

生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 30

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一、
真野浩行、武田文彦

【要旨】

本調査では異なる季節に下水に対する生物影響評価を行うことにより、下水処理による生物影響削減効果の季節変化について評価を行った。2015年1月、4月、7月、10月に嫌気好気活性汚泥処理を行うA処理場で得た流入下水、下水処理水に対して藻類ムレミカツキモを用いた生物応答試験を実施した。流入下水ではどの時期の試料でもムレミカツキモの生長速度が対照区よりも有意に低下し、生物影響が確認された。下水処理水では1月試料のみ生長速度への影響が確認されたが、それ以外の時期では影響がなかった。1月の下水処理水で生物影響が見られたのは、水温低下に伴う活性汚泥処理の生物影響化学物質除去能力の低下が原因であると推定された。

キーワード：全排水毒性（WET）試験、下水処理、生物影響、ムレミカツキモ

1. はじめに

下水処理水中には流域で使用され、排出された化学物質が含まれると考えられるが、そのような微量化学物質による水生生物への影響が懸念されている。近年、生物学的な応答から水質を評価する生物応答試験が世界的に注目されており、日本でも環境省が生物応答を用いた排水管理の導入を検討している。試験方法として、生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾が2013年に提案・公表されており、事業場排水の水生生物影響に関する知見²⁾⁴⁾は増えつつあるものの、下水処理水を対象とした知見⁵⁾⁶⁾は少なく、知見の充実が求められている。

米国の資料⁷⁾では、下水処理過程において生物処理が排水の生物影響の削減に重要な役割を担っていることが示されている。冬季など水温が低下する時期には排水中の有機物等に対する除去能が低下する傾向にあるため、生物影響の削減能力も同様に低下する可能性がある。しかし我が国の既往研究において各季節における下水処理による生物影響削減効果の変化を評価した研究例は見られない。

そこで本研究では各季節における下水処理による生物影響削減効果を評価することを目的とした。実下水処理場で得られた試料を対象とし、藻類を用いた生物応答試験により生物影響を評価した。また、毒性同定評価によって下水中の生物影響物質に関する知見の収集を行った。

2. 実験材料および実験方法

2.1 下水試料の採水

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

採水は最初沈殿池の流入口付近および最終沈殿池の流出口付近で実施し、それぞれ流入下水、下水処理水とした。A処理場では施設の構造上、塩素消毒後の放流水が得られなかったため、塩素消毒前の下水処理水を採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は24時間とし、1時間ごとに1リットルずつ、合計24リットル採水した。これらの排水は採水後すぐに土木研究所に持ち帰り、それぞれの24リットルの排水をコンポジットした。コンポジットした流入下水、下水処理水に対し水質分析を行い、表-1に示す結果が得られた。また、流入下水と下水処理水は60 μ mポアサイズのメッシュでろ過を行い、ろ液を4 $^{\circ}$ Cの冷暗所で保管した。これらのろ液は下水試料として以下に示す生物応答試験に用いた。

表-1 採水後にコンポジットした流入下水、下水処理水の水質

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

*コンポジット時の水温 NH₄-N:アンモニア性窒素濃度 NO_x:硝酸性窒素濃度と亜硝酸性窒素濃度の総和
PO₄-P:リン酸態リン濃度

2. 2 藻類生長阻害試験

2. 2. 1 排水試験

本試験は藻類を下水試料に一定期間曝露し、対数増殖期における生長速度を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生長に対する下水試料の影響を明らかにする。

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾の推奨種となっている単細胞緑藻ムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*, NIES-35 株) を用いた。各試料に対して蒸留水による希釈で 5 段階の割合（試料割合 80%、40%、20%、10%、5%）の試料を作製し、各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加した。対照区は AAP 培地とした。これらの試料は細胞濃度の測定に支障がないよう、0.22μm ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行った。容量は 30mL/容器とし、生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾に基づき対照区は 6 連、各下水試料は 3 連とした。培養条件は初期細胞濃度 1.0×10⁴ cells/mL、温度 24°C、光強度 3000 Lux 連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に粒子計数分析装置（CDA-1000B、100μm アパチャー、Sysmex 社）を用いて対照区と各下水試料での細胞濃度を求め、その結果に基づき各試験水での生長速度を算出した。下水試料による生長阻害率は、以下の式(1)により算出した。生長阻害率 (%) = (対照区の生長速度 - 下水試料での生長速度) ÷ 対照区の生長速度 × 100 ……(1)

2. 2. 2 毒性同定評価

2. 2. 1 の試験で影響が見られた流入下水と下水処理水に対し、米国環境保護庁 (U.S.EPA) が公布する慢性毒性同定評価^{7,9)}を参考に毒性同定評価 TIE (Toxicity Identification Evaluation) を行った。表-2 に、各前処理と生物影響に寄与する化学物質（群）との関係を示す。流入下水あるいは下水処理水 80% に対し、無処理、チオ硫酸ナトリウム添加 (5mg/L)、EDTA[エチレンジアミン四酢酸]添加 (0.5mg/L、EDTA 二水素二ナトリウムを使用)、ばっ気 (下水試料 100% 1L/1L air、1 時間、ばっ気後に 20% に希釈)、pH 調整 (pH 約 6.5 に調整) の前処理を行った。また、SPE [Solid Phase Extraction、固層抽出] カラム (Sep-Pak C18, Waters 社) を用い、試料を 1.0μm ポアサイズフィルターでろ過後に SPE カラムに通水したもの (SPE カラム通過水)、及び SPE カラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの (メタノール溶出物) も前処理水として同様に試験した。各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22μm ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行ったものを藻類試験に供した。対照区は AAP 培地とし、試験条件は 2. 2. 1 と同一とした。

2. 3 統計解析方法

排水試験では、生長速度について、Bartlett 検定 (有意水準 α = 0.05) により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnnett 検定による多重比較 (

表-2 前処理によって生物影響が変化する化学物質のまとめ。本表は米国環境保護庁 (U.S.EPA) の資料^{7,9)}の記述をもとに作成

	pH調整	ろ過	ばっ気	SPE	チオ硫酸ナトリウム	EDTA	物性
酸化物 (塩素を含む)			○		○		4°C保存で時間とともに生物影響消失
アンモニア	○ ¹						
無極性有機物				○			SPEカラムのメタノール溶出物に生物影響あり
界面活性剤		○	○	○			4°C保存で時間とともに生物影響消失
陽イオン金属		○ ²		○	○	○	
全溶解固形分 (TDS)	△			△	△	△	

○ : 生物影響が低下

○¹ : pHが低いほど生物影響小

○² : pH調整とろ過を組み合わせると生物影響低下

△ : 生物影響が低下しない

SPE : 固相抽出 (Solid Phase Extraction)

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区と下水試料との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照系と下水試料との生長速度の比較を実施した。これらの解析には統計解析ソフト R¹⁰⁾を用いた。排水試験では、対照系と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) として求めた。全ての下水試料割合で対照区と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合を NOEC とした。

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

3. 実験結果

3. 1 排水試験

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

3. 1. 1 1月試料に対する試験

流入下水は、割合が 40%以上で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$ 、図-1(a))。下水処理水では割合が 80%の場合に生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$)。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水で 40%と求められた。

3. 1. 2 4月試料に対する試験

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

3. 1. 3 7月試料に対する試験

流入下水は、割合が 40%以上の場合に対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$ 、図-1(c))。下水処理水では最大の試料割合である 80%でも生長速度が低下せず ($p > 0.05$)、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水では 80%以上と求められた。

3. 1. 4 10月試料に対する試験

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

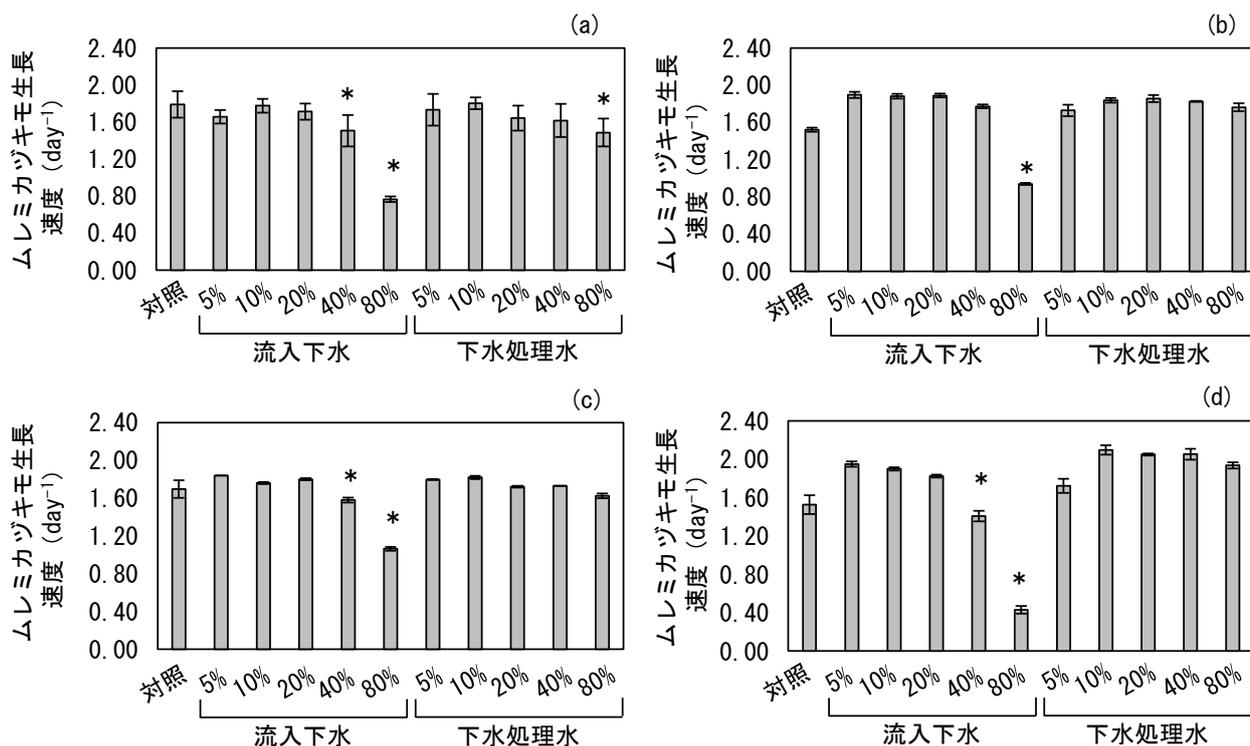


図-1 流入下水、下水処理水に曝露した緑藻μレミカツキモの生長速度。(a)2015年1月試料、(b)2015年4月試料、(c)2015年7月試料、(d)2015年10月試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。
* : 対照区よりも有意に低下 (p<0.05)

は80%以上と求められた。

3. 2 毒性同定評価

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

3. 2. 1 1月流入下水、下水処理水に対する試験

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(a)に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは SPE カラム通過水であった (p<0.05)。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し (p<0.05)、影響が見られた。表-2 よりメタノール溶出物は無極性有機物である。よって流入下水中の主な影響物質は無極性有機物であると推定された。

下水処理水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(b)に示す。対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった (p>0.05)。無処理に比べて生長速度が有意に増加した前処理区はなかった。下水処理水に対する TIE は排水試験より 8 日後に実施したが、図-1(a)の下水処理水 80%と図-2(b)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 16.9%、4.7%であった。生長阻害率は TIE 試験時の方で小さくなったことから、4℃暗所で保管した

ことにより生物影響は低下したと判断した。

表-2 より 4℃保存で生物影響が低下する物質は酸化物質あるいは界面活性剤である。よって下水処理水中の主な影響物質は酸化物質あるいは界面活性剤であると推定された。

3. 2. 2 4月流入下水に対する試験

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(c)に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整であった (p<0.05)。また、対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった (p>0.05)。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、図-1(b)の流入下水 80%と図-2(c)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 38.3%、27.1%であった。生長阻害率は TIE 試験時の方で小さくなったことから、4℃暗所で保管したことにより生物影響は低下したと判断した。

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

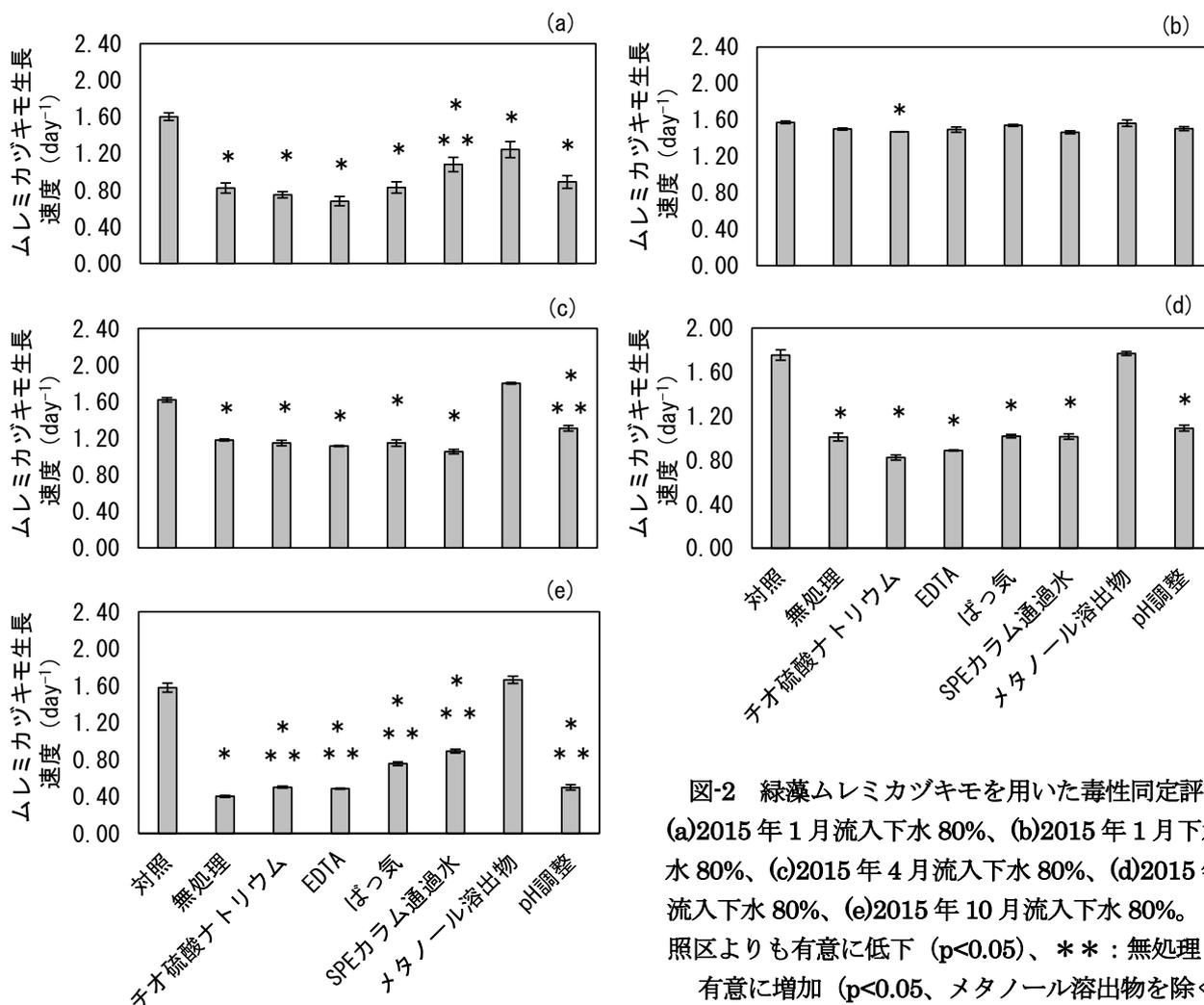


図-2 緑藻μレミカヅキモを用いた毒性同定評価。

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

3. 2. 3 7月流入下水に対する試験

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(d)に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加 (p<0.05) したのは pH 調整であった。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり (p>0.05)、影響が無かった。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、図-1(c)の流入下水 80%と図-2(d)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 37.3%、42.5%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

表-2 より pH 調整で生物影響が低下する物質はアンモニアである。ただし、本試験において pH 調整による生長速度の改善はわずかであることから、流入下水中の主な影響物質はアンモニアのみならずそれ以外の化学物質も複合的に作用していることも推定された。

3. 2. 4 10月流入下水に対する試験

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-2(e)に示す。無処理に比べ、全ての前処理区で生長速度が有意に増加した (p<0.05)。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり (p>0.05)、影響が無かった。流入下水に対する TIE は排水試験より 13 日後に実施したが、図-1(d)の流入下水 80%と図-2(e)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 71.8%、74.6%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

メタノール溶出物を除く全ての前処理で生物影響が低下したことから、表-2 より流入下水中の主な影響物質は酸化物、アンモニア、界面活性剤、陽イオン金属などが推定された。

4. 考察

表-3 に各試験生物に対する流入下水、下水処理水の NOEC、TIE により推定された生物影響化学物質をまとめた。表中の推定影響物質について、生物影響が見られず TIE を実施する必要がなかった下水試料については「なし」とした。

NOEC をみると、いずれの採取時期においても流入下水より下水処理水の NOEC の値が大きい、あるいは試験における最高の試料割合でも影響がないことから、A 処理場での下水処理によって生物影響が削減されたことが示された。表-3 に示したように流入下水の生物影響化学物質として種々の生物影響化学物質が推定されたが、下水処理水では生物影響が低減あるいは消失したことから、A 処理場での下水処理によってこれらの化学物質による生物影響が削減されたと考えられた。PRTR けんさくくん⁸⁾の公開情報によると A 処理場には界面活性剤、疎水性化学物質、金属類、酸化物等が流入することが示されており、TIE で示された生物影響物質との関連性があると分かった。このような公開情報は下水試料中の生物影響物質の推定や同定を行う上で参考になることが示唆された。本研究で実施した PRTR 情報の活用、生物応答試験、毒性同定評価の一連の調査研究手法は、下水道における新しい排水管理手法になり得ると考えられた。

下水処理水においては 1 月試料のみ生物影響が確認された。2015 年 1 月、2015 年 4 月、7 月、10 月での A 処理場の下水処理水の月間平均水温は約 18℃、約 19℃、約 28℃、約 27℃であり、1 月に最も水温が低かった。1 月の下水処理水のみムレミカヅキモに対する生物影響が見られたのは水温低下によって生物活性が他の時期よりも相対的に低下し、そのことが生物影響化学物質の除去能低下を引き起こし、その結果として下水処理水中に一部の生物影響化学物質が残存したと推定された。また、本調査では A 処理場のほか標準活性汚泥処理で処理する 2 箇所の処理場でも流入下水と放流水を採水し、同様の試験を行ったところ、2 処理場ともに A 処理場と同様に冬季の水温低下期のみ放流水はムレミカヅキモに対する生物影響が見られた。水温低下による生物影響削減効果の低下は活性汚泥処理で生じやすいことが示唆されるとともに、他の処理方式でも同様の現象が起こるか否か、またそのメカニズムについて今後も情報収集に努める必要があると考えられた。

表-3 緑藻ムレミカヅキモに対する流入下水、下水処理水の NOEC と毒性同定評価により推定された生物影響物質のまとめ。NOEC：無影響濃度 (No Observed Effective Concentration)

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

5. まとめ

本調査では下水処理による生物影響削減能の季節変化を評価するため、嫌気好気活性処理を行う A 処理場において流入下水と下水処理水を採水し藻類生長阻害試験を実施した。結果として、流入下水では計 4 回のいずれの時期においても供試藻類に対する生物影響が見られた。下水処理水では春 (4 月)、夏 (7 月)、秋 (10 月) に得たものは生物影響がなかったものの、冬 (1 月) に得たもののみ影響が確認された。その原因として、冬季には下水の水温低下に伴う生物活性の低下に起因して生物影響物質が除去しきれずに残存してしまうことが推定された。

参考文献

- 1) 国立環境研究所・環境省：生物応答を用いた排水試験法 (検討案)、排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会、2013
- 2) Kusui, T., Takata, Y., Itatsu, Y., and Zha, J. : Whole effluent toxicity assessment of industrial effluents in Toyama Prefecture with a battery of short-term chronic bioassays. *J. Wat. Environ. Technol.*, 12, 55-63, 2014
- 3) 富川恵子、入江俊行、内田弘美、渡部春奈、鎌迫典

- 久：WET法を活用した工場排水管理：化学工業における排水改善の取り組み、環境化学、25(1)、27-33、2015
- 4) 藤原尚美、野中信一、豊久志朗、鑪迫典久：金属製品製造工場のWETを用いた排水中毒性要因の推定とその改善例、環境化学、25(1)、35-42、2015
- 5) 山本裕史、安部香緒里、池幡佳織、安田侑右、田村生弥、中村友紀、鑪迫典久：徳島県内の下水処理施設放流水を対象にしたWET試験、環境工学研究論文集、47、727-734、2010
- 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-III_384、2013
- 7) U.S.EPA, Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 1999
- 8) 経済産業省ホームページ
http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、平成27年5月アクセス
- 9) U.S.EPA, Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992
- 10) R Core Team : R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>, accessed on May 2015

A STUDY ON UPGRADING OF EVALUATION OF TREATED SEWAGE USING BIOLOGICAL RESPONSES

Budget: Grants for operating expenses (General account)

Research Period: FY2014-2019

Research Team: Water Quality Research Team,

Author: Seiichiro OKAMOTO, Koya KOMORI,
Tomokazu KITAMURA, Hiroyuki MANO,
Fumihiko TAKEDA

Abstract:

The purpose of this study is to evaluate seasonal variation of a reduction ability of biological impact by a wastewater treatment. Influent and secondary effluent were obtained from a wastewater treatment plant employing anoxic-oxic process, which were examined based on an algal growth test using a green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. The influent in every season tested had a growth-inhibiting effect on the algae. The secondary effluent obtained in winter had the effect, although not obtained in other seasons. The growth-inhibiting effect of the effluent in the winter may be due to the reduction in the biological activity accompanied by a decrease in water temperature, which may lead to the residue of some biologically impactful chemicals in the effluent.

Key words: Whole Effluent Toxicity, Sewage treatment, biological impact, *Pseudokirchneriella subcapitata*.