添加することで、藻類の増殖が促進されることを明らかにし、処理水のプラスの影響を確認した。一方、80%処理水を継続的に添加すると細胞が肥大し、藻類への慢性的な影響がある可能性が示唆された。

キーワード：アンモニア性窒素、微生物保持担体、アンモニアセンサー、藻類、慢影響評価

1. はじめに

H28 に水生生物保全に係る化学物質有害性評価作業委員会（環境省の諮問委員会）は、水生生物保全環境基準へのアンモニア性窒素（以下、NH_4-N とする）の追加と、その基準値（案）を提示した。この際の NH_4-N の基準値（案）は、生物 A 類型水域では 0.2 mg-N/L、生物 B 類型水域では 0.7 mg-N/L と厳しい値が提示されている。

一方、これまでの水質チームの研究により、小規模下水処理場の処理水中の NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L（生物 A 類型水域の 10 倍値）を超える処理場は 44%であることが明らかになっており [1)]、排水基準値が低く設定された場合は、多くの処理場で低減対策が必要となる可能性が考えられる。

下水処理水の消毒は塩素を用いる方法が一般的であり、塩素はそれ自体が毒性を有することに加え [2)]、NH_4-N が残存している処理水に塩素消毒を行うと、塩素消毒副生成物が生成され、水生生態系に悪影響がでることが懸念される。実際 NH_4-N が残存している処理水に塩素消毒を行うと、ムレミカヅキモやゼブラフィッシュに対して毒性が強く現れることはこれまでの水質チームの研究により確認している [1)]。

本研究は下水処理水中に残存する NH_4-N の効率的除去法についての検討、また水生生物を用いた処理水の安全性評価の 2 つの面から構成される。本年度は、微生物保持担体を用いて、下水処理水中に残存する NH_4-N の効率的除去法について検討を行った。また、アンモニア性窒素残存や塩素消毒以外の影響をまず確認する目的で、藻類（ムレミカズキモ）を用いて下水処理水の慢性的影響評価法の検討を行った。

２．下水二次処理水に残存する NH_4-N を対象とした担体と NH_4-N センサーを用いた省エネ型低減方法の提案

2.1. はじめに

NH_4-N の環境基準項目への追加が検討されており、排水規制値の設定に関しても今後議論される可能性がある。この背景から、当所において、全国 54 カ所の小規模下水処理場の下水二次処理水中 NH_4-N 濃度を測定したところ [1)]、全体の 44%の処理場で下水二次処理水の NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L 以上であり、排水基準値が低く設定された場合は、多くの下水処理場で低減対策が必要となる可能性がある。本研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中 NH_4-N について微生物保持担体を用いた低減対策を検討した。令和元年度は担体の種類、充填率、送気倍率の検討と実験装置のスケールアップ及び NH_4-N センサーによる曝気量制御について検討した。

2. 2　研究方法

2. 2. 1　担体の種類、充填率、送気倍率の基礎的検討

本研究で用いた微生物保持担体処理実験装置は、容

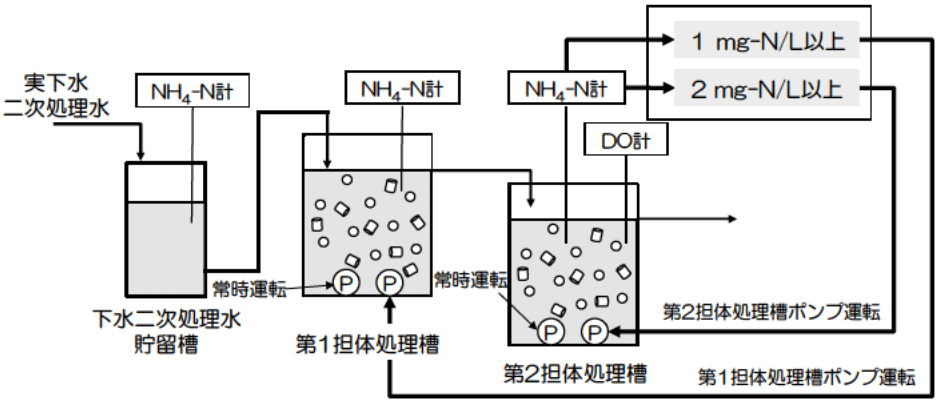


図-1　NH_4-Nセンサーを用いた担体処理の曝気量制御フロー

量 10 L の反応槽を 2 つ連結し、各反応槽には微生物保持担体を投入した。本研究で使用した担体は、ポリプロピレン（以下、PP とする）製中空円筒状（4 mm^{OD} × 3 mm^{ID} × 5 mm^{L}）の担体と多孔質ポリウレタン製スポンジ状（12 mm^{W} × 12 mm^{D} × 15 mm^{H}）の担体の 2 種類である。微生物保持担体処理のための原水は、実流入下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、下水二次処理水中に NH_4-N を残留させたものを用いた。微生物保持担体による NH_4-N の除去性能を担体の種類、充填率、送気倍率毎に比較した。実験期間は担体の種類の検討実験が 2019 年 4 月 9 日～2019 年 6 月 14 日、充填率の検討実験が 2019 年 6 月 18 日～2019 年 7 月 30 日、送気倍率の検討実験が 2019 年 8 月 1 日～2019 年 9 月 10 日である。

2. 2. 2　PP 製担体付着微生物量の測定法

PP 製担体処理槽の担体付着微生物量の測定を、実験期間中に週に 1 回程度行った。測定方法は次の通りである。各担体処理槽から担体 50 mL をビーカーに採取し、純水を 100 mL 加えた後、担体と純水の入ったビーカーを超音波発生器(出力 200 W)に 10 分間接触させ、純水中に担体付着微生物を抽出した。その懸濁液を試料として、下水道試験法 [3]に従い浮遊物質濃度を測定し、その測定結果を担体 1 L 当たりの担体付着微生物量とした。

2. 2. 3　実験装置のスケールアップと NH_4-N センサーによる曝気量制御運転

本研究で用いた微生物保持担体処理実験装置は、容量 60 L の反応槽を 2 つ連結し、各反応槽には PP 製担体を投入した。担体充填率は嵩比率 35%に設定した。担体流動性確保のための曝気は 1 槽当たり送気倍率 4.5 倍で行った。NH_4-N 濃度のリアルタイムモニタリングと流入負荷変動に応じた曝気量制御のために NH_4-N センサーを下水二次処理水貯留槽および各担体処理槽に設置し、DO センサーを第 2 担体処理槽に設置した。NH_4-N センサーを用いた担体処理の曝気量制御フローを図-1 に示す。曝気量制御は第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が 1 mg-N/L 以上で第 1 担体処理槽の送気倍率が 7.4 倍となるように設定し、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L 以上で第 2 担体処理槽の送気倍率が 7.4 倍となるように設定した。本研究では HRT を 2 槽で 180 分と 120 分に設定し、異なる HRT における担体付着微生物量の差異、微生物保持担体による NH_4-N 処理性能、NH_4-N センサーを用いた曝気量制御による曝気量削減効果を確認した。 実験期間は HRT を 180 分に設定した実験が 2019 年 12 月 3 日～2020 年 1 月 14 日、HRT を 120 分に設定した実験が 2020 年 2 月 1 日～2020 年 3 月 14 日である。

2. 3　結果と考察

2. 3. 1　担体の種類、充填率、送気倍率の基礎的検討

a)　素材と形状の異なる担体による NH_4-N 処理性比較

PP 製担体及びスポンジ担体を用いた HRT45 分及び 90 分での運転時における NH_4-N の処理特性を検討した実験結果を図-2 に示す。実験期間中における各反応槽の水温は 19～25℃であった。HRT90 分時点での NH_4-N 除去率は PP 製担体、スポンジ担体ともに 99%であった。本実験で用いたスポンジ担体は PP 製担体に比べて比重が大きいため、担体流動性の確保がより容易な PP 製担体をこれ以降の実験では使用した。

b)　異なる担体充填率による NH_4-N 処理性比較

PP 製担体の充填率を 35%及び 10%に設定した HRT22.5 分及び 45 分での運転時における NH_4-N の処理特性を検討した実験結果を図-3 に示す。実験期間中における各反応槽の水温は 22～28℃であった。HRT45 分時点での NH_4-N 除去率は充填率 35%で 98%、充填率 10%で 53%

であった。HRT45 分時点での反応槽容積当たりの硝化速度は充填率 35%で 14.4（mg-N/L・h）、充填率 10%で 8.8（mg-N/L・h）となった。本実験で用いた下水二次処理水中 NH_4-N 濃度は 13.5 ± 1.5 mg-N/L であり、担体処理後の目標 NH_4-N 濃度を 2 mg-N/L、HRT を 45 分、反応槽容積を 120 L と想定すると、目標 NH_4-N 濃度を達成するために必要な反応槽容積当たりの硝化速度は 15.3（mg-N/L・h）である。本実験で用いた下水二次処理水中 NH_4-N 濃度に対しては、充填率 10%では目標 NH_4-N 濃度を達成できないことが想定されるため、これ以降の実験では充填率を 35%に設定した。

c） 異なる送気倍率による NH_4-N 処理性比較

PP 製担体を送気倍率 5.3 倍及び 2.7 倍に設定した HRT22.5 分及び 45 分での運転時における NH_4-N の処理特性を検討した実験結果を図-4 に示す。実験期間中における各反応槽の水温は 25～30℃であった。HRT45 分時点での反応槽容積当たりの硝化速度は送気倍率 5.3 倍で 12.5（mg-N/L・h）、2.7 倍で 8.3（mg-N/L・h）となった。本実験で用いた下水二次処理水中 NH_4-N 濃度は 14.2 ± 0.8 mg-N/L であり、担体処理後の目標 NH_4-N 濃度を 2 mg-N/L、HRT を 45 分、反応槽容積を 120 L と想定すると、目標 NH_4-N 濃度を達成するために必要な反応槽容積当たりの硝化速度は 16.2（mg-N/L・h）である。本実験で用いた下水二次処理水中 NH_4-N 濃度の変動を考慮し、これ以降の実験では最低送気倍率を 5.3 倍程度以上に保つ必要があることを確認した。

2. 3. 2 スケールアップ及び NH_4-N センサーを使用した担体処理

a） 異なる HRT における担体付着微生物量の比較

HRT を 180 分と 120 分に設定した実験における、担体 1 L 当たりの担体付着微生物量の測定結果を表-1 に示す。HRT を 180 分に設定した実験における第 1 担体処理槽（HRT：90 分時点）と第 2 担体処理槽（HRT：180 分時点）から採取した担体 1 L 当たりの担体付着微生物量はそれぞれ 1,031 ± 56 mg-SS/L、1,113 ± 42 mg-SS/L であり、HRT を 120 分に設定した実験における第 1 担体処理槽（HRT：60 分時点）と第 2 担体処理槽（HRT：120 分時点）から採取した担体 1 L 当たりの担体付着微生物量はそれぞれ 1,177 ± 223 mg/L、1,117 ± 197 mg/L であった。HRT の違いによる担体付着微生物量に大きな差異はないことを確認した。このことから、運転期間も考慮すると、担体付着微生物量が飽和に達している可能性が示唆された。

b） 異なる HRT における NH_4-N 処理性能の比較

b-1） HRT を 2 槽で 180 分に設定した実験における

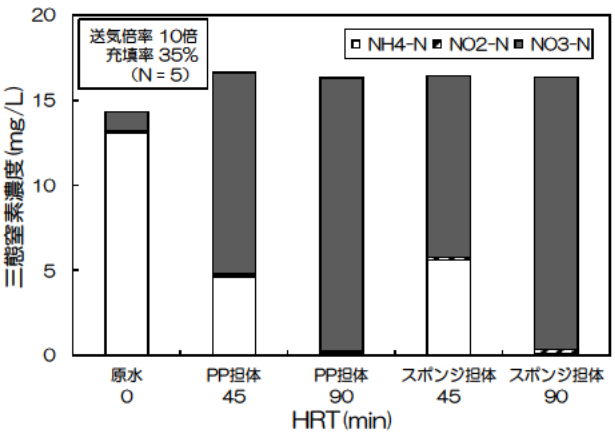


図-2 PP製担体及びスポンジ担体を用いたHRT45分及び90分での運転時におけるNH_4-Nの処理特性

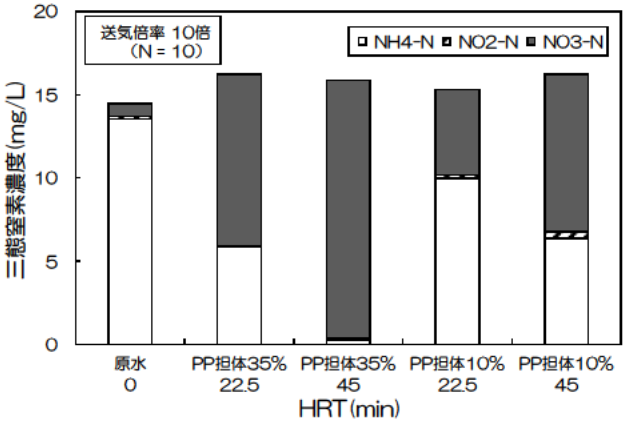


図-3 PP製担体の充填率を35%及び10%に設定したHRT22.5分及び45分での運転時におけるNH_4-Nの処理特性

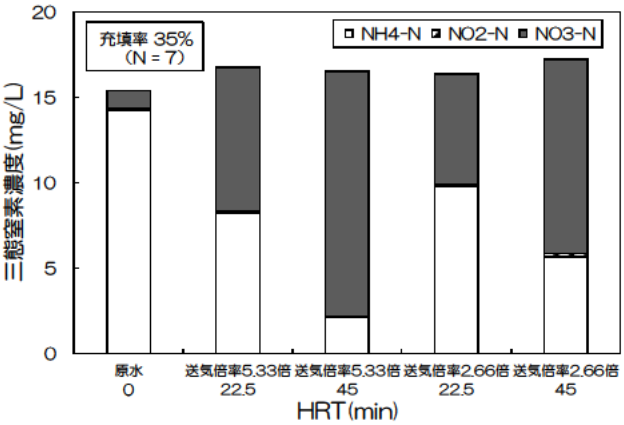


図-4 PP製担体を送気倍率5.3倍及び2.7倍に設定したHRT22.5分及び45分での運転時におけるNH_4-Nの処理特性

NH_4-N 処理性能

NH_4-N センサーと DO センサーの測定値の経時変化を図-5 に示す。実験期間中における各反応槽の水温は 12～19℃であった。下水二次処理水貯留槽における平均 NH_4-N 濃度は 16.3 mg-N/L であり、第 2 担体処理槽に

表-1　HRTを180分と120分に設定した実験における
担体1 L当たりの担体付着微生物量の比較

	HRT180分		HRT120分	
担体採取箇所	第1担体処理槽	第2担体処理槽	第1担体処理槽	第2担体処理槽
担体1 L当たりの担体付着微生物量（mg/L）	1,031 ± 56（N = 6）	1,113 ± 42（N = 6）	1,177 ± 223（N = 6）	1,117 ± 197（N = 6）

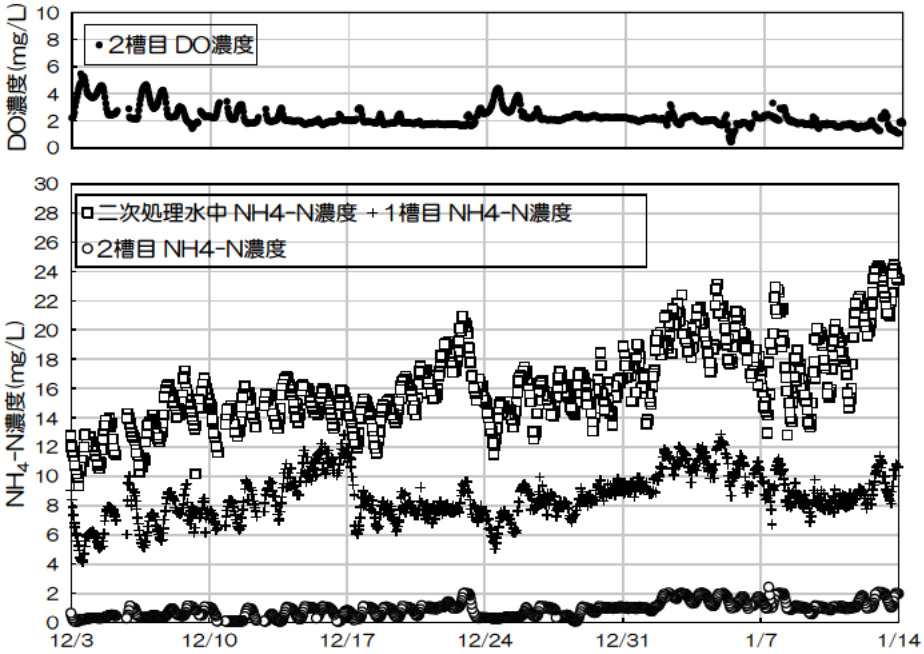


図-5　NH_4-N濃度とDO濃度の経時変化（HRT: 180分）

おける平均 NH_4-N 濃度は 0.9 mg-N/L であったことから、本実験における平均 NH_4-N 除去率は 94%となった。HRT180 分時点での反応槽容積当たりの硝化速度は 4.7（mg-N/L・h）となった。下水二次処理水貯留槽における NH_4-N 濃度が 20 mg-N/L を超える高負荷期間（2019 年 12 月 22 日～23 日、2020 年 1 月 2 日～14 日）においても、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度を 2 mg-N/L 以下に低減できることを確認した。一方、雨天時など流入 NH_4-N 低負荷期間（2019 年 12 月 3 日、12 月 10 日～13 日、12 月 16 日、12 月 28 日）においては、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が測定下限値である 0.1 mg-N/L となった。この期間には担体流動性確保のための曝気のみ行われていたが、第 2 担体処理槽の DO 濃度は 2～5 mg/L であり、NH_4-N 処理の観点からは過剰な曝気量であることを確認した。

b-2)　HRT を 2 槽で 120 分に設定した実験における NH_4-N 処理性能

NH_4-N センサーと DO センサーの測定値の経時変化を図-6 に示す。実験期間中における各反応槽の水温は 10～20℃であった。下水二次処理水貯留槽における平均 NH_4-N 濃度は 16.5 mg-N/L であり、第 2 担体処理槽における平均 NH_4-N 濃度は 2.5 mg-N/L であったことから、本実験における平均 NH_4-N 除去率は 85%となった。HRT120 分時点での反応槽容積当たりの硝化速度は 6.8（mg-N/L・h）となった。実験期間中の半分以上の期間で、第 2 担体処理槽の NH_4-N 濃度が 2 mg-N/L を超過した。この期間における第 2 担体処理槽の DO 濃度は 1～5 mg/L であった。HRT を 2 槽で 180 分に設定した実験に比べて、平均 NH_4-N 除去率は低下したものの、反応槽容積当たりの硝化速度は増加したことから、流入 NH_4-N 濃度と設定され得る NH_4-N 排水基準値によっては、HRT を 120 分より短く設定しても、NH_4-N 排水基準値を達成できる可能性が示唆された。

2. 3. 3　異なる HRT における曝気量制御による曝気削減率と総曝気量当たりの処理速度の比較

異なる HRT における曝気量制御による曝気削減率と総曝気量当たりの硝化速度の比較結果を表-2 に示す。HRT を 2 槽で 180 分に設定した実験では、曝気量制御を行わなかった場合に比べて総曝気量を 31%削減できることを確認した。総曝気量当たりの硝化速度は

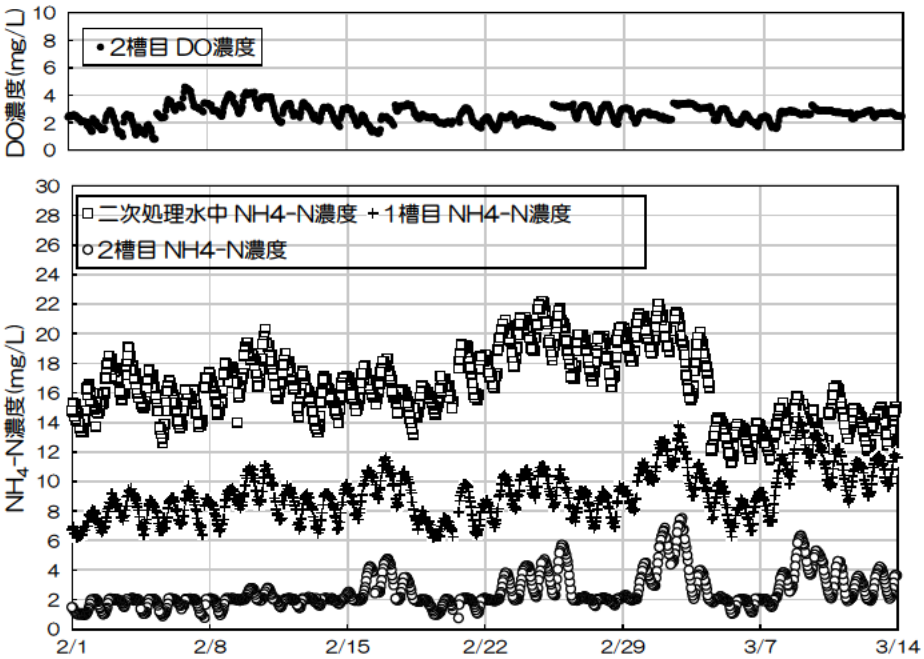


図-6　NH_4-N濃度とDO濃度の経時変化（HRT: 120分）

表-2　異なるHRTにおける曝気量制御による曝気削減率と総曝気量当たりの硝化速度の比較

	HRT180分				HRT120分			
	曝気量制御あり		曝気量制御なし		曝気量制御あり		曝気量制御なし	
	1槽目	2槽目	1槽目	2槽目	1槽目	2槽目	1槽目	2槽目
常時曝気量（L/h）	165	165	165	165	248	248	248	248
常時曝気時間（h）	984	984	984	984	992	992	992	992
制御曝気量（L/h）	105	105	105	105	158	158	158	158
制御曝気時間（h）	371	11	984	984	974	601	992	992
総曝気量（L）	364,830		531,360		740,882		805,504	
曝気削減率	31%		-		8%		-	
総曝気量当たりの硝化速度 (g-N/m^3-Air)	1.55		-		0.85		-	

1.55（g-N/m^3-Air）となった。一方、HRT を 2 槽で 120 分に設定した実験では、曝気量制御を行わなかった場合に比べて総曝気量を 8%削減できることを確認した。総曝気量当たりの硝化速度は 0.85（g-N/m^3-Air）となった。本実験における曝気量制御方法においては、HRT を 180 分に設定した方がより効率的に NH_4-N を除去できることを確認した。

3.　下水処理水を対象としたムレミカヅキモを用いた慢性的影響評価に関する研究

3．1　はじめに

下水処理水が生物に及ぼす影響として、短期的影響に加え、長期的な慢性影響も考えられる。当研究チームでは、これまでの研究において、全排水毒性（Whole Effluent Toxicity：WET）試験において、藻類（ムレミカヅキモ）が下水処理水に最も影響を受けやすいことを明らかにした[4]。一方、従来の WET 試験では、数日間の培養による増殖速度を指標とし、形態学的または遺伝子学的な変異は指標とされないため慢性影響は評価できない[5]。下水処理水が藻類に与える慢性的影響を把握するためには、増殖速度に加え、細胞形態等他の影響を確認することが重要である。そこで本研究では、ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella*

subcapitata)を用いて下水処理水による多世代培養を行い、下水処理水による慢性的影響の評価を行った。

3. 2　実験材料および実験方法

3. 2. 1　下水処理水の採水

使用した下水処理水（終沈流出水）は、A 処理場の嫌気・無酸素・好気処理（A_2O）処理後の最終沈澱槽のサンプリングポートから採取した。2019 年 8 月 7 日～2019 年 10 月 9 日（10 週間）にかけて毎週 1 回、10L バッチ採取し、速やかに土木研究所に搬入した。これらの処理水は試験に用いるまで 4℃冷暗所に保管した。採取された各処理水は一般水質項目を測定し、慢性影響試験に用いた。

3. 2. 2　藻類を用いた処理水の慢性影響試験

試験には国立研究開発法人国立環境研究所から分譲されたムレミカヅキモ（*P. subcapitata*; NIES-35 株）を用いた。処理水を 0（Control）、5、80%濃度として Milli-Q 水で希釈し、10 倍濃度の C 培地[6]を 1 倍量になるよう添加して試験溶液を作製した。前培養したムレミカヅキモは最終濃度 $2x10^5$ cells/mL として、フィルター滅菌した各試験溶液（20mL）を 100mL フラスコに添加した。培養条件は 24℃、1,500 Lux 連続照射、回転振とう 100 rpm とし、1 週間培養を行った。培養後、各培養液はそれぞれ同処理水濃度の新しい試験溶液に添加し、この工程を 10 回繰り返した(図-7)。0%試験溶液では、毎回細胞を最終濃度 $2x10^5$ cells/mL で新しい試験溶液に添加し、5%と 80%試験溶液では 0%に添加した際と同容量の培養液（① mL、図-7）をそれぞれの試験溶液に添加した。7 日間培養後、細胞の増殖、形態（細胞面積）を検討した。試験は各濃度 3 連で行った。

3. 2. 3　ムレミカヅキモの細胞数測定と形態観察

7 日間培養を行った各処理水濃度の培養液に対して、細胞数の測定と形態観察を行った。細胞数の測定は粒子計数分析装置（CDA-1000B、Sysmex 社）を用いて行った。細胞の形態観察は、光学顕微鏡（BX51、Olympus 社）を用いて行った。細胞面積は、顕微鏡写真からフリーソフトの ImageJ（https://imagej.net/Welcome）と Inkscape（https://inkscape.org/ja/）を用いて求めた。各処理水濃度に対し、1 フラスコから約 50 細胞採取し、3 連で合わせた 150 個以上の細胞を検討した。

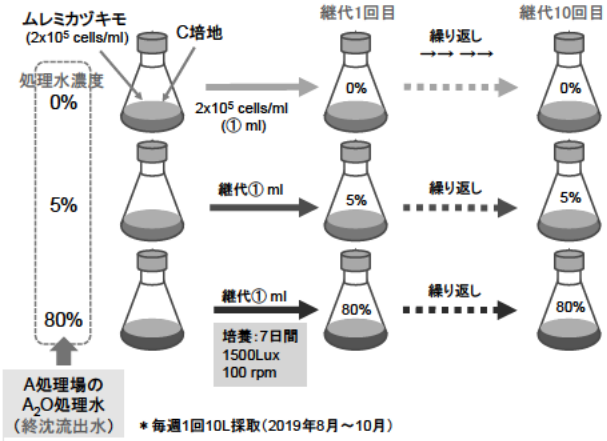


図-7　藻類多世代培養による慢性影響試験の概要

3. 2. 4　金属分析

各処理水をガラスフィルター（GFB、孔径 1 μm、Millipore 社）で濾過し、硝酸分解した後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置（X7CCT、Thermo Fisher Scientific）を用いて 20 種類の重金属（V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Mo、Rh、Ag、Cd、In、Sn、Sb、Te、Pb、Bi）の定量を行った。

3. 3.　結果と考察

3. 3. 1　使用した処理水の水質の特徴

表-3　各処理水の一般水質項目　　＊ND：未測定

回数(採水日時)	天気	水温(℃)	pH	DO (mg/L)	濁度(度)	SS mg/L	CODcr mg/L	T-N mg/L	T-P mg/L	NH_4^+ mg/L	NO_2^- mg/L	NO_3^- mg/L	PO_4^{3-} mg/L
①(190807)	晴	27.6	6.62	1 25	1.38	1.9	16	5.1	0.28	0.00	0.00	24.50	0 08
②(190814)	曇	28.0	6 89	1 24	1.29	1.9	9	6.8	0.6	0.00	0.00	30.21	0.12
③(190821)	晴	28.0	6.60	1 52	1.34	1.2	22	6.4	0.5	0.00	0.00	25.10	0.10
④(190828)	曇	27.7	6.61	1.41	1.26	0.75	7	6.1	1.3	0.00	0.95	23.32	0.79
⑤(190904)	曇	27.9	6.65	1.24	1.16	0.85	16	5.8	0.40	0.00	0.00	23.53	0 54
⑥(190911)	曇	27.0	6.61	0.48	1.16	0.45	12	4.3	0.4	0.00	0.00	17.38	0 53
⑦(190918)	晴	27.4	6 54	1.06	1.10	0.45	14	4.5	0.3	0.00	0.00	18.73	0.45
⑧(190925)	晴	27.2	6.65	2.06	1.50	1	10	7.6	0.3	0.00	0.00	25.92	0 00
⑨(191002)	晴	27.2	6 52	1.90	1.26	2.4	14	7.2	0.23	0.00	0.00	30.24	0 00
⑩(191009)	晴	26.6	6 53	1.56	1.27	3.5	15	7.2	ND	0.00	0.00	30.05	2 57

表-4　各処理水の重金属濃度

回数（採水日時）	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Rh	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	Pb	Bi
①(190807)	1.72	0.33	33.56	68.62	0.16	1.68	1.75	29.52	0.15	0.40	2.14	1.59	0.68	0.82	1.18	1.41	1.25	0.75	0.20	1.73
②(190814)	2.18	0.48	29.32	75.02	0.14	1.31	2.42	35.14	0.15	0.40	2.12	1.62	0.67	0.83	1.17	1.29	1.25	0.72	0.36	1.76
③(190821)	2.11	0.34	37.58	54.82	0.15	1.47	1.32	44.46	0.15	0.40	1.86	1.58	0.67	0.82	1.17	1.19	1.23	0.71	0.74	1.73
④(190828)	2.54	0.41	45.10	65.52	0.23	2.03	1.96	46.52	0.15	0.40	1.85	1.53	0.67	0.83	1.17	1.18	1.21	0.71	0.38	1.70
⑤(190904)	2.62	0.41	38.36	61.92	0.16	1.55	2.04	60.36	0.15	0.40	1.87	1.50	0.71	0.83	1.17	1.13	1.19	0.71	0.10	1.68
⑥(190911)	2.64	0.46	40.18	47.26	0.18	1.48	1.77	51.60	0.15	0.40	2.02	1.48	0.67	0.82	1.17	1.13	1.23	0.71	0.20	1.67
⑦(190918)	2.35	0.35	36.26	33.66	0.16	1.74	2.56	49.58	0.15	0.40	1.78	1.46	0.70	0.82	1.17	1.10	1.20	0.67	0.27	1.65
⑧(190925)	2.31	0.33	29.56	58.32	0.14	2.10	3.11	64.54	0.15	0.40	1.80	1.44	0.70	0.84	1.17	1.13	1.20	0.70	0.41	1.63
⑨(191002)	2.56	0.45	11.26	66.78	0.06	1.62	2.40	51.80	0.15	0.40	1.75	1.41	0.68	0.82	1.17	1.13	1.20	0.68	1.71	1.61
⑩(191009)	2.73	0.40	14.23	58.66	0.14	1.30	1.76	43.58	0.15	0.40	1.92	1.40	0.69	0.82	1.17	1.20	1.22	0.69	0.60	1.60
平均値	2.38	0.40	31.54	59.06	0.15	1.63	2.11	47.71	0.15	0.40	1.91	1.50	0.68	0.82	1.17	1.19	1.22	0.70	0.50	1.67
標準偏差	0.31	0.06	10.99	11.83	0.04	0.27	0.52	10.52	0.00	0.00	0.14	0.08	0.01	0.01	0.00	0.09	0.02	0.02	0.47	0.05
変動係数	0.13	0.14	0.35	0.20	0.28	0.17	0.24	0.22	0.00	0.00	0.07	0.05	0.02	0.01	0.00	0.08	0.02	0.03	0.94	0.03

単位 (μg/L)

採取回数 1～10 回目の処理水に対して、一般水質項目を検討した（表-3）。その結果サンプル間で、水温、pH、DO、濁度、SS 、CODcr 、T-N、T-P、NO_4^+、NO_2^-、NO_3^-、PO_4^{3-}における大きな差は見られなかった。

各処理水の重金属濃度を表-4 に示す。Mn、Fe、Zn はそれぞれ平均 31.5、59.1、47.7 μg/L と比較的高い値が検出されたが、他の重金属は 2.38 μg/L 以下と低い値を示した。Mn 濃度は採取回数 9、10 回目で平均値の半分以下に減少したが、他の重金属は採取回数 1～10 回目にかけて、濃度の大きな変動は見られなかった。A 処理場は家庭排水が多く流入する処理場であり、採取時に雨天時がなかったことから、比較的一定した水質のサンプルが採取されたと考えられる。

3. 3. 2　ムレミカヅキモの培養と細胞形態の検討

継代培養を繰り返したムレミカヅキモの増殖速度は、10 回の培養でも処理水濃度 0%、5%、80%の間で大きな差は見られなかった。各処理水濃度に対する培養

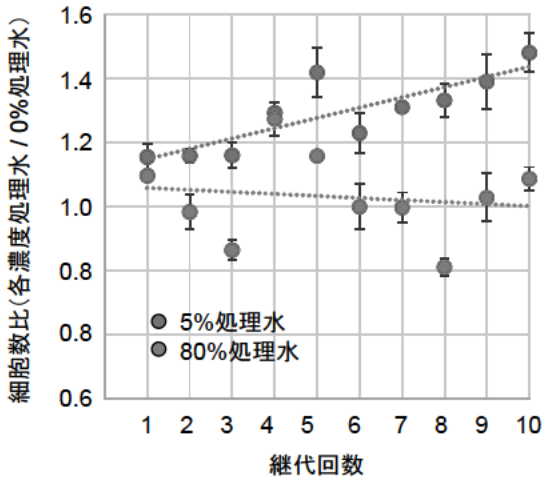


図-8　各処理水濃度における継代回数と細胞数の関係

培養 7 日後の細胞数を示す。

7 日目の細胞数と継代回数の関係を図-8 に示す。処理水濃度 5%では培養を繰り返すことで培養 7 日目の細胞数が増加し、10 回目の継代培養では 0%に比べて約 1.5 倍の増加が確認された。一方、80%処理水を含む培地では培養を繰り返しても細胞数に大きな変動は見られなかった。これらの結果から、5%処理水を継続的に添加することで、藻類の増殖が促進されることが推察される。

次に継代回数と各処理水濃度における細胞の大きさの検討を行った。図-9 に 8 回目の継代培養後の細胞面積の分布と処理水濃度の関係を示す。各処理水濃度における細胞の大きさを比較した場合、5%処理水では継代培養を 8 回繰り返しても、ムレミカヅキモの細胞の大きさは、0%とほとんど変わらなかった（平均面積 23.5 μm^2、0%の 1.2 倍）。一方、80%処理水では培養回数 6 回目から細胞の肥大が確認され、培養 8 回目では細胞面積は 40.0 μm^2 となり、0%と比べて 2.1 倍を示した。また核を観察した結果、80%処理水では細胞内に核を 8 個以上含む異常形態が多く確認された。これらの結果は、80%処理水で継代を繰り返すことにより、ムレミカヅキモの分裂が阻害されることを示唆している。ムレミカヅキモは重金属の存在下で増殖に影響を受けることが報告されている。Machado と Soares は、Zn（≧0.6 μM、39.2 μg/L に相当）の存在下でムレミカヅキモを 72 時間培養すると、細胞の増殖が阻害され、体積が増加することを報告している[7]。A 処理場の処理水には、Zn が平均 47.7 μg/L 含まれており（表-3）、80%濃度では約 38.2 μg/L 含まれる計算になる。本実験において、80%処理水で継代培養することでムレミカヅキモの細胞が肥大した結果は、処理水中に含まれる Zn が一つの要因であることが推察される。一方、Fe と Mn の EC_{50}（72 時間）はそれぞれ 3.28-4.95

mg/L、5-8.3 mg/L と報告されている[8]。今回の処理水

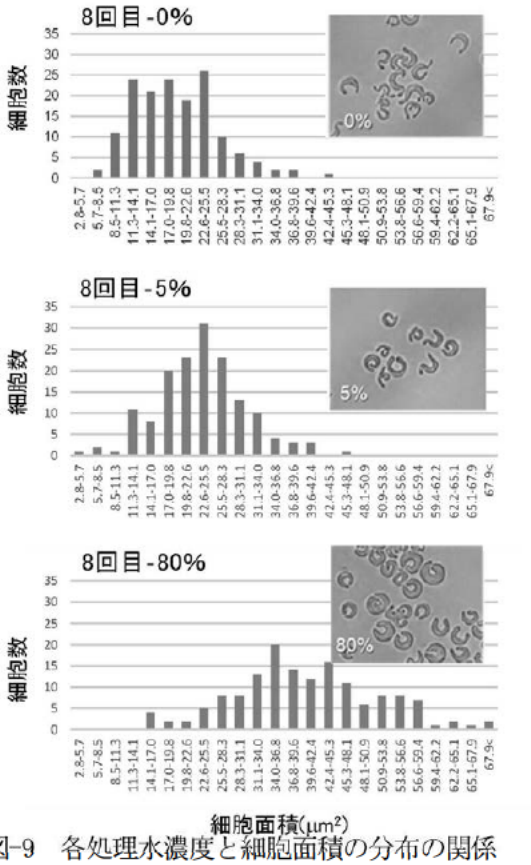


図-9　各処理水濃度と細胞面積の分布の関係
培養 7 日後の細胞面積を示す。各排水濃度において 150 細胞以上の細胞を検討した。

に含まれる平均濃度（Fe: 59.06±11.83 μg/L、Mn: 31.54±10.99 μg/L）から考えると、Fe と Mn により細胞の増殖に影響が生じる可能性は小さいことが推察される。

4. まとめ

本研究では、下水二次処理水に残存する NH_4-N について担体を用いた低減対策を検討した。本研究で用いた 2 種の担体については、担体流動性確保の観点からより比重の小さい PP 製担体が望ましく、担体充填率は嵩比率 35%程度で十分に NH_4-N を除去できる結果となった。実験装置のスケールアップ及び NH_4-N センサーを使用した担体処理実験において、処理槽全体の HRT を 180 分に設定することで、流入 NH_4-N 濃度が 20 mg-N/L を超える場合においても、処理槽末端の NH_4-N 濃度を 2 mg-N/L 以下に低減できることを確認した。一方、雨天時など流入 NH_4-N 低負荷時において、硝化のための曝気を抑制しても、担体流動性確保のための曝気が必要であるため、NH_4-N 処理の観点からは、過剰な曝気量となることを確認した。今後、この課題を解決するために、流動性を確保する必要のない固定床担体の NH_4-N 処理性能を本研究で使用した担体と比較する予定である。

また本研究ではムレミカヅキモを用いた処理水の慢性影響評価を検討した。その結果、5%処理水を継続的に添加することで、藻類の増殖が促進されることを明らかにし、処理水のプラスの影響を確認した。一方、処理水が十分希釈されない場合、藻類への慢性的な影響がある可能性が示唆された。これまでは 1 種の藻類を用いて影響評価を行ってきたが、R2 以降は、5～10 種の付着藻類を用いて種の感受性分布（SSD）評価を行い、生物多様性面から処理水の安全評価を行う予定である。

謝辞

本研究の一部は 2018 年度（公財）クリタ水・環境科学振興財団の国内研究助成により実施した。

参考文献

1) 小川他、下水処理工程における化学物質等の除去特性及び生物影響に係る検討業務、平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、2018

2) 武田茂、水の消毒に用いる塩素の水環境への排出実態と生態系への影響、防菌防黴、32、pp. 515-522、2004

3) 日本下水道協会、下水道試験法上巻、pp. 251-252、2012

4) 岡本他、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、平成 30 年度 研究開発プログラム報告書、2019

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

6) Ichimura, T. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium, University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 208-214, 1971

7) Machado M.D., Soares E.V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. Aquat Toxicol, 147, pp. 1-6, 2014

8) 大曲遼他、緑藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）の遅延発光による重金属類の毒性評価、環境と安全、8、pp. 141-148、2017

下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究

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

【要旨】
本研究では、夾雑物の多い下水試料に対するマイクロプラスチックの測定手法の高度化に関する研究において、既に構築してきた蛍光染色観察法の試料前処理を改良することを目的に、計測対象を損なわずに夾雑物を効果的に除去する手順を検討し、フェントン反応（30%H_2O_2+$FeCl_2$ または+$FeSO_4$）後に HCl で洗浄する手法を構築した。また、紫外線照射されたナイロン 6 粒子（Ny6）がムレミカヅキモに及ぼす影響に関する研究では、Ny6 を UVC 照射することで、ムレミカヅキモへの吸着力が減少し、それにより増殖阻害が減少することを明らかにした。
キーワード：マイクロプラスチック、測定前処理、フェントン反応、ナイロン 6 粒子、紫外線、ムレミカヅキモ

1. はじめに

近年、ナノテクノロジーの進歩により、炭素粒子や金・銀、チタン等の金属粒子の特性を利用したナノ粒子工業品が年間数%の生産量の伸び率で増加し、下水道を経由する等により、水環境中へ放出され得ることが懸念されている。また、プラスチック製品が劣化し細かくなったものや洗顔料などに使用されるマイクロビーズなどのマイクロプラスチックも、水生生物の成長等に影響を及ぼす等の研究結果が報告されている。G7(2016 年 5 月富山)環境大臣会合では海洋ゴミ（マイクロプラスチック）について、「陸域を発生源とする海洋ゴミの発生抑制と削減」「マイクロプラスチックの生態系への影響評価のための科学的な研究」などの施策の実施が約束された。

これらの物質の中にはラボ実験において高い毒性が確認されているものもあるが、様々な物質が共存する自然環境中における影響は明らかにされていない。特に、下水に含まれるナノ物質・マイクロプラスチックの挙動や影響については、研究手法すら確立されていない。下水道の技術開発に関する中長期的な計画・方向性を示す「下水道技術ビジョン」ロードマップに「環境中における微量汚染物質の測定技術の確立と影響評価」が示されており、学術的にも行政的にも研究開発が求められている。

本研究は、平成 29 年度から令和 3 年度までの計画で、下水に含まれるナノ物質やマイクロプラスチック（MPs）等の微小粒子の定性・定量方法を構築し、それらの下水や放流先での挙動、水生生物やヒト細胞に与える影響を確認することを目的とする。これまでに、ナノ物質については、サイズ分画を行った下水流入水および処理水に銀ナノ粒子を添加した培地でムレミカヅキモを用いた藻類増殖阻害試験を実施した結果、10 kDa より大きい画分では、銀ナノ粒子が下水中に含まれる溶存化合物と共存することで、銀ナノ粒子の持つ毒性が軽減される傾向を確認し、下水中には相殺効果を引き起こす化学物質が存在していたと考察された。また、MPs については、Nile Red 試薬を用いた蛍光染色観察法を構築し、同手法を用いて下水処理場における通日調査を実施した。その結果、流入時に存在していた繊維状 MPs は最初沈殿池流入までに（主に沈砂池で）70.35%、最初沈殿池流出までに 98.20%が除去されていることを確認するなど、下水処理過程における調査データが蓄積された。また、MPs の安全性評価として、大きさや種類の異なる 7 種の MPs を用いて、藻類のモデル生物であるムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した。その結果、ブロック状と比較して粒子状の MPs の影響が大きいこと、また、粒子状の MPs では特にナイロン 6 粒子（Ny6）がムレミカヅキモの増殖に影響を与えることが明らかになった。令和元年度は、MPs について、夾雑物の多い下水試料に対する測定前手法の高度化を図るとともに、水生生物への安全性評価として、より環境中での挙動を考慮した試験を実施することを試みた。

2. 下水試料中のマイクロプラスチック検出における効果的な前処理手法の検討

2.1 背景と目的

人間活動由来の MPs に関する水環境中からの検出事例は近年増加しつつあるが、下水処理場における知見についてはさらなる蓄積が求められている [1]。特に都市域では、下水道を経由して水環境へ到達する MPs について、その重要性や環境負荷全体に占める割合等の把握が必要である。我々は MPs の一種である繊維状 MPs について、Nile Red 試薬を用いた蛍光染色観察法を構築し、下水処理場の調査データの取得に取り組んできた [2]。一方で、これまで採用してきた試料前処理手法は、既報での適用例の多い過酸化水素（H_2O_2）による湿式過酸化法を基本としており、有機成分の多い下水に対しては検出の妨害となる夾雑物の除去手法として改善の余地があった。下水汚泥を H_2O_2 で前処理した際の処理温度と懸濁物質（SS）重量残存率の関係を図-1 に示す。23℃、40℃、60℃、80℃の条件で残存率が各々57.4%、46.1%、45.4%、29.2%であり、高温にすることで残存率が低下する傾向が分かるが、完全除去には至らず、また、高温になるとプラスチックの変形や消失の恐れがあるため正確な計測には向かない。そこで本研究では、目的 MPs（特に繊維状 MPs）を損なわずに夾雑物を効果的に除去できる手順を検討した。

2.2 実験の方法

難分解性有機物の処理に有効な技術の一つにフェントン反応がある [3]。単独では酸化力が弱い H_2O_2 に対し、二価鉄化合物を H_2O_2 に混合したフェントン試薬では、式 1 の通り、ヒドロキシルラジカルが発生し、強力な酸化力を発揮する。本研究では、このフェントン反応を用いて、下水試料中の夾雑物除去の効果を検討した。検討した手順を表-1 に示す。

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot} \qquad 式 1$$

実験手順は既報 [4]を一部改良し、以下の通り操作した。流入下水試料を 500 mL 取り、ポリカーボネート製ろ紙（孔径 10μm、Φ47mm、Merck）でろ過をした。残渣に対し、試薬の添加や反応操作をせずにそのまま染色作業に供したものを系 A とし、30%H_2O_2、30% H_2O_2+$FeCl_2$、30%H_2O_2+$FeSO_4$ の 3 種の異なる添加試薬を加える系を各々系 B、系 C、系 D とした。30%H_2O_2（精密分析用、富士フィルム和光純薬）の添加量は 10 mL とし、系 C と系 D ではそれぞれ 0.5M に調整した

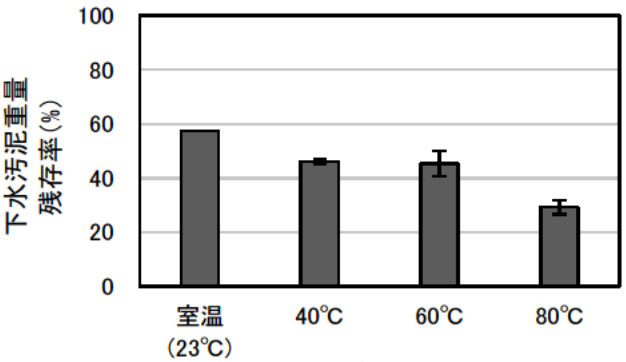


図-1 下水汚泥の H_2O_2 前処理における処理温度と汚泥重量残存率

表-1 検討した下水試料（500mL）の前処理手順

系	ろ過	添加試薬	温度（℃）	反応回数	追加処理
A	ポリカーボネート製ろ紙（孔径10μm, Φ47mm）	–	–	–	なし
B		30%H_2O_2	60℃	2回	
C		30%H_2O_2+$FeCl_2$			
D		30%H_2O_2+$FeSO_4$			
E		30%H_2O_2+$FeCl_2$			2N HCl で洗浄
F		30%H_2O_2+$FeSO_4$			

$FeCl_2$ 水溶液（特級、富士フィルム和光純薬）と $FeSO_4$ 水溶液（特級、富士フィルム和光純薬）を 100 μL 添加した。反応は 60℃で行い、1 時間経過時点の残留溶液はろ過し、残渣に再度同じ試薬を添加して 60℃で 1 時間反応させた。最後に、残留溶液をろ過し、*Milli-Q* 水で洗浄、ろ過した残渣を染色操作前試料とした。また、系 E と系 F では、系 C と系 D と同様に反応操作した後に、2 M の HCl を 5 mL 添加して、反応沈殿物の除去を試行した。夾雑物除去効果は、式 2 に示す反応・後処理の前後の SS 重量減少率（%）で評価した。

$$Rss = (M_{SS(\beta)} - M_{SS(\alpha)}) / (M_{SS(\beta)}) \times 100 \qquad 式 2$$

ここで Rss = SS 重量減少率（%）、

$M_{SS(\alpha)}$=処理後の SS 重量（mg）、

$M_{SS(\beta)}$= 処理前の SS 重量（mg）

染色操作では調製済みの Nile Red 溶液（1 mg/mL アセトン溶液（Merck）100 μL + エタノール 9.9 mL（100 倍希釈））を試料に 4 mL 添加し 70℃で 90 分反応させ、エタノールの蒸発を確認し、観察に供した。加熱による染色性の向上、エタノールの残留防止による視認性向上を事前に確認している。観察には実体顕微鏡（Leica）に蛍光ユニット（BioTools）を組み合わせた装置を使用し、落射蛍光条件下で短軸径 100 μm 以下を目安に確認された繊維状物質を計測した。落射蛍光条件下でポリエチレンテレフタラート、ナイロン等が

赤、ポリスチレン等が黄、ポリエチレン、ポリプロピレン等が緑色に発光してみえることは既報 [2]に示した通りである。また、ナイロン 6,6 糸とポリエステル糸の標準品を対象に、前処理の前後で実体顕微鏡を用いた観察と FTIR（日本分光）を用いた分析を行うことにより、前処理による物性変化の有無を確認した。

2.3 結果および考察

2.3.1 各前処理手順における夾雑物の除去率

流入下水試料に対する前処理手順別の SS 重量減少率を図-2 に示す。H_2O_2 のみで処理した系 B では SS 重量減少率は 79.8%であり、H_2O_2+$FeCl_2$（系 D）と H_2O_2+$FeSO_4$（系 F）のフェントン反応の系では、それぞれ 64.3%と 63.8%の減少率であり、H_2O_2 のみの系と比較して減少率が悪化する結果であった。

系 A（添加試薬なし）、系 D、系 F の前処理後の試料の写真を図-3 に示す。湿式過酸化法、フェントン反応に供していない系 A では下水試料由来の黒褐色の SS 成分がろ紙上で層状に残渣となって存在したのに対し、フェントン反応に供した系 D では、系 A と比べ SS 成分の厚みは薄いものの、元の黒褐色とは異なり茶褐色の残渣が存在していた。これは、鉄イオンと試料中の成分とが反応して酸化鉄塩がろ紙上で生成したためであると推察され、このために試料中の有機成分の重量の減少率が過小評価されたと考えられた。

上述の結果を受け、反応後の試料に HCl を添加することで酸性条件とし、酸化鉄塩を再溶解させた後、残った溶液をろ過して排除した（系 E および系 F）。その結果、SS 重量除去率が系 E（H_2O_2+$FeCl_2$）では 96.7%、系 F（H_2O_2+$FeSO_4$）では 97.0%となり、顕著に上昇した。$FeCl_2$ か $FeSO_4$ かに関わらず、フェントン反応後に HCl で洗浄する手法が有効であることが見出された。

洗濯排水から下水道に流入する繊維状物質には、人工のプラスチック繊維だけではなく、自然由来の木綿繊維も多く含まれていると考えられる。木綿を下水試料と同様に前処理した際の写真を図-4 に示す。フェントン反応（H_2O_2+$FeSO_4$）のみで処理した場合には、下水試料と同様に茶褐色塩の沈殿がみられたが、HCl による洗浄を経ると残留物は目視では確認されなかった（SS 重量除去率 99.8%）。木綿が前処理で除去されない場合、Nile red 染色後の落射蛍光観察では赤色に発光してみえるために誤計測につながるが、酸洗浄を行うフェントン反応処理では、前処理後の木綿から赤発光繊維は確認されなかった。

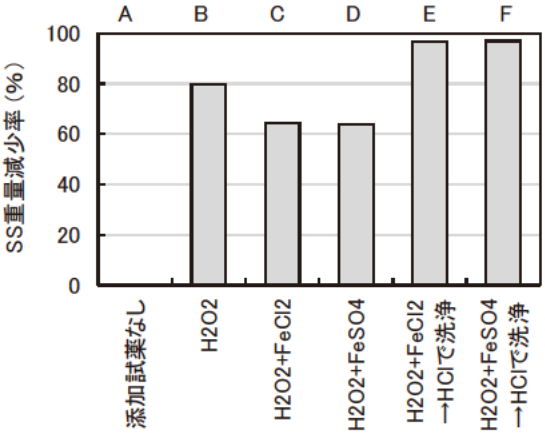


図-2 流入下水試料の前処理手順別の SS 重量減少率

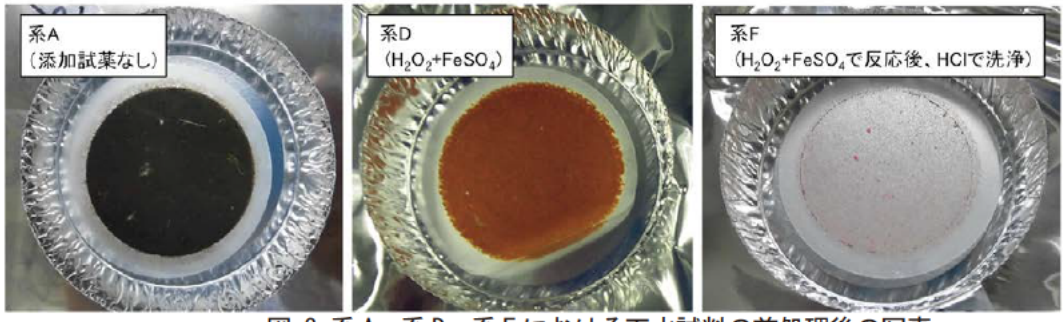


図-3 系 A、系 D、系 F における下水試料の前処理後の写真

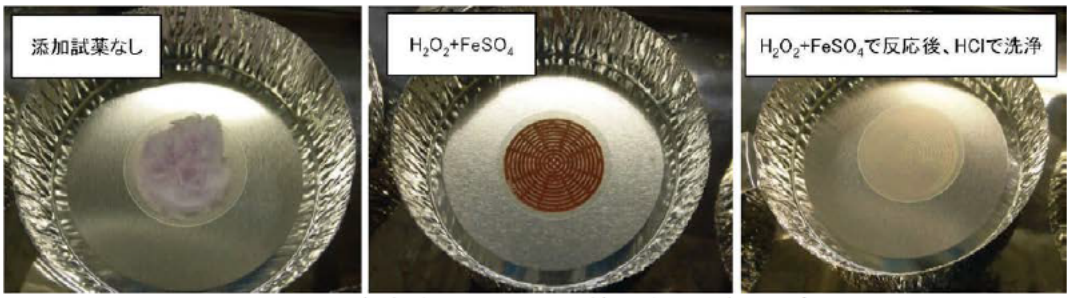


図-4 各実験系における木綿の前処理後の写真

2.3.2　各前処理手順における繊維状物質の計測数

各前処理手順における流入下水中の各色発光繊維状物質数を図-5 に示す。分解反応を行わなかった系 A で計測されたのは赤発光繊維 14 本/L であり、6 つの前処理で最少であった。続いて、H_2O_2+$FeCl_2$ 処理（系 C）で合計 18 本/L、H_2O_2+$FeSO_4$ 処理（系 D）で合計 20 本/L であった。これらで計測数が少なかった原因として、繊維が残留夾雑物や発生した酸化鉄塩に埋没する等により見落としがあった可能性が考えられた。一方で、SS 重量除去率が高かった系 E（H_2O_2+$FeCl_2$）と系 F（H_2O_2+$FeSO_4$）では、各々合計計測数が 70 本/L と 84 本/L であった。また、H_2O_2 処理のみでは合計計測数が 90 本/L であり、6 つの前処理で最多であった。

以上の結果からフェントン反応（＋酸洗浄）の有無にかかわらず、H_2O_2 処理を行った場合に計測数が多くなる傾向が示されたが、実際の観察・計測において両者は作業効率が異なっていた。二つの前処理後の下水試料の観察像（明視野観察および落射蛍光観察）を図-6 に示す。2.3.1 項でも示したように SS 重量の除去率は H_2O_2 処理のみの系 B では 79.8%であり、フェントン反応＋酸洗浄の系 F の 97.0%よりも低く、繊維状物質の確認・計測作業は、系 B の試料では系 F の試料と比べて容易ではなかった。さらに系 B では、系 F ではみられない繊維状物質の塊のようなものが観察された。

H_2O_2 処理を適用して実施した既報の下水処理場調査結果 [4]を振り返ると、流入下水から計測された合計発色繊維数の平均値は 217 本/L であり、今回の実験（流入下水）で検出された繊維状物質数よりやや多いが同オーダーであった。今回の実験結果では、H_2O_2 処理のみの系 B と、フェントン反応後に HCl で洗浄する系 E、系 F とを比較して計測数に顕著な差がなかったことを含めて考察すると、既報調査の計測数が適切に評価できていないとは断定できないものの、実際に検出し計測された繊維には一定程度の見落としと誤計測が含まれていた可能性が示唆された。

2.3.3　構築した前処理手法の検証

標準プラスチックにフェントン反応＋酸洗浄の操作をする前後の実体顕微鏡観察と FTIR 測定結果を図-7 に示す。下水からの検出数が比較的多いと考えられるナイロン 6,6 糸とポリエステル糸の両者において、顕微鏡観察時における操作前後の顕著な変化はみられなかった。また、IR スペクトルもほぼ一致し、データ解析後に同じプラスチック材質であると同定された。

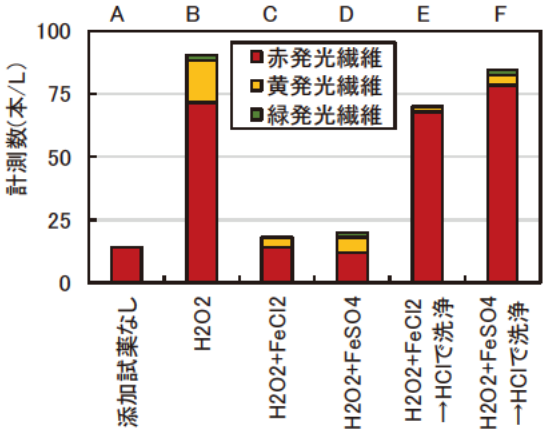


図-5 前処理手順別の落射蛍光観察による各色発光繊維状物質の計測数

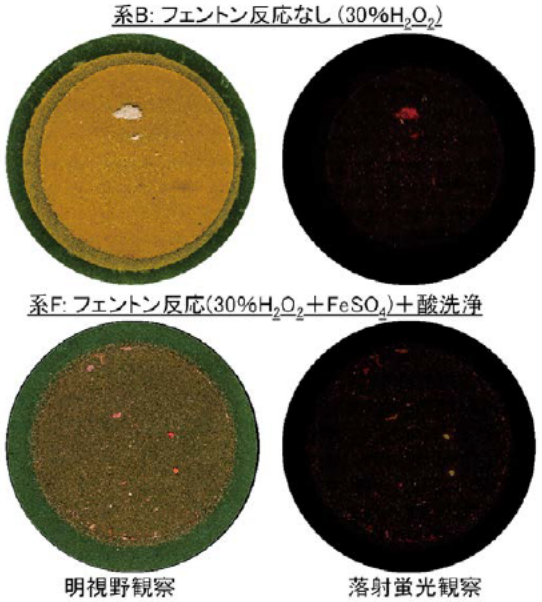


図-6　異なる前処理を施した下水試料の観察像の比較

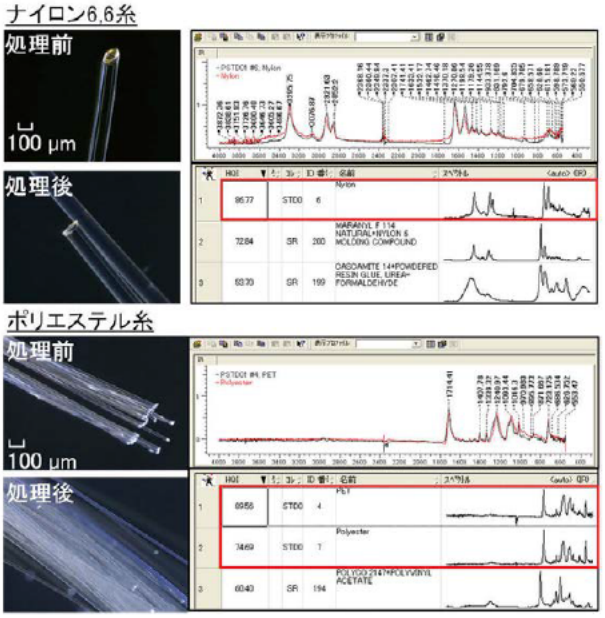


図-7 フェントン反応＋酸洗浄による物性変化の確認

2.3.4 構築した前処理フロー

本研究で構築した下水試料の前処理フローを図-8に示す。フェントン反応後に、HCl による洗浄操作を適用することで、高い夾雑物除去効果が期待できる。上述の操作でも依然として残留物がみられる場合には、さらなる有機成分の分解・除去は容易ではないが、従来の MPs 分析でよく用いられている比重分離法では比重差のある無機成分等の分離が期待できるため、併用するとよい。以上、本フローにより、Nile red を用いた蛍光染色観察法に適した観察前試料を準備できることが示された。

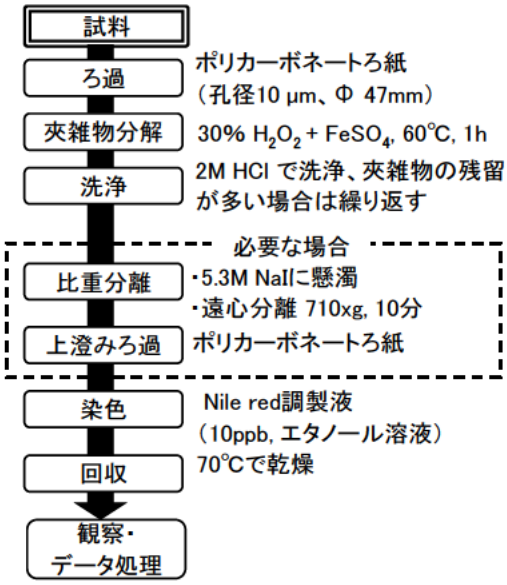


図-8 構築した下水試料の前処理フロー

3. 紫外線照射されたナイロン6粒子がムレミカヅキモに及ぼす影響に関する研究

3.1 背景と目的

現在マイクロプラスチック（MPs）が環境中の生物に及ぼす影響が懸念されており、種々の生物に対する影響の解明が待たれている。これまで我々の研究では、7 種の MPs（ポリスチレン、低密度ポリエチレン、超高密度ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、Ny6、ナイロン 12（Ny12）、ポリプロピレン）がムレミカヅキモに与える影響について検討した結果、①Ny6 と Ny12 でムレミカヅキモに対する増殖阻害が確認され、②その中でも Ny6 の増殖阻害が特に強いこと、③その要因の 1 つとして、Ny6 が試料中でプラスに帯電し、マイナスに帯電したムレミカヅキモに吸着することで増殖を阻害していることを明らかにした[5]。一方、環境中に放出された MPs は紫外線（UV）等の自然劣化を受けるため、純正品の MPs の影響とは異なることが推察される。そこで、本年度は UV 照射された Ny6 を用いて、ムレミカヅキモに与える影響を検討した。

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 UVC 照射した Ny6 粒子の作製

Ny6（粒子状、平均直径：15–20 μm、Goodfellow 社製）を滅菌した *Milli-Q* 水（3.3 g/L）に添加し、スターラーで完全混合した状態で低圧紫外線ランプ（エイコー電気株式会社）を用いて UVC（254 nm）を照射した。つくば市の年平均 UVB（280–315 nm）照射量を UVC に換算し、約 47 日分と想定される UVC（84.9 J/cm^2）量を Ny6 に照射した。照射後 Ny6 を回収し、風乾させた粒子を Ny6＋UVC として実験に用いた。また UVC 照射を行わず *Milli-Q* 水のみで調整した Ny6 をネガティブコントロール（Ny6＋*Milli-Q* 水）として用いた。処理後の Ny6 粒子は走査型電子顕微鏡（JSM-6301F、JEOL）を用いて観察を行った。

3.2.2 UVC 照射した Ny6 を用いたムレミカヅキモの吸着試験

試験には国立研究開発法人国立環境研究所から分譲されたムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella. subcapitata*; NIES-35 株）を用いた。吸着実験は C 培地[6]で培養したムレミカヅキモの細胞懸濁液（1×10^6 cells/mL）に Ny6、Ny6＋*Milli-Q* 水、Ny6＋UVC をそれぞれ 750 mg/L 添加後、25℃、100 rpm で振とうした。上清中の細胞数はセルカウンター（CDA-1000B、シスメックス株式会社)を用いて経時的に測定した。処理から 6 時間後、沈殿部の粒子を光学顕微鏡（BX51、Olympus）を用いて観察した。試験は 24 時間、3 連で行った。

3.2.3 UVC 照射した Ny6 を用いたムレミカヅキモの増殖阻害試験

AAP 培地[7]に Ny6（50 mg/L）、Ny6＋*Milli-Q* 水（50、250、750 mg/L）、Ny6＋UVC（50、250、750 mg/L）をそれぞれ添加後、前培養したムレミカヅキモを（1×10^4 cells/mL）添加し、25℃、3,000 Lux、100 rpm の条件下で、72 時間振とう培養を行った。培養後、培養液からクロロフィル-a（Chl-a）を抽出し、ムレミカヅキモの増殖を測定した。試験は 3 連で行った。

3．3．　結果と考察

3．3．1　UVC 照射後の Ny6 粒子の顕微鏡観察

Ny6＋UVC 粒子の表面を走査電子顕微鏡観察した結果、UVC 照射により表面に亀裂が生じ、内部に空隙が観察された（図-9、矢印）。一方 FT-IR の波形は UVC 照射前後で変化は見られなかった（データには示していない）。これらの結果から、UVC を照射することで、Ny6 粒子の表面が劣化することが考えられた。

3．3．2　UVC 照射後の Ny6 を用いたムレミカヅキモの吸着試験と増殖阻害試験

Ny6 粒子を用いてムレミカヅキモの増殖阻害実験を行った場合、Ny6 と Ny6＋*Milli-Q* 水では、50mg/L 濃度でムレミカヅキモの増殖は 4.6%まで阻害された。一方、Ny6+UVC では 750 mg/L の添加でもコントロールと Chl-a 量は変わらず、ムレミカヅキモの増殖阻害は観察されなかった（図-10）。これらの結果は、Ny6 のムレミカヅキモに対する増殖阻害は UVC 照射により、減少することが推察される。

次に Ny6 粒子に対するムレミカヅキモの吸着実験を行った。振とう 6 時間後、Ny6 が添加されたフラスコでは、Ny6 粒子にムレミカヅキモが吸着し、フラスコ底部に緑色の沈殿が確認された(図-11-b、c)。一方 Ny6+UVC では緑色の沈殿は確認されず、Ny6 粒子に対するムレミカヅキモの吸着は確認されなかった(図-11-b)。振とう 24 時間後の上清中の細胞数は、Ny6 ではコントロールに比べて 7.3％まで減少したが、Ny6+UVC では 75.6%の細胞が検出された(図-11-a)。Ny6＋*Milli-Q* 水では Ny6 と同様な傾向が見られたことから、UVC 照射によりナイロンが劣化することでムレミカヅキモへの吸着力が低下することが推察された。

4．まとめ

本研究では、マイクロプラスチック（MPs）について、夾雑物の多い下水試料に対する測定前処理手法の高度化を図るとともに、水生生物への安全性評価として、より環境中での挙動を考慮した試験を実施することを試みた。主な成果を以下に示す。

夾雑物の多い下水試料に対する測定手法の高度化に関する研究では、計測目的の MPs（特に繊維状 MPs）を損なわずに夾雑物を効果的に除去できる手順を検討し、

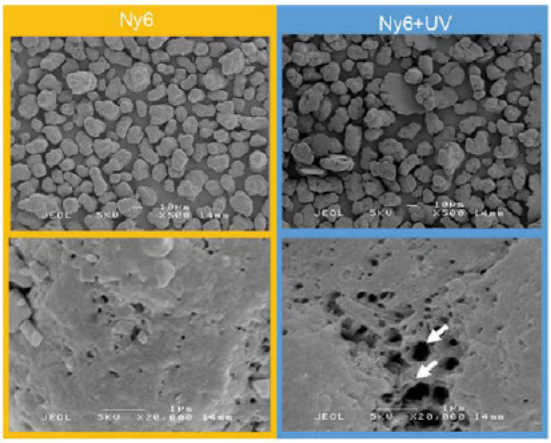


図-9　UVC 照射後の Ny6 の電子顕微鏡写真

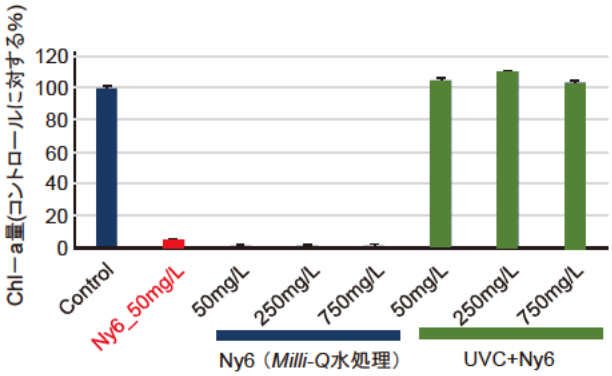


図-10　UVC 照射後の Ny6 を用いたムレミカヅキモの増殖阻害試験

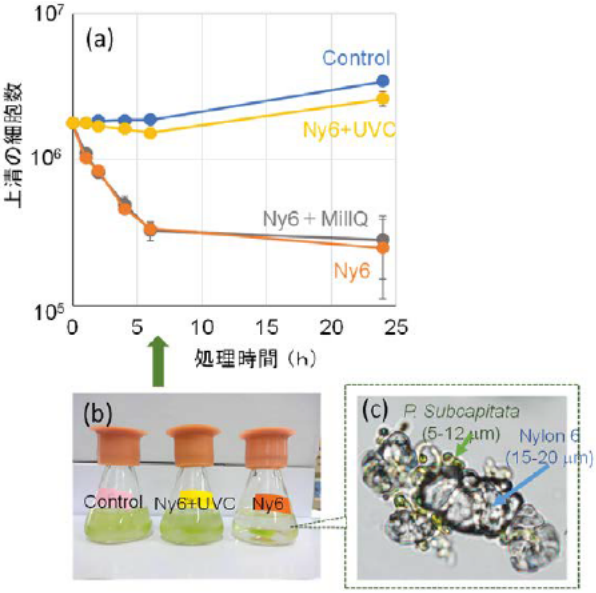


図-11　UVC 照射後の Ny6 を用いたムレミカヅキモの吸着試験

(a) 各 Ny6 粒子処理における培地上清中のムレミカヅキモの細胞数、(b) 培養 6 時間後のフラスコの写真、(c) Ny6 に吸着したムレミカヅキモの顕微鏡写真

1-1) フェントン反応（30%H_2O_2+$FeCl_2$ あるいは H_2O_2+$FeSO_4$）後に HCl で洗浄する手法が、夾雑物除去率の向上に有効であり、それにより、Nile red 試薬を用いた蛍光染色観察法による繊維状 MPs の計測作業が効率化するとともに、誤計測や見落としを低減できることが示唆された。

1-2) 実体顕微鏡観察と FTIR 分析により、本研究で構築したフェントン反応＋HCl 洗浄をプラスチック繊維に施しても材質や形状への変化はないことを確認した。

今後は、本研究で構築した前処理を含む蛍光染色観察法を用いて、下水処理水の放流先における MPs 調査を実施するとともに、下水道事業者の方々が本手法を簡易に活用できるよう、マニュアル化を進める。

紫外線照射されたナイロン 6 粒子がムレミカヅキモに及ぼす影響に関する研究では、

2-1) Ny6 を UVC 照射することで、ムレミカヅキモへの吸着力が減少し、それにより増殖阻害が減少することを明らかにした。

2-2) Ny6 粒子は水環境中に放出された直後は藻類を吸着するが、UV 照射により劣化するとそれ自体が浮遊し、藻類の吸着や増殖阻害を生じにくくなることが推察された。

本年度までは粒子状の MPs に対する藻類の影響を検討したが、今後は、繊維状 MPs に対する藻類の影響を検討する予定である。

参考文献

1) Rezania, S., Park, J., Din, M. F. M., Taib, S. M., Talaiekhozani, A., Yadav, K. K., & Kamyab, H. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine pollution bulletin*, **133**, pp.191-208, 2018

2) 鈴木裕識,山下洋正.：下水道におけるマイクロプラスチックの存在実態に関する研究動向と繊維状マイクロプラスチック簡易検出法の構築に向けた取組み (特集マイクロプラスチック汚染). *EICA: journal of EICA: 環境システム計測制御学会誌*, **24** (4), pp. 35-39, 2020

3) Fenton, H. J. H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*, Transactions, 65, pp. 899-910, 1894

4) 鈴木裕識, 阿部翔太, 村田里美, 北村友一, 對馬育夫, 田中周平, 小川 文章.: 蛍光染色/観察法を用いた繊維状マイクロプラスチックの下水処理場における存在実態調査, 第 53 回日本水環境学会年会講演集, **53**, p.9, 2019

5) 村田里美、鈴木裕識、小川文章、7 種マイクロプラスチックがムレミカヅキモの増殖に与える影響、第 21 回日本水環境学会シンポジウム、2018、pp. 226

6) Ichimura, T. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium, University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 208-214, 1971

7) OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS (OECD201), Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2006

小規模下水処理場における未規制化学物質の挙動と除去特性に関する研究

研究予算：運営費交付金
研究期間：平29～令元
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、鈴木裕識
小森行也、髙沢麻里

【要旨】
水生生物保全に係る要監視項目は、現時点において下水処理場放流水が規制を受けることはないが、将来の環境基準化・排水規制化の可能性を踏まえ、下水処理場での挙動及び除去特性把握が必要と考えられる。本年度は、平成30年度調査において流入下水から公共用水域での指針値を超える濃度で検出されたフェノールを対象として下水処理場における挙動調査を行った。標準活性汚泥法、嫌気好気ろ床法の下水処理場における挙動調査の結果、両処理方式とも生物反応槽で大きく除去されていることを確認した。また、標準活性汚泥法の活性汚泥を用いた室内実験によりフェノールは活性汚泥により容易に除去されることがわかった。
キーワード：水生生物保全、要監視項目、下水処理、挙動調査

1. はじめに

水生生物保全に係る要監視項目として、クロロホルム、フェノール、ホルムアルデヒド、4-t-オクチルフェノール、アニリン、2,4-ジクロロフェノールが設定されている。これら物質は、公共用水域における検出状況等からみて、現時点では直ちに環境基準項目とはせず、引き続き環境中の検出状況等に関する知見の集積に努めるべきとされているものである。現時点において、下水処理場放流水が規制を受けることはないが、将来の環境基準化、排水規制化への対応の一つとして下水処理場での挙動及び除去特性把握が必要と考える。我が国の下水処理場、特に小規模下水処理場では、これらを含む未規制化学物質等の挙動及び除去特性についてのデータが少ない。また、これらの要監視項目のうち幾つかの物質については、下水道での調査を実施する際に必要となる下水試料を対象とした分析方法が未確立である。

本研究は、下水試料を対象とした要監視項目の分析方法の開発と下水処理場における要監視項目の除去特性把握、挙動解明を目的としており、研究初年度の平成29年度は、下水試料を対象とした分析方法について検討し、下水に適した分析方法を提案した。研究2年目の平成30年度は、10ヶ所の下水処理場において要監視項目6物質の除去特性調査を実施し、クロロホルム、ホルムアルデヒド、4-t-オクチルフェノール、アニリン、2,4-ジクロロフェノールの5物質の流入下水の濃度は、公共用水域の各指針値を下回っていること、フェノールは流入下水から指針値を超える濃度で検出されたが下水処理により90%以上除去されて二次処理水では指針値を下回ることがわかった。研究最終年度の令和元年度は、平成30年度調査において流入下水から公共用水域での指針値を超える濃度で検出されたフェノールを対象として下水処理場における挙動調査を実施した。

2. 研究方法

2.1 標準活性汚泥法の下水処理場におけるフェノール挙動調査

平成30年度調査において流入下水から指針値を超える濃度で検出されたフェノールを対象とした。調査処理場は、平成30年度調査で調査対象とした標準活性汚泥法4ヶ所のうち、流入下水中のフェノールの濃度が最も高かった下水処理場で、2019年11月6日と2020年1月8日に行った。調査処理場の処理フローを図-1 に示す。両調査とも降雨の影響の少ない日に調査した。また、1月8日は反応槽内に限り水塊を追うことを想定して試料採取を実施した。この処理場の現有処理能力は約 140,000m^3/d、下水の排除方式は分流式一部合流式である。試料採取を行った系列は、分流区域の下水だけを処理する系列で汚泥処理工程からの返流水が流入している。この処理場では、他の処理場の汚泥を受け入れていることから、濃縮機・脱水機からの分離液に加え、圧送汚泥管の洗管水や当該処理場の床排水等が返流水に含まれている。処理方式は、標準活性汚泥法であるが、試料採取を行った系列は、バルキング対策等のため反応槽8槽のうち1槽目はエアレーションなし、2槽目は微曝気とし、疑似嫌気好気運転

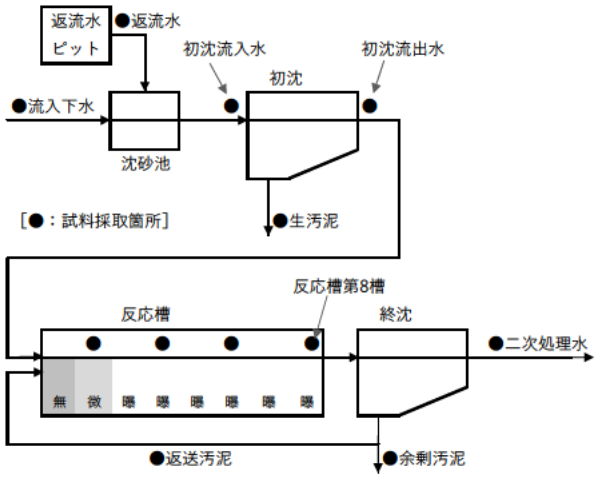


図-1 標準活性汚泥法（疑似嫌気好気運転）の処理フロー
（無：無曝気、微：微曝気、曝：曝気）

としていた。

11 月 6 日には、流入下水、汚泥処理からの返流水、最初沈殿池流入水（以下、初沈流入水とする）および流出水（以下、初沈流出水とする）、反応槽内活性汚泥混合液 4 か所（反応槽 8 槽のうち、流下する方向の順で第 2 槽・第 4 槽・第 6 槽・第 8 槽）、返送汚泥、最終沈殿池流出水（以下、二次処理水とする）を 13 時から 15 時（ただし、返流水だけは 10 時から 11 時）の間にスポット採取し、クーラーボックスに入れ氷で保冷し分析所に運搬した後、フェノール、SS、BOD 等を分析した。また、試料採取時に現場において水温、pH を測定した。

1 月 8 日には、水塊を追うことを想定して、初沈流出水、反応槽内活性汚泥混合液（4 か所）、返送汚泥を水塊の移動を流量と反応槽容量から算出される流下時間差で、9 時から 17 時に試料採取するとともに、この他の流入下水等の試料は 11 月 6 日と同様に 9 時から 11 時にスポット採取し、運搬・分析・現場測定も前回同様に実施した。

フェノールの分析は、平成 29 年度に提案した方法に準じる方法とした。活性汚泥や返流水などの SS 濃度が 500mg/L を超える試料は、そのままでは分析が困難であるため、遠心分離(3000 rpm, 20 分)したのち、自然ろ過（GF/B, φ12.5cm）操作を行った後に分析した。11 月 6 日の流入下水、初沈流入水、初沈流出水、二次処理水の試料は、これらの操作をせず分析した。また、これらの操作の有無による相違の確認のため、1 月 8 日の返流水と初沈汚泥は、ろ過等の操作を行わない試料も分析した。

他の項目（SS、BOD 等）については下水試験方法[1]により分析した。

2.2 嫌気好気ろ床法の下水処理場におけるフェノール挙動調査

調査処理場は、平成 30 年度調査で調査対象とした嫌気好気ろ床法 3 ヶ所のうち、流入下水中のフェノールの濃度が最も高かった下水処理場で、2019 年 9 月 25 日に行った。処理フローの概略を図-2 に示す。試料採取は、スクリーン前後の流入下水（流入下水①、流入下水②）、第一分配槽出口、第二分配槽出口、好気槽出口、逆洗水槽上層水の 6 試料とし、13 時 50 分～14 時 35 分の間にスポット採取した。採取試料はクーラーボックスに入れ氷で保冷し分析所に運搬した後、フェノール、SS、BOD 等を分析した。また、試料採取時に現場において水温、pH を測定した。フェノールの分析は、平成 29 年度に提案した方法に準じる方法とし、SS を含む全試料について行った。他の項目（SS、BOD 等）については下水試験方法[1]により分析した。

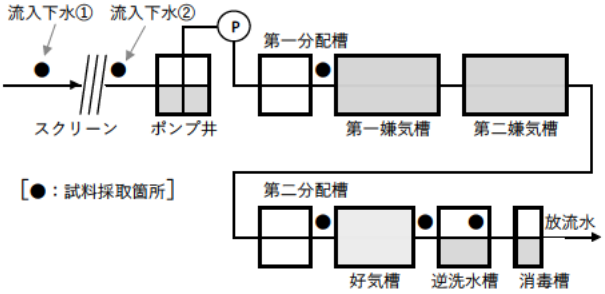


図-2 嫌気好気ろ床法の処理フロー

2.3 活性汚泥によるフェノール除去特性の回分実験

活性汚泥によるフェノール除去を確認するため、2.1 で調査した処理場の活性汚泥を用いた室内回分実験を行った（図-3、写真-1 参照）。

実験ケースは、5 リットルのガラスビンに蒸留水（5L）+フェノール 1,000μg/L のコントロール系と蒸留水（3L）+活性汚泥（約 2g/2L）+フェノール 1,000μg/L の実験系とした。フェノール供試濃度は後述する平成 30 年度調査で得られた流入下水濃度の最大値（88μg/L）の約 10 倍濃度に設定したものである。

無機塩類として BOD 希釈液に用いる A 液、B 液、C 液、D 液を 1L に対して 3mL 添加した。実験は、試験水の水温を約 25℃にした後、25℃の室温で行った。それぞれマグネチックスターラーで撹拌しながら小型エアーポンプにより空気曝気（0.3L/min）した。実験開始後 5 分、30 分、60 分、120 分、240 分、480 分に約 100mL 採取した。コントロール系はそのまま、実験系は、試料採取後直ちにガラス繊維ろ紙（GF/B）で吸引ろ過を行い、SS とろ液に分けそれぞれフェノール分析を行った。

フェノールの分析は、供試濃度が 1,000μg/L と高濃度で

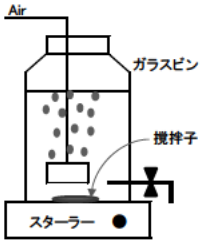


図-3　フェノール除去実験装置

写真-1　フェノール除去実験装置（実験系）

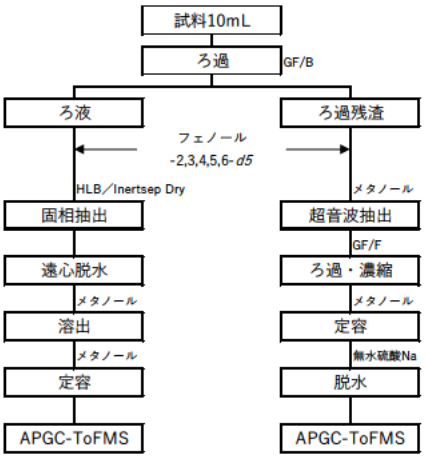


図-4　APGC-ToFMS によるフェノール分析フロー

表-1 フェノールにおける APGC-ToFMS 測定条件

GC部	
装置	Agilent 7890B
	DB-17MS (J&W)
カラム	30 m x 0.25 mm x 0 25 µm
昇温条件	40°C-(25°C/min)-280°C
注入方法	スプリット-スプリットレス
注入口温度	280°C
注入量	1 µL
キャリアガス	窒素
MS部	
装置	Xevo G2-XS QTof
イオン化法	大気圧イオン化
コロナ電圧	2.5 µA
インターフェイス温度	280°C
質量範囲	m/z 50-300
目的物質のm/z	フェノール：94.0419
	フェノール-d_5：99.0732

あることから平成 29 年度に提案した方法の誘導体化し GC/MS で測定する方法とせず、図-4 および表-1 に示す APGC-ToFMS を用いる方法とした。

3. 研究結果

3. 1 標準活性汚泥法の下水処理場におけるフェノール挙動調査結果

2019 年 11 月 6 日調査時の水温は 22.6～23.7℃、pH は 6.4～7.2、同様に 2020 年 1 月 8 日調査時は、18.2～19.2℃、6.8～7.7 であった。また、調査時の二次処理水の SS は両日ともに 2mg/L 以下、BOD は 5.6mg/L 以下であり良好な処理が行われていた。

フェノールの調査結果を図-5 に示す。11 月 6 日の流入下水、初沈流入水、初沈流出水、二次処理水以外は、ろ過等の操作を行った試料のものである。なお、1 月 8 日の返流水と初沈汚泥は、ろ過等の操作を行わない試料の分析結果と比べると、ろ過等の操作を行った試料ではフェノール濃度が 8～14%減少しており、ろ過等の影響が考えられた。また、サロゲート回収率は 93～108%であった。

流入下水のフェノール濃度は、両日の平均で 43 µg/L であり、公共用水域の指針値 10 µg/L を超える濃度であったが、下水処理により 99%以上除去されていた。二次処理水のフェノール濃度は、両日の平均で 0.041 µg/L であり、指針値の約 1/240 であった。また、11 月 6 日の初沈汚泥のフェノールの濃度は、210 µg/L であった。

流下方向の大きな変化としては、初沈流出水と返送汚泥が混合（比率は、ほぼ 3 : 2）した後の反応槽において、フェノール濃度が大きく低下しており、初沈流出水に比較して第 2 層の濃度レベルは 1/100 以下であった。また、反応槽内のフェノール濃度は、今回調査を実施した時間帯（11 月 6 日；13 時～15 時、1 月 8 日；9 時～17 時）に

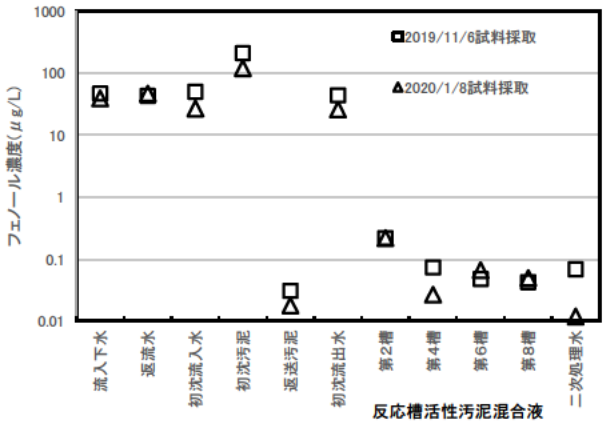


図-5　標準活性汚泥法（疑似嫌気好気運転）の下水処理場におけるフェノール挙動調査結果

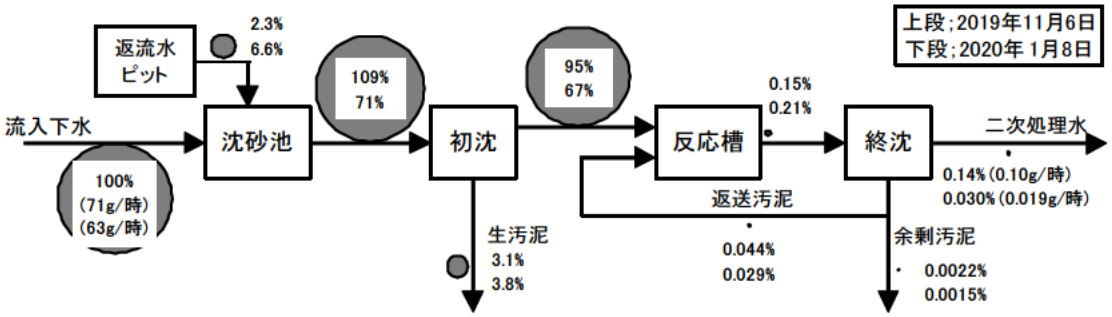


図-6　下水処理工程のフェノール負荷割合の変化
(流入下水中のフェノールを 100%として算出。○の大きさは両日の平均を基に作図)

おいては、両日間に大きな相違がなかった。また、返流水の濃度レベルは、流入下水とほぼ同じであった。

下水処理工程におけるフェノールの負荷量の変化を、流入下水中の量を基準にした割合として図-6 に示す。なお計算に用いた流量は、スポット採取を行った時間帯の 1 時間分とした。データも少なく誤差もあるが、概略としては流入した下水に返流水分が少々加わり、最初沈殿池汚泥として少々引き抜かれる工程を経るまでは少々減少し、割合としては大きな変化がなく見え、活性汚泥処理を経るとフェノール量が流入下水の 1 %未満となり、明らかに減少していると見える。

本調査において、フェノールは調査処理場の下水処理により 99%以上除去されているという結果が得られたが、前述の好気的生分解性試験 [2]結果を比較して考えると下水処理におけるフェノール除去は活性汚泥による生物分解が主体であると推測される。また、反応槽に流入した直後の大きな濃度低下は、活性汚泥による吸着や分解が要因と考えられた。

3. 2 嫌気好気ろ床法の下水処理場におけるフェノール挙動調査結果

9 月 25 日調査時の各採取試料の水温は 18.8～20.0℃、pH は 6.5～7.3 であった。また、調査時の処理水（逆洗水槽）の SS は 2mg/L、BOD は 2.6mg/L、COD は 7.7mg/L であり良好な処理が行われていた。

フェノールの調査結果を図-7 に示す。流入下水①、②の濃度はそれぞれ 2.0mg/L、3.3mg/L、第一分配槽出口の濃度は 0.13μg/L、第二分配槽出口の濃度は 0.022μg/L、好気槽出口の濃度は 0.011μg/L、逆洗水槽上層水の濃度は 0.017μg/L であった。本処理方式の処理主体となる嫌気槽、好気槽の両反応槽において大きく減少し、その除去率は 99%以上であった。本調査では嫌気槽に流入する前の第一分配槽出口において 0.13μg/L と流入下水濃度に比べて

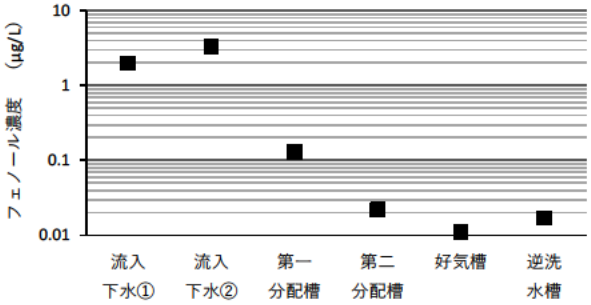


図-7　嫌気好気ろ床法の下水処理場における
フェノール挙動調査結果

大きく減少していたが、ポンプ井、第一分配槽での除去の可能性に加え、本調査試料がスポット採取によることから水質の時間変動が考えられる。

流入下水のフェノール時間変動を確認するため、2020 年 2 月 18 日～19 日にかけて自動採水器を用いた通日調査を行った。流入下水②を 1 時間間隔で 24 時間採取し、3 時間分を等量コンポジットし分析試料とした。フェノール分析結果を図-8 に示す。フェノール濃度が高い時間帯は 7：00～15:00 で最大濃度が 2 月 19 日 10：00～12：00 の 2.3μg/L、最小濃度が 2 月 19 日 1:00～3:00 の 0.14μg/L であった。9 月 25 日の挙動調査時の採取時間帯は、流入下水のフェノール濃度が高い時間帯であり、調査時のフェノール濃度は、2 月の通日調査のフェノール濃度とほぼ同じであった。また、9 月 25 日の調査における第一分配槽出口では、ポンプ井の容積と平均流量から算出した平均滞留時間（11.6 時間）を考慮するとフェノール濃度が低い時間帯の下水が到達していることになる。これが、第一分配槽出口でのフェノール濃度が、流入下水より低いことの一因と考えられる。

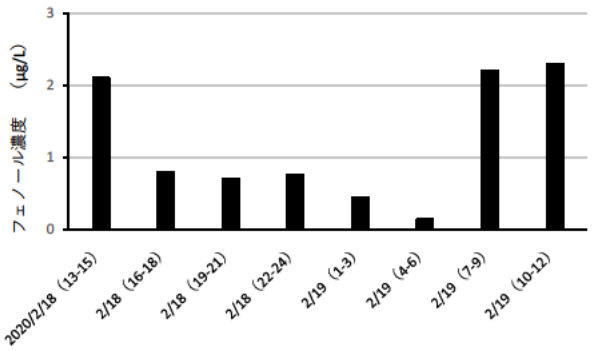


図-8　流入下水②のフェノール時間変動

3.3 活性汚泥によるフェノール除去特性の回分実験

室内回分実験結果を図-9 に示す。実験開始 5 分後のフェノール濃度は、コントロール系が 540μg/L、実験系が 320μg/L であった。コントロール系は、8 時間後においても 410μg/L であった。実験系は 30 分後で 210μg/L、1 時間後では検出下限値以下（ND）であり大きく減少した。また、実験系の SS はメタノールを用いた超音波抽出によりフェノール分析を行ったがいずれも ND であり、フェノールの SS 吸着は確認されなかった。これらのことから、活性汚泥処理によるフェノールの除去は生物分解によるものと考えられる。

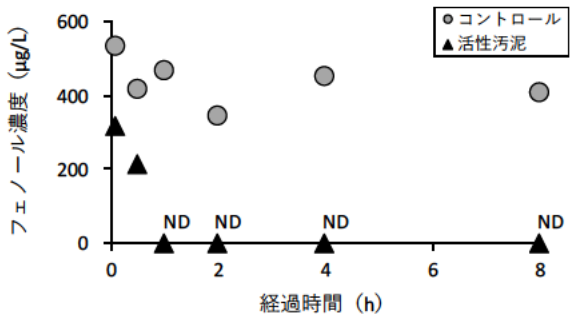


図-9　室内回分実験結果

4. まとめ

平成30年度調査の流入下水から公共用水域の指針値を超える濃度で検出されたフェノールを対象として標準活性汚泥法、嫌気好気ろ床法の 2 処理場において挙動把握調査を行った。両処理方式とも生物反応槽において大きく除去され、処理水では指針値を下回る濃度であった。また、標準活性汚泥法の活性汚泥を用いた室内回分実験によりフェノールは活性汚泥により容易に除去されることがわかった。

謝辞

本調査の実施にあたってご協力を頂いた自治体、関係各位に感謝申し上げます。

なお、本調査研究は、運営費交付金により実施されたものである。

参考文献

1) 下水試験方法-2012 年版-，公益社団法人日本下水道協会，平成 24 年 11 月 30 日発行

2) 財団法人化学物質評価研究機構、CERI 有害性評価書、フェノール、https://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/108_95_2.pdf （令和 2 年 6 月 15 日確認）

仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の慢性影響評価法の開発

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 29～令元
担当チーム：水質チーム
研究担当者：山下洋正、北村友一、服部啓太

【要旨】
本研究では遺伝子発現解析を魚の曝露試験に適用し、下水処理水の魚類慢性影響の検出と評価法の提案を行った。二次処理水を用いてゼブラフィッシュの胚・仔魚期の曝露試験を行い、ふ化率、生存率と網羅的遺伝子発現への影響、および、希釈またはオゾン処理による遺伝子発現影響の低減効果を調査した。二次処理水、オゾン処理水の曝露による遺伝子発現への影響レベルは、河川水の同様の曝露結果と比較した。その結果、二次処理水最大濃度（80%）においてもふ化率や生存率に影響は見られなかったが、遺伝子発現への影響は見られた。二次処理水の割合が減少するに従い、発現変動遺伝子数も少なくなることが確認された。二次処理水曝露により免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達など様々な影響を受けていることが示唆された。二次処理水は 10 倍希釈、または、オゾン処理により、遺伝子発現への影響を河川水レベルまで低減できることがわかった。
キーワード：ゼブラフィッシュ、短期毒性試験、網羅的遺伝子発現解析、下水処理水

1.　はじめに

排水の水生生物への影響評価には、毒性値が明らかにされている化学物質の機器分析による排水中の濃度測定と毒性値との比較、または、排水に水生生物を曝露し、死亡や成長阻害などの生物応答から評価する全排水毒性（WET：Whole Effluent Toxicity）試験がある。生物応答を用いた試験は、排水の有害性を直接評価でき、米国等では藻類、無脊椎動物、魚類を用いたWET試験が導入[1]されている。日本でも生物応答を用いた排水試験法（検討案）[2]が公表（平成 26 年 3 月）され、生物応答に基づく排水管理の制度化と導入が検討された。平成 31 年 3 月時点で、事業者の自主的取り組みとして活用されることとなった[3]。これまでに様々な事業所排水について生物応答試験が適用[4)5)]されてきたが、下水処理場の放流水への適用[6)7)8)]例は少ない。下水放流水の水量は、他の事業所に比べて大きく放流先水域の水質に影響する場合もある。公共用水域の水生生物保全のために、下水放流水の水生生物影響の評価が必要な場合も考えられる。下水処理水に生物応答試験を適用した報告では、藻類への影響[6)]は塩素消毒水で、甲殻類への影響[7)]は金属を含む排水で確認される場合もあるが、下水処理水の水生生物への影響は一般的に低い[8)]。魚類に影響が見られる場合[6)]があるものの、3 生物種の中で魚類への影響は特に低い[8)]といえる。ただし、生物応答を用いた排水試験法の中で魚類影響については、胚・仔魚期の曝露からふ化率と仔魚の生存率を評価する試験である点に留意が必要である。下水処理水放流先の魚類存続の確保の観点からは、ふ化率、仔魚の生存率だけではなく、成長、繁殖、内分泌かく乱影響など様々な評価軸で下水処理水の魚類への安全性を評価することも重要である。しかしながら、このためにはそれぞれの評価軸に対応する試験を別途行う必要があり、試験コストと労力を要する。

一方で、次世代シーケンサーなどの網羅的遺伝子発現解析技術の普及により、遺伝子レベルで生物影響を詳細に解析することが可能となっている。また、OECD を中心に、化学物質の曝露から、分子、細胞、臓器、個体および個体群レベルへの影響についての反応経路（Adverse Outcome Pathway；AOP[9)]）を整理する取り組みが進められており、AOP の一部である遺伝子発現の知見の充実や遺伝子発現レベルと個体レベルの影響の関係解明が重要となっている。

毒性学や分子生物学の分野で蓄積されてきた遺伝子発現とその機能に関するデータベースを活用し、仔魚期の魚の様々な機能遺伝子を網羅的に解析することで、一回の生物応答試験から、遺伝子レベルではあるが様々な評価軸での影響評価が可能になると考えられる。

下水処理水を対象とし、胚・仔魚期の魚類を用いる曝露試験に網羅的遺伝子発現解析を追加し、魚が受けているストレスの種類の判定と希釈や高度処理過程でのその低減効果および遺伝子発現の影響レベルを評価した報告は見られない。

本研究では、下水二次処理水を対象とし、生物応答を用いた排水試験法（検討案）[2]に掲載されている胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いる短期毒性試験に、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を追加し、ふ化率と生存率の他に、生体維持に関わる様々な機能への影響の検出が可能かどうか、また、検出された影響の希釈とオゾン処理による低減効果、および、河川水との比較による遺伝子発現レベルの評価について検討した。さらに、曝露水の水質と遺伝子発現の関係についての解

析も行った。

2. 実験方法

2. 1 曝露水と曝露試験の方法

図-1 に本研究で用いた活性汚泥処理実験装置とオゾン処理実験装置の概要を、写真-1 にオゾン処理装置の外観、処理条件を示す。本実験で使用した装置は、最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L ×4 槽）、最終沈殿池（700L）からなる活性汚泥処理実験装置、砂ろ過塔と、その後段のオゾン反応塔、担体処理槽から構成される。流入下水は、主に分流式下水道として整備され生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用いた。生物反応槽は、第 1 槽から第 4 槽まで全面エアレーションを行う標準活性汚泥法（HRT：約 8 時間、MLSS 濃度：約 2,300 mg/L、SRT：約 9 日）による処理を行った。オゾン処理の条件については、下水処理水の消毒を対象とする場合のオゾン注入量は 5 mg/L、接触時間は 10 ～20 分が標準[10]とされる。本実験ではオゾン発生装置の性能に制約があったためオゾン注入量を約 3 mg/L とし、接触時間は約 20 分で砂ろ過水のオゾン処理を行った。オゾン処理水は滞留槽（10L）を経て生物膜処理を行った。生物膜処理には、一部の医薬品の低減に効果があることが報告[11]されている微生物保持担体（ポリプロピレン製円筒担体 4mmOD×3 mmID×5 mmL）によるものとし、充填率 90%（嵩）で充填したろ床にオゾン処理水を上向流で通

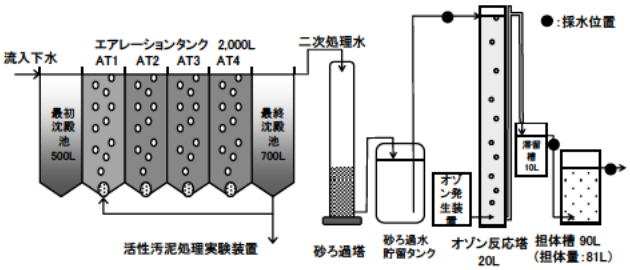


図-1 活性汚泥・オゾン処理実験装置の概要

写真-1 オゾン処理実験外観と処理条件

表-1 曝露条件

試験魚種	ゼブラフィッシュ
曝露水 （下水処理水）	採水日：2017年12月7～8日
	・二次処理水（80, 40, 20, 10%） ・オゾン処理水（80%） ・オゾン＋担体処理水（80%） ・脱塩素水道水：Control 1 （）内の%値は脱塩素水道水で希釈したときの曝露水の存在割合
比較対象曝露水 （河川水）	採水日：2019年1月21日
	・山口川（桜川支流）（80%） ・桜川下流（80%） ・恋瀬川（80%） ・山王川（80%） ・脱塩素水道水：Control 2 （）内の%値は脱塩素水道水で希釈したときの曝露水の存在割合
曝露期間	9日間、胚～仔魚期
曝露方式	半止水式（2, 4, 6, 8日目に換水）
連数	4連/試験区
供試卵数	15粒/連
温度	26℃
明暗周期	明 16h / 暗 8h
給餌	なし
観察項目	生存数、孵化数
RNA抽出方法	Qiagen RNeasy Mini Kit
ライブラリ調整方法	Illumina Truseq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit
使用シーケンサーと試薬	Miseq, Reagent kit v3 150cycle

図-2 霞ヶ浦流入河川の採水地点

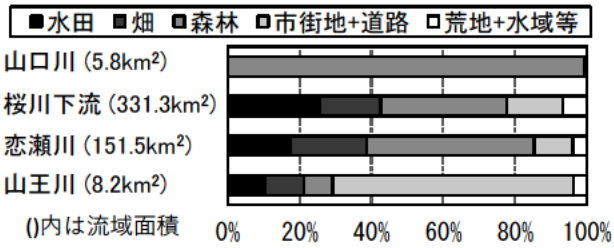


図-3 霞ヶ浦流入河川の土地利用の割合

国土数値情報 H28 年度土地利用から ArcGIS で算出

水し、水理学的滞留時間約 2 時間で処理した（以降、オゾン+担体処理とする）。なお、実験装置は、曝露水採水の約 1 カ月前から上記条件で連続運転した。

採水は、2017 年 12 月 7～8 日に二次処理水（砂ろ過水）、オゾン処理水、オゾン+担体処理水を 24 時間連続採水し、13 日から 22 日にかけてゼブラフィッシュを用いて胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験に従い試験を行った。表-1 に曝露条件を示す。二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水の最大曝露濃度 [2]は 80 %に設定した。曝露水の希釈には活性炭処理した脱塩素水道水を用い、コントロール曝露区は脱塩素水道水 100 %とした。

下水処理水曝露による遺伝子発現レベルの評価は、河川水との比較によることとした。比較対象とする河川水は、霞ヶ浦流入河川水とし、土地利用の異なる以下の 4 地点を選定した。図-2 に採水地点、図-3 に土地利用の概要を示す。採水地点より上流域の土地利用の特徴は次のとおりである。山口川（桜川支流）は筑波山の渓流で、その流域は森林が 99 %を占める。桜川下流は霞ヶ浦流入河川の中で最大流域面積をもち、他の流域よりも水田の割合（26 %）が高い。恋瀬川は桜川下流に次ぎ流域面積が大きく森林の割合（46 %）が高い。山王川は市街地の割合（67 %）が大きい。なお、桜川、恋瀬川、山王川は、生物類型 B（コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生育する水域）に指定[12]されており、魚類影響は少ない河川であると考えられる。採水は、2019 年 1 月 21 日にスポット採水した。曝露濃度は最大曝露濃度 80 %のみとし、試験は 1 月 23 日から 2 月 1 日にかけて実施した。

各下水試料、各河川試料原水は、下水処理工程での処理の程度、河川水の汚濁程度を把握するため、溶存有機炭素濃度 DOC（島津製作所製 TOC-V）、NH_4-N、NO_3-N、NO_2-N（ビーエルテック製 QuAAtro2-HR）とオゾン処理の処理効果や水質のキャラクタリゼーションが簡便に把握できる三次元蛍光スペクトル（日立ハイテクノロジーズ製 F-4500）を測定した。

2. 2 遺伝子発現解析の方法

曝露試験終了時に生存していた仔魚は、液体窒素で急速凍結し、RNA 抽出まで-80℃で保存した。冷凍保存した仔魚の RNA は、RNeasy Mini Kit（Qiagen 製）を用いて、1 連最大 15 匹をまとめて 1 検体として抽出した。RNA 試料は Bioanalyzier（Agilent 製）を用いて、分解を受けていないことを確認し、Truseq Stranded mRNA prep kit（Illumina 製）を用いてライブラリ調製後、次世代シーケンサー Miseq（Reagent kit v3、150cycle、Illumina 製）により、1 ラン 2 検体でシーケンシングを実施した。81 塩基のペアエンドで 1 検体につき約 1,600 万リードの塩基配列を取得した。

遺伝子発現解析はセルイノベーション（国立遺伝学研究所のデータ解析拠点 Maser[13]）にリードデータをアップロードして実施した。Tophat2 を用いてゼブラフィッシュゲノム（DanRer11）にマッピング後、Cufflinks2 を用いて遺伝子発現量を FPKM（Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped）で表した。得られた遺伝子配列は、NCBI に登録されているゼブラフィッシュ蛋白質配列（Refseq Protein）[14]に対して Blastx による相同性検索を行い、E-value と Bit score から最も相同性が高い Refseq ID を得た。そして、UniProt[15]および UniProt-GOA[16]のデータベースを用いて各遺伝子の Refseq ID に対応したゼブラフィッシュの遺伝子機能情報（Gene Ontology： GO）を取得した。

発現変動遺伝子の抽出および Gene Ontology 解析は、subio ver.1.24 (subio 社製)により行った。発現変動遺伝子の抽出条件は、各曝露区でコントロール区の 2 倍以上、1 / 2 以下（Fold change 2）、および T 検定で p 値が 0.05 以下となる遺伝子とした。なお、下水試料と河川水曝露試験の時期が異なったため、コントロール区は下水試料の Control 1 と河川試料の Control 2 の 2 種類あるが、発現変動遺伝子の抽出の際は 2 種類のコントロールを統合し 1 つとし解析した。Gene Ontology 解析では、Biological process の機能情報を用いることとし、 Fisher の正確確率検定により二次処理水最大濃度 80%曝露区を基準として発現変動遺伝子と関連が強い機能を抽出（検定条件：overlap 3 以上、p 値 0.05 以下）し、各曝露区間を p 値で比較した。

3. 実験結果

3. 1 曝露原水の水質分析結果

図-4、 5、 6 に脱塩素水道水（Control 1、 2）、各下水試料、各河川水試料の DOC、形態別窒素、蛍光強度の分析結果を示す。DOC 濃度は二次処理水が最も高く、オゾン処理水とその後段の担体処理水で若干の低下が見られた。この値は都市河川である山王川よりも高い値であった。二次処理水中の NH_4-N、NO_2-N 濃度は低く硝化が十分に進行した処理水であった。NH_4-N の値はいずれの河川水よりも高い値であった。図-7 に全ての曝露試料原水の三次元蛍光スペクトルの結果を示した。図-6 は二次処理水の三次蛍光スペクトルで高い値を示した励起波長 (Ex) 240 nm / 蛍光波長 (Em) 430 nm、Ex : 340 nm / Em 430 nm のピーク強度である。二次処理水で見られたこれらのピークは、オゾン処理で約 1/3～1/4 まで低下し、桜川下流や山王川と同程度となった。

3. 2 胚仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験露の結果

図-8、 9 に各曝露区のふ化率と生存率の平均値と標準偏差を示した。ふ化率と生存率の平均値は、Control 1 区ではそれぞれ 95 %、 92 %、Control 2 区では 100 %、

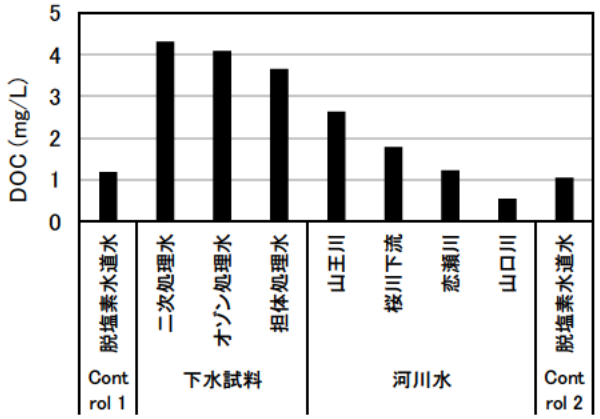


図-4 曝露水原水の DOC 濃度

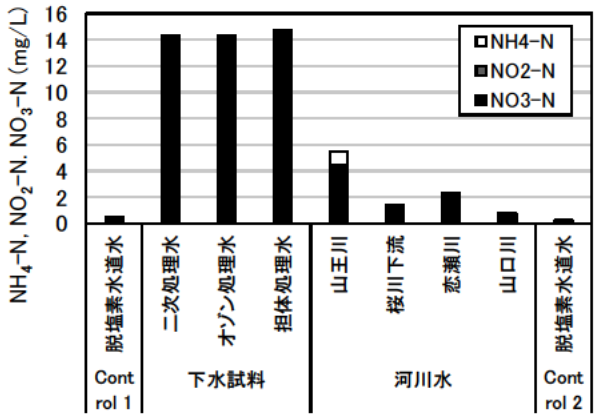


図-5 曝露水原水の NH_4-N, NO_2-N,NO_3-N 濃度

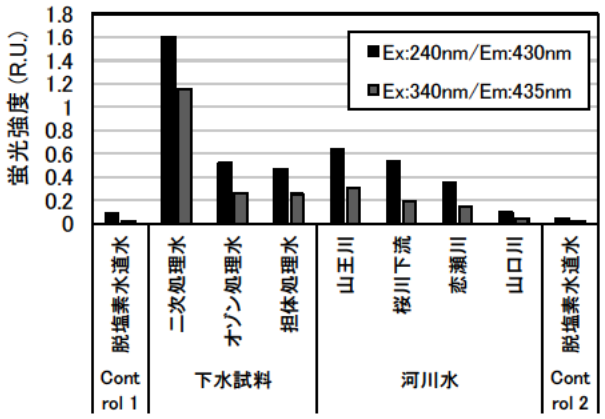


図-6 曝露水原水の蛍光強度

100 %であり、いずれの曝露区も 80 %を超え試験は成立[2]していた。Dunnett の多重比較法を用いて、コントロール区と各曝露区のふ化率の平均値の差を検定したところ、いずれの曝露区でも有意にならなかった（有意水準 1%）。生存率についてもコントロール区と各曝露区で統計的に有意な差は認められなかった。

3. 3 遺伝子発現解析結果

3.3.1 ゲノムマッピングによる遺伝子の検出と発現変動解析結果

Tophat 2-Cufflinks 2 によるゼブラフィッシュゲノムへのマッピングの結果、25,567 遺伝子が検出された。25,567

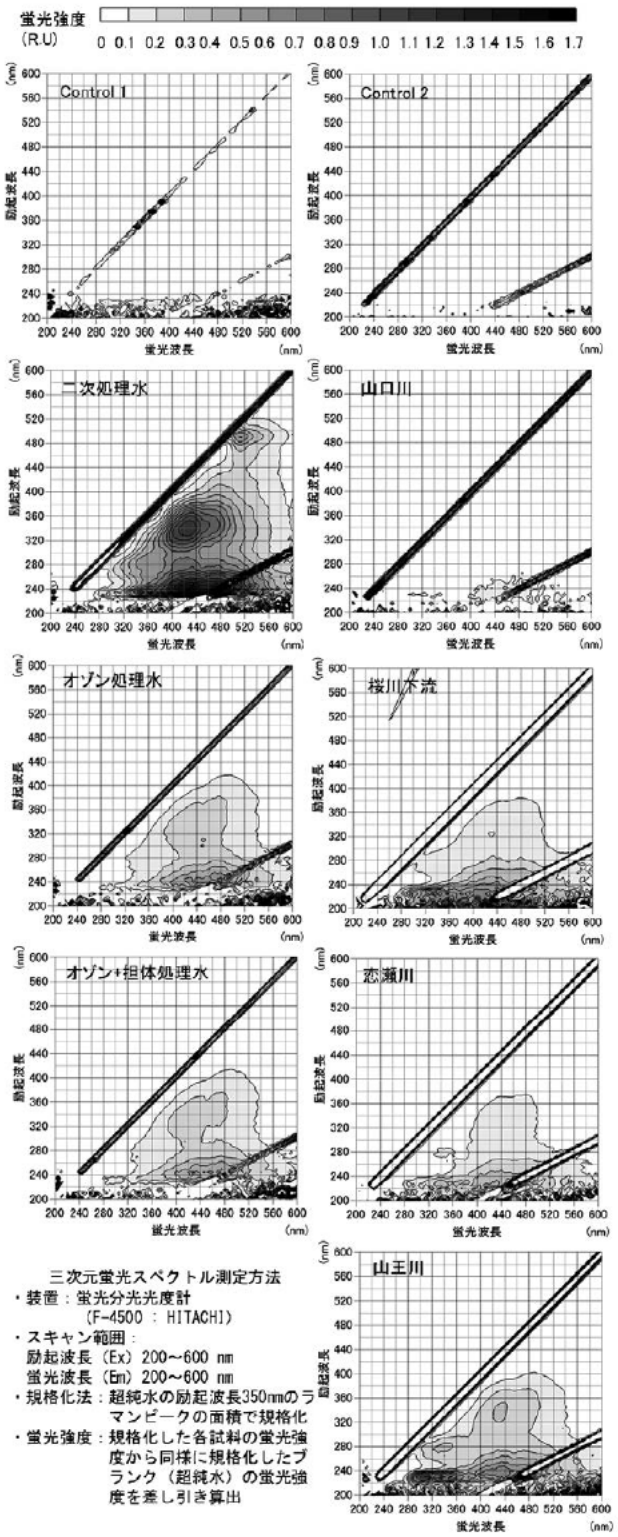


図-7 曝露水原水の三次元蛍光スペクトル

遺伝子のうち 75 %にあたる 19,317 遺伝子に Biological process の機能情報（GO : Gene ontology）を与えることができた。図-10 はコントロール区と各曝露区の各遺伝子発現量の散布図である。図中のプロットが検出された各遺伝子を反映しており、Fold change 2、かつ、p 値 0.05 以下と判定された発現変動遺伝子を黒色で示した。二次処理水 80 %曝露区は発現変動遺伝子数が多いこと、山口

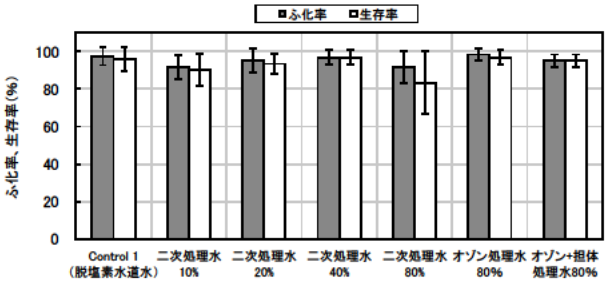


図-8 下水試料のふ化率, 生存率の結果

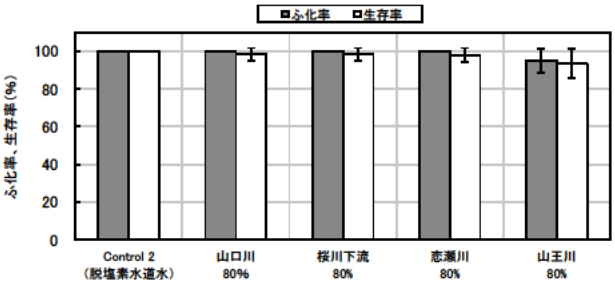


図-9 河川試料のふ化率, 生存率の結果

川で少ないことがわかる。

図-11 は各曝露区の発現変動遺伝子数で、各下水試料、河川水試料への曝露により遺伝子発現量が上昇したものと下降したものを分けて図示した。下水処理水曝露区で上昇する遺伝子が多くなっていた。コントロール区に対して上昇と下降を示した発現変動遺伝子の総数は、二次処理水 80 %、40 %、20 %、10 %曝露区でそれぞれ 223、128、101、66 個となり、下水処理水の割合が減少するに従い、発現変動遺伝子も少なくなった。オゾン処理水 80 %、オゾン+担体処理水 80 %曝露区の発現変動遺伝子数は 63、47 個となり、オゾン処理により発現変動遺伝子数を抑制できることがわかった。発現変動遺伝子数でみると、オゾン処理は二次処理水の 10 倍希釈に相当する結果となった。本実験ではオゾン処理の後段に担体処理を設けていた。本処理により若干ではあるが発現変動遺伝子数のさらなる低下が見られた。

河川水試料では渓流である山口川で 29 個と最も少なく、都市河川である山王川で 65 個と最も多くなった。二次処理水 10 %、オゾン処理水曝露区の発現変動遺伝子数は、桜川下流、山王川に、オゾン+担体処理水曝露区は、恋瀬川に曝露した時と近い数になっていた。

3.3.2 ゼブラフィッシュの GO を用いた機能解析結果

図-12 に発現変動遺伝子の機能解析をゼブラフィッシュの Biological process 情報を用いて実施した結果を示す。図は Biological Process 関連の GO を、二次処理水 80 % 曝露区で p 値 0.05 （- $\log_{10}$表示で 1.3 以上）まで示したものである。二次処理水 80 %曝露区で影響が高いと判定された機能は、defense response、cytokine-mediated signaling pathway で、これらは免疫に関係する機能である。その他にも代謝、ストレス応答、シグナル伝達など様々な機能への影響を生じている可能性があった。これらの機能

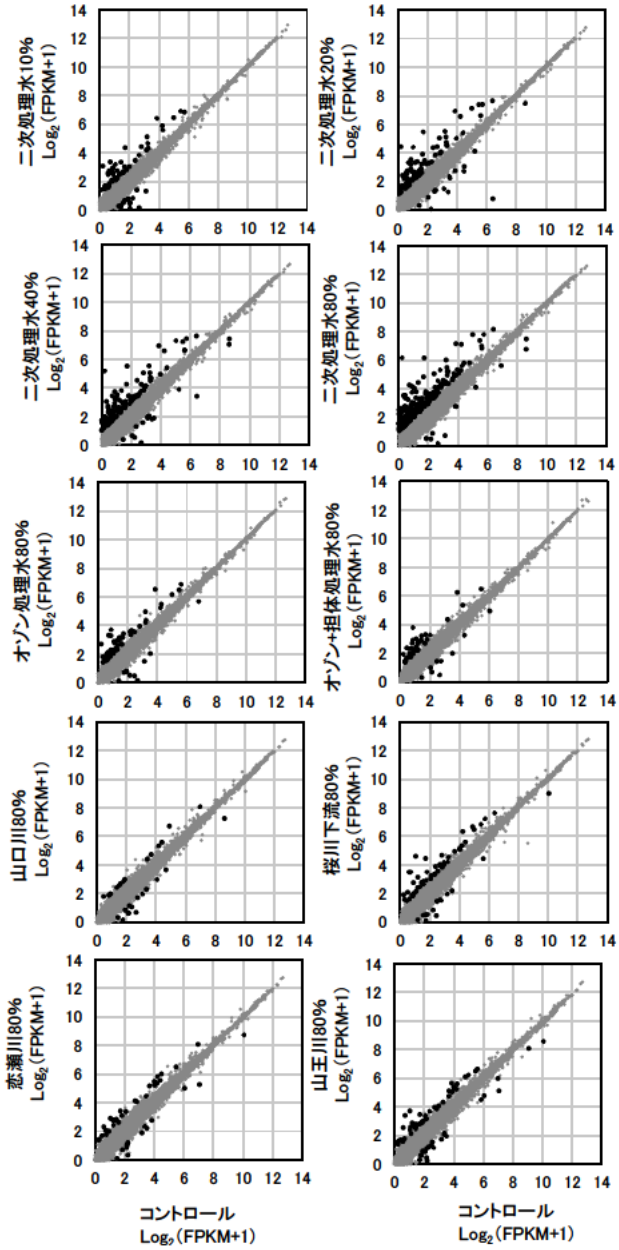


図-10 コントロール区と各曝露区の各遺伝子発現量の散布図

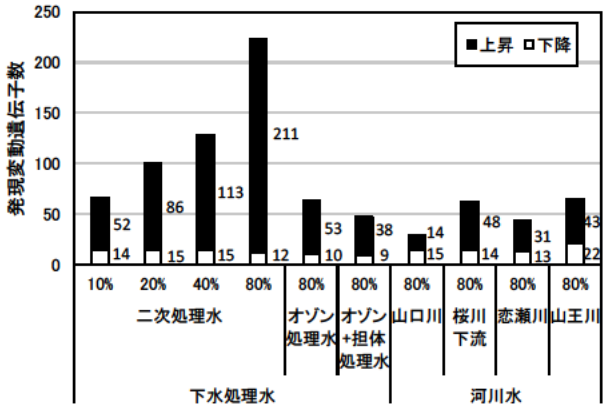


図-11 各曝露区の発現変動遺伝子数

の p 値は希釈倍率が高くなるに従い大きくなる傾向が見

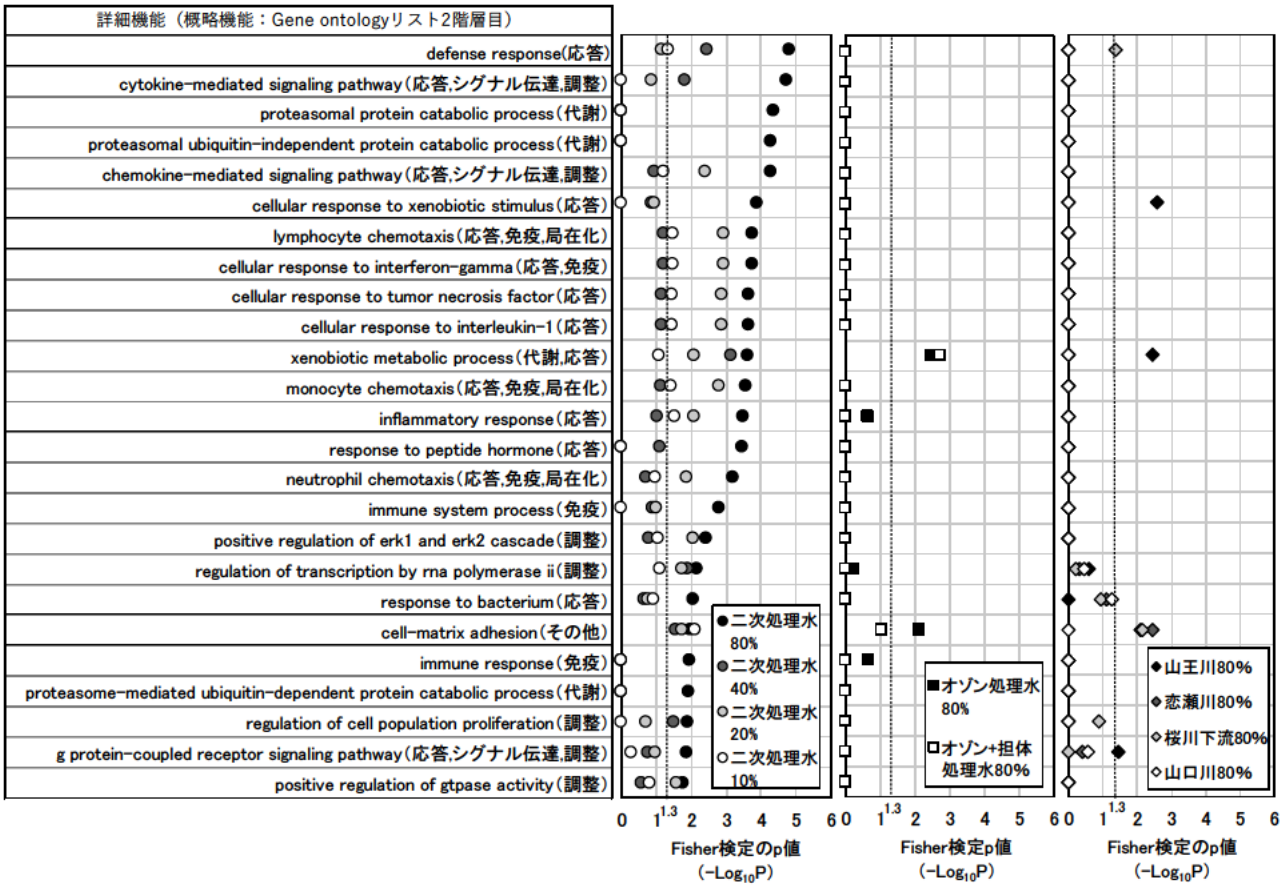


図-12 ゼブラフィッシュの機能情報(Biological Process)を用いた機能解析(Fisher の正確確率検定)の結果

られ、二次処理水 10%曝露区で p 値が 0.01 以下になるのものは 1 機能(cell-matrix adhesion)のみとなった。二次処理水が 10 倍希釈されることにより、遺伝子発現に与える影響は概ね抑制できることがわかった。

オゾン処理では二次処理水 80 % 曝露区で見られた各機能への影響が顕著に低下していることがわかる。河川水では山王川で数個の機能で p 値が低いものがみられるものの、魚類の遺伝子発現に与える影響は低いことがわかる。

4. 考察

4. 1 生物応答と遺伝子発現の関係について

ふ化率、生存率の生物応答を指標にした二次処理水の希釈系列の曝露試験では、二次処理水最大濃度 80 %でもふ化率と生存率に有意な影響は見られなかったが、遺伝子発現への影響は見られた。二次処理水で見られた遺伝子発現への影響は、現時点で各遺伝子の発現レベルと将来生じる成長や繁殖阻害との関係は未解明であるため、悪影響であるとは断定はできない。しかし、機能解析の結果、免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達などへの影響を受けている可能性が示唆され、二次処理水 80 %の曝露条件で成魚に至るまで長期間曝露された場合、成長阻害や生存率に影響が生じる可能性も否定できない。より安全側の観点からは、発現変動遺伝子数や有意に検出される機能への影響について、河川水レベルまでの低減を目指すことも考えられ、今後、さらなる知見の蓄積を踏まえた検討が求められる。

本研究からは二次処理水曝露により免疫への影響が生じる可能性が高いことが示唆されたが、ヒト細胞に下水処理水を曝露し、遺伝子発現量の変化をマイクロアレイで測定し、Biological Process で機能解析した報告[17]においても、本研究で影響が見られた defense response（防御反応）、inflammatory response（炎症応答）への影響が見られている。こうした免疫機能に影響を与える原因物質は明らかではないが、response to bacterium(細菌による応答)、芳香族炭化水素により誘導される xenobiotic metabolic process（生体外物質の代謝）や、医薬品などにより誘導される g protein-coupled receptor signaling pathway（G タンパク質共役受容体シグナル）への影響が見られることから、処理水中の細菌と化学物質の両方の影響を受けていたと考えられる。

生物応答試験に網羅的遺伝子発現解析を適用することにより、生物応答試験だけでは捉えられることができなかった、魚類の免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達などの様々な遺伝子レベルでの影響とその原因物質の推測に利用できると考えられた。 今後、魚類遺伝子の機能情報の充実や AOP の解明が進むことが予想され、遺伝子発現解析は魚類個体の詳細影響や影響予測のツー

ルとして発展していくものと考えられる。

4. 2　下水処理水の希釈とオゾン処理による遺伝発現レベルでの影響低減効果について

二次処理水 80%曝露区で見られた遺伝子発現レベルの影響は、希釈されることにより低減できることがわかった。概ね 10 倍程度希釈されることにより、発現変動遺伝子数は河川水下流程度まで、機能解析で有意と判定された様々な機能影響は、有意水準以下（p 値 0.05 以上）まで低減できることがわかった。環境基準値と排水基準値の関係など、下水処理水の影響は 10 倍希釈で議論されることが多く、遺伝子発現解析の結果はこれを支持する形となった。オゾン処理水 80%曝露区では、二次処理水 80%曝露区で発現変動を示した遺伝子数、有意となった様々な機能への影響は顕著に低減していた。本研究からは、下水処理水の放流先の希釈状況や生態系に特に配慮する場合や、修景用水、河川維持用水として水生生物にも配慮しながら再利用する場合等において、オゾン処理が有効な処理方法となりうると考えられた。一方で、下水処理水をオゾン処理したことにより、雄魚の肝臓で CYP1a1（薬物代謝酵素）、VTG（卵黄前駆蛋白質）のマーカー遺伝子が誘導されることがあるとも報告[18]されていることから、オゾン処理の魚類への安全性を確定するためには、オゾン処理条件（後処理も含め）と魚の遺伝子発現および成長、繁殖への影響についての知見の充実が必要である。

4. 3　河川水との比較による下水処理水の遺伝子発現レベルの評価について

遺伝子発現レベルと魚類の成長、繁殖影響の関係は明確になっておらず、この解明には長期間を要すと考えられる。当分は魚類の安全性を保障できる各遺伝子の発現量を示すことはできない。現時点では、魚類調査が行われ、魚類の存続が確認されている河川水を比較対象とすることが最適と考えられる。本研究で比較対象とした霞ヶ浦流入河川下流は、生物類型 B（コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及び これらの餌生物が生育する水域）に指定されている水域であり、ゼブラフィッシュのふ化率や生存率を指標にした生物応答試験でも影響は見られなかった。他に、比較対象とする河川の選定方法には、河川水辺の国勢調査地点の活用も考えられる。また、下水放流口より上流の河川水を比較対象とすることも一案と考えられる。下水処理水の魚類影響レベルをどの程度にするのかについては、魚類の生息状況も含め放流先で求められる水環境像によって異なり、比較対象として相応しい地点の選定が必要となる。

4. 4　遺伝子発現と水質の関係について

本研究では、曝露水原水の水質の簡易水質分析を行っていた。図-13 は各下水試料、各河川試料原水の蛍光強度と各下水、各河川試料 80%曝露区の発現変動遺伝子数の関係を示したものである。図より各曝露水の蛍光強度と発現変動遺伝子数が正の相関関係を示していることがわかる。二次処理水原水で見られた蛍光ピークはブロードであることから、曝露水には様々な化学物質が含まれていると考えられる。三次元蛍光分析から魚類に影響を与える化学物質を特定することはできないが、水質のキャラクタリゼーションは可能である。こうしたキャラクタリゼーション可能な機器分析による水質分析と生物応答試験による有害性評価に相関を見いだせる可能性がある。そのためには、生物応答試験とキャラクタリゼーション可能な機器分析（三次元蛍光分析、LC-GC-TOF/MS など）を併用したデータ集積と統計解析が必要である。機器分析でのスクリーニングが可能となれば、水生生物への有害性が疑わしい試料のみを、生物応答試験に供することができ、生物応答試験の労力や費用を低減できると考えられる。

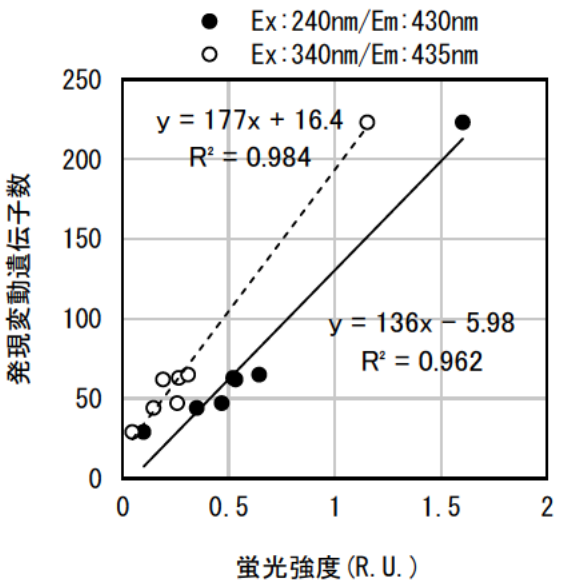


図-13 曝露水の蛍光強度と発現変動遺伝子数の関係

5.　おわりに

本研究では、下水処理水を試験水とし、胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いる短期毒性試験に網羅的遺伝子発現解析を追加し、ふ化率と生存率の他に、生体維持に関わる様々な機能への影響検出が可能かどうかを検討するとともに、希釈とオゾン処理による遺伝子発現影響の低減効果を探った。さらに、河川水との比較から下水処理水の遺伝子発現レベルの評価を行った。本研究で得られた知見を以下に示す。

(1) ふ化や生存への影響が低い下水処理水においても、網羅的遺伝子発現解析を追加することにより、魚の生体維持に関わる様々な機能への影響の可能性が検出できることがわかった。生物応答試験への網羅的遺伝子発現解析の適用は、下水処理水のより安全側

での魚類影響評価に利用できると考えられた。

(2) 二次処理水の希釈系列の生物応答試験では、最大濃度 80%でもふ化率と生存率に影響は見られなかったが、網羅的遺伝子発現解析では発現変動遺伝子数の増加が確認され、遺伝子発現への影響が見られた。

(3) 二次処理水曝露により発現変動を示した遺伝子群を機能解析した結果、免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達など様々な影響を受けている可能性があった。

(4) 二次処理水 80%曝露区で見られた遺伝子発現影響は、希釈されることにより低減できることがわかった。10 倍希釈されることにより、発現変動遺伝子数を概ね河川水下流程度まで低減でき、機能への影響も低減できることがわかった。

(5) オゾン処理は発現変動遺伝子数の抑制に顕著な効果があった。

(6) 下水処理水が魚類に与える遺伝子発現レベルの影響は、河川水を比較対象とすることで相対的評価が可能と考えられた。

(7) 曝露水原水の三次元蛍光分析の蛍光強度と発現変動遺伝子数に類似した傾向が見られた。

謝辞：次世代シーケンサーの解析には国立遺伝学研究所データ解析拠点、Maser データ解析システムを利用させていただいた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

1) 有薗幸司：バイオアッセイと WET 法の展望, 環境技術,47(2), 60-65, 2018
2) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案）, 2014
3) 生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会：生物応答試験を用いた排水の評価手法とその活用の手引き（中間とりまとめ）, 2019
4) 板津靖之, 高野智弘, 金俊, 福冨真実子, 楠井隆史： 事業所排水の生態毒性学的評価：毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響,25(1),19-26, 2015
5) 渡部春奈, 林岳彦, 田村生弥, 中村中, 阿部良子, 高信ひとみ, 荻野仁子, 小塩正朗, 鑪迫典久：生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査, 環境化学,25(1),43-53, 2015
6) 山本裕史, 矢野陽子, 森田隼平, 西家早紀, 安田侑右, 田村生弥, 鑪迫典久：下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価,土木学会論文集 G（環境）,69(7),III_375-384, 2013
7) 真野 浩行, 武田 文彦, 南山 瑞彦：溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ 2 種への影響の調査と毒性同定評価試験の適用, 土木学会論文集 G（環境）72(7), III_107-115, 2016
8) 岡本誠一郎,南山瑞彦,小川文章,北村友一,真野浩行,武田文彦,村田里美,服部啓太,藤村幸裕：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,土木研究所平成30年度研究開発プログラム報告書,表-21, p 38, https://www pwri.go.jp/jpn/results/report/report-program/2018/pdf/pro-13-1.pdf
9) Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL.: Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment, Envi-ron Toxicol Chem.29(3), 730-741, 2010
10) 日本下水道協会：オゾン消毒,下水道維持管理指針実務偏-2014 年版-, pp.681-682, 2014
11) 小森行也, 岡本誠一郎: 運転条件の異なる微生物担体処理における医薬品の除去特性, EICA, 19(2,3), 15-17, 2014
12) 茨城県：平成 30 年度版環境白書（データ）表 2-43 水生生物の保全に係る水質環境基準の類型指定状況, https://www.pref ibaraki.jp/seikatsukankyo/kansei/kankyo/08hakusho/hakusyo-h30data html（最終確認日 2020 年 5 月 19 日）
13) セルイノベーション（国立遺伝学研究所データ解析拠点）https://cell-innovation nig.ac.jp/(最終利用日：2020/3/5)
14) Refseq-Protein データベース, National Center for Bio-technology Information (NCBI) ,https://www ncbi nlm nih gov/protein/(データベース利用日：2019/11/1)
15) The UniProt Consortium: UniProt: a worldwide hub of protein knowl-edge, Nucleic Acids Res. 47: D506-515 (2019), http://www.uniprot.org/ (データベース利用日：2019/11/1)
16) Huntley RP, Sawford T, Mutowo-Meullenet P, Shypitsyna A, Bonilla C, Martin MJ, O’Donovan C：The GOA da-tabase: Gene Ontology annotation updates for 2015. , Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43:D1057-63, http://www.ebi.ac.uk/GOA /zebrafish_release (データベース利用日：2019/11/1)
17) Hiroe Hara-Yamamura, Toshikazu Fukushima, Lea Chua Tan, Satoshi Okabe*: Transcriptomic analysis of HepG2 cells exposed to fractionated wastewater effluents suggest-ed humic substances as potential inducer of whole effluent toxicity, Chemosphere 240, 124894, 2020
18) Pohl J, Björlenius B, Brodin T, Carlsson G, Fick J, Lars-son DGJ, Norrgren L, Örn S : Effects of ozonated sewage effluent on reproduction and behavioral endpoints in zebrafish (Danio rerio), Aquatic Toxicology, 200, 93–101, 2018

PRTR データを活用した化学物質の排出管理手法の構築

排出量への寄与が大きい業種における排出量推定手法の高度化

研究予算：環境研究総合推進費
研究期間：令元～令 3
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：山下洋正、平山孝浩、對馬育夫、
鈴木裕識、小森行也、髙沢麻里

【要旨】
下水道における PRTR 対象物質の排出量推定手法の高度化を目的とし、まず、下水試料に対し有機・無機物質を合わせて 100 物質の有無判定と、このうち 47 物質の定量が可能なスクリーニング手法を構築した。本手法を用いて 10 箇所の下水処理場で流入下水と放流水（各 11 検体）を測定した結果、いずれかの試料から合計 55 物質が検出され、このうち 24 物質で定量値が得られた。推計に資する実測データを効率的に蓄積する手法が示された。
キーワード：PRTR、下水道、排出量推定、高度化、スクリーニング分析

1. 背景とプロジェクト概要

「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律（化管法）」に基づく化学物質排出・移動量届出制度（PRTR: Pollutant Release and Transfer Register）は、事業者が対象化学物質の排出・移動量の届出を行い、国がこれを公表するものであり、環境中の化学物質の動態や環境への影響を把握する上で有用な制度である。当チームでは、プロジェクト「ライフサイクル全体での化学物質管理に資する PRTR データの活用方策に関する研究」に参画し、サブテーマ「PRTR データを活用した化学物質の排出管理手法の構築」を担当して、下水道を対象に排出量推計手法の高度化に取り組んでいる。本年度は、下水試料中の広範な PRTR 対象物質の一斉スクリーニング手法の検討とともに、下水処理場での実測データを収集した。

2. 下水試料中 PRTR 物質のスクリーニング手法の構築

PRTR 対象の有機物質は 434 種あり、物性が幅広い。そこで、精密質量分析技術によるターゲットスクリーニング手法の下水試料への適用を検討した。その結果、LC-ESI(±)-QToF-MS の無段階 MS/MS 法によるデータ取得により独自のデータベース（DB）を構築することで、29 物質の同定および定量を可能とした。また、既存 DB と公開データの活用により 53 物質の検出有無判定が可能となった。18 元素については、ICP-MS 一斉分析法を適用した。結果として、有機・無機物質を合わせて、100 物質の有無判定と、このうち 47 物質については定量が可能なスクリーニング手法を構築した。

3. 下水処理場における流入下水と放流水の実測

10 箇所の下水処理場対象とし、2019-2020 年の冬期に流入下水と放流水を採取し分析に供した（2 系列で調査した処理場が 1 箇所あるため、各 11 検体）。その結果、有機物質では合計 40 物質が、無機物質では合計 15 物質がいずれかの試料から検出「有」と判定された。これら 55 物質のうち 17 物質は公表データの中で下水処理場への流入量が把握されておらず、届出外排出量の推計値が得られていなかった。また、24 物質については定量値が得られた。

4. まとめ

100 種の PRTR 対象物質の検出有無判定が可能なスクリーニング手法を構築し、下水試料に適用した結果、新たに推計に資するデータが効率的に取得された。

謝辞
本研究は（独）環境再生保全機構の環境研究総合推進費（JPMEERF19S20402）により実施された。

土　木　研　究　所　資　料
TECHNICAL NOTE of PWRI
No.4402　　January 2021

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