

生物応答試験による下水処理水の影響評価の試み

武田文彦・真野浩行・岡本誠一郎

1. はじめに

家庭や産業由来の排水には多種多様の化学物質が含まれている。しかしそれら全ての化学物質が下水処理における処理対象物質というわけではなく（例えば難分解有機物や重金属など）、処理場で除去しきれない一部の化学物質は下水処理水中に残存したまま河川等の水環境へ放出されている。そのような化学物質が放流先の水生生物・生態系に何らかの影響を及ぼすことが懸念されており、下水処理水中に残存する化学物質に対する生物影響評価が重要な課題となっている。従来行われてきたように、個々の化学物質の濃度に基づき生態影響を評価する方法があるが、下水処理水中に含まれる化学物質の種類はよく分かっていない。また個別の化学物質の生物影響評価では化学物質の複合影響（生物影響の相加・相乗・相殺効果）や未知の化学物質の影響を評価することはできない。

近年では個別の化学物質の濃度に基づき生物影響を評価するのではなく、生物を用いて化学物質の影響を評価する生物応答試験が注目されている。生物応答試験は、個別の化学物質等の定量などによる従来の物理化学的分析方法に比して、複合影響を評価できる、生物への直接的な影響（生長の度合い、生死等）に基づき評価するため一般市民が評価結果を実感しやすいなどの特徴がある。このような手法は現在、アメリカ、カナダ、ドイツや韓国などの様々な国で実施されている。日本では、平成22年度から環境省により、生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会が立ち上げられ、制度の導入や運用法を検討する「制度・運用分科会」と試験法を作成する「技術検討分科会」において、それぞれの内容が検討されてきた。技術検討分科会で検討された試験法については概ね確定され、生物応答を用いた排水試験法（検討案、以下「試験法」という。）¹⁾として、平成25年3月1日に国立環境研究所において公表されている。

下水処理水の生物影響評価については、硝化細菌を用いたバイオセンサ²⁾などによって行われた例がある。しかし、今後はこの試験法¹⁾が制度として導入される可能性があることから、本試験法¹⁾に基づいた下水処理水の生物影響の評価に関する基礎的知見の収集が求められる。

本調査では、下水処理場への流入下水及び活性汚泥処理実験装置より得た二次処理水、放流水を対象に、生物応答を用いた排水試験法等を参考に、藻類、ミジンコ類、魚類を用いた生物応答試験を実施し、各処理水について生物影響評価を試みた。また、流入下水、二次処理水、放流水の試験結果を比較し、下水処理による生物影響の低減効果を調査した。

2. 実験方法

2.1 実験装置の概要

本調査では、主に生活排水が流入する実下水処理場において、活性汚泥処理実験装置を設置した。装置は最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L×4槽）、最終沈殿池（500L）、塩素混和池（100L）から構成されている。生物反応槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行い、標準活性汚泥法による処理を行った。装置の概要を図-1に示す。

2.2 下水試料の採水

藻類試験用の下水試料は2014年2月19～20日、ミジンコ類試験用の下水試料は2014年2月13～14日、ゼブラフィッシュ試験用の下水試料は2014年1月8～9日に24時間連続採水した。下水試料は流入下水、二次処理水、放流水とした。採水後、直ちに0.22 μ mポアサイズのフィルターを用いて滅菌ろ過を行った。試験法¹⁾に従い、ろ過試料を採水後、可能な限り36時間以内に生物応答実験に使用した。下水試料は4℃暗所にて保管した。

2.3 藻類生長阻害試験

本試験は藻類を下水試料に一定期間曝露して生長速度を調べ、対照区と比較することにより、藻類の増殖に対する下水試料の影響を明らかにする。

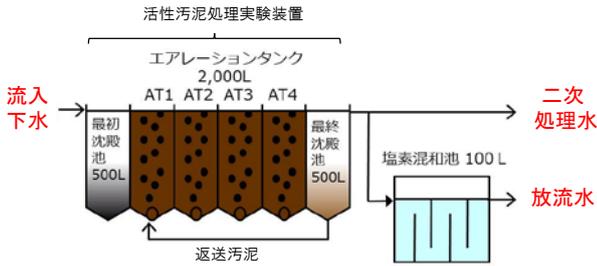


図-1 活性汚泥処理実験装置の概要と下水試料

被験生物には単細胞緑藻ムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*、NIES-35株) を用いた。本試験は試験法¹⁾を参考に実施した。各下水試料に対して5濃度区(試料割合83.3%、42%、21%、10%、5.2%)に調整し、同一試料を5つ用意した。対照区にはAAP培地(藻類培養用の富栄養培地)を用いた。培養期間は72時間とし、各試験区の生長速度(day⁻¹)を求めた。

2.4 オオミジンコ繁殖試験

本試験は、ミジンコを下水試料に一定期間曝露し、ミジンコの繁殖に対する下水試料の慢性毒性を明らかにする。試験法¹⁾ではニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いた試験を行うが、本研究では、経済協力開発機構(OECD)のテストガイドラインNo.211³⁾に準拠し、生後24時間以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いて実施した。オオミジンコはニセネコゼミジンコと変わらない感受性を示すといわれている。

各下水試料の5濃度区(試料割合80%、40%、20%、10%、5%)および対照区を用意した。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、脱塩素水道水を用いた。濃度区ごとに生後24時間以内の個体を10匹(1容器1匹)曝露し、曝露期間を21日間とした。曝露方式は半止水式(少なくとも週3回、2日または3日ごとに換水)とし、曝露終了後まで、試験個体の生存と産仔数を観察し、各下水試料の濃度区ごとに死亡率と累積産仔数を求めた。

2.5 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

本試験は、魚類の受精卵を下水試料に一定期間曝露し、ふ化率や生存率などを調べ、対照区と比較することにより、魚類に対する下水試料の生物影響を明らかにする。本試験は試験法¹⁾に基づき実施した。試験には5濃度区(試料割合80%、

40%、20%、10%、5%)の下水試料および対照区を用意した。各下水試料の希釈および対照区には脱塩素水道水を用いた。容量は50mL/容器とし、同一試料を4つ用意して試験した。試験区ごとに受精4時間以内の受精卵を40個(1容器10個)曝露した。試験は対照区の半数以上がふ化した日をふ化日とし、ふ化日から5日後まで¹⁾とすることに基づき、曝露期間は8日間とした。曝露方式は半止水式(1日おきに換水)とし、ふ化率、生存率を求めた。

2.6 統計解析方法

各試験での評価指標(藻類:0~72時間の生長速度、オオミジンコ:累積産仔数、ゼブラフィッシュ:ふ化率と生存率)について、試験法¹⁾に基づき有意水準 $\alpha=0.05$ とし、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められない濃度区のうち、最も高い試料割合(%)の値を無影響濃度NOEC(No Observed Effect Concentration)として求めた。全ての下水試料割合で対照区と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合をNOECとした。

3. 実験結果

3.1 下水試料の水質

採水後の各下水試料の水質を表-1に示す。流入下水に比べると、二次処理水や放流水の全窒素(T-N)、全リン(T-P)、溶存有機炭素(DOC)は低下傾向にあることから、本実験装置により良好な処理がなされていたと判断した。

3.2 藻類生長阻害試験

図-2(a)に各下水試料割合に対する藻類の生長速度を示す。流入下水は、42%以上の割合で対照区よりも生長速度が有意に低下し、生物影響が確認された。二次処理水と放流水は最大の濃度区である、83.3%の割合でも生長速度の低下が見られず、藻類の生物影響は確認されなかった。よって生長速度に対するNOECは流入下水で21%、二次処理水及び放流水は83.3%と求められた。

3.3 オオミジンコ繁殖試験

各下水試料でのオオミジンコの累積産仔数を図-2(b)に示す。全ての下水試料の濃度区において、対照区に比べて累積産仔数が有意に低下する試験区はなかった。すなわち、流入下水、二次処理水と放流水はオオミジンコの累積産仔数へ生物影響

表-1 下水試料の水質項目

採水日	下水試料	pH	DO (mg/L)	水温 (°C)	EC (mS/m)	TRC (mg/L)	T-N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	T-P (mg/L)	DOC (mg/L)
2014年 1月8~9日	流入下水	6.97	3.40	15.3	63	-	29.2	17.1	1.95	33.1
	二次処理水	6.87	9.20	15.7	53	-	16.5	0.13	1.57	6.58
	放流水	6.84	9.50	15.4	56	0.11	16.5	0.12	1.58	7.03
2014年 2月13~14日	流入下水	6.73	1.32	9.2	72	-	24.0	17.4	2.13	34.2
	二次処理水	6.47	8.87	9.8	59	-	15.6	2.39	1.27	9.64
	放流水	6.72	9.99	9.5	60	0.37	16.1	2.47	1.33	9.63
2014年 2月19~20日	流入下水	6.68	10.7	9.4	63	-	20.7	15.1	1.81	30.9
	二次処理水	6.42	9.1	9.4	53	-	18.0	0.04	1.62	7.73
	放流水	6.65	9.3	9.3	56	0.87	17.2	0.00	1.62	7.33

DO: 溶存酸素(Dissolved Oxygen) EC: 電気伝導度(Electric conductivity)
 TRC: 総残留塩素濃度(Total Residual Chloride) T-N: 全窒素(Total Nitrogen) NH₄-N: アンモニア態窒素
 T-P: 全リン(Total Phosphorus) DOC: 溶存有機炭素(Dissolved Organic Carbon) -: 未分析

は見られなかった。よって累積産仔数に対するNOECはいずれの下水試料においても80%と求められた。

3.4 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

図-2(c)に各下水試料でのふ化率及び生存率を示す。流入下水の場合、試料割合80%でふ化率と生存率が対照区よりも有意に低下した。一方、二次処理水と放流水では全ての濃度区において対照区と同等であった。以上の結果から、ふ化率と生存率に対するNOECは流入下水では40%であり、二次処理水と放流水はいずれも80%と求められた。

4. 考察

各試験生物における各下水試料のNOECを表-2にまとめた。流入下水ではNOECが21%（藻類）や40%（ゼブラフィッシュ・ふ化率と生存率）となるように、生物影響が見られる試験区があったが、二次処理水や放流水では最高の割合である80%でも無影響となった。このことから標準活性汚泥法によって水生生物に対する生物影響を改善できたことが明らかになった。放流水では二次処理水と同様にNOECがいずれも80%であったことから、本調査での総残留塩素（TRC）濃度では塩素消毒による生物影響は無かったことも分かった。山本ら⁴⁾の報告では、放流水のTRC濃度が1.5mg/Lの場合はムレミカヅキモ、ニセネコゼミジンコやメダカに影響が見られたが、0.4mg/L以下であればほとんど影響しなかった。本調査でのTRC濃度は、ムレミカヅキモでは0.87mg/L、オオミジンコで0.37mg/L、ゼブラフィッシュで0.11mg/Lであったが、山本ら⁴⁾の研究と同様に

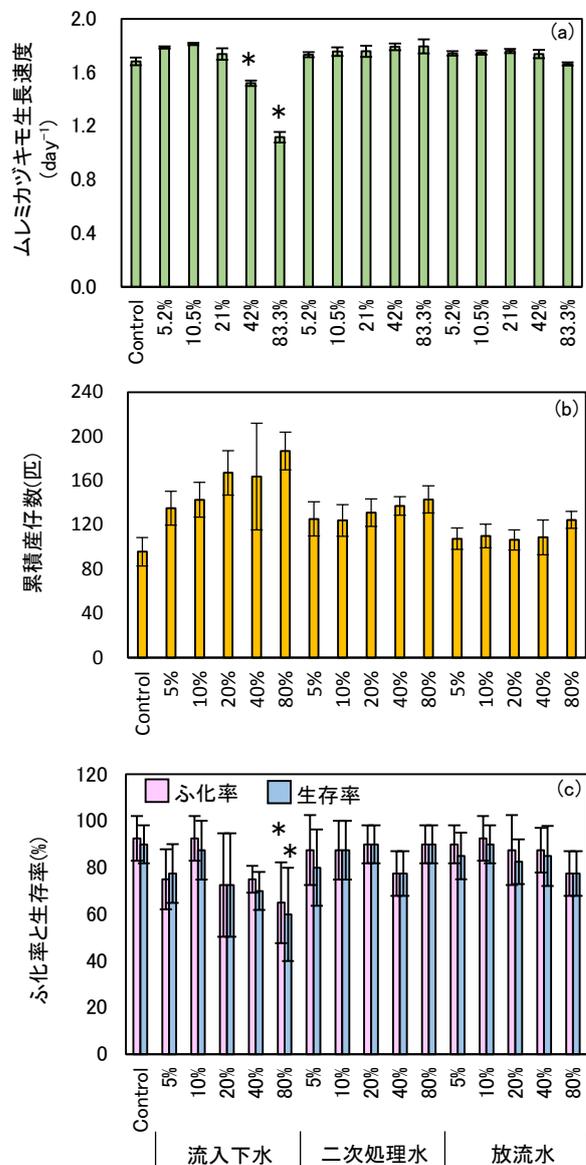


図-2 (a) 緑藻ムレミカヅキモ、(b) オオミジンコ、(c) ゼブラフィッシュを用いた下水試料の生物応答試験結果。数値は平均値±標準偏差(エラーバー)。*: 対照区より有意に低下(p<0.05)

表-2 ムレミカツキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュに対する各下水試料の無影響濃度NOEC

試験生物	評価指標	下水試料	NOEC(%)
ムレミカツキモ	生長速度	流入下水	21
		二次処理水、放流水	83.3
オオミジンコ	累積産仔数	流入下水、二次処理水、放流水	80
		流入下水	40
ゼブラフィッシュ	ふ化率	二次処理水、放流水	80
		流入下水	40
	生存率	流入下水	40
		二次処理水、放流水	80

0.4mg/L以下では試験生物に影響しないことが本調査でも確認できた。また、本調査のムレミカツキモを用いた試験から、TRC濃度が0.9mg/L程度でも影響しない場合があることが示唆された。

5. まとめと今後の課題

本調査では流入下水および標準活性汚泥法で処理した二次処理水、塩素消毒した放流水に対し、緑藻ムレミカツキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いて生物影響を評価した。流入下水ではムレミカツキモ、ゼブラフィッシュに対して生物影響が見られたが、二次処理水および放流水では影響がなかった。よって下水の生物影響は標準活性汚泥処理によって改善できることが明らかになった。

本調査は1～2月に実施したものであるが、生物影響物質の下水処理場への流入は時期によって異なる可能性があると考えられる。よって、下水の生物影響においては季節変化などに着目した、異なる時期での下水を用いた影響評価を行う必要がある。また、家庭排水や工業排水由来の化学物質の種類や量は下水処理場によって異なると考えられる。さらに、標準活性汚泥処理以外の処理方式では生物影響の低減効果が異なる可能性があることから、複数の処理場の下水を用いた生物

影響の評価とその比較に関する知見の蓄積が求められる。

放流水で生物影響が確認され、生物影響の低減を検討する場合、生物影響物質を解明することが必須である。山本ら⁵⁾が塩素等に着目して放流水中の生物影響物質を推定した知見があるが、日本では生物影響物質の解明はほとんどなされていないのが現状である。今後は毒性同定評価（排水中の生物影響物質を同定するための試験方法）を組み合わせた生物応答試験を実施し、生物影響物質の解明につながる情報を収集する所存である。

謝 辞

本研究は、国土交通省の平成25年度受託調査の一環として実施されたものである。ここに感謝の意を表す。

参考文献

- 1) (独)国立環境研究所：生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナーテキスト、2013
- 2) 岡安祐司：水質監視システム—硝化細菌を用いた毒物検出バイオセンサの開発と実用化—、下水道協会誌、Vol.41、No.504、pp.33～37、2004
- 3) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD): *Daphnia magna* Reproduction Test. No. 211. OECD, Paris, France, 2012
- 4) 山本裕史、安部香緒里、池幡佳織、安田侑右、田村生弥、中村友紀、鐘迫典久：徳島県内の下水処理施設放流水を対象にしたWET試験、環境工学研究論文集、Vol.47、pp.727～734、2010
- 5) 山本裕史、矢野陽子、森田隼平、西家早紀、安田侑右、田村生弥、鐘迫典久：下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価、土木学会論文集G（環境）、Vol.69、No.7、III_375～III_384、2013

武田文彦



土木研究所水環境研究グループ
水質チーム 研究員
Fumihiko TAKEDA

真野浩行



土木研究所水環境研究グループ
水質チーム 研究員
Hiroyuki MANO

岡本誠一郎



土木研究所水環境研究グループ
水質チーム 上席研究員
Seiichiro OKAMOTO