

13 地域の水利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発

研究期間：平成 28 年度～令和 3 年度

プログラムリーダー：水環境研究グループ長 萱場 祐一

研究担当グループ：水環境研究グループ（水質）、材料資源研究グループ、寒地水圏研究グループ（水環境保全）、水工研究グループ（水理）

1. 研究の必要性

様々な水質改善対策が実施されてきた現在も、社会活動に重大な影響を及ぼす新たな感染症の発生や、日用品由来の化学物質の生態影響、汽水湖等の貧酸素化、貯水池におけるアオコ・カビ臭による利水障害等の水に由来する問題が生じている。そのため、新たな規制の動向にも対応しつつ河川・湖沼等の水質管理を行うとともに、下水処理による新規規制項目への対策やモニタリング・評価技術の確立が必要である。したがって、本研究開発プログラムでは、水環境中の化学物質や病原微生物等の影響の評価手法の構築やその軽減のための処理技術を開発する。また、停滞性水域等における水利用や生態系を保全するためのモニタリング技術、予測手法を構築する。さらに、上記の開発技術やモニタリング・評価手法を活用しつつ流域全体の利水や水生生態系に対する影響を軽減し、環境の質を向上するための管理方策の提案を目指す。

2. 目標とする研究開発成果

本研究開発プログラムでは、水環境の質を向上し、地域の水利用や生活環境、水生生態系を保全していくことを目指し、個々の湖沼・ダム管理や下水道管理の技術的支援、国が実施する関連行政施策の立案や技術基準の策定への反映を目標に、以下の達成目標を設定した。

- (1) 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
- (2) 水質リスク軽減のための処理技術の開発
- (3) 停滞性水域の底層環境・流入負荷変動に着目した水質管理技術の開発

3. 研究の成果・取組

「2. 目標とする研究開発成果」に示した達成目標に関して、令和元年度に実施した研究の成果・取組について要約すると以下のとおりである。

(1) 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

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

湖沼・ダム貯水池の水質改善に向け、効率的な藻類のモニタリング手法の構築が急務となっているため、並列

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

アオコ発生の主要な原因藻類と考えられる *Microcystis aeruginosa* を用いて鉄濃度の変化が藍藻類の生長におよぼす影響を検討した。MA 培地の金属以外の成分と Mn 及び Co を加えた培地の Fe 濃度を 6 段階に調整した培地を用いて、藻類生長試験を行った結果、Fe の濃度が 20–50 µg/L の範囲で生長指数の値が明確に変化し、これらの濃度域で *M. aeruginosa* の生長が制限されることが示唆された。

貯水池内における濁質の長期的な挙動をより実現象に則するよう表現できるモデルの改良を行った。モデルの改良には長期間の貯水池濁質挙動を計算できるよう、計算負荷の小さい乱流モデルを採用した。乱流モデルには基準となる中立状態の鉛直渦混合係数という不確定なパラメータが存在するため、実際の濁質挙動を再現できるようパラメータを変化させ感度分析を行った。感度分析は、東北地方の特定のダムを対象に、貯水池形状と洪水規模を変化させる事によって再現性を確認した。

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

(2) 水質リスク軽減のための処理技術の開発

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

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を目的に、大腸菌ファージの F 特異 RNA ファージ（FRNAPH）遺伝子群（GI~GIV）を対象に、塩素と紫外線消毒による不活化効果を評価することで、消毒処理によるウイルスの不活化効果において安全側の評価となる遺伝子群を選定した。また、ふん便汚染の基本的な指標である大腸菌群から大腸菌指標への移行が検討されていることにあたり、従来指標との関連性を評価するため、大腸菌群に占める大腸菌の割合を調査した。次いで、下水試料に適した大腸菌の定量法の提案を目的に、放流水を想定して大腸菌を低濃度とした試料を対象に複数の特定酵素基質培地による検出定量に関し比較評価を行った。その結果、塩素消毒による不活化効果は、高濃度に培養・添加した結果では遺伝子群の間に差はなかったが、元々下水処理水中に存在した濃度での結果では GI と比べて GII~GIV の方が低かったことから、これらを指標として用いる場合、安全側の評価となることが確認された。紫外線消毒による不活化効果は、高濃度培養の FRNAPH 添加有無による結果に顕著な差は無く、GIV が最も高く、GIII、GII、GI の順であり、GI が最も耐性が強かったことから、GI を指標として用いることで安全側の評価となることが示された。大腸菌群に占める

大腸菌の割合は、水温による影響を受け変動するものと考えられた。大腸菌濃度を 20 CFU/mL 程度した試料の定量評価では、一部の培地・手法において検出濃度が他と比較して乖離した状況となったが、30～80 CFU/mL 程度であれば、各培地・手法の変動係数の多くは 10%以内で推移し、定量値に関しても大差がない結果となった。さらに、実態調査に基づく合流式下水道越流水の影響評価としてノロウイルス (Norovirus: NoV) を指標とした汚染の実態を把握した。次いで、高度処理法などによる病原微生物の除去率向上評価の一環として、膜分離活性汚泥法 (Membrane Bioreactor: MBR) による NoV の除去効果について、実験プラント (P.P.) と実下水処理場で稼働している実プラントを対象に評価を行った。その結果、1 降雨あたりの総降雨量が合流式下水道改善事業の降雨条件を超える降雨時では、越流水による放流先水域への NoV 汚染が生じる可能性があった。越流水影響下による NoV の汚染状況を簡易に把握するため、水質指標として濁度と SS との関連性を評価した結果、濁度、SS 指標の活用により NoV 汚染の影響を評価できる可能性が示唆された。MBR による NoV の最大除去率は 4.5～5.2log、平均は概ね 4log 程度であり、標準活性汚泥法 (標準法) と比較して 2 オーダー程度向上していた。

(3) 停滞性水域の底層環境・流入負荷変動に着目した水質管理技術の開発

塩淡水層汽水湖の網走湖において、塩水層の貧酸素水塊の解消を目的として、現地に酸素溶解装置(WEP)を建設して酸素供給による水質変化について実水域で観測を行った。結氷下から融雪後まで装置を連続運転させた結果、結氷下では湖内の流動が抑制され、装置近傍に溶存酸素量(DO)の上昇と硫化水素の酸化による濁度上昇が確認された。結氷下での 2 ヶ月の装置運用でおよそ 90000 m²に DO 供給影響が確認され、硫化水素濃度は DO 供給標高を中心に大幅な低下が確認されたが、検出限界以下にはならなかった。一方で、融雪後は湖内流動が再開することで、水塊移動に伴い DO 供給効果が流下して、DO と濁度は低下する挙動が確認された。また水質分析の結果から、WEP による DO 供給によって、機器周辺の硫化水素は 40 %削減され、全リン及び全窒素も 20 %削減されることが確認された。これより、DO 供給によって汽水性貧酸素水塊の水質改善が可能であり、流動が少ないほど効果が明瞭となることが分かった。

THE DEVELOPMENT OF WATER QUALITY MANAGEMENT AND CONTROL TECHNIQUES FOR REGIONAL WATER USE AND AQUATIC ECOSYSTEM CONSERVATION

Research Period : FY2016-2021

Program Leader : Director of Water Environment Research Group
Yuichi Kayaba

Research Group : Water Environment Research Group (Water Quality Team)
Material and Resource Research Group
Cold-Region Hydraulic and Aquatic Environment Engineering Research Group
(Water Environment Engineering Team)
Hydraulic Engineering Research Group (River and Dam Hydraulic Engineering Research Team)

Abstract : Although various improvement measures for water quality have been implemented, serious issues are still found in water environments, such as infectious diseases that influence social activities, ecological effect of chemical substances derived from products for daily use, and occurrence of algal bloom and musty odor in reservoirs. Therefore, new strategies for evaluation, monitoring and management are required to respond to these issues. In addition, it is important to apply these techniques to the basins in an integrated manner to improve environmental quality. In this R&D program, in order to respond to these challenges, we will promote researches towards achieving the following 3 goals:

- (1) Development of assessment and monitoring methods to understand the water environments of basins with accuracy and speed.
- (2) Development of adequate water treatment technology for the mitigation of water quality risks.
- (3) Development of water quality management focused on the bottom layer environment and the inflow change in stagnant water areas.

We aim to reflect these developments to the planning of the administrative measures and technical standards by the national government towards the improvement of water environmental quality, conservation of regional water use in basins, living environment and the aquatic ecosystem.

Keywords: Water environment, water quality management, water quality control techniques, aquatic ecosystem conservation, mitigation of water quality risk

13.1 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

13.1.1 公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究（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：山下洋正、平山孝浩、北村友一、
對馬育夫、鈴木裕識、小森行也、
高沢麻里

【要旨】

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

キーワード：モニタリング、下水処理水、精密質量分析、簡易スクリーニング、未知物質探索

1. はじめに

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

過年度では、医薬品類を対象に都市流域で下水処理水および河川水を調査し、河川水中濃度に対して寄与率の高い下水処理場を把握した³⁾。また、水中の医薬品類の濃度変化に影響を及ぼす環境因子として底質への収着に着目して野外調査や室内実験を行った結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が河川底質に蓄積されやすいことや、azithromycin と levofloxacin の底質への収着は主に陽イオン交換反応によるものであることを明らかにした⁴⁾。次に、河川流下過程における医薬品の消長を効率的に推測するこ

とを目的として、水系暴露解析モデルを用いた非定常解析により流域全体における医薬品の暴露濃度の網羅的予測を試みた。その結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の3種医薬品について、モデル計算濃度が野外実測濃度と比べ低く算出される傾向があったものの、シミュレーション結果から流域全体の濃度マッピングが達成された⁵⁾。

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

本年度は、水環境への主要な経路点の一つである下水処理場の処理水を対象に、精密質量分析技術を用いた多成分の簡易一斉スクリーニングにおいて重要となる検出有無判定での見落とし低減に繋がるデータベース（DB）の構築手法を検討するとともに、膨大な精密質量測定データからの未知物質探索手法を検討した。

2. 方法

2.1 試料の採取

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

2.2 精密質量分析

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

2.2.1 分析前処理の方法

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

2.2.2 測定の方法

上述の方法に沿って前処理された試料は LC-QToF-MS に導入され測定された。詳細な測定条件は表 1 に示す通りである。各条件はできるだけ多くの物質の測定データを効率的に取得できるよう事前に検討し、設定した。カラムには ACQUITY UPLC HSS T3 を用いた。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) により行い、Positive (+) と Negative (-) の両モードを用いた。測定範囲は m/z 50-1200 とし、ロックマスにはロイシンエンケファリンを用いた。本分析装置の特徴として、全測定時間にかけて 10-40 V のコリジョンエネルギーを無段階（ステップレス）でかけて、測定データを取得している（以下、無段階 MS/MS 法）ことが挙げら

れる。これにより、事前に対象物質を定めていなくても、検出の有無判定の際に有効となる個々の物質のフラグメントイオンの情報を網羅的に収集しておくことが可能である。

2.2.3 データ解析の方法①：簡易スクリーニング

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

表-1 LC-QToF-MS の測定条件

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

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

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

2.2.4 データ解析の方法②：未知物質の探索

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

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

3. 結果と考察

3. 1 スクリーニングデータベース (DB) 構築手順の検討

スクリーニング用 DB の構築のための標準品解析手順を検討した。その結果を図-1 に示す。本研究では見落としを低減した汎用性の高い DB 構築を目的として、分析環境および条件の影響を受けにくい、MS 内の真空環境下で発生するプロダクトイオンに着目し、実測値を登録した。標準品の測定に際しては、非対象物質

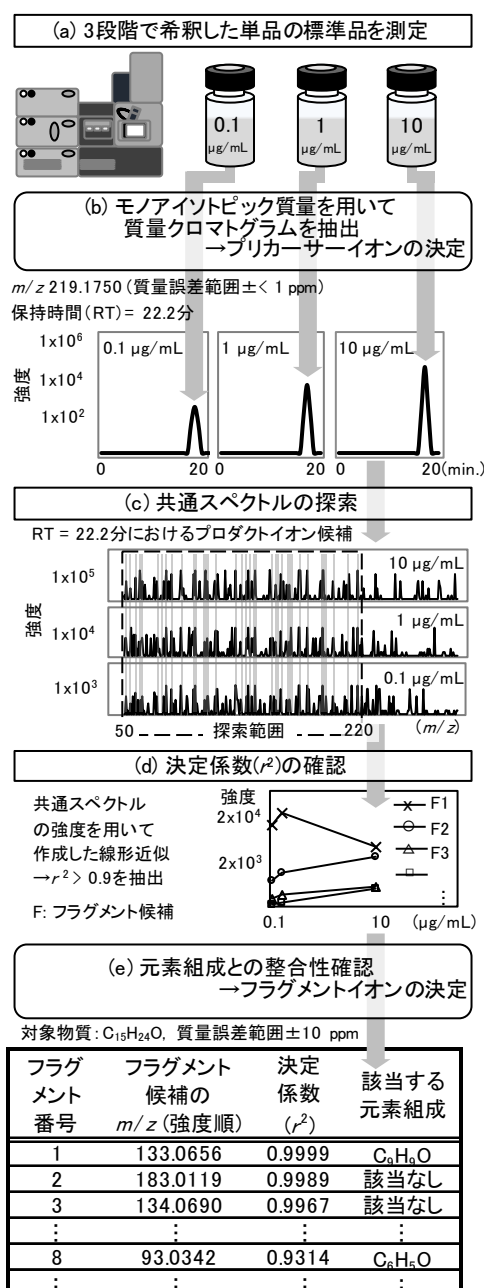


図-1 見落としを低減したスクリーニング用データベース作成のための標準品解析手順 (解析例: ノニルフェノール)

由来の夾雑イオンの発生を極力避けつつ、正確なプロダクトイオン候補を取得し登録するために単品の標準品を用いた。本研究では、健康生態リスクが懸念される化学物質群の一例として PRTR 第一種指定化学物質を取り上げ、標準品を入手した 28 物質を対象とし、DB 登録情報の取得手順を検討した。なお、ここではノニルフェノール (NP) の例を示す。

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

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

合したところ、主要なプロダクトイオンが取得されていることが確認できた⁷⁻⁹⁾。

本研究で構築した手順を用いて作成される DB は、本研究グループ以外で DB が使用された場合に、他機種の装置で取得された測定データとの突合においても、有効な照合指標となることが期待できる。夾雑物が多く含まれることが想定される下水試料中では、同一の RT で溶出され MS 内で生成するイオンが複雑化することで、本来検出されるべき対象物質が不検出となる可能性があるが¹⁰⁾、本手法では、突合に有力なプロダクトイオンを複数個登録することにより、突合妨害のリスクを低減し、検出漏れを最小限に抑え、汎用性の高い DB を構築することができる。

3. 2 スクリーニング DB の実試料への適用性の検討

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

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

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

* 自動では値が得られず、測定結果の目視が必要であった。 □ 検出不良

については、検出が想定される RT 近傍において明瞭なピークが確認できないケースが多く、下水試料によるイオン化の妨害等が原因となり、添加濃度 (50ng/mL) の範囲では適切に検出判定されなかったことが示唆された。この点を解決するための対応策として、下水中の夾雑物に影響を受けにくいフラグメントイオン情報の DB への追加が考えられた。また、フタル酸 *n*-ブチル=ベンジルは、解析ソフトウェアでは RT 情報が自動で捕捉されなかった。手で確認したフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの EIC の一例を図-2 に示す。下水試料への標準添加試料の EIC をみたところ、有機溶媒中の標準品試料と同様に、RT=18.0 分の近傍にピークが確認された。また、下水試料への添加試料からは溶媒試料の約 600 倍の強度が確認され、実試料中にフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルが存在していたことが示唆された。つまり、現状のスクリーニング条件ではこの物質の検出を適切に判定できず、存在が見逃されてしまうことになる。この原因を検討したところ、実試料にはフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの異性体が複数存在しており、それによりピークが十分に分離されずに突合条件である RT 許容範囲(±1min)を超えるブロードなピークを形成してしまったことが理由の一つであると示唆され、異性体の分離は本手法における課題の一つであると考えられた。異性体同士を的確に分

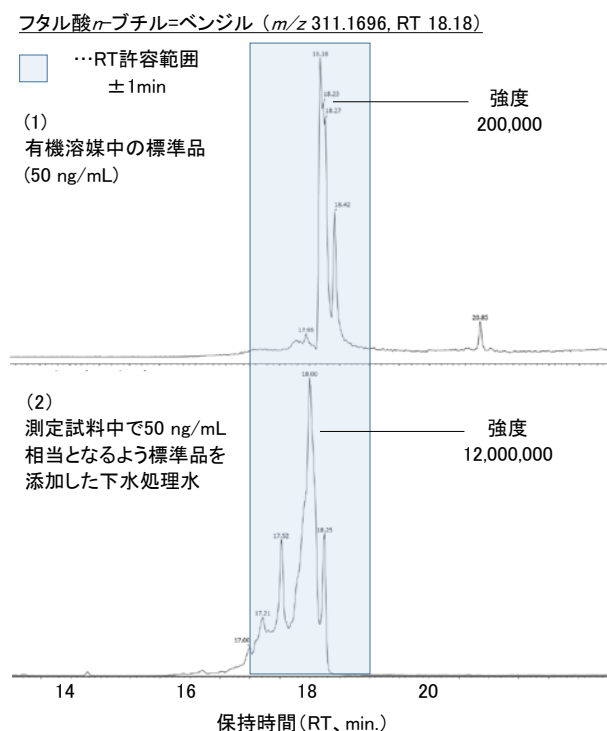


図-2 標準添加した下水試料で検出不良であったフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの質量イオンクロマトグラム

離するための最新技術として、イオンモビリティ質量分析技術が有力であるとの報告があるが¹¹⁾、水環境試料の測定データの蓄積を目指す上では、汎用性に欠けることが懸念される。

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

3. 3 下水試料のスクリーニング結果

PRTR 対象物質の簡易スクリーニング結果の一覧を表-3 に示す。簡易スクリーニング DB には、本研究で見出した手法により登録した情報を一部含めて別途作成した PRTR 対象物質 (81 物質) の DB を用いた。対象試料は試料採取期間前半の下水処理水 (n=7) である。解析の結果、いずれかの試料から検出された物質の合計数は 32 種であった。最も高頻度で検出「有」と判定されたのは、ESI(+)測定データではアトラジン、ESI(-)測定データではテブフェノジドであった。アトラジンは、欧州連合では使用が禁止されているが世界で最も多く使用されている除草剤の一つであり¹²⁾、テ

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

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

ブフェノジドは昆虫生育制御機能のある殺虫剤として、
 水稲、果樹等の栽培時に広く使用されている¹³⁾。下水
 処理水から検出「有」と判定された物質については、
 標準活性汚泥法（硝化抑制運転条件下）では処理水に
 残留することが示唆され、健康・生態リスクが懸念さ
 れる物質群としての側面がある PRTR 対象物質とし
 ては、今後も公共用水域での存在実態や健康・生態影
 響について詳細検討が必要な物質であると考えられた。

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

3. 4 未知物質探索のためのデータ整理

下水処理水と水道水（各 $n=15$ ）、下水処理水 MIX、
 水道水 MIX（各 $n=1$ ）の合計 32 試料を同時にノター
 ゲット解析にかけたところ、いずれかの試料から確認
 されたピーク数の合計は ESI(+)測定データでは
 29,556、ESI(-)測定データでは 21,222 であった。これ
 らの内訳を表-4 に示す。なお、ピークは強度 1,000 以
 上であったもののみをカウントした。また、ここでピー
 クとして示されたものは必ずしも固有の物質ではない
 という点に留意されたい。15 回の採取試料のうち、
 ESI(+)測定データでは下水処理水から 2,284 ピーク
 (2020 年 1/17)~14,984 ピーク(3/10)の範囲で確認さ
 れ、水道水から 755 ピーク(2020 年 1/17)~4,444 ピー

ク(2/12)の範囲で確認された。また、ESI(-)測定デー
 タでは下水処理水から 1,992 ピーク(1/10)~8,192 ピー
 ク(3/17)の範囲で確認され、水道水から 415 ピーク
 (2020 年 1/10)~2,976 ピーク(2019 年 12/26)の範囲で
 確認された。下水処理水と水道水を比較すると、
 ESI(+)測定データでは下水処理水の方が水道水より
 2.0 倍(12/18)~4.1 倍(3/4)ピーク数が多く、ESI(-)測定
 データも同様であった (2.3 倍(11/28)~5.2 倍(3/4))。試
 料採取日毎のピーク数の変動については明確な要因の
 把握には至らず、今後の課題の一つとして考えられた。

各種試料の MIX 試料の測定データと下水処理水 15
 試料で共通して確認されたピークを図-3 に示す。
 ESI(+)測定データでは、下水処理水 MIX から 13,610
 ピークが確認され、水道水 MIX から 3,804 ピークが
 確認された。これらの結果を踏まえ、下水処理水 15 試
 料に共通して確認され、水道水 MIX からはみられない
 固有のピーク数をカウントしたところ、901 ピーク
 が見出された。ESI(-)測定データに対し同様の操作を
 行ったところ、下水処理水 15 試料に共通して確認さ
 れ水道水 MIX からはみられない固有のピーク数は
 802 であった。以上、整理された下水処理水に共通か
 つ固有なピーク群は今回調査した活性汚泥処理実験装
 置に平常時に流入しつつ、標準活性汚泥処理後に残留
 している物質群の探索対象として位置づけることがで
 き、全ピーク数の 3-4%程度にまで探索候補を絞り込

表-4 ノターゲット解析により確認された各試料中のピーク数

| ESI 試料種 | 採取日等 | 2019 | | | | | 2020 | | | | | MIX | | | | | |
|-----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 11/28 | 12/6 | 12/13 | 12/18 | 12/26 | 1/10 | 1/17 | 1/28 | 2/4 | 2/12 | | 2/18 | 2/25 | 3/4 | 3/10 | 3/17 |
| (+) 下水処理水 | | 6,522 | 7,563 | 3,370 | 3,813 | 6,376 | 2,540 | 2,284 | 14,512 | 14,238 | 11,398 | 13,387 | 13,510 | 13,752 | 14,984 | 14,894 | 13,610 |
| 水道水 | | 3,130 | 1,841 | 1,613 | 1,899 | 3,021 | 770 | 755 | 3,683 | 3,573 | 4,444 | 4,160 | 3,924 | 3,319 | 3,828 | 3,670 | 3,804 |
| (-) 下水処理水 | | 6,548 | 4,240 | 2,375 | 3,054 | 7,145 | 1,992 | 3,084 | 7,968 | 7,127 | 5,656 | 7,077 | 7,155 | 7,808 | 7,628 | 8,192 | 6,930 |
| 水道水 | | 2,897 | 977 | 965 | 1,130 | 2,976 | 415 | 761 | 1,594 | 1,570 | 1,891 | 1,797 | 1,730 | 1,494 | 1,576 | 1,621 | 1,681 |

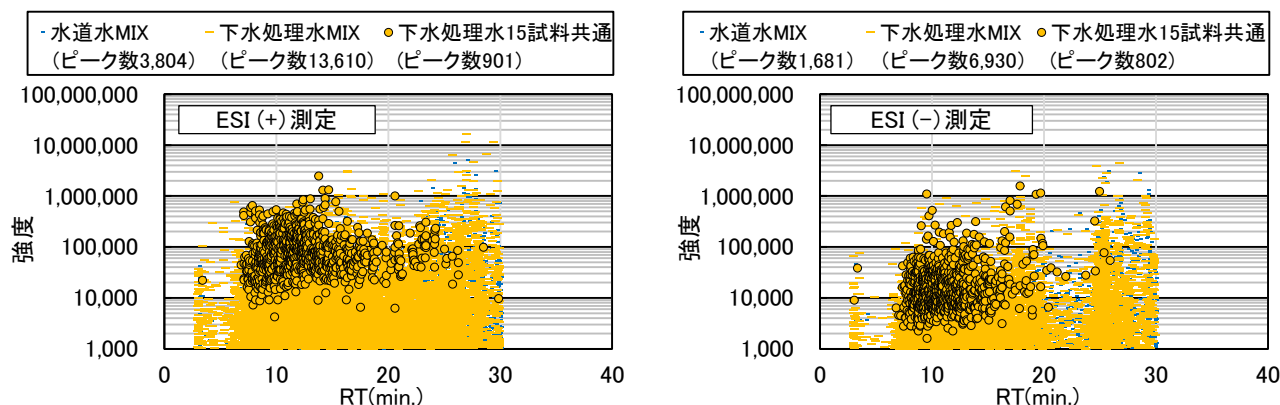


図-3 各種試料の MIX 試料の測定データと下水処理水 15 試料で共通して確認されたピーク

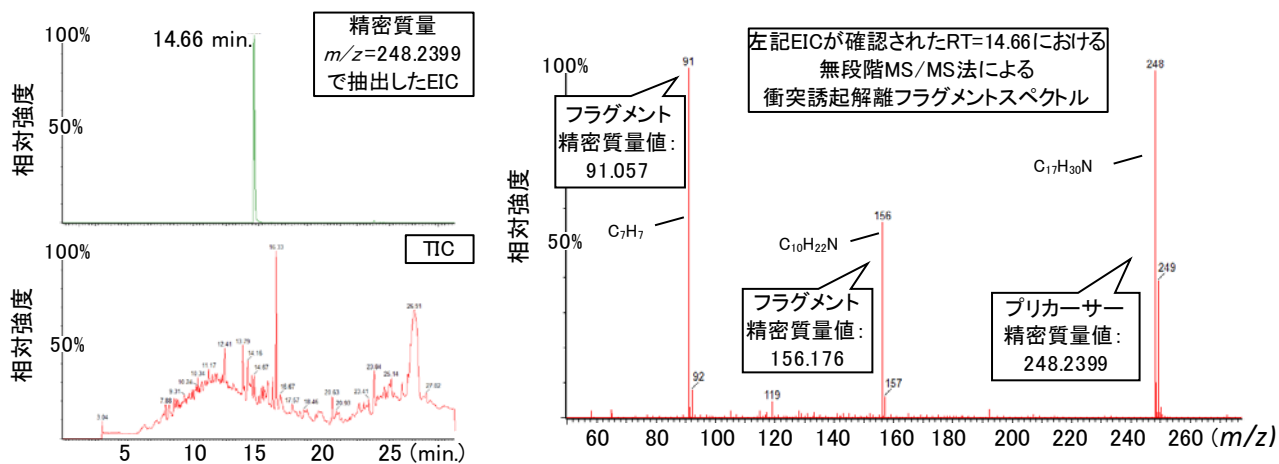


図-4 $m/z = 248.2399$ の精密質量測定データと元素組成演算により推定されたフラグメント組成

むことができた。このように、精密質量分析により網羅的に取得された測定データは、そのままでは膨大であり、未知物質の探索を効率的に行うためには、事前の絞り込みが重要であることが再確認された。

3. 5 下水処理水からの未知物質の探索

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

ESI(+)測定データから絞り込まれた 901 のピークのうち、上述の探索条件に当てはまるデータとして精密質量 $m/z = 248.2399$ (RT:14.66) を選出し、この情報に基づいて MassLynx V4.2 (Waters) により元素組成演算を行った。その際の条件は m/z 値より推定される各元素の最大組成数を考慮して設定し、炭素数: 1-20、水素数: 1-42、窒素数: 0-17、酸素数: 0-22、ナトリウム数: 0-10、硫黄数: 0-7、臭素数: 1-10、フッ素数: 0-10、塩素数: 1-10、リン数: 0-10、許容質量誤差範囲 50 ppm とした。その結果、462 の組成候補が選ばれた。この段階では詳細検討のための候補が過大であるため、既報の絞り込み条件である H/C 比率 3.1 以下¹⁴⁾を導入して選抜したところ、候補組成が 19 種に絞り込まれた。次に、これらについて、多くの化学物質の情報を持つ Chemspider¹⁵⁾ の検索機能を用いて、実在の有無を検証したところ、 $C_{17}H_{30}N$ (モノアイソトピックマス: 248.23727) と $C_{12}H_{30}N_3O_2$ (モノアイソトピックマス: 248.23216) について情報が得られた。なお、モノアイソトピックマスとは各元素について天然存在比が最大の同位体の質量を用いて計算したイオン

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

| 物質名 | 構造式(Chemspider ¹⁹⁾ から抜粋) |
|---|-------------------------------------|
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N,N</i> -dimethyl-1-octanaminium | |

または分子の計算精密質量 (exact mass) を指す¹⁶⁾。このうち、測定結果の精密質量 m/z 248.2399 との質量誤差がより小さい $C_{17}H_{30}N$ を第一候補とし、Chemspider から推定構造情報を取り込んだところ、31 種の化学物質が提示された。ここで、 $m/z = 248.2399$ に関する精密質量測定データを図-4 に示す。本研究で用いた測定装置では、各化学物質 (プリカーサーイオン) 固有の精密質量データとともに、無段階 MS/MS 法により、衝突誘起解離 (CID) によりフラグメントイオンを発生させ、各化学物質に関連する情報として取り込んでいる。この情報を活用して、Chemspider から提示された各化学物質の構造と照合した結果、表-5 に示す化学物質 (候補) *N*-Benzyl-*N,N*-dimethyl-1-octanaminium が推定された。この物質は、塩化物塩としては塩化ベンザルコニウムに分類される陽イオン界面活性剤の一種である。塩化ベンザルコニウムは消毒¹⁷⁾やコンタクトレンズの防腐剤として広く用いられており、下水に含まれている可能性としては十分に想定される物質であった。

ESI(-)測定データについても、ESI(+)測定データと同様に未知物質探索の解析を行った。探索条件に当てはまるデータとして精密質量 $m/z = 199.0476$ (RT:9.52) を選出し、この情報に基づいて元素組成演算を行い、H/C 比率 3.1 以下の条件で選抜した結果、候補組成が

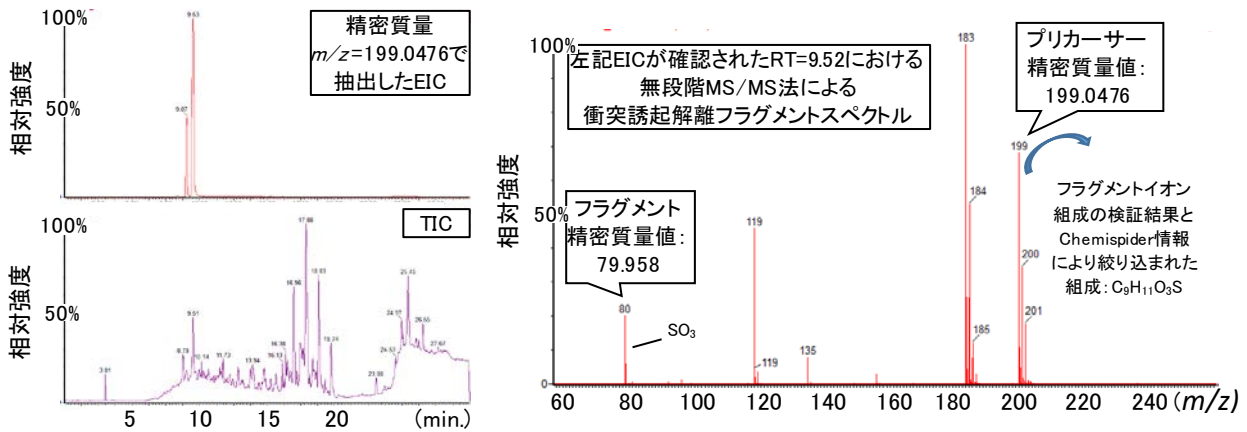


図-5 $m/z=199.0476$ の精密質量測定データとフラグメントイオンの検証から絞り込まれた探索物質の元素組成

46種に絞り込まれた。次に、Chemspiderで実在の有無を確認したところ、依然として候補組成が8種あり、この段階での物質推定は容易ではなかった。そこで、他の手がかりを得ることを目的として $m/z=199.0476$ に関する精密質量測定データについて CID 情報を含めて事前に確認することにした。その結果を図-5に示す。CIDによるフラグメントイオン情報から、精密質量 $m/z=79.958$ に相当するフラグメントイオンが SO_3 であることが推定された。この情報を活用し、Chemspiderから提示された各化学物質と照合した結果、 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{S}$ (モノアイソトピックマス: 199.04344) が候補組成であることが示唆された。さらに Chemspider から本組成の推定構造情報を取り込んだところ、9種の異なる構造異性体が提示された。このうち、実際に下水試料中に存在する可能性のあるものを検討した結果、*p*-cumenesulphonate (*p*-クメンスルホン酸) が考えられた。

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

本研究で構築した候補物質の絞り込むためのフローを図-6に示す。本研究で採用した LC-QTOF-MS により取得された精密質量測定データは、それ自体は

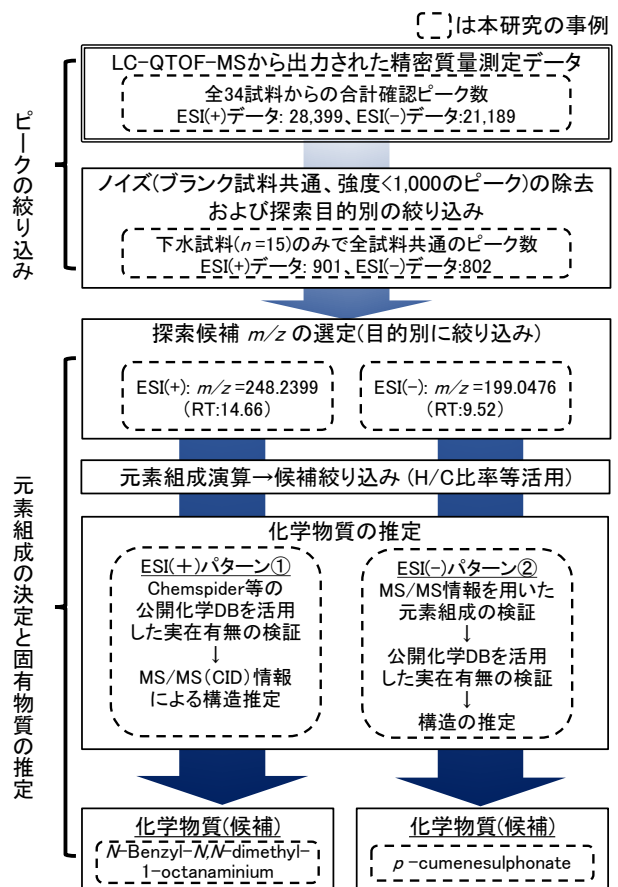


図-6 精密質量測定データを用いた未知物質探索解析における化学物質(候補)絞り込みフロー

ビッグデータというべき膨大なデータ量ではあるが、一定の目的を設定し、探索の候補とするデータを絞り込んだ上で、元素組成演算等の既往の探索ツールや Chemspider 等の公開化学 DB、さらに、本手法の特徴の一つである無段階 MS/MS 法により取得したフラグメントイオン情報を有効に活用することにより候補物質をさらに絞り込むことができることを、手順を追って示すことができた。本検討では、複数の下水処

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

4. まとめ

本研究で得られた主な知見は以下のとおりである。LC-QTOF-MS で取得された精密質量測定データを用いた多成分の簡易一斉スクリーニングを行うために重要な、データベース (DB) 構築手法を検討し、

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

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

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

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

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

参考文献

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

- 7) Takazawa, M., Suzuki, S., Nakano, T., Tsunoi, S. and Shinomiya, M.: Quantitative and Qualitative Analysis of Organic Halogenated Compounds Unintentionally Generated in Wastewater Treatment Plants using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and High-Resolution Mass Spectrometry, *Journal of Environ. Chem.*, **27**(4), pp.137-144, 2017
- 8) 環境省環境保健部環境安全課：平成 22 年度版化学物質分析法開発調査報告書、https://www.nies.go.jp/kisplus/images/bunseki/pdfs/kurohon/2010/adoc2010-3-486_v2.pdf, 2011 (accessed 2020-6-1)
- 9) Leary, D. B., Takazawa, M., Kannan, K. and Khalil, N.: Perfluoroalkyl Substances and Metabolic Syndrome in Firefighters, A Pilot Study. *J. Occup. Environ. Med.*, **62**(1), pp.52-57, 2020
- 10) Rogatsky, E. and Stein, D.: Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development, *J. Ame. Soci. Mass Spec.*, **16**, pp.1757-1759, 2005
- 11) 林明生、佐藤信武、細田晴夫、建田潮：イオンモビリティ質量分析計、日本農薬学会誌、**42**(1)、pp. 187-196、2017
- 12) Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. and Wilson, S. P.: Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment, *Environmental pollution*, **157**(11), pp. 2903-2927, 2009
- 13) 環境省：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料テブフェノジド、<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/251tebufenozide.pdf> (accessed 2020-6-1)
- 14) Kind, T. and Fiehn, O.: Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC bioinformatics*, **8**(1), p.105, 2007
- 15) ChemSpider ウェブサイト、R. S. C <http://www.chemspider.com/> (accessed 2020-6-1)
- 16) 日本質量分析学会用語委員会：マスマスペクトロメトリー関係用語集第3版（WWW版）、http://www.mssj.jp/publications/books/glossary_01.html (accessed 2020-6-1)
- 17) Frank, M. J. and Schaffner, W.: Contaminated aqueous benzalkonium chloride: an unnecessary hospital infection hazard, *Jama*, **236**(21), pp. 2418-2419, 1976

13.1.2 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（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）

担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）

研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

本研究は、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に関わる調査・研究として、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている大腸菌ファージの F 特異 RNA ファージ (FRNAPH) 遺伝子群 (GI~GIV) を対象に、塩素と紫外線消毒による不活化効果を評価することで、消毒処理によるウイルスの不活化効果において安全側の評価となる遺伝子群を選定した。また、ふん便汚染の基本的な指標である大腸菌群から大腸菌指標への移行が検討されていることにあたり、従来指標との関連性を評価するため、大腸菌群に占める大腸菌の割合を調査した。次いで、下水試料に適した大腸菌の定量法の提案を目的に、放流水を想定して大腸菌を低濃度とした試料を対象に複数の特定酵素基質培地による検出定量に関し比較評価を行った。

その結果、塩素消毒による不活化効果は、高濃度に培養・添加した結果では遺伝子群の間に差はなかったが、元々下水処理水中に存在した濃度での結果では GI と比べて GII~GIV の方が低かったことから、これらを指標として用いる場合、安全側の評価となることが確認された。また、紫外線消毒による不活化効果は、高濃度培養の FRNAPH 添加有無による結果に顕著な差は無く、GIV が最も高く、GIII、GII、GI の順であり、GI が最も耐性が強かったことから、GI を指標として用いることで安全側の評価となることが示された。大腸菌群に占める大腸菌の割合は、水温による影響を受け変動するものと考えられた。大腸菌濃度を 20 CFU/mL 程度した試料の定量評価では、一部の培地・手法において検出濃度が他と比較して乖離した状況となったが、30~80 CFU/mL 程度であれば、各培地・手法の変動係数の多くは 10% 以内で推移し、定量値に関しても大差がない結果となった。

キーワード：消毒処理、塩素、紫外線、ウイルス不活化効果、F 特異 RNA ファージ、指標ウイルス、大腸菌

1. はじめに

日本国内における下水処理場の多くは、下水処理水の放流前に塩素を用いた消毒を行っているが、近年では紫外線消毒を採用する処理場数も増加傾向にある¹⁾。下水処理水の消毒では、放流水の基準項目の一つが大腸菌群であるため、大腸菌群と比べ塩素や紫外線消毒に対して耐性が強いウイルスにおいては消毒効果が十分に得られていない可能性がある。しかし、ノロウイルス等のヒト腸管系ウイルスは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²⁾、感染力の評価が難しいことから、下水処理場での消毒処理によりウイルスが適切に不活化されているか確認できていない状況である。

一方、大腸菌に感染するウイルスである大腸菌ファージの中で、F 特異 RNA ファージ (F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH) は、大きさ (直径約 20~40 nm) や構造 (正二十面体) がノロウイルス等のヒト腸管系ウイルスと類似しているため、指標ウイルスとして最も注目されており、多くの研究に用いられている^{3~7)}。人への危険性が無く培養が容易であることから、培養法による

感染力の評価が可能であるため、塩素や紫外線を用いた消毒実験にも多く用いられている^{5, 8~12)}。ヒトノロウイルスに近縁で細胞培養可能なマウスノロウイルスやネコ、イヌカリシウイルスと比べて FRNAPH の MS2 が、塩素および紫外線消毒に対する耐性がより強いことが多くの研究により確認されている^{10~12)}。また、米国のカルフォルニア州では、下水処理水を高度処理した再生水を農業用水に用いる場合、ウイルスの消毒処理等による除去・不活化の基準として、培養や検出が容易な FRNAPH の MS2 を用いて評価することとなっている¹³⁾。このことから、今後、下水処理場の放流先での水利用における衛生的安全性を考えた場合、下水処理場でのウイルスに対する消毒効果を評価する上で、他の近縁なウイルスと比べて強い消毒耐性を有する MS2 を含む FRNAPH を用いる可能性が高いと考えられる。

FRNAPH は GI から GIV の 4 つの遺伝子群に分けられ、それぞれの遺伝子群により環境水中において異なる生存能力を示し^{4, 8)}、また、下水処理場での生物処理、凝集や膜を用いた水処理による除去効果が異なる^{6, 7, 9, 14)}。さ

らに、塩素や紫外線消毒においても遺伝子群の間で異なる耐性を示しており、前述した FRNAPH の MS2 が属する GI が最も耐性が強く、次いで GII、GIII、GIV の順であることが報告されている^{5,8)}。一方、Boudaud et al は⁹⁾、遺伝子群による評価結果とは異なり、遺伝子群に属する株を用いた評価では塩素消毒において GII に属する株の GA が GI に属する株の MS2 より耐性が強いと報告している。上記の報告例では^{8,9)}、単離した株や実験室株を高濃度に培養し、試験水のイオン交換水に添加した消毒実験にて評価を行っている。しかし、下水試料のように汚泥や濁質等を含む場合、水中での存在形態（汚泥や濁質等への吸着有無）により消毒効果が異なることが報告されており^{15,16)}、特に FRNAPH は遺伝子群により表面特性が異なるため水中での存在形態が異なることが報告されている^{17,18)}。そのため、実際の下水処理水を試験水として、また、その中に存在する FRNAPH 遺伝子群を用いた場合は消毒効果が異なる可能性がある。よって、下水処理場にてウイルスに対する消毒効果の指標として FRNAPH を用いる場合には、実際に下水処理水中に存在する FRNAPH 遺伝子群を用いた検討を行い、安全側の評価となる遺伝子群を選定する必要があると考えられる。

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

2. 研究方法

2.1 試験水の採水

本研究では、A 下水処理場内に設置されている標準活性汚泥処理装置の最終沈殿池後の処理水を試験水として用いて塩素と紫外線消毒実験を行った。試験水の水質を表-1 に示す。塩素および紫外線消毒効果に最も影響する NH₄-N 濃度と紫外線 (254 nm) の透過率はそれぞれ 0.05 ~ 0.27 mg/L と 75 ~ 81% でありばらつきが小さかったため、塩素と紫外線消毒に用いた試験水間における水質の差は大きくないと考えられた。

2.2 塩素消毒実験

2.1 で採水した試験水を用いて回分式塩素消毒実験を 6

表-1 試験水の水質

| 水質項目 | 試験水 (n = 12) |
|---------------------------|--------------|
| SS (mg/L) | 3.4-6.7 |
| Turbidity (NTU) | 0.5-2.8 |
| COD _{cr} (mg/L) | 11-27 |
| pH | 6.4-7.4 |
| T-N (mg/L) | 15-22 |
| NH ₄ -N (mg/L) | 0.05-0.27 |
| T-P (mg/L) | 3.5-5.2 |
| UV254 (Abs) | 0.093-0.125 |
| UV254 (%) | 75-81 |

回実施した。室温 (20~25°C) 下でマグネチックスターラーにより完全混合させながら初期投入塩素濃度を 1、2、3、4 mg-Cl/L とし、接触時間は 20 分間とした。しかし、実験で用いた試験水には、感染力を有する野生株の FRNAPH 遺伝子群が消毒後に全て検出されるほど高濃度に存在していない。そのため、試験水に 2.4 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 10⁶~10⁹MPN/L となるように添加し、添加なしと同様な条件にて 6 回の塩素消毒実験を行った。

本研究では、残留遊離塩素濃度 (C) と接触時間 (t) の積で定義される Ct 値を用いて評価した。塩素消毒実験において、塩素添加直後から 5 分間の経過時間ごとに残留遊離塩素を Pocket Colorime-ter™ II (Hach) を用いた DPD 法により測定し、その平均残留遊離塩素濃度にその時の接触時間を乗じ、最終的に 20 分間における積により Ct 値を算出して評価した。接触時間が 20 分に達した試料は、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加して試験水中の残留塩素を中和し、この試料を用いて FRNAPH を定量した。なお、SS 濃度が 4~7 mg/L の試験水を用いた予備塩素消毒実験により、DPD 法による残留遊離塩素濃度の測定時において、濁質の有無 (0.45 μm のメンブレンフィルターによるろ過の有無) による測定値への影響は顕著でなかったため、ろ過を行わずに残留遊離塩素濃度を測定した。また、実験結果には含めていないが、全ての塩素消毒実験において DPD 法により全残留塩素濃度も測定しており、モノクロラミンを含む結合塩素による消毒効果の評価も行っている。しかし、結合塩素による FRNAPH への不活化効果は遊離塩素と比べてかなり低かったことから、全残留塩素濃度からの Ct 値を用いて評価した結果において、Ct 値による不活化効果に明確な傾向が見られなかった。そのため、本消毒実験では残留遊離塩素濃度からの Ct 値による不活化効果の結果のみを示している。

2.3 紫外線消毒実験

2.1で採水した試験水と光化学反応用装置(ウシオ電機)を用いて回分式紫外線消毒実験を6回実施した。紫外線ランプは6Wの低圧紫外線ランプ(ULO-6DQ、ウシオ電機)を用い、実験開始前に照度を安定させるために30分以上のウォームアップを行った。光化学反応用装置を4つ用いて試験水をそれぞれ500 mL入れた後、マグネチックスターラーにより完全混合させながら、それぞれ所定の時間、紫外線を照射し、照射前後でのFRNAPH遺伝子群の濃度を定量した。塩素消毒実験と同様に紫外線消毒実験においても高濃度に培養したFRNAPH遺伝子群を添加した試験水を用いて、添加なしと同様な条件にて6回の紫外線消毒実験を実施した。

各試験水を用いた紫外線消毒実験における紫外線照射量は、参考文献¹⁹⁾に準拠し、実験直後にヨウ素/ヨウ素酸イオンによる指標化学物質を用いた化学線量計により算定した。

2.4 FRNAPHの定量および高濃度FRNAPH液の作製

感染力を有しているGI~GIVのFRNAPH遺伝子群の定量にはIC-PCR⁴⁾を用いた。この方法では、宿主菌の*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49(以下、WG49)を用いて、試料中に存在する感染力を有したFRNAPHを液体培養し、PCR法により増殖を確認する方法である。定量にはMPN法を用いており、0.01~100 mLまでの試料を10倍段階の3連で培養することで定量値を得ており、単位はMPN/Lとして整理した。本実験での検出下限値は3 MPN/L(約0.5 log₁₀[MPN/L])である。

試験水中に存在する感染力を有したFRNAPH遺伝子群が消毒後において検出率が低くなるのが想定されたため、試験水中に存在するFRNAPH遺伝子群をそれぞれ人為的に培養して高濃度FRNAPH液を作製し、実験に用いた。IC-PCRによる試験水中のFRNAPH濃度測定において、段階希釈した試料も含めてFRNAPHのGI-GIVの遺伝子群がそれぞれ高濃度で検出された液体培地を用い、宿主菌のWG49を含む新たな液体培地にGI-GIVの遺伝子群をそれぞれ添加した。この混合液を37°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液を消毒実験用試験水に直接添加すると、培地成分により試験水の水質性状が変化するため、試験水に添加する直前にAmiconUltra-15(分画分子量100 kDa、Merck)を用いて培地成分を取り除いた。作製したGI-GIVそれぞれの高濃度FRNAPH液において、他の遺伝子群は不検出あるいは低濃度になっていることを確認している。

2.5 大腸菌指標に関わる調査

大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価は、上記2.1のA下水処理場にて通年にわたり調査を行った。試料は流入下水、生物学的高度処理水、二次処理水、放流水とし、定量法はXM-G培地の混釈法、放流水の一部はQTトレイのMPN法とした。また、大腸菌の検出法の評価では、国内、海外メーカーから市販されている特定酵素基質培地A-Gの7種類を用いた。A~F培地には寒天が含まれていることから混釈法とフィルター法にて、培地Gでは測定試料と試薬混合による発色状況の陽性数を基にしたMPN表から求める最確数法で各々定量を行った。培養温度・時間については各培地の取り扱い説明書に従った。対象試料は放流水を想定して二次処理水を次亜塩素酸ナトリウムで塩素消毒しチオ硫酸ナトリウムで中和を行い、大腸菌濃度を20 CFU/mL程度とした時の試料を主に評価を行った。各培地による大腸菌の定量は、同一試料について同時測定、同一人物による操作とした。

3. 研究結果および考察

3.1 試験水中のFRNAPH遺伝子群の存在濃度

塩素と紫外線消毒実験で用いた全ての試験水(n=6)で、感染力を有する野生株のFRNAPH遺伝子群が検出された(表-2、添加なし)。平均濃度では、GIIが3.2 log₁₀(MPN/L)と最も高く、次にGIが2.8 log₁₀(MPN/L)、GIIIが2.6 log₁₀(MPN/L)、GIVが最も低く1.9 log₁₀(MPN/L)であった。人為的に高濃度に培養して添加した系の試験水中のFRNAPH遺伝子群の平均濃度は、7.3~7.9 log₁₀(MPN/L)であった(表-2、添加あり)。

表-2 試験水におけるFRNAPH遺伝子群の存在濃度

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

3.2 塩素消毒によるFRNAPH遺伝子群の不活化効果

塩素消毒による試験水中に存在する野生株のFRNAPH遺伝子群(添加なし)の不活化効果(inactivation)をIC-PCRにより定量し算出した結果(図-1の○)、Cr値の増加に伴

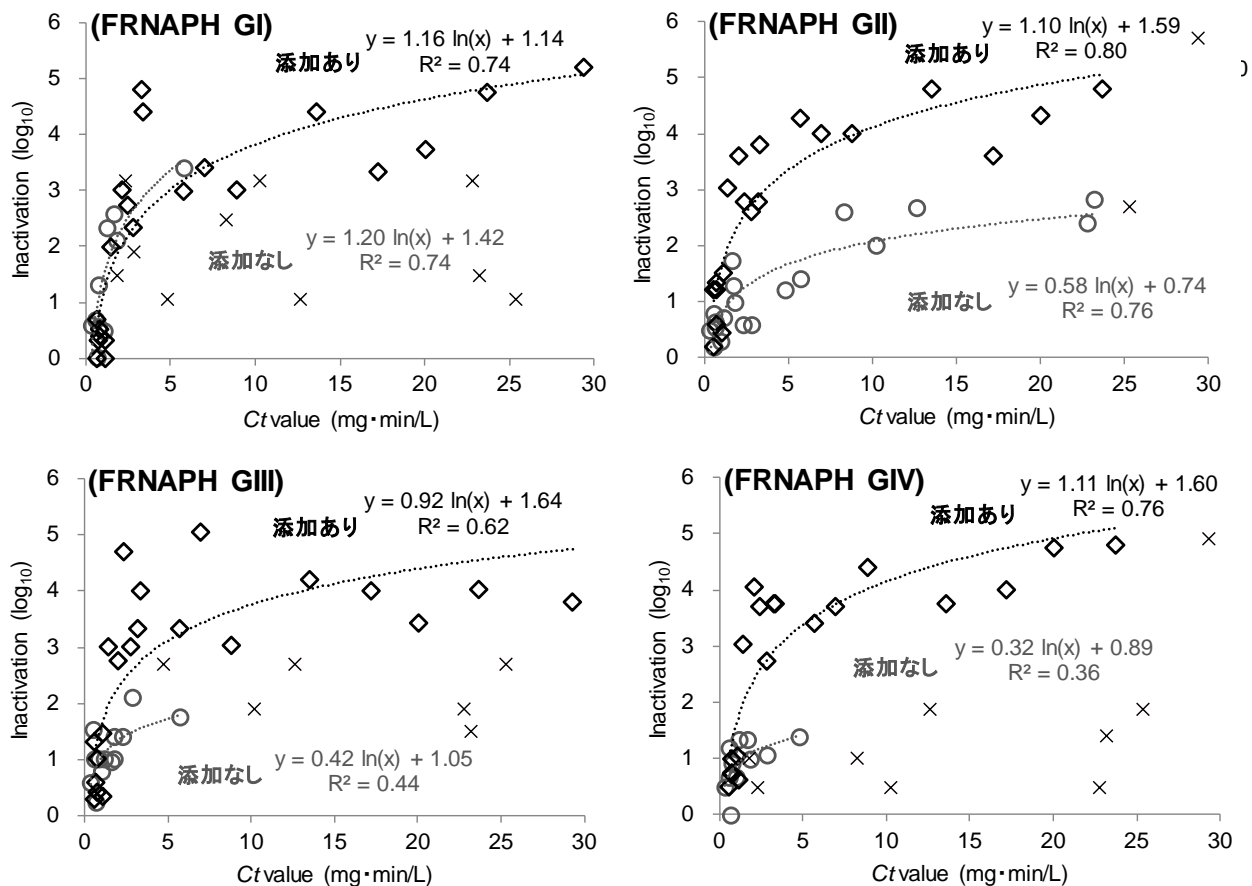


図-1 塩素消毒実験における感染力を有したFRNAPH遺伝子群の不活化効果の比較
 (○: 添加なし, ◇: 添加あり, ×: 塩素消毒後に検出下限以下であり検出下限値から算出した値)

い、全てのFRNAPH遺伝子群の不活化効果においてテーリング現象が見られた。不活化結果から近似曲線を求めてCt値5 mg·min/Lでの不活化効果を算出すると、GIは3.4 log₁₀、GIIは1.7 log₁₀、GIIIは1.7 log₁₀、GIVは1.4 log₁₀であり、GIが最も高く、GII、GIII、GIVは同程度であった。また、人為的に高濃度に培養したFRNAPH遺伝子群を添加した塩素消毒実験での不活化効果は(図-1の◇)、添加無しの場合と同様にCt値の増加に伴いテーリングした。不活化結果から近似曲線を求めてCt値5 mg·min/Lでの不活化効果を算出すると、GIは3.0 log₁₀、GIIは3.4 log₁₀、GIIIは3.1 log₁₀、GIVは3.4 log₁₀であり、遺伝子群の間に大きな差はなかった。NGS解析で用いた塩素①(Ct値: 24 mg·min/L)での不活化効果は、GIは4.8 log₁₀、GIIは4.8 log₁₀、GIIIは4.0 log₁₀、GIVは4.8 log₁₀であり、GIIIがやや低くその他の遺伝子群は同程度であった。また、塩素②(Ct値: 20 mg·min/L)での不活化効果は、GIは3.8 log₁₀、GIIは4.3 log₁₀、GIIIは3.4 log₁₀、GIVは4.8 log₁₀であり、GIVが最も高く、GII、GI、GIIIの順であり、GIIIが最も低かった。一方、添加なしとありの不活化効果を比較すると、GIは大きな差はなかったが、そ

他の遺伝子群(GII~GIV)においては添加なしの方が添加ありと比べて低かった。

河川水や下水試料からGI~GIIIの遺伝子群に属する2~4種類の株を単離・培養して添加し、塩素消毒実験を実施した報告例では、GI~GIIIの塩素耐性に差異が小さいことが確認されている(Ct値: 0.4 mg·min/L)²⁰。本消毒実験において下水処理水中に存在するFRNAPH遺伝子群を高濃度に培養して添加した結果でも、遺伝子群の間で塩素消毒に対する耐性に大きな差はなかった(図-1の◇、Ct値: 5 mg·min/L)。一方、下水処理水中に元々存在する濃度で消毒実験を行った結果(図-1の○)と、高濃度に培養して添加した結果(図-1の◇)を比較すると、GI以外の遺伝子群(GII~GIV)は添加しない場合において消毒効果が低かった。このような差が生じた理由としては、下水処理水中での存在形態がFRNAPH遺伝子群により異なることが考えられる。GIは他の遺伝子群と比べて下水処理での吸着・沈殿による除去効果が著しく低いことが報告されており^{6, 7, 14}、下水処理水中での存在形態としては汚泥や濁質等に吸着せず浮遊して存在している可能

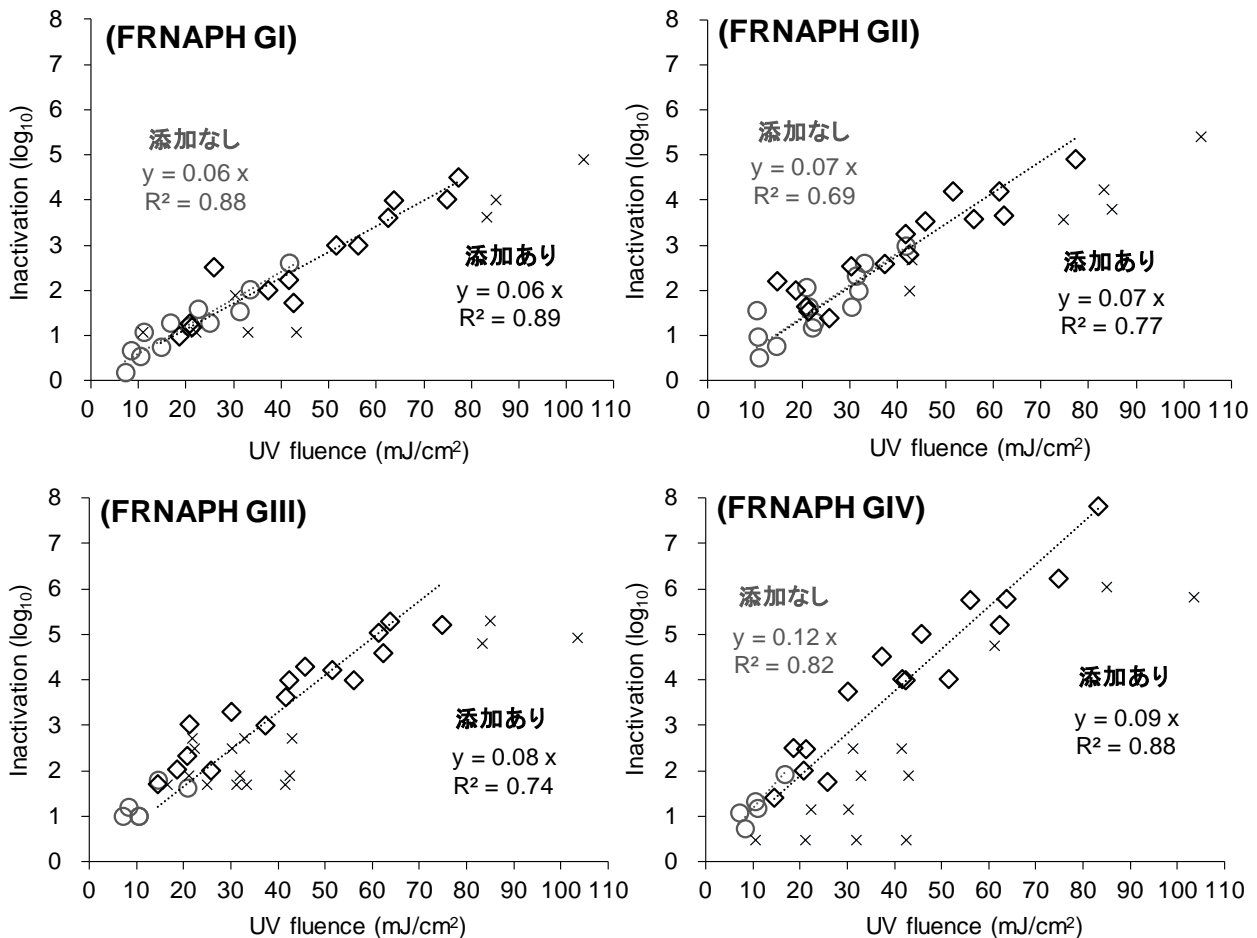


図-2 紫外線消毒実験における感染力を有したFRNAPH遺伝子群の不活化効果の比較
 (○: 添加なし、◇: 添加あり、×: 紫外線消毒後に検出下限以下であり検出下限値から算出した値)

性が高い。一方、その他の遺伝子群はGIと比べて下水処理での除去効果が高いため、下水処理水中において多くが汚泥や濁質等に吸着して存在していることが考えられる。塩素消毒では、水中で浮遊しているウイルスと比べて濁質等に吸着している方が不活化効果が低い¹⁵⁾ ¹⁶⁾。そのため、GIと比べてその他の遺伝子群 (GII~GIV) は塩素による不活化効果が低かったことが考えられる。しかし、添加したケースにおいて遺伝子群の間に差がなかったのは、高濃度にして添加しているため吸着部位が飽和状態になり、ほとんどが浮遊している状態であったことから存在形態に関係なく塩素消毒による不活化効果が得られたことが考えられた。

以上の結果から、下水処理水中のFRNAPH遺伝子群の不活化効果において、元々存在した濃度で評価した結果、GIと比べてGII~GIVの方が低かったことから、これらを指標として用いる場合、安全側の評価となることが確認された。また、塩素消毒によるFRNAPH遺伝子群の消毒効果の差異は、遺伝子群により耐性が異なるのではなく下水処理水中での存在形態が消毒効果に影響を及ぼし

ている可能性が示唆された。今後、この存在形態による塩素消毒での不活化効果への影響についてより明確にするため、更なる検討が必要であると考えられる。

3.3 紫外線消毒によるFRNAPH遺伝子群の不活化効果

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

外線照射量:61 mJ/cm²)での不活化効果は、GIは3.8 log₁₀、GIIは4.2 log₁₀、GIIIは5.0 log₁₀、GIVは4.8 log₁₀であり、GIが最も低く、GII、GIV、GIIIの順であった。紫外線②(紫外線照射量:56 mJ/cm²)での不活化効果は、GIは3.0 log₁₀、GIIは3.6 log₁₀、GIIIは4.0 log₁₀、GIVは5.7 log₁₀であり、GIが最も低く、GII、GIII、GIVの順であり、GIVが最も高かった。

下水処理水を用いた膜と紫外線処理を組み合わせた処理プロセスにおいて、紫外線消毒でGIが最も紫外線に対する耐性が強く (k_i :0.04)、その次がGII (k_i :0.05)であったことが報告されている⁹⁾。また、下水処理場の最初沈澱池越流水中に存在するFRNAPH遺伝子群の紫外線感受性を評価した結果、GIが最も低く (k_i :0.04)、GII (k_i :0.06)、GIII (k_i :0.07)、GIV (k_i :0.09)の順であり⁹⁾、本研究の結果と一致した。この結果から、下水処理水中に存在するFRNAPH遺伝子群の中では、GIが紫外線消毒に対して最も耐性を有していることが確認された。GIに属する株であるMS2がヒトノロウイルスに近縁のマウスノロウイルスやカリシウイルスのみならず、ポリオウイルス、ロタウイルス、A型肝炎ウイルス、コクサッキーウイルスと比べても紫外線消毒に対する耐性がより強いことが既往研究により報告されている^{11)、12)、21)}。そのため、紫外線消毒による下水処理水中のウイルスに対する不活化効果を評価する上で、FRNAPHのGIは安全側の指標となることが考えられた。

一方、下水処理水中に元々存在する濃度で消毒実験を行った結果(図-2の○)と、高濃度に培養して添加した結果(図-2の◇)を比較すると、塩素消毒実験の結果とは異なり、FRNAPH遺伝子群の不活化効果に大きな差は無かった。塩素消毒と同様に紫外線消毒においても試験水中の汚泥や濁質等がウイルスへの不活化効果に影響することが考えられるが²²⁾、下水処理場の二次処理水の濁度範囲(0.2~2.5 NTU)では不活化効果に影響しなかったことや²²⁾、試験水中の濁質濃度を極端に高く調製した場合(UV254:0.4~4.4%)以外の紫外線透過率条件(UV254:56~70%)では粒子がない場合と不活化効果に有意な差が無かったことも報告されている²³⁾。このことから、本消毒実験で用いた試験水において、塩素消毒と比べて紫外線消毒では下水処理水中のFRNAPHの存在形態による不活化効果への影響は顕著でなかったことが考えられた。

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

3.4 大腸菌指標に関わる調査

各種下水試料を対象とした大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価結果について図-3に示す。流水下水では大腸菌群に占める大腸菌の割合は0.02~0.83であり、平均割合は0.27(中央値:0.23)であった。割合の変動要因は季節性が考慮され、夏季の高水温期では割合が高く、冬季では低い状況であった。その傾向を踏まえ、水温と割合について整理した結果を図-4に示す。水温と割合との相関関係が認められ、水温が24°Cを超えることで割合が0.4を超えるケースが多い状況となり、24°C以上のデータで平均割合を整理すると0.46、24°C以下では0.2となった。一定水温の基では大腸菌が増殖する報告²⁴⁾もあることから、高水温期では流入下水の流下過程において大腸菌が増殖することで割合が上昇したものと考えられた。生物学的処理水と二次処理水の結果では、割合は0.01~0.42であり、流入下水と比較して変動幅は小さくなった。平均割合は0.09~0.12(中央値:0.06~0.08)であり、流入下水と比較して平均割合が1/2~1/3に減少した。水温との関係では、26°Cを超えると割合が概ね0.2を超え、その平均割合は0.29、26°C以下では0.1(24°C以上の平均0.20、24°C以下は0.09)であり、流入下水と同様に水温の影響を受け割合が変動するものと考えられた。放流水については混釈法による定量では、大腸菌が不検出であるケースが多々見受けられたため、QTトレイによるMPN法の結果を示したが、この時の平均割合は0.07(中央値

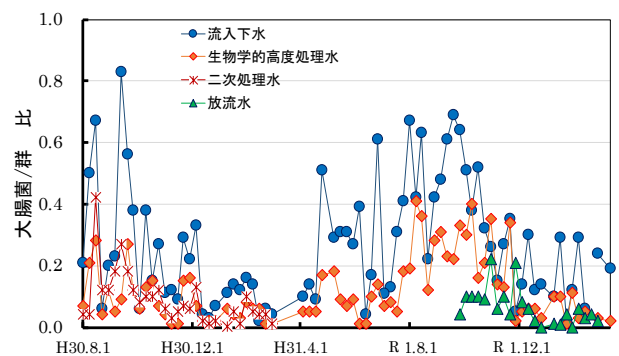


図-3 大腸菌/群比の推移

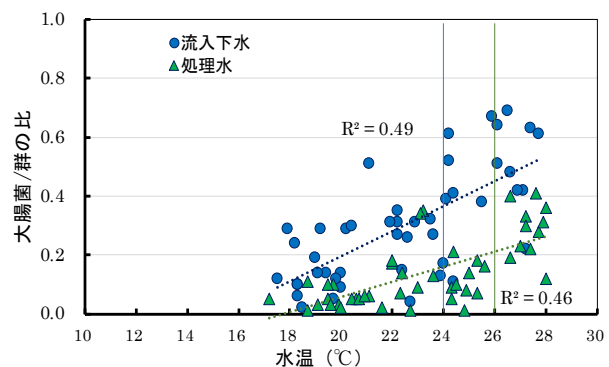


図-4 水温と大腸菌/群比の関係

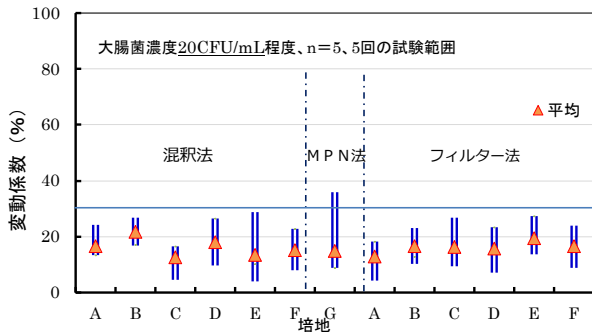


図-5 大腸菌濃度が20CFU/mL程度における各培地・手法の変動係数の比較

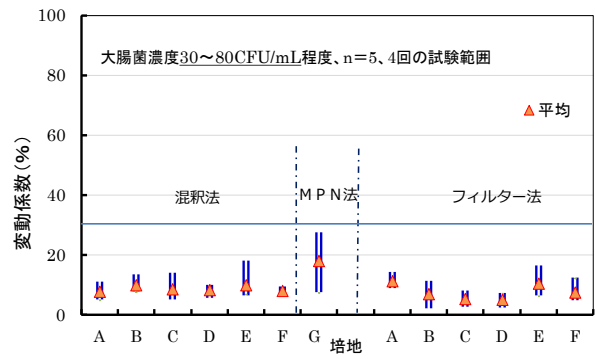


図-7 大腸菌濃度が30CFU/mL以上における各培地・手法の変動係数の比較

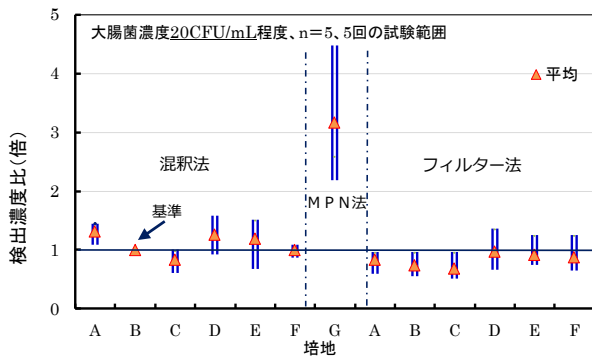


図-6 大腸菌濃度が20CFU/mL程度における各培地・手法の検出濃度比の比較

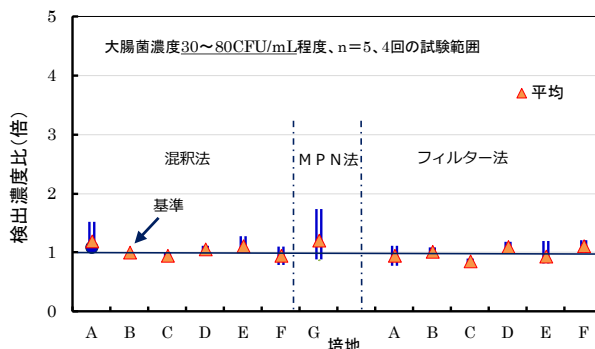


図-8 大腸菌濃度が30CFU/mL以上における各培地・手法の検出濃度比の比較

:0.06)であった。他の試料に比べデータ数が少ないことや、塩素消毒により菌数が低濃度であったことから水温と割合の関係性は見出せていない。

一方、全国54箇所の下水処理場を対象にした既往の調査例では、各種下水試料の大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は概ね20% (0.2)であったとする報告例²⁹⁾がある。本調査の処理水等の平均割合と比較してやや高い状況にあるが、調査の継続期間の違いや、地域ごとに下水試料の水温等が異なることが要因となり、割合に違いが生じたものと推定される。

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

比が0.70～0.98倍、混釈法は0.84～1.32倍の範囲内であった。

一方、大腸菌濃度を30～80 CFU/mLとやや高めた場合の評価結果を図-7、8に示す。変動係数の平均値の多くは10%以内で推移していた。B培地の定量値を基準(1.0倍)として各培地・手法の検出濃度比を整理すると、混釈法では0.95～1.20倍、フィルター法は0.86～1.11倍となった。特に、G培地のMPN法が1.21倍となり、他の培地・手法の定量値と比較して大差がない結果となった。試料中の大腸菌濃度が20 CFU/mLよりも高まることで、安定した定量値が得られるものと考えられた。

本定量結果では、大腸菌濃度が20 CFU/mL程度時にG培地のMPN法において検出濃度比が他の培地・手法と比較して乖離しており、この要因の解明が課題として生じた。この時の検出濃度比はB培地の混釈法を基準として最小値で0.70倍、最大値が3.18倍であった。B培地の混釈法で得られた定量値を100%の回収率と仮定すれば、C培地のフィルター法で70%、A培地の混釈法は132%、G培地のMPN法が300%を超える回収率となる。水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン²⁶⁾によれば、細菌試験を含めた機器分析によらない検査方法は本ガイドラインの対象外としているが、1つの尺度として農薬類の定量

に関わる目標値は、繰り返し精度（変動係数）が30%以内、真度（回収率）が70~130%としている。大腸菌の定量法に関わる回収率や変動係数の明確な基準はないが、本試験結果による変動係数は概ね10~20%以内で推移、回収率として仮定した値としては、大腸菌濃度が20 CFU/mL程度時にG培地のMPN法が300%を超えたが、その他の培地・手法では概ね目標値を満足するものと考えられた。

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

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

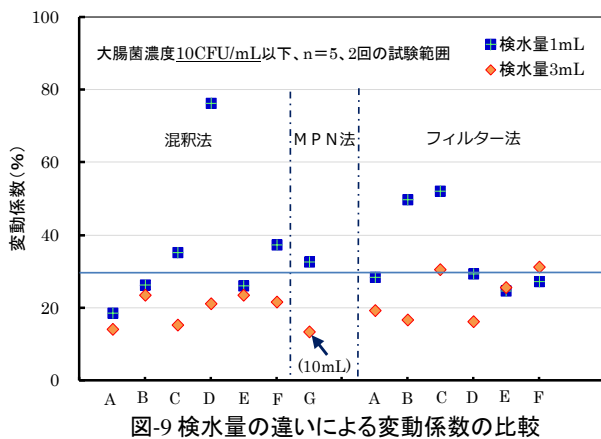


図-9 検水量の違いによる変動係数の比較

4. まとめ

本研究は、消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案に関わる調査・研究として、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている大腸菌ファージのF特異RNAファージ（FRNAPH）遺伝子群（GI~GIV）を対象に、塩素と紫外線消毒による不活化効果を評価することで、消毒処理によるウイルスの不活化効果において安全側の評価となる遺伝子群を選定した。また、大腸菌群から大腸菌指標への移行にあたり、従来指標との関連性を評価するため、大腸菌群に占める大腸菌の割合の調査とともに、放流水を想定して大腸菌を低濃度とした試料を対象に複数の特定酵素基質培地による検出量に関し比較評価を行った。以下に得られた結果を示す。

1) 塩素消毒による下水処理水中のFRNAPH遺伝子群の不活化効果において、高濃度に培養・添加した結果では遺伝子群の間に大きな差はなかったが、元々存在した濃度での結果ではGIと比べてGII~GIVの方が低かった。このことから、これらを指標として用

いる場合、安全側の評価となることが確認された。また、高濃度培養のFRNAPH添加有無による結果に差が生じた理由としては下水処理水中での存在形態が影響している可能性が考えられた。

- 2) 紫外線消毒による下水処理水中のFRNAPH遺伝子群の不活化効果は、GIVが最も高く、GIII、GII、GIの順であり、GIが最も紫外線に対する耐性が強かった。そのため、紫外線消毒による下水処理水中のウイルスに対する不活化効果を評価する上で、FRNAPHのGIは安全側の指標となることが確認された。
- 3) 大腸菌群に占める大腸菌の割合は、水温による影響を受け変動するものと考えられた。
- 4) 塩素消毒により大腸菌濃度を20 CFU/mL程度とした試料の定量評価では、一部の培地・手法において検出濃度が他と比較して乖離した状況となった。
- 5) 大腸菌濃度が30~80 CFU/mL程度であれば、各培地・手法の変動係数の多くは10%以内で推移し、定量値に関しても大差がない結果となった。

謝辞

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

参考文献

- 1) 星川珠莉, 橋本敏一: 下水処理施設における紫外線消毒技術の実態調査、第55回下水道研究発表会講演集、pp. 1043-1045, 2018.
- 2) Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P., Estes, M.K.: Laboratory efforts to cultivate noroviruses, *J. Gen. Virol.*, Vol. 85, pp. 79-87, 2004.
- 3) Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Greening, G.E.: Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, *J. Virol. Methods*, Vol. 149, pp. 123-128, 2008.
- 4) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H.: Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 82, pp. 4244-4252, 2016.
- 5) Lee, S., Tasaki, S., Hata, A., Yamashita, N., Tanaka, H.: Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes, *Environ. Technol.*, Vol. 40, pp. 2527-2537, 2019.
- 6) Hata, A., Kitajima, M., Katayama, H.: Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in

- Japan, *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 114, pp. 545–554, 2013.
- 7) Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M. : Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant, *Sci. Total Environ.*, Vol. 520, pp. 32–38, 2015.
 - 8) Schaper, M., Durán, A. E., Jofre, J. : Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, pp. 3702–3707, 2002.
 - 9) Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C. : Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale, *Water Res.*, Vol. 46, pp. 2651–2664, 2012.
 - 10) Lim, M., Kim, J., Ko, G. : Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide, *Water Res.*, Vol. 44, pp. 3243–3251, 2010.
 - 11) Park, G.W., Linden, K.G., Sobsey, M.D. : Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation, *Letts. Appl. Microbiol.*, Vol. 52, pp. 162–167, 2011.
 - 12) De Roda Husman, A.M., Bijkerk, P., Lodder, W., Van Den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., Duizer, E. : Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 70, pp. 5089–5093, 2004.
 - 13) USEPA : *Guidelines for Water Reuse*. Environmental Protection Agency, Washington, DC., 2012.
 - 14) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H. : Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, *J. Water Health*, Vol. 17, pp. 50–62, 2019.
 - 15) Narkis, N., Armon, R., Offer, R., Orshansky, F., Friedland, E. : Effect of suspended solids on wastewater disinfection efficiency by chlorine dioxide, *Water Res.*, Vol. 29, pp. 227–236, 1995.
 - 16) Zhang, W., Zhang, X. : Adsorption of MS2 on oxide nanoparticles affects chlorine disinfection and solar inactivation, *Water Res.*, Vol. 69, pp. 59–67, 2015.
 - 17) Dika, C., Ly-chatain, M.H., Francius, G., Duval, J.F.L., Gantzer, C. : Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, Vol. 435, pp. 178–187, 2013.
 - 18) Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Gantzer, C. : Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes, *Water Res.*, Vol. 42, pp. 2769–2777, 2008.
 - 19) Rahn, R., O., Stefan, M., I., Bolton, J., R., Goren, E., Shaw, P., Lykke, K. R. : Quantum yield of the iodide-iodate chemical actinometer: dependence on wavelength and concentrations, *Photochem. Photobiol.*, Vol. 78, pp. 146–152, 2003.
 - 20) 堂山貴広、原本英司 : 塩素消毒処理による大腸菌ファージ野生株の遺伝子型別の不活化効果、第 53 回日本水環境学会年会講演集、pp. 252、2019.
 - 21) Hijnen, W.A., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. : Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review, *Water Res.*, Vol. 40, pp. 3–22, 2006.
 - 22) Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R. : Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light, *Water Res.*, Vol. 39, pp. 3487–3500, 2005.
 - 23) 小熊久美子、小塩美香、Jenyuk Lohwacharin、滝沢智 : 水中の懸濁粒子が紫外線消毒効率に及ぼす影響、水環境学会誌、Vol. 40、pp. 59–65、2017.
 - 24) 諏訪守、安井宣仁、南山瑞彦 : 下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の実態、下水道協会誌論文集、Vol. 54(652)、pp. 89–96、2017.
 - 25) 諏訪守、李善太、重村浩之 : 下水試料に対する大腸菌定量手法の評価と下水処理場における大腸菌と大腸菌群の実態調査、下水道協会誌論文集、Vol. 56(676)、pp. 85–92、2019.
 - 26) 厚生労働省、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン (最終改正 : 平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 号第 1 号) .

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

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：山下洋正、對馬育夫

【要旨】

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

キーワード：ダム貯水池、プランクトン、細菌、次世代シーケンサー

1. はじめに

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

さらに、湖沼水質を把握する上で、藻類等の植物プランクトンのモニタリングは非常に重要である。藻類の中にはカビ臭物質や毒性物質を生産するものもあり、水の安全性確保の観点からも湖沼・ダム貯水池における藻類のモニタリングは非常に重要である。また、植物プランクトンの大量増殖が湖水の透明度や溶存酸素濃度の低下を引き起こすこともある²⁾。従来、ダム貯水池の動植物プランクトンのモニタリングは、「河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】V. 動植物プランクトン調査」³⁾ に準じて行われ、光学顕微鏡

を使用した検鏡による同定が行われている。しかしながら、同定には熟練した技術が必要で、対応できる技術者も限られており、形態により判断しているため、形態が非常に似通った植物プランクトンは判断が困難である場合がある。また、カビ臭物質産生プランクトンやアオコの原因となる植物プランクトンは、主にシアノバクテリア（藍藻）に属す細菌であり、一般的な植物プランクトンより小さく、光学顕微鏡での同定が困難である。

一方、近年、ゲノム解析技術の急速な発展により、大規模 DNA 塩基配列データの取得がより手軽に行えるようになった⁴⁾。本研究では、ダム貯水池水質の維持管理に有効な手法の開発を目指し、次世代シーケンサー（NGS：New Generation Sequencer）を用いた DNA 塩基配列に基づく動植物プランクトン等のモニタリング手法の開発を目指している。H28~29 年度は、細菌が持つ 16S rRNA 遺伝子に着目し、検出方法の検討等を行った。H30 年度は、真核生物が持つ 18S RNA 遺伝子にも着目し、ダム貯水池や湖沼から採取した水試料を用い、月別の動植物プランクトン及び細菌を検出した結果について報告した。R1 年度は、ダム貯水池から採取した水試料について、NGS を用いて検出された動植物プランクトンおよび細菌の結果と熟練者が光学顕微鏡を用いて検出した結果を比較し、NGS の

有用性を確認した。

2. 実験方法

2.1 対象試料

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

2.2 NGSによる塩基配列解読

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

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

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

2.3 光学顕微鏡による同定

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

3. 結果と考察

3.1 NGSで同定された細菌

NGSを用いてAダム及びBダムで採水した試料に含まれる細菌由来のDNA配列を解析した。解析の結果、それぞれから約10万リード（取得データ量）分の塩基配列データを取得することができた。取得したリードを約20万種のDNA配列データが登録されているデータベース（細菌データ：約17万種、プランクトンデータ：約3万種）と照合し、それぞれの種を同定した。同定の結果、1リード以上検出された種はAダムで448種、Bダムで556種であり、Bダムの方が細菌種の多様性が高かった（図1）。また、AダムとBダムから共通して検出された種は278種であった。

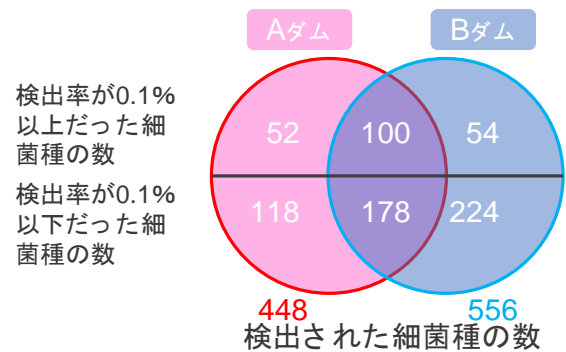


図1 NGSで同定された各ダムにおける細菌種数

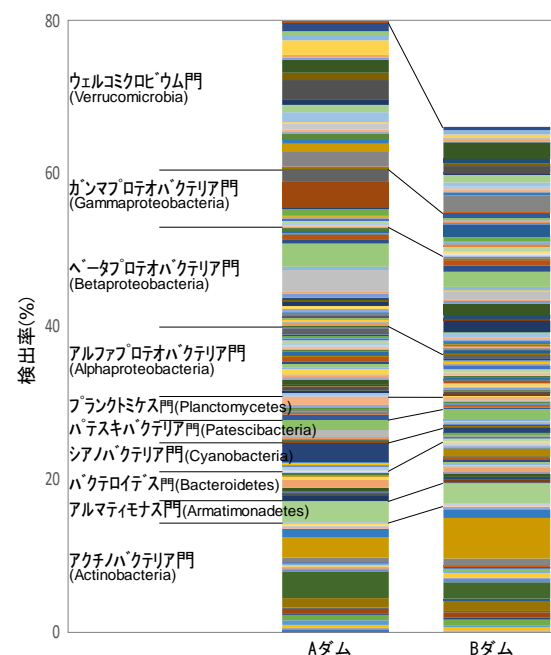


図2 NGSで同定された各ダムにおける細菌構成（検出率0.1%以上）

NGSを使うことで、検出率（検出リード数/全取得リード数）が極めて低い種（0.001%程度）でも検出可能であることが示された。検出率が0.1%以上だった種は、Aダムで152種、Bダムで154種、共通して検出された種は100種であった（図1）。

図2に各ダムにおいて検出率が0.1%以上だった細菌の構成を示す。図の積み上げ棒グラフで色分けされた領域は、検出された種を示している。門レベルの比較において、各ダム貯水池間で検出率に大きな差はなかったが、ウェルコミクロビウム門は、Aダムでは検出率が約20%を占めたのに対して、Bダムでは検出率が約10%だった。ウェルコミクロビウムは未分離培養株が多く生理生態が不明な種も多いが、メタン酸化細

菌が含まれることが知られている⁶⁾。A ダムからは、同様にメタン酸化細菌として知られるガンマプロテオバクテリア綱メチロバクター属(*Methylobacter* sp.)が比較的多く検出されたことから、メタン酸化細菌の生育に適した環境になっていることが示唆された⁷⁾。また、シアノバクテリア門からはアオコやカビ臭の原因となる種は検出されず、シネココッカスに近縁な種(*Synechococcus* sp.)が検出された。

3. 2 NGSで検出されたプランクトン

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

3. 3 光学顕微鏡による同定結果とNGSとの比較

Aダム及びBダムにおける光学顕微鏡による同定結果を表1に示す。光学顕微鏡による同定では、各ダムから16種ずつ、計25種の細菌・プランクトン(細菌1種、プランクトン24種)が同定された。それらのNGSでの検出状況もあわせて表1に示す。NGSでは、細菌を726種、プランクトンを522種同定できたことから、光学顕微鏡で同定されなかった多くの種が、NGSで検出されたことになる。今回、光学顕微鏡で同定された25種のうち、16種については、NGSで同種が検出された。また、7種については、解析に用いたデータベース上に登録のない種であったため、同種は検出されなかったが、その近縁種が検出されていたことから、データベースを更新することにより検出されるものと考えられる。珪藻の一種である*Stephanodiscus* sp.に関しては、光学顕微鏡では非常に多く検出されたのに対して、NGSではわずかししか検出されなかった。一方、NGSでは、この珪藻と近縁な*Thalassiosira* sp.が多数検出されていたため、

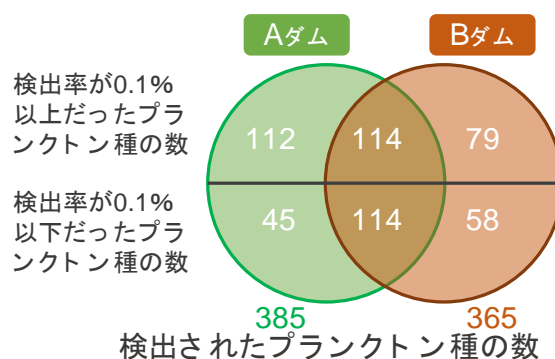


図3 NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン種数

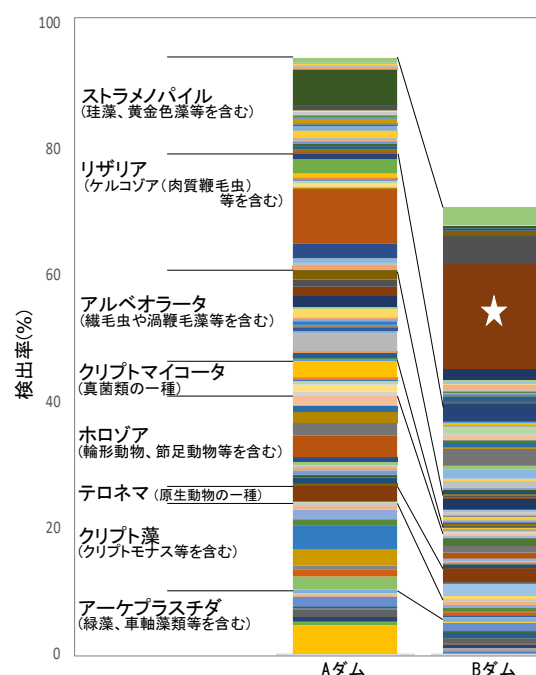


図4 NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン構成(検出率0.1%以上)

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

3. 4 NGSによる月別の検出結果の比較

各ダムにおいてNGSにより検出された月毎のプランクトンおよび細菌の種類（門レベル）と検出率を表2に示す。なお、DNA解析はプランクトンと細菌で別々に行われるため、それぞれの検出率の合計を100%としている。これらの結果から、肉質鞭毛虫であるケルコゾアや、珪藻や黄金色藻を含むストラメノバイルが2つのダムにおいて優占しており比較的どの月においても多く検出されていた。また、緑藻類もどの月においても比較的多く検出されていた。真菌類は採水期間において検出率の変動が大きく、また、Aダムでは7-8月で多く検出されているのに対し、Bダムでは9月で多く検出されていた。渦鞭毛藻も同様に採水期間において変動が大きく、Aダムでは5月、Bダムでは7月に多く検出されていた。細菌においては、アクチノバクテリア門、バクテロイデス門、ガンマプロテオバクテリア綱、ウェルコミクロビウム門が優占しており、どの月においても比較的多く検出されていた。

シアノバクテリア門は、Aダムにおいて9月と10月、Bダムにおいて9月に比較的多く検出され、それ以外の月ではあまり検出されなかった。また、検出されたシアノバクテリアのほとんどが *Synechococcus* sp.であった。10月の試料について、光学顕微鏡で観察した結果（表1）では、シアノバクテリア門である *Synechococcus* sp.はAダムからは検出されているが、Bダムからは未検出であった。一方、NGSを用いたBダム10月の結果では、検出された全73,422リードのうち639リードの *Synechococcus* sp.が検出（検出率0.87%）された。したがって、NGSでは、光学顕微鏡では捉えきれない低濃度の生物の検出が可能であることが示唆された。Bダムは、過去に、アオコ・カビ臭の発生が報告されたことのあるダムであるが、調査年度においては、アオコやカビ臭は発生していない。また、淡水赤潮の原因となる *Peridinium* sp.が属する渦鞭毛藻もAダム5月、Bダム7月で比較的多く検出されたが、10月の光学顕微鏡観察では検出されてお

表1 光学顕微鏡により同定された種とそれらのNGSによる検出状況の比較

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

表2 NGSによって検出された各月のプランクトンおよび細菌の検出割合(%)

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

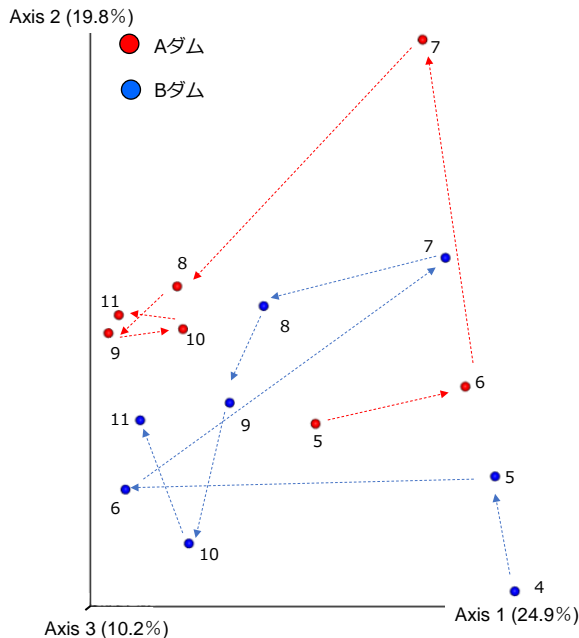


図5 各サンプルから検出された種構成の類似度比較(プロット横の数字はサンプリング月を示す)

らず淡水赤潮が発生したとの報告はなかった。今後は、これらの水質変化現象の発生が想定されるダム貯水池で原因種のモニタリングを行う予定である。

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

4. まとめ

本研究では、ダム貯水池の水試料に含まれる細菌および動植物プランクトンについて、NGS および光学顕微鏡による同定結果を比較した。その結果、光学顕微鏡で同定されなかった多くの種が、NGS で検出されたことを確認した。また、光学顕微鏡で同定された種は NGS でほぼ検出可能であった。さらに、アオコ

や淡水赤潮の原因藻類について、光学顕微鏡観察では捉えきれない低濃度での検出が可能と考えられ有用性が示唆された。今後、本技術が確立すれば、ダム貯水池における微生物由来の水質変化現象（アオコ、カビ臭、淡水赤潮等）に対して、簡便で迅速、低コストで発生原因や発生箇所を特定することができ、効率的な水質の維持管理が期待される。

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

参考文献

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

13.1.4 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（藻類増殖に 関与する水質項目の影響評価）

担当チーム：水環境研究グループ（水質チーム）
研究担当者：山下洋正、對馬育夫、村田里美、
服部啓太

【要旨】

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

キーワード：湖沼・ダム貯水池、アオコ、*Microcystis aeruginosa*、微量元素、藻類生長試験

1. はじめに

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

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

2. 方法

2.1 鉄濃度を調整した培地の作成方法

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

に供した。

2.2 藻類生長試験

生長試験に供した藻類株は、国立環境研究所 NIES Collection より分譲された *M. aeruginosa* (NIES-87 株) を使用した。継代培養には MA 培地を用いて、温度 25°C、明暗周期 12 時間、フラスコ振とう培養の条件で株の維持を行った。

生長試験では多数の培地の検討を効率的に実施するために、96 ウェルのマイクロプレート上で *M. aeruginosa* を培養した。生長試験では各培地 200 µL と

表-1 MA 培地成分表

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

約 2.2×10^6 cells/mL に濃度調整した藻類細胞懸濁液 20 μ L をウェルに添加し、温度 25 ± 1 $^{\circ}$ C、光強度 40 μ mol/m²/s 連続照射の条件下で培養した。*M. aeruginosa* の生長の定量には、波長 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（CHROMATE 製）で測定した。予備試験の結果より、試験開始から 8 日目で吸光度の増加が収束する傾向が見られたため、生長の傾向が明確に表れる 3、5、7 日目に吸光度の測定を行った。各培地に対して 5 ウェルを用いて培養を行い、以下では測定した吸光度は平均値（n=5）で評価した。CV（変動係数）は 10% 程度であったため統計的な評価は本研究では行わなかった。

また、生長試験におけるプレート間の誤差を補正するため、各プレートに金属 5 種を含む培地に *M. aeruginosa* を添加した系（Control）と金属 5 種を含む培地に *M. aeruginosa* を添加していない系（Blank）を加え、生長試験を行った。それらの吸光度を用いて次の式に示す生長指数により、各培地の生長を評価した。

$$\text{生長指数} = \frac{\text{Sample吸光度}_{450\text{nm}} - \text{Blank吸光度}_{450\text{nm}}}{\text{Control吸光度}_{450\text{nm}} - \text{Blank吸光度}_{450\text{nm}}}$$

3. 結果と考察

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

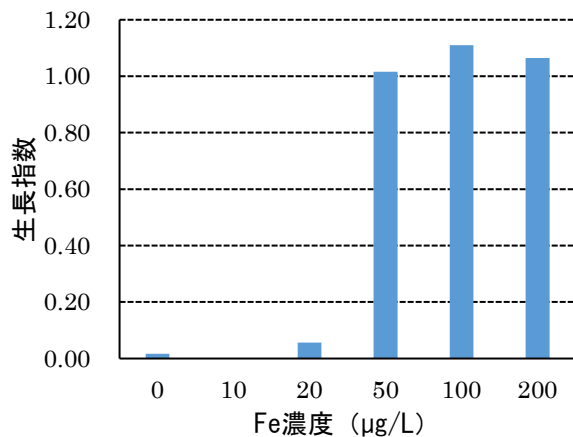


図-1 Fe 濃度と藻類生長指数の関係

であることが再確認された。

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

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

4. まとめ

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

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

参考文献

- 1) 藤本尚志、福島武彦、稲森悠平、須藤隆一：全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子との関係、水環境学会誌、18 巻 11 号、pp.901-908、1995
- 2) 中島進、八木正一：Oscilla teunis の増殖と 2-メチルイソボルネオール の産生に及ぼす微量金属の影響、日本水処理生物学会誌、Vol.26、No.2、pp.44-55、1995
- 3) 小川文章、對馬育夫、村田里美、服部啓太：底層環境に着目した停滞性水域の水環境管理技術に関する研究（藻類増殖に関与する 水質項目の影響評価）、平成 30 年度 土木研究所研究開発プログラム報告書（13 地域の水利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発）、pp.22-

25、2019

- 4) Nagai Takashi, Akio Imai, Kazuo Matsushige, Takehiko Fukushima: Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation, *Limnology*, 8, pp.261-270, 2007

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

13.1.5 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、適応策の検討）

担当チーム：水工研究グループ（水理）

研究担当者：石神孝之、宮川仁、中西哲

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：山下洋正、對馬育夫、服部啓太

【要旨】

本研究では、気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える影響についての将来的な予測に取り組んでいる。今年度は、貯水池内における濁質の長期的な挙動をより実現象に則した計算のためのモデルの改良を行った。モデルの改良には長期間の貯水池濁質挙動を検討するために、計算コストの小さい乱流モデルを採用した。乱流モデルには基準となる中立状態の鉛直渦混合係数という不確定なパラメータが存在するため、実際の濁質挙動を再現できるようパラメータを変化させ感度分析を行った。感度分析は、東北地方の特定のダムを対象に、貯水池形状と洪水規模を変化させる事によって再現性を確認した。

キーワード：地球温暖化、湖沼・ダム貯水池、水質変動予測モデル、濁水長期化

1. はじめに

地球温暖化が水環境に与える影響は徐々に顕在化しており、現在における全ての温室効果ガス排出とその他の強制力因子は、今後数十年にわたる気候変動の速度及び程度に影響を及ぼすと報告されている¹⁾。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²⁾」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³⁾」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、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っている。

濁質の貯水池への流入は、濁水長期化および堆砂への影響が大きい。気候変動下でも、流入条件の変化や

貯水池の成層の形成が変化することなどによって、濁質の貯水池内挙動が変化する可能性がある。そこで、令和元年度では、貯水池内における濁質の長期的な挙動をより実現象に則するよう表現できるモデルの改良を行った。

2. 既存モデルの改良

2.1 改良方針

貯水池の水質予測における重要なパラメータの1つとして鉛直拡散係数が挙げられる。鉛直拡散係数は水深方向の水質の混合度合いに影響を及ぼすため、特に、洪水時に流入する濁水の挙動を予測する際に重要な役割を果たす。

表-1に鉛直拡散係数の設定方法を整理した。鉛直拡散係数は大きくわけて①定数モデル、②関数モデル、③乱流モデルの3つに大別することができる。このうち①と②は経験モデルと呼ばれ、対象水域の観測結果との比較によって最適な値を設定する方法である。一方、③は乱流モデルと呼ばれ、乱流の特性諸量によって鉛直拡散係数を算出する方法である。代表的な乱流モデルとしては、 $k-\epsilon$ モデルが挙げられる。

鉛直拡散係数は周辺地形や流況によって変化するため、上記3つに方法の中では③が最も精度が高い。しかし、計算すべき変数が増えるため計算負荷がかな

表-1 鉛直拡散係数の設定方法

| 鉛直拡散係数の設定方法 | 設定方法 | 適した対象期間 | 予測に適した水質現象 |
|-------------|-----------------------------------|---------|-------------|
| ① 定数モデル | ・全域一定値を設定 | ・長期 | ・水温、富栄養化 |
| ② 関数モデル | ・水理量の解析値を数式に代入して算出 | ・短期～長期 | ・水温、SS、富栄養化 |
| ③ 乱流モデル | ・流れの解析と合わせて乱流諸量を連立計算し、その特性量を用いて算出 | ・短期 | ・水温、SS |

り増大してしまう。一方、①や②は計算負荷が少なく済むため、長期間の水質予測を実施する場合に効果的である。過年度検討では気候変動による20年間の長期的な水質変化に着目してきたため、ダムサイトの水質や放流水質の統計的な変化を主な評価対象としてきた。そのような場合、①定数モデルでも十分評価可能であるが、本年度検討は貯水池規模や水深等を変化させた場合の水質問題が検討対象となるため、濁水長期化が発生する条件を適切に把握する必要があり、濁水(SS)の予測精度を従来モデルよりも高める必要がある。

そこで、本検討では既存モデルの①定数モデルよりも洪水時の濁水現象を精度よく再現可能な②関数モデルを採用する。なお、関数形としては、従来から研究分野で実績の多くある「流速と密度勾配から算出されるリチャードソン数」を用いることとする。

2.2 改良方法

本検討で用いる乱流モデルの適用は、鉛直2次元水質予測モデルのうち流れに関する運動方程式中の渦動粘性係数を導入する事によって、乱流効果を考慮した改良モデルとする。

上記の鉛直拡散係数について、本検討ではリチャードソン数(R_i)を用いた関数とした。 z 方向を鉛直上向きとして、は一般に以下の式で表現される。

$$R_i = -g \frac{\left(\frac{\partial \rho}{\partial z}\right)}{\rho_0 \left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^2} \quad (1)$$

ここで、 ρ : 水の密度 (ML^{-3})、 u : 水平方向の流速 (LT^{-1})、 g は重力加速度 (LT^{-2}) である。

R_i は成層の安定性を表すパラメータとして研究分野では広く知られており、局所的な密度勾配と速度勾配を用いて表現される。貯水池で想定される水平流速及び密度の鉛直分布のイメージを図-1に示す。

水平流速は表層ほど大きい場合、速度勾配は正の値となる。一方、密度に関しては水温が高い水は低い水よりも密度が小さいため上層に分布する。よって、安定的な成層が形成されている場合、密度勾配は通常、

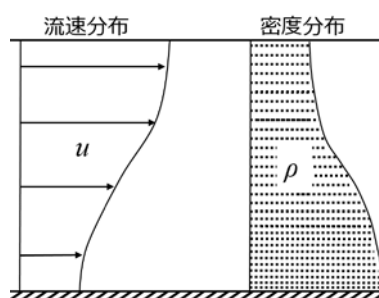


図-1 想定される流速分布と密度分布

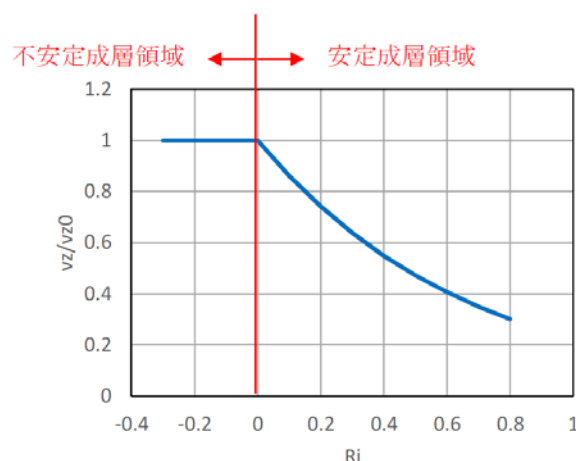


図-2 R_i と v_z の関係

負の値となる。

貯水池のように水温成層が発達する水域は密度成層場と呼ばれ、鉛直渦動粘性係数 v_z は R_i の影響を強く受けることが知られている。 v_z と R_i の関係性は多くの研究報告があるが、本検討では密度成層場において実績のある自然対数の関数形を用いることとした。

$$v_z = \begin{cases} v_{z0} e^{-aR_i} & (R_i > 0 : \text{安定}) \\ v_{z0} & (R_i < 0 : \text{不安定}) \end{cases} \quad (2)$$

ここに、 v_{z0} : 中立状態の v_z である。上式を踏まえた R_i と v_z の関係は図-2のようになる。なお、係数 a は研究者によって異なる値が報告されているが、本検討では岩佐⁴⁾が用いた $a=1.5$ を与えることとした。この図より、 R_i が正の値で大きいほど成層は安定し、その結果、鉛直方向の拡散係数は小さくなる。逆に R_i が負の値となる場合、成層は不安定となり鉛直方向の拡散が進む。

3. 改良モデルによる水質検証計算

3.1 計算条件およびケース

改良モデルによる水質の再現計算を実施した。検証計算は過年度検討で検証した東北地方の御所ダムを

表-2 計算条件

| 項目 | 内 容 |
|------|---|
| 対象領域 | 御所ダム |
| 対象期間 | 年最大時間流入量最大年：平成2年（1990年） |
| 流入条件 | 雫石川(本川)：(流入量)=0.73×(ダム全流入量) (流入水温)=(気温との相関により算出) (流入水質)=(L-Q式より算出した濃度) 南川(支川)：(流入量)=0.27×(ダム全流入量) (流入水温)=(気温との相関により算出) (流入水質)=(L-Q式より算出した濃度) |
| 放流条件 | 洪水吐：クレストゲート(敷高 EL.173.564m)とオリフィスゲート(敷高 EL.159.802m)の放流量を設定 取水施設：ダム地点に利水放流バルブ(敷高 EL.158.5m)と発電放流(表層取水)の放流量を設定 |
| 地形条件 | 水平グリッド(dx)：200mメッシュ 鉛直グリッド(dz)：1mメッシュ |
| 初期条件 | 流速：初期流速は全域でゼロ 水温：計算開始時の水温鉛直分布 貯水位：計算開始時の貯水位 |
| 気象条件 | 気温・湿度・日射・風速・雲量の観測データ |

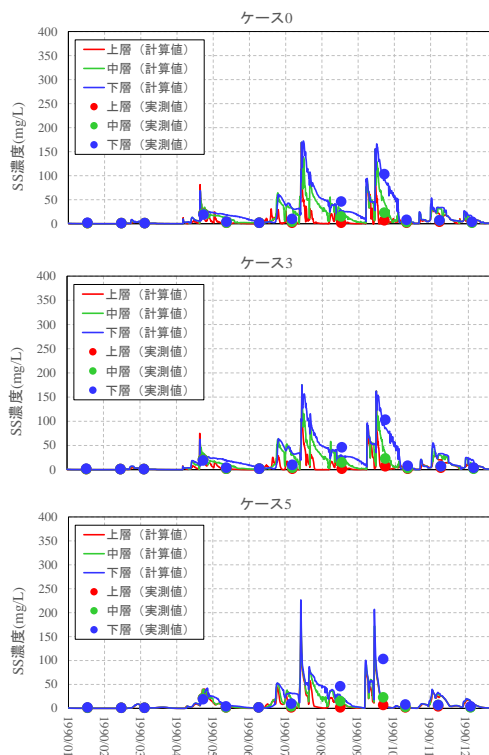


図-3 計算結果：ダムサイト地点のSS鉛直分布

表-3 計算ケース

| ケース | 乱流モデル | 中立状態の v_{z0} (m^2/s) |
|------|-------|-------------------------------|
| ケース0 | 無 | — |
| ケース1 | 有 | 10^{-6} |
| ケース2 | 有 | 10^{-5} |
| ケース3 | 有 | 10^{-4} |
| ケース4 | 有 | 10^{-3} |
| ケース5 | 有 | 10^{-2} |

対象とした。再現計算の計算条件を表-2に示す。なお、 v_{z0} については自然現象においては $10^{-6} \sim 10^{-2} m^2/s$ の範囲と考えられる。そこで本検討では既存モデル(乱流モデルなし)およびリチャードソン数を採用した乱流モデルについて、 $10^{-6} \sim 10^{-2} m^2/s$ までの範囲で5ケース、計6ケースを設定し、これらの範囲における感度分析を行った(表-3)。

3.2 計算結果

3.2.1 ダムサイト地点のSS濃度変動

計算結果として、ダムサイト地点での観測結果との比較を図-3、4に示す。なお、ケース1~ケース4

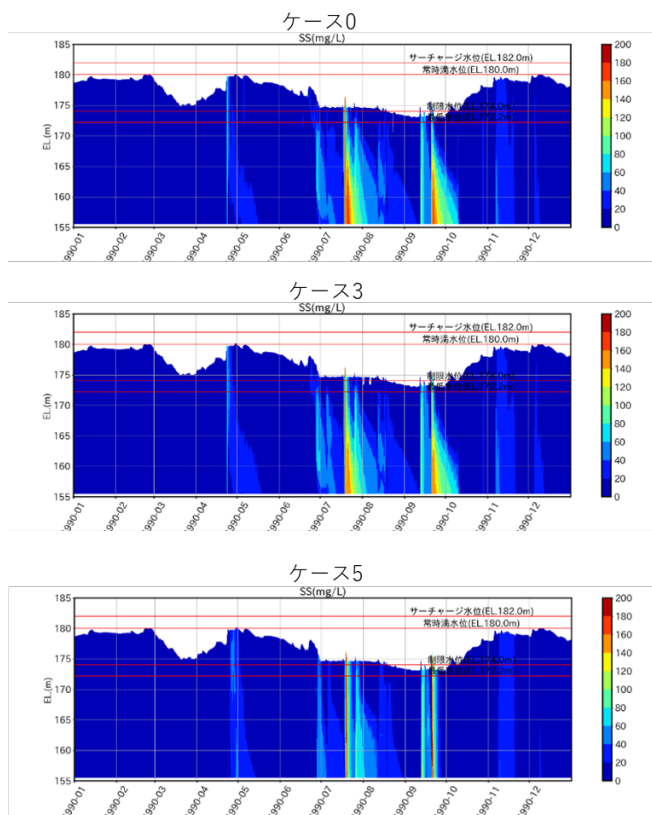


図-4 計算結果：ダムサイトのSSコンター

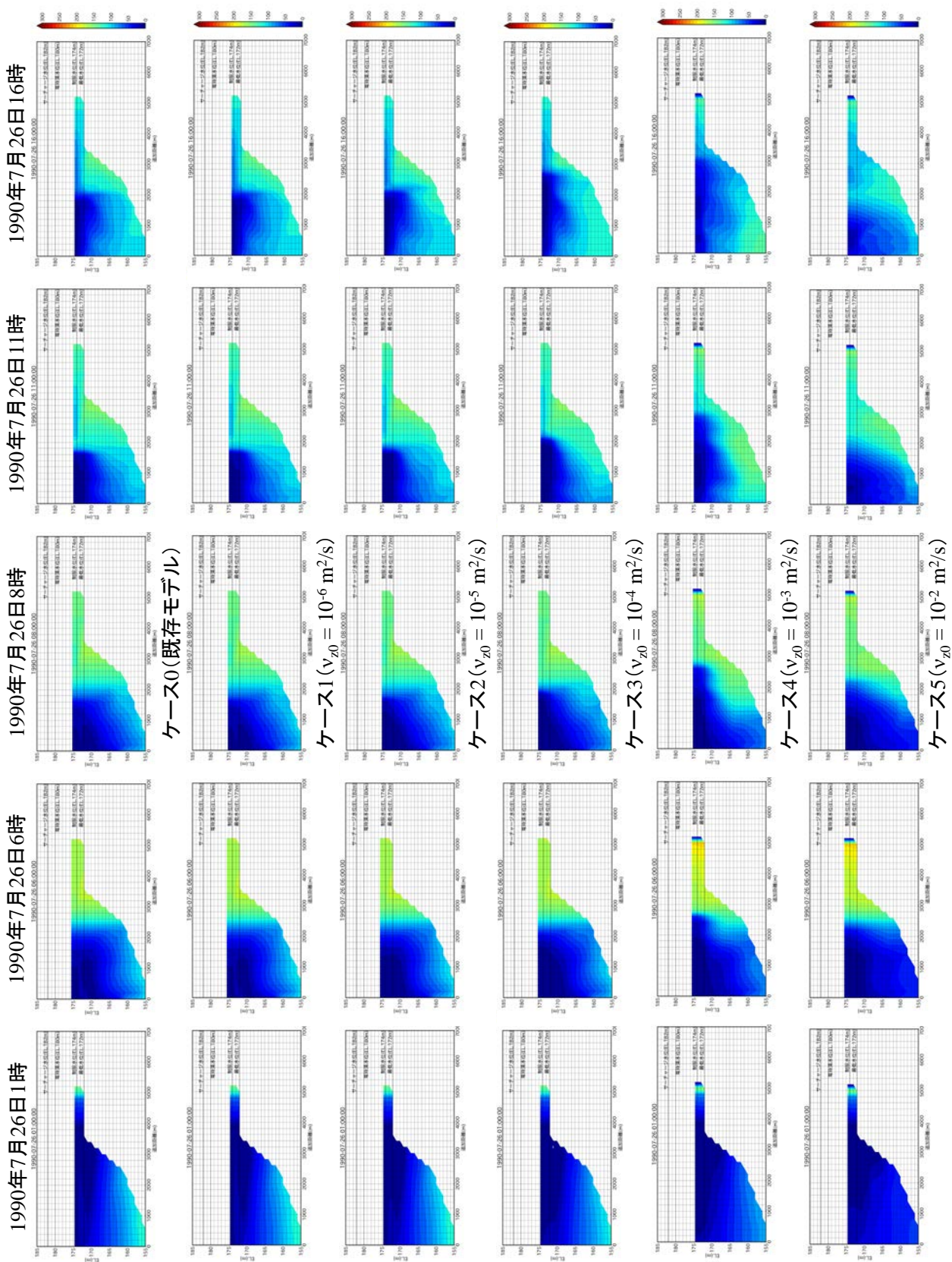


図-5 計算結果：洪水時のSS縦断分布

についてはほぼ同程度の計算結果となったため、ここでは、ケース 0、3、5 について図示している。対象期間のうち最大の洪水が発生した 1990 年の計算結果を用いて再現性について述べる。

$v_{z0}=10^{-2} \text{ m}^2/\text{s}$ のケース 5 を除けばいずれの結果もダムサイト地点の SS 濃度の変化状況を既存モデルと同程度に再現していると思えることができる。

SS 濃度の時系列コンターで見ると鉛直拡散係数を大きくするほどダム地点に到達する濃度が減少傾向になっている。これは物質輸送方程式において拡散項が卓越し、濁水がダムサイト地点に到達するまでに SS 濃度が低下した結果と考えられる。

3.2.2 洪水時の濁水の挙動

次に洪水時の流入濁水の挙動について各ケースを比較した計算結果を図-5 に示す。1990 年の 7 月に発生した洪水を対象として貯水池内の濁水の挙動を確認した。

既存モデルの結果であるケース 0 についてみると、流入した濁水がダムサイトから約 2.5km のところまで鉛直一様に貫入している。7 月 26 日 8 時頃から底層密度流が発生し、堤体地点に到達する。16 時には到達した濁水の一部が中層まで浮上している様子も認められる。その後、徐々に沈降して貯水池内の濁度が低下するが、水深が急に深くなる 2.5~3km の区間に濁水の一部が残存している。

ケース 0 の現象はケース 1、2 でも同様に認められたが、ケース 3、4 は底層密度流が比較的大規模に発生している様子が確認された。その後、ダム堤体に到達すると濁水の一部が中層まで浮上する様子はケース 0~2 とほぼ同様だが、水深が急に深くなる 2.5~3km 区間に濁水が残留するような傾向は認められなかった。

ケース 5 については流入濁水が底層密度流を形成しないで貯水池中流域から上流域にほぼ滞留した状態で沈降する結果となった。以上から、洪水時の濁水の挙動を比較すると鉛直渦動粘性係数の値の変化による違いが比較的明確に認められた。

4. 考察

改良モデルの再現性を検証するため、定期水質調査結果と比較したところ、月 1 回の観測結果ではケース 5 を除いてほぼ同程度の再現性と考えられた。次に、洪水時の濁水挙動を確認したところ、ケースによって流入濁水の挙動が異なる傾向が認められた。そこで、規模が異なるその他の出水時の濁水の挙動について

表-4 比較対象出水

| 対象出水発生日 | 出水規模 | ピーク流入量 | 総流入量 | 出水あたりの回転率※ |
|------------|------|------------------------|-----------------------------------|------------|
| 1990年7月17日 | 小規模 | 252 m ³ /s | 13×10 ⁶ m ³ | 0.5 |
| 1990年7月19日 | 大規模 | 1375 m ³ /s | 77×10 ⁶ m ³ | 3.1 |
| 1990年7月26日 | 中規模 | 598 m ³ /s | 19×10 ⁶ m ³ | 0.8 |

も比較し、全体的な濁水の挙動を踏まえて再現性の評価を行った。

比較対象とした洪水を表-4 に示す。前述の 1990 年 7 月 26 日出水に 2 出水を加えた。回転率をみると 0.5、0.8、3.1 であり、回転率が 1 未満の場合は成層が破壊されず密度流として流動するパターン、回転率 1 以上の場合は成層が破壊されて全層的な混合が生じるパターンである。

上述の 3 つの出水について、流入ピーク時における貯水池内の濁水状況を比較した。比較した結果を図-6 示す。出水規模によって様々な濁水現象が発生することが分かるが、小規模や中規模の出水時において再現性が異なる様子が認められる。

図-7 に貯水池で生じる濁水現象の模式図⁵⁾を示す。この図は水温成層が形成された貯水池に小規模~中規模の出水が発生した場合の濁水の挙動を表している。貯水池の濁水現象としては、中小出水時の表層密度流や貯水池上流端での濁水の潜入、下層密度流の発生が代表的である。このような現象の再現性や大出水時の全層混合について各ケースの再現性を比較すると、既存モデルやケース 1、2 は中規模出水時に生じる濁水の潜入や下層密度流の再現性が不十分と考えられ、ケース 4 は小規模出水時の鉛直混合が強すぎる傾向がみられる。

以上を踏まえると、御所ダムにおいてはケース 3 ($v_{z0}=10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$) が出水規模による様々な濁水現象を比較的良好に再現出来ていると考えられる。

5. おわりに

気候変動下での貯水池内の濁質挙動は、濁水長期化問題や堆砂などに影響を及ぼすため、その挙動を実現現象に則し、かつ計算コストを抑えるよう貯水池水質モデルの改良を行った。モデルの改良には、リチャードソン数を乱流モデルに組み込み、その係数について感度分析を行った。今後はこれらのモデルを用いて、気候変動下における貯水池内の濁質挙動およびその適応策について検討を行う予定である。

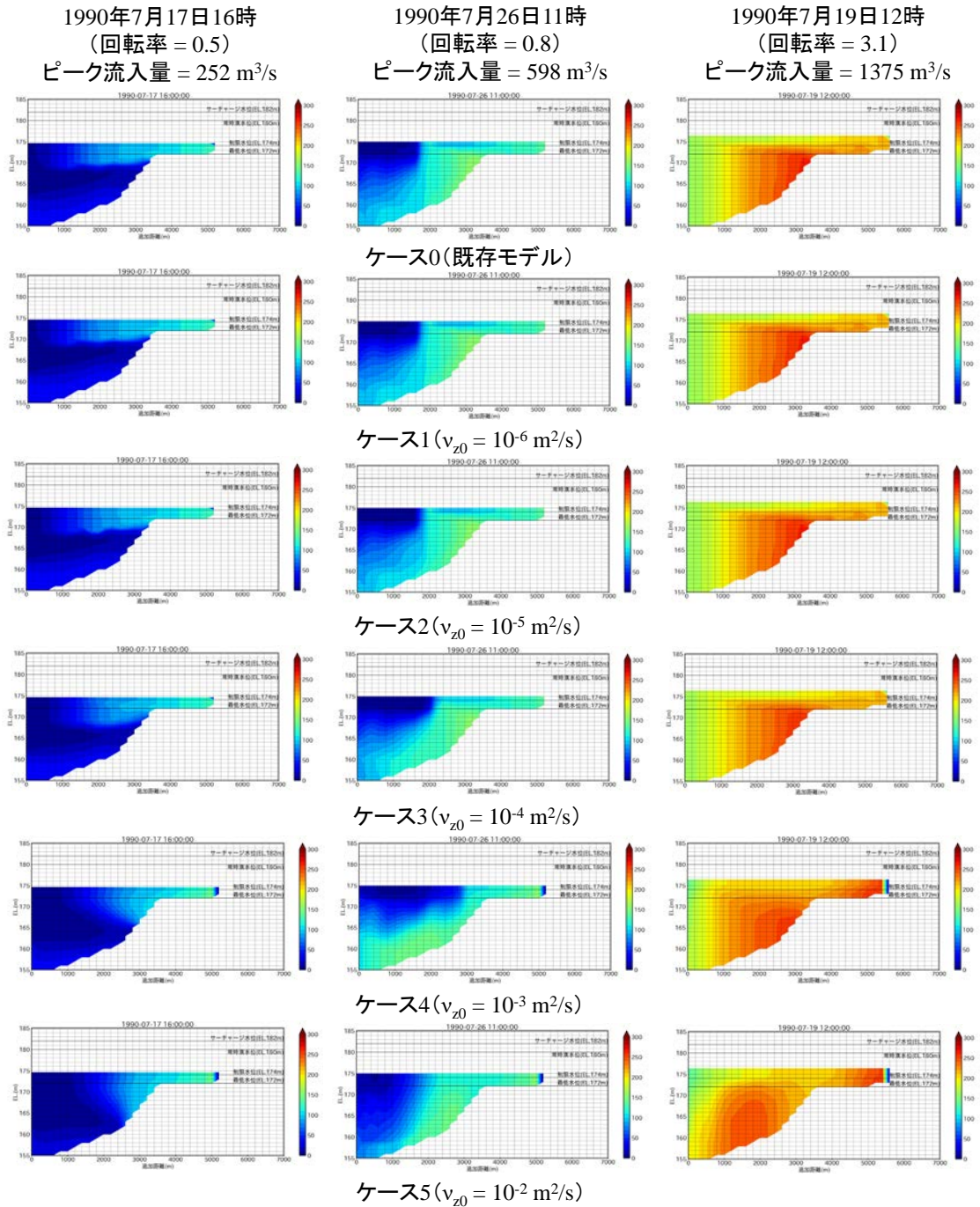


図-6 出水規模による濁水現象の比較

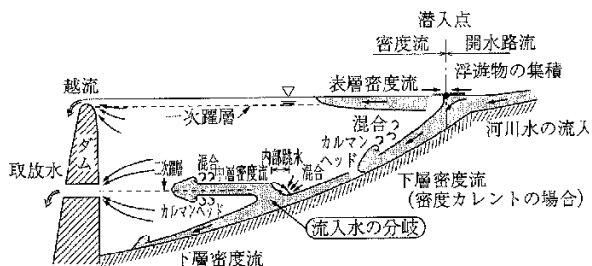


図-7 貯水池における濁水現象の模式図⁵⁾

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、<http://www.env.go.jp/press/files/jp/28593.pdf>、2015（2020年3月確認）
- 3) 国土交通省：国土交通省気候変動適応計画、<https://www.mlit.go.jp/common/001264212.pdf>、2015（2020年3月確認）
- 4) 岩佐義朗 編著：湖沼工学、山海堂、1990
- 5) 有田正光 編著：水圏の環境、東京電機大学出版、1990

13.1.6 気候変動による停滞性水域の熱・物質循環と水質環境への影響評価と適応策に関する研究（ダム貯水池・湖沼の底層貧酸素化要因の整理と気候変動影響の評価）

担当チーム：水環境研究グループ（水質チーム）
研究担当者：山下洋正、對馬育夫、服部啓太
担当チーム：水工研究グループ（水理チーム）
研究担当者：石神孝之、宮川仁、中西哲

【要旨】

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

キーワード：地球温暖化、ダム貯水池、底層溶存酸素、気温、流入量

1. はじめに

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

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

このような結果から、多くのダム貯水池で底層 DO の低下が予測され、将来気候における水質をシミュレーションモデルなどを用いて試算することが求められる。しかし、水質シミュレーションは技術的なハードルも大きく、ダム貯水池ごとに独自で実施することは難しい。気候変動による影響を評価する方法として限定的な評価方法ではあるが、既存調査に基づく統計モデルから影響を評価することが可能である。過去の水質調査データからクロロフィル a や DO などの各種

の水質指標に相関関係を見出すことにより、富栄養化や底層貧酸素化の傾向を把握可能な場合が存在する。特に底層 DO の低下は水温躍層の形成が原因となることが多いため、躍層形成の要因となる気温や水象データからある程度予測が可能になると考えられる²⁾。

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

2. 方法

2.1 解析対象としたダムと気象データ

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

- ・底層の DO の値が過去 20 年間の調査で 2.0mg/L 以下を記録したことがあり、なおかつ深層曝気施設や高濃度酸素供給装置などの底層溶存酸素改善対策を実施していない。
- ・水文水質データベースからダムの流入量が取得可能である。

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

表-1 対象としたダムと対応する気象観測所

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

示す。

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

2. 2 解析方法

本研究では、目的変数に対する説明変数の影響力が定量的に示される重回帰分析を用いて底層 DO と気温、流入量の関係性を整理した。重回帰分析においては各調査における底層 DO を目的変数に、気温と流入量を説明変数に設定した。気温については底層 DO の調査時間から 24 時間前までの平均値を気温データとした。流入量については、底層 DO の調査時間から 24 時間前平均、48 時間前平均、72 時間前平均の三つを流入量データとし、3 通りのデータを代入し解析を行った。

重回帰分析は EXCEL を用いて行った。また重回帰分析にて高い相関が得られたダムについては底層 DO 濃度と底層 TN 濃度、底層 TP 濃度を比較し、溶出傾向について整理した。

また、各ダムにおける底層 DO の季節別の変動傾向を整理したところ、季節的な周期性が強いダムが多く存在したため、Lomb-Scargle 法によるフーリエ解析を実施し、パワースペクトルを算出した。Lomb-Scargle 法によるフーリエ解析は Python 言語の astropy.timeseries ライブラリを用いて行った³⁾。

3. 解析の結果

3. 1 重回帰分析による結果

重回帰分析による相関係数 R^2 の一覧を図-1 に示す。

すべてのダムに対して気温と24h流入量、48h流入量、72h流入量の三つの重回帰分析を行ったところ、3つの分析に対するR²の差はほとんどなく、1-3日程度の流入量の変化は底層DOに大きく影響しないことが示唆された。

また、R²>0.5を示した7つのダムにおける気温-24h流入量の重回帰分析に対する回帰係数及びt値を図-2に示す。気温に対する回帰係数は-0.20~-0.41の範囲であり、t値の絶対値についてもすべて10以上であった。流入量に対する回帰係数は新豊根ダムを除いた6つで0.05~0.25の範囲であり、t値についてもすべて2以上であった。新豊根ダムにおいて流入量は回帰係数が負の値を示し、またt値の絶対値についても2以下であったため、流入量の影響力は小さかった。

気温と流入量の説明変数としての影響を比較するとt値の絶対値から気温が流入量より影響力が大きいこ

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

高い相関を示した7つのダムにおける底層DOとTN、TPに関係性を図-3に示す。御所ダムや菌原ダムではDO濃度2.0mg/L以下の貧酸素状態におけるTNとTP濃度の著しい増加傾向は見られなかったが、新宮ダムではDO濃度0mg/L付近で高い値を示す観測プロットが見られた。新宮ダムの流入河川のTNの平均濃度は0.38 mg/L、TPの平均濃度は0.0062 mg/L

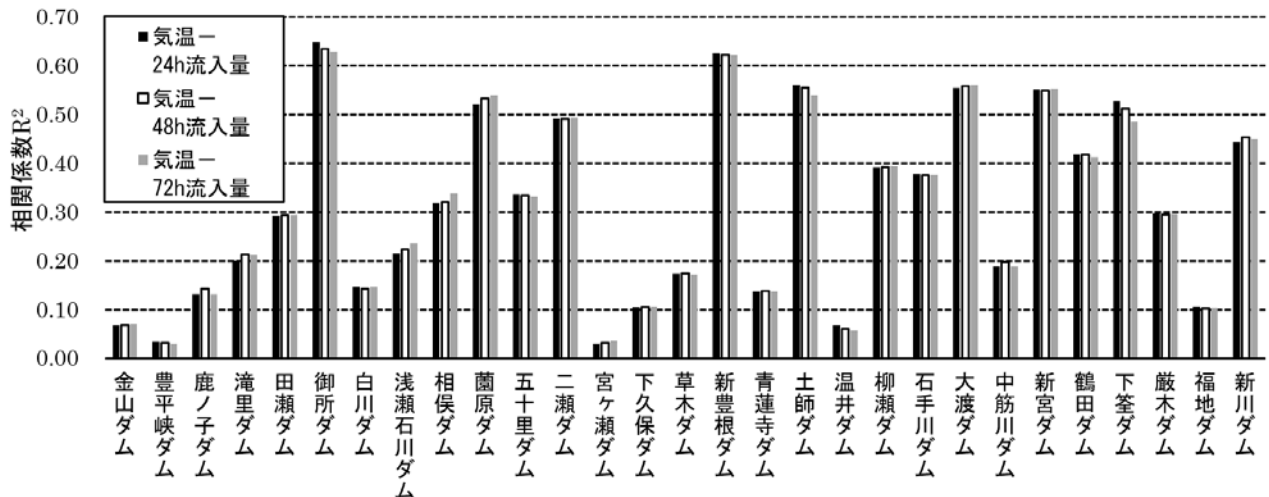


図-1 重回帰分析の相関係数一覧

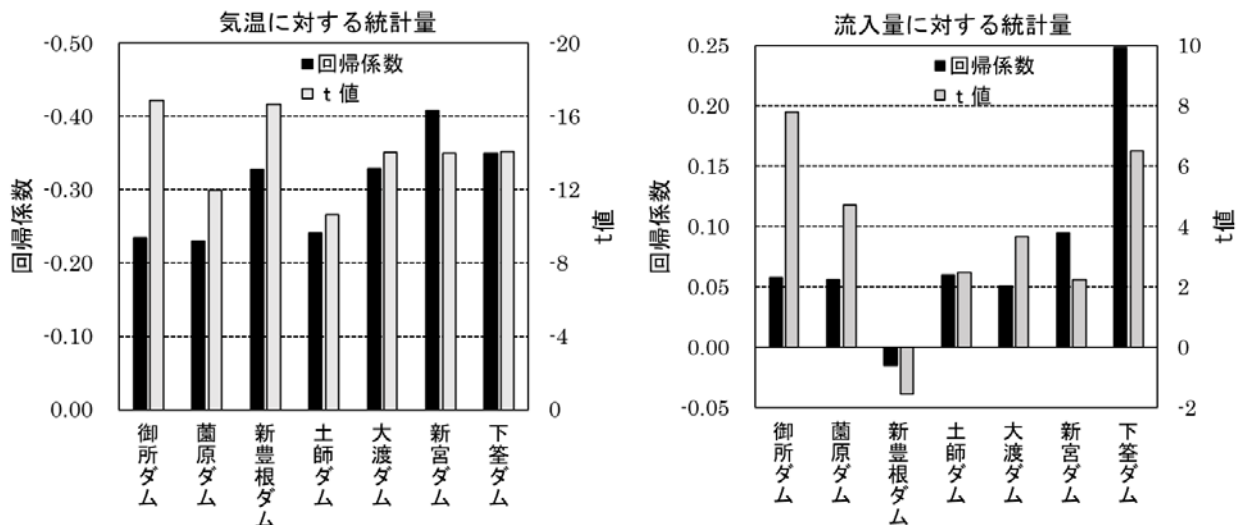


図-2 相関係数が大きかったダムにおける気温と流入量の回帰係数とt値

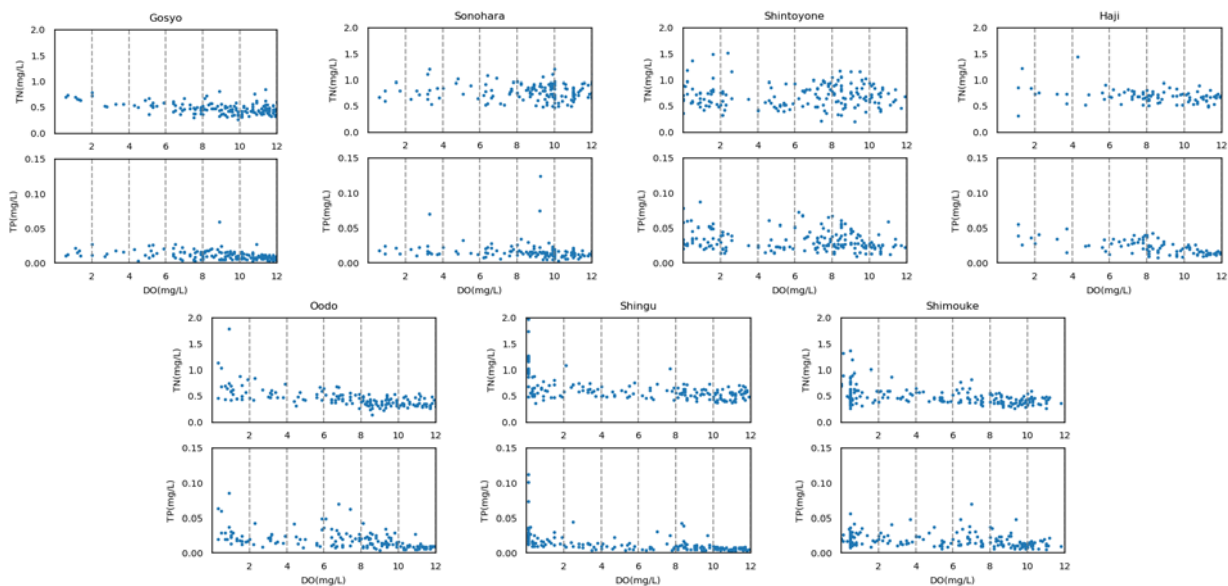


図-3 底層 DO と TN、TP 濃度の関係性

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

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

各ダムにおける底層 DO の年変動特性と Lomb-Scargle 法を用いたフーリエ解析により算出されたパワースペクトルを上段下段に整理した一覧を図-4 に示す。特定の時期に調査が実施されていないダムが複数存在したため、それらのパワースペクトルについては解釈が難しいが、365 日波長付近の Power が大きいダムほど年間の周期性が強い傾向が見られた。最大 Power が 0.6 以上のダムでは貧酸素化が発生する期間が限定的であり、特に最大 Power が 0.78 を示した厳木ダムでは 4-8 月にかけて底層の貧酸素化が進行し、9-12 月の貧酸素期間から 1-2 月に循環期に入り貧酸素水塊が解消されるという年間の動きが顕著に示されていた。加えて、厳木ダムにおける 4-9 月のデータにおいて底層 DO と水温、24h 流入量を対象として重回帰分析を行った結果を表-2 に示す。相関係数

表-2 厳木ダムの 4-9 月のデータによる重回帰分析結果

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

$R^2=0.69$ と高い相関性を示し、気温に対する t 値の絶対値が 12.9 と高いのに対して、流入量に対する t 値の絶対値は 0.86 と低く、気温に対する影響を強く受けると考えられた。厳木ダムにおいては気温が上昇した将来気候での 4-9 月における底層 DO は低下し、貧酸素化期間が長期化することが考えられた。

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

4. まとめ

日本全国の底層貧酸素化対策を実施していないダム貯水池を対象として、底層溶存酸素濃度について気温と流入量の関係性について重回帰分析を行った。重回帰分析の結果、一部のダムでは一定の相関関係が得られ、気温上昇によって底層 DO が低下する傾向が見られた。特に気温の回帰係数は -0.20 ~ -0.41 の範囲であり、4℃上昇の世界では底層貧酸素化の長期化が懸念された。一方で流入量の底層 DO に対する影響力は小さい結果となり、成層の形成等を考慮せずに

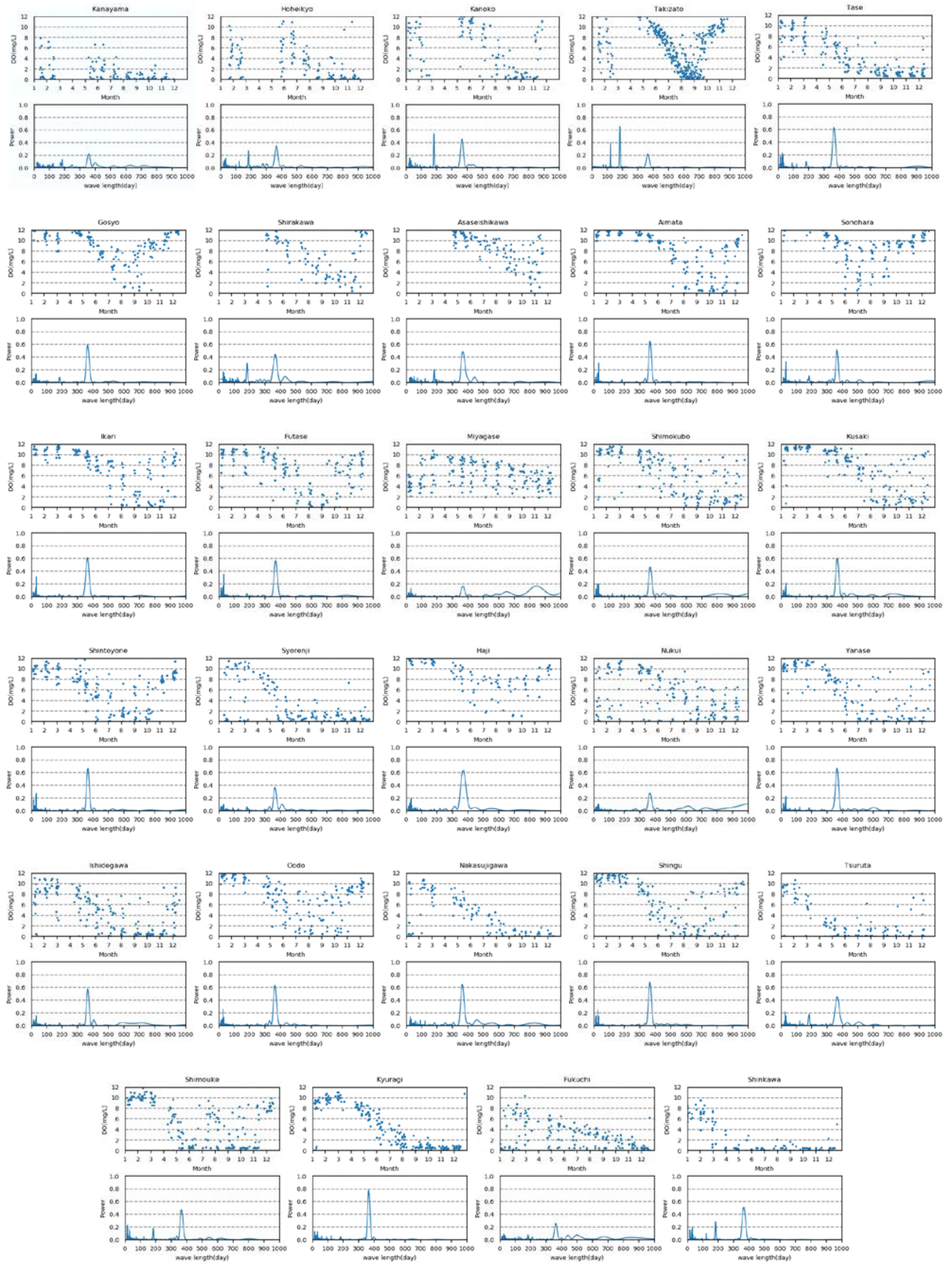


図-4 各ダムの間年における底層 DO の変動と算出されたパワースペクトル

重回帰分析を行っても流入量の影響を評価することは難しいと考えられた。底層の貧酸素化により、嫌気化した底泥からの栄養塩溶出が起きていることが推察され、水温上昇の水質影響が懸念された。

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

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

参考文献

- 1) 文部科学省、経済産業省、気象庁、環境省：IPCC 第 5 次評価報告書統合報告書政策決定者向け要約（翻訳）、2015
- 2) 池田祐一、中井正則、中村由行、道奥康治、村上和男：水圏の環境、東京電機大学出版局、pp.228-275、1998
- 3) The Astropy Project: Astropy v4.0.1 documentation , <https://docs.astropy.org/en/stable/timeseries/lombscargle.html> (2020/06 accessed)

13.2 水質リスク軽減のための処理技術の開発

13.2.1 公共用水域における健康・生態リスクが懸念される化学物質の制御手法に関する研究（水質リスクを軽減するための処理技術）

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：山下洋正、平山孝浩、北村友一、
對馬育夫、鈴木裕識、小森行也、
厚朴大祐、高沢麻理

【要旨】

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

キーワード：下水処理水、医薬品、アンモニア性窒素、微生物保持担体

1. はじめに

環境省では水生生物の保全に係る水質環境基準項目へのアンモニア性窒素（以下、 $\text{NH}_4\text{-N}$ とする）の追加を検討している。下水放流水から $\text{NH}_4\text{-N}$ が検出される場合¹⁾もあり、下水放流先に環境基準点がある場合や、排水基準値が設定された場合に対応するため、特に、硝化の促進が難しい処理方法・運転条件の小規模処理場に適した $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減法を提案しておく必要がある。 $\text{NH}_4\text{-N}$ の他にも、下水放流水中に含まれる医薬品などは水生生物へ影響が懸念されており、環境省では医薬品の有害性についての検討が行われている。医薬品の中で抗生物質であるクラリスロマイシンの予測無影響濃度(PNEC)は、69 ng/L という低濃度となることが報告²⁾され、下水処理水からこれを上回る濃度が検出される場合³⁾⁴⁾⁵⁾もあることが明らかとなってきた。下水処理水放流先の水生生物保全のため、下水処理過程での $\text{NH}_4\text{-N}$ と医薬品の低減法の開発が求められている。

令和元年度は、平成 30 年度に下水処理水に残存する $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減効果が確認された微生物保持担体処

理（以降、担体処理とする）が、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の低減と同時に医薬品の除去に効果があるかどうかを調査した。

2. 実験方法

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



写真-1 微生物保持担体処理槽の外観

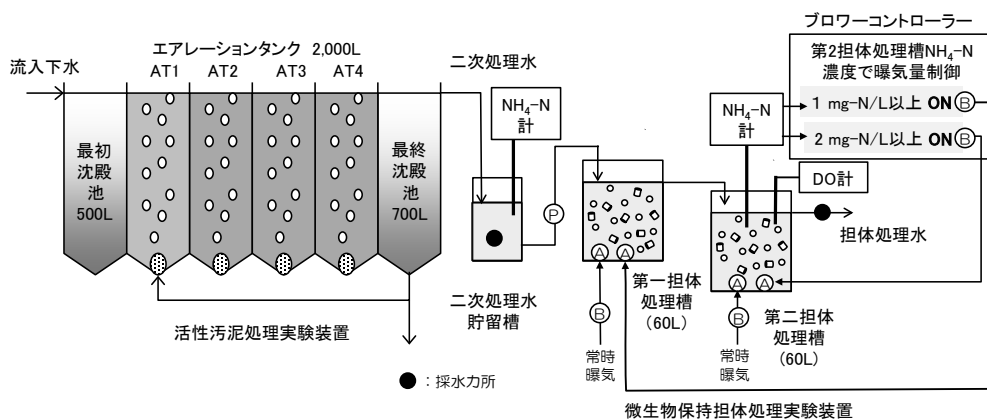


図-1 活性汚泥処理実験装置と微生物保持担体処理実験装置の概要

表-1 微生物保持担体処理実験の実験期間、二次処理水流量と曝気条件

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

した。各担体処理槽にはポリプロピレン製の中空円筒状の担体 (4mm^{OD}×3mm^{ID}×5mm^L) を嵩比率 35% (21 L) で充填した。担体処理実験のための原水は、実下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、処理水中に NH₄-N を残留させたものである。

各担体処理槽は常時曝気と追加曝気装置を設置し、第二担体処理槽に設置したアンモニアセンサーで追加曝気を ON-OFF 方式で制御した。すなわち、第二担体処理槽の NH₄-N 濃度が 1 mg-N/L 以上で第一担体処理槽の追加曝気を ON、NH₄-N 濃度が 2 mg-N/L 以上で第二担体処理槽の追加曝気を ON となるようにした。担体処理槽の水学的滞留時間 (HRT) は 180 分 (90 分/1 槽) と 120 分 (60 分/1 槽) の 2 条件とし、各条件で約 2 カ月の連続運転を行った。表-1 に各 HRT 条件の実験期間、二次処理水流量、曝気量の設定条件を示した。

担体処理による硝化運転時の医薬品の除去特性を明らかにするため、各 HRT 条件中に小型流量ポンプによる 24 時間連続採水を HRT120 分条件では 5 回 (12/2~3、12/9~10、12/16~17、12/23~24、1/6~7)、HRT180 分条件では 7 回 (2/3~4、2/11~12、2/17~18、2/24~25、3/2~3、3/9~10、3/17~18) 行い、コンポジット試料の医薬品の分析を行った。分析対象とした医薬品は、PNEC が低く²⁾⁵⁾、下水処理水中に残存すると考えられる³⁾⁴⁾

⁵⁾アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェンとした。医薬品測定の前処理は、遠心分離 (3500 rpm、5 分) のみとし、その上澄水を分析試料とした。分析法は、LC/MS (Waters 製 Xevo G2-XS) による MS^e モードでの同位体希釈法である。分析試料はメタノールで 1 : 1 に希釈したものを 30 μL 分析装置に注入した。医薬品の他に、一般水質分析項目として NH₄-N、NO₂₊₃-N、NO₃-N を自動流れ分析 (ビーエルテック QuAAtro2-HR) で、DOC を全有機炭素計 (島津製作所 TOC-5000) で、SS を (ガラス繊維ろ紙法) で測定した。第一、第二担体槽内の担体付着物質質量は、超音波抽出 (200 W、10 分間) し付着物質の重量をガラス繊維ろ紙により週 1 回測定した。

3. 結果と考察

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

図-3 に HRT 180 分と 120 分の 24 時間採水で得られた二次処理水と担体処理水の NH₄-N、NO₃-N、NO₂-N 濃度を示した。図-4 は DOC、図-5 は担体処理水中 SS 濃度である。HRT180 分の二次処理水、担体処理水中

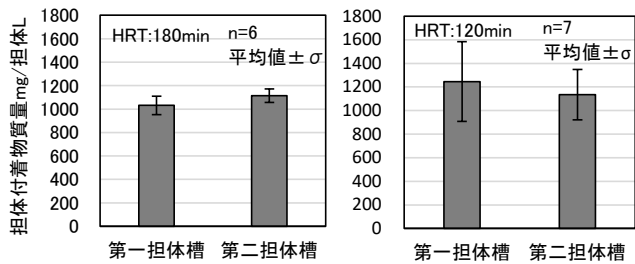


図-2 HRT:180分と120分の第一、第二担体槽の付着物質質量

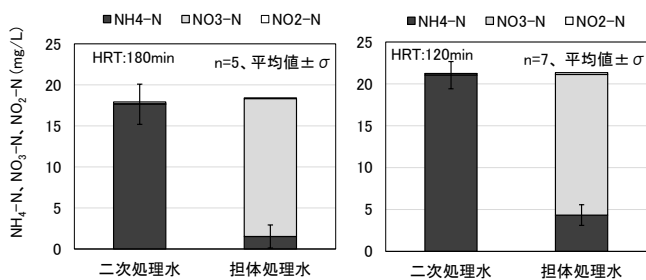


図-3 HRT:180分と120分の二次処理水と担体処理水中の平均NH₄-N濃度(エラーバーはNH₄-Nのみ)

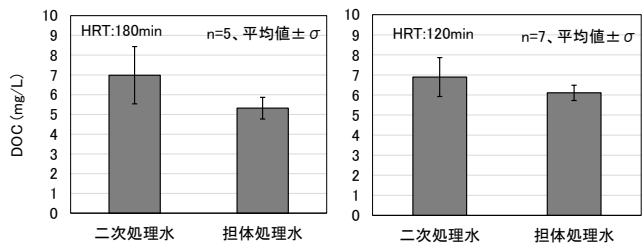


図-4 HRT:180分と120分の二次処理水と担体処理水中の平均DOC濃度

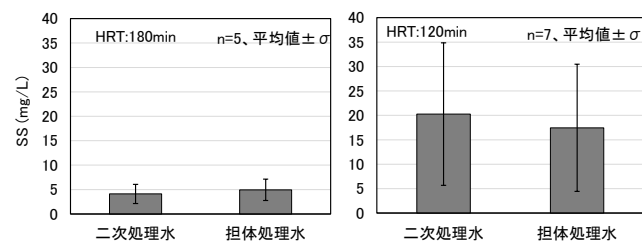


図-5 HRT:180分と120分の二次処理水と担体処理水中の平均SS濃度

NH₄-N 濃度の平均値は 17.6、1.51 mg-N/L (低減率: 91%)、120分では 21.0、4.33 mg-N/L (低減率: 79%) となった。HRT120 分の担体処理水中 NH₄-N 濃度は HRT180 分条件より高いものの低減率は 79%あり、HRT180、120 分とも担体処理による硝化運転を維持できていた。HRT180 分の二次処理水、担体処理水中の DOC 濃度の平均値は、6.98、5.32 mg/L (低減率: 24%)、

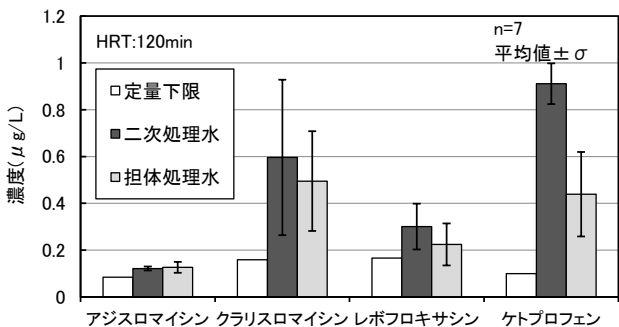
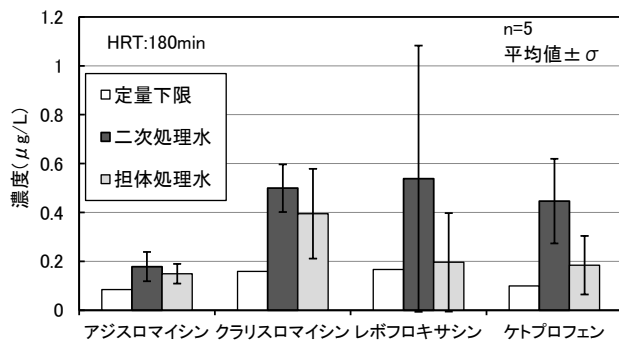


図-6 HRT:180分(上図)と120分(下図)の二次処理水と担体処理水中の医薬品濃度(参考として検出下限を图示)

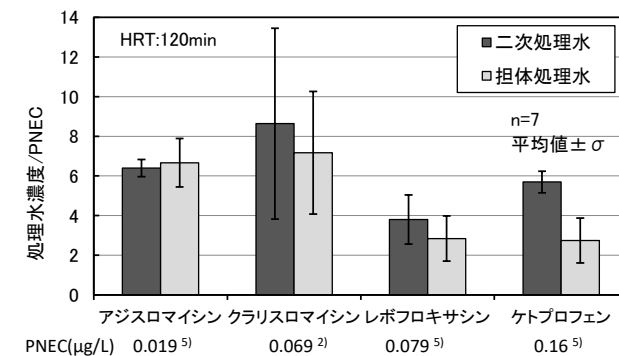
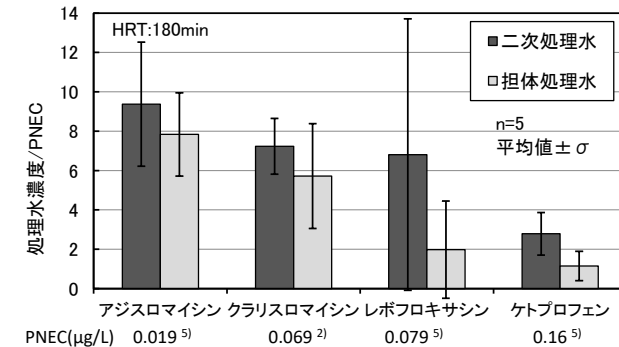


図-7 HRT:180分(上図)と120分(下図)の二次処理と担体処理水中の医薬品濃度/PNEC 比

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

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

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

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

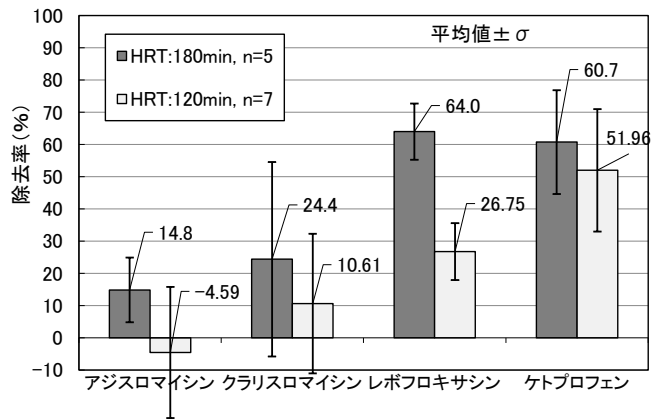


図-8 HRT:180 分と 120 分の二次処理水と担体処理水中の医薬品除去率

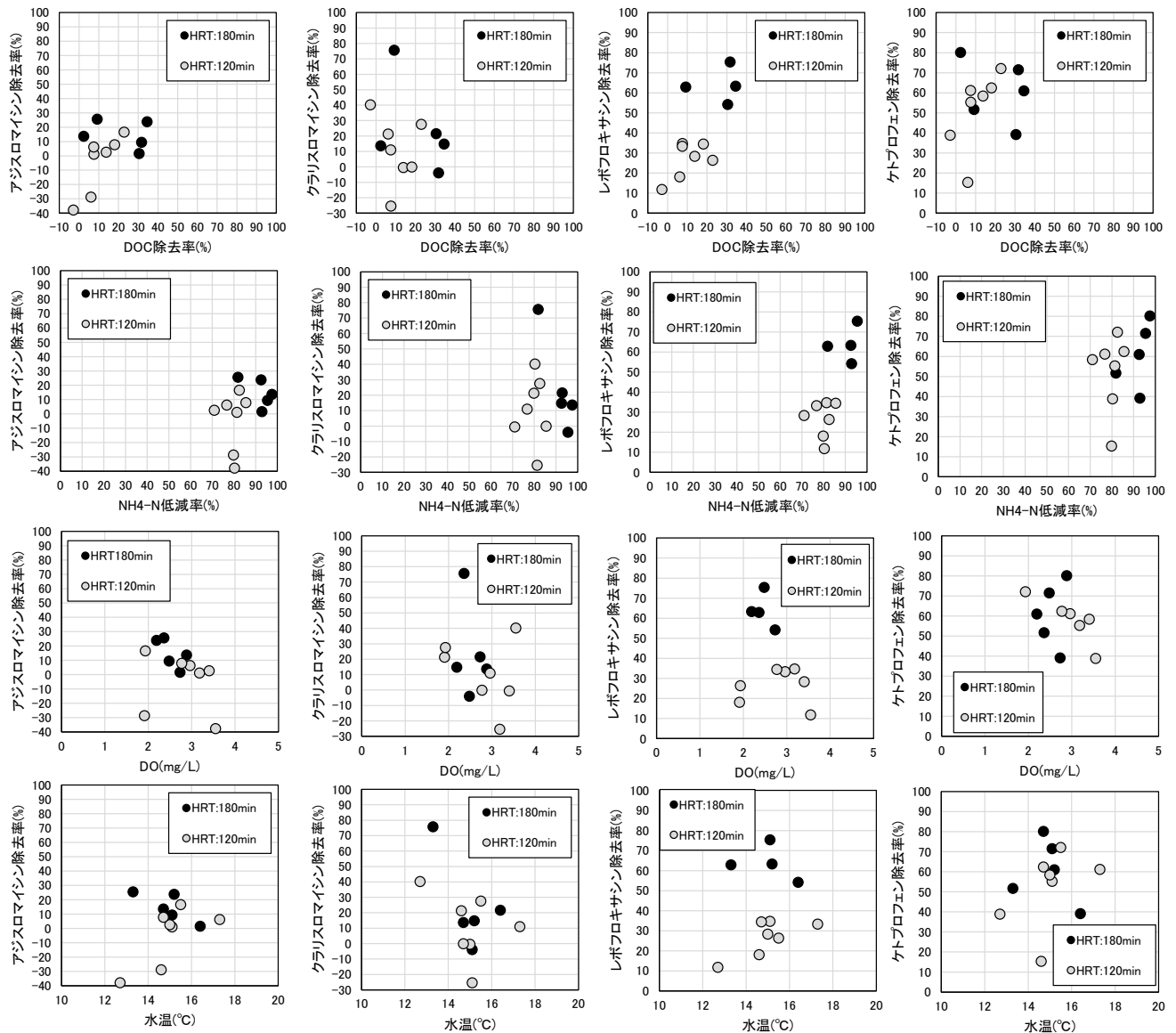


図-9 HRT:180 分と 120 分条件での DOC 除去率、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 低減率、第二担体処理槽平均 DO、第二担体処理平均水温と各医薬品の除去率の関係

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

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

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

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

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

図-9にDOC除去率、NH₄-N低減率、第二担体槽のDO、水温と各医薬品除去率に関係を示した。各水質項目と医薬品除去率の間に明確な関係性は見いだせなかった。医薬品の除去率の変動は大きく、除去率の向上や安定した除去率を得るためには、除去に寄与する因子の解明が重要となる。

4. まとめ

下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減効果が確認された微生物保持担体処理がアンモニア性窒

素の低減と同時に医薬品の除去に効果があるかどうかを調査した。

本研究で得られた知見は以下のとおりである。

- 1) ポリプロピレン製中空円筒担体による流動型担体処理において、下水処理水に残存するアンモニア性窒素と医薬品の同時除去は可能であった。
- 2) HRT180分でのNH₄-Nの低減率は91%で、本条件でのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ケトプロフェン平均除去率は、15%、24%、64%、61%となった。この値は活性汚泥処理と同等以上であった。

5. 今後の予定

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

参考文献

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

13.2.2 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（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、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）

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

【要旨】

本研究は、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。令和元年度は、上記②、③の達成目標に関わる調査・研究では、実態調査に基づく合流式下水道越流水の影響評価としてノロウイルス（Norovirus: NoV）を指標とした汚染の実態を把握した。次いで、高度処理法などによる病原微生物の除去率向上評価の一環として、膜分離活性汚泥法（Membrane Bioreactor: MBR）によるNoVの除去効果について、実験プラント（PP）と実下水処理場で稼働している実プラントを対象に評価を行った。

その結果、1降雨あたりの総降雨量が合流式下水道改善事業の降雨条件を超える降雨時では、越流水による放流先水域へのNoV汚染が生じる可能性があった。越流水影響下によるNoVの汚染状況を簡易に把握するため、水質指標として濁度とSSとの関連性を評価した結果、濁度、SS指標の活用によりNoV汚染の影響を評価できる可能性が示唆された。MBRによるNoVの最大除去率は4.5～5.2log、平均は概ね4log程度であり、標準活性汚泥法（標準法）と比較して2オーダー程度向上していた。

キーワード：合流式下水道越流水、ノロウイルス、濁度、膜分離活性汚泥法

1. はじめに

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

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

づく合流式下水道越流水の影響評価としてNoVを指標とした汚染実態を把握した。次いで、高度処理法などによる病原微生物の除去率向上評価の一環として、MBRによるNoVの除去効果について、PPと実下水処理場で稼働している実プラントを対象に評価を行った。

2. 研究目的および方法

2.1 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

下水道の普及に早くから取り組んできた一部の自治体においては、下水と雨水の排除を同一の管渠とした合流式下水道を採用している。合流式下水道では降雨時において、雨水量が増加し下水処理場において処理対応が困難になる場合には、未処理下水が公共用水域へ放流されることから、衛生学的な安全性を担保するため合流式下水道越流水の対策技術の構築が必要となる。一方、当面の合流式下水道改善事業の目標としては、汚濁負荷量の削減、公衆衛生上の安全確保、夾雑物の削減の3つが挙げられており、処理区域の面積が1,500ヘクタール未満（流域関連は5,000ヘクタール未満）の都市においては、H25年度を目標に合流式下水道改善事業が進められた。合流式下水道改善事業の具体的な対策としては、雨水浸透

施設の設置、完全（部分）分流化、下水処理場の処理能力の増強（遮集容量の増強、雨天時活性汚泥法の適用など）、雨天時下水の貯留などである³⁾。

本研究では過年度において、合流式下水道改善事業の1手法である雨天時活性汚泥法によるNoVの削減効果を評価した。R1年度は、公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価を目的に、NoVを指標とした実態調査を行った。調査対象はA市とし、主な合流式下水道改善事業としては合流下水の貯留施設の建設であり、1降雨あたりの総降雨量が20mm時の降雨条件にて期待される効果として、雨天放流時のBOD負荷を分流式並み、放流回数の半減を予測している。雨天時調査は1降雨あたりの総降雨量が10.5～115.5mmの3降雨時に2箇所ある雨水吐き地点（採水箇所から上流約1,000mと約4,000mに位置）の下流にて河川水を採水した。調査の実施は5～10月であったことから、冬季の感染性胃腸炎の流行期を過ぎ、非流行期への移行期間であると考えられる。NoVに加え濁度、SSの測定を行った。

NoVの測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮はPEG沈殿法とした。PEG沈殿法により回収した沈渣をRNase-free水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイムRT-PCR法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社)の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN社)でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料0.5μgをランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN社)を用い全量50μLの系で逆転写反応によりcDNAを作製し5μLをリアルタイムPCRに供した。NoVの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」⁴⁾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⁵⁾。他の水質分析項目の濁度は水質計、SSはGF/Bろ紙による定量とした。

2.2 MBRによるNoV除去効果の向上評価

活性汚泥処理水や再生水の水質向上などを目的として

膜分離技術の導入が徐々に行われつつある。除去対象物質に応じて膜の公称孔径は精密(MF膜)、限外(UF膜)、逆浸透(RO膜)などに大別されるが、MF膜が多く用いられているMBRの適用事例は平成23年3月時点で16箇所となっている⁶⁾。SSや細菌類の除去により良好な水質が得られるとともに、ウイルスの除去効果が高いとの報告事例⁷⁾があるが、限られた知見である。

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

除去効果の評価は、B下水処理場内の活性汚泥処理プラントの生物反応槽にMF膜（無機系/平膜/公称孔径0.1μm）を浸漬させたPPとし、HRTを約8時間とした連続処理によりMLSS濃度を徐々に高め2,200～7,400mg/Lの範囲での評価となった。また、実下水処理場は堺市泉北水再生センターにて稼動しているMBR（有機系/平膜/公称孔径0.2μm、MLSS 7,500～11,200mg/L）、HRTが6.8時間の実プラントを対象とした。併せて、除去率の向上割合を把握するため、PPからMF膜を引き抜いた状態による標準法と泉北水再生センターにて並列処理を行っている標準法の処理水についても対象とした。さらに、PPでは原因が不明である反応タンク内の発泡現象による活性汚泥の解体状況時についても評価を加えた。採水はPPが約18ヵ月間（4回程度/月）、実プラントが約12ヵ月間（1回/月）行ない、NoVの他に大腸菌を測定した。NoVの測定法は上記2.1と同様であり、大腸菌はQTトレイによるMPN法とした。

3. 研究結果および考察

3.1 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案

調査時の降雨状況を図-1に示す。時間最大降雨量は2.5、14、20mm/h、総降雨量は10.5、59.5、115.5mmであり、3回の降雨時調査の内2回はA市の合流式下水道改善事業の降雨条件(1降雨の総雨量20mm)を超えていた。雨天調

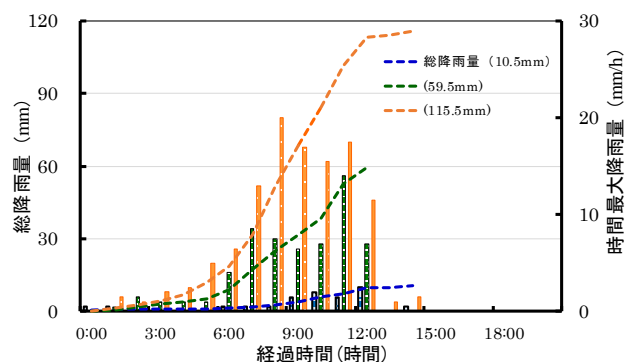


図-1 調査時の降雨状況

査時の NoV 濃度の推移を図-2 に示す。越流水の影響の無い状況での河川水の NoV 濃度は $10^4 \sim 10^5$ copies/L で推移していた。1 降雨あたりの総降雨量が 10mm 程度であれば NoV 濃度の顕著な上昇は認められず、NoV 濃度は調査開始当初から大きな変動は見られなかった。しかし、総降雨量が A 市の合流改善事業の降雨条件を超えるケースにて NoV 濃度は最大 10^6 copies/L となり、調査開始当初と比較して 2 オーダーの濃度上昇が認められた。

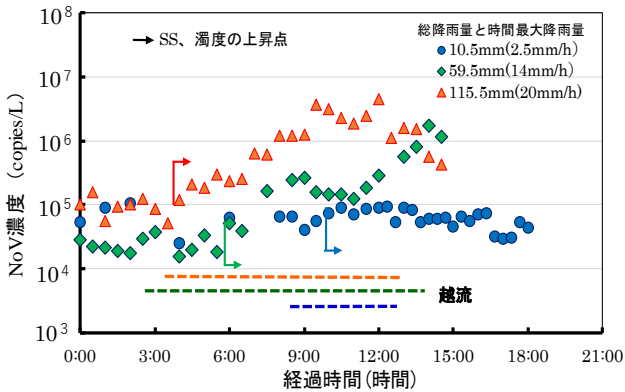


図-2 雨天時調査における河川水のNoV濃度の推移

次いで、越流水の影響下による NoV の汚染状況を簡易に把握するため、水質指標として濁度と SS との関連性を評価した結果を図-3、4 に示す。越流水の影響下において濁度、SS の上昇時からのデータについて整理を行ったが、

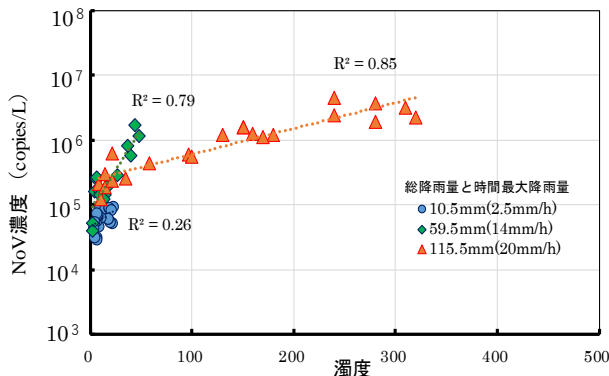


図-3 総降雨量ごとの河川水の濁度とNoV濃度の関係

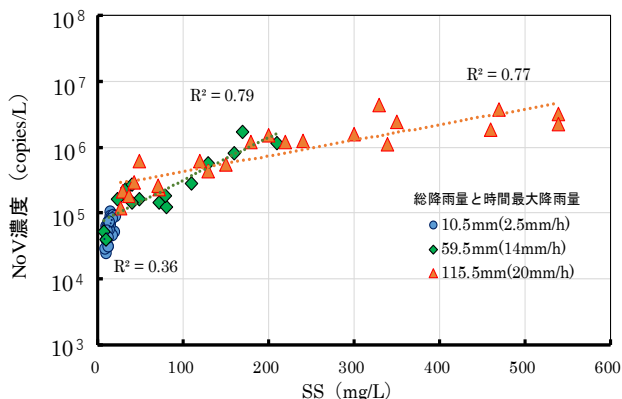


図-4 総降雨量ごとの河川水のSSとNoV濃度の関係

総降雨量が A 市の合流式下水道改善事業の降雨条件を超えるケースにて濁度と NoV 濃度との関連性が見出された。同様に SS との関連性も高い状況にあったが (図-4)、総降雨量が 10mm 程度時には越流水影響下による NoV、濁度、SS の顕著な上昇はないことから、NoV 濃度との明確な関連性は見出せなかった。

合流式下水道改善事業の降雨条件 (1 降雨の総雨量 20 mm) を上回る降雨状況にて、濁度、SS の顕著な上昇が認められることで、NoV 濃度が上昇しており、濁度、SS 指標の活用により NoV 汚染の影響を評価できる可能性が示唆された。一方、合流式下水道改善事業において NoV の放流負荷に関わる目標値は定められていないが、合流式下水道改善事業の降雨条件を超える降雨時には、越流水による放流先河川水への NoV 汚染が生じる可能性がある。近年では気候変動に伴う集中豪雨が頻発傾向であることから、越流水の影響評価は今後益々重要となることが予想される。濁度、SS 指標を活用した影響評価が可能となれば、重要影響水域での水利用の安全性向上に寄与できることが想定される。

3.2 MBR による NoV 除去効果の向上評価

NoV の除去効果の向上評価に関わる調査結果を図-5、6 に示す。調査期間中の流入下水の NoV 濃度は概ね $10^6 \sim 10^8$ copies/L の範囲内で推移しており、夏季と冬季において 2 オーダー程度の違いが見られた。各 MBR 処理水の NoV 濃度は $10^2 \sim 10^3$ copies/L レベルで推移しており、流入下水に比較して濃度の変動幅は小さい状況であった。全期間の NoV 平均除去率は PP が 4.0log、実プラントが 3.9log となり概ね 4log と整理された。一方、反応タンク内の MLSS の推移について図-7 に示すが、PP の運転立上げ時には MLSS が低く 6,000mg/L 以下の状況では NoV の除去率にバラツキが見られ除去率は 2.3~5.0log であった。このため、6,000mg/L 以上のデータのみとした除去率で整理を行うと 3.9~5.2log、平均で 4.4log であった。今回の MBR での MF 膜は公称孔径が 0.1 と 0.2 μ m の平膜であり、ウイルスが通過できる孔径ではあるが、MLSS の上昇とともに NoV の除去率がやや向上傾向を示していることから、活性汚泥のフロック形成時にウイルスが取り込まれ、粒径の大きいフロックが膜に捕捉されることで NoV の除去効果が向上するものと推定された。また、MLSS 上昇による膜透過流速の低下や膜面におけるケーキ層の形成なども考えられる。実プラントでは MLSS が PP よりも全体的に高濃度ではあったが、NoV の除去率は 3.1~4.5log で推移しており、PP (MLSS 6,000mg/L 以上時) と比較してやや低い状況にあり、公称孔径の違いが影響している可能性が推定された。

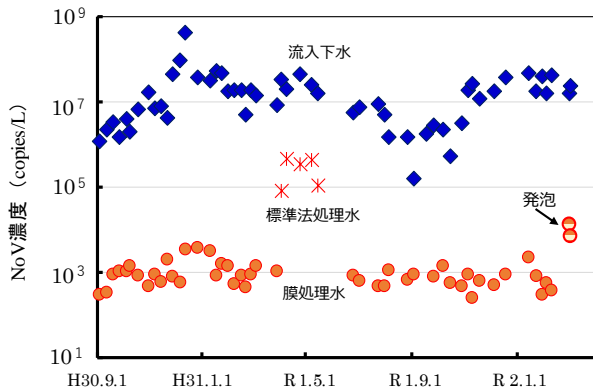


図-5 P.P.でのNoV濃度の推移

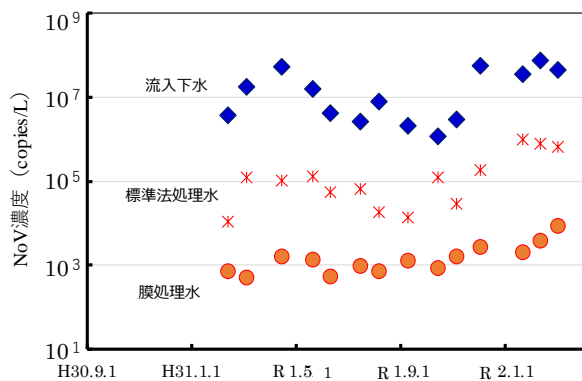


図-6 堺市泉北水再生センターのNoV濃度の推移

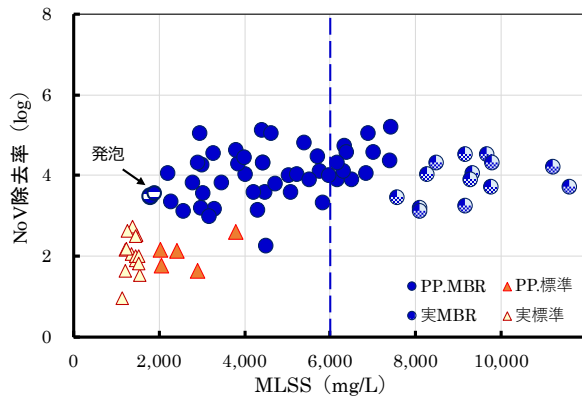


図-7 反応タンク内MLSSとNoV除去率の関係

標準法の処理水のNoV濃度はPPと実プラントともに $10^4 \sim 10^6$ copies/Lレベルで推移しており、膜処理水と比較して2~3オーダー程度高い状況にあった。平均除去率はPPが2.0log (1.6~2.6log)、実プラントで2.0log (1.0~2.7log)であり、既往の報告例⁸⁾と一致した値であった。これらの結果から、MBRのNoV除去率は標準法に比較して2オーダー程度向上し、NoVの最大除去率としては4.5~5.2logであった。

併せて測定を行った大腸菌の除去率の推移について図-8に示す。大腸菌は膜の公称孔径よりも大きいためろ過捕捉されることからNoVの除去効果よりも高い状況にあ

った。流入下水の大腸菌濃度に影響を受け除去率が変動しているが、多くのデータは6log以上でありMBR処理水中の大腸菌濃度は定量限界値以下あるいは、採水時等において極微量の汚染の可能性があったことから、それに近い値となった。一方、標準法によるPPと実プラントの大腸菌の除去率は概ね2log程度であり、MBRと比較して大腸菌の除去率に大きな違いが見られた。

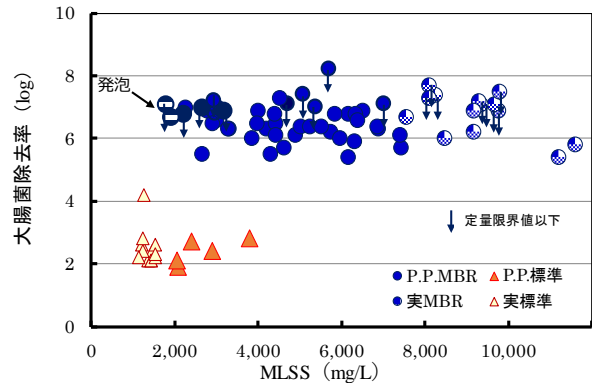


図-8 反応タンク内MLSSと大腸菌除去率の関係

次いで、PP反応槽の発泡状況について写真-1に示す。泡とともに活性汚泥が流出したため、MLSSの低下が見られた(図-7)。曝気を止め汚泥を沈降させても上澄液は濁っており、活性汚泥によるフロックの形成能力は失われていた。図-5、7にNoV濃度と除去率について追記したが、処理水のNoV濃度の上昇が見られ除去率がやや低下した。大腸菌の除去率への影響は見られなかったが(図-8)、ろ過水量の減少とともにろ過圧力の上昇が生じたため、MBR処理の継続は難しい状況となった。発泡の原因は不明である。この時の反応槽の汚泥について、顕微鏡による生物相を観察した結果 *Aspidisca* sp.、*Vorticella* sp.などが確認されたが、個体数は160~280細胞/mLであった。これらの活性汚泥性生物量は活性汚泥微生物相の一例⁹⁾と比較して少ない状況であり、浄化の程度が低い時に出現⁹⁾する *Amoebida* (アメーバ目)が1,360細胞/mLで優占していた。



写真-1 P.P.反応槽の発泡状況

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。R1年度は、実態調査に基づく合流式下水道越流水の影響評価として NoV を指標とした汚染実態を把握した。次いで、高度処理法などによる病原微生物の除去率向上評価の一環として、MBR による NoV の除去効果について、PPと実プラントを対象に評価を行った。以下に得られた結果を示す。

「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」

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

「高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価」

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

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした A 市、堺市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) 外務省：G7 伊勢志摩首脳宣言、平成 28 年 5 月 27 日、<https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000160267.pdf> (2019 年 9 月 24 日閲覧)
- 2) CDC：ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013, <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013> (2019 年 9 月 24 日閲覧)
- 3) 国土交通省都市地域整備局下水道部、効率的な合流式下水道緊急改善計画策定の手引き（案）。
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：ノロウイルスの検出法について，2007, <https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html> (2019 年 9 月 24 日閲覧)
- 5) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子：下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、Vol. 46(561)、pp. 91-101, 2009
- 6) 下水道膜処理技術会議、下水道への膜処理技術導入のためのガイドライン第 2 版、pp19,平成 23 年 3 月。
- 7) 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会報告書、pp.11、平成 22 年 3 月。
- 8) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介：ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、Vol. 47(571)、pp. 103-111, 2010
- 9) 下水試験方法下巻-2012 年版-, pp.211、pp.204.

13.3 停滞性水域の底層環境・流入負荷変動に着目した水質管理技術の開発

13.3.1 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（結氷する汽水湖の生物生息環境への支配要因の機構解明、結氷する汽水湖の貧酸素化予測手法の高度化、貧酸素化改善技術の開発と生物影響評価及び管理手法の提案）

担当チーム：寒地水圏研究グループ（水環境保全）
研究担当者：村山雅昭、谷瀬敦、杉原幸樹

【要旨】

塩淡水層汽水湖の網走湖において、塩水層の貧酸素水塊の解消を目的として、現地に酸素溶解装置(WEP)を建設して酸素供給による水質変化について実水域で観測を行った。結氷下から融雪後まで装置を連続運転させた結果、結氷下では湖内の流動が抑制され、装置近傍に溶存酸素量(DO)の上昇と硫化水素の酸化による濁度上昇が確認された。結氷下での2ヶ月の装置運用でおよそ90000 m²にDO供給影響が確認され、硫化水素濃度はDO供給標高を中心に大幅な低下が確認されたが、検出限界以下にはならなかった。一方で、融雪後は湖内流動が再開することで、水塊移動に伴いDO供給効果が流下して、DOと濁度は低下する挙動が確認された。また水質分析の結果から、WEPによるDO供給によって、機器周辺の硫化水素は40%削減され、全リン及び全窒素も20%削減されることが確認された。これより、DO供給によって汽水性貧酸素水塊の水質改善が可能であり、流動が少ないほど効果が明瞭となることが分かった。

キーワード：汽水湖、硫化水素、貧酸素、WEP、酸素供給

1. はじめに

停滞性水域の底層貧酸素改善を目的に様々な研究^{1) 2)}がなされている。直接的な貧酸素改善のため、酸素供給等も行われている³⁾。隔離水塊での鉛直循環⁴⁾やマイクロバブルによる曝気⁵⁾、高濃度酸素水製造装置によるダム貯水池での酸素供給試験⁶⁾、曝気噴流による手法⁷⁾など、淡水域を対象とし、主に流速を発生させる手法で貧酸素改善が行われている。これらは酸素供給により栄養塩濃度、金属イオン濃度の低下が観測され、溶存酸素量(DO)の上昇を報告している。しかし、海域および汽水湖においては浚渫窪地など特殊地形における酸素供給効果が報告されている⁸⁾のみである。

また、塩水性水塊で流動の影響が無視できない区域、および結氷する水域での酸素供給の影響については報告がない。そこで我々は実際の結氷する汽水湖沼での酸素供給効果を検証することを目的として、網走湖の貧酸素塩水に水中型気液溶解装置(WEP：特許第3849986号、松江土建(株)・土木研究所)を用いて、DO供給時に起こる化学的变化について報告⁹⁾し、硫化水素の酸化によって固体硫黄が析出して無害化することを明らかにした。さらに現地にWEP酸素供給プラントを建設し、秋期のプラント運用による水質変化の観測結果から、目的とする

水深(標高-7.5 m)に選択的にDO供給し、実水域においても水質が改善することを報告¹⁰⁾した。そこで本研究は、結氷下および融雪期の運用による観測結果をまとめ、DO供給効果について報告するものである。

2. 試験設備の建設と観測

2.1 対象水域

対象水域の網走湖(図1参照)は北海道北東部に位置し、面積32.3 km²、最大水深16.1 m、平均水深6.1 m、貯水量約2億3千万 m³の海跡湖である。主な流入河川は網走川と女満別(メマンベツ)川であり、網走川が流入河川水量の約97%を占めている。網走湖の水位は潮位や洪水により標高-0.2~2.4 mで変動し、平均水位は標高0.39 m(水文水質DBより1971~2016年の川尻観測所平均)である。なお、塩淡水境界面は標高-4~-7 mで変動し、表面水位とは独立に変動する。このため水深基準では表面水位の変動で、高さを規定できないため、本論文では標高で統一する。また、下流部では網走川を通じてオホーツク海に接続し、海水が遡上して湖内では塩水と淡水の二層構造を形成している。網走湖では内水面漁業が重要な産業であり、ワカサギ、シジミなど国内でも有数の漁獲量である。一方で塩水層は湖内に局在化して無酸素化し

ているため、無酸素水塊中の硫化水素やアンモニアなど有害物質が、強風等で淡水層に暴露し、たびたび大規模な斃死が生じ、水質改善が重要な課題である。なお、網走湖は例年12月～3月まで湖面が全面結氷し、氷厚は1mほどになる。結氷前後も塩水密度が高いために塩水と淡水が混合せず循環期は存在しない、さらに氷板により水面からの酸素供給が遮断されるため、湖水全体の酸素濃度が低下する挙動¹¹⁾を示す。塩水層は通年での海水逆流や夏季降雨に伴う流出などの変動を受けるが、塩水層は残存して局在化する特徴がある¹²⁾、残存量は塩水交換量に比べ大量なため、塩水層の水質は無酸素、嫌気溶出が継続する水塊構造となっている^{11)~13)}。そのため塩水層の栄養塩濃度や硫化水素濃度は経年増加傾向にある。

2.2 試験設備

網走湖内の呼人港に酸素精製機など陸上設備、および岸壁から160m湖心側(図-1中B2地点)の標高-7mの位置にWEPなど水中設備を2017年8月28日に建設・設置し、概略を図-2に示す。水中設備は大きさ20m³、陸上重量1.2tで吐出量120m³/hのポンプを搭載し、浮力が100kgになるように浮子を取り付け、B2地点に図-2に示す様に水中立上で係留設置した。図-3に岸壁からの断面図および設置日のB2での鉛直投下式の水質計(Hydrolab社、DS5)での水質鉛直観測結果を示す。B2において標高-6.2mに明瞭な塩淡境界が存在し、塩水層は無酸素状態であった。境界面付近にDO供給するため、500kgのアンカーで固定、吐出口が標高-7.3m、吸入口が標高-6.8mになるように係留した。ここで、陸上で精製された酸素ガス(濃度92%)は水中設備に圧送し、圧送総量の80%が水中溶解する。そのため余剰酸素を残気吐出口から排気する必要がある。設置時の塩淡境界は標高-6.2mであったが、残気吐出口は、気泡上昇による塩水の連行が起きないように標高-3.5mに設定した。陸上設備は酸素圧送するための圧縮機や配電盤を装備し、送気管と電線を水中設備に接続させた。2017年8月28日に施工、調整完了し、2017年8月29日より24時間の連続運転を開始した。なお、設置標高は2000年以降の塩淡境界標高の最低値より1m下および電力供給時の電線長による電圧降下を考慮して標高-7.3mにしている。建設水域が国定公園であること、および予算の都合上から吐出標高は固定して試験運用を行った。

2017年夏期の運用結果については報告¹¹⁾しており、本研究では結氷期の2017年11月20日から2018年4月20日までの観測結果、及び融雪後の2018年5月25日から2018年8月20日までの観測結果をまとめる。なお、上記期間に故障等によるWEPの運転停止はなく、観測機器の故障等によるデータの未取得もないが、2018年4月20日～2018年5月25日までは薄氷流出や融雪出水によって現地作業が危険なため機器の再設置ができずにデー

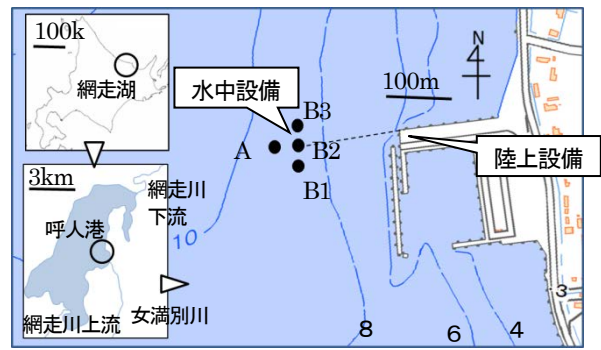


図-1 調査位置図

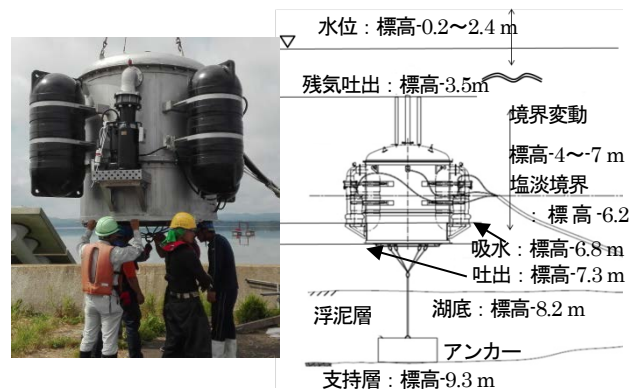


図-2 左：水中設備外観と右：水中設置概略立面図

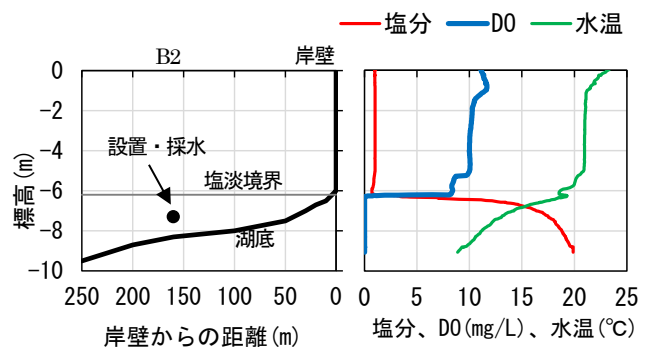


図-3 断面位置図と水質鉛直分布 (B2地点：2017/8/28)

タが取得できなかった。

2.3 現地観測

2.3.1 自記計観測

結氷期の2017年11月20日～2018年4月20日の間は図-1中A地点に超音波流速計(TELEDYNE RD Instruments Workhorse sentinel 1200 kHz)と圧力式水位計(Onset Computer Corporation HOBO-U20)を標高-9mに係留した。流速は60分間隔で毎秒5回の測定を60秒行った平均値を取得した。また、B1、B2、B3の各地点の標高-7.5mに塩分水温計(JFEアドバンテック Compact-CT)、光学式溶存酸素計(JFEアドバンテック RINKO-W)、クロロフィル濁度計(JFEアドバンテック Infinity-CLW)に係留した。加えてB1の標高-3.0m、標高-5.5mに塩分水温計(JFEアドバンテック Compact-CT)に係留した。B1とB2間、B2とB3間は25mの距離をとって南北方

向に配置した。設置期間中は1時間間隔でデータを取得した。融雪後の2018年5月25日～2018年8月20日の間はA地点の標高-9.0mに超音波流速計、B2、B3地点の標高-7.5mに塩分水温計、光学式溶存酸素計、クロロフィル濁度計を係留した。設置期間中は1時間間隔でデータを取得した。

2.3.2 鉛直観測

投下式水質計(Hydrolab社、DS5)でB2を中心に300m四方内の13地点で水質鉛直分布観測を行い、空間的な水質観測を実施した。観測項目は水温、塩分、DO、濁度で、実施日は2018年2月28日、5月25日である。ここで、実際にどの程度の範囲に効果が発現するかは全く不明であり、その効果を検出するために調査範囲を設定している。しかし予算の都合上および氷上作業のための安全確保、同一日の穿孔観測実施のためには、今回設定した地点数と範囲が限界であった。

2.3.3 水質分析、底質分析

2017年10月26日、2018年8月20日および鉛直観測と同一日にB2地点の標高-7.5m(塩水)で採水を行い、日本工業規格に準じた水質分析を行った。分析項目は全有機炭素(TOC)、全リン(T-P)、オルトリン酸態リン(PO_4 -P)、全窒素(T-N)、アンモニウム態窒素(NH_4 -N)、亜硝酸態窒素(NO_2 -N)、硝酸態窒素(NO_3 -N)である。加えて、硫化水素については、管原ら¹⁴⁾の手法を用いて、酢酸亜鉛固定法により定量した。また、参考として北海道開発局網走開発建設部のホームページで公開されている定期水質観測結果から湖心のデータを比較した。

また、エクマン・バージ採泥器によりB2地点の採泥を行い、採取泥全量を混合攪拌して試料とし、強熱減量、T-P、T-N、硫化物、TOCの分析を行った。採泥日は2017年9月28日、11月2日、2018年5月25日、8月20日である。

3. 観測結果

3.1 水位・気象

図-4に気象庁網走観測所の風速と降水量、図-5に気温と積雪深、図-6に国土交通省網走潮位、網走湖水位をまとめる。各データは気象庁WEBより毎正時データを取得した。なお、目視観察による湖水面の全面結氷日は2017年12月10日、全面開氷日は2018年4月10日であった。本研究では便宜上2017年12月10日から2018年4月10日を結氷期、2018年4月10日以降を融雪後と呼称する。図-4、図-5より結氷期は融雪後よりも風速が強く、降水量は少なくなっていた。結氷期の降水は気温が氷点下であり、雪として降下して積雪深の上昇となっている。積雪深は気温が上昇に転じる2月20日をピークとして減少に転じ、3月26日にゼロとなった。

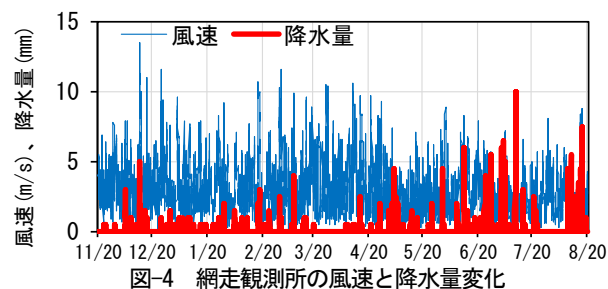


図-4 網走観測所の風速と降水量変化

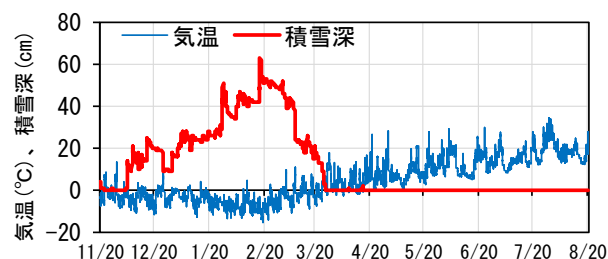


図-5 網走観測所の気温と積雪深変化

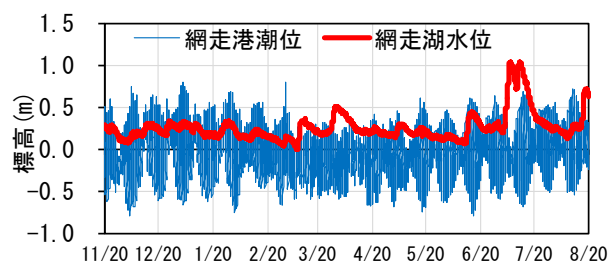


図-6 網走港潮位と網走湖水位

図-6より結氷期でも氷面が変動することが確認される。観測水位は水面高さであり、氷面高さは0～10cm程度水面高さよりも高くなるが、ほぼ観測水位と同程度である。高さの変動は水位変動に依存し、網走湖では0.1～0.3mの範囲で変動していた。なお、氷厚の連続観測データはない。気温が10°Cまで上昇した3月10日に湖水位も急上昇し、水際の開氷により氷面変動が助長されたと推察される。さらに4月1日に気温が20°Cまで急上昇すると融雪洪水流入により、湖水位の上昇となった。なお、このとき降雨はなく、氷板も残存していた。また、結氷期は潮位が湖水位よりも高くなる頻度が多いため、海水の逆流により湖内に海水が流入している。一方で融雪後は降雨に連動して湖水位が上昇し、6月15日や7月10日に水位のピークが観測された。

3.2 自記計観測結果

まずA地点の超音波流速計の標高-7.5mの観測結果を抽出して北方成分と東方成分の各成分毎に流速を積算した結果をまとめる。北向きおよび東向きの流速を正值として、任意期間中の毎時観測流速を単純加算して、時系列の積算値とした。そのため北向きまたは東向き流速が連続する場合は正值が増大し、南向きまたは西向き流速が連続する場合は負値が増加することになる。

図-7 は結氷期のデータで起算点を 2017 年 11 月 20 日 13 時、積算期間を 2018 年 4 月 20 日 13 時までとした結果、図-8 は融雪後のデータで起算点を 2018 年 5 月 25 日 13 時、積算期間を 2018 年 8 月 20 日 13 時までとした結果である。図-7 より 11 月 20 日から 12 月 12 日までは各成分は北向き、西向きに卓越して変動するが、その後は変動幅が小さくなっていた。さらに北方成分は 4 月 10 日にピークを有する挙動となり、3 月 30 日から北向きに変動しはじめ、4 月 10 日に南向きに変動方向を変える挙動がみられた。これら変動契機は全面結氷や部分開氷と一致しており、結氷により湖水流動が抑制されることが確認された。次に図-8 より融雪後は北方成分はほぼ一様に北向きの流れが観測され、東方成分は 6 月 15 日までは東向きが卓越し、その後の 7 月 20 日まで西向きの流れが卓越する挙動を示した。これらは湖水位のピーク(図-6 参照)とほぼ一致し、降雨洪水が流況変化の契機となり、東方成分に影響することが確認された。

次に図-7、図-8 の結果より横軸に東方積算流速、縦軸に北方積算流速をとり、標高-7.5 m における水塊の移動軌跡を図-9 に示す。積算期間は結氷期について 2018 年 1 月 1 日 0 時～3 月 20 日 23 時、融雪後について 2018 年 6 月 1 日 0 時～8 月 18 日 23 時の各 80 日間とした。結氷期の水塊はやや北西に向かい揺らぎながら、原点近傍に集中する軌跡であった。一方で融雪後は北西に向かい移動する結果となった。2017 年の秋期の結果¹⁰⁾からも北西方向に水塊が移動しており、無氷期は同様の水塊移動となっていた。この結果から、結氷の有無により水塊移動は大きく異なり、結氷により水塊移動が抑制されることが確認された。

次に B1 地点 3 標高の水温変化を図-10 に塩分変化を図-11 に示す。図-10 の標高-3 m の結果から 12 月 10 日に水温変曲点が見られ、4 月 10 日までは水温 2℃以下の低水温を維持していた。これら変曲点は結氷日と開氷日に一致しており、結氷により表層ほど水温が低く、底層は 5～6℃で一定の水温変化を示した。図-11 の塩分変化から結氷中は各層の急激なばらつきは観測されず、淡水流入や風の影響がないことで、塩水状況が安定していると推測される。一方で標高-5.5 m では結氷とともに塩分の上昇が観測される。既往報告¹¹⁾でも見られているが、逆水温分布になることや塩分躍層は破壊されるが DO 躍層が存在し続け、栄養塩濃度は DO 躍層前後で大きく異なる挙動が見られる。水温と塩分は上方拡散して二重拡散対流の挙動が見られる、一方で DO や栄養塩については二重拡散対流挙動は確認されず、水塊の鉛直拡散に対する詳細は不明である。しかしながら、結氷期は氷面の氷板によって、風などの外力攪乱が抑制され、流況や水質鉛直分布の変動が少なくなることが確認された。

結氷期の 2 月 28 日の B2 地点における水質鉛直分布を

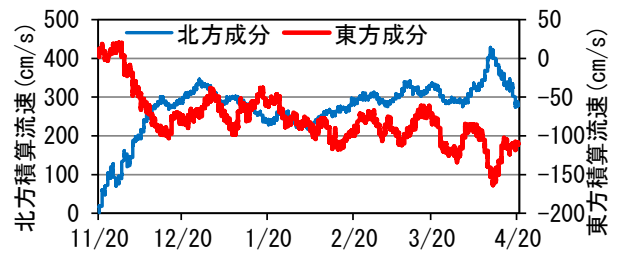


図-7 結氷期の積算流速変化 (標高-7.5 m)
積算期間: 2017/11/20~2018/4/20

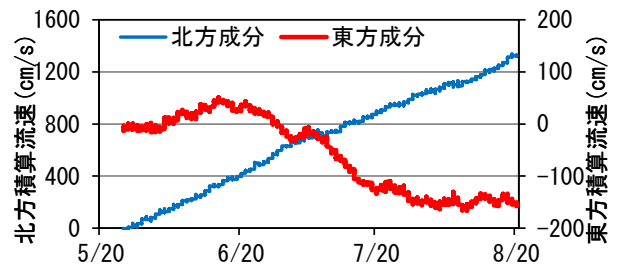


図-8 融雪後の積算流速変化 (標高-7.5 m)
積算期間: 2018/5/25~2018/8/20

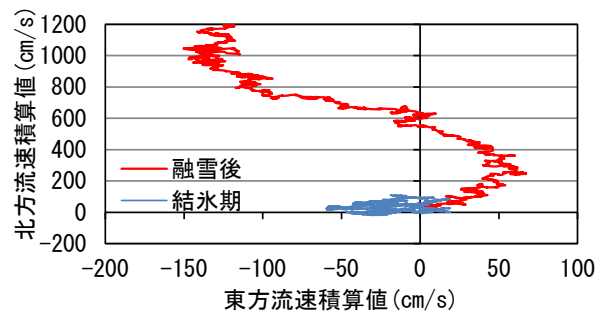


図-9 水塊の相対軌跡
(A 地点標高-7.5 m、積算期間 80 日)

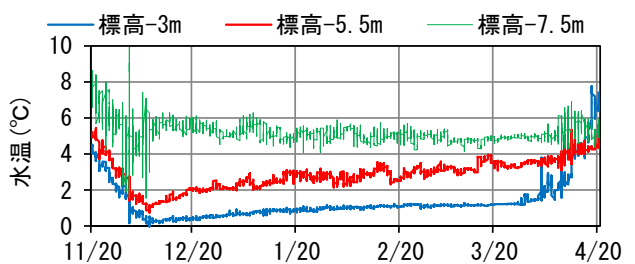


図-10 結氷期 B1 地点水温変化

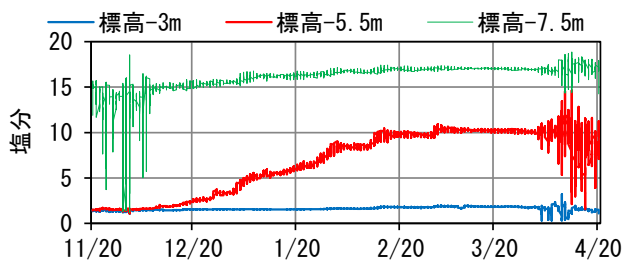


図-11 結氷期 B1 地点塩分変化

図-12に示す。このとき氷厚は80cmであった。DOの躍層は標高-6.5m付近にみられるが、水温や塩分は躍層を形成せずに、緩やかな連続勾配を有して、表層ほど小さい値となる分布であった。さらにWEPの吐出口である標高-7.3m付近にDOと濁度のピークが確認された。WEPの吐出によって水塊の攪乱が起きないことは確認¹⁰⁾しており、この結果からも逆水温勾配や塩分躍層の破壊に影響せず、DOを供給して、硫化水素の酸化により無害化していることが確認された。

次に自記計連続観測結果を示す。図-13に結氷期のB1、B2、B3におけるDOの時系列変化、図-14に濁度の時系列変化を示す。B1はDO供給点(B2)の南側、B3は北側に位置している。図-9から水塊はB2からやや北西に移動している。そのためDOはB2で最も濃度が高く、0~35mg/Lで変動している。次いでB3で0~31mg/Lの濃度が検出されているが、B1では、ほぼ0mg/Lの無酸素となっており、結氷期間前後の無氷期間に対応してDOの増加がみられた。また、現地底層水に一時的にDO供給を行った水槽実験の結果から、現状硫化水素濃度での酸素消費速度⁹⁾では、20mg/LでDOを供給しても約30分でゼロとなる。加えて多量の硫化水素を含む無酸素水塊が流動接触するため、供給したDOは速やかに消費されて変動が大きくなっていると考えられる。

次に濁度の観測結果をみると、B1では観測期間平均で20NTU以下となり、B2とB3では観測期間平均で100NTU以上が検出されている。特に塩水の上方拡散(図-11参照)が顕著になった2月10日前後からB2の濁度上昇が顕著になっているように見受けられる。水量90Lの水槽実験⁹⁾では含有硫化水素濃度130mg/Lを完全酸化したときの濁度は1100NTUであったため、暫定的に水100L中の硫化水素10mgから酸化生成する固体硫黄によって濁度が1NTU相当上昇することになる。これよりB2においては時間あたり最大で100mg/L相当の硫化水素が無害化されていると推察される。実際には流動水塊のために体積の推定が困難であるが、初期硫化水素濃度を130mg/Lとすると、100mg/L相当は約75%の硫化水素酸化に相当する。

B2でDO供給され、北側のB3に向かいDOの減少と濁度の上昇となる挙動は融雪後も確認され、図-13、14に見られるように変動が激しい傾向であった。そこで表-1に各観測データの統計値をまとめる。参考として2017年秋期の結果¹⁰⁾も加える。B1では秋期、結氷期ともにDOと濁度が同程度であり、通年で南向きの流れが発生しづらいためと考えられる。一方で、B2では結氷期にDO、濁度ともに高濃度となり、B3まで効果が波及していることがわかる。秋期に比べて水塊流動が抑制されることで、硫化水素の酸化反応がより進行しやすくなるため、B2の水質変化が確認しやすくなっているものと推察される。

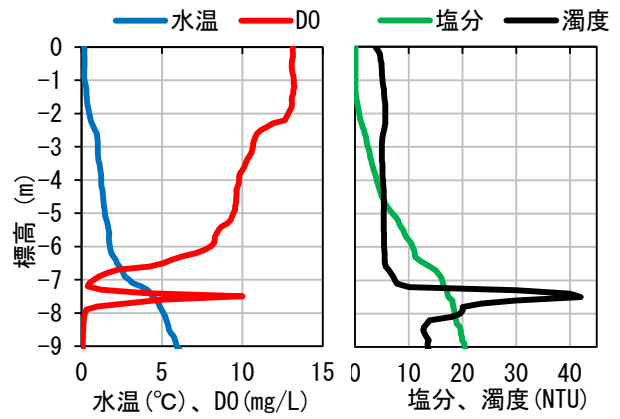


図-12 B2地点の水質鉛直分布 (2018/2/28)

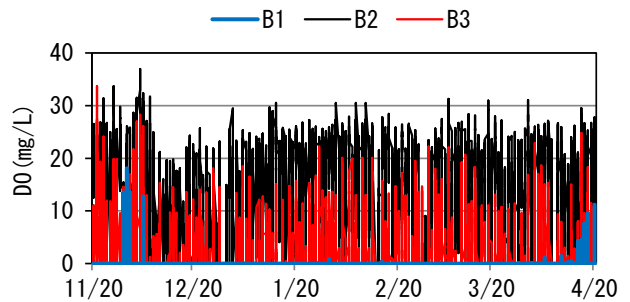


図-13 各地点DOの連続観測結果 (標高-7.5 m)

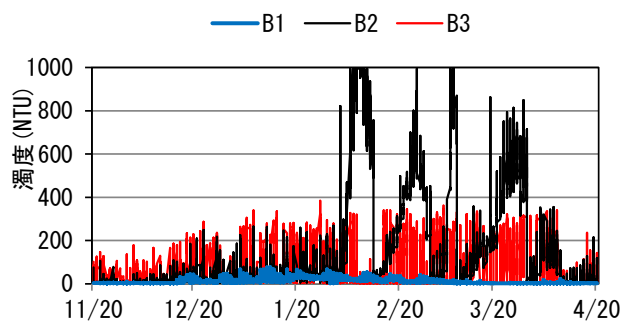


図-14 各地点濁度の連続観測結果 (標高-7.5 m)

表-1 標高-7.5mにおけるDOと濁度観測値の統計値

| 時期 | 項目 | 統計値 | B1 | B2 | B3 |
|-----|-----------|------|-------|--------|-------|
| 秋期 | DO (mg/L) | 平均値 | 0.18 | 11.69 | 1.11 |
| | | 標準偏差 | 1.23 | 7.61 | 3.01 |
| | 濁度 (NTU) | 平均値 | 9.03 | 21.35 | 41.59 |
| | | 標準偏差 | 16.68 | 28.61 | 41.59 |
| 結氷期 | DO (mg/L) | 平均値 | 0.10 | 14.02 | 2.08 |
| | | 標準偏差 | 1.02 | 8.96 | 4.49 |
| | 濁度 (NTU) | 平均値 | 13.59 | 156.22 | 71.01 |
| | | 標準偏差 | 13.08 | 237.22 | 90.91 |
| 融雪後 | DO (mg/L) | 平均値 | - | 4.24 | 0.16 |
| | | 標準偏差 | - | 6.65 | 0.90 |
| | 濁度 (NTU) | 平均値 | - | 45.33 | 23.99 |
| | | 標準偏差 | - | 51.81 | 40.93 |

一方で秋期は水塊流動が卓越するため、B2 より北側のB3 で濁度が上昇するような流下挙動が観測されている。さらに、融雪後には結氷期に比べ水塊流動が活発になり、流下輸送が再開されると同時に流動接触する新規硫化水素に対して十分な反応時間と酸素量が確保できないことで、DO や濁度の急激な低下が観測されている。秋期では濁度が B2 から B3 にかけて上昇傾向を示すが、融雪後では逆に低下傾向を示していた、これらは水塊の流動方向に起因していると推察され、今後も継続的なデータ取得によって、要因を特定する予定である。

3.3 鉛直観測結果

次にWEP設置位置を中心として、面的に鉛直観測を行い標高-7.5 mのDOと濁度を抽出し、クリギング法により内挿したコンター図を示す。図-15は2月28日、図-16は5月25日の観測結果である。図-15のDOは中心付近に10 mg/Lの高濃度がみられ、半径50~100 mの同心円状に分布するDOが検出された。2月28日はWEPの運転開始から178日、結氷後から78日経過しており、継続運転と水塊移動抑制の影響により、秋期の分布¹⁰⁾と比較しても、DO、濁度はいずれも高濃度で広範囲に効果が観測された。図-8の水塊移動状況からも、WEP本体付近に水塊が滞留するため、硫化水素の酸化が進行しやすく、DOが残存することが確認される。濁度は本体より50 m西側が最も高濃

度で160 NTUであり、その地点から同心円状に約300 m四方の範囲に濁度が分布していた。

図-16より融雪後の5月25日では、DOの分布はWEP本体より北西向きにのびる楕円状となり、本体近傍のDOも結氷期と比較すると4.0 mg/L程に低下した。濁度も本体から北西向きに広がる分布となり、結氷期に比べ濁度も低下していた。これらは開氷にともなって滞留水塊の移動が促進され、結氷期の改善水塊が流下拡散したことを示しており、DO供給点においては新規無酸素水塊の暴露によって、改善効果が更新されることが確認された。固体硫黄の溶解度は試薬安全データシート(SDS)からは不溶となっており、酸化除去された固体硫黄が硫化水素として再溶存する量は非常に少ないと思われる。そのため水塊流動が湖内循環するならば、DO供給をする限り、硫化水素は漸減すると想定される。また、5月25日はWEPの運転開始から265日経過しているが、含有硫化水素が膨大なため、開氷による流動再開で改善効果が初期化されるように見える。一方で、水塊移動が抑制される結氷期では、約2ヶ月のDO供給でおおよそ90000 m²に影響が波及することが確認された。

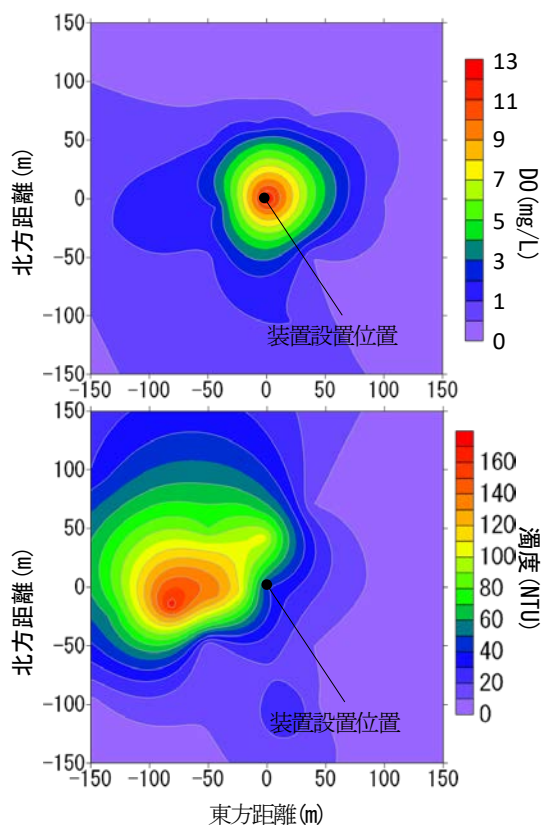


図-15 結氷期標高-7.5 mの水質平面分布
(2018/2/28 上: DO、下: 濁度)

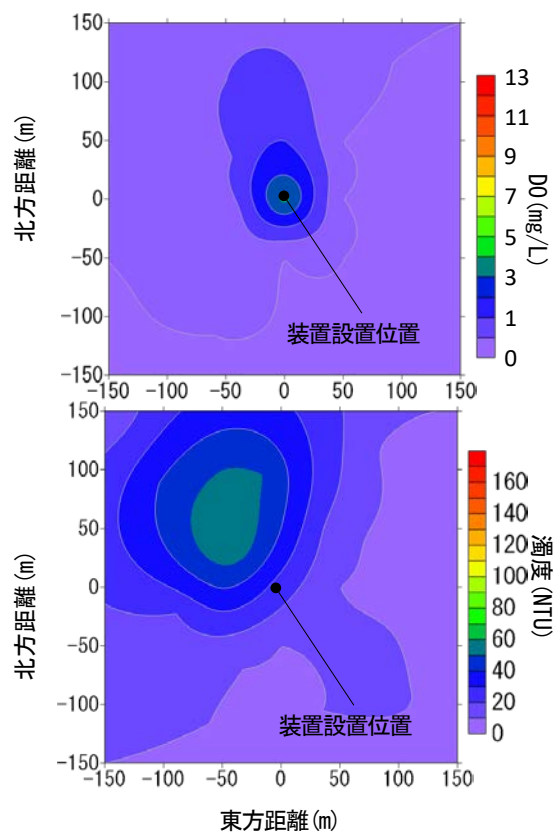


図-16 融雪後標高-7.5 mの水質平面分布
(2018/5/25 上: DO、下: 濁度)

3.4 水質分析結果

水質分析結果について B2 地点および湖心(B2 から距離 1.7 km)の塩水層(標高-7.5 m)での 2 地点比較を図-17～図-19 に示す。図-17 に T-P の時系列変化を示す。B2 では 2017 年 8 月 30 日より DO 供給を継続している。B2 において WEP 運転前は湖心と同程度であったが、運転後は濃度が低下¹⁰⁾しており、継続運転により、湖心よりも低濃度を維持している。B2 では 5 月 25 日が最大値となるような山型の変化を示し、結氷期から融雪後に濃度が増加していた。図示期間中の湖心と B2 の平均値は各々 3.2 mg/L、2.6 mg/L であり、約 20 % の濃度低下となっていた。図-18 の T-N 変化も同様に、B2 では湖心より低濃度であるが、結氷期から融雪期にかけて濃度増加する変動であった。なお、無機態窒素は全てアンモニウム態であり、硝酸態や亜硝酸態は検出されなかった。図示期間中の湖心と B2 の平均値は各々 15 mg/L、12 mg/L であり、約 20 % の濃度低下となっていた。WEP の特徴はその場の水塊を吸引して、DO のみを加えるため、希釈は起こらない。よって栄養塩濃度は硫化水素や土粒子の酸化反応に起因して、生成した個体硫黄や酸化された浮遊土粒子に吸着され水中濃度が低下していると推察される。

図-19 に B2 地点での TOC、全リン中の無機態リンの比 (PO₄-P / T-P)、全窒素中の無機態窒素の比(NH₄-N / T-N)の変化を示す。全リン中の 85～90 % は PO₄-P で時期によらずほぼ一定であった。一方で全窒素中の NH₄-N 比は 58～95 % で変化し、融雪後の 5 月 25 日に最大となっていた。TOC は期間中ほぼ一定で、むしろ 5 月 25 日に最大となっていた。TOC が上昇するときに無機態窒素が増加する結果であった。なお、DO 供給前の 2017 年 6 月の観測では無機態リンの比は 90 %、無機態窒素の比は 95 % であった。また、網走湖の水質分布は同一標高で平面的に均一に分布し、標高によって水質が区分される特徴^{11)～13)}がある。これらより結氷期から融雪後にかけて栄養塩が増加するのは沖合に相当する湖心からの水塊供給が考えられる。しかし、結氷期においては流動が抑制される結果からも、詳細については不明な点が多く、調査を継続する必要がある。

次に B2 地点における底質分析結果を表-2 にまとめる。T-P や T-N に変化はみられない。強熱減量は低水温期にやや低下する挙動がみられ、夏期に増加する挙動だった。硫化物と TOC については結氷期によって含有量の低下が確認され、融雪後も低下した含有量を維持する結果であった。これらの挙動は結氷期に水塊滞留して、WEP による DO 上昇によって底泥直上水の硫化水素が低下して底泥間隙水との平衡が変化したものと考えられる。TOC の減少について、詳細は不明であるが、硫化水素の減少でメタン細菌等の活性により有機物の分解が進行したことなどが推察される。この結果は結氷期に DO 供給する

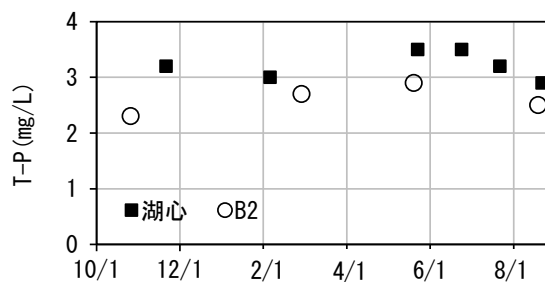


図-17 B2 と湖心の T-P の変化

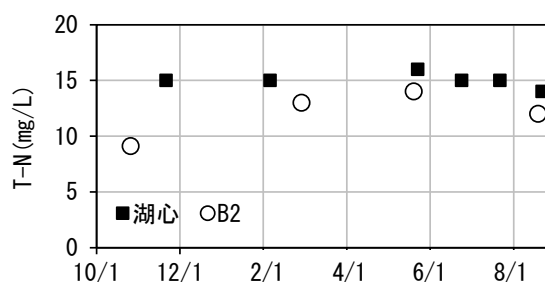


図-18 B2 と湖心の T-N の変化

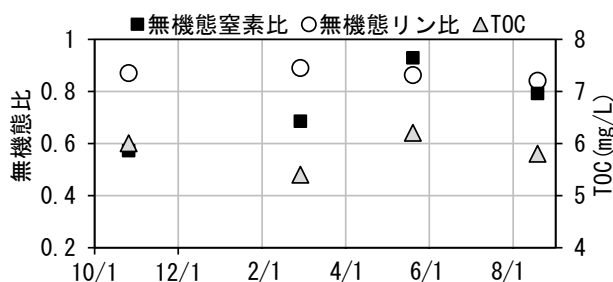


図-19 B2 におけるリン、窒素の無機態比変化

表-2 B2 における底質分析値

| 項目 | 単位 | 2017/ 9/28 | 2017/ 11/2 | 2018/ 5/25 | 2018/ 8/20 |
|------|------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 強熱減量 | % | 16.4 | 13.2 | 13.1 | 17.7 |
| T-P | mg/g | 1.1 | 0.8 | 1.0 | 1.0 |
| T-N | mg/g | 4.8 | 4.8 | 4.6 | 4.8 |
| 硫化物 | mg/g | 2.3 | 2.8 | 1.7 | 1.8 |
| TOC | mg/g | 33.5 | 34.5 | 31.0 | 31.8 |

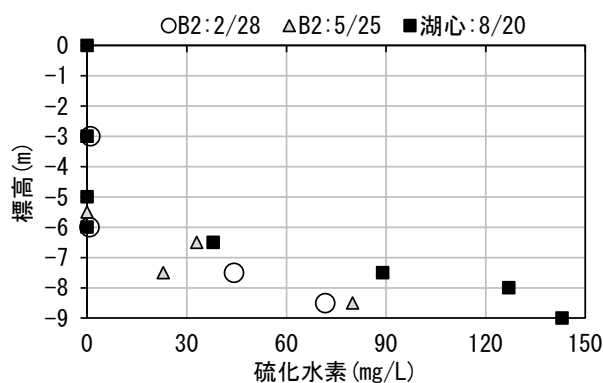


図-20 硫化水素分布の変化

ことで底質が改善し、改善効果が融雪後まで持続することを示唆している。

次に B2 地点における、硫化水素の鉛直分布の変化を図-20 に示す。結氷中の 2 月 28 日、融雪後の 5 月 25 日の結果および融雪後の 8 月 20 日の湖心での分布を示す。標高-7.5 m の硫化水素濃度は 2 月 28 日で 44 mg/L、5 月 25 日で 23 mg/L、湖心で 89 mg/L であった。DO 供給標高の濃度低下が顕著であり、結氷期よりも融雪後の方が硫化水素が低下しており、継続運転による影響と考えられる。さらに湖底付近まで濃度が低下しており、塩水層内（標高-6.0 m～-9.0 m）全体での硫化水素濃度積算値から暫定的に湖心と比較して 36～40 %の硫化水素の濃度低下が確認された。結氷期では DO の存在下で硫化水素が存在する結果となり、さらに現地データを蓄積する予定である。

4. まとめ

網走湖の底層貧酸素改善のため、現地に酸素供給装置を建設し、現地スケールでの運用試験を実施した。

結氷期を含め、通年での継続運転を実施した結果、結氷下においても DO 供給は可能で、結氷により水塊流動が抑制されることで、DO の上昇が明瞭に観測された。さらに硫化水素の酸化によって生成する固体硫黄を濁度として影響範囲を観測すると約 90000 m² に効果が波及していた。融雪後には水塊流動が大きくなるため、効果範囲が局在化しないために DO や濁度は低下するが、その影響は広範囲に拡散する結果となった。また栄養塩濃度の低下や硫化水素の 40 % の削減が確認され、吐出標高において最も酸化が進行した。また、塩水層内の鉛直方向にも影響が波及して底質の酸化挙動も確認されて、特に結氷期において顕著であった。今後も継続した長期運用を行い、詳細を観測する予定である。

参考文献

- 1) Paul E. B. : Total Phosphorus and Dissolved Oxygen Trends in the Central Basin of Lake Erie, 1970-1991, Journal of Great Lakes Research, Vol.19, No.2, pp.224-236, 1993.40, pp.97-105, 1983
- 2) Zackary, W. M., Cayelan, C.C., Alexandra, B.G., Kathleen, D. H., Jonathan, P.D., Spencer, D.K., Ryan, P.M., Madeline,

- E.S. : Effectiveness of hypolimnetic oxygenation for preventing accumulation of Fe and Mn in a drinking water reservoir, Water Research, Vol. 106, pp. 1-14, 2016
- 3) Beutel, M.W., Horne, A.J. : A review of the effect of hypolimnetic oxygenation on lake and reservoir water quality, Lake and Reservoir Management, Vol. 15, No. 4, pp. 285-297, 1999
- 4) 小松利光、岡田知也、中村由行、中島信一、長谷部崇、藤田和夫、井芹寧：閉鎖性水域底層への表層水供給による水質改善効果、海岸工学論文集、Vol.46, pp.1111-1115、1999
- 5) 道奥康治、神田徹、大成博文、西川孝晴、松尾克美、木戸崇博：マイクロバブル・エアレータによる貯水池の水質浄化実験、水工学論文集、Vol.44, pp.1119-1124、2000
- 6) 今井剛、村上奉行、樋口隆哉、関根雅彦：閉鎖性水域における水質環境が高濃度酸素水の底層部への拡散およびその水質改善に及ぼす影響、環境工学研究論文集、Vol.45, pp.121-129、2008
- 7) Singleton, V.L., Little, J.C. : Designing Hypolimnetic Aeration and Oxygenation Systems-A Review, Environ.Sci.Technol., Vol.40, pp.7512-7520, 2006
- 8) 増木新吾、矢島啓、清家泰：WEP を用いた中海（米子湾）浚渫窪地底層への高濃度酸素水導入実験、土木学会論文集 B1(水工学)、Vol.67, No.4, I_1525-I_1530、2011
- 9) 杉原幸樹、新目竜一：汽水湖の貧酸素改善手法に関する実験的研究、土木学会論文集 G(環境)、Vol.73, No.7, III_351-III_356、2017
- 10) 杉原幸樹、増木新吾、菅原庄吾、新目竜一：汽水湖の底層貧酸素改善に関する現地試験、土木学会論文集 G(環境)、Vol.74, No.7, III_35-III_41、2018
- 11) 杉原幸樹、平井康幸：塩淡水境界を持つ汽水湖の結氷下の水質挙動、土木学会論文集 B1(水工学)、Vol.72, No.4, pp. I_655-I_660、2016
- 12) 杉原幸樹、新目竜一：2016 年北海道豪雨時および 2017 年融雪期の網走湖における塩水挙動の現地観測、土木学会論文集 B1(水工学)、Vol.74, No.5, pp. I_499-I_504、2018
- 13) 池永均、山田正、向山公人、大島伸介、内島邦秀：網走湖の塩水化の機構と塩淡水二成層の長期変動特性に関する研究、土木学会論文集、No.600/II-44, pp.85-104、1998
- 14) 菅原庄吾、鮎川和泰、千賀有希子、奥村稔、清家 泰：砂泥堆積物中溶存硫化物の分析法の開発及びその現場への適用、科学研究費補助金研究成果報告書（研究番号：19201016）、pp.40-48、2010