

生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 30

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、南山瑞彦、小川文章、
北村友一、真野浩行、武田文彦、
村田里美、服部啓太、藤村幸裕

【要旨】

下水処理場には家庭排水や工場排水等が流入するため、流入下水中には多数の化学物質が存在する。そのため下水処理水の水生生物に関する安全評価を行う場合、分析機器を用いた個別の化学物質の存在評価手法より、生物を用いた安全評価手法が適当であると考えられる。一方、生物応答を用いた全排水毒性試験（Whole Effluent Toxicity 試験：WET 試験）は、主に工場排水の安全評価法として確立されているが、下水処理水の評価法としての報告は未だ少ない。そこで本研究では、藻類、甲殻類、魚類を用いた下水に対する生物影響評価と、毒性同定評価（TIE：Toxicity Identification Evaluation）を行った。その結果、流入下水より下水処理水では生物影響が軽減されること、生物種により化学物質の感受性が異なることを明らかにした。

キーワード：全排水毒性（WET）試験、下水処理、ムレミカツキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ、ヒメダカ

1. はじめに

近年、排水の毒性評価において、毒性を有する個別の化学物質の存在を評価するのではなく、生物応答から毒性判定を行う生物応答試験が世界的に注目されている。生物応答試験は、個別の化学物質の定量などによる従来の物理化学分析方法と比べて、①試験水中に含まれる化学物質の影響を複合的に評価できる、②生物への直接的な影響を評価するため、一般市民が評価結果を実感しやすいなどの長が挙げられる。海外では、排水中の化学物質の生物影響について、米国で導入された全排水毒性 WET（Whole Effluent Toxicity）試験¹⁾など、生物応答を用いた試験により評価が行われている。日本では環境省が 2019 年に自主管理規制案として生物応答試験を用いた排水の評価手法（仮称）とその活用の手引き²⁾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。

下水処理水は主要排水のひとつであるが、国内で公表された試験法に基づき試験した研究例^{3,4)}は極めて少ない。そのため、下水処理水に対する生物応答試験を行い、下水処理により生物影響を低減できるかなどの知見を収集することが必要であると考えられる。また、生物影響が確認された場合、生物影響を引き起こした化学物質を明らかにし、影響物質の除去の可能性も含めた対策手法を検討することが必要になる。しかし、

公表された試験法に基づき下水に含まれる影響物質を評価した知見⁴⁾は少なく、情報収集が必要であると考えられる。

そこで本研究では下水処理場から得た実下水を対象に、ムレミカツキモの生長阻害試験、ニセネコゼミジンコによる繁殖試験、胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験（ゼブラフィッシュまたはメダカ）を行うことで、下水試料に対する生物影響の試験法（WET 試験）の適用性の検討と、種々の処理方式の処理水について毒性データ収集を行った。また、影響が見られた排水に対して毒性同定評価（TIE：Toxicity Identification Evaluation）による生物影響物質の推定、処理の高度化の組みあわせによる、その影響の軽減の試行を行った。

本研究の成果は以下の 4 つの観点で取りまとめた。

I：下水に対する WET 試験の適用と TIE

2. 藻類、甲殻類、魚類を用いた WET 試験による下水処理水の影響評価

II：下水の藻類に対する影響解明

3. 藻類を用いた WET 試験による下水処理水の季節影響評価

4. 各種処理方式の下水処理水に対する藻類を用いた WET 試験

III：下水の甲殻類に対する影響解明

5. 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 種への影響評価
 6. ニセネコゼミジンコに対する下水処理水中のニッケルの影響とその影響に関係する金属について
 7. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水が放流先の水生生物へ及ぼす影響の評価
 8. 金属濃度の高い二次処理水が持つ生物影響と凝集沈殿処理による生物影響改善の検討
- IV: 下水の魚類に対する影響解明
9. 下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚類（ゼブラフィッシュとヒメダカ）の検討
 10. 下水処理水を対象としたメダカ多世代試験による魚類個体群存続評価

2. 藻類、甲殻類、魚類を用いた WET 試験による下水処理水の影響評価

2.1 目的

下水処理場から得た実下水を対象に、ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いて WET 試験を行い、下水に対する生物影響の評価を行った。また、影響が見られた排水に対して TIE 試験を行い、排水中の生物影響物質の推定を行った。

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 下水試料の採水

2014 年 11 月に生活排水を主とする下水を標準活性汚泥法で処理する A 下水処理場から採水を行った。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ、合計 24 リットル採水した。採水箇所は生物反応タンクの流入口および塩素混和池の出口付近で実施し、それぞれ沈砂池越流水（流入下水）、放流水とした。それぞれの排水は、採水後等量混合した。これらの流入下水、放流水に対し水質分析を行った（表-1）。また、流入下水と放流水は 60 μm 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。ろ液は試験試料として以下に示す生物応答試験に用いた。

2.2.2 WET 試験

WET 試験は、生物応答を用いた排水試験法（検討案 2）に基づき実施した。

2.2.2.1 藻類生長阻害試験

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法（検討案 2）の推奨種となっている単細胞緑藻ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*、NIES-35 株）を用いた。下水試料に対して蒸留水を用いて 5 段階（試料割合 80%、40%、20%、10%、5%）希釈し、試験試

表-1 A 処理場の流入下水、放流水の水質

| 項目 | 単位 | 流入下水 | 放流水 |
|--------------------|-------|-------|-------|
| 水温 | ℃ | 21.2 | 21.3 |
| pH | | 7.17 | 6.98 |
| 電気伝導度 | mS/cm | 0.457 | 0.429 |
| DO | mg/L | 1.72 | 8.17 |
| 塩分濃度 | % | 0.0 | 0.0 |
| TRC | mg/L | - | 0.08 |
| 水の硬度 | mg/L | 96 | 91 |
| T-N | mg/L | 27.3 | 13.7 |
| T-P | mg/L | 2.47 | 0.286 |
| NH ₄ -N | mg/L | 16.8 | 8.10 |
| NO _x | mg/L | 0.093 | 1.46 |
| PO ₄ -P | mg/L | 1.26 | 0.134 |
| TOC | mg/L | 26.4 | 10.7 |

* 試料は採取後に等量混合した。

DO: 溶存酸素濃度 (Dissolved Oxygen)、TRC: 総残留塩素濃度 (Total Residual Chloride)、TOC: 全有機炭素濃度 (Total Organic Carbon)、-: 未測定。

料を作製した。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。容量は 30 mL/容器とし、対照区は 6 連、各 1.0×10⁴ cells/mL、温度 24° C、光強度 3000 Lux 連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に粒子計数分析装置 (CDA-1000B、100 μm アパチャー、Sysmex 社) を用いて対照区と各下水試料での細胞濃度を求め、その結果に基づき各試験水での生長速度を算出した。下水試料による生長阻害率は、以下の式(1)により算出した。

$$\text{生長阻害率 (\%)} = (\text{対照区の生長速度} - \text{下水試料での生長速度}) \div \text{対照区の生長速度} \times 100 \quad \dots (1)$$

2.2.2.2 オオミジンコ繁殖試験

本試験では、OECD テストガイドライン No.211⁹⁾を参考に、初産ではない親個体から 24 時間以内に生まれたオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いて実施した。本試験には 4 段階希釈（試料割合 80%、40%、20%、10%）の下水試料および対照区を用意した。容量は 50mL/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、脱塩素水道水を用いた。試験区ごとに生後 24 時間以内

表-2 試験水に対する各種前処理により生物影響が変化する物質の一覧⁵⁾

| | 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 | | | | ○ ¹⁾ | | |
| 無極性有機物 | | | | | ○ | SPEカラムのメタノール溶出物に生物影響ある |
| 界面活性剤 | | | ○ | | ○ | 4°C保存で時間とともに生物影響消失 |
| 陽イオン金億 | ○ | ○ | | | ○ | |
| 総溶解固形分(TDS) | △ | △ | | △ | △ | |

* 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

○¹⁾: 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

の個体を10匹(1容器1匹)曝露し、曝露期間を17日間とした。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、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は21±1°Cとした。餌としてクロレラ(*Chlorella vulgaris*)を使用し、試験個体ごとに炭素含有量が0.15 mgのクロレラを1容器ごとに毎日与えた。曝露終了後まで、試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、下水試料の試料割合ごとに生存率と累積産仔数を求めた。

2.2.2.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

国立環境研究所より分譲されたゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)を使用し、実施した。試験には5段階希釈(試料割合80%、40%、20%、10%、5%)の下水試料および対照区を用意した。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、脱塩素水道水を用いた。容量は50 mL/容器とし、試験連数は4連/試験区とした。試験区ごとに受精4時間以内の胚を40個(1容器10個)曝露し、曝露期間を9日間(対照区の生存胚の半数以上がふ化した日をふ化日とし、ふ化日から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、ふ化率と生存率を求めた。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±1°Cとした。

2.2.3 TIE試験

2.2.2.1-2.2.2.3の試験において影響が見られた流入下水に対し、米国環境保護庁(USEPA)の毒性削減評価指針⁵⁾の短期慢性毒性同定評価方法を参考にTIE試験を行った。表-2に、各前処理と生物影響に寄与する化学物質(群)との関係を示す。流入下水に対し、無処理、チオ硫酸ナトリウム添加(5 mg/L)、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)添加(0.25 mg/L、EDTA二水

素二ナトリウムを使用)、ばっ気(流入下水100% 1L/1L air、1時間、ばっ気後に20%に希釈)、pH調整(pH約6.5に調整)の前処理を行った。また、SPE(Solid Phase Extraction、固層抽出)カラム(Sep-Pak C18、Waters社)を用い、試料を1.0 μmポアサイズフィルターでろ過後にSPEカラムに通水したもの(SPEカラム通過水)、及びSPEカラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの(メタノール溶出物)を前処理水として試験した。

藻類試験では、全ての試験水を0.22 μmフィルターでろ過することから、ろ過試験は実施しなかった。藻類でのTIE試験では、流入下水20%に対し各処理を行った。各試料にAAP培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22 μmフィルターでろ過滅菌を行ったものを藻類試験に供した。対照区はAAP培地とし、試験条件は2.2.2.1 藻類生長阻害試験と同一とした。

ゼブラフィッシュ胚・仔魚を用いたTIE試験では、流入下水80%に対し各前処理を行った。ろ過処理は1.0 μmポアサイズフィルターを用いて行った。対照系には脱塩素水道水を用い、曝露期間は8日、それ以外の試験条件は2.2.2.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験と同一とした。なお、オオミジンコでは下水試料が多量に必要であり、試験期間が長期にわたるため、TIE試験を実施しなかった。

2.2.4 統計解析

各試験でのエンドポイント(藻類:0-72時間の生長速度、オオミジンコ:累積産仔数、ゼブラフィッシュ:ふ化率と生存率)について、Bartlett検定(有意水準 $\alpha=0.05$)により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett検定による多重比較(有意水準 $\alpha=0.05$)で対照区と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

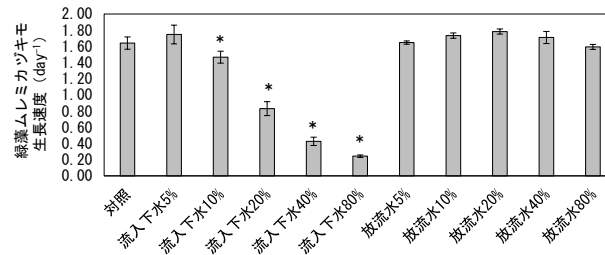


図-1 流入下水、放流水に曝露した緑藻ムレミカツキモの生長速度

* : 対照区よりも有意に低下 (p<0.05)

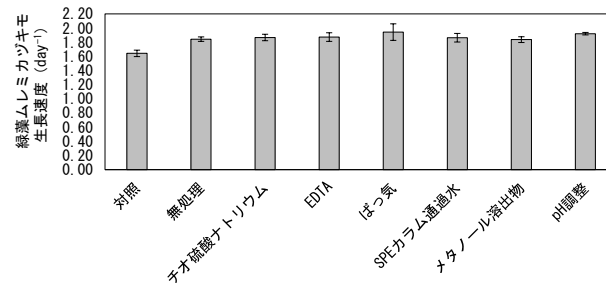


図-2 流入下水 (20%排水濃度) に対する緑藻ムレミカツキモを用いた TIE 試験

対照系と下水試料との生長速度の比較を実施した。これらの解析にはフリーの統計解析ソフト R⁷を用いた。対照系と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) として求めた。全ての下水試料割合で対照系と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合を NOEC とした。TIE 試験においては、各試料での生長速度、ふ化率および生存率について、Bartlett 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定による多重比較 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区との比較を実施した。TIE 試験では、無処理区と比較して統計学的に生長速度、ふ化率あるいは生存率の有意な増加が認められた場合、前処理による生物影響の改善が見られたと評価した。メタノール溶出物の試験はメタノールのみを AAP 培地 (藻類)、脱塩素水道水 (ゼブラフィッシュ) に添加して対照区とした。対照区と比較を行い、生長速度、ふ化率、生存率の有意な低下が見られた場合は、メタノール溶出物による影響があったと評価した。

2.3 実験結果

2.3.1 藻類生長阻害試験

図-1 に各下水の試料割合に対する藻類の生長速度を示す。流入下水は、10%以上の試料割合で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$)。放流水では最

大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられなかった。これらの結果から NOEC は流入下水で 5%、放流水で 80%と求められた。流入下水 (割合 20%) に対する TIE 試験の結果を図-2 に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加する前処理区はなかった。一方、メタノール溶出物でも生長速度に対する悪影響は確認されなかったため、無極性有機物は藻類に対して無影響であると分かった。TIE 試験は排水試験の 3 週間後に実施したが、排水試験 (図-1) で見られた影響が、TIE 試験 (図-2) では影響が確認されなかった。このことから、流入下水を 4℃暗所で保管している間に生物影響が低下したことが推察された。

2.3.2 オオミジンコ繁殖試験

図-3 に、オオミジンコの累積産仔数と生存率を示す。対照区の死亡率は 20%以下で、かつ試験個体あたりの産仔数の平均値は 60 を超えたことから、試験条件を満たした。流入下水は 20%以外の区では産仔数が対照区に比べて有意に低下した ($p < 0.05$)。流入下水 20%では対照区と同等 ($p > 0.05$) であったことから、累積産仔数に関する流入下水の NOEC は 20%と判断した。一方、放流水での累積産仔数は全ての試験区において対照区よりも多く、放流水によるオオミジンコの産仔数への生物影響は検出されなかった。よって累積産仔数に関する放流水の NOEC は 80%と求められた。生存率は累積産仔数と類似した変化を示し、流入下水では 10~80%の範囲で低下していた。放流水では 40%以上で低下する傾向にあったが、総じて高い生存率を示し

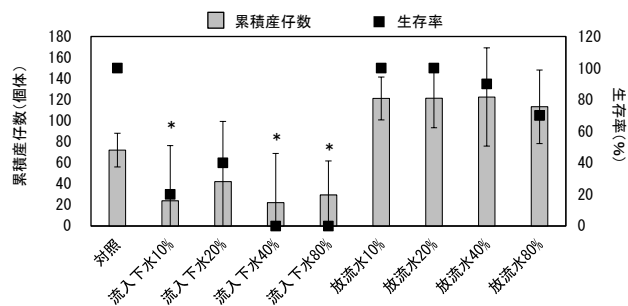


図-3 流入下水、放流水に曝露したオオミジンコの累積産仔数と生存率

* : 対照区よりも有意に低下 (p<0.05)

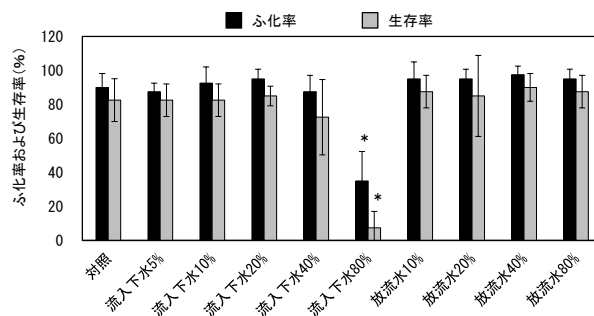


図-4 流入下水、放流水に曝露したゼブラフィッシュのふ化率と生存率

* : 対照区よりも有意に低下 (p<0.05)

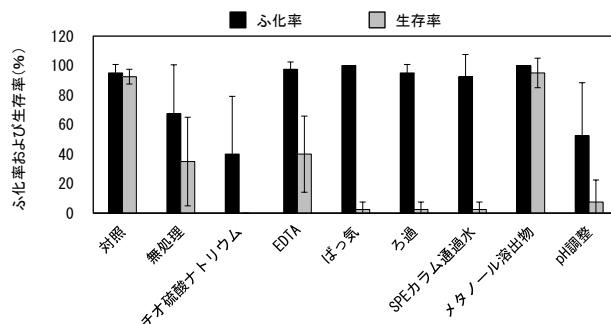


図-5 流入下水 (80%排水濃度) に対するゼブラフィッシュ胚・仔魚を用いたTIE試験

た。

2.3.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

図-4に各試料におけるゼブラフィッシュのふ化率と生存率を示す。流入下水の割合が80%の場合のみ、ふ化率と生存率は対照区よりも有意に低下した (p<0.05)。このため両指標に対する流入下水のNOECは40%と求められた。一方、放流水では全ての試験区でふ化率および生存率は対照区と有意差はなく (p>0.05)、影響は見られなかった。よって両指標に対する放流水のNOECはいずれも80%と求められた。

流入下水80%に対しTIE試験を実施した結果を図-5に示す。ふ化率では全ての系で対照系と同等であった (p>0.05)。メタノール溶出物では、ふ化率と生存率が対照と同等になり、無極性有機物は影響しないことが推察された。一方ばっ気処理では、無処理区に比べ

ふ化率が有意に改善された (p<0.05)。以上の結果から、ばっ気処理でふ化率が改善されることが明らかになったが、生存率を改善する前処理は導出できなかった。

TIE試験は排水試験より2週間後に実施したが、各試験での対照区のふ化率と生存率はt検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) より有意差がなく (p>0.05)、試験生物の性状として同等であると判断した。また、排水試験での流入下水80% (図-4) とTIE試験での無処理 (流入下水80%、図-5) におけるふ化率と生存率に有意差がないことが確認され (p>0.05)、藻類とは異なり、4℃暗所保管の間に生物影響が低下しなかったことが推察された。

2.4 考察

藻類に対するTIE試験は排水試験の4週間後に実施し、その間、下水試料を4℃冷暗所で保管した。表-2よ

り酸化物と界面活性剤は 4℃保存で生物影響が消失すると考えられる。一方、「PRTR けんさくくん」⁸⁾から平成 25 年度のデータでは、A 下水処理場で界面活性剤であるポリ＝（オキシエチレン）＝アルキルエーテルの年間推定移動量が極めて多いと推定された。ここから、流入下水で見られた藻類の生長速度に対する影響（図-1）は、界面活性剤が原因物質であると推察された。

ゼブラフィッシュに対する TIE 試験は排水試験の 2 週間後に実施した。ばっ気処理でふ化率が改善したこと、また TIE 試験において無処理のふ化率と生存率の平均値（図-5）が、排水試験（80%流入下水、図-4）より大きいことから、藻類と同様にゼブラフィッシュに対しても界面活性剤が影響を引き起こした可能性が推察された。一方、藻類と異なり、4℃保存下で生物影響が完全に消失しないこと、他の前処理でほとんど改善が見られないことから、ゼブラフィッシュに対し生物影響を引き起こす化学物質は複数存在することが推定された。

表-3 に各試験生物に対する流入下水、放流水の NOEC を示す。いずれの試験生物においても流入下水では低い値を示したが、放流水では排水割合 80%を示した。これらの結果は、A 下水処理場における標準活性汚泥処理により、試験生物に対する影響を削減できることを示している。NOEC が 80%から、1.25 倍以上の希釈で生物影響が見られなくなると判定される。通常、下水処理場では環境水中に処理水を放流しており、この程度の希釈倍率は確保され则认为られる。そのため、本試験結果から、放流水の水生生態系への影響は見られないと推察される。一方、生物影響物質の種類や量、また処理場の排水処理能力は季節において変動すると考えられるため、生物応答試験を行い、情報を蓄積することが重要であると考えられる。

2.5 まとめ

標準活性汚泥法を用いた下水処理による生物影響の低減効果を明らかにするとともに、生物影響を引き起こす化学物質を推定するために、本研究では流入下水

表-3 各試験生物に対する流入下水、放流水の無影響濃度 NOEC のまとめ

| 試験生物 | 評価指標 | NOEC (%) | |
|----------|-------|----------|-----|
| | | 流入下水 | 放流水 |
| ムレミカツキモ | 生長速度 | 5 | 80 |
| オオミジンコ | 累積産仔数 | 20 | 80 |
| ゼブラフィッシュ | ふ化率 | 40 | 80 |
| | 生存率 | 40 | 80 |

と塩素消毒した放流水に対して藻類、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を実施した。得られた結果を以下に示す。

- 1) 藻類生長阻害試験により、流入下水の割合が 10%以上の場合において生長速度への影響がみられた。放流水による生長速度への影響はいずれの試料割合においても検出されなかった。よって下水処理により藻類生長への影響の低減が確認できた。流入下水中の主要な生物影響物質は界面活性剤であると推察された。
- 2) オオミジンコ繁殖試験により、流入下水は 10、40、80%において累積産仔数が低下し影響が見られた。放流水ではいずれの試料割合においても産仔の低下は確認されなかった。生存率は流入下水の場合は全ての試料割合で大きく低下したが、放流水では総じて高かった。よって、下水処理によりオオミジンコの産仔・生存への影響の低減が確認できた。
- 3) ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験により、ふ化率、生存率は流入下水 80%のみ影響があり、放流水ではいずれの試料割合においても影響がなかった。よって下水処理によりゼブラフィッシュのふ化・生存への影響の低減が確認できた。流入下水中の主要な生物影響物質は界面活性剤であると考えられるが、複数の化学物質群が影響していると推定された。

3. 藻類を用いた WET 試験による下水処理水の季節影響評価

3.1 目的

冬季など水温が低下する時期には排水中の有機物等を除去する能力が低下する傾向にあるため、生物影響を及ぼす物質の削減能力も同様に低下する可能性が考えられる。一方、我が国の既往研究において各季節における下水処理の生物影響削減効果を評価した研究例はない。そこで本研究ではムレミカツキモを用いて各季節における下水処理による生物影響削減効果を評価した。

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 下水試料の採水

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

れた。採水は最初沈殿池の流入口付近および最終沈殿池の流出口付近で実施し、それぞれ流入下水、下水処理水とした。B 処理場では施設の構造上、塩素消毒後の放流水が得られなかったため、塩素消毒前の下水処理水を採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、24 リットル採水 (1L 採水 / 1 時間、24 時間採取) した。これらの排水は等量混合し、各排水サンプルに対して水質分析を行った (表-4)。また、流入下水と下水処理水は 60 μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、WET 試験を行うまで 4°C 冷暗所で保管した。

3.2.2 排水の藻類生長阻害試験

2.2.2.1 藻類生長阻害試験に準じて行った。

3.2.3 TIE 試験

2.2.3 TIE 試験に準じて行った。

3.2.4 統計解析

2.2.4 統計解析に準じて行った。

3.3 実験結果

3.3.1 排水試験

図-6 に各下水試料割合における藻類の生長速度をまとめた。以下、各下水試料の結果の詳細について示す。

・1 月試料 (図-6 (a))

流入下水は、40%以上の排水濃度で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。下水処理水では割合が 80%の場合に、生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。これらの結果から、NOEC は流入下水で 20%、下水処理水で 40%と求められた。

・4 月試料 (図-6 (b))

流入下水は 80%以上の排水濃度で、対照区より生長速度が有意に低下した ($p<0.05$)。下水処理水では最大の試料割合の 80%でも生長速度の低下がみられず、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 40%、下水処理水では 80%以上と求められた。

・7 月試料 (図-6 (c))

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

・10 月試料 (図-6 (d))

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

上と求められた。

3.3.2 TIE 試験

3.3.1 排水試験で影響が確認された排水試料に対して各前処理を行い、TIE 試験を行った (図-7)。以下結果の詳細について示す。

・1 月の流入下水、下水処理水 (図-7 (a)、(b))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-7(a)に示す。無処理に比べ、SPE カラム通過水で生長速度が有意に増加した ($p<0.05$)。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ($p<0.05$)、影響が見られた。表-2 よりメタノール溶出物は無極性有機物とされる。よって、流入下水中の主な影響物質は、無極性有機物であると推定された。

下水処理水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を図-7(b)に示す。対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった ($p>0.05$)。無処理に比べて生長速度が有意に増加した前処理区はなかった。下水処理水に対する TIE は排水試験より 8 日後に実施したが、図-6(a)の下水処理水 80%と図-7(b)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 16.9%、4.7%であった。生長阻害率は TIE 試験時の方で小さくなったことから、4°C 暗所の保管により生物影響が低下したと判断した。4°C 保存で生物影響が低下する物質は酸化物あるいは界面活性剤である (表-2)。よって、下水処理水中の主な影響物質は酸化物、あるいは、界面活性剤であると推定された。

・4 月の流入下水 (図-7 (c))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、pH 調整のみ生長速度が有意に増加した ($p<0.05$)。また、対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった ($p>0.05$)。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、図-6 (b)の流入下水 80%と図-7 (c)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 38.3%、27.1%であった。生長阻害率は TIE 試験時で小さくなったことから、4°C 暗所で保管したことにより生物影響は低下したと判断した。

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

・7 月の流入下水 (図-7 (d))

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加 ($p<0.05$) したのは pH 調整であった。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり ($p>0.05$)、影響が

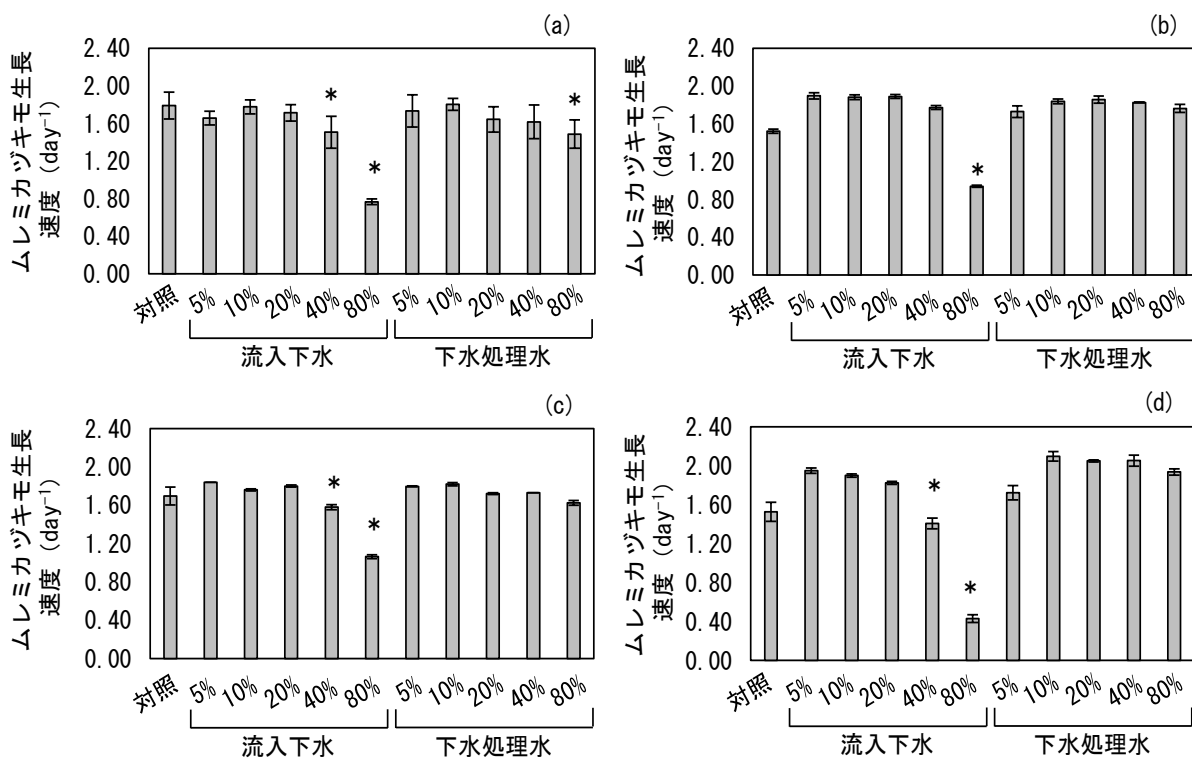
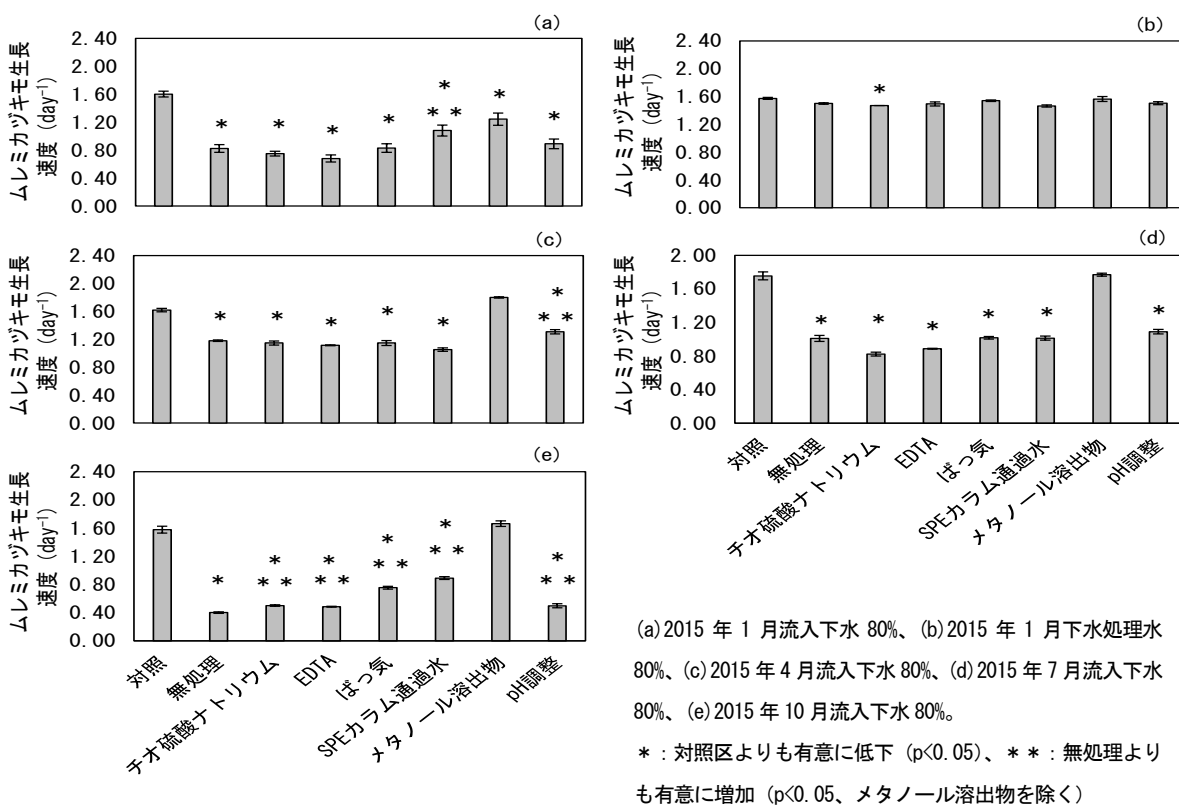


図-6 流入下水、下水処理水に曝露したムレミカツキモの生長速度

(a) 2015年1月試料、(b) 2015年4月試料、(c) 2015年7月試料、(d) 2015年10月試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。



(a) 2015年1月流入下水 80%、(b) 2015年1月下水処理水 80%、(c) 2015年4月流入下水 80%、(d) 2015年7月流入下水 80%、(e) 2015年10月流入下水 80%。

* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)、** : 無処理よりも有意に増加 ($p < 0.05$ 、メタノール溶出物を除く)

図-7 ムレミカツキモを用いた毒性同定評価

表-5 ムレミカヅキモに対する流入下水、下水処理水の NOEC と毒性同定評価により推定された生物影響物質のまとめ

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

*NOEC: 無影響濃度 (No Observed Effective Concentration)

無かった。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、**図-6(c)**の流入下水 80%と**図-7(d)**の無処理における生長阻害率はそれぞれ 37.3%、42.5%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所保管でも生物影響は低下しなかったと判断した。**表-2**より pH 調整で生物影響が改善する物質はアンモニアである。ただし、本試験において pH 調整による生長速度の改善はわずかであることから、流入下水中の主な影響物質はアンモニアの他に、別の化学物質も複合的に作用していることも推定された。

・10月の流入下水 (**図-7(e)**)

流入下水 (試料割合 80%) に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、全ての前処理区で生長速度が有意に増加した (p<0.05)。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり、影響は見られなかった。流入下水に対する TIE は排水試験より 13 日後に実施したが、**図-6(d)**の流入下水 80%と**図-7(e)**の無処理における生長阻害率はそれぞれ 71.8%、74.6%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所の保管でも生物影響は低下しなかったと判断した。メタノール溶出物を除く全ての前処理で対照区より生物影響が改善したことから、流入下水中の主な影響物質は酸化物、アンモニア、界面活性剤、陽イオン金属などが推定された (**表-2**)。

3.4 考察

表-5に各試験生物に対する流入下水、下水処理水の NOEC、TIE 試験により推定された生物影響化学物質をまとめた。表中の推定影響物質について、生物影響が見られず TIE を実施する必要がなかった下水試料については「なし」とした。

NOEC をみると、いずれの採取時期においても流入下水より下水処理水の NOEC の値が大きい、または試験における最高の試料割合でも影響がないことが明らかになった。これらの結果は、B 処理場での下水処理により、生物影響が削減されたことを示している。また、流入下水から種々の生物影響化学物質が推定されたが、下水処理水では生物影響の低減あるいは消失が確認された。これらの結果は、B 処理場での下水処理によって、これら化学物質に起因する生物影響が削減されたと考えられた。

PRTR けんさくくん⁸⁾の公開情報によると B 処理場には界面活性剤、疎水性化学物質、金属類、酸化物等が流入することが示されており、TIE で推定された生物影響物質と類似していた。このような公開情報は下水試料中の生物影響物質の推定や同定を行う上で参考になることが推察される。本研究で実施した PRTR 情報の活用、生物応答試験、毒性同定評価の一連の調査研究手法は、下水道における新しい排水管理手法になり得ると考えられた。

下水処理水においては 1 月試料のみ生物影響が確認された。2015 年 1 月、2015 年 4 月、7 月、10 月での B 処理場の下水処理水の月間平均水温は約 18℃、約 19℃、約 28℃、約 27℃であり、1 月に最も水温が低かった。1 月の下水処理水のみムレミカヅキモに対する生物影響が見られたのは、水温低下によって生物活性が他の時期より低下し、それが原因となり生物影響物質の除去能が低下したことが推定された。また本調査では、B 処理場の他に標準活性汚泥処理を行う 2 箇所の処理場でも流入下水と放流水を採水し、同様の試験を行った。その結果 2 処理場とも B 処理場と同様に、冬季の水温低下期のみ放流水でムレミカヅキモに対する生物影響が確認された。水温低下により、生物影響の削減能の低下が、活性汚泥処理で生じやすいことが示唆される。他の処理方式でも同様の現象が起こるか、またそのメカニズムについて今後検討する必要があると考えられた。

3.5 まとめ

下水処理による生物影響削減能の季節変化を評価するため、嫌気好気活性処理を行う B 処理場において流入下水と下水処理水を採水し藻類生長阻害試験を実施

した。結果として、流入下水では計4回のいずれの時期においても供試藻類に対する生物影響が見られた。下水処理水では春(4月)、夏(7月)、秋(10月)に得たものは生物影響がなかったが、冬(1月)の下水処理水のみ影響が確認された。その原因として、冬季には下水の水温低下に伴う生物活性の低下に起因して生物影響物質が除去しきれずに残存してしまうことが推定された。

4. 各種処理方式の下水処理水に対する藻類を用いたWET試験

4.1 目的

本研究では各種下水処理方法について、藻類に対する下水の生物影響の有無、および生物影響削減能力を検討することを目的とした。複数の下水処理場において生物処理前後の下水を採水し、WET試験を実施した。生物影響が確認された下水については、TIE試験を行い、生物影響原因物質の推定を行った。

4.2 実験材料および実験方法

4.2.1 下水試料の採水

C 下水処理場(標準活性汚泥処理法)、D 下水処理場(OD法)、E 下水処理場(嫌気好気ろ床法)を対象とした。いずれの処理場も主に生活排水が流入している。流入下水及び塩素消毒後の放流水を2015年6月(C処理場)、2016年7月(D処理場)、2016年8月(E処理場)

に採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は24時間とし、1時間ごとに1リットルずつ、合計24リットル採水した。これらの排水はそれぞれ等量混合し、流入下水(流出口付近で採取)、放流水に対して水質分析を行った(表-6)。また、流入下水と放流水は60µmポアサイズのメッシュでろ過し、ろ液を4°Cの冷暗所で保管した。これらのろ液は下水試料として生物応答試験に用いた。

4.2.2 藻類生長阻害試験

2.2.2.1 藻類生長阻害試験に準じて行った。

4.2.2 毒性同定評価

2.2.3 TIE試験に準じて行った。

4.2.3 統計解析方法

2.2.4 統計解析に準じて行った。

4.3 実験結果

4.3.1 排水試験

図-8に各下水試料割合における藻類の生長速度をまとめた。以下、各下水試料の結果の詳細について示す。

・C処理場 (図-8(a))

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

・D処理場 (図-8(b))

表-6 採水後に等量混合した流入下水、放流水の水質

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

*コンポジット時の水温

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

・E処理場 (図-8(c))

流入下水、放流水いずれも割合が40%以上で対照区

よりも生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$)。よってNOECは両試料とも20%と求められた。

4.3.2 TIE試験

4.3.1排水試験で放流水に影響が見られたE処理場の流入下水と終沈流出水について、各前処理試料における藻類の生長速度を検討した(図-9)。以下、各水試料の結果の詳細について示す。

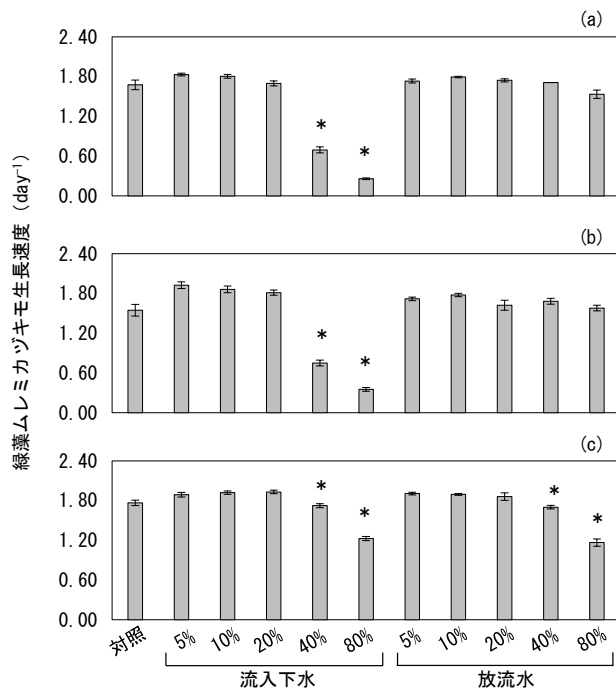


図-8 流入下水、放流水に曝露したムレミカツキモの生長速度

(a)C処理場、(b)D処理場、(c)E処理場の下水試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

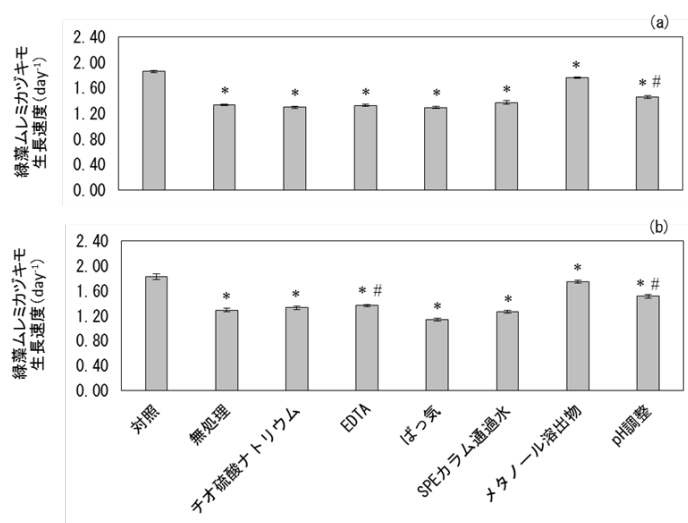


図-9 ムレミカツキモを用いた毒性同定評価

(a)E処理場の流入下水80%、(b)E処理場の放流水80%

* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)、# : 無処理よりも有意に増加 ($p < 0.05$ 、メタノール溶出物を除く)

・E 処理場の流入下水 (図-9(a))

流入下水(試料割合 80%)に対して試験を行った。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整であった ($p < 0.05$)。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ($p < 0.05$)、影響が見られた。流入下水に対する TIE は排水試験より 26 日後に実施したが、図-8(c)の流入下水 80%と図-9(a)の無処理における生長阻害率は、それぞれ 30%、28%であった。生長阻害率がほぼ同等だったことから、4°C 暗所の保管でも、生物影響は低下しないと判断した。

表-2 より pH 調整で生物影響が改善する物質はアンモニアであり、メタノール溶出物は生物影響が見られたが、SPE 通過水では生物影響の改善は見られなかった。ここから無極性有機物とはいえないが、何らかの疎水性化学物質が生物影響物質であったと推定される。以上から流入下水中の主な影響物質は、アンモニア、疎水性化学物質であると推定された。

・C 処理場の放流水 (図-9(b))

放流水(試料割合 80%)に対する TIE の結果を示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整、EDTA であった ($p < 0.05$)。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し ($p < 0.05$)、影響が確認された。流入下水に対する TIE 試験は排水試験より 14 日後に実施したが、図-8(c)の放流水 80%と図-9(c)の無処理における生長阻害率はそれぞれ 34%、29%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4°C 暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

表-2 より pH 調整、EDTA 添加で生物影響が低下する物質はアンモニア、陽イオン金属である。メタノール溶出物では生物影響が見られたが、SPE 通過水では生物影響が削減されなかった。これらの結果から無極性有機物とはいえないが、何らかの疎水性化学物質が生物影響物質であったと推察される。以上の結果から、放流水中の主な影響物質はアンモニア、陽イオン金属、疎水性化学物質であると推定された。

4.4 考察

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

一方、E 処理場では流入下水、放流水の NOEC はいずれも 20%であり、生物影響が削減できなかったこと

が明らかになった。TIE 試験により推定された生物影響物質は流入下水では疎水性化学物質とアンモニア、放流水では疎水性化学物質、アンモニアと陽イオン金属であり、その組成もほぼ同一であったことが示唆された。E 処理場の NH₄-N 濃度は、流入下水で 18.8 mg/L、放流水で 19.5 mg/L であり、放流水でも濃度が高かった (表-6)。また、各処理場の DOC 除去率を比較すると C、D、E 処理場それぞれ 66%、86%、37%であり、E 処理場では除去率が低いと考えられた。よって、E 処理場では何らかの対策により硝化促進および生物処理を強化できれば放流水の生物影響の削減にもつながる可能性があると考えられた。

4.5 まとめ

3 種の下水処理方式における藻類ムレミカヅキモに対する下水の生物影響削減能力を評価した。標準活性汚泥法を導入した C 処理場、OD 法を導入した D 処理場、嫌気好気ろ床法を導入した E 処理場において流入下水、放流水を採水し、それらに対し藻類生長阻害試験を実施した。C、D 処理場においては、流入下水には生物影響があり、放流水では影響がなかったことから、各処理場の処理によって生物影響が削減できたことが分かった。一方、E 処理場においては、流入下水と放流水に同等の生物影響が確認され、生物影響が削減できなかった。下水処理による生物影響削減能力の実態把握のため、今後も様々な処理場の下水を用いて同様の評価を行い、知見を収集する必要がある。

5. 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 種への影響評価

5.1 目的

事業場排水に由来する金属が比較的多く流入する下水処理場の二次処理水に対して、ニセネコゼミジンコとオオミジンコを用いた排水試験を実施し、それらの感受性を比較した。また影響が確認された二次処理水に対して毒性同定評価試験を行い、下水処理水中の生物影響の原因物質の推定を行った。水質分析の結果も合わせ、ニセネコゼミジンコの下水処理水の TIE 試験の適用性を検討した。

5.2 実験材料および実験方法

5.2.1 下水試料の採水

PRTR けんさくくん⁹⁾の公開情報に基づき、金属類の流入負荷量が多い下水処理場 B を対象とした。この下水処理場 B では、処理方式に嫌気好気活性汚泥処理を採用し、日平均で約 150,000 m³/日の下水を処理して河川に放流している (平成 26 年度)。表-7 は、平成 24、

表-7 下水処理場 B への金属の年間移動量 (kg)

| 第一種指定化学物質名 | 平成24年度 | | 平成25年度 | |
|------------------------|--------|-------------------|--------|-----------------|
| | 移動量* | 中央値 (下水処理場数**) | 移動量 | 中央値 (下水処理場数) |
| 亜鉛の水溶性化合物 | 80 | 10 (84) | 81 | 16 (86) |
| クロム及び三価クロム化合物、六価クロム化合物 | 113.4 | 5.9 (69) | 144.2 | 9 (65) |
| セレン及びその化合物 | 0.4 | - | 3.5 | - |
| 銅水溶性塩(錯塩を除く) | 43 | 15 (65) | 7 | 13 (62) |
| 鉛化合物 | 0.4 | - | 3.5 | - |
| ニッケル、ニッケル化合物 | 807 | 20 (119) | 167 | 20 (123) |
| 砒素及びその無機化合物 | 0.7 | - | 0.3 | - |

*PRTRけんさん¹⁰⁾の公開情報に基づいて集計した

**PRTRけんさん¹⁰⁾の公開情報から、事業場からの移動が確認された全国の下水処理場の数を示す

25 年度における下水処理場 B への金属およびその化合物の年間移動量を示す。全国の下水処理場の移動量の中央値と比較して、この下水処理場への亜鉛 (Zn)、クロム (Cr)、銅 (Cu) およびニッケル (Ni) の移動量が多いと考えられた。

2015 年の 1、4、7、10 月に二次処理水を採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ採水した。採水した二次処理水をコンポジットして、24 リットルの下水試料を得た。この下水試料をすぐに実験室に持ち帰り、孔径 60 μm のメッシュでろ過し、試験を実施まで、ろ液を遮光したガラス瓶に入れ、4℃冷暗所で保管した。

5.2.2 水質項目分析

採水した下水試料および生物試験の対照区に用いた水試料の水質を把握するため、各試料の一般水質項目 (アンモニア性窒素 (NH₄-N)、全りん (T-P)、全窒素 (T-N) および下水処理場 B に多く流入していると考えられる金属のうち Cu、Ni、Zn の溶存態濃度を測定した。アンモニア性窒素、全りんおよび全窒素の分析は下水試験方法¹⁰⁾に従い、連続流れ分析装置 (TRAACS2000, Bran+Luebbe) を用いて定量を行った。また溶存態の金属の分析は河川水質試験方法¹¹⁾に従った。孔径 0.45 μm のフィルター (Millipore 社) でろ過した試料の硝酸分解を行った後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置 (X7CCT、サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて定量を行った。

5.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた排水試験

本試験は、生物応答を用いた排水試験法 (検討案)²⁾に基づき、国立環境研究所より分譲されたニセネコゼミジンコを用いて実施した。採取した二次処理水に対して 4 段階の割合 (試料割合 40%, 20%, 10%, 5%) の希釈溶液及び対照区を用意した。二次処理水の希釈

表-8 二次処理水および対照区の水試料の水質分析 TIE 項目

| 水質項目 | 二次処理水 | | | | 対照区 | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------|--------|
| | 1月 | 4月 | 7月 | 10月 | ニセネコゼミジンコ | オオミジンコ |
| T-N (mg/L) | 11.7 | 11.7 | 10.6 | 11.6 | 1.63 | 0.33 |
| T-P (mg/L) | 0.442 | 0.468 | 0.592 | 0.132 | 0.152 | N.D. |
| NH ₄ -N (mg/L) | 1.03 | 9.17 | 0.257 | 2.2 | 0.04 | N.D. |
| Cu (μg/L) | 7.28 | 2.5 | 3.13 | 2.48 | 0.22 | - |
| Ni (μg/L) | 88.39 | 55.03 | 38.88 | 35.67 | 0.44 | 0.41 |
| Zn (μg/L) | 63.55 | 24.16 | 50.96 | 35.76 | 4.8 | 3.14 |

N.D.は不検出を示す

脱塩素水道水のCuは未測定

及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を用いた。50 mL のガラス容器に試験溶液 15 mL を入れ、試験連数を 10 連/試験区とした。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、曝露期間は最大で 8 日間とした。餌として、クロレラ (*Chlorella vulgaris*)、ムレミカヅキモ (*P. subcapitata*) および YCT (Yeast, Cerophyll and Trout Chow) を使用した。曝露方式は半止水式 (1 日おきに換水) 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±1℃とした。曝露終了後まで試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、試験個体ごとに累積産仔数を算出し、試験溶液ごとに生存率を求めた。また、曝露期間中の水換え前後に、pH、水温、溶存酸素 (DO, Dissolved Oxygen) の測定を行った。本試験は、採水した全ての二次処理水を対象とした。

5.2.4 オオミジンコを用いた排水試験

本試験は、二次処理水に対するニセネコゼミジンコの生物応答と比較するため、曝露期間中のオオミジンコの累積産仔数に対する下水試料の慢性毒性を調査した。実験方法は 2.2.2.2 オオミジンコ繁殖試験を基に行い、曝露期間は 17 日間とした。曝露方式、照明、観察および水質項目の測定はニセネコゼミジンコを用いた試験と同様の条件とした。本試験は 2015 年 1 月に採水した二次処理水を対象とした。

5.2.5 ニセネコゼミジンコを用いた下水試料の毒性同定評価試験

本研究では、ニセネコゼミジンコの累積産仔数に影響がみられた 7 月と 10 月の二次処理水に対して、米国の TIE 試験の方法¹²⁾を参考に、Tier 1 の特性評価試験 (Characterization test) を行った。二次処理水の割合を 40%とした希釈水に対し、無処理、ろ過、チオ硫酸ナトリウム添加、EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 添加、ばっ気、pH 調整の各前処理を行った。

試験は 2.2.3 TIE 試験に準じて行い、下記の項目については変更した。ろ過処理は、二次処理水 200 mL を孔径 1 μm のフィルターでろ過した後、希釈水を 500 mL 作成した。EDTA 添加処理は、希釈水 500 mL に EDTA 濃度が 3 mg/L になるように、試験開始前に EDTA 二水素ナトリウムを添加した。pH 調整処理として、換水ごとに希釈水に塩酸を添加し、pH6.2~6.5 に調整した。試験連数は 5 連/試験区とした。

5.2.6 データ解析

排水試験では、累積産仔数について Bartlett 検定(有意水準 $\alpha=0.05$)により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定(有意水準 $\alpha=0.05$)による多重比較で対照区と下水試料での累積産仔数の違いを調査した。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での累積産仔数の違いを調査した。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各前処理区の累積産仔数を対照区または無処理試料割合を、無影響濃度 NOEC として求めた。

TIE 試験では、排水試験と同様の統計手法により、区の累積産仔数と比較した。無処理区と前処理区の間で累積産仔数に有意差が認められ、無処理区よりも前処理区の累積産仔数が多い場合、その前処理による生物影響の改善がみられたと判定した。SPE 溶出物については対照区と比較し、累積産仔数の有意差がある場

合は SPE 溶出物による影響があると判定した。

5.3 実験結果と考察

5.3.1 水質項目分析

表-8 に採取した二次処理水および二次処理水の希釈や対照区に用いた水試料の水質項目分析結果を示す。全窒素、全リンは調査回間で同程度の値を示した。アンモニア性窒素は 4 月に比較的高い値で検出された。金属について、Zn は 1 月と 7 月で比較的高い濃度で検出され、Ni は 1 月に比較的高い濃度で検出された。Ni について、江藤らは 2000 年度に全国の 13 下水処理場の放流水中の Ni 濃度を測定しており、平均値は 34 $\mu\text{g/L}$ と報告している¹³⁾。また磯崎らは、2005 年に 4 都市下水処理場の標準活性汚泥処理水中の溶存態 Ni を測定しており、溶存態の Ni 濃度は 2.6~13 $\mu\text{g/L}$ と報告している¹⁴⁾。これらの値に比べて、本研究で対象とした下水処理場の二次処理水中の Ni は高い濃度で検出された。

5.3.2 下水試料の排水試験

ニセネコゼミジンコの試験期間中の各試験溶液の水温は、全ての試験区で $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 以内を維持した。平均 pH および DO を表-9 に示す。曝露試験期間中の平均 pH は、全ての試験区で 7.65~8.38 の範囲であった。

DO は、曝露前後において全ての試験区で飽和 DO 濃度の 60%以上に達していた。

表-9 ニセネコゼミジンコの排水試験における試験溶液の DO、水温、pH (平均値±標準偏差)

| 採水月 | Sample | 二次処理水の割合 (%) | 曝露前 | | | 曝露後 | | |
|-----|--------|--------------|------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | | | DO (mg/L) | 水温 ($^\circ\text{C}$) | pH | DO (mg/L) | 水温 ($^\circ\text{C}$) | pH |
| 1月 | 対照区 | - | 7.85 \pm 0.23 | 25.8 \pm 0.1 | 8.16 \pm 0.15 | 7.58 \pm 0.16 | 25.3 \pm 0.2 | 8.10 \pm 0.16 |
| | 二次処理水 | 5 | 7.94 \pm 0.15 | 25.7 \pm 0.2 | 8.15 \pm 0.09 | 7.50 \pm 0.40 | 25.2 \pm 0.5 | 8.38 \pm 0.47 |
| | | 10 | 7.99 \pm 0.14 | 25.7 \pm 0.1 | 8.12 \pm 0.05 | 7.69 \pm 0.35 | 24.8 \pm 0.7 | 8.32 \pm 0.32 |
| | | 20 | 8.08 \pm 0.28 | 25.4 \pm 0.1 | 8.06 \pm 0.03 | 6.93 \pm 0.62 | 25.4 \pm 0.3 | 7.97 \pm 0.31 |
| | | 40 | 8.34 \pm 0.33 | 25.4 \pm 0.0 | 7.86 \pm 0.06 | 7.45 \pm 0.16 | 25.4 \pm 0.1 | 8.13 \pm 0.04 |
| 4月 | 対照区 | - | 9.05 \pm 1.65 | 25.7 \pm 0.3 | 7.81 \pm 0.45 | 8.66 \pm 1.28 | 25.1 \pm 0.4 | 8.12 \pm 0.20 |
| | 二次処理水 | 5 | 9.08 \pm 1.76 | 25.5 \pm 0.4 | 7.90 \pm 0.36 | 9.06 \pm 1.48 | 25.0 \pm 0.7 | 7.98 \pm 0.23 |
| | | 10 | 9.07 \pm 1.73 | 25.5 \pm 0.4 | 7.88 \pm 0.30 | 8.60 \pm 1.04 | 24.9 \pm 0.5 | 7.99 \pm 0.24 |
| | | 20 | 8.97 \pm 2.10 | 25.4 \pm 0.6 | 7.97 \pm 0.27 | 9.49 \pm 0.63 | 25.0 \pm 0.5 | 7.96 \pm 0.34 |
| | | 40 | 10.32 \pm 1.45 | 25.4 \pm 0.7 | 7.66 \pm 0.15 | 8.65 \pm 0.98 | 25.2 \pm 0.5 | 7.97 \pm 0.25 |
| 7月 | 対照区 | - | 8.99 \pm 1.48 | 25.7 \pm 0.3 | 7.95 \pm 0.89 | 7.89 \pm 0.68 | 25.0 \pm 0.4 | 7.81 \pm 0.55 |
| | 二次処理水 | 5 | 8.67 \pm 1.33 | 25.6 \pm 0.4 | 7.75 \pm 0.67 | 8.16 \pm 0.87 | 24.8 \pm 0.3 | 7.79 \pm 0.57 |
| | | 10 | 8.75 \pm 1.29 | 25.5 \pm 0.4 | 7.73 \pm 0.66 | 8.27 \pm 1.01 | 24.9 \pm 0.3 | 7.95 \pm 0.48 |
| | | 20 | 8.87 \pm 1.25 | 25.4 \pm 0.3 | 7.71 \pm 0.59 | 8.24 \pm 1.26 | 24.7 \pm 0.5 | 8.02 \pm 0.38 |
| | | 40 | 9.10 \pm 1.14 | 25.3 \pm 0.3 | 7.65 \pm 0.50 | 8.03 \pm 0.51 | 24.5 \pm 0.4 | 8.03 \pm 0.33 |
| 10月 | 対照区 | - | 8.04 \pm 0.19 | 25.6 \pm 0.2 | 7.81 \pm 0.47 | 7.49 \pm 0.10 | 25.5 \pm 0.2 | 8.00 \pm 0.34 |
| | 二次処理水 | 5 | 8.11 \pm 0.17 | 25.6 \pm 0.2 | 7.85 \pm 0.52 | 7.62 \pm 0.55 | 25.2 \pm 0.2 | 7.79 \pm 0.41 |
| | | 10 | 8.22 \pm 0.14 | 25.5 \pm 0.2 | 7.84 \pm 0.51 | 7.36 \pm 0.52 | 25.1 \pm 0.2 | 7.85 \pm 0.38 |
| | | 20 | 8.34 \pm 0.15 | 25.4 \pm 0.3 | 7.82 \pm 0.47 | 7.41 \pm 0.40 | 25.4 \pm 0.1 | 7.87 \pm 0.33 |
| | | 40 | 8.60 \pm 0.22 | 25.3 \pm 0.5 | 7.76 \pm 0.43 | 7.42 \pm 0.49 | 25.2 \pm 0.3 | 7.89 \pm 0.29 |

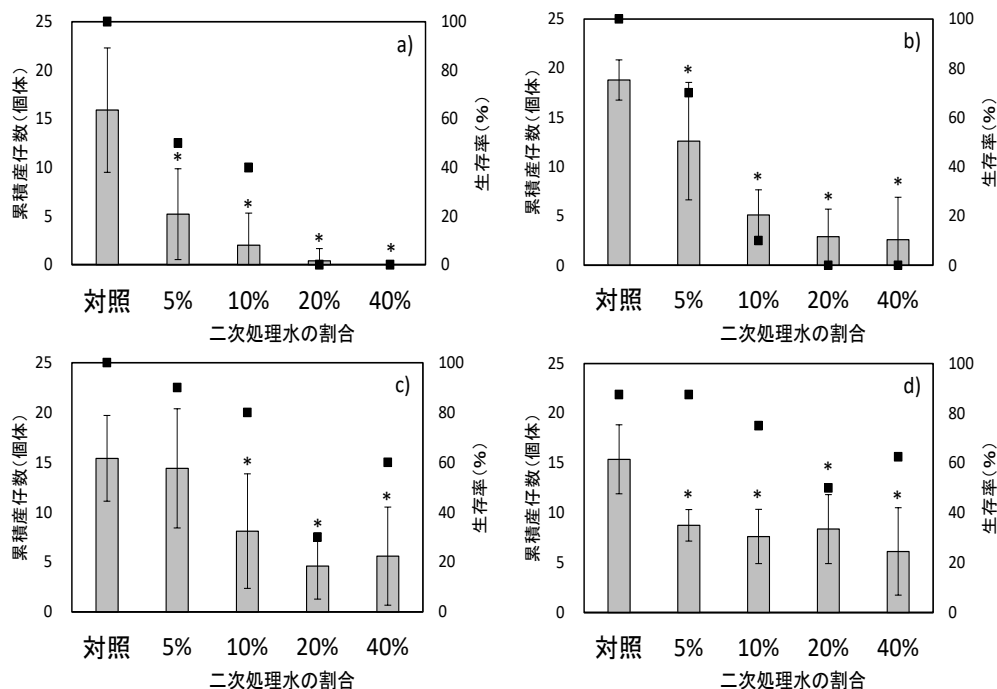


図-10 ニセネコゼミジンをういた二次処理水の排水試験における累積産仔数と生存率

a) 2015年1月試料、b) 2015年4月試料、c) 2015年7月試料、d) 2015年10月試料

■：生存率を示す。*：累積産仔数が対照区と有意な差を示し (p<0.05)、対照区よりも少ないことを示す。

表-10 オオミジンの排水試験における試験溶液のDO, 水温, pH (平均値±標準偏差)

| Sample | 二次処理水の割合 (%) | 曝露前 | | | 曝露後 | | |
|--------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| | | DO (mg/L) | 水温 (°C) | pH | DO (mg/L) | 水温 (°C) | pH |
| 対照区 | - | 8.16 ± 0.62 | 21.7 ± 0.2 | 7.01 ± 0.12 | 7.41 ± 0.96 | 22.0 ± 0.2 | 7.52 ± 0.42 |
| 二次処理水 | 10 | 8.32 ± 0.78 | 21.7 ± 0.2 | 7.04 ± 0.12 | 6.89 ± 0.87 | 21.8 ± 0.2 | 7.55 ± 0.38 |
| | 20 | 8.56 ± 0.90 | 21.6 ± 0.3 | 7.06 ± 0.07 | 7.02 ± 0.80 | 21.8 ± 0.4 | 7.59 ± 0.23 |
| | 40 | 9.08 ± 0.97 | 21.4 ± 0.3 | 7.04 ± 0.05 | 6.87 ± 0.86 | 21.9 ± 0.2 | 7.60 ± 0.18 |
| | 80 | 10.30 ± 0.65 | 21.3 ± 0.4 | 6.99 ± 0.05 | 7.04 ± 0.99 | 22.0 ± 0.3 | 7.58 ± 0.16 |

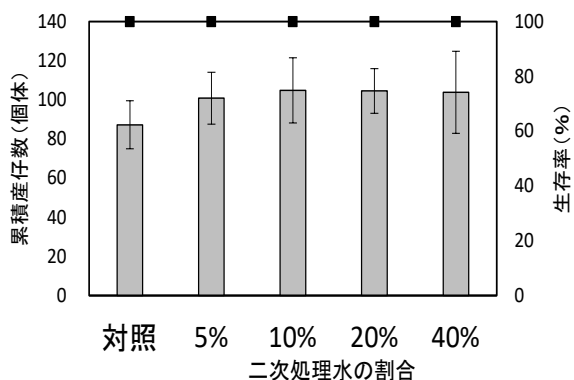


図-11 オオミジンをういた1月の二次処理水の排水試験における累積産仔数と生存率

■：生存率を示す。

図-10 にニセネコゼミジンをういた二次処理水の試験結果を示す。全ての調査回で二次処理水の生物影響がみられた。1、4、7、10月の二次処理水のNOECは全て5%未満と求められた。安田らは、都市部の下水

処理場の処理水に対してニセネコゼミジンの排水試験を実施しており、NOECは10%と報告している¹⁵⁾。NOECの比較により、既報の二次処理水に比べて本研究で対象とした二次処理水によるニセネコゼミジンへの影響が大きいことが考えられた。また生存率は、希釈試料中の二次処理水の割合の増加と共に低下する傾向を示した。特に1、4月の二次処理水の希釈系列は、7、10月の二次処理水の希釈系列に比べて生存率が低い傾向を示した。

オオミジンの試験期間中の各試験溶液の水温、pHおよびDOを表-10に示す。曝露実験期間中の平均水温は、全ての試験区で21±1°C以内を維持した。平均pHは、全ての試験区で6.99~7.60の範囲であった。DOは曝露前後において全ての試験区で飽和DO濃度の60%以上に達していた。

図-11に1月に採取した二次処理水に対するオオミ

ジンの排水試験結果を示す。オオミジンの繁殖と死亡に対する1月の二次処理水の生態影響はみられなかった。この結果から1月の二次処理水のNOECは40%以上と求められた。

1月に採取した二次処理水の排水試験結果では、ニセネコゼミジンコへの生物影響が検出されたのに対して、オオミジンコへの生物影響は検出されなかった。下水処理水に対するミジンコ種間の感受性を調査した先行研究¹⁶⁾では、オオミジンコとニセネコゼミジンコの感受性は同程度であることが報告されているが、本研究で対象とした二次処理水に対して、ニセネコゼミジンコはオオミジンコよりも高い感受性を示した。先

コを用いて下水処理水の生物影響を調査する場合、オオミジンコを用いるより安全側の結果となる可能性が示された。

5.3.3 下水試料のTIE試験

試験期間中の各試験溶液の水温、pHおよびDOを表-11に示す。水温、pH、DOは試験条件を満たしていた。7月に採取した二次処理水(試料割合40%)に対するTIE試験の結果を図-12 a)に示す。生物応答試験と同様に、無処理区で生物影響がみられた。EDTA処理による生物影響の改善がみられた。

表-2のように、EDTA処理により生物影響が低下する物質は陽イオン金属と判断されることから、陽イオン金属が7月の二次処理水中の主な生物影響の原因物

表-11 TIE試験における試験溶液のDO、水温、pH(平均値±標準偏差)

| 採水月 | Sample | 曝露前 | | | 曝露後 | | |
|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | DO (mg/L) | 水温 (°C) | pH | DO (mg/L) | 水温 (°C) | pH |
| 7月 | 対照区 | 9.47 ± 0.94 | 25.3 ± 0.5 | 8.08 ± 0.18 | 7.05 ± 0.98 | 25.1 ± 0.4 | 7.55 ± 0.40 |
| | 無処理 | 9.52 ± 0.47 | 25.2 ± 0.2 | 7.83 ± 0.08 | 7.68 ± 0.77 | 25.1 ± 0.3 | 7.41 ± 0.38 |
| | ばっ気 | 9.74 ± 0.59 | 25.1 ± 0.3 | 7.91 ± 0.12 | 7.31 ± 0.77 | 24.9 ± 0.5 | 7.71 ± 0.17 |
| | EDTA 3mg/L | 9.75 ± 0.70 | 25.1 ± 0.4 | 7.81 ± 0.06 | 7.10 ± 0.67 | 25.1 ± 0.3 | 7.84 ± 0.11 |
| | チオ硫酸 10mg/L | 9.92 ± 0.62 | 25.1 ± 0.2 | 7.74 ± 0.05 | 7.10 ± 0.86 | 24.8 ± 0.3 | 7.92 ± 0.07 |
| | ろ過 | 9.64 ± 0.67 | 25.2 ± 0.2 | 7.76 ± 0.07 | 7.43 ± 0.20 | 24.4 ± 0.5 | 7.83 ± 0.22 |
| | SPE通過 | 9.51 ± 0.69 | 25.0 ± 0.3 | 7.79 ± 0.06 | 6.89 ± 0.61 | 24.8 ± 0.2 | 7.99 ± 0.07 |
| | SPE溶出 | 8.79 ± 0.41 | 25.1 ± 0.3 | 7.61 ± 0.14 | 7.08 ± 1.02 | 24.8 ± 0.4 | 8.07 ± 0.07 |
| | 低pH | 9.57 ± 0.92 | 25.2 ± 0.2 | 6.44 ± 0.07 | 7.40 ± 1.03 | 24.7 ± 0.4 | 7.96 ± 0.06 |
| | 10月 | 対照区 | 9.60 ± 0.95 | 25.0 ± 0.4 | 8.08 ± 0.03 | 7.83 ± 1.61 | 24.9 ± 0.3 |
| 無処理 | | 9.77 ± 0.41 | 24.5 ± 0.5 | 7.83 ± 0.08 | 8.38 ± 1.19 | 25.0 ± 0.4 | 7.96 ± 0.37 |
| ばっ気 | | 10.24 ± 0.34 | 24.7 ± 0.6 | 7.78 ± 0.06 | 8.10 ± 1.32 | 24.9 ± 0.6 | 8.02 ± 0.29 |
| EDTA 3mg/L | | 9.99 ± 0.59 | 24.7 ± 0.4 | 7.75 ± 0.08 | 7.74 ± 0.90 | 25.1 ± 0.5 | 8.07 ± 0.25 |
| チオ硫酸 10mg/L | | 9.93 ± 0.64 | 24.9 ± 0.2 | 7.77 ± 0.13 | 7.33 ± 1.05 | 24.9 ± 0.6 | 8.11 ± 0.14 |
| ろ過 | | 9.97 ± 0.72 | 24.7 ± 0.4 | 7.80 ± 0.03 | 7.96 ± 1.28 | 24.9 ± 0.7 | 8.08 ± 0.21 |
| SPE通過 | | 10.23 ± 0.37 | 24.7 ± 0.3 | 7.82 ± 0.03 | 7.93 ± 0.41 | 25.3 ± 0.6 | 8.13 ± 0.19 |
| SPE溶出 | | 8.62 ± 0.69 | 24.9 ± 0.5 | 7.53 ± 0.08 | 7.49 ± 0.74 | 25.1 ± 0.4 | 8.20 ± 0.14 |
| 低pH | | 9.42 ± 0.36 | 25.1 ± 0.4 | 6.19 ± 0.05 | 7.23 ± 0.96 | 24.5 ± 0.5 | 8.08 ± 0.19 |

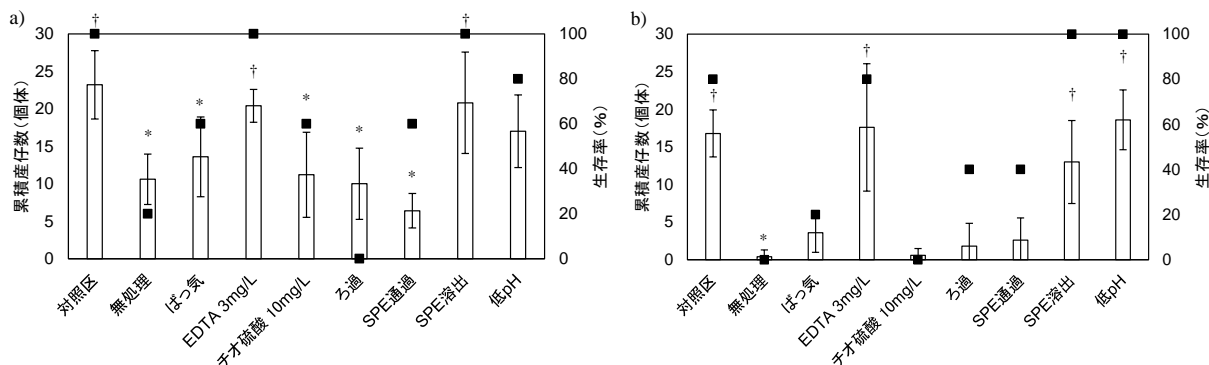


図-12 TIE試験におけるニセネコゼミジンの累積産仔数と生存率

a) 2015年7月二次処理水40%、b) 2015年10月二次処理水40%、棒グラフは累積産仔数の平均値、バーは標準偏差を示す。■：生存率を示す。*：累積産仔数が対照区と有意差(p<0.05)を示し、対照区に比べて少ないことを示す。†：累積産仔数が無処理区と有意差(p<0.05)を示し、無処理区に比べて多いことを示す。

表-12 7月と10月に採取した二次処理水の割合が5、10、20および40%の試験溶液に含まれる陽イオン金属3物質の推定濃度

| | 40%試験溶液 | | 20%試験溶液 | | 10%試験溶液 | | 5%試験溶液 | | 無影響濃度 | 最低影響濃度 |
|-----------|----------|----------|---------|--------|---------|------|--------|------|-------|--------|
| | 7月 | 10月 | 7月 | 10月 | 7月 | 10月 | 7月 | 10月 | | |
| Cu (μg/L) | 1.38 | 1.12 | 0.80 | 0.67 | 0.51 | 0.45 | 0.33 | 0.37 | 6.3 | 9.9 |
| Ni (μg/L) | 15.82 ** | 14.53 ** | 8.13 * | 7.49 * | 4.28 | 3.96 | 3.17 | 2.36 | 5.3 | 9.9 |
| Zn (μg/L) | 23.26 * | 17.18 * | 14.03 * | 10.99 | 9.42 | 7.90 | 5.77 | 7.11 | 13 | 25.1 |

**ニセネコゼミジンコに対する最低影響濃度よりも高い金属濃度を示す

*ニセネコゼミジンコに対する無影響濃度よりも高く、最低影響濃度よりも低い金属濃度を示す

質であると推定された。また SPE 通過水で生物影響が検出され、SPE 溶出液で生物影響が検出されなかったことから、有機物ではなく金属等のイオン物質による生物影響への寄与が考えられた。

TIE 試験により、7月と10月に採水された二次処理水の生物影響の原因物質として推定されたアンモニアと陽イオン金属について、原因物質であるかどうかを検討した。水質分析結果から推計された試験溶液中の濃度と既報文献²⁰⁻²³から得られた慢性毒性の値を比較し、試験溶液の濃度で、これらの化学物質がニセネコゼミジンコに影響を引き起こすかどうか調査した。

はじめに、アンモニアによるニセネコゼミジンコへの影響を検討した。二次処理水と対照区の水試料のアンモニア性窒素の濃度に基づいて、二次処理水の割合が40%の試験溶液に含まれるアンモニア性窒素濃度を推計した。7月および10月に採取した二次処理水の割合が40%の試験溶液中のアンモニア性窒素の濃度はそれぞれ、0.13、0.90 mg/Lと推計された。アンモニアの毒性値として、平均水温 24.5°C、平均 pH8.59 の試験環境下で、アンモニア性窒素濃度で示された 25%阻害濃度は 1.99 mg/Lと報告されている¹⁷。アンモニアの毒性は pH に依存して変化するため¹⁸、以下の pH による慢性毒性値の標準化式¹⁹を用いて、TIE 試験における平均 pH でのアンモニアの慢性毒性値に換算した。

$$CV_x = CV_{pH8} \times \left(\frac{0.0676}{1+10^{7.688-x}} + \frac{2.91}{1+10^{x-7.688}} \right) \dots (2)$$

CV_x は pH が x での慢性毒性値を示し、CV_{pH8} は pH8 での慢性毒性値を示す。

7月および10月の二次処理水の毒性同定評価試験の平均 pH の下で推計されたアンモニアの毒性値は、アンモニア性窒素濃度でそれぞれ 8.29、6.03 mg/Lと推計された。7月および10月の二次処理水の40%試験溶液のアンモニア性窒素濃度の推計値は、推計されたア

ンモニアの慢性毒性値よりも低い値を示した。このことから、7月および10月の二次処理水の生物影響にアンモニアは寄与しなかったことが推察された。

次に陽イオン金属によるニセネコゼミジンコへの影響を検討した。表-12に、各希釈試料の陽イオン金属濃度の推定値を示す。推計は、二次処理水と対照区の水試料の陽イオン金属に基づいて行った。ニセネコゼミジンコの繁殖に対する Cu の無影響濃度と最低影響濃度は、硬度 94.1 mg/L で 6.3 μg/L と 9.9 μg/L²⁰、Ni の無影響濃度と最低影響濃度は硬度 113 mg/L で 5.3 μg/L と 9.9 μg/L²¹、Zn の無影響濃度と最低影響濃度は硬度 82.4 mg/L で 13 μg/L と 25.1 μg/L²²と報告されている。最低影響濃度に比べて、毒性同定評価試験で用いた二次処理水の割合が40%の試験溶液中の Ni 濃度の推計値が高いことから、Ni はこの試験溶液の生物影響に大きく寄与していたことが考えられた。一方、オオミジンコの最低影響濃度は 250 μg/L と報告されており²³、二次処理水中の Ni によるオオミジンコへの影響はなかったと考えられた。Cu については、二次処理水の割合が40%の試験溶液の濃度の推計値が最低影響濃度よりも低いことから、Cu はこの試験溶液の生物影響に寄与しなかったことが考えられた。また Zn については、二次処理水の割合が40%の試験溶液中の濃度の推計値が最低影響濃度よりも低いが無影響濃度よりも高い値を示しており、この試験溶液の生物影響に寄与していた可能性が考えられた。

以上の結果から、陽イオン金属のうち Ni が主要な影響原因物質として7月と10月に採水された二次処理水の生物影響に寄与していると考えられた。

10月の二次処理水を用いた毒性同定試験では、低 pH 処理によりニセネコゼミジンコへの影響が改善された。ニセネコゼミジンコに対する Ni の毒性は、低 pH 条件下で低下することが報告されている^{12,24}。これは、Ni イオンが低 pH 処理により増加した水素イオン

表-13 Ni で馴致された標準活性汚泥処理実験装置の流入下水と終沈流出水の一般水質項目

| 試料名 | 水温 | pH | DO | DOC | BOD | COD | SS | VSS | TN | TP |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | °C | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L |
| 流入下水 | 24.8 | 7.25 | 0.11 | 20.7 | 134 | 191 | 473 | 347 | 58 | 9 |
| 終沈流出水 | 24.3 | 6.92 | 5.54 | 5.3 | 1 | 10 | 1 | 2 | 16 | 1 |

と競合し、ニセネコゼミジンの鯉に結合しにくくなるためと考えられている²⁵⁾。このことから、低 pH 処理によりニッケルの毒性が低下し、10月に採水された二次処理 40%の試験溶液の生物影響が低下したと考えられた。

また、7月および10月に採水した二次処理水の排水試験では、ニセネコゼミジンコで影響がみられた二次処理水の割合の最小値はそれぞれ、10%と5%であった。これらの試験溶液の陽イオン金属3物質の濃度の推計値は慢性毒性値よりも下回っており、個別の陽イオン金属によるニセネコゼミジンコへの影響は小さいことが考えられた(表-12)。そのため、これらの試験溶液によるニセネコゼミジンコへの影響は、陽イオン金属の複合的な影響による可能性が考えられた。また本研究では、対象下水処理場への移動量が高いCrについて検討していないため、今後Crによる影響についても調査が必要である。

以上の結果から、本研究で用いた二次処理水では、毒性同定評価試験により二次処理水に含まれる溶存態の陽イオン金属の生物影響を検出できた。また7月と10月に採水した二次処理水の生物影響の主要な原因物質として、Niが推察された。Niは金属製品製造業の排水において、ニセネコゼミジンコに影響を引き起こす原因物質の1つとして報告されている^{26,27)}。溶存態のNiを比較的多く含む排水が流入する下水処理場において、二次処理水によるニセネコゼミジンコへの影響が考えられるため、今後他の下水処理場で採取された溶存態金属の濃度が高い二次処理水に対して排水試験および毒性同定評価試験を実施し、Niによる生物影響に関する知見を収集する必要がある。また水生生物に対する金属の毒性は、遊離イオンや無機錯体として存在する金属によって引き起こされるとされている²⁸⁾。そのためNiが生物影響原因物質であることを確認するためには、遊離イオンや無機錯体のNi濃度が毒性同定評価の前処理により減少することを確かめる必要がある。

5.4 まとめ

溶存態金属の濃度が高い下水処理水に対して、ミジンコ種の生物応答を用いた排水試験を適用するとともに、

対象とした下水処理水にTIE試験を適用することで生物影響の原因物質を推定した。また水質分析の結果に基づいて、毒性同定評価試験により推定された原因物質の生物影響を個別に調査し、下水処理水に対するTIE試験の適用性を検討した。得られた結果を以下に示す。

- 1) PRTR データに基づいて溶解性金属負荷が高い下水処理場を選定し、その二次処理水を用いてニセネコゼミジンコを用いた排水試験を実施したところ、ニセネコゼミジンコに対する二次処理水の影響が検出された。
- 2) ニセネコゼミジンコと個別化学物質の毒性試験に使用されるオオミジンコの、下水処理水に対する感受性を比較した。その結果、ニセネコゼミジンコはオオミジンコに比べて高い感受性を示した。
- 3) TIE試験により生物影響の原因物質として推定された陽イオン金属とアンモニアについて、水質分析の結果と既報文献²⁰⁻²³⁾に基づいて推定された慢性毒性値とを比較した。その結果、ニセネコゼミジンコへの影響を引き起こした原因物質として陽イオン金属のNiが推定された。
- 4) TIE試験は二次処理水に含まれる溶存態の陽イオン金属の生物影響の検出に使用できると考えられた。
- 5) 7月および10月に採水した二次処理水の排水試験では、ニセネコゼミジンコで影響がみられた二次処理水の割合の最小値はそれぞれ、10%と5%であり、これらの試験溶液の陽イオン金属3物質(Cu, Ni, Zn)の濃度の推計値は慢性毒性値よりも下回っていた。そのため、試験溶液によるニセネコゼミジンコへの影響は、これら陽イオン金属の複合的な影響による可能性が考えられた。

6. ニセネコゼミジンコに対する下水処理水中のニッケルの影響とその影響に関係する金属について

6.1 目的

我々の既往研究では、実下水処理場の流入下水にNiを添加し、馴致した活性汚泥処理装置の流入下水とその終沈流出水を用いてニセネコゼミジンコの影響を検討した結果、流入下水より終沈流出水で生物影響が高

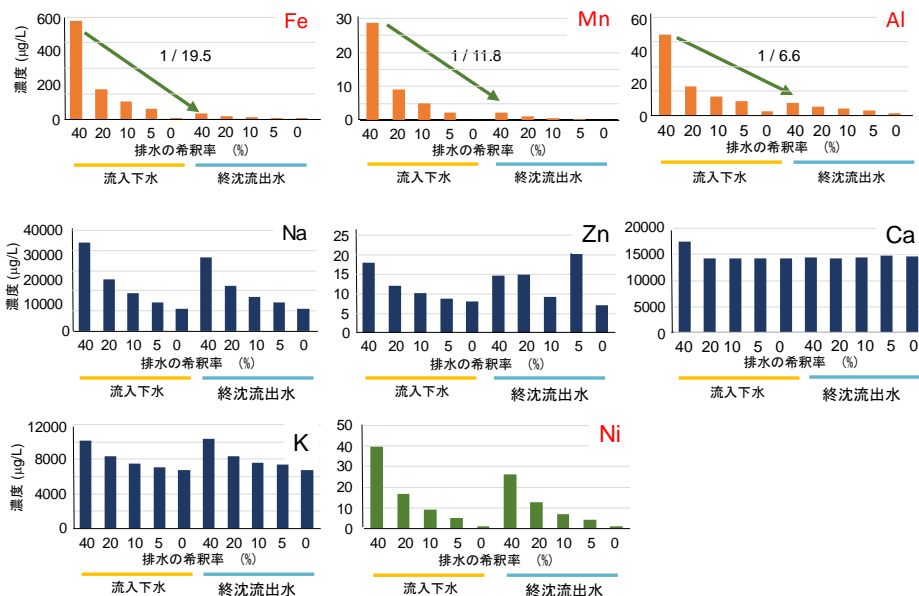


図-13 Ni で馴致された活性汚泥処理実験装置の流入下水と終沈流出水の溶存態金属濃度

くなることを明らかにした²⁹⁾。本研究ではその原因究明のため、特に流入下水中に含まれる金属に着目して検討を行った。

6.2 実験材料および実験方法

6.2.1 Ni 排水サンプルの調製

実下水処理場の流入下水で連続運転している活性汚泥処理実験装置の流入下水に Ni (塩化ニッケル: 最終濃度 100 μg/L) を添加し 40 日間馴致させた後、流入下水と終沈流出水を採取した (採取日 2017 年 10 月 13 日)。一般水質項目を表-13 に示す。採取した排水試料は 60 μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、金属分析まで褐色瓶に入れて 4℃、冷暗所で保管した。

6.2.2 金属試験水の調製

ニセネコゼミジンコに対する金属影響試験には、塩化鉄 III・6 水和物、塩化マンガン・4 水和物、塩化アルミニウム・6 水和物を用いた。それぞれの試薬は流入下水の 20%濃度に相当する金属量 (Fe: 200 μg/L、Mn: 10 μg/L、Al: 20 μg/L) をミネラルウォーターに懸濁し、試験に用いた。金属の組み合わせとして、①Ni (0、5、7.5、10 μg/L)、②Ni (0、5、7.5、10 μg/L) +Fe (5 μg/L)、③Ni (5 μg/L) +Al (20 μg/L)、④Ni (5 μg/L) +Mn (10 μg/L) を検討した。全ての対照区はミネラルウォーターとした。

6.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた各サンプルの影響試験

生物応答を用いた排水試験法 (検討案)²⁾に基づき、(国研) 環境研より分譲されたニセネコゼミジンコを

用いた。各試験試料で生後 24 時間以内の個体を 10 匹 (1 匹/15 mL/容器) 曝露し、曝露期間を最大 8 日間とした。金属影響試験にはミネラルウォーターを用いた。曝露方法は半止水式 (1 日おきに換水) とし、照明は白色蛍光で明期 16 時間、暗期 8 時間、水温 25±1℃とした。餌はクロレラ、YCT を用いた。曝露終了後まで試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、各試料の生存率と 3 日間の平均産仔数を算出した。

6.2.3 データ解析

ニセネコゼミジンコの影響試験の結果は、5.2.6 データ解析に準じて検討した。

6.2.4 金属分析

各排水サンプルをフィルター (孔径 0.2 μm、Millipore 社) 濾過した試料を硝酸分解した後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置 (X7CCT、Thermo Fisher Scientific) を用いて 8 種金属 (Fe、Mn、Al、Na、Zn、Ca、K、Ni) の定量を行った。

6.3 結果と考察

6.3.1 Ni で馴致された流入下水と終沈流出水の金属濃度

40 日間 Ni で馴致された活性汚泥処理実験装置から流入下水と終沈流出水を採取し、8 種金属の溶存態金属濃度を測定した (図-13)。Ni は流入下水 40%希釈濃度で 39.2 μg/L、終沈流出水 40%希釈濃度で 25.8 μg/L となり、処理過程で 34.2%の減少が確認された。Ni 以外の 7 種金属のうち、流入下水より終沈流出水で濃度減少が顕著に確認された金属は、Fe (95%減)、Mn

(92%減)、Al (85%減) であった。一方、Na、Zn、Ca、K では下水処理過程で濃度の大きな減少は確認されなかった。これらの結果は下水処理により除去される金属は、種類により異なることを示している。

下水処理過程で Fe、Mn、Al の濃度減少が顕著に確認されたことから、ニセネコゼミジンコに対する Ni の影響がこれら金属の存在下で変化するのか、検討を行った。Ni を含む飼育水 (ミネラルウォーター) に Fe、Mn、Al をそれぞれ添加し、ニセネコゼミジンコの生存率と 3 日間の平均産仔数を検討した。本試験では、流入下水 20%希釈濃度に含まれる金属濃度にあわせて、Fe: 200 µg/L、Mn: 10 µg/L、Al: 20 µg/L で検討した。

ニセネコゼミジンコに対する Fe の影響は、対照区に比べて生存率 80%、3 腹分の平均産仔数は 65%の影響が確認された (図-14a、b)。Ni 濃度 5 µg/L の場合、Fe の存在下では生存率が 10%だったが、Fe 非存在下で

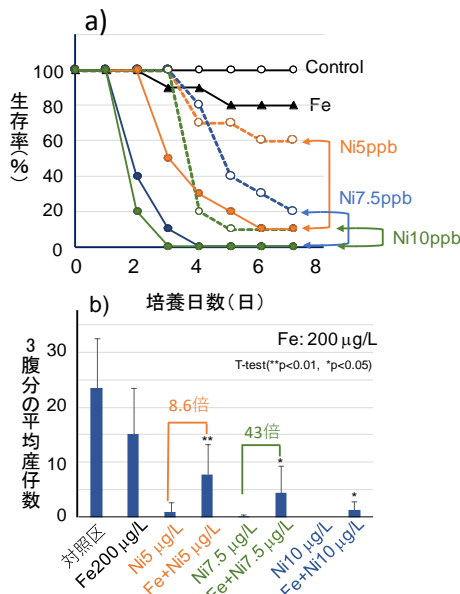


図-14 Fe 存在下における Ni がニセネコゼミジンコに及ぼす影響

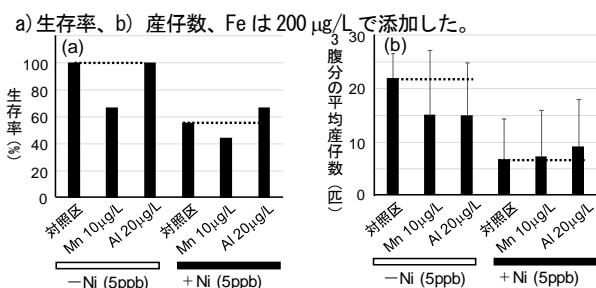


図-15 Mn、Al 存在下における Ni がニセネコゼミジンコに及ぼす影響

a) 生存率、b) 産仔数、Fe は 200 µg/L で添加した。

は 60%まで回復した。また Fe 非存在下での平均産仔数は、Fe 存在下に比べ 8.6 倍増加した。以上の結果から、Fe が Ni と共存する場合、Ni 濃度 5~10 µg/L ではいずれも Fe が無い場合に比べて生残数、産仔数ともに影響が軽減されることが明らかになった。

ニセネコゼミジンコに対する Mn (10 µg/L) と Al (20 µg/L) の影響は対照区と比べて、生存率は 100%と 70%、3 腹分の平均産仔数は両者とも 75%であった。一方、Mn と Al が Ni: 5 µg/L と共存する場合、ニセネコゼミジンコに対する生存率と産仔数の影響は、Ni 単独の場合に比べ、ほとんど差は見られなかった (図-15)。Fe に比べ Mn と Al は流入下水に含まれる量は少なかったが、本実験では流入下水において Mn と Al がニセネコゼミジンコに対する Ni の影響に関与しないと推察される。

以上の結果から、流入下水より終沈流出水でニセネコゼミジンコに対する影響が高く見られる要因の 1 つとして、Fe の減少が要因の 1 つであることが推察される。今後は、Fe 存在下でのニセネコゼミジンコに対する Ni の作用機構について、検討する必要があると考えている。

6.4 まとめ

Ni を添加した流入下水とその終沈流出水を用いてニセネコゼミジンコの影響を評価したところ、流入下水より終沈流出水で影響が高くなることもある。本研究ではその原因究明のため、特に流入下水中に含まれる金属に着目して実験を行った。

1) ニッケルを添加した流入下水と終沈流出水中の 8 種類の金属濃度を比較した結果、流入下水より終沈流出水で Fe、Mn、Al で顕著な濃度減少が確認された。
2) Fe が存在するとニセネコゼミジンコに対する Ni の影響が軽減されることが明らかになった。

以上の結果から、流入下水より終沈流出水でニセネコゼミジンコに対する影響が高く見られる要因の 1 つとして、Fe の減少が推察された。

7. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水が放流先の水生生物へ及ぼす影響の評価

7.1 目的

5. 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 種への影響評価では、Ni を比較的多く含む事業場排水が流入する B 下水処理場の二次処理水に対して、排水希釈濃度 5%でもニセネコゼミジンコの生存率と産仔数に影響が生じることを明らかにした。そこで 2017 年度に B 処理場の放流水を採取し、同時

に放流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。B 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。

7.2 実験材料および実験方法

7.2.1 下水試料の採水

2018 年 1 月 18～19 日に B 処理場の①放流水、②放流水口 (B 処理場から河川への放流水口)、③河川水 (放流水口から 150 m 程度下流、海に流入) の採水を行った (図-16)。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、等量混合とした。放流水口と河川水は、海の潮位が最も低い干潮時にそれぞれバッチ採取した (20 L)。これら水試料は 60 μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、試験まで、ろ液を 4℃の冷暗所で保管した。

7.2.2 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³⁰⁾を参考に実施し、試験生物には、水産庁海産生物毒性試験指針で推奨されているシオダマリミジンコ (*Tigriopus japonicus*) を用いた (図-17)。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。各下水試料の希釈に使用する試験水は、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 に調製したものをを用いた。①放流水、②放流水口、③河川水にそれぞれ既定の塩分濃度に合わせてマリンソルトプロを添加し、試験を行った。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 200 μm 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 5 mL/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℃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。

7.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた影響試験

5.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた排水試験に準じて行った。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 (放流水口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。)

7.2.4 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⁺、NH₄⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻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) でろ過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。

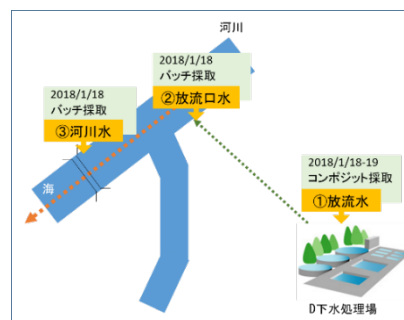


図-16 各水試料の採取場所

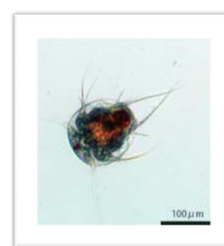


図-17 シオダマリミジンコの顕微鏡写真

表-14 各サンプル水中の一般水質項目

| | DO | pH | 水温 | SS | VSS | DOC | Na ⁺ | NH ₄ ⁺ | K ⁺ | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ | Cl ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | SO ₄ ²⁻ |
|-------|--------|-----|------|--------|--------|--------|-----------------|------------------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | (mg/L) | | (°C) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) |
| ①放流水 | 10.1 | 6.9 | 10.9 | 4.2 | 3.9 | 8.3 | 132.8 | 1.5 | 10.2 | 17.9 | 37.9 | 156.8 | 3.2 | 22.6 | 158.4 |
| ②放流水口 | 9.7 | 7.0 | 13.2 | 5.4 | 1.9 | 3.0 | 3776.6 | - | 129.8 | 475.9 | 179.1 | 6769.4 | - | 11.2 | 991.5 |
| ③河川水 | 9.6 | 7.2 | 12.1 | 7.1 | 1.5 | 3.2 | 2027.5 | - | 67.0 | 180.3 | 100.1 | 3627.8 | - | 8.5 | 526.4 |

7.3 結果と考察

試験に用いた各水サンプルの一般水質項目を比較した(表-14)。その結果、①放流水に比べ②放流口水と③河川水の Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 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(Ni、Mn、Zn、Fe、Al)濃度を比較した(図-18)。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。特にNiは放流水では21.25 $\mu\text{g/L}$ が、放流口水ではその1/2、河川水では1/10まで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。

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(図-19)、また生存率にも影響が見られなかったことから、 $\text{NOEC} \geq 80\%$ であることが明らかになった。

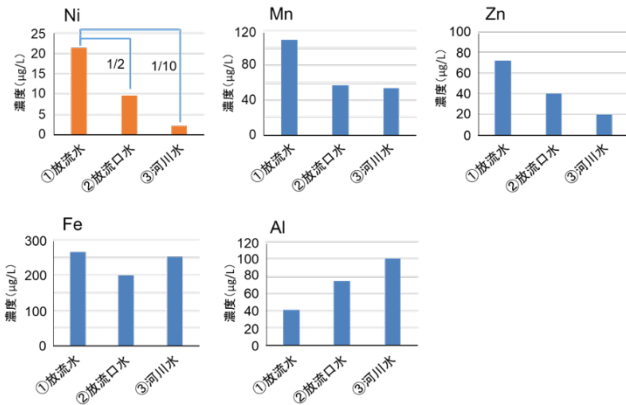


図-18 各サンプル水中の金属濃度

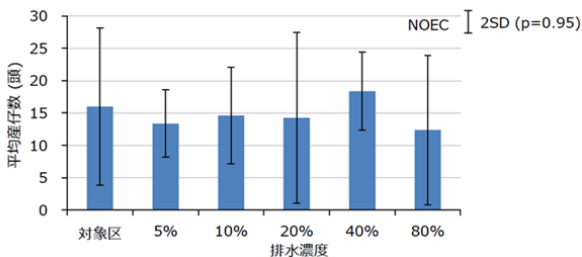


図-19 ニセネコゼミジンコの産仔数に対する放流水の影響評価

一方、2015年の放流水5%希釈濃度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%で有意な影響は見られなかった(5. 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種への影響評価)。既存の報告では、NiのNOECとLOECは硬度113 mg/Lで5.3 $\mu\text{g/L}$ と9.9 $\mu\text{g/L}$ ²¹⁾と報告されているが、今回の実験で用いたニセネコゼミジンコのNiのNOECは20 $\mu\text{g/L}$ と高い値を示した(データには示していない)。放流水(80%希釈濃度)中のNi濃度が17 $\mu\text{g/L}$ (推定値)であったことから(図-18)、①放流水におけるニセネコゼミジンコの有意な影響が見られな

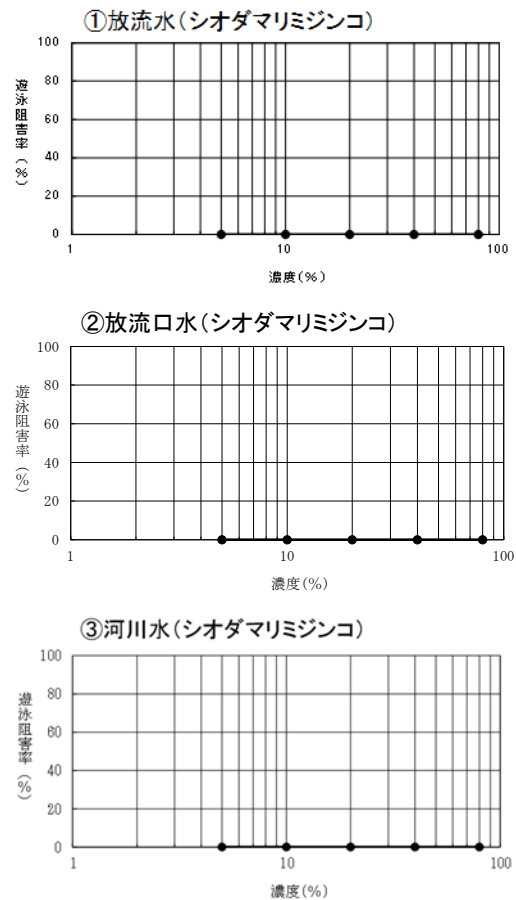


図-20 放流水、放流口水、河川水に対するシオダマリミジンコを用いた影響評価

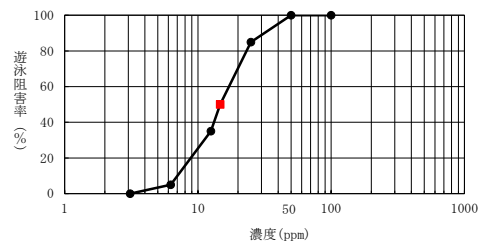


図-21 塩化ニッケルに対するシオダマリミジンコの影響評価

かったと考えられる。

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-20)。一方、塩化ニッケルに対するシオダマリミジンコの半数遊泳阻害濃度EC₅₀は14.7 mg/Lであった(図-21)。本研究の結果から、シオダマリミジンコを用いて下水処理水の生物影響を調査する場合、ニセネコゼミジンコを用いるよりNiの影響が低く評価される可能性が示された。またB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から雨水が流入し、流入下水が希釈されたことも要因の一つとして考えられる。

7.4 まとめ

5. 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種への影響評価において、ニセネコゼミジンコに影響が見られたB処理場の放流水が河川水に及ぼす影響を調査した。B処理場は海から1km程度の場所にあることから放流先は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。放流水の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。放流水のNi濃度は河川水により1/10程度まで希釈されていたことから、水生生物に対する影響は更に低減することが推定された。

8. 金属濃度の高い二次処理水が持つ生物影響と凝集沈殿処理による生物影響改善の検討

8.1 目的

5. 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種への影響評価では、下水処理水中に残存する金属が生物に対して毒性影響を持ち、特にNiがニセネコゼミジンコに対する毒性の原因であることが推察された。そこで本研究では金属含有濃度が高い実二次処理水に対してポリ塩化アルミニウム(PAC)を

用いた凝集沈殿処理の実験を行い、二次処理水中に残存する金属の除去を試みた。また、凝集沈殿処理を行った処理水サンプルを用いて生物試験を行い、生物影響の低減効果を評価した。

8.2 実験材料および実験方法

8.2.1 生物試験に用いた二次処理水

本研究で用いた二次処理水は事前の調査で約100 μ g/LのNi含有濃度が確認されたG処理場の二次処理水(以下G処理水と称す)である(採取日2018年11月26日)。F処理水の一般水質項目を表-15に示す。採取後のG処理水は孔径60 μ mのナイロンメッシュ(ASTM 230-62、SEFER製)を用いてろ過を行い、褐色瓶に入れ試験まで冷暗所(4 $^{\circ}$ C)で保管した。

また後述の凝集沈殿処理を施したG処理水を用いて生物影響の低減効果を検証した。試験にはG処理水にPAC 6.4 ml/Lを添加後、凝集沈殿処理を行い、24時間静置後上澄み液を採取したものを使用した。

8.2.2 凝集沈殿処理実験

PACを用いた凝集沈殿処理の手順を図-22に示す。Ni除去能を検証するために二次処理水のサンプルは以下の2種類を用いて実験を行った。

- ① G処理水
- ② A処理場の流入下水を連続的に処理している活性汚泥処理実験装置から得られた二次処理水に、Ni濃度が80 μ g/L程度になるように塩化ニッケルを添加したサンプル(以下A処理水と称す)

本研究ではAl含有濃度が約5.6%であるPAC(多木化学株式会社製)を使用し、PACの注入率を変化させて実験を行った。PAC注入率は塩化アルミニウムを使った金属除去の既往研究³⁾を参考に以下の通りに設定した。Ni濃度が164 μ g/LであったG処理水でのPAC

表-15 G処理水一般水質項目

| 一般水質項目(mg/L) | | | | |
|--------------|--------------------|----------------------|------|--------------------|
| BOD | COD | SS | VSS | DOC |
| 3.00 | 25.3 | 22.8 | 15.2 | 10.9 |
| TN | NH ₄ -N | NO ₂₊₃ -N | TP | PO ₄ -P |
| 10.6 | 2.80 | 5.60 | 2.63 | 2.18 |

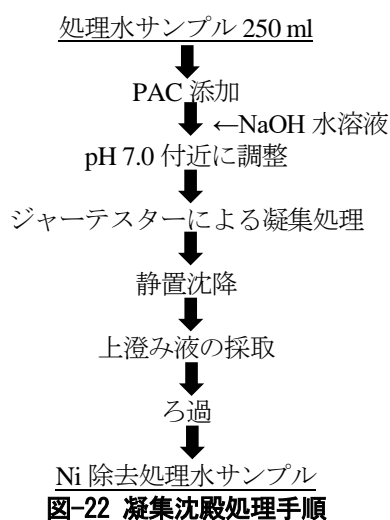


図-22 凝集沈殿処理手順

注入率を 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 ml/L、Ni 濃度が 79.8 µg/L であった A 処理水での PAC 注入率を 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 ml/L とした。PAC の注入に応じて処理水サンプルの pH が低下し酸性側の値を示す傾向が見られた。凝集沈殿処理では一般的に水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液を加えて pH を調整することで凝集効果が得られるが、本研究では処理後の水試料を生物試験に供するため pH を 7.0 付近に調整した。

凝集沈殿処理では PAC と NaOH 水溶液を加えた処理水サンプル 250 ml をガラス製の 500 ml ビーカーに分注し、2 連式のジャーテスター (JMD-2E、宮本理研工業株式会社製) を用いて急速攪拌 (245 rpm、15 分) と緩速攪拌 (50 rpm、5 分) を行った。その後 15 分以上静置沈降を行い、懸濁液と上澄み液を分離させた。上澄み液を慎重に採取し、孔径 4 µm のセルロース製ろ紙 (No.5B、ADVANTEC 製) を用いてろ過を行った。これらの処理を施した水試料を金属分析に供した。

8.2.3 生物試験

本研究では生物を用いた排水試験法 (検討案)²⁾ に従い、WET 試験で推奨される水生生物 3 種、ムレミカツキモ (*P. subcapitata*)、ニセネコゼミジンコ (*C. dubia*)、ゼブラフィッシュ (*D. rerio*) を用いて生物試験を行った。以下で各生物の試験条件・概要を述べる。

8.2.3.2 藻類生長阻害試験

G 処理水を 5 段階濃度 80%、40%、20%、10%、5% に調製して試験した。他の試験条件は 2.3.1 藻類生長阻害試験に準じて行った。

8.2.3.3 ニセネコゼミジンコ繁殖試験

G 処理水をミネラルウォーターを用いて二段階濃度 10%、5% に調製して試験に用いた。他の試験条件は 5.2.3 ニセネコゼミジンコを用いた排水試験に準じて行った。

8.2.3.4 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

G 処理水を脱塩素水道水を用いて 4 段階濃度 80%、40%、20%、10% に調整して試験に用いた。2.3.3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験に準じて行った。

8.2.4 データ解析

2.2.4 と 5.2.6 の統計解析に準じて行った。ミジンコの生存率については、10 個体の生存数であり、分散が計算されないため統計解析の対象とはしなかった。

8.2.5 金属分析

生物影響の原因推定のため、F 処理水中の 14 種の金属分析 (Al、V、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Sr、Cd、Sb、Te、Ba、Pb) を行った。6.2.4 金属分析に準じて行った。

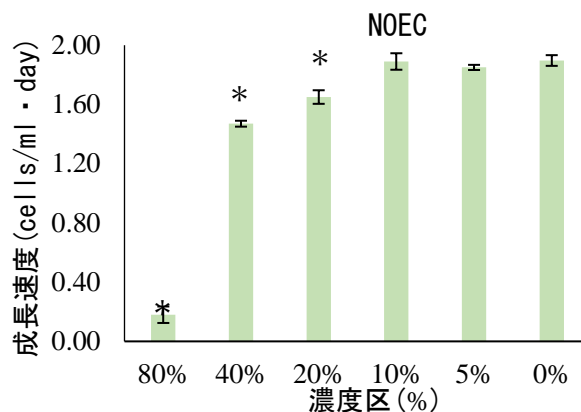


図-23 ムレミカツキモの生長試験結果

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

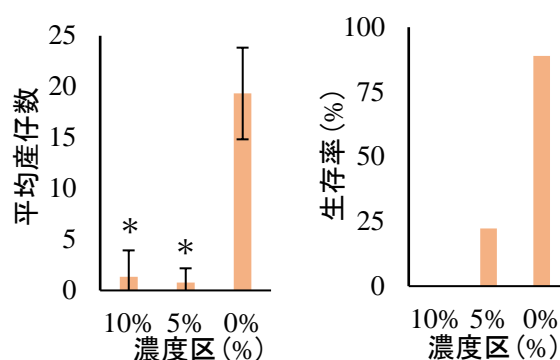


図-24 ニセネコゼミジンコの繁殖試験結果

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

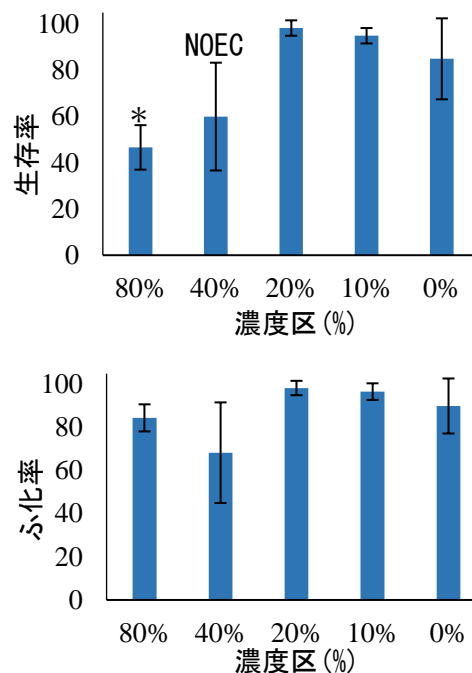


図-25 ゼブラフィッシュの短期毒性試験結果

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

表-16 G 処理水金属濃度

| 重金属濃度 (µg/L) | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| Al | V | Cr | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn | Sr | Cd | Te | Ba | Pb |
| 13.0 | 58.1 | 1.05 | 164 | 25.4 | 3.05 | 164 | 3.18 | 4.31 | 3016 | 2.76 | 4.07 | 92.3 | 0.27 |

表-17 PAC 注入濃度と Ni 除去率

| PAC 注入率 (ml/L) | | 0.2 | 0.4 | 0.8 | 1.6 | 3.2 | 6.4 |
|----------------|-------|------|------|------|------|------|------|
| Ni 除去率 (%) | F 処理水 | - | 22.9 | 37.8 | 67.5 | 72.8 | 80.5 |
| | A 処理水 | 50.0 | 61.4 | 63.7 | 72.7 | 87.2 | - |

8.3 結果と考察

8.3.1 F 処理水の生物影響試験

レミカヅキモを用いた試験の結果を図-23 に示す。ムレミカヅキモは対照区 (0%) に対して、20%排水濃度以上で有意差 ($p < 0.05$) が確認された。

ニセネコゼミジンコを用いた試験の結果を図-24 に示す。ニセネコゼミジンコの試験では対照区に異常個体が 1 匹存在したため、9 連の試験結果を示す。二次処理水の最低希釈濃度の 5%排水濃度で平均産仔数に有意差 ($p < 0.05$) が確認された。また生存率においても二次処理水の 5%排水濃度で対照区と比べて著しく生存率が減少した。ここから NOEC $< 5\%$ となった。

ゼブラフィッシュを用いた試験の結果を図-25 に示す。ふ化率を対照区と比較した際に有意差を示した濃度は確認されなかった。生存率では対照区 (0%) に対して 80%排水濃度で有意差が確認された。

8.3.2 G 処理水の金属成分と毒性原因に対する考察

二次処理水の毒性原因を推定するため、処理水中の金属濃度を測定した。分析の対照とした 14 種の金属 (Al、V、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Sr、Cd、Sb、Te、Ba、Pb) 濃度を表-16 に示す。既往研究ではニセネコゼミジンコに対する二次処理水中 Ni の NOEC は $5.3 \mu\text{g/L}$ 、最低影響濃度 (LOEC) は $9.9 \mu\text{g/L}$ であることが報告されており²¹⁾、今回用いた二次処理水の Ni 濃度は $166 \mu\text{g/L}$ であった。5%排水濃度では Ni 濃度は $8.3 \mu\text{g/L}$ と推定され、ニセネコゼミジンコへ生物影響が考えられる濃度であった。

Ni の藻類に対する LOEC は $100 \mu\text{g/L}$ であることが報告されており³²⁾、有意差が確認された 80%排水濃度、40%排水濃度、20%排水濃度それぞれの Ni 濃度は約 $166 \mu\text{g/L}$ 、 $66.4 \mu\text{g/L}$ 、 $33.2 \mu\text{g/L}$ であることが推察された。報告された LOEC 値よりも低い 40%排水濃度以下で影響が確認されたことから、ムレミカヅキモでは Ni による影響と Ni 以外の他の物質による複合影響が

生じていると考えられる。

ゼブラフィッシュの Ni に対する感度は、後述の 9. 下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚類 (ゼブラフィッシュとヒメダカ) の検討にて NOEC 濃度が 6.79 mg/L であることが判明したため、Ni の影響は考えられなかった。

8.3.3 凝集沈殿処理実験

生物試験の結果より、F 処理水はムレミカヅキモとニセネコゼミジンコに影響を有し、それらの原因の一つは Ni であることが推察された。そこで、二次処理水中に残存する Ni 除去手法の検討として凝集沈殿処理の実験を行った。PAC 注入率と Ni の濃度の関係を図-26 に、除去率を表-17 に示す。F 処理水の Ni 濃度は PAC の添加量に応じて減少し、PAC 注入率 6.4 ml/L で Ni 濃度は $31.9 \mu\text{g/L}$ となり、無処理と比べ 80.5% の濃度減少が見られた。A 処理水でも PAC の添加量に応じて Ni 濃度は減少し、無処理と比べ PAC 注入率 3.2 ml/L で Ni 濃度は $10.0 \mu\text{g/L}$ となり、87.2% の濃度減少が見られた。PAC 注入率 0.4 ml/L での Ni 除去率は F 処理水で 22.9%、A 処理水で 61.4% であり、除去率に大きな差が生じた。

PAC 処理前後の 14 種金属の濃度比較 (PAC 注入率 3.2 ml/L) を図-27 に示す。F 処理水と A 処理水のどちらも Al 濃度の大幅な増加が確認されたが、この原因として PAC 添加が起因したと考えられる。他の金属においては除去率が 90% を超えたものは A 処理水における Fe、F 処理水における Zn のみであった。Fe の濃度は F 処理水で $25.4 \mu\text{g/L}$ 、A 処理水で $476 \mu\text{g/L}$ 、それぞれの除去率は 68% と 97% であり濃度の高い A 処理水で高い除去効果が得られた。同様に Zn の濃度は F 処理水で $4.31 \mu\text{g/L}$ 、A 処理水で $30.8 \mu\text{g/L}$ 、それぞれの除去率は 77% と 97% であり濃度の高い A 処理水で高い除去効果が得られた。

これらの結果より、金属の除去効果は排水の状態や

金属の種類によって変動することが考えられ、PAC をいた凝集沈殿処理は Ni だけではなく Fe や Zn などの除去にも有効である可能性が示唆された。

8.3.4 凝集沈殿処理を施した二次処理水を用いた生物影響試験

PAC を用いた凝集沈殿処理による生物影響の低減効果を評価するため、8.3.2 G 処理水の金属成分と毒性原因に対する考察で影響が確認されたムレミカヅキモとニセネコゼミジンコを対象として生物試験を行った。

ムレミカヅキモを用いた生物試験の結果を図-28 に示す。40%と80%排水濃度で対照区(0%)と有意差が確認された。処理前後の試験結果を比較すると凝集沈殿処理前の生物影響(図-22)は20%排水濃度で有意差が確認されたが、処理後では20%での有意差は確認されなかった。試験の結果から凝集沈殿処理により二次処理水のムレミカヅキに対する生物影響に改善傾向が見られたが、凝集沈殿処理による明確な生物影響の改善は80%濃度と40%排水濃度では確認されなかった。

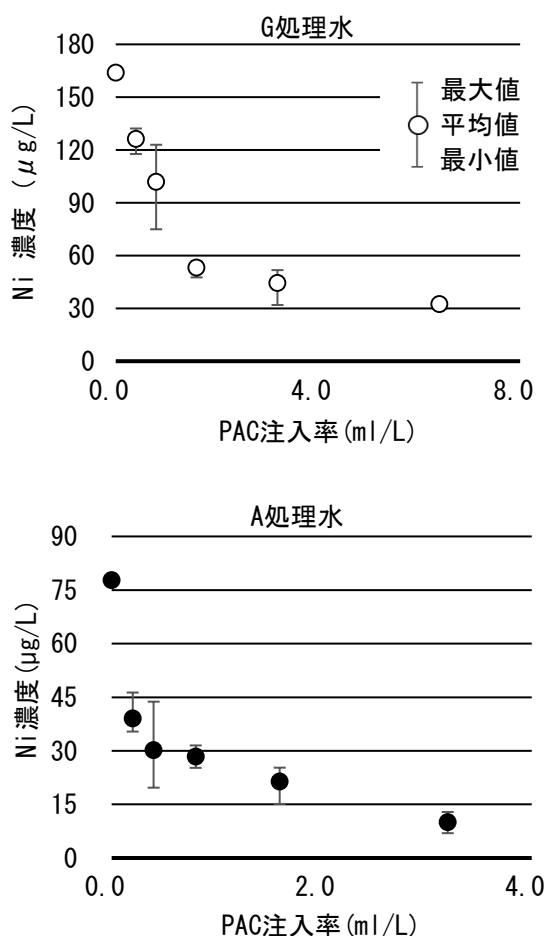


図-26 PAC 処理前後の Ni 濃度

処理前後の Ni 濃度を比較すると、80%排水濃度では処理前で約 131 µg/L から処理後に約 25.5 µg/L に低下し、40%排水濃度では処理前で約 65.6µg/L から処理後に約 12.8 µg/L に低下した。処理前の 10%排水濃度では Ni 濃度が約 16.4 µg/L で NOEC を示しているが、処理後の 40%排水濃度では 16.4 µg/L 以下の Ni 濃度で生物影響を有するため、ムレミカヅキモに対しては Ni 以外の他の物質も生物影響の要因であることが推察された。

ニセネコゼミジンコを用いた生物試験の結果を図-29 に示す。ニセネコゼミジンコの平均産仔数は10%排水濃度で有意差が確認された。処理前後の試験結果を比較すると、凝集沈殿処理前の生物影響(図-23)は5%排水濃度で平均産仔数に有意差が確認されたが、処理後では5%排水濃度で平均産仔数に有意差が確認されなかった。

また生存率においても、処理前では5%排水濃度で22.2%であったものが、処理後では55.6%まで向上した。試験の結果から5%排水濃度では凝集沈殿処理によりニセネコゼミジンコの平均産仔数と生存率に改善傾向が見られることが明らかになった。

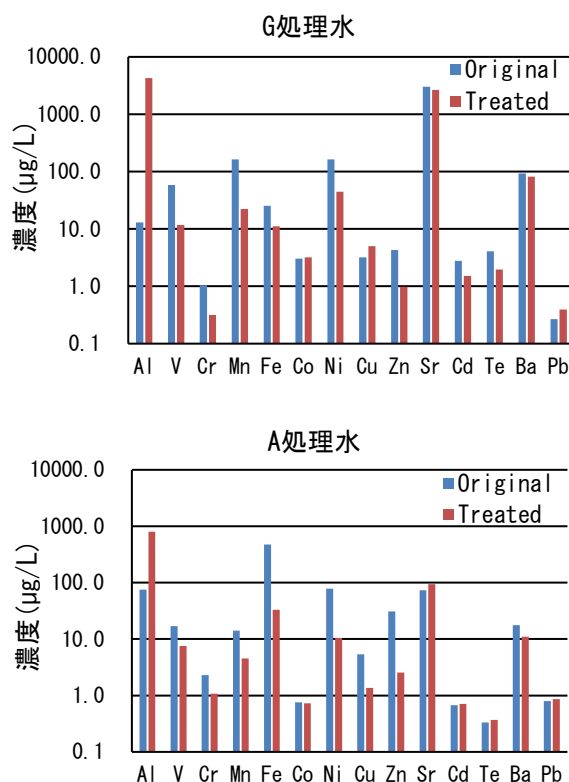


図-27 PAC 処理後の金属濃度

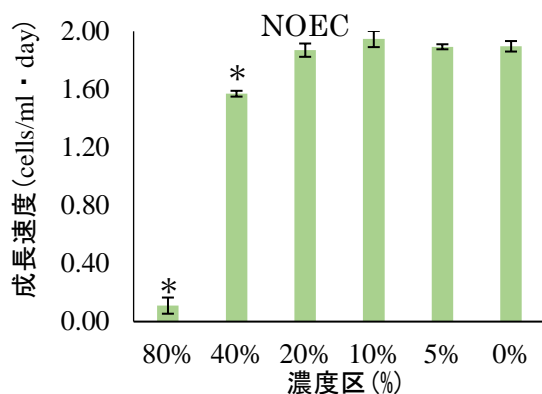


図-28 F 処理水に対する PAC 処理後のムレミカツキモに対する影響評価

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

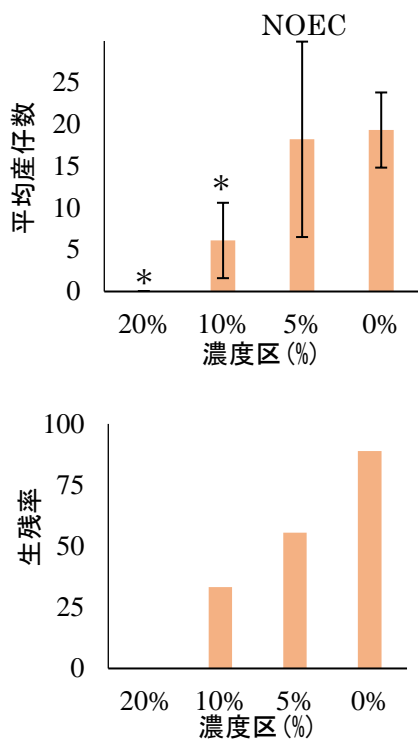


図-29 F 処理水に対する PAC 処理後のニセネコゼミジンコに対する影響評価

*:Steel 検定で対象区より優位に低下(p<0.05)

8. 4 まとめ

5. 溶解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 種への影響評価において、工場排水などを受け入れる下水処理場では、下水処理水中に残存する金属が生物に対して毒性影響を持つこと、特に Ni がニセネコゼミジンコに対する毒性の原因であることが考えられた。本研究では金属含有濃度が高い二次処理

水に対し、PAC を用いた凝集沈殿処理の実験を行い、二次処理水中に残存する金属の除去を試みた。また凝集沈殿処理を行った処理水サンプルを用いて生物試験を行い、生物影響の低減効果を評価した。

1) 下水処理水に PAC 処理を行う事で、Fe、Zn、Ni を最大で 90%以上除去することができたが、除去率は排水の状態により異なった。

2) Ni 等の金属を多く含む下水処理水に対し PAC 処理を行い、処理後の金属濃度が低減された水試料についてムレミカツキモとニセネコゼミジンコを用いて影響評価を行った。その結果、PAC 処理により処理水の生物影響が軽減されることが明らかとなり、Ni 等の金属の除去が寄与していると推察された。

9. 下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚類（ゼブラフィッシュとヒメダカ）の検討

9.1 目的

生物応答を用いた排水試験において、胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験では、ゼブラフィッシュとヒメダカが推奨されているが、下水試料に適用できる種を選定する必要がある。そこで実際の流入下水と終沈流出水を用いてゼブラフィッシュとヒメダカの WET 試験を行い、下水処理水の評価に適した魚種の検討を行った。

9.2 実験材料および実験方法

9.2.1 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する化学物質の曝露実験

本試験は国立研究開発法人国立環境研究所より分譲されたゼブラフィッシュ (*D. rerio*) 及びヒメダカ (*Oryzias latipes*) を使用し、生物応答を用いた排水試験法 (検討案) 2) に基づき実施した。

試験に用いた化学物質と濃度区を表-18 に示す。また、ゼブラフィッシュとヒメダカの試験条件の概要を表-19 に示す。試験には 50 mL のガラスビーカーを使用し、試験連数は 4 連/濃度区とした。濃度区ごとに受精 4 時間以内のゼブラフィッシュの胚、または受精 10 時間以内のヒメダカの胚をそれぞれ 60 個 (15 個/連)、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、孵化日の 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、ゼブラフィッシュの水温は 26±1℃、ヒメダカの水温は 24±1℃とした。試験条件成立の確認のため、水質測定項目として、換水前・後の試料の pH、

表—18 試験に用いた化学物質と濃度区

| 曝露物質 | 化学物質 | 試験濃度 (mg/L) |
|-------|----------------|---|
| ニッケル | 塩化ニッケル | 3.75, 7.5, 15, 30 |
| アンモニア | 塩化アンモニウム | 12.5, 25, 50, 100, 200 |
| 塩素* | 次亜塩素酸 ナトリウム | 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 |

* 塩素濃度は全塩素濃度 (mgCl/L) を示す。

表-19 ゼブラフィッシュとヒメダカの試験条件

| 試験魚種 | ゼブラ フィッシュ | ヒメダカ |
|------|-------------------------------------|---------------------|
| 試験水 | 脱塩素水道水 | |
| 連数 | 4 連/濃度区 (15 個/連) | 4 連/濃度区 (10 個/連) |
| 曝露期間 | 8-9 日 | |
| 曝露方式 | 半止水式 (2-3 日 ごとに換水) | 13-14 日 |
| 照明 | 白色蛍光灯 | |
| 照明 | 明期 16 時間, 暗期 8 時間 | |
| 水温 | 26±1°C | |
| 評価項目 | 孵化率 ¹ , 生存率 ² | 24±1°C |

※¹ 孵化率 = 孵化所要日数での総孵化仔魚数 / 供試卵数 × 100

※² 生存率 (%) = (曝露終了時の生存胚体数 + 生存仔魚数) / 供試卵数 × 100

水温、溶存酸素 (DO) を測定した。次亜塩素酸ナトリウムを曝露した試験では、最大濃度区の換水前試料についてポケット残留塩素計 (HACH 社製) を使用して全塩素濃度及び遊離塩素濃度を測定した。

9.2.2 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する下水処理水の影響評価

実下水処理場の流入下水を連続処理している活性汚泥処理実験装置から、2017 年 11 月 13 日にスポット採水した流入下水と終沈流出水を排水試料として用いた。排水試料は 60 μm ポアサイズメッシュ (SEFER 社製) でろ過を行い、褐色瓶に入れ、試験まで冷暗所 (4°C) で保管した。終沈流出水に塩素 (次亜塩素酸ナトリウム、2.5 mg-Cl/L) を試験直前に添加し、30 分間接触した試験試料を疑似放流水として試験に使用した。

試料の希釈と対照区には脱塩素水道水を用いた。各下水試料は脱塩素水道水を用いて 80%、40%、20%濃度に希釈し、脱塩素水道水のみを対照区 (0%) として実験に用いた。試験条件は 9.2.1 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する化学物質の影響評価と同条件で行った。

9.2.3 統計解析方法

2.2.3 統計解析に準じて行った。

9.2.4 発達異常卵からの微生物の分離と検証

終沈流出水中で曝露した際に発達異常が確認されたヒメダカの卵をそれぞれ 1 つずつ R2A 培地 (日本製薬株式会社製、3 mL / 試験管) に添加し、25°C で 2 日間静置培養した。白濁した培養液は R2A 寒天培地上に塗布し、2 日間培養後コロニーを形成させ、微生物株として単離した。コロニーは色、大きさ、形状の違いにより区別した。単離した微生物は定常期まで増殖させ、脱塩素水道水に 200 μL/50 mL 添加し、曝露用試験水とした。受精 10 時間以内のヒメダカの胚 (卵、n=10) をそれぞれの微生物培養液が入った試験水に添加し (最終濃度 OD₆₅₀=0.0008)、対照区が孵化するまでの 8-9 日間曝露した。換水は 1 日置きに行った。培養期間中、実体顕微鏡 (MC170HD、Leica 社製) を用いて経時的に胚発生を観察し、早孵化や奇形等の異常が確認された胚が曝露された微生物を該当微生物とした。

9.3 実験結果と考察

9.3.1 ゼブラフィッシュとヒメダカに対する化学物質の影響評価

ゼブラフィッシュとヒメダカを用いて塩化ニッケル、塩化アンモニウム、次亜塩素酸ナトリウム (塩素) が孵化率、生存率に及ぼす影響を試験した。特にゼブラフィッシュとヒメダカの孵化率と生存率に対する NOEC を比較すると、化学物質の種類により違いは見られたが、孵化率、生存率のどちらを見ても 2 倍程度の差であった。これらの結果は、使用した化学物質に対する感受性が両魚種で類似していることを示している。使用した化学物質は異なるが、我々の結果は既報の魚類における急性毒性試験 (96 時間、50%効果濃度: EC₅₀) の結果と類似していた³³⁾。

一方、個々の化学物質における孵化後の稚魚の生残数を継時的に検討した場合、それぞれの化学物質に特徴的な影響が確認された (図-30)。例えばゼブラフィッシュでは塩化ニッケルを曝露すると、3.75~15 mg/L までは最終的な稚魚の生残数は減少せず影響は見られなかったが、濃度に比例して孵化の遅延が確認された。一方ヒメダカでは 15~30 mg/L で孵化数の減少が確認

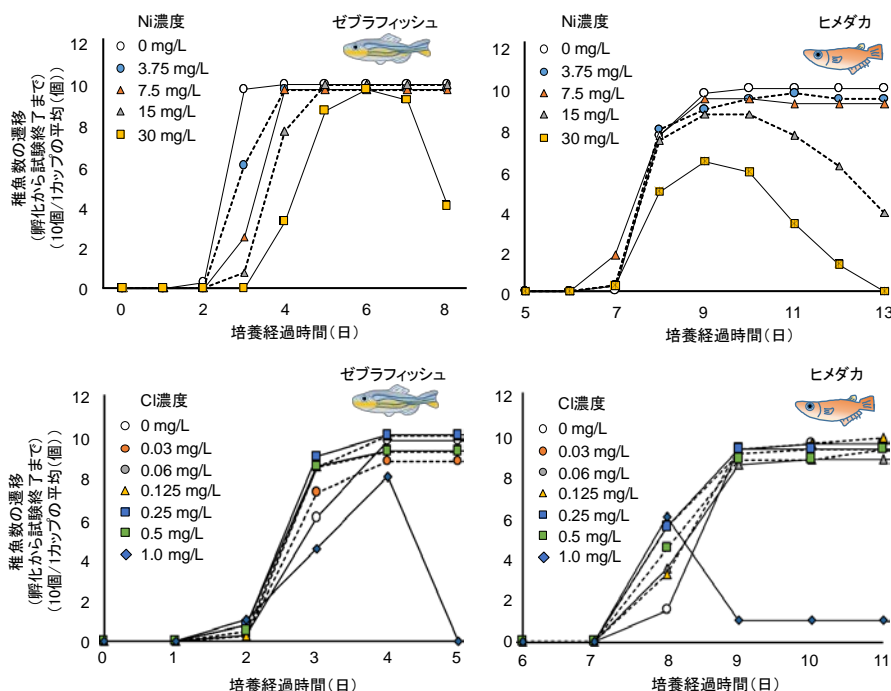


図-30 ゼブラフィッシュとヒメダカに対するニッケルと塩素の経時的影響評価

されたが、3.75~15 mg/L 以下で孵化の遅延は確認されなかった。これらの結果から、ニッケルによる孵化遅延がゼブラフィッシュに特異的であることが推察される。一方塩素を曝露した場合、ゼブラフィッシュとヒメダカで共に 1.0 mg/L で孵化数の減少が確認されたが、0.125~0.5 mg/L では塩素濃度の増加に伴い、孵化の促進が確認された。これらの結果は NOEC では示されない化学物質の影響が、魚の孵化時間で確認されることを示唆している。魚の WET 試験では、孵化日から 5 日後までの孵化率と生存率に基づいて安全性を評価しているが²⁾、本実験結果から孵化の促進・遅延なども水質評価の判断材料になることが推察される。

9.3.2 ゼブラフィッシュとヒメダカを用いた下水処理水の影響評価

実下水を連続処理している活性汚泥処理実験装置から採取した流入下水と終沈流出水（模擬放流水として塩素 2.5mg/L を添加し 30 分間接触）を排水試料として使用し、ゼブラフィッシュとヒメダカを用いて WET 試験を行った。その結果を図-31 に示す。流入下水における孵化率での NOEC は、ゼブラフィッシュでは 80% 希釈濃度以上、ヒメダカでは 40% 希釈濃度であり、生存率での NOEC はゼブラフィッシュとヒメダカで共に 40% 希釈濃度であった。終沈流出水では、ゼブラフィッシュの孵化率と生存率に対する NOEC は 80% 希釈濃度以上と影響は見られなかった。一方、ヒメダカ

では 80% 希釈濃度の終沈流出水を曝露した場合、約 70% の生存率と孵化率を示したが、20% と 40% 希釈濃度の終沈流出水を曝露した場合では、孵化前に卵が全て死滅したため、NOEC を求めることができなかった。これら死亡したヒメダカの卵を実体顕微鏡で観察すると、曝露 4~7 日目の卵の周りに微生物の増殖が観察され、魚が未発達のまま早孵化する、もしくは卵の中で死亡する現象が確認された（図-32-B）。

この現象が微生物に起因するか明らかにするため、

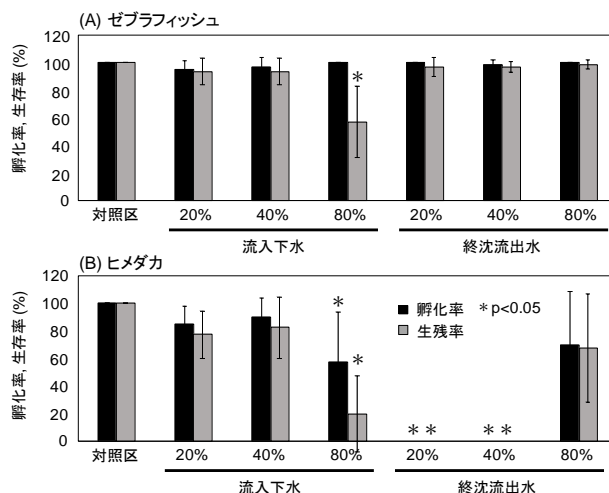


図-31 流入下水と終沈流出水に対するゼブラフィッシュヒメダカを用いた WET 試験

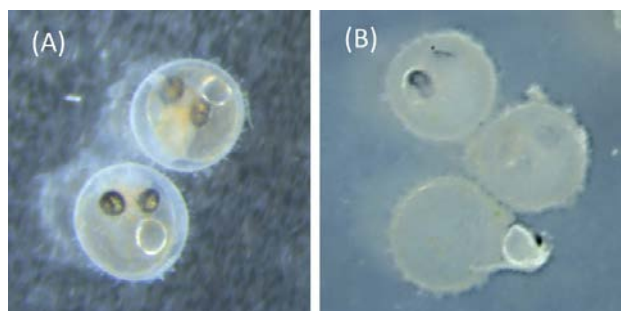


図-32 終沈流出水で飼育したヒメダカ卵

(A) 脱塩素水で飼育したヒメダカ卵 (対照区)、(B) 40%希釈濃度の終沈流出水で飼育したヒメダカ卵。いずれも培養4日目の実体顕微鏡写真

同様な現象が観察された卵を R2A 培地で培養し、原因となる微生物の単離を試みた。その結果、5 菌株の微生物を分離することができた。単離された微生物株をそれぞれヒメダカの卵に曝露し、終沈流出水を曝露した場合と同様な現象が確認されるか検討を行った。その結果、5 菌株中 2 菌株 (Type-A、B 株) で、卵の中で凝集し死亡する (図-33-B)、卵膜からの卵黄の飛び出し、早孵化や奇形等の現象が確認された (図-33-C)。

これらの結果から、20%と 40%希釈濃度の終沈流出水中でヒメダカの卵が死滅した原因は、用いた排水中の化学物質等の影響が要因ではなく、微生物の増殖が原因で卵が死亡したことが推察される。

Cao らは中国の下水処理場から採取した二次処理水に対してヒメダカを用いた影響試験を行った結果、未処理、塩素添加処理、砂ろ過処理を行った二次処理水を用いた場合に、ヒメダカ胚の早孵化、小胞突出、出血が確認されたことを報告している³⁴⁾。また田中らは地下由来の水道水でヒメダカの卵を飼育した場合、微生物が原因で卵膜軟化症が観察されたことを報告している³⁵⁾。魚類の早孵化や小胞突出等の現象 (卵膜軟化症) は特にサケ・マス類の魚類で多く研究され、微生物が原因で発症することが報告されている^{36,37)}。

80%希釈濃度の終沈流出水でヒメダカ卵への微生物の発生・死亡率が低かったことは、添加した塩素濃度が高く (約 2 mg/L)、それにより微生物の発生が抑制されたと推察される。一方、40%と 20%希釈濃度では、塩素濃度が低くなる (それぞれの塩素濃度: 約 1 mg/L、0.5 mg/L) ことから、消毒が不十分のため微生物が増殖し、それが要因でヒメダカ胚の異常発達が生じたことが推察される。

本実験で分離された Type-A 株は 16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Pseudomonas* 属 (相同性 100%、

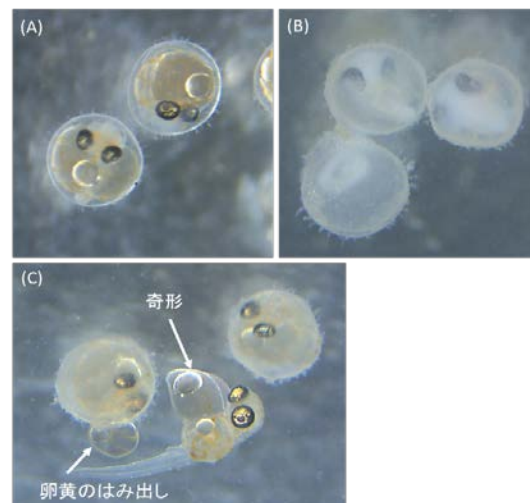


図-33 分離菌株 (Type-A と B) で飼育したヒメダカ卵の実体顕微鏡写真

(A) 脱塩素水道水で飼育したヒメダカ卵 (対照区、4 日間培養)、(B) Type-A の分離菌株を添加した脱塩素水道水で培養したヒメダカ卵 (4 日間培養)、(C) Type-B の分離菌株を添加した脱塩素水道水で培養したヒメダカ卵 (6 日間培養)。

Pseudomonas koreensis、*Pseudomonas granadensis*、*Pseudomonas zhaodongensis*、*Pseudomonas jessenii* のいずれか) に属する細菌であり、Type-B 株は未同定株であることが明らかになった。Type-A 株で推定された *Pseudomonas* 属はいずれも自然界の土壌や水から分離報告された細菌であることから、下水処理水に特有な微生物ではなく、一般的に環境中に存在する微生物であることが推察される。ちなみに、今回分離された Type-A、B 株をゼブラフィッシュの卵に曝露しても、ヒメダカと同様な現象は確認されなかった。

以上の結果を考慮すると、下水処理水の WET 試験では、ゼブラフィッシュを用いる方が、処理水中の微生物の影響を受けにくく、化学物質等の影響を安定して評価できると考えられる。

9.4 まとめ

下水処理水の生物応答を用いた排水試験に適した魚種の選定を目的とし、ゼブラフィッシュとヒメダカを用いた化学物質と下水試料の曝露実験から、以下の点を明らかにした。

- 1) 3 種の化学物質 (ニッケル、アンモニア、塩素) による影響は、ゼブラフィッシュとヒメダカの孵化率と生存率を比較すると、それぞれの化学物質に対する感受性として 2 倍以内の差であった。
- 2) 下水処理水に対して WET 試験を行った場合、ヒ

メダカは処理水中に含まれる化学物質の他に微生物から影響を受ける可能性があった。

3) WET 試験における各魚類の曝露期間は、ゼブラフィッシュで8~9日間、ヒメダカで13~14日間であり、飼育期間がゼブラフィッシュで短いことも考慮すると、下水処理水を対象とした WET 試験では、ヒメダカよりゼブラフィッシュを用いる方がより簡便にデータが得られることが推察された。

10. 下水処理水を対象としたメダカ多世代試験による魚類個体群存続評価

10.1 目的

魚類の個体群存続に影響を与える恐れのある女性ホルモン、女性ホルモン様物質などの未規制化学物質が下水処理水から検出される場合がある。河川水に占める下水処理水の割合が高くなっている水域もあり、こうした水域では、魚類の個体群存続への影響が懸念される。魚類は水生生物の代表種、経済生物であり、下水処理水放流先の魚類保全のためには、下水処理方式とその処理水が魚類個体群存続に与える影響を把握し、魚類への影響が少ない処理方法を選択することも重要となる。魚類の個体群存続への影響は、繁殖(産卵、孵化、稚魚の成長、二世代目の産卵、性比など)で評価する必要があるが、生物応答を用いた試験法(検討案)の胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験²⁾では評価で

きない。排水を対象とした多世代魚類試験は確立されていない。本研究では、二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水でメダカの多世代繁殖実験を行い、魚類個体群存続評価への適用可能性を調査した。

10.2 実験方法

10.2.1 下水処理実験装置とメダカ曝露水槽

図-34、写真-1 に本実験で用いた下水処理実験装置と流水式メダカ曝露水槽の関係を示す。下水処理実験装置は、活性汚泥処理実験装置、砂ろ過塔、オゾン処理実験装置から構成され、活性汚泥処理実験装置は、最初沈殿池(500L)、活性汚泥処理槽(500L×4槽)、最終沈殿池(700L)、からなる。流入下水は、主に生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用いた。活性汚泥処理槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行う標準活性汚泥法とした。水理学的滞留時間(HRT)は約7時間である。二次処理水はアンスラサイトによりろ過した後、オゾン処理実験装置に送られる。オゾン処理実験装置は、オゾン反応塔とその後段に中空円筒状担体(ポリプロピレン製4mm^{OD}×3mm^{ID}×5mm^L)を充填したろ床から構成される。メダカへの曝露水は、活性汚泥二次処理水を砂ろ過したもの(以降、砂ろ過水)、それをオゾン処理したもの、オゾン処理水を担体ろ床でろ過したものと、コントロール区とした脱塩素水道水である。

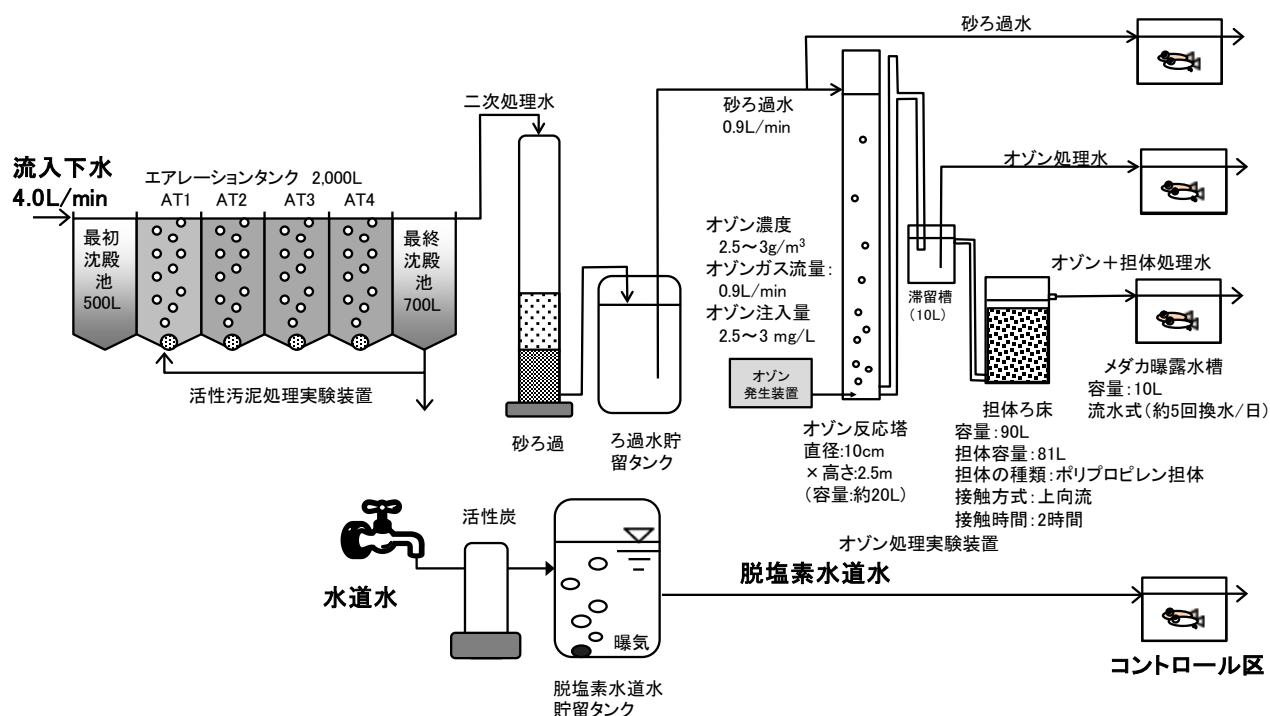


図-34 下水処理実験装置とメダカ曝露水槽の概要



写真-1 下水処理実験装置とメダカ曝露水槽の概要

曝露期間中は曝露水槽内の水質分析(水温、pH、DO、電気伝導度、DOC、NH₄-N、NO₃-N、ホルムアルデヒド(HCHO))を週1~3回行い、水質の安定性を確認した。

10.2.2 メダカ曝露実験

メダカの曝露実験は、2017年11月24日~2018年10月29日の間で行った。曝露実験は、成魚(F0:親世代)の産卵実験から始まり、F1(子)世代のふ化実験、成長実験、産卵実験を経て、F2(孫)世代のふ化実験、成長実験、産卵実験、F3(ひ孫)世代のふ化実験からなる。図-35に曝露スケジュール、実験条件を示した。メダカはヒメダカ(系統:NIES)を用いた。曝露方式は、流水式とし、各曝露水当たり1連とした。給餌は各水槽で同量の餌量となるように調整した自動給餌機で粉末試料(おとひめB2)を1日3回(8:00、13:00、18:00)、飽食量を与えた。

10.2.3 メダカの繁殖影響の評価法

下水処理水がメダカの個体群存続に与える評価には、化学物質が魚類個体群存続に与える影響の評価としても利用されるレスリー行列による個体群存続評価³⁸⁾を適用した。今回の曝露実験で得られた、受精卵数、ふ化率、生存率、性比を用いて、シミュレーションおよび最大固有値(λ)を算出し、個体群存続可能性を評価した。

10.3 実験結果と考察

10.3.1 曝露水の水質分析の結果

図-36に曝露期間中の各曝露水槽内の水質分析の結

果を示す。コントロール、オゾン+担体処理水槽の水温は、冷却制御を行わなかった夏季を除き、産卵実験中は26°C、成長、ふ化実験中は24°Cに維持されていた。pHは7~8程度、DOは概ね7~8 mg/Lと各曝露区で顕著な違いはなかった。下水処理水曝露区の電気伝導度は、約0.5 s/m、DOC濃度は約4 mg/L、NO₃-N濃度は概ね10~20 mg/L、オゾン+担体処理水槽のHCHOは0.05~0.1 mg/Lであった。オゾン+担体処理水の水質は曝露期間中、概ね安定していた。

10.3.2 多世代繁殖実験の結果

本多世代繁殖実験では、F1(子)世代のふ化実験において、砂ろ過水と、オゾン処理水曝露区とのふ化率が低下した。これは受精卵にカビが発生し、死亡個体が多くなったためである。これにより、多世代試験に必要な次世代の個体を確保できなかったため、砂ろ過水とオゾン処理水曝露区の実験は、F1世代のふ化実験までとした。オゾン+担体処理水曝露区での多世代繁殖実験は継続して続けた。

図-37~39にF0(親)、F1(子)、F2(孫)世代の産卵実験の結果を示す。図-37より、砂ろ過水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水曝露区では、雌一匹一日当たりの受精卵数は、40個程度と同程度であることがわかる。受精卵数は、コントロール区より上回っており、本実験での砂ろ過水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水は成魚の産卵に与える悪影響はないと考えられた。

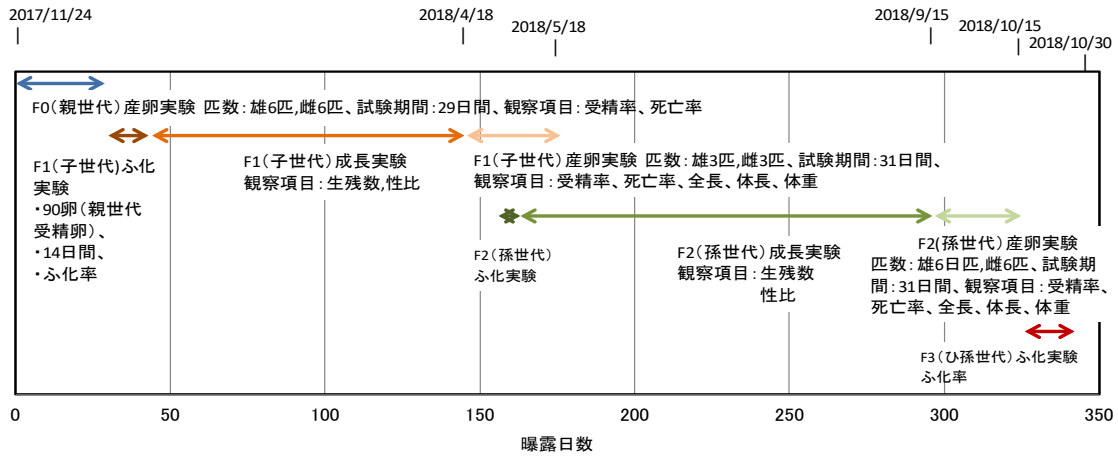


図-35 メダカ多世代試験の曝露スケジュールと曝露条件

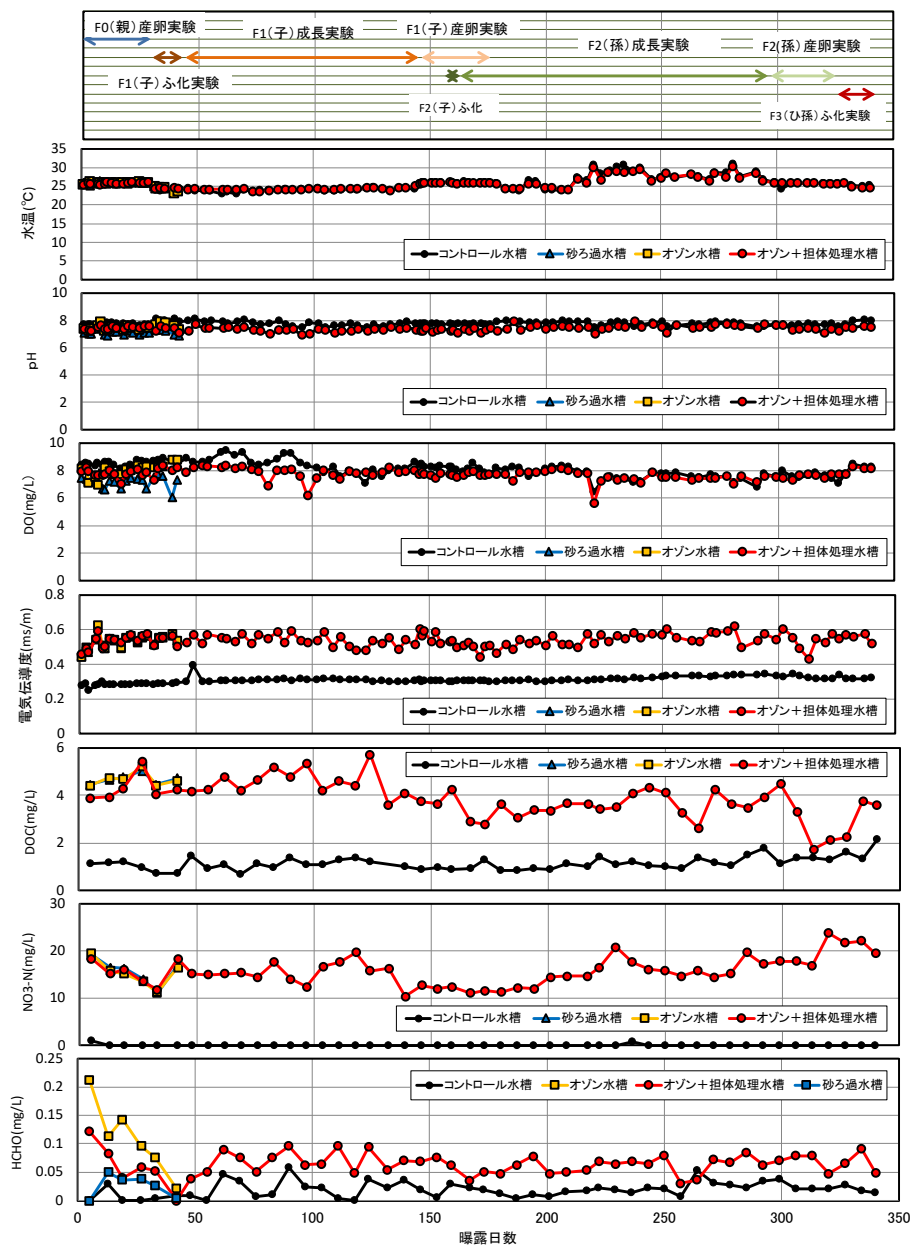


図-36 メダカ多世代試験の実験条件と各曝露水槽の簡易水質分析の結果

注) 砂ろ過水槽、オゾン水槽の分析値は、0~43日目までのみ

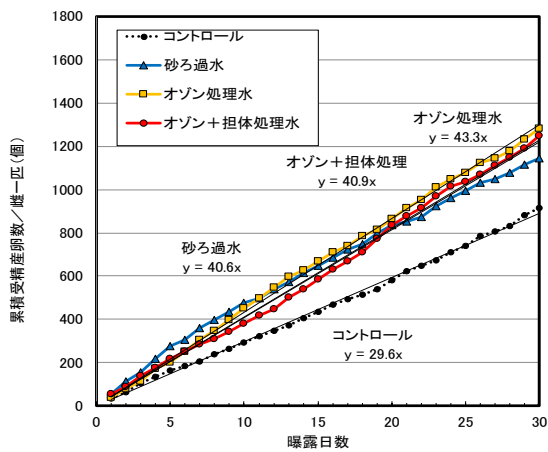


図-37 F0 (親) 世代の産卵実験の結果

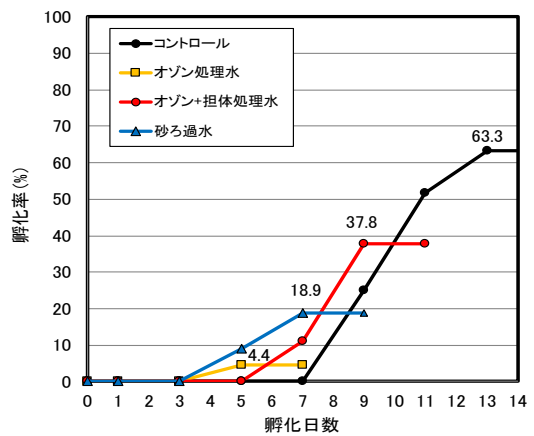


図-40 F1 (子) 世代のふ化実験の結果

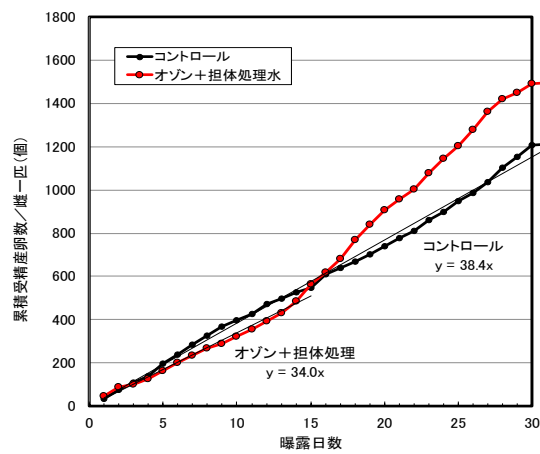


図-38 F1 (親) 世代の産卵実験の結果

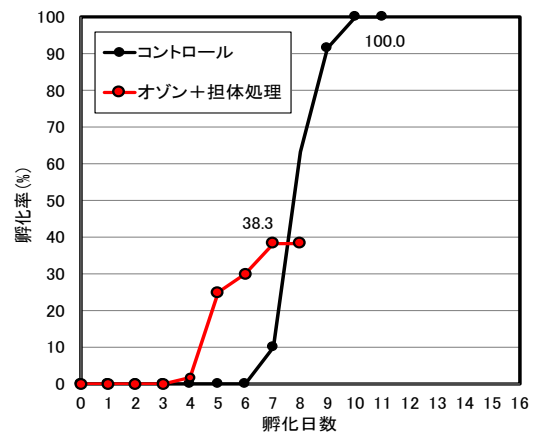


図-41 F3 (ひ孫) 世代のふ化実験の結果

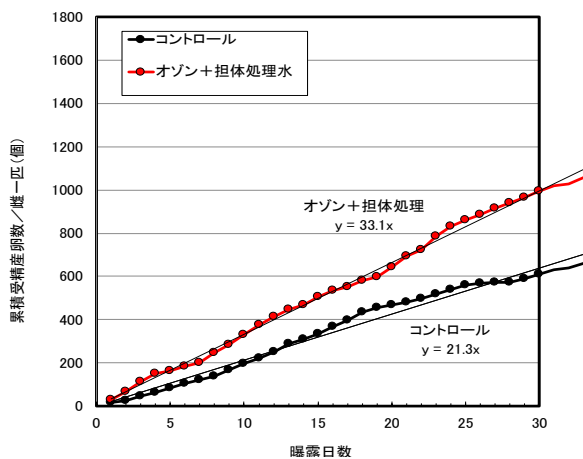


図-39 F2 (孫) 世代の産卵実験の結果

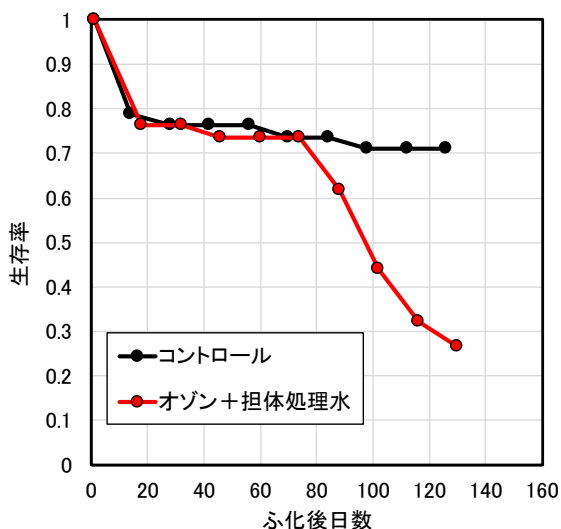


図-42 F1 (子) 世代の生存率

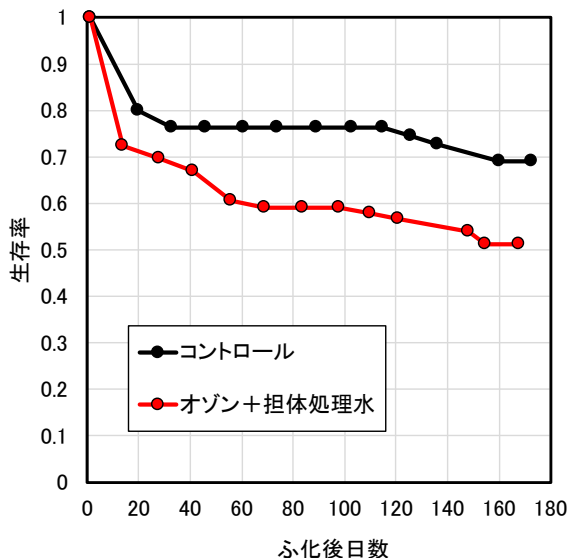


図-43 F2 (孫) 世代の生存率

図-40、41 に F1 (子)、F3 (ひ孫) 世代のふ化実験の結果を示す。図-40 の F0 (親) 世代のふ化実験より、砂ろ過水、オゾン処理水曝露区のふ化率が低いことがわかる。これらの下水処理水曝露区では、受精卵にカビが発生し死亡に至りやすく、正確なふ化率を得ることが困難であった。

オゾン+担体処理水曝露区のふ化率は、概ね 38% であった。なお、F2 (孫) 世代のふ化は、孵化仔魚をできるだけ多く得るため、産卵した受精卵を計数せずに 1 容器の半止水式でオゾン+担体処理水に投入しつづけたため、ふ化率は正確に算出してない。

図-42、43 に F1 (子)、F2 (孫) 世代の生存率を示す。オゾン+担体処理水曝露区の生存率がコントロール区より、低くなる傾向を示した。図-42 より、F1 (子)

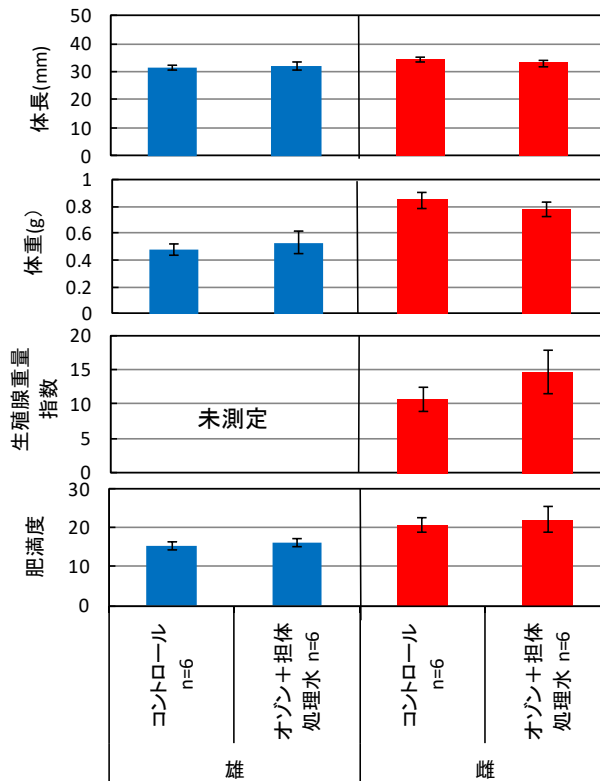


図-44 F2 (孫) 世代の体長、体重、生殖腺重量指数、肥満度

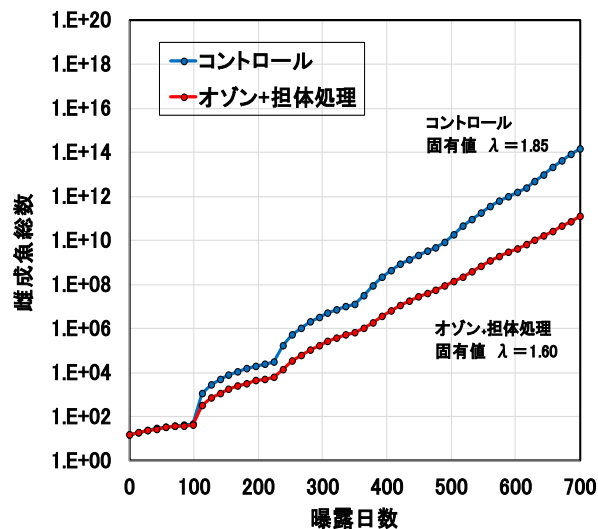


図-45 レスリー行列による個体群存続評価の結果

世代のオゾン+担体処理水曝露区で、80 日目以降、生存率の低下が見られた。この原因は明らかではないが、孫世代では見られていないことから、曝露水槽の管理に問題があった可能性もあり、このような現象が引き続き起こるか調査していく必要がある。

表-20 メダカ多世代繁殖実験から得られた評価結果の一覧

| 世代 | F0(親)世代 | | F1(子)世代 | | F2(孫)世代 | | F3(ひ孫)世代 | |
|---------------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|
| | コントロール | オゾン+担体処理 | コントロール | オゾン+担体処理 | コントロール | オゾン+担体処理 | コントロール | オゾン+担体処理 |
| 雌1匹・14日当たり受精卵数…(A) | 414 | 573 | 538 | 476 | 298 | 463 | - | - |
| ふ化率(%)…(B) | - | - | 63.3 | 37.8 | - | - | 100 | 38.8 |
| 雌の割合(%)…(C) | - | - | 44.4 | 20.0 | 47.4 | 35.9 | - | - |
| 14日当たりの生残率(仔魚期)…P仔 | - | - | 0.794 | 0.818 | 0.860 | 0.726 | - | - |
| 14日当たりの生残率(稚成魚期)…P稚 | - | - | 0.990 | 0.991 | 0.992 | 0.982 | - | - |

繁殖率…F繁=A×B×C

(レスリー行列)

$$\begin{bmatrix}
 \text{0期の1期経過時匹数} \\
 \text{1期} \quad // \\
 \text{2期} \quad // \\
 \text{3期} \quad // \\
 \text{4期} \quad // \\
 \text{5期} \quad // \\
 \text{6期} \quad // \\
 \text{7期} \quad // \\
 \text{8期} \quad // \\
 \text{9期以降の} //
 \end{bmatrix}
 =
 \begin{bmatrix}
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & F_{\text{繁}} & F_{\text{繁}} \\
 P_{\text{仔}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & P_{\text{稚}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & P_{\text{稚}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & P_{\text{稚}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & P_{\text{稚}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{\text{稚}} & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{\text{稚}} & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{\text{成}} & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_{\text{成}} & P_{\text{成}}
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 \text{0期の匹数} \\
 \text{1期} \quad // \\
 \text{2期} \quad // \\
 \text{3期} \quad // \\
 \text{4期} \quad // \\
 \text{5期} \quad // \\
 \text{6期} \quad // \\
 \text{7期} \quad // \\
 \text{8期} \quad // \\
 \text{9期以降}
 \end{bmatrix}
 \quad \dots \text{式(1)}$$

図-44 は、F2(孫)世代の産卵実験終了後の体長、体重、生殖腺重量指数、肥満度の結果である。オゾン+担体処理水曝露区は、コントロール曝露区と比較して有意(有意水準1%)に低下している指標はなく、オゾン+担体処理水の成長に与える悪影響は見られなかった。

10.3.3 レスリー行列による個体群存続評価

表-20 はメダカ多世代繁殖実験で得られた結果をまとめたものである。多世代繁殖実験からは各世代で、産卵数、ふ化率、性比、生存率が得られ、これらの値を用いると個体群存続評価が可能となる。本研究では個体群存続の評価に利用されることが多く、簡易なレスリー行列による解析を試みた。解析に使用したパラメータは、表-20 の白黒反転の値である。解析に用いたレスリー行列を式(1)に示した。なお、本解析では、14日間を1期、9期(126日)以降を成魚と仮定し計算を行った。

図-45 は、レスリー行列によるシミュレーション結果で、700日間曝露を継続した時の雌成魚の総数の推移を示している。オゾン+担体処理水曝露区の総数は、コントロール区より低くなる傾向を示したが、個体数は増加することがわかる。

コントロール区とオゾン+担体処理水曝露区についてレスリー行列から算出された最大固有値λは、1.85

と1.60となった。最大固有値λが1以上のときは個体群増加、0のときは個体群維持、1以下のときは個体群減少と評価される。オゾン+担体処理水曝露区の最大固有値は、コントロール区よりも低い値となったが、1以上であり、個体群増加と判断された。オゾン+担体処理水は個体群存続への悪影響はないと判断された。

10.4 まとめ

オゾン+担体処理水を評価対象としてメダカ多世代繁殖実験を行い、個体群存続評価に必要なパラメータとなる雌一匹当たりの受精卵数、ふ化率、生存率、性比についてのデータ取得を行った。得られたこれらの値を用いてレスリー行列による個体群存続評価を試みた。その結果、多世代繁殖実験においてオゾン+担体処理水曝露区では、ふ化率の低下が見られたが、その他のパラメータ値は、コントロール区と比較しても顕著な違いは見られなかった。得られたパラメータ値を用いたレスリー行列による個体群存続解析でも、オゾン+担体処理水曝露区の最大固有値λは1以上を示し、オゾン+担体処理水は個体群存続への悪影響はないと考えられた。多世代繁殖試験の実施には、試験期間が1年近く要するが、排水の魚類個体群存続評価への適用は可能であると考えられた。

表-21 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 | | | 非極性有機物 | | | 界面活性剤 | | | 陽イオン金属 | | | 全溶解固形分(TDS) | | | |
| | | | | P | C | D ^H | D ^S | P | C | D | P | C | D | P | C | D | P | C | D | P | C | D | P | C | D | |
| A | 標準毒性汚泥法 | 2014 | 10 | ≧80 | / | ≧80 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 1 | 10 | ≧40 | ≧40 | ≧40 | 40 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 嫌気的気活性汚泥法 | 2015 | 2 | 20 | ≧40 | ≧80 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 1 | 20 | 20 | 40 | 40 | | / | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 4 | 40 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | 40 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 7 | 20 | ≧40 | ≧40 | ≧40 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 標準高毒性汚泥法 | 2014 | 9 | 42 | / | ≧80 | 5 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| | | | 12 | 40 | / | ≧80 | 40 | | / | ○ | | / | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2015 | 3 | 20 | ≧40 | ≧20 | ≧20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 6 | 20 | ≧40 | ≧20 | ≧20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | オキシソニシメット法 | 2016 | 1 | 20 | ≧40 | ≧80 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 7 | 20 | ≧40 | ≧40 | ≧20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 嫌気的工場の法 | 2016 | 2 | 20 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 8 | 20 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 標準高毒性汚泥法 | 2014 | 11 | 5 | / | 40 | 40 | ○ | / | ○ | / | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 2 | 10 | ≧40 | ≧80 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2015 | 5 | 20 | ≧40 | ≧80 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 8 | 20 | ≧40 | ≧80 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(B) 放流水

| 場所 | 処理法 | 年 | 月 | WET | | | | TIE | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------------|------|----|------|-----|----------------|----------------|-----|---|---|-------|---|---|--------|---|---|-------|---|---|--------|---|---|-------------|---|---|--|
| | | | | NOEC | | | | 酸化物 | | | アンモニア | | | 非極性有機物 | | | 界面活性剤 | | | 陽イオン金属 | | | 全溶解固形分(TDS) | | | |
| | | | | P | C | D ^H | D ^S | P | C | D | P | C | D | P | C | D | P | C | D | P | C | D | P | C | D | |
| A | 標準毒性汚泥法 | 2014 | 10 | ≧80 | / | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 1 | 40 | <5 | ≧80 | ≧80 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2015 | 2 | 40 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 嫌気的気活性汚泥法 | 2015 | 1 | 40 | <5 | ≧80 | ≧80 | ○ | / | | / | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 4 | ≧80 | <5 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 7 | ≧80 | <5 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 10 | ≧80 | <5 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 標準高毒性汚泥法 | 2014 | 9 | ≧83 | / | ≧80 | ≧80 | | / | | / | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 12 | ≧80 | / | ≧80 | ≧80 | | / | | / | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2015 | 3 | 10 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 6 | ≧80 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | オキシソニシメット法 | 2016 | 1 | 40 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 7 | ≧80 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 嫌気的工場の法 | 2016 | 2 | 20 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 8 | 20 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 標準高毒性汚泥法 | 2014 | 11 | ≧80 | / | ≧80 | ≧80 | | / | | / | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 2 | 40 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | ○ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2015 | 5 | ≧80 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 8 | ≧80 | ≧40 | ≧80 | ≧80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

WET：全排水毒性試験(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^H：ゼブラフィッシュ（卵のふ化率）、D^S：ゼブラフィッシュ（稚魚の生存率）

11. おわりに

以下に本研究で得られた知見を4つの観点からまとめた。

I：下水に対する WET 試験の適用と TIE

本研究では、ムレミカツキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いて、6 処理場の流入下水と処理水に対して全排水毒性 (WET) 試験を行い、下水処理水の生物影響評価と、毒性同定評価を行った。全 WET 試験の結果を表-21 に示す。流入下水では無影響濃度が

80%以下となるケースが多く見られたが、処理水では80%でも生物影響は見られないケースが増加しており、毒性は下水処理過程で低減することが明らかになった。毒性原因物質は、酸化物、アンモニア、界面活性剤と推察された。

II：下水の藻類に対する影響解明

ムレミカツキモを用いた生物影響試験では、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、気温の低い冬季では生物処理活性の低減により、下水処理水に生物影響が残存するこ

と、また下水処理方法の違いにより、下水処理水の生物影響の結果が異なることを明らかにした。

III：下水の甲殻類に対する影響解明

ニセネコゼミジンコを用いた生物影響試験では、金属排水が多く含まれる下水処理水において影響が残存し、特に Ni を含む処理水で顕著に影響が確認されることを明らかにした。これらの結果は、ニセネコゼミジンコが Ni に対する感受性が高いことを示している。一方、処理水中に含まれる Fe により、ニセネコゼミジンコに対する Ni の影響が軽減されることが明らかになった。これら下水処理水は PAC 等の凝集沈殿処理を行うことで金属が除去され、それに伴い、ニセネコゼミジンコの影響も軽減されることを明らかにした。溶存態金属濃度が高い下水処理水が放流されている汽水域の河川水に対し、シオダマリミジンコを用いて影響評価を行ったが、本試験では影響はみられなかった。Ni 濃度は放流水が河川水と混ざることによって 1/10 程度まで希釈され、水生生物に対する影響は低減されることが推察される。陽イオン金属が多く流入する下水処理場では、PAC 処理を用いて金属を除去することにより生物影響が軽減されることが明らかになった。

IV：下水の魚類に対する影響解明

魚類を用いた WET 試験では一般的にヒメダカとゼブラフィッシュを用いるが、下水処理水の試験では、ヒメダカが微生物の影響を受けるため、ゼブラフィッシュが適していることを明らかにした。ただし、ヒメダカとゼブラフィッシュでは化学物質に対する感受性が異なることに留意が必要であった。また、ヒメダカを用いて下水処理水の多世代繁殖試験を行った結果、オゾン+担体処理水では孵化率の低下が見られたものの、ひ孫世代まで成長への影響が生じないことを明らかにした。レスリー行列による個体群存続解析でも悪影響がなく、存続可能と評価された。WET 試験は亜慢性試験のため、下水処理水の慢性影響は評価できないが、本手法を用いると長期的な影響評価をすることが可能であると考えられる。

参考文献

- 1) USEPA: “Draft National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance”, EPA832-B-4-003, 2004
- 2) 環境省:「生物応答試験を用いた排水の評価手法(仮称)とその活用の手引き(中間とりまとめ案)」, 2019
- 3) 山本裕史、安部香緒里、池幡佳織、安田侑右、田村生弥、中村友紀、鎌迫典久:「徳島県内の下水処理施

設放流水を対象にした WET 試験」、環境工学研究論文集、Vol.47、pp727-734、2010

- 4) 山本裕史、矢野陽子、森田隼平、西家早紀、安田侑右、田村生弥、鎌迫典久:「下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価」、土木学会論文集 G (環境)、Vol.69、No.7、pp.375-384、2013
- 5) USEPA: “Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants”, EPA/833B-99/002, 1999
- 6) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD): “*Daphnia magna* Reproduction Test”, No. 211, OECD, Paris, France, 2012
- 7) R Core Team: R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austraria. <http://www.r-project.org/>, accessed on May 2015
- 8) PRTR けんさく、経済産業省ホームページ、http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、2015年5月参照
- 9) PRTR けんさく、経済産業省ホームページ、http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、2014年6月参照
- 10) 社団法人日本下水道協会:「下水試験方法 1997 年版試験方法編」、社団法人日本下水道協会、1997.
- 11) 国土交通省水質連絡会:「河川水質試験方法(案)[2008 年度版]河川管理者のために」、http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html、2009
- 12) U.S.EPA: “Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents”, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992
- 13) 江藤隆、栗林栄、新海幸男、野尻希守:「下水道施設における微量化学物質に関する現状と対策についての調査研究」、2000 年度下水道新技術研究所年報、pp.75-80、2000
- 14) 磯崎雄一、中島典之、古米弘明:「下水処理工程水及び放流先河川水における亜鉛・銅・ニッケルの形態分析」、環境科学会誌、Vol.19、No.5、pp445-452、2006
- 15) 安田侑右、澤井淳、中本貴士、岡村哲郎、増崎優子、宮本信一:「生物応答を用いた下水処理水の毒性原因の特徴化」、第 18 回日本水環境シンポジウム講演要旨集、pp.159-160、2015
- 16) 松原正明、原田新、南山瑞彦、田中宏明:「水生生物を用いた各種のバイオアッセイの下水試料に対す

- る感受性の比較」、環境工学研究論文集、Vol.35、pp.305-312、1998
- 17) Johnson, C. G. : “Effects of pH and hardness on acute and chronic toxicity of un-ionized ammonia to *Ceriodaphnia dubia*”, M.S. Thesis, University of Wisconsin, Stevens Point, WI, 1995
- 18) 若林明子 : 「化学物質の毒性や濃縮性に影響を与える因子」、環境毒性学会誌、Vol.1、No.2、pp.27-40、1998
- 19) U.S.EPA: “1999 Update of Ambient Water Quality Criteria For Ammonia”, EPA-822-R-99-014, pp.34, 1999
- 20) Belanger, S. E , Farris, J. L. and Cherry, D. S. : “Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*”, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol.18, No.4, pp.601-611, 1989
- 21) Keithly, J. , Brooker, J. A. , DeForest, D. K. , Wu, B. K. and Brix, K. V. : “Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella azteca*)”, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.23, No.3, pp.691-696, 2004
- 22) Cooper, N. L., Bidwell, J. R. and Kumar, A.: “Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*”, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.72, No.5, pp.1523-1528, 2009
- 23) Pavlaki, M. D. , Pereira, R. , Loureiro, S. , Soares, A. M. V. M. : “Effect of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*”, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.74, No. 1, pp.99-110, 2011
- 24) Schubauer-Berigan, M. K. , Dierkes, J. R. , Monson, P. D. and Ankley, G. T. : “pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*”, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.12, No.7, pp.1261-1266, 1993
- 25) De Schampelaere, K. A. C. , Van Laer, L. , Deleebeeck, N. M. E. , Muysen, B. T. A. , Degryse, F. , Smolders, E. and Janssen, C. R. : “Nickel speciation and ecotoxicity in Europe-an natural surface waters: Development, refinement and validation of bioavailability models”, Report prepared for the Nickel Producers Environmental Research Association, Gent University, Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Gent, Belgium, <https://biblio.ugent.be/publication/5785290>, accessed in August 2016
- 26) 藤原尚美、野中信一、豊久志朗、鏑迫典久 : 「金属製品製造工場のWETを用いた排水中毒性要因の推定とその改善例」、環境化学、Vol.25、No.1、pp.35-42、2015
- 27) 板津靖之、高野智弘、金俊、福富真実子、楠井隆史 : 「事業所排水の生態毒性学的評価 : 毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響」、環境化学、Vol.25、No.1、pp.19-26、2015
- 28) 永井孝志 : 「環境水中重金属のスぺシエーションと生物利用性」、環境毒性学会誌、Vol.14、No.1、pp.13-23、2011
- 29) 小川文章、小森行也、村田里美、鈴木裕識 : 「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」、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、pp.83-84、2018
- 30) 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
- 31) A.G El Samrani, B.S. Lartiges, F. Villieras.: “Chemical co-agulation of combined sewer overflow: Heavy metal removal and treatment optimization”, Water Research., Vol.42, No.2, pp.951-960, 2008
- 32) 大曲遼、竹内彩乃、勝又政和、中村勝、有菌幸司、石橋康弘 : 「緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) の遅延発光による重金属類の毒性評価」、環境と安全、Vol.8、No.3、pp.141-148、2017
- 33) 環境省ホームページ、生態毒性の生物種間の比較、https://www.env.go.jp/council/05hoken/y053-02/ref_03.pdf
- 34) Cao N, Yang M, Zhang Y, Hu J, Ike M, Hirotsuji J, Matsui H, Inoue D, Sei K: “Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays”, Sci Total Environ, 407, pp.1588-1597, 2008
- 35) 田中麻記子、深津和彦、高橋徹 : 「ヒメダカ (*Oryzias latipes*) 卵における卵膜軟化症」、第 37 回日本水環境学会年会講演集、p.340、2003
- 36) Liu Y, de Bruijn I, Jack AL, Drynan K, van den Berg AH, Thoen E, Sandoval-Sierra V, Skaar I, van West P, Diéguez-Uribeondo J, van der Voort M,

- Mendes R, Mazzola M, Raaijmakers JM: “Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases”, ISME J, 10, pp.2002-2014, 2014
- 37) Thoen E, Evensen O, Skaar I: “Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs”, J Fish Dis, 10, pp.601-608, 2011
- 38) 林 他: 「魚類個体群レベルにおける生態リスク評価手法の提案、4-ノニルフェノールによるメダカ個体群評価のケーススタディ」、水環境学会誌 Vol.26、No.9、pp.575-582、2003

The Establishment of Whole Effluent Toxicity (WET) Test to Determine Toxicity of Sewage Effluent

Budget: Grants for operating expenses
(General account)

Research Period: FY2014-2019

Research Team: Water Quality Research Team,

Author: Seiichiro OKAMOTO, Mizuhiko MINAMIYAMA,
Fumiaki OGAWA, Tomokazu KITAMURA,
Hiroyuki MANO, Fumihiko TAKEDA,
Satomi MIZUKAMI-MURATA,
Keita HATTORI, Yukihiro HUIJIMURA

Abstract:

The whole effluent toxicity (WET) test is a useful way to evaluate effluent, and determine its potential toxicity, for two key reasons. Firstly, the WET test can evaluate the chemical toxicity of unknown compounds, whereas conventional tests can only be used on known chemicals. Secondly, the WET test can evaluate complex chemical effects by measuring biological responses. The sewage treatment of waste water is a complex process because many kinds of pollutants, from both domestic and industrial sources, may contaminate the water. However, there are a few reports on the characteristics of sewage water, which evaluate their toxicity and also identify pollutants. Here, we demonstrate use of the WET test to determine the toxicity of sewage effluent, using three different kinds of organisms: an algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*), an arthropod (*Ceriodaphnia dubia*), and two species of fish (*Danio rerio* and *Oryzias latipes*).

Key words: Whole Effluent Toxicity (WET) test, sewage treatment, biological effect, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia*, *Danio rerio*, *Oryzias latipes*.