

土木研究所

平成29年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2017 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

平成30年8月

国立研究開発法人 土木研究所

National Research and Development Agency  
Public Works Research Institute

平成30年8月

# 平成29年度下水道関係調査研究年次報告書集

材料資源研究グループ

水環境研究グループ

水質チーム

## 概要

本報告書集は、平成29年度に国立研究開発法人土木研究所において実施された下水道に関係する調査研究の成果を集約して資料としてとりまとめたものである。

キーワード：下水道、下水処理、高度処理、汚泥、水質浄化、リサイクル

# 目 次

## I 材料資源研究グループ

		頁
1	水質リスクの評価手法に関する調査 (受託業務費)	3
2	下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産 (受託業務費)	21
3	下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究 (運営費交付金)	26
4	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)	33
5	公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究 (運営費交付金)	40
6	再生水の利用促進に向けた病原微生物と消毒副生成物の制御手法に関する研究 (運営費交付金)	50
7	新規省エネルギー型下水処理技術の開発 (運営費交付金)	56
8	多様化する感染症に応じた下水処理水の高度な消毒手法の構築に関する研究 (運営費交付金)	62
9	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)	79

## II 水質チーム

10	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 (受託業務費)	83
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 (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
12	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 (運営費交付金)	89
13	底層環境に着目した停滞性水域における水環境管理技術に関する研究 (運営費交付金)	96
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 (運営費交付金)	101
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)	110
16	生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究 (運営費交付金)	114
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)	121
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)	128
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)	132
20	オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価法の開発 (科研費)	138

\*受託業務費とは、国土交通省からの受託によるものである。

## I . 材料資源研究グループによる研究

## 水質リスクの評価手法に関する調査

研究予算：受託研究費（下水道事業調査費）

研究期間：平 29

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】

本調査では、小規模下水処理場における大腸菌の実態把握、さらには塩素消毒によるノロウイルス（NoV）、NoV 代替指標として大腸菌ファージなどへの除去・不活化効果にアンモニアが及ぼす影響を把握した。小規模下水処理場を対象とした大腸菌の実態調査では、流入下水の検出濃度範囲は  $10^3 \sim 10^5$  CFU (MPN) /mL レベルであり、平均検出濃度は約  $8.0 \times 10^4$  CFU/mL であった。二次処理水では 1 程度から 1,200~2,000CFU (MPN) /mL で推移、平均検出濃度は 170 CFU (MPN) /mL 程度であった。また、好気性ろ床法の二次処理水の大腸菌、大腸菌群の平均検出濃度は、調査対象とした全下水処理場の平均値と比較してやや高い状況にあった。放流水の大腸菌の検出濃度に関しては、不検出～最大 300~800 CFU (MPN) /mL 程度、平均検出濃度は 35~60 CFU (MPN) /mL であった。大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は流入下水で 20%~26%、二次処理水では 24%~32%、放流水は 12%~26% であった。大腸菌の日間変動として最小検出濃度に対する最大検出濃度比を求めると、流入下水では 4.7~6.9 倍、二次処理水は 1.6~2.4 倍であり、二次処理水では流入下水に比較して変動幅が平滑化されていた。大腸菌と大腸菌群の関係について整理した結果、放流水の平均大腸菌群濃度が 235~300 CFU (MPN) /mL としたときの大腸菌濃度は、35~50 CFU (MPN) /mL、不検出時のデータに検出下限値を入れた場合には 31~46 CFU (MPN) /mL となった。

アンモニアの濃度が大きく異なると予測される下水処理場での硝化促進および抑制運転時において、大腸菌、野生株の大腸菌ファージとその遺伝子群、ノロウイルス（NoV）の存在実態と塩素消毒での不活化および遺伝子低減効果を評価・比較した。その結果、野生株の F 特異 RNA ファージ（FPH）を対象とし硝化促進処理水において、FPH と NoV の遺伝子の低減効果の比較結果から NoV の不活化効果を推定すると、残留全塩素濃度からの Ct 値を 25 mg・min/L 以上とすることで NoV の感染価を 3-log 以上低減できる可能性があることが推算された。しかし、硝化抑制処理水では、FPH の感染価評価において残留遊離塩素濃度からの Ct 値では 8 mg・min/L 以上、残留全塩素からの Ct 値では 200 mg・min/L 以上の Ct 値でも 1-log 以下の不活化効果が確認され、アンモニア濃度が高い硝化抑制処理水ではウイルスへの消毒効果は期待できないことが確認された。そのため、硝化抑制運転等により終沈流出水中にアンモニア濃度が高いことが予測される場合は、アンモニア等の水質によりウイルス不活化効果への影響が少ない紫外線消毒等を用いる必要があることが示唆された。

キーワード：アンモニア、大腸菌、塩素消毒、ノロウイルス、野生株大腸菌ファージ、感染価

### 1. はじめに

現在、環境省においてアンモニア、ニッケルの水質目標および有害性評価や、環境基準項目の大腸菌への変更について検討がなされている。下水処理過程における当該物質等の除去特性や生物影響を明らかにすることは、下水道事業における喫緊の課題である。特に、アンモニアに関しては生物影響に加え、塩素消毒効果に影響を及ぼす物質であることから、実態把握と併せて大腸菌などを対象とした消毒効果や、生物影響に係る評価が必要である。

本調査の目的は、小規模下水処理場における大腸菌の放流実態、さらには塩素消毒による大腸菌などへの不活化効果にアンモニアが及ぼす影響を把握するものである。

### 2. 大腸菌の実態把握

特定酵素基質培地法により、小規模下水処理場（北海道～九州地方 54 箇所の下水处理場）の流入下水、二次処理水、放流水を対象とした大腸菌濃度の分布を把握した。

(1) 調査目的

環境基準項目の1つである大腸菌群指標が大腸菌への変更が検討されている。このため、現行の放流水質基準項目である大腸菌群から大腸菌指標への移行を考慮するにあたり、下水試料の大腸菌の実態把握を目的として、全国54箇所の下水処理場にて調査を行った。

(2) 評価方法

処理水量が1万m<sup>3</sup>/日未満の小規模下水処理場を対象に、調査協力が得られた54箇所の下水処理場（北海道～九州地方）の下水試料を採水した。下水処理方式の内訳は標準活性汚泥法（15箇所）、土壌被覆型礫間接触法（5箇所）、接触酸化法（4箇所）、好気性ろ床法（4箇所）、嫌気好気ろ床法（6箇所）、オキシデーションディッチ法（20箇所）であった。採水試料は流入下水、二次処理水（消毒前）、放流水（消毒後）とし、大腸菌（群）を定量した。定量方法はXM-G寒天培地による混釈法、QTトレイによるMPN法の2手法とした。また、一部の下水処理場にて24時間採水を行い、大腸菌（群）濃度の日間変動を把握した。

(3) 評価結果

調査対象とした全下水処理場の大腸菌（群）の検出濃度の推移を表-1に、各下水処理法別に整理した結果を表-2~7に示す。全下水処理場における流入下水の大腸菌の検出濃度範囲は、10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup>CFU（MPN）/mLレベルであり、平均検出濃度は約8.0×10<sup>4</sup>CFU/mLであった。XM-G寒天培地、QTトレイによる検出濃度に違いは生じていなかった。大腸菌群では10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup>CFU（MPN）/mLの検出濃度範囲となっており、最大検出濃度は大腸菌に比較して1オーダー高い状況であった。流入下水試料中の大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は20%~26%であった。

表-1 調査対象全下水処理場の大腸菌（群）の推移

全54箇所下水処理場の大腸菌（群）の検出濃度								
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	2,000~895,000	0.5~1,220	0~535	濃度範囲	2,500~3,100,000	1.5~3,800	0~6,700
	平均	83,000	167	35	平均	410,000	708	299
	中央値	50,000	68	0.5	中央値	240,000	345	24
QTトレイ	濃度範囲	2,600~800,000	0.6~1,970	0~777	濃度範囲	14,000~2,000,000	0.9~4,200	0~2,400
	平均	78,000	178	60	平均	300,000	562	235
	中央値	49,000	54	1.2	中央値	190,000	237	37

CFU(MPN)/mL

表-2 標準活性汚泥法導入処理場における大腸菌（群）の推移

標準活性汚泥法（15箇所）								
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	2,000~450,000	5.0~455	0~90	濃度範囲	48,000~3,100,000	180~2,000	0~730
	平均	84,000	149	22	平均	660,000	790	191
	中央値	60,000	98	3.5	中央値	260,000	470	79
QTトレイ	濃度範囲	8,300~140,000	7.2~883	0~44	濃度範囲	76,000~1,600,000	170~2,100	0.1~752
	平均	60,000	150	25	平均	370,000	566	201
	中央値	45,000	86	5.2	中央値	250,000	385	53

CFU(MPN)/mL

表-3 土壤被覆型礫間接触法導入処理場における大腸菌(群)の推移

土壤被覆型礫間接触法(5箇所)								
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	14,000~100,000	0.5~395	0~280	濃度範囲	2,500~640,000	1.5~910	0~670
	平均	37,000	111	56	平均	230,000	430	133
	中央値	20,000	38	0	中央値	130,000	440	0
QTトレイ	濃度範囲	11,000~140,000	0.6~282	0~355	濃度範囲	14,000~230,000	0.9~600	0~816
	平均	54,000	88	71	平均	100,000	204	163
	中央値	33,000	31	0	中央値	97,000	111	0.2

CFU(MPN)/mL

表-4 接触酸化法導入処理場における大腸菌(群)の推移

接触酸化法(4箇所)								
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	5,000~50,000	17~260	0~4	濃度範囲	47,000~270,000	240~1,300	0~120
	平均	37,000	87	1	平均	190,000	590	36
	中央値	47,000	35	0	中央値	220,000	440	12
QTトレイ	濃度範囲	12,000~79,000	13~208	0~9	濃度範囲	26,000~1,100,000	57~930	0~37
	平均	46,000	74	2.6	平均	360,000	544	12
	中央値	47,000	37	0.7	中央値	150,000	595	6.2

CFU(MPN)/mL

表-5 好気性ろ床法導入処理場における大腸菌(群)の推移

好気性ろ床法(4箇所)								
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	15,000~90,000	9~1,220	0~175	濃度範囲	50,000~440,000	80~3,800	0~655
	平均	51,000	429	44	平均	300,000	1,800	186
	中央値	50,000	243	0.7	中央値	360,000	1,700	44.0
QTトレイ	濃度範囲	16,000~113,000	16~1,970	0~614	濃度範囲	57,000~290,000	45~3,500	0~1,700
	平均	62,000	696	158	平均	200,000	1,500	486
	中央値	59,000	400	8.0	中央値	220,000	1,200	121

CFU(MPN)/mL

表-6 嫌気好気ろ床法導入処理場における大腸菌(群)の推移

嫌気好気ろ床法(6箇所)								
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	10,000~110,000	2~815	0~10.3	濃度範囲	5,000~550,000	70~1,400	0~6,700
	平均	45,000	256	2.6	平均	170,000	570	1,200
	中央値	29,000	33	0	中央値	120,000	330	15
QTトレイ	濃度範囲	2,600~116,000	1~827	0~15	濃度範囲	34,000~500,000	18~2,400	0.1~397
	平均	47,000	167	4.7	平均	150,000	537	134
	中央値	26,000	52	0.04	中央値	66,000	167	40

CFU(MPN)/mL

表-7 オキシレーションディッチ法導入処理場における大腸菌(群)の推移

		OD法(20箇所)						
培地	大腸菌	流入下水	二次処理水	放流水	大腸菌群	流入下水	二次処理水	放流水
XM-G	濃度範囲	25,000~895,000	0~1,095	0~535	濃度範囲	45,000~2,100,000	61~3,300	0~1,400
	平均	120,000	122	55	平均	400,000	130	230
	中央値	68,000	46	5.0	中央値	330,000	170	57
QTトレイ	濃度範囲	22,000~800,000	0.2~1,600	0.002~777	濃度範囲	73,000~2,000,000	5.5~4,200	0.4~2,400
	平均	120,000	141	89	平均	350,000	481	300
	中央値	63,000	49	4.3	中央値	200,000	149	38

CFU(MPN)/mL

二次処理水の大腸菌の検出濃度範囲は、1程度~最大1,200あるいは2,000 CFU (MPN) /mLで推移、平均検出濃度は170 CFU (MPN) /mLであった。大腸菌群の検出濃度範囲は1程度~最大4,000 CFU (MPN) /mLで推移、平均検出濃度は600~700 CFU (MPN) /mLであり、二次処理水試料中の大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は24%~32%と整理された。

放流水の大腸菌の検出濃度に関しては、不検出~最大300~800 CFU (MPN) /mL、平均検出濃度は35~60 CFU (MPN) /mLであった。大腸菌群は不検出~最大2,400~6,700 CFU (MPN) /mL、平均検出濃度は240~300 CFU (MPN) /mL程度であり、放流水試料中の大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は12%~26%であった。

本実態調査時における消毒方式と消毒条件について表-8に整理したが、固形塩素による消毒方式が多くを占めていた。添加濃度は0.01~6.3 mg-Cl/L、残留塩素(遊離あるいは結合型)は0.03~1.5 mg-Cl/L、接触時間は7~180分間であった。なお、各下水処理場の管理者から提供された残留塩素の値は多くが遊離型残留塩素であった。これは、残留塩素が保持されているか否かについて現場にて迅速に確認しているものであり、遊離型残留塩素よりも測定時間を要する結合型残留塩素を同時に測定している下水処理場は少ない状況にあった。また、一部の下水処理場では残留塩素の有無として発色のみで評価を行っているところがあった。

各処理方式別に整理を行った結果を表-2~7に示したが、この中で全体の傾向と比較して異なる状況が見られたのは、好気性ろ床法の二次処理水の大腸菌、大腸菌群の平均検出濃度がやや高いことであった。また、嫌気好気ろ床法の一部の放流水において大腸菌群が高濃度となっており、平均検出濃度に影響を及ぼしていた。この一部の特異データ(大腸菌群6,700 CFU/mL、大腸菌は不検出)を除けば、全ての放流水で現行の放流水質基準の3,000 CFU/mLをクリアしている状況であった。

表-8 調査対象処理場の消毒方式と消毒条件

消毒方式	添加濃度(mgCl/L)	遊離・結合残留塩素(mgCl/L)	接触時間(分)	
固形塩素(34箇所)、次亜塩素酸ナトリウム(15箇所)	範囲	0.01~6.3	0.03~1.5	7~180
	平均	2.2	遊0.2、結0.4	43
紫外線(2箇所)	—	—	—	—
回答数	29	遊37、結12	48	

次いで、放流水の大腸菌(群)の検出濃度が高い状況における消毒条件等を抽出した。具体にはオキシレーションディッチ法による放流水で約500 CFU/mLの場合、固形塩素による添加濃度は1.8 mg-Cl/L、残留塩素濃度が0.1 mg-Cl/L、接触時間は70分間、800 MPN/mLでは固形塩素による添加濃度は不明、残留塩素濃度が0.1 mg-Cl/L、接触時間は24分間であった。同時に測定を行った放流水のNH<sub>4</sub>-N濃度は0.10と0.34 mg/Lであった。他の処理場と比較して消毒条件等に大きな違いはないと考えられるが、固形塩素による対応のため流量変動などの影響を受け消毒効果に影響が現れたものと推定される。

大腸菌の日間変動については3箇所の下水処理場で実施した。標準活性汚泥法が2箇所(日平均下水量2,300 m<sup>3</sup>、5,500 m<sup>3</sup>)、オキシレーションディッチ法の導入処理場が1箇所(970 m<sup>3</sup>/日)である。最小検出濃度に対する最大検

出濃度比を求めると、流入下水試料(2処理場分)の大腸菌の日間変動では4.7~6.9倍(4.1~10倍:QTトレイ評価)、二次処理水(2処理場分)では1.6~2.4倍(1.7~2.6倍:QTトレイ評価)であり、二次処理水では流入下水に比較して変動幅が平滑化されていた。

大腸菌と大腸菌群の関係について整理したものを図-1~6に示す。流入下水試料でややバラツキがあるものの全体的には高い相関関係が見られた。最終的な評価項目である放流水のデータのみを整理した結果を図-3、4に示す。この関係から大腸菌群数が3,000 CFU/mLの場合には、外挿による評価となるが、大腸菌濃度は1,500 CFU/mLとなった。また、本実態調査における放流水の平均大腸菌群数が300 CFU/mLとしたときの大腸菌濃度を求めると約50 CFU/mLとなった(XM-G培地による評価)。同様にQTトレイによる評価では、大腸菌群数が3,000 MPN/mLの場合には、外挿による評価となるが大腸菌濃度は970 MPN/mL、放流水の平均大腸菌群数が235 MPN/mLとしたとき大腸菌濃度は35 MPN/mLとなった。

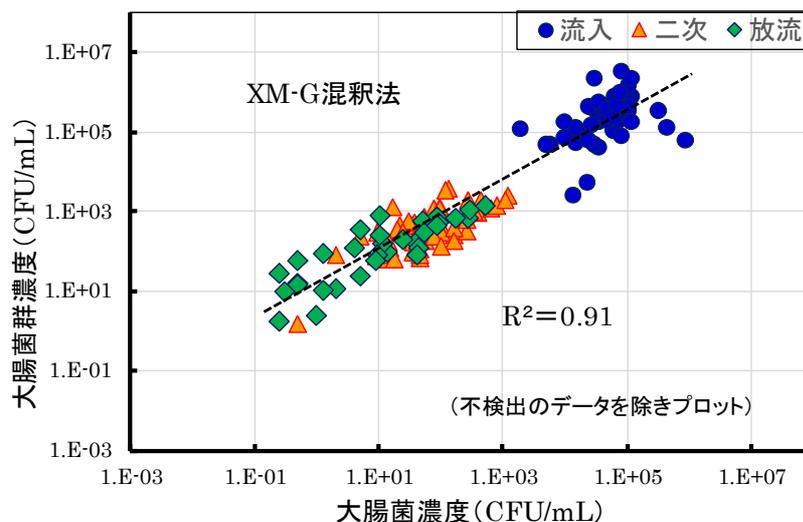


図-1 大腸菌と大腸菌群との関係

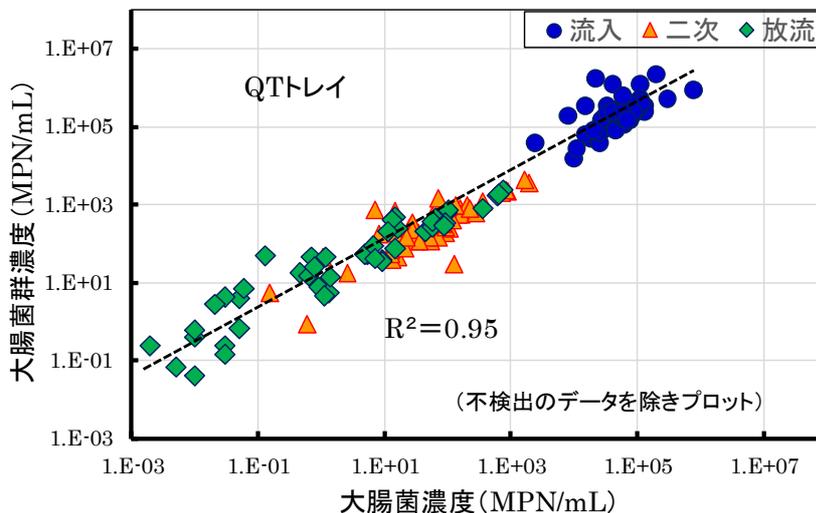


図-2 大腸菌と大腸菌群との関係

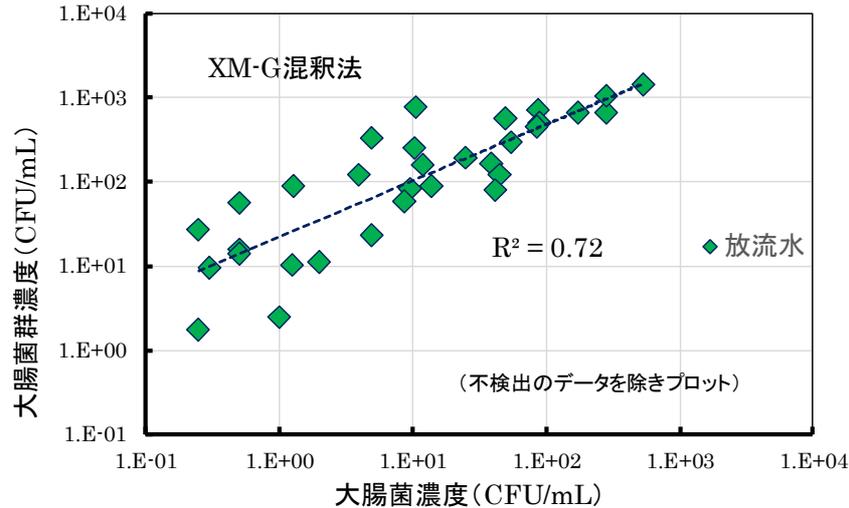


図-3 放流水の大腸菌と大腸菌群の関係

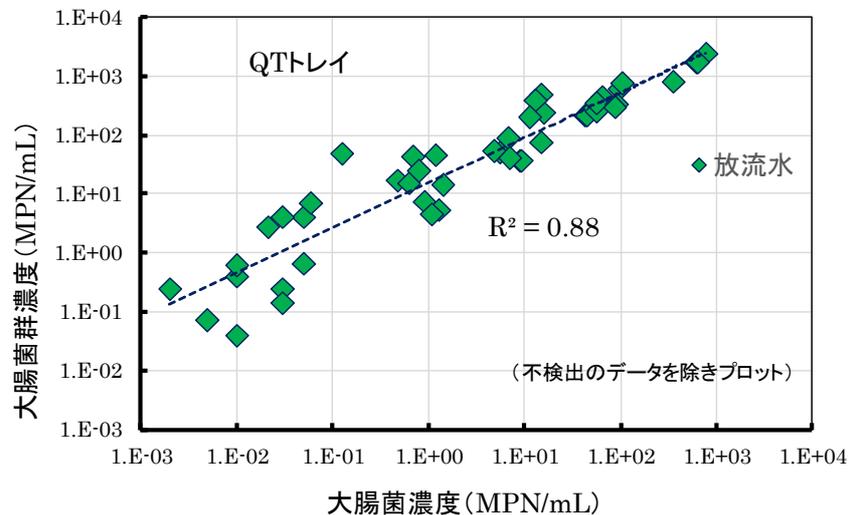


図-4 放流水の大腸菌と大腸菌群の関係

さらに、放流水では不検出のデータがあることから、不検出時のデータに検出下限値を入れ再整理した結果を図-5、6に示す。XM-G 培地による定量において、大腸菌群数が 3,000 CFU/mL の場合には、外挿による評価となるが、大腸菌濃度は 531 CFU/mL となった。本実態調査における放流水の平均大腸菌群数が 300 CFU/mL としたときの大腸菌濃度を求めると 46 CFU/mL となった。同様に QT トレイによる定量では、大腸菌群数が 3,000 MPN/mL の場合には、外挿による評価となるが大腸菌濃度は 600 MPN/mL、放流水の平均大腸菌群数が 235 MPN/mL としたとき大腸菌濃度は 31 MPN/mL となった。

なお、本実態調査では大腸菌の定量法において XM-G 寒天培地による混釈法と QT トレイによる MPN 法の 2 手法を適用したが、その定量値の比較結果について図-7 に示す。相関係数が高く、さらには大腸菌の定量値はほぼ 1 対 1 で整合していた。

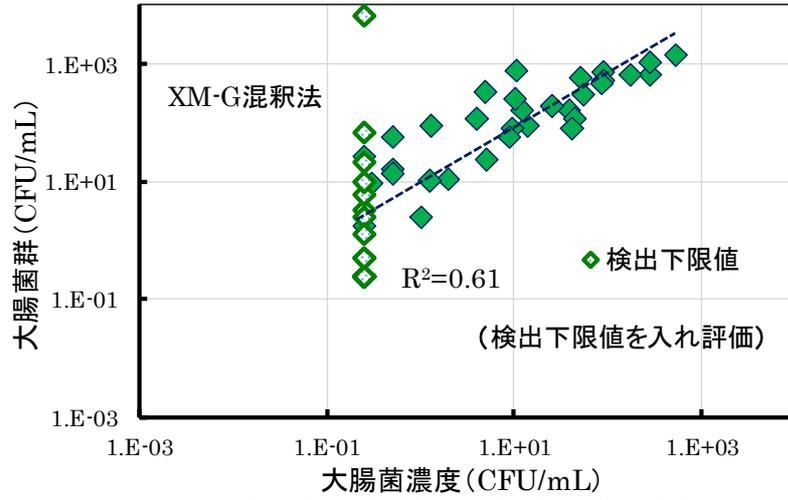


図-5 放流水の大腸菌と大腸菌群の関係

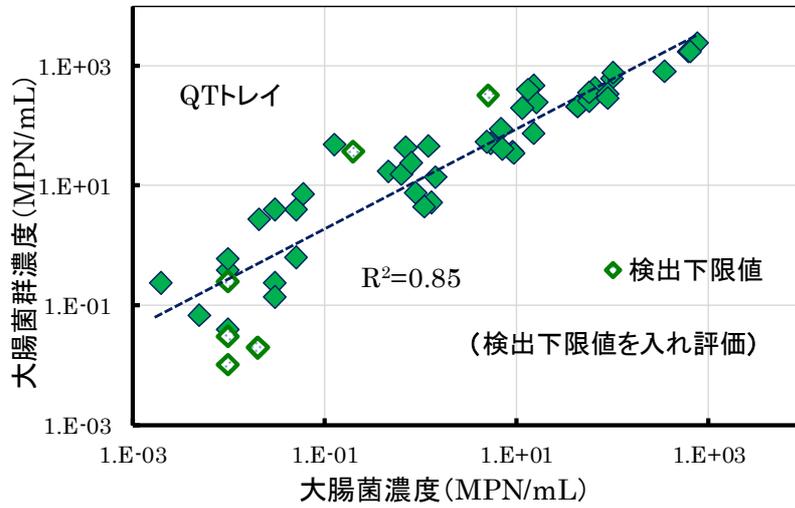


図-6 放流水の大腸菌と大腸菌群数の関係

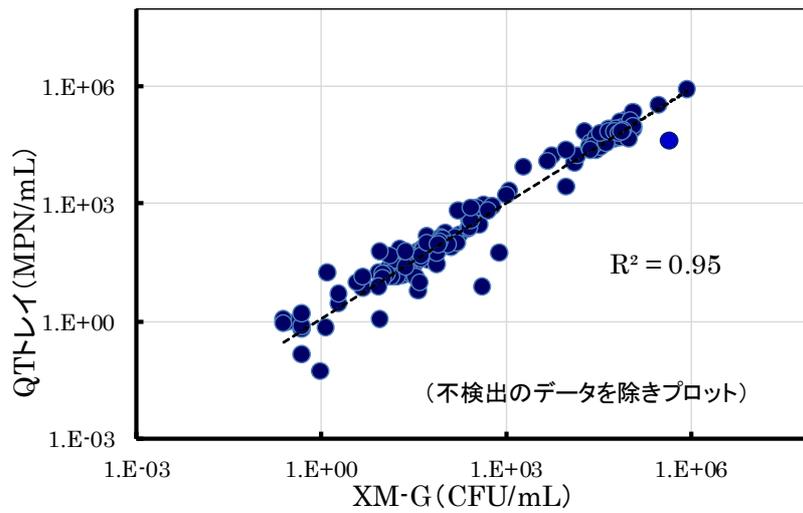


図-7 大腸菌の定量値の比較

### 3. 塩素消毒による大腸菌、大腸菌ファージの不活化、ノロウイルス遺伝子の低減効果に関わる実験

過年度の調査では、野生株大腸菌ファージの感染価と遺伝子減少量からノロウイルス感染価の低減量を類推し、 $Ct$  値を  $20 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  以上とすることで感染価を  $3\text{-log}$  以上低減できる可能性が示唆された。しかし、用いた野生株大腸菌ファージは宿主菌に感染する全ての大腸菌ファージを対象としており、近年では大腸菌ファージの中でも異なる遺伝子群に属する種において、凝集や膜処理および紫外線処理において除去・不活化効果や特性が異なる傾向を示すとの報告がなされている<sup>1)</sup>。

そこで本調査では、アンモニアの濃度が大きく異なると予測される下水処理場での硝化促進および抑制運転時において、大腸菌、野生株の大腸菌ファージとその遺伝子群、ノロウイルスの存在実態と塩素消毒での不活化および遺伝子低減効果を評価した。さらに、野生株の大腸菌ファージ遺伝子群をノロウイルスの測定法と同様の PCR 法（分子生物学的手法であり感染性の有無に関係なく遺伝子量を測定）のみならず、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）による遺伝子低減効果及び不活化効果を明確に評価し、ノロウイルスの遺伝子低減効果との比較によって不活化効果の推定を行った。

以下にパイロットプラントでの調査並びに塩素消毒実験における評価手順を示す。

#### (1) パイロットプラントの採水

本評価では、A 下水処理場に設置されている標準活性汚泥法のパイロットプラントを用いて検討を行った。2017 年 11 月に硝化促進運転を行い、2 回の採水 (No. 1, 2) を行った。No. 1 の採水では、流入水、最終沈澱池流出水（以下、終沈流出水）及び  $2 \text{ mg-Cl/L}$  の塩素添加後 20 分の接触を行った後の放流水を採水した。また、No. 2 の採水では終沈越流水のみを採水し、(2) で示す回分式塩素消毒実験に用いた。2018 年 1 月には硝化抑制運転を行い、硝化促進運転時と同様に 2 回の採水 (No. 1, 2) を行った。しかし、硝化抑制運転では終沈流出水の塩素消毒での塩素添加濃度を  $6 \text{ mg-Cl/L}$  としている。

採水したサンプルの一般水質分析は、下水試験方法に準拠して測定した。また、サンプル中の大腸菌は、XM-G 寒天培地（ニッスイ）を用いて測定した。大腸菌ファージは、採水したサンプル中に存在する野生株の F 特異 RNA ファージ (FPH) を対象として測定した。Typhimurium WG49（以下、WG49）を宿主菌として用いて、ブラック形成法<sup>2)</sup>による感染力を有している総 FPH 濃度 (Plaque)、定量的タイピング手法<sup>3)</sup>による感染力を有している FPH 遺伝子群別の濃度 (ICC-PCR)、リアルタイム PCR 法<sup>4)</sup>による FPH 遺伝子群別の遺伝子濃度 (PCR)、の 3 つの手法により定量した。また、ノロウイルスの GII (NoV GII) は、感染力の評価手法が確立されていないことから、リアルタイム PCR 法<sup>4)</sup>でのみ定量した。

塩素消毒では、残留塩素濃度 ( $C$ ) と接触時間 ( $t$ ) の積で定義される  $Ct$  値が指標として広く用いられている。塩素は水中に存在している形態により大きく消毒力が異なるため、残留塩素濃度測定時に遊離塩素および全塩素の両方から算出した  $Ct$  値での評価を行う必要がある。そのため、パイロットプラントの調査および (2) で示す塩素消毒実験において、5~10 分間の経過時間ごとに残留遊離塩素および全塩素濃度を測定し、その平均残留塩素濃度にその時の接触時間を乗じ、最終的に 20 分間における積により算出して評価した。

#### (2) 塩素消毒実験

(1) で採水した No. 1, 2 の硝化促進・抑制運転の終沈流出水（硝化促進運転処理水、硝化抑制運転処理水）を用いて回分式塩素消毒実験を実施した。試験水の水質性状は表-9 に示すとおりであった。硝化促進運転処理水 No. 1, 2 を用いた消毒実験では、初期投入塩素濃度を  $1, 2, 3, 4 \text{ mg-Cl/L}$  とし、接触時間を 20 分間とした。また、硝化抑制運転処理水 No. 1, 2 を用いた消毒実験では、初期投入塩素濃度を  $2, 4, 6, 8 \text{ mg-Cl/L}$  (No. 1) と  $2, 8 \text{ mg-Cl/L}$  (No. 2) とし、接触時間は 20 分間とした。終沈流出水には、感染力を有する野生株の FPH が消毒処理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、的確に消毒効果を評価するため、人為的に高濃度に培養させた FPH を添加して消毒実験を行った。ICC-PCR により終沈流出水中の FPH 濃度測定結果で、FPH 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て、宿主菌の WG49 を新たな液体培地に添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養し、野生株の FPH を再増殖させた。宿主菌を取り除くため、 $2000 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 10 分間遠心分離し、その上澄液を  $0.45 \mu\text{m}$

のメンブレンフィルターでろ過した。なお、高濃度の FPH 液を消毒実験用試験水に直接添加すると、培地成分により試験水の水質性状が大きく変化するため、試験水に添加する直前に AmiconUltra-15 (分画分子量 100kDa, Merck 社製) を用いて培地成分を除いた。作成した高濃度 FPH 液を初期濃度で約  $10^6$  MPN/100mL となるように添加し、硝化促進運転処理水 No. 1, 2 を用いた消毒実験では初期投入塩素濃度を 1, 2, 3, 4 mg-Cl/L、硝化抑制運転処理水 No. 1, 2 を用いた消毒実験では初期投入塩素濃度を 3, 6, 9, 12 mg-Cl/L (No. 1) と 2, 8 mg-Cl/L (No. 2) とし、接触時間を 20 分間とした。接触時間が 20 分間に達した試料は、残留塩素中和のためにチオ硫酸ナトリウム溶液を添加した。試験水及び消毒処理後の FPH の定量は (1) と同様に 3 つの手法により定量した。また、NoV GII に対しても (1) と同様に PCR での測定を行い、FPH の PCR による結果と比較し、遺伝子低減効果が類似した FPH 遺伝子群から、ICC-PCR での評価により不活化効果の推定を行った。

表-9 試験水 (硝化促進・抑制運転の終沈流出水 No. 1, 2) の組成

項目	硝化促進運転処理水		硝化抑制運転処理水	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
懸濁物質(SS) (mg/L)	4.7	4.7	1.7	1.3
化学的酸素要求量 COD <sub>cr</sub> (mg/L)	11	11	27	22
全窒素 (T-N) (mg/L)	15.7	15.4	22.0	21.8
全リン (T-P) (mg/L)	4.8	5.2	4.4	3.5
アンモニア性窒素(NH <sub>4</sub> -N) (mg/L)	0.12	0.17	18.7	20.8
濁度 (NTU)	1.2	2.5	0.5	0.2

### (3) 評価結果

#### 硝化促進運転時における存在濃度及び終沈流出水を用いた塩素消毒実験結果

図-8 に、パイロットプラントの硝化促進運転時における FPH (ICC-PCR、PCR、Plaque) と NoV GII の存在濃度を示す。流入水において感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の存在濃度は、GI < GII = GIII = GIV = Plaque の順であり、GI が最も低濃度で存在しており、その他は同程度であった。FPH と NoV GII 遺伝子 (PCR) の存在濃度は、FPH GI < FPH GIII = FPH GIV < NoV GII < FPH GII の順であり、FPH GII が最も高く、感染力を含めた評価と同様に FPH GI が最も低かった。

終沈流出水では、感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の存在濃度は、GI < GIV < GII = GIII = Plaque の順であり、GI が最も低濃度で存在し、GIV も低下した。FPH と NoV GII 遺伝子 (PCR) の存在濃度は、FPH GIII < FPH GI < NoV GII < FPH GII (FPH GIV は不検出) の順であり、流入水と順番が異なった。塩素消毒後の放流水では、感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の中では GII と Plaque のみ検出されたが、FPH と NoV GII 遺伝子 (PCR) は終沈流出水に検出されなかった FPH GIV を除いたすべての遺伝子が検出され、その濃度も終沈流出水と同程度であった。

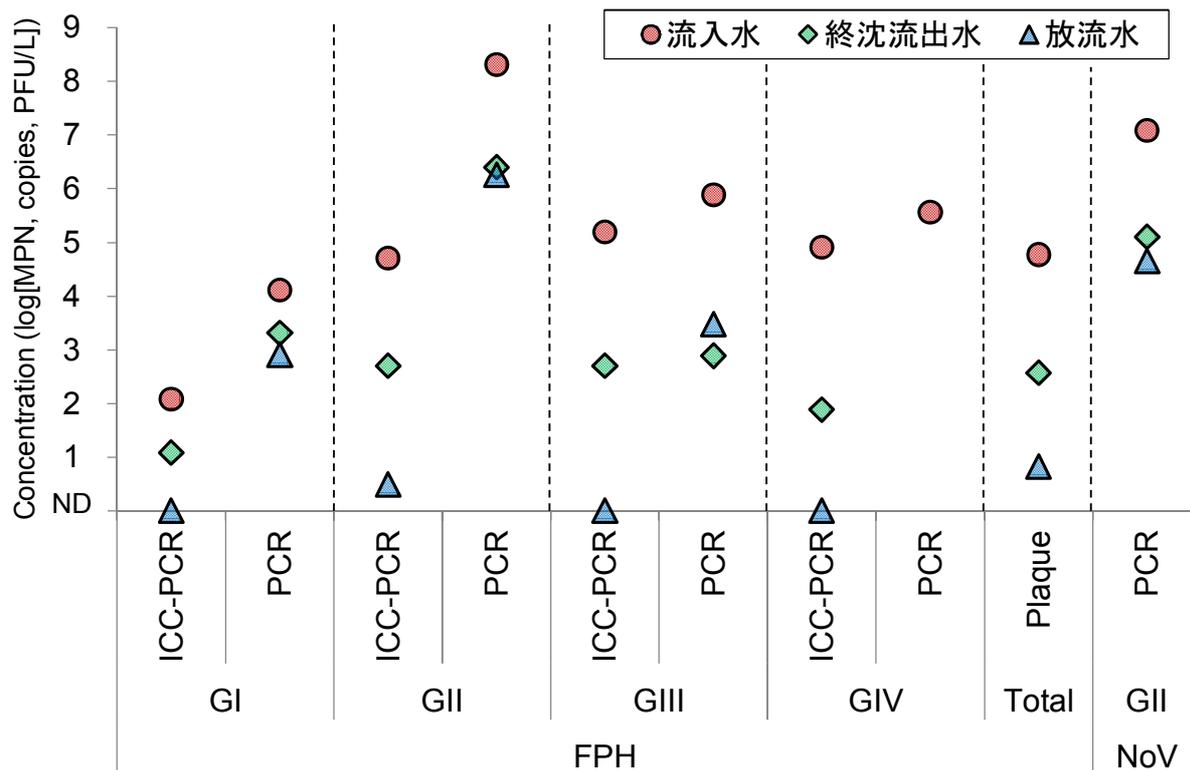


図-8 硝化促進運転時におけるFPH (ICC-PCR、PCR、Plaque) とNoV GIIの存在濃度

これらの存在濃度から、生物処理（硝化促進運転）と塩素消毒での除去・不活化効果を計算した（表-10）。生物処理による感染力を含めたFPH（ICC-PCR、Plaque）の除去・不活化効果は、GI<GII≒Plaque<GIII<GIVの順であり、GIが最も低かった。FPHとNoV遺伝子の除去率（PCR）は、FPH GI<FPH GII≒NoV GII<FPH GIII≒FPH GIVの順であり、感染力を含めた結果と同様にFPH GIが最も低かった。塩素消毒では、感染力を含めた除去・不活化効果については、FPH GI、GIII、GIVが検出されなかったことから、明確な不活化効果の評価ができなかったが、1.1~2.7-log以上の不活化効果が得られた。塩素処理後に検出された感染力を含めたFPH GIIとPlaqueは、それぞれ2.2-logと1.7-logの不活化効果が得られた。しかし、塩素消毒によるFPHとNoV遺伝子（PCR）の低減効果は、0.0~0.4-logとほとんど低減されていないことが確認された。塩素消毒での残留塩素からCt値を算出した結果、遊離塩素では1.4 mg·min/L、全塩素では8.6 mg·min/Lだった。一方、大腸菌は流入水、終沈流出水、放流水でそれぞれ、4.5×10<sup>4</sup>、36、2 CFU/mLで検出された。

表-10 硝化促進運転時における FPH (ICC-PCR、PCR、Plaque) と NoV GII の除去・不活化率

			生物処理 (硝化促進運転)	塩素消毒 (2mg-Cl/L、滞留時間 20 分)
FPH	GI	ICC-PCR	1.0-log	>1.1-log
		PCR	0.8-log	0.4-log
	GII	ICC-PCR	2.0-log	2.2-log
		PCR	1.9-log	0.1-log
	GIII	ICC-PCR	2.5-log	>2.7-log
		PCR	3.0-log	0.0-log
	GIV	ICC-PCR	3.0-log	>1.9-log
		PCR	>2.7-log	-
	Total	Plaque	2.2-log	1.7-log
NoV	GII	PCR	2.0-log	0.4-log

図-9 に、硝化促進運転処理水 No. 1, 2 を用いた回分式塩素消毒実験における FPH GI~IV (ICC-PCR) の結果を示す。残留遊離塩素からの  $Ct$  値での評価 (図-9、左) では、FPH GI~IV とともに 3-log 程度までは線形に不活化されるが、それ以上ではテーリングする傾向が見られた。このような傾向は、酸化成分と浮遊粒子を含む下水で得られる典型的な塩素消毒曲線 (図-10) と同様な傾向であった。残留遊離塩素からの  $Ct$  値で  $5 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  までは線形で不活化されていることから、 $5 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  以下のデータから近似直線を引いて 3-log 不活化に必要な  $Ct$  値を算出した (図-9、左)。その結果、FPH GI~IV (ICC-PCR) に対して 3-log (99.9%) の不活化効果が確認できる残留遊離塩素濃度からの  $Ct$  値は  $2.6 \sim 4.2 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  であり、GI~IV の遺伝子群の間には大きな差はなかった。また、残留全塩素からの  $Ct$  値での評価 (図-9、右) では、 $Ct$  値が増加するとともに FPH GI~IV の不活化効果が向上した。そのため、すべてのデータから近似直線を引いて 3-log 不活化に必要な  $Ct$  値を算出した結果 (図-9、右)、 $20 \sim 25 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  であり残留遊離塩素からの  $Ct$  値での評価と同様に GI~IV の遺伝子群の間には大きな差はなかった。一方、大腸菌は、初期投入塩素濃度  $2 \text{ mg-Cl/L}$  の 20 分接触で、 $1 \sim 2 \text{ CFU/mL}$  になり、初期投入塩素濃度  $3 \text{ mg-Cl/L}$  以上の 20 分接触で、 $1 \text{ CFU/mL}$  以下となった。これらの結果から、塩素消毒により FPH を 3 log 以上不活化させるためには、全塩素濃度で  $Ct$  値が  $20 \sim 25 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$ 、または遊離塩素濃度での  $Ct$  値で  $2.6 \sim 4.2 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  以上の確保が必要であると考えられた。

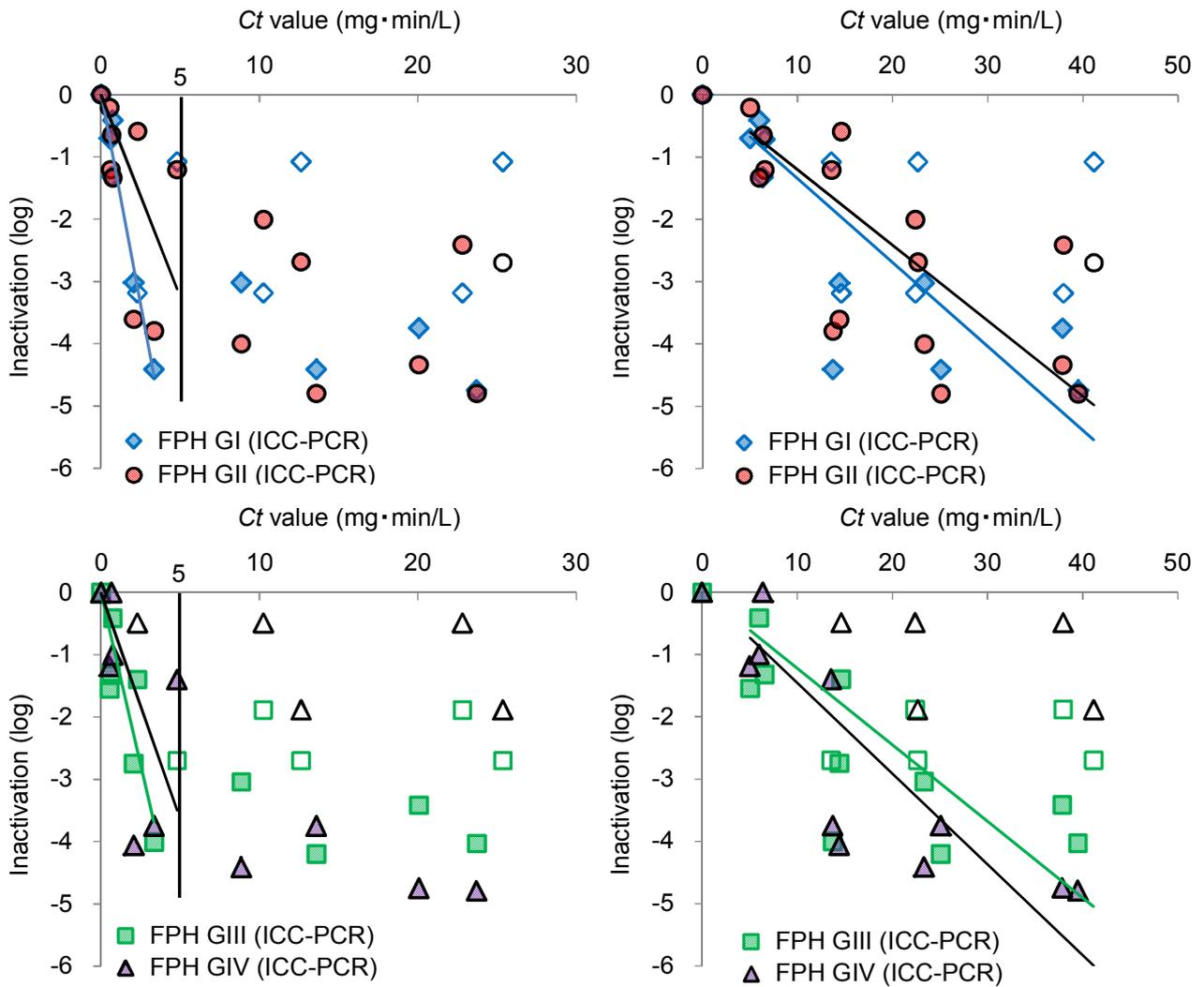


図-9 硝化促進処理水を用いた塩素消毒実験における FPH GI~IV の不活化  
 (左は残留遊離塩素、右は残留全塩素からの Ct 値、白抜きは検出下限値以下)

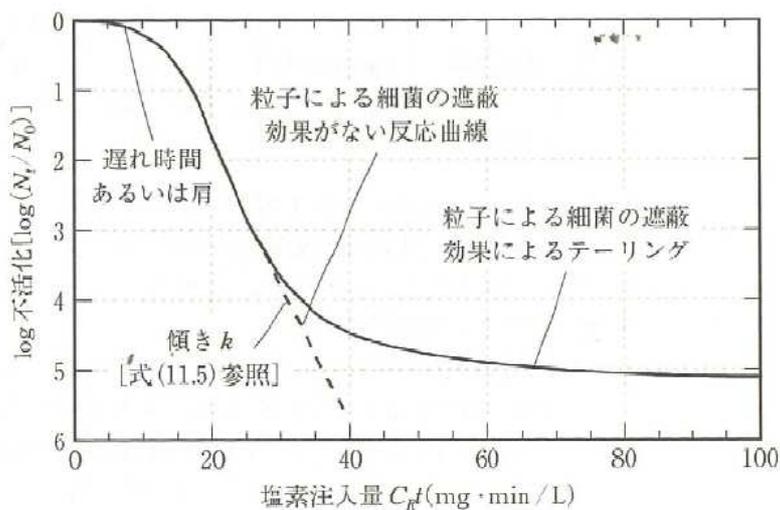


図-10 下水で得られる典型的な塩素消毒曲線 (図中の Ct 値は残留遊離塩素からの計算値)  
 (出典：水再生利用学)

図-11 に、硝化促進運転処理水 No. 1, 2 を用いた回分式塩素消毒実験における NoV と FPH GI~IV (PCR) 遺伝子の低減効果の比較結果を示す。FPH GIV 遺伝子は検出されなかったため図-11 では除外している。感染力を含めた FPH GI~IV (ICC-PCR) の不活化効果の評価において残留全塩素からの Ct 値での評価 (図-9、右) で、すべてのデータを用いて解析ができたことから、NoV と FPH GI~IV (PCR) 遺伝子の低減効果の評価では残留全塩素からの Ct 値での評価結果のみを示す。NoV GII の遺伝子は、残留全塩素からの Ct 値に応じて減少する傾向が確認され、48 mg・min/L で 3-log の遺伝子低減効果が見込まれた。FPH GI、GII、GIII 遺伝子 (PCR) の 3-log の低減効果に必要な Ct 値は、それぞれ 38、39、26 mg・min/L であり、NoV GII の遺伝子低減効果と比較した結果、FPH GII 遺伝子と最も類似しており、FPH GI 遺伝子の低減効果とも比較的近かったが FPH GIII とは少し離れていた。遺伝子の低減効果の比較結果から、NoV GII と FPH GI、GII の塩素消毒に対する消毒耐性が同等であると類推すると、感染力を含めた FPH GI と GII (ICC-PCR) の不活化効果の評価では、3-log 不活化に必要な Ct 値がそれぞれ 21、25 mg・min/L であったため、Ct 値を 25 mg・min/L 以上とすることで NoV GII の感染価を 3-log 以上低減できる可能性があると考えられた。

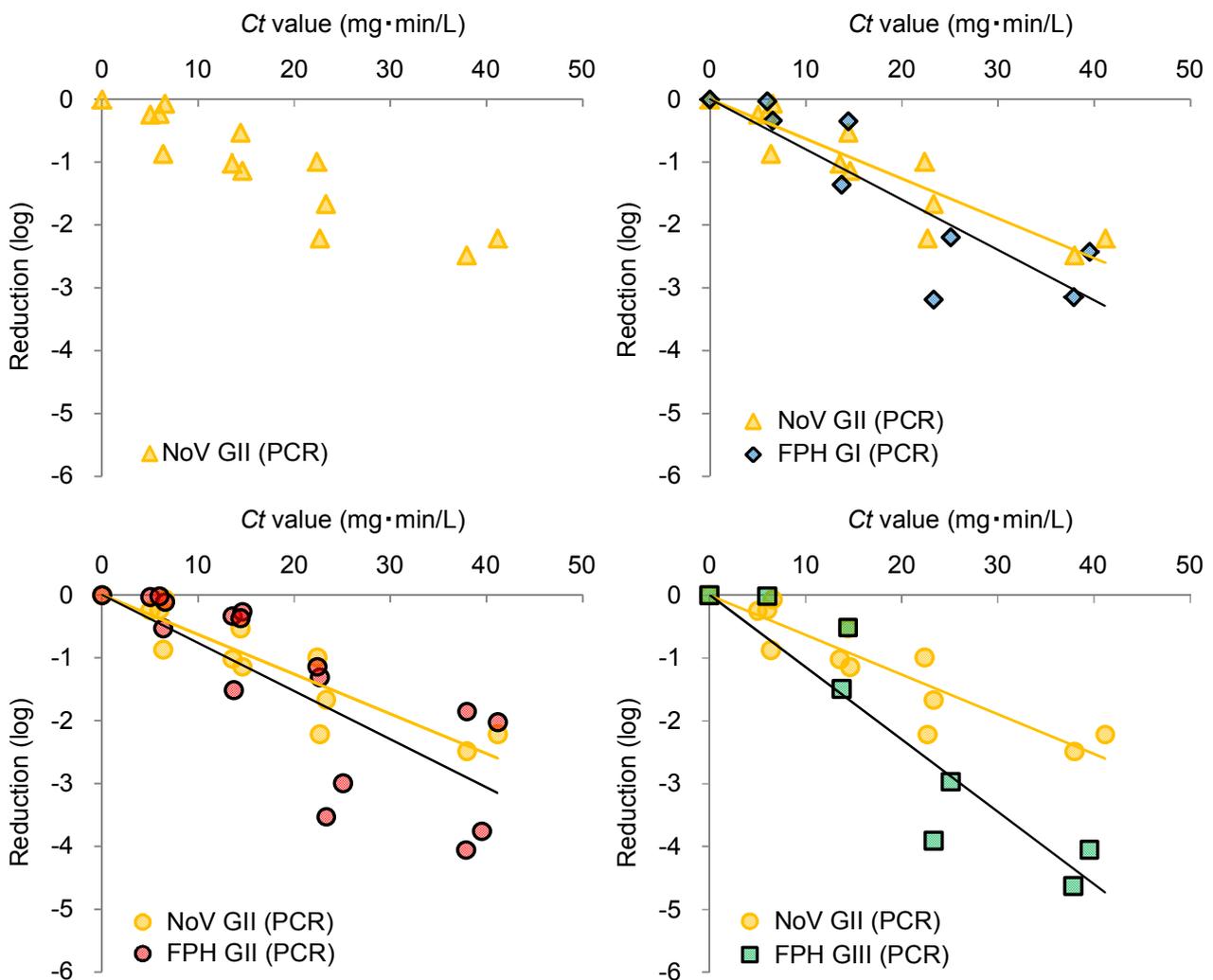


図-11 硝化促進処理水を用いた塩素消毒実験における NoV と FPH 遺伝子の低減効果の比較  
(残留全塩素からの Ct 値、白抜きは検出下限値以下)

#### 硝化抑制運転時における存在濃度及び終沈流出水を用いた塩素消毒実験結果

図-12 に、パイロットプラントの硝化抑制運転時における FPH (ICC-PCR、PCR、Plaque) と NoV GII の存在

濃度を示す。流入水において感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の存在濃度は、GI=GIII<Plaque<GIV の順であり、GIV が最も高濃度で存在していた。流入水の FPH と NoV GII 遺伝子 (PCR) の存在濃度は、FPH GI=FPH GIII<FPH GIV<NoV GII=FPH GII の順であり、FPH GII と NoV GII が最も高かった。硝化促進運転時 (2017 年 11 月) と比べて、感染力を含めた FPH GI と GIV の濃度および NoV GII と FPH GIV の遺伝子濃度が大きく向上していた。FPH GI と GIV は主に動物の糞便由来であることが報告されていることから<sup>5)</sup>、下水処理場への家畜排水の流入量増加等により濃度が向上したことが考えられた。また、NoV GII は冬季流行性が報告されていることから<sup>6)</sup>、NoV GII による感染性胃腸炎の患者数の増加により濃度が向上したことが考えられる。

終沈流出水では、感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の存在濃度は、GIII<GIV<GII<GI=Plaque の順であり、GI が最も高濃度で存在していた。また、FPH と NoV GII 遺伝子 (PCR) の存在濃度は、FPH GIII=FPH GIV<FPH GI<NoV GII=FPH GII の順であり、流入水と同様に、FPH GII と NoV GII が最も高かった。塩素消毒後の放流水では、感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の中でも Plaque 以外、終沈流出水と同程度の濃度で検出され、FPH と NoV GII 遺伝子 (PCR) の濃度も終沈流出水と同程度であった。

これらの存在濃度から、生物処理 (硝化抑制運転) と塩素消毒での除去・不活化効果を計算した (表-11)。生物処理による感染力を含めた FPH (ICC-PCR、Plaque) の除去・不活化効果は、GI<GII<Plaque<GIII<GIV の順であり、GI が最も低く、硝化促進運転時 (2017 年 11 月) の生物処理における順番と同様であった。FPH と NoV 遺伝子の除去率 (PCR) は、FPH GI<FPH GII<NoV GII<FPH GIII<FPH GIV の順であり、感染力を含めた結果と同様に FPH GI が最も低く、硝化促進運転時の生物処理における順番と同様であった。塩素消毒では、感染力を含めた FPH GII と Plaque が 0.5、1.5-log の不活化効果が見られたが、その他の FPH の不活化効果は確認されなかった。また、塩素消毒による FPH と NoV 遺伝子 (PCR) の低減効果も同様に、0.0~0.1-log とほとんど低減されていないことが確認された。塩素消毒での残留塩素から Ct 値を算出した結果、遊離塩素では 1.2 mg·min/L、全塩素では 61 mg·min/L だった。一方、大腸菌は流入水、終沈流出水、放流水でそれぞれ、 $4 \times 10^4$ 、170、2 CFU/mL で検出された。

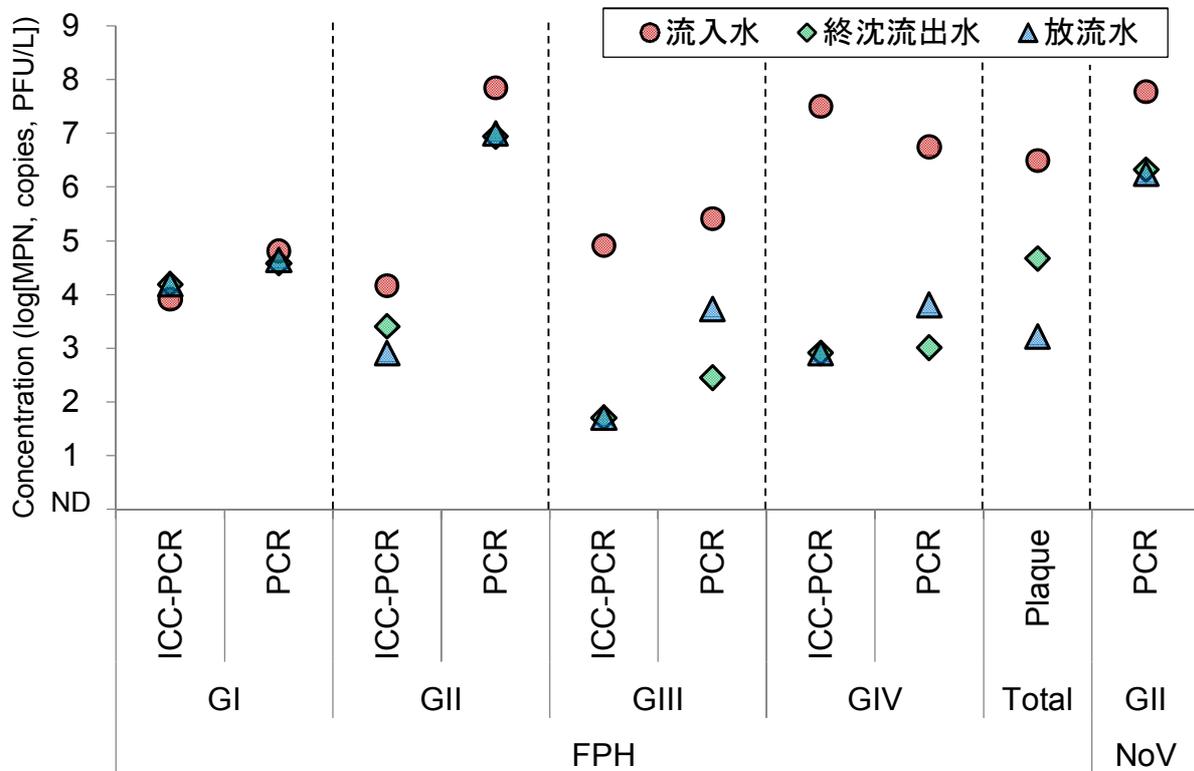


図-12 硝化抑制運転時における FPH (ICC-PCR、PCR、Plaque) と NoV GII の存在濃度

表-11 硝化抑制運転時における FPH (ICC-PCR、PCR、Plaque) と NoV GII の除去・不活化率

			生物処理 (硝化促進)	塩素消毒 (2mg-Cl/L、滞留時間 20 分)
FPH	GI	ICC-PCR	0.0 log	0.0 log
		PCR	0.2 log	0.0 log
	GII	ICC-PCR	0.8 log	0.5 log
		PCR	0.9 log	<0.0 log
	GIII	ICC-PCR	3.2 log	0.0 log
		PCR	3.0 log	<0.0 log
	GIV	ICC-PCR	4.6 log	0.0 log
		PCR	3.7 log	<0.0 log
	Total	Plaque	1.8 log	1.5 log
NoV	GII	PCR	1.5 log	0.1 log

図-13 に、硝化抑制運転処理水 No. 1, 2 を用いた回分式塩素消毒実験における FPH GI~IV (ICC-PCR) の結果を示す。残留遊離塩素からの  $Ct$  値での評価 (図-13、左) では、FPH GI~IV とともに  $8 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  程度の  $Ct$  値でも 1-log 以下の不活化効果が確認された。また、残留全塩素からの  $Ct$  値での評価 (図-13、右) でも、 $200 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  以上の  $Ct$  値でも 1-log 以下の不活化効果が確認された。残留全塩素からの  $Ct$  値での評価結果から近似直線を引いて 2-log 不活化に必要な  $Ct$  値を算出した結果、すべて  $1,000 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  以上が必要である結果となった。一方、大腸菌は、初期投入塩素濃度  $2 \text{ mg-Cl/L}$  の 20 分接触でも検出下限値以下となり、良好な不活化効果が得られた。塩素消毒に用いる試験水中のアンモニアは、塩素と反応して遊離塩素より酸化力が低いモノクロラミンやジクロラミン等の結合塩素が生成される。これらは、大腸菌には効果があるもののウイルスにはほとんど効果がないため高い  $Ct$  値が要求される。本研究の結果でも、アンモニア濃度が高い硝化抑制運転時の終沈流出水を用いた塩素消毒では、そのほとんどが結合塩素として生成されたためウイルスへの消毒効果は確認できなかった。そのため、硝化抑制運転等により終沈流出水中にアンモニア濃度が高いことが予測される場合は、アンモニア等の水質によりウイルス不活化効果への影響が少ない紫外線消毒等を用いる必要があると考えられた。

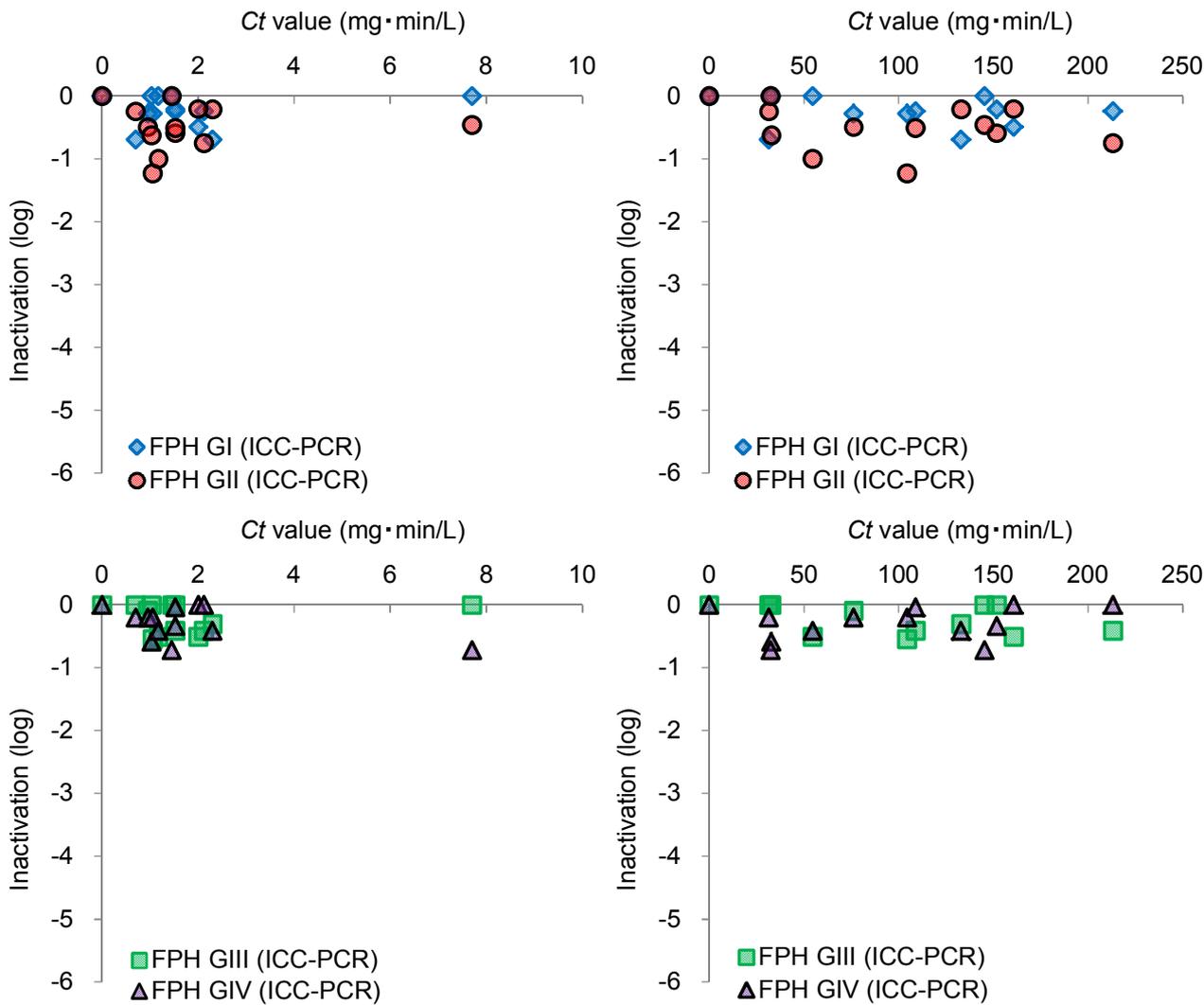


図-13 硝化抑制処理水を用いた塩素消毒実験における FPH GI~IV の不活化  
 (左は残留遊離塩素、右は残留全塩素からの Ct 値、白抜きは検出下限値以下)

#### 4. まとめ

現行の放流水質基準項目である大腸菌群から大腸菌指標への移行を考慮するにあたり、下水試料の大腸菌の実態把握を目的として、調査協力が得られた全国 54 箇所（北海道～九州地方）の下水処理場にて調査を行った。また、アンモニアの濃度が大きく異なると予測される下水処理場での硝化促進および抑制運転時において、大腸菌、野生株の大腸菌ファージとその遺伝子群、ノロウイルスの存在実態と塩素消毒での不活化および遺伝子低減効果を評価・比較した。

以下に本調査で得られた結果を示す。

- 1) 流入下水の大腸菌の検出濃度範囲は  $10^3 \sim 10^5$  CFU (MPN) /mL レベルであり、平均検出濃度は約  $8.0 \times 10^4$  CFU/mL であった。
- 2) 二次処理水では 1 程度から 1,200～2,000 CFU (MPN) /mL で推移、平均検出濃度は 170 CFU (MPN) /mL 程度であった。また、好気性ろ床法の二次処理水の大腸菌、大腸菌群の平均検出濃度は、調査対象とした全下水処理場の平均値と比較してやや高い状況にあった。
- 3) 放流水の大腸菌の検出濃度は、不検出～最大 300～800 CFU (MPN) /mL 程度、平均検出濃度は 35～60 CFU (MPN) /mL であった。
- 4) 大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は流入下水で 20%～26%、二次処理水では 24%～32%、放流水は 12%～26% であった。
- 5) 大腸菌の日間変動として最小検出濃度に対する最大検出濃度比を求めると、流入下水では 4.7～6.9 倍、二次処理水は 1.6～2.4 倍であり、二次処理水では流入下水に比較して変動幅が平滑化されていた。
- 6) 大腸菌と大腸菌群の関係について整理した結果、放流水の平均大腸菌群濃度が 235～300 CFU (MPN) /mL としたときの大腸菌濃度は、35～50 CFU (MPN) /mL、不検出時のデータに検出下限値を入れた場合には 31～46 CFU (MPN) /mL となった。
- 7) 硝化促進処理水では、FPH の感染価評価において 3-log (99.9%) の不活化効果が確認できる残留遊離塩素濃度からの  $Ct$  値は 2.6～4.2 mg·min/L であり、残留全塩素濃度からの  $Ct$  値は 20～25 mg·min/L であった。
- 8) 硝化促進処理水において、FPH と NoV の遺伝子の低減効果の比較結果から NoV の不活化効果を推定すると、残留全塩素濃度からの  $Ct$  値を 25 mg·min/L 以上とすることで NoV の感染価を 3-log 以上低減できる可能性があることが推算された。
- 9) 硝化抑制処理水では、FPH の感染価評価において残留遊離塩素濃度からの  $Ct$  値では 8 mg·min/L 以上、残留全塩素からの  $Ct$  値では 200 mg·min/L 以上の  $Ct$  値でも 1-log 以下の不活化効果が確認され、アンモニア濃度が高い硝化抑制処理水ではウイルスへの消毒効果は期待できないことが確認された。そのため、硝化抑制運転等により終沈流出水中にアンモニア濃度が高いことが予測される場合は、アンモニア等の水質によりウイルス不活化効果への影響が少ない紫外線消毒等を用いる必要があることが示唆された。

#### 謝辞

本調査・検討を実施するにあたり A 下水処理場管理者の関係各位には多大なご協力を頂いた。ここに記して謝意を表す。

## 参考文献

- 1) Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Q $\beta$  and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Research*. 46, 2651–2664.
- 2) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 4244–4252.
- 3) Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Greening, G.E., 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods* 149, 123–128.
- 4) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (4), 1548–1557.
- 5) Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.T., Caprais, M.P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J.A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Research*. 47, 6929–6943.
- 6) Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 42, 1441–1448.

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

研究予算：受託研究費

研究期間：平 27～平 29

材料資源研究グループ 上席研究員 重村浩之  
主任研究員 岡安祐司  
研究員 山崎廉子

## 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<sup>1)</sup>。本研究は、下水処理水を用いて土着藻類を培養し、エネルギーを生産することを目的としている。昨年度は、屋外での藻類培養における膜分離 CO<sub>2</sub> の有用性の検証、藻類培養が困難になる冬季における、下水熱利用による藻類培養の検証を行った<sup>2)</sup>。今年度は、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た。

## 2. 密閉縦型槽による屋外連続式藻類培養の評価

### 2. 1 実験方法

A 下水処理場内に設置した藻類培養装置を用いて、冬季の藻類培養検証を行った。培養槽は、有効容積 50L (高さ 0.5 m、横 0.5m、幅 0.2m) の密閉縦型槽を使用した。藻類培養装置を図-1 に示す。また、装置全体の概要図を図-2 に示す。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、培養が安定するまでは 8 日、安定後は 4 日とした。A 処理場の施設で回収した膜分離 CO<sub>2</sub> を pH8 に制御しながら添加した<sup>3)</sup>。また、培養槽内の藻類濃度が均一になるように、攪拌機による攪拌を常に行った。太陽エネルギーは、主に一面 (0.5m×0.5m) から取り入れることを期待した。屋外設置のため、降雨の影響を排除する目的で蓋をした密閉型とした。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す (流量 3.2L/分) ことで、培養槽の加温を行った。実際にこの装置を導入する際は、この面を壁側に密接させることを想定している。培養槽の水温を、65 日目までは 25°C、その後は 30°C 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。培養槽の後段には、培養槽と同じ容積の沈殿槽を設置し、沈殿槽の上澄み水を放流水として、排水した。流入ポンプ、攪拌機等の動力は、A 処理場の施設に設置した消化ガス発電機より供給した。よって、外部からのエネルギー投入を行わない、下水道資源のみを活用した藻類培養装置となっている。実験期間は平成 29 年 11 月 15 日から平成 30 年 2 月 16 日の約 3 カ月間とした。

流入水、培養槽の水 (培養水)、沈殿槽から排水される水 (放流水) を週 1 回サンプリングした。沈殿槽の水 (沈殿水) は、1 週間で沈殿した藻類を毎回全量回収し、測定を行った。浮遊性物質 (Suspended solids: SS)、クロロフィル a、全窒素 (Total nitrogen: TN)、溶存態窒素 (Dissolved total nitrogen: DTN)、全リン (Total

phosphorus: TP)、溶存態リン(Dissolved total phosphorus: DTP)、COD を適宜測定した。クロロフィル a 測定の際のろ過は、孔径 1.2  $\mu\text{m}$  の GF-C (Whatman、アメリカ)を用い、それ以外のろ過は孔径 1.0  $\mu\text{m}$  の GF-B(Whatman、アメリカ)を用いた。SS は Standard method<sup>4)</sup>、クロロフィル a は河川水質試験方法 (案)<sup>5)</sup> にそれぞれ従い測定を行った。TN、DTN、TP、DTP は、下水試験方法<sup>6)</sup>に従い測定を行った。



図-1 密閉縦型藻類培養装置

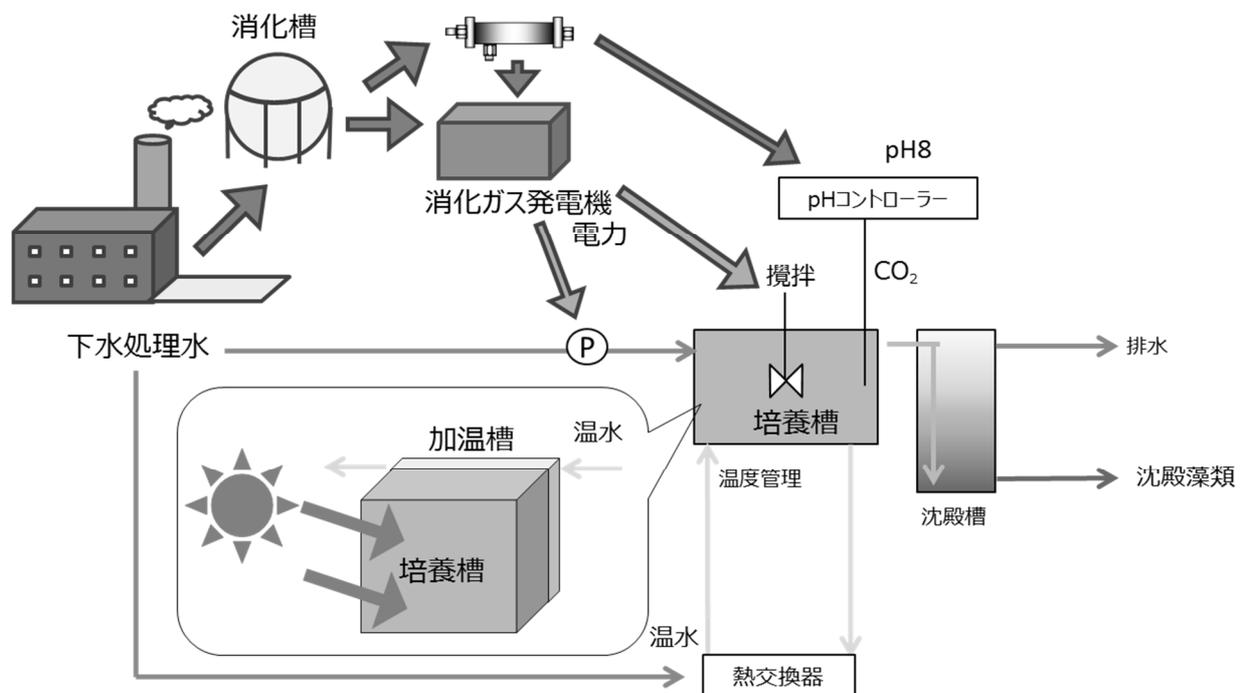


図-2 下水道資源を活用した連続式藻類培養装置の概要図

### 3. 実験結果

50L 密閉縦型培養槽における、流入水、培養水、沈殿水、放流水の各水質項目の経時変化を図-3 に示す。また、培養槽内の水温および外気温を図-4 に示す。培養槽内の水温は、1 時間ごとに計測した日平均を示し、培養開始 13 日後から 65 日後まで測定した。

培養開始後、藻類培養におけるバイオマス濃度の指標となる SS は、培養開始 49 日後に 108mg/L まで増殖した。その後、56 日目に SS が減少したのは、pH コントローラーの故障による、pH の低下が原因であった。77 日目までの減少は、外気温低下に伴う、流入水のチューブの凍結による閉塞が原因であった。それに伴い、沈殿槽からの放流水の流出がなくなり、藻類が滞留したため、沈殿水の SS が高くなった。装置の運転が安定した後は、培養水の SS は 210 mg/L、710mg/L と、連続的に増殖した。藻類濃度の指標となるクロロフィル a についても、SS と同様の挙動を示した。窒素、リン、COD の経時変化は、流入水、放流水は全リン、全窒素濃度を示し、培養水は、溶解性リン、溶解性窒素の結果を示している。50 日までの培養が安定していた時期においては、リン、窒素の除去率は 40-60%程度であった。その後、70 日以降は、窒素の除去率は 90%程度まで上昇した。リンの除去率は、56 日から 70 日頃のトラブル期を除くと、平均で 49%程度であった。COD の除去率は、最大で 25%程度であり、藻類の増殖にはほぼ利用されていないと考えられる。

沈殿槽の SS は、トラブル期を除くと、培養槽の SS の 1.3~1.5 倍の濃度であり、沈殿しきれずに放流されている藻類も少なくない。放流水の水質は、沈殿水の上澄みの全量であり、流入水や培養水よりも値が高い時があった。藻類培養においては、自然沈降ではなく、凝集剤の添加や、遠心などの固液分離操作が必要となると考えられる。

培養槽の水温は、温度制御により、外気温が 0 度近くでも 20℃前後を保てることが示された。20℃以下を下回ったときなど、水温が低下しているときは、共同研究で使用しているビニルハウスへの温熱供給も含めて、供給の容量を超えたために、供給できなくなった可能性が考えられる。56 から 63 日までは、水温が 0℃まで低下してしまっているが、培養槽が雪に埋もれてしまったことが影響していると考えられる。しかし、SS やクロロフィルの濃度低下は見られず、短期間の水温低下は培養に影響がないと考えられる。

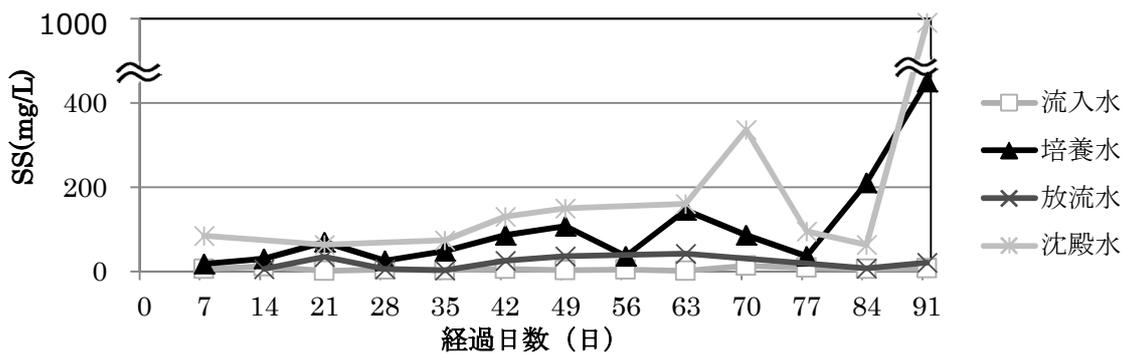


図-3 流入水、培養水、沈殿水、放流水の各水質項目の経時変化

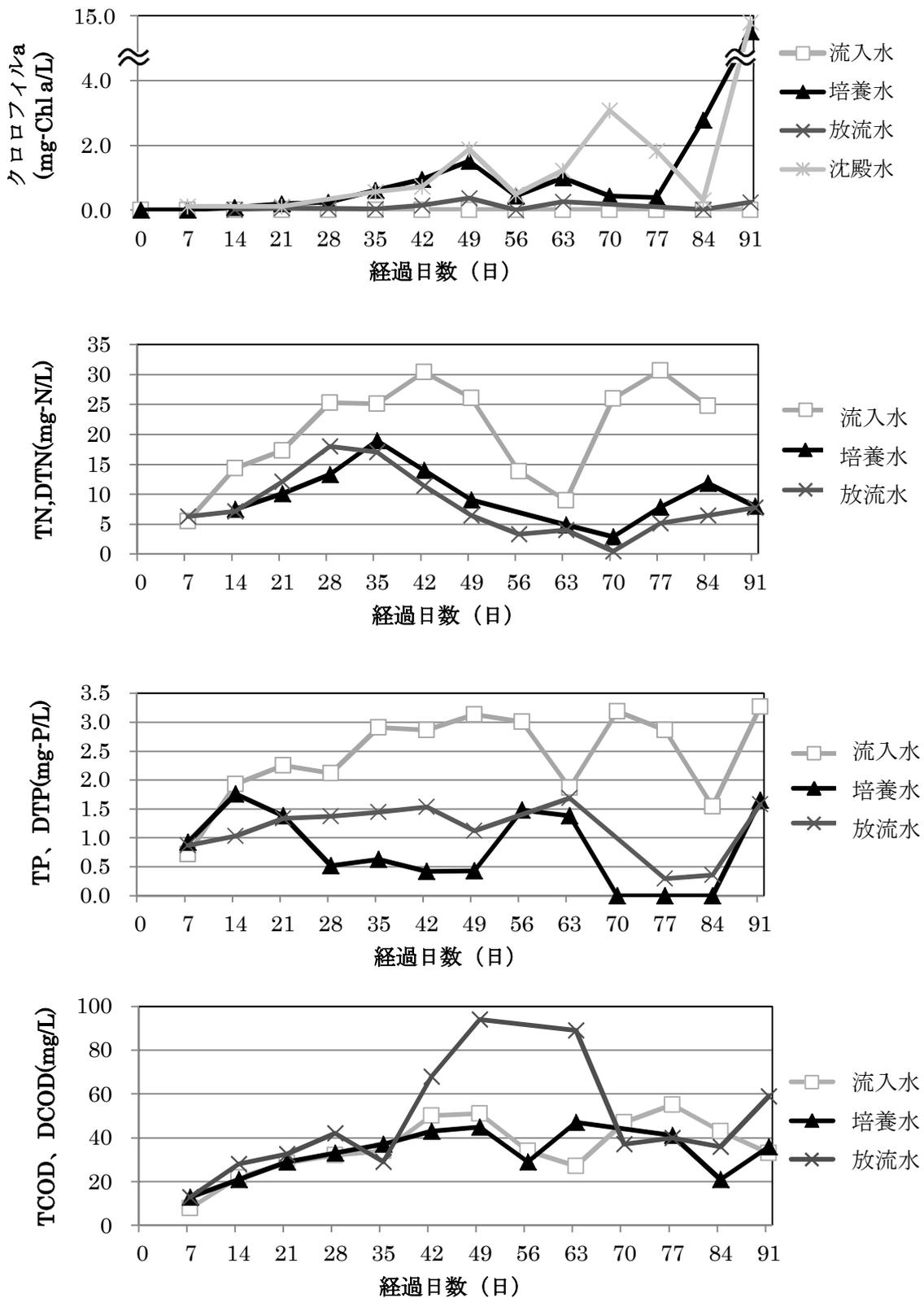


図-3 (つづき) 流入水、培養水、沈殿水、放流水の各水質項目の経時変化

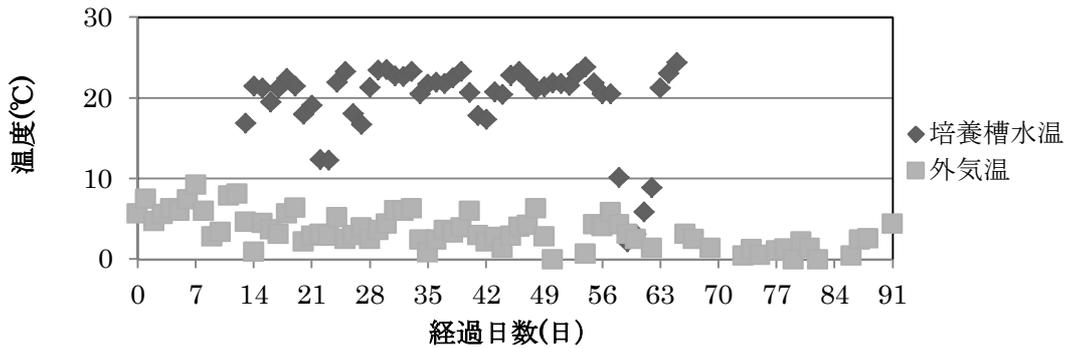


図-4 密閉縦型培養槽の水温と外気温

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

#### 謝辞

長岡技術科学大学 環境社会基盤工学専攻 資源エネルギー循環研究室 姫野修司准教授には、膜分離 CO<sub>2</sub> の提供等実験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<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water Res.*, 70, 9-26, 2015.
- 2) 平成 28 年度 下水道関係調査研究年次報告書集, 土木研究所資料第 4370 号, pp.11-16, 2018.
- 3) 高部祐剛, 日高平, 津森ジュン, 南山瑞彦: 炭酸添加が下水処理水を用いた藻類培養に与える影響に関する研究, 第 52 回下水道研究発表会講演集, pp.797-799, 2015.
- 4) American Public Health Association Publication (APHA): Standard methods for the examination of water and wastewater, nineteenth ed. Washington, DC, USA, 2005.
- 5) 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.
- 6) 公益社団法人日本下水道協会: 下水試験方法 上巻, 2012 年
- 7) 石川隆世, 佐々木星弥, 姫野修司, 小松俊哉, 星拓也, 田中正, 池田昌弘, 張満良: 下水放流水からの冷温熱回収と植物栽培への利用, 第 54 回下水道研究発表会講演集, pp483-485, 2017.

## 下水含有栄養塩を活用したエネルギー生産技術の開発に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 28～平 33

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、山崎廉予

【要旨】下水道を核とした資源回収、エネルギー生産およびエネルギー利用技術の開発を目指し、下水道資源を用いた藻類培養技術の高効率化や、水草と下水汚泥の混合消化特性に関して調査・研究を行った。下水処理水を用いた藻類培養では、上部開放レースウェイ型培養槽よりも、密閉縦型培養槽を用いることで、冬季の藻類培養量が増加することが明らかとなり、藻類培養量の高効率化が見込まれることが示唆された。嫌気性消化脱離液を用いた藻類培養では、下水で希釈した溶液を基質として、HRT を 8.4 日、16.8 日に設定した 2 系列のカラム型藻類培養水槽を用いて、3 月～10 月の間、太陽光の下で、回分式継代藻類培養を実施した。実験期間中の各系列の溶解性窒素の平均除去率は 63%、95%、溶解性リンの平均除去率は 89%、97%、藻類培養液 1L あたりの平均余剰藻類生産速度は 25.5mgSS/L・d、22.9mgSS/L・d であった。

キーワード：下水道資源、藻類培養、消化脱離液、バイオマス、混合嫌気性消化

### 1. はじめに

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

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

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

化石燃料の枯渇への懸念、化石燃料利用にとまなう

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

既往研究において<sup>4)5)6)</sup>ボトリオコッカスやクロレラなどのオイル含量の高い特定藻類や、ユーグレナなどの高機能物質を生産する特定藻類などを対象に、下水処理水等を用いた培養が実施されているが、これら特定の藻類の培養は、実環境下での適用性、大規模化に課題が残る。これに対し本研究室では、特定藻類の接種は行わず、下水処理水を直接培養液として用い、与えられた環境条件で優占する土着藻類（以下、藻類と記述）の培養技術の確立および培養藻類のエネルギー利用手法の検討を行ってきた。その結果、下水の初沈流出水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<sup>7)8)</sup>。本研究では、下水処理水によるさらなる藻類培養の高効率化、培養藻類の回収、濃縮、脱水技術の開発を目的とし、培養装置の検討、培養基質の SS 分の存在の検討を行った。

## 2. 1. 藻類培養装置の検討

### 2. 1. 1. 藻類培養状況の比較

藻類培養の高効率化において、培養装置の形状を検討した。本研究室ではこれまで、屋外に設置した 380L の上部開放レースウェイ型培養槽 (図-1) において、土着藻類の培養が可能であることを明らかにしてきた<sup>7)8)</sup>。レースウェイ型で藻類培養を行う場合、水槽を製作するよりも、建設コストを抑えられる利点があるが、上部開放であるため、天候の影響を受けやすく、特に冬季は水温の低下から、藻類培養量の低下が懸念される。また、光を取り込むために、20~30 cm 程度の浅い高さにしなければいけないことから、大規模培養するためには、広い敷地面積が必要となる欠点がある。

そこで本研究では、天候の影響を受けにくい密閉型で、かつ培養に必要な敷地面積を削減可能な縦型培養槽 (図-2) での藻類培養を試みた。有効容積 50L (高さ 0.5 m、横 0.5m、幅 0.1m) の培養槽を用いた。装置の想定設置場所は、処理場内の建物の壁や外壁等とし、太陽エネルギーは、一面 (0.5m×0.5m) から取り入れることを期待している。また、培養槽の後段に 50L の沈殿槽を設置し、重力濃縮により、培養藻類の回収を行った。また、沈殿槽からの排水を処理水とした。冬季の期間 (11 月~1 月) は、培養槽の集光を期待しない一面 (0.5m×0.5m) に設置した幅 0.01m の加温槽に、A 処理場の下水処理水をかけ流し、下水処理水熱を利用して、培養槽の加温を行った。

密閉縦型槽と藻類培養量を比較するため、上部開放レースウェイ型培養槽での藻類培養も同時に行った。培養槽の後段には、32L の沈殿槽を設置し、重力濃縮により、培養藻類の回収を行った。また、沈殿槽からの排水を処理水とした。冬季の期間 (11 月~1 月) は、培養槽内に巻いたチューブに A 処理場の下水処理水をかけ流し、下水処理水の熱を利用して、簡易的な培養槽の加温を行った。

培養基質は、A 処理場の流入水を A 下水処理場内の実験施設に設置された標準活性汚泥処理装置 (曝気槽有効容積: 100 L) の最初沈殿池を通過した後の初沈流出水とした。CO<sub>2</sub> は、純炭酸ガスポンプ (体積比率: 99.95%) を使用し、pH コントローラー (NPH-660NDE、日伸理化、日本) を用いて、pH8 に制御しながら添加した<sup>7)</sup>。また、培養槽内の藻類濃度が均一になるように、攪拌機による攪拌を常に行なった。培養期間は、2017 年 6 月から 2018 年 1 月とした。

分析項目は、流入基質、培養液、処理水の SS、流入基質、培養液のクロロフィル a、水質 (COD、アンモ



図-1 上部開放レースウェイ型培養槽

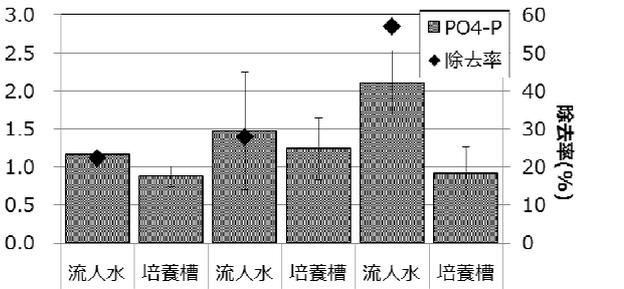
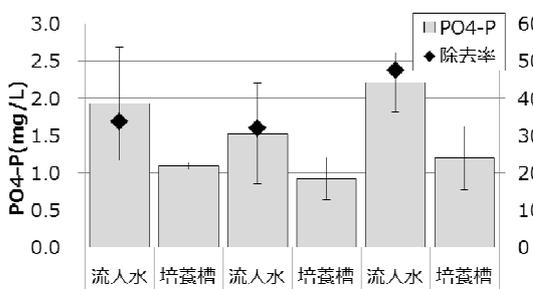
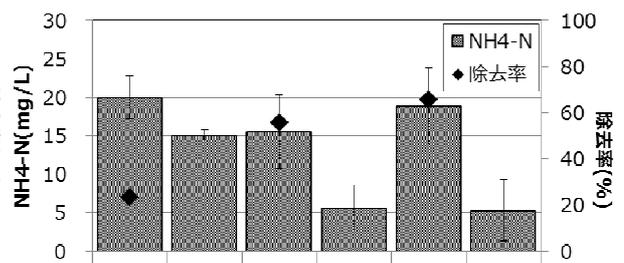
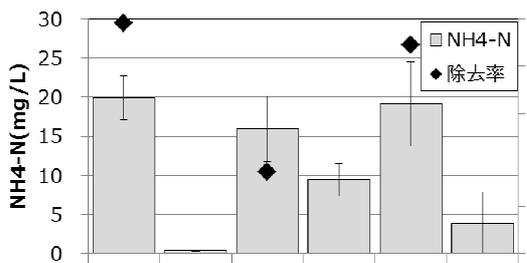
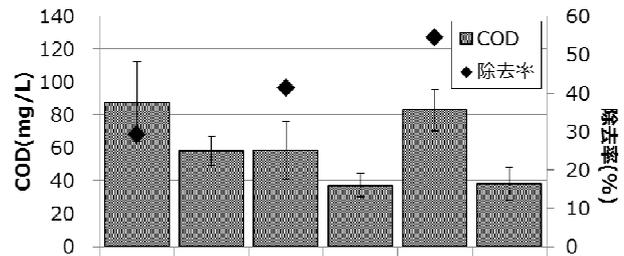
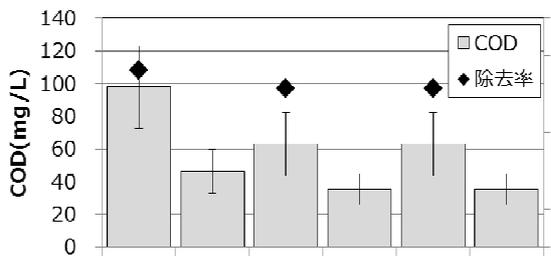
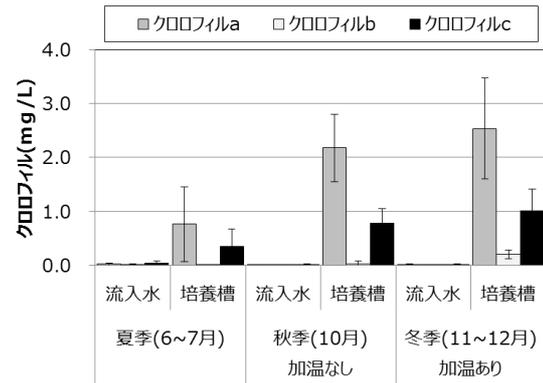
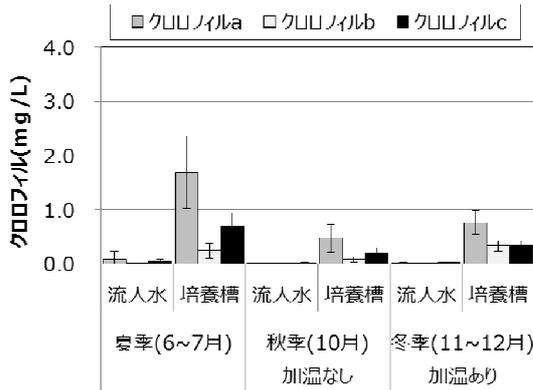
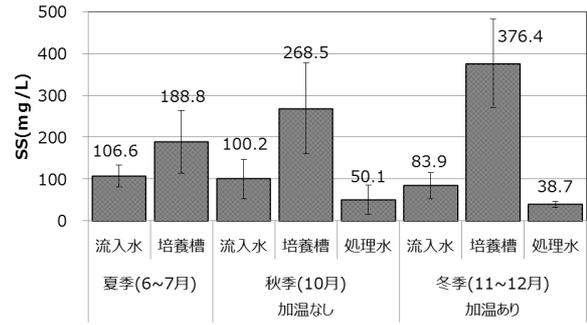
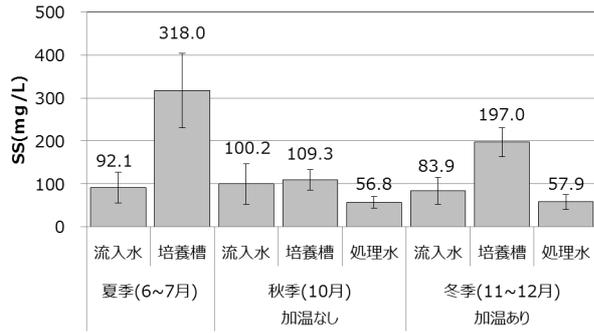


図-2 密閉縦型培養槽

ニア性窒素 (NH<sub>4</sub>-N)、リン酸態リン (PO<sub>4</sub>-P) とした。分析頻度は、基本的に週 1 回とした。1 週間に一度、沈殿槽から藻類の引き抜きを行っており、TS (固形物濃度)、VS (有機物濃度) を定期的に測定した。

各装置での藻類培養における、流入水、培養液の SS とクロロフィル a、水質分析結果 (COD、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P) を図-3 に示す。夏季 (6~7 月)、秋季 (10 月)、冬季 (11~12 月) の 3 つの期間に分けて、それぞれの平均値として示した。図-4 に、各装置での水温の経時変化を示した。上部開放レースウェイ型培養槽については、冬季に加温をしていない 2016 年の結果も合わせて示した。

上部開放レースウェイ型培養槽において、夏季 (6 月~7 月) では水温が 20~30℃ と高いこともあり、SS が 300mg/L 程度で培養できていた。秋季 (10 月) は、夜間の水温が 10℃ 程度まで下がることもあり、流入水に対して、培養槽での培養液の SS の増加は見られなかった。クロロフィルにおいても、0.5mg/L 程度まで減少してしまった。上部開放レースウェイ型培養槽の



上部開放レースウェイ型培養槽

密閉縦型培養槽

図-3 上部開放レースウェイ型培養槽と密閉縦型培養槽の流入水、藻類培養液のSS、クロロフィル a、水質

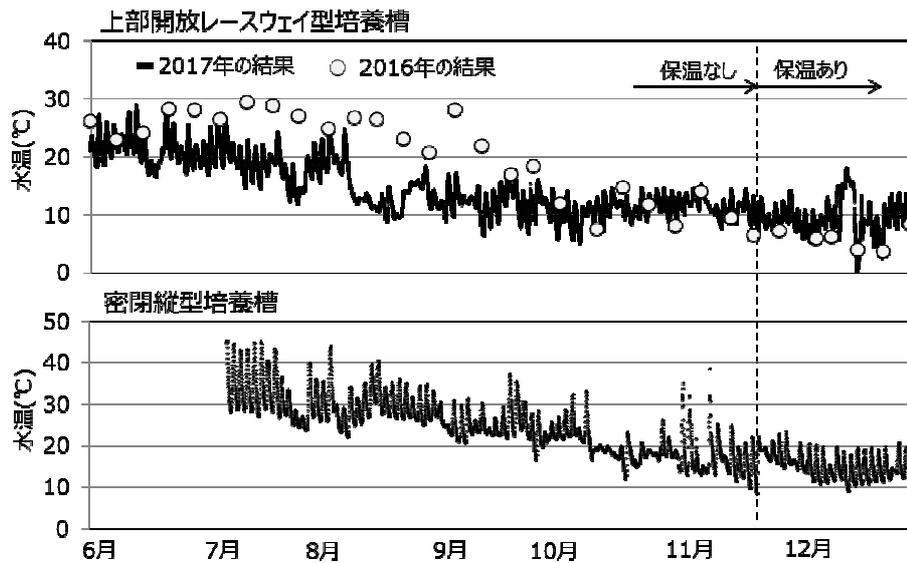


図4 上部開放レースウェイ型培養槽と密閉縦型培養槽の水温の経時変化 (2016年、2017年)

2016年の結果は日中に測定した水温であり、2017年は、30分毎に24時間計測を行った結果である。図4より、2016年の冬季の日中の水温は、2017年の培養槽の夜間の最低水温と同程度であることがわかる。よって、簡易的な加温により、水温の低下を防げたことが示された。

密閉縦型培養槽は、2017年6月より装置を立ち上げたため、夏季におけるSSは、200mg/L程度と、上部開放レースウェイ型培養槽よりも低かった。水温は、30~40°C程度で上部開放レースウェイ型培養槽よりも、10°C程度高い温度で培養できていた。冬季においても、上部開放レースウェイ型培養槽よりも10°C近く高い水温で保持できており、日中は、20°C程度まで上昇したため、SSも350mg/Lと高濃度で藻類培養が可能であることが示された。

処理水のSSは、上部開放レースウェイ型培養槽においては、秋季の培養液のSSの1/2、冬季の培養液のSSの1/3程度で排水できていた。また、密閉縦型槽では、秋季では、培養槽の培養液のSSの1/5、冬季では、1/10程度で排水できていたが、いずれも処理場外への排水ができるレベルまでは減少しなかった。このため、そのまま系外へ排水する場合は、凝集剤添加やろ過、遠心等の処理が必要となると考えられる。その他の手法として、水処理系へ排水を逆流する手法も考えられるため、藻類を含んだ水を水処理系へ流入させる場合の、活性汚泥への影響等を調査する必要があると考えられる。

図3において、クロロフィルの結果をみると、上部開放レースウェイ型培養槽と密閉縦型培養槽で、クロ

ロフィルbとクロロフィルcの割合が異なることがわかる。クロロフィルbは、緑藻に主に含まれており、クロロフィルcは、主に、珪藻に含まれる。密閉縦型培養槽では、上部開放レースウェイ型培養槽と比較して、緑藻が減少し、珪藻が安定的に保持される傾向があることがわかる。珪藻には殻があり、緑藻と比較して、動物プランクトンに捕食されにくい傾向がある。水温を安定的に保つことができ、気候の影響を受けにくい密閉縦型培養槽においては、動物プランクトンも高濃度で生息できると考えられ、通年を通して緑藻が動物プランクトンに捕食されたため、緑藻と珪藻の割合が、上部開放レースウェイ型培養槽と異なったのではないかと考えられる。これらについては、植物プランクトン、動物プランクトンの種類や細胞数を計測することで、明らかにすることができると考えられるため、今後検証を行っていく。

藻類培養における水質の変化は、上部開放レースウェイ型培養槽において、夏季のCOD除去率、NH<sub>4</sub>-N除去率、PO<sub>4</sub>-P除去率は、それぞれ46%、98%、34%程度であり、加温を行った冬季では、それぞれ42%、89%、47%程度であった。密閉縦型培養槽においては、夏季のCOD除去率、NH<sub>4</sub>-N除去率、PO<sub>4</sub>-P除去率は、それぞれ29%、23%、22%程度であり、加温ありの冬季では、それぞれ55%、66%、57%程度であった。密閉縦型培養槽では、夏季の藻類培養が安定しなかったため、各除去率が低かった。冬季においては、両装置において、窒素除去率に若干差がみられるが、どちらの装置もほぼ同程度のCOD、栄養塩除去率であることが示された。

## 2. 1. 2. 培養藻類の回収

冬季において、沈殿槽での重力濃縮による、培養藻類の回収量(10~20L)と液中 TS 濃度を測定した。培養槽の培養液の TS と、沈殿槽での沈殿藻類 (1 週間で沈殿した分) の TS を測定した結果、上部開放レースウェイ型培養槽では、それぞれ 0.058 (±0.039) %、0.43 (±0.17) % であり、1 週間で、約 7.5 倍に濃縮された藻類が 10~20L 程度 (培養槽 1L あたり、0.03L ~0.05L) 回収できる結果となった。密閉縦型培養槽では、それぞれ 0.079 (±0.013) %、0.4 (±0.25) % であり、1 週間で約 5 倍に濃縮された藻類が 10~20L 程度 (培養槽 1L あたり、0.2~0.4L) 回収できる結果となった。本研究では、上部開放レースウェイ型培養槽と密閉縦型培養槽で同程度の濃度の藻類が回収できる試算であるが、培養槽 1L あたりで換算すると、密閉縦型槽の方が、効率よく回収できる試算となった。回収効率は、沈殿槽の容積(面積)にも影響されるため、培養槽と沈殿槽の容積の関係についても、検証していく必要がある。また、回収藻類の TS 濃度は、消化汚泥に投入するバイオマスとしては低いと考えられ、消化槽に投入する濃縮汚泥と同程度の TS1%~3%にするためには、さらに 2~7 倍は濃縮する必要があると考えられる。これに対しては、沈殿槽の面積を大きくして、水面積負荷を下げることや、凝集剤の投入、遠心分離機などの使用で濃縮効率を上げる等の対応が必要であると考えられる。培養藻類を消化槽へ投入する際に適切な TS 濃度について今後検証し、適切な回収方法を検討していく。

## 2. 1. 3. 培養藻類のエネルギー化

培養藻類のエネルギー化として、藻類と汚泥の混合嫌気性消化によるメタンガス発生量の増加を想定し、冬季の藻類培養における、嫌気性消化槽へ投入した場合の消費エネルギーと生産エネルギーの収支の試算を簡易的に行った。

消費エネルギーにかかわる項目は、培養槽への流入ポンプ (180 kJ/m<sup>3</sup>槽容量/日)、培養槽の攪拌 (144 kJ/m<sup>3</sup>槽容量/日)、回収時のかき寄せ機 (144 kJ/m<sup>3</sup>) の消費電力、嫌気性消化における加温、攪拌等の消費電力 (19,080 kJ/m<sup>3</sup>) とした。培養槽への流入量を 10,000m<sup>3</sup>/日、HRT4 日、培養槽の容積を、40,000m<sup>3</sup>と設定した。回収方法は重力濃縮とし、回収率 0.76、濃縮倍率 58<sup>7)</sup>とした場合、回収時の容量は 131m<sup>3</sup>/日であった。

上部開放レースウェイ型培養槽では、培養藻類による総生産エネルギーは、藻類の培養量(197mg/L)と高

位発熱量 (16.2kJ/g-dry) のより、31,914 MJ/日と試算され、回収率 0.76 より、回収エネルギーは、24,255 MJ/日と試算された。最終的な生産エネルギーは、メタン転換率 (0.51) をかけることで、12,370MJ/日と算出された。消費エネルギーは、8,279 MJ/日と試算され、4,091 MJ/日のエネルギーが回収できる試算結果となった。

密閉縦型培養槽では、培養藻類による総生産エネルギーは、藻類の培養量(376mg/L)と高位発熱量 (16.2kJ/g-dry) より、60,912 MJ/日と試算され、回収エネルギーは、46,293 MJ/日と試算された。最終的な生産エネルギーは、メタン転換率 (0.51) をかけることで、23,609 MJ/日と算出され、消費エネルギーは、8,279 MJ/日と試算され、15,330 MJ/日のエネルギーが回収できる試算結果となった。

これらの結果を図-5 に示す。簡易的なエネルギー収支の試算の結果、上部開放レースウェイ型培養槽、密閉縦型培養槽ともに、培養藻類を嫌気性消化へ投入することにより、エネルギー生産が可能とであることが示された。

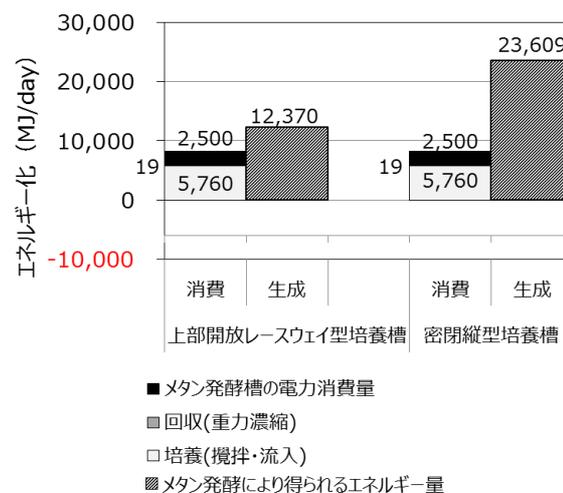


図-5 培養藻類エネルギー化 (嫌気性消化) におけるエネルギー収支 (冬季)

## 3. 汚泥処理工程で発生する排水を利用した藻類培養技術の開発

### 3. 1. 目的

本研究では、下水を用いて培養した藻類や、下水処理場の放流先水域に発生する水草を、下水処理場にて下水汚泥と混合し、嫌気性消化によりエネルギーを回収する手法の開発を目的としている。

既往の調査研究の結果、下水処理水による藻類培養が可能であることが示された。下水処理場には、下水

処理水以外にも、窒素やリンなどの栄養塩を豊富に含む工程水が存在する。そこで本研究では、これらを対象とした藻類培養技術について検討する。まず、手始めとして、汚泥の減容化のために用いられている消化工程で発生する消化汚泥を脱水した際に得られる消化脱離液を対象とした藻類培養技術の開発について検討した。新たに開発する技術の概略を図-6に示す。

### 3. 2. 実験方法

消化脱離液は、下水処理方式：標準活性汚泥法、汚泥処理方式：中温嫌気性消化を採用している B 下水処理場より採取し用いた。なお、消化脱離液は、藻類培養への阻害を考慮し、他の工程水を用いて希釈することとし、一部合流式を含む分流式の A 下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、さらに、部分循環式嫌気性ろ床実験装置にて処理を行った処理水を希釈水として用いた。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を用い、茨城県つくば市内の温室内で実施した。藻類培養方法は回分式とし、培養開始時に、消化脱離液と嫌気性ろ床流出水の混合液と、前回の培養終了時の培養液の一部を、カラム型藻類培養装置に投入し、その後は、一定の培養期間（1週間または2週間）を設定し放置した。それぞれの系列の水理学的滞留時間（HRT）は、8.4日、16.8日となる。培養液の攪拌

は、常時、小型のエアレーション装置にて行った。消化脱離液と嫌気性ろ床流出水の混合比は、あらかじめ各溶液中の溶解性リン濃度を測定し、混合液の濃度が 4mg-P/L になるように設定した。前回の培養終了時の培養液は、混合液に対して、1/5 の容積の溶液を投入し、合計で 30L になるように調整した。温室での実験に先立ち、室温 15~20℃の実験室内に、蛍光灯により 1日あたり 12時間、側面から光（光量子密度：約 165  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）を照射する 5L のピーカー2系列を設置し、消化脱離液、嫌気性ろ床流出水、および別の実験で、下水処理水を用いて培養した藻類培養液を投入し、1週間の培養後、温室内で実施する実験と同様の要領で、培養期間1週間の回分式藻類継代培養を3回実施し、得られた培養液を、温室での実験に用いた。さらに、分析開始前に2か月間の馴致期間を設けた。分析は、2017年3月から開始し、培養開始時および終了時の培養液の性状（溶解性各態窒素、溶解性リン、浮遊物質）を分析した。

### 3. 3. 実験結果

2017年3月~10月の間の実験期間中における、2系列（系列1—培養期間：1週間（HRT 8.4日）、系列2—培養期間：2週間（HRT 16.8日））の培養装置内培養液の水質分析結果の平均値を表-1、表-2に示す。培養液中の溶解性窒素濃度、溶解性リン濃度は、培養前後を比較すると、藻類に取り込まれる等の結果、低

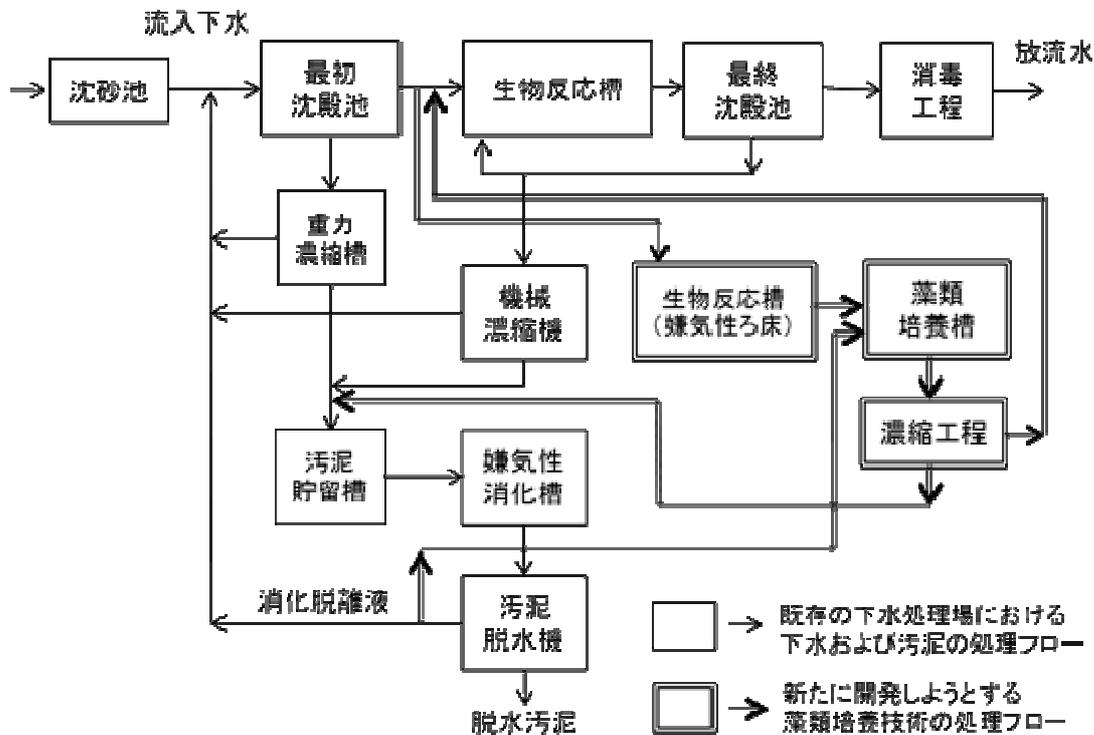


図-6 新たに開発する技術の概略

下した。表-1、表-2において、実験期間中の各系列の溶解性窒素の平均除去率はそれぞれ63%、95%、溶解性リンの平均除去率はそれぞれ89%、97%であった。また、溶解性窒素は、消化脱離液中、嫌気性ろ床流出水中とも、大部分がアンモニア性窒素の形態であった。一方、培養終了時の培養液中の溶解性窒素の形態は、アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素が大部分を占めたが、それらの比率について、明確な傾向はみられなかった。

また、表-1、表-2より、藻類培養液1Lあたりの平均余剰藻類生産速度は25.5mgSS/L・d、22.9mgSS/L・dであった。今後は、日射量や水温、水質、攪拌方式等と藻類増殖速度の関係を整理し、最適な培養条件について検討する予定である。

表-1 系列1の培養液の分析結果(平均値、単位 mg/L)

	培養開始時	培養終了時
溶解性窒素	34.7	12.7
溶解性リン	3.55	0.39
浮遊物質	53.7	214

表-2 系列2の培養液の分析結果(平均値、単位 mg/L)

	培養開始時	培養終了時
溶解性窒素	34.6	1.7
溶解性リン	3.53	0.11
浮遊物質	74.7	385

#### 4. まとめ

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

1. 屋外での活性汚泥の初沈流出水を用いた連続藻類培養において、上部開放レースウェイと密閉縦型槽の装置での藻類培養状況の比較を行った。その結果、密閉縦型槽では、上部開放レースウェイと比較して、冬季において、10°C程度高い水温を維持することが可能であり、培養槽のSSを約2倍程度の濃度で培養できるとなることが示された。栄養塩除去率、COD除去率は、どちらの装置においても、同程度見込まれることが示された。
2. 培養藻類のエネルギー化について、消費エネルギーおよび生産エネルギーの簡易的な収支試算

を行った結果、嫌気性消化への投入により、エネルギー生産が可能であることを示した。

3. 嫌気性消化脱離液を下水で希釈した溶液を基質として、HRTを8.4日、16.8日に設定した2系列の上部開放型カラム型藻類培養水槽を用いて、3月~10月の間、太陽光の下で、回分式継代藻類培養を実施した。実験期間中の各系列の溶解性窒素の平均除去率は63%、95%、溶解性リンの平均除去率は89%、97%、藻類培養液1Lあたりの平均余剰藻類生産速度は25.5mgSS/L・d、22.9mgSS/L・dであった。

#### 参考文献

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部公益社団法人日本下水道協会：下水道政策研究委員会 報告書 新下水道ビジョン~「循環のみち」の持続と進化~、2014.
- 2) J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton: Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond, Water Research, Vol.45, pp.6637-6649, 2011.
- 3) S. Chinnasmy, A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das: Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biodiesel application, Bioresource Technology, Vol.101, pp.3097-3105, 2010.
- 4) S. Cho, T.T. Luong, D. Lee, Y.K. Oh, T. Lee: Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production, Bioresource Technology. Vol.102, pp.8639-8645, 2011.
- 5) E.B. Sydney, T.E. da Silva, A. Tokarski, A.C. Novak, J.C. de Carvalho, A.L. Woiciechowski, C. Larroche, C.R. Soccol: Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. Applied Energy. Vol.88 (10), pp.3291-3294, 2011.
- 6) 鈴木秀幸ら：下水処理場から発生する「未利用資源」を利活用したユーグレナ培養技術の実証研究、第53回下水道研究発表会講演集、p.184-186、2016
- 7) 国立研究開発法人土木研究所：下水道を核とした資源回収・生産・利用技術に関する研究、平成27年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第4347号、pp.26-51、2017.
- 8) 岡安祐司、山崎廉予、桜井健介、重村浩之：下水汚泥の嫌気性消化脱離液を用いた藻類培養における水理学的滞留時間の影響について、第52回日本水環境学会年会講演集、p.160、2018.

## 河川事業等に由来するバイオマスの下水処理場内利用に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 28～平 33

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、桜井健介、山崎廉予

【要旨】下水道施設を活用したバイオマスの資源・エネルギー有効利用方法の開発を目指し、河川・道路等の管理で生じる草木バイオマスを下水処理場内で利用する方法に関して調査・研究を行った。剪定枝を下水汚泥焼却炉で補助燃料として活用する技術について、自然乾燥が困難な場合には、下水汚泥焼却炉の白煙防止空気の余剰分が乾燥に利用可能であると考えられた。刈草を汚泥脱水助剤として適用する技術において、下水処理場で刈草を受け入れることで、河川事業における刈草処分費が削減できる可能性が示された。また、下水道事業において、下水処理場外での焼却処分を想定した場合、刈草を汚泥に混合することで、汚泥処分費が削減できる可能性が示された。また、刈草の嫌気性消化の前処理手法として、凍結解凍手法について検討した。模擬刈草と見立てた緑藻と下水汚泥との混合消化（中温消化）によるメタン転換ポテンシャルを評価したところ、凍結解凍操作によりメタン発生ポテンシャルを著しく低下させる結果となり、前処理手法としては不適當であることがわかった。

キーワード：バイオマス、剪定枝、刈草、凍結解凍、混合嫌気性消化

### 1. はじめに

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

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

### 2. 剪定枝を木質バイオマスとして下水汚泥焼却炉で活用する技術の検討

昨年度<sup>4)</sup>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、比較的利用しやすいバイオマスであると考えられる。これらで発生した剪定枝等の木質バイオマスを、下水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)<sup>5)</sup>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。そこで、木質チップの自然乾燥に要する保管期間、保管場所の面積について調査した。つぎに、土地の制約などから自然乾燥が困難な場合を想定し、温風を利用した強制乾燥の実用性を検討するため、熱源としての下水汚泥焼却炉の利用可能性を調査した。さらに、剪定枝の灰分とその低減方法を調査した。

#### 2. 1 木質チップの自然乾燥の可能性について

スギの枝葉を自然乾燥させた実験では、破碎径を段々細かくして空隙が小さくなるほど乾燥速度は遅くなり、チップは特に遅い<sup>6)</sup>。イチヨウやプラタナスを数十 cm 程度で切断したものを、屋内で乾燥させたケースでは、含水率 20%以下にするのに 1~3 か月程度を要するが、チップでは約 3 か月でも含水率 20%に達しておらず<sup>7)</sup>、チップの自然乾燥には時間を要する。また、34mm×14mm×4mm 程度のスギ・ヒノキチップを水浸させて含水率を調整した

実験では、攪拌なしで乾燥するのは表面から 10cm 程度までであり、攪拌の効果が顕著であるとされている<sup>7)</sup>。河川、道路、公園、ダム等の管理に由来する剪定枝を多量に乾燥する場合、破碎径等により変化するものの、温風を用いる強制乾燥に比べて長く時間がかかり、広大な土地を要すると考えられた。

また、チップを保管する際には、微生物の活動に起因する発酵熱と、油脂類の酸化に起因する発熱による火災<sup>8)</sup>の発生に注意する必要がある。破碎チップは、切削チップよりも発火の危険性が高いので、注意が必要である<sup>9)</sup>。なお、堆肥化等のため剪定枝チップを保管している場合、積み上げ高さの上限を 3m または 3.5m に設定している例があり<sup>10)</sup>、積み上げ高さの上限に配慮する必要がある。

## 2. 2 木質チップの乾燥に適した下水污泥焼却炉の排熱の種類

50 トン/日の下水污泥焼却炉から、中・低温排熱は年間約 3PJ 程度発生しているが、排熱温度が低く用途に限られること等から大半が利用されずにいる<sup>11)</sup>。これは、土地の制約などから自然乾燥が困難な場合に、木質チップの乾燥熱源として利用できる可能性がある。具体には、「洗煙排水」や「白煙防止空気」がある。それぞれの性質、温度、熱量を表-1 に示す。

表-1 洗煙排水や白煙防止空気の特徵

	洗煙排水	白煙防止空気
性質	排煙処理塔において、硫酸化物、硫化水素、ばいじん等を吸収した水	白煙防止のため煙突において洗浄排煙と混合するために、白煙防止熱交換器で加温された空気
温度*	50°C <sup>11)</sup>	350°C <sup>11)</sup>
熱量*	10GJ/h <sup>11)</sup>	1.8GJ/h <sup>11)</sup>

\*温度と熱量は、50 トン/日の流動床式焼却炉の例

洗煙排水は、熱量は多いが、温度が低く活用が難しい。また、塩化物イオン、硫酸イオン濃度が高い場合<sup>12)</sup>があり、ステンレス鋼に対して腐食させる可能性がある。

一方、白煙防止空気は、白煙の防止に必要な熱量以上の熱を大気中へ放出しており、一部が利用可能である<sup>13)</sup>。白煙防止空気は、外気を熱交換器で加温したものであり、絶対湿度が低く、洗煙排水に比べ

て熱量は少ないものの、乾燥に適していると考えられた。ごみ焼却施設では、環境省の「高効率ごみ発電施設整備マニュアル<sup>14)</sup>」において、原則として白煙防止処理をせず、より高効率なエネルギー回収を推進するよう努めることとされている。ただし、白煙が見えること等について、周辺住民に理解を求めるよう努める必要がある<sup>14)</sup>。白煙防止基準を設定する場合は、外気温度 5°C、湿度 50%程度が一般的である<sup>15)</sup>とされている。

## 2. 3 剪定枝の灰分について

剪定枝を燃料として利用する際、灰分が多いと重量当たりの熱量が低下し、灰の炉外への持ち出し熱量も増加するのに加えて、灰の処分量が増加するため、重要な成分である。土木研究所が調査<sup>16)</sup>した、国土交通省の河川または国道事務所等で採取された剪定枝に該当する 14 試料の灰分は、1.7~13%であった。一般社団法人日本木質バイオマスエネルギー協会の制定した木質チップの規格<sup>17)</sup>において、灰分は最大で 5.0%である。また、一般社団法人日本木質ペレット協会の制定した木質ペレット品質規格<sup>18)</sup>において、灰分は最大で 2.0%である。

灰分を下げようとする場合、剪定枝の灰分は平均直径と相関関係がある<sup>19)</sup>ため、平均直径が一定以上の剪定枝を用いることで灰分を低減可能と思われる。また、混入する土砂を取り除くことも有効であり、剪定枝から篩目 1mm で土砂を篩分けた事例<sup>20)</sup>では、灰分が 3.4%から 1.7%まで減少したとのことであり、これらによっても灰分が低下することが期待される。

## 3. 刈草を污泥脱水助剤として適用する技術

1. で示した課題について、河川等で発生する刈草を下水道事業で受け入れ、污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、凝集剤添加や污泥処理費用の削減が可能となり、かつ刈草のリサイクルシステムが確立できる。本研究では、裁断したイネ科の刈草を様々な性状の污泥と混合し、污泥の脱水性が向上するかどうか、実験室レベルで検証を行った結果、刈草の混合により、脱水時の污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<sup>4)</sup>。本研究では、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污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。

### 3. 1. 河川事業における刈草処分費の試算

河川等で発生する刈草を下水道事業に受け渡すことで、破碎処理までの処分となり、焼却処理をした場合と比較すると、刈草処分費が削減される可能性がある(図-1)。そこで、試算により検証を行った。従来の刈草処分方法として、焼却場に運搬するケース(A)を設定し、本研究提案技術を導入した場合の刈草処分方法として、再資源化施設で破碎後、下水処理場へ受け渡すケース(B)を設定した(図-2)。1回あたりの刈草処分量は、茨城県において、有効利用されていない分1,224t(平成27年度実績)とした。刈草処分費は、運搬費(運搬距離×ガソリン代)と処分費[(焼却(30,660円/t)または破碎(22,090円/t)の処理費)×刈草処分量]の合計とした。草刈り場所から処理場所までの片道の運搬距離は、茨城県の総面積や同県内に立地している焼却場の数等を考慮して試算<sup>20)</sup>し、1往復の運搬距離は、ケース(A)が17.4km、ケース(B)は、最も短い場合で24.4km、最も長い場合で41.6kmと設定した。運搬には2tトラックの使用を想定し、走行速度30km/h、ガソリン燃費4.9L/h<sup>20)</sup>、ガソリン単価を121円/Lより、19.76円/kmと設定した。

ケース(A)、ケース(B)における、刈草処分費の試算結果を図-3に示す。1回あたりの刈草処分費は、ケース(B)がケース(A)よりも1千万円程度安くなる試算結果となった。また、運搬費は処分費の0.5~2.0%程度とかなり小さい結果であった。この結果、運搬距離がこれよりも長くなったとしても、刈草を下水処理場に受け渡した方が、刈草処分費は安く抑えられる可能性が示された。

### 3. 2. 下水道事業における汚泥処分費の試算

刈草を汚泥に混合することで、脱水時の凝集剤使用量や発生する脱水汚泥量の変化によって、脱水汚泥処分費が変化する。そこで、試算による検証を行った。脱水汚泥の処分方法は、本研究では、下水処理場外の焼却場における焼却処分を想定した。汚泥処分費は、脱水時の凝集剤費、下水処理場外への運搬費及び焼却処分や埋立処分費等を含めた脱水汚泥処分費の合計とした。本試算では、刈草の破碎および下水処理場への運搬にかかる費用は河川事業で負担するものとみなし、破碎された刈草の下水処理場での受入れの費用は、実質0円とした。凝集剤費は820円/kg、脱水汚泥処分費は16千円/t(湿重量ベース)とした。汚泥脱水設備に投入する汚泥量は、高分子凝集剤を使用した濃縮汚泥または消化汚泥の脱水を行っている1,212か所の下水処理場における平成26

年度の一カ月あたりの平均値(4,762t/月(湿重量

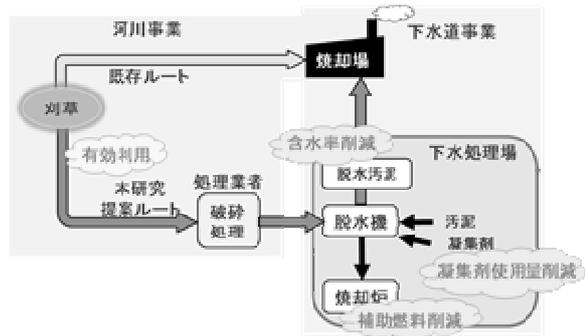


図-1 河川刈草を下水道事業で受入れるケースの一例

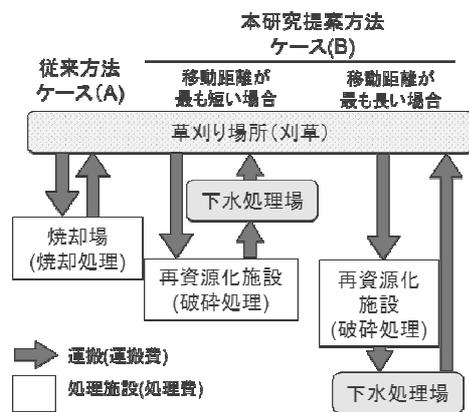


図-2 刈草処分ルートの場合設定

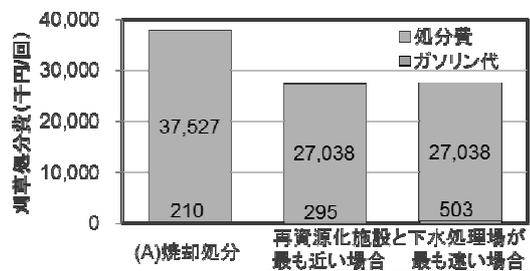


図-3 1回あたりの刈草処分費の試算結果

ベース))とした<sup>20)</sup>。昨年度の実験結果<sup>4)</sup>で得られた脱水前の汚泥TS、脱水後の刈草混合脱水汚泥量の値を用いて、一カ月あたりの脱水汚泥量を算出し、汚泥処分費を試算した<sup>20)</sup>。なお、脱水前の汚泥TSは、標準汚泥は2.9%、OD汚泥は1.1%であった。

脱水汚泥処分費の試算結果を図-4に示す。図中に、従来の方法として、凝集剤2%、刈草0%の場合の汚泥処分費を⊗で示した。また、⊗よりも汚泥処分費が安くなる条件に×を付けた。標準汚泥では、凝集剤0.5%、1.0%、刈草10%、30%の場合、刈草を混合することで、従来の方法よりも汚泥処分費が削減できる可能性が示された。刈草30%では汚泥のみ

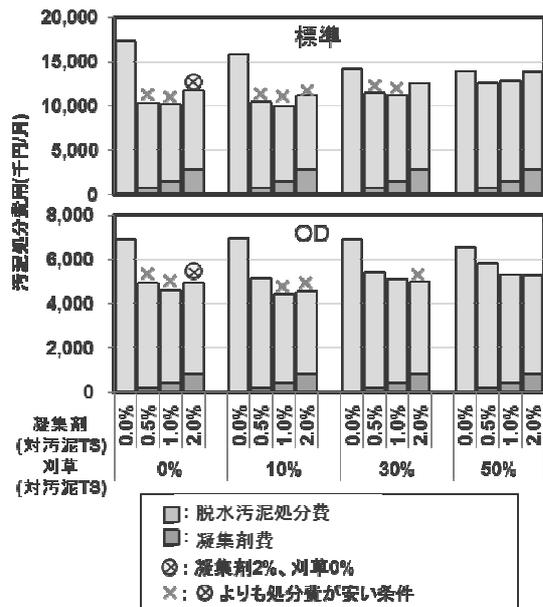


図-4 汚泥処分費の試算結果

の含水率が上昇する傾向を示した<sup>4)</sup>が、汚泥処分費としてみると、凝集剤費の削減により、安くなる結果となった。OD 汚泥では、汚泥処分費が削減できる可能性のあるケースは、凝集剤 1.0%以上、刈草 10%であった。どちらの性状の汚泥でも、刈草混合により汚泥処分費が安くなるケースがみられた。

#### 4. 下水汚泥と刈草の混合嫌気性消化の効率向上技術

##### 4.1 はじめに

河川事業等の公共事業に由来するバイオマスの有望な利用方法の一つとして、下水処理場での下水汚泥との混合による嫌気性消化が考えられ、新潟市での検討事例<sup>25)26)</sup>も報告されており、また、既往の調査研究<sup>27)28)</sup>で、刈草(草の葉や茎)について検討し、特殊な前処理を行わなくても裁断のみで、ある程度のメタン転換が期待できることを示してきたところである。一方で、刈草中の有機物のメタンへの転換率は、下水汚泥に比べて小さいこと、何らかの前処理を加えることで、メタン転換率が向上する事例も報告されている。

そこで、本研究では、刈草の前処理手法として、刈草を凍結し、細胞中の水の凍結に伴う体積増加により細胞壁を破碎する手法について検討した。なお、本年度は、刈草は種類が多岐にわたるため、陸上植物と同様に緑色植物界に属し、クロロフィル a, b による光合成を行う単純な緑藻を模擬刈草に見立てて、培養した緑藻に対して前処理手法を適用した場

合としない場合の、培養緑藻と下水汚泥との混合嫌気性消化によるメタン転換ポテンシャルについて検討を行った。

##### 4.1. 実験方法

嫌気性消化槽での、濃縮汚泥および模擬刈草投入による効果を確認するために、消化汚泥、濃縮汚泥、濃縮藻類、凍結解凍濃縮藻類を用いて、消化汚泥のみを添加する系列(ブランク)、消化汚泥に濃縮汚泥のみを添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥と濃縮藻類を添加する系列ならびに消化汚泥に濃縮汚泥と凍結解凍藻類を添加する系列について、中温条件(35℃)にて回分式嫌気性消化実験を行った。実験に使用した消化汚泥、濃縮汚泥は、茨城県内の、下水処理方式として標準活性汚泥法、汚泥処理方式として中温消化を行っている下水処理場より採取して使用した。実験に使用した濃縮藻類は、既述の下水処理場で発生した消化脱離液を用いて HRT=16.8 日の条件で継代培養して得られた余剰藻類培養液<sup>29)</sup>を遠心分離により固液分離し、上澄水を取り除いたものとした。その一部については、-20℃に設定した冷凍庫内に一日置き、その後、冷蔵庫内にて解凍し、凍結解凍濃縮藻類試料とした。

回分式嫌気性消化実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥 400mL を投入し、表-2 に示す所定量の濃縮汚泥、濃縮藻類、凍結乾燥濃縮藻類を添加し、沸騰後冷ました水道水を加えて 500mL とした。その後、反応器内を窒素ガスで十分に置換し密栓後、35℃に調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。なお、回分式嫌気性消化実験は、2017年10月

表-2 回分式嫌気性消化実験における基質の組成

系列名	投入消化汚泥	投入基質 (gVS)		
		濃縮汚泥	濃縮藻類	
			凍結	解凍
1-1	400mL	—	—	—
1-2	400mL	—	—	—
2-1	400mL	0.344	—	—
2-2	400mL	0.344	—	—
3-1	400mL	0.344	0.069	—
3-2	400mL	0.344	0.069	—
4-1	400mL	0.344	—	0.069
4-2	400mL	0.344	—	0.069

～11月にかけて実施した。

#### 4.2. 分析方法

消化汚泥、濃縮汚泥、濃縮藻類、凍結解凍濃縮藻類、実験終了後の培養液の性状分析は、下水試験方法に従って行った。なお、COD<sub>Cr</sub>の分析は、吸光度計（DR2400、HACH社）により、COD試薬を用いた。アンモニア性窒素濃度の測定には、自動比色分析装置（TRAACS2000、BRANLUEBBE社）を用いた。発生メタンガス量の測定には、水上置換方式のガス流量計（BioReactor Simulator AMPTS II、Bioprocess Control）を用いた。

#### 4.3. 結果および考察

本実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、濃縮藻類、凍結解凍濃縮藻類のTSは1.2%、2.8%、1.4%、1.4%、VSは0.9%、2.3%、1.1%、1.1%であった。濃縮汚泥や濃縮藻類を投入した系列では、実験開始後1週間程度の間は、メタン発生速度が大きかったが、その後は、基質を投入しなかったブランクの系列と同程度にまで、発生速度が低下した。本実験では、実験期間を21日間に設定した。各系列における累積メタン発生量、他の系列でのメタン発生量を差し引いて計算される濃縮汚泥、濃縮藻類、凍結解凍濃縮藻類由来のメタン発生量を表3に示す。

本実験における、投入基質の単位VSあたりのメタン発生量は、濃縮汚泥のみを投入した場合で、 $72.6 / 0.344 = 211 \text{ NmL/gVS}$ であった。既往の調査研究で示されている一般的な下水処理場における中温消化での数値（ $0.36 \text{ NL/gVS}$ ）に比べてやや小さかったが、これは、下水処理場の消化槽が連続式であるのに対して、本実験では、回分式実験であることによるものと考えられる。

また、投入基質として、濃縮汚泥のみを投入した場合（系列2）と、濃縮汚泥および濃縮藻類を投入した場合（系列3）を比較し、投入濃縮藻類の単位VSあたりのメタン発生量を算出すると、 $24.2 / 0.069 = 351 \text{ NmL/gVS}$ となった。この数値は、既往の調査研究結果<sup>27)</sup>で示されている、濃縮汚泥および葉や茎のみの刈草を投入した、中温条件での回分式嫌気性消化実験結果から得られた、投入刈草の単位VSあたりのメタン発生量（ $0.118 \text{ NL/gVS}$ ）と比較すると大きく、一般的な植物と比べると、メタン転換ポテンシャルが大きい結果であった。

一方、濃縮汚泥のみを投入した場合（系列2）と、濃縮汚泥および凍結解凍濃縮藻類を投入した場合（系列4）を比較し、投入凍結解凍濃縮藻類の単位

表-3 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量  
(単位：NmL)

系列名	累積メタン発生量	メタンガスの由来			
		消化汚泥	濃縮汚泥	濃縮藻類	
				凍結解凍	
1-1	105.2	107.5	—	—	—
1-2	109.7				
平均	107.5				
2-1	178.6	107.5	72.6	—	—
2-2	181.4				
平均	180.0				
3-1	198.8	107.5	72.6	24.2	—
3-2	209.6				
平均	204.2				
4-1	187.6	107.5	72.6	—	2.5
4-2	177.4				
平均	182.5				

VSあたりのメタン発生量を算出すると、 $2.5 / 0.069 = 36 \text{ NmL/gVS}$ となった。この数値は、凍結解凍を行わない濃縮藻類の場合（系列3）に比べて著しく小さく、凍結解凍処理により、メタン発生ポテンシャルを著しく低下させる結果となった。凍結操作により、有機物の酸発酵に関与する酵素が失活した等の理由が考えられるが、詳細な原因は不明である。

#### 5. まとめ

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

1. 剪定枝を下水汚泥焼却炉で活用する技術について、自然乾燥が困難な場合には、白煙防止空気の余剰分が乾燥に利用可能であると考えられた。
2. 刈草を汚泥脱水助剤として適用する技術において、河川事業における刈草処分費は、焼却処理するよりも破碎処理後に下水処理場へ受け渡す方が削減できる可能性が示された。下水道事業における汚泥処分費は、下水処理場外での焼却処分を想定した場合、凝集剤1.0%、刈草10%を混合して脱水を行うことで、汚泥処分費が削減できる可能性が示された。

3. 河川事業等の公共事業に由来する刈草の有望な利用方法の一つとして、下水処理場での下水汚泥との混合による嫌気性消化が考えられているが、刈草中の有機物のメタンへの転換率は、下水汚泥に比べて小さく、何らかの前処理を加えることで、メタン転換率を向上させることが有効であると考えられる。本年度は、刈草の前処理手法として、凍結解凍手法について検討した。模擬刈草と見立てた緑藻と下水汚泥との混合消化（中温消化）によるメタン転換ポテンシャルを評価したところ、凍結解凍操作により、むしろメタン発生ポテンシャルを著しく低下させる結果となり、前処理手法としては不適当であることがわかった。

### 参考文献

- 1) 公益社団法人日本下水道協会：平成 28 年度下水道白書 p.50、2016
- 2) 閣議決定：循環型社会形成推進基本計画、2015 [http://www.env.go.jp/recycle/circul/keikaku/keikaku\\_3.pdf](http://www.env.go.jp/recycle/circul/keikaku/keikaku_3.pdf) (参照：2017.2.27)
- 3) 国土交通省河川砂防技術基準維持管理編（河川編）、平成 27 年 3 月改定、2015、[http://www.mlit.go.jp/river/shishin\\_guideline/gijutsu/gijutsukijunn/ijikamri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf](http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/gijutsu/gijutsukijunn/ijikamri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf) (参照 2017.2.27)
- 4) 国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 43 70 号、pp.27-35、2018。
- 5) 農林水産技術会議事務局：第 3 編 木質バイオマス変換総合技術の開発、地域活性化のためのバイオマスの利用技術の開発(2)、pp.153-165、2014、<http://agriknnowledge.affrc.go.jp/RN/2039017291.pdf> (参照：2017.8.22)
- 6) 国土交通省国土技術政策総合研究所：都市由来植物廃材のエネルギー利用手法等に関する技術資料、国総研資料第 845 号、pp.167-168、2015
- 7) 宮田大輔、鈴木保志、小畑篤史、後藤純一、板井拓司、政岡尚志、吉井二郎：木質チップの自然乾燥における攪拌の効果、pp.75-83、90(2)、2008、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjfs/90/2/90\\_2\\_75/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjfs/90/2/90_2_75/_pdf) (参照：2017.8.22)
- 8) 水田 亮、望月真、海和晋史、鳥谷淳：災害廃棄物の発熱及び出火危険性に関する検証、消防技術安全所報 5 2 号、pp.96-104、2015、<http://www.tfd.metro.tokyo.jp/hp-gijyutuka/shyohou2/52/52-10.pdf> (参照：2017.8.22)
- 9) 株式会社森林環境リアライズ、株式会社富士通総研、環境エネルギー普及株式会社：木質バイオマスボイラー導入・運用にかかわる実務テキスト、2013、[http://www.rinya.maff.go.jp/j/riyou/biomass/con\\_4.html](http://www.rinya.maff.go.jp/j/riyou/biomass/con_4.html) (参照 2017.8.22)
- 10) 国土交通省国土技術政策総合研究所：都市由来植物廃材のエネルギー利用手法等に関する技術資料、国総研資料第 845 号、p.220、2015
- 11) 資源のみち委員会：資源のみちの実現に向けて 報告書、p.30、2007、<http://www.mlit.go.jp/common/000038167.pdf> (参照 2017.8.8)
- 12) 岩下栄、小川裕正、落修一、石田貴、井上匠、尾家俊康、和泉一也：焼却炉からの排熱利用によるバイナリー発電技術の適用について、第 51 回下水道研究発表会講演集、2014。
- 13) 三島俊一：複数熱源に対する温度差発電技術の適応に関する研究、博士論文、佐賀大学、2016。
- 14) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部廃棄物対策課：高効率ごみ発電施設整備マニュアル、平成 22 年 3 月改定、2010、[https://www.env.go.jp/recycle/misc/he-wge\\_facil/](https://www.env.go.jp/recycle/misc/he-wge_facil/) (参照：2017.8.8)
- 15) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部廃棄物対策課：廃棄物処理施設の発注仕様書作成の手引き(標準発注仕様書及びその解説)エネルギー回収推進施設編ごみ焼却施設(第 2 版)、2013、[https://www.env.go.jp/recycle/waste/3r\\_network/7\\_misc/man\\_wtfspec/1-1\\_hrf.pdf](https://www.env.go.jp/recycle/waste/3r_network/7_misc/man_wtfspec/1-1_hrf.pdf) (参照：2017.8.8)
- 16) 独立行政法人土木研究所：草木系バイオマスの組成分析データ集、土木研究所資料第 4095 号、平成 20 年 2 月、2008、<https://www.pwri.go.jp/team/imarrro/activity/tech-info/tech4095.pdf> (参照：2017.9.12)
- 17) 木質バイオマスエネルギー利用推進協議会制定：燃料用木質チップの品質規格、2014
- 18) 一般社団法人日本木質ペレット協会制定：木質ペレット品質規格、2017、<https://w-pellet.org/download/1313/> (参照：2017.9.12)
- 19) 澤井徹、梶本武志、本庄孝子、佐野寛、難皮邦彦、井田民男、湊端学、左近孝憲：和歌山県における果樹剪定枝のエネルギー利用—剪定枝の灰分、C/N 比および燃焼特性—、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jriet1/972/35/12/35\\_12\\_916/\\_article-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jriet1/972/35/12/35_12_916/_article-char/ja/) (参照：2017.9.12)
- 20) 地方独立行政法人北海道立総合研究機構産業技術研究

- 本部工業試験所：一般廃棄物（枝・葉・草等）を原料としたペレット燃料製造、技術支援成果事例集、2016、<https://www.hro.or.jp/list/industrial/research/iri/jyoho/casebook/16/example/22.pdf>（参照：2017.9.12）
- 21) 国立研究開発法人土木研究所：地域バイオマスの資源管理と地域モデル構築に関する研究、平成 27 年度下水道関係年次報告書集、土木研究所資料第 4347 号、p p.16-25、2017.
  - 22) 国立研究開発法人土木研究所：平成 20 年度下水道関係調査研究年次報告書集、公共事業由来バイオマスの資源化・利用技術に関する研究、土木研究所資料第 4157 号、pp.38-46、2011.
  - 23) 公益社団法人日本下水道協会：平成 26 年度版下水道統計、第 71 号、2017.
  - 24) 山崎廉予、重村浩之：刈草の汚泥脱水助剤としての利用検討、環境工学フォーラム論文集、Vol.73、No.7、pp.365-373、2017.
  - 25) 山本茂浩：新潟市における再生可能エネルギーの取り組み、第 50 回下水道研究発表会講演集、pp.916-918、2013.
  - 26) 山本茂浩：下水汚泥と刈り草等の混合消化実証実験、第 51 回下水道研究発表会講演集、pp/937-939、2014.
  - 27) 独立行政法人土木研究所：平成 24 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料、第 4275 号、2013.
  - 28) 栗田雄佑、小松俊哉、姫野修司：異なる下水汚泥を用いた刈草と混合嫌気性消化における分解特性の把握、第 51 回下水道研究発表会講演集、pp.940-941、2014.
  - 29) 岡安祐司、山崎廉予、桜井健介、重村浩之：下水汚泥の嫌気性消化脱離液を用いた藻類培養における水理学的滞留時間の影響について、第 52 回日本水環境学会年会講演集、p.160、2018.

# 公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究

研究予算 : 運営費交付金

研究機関 : 平 28～平 33

担当チーム : 材料資源研究グループ (資源循環担当)

研究担当者 : 重村浩之、諏訪守、李善太

## 【要旨】

社会活動に重大な影響を及ぼす新たな感染症の発生に伴い、法改正による監視強化や水循環基本計画に基づく新たな衛生微生物指標等に着眼した環境基準等の目標に関わる調査研究、合流式下水道について必要に応じた対策の実施、さらには感染症拡大を防止するなど地域に貢献できる下水道システムの構築が望まれている。

本研究は、平成 28～33 年度にかけ、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。29 年度は、上記①の達成目標に関わる調査・研究として、ふん便汚染の基本的な指標である大腸菌について、下水試料に適した測定法の提案を行うため、複数の特定酵素基質培地を利用した検出定量等に関し比較評価を行った。また、消毒耐性病原微生物に対応した代替指標の提案に関しては、比較的測定が容易かつ下水中に存在、消毒耐性を有すると考えられる F 特異性 RNA Phage GI ～ GIV (FRNAPH GI ～ GIV) を対象に、活性汚泥処理水の連続モニタリングを実施することで、代替指標としての利用可能性について検証した。上記②に関わる調査・研究では、実態調査に基づき合流式下水道越流水対策技術の 1 つである雨天時活性汚泥法のノロウイルス (NoV) 削減効果を明らかにした。②に関わる調査・研究では、活性汚泥法による NoV の除去効率向上要因の解明のため、活性汚泥中のタンパク質量と NoV の除去効果を評価した。

その結果、試料中の大腸菌濃度の違いにより培地間で定量値に差異が生じることや、変動係数に影響を及ぼすことが明らかとなった。FRNAPH GI は活性汚泥処理による残存割合の観点から、FRNAPHGII では活性汚泥処理による NoV の除去率と相関があり、NoV の代替指標としての利用可能性が示唆された。雨天時活性汚泥法による NoV 負荷の削減効果は、反応タンク内の MLSS 濃度に依存している傾向が見られた。活性汚泥処理による NoV の除去効果に活性汚泥中のペプチド量が深く関与している可能性が示唆された。

キーワード : 大腸菌、F 特異性 RNA Phage、ノロウイルス、合流式下水道越流水、タンパク質

## 1. はじめに

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

29 年度は、達成目標である消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案に関わる調査・研究として、下水試料に適した大腸菌の測定法の評価をはじめ、Phage の実態調査および越流水の対策技術として雨天時活性汚泥法による NoV の削減効果、活性汚泥中のタンパク質の存在量と NoV の除去効果を把握した。

## 2. 研究目的および方法

### 2.1 消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案

#### 2.1.1 衛生学的な基本指標である大腸菌の測定法の評価

特定酵素基質培地を利用することで大腸菌の検出定量が容易となった。ふん便汚染指標として大腸菌指標が優れていることもあり、環境基準項目の1つである大腸菌群が大腸菌への変更について検討中であることから、下水処理場における放流水質の技術上の基準項目である大腸菌群に関しても検討が必要である。大腸菌数の見直しにあたっては、定量評価を行うための測定法を考慮しなければならないが、複数の特定酵素基質培地が市販され培地組成が製造元により若干異なることなど、下水試料への適用にあたっては比較検討を行う必要があると考えられる。

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

### 1) 特定酵素基質培地と評価対象試料

評価対象とした特定酵素基質培地は、国内、海外メーカーから市販されている培地A~Gの7種類とした。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。

評価対象試料は活性汚泥法の二次処理水、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った試料の、計2試料とした。各培地による大腸菌の定量は、同一試料について同時測定、同一人物による操作とした。

### 2) 検出コロニーの同定

各培地に形成される典型的なコロニーは、基本的に大腸菌と推定されるが、疑陽性を示すことも考えられる。また、培地の違いによりコロニーなどの発色状況が異なるが、選定の判断に迷うこともある。このため、各培地によって形成された典型的なコロニーを対象に、菌種の簡易同定を行った。試料には二次処理水を用い同定における釣菌操作では、各培地による混釈法によって得られた典型コロニーを白金耳にて釣菌し、簡易同定はIDテストEB-20(日水製薬社製)を利用した。

#### 2.1.2 代替指標としてのF特異性RNA Phageの評価

多様な病原微生物が検出される中で、各々の微生物に特化した検出対応は費用や労力の面から困難であるため、消毒耐性、存在実態、定量性(PCR法、培養法)観点から、代表的な指標を選定し評価することができれば、病原微生物の効率的な管理に資することができると考えられる。上記の観点を踏まえた代替指標の1つとしては、

ファージの存在が挙げられる。腸管系ウイルスの代替指標としての有用性について下水中での存在実態、消毒耐性の評価例<sup>3)</sup>、細菌、腸管系ウイルスとの塩素消毒に対する耐性比較などに関する報告<sup>4) 5) 6) 7)</sup>があり、また、ウイルス不活化手法の評価<sup>8)</sup>や下水再利用プロセスにおけるモデルウイルスとしての利用例<sup>9)</sup>がある。F特異性RNA PhageはGIからGIV(FRNAPH GI~GIV)の遺伝子群に分けられ、それぞれの遺伝子群は環境水中や凝集や膜処理などの水処理において耐性が異なるとの報告がなされている<sup>10) 11) 12)</sup>。

本項では、大きさ(直径約20~40nm)や構造(正二十面体)がNoVなどのヒト病原ウイルスと類似しているFRNAPH GI~GIVを対象として、活性汚泥処理による除去率を調査し、NoVとの関連性を評価することでNoVの代替指標としての利用可能性を検討した。

調査は、I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流入水および処理水を平成29年5月から翌年の4月の間に17回採水した。流入水と処理水中のFRNAPHとNoVを定量し、活性汚泥処理による除去率を算出した。FRNAPH遺伝子群(GI~GIV)とNoV GI, GIIは、リアルタイムRT-qPCR法(PCR)により定量した。定量ではポリエチレングリコール沈殿法によりサンプルを濃縮した。濃縮液からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit(QIAGEN)およびQIAcube(QIAGEN)にて抽出した。なお、ウイルス濃縮液をRNA抽出カラムに通水し遺伝子を捕捉させる際、検出感度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたりのSS負荷量が0.05mg-SS以下となるようにウイルス濃縮液の通水量を調整した<sup>13)</sup>。抽出したRNAは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてRT反応を行い、cDNAを得た。この合成したcDNAをTaqMan<sup>®</sup>プローブを用いたPCRにより定量した。TaqMan<sup>®</sup>Gene Expression Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を用いて、QuantStudio<sup>™</sup>12K Flex Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific)により検出した。FRNAPH遺伝子群とNoVのプライマー、TaqManプローブの配列およびアニーリング温度はWolfら<sup>14)</sup>のとKageyamaら<sup>15)</sup>報告をそれぞれ参考にした。PCRにおける検出下限値は約1000copies/L(約3log[copies/L])程度となる。さらに、RNA抽出効率およびRT-qPCR阻害の影響を把握する目的でRNA抽出に用いる濃縮後のサンプルにマウスノロウイルス(MNV)高濃度液を添加して回収率を評価した<sup>7)</sup>。なお、da Silvaら<sup>16)</sup>は、回収率が10%を下回った場合は検出阻害が生じたと判断し、1%を下回った場合は深刻な

検出阻害が生じたと判断すると報告している。本調査では全てのサンプルの回収率が10%を上回っており大きな検出阻害は見られなかったため、ここではPCRによる定量値において回収率による補正は行っていない。

## 2.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

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



図-1 雨天時活性汚泥法の概略図

NoVの測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮はPEG沈殿法としたが、その後の前処理法は上記の2.1.2の方法とは若干異なる。PEG沈殿法により回収した沈渣をRNase-free水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイムRT-PCR法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社）の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit（QIAGEN社）でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料0.5 $\mu$ gをランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit（QIAGEN社）を用い全量50 $\mu$ Lの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し5 $\mu$ L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」<sup>17)</sup>に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantitect Probe PCR Kit（QIAGEN社）を用い、リアルタイムPCR装置はQuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）を使用した。逆転写反応に使用する抽出RNA量はSpectrophotometer（NanoDrop社製）により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した<sup>13)</sup>。他の水質分析項目は濁度、SSとした。

## 2.3 活性汚泥中のタンパク質とNoV除去効果の関係

NoVは、活性汚泥法により2 log程度の除去効果が得られるが、活性汚泥法の変法である生物学的高度処理法では3 log程度に向上する報告がある<sup>18)</sup>。感染性胃腸炎の流行により、流入下水中のNoV濃度が高まることから、放流先の水利用の状況によっては、下水処理場においてより高度な除去効果が必要となることも予想される。

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

処理プロセスが異なる活性汚泥を評価対象として、生物学的高度処理法を導入しているI下水処理場のA<sup>2</sup>/O法の好気槽（A<sup>2</sup>/O法）、I下水処理場内の活性汚泥処理プラントの反応タンクから活性汚泥（標準法）を各々採取した。各々採取した活性汚泥は、静置沈殿させ上澄液などの取り除き量や流入下水を10L添加することで、MLSS濃度が500、1,000、2,000mg/Lとなるように20Lの反応系を6ケース（2種類の活性汚泥×MLSS濃度が3ケース）作成した。この20Lの反応系を利用し回分実験として7時間の曝気混合後に混合液を採取、その後静置沈殿させ上澄液を採水した。回分実験から得られた上澄液についてはNoVとSSを測定した。NoVの測定法は上記2.2と同様である。タンパク質については、20mLの試料を2,400×G、15分間、4℃にて遠心分離を行い上澄液と沈渣に分別し、上澄液には滅菌蒸留水を加え20mLとしタンパク質測定用試料とした。沈渣からのタンパク質の抽出は抽出液を添加、超音波処理による手法を参照した<sup>19)</sup>。抽出液として50mMりん酸緩衝液+1% SDSを20mLになるまで添加、攪拌混合の後、10分間の超音波処理、その後、遠心分離により上澄液と沈渣に分別、同様の操作を繰り返すことで2回の抽出操作を行った。最終的には、遠心分離・抽出処理後に得られた全ての上澄液をタンパク質測定用試料としてBicinchoninic

Acid (BCA 法) により測定を行った<sup>20)</sup>。BCA 法における標準タンパク質としては、牛血清アルブミンを希釈して利用した。また、上澄液は透析膜により 3KDa 以下、3~10KDa 以下、10KDa 以上に分子量分画を行った後にタンパク質を測定した。

### 3. 研究結果および考察

#### 3.1 消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案

##### 3.1.1 衛生学的な基本指標である大腸菌の測定法の評価

###### 1) 特定酵素基質培地

特定酵素基質培地による定量結果を図-2 に示す。活性汚泥法の二次処理水を対象に、採水日を変えて 18 回の採水、定量 (n = 3/試料) を行った。この時の定量範囲は約 20~270 CFU/mL であった。A 培地の混積法による定量値を基準として、各培地、手法での 18 回の定量値から各々の検出濃度比を求めその平均値を整理したものである。培地 A~C では、混積法に比較してフィルター法での検出濃度比が若干低いが、培地 D~F では若干高い傾向が見られた。検出濃度比は A 培地の混積法の定量値を基準にすると、培地間、手法間による違いは 0.95~1.1 倍程度であり、大きな差異は無いものと考えられた。この時の

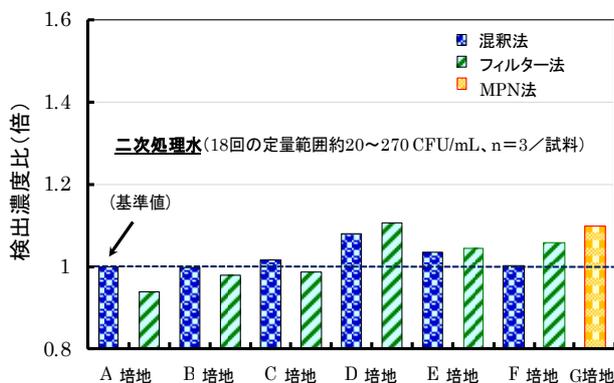


図-2 各培地・手法による大腸菌の検出濃度比

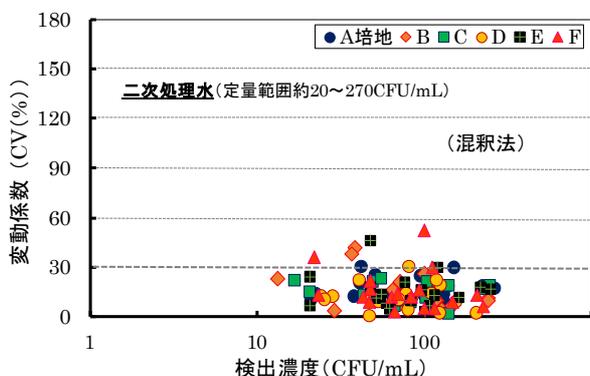


図-3 各培地による検出濃度と変動係数の関係

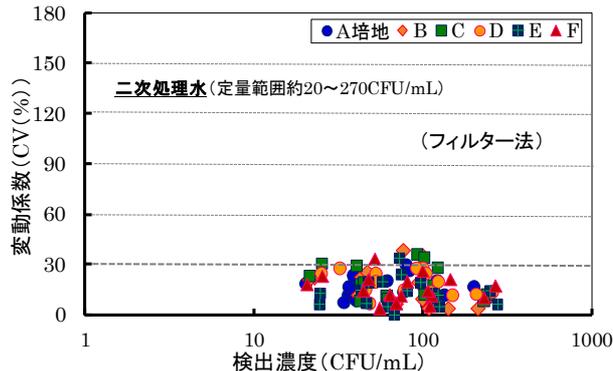


図-4 各培地による検出濃度と変動係数の関係

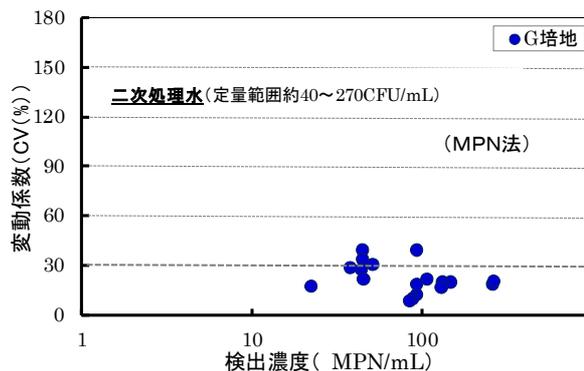


図-5 検出濃度と変動係数の関係

変動係数 (CV) の推移について図-3~5 に示す。混積法の 1 部の培地で若干高い値が見られたが、各培地の混積法、フィルター法、MPN 法ともに概ね 30%以内で変動係数が推移しており、検出濃度比とともに培地間、手法の違いによる大きな差異は認められなかった。

一方、放流水を想定し二次処理水を塩素消毒した試料を対象とした大腸菌の定量結果を図-6 に示す。採水日を変え 16~17 回の採水、定量 (n = 3/試料) を行った。この時の定量範囲は約 1~30 CFU/mL であった。A 培地の混積法による定量値を基準として、各培地、手法での定量値から検出濃度比を求めその平均値を整理した。A 培地の混積法の定量値を基準にすると 0.87~1.5 倍の範囲内となり、検出濃度が低くなることで培地間の検出濃度比に大きな違いが生じた。特に、G 培地の検出濃度比が大きく上昇、また、E、F 培地において混積法とフィルター法で手法が異なることで検出濃度比に違いが見られた。この時の CV の推移について図-7~9 に示す。混積法、フィルター法、MPN 法ともに大腸菌の検出濃度が 10 CFU (MPN) /mL 以下と低濃度となることで CV が上昇傾向を示しており、試料中の大腸菌濃度の違いにより培地間で定量値に差異が生じることや、変動係数に影響を及ぼすことが明らかとなった。水質基準項目に関わる測定精度において、変動係数は 10~20%とされているが、一般

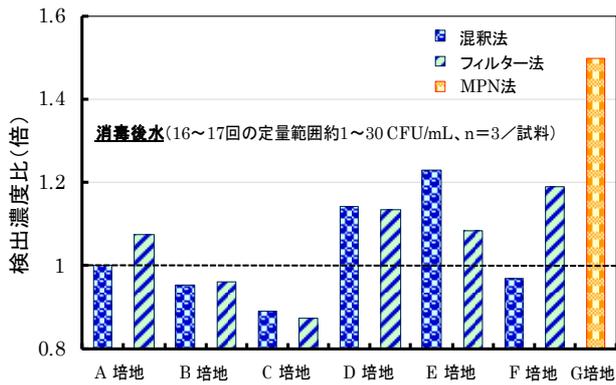


図-6 各培地・手法による大腸菌の検出濃度比

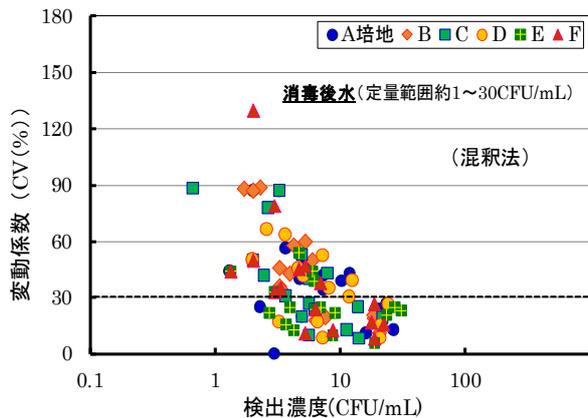


図-7 各培地による検出濃度と変動係数の関係

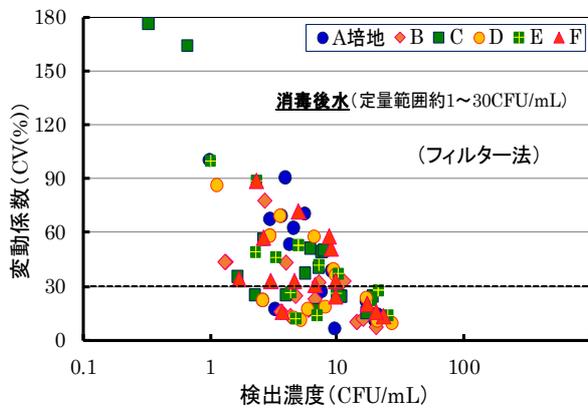


図-8 各培地による検出濃度と変動係数の関係

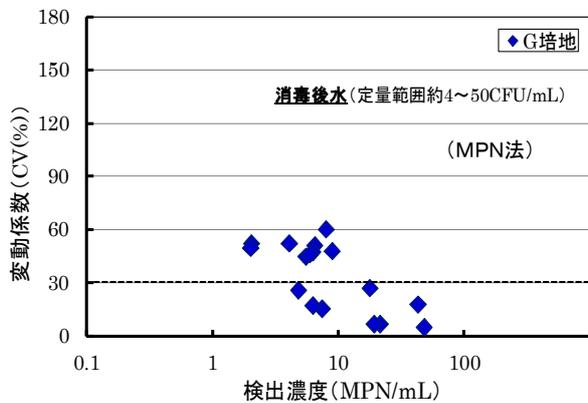


図-9 検出濃度と変動係数の関係

細菌、従属栄養、大腸菌などに関しては特に変動係数の目安は示されていないものの、特に 10 CFU/mL 以下の試料では、CV が大幅に上昇することが明らかとなったため、安定した定量値を得るための改善策を考慮する必要があるものと考えられた。

このため、低濃度試料に対する具体的改善策として、検水量を増加させ定量値の評価を行った。各培地・手法による評価結果を図-10~12 に示す。検水量を 1 mL から 2 mL あるいは 3 mL、MPN 法では 1 mL から 10 mL に増加させることで、全体的に CV は低下傾向を示すことが明らかとなった。この結果を基に、低濃度試料を対象に検水量を増加させた各培地・手法による比較結果を図-13 に示す。各培地間・手法の検出濃度比は 0.81~1.1 倍程度に改善され、安定した定量値が得られると考えられた。

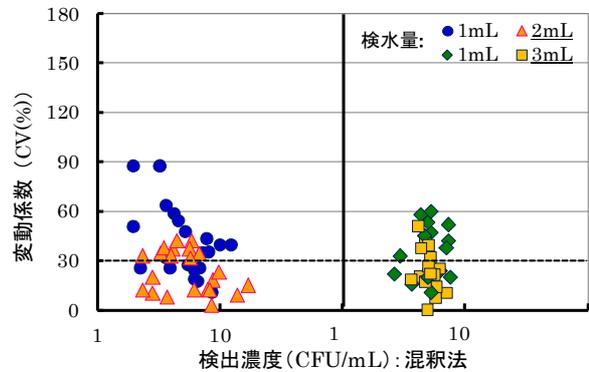


図-10 検水量の違いがCVへ及ぼす影響

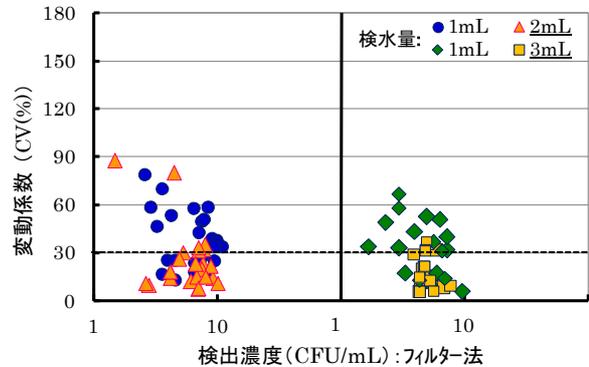


図-11 検水量の違いがCVへ及ぼす影響

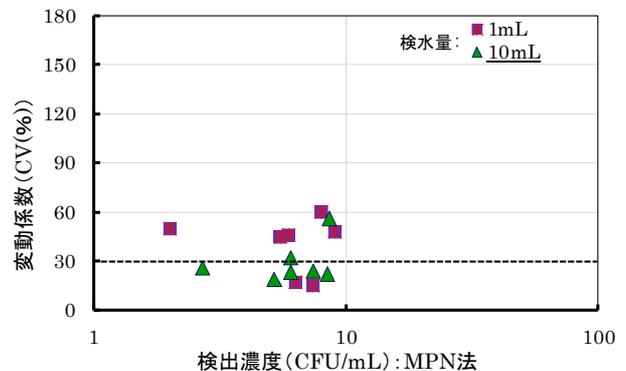


図-12 検水量の違いによる検出濃度とCVの関係

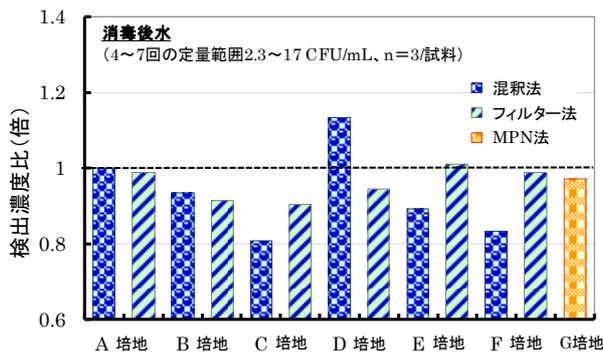


図-13 各培地・手法による検出濃度比  
(CVが30%程度までのデータにおいて整理)

## 2) 検出コロニーの同定

各培地による検出コロニーの同定結果を表-1 に示す。各培地から得られた 20 のコロニーを対象とし、釣菌にあたっては他の大腸菌等のコロニーと重なりが無い独立したコロニーを選定した。なお、培地 G に関しては液体培地であるためコロニーを釣菌できないことから評価対象外とした。培地 A~F における典型コロニーの大腸菌 (*E.coli*) の陽性率は 90~100% であり、培地 F では典型コロニーの 10% が疑陽性を示した。各培地で疑陽性を示したコロニーの大部分は腸内細菌科に分類されている種であり、大腸菌を含めた腸内細菌の陽性率としては 95~100% であった。特定酵素基質培地を利用して、腸内細菌の一部が疑陽性を示すとされているが<sup>21)</sup>、培地が異なることで疑陽性の割合に若干の違いが生じる可能性が示唆された。

表-1 各培地における検出コロニーの同定結果

培地	同定数	同定結果	<i>E.coli</i> 陽性率 (%)	腸内細菌陽性率 (%)
A	20	<i>E.coli</i> (19), <i>E.coli</i> ・ <i>K.ascorbata</i> 混合(1)	100	100
B	20	<i>E.coli</i> (18), <i>E.coli</i> ・ <i>E.hermannii</i> ・ <i>E.fergusonii</i> 混合(1), <i>Kryocrescens</i> (1)	95	100
C	20	<i>E.coli</i> (17), <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonicus</i> 混合(1), <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonicus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1), 不明(1)	95	95
D	20	<i>E.coli</i> (20)	100	100
E	20	<i>E.coli</i> (16), <i>E.coli</i> ・ <i>S.flexneri</i> 混合(1), <i>E.coli</i> ・ <i>S.dysenteriae</i> 混合(1), <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonicus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1), <i>E.hermannii</i> (1)	95	100
F	20	<i>E.coli</i> (17), <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonicus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1), <i>C.freundii</i> (1), 不明(1)	90	95

( )内は同定株数、*E.coli*との混合同定分については、*E.coli*として評価

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

活性汚泥処理による FRNAPH 遺伝子群 (GI~GIV) と NoV GI, GII の除去率推移の調査結果を図-14 に示す。FRNAPH 遺伝子群の中では GIII の除去率が最も高い傾向を示し、GIV, GII, GI の順であり、GI が活性汚泥処理による残存割合が最も高かった。NoV GI と GII に関しては同程度の除去率で推移していた。全体の除去率が

ら検出下限以下の値を除外して平均値を求めたところ、FRNAPH 遺伝子群の平均除去率は、GI は 1.4 log、GII は 1.6 log、GIII は 2.5 log、GIV は 2.1 log であり、NoV GI と GII はそれぞれ 1.4 log と 1.6 log であった。FRNAPH GI は活性汚泥処理による残存割合が最も高かったため、除去率の評価の観点から FRNAPH GI を代替指標とすることで、より安全側の評価が行える可能性が示唆された。

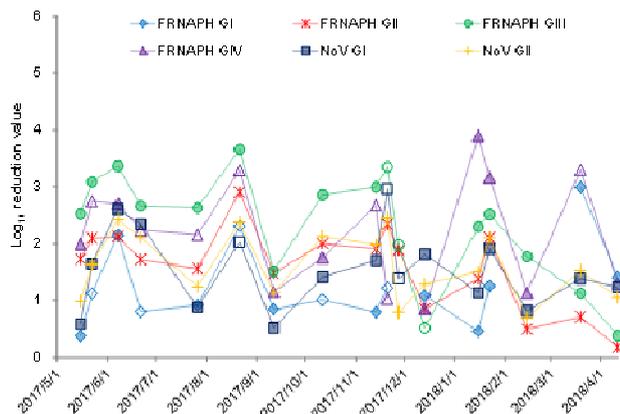


図-14 活性汚泥処理による FRNAPH と NoV の除去率の推移  
さらに、FRNAPH 遺伝子群 (GI~GIV) と NoV GI, GII の除去率推移について整理した結果、FRNAPH GII, GIII と NoV GII の除去率の間に相関が見られた (図-15、16)。

FRNAPH 遺伝子群の GI と GIV は主に動物の糞便由来であり、GII と GIII は人の糞便由来であることが報告されている<sup>22)</sup>。そのため、FRNAPH の GII、GIII は、人糞便由来である NoV と下水処理における除去機構が類似していると考えられる。特に、FRNAPH GII は NoV と平均除去率において上述のとおり有意な差がないことから、下水処理において NoV の代替指標としての利用可能性

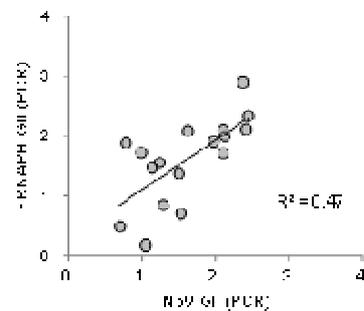


図-15 NoVGII と FRNAPHGII の除去率

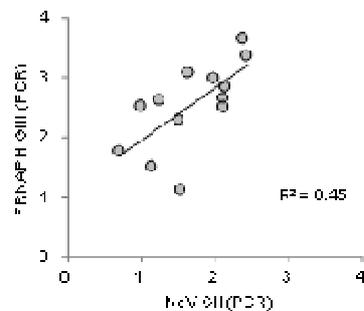


図-16 NoVGII と FRNAPHGIII の除去率

が示唆された。

以上の結果から、下水処理における代替指標として、安全側の評価の観点から FRNAPH GI が、NoV との関連性からは FRNAPH GII が利用できる可能性が示された。今後は、これらの FRNAPH の消毒処理での不活化効果を含めて代替指標としての利用可能性を評価する。

### 3.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

降雨時に越流水対策として雨天時活性汚泥法（嫌気好気法）を導入している H 市下水処理場における NoV 負荷の削減効果の調査結果を図-17、18 に示す。これは過去に得られた調査データを加え整理した結果である。全調査時における降雨状況は、時間最大降雨量が 2.0～18.5mm、累積降雨量は 9.5～54mm であった。また、最大バイパス流量は 0.3～1.7Q であった。雨天時活性汚泥処理時における NoV 負荷の削減効果は、流入負荷量を 1 とし流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ 0.002～0.115 であった。雨天時活性汚泥処理を実施しなかったとすると、晴天時の受け入れ可能な流入水量である 1Q を超過した NoV の負荷が公共用水域へ直接放流されることとなることから、雨天時活性汚泥処理により放流先河川水への負荷を大幅に低減しているものと考えられた。処理水の負荷量比に大きな違いが見られたことから、その要因を推定するため雨天時活性汚泥処理時における反応タンク内の MLSS と NoV 流出負荷の関係について、整理した結果を図-18 に示す。雨天時活性汚泥処理開始当初の反応タンク内（バイパス流入槽の前段での評価）の MLSS は約 1,500～1,700mg/L で推移していたが、NoV の流出負荷は MLSS に依存しており、MLSS を若干高めることで NoV 負荷の削減効果が高まる傾向が見られた。併せて図中に雨天時活性汚泥処理時間を記したが、3.3～13.8 時間の間で NoV 流出負荷との関連性は認められないため、処理時間の長短よりも反応タンク

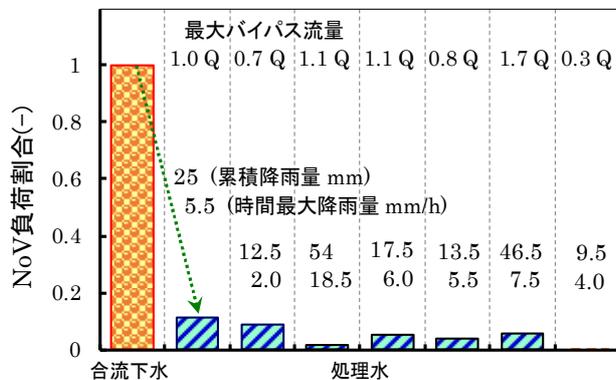


図-17 雨天時活性汚泥法によるNoV負荷の削減効果

内の MLSS が NV の除去性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

一方、MLSS を若干高めることで雨天時活性汚泥処理時における処理水の SS の変動が懸念されたため、MLSS と処理水の平均 SS を整理し図-19 に示す。MLSS を高めても処理水の平均 SS 濃度は上昇傾向を示しておらず、SS の観点から処理水質へ及ぼす影響は小さいものと考えられた。

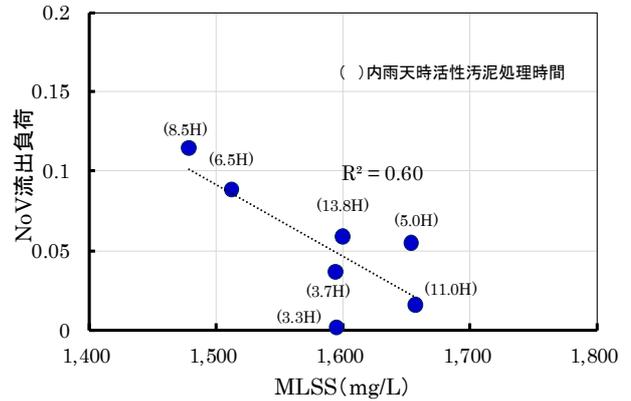


図-18 反応タンク内MLSSとNoV流出負荷との関係

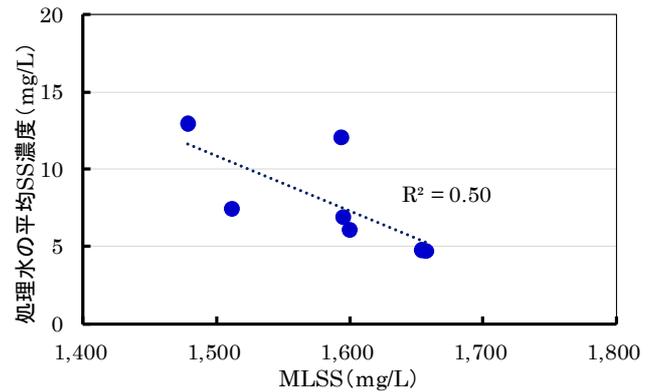


図-19 反応タンクのMLSSと処理水のSSとの関係

### 3.3 活性汚泥中のタンパク質と NoV 除去効果の関係

回分実験時の MLSS の測定結果を表-2 に示す。曝気混合開始から間もない 1 時間後において混合液の MLSS を測定したが、設定濃度に対して実際には実験 1 では若干高く、実験 2 では全体的にやや低い状況となった。曝気混合 7 時間後では回分実験開始当初の濃度と比較して若干の濃度上昇が見られたことから、実験時における活性汚泥の性状としては問題がないものと考えられた。

表-2 MLSSの測定結果

設定MLSS濃度 (mg/L)	A <sup>2</sup> /O法 MLSS濃度			標準法 MLSS濃度			
	500	1,000	2,000	500	1,000	2,000	
実験1	曝気混合1h	650	1,200	2,400	580	1,100	2,100
	曝気混合7h	660	1,300	2,500	600	1,100	2,200
実験2	曝気混合1h	670	680	1,800	410	770	1,500
	曝気混合7h	700	730	2,000	440	840	1,600

次いで、回分実験後における混合液のタンパク質量と上澄液中の NoV 濃度との関係について図-20～22、表-3 に示す。なお、分子量分画において 10KDa 以下のものをペプチド、10KDa 以上をタンパク質として整理した。MLSS 濃度が設定濃度に対して実験 2 では低かったため、実験 1 に比較して実験 2 の上澄液の NoV 濃度が全体的に高濃度になったものと推定された。曝気混合 7 時間後における 3KDa 以下のペプチド量と上澄液の NoV 濃度との関係について図-20 に示す。ペプチド量と上澄液の NoV 濃度との間には高い相関関係があり、活性汚泥中のペプチド量の増加に伴って NoV 濃度が低くなる傾向が見られた。ペプチド量とタンパク質量を表-3 に整理したが、3KDa 以下のペプチド量は標準法に比較して A<sup>2</sup>/O 法では 3～6 倍量多かった。A<sup>2</sup>/O 法における 3KDa 以下のペプチド量が最大値 (5.8～8.0g/20L) での上澄液の NoV 濃度は  $2.9 \times 10^5 \sim 3.6 \times 10^5$  copies/L、標準法の最大値 (0.92～2.1g /20L) では  $6.9 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6$  copies/L となっており、上澄液の NoV 濃度は A<sup>2</sup>/O 法と標準法で最大で 6 倍程度の違いが見られた。また、標準法における 3KDa 以下のペプチド量が最小値 (0.1～0.22 g / 20L) での NoV 濃度は  $1.7 \times 10^6 \sim 8.6 \times 10^6$  copies/L に上昇しており、A<sup>2</sup>/O 法の 3KDa 以下のペプチド量が最大値での NoV 濃度と比較して 30 倍程度高まった。

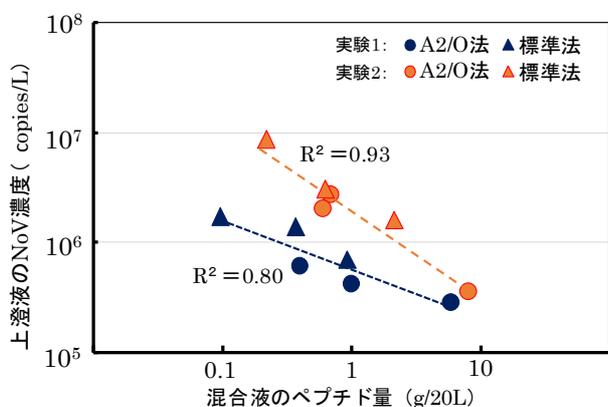


図-20 3KDa以下のペプチド量とNoV濃度

図-21 には 3～10KDa 以下のペプチド量と上澄液の NoV 濃度との関係について整理した。活性汚泥中のペプチド量と上澄液の NoV 濃度との間には相関関係があり、3～10KDa 以下のペプチド量の増加に伴って NoV 濃度が低下していた。3～10KDa 以下のペプチド量は、標準法に比較して A<sup>2</sup>/O 法では 2～10 倍量多かったが、3KDa 以下のペプチド量よりも全体的には 1 オーダー程度低い状況にあった。

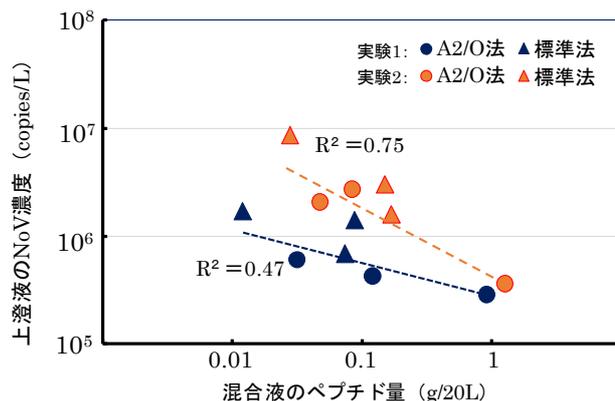


図-21 3～10KDa以下のペプチド量とNoV濃度の関係  
分子量分画を 10KDa 以上としたタンパク質との関係について整理した結果を図-22 に示す。タンパク質量の増加により NoV 濃度の低下傾向が見られた。標準法に比較して A<sup>2</sup>/O 法の活性汚泥は、10 KDa 以上としたタンパク質量が 1.2～2.5 倍量多くになっていた。

A<sup>2</sup>/O 法の活性汚泥は、標準法に比較してタンパク質やペプチドの含有量が多く、特にペプチド量に大きな違いが見られた。これらの結果から、活性汚泥による NoV の吸着除去効果にペプチド量が深く関与している可能性が示唆された。

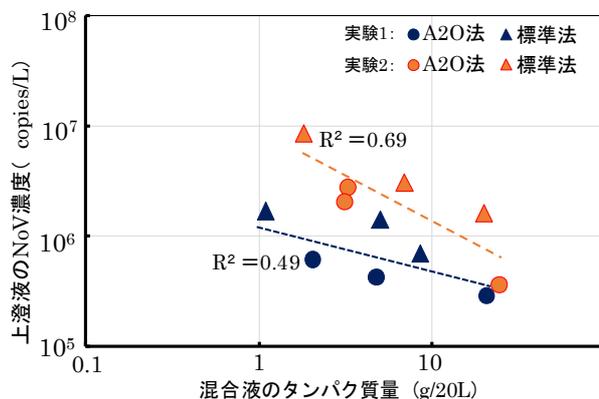


図-22 タンパク質量(10KDa以上)とNoV濃度の関係

表-3 ペプチド量とタンパク質量の比較

		実験1 (g/20L)	実験2 (g/20L)	A <sup>2</sup> /O法/標準法の比 (最小と最大の比)
3KDa以下 (ペプチド)	A <sup>2</sup> /O法	0.40～5.8	0.60～8.0	3～6倍
	標準法	0.10～0.92	0.22～2.1	
3-10KDa以下 (ペプチド)	A <sup>2</sup> /O法	0.03～0.93	0.05～1.3	2～10倍
	標準法	0.01～0.09	0.03～0.17	
10KDa以上 (タンパク)	A <sup>2</sup> /O法	2.1～21.0	3.1～24.0	1.2～2.5倍
	標準法	1.1～8.5	1.8～20.0	

#### 4. まとめ

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

である。29年度は、達成目標である消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案に関わる調査・研究として、下水試料に適した大腸菌の測定法の評価をはじめ、Phageの実態調査および越流水の対策技術として雨天時活性汚泥法によるNoVの削減効果、活性汚泥中のタンパク質の存在量とNoVの除去効果を把握した。以下に得られた結果を示す。

#### 「消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案」

- 1) 試料中の大腸菌濃度の違いにより培地間で定量値に差異が生じることや、変動係数に影響を及ぼすことが明らかとなった。
- 2) 低濃度試料に対しては、検水量を増加させることで変動係数を低下させられ安定した定量値が得られるものと考えられた。
- 3) 典型的なコロニーの大腸菌の陽性率は90~100%であり、培地が異なることで擬陽性の割合に若干の違いが生じた。
- 4) FRNAPH GIは活性汚泥処理による残存割合が最も高かったため、除去率の評価の観点からFRNAPH GIを代替指標とすることで、より安全側の評価が行える可能性が示唆された。
- 5) FRNAPH GIIはNoVの活性汚泥処理における除去率と相関があり、平均除去率においても有意な差がなかったことから、NoVの代替指標としての利用可能性が示唆された。

#### 「公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案」

- 6) 雨天時活性汚泥法によるNV負荷の削減効果は、反応タンク内のMLSS濃度に依存している可能性が示唆された。
- 7) 反応タンク内のMLSSを高めても処理水のSSは上昇傾向を示しておらず、SSの観点から処理水質へ及ぼす影響は小さいものと考えられた。

#### 「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」

- 8) 活性汚泥中のタンパク質量とペプチド量の増加に伴って、上澄液のNoV濃度が低くなる傾向が見られた。
- 9) A<sup>2</sup>/O法と標準法において、活性汚泥中のペプチド量に大きな違いが見られたため、NoVの吸着除去効果にペプチド量が深く関与している可能性が示唆された。

#### 謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象としたH市

下水処理場、I下水処理場の下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。ここに記して謝意を表します。

#### 参考文献

- 1) G7伊勢志摩首脳宣言、平成28年5月27日。
- 2) ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States,2013: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- 3) 下水処理水の滅菌及び消毒に関する研究報告書(1990)、土木研究所資料第2859号。
- 4) Sobsey M.D. (1989): Inactivation of Health-Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes, *Wat. Sci. Tech.*, 21(3),179-195.
- 5) M.C. Snead, V.P. Olivieri, K. Kawata, and C.W. Kruse (1980) The Effectiveness of Chlorine Residuals in Inactivation of Bacteria and Viruses Introduced by Post-Treatment Contamination, *Wat. Sci. Tech.*, 14,179-195.
- 6) J.A.Tree, M.R.Adams, and D.N.Less (1997) Virus Inactivation During Disinfection of Wastewater by Chlorination and UV Irradiation and the Efficacy of F+ Bacteriophage as a Viral Indicator, *Wat. Sci. Tech.*, 35(11-12),227-232.
- 7) S.R.Rippey and W.D.Watkins (1992) Comparative Rates of Disinfection of Microbial Indicator Organisms in Chlorinated Sewage Effluents, *Wat. Sci. Tech.*, 26 (9-11), 2185-2189.
- 8) ウイルス不活化手法の大腸菌フェージによる評価(1993)、土木学会衛生工学委員会編、環境微生物工学研究法。
- 9) 「21世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価」に関する研究調査報告書(2016)、土木研究所資料第4313号。
- 10) Hata, A. et al (2016): “Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, pp. 4244–4252.
- 11) Lee, S. et al (2018): “Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes”, *Environ. Technol.*, in press.
- 12) Boudaud, et al (2012): “Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale”, *Water Research*, 46, pp. 2651–2664.
- 13) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子(2009)、下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、46(561)、91-101.
- 14) Wolf, S. et al (2008): “Detection and characterization of F+

- RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR”, *J. Virol. Methods*, 149, pp. 123–128.
- 15) Kageyama, T. et al (2003): “Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR”, *J. Clin. Microbiol.*, 41(4), pp.1548–1557.
- 16) da Silva, A. K. et al (2007): “Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, pp.7891–7897.
- 17) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について。
- 18) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2010) ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、*下水道協会誌論文集*、47 (571)、103-111.
- 19) M. Ras, E. Girbal-Neuhauser, E. Paul, M. Sperandio, D. Lefebvre (2008), Protein extraction from activated sludge: An analytical approach, *Water Res.*, 42, pp1867-1878. 諏訪
- 20) Instruction of Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).
- 21) 下水試験方法下巻、(公社) 日本下水道協会、2012 年版、pp252-253.
- 22) Cole, D. et al (2003): “Evaluation of F + RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (11), pp. 6507–6514.

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

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 28～平 31

担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）

研究担当者：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 28～31 年度にかけ、①再生処理水質と生物膜生成要因の解明、②水質性状が消毒効果等に及ぼす影響の解明、③消毒効果の観点での再生処理技術の評価、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。29 年度は、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける同化性有機炭素（AOC : Assimilable Organic Carbon）とノロウイルス（NoV : Norovirus）や大腸菌 Phage（Phage）の消長把握を行った。また、消毒副生成物として N-ニトロソアミン類を対象とした実態調査を行った。

その結果、下水試料中の NH<sub>4</sub>-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、密接な関係があるものと考えられた。ろ過処理により 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。N-ニトロソアミン類の生成濃度が最も高い試料は、オゾン処理水の塩素添加濃度を 10mgCl/L とした条件であった。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 N-ニトロソピロリジン（NPYR）であり、次いで生成量が多い N-ニトロソピペリジン（NPIP）、N-ニトロソジ-n-プロピルアミン（NDPA）を含めると N-ニトロソアミン類の 8 物質の全生成量に対して概ね 90%以上となった。オゾン処理後の易分解有機物を担体処理にて分解、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。生物膜・オゾン・塩素処理を行った再生水中からは NoV、F 特異性 RNA Phage（FRNAPH）とも検出されなかった（低減効果 3.9log 以上と推定）。

キーワード：AOC、ノロウイルス、Phage、消毒、N-ニトロソアミン類

### 1. はじめに

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

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

本研究は、再生処理水質が消毒剤消費や消毒効果に及ぼす影響を評価し、消毒剤の消費要因および消毒副生成物を制御することで、維持管理費の低減と、再生水の安全性の確保の両立を図り、再生水利用の促進に資することを目的とする。29 年度は、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける AOC と NoV や Phage の消長把握を行った。また、消毒副生成物として N-ニトロソアミン類を対象とした実態調査を行った。

### 2. 研究方法および結果

#### 2.1 再生処理水質と生物膜生成要因の解明

## 2.1.1 下水再生処理施設などにおける AOC の実態

### 1) 調査目的

再生水利用における水質基準項目としての残留塩素濃度は遊離 0.1～結合 0.4mgCl/L 以上であるが<sup>2)</sup>、水質性状などにより塩素が消費されることで、注入濃度を高める課題がある。消費要因の 1 つには施設配管内などの生物膜の生成が推定され、その生成要因としては再生水中の AOC の存在が考えられる。

本項では、再生処理施設などにおける AOC の実態把握を目的としているが、昨年度の調査結果では試料中に残存している栄養塩類が検出濃度に影響を与えている可能性が示唆されたことから、各種下水試料を対象として栄養塩類との関係性を評価した。

### 2) 調査方法

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 2.5～3mg/L、HRT20 分間) および生物学的高度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<sup>3)</sup>。試験用の菌株は *Pseudomonas fluorescens* (現名：*Pseudomonas brenneri* (P17 : ATCC49642)) 株、*Aquaspirillum* sp. (現名：*Herminiimonas* sp. (NOX : ATCC49643)) 株を利用し、各々の試験用菌液を調整した。酢酸ナトリウムを添加した塩類溶液に各菌液を接種、培養しコロニー数と酢酸ナトリウムに由来する有機炭素の濃度との関係性を求め、収率係数を算出した。収率係数は P17 株が  $4.26 \times 10^6$  CFU/酢酸-C $\mu$ g、NOX 株が  $1.08 \times 10^7$  CFU/酢酸-C $\mu$ g であった。

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

### 3) 調査結果

総 AOC と栄養塩類として NH<sub>4</sub>-N との関係について図-1 に示す。各試料の総 AOC の構成は P17 株によるものが 27～99% (平均 77%) を占めていた。なお、NH<sub>4</sub>-N が高濃度域におけるデータ数が限られるため、昨年度に同施設にて得られたデータを含めて整理した。下水試料中の NH<sub>4</sub>-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、密接な関係があるものと考えられた。また、一部の試料を用いて実験的にろ過処理 (公

称孔径：0.45 $\mu$ m、材質：ポリエーテルサルホン) による AOC の低減効果を評価した結果を図-2 に示す。ろ過処理により 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<sub>4</sub>-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。

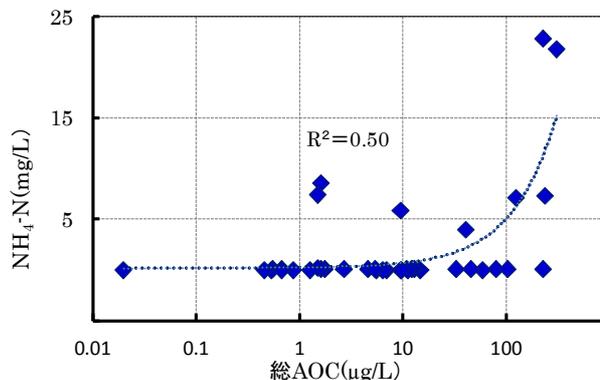


図-1 総AOCとNH<sub>4</sub>-Nの関係

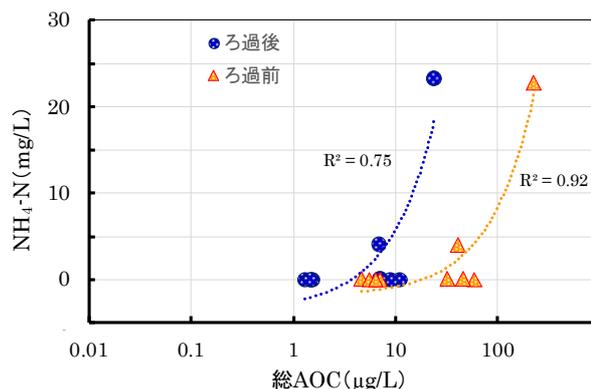


図-2 総AOC濃度とろ過処理の関係

一方、PO<sub>4</sub>-P との関係について図-3 に示す。PO<sub>4</sub>-P についても昨年度に同施設にて得られたデータを含めて整理した。昨年度の調査結果では PO<sub>4</sub>-P 濃度が 0.2mg/L 程度を超えることで総 AOC が上昇傾向を示したが、本調査では NH<sub>4</sub>-N と比較してのバラツキが見られ、相関関係は

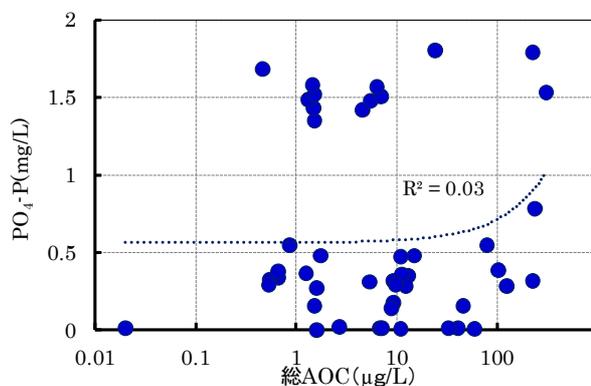


図-3 総AOCとPO<sub>4</sub>-Pの関係

見られなかった。

バクテリアの増殖防止にはAOC濃度を10 $\mu$ g/L以下にする必要があるとの報告<sup>4)</sup>があるが、一部のオゾン処理後水などにおいて超過していた。オゾン処理後におけるAOCの濃度上昇への課題とともに再生水中等に残留しているNH<sub>4</sub>-NがAOCに影響を及ぼしている可能性があることから、これらの栄養塩類の制御にも留意が必要であると考えられた。

## 2.1.2 ニトロソアミン類の実態調査

### 1) 調査目的および方法

N-ニトロソアミン類は消毒副生成物として、その1部は発がん性が指摘されているが再生水での調査例は少ない。本項では、活性汚泥二次処理水、生物学的高度処理水(A<sup>2</sup>/O法)、オゾン処理水(注入濃度2.5~3mg/L、接触時間20分間、気液対向方式)、オゾン処理後の担体処理水(ポリプロピレン製中空円筒担体4×3×5mm/個、担体容量81L、接触時間約2時間)を対象に、塩素処理の有無やオゾン処理後の易分解有機物の低減によるN-ニトロソアミン類の定量評価を行った。塩素処理条件は塩素添加濃度を2、10mgCl/L、接触時間を20分間とした。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物質とした。

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

### 2) 調査結果

各種下水試料に対する塩素処理によるN-ニトロソアミン類の生成濃度の推移について図-4、5に示す。試料の採水日、塩素添加濃度および残留塩素の中和処理の有無による実験条件が異なる結果を示した。N-ニトロソアミン類の生成濃度が最も高い試料は、オゾン処理水の塩素

添加濃度を10mgCl/Lとした条件であったが、オゾン処理後において易分解有機物を後段の担体処理で分解することで、N-ニトロソアミン類の生成濃度は少なくなり、二次処理水、A<sup>2</sup>/O処理水と比較して大差がなくなった。また、塩素の添加濃度を10mgCl/Lとしても中和処理を行うことで、塩素の無添加ケースと同程度の生成濃度で推移していたが、二次処理水を除く試料において塩素の無添加ケースと比較して中和後の試料では、生成濃度が若干低いことから、チオ硫酸ナトリウムによる分析への影響について検討する必要があると考えられた。各種下水試料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、N-ニトロソアミン類の8物質の全生成量に対して約60~70%を占めており、次いで生成量が多いNPIP、NDPAを含めると概ね90%以上となった。通常の活性汚泥法の二次処理水と生物学的高度処理法であるA<sup>2</sup>/O法の処理水では大きな違いが見られなかった。

その他の生成物質として発がん性が懸念<sup>8)</sup>されているNDMAやNMORについて改めて整理した結果を図-6、7に示す。本調査でのNDMAの生成濃度は1.5~13.4ng/Lでありオゾン処理水の塩素添加濃度を10mgCl/Lとした条件にて最大値を示した。NMORでは、NDMAほど試料毎に大差が見られず、生成濃度は7.0~18.7ng/Lであり、オゾン、塩素処理による生成濃度の大

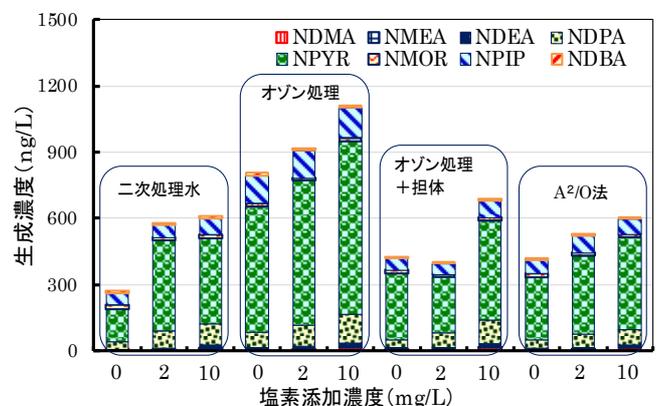


図-4 塩素添加によるニトロソアミン類の生成濃度

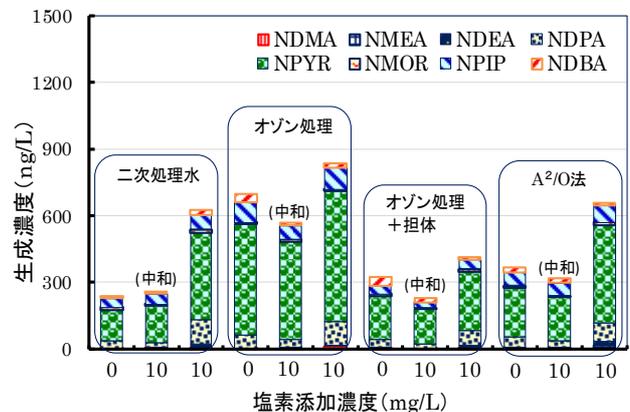


図-5 塩素添加によるニトロソアミン類の生成濃度(中和有)

幅な上昇傾向は見られなかった。

なお、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  $7\text{ng/L}$  を示している<sup>9)</sup>。また、WHO の飲料水水質ガイドライン値<sup>10)</sup> や厚生労働省の水道水質基準の要検討項目の目標値<sup>11)</sup> として  $100\text{ng/L}$  が定められている。本調査では、各下水試料に対して塩素添加濃度を  $10\text{mgCl/L}$  とした場合に NDMA 濃度が  $7\text{ng/L}$  を超過したが、残留塩素の中和処理やオゾン処理後における易分解有機物の担体処理を行うことで NDMA の低減化が図られる可能性が示された。

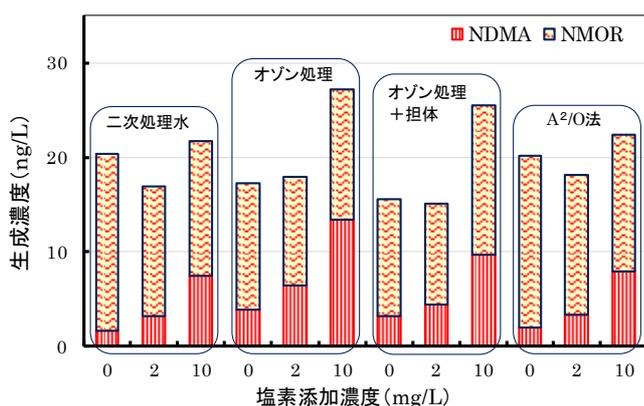


図-6 塩素添加によるNDMAとNMORの生成濃度

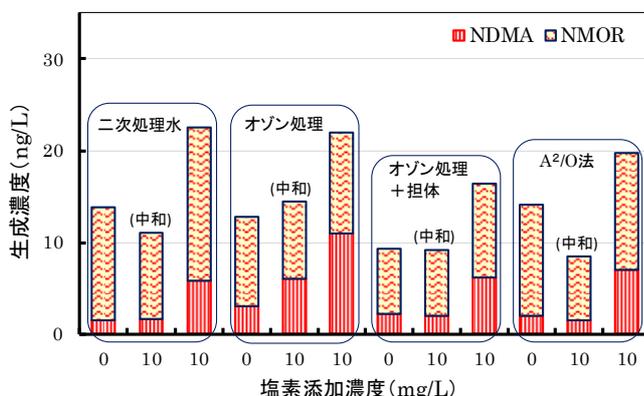


図-7 塩素添加によるNDMAとNMORの生成濃度(中和有)

## 2.1.3 再生処理施設における NoV、Phage の消長

### 1) 調査目的

再生水を水洗、散水、親水利用する際には衛生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<sup>3)</sup>、大腸菌に比較して塩素消毒耐性があるウイルスの存在が危惧される。より衛生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 を対象に、上記の再生処理施設などにおける低減効果の把握を目的として実態調査を行った。また、消毒耐性を有すると考えられる Phage を含めて評価を行った。

### 2) 調査方法

上記 B 再生処理施設における AOC の測定試料を対象に NoV と Phage の定量を行った。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澱を 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  $0.5\mu\text{g}$  をランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量  $20\mu\text{L}$  の系で逆転写させ cDNA を作製し  $5\mu\text{L}$  をリアルタイム PCR に供した。NV の検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」<sup>12)</sup> に準じた。リアルタイム PCR 反応のための試薬は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN 社) を用い、リアルタイム PCR 装置は QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher 製) を使用した。逆転写反応に使用する抽出 RNA 量は Spectrophotometer (NanoDrop 社製) により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたり  $0.05\text{mg-SS}$  となるように統一した<sup>13)</sup>。また、NoV と併せて調査した Phage は、F 特異性 RNA Phage 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<sup>14)</sup> 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 法を組み合わせ手法) と、Typhimurium WG49 を宿主菌としたブラック形成法<sup>14)</sup> による感染力を有している総 FPH 濃度 (Plaque 法) により評価を行った。

### 3) 調査結果

B 再生処理施設における NoV と FRNAPH の消長把握結果を図-8 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  $0.3\text{log}$  程度であった。生物膜処理後のオゾン処理 (注入濃度  $6\text{mg/L}$ 、HRT 約 3 時間) では NoV の低減効果は  $1.6\text{log}$  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 では 2.9~3.9log 以上となった。NoV と FRNAPH の低減効果に差が見られたが NoV は遺伝子定量法、FRNAPH は培養法による評価であるため、実際の低減効果は FRNAPH の値に近似しているものと推定される。また、昨年度において同施設にて大腸菌 K12F+(A/λ)株を宿主菌とした Phage の不活化効果は 4.1log 以上 (不検出) であり、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る。

なお、採水時における再生水の残留塩素濃度は、遊離が 4.9~6.5mg/L、結合が 6.9~8.7 mg/L で推移していた。

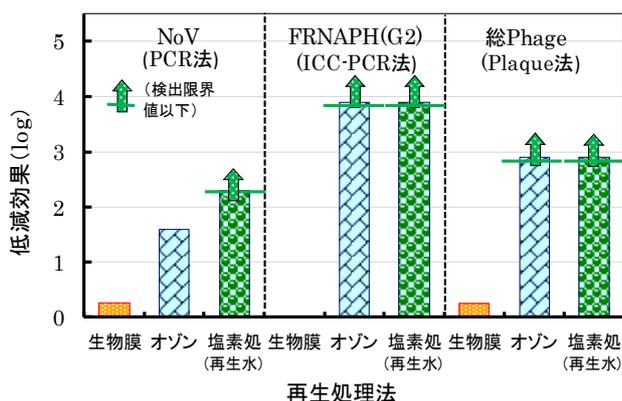


図-8 再生処理プロセスごとのNoVとPhageの低減効果

### 3. まとめ

本研究は、再生処理水質が消毒剤消費や消毒効果に及ぼす影響を評価し、消毒剤の消費要因および消毒副生成物を制御することで、維持管理費の低減と、再生水の安全性の確保の両立を図り、再生水利用の促進に資することを目的とする。29年度は、生物膜の生成要因や水質性状が消毒効果等に及ぼす影響把握として、下水再生処理施設などにおける AOC と NoV や Phage の消長把握を行った。また、消毒副生成物として N-ニトロソアミン類を対象とした実態調査を行った。以下に得られた結果を示す。

1) 下水試料中の NH<sub>4</sub>-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、密接な関係があるものと考えられた。

- ろ過処理により 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。
- N-ニトロソアミン類の生成濃度が最も高い試料は、オゾン処理水の塩素添加濃度を 10mgCl/L とした条件であった。
- 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、次いで生成量が多い NPIP、NDPA を含めると N-ニトロソアミン類の 8 物質の全生成量に対して概ね 90% 以上となった。
- オゾン処理後の易分解有機物を担体処理にて分解、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。
- 生物膜・オゾン・塩素処理を行った再生水中からは NoV、FRNAPH とも検出されなかった (低減効果 3.9log 以上と推定)。

### 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

- (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。
- 下水処理水の再利用水質基準等 マニュアル、国土交通省都市・地域整備局下水道部、国土交通省国土技術政策総合研究所、平成 17 年 4 月。
- (公社) 日本下水道協会、下水試験方法 (下巻)、387-389。
- Dirk van der Kooij (1992), Assimilable Organic Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth, JOURNAL of AWWA pp.57-65.
- 日本水道協会 上水試験方法 (2011 年版) IV. 有機物編、212-214。
- Suchul Yoon, Norihide Nakada, Hiroaki Tanaka (2012) A new method for quantifying N-nitrosamines in wastewater samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, Talanta 97, 256-261.
- 中田典秀、板井周平、楊永奎、鈴木裕識、田中修平 (2016) 工業用化学物質の酸化処理過程における副生成物生成能試験法の提案、土木学会論文集 G (環境)、72 (7) III\_95-III\_116。
- 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.
- US EPA: N-Nitrosodimethylamine (CASRN 62-75-9) Integrated Risk Information system (IRIS), 1993.

- 10) WHO: Concise International Chemical Assessment Document, 38, World Health Organization, Geneva, N-Nitrosodimethylamine, 2002.
- 11) 厚生労働省健康局水道課 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>.
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について.
- 13) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2010)、ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、47(571),pp.103~111.
- 14) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 4244–4252.

## 新規省エネルギー型下水処理技術の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 26～平 29

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、岡安祐司、桜井健介

【要旨】 エネルギー消費量の少ない高速散水ろ床法に着目して、汚泥接触処理を組み合わせる下水処理試験を行った。水温が 15℃以上であれば、標準活性汚泥法における有機物の放流水質の上限値を下回る水準の水質が得られ、消費電力は、標準活性汚泥法より 20%削減された。また、最初沈殿池流出水に対して、部分循環式嫌気性ろ床装置を連続的に適用した結果、嫌気性ろ床部分（最初沈殿池流出水～嫌気性ろ床流出水）における T-COD<sub>Cr</sub> の除去率は、流入下水に対して 25%であった。さらに後段に設置した嫌気 HRT 2.3hr、好気 HRT 3.7h の仕上げ嫌気好気処理装置においては、溶解性有機物、溶解性リンの安定した除去を達成し、流入水量あたりの余剰汚泥の発生量は、0.0194kg-DS/m<sup>3</sup>であった。

キーワード：散水ろ床法、汚泥接触法、溶解性有機物、嫌気性ろ床、生物学的リン除去

### 1. はじめに

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

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

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

### 2. 高速散水ろ床法に汚泥接触法を組み合わせる水処理法の開発

近年、消費電力の少なさ等が着目され、生物膜法の再検討が期待されている<sup>4)</sup>。生物膜法の一つである高速散水ろ床法は、ろ床中に敷き詰められた担体の上に散水して下水を処理する方法であり、ろ床パエの発生や汚泥によるろ床の閉塞を防ぐため、湛水洗浄が可能な構造を持つ<sup>5)</sup>。我が国の高速散水ろ床法を採用する下水処理場の消費電力量原単位（汚泥処理を含む）は約 0.13 kWh/m<sup>3</sup>であり、標準活性汚泥法の原単位と比べて半分以下とな

っている<sup>6)</sup>。しかし、処理水の透視度が劣るなどの課題が指摘されている<sup>7)</sup>。

#### 2.1 散水ろ床法の流出水の性状把握

##### 2.1.1 目的

本研究では、まず、散水ろ床法の処理水質を把握するため、連続的に最初沈殿池越流水を散水し、散水ろ床流出水の性状を分析した。有機物指標(COD<sub>Cr</sub>)の分析にあたっては、全体の COD<sub>Cr</sub>および溶解性 COD<sub>Cr</sub>(孔径 1μm ろ紙のろ液)に加えて、Schubert と Gunthert<sup>8)</sup>が、散水ろ床流出水中の直径 100μm 以上の粒子は、最終沈殿池で除去されたことを報告していることから、沈殿池で除去が困難な 100μm 以下の粒子に着目し、100μm ろ紙でろ過した試料の COD<sub>Cr</sub>も測定した。

##### 2.1.2 実験方法

製作した散水ろ床実験装置の断面図を図 1 に示した。本装置は、直径 300mm の円筒状である。図 1 中の網掛け部分は、プラスチック担体を充てんしたエ

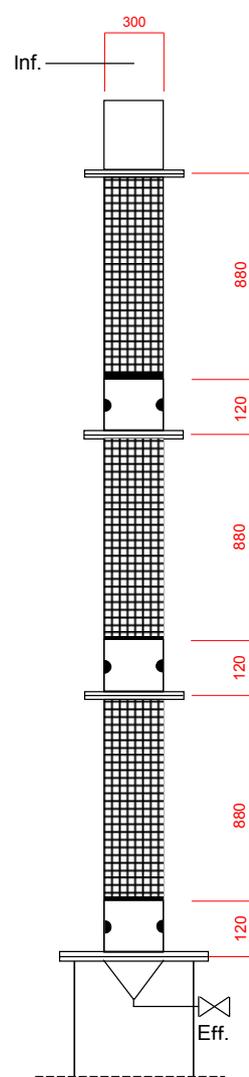


図 1 散水ろ床実験装置の断面図(単位:mm)

リアを示し、有効高さは 2.6m とした。プラスチック担体の大きさは、直径 15mm、長さ 15mm、厚さ 1mm の円筒状であり、比表面積は 450m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> である。また図 1 中の黒色で着色された半円(6 箇所)は、内径 20mm の通気口を示す。

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

最初沈殿池越流水と散水ろ床流出水を月に 1~2 回の頻度で計 7 回、採取し、COD<sub>Cr</sub>を測定した。COD<sub>Cr</sub>は、孔径 100μm と 1μm のフィルターを用いて分画し、HACH 社の DR3900 と試薬を用いて測定した。孔径 100μm と 1μm のフィルターは、それぞれ、孔径 100μm のナイロンネットフィルター(メルクミリポア社)、ガラス繊維ろ紙(ワットマン社、GF/B)を用いた。

### 2.1.3 実験結果

最初沈殿池越流水と散水ろ床流出水の粒形別平均 COD<sub>Cr</sub> (100μm 以上、1-100μm、1μm 未満)とそれらの除去率を表 1 に示した。それぞれの除去率は、66%、73%、47%であった。

表 1 最初沈殿池越流水と散水ろ床流出水の粒形別平均 COD<sub>Cr</sub>とその除去率(11 月~翌年 3 月)

	粒形別平均 COD <sub>Cr</sub>		
	100μm 以上	1-100μm	1μm 未満
最初沈殿池越流水(mg/L)	18	83	63
散水ろ床流出水(mg/L)	6	23	34
除去率(%)	66	73	47

## 2.2 散水ろ床流出水に残存する微小有機物の汚泥接触処理による除去の影響因子<sup>9)</sup>

### 2.2.1 目的

散水ろ床法の処理水質を改善する方法として、標準活性汚泥法と比べ水理的滞留時間(HRT)が短い、図 2 に示すような汚泥接触処理を組み合わせる方法<sup>10)</sup>があるが、処理水質の向上をはかるには、汚泥接触処理において、それらの微小有機物を安定して除去することが欠かせな

い。そこで、汚泥接触処理による微小有機物の安定した除去を目指し、実下水を用いて約 7 か月間、ラボスケールの装置で連続運転し、汚泥接触槽への流入水質、汚泥接触槽の汚泥濃度(MLSS)、細胞外高分子物質(EPS)と、COD<sub>Cr</sub>を指標とした汚泥接触処理による微小有機物の除去量の関係を調査した。

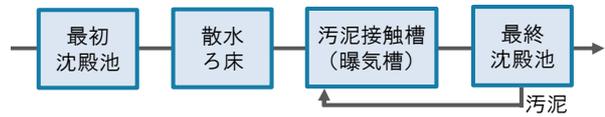


図 2 散水ろ床+汚泥接触処理の基本フロー

### 2.2.2 実験方法

実下水を最初沈殿池及び散水ろ床実験装置(前節と同じ)で処理した後、汚泥接触処理(5L 汚泥接触槽及び 2L 最終沈殿池)した。散水ろ床は、前節と同じ実験装置を使用し、散水負荷 10m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>・d)で運転し、直径及び長さが 15mm の円筒型のプラスチック担体を充填した。汚泥接触槽の HRT は 2 時間とした。最終沈殿池の水面積負荷は、8m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>・d)であり、引抜汚泥を汚泥返送比 50-100% で汚泥接触槽へ返送した。

流入下水、最初沈殿池越流水、散水ろ床流出水、最終沈殿池越流水の COD<sub>Cr</sub>を測定した。汚泥接触槽内の MLSS、EPS を測定した。いずれの試料もグラブサンプルを計 12 回採取した。COD<sub>Cr</sub>は、前節と同様に、孔径 100μm と 1μm のフィルターを用いて分画し、HACH 社の DR3900 と試薬を用いて測定した。MLSS の測定は、下水試験方法に従った。EPS は、Li ら<sup>11)</sup>の方法に準拠し、LB-EPS と TB-EPS に分けて測定した。

### 2.2.3 実験結果と考察

各試料の粒形別平均 COD<sub>Cr</sub>を図 3 に示した。最終沈殿池越流水は、中央値は 51mg/L、平均値は 55mg/L であった。MLSS は平均 2500mg/L であった。

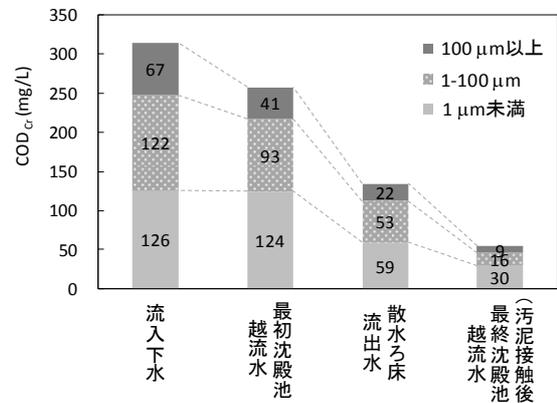


図 3 連続運転期間中の各試料の粒形別平均 COD<sub>Cr</sub>

1 $\mu$ m未満及び1-100 $\mu$ mのCOD<sub>Cr</sub>除去量と測定項目の単相関係数を表2、3に示した。単回帰分析の結果から、汚泥接触処理における1 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>の除去量は、その流入量、汚泥性状に関する各項目(MLSS、LB-EPS、TB-EPS)と、それぞれ、強い相関関係(相関係数が0.7以上)が見られた。1 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>の除去量は、その流入量と強い相関が見られたが、汚泥性状に関する各項目とは強い相関は見られなかった。

表2 1 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>除去量と測定項目の単相関係数

	1 $\mu$ m未満COD <sub>Cr</sub>		水温 (°C)	接触汚泥性状			
	除去量 (mg/L)	流入量 (mg/L)		MLSS (mg/L)	LB-EPS (mg/L)	TB-EPS (mg/L)	
1 $\mu$ m未満	除去量(mg/L)	1.00	0.95	-0.68	0.84	0.79	0.87
COD <sub>Cr</sub>	流入量(mg/L)	—	1.00	-0.55	0.82	0.65	0.78
	水温(°C)	—	—	1.00	-0.55	-0.76	-0.83
接触汚泥 性状	MLSS(mg/L)	—	—	—	1.00	0.70	0.89
	LB-EPS(mg/L)	—	—	—	—	1.00	0.83
	TB-EPS(mg/L)	—	—	—	—	—	1.00

表3 1-100 $\mu$ mのCOD<sub>Cr</sub>除去量と測定項目の単相関係数

	1-100 $\mu$ mCOD <sub>Cr</sub>		水温 (°C)	接触汚泥性状			
	除去量 (mg/L)	流入量 (mg/L)		MLSS (mg/L)	LB-EPS (mg/L)	TB-EPS (mg/L)	
1-100 $\mu$ m	除去量(mg/L)	1.00	0.93	-0.28	0.38	0.57	0.50
COD <sub>Cr</sub>	流入量(mg/L)	—	1.00	-0.41	0.46	0.58	0.60
	水温(°C)	—	—	1.00	-0.55	-0.76	-0.83
接触汚泥 性状	MLSS(mg/L)	—	—	—	1.00	0.70	0.89
	LB-EPS(mg/L)	—	—	—	—	1.00	0.83
	TB-EPS(mg/L)	—	—	—	—	—	1.00

次に、汚泥接触槽における微小有機物の流入量及び汚泥性状に関する各項目を独立変数とし、微小有機物の除去量を従属変数とする重回帰分析を行った。多重共線性回避の観点から、汚泥性状に関する項目は、重決定係数が最も大きくなる項目の一つを選択した。その結果、汚泥接触槽で除去された1 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>について以下の重回帰式(1)を得た。

$$Y_1 = 0.40X_1 + 0.13X_2 - 1.1 \quad (1)$$

ここで、Y<sub>1</sub>は汚泥接触槽で除去された1 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>(mg/L)、X<sub>1</sub>は汚泥接触槽へ流入した1 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>(mg/L)、X<sub>2</sub>は汚泥接触槽のLB-EPS濃度(mg/L)である。重決定係数は0.95であり、分散分析の結果、5%水準で有意であった。汚泥接触槽で除去された1 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>について、有効な重回帰式は得られなかった。

#### 2.2.4 まとめ

散水ろ床流出水を汚泥接触処理する際、1 $\mu$ m未満の

COD<sub>Cr</sub>の除去量は、その流入量とLB-EPS濃度の影響が大きく、1 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満のCOD<sub>Cr</sub>の除去量は、その流入量の影響が大きいことが示された。

### 2.3 下水処理場の省エネルギー化の提案

プラスチック担体を用いた高速散水ろ床法に汚泥接触法を組み合わせた方法について、さらに、低水温期に実下水を用いた下水処理試験を行った<sup>12)</sup>。その結果、水理的滞留時間120分、送風倍率1倍、返送倍率1倍、MLSS 2,400mg/L、平均水温15.5°Cの汚泥接触法の処理水の全COD<sub>Cr</sub>は29mg/Lであり、標準活性汚泥法の放流水質の上限値を下回る水準と考えられた。本処理法の水処理設備の消費電力は、0.13kWh/m<sup>3</sup>と算出され、標準活性汚泥法より20%少なかった。最低水温が15°C程度に確保されれば、消費電力の少ない下水処理技術として適用可能性があると考えられた。

本技術は、窒素・りんを除去の対象としないため、有機物処理に特化した下水処理方法として、導入が期待される。また、本技術は、水処理施設の新設または増設の際に導入可能性があるのに加えて、散水ろ床の高さが3m程度であるので、従来の浮遊性微生物法の反応槽等の既設の土木躯体を活用できる可能性がある。最初沈殿池および最終沈殿池をそのまま使用でき、反応槽の既設の土木躯体を活用できる浮遊性微生物法を採用する下水処理場において、比較的適用可能性が高いと考えられた。

## 3. 都市下水処理工程からの有機物回収効率向上に関する検討

### 3.1 研究内容

流入下水中に含まれる溶解性有機物は、曝気槽にて酸化されて二酸化炭素として大気中に放出されるのが一般的である。下水処理場での電力消費の約50%は水処理が占めており<sup>13)</sup>、曝気のために必要な電気エネルギーは無視できない。曝気槽への負荷削減手法として、最初沈殿池で凝集剤を添加し、溶解性有機物の一部を最初沈殿池汚泥として回収する前凝集処理<sup>14) 15) 16)</sup>や、浮上担体を用いて、最初沈殿池での浮遊性物質回収効率を向上させる手法<sup>17)</sup>が実証されているものの、最初沈殿池で分離できない溶解性易分解性有機物の処理は必要である。こうした溶解性有機物の除去手法として、本研究では附着性嫌気性細菌による処理に注目した。最初沈殿池流出水を、附着性嫌気性細菌を保持する担体を充填した嫌気性ろ床にて処理し、さらに、後段で仕上げ嫌気好気処理した場合の、負荷削減効果を検討した。

### 3.2 実験方法

嫌気性処理実験に用いた部分循環式嫌気性ろ床実験装置の概念図を図2に示す。内径300mmの円筒状で、底面から水面までの高さは1200mmである。図の網掛け部分（底面から200mm～600mmの間）にプラスチック担体（BIO-15、ゼビオプラスト社）を充填し、ろ層厚を400mmとした。ろ材の上端部分には直径5mmの穴を20mm間隔に空けた塩ビ板を固定し、ろ材の流出を防止した。本装置を屋内に設置し、一部合流式を含む下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、処理水をポンプで底部

より連続的に注入した。流量は、線速度が5mm/min.となるように設定した。また、ろ材を通過した液を、800mm地点から底面付近へ、流入水の流量に対して2倍の流量で液を循環した。ろ材部分における通過速度は15mm/min.、底面から800mm～1200mm部分での通過速度は5mm/min.、装置全体の水

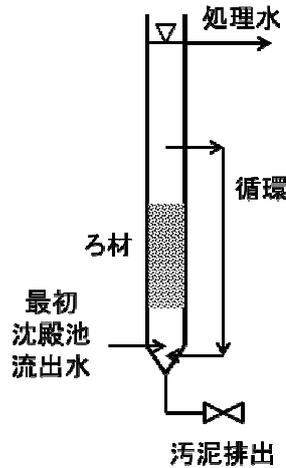


図2 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の概念図

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

次に、嫌気性ろ床実験装置の後段の仕上げ嫌気好気処理実験装置の概要を述べる。反応槽は、攪拌機を付属した内径370mm、有効水深372mm、有効容量40Lの円筒状で、底面上に設置したエアストーンを通じて、大気を水中へ送り込み、曝気した。この実験装置を6時間サイクルで回分式運転を行った。嫌気性ろ床実験装置の処理水を、6時間に1回、30L/hの流量で1時間ポンプで注入した。嫌気性ろ床実験装置の処理水の流入時およびそれに引き続く45分間、連続的に攪拌機を稼働し、嫌気工程とした。1時間45分後～4時間30分後までの2時間45分間は、攪拌および曝気を行い、好気工程とした。4時間30分後以降は攪拌、曝気ともに停止し、活性汚泥混合液を静置し固液分離を行った。5時間15分後から5時間58分後までの間、容量10Lの水位に設置した取水口から上澄水を排出し、嫌気好気処理実験装置の処理水を採取した。本実験装置における嫌気工程、好気工

程、のHRTはそれぞれ、2.33h、3.67hとなる。また、沈殿工程における水面積負荷、HRTはそれぞれ8.93m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>・日、1hとなる。余剰汚泥の排出は、好気工程の終了直前に混合液を1日あたり1.3L採取することで行った。なお、実験に先立ち、馴致期間として約3か月設定し、実験は7月～12月の期間で行った。

### 3.3 実験結果

流入下水、最初沈殿池流出水、部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流出水、仕上げ嫌気好気処理実験装置の流出水中のT-COD<sub>Cr</sub>、S-COD<sub>Cr</sub>、溶解性リン濃度の平均値と、流入下水から各工程の流出水の間での除去率を表4～表6に示した。なお、試料は1週間に1回程度の頻度でグラブサンプルを採取した。T-COD<sub>Cr</sub>の流入下水からの除去率は、最初沈殿池流出水、嫌気性ろ床流出水、嫌気好気処理流出水で、それぞれ24%、49%、85%であった。また、嫌気性ろ床部分（最初沈殿池流出水～嫌気性ろ床流出水：差分57.6mg/L）におけるT-COD<sub>Cr</sub>の除去率は、流入下水に対して25%であった。一方、S-COD<sub>Cr</sub>の除去率は、T-COD<sub>Cr</sub>の除去率に比べて低く、それぞれ10%、40%、78%であった。仮に、COD<sub>Cr</sub>とBODの関係式(COD<sub>Cr</sub>=1.34×BOD+48.4)<sup>19</sup>を用いた場合、わが国の下水放流水に求められるBODの基準15mg/Lは、COD<sub>Cr</sub>68.5mg/Lに換算されるが、本研究で得られた嫌気好気処理流出水では、この数字を下回っていた。また、嫌気好気処理水中の溶解性リン濃度は、流入下水に比べて70%程度低減されていた。嫌気工程終了時の嫌気好気処理槽混合液中では、高濃度の溶解性リン濃度が検出されており、生物学的リン除去が達成されていたと考えられる。なお、好気工程における混合液中の亜硝酸性窒素、硝酸性窒素濃度は低く、硝化抑制型の処理となっていた。嫌気好気処理槽混合液のMLSS/MLVSSの平均値は1794/1526mg/Lであり、実験期間中、大きな変動はなかった。流入水量あたりの嫌気好気処理実験装置から排出

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

	T-COD <sub>Cr</sub> (mg/L)	除去率 (%)
流入下水	231.4	—
最初沈殿池流出水	175.0	24.4
嫌気性ろ床流出水	117.3	49.3
嫌気好気処理流出水	34.6	85.0

表 5 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 S-COD<sub>Cr</sub> 濃度とその除去率

	S-COD <sub>Cr</sub> (mg/L)	除去率 (%)
流入下水	108.0	—
最初沈殿池流出水	96.8	10.3
嫌気性ろ床流出水	65.0	39.8
嫌気好気処理流出水	23.4	78.3

表 6 部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均溶解性リン濃度とその除去率

	溶解性リン (mgP/L)	除去率 (%)
流入下水	1.88	—
最初沈殿池流出水	2.30	-22.0
嫌気性ろ床流出水	2.49	-31.9
嫌気好気処理流出水	0.57	69.8

された汚泥の固形物量は、0.0194kg-DS/m<sup>3</sup>であった。

#### 4. まとめ

本研究で得られた結果を、以下にまとめる。

1. エネルギー消費量の少ない高速散水ろ床法に着目して、汚泥接触処理を組み合わせて下水処理試験を行ったところ、水温が 15℃以上であれば、標準活性汚泥法における有機物の放流水質の上限値を下回る水準の水質が得られ、消費電力は、標準活性汚泥法より 20%削減された。
2. 散水ろ床流出水を汚泥接触処理する際、1μm 未満の COD<sub>Cr</sub> の除去量は、その流入量と LB-EPS 濃度の影響が大きく、1μm 以上 100μm 未満の COD<sub>Cr</sub> の除去量は、その流入量の影響が大きいことが示された。
3. 最初沈殿池で分離回収できない溶解性易分解性有機物の低減を目的として、最初沈殿池流出水に対して、部分循環式嫌気性ろ床装置を連続的に適用した結果、嫌気性ろ床部分（最初沈殿池流出水～嫌気性ろ床流出水）における T-COD<sub>Cr</sub> の除去率は、流入下水に対して 25%であった。
4. さらに後段に設置した嫌気 HRT 2.33hr、好気 HRT 3.67h の仕上げ嫌気好気処理装置においては、溶解性有機物、溶解性リンの安定した除去を達成し、流入水量あたりの余剰汚泥の発生量は、0.0194kg-DS/m<sup>3</sup>であった。

今後は、部分循環式嫌気性ろ床における担体充填方

法・循環方法、嫌気好気処理における運転の最適化を検討し、効率的に、高含有率のリンを回収する、資源回収型下水処理技術の開発を行う予定である。

#### 謝辞

下水試料採取などでお世話になりました下水処理場関係各位に謝意を表します。

#### 参考文献

- 1) 下水道における資源・エネルギー施策の現状分析、第 3 回下水道政策研究委員会会議資料、平成 26 年 1 月 16 日、2014.
- 2) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道長期ビジョン実現に向けた中期計画、新下水道ビジョン、p.4.2、平成 26 年 7 月、2014.
- 3) 下水道における地球温暖化防止対策検討委員会：下水道における地球温暖化防止推進計画策定の手引き、平成 21 年 3 月、pp.4-5、2009.
- 4) 鈴木 穰：持続的社会に貢献する下水道のエネルギー効率化への取り組み、土木技術資料、58(1)、pp.22-25、2016.
- 5) 社団法人日本下水道協会：下水道施設設計指針と解説、pp.375-381、1984.
- 6) 公益財団法人日本下水道新技術機構：活性汚泥法等の省エネルギー化技術に関する技術資料、2014.
- 7) 社団法人日本下水道協会：下水道施設設計指針と解説 1984 年版、p.376、1984.
- 8) Schubert, W. and Gunthert, W., Particle size distribution in effluent of trickling filters and in humus tanks, Water Research, 35(16), pp.3993-3997, 2001.
- 9) 桜井健介、重村浩之：散水ろ床流出水に残存する微小有機物の汚泥接触処理による除去の影響因子、第 52 回日本水環境学会年会講演集、p.568、2018.
- 10) Norris, D. P., Parker, D. S., Daniels, M. L., and Owens, E. L. High quality trickling filter effluent without tertiary treatment. Journal Water Pollution control Federation, 54 (7), pp.1087-1098, 1982.
- 11) Li, H., Wen, Y., Cao, A., Huang, J., Zhou Q., and Somasundaran, P. The influence of additives (Ca<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, and Fe<sup>3+</sup>) on the interaction energy and loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) of activated sludge and their flocculation mechanisms, Bioresource Technology, 114, pp.188-194, 2012.
- 12) 桜井健介、重村浩之：ランダム充填型プラスチック担体を用いた高速散水ろ床法に汚泥接触法を組み合わせた水処理法の下水処理への適用可能性、土木学会論文集 G (環境)、

(投稿中).

- 13) 日本下水道協会:下水道統計(平成23年度版)(第68号)、2013.
- 14) 高岡昌輝、廣田淳一、武田信生、藤原健史:前凝集沈殿汚泥の嫌気性消化特性、土木学会論文集、No.685/VII-20、pp.17-26、2001.
- 15) 宗宮 功、津野 洋、貫上 佳則、長谷川 明巧、木下 巖、日高 平:前凝集沈殿・浮遊微生物処理法による都市下水の高度処理に関する研究、下水道協会誌論文集、Vol.36、No.436、pp.87-97、1999.
- 16) 日高 平、津野 洋、鄭 晋宇、岸本 直之、織田 稔幸:生物膜ろ過反応器での前凝集汚泥活用に関する研究、下水道協会誌論文集、Vol.40、No.487、pp.103-116、2003.
- 17) 国土交通省 国土技術政策総合研究所:B-DASH プロジェクト No.1 超高効率固液分離技術を用いたエネルギーマネジメントシステム導入ガイドライン(案)、国土技術政策総合研究所資料No.736、2013.
- 18) 後藤雅子、甘長准:下水処理における窒素除去と放流先の窒素挙動を加味した温室効果ガス排出量の一考察、第50回下水道研究発表会講演集、pp.565-567、2013.

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

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 27～平 29

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

### 【要旨】

本研究では、代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の提案を目的とした。その結果、8 種類の抗生物質に耐性を持つ抗生物質耐性大腸菌は、耐性を持たない大腸菌より同一の不活化効果を得るためにより多くの紫外線照射量が必要であることが分かった。また、下水処理水中の溶存物質、懸濁物質が通常の二次処理水の変動レベルであれば紫外線消毒によるウイルス不活化効果への影響は少ないことが分かった。さらに、F 特異 RNA フェージの不活化効果からノロウイルスの不活化速度定数を推算した結果、2~3 log の不活化に必要な紫外線照射量は 35~53 mJ/cm<sup>2</sup> となり、F 特異 RNA フェージの利用によりノロウイルスの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。

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

### 1. はじめに

新たな水資源として下水処理水の利用促進や、公共用水域の衛生的安全性を担保する上で水系感染リスクを低減させる必要があるが、新興ウイルスの出現や再興感染症としての抗生物質耐性菌（以下、耐性菌）の出現と蔓延が世界的に問題視されてきている。これらの問題解決のため、医療関係学会から構成される創薬促進検討委員会・抗微生物薬適正使用推進委員会が「世界的協調の中で進められる耐性菌対策」として国へ、耐性菌対策に取り組むように提言している<sup>1)</sup>。耐性菌の存在は、医療機関だけでなく、下水、下水処理水などから国内問わず海外においても検出報告例<sup>2),3),4),5)</sup>がある。また、健常者の糞便試料の内 80.5%に耐性菌が存在しており、それら単離された細菌の 98%が大腸菌であったとの報告例もある<sup>6)</sup>ことに加え、下水および下水処理水から検出される大腸菌の内、20~60%が耐性大腸菌である<sup>5)</sup>ことも明らかとなっている。健常者および保菌者から排出されるであろう、耐性菌が下水道に流入する可能性が高いことから、下水処理場にて適切に除去・不活化する必要があると考えられる。

現在、下水処理場の多くで塩素消毒（次亜塩素酸ナトリウム使用施設数：1076 施設）<sup>7)</sup>が行われている。耐性菌対策においては消毒の強化が考えられるが、

塩素消毒強化に伴い耐性大腸菌の存在割合が増加する傾向が報告されている<sup>8)</sup>。細菌の細胞膜やウイルスの表面タンパク質が細胞内への消毒剤の影響を阻止し耐性を有することが考えられるが、紫外線消毒では細胞内の遺伝子へ直接作用することから、塩素消毒に耐性を有する細菌やウイルスに対し有効な手段となり得る可能性がある。約 6 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線照射による大腸菌の不活化効果は、3 log とされ<sup>9)</sup>、耐性大腸菌に対しても紫外線照射による不活化効果が期待されるが、耐性大腸菌に対する紫外線による不活化および光回復の影響は、現状では明確になっていない。下水処理場では一部、放流先の生態系および水産資源の保全の観点から、塩素消毒から紫外線消毒の導入例も増えつつあり、耐性大腸菌に対する紫外線消毒の不活化効果と光回復に関する知見の集積が必要であると考えられる。

近年、紫外線ランプの高出力化に伴い、比較的処理水量が多い下水処理場への利用拡大が期待されている。しかし、水中の濁質や溶存物質等は、従来から広く一般的に用いられている低圧水銀ランプを用いた紫外線消毒による病原微生物への消毒効果に影響を及ぼすことが知られている。そのため、近年、開発が進んできている高出力型の紫外線ランプにおいても、これらの物質がどの程度影響を及ぼしてい

るのか把握する必要がある。

ノロウイルス (Norovirus; NoV) は、感染力が非常に強く、年齢や性別を問わずに幅広い人に感染し、下痢症や重篤な胃腸炎を引き起こすことから、現在世界的に最も注目を集めているヒト病原ウイルスである<sup>10)</sup>。しかし、NoVは未だに効率よく増殖させることのできる培養細胞が確立されていないため、現在行われている多くの研究では分子生物学的手法のPCR (Polymerase Chain Reaction; PCR) を濃度測定に多く用いている<sup>10), 11)</sup>。PCRはターゲットとしたウイルス遺伝子の濃度を測定することから迅速性や特異性において優れているが、感染力の有無を区別できない欠点がある。そのため、PCRでは紫外線消毒による不活化効果の評価が困難である。このことから、下水処理場において適切に消毒処理を行い、放流水の水質管理をしていくことが重要であるが、消毒処理におけるNoVの不活化効果の評価できないことから、目標とすべき消毒レベルの設定が困難である。そのため、新たなNoVの不活化推定手法を構築し、不活化効果を得るための消毒レベルを把握する必要がある。

本課題は、代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の提案を目的に、①新たな指標に基づく紫外線消毒法の評価、②処理水質が消毒効果へ及ぼす影響評価、③ウイルス不活化評価技術の提案を行った。①については、新たなリスク要因としての抗生物質耐性大腸菌を対象として低圧紫外線ランプならびに中圧紫外線ランプを用い、紫外線照射における不活化と可視光による光回復の影響を評価した。②では、低圧紫外線装置と高出力型紫外線装置を用いて、下水処理水を原水とした連続通水による長期運転下での紫外線消毒実験を実施し、溶存物質、濁度、SSなどが紫外線の消毒効果へ及ぼす影響を把握した。③では、大きさや構造がNoVなどのヒト病原ウイルスと類似しており、人への危険性がなく培養や検出が容易であるF特異RNAフェージ (FRNAPH) 遺伝子群を用いてNoVの不活化効果を推定する手法を検討した。

## 2. 研究方法

### 2. 1 抗生物質耐性大腸菌の紫外線消毒

#### 2. 1. 1 試験水と抗生物質耐性大腸菌の準備

試験水は標準活性汚泥法を採用しているA下水処

理場の二次処理水をメンブレンフィルター (公称孔径: 0.2 $\mu$ m、材質: ニトロセルロース) でろ過を行い無菌状態にしたものを用いた。作成した試験水に同下水処理場の流入下水より分離した抗生物質耐性大腸菌を添加し、紫外線照射実験に供した。実験に用いた試験水の水質は、COD<sub>Cr</sub> = 8 mg/L、TOC = 3.45 mg/L、溶解性総窒素 = 14.5 mg/L、波長 255 nm の紫外線透過率 = 80%であった。

クロモカルトコリフォーム寒天培地 (Merck Millipore) を用いA下水処理場の流入下水より検出された大腸菌、約50コロニーを釣菌した。その後、トリプトソイブイオン培地に接種し、35°Cで3~4時間培養し、培養液をミューランヒントS寒天培地に塗布した後、抗生物質を含有したディスク (KBディスク: 栄研化学) を平板培地上に貼付後に35°Cで18時間培養した。培養後に、平板上に形成された大腸菌が増殖せずに透明に形成された円 (阻止円) の直径を測定し、その大きさから耐性の有無を判定した。判定基準は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の実施基準に基づいたKBディスクの手引きを参照した。判定した大腸菌は、IDテスト (グラム陰性桿菌の同定キット、EB-20「ニッスイ」) により同定した。抗生物質は、イミペネム (IPM)、アンピシリン (ABPC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST)、セフジニル (CFDN)、テトラサイクリン (TC)、レボフロキサシン (LVFX) の8種類である。これら8種類の抗生物質は、日本国内における出荷量・額および尿排出率から推定した体外排出量や毒性の視点から、ヒト用抗生物質の上位にランキングされる<sup>12), 13)</sup>こと、および腸内細菌の大腸菌に抗菌作用を有することから選定した。

#### 2. 1. 2 紫外線照射実験

耐性大腸菌の紫外線照射による不活化効果を評価するために図-1に示す回分式紫外線照射装置を用い、所定の時間紫外線を照射、照射前後の耐性大腸菌濃度を算定し評価した。

8種類の抗生物質の内、ABPC、CFDN、KM、TC、ST、GMの6剤に耐性を持つ大腸菌 (以下、6剤耐性大腸菌) と8種類全てに耐性を持たない大腸菌 (以下、0剤耐性大腸菌) を流入下水より検出・同定し添加用の耐性大腸菌とした。また、比較対象として8種類の抗生物質に無耐性であった大腸菌であるATCC25922株の純菌も実験に供した。

消毒実験に供するため、ミューランヒントS寒天

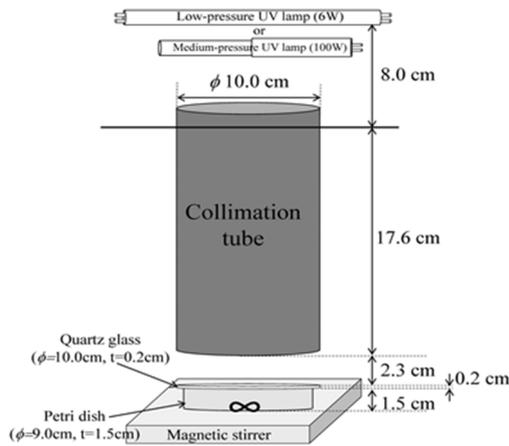


図-1 回分式紫外線照射装置

培地で培養し増菌させたが、試験水の水質性状が大きく変化することを防ぐために4000 rpmで10分間の遠心沈殿処理し、得られた沈渣を滅菌ミリQ水で洗浄したものを添加用の耐性大腸菌とし、試験水中の濃度が $10^5$  CFU/mLとなるように調整した。なお、耐性大腸菌の添加前、添加後に再度、抗生物質耐性の有無および大腸菌の同定を行った。

紫外線消毒実験では、試験水を滅菌シャーレ（直径( $\phi$ )=9 cm、水深( $d$ )=1.5 cm)に耐性大腸菌添加済みの試験水80 mLを充填した。石英ガラス(0.2 cm)で蓋をし、マグネチックスターラーにて攪拌、所定の時間、上部より紫外線を照射し、照射前後での耐性大腸菌濃度を定量した。紫外線ランプは、発光長=10 cmの6 Wの低圧紫外線ランプ(UL0-6DQ、ウシオ電機社製)および、発光長=4 cmの100 Wの中圧紫外線ランプ(UM-102、ウシオ電機社製)を用いた。紫外線光量計(本体:UIT-250、受光部:UVD-254、ウシオ電機社製)を用い、石英ガラスで蓋をした試験水表面で紫外線照度を測定した。本実験では、紫外線光量計の読み値(IR)で、低圧紫外線ランプ使用時は $IR = 0.17\sim 0.18$  mW/cm<sup>2</sup>、中圧紫外線ランプ使用時は、 $IR = 1.20\sim 1.28$  mW/cm<sup>2</sup>に設定した。実験開始前に紫外線ランプの照度を安定させるために30分間ウォームアップした後に、実験を行った。

所定の時間、紫外線を照射した試験水は、クロモカルトコリフォーム寒天培地による平板培養法にて37°C、22時間培養した後、耐性大腸菌濃度を定量した。紫外線照射前後のシャーレ上に形成したコロニー数をカウントし、式(1)に従って試料の生残率を算出した。

$$S_t = \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

$S_t$ は紫外線照射時間 $t$ における生残率(-)、 $N_t$ は紫外線照射時間 $t$ における耐性大腸菌濃度(CFU/mL)、 $N_0$ は紫外線照射前の初期耐性大腸菌濃度(CFU/mL)である。

### 2. 1. 3 光回復実験

低圧・中圧紫外線照射後、生残率が概ね $10^{-2}\sim 10^{-5}$ の試料に対して、可視光照射による光回復実験を行った。紫外線照射後の試料を遮光ボトルに保存し、速やかに滅菌シャーレ( $\phi$ :9 cm、 $d$ :1.5 cm)に80 mL充填した後、石英ガラス(0.2 cm)で蓋をし、マグネチックスターラーで攪拌しながら可視光を照射した。照射時間は、0、10、30、60、90分間とし、実験中に水温の上昇等を防ぐために可視光が照射可能なインキュベーター(人工気象器、LPH-350SP、日本医化器機製作所)内に試料を置き、20°C一定条件で光回復実験を行った。

可視光照射は、自然光(太陽光)に極力近づくように設計された40 Wおよび20 Wのバイタライトを用い、上部および四方から紫外線照射後の試料に可視光を照射した。デジタル照度計(DT-1309、CEM社製)を用い、実験中の照度値を常時モニタリングした。本実験中の照度は、815~817 luxであった。

可視光を所定時間照射した試料は、遮光ボトルに保存し、速やかに耐性大腸菌濃度を定量した。また光回復実験と同時に、暗回復の影響を把握するために可視光なしの条件下で0~90分間攪拌した試料の耐性大腸菌濃度の定量も行った。さらに、紫外線照射後の試料を用い暗回復実験を行った結果、耐性大腸菌の回復が確認されなかった。従って本研究における暗回復効果は無視できるものと判断した。

なお、紫外線照射直後および光回復後において耐性大腸菌の抗生物質感受性の再確認として、各試料からランダムに50個程度のコロニーを釣菌し、抗生物質に対する感受性を評価したが、添加当初と比較して変化は確認されなかった。

### 2. 1. 4 紫外線量の算定

低圧紫外線ランプは、中心波長=254 nmの単一の紫外線を放射するため、紫外線量の算定は、試験水表面での紫外線光量計の読み値と試験水の波長254 nmの吸光度から、ランベルト・ベール法則に従い深さ方向に対する紫外線照度の減衰を考慮した平均紫外線量として表すことが可能である。しかしながら、中圧紫外線ランプは、複数の波長の紫外

線が放出されていることから、ランプ自体が発光波長分布を有している。また、紫外線光量計の受光部においても受光分布があるなど、紫外線量の算定が非常に複雑である。中圧紫外線ランプ使用時には、以下の事項を勘案して紫外線量を算定することで、低圧紫外線ランプと比較できると考えられる。

- ・紫外線ランプ発光波長分布
- ・試料の吸光度分布
- ・使用した紫外線光量計の受光分布
- ・大腸菌の紫外線感受性分布

低圧および中圧紫外線ランプでの耐性大腸菌の不活化を的確に評価するために本研究では、双方の紫外線ランプともに文献<sup>14)</sup>を参考に総相対殺菌有効放射照度( $I_{\text{erf}}$ : Total relative germicidal effective irradiance)を式(2)、(3)、(4)を用い算出した。算出した $I_{\text{erf}}$ に紫外線照射時間を掛け合わせた、総相対殺菌有効放射照度 ( $\text{mW/cm}^2 \cdot \text{s} = \text{mJ/cm}^2$ ) として低圧、中圧紫外線照射における耐性大腸菌の不活化を評価した。

$$I_{\text{erf}} = \int I_R \times f_p \times L_\lambda \times \frac{(1 - e^{-2.3A_\lambda d})}{2.3A_\lambda \cdot d} \times A_{\text{DNA}}(\lambda) \quad (2)$$

$$f_p = \frac{\int RLE(\lambda) d\lambda}{\int \frac{RLE(\lambda)}{R(\lambda)} d\lambda} \quad (3)$$

$$L_\lambda = \frac{RLE(\lambda)}{\int RLE(\lambda) d\lambda} \quad (4)$$

ここで、 $f_p$ 、 $L_\lambda$ は補正係数(-)、 $I_R$ は紫外線光量計の読み値 ( $\text{mW/cm}^2$ )、 $A_\lambda$ は波長 $\lambda$ における吸光度 ( $\text{cm}^{-1}$ )、 $RLE(\lambda)$ は波長 $\lambda$ における紫外線ランプのエネルギー比(-)、 $R(\lambda)$ は波長 ( $\lambda = 255 \text{ nm}$ ) を1とした際の各波長の紫外線光量計の相対値(-)、 $A_{\text{DNA}}(\lambda)$ は波長 $\lambda$ におけるDNAの波長感受性割合(-)、 $d$ は水深 (1.5 cm) である。

$I_{\text{erf}}$ は、Microsoft Excel 2010 を用い便宜的に波長 $\lambda = 5 \text{ nm}$  間隔とし、波長 $\lambda = 200 \sim 400 \text{ nm}$  の領域を数値積分により算定した。低圧紫外線ランプ使用時は、単一波長の紫外線を放射するので、 $RLE(\lambda = 254 \text{ nm}) = 1$ 、 $R(\lambda = 254 \text{ nm}) = 1$  となり、式(2)、(3)の $f_p$ 、 $L_\lambda$ は1となる。

### 2. 1. 5 光回復速度定数の算定

光回復の回復過程は、Dulbecco<sup>15)</sup>により、一次反応式が提唱されており、多くの光回復の実験結果において実測値の傾向を表していることが知られている<sup>16)</sup>。しかしながら、紫外線量を大きくした際の試料に対する光回復過程がモデル式に従わず、光回復の開始時期に生残率の上昇がモデル式よりも遅れる

現象が報告されている<sup>17)</sup>。Sanzら<sup>17)</sup>は、これらの現象を説明するために、式(5)で示される二次反応式を提唱している。式(5)は1838年にVerhulstにより生物学の人口増加における予測式として示された式であり、Sanzら<sup>17)</sup>はこの式を微生物の光回復予測式に適用した。

$$\frac{dS}{dt} = k_1 \cdot (S_m - S) \cdot S$$

$$S = \frac{S_m}{1 + \left(\frac{S_m}{S_0} - 1\right) e^{-k_1 \cdot S_m \cdot t}} \quad (5)$$

$S$ は可視光照射時間 $t$ 分後の耐性大腸菌の生残率、 $S_0$ は紫外線照射直後の耐性大腸菌の生残率、 $S_m$ は最大光回復生残率、 $k_1$ は光回復速度定数 (1/min) である。なお、最大光回復生残率は可視光照射90分後の耐性大腸菌濃度より算出した値を用いた。

本実験においては、耐性大腸菌の光回復の定式化として式(5)を用い低圧および中圧紫外線照射後の可視光照射による光回復速度を評価した。

## 2. 2 連続通水による長期運転での紫外線消毒実験

### 2. 2. 1 流水式紫外線照射装置の概略

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

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

### 2. 2. 2 採水方法

A下水処理場の二次処理水を砂ろ過した処理水を紫外線消毒の原水として使用した実験装置を図-2に示す。調査期間は平成28年6月~平成29年1月であり、紫外線照射装置に24時間連続的に通水し、採水ポートより適宜、紫外線照射後の試料を採水した。なお低圧装置への通水した系をRUN-1、高出力装置の系をRUN-2と設定した。

水質変動に伴う紫外線消毒の効果を把握するために、2カ月間隔で通水流量を段階的に減少させた。流量を変化させる際には、紫外線ランプスリーブの

表-1 試験水の水質

水質項目	試験水 (n = 10)
SS (mg/L)	1.3~6.7
pH	6.4~7.4
UV254 (Abs)	0.093~0.125
UV254 (%)	75~81
濁度 (NTU)	0.1~2.8
COD <sub>cr</sub> (mg/L)	11~27
T-N (mg/L)	15~22
T-P (mg/L)	3.5~5.2

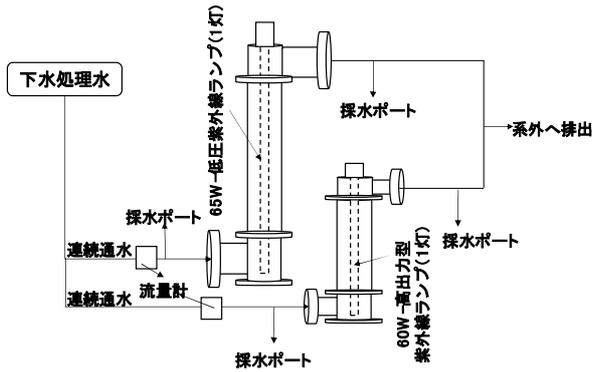


図-2 長期連続通水実験装置概略

濁質等の汚れを一度、酸—アルカリにより洗浄を行った。採水間隔は毎週1回実施し、同流量で採水回数  $n=7\sim 8$  (総数  $n=32$ ) とした。装置流入側に流量センサー (FD-Q50C, KEYENCE 社製) を取り付け、24時間1分間置にデータ取得を行った。

### 2. 2. 3 測定項目および定量方法

本調査における対象病原微生物は野生株のFRNAPH、大腸菌、大腸菌群とし、大腸菌および大腸菌群は、クロモカルトコリフォーム寒天培地 (Merck Millipore) を用いた平板法により、FRNAPHは、宿主菌として *E.coli* *k12+(A/λ)* を用いた重層寒天培地法にて定量した。

一般水質としてSS、濁度、COD<sub>cr</sub>、全窒素、全リン、波長254nmの紫外線吸光度の測定を行った。SSは下水試験方法<sup>18)</sup>に準拠し測定した。pHおよび濁度は、ポータブルpH計 (LAQUAact, 堀場製作所)、高感度濁度計 (TR-55、笠原理化) を用い定量した。COD<sub>cr</sub>、全窒素、全リンの測定はHACH社製の試薬を用い吸光光度計 (DR-3900、HACH) により定量した。

## 2. 3 NoVの不活化効果の推定

### 2. 3. 1 試験水の採水

A 下水処理場内に設置されている活性汚泥処理装置の処理水を試験水として用いて紫外線照射実験を行った。2017年11月から2018年1月の間に5回採水した試験水の水質を表-1に示す。なお、n数が10となっている理由としては、2.3.2で示すFRNAPHの高濃度液を用いた添加実験をそれぞれの試験水において実施しており、その時の試験水の水質測定も行っているためn数が2倍となっている。なお、FRNAPHの高濃度液添加後の水質変動はなかったことを確認している。不活化効果に影響するSSおよび濁度がそれぞれ1.3~6.7 mg/Lと0.1~2.8 NTUと

ばらついているが、最も影響する紫外線 (254 nm) の透過率は75~81%と大きな差はなかったため、紫外線消毒における試験水間の水質の差は大きくないと考えられる。

### 2. 3. 2 紫外線消毒実験

図-3に示す光化学反应用装置 (ウシオ電機) を用いて回分式紫外線消毒実験を実施した。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分以上のウォームアップを行った。図-3の光化学反应用装置を4つ用いて試験水をそれぞれ600 mL入れた後、それぞれ所定の時間、紫外線を照射し、照射前後でのFRNAPH遺伝子群とNoVの濃度を定量した。しかし、実験で用いた試験水 (活性汚泥処理装置の処理水) には、感染力を有する野生株のFRNAPH遺伝子群が紫外線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、2.3.3の3)で示す高濃度に培養させたFRNAPH遺伝子群を添加した紫外線消毒実験も行った。試験水に2.3.3の3)で培養および精製した高濃度のFRNAPH GIからGIVのそれぞれの遺伝子群を初期濃度で約 $10^{7-8}$  MPN/Lとなるように添加し、添加なしと同様な条件

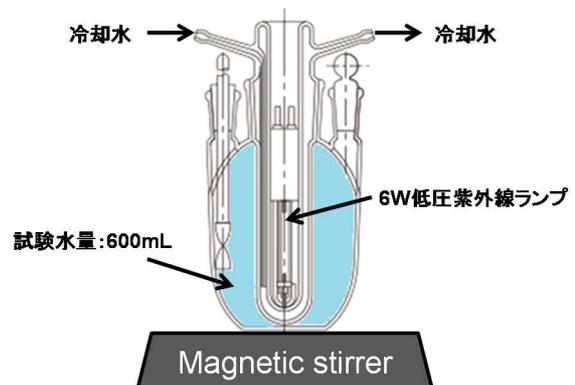


図-3 光化学反应用装置の概要

にて紫外線消毒実験を行った。

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、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<sup>19)</sup>。紫外線照射量の算定方法は参考文献<sup>19)</sup>に準拠し、式(6)にて各照射時間での紫外線照射量を求めた。

$$\text{UV fluence} \left( \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2} \right) = \left[ \left\{ \frac{(A_{352} - \text{Ablank}_{352})}{\varepsilon} \times V \right\} / \phi \right] / \text{Area} \quad (6)$$

ここで、UV fluence は紫外線量 (mJ/cm<sup>2</sup>)、A<sub>352</sub> は任意の照射時間での波長 352 nm のヨウ素/ヨウ素酸イオンの吸光度 (cm<sup>-1</sup>)、A<sub>blank352</sub> は紫外線照射前の波長 352 nm のヨウ素/ヨウ素酸イオンの吸光度 (cm<sup>-1</sup>)、ε はヨウ素/ヨウ素酸イオン溶液のモル吸光係数 (27600 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)、V は容積 (600 mL)、φ は量子収率 (-)、Area は紫外線照射面積 (456 cm<sup>2</sup>) である。

### 2. 3. 3 FRNAPH の定量および高濃度 FRNAPH 液の作製

#### 1) 感染力を有する FRNAPH の定量

感染力を有している GI~IV の FRNAPH 遺伝子群の定量には Integrated Culture-PCR (IC-PCR)<sup>20), 21)</sup>を用いた。この方法では、宿主菌の Typhimurium WG49 (以下、WG49) を用いて、試料中に存在する感染力の有る 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。

#### 2) FRNAPH 遺伝子の定量

GI~GIVのFRNAPH遺伝子群の遺伝子定量にはリアルタイムRT-qPCR法 (PCR) を用いた。まず、ポリエチレングリコールを用いたウイルス濃縮法によりサンプルを濃縮した。試験水および紫外線照射後のサンプル 50~200 mL にポリエチレングリコール (PEG#6000、終濃度: 8%) と NaCl (終濃度: 0.4 M) を添加して攪拌し、完全に溶解させた。4°C で 1 夜静置後、10000×G で 30 分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣を RNase-free water を用いて再懸濁させてウイルス濃縮液とした。ウイルス濃縮液からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN) および QIAcube (QIAGEN) にて抽出した。なお、ウイルス濃縮液を RNA 抽出カラムに通水し遺伝子を捕捉させる際、検出感度にバラツキが生じないように抽出カラム 1 本あたりの SS 負荷量が 0.05 mg-SS 以下となるようにウイルス濃縮液の通水量を調整した。

抽出した RNA は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて RT 反応を行い、cDNA を得た。この合成した cDNA を TaqMan<sup>®</sup> プローブを用いた PCR により定量した。TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、QuantStudio<sup>™</sup> 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により検出した。FRNAPH 遺伝子群のプライマー、TaqMan プローブの配列およびアニーリング温度は Wolf<sup>ら</sup><sup>22)</sup> の報告を参考にした。PCR における検出下限値は約 1000 copies/L (約 3 log[copies/L]) 程度となる。

RNA 抽出効率および RT-qPCR 阻害の影響を把握する目的で RNA 抽出に用いる濃縮後のサンプルにマウスノロウイルス (MNV) 高濃度液を添加して回収率を評価した<sup>23)</sup>。なお、da Silva<sup>ら</sup><sup>11)</sup> は、回収率が 10% を下回った場合は検出阻害が生じたと判断し、1% を下回った場合は深刻な検出阻害が生じたと判断すると報告している。本研究で行った全てのサンプルの回収率は、17~181% (中央値: 72%, n = 50) であり大きな検出阻害は見られなかったため、ここでは PCR による定量値において回収率による補正は行っていない。

#### 3) 高濃度 FRNAPH 液の作製

試験水中に存在する感染力を有した FRNAPH 遺伝子群が紫外線消毒後において検出率が低いことが考えられたため、人為的に高濃度に培養した高濃度 FRNAPH 液を作製し、実験に用いた。2.3.3の1) で示した IC-PCR による試験水中の FRNAPH 濃度測定において、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°C 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°C 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 液を紫外線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 Amicon Ultra-15 (分画分子量 100 kDa, Millipore) を用いて培地成分を除いた。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。

#### 4) NoV 遺伝子の定量

NoVはGIとGII遺伝子群を対象にして、2.3.3の2)と同様な手法により遺伝子濃度を定量した。NoV GIとGIIのプライマーとTaqManプローブの配列およびアニーリング温度はKageyamaら<sup>10)</sup>の報告を参考にした。

### 5) 相関分析

本研究では、紫外線消毒実験におけるFRNAPH遺伝子群のIC-PCRとPCRにより得られた不活化効果と遺伝子低減効果の関係と、FRNAPH遺伝子群とNoVとの遺伝子低減効果の関係を調べるために、PASW Statistic 18 (SPSS)を用いてPearsonの相関分析を行った。

## 3. 研究結果

### 3. 1 抗生物質耐性大腸菌の紫外線消毒実験結果

#### 3. 1. 1 紫外線照射による耐性大腸菌の不活化

##### 1) 低圧紫外線照射

低圧紫外線ランプ照射による、0剤耐性大腸菌、6剤耐性大腸菌、純菌(ATCC25922)の生残率を図-4に示す。図中の横軸は総相対殺菌有効放射照度 ( $I_{eff}$ )と照射時間 (s)の積で表される総相対殺菌有効放射線量 ( $mJ/cm^2$ )とし、縦軸は生残率とした。また、図中の回帰直線は不活化速度を表している。

0剤・6剤耐性大腸菌、純菌ともに概ね総相対殺菌有効放射線量に比例して不活化されている傾向が確認され、0剤耐性大腸菌ならびに純菌の不活化はほぼ同様であり、90%不活化(生残率=0.1)に要する総相対殺菌放射線量は、約1.4  $mJ/cm^2$ であることが分かった。一方、6剤耐性大腸菌は紫外線照射初期(0~3  $mJ/cm^2$ )では、純菌および0剤耐性大腸菌とは異なり、紫外線に対する抵抗を示しており、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量は約4.2  $mJ/cm^2$ であった。0剤耐性大腸菌および純菌よりも3  $mJ/cm^2$ ほど低圧紫外線ランプ照射に対して耐性を有していることが確認された。

0剤耐性大腸菌および純菌は紫外線照射初期においては紫外線に対する抵抗を示しておらず、6剤耐性大腸菌はいわゆる「肩」を持つ反応であった。また、0剤・6剤耐性大腸菌および純菌ともに総相対殺菌放射線量が10  $mJ/cm^2$ 以上、生残率で0.00001(5Log)以下になると、テーリング現象が確認された。紫外線照射におけるテーリング現象はしばしば報告されている。この現象が生じる明確な理由は定かではないが、紫外線耐性が全て同一な微生物であることが明らかな場合でもテーリング現象は生じる可能性が

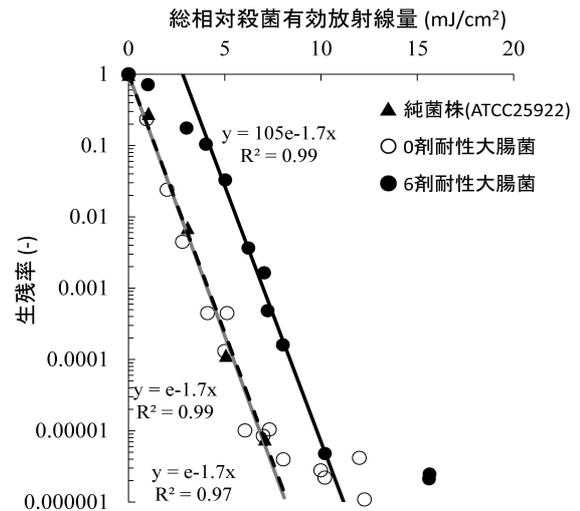


図-4 低圧紫外線ランプ照射による抗生物質耐性大腸菌(0剤, 6剤耐性大腸菌)および純菌大腸菌の不活化

あり、微生物同士の凝集により、単独で存在している微生物よりも見かけの紫外線耐性が大きくなる部分が生じることで起こりうると考えられている<sup>24)</sup>。本実験においても同様な現象が生じたと考えられた。

図-4より低圧紫外線ランプ照射時における、0剤耐性大腸菌、6剤耐性大腸菌と純菌の不活化速度の違いを評価した。総相対殺菌放射線量が10  $mJ/cm^2$ 以上でテーリング現象が確認されたため、10  $mJ/cm^2$ 以上のデータを除外し、総相対殺菌放射線量と生残率が一次反応であると仮定し不活化速度を算出した。6剤耐性大腸菌は「肩」の存在が確認されたため、0~3  $mJ/cm^2$ および10  $mJ/cm^2$ 以上のデータを除外し不活化速度を算出した。すなわち図中の回帰直線の傾きが不活化速度定数となる。その結果、0剤耐性大腸菌、6剤耐性大腸菌、純菌ともに不活化速度は1.7 ( $cm^2/mJ$ )と顕著な差は確認されなかった。既往の研究結果<sup>9)</sup>によれば、コリメート試験による低圧紫外線照射における*Escherichia coli*は、「肩」を持たない反応であり、90%不活化に要する紫外線量は約1.8  $mJ/cm^2$ 、不活化速度は紫外線量と生残率に比例し、約1.4 ( $cm^2/mJ$ )と報告されており、本研究で検討した0剤耐性大腸菌および純菌の不活化速度は既往の研究結果とほぼ同様であった。

##### 2) 中圧紫外線照射

中圧紫外線照射時における0剤耐性大腸菌、6剤耐性大腸菌、純菌(ATCC25922)の生残率を図-5に示す。0剤耐性大腸菌および6剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同様に、生残率は総相対殺菌

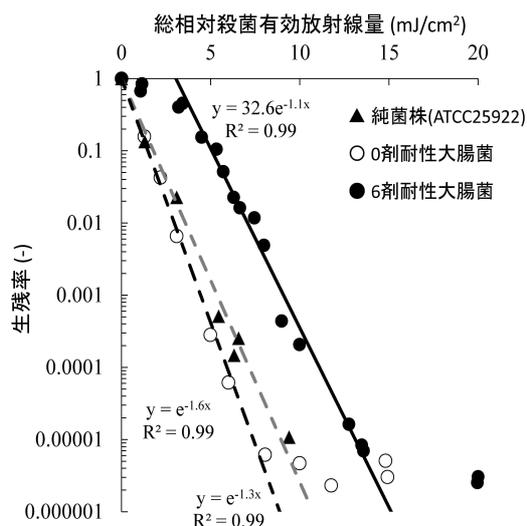


図-5 中圧紫外線ランプ照射による抗生物質耐性大腸菌 (0剤, 6剤耐性大腸菌) および純菌大腸菌の不活化

有効放射線量に比例している傾向が確認された。0剤耐性大腸菌および純菌は、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量が約 1.5~1.8 mJ/cm<sup>2</sup>で、低圧紫外線ランプ照射時とほぼ同等であった。一方、6剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時とは異なり、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量は約 6.9 mJ/cm<sup>2</sup>であり、中圧紫外線ランプを用いた際は、低圧紫外線ランプと同程度の不活化を得るためには、約 1.5 倍の紫外線量が必要となることが明らかとなった。

低圧紫外線ランプ照射時と同様に、各耐性大腸菌および純菌の不活化速度を把握するために、不活化速度を算出した。生存率が 0.00001 (5 log) 以下でテーリング現象が確認されたため、テーリング現象が確認された以降のデータを除き、総相対殺菌有効放射線量と生存率が比例すると仮定して不活化速度を算出した。なお 6剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同様に照射初期で「肩」を持つ反応が確認されたため、総相対殺菌有効放射線量で 3 mJ/cm<sup>2</sup> 未満 10 mJ/cm<sup>2</sup> 以上のデータを除外し不活化速度を算出した。その結果、0剤耐性大腸菌および純菌の不活化速度は低圧紫外線ランプ照射時と比較し、1.3~1.6 (cm<sup>2</sup>/mJ) でほぼ同等であった。6剤耐性大腸菌は、低圧紫外線ランプ照射時とは異なり、不活化速度が 1.1 (cm<sup>2</sup>/mJ) であり、低圧紫外線ランプ照射時よりも 67%程度、不活化速度が低下した。

中圧紫外線ランプは、低圧紫外線ランプの主波長である 254 nm 以外の紫外線、主に波長 200~400 nm

の紫外線を放射する。本研究では、中圧紫外線ランプ照射における耐性大腸菌の不活化には、紫外線光量計、試料吸光度分布、ランプの発光波長分布 (エネルギー分布)、DNA 波長感受性分布を全て考慮した、式(2)における総相対殺菌放射照度を算定し、照射時間を乗じた総相対殺菌放射線量で評価し、低圧紫外線ランプ照射時と比較した。式(2)を用いることで、紫外線の不活化に寄与する波長のエネルギー全てを勘案して不活化を評価することができ、中圧紫外線ランプ照射時は、低圧紫外線照射時よりも、波長 254 nm 以外の他波長の紫外線が不活化に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、0剤耐性大腸菌および純菌は、低圧・中圧紫外線ランプ照射時と比較して、90%不活化に要する紫外線量ならびに不活化速度が同程度であったのに対して、6剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時の方が、不活化速度が速く、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量が小さかった。

以上より、0剤耐性大腸菌、6剤耐性大腸菌ともに波長 254 nm 以外の紫外線が不活化に及ぼす影響が小さかった可能性が考えられた。また、6剤耐性大腸菌の不活化速度が、0剤耐性大腸菌とは異なり、中圧紫外線ランプ照射時に低下したのは、波長 254 nm 以外の波長の紫外線の寄与以外にも、式(2)からも判断できるように DNA の紫外線に対する波長感受性が異なるためではないかと考え、不活化速度差異について微生物の薬剤耐性機構や我々の既往の研究結果<sup>8)</sup>から推察した。

微生物の薬剤耐性機構は、主に①外膜透過孔の減少による薬剤の不透過、②取り込んだ薬剤の菌体外への排出、③不活化酵素の産出などが知られている<sup>25)</sup>。また既往の研究結果<sup>8)</sup>では、塩素消毒後に 1剤あるいは 2剤以上の抗生物質に耐性を有する多剤耐性大腸菌の割合が上昇する報告がある。すなわち、抗生物質に対する耐性を有している大腸菌は、上記①~③の作用が生じている可能性が考えられ、特にその内①の作用による耐性大腸菌の細胞膜が変質した事で、6剤耐性大腸菌は、0剤耐性大腸菌、純菌とは表面タンパク質の DNA の変質により、結果として紫外線に対する抵抗や感受性が変化したのではないかと推察した。しかしながら、本研究では厳密に 6剤耐性大腸菌の遺伝情報等の解析がなされていないため、これらはあくまでも推察の領域である。

### 3. 1. 2 可視光照射による耐性大腸菌の光回復

0剤耐性菌、6剤耐性菌の可視光照射による光回復

の結果を図-6 に示す。図中の横軸は照射時間 (min) とし、縦軸は光回復後の生残率とした。また式(5)におけるモデル式より算出した可視光照射時間  $t$  分での生残率を実線および破線で図中に示した。式(5)における光回復のモデル式の計算値と実測値では、総相対殺菌有効放射線量が小さい場合、光回復の回復初期で実測値の間に若干の乖離が生じていたが、概ね本研究で検討した光回復の予測式と実測値との間に整合性が確認された。

### 1) 0 剤耐性大腸菌の光回復

低圧紫外線ランプ照射後 (図-6 (a)) における光回復量は、総相対有効殺菌放射線量  $10 \text{ mJ/cm}^2$  程度では、概ね  $3 \text{ log}$  ( $1000$  倍) 光回復する傾向が確認されたが、 $12 \text{ mJ/cm}^2$  以上照射することで、 $1 \text{ log}$  程度に抑制された。

中圧紫外線ランプ照射後 (図-6 (b)) は、 $3 \text{ mJ/cm}^2$  の低放射線量では  $2 \text{ log}$  不活化されるが、90 分の可視光ランプ照射後は 7 割程度、耐性菌濃度が回復し

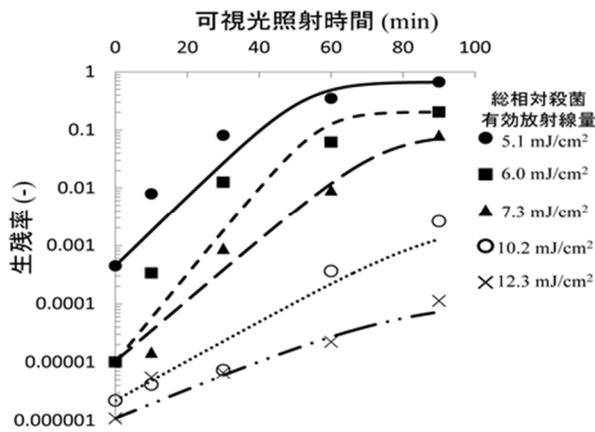
た。低圧紫外線ランプ照射時と同様に  $10 \text{ mJ/cm}^2$  程度では、約  $3 \text{ log}$  光回復することが確認されたが、 $15 \text{ mJ/cm}^2$  以上照射することで、光回復が  $1 \text{ log}$  程度に抑制された。

### 2) 6 剤耐性大腸菌の光回復

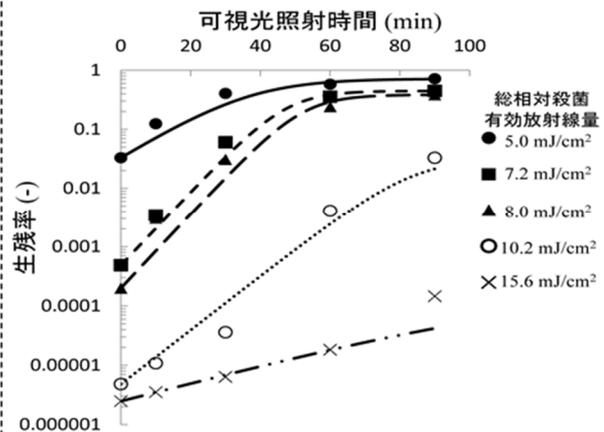
低圧紫外線ランプによる  $8 \text{ mJ/cm}^2$  までの照射では、可視光ランプ照射後 90 分で紫外線照射初期の濃度の 4-8 割程度回復する傾向が確認された。 $10 \text{ mJ/cm}^2$  照射すれば 6 剤耐性大腸菌を  $5 \text{ log}$  不活化可能であったが、可視光ランプ照射により  $3 \text{ log}$  光回復し、 $15 \text{ mJ/cm}^2$  照射することで光回復を  $1 \text{ log}$  程度に抑制できることが確認された。

中圧紫外線ランプ照射後の光回復は、低圧紫外線ランプ照射時と同様の傾向を示しており、 $10 \text{ mJ/cm}^2$  以下では紫外線照射初期濃度の 4-8 割程度まで回復した。一方  $10 \text{ mJ/cm}^2$  を超える照射量であっても  $20 \text{ mJ/cm}^2$  未満では、中圧紫外線ランプで  $5 \text{ log}$  程度不活化可能であるが、光回復により約  $3 \text{ log}$  回復する

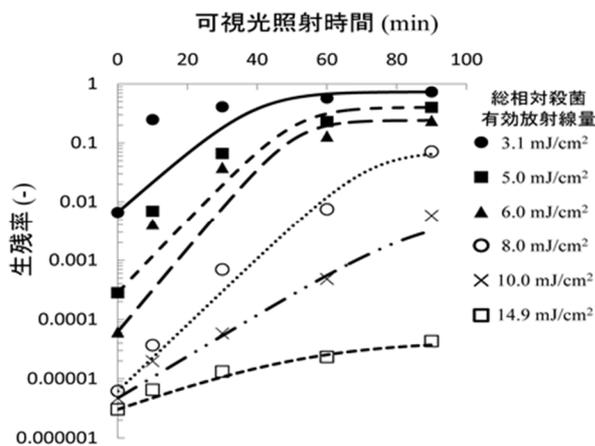
(a): 低圧紫外線ランプ照射時後の0剤耐性大腸菌の光回復



(c): 低圧紫外線ランプ照射時後の6剤耐性大腸菌の光回復



(b): 中圧紫外線ランプ照射時後の0剤耐性大腸菌の光回復



(d): 中圧紫外線ランプ照射時後の6剤耐性大腸菌の光回復

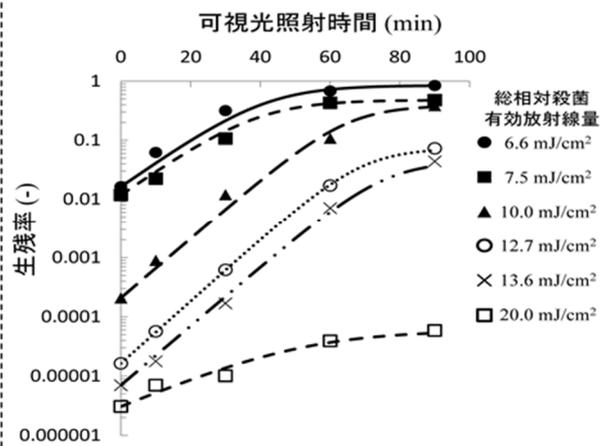


図-6 低圧・中圧紫外線ランプ照射後の0剤, 6剤耐性大腸菌の光回復

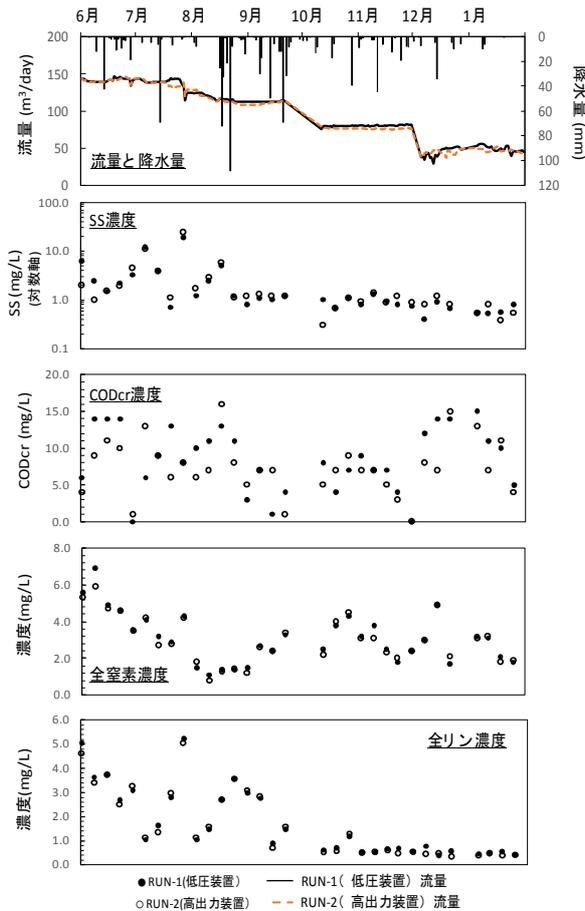


図-7 調査期間中(2016/6~2017/1)の流入原水の水質変動

傾向が確認され、20 mJ/cm<sup>2</sup>の照射で光回復を1 logに抑制できることが確認された。

### 3. 2 連続通水による長期運転での紫外線消毒実験結果

#### 3. 2. 1 一般水質データ

調査期間中の流入原水の流量変動、SS濃度、CODcr濃度、全窒素濃度、全リン濃度を図-7に示す。併せて採水当日の降水量を棒グラフで示した。同様に図-8には紫外線照射後の水質を示す。調査期間中を通して、原水、処理水ともにSS濃度の変動係数(CV)は150~170%、CODcrのCVは50%、全窒素および全リンのCVは80%程度で原水中の水質変動が大きかった。一方、紫外線照射前後で顕著な水質の変化は確認されなかった。なおpHは調査期間中では、照射前後で大きな変化はなく、概ねpH = 6.4~7.2の範囲で推移していた。

#### 3. 2. 2 大腸菌群、大腸菌、FRNAPH濃度

図-9に低圧装置(RUN-1)、図-10に高出力装置(RUN-2)の紫外線照射前後の大腸菌、大腸菌群、野生株のFRNAPH濃度を示す。各図より、流入原水

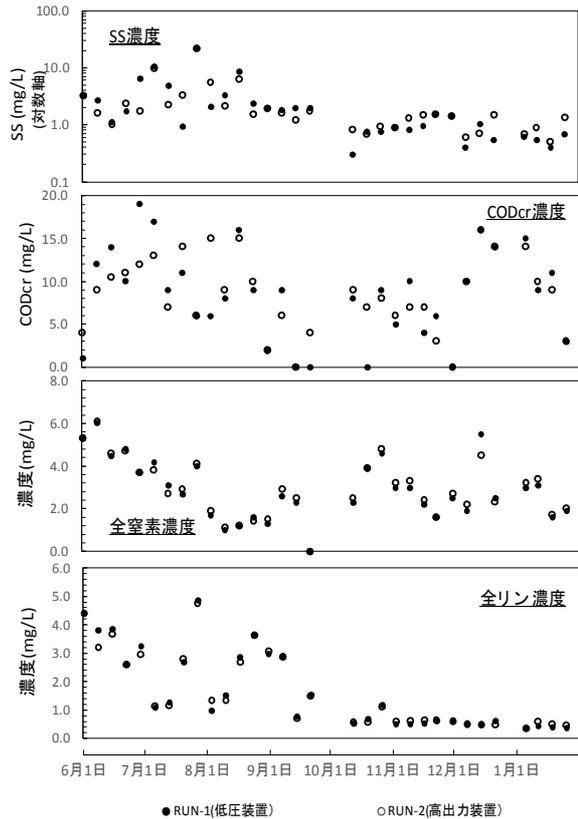


図-8 調査期間中(2016/6~2017/1)の紫外線照射後の処理水の水質変動

中の大腸菌群濃度は概ね10<sup>3</sup> CFU/mL、大腸菌は約10<sup>1</sup>~10<sup>2</sup> CFU/mLで推移しており、FRNAPHは数~数十PFU/mLで検出され、検出率は96.8%であった。

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

本調査で使用した低圧装置と高出力装置とでは、容積が異なるため、装置内の平均滞留時間に違いが生じるが、装置内の流動特性、すなわち装置内の混合拡散状態と滞留時間分布が同一であると仮定した。式(7)より双方の装置の紫外線照射前後の大腸菌および大腸菌群濃度から、同一条件における不活化効果の違いを評価した。

$$\frac{C_{t-L}}{C_{0-L}} = \frac{(I_{avg-L}/65W) \cdot V_L \cdot Q}{D_{10}} = \frac{C_{t-H}}{C_{0-H}} \cdot \frac{(I_{avg-H}/60W) \cdot V_H \cdot Q}{D_{10}} \quad (7)$$

ここで、C<sub>0-H</sub>、C<sub>0-L</sub>は高出力および低圧装置の微生物

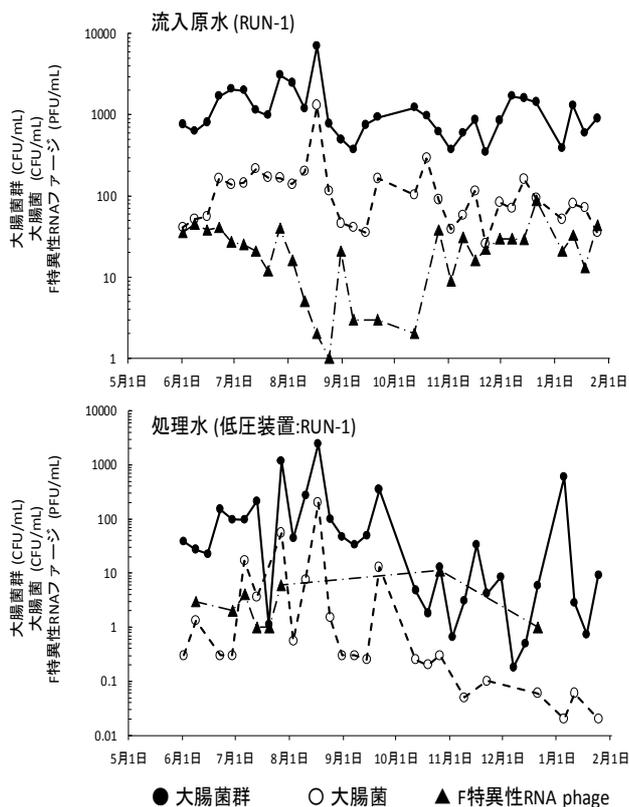


図-9 紫外線照射前後の大腸菌群、大腸菌、FRNAPH の濃度推移 (低圧装置)  
(不検出のデータは図に表示していない)

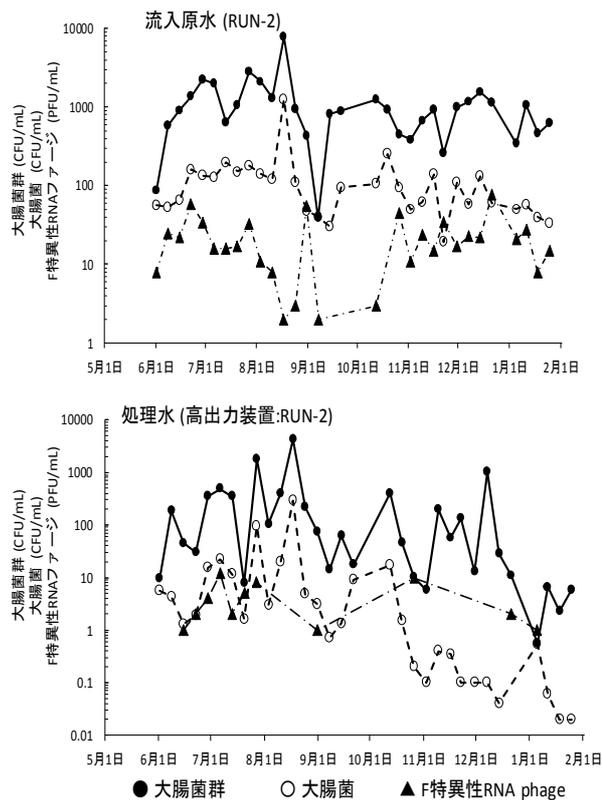


図-10 紫外線照射前後の大腸菌群、大腸菌、FRNAPH の濃度推移 (高出力型装置)  
(不検出のデータは図に表示していない)

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

式(7)において双方の装置における出力  $W$  数が異なるため、単位  $W$  数あたりの平均紫外線照度 ( $I_{avg}$ ) の比が直接不活化率に対応している。また式(7)の  $D_{10}$ は対象となる微生物が1 log 不活化するのに必要な紫外線量となるため、同微生物で比較した場合は同値となる。

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

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

ると仮定し、式(7)で示した試算と同様に算出すると、低圧装置の約2倍の消毒効果であると試算された。また、水質変動による消毒効果への影響として、原水中のSS (0.2~30 mg/L)、 $COD_{Cr}$  (0.1~17 mg/L)、全窒素 (0.5~7.5 mg/L) および全リン (0.2~5.4 mg/L) の変動が大きかったにもかかわらず、処理水中のFRNAPHは1~10 PFU/mLの間であり、安定的に不活化されていた。このため、通常の二次処理水の水質変動範囲であれば紫外線消毒によるウイルスの消毒効果への影響は小さいことが考えられた。

### 3.3 NoVの不活化効果の推定結果

#### 3.3.1 紫外線消毒による不活化効果

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) の不活化効果をIC-PCRにより定量し算出した結果 (図-11の○)、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。紫外線照射量を増加させることで、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。テーリングした値を除外した近似曲線から不活化速度定数 ( $y = k_i x$ の傾き:  $k_i$ ) を求めると、GIは0.060、GIIIは0.071、

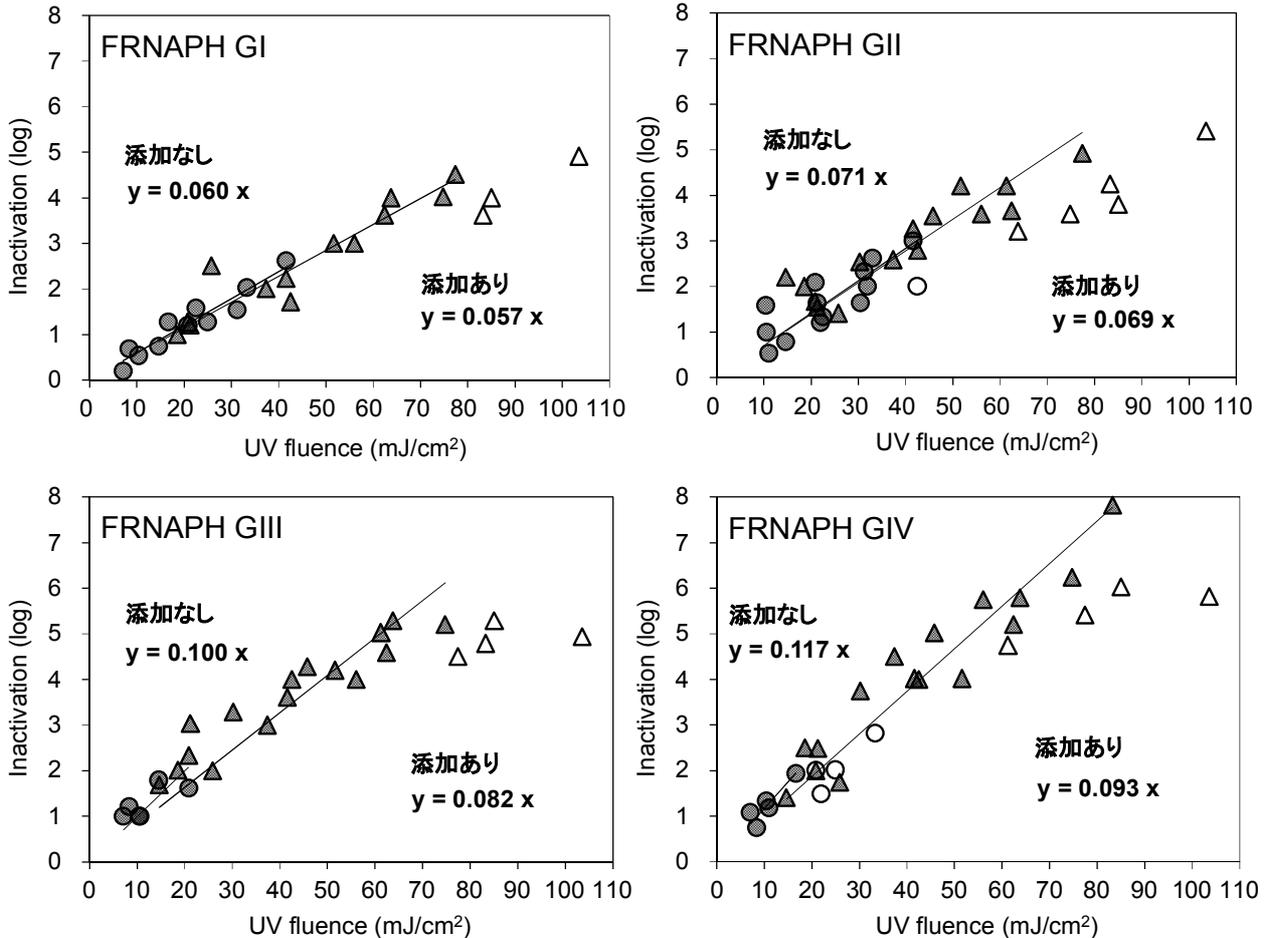


図-11 紫外線消毒実験における感染力を有したFRNAPH遺伝子群の不活化効果の比較

(○：添加なし、△：添加あり、白抜き：テーリング時の除去率と判断して近似曲線を求める際に除外した値、紫外線消毒後に検出下限以下であった不活化率は除外している)

GIIIは0.100、GIVは0.117であった。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-11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が最も低かった。同じくテーリングした値を除外した近似曲線より添加したFRNAPH遺伝子群の不活化速度定数( $k_i$ )を求めると、GIは0.057、GIIは0.069、GIIIは0.082、GIVは0.093となり、添加なしと比べて大きな差は無かった。

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( $k_i$ :0.044)、その次がGII( $k_i$ :0.050)であったことが報告されている<sup>21)</sup>。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( $k_i$ :0.041)、GII( $k_i$ :0.055)、GIII( $k_i$ :0.072)、GIV( $k_i$ :0.094)の順であり<sup>21)</sup>、本研究での結果と同様であった。しかし、不活化速度定数( $k_i$ )は先の

報告例<sup>21)</sup>と比較して今回の方がやや高くなっていた。これは紫外線照射効果に影響する紫外線(254 nm)透過率などが異なるためであることが推察される。一方、人為的に高濃度に培養して添加したFRNAPH遺伝子群の不活化効果と、元々試験水中に存在していたFRNAPH遺伝子群の不活化効果に大きな差は無かったことから、高濃度のFRNAPH遺伝子群液を用いることで紫外線消毒によるよりの確な不活化効果の評価が可能であると考えられた。

### 3. 3. 2 紫外線消毒による遺伝子低減効果

紫外線消毒による野生株のFRNAPH遺伝子群(添加なし)の遺伝子低減効果をPCRにより定量し算出した結果(図-12の○)、GIVが最も高く、GII、GIの順であり、近似曲線により遺伝子低減速度定数( $y = k_i x$ の傾き: $k_i$ )を求めると、GIVは0.015、GIIIは0.010、GIは0.006であった。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-12の△)、PCRにより定量出来なかったGIV

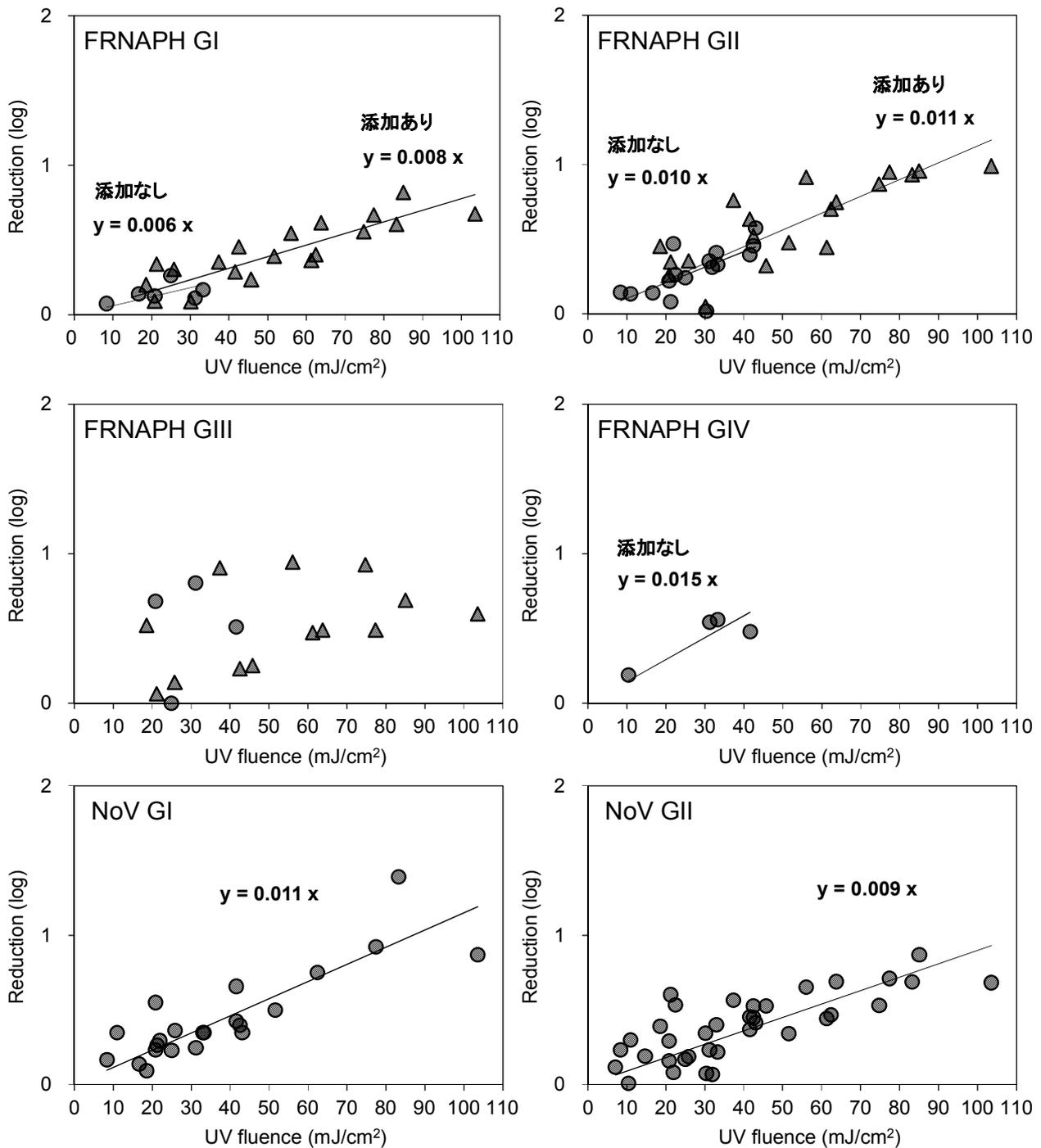


図-12 紫外線消毒実験におけるFRNAPH遺伝子群とNoVの遺伝子低減効果の比較 (○：添加なし、△：添加あり)

を除き、添加なしと同様にGIの遺伝子低減効果が最も低く ( $k_r$ : 0.008)、次いでGII ( $k_r$ : 0.011) であった。一方、添加なしと添加ありの紫外線消毒実験におけるGIIIの遺伝子低減効果は紫外線照射量の増加により線形に向上せず、近似曲線を引くことができなかったため遺伝子低減速度定数を求めることはできなかった。紫外線消毒における試験水中に存在するNoVの遺伝子低減効果は (図-12)、NoV GIとGII

ともに紫外線照射量を増加させることで線形に向上する傾向が見られた。そこで、近似曲線から遺伝子低減速度定数 ( $k_r$ ) を求めると、NoV GIは0.011、NoV GIIIは0.009であり、NoV GI遺伝子の方が紫外線感受性が高かった。

遺伝子低減速度定数 ( $k_r$ ) が求められたFRNAPH GI、GII、GIVにおいて不活化速度定数 ( $k_i$ ) と比較すると、不活化速度定数 ( $k_i$ ) が遺伝子低減速度定数 ( $k_r$ )

より6~10倍高くなっていたが、その関係を見るとGI < GII < GIVと紫外線感受性については同じ傾向を示していた。このことは、紫外線消毒における遺伝子低減効果は、感染力を含めた不活化効果の結果を反映している可能性が考えられる。紫外線によるウイルスの不活化機構は直接遺伝子に作用して感染力を失わせる。しかし、PCRでは検出対象としている遺伝子の増幅領域が短いため、対象とした増幅領域部分の遺伝子が紫外線により損傷しない限りPCRにより検出されてしまう。そのため、紫外線照射前後においてPCRによる遺伝子濃度がほとんど減少しないことも報告されている<sup>26), 27)</sup>。一方、紫外線照射量を増加させることによりPCRの検出に用いる増幅領域の遺伝子部分にも損傷が生じることで遺伝子濃度が減少することも報告されている<sup>28), 29)</sup>。本研究でも紫外線照射量を増加させることで線形に遺伝子濃度が減少する傾向が確認されており（図-12のFRNAPH GI、GII、GIV、NoV GI、NoV GII）、紫外線消毒による遺伝子低減効果は不活化効果を反映している可能性が示唆された。また、紫外線によりNoV GIの遺伝子の方がNoV GIIと比べてより減少しやすい傾向があることが報告されている<sup>28)</sup>。本研究の結果においても紫外線消毒による遺伝子低減速度定数 ( $k_r$ ) がNoV GIIと比べてNoV GIの方が大きかったことから、既報の研究結果と合致していた。

### 3. 3. 3 紫外線消毒によるNoVの不活化効果の推定

#### 1) 遺伝子低減効果から不活化効果の推定

遺伝子低減効果から不活化効果の推定を行うため、FRNAPHのそれぞれの遺伝子群においてIC-PCRにより得られた不活化効果とPCRにより得た遺伝子低減効果の関係を評価した（表-2）。FRNAPH GIとGIIの不活化効果と遺伝子低減効果との相関係数が0.88と0.71であり有意な相関関係を示した ( $p < 0.01$ )。しかし、GIIIにおいては相関関係が見られなかった。また、GIVはn数が少なかったため相関分析は行っていない。

FRNAPH GIとGIIの結果から、紫外線消毒による不活化効果と遺伝子低減効果の間に有意な相関関係が示されたことから、遺伝子低減効果から不活化効果を推定できる可能性が考えられる。そこで、FRNAPH GIとGIIの遺伝子低減速度定数 ( $k_r$ ) からそれぞれの不活化速度定数 ( $k_i$ ) を求めるための倍率を調べた結果（表-3）、添加なしでGIは10倍、GIIは7.1倍、添加ありでGIは7.1倍、GIIは6.3倍であった。添加なしでは45 mJ/cm<sup>2</sup>以上の紫外線照射量での不

表-2 FRNAPH 遺伝子群の IC-PCR（不活化効果）と PCR（遺伝子低減効果）との相関関係

FRNAPH	相関係数 (n数)			
	GI	GII	GIII	GIV
IC-PCR vs PCR	0.88** (n=22)	0.71** (n=34)	0.22 (n=14)	-

\*\*:<0.01

表-3 FRNAPH GI と GII における遺伝子低減効果から不活化効果の計算倍率

	FRNAPH GI		FRNAPH GII	
	添加なし	添加あり	添加なし	添加あり
遺伝子低減速度定数( $k_r$ )	0.006	0.008	0.010	0.011
↓ × 倍率	↓ × 10	↓ × 7.1	↓ × 7.1	↓ × 6.3
不活化速度定数( $k_i$ )	0.060	0.057	0.071	0.069

活化効果が反映できなかったことや（45 mJ/cm<sup>2</sup>以上では全て検出下限値以下であったため不活化効果の評価ができなかった）、安全側の評価とするとFRNAPH GIの7.1倍とGIIの6.3倍が妥当と考えられた。

#### 2) FRNAPH の不活化効果から NoV の不活化効果の推定

紫外線消毒によるNoVの不活化効果を推定するため、同じ測定手法であるPCRで得たFRNAPHとNoVの遺伝子低減効果の関係を評価した（表-4）。NoV GIとGIIともにFRNAPH GIおよびGIIと有意な相関関係が得られた（相関係数：0.54~0.86）。NoV GIはFRNAPH GIIと最も相関があり（相関係数：0.55、 $p < 0.01$ ）、NoV GIIはFRNAPH GIと最も相関があった（相関係数：0.86、 $p < 0.01$ ）。紫外線消毒においてFRNAPH（GIとGII）とNoVの遺伝子低減効果の間に相関関係が得られたことから、これらの不活化効果の間にも相関関係がある可能性が示唆される。また、3.3.3の1)での結果で遺伝子低減効果と不活化効果の間には相関関係があったことから、NoVにおいても遺伝子低減効果と不活化効果に相関関係がある可能性が考えられる。そこで、NoVにおいても遺伝子低減効果と不活化効果に相関関係があるとの前提の上、FRNAPHにおける遺伝子低減効果から、上記の不活化速度定数の倍率を用いてNoVの不活化効果を推算した（表-5）。推算されたNoVの不活化速度定数 ( $k_i$ ) は、NoV GIは0.078（FRNAPH GIから）と0.069

(FRNAPH GIIから)であり、NoV GIIは0.064 (FRNAPH GIから)と0.057 (FRNAPH GIIから)であった(表-5)。これらの不活化速度定数( $k_i$ )からNoVを1 log不活化するために必要な紫外線照射量を求めると、NoV GIは12.8~14.4 mJ/cm<sup>2</sup>、NoV GIIは15.6~17.6 mJ/cm<sup>2</sup>が必要である結果となった。これらの結果から、下水処理水中のNoVを2~3 log以上不活化させるための紫外線照射量は、35~53 mJ/cm<sup>2</sup>以上必要であることが推算された。

#### 4. まとめ

本研究では、代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の提案を目的に、①新たな指標に基づく紫外線消毒法の評価、②処理水質が消毒効果へ及ぼす影響評価、③ウイルス不活化評価技術の提案について検討を行った。得られた結果を以下にまとめる。

「①新たな指標に基づく紫外線消毒法の評価」

- 1) 低圧紫外線ランプ照射による不活化速度は、0、6 剤耐性大腸菌とも 1.7 (cm<sup>2</sup>/mJ) 程度であり、1 log の不活化に要する総相対殺菌有効放射線量は、0 剤耐性大腸菌で約 1.4 mJ/cm<sup>2</sup>、6 剤耐性大腸菌で約 4.2 mJ/cm<sup>2</sup>であった。
- 2) 中圧紫外線ランプ照射による不活化速度は、0 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同程度で 1.3~1.6 (cm<sup>2</sup>/mJ) であった。6 剤耐性大腸菌は、低圧紫外線ランプ照射時と異なり、不活化速度が 1.1 (cm<sup>2</sup>/mJ) であった。中圧紫外線ランプ照射において 1 log の不活化に要する総相対殺菌有効放射線量は、0 剤耐性大腸菌で約 1.5 mJ/cm<sup>2</sup>、6 剤耐性菌で約 6.9 mJ/cm<sup>2</sup>であった。
- 3) 紫外線照射後の光回復においては、0 剤耐性大腸菌は、低圧・中圧紫外線ランプ照射で 10 mJ/cm<sup>2</sup> 以下では、約 3 log 光回復することが確認されたが、15 mJ/cm<sup>2</sup> 以上照射することで、光回復が 1 log 程度に抑制された。
- 4) 6 剤耐性大腸菌の光回復は、低圧紫外線ランプ照射で 10 mJ/cm<sup>2</sup> とすれば 5 log の不活化が可能であったが、可視光ランプ照射により 3 log 光回復し、15 mJ/cm<sup>2</sup> の照射で光回復を 1 log 程度に抑制できることが確認された。中圧紫外線ランプ照射時は、20 mJ/cm<sup>2</sup> で 5 log 程度の不活化が可能であり、光回復も 1 log 程度に抑制できることが確認された。

表-4 FRNAPH と NoVs との相関関係

FRNAPH (PCR)	相関係数 (n数)			
	GI	GII	GIII	GIV
NoV GI (PCR)	0.54* (n=19)	0.55** (n=24)	-	-
NoV GII (PCR)	0.86** (n=24)	0.77** (n=33)	-	-

\*:<0.05, \*\*:<0.01

表-5 FRNAPH から NoV の不活化効果の推定

FRNAPH	NoV GI		NoV GII	
	GI	GII	GI	GII
遺伝子低減速度定数( $k_i$ )	0.011	0.011	0.009	0.009
↓ × 倍率	↓ × 7.1	↓ × 6.3	↓ × 7.1	↓ × 6.3
推算した不活化速度定数( $k_i$ )	0.078	0.069	0.064	0.057
1 log不活化に必要な紫外線照射量(mJ/cm <sup>2</sup> )	12.8	14.4	15.6	17.6

- 5) 6 剤耐性大腸菌の 3 log 不活化効果を見込む場合、低圧紫外線ランプ照射時では 15 mJ/cm<sup>2</sup> 以上、中圧紫外線ランプ照射時では 20 mJ/cm<sup>2</sup> 以上の照射量が必要であることが分かった。

「②処理水質が消毒効果へ及ぼす影響評価」

- 1) 高出力装置による大腸菌群の不活化効果は、装置内滞留時間を考慮すると低圧装置と比較して 1.4 倍、大腸菌では 1.7 倍向上すると試算された。
- 2) 原水中の SS、COD<sub>cr</sub>、全窒素および全リンの変動が大きかったにもかかわらず、処理水中の FRNAPH は 1~10 PFU/mL の間であり、安定的に不活化されていた。このことから、本調査期間中における下水処理水の溶存物質、SS の濃度範囲内では、紫外線消毒によるウイルスの消毒効果への影響は少ないことが分かった。

「③ウイルス不活化評価技術の提案」

- 1) 紫外線消毒による 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。
- 2) 紫外線消毒による FRNAPH 遺伝子群の遺伝子低減効果は不活化効果と同じく、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。

- 3) FRNAPH GIとGIIにおいて、IC-PCRにより得られた不活化効果とPCRにより得た遺伝子低減効果の間に有意な相関関係を示したことから、遺伝子低減効果から不活化効果を推定できる可能性が示唆された。
- 4) FRNAPH遺伝子群とNoVの遺伝子低減効果の関係を評価した結果、NoV GIとGIIともにFRNAPH GIおよびGIIと有意な相関関係を示したことから、FRNAPH遺伝子群を用いてNoVの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。
- 5) FRNAPH遺伝子群を用いてNoVの不活化速度定数 ( $k_i$ ) を推算した結果、下水処理水中のNoVを2~3 log以上不活化させるためには35~53 mJ/cm<sup>2</sup>以上の紫外線照射量が必要とであることが示された。このことから、FRNAPH遺伝子群の利用によりノロウイルスの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 創薬促進検討委員会 ・ 抗微生物薬適正使用推進委員会:「提言第2弾, 世界的協調の中で進められる耐性菌対策」、  
<[http://www.kansensho.or.jp/news/gakkai/pdf/1603\\_resistant\\_bacteria\\_measures\\_02.pdf](http://www.kansensho.or.jp/news/gakkai/pdf/1603_resistant_bacteria_measures_02.pdf)> [参照 2018年6月8日]
- 2) Trevors, J.T.: “Survival of Echerichia coli donor, recipient and trans conjugant cells in soil”, *Water, Air, and Soil Pollution*, 34(4), pp.409–14, 1987
- 3) Reinthaler, F.F. et al: “Antibiotic resistance of E.coli in sewage and sludge”, *Water Research*, 37, pp.1685–90, 2003.
- 4) 清野敦子他:「金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布」、*水環境学会誌*, (27) 11, pp.693–8, 2003
- 5) 岡本誠一郎他:「水環境中における病原微生物の消長に関する研究」、平成22年度下水道関係調査研究年次報告書, 土木研究所資料, 第4212号, pp.103–11, 2011
- 6) Korzeniewska, E.: “Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - a review”, *Front Biosci (Schol Ed)*, pp.393-407, 2011
- 7) 公益社団法人 日本下水道協会:「平成25年度版 下水道統計」、第70号、CD-R、2015
- 8) 諏訪守他:「下水処理水における抗生物質大腸菌の実態」、*下水道協会誌論文集*, 54(652), pp.89–96, 2017
- 9) Hijnen, W.A. et al: “Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review”, *Water Research*, 40, pp.3–22, 2006
- 10) Kageyama, T. et al: “Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR”, *J. Clin. Microbiol.*, 41(4), pp.1548–1557, 2003
- 11) da Silva, A. K. et al: “Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, pp.7891–7897, 2007
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute: “CLSI Approved Standard Tenth ed.”, M2–A10, 2009
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute: “CLSI Approved Standard Tenth ed.”, M100–S19, 2009
- 14) Linden, K.G. et al: “Disinfection Efficiency and Dose Measurement of Polychromatic UV Light”, *AWWA Research Foundation*, pp.37–43, 2003
- 15) Dulbecco, R.: “Photoreactivation”, *Radiation Biology*, 2, pp.455–486, 1955
- 16) 鹿嶋田浩二他:「紫外線照射水処理における光回復の評価」、*水環境学会誌*, 18(1), pp.44–50, 1995
- 17) Sanz, E. et al: “Modelling of reactivation after UV disinfection: Effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair”, *Water Research*, 41, pp.3141–3151, 2007
- 18) 公益社団法人 日本下水道協会:「下水試験方法 上巻」、CD-ROM、2012
- 19) Rahn, R., O. et al: “Quantum yield of the iodide-iodate chemical actinometer: dependence on wavelength and concentrations”, *Photochem. Photobiol.*, 78, pp. 146–152, 2003
- 20) Hata, A. et al: “Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, pp. 4244–4252, 2016
- 21) Lee, S. et al: “Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes”, *Environ. Technol.*, in press
- 22) Wolf, S. et al: “Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR”, *J. Virol. Methods*, 149, pp. 123–128, 2008
- 23) Kitajima, M. et al: “Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses”, *J. Virol. Methods*, 169, pp. 269–273, 2010

- 24) 平田強編他:「紫外線照射 ー水の消毒への適用性ー」、技報堂出版、pp.43-44、2008
- 25) 橋本一他:「病原菌の薬剤耐性 機構の解明とその対策」、学会出版センター、pp.6-10、1993
- 26) Flannery, J. et al: “Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters”, *Water Res.*, 47, pp. 5222-5231, 2013
- 27) Qiu, Y. et al: “Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada”, *J. Appl. Microbiol.*, 119, pp. 1729-1739, 2015
- 28) Barrett, M. et al: “Detection, fate and inactivation of pathogenic norovirus employing settlement and UV treatment in wastewater treatment facilities”, *Sci. Total Environ.*, 568, pp. 1026-1036, 2016
- 29) Lee, J. et al: “Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO<sub>2</sub> under various environmental conditions”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, pp. 2111-2117, 2008

## 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～平 31

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：重村浩之、山崎廉予

### 1. はじめに

下水処理場から発生する汚泥量は増加傾向にあり、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。しかし、脱水機導入にはコストや電力を消費することや、消化工程導入にはスケールメリットが発現しにくいことなど課題も多い。また、下水汚泥の有効利用としての緑農地利用については、発生汚泥の 10%程度（2015 年度）であり、全国的に進んでいるわけではない。また、河川事業においては、河川周辺、堤防等の刈草、伐木のリサイクルには、運搬と処分費が高いなどの問題がある。運搬せずに河川敷で放置すると、刈草が堆肥化し、ミミズやモグラの発生により堤防の脆弱化に繋がる恐れがある。一方、自然界の視点に立ってみると、有機物や生物の枯死体、腐敗物等を分解する生物は多く存在しており、これらの生物の働きによって生態系が成り立っていることは周知の事実である<sup>2)</sup>。中でもミミズ(シマミミズ：*Eisenia fetida*)は土壌改良効果があることが一般常識レベルで知られており、家庭用の生ゴミ処理のためのミミズコンポストも開発・販売されている。数十年前には、シマミミズを利用した食品工場排水処理汚泥の有効利用技術の企業化に成功しており、現在でも家畜糞尿を利用したミミズコンポストなどが生産されているが、幅広い普及には至っていない。しかしここ数年、食品工場や、化学工場の排水処理でイトミミズ (*Tubifex tubifex*) を活用する技術が取り入れられるようになり、和歌山県では、イトミミズを用いた汚泥処理技術が新たに開発され、下水処理場での実証実験が平成 29 年度より行われている<sup>3)</sup>。以上より、ミミズを活用した廃棄物処理技術が近年、再度着目されてきていることがわかる。そこで本研究では、下水汚泥と刈草の安価な減容化、汚泥の有効利用方法として、ミミズを用いる技術を開発することを目的とする。

### 2. 実験方法

上記目的達成のための準備実験として、汚泥と地域バイオマスを混合した育床で、ミミズの簡易飼育を行った。ミミズは、ツリミミズ科のシマミミズ(*Eisenia foetida*)を用いた。シマミミズ(以下、ミミズ)の特徴は、摂食量の 40～60%程度の糞を排泄することである。また、繊維質をよく好んで食べるといわれている。ミミズの育床は、各バイオマスと A 処理場の初沈汚泥の濃縮汚泥を混合して遠心脱水したものを適量混合した系を 4 種類用意した。各バイオマスは、イネ科の刈草を粉末化したもの(以下、刈草粉末)、10 mm にハサミで裁断したもの(以下、刈草 10 mm)、水草(スズメノヒエ)(以下、水草)、落ち葉(以下、落ち葉)とした。比較対照として、各バイオマスを含まない脱水汚泥のみ(以下、脱水汚泥)の系も用意した。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、下部から空気を送り、温度 20±5℃程度で飼育を行った。各ポリビン内の混合物に同程度の大きさのミミズを 5 匹ずつのせ、生育の様子を観察した。

### 3. 結果

1 日目、5 日目、11 日目、70 日目の各系の様子を図 1 に示す。水草の系では、カビが生え、ミミズが死んでしまった。また、脱水汚泥のみの系でも、ミミズが死んでしまった。これらは、含水率が高いことで、ミミズが育床中に潜り込めないことが原因と考えられる。刈草 10 mm、落ち葉の系では、ミミズの糞粒が見ら

れるが、バイオマスの分解の様子は見られなかった。刈草粉末の系では、ミミズの糞粒が一面を覆っている様子がみてとれ、育床の高さが下がっている様子がみられ、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が、ミミズの育床として最適であることが考えられた。今後は、バイオマスの前処理方法や、汚泥との混合割合等について、具体的に検討していく。

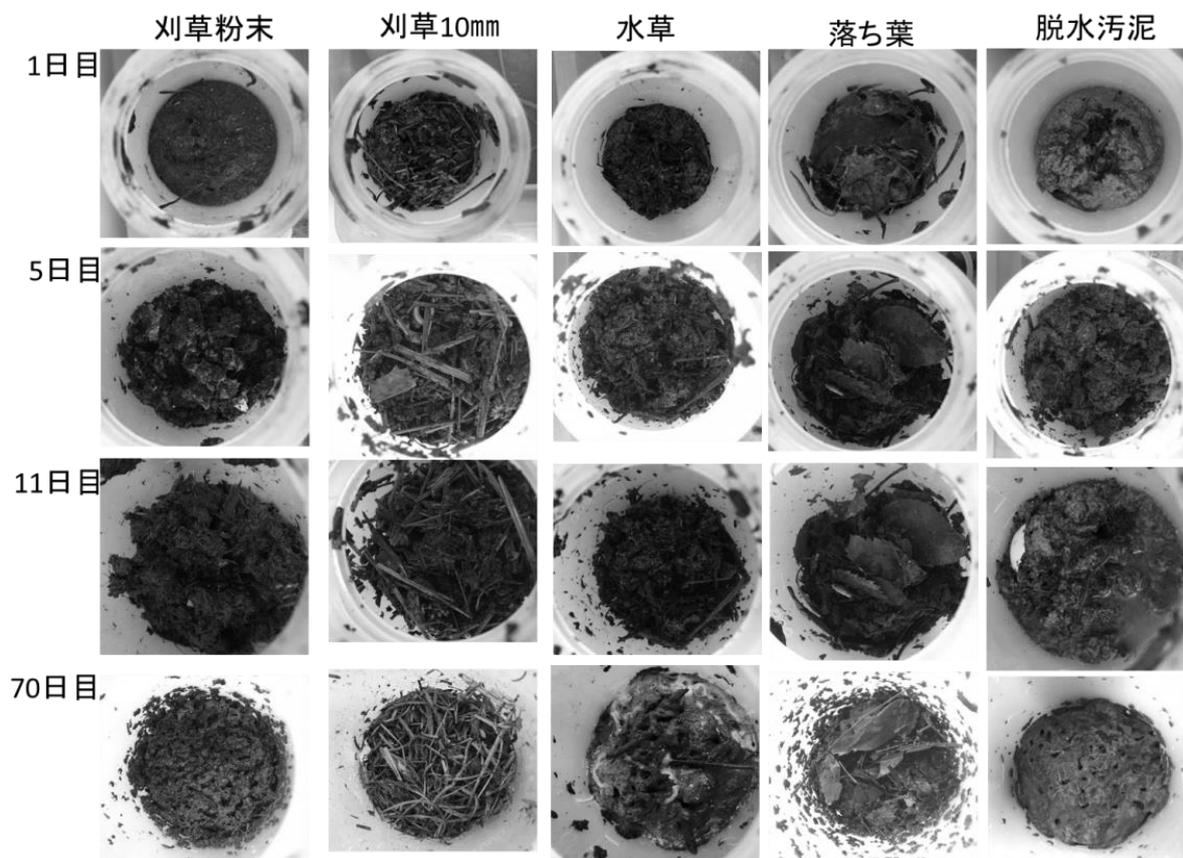


図-1 各バイオマスと脱水汚泥の混合物によるミミズ飼育状況の経時変化

謝辞 水草や汚泥の採取には、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) 社会資本整備審議会：安全を持続的に確保するための今後の河川管理のあり方について(答申), 2014.
- 2) Mahdi Safaei Khorram, Yuan Zheng, Dunli Lin, Qian Zhang, Hua Fang and Yunlong Yu, Dissipation of fomesafen in biochar-amended soil and its availability to corn (*Zea mays* L.) and earthworm (*Eisenia fetida*), J. Soils Sediments, Vol.16, pp.2439-2448, 2016
- 3) 和歌山県 HP, ようこそ知事室へ 知事からのメッセージ 平成 29 年 6 月 進め ミミズ, <https://www.pref.wakayama.lg.jp/chiji/message/201706.html>(2018/7/17 参照)

## Ⅱ. 水質チームによる研究

## 下水処理工程における化学物質等の除去特性 及び生物影響に係る検討業務

水質チーム 上席研究員 小川 文章  
特任研究員 小森 行也  
研究員 村田 里美  
研究員 鈴木 裕識

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

### 1. 下水処理工程における化学物質等の除去特性に係る調査

#### 1. 1 活性汚泥処理プロセスにおけるアンモニアの挙動調査

硝化促進運転条件における  $\text{NH}_4\text{-N}$  の除去率は 99.5~99.8%であった。硝化抑制運転条件における  $\text{NH}_4\text{-N}$  の除去率は 2.6%~40.7%であり、pH 条件による顕著な差はみられなかった。 $\text{NH}_4\text{-N}$  の流入フラックス (IN: 流入下水) に対する排出フラックス (OUT: 生汚泥+余剰汚泥+エアレーション+放流水) の割合は 72.1%~109.8%であり、活性汚泥の馴致が進んでいない場合、ほとんど除去されずに処理系から排出される可能性が示唆された。また、エアレーション空気によるアンモニア排出量は非常に小さく流入フラックスの 0.004~0.005%であった。

#### 1. 2 活性汚泥処理プロセスにおけるニッケルの挙動調査

硝化促進運転条件における Ni の総量としての除去率は 56.6%、61.2%、94.5%と算出された。一方で、溶存態 Ni、Labile 態 Ni としての除去率は -3.7~43.9%、-4.7%~62.0%であった。形態別存在実態に着目すると、活性汚泥処理プロセスを経た後には、総量態 Ni に占める割合のほとんどが溶存態 Ni であり、初沈汚泥や返送汚泥、余剰汚泥には懸濁態 Ni として収着し、高濃度で存在していることが明らかとなった。流入フラックス (IN) に対する排出フラックス (OUT) の割合は 57.7%、74.4%と算出された。

#### 1. 3 小規模下水処理場におけるアンモニア性窒素の実態調査

環境省の平成 29 年度水生生物保全に係る化学物質有害性評価作業委員会においてアンモニアの有害性が確認され、水生生物への影響を示す評価水質値 (案) が示された。アンモニアについて評価水質値 (案) が示されたということは、下水道において重要な課題として捉える必要がある。本調査は下水処理場のアンモニア性窒素 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) の実態把握を目的として、下水処理場の流入下水、処理水 (消毒前)、放流水 (消毒後) について  $\text{NH}_4\text{-N}$  分析を行った。これまで、小規模下水処理場のデータが少ないことから、処理水量 10,000 $\text{m}^3$ /日以下の処理場を中心に種々の処理方式の処理場を調査対象とした。調査処理場は、標準活性汚泥法 (15ヶ所)、土壌被覆型礫間接触法 (5ヶ所)、接触酸化法 (4ヶ所)、好気性ろ床法 (4ヶ所)、嫌気好気ろ床法 (6ヶ所)、オキシデーションディッチ法 (20ヶ所) の合計 54 処理場である。調査時の晴天時日平均下水量が 18,000 $\text{m}^3$ /日以下の小規模下水処理場において  $\text{NH}_4\text{-N}$  の実態調査を行い以下の結果が得られた。

$\text{NH}_4\text{-N}$  は流入下水の 25 $\text{mg/L}$  (中央値) に対し、処理水では 1.6 $\text{mg/L}$  (中央値)、放流水では 1.6 $\text{mg/L}$  (中央値) であり、除去率は 94%であった。放流水の 75%値が 10 $\text{mg/L}$  であることから、調査処理場の 1/4 に当たる処理場で  $\text{NH}_4\text{-N}$  が 10 $\text{mg/L}$  以上で放流されていることが分かった。

また、 $\text{NH}_4\text{-N}$  は流入下水の平均 27 $\text{mg/L}$  に対し、処理水 6.5 $\text{mg/L}$ 、放流水 6.2 $\text{mg/L}$  で下水処理により大きく減少

し、その除去率は処理水で 76%、放流水で 77%であった。処理方式別の NH<sub>4</sub>-N 除去率は、標準活性汚泥法が処理水、放流水でそれぞれ 66%、土壌被覆型礫間接触法が処理水で 25%、放流水で 40%、接触酸化法が処理水、放流水でそれぞれ 75%、好気性ろ床法が処理水で 92%、放流水で 94%、嫌気好気ろ床法が処理水で 50%、放流水で 45%、オキシデーションディッチ法が処理水、放流水でそれぞれ 98%であった。放流水に残存する NH<sub>4</sub>-N の濃度は、土壌被覆型礫間接触法、嫌気好気ろ床法、標準活性汚泥法の処理場で 11~12mg/L、接触酸化法で 5.6mg/L、好気性ろ床法で 1.4mg/L、オキシデーションディッチ法で 0.69mg/L であり、下水処理方式の違いにより処理水、放流水に残存する NH<sub>4</sub>-N 濃度が異なることが確認された。

## 2. 生物応答手法による生態影響に係る調査

### 2. 1 活性汚泥処理プロセスにおける生物応答を用いたアンモニアの影響評価

昨年度の調査では活性汚泥処理実験装置を用いて硝化抑制運転を行い、得られた終沈流出水を用いてゼブラフィッシュのアンモニア毒性を調査した。その結果、終沈流出水（アンモニア性窒素濃度 13.0 mg/L）ではゼブラフィッシュに対し影響がないことを明らかにした。一方、下水処理場では終沈流出水をそのまま放出せず、塩素消毒を行った後環境中へ放出する。しかし硝化抑制条件下のような終沈流出水にアンモニアが多く存在する場合は、アンモニアが塩素と反応してクロラミンを生成するため、塩素とアンモニアの複合影響を考慮する必要がある。本調査では活性汚泥処理実験装置を用いて硝化抑制運転を行い、得られた終沈流出水に塩素（2 mg/L）を添加した条件下で生物応答試験を実施した。その結果、この条件ではムレミカツキモとニセネコゼミジンコで塩素の影響が強く生じることが明らかになった。流入下水を硝化促進または硝化抑制運転で活性汚泥処理した終沈流出水に塩素を添加し、ゼブラフィッシュの孵化率、生残率を検討した。その結果、硝化促進運転で活性汚泥処理した終沈流出水（低アンモニア濃度）に塩素を添加した排水試料では、ゼブラフィッシュに対する生物影響は発現しなかった。一方硝化抑制運転で活性汚泥処理した終沈流出水（高アンモニア濃度）に塩素を添加した排水試料では、ゼブラフィッシュに対する生物影響を強く受けることが明らかになった。その一因としてクロラミンが関与していることが考えられる。

### 2. 2 活性汚泥処理プロセスにおける生物応答手法を用いたニッケルの影響評価

昨年度の調査では、標準活性汚泥処理装置から採取した流入下水と終沈流出水に Ni を添加し、ニセネコゼミジンコの生残率と累積産仔数の検討を行い、終沈流出水に強く負の影響が生じることを明らかにした。そこで本調査では Ni で馴致された湖北下水処理場の標準活性汚泥処理装置から流入下水と終沈流出水を採取し、各排水試料に対するニセネコゼミジンコの生物影響を検討した。

始めに WET 試験で用いられる 3 種生物（ムレミカツキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ）の Ni に対する影響を検討したところ、ニセネコゼミジンコが最も強い負の影響を受けることが明らかになった。そこでニセネコゼミジンコを用いて、Ni（100 Ni- $\mu$ g/L）で馴致された流入下水と終沈流出水の生物影響を評価した。その結果、流入下水より終沈流出水でニセネコゼミジンコの累積産仔数と生残率に強い負の影響が見られることが明らかになった。流入下水は有機物を多く含むことから、Ni は有機物と錯体を形成し、生物に直接影響を与えると考えられる Labile 態 Ni 濃度が流入下水で減少することがその原因として考えられた。しかし実際にキレート樹脂個相で Ni の形態を分けて測定すると、終沈流出水より流入下水の Labile 態 Ni 濃度が高く、Labile 態 Ni 濃度によりニセネコゼミジンコに対する影響を説明することはできなかった。そのため、排水中の Ni の影響には他の要因（Ni 以外の金属の存在、有機物等）を考慮する必要があると考えられる。

また、上記内容は調査の概要を記述したものであり、詳細は、「下水処理工程における化学物質等の除去特性及び生物影響に係る検討業務報告書、平成 30 年 3 月、国土交通省水管理・国土保全局下水道部（編集・発行：国立研究開発法人土木研究所）を参照されたい。

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

**(流域の水環境を的確・迅速に把握するための影響評価、モニタリング手法の開発)****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)**

担当チーム：水環境研究グループ (水質)

研究担当者：小川文章、對馬育夫、鈴木裕識、  
小森行也、花本征也**【要旨】**

医薬品等の化学物質のリスクを評価・管理するためには、河川水中の挙動を明らかにする必要がある。本チームではこれまでに、河川における医薬品の濃度変化に対して、底質への収着が重要な役割を担っていることを見出したが、底質中における存在実態や底質への収着機構は明らかとなっていない。そこで本年度では、多摩川中流域における現地調査と、多摩川水系、淀川水系、霞ヶ浦水系の 8 地点の河川底質を用いた収着試験を実施した。その結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が河川底質に蓄積されやすいことを明らかにした。また、試験溶媒のイオン強度、EDTA 濃度、pH を変化させた収着試験を行うことで、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。

キーワード：医薬品、河川、底質、収着、陽イオン交換反応

**1. はじめに**

近年、生活で使用され、下水道を通して河川水中に流出する医薬品類などの微量化学物質による河川水環境への影響が懸念されている。我が国の河川において、環境リスク初期評価により、一部の化学物質のリスクが示唆されている<sup>1,2)</sup>。そのため、河川水環境において微量化学物質の効率的な削減対策やリスクの管理を検討する必要がある。このような背景のもと、本研究課題では、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。

昨年度は、都市河川である多摩川流域において、医薬品既往の野外調査結果に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量から、調査区間に流入する負荷量および調査区間の最下流地点での負荷量に対する下水処理場への寄与率を推計し、下流地点の医薬品濃度に対して寄与率の高い下水処理場を把握した。この結果は、下水処理場の下流地点における濃度予測に繋がると思われる。一方で、河川水中の濃度をより正確に予測するには、水中の濃度変化に影響を及ぼす因子の詳細な検討が重要となる。

本チームではこれまでも、都市河川水中の医薬品の動態を明らかにすることを目的とし、東京都の多摩

川において医薬品の現地調査を行ってきた<sup>1)</sup>。また、室内実験により医薬品の分解・吸着性を明らかにし、河川における医薬品の減衰に対して、底質への収着が重要な役割を担っていることを見出した<sup>2)</sup>。しかし、都市河川における底質中の医薬品の蓄積実態は不明な点が多い。そこで、本年度は、現地調査により、多摩川を対象に河川水、底質中における医薬品の存在実態を把握した。また、底質への収着をモデル化するために、医薬品の底質への収着機構を明らかにする必要がある。そこで、より広範囲の河川で採取した底質を用いて医薬品の収着試験を行い、医薬品の底質への収着機構の解明を試みた。

**2. 方法****2.1 現地調査**

多摩川の日野橋と関戸橋において河川水と底質を採取し、医薬品 6 物質 (azithromycin : マクロライド系抗菌剤、clarithromycin : マクロライド系抗菌剤、crotamiton : 鎮痒剤、ketoprofen : 解熱鎮痛剤、levofloxacin : キノロン系抗菌剤、sulfamethoxazole : サルファ剤) の分析を行った。河川水中の医薬品は、ろ過、固相抽出を行った後、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) により測定、サロゲー

ト法により定量した。底質中の医薬品は、メタノール：超純水=1：1 にアンモニアを 0.3%含めたものを溶媒とし、室温で2日間振とうして抽出した。抽出液をろ過し、ろ液をメタノールの含有割合が 5%以下となるように超純水で希釈したものを、河川水と同様の方法で分析した。

## 2.2 収着試験

淀川水系の桂川（羽束師橋、宮前橋）、西高瀬川、古川、多摩川水系の多摩川（日野橋、関戸橋）と浅川、霞ヶ浦水系の桜川の計 8 地点から採取した底質を用い、経済協力開発機構（OECD）の試験ガイドライン（No. 106）<sup>3)</sup>に準拠して、以下の手順で医薬品の収着試験を行った。底質を風乾した後、2mm のふるいにかけて、ガラス製遠沈管に入れた。超純水に塩化ナトリウムが 100mM、アジ化ナトリウムが 0.02%、医薬品が各 1 μg/L となるように添加した。アジ化ナトリウムは試験中における医薬品の生分解を抑えるために用いた。この溶液を遠沈管に注ぎ、20℃の暗所においてローテータで 3 日間攪拌した後、溶液中と底質中の医薬品の濃度を 2.1 に示した方法で分析した。底質中濃度を溶液中濃度で除したものを収着平衡定数とした。

医薬品等の化学物質の底質への収着機構には、大きく分けて、疎水性相互作用、イオン交換反応、金属錯体形成反応が考えられる。本研究では、医薬品の中でも、底質への収着性が特に高いと考えられ、生態リスクが懸念されている<sup>4)</sup>マクロライド系抗菌剤の azithromycin と levofloxacin を対象とし、収着試験の溶媒（塩化ナトリウム水溶液）の pH（6.5、11.6）、イオン強度（NaCl：100mM、10mM）、エチレンジアミン四

酢酸（EDTA）濃度（0mM、10mM）を変化させることで収着機構の解明を試みた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 多摩川の河川水と底質における医薬品の分配

多摩川の河川水と底質における医薬品の濃度と濃度比（底質中濃度を河川水中濃度で除したもの）を表 1 に、河川水中濃度と底質中濃度をプロットしたグラフを図 1 に示す。Ketoprofen 以外の 5 物質は、両地点において河川水、底質から検出され、濃度比が定量された。Crotamiton と sulfamethoxazole は濃度比が 10 (L/kg) 未満と低く算出され、底質に収着しにくいことが示唆された。一方で、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin は濃度比が 158~1625 (L/kg) と高く、底質に蓄積されていた。

対象とした医薬品 6 物質のうち、これまでの現地調査において多摩川で 0.10 (h<sup>-1</sup>) 以上の速い速度で減衰した医薬品は、ketoprofen、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 4 物質であった<sup>1)</sup>。また、過去の室内実験の結果から、主な減衰要因は、ketoprofen では太陽光による光分解、azithromycin と clarithromycin では底質への収着、levofloxacin は光分解と収着の両方であることが示唆されている<sup>2)</sup>。以上より、本年度の調査により、底質への収着の影響が示唆されていた 3 物質が、実際に多摩川の底質に蓄積していることが明らかとなり、これまでの研究で得られていた仮説が支持された。また、多摩川ではほとんど減衰しなかった crotamiton と sulfamethoxazole は濃度比（底質/河川水）も低く、この点においてもこれまでの成果と調和した。

表1 多摩川における医薬品の河川水・底質中濃度と濃度比

	河川水中濃度 (ng/L)		底質中濃度 (ng/g-dry)		濃度比 (L/kg-dry) <sup>1)</sup>	
	日野橋	関戸橋	日野橋	関戸橋	日野橋	関戸橋
Azithromycin	102.1	54.9	89.7	89.2	879	1625
Clarithromycin	245.2	172.2	38.8	29.5	158	171
Crotamiton	390.4	390.0	2.8	2.3	7	6
Ketoprofen	<i>N.D.</i> <sup>2)</sup>	2.1	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.A.</i> <sup>2)</sup>	<i>N.A.</i>
Levofloxacin	159.5	154.4	146.4	160.4	918	1039
Sulfamethoxazole	100.6	109.3	0.1	0.1	0.9	0.5

1: 底質中濃度を河川水中濃度で除したもの  
2: *N.D.* (検出下限値以下)、*N.A.* (データなし)

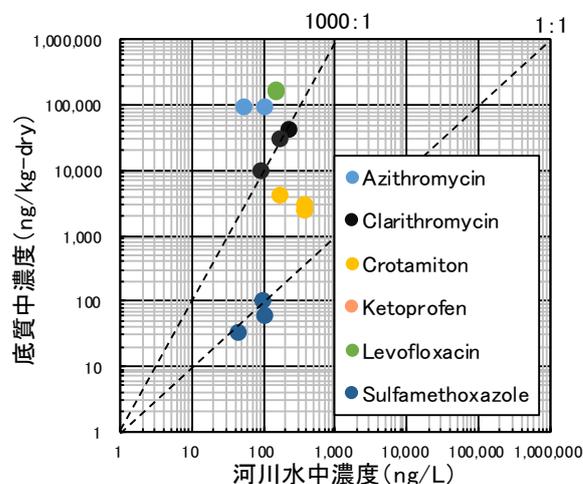


図1 6種の医薬品における河川水と底質の濃度比較

### 3.2 医薬品の底質への収着機構

イオン強度、EDTA濃度、pHを変化させた溶媒におけるazithromycinとlevofloxacinの底質への収着平衡定数を図2に示す。Azithromycinは分子内に2つのアミノ基を有しており、 $pK_a$ はそれぞれ8.7と9.5であり、levofloxacinはアミノ基の $pK_a$ が8.0、カルボキシル基の $pK_a$ が5.5である。従って、pH=6.5の中性溶液中では、両物質ともに分子内のアミノ基が正電荷を帯びており、共存陽イオン濃度の増加により、陽イオン交換が抑制される。本実験では、ナトリウムイオン濃度の増加により医薬品の収着平衡定数が5~7倍程度低下していた(図2:溶媒AとBの比較)。また、低下の

程度を他物質の文献値と比較したところ、陽イオン交換が主な収着機構である有機化学物質に対する報告値と類似であった(図3)。従って、azithromycinとlevofloxacinに対しても、陽イオン交換が主要な収着機構であることが示された。また、EDTAは底質の負電荷サイトに吸着している交換性の金属イオンや底質の鉱物中に含有される金属元素と錯体を形成するため、医薬品の金属錯体形成反応による底質への収着を抑制する。本実験では、EDTAの添加による医薬品の収着平衡定数の変化はほとんどなかったことから(図2:溶媒BとCの比較)、金属錯体形成反応の影響は小さいと考えられた。また、pH=11.6の塩基性溶液中にお

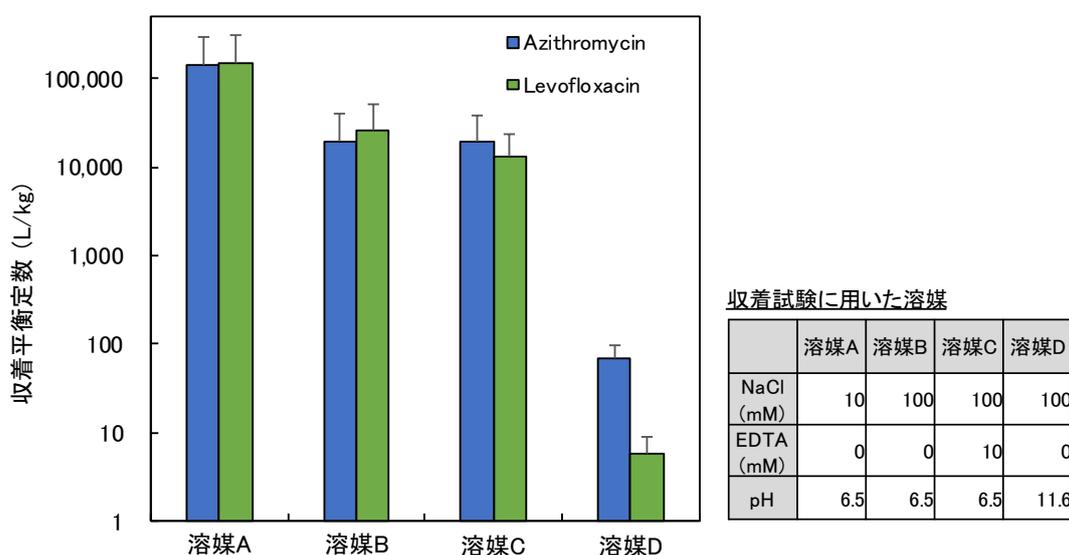


図2 各種溶媒におけるazithromycinとlevofloxacinの底質への収着平衡定数

(棒グラフとエラーバーは8カ所の河川底質における平均値と標準偏差を示す)

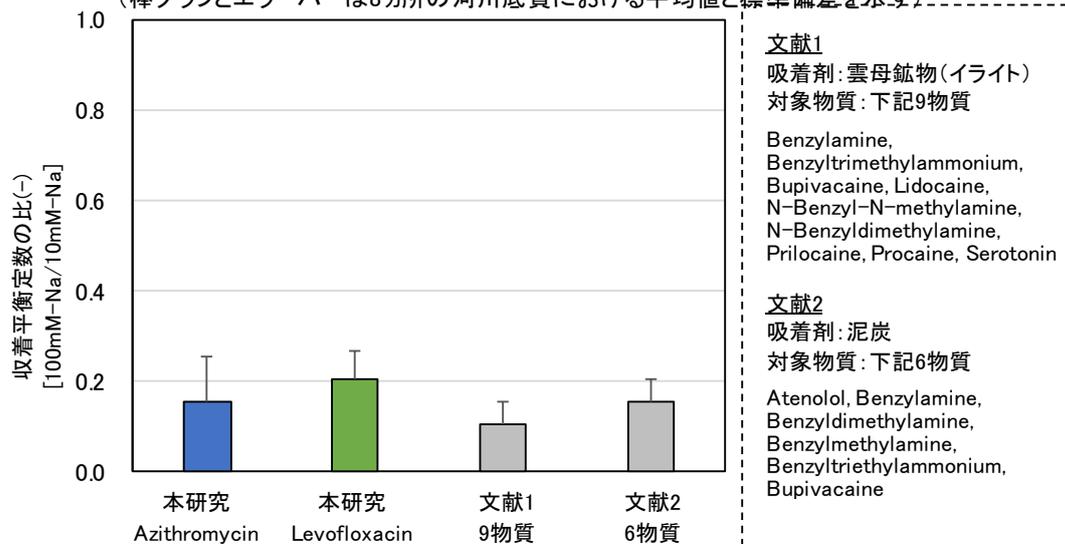


図3 Azithromycinとlevofloxacinの収着平衡定数のイオン強度依存性と報告値との比較

(文献1, 2は本文の参考文献5, 6に対応する。文献1, 2の対象物質は全てアミンであり、陽イオン交換が主な収着機構だと考えられる有機化学物質である。棒グラフとエラーバーは平均値と標準偏差を示す。)

いては、azithromycin と levofloxacin のアミノ基は帯電していないため、陽イオン交換反応は生じない。本実験では、塩基性溶液中において、医薬品の収着平衡定数が大幅に低下していたことから（図 2：溶媒 B と D の比較）、陽イオン交換反応の重要性が示され、前述の結果と調和した。塩基性溶液中（溶媒 D）においては、azithromycin は分子態、levofloxacin は陰イオンとして存在しており、疎水性相互作用や陰イオン交換の影響は小さいことが示された。

#### 4. まとめ

現地調査により、多摩川の河川水と底質における医薬品 6 物質の存在実態を明らかにし、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が底質に蓄積されていることを見出した。これにより、これまでの研究において底質への収着の影響が示唆されていたこれら 3 物質が、底質に蓄積されやすいことが明らかになった。また、溶媒のイオン強度、EDTA 濃度、pH を変化させた収着試験により、対象医薬品の中でも収着性が特に高い azithromycin と levofloxacin に対して、河川底質への収着機構を検討した。その結果、これら 2 物質の底質への収着は、主に陽イオン交換反応によるものであること、疎水性相互作用や金属錯体形成反応はほとんど影響していないことが明らかになった。今後は、さらに河川中の動態の検討を進め、得られた動態パラメータを組み込んだ流域モデルによる河川水中濃度予測に取り組む。将来的には、それにより得られる情報から下水処理場での微量化学物質の削減対策やリスク評価・管理方策を検討していく予定である。

#### 参考文献

- 1) 岡本誠一郎、小森行也、北村友一、真野浩行、水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、平成 27 年度研究成果報告書、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-project/2015/pdf/ju-10.pdf>（2018 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、2017 年 3 月
- 3) Adsorption-desorption using a batch equilibrium method, OECD test guidelines for chemicals No. 106, 1995
- 4) Mano, H. and Okamoto, S., Preliminary ecological risk assessment of 10 PPCPs and their contributions to the toxicity of concentrated surface water on an algal species in the middle

basin of Tama River. *J. Water Environ. Technol.*, 14(6), 423-436, 2016

- 5) Droge, S.T.J and Goss, K.-U., Sorption of Organic Cations to Phyllosilicate Clay Minerals: CEC-Normalization, Salt Dependency, and the Role of Electrostatic and Hydrophobic Effects. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 14224-14232, 2013
- 6) Droge, S.T.J and Goss, K.-U., Effect of Sodium and Calcium Cations on the Ion-Exchange Affinity of Organic Cations for Soil Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 5894-5901, 2012

(水質リスク軽減のための処理技術の開発)

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

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：小川文章、對馬育夫、小森行也

【要旨】

都市河川で検出される微量化学物質の中には、下水道を経由して到達したものが存在すると考えられる。河川水中に存在する微量化学物質を効率的に削減するためには、下水処理水中に存在する微量化学物質の除去技術開発が必要である。本年度は、下水処理水中の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）の微生物担体処理による削減に関して処理条件（水温）の検討と下水処理水中に残存する医薬品類の除去技術について検討した。  
 キーワード：LAS、医薬品類、微生物担体処理、微生物叢解析

1. はじめに

環境中で検出される多様な化学物質による汚染の実態や環境影響に対する関心、懸念が高まっており、安全で快適な水環境の実現・保全に向けた取り組みが求められている。

平成 25 年 3 月には直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（LAS）が水生生物の保全に係る水質環境基準項目として追加された。LAS は下水処理の標準活性汚泥法で 99%以上除去<sup>1)2)3)</sup>されるが、回転生物接触法、礫間接触酸化法、好気性ろ床法、接触ばっき法、高速散水ろ床法の LAS 除去率は 87%~100%<sup>3)</sup>であり、なかには放流水の LAS 濃度が環境基準値（河川・生物特 A：0.02mg/L）の 10 倍を超える値も観測されたところがあったとされている。LAS は、排水規制化も視野に取り扱いが検討されていることから、放流水中に存在する LAS の低減手法の検討が必要である。

また、下水には有機汚濁物質の他、微量の化学物質が含まれているが、日常生活において多く使用されている化粧品、医薬品類もその一つである。下水処理における医薬品類の除去特性については多くの調査報告<sup>4)5)6)</sup>がみられその実態が明らかになりつつある。医薬品類の中には水生生物への影響が懸念される物質もあることから、生物影響の視点で下水処理水中の医薬品類の評価<sup>6)</sup>もなされている。下水処理水又は排水中の医薬品類の処理については物理化学処理による調査報告<sup>7)11)</sup>が多くみられるが生物処理による除去技術についての報告は少ない。

平成 29 年度は、下水処理水中に残存する LAS の微生物担体処理と下水処理水中に残存する医薬品等のスポンジ担体処理について検討を行った。なお、医薬

品等のスポンジ担体処理は（株）西原環境との共同研究により実施した。

2. 下水処理水に残存する LAS の微生物担体処理

2.1 実験方法

2.1.1 実験装置

微生物担体処理実験装置のフローを図-1 に示す。嫌気好気ろ床法の下水処理場に実験装置を設置し実験を行った。反応槽（A）は容量 5.6L の槽を 3 つ、反応槽（B）は容量 10L の槽を 4 つ連結した。

各反応槽にはポリプロピレン製の中空円筒状の微生物保持担体（4mmOD×3mmID×5mmL）を担体添加率 35%（嵩比率）で投入した。また、反応槽（B）はヒーターを投入した恒温水槽を用いて水温コントロールを可能にした。微生物保持担体は、実下水を流入水と

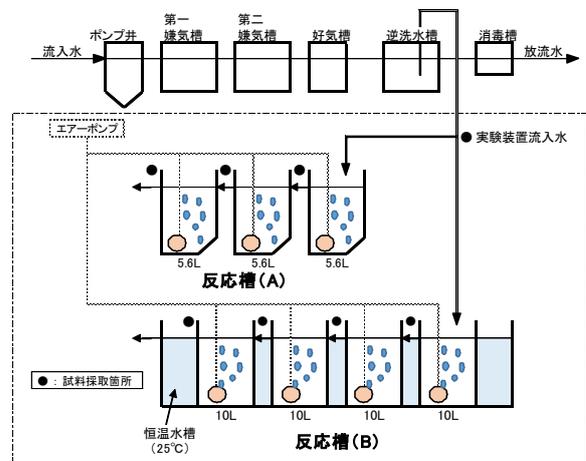


図-1 微生物担体処理実験装置のフロー

した活性汚泥処理実験プラントの二次処理水で数ヶ月間馴致したものを投入した。反応槽 (A) の流入水量は 79mL/min、反応槽 (B) の流入水量は 190mL/min とし、それぞれの反応槽全体の処理時間 (HRT) は 3 時間に設定した。実験装置流入水は、本施設の逆洗水槽の処理水を定量ポンプにより連続注入した。

### 2.1.2 試料採取と分析方法

試料採取は、平成 29 年 12 月～平成 30 年 1 月にかけて数回行った。試料採取はスポット採取とし、採取試料は LAS の保存性<sup>12)</sup>を考慮し分解を抑えるため直ちに氷水に浸けて冷却した。また、試料採取後、各反応槽の水温測定と流入水量の確認を行なった。

LAS の分析は、「水質汚濁に係る環境基準について (平成 26 年 11 月 17 日環境省告示第 126 号)」の付表 12 に示す方法により行った。また、有機物指標として DOC を下水試験方法-2012 年版 (公益社団法人日本下水道協会) に示す方法により分析した。

## 2.2 実験結果

### 2.2.1 形状・容量が異なる反応槽の LAS 除去特性比較

実験に用いた微生物担体処理実験装置の反応槽 (A)、反応槽 (B) は、その形状・容量が異なることから実験装置の違いによる LAS 除去特性の比較を行った。実験装置の運転開始から約 2 週間後に採取した試料の LAS 分析結果を図-2 に示す。試料採取時の反応槽水温は、反応槽 (A) が 10.4～12.2℃ (平均 11.3℃)、反応槽 (B) が、10.7～12.9℃ (平均 11.7℃) であった。図-2 に示されるように反応槽 (A)、反応槽 (B) の LAS 除去に大きな違いは見られず、HRT が長くなるに従い大きく減少した。反応槽の形状・容量が異なる反応槽 (A)、反応槽 (B) においても LAS 除去特性は同等であることが確認された。

また、有機物指標の DOC 分析結果を図-3 に示す。

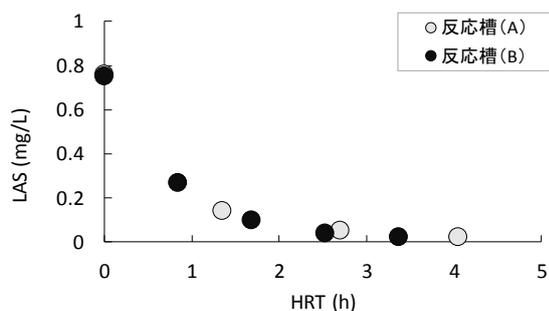


図-2 反応槽 (A)、(B) の LAS 除去特性

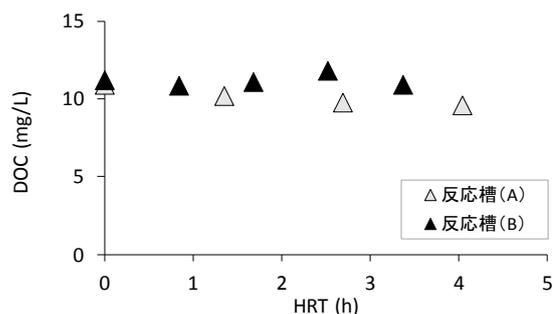


図-3 反応槽 (A)、(B) の DOC 除去特性

DOC として測定される溶解性有機物濃度に大きな変化はみられず、微生物担体処理では下水処理水に残存する有機物はほとんど除去されないことが確認された。

### 2.2.2 反応槽水温と LAS 除去の関係

水温コントロール無しの反応槽とヒーターを用いて水温コントロールした反応槽の LAS 除去特性を図-4 に示す。前述の 2.2.1 形状・容量が異なる反応槽の LAS 除去特性比較で得たデータも併せて図中に示した。水温コントロール無しの反応槽の水温は 10～13℃ (平均 11℃)、水温コントロールした反応槽の水温は 19～22℃ (平均 21℃) であった。実験は複数回行っており、流入水の LAS 濃度は 0.75～1.3mg/L であった。図-4 に示すように両反応槽とも約 2 時間の処理で LAS 濃度は環境基準の河川・生物特 A で設定された基準値 0.02mg/L の 10 倍濃度 (0.2mg/L) 以下となった。

また、有機物指標の DOC 分析結果を図-5 に示す。DOC 濃度は、反応槽水温が 11℃では、HRT が長くなっても大きな変化は見られないが、水温 21℃では 20% 程度の減少がみられた。反応槽水温を 21℃程度に加温することにより、下水処理水に残存する有機物を約 20%除去できることが分かった。

各調査の流入水 LAS 濃度が異なることから、それ

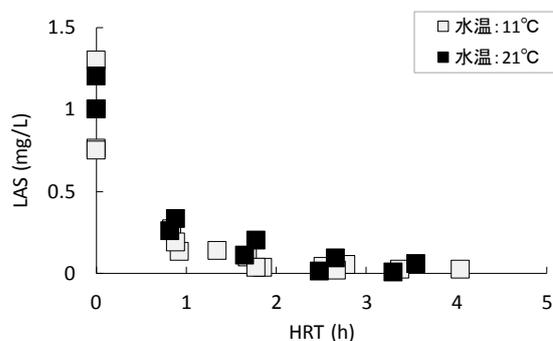


図-4 異なる反応槽水温における LAS 除去特性

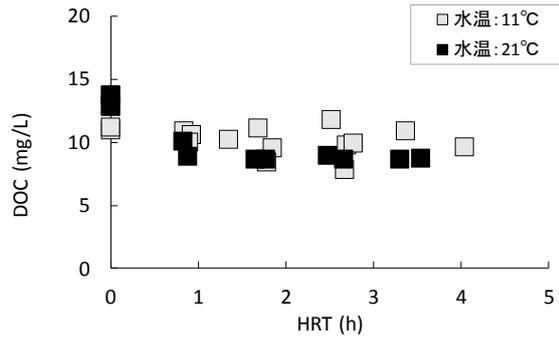


図-5 異なる反応槽水温における DOC 除去特性

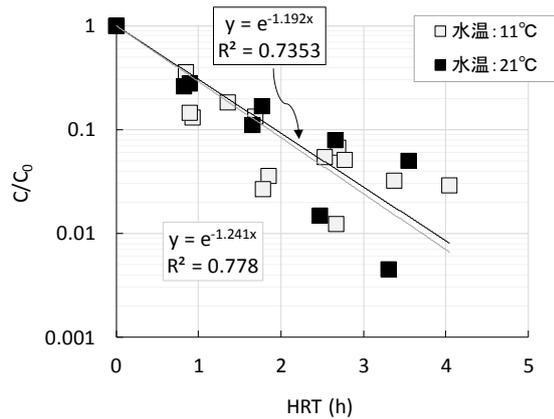


図-6 異なる反応槽水温における LAS 除去速度

ぞれの実験装置流入水の LAS 濃度を  $C_0$ 、微生物担体処理水の LAS 濃度を  $C$  として  $C/C_0$  を算出し、HRT と  $C/C_0$  の関係を図-6 に示す。 $C/C_0$  の減少が 1 次反応と仮定し反応係数  $k_1$  (1/h) を求めた。

バラツキが見られるものの反応槽水温 11°C で反応係数 1.19、反応槽水温 21°C で反応係数 1.24 が求められた。この関係式より、反応槽の平均水温が 11°C、21°C とともに LAS 除去率 90% を得るのに必要な処理時間 (HRT) は、約 2 時間であることが分かる。また、99% 除去には約 4 時間の処理時間が必要である。

### 3. 下水処理水に残存する医薬品等のスポンジ担体処理

#### 3.1 実験方法

##### 3.1.1 実験装置

実験装置フローを図-7 に示す。実下水を実験装置に流入させ、活性汚泥法による二次処理を行い、得られた処理水を砂ろ過装置でろ過し、ろ過水を試験原水としてスポンジ担体による高度処理実験を行った。ろ過水は曝気により担体を片旋回流で流動させる曝気流動槽 (担体添加率 40%) と、担体を槽に充満させて固

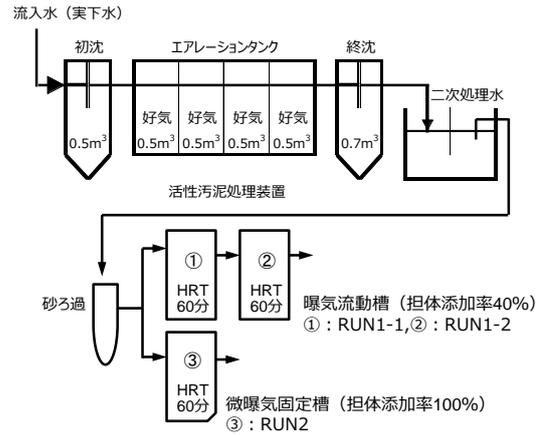


図-7 実験装置フロー

定し、微曝気を行う微曝気固定槽 (担体添加率 100%) の 2 つにそれぞれ流入させて実験した。各槽の理論滞留時間は 60 分ずつとし、曝気流動槽では滞留時間ごとの処理性を評価するため 2 槽直列として、1 槽目と 2 槽目で処理水を比較した。

##### 3.1.2 実験条件

本試験の実験条件を表-1 に示す。本実験で使用した担体は前年度の実験<sup>13)</sup>で使用した担体を含む馴養後の担体を引き続き利用した。RUN1 は直列の 1, 2 槽目をそれぞれ RUN1-1、RUN1-2 とした。また、RUN2 の流入部付近を RUN2-1、流出部付近を RUN2-2 と区別し、運転終了時に担体を採取し、菌叢解析を行った。

表-1 実験条件

	RUN1		RUN2
	RUN1-1	RUN1-2	
試験槽種類	曝気流動槽		微曝気固定槽
試験原水	二次処理水 砂ろ過水	RUN1-1の 流出水	二次処理水 砂ろ過水
薬品添加	なし	なし	なし
担体添加率 [%]	40	40	100
HRT [分]	60	60	60
曝気状態	片旋回流	片旋回流	全面 微曝気
装置容量 [L]	8	8	6
実験期間 (サンプリング)	2017年 11~12月	2017年 11~12月	2017年 11~12月
備考	図-7中の①	図-7中の②	図-7中の③

##### 3.1.3 菌叢解析

処理槽内の担体に付着する微生物担体の付着細菌について、16S rRNA 遺伝子配列に基づき菌叢解析を行った。採取した担体は液体窒素により凍結させ、粉

砕した後、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (日鉄住金環境) を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的としたプライマーを用い、PCR 増幅を行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics) を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3 (600 サイクル、Illumina) を用いて解析した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking およびクラスター解析は QIIME を用い、97%以上の相同性を持つ配列を同一 OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13\_9 をリファレンスとした。

### 3.2 実験結果

#### 3.2.1 医薬品類の除去特性

各実験条件における物質ごとの除去率を表-2 に示す。RUN1 では、生物処理をさらに向上させるため RUN1-1 から 1-2 へとそれぞれ 60 分ずつ合計 120 分の HRT とし、その影響を検討した。また、RUN2 では、生物分解速度が遅いと考えられる物質の除去率をさらに向上させるため、こうした物質の除去に関わると考えられる増殖速度の遅い微生物を担体流動槽に比べ保持しやすい担体固定槽を用い、さらにこれを微曝気することによって、曝気なしの場合に比べ、より好気的な条件とすることで改善を図った。上記に加え、原水の SS 増減による処理への影響が考えられたので、原水を二次処理水のろ過水に変更した。

RUN2 で AZM と CAM の平均除去率はそれぞれ 78%、58%であり、RUN1-2 の結果のそれぞれ 25%、2.8%を上回った。しかし、TCS の平均除去率は RUN2 の 10%に対し、RUN1-1 で 39%、RUN1-2 で 53%と、曝気流動槽の HRT の 120 分が良好であった。RUN1 では HRT が長い条件で、AZM、CAM、TCS のいずれの除去率も高くなる傾向だが、RUN2 の微曝気担体固定槽と比べると、担体の流動による影響が大きい条件も考えられる

RUN1 および 2 の実験期間で各実験装置の担体を採取し、生物付着量を測定して槽内の MLSS 濃度に換算した。各実験装置の MLSS と DO 測定の結果を表-3 に示す。RUN1-1、1-2 の MLSS は同程度で平均値を RUN1 の MLSS とした。担体を流動させない RUN2 はそれらに比べ 3~4 倍程度多い MLSS であった。また、DO は各条件ともに 1mg/L 以上であり好気的な条件であっ

表-2 各実験条件における物質ごとの除去率

		RUN1-1	RUN1-2	RUN2
AZM 除去率 [%]	平均	-1.5	25	78
	範囲	(-19~8.3)	(19~35)	(73~83)
CAM 除去率 [%]	平均	-14	2.8	58
	範囲	(-25~-2)	(-2~16)	(51~63)
TCS 除去率 [%]	平均	39	53	10
	範囲	(35~48)	(47~61)	(-14~33)

表-3 各実験装置の MLSS と DO (mg/L)

	RUN1		RUN2		
	MLSS	DO	MLSS	DO (入口)	DO (出口)
2017/11/21	400	6.5	1,740	1.2	6.6
2017/12/5	950	6.6	2,960	2.9	4.4
2017/12/19	720	6.6	2,660	5.3	5.1
平均	690	6.6	2,450	3.1	5.4

た。

各物質の反応速度を図-8 に、各 RUN の平均 MLSS から求めた単位 MLSS 当りの反応速度定数を表-4 に示す。データは 2 点ではあるが、これまでの研究成果から調査対象の各物質の微生物担体処理における除去が一次反応で近似できると考えた<sup>2)</sup>。単位 MLSS 当りの AZM、CAM の反応速度は RUN2 が RUN3 に比べそれぞれ 3 倍、15 倍程度であり、TCS は逆に RUN1 が

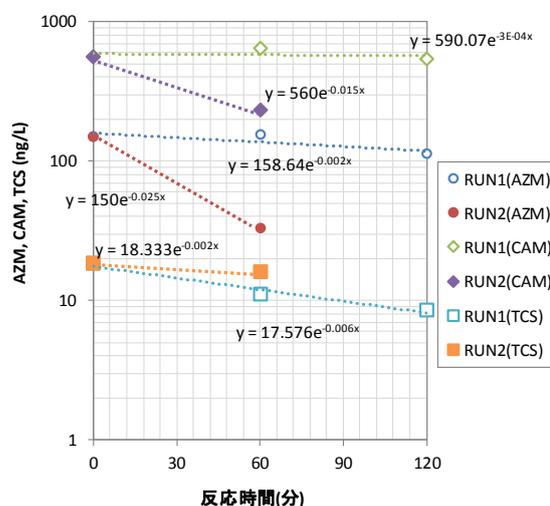


図-8 各物質の反応速度

表-4 各 RUN の単位 MLSS 当たりの反応速度定数 (ng/(g-MLSS・時))

対象物質	RUN1	RUN2
AZM	-0.17	-0.61
CAM	-0.026	-0.37
TCS	-0.52	-0.05

RUN2 の9倍となった。

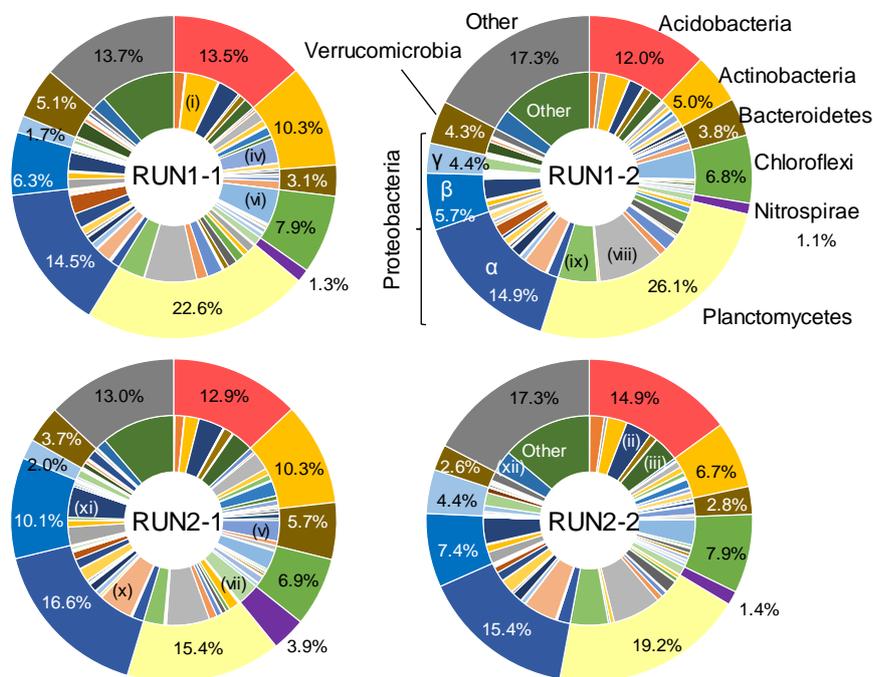
各物質の反応速度の違いについて、担体の流動に起因する担体に付着する生物の蓄積・更新が影響したのではないかと考えられる。RUN1-1 と RUN2 では同じ水質・容積負荷の流入水があるが、担体添加率40%のRUN1-1 に比べて、100%のRUN2 は担体1L 当たりの生物付着量が多かった。

RUN1 では担体の流動によって担体同士や水槽内壁と接触するため、生物膜が物理的に剥離し流出したと考えられる。一方、RUN2 では担体の流動がないため生物保持力が高かった。

AZM、CAM は生物による吸着と分解が進むため、分解微生物が有効に保持されたRUN2 で除去効果が高かったのではないかと考えられる。TCS は生物分解よりも吸着が主な除去メカニズムといわれており、担体が流動することによって、生物が更新されると考えられるRUN1 で除去率が高かったのではないかと考えられる。したがって、AZM、CAM と TCS では生物処理のメカニズムが異なるため、それぞれに適した処理条件があることが考えられる。

塩基配列解析の結果、各サンプルから取得した約1~3万リードの塩基配列から、約1,000個のOTUが得られ、系内に0.1%存在する属以上の近縁な分類ができた。図-9に各サンプルにおける門レベルおよび属レベルの菌叢解析結果、図-10に各サンプルの類似度をウォード法によるクラスター解析結果を示す。RUN1-1、1-2 は表-1の実験条件のRUN1-1、1-2を、RUN2-1、2-2 は同様にRUN2を示すが、RUN2-1は固定されている担体のうち、原水流入部の担体をサンプリングし、RUN2-2は流出部の担体をサンプリングしていることを指している。担体が流動し、槽内が完全混合のRUN1の条件に比べ、担体が固定され、押出流れに近いと考えられるRUN2では原水流入部と流出部で菌槽に違いがある可能性を考慮した。菌叢を構成する主な門はProteobacteria、Planctomycetes、Acidobacteria、Actinobacteria、Chloroflexiで、どの系からも比較的高い割合で検出され、また、それぞれの細菌構成も類似していたが、クラスター解析の結果、RUN1、RUN2が別々のクラスターに分類され、2カ月という比較的短期間の実験であったが、リアクターの運転条件が菌叢構成に大きな影響を与えていることが確認された。また、Proteobacteriaの中では、

### 3.2.2 菌叢解析



(i) Acidobacteria group 6 (mb2424), (ii) Solibacterales, (iii) Chloracidobacteria RB41 Ellin6075, (iv) *Rhodococcus* sp., (v) Chitinophagaceae, (vi) Caldilineaceae, (vii) *Nitrospira* sp., (viii) Pirellulaceae, (ix) *Planctomyces* sp., (x) Rhizobiales, (xi) Comamonadaceae, (xii) *Meiothermus* sp.

図-9 菌叢解析結果 (外側：門レベル、内側：属レベル)

RUN2 の流入部付近を RUN2-1、流出部付近を RUN2-2 と区別している。

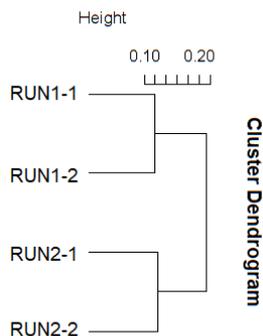


図-10 サンプル間のクラスター解析  
(属レベル)

Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteriaの順で検出され、RUN1では平均14.7%、6.0%、3.1%の検出割合であったのに対して、RUN2では平均16.0%、8.8%、3.2%とRUN1に比べ若干高い割合で検出された。Proteobacteriaに限ったことではないが、細菌叢の違いはRUN1とRUN2の運転条件の最も異なる部分である曝気方式に対する細菌の酸素要求性の違いによるものと思われる。属レベルの分類では、Pirellulaceae科(Planctomycetes門)に近縁な細菌が最も高く、次いで、同じくPlanctomycetes門に属するPlanctomyces sp.がどの系からも高頻度で検出され、特に、RUN1はRUN2に比べ高頻度で検出された。通常の下水処理プロセスにおける活性汚泥からはPlanctomycetes門が高頻度で検出されることは極めて稀で、優占化していた細菌は、後段処理という低BOD下における貧栄養的な環境を好む好氣的従属栄養細菌であると思われる。Planctomycetes門には嫌氣的アンモニア酸化(Anammox)細菌が含まれるが、今回、菌叢解析を行ったサンプルからは、Anammox細菌として知られるBrocadia属やScalindua属は検出されなかった。Planctomyces sp.の次に多く検出されたのは、Caldilineaceae科(Chloroflexi門)に含まれる細菌で、どの系からも3.1-6.0%の割合で検出された。一般的に、Chloroflexiは糸状性細菌で、下水処理場においてはバルキングの原因細菌とされるが、膜分離活性汚泥法等からも検出されており、難分解性有機物の分解に関与する種もいることが報告されており、本実験系においても難分解性物質の分解に関与している可能性が考えられる<sup>14)</sup>。また、Actinobacteria門は、RUN1、RUN2ともに、流入部付近で多く、後段では検出割合が低下した。Mycobacterium属のような多環芳香族化合物を

分解すると考えられる細菌は、医薬品のような難分解性物質の分解に寄与しているものと考えられる<sup>15)</sup>。Alphaproteobacteria綱Rhizobiales目に含まれる細菌も全ての系から検出された。Rhizobiales目には、紅色非硫黄光合成細菌および絶対好気性光合成細菌が含まれ、細胞が固形物に付着すると、その一端から新しい細胞が出芽状に伸びて菌糸状になるものも知られている。そのため、微生物担体から高頻度で検出されたと考えられる。未分離培養門であるDeinococcus-Thermi門に含まれるMeiothermus sp.は、RUN1-1、RUN2-1に比べ、RUN1-2、RUN2-2で、より多く検出された。Meiothermus sp.は一般に化学合成有機従属栄養細菌であるが、一部、硝酸呼吸することが知られている。

## 4. まとめ

### 4.1 下水処理水に残存するLASの微生物担体処理

- 1) LAS濃度が0.75~1.3mg/Lの流入水を微生物担体処理したところ、流入水中のLASは約2時間の処理で環境基準の河川・生物特Aで設定された基準値0.02mg/Lの10倍濃度(0.2mg/L)以下となった。
- 2) 微生物担体処理におけるLAS除去を1次反応と仮定し反応係数 $k_1$ (1/h)を求めたところ反応槽水温11℃は反応係数1.19、反応槽水温21℃は1.24が求められた。
- 3) 反応槽の水温が11℃、21℃の反応槽でLAS除去率90%を得るのに必要な処理時間(HRT)は約2時間、99%では約4時間であった。
- 4) 微生物担体処理における水温の影響について、反応槽水温が11℃と21℃でLAS除去特性を比較したところ、LAS除去速度に大きな違いはみられなかった。

### 4.2 下水処理水に残存する医薬品等のスポンジ担体処理

- 1) HRTの増加によってAZM、CAM、TCSの除去率改善がみられた。
- 2) AZM、CAMは分解菌が多く保持されると考えられるRUN2の条件で除去率が高い結果となった。
- 3) TCSは吸着が主な反応と考えられ、生物が更新されるRUN1の条件はRUN2のような担体当たりの生物付着量が多く生物の入れ替わりが少ないと考えられる条件に比べ除去率が高い結果となった。
- 4) 医薬品等の生物分解しにくい微量化学物質では、同じような好気性生物処理であっても、対象物質ごと

に適した処理条件があると考えられ、担体付着生物の SRT（固形物滞留時間）によると考えられる。

- 5) それぞれの系から採取したサンプルの菌叢解析の結果、0.1%以上の割合で検出されるリードについて、近縁な種が同定できた。各菌叢構造は互いに類似するも、それぞれの環境に適した細菌構成に変化していることが示唆された。

なお、本調査は、運営交付金（一般勘定）により実施されたものである。

## 参考文献

- 1) 小森行也、岡本誠一郎. 下水処理における直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の除去特性, 第 50 回下水道研究発表会講演集, 346-348, 2013.
- 2) H.Temmink, Bram Klapwijk, Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in activated sludge plants, *Water Research*, 38, 903-912, 2004.
- 3) 小森行也、岡本誠一郎. 実下水処理場における直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)の除去特性, 第 51 回下水道研究発表会講演集, 307-309, 2014.
- 4) 小森行也、岡安祐司、鈴木穰. 下水処理における医薬品(92 物質)の除去特性, 45 回下水道研究発表会講演集, 91-93, 2008.
- 5) 成宮正倫、奥田隆、中田典秀、山下尚之、田中宏明、佐藤和志、末岡峯数、大岩俊雄. 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, 環境工学研究論文集, 46, 175-185, 2009.
- 6) Koya Komori, Kouki Murayama, Arata Harada, Yuji Okayasu, Mizuhiko Minamiyama and Yutaka Suzuki. Occurrence of 92 Pharmaceuticals in wastewater and their environmental risk in Japan. 4<sup>th</sup> EWA/WEF/JSWA specialty conference cutting-edge technologies and best practices on sewerage globally leading 21<sup>st</sup> century, 87-90, 2012.
- 7) 香川千絵、菊田友弥、浦瀬太郎. 医薬品の除去に対する膜分離活性汚泥法分離膜の付加効果, 水環境学会誌, 28(3), 207-210, 2005.
- 8) 浦瀬太郎、佐藤孝太. ナノろ過膜による医薬品の阻止特性, 水環境学会誌, 28(11), 657-662, 2005.
- 9) 尾崎博明、池嶋規人、深見晃司、児戸睦尚、松井三郎. 低圧逆浸透膜による医薬品類及び身体ケア製品由来物質(PPCPs)の分離特性と影響因子, 環境工学研究論文集, 44, 275-282, 2007.
- 10) 金一昊、山下尚之、田中宏明、田久保剛、岩崎達行. UVおよび UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた連続処理実験での下水 2 次処理水中の PPCPs の除去特性, 環境工学研究論文集, 44, 283-290, 2007.
- 11) 谷口省吾、尾崎博明、山田修. 多孔質セラミックス電極を用いた排水中医薬品の電気分解処理, 環境工学研究論文集, 44, 299-305, 2007.
- 12) 中村明広、八十島誠、小森行也、高菅卓三、岡本誠一郎. 下水中 LAS の保存性, 第 23 回環境化学討論会講演要旨集, 549-550, 2014.
- 13) 金子洋輔、對馬育夫、南山瑞彦、中村知弥、大日向祐介、山浦研二郎、永松真一. 微生物担体による微量化学物質の処理性の検討と菌叢解析, 第 54 回下水道研究発表会講演集, 922-924, 2017.
- 14) Yuki Miura, Yoshimasa Watanabe, and Satoshi Okabe. Significance of Chloroflexi in Performance of Submerged Membrane Bioreactors (MBR) Treating Municipal Wastewater. *Environmental Science and Technology*, 41(22), 7787-7794, 2007
- 15) Ainhua Rubio-Clemente, Ricardo A. Torres-Palma, and Gustavo A. Peñuela. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science of the Total Environment*, 478, 201-22, 2014.

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

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：小川文章、對馬育夫

### 【要旨】

本研究では、湖沼・ダム貯水池の水質改善に向け、並列型高速塩基配列決定装置（次世代シーケンサー）を用いた 16S rRNA 遺伝子および 18S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物モニタリングの開発に取り組んだ。細菌叢解析においては、ダム貯水池毎に特徴的な細菌叢構成になっていることが明確となり、地理的要因より水温等の影響を受け変化することが示唆された。また、アオコやカビ臭等の水質問題が生じていないダム貯水池では、検出される細菌の種類が少ないことが示唆された。植物プランクトンに関して、いくつかの真核生物種が同定された。キーワード：湖沼・ダム貯水池、次世代シーケンサー、細菌、植物プランクトン

### 1. はじめに

環境負荷増大による湖沼やダム貯水池の水質の悪化が長らく問題となっている。生物多様性国家戦略に基づいて、河川・湖沼などにおける水質の改善について「豊かな生態系の確保」の視点から調査が実施されているが、湖沼における環境基準達成率は約 50%と低い水準で推移している。現在まで、流域における流入負荷の削減の取り組みや湖沼底泥の浚渫等様々な取り組みが行われているが、依然としてアオコ・カビ臭発生等の問題は解決されていない。本研究では、プログラム達成目標の一つである「流域の水環境を的確・迅速に把握するための影響評価、モニタリング手法の開発」達成のため、湖沼・ダム貯水池などの停滞性水域を主な対象とし、底層の生態系保全や底泥からの溶出物質による水質汚濁の抑制を中心に対策手法の構築を目指す。

現在、気候変動に伴い、藻類の異常増殖の発生頻度の増加が懸念されている。湖沼水質を把握する上で、藻類等の植物プランクトンを同定・定量化することは非常に重要である。藻類の中にはカビ臭物質や毒性物質を生産するものもあり、水の安全性確保の観点からも湖沼・ダム貯水池における藻類のモニタリングは非常に重要である。従来、藻類モニタリングは、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われているが、同定には熟練した技術が必要で、対応できる技術者も限られており、形態により判断しているため、形態が非常に似通った植物プランクトンは判断が困難である場合がある。さらに、厳しい財政状況や省力化の観点

からも、効率的なモニタリング手法の構築が急務となっている。したがって、本研究は DNA 塩基配列に基づく藻類モニタリング解析手法の確立を目指し、ダム貯水池水質の維持管理に有効な手法の開発に取り組んでいる。H29 年度は、ダム貯水池から深度別にサンプリングした水試料を用い、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づき微生物分類を行い、分析方法の確認を行った。

### 1.2 ダム貯水池におけるカビ臭、アオコの現状

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

ダム貯水池において、カビ臭を引き起こす原因は、主に、①ラン藻の湖水中での増殖、②ラン藻の底泥での増殖、③放線菌の底泥での増殖/死滅があると考えられる。①では、*Anabaena* 属、*Aphanizomenon* 属が主に Geosmin を産生し、*Oscillatoria* 属や *Phormidium* 属が主に 2-MIB を産生する。②では、*Oscillatoria* 属や *Phormidium* 属が主に 2-MIB を産生する。大型の付着性ラン藻である *Phormidium Tergestinum* 等は 2-MIB を産生するとしてよく知られている。③では、放線菌の代謝により 2-MIB や Geosmin を産生する。両物質を放出する種もいれば、いずれかしか放出しない種もあり、環境因子により、産生する成分や量が異なるという報

告がある<sup>1)</sup>。また、嫌気条件下では死滅し、菌体内のカビ臭物質を放出する。これら以外にも、カビそのものが増殖し、カビ臭原因物質を産生していることも考えられる。

アオコに関しては、アオコを構成する種は Bacteria に分類されるラン藻とその他の真核生物に分類される植物プランクトンに大別される。ラン藻では *Mycrocystis* 属、*Anabaena* 属、*Aphanizomenon* 属、*Oscillatoria* 属、*Planktothrix* 属等が原因で、植物プランクトンでは、珪藻である *Synedra* 属、*Asterionella* 属、*Cyclotella* 属、*Melosira* 属、緑藻である *Closterium* 属、*Pediastrum* 属、*Scenedesmus* 属、*Botryococcus* 属、ユーグレナ藻である *Trachelomonas* 属、*Euglena* 属、渦鞭毛藻である *Peridinium* 属、*Gymnodinium* 属、黄緑色藻である *Uroglena* 属が原因で引き起こされる。

## 2. 実験方法

本研究では、北海道にある 4 箇所のダム貯水池 (A ダム、B ダム、C ダム、D ダムと表記) を対象に、次世代シーケンサー (Miseq, Illumina) を用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物分類を行った。湖水を採取した日を表 1 に示す。採水はダムサイト、湖心、上流で行い、表層、中層、底層の 3 箇所から採取した。ダム湖水 300 mL を遠心分離で 50 mL にまで濃縮し、懸濁したものから Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2(日鉄住金環境)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー(S-D-Bact-0341-b-S-17 および S-D-Bact-0785-a-A-21)にオーバーハンガアダプター配列を付加したものを用い、PCR 増幅を行った。PCR 反応条件は初期変性を 94°C で 30 秒行った後、乖離温度を 94°C で 5 秒、アニーリング温度を 58°C から 48°C で 1°C ずつタッチダウンで 30 秒、伸長温度を 72°C で 30 秒のサイクルを 10+30 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit(Beckman Coulter Genomics)を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3 (600 サイクル、Illumina)を用い、塩基配列を決定した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU) - picking およびクラスター解析は QIIME を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13\_8 をリファレンスとした。また、植物プランクトンの検出には、18S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー TAREuk454FWD1 および TAREukREV3 を用い、16S

表 1 湖水採水日と採水水深 (- はサンプルなし)

	Aダム	Bダム	Cダム	Dダム
4月	-	-	-	2017/4/24
5月	2017/5/8 2017/5/24	2017/5/19	2017/5/29	2017/5/24
6月	2017/6/14	2017/6/20	2017/6/29	2017/6/7
7月	2017/7/10	2017/7/25	2017/7/24	2017/7/12
8月	2017/8/9	2017/8/15	2017/8/30	2017/8/9
9月	2017/9/11	2017/9/26	2017/9/14	2017/9/27
10月	2017/10/11	2017/10/10	2017/10/17	2017/10/11
11月	2017/11/14	2017/11/13	2017/11/14	2017/11/9
12月	2017/12/1	-	-	-
1月	2018/1/17	2018/1/17	2018/1/16	-
2月	-	-	-	2018/2/1
採水層	0.5	0.5	0.5	0.5
水深 (m)	12.7 - 23.7	3.8 - 7.5	30.7 - 42.2	10.5 - 12.8
流域面積 (km <sup>2</sup> )	239	113	104	1,662
総貯水量 (10 <sup>6</sup> ・m <sup>3</sup> )	93	15.3	82.3	108

rRNA 遺伝子同様の方法で、ライブラリ調整を行った。

## 3. 結果と考察

標的とする 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域について、各サンプルにつき 10 万~30 万リードの塩基配列を明らかにした。環境における種の多様性を示す  $\alpha$  多様性解析の結果、各ダムサンプルから検出された OTU の合計は、B ダムおよび D ダムにおいて、他のダム貯水池より多く、細菌種の多様性が高いことが示された (図 1 上)。A ダムと C ダムは、比較的水質が良好なダム貯水池で特に異臭味やアオコ発生等の水質変化現象等は報告されていない。細菌種の多さも水質変化現象の兆候を捉える上で重要な因子となることが示唆された。サンプリング採取月で  $\alpha$  多様性を比較した場合 (採取日は表 1 を参照)、水温が上昇する 4 月から月で増加し、その後、徐々に低下し、融雪水が流入し、水温が最も下がる冬季から春季にかけて、細菌種の多様性が最も低くなった (図 1 中) ただ、この傾向はダム貯水池毎に若干異なり、B ダムでは、5 月から夏季、秋季にかけて増加していき、1 月から 2 月の冬季でも高い多様性を保ったままであった。一方、C ダムは、年間を通じて一定で推移していた。深度別で比較した結果 (採取水深は表 1 を参照)、表層より底層・中層で、多様性が高い結果となった。恐らく、底泥から溶出する栄養塩や微量元素を利用し増殖する細菌が存在していると思われる (図 1 下)。

サンプル間における細菌群集構造を比較するため行った  $\beta$  多様性解析の結果について、門レベルおよび属レベルの分類結果を図 2 に示す。門レベルの分類で

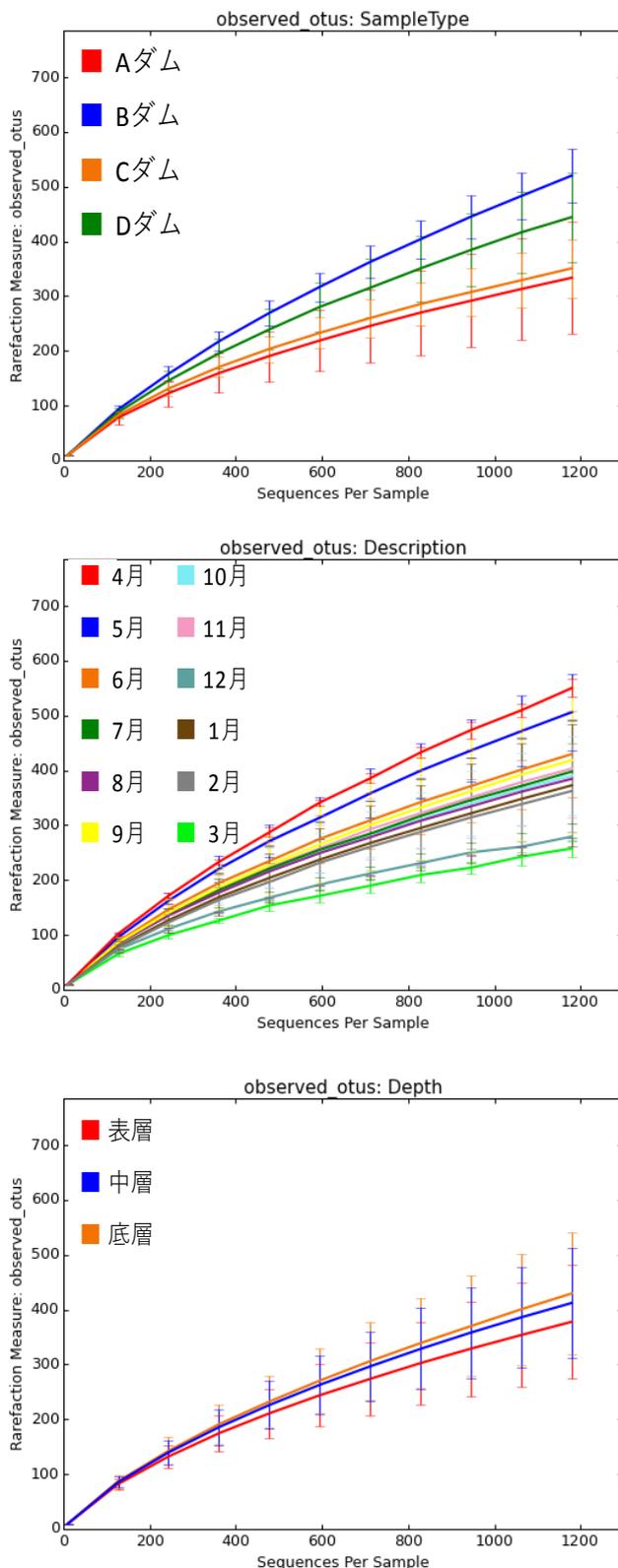


図1 α多様性解析の結果（上：ダム別比較、中：月別比較、下：深度別比較）

は、どのダム貯水池からも Proteobacteria 門が最も多く検出された (40.5%±8.5)。Proteobacteria の中では、Betaproteobacteria 綱がほとんどのサンプルで優占し (21.0%±6.3)、次いで、Alphaproteobacteria 綱が多く検出されていた (12.0%±4.1) が、サンプルによっては、Betaproteobacteria より Alphaproteobacteria がより多く検出される場合もあった (例えば、Cダム表層部9月-11月、中層部2月、5月等)。また、どのダム貯水池においても、11月以降は、Gammaproteobacteria の検出割合が増加する傾向が見られ、特に、Bダムでは、Gammaproteobacteria が20%近く検出された。その中で、鉄酸化細菌として知られる *Crenothrix* 属が主に検出された。Proteobacteria 以外では、Aダム、Cダムでは、Actinobacteria 門が多く検出され、中には30%を超える月があった。Actinomycetales 目は通常、放線菌として知られているが、Actinomycetales は42科約200属で構成されており、様々な種が存在している。Aダム、Cダムで多く検出された Actinomycetales 目 ACK-M1 属や Acidimicrobiales 目 C111 属の細菌は、機能は未知で、これらの細菌がカビ臭を産生するかは不明である。AダムおよびCダムは、これまでにカビ臭等の異臭味問題が生じたことはないが、一部、下流河川内の滞留域でカビ臭が発生する等の事例もあり、これらの細菌がその要因になっている可能性もある。一方、Bダムでは、Bacteroidetes 門や Verrucomicrobia 門、Dダムでは、Cyanobacteria 門が多く検出されていたことが特徴的であった。また、Dダムにおいて多く検出された Cyanobacteria に含まれていた細菌は *Synechococcus* 属が主で、その他のアオコの原因となる藍藻類は検出されなかった。またDダムからは、植物プランクトン由来の葉緑体DNAが多数検出された。

各サンプルについて、属レベルの菌叢構成データを用い UniFrac distance を計算し、主座標分析を行った結果を図4に示す。各サンプルの菌叢構成の類似度は各プロット間のユークリッド距離で示される。この結果、各ダムの菌叢は、それぞれまとまった群を構成し、一定の傾向を示しながら、推移した。すなわち、各ダムの菌叢は、地理的要因および水温の影響等の季節的要因を受け変化していくことが示唆された。

一方、18S rRNA 遺伝子 V4-V5 領域を標的とした菌叢解析の結果の一例を図5に示す。動植物プ

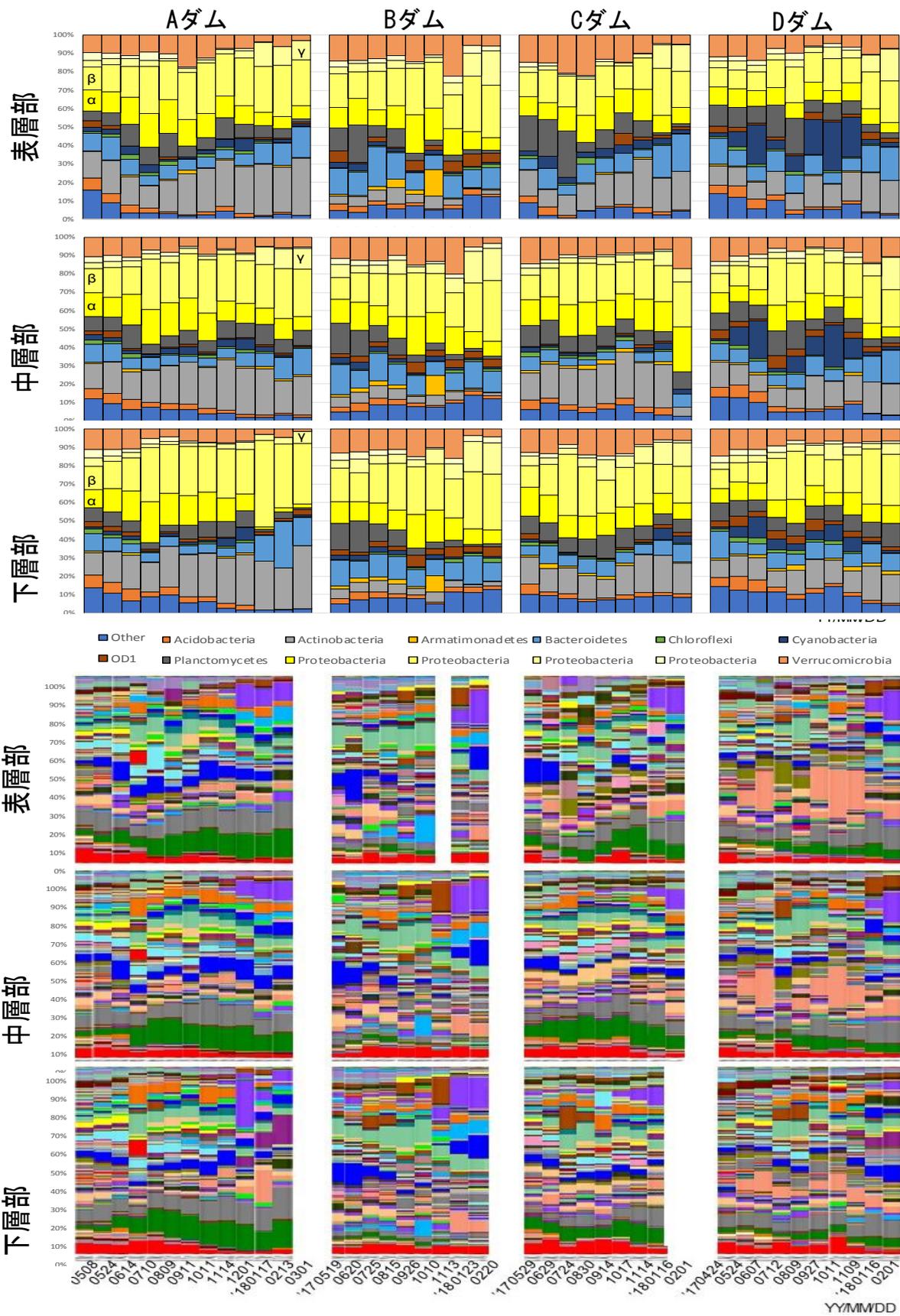


図2 β多様性解析の結果 (上：門レベル、下：属レベル)

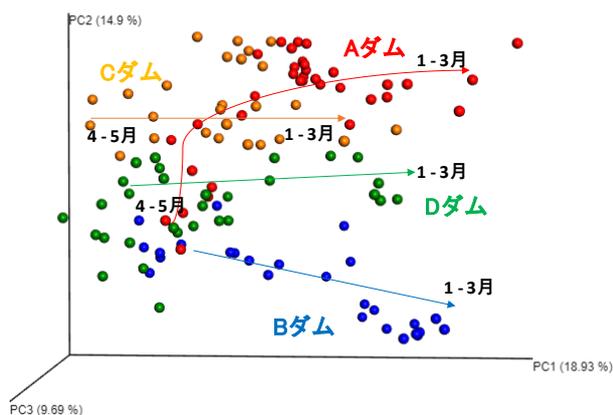


図4 各サンプルの主座標分析結果  
(図中の矢印は時間的推移を示す。軸の括弧内の数字は寄与率を示す)

ランクトンにおいてもダム毎に異なる構成を示す可能性が示唆された。しかしながら、ダム貯水池で比較的多く検出されるクリプト藻綱、珪藻綱、緑藻綱は検出されなかった。これは種により DNA 抽出効率や PCR 増幅効率が異なることが要因であると考えられる。

## 2. 4 結論と今後の予定

本研究では、ダム貯水池からサンプリングした水試料を用い、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA および 18S rRNA 遺伝子配列に基づき菌叢解析を行った。その結果、採取したダム湖水では、菌叢は、地理的要因および水温等の影響を受け、変化していくことが示唆された。また、アオコやカビ臭等の水質問題が生じていないダム貯水池では、検出される細菌の種類が少ないことが示唆された。また、植物プランクトンに関しては、いくつかの種が同定された。種により DNA 抽出効率が大きく異なることから、今後は、サンプル中に含まれる DNA を網羅的に抽出するための検討を行う。また、古細菌をターゲットにするプライマーを使用することで、アンモニア酸化古細菌等のこれまで明らかにされてこなかった各細菌の微生物ループの中での機能・役割の解明についても寄与できると考えら

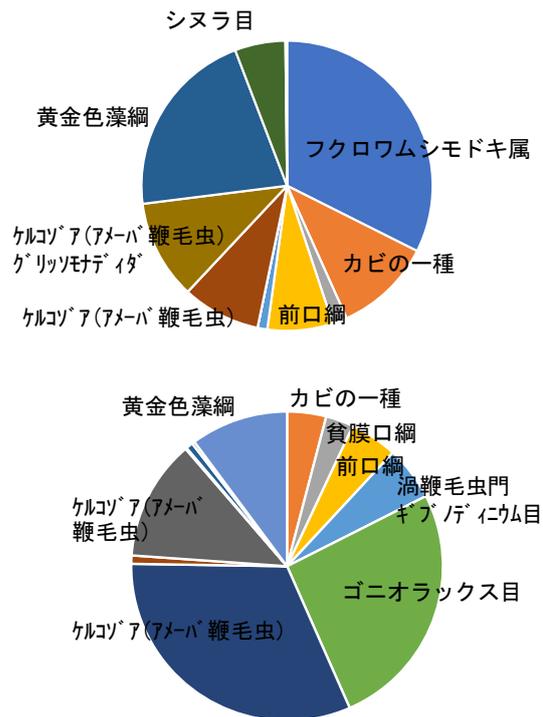


図5 検出された真核生物の例 (上: Bダム、下: Cダム)

れる。

## 参考文献

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

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

担当チーム：水工研究グループ(水理)

研究担当者：石神孝之、櫻井寿之、中西哲

担当チーム：水環境研究グループ(水質)

研究担当者：小川文章、對馬育夫

### 【要旨】

本研究では、気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える影響についての将来的な予測に取り組んだ。今年度は昨年度の成果である東北地方にある御所ダムの流域および貯水池を対象とした水質変動予測シミュレーションを利用し、予測シミュレーションの高度化や気候変動による影響の適応策の検討を実施した。主な結果として、貯水池への負荷量推定に際し L-Q 式等のデータが不足していることを念頭にいた負荷量推定手法の高度化、USLE 式の高度化について検討を行った。これら流入負荷量の高度化による貯水池内の SS 流動への影響を把握するため、貯水池数値計算を実施した結果、過年度実施した結果よりも実測データを表現できた。

キーワード：地球温暖化、湖沼、貯水池、水質変動予測モデル、水質保全

### 1. はじめに

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

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

今年度は、昨年度同様、東北地方に位置する御所ダ

ムにおける気候変動による気温・降水量の変化がダム貯水池の水質・濁質に与える影響について検討するとともに、ダム湖に流入する SS 等の推定の高度化について検討を行った。

### 2. 流入土砂量推定の精度向上

ダム貯水池に流入する SS 等の負荷量の推定には L-Q 式を用いることが多い。L-Q 式は一般的にダムに流入する流量およびその負荷量の観測データを収集し、近似曲線を算定することで求められる。そのため、L-Q 式は少ない水質観測データから負荷量を推定できる反面、過去の観測データを上回る出水時における負荷量に対しては、信頼性が低下する。

したがって、ダム貯水池の水質予測における SS の予測精度を向上するため、ダム貯水池内の堆砂測量資料やボーリング調査資料を基に L-Q 式の精度向上を検討した。

#### 2.1 精度向上のための検討手順

SS の L-Q 式の精度向上のための検討手順を図 1 に示す。なお、再現計算期間である 1984 年～2004 年(昭和 59 年～平成 16 年)のデータを用いて検討を行った。

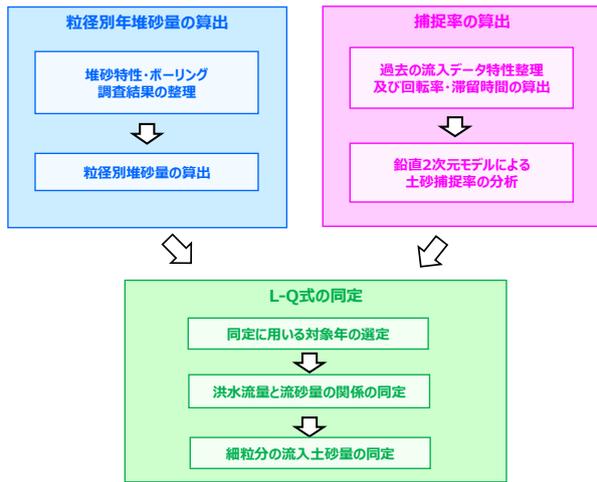


図1 堆砂量を用いたL-Q式の同定方法

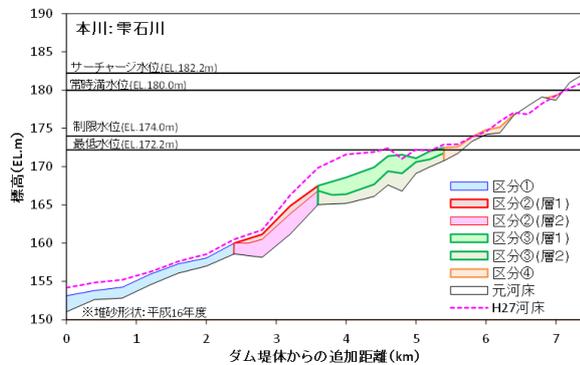


図3 本川縦断方向の粒度分布区分図

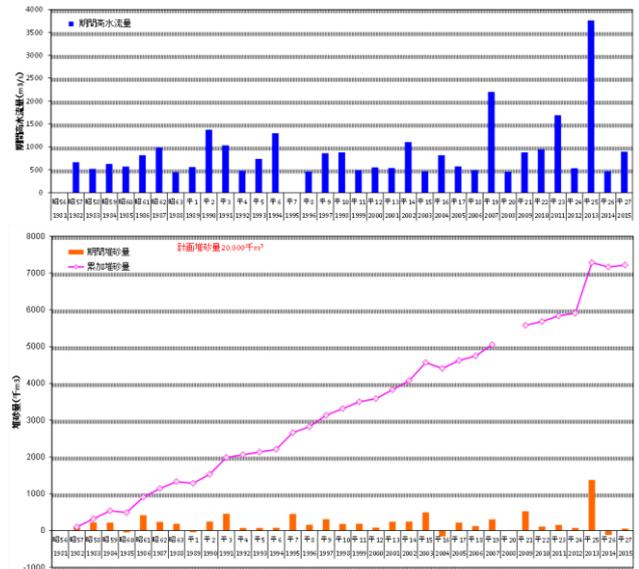


図2 御所ダムの年堆砂量と累積堆砂量の推移

表1 粒度分布区分

区分	縦断適用範囲	層1(表層)		層2(中層～底層)		備考
		代表試料	区分(深度)	代表試料	区分(深度)	
区分①	雫石川0.0～2.4k	B-1表層粒度	0～m	同左		
区分②	雫石川2.6～3.6k	B-2表層粒度	0～0.3m	B-2深層粒度	0.3～3.25m	
区分③	雫石川3.8～5.4k 南川0.0～1.0k 矢櫃川0.0～0.8k	B-3表層～中層 平均粒度	0～3.2m	B-3深層粒度	3.2～5.42m	深度の割合を同区間に適用
区分④	雫石川5.6k～7.4k	B-3深層粒度	0～m	同左		
区分⑤	南川1.2k～4.8k 矢櫃川1.0～2.0k	B-4平均粒度	0～m	同左		

## 2.2 粒径別年堆砂量の算出

### 2.2.1 堆砂特性・ボーリング調査結果の整理

御所ダムの年堆砂量と累積堆砂量の推移を図2に示し、以下に特徴をまとめる。検討対象期間における年平均堆砂量は約200千m<sup>3</sup>/年である。再現計算期間内の最大年堆砂量は、平成15年の493千m<sup>3</sup>/年である。なお、竣工～平成27年までは平成25年の1,375千m<sup>3</sup>/年であった。

御所ダムでは平成10年度にボーリング調査が貯水池内4地点で行われている。これらのデータから、縦断方向の粒度分布区分図を作成した。本川の粒度分布区分図を図3および表1に示す。

### 2.2.2 粒径別堆砂量の算出

#### (1) 粒径別年堆砂量の算出方法

本検討では、汎用性を高めるため、比較的簡易に行

える流入土砂量の推定方法を検討した。以下に概要をまとめる。

- ① ボーリング調査結果の適用範囲として、堆砂状況や調査地点の位置関係から縦断的な適用区分を設定する。また鉛直方向の区分については、ボーリング調査結果から層を設定する。
  - ② 各年度の最深河床高データと元河床断面データを用いて、元河床高からの堆積厚を各断面で計算し、各断面の堆積量を推定する。このとき①で設定した鉛直方向の粒度分布区分にも着目し、層毎の堆砂量を算出する。
  - ③ ②で算出した堆砂量と年堆砂量の差分を補正值として、各断面に割り振る（土砂収支が合うように当年の堆砂量が測量値と合うように補正をかける）。
  - ④ ①で設定した粒度分布の適用区分毎の堆砂量を算出し、粒径区分毎の年堆砂量を算出する。
- (2) 粒度分布の適用区分の設定**  
ボーリング調査結果の適用範囲として、堆砂状況や

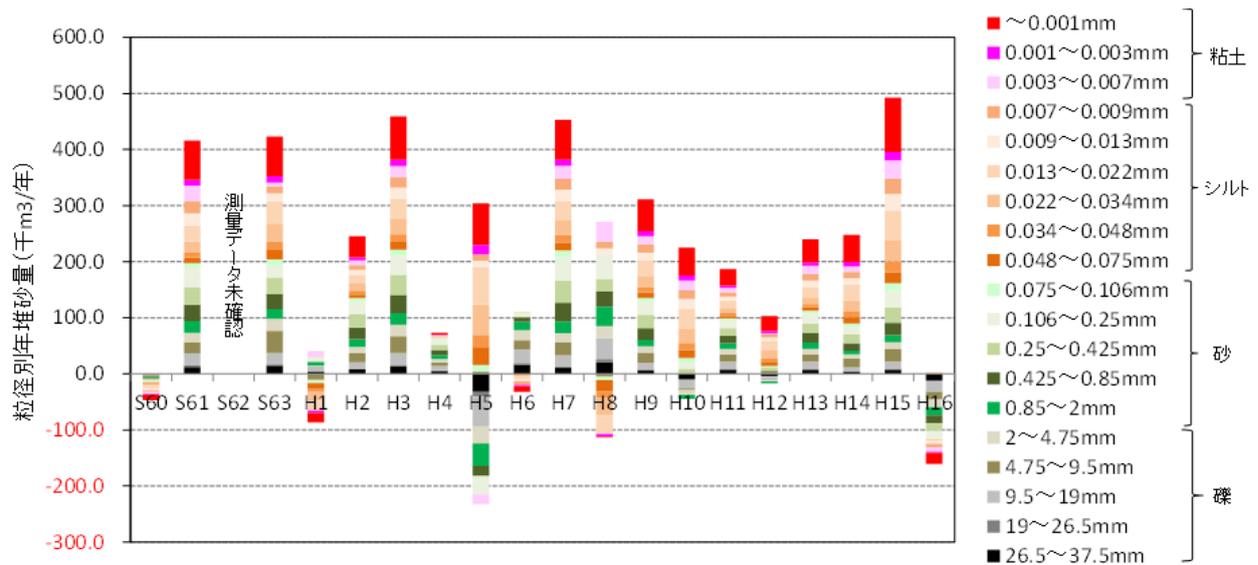


図4 粒径別年堆砂量の算出結果

調査地点の位置関係から縦断的な適用区分を設定する。また鉛直方向の区分については、ボーリング調査結果を元に平成10年度（ボーリング調査年）の河床高から適用する層を設定した。また層の境界は平成10年度の河床高の堆積厚の割合を元に境界とする標高を設定した。

### (3) 最深河床高を元にした貯水池堆砂量の算出

最深河床高を基に、貯水池堆砂量を算出した。算出方法には一般的な堆砂測量による堆砂量把握に用いられる平均断面法を適用した。

### (4) 年堆砂量の補正

(3)の手法で算出した堆砂量と堆砂測量で報告されている堆砂量では誤差があることから、この誤差を実績の堆砂量と比較し、堆積縦断分布に対応させ誤差分を案分して区間毎の堆砂量を補正した。

### (5) 粒径別堆砂量の算出

算出した年別・区間別の堆砂量を元に、区間毎の代表粒度分布の割合から、粒径別堆砂量を算出した。粒径別堆砂量の算出結果を図4に示す。S63に関してはS62の縦断データが確認できなかったため、S62との2ヶ年の差分とした。

## 2.3 捕捉率の算出

御所ダムの細粒土砂成分の捕捉率を、過去の流入データおよび鉛直2次元モデルを用いて算出した。

ある年*i*における粒径*j*の年間堆砂量 $[V_{sj}]_i$ は出水*k*毎の捕捉率 $\gamma_{jk}$ を用いて次式のように計算される。

$$[V_{sj}]_i = \sum_{k=1}^{n_i} \left( \gamma_{jk} \int \alpha_j Q \beta^j dt \right) \quad (1)$$

ここに  $n_i$  は土砂移動が発生する最小流量（足切り流量）以上の出水回数を表す。捕捉率  $\gamma_{jk}$  の推定式は、鉛直2次元モデルによって出水波形  $\cdot \alpha \cdot \beta$  の値を変化させて代表粒径別毎に作成する。なお、 $\alpha$  については、鈴木ら<sup>4)</sup>により  $\gamma_{jk}$  への影響がほとんどみられないと報告されているため、出水波形と  $\beta$  を変更した感度分析を行うこととした。

### 2.3.1 過去の流入データ特性整理

御所ダム貯水池の1984年～2004年（昭和59年～平成16年）の期間における流入データを整理し出水を抽出した。

#### (1) 日最大流入量の整理

御所ダムでは3月～5月の融雪期に貯水位を制限水位まで低下後、常時満水位まで上昇させる運用を行っている。この期間については、通常の出水とは土砂の捕捉形態が異なると考えられるため、3月1日～5月31日を除外し、日最大流入量を整理した。その結果、検討期間である21年間の日数のうち御所ダムの洪水流量である500m<sup>3</sup>/sを越えた日数は43日であり1年間に2日程度の頻度で洪水が発生している。そのため、御所ダムにおける土砂の捕捉率を確認する上で抽出する出水は、洪水流量（500m<sup>3</sup>/s）の半分程度の流量規模となるピーク流量300m<sup>3</sup>/s以上の波形を抽出し検討を行うこととした。

#### (2) 出水の選定と回転率・滞留時間算出

捕捉率の検証結果1  
( $\beta$ と滞留時間)

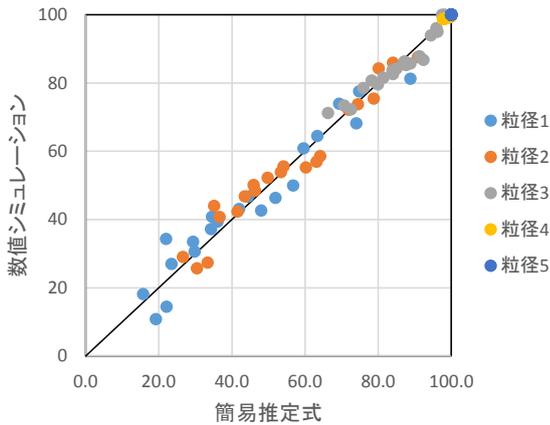


図5 簡易推定式による捕捉率の推定結果(洪水時)

ピーク流量  $300\text{m}^3/\text{s}$  以上の出水を対象に昭和59年～平成16年の21年間の出水を抽出した。また、抽出した出水毎に回転率と滞留時間を算出した。抽出した103の出水のうち、出水規模の異なる7出水を水質予測にて捕捉率の算出を行うこととした。

### 2.3.2 鉛直2次元モデルによる捕捉率の算出

鉛直2次元モデルは平成28年度に作成したモデルを用いて土砂捕捉率の算出を行った。なお、本検討では生態系モデルは考慮していない。対象とする出水は日最大流量を整理して抽出した7出水であり、さらに代表的な融雪出水規模3パターンを加えた、合計10通りの出水条件となる。

### 2.3.3 捕捉率算出結果

鉛直2次元モデルによる捕捉率の算出結果を以下にまとめる。

- 出水規模が小さい場合では、 $\beta$ の値が大きいほど捕捉率が大きくなる傾向がみられた。また、出水規模が大きい場合では、 $\beta$ と捕捉率の関係性はあまり見られなかった。
- 1出水当たりの回転率が大きいほど、捕捉率は小さくなる傾向となった。
- 平均滞留時間が大きいほど、捕捉率は大きくなる傾向となった。
- 融雪出水時の土砂捕捉率は  $2\ \mu\text{m} \sim 6\ \mu\text{m}$  の細かい粒径のみ捕捉される結果となった。

捕捉率は滞留時間、単位洪水辺り回転率、係数 $\beta$ によって変化することがわかる。そこで、これらパラ

表2 流入土砂量式の同定結果

代表粒径 ( $\mu\text{m}$ )	$\alpha$	$\beta$	
1	2.2	$2.40\text{E}-06$	1.3
2	5.6	$3.70\text{E}-06$	1.2
3	14.2	$2.30\text{E}-06$	1.4
4	32.2	$1.20\text{E}-06$	1.5
5	71.0	$5.00\text{E}-07$	1.6

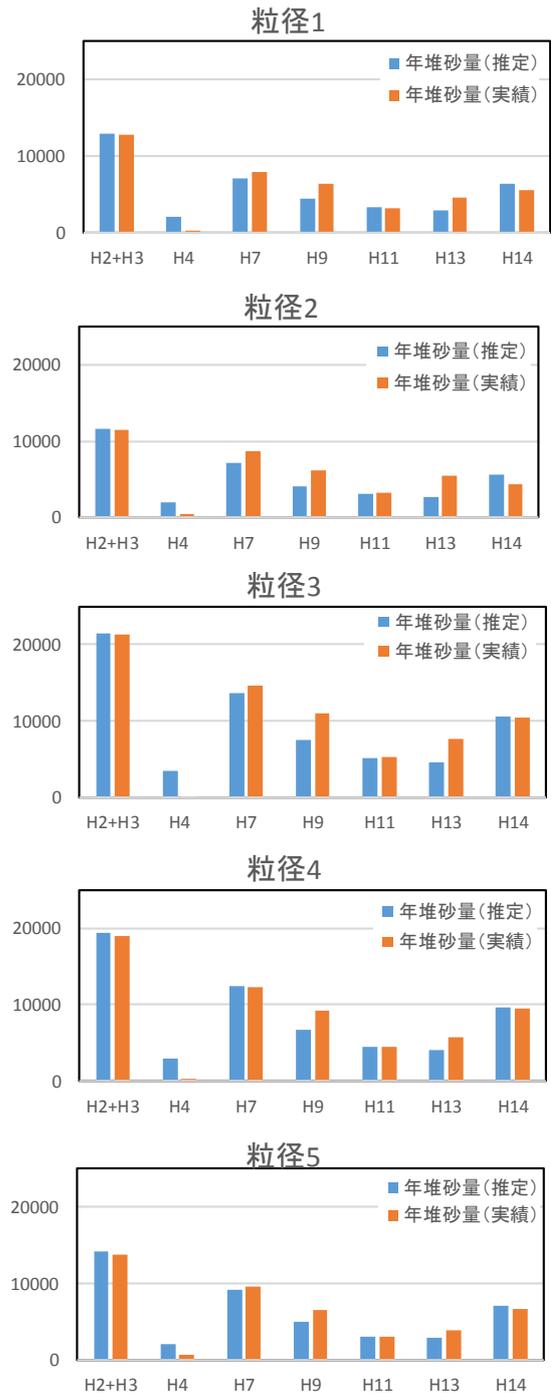


図6 粒径区分ごとの堆砂量の推定値と実績値の比較

メータを用いて代表粒径ごとに補足率の推定式を導出した。最小二乗法によって、「 $\beta$ と洪水時滞留時間」、「 $\beta$ と洪水時回転率」の2つのパラメータを使って捕捉率を推定した。これらの結果より、 $\beta$ と滞留時間を用いた方が、数値シミュレーションによる予測結果とのバラツキが小さく、比較的よい精度で予測できたため、以降における係数 $\alpha$ 、 $\beta$ の同定では洪水時滞留時間を用いた捕捉率推定式を用いることとした。

## 2. 4 L-Q 式の同定

### 2. 4. 1 同定に用いる対象年の選定

流入土砂量の推定は出水によって流入する土砂を推定することが目的であるため、測量誤差や水位低下による堆砂の再移動等によって粒径別年堆砂量と出水の間に相関が認められないデータが混在すると係数同定の精度が低下すると考えられる。

そこで、予め年堆砂量と各年に発生した流入量の積分値との相関性を確認し、対象年の選定を実施した結果、計 21 か年の堆砂データのうち、17 か年分のデータを L-Q 式の同定に用いた。また、流量を 10m<sup>3</sup>/s ごとに増加させて、堆砂量の計算による推定値と実績値の残差が最も小さくなる流量を足切り流量と設定した。

### 2. 4. 1 細粒分の流入土砂量の同定

足切り流量が 80m<sup>3</sup>/s と設定したとき、堆砂量の残差が最小となり、その時の係数  $\alpha$ 、 $\beta$  の値を表 2 に示す。表中の代表粒径区分は表 1 の区分を踏襲している。各粒径の  $\alpha$ 、 $\beta$  は、ともに一般的に知られている数値の範囲であった。

図 6 は代表年における各粒径区分ごとの計算による推定値と実績値の比較である。計算による推定値は実績の堆砂量を良好に再現する結果となった。

## 2. 5 新規 L-Q 式による貯水池内濁質流動解析

新規 L-Q 式による貯水池内の SS 成分の流動の再現性を検証するため、断面 2 次元貯水池水質計算による再現計算を実施した。再現計算の計算条件は平成 28 年度に実施した計算条件を踏襲し、SS の流入条件に新規 L-Q 式を用いた計算を実施した。図 6 に計算結果を示す。図中の点は定期水質調査による SS 濃度の測定結果である。また、比較対象の為、平成 28 年度に実施した観測結果から得られた L-Q 式による計算結果を示している (図 7 下)。

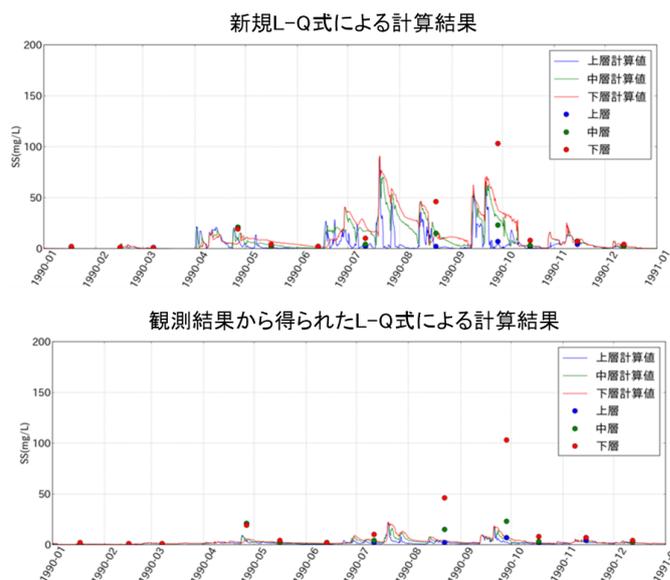


図 7 L-Q 式の違いによる貯水池内 SS 濃度分布

新規 L-Q 式を用いた計算結果は出水時に貯水池内の SS が上昇し、中層及び下層で濁水が滞留している期間が確認できる。観測結果から得られた L-Q 式による計算結果と比較して、今年度の再現計算結果は融雪期に貯水池内の SS が明確に上昇する傾向がみられた。

以上より、ダム貯水池の堆砂データやボーリングデータを使用した L-Q 式を用いることによって、出水による貯水池内の SS 成分の流動がより観測値に近い結果となった。

## 3. 気候変動による土砂量、栄養塩負荷量の推定

前章では、ダムに流入する SS 成分を L-Q 式として設定した。L-Q 式による流入 SS の推定手法は、比較的簡易である一方、負荷量は流量のみで決定することになり、気候変動に伴う降雨特性 (時間的変化、空間的変化等) による影響や、流域の土地利用特性等は十分反映されない可能性がある。

そこで、御所ダム流域を対象に農学分野で広く用いられる土壌流出量の経験式 (USLE 式) を用いて降雨の空間分布や降雨強度の違いを直接的に流入 SS 負荷量に反映させ、気候変動に伴う貯水池水質予測を実施し、L-Q 式による予測との違い等について検討した。

### 3. 1 現在と将来予測データの概要

検討に用いた気候変動モデルには、環境省が公表している RCP シナリオに基づいた地域気候モデル (MRI-NHRCM20:水平格子間隔 20 km) を使用した。

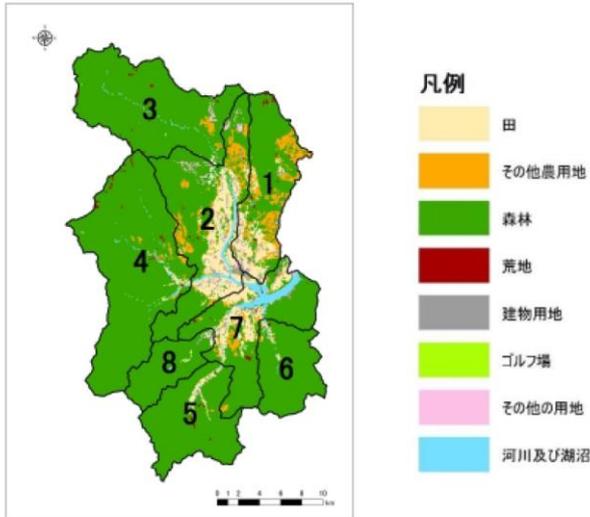


図8 御所ダム流域の流域区分と土地利用

現在気候は1984年9月～2004年8月、将来気候は2080年9月～2100年8月の期間で出力されている。本年度の検討では現在気候・将来気候（RCP4.5・RCP6.0・RCP8.5）の4シナリオについて実施した。

### 3.1.1 気象データ

気候変動モデルの出力結果は観測値との差異があるためバイアス補正を行った。気温については毎月に観測値とモデル出力値の差分を補正し、降水量については月別に累積分布関数を作成し補正を行った。

その他の気象条件については、風速は観測値の月平均値を使用し、湿度・日射量・雲量は降水量との関係式を作成した後、バイアス補正後の降水量を用いて作成した。

### 3.1.2 流入量・放流量

作成した気象データを用いて分布型流出モデルによる流出計算を行い、流入量を作成した。一方、放流量は実績のダム運用を踏まえた利水モデルを構築し設定した。

### 3.2 USLE 式によるダム流入負荷量の推定

USLE 式は農地を対象とした土壌流出の経験式として用いられるが<sup>9)</sup>、式中に降雨強度に関する係数 R が含まれており、ダム流域における気候変動に伴う降雨特性の変化による負荷量への影響を予測できると考えられる。

$$A = R \cdot K \cdot LS \cdot P \cdot C \quad (2)$$

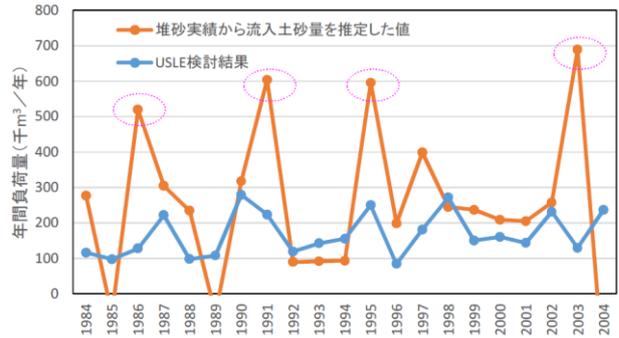


図9 USLE 式による御所ダム流域の流入土砂量推定結果

ここで、A：単位面積当たりの流出土砂量 (tf/ha)、R：降雨係数 (tf・m<sup>2</sup>/ha/h)、K：土壌係数 (h・m<sup>2</sup>)、LS：地形係数、C：作物係数、P：保全係数である。各係数の設定方法を表3に示す。なお、保全係数は土壌侵食軽減対策の効果を示す係数であり、森林・畑地等には適応せず、本検討では全て1.0とした。

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

本研究では、ダム流域の流域情報の分布に着目し、「森林」を主とする流域と「農用地」を主とする流域が区別されるよう、8つの流域区分を設定し、流域毎にUSLE 式の係数を算定した(図8)。

USLE 式を用いて算出した御所ダム流域の流出土砂量を図9に示す。崩壊地の発生等により流入土砂量が大きくなった可能性がある年がみられる(図中赤楕円)が、1984年～2004年の堆砂実績から算定した流出土砂量の傾向を概ね良く再現することができた。

### 3.3 USLE 式を用いた貯水池水質再現計算

#### 3.3.1 水質計算概要

貯水池の水質計算には、SSの輸送方程式を組み込んだ鉛直2次元モデルを使用した。

貯水池水質計算に必要な流入SSについて、USLE 式より得られた年間負荷量は土壌を対象としており砂分を含む量である。そのため、粘土・シルト分(SSを対象とした粒径)に換算する必要がある。換算方法は堆砂ボーリングデータなどをもとに、実績の粒径別流入土砂量の比率を算出した。

また、貯水池水質計算を実施するにあたり、貯水池に流入するSS濃度を、USLE 式で算出されたSSの年間負荷量から貯水池水質計算に必要な日平均負荷量に換算する必要がある。本検討で用いた換算方法は、SS負荷量は日平均流量と相関があるという仮定の基、

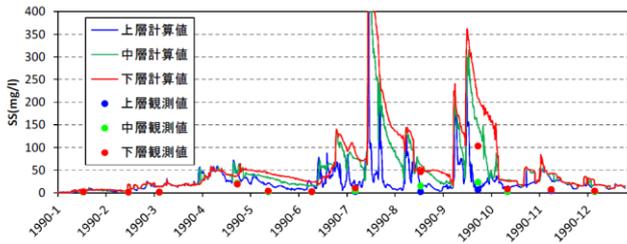


図 10 1990 年のダムサイト 3 深度の SS 濃度時系列変化

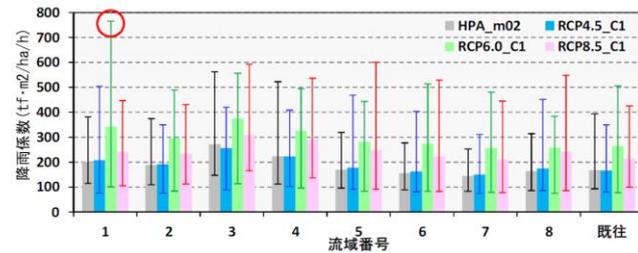


図 11 降雨係数の年平均値・年最大値・年最小値

ダム貯水池に流入する年間の日流量の総和に対する日流量の比により年間負荷量を配分した。一般的に SS の負荷量は流量の冪関数として表されるとされている。そのため、年間負荷量から日平均負荷量への変換にも、流量の冪関数を用いることが妥当である。しかし、本検討のような年間負荷量から日平均負荷量への変換に関する冪指数の検討事例はあまりない。そのため、本検討では日流量を 2 乗する方法と 3 乗する方法のそれぞれについて貯水池水質計算を実施した。その結果、流量の 2 乗で負荷量を算出する方法が、より実際の貯水池の状況を再現していると判断し、日流量の 2 乗を用いた方法を採用した。

### 3. 3. 2 計算結果

1984 年～2004 年の期間で年最大時間流入量 (1,375 m<sup>3</sup>/s) が発生した 1990 年のダムサイト 3 深度の SS 濃度時系列変化を図 10 に示す。8 月中旬頃をみると、出水後の貯水池 SS 濃度の観測値を比較的良く再現していた。

### 3. 4 気候変動を考慮した貯水池水質計算

#### 3. 4. 1 現在気候・将来気候の USLE 係数

現在気候および将来気候の降雨データを用いて、流域毎の降雨係数を算出した結果を図 11 に示す。図 11 の赤丸をみると、流域 1 における降雨係数の年最大値が RCP6.0 で 700 を越える高い値となっている。

表 3 USLE 式の係数設定方法

項目	使用するデータ	係数の設定方法
降雨係数	・観測データ ・気候変動シナリオ	降雨の分布を考慮して、流域区分毎に降雨係数を算出する
土壌係数	国土交通省発行の 20 万分の 1 の土地分類基本調査 (土壌図)	既往文献を基に土壌係数を設定する <sup>7)</sup>
地形係数	国土数値情報	流域区分毎に地形係数を算出する <sup>8)</sup>
作物係数	国土数値情報	既往文献を基に作物係数を設定する <sup>6)</sup>

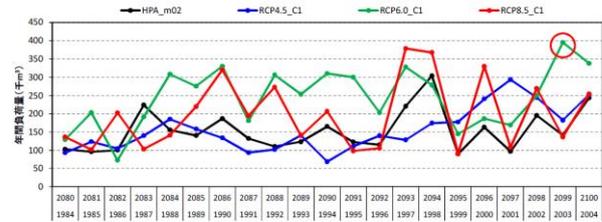


図 12 SS 年間負荷量 (上段：将来気候年，下段：現在気候年)

流域 1 は農地利用が多い流域であり、土壌流出が活発な流域となるため、多くの降雨が生じることで RCP6.0 における 2099 年は高い SS 負荷量が生じる結果となった (図 12 の赤丸)。なお、降雨係数以外の各係数については、再現計算時の係数をそのまま使用した。

#### 3. 4. 2 気候変動を考慮した貯水池水質計算結果

降雨の空間分布に違いが見られたシナリオ RCP6.0 の計算結果を図 13 示す。比較的降雨量が多く、流入量の多い 2084 年 (青) や 2093 年 (緑) は、USLE 式および L-Q 式でともに、下層 SS の月平均濃度が 7 月、9 月でそれぞれ最大となり一致していた。

一方、USLE 式で SS 負荷量の多い結果となった 2099 年は流入量の比較的少ない年であったため、L-Q 式の計算結果では平年並の濃度となっているが、USLE 式の計算結果では 8 月の月平均 SS 濃度が 20 年間で最大となった。

次に融雪期 (3 月～5 月) をみると、USLE 式の計算結果は融雪出水の影響で、下層の SS 濃度が常に高い値となっている。これは単純に年間負荷量を流入量ベースで配分したことが原因であると考えられる。

#### 3. 5 まとめ

検討の結果、L-Q 式では考慮できない降雨の空間分布や強度の違いを USLE 式によって直接的に SS 負荷

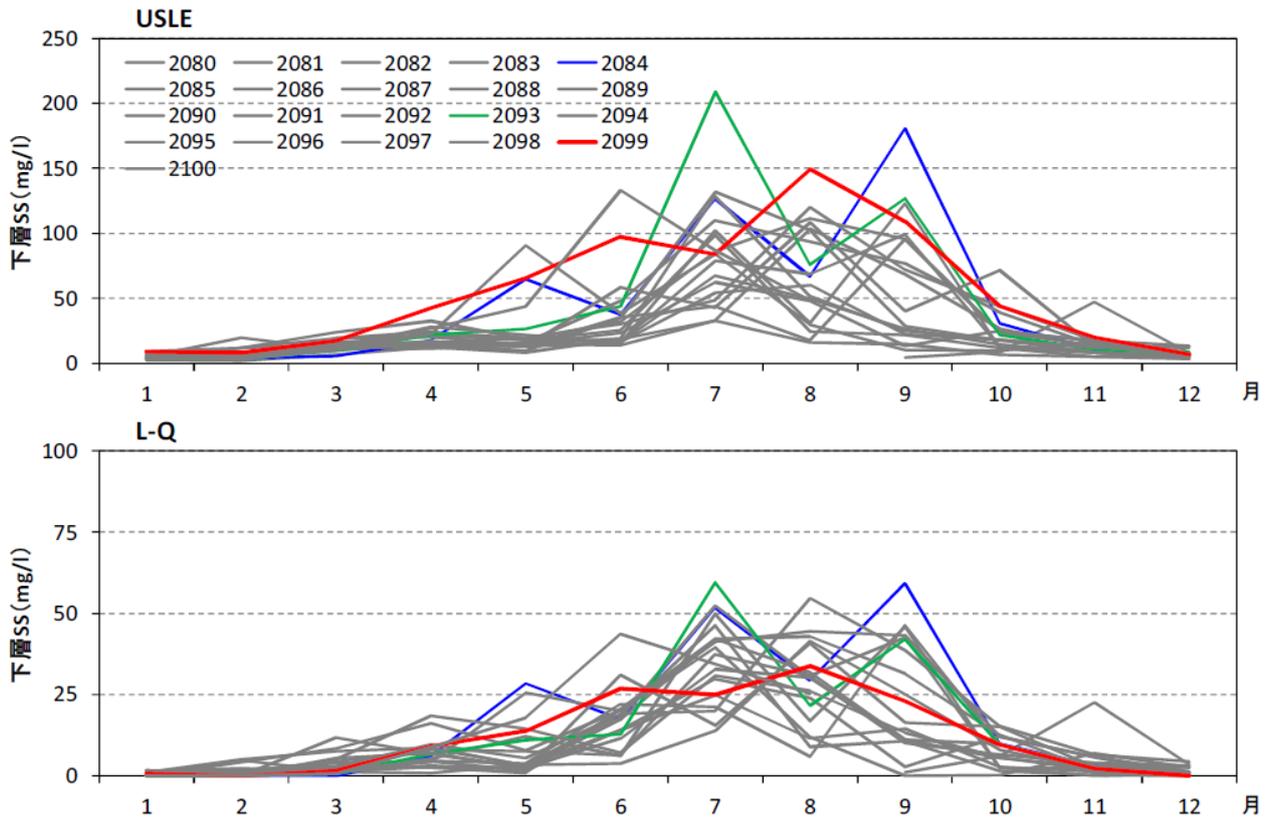


図 13 ダムサイト下層 SS 濃度の月平均値 (RCP6.0)

量に反映することで、気候変動に伴う SS 負荷量の変化をより適切に表現できる可能性を示すことができた。

また、USLE 式は水質データの観測結果が少なく、L-Q 式を作成することが困難な貯水池でも SS 負荷量を推定できる可能性があることも示された。

なお、融雪期における負荷量は、年負荷量を流量によって単純に按分すると過大となるため、融雪期の負荷量の設定方法が課題としてあげられた。

#### 4. おわりに

気候変動により流量および流域への気候等の変化に対応できるよう、流入負荷量の高度化を、細粒土砂成分に対して実施した。主な成果は以下の通り、

- 御所ダムの粒径別堆砂実績と洪水実績の関連性から細粒土砂 (SS) の L-Q 式を同定することにより、既存の水質観測に基づく L-Q 式よりも貯水池水質計算の再現精度が向上された。
- 御所ダム・寒河江ダムの 2 ダムを対象として、降雨分布や土地利用等を小流域毎に算出し USLE 式を用いて SS の再現計算を実施した。

- 濁質の沈降や融雪期の取り扱いなど多少の改善の余地はあるものの、土地利用の異なる 2 つのダム貯水池の SS 変化を概ね再現できた。
- USLE 式では L-Q 式で考慮できない降雨分布や降雨強度を直接的に流入 SS 負荷として反映できるため、気候変動に伴う流入 SS 変化をより適切に表現できると可能性がある。

#### 参考文献

- 1) 文部科学省, 経済産業省, 気象庁, 環境省: IPCC 第 5 次評価報告書統合報告書政策決定者向け要約 (翻訳), 2015.
- 2) 環境省: 気候変動の影響への適応計画, 2015.
- 3) <http://www.env.go.jp/press/files/jp/28593.pdf>
- 4) 鈴木伴征, 柏井条介, 吉岡喜浩: 鯖石川ダム堆砂実績を用いた粒径別流入土砂量の推定. ダム工学, 14(4), 257-269, 2004.
- 5) 鶴木啓二, 子檜山雅之: 汎用土壌流亡予測式による農業流域からの土砂流亡量予測, 寒地土木研究所月報, No.700, pp.13-19, 2011.
- 6) 農林水産省: 「土地改良事業計画指針 農地開発 (改良山成畑工) 平成 4 年 5 月」, 1992.

- 7) 今井啓, 石渡輝夫: 統計資料等を用いて整理した北海道における土壌浸食因子の地域性について, 寒地土木研究所 月報, No.640, 2011.

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

研究予算：運営交付金

研究期間：平 28～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、村田里美、  
鈴木裕識

## 【要旨】

国土形成計画等において、山地から海岸までの一貫した総合的な土砂管理の推進等が謳われており、これらを推進していくためには、土砂動態のモニタリング、環境影響評価、対策技術を統合した流砂系における持続可能な土砂管理システムの構築が求められている。本研究では、土砂供給に伴う水質変化への影響評価対象地とする現地の環境を考慮した有害性評価値の導出フローを構築し、ケーススタディーとして、矢作ダムにおける土砂供給時のマンガン有害性評価値の導出に適用した。また、土砂供給時を想定した試料（土砂の溶出試験後の試験液）に含まれる 10 種の金属類について、水生生物に直接影響を及ぼすと考えられるイオンとしての形態（Labile 態）の存在率を算出した。その結果、形態別の存在濃度を考慮することにより、従来の全濃度による評価と比較してより適切な影響評価に繋がる可能性が示唆された。

キーワード：急性毒性、生態リスク、形態別金属存在比率

## 1. はじめに

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

昨年度は、マンガン、亜鉛、鉛、ヒ素の 4 物質について、既報の有害性の文献情報から有害性評価値を導出した<sup>2)</sup>。その際に用いた導出フローを図 1 に示す。また、矢作ダムを対象として、ダム貯水池の底質を採取し、金属類 4 物質について底質の溶出試験を実施し、土砂供給時の河川水中濃度を推定した。その結果、推定した河川水中濃度を有害性評価値で除して求めたハザード比に基づいて生物影響の可能性を判定したところ、4 種すべての金属類について、生物影響の可能性が低いことが示された。一方で、本評価では、既報の金属類の有害性データが用いられており、評価対象となる河川には、その河川特有の生物が生息している可能性がある。そのため、今年度の第一の研究目的として、評価対象地の環境条件を考慮した有害性評価を検討した。さらに、重金属はその存在形態により生物に及ぼす影響が異なることが報告され始めている<sup>3)</sup>。そこで、第二の研究目的として、溶出試験後の試料中に、イオンとして存在する形態（Labile 態）の金属類濃度を測定して、存在比率の把握を試みた。

## 2. 方法

昨年度の矢作ダムのダム貯水池の底質を用いた溶出試験結果（図 2）では、マンガンの溶出量がその他の金属

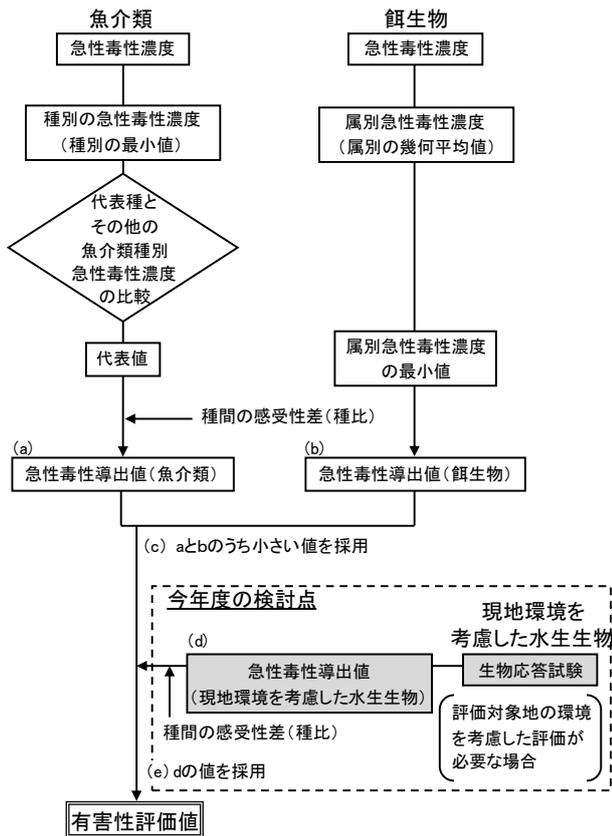


図1 昨年度用いた有害性評価値の導出フローと今年度の検討点

よりも顕著に多く、また、低い固液比での溶出量が高い傾向にあった。さらに、マンガンは有害性評価値 (55  $\mu\text{g/L}$ ) の導出に際し、オオユスリカを用いた実験結果の値<sup>4)</sup>を採用しているが、現地の水環境への影響を鑑み、魚類を用いた実験値による評価を試みることにした。本研究で検討対象とする矢作ダム下流の矢作川は水生生物の保全に係る水質環境基準の水域類型においてB類型と指定されていることから、B類型の魚類として、メダカを用いて生物応答試験を実施した。その手順を以下に詳述する。試験生物には、生物応答を用いた排水試験法(検討案)の推奨種となっているヒメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた。本試験生物は国立環境研究所より分譲されたものである。試験区は4段階のマンガン濃度区 (0.5、5、50、500  $\text{mg-Mn/L}$ ) と対照区とした。マンガン試料の希釈および対照区には脱塩素水道水を用いた。容量は 50 mL/容器とした。試験連数は4連/試験区である。試験区毎に受精 10 時間以内の胚を 1 容器に対し 10 個曝露し、対照区の生残胚の半数以上がふ化した日をふ化日として、ふ化から 5 日後までを測定した。曝露方法は半止水式 (2 日ごとに換水) とし、ふ化率、生残率を求めた。照明は白色蛍光灯で明期 16 時間、暗期 8 時間とし、水温は

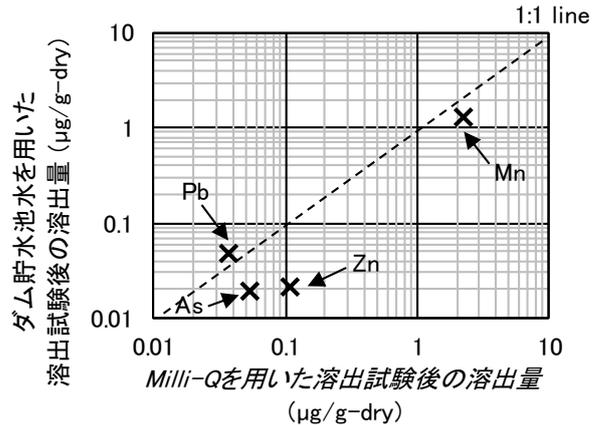


図2 各溶出試験水に対するダム底質の溶出試験結果から求めた底質の乾燥重量あたりの金属溶出量 (プロットした値は試験で得られた最大溶出量)

24 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ とした。曝露期間中の水換え前後に pH、水温、DO を測定した。

2017年に採取された矢作ダムの上流河川の底質、矢作ダムの貯砂ダムの土砂、貯水池底質の3種の底質試料を用いて環境庁告示第46号<sup>5)</sup>を参考に金属類の溶出試験を実施した。溶出液には Milli-Q 水を用いた。底質試料と溶媒との固液比 (重量体積比) は 10% とした。繰り返し数を 3 回とした。試験後に、検液を前処理し、亜鉛、マンガン、鉛、ヒ素の重金属の他、ナトリウム、マグネシウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、鉄の合計 10 種の金属類に対して、検液中の溶存態濃度と Labile 態濃度を測定して、形態別存在比率を算出した。溶存態測定用試料は、検液のろ液をホットプレート分解に供して前処理したものとした。Labile 態はろ液を別途用意し、キレート樹脂 (MetaSEP CH-1、GL サイエンス) に通過し、硝酸で溶出後、溶存態試料と同様に前処理した。測定は ICP-MS (X7CCT, Thermo Fisher Scientific) で行った。

### 3 結果

#### 3.1 ヒメダカを用いたマンガンの影響評価試験と現地環境を考慮した有害性評価値の導出

ヒメダカの受精卵を用いたマンガンの影響評価試験結果を図3に示す対象区におけるふ化日は9日目で、試験日数は14日であった。ふ化率と生残率のデータを Bartlett 検定 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) により等分散性を評価した。等分散が棄却されたため、Steel 検定 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) により対照区とマンガン添加試料とのふ化率と生残率を比較した。その結果、ふ化率はどの濃度区においても有意な差はみられなかった ( $p < 0.05$ )。生残率については、対照区と比較して有意な低下が認められた濃度区は 50

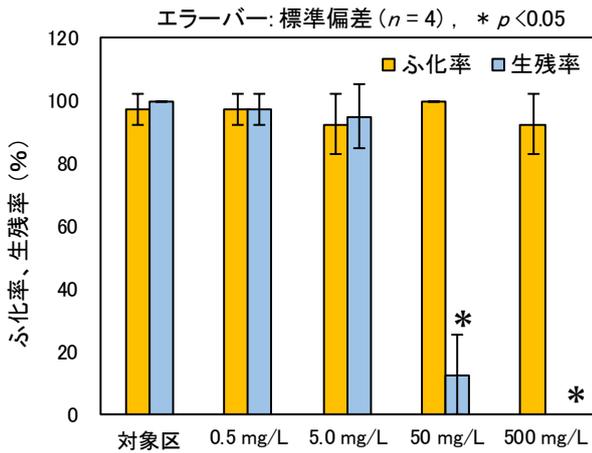


図3 ヒメダカの受精卵を用いたマンガンの影響評価試験 (\*は対照区より有意に低い値 ( $p < 0.05$ )。濃度は mg-Mn/L)

mg-Mn/L ( $p < 0.05$ ) および 500 mg-Mn/L ( $p < 0.05$ ) であった。このことから、無影響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) は 5 mg-Mn/L と求められた。本結果は、Stubblefield ら (1997) によりブラウントラウト (*Salmo trutta*) の胚を用いて実施された 62 日間の魚類初期生活段階毒性試験の実測値濃度に基づき得られた NOEC の値 (2.84 mg-Mn/L) <sup>6)</sup> と同程度であった。次に、得られた NOEC 値に基づき、環境省の中央環境審議会での資料 <sup>7)</sup> を参考に、有害性評価値を以下の手順により導出した。まず、土砂供給による水質の変化は比較的短時間で生じると考えられるため、水生生物の生存等への急性的な毒性に着目して有害性を評価する必要があることから、今回実施した亜慢性毒性試験により得られた NOEC 値に対して、係数「10」で除して急性毒性導出値を算出した。さらに、今回の試験では当該水域の代表種としてヒメダカの 1 種のみでの試験であったことから、他の生物種との感受性の相違 (種比) として、係数「10」で除して最終的な急性毒性導出値を 50  $\mu\text{g-Mn/L}$  とした。この数値は、前年度のオオユスリカによる実験結果を示す文献値により算出されていた 55  $\mu\text{g-Mn/L}$  と比べ、若干ではあるが低い値であり、現地環境を考慮した有害性評価値として 50  $\mu\text{g-Mn/L}$  が導出された。本研究では、文献値からの導出値と、現地環境を考慮するために実施した実験値からの導出値が同程度であったが、両者に顕著な差があった場合には本手法が有効となる可能性がある。

### 3.2 ダム底質試料を用いた溶出試験後の水溶液中に含まれる 10 種金属類の Labile 態存在比率

ダム関連の 3 種底質試料を用いた溶出試験後の水溶液中に含まれる 10 種金属類の Labile 態存在比率を図 4

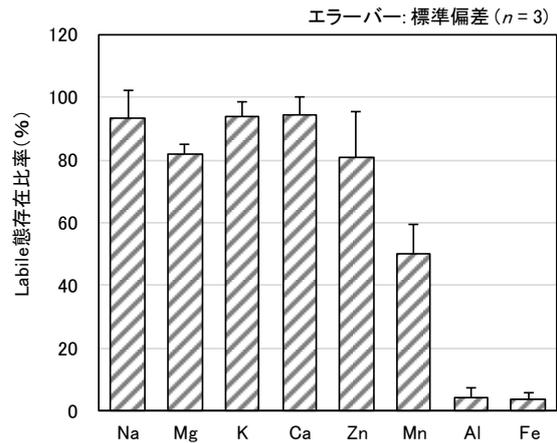


図4 ダム関連の3種底質試料を用いた溶出試験後の溶液中に含まれる 10 種金属類の Labile 態存在比率 (\* As, Pb は定量下限値以下のためデータなし)

に示す。棒グラフには平均値を示した。10 種金属類のうち、ナトリウム (Na)、マグネシウム (Mg)、カリウム (K)、カルシウム (Ca) はイオンとしての形態を表す Labile 態の存在比率はそれぞれ 93.3%、81.6%、93.7%、94.1% であり、溶存全濃度のほとんどを占めていた。また、水生生物保全環境基準として設定されている亜鉛 (Zn) も Labile 態の存在比率は 80.6% と高かった。一方で、マンガン (Mn)、アルミニウム (Al)、鉄 (Fe) の Labile 態存在比率はそれぞれ 50.2%、4.2%、3.3% と他の金属類よりも低く、ヒ素 (As) や鉛 (Pb) は Labile 態の測定値が定量下限値以下のためデータが得られなかった。

ダム関連底質試料と都市河川底質試料を用いた溶出液における 10 種金属類の Labile 態存在比率の比較結果を図 5 に示す。ダム関連の底質試料と都市河川の底質試料の

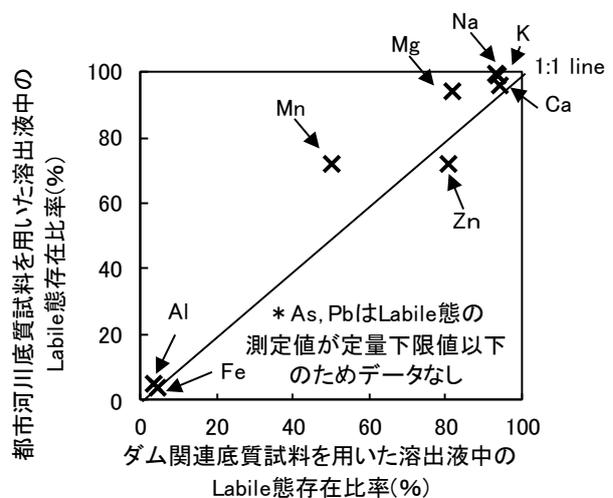


図5 ダム関連底質試料と都市河川底質試料を用いた溶出液における 10 種金属類の Labile 態存在比率の比較

実験試料との間で、10種金属類全体としては Labile 態存在比率に顕著な差はみられなかったが、マンガン、亜鉛、マグネシウムは若干異なる傾向がみられた。

これらの結果から、金属類の水生生物への影響を評価する上で、実際に生物に影響を及ぼす形態を考慮する必要があることが示唆された。

#### 4. まとめ

本研究では、土砂供給に伴う水域生物への影響について調査を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 土砂供給に伴う水質変化への影響評価をする上で、対象地の環境を考慮した有害性評価値の導出フローを構築し、ケーススタディーとして、矢作ダムにおける土砂供給時のマンガンの有害性評価値の導出に適用した。
- 土砂供給時を想定した試料（土砂の溶出試験後の試験液）に含まれる10種の金属類について、水生生物に直接影響を及ぼすと考えられるイオンとしての形態（Labile 態）の存在率を算出した。その結果、形態別の存在濃度を考慮することにより、従来の全濃度による評価と比較してより適切な影響評価に繋がる可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 栗津陽介ら:排砂バイパスを導入したダム下流における河床環境と底生動物群集、*京都大学防災研究所年報*, 58号 B、527-539、2015年6月
- 2) 土木研究所、平成28年度 研究開発プログラム 報告書 流砂系における持続可能な土砂管理技術の開発、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-program/2016/pdf/pro-12.pdf> (2018年6月確認)
- 3) 永井孝志:環境水中重金属のスペシエーションと生物利用性 *環境毒性学会誌* 14(1), 13-23、2011
- 4) Fargašová, A., Bumbálová, A., & Havránek, E. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu+, Cu2+, Mn2+, Mo6+, Ni2+, V5+) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*, 38(5), 1165-1173, 1999
- 5) 環境庁:環境庁告示第46号、1991年8月
- 6) Stubblefield, W. A., et al. Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(10), 2082-2089, 1997
- 7) 中央環境審議会水環境部会 水生生物保全環境基準専門委員会:水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について (第二次報告)

## 生物応答手法を用いた下水処理水の評価と処理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：小川文章、北村友一、村田里美、  
藤村幸裕

## 【要旨】

国内 6 下水処理場の流入下水と放流水（各 19 サンプル）に対し、3 種生物（ムレミカヅキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ）を用いて生物応答（WET）試験と毒性同定評価（TIE）試験を行い、各処理水の特徴について検討を行った。排水サンプルに高い影響が確認されたムレミカヅキモとゼブラフィッシュ（稚魚の生残率）で流入下水と放流水を比較すると、NOEC $\leq$ 40%が試料全体に占める割合は、ムレミカヅキモでは95%から42%に、ゼブラフィッシュでは84%から0%まで減少し、下水処理工程で生物影響が軽減することが明らかになった。生物影響が確認された流入下水試料に対して TIE 試験を行ったところ、ゼブラフィッシュを用いた試験では、季節に関わらず A-E 処理場のサンプルで界面活性剤と酸化物が含まれる可能性が示唆された。同様の結果はムレミカヅキモの TIE 試験でも確認されたが、ゼブラフィッシュの結果と完全に一致しなかった。C、D 処理場の流入下水では、ムレミカヅキモとゼブラフィッシュの両者でアンモニアと非極性有機物の存在が推察された。D 処理場ではニセネコゼミジンコで放流水のみ NOEC < 5%の試料が検出され、陽イオン金属（ニッケル）が含まれることが推察された。放流水に一番影響が見られた D 処理場について、放流水が河川水に及ぼす影響を調査した。D 処理場は海から 1km 程度の場所にあることから海水が流入する汽水域と考え、海洋性のミジンコであるシオダマリミジンコを用いて影響評価を行った。放流水が放流口水と河川水に対する影響を調査した結果、いずれもシオダマリミジンコの NOEC $\geq$ 80%であり、放流水が海産甲殻類に及ぼす影響は小さいことが推察された。

キーワード：生物応答（WET）試験、毒性同定評価（TIE）試験、流入下水、放流水

## 1 はじめに

近年、日常生活や産業活動で使用される化学物質は多様化しており、日本の化審法では 3 万種、米国の TSCA では 8～9 万種、欧州の REACH では 10 万種を超えることが報告されている。環境中の化学物質の影響を評価する際、機器分析では新規化学物質や代謝物を評価することに限界があり、また化学物質が複数存在する場合の複合影響を評価することは難しい。特に流入下水は家庭や工場地帯など様々な場所から流入するため、ブラックボックス状態になっている。これらの理由から、下水処理水の安全評価には生物応答（Whole Effluent Toxicity：WET）試験が有用であると考えられる。

WET 試験は排水規制の目的で 1980 年代からアメリカを筆頭に、カナダ、ドイツ、イギリス、韓国等が積極的に導入を行っている。日本では環境省が「生物応答を利用した水環境管理手法」の制度化に向けた検討会を平成 29 年から開始しており（生物応答試験法等検討

WG）、国土交通省は平成 30 年から水系水質リスク検討会で下水処理における WET 試験の利用に向けた検討会を開始している。しかし WET 試験を用いた下水処理場の流入下水や処理水の特徴を報告した例は未だ少ない。今後下水処理水の安全評価における WET 試験の導入に向けて、より多くの情報を収集することが必要である。

本研究では国内の 6 下水処理場の流入下水と放流水の各 19 サンプルに対し、3 種生物（ムレミカヅキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ）を用いて WET 試験を行った。また影響が見られた試料については毒性同定評価（Toxicity Identification Evaluation：TIE）試験を行い、各処理場の特徴について検討を行った（2 章）。特に影響が確認された下水処理場では放流水が河川に及ぼす水質と生物影響の調査を行った（3 章）。

## 2. 6 下水処理場処理水の影響評価

### 2.1 実験材料および実験方法

#### 2.1.1 下水試料の採水

2014～2016年にかけて国内の6下水処理場から流入下水と放流水を採取し、WET試験に供した。採取場所を図1に示す。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コンポジットした。これら排水サンプルは60μmポアサイズのメッシュでろ過を行い、ろ液を4℃の冷暗所で保管した。



図1 下水処理水サンプルの採取地点

#### 2.1.2 WET試験

##### ①ムレミカツキモ

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法(検討案)<sup>2)</sup>の推奨種となっているムレミカツキモ(*Pseudokirchneriella subcapitata*, NIES-35株、国立環境研究所より分譲)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%)の試料を調整し、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、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 $1.0 \times 10^4$  cells/mL、温度24℃、光強度3000 Lux連続照射、回転振とう速度100 rpmとした。開始から72時間後に粒子計数分析装置(CDA-1000B、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

##### ②ニセネコゼミジンコ

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法(検討案)<sup>2)</sup>の推奨種となっているニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*, 国立環境研究所より分譲)を用

いた。各排水試料(原液を100%とする)に対して、それぞれ放流水を4段階希釈(40%、20%、10%、5%)した。容量は15mL/試験容器とし、試験連数は10連/試験区とした。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、市販のミネラルウォーター(エビアン:ボルビック=1:9で混合)を用いた。試験区ごとに生後24時間以内の個体を10匹(1容器1匹)曝露し、対照区で産仔数が60%以上の個体で3腹以上の産仔数になるまで(最長8日間)試験した。曝露方式は半止水式(1日毎に換水)とし、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。餌としてクロレラ(*Chlorella vulgaris*, リーセンテック株式会社)、ムレミカツキモ、YCT(Yeast, Cerophyll and Trout Chow, リーセンテック株式会社)を使用した。試験個体(1容器)ごとに、クロレラとムレミカツキモを合計の炭素含有量で0.03mg、YCTは50μLを毎日給餌した。試験個体の生存数と産仔数を毎日観察し、生残率と1個体当たりの累積産仔数を求めた。また、曝露期間中の水換え前後にpH、水温、DOの測定を行った。

##### ③ゼブラフィッシュ

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法(検討案)<sup>2)</sup>の推奨種となっているゼブラフィッシュ(*Danio rerio*, 国立環境研究所より分譲)を用いた。各排水試料(原液を100%とする)に対して、それぞれ放流水を5段階希釈(80%、40%、20%、10%、5%)した。容量は50mL/試験容器とし、試験連数は4連/濃度区とした。希釈水、対照区には脱塩素水を用いた。濃度区ごとに受精4時間以内のゼブラフィッシュの胚を40個(10個/連)曝露した。曝露期間は対照区の生存胚の半数以上が孵化した日を孵化日とし、孵化日から5日後までとした。曝露方式は半止水式(少なくとも週3回、2日または3日ごとに換水)とし、孵化率及び生存率を求めた。照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間とし、水温は $26 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。水質測定項目として、換水前・後(培養2日後)の試料のpH、水温、DOを測定した。

#### 2.1.3 毒性同定評価

2.1.2の試験で影響が見られた流入下水と放流水に対し、米国環境保護庁(U.S.EPA)が公布する慢性毒性同定評価<sup>3,4)</sup>を参考に毒性同定評価(TIE)を行った。表1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。生物影響が確認された処理場の流入下水および放流水(試料割合80%)に対し、a)無処理、

表1 毒性同定評価 TIE (Toxicity Identification Evaluation) による生物影響物質の推定

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

\* 米国環境保護庁(U.S.EPA)の資料を基に作成<sup>3,4)</sup>

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

○:生物影響が低下

SPE: 個相抽出

○<sup>1</sup>: pHが低いと生物影響が低下

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

△: 生物影響は低下しない

b) チオ硫酸ナトリウム添加 (5mg/L)、c) 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用いた。)、d) ばっ気 (下水試料 100% 1L / 1L air、1時間、ばっ気後に 20% に希釈)、e) pH 調整 (pH 約 6.5 に調整) の前処理を行った。また試料を 1.0 μm ポアサイズフィルターでろ過後に SPE (Solid Phase Extraction、固相抽出) カラム (Sep-Pak C18、Waters 社) を用い、f) カラムに通水したもの (SPE カラム通過水)、及び g) SPE カラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの (メタノール溶出物) を前処理水として同様に試験した。藻類試験では各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22 μm ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行ったものを供した。

#### 2.1.4 統計解析方法

WET 試験では、生長速度 (ムレミカツキモ)、産仔数 (ニセネコゼミジンコ)、孵化率と生残率 (ゼブラフィッシュ) 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、Dunnnett 検定による多重比較 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) で対照区と下水試料との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準  $\alpha = 0.05$ ) で対照区と下水試料の結果を比較した。これらの解析には統計解析ソフト R<sup>5)</sup>を用いた。排水試験では、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) として求めた。

TIE 法では無処理区と比較して統計学的に有意差有意水準  $\alpha = 0.05$  が認められ増殖が改善した場合に、前処理による生物影響が減少したと評価した。

## 2.2 結果と考察

2014~2016 年にかけて国内各地の 6 下水処理場から流入下水と放流水をそれぞれ 19 試料採取し、WET 試験を行った (表 2)。6 処理場のうち、3 処理場は標準活性汚泥法、1 処理場は嫌気好気活性汚泥法、1 処理場はオキシデーションディッチ法、1 処理場は嫌気好気ろ床法であり、同じ場所から複数回、季節別に試料を採取した。始めに 3 種生物間 (ムレミカツキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ) での下水処理水に対する感受性を比較した。その結果、これら生物種で NOEC  $\leq 40\%$  が全体に占める割合は、流入下水ではムレミカツキモ: 95% (18/19 試料)、ゼブラフィッシュ卵の孵化率: 37% (7/19 試料)、稚魚の生残率: 84% (16/19 試料)、ニセネコゼミジンコ: 5% (1/19 試料) となり、ムレミカツキモとゼブラフィッシュ稚魚の生残率が流入下水に対する WET 試験で感度が高いことが推察された (表 2)。感度が高かったムレミカツキモの試験では、下水処理後の放流水における NOEC  $\leq 40\%$  のサンプルは、42% (8 試料/19 試料) であった。また放流水に対するゼブラフィッシュの試験では、卵の孵化率と稚魚の生残率ともに NOEC  $\geq 80\%$  となり、影響が確認されなかった。これらの結果から、流入下水は下水処理工程を経て、毒性が低減されることが明らかになった。

NOEC  $\leq 40\%$  で影響が見られた排水サンプルに対し、それぞれの生物種で TIE 試験を行った。その結果、生物種により、原因物質に対する感受性が異なることが明らかになった (表 2)。ゼブラフィッシュでは流入下水を① SPE カラムに通過させる、②曝気、③4°C保存により、74% (13 試料/19 試料) の試料で毒性の低減が確認された。また 57.9% (11 試料/19 試料) の試料でチオ硫酸ナトリウムの添加により毒性の低減が確認された。これらの結果は、A-E の流入下水には季節に関わらず界面活性剤と酸化物が含まれる可能性を示

表2 各下水処理場の流入下水と放流水に対するWETとTIEの結果

(A) 流入下水

場所	処理法	年	月	WET				TIE																	
				NOEC				酸化物			アンモニア			無機性有機物			界面活性剤			陽イオン金属			全溶解固形分(TDS)		
				P	C	D <sup>H</sup>	D <sup>S</sup>	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D
A	標準活性汚泥法	2014	10	≧80	/	≧80	40																		
			1	10	≧40	40	40	○		○						○		○							
		2015	2	20	≧40	≧80	40			○								○							
B	標準活性汚泥法	2014	9	42	/	≧80	5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			12	40	/	≧80	40		/	○		/					/	○		/			/		
		2015	3	20	≧40	20	20			○	○				○		○		○						
D	標準活性汚泥法	2014	11	5	/	40	40	○	/	○	/			○	/	○	/	○		/			/		
			2	10	≧40	≧80	40			○					○		○								
		2015	5	20	≧40	≧80	40			○	○				○		○								
B	嫌気好気活性汚泥法	2015	1	20	20	40	40		/	○				○	/	○		/				/			
			4	40	≧40	≧80	≧80	○		○					○										
			7	20	≧40	40	40			○	○							○							
10	20		≧40	≧80	40	○		○						○		○		○							
E	オキシアンモニウム法	2016	1	20	≧40	≧80	40				○			○		○		○							
			7	20	≧40	40	20																	○	
F	嫌気好気法	2016	2	20	≧40	≧80	≧80	○										○							
			8	20	≧40	≧80	≧80				○														

(B) 放流水

場所	処理法	年	月	WET				TIE																	
				NOEC				酸化物			アンモニア			無機性有機物			界面活性剤			陽イオン金属			全溶解固形分(TDS)		
				P	C	D <sup>H</sup>	D <sup>S</sup>	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D	P	C	D
A	標準活性汚泥法	2014	10	≧80	/	≧80	≧80		/		/								/					/	
			1	40	≧5	≧80	≧80	○										○							
		2015	2	40	≧40	≧80	≧80	○			○							○							
B	標準活性汚泥法	2014	9	≧83	/	≧80	≧80		/		/			/				/					/		
			12	≧80	/	≧80	≧80		/		/							/					/		
		2015	3	10	≧40	≧80	≧80	○			○														
C	標準活性汚泥法	2014	11	≧80	/	≧80	≧80		/		/			/				/					/		
			2	40	≧40	≧80	≧80	○			○														
		2015	5	≧80	≧40	≧80	≧80																		
D	嫌気好気活性汚泥法	2015	1	40	≧5	≧80	≧80	○	/		/			/		○	/		/			/			
			4	≧80	≧5	≧80	≧80		/		/			/			/		/			/			
			7	≧80	≧5	≧80	≧80													○					
10	≧80		≧5	≧80	≧80				○										○						
E	オキシアンモニウム法	2016	1	40	≧40	≧80	≧80																		
			7	≧80	≧40	≧80	≧80																		
F	嫌気好気法	2016	2	20	≧40	≧80	≧80	○																	
			8	20	≧40	≧80	≧80				○									○					

WET：排水管理法 (Whole Effluent Toxicity)、NOEC：無影響濃度、TIE：毒性同定評価

P：ムレミカツキモ、C：ニセネコゼミジンコ、D<sup>H</sup>：ゼブラフィッシュ (卵のふ化率)、D<sup>S</sup>：ゼブラフィッシュ (稚魚の生残率)

唆している。同様な毒性はムレミカツキモのTIE試験でも確認されたが、それらの結果は完全にはゼブラフィッシュと一致しなかった。一方、CとD処理場の流入下水では、ムレミカツキモとゼブラフィッシュの両方でアンモニア (低pHで毒性が低減) と非極性有機物 (SPEカラムに通過させたろ液で毒性が低減) の存在が推察された。「生物応答を利用した排水管理法の活用について (2015)」<sup>6)</sup>では、「排水基準の設定の考え方を踏まえ、排水に対する3種類の生物応答試験結果のいずれかにおいて、排水の毒性を無影響にするため

に必要な希釈倍率が10倍を超過する場合、すなわち、最大無影響濃度NOEC (%) の逆数TU (Toxic Unit = 100/NOEC) が10を超過する場合、その排水について、改善の必要があると評価することが想定される。」と記述されている。しかしD下水処理場ではニセネコゼミジンコの試験において、流入下水ではNOEC ≤ 40%の試料は検出されなかったが、放流水では、NOEC < 5%が4試料検出された。これらの試料に対しTIE試験を行った結果、EDTA添加により生物影響の改善が見られ、ここから陽イオン金属の存在が推定された。

7月と10月のサンプルの金属イオン (Cu, Ni, Zn) を測定し、40%試験溶液の濃度を推定したところ、Cu: 1.12~1.38 µg/L、Ni: 14.53~15.82 µg/L、Zn: 17.18~23.26 µg/Lであった。ニセネコゼミジンコの繁殖に対する銅のNOECと最低影響濃度 (Lowest Observed Effect Concentration: LOEC) は硬度 94.1 mg/Lで 6.3 µg/Lと 9.9 µg/L、NiのNOECとLOECは硬度 113 mg/Lで 5.3 µg/Lと 9.9 µg/L、ZnのNOECとLOECは硬度 82.4 mg/Lで 13 µg/Lと 25.1 µg/Lと報告されている<sup>7)</sup>。LOECに比べ、TIE試験で用いた試料溶液中のNi濃度の推定値が高いことから、D下水処理場の放流水ではNiの存在が生物影響に大きく寄与することが考えられた。

### 3. D処理場の放流水が河川水へ及ぼす影響の評価

#### 3.1 実験材料および実験方法

##### 3.1.1 試料の採水

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

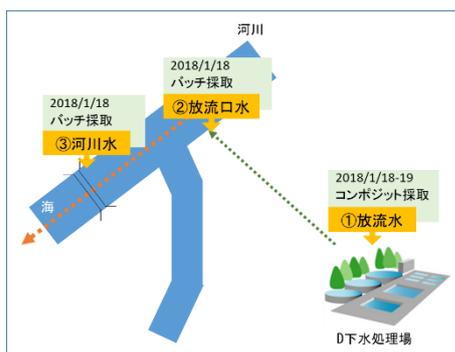


図2 各水サンプルの採取場所

##### 3.1.2 シオダマリミジンコを用いた影響試験

本試験は海産生物毒性指針<sup>8)</sup>を参考に実施し、試験水産庁海産生物毒性試験指針生物には、シオダマリミジンコ (*Tigriopus japonicus*, 一般財団法人九州環境管理協会に委託)を用いた (図3)。各排水試料 (原液を100%とする) に対して、それぞれ放流水を5段階希釈

(80%、40%、20%、10%、5%)した。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、蒸留水に人工海水のもと (テトラ (製) マリンソルトプロ) を添加して塩分濃度 32 に調製し、試験用水として用いた。対照区は天然海水を用いた。試験前日に継代培養している個体群の中から卵嚢を有する雌のみを取り出し、別容器に収容して試験開始まで飼育した。試験開始時に200µmのメッシュで幼生と親を分離し、幼生を希釈水で洗浄後試験に用いた。各試験の容量は5mL/試験容器とし、試験連数は4連/試験区とした。曝露方式は止水式とし、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は22±1°Cとした。試験区ごとに幼生を20匹 (1容器5匹) 曝露し、開始から24時間後に遊泳阻害及び異常な挙動の有無を観察した。15秒間に一度も遊泳できない場合を遊泳阻害とみなした。遊泳阻害率 (%) は各試験区の遊泳阻害個体数から求めた。

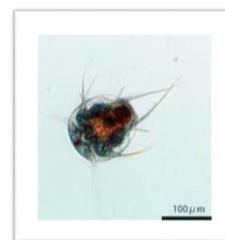


図3 シオダマリミジンコの顕微鏡写真

##### 3.1.3 ニセネコゼミジンコを用いた影響試験

###### 2.1.2 WET試験参照のこと。

##### 3.1.4 試料水の一般水質項目と金属イオンの測定

一般水質項目として、溶存酸素 (DO)、pH、水温、溶存性有機炭素 (DOC)、浮遊物質 (SS)、揮発性浮遊物質 (VSS)、Na<sup>+</sup>、NH<sup>4+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を測定した。pHと水温の測定はHM-31P (東亜-DKK製) で測定した。金属イオンはガラス製ろ紙 (GF/B、Whatman製) でろ別したろ液をホットプレート分解に供して前処理し、ICP-MS (7700x、Agilent社製) により行った。

#### 3.2 結果と考察

2015年のD処理場の放流水においてニセネコゼミジンコに対する影響が確認されたため、再度2017年度にD処理場の放流水を採取し、同時に放流口水と河川水を採取することで放流水が河川水に及ぼす生物影響を検討した。D処理場は海から1km程度の場所にあることから海水が流入する汽水域と考え、海洋性のミ

表3 各サンプル水中の一般水質項目

	DO (mg/L)	pH	水温 (°C)	SS (mg/L)	VSS (mg/L)	DOC (mg/L)	Na+ (mg/L)	NH <sub>4</sub> + (mg/L)	K+ (mg/L)	Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	Cl- (mg/L)	NO <sub>2</sub> - (mg/L)	NO <sub>3</sub> - (mg/L)	SO <sub>4</sub> 2- (mg/L)
①放流水	10.1	6.9	10.9	4.2	3.9	8.28	132.81	1.51	10.24	17.91	37.86	156.83	3.15	22.59	158.35
②放流口水	9.7	7.0	13.2	5.4	1.9	2.95	3776.55	-	129.76	475.87	179.13	6769.39	-	11.24	991.54
③河川水	9.6	7.2	12.1	7.1	1.5	3.23	2027.51	-	67.04	180.32	100.15	3627.84	-	8.46	526.41

ジンコであるシオダマリミジンコを用いて影響評価を行った。

始めに、試験に用いた各水サンプルの一般水質項目を検討した(表3)。その結果、①放流水に比べ②放流口水と③河川水のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度は3.3~43倍に増加することが明らかになった。採取時間は干潮の時刻であったことから、海水が放流口水と河川水に流入し、海水中の成分が混入することで上記のイオン成分が増加したと考えられた。

次に、各水サンプルの金属イオン(ニッケル: Ni、マンガン: Mn、亜鉛: Zn、鉄: Fe、アルミニウム: Al)の濃度を測定した(図4)。その結果Ni、Mn、Zn濃度は放流水から河川水にかけて減少することが明らかになった。これらの現象は放流水が河川水に流れ込む過程で希釈されることが要因であると推察された。一方Feの濃度は変動せず、Alは放流水より河川水で濃度が高くなる現象が確認された。

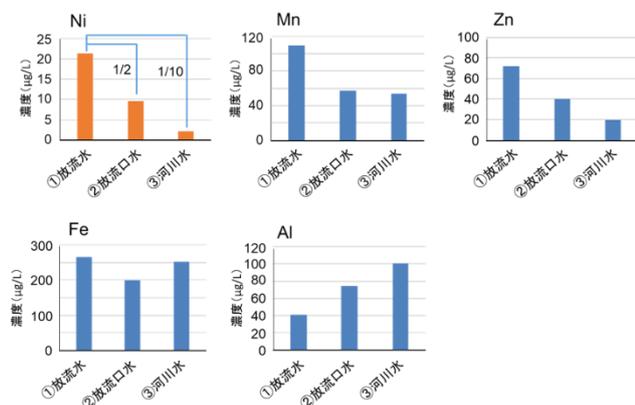


図4 各サンプル水中の金属濃度

各水サンプルに対するニセネコゼミジンコとシオダマリミジンコを用いた生物影響評価を行った。ニセネコゼミジンコは淡水生物であるため①放流水のみ試験を行った(放流口水と河川は塩分濃度が高いため、ニセネコゼミジンコの生育は困難と考えた。)。シオダマリミジンコは海洋生物であるため①放流水、②放流口水、③河川水にそれぞれ既定の塩分濃度に合わせてマ

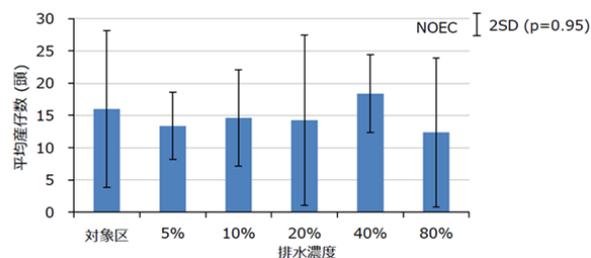


図5 放流水に対するニセネコゼミジンコを用いた影響評価

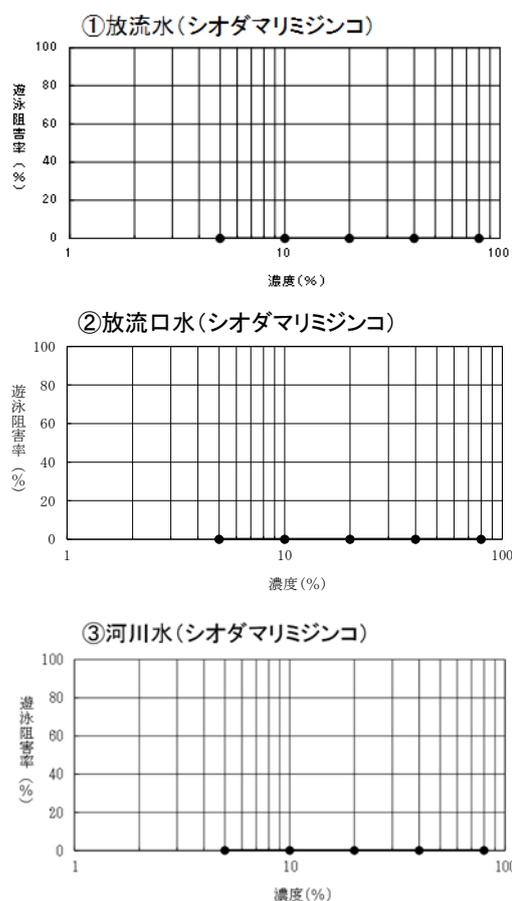


図6 放流水、放流口水、河川水に対するニセネコゼミジンコを用いた影響評価

リンソルトプロを添加し、試験を行った。ニセネコゼミジンコを用いて①放流水を試験した場合、対照区に

比べ全試験濃度区の平均産仔数の影響は見られず、NOEC $\geq$ 80%であることが明らかになった(図5)。またシオダマリミジンコを用いて①放流水、②放流口水、③河川水を試験した結果、対照区に比べ全試験濃度区において遊泳阻害の影響は見られず、NOEC $\geq$ 80%であることが明らかになった(図6)。これらの結果は、今回採取したD処理場の放流水の影響は小さく、かつ放流口水や河川水に及ぼす影響も小さいことを示している。2015年の放流水ではニセネコゼミジンコに影響が見られたが、本実験では排水濃度80%でも影響は見られなかった。この要因として、D処理場は合流式であり、採取日の前日が雨天であったことが要因の一つとして考えられる。

#### 4 まとめ

本研究では6下水処理場の流入下水と放流水のそれぞれ19サンプルについてWET試験を行った。その結果、流入下水は下水処理工程を経て、毒性が低減されることが明らかになった。一方、陽イオン金属(Ni)は、下水処理工程で除去されにくいことが推察された。本試験では放流水から河川水にかけてNi濃度は1/10程度まで希釈されることで、水生生物に対する影響は低減することが明らかになったが、陽イオン金属が多く流入する下水処理場では、金属を除去する処理技術を組み合わせた処理法が必要であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 環境省：諸外国におけるWET手法の活用事例について、  
<http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf/01/mat02-3.pdf>
- 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)、2013
- 3) U.S.EPA：Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 1999
- 4) U.S.EPA：Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992
- 5) R Core Team：R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>, accessed on May 2015
- 6) 生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会：生物応答を利用した排水管理手法の活用について、2015
- 7) 眞野浩行、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応、土木学会論文集G(環境)、2016
- 8) 水産庁：魚介類水質環境基準検討調査総合報告書(海産生物毒性試験指針)、2000

## 下水に含まれるナノ物質等の挙動および影響把握に関する研究

研究予算：運営交付金

研究期間：平 29～平 33

担当チーム：水質チーム

研究担当者：小川文章、北村友一、對馬育夫、  
村田里美、鈴木裕識

### 【要旨】

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行った。その結果、10 kDa より大きい画分では、銀ナノ粒子が下水中に含まれる溶存化合物と共存することで、銀ナノ粒子の持つ毒性が軽減されることが示唆された。つまり、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えられる。また、下水に含まれる繊維状のマイクロプラスチックの検出方法を構築することを目的として、下水処理場の最初沈殿汚泥を対象に、比重分離法と Nile Red 染色試薬による染色法を組み合わせた前処理の後に蛍光顕微鏡で観察する手法を検討した。その結果、ナイロン繊維（長軸径約 500 μm、短軸径約 10 μm）の添加回収実験の回収率は 89.2%であり、本手法が同様な繊維状マイクロプラスチックの検出に有効であることが示唆された。

キーワード：下水処理場、ナノマテリアル、藻類増殖試験、マイクロプラスチック、繊維状マイクロプラスチック、Nile Red 染色、蛍光顕微鏡観察

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

本研究は、平成 29 年度から平成 33 年度までの計画

で、下水に含まれるナノ物質やマイクロプラスチック等の微小粒子の定性・定量方法を構築し、それらが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。

### 2. ナノ物質について

#### 2.1 研究背景

近年、ナノテクノロジー産業の発展につれて、ナノマテリアルが環境中へ流出することが問題視されつつある。ナノ粒子は粒径が 100 nm 未満の物質の総称であり、有機物・無機物を問わず数多くの種類が存在する<sup>1)</sup>。その中でも、今後、使用量の増加が見込まれる銀ナノ粒子に着目し、研究を行った。銀ナノ粒子は、化粧品や洗剤に含まれており、抗菌作用や導電性、易加工性を持ち、応用性が高く使用用途は多岐に渡る<sup>2)</sup>。

家庭や工場で使用された銀ナノ粒子は下水に流入し、下水処理場へ運ばれ、下水処理過程で大部分が汚泥系に移行する。しかし、一部の銀ナノ粒子は除去されずに放流され、水生生物に影響を与える可能性が指摘されている<sup>3,4)</sup>。また、下水処理方法によっては、下水処理を行っても、銀ナノ粒子が未処理のまま河川へ放流されることも考えられる。

これまでに銀ナノ粒子の水生生物への単独影響に

ついてはいくつか研究報告例がある。一方で、製品から漏出された銀ナノ粒子は、環境中においては、水中に含まれる化学物質と共存していると考えられることから、共存する化学物質と銀ナノ粒子の水生生物への複合影響を評価しなければならない。そのような研究は、魚類 (*Danio rerio*) に対して行った既往研究例<sup>5)</sup>を除きほとんどないのが現状である。生物毒性試験では、試験に使用した生物によって、別々の化学物質と反応している可能性が指摘されており、同じ下水と銀ナノ粒子を用いた複合影響試験でも、試験に使用する生物が異なれば、異なる影響が確認される場合がある<sup>6)</sup>。また、複合影響を引き起こす下水中の化学物質の探索を行った研究も存在しない。そこで、本研究では下水と銀ナノ粒子の複合影響(相加・相乗・相殺)を評価すること、及び、銀ナノ粒子と複合影響を引き起こす下水に含まれる化学物質について知見を得ることを目的とした。

## 2. 2 実験方法

### 2. 2. 1 下水採取、サイズ分画

工場排水を主流入源とする下水処理場の流入原水と処理水(塩素注入前)をコンポジット採水し、各試料を 0.1  $\mu\text{m}$ 、0.02  $\mu\text{m}$ 、0.01  $\mu\text{m}$ 、50 kDa、10 kDa の順に膜ろ過を行うことで、流入原水と処理水の各サイズ分画を得た。サイズ分画フロー図を図 1 に示す。ろ過方式はクロスフローとした。0.1  $\mu\text{m}$ 、0.02  $\mu\text{m}$ 、0.01  $\mu\text{m}$  の膜はポリスルホン製中空糸膜(マイクロザ UF 膜:旭化成ケミカルズ)、50 kDa、10 kDa の膜はポリスルホン製平膜(ULTRAFILTER: ADVANTEC)を使用した。また、超純水を同様の分画方法でろ過することで、装置由来の化学物質を含むブランク試料を採取した。

### 2. 2. 2 水質分析項目

2. 2. 1 で分画された試料の水質分析を行った。DOC、DN については、TOC 計(TOC-L: 島津製作所)を用いて測定した。UV<sub>254</sub>については、紫外可視分光光度計(UV-1800: 島津製作所)を用いて測定した。

### 2. 2. 3 生物影響試験

サイズ分画試料を得た際に、ろ過を行った装置から漏出される化学物質が藻類生長阻害に影響しているのかの確認を行うために、超純水を 2. 2. 1 と同様にサイズ分画して、得られたブランク試料について生物影響試験を行った。対照区と比較して、特定の試料割合で悪影響が確認された場合、影響が確認されなかった試料割合を単

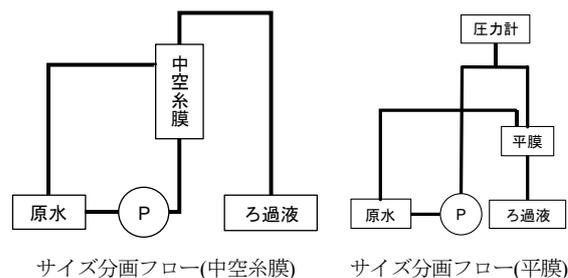


図 1 サイズ分画時のフロー

独影響試験および複合影響試験の最大試料割合とした。次に、銀ナノ粒子、流入原水、処理水の各単独影響試験を行い、試料割合や濃度と、阻害率の関係を評価し、複合影響試験時の実験条件を決定した。本研究では、流入原水・処理水の試料割合は 20%、銀ナノ粒子(10 nm particle size、SIGMA-ALDRICH)濃度は 1 mg/L とし、各サイズ分画の流入原水と、処理水、銀ナノ粒子のそれぞれの単独影響試験と複合影響試験(銀ナノ粒子 1 mg/L + サイズ分画下水 20%)を行い、単独影響と複合影響の比較を行った。

### 2. 2. 4 藻類生長阻害試験

生物影響試験は「生物応答を用いた排水試験法(検討案)」<sup>7)</sup>を参考に緑藻ムレミカヅキモ(NIES-35)を用いて行った。対照区は AAP 培地とし、各下水試料には AAP 培地作成時と同等の栄養塩を添加した。各試料は孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過滅菌を行った。容量は 10 mL/容器とし、対照区は 6 連、各試験区は 3 連とした。初期細胞濃度  $1.0 \times 10^4$  cells/mL、温度 24  $^{\circ}\text{C}$ 、光強度 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に対照区と各試料の細胞濃度を求め、藻類生長速度( $\text{day}^{-1}$ )と藻類生長阻害率(-:無次元)を、それぞれ式(1)、(2)により算出した。

$$\text{生長速度}[\text{day}^{-1}] = \{\ln(72 \text{ 時間後の藻類濃度}[\text{cells}/\text{mL}]) - \ln(\text{初期藻類濃度}[\text{cells}/\text{mL}])\} \div 3[\text{day}] \quad (1)$$

$$\text{阻害率}[-] = \frac{(\text{対照の平均生長速度} - \text{試験区の平均生長速度})[\text{day}^{-1}]}{(\text{対照の平均生長速度})[\text{day}^{-1}]} \quad (2)$$

### 2. 2. 5 複合影響評価

複合影響予測モデルを用いて複合阻害率の予測値を算出し、複合阻害率の実測値との比較を行った。複合影響予測モデルは化学物質同士の相乗・相殺効果を考慮せず、相加効果であることを過程したモデルのため<sup>6)</sup>、予測モデルにより算出した複合阻害率の実測値と予測値を

比較することで、相加効果や相乗効果、相殺効果といった複合影響評価が可能となる。複合阻害率の予測値よりも実測値のほうが高ければ相乗効果、低ければ相殺効果、同等であった場合は相加効果とした。複合阻害率の予測値(-:無次元)は、下式(2)により算出した<sup>8)</sup>。

$$\text{予測値}[-] = 1 - (1 - R_{Ag}) \times (1 - R_{Ef}) \quad (3)$$

$R_{Ag}$ : 銀ナノ粒子単独阻害率[-],  $R_{Ef}$ : 下水単独阻害率[-]

また、得られた生長速度について、流入原水、もしくは処理水の各サイズ画分間に有意差の有無を確認するために、R version 3.3.0<sup>9)</sup>を用いて、統計解析を行った。等分散性の検定のために Bartlett 検定を行い、等分散性を検討した。等分散性を仮定できる場合は、Tukey-kramer 検定を行い、試験区間の有意差の有無を確認した。等分散性を仮定できない場合は、Steel-Dwass 検定を行い、試験区間の有意差の有無を確認した。なお、有意水準は  $p=0.05$  とした。

## 2. 2. 6 複合影響要因物質探索

2. 2. 2において、流入原水や処理水の各サイズ画分+銀ナノ粒子の複合影響試験で、サイズ画分間で生長速度に有意差が確認された範囲について、励起蛍光マトリクス(EEM)を測定した。測定励起・蛍光幅は 220 nm~600 nm、励起・蛍光サンプリング間隔は 5 nm、励起・蛍光スリット幅は 10 nm、ホトマル電圧を 400 V とした。また、測定前に 450  $\mu\text{g/L}$  の硫酸キニーネ( $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ )を使用して、標準化を行った。測定後、得られた EEM について、グラフ描写ソフト(Origin Pro 2016J)により、縦軸を励起波長、横軸を蛍光波長、高さ軸を蛍光強度として、3次元等高線図を作成した。

## 2. 3 結果と考察

### 2. 3. 1 ブランク評価

流入原水と処理水の各サイズ画分の水質(DOC, DN,  $\text{UV}_{254}$ )を表 1 に示す。また、ブランク試験の結果を図 2 に示す。図 2 より、10 kDa 未満のブランク試料を 80% 混合させたとき、藻類の生長速度の低下が観察された。したがって、10 kDa の試料を 80% 混合した培地では、毒性評価試験で影響が出たとしても、下水中に含まれる化学物質が原因なのか、装置そのものから溶出した化学物質が原因なのか不明となる。そのため、以降の試験では 10 kDa のサイズ画分においては、混合割合を最大 40% とした。

### 2. 3. 2 複合影響評価

流入原水と処理水における複合阻害率予測値と複合

表 1 処理水の水質データ

流入原水 DOC、DN [mg/L]					
項目	0.1 $\mu\text{m}$	0.02 $\mu\text{m}$	0.01 $\mu\text{m}$	50 kDa	10 kDa
	未満	未満	未満	未満	未満
DOC	27.9	26.7	26.0	21.7	17.3
DN	23.3	19.1	19.5	18.9	13.8
$\text{UV}_{254}$	0.517	0.473	0.500	0.462	0.353
処理水 DOC、DN [mg/L]					
項目	0.1 $\mu\text{m}$	0.02 $\mu\text{m}$	0.01 $\mu\text{m}$	50 kDa	10 kDa
	未満	未満	未満	未満	未満
DOC	13.3	11.1	11.3	11.9	12.2
DN	15.3	13.8	13.0	14.7	14.1
$\text{UV}_{254}$	0.342	0.340	0.329	0.316	0.293

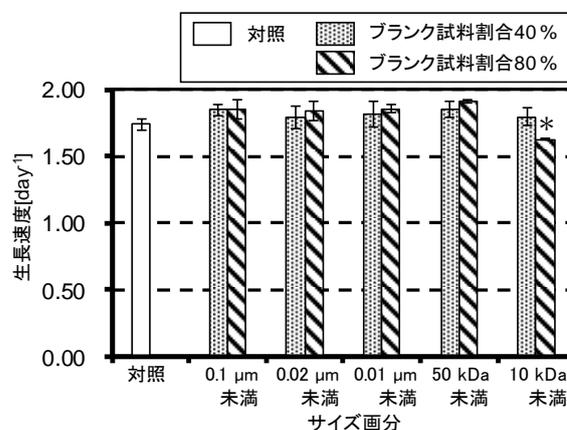


図 2 緑藻ムレミカツキモに対するブランクによる生長速度変化

\* : 対照区よりも有意な低下を確認 ( $p < 0.05$ )

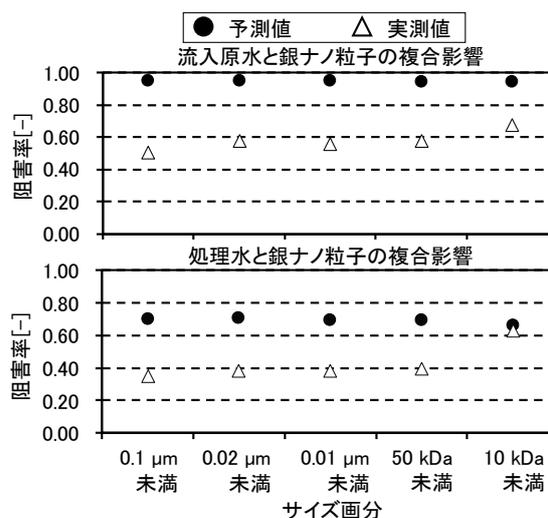


図 3 緑藻ムレミカツキモに対する複合阻害率の実測値と予測モデルで算出した複合阻害率予測値

阻害率実測値を図3に示す。流入原水の全てのサイズ画分と処理水の10 kDa画分以外において、阻害率は、予測値よりも実測値が低くなった。一方で、処理水の10 kDa画分では、実測値と予測値が同等であった。したがって、処理水の10 kDaのサイズ画分を除き、銀ナノ粒子は流入原水および処理水に対して相殺効果を示すことが示唆された。一方で、処理水の10 kDaのサイズ画分では、相加効果が示唆された。

### 2. 3. 3 複合影響要因物質のサイズ画分推定

複合影響試験で得られた各サイズ画分における生長速度を図4に示す。流入原水では0.1 μmと0.02 μm、及び、50 kDaと10 kDaの間に、処理水では50 kDaと10 kDaの間において阻害率の上昇が確認された。したがって、流入原水では0.1 μm~0.02 μm、50 kDa~10 kDaの範囲と10 kDa未満に、処理水では50 kDa~10 kDaの範囲にて銀ナノ粒子と相殺効果を引き起こす化学物質が存在すると示唆された。

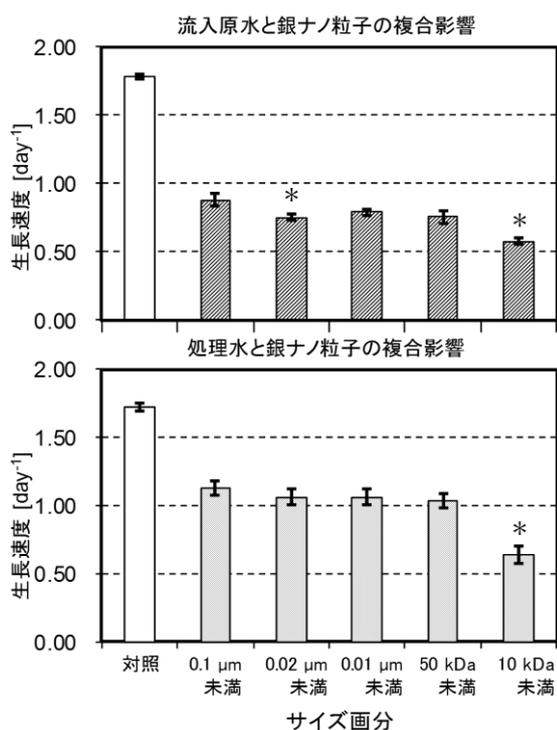


図4 緑藻ムレミカツキモに対する下水+銀ナノ粒子による成長速度変化

\* : 一つ大きいサイズ画分よりも有意な低下を確認 (p<0.05)

### 2. 3. 4 複合影響要因物質の詳細分析

2. 3. 3より推定したサイズ画分の範囲について EEM

測定を行った結果を図5に示す。図5より、各サイズ画分の範囲にそれぞれ EEM 測定によりピークが見られた。このピーク位置と既往研究との比較の結果、表2のような物質が得られた。したがって、表2にて得られた有機物が銀ナノ粒子との相殺効果を主に引き起こす化学物質であることが示唆された。

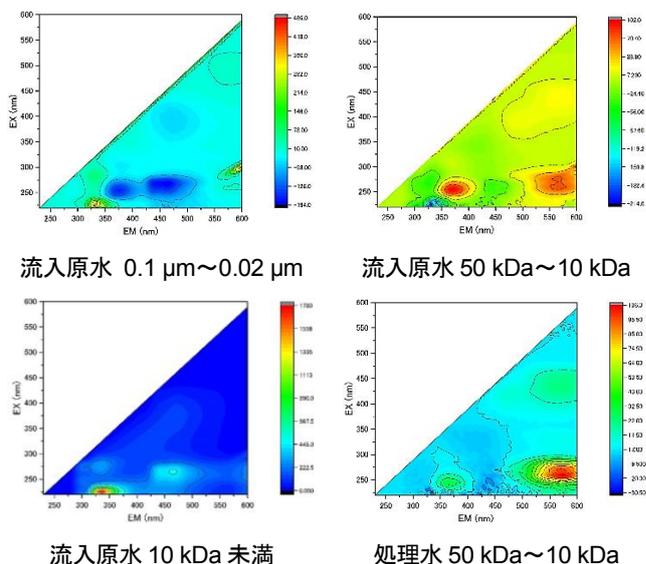


図5 流入原水・処理水の EEM データ

表2 図5より推定されたサイズ毎の有機物

	サイズ	観測された物質(EX/EM)
流入原水	0.1 μm~0.02 μm	トリプトファン様物質(225/325)
	50 kDa~10 kDa	タンパク質様物質(250/375) フルボ酸様物質(275/570)
	10 kDa 未満	トリプトファン様物質(225/330) チロシン様物質(275/330) フミン質様物質(275/450)
処理水	50 kDa~10 kDa	フルボ酸様物質(250/575) タンパク質様物質(250/375) フミン質様物質(450/575)

Elke らが行った研究では、*Danio rerio* において、銀ナノ粒子と下水の複合影響は相殺効果であることが示唆されている<sup>9)</sup>。本研究では、緑藻ムレミカツキモ (NIES-35) でも同様に相殺効果が得られた。また、相殺効果を引き起こす化学物質が、流入原水では、0.1 μm~0.02 μm、50 kDa~10 kDa、10 kDa 未満のサイズで、処理水では50 kDa~10 kDaのサイズに存在すると示唆された。

Chappell らが行った研究では、市販のフミン質に銀ナノ粒子を添加したことで、キレート作用を起こし、銀ナノ粒子

が持つ毒性を低減したことが明らかとなっている<sup>10)</sup>。本研究では、流入原水・処理水ともにフミン質様物質の存在が確認されたため、フミン質様物質とキレート作用を起こし、銀ナノ粒子の持つ毒性が低減したと示唆された。また、表2より、フミン質様物質だけでなく、フルボ酸様物質やタンパク質様物質もキレート作用を起こすであろうと考えられる。

### 3. マイクロプラスチックについて

近年5 mm以下のマイクロプラスチックによる水環境汚染が注目を集めている。発生源として様々なものが想定されるが、大きく分けると、プラスチック製品原料である樹脂ペレットや化粧品類のスクラブビーズ、塗料原料や研磨剤など、マイクロプラスチックであることが下流製品の要求仕様となっている「1次」マイクロプラスチックと、元々は種々のプラスチック製品であったものが環境中に流出することにより、紫外線や機械的破壊により時間と共に破碎され、微細化した「2次」マイクロプラスチックの2種類に整理することができる<sup>11)</sup>。欧米各国では、2014年以降、水で洗い流す化粧品に含まれるマイクロビーズの使用禁止に関わる規制の動きがみられ始めた<sup>11)</sup>。2017年にはG7ボローニャ環境大臣会合において海洋ごみの問題、とりわけプラスチックごみとマイクロプラスチックへの懸念が改めて表明され、問題解決のための施策の実施に対するコミットメントが再確認されている<sup>12)</sup>。本研究では、まず、下水に含まれるマイクロプラスチックについて研究を進める上で基礎となる既往の知見を整理した。

マイクロプラスチックの研究動向を把握するために、Science Directのウェブサイト<sup>13)</sup>において「Microplastics」をキーワードに検索をかけた。その結果を図6に示す。総数2011件がヒットし、最終的に関連文献が530件抽出された(2018年3月1日時点)。論文数は2010年頃から上昇傾向にあり、それ以前とそれ以降では文献数が264倍に急増している。文献の種類をみると、海洋汚染に関連する研究報告が全体の約73%、陸域の水環境に関連するものが約18%、下水処理に関連するものが3.6%であった。これは海洋ゴミ(Marine Debris)問題からマイクロプラスチック汚染が提起されてきた経緯が反映されたものであり、陸域の水環境の研究事例が未だ少ないことを示している。また、毒性や化学物質の吸着に関連する報告は全体の約18%であった。

毒性関連の研究動向に着目すると、マイクロプラス

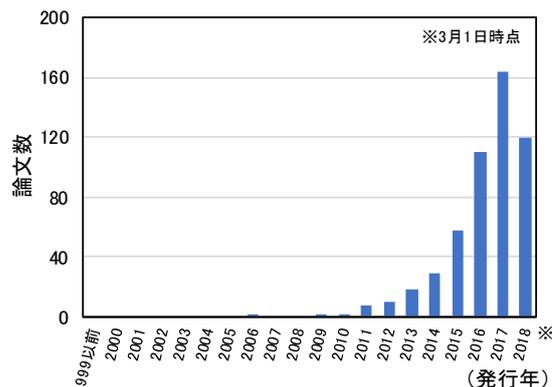


図6 マイクロプラスチック研究の関連文献数の推移

チックという異物を摂食することによる物理的影響(ポリスチレン粒子曝露によるゼブラフィッシュ成魚の肝臓の炎症<sup>14)</sup>、ポリエチレン粒子曝露によるメダカの肝臓の液胞形成や細胞死<sup>15)</sup>、ポリ塩化ビニル曝露によるスズキ目魚類の腸機能の障害<sup>16)</sup>)と、化学物質との複合影響(ポリエチレン粒子にPFOSやPCBなどの複数の化学物質を吸着させて曝露させた際にゼブラフィッシュ中でcyp1a, prdx1などの遺伝子発現が上昇<sup>17)</sup>、ベンゾ[a]ピレンを吸着させた粒子のゼブラフィッシュへの曝露の結果、鰓などに付着した粒子から汚染物質が溶出し体内へ取り込まれたという報告<sup>18)</sup>)の2種類の研究動向に分けて整理することができる。特に、化学物質との複合影響においては、化学物質が添加剤等としてプラスチック製品に排出時から含まれている場合と、環境中で汚染物質が収着した結果含まれている場合とを区別して議論しなければならない。下水道には多様な化学物質が流入していることから、下水を対象とする際には、マイクロプラスチックに収着する化学物質との複合影響を考慮した上で研究を展開する必要があることが示された。

### 3.1 研究背景

マイクロプラスチックは、上述の通り、陸域の水環境からの検出報告例が少なく、下水処理場についての報告例は限られている。そのような中、Carr *et al.* (2016) はアメリカ合衆国の下水処理場に流入した99.9%のマイクロプラスチックが処理場で除去されており、二次処理までの間にそのほとんどが除去されていたと報告した<sup>19)</sup>。同様に、Murphy *et al.* (2016) のイギリスでの調査では二次処理での除去率が98.4%<sup>20)</sup>、Talvite *et al.* (2017a) *et al.*の調査では二次処理での除去率が99.9%であったとしている<sup>21)</sup>。一方で、洗濯排水等からの流入が懸念される繊維状のマイクロプラスチックの検

出・同定に関する報告例は少ない。以上の背景を踏まえ、本研究では、下水試料を対象に、短軸径が数  $\mu\text{m}$  程度の極微小な繊維状のマイクロプラスチックの検出方法として、比重分離法と染色法を組み合わせた手法を検討した

### 3.2 実験方法

2017年10月18日に茨城県内の下水処理場で採取した最初沈殿汚泥（初沈汚泥）を用いて、既往研究<sup>22)</sup>、<sup>23)</sup>を参考に方法を検討した。初沈汚泥 200 mL を乾燥させ、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加えて  $60^\circ\text{C}$  で4時間加熱し夾雑有機物を分解した。ろ過（ $10\ \mu\text{m}$ ）後の残渣を Etanol に懸濁させて遠心分離（ $\times 710\text{g}$ , 10分）し、沈殿物を NaI 溶液に懸濁させて遠心分離後、上澄み液をろ過（ $0.2\ \mu\text{m}$ ）した。ろ紙に Milli-Q 4 mL と Nile Red 溶液（ $1\text{mg/mL}$ -Acetone, Sigma-Aldrich 製）200  $\mu\text{L}$  を加えて染色し、スライドガラスに移して観察試料とした。観察には落射型蛍光顕微鏡（BX51, Olympus 製）の B 励起モードを用いた。方法の評価のため、標準ナイロン繊維（Nylon 6,6, 長軸径約  $500\ \mu\text{m}$ 、短軸径約  $10\ \mu\text{m}$ , GoodFellow 製）を 56 本添加した試料を分析し、回収率を求めた。

### 3.3 実験結果

顕微鏡により観察された初沈汚泥試料の様子を図 7 に示す。明視野観察では、前処理で除去されずに残留した夾雑物により全体が白色っぽく、識別が容易ではなかった。一方、落射蛍光観察では、赤、黄、緑に発色された粒子や繊維が観察された。標準品として添加したナイロン繊維は赤色に発色しており、試料由来の赤発色繊維も観察された。赤発色繊維の検出結果を図 8 に示す。添加したナイロン繊維の回収率は 89.2% であった。前処理操作の繰り返しによる回収率や使用器具への残留を検討した結果、NaI 添加と遠心分離の繰り返し操作では、1 回目に 64.3%、2 回目に 17.9% が回収され、3 回目以降は回収されなかった。また、使用したビーカーの洗浄液から 5.4%、ろ過器の洗浄液から 1.8% が回収された。初沈汚泥由来の赤発色繊維は全部で 3,560 本/L（274 本/g-dry）が計測され、下水試料から繊維状のマイクロプラスチックであると考えられる繊維が検出された。各操作における回収率は添加したナイロン繊維と同程度であった。

### 4 まとめ

ナノ物質に関する研究では、流入原水及び処理水中の化学物質と銀ナノ粒子の複合影響は相殺効果であるこ

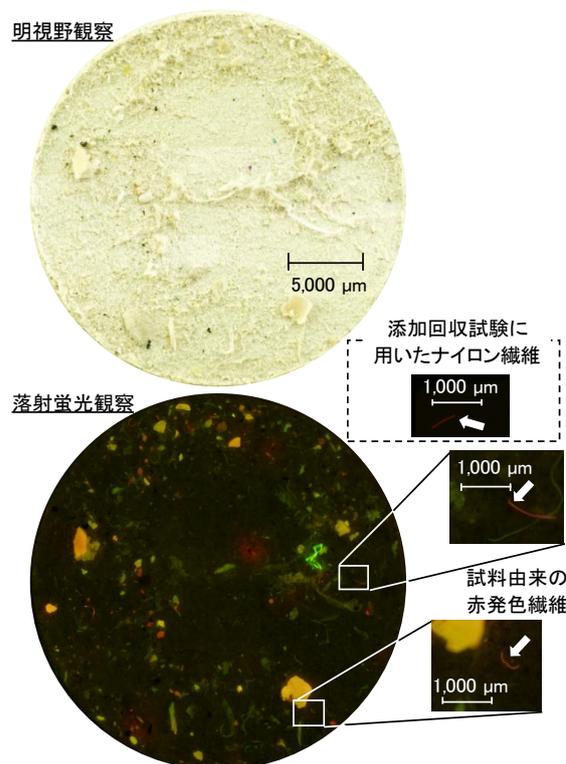


図 7 落射型蛍光顕微鏡による初沈汚泥の観察の様子

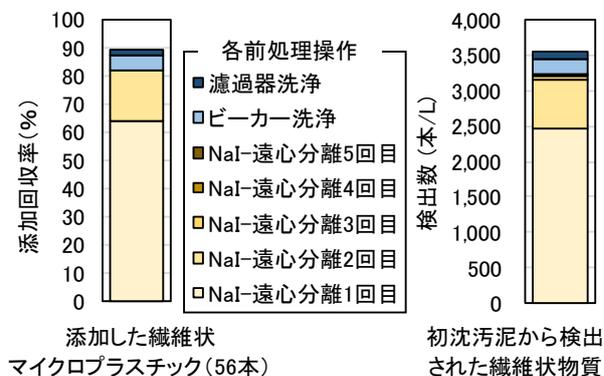


図 8 蛍光観察時における赤発色繊維の検出結果

とが分かった。また、流入原水では  $0.1\ \mu\text{m}$ ~ $0.02\ \mu\text{m}$ 、50 kDa~10 kDa、10 kDa 未満の範囲に、処理水では 50 kDa~10 kDa の範囲に、銀ナノ粒子と相殺効果を主に引き起こす化学物質が存在することが示唆された。

マイクロプラスチックに関する研究では、下水試料に対して繊維状のマイクロプラスチックの検出に有効な前処理と観測の方法を見出した。今後は同定手法や下水処理過程での動態の検討を進める。

## 参考文献

- 1) Howard Weinburg, Anne Galyean, Micheal Leopold. (2011). Evaluating engineered nanoparticles in natural water, *Trends in Analytical Chemistry*, **Vol. 30, No. 1**, 72-83
- 2) (株) 三菱化学テクノロジー (2010)、ナノマテリアル安全対策調査事業報告書 (厚生労働省請負業務) <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/nano/nanopdf/H21hokoku/honbun/all.pdf> (2017年1月31日確認)
- 3) Julia Fabrega, Samuel N. Luoma, Charles R. Tyler, Tamara S. Galloway, Jamie R. Lead. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environmental International*, **37**:517-531
- 4) Fadri Gottschalk, Tobias Sonderer, Roland W. Scholz & Bernd Nowack. (2009). Modeled environmental concentration of engineered nanoparticles (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions, *Environmental Science and Technology*, **43, 24**, 9216-9222
- 5) Elke Muth-Köhne, Laura Sonnack, Karsten Schlich, Florian Hischen, Werner Baumgartner, Kerstin Hund-Rinke, Christoph Schäfers, Martina Fenske. (2013). The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes, *Ecotoxicology*, **22**: 1264-1277
- 6) 鎌迫典久、水圏保全のための新たな排水管理ツール“WET”の最新事情、資源環境対策、**Vol.47 No.5**、58-66 (2011)
- 7) 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)、平成25年度 排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会 (第2回) (2013)
- 8) 永井孝志、加茂将史、藻類に対する金属複合毒性のモデリング: Biotic Ligand Model, 濃度加算, 独立作用の比較、環境毒性学会誌、**17(2)**、57-68 (2014)
- 9) R-3.3.0 for Windows (32/64 bit) <https://cran.rproject.org/bin/windows/base/old/3.3.0/> (2017年1月27日確認)
- 10) Mark A. Chappell, Lesley F. Miller, Aaron J. George, Brad A. Pettway, Cynthia L. Price, Beth E. Porter, Anthony J. Bednar, Jennifer M. Seiter, Alan J. Kennedy, Jeffery A. Steevens. (2011). Simultaneous dispersion-dissolution behavior of concentrated silver nanoparticle suspension in the presence of model organic solutes, *Chemosphere*, **84**, 1108-1116
- 11) 経済産業省、平成28年度化学物質安全対策 (マイクロプラスチック国内排出実態調査) 報告書
- 12) <http://www.env.go.jp/press/104177.html>
- 13) ScienceDirect.com ウェブサイト, <https://www.sciencedirect.com/> (2018年3月1日確認)
- 14) Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., ... & Ren, H. (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental science & technology*, **50(7)**, 4054-4060.
- 15) Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific reports*, **3**, 3263.
- 16) Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., ... & Maricchiolo, G. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: preliminary results. *Environmental pollution*, **212**, 251-256.
- 17) Rainieri, S., Conlledo, N., Larsen, B. K., Granby, K., & Barranco, A. (2018). Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental research*, **162**, 135-143.
- 18) Batel, A., Borchert, F., Reinwald, H., Erdinger, L., & Braunbeck, T. (2018). Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo [a] pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, **235**, 918-930.
- 19) Carr, S. A., Liu, J., & Tesoro, A. G. (2016). Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water research*, **91**, 174-182.
- 20) Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., & Quinn, B. (2016). Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol*, **50(11)**, 5800-5808.
- 21) Talvitie, J., Mikola, A., Setälä, O., Heinonen, M., & Koistinen, A. (2017a). How well is microlitter purified from wastewater? – A detailed study on the stepwise removal of microlitter in a tertiary level wastewater treatment plant. *Water research*, **109**, 164-172.
- 22) 垣田ら (2017) 下水処理場の各処理工程における粒径100 μm以上のマイクロプラスチックの存在実態調査, 第20回日本水環境学会シンポジウム講演集, **20**, 52-53
- 23) Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine pollution bulletin*, **113(1-2)**, 469-476.

# 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

水質チーム 上席研究員 小川 文章  
研究員 鈴木 裕識  
特任研究員 小森 行也

## 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、2,4-ジクロロフェノール、ホルムアルデヒド、4-*t*-オクチルフェノール、アニリンが設定されている。これら 6 物質は、公共用水域における検出状況等からみて、現時点では直ちに環境基準項目とはせず、引き続き環境中の検出状況等に関する知見の集積に努めるべきとされているもので、今後、環境基準項目への追加が検討される予定である。現時点において、下水処理場放流水が規制を受けることはないが、将来の環境基準化、排水規制化への対応の一つとして下水処理場での挙動及び除去特性把握が必要と考える。我が国の下水処理場、特に小規模下水処理場では、これらを含む未規制化学物質等の挙動及び除去特性についてのデータが少ない。また、これらの要監視項目のうち幾つかの物質については、下水道での調査を実施する際に必要となる下水試料を対象とした分析方法がみられない。本研究では、小規模処理場における要監視項目の挙動と除去特性把握を目的としているが、研究初年度の平成 29 年度は下水試料を対象とした分析法について検討した。

## 2. 調査方法

### 2.1 分析方法の検討

分析方法の検討は、下水試験方法<sup>1)</sup>に分析方法が示されているクロロホルム、4-*t*-オクチルフェノールの 2 物質を除いた以下に示す 4 物質について、上水又は河川水等の環境水を対象とした既往の分析方法等を参考に行った。下水道の調査では、下水処理水の放流先への環境負荷量把握に必要となる二次処理水の分析に加え、下水処理場での挙動又は除去特性把握のため流入下水の分析が必要となる。分析検討に当たっては、二次処理水は浮遊物質 (SS) をろ過により除いた「ろ液」、流入下水は、「ろ液」と「SS」に分けて検討した。分析装置の定量下限値 (IQL) は、各物質の指針値の 1/10、回収率は 80~120% を目標とした。また、サロゲート物質を添加する分析方法においては、サロゲート回収率を 50~120% を目標とした。

#### 1) フェノール、2,4-ジクロロフェノール

水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法<sup>2)</sup>を参考に 2 物質同時分析について検討した。サロゲート物質としてフェノール-2,3,4,5,6-*d*<sub>5</sub>、2,4-ジクロロフェノール-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> を用いる方法とし、分析フローを図-1、GC/MS 測定条件を表-1 に示す。まず、試料 100mL を孔径 1 $\mu$ m のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液と SS に分けた。ろ液試料は、pH 調整の後、固相抽出し、N<sub>2</sub>O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) を用いて誘導体化した後、GC/MS で分析した。SS 試料は、サロゲート物質添加後、アセトンによる超音波抽出を行い、その上澄液を濃縮した後、ジクロロメタンを加えた。次に、脱水・濃縮し酢酸エチルを加えた後、再度、濃縮し誘導体化を行い GC/MS で測定した。

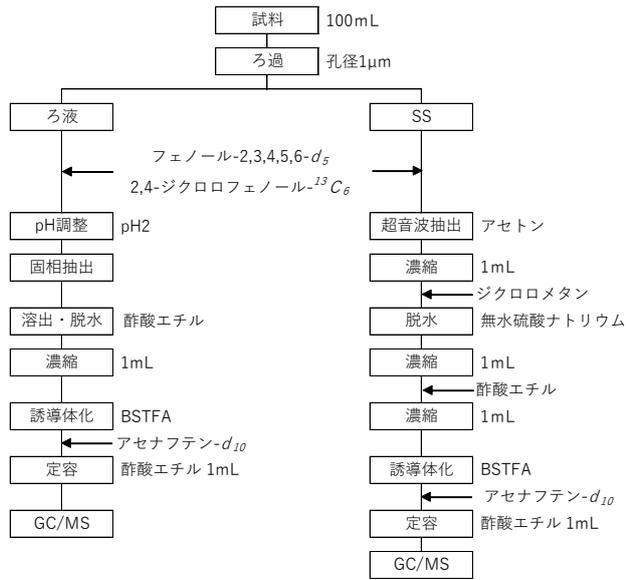


図-1 フェノール、2,4-ジクロロフェノール分析フロー

表-1 フェノール、2,4-ジクロロフェノールの GC/MS 測定条件

測定機器		
・島津製作所製ガスクロマトグラフ-四重極型質量分析計, GC/MS-QP2010 Ultra		
GC部条件		
・カラム	DB- 5 MS, 30m×0.25mm(id), 0.25µm	
・ラム温度	50°C-(5°C/min)-120°C-(10°C/min)-200°C-(30°C/min)-280°C (2min)	
・入方法	スプリット(1:5)	
・注入口温度	250°C	
・注入量	1µL	
・キャリアーガス	ヘリウム(1.0mL/min)	
MS部条件		
・イオン化法	EI	
・イオン化電圧	70eV	
・インタフェース温度	250°C	
・イオン源温度	250°C	
・検出モード	SIM	
・モニターイオン設定(m/z)		
測定対象物質	定量用	確認用
フェノール(BSTFA誘導体化物)	151	166
フェノール-2,3,4,5,6-d <sub>5</sub> (BSTFA誘導体化物)	156	171
2,4-ジクロロフェノール(BSTFA誘導体化物)	219	234
2,4-ジクロロフェノール- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> (BSTFA誘導体化物)	227	242
アセナフテン-d <sub>10</sub>	164	-

## 2) ホルムアルデヒド

化学物質分析法開発調査報告書<sup>3)</sup>を参考に検討した。分析フローを図-2、GC/MS 測定条件を表-2 に示す。先ず、試料 60mL を孔径 1µm のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液と SS に分けた。ろ液試料は、ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン (PFBOA) を用いて誘導体化後、ヘキサン抽出し GC/MS で分析した。SS 試料は、ミネラルウォーターによる超音波抽出を行った後、その上澄液を誘導体化し、ヘキサンを加え振とう抽出した。ヘキサン層を脱水した後、GC/MS で測定した。

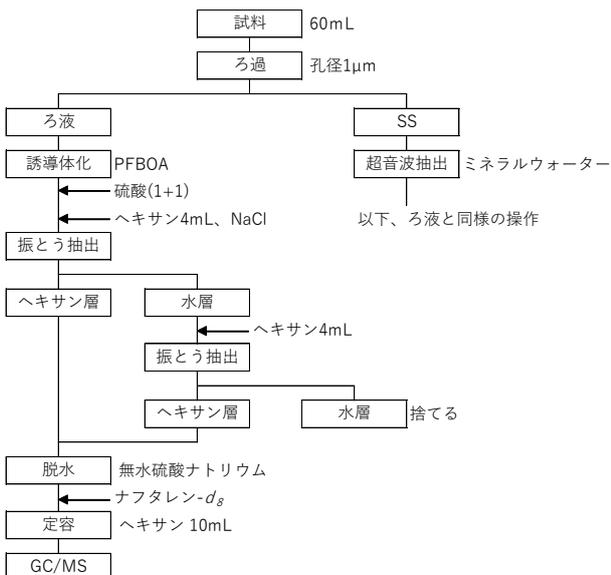


図-2 ホルムアルデヒド分析フロー

表-2 ホルムアルデヒドの GC/MS 測定条件

測定機器		
・島津製作所製ガスクロマトグラフ-四重極型質量分析計, GC/MS-QP2010 Ultra		
GC部条件		
・カラム	InertCap Pure WAX, 30m×0.25mm(id), 0.25µm	
・カラム温度	40°C(1min)-40°C/min-60°C(0min)-10°C/min-200°C(0min)-20°C/min-250°C(2min)	
・入方法	スプリットレス	
・注入口温度	250°C	
・注入量	1µL	
・キャリアーガス	ヘリウム(1.0mL/min)	
MS部条件		
・イオン化法	EI	
・イオン化電圧	70eV	
・インタフェース温度	250°C	
・イオン源温度	250°C	
・検出モード	SIM	
・モニターイオン設定(m/z)		
測定対象物質	定量用	確認用
PFBOAホルムアルドキシム	181	195
ナフタレン-d <sub>8</sub>	136	134

### 3) アニリン

「水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について」の付表2 アニリンの測定方法<sup>4)</sup>を参考に検討した。分析フローを図-3、GC/MS 測定条件を表-3 に示す。まず、試料 100mL を孔径 1 $\mu$ m のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液と SS に分けた。ろ液試料は、pH 調整後、固相抽出し、酢酸エチルで溶出後、GC/MS で分析した。SS 試料は、サロゲート物質添加後、メタノールによる超音波抽出を行った。次に、その上澄液を濃縮した後、固相抽出した。固相を乾燥後、酢酸エチルで溶出し、脱水・濃縮した後、GC/MS で測定した。

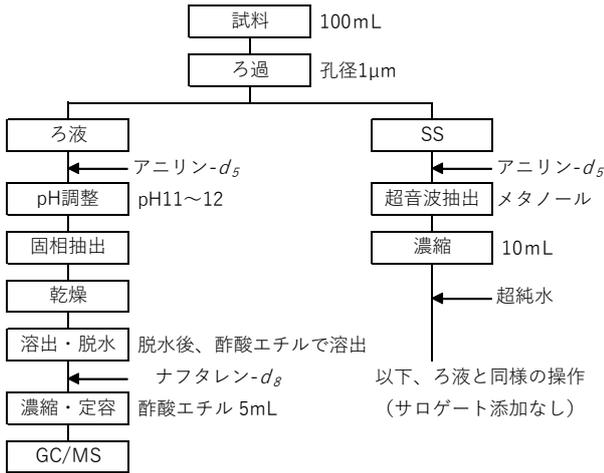


図-3 アニリン分析方法

表-3 アニリンの GC/MS 測定条件

測定機器		
・島津製作所製ガスクロマトグラフ-四重極型質量分析計, GC/MS-QP2010 Ultra		
GC部条件		
・カラム	Rtx-VolatileAmine, 60m×0.32mm(id), 0 $\mu$ m	
・カラム温度	80°C(1min)-15°C/min-230°C(10min)	
・注入方法	スプリットレス	
・注入口温度	250°C	
・注入量	1 $\mu$ L	
・キャリアーガス	ヘリウム(1.0mL/min)	
MS部条件		
・イオン化法	EI	
・イオン化電圧	70eV	
・インタフェース温度	240°C	
・イオン源温度	230°C	
・検出モード	SIM	
・モニターイオン設定(m/z)		
測定対象物質	定量用	確認用
アニリン	93	66
アニリン-d <sub>5</sub>	98	71
ナフタレン-d <sub>8</sub>	136	-

### 3. 調査結果

#### 3.1 分析方法の検討結果 (IDL、IQL と添加回収試験結果)

水生生物保全に係る項目の指針値と分析装置の検出下限値 (IDL)、IQL を表-4、添加回収試験結果を表-5 に示す。

IDL、IQL 確認試験では、各物質とも検量線作成用標準溶液の最低濃度を 5 回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差の 3 倍を IDL、10 倍を IQL とした。表-4 に示すとおり、各物質の IQL はそれぞれの指針値の 1/10 以下であった。

二次処理水のろ液、流入下水のろ液と SS について添加回収試験を行った。ろ液試料への各物質の添加量は、添加後の試料濃度が無添加濃度の 2 倍以上、又は、IQL の 10 倍濃度以上、又は、指針値程度となる量とした。また、流入下水の SS 試料への添加量

表-4 各項目の指針値と IDL、IQL

	指針値 [ $\mu$ g/L]	IDL [ $\mu$ g/L]	IQL [ $\mu$ g/L]
フェノール	10 (生物特A)	0.0075	0.025
2,4-ジクロロフェノール	3 (生物特A)	0.020	0.066
ホルムアルデヒド	1,000 (生物特A)	0.073	0.24
アニリン	20 (生物特A)	0.019	0.063

表-5 各項目の添加回収試験結果 [回収率 (%) ]

	二次処理水	流入下水	
	ろ液	ろ液	SS
フェノール	96	95	100
2,4-ジクロロフェノール	102	96	98
ホルムアルデヒド	97	93	99
アニリン	105	103	101

は、ろ液試料の添加量と同量とした。それぞれの分析項目について、標準物質無添加試料（n=1）、標準物質添加試料（n=3）の試験を行い添加回収率を求めた。表-5 に示すとおり、添加回収試験の結果、二次処理水のろ液、流入下水のろ液、SS の回収率は 93～105%であり、目標とした回収率を満足する結果であった。また、サロゲート物質を添加して分析した、フェノール、2,4-ジクロロフェノール、アニリンのサロゲート回収率は 56～90%であり、目標回収率を満足した。

以上の結果から本分析検討で得られた分析方法は、下水試料の分析に適用可能と判断される。

#### 4. まとめ

本研究では、水生生物保全に係る要監視項目 6 物質のうち、下水試料の公定分析法がみられない 4 物質（フェノール、2,4-ジクロロフェノール、ホルムアルデヒド、アニリン）について下水試料の分析方法について検討した。検討の結果、提案した各物質の分析方法は、目標とした以下の事項を満足する結果であり、下水試料の分析に適用可能と判断した。

- ・分析装置の定量下限値（IQL）：各項目の指針値の 1/10
- ・回収率：80～120%
- ・サロゲート回収率：50～120%（サロゲートを添加する方法）

なお、本調査は、運営交付金（一般勘定）により実施されたものである。

#### 参考文献

- 1) 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) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成 15 年厚生労働省告示第 261 号）, [www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000045881.pdf](http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000045881.pdf)（平成 30 年 6 月確認）
- 3) 環境省, 化学物質と環境 平成 27 年度化学物質環境調査報告書, 平成 28 年 10 月, 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課, <http://www.nies.go.jp/emdb/pdfs/kurohon/2015/adoc2015.pdf>（平成 30 年 6 月確認）
- 4) 水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について（環水大水発第 1303272 号）, <https://www.env.go.jp/hourei/add/e032.pdf>（平成 30 年 6 月確認）

## 仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の慢性影響評価法の開発

研究予算：運営費交付金（一般勘定）  
 研究期間：平 29～平 31  
 担当チーム：水環境研究グループ（水質）  
 研究担当者：小川文章、北村友一

### 【要旨】

遺伝子発現解析から下水二次処理水の魚類慢性影響評価が可能かどうかを明らかにするため、ゼブラフィッシュを用いた胚・仔魚期曝露試験を行い、生残個体の網羅的遺伝子発現解析を試みた。下水二次処理水 80 %、40 %、20 %、0 % の 4 濃度区のうち、生存率に影響がみられた濃度区は 80 % のみであったが、40 % や 20 % の濃度区でも仔魚の遺伝子発現に変動が生じていた。発現変動遺伝子の機能解析から、調節、免疫、代謝、シグナル伝達への影響がみられ、遺伝子発現解析から魚類の慢性影響の検出は可能であった。20 % 濃度区では遺伝子発現への影響は低下していたことから、下水処理水が 5 倍以上希釈されることにより遺伝子発現への影響は低減されることがわかった。

キーワード：ゼブラフィッシュ、仔魚、下水処理水、遺伝子発現解析

### 1. はじめに

近年、排水中の毒性を評価する試験として、個別の化学物質分析ではなく生物応答を用いた総毒性試験が注目されている。米国では魚類、ミジンコ、藻類の 3 種を用いた WET (Whole Effluent Toxicity) 試験が導入されており、日本でも環境省が生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>1)</sup> を公表するなど、生物応答に基づく排水管理の制度化と導入が検討されている。このうち魚類については、胚・仔魚期の曝露により、胚と仔魚の生残性の観察に基づく亜慢性影響を評価する試験が用いられている。

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、遺伝子レベルで影響を詳細に解析することが可能となっている。また、OECD を中心に、化学物質の曝露から、分子レベル、細胞レベル、臓器レベル、個体および個体群レベルへの影響についての反応経路 (Adverse Outcome Pathway ; AOP<sup>2)</sup>) 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の影響と個体レベルの影響の関係解明が重要となっている。毒性学や分子生物学の分野で蓄積されてきた遺伝子発現とその機能に関するデータベースを活用し、胚・仔魚期の魚類の様々な遺伝子発現を網羅的に解析することで、遺伝子レベルでの影響の評価が可能になると考えられる。

本研究では、遺伝子発現解析から下水二次処理水の魚類慢性影響評価が可能かどうかを明らかにするため、WET 試験の標準試験魚種であるゼブラフィッシュを用いて、下水処理水への胚・仔魚期魚類の曝露試験と、仔魚の網羅的遺伝子発現解析を行い、個体レベルと遺伝子発現レベルの影響について関係解析を行った。

### 2. 実験方法

本研究で用いた活性汚泥処理実験装置の概要を図-1 に示す。装置は、最初沈殿池 (500L)、生物反応槽 (500L × 4 槽)、最終沈殿池 (700L)、砂ろ過装置から構成されている。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い、標準活性汚泥法による処理を行った。平成 28 年 12 月 12 日に二次処理水のスポット採水を行い、13 日から 21 日にかけて曝露試験を実施した。

試験条件を表-1 に示す。下水処理水は、脱塩素水道水と混合し、80 %、40 %、20 %、0 % (対照区) の 4 濃度区の試料を作成した。1 濃度区あたり 4 個のガラス製スナップカップに試料を 60mL 入れ、当日朝に産卵されたゼブラフィッシュの受精卵を 15 個ずつ移し入れた。曝露作業は受精後 4～6 時間の間に行った。試験期間中は毎日生存個体数を記録し、死亡個体は取り除いた。

水の交換は 2、3、5、7 日目に実施した。冷蔵保存した下水処理水を必要量取り出してウォーターバスで 26℃ に戻し、各濃度区の試料を調製し、試験容器を傾けて古い試料を約 5mL 残して

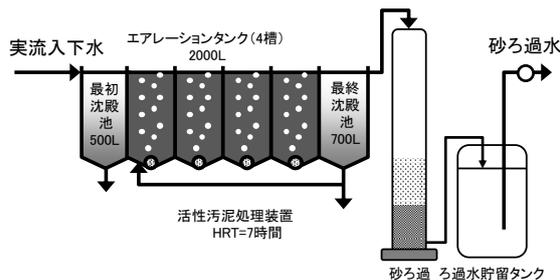


図-1 活性汚泥処理実験装置

排出し、新しい試料を静かに注ぎ入れた。

水質測定項目のうち、水温、溶存酸素濃度(DO)、pHは曝露開始および終了日と換水前後に、電気伝導度(EC)は換水前に測定した。また、二次処理水と脱塩素水道水についてNH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、DOC、無機イオン(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>:イオンクロマト法)、金属(Fe、Al、Cu、Zn、Mn、Cr等:ICP-MS法)を測定した。

仔魚のRNA抽出はRNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いた。曝露終了時に生存していた仔魚を氷水麻酔し、300μLのRLT+βMe-Bufferを入れた1.5mLチューブに移してホモジナイズ後、プロトコルに従ってTotal RNAを抽出した。抽出したRNAは、Bioanalyzer(Agilent)を用いて、分解を受けていないことを確認した。RNA試料は、Truseq Stranded mRNA prep kit(Illumina)を用いてライブラリ調製後、次世代シーケンサーMiseq(Reagent kit v3, 150cycle, Illumina)により、1ラン2検体でシーケンシングを実施した。76塩基のペアエンドで1検体につき1.1~1.9千万リードの塩基配列を取得した。

遺伝子発現解析はセルイノベーション(国立遺伝学研究所のデータ解析拠点)<sup>3)</sup>にリードデータをアップロードして実施した。Tophat2を用いてゼブラフィッシュゲノム(DanRer7)にマッピング後、Cufflinks2を用いて遺伝子の構造を推定し、Cuffdiffを用いて遺伝子発現量計算と発現変動判定を行った。遺伝子発現量の単位はFPKM(Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped)で表した。遺伝子の配列は、NCBIに登録されているヒトのタンパク質配列

(Refseq\_Protein)<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>およびUniProt-GOA<sup>6)</sup>のデータベースを用いて各遺伝子のRefseq IDに対応した遺伝子機能情報(Gene Ontology, GO)を取得した。統計処理はR ver. 3.3.1およびExcelを用い、Fisherの正確確率検定により発現変動遺伝子と関連が強い機能を抽出した。

### 3. 実験結果と考察

#### 3.1 下水処理水の水質測定結果

図-2は、曝露した試料水のDO濃度とpHの測定結果で、使用前および使用後の、濃度区別の平均、最大、最小値である。下水処理水希釈時のDO濃度は8.6~9.1mg/Lであり、換水前後で約1mg/L低下した。pHは7.0~7.7の範囲であり、換水前後の変化は小さかった。図-3は0日目の試料水のECである。ECは、下水処理水では55.3mS/mであり、いずれの濃度区も希釈割合に応じた値を示した。

図-4は、下水処理水と脱塩素水道水のNH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、DOC濃度である。二次処理水の溶存態窒素はほぼ全てがNO<sub>3</sub>-Nであり、濃度は18.9mgN/Lであった。溶存有機物(DOC)濃度は、脱塩素水道水では1.1mgC/L、二次処理水では4.8mgC/Lであった。

図-5は無機イオン類(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)濃度である。二次処理水ではNa<sup>+</sup>濃度とCl<sup>-</sup>濃度が高くなっていた。図-6は主な金属類の濃度である。

表-1 実験条件

試験魚種	ゼブラフィッシュ
曝露期間	8日間、胚~仔魚期 (受精後6時間~孵化後5日目)
曝露方式	半止水式(2,3,5,7日目に換水)
試験水	脱塩素水道水
試験区	下水二次処理水80, 40, 20%濃度区 および対照区(0%)
連数	4連 / 1試験区
供試卵数	受精卵15粒 / 1連
試験温度	26°C
明暗周期	明 16h / 暗 8h
給餌	なし
観察項目	生存数、孵化数
RNA抽出	Qiagen RNeasy Mini Kit
ライブラリ調製	Illumina Truseq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit
シーケンサー	Miseq, Reagent kit v3 150cycle

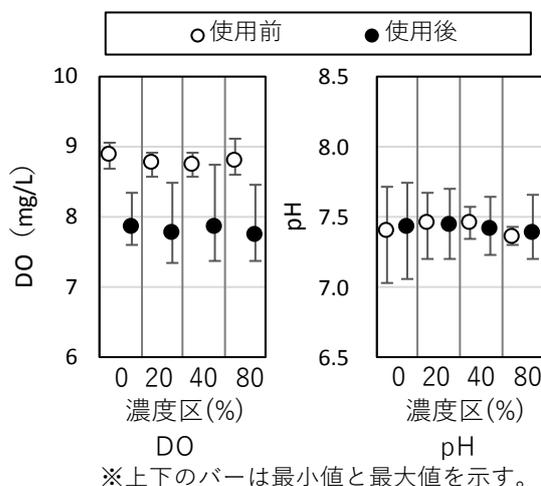


図-2 換水前後のDOおよびpH

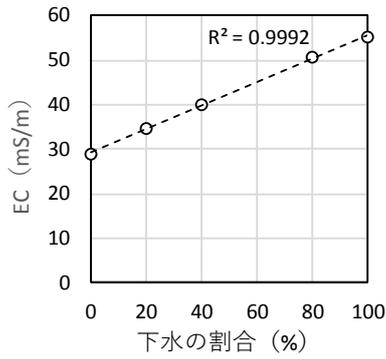


図-3 二次処理水の各希釈段階の EC

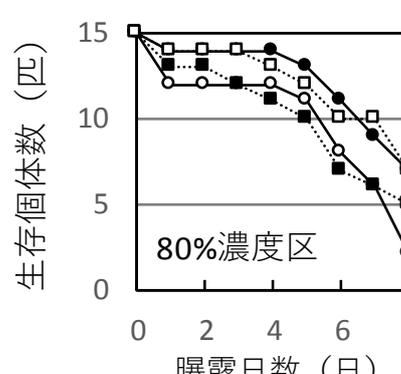
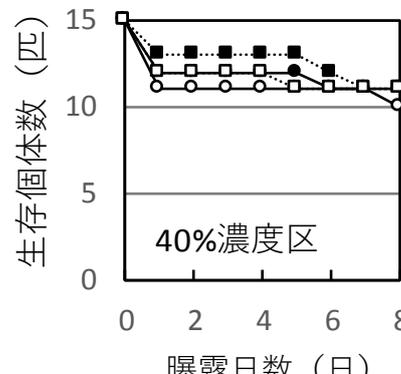
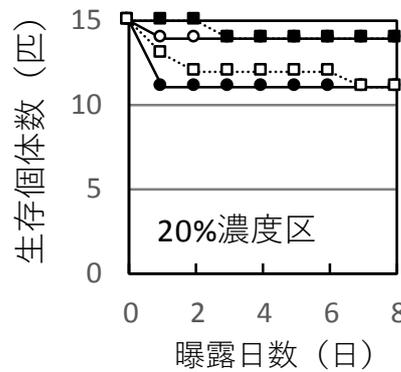
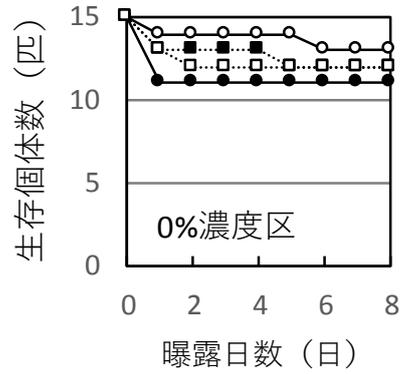


図-7 各曝露区各連の生存個体数

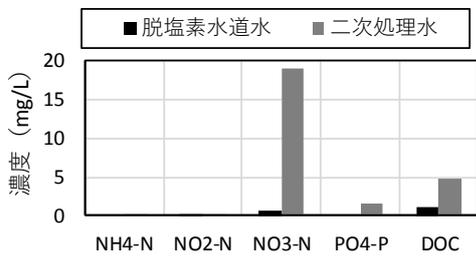


図-4 脱塩素水道水と二次処理水の NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、DOC 濃度

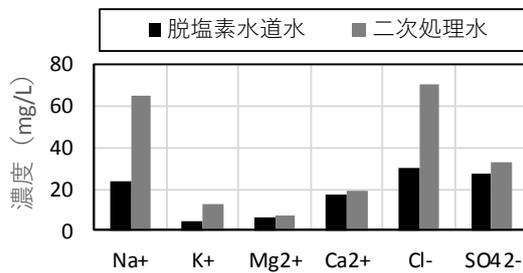


図-5 脱塩素水道水と二次処理水の無機イオン類濃度

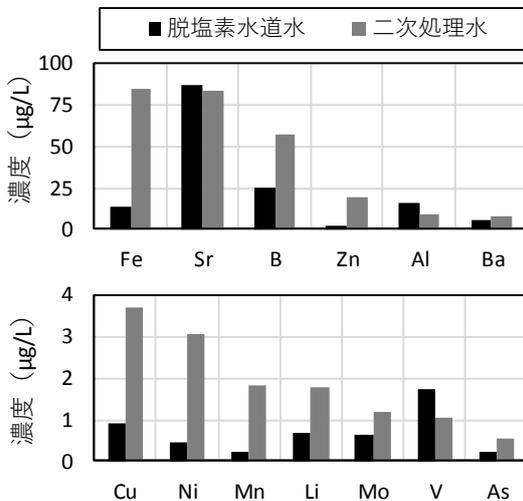


図-6 脱塩素水道水と二次処理水の金属類濃度

### 3.2 ゼブラフィッシュ胚・仔魚曝露試験結果

図-7 は各濃度区の生存数の経日変化である。1 日目はいずれの濃度区でも 0~4 匹の死亡個体がみられた。80%濃度区では、他の濃度区と異なり、5 日目以降に生存数が低下した。図-8 は、各濃度区の、累積孵化仔魚数の平均値の経日変化である。孵化日(対照区において 50%を超える胚が孵化した日)は曝露後 3 日目となったことから、孵化後 5 日目である 8 日目を試験終了日とした。いずれの濃度区でも 3 日目にすべての個体が孵化した。

図-9 は各濃度区の孵化率、生存率、孵化後生存率

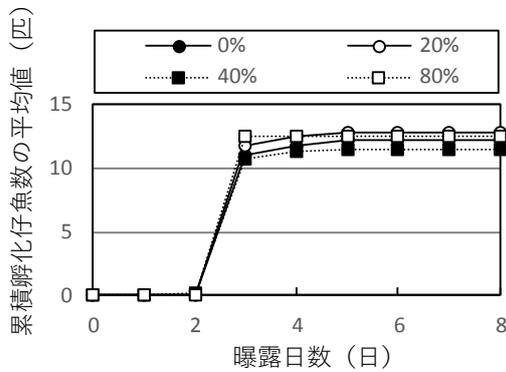
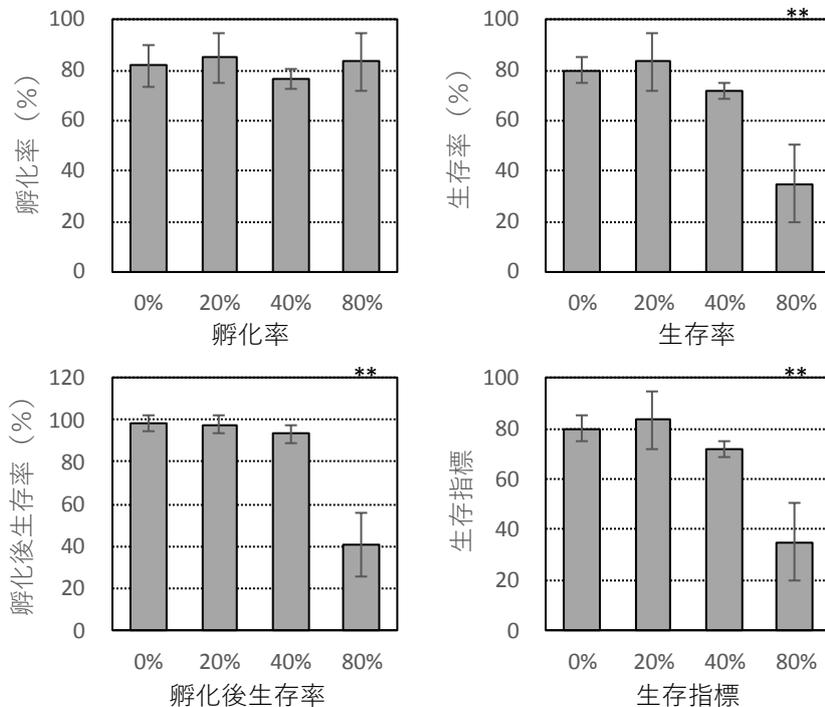


図-8 各濃度区における累積孵化仔魚数の平均値の変化



0%濃度区との差の検定結果が $p < 0.01$ で有意な個所は\*\*で示した (Dunnnettの多重比較)

図-9 各濃度区の孵化率、生存率、孵化後生存率、生存指標の平均値と標準偏差

率、生存指標の平均値と標準偏差である。Dunnnett の多重比較が有意であった濃度区は\*\*で示した。孵化率は、ゼブラフィッシュの最大孵化所要日数である 5 日目<sup>1)</sup>で算出した。孵化率はいずれの濃度区でも約 80%であり、0%濃度区との差はみられなかった。生存率は、0%濃度区に対して 80%濃度区で有意に低下し 35%となった。孵化後生存率、生存指標についても、80%濃度区は 0%濃度区と比較して低い値を示した。

0%濃度区は 4 連の平均値でみると生存率が 80%、孵化率が 82%であり、短期毒性試験の有効性を判断する基準(対照区の生存率 70%以上、孵化率 80%以上、溶存酸素濃度が飽和値の 60%以上)<sup>1)</sup>を満たしていた。本試験を短期毒性試験として評価すると、下水処理水の影響がみられた最小濃度は 80%であり、最大無影響濃度は 40%となった。

### 3.3 遺伝子発現解析結果

#### (1) ゲノムマッピングによる遺伝子の検出と発現変動解析結果

Tophat2-Cufflinks2による解析の結果、ゼブラフィッシュゲノムの 27,540 領域から遺伝子 (gene) が検出された。表-2 は、27,540 遺伝子のうち機能情報が得られた遺伝子の数と割合である。機能情報 (GO) が得られた遺伝子の割合

は、ゼブラフィッシュのデータベースを用いた場合は約 4 割、ヒトのデータベースの場合は約 6 割で、ヒトで機能情報を多く付与できることがわかった。

図-10は遺伝子発現量のスカッタープロットで、0%濃度区を横軸、20および80%濃度区を縦軸で示したものである。Cuffdiffで発現変動と

表-2 検出された 27,540 遺伝子のうち機能情報が得られた遺伝子の数と割合

遺伝子機能情報	相同性検索した生物種	
	ゼブラフィッシュ	ヒト
GO(Biological Process)	11,114 (40%)	16,020 (58%)
GO(Molecular Function)	11,639 (42%)	16,127 (59%)
GO(Cellular Component)	11,076 (40%)	16,891 (61%)

判定された遺伝子を赤色で示した。80%濃度区では20%濃度区と比較して発現変動遺伝子を示す赤色プロットは多く、分布幅も広がっていた。

図-11は各濃度区の発現変動遺伝子数である。対照区(0%)に対する発現変動遺伝子数は、20%、40%、80%濃度区でそれぞれ273、621、743個となり、下水処理水の割合が多くなるほど、発現変動遺伝子も多くなった。

## (2) ヒトの機能情報を用いた機能解析結果

発現変動遺伝子の機能解析を、ヒトの機能情報を用いて実施した結果、20%、40%、80%のうち少なくとも1濃度区で有意 ( $p < 0.01$ ) なGOは、Biological Process 関連は303個、Molecular Function 関連は90個、Cellular Component 関

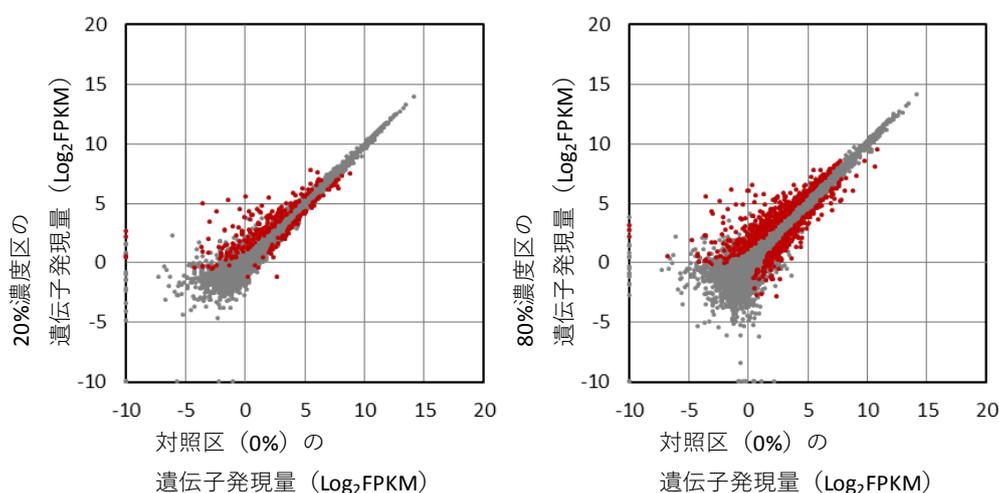


図-10 遺伝子発現量の0%に対する、20%濃度区(左)と80%濃度区(右)のスカッタープロット

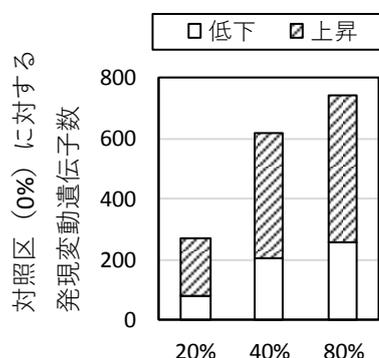


図-11 各濃度区の発現変動遺伝子数

連は80個であった。

図-12は、Biological Process 関連のGOを、80%濃度区でp-valueが低かった上位50個まで示したものである。図より調節、免疫、代謝、シグナル伝達への影響を生じていることがわかる。これらの機能のp-valueは、20%濃度区と比較して40%濃度区で低く、40%濃度区と80%濃度区は同程度の値となる傾向がみられた。20%曝露区でp-valueの値が大きくなっていったことから、下水処理水が遺伝子発現に与える影響は、5倍以上希釈されることにより低減できることがわかった。

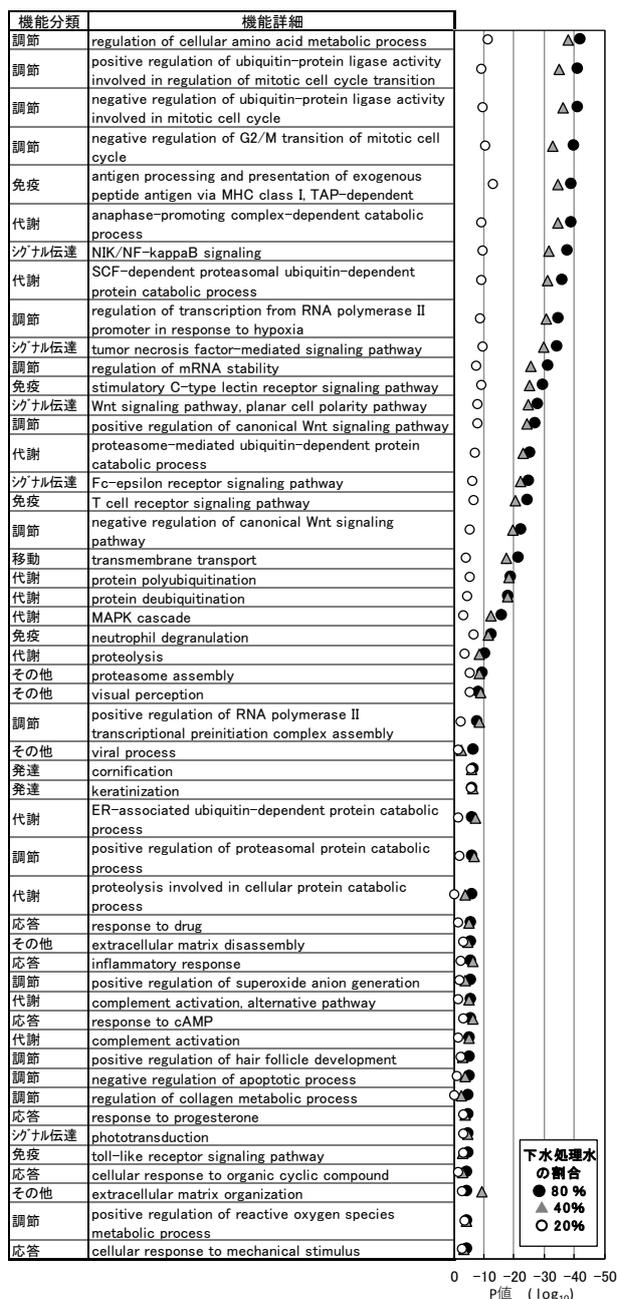


図-12 ヒト機能情報を用いた各濃度区の Fisher の正確確率検定の結果 (p 値は、値が低いほど有意に影響が生じる)

#### 4. おわりに

遺伝子発現解析から下水二次処理水の魚類慢性影響評価が可能かどうかを明らかにするため、胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた曝露試験

を実施し、下水処理水曝露後に生存していた仔魚の遺伝子発現を網羅的に解析した。得られた知見を以下に示す。

- (1) 胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた曝露試験では、下水処理水 80 %濃度区で生存率と孵化後生存率が低下した。最大無影響濃度は 40 %となった。
- (2) 発現変動遺伝子数は、下水処理水の割合 20 %、40 %、80 %濃度区でそれぞれ約 270、620、740 個となり、下水処理水の割合が多いほど発現変動遺伝子数も多くなった。
- (3) 発現変動遺伝子の機能解析の結果、下水処理水は調節、免疫、代謝、シグナル伝達などの機能に影響を及ぼすことがわかった。
- (4) 遺伝子発現への影響は、5 倍以上希釈されることにより大きく低減されることが明らかとなった。

以上、胚・仔魚期魚類の曝露試験に網羅的遺伝子発現解析を追加することにより、魚類の詳細な慢性影響を検出できることが明らかとなった。

今後は、高度処理による遺伝子発現への影響低減効果と河川水との相対比較から遺伝子発現レベルの安全性評価を行う予定である。

#### 参考文献

- 1) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案）、2014
- 2) OECD: GUIDANCE DOCUMENT ON DEVELOPING AND ASSESSING ADVERSE OUTCOME PATHWAYS, Series on Testing and assessment No. 184, ENV/JM/MONO(2013)6
- 3) セルイノベーション（国立遺伝学研究所データ解析拠点） <https://cell-innovation.nig.ac.jp/members/index.html>
- 4) Refseq-Protein データベース, National Center for Biotechnology Information (NCBI), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
- 5) The UniProt Consortium; UniProt: the universal protein knowledgebase, Nucleic Acids Res. 45: D158-D169 (2017), <http://www.uniprot.org/>
- 6) Barrell D, Dimmer E, Huntley RP, Binns D, O'Donovan C, Apweiler R. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. Nucleic Acids Res. 2008 Oct 27. [Epub ahead of print] <http://www.ebi.ac.uk/GOA>

## オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価

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

## 【要旨】

下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、二次処理水と総残留塩素濃度 0.07, 0.04, 0.03, 0.02 mg/L の二次処理水の塩素消毒水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体および甲状腺組織観察から調査した。その結果、総残留塩素濃度 0.07mg/L で、オタマジャクシ期の死亡個体が他の曝露区より多くなる傾向となったが、全ての曝露区で生残したオタマジャクシはカエルに変態し、変態停止や変態遅延の影響は観察されなかった。また、各曝露区でステージ 62 に達したオタマジャクシの甲状腺組織にも異常はみられなかった。

キーワード：アフリカツメガエル、変態、下水処理水

## 1. はじめに

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

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

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

H28 から 29 年度にかけては、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、二次処理水と総残留塩素濃度を数段階に設定した二次処理水の塩素消毒水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体と甲状腺組織観察から調査した。

## 2. 実験方法

## 2.1 供試オタマジャクシ

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

カエルをペアにして一晩置き、翌日、産卵された卵を脱塩素水道水の流水式水槽に移し、そこで孵化した 2 日目のオタマジャクシを曝露実験に供した。

## 2.2 下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽

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

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

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

## 2.3 水質分析

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

## 2.4 オタマジャクシの飼育と変態の観察

オタマジャクシの曝露条件は、水温：21℃、明暗

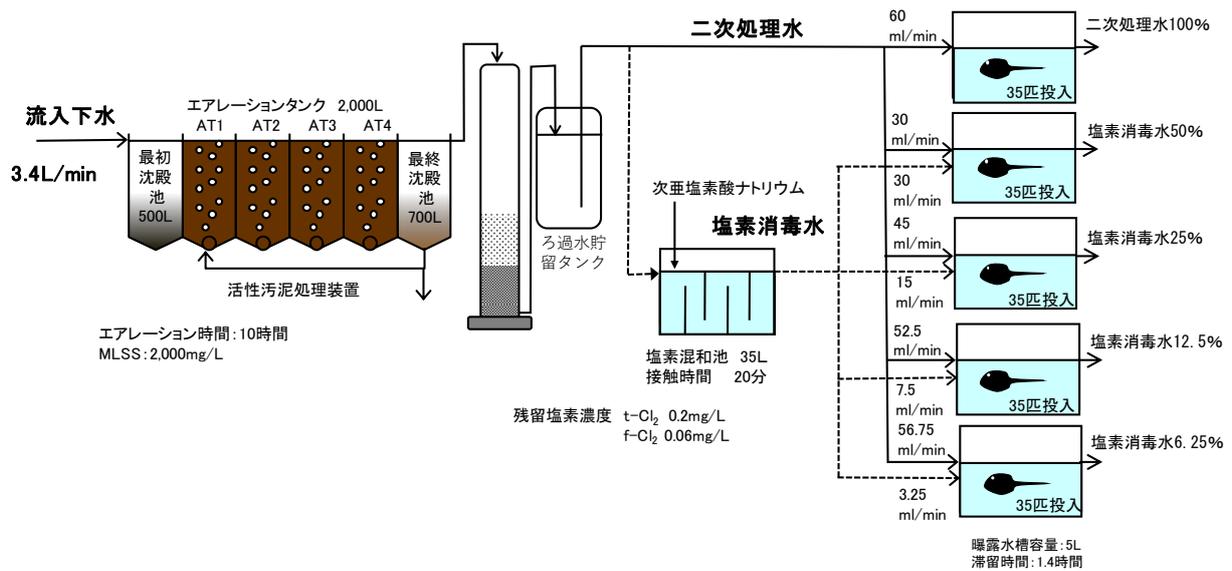


図-1 活性汚泥処理装置とオタマジヤクシの曝露水槽の概要

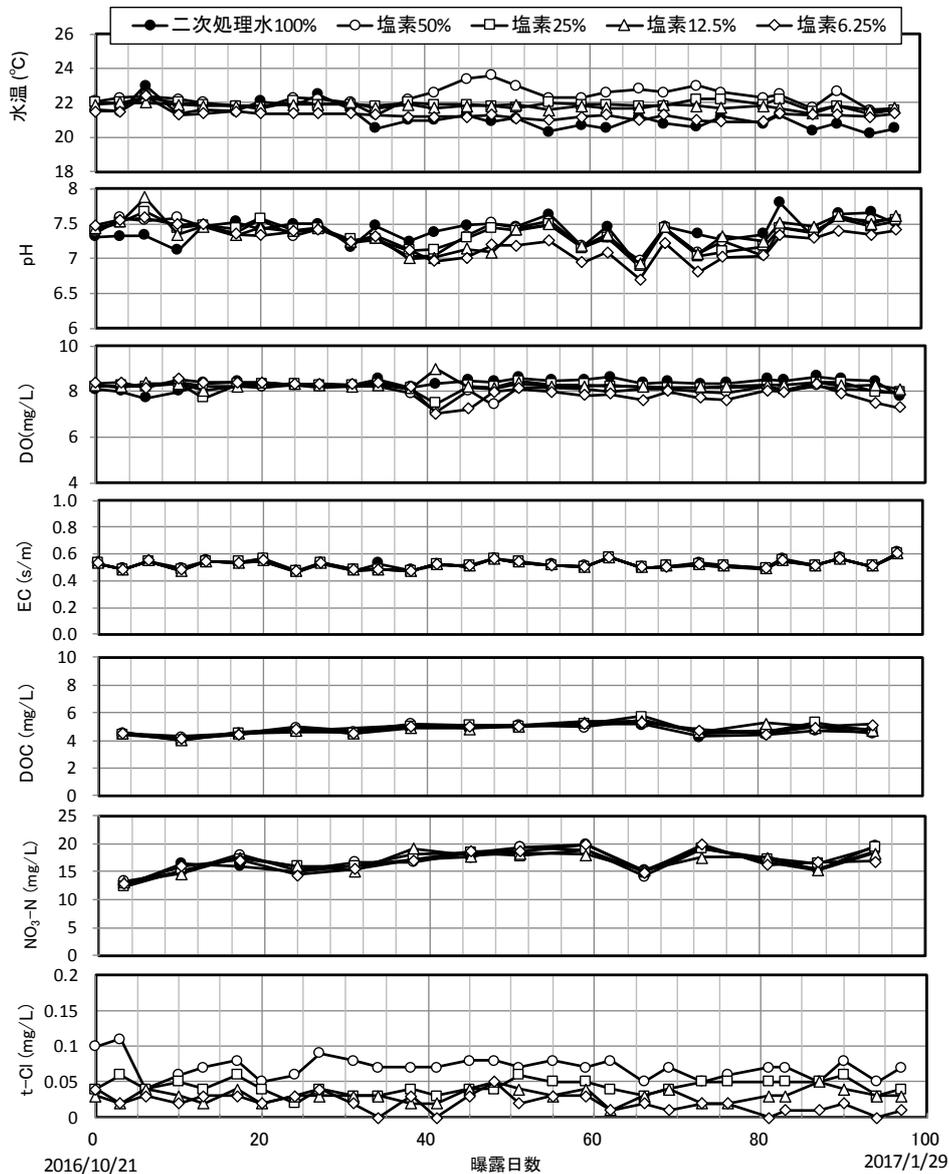


図-2 各曝露水槽内の水質測定結果

周期：明期 12h, 暗期 12h, 給餌：1日1回オタマジャクシ用餌（浜松生物教材）を飽食量、とした。オタマジャクシの変態観察は、変態が始まった曝露後 21日目から、週2回1匹ずつ曝露水槽から取り出し、P. D. Nieuwkoop and J. Faber の発達ステージ表<sup>4)</sup>と比較し、発達ステージを目視判定し記録した。また、甲状腺組織の観察のため、ステージ 62（写真-1）に達したオタマジャクシを塩素消毒水 50%曝露区は 3匹、他の曝露区は 5匹間引いた。



写真-1 ステージ 62 のオタマジャクシ

## 2.5 オタマジャクシの甲状腺ホルモン観察

甲状腺組織のために間引いた個体は、頭胴長、頭部幅を測定した。甲状腺組織の観察は、パラフィン包埋、薄切後、エオシン・ヘマトキシリン染色し、顕微鏡観察した。甲状腺の組織の評価は、表-1に示した OECD Series on testing and assessment No 82: Guidance document on amphibian histology (24 October 2007)<sup>5)</sup>に準拠した。

表-1 組織標本の観察項目とグレードおよび判断基準

観察項目	グレード	評価	判断基準
甲状腺の肥大 (Thyroid gland hypertrophy)	0	注目に値しない	対照区と比較して25%未満の肥大がみられる
	1	軽度	対照区と比較して25~55%の肥大がみられる
	2	中程度	対照区と比較して55~80%の肥大がみられる
	3	重篤	対照区と比較して80%を超える肥大がみられる
甲状腺の委縮 (Thyroid gland atrophy)	0	注目に値しない	対照区と比較して25%未満の委縮がみられる
	1	軽度	対照区と比較して25~55%の委縮がみられる
	2	中程度	対照区と比較して55~80%の委縮がみられる
	3	重篤	対照区と比較して80%を超える委縮がみられる
濾胞上皮細胞の肥大 (Follicular cell hypertrophy)	0	注目に値しない	25%未満の細胞が肥大している
	1	軽度	25~55%の細胞が肥大している
	2	中程度	55~80%の細胞が肥大している
	3	重篤	80%を超える細胞が肥大している
濾胞上皮細胞の過形成 (Follicular cell hyperplasia)	0	注目に値しない	局所性または広範性の濾胞上皮細胞の密集が、組織の25%未満に影響している
	1	軽度	局所性または広範性の濾胞上皮細胞の密集が組織の25~55%に影響し、1個所または複数個所で濾胞上皮細胞層への乳頭状陥入がみられる
	2	中程度	55~80%の濾胞に、多層または層別の濾胞上皮を特徴とする局所性の過形成がみられる。乳頭状陥入は恐らく存在する
	3	重篤	80%を超える濾胞に、2~3細胞の厚さで層化した広範囲の過形成がみられる。乳頭状陥入は恐らく存在する

## 3. 実験結果

### 3.1 曝水水質

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

表-2 各塩素曝露区の平均総残留塩素濃度(mg/L)

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

### 3.2 オタマジャクシの変態観察の結果

図-5~9に各曝露区のオタマジャクシの 46ステージ以降の変態の進行結果を示す。図には各水槽の生残率も合わせて示した。

各曝露区とも変態は 100日までに完了した。曝露後 100日目での生残率と中央値から読み取ったステージ 62に要する日数を表-3に示した。各曝露区ともオタマジャクシ期に死亡個体がみられたが、特に塩素消毒水 50%曝露区（総残留塩素濃度 0.07mg/L）でオタマジャクシ期での死亡個体が多くなった。塩素濃度 25%曝露区（総残留塩素濃度 0.04mg/L）の死亡個体数は、二次処理水 100%曝露区と同等であった。

ステージ 62に要する日数は、塩素消毒水 50%曝露区が 55日と他の曝露区より早くなる傾向がみられたが、これは、オタマジャクシ期に死亡した個体が多かったため、見かけ上、早くなったことによる。

各曝露区とも、変態停止や顕著な変態遅延は観られなかったことから、本実験範囲では、塩素消毒水が変態に与える影響はないものと考えられる。ただし、塩素処理水 50%曝露区でオタマジャクシ期の死亡個体が観られたことから、塩素の添加量には注意を要すると考えられる。

表-3 各曝露区の生残率とステージ 62に要する日数

	二次処理水 100%	塩素処理水 50%	塩素処理水 25%	塩素処理水 12.5%	塩素処理水 6.25%
生残率*	57%	23%	60%	74%	77%
St. 62に要する日数	65日	55日	68日	69日	72日

※甲状腺組織観察のために間引いた個体も生残に計数

### 3.3 オタマジャクシの甲状腺組織観察結果

甲状腺組織観察のための間引いたステージ 62に達したオタマジャクシについて、頭胴長と頭部幅の測定結果を図-10, 11に示す。二次処理水 100%区と塩素処理水の各曝露区の間には違いは観られないことから

も、塩素消毒水が変態に及ぼす影響はないと考えられた。

各試料の甲状腺組織の観察結果を表-4に示す。写真-2,3は甲状腺組織標本の一例である。甲状腺組織異常の典型症例である、甲状腺の肥大(Thyroid gland hypertrophy)、甲状腺の萎縮(Thyroid gland atrophy)、濾胞上皮細胞の肥大(Follicular cell hypertrophy)、濾胞上皮細胞の過形成(Follicular cell Hyperplasia)については、全ての曝露区でグレード0~1であり異常はみられなかった。

#### 4. おわりに

下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、活性汚泥二次処理水と総残留塩素濃度 0.07, 0.04, 0.03, 0.02 mg/L の二次処理水の塩素消毒水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体と甲状腺組織観察から調査した。

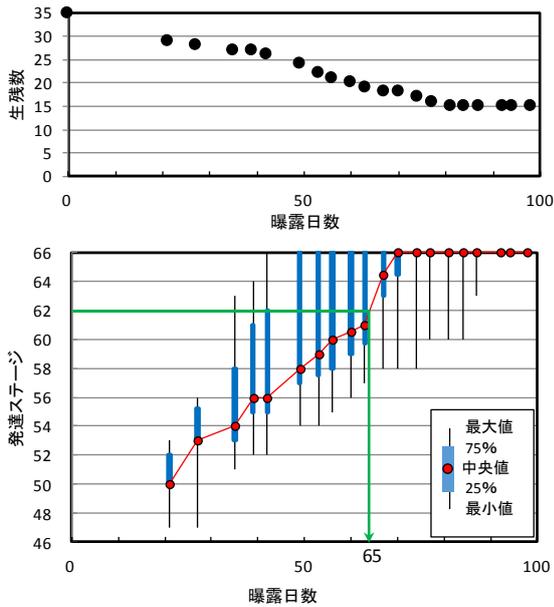


図-5 二次処理水 100%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

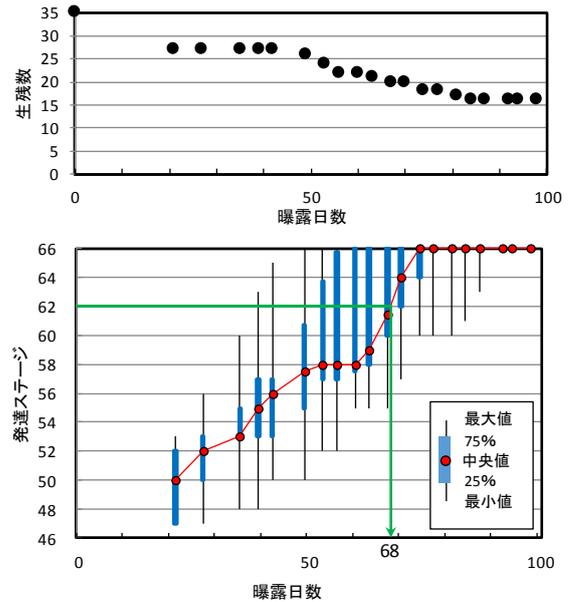


図-7 塩素消毒水 25%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

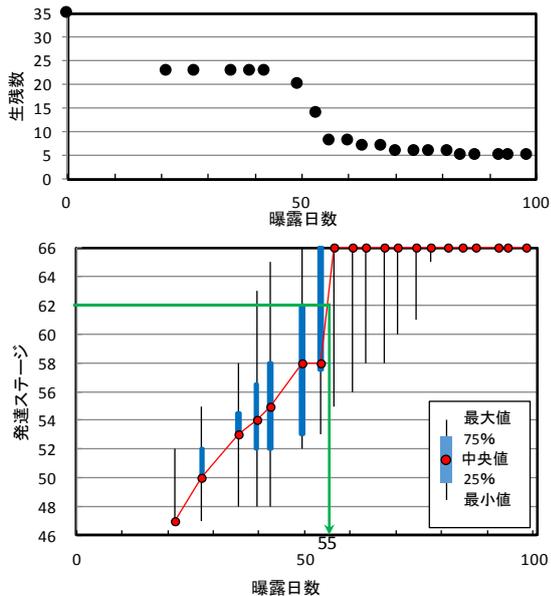


図-6 塩素消毒水 50%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

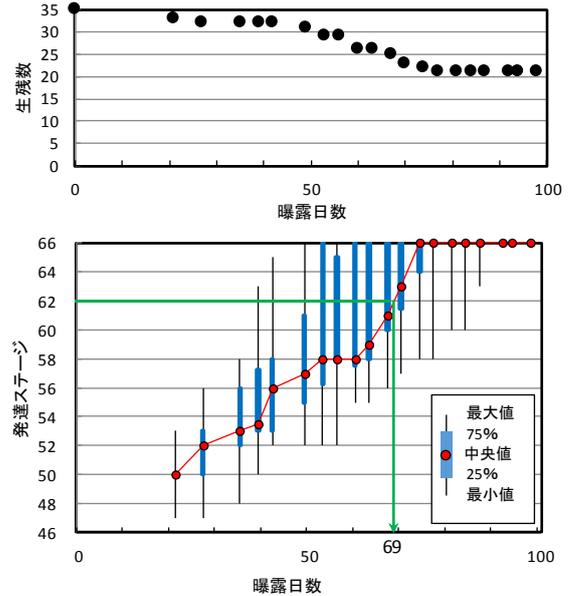


図-8 塩素消毒水 12.5%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

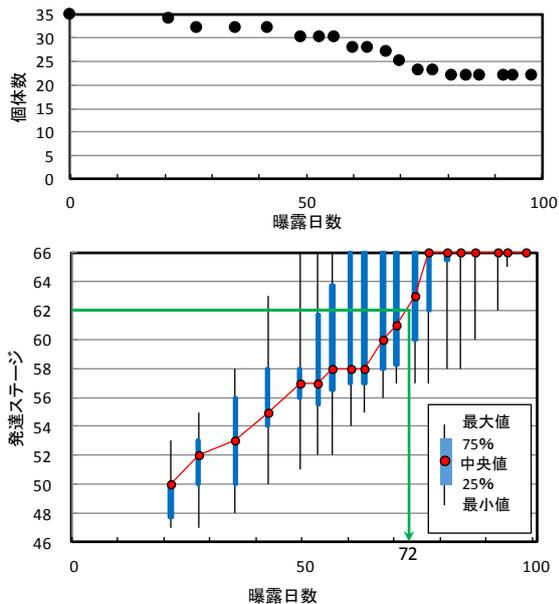


図-9 塩素消毒水 6.25%曝露区でのオタマジャクシの生残数と発達ステージ

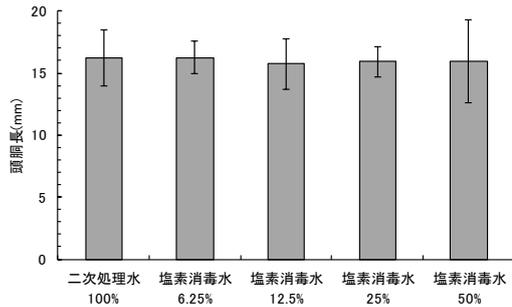


図-10 各曝露区の個体の頭胴長

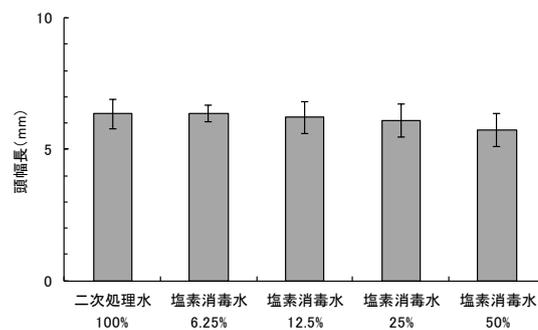


図-11 各曝露区の個体の頭幅長

表-4 各曝露区の甲状腺組織の観察結果

試験濃度区	試料 I D	甲状腺断面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	甲状腺の肥大 (Thyroid gland hypertrophy) グレード	甲状腺萎縮 (Thyroid gland atrophy) グレード	濾胞上皮細胞肥 大 (Follicular cell hypertrophy) グレード	濾胞上皮細胞過 形成 (Follicular cell hyperplasia) グレード
2次処理水100%	99-①	45,596	0	0	0	0
	99-②	77,867	0	0	0	0
	99-③	100,882	0	0	0	0
	99-④	125,531	0	0	0	0
	99-⑤	122,384	0	0	0	0
塩素処理水6.25%	04-①	90,278	0	0	0	0
	04-②	63,437	0	0	0	0
	04-③	83,949	0	0	0	0
	04-④	57,032	0	0	0	0
	04-⑤	149,492	0	0	0	0
塩素処理水12.5%	03-①	58,499	0	0	0	0
	03-②	45,868	0	0	0	0
	03-③	84,681	0	0	0	0
	03-④	80,463	0	0	0	0
	03-⑤	78,332	0	0	0	1
塩素処理水25%	02-①	48,316	0	0	0	0
	02-②	55,356	0	0	0	0
	02-③	73,822	0	0	0	0
	02-④	84,550	0	0	0	0
	02-⑤	96,019	0	0	0	0
塩素処理水50%	01-①	50,214	0	0	0	0
	01-②	84,451	0	0	0	0
	01-③	104,441	0	0	0	0



写真-2 二次処理水 100%区(試料 ID②)の甲状腺組織



写真-3 塩素消毒水 50%区(試料 ID①)の甲状腺組織

甲状腺組織：桃色・紫色に染色されている組織、濾胞腔：桃色に染色されている組織(コロイド)、濾胞上皮細胞：濾胞腔の周りの紫色の組織

その結果、総残留塩素濃度 0.07mg/L で、オタマジャクシ期の死亡個体が他の曝露区より多くなる傾向となったが、全ての曝露区で生残したオタマジャクシはカエルに変態し、変態停止や変態遅延の影響は観察されなかった。また、ステージ 62 のオタマジャクシの甲状腺組織にも異常はみられなかった。

今後は、変態後のカエルの曝露実験を引き続き継続し、生殖腺組織の観察を行い、下水処理水が生殖腺組織に与える影響を明らかにする予定である。

#### 参考文献

- 1) 岡本誠一郎、北村友一：レポータージーンアッセイを用いた再生水の安全性評価に関する研究、平成 27 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 No. 4347、pp. 240-251、2016
- 2) 環境省：化学物質の環境リスク評価 第 9 巻、過塩素酸、pp.11-14、平成 23 年 3 月
- 3) 高野敬志、伊藤八十男、千葉真弘、泉敏彦：次亜塩素酸ナトリウム溶液保存中における過塩素酸イオン濃度の増加、道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 61, pp. 11-13、2011
- 4) P. D. Nieuwkoop and J. Faber: Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), Routledge, pp. VII-X, 1994
- 5) OECD Series on testing and assessment No 82: Guidance document on amphibian histology (24 October 2007)