

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 松木 洋忠

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に反映を目標に、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

河川における医薬品類の量に対する下水処理場の寄与を明らかにするため、多摩川中流域を対象に、河川に流入する負荷量および下水処理場の放流水が流入する地点における負荷量に対する下水処理場の寄与率を、野外調査に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量に基づいて算出することを試みた。

多摩川中流域における現地調査と、多摩川水系、淀川水系、霞ヶ浦水系の 8 地点の河川底質を用いた収着試験を実施した。その結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が河川底質に蓄積されやすいことを明らかにした。また、試験溶媒のイオン強度、EDTA 濃度、pH を変化させた収着試験を行うことで、azithromycin と levofloxacin の底質への収着は、主に陽イオン交換反応によるものであることを明らかにした。

水系暴露解析モデル AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いた 250m メッシュの非定常解析により、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。流域への azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 3 種医薬品の排出量として、既存の下水処理場調査実測データと下水処理人口に基づく推定式から多摩川流域内の下水処理場からの放流負荷量を推定してモデル計算に適用した。その結果、3 種医薬品の全てで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が、モデル計算濃度は概ね実測値の 1/10～10 倍の範囲の値であった。また、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。

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

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。その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。

下水処理水中での消毒副生成物等としての存在および公共用水域への影響可能性が懸念される化学物質として有機ハロゲン化合物類に着目し、1) 懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物（TOX）のうち全有機塩素化合物（TOCl）の分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に塩素消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*）に対する影響評価を実施した。その結果、1) TOCl 分析用下水試料の保存性に関する知見を得るとともに、高 SS 濃度水試料の TOCl 分析前処理方法を見出した。2) 模擬簡易沈澱下水を用いた消毒副生成物の生成メカニズム検討実験から、塩素注入率・残留塩素濃度・反応時間と生成 TOCl 濃度の関係性を確認するとともに、消毒副生成物の放流先河川における挙動調査から、その影響に関する知見を得た。3) 応急復旧段階を模した下水を用いたムレミカヅキモに対する影響評価から、消毒後に残留塩素を中和することで、藻類への影響が改善されることが推察された。塩素消毒副生成物として検出されたクロロホルム、トリクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドは、ムレミカヅキモの増殖に影響を与える濃度に達していなかったため、ムレミカヅキモに対する影響が検出された原因として、上記以外の副生成物の影響が推察された。

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した。消毒耐性病原微生物に対応した代替指標の提案では、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている F 特異 RNA フェージ（F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH）遺伝子群について、活性汚泥処理での除去効果を評価し、NoV の指標としては FRNAPH GII が有効である可能性を示した。塩素消毒による不活化効果では GII～GIV を指標とすることで安全側の評価となることが確認された。紫外線消毒では、FRNAPH GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。

環境基準の見直しにより、今後、放流水質基準項目の大腸菌群は大腸菌指標へ移行することが想定されるため、下水試料に適した大腸菌の測定法の提案を目的に、各種特定酵素基質培地・手法による回収率、希釈水の違いおよび試料中の大腸菌濃度が CV に及ぼす影響を評価し、公定法として許容値を満たす測定法を提示できた。水温上昇時に二次処理水の大腸菌割合が高まる要因の 1 つは、流入下水の大腸菌/群の割合が高まっていることによる可能性が示唆された。従来指標との関連性として、大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は二次処理水が 14%、残留塩素の平均濃度が 0.25mg/L の放流水では 12%であり、放流水質の技術上の基準値を検討するための知見が得られた。

ダム貯水池水質において、動植物プランクトンの省力かつ高度な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と適用ならびに機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に取り組んだ。第 4 期中長期研究計画期間中、ダム貯水池に存在する微生物（細菌、古細菌、植物プランクトン、動物プランクトン等）を、次世代シーケンサーを用い網羅的に検出する方法を確立した。また、機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発を進め、ダム管理所から実務に用いた画像を収集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、訓練画像の質や枚数、組み合わせに応じて認識率が向上する分類モデルを作成することが可能になった。さらに、高濃度酸素溶解装置（WEP システム）が導入されているダム貯水池において、次世代シーケンサーによる詳細な微生物叢データを取得することで、環境改善効果の指標となるカビ臭産生細菌の分布や推移を把握することが可能となった。また、微量金属が藍藻類の生長に及ぼす影響について検討するために、アオコ発生の主要な原因藻類と考えられる *M. aeruginosa* を用いた 3 種の藻類生長試験を行った。ダム湖水に Mn 添加を行った試験の結果では、一部のダム湖水では Mn 添加により *M. aeruginosa* の生長が促進されることが明らかになった。5 種の金属の添加を行った試験の結果では、*M. aeruginosa* の生長に対して Fe が第一制限物質となること、Mn と Co が第二制限物質となることが示

唆された。Fe 濃度を調整した培地の試験の結果では、Fe 濃度が 20 $\mu\text{g/L}$ 以下と 50 $\mu\text{g/L}$ 以上の場合で生長に明確な違いが表れ、ダム貯水池における Fe 濃度の既存報告を合わせると Fe 濃度が実環境中の *M. aeruginosa* の生長に対しても影響している可能性が示唆された。

気候変動の影響によりダム貯水池において発生頻度が増大すると考えられているアオコ発生予測手法の開発に向けて、機械学習手法を用いた Chl-a 濃度予測モデルの構築に取り組んだ。モデルの構築においては、機械学習手法として全結合型の NN モデルと LSTM モデルの 2 つを採用し、ダム貯水池の水質や水象等のデータを入力データ、Chl-a 濃度を出力データとするモデルを構築した。モデル構築の結果、最も高い予測精度を示したダムにおけるモデルの相関係数は $R=0.70$ であり、藻類の夏季の濃度ピークをある程度再現可能であった。一方で、Chl-a 濃度の変動が複雑なダムでは十分な予測精度が得られなかった。これらの原因は Chl-a 濃度のみでは藻類種に応じた増殖の特性をとらえられていないためと推測され、予測精度の向上には異なった変数の学習データが必要と考えられた。また、最も高い精度が得られたダムを対象として変数群に対する感度解析を行った結果、水象データを除いたモデルで最も精度が低下し、対象としたダムにおいては水象データが Chl-a 濃度予測に大きく影響していることが推察された。これらの結果から、一部のダムでは機械学習手法によってアオコ発生の予測が可能になることが示唆された。

(2) 水質リスク軽減のための処理技術の開発

都市河川で検出される化学物質の中には、下水道を経由して到達するものが存在する。下水処理場における水質リスク軽減技術の開発については、平常時と災害時で適応技術が異なることに留意する必要がある。平常時は下水処理水中の残存する微量化学物質の除去技術の開発、災害時は流入下水に含まれる有害物質の応急的除去技術の開発が求められる。本研究は、平常時の下水処理水に残存する直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)、医薬品 3 物質 (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) の担体を用いた追加的処理法の開発および災害時に被災した下水処理場を想定した沈殿処理での有害金属の除去特性を把握した。下水処理水中の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) の除去については、流動型担体処理で除去率 90%を得るのに必要な水理学的滞留時間は約 2 時間、99%では約 4 時間であることを確認した。NH₄-N が残存する下水処理水中の医薬品 3 物質 (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) の除去については、NH₄-N の除去率は水理学的滞留時間 45 分の固定床型担体処理で 92%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、レボフロキサシン除去率は、9.6%、4.9%、72%となった。活性汚泥処理の後段に固定床型担体処理を追加することにより、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの下水処理全工程での除去率を 17%、51%、78%程度まで向上できることがわかった。簡易沈殿処理における有害金属の除去特性については、Pb、As、B、Cu、Zn、Mn の簡易沈殿処理での除去率は 30%以下で、これらは沈殿除去困難物質であることがわかった。

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した。②の成果では、各種の合流改善事業におけるノロウイルス (Norovirus: NoV) の流出抑制効果を明らかにした。また、越流水の影響下による河川水中の NoV 濃度は、ろ過により 90%程度低下することから、越流水対策として高濁度水を対象としたろ過プロセスの導入によっても、ウイルス負荷の低減が図れるものと考えられた。③では、NoV の除去効果向上要因の 1 つとして活性汚泥中のタンパク質 (ペプチド) 量が深く関与している可能性を明らかにした。膜分離活性汚泥法は、通常の活性汚泥法と比較して NoV の除去効果が 2log 程度高まることが明らかにし、技術の有効性を確認した。④に関しては、消毒耐性病原微生物として NoV と Phage を指標にオゾン・塩素消毒による不活化効果の向上と、消毒副生成物の生成抑制の観点から有効となる消毒条件を明らかにした。さらに、被災下水処理場において段階的な復旧対策技術による水質改善に伴う消毒効果および消毒副生成物抑制の向上効果を明らかにし、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。

(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

塩淡二層汽水湖で塩水層の貧酸素解消を目的に、通年での水質挙動の観測および実水域で酸素溶解装置(WEP)

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

の運用試験を行った。2ヶ月の装置運転でおよそ210,000 m²に酸素供給影響が確認された。一方で残存酸素量は装置の運転時間と含有硫化水素濃度に依存して、水塊移動と供給酸素濃度が重要であることが確認された。また装置の筐体耐久度も強還元状態の水中においては、2カ年ほどで破損を生じることが確認された。これらの知見から本研究の条件では運転費用に加え、2年おきの保守修繕費が必要となり、年間の維持費用として390～550万円が必要であることが明らかとなった。一方で保守頻度を減少させるための装置も開発し、想定どおりに保守頻度の減少を達成した。

気候変動による気温、降雨、流入量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える将来影響及び影響に対する適応策効果の評価について鉛直2次元モデルの水質計算により検証した。将来影響の評価については気候変動シナリオに応じた外力条件（気象条件、流入条件）を作成し、3段階の規模を設定した仮想ダム貯水池における気候変動シナリオごとの水質計算を実施し、各種の水質障害（富栄養化、底層貧酸素化、冷温水放流、濁水長期化）について発生の頻度や規模の変化について評価した。適応策効果の評価については3段階の規模を設定した仮想ダム貯水池にて、水質障害の進行が著しいと考えられた気候変動シナリオの条件を用いて、各種の水質障害に対する適応策を設定した水質計算を行い、それぞれの適応策の効果を定量的に示した。

気候変動による気温、降水量の変化がダム貯水池の水質、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、気候変動影響下において貯水池の水温が上昇した際に、放流水温を下げるための方策の一つとして考えられる異高同時取水の取水特性について検討した。より具体的には、多孔式取水ゲートを有するダムを対象として、貯水池上方及び下方の取水孔から同時に取水した際の、それぞれの取水孔からの取水率について水理実験及び数値シミュレーションにより検討した。ここでは、下方取水孔からの取水量を下げるための試みとして、下方取水孔のゲートを半開とした場合の取水率についても検討した。結果として、取水塔内の流速が小さいほど下方取水孔からの取水率が大きくなることや、下方取水孔のゲートを半開とすることで下方取水孔からの取水率を抑えることが可能であること等が確認された。得られた結果は、実ダムにおける異高同時取水の導入検討において、異高同時取水を実施した場合の放流水温の概算等に用いられることが期待される。

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
Hirota MATSUKI

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：南山瑞彦、小川文章、山下洋正、平山孝浩、北村友一、對馬育夫、真野浩行、鈴木裕識、武田文彦、村田里美、金子陽輔、小森行也、花本征也、高沢麻里

【要旨】

河川における医薬品類の存在量に対する下水処理場の寄与を明らかにするため、多摩川中流域を対象に、河川に流入する負荷量および下水処理場の放流水が流入する地点における負荷量に対する下水処理場の寄与率を、野外調査に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量に基づいて算出することを試みた。

多摩川中流域における現地調査と、多摩川水系、淀川水系、霞ヶ浦水系の8地点の河川底質を用いた収着試験を実施した。その結果、azithromycin、clarithromycin、levofloxacinが河川底質に蓄積されやすいことを明らかにした。また、試験溶媒のイオン強度、EDTA濃度、pHを変化させた収着試験を行うことで、azithromycinとlevofloxacinの底質への収着は、主に陽イオン交換反応によるものであることを明らかにした。

水系暴露解析モデル AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いた 250m メッシュの非定常解析により、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。流域への azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の3種医薬品の排出量として、既存の下水処理場調査実測データと下水処理人口に基づく推定式から多摩川流域内の下水処理場からの放流負荷量を推定してモデル計算に適用した。その結果、3種医薬品の全てで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が、モデル計算濃度は概ね実測値の1/10~10倍の範囲の値であった。また、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。

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、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。標準活性汚泥処理実験装置（硝化抑制条件下）の下水処理水試料に適用し、簡易一斉スクリーニング手法では7試料のいずれかから検出できた物質の合計数は32種であった。未知物質の探索手法では、15試料に共通して含まれる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、手法の適用性が示された。

下水処理水中での消毒副生成物等としての存在および公共用水域への影響可能性が懸念される化学物質として有機ハロゲン化合物類に着目し、1) 懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物（TOX）のうち全有機塩素化合物（TOCl）の分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に塩素消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*）に対する影響評価を実施した。その結果、1) TOCl分析用下水試料の保存性に関する知見を得るとともに、高SS濃度水試料のTOCl分析前処理方法を見出した。2) 模擬簡易沈澱下水を用いた消毒副生成物の生成メカニズム検討実験から、塩素注入率・残留塩素濃度・反応時間と生成TOCl濃度の関係性を確認するとともに、消毒副生成物の放流先河川における挙動調査から、その影響に関する知見を得た。3) 応急復旧段階を模した下水を用いたムレミカヅキモに対する影響評価から、消毒後に残留塩素を中和することで、藻類への影響が改善されることが推察された。塩素消毒副生成物として検出されたクロロホルム、トリクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドは、ムレミカヅキモの増殖に影響を与える濃度に達していなかったため、ムレミカヅキモに対する影響が検出された原因として、上記以外の副生成物の影響が推察された。

キーワード：下水処理場、医薬品、底質、収着、水系暴露解析モデル、濃度予測、精密質量分析、未知物質探索、塩素消毒副生成物、藻類、影響評価

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。

2. 河川における医薬品類の下水処理水の寄与率

本章では、都市河川に流入する負荷量や下水処理場の放流水が流入する地点での負荷量に対する下水処理場の寄与を把握することを検討した。多摩川中流域における下水処理場を対象に、水生生物への影響が懸念される医薬品類について、この流域に流入する医薬品類の負荷量および下水処理場が流入する地点での医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率を算出することを試みた。

2.1 調査方法

2.1.1 調査対象の医薬品類

本研究チームではこれまで、医薬品類等生理活性物質を対象として、水環境中における実態把握、生態リスクの検討などを進めてきた。本研究では、過年度の研究成果を基に、多摩川において水生生物に対する生態リスクの懸念が指摘されている医薬品類 5 物質¹⁾を調査対象に選定した(表 2-1)。

2.1.1 対象地域

本研究では、多摩川中流域を対象とした。多摩川は、山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本川である(流域面積: 1240 km²、流域人口: 約 400 万人³⁾)。代表的な都市河川であり、高度成長期の急

表 2-1 調査対象の医薬品類

物質名	主な効用
Azithromycin	マクロライド系抗生物質
Clarithromycin	マクロライド系抗生物質
Ketoprofen	消炎・鎮痛・解熱剤
Levofloxacin	フルオロキノロン系合成菌剤
Triclosan	殺菌剤

激な流域の都市化の影響を受けて水質が悪化したが、下水道整備や河川浄化施設の設置などに伴い改善が進み、近年では中流域(多摩川原橋)の水質は、BOD 2mg/L 程度で推移している(2001 年以降の環境基準は B 類型、BOD 3mg/L)。一方で、人口増加および下水道普及率の上昇に伴い、中流域においては渇水期に河川流量の 5 割以上を下水処理水が占めることもある。

2.1.3 寄与率の算出方法

本研究チームでこれまでに算出した医薬品類の減衰速度係数に基づき、多摩川中流域に設定した調査区間に流入する医薬品類の負荷量および下水処理場の放流水が流入する地点での医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率を算出することを試みた。

本研究における調査地点を図 2-1 に示す。本研究チームでは、これまでに多摩川中流域の約 11km の調査区間を設定し、2012 年の 1/31、2/16、8/22、2013 年の 1/30、9/30、12/17、2014 年の 12/16 の合計 7 回、10 地点(St.1~St.6、A 処理場~D 処理場)における河川水と下水処理放流水中の医薬品類の実態調査を実施するとともに、多摩川本川の 2 地点と支川の 4 地点において、「河川砂防技術基準(案)」に準じた流量観測を行ってきた。ただし、根川の St.4 では、2012 年の 1/31、2/16、8/22、2013 年の 1/30 において流量観測を行わなかったため、東京都より入手した調査日と同じ月の流量データを採用した。また、東京都下水道局から調査

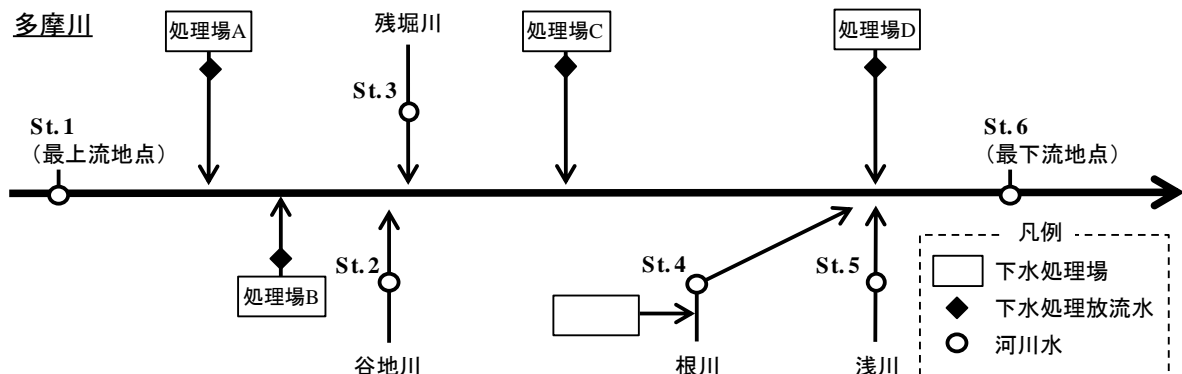


図 2-1 多摩川の調査地点図

日の下水処理場の放流量データを入手した。さらに、得られたデータを基に、対象医薬品類が流下過程において、一次反応式に従って減少するという仮定の下で、花本ら⁴⁾の方法を参考に、以下の式から減衰速度係数 k を算出した。

調査区間の最下流地点での負荷量

$$= \sum \text{調査地点} i \text{の負荷量} \times e^{(-k \times \text{調査地点} i \text{から最下流地点 St.5 までの流下時間})} \quad (1)$$

式(1)中の調査地点 i の負荷量は調査地点ごとに医薬品類の濃度と調査日における一日当たりの流量の積から算出された。また、調査地点 i から最下流地点 St.6 までの流下時間は Google map を用いて計測した流下距離を流量観測時に得られた平均流速で除して求めた。算出結果を図 2-2 に示す。Ketoprofen は他の医薬品に比べて、高い減衰速度係数を示した。本研究では、下水処理場の寄与率を算出するために、各調査地点の負荷量と減衰速度係数の値を使用した。

河川水中の医薬品類の負荷量に対する下水処理場から放流された処理水の寄与率として、調査区間に流入する負荷量 (St. 1~St.5 と A 処理場~D 処理場における負荷量の和) に対する各下水処理場の負荷量の割合を算出した。また、下水処理放流水が流入する地点における医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率として、最下流地点 St. 6 を対象に、各下水処理場の寄与率を以下の式から算出した。

下水処理放流水 _{i} の寄与率(%)

$$= \frac{\text{負荷量}_i \times e^{\text{減衰速度係数} \times \text{下水処理場} i \text{から St.6 までの流下時間}}}{\text{最下流地点 St.6 での負荷量}} \times 100 \quad (2)$$

寄与率が高い処理場ほど、最下流地点 St. 6 での負荷

量に対する寄与の割合が高いことを示す。本研究では、処理場 A~処理場 D および下水処理場直下の根川 (多摩川の支川) の St. 4 における寄与率を算出した。

2.2 結果と考察

対象とした医薬品類 5 物質について、調査区間に流入する各下水処理水の寄与率を図 2-3 に示す。処理場 A、処理場 B、St.4 の上流に位置する下水処理場は、処理場 C、処理場 D と比べ、対象医薬品類の流入負荷量に対する高い寄与率を示した。医薬品類 5 物質の調査区間における合計流入負荷量に対する処理場 A、処理場 B、St. 4 の寄与率の平均値の範囲は、それぞれ、22.9~33.1%、16.4~25.4%、24.4~38.1%であった。

調査区間の最下流地点 St.6 での医薬品類の負荷量に対する下水処理場の寄与率についてみると、Ketoprofen 以外の医薬品類 4 物質では、上流にある処理場 A と処理場 B において、合計流入負荷量に対する寄与率と比較して低い値を示した。これは、St.6 までの流下距離が長い上流の下水処理場から河川に流入した医薬品類が、流下過程で減衰するため、これらの下水処理場の寄与が相対的に低くなったためであると考えられる。一方で、下流側に位置する St. 4 と処理場 D においては、St.6 での負荷量に対する下水処理場の寄与率は、合計流入負荷量に対する寄与率と比較して高い値を示した。また、Ketoprofen について、St.6 での負荷量に対する下水処理場の寄与率は、合計流入負荷量に対する寄与率に比べて、上流の処理場 A、処理場 B、処理場 C で著しく低い値を示し、St.4 と処理場 D での寄与率がほとんどを占めた。さらに、処理場 D において、St.6 での Ketoprofen の負荷量に対する寄与率は、他の医薬品類 4 物質に比べて、高い値を示した。この違いは、Ketoprofen の流下過程での減衰速度が他の医薬品類に比べて高いために、最下流地点までの流下距離の短い下流の下水処理場の寄与率が高くなった

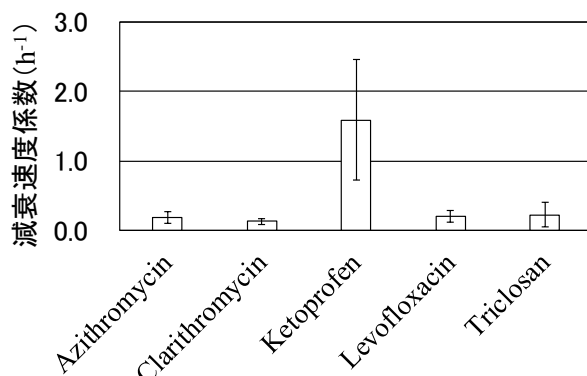


図 2-2 多摩川の調査区間において算出した減衰速度係数

ためである。以上の結果のように、多摩川中流域において、流入負荷量および多摩川本川での負荷量に対する下水処理場の寄与率を示すことができた。

調査地点 St. 6 での医薬品類の負荷量に対する寄与率が高い下水処理場は、St. 6 での医薬品類の生態リスクへの寄与率が高いと考えられる。過年度の調査研究で実施した生態リスク初期評価により、調査地点 St. 6 において、本研究で対象とした医薬品類のうち Azithromycin、Clarithromycin、Triclosan の生態リスクが懸念されている^{1,5)}。Azithromycin、Levofloxacin、Triclosan については、生態リスクに対して St. 4 の寄与率が高く、Clarithromycin については、生態リスクに対して処理場 A、処理場 B、St. 4 の寄与率が高いと考え

られる。そのため、上記の医薬品類について、これらの下水処理場で負荷量の削減対策を実施し、例えば、St. 4 での負荷量の寄与率を下げるにより、調査地点 St. 6 での生態リスクを効果的に下げることができると期待される。今後、下水処理場での医薬品類の削減対策やリスク管理を検討していくために、生態リスク初期評価で使用されているハザード比などを指標として、下水処理場の放流水が流入する調査地点での負荷量に対して高い寄与率を示す下水処理場から排出される負荷量が低下した時に、下水処理場の放流水が流入する調査地点で生態リスクがどの程度低減するのかを検討する必要がある。

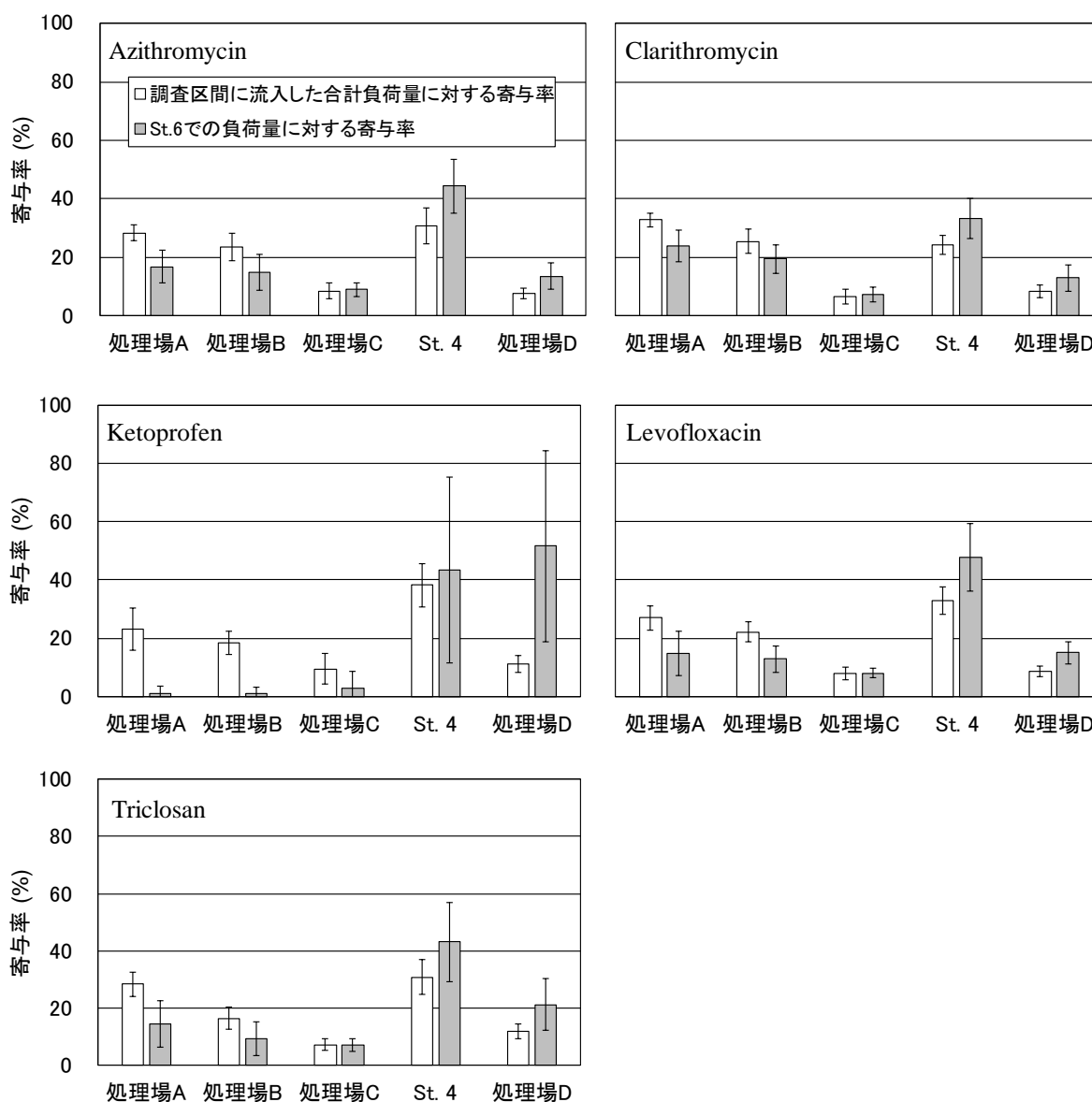


図 2-3 医薬品 5 物質の調査区間合計負荷量と St. 4 での負荷量に対する下水処理場の寄与率

2.3 まとめ

本章では、多摩川中流域において、河川中の医薬品類の物質質量に対する下水処理場の寄与を把握することを目的とした。野外調査に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量から、調査区間に流入する負荷量および調査区間の最下流地点での負荷量に対する下水処理場への寄与率を推計した。その結果、寄与率の高い下水処理場を把握することができた。

3. 底質中の医薬品の存在実態と底質への吸着機構

2章では、都市河川である多摩川流域において、医薬品既往の野外調査結果に基づいて算出した減衰速度係数と調査地点での負荷量から、調査区間に流入する負荷量および調査区間の最下流地点での負荷量に対する下水処理場への寄与率を推計し、下流地点の医薬品濃度に対して寄与率の高い下水処理場を把握した。この結果は、下水処理場の下流地点における濃度予測に繋がると考えられる。一方で、河川水中の濃度をより正確に予測するには、水中の濃度変化に影響を及ぼす因子の詳細な検討が重要となる。

本チームではこれまでも、都市河川水中の医薬品の動態を明らかにすることを目的とし、東京都の多摩川において医薬品の現地調査を行ってきた⁶⁾。また、室内実験により医薬品の分解・吸着性を明らかにし、河川における医薬品の減衰に対して、底質への吸着が重要な役割を担っていることを見出した⁷⁾。しかし、都市河川における底質中の医薬品の蓄積実態は不明な点が多い。そこで、本章では、現地調査により、多摩川を対象に河川水、底質中における医薬品の存在実態を把握した。また、底質への吸着をモデル化するために、医薬品の底質への吸着機構を明らかにする必要がある。そこで、より広範囲の河川で採取した底質を用いて医薬品の吸着試験を行い、医薬品の底質への吸着機構の解明を試みた。

3.1 方法

3.1.1 現地調査

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

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

3.1.2 吸着試験

淀川水系の桂川（羽束師橋、宮前橋）、西高瀬川、古川、多摩川水系の多摩川（日野橋、関戸橋）と浅川、霞ヶ浦水系の桜川の計8地点から採取した底質を用い、経済協力開発機構（OECD）の試験ガイドライン（No. 106）⁸⁾に準拠して、以下の手順で医薬品の吸着試験を行った。底質を風乾した後、2mmのふるいにかけ、ガラス製遠沈管に入れた。超純水に塩化ナトリウムが100mM、アジ化ナトリウムが0.02%、医薬品が各1μg/Lとなるように添加した。アジ化ナトリウムは試験中における医薬品の生分解を抑えるために用いた。この溶液を遠沈管に注ぎ、20°Cの暗所においてローテータで3日間攪拌した後、溶液中と底質中の医薬品の濃度を3.1.1に示した方法で分析した。底質中濃度を溶液中濃度で除したものを吸着平衡定数とした。

医薬品等の化学物質の底質への吸着機構には、大きく分けて、疎水性相互作用、イオン交換反応、金属錯体形成反応が考えられる。本研究では、医薬品の中でも、底質への吸着性が特に高いと考えられ、生態リスクが懸念されている¹⁾マクロライド系抗菌剤のazithromycinとlevofloxacinを対象とし、吸着試験の溶媒（塩化ナトリウム水溶液）のpH（6.5、11.6）、イオン強度（NaCl：100mM、10mM）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）濃度（0mM、10mM）を変化させる

表 3-1 多摩川における医薬品の河川水・底質中濃度と濃度比

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

1: 底質中濃度を河川水中濃度で除したもの

2: *N.D.* (検出下限値以下)、*N.A.* (データなし)

ことで収着機構の解明を試みた。

3.2 結果と考察

3.2.1 多摩川の河川水と底質における医薬品の分配

多摩川の河川水と底質における医薬品の濃度と濃度比（底質中濃度を河川水中濃度で除したもの）を表 3-1 に、河川水中濃度と底質中濃度をプロットしたグラフを図 3-1 に示す。Ketoprofen 以外の 5 物質は、両地点において河川水、底質から検出され、濃度比が定量された。Crotamiton と sulfamethoxazole は濃度比が 10 (L/kg) 未満と低く算出され、底質に収着しにくいことが示唆された。一方で、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin は濃度比が 158~1625 (L/kg) と高く、底質に蓄積されていた。

対象とした医薬品 6 物質のうち、これまでの現地調査において多摩川で 0.10 (h⁻¹) 以上の速い速度で減衰した医薬品は、ketoprofen、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 4 物質であった⁹⁾。また、過去の室内実験の結果から、主な減衰要因は、ketoprofen では太陽光による光分解、azithromycin と clarithromycin では底質への収着、levofloxacin は光分解と収着の両方であることが示唆されている⁷⁾。以上より、平成 29 年度の調査により、底質への収着の影響が示唆されていた 3 物質が、実際に多摩川の底質に蓄積していることが明らかとなり、これまでの研究で得られていた仮説が支持された。また、多摩川ではほとんど減衰しなかった crotamiton と sulfamethoxazole は濃度比（底質/河川水）も低く、この点においてもこれまでの成果と調和した。

3.2.2 医薬品の底質への収着機構

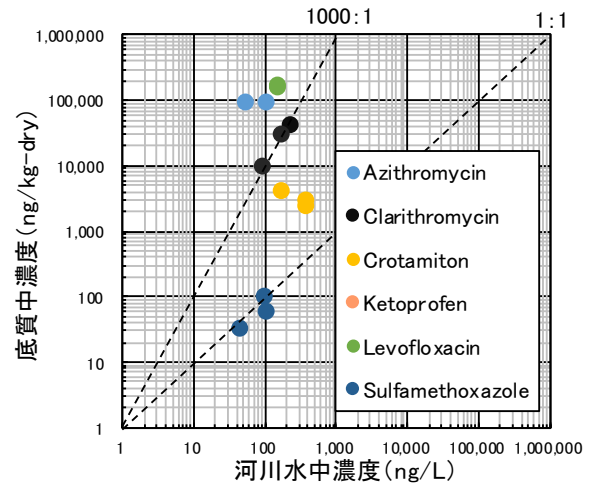


図 3-1 6 種の医薬品における河川水と底質の濃度比較

イオン強度、EDTA 濃度、pH を変化した溶媒における azithromycin と levofloxacin の底質への収着平衡定数を図 3-2 に示す。Azithromycin は分子内に 2 つのアミノ基を有しており、 pK_a はそれぞれ 8.7 と 9.5 であり、levofloxacin はアミノ基の pK_a が 8.0、カルボキシル基の pK_a が 5.5 である。従って、pH=6.5 の中性溶液中では、両物質ともに分子内のアミノ基が正電荷を帯びており、共存陽イオン濃度の増加により、陽イオン交換が抑制される。本実験では、ナトリウムイオン濃度の増加により医薬品の収着平衡定数が 5~7 倍程度低下していた（図 3-2：溶媒 A と B の比較）。また、低下の程度を他物質の文献値と比較したところ、陽イオン交換が主な収着機構である有機化学物質に対する報告値と類似であった（図 3-3）。従って、azithromycin と levofloxacin に対しても、陽イオン交換が主要な収着機

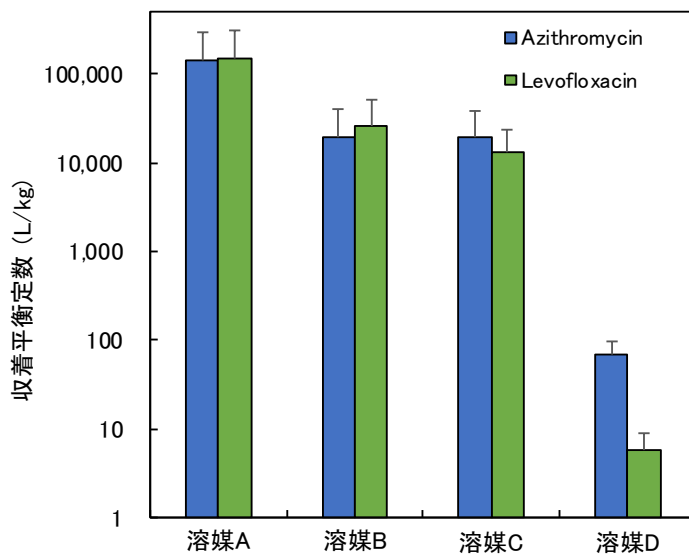


図 3-2 各種溶媒における azithromycin と levofloxacin の底質への吸着平衡定数（棒グラフとエラーバーは 8 カ所の河川底質における平均値と標準偏差を示す）

収着試験に用いた溶媒

	溶媒A	溶媒B	溶媒C	溶媒D
NaCl (mM)	10	100	100	100
EDTA (mM)	0	0	10	0
pH	6.5	6.5	6.5	11.6

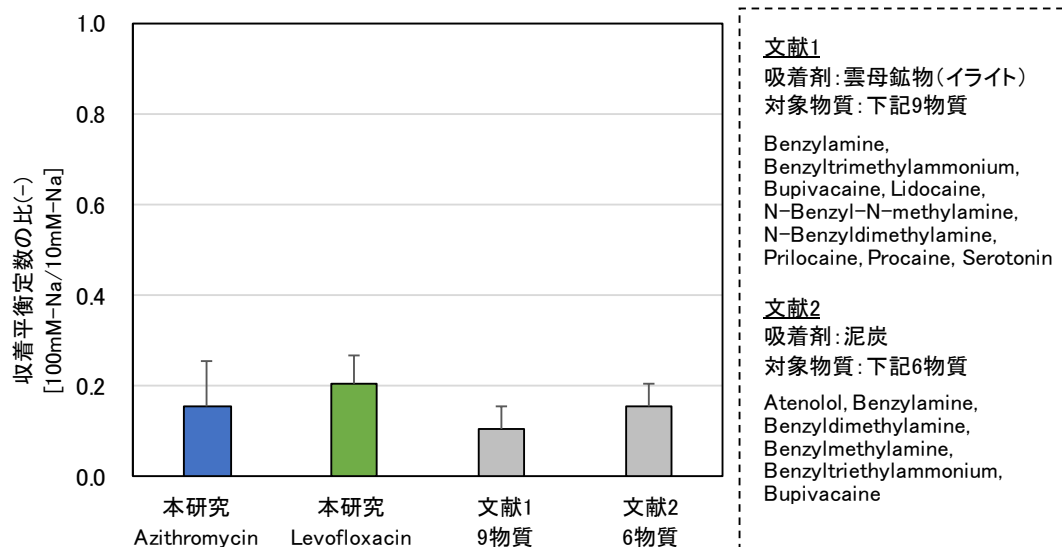


図 3-3 Azithromycin と levofloxacin の吸着平衡定数のイオン強度依存性と報告値との比較

(文献 1, 2 は本文の参考文献 9, 10 に対応する。文献 1, 2 の対象物質は全てアミンであり、陽イオン交換が主な吸着機構だと考えられる有機化学物質である。棒グラフとエラーバーは平均値と標準偏差を示す。)

構であることが示された。また、EDTA は底質の負電荷サイトに吸着している交換性の金属イオンや底質の鉱物中に含有される金属元素と錯体を形成するため、医薬品の金属錯体形成反応による底質への吸着を抑制する。本実験では、EDTA の添加による医薬品の吸着平衡定数の変化はほとんどなかったことから (図 3-2 : 溶媒 B と C の比較)、金属錯体形成反応の影響は小さいと考えられた。また、pH=11.6 の塩基性溶液中においては、azithromycin と levofloxacin のアミノ基は帯電していないため、陽イオン交換反応は生じない。本実験では、塩基性溶液中において、医薬品の吸着平衡定数が大幅に低下していたことから (図 3-2 : 溶媒 B と D の比較)、陽イオン交換反応の重要性が示され、前述の結果と調和した。塩基性溶液中 (溶媒 D) においては、azithromycin は分子態、levofloxacin は陰イオンとして存在しており、疎水性相互作用や陰イオン交換の影響は小さいことが示された。

3.3 まとめ

現地調査により、多摩川の河川水と底質における医薬品 6 物質の存在実態を明らかにし、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin が底質に蓄積されていることを見出した。これにより、これまでの研究において底質への吸着の影響が示唆されていたこれら 3 物質が、底質に蓄積されやすいことが明らかになった。また、溶媒のイオン強度、EDTA 濃度、pH を変化させた吸着試験により、対象医薬品の中でも吸着性が特に高い azithromycin と levofloxacin に対して、河川底質への吸

着機構を検討した。その結果、これら 2 物質の底質への吸着は、主に陽イオン交換反応によるものであること、疎水性相互作用や金属錯体形成反応はほとんど影響していないことが明らかになった。

4. 水系暴露解析モデルを用いた医薬品の濃度予測

3 章まで、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。一方で、回数が限られた野外水質調査や室内実験による挙動の検証のみでは流域全体の健康・生態リスクを的確・迅速に把握することは困難である。そこで本章では、水系暴露解析モデルを用いたシミュレーションにより、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。

4.1 方法

4.1.1 対象流域 (多摩川流域)

ここでは、①下水処理場を経由して排出される医薬品負荷量が多いと予想され、②シミュレーションの妥当性の検証に適している、と考えられた多摩川流域をモデル計算の対象とし、河川流域を単位メッシュサイズに分割してメッシュ毎の濃度推定を行い、流域全体の生態リスク評価を試みた。

4.1.2 適用したシミュレーションモデル

日本国内において、環境中化学物質の環境動態予測を試みることができるモデルとして G-CIEMS(Grid-Catchment Integrated Environmental Modeling System)¹¹⁾などがあり、流域を単位メッシュサイズに分割し水・熱輸送統合解析を実施できるモデルとして WEP(Water and

表 4-1 AIST-SHANEL Ver. 3.0 に内蔵されていたデータおよびそのソース

モデルに既登録の河川流域属性項目	データソース	対象年
標高	国土数値情報 標高・傾斜度3次メッシュデータ	2011
土地利用	国土数値情報 土地利用3次メッシュデータ	2006
人口	平成22年地域メッシュ統計	2010
産業中分類別工業出荷額	平成20年工業統計メッシュデータ	2008
自治体コード	総務省データ	2011
下水処理場	下水道統計(平成23年度版)	2011
気象官署毎の気象データ	気象庁データ	2011

Energy transfer Process)モデル¹²⁾などがある。

しかしながら、医薬品のような微量化学物質について河川流域全体を単位メッシュサイズに分割してシミュレーションを実施できるモデルは多くみられない。国立研究開発法人産業技術総合研究所（以下、産総研）の産総研-水系暴露解析モデル(AIST-SHANEL(Standardized Hydrology-based Assessment tool for chemical Exposure Load) Ver.3.0 は一定の入力データを準備することで、空間解像度を 250 m、時間解像度を日単位とした非定常解析により流域全体の濃度推定を可能としている¹³⁾。本研究では、AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いて多摩川流域の 250 m メッシュによる非定常解析を行うこととした。モデルに内蔵されていたデータとその引用元情報を表 4-1 に示す。データの対象年は 2006 年～2011 年であり、後述のように本研究で検証する野外調査実測データの取得年が 2011 年～2015 年であったが、適用範囲内であると考えそのままの情報を用いた。次に、AIST-SHANEL Ver.3.0 で求められる入力パラメーターを表 4-2 に示す。水理条件、大気降水量など 23 項目についてデフォルトパラメーターを用いた。一方で、蒸気圧、分子量、水溶解度、有機炭素水分配係数分解速度については、シミュレーション対象化学物質の物性に基づいて設定した。計算期間は 4 か月の助走期間を含め、487 日間で設定し、2011 年 1 月 1 日から 2011 年 12 月 31 日までの 365 日分の各メッシュにおける化学物質濃度を濃度解析することとした。なお、多摩川流域を 250 m メッシュで分割したところ、合計 19,784 メッシュであった。

4.1.3 対象医薬品の選定と関連する入力データ

本研究では、下水処理水中に残存しやすく、また、生態リスクが懸念されている⁶⁾、azithromycin、levofloxacin、clarithromycin の 3 種の医薬品を濃度解析対象とした。これらの物質の物性に基づいてあらかじめ準備した入力データを表 4-3 に示す。蒸気圧と有機炭素水分配係数 (Koc) は EPI Suite version.4. で計算

表 4-2 入力パラメーターの一覧

デフォルトパラメーターを使用した項目	単位	
空隙率	-	
容積分率-気相	-	
容積分率-液相	-	
容積分率-固相	-	
粗度係数	m ^{-1/3} *s	
懸濁物質SS沈降速度	m/D	
限界摩擦速度	m/s	
掃流式指数	-	
懸濁物質SS巻上げ速度定数	G/m ² /s	
河川底泥孔隙率	m ³ /m ³	
有機性炭素含有率	-	
土壌気相分解速度	-	
月別定常解析の計算日数	day	
空間差分間隔	m	
時間差分間隔	s	
連立常微分方程式の元の数	-	
水路液相の容積分率	-	
水路液相の相当コンパートメント番号	-	
水路底泥の相当コンパートメント番号	-	
水路液相の堆積所要日数	day	
水路底泥の負荷流出係数	1/m	
大気湿性沈着量の投入先(0:土壌 水域:1)	-	
大気乾性沈着量の投入先(0:土壌 水域:1)	-	
対象化学物質の物性に基づいて設定した項目	単位	
蒸気圧	Pa	
分子量	g/mol	
水溶解度	g/m ³	
有機炭素水分配係数	m ³ /t	
分解速度	土壌A層液相	1/h
	土壌A層固相	1/h
	土壌B層液相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌B層固相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌C層液相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌C層固相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌D層液相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	土壌D層固相(土壌Aと同じと仮定)	1/h
	河川水相	1/h
	河川底泥液相	1/h
河川底泥固相	1/h	

表 4-3 シミュレーション対象医薬品 3 種の物性に基づいた入力データ

項目	単位	Azithromycin	Clarithromycin	Levofloxacin	情報元
蒸気圧	Pa	3.5E-22	3.1E-23	1.3E-10	EPI Suite version 4.1で計算
分子量	g/mol	749	748	361	ChemSpider
水溶解度	mg/L	514	217	54	PubChem (Sanford-Burnham Center for Chemical Genomics)
有機炭素水分配係数 (K_{oc})	m ³ /t	3,135	149	12	EPI Suite version 4.1で計算(MCI method)
河川水半減期					文献 ¹⁴⁾ に記載のデータを用いて計算
河川底泥液相半減期					
河川底泥固相半減期	day	0.16	57.8	0.20	河川水と同じと仮定し、文献 ¹⁴⁾ を採用
土壌A層液相半減期					
土壌A層固相半減期					

した。分子量は Chemspider で、検索し入力した。水溶解度は PubChem の情報を基に入力した。分解速度に関わる河川水半減期は、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin に対し、既往研究からデータを引用して各々 0.16 day、57.8 day、0.20 day と入力し¹⁴⁾、その他の半減期の項目に対しても河川水と同様と仮定して同値を代入した。

4.1.4 調査実測データを用いた下水道からの排出量推計

AIST-SHANEL Ver.3.0 では、化学物質の濃度推定シミュレーション対象流域への流入データ元として、「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律（化管法）」に基づく化学物質排出・移動量届出制度（PRTR 制度）により把握が図られている情報を用いている。つまり、PRTR 制度の第一指定化学物質については、排出元である個別事業者の所在地情報を組み込むことで、対象物質の点源負荷量を与えている、あるいは、流域内の土地利用情報を利用して届出対象条件に満たない事業者からの「裾切り以下の移動・排出量」を面源的に与えている。一方で、azithromycin、clarithromycin、levofloxacin のような医薬品は PRTR 第一指定化学物質とは異なり、移動・排出量情報が把握されていないので、二次情報からは流域への流入量データを用意できない。そのため、解析対象とする 3 種医薬品については水環境への主要な排出源が下水道であること、また、これらの医薬品はほぼ全てヒトに消費されていることを踏まえて、3 種医薬品の河川流域への排出源を下水道のみと仮定することとした。まず、過年度に実施した下水道処理場での調査実測データ（放流負荷量 (kg/year)）に変換しと下水道処理場の処理人口との関係から式 (1) を作成した。使用したのは 2011 年~2015 年の間に多摩川流域

内の 6 か所の下水道処理場で調査した $n=55$ のデータセットである。放流負荷量の算出には下水道統計から晴天時の日下水量 (m³/day、年平均) を引用した。

$$L = aP + b \quad (1)$$

ここで、

- L : 下水道処理場からの放流量 (kg/year)
- a : 排出係数 (kg/人・year)
- P : 流域人口 (人)
- b : 排出定数 (kg/year)

次に、得られた変数を用いて流域内の 13 か所の下水道処理場に対して処理人口との関係から医薬品放流負荷量を算出し、モデル解析に入力した。

4.2 結果と考察

4.2.1 下水道処理場調査実測データと人口情報を用いた下水道処理場からの排出係数の算出

3 種医薬品について放流負荷量と処理人口との関係をプロットしたグラフを図 4-1 に示す。決定係数 R^2 で比較すると azithromycin では 0.757、clarithromycin では 0.697、levofloxacin では 0.591 であり、azithromycin において最も良好な相関関係が得られた。他の 2 種の医薬品の相関係数も概ね良好であり、下水道処理人口を用いた放流負荷量の推定が適用できる可能性が示唆された。今回 55 の異なるデータを用いたが、処理場数としては 6 か所と少ないため、より多くの下水道処理場のデータを使用して検証することで、広範囲の濃度域にも適した推定式を設定できることが示唆された。

今回のモデル計算では、デフォルトパラメーターをそのまま入力した項目が多く、物性に基づく入力項目も物質によっては環境での挙動を十分に考慮できて

いなかった可能性がある。そのため、推定精度の向上のためには、環境での挙動や条件等を精査しながら入力データを検討するとともに、測定データを蓄積してキャリブレーションを行う必要があると考えられた。

4.2.2 モデル計算値と河川調査実測データとの比較

3種医薬品類について、前項で得られた式(1)に基づく変数を用いて、多摩川流域内の13か所の下水処理場に対して処理人口との関係から放流負荷量を算出してAIST-SHANEL Ver.3.0に入力し、モデル解析を実行した。その結果、多摩川流域全体の19,784メッシュ(250mメッシュ)に対し、2011年1月1日～12月31日の365日間分の河川水量および3種医薬品の負荷量と濃度が計算された。このうち、前章までの河川調査実測データがある多摩川の上流点(八高線鉄橋)、中流点(日野橋)、下流点(関戸橋)そして支川(浅川高幡橋)の4地点について、シミュレーションの計

算結果と実測データをプロットしたグラフを図4-2に示す。Clarithromycinの場合、計算結果と実測結果の中央値を順に示すと、上流では0.13ng/Lと0.30ng/L(2.3倍差)、中流では78.7ng/Lと308.4ng/L(3.9倍差)、下流では89.6ng/Lと162.2ng/L(1.8倍差)、支流では21.1ng/Lと52.0ng/L(2.5倍差)であった。Levofloxacinの場合、計算結果と実測結果の中央値を順に示すと、上流では0.72ng/Lと0.14ng/L(0.2倍差)、中流では36.3ng/Lと180.2ng/L(5.0倍差)、下流では26.6ng/Lと140.0ng/L(5.3倍差)、支流では15.3ng/Lと29.0ng/L(1.9倍差)であった。Azithromycinの場合、計算結果と実測結果の中央値を順に示すと、上流では0.11ng/Lと0.29ng/L(2.5倍差)、中流では19.1ng/Lと115.0ng/L(6.0倍差)、下流では12.4ng/Lと90.4ng/L(7.3倍差)、支流では4.5ng/Lと5.6ng/L(1.3倍差)であった。3種の医薬品全てで、実測値の方が計算値よりも高い傾向

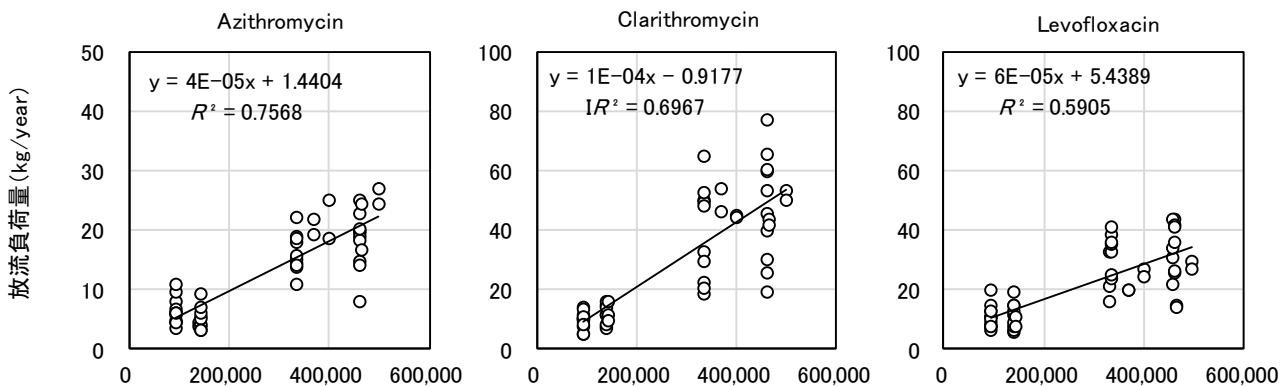


図4-1 3種医薬品の放流負荷量と下水処理人口との関係 (n = 55)

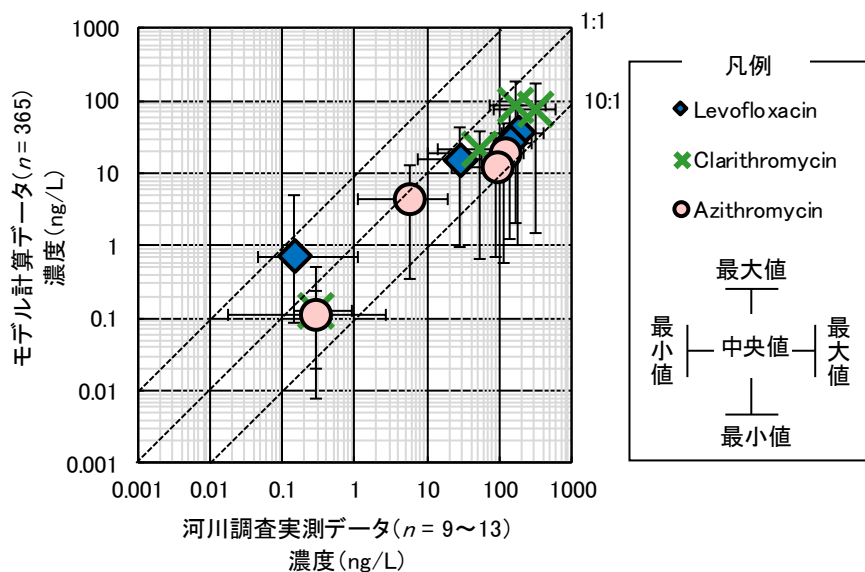


図4-2 同一メッシュ中の医薬品濃度におけるSHANEL Ver. 3.0計算値と河川調査実測値の比較

があるものの、計算値は実測値の 1/10~10 倍の範囲に収まっていた。

4.2.3 多摩川流域における濃度解析結果のマッピング

計算終了となる 487 日目（助走期間終了後 365 日目）のデータを使用して、多摩川流域全体のメッシュに河川水流量と clarithromycin の負荷量および濃度をマッピングした結果を図 4-3 に示す。まず、河川水の流量は、奥多摩湖の出口付近で約 7.0 m³/s、流域最下流端のメッシュでは 41.1 m³/s であった。2013 年度の下水道統計に基づいて、多摩川流域内に位置する下水処理場の晴天時日平均下水量を合計すると 948,199 m³/day (= 11m³/s) となり、流域最下流端のメッシュでは全流量の 27%を下水処理水由来の流量が占めていた。次に、clarithromycin の日負荷量をみてみると、負荷源として設定した下水処理場がある中流域の高線鉄橋付近で 99 g/day、流域最下流端のメッシュでは 872 g/day であり、8.8 倍の負荷量となっていた。この結果は、同一地点間の河川水流量増加率（2.2 倍）と比較して高く、河川流下過程における分解や底質への吸着による水中からの減少量よりも都市域からの排出量の方が大きいことを示すものであった。最後に、clarithromycin の濃度に着目してみると、最大濃度であった場所は支川流域の負荷源付近で 427 ng/L であり、流域最下流端のメッシュでは 245 ng/L であった。本研究グループでは過年度に、clarithromycin に対する初期リスク評価として、ムレミカヅキモを用いた藻類生長阻害試験で得られた EC50 値¹⁹⁾を基にして PNEC を 20 ng/L と算出している²⁰⁾。この値を超過しているメッシュは全 19,784 メッシュのうち 219 メッシュ存在し、全体の 1.1%であった。また、河道範囲（河道次数が 3 以上、2852 メッシュ）に限った全メッシュと比較すれば 7.7%であった。今回得られた推定濃度と PNEC との単純比較によるハザード比の結果を直ちに信頼することはできないが、水系暴露解析モデルと毒性データを併せて検討することで、流域の生態リスクを包括的に評価できる可能性が示唆された。一方で、本研究で実施した濃度推定では、詳細なパラメーターの検討やキャリブレーションをせずに既存のシステムのデフォルト設定を採用している点が多かったことから、濃度が的確に推定されなかった可能性がある。水系暴露解析モデルに基づいた生態リスク評価にあたっては、化学物質濃度の推定精度を考慮した評価が必要である。

今後、水系暴露解析モデルのようなシミュレ

ションモデルを適用して流域全体の濃度をなるべく精度良く推定して実測データを補うことができれば、潜在的な汚染を迅速に把握しつつ、視覚的にも理解しやすい形で生態リスク評価が実施できるようになると考えられた。

4.3 まとめ

水系暴露解析モデルを用いたシミュレーションにより、多摩川流域全体での医薬品の暴露濃度の網羅的予測を試みた。主要な成果を以下に示す。

○azithromycin、clarithromycin、levofloxacin の 3 種の医薬品について、下水処理場における実測データを基に計算した処理場からの放流負荷量と下水処理人口との間には良好な相関があった。下水処理人口に基づいた 3 種医薬品の放流負荷量の推定式が得られ、未調査の下水処理場からの 3 種医薬品の放流負荷量が推定された。

○下水処理場からの放流負荷量推定値を適用し、AIST-SHANEL Ver.3.0 を用いた 250 m メッシュの非定常解析を実行した。検討した 3 種医薬品の全てで、モデル計算濃度は野外実測濃度と比較して 1/10~10 倍の範囲に収まっていた。

○モデルによる推定濃度データを用いて流域全体の濃度マッピングが達成された。水系暴露解析モデルと毒性データを併せて検討することで、流域の生態リスクを包括的に評価できる可能性が示唆された。

5. 精密質量測定データを用いたモニタリング手法

前章までのように、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。

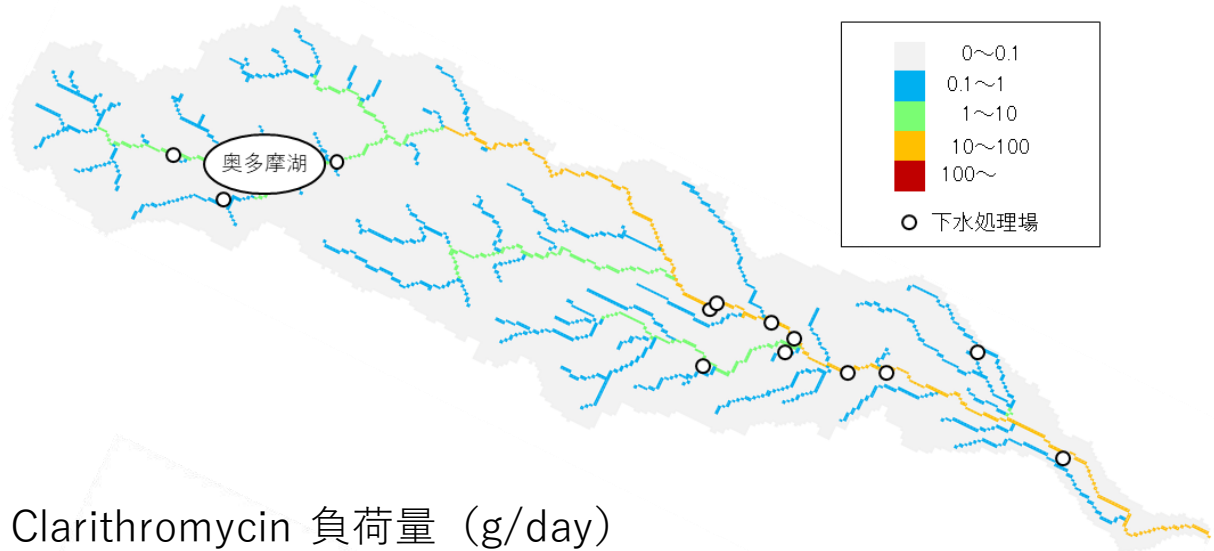
そこで、水環境への主要な経路点の一つである下水処理場の処理水を対象に、精密質量分析技術を用いた多成分の簡易一斉スクリーニングにおいて重要となる検出有無判定での見落とし低減に繋がるデータベース (DB) の構築手法を検討するとともに、膨大な精密質量測定データからの未知物質探索手法を検討した。

5.1 方法

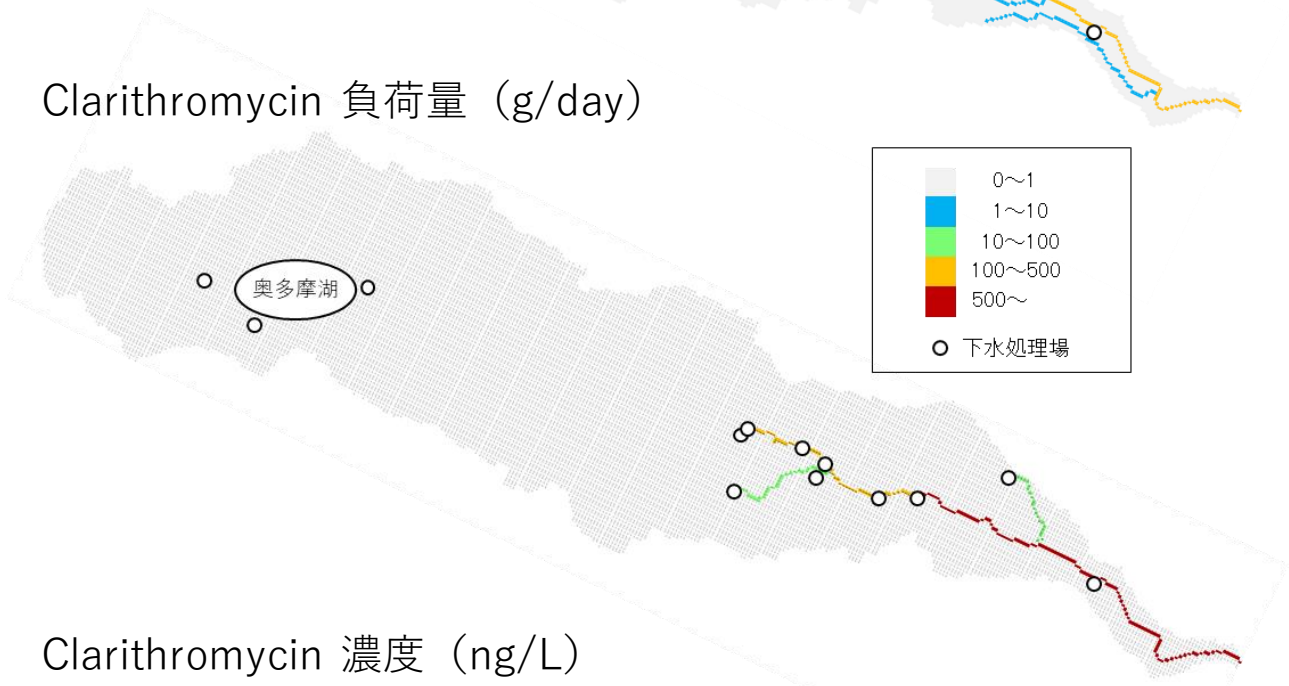
5.1.1 試料の採取

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

流量 (m³/s)



Clarithromycin 負荷量 (g/day)



Clarithromycin 濃度 (ng/L)

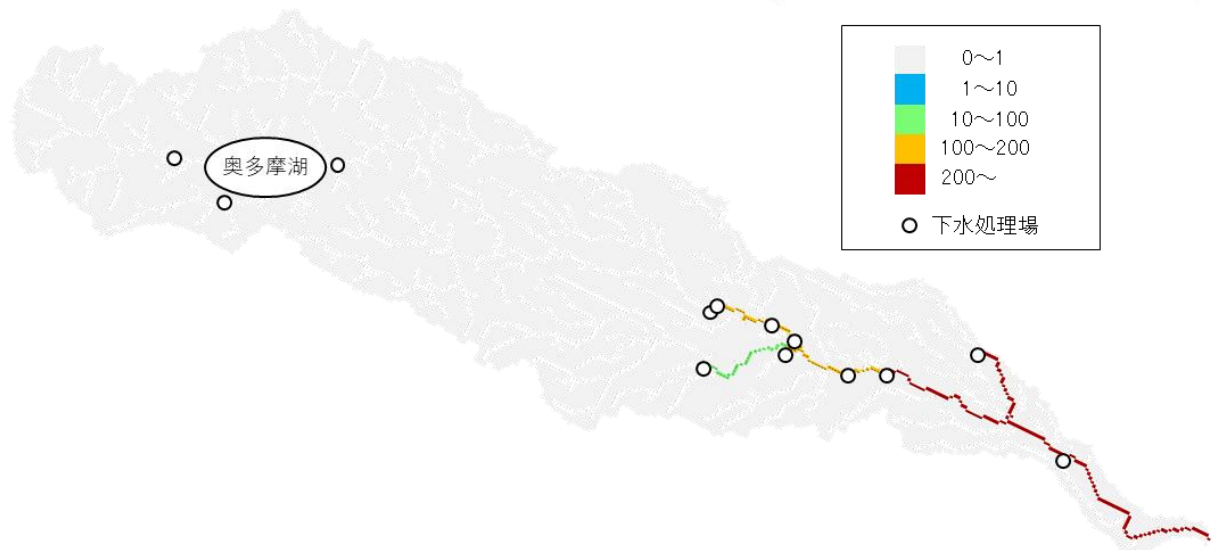


図 4-3 AIST-SHANEL Ver. 3.0 による計算値を用いた
多摩川流域における河川水流量および clarithromycin の負荷量と濃度のマッピング結果

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。

5.1.2 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。

(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（ミニミニ、0.2 μ m（ポリプロピレン）、GE ヘルステア）に収め、LC-QToF-MS に供した。試料には安定同位体標識標準 12 物質を添加し、試料間の測定誤差を確認した。

(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 5-1 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、対象物質を事前に定めなくても、検出の有無判定の際に有効となる個別物質のフラグメントイオン情報の網羅的な収集が可能である。

表 5-1 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) 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				

(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」¹⁰⁾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、5.1.1 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。

(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。

5.2 結果と考察

5.2.1 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 5-1 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 5-1 に示した装

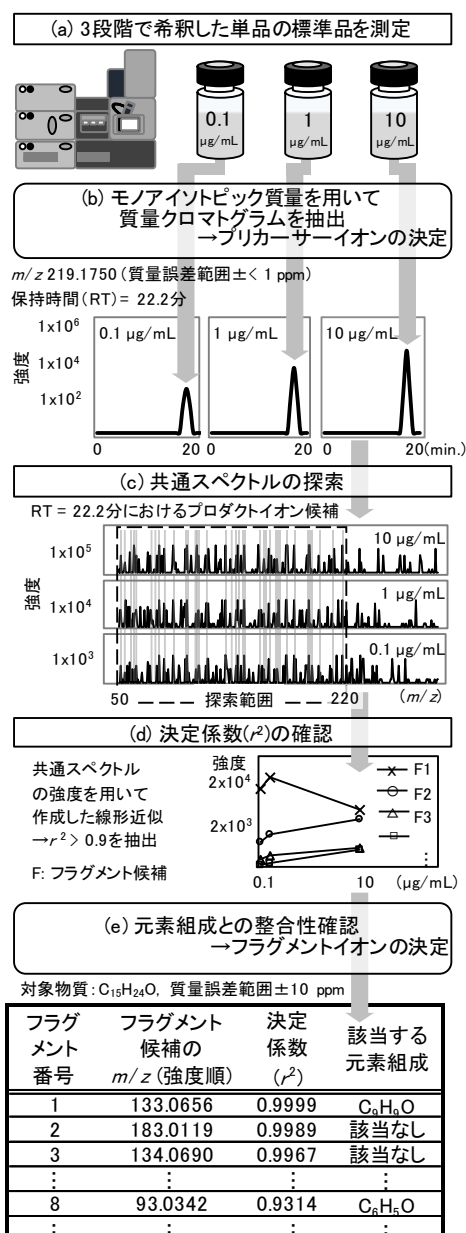


図 5-1 見落としを低減したスクリーニング用データベース作成のための標準品解析手順 (解析例: ノニルフェノール)

置条件で測定し (図 5-1 (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: ± 1 ppm、図 5-1 (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 5-1 (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 5-1 (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 5-1 (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 5-1 (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 5-1 (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¹⁷⁻²¹⁾。

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²⁰⁾、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。

5.2.2 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 ($n=11$) 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 5-2 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、ブロマシル、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。

表 5-2 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
ブロマシル	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

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。手動で確認したフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの EIC の一例を図 5-2 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²¹⁾、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。

5.2.3 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 5-3 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 (r=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²²⁾、テ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稻、果樹等の栽培時に広く使用されている²³⁾。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

表 5-3 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)

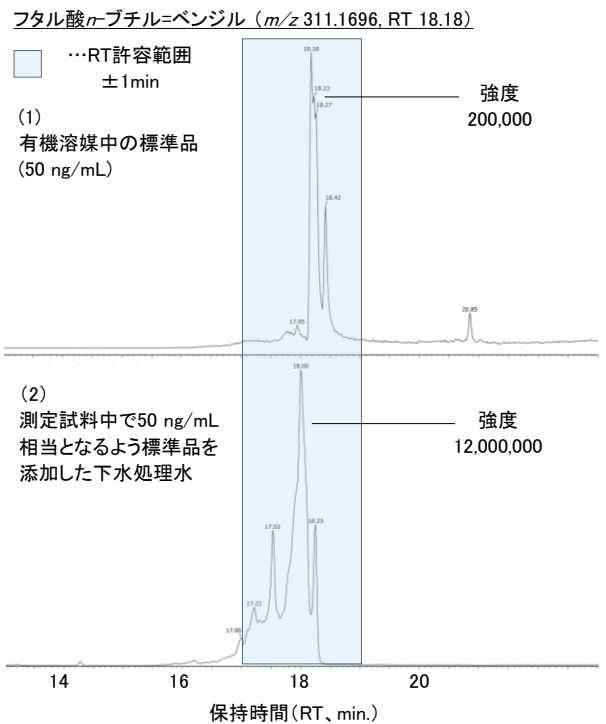


図 5-2 標準添加した下水試料で検出不良であったフタル酸 *n*-ブチル=ベンジルの質量イオンクロマトグラム

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	メタミトロン	+	203.0931	2
37	ピスフェノールA	-	227.1087	3
46	キザロホップエチル	+	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	フェンプロナゾール	+	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D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	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

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。

5.2.4 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 試料を同時にノン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 5-4 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 5-3 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。

5.2.5 下水処理水からの未知物質の探索

上述 5.2.4 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

表 5-4 ノン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 2019 等 11/28															MIX
	12/6	12/13	12/18	12/26	2020 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
ESI 試料種	採取日 2019 等 11/28															MIX
	12/6	12/13	12/18	12/26	2020 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	6,548	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

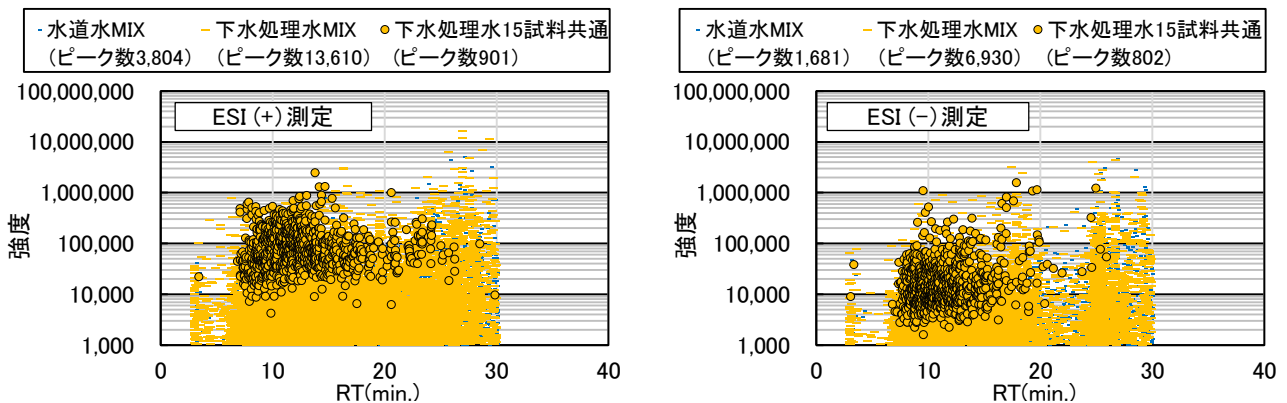


図 5-3 各種試料の MIX 試料の測定データと下水処理水 15 試料で共通して確認されたピークスクリーニング結果 (スクリーニング対象全 81 種)

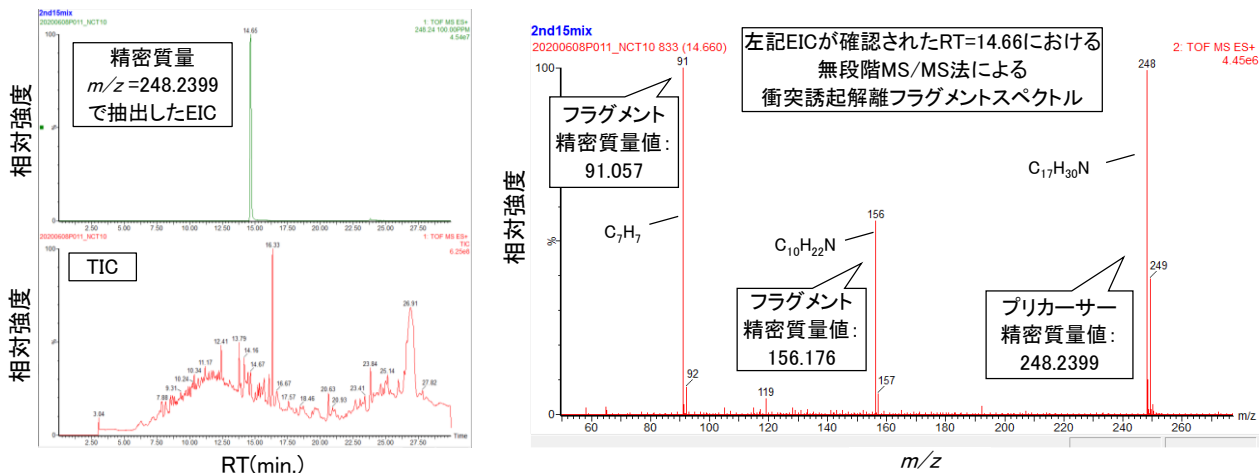


図 5-4 $m/z = 248.2399$ の精密質量測定データと元素組成演算により推定されたフラグメント組成

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²⁴⁾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 Chemspider²⁵⁾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または分子の計算精密質量 (exact mass) を指す²⁶⁾。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 5-4

表 5-5 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	

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 5-5 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²⁷⁾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 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

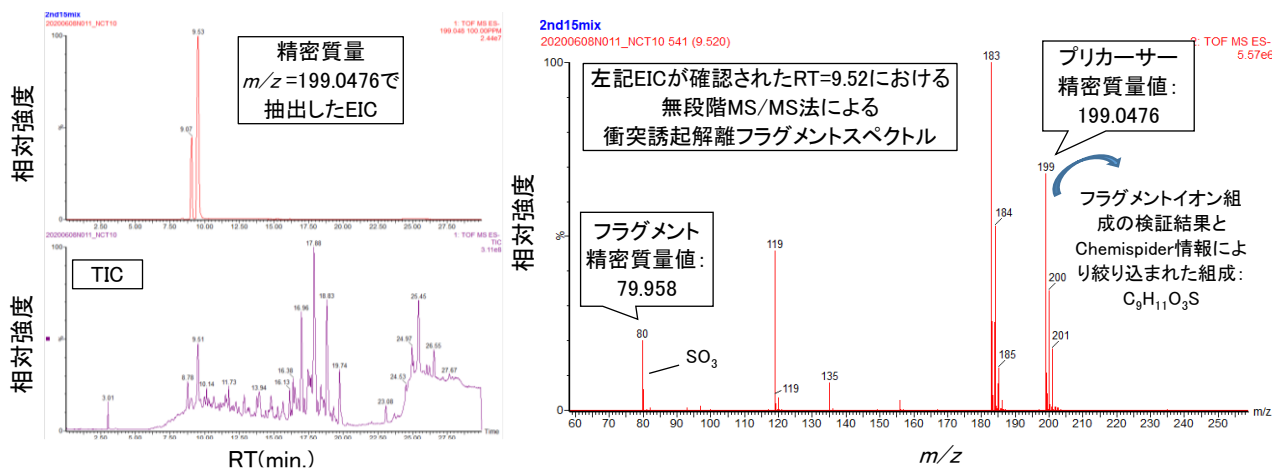


図 5-5 $m/z=199.0476$ の精密質量測定データとフラグメントイオンの検証から絞り込まれた探索物質の元素組成

めて事前に確認することにした。その結果を図 5-5 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 5-6 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

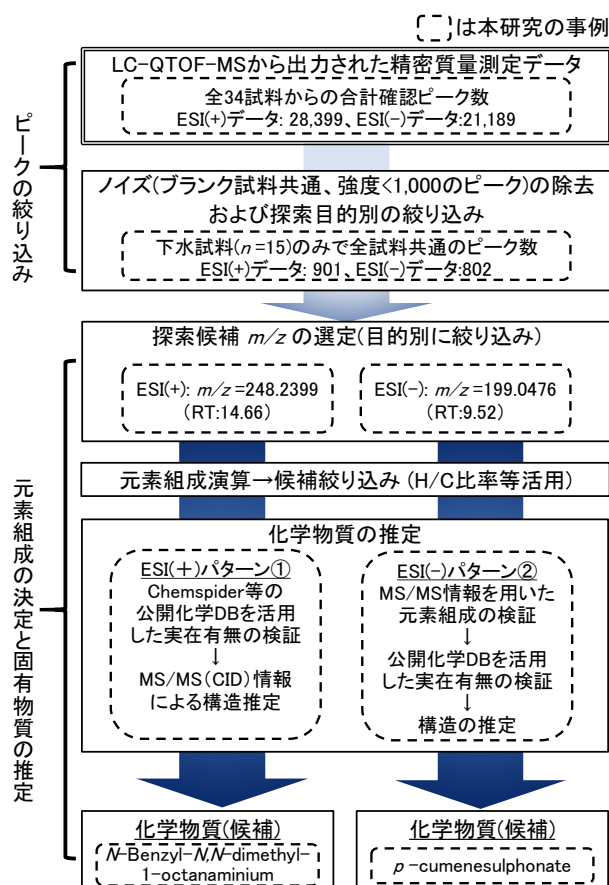


図 5-6 精密質量測定データを用いた未知物質探索解析における化学物質 (候補) 絞り込みフロー

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を期待できる。

5.3 まとめ

本章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。

本章では、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

6. 下水に含有される PRTR 物質の簡易リスク評価手法

「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律 (化管法)」に基づく化学物質排出・移動量届出 (PRTR: Pollutant Release and Transfer Register) 制度は、事業者が第一種指定化学物質 (以下「PRTR 物質」という。) の排出・移動量の届出を行い、国がこれを公表するものである。また、集計結果等を踏まえて環境モニタリングや影響に関する調査も実施される。これらにより、法の目的である「事業者による化学物質の自主的な管理の改善を促進し、環境の保全上の支障を未然に防止」につながるものである。下水道業は、PRTR 制度の届出対象業種の 1 つであり、下水処理施設からの届出排出量及び国が推計している届出外排出量において、公共用水域への排出量に関する寄与が大きい業種である^{28),29)}。

しかしながら、下水処理施設自身が PRTR 対象物質を製造・使用後に排出しているのではなく、流域内の事業所から受け入れたものを經由させている場合がほとんどであるため、実際にどのような PRTR 物質が下水処理施設に流入しているかは十分に捕捉されておらず、実態が的確に把握されていない可能性がある。

本章では、簡易的に生態リスク評価を行い、下水処理施設を經由した環境影響の実態把握の観点で、優先的に測定又はモニタリング対象とすべき PRTR 物質の抽出を試みた。検証項目は以下 3 点である。1) 下水試料のスクリーニング分析を行い、PRTR 物質の含有有無判定と定量、2) 下水処理における PRTR 物質の除去率の算出、3) 下水実測値と公表されている生態毒性値に基づき、水生生物に対するハザード比 (以下「HQ」という。) を算出。

6.1 測定対象の試料と PRTR 物質及び評価方法

6.1.1 試料採取と測定対象物質

2019 年冬期に 10 か所の下水処理施設における流入

水及び二次処理水を採水し、前章で開発した分析法で効率的に網羅測定可能な PRTR 対象無機物質 15 種と有機物質 91 物質の分析試料とした。なお、対象とした下水処理施設は、生活排水の流入が多い 5 処理施設 (A~E) 及び事業所排水の流入が多い 5 処理施設 (F~J) である。

また、2021 年には 2019 年冬期の一部を含む 11 か所の下水処理施設における流入水及び二次処理水を採水し、2019 年とほぼ同様に分析した (重複込みで 16 か所)。

無機物質分析用試料は、硝酸によるホットプレート分解法で前処理して測定に供した (図 6-1)。分析装置は ICP-MS (サーモフィッシャーサイエンティフィック製 X-Series X7CCT) を使用した (図 6-2)。なお、本研究における無機物質は無ろ過で全濃度を分析した。有機物質分析用試料は、ガラス繊維ろ紙 GF/B でろ過し、SS (浮遊物質) とろ液を分離した。SS は溶媒抽出で、ろ液は固相カートリッジ HLB と AC2 (Waters 社製) で固相抽出し、溶出液を濃縮した (図 6-1)。分析装置は LC-ESI(±)-QToF-MS (ACQUITY UPLC H CLASS Plus および Xevo G2-XS QToF, 共に Waters) を用いた (図 6-2)。既報³⁰⁾のターゲットスクリーニング法 (有機物質) で検出有と判定された化学物質について、SS 及びろ液の測定データの双方を併せた定量値を取得した。

6.1.2 生態毒性値の取得及びハザード比の算出

下水試料の実測により定量値が得られた PRTR 物質の生態毒性値は、環境リスク初期評価の評価書³¹⁾に掲載されている予測無影響濃度 (以下「PNEC」という。) を引用した。下水に含まれる PRTR 物質の実測濃度を、既報より引用した PNEC で除することで HQ (生態毒性値のハザード比) を算出した。計算式は下記の通りである。なお、既報³¹⁾中で PNEC 算出対象となっていた生物は、藻・甲殻・魚類のうち最も感受性の高い生物であった。

$$HQ = \frac{\text{PRTR 物質の下水濃度 } (\mu\text{g/L})}{\text{PNEC } (\mu\text{g/L})}$$

6.2 結果及び考察

6.2.1 下水処理施設における PRTR 物質の除去率

下水中で定量された PRTR 物質は、2019 年調査、2021 年調査の順に有機物質 9 種 (0.0002–8.6 $\mu\text{g/L}$)、11 種 (0.003–23 $\mu\text{g/L}$)、及び無機物質 15 種 (0.01–4,700 $\mu\text{g/L}$)、11 種 (23–3,600 $\mu\text{g/L}$) (計 30 種) で

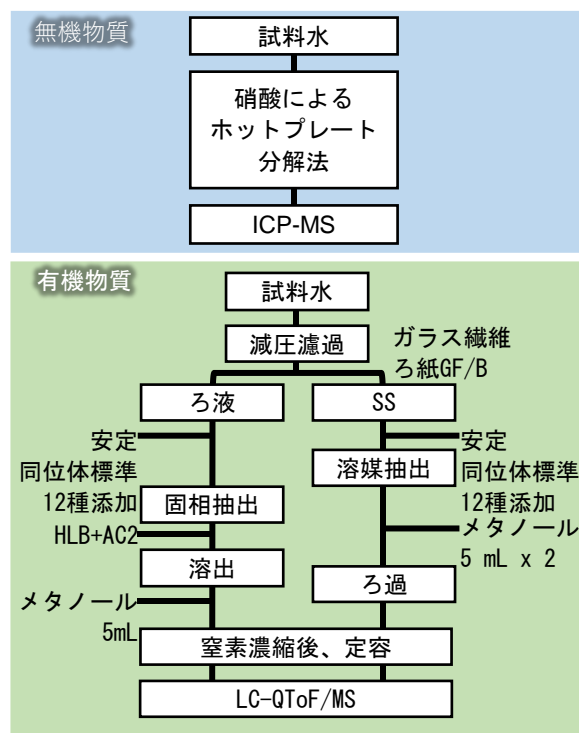


図6-1 下水試料の前処理方法



図6-2 試料の測定に用いた分析機器

あった。これらのうち、PNEC の報告値が既報より得られた物質は、前述と同じ順に 5、4、6、7 種 (計 16 種) であった。以降ではこれらの物質を対象として述べる。2019 年調査の対象物質について、下水処理施設ごとに積算した濃度を図 6-3 に示す。高濃度で検出された物質のほとんどが金属類であり、特に Mn

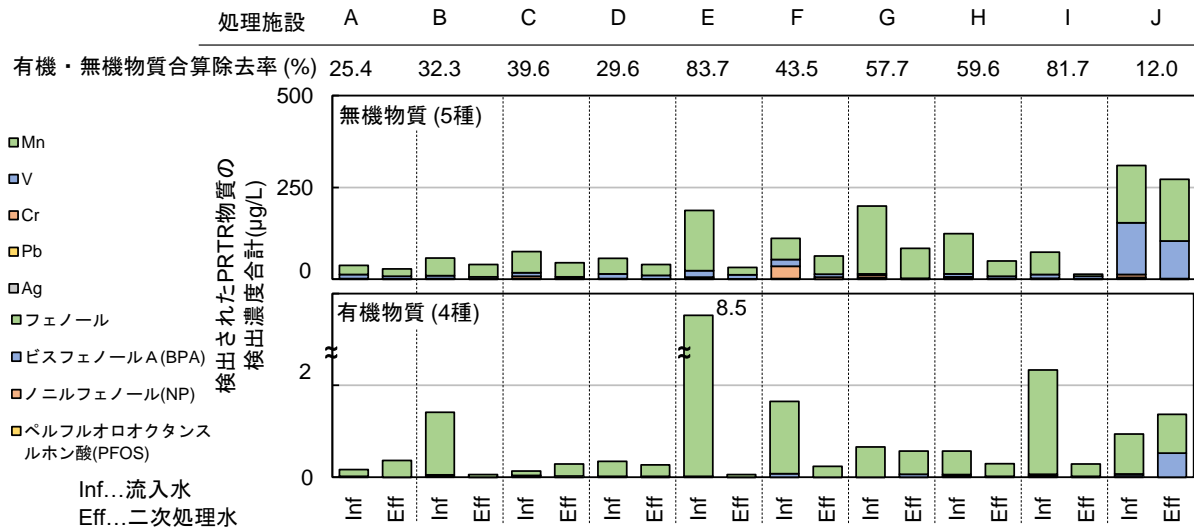


図6-3 下水試料から検出されたPRTR物質9種の処理施設別積算濃度（2019年調査）

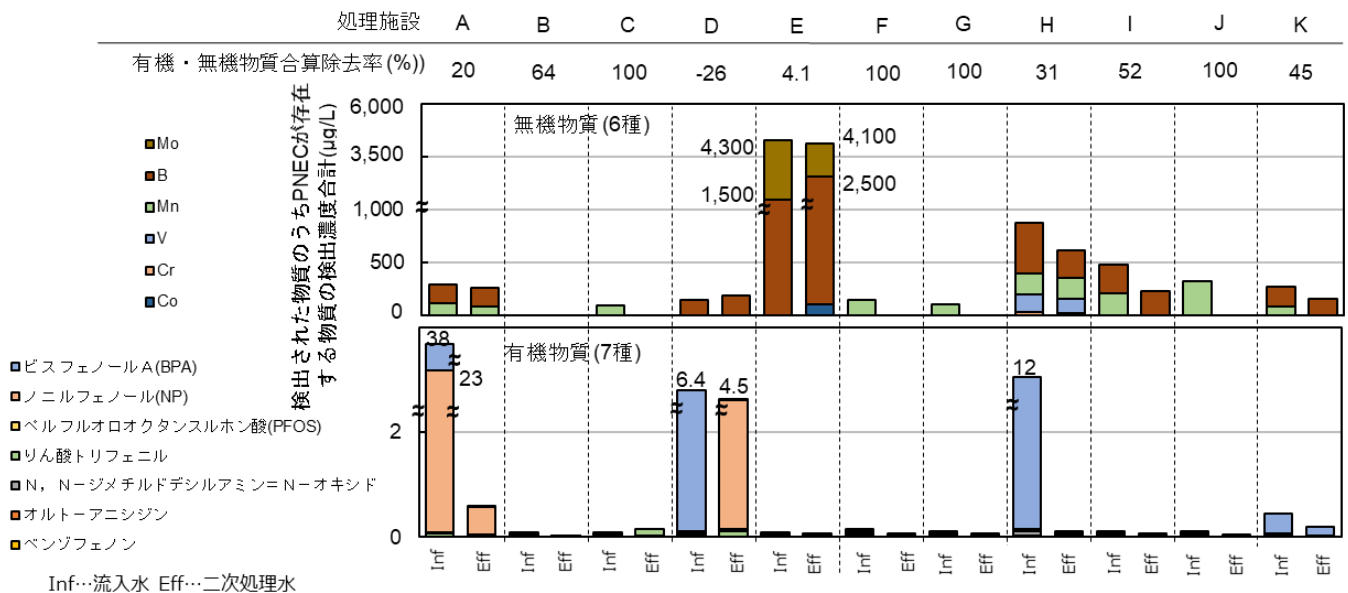


図6-4 下水試料から検出されたPRTR物質9種の処理施設別積算濃度（2021年調査）

及びVが高かった。有機物質では、フェノールが最も高濃度であった。生活排水の流入が多い施設（A～E）と比較し、事業所排水の流入が多い施設（F～J）の方が、PRTR物質の流入総濃度が高い傾向が見られた。施設A, C, J以外の二次処理水の濃度は流入水より低下しており、各物質の施設別除去率は2.5～99.7%、全物質の積算濃度での施設別除去率は12.0～83.7%であった。

2021年調査の対象物質について、下水処理施設ごとに積算した濃度を図6-4に示す。2019年調査と同様に検出された物質のほとんどが金属類であり、2019年調査で濃度の高かったMnとVに加え、MoとBの濃度が高い施設が見られた。有機物質では、ビスフェノールAとノニルフェノールが高濃度であった。施設

D以外の二次処理水の濃度は流入水より低下しており、全物質の積算濃度での施設別除去率は4～100%（施設Dを除く）であった。なお、2021年調査では、フェノールは分析対象としていない。

下水試料は採取時刻や季節等により流入変動を大きく受けるため、正確な実態把握には調査の継続が必要である。

また、下水処理施設では、最終沈殿池で分離された活性汚泥の一部は余剰分として引き抜かれ、その他は返送汚泥として生物反応槽へ返送される。物質によっては、汚泥中に存在しながら生物反応槽へ再流入し、その一部が放流水に移行することで下水処理施設からの排出濃度が流入濃度を一時的に見かけ上で上回ることもあると考えられる。

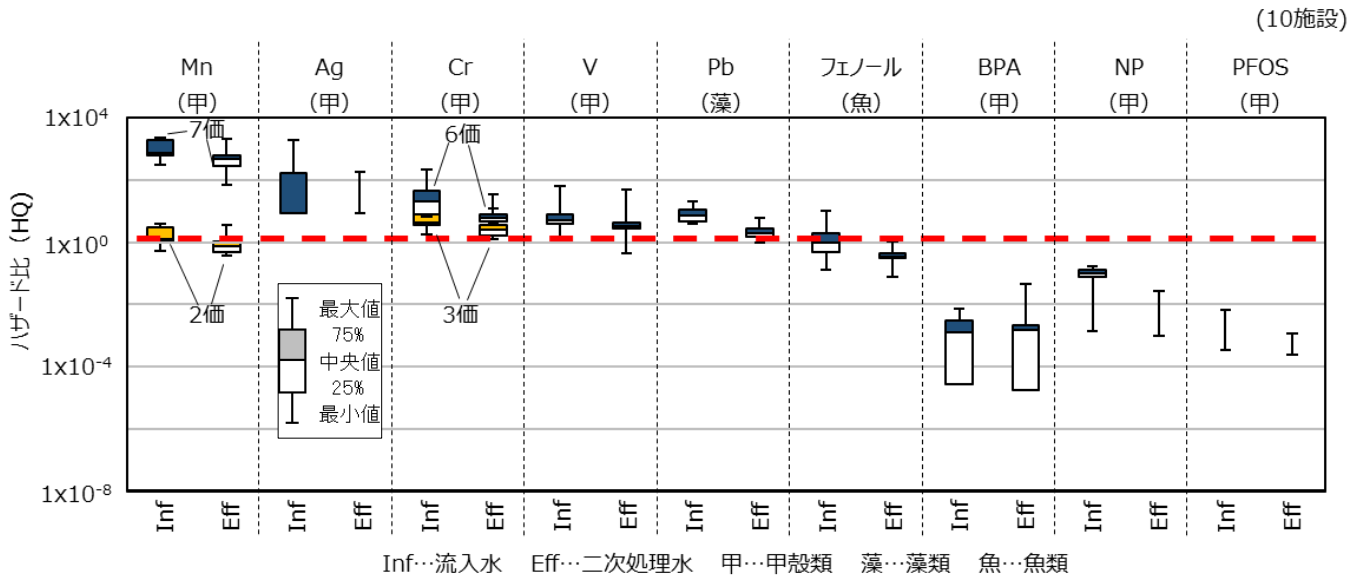


図6-5 流入水と二次処理水から検出されたPRTR物質9種のハザード比 (2019年調査)

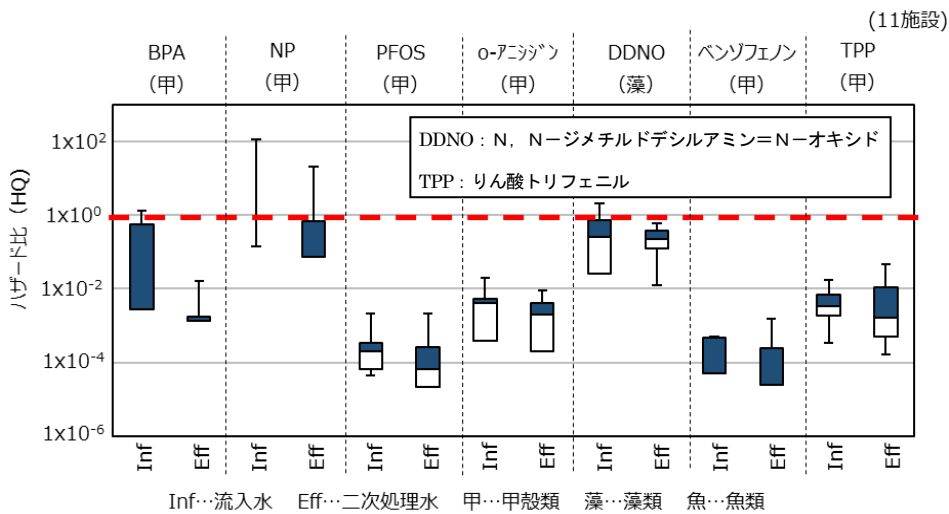
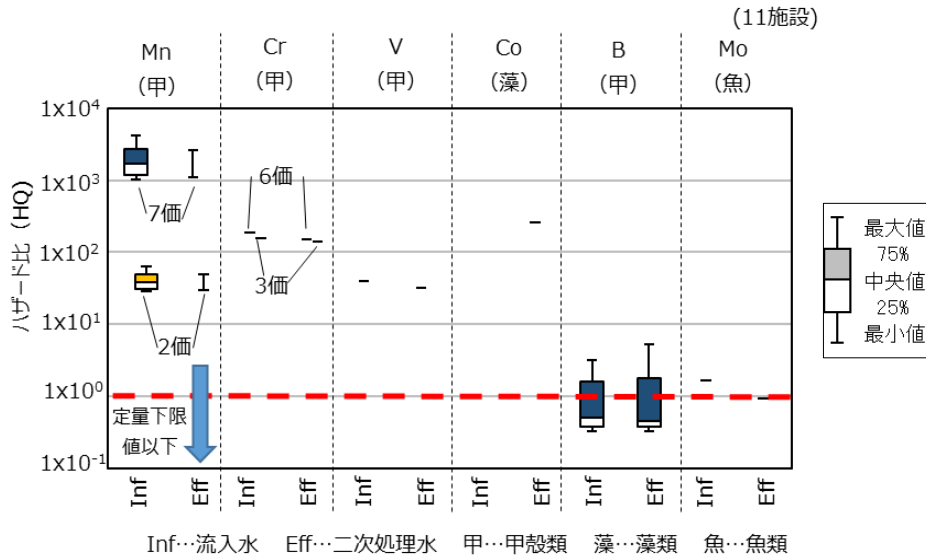


図6-6 流入水と二次処理水から検出されたPRTR物質13種のハザード比 (2021年調査)

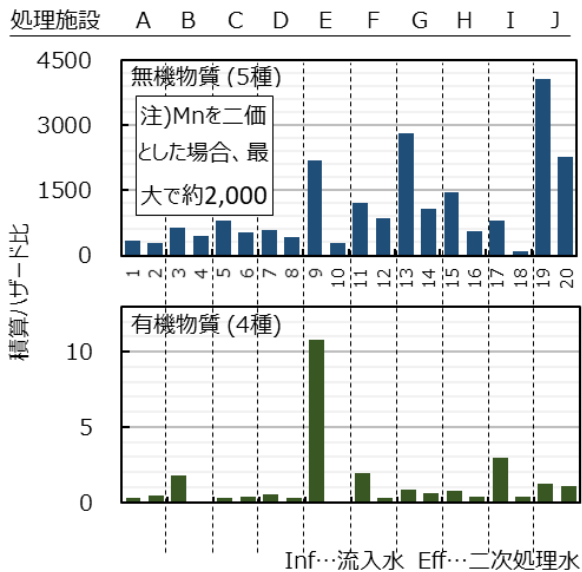


図6-7 下水試料から検出されたPRTR物質 9種の積算ハザード比 (2019年調査)

6.2.2 下水処理施設におけるハザード比の低減と生態リスク影響評価

下水から検出された PRTR 物質のうち、既報³⁰⁾から PNEC が引用できた 9 種 (2019 年調査)、13 種 (2021 年調査) における流入水及び二次処理水の HQ を図 6-5 及び図 6-6 に示す。Mn 及び Cr については、価数の違いにより 2 つの PNEC が報告されていたため、双方の HQ を示した。2019 年調査、2021 年調査ともに、無機物質は有機物質より高い HQ を示す傾向が見られた。

2019 年調査の流入水の HQ は $2.7 \times 10^{-5} \sim 2,395$ 、二次処理水は $1.8 \times 10^{-5} \sim 2,186$ であり、有機物質すべてと 2 価 Mn における二次処理水の HQ 中央値は 1 以下であった。

2021 年調査の流入水の HQ は $4.4 \times 10^{-5} \sim 4,174$ 、二次処理水は $2.2 \times 10^{-5} \sim 2,622$ であり、有機物質すべてと B における二次処理水の HQ 中央値は 1 以下であった。また、Mo(n=1)における二次処理水の HQ は 1 以下であった。なお、Mn が流入水において定量された 8 施設のうち 6 施設は、二次処理水において定量下限値以下であったため、HQ が算出されないことに注意を要する。Co は、1 施設の二次処理水において定量された結果、HQ が二次処理水にのみ存在するが、6.2.1 で述べたように一時的なものと考えられる。

以上のように、下水実測値と既報の PNEC を用いて HQ を算出し、簡易的なリスク評価手法でも優先度が高い物質を抽出できる可能性が示唆された。なお、金属類は下水処理過程で形態が変化することが想定さ

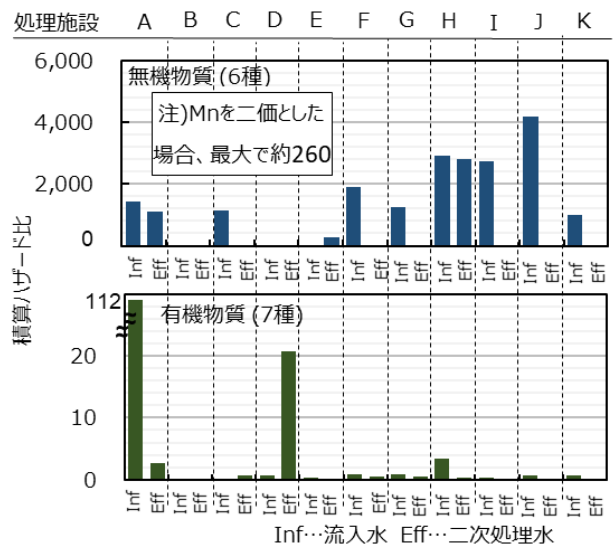


図6-8 下水試料から検出されたPRTR物質 13種の積算ハザード比 (2021年調査)

れることから、二次処理水における HQ の算出については、形態別の実測値を取得する、又は形態別の毒性情報値の収集・引用をすることで、より精度の高い HQ 算出が期待される。また、今回 PNEC を引用できなかった物質についても、今後評価対象とできるような毒性情報値の充実が期待される。

簡易的な生態リスク影響評価手法として検討するため、検出された無機及び有機物質ごとの HQ の単純合計値 (積算ハザード比と呼ぶ) を、処理施設別に算出した結果を図 6-7 及び図 6-8 に示す。なお、Mn 及び Cr については、より安全側に評価するため 7 価及び 6 価をそれぞれ採用した。2019 年調査、2021 年調査の順に、流入水の積算 HQ は 348~4,062、0.18~4,175、二次処理水の積算 HQ は 87.5~2,257、0.086~2,808 であった。有機物質において 10 以上の積算 HQ を示したのは 3 施設であった。このうち 2019 年調査施設 E 流入水では、フェノールが、2021 年調査施設 A 流入水及び施設 D 二次処理水では、ノニルフェノールがそれぞれ大きく寄与している。また、2021 年調査施設 A 流入水では、ノニルフェノールの 97% が SS に、施設 D 二次処理水では、全てろ液に含まれていた。ここでも、6.2.1 で述べたように、汚泥中に存在しながら生物反応槽へ再流入し、その一部が放流水に移行することがこのような結果の 1 要因と考えられた。

2021 年調査の 2 か所を除き二次処理水において積算 HQ の減少が見られたことから (3~100%減)、下水処理により、公共用水域における水生生物への生態リスクが低減していることが推察された。

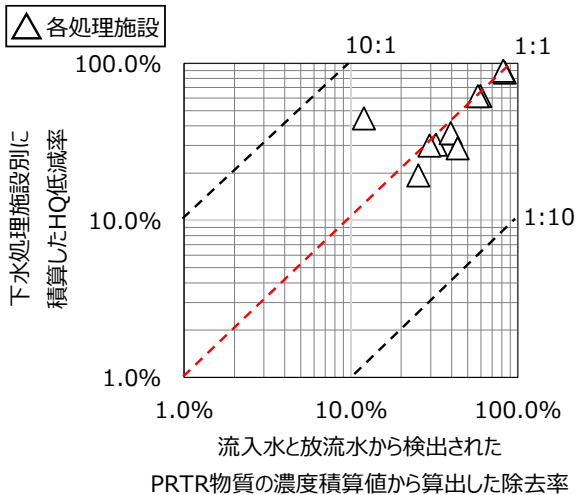


図6-9 下水処理施設におけるPRTR全物質の積算濃度除去率と積算HQ低減率の相関(2019年調査)

下水処理施設におけるPRTR物質の除去率（全種積算濃度）と積算HQの低減率の相関を図6-9及び図6-10に示す。2019年調査の10施設中9施設、2021年調査の11施設中8施設では、除去率とHQ低減率がほぼ1:1であり、正の相関が見られたことから、PRTR物質の除去によるリスクの低減傾向を反映しているものと考えられた。一方、2019年調査では、除去率は低いものの、HQ低減率が高い処理施設が1か所見られ、これはより高リスクであるAgやCrの除去率が99.5%及び77.6%と相対的に高いことに由来するものと考えられる。2021年調査では、除去率30%程度で、HQ低減率が非常に低い処理施設が1か所見られ、これはより高リスクであるMnやCrの除去率が相対的に低いことに由来するものと考えられる。また、2021年調査では、HQ低減率がマイナスになった処理施設が2か所あった。6.2.1と同様に、下水処理施設からの排出濃度が流入濃度を一時的に見かけ上で上回ることもあることなどが要因と考えられる。

6.3 まとめ

計16か所の下水処理施設の流入水及び二次処理水について、PRTR物質に着目して網羅的な分析を行い、30種を定量した。定量されたPRTR物質のうち水生生物におけるPNECの報告値が得られた16種に着目し、実測データと突合することで簡易的にリスク評価を行ない、優先的に測定・モニタリングを行うべき化学物質の抽出を試みた。16種のPRTR物質積算濃度の下水処理施設における除去率は4~100%で、流入水の積算HQは0.18~4,175、二次処理水は0.086~2,808であった。ほぼ全ての二次処理水において積算HQの減少が見られたことから（3~100%減）、下水

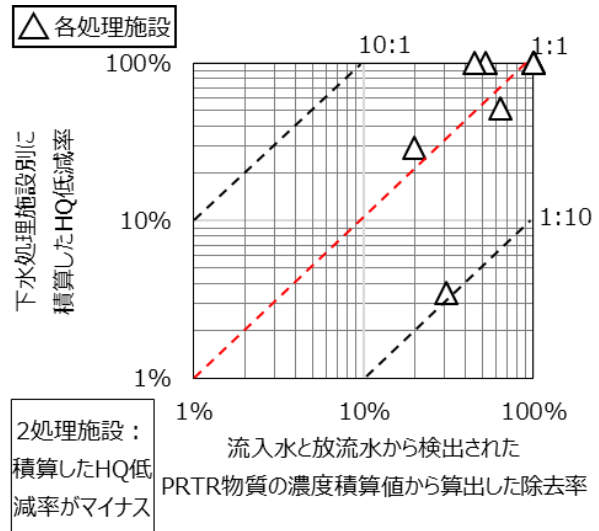


図6-10 下水処理施設におけるPRTR全物質の積算濃度除去率と積算HQ低減率の相関(2021年調査)

処理により、公共用水域における水生生物への生態リスクが低減していることが推察された。一方で、HQは引用するPNEC値や下水処理による除去率など、複数の要素によって変動することから、HQ計算に使用する入力データや計算方法の精緻化が必要である。本手法では、簡易的に算出されたHQを活用することで、放流先河川における水生生物に対するリスク低減を相対的に把握できる可能性が示唆された。併せて、WET試験等により、本手法の相対把握の妥当性が確認できれば、リスク評価の簡易化につながることを期待される。

7. 消毒副生成物のモニタリングと評価

下水処理水中での消毒副生成物等としての存在および公共用水域への影響可能性が懸念される化学物質として有機ハロゲン化合物類がある。フッ素、塩素、臭素を含む多様な有機化合物であり、水環境中における各々の存在実態に関する知見は十分でない。下水道では、流入水にも含まれる可能性があり、消毒プロセスでの副生成物発生と合わせて、多様な発生源と種類が想定しうることから、個別の把握は費用労力面からも難しく、全有機ハロゲン化合物（TOX）等の包括的指標の活用した把握・評価が有効と考えられる。本年度はTOXに着目し、1) 懸濁物質を含む水試料中のTOX分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に塩素消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモ（*Raphidocelis subcapitata*）に対する影響評価を実

施した。

7.1 懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物の分析方法の検討

7.1.1 背景と目的

河川水質試験方法（案）によれば、有機ハロゲン化合物は発ガン性、変異原性、肝毒性等、様々な生体影響を持った化合物群であるといわれており、全有機ハロゲン化合物（Total Organic Halide, 以下 TOX とする）を測定することは、有機化合物による水の汚染度を示す指標として重要であるとされている³²⁾。

PRTR 制度では、2021 年時点で、人の健康や生態系に有害なおそれのある化学物質として全 462 物質が第一種指定化学物質に指定されているが、この中でハロゲンを構造内に持つ物質数は有機塩素化合物類として 82 種（全 462 種の 17.7%）、有機フッ素化合物類として 29 種（同 6.3%）、有機臭素化合物類として 18 種（同 3.9%）であり、合わせると全体数の 1/4 以上を占める。その中には、炭素とハロゲンが直接結合しているペルフルオロオクタン酸（PFOS）³³⁾やジウロン（除草剤の一種）³⁴⁾のように難分解性でありながら河川水中での検出報告例があるものも存在する。

以上のことを踏まえると、TOX 分析は、全てではないものの環境水中に存在する幅広い影響懸念物質群の簡易定量手法として活用できる可能性がある。しかしながら、これまでの TOX 分析では、浄水処理における消毒副生成物の発生挙動の評価を中心とした適用事例³⁵⁾がほとんどであり、懸濁物質を含む環境水の分析方法の検討事例はみられない。そこで本研究では、環境水としては夾雑物が多い下水試料を対象として、比較的懸濁物質（SS）濃度が高い水試料に適用可能な TOX 分析手法を検討した。

7.1.2 実験の方法

(1) 燃焼イオンクロマトグラフィーの適用

本研究では代表的な TOX として全有機塩素化合物（TOCl）について検討することとし、TOCl の分析は既報の燃焼イオンクロマトグラフィー手法³⁶⁾を基本として検討した。装置は自動試料燃焼装置（イオンクロマトグラフ用前処理装置、AQF2100H、日東精工アナリティック製、以下 TOX 計）を用いた。TOX 計はオートポートコントローラー、燃焼ユニット、吸収ユニットで構成され、ポートコントローラーにより燃焼ユニットに導入された試料は、アルゴンガス雰囲気下で熱分解された後、酸素と反応し、燃焼によりハロゲン化水素およびハロゲンガスを発生させる。吸収ユ

表 7-1 下水試料の保存性検討実験の概要

実験	試料 (流入下水の 沈殿上澄液)	試料量 (mL)	試料保存期間 (日)	
			TXAPPC 通水まで	TXAPPC通水後、 燃焼まで
冷蔵保存 (4°C) 実験	消毒処理なし 消毒処理後	100	0, 1, 3, 7, 15	0, 1, 6, 7, 8, 14, 15

実験	試料 (流入下水の 沈殿上澄液)	試料量 (mL)	TXAPPC通水までの 試料保存期間 (日)	
冷凍保存 (-20°C) 実験	消毒処理なし 消毒処理後	100	0, 14, 28, 56, 84	

TXAPPC: 活性炭プリパックドカラム

ニットでは、発生したガスが吸収液（過酸化水素）により捕集され、ハロゲン化物イオンを含む水溶液として、イオンクロマトグラフ（IC）への導入試料となる。ICにはICS-1100（Thermo Fisher Scientific 製）を用い、塩化物イオン（Cl⁻）濃度を測定することで、試料中の TOCl 濃度とした。定量は絶対検量線法により行った。IC 測定における Cl⁻の IDL（装置検出下限値）は 14 µg/L、IQL（装置定量下限値）は 47 µg/L であった。なお、吸収ユニットで吸収液量が変動することにより生じる濃度誤差は、吸収液に予め添加したリン酸イオンの測定濃度を用いて、補正した。

(2) TOX 計導入前処理の検討

液体試料の TOX 計導入前処理としては、活性炭吸着-無機ハロゲン除去法³⁶⁾がある。具体的には、水試料に対し、試料の 5%量の硝酸ナトリウム（0.2 mol/L）を添加して活性炭プリパックドカラム（TXAPPC、日東精工アナリティック製）に通水した後、硝酸ナトリウム（0.012 mol/L）を適量通水し、無機態ハロゲンを除去するものである。一方で、本手法について、1)下水試料のように夾雑物が多い試料の保存性に関する検討事例、2)下水試料のように SS 濃度の高い試料に適した前処理方法に関する検討事例が見られない。本検討では、1)および 2)について検討実験を行い、より適切な前処理の提案を試みた。なお、予備実験として TOCl を含まないイオン交換水に 4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzene（Sigma-Aldrich 製）を 500 µg/L となるよう添加し（n=10）、前処理後に測定した時の回収率の平均値は 72.3%、変動係数は 10.8%であった。

a) TOCl 分析用下水試料の保存性の検討

試料採取から前処理を実施して測定するまでの間における TOCl 濃度の変化の有無を検証することを目的とし、水試料およびカラム通水後試料の保存性を検討した。具体的な実験条件を表 7-1 に示す。保存条件

として、冷蔵(4℃)と冷凍(-20℃)を設定した。

冷蔵実験では、TXAPPCに通水するまでの保存期間を0日(採取当日)、1日、3日、7日、15日、の5通りとし、また、通水後のカラムをパラフィルムとアルミホイルで包んで冷蔵保存し、燃焼操作まで保存する期間を0日(通水当日)または1日、6日、から8日、14日または15日の3通りに設定した。

冷凍実験では、TXAPPCに通水するまでの保存期間を0日(採取当日)、14日、28日、56日、84日の5通りを設定した。試料は沈殿させた流入下水の上澄み(以下、消毒処理なし試料。SS濃度32mg/L)および同試料に塩素消毒処理を行ったもの(以下、消毒処理後試料。SS濃度26mg/L)を各100mL準備し、それぞれの実験に供した。なお、塩素処理では、塩素注入率を10mg/L、反応時間を20分として処理した後、残留塩素を中和するために飽和濃度に調整したチオ硫酸ナトリウム溶液を試料に加え、5分間反応させた。燃焼後の試料がICで測定されるまでは3日以内であった。

b) 高SS濃度水試料のTOCI分析前処理方法の検討

試料に多くの懸濁物が含まれる場合、TXAPPCに十分な量の通水ができず、試料定量下限値が悪化して低濃度までの測定ができなくなるだけでなく、適切な濃度評価ができなくなる恐れがある。また、試料をろ別し、ろ液を溶存態試料、ろ紙上の残渣を懸濁態試料として各々分析することで得られる形態別分析データは、環境中の挙動の把握や水処理の処理操作の評価において有効となる。

本検討では、ろ過後のろ紙上の残渣を懸濁態試料として燃焼イオンクロマトグラフィーに供するために重要な検討項目として、ろ紙材の選定、無機ハロゲン除去操作の検討、前処理後試料の保存を含めた一連の操作における精度と確度の確認を行った。

ろ紙材の検討では、SS濃度測定で一般的に使用されるガラス繊維ろ紙(GF/B, Φ47mm, Whatman製)、セルロース混合エステルろ紙(MCE, Φ47mm, ADVANTEC製)、酢酸セルロースろ紙(CA, Φ47mm, ADVANTEC製)の3種に対し、ろ紙由来のコンタミネーションの有無と測定の再現性を確認した。

無機ハロゲン除去の検討では、液体(水)試料と同様に硝酸ナトリウム(0.012mol/L)を用いることとし、ろ紙の洗浄量を0,30,60,90,120mLの5段階設定し、適切な洗浄量を検討した。また、使用するろ紙中のTOCI除去を目的として、比較的極性の低いトル

エンと比較的極性の高いメタノールによる事前洗浄操作を検討した。実験に用いた試料は、流入下水を沈殿させた上澄み液を塩素消毒処理後にNaClを60mg-Cl/Lとなるよう添加して調整し、各々50mLずつろ過した残渣を用いた。

最後に、SS濃度が224mg/Lの流入下水を用いて各25mLをろ過した懸濁態試料を準備し、標準添加回収試験を実施した。標準物質には4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzeneを用い、前処理実施前に1250μg/試料となるよう添加した試料と無添加試料を準備した。前処理ではまず、見出したろ紙を用いたろ過と洗浄方法を施した。次に、燃焼操作までの試料保存と効率的な燃焼のために試料の乾燥処理が必要であることを考慮して、上述の前処理を経た試料を凍結乾燥させてからTOX計に供した。なお、高SS濃度の水試料に対する分析手法全体としての精度と確度を確認するため、ろ液についてもTXAPPC通水前の試料に同条件で標準添加を行い、測定時の回収率を算出した。また、凍結乾燥による測定への影響を確認するため、凍結乾燥前後の懸濁態試料への標準添加回収試験も同条件で実施した。全ての試験をn=5で実施した。

7.1.3 結果

(1) 下水試料のTOCI分析試料の保存性の検討

水試料および通水後カラム試料の冷蔵保存実験の結果を図7-1に示す。なお、試料準備日に冷蔵保存をせずにTXAPPCに通水し、当日中に燃焼操作を終えた試料の測定データ(消毒処理なし:15.9μg/L、消毒処理後試料:37.0μg/L)をそれぞれTOCI残存率100%として、保存期間ごとの残存率を算出した。各冷蔵保存期間(n=6)の残存率の平均値は112.6%(0日後)、80.4%(1日後)、71.0%(3日後)、79.0%(7日後)、

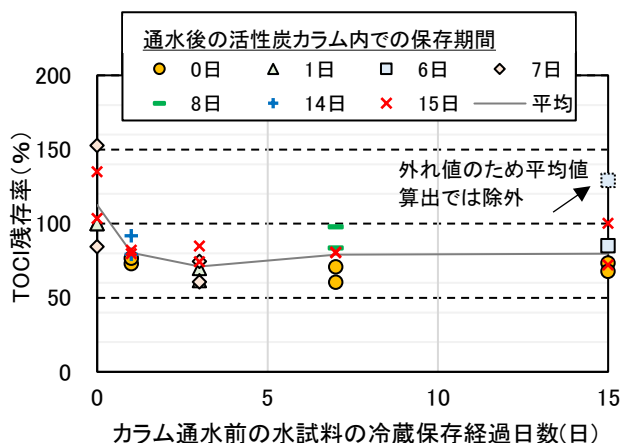


図 7-1 冷蔵保存試料の TOCI 残存率の推移

79.8% (15日後)であり、開始日～1日後にかけて顕著な減少傾向がみられた。一方で、通水後にTXAPPCとして保存したデータに着目すると、水試料としての冷蔵保存期間が0日、あるいは7日、15日では若干のばらつきはあったものの、カラムでの保存期間による残存率への大きな影響はみられなかった。

水試料の冷凍保存実験の結果を図7-2に示す。TOCl残存率の算出方法は上述通りである。また、本実験は $n=3$ で行ったが、全ての保存条件で測定値の変動係数が10%以下(最大で9.5%(消毒なしの28日冷凍保存試料))であり、同じ試料群の再現性は良好であったため、グラフには平均値をプロットした。平均残存率は、消毒処理なし試料では67.6%(14日後)、73.8%(28日後)、82.7%(56日後)、68.7%(84日後)、消毒処理後試料では59.9%(15日後)、73.3%(28日後)、80.6%(56日後)、50.4%(84日後)であった。実験開始日とその他の保存試料の残存率の差の要因は、冷凍試料の解凍操作等に半日程度の作業時間がかかり、TOCl濃度に変化が生じたためであると推察された。一方で、解凍操作中の濃度減少を除けば、56日(約2ヶ月)程度の保存であれば残存率への顕著な影響はないことが示唆された。

以上の結果を整理すると、試料中のTOCl濃度をより適切に測定するためには、試料取得後速やかにTXAPPCへの通水を開始することが望ましいことが示唆された。一方で、試料取得から実験室での通水作業までには1日程度を要することも想定されるため、水試料の速やかな冷凍ならびに迅速な解凍作業により、1-2ヶ月程度の冷凍保存が可能となることが示された。また、通水後のTXAPPCを15日程度冷蔵保存しても測定値に影響しないことが示唆された。

(2) 懸濁態試料中の低濃度 TOCl 測定を目指したろ紙材と洗浄法の検討

SS濃度が高い水試料中のTOCl測定方法として適した条件を検討するために、異なるろ紙材と洗浄方法を用いてコンタミネーションの有無を確認した。その結果を図7-3に示す。まず、MCEろ紙を検討した結果、無洗浄での吸収液(5mL程度)の濃度が平均値($n=3$)で670 $\mu\text{g/L}$ 、 NaNO_3 による洗浄後で435 $\mu\text{g/L}$ 検出された。GF/Bろ紙の場合には、 NaNO_3 による洗浄後で158 $\mu\text{g/L}$ 検出された。これらの濃度は、装置定量下限値(IQL)の47 $\mu\text{g/L}$ よりも顕著に高く、ろ紙に含まれる塩素化合物によるコンタミネーションが示唆された。また、GF/Bろ紙の場合には燃焼後にも燃焼ボートにガラス塊が残留してしまう課題もあった。一方、CAろ紙では、無洗浄の場合でも60.0 $\mu\text{g/L}$ の検出に留まり、MCEろ紙やGF/Bろ紙と比べ、バックグラウンド濃度が大幅に改善した。また、 NaNO_3 による洗浄後では50.9 $\mu\text{g/L}$ であった。さらに

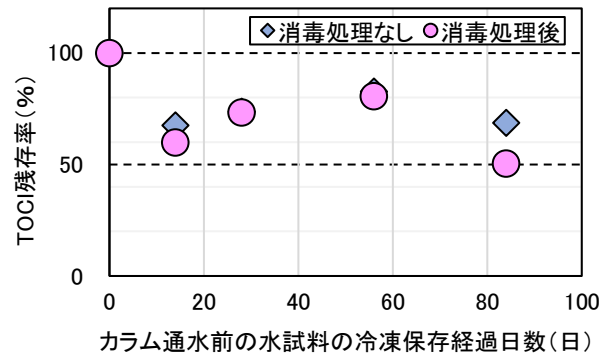


図7-2 水試料の冷凍保存後のTOCl残存率

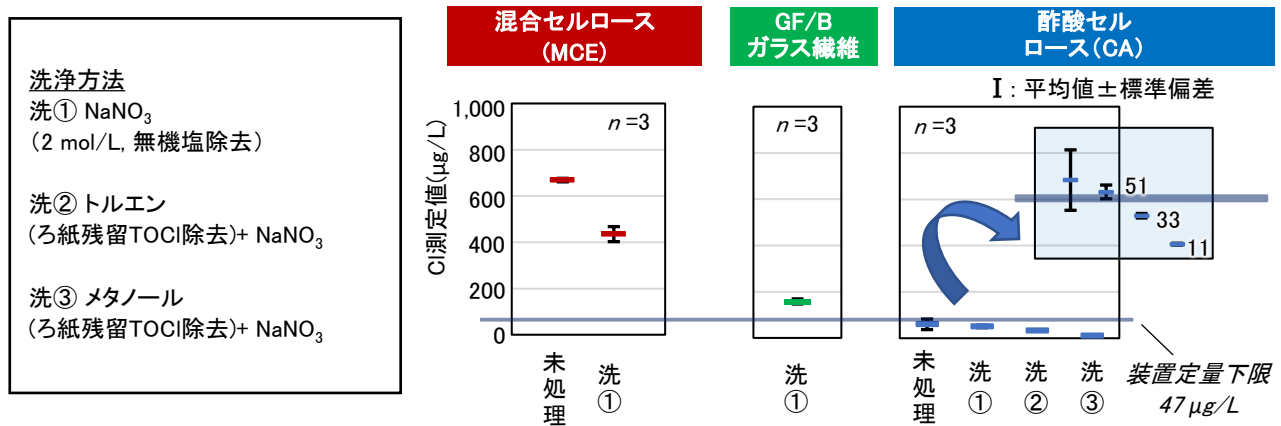


図7-3 懸濁態試料中の低濃度 TOCl 測定を目指したろ紙材と洗浄法の検討

トルエン+NaNO₃洗浄後では 32.8 µg/L、メタノール+NaNO₃洗浄後では 10.9 µg/L の検出に留り、*IQL* の 47 µg/L よりも低くなった。以上より、メタノールと NaNO₃ による事前洗浄をした CA ろ紙を採用することで、試料中 TOCl が数 µg/L～数十 µg/L の低濃度域まで測定できる可能性が示された。

見出した洗浄方法で準備した CA ろ紙を用いて、下水試料をろ過した残渣を含むろ紙に対して無機ハロゲン除去に必要な NaNO₃ (2.0 mol/L) 洗浄液量を検討した。結果を図 7-4 に示す。NaNO₃ 液量が 0, 30, 60, 90, 120 mL の時の TOCl 濃度はそれぞれ、99.4, 58.3, 34.7, 31.2, 36.5 µg/L であり、60 mL 以上では大きな差はみられなかった。60 mL の洗浄液量があれば作業が非効率化せずに、十分に無機ハロゲン（無機塩素化合物）が除去されることが示唆された。

(3) 下水懸濁態試料への標準添加回収試験結果と結乾燥による TOCl 測定への影響の確認

実下水試料を用いた標準添加回収試験の結果を図 7-5 に示す。本研究で見出して(1)及び(2)に示した前処理方法（試料水の冷凍保存期間、通水後カラムの冷蔵保存期間、ろ紙の洗浄方法）で処理した後に凍結乾燥した上で TOX 計に供した懸濁態試料中の TOCl 標準添加回収率は 62.3% であり、その変動係数は 11.4% であった。また、溶存態試料を既往の手法で前処理し TOX 計に供した時の回収率は 62.1% であり、その変動係数は 3.4% であった。これらを比較すると、回収率の再現性は懸濁態試料でやや誤差が大きかったが、回収率自体は懸濁態と溶存態とで同様であった。一方、標準非添加試料の測定値から算出した試料中に元々含まれていた TOCl 濃度に着目すると、溶存態試料では平均値 27.5 µg/L（濃度の変動係数 3.4%）であったのに対し、懸濁態試料では平均値 118 µg/L（濃度の変動係数 33.8%）と変動が顕著に大きかった。この要因の一つには、標準添加試料中の TOCl 濃度に対して、実試料中の TOCl 濃度が 2 オーダー程度低かったことが考えられた。

懸濁態試料において分析値の変動係数が比較的高かった結果を受け、前処理の後段で行う凍結乾燥処理による TOCl 測定結果への影響を検討した。結果を図 7-6 に示す。凍結乾燥後に標準添加した試料では、回収率は 95.4% であり、その変動係数は 3.7% であった。一方で、凍結乾燥前の添加試料では回収率は 75.0% であり、その変動係数は 22.9% であった。この結果から、凍結乾燥処理により懸濁態試料中 TOCl のロスや測定

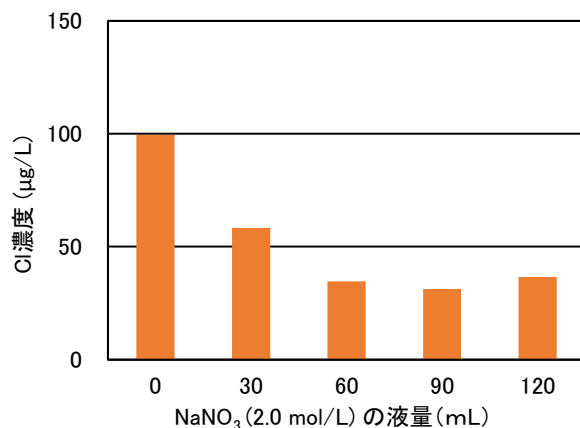


図 7-4 無機ハロゲン除去のための NaNO₃ 洗浄における液量別の Cl 測定濃度

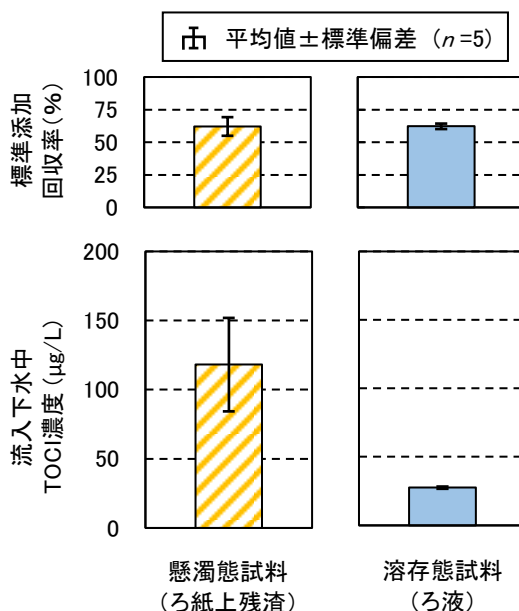


図 7-5 標準物質 4-bromo-2-chloro-1-fluorobenzene を用いた下水試料への添加回収試験結果と同試料中に元々含まれていた TOCl 濃度

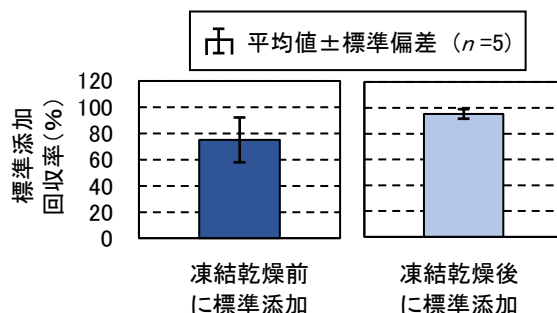


図 7-6 ろ紙試料の凍結乾燥処理の有無による TOCl 回収率の比較

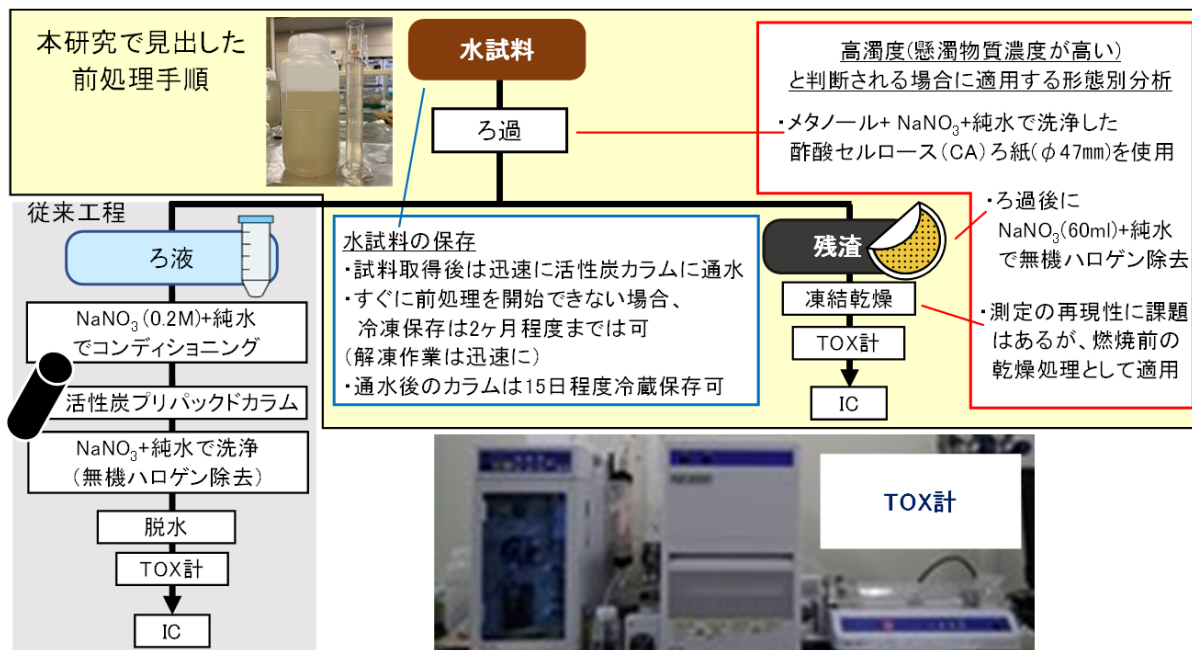


図 7-7 本研究で見出した TOCI の測定手順

誤差を生じていることが示唆された。一方で、凍結乾燥処理を除いて試料への影響が少ない乾燥操作は現状では提案は容易ではなく、凍結乾燥操作への対処方策の検討が必要であることが示された。

以上の検討結果より本研究で見出した TOCI の測定手順を図 7-7 に示す。本手法の懸濁態分析では濃度が数十 $\mu\text{g/L}$ 程度以下の低い下水試料の分析では測定結果が一定のばらつきを含むため、複数試料の分析による誤差の確認が重要であると考えられた。また、全有機フッ素化合物類 (TOF) や、有機臭素化合物類 (TOBr) についても定量可能なことを確認しており、今後の活用を検討していく。

7.2 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動把握

7.2.1 背景と目的

下水処理場が地震、豪雨等により被災しその処理機能が喪失した場合、被災後の緊急措置として未処理下水の消毒放流が行われ、また、応急復旧段階においては沈殿や簡易生物処理を行った後、消毒放流されている。これらの消毒放流についてはこれまでの知見から衛生学的な安全を確保するために必要な主要消毒技術の一つとして塩素消毒³⁹⁾が用いられている。塩素注入率は放流水の大腸菌群数を $3,000$ 個/ cm^3 以下に保ちつつ消毒塩素の放流先への影響を考慮し、残留塩素 0.1mg/L 程度が目安となっている。残留塩素が 1.0mg/L を超えた場合には、放流先の水生生物への影

響懸念から還元剤による脱塩素や海水、環境水等による希釈が必要となる場合もある。また、下水処理の消毒の他、浄水処理の消毒においても用いられている塩素消毒は、有害なトリハロメタン、ニトロソアミン類、ホルムアルデヒド、全有機ハロゲン等の消毒副生成物を生成する反応を起こしうることが知られている^{39)~43)}。

応急復旧段階の下水の塩素消毒は、通常の下水处理水の塩素消毒に比べ、塩素注入率が高いことから消毒副生成物の生成濃度が高くなることが予想されるが、応急復旧段階の消毒副生成物に関する調査・研究報告はみられず、その実態は不明である。また、これら消毒副生成物の放流先河川における挙動の調査報告は少なく、応急復旧段階の消毒放流を対象とした調査報告はみられない。

本研究は、応急復旧段階を模した下水を用い、消毒副生成物の生成メカニズム検討として塩素注入率と副生成物の関係、反応時間と副生成物の関係について室内実験を行った。また、消毒副生成物の放流先河川における挙動について応急復旧段階の下水処理場の放流先河川における現地調査を行った。

7.2.2 方法

(1) 消毒副生成物の生成メカニズム検討

塩素消毒における消毒副生成物の生成メカニズム検討については、塩素注入率、反応時間をパラメータとした消毒副生成物の生成実験を行った。消毒副生成

物として全有機ハロゲン (TOX)、ホルムアルデヒド (HCHO)、ニトロソアミン類の N-ニトロソジメチルアミン (NDMA)、N-ニトロソジエチルアミン (NDEA) を分析した。HCHO は公共用水域における水生生物保全の要監視項目でその淡水域の指針値は 1mg/L 以下とされている化学物質であり、水道水質基準の基準値が 80 µg/L 以下と設定されている。NDMA は水道水の要検討項目としてその目標値 0.1 µg/L が示されている化学物質である。

TOX の分析は、前述した 7.1.3(3) に示す方法により行った。本研究は、塩素消毒副生成物の検討を主眼としていることから TOX 化合物のなかでも塩素化有機物について測定し TOCl 濃度として「µg-Cl/L」で示した。また、HCHO は、化学物質と環境平成 27 年度化学物質分析法開発報告書⁴⁴⁾の方法により、ろ過無しで分析した。NDMA、NDEA は、試料を孔径 1 µm のガラス繊維ろ紙で自然ろ過した後、ろ液を上水試験方法-2011 年版・有機物編⁴⁵⁾の方法により分析した。また、供試下水について水温、pH、ORP、SS、DOC、NH₄-N を測定した。

a) 塩素注入率と副生成物生成の関係

塩素注入率と副生成物生成の関係把握は、図 7-8 に示す 2L のポリビンに pH 計、ORP 計をセットした実験装置を 4 組用いて行った。塩素注入率は、流入下水の消毒において大腸菌群数を 3,000 個/cm³ 以下にするために必要な 7~12mg/L^{46,47)}を参考に 5~20mg/L とし、また、反応時間は一般的な消毒槽の接触時間が 15 分以上⁴⁷⁾を標準としていることを参考に 20 分に設定した。添加する塩素は、有効遊離塩素約 1,000mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液とした。各装置に塩素注入率 5、10、15、20mg/L で塩素添加し、20 分撹拌した。残留塩素を測定した後、直ちに L-アスコルビン酸を 1g/L 加え残留塩素の中和を行った。残留塩素中和後の試料について消毒副生成物 (TOCl、HCHO、NDMA、NDEA) を分析した。

実験は実処理場の流入下水を用いて 2 回行った。実験 1 回目の試料は、ピット表層水を簡易沈澱下水の模擬下水として用いた。実験 2 回目は、ピット下水を採取し嫌気化させる目的で 3 日間室温で放置し、再混合した後 1 時間静置した上澄液を還元性簡易沈澱下水の模擬下水とした。それぞれの供試下水の水質を表 7-2 に示した。実験 1 回目に供した模擬簡易沈澱下水の水質は、ORP-125 mV、SS91mg/L、DOC26mg/L、NH₄-N16mg/L であった。また、実験 2 回目の供試下

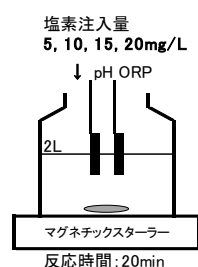


図 7-8 実験装置 (塩素注入率の影響実験)

表 7-2 供試下水の水質 (塩素注入率の影響実験)

	水温 (°C)	pH (-)	ORP (mV)	SS (mg/L)	DOC (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)
1回目	22	7.0	-125	91	26	16
2回目	16	6.9	-225	28	39	26

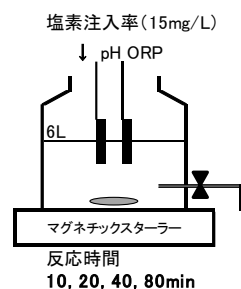


図 7-9 実験装置 (反応時間の影響実験)

表 7-3 供試下水の水質 (反応時間の影響実験)

	水温 (°C)	pH (-)	ORP (mV)	SS (mg/L)	DOC (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)
実験①	21	7.1	-220	165	24	17
実験②	10	7.3	-74	103	41	26

表 7-4 塩素消毒後の水質 (塩素注入率の影響実験)

	塩素注入率 (mg/L)	残留塩素 (mg/L)		水温 (°C)	pH (-)	ORP (mV)	
		Free	Total				
1 回目	5	添加20分後	0.20	0.02	22	7.1	-37
		中和後	—	—	22	4.1	64
	10	添加20分後	0.21	4.0	21	7.1	450
		中和後	—	0.00	21	4.2	74
	15	添加20分後	0.09	7.2	21	7.1	499
		中和後	—	0.00	21	4.3	67
20	添加20分後	0.48	13	21	7.1	519	
	中和後	—	0.00	21	4.3	68	
2 回目	5	添加20分後	0.06	0.00	17	7.1	-78
		中和後	—	—	17	4.6	-2
	10	添加20分後	0.06	1.1	16	7.0	349
		中和後	—	—	16	4.6	62
	15	添加20分後	0.12	5.0	16	7.1	430
		中和後	—	—	16	4.7	40
20	添加20分後	0.16	11	16	7.1	450	
	中和後	—	—	16	4.8	92	

水は、3日間室温放置により ORP が-225mV と還元は進行し、模擬還元性簡易沈澱下水とすることができた。

b) 反応時間と副生成物生成の関係

反応時間と副生成物の関係把握は、前述の 1) と同様に図 7-8 の装置を 4 組用い、それぞれの塩素注入率を 15mg/L とし塩素添加から 10、20、40、80 分経過後に各試料の残留塩素を測定した後、直ちに L-アスコルビン酸を 1g/L 加え残留塩素の中和を行った。残留塩素中和後の試料について消毒副生成物 (TOX、HCHO、NDMA、NDEA) を分析した (実験①)。

また、別々の装置による実験①では、バラツキがみられたことから同一ボトルを用い所定の反応時間経過後に分析試料を採取する方式の実験②を行った (図 7-9 参照)。実験②では消毒副生成物は TOCl のみ分析した。実験は試料 6L、塩素注入率 15mg/L とし、塩素添加から 10 分経過後に試料約 300mL を採取し残留塩素測定後、直ちに L-アスコルビン酸を 1g/L 加え残留塩素の中和を行い TOCl 分析に供した。20 分経過後、40 分経過後、80 分経過後においても 10 分経過後同様に試料採取、残留塩素測定、残留塩素中和を行い TOCl 分析した。

供試下水の水質を表 7-3 に示した。実験①の試料は実処理場の流入下水を午前中に採取し、直ちに実験に供し、実験②の試料は午後採取したピット表層下水を翌日まで室温保存したものを実験に供した。

(2) 消毒副生成物の放流先河川における挙動

消毒副生成物の放流先河川における挙動調査は、K 浄化センターの放流先河川 (A 川) において実施した。分析試料は、下水処理場の放流口と放流先河川 5 地点 (放流口の上流約 0.7km、下流約 3km、約 7.5km、約 11.5km、約 22km) で採取した。採取地点において水温、pH、ORP、EC、濁度、DO、TDS、残留塩素 (遊離、全) を測定した。また、採取試料は、冷蔵状態で分析所に持ち込み、一般項目 (SS、DOC、TP、NH₄-N、NO_x-N、NO₂-N) の測定と消毒副生成物 (TOCl、HCHO、NDMA、NDEA) を分析した。TOCl 測定は、試料の SS 濃度が低いことから未ろ過試料をそのまま活性炭カラムに通水した。

7.2.3 結果と考察

(1) 消毒副生成物の生成メカニズム検討結果

a) 塩素注入率と副生成物生成の関係

塩素消毒後の水質を表 7-4 に示した。各実験とも残留塩素は、遊離残留塩素の存在は少なく、ほとんどが結合残留塩素であった。結合残留塩素としてクロラミ

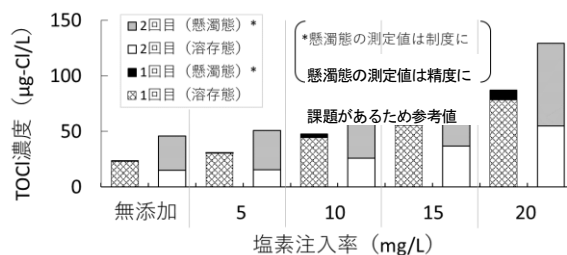


図 7-10 TOCl 測定結果 (塩素注入率の影響実験)

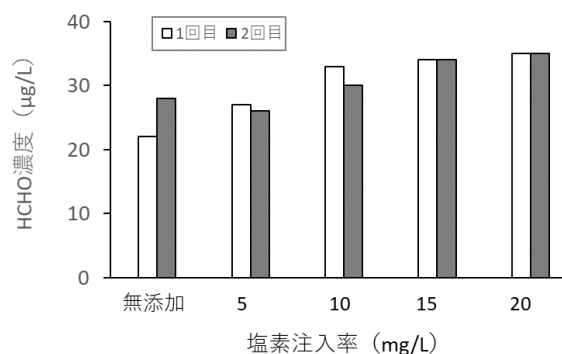


図 7-11 HCHO 測定結果 (塩素注入率の影響実験)

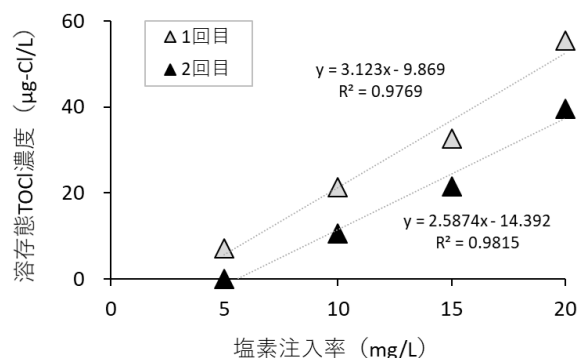


図 7-12 塩素注入率と生成 TOCl 濃度の関係

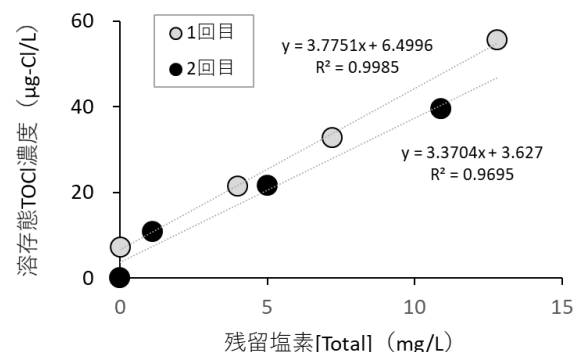


図 7-13 残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の関係

ン (モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミン) が知られているが、本研究ではクロラミンの形態につ

いては確認していない。また、いくつかの中和試料の残留塩素測定を行い、中和後に残留塩素が不検出であることを確認した。

pH は、塩素添加前後の変化はほとんど見られないが、残留塩素の中和剤として 1g/L の濃度で L-アスコルビン酸を添加した後は 4.1~4.8 と酸性を示した。また、ORP の変化から、還元状態の供試下水試料（表 7-2）が塩素添加後に酸化状態となっていることがわかる。還元剤としての作用をもつ L-アスコルビン酸の添加により ORP の値が少し低下しているが、残留塩素が中和されることによる。消毒副生成物の分析は、中和後の試料を用いた。

塩素無添加の TOCl 濃度、塩素注入率を 5、10、15、20mg/L で添加し反応時間 20 分とした試料の TOCl 濃度を図 7-10、HCHO 濃度を図 7-11 に示した。実験 1 回目の TOCl 測定は、孔径 1 μ m のミックスセルロースエステル（MCE）ろ紙、実験 2 回目は、孔径 0.8 μ m のセルロースアセテート（CA）ろ紙によりろ過したろ液（溶存態）とろ紙上残渣（懸濁態）に分けて行った。また、HCHO 測定は懸濁態を含む試料を PFBOA 誘導体化後、ヘキササン抽出し GC/MS により測定した。図 7-10 より塩素消毒により TOCl の生成がみられ、その生成濃度は、塩素注入率に比例し高くなる傾向がみられた。1 回目、2 回目の結果を比較すると、溶存態と懸濁態の比率が異なる結果となったが、懸濁態を捕捉するろ紙の孔径が 1 回目 1 μ m、2 回目 0.8 μ m と違うことが一因と考えられる。また、図 7-11 の HCHO については、塩素注入率との間に強い相関は認められなかった。塩素消毒の副生成物としての HCHO は、ヘキサメチレンテトラミン、トリメチルアミンの他種々の化学物質の存在下で生成することが報告^{46,47}されている。本試料においてもこれら前駆物質の存在と反応が想定されるが、塩素添加の有無で HCHO 存在量にあまり差異がないことから、HCHO 生成への寄与は限定的と考えられた。

ニトロソアミン類の NDMA は、1 回目の塩素注入率 5mg/L の試料が 0.024 μ g/L であった他は、どの試料においても定量下限値（0.018 μ g/L）未満であった。また、NDEA はいずれの試料においても定量下限値（0.045 μ g/L）未満であった。本実験では、人健康の懸念となるレベルのニトロソアミン類の生成は認められなかった。

図 7-12 に塩素注入率と TOCl 生成濃度、図 7-13 に残留塩素と TOCl 生成濃度、図 7-14 に塩素消費量と

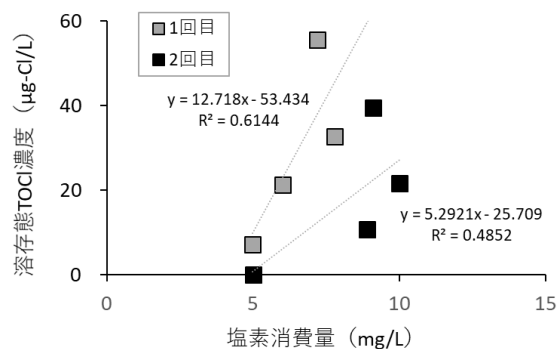


図 7-14 塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係

表 7-5 塩素消毒後の水質（反応時間の影響実験）

	反応時間 (10分)		残留塩素 (mg/L)		水温 (°C)	pH (-)	ORP (mV)
	Free	Total	Free	Total			
実験①	10	添加後10分	0.26	8.7	20	7.2	429
		中和後	—	0.00	20	4.4	35
	20	添加後20分	0.19	6.3	20	7.2	443
		中和後	—	0.00	20	4.3	40
	40	添加後40分	0.24	7.3	20	7.3	480
		中和後	—	0.00	20	4.4	56
	80	添加後80分	0.19	6.3	20	7.4	487
		中和後	—	0.00	20	4.3	79
実験②	10	添加後10分	0.08	12	11	7.4	414
	20	添加後20分	0.08	11	11	7.5	416
	40	添加後40分	0.11	12	11	7.5	416
	80	添加後80分	0.07	11	11	7.6	415

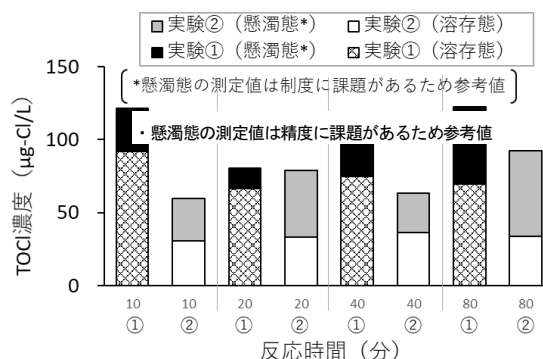


図 7-15 反応時間と TOCl 濃度の関係

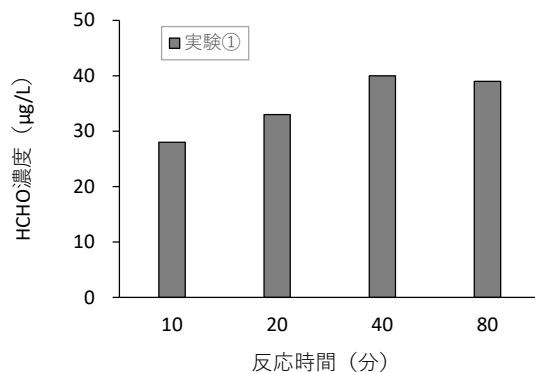


図 7-16 反応時間と HCHO 濃度の関係

生成 TOCl 濃度の関係を示した。懸濁態の TOCl 測定

については、測定結果の再現性に課題がみられることから、図 7-12、13、14 の塩素注入量、残留塩素、塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係については溶存態の測定データを用いて図示した。縦軸の TOCl 濃度は、塩素添加後の試料の分析値から塩素無添加の値を減じた濃度とした。図 7-12、13 からわかるように塩素注入率と生成 TOCl 濃度、残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の間に強い正の相関がみられた。また、図 7-14 に示した塩素消費量と生成 TOCl 濃度の関係は、塩素消費量に比例し生成 TOCl 濃度が高くなる傾向は認められるが、塩素注入率、残留塩素に比べるとその相関は低い傾向であった。注入された塩素は、消毒副生成物生成に使われる他、還元性物質の酸化にも消費されることが原因と考えられる。

b) 反応時間と副生成物生成の関係

塩素消毒後の水質を表 7-5 に示した。残留塩素は、前述の a) 同様、遊離残留塩素の存在は少なく、ほとんどが結合残留塩素であった。実験①は、それぞれ別のボトルを用いた実験だったこともあり残留塩素濃度のバラツキがみられる。実験②は、所定時間経過後に試料採取する方式としたことから大きな変動はみられなかった。pH は、L-アスコルビン酸の添加で酸性に変化すること、ORP は、供試下水試料(表 6-3) の還元状態から塩素添加後に酸化状態となっていること、還元剤の L-アスコルビン酸の添加後に値が少し低下するなど、前述の a) と同様であった。

消毒副生成物の分析結果については、実験①、実験②の TOCl 測定結果を図 7-15、HCHO 測定結果を図 7-16 に示した。バラツキが大きい結果となったが、反応時間 10 分～80 分では TOCl 濃度が大きく異なることはなかった。この結果から、TOCl 生成反応は 10 分の反応時間で既に平衡に達していると考えられる。

HCHO、NDMA、NDEA は、実験①のみ分析した。図 7-16 に示すとおり、HCHO は反応時間が 10 分、20 分、40 分までは反応時間が長くなるに従い高くなり、80 分の値は 40 分とほぼ同じであった。反応時間と HCHO 生成の関係の明確化には再試験による確認などデータ蓄積が望ましいと考えられた。また、NDMA は、0.020～0.027 $\mu\text{g/L}$ と低濃度で定量されたがバラツキが大きく反応時間との関係はみられなかった。NDEA はいずれの試料も定量下限値 (0.045 $\mu\text{g/L}$) 未満であった。

なお、本項で得られた TOCl 濃度は、塩素消毒前が約 25 $\mu\text{g-Cl/L}$ 、塩素消毒試料は最大約 130 $\mu\text{g-Cl/L}$ で

表 7-6 河川調査結果一覧

	上流 約0.7km	放流口 (放流水)	下流 約3km	下流 約7.5km	下流 約11.5km	下流 約22km
水温 (°C)	19	22	18	17	17	17
pH (-)	7.4	7.2	7.2	6.9	6.8	6.6
ORP (mV)	150	360	170	140	150	190
EC (mS/cm)	0.21	0.46	0.19	0.20	0.22	0.21
濁度 (NTU)	9	50	12	14	14	16
DO (mg/L)	9.6	11	8.0	9.4	9.6	9.7
SS (mg/L)	8.9	30	8.7	12	12	13
DOC (mg/L)	1.7	22	2.0	1.6	1.7	1.8
T-P (mg/L)	0.08	2.1	0.08	0.09	0.09	0.09
PO ₄ -P (mg/L)	0.04	1.5	0.04	0.04	0.04	0.05
NH ₄ -N (mg/L)	0.06	17	0.15	0.13	0.14	0.11
NO _x -N (mg/L)	0.85	0.23	0.83	0.84	0.84	0.84
NO ₂ -N (mg/L)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

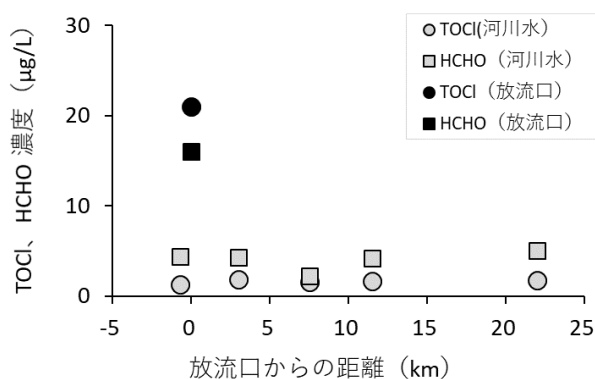


図 7-17 放流先河川における TOCl、HCHO 濃度

あった。これらの値は、山根らの調査研究⁴⁸⁾で報告されている流入下水の TOCl 濃度、高橋らの研究⁴⁹⁾で報告されている塩素消毒下水の TOCl 濃度と同レベルであった。

(2) 消毒副生成物の放流先河川における挙動調査結果

河川調査結果一覧を表 7-6 に示した。放流口上流約 0.7km、下流約 3km～22km の各地点の一般水質項目 (SS、DOC、T-P 等々) の数値は概ね同じ値であった。放流口で採取した放流水の水質は、SS が河川水の約 3 倍、DOC が約 10 倍、T-P が約 20 倍であったが、放流水流入前後の河川水質にほとんど変化はみられず放流水の河川水質への影響は小さかった。放流水量が放流先河川水量の約 1/180 であったことなど放流負荷量が放流先河川の負荷量に比べ小さいことによると考えられる。他の一般水質項目についても同様であった。

TOCl、HCHO 濃度変化図を図 7-17 に示した。消毒副生成物の TOCl 濃度は、放流先河川水濃度は 1.2～1.9 $\mu\text{g-Cl/L}$ 、放流口で採取した放流水は 21 $\mu\text{g-Cl/L}$ であった。放流水の TOCl 濃度は、放流先河川の 10～

17倍であったが、水量が1/180であったことから、負荷量では約1/10～1/16であり、放流先河川への影響は小さいと考えられる。

HCHO についても放流先河川水の濃度は、2.2～5.0 $\mu\text{g/L}$ 、放流水の濃度は16 $\mu\text{g/L}$ であり、TOCl 同様に放流水の放流先河川への影響は小さい。また、ニトロソアミン類のNDMA、NDEAは、放流水及び河川のどの地点においても定量下限値（0.018 $\mu\text{g/L}$ 、0.045 $\mu\text{g/L}$ ）未満であった。

なお、TOCl、HCHO の調査結果から放流口から下流約22kmの区間における濃度は減少することなく概ね同じ値であったことから、これらは河川水中において保存性が高いことがわかった。HCHO については、岡本ら⁵⁰⁾が多摩川の中流域11km区間において実施した調査で減少係数は小さく、流下過程で減衰しにくい化学物質であることが報告されている。また、南山ら⁵¹⁾はHCHO添加の二次処理水を用いた水路実験を行い、約45分の流下時間では減衰がみられなかったと報告している。今回の調査結果は、これらの既往知見と一致していた。

TOCl、HCHO は、現時点で環境基準や排水基準における規制項目ではない。HCHO は、水生生物の保全に係る要監視項目として、環境中の指針値が淡水域で1mg/Lとされており、今回の現地調査における放流水濃度および河川水濃度、ならびに模擬排水実験における生成濃度は、いずれも指針値を大幅に下回っていた。また、TOCl には同じく水生生物の保全に係る要監視項目であるクロロホルムが含まれるが、TOX 全体としては他のトリハロメタン類も含めた極めて多様な有機塩素化合物の包括指標であり、個別物質はその一部に過ぎないため、水環境影響の評価への包括指標の活用方策も含めて、今後検討していくことが望ましいと考えられた。

7.3 応急復旧段階における下水処理水の水生生物に及ぼす影響評価

7.3.1 背景と目的

近年、震災や豪雨被害により下水処理施設の被災が増加しており、汚水処理機能の一次停止や復旧が長期間に及ぶ被害が報告されている。応急復旧段階では、流入下水を沈殿や簡易生物処理を行った後、消毒放流することが一般的であるが、この状態での処理水は有機物やアンモニア性窒素濃度が高く、また消毒の塩素添加量が平常時よりも多いため、消毒副生成物の生成も促進されることが考えられる⁵¹⁾。一方、応急復旧下

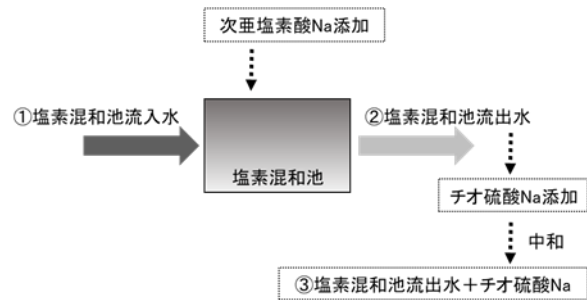


図 7-18 試験水採取場所の概略図

における処理水の生物影響に関する調査報告は少なく、特に消毒副生成物の影響観点から考えると、影響を受けやすいとされる藻類を用いて評価する必要があると考えられる。そこで本研究では、応急復旧段階を模した下水を用い、ムレミカヅキモ (*Raphidocelis subcapitata*) に対する影響評価を行った。

7.3.2 実験材料および実験方法

(1) 試験水の採取と調製

試験水は、2021年3月1日、K 浄化センターからバッチ採取した。使用した試験水は、①塩素混和池流入水（試験水①）、②塩素混和池流出水（試験水②）、③塩素混和池流出水+チオ硫酸 Na（試験水③）の3種である（図 7-18）。②の消毒用塩素には次亜塩素酸 Na が用いられていた。事前にムレミカヅキモの生育に影響がないことを確認したチオ硫酸 Na (1.1mM) を採取直後の試験水②に添加し、残留塩素を中和した水試料を試験水③とした。各サンプルは低温下で速やかに土木研究所に搬入し、試験に用いるまで4℃冷暗所に保管した。採取された各処理水は一般水質、消毒副生成物を測定し、ムレミカヅキモの影響試験に用いた。

(2) 藻類を用いた処理水の影響試験

試験には国立研究開発法人国立環境研究所から分譲されたムレミカヅキモ (*R. subcapitata*; NIES-35 株) を用いた。保存飼育時は AAP 培地を用いてフラスコで培養し、25℃、3000 lx（白色蛍光灯下）で明期16h/暗期8hで培養を行い、1週間おきに継代培養を行った。

本試験は OECD201 を基に、96 穴平底プレートを用いて検討を行った⁵²⁾。超純水を用いて各処理水を 0 (Control)、1、5、10、20、40%濃度となるよう希釈調製し、10倍濃度の AAP 培地を最終濃度1倍量になるよう添加して試験溶液を作製した。フィルター滅菌した各試験溶液と前培養したムレミカヅキモ（最終濃

度 1×10^4 cells/ml) を全量 $200 \mu\text{L}$ になるよう 96 穴平底プレートに添加し、1 週間静置培養を行った。培養条件は 25°C 、 $4,000 \text{ lx}$ で連続照射とした。藻類の増殖はクロロフィル a を指標とし、そこから比増殖速度を算出した。クロロフィル a はプレートリーダー (SoftMax® Pro、モレキュラーデバイスジャパン) を用いて、励起 435 nm 蛍光 685 nm を測定した。試験は各濃度 6 連で行った。

(3) 一般水質項目の測定

試験水①と②は、水温、pH、ORP、EC、DO、残留塩素 (全塩素、遊離塩素)、SS、DOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_x\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を測定した。残留塩素は、採水翌日にも全サンプルにおいて測定を行った。

(4) TOX と消毒副生成物の測定

試験水①と②について、TOX と消毒副生成物を測定した。消毒副生成物は、揮発性有機化合物 (クロロフォルム、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、ブロモホルム、ブロモクロロメタン、ジブロモメタン、トリクロロプロモメタン、テトラプロモメタン、クロロピクリン)、ハロアセトニトリル (ジクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、ブromoアセトニトリル、ジブromoアセトニトリル)、抱水クロラール、ハロ酢酸 (クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸)、アルデヒド (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、イソブチルアルデヒド、イソバレルアルデヒド) を測定した。

TOX の測定は、前述した 7.1.3(3) に示す方法により行い、水中に含まれる塩素の有機ハロゲン化合物の総量を TOCI として示した。

揮発性有機化合物、ハロアセトニトリル、抱水クロラール、ハロ酢酸測定用の試験水には、採取直後にアスコルビン酸ナトリウム (最終濃度 1 g/L) を添加し、アルデヒド測定用の試験水には、採取後に 0.1 mL チオ硫酸ナトリウム ($0.3 \text{ w/v}\%$) を添加した。揮発性有機化合物の測定は、ページ・トラップガスクロマトグラフ質量分析法を用いた。ハロアセトニトリルと抱水クロラールの測定は、溶媒抽出ガスクロマトグラフ質量分析法を用いた。ハロ酢酸の測定では、溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ質量分析法を用いた。またアルデヒドの測定には、溶媒抽出-誘導体化-ガスクロマトグラフ質量分析法を用いた。

(5) 有機化学物質の精密質量分析

試験水①、②、③について、高沢ら³⁰⁾の方法で固相抽出を行った。無添加の超純水をコントロール試料と

表 7-7 試験水①と②の一般水質項目

試料名	試験水①	試験水②	
採水時間	13:45	13:25	
水温 ($^\circ\text{C}$)	16.3	17.4	
pH (-)	7.85	7.74	
ORP (mV)	-19.2	-20	
EC (mS/cm)	469	500	
DO (mg/L)	6.8	7.5	
残留塩素 (mg/L)	遊離塩素	—	0.25
	全塩素	—	1.55
SS (mg/L)	42	46	
DOC (mg/L)	14	27	
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/L)	23	26	
$\text{NO}_x\text{-N}$ (mg/L)	1.12	0.59	
$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/L)	0.45	0.23	

表 7-8 各試験水で検出された残留塩素

サンプル	遊離塩素 (mg/L)	全塩素 (mg/L)
試験水①	0.03	0.04
試験水②	0.03	0.15
試験水③	0.02	0.00

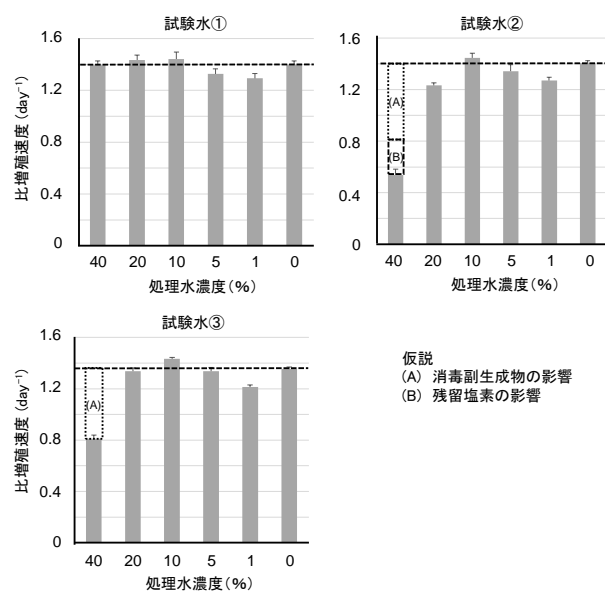


図 7-19 各水試料がムレミカツキモの生育速度に及ぼす影響

した。前処理した各試料を液体クロマトグラフ—精密質量分析装置で測定し³⁰⁾、各試料から検出された全スペクトル (m/z) を抽出した。抽出したスペクトルは、解析 (A) と解析 (B) で検討を行った。

解析 (A) : 抽出した全スペクトルのうち、コントロール試料におけるスペクトル強度が低く (<100)、かつ試験水①～③では高い (>1000) スペクトルのみをカウントした。

解析 (B) : 試料①で検出されたスペクトル強度に対し、試験水②および③においてスペクトル強度が 10 倍以上または以下のものをカウントした。

7.3.3 結果と考察

(1) 使用した処理水の水質の特徴

試験水①と②の一般水質を表 7-7 に示す。試験水②で DOC の増加が見られたが、他の一般水質項目では試験水①と②で大きな差は見られなかった。応急復旧段階の下水であるため、いずれも NH₄-N 濃度が高く、試験水①で 23 mg/L、試験水②で 26 mg/L が検出された。また塩素消毒を行った試験水②では残留塩素が確認され、遊離塩素 0.25 mg/L、全塩素 1.55 mg/L が検出された。

(2) ムレミカヅキモに対する処理水の影響評価

採水翌日にそれぞれの試験水を用いて、ムレミカヅキモの影響評価を行った。始めに、各試験水の残留塩素の測定を行った (表 7-8)。全ての試験水で遊離塩素はほとんど検出されず、全塩素は試験水②のみ 0.15mg/L 検出されたが、前日の測定値の約 10% であった。次に各試験水がムレミカヅキモの増殖に与える影響を検討した (図 7-19)。試験水①では処理水濃度 40%でもムレミカヅキモに対する影響は見られなかった。試験水②における阻害率は処理水濃度 40%で 61.9%、処理水濃度 20%で 12.3%を示した。この結果は、消毒を目的として添加された塩素または消毒副生成物が試験水中に残存し、ムレミカヅキモの増殖に影響を与えたことが推察される。一方、試験水③における阻害率は処理水濃度 40%で 40.2%であり、処理水濃度 20%では影響が見られなかった。試験水②と比べて試験水③の増殖阻害の影響が改善されたことから、残留塩素がチオ硫酸 Na により中和され、ムレミカヅキモに対する影響が軽減されたことが推察される。本研究では、残留塩素としてのクロラミン類 (モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミン) の測定は行わなかったが、試験水②で検出された全塩素 (0.15 mg/L) の一部はモノクロラミンであることが

表 7-9 試験水①と②で検出された消毒副生成物 (mg/L)

	化学物質	①塩素混和池流入水	②塩素混和池流出水
揮発性有機化合物	クロロホルム	0.0013	0.0033
	ブロモジクロロメタン	0.0002	0.0002
	ジブロモクロロメタン	0.0001	0.0001
	ブロモホルム	<0.0001	<0.0001
	ブロモクロロメタン	<0.0001	<0.0001
	ジブロモメタン	<0.0001	<0.0001
	トリクロロブロモメタン	<0.0001	<0.0001
	テトラブロモメタン	<0.0001	<0.0001
	クロロピクリン	<0.0001	<0.0001
ハロアセトニトリル・抱水クロラール	ジクロロアセトニトリル	<0.001	<0.001
	トリクロロアセトニトリル	<0.001	<0.001
	ブロモアセトニトリル	<0.001	<0.001
	ジブロモアセトニトリル	<0.001	<0.001
	抱水クロラール	<0.001	<0.001
ハロ酢酸	クロロ酢酸	<0.002	<0.002
	ジクロロ酢酸	<0.002	<0.002
	トリクロロ酢酸	<0.001	0.003
アルデヒド	ホルムアルデヒド	<0.001	0.006
	アセトアルデヒド	0.01	0.03
	プロピオンアルデヒド	<0.02	<0.02
	イソブチルアルデヒド	<0.01	<0.01
	イソバレルアルデヒド	<0.004	<0.004

考えられる。ムレミカヅキモに対するモノクロラミンの影響は 0.018 mg/L (EC₅₀) であることが報告されており⁵³⁾、ここから、試験水②に含まれるモノクロラミンがムレミカヅキモに影響を与える可能性が推察された。一方、塩素中和後の試験水③において、試験水濃度 40%でも影響が完全に軽減されなかった理由としては、何らかの消毒副生成物が残留することが推察された。

(3) 消毒副生成物の検出状況と影響検討

高濃度の有機物が含まれる流入水を塩素消毒した場合、塩素と有機物が反応し、消毒副生成物が生成されることが推察される。そこで試験水①と②の消毒副生成物について検討を行った。TOX 計を用いた溶存態 TOCl の測定では、試験水①で 26.9 μg-Cl/L、試験水②で 30.7 μg-Cl/L を示した。揮発性有機化合物、ハロアセトニトリル、抱水クロラール、ハロ酢酸の測定において、試験水①より試験水②で多く検出された消毒副生成物は、22 化学物質中、クロロホルム、トリ

クロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのみであり、最も検出濃度が高いアセトアルデヒドは、試験水②で 0.03 mg/L であった (表 7-9)。これらの化学物質が藻類に及ぼす影響は、クロロホルム : 437 mg/L (EC₅₀、*Skeletonema costatum*)⁵⁴、トリクロロ酢酸 : 3 mg/L (無影響濃度 NOEC、*Pseudokirchneriella subcapitata*)⁵⁵、ホルムアルデヒド : 0.1 mg/L > (NOEC、*Phyllospora comosa*)⁵⁶、アセトアルデヒド : 236.6 mg/L (5 日間半数生存濃度 TLm、*Nitzschia linearis*)⁵⁷ であることが、報告されている。今回検出された濃度はこれらの既往報告の値より大幅に低いことから、今回検出された消毒副生成物はムレミカヅキモの生育に影響を与える可能性が低いことが推察された。

(4) 下水消毒で生成される副生成物の検討

試験水①ではムレミカヅキモに対して影響は見られなかったが、試験水②、③では影響が確認された。しかし、今回測定した TOCl や表 7-9 に示す物質の影響とは考えられず、下水の消毒過程において、表 7-9 以外の副生成物を生じることが要因の一つとして考えられる。そこで原因物質同定のための初期解析として、液体クロマトグラフ-精密質量分析装置を用いて、検出された質量スペクトルの整理を行った。試験水②と③でのみ共通して検出された質量スペクトルはポジティブモード (Posi) では 7,287 種、ネガティブモード (Nega) では 2,089 種であった (図 7-20)。その中で、試験水①に比べ試験水②と③でスペクトル強度が 10 倍以上・以下を示す質量スペクトルは Posi では 1,258 種、Nega では 842 種検出された。これらの結果から、下水の消毒過程で、様々な副生成物が生成している可能性が推察された。今回の結果では、藻類に影響する化学物質の特定は行っていないが、今後下水中の消毒副生成物の影響を考える上で、さらに知見の蓄積が必要であると考えられる。

7.4 まとめ

本章では、有機ハロゲン化合物類に着目し、1) 懸濁物質を含む水試料中の全有機ハロゲン化合物分析手法の構築を試みるとともに、2) 塩素消毒副生成物の生成メカニズム検討と放流先河川における挙動の検討、3) 応急復旧段階を模した下水を用い、特に消毒副生成物の影響の観点からムレミカヅキモに対する影響評価を実施した。得られた主な知見を以下に示す。

1) TOCl 分析用下水試料の保存性を検討した結果、

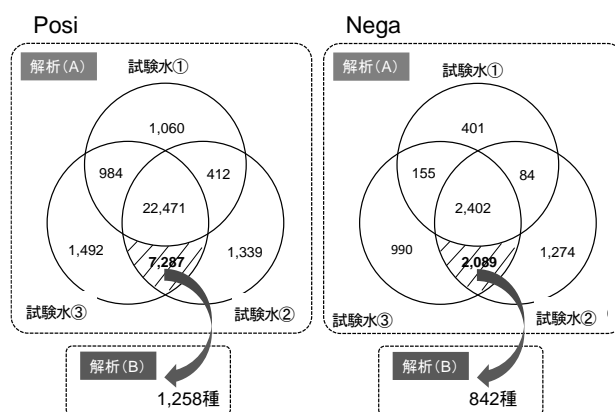


図 7-20 液体クロマトグラフ-精密質量分析装置を用いた、各水試料中の副生成物の検討

- 下水試料中の TOCl 濃度の適切な測定には、試料取得後速やかに活性炭カラムへの通水を開始することが望ましいが、試料水の速やかな冷凍ならびに迅速な解凍作業により、1-2 ヶ月程度の冷凍保存が可能となることが示された。また、通水後の活性炭カラムを 15 日程度冷蔵保存しても測定値に影響しないことが示唆された。

高 SS 濃度水試料の TOCl 分析前処理方法を検討し、

- メタノールと NaNO₃ (0.012 mol/L) による事前洗浄をした酢酸セルロースろ紙を採用して下水試料をろ過し、残渣を NaNO₃ (2 mol/L) 洗浄することで無機ハロゲンを除去する手法を見出した。
- 本研究で見出した高 SS 濃度水試料の溶存態と懸濁態の形態別分析手法では、両形態の回収率は概ね良好であったものの、懸濁態 TOCl 分析においては、濃度が数十 µg/L 程度の低い下水試料の分析では測定結果が一定のバラつきを含むため、複数試料の分析による誤差の確認が重要であると考えられた。

2) 模擬簡易沈澱下水を用いた消毒副生成物の生成メカニズム検討実験から、

- 反応時間 20 分で塩素注入率 5~20mg/L の範囲において塩素注入率と生成 TOCl 濃度、残留塩素濃度と生成 TOCl 濃度の間に強い正の相関がみられた。
- 塩素注入率 15mg/L で反応時間 10~80 分の範囲において TOCl 濃度に大きな違いはなく反応時間と消毒副生成物の TOCl 生成に係り性は認められなかった。

消毒副生成物の放流先河川における挙動調査から、

- 放流口から下流約 22km 区間における消毒副生成

物の挙動調査において河川水中の TOCl 濃度、HCHO 濃度の減少はみられず、これらは河川水中において保存性が高いことがわかった。また、TOCl、HCHO の放流負荷量は放流先河川の 1/10 ~1/16 であり、放流先河川との流量比により希釈倍率が高い場合は、放流水の放流先河川への影響は小さかった。

3) 応急復旧段階を模した下水を用いたムレミカヅキモに対する影響評価から、

- ・ムレミカヅキモを用いて、①塩素混和池流入水（試験水①）、②塩素混和池流出水（試験水②）、③塩素混和池流出水+チオ硫酸 Na（試験水③）に対する影響評価を行ったところ、試験水②で最も影響が強く、試験水③で影響が軽減された。この結果から、消毒後に残留塩素を中和することで、藻類への影響が改善されることが推察された。
- ・試験水②に含まれる消毒副生成物として、クロロホルム、トリクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドが検出されたが、ムレミカヅキモの増殖に影響を与える濃度は検出されなかった。
- ・ムレミカヅキモに対する影響が試験水③で検出された原因として、上記以外の副生成物の影響が推察された。

なお、本章の検討は、国における下水道技術検討タスクフォース（テーマ：災害時処理場の応急復旧検討）の一環として土木研究所にて実施した。ご協力いただいた関係各位に感謝いたします。

参考文献

- 1) Mano, H., and Okamoto, S.: Preliminary ecological risk assessment of 10 PPCPs and their contributions to the toxicity of concentrated surface water on an algal species in the middle basin of Tama River. *J. Water Environ. Technol.*, 14(6), pp.423-436, 2016
- 2) 真野浩行、村山康樹、鈴木穰、中田典秀、南山瑞彦：PRTR 情報等を活用した下水処理水中に含まれる化学物質の環境リスク初期評価、下水道協会誌、50、85-93、2013年10月
- 3) 国土交通省：一級水系における流域等の面積、総人口、一般資産額等について、http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/r

yuiki.pdf (2019年6月確認)

- 4) 花本征也：確率論的モデルと現地調査とに基づく河川流下過程における医薬品類の光分解に関する研究、博士論文、2013年3月
- 5) 池田茂、小森行也、北村友一、真野浩行：水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、平成24年度研究成果報告書、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-project/2012/pdf/zyu-08.pdf> (2017年3月確認)
- 6) 岡本誠一郎、小森行也、北村友一、真野浩行：水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、平成27年度研究成果報告書、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-project/2015/pdf/ju-10.pdf> (2019年6月確認)
- 7) 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、pp.165、2017年3月
- 8) OECD: Adsorption-desorption using a batch equilibrium method, OECD test guidelines for chemicals No. 106, 1995
- 9) Droge, S.T.J and Goss, K.-U.: Sorption of Organic Cations to Phyllosilicate Clay Minerals: CEC-Normalization, Salt Dependency, and the Role of Electrostatic and Hydrophobic Effects. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 14224-14232, 2013
- 10) Droge, S.T.J and Goss, K.-U.: Effect of Sodium and Calcium Cations on the Ion-Exchange Affinity of Organic Cations for Soil Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 5894-5901, 2012
- 11) Suzuki, N., Murasawa, K., Sakurai, T., Nansai, K., Matsubashi, K., Moriguchi, Y., Tanabe, K., Nakasugi, O. and Morita, M.: Geo-Referenced Multimedia Environmental Fate Model (G-CIEMS). Model formulation and comparison to the generic model and monitoring approaches, *Environ. Sci. Technol.* 38, pp. 5682-5693, 2004
- 12) Jia, Y., Ni, G., Kawahara, Y., & Suetsugu, T.: Development of WEP model and its application to an urban watershed. *Hydrological Processes*, 15 (11), pp. 2175-2194, 2001
- 13) 石川百合子、川口智哉、東野晴行：国内の任意水系を対象にした化学物質リスク評価のための産総研-水系暴露解析モデル (AIST-SHANEL) Ver. 3.0.、水環境学会誌、40 (5)、pp.199-208、2017

- 14) 花本征也、杉下寛樹、山下尚之、田中宏明、宝輪勲、小西千絵: 淀川水系における医薬品類の挙動に関する検討、環境工学研究論文集、45、pp. 29-37、2008
- 15) Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., Parrella A.: Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.*, 346(1-3), pp. 87-98, 2005.
- 16) Wode, F., van Baar, P., Dünbier, 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
- 17) 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
- 18) 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)
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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/suikaitei/kijun/rv/251tebufenozide.pdf> (accessed 2020-6-1)
- 24) 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
- 25) ChemSpider ウェブサイト, R. S. C <http://www.chemspider.com/> (accessed 2020-6-1)
- 26) 日本質量分析学会用語委員会: マス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)
- 27) Frank, M. J. and Schaffner, W.: Contaminated aqueous benzalkonium chloride: an unnecessary hospital infection hazard, *Jama*, 236(21), pp. 2418-2419, 1976
- 28) 環境省ウェブサイト: PRTR インフォメーション広場集計結果の概要、<https://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/gaiyo.html> (2021年4月1日アクセス)
- 29) 環境省ウェブサイト: PRTR インフォメーション広場届出外推計資料 21. 下水処理施設に係る排出量 <https://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/todokedegaiH29/syosai/21.pdf> (2021年11月30日アクセス)
- 30) 高沢麻里、鈴木裕識、小森行也、對馬育夫、山下洋正、小口正弘: 液体クロマトグラフ-精密質量分析計を用いた PRTR 物質の簡易スクリーニング手法の構築と下水試料への適用、環境科学誌、33(5)、pp.114~125、2020
- 31) 環境省ウェブサイト: 化学物質の環境リスク初期評価評価書一覧(第18巻まで)、http://www.env.go.jp/chemi/risk/chemi_list/index.html (2021年11月30日アクセス)
- 32) 田中周平、藤井滋穂、野添宗裕、木村功二: 世界10カ国21都市の水環境における PFOS・PFOA 汚染の現況、水環境学会誌、31(11)、pp.665-670、2008
- 33) 佐久川弘、田原康作、青木一兼、荒井直朋、中谷暢丈、竹田一彦: 広島県河川水中における除草剤ジウロンの濃度、分解速度、半減期、分解産物に関する研究、地球化学、44(1)、pp.1-15、2010
- 34) Echigo, S, Itoh, S, Natsui, T, Araki, T, Ando, R.: Contribution of brominated organic disinfection by-products to the mutagenicity of drinking water. *Water Sci. Technol.*, 50(5), pp. 321-328, 2004
- 35) 国土交通省水質連絡会: 河川水質試験方法、2009 https://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html (令和3年6月1日確認)

- 36) 鈴木裕識：全有機ハロゲン分析手法を用いた未知の有機フッ素化合物類の汚染分布調査、平成 28 年度水質保全研究助成、成果報告書 No.8、2017
- 37) 国土交通省国土技術政策総合研究所：災害時における下水の排除・処理に関する考え方（案）、pp.43-51、2012
- 38) 竹田茂、浅野寛子、岩堀恵祐：生活排水の塩素処理副生成物生成能の高度処理による低減効果、水環境学会誌、23(3)、pp.155-160、2000
- 39) 伏見絵里、深澤達矢、工藤憲三、清水達雄：下水処理水における塩素消毒副生成物の生成、第 9 回衛生工学シンポジウム論文集、pp.245-249、2001
- 40) 伊藤禎彦：消毒副生成物に関する国内外の研究動向、水環境学会誌、31(9)、pp.8-13、2008
- 41) 尹水鐵、中田典秀、山下尚之、田中宏明：下水処理場における N-ニトロソアミン類及びそれらの生成能の挙動、土木学会論文集 G（環境）、68(7)、pp.351-358、2012
- 42) 小林憲弘、杉本直樹、久保田領志、野本雅彦、五十嵐良明：ホルムアルデヒド水質汚染の原因物質の特定に至る経緯と水道水中の未規制物質の管理における今後の課題、日本リスク研究学会誌、23(2)、pp.65-70、2013
- 43) 浅見真理：水道水質リスク管理に関する日本の検討状況および海外の事例、第 59 回日本水環境学会セミナー講演資料集、pp.9-19、2014
- 44) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：平成 27 年度 化学物質分析法開発調査報告書、化学物質と環境、平成 28 年 10 月、https://www.nies.go.jp/kisplus/images/bunseki/pdfs/kurohon/2015/adoc2015_v2.pdf
（令和 3 年 2 月 10 日確認）
- 45) 公益社団法人日本水道協会：上水試験方法・2011 年版・IV 有機物編、pp.212-216、2011
- 46) 公益社団法人日本下水道協会：下水道維持管理指針（実務編）-2014 年版-、pp.662-672、2014
- 47) 公益社団法人日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 後編-2019 年版-、pp.234-243、2019
- 48) 山根昭、横川佳重、木町元康、平野裕司：下水道施設における微量化学物質に関する現況と対策についての調査研究、1997 年度下水道新技術研究所年報（1/2 巻）、pp.105-110、1998
- 49) 高橋正宏、鈴木穰：塩素消毒技術の高度化に関する研究、平成 7 年度下水道関係調査研究年次報告書集、建設省土木研究所、pp.53-58、1996
- 50) 岡本誠一郎、小森行也、北村友一、真野浩行：水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、平成 27 年度下水道関係調査年次報告書集（土木研究所資料第 4347 号）、pp.194-206、2017
- 51) 南山瑞彦、小森行也：消毒副生成物の水環境中での挙動とその影響に関する研究、平成 28 年度下水道関係調査年次報告書集（土木研究所資料第 4370 号）、pp.118-121、2018
- 52) Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006
- 53) 金俊：生物応答試験を用いた下水道放流水の生態影響の評価、富山県立大学大学院博士論文、pp.36-38、2019
- 54) 環境省：クロロホルム、II) 化学物質の環境リスク初期評価（13 物質）の結果、2003、
<https://www.env.go.jp/chemi/report/h15-01/pdf/chap01/02-2/07.pdf>
- 55) 環境省：[2] トリクロロ酢酸、[http://www.env.go.jp/chemi/report/y052-\[24\]/1_2_3_02%20Trichloroacetic%20acid.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/report/y052-[24]/1_2_3_02%20Trichloroacetic%20acid.pdf)
- 56) 環境省：[37] ホルムアルデヒド、化学物質の環境リスク初期評価（平成 9～12 年度）結果[39 物質]、
<https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/37.pdf>
- 57) 環境省：[2] アセトアルデヒド、化学物質の環境リスク初期評価（平成 9～12 年度）結果[39 物質]、
<https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/02.pdf>

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：水環境研究グループ（水質）
 研究担当者：山下洋正、諏訪守
 担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環）
 研究担当者：植松龍二、重村浩之、李善太

【要旨】

本研究は、平成 28～令和 3 年度にかけ、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施した。令和 3 年度は研究期間の最終年度であり、本項では、①の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ついて、6 年間で得られた成果をとりまとめた。

消毒耐性病原微生物に対応した代替指標の提案では、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている F 特異 RNA フェージ (F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH) 遺伝子群について、活性汚泥処理での除去効果を評価し、NoV の指標としては FRNAPH GII が有効である可能性を示した。塩素消毒による不活化効果では GII～GIV を指標とすることで安全側の評価となることが確認された。紫外線消毒では、FRNAPH GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。

環境基準の見直しにより、今後、放流水質基準項目の大腸菌群は大腸菌指標へ移行することが想定されるため、下水試料に適した大腸菌の測定法の提案を目的に、各種特定酵素基質培地・手法による回収率、希釈水の違いおよび試料中の大腸菌濃度が CV に及ぼす影響を評価し、公定法として許容値を満たす測定法を提示できた。水温上昇時に二次処理水の大腸菌割合が高まる要因の 1 つは、流入下水の大腸菌/群の割合が高まっていることによる可能性が示唆された。従来指標との関連性として、大腸菌群に占める大腸菌の平均割合は二次処理水が 14%、残留塩素の平均濃度が 0.25mg/L の放流水では 12%であり、放流水質の技術上の基準値を検討するための知見が得られた。

キーワード：F 特異 RNA フェージ、ノロウイルス、塩素消毒、紫外線消毒、大腸菌、特定酵素基質培地

1. はじめに

日本国内の下水処理場の多くは、塩素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も増加傾向にあり¹⁾、塩素や紫外線消毒に対して耐性を有するウイルスにおいては不活化効果が十分に得られていない可能性がある。また、冬季における感染性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルス等のヒト腸管系ウイルスは培養細胞による評価が確立されていないため²⁾、消毒による不活化効果を評価できない課題がある。このため、ウイルス代替指標として注目されている FRNAPH GI～GIV を対象として、活性汚泥処理による除去効果や塩素と紫外線消毒の不活化効果を各々把握し、NoV との関連性を評価することで NoV の代替指標としての利用可能性を検討した。

一方、環境基準の見直しにより大腸菌群から大腸菌指標への移行を踏まえ、下水道からの放流水質の技術上の基準項目として大腸菌への見直しについて今後検討が行われる。大腸菌への見直しにあたり基準値への適合を判断するため下水試料に適した公定法を検討しなければ

ならない。このため、下水試料に適した測定法の提案を目的に、各種特定酵素基質培地での大腸菌の回収率や希釈水違いおよび大腸菌濃度が変動係数に及ぼす影響を評価し、公定法のための精度等を明らかにした。さらに、従来指標との関連性を評価するため、下水試料の大腸菌群に占める大腸菌の割合を把握し、その関連性を明らかにした。

本項は、平成 28 年度から令和 3 年度にかけ実施した上記の調査・研究結果をとりまとめたものである。

2. FRNAPH の調査研究事例

大腸菌に感染するウイルスの大腸菌フェージの中で、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り感染力の評価が可能であるため、塩素や紫外線などの消毒実験の評価にも用いられている^{5)、8)～12)}。ヒトノロウイルスに近縁で培養細胞による評価が可

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)}。さらに、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⁾。これら FRNAPH を指標とすることで衛生学的安全性をより高められる可能性がある。

また、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)}、下水処理場での生物処理、凝集や膜による除去効果も異なる^{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と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。

3. 大腸菌等の測定法の現状

大腸菌、大腸菌群の定量・定性試験について下水試験方法¹⁹⁾を参考に整理したものを図-1に示す。下水の水質の検定方法に関する省令(環境大臣が定める排水基準に係る検定方法告示でも同じ)で定める大腸菌群の検定方法は、デソキシコール酸塩培地による平板培養法が定められている。大腸菌指標への見直し以前の環境基準では、乳糖ブ

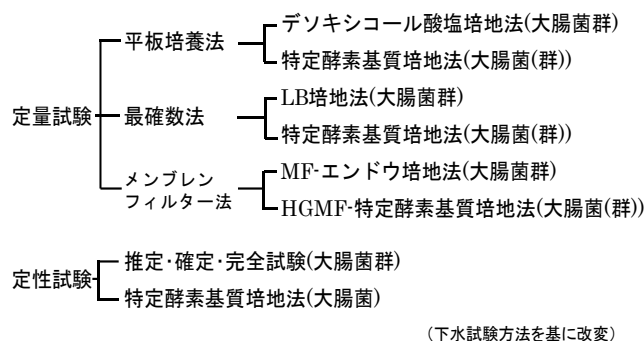


図-1 大腸菌(群)の定量・定性試験

イオン-ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地法(LB-BGLB)による最確数法が公定法であったが、見直し後は特定酵素基質培地によるメンブレンフィルター法が定められた。下水再生水利用に関しては、再生水の用途別に水洗、散水、親水利用では特定酵素基質培地法による大腸菌指標²⁰⁾、修景利用では暫定的にエンドウ培地によるフィルター法の大腸菌群指標²¹⁾が採用されている。特定酵素基質培地はMMO-MUG培地、IPTG添加ONPG-MUG培地、XGal-MUG培地、ピルビン酸添加XGal-MUG培地のいずれかの培地を用いるものとされ、検水量を100 mLとした定性試験(大腸菌の有無判定)としている²²⁾。下水試料等に関わる大腸菌群、大腸菌の定量法は公定法として上記の4手法である。今後、放流水質基準項目を大腸菌へ変更する際の基準値に対応した公定法についても、これらの既存の手法を考慮しつつ検討する必要があると考えられる。

4. 活性汚泥処理と消毒による FRNAPH の除去不活化効果の評価方法

4.1 活性汚泥処理による FRNAPH の除去効果

調査は、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流入水および二次処理水を平成29年5月から平成31年3月の間に計61回採水した。流入下水と二次処理水中のFRNAPHとNoVを定量し、活性汚泥処理による除去効果を算出した。また、活性汚泥処理装置でのSS、有機物等の除去効果を表-1に示すが、各測定項目の平均除去率は94~98%であり、処理水質は良好であった。

表-1 標準活性汚泥処理装置のSS等の除去効果

分析項目	流入下水	二次処理水	平均除去率(%)
	濃度範囲(平均)		
SS (mg/L)	71-322 (109)	0.7-6.9 (2.6)	98
濁度	50-161 (81)	1.1-9.6 (3.2)	96
T-CODcr (mg/L)	165-465 (287)	4-36 (18)	94

※ H30.5~H31.2の間の水質データ

FRNAPH遺伝子群(GI~GIV)とNoV GI, GIIは、リアルタイムRT-qPCR法(PCR)により試料中の遺伝子濃

度を定量した。定量ではポリエチレングリコール沈殿法によりサンプルを濃縮した。濃縮液からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN) およびQIAcube (QIAGEN) にて抽出した。なお、ウイルス濃縮液をRNA抽出カラムに通水し遺伝子を捕捉させる際、検出感度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたりのSS負荷量が0.05 mg-SS以下となるようにウイルス濃縮液の通水量を調整した¹³⁾。抽出したRNAは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてRT反応を行い、cDNAを得た。この合成したcDNAをTaqMan[®]プローブを用いたPCRにより定量した。TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、QuantStudio[™] 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により検出した。FRNAPH遺伝子群とNoVのプライマー、TaqManプローブの配列およびアニーリング温度はWolfら³⁾のとKageyamaら²⁴⁾報告をそれぞれ参考にした。PCRにおける検出下限値は約1000 copies/L程度であった。さらに、RNA抽出効率およびRT-qPCR阻害の影響を把握する目的でRNA抽出に用いる濃縮後のサンプルにマウスノロウイルス高濃度液を添加して回収率を評価した。なお、da Silva ら²⁵⁾は、回収率が10%を下回った場合は検出阻害が生じたと判断し、1%を下回った場合は深刻な検出阻害が生じたと判断すると報告している。本調査では全てのサンプルの回収率が10%を上回っており大きな検出阻害は見られなかったため、ここではPCRによる定量値において回収率による補正は行っていない。

さらに、ブラック形成法による感染力を有している総FRNAPH濃度 (Plaque) と、培養法とPCRを組み合わせたIC-PCR (Integrated Culture-PCR; IC-PCR)^{4), 5)}による感染力を有しているFRNAPH遺伝子群 (GI-GIV) 濃度の定量も行った。PCRは遺伝子をターゲットとしていることから、感染力の有無に関係なく試料中の遺伝子情報を検出するため、下水処理中に不活化され感染力を失ったものまで検出してしまふ。このことから、FRNAPH遺伝子群 (GI-GIV) においては、IC-PCR (感染力を反映している) とPCR (感染力を反映していない) の両手法を用いて定量し、下水処理場での存在実態を詳細に把握した。IC-PCR法は、宿主菌の*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (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。0.01~100 mLまでの試料を10段階階の3連で培養することで定量値 (MPN/L) を得るものである。

4.2 塩素消毒によるFRNAPHの不活化効果

塩素消毒実験は回分式により6回実施した。室温 (20~25°C) 下で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/Lとし、接触時間は20分間とした。一方、実験で用いた二次処理水には、感染力を有する野生株のFRNAPH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可能性が想定されたため、下記4.4に示すFRNAPHの培養液を二次処理水に添加し、培養液の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。二次処理水のFRNAPHの初期濃度が約 $10^6 \sim 10^9$ MPN/Lとなるよう培養液を添加した。消毒強度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値とした。残留塩素の中和にはチオ硫酸ナトリウム溶液を添加した。塩素消毒によるFRNAPH遺伝子群 (GI-GIV) の不活化効果は、4.1に示したIC-PCR^{4), 5)}法を用いて評価した。なお、実験に用いた二次処理水の水質分析結果を表-2に示す。

表-2 二次処理水の水質

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

4.3 紫外線消毒によるFRNAPHの不活化効果

消毒実験は、光化学反応用装置 (ウシオ電機) を用いて回分式により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分間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300 mL入れた後、スターラーにより完全混合させながら、それぞれ紫外線を照射し、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でも高濃度に培養したFRNAPH遺伝子群を添加した二次処理水を用いて、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。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²⁶⁾により紫外線照射量を算定した。紫外線消毒によるFRNAPH遺伝子群 (GI-GIV) の不活化効果は、4.1に示したIC-PCR^{4), 5)}法を用いて評価した。

4.4 高濃度FRNAPH液の作製

高濃度のFRNAPH液の作製は、宿主菌のWG49を含む液体培地に二次処理水中のGI-GIV遺伝子群をそれぞれ添加し、37°Cで24時間培養してFRNAPH遺伝子群を増

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。また、作製したGI-GIVの各々の高濃度FRNAPH液は、他の3つの遺伝子群が不検出あるいは低濃度であることを確認している。

5. 大腸菌の測定法の評価

5.1 各種特定酵素基質培地による大腸菌の回収率評価

評価対象とした特定酵素基質培地は、国内、海外メーカーから市販されている培地A-Fの6種類とし、混釈法とフィルター法にて、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。回収率試験は、A下水処理場の生物学的高度処理水（二次処理水）を公称孔径が0.2μmのメンブレンフィルターでろ過を行い、無菌状態とした試料に大腸菌濃度が30CFU/mL程度となるよう菌株（バイオボール：ピオメリュー・ジャパン（株）製造・販売）を添加した。混釈法では上記の菌株添加試料の1mLを用い定量を行った。フィルター法は50mLの滅菌蒸留水に菌株添加試料を1mL添加しろ過を行い、さらにファンネル等の洗浄ため50mLの滅菌蒸留水を追加ろ過することで定量を行った。混釈法、フィルター法とも試験は3回行いその平均値から回収率を求めたが、1試料あたりの定量数は5連（n=5）とした。なお、全国54箇所の下水処理場における放流水の大腸菌平均検出濃度が35~60 CFU (MPN) /mLという報告²⁷⁾があったことから、大腸菌濃度を30CFU/mL程度としたものである。

5.2 希釈水の違いが変動係数に及ぼす影響評価

処理水や放流水中の大腸菌濃度等が高い場合には、定量精度を確保するため、測定試料の希釈が必要となる。希釈水としては生理食塩水やりん酸塩希釈水などがあるが、特定酵素基質培地の利用時において、希釈水の違いが大腸菌の定量精度に及ぼす影響に関する知見は少ない。このため、各培地・手法にて希釈水として生理食塩水、りん酸塩希釈水および滅菌蒸留水の3種類を利用した際の変動係数(CV)を比較評価した。評価に利用した二次処理水の大腸菌濃度が30CFU/mL程度となるよう各希釈水で希釈し、各培地・手法にて定量値を得てCVを求めた。1試料あたりの定量数は5連(n=5)とし試験は2回行った。

5.3 処理水・消毒後水の大腸菌濃度の違いが変動係数に及ぼす影響

今後、放流水質の技術上の基準値となる大腸菌濃度が設定されることが予想される。下水処理法や消毒の方式・

強度の違いによって処理水、消毒後水の大腸菌濃度が異なるが、測定精度を担保する観点から大腸菌濃度の違いがCVに及ぼす影響を評価する必要がある。このため、処理水とその処理水を次亜塩素酸ナトリウムで塩素消毒を行うことで大腸菌濃度を変動させCVに及ぼす影響を評価した。試料はA下水処理場の二次処理水とその処理水に次亜塩素酸ナトリウムを添加した消毒後水としたが、その時の大腸菌濃度は二次処理水が約20~270CFU/mL（定量にあたって希釈は行っていない）、消毒後水が約1~30CFU/mLであった。各培地・手法にて定量値を得てCVを求めたが、1試料あたりの定量数は3連（n=3）とした。なお、消毒後水では大腸菌濃度が低くなりCVの高まりが想定されるため、その改善策として検水量を1mLから2、3mLに増加させ評価を行った。混釈法では検水量を1mLから2mLあるいは3mLとして定量を行った。フィルター法は50mLの滅菌蒸留水に検水量を各々1、2、3mL添加しろ過を行い、さらにファンネル等の洗浄ため50mLの滅菌蒸留水を追加ろ過することで定量を行った。

5.4 検出コロニーの同定

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

5.5 大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価

大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価は、A下水処理場にてH31.4~R2.3月とR2.7~R3.3月の約21ヶ月にわたり下水試料を採水し大腸菌/群を定量することにより行った。対象試料は流入下水、生物学的高度処理水（二次処理水）、放流水とし、定量法は大腸菌が上記のD培地の混釈法、大腸菌群がデソキシコール酸塩培地の混釈法とした。測定数は流入下水、二次処理水で各々72検体、放流水が44検体である。

なお、上記の5.1から5.5に関わる大腸菌等の定量は、同一試料について同時測定、同一人物による操作とした。

6. 評価結果および考察

6.1 活性汚泥処理によるFRNAPHの除去効果

流入下水および処理水の濃度から算出した下水処理によるFRNAPHとNoVの除去効果を図2に示す。感染力を含めたFRNAPHの除去効果(IC-PCR、Plaque)は、

GI<GII=Plaque<GIII=GIVの順であり、GIは下水処理による除去・不活化効果が最も低かった。下水処理によるFRNAPHとNoV遺伝子の除去効果(PCR)は、FRNAPH GI=NoV GI \leq FRNAPH GII=FRNAPH GIV=NoV GII<FRNAPH GIIIの順であり、FRNAPH GIとNoV GIが最も低かった。また、不活化効果を見込んでいないPCRによるFRNAPHとNoVの除去効果の関係を整理したが、FRNAPH GIIとNoV GIIのみで唯

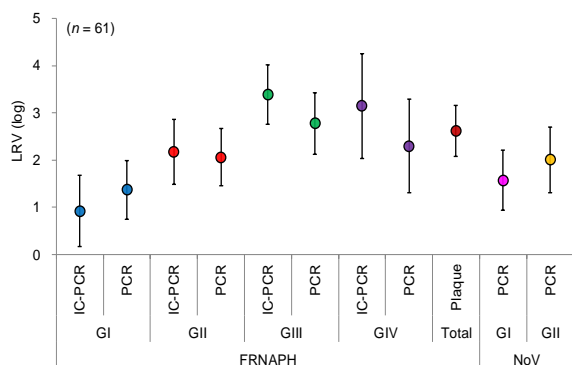


図2 下水処理によるFRNAPHとNoVの除去効果

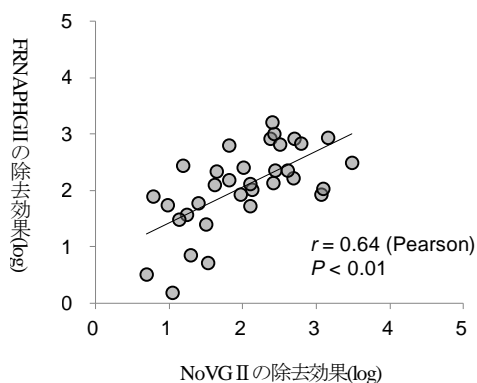


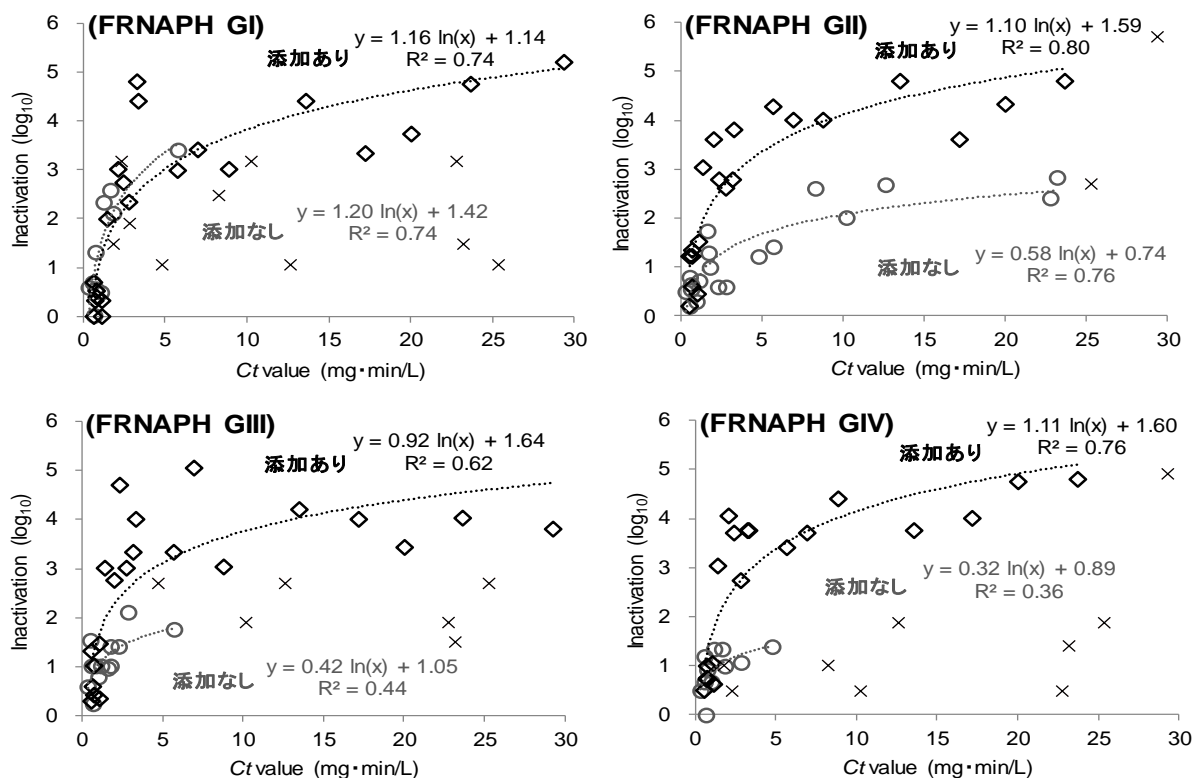
図3 下水処理によるNoV GIIとFRNAPH GIIの除去効果

一高い相関関係が見られた(図-3)。FRNAPH GIIに関しては、下水処理場での挙動²⁵⁾や牡蠣における存在実態²⁹⁾においてNoVとの関連性が報告されている。本項においても下水処理での除去効果において相関関係が示されたことから、NoVの指標ウイルスとしての利用可能性が確認された。一方、FRNAPH GIは本項で対象とした指標の中で、下水処理により最も除去されにくかった。既往の研究においても、NoVのみならずエンテロウイルスやサポウイルス、アデノウイルスなどのヒト腸管系ウイルスおよび大腸菌などの細菌と比べても下水処理による除去効果が著しく低いことが報告されている^{28), 30)}。

6.2 塩素消毒によるFRNAPH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)の不活化効果をIC-PCRにより定量し算出した結果(図-4の○)、Ct値の増加に伴

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 \cdot 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-4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 \cdot 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。Ct値が24 mg \cdot 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、Ct値が20 mg \cdot 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、その他の遺伝子群(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 \cdot min/L)²⁹⁾。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-4の◇、Ct値:5 mg \cdot 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-4の○)と、高濃度に培養して添加した結果(図-4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^{25), 31), 32)}、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^{17), 18)}。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



(○:添加なし、◇:添加あり、×:塩素消毒後に不検出となり定量下限値から算出した値)

図4 塩素消毒によるFRNAPH遺伝子群の不活化効果

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。

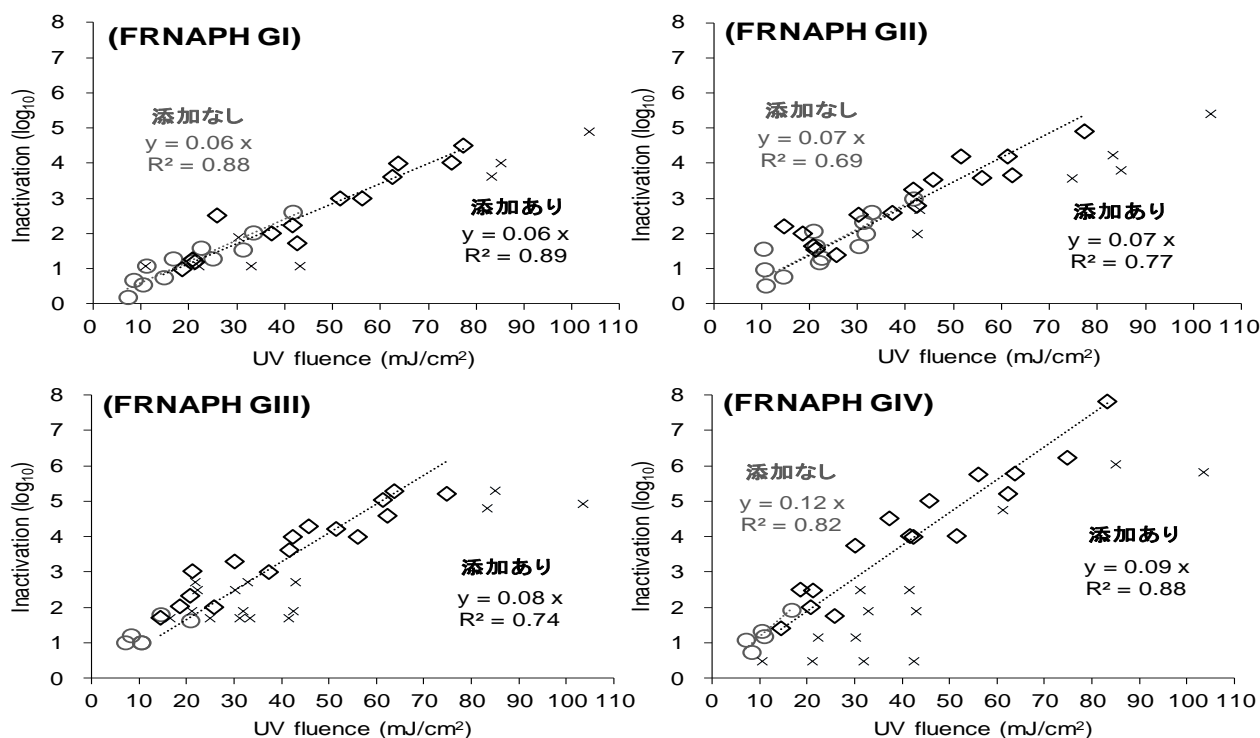
以上の結果から、下水処理水中のFRNAPHの不活化効果において、元々存在した濃度で評価した結果、GIと比べてGII~GIVの方が低かったことから、これらを指標として用いる場合、安全側の評価となることが確認された。また、塩素消毒によるFRNAPH遺伝子群の消毒効果の差異は、遺伝子群により耐性が異なるのではなく下水処理水中での存在形態が消毒効果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後、この存在形態による塩素消毒での不活化効果への影響についてより明確にするため、更なる検討が必要であると考えられる。

6.3 紫外線消毒によるFRNAPH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(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5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5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。紫外線照射量が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。紫外線照射量が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⁷⁾。また、下水処理場の最



(○:添加なし、◇:添加あり、×:紫外線消毒後に不検出となり定量下限値から算出した値)

図5 紫外線消毒による FRNAPH 遺伝子群の不活化効果

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 (ki : 0.04)、GII (ki : 0.06)、GIII (ki : 0.07)、GIV (ki : 0.09) の順であり 5)、本実験結果と一致した。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^{13), 14), 28)}。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-5 の○) と、高濃度に培養して添加した結果 (図-5 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なかった。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²⁹⁾、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²⁸⁾、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なかったことも報告されている³⁰⁾。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ウイルスに対する衛生学的安全性を担保できる可能性を示せた。

7. 大腸菌の測定法の評価

7.1 各種特定酵素基質培地による大腸菌の回収率評価

各種培地・手法による大腸菌の回収率の評価結果を図-6 に示す。各培地・手法にて概ね 90%程度の回収率が得られており、混釈法が 81~93%、フィルター法が 86~95%の範囲内であった。水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン³³⁾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 70~120%とされている。大腸菌の定量法に関わる回収率や変動係数の目標値について確立された基準はないが、上述の目標値を参考として許容値とすると、本試験結果

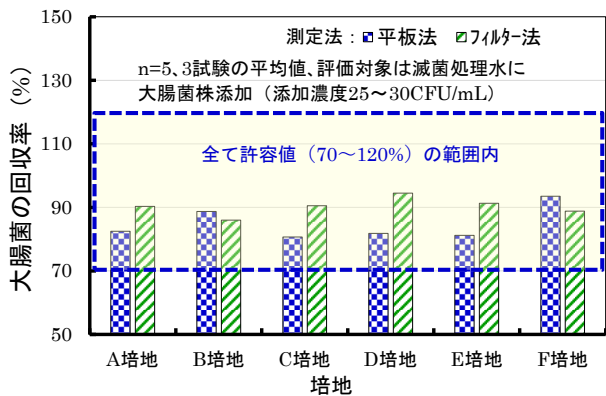


図6 異なる培地・手法における大腸菌の回収率による真度(回収率)は培地・手法が異なっても概ね90%で推移しており、許容値を満足するものと考えられた。

7.2 希釈水の違いが変動係数に及ぼす影響評価

培地・手法と希釈水の違いが大腸菌数測定値のCVに与える影響について図-7、8に示す。混積法の各培地間において、りん酸塩希釈水を利用した際のCVの範囲は12~25%、生理食塩水は16~26%、滅菌蒸留水では11~19%であった。

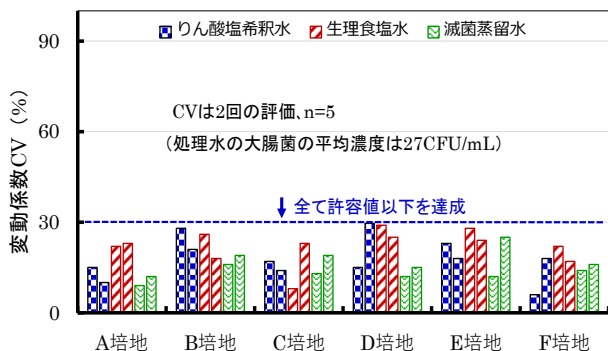


図7 異なる培地と希釈水における大腸菌

測定値のCV (混積法)

フィルター法(図-8)では各培地間において、りん酸塩希釈水のCVの範囲は11~20%、生理食塩水が8~23%、滅菌蒸留水は8~17%であり、培地・手法と希釈水の違いがCVに与える影響は小さいものと考えられた。本試験結果における繰り返し精度(変動係数:CV)は混積法、フィルター法ともに概ね許容値である30%以下であった。本評価結果から回収率、CVとも許容値を満たす測定法を提示できた。

なお、上記の回収率試験、希釈水の影響評価では、各培地・手法において回収率やCVは許容値の範囲内であったが、大腸菌やその他の雑菌等が高濃度の場合には、フィルター法では大腸菌のコロニーとその他の菌が重なることによってコロニーの発色が滲み、その発色状況から大腸菌であることの判断が難しくなる可能性が生じた。

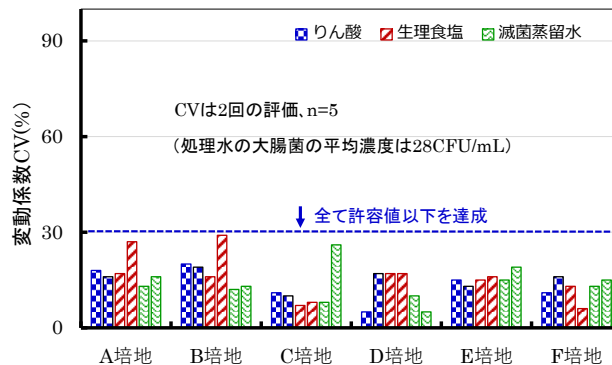


図8 異なる培地と希釈水における大腸菌

測定値のCV (フィルター法)

7.3 処理水・消毒後水の大腸菌濃度の違いが変動係数に及ぼす影響

各種培地・手法による処理水、消毒後水の大腸菌測定でのCVについて図-9、10に示す。定量範囲が約20~270CFU/mLであった処理水では、混積法の1部の培地で若干高い値が見られたが、各種培地の混積法、フィルター法ともに変動係数は概ね30%以内であり、培地間、手法の違いによる大きな差異は認められなかった。

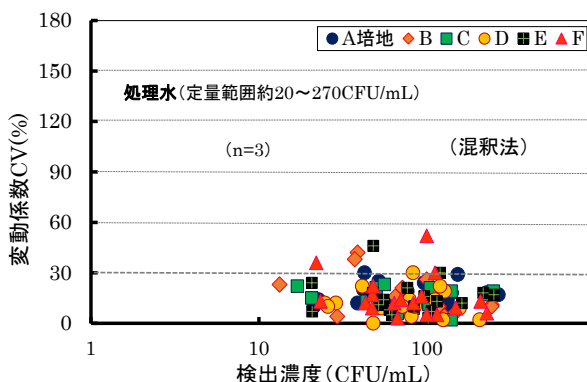


図-9 各培地による検出濃度と変動係数の関係(混積法)

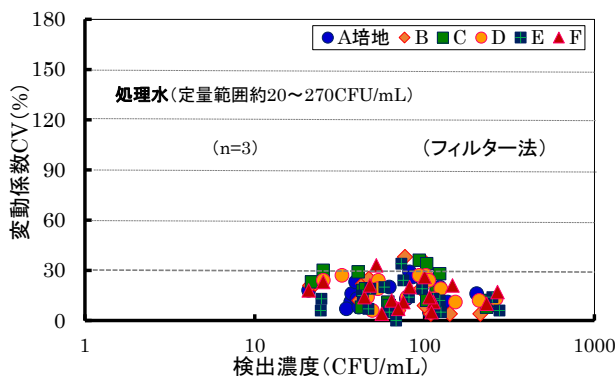


図-10 各培地による検出濃度と変動係数の関係(フィルター法)

一方、放流水を想定し処理水を塩素消毒した試料を対象としたCVについて図-11、12に示す。この時の定量範囲は約1~30CFU/mLであった。混積法、フィルター法ともに大腸菌の検出濃度が10CFU/mL以下と低濃度と

なることでCVが高まっており、CVに影響を及ぼすことが明らかとなった。水質基準項目などに関わる測定精度において、変動係数は最大 10~20%とされているが³³⁾、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌などに関しては特に変動係数の目安は示されていないものの、特に 10 CFU/mL以下の試料では、CVが大幅に高まることが明らかとなったため、安定した定量値を得るための改善策を考慮する必要があるものと考えられた。

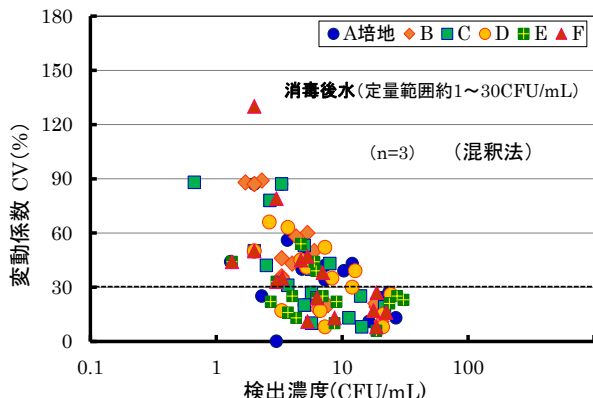


図-11 各培地による検出濃度と変動係数の関係(混釈法)

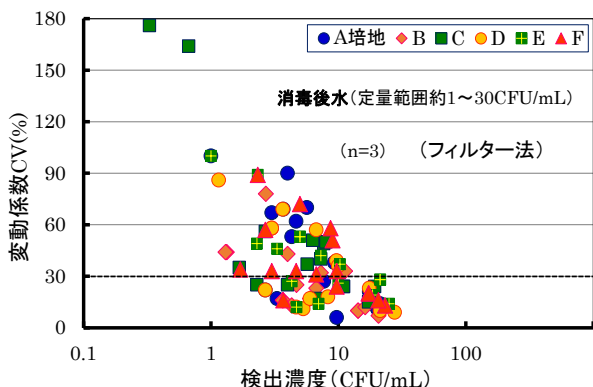


図-12 各培地による検出濃度と変動係数の関係(フィルター法)

このため、低濃度試料に対する具体的改善策として、検水量を増加させ定量値の評価を行った。各培地・手法による評価結果を図-13、14に示す。検水量を1 mLから2 mLあるいは3 mLに増加させることで、混釈法とフィルター法とともに全体的にCVが低下傾向を示した。

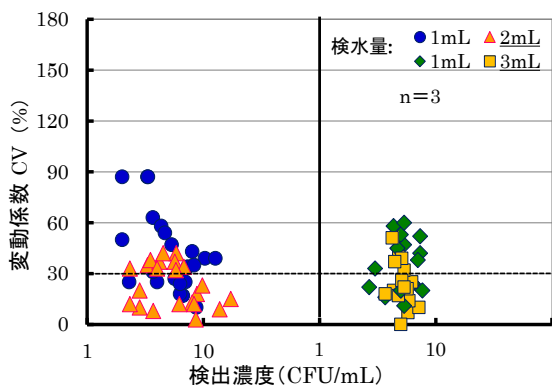


図-13 混釈法による検水量の違いがCVへ及ぼす影響

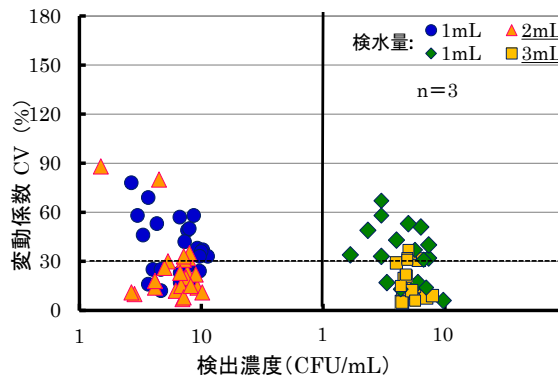


図-14 フィルター法による検水量の違いがCVへ及ぼす影響

7.4 検出コロニーの同定結果

各種培地から得られた検出コロニーの同定結果を表-3に示す。各々20のコロニーを対象とし、釣菌にあたっては他の大腸菌等のコロニーと重なりが無い独立したコロニーを選定した。培地A~Fにおける典型コロニーについて大腸菌(*E.coli*)と同定された割合(陽性率)は90~100%であり、培地Fでは典型コロニーの10%が偽陽性を示した。各培地で偽陽性を示したコロニーの大部分は腸内細菌科に分類されている種であり、典型コロニー全体について大腸菌を含めた腸内細菌と同定された割合(陽性率)は95~100%であった。特定酵素基質培地を利用しても、腸内細菌の一部が擬陽性を示すとされているが³⁴⁾、培地が異なることで偽陽性の割合に若干の違いが生じる可能性が示唆された。

表-3 各培地における検出コロニーの同定結果

培地	同定数	同定結果	<i>E.coli</i> の割合 (%)	腸内細菌※の割合 (%)
A	20	<i>E.coli</i> (19)、 <i>E.coli</i> ・ <i>K.ascorbata</i> 混合(1)	100	100
B	20	<i>E.coli</i> (18)、 <i>E.coli</i> ・ <i>E.hermannii</i> ・ <i>E.fergusonii</i> 混合(1)、 <i>K.cryocrescens</i> (1)	95	100
C	20	<i>E.coli</i> (17)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> 混合(1)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1)、不明(1)	95	95
D	20	<i>E.coli</i> (20)	100	100
E	20	<i>E.coli</i> (16)、 <i>E.coli</i> ・ <i>S.flexneri</i> 混合(1)、 <i>E.coli</i> ・ <i>S.dysenteriae</i> 混合(1)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1)、 <i>E.hermannii</i> (1)	95	100
F	20	<i>E.coli</i> (17)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1)、 <i>C.freundii</i> (1)、不明(1)	90	95

()内は同定株数、*E.coli*との混合同定分については、*E.coli*として評価
※温血動物の腸管に常在している菌

7.5 大腸菌群に占める大腸菌の割合の評価

A 下水処理場における流入下水および二次処理水(生物学的高度処理水)について、特定酵素基質培地のD培地による大腸菌/群割合の評価結果を図-15、16に示す。夏季の水温上昇時において大腸菌群に占める大腸菌の割合が上昇傾向を示していたため、水温と大腸菌/群の比の関係を整理した。流入下水、二次処理水ともに水温が23°C付近を境として割合が高まり、その平均割合は23°C以上

において流入下水が37%、二次処理水が18%であった。23°C以下では各々17%、7%となっており、割合の変動要因として季節変動による水温の影響が見られ、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。この時の流入下水の大腸菌濃度は、大腸菌/群の割合が37%以上とそれ以下で平均濃度を整理すると 9.1×10^4 CFU/mL に対し 7.2×10^4 CFU/mL であり、高水温期は約30%の濃度上昇が見られた。20°Cの水温では大腸菌が増殖するとの報告³⁵⁾があることから、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。また、流入下水と二次処理水の大腸菌/群の割合を整理した結果を図-17に示す。相関関係があり水温の上昇により、二次処理水の大腸菌割合が高まる要因の1つは、流入下水の大腸菌/群の割合が高まっていることによる可能性が示唆された。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%であったとする報告例²⁷⁾がある。本調査の処理水等の平均割合はこれと比較してやや低い状況にあるが、生物学的高度処理を実施している1処理場の調査結果であること、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等が要因となり、割合に違いが生じたものと推定される。

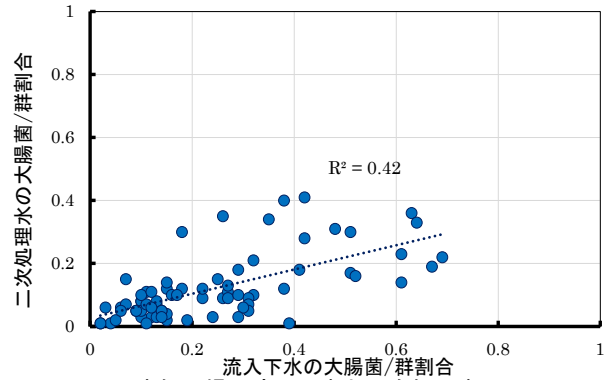


図-17 A下水処理場の流入下水と二次処理水(生物学的高度処理水)の大腸菌/群割合

次いで、従来指標との関連性として二次処理水の大腸菌(特定酵素基質培地)と大腸菌群(デソキシコール酸塩培地)について整理した結果を図-18に示す。やや弱い相関関係が見られており、大腸菌群に占める大腸菌の割合は2~35%の範囲内であり、平均割合は14%であった。また、放流水では相関関係が見られ、大腸菌群に占める大腸菌の割合は1~33%の範囲内であり、平均割合は12%であった(図-19)。この時の結合残留塩素濃度範囲は0.13~0.51mg/L、平均濃度は0.25mg/Lであり、放流水質の技術上の基準値を検討するための知見を得た。

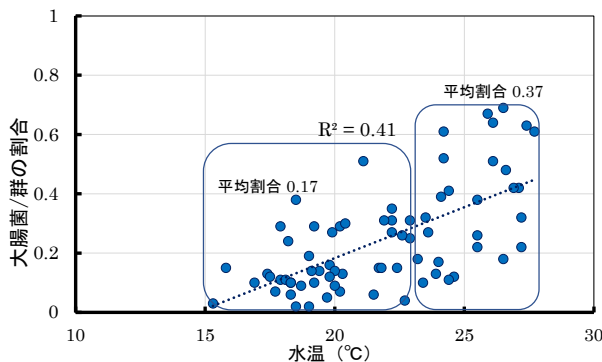


図-15 A処理場の流入下水の水温変動と大腸菌/群割合の関係

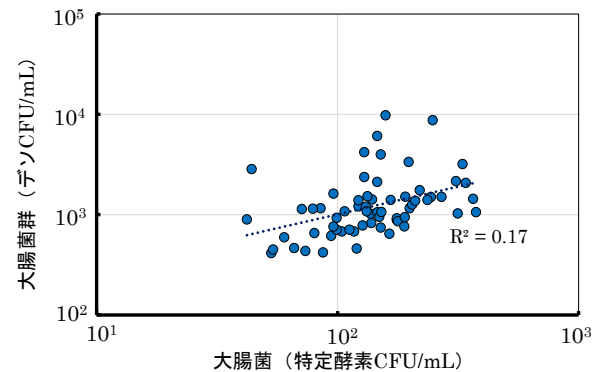


図-18 A下水処理場の二次処理水(生物学的高度処理水)の大腸菌と大腸菌群の関係

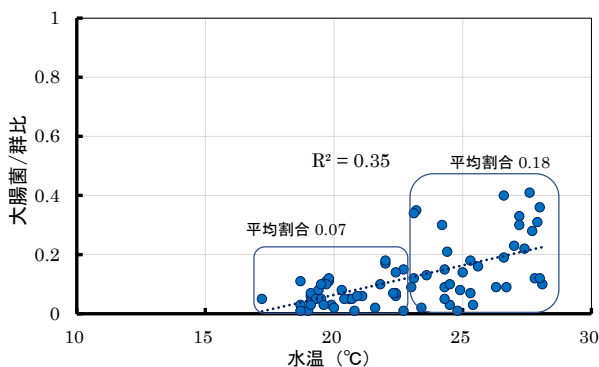


図-16 A下水処理場の二次処理水(生物学的高度処理水)の水温変動と大腸菌/群割合の関係

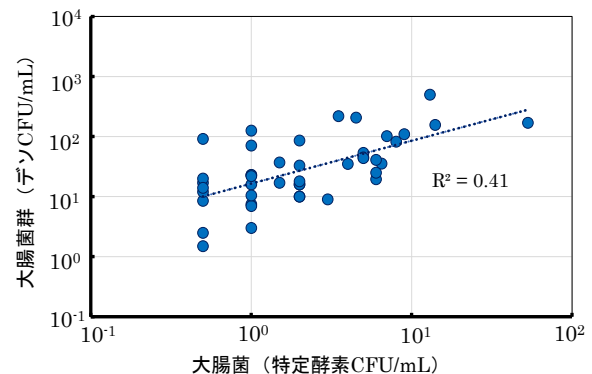


図-19 A下水処理場の放流水の大腸菌と大腸菌群の関係

5. まとめ

本研究では、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として注目されている F 特異 RNA フェージ遺伝子群について、活性汚泥処理での除去効果、塩素と紫外線消毒の不活化効果を各々把握し、ウイルスの代替指標としての可能性を評価した。大腸菌に関しては、下水試料に適した測定法の提案を目的に、各種特定酵素基質培地での大腸菌の回収率や希釈水違いおよび試料中の大腸菌濃度が変動係数に及ぼす影響を評価し、公定法のための精度等を明らかにした。また、従来指標との関連性を評価するため、下水試料の大腸菌群に占める大腸菌の割合を把握し、その関連性を明らかにすることで放流水質の技術上の基準値を検討するための知見が得られた。以下に得られた結果を示す。

- 1) 下水処理による NoV の除去効果を評価する指標としては、FRNAPH GII が有効である可能性が示された。
- 2) 塩素消毒による下水処理水中の FRNAPH の不活化効果において、GII~GIV を指標とすることで安全側の評価となることが確認された。
- 3) 紫外線消毒による下水処理水中の FRNAPH 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。
- 4) 各種特定酵素基質培地・手法による大腸菌の回収率、希釈水の違いおよび試料中の大腸菌濃度が CV に及ぼす影響を評価し、許容値を満たす測定法を提示できた。
- 5) 水温上昇時に二次処理水の大腸菌割合が高まる要因の 1 つは、流入下水の大腸菌群の割合が高まっていることによる可能性が示唆された。
- 6) 従来指標との関連性として、生物学的高度処理を行っている処理場での約 21 ヶ月の測定結果として、大腸菌群に占める大腸菌の割合は処理水が 2~35% (平均 14%)、残留塩素の平均濃度が 0.25mg/L の放流水では 1~33% (平均 12%) であった。

謝辞

本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., Dura'n, 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, *Lett. 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) (公社) 日本下水道協会：下水試験方法下巻、pp225、2012.
- 20) 平成 20 年国土交通大臣告示第 334 号.
- 21) 建設省高度処理会議：下水処理水の修景・親水利用水質検討マニュアル (案)、平成 2 年 3 月.
- 22) 国土交通省都市・地域整備局下水道部、国土交通省国土技術政策総合研究所：下水処理水の再利用水質基準等マニュアル、平成 17 年 4 月.
- 23) 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.
- 24) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N. and Katayama, K. : Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 41(4), pp.1548–1557, 2003.
- 25) da Silva, A. K., Le Saux, J. C., Pamaudeau, S., Pommepeuy, M., Elimelech, M. and Le Guyader, F. S. : Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 73, pp.7891–7897, 2007.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Lee, S., Suwa, M. and 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 (1), pp. 50–62, 2019.
- 29) Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N. and Gantzer, C. : F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 84 (1), pp. 1–14, 2018.
- 30) Hata, A., Kitajima, M. and 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.
- 31) 李善太、諏訪守、重村浩之：紫外線によるノロウイルスの不活化とその効果の推定手法、土木技術資料、Vol. 61(2)、pp. 40–43, 2019.
- 32) Lee, S. Ihara, M., Yamashita, N., Tanaka, H. : Improvement of virus removal by pilot-scale coagulation-ultrafiltration process for wastewater reclamation: Effect of optimization of pH in secondary effluent, *Water Res.*, Vol. 114, pp. 23–30, 2017.
- 33) 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) .
- 34) (公社) 日本下水道協会：下水試験方法下巻、pp252-253、2012.
- 35) 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.

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、小川文章、南山瑞彦
 對馬育夫、服部啓太、末永敦士

【要旨】

本研究では、ダム貯水池における動植物プランクトンの省力かつ高度な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と適用ならびに機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に取り組んだ。第 4 期中長期研究計画期間中、ダム貯水池に存在する微生物（細菌、古細菌、植物プランクトン、動物プランクトン等）を、次世代シーケンサーを用い網羅的に検出する方法を確立した。また、機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発を進め、ダム管理所から実務に用いた画像を収集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、訓練画像の質や枚数、組み合わせに応じて認識率が向上する分類モデルを作成することが可能になった。さらに、高濃度酸素溶解装置（WEP システム）が導入されているダム貯水池において、次世代シーケンサーによる詳細な微生物叢データを取得することで、環境改善効果の指標となるカビ臭産生細菌の分布や推移を把握することが可能となった。

キーワード：ダム貯水池、プランクトン、次世代シーケンサー、自動画像分類、WEP システム

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、環境基準設定地点の約 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⁾。ダム管理者は、水質改善対策を実施し、その影響の軽減・解消に努めているが、課題解決には至っていない場合もある。

水質異常時に原因種を特定し有効で効果的な対策を実施するため、ダム貯水池における動植物プランクトン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⁾ため、平常時における優占種の把握も欠かせない。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、ダム管理者は、「ダム貯水池水質調査要領³⁾」及び「河川水辺の国



写真 1 次世代シーケンサー(NGS)外観

勢調査マニュアル【ダム湖版】⁴⁾に準じ、定期的を実施しているが、そのモニタリング方法に関して、DNAに着目した新たな技術や AI 画像識別技術を導入することにより、目的に応じたモニタリングの省力化や高度化が可能となると考えられる。現在、動植物プランクトンのモニタリングは、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われている。しかしながら、光学顕微鏡を用いた同定には、熟練した技術が必要な上、対応できる技術者も年々減少傾向にある。また、熟練者で

あっても、形態が似通ったプランクトンの同定は非常に困難で個人差が大きいといった問題点がある。さらに、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、光学顕微鏡で同定できる種は非常に限られている。

一方、近年、ゲノム解析技術の急速な発展により、次世代シーケンサー（New Generation Sequencer：以下「NGS」という。）（写真1）を使った大規模 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てきていることから⁵⁾、本研究では、ダム貯水池におけるプランクトン等のモニタリングに本手法を適用することにより上述の課題を解決することを目的としている。また、近年、発達が目覚ましい AI 技術を取り入れ、動植物プランクトン画像の自動判別技術の開発にも取り組んだ。さらに、高濃度に酸素を溶解させた水を深層に供給できる気液溶解装置（以下、WEP システム）が導入されているダム貯水池において、NGS を用いた微生物叢を含む詳細な水質を把握することで、WEP システムによる水質改善効果の確認を行った。これらの新技术を導入することにより、従来のモニタリングでは捉えられなかった詳細な微生物叢を把握することで、水質の維持管理に有効な方法の提案に資する知見を得ることが期待される。

2. NGS を用いた簡易的な藻類モニタリング手法の開発

平成 28~29 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。平成 30 年度は、真核生物が持つ 18S rRNA 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。令和元年度は、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。その際、顕微鏡では観察されたが NGS では検出されなかった種が明らかになったため、令和 2~3 年度は、解析条件の見直し、改善策の検討を行った。本項目では、主に、調査に適したユニバーサルプライマーの選定、ダム貯水池での適用例、検鏡結果との比較、プライマーの網羅性向上に関する検討について報告する。また、詳細は過去の報告書⁶⁻¹⁰⁾も参考にされたい。

2. 1 実験方法

2. 1. 1 NGS による塩基配列解読

本項目では、NGS を用いた一連の実験手法および解析についてまとめる。なお、ここで記述する方法は淡水であるダム貯水池に適した場合であり、塩水が混じる汽水湖や下水処理場を対象とする場合には、より適した方法が別に存在するため留意が必要である。

採水した水試料は、500 mL を 0.2 μm フィルターでろ過し、STE バッファー（10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH8）30 mL にフィルターを一晩浸漬させた後、激しく混合することにより、フィルターに捕集された残渣を剥離させた。その後、遠心分離（3,000 g で 20 分間）で上澄水を除去し、全体量が 0.5 mL になるまで濃縮した。濃縮した懸濁物は、Nucleo Spin[®] Soil（MACHERY-NAGEL）を用いて DNA を抽出した。詳細な手順は使用したキットのマニュアルに従った。特に、アオコ発生時には、DNA 抽出液に PCR 阻害物質が残留し、PCR で DNA が十分に増幅されない場合があるので、DNA 抽出液の精製を入念に行う必要がある。DNA 抽出後は、蛍光光度計を用い、蛍光試薬を使用して DNA 濃度の測定を行った。

ライブラリ調整として、Amplicon PCR、PCR 産物の精製、Index PCR、その後、再度、PCR 産物の精製を行った。PCR 反応条件は初期変性を 94°C で 30 秒間行った後、乖離温度を 94°C で 5 秒間、アニーリング温度を 60°C から 58°C で 30 秒間に設定し（アニーリング温度は使用するプライマーによって変更）、10 サイクル毎に 1°C 下げるタッチダウン方式を採用し、伸長温度を 72°C で 30 秒間に設定し、合計 30 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit（Beckman Coulter Genomics）を用いて精製した。

DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3（600 サイクル、Illumina）を用い、塩基配列を決定した。解析で得た各リードの分類および統計処理は QIIME2（version 2020.2）を用い、参照データベースは主に SILVA132₉₇¹¹⁾を用いた。

2. 1. 2 網羅的検出のためのプライマーの選定

本研究では、より網羅性の高いプライマーを選定するため、既往のプライマーセット（表 1）を候補として選定した。それらのプライマーの網羅性を確認するため、塩基配列情報が記載されているデータベース SILVA132（表 2）を用いた。各分類（門及び一部綱等を含む）の配列登録数に対して、プライマーの配列と適合する登録数を確認した。表 2 の登録数のうち、どの分類においても 100% に近く適合するプライマーが最も網羅性の高いプライマーであると考えられる。PCR にはフォワードプライマー及びリバースプライ

表 1 本実験で用いたプライマーセット

プライマー名	プライマー配列(5'-3')
16S rRNA遺伝子	
Bac341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
Bac850R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
Pro341F	CCTACGGGNBGCASCAG
Pro850R	GACTACNVGGGTATCTAATCC
Pro341F(modi)	CCTACGGGWBCWSCAG
Pro850R(modi)	CACTACNVGGGHTHTCTAATYC
18S rRNA遺伝子	
TAReuk454	CCAGCASCYCGGTAATTC
TAReukREV3	ACTTTCGTCTTGATYRA
TAReukREV3(modi)	RCTYWSRTYCTTGATYRR
SSU-F1	TAYCTGGTTGATYCTGCCAGT
SSU-R568	TGCTGGCACCACTGCCCCT
SSU-F1289	TGGAGYGATTTGCTGGTTDATTCCG
SSU-R1772	TCACCTACGAAACCTTGTTACG

表 2 本実験で用いたデータベースにおける各分類における配列登録数

分類	データベース登録数	分類	データベース登録数
Bacteria		Bacteria	
Acidobacteria	14,534	Betaproteobacteriales	43,156
Actinobacteria	60,510	Gammaproteobacteria	119,171
Armatimonadetes	752	Deltaproteobacteria	15,396
Bacteroidetes	55,663	Epsilonbacteraeota	5,422
Chloroflexi	9,245	Archaea	
Cyanobacteria	13,970	Euryarchaeota	12,957
Elusimicrobia	435	Crenarchaeota	4,611
Firmicutes	149,757	Eukarya	
Fusobacteria	2,216	Amoebozoa	867
Gemmatimonadetes	2,185	Archaeplastida	13,111
Hydrogenedentes	271	Centrohelida	93
Nitrospirae	1,297	Cryptophyceae	364
Patescibacteria	4,521	Excavata	1,326
Planctomycetes	9,014	Haptophyta	370
Spirochaetes	4,253	Incertae Sedis	237
Synergistetes	1,152	Opisthokonta	41,748
Tenericutes	2,561	Stramenopiles	4,329
Verrucomicrobia	4,419	Alveolata	11,651
Alphaproteobacteria	60,871	Rhizaria	3,376

マーが必要であるため、それらプライマーの相補配列と完全に一致する条件 (FOR0 と記載) およびそれぞれ 1~2 ミスマッチを許容した条件で抽出を行った (例えば、F1R2 は、フォワードプライマーに 1 塩基ミスマッチ、リバープライマーに 2 塩基ミスマッチを含む条件で抽出を行ったことを意味する)。それぞれの分類に含まれる配列登録数から抽出された配列数の割合

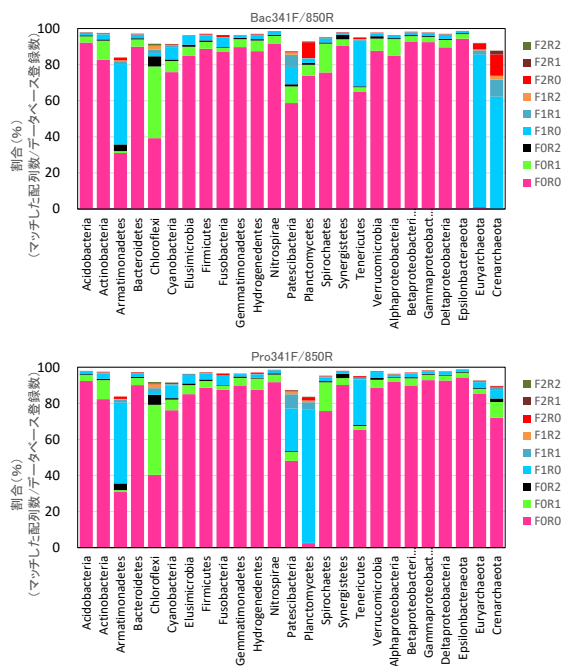


図 1 原核生物を対象としたプライマーの適合率の比較

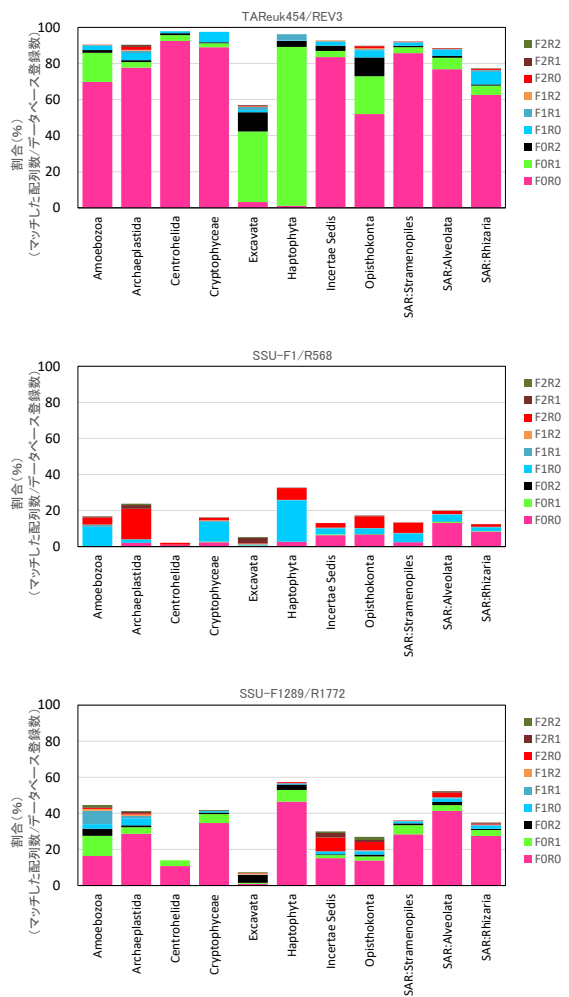


図 2 真核生物を対象としたプライマーの適合率の比較

(適合率)の合計をカバー率とした。

2. 1. 3 NGSと光学顕微鏡による検鏡結果の比較

NGSによる塩基配列解読及び光学顕微鏡による検鏡試験の結果を比較するため、上記で選定したプライマーセットを用い、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50km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)を対象に実験を行った。

NGSによる実験方法は上述の通りである。一方、光学顕微鏡による同定は、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った。分析方法は「河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】⁴⁾」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。これらの結果を基に、プライマーの改良を行った。

2. 1. 4 プライマーの改良

通常、PCR増幅において数ミスマッチ程度であれば増幅される場合もあるが、本研究で用いたプライマーとその実験条件では、Excavataが検出できなかった(結果は後述する)。したがって、モニタリングの観点で重要な網羅性の向上のため、原核生物および真核生物用のプライマーの塩基配列を一部改変することで、カバー率の向上を試みた。塩基配列を一部改変したプライマーは表1の(modi)と表記したプライマーである。このプライマーについて、2.1.2と同様の方法によりプライマーの網羅性を確認した。また、購入した分離株であるExcavataに属する*Euglena* sp. (NIES-2345株)を環境試料に添加し、2.1.1と同様の方法によりNGSによる検出を試みた。

2. 2 結果と考察

2. 2. 1 原核生物(16S rRNA 遺伝子)を対象としたプライマーの網羅性

細菌(Bacteria)および古細菌(Archaea)をターゲットとした16S rRNA遺伝子を対象とした場合の各分類に対するカバー率を図1に示す。Bac341F/850Rでは、0ミスマッチ(F0R0)の場合、ArchaeaであるEuryarchaeotaおよびCrenarchaeotaが適合した割合はそれぞれ1.1%、0.1%と小さくほとんどの種が検出されないという結果だった。一方、Pro341F/850Rでは、EuryarchaeotaおよびCrenarchaeotaの適合率は85.5%、72.0%とBac341F/850Rと比較し高いものの、PatescibacteriaやPlanctomycetesについては、48.1%、2.5%と低い結果となった。また、Chloroflexiや未分離種を多く含むArmatimonadaetesに関しては、どちらのプライマーセットも適合率はそれぞれ39.2%~40.4%、

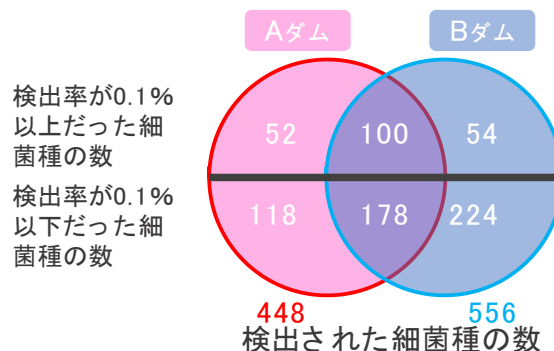


図3 NGSで同定された各ダムにおける細菌種数

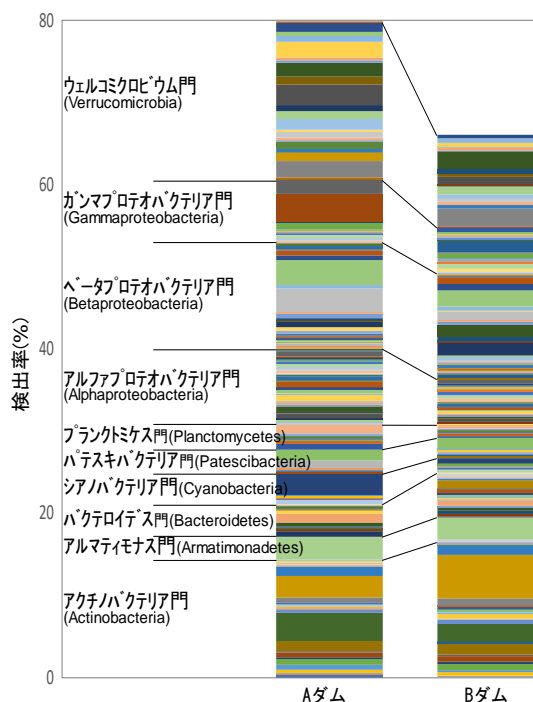


図4 NGSで同定された各ダムにおける細菌構成

30.9%~31.0%と他の門と比べ低かった。2ミスマッチまで許容した場合、どちらのプライマーセットでもカバー率は全体として95%まで向上した。ダム貯水池水質を考える上で、古細菌に分類されるメタン生成古細菌やアンモニア酸化古細菌の把握も重要になるため、本研究では、Pro341F/850Rを選定し実験に用いた。

2. 2. 2 真核生物(18S rRNA 遺伝子)を対象としたプライマーの網羅性

真核生物(Eukarya)をターゲットとした18S rRNA遺伝子を対象とした場合の結果を図2に示す。TAReuk454/REV3の組み合わせにおいて、0ミスマッチ(F0R0)の場合は63.1%、2ミスマッチまで許容した場合は92.2%だった。また、SSU-F1/R568の組み合

わせにおいて、0 ミスマッチの場合は 4.2%、2 ミスマッチまで許容した場合は 51.5%、SSU-F1289/R17720 の組み合わせにおいて、0 ミスマッチの場合は 24.0%、2 ミスマッチまで許容した場合は 24.8% だった。したがって、TAReuk454/REV3 の組み合わせがダム貯水池の真核生物の検出には最も適していることが示唆され、本研究で実験に用いることにした。ただし、TAReuk454/REV3 の組み合わせでは、Excavata (エクスカバータ) や Haptophyta (ハプト藻類) のカバー率は、FOR0 では、それぞれ 3.2%、1.1% と低かった。F2R2 まで許容した場合でも、Excavata は 57% までしかカバーしないため、後述するミドリムシ藻 (ユーグレナ藻) の状況把握には留意が必要であることが明らかとなった。

2. 2. 3 NGS で同定された細菌 (原核生物、16S rRNA 遺伝子)

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 68 万種の DNA 配列データが登録されているデータベース (原核生物: 約 60 万種、真核生物: 約 8 万種) と照合し、それぞれのリードと種を紐づける作業を行った。その結果、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 3)。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。NGS を使うことで、検出率 (データベースに登録されたある配列に一致したリード数/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 4 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。各積上げ領域は、検出された種を示している。門レベルの比較において、各ダム間で構成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¹²⁾。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、つまり、溶存メ

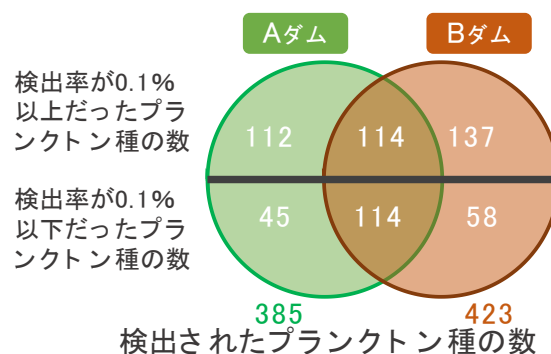


図5 NGSで同定された各ダムにおける

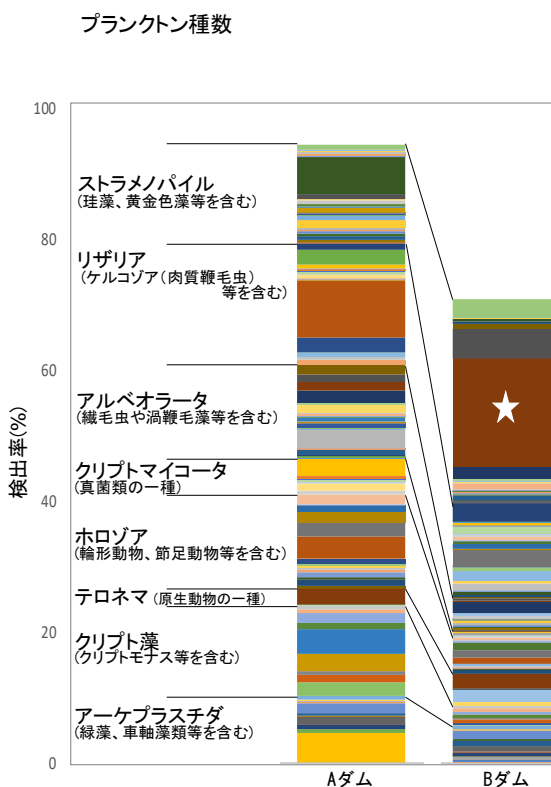


図6 NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン構成

タン濃度が高い状態になっていることが示唆された。また、データは示さないが、A ダムの底層からはメタン生成古細菌が年間を通じてほとんど検出されないが、一時的に酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta* sp. が比較的多く検出された時期があった (検出率として 2.0% 程度)。 *Methylobacter* sp. の増加はこの影響を受けている可能性が考えられる。一方、アオコやカビ臭の原因となるシアノバクテリアは検出されず、光学顕微鏡では分類が困難なピコプランクトンの一種であるシネココッカスに近縁な種 (*Synechococcus* sp.) が多数検出された。

表3 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	
シアバクテリア綱	<i>Synechococcus</i> sp.	○	○		○	
黄金色藻綱	<i>Chrysooccus</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

2. 2. 4 NGSで同定されたプランクトン（真核生物、18S rRNA 遺伝子）

細菌と同様、試料に含まれるプランクトン由来のDNA配列を解析した。その結果、Aダム及びBダムから約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423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、Bダムの方が若干多い結果となった（Aダム:226種、Bダム:251種）（図5）。図3および図5から、近接するダム貯水池間でも共通して検出される細菌・プランクトン種はそれほど多くなく、固有の微生物叢を形成していることが示唆された。図6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。Bダムには別の支流からの流入もあり、

そのため、構成される種数が多くなっている可能性が考えられる。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%と卓越して検出された（図6の☆印）。ニセコアミケイソウは淡水域から汽水域にかけて広く検出され、比較的富栄養化が進んだ水域で多く見られるプランクトンである。

2. 2. 5 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り同定された種とそれらのNGSによる検出状況の比較を表3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。NGSでは、細菌を726種、プランクトンを580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

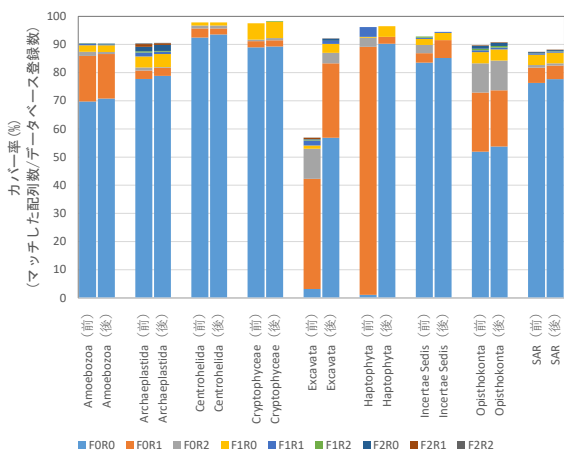


図7 改良前後のプライマーによるカバー率の比較 (真核生物)

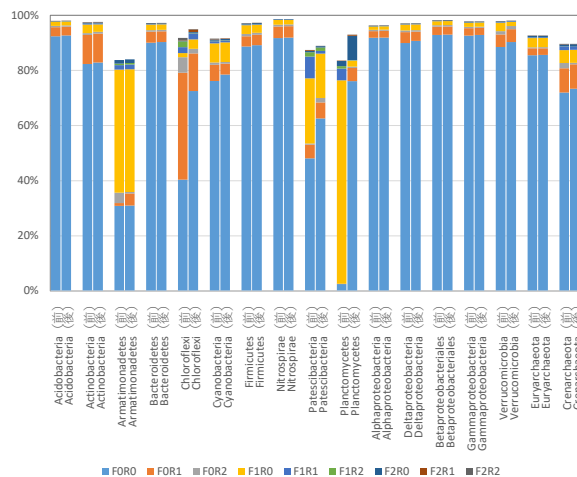


図8 改良前後のプライマーによるカバー率の比較 (原核生物)

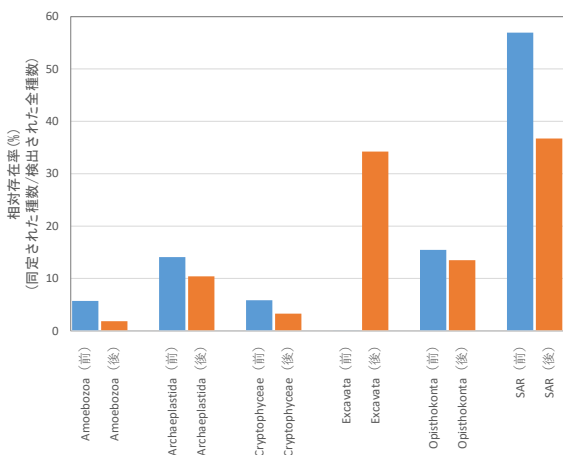


図9 改良前後のプライマーによる検出率の比較 (真核生物)

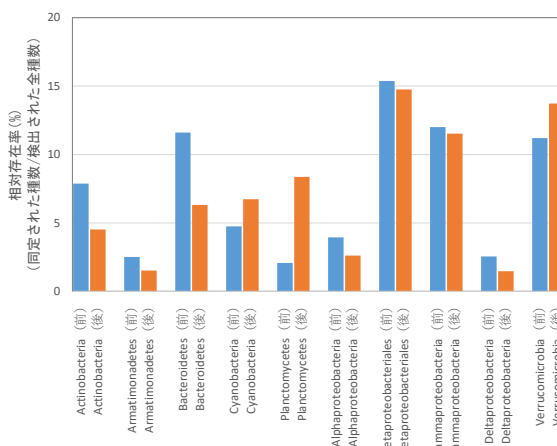


図10 改良前後のプライマーによる検出率の比較 (原核生物)

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ではわずかしが検出されなかった。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、*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。また、ミドリムシ藻（ユーグレナ藻）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。これは、本研究で使用したプライマーでは、図2に示すように *Trachelomonas* sp. が分類されている *Excavata* をほとんど検出しないためであると考えられる。

2. 2. 6 プライマーの改良

改良前後のプライマーによるカバー率を比較した結果、真核生物を対象とした結果を図7に、原核生物を対象とした結果を図8に示す。真核生物を対象としたプライマーでは、改良前の *Excavata* のカバー率は、0 ミスマッチの場合は、3.2%、2 ミスマッチまで許容しても56.9%と他のグループと比較して著しく低い値であった。一方、改良後の *Excavata* のカバー率は、0 ミスマッチの場合は56.9%、2 ミスマッチまで許容し

た場合は 92.2%と大幅に向上させることができた。また、同時に、淡水湖沼では検出されることは少ないが海水では頻りに検出される Haptophyta の 0 ミスマッチ時のカバー率も大幅に向上させることができた。原核生物を対象としたプライマーでは、改良前の Planctomycetes のカバー率は、0 ミスマッチの場合は、2.5%と他のグループと比較して著しく低い値であった。また、2 ミスマッチまで許容した場合は 83.6%と他のグループと比べ若干低い程度であった。一方、改良後の Planctomycetes のカバー率は、0 ミスマッチの場合は 71.6%と大幅に向上させることができた。

改良後のプライマーによる NGS での検出を試みた結果、改良前のプライマーでは検出されなかった Excavata が検出されたことを確認した (図 9)。また、Planctomycetes の相対存在率 (同定された種数/検出された全種数) が 2.1%から 8.4%に増加した (図 10)。プライマーの網羅性向上により、これまで検出されなかった細菌も検出されるようになった。

2. 3 NGS を用いた簡易的な藻類モニタリング手法の開発のまとめ

本項目では、NGS を用いた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のモニタリング手法の開発について報告した。NGS はミドルスペックの機種でも、一度の解析で、96 サンプルを同時に解析でき、合計で約 150 億もの塩基配列情報を取得することができる。これまで顕微鏡による同定では困難だった網羅的な微生物叢の把握が手軽にできるようになった。本研究においても、プライマーを改良することにより NGS は検鏡と同等以上にプランクトン類を網羅的に検出できることが示唆された。また、後述するが、光学顕微鏡では検出されにくいシアノバクテリアについても、NGS を使うことで多数検出可能であるとの結果を得ている。水質変化予測に活用することも見込まれ、ダム貯水池の効率的な水質の維持管理への貢献が期待される。また、本研究成果の一部は「ダム貯水池水質改善に向けた気泡式循環施設マニュアル」¹³⁾にも反映されている。

3. プランクトン自動判別技術の開発

検鏡によるプランクトン同定の効率化を図るため、自動画像認識技術による動植物プランクトンの判別技術の開発に取り組んだ。本技術が確立されれば、ダム管理事務所等において、より安価で高頻度にモニタリングを行うことが可能となる。また、浄水施設や下水処理での試験にも活用されることが予想され、汎用

表 4 除外対象データ

対象	効果
重複画像	過学習を防ぐ
つぎはぎのある画像	つぎはぎの直線の特徴として捉え、直線の特徴とするクラスと誤分類してしまうのを防ぐ
文字入り画像	文字の特徴と捉えてしまうのを防ぐ
複数種が混合している画像	他クラスの特徴を学習してしまうのを防ぐ
写る面積が小さい画像	特徴が捉えられないため、テストデータに混ざると正答率が下がるのを防ぐ
過度にスケールが違う画像	プランクトンは拡大すると網目状になっているものが多く、全体像としての形状は異なるにも関わらず同種と分類されてしまう問題を防ぐ

性は極めて高いと考える。研究着手にあたり、令和元年度は、国内のダム貯水池において頻りに検出される 19 種の植物プランクトンについて、インターネット上から収集した画像を用い、機械学習による画像分類を試みた。令和 2-3 年度は、ダム管理所から実務に用いた画像を収集し、機械学習による画像分類システムの性能向上を試みた。本項目では、主に、実務に用いた画像を収集し、機械学習による画像分類システムに関する検討について報告する。また、詳細は過去の報告書等も参考にされたい^{9-10および14)}。

3. 1. 実験方法

3. 1. 1 画像データ収集と選定

R1 年度は「河川水辺の国勢調査のための生物リスト」¹⁵⁾の中からダム貯水池で頻りに検出される 102 種を抽出し、さらに、水質管理に重要な種、形状の似た種等を考慮し、対象を 19 種に絞りこみ、インターネット上から画像を収集してデータセットを作成した。令和 2-3 年度は、国交省直轄ダムおよび水資源機構ダムから定期モニタリングで取得する直近 1~6 年分のダム貯水池水質調査要領「様式 1-1-14 定期調査 動植物プランクトン写真票」に準ずる画像データを収集した。また、*Microcystis aeruginosa* に関しては、実験室にて顕微鏡画像を 500 枚以上取得した。本報告書では、その中からダム貯水池で比較的良好に検出される動物プランクトンであるスナカラムシ属とハネウデワムシ属

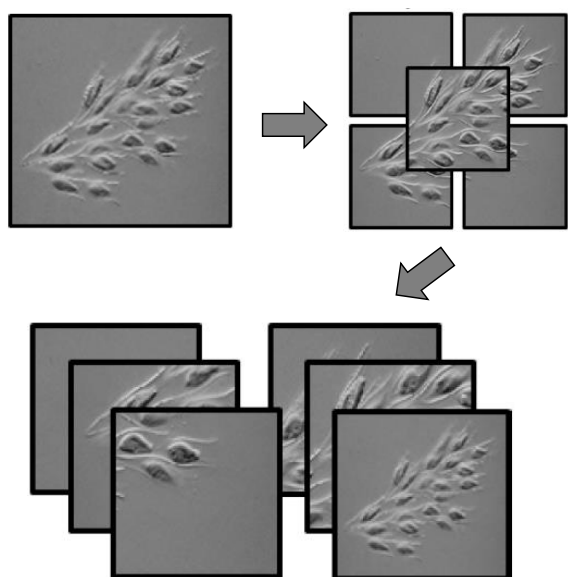


図 11 分割と切り抜きによるデータ拡張の例

の組み合わせや形状が類似している珪藻類のコアミケイソウ属と藍藻類のマイクロキスティス属を選定し、機械学習を行った。

3. 1. 2 データの事前処理 (クレンジング)

データクレンジングとして、データセットの中学習に悪影響のあると思われる種々の画像を除外した。除外対象データを表 4 に示す。

3. 1. 3 データ拡張

今回用意したデータセットは1プランクトン種 (クラス) 平均約 100 枚と少ないため、データの拡張を行った。元画像を縦横 2 倍に拡大したものに対して、縦横に 4 分割した画像と中央部分を切り抜いた画像を作成し (図 11)、これに元画像を加えた計 6 種類の画像を作成し、データを拡張した。この処理により、学習させる画像数を増やすだけでなく、微細な特徴に着目させ効率的に学習させることが期待できる。また、この処理により生じる画像に対しても上記のクレンジングを行う。さらに、画像を 90°、180°、270°回転させ、拡張を行った (図 12)。実際に、光学顕微鏡を用いてプランクトンを撮影する際は、様々な向きで撮影されるため、回転を加えることで汎化性を獲得できる。

3. 1. 4 グレースケール化

プランクトンの種判別は、形状による分類が主であり、色に頼らなくとも識別可能であると考えられるため、画像はすべてグレースケール化を行った。グレースケール化には学習速度向上の利点もある。

3. 1. 5 分類モデル

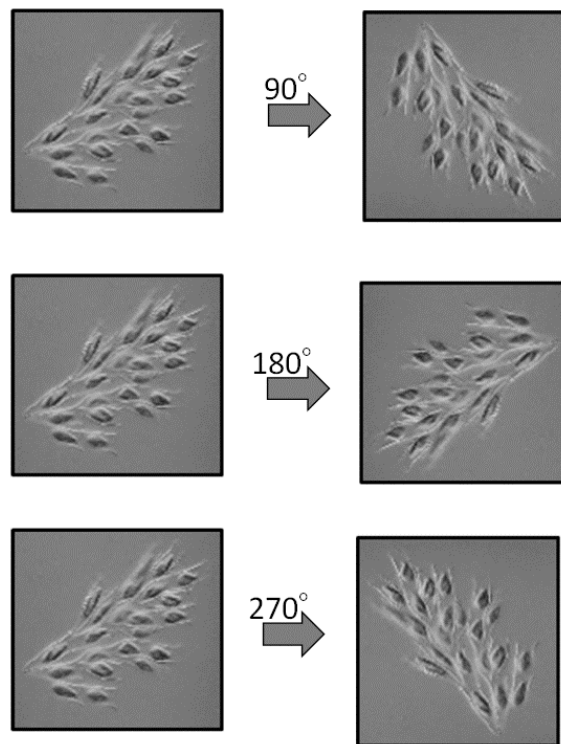


図 12 回転によるデータ拡張の例

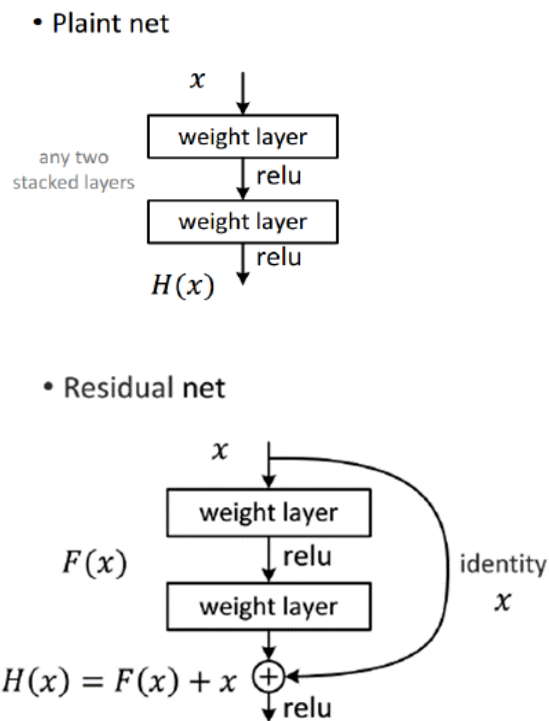


図 13 一般的な畳み込み層 (上図) と RES NET (下

表 5 プランクトン画像収集結果

順位	分類	画像数 (H28-R2)	R3 追加	合計 枚数
1	<i>Asterionella formosa</i> complex	331	345	676
2	<i>Cryptophyceae</i>	392	338	730
3	<i>Polyarthra vulgaris</i>	321	198	519
4	<i>Tintinnopsis</i>	230	195	425
5	<i>Achnanthydium</i> (sensu lato)	52	164	216
6	<i>Aulacoseira pusilla</i> complex	206	159	365
7	<i>Peridinium</i> (others)	114	157	271
8	<i>Coscinodiscineae</i> (others)	577	141	718
9	<i>Cymbella</i> (sensu lato)	52	138	190
10	Other green flagellate	196	137	333
11	<i>Aulacoseira granulata</i> f. <i>granulata</i>	144	136	280
12	<i>Copepoda</i> (nauplius)	208	132	340
13	<i>Chrysophyceae</i> (others)	307	130	437
14	<i>Nitzschia</i> (others)	149	129	278
15	<i>Dinobryon</i>	126	126	252
16	<i>Peridinium bipes</i>	111	113	224
17	<i>Thalassiosiraceae</i> (others)	67	111	178
18	<i>Naviculaceae</i> (others)	54	110	164
19	<i>Bosmina longirostris</i>	83	102	185
20	<i>Fragilaria crotonensis</i>	149	82	231
21	<i>Synchaeta</i>	185	72	257
22	<i>Eudorina</i>	96	68	164
23	<i>Ploesoma truncatum</i>	71	56	127
24	<i>Lindavia</i>	76	55	131
25	<i>Dolichospermum-Sphaerospermopsis</i>	51	48	99
26	<i>Diatoma</i>	61	47	108
27	<i>Pandorina morum</i>	67	45	112
28	<i>Trichocerca</i>	70	42	112
29	<i>Aulacoseira ambigua</i> f. <i>ambigua</i>	51	40	91
30	<i>Bosminopsis deiteri</i>	52	33	85

本研究では、画像の分類に Residual Networks (ResNet)モデルを使用した。ResNet モデルは、He らが 2015 年に考案したニューラルネットワークのモデルである¹⁶⁾。ResNet モデルは、一般的な畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network: CNN) に加えて、基本的な恒等写像を学習することを目的として開発されたショートカット構造が、複数の畳み込み層をスキップするように組み込まれているため、深い層においても、学習が進むという利点を持っている (図 13)。本研究では ResNet-152 を用いた。

3. 2 実験結果と考察

3. 2. 1 画像データ収集と選定

各管理所から収集した報告書 457 編からプランクトン画像約 12,000 枚を抽出した。抽出された上位 30 位のプランクトン種を表 5 に示す。そのうち、多くのダムにおいて高頻度で検出される動物プランクトンとして繊毛虫門多膜綱スナカラムシ科スナカラムシ属 (*Tintinnopsis* spp.)、輪形動物門ワムシ綱ヒゲワムシ科ハネウデワムシ属 (*Polyarthra vulgaris*) の 2 種および植物プランクトン (藍藻を含む) としてアオコの原因となるシアノバクテリア門クロオコッカス目ミクロ

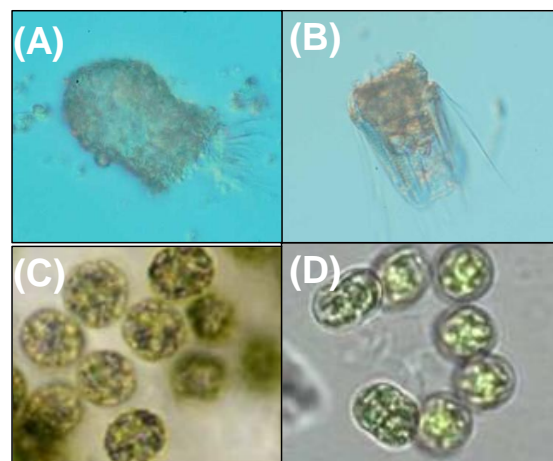


図 14 分類に用いたプランクトン画像の例 (A; スナカラムシ属、B; ハネウデワムシ属、C; ミクロキスティス属、D; コアミケイソウ属)

キスティス属 (*Microcystis aeruginosa*)、アオコと形状の似ているオクロ植物門珪藻類コアミケイソウ属 (*Coscinodiscus* sp.) について (図 14)、深層学習を行い、画像分類を試みた。

3. 2. 2 スナカラムシ属とハネウデワムシ属の画像識別

スナカラムシ属とハネウデワムシ属について、深層学習を行った結果について、表 6 に示す。本研究では、3~10 回以上学習させても認識率が向上しない場合、学習を打ち切った。No.1~No.3 に関して、訓練画像の枚数を変えず、種類を変えて学習を行った結果、訓練画像の選び方次第で、認識率は 0.85~1.00 と異なった。訓練データ数を 100 とした No.4 は、学習は収束せず、認識率は低かった。この原因として、訓練データの画像の中には、対象が不鮮明なものや小さ過ぎるものが含まれていたことが考えられた。No.5~No.8 では、訓練データの中から、対象が不鮮明なものや小さ過ぎるものを除外した。その結果、特に、多くの訓練画像を用いた No.8 において、大きく認識率が向上した。しかし、この場合においても、8 回目の学習以降は認識率が低下していった。これは訓練データ数の不足によるものと思われる。訓練データを追加した No.9 では、訓練画像の認識率が高いが、訓練に用いなかった未学習の検証用データに対する認識率が低くなった。一方、訓練データを可能な限り減らした No.10 でも、認識率は No.9 と大きく変わらない結果となった。これは、プランクトンの形状だけではなく、顕微鏡の種類、撮影条件、写り込みのプランクトンの大きさなどバリエー

表 6 スナカラムシ属とハネウデワムシ属の深層学習結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	1.00	0.85	13	0.85	
2	30	10	1.00	1.00	13	0.95	
3	30	10	1.00	0.95	20	0.95	
4	100	10	0.56	0.80	1	0.80	11
5	30	10	0.82	1.00	3	0.75	13
6	30	10	0.98	0.90	13	0.90	
7	30	10	0.97	0.90	6	0.80	16
8	100	10	0.99	0.90	8	0.90	18
9	150	20	0.98	0.78	13	0.68	16
10	30	10	0.96	0.70	10	0.70	10
11	100	10	0.88	0.55	1	0.55	4
12	100	10	0.93	0.70	5	0.70	8
13	100	10	0.92	0.70	2	0.60	2

表 7 ミクロキスティス属とコアミケイソウ属の深層学習結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数(*20)	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	0.99	0.83	17	0.83	
2	500	10	1.00	0.85	1	0.83	
3	100	10	1.00	0.90	2	0.90	12

ションが豊富であるため、No.10 においても当該条件を満たす必要な訓練データ数を担保できなかった可能性が考えられる。画像識別の精度を向上させるには、訓練データ数を増やすことで対応可能であるが、訓練データの中に違う条件で撮影された画像が大量に含まれている場合、正しく学習が進まず、誤同定してしまう。また、正しく学習していても、検証用データに含まれる別条件で撮影された画像を別種と判断してしまい正しく認識できない場合もある。そのため、実用化を考える上では、訓練データ、検証データともに条件を絞った運用にするか、汎用性を高めるため、様々な条件の下で撮影された訓練データ数を大量に（少なくとも 1 条件につき 2~300 枚以上）用意する必要があると考えられる。No.11~No.13 で試行した結果も訓練画像の認識率は高いが、未学習の訓練用データでは十分な認識率を得ることができなかったこと、試行毎でばらつきも大きいことから訓練データの不足を示唆していた。

3. 2. 3 ミクロキスティス属とコアミケイソウ属の画像識別

ミクロキスティス属とコアミケイソウ属について、深層学習を行った結果について、表 6 に示す。訓練画

像を 30 枚で試行した No.1 は、認識率が 0.83 と本研究における平均的な認識率となった。訓練画像の枚数を増やした No.2 では、認識率が若干増加した。単一顕微鏡の多数のデータで訓練した場合、過学習が進み別種の顕微鏡画像が識別できなくなったものと考えられたため、訓練データのバリエーションを調整した No.3 では、高い認識率 (0.90) となった。ミクロキスティス属のように群体を形成し存在している種類のプランクトンも良質な訓練データが 100 枚程度あれば認識可能であることが示唆された。したがって、年間にダム管理所から収集できる画像数が少ない種でも、年数を重ねていけば、いずれ高い認識率が達成できると思われる。

3. 3 プランクトン自動判別技術の開発のまとめ

機械学習によるプランクトンの自動判別を試みた結果、分類精度の導出までのアプローチを確認することができた。試行したパターンにおける認識率は 0.73-1.00 であり、今後、継続的にダム管理所から画像を収集し、質の高い訓練データ数を増やすことにより、認識率が向上すると思われる。また、今後は、ダム水質管理に重要な種について、現場での導入を見据えた検討をしていく。また、将来的には、本技術を用いて、一般的な植物プランクトンのモニタリングに留まらず、水質に影響を与える特定種の常時監視等、能動的なダム貯水池の水質管理手法の提案を目指していきたい。

4. WEP システムを導入しているダムにおける水質改善効果の確認

4. 1 実験方法

本研究では、WEP システムを導入しているダム貯水池において、WEP システムの水質改善効果の確認を目的として、令和 2 年および令和 3 年に現地調査、水質分析、検鏡によるプランクトンの同定および NGS を用いた微生物叢解析を行った。

4. 1. 1 調査概要

令和 2 年度の現地調査は、8 月 20 日および 10 月 5 日の計 2 回実施し、湖内 2 地点 (St. A と St. B、図 15) において多項目水質計を用いて水温、pH、酸化還元電位 (ORP)、溶存酸素濃度 (DO)、電気伝導率 (EC)、濁度について現地観測を行うとともに、St. A では 6 水深 (水深 0.5 m、5 m、10 m、15 m、20 m、25 m)、WEP システム設置箇所から約 600 m 離れた St. B では 4 水深 (水深 0.5 m、5 m、10 m、13 m) から採水を行い、表 8 に示す各種分析を行った。令和 2 年度は、金属分

析を含む詳細な水質分析を実施した。また、NGSの結果と光学顕微鏡による検鏡結果を比較するため、NGS解析では16S rRNA (原核生物) のみならず、18S rRNA (真核生物) を対象とした解析を実施した。

令和3年度の現地調査は、7月2日、7月26日、8月24日、9月29日および12月24日の計5回実施した。湖内4地点 (St1.0、St1.5、St2.5 および St3.0、図15) において、令和2年度と同様に多項目水質計を用いて、現地観測を行うとともに、表7に示した観測水深地点の4地点で4~5水深の試料水の採水を行い、各種分析を行った。令和3年度は、カビ臭産生微生物を含む微生物動態の季節性変化を調査するために、採水地点および採水頻度を増やした。水質分析については藻類の動態に強く影響を与える栄養塩である T-N、T-P に絞り、NGS 解析も 16S rRNA のみを解析対象とした。

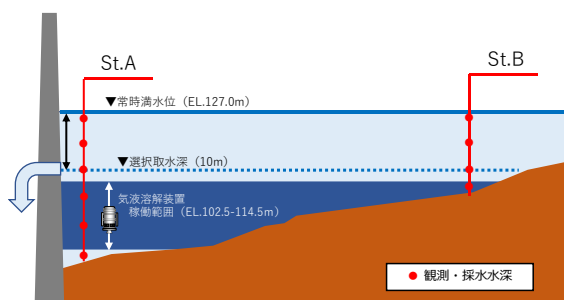
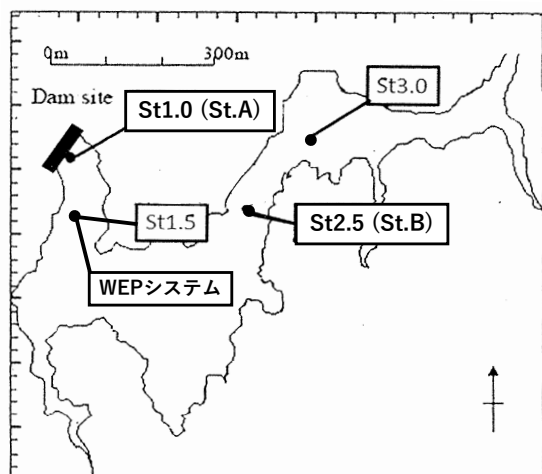


図15 対象としたダム貯水池における調査地点

4. 1. 2 水質分析

水試料の NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、T-N、PO₄-P、T-P はオートアナライザー (ビールエルテック製 QuAAtro2-HR) により測定した。各種金属は ICP - MS

(Thermo Fisher SCIENTIFIC、X7CCT) により分析した。

表8 現地調査概要と分析項目

調査実施日	令和2年8月20日、令和2年10月5日、 令和3年7月2日、令和3年7月26日、 令和3年8月24日、令和3年9月29日、 令和3年12月24日
調査地点	St1.0(St.A)、St1.5、St2.5(St.B)およびSt3.0 (図15参照)
現地観測	多項目水質計による
観測項目	水温、pH、EC、DO、ORP、濁度
観測水深	St1.0(St.A) : 0.5m、5m、15m、20m、25m (湖底直上1m) St1.5 : 0.5m、5m、15m、20m、25m (湖底直上1m) St2.5(St.B) : 0.5m、5m、10m、13m (湖底直上1m) St3.0 : 0.5m、5m、10m、13m (湖底直上1m)
水質分析	SS、VSS、DOC、各態窒素 (NO ₂ +NO ₃ -N、NH ₄ -N及びT-N) と各態リン (PO ₄ -P及びT-P)
金属分析 ^{※1}	Mg、Al、P、K、Ca、V、Cr、Mn、Fe、 Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Ag、Cd、Sn及びPb
顕微鏡分析 ^{※2}	植物プランクトン、動物プランクトン
次世代シーケンス解析	16SrRNA (原核生物) 及び18SrRNA (真核生物)

※1 : St.Bは水深0.5m、5m、13mの3水深のみ分析対象とした

※2 : St.Aは水深0.5mと水深25m、St.Bは水深0.5mと13mの各2水深を分析対象とした

4. 1. 3 光学顕微鏡による同定

2. 1. 3に記載の同定手法により実施した。

4. 1. 4 NGSによる塩基配列解読

2. 1. 1に記載の分析手法により実施した。

4. 2 実験結果と考察

4. 2. 1 水温、DO、ORPについて

令和2年8月20日および10月5日調査時の各調査ポイントにおける多項目水質計による水温、DOの現地観測結果を図16に示す。

8月調査時の水温分布は、WEPシステム設置近傍箇所に位置する St. A では表層から水深10mまでは28.4°C~25.7°Cと高く、水温躍層は水深10mから15mにかけて形成されており、その下層となる水深15m以深から水深25m (湖底直上+1.0m) では20.8°C~17.0°Cと緩やかに低下する傾向にあった。St. Bの水温分布は、表層0.5mおよび水深5mでは31.5°Cおよび28.3°Cと St. A と比べて高く、水深10mおよび13mでは24.8°Cおよび21.2°Cと低い結果となった。

10月調査時の水温分布は、St. Aの水温は表層0.5mから水深10mにかけて21.0°C~18.7°Cと8月調査に比べて低下していたが、水深15m以深から水深25mでも12.7°C~8.9°Cと低下していたため、水温躍層は依然として水深10mから15mにかけて形成されていた。また、St. Bの水温分布は、表層0.5mから水深13mにかけて St. A と同様の分布傾向にあり、8月調査時のような地点間での水温分布の違いは認められなかった。

8月調査時のDO分布は、St. Aでは水深0.5mで7.9 mg/Lと最も高く、下層に向けて低下する傾向があった。特に水温躍層の上層側となる水深10mと下層側となる水深15m間ではDOが大きく低下しており、水温躍層下層への酸素供給が遮断されている様子が確認できた。St. BのDO分布は表層0.5mでは8.6 mg/LとSt. Aよりも高い値が観測されたが、水深10mおよび13mでは3.6 mg/Lおよび2.6 mg/LとSt. Aの同水深よりも低い値が観測された。10月調査時のDO分布は、St. Aの表層0.5mは10.7 mg/Lと高かったが、湖底直上1mとなる水深25mでは0.7 mg/Lと8月調査時よりも貧酸素化が進行していた。一方、St. BのDO分布は表層0.5mではSt. Aと同等であったが、水深5mと10mでは約8 mg/LとSt. Aの同水深よりも高い値が観測された。

8月調査時のORP分布は、St. Aでは表層0.5mから水深15mまでは約170 mVと一定であったが、水深20mでは201 mVと高く、水深25mでは29 mVと急激に低下した。St. Bでは、表層0.5mでは99 mVと低く、また水深5mから13mでは明確な分布傾向はなく、158 mV～188 mVで推移していた。10月調査時のORP分布は、St. Aでは表層0.5mから水深23m付近にかけて150～184 mVで推移していたが、水深25mでは87 mVと急激に低下した。St. Bでも、St. Aと同様の分布傾向にあり、表層0.5mから水深13mにかけ

て139～181 mVで推移していた。

8月調査において、選択取水深付近（水深約10m、EL.117m）に形成される水温躍層により、その上層と下層の水塊は分断されると考えられる。また、St. Bでは水深の浅い上流部で受熱した表層水と滯筋を流下する水温の低い流入水の影響により、St. Aよりも鉛直方向の水温差が大きかったものと推察される。通常、水温躍層より下層側では酸素供給が遮断されるため、湖底付近から貧酸素水塊が形成され、還元状態へと至る。実際に、St. Bでは水深10mおよび13mではDOが4 mg/L以下にまで低下していた。一方、St. Aでは水深15mに比べて20mで高いDO及びORP値が観測された。これは、この時期WEPシステムが水深18.5m（EL.108.5m）で運用されていたことから、装置から吐出された高濃度酸素水の効果によるものと考えられる。10月調査においても、水温躍層は選択取水深付近（水深約10m、EL.117m）に形成されている状態であった。しかし、8月調査で確認されたSt. AとSt. Bとの縦断方向での鉛直水温分布の違いは解消されており、また水深10m以深の複数の水深にWEPシステムから供給された高濃度酸素水による影響と考えられる断続的に高いDOが確認された。特に、水深13m付近（EL.114.5mに相当）にはSt. AとSt. Bの双方で前後の水深よりも高いDOが観測されたことから、WEPシステムによる酸素供給範囲が少なくともSt. B近傍まで波及していたと推察される。

次に令和3年7月2日、令和3年7月26日、令和3年8月24日、令和3年9月29日、令和3年12月24日に調査した際の多項目水質にて測定した水温の結果を図17に、DOを図18に示す。

令和3年7月2日は各地点で表層の水深0.5mから水深15mにかけて、ほぼ一定に水温が減少していた。St1.0およびSt1.5では、水深15m以深から水深25mでは緩やかに水温が減少していた。

7月26日以降は12月24日を除いて、水深10mから15mにかけて水温躍層が形成されていた。St2.5およびSt3.0は湖底までの水深が浅いため、水温躍層の途中で湖底に達していたが、St1.0およびSt1.5では、水深15m以深から水深25mにかけて、7月2日と同様に緩やかに水温が減少していた。

表層（0.5m）の水温は7月2日および7月26日は24～26℃、8月24日および9月29日は21～22℃であった一方、図16の通り令和2年度の8月20日は28～31℃と前年の方が表層の水温は高かった。さらに湖底付近の水温を見ても、令和3年度は水深25mでは

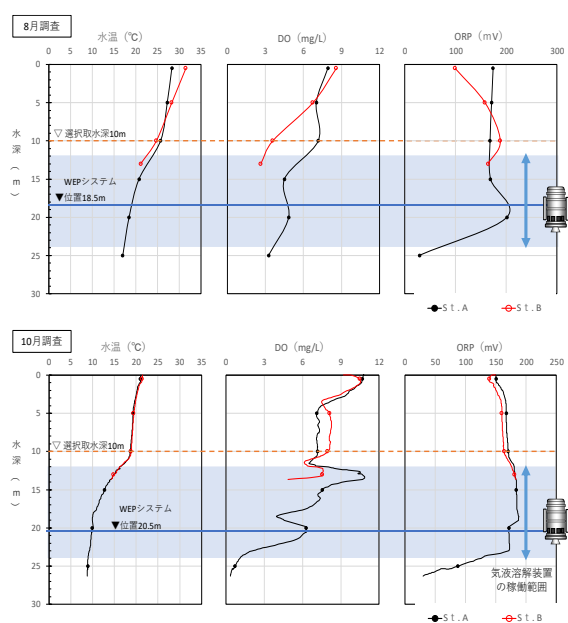


図16 令和2年度の水温、DO、ORPの現地観測結果

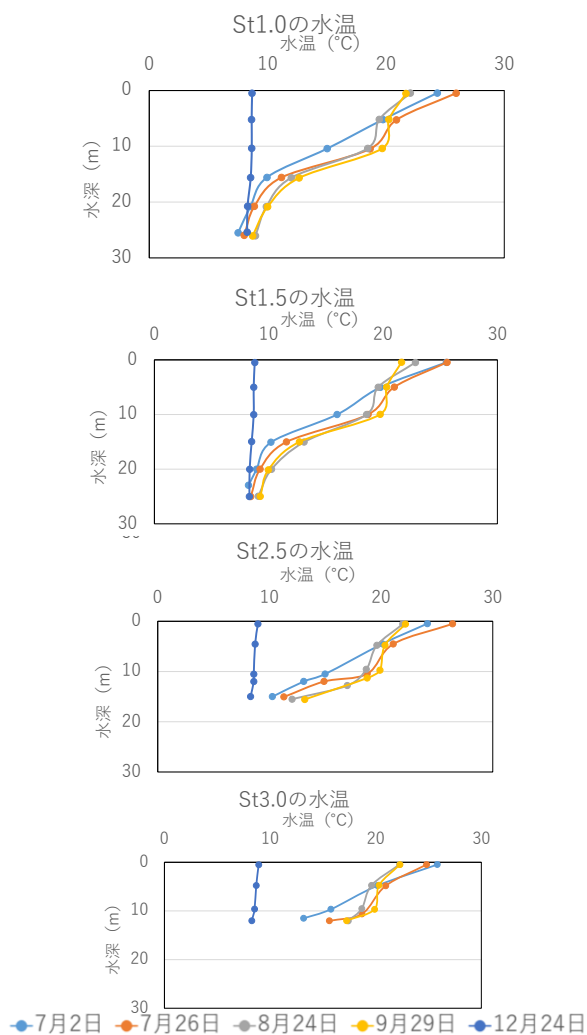


図 17 令和 3 年度の各調査地点の水温

8.0°C前後まで低下していたが、令和 2 年度の 8 月 20 日は水深 25 m でも 17.0°Cあり、令和 2 年度 8 月 20 日の水温分布は令和 3 年度よりも全体的に高かった。令和 2 年 10 月 5 日は表層 (0.5 m) で 21.0°Cで水深 25 m で 8.9°Cであり、令和 3 年 8 月 24 日および 9 月 29 日と似た挙動であった。12 月 24 日は鉛直方向の水温に変化はほとんどなく、全層循環となっていた。

DO に関して、St1.0 および St1.5 において 7 月 2 日から 9 月 29 日にかけての水温躍層形成時は、表層 (0.5 m) はおおよそ 10.0 mg/L 以上となっており、DO は過飽和となっていたが、水深 10 m にかけて DO は徐々に減少していった。これは表層では植物プランクトンによる光合成と大気からの酸素供給により、過飽和となっていた DO が、水深が深くなるにつれて、光量低下に伴う光合成活動の減少や従属栄養細菌等の働きにより減少していったものと考えられる。その後、水深 15 m 付近で大幅に DO は増加しているが、これは

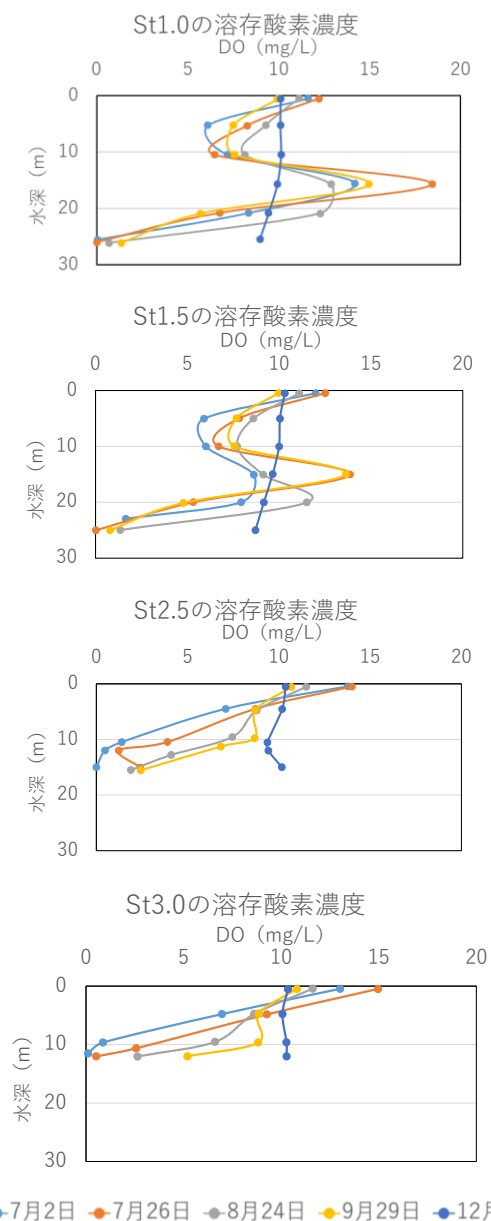


図 18 令和 3 年度の各調査地点における DO 濃度

WEP システムにより高濃度酸素水が供給された効果であると考えられる。しかし、水深 20 m 以下では急激に DO が減少しており、水深 25 m では多くの場合、1 mg/L 未満であり、貧酸素環境となっていた。ただし、9 月 29 日は WEP システムの稼働水位を 13 m から 25 m へ変更する日に採水しているの、25 m で稼働させた場合の効果が検証できていないと思われる。

St2.5 および St3.0 は WEP システムから 600 m 以上離れており、且つ、水深も浅いことから、St1.0 および St1.5 と比較するとはっきりした効果は見えない。しかし、St2.5 において水深 10 m 付近で 7 月 26 日および 9 月 29 日において DO が増加していることから、WEP システムによる高濃度酸素水の影響がわずかに見ら

れたが、一方で7月2日では湖底付近ではほぼ0 mg/L になっていることから、WEPシステムの遠方への効果は様々な環境条件によって変動するものであると考えられる。

12月24日は全層循環となっており、調査地点および水深が変わっても大きな差異はなかった。

4. 2. 2 窒素、リンについて

アオコやカビ臭を産生する有害藍藻類の増殖には窒素・リンに代表される栄養塩の存在が不可欠である。そこで、採水地点毎に窒素およびリンの濃度を測定し、表9に示した坂本(1966)が提唱したT-NおよびT-Pによる湖沼の栄養塩レベルの分類¹⁷⁾に従って、栄養塩状態の把握を行った。

表9 T-N、T-Pによる湖沼の栄養塩レベルの分類¹⁷⁾

	階級		
	貧栄養	中栄養	富栄養
T-N (mg/L)	0.02-0.2	0.1-0.7	0.5-1.3
T-P (mg/L)	0.002-0.02	0.01-0.03	0.03-0.1

令和2年度の窒素およびリンの測定結果を図19に示す。藻類は増殖に光合成が必要なため、表層の栄養塩に着目したところ、令和2年8月の試料では、St.AとSt.BともにT-Pは0.02~0.03 mg/Lであり、T-Nも0.3 mg/L程度であった。表9の分類に従うと、中栄養状態であったといえる。令和2年10月の試料もSt.AとSt.BともにT-Pは0.02~0.03 mg/Lであり、T-Nも0.5 mg/L程度であり、中栄養状態であった。

水深が深くなるにつれてT-N、T-Pともに濃度が増加する傾向にあり、湖底付近では大きく濃度が増加していたものもあった。特に令和2年8月のSt.Aの試料はT-N、T-Pともに濃度が大幅に増加しており、令和2年10月のSt.Aの試料のT-Nも大幅に増加していた。

各態窒素は、NH₄-Nとその他窒素(T-NからNO₂+NO₃-NとNH₄-Nを差し引いた値)は水深方向で増大傾向を示し、NO₂+NO₃-Nは表層0.5mと湖底直上1m(St.A水深25m、St.B水深13m)で低かった。St.Aにおいて、水深15m以深では、NH₄-Nが増加する傾向が確認され、水深25mではその他窒素も大幅に増加していた。これは、嫌気条件下において、タンパク質分解活性の高い嫌気性細菌属が優占し、それに伴い、タンパク質分解によって底質間隙中のNH₄-N濃度が増加・拡散¹⁸⁾、または、底泥中に溜まったガス泡が噴出し、直上水中にNH₄-Nが放出されること¹⁹⁾等によるものと推察されるが、詳細なメカニズムは不明

である。

各態リン濃度は、その大部分がその他リン(T-PからPO₄-Pを差し引いた値)であった。PO₄-Pは最大でもSt.A水深25mで0.007 mg/Lと低く推移していた。10月調査時の各態リン濃度も、その大部分がその他リンであり、PO₄-Pは最大でもSt.B水深10mで0.004 mg/Lと全地点で8月調査時よりも低濃度で推移していたことから、植物プランクトンは強いリン制限を受けていた可能性が考えられる。

次に、令和3年度の各調査地点におけるT-P濃度を図20に、T-N濃度を図21に示した。令和3年7月2日の表層試料では、T-Pは0.05~0.07 mg/Lであり、T-Nも1 mg/L程度であった。表9の分類に従うと富

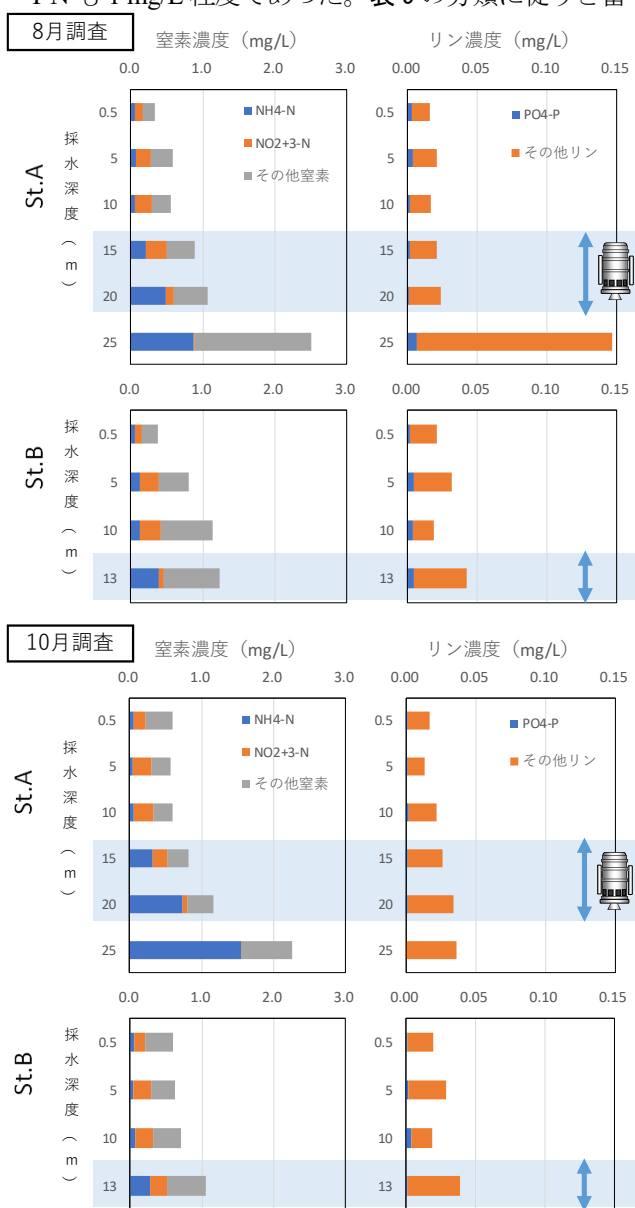


図19 令和2年度の窒素、リンの測定結果

栄養化状態であったといえる。7月26日および8月24日の表層はT-Pは0.03~0.04 mg/L、T-Nは0.4~0.6 mg/Lであり、7月2日から栄養塩濃度は減少して中栄養状態であった。9月29日および12月24日はT-Pは0.01 mg/L程度、T-Nは0.5 mg/L程度であり、貧栄養状態にまでT-Pは減少していた。このように季節に応じて、表層の栄養塩濃度は大きく変化していることが把握できた。

また、令和3年度も前年度と同様に湖底付近になるとT-N、T-Pともに濃度が上昇する傾向にあった。これも湖底付近が貧酸素環境になり、栄養塩の溶出が起きているものと考えられる。

4. 2. 3 実験結果と考察(金属分析について)

令和2年度の調査では、サンプル水中に含まれる金属について、総量と溶存態濃度をそれぞれ分析した。分析対象とした金属は、Mg、Al、K、Ca、V、Cr、Mn、

Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Ag、Cd、Sn及びPbの18項目であるが、これらのうちCr、Co、Zn、Cd、Sn及びPbの6項目については、全試料が定量限界もしくは検出限界以下であった。また、Mg、K、Ca及びVは全ての試料から検出されたが、地点間に明確な違いはなく、また大部分が溶解性であることから流水中に含まれるイオン成分を反映しているものと考えられる。したがって、特筆すべきMn、Fe、As濃度について整理した結果を図22に示す。Tは全量態、Dは溶存態を示している。いくつかの地点において、全量態よりも溶存態が高い値を示しているが、その理由は不明である。

8月調査時および10月調査時ともに、Mn、FeおよびAsは、貧酸素状態にあったSt. A水深25 mにおいて高濃度で検出されていた。このことは、底質からの溶出による影響を反映していると考えられる。また、水深20 m以浅では総量が大きく減少していた。これ

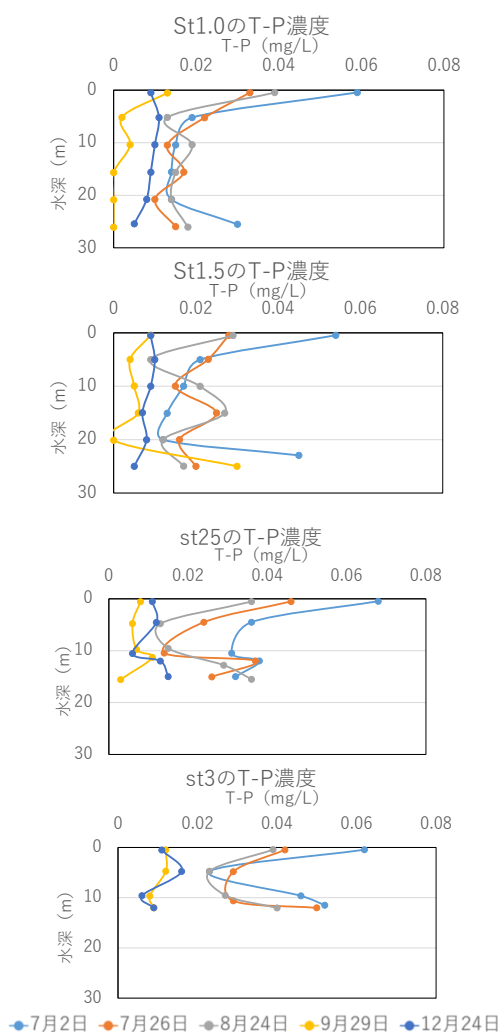


図20 各調査地点におけるT-P濃度

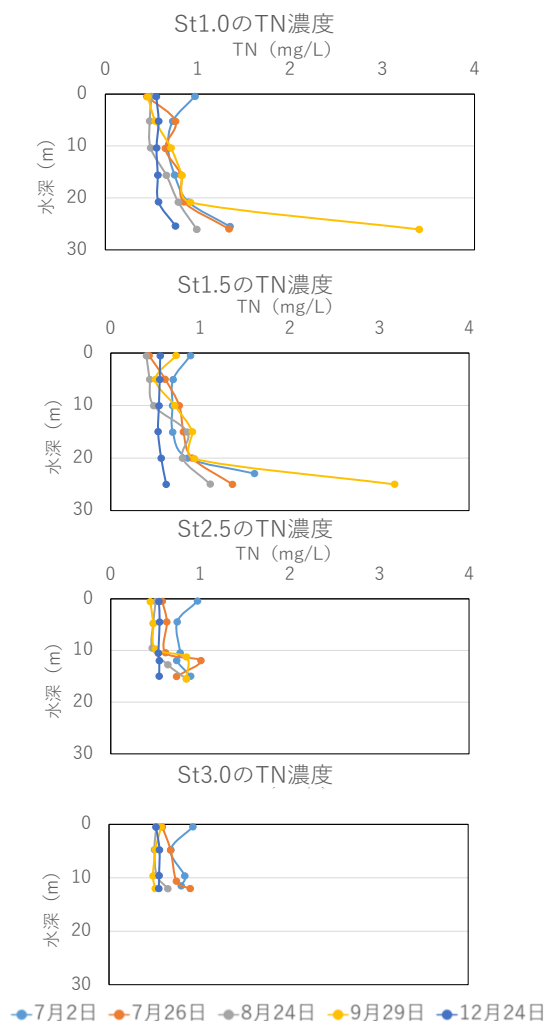


図21 各調査地点におけるT-N濃度

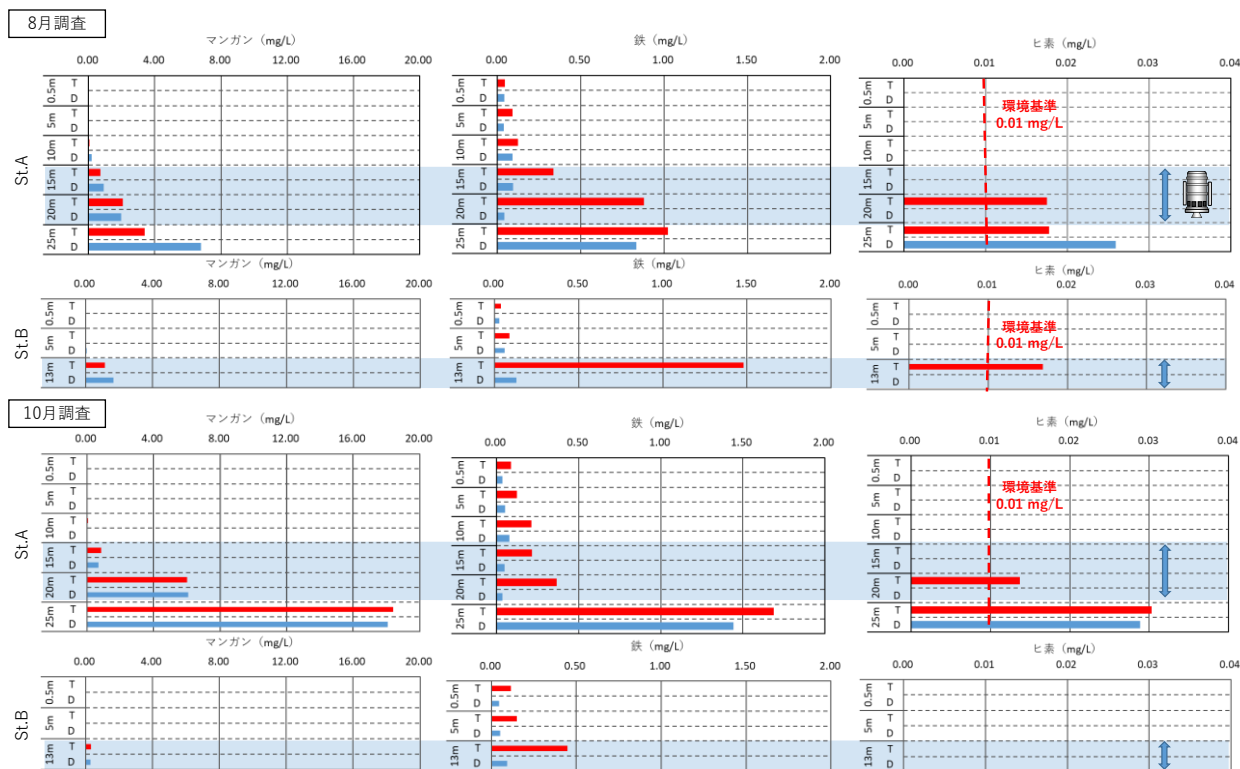


図 22 金属濃度測定結果

は、水深 20 m では DO が高く保持されているため、底質から溶出した金属イオンが上層側に拡散しても、酸化を受けて粒子態となり、速やかに沈降するためと推察される。また、Fe と As は水深 20 m ではほとんど溶解性成分が検出されなかったのに対して、Mn は溶解性成分が多く残存していた。これらの違いは、それぞれの金属イオンの酸化還元電位と物質間の吸着特性を反映しているものと考察される。すなわち、酸化還元電位が低く速やかに酸化される Fe は水酸化鉄となり、且つ、As は水酸化鉄に吸着・固定され共沈する一方、鉄より酸化還元電位が高い Mn は、鉄イオンの存在下においてイオン態として水中に残存していたと考えられる²⁰⁾。

4. 3 実験結果と考察(微生物解析)

4. 3. 1 顕微鏡との比較

光学顕微鏡での同定の結果、シアノバクテリア門は 2 種、植物プランクトンは 34 種、動物プランクトンは 32 種検出された。一方、同様の水試料の NGS による DNA 塩基配列解読では、データベース SILVA132_SSURef_Nr99 を用いた場合、細菌 2, 232 種 (うちシアノバクテリア門は 51 種)、古細菌 65 種、

植物プランクトン 347 種、動物プランクトン 767 種、分類不明種 13 種が検出された。また、前述のとおり、Excavata に含まれる *Euglena sp.* や *Trachelomonas sp.* は光学顕微鏡による同定では検出されるが NGS では検出されなかった。

光学顕微鏡で検出されたシアノバクテリア門は *Aphanocapsa* 属および *Aphanizomenon* 属であったが、これらも NGS では検出されていない。その理由として、形態学的に類似した種と誤認した可能性、または近年、遺伝子情報に基づく研究結果が加味され、藍藻類の分類が変更されていること²¹⁾や、検鏡と NGS の同定における参照データベースの違いが影響していると考えられる。そのため、検鏡の検出結果における *Aphanocapsa* 属は NGS ではミクロキスティス属²²⁾、同様に検鏡の検出結果における *Aphanizomenon* 属は NGS ではカスピドスリックス属²¹⁾に、それぞれ分類されたと考えられる。

4. 3. 2 16S rRNA 遺伝子 (古細菌・真正細菌)

令和 2 年度に実施した 16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析について門レベルで整理した結果を図 23 に示す。主な菌叢はプロテオバクテリア門、バクテロイデス門、ウェルコマイクロビウム門、放線菌門、

シアノバクテリア門、アルマティモナス門、プランクトミクス門であった。水深が変化すると、構成する門の割合が変化していた。

8月調査時、選択取水深度（10 m）より浅層側では独立栄養細菌であるシアノバクテリア門やアルマティモナス門が多く存在していた。アルマティモナス門は、2011年に提唱された新規の門であり、ウキクサやヨシなどの水生植物の根圏環境に多く生息していることが知られている²³⁾。そのため、増殖のために光が必要なシアノバクテリア門と共に浅層で多く存在していたものと思われる。その他に浅層側ではバクテロイデス門が多く存在していた。バクテロイデス門は幅広い代謝能力を持ち、特にタンパク質や多糖類の分解作用²⁴⁾が報告されている。また、有機体窒素をアンモニアへ変換し、微生物や水生植物に供給する²⁵⁾という点において、窒素循環の中で重要な役割があり、*Flavobacteria* や *Fluviicola* が優占していた。一方、下層側では従属栄養細菌が多く、その中でも γ プロテオバクテリア綱のメタン酸化能を有する *Methylobacter*、 β プロテオバクテリア綱の *Rhodoferrax* が特に多く存在していた。*Rhodoferrax* は鉄・マンガン酸化を担うことが報告されている。これらの細菌は一般的に、好気環境においてメタンや鉄・マンガン酸化を行う²⁶⁾ものである。本調査では貧酸素環境になる傾向にある下層側の試料から多く検出されており、WEPシステムの設置により、温度躍層より下層の溶存酸素が増えたことが大きな要因であると考えられ、WEPシステムが微生物叢に影響を与えていることが示唆された。底層付近（St.A 25 m）からは、メタン生成古細菌（*Methanomicrobia*）が検出されており、且つ、上記の通り、生成したメタンを利用するメタン酸化細菌（*Methylobacter*）も多く検出されていることから、湖沼における炭素循環において、WEPシステムはメタンの資化を増大させている可能性がある。即ち、細菌叢のみならず、物質循環にも影響を与えていると考えられるが、それらがどの程度の寄与であるかは不明であり、今後さらなる研究が必要である。また、全地点で比較的多く検出された放線菌（*Sporichthyaceae*）は、主に土壌に生息する細菌であり、流域の土壌から流入河川を通じてダム湖に流入した可能性が考えられる。

10月調査時の微生物叢の構成は、概ね8月調査時と類似していた。主な構成の変化としては、独立栄養細菌であるシアノバクテリア門およびバクテロイデス門の検出率が減少した一方、ウェルコミクロビウム門、およびプランクトミクス門の検出率は増加した。プラ

ンクトミクス門では、*Rubinisphaeraceae* 科に属す細菌が大きく増加していた。メタンをポリヒドロキシ酪酸に変換させる際に優占する細菌であり、メタン酸化細菌の *Methylocystis* とともに検出されることが報告されている²⁷⁾。10月調査時は *Methylocystis* も増加していることから、上記の反応によりポリヒドロキシ酪酸が生成されていることが示唆された。ウェルコミクロビウム門では *Terrimicrobium* が優占していた。この細菌は幅広い多糖類だけでなく、セルロース、キチン、キシランなどの難分解性の炭素源に対して、高い分解能を有している。即ち、植物、藻類、カイアシ類、真菌類等の細胞壁を構成する主要、且つ難分解性の物質の分解者²⁸⁾である可能性がある。

令和3年度に実施した16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析の結果を図24に示す。菌叢を構成する主要な門は令和2年度と同じであった。また、水温躍層形成期である7月から9月にかけては、令和2年度と同様に表層から底層にわたって、構成する門の割合が変化しており、水深が深くなるにつれて、メタン酸化機能を有する γ プロテオバクテリア綱が優占する傾向であった。

一方で、12月24日の試料は、採水地点や水深が変化しても菌叢の割合に変化が少なかった。これは気温が低下したことにより全層循環しているため、採水地点や水深が変化しても環境要因の変化が乏しいため

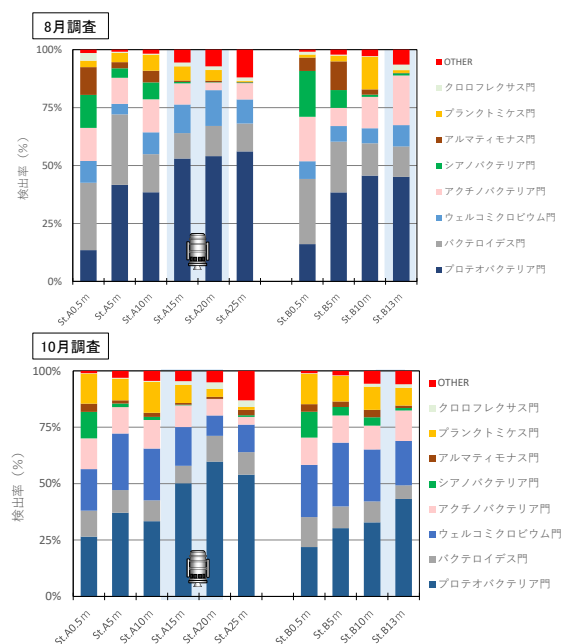


図23 令和2年度の16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析結果

であると考えられる。

7月2日の試料では、水深の浅いところではウェルコミクロビウム門の割合が著しく高く、水深が深くなるに従って、その割合が減少していた。ウェルコミクロビウム門の中では、*Terrimicrobium* とその近縁種が優占しており、一般的な微生物では分解の難しい細胞壁を構成するキシランなどの分解を担っていた可能性がある。

8月24日および9月29日の試料は表層（0.5m）ではバクテロイデス門の割合が増えており、水深が深くなると割合が減少していた。特に *Flavobacterium* や *Fluviicola* が優占していたが、令和2年8月も同様の傾向が観察されたことから、季節性を表している可能性がある。

このように季節や水深ごとの水質状況に応じて門レベルの菌叢は変化していることが把握できた。

また、令和2年度および令和3年度の藍藻類が属するシアノバクテリア門を見ると、令和2年8月20日のSt.Bの表層（0.5m）、令和3年7月26日の表層（0.5m）では16~18%程度であったが、その他の試料は全て10%未満であった。夏期に藻類が増殖するとシアノバクテリア門が30%以上を占めることは珍しいことではないため、シアノバクテリア門の増殖は全体としては抑制されていたと考えられる。次に、シアノバクテリア門の中の詳細な内訳について、属レベルでの把握を行った。

4. 3. 3 シアノバクテリア門(藍藻類)に属する細菌におけるカビ臭産生種の割合

このダムにおいて過去にジオスミンが高濃度に検出された際にドリコスペルマム属に属する細菌がジオスミン生産菌として報告されている。そこで、各試料におけるドリコスペルマム属を含むシアノバクテリア門を構成する細菌の存在割合について、令和2年度の結果を図25に示す。

8月調査時では全ポイントでシアノビウム属が優占していた。シアノビウム属はピコ植物プランクトンの一種で、アオコやカビ臭には直接関与しないが、高濃度により浄水場においてろ過障害などの問題を発生させることがあるので、注意が必要である。既往の報告では貧栄養湖から中栄養湖におけるピコ植物プランクトンの優占が報告されている²⁹⁻³⁰ことから、そのような環境が反映されていると考えられる。St.Aの水深25mからドリコスペルマム属が検出され、同時期にジェオスミンが40ng/L検出されていたことから、本種はこのダムの主なジェオスミン生産種であると

考えられる。

10月調査時では、St.Aの水深20mおよび25mを除き、シアノビウム属が優占していた。ミクロキスティス属がSt.Aの水深15mを除く全地点から検出され、特にSt.Aの水深20mおよび25mではシアノバ



図24 令和3年度の16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析結果

クテリア門の 80%前後を占めており、シアノバクテリア門を構成する細菌が変化していることが確認できた。ドリコスペルマム属は検出されなかったが、2-MIB 産生種であるシュードアナベナ属が全試料から検出され、特に St. A 水深 5 m~15 m、St. B 水深 5 m 以深において高頻度で検出された。同時期に 2-MIB が 4 ng/L 検出されていたことから、本種はこのダムの主な 2-MIB 産生種である可能性が考えられる。なお、光学顕微鏡での同定では、このシュードアナベナ属も他の 2-MIB 産生種も検出されなかったことから、NGS はカビ臭産生種を含むシアノバクテリア門を網羅的に検出し、相対存在比の増減を把握することができたため、カビ臭原因種を推定するために効果的な手法であることが確かめられた。

次に令和 3 年度のシアノバクテリア門を構成する細菌の存在割合結果を図 26 に示す。

7 月 2 日の試料では表層付近の 0.5 m および 5 m の水域においてマイクロキスティス属とドリコスペルマム属が多く検出され、水深が深くなるにつれてマイクロキスティス属の存在割合は減少しており、ドリコスペルマム属が優占するようになった。しかし、7 月 26 日以降、ドリコスペルマム属はほとんど検出されず、12 月 24 日にわずかに検出されたのみであった。

7 月 26 日の表層 (0.5 m) では上述の通りシアノバクテリア門の割合が増えているにも関わらず、ドリコスペルマム属は非検出となっており、一方で 7 月 2

日の試料では非常に少量しか検出されなかったシアノビウム属が急増していた。上述したように、貧栄養湖から中栄養湖におけるピコ植物プランクトンの優占が報告されている^{29,30}ことから、7 月 26 日以降、表層の栄養塩が減少したことを表した結果であると考えられる。

また、7 月 26 日以降、2-MIB を産生すると報告のあるシュードアナベナ属が検出されている。これらのことから、A ダムにおいて藍藻類の増殖が全体としては抑制されている傾向にあるが、藍藻類でカビ臭産生する種は継続的に発生しており、カビ臭産生する藍藻類の制御に向けたさらなる対策の検討が有用であると考えられる。

4. 3. 4 18S rRNA 遺伝子 (真核生物)

令和 2 年度の 18S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析の結果を図 27 に示す。8 月調査時は、ストラメノパイル(Stramenopiles)、アルベオラータ(Alveolates)、リザリア(Rhizaria)を含む系統群である SAR スーパーグループ、動物(Holozoa)、真菌(Nucleomyces)等を含むオピストコンタ(Opisthokonta)、及び緑藻、車軸藻類等を含むアーケプラスチダ(Archaeplastida)の検出率が高かった。SAR スーパーグループのうち、繊毛虫や渦鞭毛藻等を含むアルベオラータ(Alveolata)は、St. A では表層 0.5 m と水深 15 m から湖底直上となる 25 m で検出率が高く、水深 5 m と 10 m では他の水深に比べて大きく減少したのに対して、St. B では水深方向での顕著な違いは認められなかった。また、肉質鞭毛虫 (アメーバ鞭毛虫) 等を含むリザリア(Rhizaria)は、St. A と St. B ともに中層付近 (水深 5~20 m) で多く検出された。珪藻類や黄色鞭毛藻類等を含むストラメノパイル(Stramenopiles)は、St. A 水深 25 m からの検出率が低いものの、水深方向での明確な違いは認められなかった。オピストコンタは、その大部分がホロゾアエによって占められており、St. A と B ともに、表層側ではカイアシ亜綱やワムシ類の単生殖巣綱が多く、選択取水深度 (水深 10 m) 以深では襟鞭毛虫綱が多く検出される傾向があった。アーケプラスチダは、その大部分が緑藻綱によって占められており、St. A では表層から選択取水水深 (10 m) で多く検出されていたのに対し、St. B では表層の検出率が高いものの、水深 5 m と 10 m では少なく、湖底直上となる 13 m からは多く検出された。

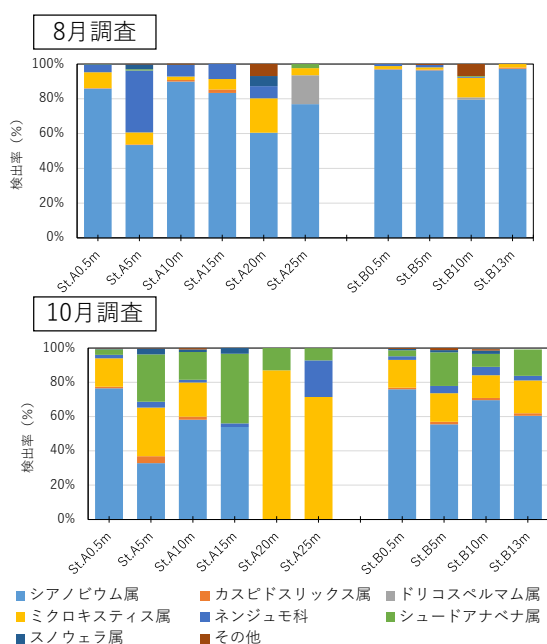


図 25 令和 2 年度のシアノバクテリア門の内訳

10月調査時は、SAR スーパーグループ、オピストコンタおよびアーケプラスチダ(Archaeplastida)の検出率が全検出率の90%を占めていた。SAR スーパーグループの検出率は、繊毛虫や渦鞭毛藻等を含むアルベオラータ(Alveolata)が8月調査に比べて減少傾向を示したのに対して、ストラメノパイル(Stramenopiles)の検出率は増加傾向を示し、特に St.A 表層 0.5m~水深 15m および St. B 全層で顕著であった。ストラメノパイルの検出率の増加は、主に珪藻綱 (Ulnaria 属及び Aulacoseira 属) のリード数の増加と一致していた。オ

ピストコンタは、8月調査に比べて、St .A 表層 0.5 m から水深 15 m、および St. B 全層においてホロゾアの検出率が大きく低減したのに対し、St. A 水深 20 m と 25 m では減少幅はわずかであった。この原因は、カイアシ亜綱や単生殖集綱のリード数が8月調査に比べて減少したのに対して、St. A 水深 20m と 25m では襟鞭毛虫綱のリード数は8月調査と同様に高く維持されていたことによるものと考えられる。アーケプラスチダは、St. A と St. B とともに表層 0.5 m で最も検出率が高く、深度方向に減少する傾向が認められた。

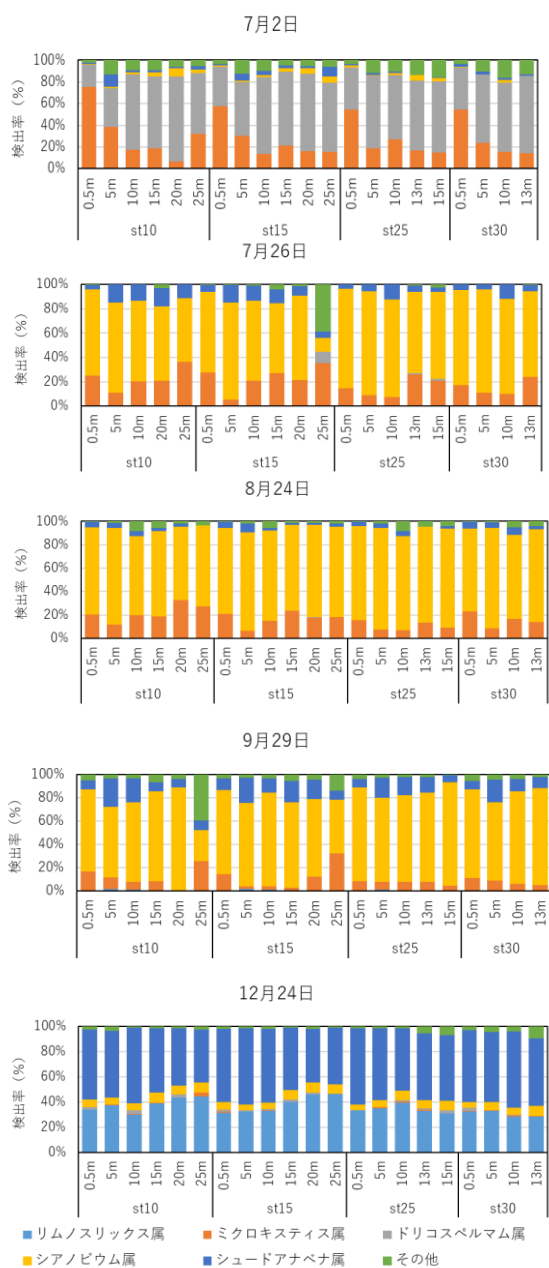


図 26 各試料中のシアノバクテリア門を構成する最近の割合

4. 3. 5 細菌叢比較

16S rRNA 遺伝子を対象とした検体間の微生物叢の類似度を Bray-Curtis 距離を用いた主座標分析結果により図 28 に示す。各試料における細菌・古細菌の群集構造は、第 1 軸により 20.99%、第 2 軸により 14.83% を説明することができた。

全層循環期である令和 3 年 (2021 年) 12 月の試料は、全て図の左上の所にプロットされていた。

一方で、水温躍層形成期の試料は、試料の水深が変わると同一日に採取した試料であっても、プロットされる位置は大きく変化していた。ただし、水深 25 m の試料は採取日が異なっても、図の左下の位置にプロッ

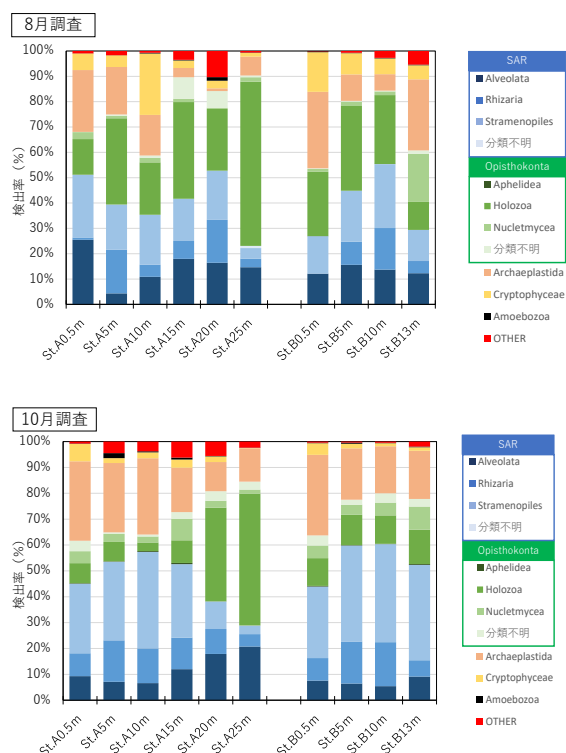


図 27 18S rDNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析

トが集中していた。その理由として、湖底直上で水塊が停滞し、且つ、貧酸素環境であることから、環境の変化に乏しく、微生物叢の変化も少なかったものと考えられる。水深が浅くなるにつれて、プロットの位置は図の右上に移動していく傾向にあった。ただし、令和3年(2021年)7月2日の表層(0m)試料は図の右下の方にプロットされていた。これらの試料にはジオスミンの生成報告のあるドリコスペルマム属が多く検出されていることから、高濃度にジオスミンを生成する細菌叢を主座標分析のプロットから予測できる可能性があるが、この点についてはさらなるデータの蓄積が必要である。

また、表層でジオスミンが非検出となった7月後半から8月、9月にかけて、プロットは左上に移動した。しかし、令和2年(2020年)8月20日と令和3年(2021年)8月24日のプロットや、令和2年(2020年)10月5日と令和3年(2021年)9月29日のプロットを比較すると、年度が違っても採取時期が似ていても、水温などの環境条件が異なるのであまり近くにプロットされておらず、菌叢全体としては類似度が低かった。

4.4 WEPシステムを導入しているダムにおける水質改善効果の確認のまとめ

本研究では、WEPシステムを導入しているダム貯水池において、WEPシステムの水質改善効果の確認を行った。その結果、WEPシステム設置点付近では、最下層で濃度が高かった溶解性のリンや鉄、マンガンが、WEPシステムの稼働範囲において、急激に濃度が減少

した。これはWEPシステムから供給される高濃度酸素水により、底層から溶出した溶解性のリンや金属が粒子化され沈降することで、表層への移動が制限され、表層では植物プランクトンは強いリン制限を受けていた可能性が示唆された。また、WEPシステムの効果は、約600m離れた地点においても波及していたことが示唆された。

一方、NGSによる微生物叢解析の結果、光学顕微鏡による同定結果と比べ、極めて多くの種類に分類することができた。さらに、光学顕微鏡では検出されなかったカビ臭産生種を含むシアノバクテリア門をNGSにより網羅的に検出することができた。これにより相対存在比の増減を把握することができ、カビ臭原因種を推定することができた。このことから、NGSは水質障害の原因種を特定するために効果的な手法であることが示唆された。また、下層部で好気性細菌が優占している、夏期の表層のシアノバクテリア門が抑制傾向にあるなど、WEPシステムが微生物叢や物質循環に影響を与えていることが示唆された。しかし、これがアオコやカビ臭の発生に与える影響については現時点では不明確な点も多く、今後、ダム貯水池においてNGSで検出される原核生物および真核生物を含めた詳細な検討を行う必要がある。

5. まとめ

本研究では、ダム貯水池水質モニタリングの効率化に資するNGS解析手法の開発に関して、既存のユニバーサルプライマーの塩基配列を一部変更することによりに既往のプライマーよりも網羅的にプランクトン類を検出でき、検鏡と同等以上の高度なモニタリングが可能であることが示唆された。機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に関して、ダム管理所から実務に用いた画像を収集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、認識率が0.73-1.00の分類モデルを作成することができた。今後は、質の高い訓練データ数を増やすことにより、認識率を向上させ、現場での導入を見据えた検討をしていく。WEPシステムが導入されているダム貯水池における水質改善効果のNGSを用いた検討について、光学顕微鏡では検出されなかったカビ臭産生種を含むシアノバクテリア門をNGSにより網羅的に検出することができた。これにより、相対存在比の増減を把握することができ、カビ臭原因種を推定することができた。さらに、本ダム貯水池ではシアノバクテリア門の検出割合は他の富栄養化が問題と

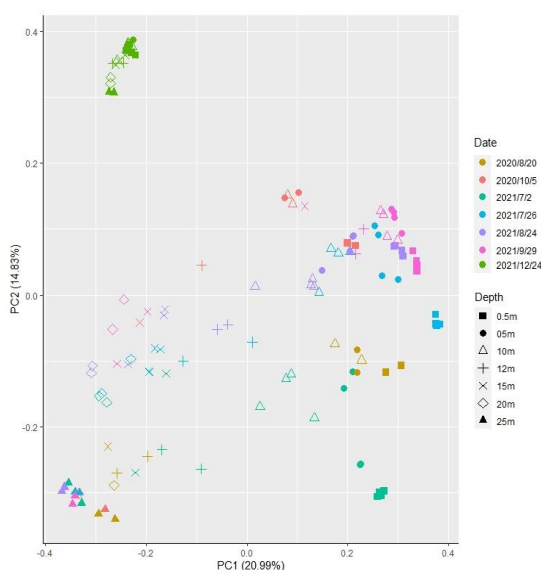


図 28 16S rRNA 遺伝子を対象とした主座標分析

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

なっているダム貯水池と比べ比較的安く、WEP システムによるシアノバクテリア抑制効果を示唆するような関連性も確認された。今後は、NGS の定量性を改善する手法やダム貯水池において NGS で検出される原核生物および真核生物を含めたダム貯水池における微生物間のネットワーク解析などの統計解析手法の検討を重ねることにより、効果的な水質管理に向けた研究を進めていく予定である。

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：ダム貯水池水質調査要領、pp.1-VII-7、2015年3月
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 對馬育夫、武田文彦、金子陽輔、南山瑞彦：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及び藻類増殖に関与する水質項目の影響評価）、平成 28 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. 15-20、2017
- 7) 對馬育夫、小川文章：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 29 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. 15-20、2018
- 8) 對馬育夫、小川文章：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、2020
- 9) 對馬育夫、山下洋正：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）、令和元年度 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. 24-29、2019
- 10) 對馬育夫、山下洋正：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）、令和 2 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. 27-38、2019
- 11) Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO: The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596, 2013
- 12) 玉木幸秀：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
- 13) 国土交通省：ダム貯水池水質改善に向けた気泡式循環施設マニュアル（案）～富栄養化対策のための気泡式（曝気式）循環施設に関する技術資料～、pp. 1-1-5-63、2021
- 14) 對馬育夫：ダム湖周辺の水環境改善に向けた植物プランクトン試験効率化システムの開発、令和 2 年度河川基金研究成果発表会 https://www.kasen.or.jp/Portals/0/pdf/_jyosei/%E9%85%8D%E5%B8%83%E8%B3%87%E6%96%99_%E3%82%B3%E3%83%BC%E3%82%B9%E2%91%A0.pdf（2021年6月アクセス）
- 15) 河川環境データベースウェブサイト「河川水辺の国勢調査 生物リスト」<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/seibutsuList.htm>（2021年6月アクセス）
- 16) Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, and Jian Sun. Deep residual learning for image recognition. In Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition, pp. 770-778, 2016.
- 17) Mitsuru Sakamoto: Primary production by the phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake depth. *Arch. Hydrobiol* 62:1-28, 1966
- 18) 今井章雄：湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究、平成 27 年度環境研究総合推進費 終了 成果 報告 書、https://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo_report/h27/pdf/5-1304.pdf（2021年6月アクセス）
- 19) 中菌孝裕、阿部千雅、鈴木譲：霞ヶ浦の底泥表層の巻き上げ時における栄養塩類と鉄・マンガンの溶出特性、EICA、14、pp.45-52、2009
- 20) 大脇哲生、星山英一、中田泰輔、村岡和満：高濃度酸素供給によるダム貯水池底層の重金属類の低減効果、環境システム研究論文発表会講演集、40、pp. 251-256、2012
- 21) 新山優子、辻彰洋：藍藻ネンジュモ目の浮遊性種の分類

- 学的変更と類似種の比較、陸水学雑誌、74 (3)、pp. 153-164、2013
- 22) 国立科学博物館標本・資料データベース「ダム湖の植物プランクトン」
<https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/dam/c2-1-0.html>
- 23) Hideyuki Tamaki, Yasuhiro Tanaka, Hiroaki Matsuzawa, Mizuho Muramatsu, Xian-Ying Meng, Satoshi Hanada, Kazuhiro Mori, Yoichi Kamagata: *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. Nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1442-1447, 2011
- 24) Ran Mei, Masaru K. Nobu, Takashi Narihiro, Wen-Tso Liu: Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses Revealed Uncultured Bacteroidales Populations as the Dominant Proteolytic Amino Acid Degradors in Anaerobic Digesters. *Front Microbiol.* 30:11-593006, 2020
- 25) Keiji Watabanbe, Tatsumi Kitamura, Yusuke Ogata, Chie Shindo, Wataru Suda: *Flavobacterium ammonificans* sp. Nov. and *Flavobacterium ammoniigenese* sp. Nov., ammonifying bacteria isolated from surface river water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 72: 005307, 2022
- 26) Kato and Ohkuma: A single bacterium capable of oxidation and reduction of iron at circumneutral pH. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00161-21>
- 27) Carlos R. Cattaneo, Yadira Rodríguez, Elson R. Rene, Octavio García-Depraect, Raúl Muñoz: Biogas bioconversion into poly(3-hydroxybutyrate) by a mixed microbial culture in a novel Taylor flow bioreactor. *J. Waster Manag.* vol. 150, no. 1, p.364-372, 2022
- 28) Pedro J. Cabello-Yeves, Rohit Ghai, Maliheh Mehrshad, Antonio Picazo, Antonio Camacho and Francisco Rodriguez-Valera: Reconstruction of diverse Verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs. *Front Microbiol.*8:2131, 2017
- 29) Naoshi Fujimoto, Keigo Mizuno, Tomoki Yokoyama, Akiko Ohnishi, Masaharu Suzuki, Satoru Watanabe, Kenji Komatsu, Yoichi Sakata, Naohiro Kishida, Michihiro Akiba, Satoko Matsukura: Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J. Gen Appl. Microbiol.* 61:171-176, 2015
- 30) 大久保智司: 分子生物学的手法で見えてきたシアノバクテリアの分布と多様性、植物科学の最前線(BSJ-Review)、1:43-56、2010

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、小川文章、南山瑞彦
 對馬育夫、服部啓太、末永敦士

【要旨】

本研究では、ダム貯水池における動植物プランクトンの省力かつ高度な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と適用ならびに機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に取り組んだ。第4期中長期研究計画期間中、ダム貯水池に存在する微生物（細菌、古細菌、植物プランクトン、動物プランクトン等）を、次世代シーケンサーを用い網羅的に検出する方法を確立した。また、機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発を進め、ダム管理所から実務に用いた画像を収集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、訓練画像の質や枚数、組み合わせに応じて認識率が向上する分類モデルを作成することが可能になった。さらに、高濃度酸素溶解装置（WEP システム）が導入されているダム貯水池において、次世代シーケンサーによる詳細な微生物叢データを取得することで、環境改善効果の指標となるカビ臭産生細菌の分布や推移を把握することが可能となった。

キーワード：ダム貯水池、プランクトン、次世代シーケンサー、自動画像分類、WEP システム

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、環境基準設定地点の約 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⁾。ダム管理者は、水質改善対策を実施し、その影響の軽減・解消に努めているが、課題解決には至っていない場合もある。

水質異常時に原因種を特定し有効で効果的な対策を実施するため、ダム貯水池における動植物プランクトン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⁾ため、平常時における優占種の把握も欠かせない。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、ダム管理者は、「ダム貯水池水質調査要領³⁾」及び「河川水辺の国



写真1 次世代シーケンサー(NGS)外観

勢調査マニュアル【ダム湖版】⁴⁾に準じ、定期的を実施しているが、そのモニタリング方法に関して、DNAに着目した新たな技術や AI 画像識別技術を導入することにより、目的に応じたモニタリングの省力化や高度化が可能となると考えられる。現在、動植物プランクトンのモニタリングは、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われている。しかしながら、光学顕微鏡を用いた同定には、熟練した技術が必要な上、対応できる技術者も年々減少傾向にある。また、熟練者で

あっても、形態が似通ったプランクトンの同定は非常に困難で個人差が大きいといった問題点がある。さらに、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、光学顕微鏡で同定できる種は非常に限られている。

一方、近年、ゲノム解析技術の急速な発展により、次世代シーケンサー（New Generation Sequencer：以下「NGS」という。）（写真1）を使った大規模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てきていることから⁵⁾、本研究では、ダム貯水池におけるプランクトン等のモニタリングに本手法を適用することにより上述の課題を解決することを目的としている。また、近年、発達が目覚ましいAI技術を取り入れ、動植物プランクトン画像の自動判別技術の開発にも取り組んだ。さらに、高濃度に酸素を溶解させた水を深層に供給できる気液溶解装置（以下、WEPシステム）が導入されているダム貯水池において、NGSを用いた微生物叢を含む詳細な水質を把握することで、WEPシステムによる水質改善効果の確認を行った。これらの新技术を導入することにより、従来のモニタリングでは捉えられなかった詳細な微生物叢を把握することで、水質の維持管理に有効な方法の提案に資する知見を得ることが期待される。

2. NGSを用いた簡易的な藻類モニタリング手法の開発

平成28-29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。平成30年度は、真核生物が持つ18S rRNA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。令和元年度は、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。その際、顕微鏡では観察されたがNGSでは検出されなかった種が明らかになったため、令和2~3年度は、解析条件の見直し、改善策の検討を行った。本項目では、主に、調査に適したユニバーサルプライマーの選定、ダム貯水池での適用例、検鏡結果との比較、プライマーの網羅性向上に関する検討について報告する。また、詳細は過去の報告書⁶⁻¹⁰⁾も参考にされたい。

2.1 実験方法

2.1.1 NGSによる塩基配列解読

本項目では、NGSを用いた一連の実験手法および解析についてまとめる。なお、ここで記述する方法は淡水であるダム貯水池に適した場合であり、塩水が混じる汽水湖や下水処理場を対象とする場合には、より適した方法が別に存在するため留意が必要である。

採水した水試料は、500 mLを0.2 μm フィルターでろ過し、STE バッファー（10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH8）30 mLにフィルターを一晩浸漬させた後、激しく混合することにより、フィルターに捕集された残渣を剥離させた。その後、遠心分離（3,000 gで20分間）で上澄水を除去し、全体量が0.5 mLになるまで濃縮した。濃縮した懸濁物は、Nucleo Spin® Soil（MACHERY-NAGEL）を用いてDNAを抽出した。詳細な手順は使用したキットのマニュアルに従った。特に、アオコ発生時には、DNA抽出液にPCR阻害物質が残留し、PCRでDNAが十分に増幅されない場合があるので、DNA抽出液の精製を入念に行う必要がある。DNA抽出後は、蛍光光度計を用い、蛍光試薬を使用してDNA濃度の測定を行った。

ライブラリ調整として、Amplicon PCR、PCR産物の精製、Index PCR、その後、再度、PCR産物の精製を行った。PCR反応条件は初期変性を94°Cで30秒間行った後、乖離温度を94°Cで5秒間、アニーリング温度を60°Cから58°Cで30秒間に設定し（アニーリング温度は使用するプライマーによって変更）、10サイクル毎に1°C下げるタッチダウン方式を採用し、伸長温度を72°Cで30秒間に設定し、合計30サイクル行った。PCR増幅産物はAMPure XP kit（Beckman Coulter Genomics）を用いて精製した。

DNAシーケンシングにはMiseq reagent Kit v3（600サイクル、Illumina）を用い、塩基配列を決定した。解析で得た各リードの分類および統計処理はQIIME2（version2020.2）を用い、参照データベースは主にSILVA132₉₇¹¹⁾を用いた。

2.1.2 網羅的検出のためのプライマーの選定

本研究では、より網羅性の高いプライマーを選定するため、既往のプライマーセット（表1）を候補として選定した。それらのプライマーの網羅性を確認するため、塩基配列情報が記載されているデータベースSILVA132（表2）を用いた。各分類（門及び一部綱等を含む）の配列登録数に対して、プライマーの配列と適合する登録数を確認した。表2の登録数のうち、どの分類においても100%に近く適合するプライマーが最も網羅性の高いプライマーであると考えられる。PCRにはフォワードプライマー及びリバースプライ

表 1 本実験で用いたプライマーセット

プライマー名	プライマー配列(5'-3')
16S rRNA遺伝子	
Bac341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
Bac850R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
Pro341F	CCTACGGGNBGCASCAG
Pro850R	GACTACNVGGGTATCTAATCC
Pro341F(modi)	CCTACGGGWGCWSCAG
Pro850R(modi)	CACTACNVGGGHTHTCTAATYC
18S rRNA遺伝子	
TAReuk454	CCAGCASCYCGGTAATTC
TAReukREV3	ACTTTCGTCTTGATYRA
TAReukREV3(modi)	RCTYWSRTYCTTGATYRR
SSU-F1	TAYCTGGTTGATYCTGCCAGT
SSU-R568	TGCTGGCACCAGACTTGCCCT
SSU-F1289	TGGAGYGATTTGTCTGGTTDATTCCG
SSU-R1772	TCACCTACGGAAACCTGTTACG

表 2 本実験で用いたデータベースにおける各分類における配列登録数

分類	データベース登録数	分類	データベース登録数
Bacteria		Bacteria	
Acidobacteria	14,534	Betaproteobacteriales	43,156
Actinobacteria	60,510	Gammaproteobacteria	119,171
Armatimonadetes	752	Deltaproteobacteria	15,396
Bacteroidetes	55,663	Epsilonbacteraeota	5,422
Chloroflexi	9,245	Archaea	
Cyanobacteria	13,970	Euryarchaeota	12,957
Elusimicrobia	435	Crenarchaeota	4,611
Firmicutes	149,757	Eukarya	
Fusobacteria	2,216	Amoebozoa	867
Gemmatimonadetes	2,185	Archaeplastida	13,111
Hydrogenedentes	271	Centrohelida	93
Nitrospirae	1,297	Cryptophyceae	364
Patescibacteria	4,521	Excavata	1,326
Planctomycetes	9,014	Haptophyta	370
Spirochaetes	4,253	Incertae Sedis	237
Synergistetes	1,152	Opisthokonta	41,748
Tenericutes	2,561	Stramenopiles	4,329
Verrucomicrobia	4,419	Alveolata	11,651
Alphaproteobacteria	60,871	Rhizaria	3,376

マーが必要であるため、それらプライマーの相補配列と完全に一致する条件 (FOR0 と記載) およびそれぞれ 1~2 ミスマッチを許容した条件で抽出を行った (例えば、F1R2 は、フォワードプライマーに 1 塩基ミスマッチ、リバープライマーに 2 塩基ミスマッチを含む条件で抽出を行ったことを意味する)。それぞれの分類に含まれる配列登録数から抽出された配列数の割合

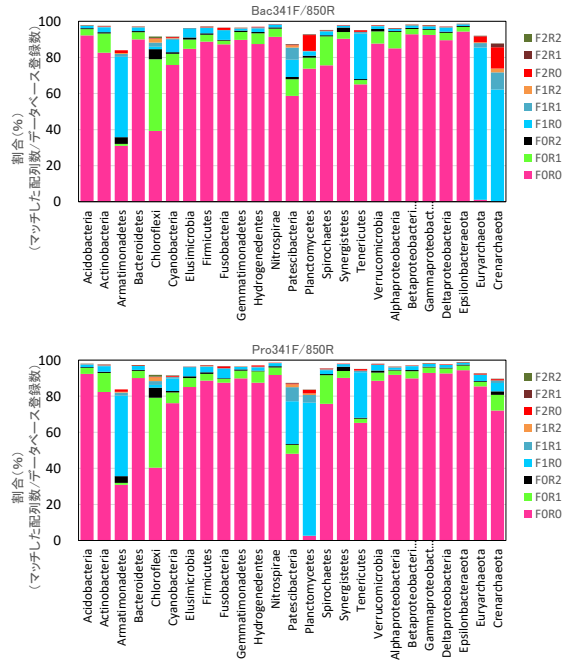


図 1 原核生物を対象としたプライマーの適合率の比較

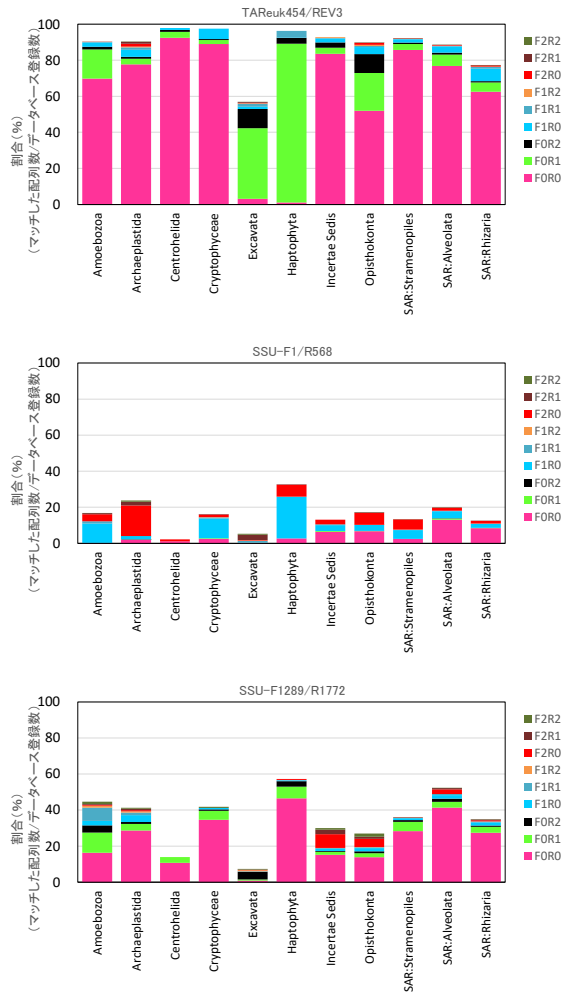


図 2 真核生物を対象としたプライマーの適合率の比較

(適合率)の合計をカバー率とした。

2. 1. 3 NGS と光学顕微鏡による検鏡結果の比較

NGS による塩基配列解読及び光学顕微鏡による検鏡試験の結果を比較するため、上記で選定したプライマーセットを用い、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) を対象に実験を行った。

NGS による実験方法は上述の通りである。一方、光学顕微鏡による同定は、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った。分析方法は「河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】⁴⁾」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。これらの結果を基に、プライマーの改良を行った。

2. 1. 4 プライマーの改良

通常、PCR 増幅において数ミスマッチ程度であれば増幅される場合もあるが、本研究で用いたプライマーとその実験条件では、Excavata が検出できなかった(結果は後述する)。したがって、モニタリングの観点で重要な網羅性の向上のため、原核生物および真核生物用のプライマーの塩基配列を一部改変することで、カバー率の向上を試みた。塩基配列を一部改変したプライマーは表 1 の(modi)と表記したプライマーである。このプライマーについて、2. 1. 2 と同様の方法によりプライマーの網羅性を確認した。また、購入した分離株である Excavata に属する *Euglena* sp. (NIES-2345 株) を環境試料に添加し、2. 1. 1 と同様の方法により NGS による検出を試みた。

2. 2 結果と考察

2. 2. 1 原核生物(16S rRNA 遺伝子)を対象としたプライマーの網羅性

細菌 (Bacteria) および古細菌 (Archaea) をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子を対象とした場合の各分類に対するカバー率を図 1 に示す。Bac341F/850R では、0 ミスマッチ (F0R0) の場合、Archaea である Euryarchaeota および Crenarchaeota が適合した割合はそれぞれ 1.1%、0.1%と小さくほとんどの種が検出されないという結果だった。一方、Pro341F/850R では、Euryarchaeota および Crenarchaeota の適合率は 85.5%、72.0%と Bac341F/850R と比較し高いものの、Patescibacteria や Planctomycetes については、48.1%、2.5%と低い結果となった。また、Chloroflexi や未分離種を多く含む Armatimonadaetes に関しては、どちらのプライマーセットも適合率はそれぞれ 39.2%~40.4%、

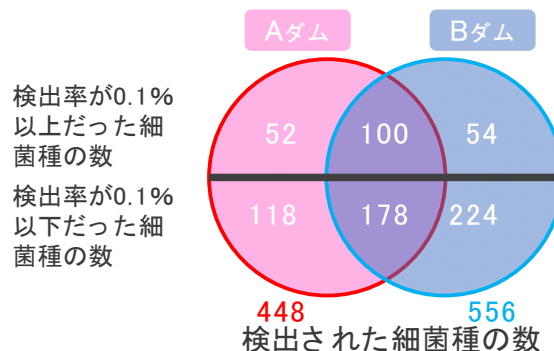


図3 NGSで同定された各ダムにおける細菌種数

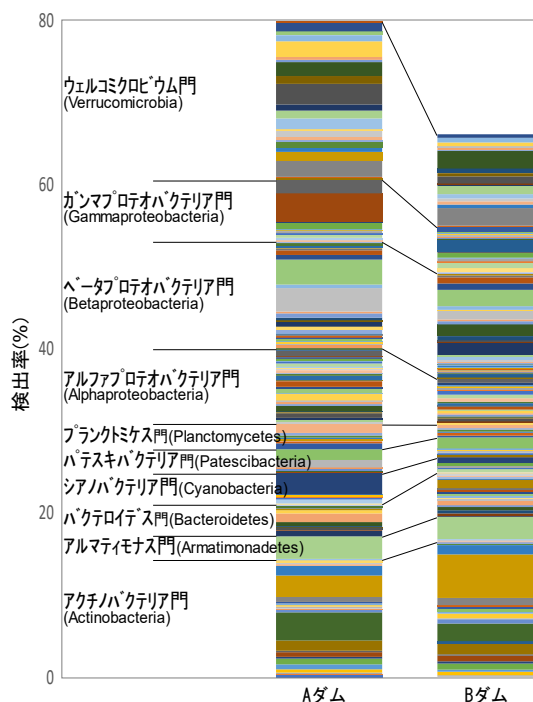


図4 NGSで同定された各ダムにおける細菌構成

30.9%~31.0%と他の門と比べ低かった。2 ミスマッチまで許容した場合、どちらのプライマーセットでもカバー率は全体として 95%まで向上した。ダム貯水池水質を考える上で、古細菌に分類されるメタン生成古細菌やアンモニア酸化古細菌の把握も重要になるため、本研究では、Pro341F/850R を選定し実験に用いた。

2. 2. 2 真核生物(18S rRNA 遺伝子)を対象としたプライマーの網羅性

真核生物 (Eukarya) をターゲットとした 18S rRNA 遺伝子を対象とした場合の結果を図 2 に示す。TAReuk454/REV3 の組み合わせにおいて、0 ミスマッチ (F0R0) の場合は 63.1%、2 ミスマッチまで許容した場合は 92.2%だった。また、SSU-F1/R568 の組み合

わせにおいて、0 ミスマッチの場合は 4.2%、2 ミスマッチまで許容した場合は 51.5%、SSU-F1289/R17720 の組み合わせにおいて、0 ミスマッチの場合は 24.0%、2 ミスマッチまで許容した場合は 24.8%だった。したがって、TAReuk454/REV3 の組み合わせがダム貯水池の真核生物の検出には最も適していることが示唆され、本研究で実験に用いることにした。ただし、TAReuk454/REV3 の組み合わせでは、Excavata (エクスカバータ) や Haptophyta (ハプト藻類) のカバー率は、FOR0 では、それぞれ 3.2%、1.1%と低かった。F2R2 まで許容した場合でも、Excavata は 57%までしかカバーしないため、後述するミドリムシ藻 (ユーグレナ藻) の状況把握には留意が必要であることが明らかとなった。

2. 2. 3 NGS で同定された細菌 (原核生物、16S rRNA 遺伝子)

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 68 万種の DNA 配列データが登録されているデータベース (原核生物: 約 60 万種、真核生物: 約 8 万種) と照合し、それぞれのリードと種を紐づける作業を行った。その結果、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 3)。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。NGS を使うことで、検出率 (データベースに登録されたある配列に一致したリード数/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 4 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。各積上げ領域は、検出された種を示している。門レベルの比較において、各ダム間で構成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¹²⁾。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、つまり、溶存メ

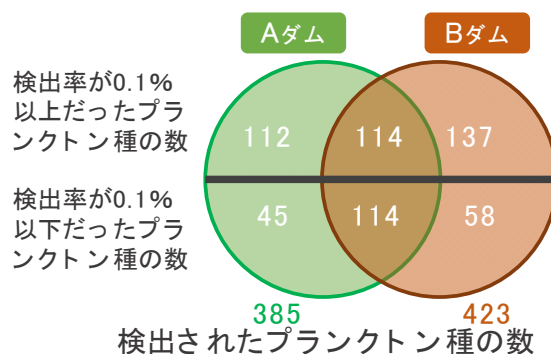


図5 NGSで同定された各ダムにおける

プランクトン種数

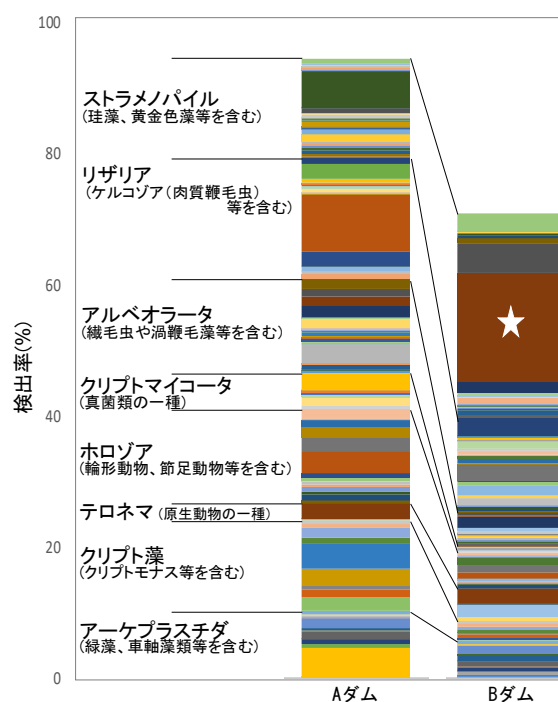


図6 NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン構成

タン濃度が高い状態になっていることが示唆された。また、データは示さないが、A ダムの底層からはメタン生成古細菌が年間を通じてほとんど検出されないが、一時的に酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta* sp. が比較的多く検出された時期があった (検出率として 2.0%程度)。 *Methylobacter* sp. の増加はこの影響を受けている可能性が考えられる。一方、アオコやカビ臭の原因となるシアノバクテリアは検出されず、光学顕微鏡では分類が困難なピコプランクトンの一種であるシネココッカスに近縁な種 (*Synechococcus* sp.) が多数検出された。

表3 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	
シアバクテリア綱	<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

2. 2. 4 NGSで同定されたプランクトン（真核生物、18S rRNA 遺伝子）

細菌と同様、試料に含まれるプランクトン由来のDNA配列を解析した。その結果、Aダム及びBダムから約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423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、Bダムの方が若干多い結果となった（Aダム:226種、Bダム:251種）（図5）。図3および図5から、近接するダム貯水池間でも共通して検出される細菌・プランクトン種はそれほど多くなく、固有の微生物叢を形成していることが示唆された。図6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。Bダムには別の支流からの流入もあり、

そのため、構成される種数が多くなっている可能性が考えられる。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%と卓越して検出された（図6の☆印）。ニセコアミケイソウは淡水域から汽水域にかけて広く検出され、比較的富栄養化が進んだ水域で多く見られるプランクトンである。

2. 2. 5 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り同定された種とそれらのNGSによる検出状況の比較を表3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。NGSでは、細菌を726種、プランクトンを580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

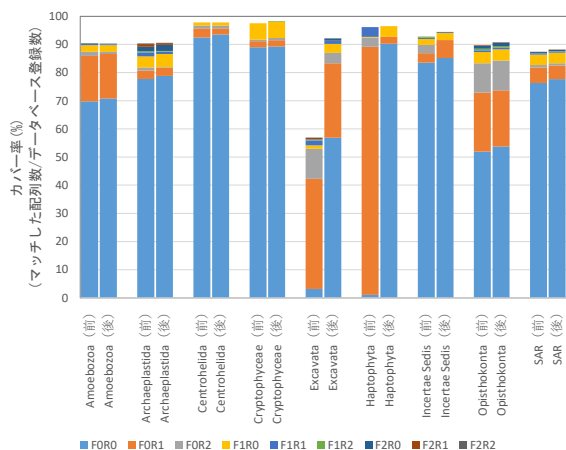


図7 改良前後のプライマーによるカバー率の比較 (真核生物)

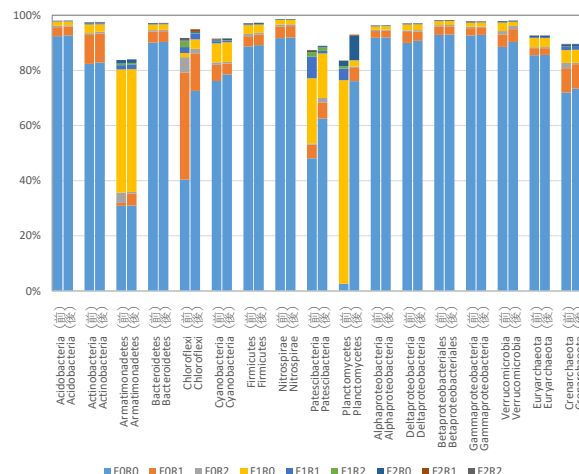


図8 改良前後のプライマーによるカバー率の比較 (原核生物)

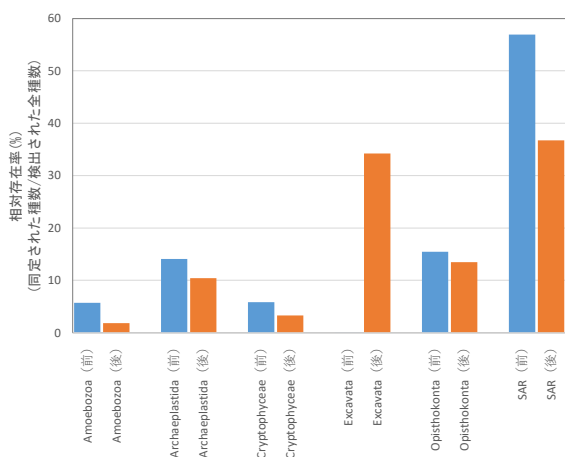


図9 改良前後のプライマーによる検出率の比較 (真核生物)

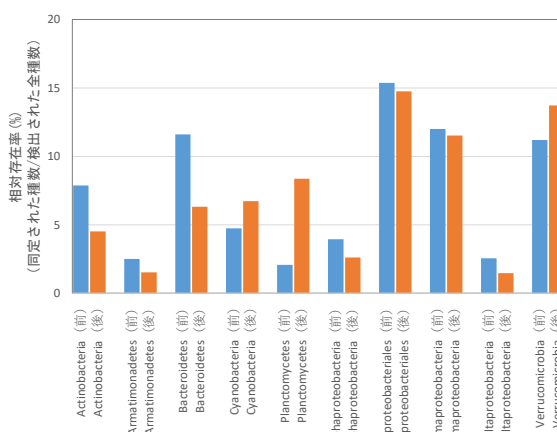


図10 改良前後のプライマーによる検出率の比較 (原核生物)

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、*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。また、ミドリムシ藻（ユーグレナ藻）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。これは、本研究で使用したプライマーでは、図2に示すように *Trachelomonas* sp. が分類されている *Excavata* をほとんど検出しないためであると考えられる。

2.2.6 プライマーの改良

改良前後のプライマーによるカバー率を比較した結果、真核生物を対象とした結果を図7に、原核生物を対象とした結果を図8に示す。真核生物を対象としたプライマーでは、改良前の *Excavata* のカバー率は、0 ミスマッチの場合は、3.2%、2 ミスマッチまで許容しても 56.9% と他のグループと比較して著しく低い値であった。一方、改良後の *Excavata* のカバー率は、0 ミスマッチの場合は 56.9%、2 ミスマッチまで許容し

た場合は 92.2%と大幅に向上させることができた。また、同時に、淡水湖沼では検出されることは少ないが海水では頻りに検出される Haptophyta の 0 ミスマッチ時のカバー率も大幅に向上させることができた。原核生物を対象としたプライマーでは、改良前の Planctomycetes のカバー率は、0 ミスマッチの場合は、2.5%と他のグループと比較して著しく低い値であった。また、2 ミスマッチまで許容した場合は 83.6%と他のグループと比べ若干低い程度であった。一方、改良後の Planctomycetes のカバー率は、0 ミスマッチの場合は 71.6%と大幅に向上させることができた。

改良後のプライマーによる NGS での検出を試みた結果、改良前のプライマーでは検出されなかった Excavata が検出されたことを確認した (図 9)。また、Planctomycetes の相対存在率 (同定された種数/検出された全種数) が 2.1%から 8.4%に増加した (図 10)。プライマーの網羅性向上により、これまで検出されなかった細菌も検出されるようになった。

2. 3 NGS を用いた簡易的な藻類モニタリング手法の開発のまとめ

本項目では、NGS を用いた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のモニタリング手法の開発について報告した。NGS はミドルスペックの機種でも、一度の解析で、96 サンプルを同時に解析でき、合計で約 150 億もの塩基配列情報を取得することができる。これまで顕微鏡による同定では困難だった網羅的な微生物叢の把握が手軽にできるようになった。本研究においても、プライマーを改良することにより NGS は検鏡と同等以上にプランクトン類を網羅的に検出できることが示唆された。また、後述するが、光学顕微鏡では検出されにくいシアノバクテリアについても、NGS を使うことで多数検出可能であるとの結果を得ている。水質変化予測に活用することも見込まれ、ダム貯水池の効率的な水質の維持管理への貢献が期待される。また、本研究成果の一部は「ダム貯水池水質改善に向けた気泡式循環施設マニュアル」¹³⁾にも反映されている。

3. プランクトン自動判別技術の開発

検鏡によるプランクトン同定の効率化を図るため、自動画像認識技術による動植物プランクトンの判別技術の開発に取り組んだ。本技術が確立されれば、ダム管理事務所等において、より安価で高頻度にモニタリングを行うことが可能となる。また、浄水施設や下水処理での試験にも活用されることが予想され、汎用

表 4 除外対象データ

対象	効果
重複画像	過学習を防ぐ
つぎはぎのある画像	つぎはぎの直線の特徴として捉え、直線の特徴とするクラスと誤分類してしまうのを防ぐ
文字入り画像	文字を特徴と捉えてしまうのを防ぐ
複数種が混合している画像	他クラスの特徴を学習してしまうのを防ぐ
写る面積が小さい画像	特徴が捉えられないため、テストデータに混ざると正答率が下がるのを防ぐ
過度にスケールが違う画像	プランクトンは拡大すると網目状になっているものが多く、全体像としての形状は異なるにも関わらず同種と分類されてしまう問題を防ぐ

性は極めて高いと考える。研究着手にあたり、令和元年度は、国内のダム貯水池において頻りに検出される 19 種の植物プランクトンについて、インターネット上から収集した画像を用い、機械学習による画像分類を試みた。令和 2-3 年度は、ダム管理所から実務に用いた画像を収集し、機械学習による画像分類システムの性能向上を試みた。本項目では、主に、実務に用いた画像を収集し、機械学習による画像分類システムに関する検討について報告する。また、詳細は過去の報告書等も参考にされたい^{9-10 および 14)}。

3. 1. 実験方法

3. 1. 1 画像データ収集と選定

R1 年度は「河川水辺の国勢調査のための生物リスト」¹⁵⁾の中からダム貯水池で頻りに検出される 102 種を抽出し、さらに、水質管理に重要な種、形状の似た種等を考慮し、対象を 19 種に絞りこみ、インターネット上から画像を収集してデータセットを作成した。令和 2-3 年度は、国交省直轄ダムおよび水資源機構ダムから定期モニタリングで取得する直近 1~6 年分のダム貯水池水質調査要領「様式 1-1-14 定期調査 動植物プランクトン写真票」に準ずる画像データを収集した。また、*Microcystis aeruginosa* に関しては、実験室にて顕微鏡画像を 500 枚以上取得した。本報告書では、その中からダム貯水池で比較的良好に検出される動物プランクトンであるスナカラムシ属とハネウデワムシ属

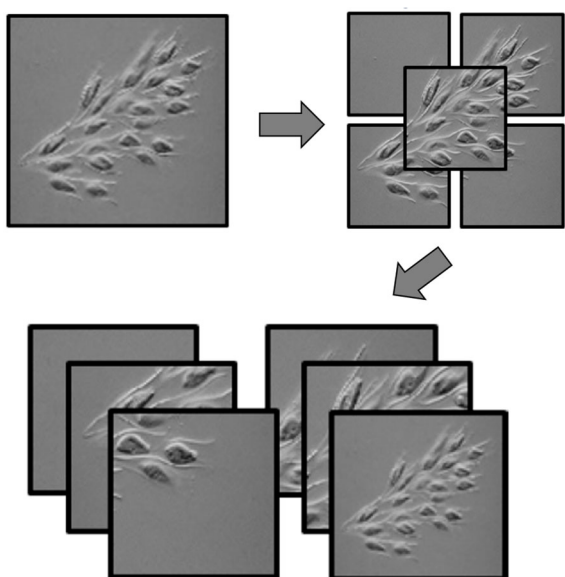


図 11 分割と切り抜きによるデータ拡張の例

の組み合わせや形状が類似している珪藻類のコアミケイソウ属と藍藻類のマイクロキスティス属を選定し、機械学習を行った。

3. 1. 2 データの事前処理 (クレンジング)

データクレンジングとして、データセットの中学習に悪影響のあると思われる種々の画像を除外した。除外対象データを表 4 に示す。

3. 1. 3 データ拡張

今回用意したデータセットは1プランクトン種 (クラス) 平均約 100 枚と少ないため、データの拡張を行った。元画像を縦横 2 倍に拡大したものに対して、縦横に 4 分割した画像と中央部分を切り抜いた画像を作成し (図 11)、これに元画像を加えた計 6 種類の画像を作成し、データを拡張した。この処理により、学習させる画像数を増やすだけでなく、微細な特徴に着目させ効率的に学習させることが期待できる。また、この処理により生じる画像に対しても上記のクレンジングを行う。さらに、画像を 90°、180°、270°回転させ、拡張を行った (図 12)。実際に、光学顕微鏡を用いてプランクトンを撮影する際は、様々な向きで撮影されるため、回転を加えることで汎化性を獲得できる。

3. 1. 4 グレースケール化

プランクトンの種判別は、形状による分類が主であり、色に頼らなくとも識別可能であると考えられるため、画像はすべてグレースケール化を行った。グレースケール化には学習速度向上の利点もある。

3. 1. 5 分類モデル

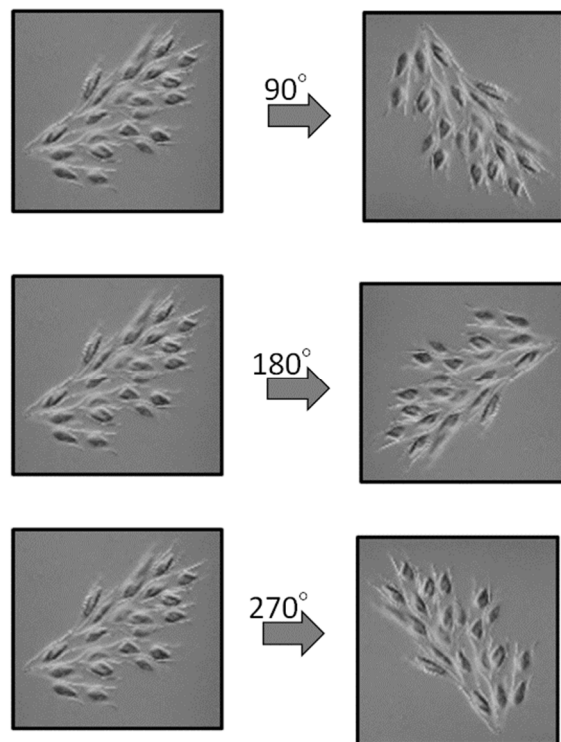


図 12 回転によるデータ拡張の例

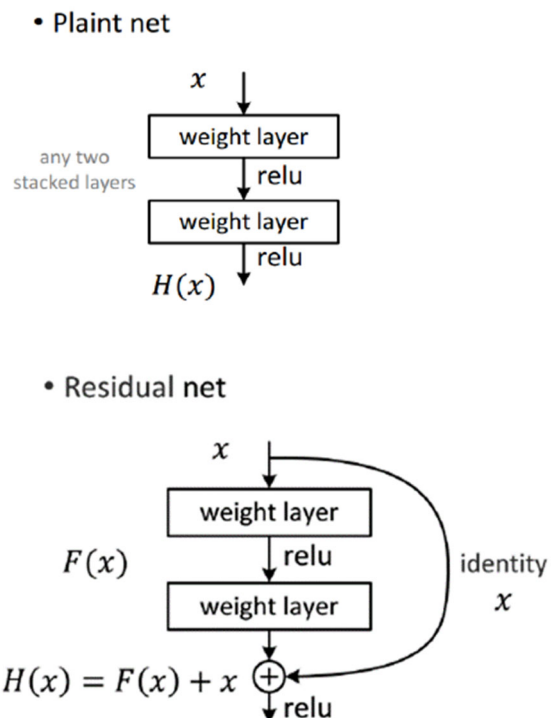


図 13 一般的な畳み込み層 (上図) と RES NET (下

表 5 プランクトン画像収集結果

順位	分類	画像数 (H28-R2)	R3 追加	合計 枚数
1	<i>Asterionella formosa</i> complex	331	345	676
2	<i>Cryptophyceae</i>	392	338	730
3	<i>Polyarthra vulgaris</i>	321	198	519
4	<i>Tintinnopsis</i>	230	195	425
5	<i>Achnanthydium</i> (sensu lato)	52	164	216
6	<i>Aulacoseira pusilla</i> complex	206	159	365
7	<i>Peridinium</i> (others)	114	157	271
8	<i>Coscinodiscineae</i> (others)	577	141	718
9	<i>Cymbella</i> (sensu lato)	52	138	190
10	Other green flagellate	196	137	333
11	<i>Aulacoseira granulata</i> f. <i>granulata</i>	144	136	280
12	<i>Copepoda</i> (nauplius)	208	132	340
13	<i>Chrysophyceae</i> (others)	307	130	437
14	<i>Nitzschia</i> (others)	149	129	278
15	<i>Dinobryon</i>	126	126	252
16	<i>Peridinium bipes</i>	111	113	224
17	<i>Thalassiosiraceae</i> (others)	67	111	178
18	<i>Naviculaceae</i> (others)	54	110	164
19	<i>Bosmina longirostris</i>	83	102	185
20	<i>Fragilaria crotonensis</i>	149	82	231
21	<i>Synchaeta</i>	185	72	257
22	<i>Eudorina</i>	96	68	164
23	<i>Ploesoma truncatum</i>	71	56	127
24	<i>Lindavia</i>	76	55	131
25	<i>Dolichospermum-Sphaerospermopsis</i>	51	48	99
26	<i>Diatoma</i>	61	47	108
27	<i>Pandorina morum</i>	67	45	112
28	<i>Trichocerca</i>	70	42	112
29	<i>Aulacoseira ambigua</i> f. <i>ambigua</i>	51	40	91
30	<i>Bosminopsis deiteri</i>	52	33	85

本研究では、画像の分類に Residual Networks (ResNet)モデルを使用した。ResNet モデルは、He らが 2015 年に考案したニューラルネットワークのモデルである¹⁶⁾。ResNet モデルは、一般的な畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network: CNN) に加えて、基本的な恒等写像を学習することを目的として開発されたショートカット構造が、複数の畳み込み層をスキップするように組み込まれているため、深い層においても、学習が進むという利点を持っている (図 13)。本研究では ResNet-152 を用いた。

3. 2 実験結果と考察

3. 2. 1 画像データ収集と選定

各管理所から収集した報告書 457 編からプランクトン画像約 12,000 枚を抽出した。抽出された上位 30 位のプランクトン種を表 5 に示す。そのうち、多くのダムにおいて高頻度で検出される動物プランクトンとして繊毛虫門多膜綱スナカラムシ科スナカラムシ属 (*Tintinnopsis* spp.)、輪形動物門ワムシ綱ヒゲワムシ科ハネウデワムシ属 (*Polyarthra vulgaris*) の 2 種および植物プランクトン (藍藻を含む) としてアオコの原因となるシアノバクテリア門クロオコッカス目ミクロ

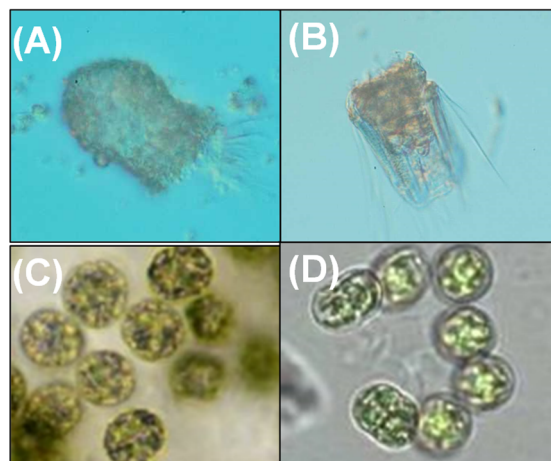


図 14 分類に用いたプランクトン画像の例 (A; スナカラムシ属、B; ハネウデワムシ属、C; ミクロキスティス属、D; コアミケイソウ属)

キスティス属 (*Microcystis aeruginosa*)、アオコと形状の似ているオクロ植物門珪藻類コアミケイソウ属 (*Coscinodiscus* sp.) について (図 14)、深層学習を行い、画像分類を試みた。

3. 2. 2 スナカラムシ属とハネウデワムシ属の画像識別

スナカラムシ属とハネウデワムシ属について、深層学習を行った結果について、表 6 に示す。本研究では、3~10 回以上学習させても認識率が向上しない場合、学習を打ち切った。No.1~No.3 に関して、訓練画像の枚数を変えず、種類を変えて学習を行った結果、訓練画像の選び方次第で、認識率は 0.85~1.00 と異なった。訓練データ数を 100 とした No.4 は、学習は収束せず、認識率は低かった。この原因として、訓練データの画像の中には、対象が不鮮明なものや小さすぎるものが含まれていたことが考えられた。No.5~No.8 では、訓練データの中から、対象が不鮮明なものや小さすぎるものを除外した。その結果、特に、多くの訓練画像を用いた No.8 において、大きく認識率が向上した。しかし、この場合においても、8 回目の学習以降は認識率が低下していった。これは訓練データ数の不足によるものと思われる。訓練データを追加した No.9 では、訓練画像の認識率が高いが、訓練に用いなかった未学習の検証用データに対する認識率が低くなった。一方、訓練データを可能な限り減らした No.10 でも、認識率は No.9 と大きく変わらない結果となった。これは、プランクトンの形状だけではなく、顕微鏡の種類、撮影条件、写り込みのプランクトンの大きさなどバリエー

表 6 スナカラムシ属とハネウデワムシ属の深層学習結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	1.00	0.85	13	0.85	
2	30	10	1.00	1.00	13	0.95	
3	30	10	1.00	0.95	20	0.95	
4	100	10	0.56	0.80	1	0.80	11
5	30	10	0.82	1.00	3	0.75	13
6	30	10	0.98	0.90	13	0.90	
7	30	10	0.97	0.90	6	0.80	16
8	100	10	0.99	0.90	8	0.90	18
9	150	20	0.98	0.78	13	0.68	16
10	30	10	0.96	0.70	10	0.70	10
11	100	10	0.88	0.55	1	0.55	4
12	100	10	0.93	0.70	5	0.70	8
13	100	10	0.92	0.70	2	0.60	2

表 7 ミクロキスティス属とコアミケイソウ属の深層学習結果

No	訓練画像	検証画像	訓練画像の認識率	認識率	最良時の学習回数(*20)	最大学習回数時の認識率	打ち切り時の学習回数
1	30	10	0.99	0.83	17	0.83	
2	500	10	1.00	0.85	1	0.83	
3	100	10	1.00	0.90	2	0.90	12

ションが豊富であるため、No.10 においても当該条件を満たす必要な訓練データ数を担保できなかった可能性が考えられる。画像識別の精度を向上させるには、訓練データ数を増やすことで対応可能であるが、訓練データの中に違う条件で撮影された画像が大量に含まれている場合、正しく学習が進まず、誤同定してしまう。また、正しく学習していても、検証用データに含まれる別条件で撮影された画像を別種と判断してしまい正しく認識できない場合もある。そのため、実用化を考える上では、訓練データ、検証データともに条件を絞った運用にするか、汎用性を高めるため、様々な条件の下で撮影された訓練データ数を大量に（少なくとも 1 条件につき 2~300 枚以上）用意する必要があると考えられる。No.11~No.13 で試行した結果も訓練画像の認識率は高いが、未学習の訓練用データでは十分な認識率を得ることができなかったこと、試行毎でばらつきも大きいことから訓練データの不足を示唆していた。

3. 2. 3 ミクロキスティス属とコアミケイソウ属の画像識別

ミクロキスティス属とコアミケイソウ属について、深層学習を行った結果について、表 6 に示す。訓練画

像を 30 枚で試行した No.1 は、認識率が 0.83 と本研究における平均的な認識率となった。訓練画像の枚数を増やした No.2 では、認識率が若干増加した。単一顕微鏡の多数のデータで訓練した場合、過学習が進み別種の顕微鏡画像が識別できなくなったものと考えられたため、訓練データのバリエーションを調整した No.3 では、高い認識率 (0.90) となった。ミクロキスティス属のように群体を形成し存在している種類のプランクトンも良質な訓練データが 100 枚程度あれば認識可能であることが示唆された。したがって、年間にダム管理所から収集できる画像数が少ない種でも、年数を重ねていけば、いずれ高い認識率が達成できると思われる。

3. 3 プランクトン自動判別技術の開発のまとめ

機械学習によるプランクトンの自動判別を試みた結果、分類精度の導出までのアプローチを確認することができた。試行したパターンにおける認識率は 0.73-1.00 であり、今後、継続的にダム管理所から画像を収集し、質の高い訓練データ数を増やすことにより、認識率が向上すると思われる。また、今後は、ダム水質管理に重要な種について、現場での導入を見据えた検討をしていく。また、将来的には、本技術を用いて、一般的な植物プランクトンのモニタリングに留まらず、水質に影響を与える特定種の常時監視等、能動的なダム貯水池の水質管理手法の提案を目指していきたい。

4. WEP システムを導入しているダムにおける水質改善効果の確認

4. 1 実験方法

本研究では、WEP システムを導入しているダム貯水池において、WEP システムの水質改善効果の確認を目的として、令和 2 年および令和 3 年に現地調査、水質分析、検鏡によるプランクトンの同定および NGS を用いた微生物叢解析を行った。

4. 1. 1 調査概要

令和 2 年度の現地調査は、8 月 20 日および 10 月 5 日の計 2 回実施し、湖内 2 地点 (St. A と St. B、図 15) において多項目水質計を用いて水温、pH、酸化還元電位 (ORP)、溶存酸素濃度 (DO)、電気伝導率 (EC)、濁度について現地観測を行うとともに、St. A では 6 水深 (水深 0.5 m、5 m、10 m、15 m、20 m、25 m)、WEP システム設置箇所から約 600 m 離れた St. B では 4 水深 (水深 0.5 m、5 m、10 m、13 m) から採水を行い、表 8 に示す各種分析を行った。令和 2 年度は、金属分

析を含む詳細な水質分析を実施した。また、NGSの結果と光学顕微鏡による検鏡結果を比較するため、NGS解析では16S rRNA (原核生物) のみならず、18S rRNA (真核生物) を対象とした解析を実施した。

令和3年度の現地調査は、7月2日、7月26日、8月24日、9月29日および12月24日の計5回実施した。湖内4地点 (St1.0、St1.5、St2.5 および St3.0、図15) において、令和2年度と同様に多項目水質計を用いて、現地観測を行うとともに、表7に示した観測水深地点の4地点で4~5水深の試料水の採水を行い、各種分析を行った。令和3年度は、カビ臭産生微生物を含む微生物動態の季節性変化を調査するために、採水地点および採水頻度を増やした。水質分析については藻類の動態に強く影響を与える栄養塩である T-N、T-P に絞り、NGS 解析も 16S rRNA のみを解析対象とした。

(Thermo Fisher SCIENTIFIC、X7CCT) により分析した。

表8 現地調査概要と分析項目

調査実施日	令和2年8月20日、令和2年10月5日、 令和3年7月2日、令和3年7月26日、 令和3年8月24日、令和3年9月29日、 令和3年12月24日
調査地点	St1.0(St.A)、St1.5、St2.5(St.B)およびSt3.0 (図15参照)
現地観測	多項目水質計による
観測項目	水温、pH、EC、DO、ORP、濁度
観測水深	St1.0(St.A) : 0.5m、5m、15m、20m、25m (湖底直上1m) St1.5 : 0.5m、5m、15m、20m、25m (湖底直上1m) St2.5(St.B) : 0.5m、5m、10m、13m (湖底直上1m) St3.0 : 0.5m、5m、10m、13m (湖底直上1m)
水質分析	SS、VSS、DOC、各態窒素 (NO2+NO3-N、NH4-N及びT-N) と各態リン (PO4-P及びT-P)
金属分析※1	Mg、Al、P、K、Ca、V、Cr、Mn、Fe、 Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Ag、Cd、Sn及びPb
顕微鏡分析※2	植物プランクトン、動物プランクトン
次世代シーケンス解析	16SrRNA (原核生物) 及び18SrRNA (真核生物)

※1 : St.Bは水深0.5m、5m、13mの3水深のみ分析対象とした

※2 : St.Aは水深0.5mと水深25m、St.Bは水深0.5mと13mの各2水深を分析対象とした

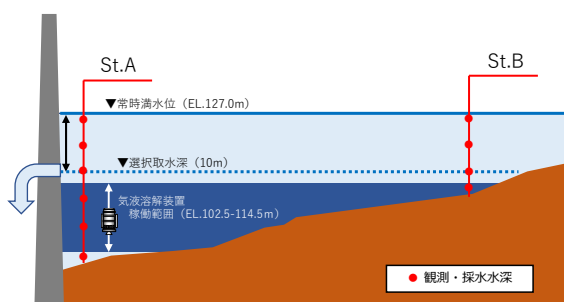
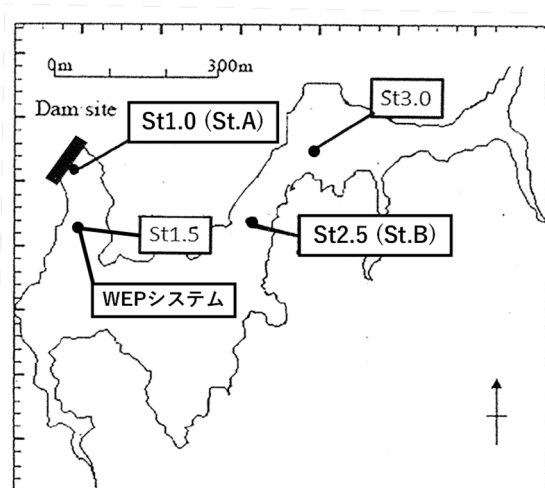


図15 対象としたダム貯水池における調査地点

4. 1. 2 水質分析

水試料の NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、T-N、PO₄-P、T-P はオートアナライザー (ビールエルテック製 QuAAtro2-HR) により測定した。各種金属は ICP - MS

4. 1. 3 光学顕微鏡による同定

2. 1. 3 に記載の同定手法により実施した。

4. 1. 4 NGSによる塩基配列解読

2. 1. 1 に記載の分析手法により実施した。

4. 2 実験結果と考察

4. 2. 1 水温、DO、ORPについて

令和2年8月20日および10月5日調査時の各調査ポイントにおける多項目水質計による水温、DOの現地観測結果を図16に示す。

8月調査時の水温分布は、WEPシステム設置近傍箇所に位置する St.A では表層から水深10mまでは28.4°C~25.7°Cと高く、水温躍層は水深10mから15mにかけて形成されており、その下層となる水深15m以深から水深25m (湖底直上+1.0m) では20.8°C~17.0°Cと緩やかに低下する傾向にあった。St.Bの水温分布は、表層0.5mおよび水深5mでは31.5°Cおよび28.3°Cと St.A と比べて高く、水深10mおよび13mでは24.8°Cおよび21.2°Cと低い結果となった。

10月調査時の水温分布は、St.Aの水温は表層0.5mから水深10mにかけて21.0°C~18.7°Cと8月調査に比べて低下していたが、水深15m以深から水深25mでも12.7°C~8.9°Cと低下していたため、水温躍層は依然として水深10mから15mにかけて形成されていた。また、St.Bの水温分布は、表層0.5mから水深13mにかけて St.A と同様の分布傾向にあり、8月調査時のような地点間での水温分布の違いは認められなかった。

8月調査時のDO分布は、St. Aでは水深0.5mで7.9 mg/Lと最も高く、下層に向けて低下する傾向があった。特に水温躍層の上層側となる水深10mと下層側となる水深15m間ではDOが大きく低下しており、水温躍層下層への酸素供給が遮断されている様子が確認できた。St. BのDO分布は表層0.5mでは8.6 mg/LとSt. Aよりも高い値が観測されたが、水深10mおよび13mでは3.6 mg/Lおよび2.6 mg/LとSt. Aの同水深よりも低い値が観測された。10月調査時のDO分布は、St. Aの表層0.5mは10.7 mg/Lと高かったが、湖底直上1mとなる水深25mでは0.7 mg/Lと8月調査時よりも貧酸素化が進行していた。一方、St. BのDO分布は表層0.5mではSt. Aと同等であったが、水深5mと10mでは約8 mg/LとSt. Aの同水深よりも高い値が観測された。

8月調査時のORP分布は、St. Aでは表層0.5mから水深15mまでは約170 mVと一定であったが、水深20mでは201 mVと高く、水深25mでは29 mVと急激に低下した。St. Bでは、表層0.5mでは99 mVと低く、また水深5mから13mでは明確な分布傾向はなく、158 mV~188 mVで推移していた。10月調査時のORP分布は、St. Aでは表層0.5mから水深23m付近にかけて150~184 mVで推移していたが、水深25mでは87 mVと急激に低下した。St. Bでも、St. Aと同様の分布傾向にあり、表層0.5mから水深13mにかけ

て139~181 mVで推移していた。

8月調査において、選択取水深付近（水深約10m、EL.117m）に形成される水温躍層により、その上層と下層の水塊は分断されると考えられる。また、St. Bでは水深の浅い上流部で受熱した表層水と滞筋を流下する水温の低い流入水の影響により、St. Aよりも鉛直方向の水温差が大きかったものと推察される。通常、水温躍層より下層側では酸素供給が遮断されるため、湖底付近から貧酸素水塊が形成され、還元状態へと至る。実際に、St. Bでは水深10mおよび13mではDOが4 mg/L以下にまで低下していた。一方、St. Aでは水深15mに比べて20mで高いDO及びORP値が観測された。これは、この時期WEPシステムが水深18.5m（EL.108.5m）で運用されていたことから、装置から吐出された高濃度酸素水の効果によるものと考えられる。10月調査においても、水温躍層は選択取水深付近（水深約10m、EL.117m）に形成されている状態であった。しかし、8月調査で確認されたSt. AとSt. Bとの縦断方向での鉛直水温分布の違いは解消されており、また水深10m以深の複数の水深にWEPシステムから供給された高濃度酸素水による影響と考えられる断続的に高いDOが確認された。特に、水深13m付近（EL.114.5mに相当）にはSt. AとSt. Bの双方で前後の水深よりも高いDOが観測されたことから、WEPシステムによる酸素供給範囲が少なくともSt. B近傍まで波及していたと推察される。

次に令和3年7月2日、令和3年7月26日、令和3年8月24日、令和3年9月29日、令和3年12月24日に調査した際の多項目水質にて測定した水温の結果を図17に、DOを図18に示す。

令和3年7月2日は各地点で表層の水深0.5mから水深15mにかけて、ほぼ一定に水温が減少していた。St1.0およびSt1.5では、水深15m以深から水深25mでは緩やかに水温が減少していた。

7月26日以降は12月24日を除いて、水深10mから15mにかけて水温躍層が形成されていた。St2.5およびSt3.0は湖底までの水深が浅いため、水温躍層の途中で湖底に達していたが、St1.0およびSt1.5では、水深15m以深から水深25mにかけて、7月2日と同様に緩やかに水温が減少していた。

表層（0.5m）の水温は7月2日および7月26日は24~26℃、8月24日および9月29日は21~22℃であった一方、図16の通り令和2年度の8月20日は28~31℃と前年の方が表層の水温は高かった。さらに湖底付近の水温を見ても、令和3年度は水深25mでは

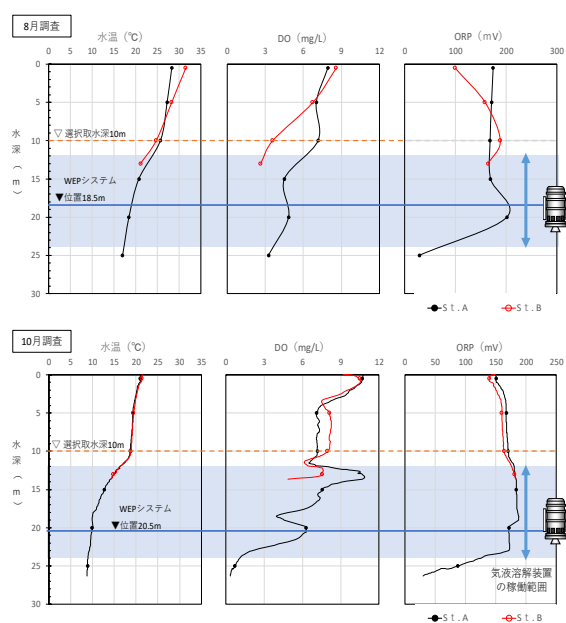


図16 令和2年度の水温、DO、ORPの現地観測結果

8.0°C前後まで低下していたが、令和2年度の8月20日は水深25mでも17.0°Cあり、令和2年度8月20日の水温分布は令和3年度よりも全体的に高かった。令和2年10月5日は表層(0.5m)で21.0°Cで水深25mで8.9°Cであり、令和3年8月24日および9月29日と似た挙動であった。12月24日は鉛直方向の水温に変化はほとんどなく、全層循環となっていた。

DOに関して、St1.0およびSt1.5において7月2日から9月29日にかけての水温躍層形成時は、表層(0.5m)はおおよそ10.0mg/L以上となっており、DOは過飽和となっていたが、水深10mにかけてDOは徐々に減少していった。これは表層では植物プランクトンによる光合成と大気からの酸素供給により、過飽和となっていたDOが、水深が深くなるにつれて、光量低下に伴う光合成活動の減少や従属栄養細菌等の働きにより減少していったものと考えられる。その後、水深15m付近で大幅にDOは増加しているが、これはWEPシステムにより高濃度酸素水が供給された効果であると考えられる。しかし、水深20m以下では急激にDOが減少しており、水深25mでは多くの場合、1mg/L未満であり、貧酸素環境となっていた。ただし、9月29日はWEPシステムの稼働水位を13mから25mへ変更する日に採水しているため、25mで稼働させた場合の効果が検証できていないと思われる。

St2.5およびSt3.0はWEPシステムから600m以上離れており、且つ、水深も浅いことから、St1.0およびSt1.5と比較するとはっきりした効果は見えない。しかし、St2.5において水深10m付近で7月26日および9月29日においてDOが増加していることから、WEPシステムによる高濃度酸素水の影響がわずかに見られたが、一方で7月2日では湖底付近ではほぼ0mg/Lになっていることから、WEPシステムの遠方への効果は様々な環境条件によって変動するものであると考えられる。

12月24日は全層循環となっており、調査地点および水深が変わっても大きな差異はなかった。

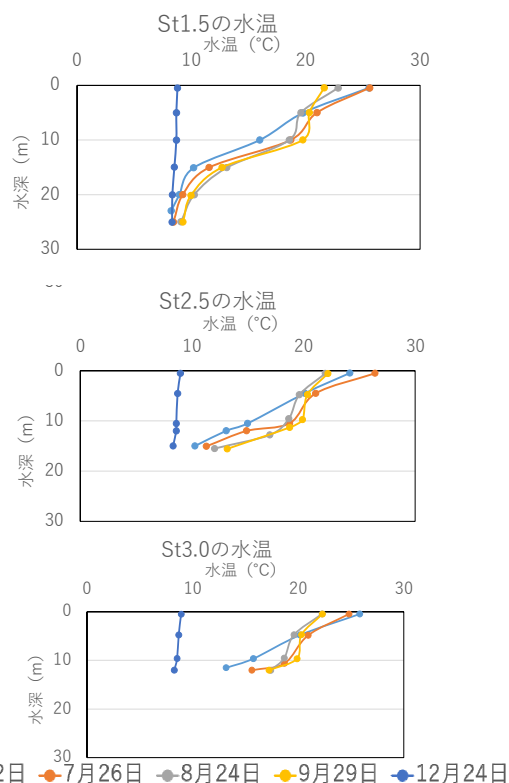
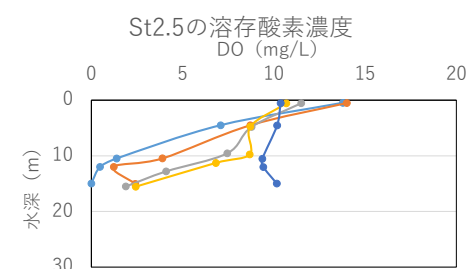
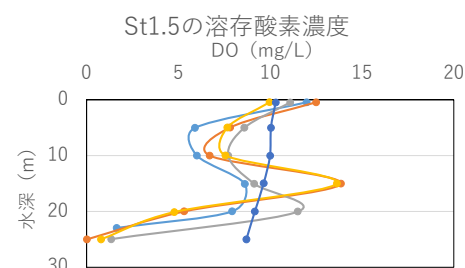
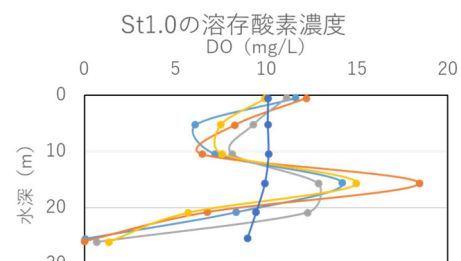
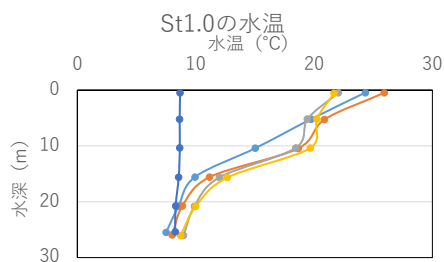


図17 令和3年度の各調査地点の水温



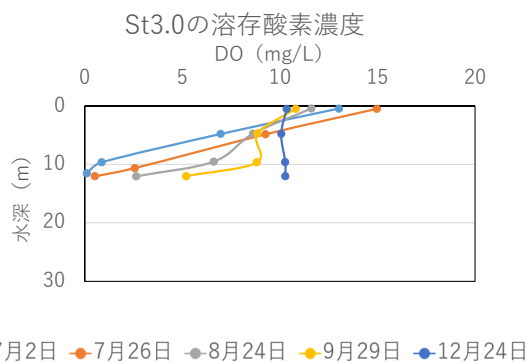


図 18 令和 3 年度の各調査地点における DO 濃度

4. 2. 2 窒素、リンについて

アオコやカビ臭を産生する有害藍藻類の増殖には窒素・リンに代表される栄養塩の存在が不可欠である。そこで、採水地点毎に窒素およびリンの濃度を測定し、表 9 に示した坂本 (1966) が提唱した T-N および T-P による湖沼の栄養塩レベルの分類¹⁷⁾に従って、栄養塩状態の把握を行った。

表 9 T-N、T-P による湖沼の栄養塩レベルの分類¹⁷⁾

	階級		
	貧栄養	中栄養	富栄養
T-N (mg/L)	0.02-0.2	0.1-0.7	0.5-1.3
T-P (mg/L)	0.002-0.02	0.01-0.03	0.03-0.1

令和 2 年度の窒素およびリンの測定結果を図 19 に示す。藻類は増殖に光合成が必要なため、表層の栄養塩に着目したところ、令和 2 年 8 月の試料では、St. A と St. B ともに T-P は 0.02~0.03 mg/L であり、T-N も 0.3 mg/L 程度であった。表 9 の分類に従うと、中栄養状態であったといえる。令和 2 年 10 月の試料も St. A と St. B ともに T-P は 0.02~0.03 mg/L であり、T-N も 0.5 mg/L 程度であり、中栄養状態であった。

水深が深くなるにつれて T-N、T-P ともに濃度が増加する傾向にあり、湖底付近では大きく濃度が増加していたものもあった。特に令和 2 年 8 月の St. A の試料は T-N、T-P ともに濃度が大幅に増加しており、令和 2 年 10 月の St. A の試料の T-N も大幅に増加していた。

各態窒素は、NH₄-N とその他窒素 (T-N から NO₂+NO₃-N と NH₄-N を差し引いた値) は水深方向で増大傾向を示し、NO₂+NO₃-N は表層 0.5 m と湖底直上 1 m (St. A 水深 25 m、St. B 水深 13 m) で低かった。St. A において、水深 15 m 以深では、NH₄-N が増加す

る傾向が確認され、水深 25 m ではその他窒素も大幅に増加していた。これは、嫌気条件下において、タンパク質分解活性の高い嫌気性細菌属が優占し、それに伴い、タンパク質分解によって底質間隙中の NH₄-N 濃度が増加・拡散¹⁸⁾、または、底泥中に溜まったガス泡が噴出し、直上水中に NH₄-N が放出されること¹⁹⁾等によるものと推察されるが、詳細なメカニズムは不明である。

各態リン濃度は、その大部分がその他リン (T-P から PO₄-P を差し引いた値) であった。PO₄-P は最大でも St. A 水深 25 m で 0.007 mg/L と低く推移していた。10 月調査時の各態リン濃度も、その大部分がその他リンであり、PO₄-P は最大でも St. B 水深 10 m で 0.004 mg/L と全地点で 8 月調査時よりも低濃度で推移していたことから、植物プランクトンは強いリン制限を受けていた可能性が考えられる。

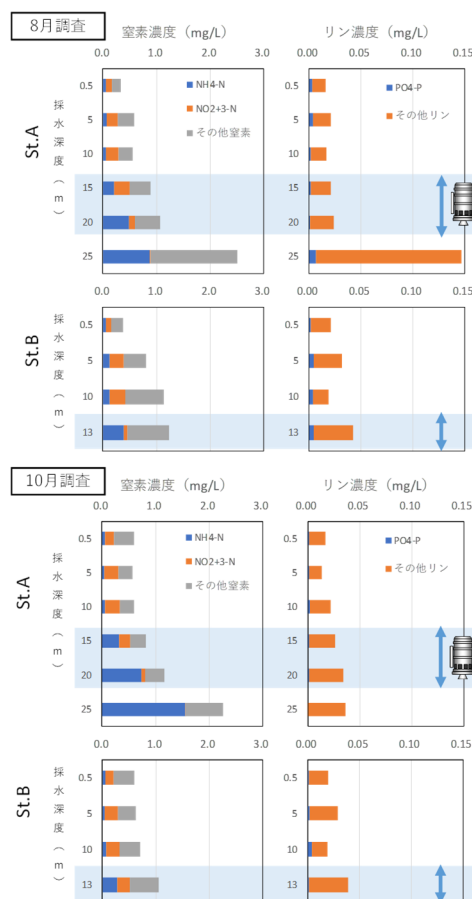


図 19 令和 2 年度の窒素、リンの測定結果

次に、令和3年度の各調査地点における T-P 濃度を図 20 に、T-N 濃度を図 21 に示した。令和3年7月2日の表層試料では、T-P は 0.05~0.07 mg/L であり、T-N も 1 mg/L 程度であった。表 9 の分類に従うと富栄養化状態であったといえる。7月26日および8月24日の表層は T-P は 0.03~0.04 mg/L、T-N は 0.4~0.6 mg/L であり、7月2日から栄養塩濃度は減少して中栄養状態であった。9月29日および12月24日は T-P は 0.01 mg/L 程度、T-N は 0.5 mg/L 程度であり、貧栄養状態にまで T-P は減少していた。このように季節に応じて、表層の栄養塩濃度は大きく変化していることが把握できた。

また、令和3年度も前年度と同様に湖底付近になると T-N、T-P とともに濃度が上昇する傾向にあった。これも湖底付近が貧酸素環境になり、栄養塩の溶出が起きているものと考えられる。

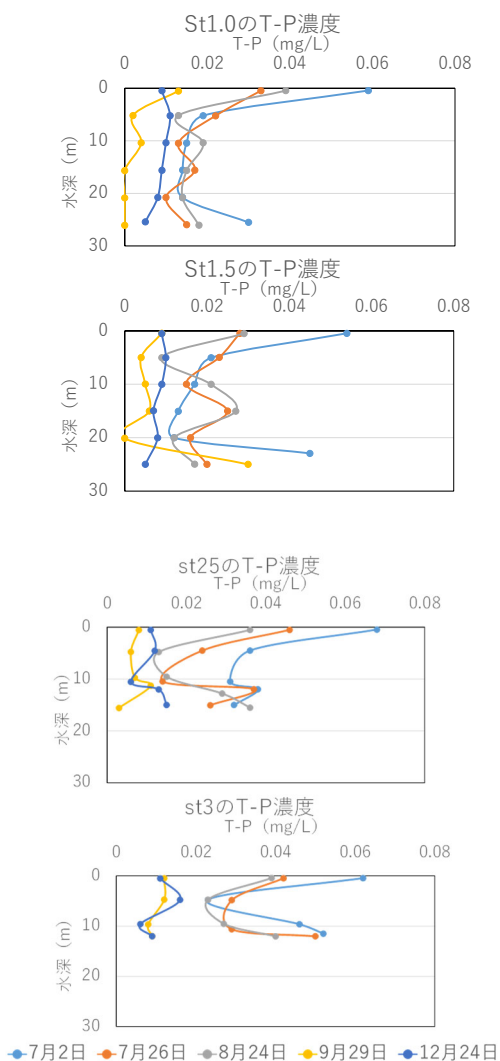


図 20 各調査地点における T-P 濃度

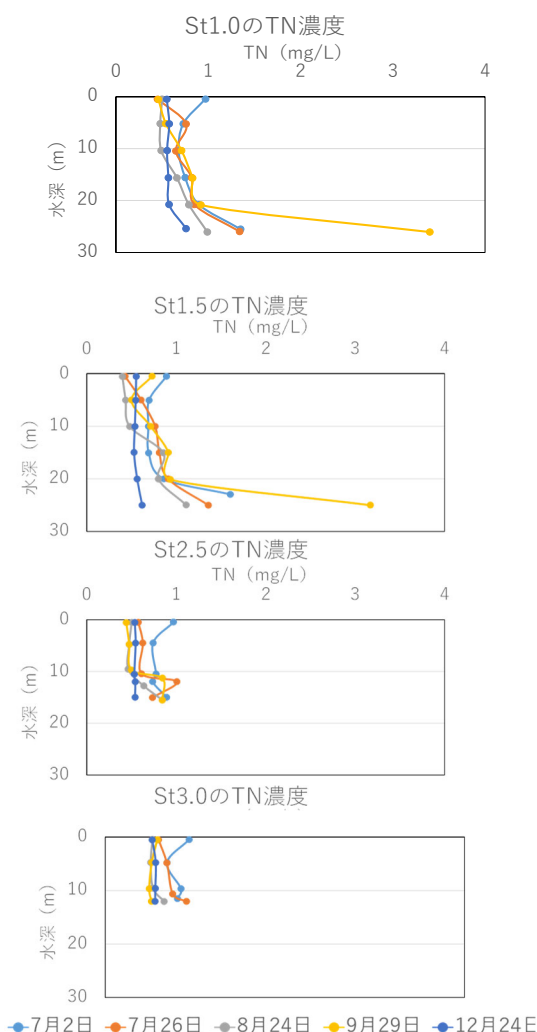


図 21 各調査地点における T-N 濃度

4. 2. 3 実験結果と考察(金属分析について)

令和2年度の調査では、サンプル水中に含まれる金属について、総量と溶存態濃度をそれぞれ分析した。分析対象とした金属は、Mg、Al、K、Ca、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Ag、Cd、Sn 及び Pb の 18 項目であるが、これらのうち Cr、Co、Zn、Cd、Sn 及び Pb の 6 項目については、全試料が定量限界もしくは検出限界以下であった。また、Mg、K、Ca 及び V は全ての試料から検出されたが、地点間に明確な違いはなく、また大部分が溶解性であることから流水中に含まれるイオン成分を反映しているものと考えられる。したがって、特筆すべき Mn、Fe、As 濃度について整理した結果を図 22 に示す。T は全量態、D は溶

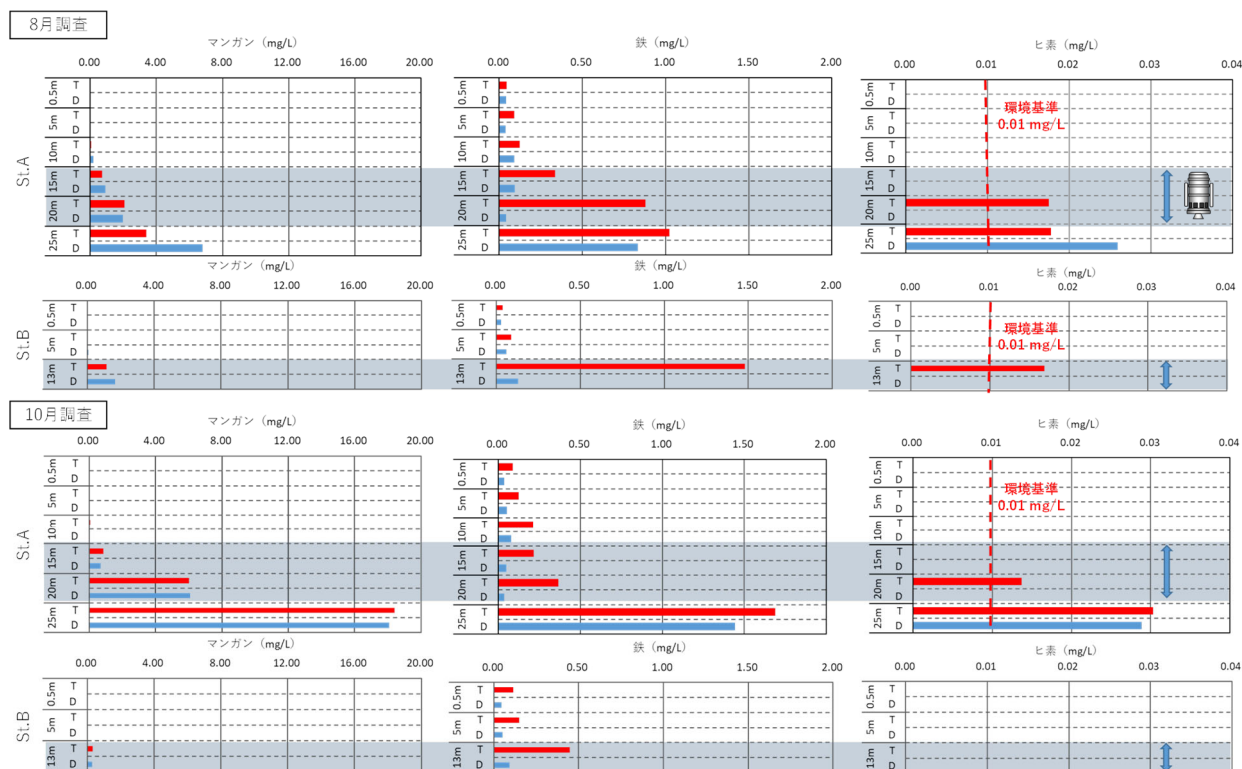


図 22 金属濃度測定結果

存態を示している。いくつかの地点において、全量態よりも溶存態が高い値を示しているが、その理由は不明である。

8月調査時および10月調査時ともに、Mn、FeおよびAsは、貧酸素状態にあったSt.A水深25mにおいて高濃度で検出されていた。このことは、底質からの溶出による影響を反映していると考えられる。また、水深20m以浅では総量が大きく減少していた。これは、水深20mではDOが高く保持されているため、底質から溶出した金属イオンが上層側に拡散しても、酸化を受けて粒子態となり、速やかに沈降するためと推察される。また、FeとAsは水深20mではほとんど溶解性成分が検出されなかったのに対して、Mnは溶解性成分が多く残存していた。これらの違いは、それぞれの金属イオンの酸化還元電位と物質間の吸着特性を反映しているものと考察される。すなわち、酸化還元電位が低く速やかに酸化されるFeは水酸化鉄となり、且つ、Asは水酸化鉄に吸着・固定され共沈する一方、鉄より酸化還元電位が高いMnは、鉄イオンの存在下においてイオン態として水中に残存していたと考えられる²⁰⁾。

4.3 実験結果と考察(微生物解析)

4.3.1 顕微鏡との比較

光学顕微鏡での同定の結果、シアノバクテリア門は2種、植物プランクトンは34種、動物プランクトンは32種検出された。一方、同様の水試料のNGSによるDNA塩基配列解読では、データベースSILVA132_SSURef_Nr99を用いた場合、細菌2,232種(うちシアノバクテリア門は51種)、古細菌65種、植物プランクトン347種、動物プランクトン767種、分類不明種13種が検出された。また、前述のとおり、Excavataに含まれる*Euglena sp.*や*Trachelomonas sp.*は光学顕微鏡による同定では検出されるがNGSでは検出されなかった。

光学顕微鏡で検出されたシアノバクテリア門は*Aphanocapsa*属および*Aphanizomenon*属であったが、これらもNGSでは検出されていない。その理由として、形態学的に類似した種と誤認した可能性、または近年、遺伝子情報に基づく研究結果が加味され、藍藻類の分類が変更されていること²¹⁾や、検鏡とNGSの同定における参照データベースの違いが影響していると考えられる。そのため、検鏡の検出結果における*Aphanocapsa*属はNGSではマイクロキスティス属²²⁾、同様に検鏡の検出結果における*Aphanizomenon*属はNGS

ではカスピドスリックス属²¹⁾に、それぞれ分類されたと考えられる。

4. 3. 2 16S rRNA 遺伝子 (古細菌・真正細菌)

令和2年度に実施した16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析について門レベルで整理した結果を図23に示す。主な菌叢はプロテオバクテリア門、バクテロイデス門、ウェルコミクロビウム門、放線菌門、シアノバクテリア門、アルマティモナス門、プランクトミケス門であった。水深が変化すると、構成する門の割合が変化していた。

8月調査時、選択取水深度(10m)より浅層側では独立栄養細菌であるシアノバクテリア門やアルマティモナス門が多く存在していた。アルマティモナス門は、2011年に提唱された新規の門であり、ウキクサやヨシなどの水生植物の根圏環境に多く生息していることが知られている²³⁾。そのため、増殖のために光が必要なシアノバクテリア門と共に浅層で多く存在していたものと思われる。その他に浅層側ではバクテロイデス門が多く存在していた。バクテロイデス門は幅広い代謝能力を持ち、特にタンパク質や多糖類の分解作用²⁴⁾が報告されている。また、有機体窒素をアンモニアへ変換し、微生物や水生植物に供給する²⁵⁾という点において、窒素循環の中で重要な役割があり、*Flavobacteria* や *Fluviicola* が優占していた。一方、下層側では従属栄養細菌が多く、その中でもプロテオバクテリア綱のメタン酸化能を有する *Methylobacter*、 β プロテオバクテリア綱の *Rhodoferrax* が特に多く存在していた。*Rhodoferrax* は鉄・マンガン酸化を担うことが報告されている。これらの細菌は一般的に、好気環境においてメタンや鉄・マンガン酸化を行う²⁶⁾ものである。本調査では貧酸素環境になる傾向にある下層側の試料から多く検出されており、WEPシステムの設置により、温度躍層より下層の溶存酸素が増えたことが大きな要因であると考えられ、WEPシステムが微生物叢に影響を与えていることが示唆された。底層付近(St.A 25 m)からは、メタン生成古細菌(*Methanomicrobia*)が検出されており、且つ、上記の通り、生成したメタンを利用するメタン酸化細菌(*Methylobacter*)も多く検出されていることから、湖沼における炭素循環において、WEPシステムはメタンの資化を増大させている可能性がある。即ち、細菌叢のみならず、物質循環にも影響を与えていると考えられるが、それらがどの程度の寄与であるかは不明であり、今後さらなる研究が必要である。また、全地点で

比較的多く検出された放線菌(*Sporichthyaceae*)は、主に土壌に生息する細菌であり、流域の土壌から流入河川を通じてダム湖に流入した可能性が考えられる。

10月調査時の微生物叢の構成は、概ね8月調査時と類似していた。主な構成の変化としては、独立栄養細菌であるシアノバクテリア門およびバクテロイデス門の検出率が減少した一方、ウェルコミクロビウム門、およびプランクトミケス門の検出率は増加した。プランクトミケス門では、*Rubinisphaeraceae*科に属する細菌が大きく増加していた。メタンをポリヒドロキシ酪酸に変換させる際に優占する細菌であり、メタン酸化細菌の *Methylocystis* とともに検出されることが報告されている²⁷⁾。10月調査時は *Methylocystis* も増加していることから、上記の反応によりポリヒドロキシ酪酸が生成されていることが示唆された。ウェルコミクロビウム門では *Terrimicrobium* が優占していた。この細菌は幅広い多糖類だけでなく、セルロース、キチン、キシランなどの難分解性の炭素源に対して、高い分解能を有している。即ち、植物、藻類、カイアシ類、真菌類等の細胞壁を構成する主要、且つ難分解性の物質の分解者²⁸⁾である可能性がある。

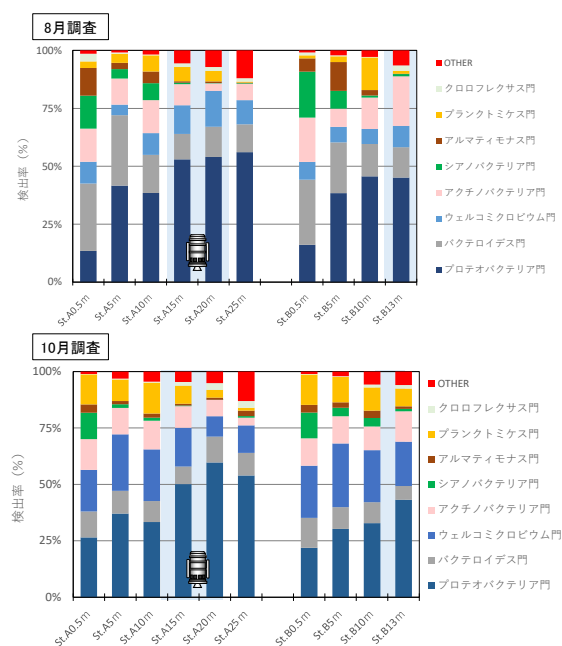


図23 令和2年度の16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析結果

令和3年度に実施した16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析の結果を図24に示す。菌叢を構成する主要な門は令和2年度と同じであった。また、水温躍層形成期である7月から9月にかけては、令和2年

度と同様に表層から底層にわたって、構成する門の割合が変化しており、水深が深くなるにつれて、メタン酸化機能を有する γ プロテオバクテリア綱が優占する傾向であった。

一方で、12月24日の試料は、採水地点や水深が変化しても菌叢の割合に変化が少なかった。これは気温が低下したことにより全層循環しているため、採水地点や水深が変化しても環境要因の変化が乏しいためであると考えられる。

7月2日の試料では、水深の浅いところではウェルコミクロビウム門の割合が著しく高く、水深が深くなるに従って、その割合が減少していた。ウェルコミクロビウム門の中では、*Terrimicrobium* とその近縁種が優占しており、一般的な微生物では分解の難しい細胞壁を構成するキシランなどの分解を担っていた可能性がある。

8月24日および9月29日の試料は表層(0.5m)ではバクテロイデス門の割合が増えており、水深が深くなると割合が減少していた。特に *Flavobacterium* や *Fluviicola* が優占していたが、令和2年8月も同様の傾向が観察されたことから、季節性を表している可能性がある。

このように季節や水深ごとの水質状況に応じて門レベルの菌叢は変化していることが把握できた。

また、令和2年度および令和3年度の藍藻類が属するシアノバクテリア門を見ると、令和2年8月20日のSt.Bの表層(0.5m)、令和3年7月26日の表層(0.5m)では16~18%程度であったが、その他の試料は全て10%未満であった。夏期に藻類が増殖するとシアノバクテリア門が30%以上を占めることは珍しいことではないため、シアノバクテリア門の増殖は全体としては抑制されていたと考えられる。次に、シアノバクテリア門の中の詳細な内訳について、属レベルでの把握を行った。

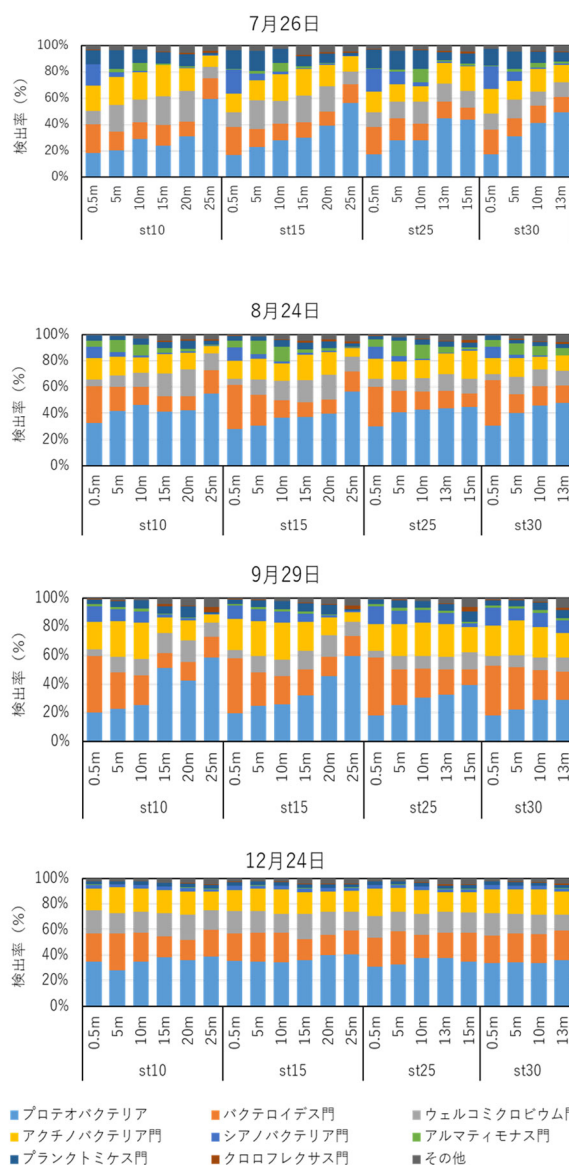
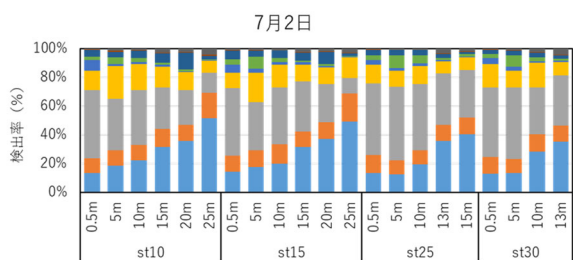


図 24 令和3年度の16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析結果



4. 3. 3 シアノバクテリア門(藍藻類)に属する細菌におけるカビ臭産生種の割合

このダムにおいて過去にジオスミンが高濃度に検出された際にドリコスペルマム属に属する細菌がジオスミン生産菌として報告されている。そこで、各試料におけるドリコスペルマム属を含むシアノバクテリア門を構成する細菌の存在割合について、令和2年度の結果を図25に示す。

8月調査時では全ポイントでシアノビウム属が優占していた。シアノビウム属はピコ植物プランクトンの

一種で、アオコやカビ臭には直接関与しないが、高濃度により浄水場においてろ過障害などの問題を発生させることがあるので、注意が必要である。既往の報告では貧栄養湖から中栄養湖におけるピコ植物プランクトンの優占が報告されている²⁹⁻³⁰ことから、そのような環境が反映されていると考えられる。St.A の水深 25 m からドリコスペルマム属が検出され、同時期にジェオスミンが 40 ng/L 検出されていたことから、本種はこのダムの子なジェオスミン生産種であると考えられる。

10月調査時では、St.A の水深 20 m および 25 m を除き、シアノビウム属が優占していた。マイクロステイス属が St.A の水深 15 m を除く全地点から検出され、特に St.A の水深 20 m および 25 m ではシアノバクテリア門の 80%前後を占めており、シアノバクテリア門を構成する細菌が変化していることが確認できた。ドリコスペルマム属は検出されなかったが、2-MIB 産生種であるシュードアナベナ属が全試料から検出され、特に St.A 水深 5m~15m、St.B 水深 5m 以深において高頻度で検出された。同時期に 2-MIB が 4ng/L 検出されていたことから、本種はこのダムの子な 2-MIB 産生種である可能性が考えられる。なお、光学顕微鏡での同定では、このシュードアナベナ属も他の 2-MIB 産生種も検出されなかったことから、NGS はカビ臭産生種を含むシアノバクテリア門を網羅的に検出し、相対存在比の増減を把握することができたため、

カビ臭原因種を推定するために効果的な手法であることが確かめられた。

次に令和3年度のシアノバクテリア門を構成する細菌の存在割合結果を図 26 に示す。

7月2日の試料では表層付近の 0.5 m および 5 m の水域においてマイクロステイス属とドリコスペルマム属が多く検出され、水深が深くなるにつれてマイクロステイス属の存在割合は減少しており、ドリコスペルマム属が優占するようになった。しかし、7月26日以降、ドリコスペルマム属はほとんど検出されず、12月24日にわずかに検出されたのみであった。

7月26日の表層 (0.5 m) では上述の通りシアノバクテリア門の割合が増えているにも関わらず、ドリコスペルマム属は非検出となっており、一方で7月2日の試料では非常に少量しか検出されなかったシアノビウム属が急増していた。上述したように、貧栄養湖から中栄養湖におけるピコ植物プランクトンの優占が報告されている²⁹⁻³⁰ことから、7月26日以降、表層の栄養塩が減少したことを表した結果であると考えられる。

また、7月26日以降、2-MIB を産生すると報告のあるシュードアナベナ属が検出されている。これらのことから、A ダムにおいて藍藻類の増殖が全体としては抑制されている傾向にあるが、藍藻類でカビ臭産生する種は継続的に発生しており、カビ臭産生する藍藻類の制御に向けたさらなる対策の検討が有用であると考えられる。

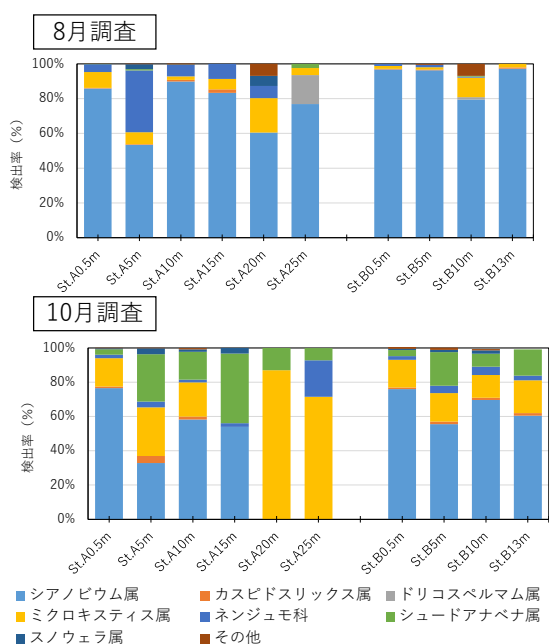
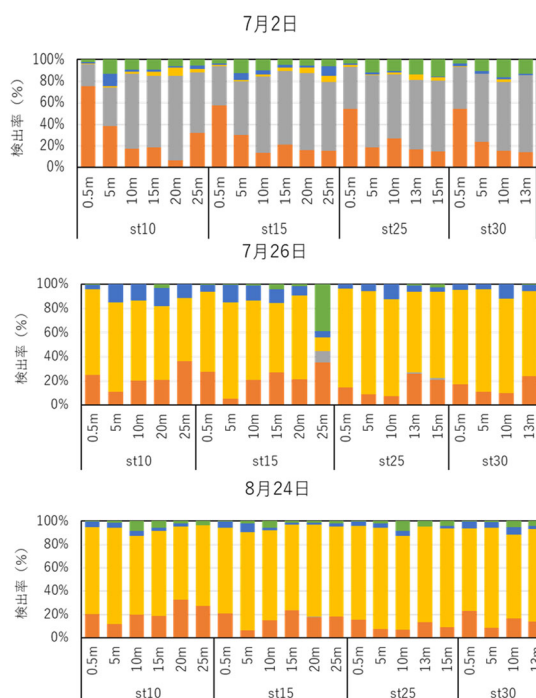


図 25 令和2年度のシアノバクテリア門の内訳



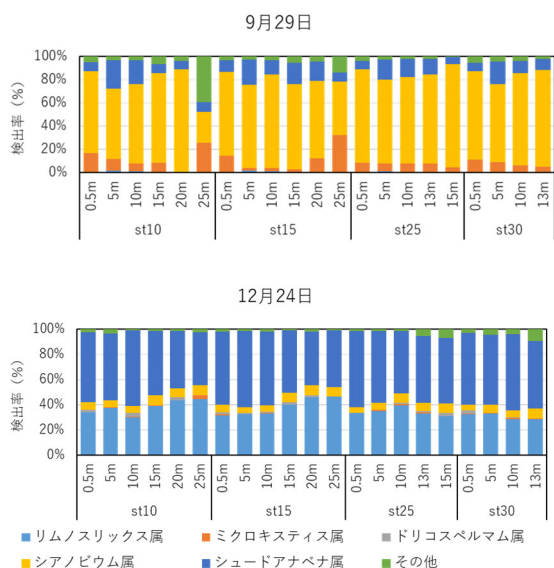


図 26 各試料中のシアノバクテリア門を構成する細菌の割合

4. 3. 4 18S rRNA 遺伝子 (真核生物)

令和2年度の18S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析の結果を図27に示す。8月調査時は、ストラメノパイル(Stramenopiles)、アルベオラータ(Alveolates)、リザリア(Rhizaria)を含む系統群である SAR スーパーグループ、動物(Holozoa)、真菌(Nucleomycea)等を含むオピストコンタ(Opisthokonta)、及び緑藻、車軸藻類等を含むアーケプラスチダ(Archaeplastida)の検出率が高かった。SAR スーパーグループのうち、繊毛虫や渦鞭毛藻等を含むアルベオラータ(Alveolata)は、St. A では表層0.5 m と水深15 m から湖底直上となる25 m で検出率が高く、水深5 m と10 m では他の水深に比べて大きく減少したのに対して、St. B では水深方向での顕著な違いは認められなかった。また、肉質鞭毛虫(アメーバ鞭毛虫)等を含むリザリア(Rhizaria)は、St. A と St. B ともに中層付近(水深5~20 m)で多く検出された。珪藻類や黄色鞭毛藻類等を含むストラメノパイル(Stramenopiles)は、St. A 水深25 m からの検出率が低いものの、水深方向での明確な違いは認められなかった。オピストコンタは、その大部分がホロゾアエによって占められており、St. A と B ともに、表層側ではカイアシ亜綱やワムシ類の単生殖巣綱が多く、選択取水深度(水深10 m)以深では襟鞭毛虫綱が多く検出される傾向があった。アーケプラスチダは、その大部分が緑藻綱によって占められており、St. A では表層から選択取水水深(10 m)で多く検出されていたのに対し、St. B では表層の検出率が高いものの、水深5 m と10 m で

は少なく、湖底直上となる13 m からは多く検出された。

10月調査時は、SAR スーパーグループ、オピストコンタおよびアーケプラスチダ(Archaeplastida)の検出率が全検出率の90%を占めていた。SAR スーパーグループの検出率は、繊毛虫や渦鞭毛藻等を含むアルベオラータ(Alveolata)が8月調査に比べて減少傾向を示したのに対して、ストラメノパイル(Stramenopiles)の検出率は増加傾向を示し、特にSt. A 表層0.5 m~水深15 m および St. B 全層で顕著であった。ストラメノパイルの検出率の増加は、主に珪藻綱(Ulnaria 属及び Aulacoseira 属)のリード数の増加と一致していた。オピストコンタは、8月調査に比べて、St. A 表層0.5 m から水深15 m、および St. B 全層においてホロゾアエの検出率が大きく低減したのに対し、St. A 水深20 m と25 m では減少幅はわずかであった。この原因は、カイアシ亜綱や単生殖巣綱のリード数が8月調査に比べて減少したのに対して、St. A 水深20 m と25 m では襟鞭毛虫綱のリード数は8月調査と同様に高く維持されていたことによるものと考えられる。アーケプラスチダは、St. A と St. B ともに表層0.5 m で最も検出率が高く、深度方向に減少する傾向が認められた。

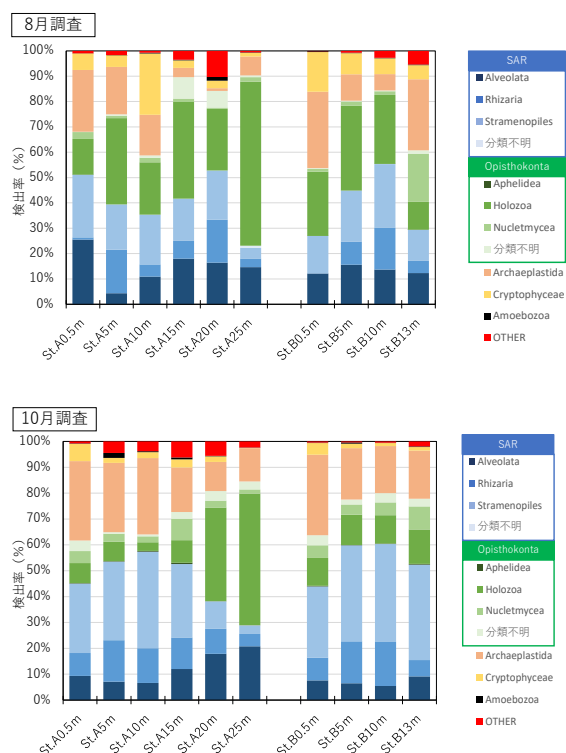


図 27 18S rRNA 遺伝子を対象とした微生物叢解析

4. 3. 5 細菌叢比較

16S rRNA 遺伝子を対象とした検体間の微生物叢の類似度を Bray-Curtis 距離を用いた主座標分析結果により図 28 に示す。各試料における細菌・古細菌の群集構造は、第 1 軸により 20.99%、第 2 軸により 14.83% を説明することができた。

全層循環期である令和 3 年（2021 年）12 月の試料は、全て図の左上の所にプロットされていた。

一方で、水温躍層形成期の試料は、試料の水深が変わると同一日に採取した試料であっても、プロットされる位置は大きく変化していた。ただし、水深 25 m の試料は採取日が異なっても、図の左下の位置にプロットが集中していた。その理由として、湖底直上で水塊が停滞し、且つ、貧酸素環境であることから、環境の変化に乏しく、微生物叢の変化も少なかったものと考えられる。水深が浅くなるにつれて、プロット的位置は図の右上に移動していく傾向にあった。ただし、令和 3 年（2021 年）7 月 2 日の表層（0 m）試料は図の右下の方にプロットされていた。これらの試料にはジオスミンの生成報告のあるドリコスペルマム属が多く検出されていることから、高濃度にジオスミンを生成する細菌叢を主座標分析のプロットから予測できる可能性があるが、この点についてはさらなるデータの蓄積が必要である。

また、表層でジオスミンが非検出となった 7 月後半から 8 月、9 月にかけて、プロットは左上に移動した。しかし、令和 2 年（2020 年）8 月 20 日と令和 3 年（2021 年）8 月 24 日のプロットや、令和 2 年（2020 年）10

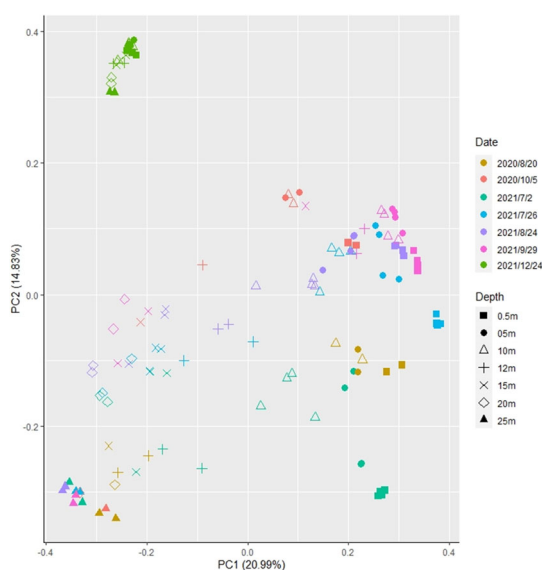


図 28 16S rRNA 遺伝子を対象とした主座標分析

月 5 日と令和 3 年（2021 年）9 月 29 日のプロットを比較すると、年度が違っても採取時期が似ていても、水温などの環境条件が異なるのであまり近くにプロットされておらず、菌叢全体としては類似度が低かった。

4. 4 WEP システムを導入しているダムにおける水質改善効果の確認のまとめ

本研究では、WEP システムを導入しているダム貯水池において、WEP システムの水質改善効果の確認を行った。その結果、WEP システム設置点付近では、最下層で濃度が高かった溶解性のリンや鉄、マンガンが、WEP システムの稼働範囲において、急激に濃度が減少した。これは WEP システムから供給される高濃度酸素水により、底層から溶出した溶解性のリンや金属が粒子化され沈降することで、表層への移動が制限され、表層では植物プランクトンは強いリン制限を受けていた可能性が示唆された。また、WEP システムの効果は、約 600 m 離れた地点においても波及していたことが示唆された。

一方、NGS による微生物叢解析の結果、光学顕微鏡による同定結果と比べ、極めて多くの種類に分類することができた。さらに、光学顕微鏡では検出されなかったカビ臭産生種を含むシアノバクテリア門を NGS により網羅的に検出することができた。これにより相対存在比の増減を把握することができ、カビ臭原因種を推定することができた。このことから、NGS は水質障害の原因種を特定するために効果的な手法であることが示唆された。また、下層部で好気性細菌が優占している、夏期の表層のシアノバクテリア門が抑制傾向にあるなど、WEP システムが微生物叢や物質循環に影響を与えていることが示唆された。しかし、これがアオコやカビ臭の発生に与える影響については現時点では不明確な点も多く、今後、ダム貯水池において NGS で検出される原核生物および真核生物を含めた詳細な検討を行う必要がある。

5. まとめ

本研究では、ダム貯水池水質モニタリングの効率化に資する NGS 解析手法の開発に関して、既存のユニバーサルプライマーの塩基配列を一部変更することによりに既往のプライマーよりも網羅的にプランクトン類を検出でき、検鏡と同等以上の高度なモニタリングが可能であることが示唆された。機械学習による自動画像認識技術を用いたプランクトンの判別技術の開発に関して、ダム管理所から実務に用いた画像を取

13 地域の水利利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発

集することで、効率的な自動画像分類モデルの構築が可能となり、認識率が0.73-1.00の分類モデルを作成することができた。今後は、質の高い訓練データ数を増やすことにより、認識率を向上させ、現場での導入を見据えた検討をしていく。WEPシステムが導入されているダム貯水池における水質改善効果のNGSを用いた検討について、光学顕微鏡では検出されなかったカビ臭産生種を含むシアノバクテリア門をNGSにより網羅的に検出することができた。これにより、相対存在比の増減を把握することができ、カビ臭原因種を推定することができた。さらに、本ダム貯水池ではシアノバクテリア門の検出割合は他の富栄養化が問題となっているダム貯水池と比べ比較的低く、WEPシステムによるシアノバクテリア抑制効果を示唆するような関連性も確認された。今後は、NGSの定量性を改善する手法やダム貯水池においてNGSで検出される原核生物および真核生物を含めたダム貯水池における微生物間のネットワーク解析などの統計解析手法の検討を重ねることにより、効果的な水質管理に向けた研究を進めていく予定である。

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：ダム貯水池水質調査要領、pp.1-VII-7、2015年3月
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 對馬育夫、武田文彦、金子陽輔、南山瑞彦：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及び藻類増殖に関与する水質項目の影響評価）、平成28年度研究開発プログラム報告書（13.地域の水利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.15-20、2017
- 7) 對馬育夫、小川文章：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29年度研究開発プログラム報告書（13.地域の水利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.15-20、2018
- 8) 對馬育夫、小川文章：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、2020
- 9) 對馬育夫、山下洋正：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）、令和元年度研究開発プログラム報告書（13.地域の水利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.24-29、2019
- 10) 對馬育夫、山下洋正：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）、令和2年度研究開発プログラム報告書（13.地域の水利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.27-38、2019
- 11) Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO: The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596, 2013
- 12) 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
- 13) 国土交通省：ダム貯水池水質改善に向けた気泡式循環施設マニュアル（案）～富栄養化対策のための気泡式（曝気式）循環施設に関する技術資料～、pp.1-1-5-63、2021
- 14) 對馬育夫：ダム湖周辺の水環境改善に向けた植物プランクトン試験効率化システムの開発、令和2年度河川基金研究成果発表会 https://www.kasen.or.jp/Portals/0/pdf/_jyosei/%E9%85%8D%E5%B8%83%E8%B3%87%E6%96%99_%E3%82%B3%E3%83%BC%E3%82%B9%E2%91%A0.pdf（2021年6月アクセス）
- 15) 河川環境データベースウェブサイト「河川水辺の国勢調査 生物リスト」 <http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/seibutsuList.htm>（2021年6月アクセス）
- 16) Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, and Jian Sun. Deep residual learning for image recognition. In Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition, pp. 770-778, 2016.
- 17) Mitsuru Sakamoto: Primary production by the phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake depth. *Arch. Hydrobiol* 62:1-28, 1966

13 地域の水利利用と水生生態系の保全のための水質管理技術の開発

- 18) 今井章雄：湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究、平成 27 年度環境研究総合推進費 終了 成果 報告 書、
https://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo_report/h27/pdf/5-1304.pdf (2021 年 6 月アクセス)
- 19) 中菌孝裕、阿部千雅、鈴木譲：霞ヶ浦の底泥表層の巻き上げ時における栄養塩類と鉄・マンガンの溶出特性、EICA、14、pp.45-52、2009
- 20) 大脇哲生、星山英一、中田泰輔、村岡和満：高濃度酸素供給によるダム貯水池底層の重金属類の低減効果、環境システム研究論文発表会講演集、40、pp.251-256、2012
- 21) 新山優子、辻彰洋：藍藻ネンジュモ目の浮遊性種の分類学的変更と類似種の比較、陸水学雑誌、74 (3)、pp.153-164、2013
- 22) 国立科学博物館標本・資料データベース「ダム湖の植物プランクトン」
<https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/dam/c2-1-0.html>
- 23) Hideyuki Tamaki, Yasuhiro Tanaka, Hiroaki Matsuzawa, Mizuho Muramatsu, Xian-Ying Meng, Satoshi Hanada, Kazuhiro Mori, Yoichi Kamagata: *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. Nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1442-1447, 2011
- 24) Ran Mei, Masaru K. Nobu, Takashi Narihiro, Wen-Tso Liu: Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses Revealed Uncultured Bacteroidales Populations as the Dominant Proteolytic Amino Acid Degradors in Anaerobic Digesters. *Front Microbiol.* 30:11-593006, 2020
- 25) Keiji Watabanbe, Tatsumi Kitamura, Yusuke Ogata, Chie Shindo, Wataru Suda: *Flavobacterium ammonificans* sp. Nov. and *Flavobacterium ammoniigenese* sp. Nov., ammonifying bacteria isolated from surface river water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 72: 005307, 2022
- 26) Kato and Ohkuma: A single bacterium capable of oxidation and reduction of iron at circumneutral pH. *Microbiol. Spectr.*
<https://doi.org/10.1128/Spectrum.00161-21>
- 27) Carlos R. Cattaneo, Yadira Rodríguez, Elson R. Rene, Octavio García-Depraect, Raúl Muñoz: Biogas bioconversion into poly(3-hydroxybutyrate) by a mixed microbial culture in a novel Taylor flow bioreactor. *J. Waster Manag.* vol. 150, no. 1, p.364-372, 2022
- 28) Pedro J. Cabello-Yeves, Rohit Ghai, Maliheh Mehrshad, Antonio Picazo, Antonio Camacho and Francisco Rodriguez-Valera: Reconstruction of diverse Verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs. *Front Microbiol.*8:2131, 2017
- 29) Naoshi Fujimoto, Keigo Mizuno, Tomoki Yokoyama, Akiko Ohnishi, Masaharu Suzuki, Satoru Watanabe, Kenji Komatsu, Yoichi Sakata, Naohiro Kishida, Michihiro Akiba, Satoko Matsukura: Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J. Gen Appl. Microbiol.* 61:171-176, 2015
- 30) 大久保智司：分子生物学的手法で見えてきたシアノバクテリアの分布と多様性、植物科学の最前線(BSJ-Review)、1:43-56、2010

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、小川文章、南山瑞彦、
對馬育夫、村田里美、服部啓太、
武田文彦、金子陽輔

【要旨】

本研究では、微量金属が藍藻類の生長に及ぼす影響について検討するために、アオコ発生の主要な原因藻類と考えられる *M. aeruginosa* を用いた 3 種の藻類生長試験を行った。ダム貯水池表層水に Mn 添加を行った試験の結果では、一部のダム貯水池表層水では Mn 添加により *M. aeruginosa* の生長が促進されることが明らかになった。5 種の金属の添加を行った試験の結果では、*M. aeruginosa* の生長に対して Fe が第一制限物質となること、Mn と Co が第二制限物質となることが示唆された。Fe 濃度を調整した培地の試験の結果では、Fe 濃度が 20 µg/L 以下と 50 µg/L 以上の場合で生長に明確な違いが表れ、ダム貯水池における Fe 濃度が実環境中の *M. aeruginosa* の生長に対しても影響してい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*、微量金属、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ことから、栄養塩濃度によって湖沼・ダム貯水池の植物プランクトンの状況を分類できると考えられているが²⁾、近年の研究では、窒素・リンに加え、鉄 (Fe) などの微量金属も植物プランクトンの生長に必須な物質であることが示唆されている³⁾。

既往の研究においては、実湖沼での水質調査から DRMn (dissolved reactive manganese) のような溶解態のマンガン (Mn) が湖沼における一次生産量の決定に寄与する一因子であることが提案されている⁴⁾。また、藍藻類 *Synechocystis* の生長については、鉄源として Fe-EDTA を与えた藻類培養培地において Mn 欠乏の状況下ではほとんど増殖しないが、Mn 共存下では増殖が促進されるとの知見がある⁵⁾。

上記の通り、微量金属は水環境中のアオコ発生（藍藻類の異常増殖）に対して関連されることが考えられるが、既往研究の培養試験で用いられたのは藻類培養培地であり、実環境水においても同様の結果が得られるか否かを検証した研究例や実環境中の金属濃度を考慮した事例は少ない。そこで本研究では、アオコ発生

の主要な原因藻類と考えられる *Microcystis aeruginosa* を用いて複数の藻類生長試験を実施し、微量金属がダム貯水池の藍藻類の生長に及ぼす影響について検討した。

2. ダム貯水池表層水における藻類生長に対する Mn 添加の影響の検討

既往研究等から藍藻類の生長に対して Mn が強く影響することが考えられた。そこで平成 28 年度では、Mn がダム貯水池表層水における藍藻類への生長に対する影響を把握することを目的として、4 つのダム貯水池表層水に対し Mn 添加・無添加での藻類生長試験を行った。

2.1 方法

2.1.1 使用したダム貯水池表層水と培地の作成方法

本実験では、国内の A～D ダム (2016 年 9 月採水) の表層水を試験に供した。それぞれ採水水深は水面から 0.5 m とした。水質項目として TN、TP、NH₄-N、NO_x-N (NO₂-N と NO₃-N の総和)、PO₄-P、T-Fe、D-Fe、T-Mn、D-Mn、DOC を測定した。これらの水試料は藻類生長試験に供するまで 4℃暗所で保管した。

試験に供する培地の作成においては、それぞれのダム貯水池表層水に対し、0.22 µm ポアサイズのメンブレンフィルターでろ過滅菌を行った。ろ過滅菌を行っ

表1 各ダム貯水池表層水の水質分析結果

	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	NO ₂ -N + NO ₃ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	T-Fe (μg/L)	D-Fe (μg/L)	T-Mn (μg/L)	D-Mn (μg/L)	DOC (mg/L)
A ダム	0.355	0.140	0.014	0.155	0.018	2663	43.7	141	35.2	1.10
B ダム	0.266	0.025	0.010	0.173	0.007	96.1	14.0	12.9	ND	0.24
C ダム	0.232	0.017	0.012	0.168	ND	61.8	15.5	24.0	0.32	0.85
D ダム	1.225	0.149	0.009	0.867	0.018	3274	61.9	135	4.86	1.02

ND: Not Detected

た各ダム貯水池表層水を用いて Mn 添加・無添加系を用意し、Mn 添加系には溶存態マンガン濃度が 30 μg/L 上昇するように MnCl₂・4H₂O を添加した。この濃度は CB 培地におけるマンガン濃度を参考に決定した。

2.1.2 藻類生長試験

藻類生長試験に供した藻類株は、国立研究開発法人国立環境研究所 NIES Collection より分譲された *M. aeruginosa* (NIES-87 株) を使用した。*M. aeruginosa* の継代培養には富栄養培地である CB 培地を使用した。

試験では、オートクレーブで加熱滅菌 (121°C、15 分) した 50 mL 三角フラスコに対し、作成した各培地を 30 mL 分注し、初期細胞濃度が 1.0×10⁴ cells/mL となるよう *M. aeruginosa* を接種した。培養条件は光強度 40 μmol/m²/s、明暗 12 時間周期、25±1°C、90 rpm 回転振とうとし、人工気象機内で培養した。各培養系はいずれも 4 連とした。培養開始から 3 日あるいは 4 日おきに細胞濃度を測定した。これらの条件は Algal Growth Potential (AGP) 試験⁶⁾を参考にした。各培養系において、AGP 試験に基づき 1 日あたりの平均細胞濃度増加率が 5%未満となった場合に培養を終了した。Mn 添加・無添加における最大細胞濃度について、有意差の有無を t 検定 (有意水準 α=0.05) により評価した。

2.2 結果と考察

2.2.1 ダム貯水池表層水の水質

各ダム貯水池表層水の水質項目の分析結果を表 1 に示す。全般的に、A ダム、D ダムは B ダムや C ダムに比べて各水質項目の濃度が高い傾向にあることが分かった。

2.2.2 Mn 添加がダム貯水池表層水での藻類生長に及ぼす影響

図 1 に各ダム貯水池表層水における Mn 添加・無添加時の *M. aeruginosa* の生長曲線を示す。C ダムの水では、Mn 添加系の方が培養開始時から生長速度が大

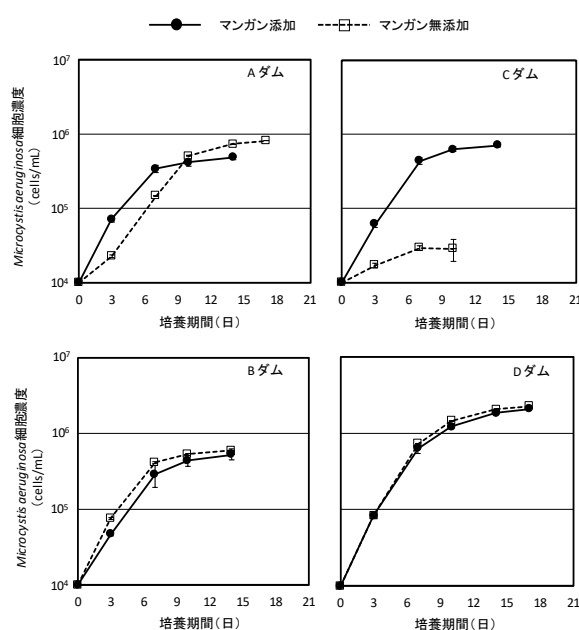


図1 ダム貯水池表層水における藍藻 *M. aeruginosa* の生長に及ぼす Mn 添加の影響

きく、最大細胞濃度も有意に増大した。A ダムでは培養開始から 7 日目までは Mn 添加系の方が細胞濃度が高く Mn 添加により初期の生長速度が増加した。一方、最大細胞濃度はマンガン無添加系の方が有意に大きかった。B ダム、D ダムでは Mn 添加の有無に関係なくほぼ同じ生長曲線を描いたが、最大細胞濃度は B ダムではわずかながら Mn 無添加の方が有意に高く、D ダムでは Mn 添加・無添加系で同等となった。

試験の結果、A ダムと C ダムの水ではマンガン添加による *M. aeruginosa* の生長が促進され、B ダムと D ダムでは促進しないことが確認された。表 1 に示した各水質項目をみると、例えば A ダムの水は D-Fe、D-Mn いずれも他のダム貯水池表層水より高い傾向にもあるにもかかわらず Mn 添加による生長促進が確認され、一方でそれらの濃度が最も低い B ダムでは Mn 添

加による生長促進がないなど、一貫性のある傾向が見られなかった。本研究では既往の研究⁹⁾を参考に Mn に着目して評価を行ったが、Mn 存在下において摂取能力が向上する微量元素は Fe 以外にもあると推定され、その微量元素の解明とダム貯水池表層水中の濃度測定が重要であると考えられた。また、A ダムの水では Mn 添加系の最大細胞濃度が低下した。既往の知見や土木研究所の先行研究ではこれまでにそのような事例はなく、原因は不明である。今後も知見を収集し、そのメカニズムについて検討する予定である。

3. ダム貯水池表層水に 5 種の金属を添加した藻類生長試験

2.2 にてダム貯水池表層水においても Mn の添加により、藻類の生長が促進される可能性が示唆された。そこで平成 30 年度では、*M. aeruginosa* の飼育・継代に使用される MA 培地中 (表 2) に含まれる 5 種の金属 (Fe、Mn、亜鉛 (Zn)、コバルト (Co)、モリブデン (Mo)) に着目した。*M. aeruginosa* の生長に対するこれらの金属の影響を明らかにすることを目的とし、ダム貯水池表層水に 5 種の金属を添加した培地を用いて *M. aeruginosa* の生長試験を行った。

3.1 方法

3.1.1 使用したダム貯水池表層水と培地の作成方法

本実験では、2.1 で対象とした A~D ダムからダム貯水池表層水を採取し (2018 年 9 月採水)、生長試験に供した。4 つのダム貯水池表層水に加えて、対象区として Milli-Q 水を供した。それぞれのダム貯水池表層水は 5 種金属 (Fe、Mn、Zn、Co、Mo) を測定した。金属分析では硝酸を用いた前処理操作を行い、測定は ICP-MS (X7CCT, Thermo Fisher Scientific 製) を用いた。

培地の作製においては、ダム貯水池表層水または Milli-Q 水 (水道水を超純水製造装置 (Merck 製) により精製した超純水) に MA 培地の栄養塩類成分を添

加したものを No Metal 培地とした。No Metal 培地を基に各金属成分を一種類ずつ表 2 に示す濃度になるよう添加し、1 つのダム貯水池表層水につき 32 パターン (表 3) の金属を含む培地を作成した。作成した培地は 0.22 μm ポアサイズのメンブレンフィルターにより濾過滅菌を行い、生長試験に用いた。

3.1.2 藻類生長試験

生長試験における藻類株は *M. aeruginosa* を使用し、継代培養には MA 培地を用いた。

生長試験では多数の培地の検討を簡易に可能とするために、96 穴のマイクロプレート上で *M. aeruginosa* を培養する手法を用いた⁷⁾。生長試験では各培地 200 μL と約 2.2×10⁶ cells/mL に濃度調整した藻類細胞懸濁液 20 μL をウェルに添加し、温度 25±1 °C、光強度 40 μmol/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、

表 2 MA 培地成分表

MA 培地成分一覧 (mg/L)			
栄養塩類成分 (No Metal 培地成分)		金属成分	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	50	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.5
KNO ₃	100	MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.0
NaNO ₃	50	ZnCl ₂	0.5
Na ₂ SO ₄	40	CoCl ₂ · 6H ₂ O	5.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	50	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.8
β-Na ₂ glycerophospher · 5H ₂ O	100		
Bicine	500		
H ₃ BO ₃	20		
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5.0		

表 3 培地の金属添加パターン

	金属種数																								
	0	1				2				3				4				5							
Fe	○				○	○				○	○				○	○	○	○		○		○	○	○	○
Mn		○			○		○	○				○	○				○	○	○	○	○		○	○	○
Zn			○			○	○		○			○	○				○	○	○	○	○	○		○	○
Co				○			○	○				○	○	○			○	○	○	○	○	○		○	○
Mo				○				○	○				○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○

生長の傾向が明確に表れる 3、5、7 日目に測定を行った。培養は一つの金属添加パターンに対して 5 ウェルを用いて行い、以下では測定した吸光度は平均値 (n=5) で評価した。

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、*M. aeruginosa* の増殖を規格化して各培地の生長を評価した。

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

3.2 結果と考察

ダム貯水池表層水の金属分析の結果を表 4 に示す。4 つのダム貯水池表層水の金属濃度は低く、今回測定対象とした 5 種の金属はほとんどが測定限界値未満であった。

生長の傾向が明確に表れた 7 日目の生長指数を図 2 に示す。4 つのダム貯水池表層水と Milli-Q 水すべてにおいて、Fe を含まない培地では、7 日目の生長指数

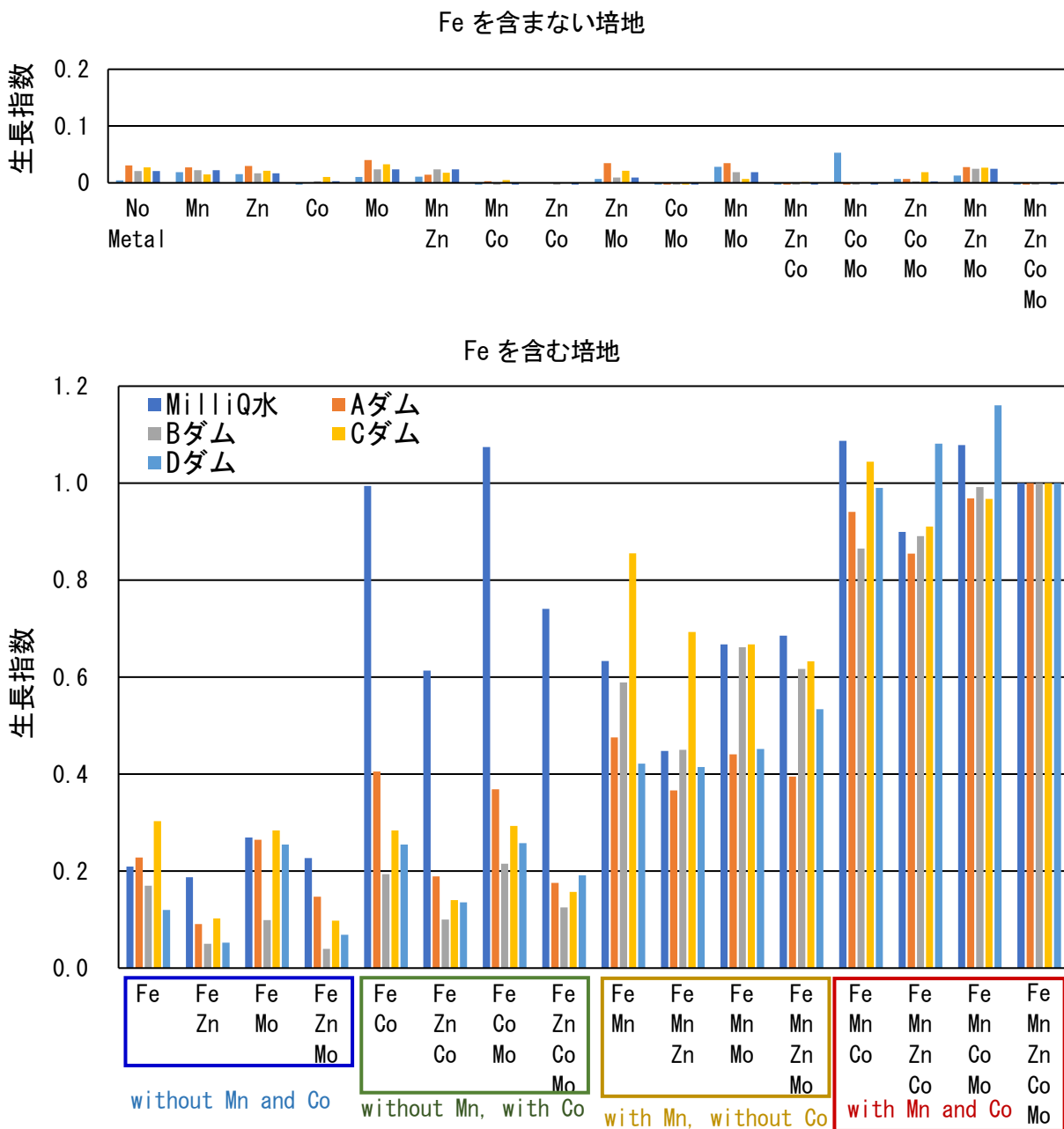


図 2 *M. aeruginosa* の生長に対する 5 種の金属の影響

が0.1以下と *M. aeruginosa* の生長が制限された。この結果より、本実験系では *M. aeruginosa* の生長に対して Fe が第一制限物質となることが示唆された。Fe を含む培地を比較した場合、Mn と Co をどちらも含まない培地では生長指数がすべて 0.4 以下であった。一方、Mn と Co の両方を含む培地では、すべての培地で生長指数が 0.8 以上となり、Control と同程度の値を示した。これらの結果から、*M. aeruginosa* の生長に対して Mn と Co が第二制限物質となることが示唆された。Mn の効果は 2.2 と同様の結果が得られた。また、Co は *Anabaena* の生長に対して制限物質となることも報告されており⁸⁾、*M. aeruginosa* も Co が制限物質になりうるものと考えられた。

また、「Fe と Fe+Zn」や「Fe+Co と Fe+Co+Zn」などの「Zn を含まない培地と含む培地」を比較した場合、Zn を含む培地では生長指数が減少する傾向がみられた。Zn は一定の濃度で *M. aeruginosa* の生長を阻害することが報告されており⁹⁾、本実験においても Zn の影響により生長が阻害されたことが考えられた。

4 つのダム貯水池表層水と Milli-Q 水を比較した場合、Fe+Co や Fe+Co+Mo などの培地においては、Milli-Q 水を基にした培地は生長指数が 1.0 に近い値を示し、金属 5 種が含まれている培地とほぼ同様の生長を示した。一方、4 つのダム貯水池表層水を基にした培地は生長指数が 0.2–0.4 程度の値を示し生長が抑制された。ダム貯水池表層水には金属以外にも様々な物質が含有されるため、Milli-Q 水には含まれていない何らかの物質が Co の効果を低減させていることが考えられた。

4 つのダム貯水池表層水の比較では、生長指数に明確な違いは見られなかった。いずれのダム貯水池表層水も金属濃度は低く、生長に影響を与える微量金属はいずれも不足していたため、明確な違いは現れなかったと考えられた。

表 4 ダム貯水池表層水の金属濃度 (µg/L)

	Mn	Fe	Co	Zn	Mo
A ダム	1.11	DL	DL	DL	0.76
B ダム	DL	8.16	DL	DL	0.69
C ダム	DL	DL	DL	DL	0.78
D ダム	DL	DL	DL	DL	0.75

※DL: 測定限界 (各 DL の値は Mn: 0.27, Fe: 7.1, Co: 0.16, Zn: 2.0)

4. Fe 濃度の変化による藻類生長に対する影響の検討

3.2 の結果から微量元素の中で藍藻類の生長に Fe が最も重要であると考えられた。そこで令和元年度では、Fe 濃度の変化による藻類生長に対する影響の変化を把握することを目的として、Fe 濃度を変化させた *M. aeruginosa* の生長試験を行い、水環境中における Fe 濃度の変化が藍藻類の生長に与える影響を検討した。

4.1 Fe 濃度を調整した培地の作製と実験方法

本実験では Fe 濃度を変化させた培地による藻類生長試験の実施を試みた。培地の作成においては、Milli-Q 水に MA 培地 (表 2) の栄養塩類成分と $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 及び $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 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。生長試験は 3.1.2 と同様の方法で行った。

4.2 結果と考察

藻類生長試験の結果を図 3 に示す。試験の結果、0–20 µg/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 µg/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。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 µg/L から 5.0 µg/L 以下にまで低下することが確認されている¹⁰⁾。本実験においては、Fe 濃度が 0–20 µg/L の培地では Fe 濃度が不十分であり、十分な生長を示さなかったと考えられた。

また、既往研究において国内複数のダム貯水池の溶存態 Fe 濃度を調査した事例では 0–400 µg/L の濃度

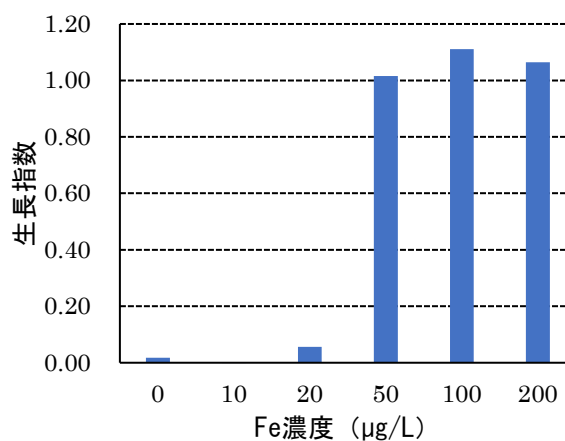


図 3 Fe 濃度と藻類生長指数の関係

範囲であり、また川内ダムでの連続的な調査において溶存態 Fe 濃度が 0–60 µg/L の範囲で変動することが報告されている¹⁴⁾。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. まとめ

本研究では、湖沼・ダム貯水池のアオコ発生（藍藻類の異常増殖）に対して影響を持つと考えられる微量元素について以下の結果を得た。

- 1) *M. aeruginosa* の藻類生長試験を Mn 添加・無添加の 4 種のダム貯水池表層水で実施した結果、一部のダム貯水池表層水では Mn 添加により *M. aeruginosa* の生長が促進されることが明らかになった。
- 2) 5 種の金属 (Fe, Mn, Zn, Co, Mo) の添加・無添加の組み合わせによる培地で藻類生長試験を実施した結果、Fe, Mn, Co は *M. aeruginosa* の生長に対して制限物質となることが示唆された。また、Zn は *M. aeruginosa* の生長を阻害する効果があることが示唆された。
- 3) Fe 濃度を変化させた培地で藻類生長試験を実施した結果、Fe 濃度が 20 µg/L 以下と 50 µg/L 以上の場合で *M. aeruginosa* の生長に明確な違いが表れ、これらの濃度域で藍藻類の生長傾向が大きく変化することが示唆された。

これらの結果より、富栄養化の著しいダム貯水池・湖沼の水質管理において Fe や Mn 等の微量元素濃度を把握することが重要と考えられた。Fe や Mn の供給源は流入河川からの外部負荷だけでなく湖底からの溶出による内部負荷も供給源の一つであることから、底層嫌気化の抑制等の底層環境改善について Fe や Mn の溶出抑制効果の把握を進めることが期待される。

また、本研究の成果の一部は「ダム貯水池水質改善に向けた気泡式循環施設マニュアル(案)～富栄養化対策のための気泡式(曝気式)循環施設に関する技術資料」に記載され、藻類の基礎的な知見を提供することでダム貯水池の水質管理に貢献した。

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) 牛島健、藤田俊司、草場智哉、森川一郎、熊谷清、土居邦弘：日本のダム貯水池の水質の現状と水質保全対策について、大ダム、Vol.208、pp.51-58、2009
- 3) 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元素の影響、日本水処理生物学会誌、Vol.26、No.2、pp.44-55、1995
- 4) Cudowski A. : Dissolved reactive manganese as a new index determining the trophic status of limnic waters. Ecol. Indic. Vol. 48, pp.721-727, 2015
- 5) Sharon S., Salomon E., Kranzler C., Lis H., Lehmann R., Georg J., Zer H., Hess W. R. and Keren N. : The hierarchy of transition metal homeostasis: Iron controls manganese accumulation in a unicellular cyanobacterium. Biochim. Biophys. Acta. Vol.1837, pp.1990-1997, 2014
- 6) 日本下水道協会：下水試験方法上巻、pp.554-562、1997
- 7) 山下尚之、福永彩、田中宏明：緑藻類、珪藻類および藍藻類を供試藻類としたマイクロプレートを用いる AGP 試験の検討と河川水および下水処理水の水質評価、環境科学会誌 30(4)、pp.250-260、2017
- 8) 南條吉之、永美敏正、若林健二、道上隆文、森明寛、奥田益算：湖山池でアオコを形成する増殖試験結果について、鳥取県衛生環境研究所報、第 43 号、pp.45-48、2004
- 9) Haiming W., Li L., Guangzhu S., Ming L. : Heavy-metal pollution alters dissolved organic matter released by bloom-forming *Microcystis aeruginosa*, RSC adv, 7, pp.18421-18428, 2017
- 10) Nagai T., Akio I., Kazuo M., Takehiko F.: Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation, Limnology, 8, pp.261-270, 2007
- 11) 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（機械学習手法を用いたダム貯水池におけるアオコ発生予測の検討）

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、小川文章、南山瑞彦、
平山孝浩、對馬育夫、服部啓太、
金子陽輔

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、猪股広典、櫻井寿之、
宮川仁、中西哲

【要旨】

本研究では、気候変動の影響によりダム貯水池において発生頻度が増大すると考えられているアオコ発生予測手法の検討として、既存の実測データを基にした Chl-a 濃度予測モデル及び計算結果を基にした長期 Chl-a 濃度予測モデルの構築を試みた。短期 Chl-a 濃度予測モデルを構築した結果、最も高い予測精度を示したダムにおけるモデルの相関係数は $R=0.70$ であり、藻類の夏季の濃度ピークをある程度再現可能であった。一方で、Chl-a 濃度の変動が複雑なダムでは十分な予測精度が得られなかった。これらの原因は Chl-a 濃度のみでは藻類種に応じた増殖の特性をとらえられていないためと推測され、予測精度の向上には異なった変数の学習データが必要と考えられた。また、計算結果を基にした長期 Chl-a 濃度予測モデルを構築した結果、1 ヶ月間の平均 Chl-a 濃度を精度よく予測することができ、計算結果を基にした機械学習モデルの長期的な予測手法としての有用性が示された。

キーワード：ダム貯水池、アオコ発生、機械学習手法、短期予測、長期予測

1. はじめに

国内のダム貯水池では、特定の藍藻類の異常増殖によるアオコ発生やアオコの集積・腐敗による悪臭が水質管理上の問題となっている。特に利水目的を有するダム貯水池では利水障害の発生につながり、ダム下流域の社会活動に影響をおよぼすことも懸念される。また、気候変動による水温上昇や流出特性の変化は藻類濃度の増加に寄与する可能性が示唆されており、将来気候下では水環境におけるアオコ発生の頻度・規模が増加することが想定される。

ダム貯水池の水質管理や対策手法導入の検討のためにアオコ発生の予測技術が求められる。しかし、従来の物理・化学・生物学的プロセスを基にした生態系モデルでは、藻類濃度の短期的な変動予測を高い再現性で行うことは難しい。また、貯水池の流動と生態系を計算する水質シミュレーションは高度な専門知識を必要とするため、個々のダム貯水池ごとに独自で実施することは困難である。近年、水質予測の分野においては、統計学的手法を用いた再現・予測モデルが様々

な研究で検討されており、霞ヶ浦におけるアオコ発生を検討した既往研究では、機械学習手法を生態系モデルに組み込んだ予測手法の構築を行い、優れた予測精度が得られたことを示しており²⁾、その他の水域においても様々な検討がなされている^{3, 4)}。このように機械学習手法は、データが充実している現象に対する再現・予測手法として画期的なアプローチとなることが期待されている。加えて、現象をモデル化した従来のシミュレーションモデルの計算結果を学習に用いるデータとして使用し、それらを基にした機械学習による予測手法等も環境分野では検討が行われている⁵⁾。閉鎖性水域の水質変化を考えたときに、流量や気象等の短期的な変動が大きく、水質に密接にかかわっていると考えられるデータから水質を予測できる可能性が考えられる。一方で、データから予測できる事象は実測データが存在するものに限定される。十分なデータがない事象の中長期的な変動を予測する際には、数値計算による計算データを基にした予測が有効となることも考えられる。

そこで本研究では、アオコ発生が確認されているダム貯水池を対象として水質や気象、水象、その他データの収集を行い、実測データを基にした短期的なChl-a濃度の予測モデルの構築を試みた。また、ダム貯水池の計算結果を学習データとした、長期的なChl-a濃度の予測手法の構築を試みた。

2. 実測データに基づく機械学習手法を用いた短期予測モデルの構築

2.1 方法

2.1.1 対象としたダムと実測データ

本研究においては、アオコの発生が確認されている中国地方の5つのダムを対象としてモデル構築を行った。

5つのダムのアオコ発生に関する諸元と解析対象の期間を以下に記す。

Aダム及びBダムでは2012年の竣工から6年間のうち3年間でアオコの発生が確認されている。本研究では2012年1月から2017年2月を解析対象期間とした。

Cダムでは2011年の竣工から7年間のうち5年間でアオコの発生が確認されている。本研究では2011年

3月から2017年12月を解析対象期間とした。

Dダムに関しては少なくとも1998年よりアオコの発生が確認されている。なお、Dダムは2008年以降、アオコ対策施設としてフェンスと表層水移送装置が設置されており、水質改善対策の前後でアオコ発生の特性が変化することが考えられるため、本研究では2000年1月から2007年12月までを解析対象期間とした。

Eダムでは2004年の竣工から14年間のうち5年間でアオコの発生が確認されている。研究では2004年6月から2016年8月を解析対象期間とした。

これらのダムで取得・管理されている実測データを本研究では解析用のデータとした。検討に用いたデータの一覧を表-1に示す。湖沼・貯水池における藻類の増殖に強く影響すると考えられる気象・水象・貯水池水質・流入水質の大項目にデータを分類し、それらの中で取得可能なデータを下記の通りに整理して入力変数とした。また、これらの季節に関わる情報が重要であると考えたため季節変数を入力変数に加えた。

2.1.2 機械学習手法を用いた短期予測モデル構築方法

本研究では、機械学習手法として代表的な手法である全結合型のニューラルネットワークモデル（NNモ

表-1 モデル構築に用いたデータ

項目		観測・算出	単位	備考	
気象	気温	日平均気温	観測	°C	
		前30日平均気温	算出	°C	
	日射	日平均日射量	観測	MJ/m ²	
		前30日平均日射量	算出	MJ/m ²	
	風速	日平均風速	観測	m/s	
雨量	ダム地点雨量	観測	mm		
水象	流量	ダム流入量	観測	m ³ /s	
		前30日平均流入量	算出	m ³ /s	
	運用	ダム放流量	観測	m ³ /s	
		貯水位	観測	m	
		貯水量	算出	m ³	H-V式から算出
灌水面積	算出	m ²	H-A式から算出		
貯水池水質	水温	水深0.5m水温	観測	°C	
		水深5m水温	観測	°C	
		水温勾配	算出	°C	自動観測データ
	濁度	水深0.5m濁度	算出	度	自動観測データ
		栄養塩	貯水池上層T-P	観測	mg/L
		貯水池上層T-N	観測	mg/L	※1
流入水質	水温	流入水温	観測	°C	
		栄養塩	貯水池上層T-P	観測	mg/L
			貯水池上層T-N	観測	mg/L
季節変数	月	※各データの対応する月を表す変数	観測	-	
出力	Chl-a	水深0.5mChl-a	観測	µg/L	

※1 月1回の定期観測データであるため、観測日間を線形補完することで日データとした

表-2 各ダムにおけるモデル構築の結果

ダム名	Aダム		Bダム		Cダム		Dダム		Eダム	
	全結合	LSTM	全結合	LSTM	全結合	LSTM	全結合	LSTM	全結合	LSTM
モデル										
入力変数	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
中間層数	4	1	4	1	1	1	5	1	1	1
ユニット数	32	5	64	10	16	5	64	1	10	2
	32		64				32			
	32		32				32			
	16		32				32			
							32			
学習率	0.0001	0.01	0.001	0.01	0.0001	0.01	0.0001	0.01	0.00001	0.0001
活性化関数	linear	linear	hard sigmoid	relu	linear	hard sigmoid	relu	relu	linear	linear
最適化	rmsprop	rmsprop	Adam	Adam	rmsprop	rmsprop	rmsprop	Adam	rmsprop	rmsprop
エポック	100	100	200	100	100	100	100	100	300	100
バッチサイズ	64	32	64	8	16	16	16	256	128	256
平均二乗誤差(RMSE)	7.33	6.66	33.39	33.02	9.12	9.38	11.27	12.93	21.50	20.98
相関係数	0.46	0.70	0.16	0.19	0.57	0.56	0.23	0.01	-0.15	-0.04

デル) と時系列データの取り扱いに優れるとされる長短期記憶モデル (LSTM モデル) を用いて Chl-a 濃度予測モデルの構築に取り組んだ。NN モデルや LSTM モデルについては参考文献で詳細が述べられているため^⑥、本報では数学的な説明等を省略する。中間層の活性化関数は代表的な関数である ReLU 関数、linear 関数、hard sigmoid 関数の3つについて感度解析を行い、最も高い精度 (RMSE 及び相関係数) が得られた関数をそれぞれのダムにおけるモデルで採用した。最適化手法についても rmsprop および Adam の両方について感度解析を行い、精度の高い手法を採用した。また、中間層の層数及び中間層の各ニューロン数については感度解析を行い、最も精度が良かったモデルの形状をそれぞれのダムで用いた。

モデルの構築においては、精度検証のために対象のデータを教師データとテストデータに分割した。教師データで作成したモデルの予測値をテストデータと比較することで、それぞれのモデルの精度を検証した。

加えて、一定の予測精度が得られたダムについて一部の入力データを変化させたモデルの構築を行い、入力変数の種類に関する感度解析を行った。これらの解析では、気象・水象・貯水池水質・流入水質・季節変数の大項目から一つずつ項目を除外し、モデルの精度の変化を確認した。

2.2 解析結果

2.2.1 各ダムにおけるモデル構築結果

表-2に各ダムにおけるモデルの構築結果を示す。AダムやCダムにおいては相関係数が0.5を超え、一定の精度を示すモデルが構築されたが、B、D、Eダムにおいては相関係数がすべて0.3以下であり、十分な予測精度を得ることが難しかった。

図-1に各ダムのテストデータ期間におけるChl-a濃

表-3 入力変数の項目群の組み合わせによる感度解析の結果

	Case-0	Case-1	Case-2	Case-3	Case-4	Case-5
気象	○		○	○	○	○
水象	○	○		○	○	○
貯水池水質	○	○	○		○	○
流入水質	○	○	○	○		○
季節変数	○	○	○	○	○	
RMSE	6.66	850.11	inf	7.51	314.64	6.82
相関係数	0.70	0.49	0.01	0.38	0.52	0.61

度の実測と高い精度を示したモデルによる予測値を示す。Aダムにおいては9~11月のChl-a濃度の上昇傾向を再現することができており、これらは夏~秋季の藍藻由来の植物プランクトンの増殖をある程度表現していると考えられた。Cダムにおいては6~7月のChl-a濃度の上昇傾向をある程度再現していたが、4~5月の珪藻由来と考えられるChl-a濃度の上昇傾向については再現が難しかった。B、D、EダムにおいてはChl-a濃度のピークが年間で複数のタイミングで観測されており、それらの変動傾向を再現することは難しく、十分な予測精度が得られなかった。

上記の結果から、Aダムにおいては本手法によるChl-a濃度予測が有効となる可能性が考えられたが、B、C、D、Eダムでは適用が難しいことが考えられた。これらの要因として、AダムにおいてはChl-a濃度の上昇が9~11月の時期に限られており、春季の珪藻由来と考えられるChl-a濃度の上昇が起こらないダムであるため濃度変化の予測が容易であると推察された。一方で、B、C、D、Eダムのような1年間を通じて複数のタイミングでChl-a濃度の上昇ピークが存在するようなダムでは、珪藻や藍藻等の植物プランクトン種の違いによる複数の濃度ピークが存在すると考えられ、これらの違いに起因する変動傾向を学習することは本研究で使用したデータからは難しいと推察された。

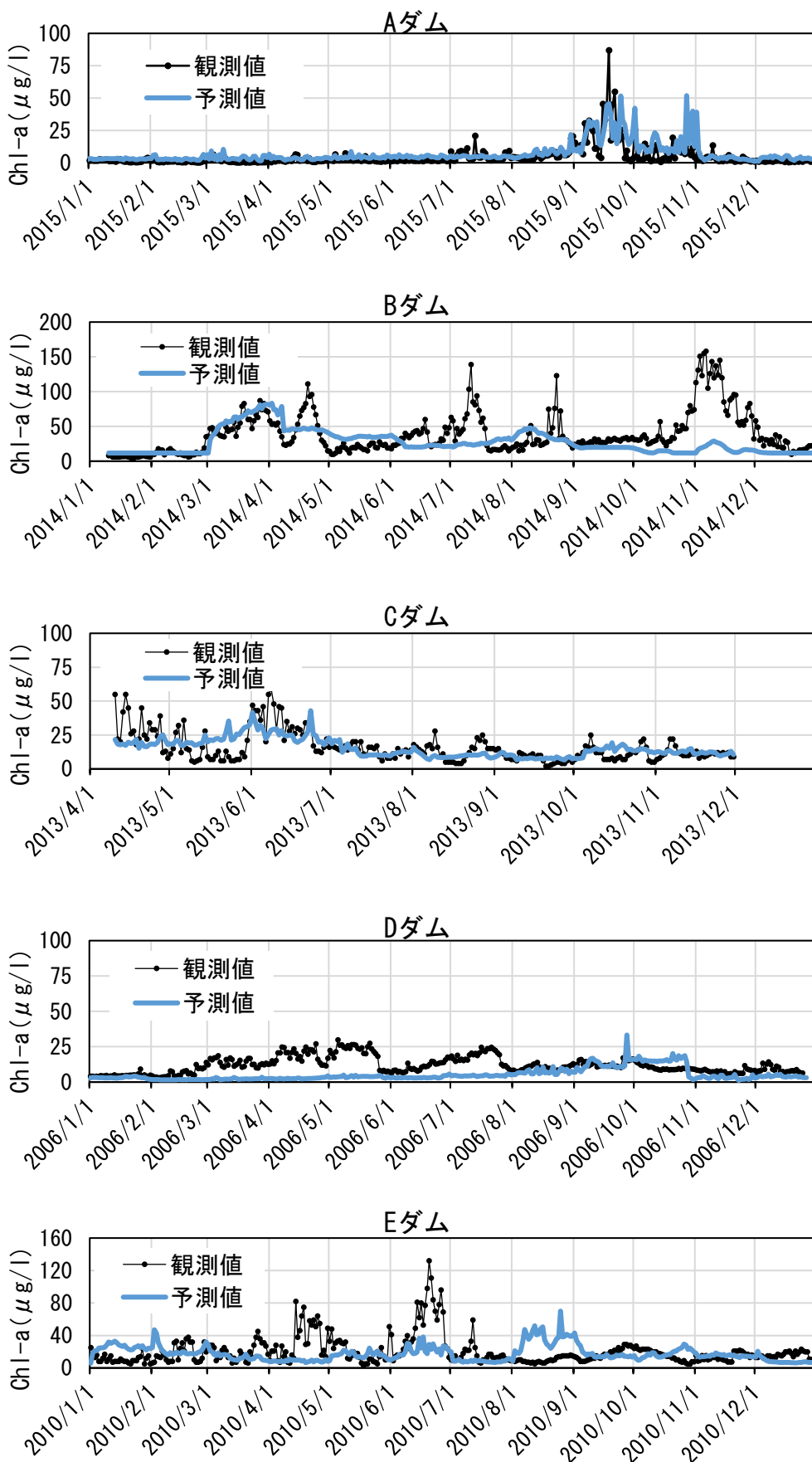


図-1 各ダムにおける短期予測モデルによる Chl-a 予測値と観測値の比較

2.2.2 入力変数を変化させた感度解析の結果

2.2.1にて最も高い精度が得られたAダムを対象として入力変数を変化させた感度解析を行った。それらの結果を表-3に示す。Aダムにおいては、すべての変数を入力データに使用したモデル(Case-0)に対して、大項目の変数群を一つずつ除いたそれぞれのモデル(Case-1~Case-5)は相関係数が低下する結果となっ

表-4 学習データに用いた計算結果の各ケースの条件

HPA_m02	貯水池規模 (m ³)					平均T-P濃度 (mg/l)		
	0.53億	0.8億	1.2億	2.4億	6.0億	0.005	0.015	0.05
	23回/年	15回/年	10回/年	5回/年	2回/年	最小	平均	最大
A-1	●					●		
A-2	●						●	
A-3	●							●
A-4		●					●	
A-5			●			●		
A-6			●				●	
A-7			●					●
A-8				●		●		
A-9				●			●	
A-10				●				●
A-11					●		●	

RCP_4.5	貯水池規模 (m ³)					平均T-P濃度 (mg/l)		
	0.53億	0.8億	1.2億	2.4億	6.0億	0.005	0.015	0.05
	23回/年	15回/年	10回/年	5回/年	2回/年	最小	平均	最大
B-1	●					●		
B-2	●						●	
B-3	●							●
B-4		●					●	
B-5			●			●		
B-6			●				●	
B-7			●					●
B-8				●		●		
B-9				●			●	
B-10				●				●
B-11					●		●	

RCP_6.0	貯水池規模 (m ³)					平均T-P濃度 (mg/l)		
	0.53億	0.8億	1.2億	2.4億	6.0億	0.005	0.015	0.05
	23回/年	15回/年	10回/年	5回/年	2回/年	最小	平均	最大
C-1	●					●		
C-2	●						●	
C-3	●							●
C-4		●					●	
C-5			●			●		
C-6			●				●	
C-7			●					●
C-8				●		●		
C-9				●			●	
C-10				●				●
C-11					●		●	

RCP_8.5	貯水池規模 (m ³)					平均T-P濃度 (mg/l)		
	0.53億	0.8億	1.2億	2.4億	6.0億	0.005	0.015	0.05
	23回/年	15回/年	10回/年	5回/年	2回/年	最小	平均	最大
D-1	●					●		
D-2	●						●	
D-3	●							●
D-4		●					●	
D-5			●			●		
D-6			●				●	
D-7			●					●
D-8				●		●		
D-9				●			●	
D-10				●				●
D-11					●		●	

たが、その低下の度合いは除いた変数群に応じて異なっていた。構築したそれぞれのモデルを比較したときに、水象データを除いたモデル(Case-2)は相関係数が0.01となり精度の低下が著しく、AダムのChl-a濃度予測に最も影響を与えている変数群であることが示唆された。一方で、季節変数を除いたモデル(Case-5)の精度低下は限定的であり、気象や貯水池水質などに含まれる気温や水温などのパラメーターが季節変数と同様の役割を果たすため、精度低下が限定的であると考えられた。

3. 水質計算結果を基にしたChl-a濃度長期予測手法の構築

3.1 方法

3.1.1 長期予測モデル構築における対象とした計算データ

本研究においては「13.3.2 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)」において構築した計算モデルを用いて、気象条件、貯水池の規模及び流入栄養塩濃度を変化させた各条件における計算を行い、それらの計算結果を基に表層Chl-a濃度の中長期的な予測を行う機械学習モデルの構築を行った。モデルの基となる計算ケースの一覧を表-4に示す。これらの計算の諸条件については「13.3.2 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・

表-5 モデル構築に使用した変数の一覧

変数	分類	項目	
入力変数	気象	気温	
		日射	
		雲量	
		風速	
		湿度	
	ダム諸量	流入量	
		貯水量	
		流入水質	流入T-P
			流入T-N
			流入水温
			流入SS(濁度)
		流入DO(溶存酸素)	
	季節	季節変数(1~12月を0.1で表現)	
	出力変数	貯水池水質	Chl-a濃度

表-6 構造を変化させたモデル構築の詳細と結果

項目	case3-1	case3-2	case3-3	case3-4	case3-5
モデル	全結合モデル	全結合モデル	全結合モデル	全結合モデル	全結合モデル
入力変数	13	13	13	13	13
中間層数	1	1	3	5	3
ユニット数	16	64	32	32	64
			32	32	64
			32	32	64
				32	
学習率	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
活性化関数	hard_sigmoid	hard_sigmoid	hard_sigmoid	hard_sigmoid	hard_sigmoid
最適化	rmsprop	rmsprop	rmsprop	rmsprop	rmsprop
エポック	100	100	100	100	100
バッチサイズ	16	16	16	16	16
RMSE	3.121	2.808	2.419	2.699	2.380
R ²	0.885	0.884	0.881	0.872	0.886
a	1.127	0.965	0.957	0.965	0.971

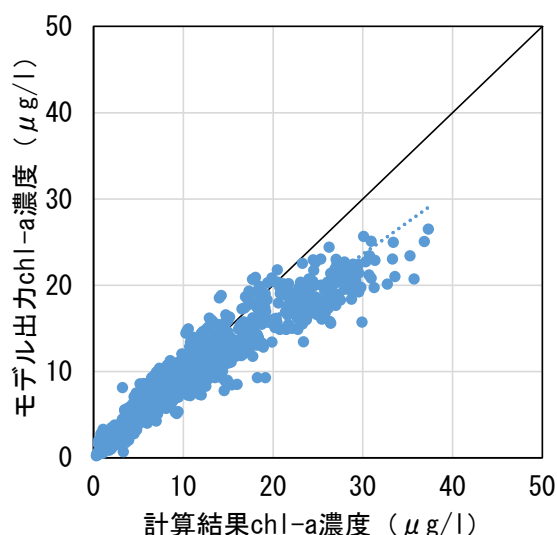


図-2 Case3-5における計算結果Chl-a濃度と機械学習による予測値の比較（月平均値）

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」に詳細が記載されている。これらの計算ケースを対象とした予測モデルを構築することで、気象条件・貯水池規模・流入栄養塩濃度が変化した場合にもChl-a濃度が予測可能となる手法の構築を試みた。

3.1.2 計算結果に基づく機械学習手法を用いた長期予測モデルの構築

機械学習手法で学習データとして使用した変数の一覧を表-5に示す。貯水量以外は貯水池の水質計算で外

力変数として使用するデータを主に採用し、外力によって貯水池内部の状態を推定できるかを検討した。予測モデルではChl-a濃度の月平均値を出力するために、これらの変数の同月の月平均値をモデルに入力した。

機械学習手法はNNモデルを採用し、活性化関数はhard_sigmoid、最適化手法はrmspropをそれぞれ用いた。中間層数および中間ユニット数についてはそれぞれを変化させた感度分析を行い、モデル構造の変化による応答を調べた。感度分析の際のそれぞれのモデル構造を表-6に示す。モデル構築においては3つの気候シナリオを学習データ、1つの気候シナリオをテストデータとして分割し、その組み合わせを4通り行って予測モデルをそれぞれ作成した。

予測モデルの精度検証においては、平均二乗誤差(RMSE)、相関係数(R²)、予測モデルの出力値と検証データによる回帰直線の傾き(a)を4通りの分割したモデルの平均値から算出し、それぞれのモデルの予測精度を評価した。本検討の予測モデルは夏季の濃度の再現性が重要であると考えたため、これらの値の算出においては、4-10月のデータのみを対象として計算を行った。

3.2 解析結果

機械学習手法を用いて構築した長期予測モデルの結果を表-6及び図-2に示す。構築したモデルによるR²はすべて0.8を超えており、一定の予測精度が得ら

れていると考えられた。また、モデルの構造の違いによる予測精度の差は大きく生じないと考えられる結果であった。構築したモデルは高濃度域の Chl-a 濃度をやや低く予測する傾向が見られ、高濃度域はサンプルプロットが少ないためこのような傾向が生じると考えられた。

本研究で作成したモデルは計算結果を基に予測するモデルであるため、計算結果を事前に作成可能な水域に限定されるが、中長期的な水質変動の予測にこのような機械学習手法を用いたアプローチの有効性が示唆された。

4. まとめ

機械学習手法を用いたアオコ発生予測手法の検討として、既存の実測データを基にした短期 Chl-a 濃度予測モデル及び計算結果を基にした長期 Chl-a 濃度予測モデルの構築を試みた。

既存の実測データを基にした短期 Chl-a 濃度予測モデルにおいては、一部のダム貯水池では相関係数が 0.5 を超え、一定の精度を示すモデルが構築できた。一方で、複数のタイミングで Chl-a 濃度の上昇ピークが存在するようなダム貯水池ではモデルの精度が低く、藻類濃度の指標として Chl-a 濃度のみを使用したデータセットからは珪藻や緑藻、藍藻等の複数の植物プランクトンのピークを含む年間の変動傾向を予測することは難しいと考えられた。

計算結果を基にした長期 Chl-a 濃度予測モデルにおいては、相関係数 R^2 が 0.8 を超える結果が得られ、一定の精度を有するモデルが構築できた。中長期的な水質変動の予測において、このような機械学習手法を用いたアプローチの有効性が示唆された。

上記の結果から、機械学習手法を用いた Chl-a 濃度の予測には解決すべき技術的課題が複数存在するもの

の、特定のケースでは有効な手法であると考えられた。現場の貯水池水質管理における短期的なアオコ発生への対策のための予測や気候変動による長期的な水質変化の予測に対して、このような手法が今後活用されることが期待される。

参考文献

- 1) 国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課：ダム貯水池水質改善に向けた気泡式循環施設マニュアル(案) ～富栄養化対策のための気泡式(曝気式)循環施設に関する技術資料～、2021
- 2) 長濱祐美、阿部真己、松本俊一、福島武彦：霞ヶ浦土浦入を対象に構築したアオコ予測システムの紹介、17th World Lake Conference、pp.339-341、2018
- 3) 齋幸治、原田昌佳、吉田勲、平松和昭、森牧人：ニューラルネットワークを用いた富栄養湖のクロロフィル a 濃度の推定、農業農村工学会論文集、No.250、pp.57-64、2008
- 4) 森雅也、山城広周、山本雄太、森楓、鈴木祥広、平岡透、野中尋史：機械学習を用いたダム湖上流における有害藻類ブルームの発生予測モデルの開発と発生要因分析への応用、情報処理学会第 83 回全国大会講演論文集、pp.505-506、2021
- 5) 樋田祐輔、千葉洋、朝岡良浩、長林久夫：流出解析モデルと機械学習を用いた下水道管渠内水位のリアルタイム予測手法、土木学会論文集 B1(水工学)、Vol.73、No.4、pp.649-654、2017
- 6) 斎藤康毅：ゼロから作る Deep Learning 2 ー自然言語処理編、オライリージャパン、2018

13.2 水質リスク軽減のための処理技術の開発

13.2.1 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

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、小川文章、南山瑞彦、平山孝浩、
北村友一、對馬育夫、鈴木裕識、金子陽輔、
小森行也、高沢真里、厚朴大祐

【要旨】

都市河川で検出される化学物質の中には、下水道を経由して到達するものが存在する。下水処理場における水質リスク軽減技術の開発については、平常時と災害時で適応技術が異なることに留意する必要がある。平常時は下水処理水中の残存する微量化学物質の除去技術の開発、災害時は流入下水に含まれる有害物質の応急的除去技術の開発が求められる。本研究は、平常時の下水処理水に残存する直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）、医薬品 3 物質（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）の担体を用いた追加的処理法の開発および災害時に被災した下水処理場を想定した沈殿処理での有害金属の除去特性を把握した。

下水処理水中の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）の除去については、流動型担体処理で除去率 90%を得るのに必要な水理的滞留時間は約 2 時間、99%では約 4 時間であることを確認した。

$\text{NH}_4\text{-N}$ が残存する下水処理水中の医薬品 3 物質（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）の除去については、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去率は水理的滞留時間 45 分の固定床型担体処理で 92%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、レボフロキサシン除去率は、9.6%、4.9%、72%となった。活性汚泥処理の後段に固定床型担体処理を追加することにより、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの下水処理全工程での除去率を 17%、51%、78%程度まで向上できることがわかった。

簡易沈殿処理における有害金属の除去特性については、Pb、As、B、Cu、Zn、Mn の簡易沈殿処理での除去率は 30%以下で、これらは沈殿除去困難物質であることがわかった。

キーワード：下水処理水、LAS、レボフロキサシン、微生物保持担体、簡易沈殿処理

1. はじめに

公共用水中で検出される多様な化学物質による汚染の実態や健康・生態影響に対する関心、懸念が高まっており、安全で快適な水環境の実現・保全に向けた取り組みが求められている。都市河川で検出される化学物質の中には、下水道を経由して到達するものもあることから、下水処理水中の化学物質の除去技術の開発が必要となる。水質リスク軽減技術の開発については、平常時と災害時で適応技術は異なる。平常時は下水処理水中の残存する微量化学物質の除去技術の開発、災害時は流入下水に含まれる有害物質の応急的除去技術の開発が求められる。

平常時としては以下の水質規制等の動向に対応可能な処理技術の開発が求められる。平成 25 年 3 月に直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（LAS）が水生生物の保全に係る水質環境基準項目として追加された。LAS は下水処理の標準活性汚泥法で 99%以上除去¹⁾²⁾されるが、回転生物接触法、礫間接触酸化法、好気性ろ床法、接触ばっき法、高速散水ろ床法の LAS 除去率は 87%~100%³⁾で、除去率が低下する場合もある。下水放流水中に LAS が高濃度で残存する場合は、下水処理工程で LAS の低減手法の開発が必要となる。

また、下水中には日常生活で使用されている医薬品類も存在している。下水処理における医薬品類の除去

特性については多くの調査報告⁴⁾⁵⁾⁶⁾がみられその実態が明らかになりつつある。医薬品類の中で抗生物質や抗菌剤は、藻類増殖に悪影響する⁷⁾ことがわかってきている。下水処理水中の医薬品類の処理については物理化学処理による調査報告⁸⁾⁹⁾がみられるが、安価な生物処理による除去技術の開発が求められている。

アンモニアの水生生物への影響も懸念されており、今後、水生生物の保全の観点からアンモニア性窒素(以下、NH₄-Nとする)の濃度の低減について議論される可能性がある。濃度の目標値が低く設定された場合に対応するため、特に、硝化の促進運転が難しい下水処理方式に対応可能なNH₄-Nの低減法を開発しておく必要がある。生物学的硝化時は一部の医薬品の除去率が向上するとの報告もあり¹⁰⁾、NH₄-Nと医薬品の低減が同時に進行できれば有効な処理法となる。

災害時については、応急的処理時の実態解明や処理法の提案が必要とされる。近年、下水処理場が地震、洪水等の災害時に被災する事例がみられる。下水処理場が被災し処理機能停止となった場合は、応急復旧の第一段階として簡易沈殿処理が行われている。簡易沈殿処理における有害物質等の除去特性に関する知見は未だ十分とはいえない状況にある。

以上の水質規制などの動向に応じて、本主要研究の研究内容は表-1のとおり、機動的に対応し、処理技術の開発を進めた。平常時の処理技術については、既存の処理施設に後付け可能な担体処理法とし、流動型、固定床型方式の違いによる処理特性の把握を行った。

災害時を想定した簡易沈殿処理による有害物質の除去特性把握については、実流入下水を用いた簡易沈殿処理実験から、有害物質、排水基準項目の金属類を対象として除去特性を把握した。

表-1 各年度の対象物質と処理技術の関係

	処理法	処理対象	H28	H29	H30	H31	R2	R3
平常時	流動型担体 (ポリプロピレン製担体)	二次処理水	LAS		NH ₄ -N	NH ₄ -N、医薬品		
	固定床担体 (繊維状担体)	二次処理水						NH ₄ -N 医薬品
災害時	簡易沈殿処理	流入下水			金属(Cd、Pb、As、Se、B、Cu、Zn、Fe、Mn、Cr)			

LAS：直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩
NH₄-N：アンモニア性窒素

2. 実験方法

2.1 流動型担体処理による下水処理水に残存するLASの除去実験

2.1.1 実験装置

LASの除去実験に用いた流動型担体処理実験装置の概要を図-1に、外観を写真-1に示す。嫌気好気ろ床法を採用している下水処理場実験装置を設置し実験を行った。反応槽(A)は容量5.6Lの槽を3つ、反応槽(B)は容量10Lの槽を4つ連結した。

各反応槽には、写真-2示したポリプロピレン製の中空円筒状の担体(4mm^{OD}×3mm^{ID}×5mm^L)を添加率35%(嵩比率)で投入した。また、反応槽(B)はヒーターを投入した恒温水槽を用いて水温コントロールを可能

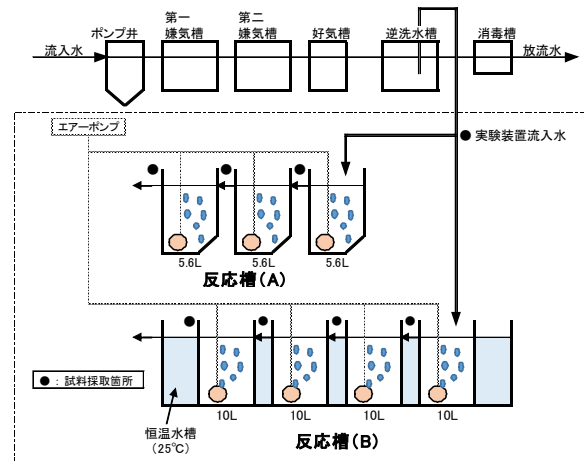


図-1 LASの除去実験に用いた流動型担体処理実験装置の概要

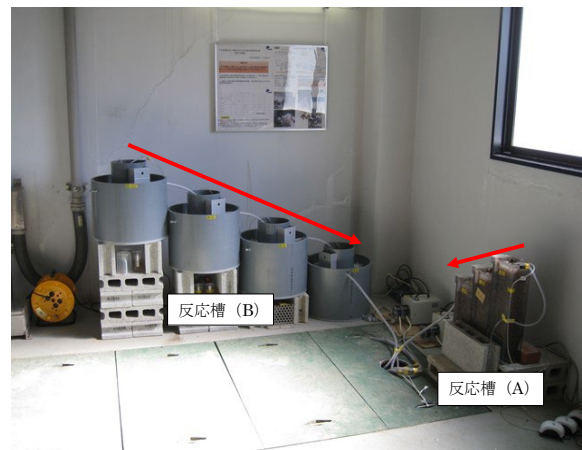


写真-1 LASの除去実験に用いた流動型担体処理装置



写真-2 LASの除去実験に用いた流動型担体の外観

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

2.1.2 試料採取と分析方法

試料採取は、平成 29 年 12 月～平成 30 年 1 月にかけて数回行った。試料採取はスポット採取とし、図-1 に試料採取カ所として示すとおり、実験装置の流入水および各反応槽の流出水について行った。採取試料は LAS の保存性¹¹⁾を考慮し分解を抑えるため直ちに氷水に浸けて冷却した。また、試料採取後、各反応槽の水溫測定と流入水量の確認を行なった。

LAS の分析は、「水質汚濁に係る環境基準について（平成 26 年 11 月 17 日環境省告示第 126 号）」の付表 12 に示す方法により行った。また、有機物指標として DOC を全有機炭素計（島津製作所 TOC-5000）で測定した。

2.2 流動型担体処理による下水処理水に残存する NH₄-N と医薬品の除去実験

2.2.1 実験装置

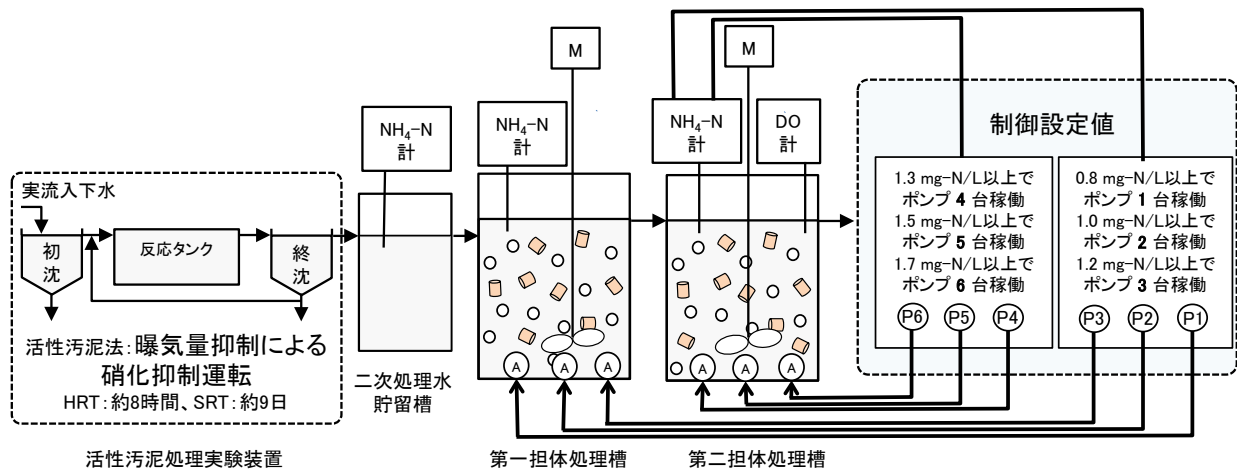


図-2 NH₄-N、医薬品の除去実験に用いた活性汚泥処理装置と流動型担体処理実験装置（機械攪拌）の概要

表-2 NH₄-N、医薬品の除去実験における流動型担体処理の処理条件

HRT (2槽当たり)	実験期間	二次処理水流量 (L/分)	第一担体槽曝気量 (L/分) ※			第二担体槽曝気量 (L/分) ※		
			ポンプ1	ポンプ2	ポンプ3	ポンプ4	ポンプ5	ポンプ6
180分	令和2年10月9日 ～令和3年2月10日	0.61	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

※曝気量は第二担体処理槽のNH₄-N濃度に応じた制御

NH₄-N と医薬品の除去実験で用いた流動型担体処理装置の概要を図-2 に、外観を写真-3 に示した。表-2 は処理条件である。有効容量 60 L のステンレス製反応槽を 2 つ直列に設置し、各反応槽に 2.1.1 と同様のポリプロピレン製中空円筒状担体（4 mm^{OD}×3 mm^{ID}×5 mm^L）を嵩比率 35% で充填した。各反応槽には、機械攪拌装置を設置し、充填した担体が軽く流動する程度の回転数（80 rpm）に設定した。原水は、実流入下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、下水二次処理水中に NH₄-N を残留させたものである。本実験では、NH₄-N 濃度のオンラインモニタリングと NH₄-N 負荷変動に応じた曝気量制御運転のために、アンモニアセンサーを下水二次処理水貯留槽および各担体処理槽に設置した。曝気量制御方法は第二担体槽に設置したアンモニアセンサーによるフィードバック方式とし、図-2 中に記載した条件で行った。

2.2.2 医薬品の分析方法

流動型担体処理による NH₄-N と医薬品の除去効果を明らかにするため、原水（二次処理水）と第二担体処理槽流出水をスポット採水として、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⁷⁾¹²⁾、下水処理水中に残存すると報告されている¹²⁾¹³⁾抗生物質のアジスロマイシン、クラリスロマイシン、抗菌剤



写真-3 NH₄-N と医薬品除去実験に用いた流動型担体処理装置

のレボフロキサシンである。測定頻度は実験期間中、週 1 回のスポット採水とし、採水回数は 17 回となった（採水日は図-10 中の↑で表示）。医薬品測定の前処理は、遠心分離（3,500 rpm、5 分）のみとし、その上澄水を分析試料とした。測定には LC/MS（Waters 製 Xevo G2-XS）を用い、LC 条件は逆相カラムによるグラジエント分離とし、分析試料はメタノールで 1:1 に希釈したものを 60 μL 分析装置に注入した。MS 条件は、ESI、Positive モードによる MS^E（網羅分析モード）分析であった。アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの定量は、これら 3 物質の同位体（¹³Cd₃ 体）を添加した内部標準法とした。医薬品の他に、担体処理時の有機物の除去能を確認するため DOC を全有機炭素計（島津製作所 TOC-5000）で測定した。

2.2.3 担体付着微生物量の測定

第一、第二担体処理槽の担体付着微生物量の測定を、実験期間中に週に 1 回程度行った。測定方法は次のとおりである。各担体処理槽から担体 50 mL をビーカーに採取し、純水を 100 mL 加えた後、担体と純水の入ったビーカーを超音波発生器（出力 200 W）に 10 分間接触させ、純水中に担体付着微生物を抽出した。その懸濁液を試料として、下水試験方法-2012 年版（公益社団法人日本下水道協会）に従い浮遊物質濃度を測定し、その測定結果を担体 1 L 当たりの担体付着微生物量とした。

2.2.4 担体付着細菌中の硝化細菌の割合測定

担体付着細菌中の硝化細菌の割合を求めするため、第一、第二担体処理槽の担体付着細菌について、16S rRNA 遺伝子配列に基づく菌叢解析を行った。令和 3

年 1 月 13 日に試料の採取を行った。測定方法は次のとおりである。各担体処理槽から採取した担体を液体窒素で凍結させ、粉碎したのから DNA を抽出した。DNA 抽出には、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境）を用い、抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的としたプライマーを用い、PCR 増幅を行った。DNA シーケンシングには次世代シーケンサー（Miseq、Miseq reagent Kit v3、600 サイクル、Illumina）を用いて解析した。解析で得た各リードの細菌・古細菌種の同定は QIIME2 を用いた。各塩基配列の同定には Silva 132 をリファレンスデータベースとした。担体付着細菌中の硝化細菌の割合は、全リード数に占めるアンモニア酸化細菌（*Nitrosomonas*）と亜硝酸酸化細菌（*Nitrospira*）のリード数とした。

2.3 固定床型担体処理による下水処理水に残存する NH₄-N と医薬品の除去実験

2.3.1 実験装置

NH₄-N と医薬品の処理をより効率化するため、微生物量を高濃度に保持可能と考えられる繊維状担体を用いて固定床型での処理特性の把握を行った。本実験で用いた固定床型担体処理装置の概要を図-3 に、外観を写真-4 に示した。表-3 は処理条件である。容量 20 L の塩化ビニル製円筒（内径 11cm、高さ 2.8m）、2 筒を下部で連結し、各反応槽にポリアミド系繊維状担体（52cm×25cm、嵩容積 3L、約 60 g）6 枚を嵩比率約 90%で充填した。各反応槽下部に散気球を設置した。原水は、実流入下水を活性汚泥処理実験装置で硝化抑制運転し、二次処理水中に NH₄-N を残留させたものである。本実験では、NH₄-N 濃度のオンラインモニタリングと NH₄-N 負荷変動に応じた曝気量制御運転のために、アンモニアセンサーを二次処理水貯留槽および担体処理水貯留槽（3 L）に設置した。曝気量制御方法は担体処理水貯留槽に設置したアンモニアセンサーによるフィードバック方式とし、図-3 中にした条件で行った。筒型反応槽および連結部の目詰まりを防ぐため、第一固定床担体槽下部に設置した電磁弁付き排水弁から 1 回/日、タイマーで筒内の水を排水した。

2.3.2 医薬品の分析方法

調査期間は令和 3 年 9 月～令和 4 年 3 月で、流入下水、二次処理水、第一、第二担体処理水を週 1 回、微量定量ポンプによる 24 時間連続採水を行った。得られたコンジット試料を医薬品の分析に供した。採水回数は 27 回となった。測定は LC/MS/MS（AB SCIEX

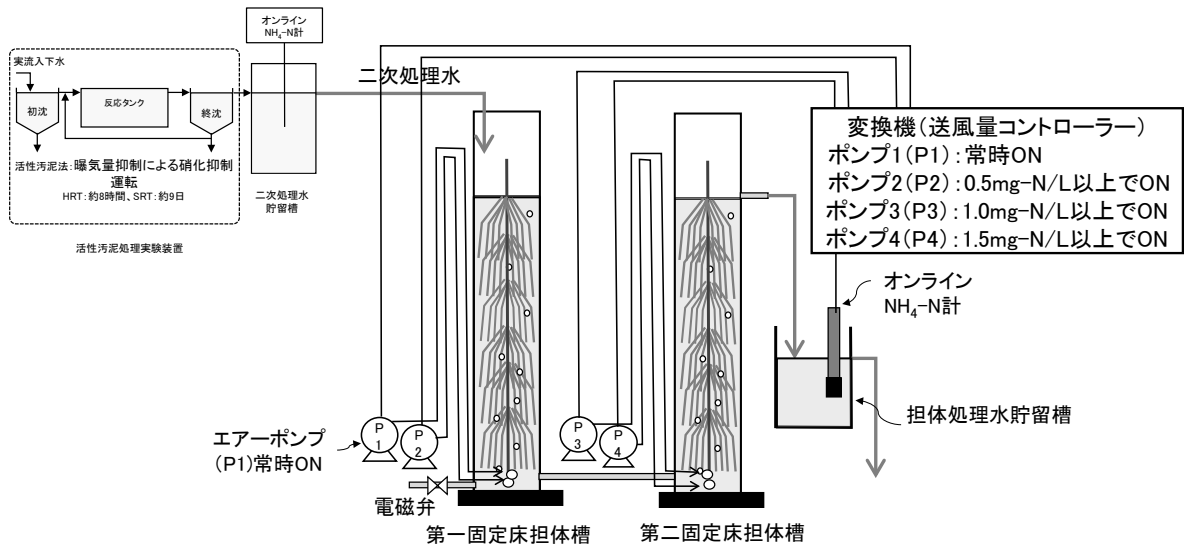


図-3 NH₄-N、医薬品の除去実験に用いた活性汚泥処理装置と固定床型担体処理の概要

表-3 NH₄-N、医薬品の除去実験に用いた固定床型担体処理の処理条件

HRT (2槽当たり)	実験期間	二次処理水流量 (L/分)	第一固定床担体槽曝気量 (L/分) ※		第二固定床担体槽曝気量 (L/分) ※	
			ポンプ1	ポンプ2	ポンプ3	ポンプ4
45分	令和3年9月17日 ~令和4年3月29日	0.88	0.88 常時曝気	0.88	0.88	0.88

※曝気量は第二担体処理水貯留槽のNH₄-N濃度に応じた制御

API4000) で行った。LC/MS/MS の測定のための前処理は、0.45 μ m のシリンジフィルターによるろ過のみであった。LC(Agilent 1100HPLC)の分析条件は、逆相カラムによるグラジエント条件とし、メタノールと試料を1:9に調整した試料80 μ Lを注入した。MS/MS条件は、ESI、Positive モードによるMRM分析とした。アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンは、同位体 (¹³C₃体) を添加した内部標準法で定量した。医薬品の他に、一般水質項目として、pH、DO、DOC (島津製作所 TOC-V)、NH₄-N、NO₂₊₃-N (ビーエルテック株式会社製: QuAAtro2-HR) を測定した。

2.3.3 担体付着微生物量の測定

繊維状担体に付着している微生物量の測定は、実験期間中に1回(令和4年12月11日)行った。第一固定床と第二固定床担体槽の上から3枚目の繊維担体を取り出し、110°Cで乾燥し、乾燥後の重量と生物膜付着前との重量差から、1枚当たりの生物量を求めた。

2.3.4 担体付着微生物中の硝化細菌の測定

繊維状担体に付着している細菌のうち硝化細菌の割合を求めするため、各固定床担体槽の上から2枚目の担体を取り出し、手作業でSSを絞り出した抽出液を、次世代シーケンス解析のサンプルに供した。DNAの抽出操作、解析方法は、2.2.4のとおりである。

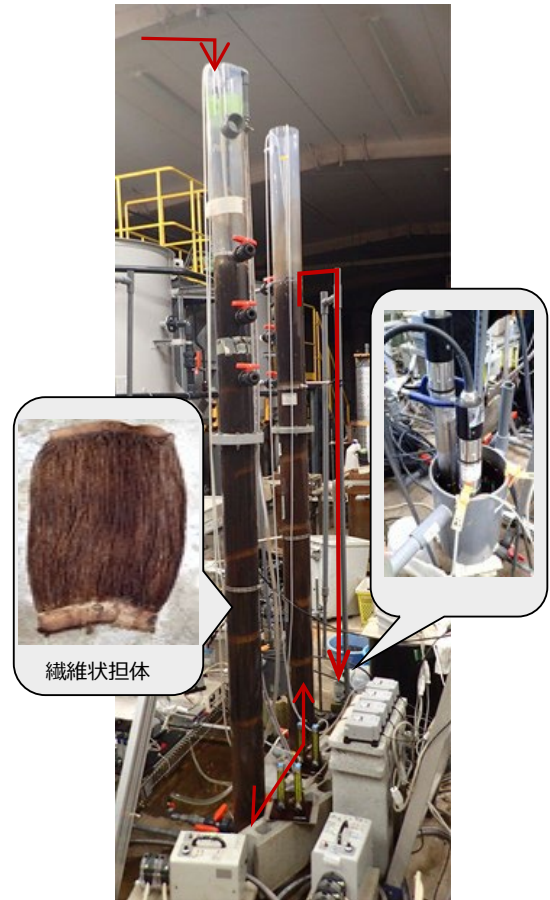


写真-4 NH₄-N、医薬品の除去実験に用いた固定床型担体処理装置

2.4 簡易沈殿処理における金属類の除去実験

本実験で用いた簡易沈殿処理実験装置の概要を図-4に、外観を写真-5に示した。実験装置は、最初沈殿池(29L)、曝気槽(146L)、最終沈殿池(44L)で構成され、流入水量 500 L/d における水面積負荷、滞留時間は表-4 のとおりである。実験は、同型の装置を 2 系列運転し、同一条件の平行再現実験とした。実下水処理場の流入下水を実験装置に流量 500 L/d (約 350 mL/min) で通水し、流入水、処理水 (A)、処理水 (B) を 1 回/週の間隔で 5 週間にわたって 5 回採取した。通常、曝気槽はエアレーションが行われ生物処理の主要部分となる重要施設であるが、災害時に被災しその機能が損なわれることがある。本実験では、曝気槽が機能停止

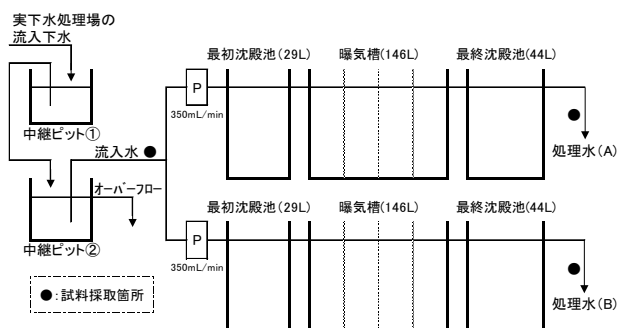


図-4 簡易沈殿処理実験装置の概要

表-4 簡易沈殿処理実験装置の諸元

	最初沈殿池	曝気槽	最終沈殿池
水面積負荷 ($m^3/m^2 \cdot d$)	33	-	22
滞留時間 (h)	1.4	7.0	2.1
W (m)	0.15	0.15	0.15
L (m)	0.10	0.50	0.15
H (m)	1.96	1.95	1.94



写真-5 簡易沈殿処理装置

したことを想定し、実験装置を構成する最初沈殿池、曝気槽、最終沈殿池すべてを沈殿池とした。また、実験期間中、汚泥の引扱は行わなかった。なお、本実験における実験装置全体の沈殿時間は 10.4 時間となる。試料採取時に水温、pH、ORP を測定するとともに、採取試料は分析室に持ち帰り BOD、COD、SS、DOC、TN、TP の他、有害物質等として金属類を分析した。分析した金属類は一律排水基準項目の有害物質から Cd、Pb、As、Se、B、その他の項目から Cu、Zn、Fe、Mn、Cr の計 10 元素とした。

3 実験結果

3.1 流動型担体水処理による下水処理水に残存する LAS の除去実験

3.1.1 形状・容量が異なる反応槽の LAS 除去特性比較

実験に用いた流動型担体処理実験装置の反応槽 (A)、反応槽 (B) は、その形状・容量が異なることから実験装置の違いによる LAS 除去特性の比較を行った。実験装置の運転開始から約 2 週間後に採取した試料の LAS 分析結果を図-5 に示す。試料採取時の反応槽水温は、反応槽 (A) が 10.4~12.2°C (平均 11.3°C)、反応槽 (B) が、10.7~12.9°C (平均 11.7°C) であった。図-5 に示さ

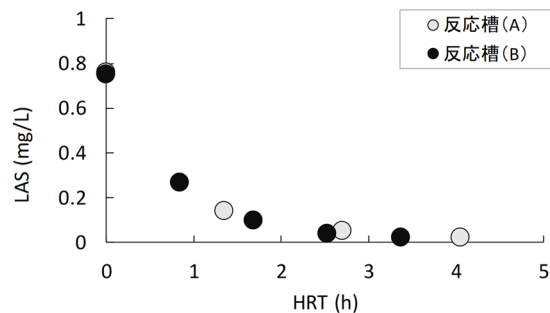


図-5 反応槽 (A)、(B) の LAS 除去特性

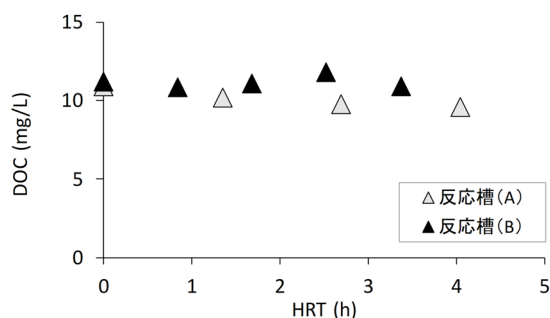


図-6 反応槽 (A)、(B) の DOC 除去特性

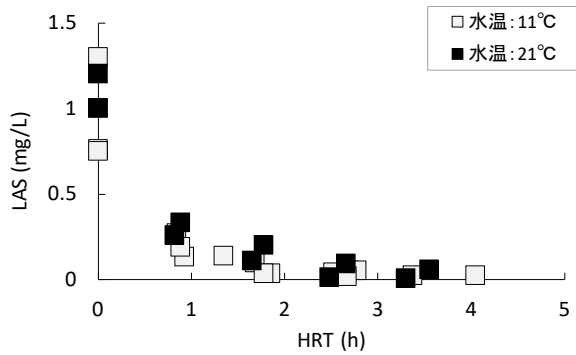


図-7 異なる反応槽水温における LAS 除去特性

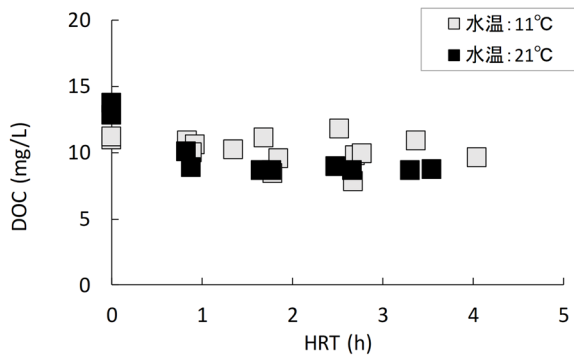


図-8 異なる反応槽水温における DOC 除去特性

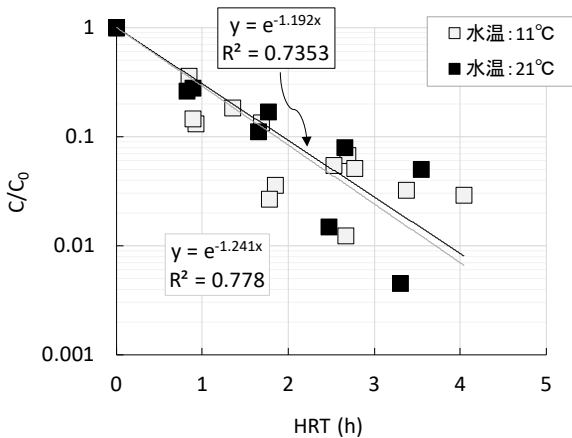


図-9 異なる反応槽水温における LAS 除去速度

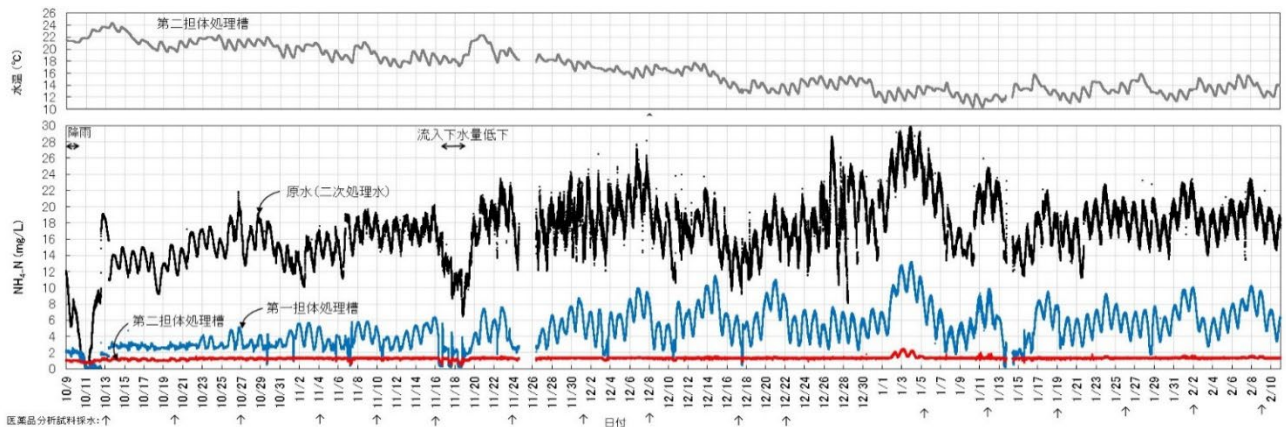


図-10 流動型担体処理における担体処理水の水温と原水(二次処理水)と第一、第二担体処理水中 NH₄-N 濃度

れるように反応槽 (A)、反応槽 (B) の LAS 除去に大きな違いはみられず、HRT が長くなるに従い大きく減少した。反応槽の形状・容量が異なる反応槽 (A)、反応槽 (B) においても LAS 除去特性は同等であることが確認された。

また、有機物指標の DOC 分析結果を図-6 に示す。DOC として測定される溶解性有機物濃度に大きな変化はみられず、流動型担体処理では下水処理水に残存する有機物はほとんど除去されないことが確認された。

3.1.2 反応槽水温と LAS 除去の関係

水温コントロール無しの反応槽とヒーターを用いて水温コントロールした反応槽の LAS 除去特性を図-7 に示す。前述の 3.1.1 形状・容量が異なる反応槽の LAS 除去特性比較で得たデータも併せて図中に示した。水温コントロール無しの反応槽の水温は 10~13°C (平均 11°C)、水温コントロールした反応槽の水温は 19~22°C (平均 21°C) であった。実験は複数回行っており、流入水の LAS 濃度は 0.75~1.3 mg/L であった。図-7 に示すように両反応槽とも約 2 時間の処理で LAS 濃度は環境基準の河川・生物特 A で設定された基準値 0.02mg/L の 10 倍濃度 (0.2mg/L) 以下となった。

有機物指標の DOC 分析結果を図-8 に示す。DOC 濃度は、反応槽水温が 11°C では、HRT が長くなっても大きな変化はみられないが、水温 21°C では 20% 程度の減少がみられた。反応槽水温を 21°C 程度に加温することにより、下水処理水に残存する有機物を約 20% 除去できることがわかった。

各調査の流入水 LAS 濃度が異なることから、それぞれの実験装置流入水の LAS 濃度を C₀、担体処理水の LAS 濃度を C として C/C₀ を算出し、HRT と C/C₀ の関

係を図-9 に示す。C/C₀の減少が1次反応と仮定し反応係数 k₁ (1/h)を求めた。

反応槽水温 11℃で反応係数 1.19、反応槽水温 21℃で反応係数 1.24 が求められた。この関係式より、反応槽の平均水温が 11℃、21℃とも LAS 除去率 90%を得るのに必要な水理的滞留時間 (HRT) は、約 2 時間、99%除去には約 4 時間の処理時間が必要であることが明らかとなった。担体処理において水温 11℃と 21℃で LAS の除去速度に大きな違いはみられなかった。ただし、担体付着生物量を考慮して生物反応速度に水温が与える影響を比較できていないことに留意する必要がある。

3.2 流動型担体処理による下水処理水に残存する NH₄-N と医薬品の除去実験

3.2.1 流動型担体処理による NH₄-N の除去

図-10 に本実験期間中の担体処理水の水温ならびに原水、第一および第二担体処理槽水中のアンモニアセンサーによる NH₄-N の連続測定結果を示す。原水の NH₄-N に変動がみられたものの、第二担体処理槽の NH₄-N 濃度は 1.3 mg-N/L 程度で安定していた。この間の NH₄-N の除去率は平均値で約 93%であった。

3.2.2 流動型担体処理による医薬品の除去

図-11 に原水 (二次処理水) と第二担体処理水中の各医薬品の平均濃度を、図-12 に除去率 (採水日毎に得られた除去率の平均値) を示した。図-13 は原水と流動型担体処理水中の平均 DOC 濃度である。原水中のアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの濃度の平均値は、約 0.336、0.237、1.37 μg/L、流動型担体処理水では約 0.267、0.196、0.632 μg/L となった。毎回の採水から得られた除去率を平均すると 14.9%、12.7%、50.7%となった。DOC 除去率の平均値は 8.7%

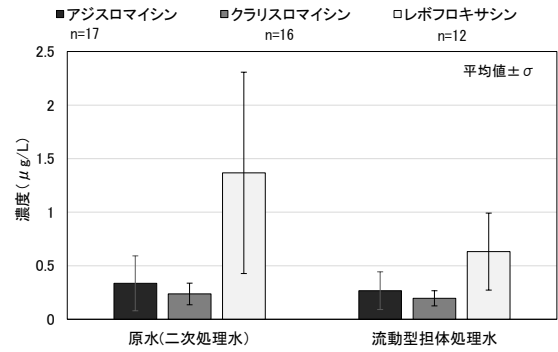


図-11 流動型担体処理における原水(二次処理水)と担体処理水中医薬品濃度

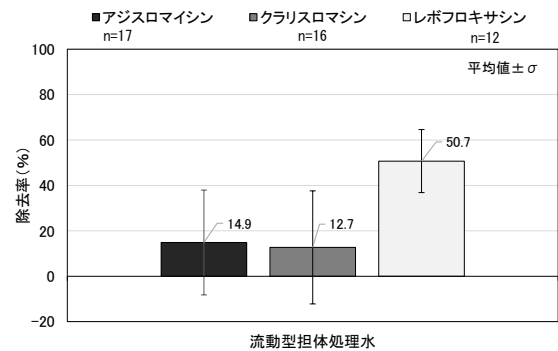


図-12 流動型担体処理における医薬品除去率

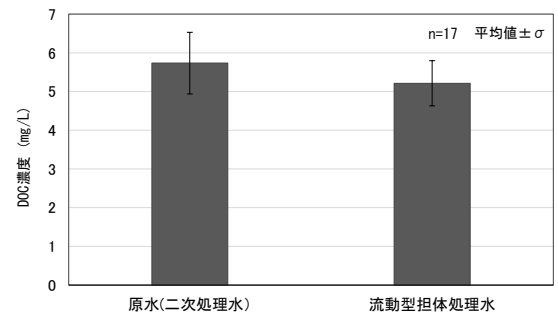


図-13 流動型担体処理水中の DOC 濃度

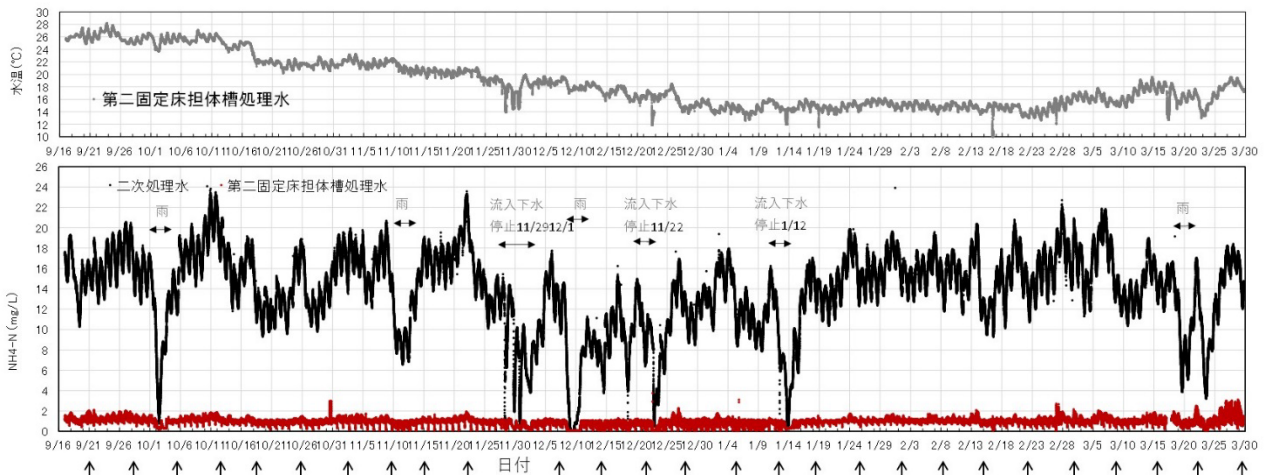


図-14 固定床型担体処理における担体処理水の水温と原水(二次処理水)と担体処理水中 NH₄-N 濃度

であり、DOCの顕著な低減はみられなかった。

レボフロキサシンの除去率が50.7%と高かったもののアジスロマイシン、クラリスロマイシンの除去率は低く限定的であった。

3.3 固定床型担体処理による下水処理水に残存するNH₄-Nと医薬品の除去

3.3.1 固定床型担体処理によるNH₄-Nの除去

図-14に本実験期間中の担体処理水の水温ならびに原水、第二担体処理水貯留槽中のアンモニアセンサーによるNH₄-Nの連続測定結果を示す。原水のNH₄-Nに変動がみられたものの、担体処理水のNH₄-N濃度は0.94 mg-N/L程度で安定していた。この間のNH₄-Nの除去率は平均値で約92%であった。

3.3.2 固定床型担体処理による医薬品の除去

図-15に流入下水と二次処理水、固定床型担体処理水(二段目)中の各医薬品の平均濃度を、図-16に二次処理水に対する担体処理での除去率、図-17に流入下水に対する二次処理、二次+担体処理での除去率を示した。なお、除去率は採水日ごとに得られた除去率の平均値である。流入下水中のアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン濃度の平均値は、0.132、0.382、0.493 μg/L、二次処理水では0.118、0.201、0.400 μg/L、固定床担体処理水(二段目)では0.105、0.191、0.110 μg/Lとなった。アジスロマイシン、クラリスロ

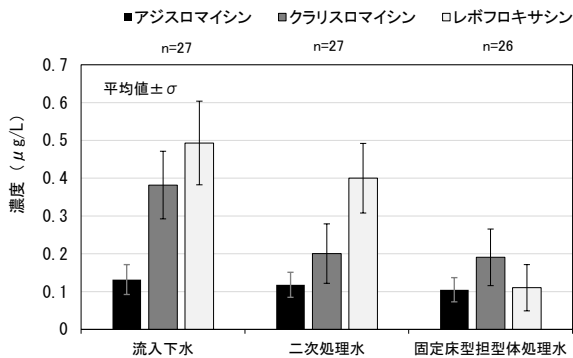


図-15 固定床型担体処理実験における流入下水、二次処理水、担体処理水中医薬品濃度

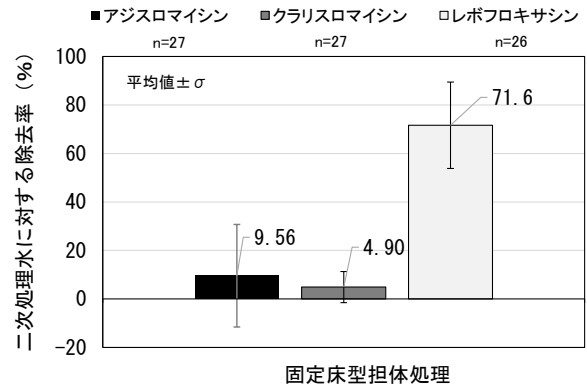


図-16 固定床型担体処理実験における二次処理水に対する医薬品の除去率

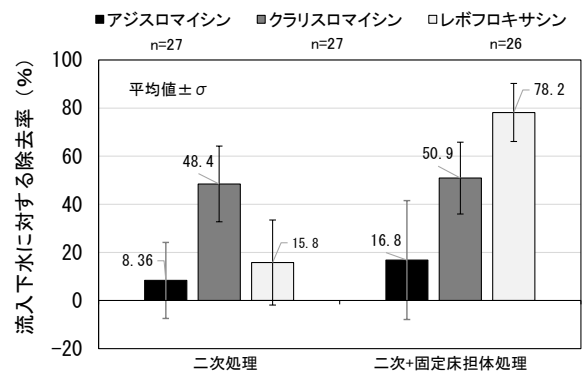


図-17 固定床型担体処理実験における流入下水に対する医薬品の除去率

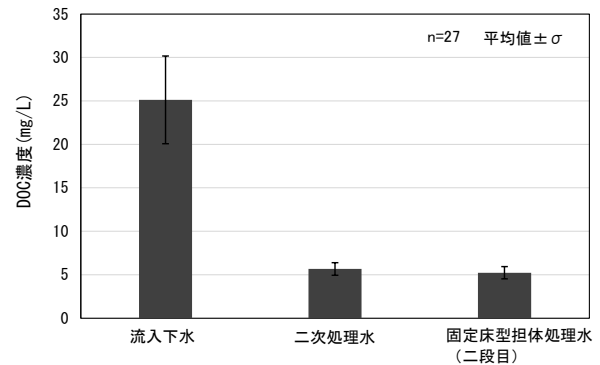


図-18 固定床型担体処理実験における流入下水、二次処理水、担体処理水中医薬品濃度

表-5 NH₄-Nと医薬品の除去特性に関する流動型と固定床型の担体処理比較

	水学的滞留時間 (分)	NH ₄ -Nの除去率 (%)	NH ₄ -N容積負荷 (kg-N/m ³ /日)	送気倍率 (送風量/流入水量)	AZM除去率 (%)	CAM除去率 (%)	LVFX除去率 (%)
流動型担体処理	180	93	0.12	9.26	14.9	12.7	50.2
固定床型担体処理	45	92	0.44	2.37	9.6	4.9	71.6

AZM:アジスロマイシン、CAM:クラリスロマイシン、LVFX:レボフロキサシン

マシン、レボフロキサシンの固定床担体での除去率は、9.56%、4.90%、71.6%となった。二次処理と担体処理の全体での除去率は、アジスロマイシンは16.8%、クラリスロマイシンは50.9%、レボフロキサシンは78.2%となった。固定床型担体処理を追加することにより、レボフロキサシンの除去率が向上できることがわかった。図-18は流入下水、二次処理水、担体処理水中の平均DOC濃度である。固定床型担体処理でのDOCの低減はみられなかった。

3.4 流動型と固定床型担体処理の処理能の比較

表-5にNH₄-Nとアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの流動型と固定床型担体の処理結果の一覧を示した。

NH₄-Nの除去については、水理的滞留時間45分の固定床型担体処理でも、180分の流動型担体と同等の92%の除去率が得られた。NH₄-Nの容積負荷(反応槽容量)で比較すると、流動型担体処理は0.12kg-N/m³/日、固定床型担体処理では、0.44kg-N/m³/日となり、固定床型担体処理は流動型担体処理の約3.7倍負荷量が高めることが可能であった。送風量は、反応槽の形状が異なることから、送気倍率での単純比較はできないが、固定床型担体は、流動型の1/4程度であり、固定床型担体処理で送風量が增大することはなかった。

表-6に流動型担体と固定床型担体処理の担体当たりの付着物質の重量と、MLSS濃度に換算した値を示した。流動型担体処理の担体付着生物量をMLSSに換算すると266mg/L(一段目と二段目の平均値)となった。

表-6 流動型担体と固定床型担体の生物量

処理方式	段目	単位当たり生物量	MLSS濃度換算
流動型担体	第一槽	0.717 g/担体-L	251 mg/L
	第二槽	0.803 g/担体-L	281 mg/L
固定床型担体	第一槽	13.5 g/担体-枚	4,120 mg/L
	第二槽	13.7 g/担体-枚	4,200 mg/L

固定床型担体処理は4,160mg/Lとなり、固定床型担体は、流動型担体の約16倍の生物量が維持されていた。

図-20は、次世代シーケンサーによる細菌叢解析結果から、流動型、固定床型担体の付着細菌に占める硝化細菌である*Nitrosomonas.sp*と*Nitrospira.sp*の割合を、リード数の比率から求めたものである。流動型担体と固定床型担体の硝化細菌の存在割合は、二槽の平均

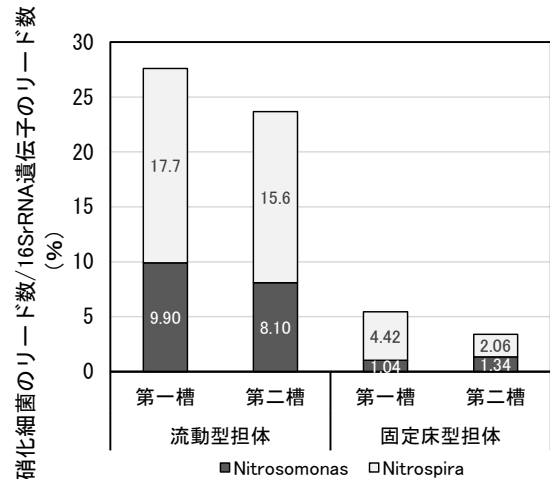


図-20 流動型と固定床型担体の硝化細菌存在割合

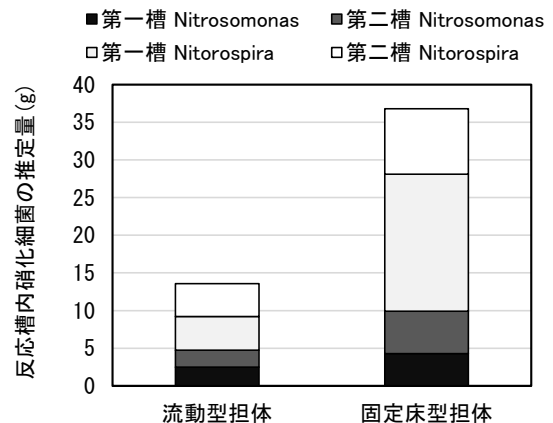


図-21 流動型と固定床担体の硝化細菌の推定量

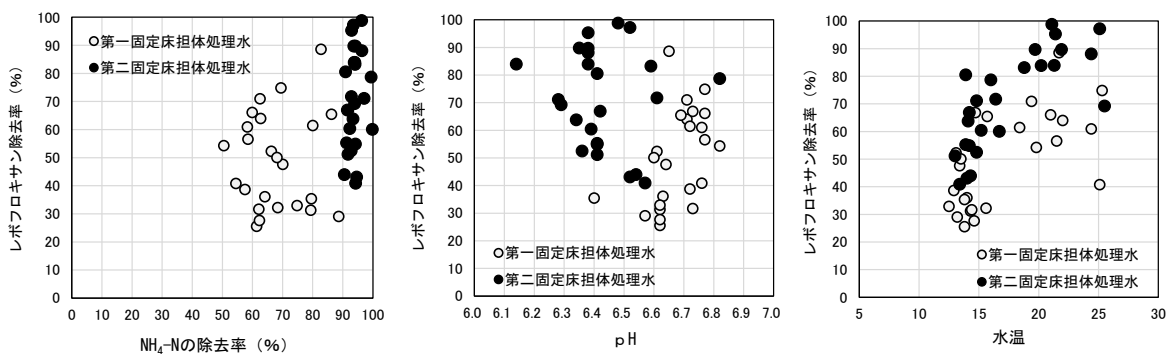


図-22 固定床型担体処理でのNH₄-N除去率、pH、水温とレボフロキサシンの除去率の関係

均値で27%と4.4%となり、流動型担体で高くなった。図-21は、槽内に存在する硝化細菌量を生物量と存在割合から算出した推定値である。固定床型での硝化細菌の存在量は、固定床担体処理の生物量が多かったため、流動型よりも約2.7倍高くなる結果となった。固定床担体処理でNH₄-Nの除去効率が高かった理由として、硝化細菌の存在量が多かったことが考えられる。固定床型担体処理は、流動型担体処理よりも単位容積当たりのNH₄-Nの負荷量を高めることが可能なことから、省スペースでの設置が期待でき、さらに、アンモニアセンサーによる風量制御も可能であったことから、省エネルギー運転が期待できる。

流動型、固定床型担体処理とも図-12、図-16に示したとおり、アジスロマイシン、クラリスロマイシンの除去率は限定的であったが、レボフロキサシンの除去率は、流動型、固定床型とも高かった。流動型と固定床型を比較すると、固定床型担体処理で高く、71.6%の除去率が得られた。

図-22にNH₄-N除去率、pH、水温とレボフロキサシンの除去率の関係を示した。図には第一固定床型担体と第二固定床担体処理水のそれぞれの水質と各槽でのレボフロキサシン除去率の関係を合わせてプロットしている。第一固定床の処理時間は約23分、第二固定床の処理時間は約45分となる。NH₄-Nの除去率は第二固定床で90%以上となり、レボフロキサシンの除去率

は40~99%と幅があるものの、第二固定床で上昇する傾向となった。pHは第二固定床で、第一固定床より低下する傾向がみられた。第二固定床処理水のpHとレボフロキサシンの除去率の関係には、明確な関係はみられなかった。水温については、水温の上昇に従いレボフロキサシンの除去率が増加する傾向もみられた。レボフロキサシン除去に関わる影響因子の解明については、NH₄-N除去率等と単独の因子で説明することに限界があり、今後は複合的な因子と網羅的解析等の取り組みが期待される。

3.5 簡易沈殿処理における金属類の除去特性

簡易沈殿処理実験結果と各項目の排水基準を表-7に示す。流入水の平均水温は20.5℃、処理水(A)、処理水(B)の平均水温はそれぞれ15.8℃、16.0℃であり、約10時間の沈殿で水温が約4℃低下した。流入水、処理水のpHの値はほぼ同じであった。また、流入水のORPは-166mV、処理水(A)、処理水(B)のORPはそれぞれ-268mV、-267mVであり、約10時間の沈殿処理により、流入水がより強い還元状態の処理水に変化していた。

本実験の流入水は、図-4に示したとおり、実下水処理場の流入下水を用いているが、幾つかのピットを経由していることもあり、一般的な流入下水の水質¹⁴⁾に比べ低い値となっており、BOD、COD、SS、DOC、TN、TPの平均値は、それぞれ66mg/L、48mg/L、70mg/L、

表-7 簡易沈殿処理実験結果と排水基準

	流入水			処理水(A)			処理水(B)			排水基準
	最小値	平均値	最大値	最小値	平均値	最大値	最小値	平均値	最大値	
水温(℃)	19.2	20.5	22.0	13.9	15.8	17.0	13.7	16.0	17.3	-
pH(-)	7.2	-	7.4	7.3	-	7.3	7.2	-	7.3	5.8 - 8.6 ^{※1}
ORP(mV)	-175	-166	-156	-276	-268	-260	-272	-267	-262	-
BOD(mg/L)	37	66	108	41	63	88	38	64	105	160 ^{※2}
COD(mg/L)	35	48	69	37	41	45	37	41	43	160 ^{※3}
SS(mg/L)	44	70	120	25	32	39	23	29	36	200
DOC(mg/L)	17	22	28	21	26	31	23	27	31	-
TN(mg/L)	24	30	36	21	24	26	22	24	26	120 ^{※4}
TP(mg/L)	2.6	3.2	3.8	2.1	2.4	2.6	2.2	2.4	2.6	16 ^{※4}
Pb(μg/L)	0.31	0.42	0.65	0.27	0.35	0.40	0.27	0.33	0.39	100
As(μg/L)	0.72	0.81	0.92	0.68	0.74	0.80	0.62	0.72	0.82	100
B(μg/L)	58	61	73	60	61	62	59	60	62	10,000
Cu(μg/L)	13	18	24	15	17	18	15	16	18	3,000
Zn(μg/L)	25	34	50	24	25	28	22	26	30	2,000
Fe(μg/L)	2,300	2,700	4,200	570	780	920	550	770	880	10,000
Mn(μg/L)	73	77	86	49	55	60	48	55	58	10,000
通水量(mL/min)	-	-	-	330	354	375	305	346	370	-
沈殿時間(hr)	-	-	-	11.1	10.3	9.8	12.0	10.6	9.9	-

※1: 海域以外の公共用水域に排出

※2: 海域及び湖沼以外の公共用水域に排出

※3: 海域及び湖沼に排出

※4: 湖沼植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれがある湖沼として環境大臣が定める湖沼、海洋植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれがある海域として環境大臣が定める海域及びこれらに流入する公共用水域に排出

22 mg/L、30 mg/L、3.2 mg/Lであった。分析した金属類のPb、As、B、Cu、Zn、Fe、Mnの平均値は、それぞれ0.42 µg/L、0.81 µg/L、61 µg/L、18 µg/L、34 µg/L、2,700 µg/L、77 µg/Lであり、Cd、Se、Crの3元素は不検出であった。本実験では、調査対象金属類の添加による濃度調節は行っていない。比較的高濃度で検出されたFeは排水基準値の約1/4、他の金属類は排水基準値の約1/60以下であった。

表-7に示すとおり、処理水(A)のBOD、COD、SS、DOC、TN、TPの平均値は63 mg/L、41 mg/L、32 mg/L、26 mg/L、24 mg/L、2.4 mg/Lであった。同一条件で行った処理水(B)の値は、処理水(A)とほぼ同じ値であり処理実験の再現性が確認できた。

これらの結果から約10時間の沈殿処理による除去率を算出すると、BODは4~6%、CODは14~15%、SSは55~58%、TNは18~19%、TPは23~24%であった。これらに対しDOCは、沈殿処理により、濃度が17~19%増加する結果となった。BOD、COD、SS、TN、TPの除去は、浮遊物質の沈降によるものと考えられる。DOCの増加は、約10時間の沈殿処理による強い還元状態において嫌気性分解により一部の有機物が可溶化したことによると考えられる。

金属類は、流入下水の中でも排水基準値に比べ低い濃度ではあったが沈殿処理による除去率を算出した。Pb除去率は17~23%、Asは9~11%、Bは1~2%、Cuは8~9%、Znは23~24%、Feは71%、Mnは29%であった。本実験で対象とした金属類は、下水処理において処理困難とされている物質であり、簡易沈殿処理においても除去率は30%以下であり、除去が困難であることが確認された。一方、比較的高濃度のFeは、沈殿処理によって71%が除去されていた。これは還元状態の強い嫌気性条件下において硫化鉄となり沈殿除去されたものと考えられる。しかしながら、沈殿汚泥の滞留による嫌気化は、水処理の観点で好ましい現象でなく、処理の復旧に伴い解消が図られるものであるため、Feの除去原理として期待することは妥当ではないと考えられた。

4. まとめ

下水処理場における水質リスク軽減技術の開発については、平常時と災害時で適応技術が異なることに留意する必要がある。平常時は下水処理水中の残存する微量化学物質の除去技術の開発、災害時は流入下水に含まれる有害物質の応急的除去技術の開発が求められ

る。平常時の処理技術の開発として、二次処理水に残留するLAS、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの担体処理の適用性を評価した。

災害時の下水処理については、下水処理場被災時を想定した簡易沈殿処理での有害金属の除去特性を把握した。

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

4.1 流動型担体処理による下水処理水に残存するLASの除去特性について

- 1) LAS濃度が0.75~1.3mg/Lの流入水(嫌気好気ろ床法の実下水処理場の処理水)を流動型担体処理したところ、流入水中のLASは約2時間の処理で環境基準の河川・生物特Aで設定された基準値0.02mg/Lの10倍濃度(0.2mg/L)以下となった。
- 2) 反応槽の水温が11°C、21°Cの反応槽でLAS除去率90%を得るのに必要な水理的滞留時間(HRT)は約2時間、99%では約4時間であった。
- 3) 担体処理における水温の影響について、反応槽水温が11°Cと21°CでLAS除去特性を比較したところ、LAS除去速度に大きな違いはみられなかった。ただし、水温別の担体付着生物量の観点での比較も必要と考えられる。

4.2 流動型および固定床担体処理による下水処理水に残存するNH₄-Nと医薬品の同時除去について

- 1) 流動型担体処理実験装置では、水理的滞留時間(HRT)180分でNH₄-Nの除去率93%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、レボフロキサシン除去率は、15%、13%、51%が得られた。
- 2) 固定床型担体では、水理的滞留時間(HRT)45分でもNH₄-N除去率92%の除去率が得られ、このときのアジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの除去率は、9.6%、4.9%、72%が得られた。
- 3) 活性汚泥処理の後段に固定床型担体処理を追加することにより、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシンの下水処理工程での除去率17%、51%、78%程度まで向上できることがわかった。

4.3 簡易沈殿処理による有害金属の除去特性

簡易沈殿処理における有害金属の除去特性については、流入下水より検出された7種のうち有害物質Pb、As、Bおよび排水基準項目Cu、Zn、Mnは、簡易沈殿処理における除去率は30%以下であり、通常処理にお

いて処理困難物質とされているのと同様に、災害時を想定した沈殿処理においても除去が困難な物質であることがわかった。

参考文献

- 1) 小森行也, 岡本誠一郎: 下水処理における直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の除去特性, 第 50 回下水道研究発表会講演集, 346-348, 2013.
- 2) H.Temmink, Bram Klapwijk, Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in activated sludge plants, *Water Research*, 38, 903-912, 2004.
- 3) 小森行也, 岡本誠一郎: 実下水処理場における直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)の除去特性, 第 51 回下水道研究発表会講演集, 307-309, 2014.
- 4) 小森行也, 岡安祐司, 鈴木穰: 下水処理における医薬品 (92 物質) の除去特性, 45 回下水道研究発表会講演集, 91-93, 2008.
- 5) 成宮正倫, 奥田隆, 中田典秀, 山下尚之, 田中宏明, 佐藤和志, 末岡峯数, 大岩俊雄: 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, *環境工学研究論文集*, 46, 175-185, 2009.
- 6) Koya Komori, Kouki Murayama, Arata Harada, Yuji Okayasu, Mizuhiko Minamiyama and Yutaka Suzuki : Occurrence of 92 Pharmaceuticals in wastewater and their environmental risk in Japan. 4th EWA/WEF/JSWA specialty conference cutting-edge technologies and best practices on sewerage globally leading 21st century, 87-90, 2012.
- 7) 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>
- 8) 金一昊, 山下尚之, 田中宏明, 田久保剛, 岩崎達行: U Vおよび UV/H₂O₂ を用いた連続処理実験での下水 2 次処理水中の PPCPs の除去特性, *環境工学研究論文集*, 44, 283-290, 2007.
- 9) 谷口省吾, 尾崎博明, 山田修: 多孔質セラミックス電極を用いた排水中医薬品の電気分解処理, *環境工学研究論文集*, 44, 299-305, 2007.
- 10) N. H. Tran, et al., : The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds, *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 1051-1057, 2009.
- 11) 中村明広, 八十島誠, 小森行也, 高菅卓三, 岡本誠一郎: 下水中 LAS の保存性, 第 23 回環境化学討論会講演要旨集, 549-550, 2014.
- 12) 南山瑞彦, 小森行也, 北村友一, 鈴木穰, 岡安祐司: 下水道における生理活性物質の実態把握と制御に関する調査, 平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集, 199-212, 土木研究所資料 第 4212 号, 2011.
- 13) 八十島誠, 小林義和, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 下水処理場における人用抗生物質の挙動, *環境工学研究論文集*, 42, 357-368, 2005.
- 14) 日本下水道協会: 平成 28 年度版下水道統計, 第 73 号, 平成 30 年 12 月

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（リスク要因に応じた管理技術の提案）

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、諏訪守、北村友一、高沢麻里

担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環）

研究担当者：植松龍二、重村浩之、李善太

【要旨】

本研究は、平成 28～令和 3 年度にかけ、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施した。令和 3 年度は研究期間の最終年度であることから、本項では、リスク要因に応じた管理技術の提案として、達成目標の②、③、④について 6 年間で得られた成果をとりまとめた。

②の成果では、各種の合流改善事業におけるノロウイルス(Norovirus: NoV)の流出抑制効果を明らかにした。また、越流水の影響下による河川水中の NoV 濃度は、ろ過により 0.9～1.4log 低下することから、越流水対策として高濁度水を対象としたろ過等の SS 低減プロセスの導入によっても、ウイルス負荷の低減が図れるものと考えられた。③では、NoV の除去効果向上要因の 1 つとして活性汚泥中のタンパク質（ペプチド）量が深く関与している可能性を明らかにした。膜分離活性汚泥法は、通常の活性汚泥法と比較して NoV の除去効果が 2log 程度高まることが明らかにし、技術の有効性を確認した。④に関しては、消毒耐性病原微生物として NoV と F 特異 RNA フェージ(F-specific RNA bacteriophage: FRNAPH)を指標にオゾン・塩素消毒による不活化効果の向上と、消毒副生成物の生成抑制の観点から有効となる消毒条件を明らかにした。さらに、被災下水処理場において段階的な復旧対策技術による水質改善に伴う消毒効果および消毒副生成物抑制の向上効果を明らかにし、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。

キーワード：合流式下水道越流水、高度処理法、オゾン・塩素消毒、ノロウイルス、FRNAPH、復旧対策技術

1. はじめに

下水道は公衆衛生の向上に寄与することを目的の一つとしていることから、グローバル化にともなう多様な感染症を含めた水系感染症拡大防止にも貢献することが期待¹⁾されている。公衆衛生をめぐる社会情勢の変化へ対応するため、感染拡大防止に資する下水道システムを確立することが求められている。従来、公衆衛生の観点では、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、現在、新型コロナウイルスの世界的流行例もあることから、今後、多種多様な病原微生物の出現も予想される。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^{2)、3)}となっているが、対策手法構築のために必要な研究・調査は途上段階にある。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 3 年度は、本研究の最終年度であることから、本項では、リスク要因に応じた管理技術の提案として、達成目標の②、③、④について得られた成果をとりまとめた。

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大都市を中心に、下水と雨水の排除を同一の管渠とした合流式下水道が採用されてきた（全国 191 都市）。合流式下水道では降雨時において、雨水量が増加し下水道施設において対応

が困難になる場合には、未処理下水等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。平成15年の下水道施行令改正を踏まえ、合流式下水道緊急改善事業（以下、合流改善事業という）が実施され、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）の都市はH25年度までに、それ以上の規模の都市はR5年度までに対策を完了すべく進められてきている。合流式下水道緊急改善計画における当面の改善目標としては、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つが挙げられている。合流改善事業の具体の対策としては、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⁴⁾。一方、公共用水域の衛生学的な指標として主に大腸菌群数が用いられているが、越流水の影響調査にて適切なリスク評価の観点から、ウイルスの直接計測が必要との報告⁵⁾がある。また、雨天時の簡易処理放流の大腸菌、F特異大腸菌フェージの排出負荷量は、年間負荷量の半分以上を占めることから放流先水域への衛生学的安全性確保のため、簡易処理放流対策が必要との報告があるが⁶⁾、これらウイルス等を対象とした調査・研究事例は限られている。

このような背景から本項では、ウイルス指標としてNoVを対象に、各種の合流改善事業による低減効果や越流水が放流先水域へ及ぼす影響評価を目的として、降雨時において実態調査を行った。

調査対象は、合流改善事業として雨天時活性汚泥法を導入しているA下水処理場および、雨天時合流下水の貯留施設の影響を受けるB市C河川とした。A下水処理場の処理フローの概略を図-1に示す。晴天時の受け入れ可

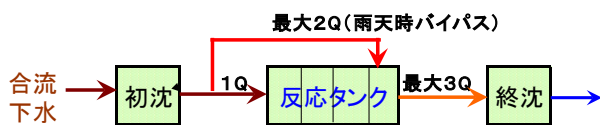


図-1 雨天時活性汚泥法の概略図

能な流入水量である1Qに対し、降雨時には最大の受け入れ流入水量を3Qとし、2Q分の流入下水を反応タンクの後段にバイパス流入させ処理を行っている。降雨時の雨天時活性汚泥処理時の運転直後から終了時にかけて、流入下水と処理水を採水しNoV濃度を測定することで、その削減効果を明らかにした。A下水処理場での降雨時調査は9回行っており、その時の累積降雨量は9.5～54mmであった。また、この時のバイパス流量は0.3～1.7Q（晴天時1Qに対する最大の水量比は1.3～2.7倍）

であった。

C河川の調査では、降雨初期から降雨中にかけて河川水を採水しNoV濃度を測定することで影響評価を行った。なお、B市の合流下水の貯留施設建設による期待される効果は、雨天放流時のBOD負荷を分流式並み、越流回数半減としており、その時の降雨条件は1降雨の総雨量を最大約280mmと見込んでいる。C河川での降雨時調査は4回行っており、累積降雨量が約10～120mmにおいて、2箇所の雨水吐き地点（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。雨水吐き地点の河川上流にて採水は行っていないが、降雨初期における越流水の越流が無い状況と越流後に採水を行うことにより、越流水の影響を評価した。水質測定項目はNoVの他、濁度、SSとした。さらに、越流水影響下での河川水中のNoVの存在形態を推測するため、SS濃度が異なる一部の河川水試料を用いてろ過(GF/B)によるNoV濃度の低減効果を把握した。

2.2 活性汚泥中のタンパク質とNoV除去効果の関係

NoVは、活性汚泥法により2log程度の除去効果が得られるが、活性汚泥法の変法である生物学的高度処理法では3log程度に向上する報告がある⁷⁾。感染性胃腸炎の流行により、流入下水中のNoV濃度が高まることから、放流先の水利用の状況によっては、下水処理場においてより高度な除去効果が必要となることも予想される。

本項では、活性汚泥法によるNoVの除去効果向上要因を明らかにすることを目的に、吸着効果に関与が推定される活性汚泥中のタンパク質とNoVの除去効果との関係を評価した。

処理プロセスが異なる活性汚泥を評価対象とするため、生物学的高度処理法を導入しているD下水処理場のA2O法の好気槽（凝集剤、担体等の投入無）、D下水処理場内において標準法で運転している活性汚泥処理プラントの反応タンクから活性汚泥を各々採取した。採取した活性汚泥によりMLSSが500、1,000、2,000mg/Lとなるように30Lの反応系を6ケース（2種類の活性汚泥×MLSS濃度が3ケース）作成した。MLSSの調整方法は、MLSSが2,000mg/L程度の活性汚泥30Lを分取し、静置沈殿の後15Lの上澄液を引き抜き、15Lの沈殿汚泥に15Lの流入下水を添加すること設定MLSSを2,000mg/Lとした。1,000mg/Lでは15Lの活性汚泥を分取し、上記の引き抜き上澄液15Lを加え混合し静置沈殿の後、15Lの上澄液を引き抜き、15Lの沈殿汚泥に15Lの流入下水を添加した。500mg/Lでは7.5Lの活性汚泥を分取し、上記の1,000mg/Lの調整時に引き抜いた上澄液7.5Lを加え混合し、15Lの流入下水を添加した。この

30L の反応系を利用し回分実験として 7 時間の曝気混合後に混合液を採取、その後静置沈殿させ上澄液を採水した。回分実験から得られた上澄液については NoV と SS を測定した。

活性汚泥中のタンパク質の測定は、Bicinchoninic Acid (BCA 法) により行った⁹⁾。まず、20mL の試料を 2,400×G、15 分間、4℃にて遠心分離を行い上澄液と沈渣に分別し、上澄液には滅菌蒸留水を加え 20mL とし、透析膜により 3KDa 以下、3~10KDa 以下、10KDa 以上に分子量分画を行った後にタンパク質を測定した。沈渣からのタンパク質の抽出は、抽出液を添加し超音波処理により行った⁹⁾。抽出液として 50mM リン酸緩衝液 +1%SDS を 20mL になるまで添加、攪拌混合の後、10 分間の超音波処理、その後、遠心分離により上澄液と沈渣に分別、同様の操作を繰り返し 2 回の抽出操作を行って得られた上澄液を上記と同様に透析膜で分子量分画を行った後にタンパク質測定用試料とした。なお、BCA 法における標準タンパク質としては、牛血清アルブミンを希釈して利用した。

2.3 高度処理法としての 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¹⁰⁾。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¹¹⁾があるが、知見は限られている。

本項では、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 の除去効果を評価した。除去効果の評価は、活性汚泥処理パイロットプラント (以下 P.P.) および実下水処理場の MBR にて行った。P.P. の評価では、D 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 0.1 μ m) を浸漬させ、HRT を約 8 時間とした連続処理を行った。処理開始当初の MLSS は 2,200mg/L であったが、最終的には 7,400mg/L まで上昇した。実下水処理場の評価では、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 0.2 μ m、MLSS 7,500~11,200mg/L、HRT 6.8 時間) を対象とした。また、MBR による NoV の除去率の向上割合を把握するため、比較対象として P.P. から MF 膜を引き抜いた状態による活性汚泥法 (標準法) と、泉北水再生センターにて MBR とは別に並列処理を行っている標準法の各

処理水の NoV 濃度を測定した。さらに、P.P. の MBR では原因不明の発泡が反応タンク内で生じたため、発泡による活性汚泥のフロックの解体が NoV 除去に及ぼす影響を把握した。採水・調査期間は P.P. が約 18 ヶ月間 (4 回程度の採水/月)、実プラントが約 12 ヶ月間 (1 回/月) とした。水質測定項目は、NoV および大腸菌である。MBR 処理水の大腸菌の測定では、低濃度であることが予測されたことから、QT トレイによる MPN 法 (分析水量 100mL) とした。

2.4 リスク要因に応じた管理技術の提案

下水道で広く用いられる塩素消毒に耐性を有する病原微生物としてはウイルス等の存在が知られており、水系感染症への対策として、下水処理における効果的な消毒技術・管理手法の検討が重要である。消毒強化と消毒副生成物抑制の間にはトレードオフの関係が想定されるため、これらの観点から合理的な水質安全性向上手法の提案が期待される。特に、衛生的安全性をより高めるために消毒耐性病原微生物に対して消毒を強化することは、消毒副生成物の生成増大につながる懸念される。その中でもオゾン処理¹²⁾、塩素消毒¹³⁾ によって生成の可能性が報告されている N-ニトロソアミン類の 1 種である N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) は、水道水質の要検討項目に位置づけられているが、下水処理水を対象とした調査例は少ない。また、N-ニトロソアミン類以外にも複数の既知の副生成物に加え、未知の生成物の存在も想定されるが、それらを物質ごとに個別に同定・定量することは容易ではない。

本項では、消毒耐性病原微生物および消毒副生成物のリスク要因に応じた管理技術の提案を目的として、NoV と FRNAPH G II を指標にオゾン・塩素消毒による低減・不活化効果の向上と、消毒副生成物の生成抑制の観点から有効となる消毒条件を明らかにした。

消毒の対象水は、活性汚泥法の二次処理水、硝化抑制活性汚泥法の NH₄-N 残存二次処理水 (NH₄-N 残存水)、窒素・リンの高度処理法である生物学的高度処理水 (高度処理水) の 3 種類とした。塩素の添加濃度を大幅に高めることなく消毒効果を向上させるため、塩素消毒前にオゾン処理を行った。オゾンの添加濃度は対象水ごとに 0~5mg/L、塩素消毒では次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を 0~4mg/L とした。オゾン処理、塩素消毒の接触時間は各々 20 分間とした。

消毒副生成物の生成評価では、LC/MS/MS でのニトロソアミン類の定量と LC-QTOF/MS による消毒副生成物の探索を試みた。ニトロソアミン類の測定方法は上水試験方法など^{14)、15)、16)} を参照した。試料 1L をろ過

(GF/B:1.0 μ m) し、ろ液に内部標準物質のメタノール混合溶液を添加した。固相カートリッジを利用し加圧型固相抽出装置により固相抽出を行い、ジクロロメタン溶出液を窒素気流下で乾固直前まで濃縮し、メタノール、ミリ Q 水溶液 (2:8) 1mL で定容、ろ過 (0.2 μ m) した後、LC/MS/MS によりニトロソアミン類の定性・定量を行った。消毒副生成物の探索では、同じ試料を LC-QTOF/MS (Xevo G2-XS QToF:Waters 社) で分析し、解析ソフト (Progenesis) でピークの溶出時間、*m/z*、ピーク強度を網羅的に取得した。その他、上記以外の水質分析項目は、NH₄-N、DOC、残留塩素とした。

2.5 NoV と FRNAPH G II の測定法

上記 2.1~2.4 で得られた試料の NoV は、ポリエチレングリコール沈殿法 (PEG 沈殿法) により濃縮し、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、リアルタイム RT-PCR 法により定量を行った。詳細は次のとおりである。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN 社) でウイルス RNA を精製した。上記で抽出したウイルス RNA 試料 0.5 μ g をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 50 μ L の系で逆転写反応により cDNA を作製し 5 μ L をリアルタイム PCR に供した。NoV の検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」¹⁷⁾ 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、PEG 沈殿法では、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量を低減させることで、陰電荷膜法に比較して NoV の検出濃度を高められる。また、ウイルス回収率への影響のバラツキを抑えるため、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、抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した¹⁸⁾。

上記 2.4 で得られた試料の FRNAPH G II の測定法は、定量的タイピング手法¹⁹⁾ による感染力の有無の判断が可能な IC-PCR 法 (培養法と分子生物学的手法の PCR 法を組み合わせた手法) とした。

3. 応急復旧段階における水質改善が消毒効果向上およ

び消毒副生成物の生成抑制に及ぼす影響評価

東日本大震災や台風では津波・浸水により下水処理場は壊滅的な被害を受け、水・汚泥処理の復旧に長期間を要した。簡易沈殿処理や簡易生物処理などの応急復旧段階を経て本復旧へ至るが、応急復旧段階の下水の消毒は、通常の塩素消毒に比べ塩素注入濃度を高める必要がある。応急復旧段階で処理水質が悪化している状況において、塩素注入濃度を高めることは、消毒副生成物の生成を促進することが懸念されるが、応急復旧段階の消毒副生成物に関する調査・研究例は少なく、その実態は不明である。

このような背景から本項では、段階的な復旧対策技術による水質改善効果が消毒効果および消毒副生成物の生成抑制へ及ぼす影響評価を目的に、台風による浸水被害を受けた E 下水処理場を対象として復旧段階ごとの下水試料を採水し塩素消毒実験を行った。消毒実験は大腸菌群数が基準値 (3,000CFU/mL) 以下となるよう次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を変動させ、接触時間を 20 分間とした。大腸菌群数の測定は、デソキシコール酸塩培地の平板培養法とした。消毒副生成物は全有機塩素 (TOCl) を指標とした。TOCl の測定はメタノール+NaNO₃+純水で洗浄したろ紙 (酢酸セルロース) によりろ過し、そのろ液を TOX 計に供した²⁰⁾。

4. 研究結果および考察

4.1 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

4.1.1 雨天時活性汚泥法による NoV の除去効果

降雨時に行った全 9 回の調査結果を図-2 に示す。調査時における降雨状況は、時間最大降雨量が 2.0~18.5mm/h、累積降雨量は 9.5~54mm であり、この時の最大のバイパス流量は 0.3~1.7Q (晴天時 1Q に対する最大の水量比は 1.3~2.7 倍) であった。雨天時活性汚泥運転時における流入 NoV 負荷量 (流入水の NoV 濃度×流入水量) を 1 とし、処理水からの流出 NoV 負荷量 (処理水の NoV 濃度×処理水量) の割合を求めたところ 0.016~0.115 となり、その平均値は 0.052 であったことから流入負荷量に対する NoV の除去効果は約 95% と見積もられた。一方、流出負荷量の割合に 7 倍量程度の違いが見られたことから、その要因を推定するため NoV の流出負荷とバイパス流量比、反応タンク内の MLSS および処理水の SS との関係性を各々整理した。整理結果を図-3~5 に示したが、晴天時の 1Q に対するバイパス流量比の高まりや、反応タンク内の MLSS の変動に関しては NoV の流出負荷へ及ぼす影響は小さいものと考えられた。SS

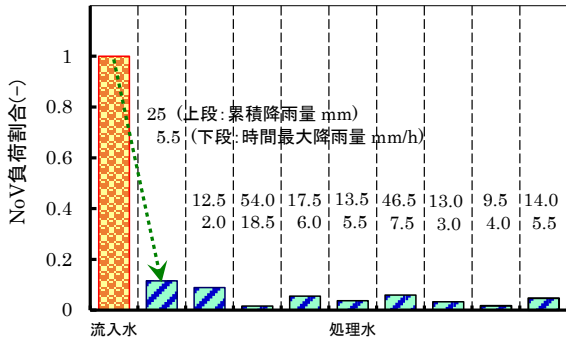


図-2 雨天時活性汚泥法によるNoVの削減効果

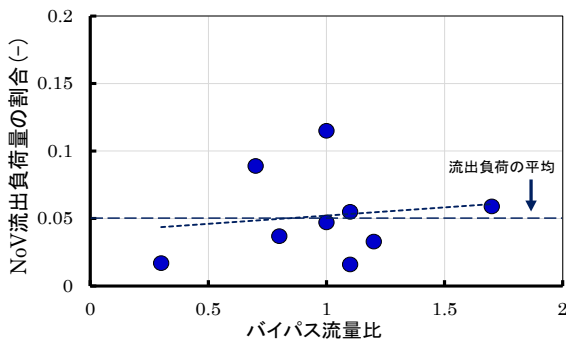


図-3 バイパス流量比とNoV流出負荷量割合の関係

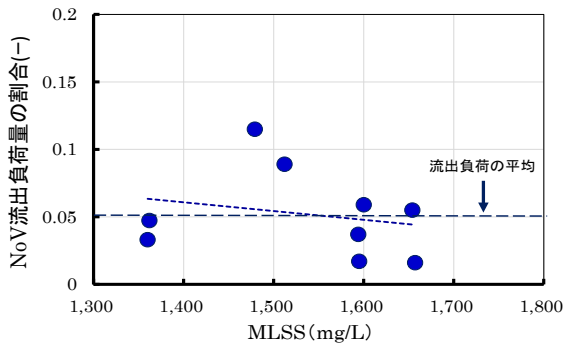


図-4 反応タンク内MLSSとNoV流出負荷量割合との関係

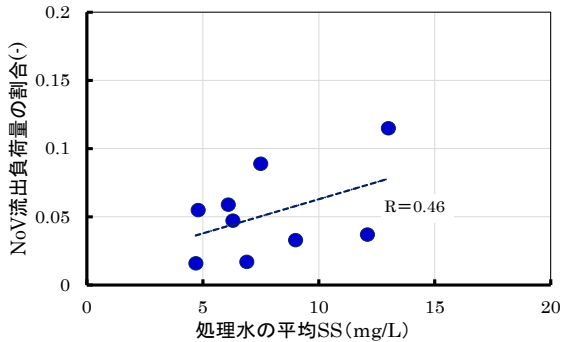


図-5 処理水の平均SSとNoV流出負荷量割合の関係

に関しては、雨天時活性汚泥処理時の処理水の平均 SS 濃度と NoV の流出負荷割合との間に正の相関が見られるものの (図-5)、バイパス流量比や MLSS 関連性は認められず、流出負荷量割合の変動要因の解明には至らなかった。

4.1.2 公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価

C 河川における 4 回の調査時の降雨状況を図-6、7 に示す。時間最大降雨量は 2.5、9.5、14、20mm/h、累積降雨量は概ね 10、30、60、120mm であり、全て異なった降雨状況での実態調査となった。調査時における河川水の NoV 濃度の推移を図-8、9 に示す。1 降雨あたりの累積降雨量が 10mm 程度であれば NoV 濃度の顕著な上昇は認められず、概ね 10^4 copies/L レベルで推移しており、調査開始当初から大きな変動は見られなかった。しかし、累積降雨量が約 30mm 以上となったケースにて放流先河川水の NoV 濃度は上昇しており、降雨初期の調査開始時と比較して 2 オーダーの濃度上昇が認められ、その最大濃度は $10^6 \sim 10^7$ copies/L となった。

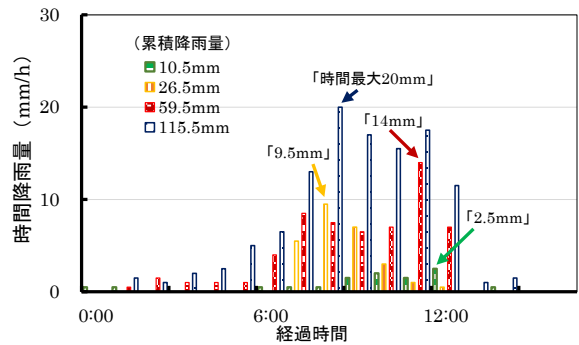


図-6 調査時の時間降雨量

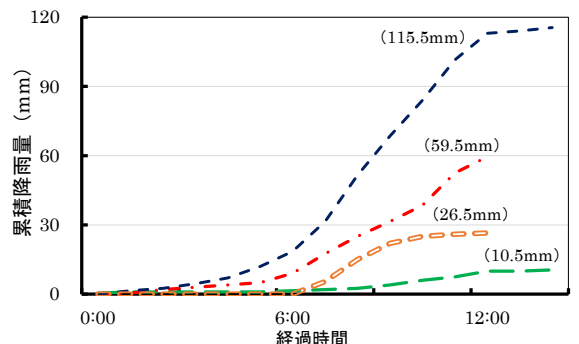


図-7 調査時の累積降雨量

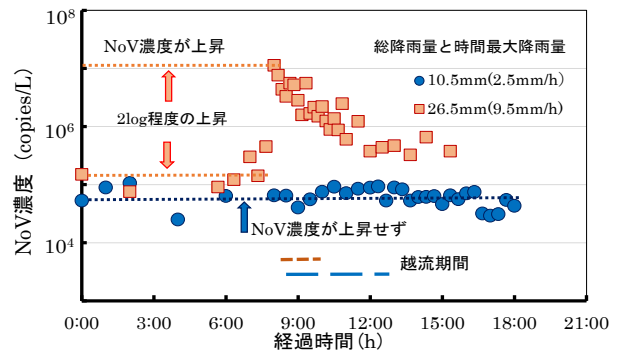


図-8 越流水影響下による河川水のNoV濃度の推移 (総降雨量約10~30mm)

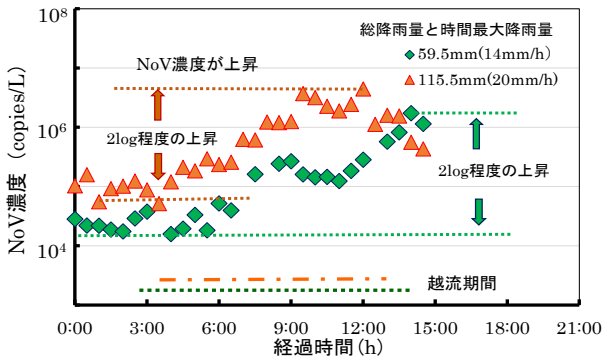


図-9 越流水影響下による河川水のNoV濃度の推移 (総降雨量約60~120mm)

当面の暫定的な達成目標として雨天放流時の BOD 負荷を分流式並み、越流回数を半減としている B 市における合流改善事業後において、NoV の流出抑制にも一定の効果があるものと推定されたが、降雨の状況に応じて越流水による放流先水域への影響が懸念された。

次いで、越流水の影響下における 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または SS との関連性を評価した結果を図-10、11 に示す。総降雨量が 10mm 程度と約 30~120mm とに分けて評価し、さらに後者については越流水の越流前後に分けて整理を行った。総降雨量が 10mm 程度では越流水の影響により河川水の濁度が最大値で 20 度、SS は 20mg/L 程度に上昇したが、NoV 濃度の顕著な上昇が見られなかったため、濁度等との明確な関連性は見出せなかった。また、総降雨量が約 30~120mm でも越流が発生する以前では濁度、SS の最大値は各々 20 度、20mg/L 程度であり、NoV 濃度がやや変動しているが顕著な上昇は見られなかった。一方、総降雨量が約 30~120mm における越流後の状況では、河川水の濁度は最大値で 300 度、SS は 500mg/L 以上に上昇し、それに伴って NoV 濃度が大幅に高まった。このことから、総降雨量が比較的多くかつ濁度、SS の顕著な上

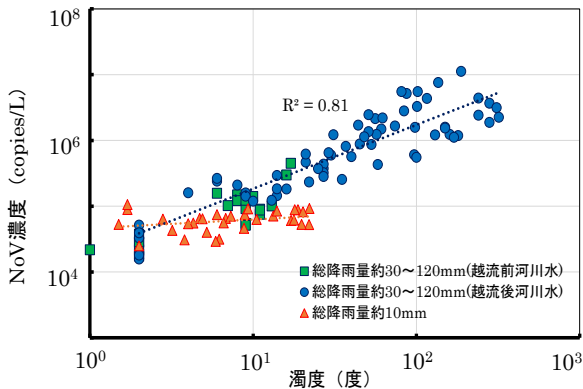


図-10 河川水の濁度とNoV濃度の関係

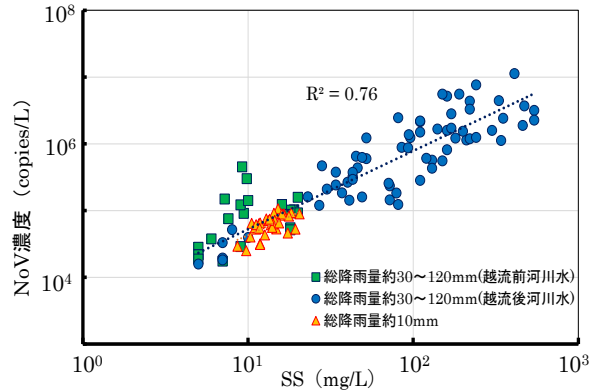


図-11 河川水のSSとNoV濃度の関係

昇時には、NoV 汚染の簡易なモニタリングのための代替指標として濁度または SS が活用できる可能性が示唆された。

越流水影響下での河川水の濁度または SS と NoV 濃度との関連性が認められたため、越流水の SS 等の制御が NoV 対策に有効となる可能性がある。このため、SS が異なる河川水試料を対象に、ろ過 (GF/B) による NoV の除去効果の評価した。越流水の影響割合が異なる河川水試料として、SS が 7、19、410mg/L の試料を評価対象とした結果を図-12 に示す。ろ過による NoV の除去率は 0.9~1.4log であり、越流水対策として、高濁度水を対象としたろ過等の SS 低減プロセスの導入によっても、ウイルス負荷の削減が図れるものと考えられた。

過去に行った調査²⁾を含めた各種合流改善対策技術の評価結果を表-1 に示す。現在、合流改善事業において NoV の放流負荷に関わる目標値は定められていないが、放流先水域が重要影響水域である場合には、将来的には衛生的な観点からウイルスに対する安全性の確保に関する検討を行うことも考えられる。

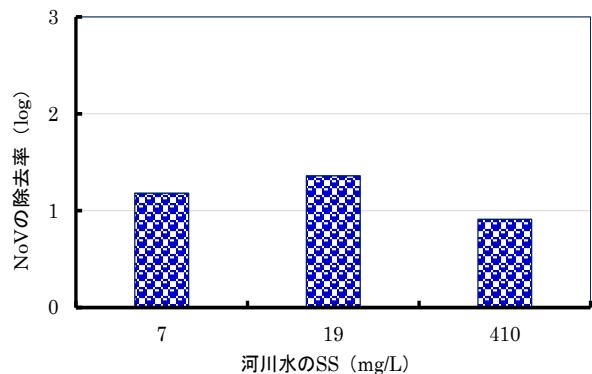


図-12 SSが異なる河川水のろ過 (GF/B) によるNoVの除去率

表-1 各種合流改善対策技術の評価結果

対策技術	対策条件	評価結果 (NoVを指標)
遮集倍率の向上	遮集倍率最大7Q	対策後、河川水のNoV濃度の上昇無 ²¹⁾
雨天時活性汚泥法	流入水量の最大3Q処理	NoV負荷量の平均除去率は95%
雨水貯留管の設置	流出負荷量が分流並、越流回数の半減	総降雨量の増加に伴い河川水のNoV濃度が上昇

4.2 活性汚泥中のタンパク質と NoV 低減除去効果の関係

活性汚泥のタンパク質（ペプチド）量と NoV 濃度の関係を図-13 に示す。なお、分子量分画において 10KDa 未満のものをペプチド、10KDa 以上をタンパク質として整理した。また、図中の○印は A2O 法、△印は標準法のプロットである。単位水量あたりの活性汚泥中には 10KDa 以上のタンパク質が最も多く、次いで、3KDa 未満、3～10KDa 未満のペプチドの順であり、かつ、A2O 法の活性汚泥は標準法に比較してタンパク質、ペプチド量ともに多い状況であった（表-2）。さらに、A2O 法では全体的に上澄液中の NoV 濃度が低くなる傾向が見られた。

次いで、図-13 に示した活性汚泥中のタンパク質・ペプチド量について A2O 法と標準法ごとに整理した結果を表-2 に示す。設定 MLSS 濃度を 500、1,000、2,000mg/L と

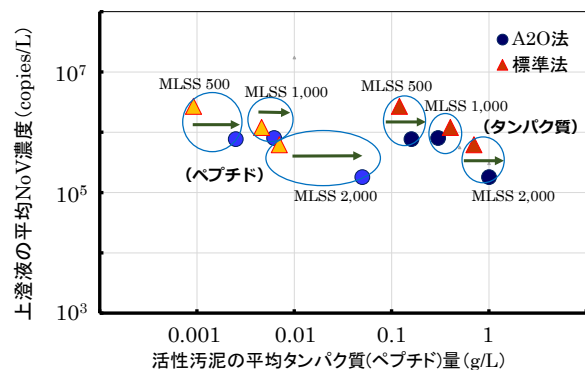


図-13 活性汚泥のタンパク質(ペプチド)量とNoV濃度の関係

した 4 回の回分実験結果の平均値を示したものであり、平均値の最小値は設定 MLSS を 500mg/L、平均値の最大値は設定 MLSS が 2,000mg/L としたものである。3KDa 未満のペプチド量は標準法に比較して A2O 法では最大 4.5 倍量、同様に 3～10KDa 未満のペプチド量は 7.1 倍量の違いが見られた。10KDa 以上のタンパク質に関しては 1.4 倍量多かった。A2O 法の活性汚泥は、標準法に比較してペプチドやタンパク質の含有量が多く、特にペプチド量に大きな違いが見られた。

上記では、回分実験で得られた上澄液の NoV 濃度の違いにより低減効果の評価したが、改めて、回分実験に利

用した流入下水と回分実験による上澄液の NoV 濃度から除去効果を求めた。A2O 法と標準法の活性汚泥 MLSS と NoV 除去効果の関係を図-14 に示すが、MLSS の高まりとともに NoV の除去効果が向上するが、標準法に比較して A2O 法では NoV の除去効果が大きかった。

なお、本結果は 1 下水処理場のみの評価であることから、今回の評価結果を裏付けるためにも、他の下水処理場の活性汚泥を利用した評価を行う必要がある。一方、対象とするウイルスが異なるが、活性汚泥から分離したタンパク質には、ポリオウイルスに対して高い吸着性能を有することが報告²²⁾ されており、活性汚泥中のタンパク質がウイルスの吸着に関与している可能性が示されている。

表-2 A2O法と標準法のタンパク質量とペプチド量の比較

	4回の回分実験の平均値 (g/L)		A2O法/標準法の比
	A2O法	標準法	
3KDa未満 (ペプチド)	0.021～0.28	0.0069～0.062	} 3.0～ 4.5
3-10KDa未満 (ペプチド)	0.0025～0.05	0.00092～0.007	
10KDa以上 (タンパク)	0.16～1.0	0.12～0.7	} 1.3～ 1.4

設定 MLSS 濃度 500、1,000、2,000mg/L とした 4 回の回分実験結果の平均値。平均値の範囲である最小値 (g/L) は設定 MLSS を 500mg/L、平均値の最大値は設定 MLSS が 2,000mg/L のものである。

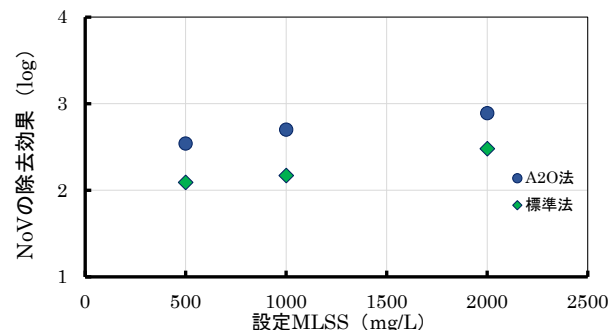


図-14 A2O法と標準法の活性汚泥MLSS とNoV除去効果の関係

4.3 高度処理法としての MBR による NoV 除去効果の向上評価

P.P.と実下水処理場の MBR における流入下水および処理水中の NoV 濃度の推移を図-15、16 に示す。調査期間中の流入下水の NoV 濃度は概ね 10⁶～10⁸copies/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 10²～10³copies/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。全期間における NoV の平均除去率は P.P.が 4.0log、実下水処理場の MBR が 3.9log となり概ね 4log であった。一方、反応タンク内の MLSS と NoV の除去率について図-17 に示すが、P.P.

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0.1μm (P.P.) と0.2μm (実処理場) 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。ファウリング等を含めた除去効果と区別できていないが、活性汚泥のフロック形成時にウイルスが吸着され、粒径の大きいフロックが膜に捕捉されることが除去率向上の一因である可能性が示唆された。実下水処理場のMBRではMLSSがP.P.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、P.P. (MLSS

標準法の処理水のNoV濃度はP.P.と実下水処理場でともに $10^4 \sim 10^6$ 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P.P.が2.0log (除去率の範囲は1.6～2.6log)、実下水処理場で2.0log (1.0～2.7log) であり、既往の報告例⁹⁾と同等の値であった。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-18に示す。大腸菌は膜の公称孔径よりも大きいため過捕捉されることからNoVの除去率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P.P.と実下水処理場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。

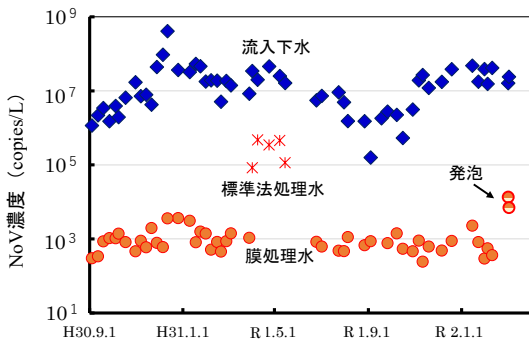


図-15 P.P.のMBRでのNoV濃度の推移

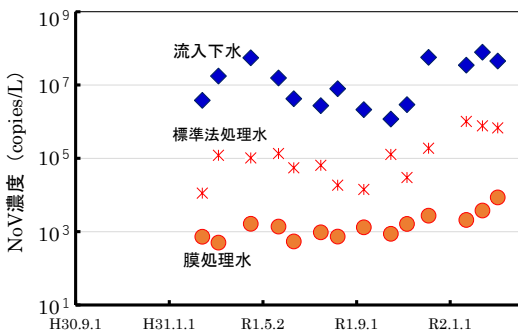


図-16 実下水処理場のMBRでのNoV濃度の推移

6,000mg/L以上時)と比較してやや低い状況にあった。

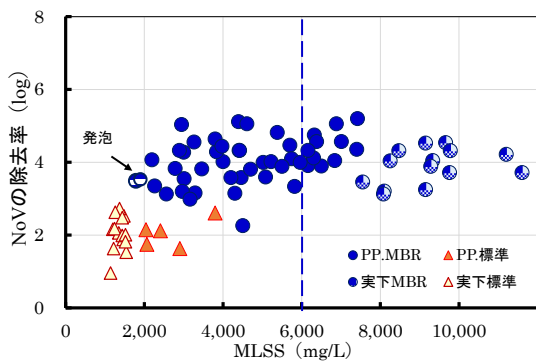


図-17 反応タンク内MLSSとNoVの除去率の関係

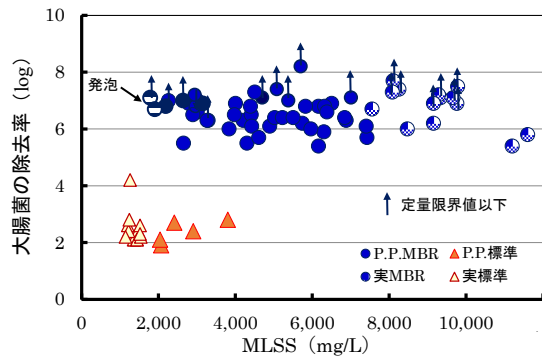


図-18 反応タンク内MLSSと大腸菌の除去率の関係

一方、P.P.反応槽の発泡の影響については、泡とともに活性汚泥が流出したため、MLSSが7,000mg/L程度から2000mg/Lに低下した(図-17)。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-15、17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-18)、ろ過水量の減少と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。処理水質悪化時におけるMBR法の微生物相を観察した報告例が見当たらず、標準的な活性汚泥法の微生物相²³⁾と比較すると、浄化の程度が低い時に出現²³⁾する *Amoebida* (アメーバ目) が1,360細胞/mLで優占していた。

4.4 リスク要因に応じた管理技術の提案

4.4.1 消毒条件に応じた FRNAPH G II の不活化効果と NoV の低減効果

ウイルスの代替指標として利用した FRNAPH G II の不活化効果について図-19 に示す。消毒対象水が高度処理水で次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を 2mg/L とした消毒条件では、FRNAPH G II が定量下限値以下となり、高い不活化効果 (3.7log 以上) が得られた。オゾン処理を先に行った場合でも定量下限値以下であったため、オゾン処理と塩素消毒の併用による不活化効果の向上を本条件では確認できなかった。高度処理水に次亜塩素酸ナトリウムを 1mg/L となるよう添加した場合、および二次処理水に次亜塩素酸ナトリウムを 2mg/L となるよう添加した場合には、先に行ったオゾン処理の添加濃度に応じてそれぞれ不活化効果の向上が見られたが、FRNAPH G II が定量下限値以下となる場合もあり、確認できた効果は最大で 1.6log であった。高度処理水の FRNAPH G II の濃度が低かったため定量できたデータ数が限定的であったことから、試料の濃縮や定量手法の改善を図る必要があると考えられた。

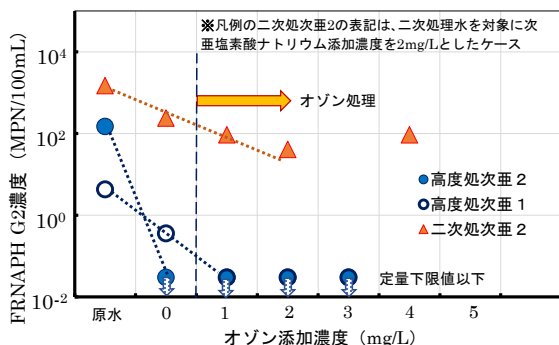


図-19 試料性状とオゾン添加濃度の違いが FRNAPH G II の不活化効果に及ぼす影響

ウイルス指標として NoV の低減効果について図-20 に示す。消毒対象水が高度処理水である場合には、オゾン処理後に次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を 2mg/L とした消毒条件にて最大 2.3log 以上の低減効果が得られた。二次処理水、NH4-N 残存二次処理水では最大で 1.2log 程度であった。

消毒の対象水が異なることで、FRNAPH G II や NoV の不活化・低減効果に大きな違いが生じたが、1つの要因としては水質性状の影響が推定される。このため、水質性状が異なる各対象水について、同一の消毒条件として次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度が 2mg/L、オゾンの添加濃度を 0、2mg/L とした場合の遊離残留塩素濃度とその CT 値について整理した結果を表-3 に示す。遊離残留塩素

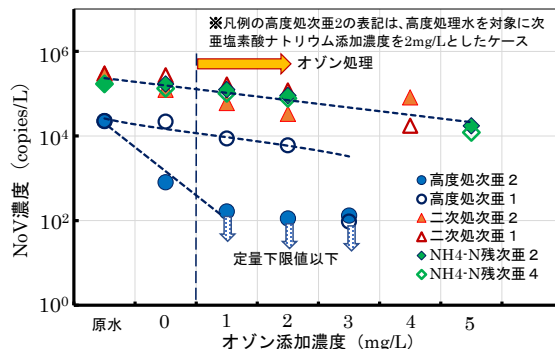


図-20 試料性状とオゾン添加濃度の違いが NoV の低減効果に及ぼす影響

濃度は次亜塩素酸ナトリウムの添加から接触時間の 20 分後に測定した値、CT 値は 5 分間隔で測定した遊離残留塩素濃度の積算値から算出し整理した結果を図-21 に示す。FRNAPH G II と NoV の不活化・低減効果が高かったオゾン添加濃度を 2mg/L、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を 2mg/L とした高度処理水は、他の試料と比較して塩素の消費量が低く遊離の残留塩素濃度が高く保持されていた。また、二次処理水と比較して DOC もやや低い状況にあった。オゾンの添加濃度が 0mg/L の消毒条件では、オゾンの添加濃度が 2mg/L よりも遊離の残留塩素濃度が低いことから、塩素を消費する有機物がオゾンの添加によって分解されているものと推定された。NH4-N 残存水では、クロラミンの生成が優先することで遊離の残留塩素濃度が低かった。

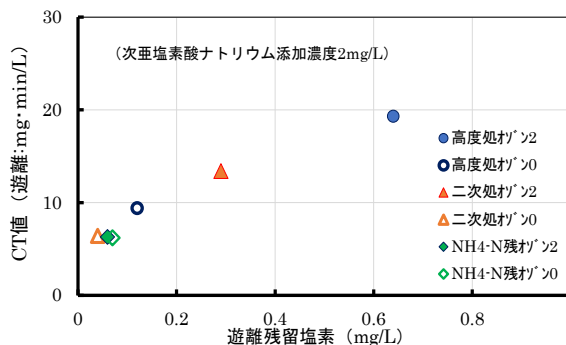


図-21 各消毒対象水の遊離残留塩素と CT 値の関係

表-3 消毒対象水の水質性状

	DOC (mg/L)	NH4-N (mg/L)	遊離残留塩素 (mg/L)対'>2	遊離残留塩素 (mg/L)対'>0	CT値 (mg·min/L)対'>2	CT値 (mg·min/L)対'>0
高度処理水	4.9	0.01	0.64	0.12	19.3	9.4
二次処理水	5.3	0.01	0.29	0.04	13.4	6.4
NH4-N残存水	6.4	14.4	0.06	0.07	6.3	6.2

※ 次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 2mg/L

4.4.2 ニトロソアミン類の生成評価

各種処理水の消毒条件によるニトロソアミン類の生成状況について図-22 に示す。N-ニトロソジメチルアミン (NDMA)、N-ニトロソメチルエチルアミン (NMEA)、

N-ニトロソジェチルアミン (NDEA)、N-ニトロソジ-n-プロピルアミン (NDPA)、N-ニトロソピロリジン (NPYR)、N-ニトロソモルホリン (NMOR)、N-ニトロソピペリジン (NPIP)、N-ニトロソジ-N-ブチルアミン (NDBA) の8生成物を評価したが、図中に示した4生成物についてのみ二次処理水とNH₄-N残存水で多くの定量値が得られた。高度処理水ではオゾン処理後に塩素消毒を行って検出された4生成物の多くが定量下限値以下(3.3~40ng/L)の濃度であった。二次処理水(NH₄-N残存水を含む)では、オゾン添加によってニトロソアミン類の生成濃度が高まり、特にNPYRの生成が顕著であったが、硝化抑制のNH₄-N残存水は二次処理水と比較して全体的にニトロソアミン類の生成濃度が低い状況であった。この理由を明らかにするためには、遊離塩素およびクロラミンならびにオゾンについて、前駆物質との反応特性を詳細に把握する必要がある。

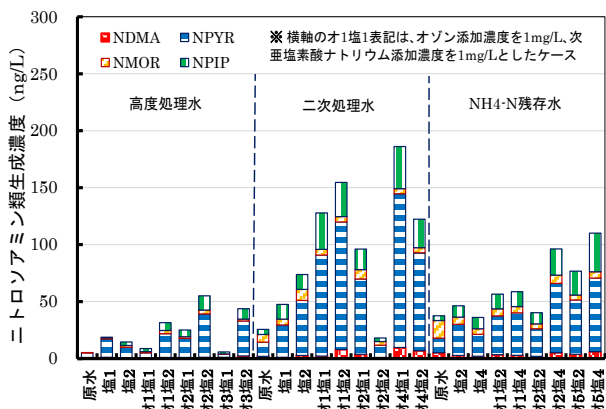


図-22 各種処理水の消毒条件によるニトロソアミン類の生成

上述したニトロソアミン類の測定結果の内、水道水質基準の要監視項目であるNDMAの生成濃度について整理した結果を図-23に示す。高度処理水ではオゾン処理後に塩素消毒を行ってもNDMAの検出濃度は定量下限値以下(3.3ng/L)であった。一方、二次処理水やNH₄-N残存水ではオゾン処理後に塩素消毒を行うことでNDMAの生成濃度が高まるケースも見られたが、最大値は10ng/L程度であった。NDMAに関しては、参考として水道水質要監視項目の100ng/Lの目標値があるが、今回の各種対象水の消毒条件下では超過したケースはなかった。

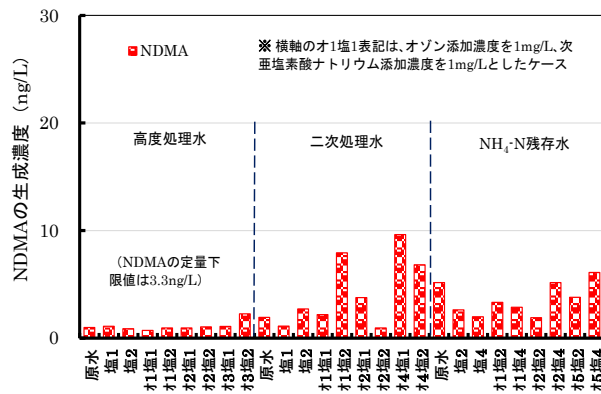


図-23 各種処理水の消毒条件によるNDMAの生成

次いで、FRNAPH G II等の不活効果やニトロソアミン類等の生成に影響を及ぼすと考えられる各種消毒条件下でのCT値(5分間隔で測定した遊離、全残留塩素濃度の積算値から算出)について図-24に示す。なお、消毒実験は条件ごとに別々に行っているが見やすさの観点からグ

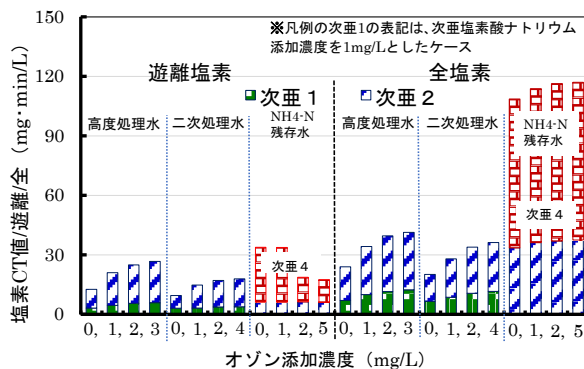


図-24 各種消毒条件下のオゾン添加濃度と塩素のCT値

ラフは積上げ表記とした。高度処理水と二次処理水等では次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度が1mg/Lである場合にはオゾン添加濃度を高めてもCT値に大きな変化がなかったが、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を2mg/Lとしオゾン添加濃度を高めることで塩素消費量が減少し、遊離・全塩素のCT値に高まりが見られた。NH₄-N残存水では、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を2mg/Lとしオゾン添加濃度を高めてもCT値に変化はなかったが、4mg/Lとすることで遊離・全塩素のCT値が上昇した。次亜塩素酸ナトリウムとオゾンの添加濃度に応じてCT値に変化が生じたが、塩素の消費物質の1つである有機物がオゾンにより分解されることにより、CT値が上昇していると推定されたことから、上記の4.4.1で示した結果とは別に、高度処理水を対象にDOCを有機物指標としてオゾン添加濃度ごとに測定を行った。オゾン添加濃度ごとのDOCとCT値の関係について図-25に示す。オゾン添加濃度を高めることでDOCの若干の低下が見られたことから、塩素を消費する有機物の分解が1つの要因となりCT値が上昇した可能性が唆された。

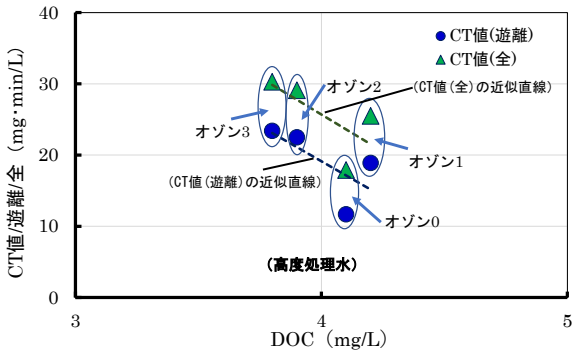


図-25 オゾン添加濃度ごとのDOCと塩素のCT値の関係

4.4.3 LC-QTOF/MSによる消毒副生成物の探索試行

LC-QTOF/MSによる消毒副生成物の探索試行として Progenesis を用いたノンターゲット解析を実施した。Positive と Negative のピーク強度について、各種消毒後水と消毒前原水を比較し、t 検定と倍率（消毒前の10倍以上）をもとに消毒前後で有意な増加を示したピークを抽出した。その結果、消毒副生成物の候補ピークは170個が抽出された。その中でオゾン処理・塩素消毒後の試料にてピーク強度が大きかった1つの例を図-26に示す。消毒原水が高度処理水である場合と比較して、二次処理水とNH₄-N 残存水を原水としたオゾン処理・塩素消毒後の試料でピーク強度が大きかった。このように消毒副生成物が未知の物質でも探索できる可能性が示唆されたが、多数のピーク候補を検討するには多大な時間・労力を要する点が課題と考えられた。

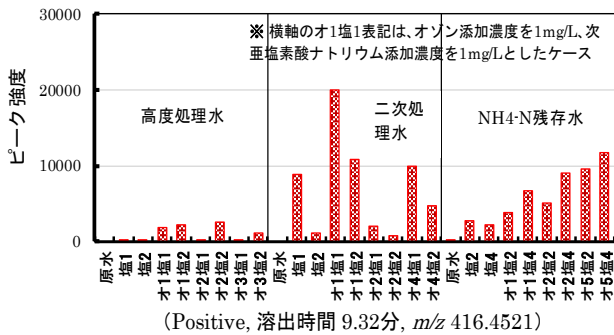


図-26 消毒で増加したピーク強度の比較の1例

5. 応急復旧段階における水質改善が消毒効果向上および消毒副生成物の生成抑制に及ぼす影響評価

被災後から応急復旧段階にかけてのE下水処理場において、簡易沈殿処理水と簡易生物処理水を対象とした塩素消毒による大腸菌群数の不活化効果について図-27に示す。応急復旧の初期段階である簡易沈殿処理水では、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を5mgCl/L以上としなければ大腸菌群数の基準値を達成できない状況であったが、段階的な復旧として簡易生物処理へ移行することで、

基準値達成のための塩素添加濃度を低くすることができた。ただし、簡易生物処理への移行において、基準値達成のための塩素添加濃度をより低減できるまでに約2ヶ月を要したことから、簡易生物処理へ移行しても消毒効果が向上するまでには一定の期間を要することが考えられた。

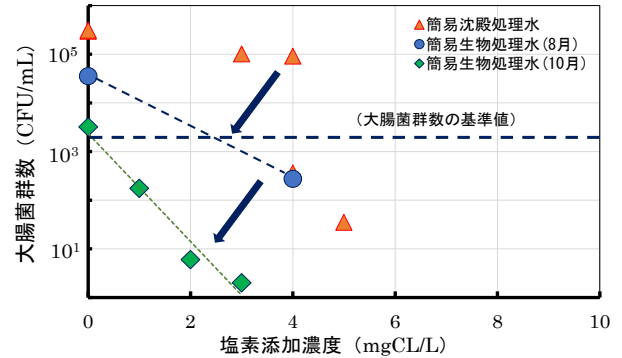


図-27 簡易沈殿処理と簡易生物処理による消毒効果の比較

次いで、段階的な復旧対策による消毒副生成物 (TOCl) の生成抑制効果について図-28に示す。図中のプロットは大腸菌群数の基準値を達成 (35~280CFU/mL) している消毒条件である。図中の初沈+簡易生物混合は、沈殿処理水と簡易生物処理水が混合 (ほぼ1:1の割合) された下水試料、放流水はその混合水を塩素混和池にて消毒した試料である。簡易沈殿処理から簡易生物処理への移行により、基準値達成のための塩素添加濃度を低く (5→1mg/L) でき、TOCl の生成が抑制された。TOCl の生成には前駆物質質量も影響するため、段階的な復旧対策による前駆物質の挙動評価も必要であると考えられた。消毒効果や消毒副生成物の生成抑制の観点から、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。

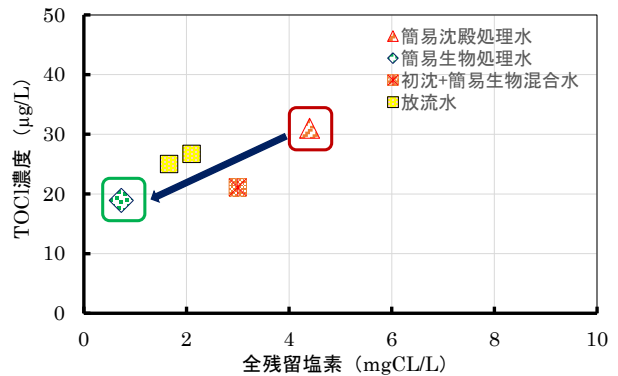


図-28 段階的な復旧対策によるTOClの生成状況

6. まとめ

本研究は、平成28~令和3年度にかけ、①消毒耐性を有する病原微生物に対応した代替指標の提案、②公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案、③高

度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価、④リスク要因に応じた管理技術の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施した。令和3年度は研究期間の最終年度であることから、本項では、リスク要因に応じた管理技術の提案として、達成目標の②、③、④について6年間で得られた成果を以下にとりまとめた。

「公共用水域へ及ぼす越流水の影響評価と対策技術の提案」

- 1) 各種の合流改善事業における NoV の流出抑制効果を明らかにした。
- 2) 越流水の影響下による河川水中の NoV 濃度は、ろ過により 0.9~1.4log 低下することが明らかとなった。越流水対策として高濁度水を対象としたろ過等の SS 低減プロセスを導入することにより、ウイルス負荷の低減が図れるものと考えられた。

「高度処理法などによる病原微生物の不活化・除去の向上評価」

- 3) NoV の除去効果向上要因の1つとして活性汚泥中のタンパク質（ペプチド）量が深く関与している可能性を明らかにした。
- 4) 膜分離活性汚泥法は、通常の活性汚泥法と比較して NoV の除去効果が 2log 程度高まることを明らかにし、技術の有効性を確認した。

「リスク要因に応じた管理技術の提案」

- 5) 消毒耐性病原微生物として NoV と FRNAPH を指標にオゾン・塩素消毒による不活化効果の向上と、消毒副生成物の生成抑制の観点から有効となる消毒条件を明らかにした。
- 6) 被災下水処理場において段階的な復旧対策技術による水質改善に伴う消毒効果および消毒副生成物抑制の向上効果を明らかにし、復旧段階に応じた塩素消毒の運転管理の適正化に資する知見を得た。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした A、D、E 下水処理場、B 市および堺市泉北水再生センター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) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：新下水道ビジョン、平成26年7月。
- 2) 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)

- 3) 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)
- 4) 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）。
- 5) 鯉淵幸生、小野澤恵一、中村格之、原本英二、片山浩之、古米弘明、佐藤慎司、岡安章夫、磯部雅彦：東京湾お台場海浜公園における雨天時合流式下水道越流水の影響調査、海岸工学論文集、Vol. 52, pp. 886-890, 2005.
- 6) 西田光希、張浩然、井原賢、田中宏明：下水処理場から水域へ放流される年間微生物負荷量の推定、土木学会論文集 G（環境）, Vol.76(7), III-441-448, 2020.
- 7) 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.
- 8) Instruction of Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).
- 9) M. Ras, E. Girbal-Neuhauser, E. Paul, M. Sperandio, D. Lefebvre: Protein extraction from activated sludge: An analytical approach, Water Res., 42, pp1867-1878, 2008.
- 10) 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。
- 11) 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、pp11,平成22年3月。
- 12) 立石浩之、北本靖子、宮田雅典：N-ニトロソジメチルアミンの水道水源での存在実態及び高度浄水処理過程における挙動、水道協会雑誌、78(4)、pp8-22, 2009.
- 13) 尹水鐵、中田典秀、山下尚之、田中宏明：下水処理場における N-ニトロソジメチルアミン類及びそれらの生成能の挙動、土木学会論文集 G(環境)、68(7)、III351-358, 2012.
- 14) 日本水道協会：上水試験方法（2011年版）IV.有機物編、pp.212~214、2011.
- 15) Suchul Yoon, Norihide Nakada, Hiroaki Tanaka: A new method for quantifying N-nitrosamines in wastewater samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, Talanta 97, 256-261, 2012.
- 16) 中田典秀、板井周平、楊永奎、鈴木裕識、田中修平：工業用化学物質の酸化処理過程における副生成物生成能試験法の提案、土木学会論文集 G(環境)、72(7) III 95-116, 2016.
- 17) 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/ka>

13 地域の水利用と水生生態系の保全のための管理技術の開発

nshi/031105-1.html (2019年9月24日閲覧)

- 18) 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.
- 19) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H.: Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 4244-4252, 2016.
- 20) 令和2年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.45-61.
- 21) 諏訪守、安井宣仁、南山瑞彦：合流式下水道の改善によるノロウイルス負荷の削減効果、第53回下水道研究発表会講演集、pp431-433,2016.
- 22) 松尾崇宏、佐野大輔、大村達夫：活性汚泥からのウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein:VBP) の分離およびその吸着能評価、土木学会第57回年次学術講演会、pp-335-336、平成14年9月.
- 23) 公益社団法人日本下水道協会：下水試験方法下巻-2012年版-、pp.211-204、2012.

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と貧酸素化予測手法の高度化、および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：新目竜一、村山雅昭、巖倉啓子、谷瀬敦、野上毅、杉原幸樹

【要旨】

塩淡水層汽水湖で塩水層の貧酸素解消を目的に、通年での水質挙動の観測および実水域で酸素溶解装置(WEP)の運用試験を行った。2ヶ月の装置運転でおよそ210,000 m²に酸素供給影響が確認された。一方で残存酸素量は装置の運転時間と含有硫化水素濃度に依存して、水塊移動と供給酸素濃度が重要であることが確認された。また装置の管体耐久度も強還元状態の水中においては、2カ年ほどで破損を生じることが確認された。これらの知見から本研究の条件では運転費用に加え、2年おきの保守修繕費が必要となり、年間の維持費用として390～550万円が必要であることが明らかとなった。一方で保守頻度を減少させるための装置も開発し、想定どおりに保守頻度の減少を達成した。

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

淡水と塩水が混合する汽水域は、生産力の高さから、漁業など生活の場として重要な水域である。一方で、汽水湖のように停滞性の強い場合には、塩水と淡水が明確な層構造を形成し、水域内の水質が鉛直方向に二分され、主に底層の塩水によって、水質障害が顕在化している¹⁾。水質改善のためには塩水総量や長期変動を把握することは定量的な対策のためには必要不可欠である。猪鼻湖²⁾、十三湖^{3) 4)}、宍道湖^{5) 6)}など比較的浅い湖沼では風や潮汐によって塩水の消長が観測され、主に夏期に貧酸素水塊を形成して水質障害の原因となっている。一方で小川原湖^{7) 8)}や網走湖^{9) 10) 11)}など深い湖沼では、塩水が局在化して恒常的に底層水質が悪化している挙動がみられる。局在化する塩水は無酸素化して、塩水層の水質悪化に加え、上層の淡水層にも影響を与える挙動が共通している。さらに塩淡水境界位置は両湖沼ともに上昇傾向を示している。湖内水質を考慮する上で、塩水挙動を把握し、無酸素水塊量を簡便に算出することは重要な課題である。また、無酸素水塊の溶存酸素回復や水質改善は湖内生態系の保全の観点からも解決すべき課題である。

そこで、本研究は網走湖の無酸素水塊挙動を明らか

にし、水質改善手法の開発および効果の検証を行い、実水域での運用について試験、研究を行うものである。

2. 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。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。また、下流部では網走川を通じてオホーツク

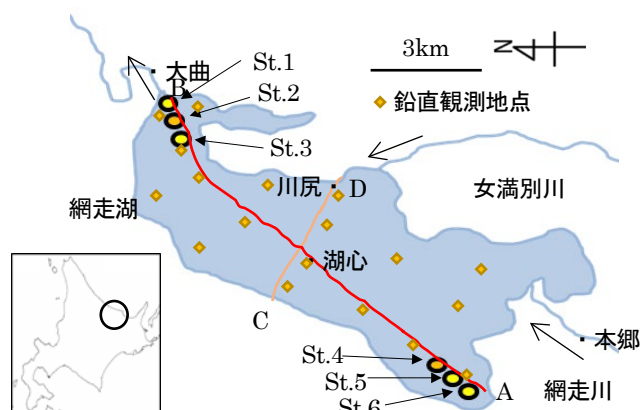


図1 観測地点図

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、たびたび大規模な魚介類の斃死が生じ、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 1 m 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を示す。加えて、2016 年 8 月 17 日～23 日に台風 7、9、11 号が連続して通過し、網走湖内の川尻水位観測所で既往最高水位(標高 2.4 m)を更新する洪水が発生した。また、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、塩淡境界は標高-4～-7 m で表面水位とは独立に変動する。

3. 結氷する汽水湖の生物生息環境への貧酸素影響把握

3.1 機器観測、水質分析外

3.1.1 鉛直観測

2016 年 9 月 7 日に湖内全域の 18 地点(図 1 参照)で鉛直投下式の水質計(Hydrolab 社、DS5)を用いて、湖内の水質分布観測を実施した。観測項目は水深、水温、溶存酸素 (DO)、濁度、塩分、観測時の網走湖の水位は標高 0.9 m であった。

3.1.2 連続観測

図 1 中 St.1～6 に自記式観測器を係留し、1 時間間隔で連続観測を行った。図 2 に観測標高の断面図を示す。下流側の St.1(標高-2.0 m)、St.3(標高-5.0 m)、上流側の St.5 (標高-6.5 m)、St.6(標高-4.0 m)に水温塩分計(JFE アドバンテック製、Compact-CT)、クロロフィル濁度計(JFE アドバンテック製、Infinity-CLW)、光学式溶存酸素計(JFE アドバンテック製、RINKO-W)を設置した。さらに St.2(標高-4.0 m)、St.4(標高-8.0 m)に超音波流速計(RDI 製、Workhorse sentinel 1200 kHz) 及び圧力式水位計(Onset Computer 製 HOBO-U20)を設置した。全ての機器は設定標高になるように立上係留または架台を用いて係留した。観測期間は 2016 年 7 月 13 日～2017 年 5 月 31 日である。ただし 2016 年 12 月 6 日～2017 年 2 月 8 日は薄氷や漁業のために欠測、2017 年 4 月 24 日～2017 年 5 月 9 日は強風のため再設置できず

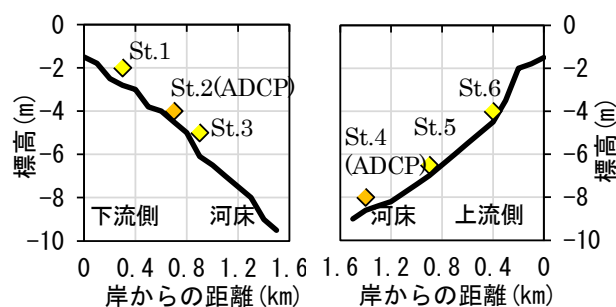


図 2 設置断面図

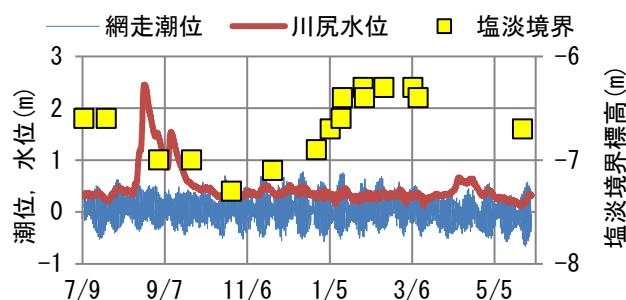


図 3 水位、潮位、境界標高の変化

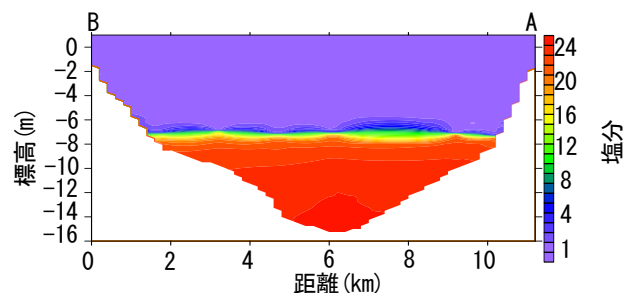


図 4 AB 断面の塩分分布 (2016 年 9 月 7 日)

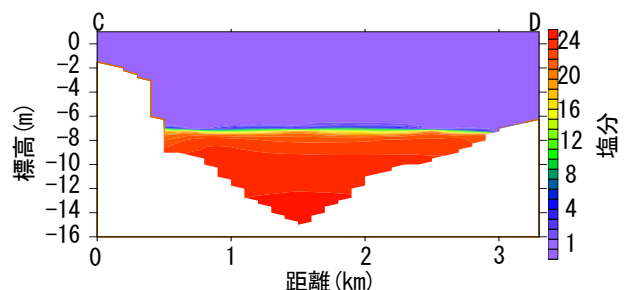


図 5 CD 断面の塩分分布 (2016 年 9 月 7 日)

に欠測している。

3.1.3 データ収集

降雨量、潮位など気象データは気象庁ホームページより網走観測所のデータを引用した。図 1 中本郷、川尻、大曲地点の水位、流量は国土交通省水文水質データベースより対象期間のデータを引用した。各データは毎正時データとして整理した。さらに湖心における、塩淡境界標高値(鉛直分布観測から塩分 10 の標高)について網走開発建設部ホームページより定期水質データより収集した。

3.2 観測結果

3.2.1 鉛直観測結果

図3に2016年7月～2017年5月までの、湖内の川尻水位、河口潮位、湖心における塩淡境界標高の経時変化を示す。8月下旬から洪水により湖内水位が上昇し、対応して塩淡境界標高が下降している。12月からの結氷期には潮位が川尻水位を逆転する頻度が増加して、塩淡境界標高は上昇に転じる。その後4月に融雪出水によって湖内水位の上昇と塩淡境界標高の下降が起こっている。

本研究では流入河川水量と貯留塩水量の関係を明らかにするため、図3中2016年8月1日～2016年10月30日を夏期洪水、2017年3月15日～2017年5月31日を融雪洪水として抽出し、以下に整理する。

まず2017年9月7日に実施した鉛直機器観測より、図1中AB断面における塩分の観測結果を図4、CD断面を図5に鉛直断面コンターとして示す。なお、D点は湖内の漁港で岸壁である。標高-7mに明瞭な躍層を有し、湖内水平面内にほぼ均一に躍層が分布して、明瞭な塩淡二層構造を形成していた。このとき既往最大水位を更新した後であるが、底層に塩水水塊が残留することが明らかとなった。このため水温、DO、濁度も淡水と塩水で明瞭に分割され、淡水層内、塩水層内は各々、鉛直方向均一に分布する傾向が確認された。やや異なる特徴が確認されたAB断面のDO分布を図6に示す。塩水層は無酸素水塊が維持され、加えて下流側河床付近にDOの低下が確認された。洪水期間中のため塩水層の連行流下の影響と考えられるが、塩分は明瞭な上昇はみられなかった。

3.2.2 連続観測結果

a) 夏期洪水

当初、連続観測はセイシュによる塩水湧昇を観測する計画であった。結果的に塩水湧昇と思しき挙動は2時間ほどの継続で断続的にみられ、風速との関係は不明瞭であった。一方で、洪水時の連続データを取得した。

図7に夏期洪水時の気象および水位を示す。8月15日から断続的な降雨が約1ヶ月継続し、川尻水位が平水位に回復する9月30日までの約45日間高水位が継続していた。図8に下流区間(図2参照)の濁度および川尻水位の変化を示す。St.1は水位の変動に追従して変動しており、St.3は本郷水位(図7参照)に追従して変動していた。最初の上昇挙動となる8月19日から濁度が上昇し、水位のピークである8月22日以降

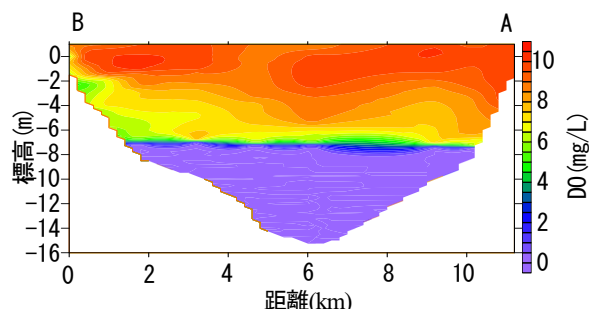


図6 AB断面のDO分布(2016年9月7日)

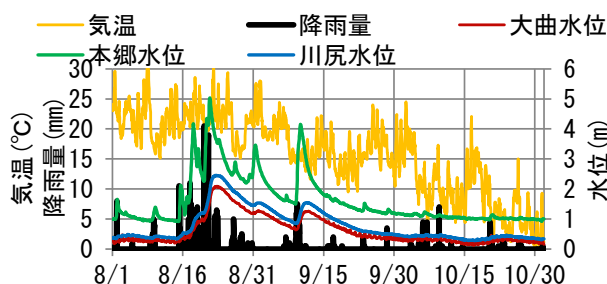


図7 夏期気象、水位変化

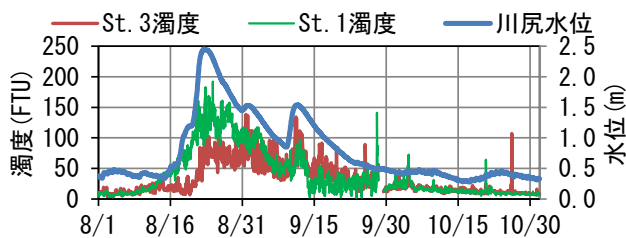


図8 夏期下流区間濁度変化

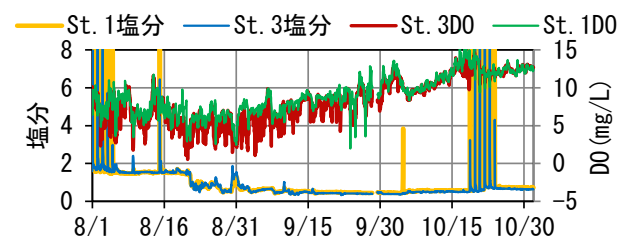


図9 夏期下流区間塩分、DO変化

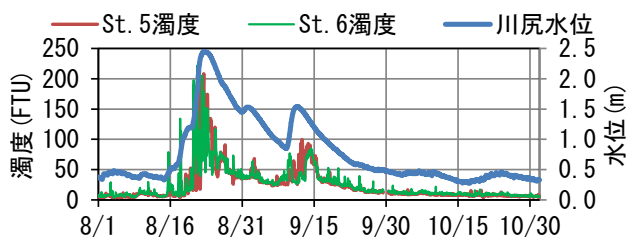


図10 夏期上流区間濁度変化

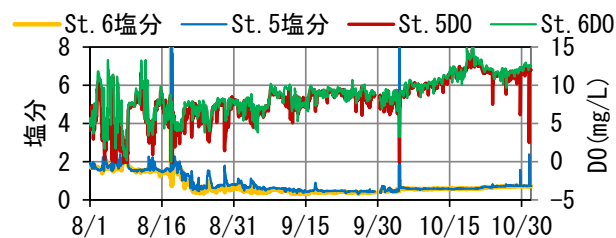


図11 夏期上流区間塩分、DO変化

は水位上昇に同調して濁度の変動が観測された。同様に塩分と DO の変化を図 9 に示す。台風通過前の 8 月 1 日前後、通過後の 10 月 20 日前後に塩分の上昇が確認され、St.1 から St.3 に向かい濃度が低下しており、塩水が逆流していることが確認される。洪水中は全地点で 8 月 19 日に塩分が 1.5 から 0.5 に低下していた。また、川尻水位上昇中の 8 月 15 日から 9 月 30 日までの間は St.1 に比べ St.3 の DO が低濃度で推移し、図 6 からも湖内塩水が流出したと考えられる。

図 10 に夏期出水時の上流側の濁度変化を示す。8 月 20 日および 9 月 10 日前後に図 8 に比べ短期間の濁度上昇が確認され、標高毎の差はほぼ無かった。図 11 に上流側の塩分、DO の変化を示す。図 9 と同様に 8 月 19 日に塩分が 1.5 から 0.5 へと低下して、観測機器の設置標高-6.5 m で淡水となっていた。一方で 8 月 17 日、10 月 5 日に St.5 の塩分上昇、DO 低下がみられ、より浅い St.6 では対応する変動が小さかった。この挙動はセイシュに由来する塩水湧昇と推察されるが、St.1、St.3 の挙動や風速などと明瞭な関係は見られなかった。DO をみると洪水前半の 8 月 16 日から 8 月 31 日までは St.5 は St.6 に比べ、やや低濃度で推移するが、その後は同程度であった。夏期洪水時は湖水位の上昇に伴って標高-6.5 m 以上で淡水化が進行し、標高が低いほど、DO の低下が観察された。加えて湖出口で淡水流出に伴う底層水の流出が DO の低下として顕著に観測された。7 月 9 日(図 3 参照)の標高-7 m の塩分は 20 であり、20 倍以上の希釈によって塩分は 1 以下となり、連続観測塩分挙動に合致する。このとき塩水層にはアンモニアや硫化水素など還元性物質が多量に含まれおり¹⁾、希釈されても溶存酸素を消費するには十分な濃度が存在していたと考えられる。

b) 融雪洪水

次に融雪洪水時の連続観測結果をまとめる。図 12 に融雪期の気象、水位変化を示す。4 月 1 日より気温がプラスとなり水位上昇がみられ、4 月 25 日には平水位となっていた。図 13 に下流側の濁度変化を示す。St.1 の濁度は 4 月 7 日の水位ピークまで断続的に 150 FTU まで変動していたが、ピーク以降は濁度が低下し、清澄になっていた。St.3 ではピークによらず低濁度で推移していた。このときの塩分、DO 変化を図 14 に示す。4 月 17 日～4 月 23 日に St.3 で塩分の上昇と DO の低下が観測され、St.1 に塩分上昇が見られないことから底層塩水の流出と考えられる。また、5 月 29 日前後には塩水の逆流と降雨流入が同時に起こり、水位が上昇

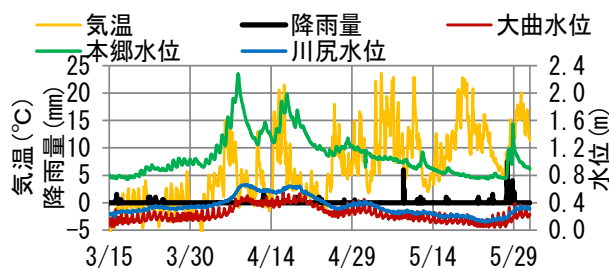


図 12 融雪期気象、水位変化

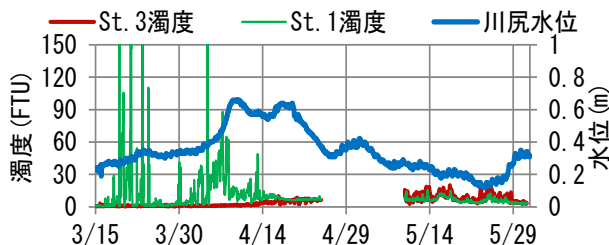


図 13 融雪期下流区間濁度変化

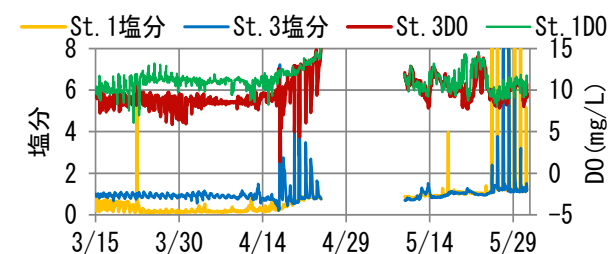


図 14 融雪期下流区間塩分、DO 変化

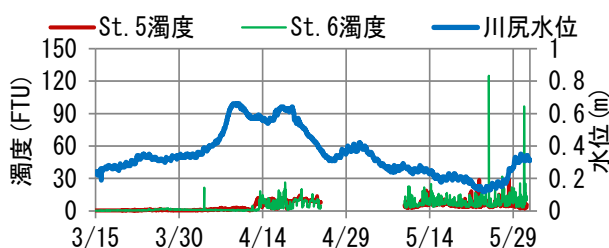


図 15 融雪期上流区間濁度変化

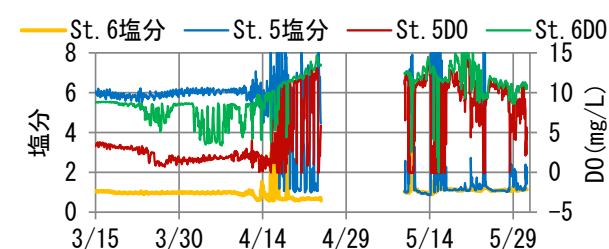


図 16 融雪期上流区間塩分、DO 変化

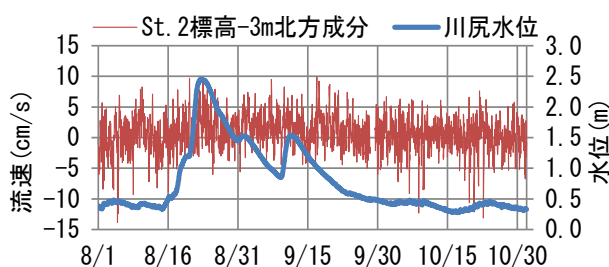


図 17 超音波流速計観測結果例

している。図 15 に上流側の濁度変化を示す。4 月 14 日以降に濁度の上昇がみられるが、融雪期間では低濃度で推移している。塩分、DO を図 16 に示す。融雪洪水前の塩淡境界標高は-6.4 m であり、St.5 の観測器は塩水層に貫入している。4 月 15 日から 4 月 16 日にかけて一旦、塩分上昇(塩淡境界が浅くなる)した後、淡水化(塩淡境界標高が-6.7m)して DO が上昇する挙動を示した。4 月前半の流入時には浅い層(St.1)に変化がみられるが、塩淡境界付近には変化が見られなかった。しかし 4 月 15 日以降の流入時には塩水の流出、塩淡境界の低下挙動が確認された。また、5 月 14 日には St.6 に及ぶまで塩水の湧昇が観察され、その後も断続的に DO 低下が観察された。なお、4 月 1 日前後の St.6 の DO 挙動については要因が不明である。

c) 流向・流速変化

次に超音波流速計の観測結果をまとめる。図 17 に観測値の例として、夏期洪水時の St.2 の 8 割水深にあたる標高-3 m の北方流速の経時変化を示す。St.2 の他の標高および東方成分、St.4 の観測結果においても、川尻水位に応じた顕著な流速変化は確認されない。全ての観測結果はほぼ±15 cm/s で変動していた。このとき鉛直方向の流速は±1 cm/s で変動し、明確な湧昇流は観測されなかった。そこで平面内の水塊移動を検討するため、標高毎に北方成分と東方成分の流速値を各々、毎正時毎に正負そのまま積算した分散図をまとめる。夏期洪水時は 8 月 1 日 0 時から 10 月 31 日 23 時までの積算、融雪洪水時は 3 月 15 日 0 時から 5 月 31 日 23 時までの積算とし、起算時を原点として作図した。なお、起算点により積算値は大きく異なるため、定性的な取扱いとする。図 18 に St.2 における積算値の分布を示す。なお、夏期洪水および融雪洪水時の St.2 の 8 割水深および 2 割水深に相当する標高-3 m、-1 m を抽出して図示する。St.2 では洪水の発生時期によらず東北東向きに水塊が移動していた。他の標高でのデータ 10 層分を含め鉛直方向均一に湖出口に向かって流出する挙動となっていた。また、塩水遡上時(図 9、図 14 参照)には西向きの流れが確認された。同様に St.4 における積算値の分布を図 19 に示す。なお、St.2 との比較のために同一標高と常に塩水中となる標高-7.5 m を抽出した。夏期洪水時には標高-1 m では初期は北西に移動するが、ピーク後の 8 月 22 日以降は南東方向に流向を変化させた。標高-3 m、標高-7.5 m では南東方向に移動し、ピーク後は南向きに流れを変えていた。融雪洪水時には全層で南向きに移動しており、St.4 に

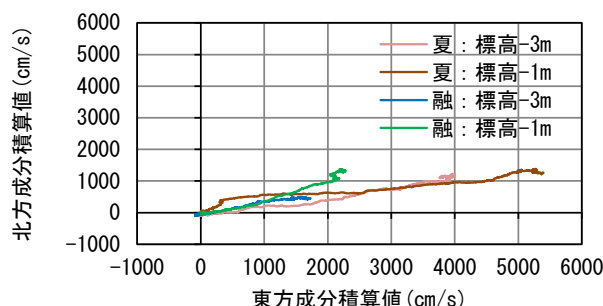


図 18 St. 2 における流速積算図

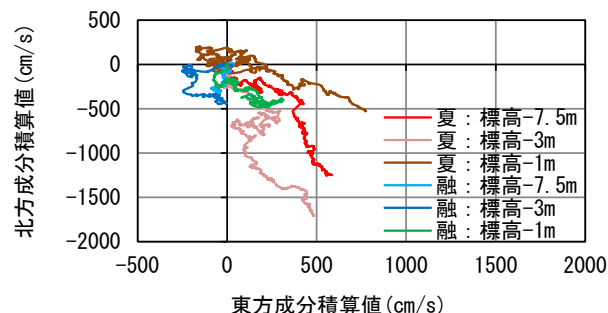


図 19 St. 4 における流速積算図

表 1 水収支とりまとめ

単位 : $\times 10^7 \text{m}^3$	夏期洪水	融雪洪水
本郷流入量	51.16	17.62
大曲逆流量	1.47	1.91
大曲流出量	52.04	21.56
塩水体積(洪水前)	8.07	8.38
塩水体積(洪水後)	7.04	7.91
塩水体積変化量	1.03	0.47

においては洪水時に流下方向である北向きと逆方向に水塊が移動していることが確認された。また、積算量をだまかに比較すると St.2 と St.4 とともに夏期洪水時が融雪洪水の 3 倍程度多い結果となった。

3.3 塩水量の検討

洪水に伴い流出する塩水量を検討する。本郷、大曲地点(図 1 参照)の毎正時流量が 1 時間継続すると仮定して各洪水期間で積算した総水量、塩淡境界標高および横断測量結果から算出した塩水体積や湖水量をとりまとめ表 1 に示す。なお、大曲流量は塩分濃度を均一として平成 28 年の HQ 式より算出した。夏期洪水時の本郷総流入量は約 51 千万 m^3 に達し、平水時の網走湖容量の 2 倍に相当する流入であった。しかし塩水は残存し、流出した塩水は約 1 千万 m^3 である。これら本郷流入量と流出塩水量から塩水は約 50 倍に希釈されていると推察され、流出塩水層の塩分を 20 とすると洪水によって 0.4 まで濃度が低下する。このとき流出

層には硫化水素が 100 mg/L 程度含まれ(標高-8m の硫化水素分析値および水塊酸素消費速度より¹¹⁾、50 倍希釈により 2 mg/L まで濃度が低下するが、同程度の酸素を消費することから図 6 に見られるように DO が 8 mg/L から 6 mg/L まで低下することになる。このため洪水時に塩分流出が観測されずに下流側の DO 低下が観測されることとなる。総量としての希釈効果はほぼ観測値と一致する結果であった。次に融雪洪水を見ると、本郷の総流入は約 18 千万 m³ であり、夏期洪水が 3 倍ほど多く、超音波流速計の結果に反映されていることが推察される。また塩水の希釈は 36 倍に相当し、この場合も塩分濃度はほぼ検出されず、DO が低下すると考えられる。

塩淡境界標高と流入量の関係を検討するため、図 3 の結果に加え、図 16 の結果から 4 月 15 日の塩淡境界標高を -6.5 m とし、池永ら¹²⁾ の 1998 年の観測結果を加え、図 20 に本郷積算流入量に対する塩淡境界標高の変化を示す。総流入量が増加するほど境界標高が低下しているが、初期値は様々である。このとき塩水容量は地形形状に影響を受けるため初期境界標高によって変化する。そこで洪水毎に境界標高の変化量として図 21 に示す。この結果から境界標高の変化量は初期値によらず流入量に依存する結果となった。一次式による最小二乗近似では決定係数が 0.91 となり、相関性が強いことが示された。また塩淡境界の初期値に依存しないことから、塩淡界面のごく薄い層で、淡水と塩水が混合されると同時に流出が継続されて塩淡境界が低下することが示唆される。さらに図 21 の結果から本郷積算流入量のみで塩水流出量が推定可能と示唆される。池永ら¹²⁾は流出塩分量を大曲地点(図 1 参照)の塩分濃度、流量、流出時間、流出水の密度で算出している。本研究の成果はより簡便に流出塩分を推定可能となった。

3.4 シジミ生息数と塩淡境界標高の関係

図 22 に川尻地点(図 1 参照)における採取標高毎のシジミ生息数と年間の平均塩淡境界標高の関係を示す。これらのデータは網走開発建設部の公表データをもとに編集した。塩淡境界標高が低い程、シジミ生息数が増加し、採取標高に塩水が長期間曝露される状況ではシジミが死滅する傾向であることが確認される。シジミは塩水耐性のある生物であるが、網走湖の無酸素塩水中には有毒成分である、高濃度の硫化水素が含まれている。そのため塩淡境界標高の上昇によって、生息水深に底層塩水が曝露されると、塩分濃度としては生

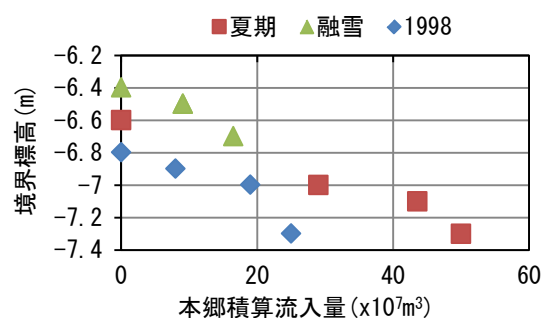


図 20 本郷流入量と塩淡境界標高の関係

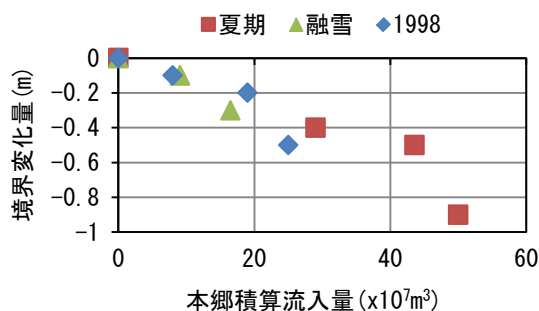


図 21 本郷流入量と境界変化量の関係

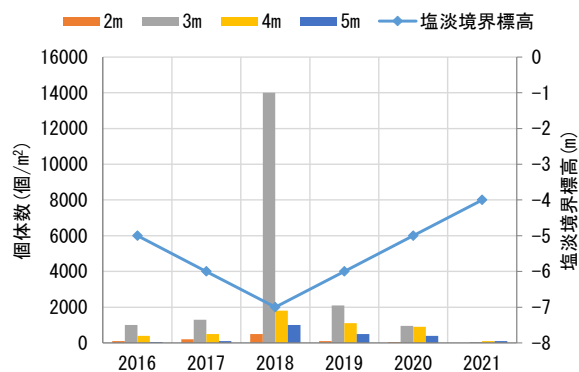


図 22 採取標高毎のシジミ生息数と塩淡境界標高の関係

息範囲内であるにもかかわらず、死滅が卓越する挙動を示している。このことから汽水湖においては、有毒成分の無害化が実現しなければ、水質改善が起こらないことが想定された。

4. 結氷する汽水湖の貧酸素化予測手法の空間再現性の向上

網走湖における水質挙動を予測するために、数値計算モデルを構築した。日本造船学会海洋環境研究委員会を母体として開発された MEC モデルを参考にして、3 次元の直交座標格子による流動モデルに水質項目を付加して、流動部分の密度項で淡水と塩水を表現出来るモデルとしている。水質項目は水温、塩分、濁度を基本として構築した。算出結果の一例として濁度と流速ベクトルの水面での平面分布算出例を図 23 に示す。

鉛直方向を含め約2万格子の算出が出来る数値モデルを構築した。

図24に川尻地点における水面水温の時系列再現比較を示す。計算期間は2014年1月1日から2015年12月31日としている。結氷を考慮した表面熱収支を適用し、結氷を含めて連続計算が可能となり、十分な精度を有していることを確認した。

図25に川尻地点地先の水深10m地点での鉛直塩分分布の再現性を示す。図は2014年8月10日を抽出している。観測値の塩淡境界における塩分躍層を完全に再現できていないが、計算上塩分値が11の標高は観測での塩淡境界標高と一致し、概ね現況水質を再現可能であることが確認された。

5. 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

5.1 事前実験

5.1.1 実験方法

図1中川尻地点と同位置の呼人(ヨビト)漁港近傍で酸素溶解装置を用いた酸素供給実験を実施した。図26に現地実験の実験位置、採水位置およびAB断面図を示す。呼人漁港沖合水深10m(岸壁から約200m西)のA地点で水深9mより、水中ポンプで試験水を90L採取し、安全確保のため漁港内で各種実験を船上で行う工程を繰り返して試験水を確保した。

写真1に実験装置の全景を示す。吐出量30L/minの小型酸素溶解装置を作成し、90Lの試験水を開放水槽内で循環させ、酸素ガス(99.5%)を1気圧条件で溶解させた。水槽内のDO、濁度、ORPの変化を水質計で1秒間隔、約3時間モニタリングした。加えて、一定時間毎にシリンジで試験水を分取し、大気に接触しないように室内に輸送して化学分析を行った。なお、原水として標高-8mの塩水、標高-4mの淡水を分取して、ブランクとした。

また、化学分析において、日本工業規格(JIS)に準じた水質分析では硫化物イオンを定量できるが、硫化水素に限定できないため、菅原ら¹³⁾の手法を用いて、酸固定法により硫化水素を定量した。なお、JIS準拠により分析した水質項目は全有機炭素(TOC)、全リン(TP)、オルトリン酸態リン(PO₄)、全窒素(TN)、アンモニウム態窒素(NH₄)、亜硝酸態窒素(NO₂)、硝酸態窒素(NO₃)であり、底質分析項目はTOC、TP、TN、硫化物である。

5.1.2 実験結果

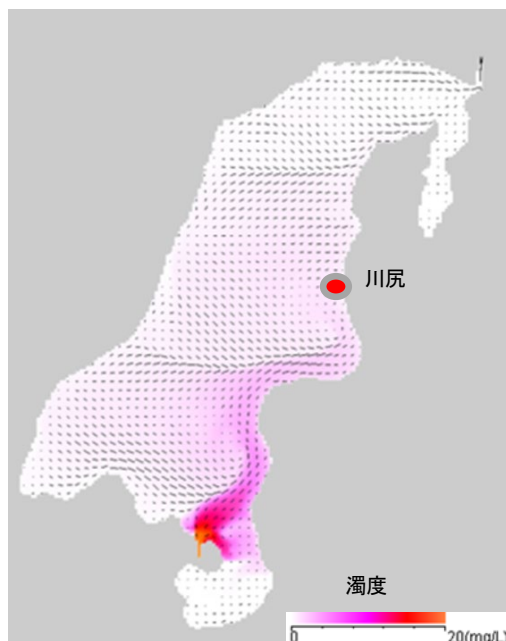


図23 数値モデルによる濁度と流速ベクトルの計算例

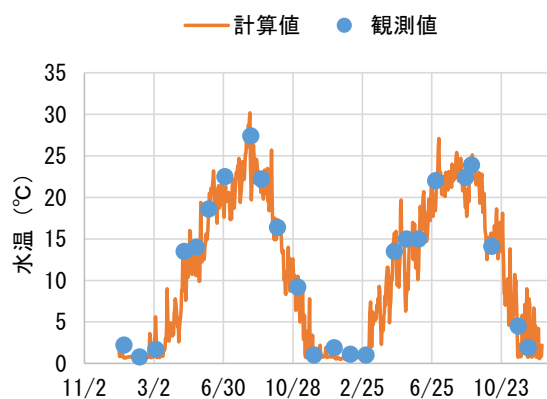


図24 川尻地点での水温時系列再現結果

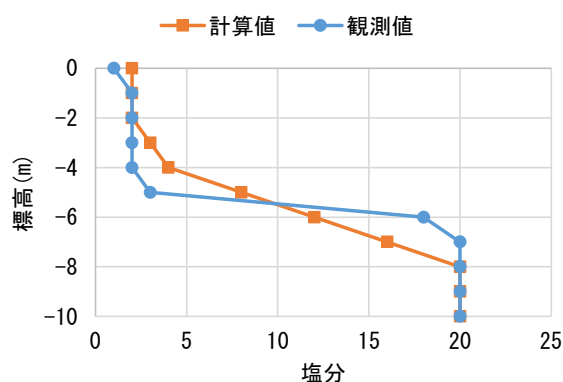


図25 鉛直塩分分布の再現性確認

酸素溶解水による試験水への酸素供給結果を図27に示す。酸素供給から10分ほどでDOは40mg/Lまで上昇し、50分ほどで一旦濃度が低下した後、以降は41mg/Lでほぼ一定値となった。実験時の試験水水温は17°Cであり、大気条件下のDO飽和濃度は9.3mg/Lで

あることから、酸素分圧がほぼ 100%で吸気した場合には最大で 46.5 mg/L ほどになる。

次に濁度をみると 50 分まで単調上昇し、その後一定値となった。目視による変化(写真 2 参照)として、初期の試験水は黒色半透明であったが、酸素供給直後から変色しはじめ、120 分後には完全に白濁して、微粒子状物質が確認された。対応するように ORP も 5~50 分までは -290 mV でほぼ一定値、50 分以降は上昇傾向を示し、140 分後には -10 mV となった。この間は DO が過剰に存在しても ORP は負値を示していた。これらの挙動は、複数回試行しても同様であった。また酸素濃度を变化させた場合でも変化点(図 27 中の場合は 50 分)に至るまでの時間に差が生じるものの挙動は同様であり、WEP による酸素供給時の初期変化の再現性が確認された。

表 2 に原水(淡水と塩水)、酸素供給 120 分後の試験水の水質分析結果をまとめる。表中 ND は未検出を意味する。まず、現状の網走湖の淡水と塩水の水質を比較すると、TOC は同一であるが、リンや窒素の濃度は大きく異なり、特に PO₄ と NH₄ は顕著であった。このことから有機物は塩淡によらず、均一に分布しているが、栄養塩は塩水層に高濃度に蓄積されていることがわかる。次に酸素を供給した場合、PO₄ と NH₄ が若干濃度低下を示したが、他の項目に変化は見られなかった。特に NO₂、NO₃ は酸素を供給しても検出されなかった。次に現地で採取した底泥を直径 8 cm のアクリル管に入れ底泥を乱さないように、図 27 の実験後の試験水を注水して 3 日間 5℃暗条件で静置した後の試験水の分析結果をみると TOC が低下、TP、PO₄ は顕著に低下、TN、NH₄ は上昇する結果となった。この場合も NO₂、NO₃ は検出されなかった。なお、3 日後の試験水の DO は 1 mg/L 以下となっており、白濁物質はほぼ消失していた。この結果から、試験水のみの場合には酸素を供給しても有機物やリン、窒素に大きな変化は見られず、他の物質が反応していることが確認された。一方で酸素を飽和させた試験水を底泥と接触させた場合には水中のリンが急激に低下する挙動が確認され、底泥表面の酸化によって PO₄ が吸着されたと推察される。

次に酸素供給時の硫化水素の経時変化を図 28 に示す。初期試験水中には 130 mg/L の硫化水素を含有しており、酸素供給開始から直線的に減少し、50 分でゼロとなった。図 27 から酸素供給後 0~50 分の間は供給した酸素は硫化水素の酸化に使われ、硫化水素消失

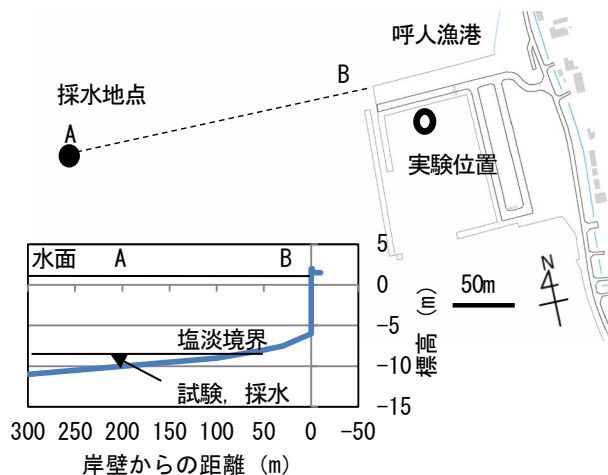


図 26 実験位置図

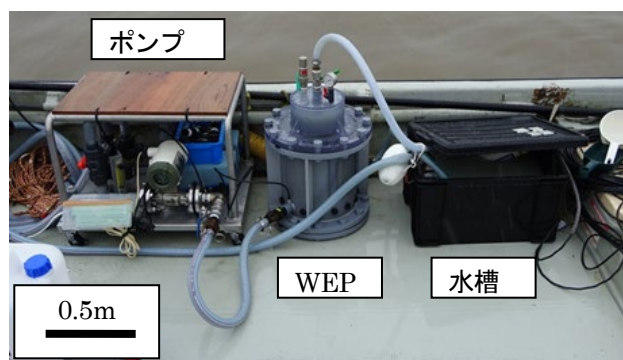


写真 1 実験装置全景

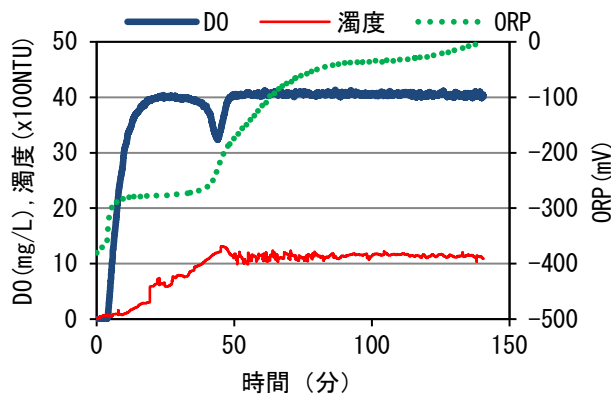


図 27 水槽中の循環酸素供給結果



写真 2 実験時の試験水の様子
(左: 実験開始時, 右: 酸素供給 120 分後)

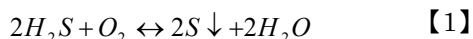
後に次段階の反応が起こっていることが推察される。

ここで、酸素供給によって白濁して濁度が上昇することから、酸素供給後の試験水を 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過し、濾別された固体について蛍光 X 線分析(XRF)および X 線回折分析(XRD)を行った。XRF は日本電子製 JSX-3400RII を使用し、含有元素の定性分析を実施した。XRF の結果から、白色固体は硫黄 84%、ケイ素 8%、リン 3%、鉄 1%、その他 4% で構成されることを確認した。XRD の結果から、白色固体はほぼ立方晶単純格子の硫黄で、立方晶面心格子の塩化ナトリウム、斜方晶系の硫黄が含まれることが確認された。よって酸素供給時に生成する白色固体は、ほぼ立方晶単純格子の硫黄であり、不純物として塩や土砂を含有することを確認した。

生成した固体硫黄の挙動を写真 3 に示す。酸素供給条件を変えた 3 本の試料を 10 日間静置した前後の比較である。写真中の左瓶は試験原水、中瓶は原水に 3 分酸素供給して初期 DO を 40 mg/L にした酸素一時供給のもの、右瓶は原水に 3 時間以上酸素供給して酸素飽和にしたもので、各試料は気泡が入らないよう充填して冷暗所で静置した。原水は 10 日後も変化は観察されなかった。一時供給は供給直後に固定硫黄が生成し、白濁していたが、10 日後には固体硫黄が消失して外観は原水とほぼ変わらず、やや黒色が退色していた。酸素飽和したものは充填直後に固体硫黄が分散して白濁していたが、10 日後には固体が沈降し、上澄みは無色透明となっていた。このことから、生成した固体硫黄は貧酸素状態で硫化水素として再溶解すること、酸素飽和を維持することで硫黄の沈降除去が可能であることが推察される。

5.1.3 酸素供給時の反応

以上の実験から、無酸素塩水層に酸素供給を行ったときの、数分から数日の極めて初期に起こる反応は硫化水素が酸化し、固体硫黄の析出が優先することが明らかとなった。このとき硫化水素は 1 時間弱で完全に酸化され、有機物や栄養塩に明瞭な変化が見られないことがわかった。特に硝化の影響は確認されず、NH₄の酸化は化学的過程ではないことが示唆される。また、析出した硫黄は貧酸素化にともない溶解する挙動が見られ、無酸素塩水中に酸素供給したときの反応は中間体を無視し、最終的には【1】式のように推察される。



【1】式から硫化水素の無害化には反応を右辺に偏

表 2 水質分析結果

(mg/L)	原水 (淡水)	原水 (塩水)	酸素供給 後(塩水)	底泥接触 3日(塩水)
TOC	9.7	10	10	8.8
TP	0.12	4.3	4.3	1.3
P04	0.086	4	3.8	1.1
TN	1.3	22	22	25
NH ₄	0.1	21	20	23
NO ₂	0.06	ND	ND	ND
NO ₃	0.91	ND	ND	ND

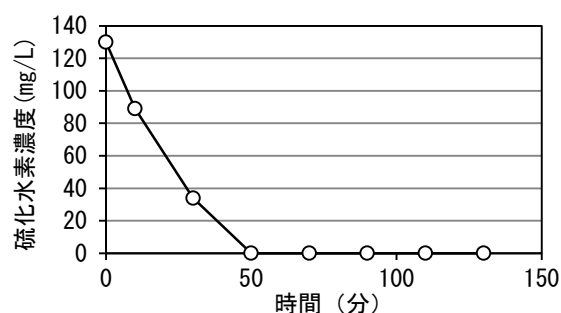


図 28 酸素供給時の硫化水素濃度変化



写真 3 固体硫黄の経時挙動

(左：実験開始時，右：静置 10 日後)

* 左瓶：原水，中瓶：酸素一時供給，右瓶：酸素飽和

らせることが有利であり、酸素の供給および沈殿硫黄の除去が有効と考えられる。

5.2 試験プラントの施工

現地底層水の酸素供給を行うことで有毒物質の無毒化が起こり、現状含有物質の有害化は確認されなかった。このことから呼人漁港に酸素溶解装置 (WEP) の試験プラントを施工して、現地スケールでの実証試験を実施した。酸素精製機など陸上設備、および岸壁から 160 m 湖心側(図 29 中 B2 地点)の標高-7 m の位置に WEP など水中設備を建設・設置し、概略を図 30 に示す。水中設備は大きさ 20 m³、陸上重量 1.2 t で吐出量 120 m³/h のポンプを搭載し、浮力が 100 kg になるように浮子を取り付けた。図 31 に岸壁からの断面図および 2017 年 8 月 28 日の B2 での鉛直投下式の水質計 (Hydrolab 社、DS5x)での鉛直水質観測結果を示す。B2 において標高-6.2 m に明瞭な塩淡水境界が存在し、塩水

層は無酸素状態であった。水中設備は 500 kg のアンカーで固定、吐出口が標高-7.3 m、吸入口が標高-6.8 m になるように係留した。設置時の塩淡境界は標高-6.2m であったが、残気吐出口は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 日以降、運転時間や吐出標高などを様々な条件で運転を開始し、実証試験を行った。

5.3 効果の検証

5.3.1 現地観測

効果を検証するため、鉛直観測、自記計観測、採水水質分析を継続的に実施した。

鉛直観測は投下式水質計（環境システム DS5x）を用いて、水中設備設置位置および吐出口位置を中心に鉛直観測を実施した。また一定期間ごとに水中設備設置位置を中心に平面的に複数点の水質鉛直分布観測を行い、空間的な水質観測を実施した。

自記計観測は図 29 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。B1、B2、B3 の各地点の標高-7.5 m 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）を係留した。B1 と B2 間、B2 と B3 間は 25 m の距離をとって南北方向に配置した。全ての測器は 1 時間間隔でデータを取得した。

水質分析は鉛直観測と同一日に B2 地点および A 地点の標高-3 m（淡水）と標高-7.5 m（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）、溶存態有機炭素（DOC）、全リン（T-P）、オルトリン酸態リン（PO₄）、全窒素（T-N）、アンモニウム態窒素（NH₄）、亜硝酸態窒素（NO₂）、硝酸態窒素（NO₃）である。加えて、硫化水素については、管原ら¹³⁾の手法を用いて、採水直後の試験水を酸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。

5.3.2 観測結果

図 32 に酸素供給後の B2 地点での鉛直分布の時間変化を示す。塩分は塩淡境界位置が 10 cm ほど変動するが、鉛直分布に大きな差は見られない。DO は標高-6.2 m 以上の淡水部は、ほぼ鉛直均一に分布し、8~12 mg/L

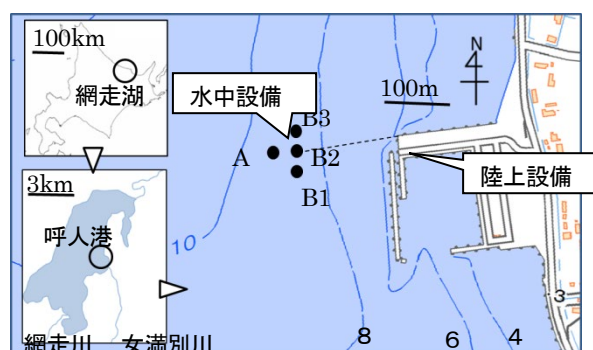


図 29 設置位置図

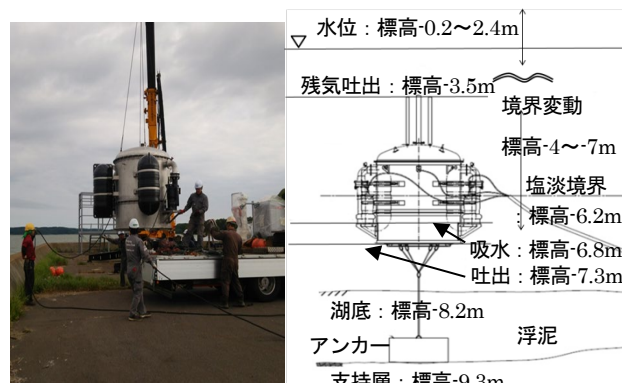


図 30 左：水中設備外観と右：水中設置概略立面図

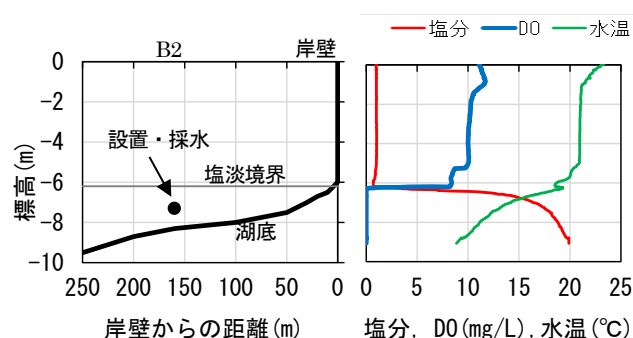


図 31 断面位置図と鉛直水質分布 (B2 地点 : 8/28)

となっていた。塩水部は標高-7.3 m にピークを有する分布となり、底層方向にも濃度の拡散が確認された。濁度は標高-7.3 m に特異的にピークを有する分布となっていた。この結果から試験プラントにより現地スケールにおいても、設定標高に選択的に酸素供給を行い、硫化水素の酸化によって固体硫黄が生成して濁度上昇¹¹⁾となっていることが確認された。なお標高-7.3m における別途採水分析した硫化水素、全鉄、全マンガン濃度は 110 mg/L、1 mg/L、0.8 mg/L であり、生成する固体の成分組成¹¹⁾からも鉄やマンガンの影響は小さいことを確認している。塩分の分布からも塩淡境界を破壊することなく酸素供給できていることが確認される。

次に A 地点の超音波流速計の観測結果より標高-7.5

m を抽出して北方成分と東方成分の流速変化図を図 33 に示す。強風に対応して流速が増加するような挙動がみられるが、おおよそ±5 cm/s の間で変動していた。2 ヶ月間の平均流速は北方成分 0.47 cm/s、東方成分 0.32 cm/s であり、北北西方向に 0.57 cm/s であった。1 時間同一流速とするならば、時間あたり 20 m ほどの移動に相当する。なお、鉛直方向の流速は±1 cm/s 以下で変動し、平均は 0.03 cm/s であった。次に水塊の移動を確認するため、図 33 の結果を成分毎の流速を加算して軌跡として図 34 に示す。積算期間は 2017 年 8 月 29 日 15:00~11 月 2 日 12:00 である。起算時刻や積算期間によって距離や方向が変化するため厳密な定量的取扱いはしないが、この軌跡は約 2 ヶ月間の定性的な水塊移動を示している。運転開始直後は原点付近に水塊が固まり最大限に酸素供給効果が現れると推察される。9 月 4 日に、おおよそ 7 m/s の風の発生にともない北北西方向に水塊が移動しはじめ、強風発生時に対応して流向に変化がみられ、おおよそ強風時に南向きに流向が変化する挙動を繰り返すことが確認される。この結果から B2 地点で酸素供給した水塊は南北方向にゆらぎながら、北北西に移動すると推察される。なお、淡水層（標高-6 m 以上）では南向きに卓越する流れが観測され、その流速は塩水層の 10 倍ほどであった。よって塩水層の流れは、降雨や風波による淡水層流速による摩擦や水面変動に伴う動水勾配の発生に起因すると考えられる。

次に B1、B2、B3 における DO と濁度の観測値次に濁度の観測結果から各観測データの統計値をまとめて表 3 に示す。B2 で酸素供給と硫黄生成し、流動にそって下流側の B3 に流され、その間に DO を消費するために DO は検出できないが、濁度が増加傾向を示し、硫化水素の反応が進行しながら硫黄が輸送されることが推察され、卓越流の上流にあたる南側の B1 では酸素供給影響が小さくなる結果であった。

次に WEP 運転 58 日後に 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 と濁度を抽出したコンター図を図 35、図 36 に示す。図 35 の DO は中心付近に 20 mg/L の高濃度がみられるが、5 m ほどの距離で 3 mg/L 以下となっていた。北北西方向および南方向に有酸素がみられるが、DO 濃度は低く、40 m 四方の範囲であった。図 36 に濁度の分布を示す。濁度は中心から北側に広く分布し、その範囲は 120 m 四方に及んでいる。また、東側 100 m ほどの地点にも高濁度帯がみられ、酸素供給の影響とも考えられるが、

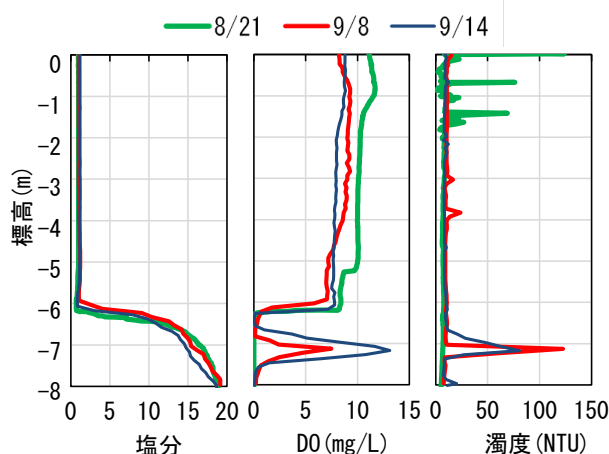


図 32 B2 地点の鉛直分布の変化
(左:塩分, 中:DO, 右:濁度)

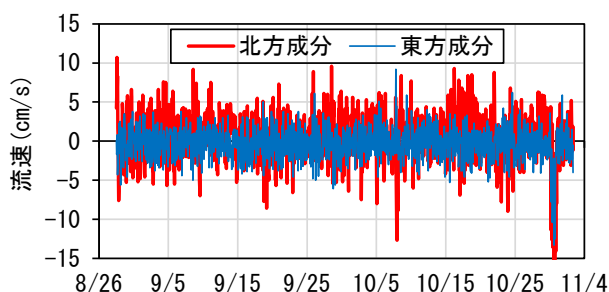


図 33 流速観測結果 (A 地点標高-7.5m 抽出)

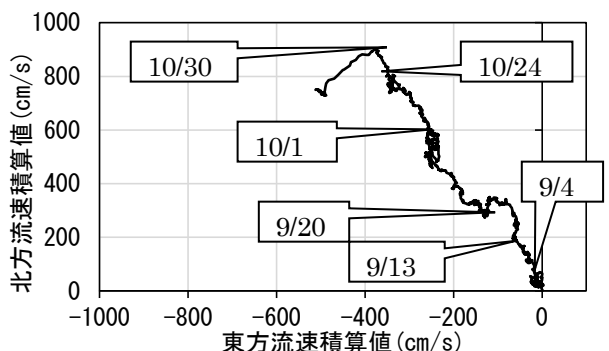


図 34 水塊の相対軌跡
(A 地点標高-7.5m, 起算 8/29, 期間 64 日)

表 3 DO と濁度観測値の統計値

観測	項目	B1	B2	B3
DO	平均	0.18	11.69	1.11
	標準偏差	1.23	7.61	3.01
濁度	平均	9.03	21.35	25.91
	標準偏差	16.68	28.61	41.59

地形上ほぼ湖底に位置する地点であり、底泥の巻き上げ等の観測影響も考えられる。酸素供給による硫化水素の酸化は水塊の移動に添って北北西方向に拡大していることが確認された。

水質分析結果について B2、A(B2 からの距離 40 m)、

湖心(B2 から距離 1.7 km)の 3 地点で塩水(標高-7.5 m)中の比較を行う。図 37 に上段に T-P、下段に T-N の時系列変化を示す。湖心の T-P は、ほぼ 3~4 mg/L の間で大きな変動なく推移している。B2 は 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していた。A 地点では湖心と B2 の中間となり、時間とともに湖心濃度に漸近する挙動であった。このことは酸素供給によって PO₄ が減少し、塩水層内で土粒子や硫化物などに吸着されて濃度の減少となると推察される。湖心の T-N 濃度は 14~18 mg/L でほぼ横ばいで推移した。B2 地点や A 地点では酸素供給後に濃度が低下し、吐出口から離れるほど湖心濃度に漸近する挙動を示し、T-P と同様の挙動となった。なお、塩水層での無機態窒素は NH₄ のみが検出された。

次に B2 地点における、硫化水素の鉛直分布の変化を図 38 に示す。WEP 運転前の 6 月 30 日では塩水層(標高-6.5m)以深で濃度が急増し、深いほど濃度が高く、B2 地点の湖底付近では 112 mg/L となっている。WEP の吐出口である標高-7.5 m 付近では 57 mg/L となっていた。WEP 運転を開始して 1 日後の 8 月 30 日には塩淡水境界は標高-6.2 m であり、標高-6.2 m~-7.5 m は塩水層であるが、硫化水素がゼロとなっていた。さらに湖底付近も 56 mg/L まで濃度が低下していた。その後は湖水の流動によって沖合の硫化水素が供給されることで、濃度が上昇する挙動となった。標高-7.5 m では継続的に 24 mg/L となっており、湖水が循環するなかで約 60%の硫化水素削減が持続される結果となった。残留濃度としては高い値を維持しているが、B2 地点の標高-7.3m からの酸素供給によって B2 地点では湖底におよぶまでの塩水層内(標高-6.2m~-8.2m)全体で、約 50%の硫化水素の濃度低下が確認された。

5.4 結氷下の運用

ここまでは 2017 年 8 月 29 日から 11 月 20 日までの 24 時間の連続運転の状況であった。次に結氷期の 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タが取得できなかった。

5.4.1 水位・気象

図 39 に気象庁網走観測所の風速と降水量、図 40 に

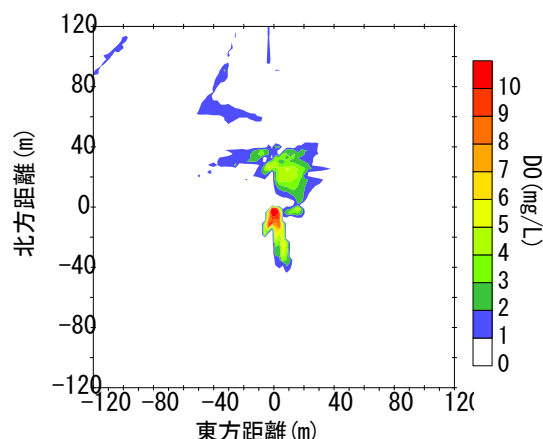


図 35 標高-7.5m の DO 平面分布(運転 58 日後)

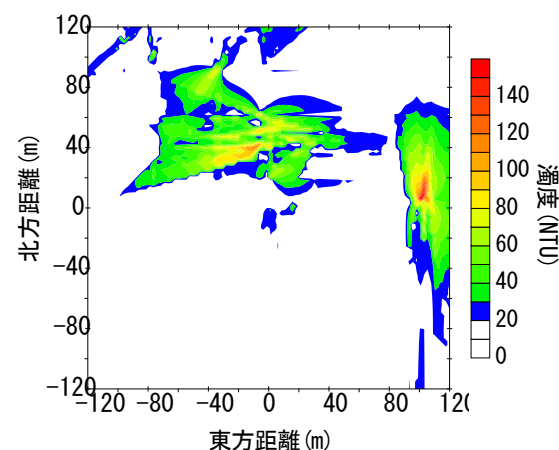


図 36 標高-7.5m の濁度平面分布(運転 58 日後)

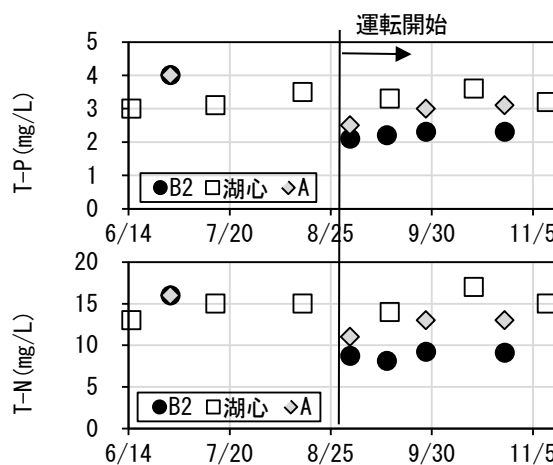


図 37 標高-7.5m の T-P (上) と T-N (下) の変化

気温と積雪深、図 41 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。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41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℃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℃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。

5.4.2 水塊移動の変化

まずA地点(図29参照)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、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後、横軸に東方積算流速、縦軸に北方積算流速をとり、標高-7.5mにおける水塊の移動軌跡を図42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43に塩分変化を図44に示す。図43の標高-3mの結果から12月10日に水温変曲点がみられ、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44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-5.5mでは結氷

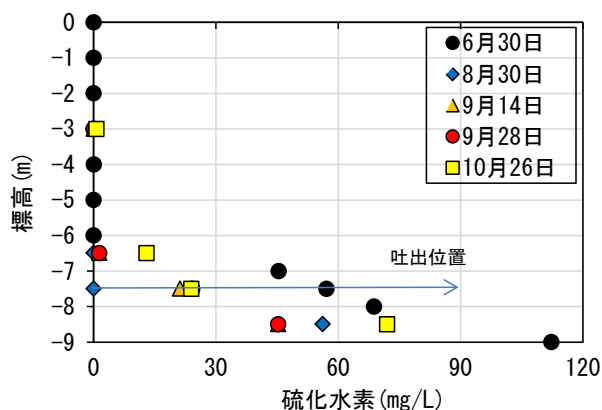


図38 硫化水素の変化 (B2地点)

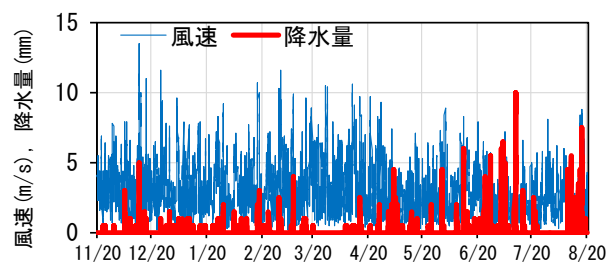


図39 網走観測所の風速と降水量変化

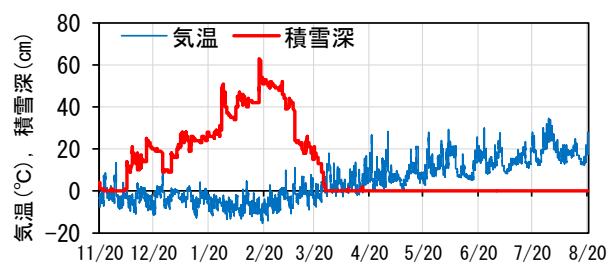


図40 網走観測所の気温と積雪深変化

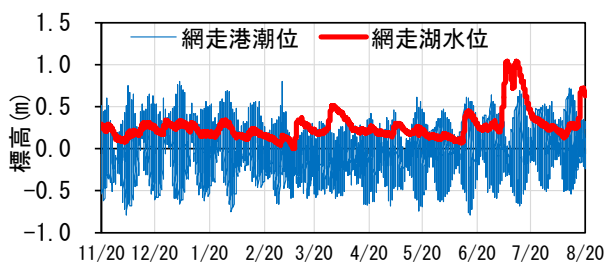


図41 網走港潮位と網走湖水位

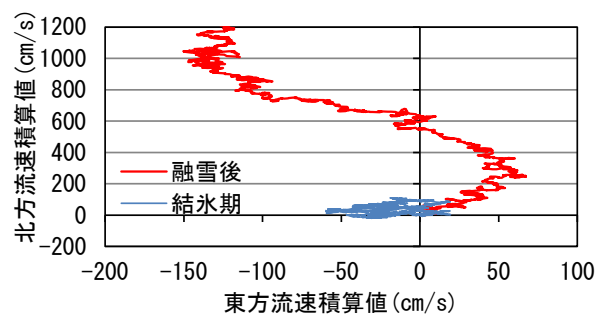


図42 水塊の相対軌跡

(A地点標高-7.5 m, 積算期間80日)

とともに塩分の上昇が観測される。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なかった。しかしながら、結氷期は水面の氷板によって、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45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¹⁴⁾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に、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より各データの統計値を表4にまとめる。参考として2017年秋期の結果¹⁴⁾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。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る。

5.4.3 水質空間分布の変化

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-7.5m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46は2月28日、図47は5月25日の観測結果である。図46のDOは中心付近に10mg/Lの高濃度がみられ、半径50~100m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

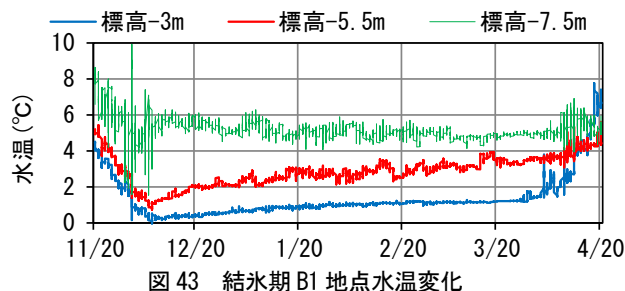


図43 結氷期B1地点水温変化

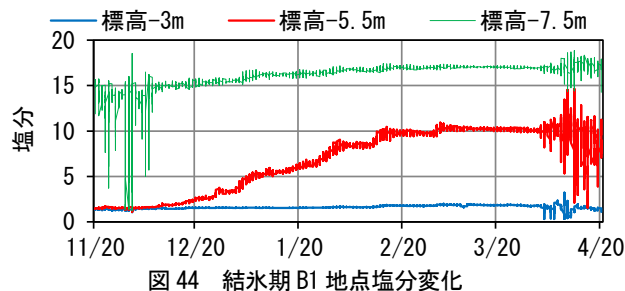


図44 結氷期B1地点塩分変化

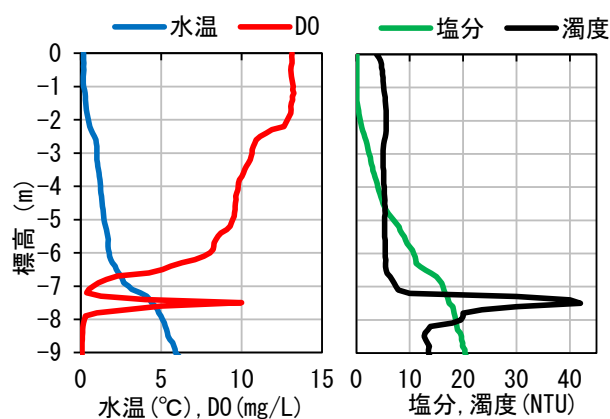


図45 B2地点の水質鉛直分布 (2018/2/28)

表4 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

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¹⁴⁾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42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47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供給でおよそ90000 m²に影響が波及することが確認された。

5.5 吐出標高の影響

5.5.1 吐出標高の影響（流況）

吐出標高の影響評価を行うため、WEPの設置位置を沖側に移設し、運転試験を行った。2017年は標高-7mの位置に2017年8月28日に建設・設置し、2018年は湖底標高-10mの位置にWEPなど水中装置を2018年8月26日に移設・再設置した。図48に岸壁からの断面図および2017年設置日の鉛直投下式の水質計(環境システム、DS5)での水質鉛直観測結果を示す。B地点(図29中B2地点相当の水中本体位置、B3相当の北側観測点をN地点と呼称)において標高-6.2mに明瞭な塩淡水境界が存在し、塩水層は無酸素状態であった。2017年は境界面付近に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。設置時の塩淡水境界は標高-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

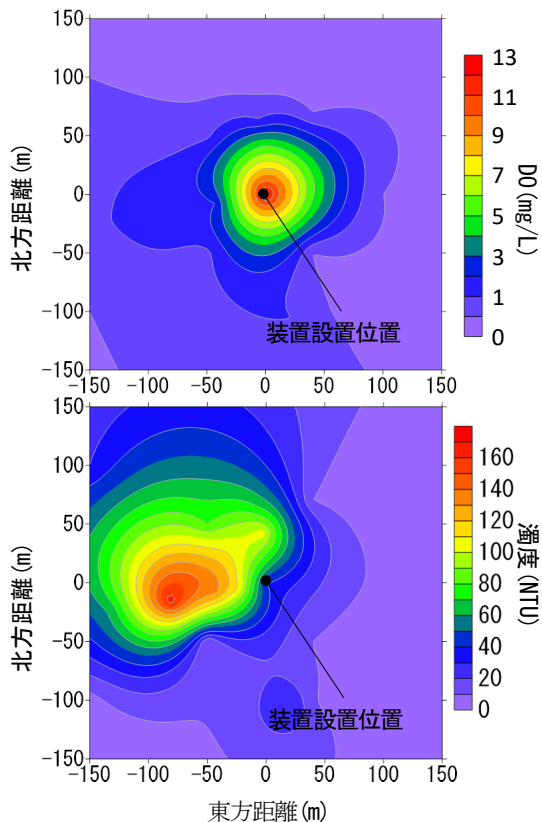


図46 結氷期標高-7.5 mの水質平面分布
(2018/2/28 上: DO, 下: 濁度)

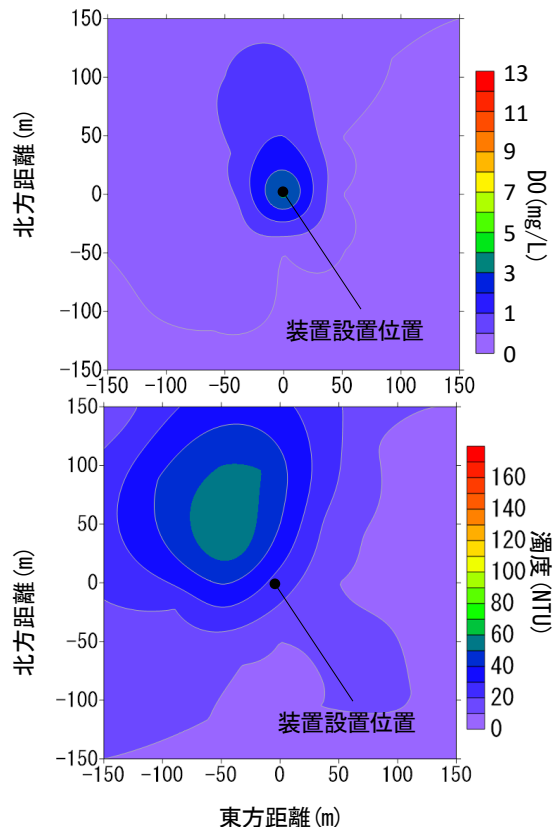


図47 融雪後標高-7.5 mの水質平面分布
(2018/5/25 上: DO, 下: 濁度)

し、送気管と電線を水中設備に接続させた。2017年8月29日より24時間の連続運転を開始した。次に2018年8月26日からは吐出口を標高-9.0mに再設置して2時間毎の運転と休止を繰り返す間欠運転とした。この時、吐出口は陸上装置のコンプレッサーで圧送できる限界水深である10m以浅とし、なおかつ底面付近の吐出とした。なお、2018年10月28日～2019年1月29日までは故障が発生してWEPの運転を停止している。故障修理後2019年8月25日まで2時間毎の間欠運転を継続し、2019年8月25日にWEPを水中より引き上げて、筐体の点検を行った。

塩分観測¹⁴⁾(図44 標高-7.5m 参考)の結果から水中装置の運転期間中は塩分値の変動がなく、塩水や淡水の鉛直混合を引き起こさず、選択した標高で吸水と吐出ができていたことが確認された。DOを供給しても、水塊中の硫化水素濃度が高いために、DOはすぐに消費され、酸化反応の痕跡である固体硫黄の生成によって濁度の上昇として計測される。B地点およびN地点の2018年8月26日から10月25日までの60日間のDOと濁度の統計値を表5にまとめる。なお、参考として2017年時の吐出標高が異なる場合の同時期の統計値¹⁴⁾も加える。

2017年と2018年は観測標高や運転時間が異なるが、標高が低いほど検出DO(換言すれば残存DO)が低く、濁度が高くなる結果となった。次にB地点とN地点の挙動をみると、観測標高によらず、B地点ではN地点よりもDOが高く、濁度が低い挙動が一致していた。WEPの最大の特徴は標高選択性である。網走湖の栄養塩や硫化水素など含有物質の水質分布の特徴は水平方向均一で、鉛直方向に低層ほど高濃度に分布する^{10), 11)}こと、間欠運転では連続運転に比べて供給DOは半分であるが、B地点のDO平均値は連続運転の半分以下となり、これらの差は含有する硫化水素の濃度に起因していると推察される。

次に各標高の水塊の軌跡を図49に示す。A地点で計測した標高-9.0mの超音波流速計の結果より2018年8月26日から10月25日までの60日間の流速を北方および東方成分毎に積算して軌跡としたものである。なお、参考として2017年8月29日から10月28日までの60日間の軌跡(図34 同一)を加える。この結果からA地点での秋期の塩水層は標高が低いほど流速が遅く、東西に揺らぎながらほぼ北向きに移動していることが確認された。標高-7.5mでは塩淡水境界が近く淡水層の影響が強いため、南向きの流れや東西方向に

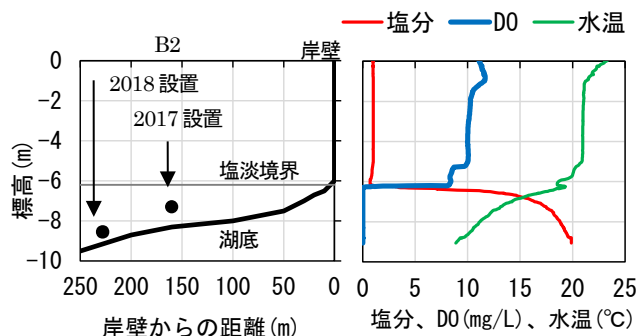


図48 断面位置図と

設置時水質鉛直分布(設置地点:2017/8/28)

表5 自記水質計観測値の統計

時期	項目	統計値	B	N
2017秋期 EL-7.5m 連続運転	DO	平均値	11.69	1.11
		標準偏差	7.61	3.01
	濁度	平均値	21.35	41.59
		標準偏差	28.61	41.59
2018秋期 EL-9.0m 間欠運転	DO	平均値	2.25	0.39
		標準偏差	4.60	0.96
	濁度	平均値	48.60	97.06
		標準偏差	86.32	75.44

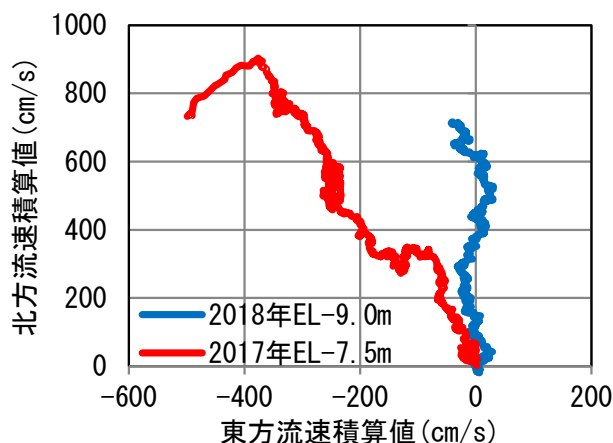


図49 各標高の60日間の積算流速の変化

も大きく変動し、水塊の混合が促進されていることが示唆される。一方で標高-9.0mにおいては淡水境界の影響が小さくなり、混合影響も小さくなるために安定した水塊の移動となっていた。なお、各年の60日間の平均流速は2017年が東方-0.22cm/s、北方0.53cm/sであり、2018年が東方-0.02cm/s、北方0.43cm/sであった。これより、低標高(水深が深い)ほど流速が遅く、北向きに偏向することがわかった。

図50に水中装置の再設置後の運転7日後のB地点におけるDO、濁度と塩分の鉛直分布と2017年の結果、および湖心における硫化水素の鉛直分布を示す。なお、湖心の最低標高は-16mであるが機器観測結果と比較するため標高-10mまでを抽出した。ここで、計測

時の塩淡水境界標高は2017年で標高-6.0 m、2018年で標高-6.8 mであった。両年ともに吐出口を施工した標高にDOと濁度の上昇が計測された。濁度の分布をみると吐出水塊の標高選択性が非常に高く、ピーク幅は40 cmほどであった。一方で貧酸素層のDOピークは幅が1 mほどになっていた。DOセンサーは蛍光式光学センサーであり、濁度センサーと時定数は同程度であることから、ピーク幅の違いは計測時の落下速度に起因するとは考えづらく、水塊中の含有物質に由来していると推察されるが、詳細は不明である。なお、N地点におけるDOと濁度の鉛直分布のピーク標高はB地点と同じで2017年は標高-7.5 m、2018年は標高-9.0 mに観測され、DOピーク値が小さく、濁度ピーク値が大きくなっていた。このとき塩分の鉛直分布にDOや濁度のピーク標高に対応する標高に急激な変化は見られず、標高が低いほど塩分が増加して、装置の運転による強制的な鉛直混合が起きていないことが確認された。

鉛直観測を平面的に実施し、2017年は標高-7.5 m、2018年は標高-9.0 mを抽出して、コンター図として図51に示す。2017年は水中装置を中心に300 m四方の範囲で計測し、2018年は明瞭な濁度を検出できなくなるまで範囲を拡大して計測している。2017年は装置の北西の範囲に濁度の上昇が確認された。2018年は装置から北側に600 mの距離まで濁度上昇が確認された。観測範囲内の濁度上昇は幅300 mで南北方向700 mの210,000 m²に広がり、酸素供給影響が確認された。図49の水塊移動の痕跡を参考すると、DO供給して生成した固体硫黄は水塊の移動に追従して広がっていることが明らかとなった。なお、2017年時は塩淡水境界近傍でDO供給を行い、2018年時は2017年に比べて深い位置としている。このことから両年の差は塩淡水境界の影響が強いと推察される。図49の結果から、2017年の軌跡が2018年に比較して同一期間での南北、東西方向の変化が大きく(流向の変化および流速が大きい)、塩淡水界面近傍では水平面の水塊の混合や往復移動が大きいと推察され、生成固体硫黄の沈降が促進されて濁度の広がり方が小さいと考えられる。また図51から濁度の上昇が水中装置より北側に600 mまで観測されており、2018年の濁質の移動速度は60日で600 m移動したとすると、0.012 cm/sとなる。一方で観測期間中の水塊の北向の平均流速は図49より0.43 cm/sであった。つまり水塊の移動よりも濁度の移動が遅くなっていた。これらは濁度を構成する固体硫黄が沈降してい

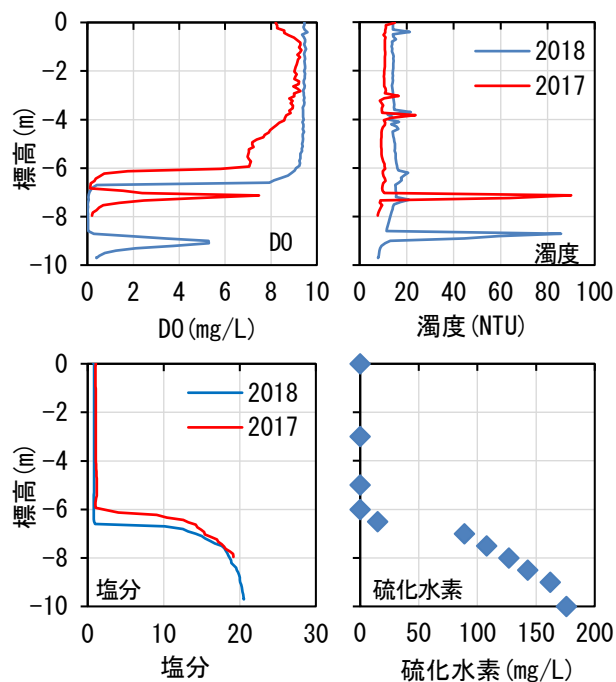


図50 B地点での再稼働7日後の鉛直分布比較(2017/9/7, 2018/9/4)および湖心での硫化水素鉛直分布(2018/8/20)

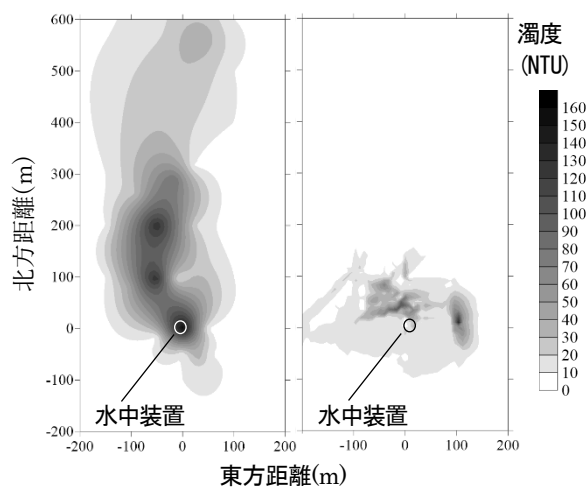


図51 運転2カ月後の濁度分布
(左: 2018年標高-9.0 m, 2018/10/25
; 右: 2017年標高-7.5 m, 2017/10/20)

るために、見かけ上の濁度の広がる速度が水塊の移動速度と一致しないためと考えられる。

5.5.2 吐出標高の影響(水質影響)

2017年の観測結果からT-NやT-Pは20%ほど濃度が低下する挙動が確認された(図37参照)が、2018年の標高-9.0 mにおいてはT-Nは20 mg/L、T-Pは4.1 mg/Lで季節によらずほぼ一定しており、装置運転による濃度の変化はほぼ見られず、最も大きく変化しても10%以下の濃度低下となっていた。TOCについても標高-9.0 mにおいては7.0 mg/Lほどで一定して推移

し、装置運転による明瞭な差異は確認できなかった。

一方で硫化水素については装置運転により明確な差異が確認された。B 地点の吐出口標高を抽出し、時系列の変化として図 52 に示す。B 地点から 3 km はなれた湖心における同一標高の値も加えている。まず 2017 年 6 月～2018 年 8 月までは湖心の標高-7.5 m では時間の経過とともに 60 mg/L から 90 mg/L に濃度が上昇していた。B 地点では 24 時間連続運転を継続し、湖心に比べて約 45 mg/L 濃度が低下しながら、時間軸方向では増加傾向を示していた。この時、湖心の硫化水素の増加率を便宜的に直線回帰によって見積もると日当たり 0.071 mg/L となった。同様に B 地点の増加率を見積もると 0.077 mg/L となりほぼ一致していた。ここで、酸素供給により反応する硫化水素量を推定する。硫化水素の酸化反応【1】式参照から硫化水素と酸素分子の物質量は 2 mol : 1 mol である。これより反応する原子質量比を算出すると硫黄原子 : 酸素原子 = 1.06 : 1 となる。ここで水質分析による結果から硫化水素は硫黄原子換算、DO は酸素原子換算の質量濃度である。これより同一体積内の反応を考慮するとほぼ同質量が反応して硫化水素が酸化され、DO が消費されることになる。B 地点で供給される水塊は吐出 DO が 40～50 mg/L(平均 43.6 mg/L)で、時間あたりの吐出量が 120 m³/h である。B 地点で連続して DO を供給し、沖合から連続して硫化水素が B 地点に流入する場合には、B 地点での硫化水素低下量は供給した DO とほぼ等しくなると考えられる。硫化水素の低下量は 46.2 mg/L となり、平均吐出 DO の観測結果(43.6 mg/L の 1.06 倍)とほぼ一致した。この結果から、硫化水素濃度が供給 DO より高い場合、供給した DO はすべて硫化水素の酸化のために消費されることがわかる。このとき原水の硫化水素濃度が経時的に増加する場合、供給 DO はほぼ一定であるため、供給 DO よりも硫化水素濃度が高いと、酸化後の残存する硫化水素濃度が経時的に増加する挙動となると考えられる。

次に 2018 年 8 月から 2019 年 6 月までの標高-9.0 m の変化をみる。この期間中の 2018 年 11 月から 2019 年 1 月までは故障のため装置が停止している。標高-7.5 m と同様に酸素供給による硫化水素低下を把握する。湖心での硫化水素増加率は日あたり 0.080 mg/L であった。停止期間を除いた B 地点での増加率は 0.079 mg/L であり、同程度で増加していた。B 地点では湖心に比べて 24 mg/L 低下しており、経時的には増加挙動を示した。2018 年は 2 時間おきの間欠運転であり、供給 DO

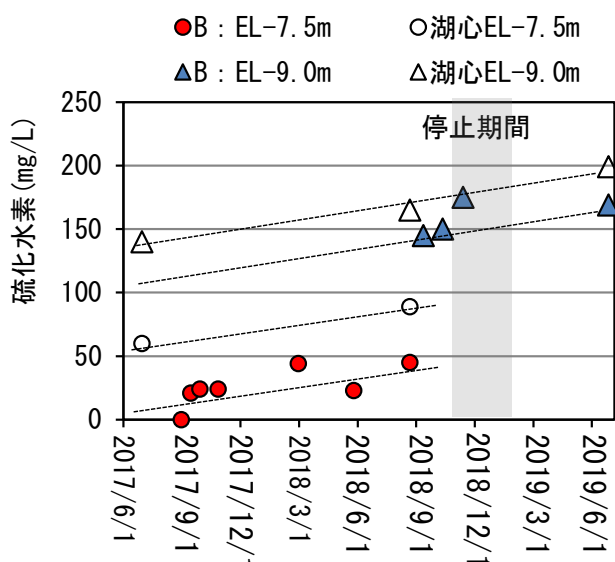


図 52 硫化水素濃度の変化

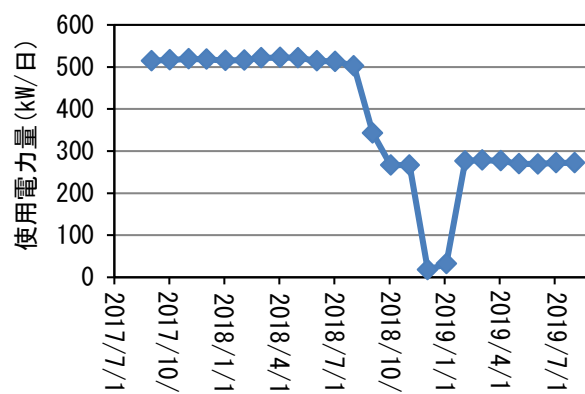


図 53 使用電力量の推移(日換算)

のおよそ半分相当の硫化水素低下を示していた。また運転を停止すると、湖心とほぼ同程度まで、硫化水素が増加していた。

5.6 維持管理

これまで複数年にわたり、現地に試験プラントを建造して運用を実施した。その結果、運転費用や保守費用、筐体の耐久性や点検頻度などの知見が得られた。これらの知見を以下にまとめる。

5.6.1 使用電力

本システムは陸上で空気より酸素を濃縮して、酸素濃度 92 %ほどの気体を水深 10 m まで圧送して、水中装置に供給している。加えて、結露や凍結、過熱対策として、陸上装置には空調機器を併設している。このため、酸素濃縮器やコンプレッサー等を電力稼働させており、運転のために電力を必要とする。本試験においては、電力のすべては電気供給会社との契約により

使用している。毎月の検針結果より日当たりの使用電力量を算出し、**図 53** に示す。2017 年 9 月～2018 年 8 月までは 24 時間連続運転を継続しており、期間平均で 1 日あたり 516 kW を使用していた。2018 年 9 月以降は 2 時間おきの間欠運転では期間平均で 1 日あたり 272 kW を使用していた。2018 年 12 月～2019 年 1 月は機器故障による運転停止となり電力使用は極端に減少している。このときの 1 日当たりの電気料金は 24 時間運転時で 11,000 円、間欠運転時は 6,600 円であった。本試験では水深 10 m に酸素圧送するためコンプレッサーは 11.4 kW/h の電気容量のものを使用している。コンプレッサーを 20 kW/h にすると水深 18 m まで対応可能となるが、使用電力量は 2 倍となる。コンプレッサーを 40 kW/h とすると水深 37 m まで対応できるが、使用電力量は 4 倍となり、目標水深によって運転費用はより高額になる。

そこで圧送目標水深毎に必要な電力量を**図 54** に示す。現地試験と同じポンプ容量や凍結対策を行い、圧送機を目標水深毎に適応させて 24 時間の連続稼働を 1 年間継続した場合の 1 日当たりの使用電力量をまとめた。現状システムは酸素を圧送する方式のため、目標水深が深いほど電力を消費することとなる。このときの使用量を金額換算したものが**図 55** である。金額は北海道電力の単価基準に準拠する。このとき受電契約容量によって適用単価は変動するが、30A 電灯、低圧電力 B の併用で算出した。図は 1 年間合計の料金としてまとめる。これより水深 10m で年 350 万円の運転費用が発生する。仮にダム等で運用する場合、ダムサイトでは水深 30-40m となり、その場合は運転費用のみで年 800 万円程が必要となることがわかった。

5.6.2 保守費用

酸素供給を継続すると、水中硫化水素が酸化され、固体硫黄として析出する。このため、水中ポンプの吸水口に硫黄が固着する挙動が確認された。**写真 4** に 2018 年 8 月 26 日から 2019 年 8 月 25 日までの 1 年間（実質 10 カ月の間欠運転）の運転による、吸水口の状況を示す。ポンプはロータリー式のため、枝などが混入しないように保護具を装着している（右写真参照）。左の写真から明らかなように、保護具に硫黄が固着し、通水障害となっていた。原水の硫化水素濃度は標高が低いほど高濃度になっている、固着する硫黄量は原水の硫化水素濃度に依存すると考えられ、2017-2018 年の吸水口標高 -6.8 m のときよりも 2018-2019 年の吸水口標高 -8.5 m の時のほうが硫黄の固着が顕著で

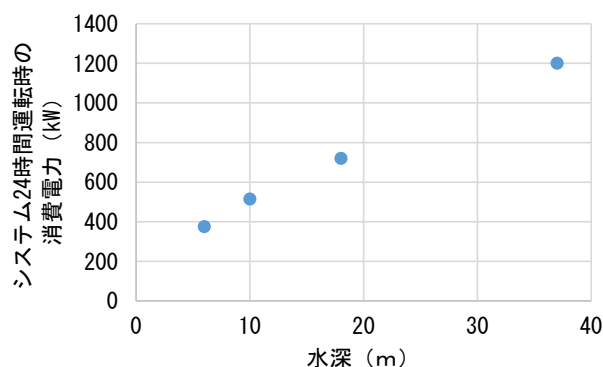


図 54 使用電力量の推移(日換算)

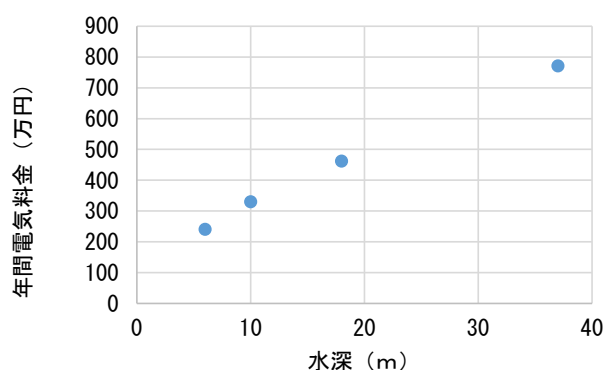


図 55 使用電力量の推移(日換算)



写真 4 吸水口の閉塞状況
(左：EL-9.0 m で 1 年稼働後、右：設置時)



写真 5 電気防食のための亜鉛板状況
(左：2 年稼働後、右：設置時)

あった。

また、塩水中に金属管体を設置することから、電気防食のため亜鉛板を接合させている。**写真 5** に示すように約 2 年の設置で、2 kg の亜鉛板がほぼ消失してい

た。筐体重量から水中装置合計で 8 kg の亜鉛板を使用した。2 年でほぼ消失していた。加えて耐久試験のため、ボルトなどを鉄、ステンレス、チタンなど様々な材質を用いて、劣化確認も行ったが、防食機能が維持されており、いずれの材質においても重大な欠損は確認されなかった。

これらの挙動から水中装置においては少なくとも 2 年に 1 度の点検、補修が必要であることが明らかとなった。水中装置の陸揚げや再設置には、用船や部材費を含めて水深 10m の位置で 200 万円ほどの維持費が必要となる。

次に陸上装置における消耗品は酸素精製装置やコンプレッサーの電磁弁やパッキン、フィルターなどがある。これらは年数もしくは開閉回数で交換目安が設定されている。本試験における陸上装置では 2 年で交換が必要となり、およそ 100 万円の費用が発生した。

一方で、想定外の故障による支出が発生する場合もある。2018 年 10 月 28 日に装置が緊急停止し、酸素精製装置の異常警報があった。結果として写真 6 に示す酸素濃縮機の開放用電磁弁のバネが折損して弁に噛み込み、閉塞しないことが原因であったが、原因が判明して修理するまでに 2 カ月を要し、2019 年 1 月 29 日まで酸素供給を停止することとなった。この故障は陸上装置であったため、比較的容易に修理が可能であった。一方で 2019 年 11 月から 2020 年 5 月までの期間は結氷期間中に故障が発生し、保守作業が実施できない状況となった。解氷後に検査した結果、故障は水中ポンプの動力線劣化およびポンプ内シーリング劣化による漏水・漏電であることが確認された。ポンプは 4 年間継続使用しており、スペック上の耐用年数以内であったが、無酸素強還元状態の水塊に浸漬していた影響と思われる、ポンプの交換補修に 300 万円の費用が発生した。

これらの結果から水深 10 m 圧送で 1 日 12 時間～24 時間の運転で電気料金は年間 240～400 万円、また 2 年に 1 度の頻度で保守点検や部品交換で 300 万円が必要となる。このことから年平均として 390～550 万円の維持費用が発生することが確認された。この他にも想定外の支出は起こりうるが、保守点検を厳守することで、故障発生頻度は抑制できると思われる。

5.7 メンテナンスに対する課題

5.7.1 メンテナンスサイクル対策

本試験から得られた課題を以下に示す。本システムを本試験規模の装置を新造して導入する場合には約

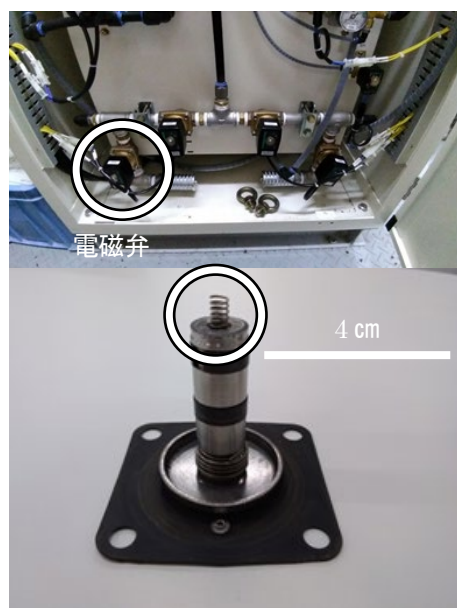


写真 6 酸素精製装置の故障箇所
(上：装置内部、下：バネの欠損)

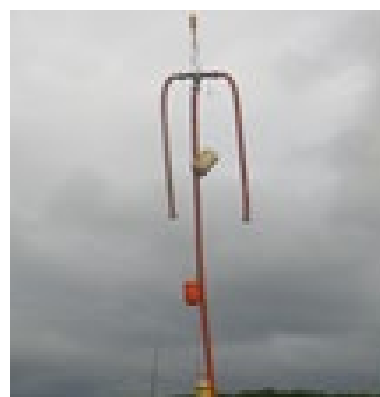


写真 7 水流生成装置初期型（腕部の延長は 20m）



写真 8 実験後の腕部拡大写真

5,000 万円の初期投資が必要である。目標の水深と水量によって陸上装置のコンプレッサーおよび水中装置の水中ポンプの吐出量が決まり、必要とする電気容量によって使用電力が概算される。目標水深が深く、大量の吐出を行うほど初期費用と運転費用は増大し、本試験機を基準に 10 m 深くなるごとに運転費用は 2 倍となる。また、対象水塊が解放水塊で流れがある場合は

本試験の装置仕様の範囲では、平均水塊流速が 0.5 cm/s 以上で一定方向に卓越するときは、DO 供給効果は流れに沿って流下する。また流れのある場合に無害化できる硫化水素濃度は供給 DO に依存して最大でも 45 mg/L 程度である。冬季の観測結果¹⁾から水塊流速が遅い場合には、DO 供給効果は流出せずに吐出口から同心円に拡大し、DO も残存することを確認している。このことから、対象水塊の流況と原水の含有硫化水素濃度によって効果の発現および発現範囲が変化すると考えられる。一方で、冬季には氷によるケーブル等の損傷、陸上装置の保温が必要であることなど、低温対策も必要となる。本稿の維持費にはこれら低温対策費用も含まれており、本試験で実装した陸上装置の仕様は必要な対策を全て見込んでいる。そのため陸上設備の維持費としては、寒冷地運用を考慮しても、ほぼ上限であり、これ以上の費用は発生しないと想定される。

また、運転上の課題として、水中ポンプの硫黄固着による吸入口の閉塞がある。現地実験上、毎年水中装置を陸揚げして保守を行ったが、吸入口の閉塞はポンプの故障を助長するため、修理費用の削減のためにも吸入口清掃は必須となる。そのため装置の機能維持のためメンテナンス頻度増えることとなり、結果として保守費用の増大となる。

5.7.2 吸水口閉塞対策（水流生成装置の開発）

メンテナンス頻度を低下させる効果を想定し、2019 年より硫黄吸入回避のため、吸入口と吐出口の位置をはなすよう、付属装置の開発および運用実験を行った。具体的には図 30 での吐出位置を改造して、実験時の吸水標高は-8.5m、吐出標高は-9.5m とし、吸水と吐出の平面位置は 30m 離して設置した。

2019 年はポンプの故障および付属装置の不具合や施工の困難さからほとんどデータを取得出来なかった。2020 年 9 月に写真 7 に示すような硫黄吸入回避のため、吸入口と吐出口の位置をはなすよう、付属装置の開発および運用実験を行った。結果として初期型の形状（吐出口を T 字配管として、T 字腕部から複数穴で吐出）では、腕部配管内に硫黄が蓄積して 2 ヶ月ほどで本線配管から漏れが発生し、先端まで溶存酸素が供給されないことがわかった。写真 8 に腕部の拡大を示す。吐出穴が白色となり、運転初期には溶存酸素の供給が行われ、硫黄固体が固着している様子が確認される。これらの結果から、水流生成装置の形状、施工方法、係留方法を全て見直し、2021 年 8 月に再設置し、2022 年 11 月まで運用実験を行った。まず吐出口は写



写真 9 水流生成装置吐出部状況



写真 10 水流生成装置吐出部の実験後状況



写真 11 水流生成装置管路内の実験後状況

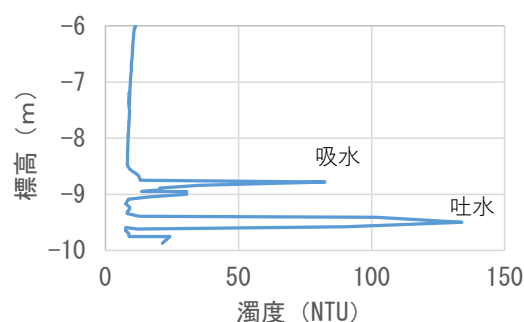


図 56 水流生成装置運転時の本体近傍の鉛直濁度分布

真 9 に示すように 360° 均一に水平吐出できる形状とし、管内流速が 2 m/s となるよう管路を調整して、管路内堆積を予防した。実験後の吐出部状況を写真 10 に示す。写真に示すように流速の遅くなる部分に硫黄の固着がみられるが、管路閉塞は起こらなかった。実験時の吸水標高は-8.5m、吐出標高は-9.5m とし、吸水と吐出の平面位置は 30m 離して設置した。写真 11 に管路の状況を示す。管路内の流速が速いが、管路内壁に

硫黄が固着していた。閉塞までは至っていないが、硫黄の吸着性状が強く、完全に防止することは困難であると推察される。吸着量は原水中の硫化水素濃度に依存するが、網走湖ほどの高濃度水塊では1年ほどの運用で管路内に300kg以上の硫黄が回収された。吐出水の分離状況を図56に示す。本体近傍の濁度鉛直分布であるが、吐出標高に高濃度濁度が検出され、吸水標高により低濃度の濁度ピークが観測され、濁度の分離および吸水口による濁度吸入の抑制となっていることを確認した。実際に運転実験終了後の吸水口の外観を写真12に示す。写真4と比較しても明らかに吸水口の閉塞が解消されていた。電蝕防止板が溶解していることから実験後の写真であることが示されている。これらの結果から、酸素溶解装置本体と吐出口を分離設置することが可能となり、吸水口の閉塞を抑制出来ることが明らかとなった。このことは、装置を他の水域に設置することを考慮すると、地形的制約に対して柔軟に対応出来ることを示し、かつ保守頻度を低減させる手法を提供できることを意味している。

6. 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。塩淡二層湖の塩水貧酸素改善のために、吐出口標高を変化させて酸素溶解装置によるDO供給を行ったときの、水質変化や維持費等の運用費用の算出を行った。本研究により得られた成果を以下にまとめる。

○結氷期を含めた停滞性貧酸素水域の流動および水質挙動を把握した。氷板により湖水の流動抑制と水面からの酸素供給抑制のため貧酸素化が助長されることが確認された。

○生物は硫化水素を含む貧酸素水塊に曝露されることで、生息数が減少する傾向であった。そのため塩淡境界標高および塩水量によって生物生息範囲が変動する。

○湖内の流出塩分量を流入淡水量のみで簡易推定できる手法を開発した。

○三次元数値モデルを構築した。

○純度90%の酸素を精製・圧送して水塊中で酸素を溶解させ、吐出量120m³/hのポンプでDOを供給した結果、吐出点近傍ではDOが20mg/Lまで上昇した。

○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追跡することで、影響範囲を検出可能となった。

○溶存酸素供給によりリン、窒素、有機態炭素、硫化水素の濃度低下が確認された。硫化水素については吐



写真12 水流生成装置付属した実験後の吸水口状況

出標高が最も酸化が進行するが、塩水層内の鉛直方向にも影響が波及し、吐出地点では継続的に硫化水素の50%削減となっていた。

○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。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固定地点の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。

○標高が低い(水深が深い)ほど、硫化水素の酸化痕跡が残存し、2ヶ月の運用で210,000m²(300m×700m)の範囲に影響が確認された。

○硫化水素の低下量は、供給酸素濃度と運転時間および水塊移動速度に依存する。

○水深10m対応の酸素供給装置の維持費用は年間390～550万円が必要となる。

以上の結果から、平均水塊速度が0.5cm/s以上であり、原水の硫化水素濃度が45mg/L以上ならば、一台の運用では硫化水素の完全酸化は困難であることが示唆された。結氷下の結果や維持費用を鑑みても隔離水塊等の流速が遅く、有限容量の改善手法とするほうが、効果の確認と改善達成までの期間の面で有利と考えられる。本機の最大の特徴は標高選択的な高濃度DO供給である。硫化水素を含む塩水水塊においては、酸素供給能力は高いがライフサイクルコストは改善の余地がある。漁業や景観、水生生物を維持するための、硫化水素や無酸素被害の緊急対策が必要な場合や維持費を上回る便益のある場合には解放水塊での導入も検討

されるが、その場合でも目標とする改善範囲が本結果以上の場合には、運転期間の長期化もしくは複数台のシステムが必要であることが推察された。

また、副生成物の付着を回避もしくは低減することで、維持費用の圧縮や水質改善効率の上昇が見込まれる。

参考文献

- 1) 環境省 水・大気環境局 水環境課：日本の汽水湖～汽水湖の水環境の現状と保全～、湖沼環境対策資料、2014.
- 2) 青木伸一、水野亮、岡本光雄：猪鼻湖における貧酸素水塊の消長に及ぼす気象擾乱の影響、海岸工学論文集、Vol.49、 pp. 1036-1040、2002.
- 3) 松根駿太郎、梅田信、田中仁、佐々木幹夫：十三湖における汽水環境の長期的な変化要因の検討、土木学会論文集 B1(水工学)、 Vol. 69、 No. 4、 pp. I_1507-I_1512、 2013.
- 4) Pracyo、 Atas、梅田信、田中仁、佐々木幹夫：汽水環境解析のための十三湖水戸口流量の推定方法に関する検討、土木学会論文集 B2(海岸工学)、 Vol. 66、 No. 1、 pp. 981-985、2010.
- 5) 奥田節夫：汽水湖における水塊の移動と混合過程、沿岸海洋研究、Vol. 35、 No. 1、 pp. 5-13、1997.
- 6) 溝山勇、大屋敬之、福岡捷二：連結系汽水湖における流動機構と長期流動シミュレーション、土木学会論文集 B1(水工学)、 Vol. 67、 No. 3、 pp. 101-120、2011.
- 7) 西田修三、佐野俊幸、中辻啓二：汽水湖における流動構造と物質循環過程、海岸工学論文集、 Vol. 48、 pp. 1116-1120、2001.
- 8) 小泉祐二、藤原広和、松尾悠佑、沼山天馬：近年の小川原湖における水質変化の特徴、土木学会論文集 B1(水工学)、 Vol. 70、 No. 4、 pp. I_1579-I_1584、2014.
- 9) 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.
- 10) 杉原幸樹、平井康幸：塩淡境界を持つ汽水湖の結水下の水質挙動、土木学会論文集 B1(水工学)、 Vol. 72、 No. 4、 pp. I_655-I_660、2016
- 11) 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、 pp. III_351-III_356、2017.
- 12) 池永均、吉本健太郎、山田正：網走湖における洪水の流入形態と洪水流入に伴う塩水吐き出し効果に関する研究、土木学会論文集、 No. 775/II-69、 pp. 29-43、2004.
- 13) 管原庄吾、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.
- 14) 杉原幸樹、増木新吾、管原庄吾、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.

13.3.2 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：水環境研究グループ（水質チーム）

研究担当者：山下洋正、小川文章、南山瑞彦、
平山孝浩、對馬育夫、服部啓太、
金子陽輔

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、猪股広典、櫻井寿之、
宮川仁、中西哲

【要旨】

本研究では、気候変動による気温、降雨、流入量の変化がダム貯水池の水質、濁質に与える将来影響及び影響に対する適応策効果の評価について3段階の規模を設定した仮想ダム貯水池における鉛直2次元モデルの水質計算により検証した。将来影響の評価については気候変動シナリオに応じた外力条件（気象条件、流入条件）を作成し、気候変動シナリオごとの水質計算を実施し、各種の水質障害（富栄養化、底層貧酸素化、冷温水放流、濁水長期化）について発生の頻度や規模の変化を定量的に示した。この結果において水質障害の進行が著しいと考えられた気候変動シナリオの条件を用いて、各種の水質障害に対する適応策を設定した水質計算を行い、それぞれの適応策の効果を定量的に示した。

キーワード：気候変動、ダム貯水池、水質、影響評価、適応策

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^{1,2)}。日本国内においても気候変動適応法が2018年に策定され³⁾、自然環境・人間社会に対する気候変動の影響予測と適応策の検討を進めることを推進している。

気候変動は自然環境に様々な影響を及ぼすことが予想されている。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・流出負荷量の変化が考えられ⁴⁾、これらの条件変化によりダム貯水池においても水質の変化が発生することが想定される⁵⁾。

既往の研究において、気候変動による水環境への影響に関する予測は様々な手法で検討されており、ダム貯水池や湖沼等への影響の予測において様々な水域において水温上昇と同時に他の水質変化が発生すること

が予測されている⁵⁻¹⁰⁾。これまで土木研究所では、本課題の先行研究にあたる『地球環境の変化が河川湖沼水質に及ぼす影響に関する調査(H21～H25)』の中で、地球温暖化に伴う水温の上昇が湖沼における硝酸イオン濃度の上昇や藻類種の変化(珪藻→藍藻)を引き起こす可能性を1Boxモデルを作成することにより導き出した。しかしながら、将来の外力条件（気象条件および流入条件）の変化による貯水池の水質変化を検討するためには、より詳細な検討ができる物理・生態系モデルを利用する必要がある。

そこで本研究では、岩手県盛岡市の御所ダムを検討例として、将来気候シナリオに応じた気候変動による外力条件の変化について検討を行った。さらに、それらの将来気候シナリオごとの外力条件を用いて、ダム貯水池の規模を変化させた仮想ダム貯水池を用いて貯水池の流動及び水質を対象とした数値計算を行い、ダム貯水池の規模に応じた気候変動の水質への影響を簡易的に評価することを試みた。加えて、ダム貯水池の


各種の水質障害(底層貧酸素化、富栄養化、温水放流、濁水長期化)に対する適応策として有効と考えられる手法について¹⁾、ダム貯水池の規模ごとにそれらを適用させた数値計算を実施し、適応策としての有効性を評価することを試みた。

2. 方法

2.1 検討流域の選定

気候変動の影響が大きいと考えられる東北地方の国土交通省管理の18ダム貯水池から、ダムの諸元・地形条件・流域状況・水質障害の発生状況を基に、「現在水質障害が生じていないダム」、「10年以上前に竣工されたダム」に着目し、1次選定を実施し、浅瀬石川ダム、御所ダム、四十四田ダム、湯田ダム、セヶ宿ダ

表1 御所ダム諸元

項目	内容	
ダム	位置	岩手県盛岡市
	形式	コンクリート・ロックフィル複合ダム
	目的	洪水調節、灌漑、発電、上水道
	堤高	52.5 m
	堤長	327.0 m
	堤体積	フィル : 980.0 千 m ³ コンクリート : 220.0 千 m ³
	計画高水量	2450 m ³ /s
	計画調節量	1250 m ³ /s
	放流設備	洪水吐: ラジアルゲート (オリフィス) 3門 洪水吐: ラジアルゲート (クレスト) 4門 利水放流: ホロ-ジェットバルブ 1門 表層取水: 鋼製2段式ローラゲート
貯水池	流域面積	635 km ²
	湛水面積	6.4 km ²
	総貯水量	65000 千 m ³
	有効貯水量	45000 千 m ³
	地形	

ム、玉川ダム、月山ダム、白川ダム、摺上川ダムの9ダムを選定した。次いで、ダムフォローアップ資料等に記載されている貯水池や下流河川の水質を確認し、「気候変動の影響で将来水質問題(冷温水放流、底層貧酸素化、濁水長期化、富栄養化等)が顕在化する可能性のあるダム」の観点から2次選定を行い、さらに、データの存在状況等を確認し、検討対象ダムとして御所ダムを選定した。

御所ダムは岩手県盛岡市に位置する国土交通省管理ダムであり、流域形状は南北に長く東西に比較的狭く、流域面積は635 km²である。御所ダムの諸元を表1に、容量配分図を図1に示す。

2.2 将来予測シナリオによる外カデータ(気象条件人及び流入条件)の作成

2.2.1 将来気候シナリオによる気象条件

将来における気象条件はRCP_4.5、RCP_6.0、RCP_8.5の3シナリオに基づく地域気候モデル(MRI-NHRCM20: 水平格子 20 km)の海面水温 SST1、積

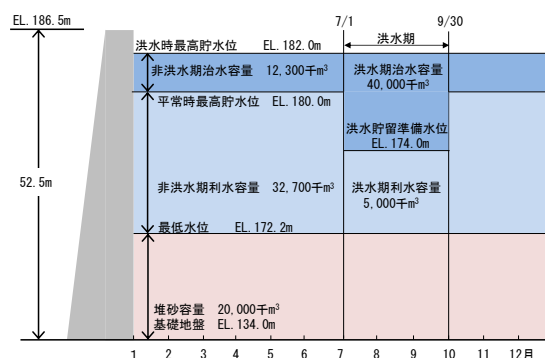


図1 御所ダム容量配分図

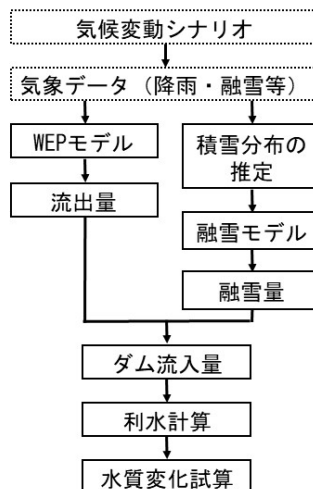


図2 気候変動シナリオに応じた外力条件を考慮した貯水池水質計算フロー

雲対流スキーム YS の条件による出力結果を用いた。また、比較のために現在気候シナリオ HPA_m02 の気象条件に基づく出力結果も使用した¹²⁾。各シナリオの計算期間は 20 年間であり、御所ダム流域の気象データを用いて気温及び降水量の出力結果についてバイアス補正を施したデータを計算に用いた。

2.2.2 将来気候シナリオ下での流入条件

流入量の条件については上記の 4 つの気候シナリオの気象データからダム貯水池に流入する流量を算出するための分布型流出モデルとして、本研究では WEP (Water and Energy transfer Process) モデル¹³⁾を用いた。WEP モデルとは土木研究所が開発したメッシュベースモデルであり、流域スケールで水収支量の計算が可能である。一方、春季の融雪による流入量の増加を考慮するにあたっては別途、御所ダム流域における既存の観測所の積雪データを用いて分布傾向を分析し、融雪量を計算した。これらの流入量算出の計算フローを図 2 に示す。流入量算出の妥当性については、HPA_m02 の気象条件による計算結果と 1984～2004 年の御所ダムの実測値との比較を付録に記した。

流入水温については実測データから気象条件との相

関関係が見出されたため、それらの相関関係を基に設定した。

流入水質については御所ダムの主要流入河川である葛根田、南川、春木場の 3 河川の過去の実測値を参考にしつつ、国内のアオコが発生しているダム貯水池の実測値を参考に藻類増殖が発生しやすいと考えられた N/P 比 33.6 程度となるように TP 流入量について α の値を増加させた L-Q 式を使用した。3 河川の L-Q 式の各係数を表 2 に示す。また、濁水長期化の検討における流入 SS 濃度は、全国のダムの SS 濃度の情報等を参考に、L-Q 式を基に計算した年間総 SS 流入量を年間総流入量で割った値が 75 mg/l となるようパラメーターを定め、以下の L-Q 式を定めた。

比流量が 0.095 より小さい場合：

$$\text{SS 負荷量 (g/s/km}^2\text{)} = 11.3 q^{1.1} \text{ 式(1)}$$

比流量が 0.095 以上の場合：

$$\text{SS 負荷量 (g/s/km}^2\text{)} = 987 q^3 \text{ 式(2)}$$

ここで、 q ：比流量 ($\text{m}^3/\text{s/km}^2$)

2.3 将来予測計算

2.3.1 ダム貯水池鉛直 2 次元モデル

気候変動による水質の変化を検証するために、2.2 で作成した各気象条件における外力条件を用いたダム貯水池の水質計算を試みた。本研究では、流動及び植物プランクトン濃度の動態を再現可能かつ計算負荷が比較的小さい鉛直 2 次元モデルを用いて、気候変動下における水質を試算した。採用した流動モデルは連続式、水平方向の運動方程式、鉛直方向の運動方程式、水面変動の式、水温の輸送方程式を基に構成されたモデルであり、基礎式等は既往研究に基づいている¹⁴⁾。本研究では、濁水長期化に対する検討のうえで重要となる鉛直拡散係数の設定のために、リチャードソン数を用いて鉛直渦動粘性係数を定式化する改良を行った。これらの改良及び濁水挙動の再現性については過年度の検討で報告している¹⁵⁾。

水質及びプランクトンについては図 3 に示す項目を考慮可能な生態系モデルを用いて、各水質項目の変化を計算した。水質計算に当たって必要な基礎式やパラメーター等は既往研究を参考に設定した¹⁶⁾。水質計算モデルとしての計算結果の妥当性については、付録に表層水温、底層水温、表層 Chl-a 濃度、底層 DO 濃度に関する検討を記した。

2.3.2 仮想ダム貯水池の設定

ダム貯水池の規模は御所ダムの諸元を参考に、横断形状を台形型に簡素化して設定した小ダム（回転率：

表 2 流入 3 河川の L-Q 式 ($L = \alpha Q^\beta$) の各係数

河川	項目	α	β
葛根田	TN	0.3822	1.0294
	TP	0.0052	1.2116
南川	TN	0.3047	1.1248
	TP	0.0040	1.2966
春木場	TN	0.2034	1.1157
	TP	0.0053	1.2233

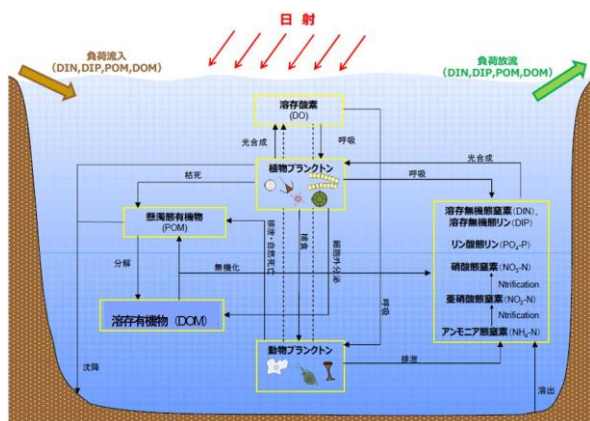


図 3 生態系モデルの概念図及び計算項目

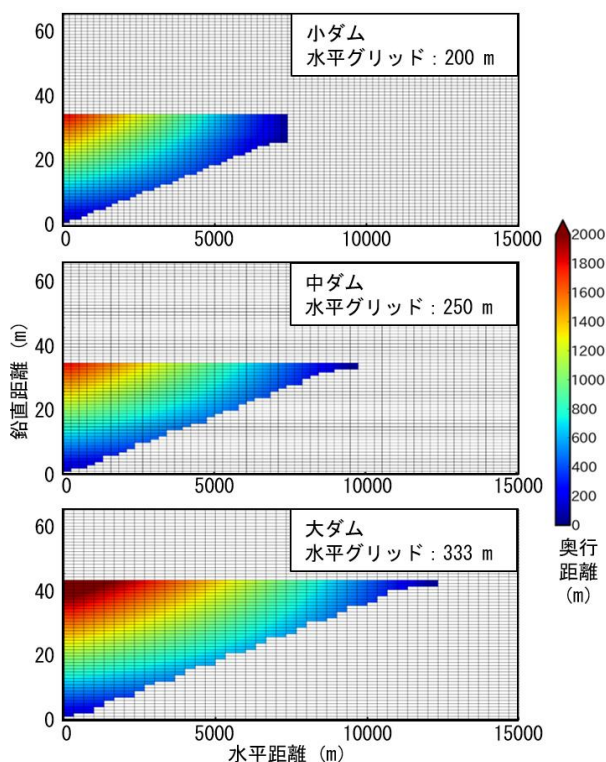


図4 規模ごとの貯水池形状の設定

表3 気候変動シナリオ及び貯水池規模の設定を変化させた計算パターン

ケース名	貯水池規模	気候変動シナリオ
A-S-02	小 (回転率：23回/年, 常時満水位時容量： 0.53億 m ³)	HPA_m02
A-S-4.5		RCP_4.5
A-S-6.0		RCP_6.0
A-S-8.5		RCP_8.5
A-M-02	中 (回転率：10回/年, 常時満水位時容量： 1.2億 m ³)	HPA_m02
A-M-4.5		RCP_4.5
A-M-6.0		RCP_6.0
A-M-8.5		RCP_8.5
A-L-02	大 (回転率：5回/年, 常時満水位時容量： 2.4億 m ³)	HPA_m02
A-L-4.5		RCP_4.5
A-L-6.0		RCP_6.0
A-L-8.5		RCP_8.5

23回/年、常時満水位時容量：0.53億 m³)と小ダムの規模を大きくした中ダム(回転率：10回/年、常時満水位時容量：1.2億 m³)及び大ダム(回転率：5/年、常時満水位時容量：2.4億 m³)の3通りを設定した。規模ごとの貯水池の地形形状の設定を図4に示す。各貯水池規模の計算において水平拡散係数はリチャードソ

ンの4/3乗則を基に、メッシュサイズに応じた水平拡散係数を設定した。

また、取水施設の条件については通常時は表層放流を基本としてダム堤体に隣接する表層2m下のメッシュから放流する設定とし、その他の放流施設は多目的ダムである御所ダムの施設諸元を参考に常用洪水吐と非常用洪水吐を設定した。洪水時には、コンジットゲートの位置によって貯水池内のSS濃度が変化することが考えられるため、コンジットゲートが下層に設置されている場合及び表層に設置されている場合を設定した。

放流量は利水モデルを作成し、施設別放流量データの作成を行った。利水モデルについては下流の利水基準点や取水地点、治水基準点における確保水量および御所ダムの過去の運用時の特徴を考慮して構築した。利水モデルについては下流の利水基準点や取水地点、治水基準点における確保水量および御所ダムの過去の運用時の特徴を考慮して構築した。構築した利水モデルによる総放流量の比率は、表層放流がそれぞれHPA_m02：77.3%、RCP_4.5：77.8%、RCP_6.0：74.5%、RCP_8.5：76.7%、常用洪水吐がそれぞれHPA_m02：22.7%、RCP_4.5：22.2%、RCP_6.0：25.5%、RCP_8.5：23.3%であり、非常用洪水吐による放流は各計算でほとんど存在しなかった。

2.3.3 将来気候下における水質計算

将来気候下における富栄養化、底層貧酸素化、温水放流の評価を目的として、三つの規模の仮想ダム貯水池(小ダム、中ダム、大ダム)における4つの気候シナリオの外力データを用いた水質計算を行った。計算の期間は各シナリオの20年間を対象とし(現在気候シナリオは1984/9/1～2004/8/31、将来気候シナリオは2080/9/1～2100/8/31)、すべての計算ケースで1984/1/1～1984/8/31の御所ダムの外力条件の実測値に基づく8ヵ月分の計算を助走期間として実施した。気候変動シナリオを変化させた仮想ダム貯水池の計算ケースの一覧を表3に示す。

濁水長期化に関する計算における流入SS負荷量の計算方法は2.2.2で述べた通りである。また、洪水時における濁質の放流量によって、洪水後の貯水池内でのSS濃度が変化することが考えられるため、2.3.2で述べたコンジットゲートの設置高さによる放流SS濃度への影響を調べる(中ダムのみ)。ここで表層の条件は、中ダムの洪水貯留準備水位から-0.5mの位置にコンジットゲートを設定し、下層の条件では常時満水位

表 4 気候変動シナリオ及び貯水池規模の設定を変化させた計算パターン

ケース名	貯水池規模	対策	運用期間	補足
B-S-1	小	高濃度酸素供給装置	6/1 - 11/30	すべての計算ケースで以下の緑色のメッシュに設定
B-S-2			7/1 - 8/31	
B-M-1	中		6/1 - 11/30	
B-M-2			7/1 - 8/31	
B-L-1	大		6/1 - 11/30	
B-L-2			7/1 - 8/31	
B-S-3	小	異高同時取水	4/1 - 11/30	底層からの引き抜き
B-S-4			6/1 - 9/31	
B-S-5			4/1 - 11/30	
B-M-3	中		4/1 - 11/30	底層からの引き抜き
B-M-4			6/1 - 9/31	
B-M-5			4/1 - 11/30	
B-L-3	大		4/1 - 11/30	底層からの引き抜き
B-L-4			6/1 - 9/31	
B-L-5			4/1 - 11/30	

から堤体直上流の河床標高の間の 3 割の水深の位置（洪水貯留準備水位から -21.0 m）にコンジットゲートを設定することとした。コンジットゲートの設定については、御所ダムの実態にはあてはまらないが、国内の他ダムにおいて、このような設定に近い事例も存在する。このため、コンジットゲートの効果検討として、非現実的な条件設定ではないと考えられる。

2. 4 各種水質障害に対する適応策の検討

2.4.1 底層貧酸素化に対する適応策の検討

底層貧酸素化に対する適応策として有効と考えられる①高濃度酸素供給装置¹⁷⁾及び②異高同時取水を適用させた貯水池の計算を大中小すべての規模で行い、気候変動の影響に対する適応策としての有効性の評価を試みた。

高濃度酸素供給装置を適応させた計算ケースについては酸素水供給量 80 m³/h、吐出 DO 濃度 30 mg/L で設定し、すべての貯水池規模で 1 基の運用として計算を行った。高濃度酸素供給装置の設置位置については、貯水池下流の堤体近傍から水平方向に 1 メッシュ分及び底層面から 1 メッシュ分離れた位置で設定した。運用期間については貧酸素化が進行する 6・11 月の 6 ヶ月間と躍層の形成により貧酸素化が最も進行しやすいと考えられた 7・8 月の 2 ヶ月間の 2 通りの条件で計算を行った。

異高同時取水を適応させた計算ケースについては、表層 5 割、底層 5 割の 1 対 1 の引き抜きを行い、底層

の取水深については計算メッシュ上の最下層からの引き抜きと、ダム運用上の最低水位等踏まえた水深での引き抜きの 2 パターンを設定した。最下層からの引き抜きの計算ケースについては運用期間を 4・11 月の 8 ヶ月間と 6・9 月の 4 ヶ月間で設定した。

上記に示す底層貧酸素化の適応策を行った水質計算の一覧を表 4 に示す。これらの計算は 2.3.3 と同様に 1984/1/1 ~ 1984/8/31 の御所ダムの外力条件の実測値に基づく 8 ヶ月分の助走計算をそれぞれの適応策を稼働させた状態で実施した。各計算における外力条件は RCP_8.5 のシナリオにおける条件を用いた。

2.4.2 富栄養化に対する適応策の検討

富栄養化に対する一般的な対策として考えられる曝気循環施設を適用させた貯水池の計算を行い、気候変動の影響に対する適応策としての有効性の評価を試みた。計算モデルでは Asaeda and Imberger による二重ブルームモデルを元に曝気循環のモデル化を行った¹⁸⁾。曝気循環によって生ずる流動場をモデル化するにあたり、中央の上昇ブルームの部分と周囲の下降ブルームの部分による二重円筒構造を持ったブルームモデルを採用した。これらのモデル化にかかわる基礎方程式等は既往研究にて詳細に記されている^{19) 20)}。

曝気循環施設は小ダム、中ダム、大ダムそれぞれに表 5 に示す台数を設定し、曝気循環施設の吐出水深は貯水池の水量に対応して水位が変化した場合も常に水深 15 m から吐出されるよう設定した。各計算におけ

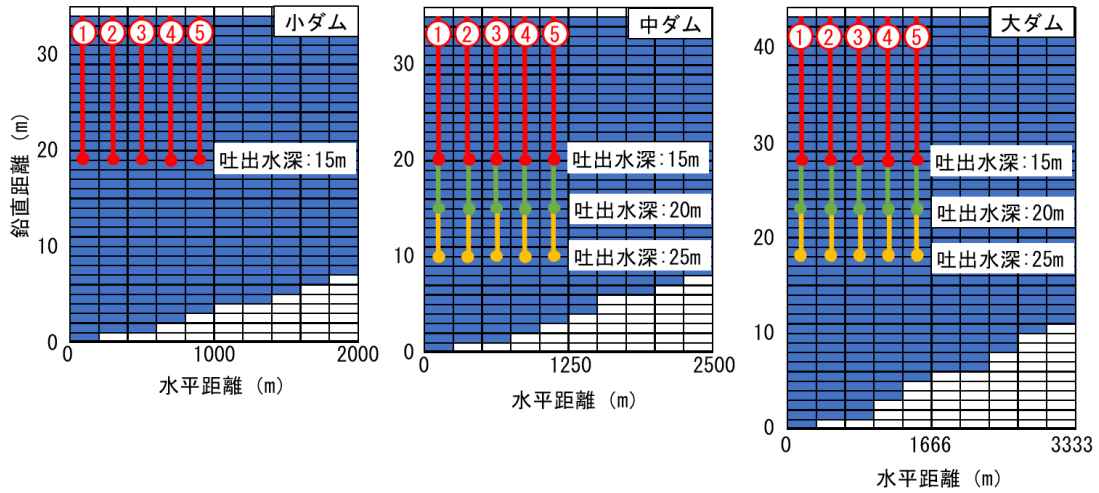


図5 各貯水池規模における曝気施設の設置位置の設定

表5 貯水池規模及び曝気循環施設の台数と吐出水深の設定を変化させた計算パターン

ケース名	規模	施設台数	吐出水深(m)	運用	設置位置	
C-S-1	小	3	15	半年運転 (4-9月に全 台数稼働)	①, ②, ③	
C-S-2		4			①, ②, ③, ④	
C-S-3		5			①, ②, ③, ④, ⑤	
C-S-4		6		夏季集中	①×2, ②, ③, ④, ⑤	
C-S-5					①×2, ②, ③, ④, ⑤	
C-S-6					①×2, ②, ③, ④, ⑤	
C-M-1	中	4	15	半年運転 (4-9月に全 台数稼働)	①, ②, ③, ④	
C-M-2		5			①, ②, ③, ④, ⑤	
C-M-3		6			①×2, ②, ③, ④, ⑤	
C-M-4		8		夏季集中	①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤	
C-M-5					①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤	
C-M-6					①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤	
C-M-7		4	20	半年運転 (4-9月に全 台数稼働)	①, ②, ③, ④	
C-M-8			25		①, ②, ③, ④	
C-M-9			8		20	①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤
C-M-10					25	①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤
C-L-1	大	5	15	半年運転 (4-9月に全 台数稼働)	①, ②, ③, ④, ⑤	
C-L-2		6			①, ②, ③, ④, ⑤×2	
C-L-3		8			①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤	
C-L-4		10		夏季集中	①×2, ②×2, ③×2, ④×2, ⑤×2	
C-L-5					①×2, ②×2, ③×2, ④×2, ⑤×2	
C-L-6					①×2, ②×2, ③×2, ④×2, ⑤×2	
C-L-7		6	20	半年運転 (4-9月に全 台数稼働)	①×2, ②, ③, ④, ⑤	
C-L-8			25		①×2, ②, ③, ④, ⑤	
C-L-9			10		20	①×2, ②×2, ③×2, ④×2, ⑤×2
C-L-10					25	①×2, ②×2, ③×2, ④×2, ⑤×2

表 6 曝気循環施設と選択取水を組み合わせた計算パターン

ケース名	規模	施設台数	吐出水深	運用	設置位置
D-S-1	小	-	-	-	-
D-S-2		3	15	半年運転	①, ②, ③
D-S-3		6		半年運転	①×2, ②, ③, ④, ⑤
D-M-1	中	-	-	-	-
D-M-2		4	25	半年運転	①, ②, ③, ④
D-M-3		8		半年運転	①×2, ②×2, ③×2, ④, ⑤
D-L-1	大	-	-	-	-
D-L-2		6	25	半年運転	①×2, ②, ③, ④, ⑤
D-L-3		10		半年運転	①×2, ②×2, ③×2, ④×2, ⑤×2

る設置位置を図 5 に示す。運用期間は水温躍層が形成される 4・9 月の 6 ヶ月とし（半年運転）、散気量は 1 台あたり 3700 L/min で設定した。曝気循環施設の台数やその他の諸条件は文献値¹¹⁾を参考に一般的と考えられる数値を設定した。また、運用期間に関する検討として、すべての貯水池規模において最も台数を多く設定した計算（小：6 台、中：8 台、大：10 台）においては、運用期間を夏季集中（7・9 月のみで全台数を運転）と早期集中（4・5、9 月に半数、6・8 月に全台数を運転）の 2 通りを追加で計算した。

加えて、中ダムと大ダムにおいては曝気循環施設の吐出水深を変更することによる効果変化を確認することを目的として、20 m と 25 m に設置した場合の計算も実施した。これらの曝気循環施設を導入した計算パターンの一覧を表 5 に示す。これらの計算は 2.3.3 と同様に 1984/1/1 ~ 1984/8/31 の御所ダムの外力条件の実測値に基づく 8 ヶ月分の助走計算をそれぞれの適応策を稼働させた状態で実施した。各計算における外力条件は RCP_8.5 のシナリオにおける条件を用いた。

2.4.3 温水放流に対する適応策の検討

温水放流に対する一般的な対策として考えられる選択取水を適用させた貯水池の計算を行った。選択取水の条件としては流入水温=放流水温となるように取水深を設定し、数値計算を行った。これらの計算ケースについては D-S-1、D-M-1、D-L-1 と称す。

2.4.4 適応策を組み合わせた検討

2.4.3 の検討の際に選択取水は温水放流の対策としては有効だが、表層水の滞留時間の増加により富栄養化を進行させる懸念が生じた。そこで曝気循環施設を選択取水と組み合わせた計算を行い、富栄養化と温水放流の同時対策を検討した。曝気循環施設の台数は各

貯水池規模で 2 通り行った。これらの適応策を組み合わせた計算ケースについて表 6 に示す。これらの計算は 2.3.3 と同様に 1984/1/1 ~ 1984/8/31 の御所ダムの外力条件の実測値に基づく 8 ヶ月分の助走計算をそれぞれの適応策を稼働させた状態で実施し、選択取水の取水深は流入水温=放流水温となるように設定した。各計算における外力条件は RCP_8.5 のシナリオにおける条件を用いた。

2.4.5 濁水長期化に対する適応策の検討

濁水に対する適応策として有効と考えられる手法及びその組み合わせにより下記 4 種類の対策効果について検討を行った。各対策の検討概要を下記に示す。

1) 流動制御フェンス

ダム堤体より上流に、深さ 5 m のフェンスを設置する。設置位置は、貯水位が洪水貯留準備水位にある時の貯水池の縦断距離に対して 2/3 を乗じた距離をダム堤体から離れた位置とする。

2) 選択取水による濁水早期放流

水深 5 m 地点で選択取水を行う。実施期間は、出水時~1 週間後まで及び出水時~2 週間後までの 2 通りとする。

3) 流動制御フェンス+選択取水

1)及び 2)を組み合わせる。選択取水の実施期間は 2 週間とした。

4) 清水バイパス

清水バイパスは、ダム貯水池に流入する前の SS 濃度が低い水をダム貯水池に流入させずにダム下流に迂回させる手法である。これまで実施されている清水バイパスの運用実績等を参考に、バイパス放流量を 12.0 m³/s 及び 35.0 m³/s の 2 通りについて検討する。出水時にはダム流入水の SS 濃度が上昇して希釈効果が得

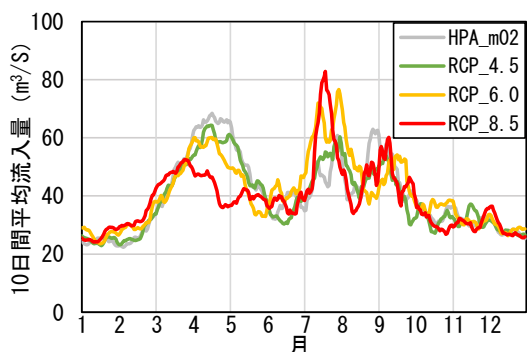


図6 気候シナリオごとの流入量の10日間平均値
20年間平均値の年間推移

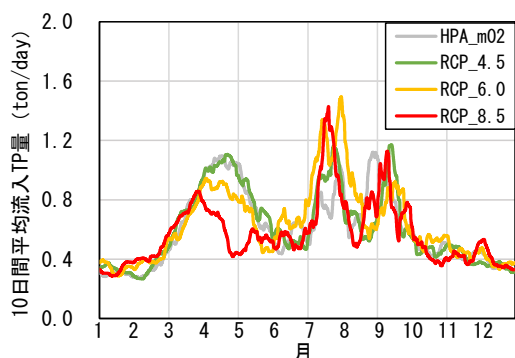


図7 気候シナリオごとの流入TP量の10日間平均
値の20年間平均値の年間推移

られないため、出水時以外の期間において運用されるものとし、具体的にはダム貯水池の流入 SS 濃度が 25.0 mg/l 以下の際に運用されるものとした。

上記の対策を適応させた計算を中ダムの条件で実施した。また、気候シナリオは将来予測計算において濁水長期化の傾向が RCP_6.0 で最も強く見られたため、RCP_6.0 の条件を採用した。

3. 将来気候下における各種計算の結果

3.1 将来気候下における流入条件の変化

現在気候 HPA_m02 及び将来気候 RCP_4.5、RCP_6.0、RCP_8.5 の4つのシナリオの各気象条件から、WEPモデルにより計算した流入量の20年間平均値の年間推移を図6に示す。それぞれのシナリオを比較すると、4-5月の融雪期の流入量が高位のシナリオほど小さくなっていることが確認された。この融雪期の流入量変化の傾向については東北地方の釜房ダムや寒河江ダム、北海道の金山ダムを対象とした既往検討においても確認されており^{5) 21)}、融雪出水が発生しやすい降雪地域のダムにおいてはこのような流入量の変化が発生しやすいと考えられた。加えて、将来気候シ

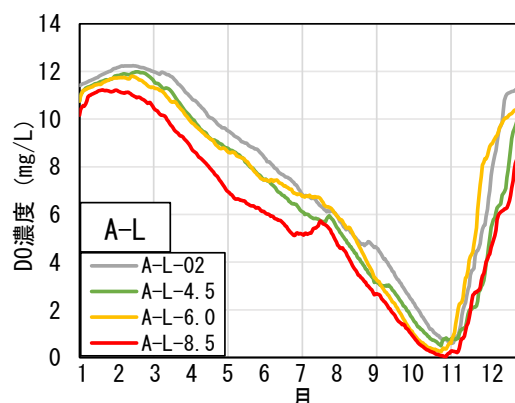
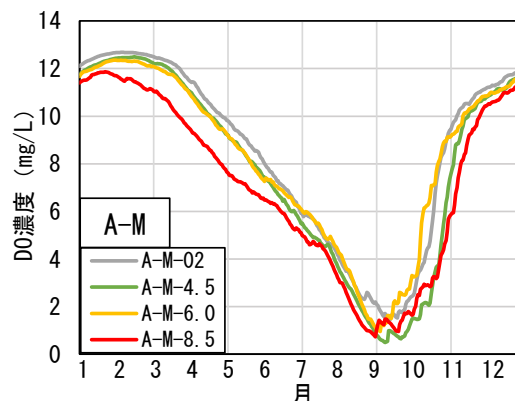
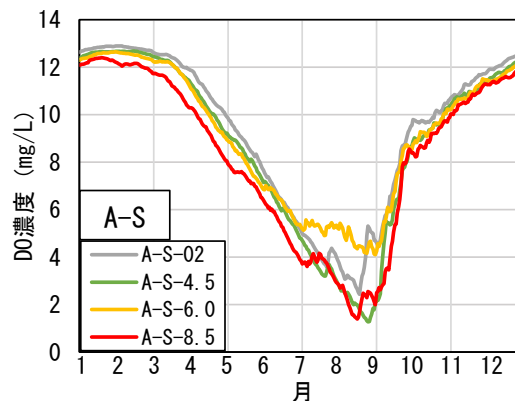


図8 貯水池規模及び気候シナリオごとの底層DO
濃度の20年間平均値の年間推移

ナリオすべてにおいて7月の流入量の増加が確認された。HPA_m02と最も流入量の増加が著しいRCP_8.5における7月の総雨量の平均値を比較すると、HPA_m02: 274.7 mm/monthとRCP_8.5: 333.5 mm/monthであり、夏季の降雨形態の変化により、流入量も変化することが示唆された。

また、L-Q式より流入量を基に算出された流入TP量の年間変動を図7に示す。流入量の変化と同様に4-5月の融雪期の低下や7月の増加傾向が確認され、1日あたりの流入TP量の年間平均値はHPA_m02: 0.606 ton/day、RCP_4.5: 0.614 ton/day、RCP_6.0: 0.637 ton/day、RCP_8.5: 0.573 ton/dayであった。

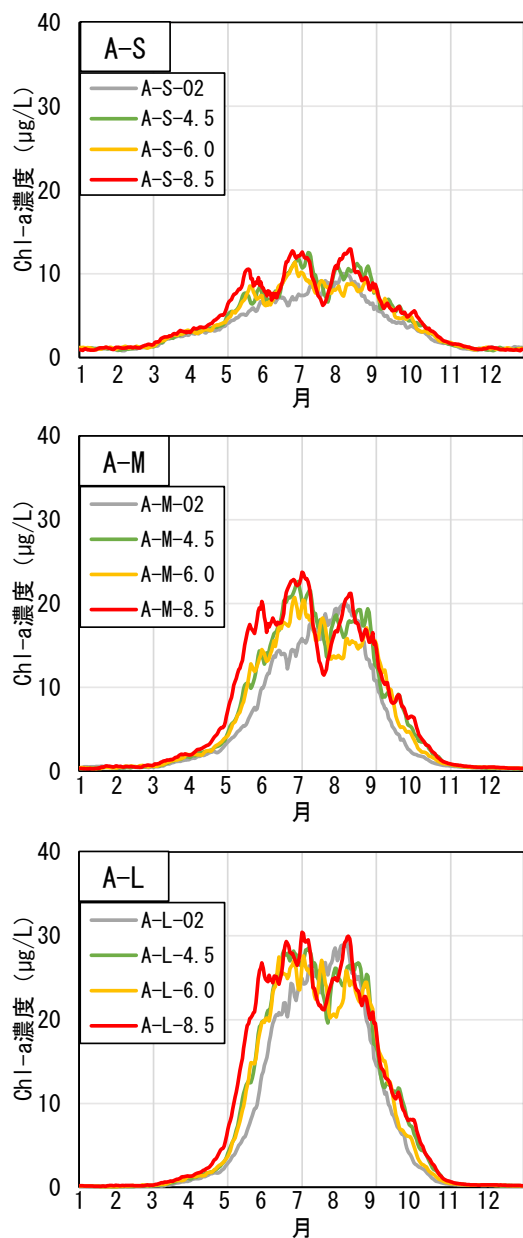


図9 貯水池規模及び気候シナリオごとの Chl-a 濃度の 20 年間平均値の年間推移

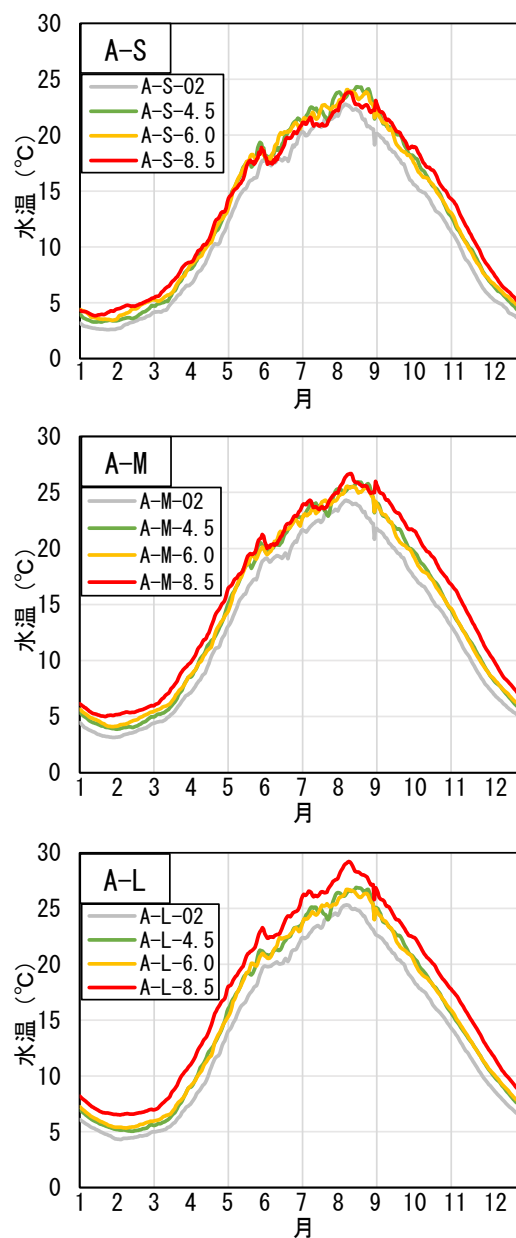


図10 貯水池規模及び気候シナリオごとの表層水温の 20 年間平均値の年間推移

RCP_8.5 のシナリオにおいては 4・5 月の著しい流入量の低下に伴い年間の TP 流入量も大きく減少するが、RCP_6.0 のシナリオにおいては夏季の流入量の増加に伴い年間の TP 流入量が増加する傾向が確認された。

3. 2 将来気候下における底層貧酸素化状況の変化

現在気候 HPA_m02 及び将来気候 RCP_4.5、RCP_6.0、RCP_8.5 の 4 つのシナリオの外力条件から計算した各貯水池規模の水質計算における底層（ダム貯水池の堤体近傍の最下層から 2 番目のメッシュを対象とした）DO 濃度の 20 年間平均値の年間推移を図 8 に示す。将来気候シナリオの計算ケースと現在気候シナリオの計算ケースを比較すると、RCP_8.5 のシナリ

オは HPA_m02 の計算ケースに対して DO 濃度の低下傾向がすべての貯水池規模で明確に表れた。しかし、RCP_6.0 のシナリオでは、A-S-6.0 の計算ケースにおいて 7-8 月の DO 濃度が A-S-02 の計算ケースよりも高くなる傾向が見られており、A-M-6.0 の計算ケースにおいても DO 濃度の明確な減少傾向はみられなかった。これらは貯水池全体の攪拌・DO 濃度回復を引き起こす大規模な流入が A-S-6.0 や A-M-6.0 の計算ケースでは増加するためと考えられた。

また、年間の DO 濃度の変動傾向について、各シナリオで大きな差は生じないと考えられた。

3. 3 将来気候下における富栄養化状況の変化

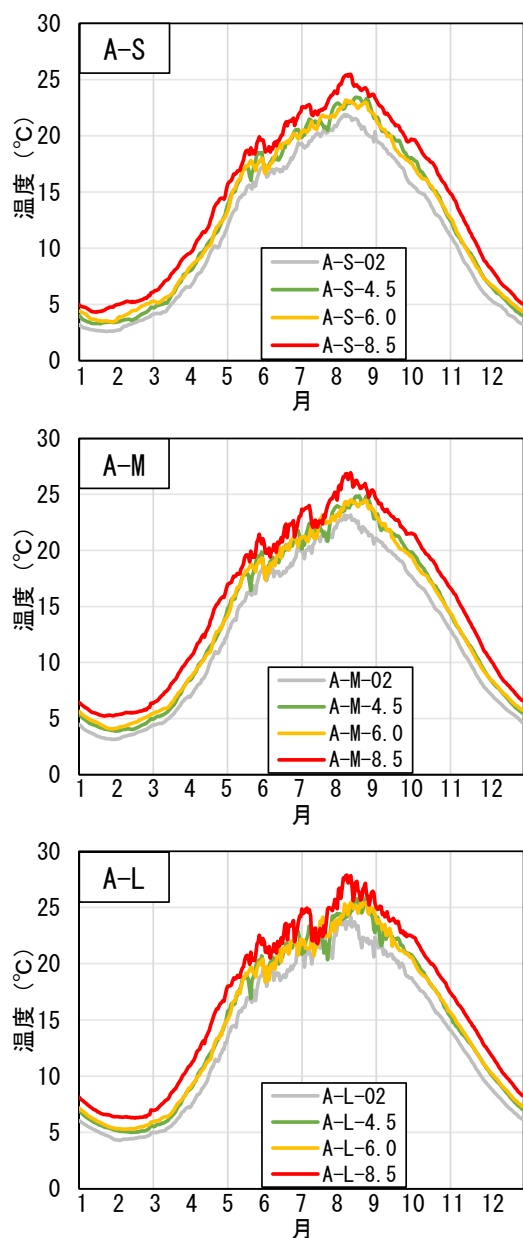


図 11 貯水池規模及び気候シナリオごとの放流水温の 20 年間平均値の年間推移

各条件の表層（ダム貯水池の堤体近傍の表層第 1 層を対象とした）Chl-a 濃度の 20 年平均値の年間推移を図 9 に、表層水温の 20 年平均値の年間推移を図 10 に示す。将来気候シナリオの計算ケースでは、HPA_m02 の計算ケースと比較して 5・6 月の Chl-a 濃度の上昇傾向が小、中、大すべての貯水池規模で明確に見られた。5・6 月の平均 Chl-a 濃度の比を将来気候と現在気候で比較すると、小ダムでは 128 - 149 %、中ダムでは 141 - 176 %、大ダムでは 134 - 159 % の上昇が見られ、特に RCP_8.5 の計算ケースでは濃度増加傾向が各貯水池規模で最も大きかった。また、5・6 月の表層水温について RCP_8.5 の計算ケースと

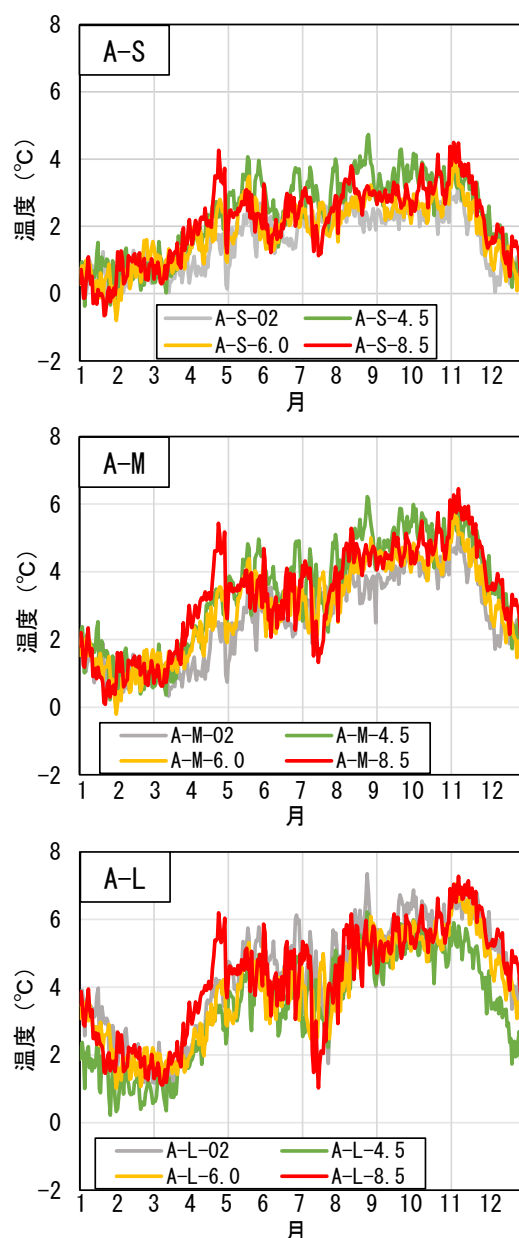


図 12 貯水池規模及び気候シナリオごとの流入と放流の水温差の 20 年間平均値の年間推移

HPA_m02 の計算ケース結果を比較すると、小ダムにおいては 1.1 °C、中ダムにおいては 2.3 °C、大ダムにおいては 3.4 °C 上昇し、貯水池の規模が大きいほど水温上昇が大きい傾向が見られた。これらの 5・6 月の水温上昇や流入条件の変化を起因として、高濃度の植物プランクトンが発生する時期が早期化することが考えられた。このような藻類増殖期の早期化は釜房ダムを対象とした既往検討においても確認されており⁵⁾、気温上昇による明確な影響として多くのダム貯水池で発生する可能性があると考えられた。

また、将来気候シナリオの計算ケースすべてにおいて、7 月前後に一度 Chl-a 濃度のピークを迎えて 8 月

までの間に減少していく傾向がみられた。これは将来気候シナリオの計算条件における7月の流入量の極端な増加により貯水池の短期回転率が高まり、Chl-a濃度の低下につながったと考えられた。Chl-a濃度の低下の原因は水温の変化や栄養塩の枯渇なども考えられるが、将来気候シナリオにおける7月の表層水温の変化は植物プランクトンの成長速度を著しく変化させるものとは考えにくく、さらにNO₃濃度やPO₄濃度の低下傾向等も計算結果では確認されなかった。

3.4 将来気候下における温水放流状況の変化

各条件の放流水温の20年間平均値の年間推移を図11に、放流水温と流入水温の差を図12に示す。放流水温は表層水温と同様にHPA_m02の計算ケースで最も高くなる傾向が各貯水池の規模で確認され、貯水池の規模が大きいほど水温上昇が大きい傾向が見られた。また、流入水温と放流水温の差について、小ダムにおけるA-S-4.5やA-S-8.5の計算ケースはA-S-02の水温差よりも大きくなる傾向が見られ、温水放流の頻度増加も増加すると考えられた。一方で、大ダムの計算においては将来気候の計算ケースが現在気候の計算ケースと比較して水温差が大きくなるような傾向はみられず、温水放流に対する影響は限定的であると考えられた。

3.5 将来気候下における濁水長期化状況の変化

2.2.2及び2.3.3で述べた手法で計算された流入SS濃度の将来予測計算結果を図13に示す。各ケースの棒グラフは下記の式(2)、エラーバーの上限及び下限は下記の式(3)、(4)で計算された値を示す。将来気候については、いずれのシナリオにおいても流入SS濃度が現在気候と比較して増加することが示された。

$$Q_{s_ave}(m) = \left(\left(\sum_{y=1}^{20} Q_s(y, m) \right) / 20 \right) \quad \text{式(1)}$$

$$Q_{s_ave} = \left(\left(\sum_{m=1}^{12} Q_{s_ave}(m) \right) / 12 \right) \quad \text{式(2)}$$

$$Q_{s_max} = \max\{Q_{s_ave}(1), Q_{s_ave}(2), \dots, Q_{s_ave}(12)\} \quad \text{式(3)}$$

$$Q_{s_min} = \min\{Q_{s_ave}(1), Q_{s_ave}(2), \dots, Q_{s_ave}(12)\} \quad \text{式(4)}$$

ここで、 y : 年、 m : 月、 $Q_s(y, m)$: y 年 m 月における流入SS濃度の平均値(mg/l)、 $Q_{s_ave}(m)$: m 月における流入SS濃度の20年間平均値(mg/l)、 Q_{s_ave} : 流入SS濃度の全期間平均値(mg/l)、 Q_{s_max} : 月毎の流入SS濃度の20年間平均値の最大値(mg/l)、 Q_{s_min} : 月毎の流入SS濃度の20年間平均値の最小値(mg/l)

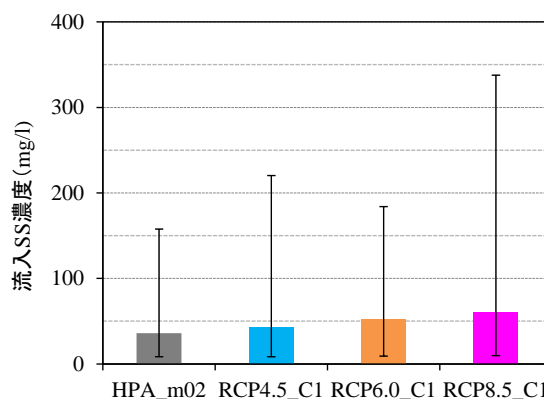


図13 気候シナリオごとの流入SS濃度の計算結果

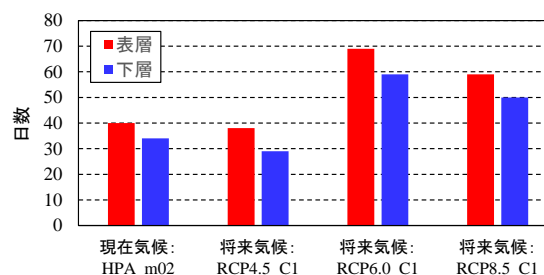


図14 気候シナリオごとの放流水のSS濃度が25 mg/lを超過する日数(年平均)

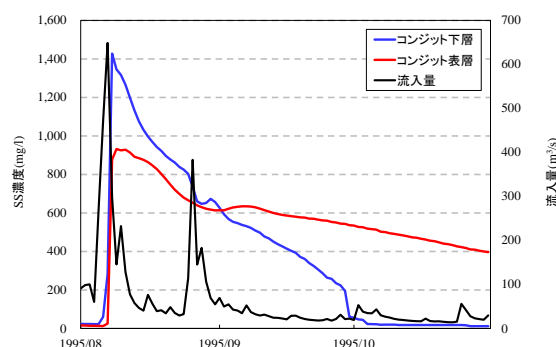


図15 コンジットゲートの位置別の貯水池下層におけるSS濃度

また、放流水のSS濃度について濁水の基準となる25 mg/lを超過する日数の気候シナリオ及びコンジットゲートの位置毎の比較を図14に示す。将来気候においては、RCP4.5_c1の場合は現在気候と比較して大きく変化しないものの、RCP6.0_c1及びRCP8.5_c1については、現在気候よりも放流水のSS濃度が25 mg/lを超過する日数が増加することが示された。さらに、コンジットゲートが表層に位置するよりも、下層に位置する場合の方が、放流水のSS濃度が25 mg/lを超過する日数が低下することがいずれのケースについても示された。

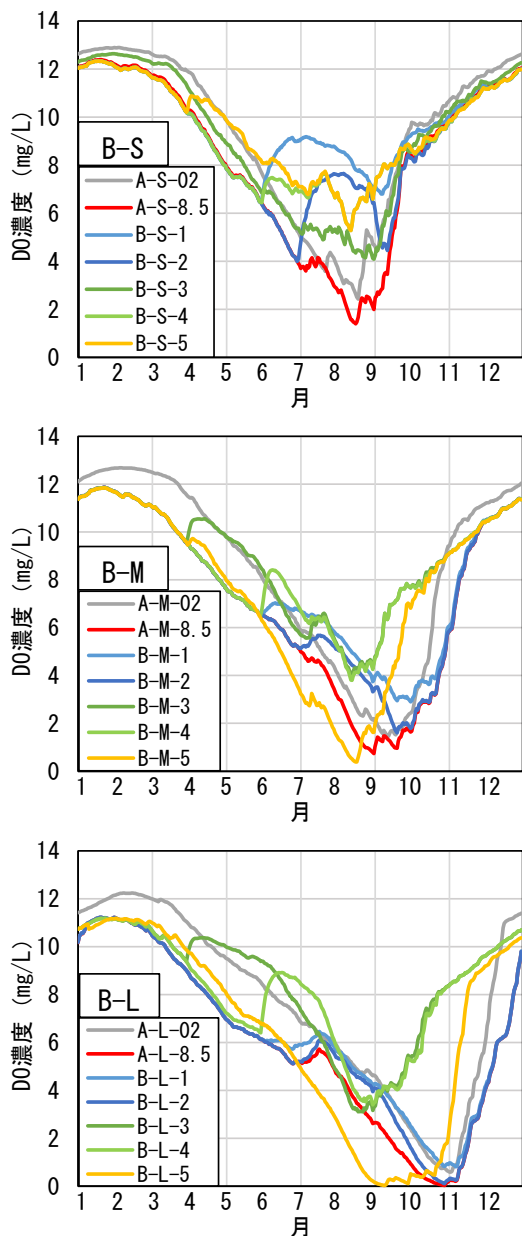


図 16 底層貧酸素化の適応策導入時の底層 DO 濃度の 20 年間平均値の年間推移

図 15 にコンジットゲートの位置別の貯水池下層の SS 濃度に関するシミュレーション結果の一例を示す。図には併せて流入量を第 2 軸で示している。この図から、コンジットゲートが下層に位置する場合、コンジットゲートが上層に位置する場合と比較して出水中は SS 濃度が高いものの SS 濃度の低下が速いことが分かる。この要因は以下のように考えられる。一般的に濁質は洪水時において貯水池の下層に流入し、コンジットゲートが下層に位置する場合、洪水時においては多くの濁質が下層にあるコンジットゲートに引き込まれるため下層の SS 濃度が高くなる。それに対しコンジットゲートが表層に位置する場合、下層に流入す

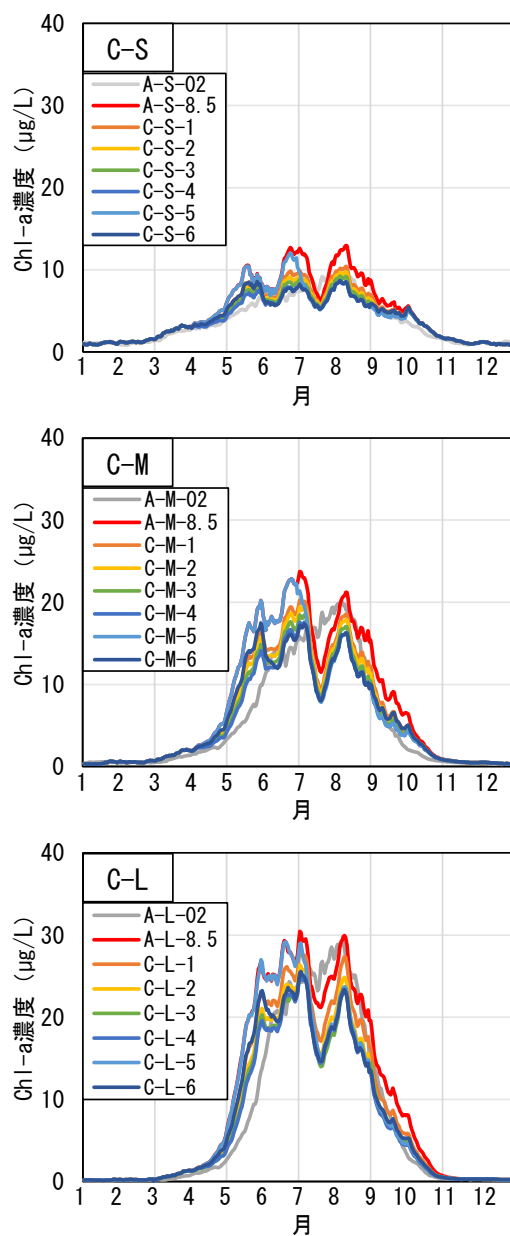


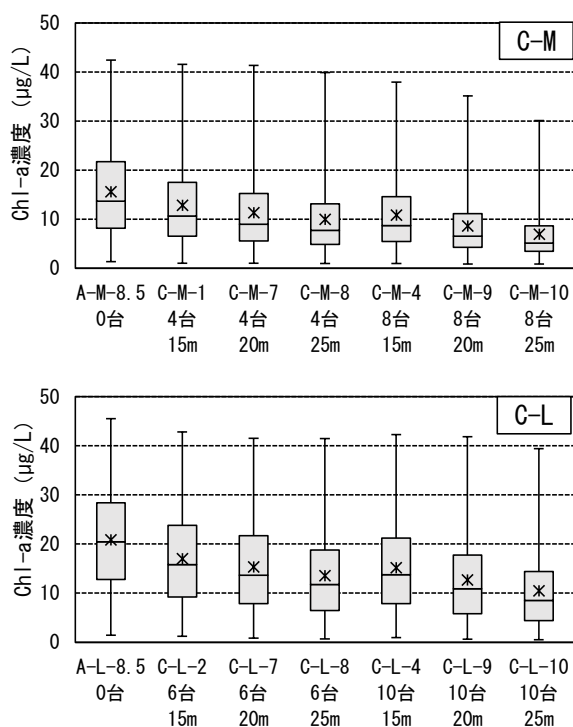
図 17 富栄養化の適応策導入時の表層 Chl-a 濃度の 20 年間平均値の年間推移

る濁質を洪水中に効率的に放流できないため、コンジットゲートが下層に位置する場合と比較して洪水中の SS 濃度は低いものの、洪水後濁質が長期間貯水池内に留まるため、貯水池下層の SS 濃度の減衰が緩やかになると考えられる。まとめると、貯水池下層にコンジットゲートが設置される場合の方が、濁水長期化の緩和効果が大きいと言える。

4. 適応策を用いた水質計算の結果

4. 1 底層貧酸素化に対する適応策の効果

底層貧酸素化に対する適応策を導入した計算結果 (B-S-1~B-L-5) を図 16 に示す。小ダムの計算におい



※5/1 から 9/30 までを対象とした表層 Chl-a 濃度の統計値 (n=3060)

図 18 中ダムと大ダムにおける曝気循環施設の吐出水深の設定値を変化させた場合の表層 Chl-a 濃度の変化

では、適応策を導入したすべての計算ケースで底層 DO 濃度の改善が見られ、適応策として十分な効果があると考えられた。一方で、B-M-1 と B-M-2 の計算において 7・9 月の DO 濃度が上昇し、高濃度酸素供給装置は DO 濃度の上昇に一定の効果があることが確認されたが、小ダムと比べてその効果は限定的であり、B-L-1 と B-L-2 の計算においても改善効果は限定的であった。本計算においてはすべての計算において同じ、酸素供給量を与えていたため、このような結果が生じたと考えられる。また、異高同時取水を適用させた計算において、底層から引き抜いた場合 (B-S-3、B-S-4、B-M-3、B-M-4、B-L-3、B-L-4) はすべての貯水池規模、運用期間で DO 濃度が回復したが、B-M-5 や B-L-5 などの引き抜き位置が高い場合は DO 濃度が増加する傾向が見られなかった。これらの結果から底層の引き抜きによる DO 濃度回復は底面に近い層からの取水を行わないと、効果が得られないことが示唆された。

4. 2 富栄養化に対する適応策の効果

底層貧酸素化に対する適応策を導入した計算結果 (C-S-1~C-S-6、C-M-1~C-M-6、C-L-1~C-L-6) を図 17 にしめす。適応策を導入したすべての計算ケースで

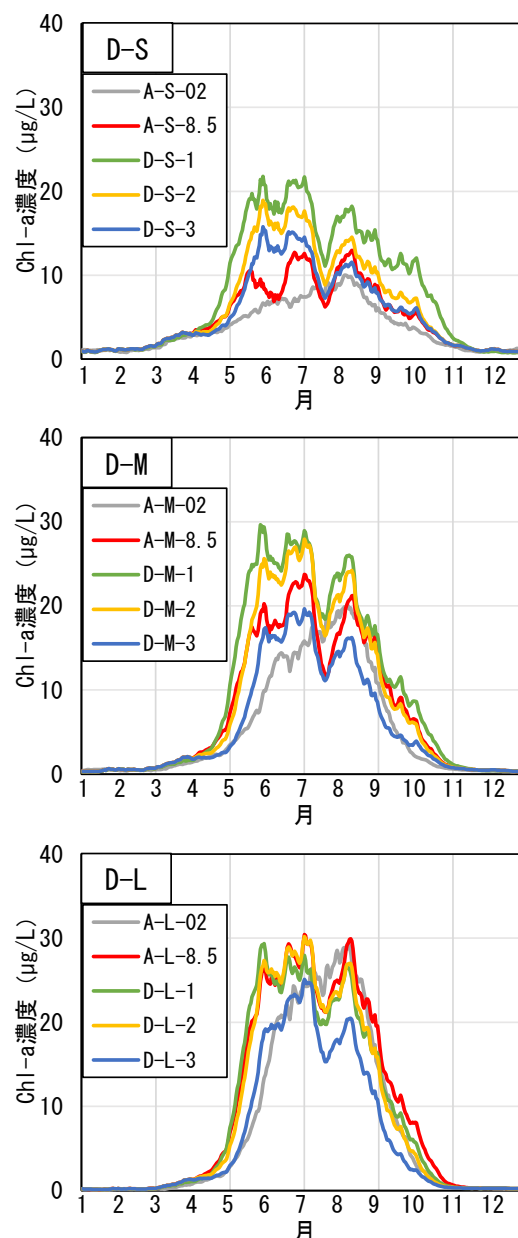


図 19 選択取水導入時の表層 Chl-a 濃度の 20 年間平均値の年間推移

表層 Chl-a 濃度の減少傾向が確認され、適応策としての有効性が確認された。一方で適応策を導入しても、5 月の表層 Chl-a 濃度が現在気候の計算結果以下となるケースは存在せず、5・6 月の表層 Chl-a 濃度上昇傾向を十分に低下させることが難しいと考えられた。また、夏季集中運転については運転を開始した 7 月頃から半年運転と同程度まで濃度を低下させることが確認されたが、将来気候下においては 5・6 月に高濃度化する傾向が見られたため、この運転方法は気候変動に対する適応策の運用としては合理的でないと考えられた。対して、早期集中運転は 6 月の表層 Chl-a 濃度を現在気候と同程度まで下げることができ、半年運転よ

りも運用コストが少なく合理的な運転と考えられた。また、中ダムおよび大ダムの曝気循環施設を吐出水深 15 m、20 m、25 m で設定した計算ケースの 20 年間における 5/1 から 9/30 までを対象とした表層 Chl-a 濃度の箱ひげ図を図 18 に示す。吐出水深の増加により平均値と中央値ともにすべての計算ケースで低下する傾向が見られ、表層 Chl-a 濃度の低減効果が増加することが確認された。特に、中ダムにおいては C-M-10 の計算ケースで Chl-a 濃度の最大値 30.1 $\mu\text{g/L}$ が A-M-8.5 (曝気循環施設なし) の最大値 42.4 $\mu\text{g/L}$ と比較して 12.3 $\mu\text{g/L}$ 低下しており、鉛直攪拌作用が貯水池で十分働くことにより、表層 Chl-a 濃度の顕著な低減効果が得られると考えられた。一方で、大ダムにおいては中ダムと同様に表層 Chl-a 濃度の低減効果の増加が確認されたが、C-L-10 の計算ケースにおいても最大濃度は 39 $\mu\text{g/L}$ であり、中ダムほどの改善効果は得られなかった。

4. 3 温水放流に対する適応策及び適応策を組み合わせた場合の効果

選択取水を導入した計算 (D-S-1~D-S-3、D-M-1~D-M-3、D-L-1~D-L-3) の表層 Chl-a 濃度を図 19 にしめす。流入水温=放流水温となるような運用をしているため、温水放流は改善されるが、選択取水の導入により表層放流の計算ケースよりも Chl-a 濃度が高くなるのが明らかとなり、それらの傾向は規模の小さいダムの方が大きかった。また、選択取水と曝気循環施設を同時に運用した場合、中ダムや大ダムにおいては曝気循環施設を十分に活用することで、選択取水による Chl-a 濃度の増加傾向を低減させることが示された。

4. 4 濁水長期化に対する適応策の効果

2.4.4 で挙げた対策を実施した計算における放流水の SS 濃度別年平均放流日数 (20 年間の年平均値) を図 20 及び図 21 に示す。図 20 は、コンジットゲートが表層、図 21 はコンジットゲートが下層に位置している場合の結果であり、両図ともに流入 SS 濃度が 25 mg/l を超過している日については除外して整理している。図 20 及び図 21 を比較すると、どの対策を実施した場合においても、図 20 に示したコンジットゲートが表層に位置する場合よりも、図 21 に示したコンジットゲートが下層に位置する場合の方が値は小さくなった。これは既に述べた通り、コンジットゲートが下層に設置されている場合のほうが洪水時に効率的に濁質を排出できるからと考えられる。また、フェンスや選択取水については、無対策の場合と比較してそれ

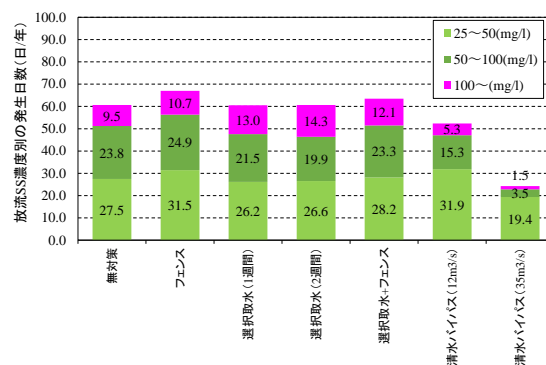


図 20 コンジットゲートが表層に位置する場合の放流水における SS 濃度別年平均放流日数 (20 年間の年平均値)

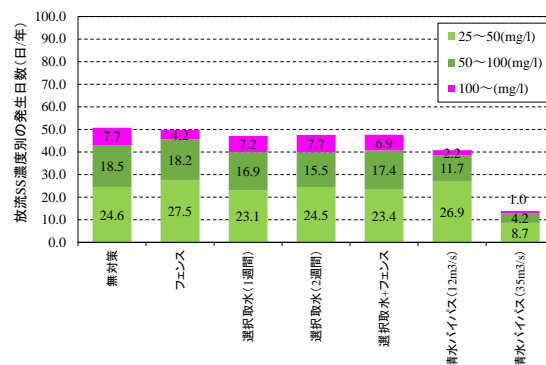


図 21 コンジットゲートが下層に位置する場合の放流水における SS 濃度別年平均放流日数 (20 年間の年平均値)

ほど大きな効果は得られなかった。その理由としては、フェンスは上層に侵入した濁質を下層に誘導する効果を有するが、下層に侵入してきた濁質に対しては効果が出にくいためである。また選択取水についても無対策と比較して大きな改善は見られない。その理由として、洪水時の高濃度の濁質は貯水池の下層に入り込むため、コンジットゲートからの排水が主体的となり、水面から 5 m の深さにおける選択取水では十分に高濃度の濁質を排出できないためと考えられる。また、選択取水とフェンスを合わせた対策についても大きな効果は得られなかった。その一方で清水バイパス (放流量 35 m³/s) は、その他の対策と比較して効果が大きく、コンジットゲートの位置について表層、下層を問わずに効果が得られている。なお、コンジットゲートが下層に位置している場合の方が、表層に位置している場合と比較して放流水の SS 濃度は低くなっている。今回の計算では出水時に清水バイパスの運用は行わず、

平水時のみの運用としている。濁質の大部分は出水時に貯水池に流入し、その一部がコンジットゲートを主として排出され、出水時に排出されなかった濁質が貯水池に残り、その後利水放流によって下流に排出される。清水バイパスにおいては、貯水池に流入する前の SS 濃度の低い流量の一部をダムを迂回してダム下流に放流するものであり、ダム下流において利水放流による SS 濃度の高い放流水と混合することで SS 濃度の低い放流水となる。この効果は出水時を除いた平常時において常時得られる効果であるため、図 20、図 21 に示したように他の対策と比較して高い結果が得られた。一方で、利水放流量が減少するため、従属発電を伴うダムにおいて減電となりうることに留意が必要である。また、他対策と比較して対策費用が高くなる傾向があることも課題である。

5. まとめ

本研究において得られた結論を以下にまとめる。

- 1) 現在気候 HPA_m02 及び将来気候 RCP_4.5、RCP_6.0、RCP_8.5 の 4 つの気候シナリオから流入量を分布型流出モデルにより計算した結果、4・5 月の流入量は気温上昇が大きいシナリオ程小さくなり、融雪量の減少が春季の流入量を低下させていると考えられた。また、7・8 月の流入量については気温上昇が大きいシナリオ程大きくなり、夏季の短期的な降雨量の増加が流入量の変化をもたらしていると考えられた。
- 2) 将来の気象データおよび計算した流入量データを用いて仮想貯水池の水質計算を行った結果、底層 DO 濃度については RCP_4.5 及び RCP_8.5 の条件で濃度が低下する傾向が見られ、底層貧酸素化が深刻化する可能性が示唆された。表層 Chl-a 濃度については将来気候の条件すべてにおいて 5・6 月の Chl-a 濃度の上昇傾向が確認され、高濃度の植物プランクトンが発生する時期が早期化することが考えられた。温水放流については小ダムや中ダムでは将来気候の条件で温水放流日数が増加することが示唆されたが、大ダムにおいてはそれらの影響は限定的であると考えられた。濁水長期化については将来気候の条件すべてにおいて流入 SS 濃度の増加が確認され、放流水の SS 濃度 25 mg/l を超過する日数が RCP_6.0 及び RCP_8.5 の条件で増加することが示され、濁水長期化が深刻化することが示唆された。

- 3) 各種の水質障害に対する適応策を導入した仮想貯水池の水質計算を行った結果、底層貧酸素化の対策として高濃度酸素供給装置及び異高同時取水は一定程度の効果があることが確認された。富栄養化の対策として曝気循環施設は台数を増加すれば効果が增加することが確認されたが、5 月の Chl-a 濃度増加傾向を十分に低下させることは難しいと考えられた。温水放流の対策として選択取水は流入水温＝放流水温となる取水を行えば、温水放流を十分に緩和できるが、表層水の滞留時間の増加により富栄養化を促進してしまうことが考えられた。選択取水と曝気循環施設を併用した計算では、選択取水による Chl-a 濃度の増加傾向を、小ダムや中ダムにおいては十分に低減可能なことが示唆された。濁水長期化の対策として清水バイパスが最も有効な効果が得られる手法であることが示唆された。

上記の気候変動による影響の把握及び適応策の効果の検討により、将来気候下で発生しうる水質変化への対応方針が見いだされた。今後は気候変動を見据えたダム貯水池の運用方法の変更等も踏まえた水質影響を検討していく予定である。

付録

本研究で行ったモデル計算の妥当性を検証するため、HPA_m02 の気象条件による小ダムの計算結果と御所ダムにおける 1984～2004 年の実測値の比較から検討した。HPA_m02 の気象条件は 1984～2004 年の過去の気象を再現した計算結果ではないため、流出計算及び水質計算は過去の現象の再現とはなっていないが、モデル化による各計算結果の絶対値や季節変動の妥当性の検証においては十分な比較と考えられる。

WEP モデルを用いた現在気候 (HPA_m02) 条件下での 10 日間平均流入量の計算結果と御所ダムにおける 1984～2004 年の実測値の比較を図 22 に示す。10 日間平均流入量は 1・3 月の流入量を計算では過大評価、5 月の流入量を過小評価する傾向が見られた。これらは降雪・融雪による流出過程のモデル化が不十分であったため、過大及び過小評価していると考えられる。一方で、流入量の絶対値及び年間の変動傾向を計算ではおおむね表現できていた。これらの比較から、気象条件の変化に基づく流出量の変化を検討するうえでは流出過程は十分な妥当性が得られていると考えられた。

鉛直 2 次元モデルを用いた表層水温及び底層水温の

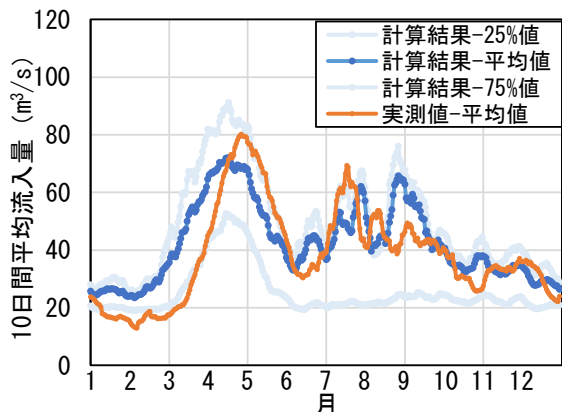


図 22 御所ダムにおける流入量の 1984-2004 年における実測値と現在気候条件における小ダムの計算結果の 20 年平均値の比較

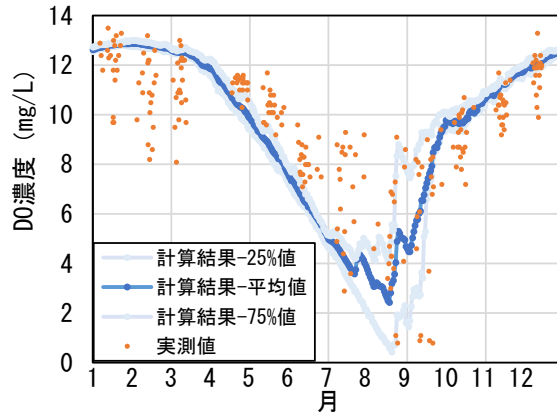


図 24 御所ダムにおける底層 DO 濃度の実測値と現在気候条件における計算結果の比較

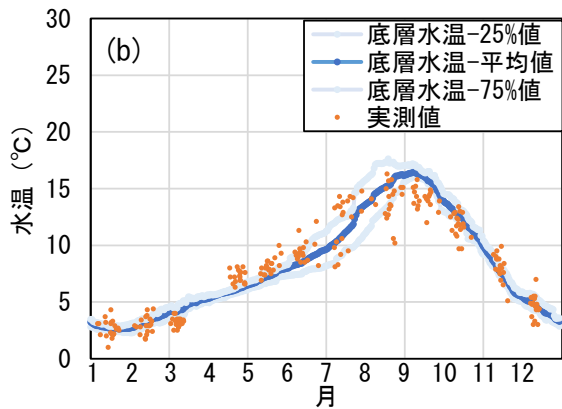
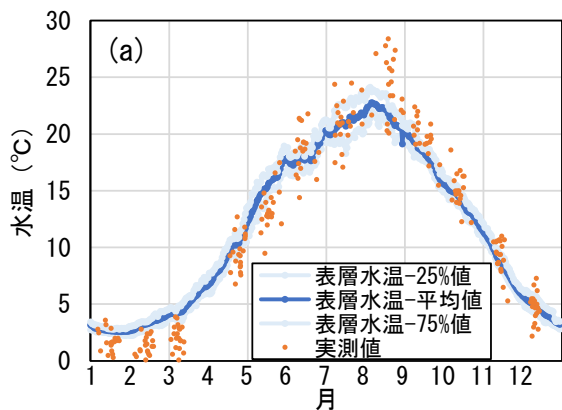


図 23 御所ダムにおける水温の実測値と現在気候条件における小ダムの計算結果の比較 (a: 表層水温、b: 底層水温)

計算結果と御所ダムにおける 1984-2004 年の実測値の比較を図 23 に示す。表層水温は 1-3 月においてやや過大評価している傾向が見られたが、年間の変動傾向を表現することができていた。また、底層水温についても 9 月付近をやや過大評価していたが、年間の変

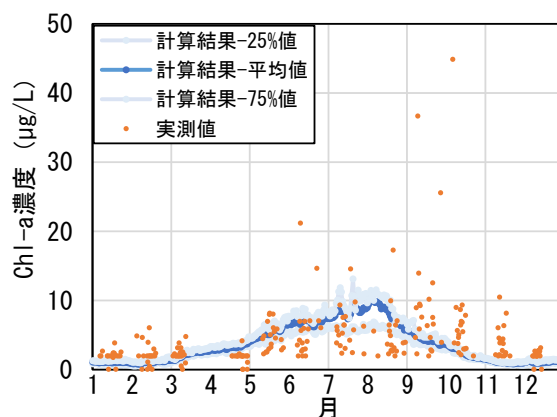


図 25 御所ダムにおける表層 chl-a の実測値と現在気候条件における計算結果の比較

動傾向を表現することができていた。これらの比較から、貯水池の鉛直的な分布については一定の妥当性が得られていると考えられた。

鉛直 2 次元モデルを用いた底層 DO 濃度の計算結果と御所ダムにおける 1984-2004 年の実測値の比較を図 24 に示す。底層 DO 濃度は年間の変動傾向を表現することができていたが、計算値の 25-75% から外れる実測値が多かった。御所ダムの実測値は濃度変動幅が大きく、モデル計算は各種の現象を単純化して計算を行っているため、このような変動幅の違いが存在していると考えられる。一方で、4-7 月の水温躍層の形成に伴う DO 濃度の低下や、8 月付近の出水時の攪拌による DO 濃度の回復、9-12 月の全層循環による DO 濃度の回復など、ダム貯水池の DO 濃度変化の重要な要素は表現されていると考えられた。これらの比較から、気候変動による影響の把握を行う上では一定の妥当性を有していると考えられた。

鉛直 2 次元モデルを用いた表層 Chl-a 濃度の計算結

果と御所ダムにおける 1984~2004 年の実測値の比較を図 25 に示す。御所ダムの表層 Chl-a 濃度の実測値は 20 $\mu\text{g/L}$ を超える外れ値が数点存在したがほとんどが 20 $\mu\text{g/L}$ 以下の濃度であり、小ダムの計算における表層 Chl-a 濃度については実現象と概ね同程度のオーダーの範囲であった。本計算における生態系モデルは各種のパラメーターについて文献値を参考に一般的と考えられる値を設定しており、実現象を再現するものでないが、濃度のオーダーが実測値と同程度であることでモデルの妥当性が示されたと考えられる。また、冬季に低濃度及び夏季に高濃度を示す一般的な藍藻類の年間の変動傾向は十分に表現できている計算結果であると考えられた。

参考文献

- 1) IPCC AR6 WGI: AR6 Climate Change 2021 The Physical Science Basis, https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC_AR6_WGI_Full_Report.pdf, 2021
- 2) 文部科学省、気象庁：IPCC 第 6 次評価報告書第 1 作業部会報告書 政策決定者向け要約 暫定訳、https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/ipcc/ar6/IPCC_AR6_WG1_SPM_JP_20210901.pdf, 2021
- 3) 環境省：気候変動への適応、<http://www.env.go.jp/earth/tekiou.html>, 2022 年 3 月閲覧
- 4) 国土交通省：国土交通省気候変動適応計画、<https://www.mlit.go.jp/common/0011111532.pdf>, 2015
- 5) 川崎将生、西村宗倫：気候変動によるダム貯水池の水質への影響に関する研究、国土技術政策総合研究所資料、第 856 号、2015
- 6) Eiji Komatsu, Takehiko Fukushima and Hideo Harasawa: A modeling approach to forecast the effect of long-term climate change on lake water quality, *Ecological Modeling*, Vol.209, pp.351-366, 2007
- 7) 梅田信、落合雄太：気候変動による国内のダム湖水質への影響評価、土木学会論文集 G (環境)、Vol.68, No.5, pp.127-135, 2012
- 8) 崔貞圭、矢島啓、谷口健司、馬籠純：気候変動による国内のダム湖水質への影響評価、土木学会論文集 B1 (水工学)、Vol.70, No.4, pp.1633-1638, 2014
- 9) 山敷庸亮、寶馨、中北英一、加藤真人：琵琶湖統合水質モデルを用いた気候変動影響評価に関する研究、京都大学防災研究所年報、No.53 B, pp.123-127, 2010
- 10) Raoul-Marie Couture, Jannicke Moe, Yan Lin, Øyvind Kaste, Sigrid Haande and Anne Lyche Solheim: Simulating water quality and ecological status of Lake Vansjø, Norway, under land-use and climate change by linking process-oriented models with a Bayesian network, *Science of the Total Environment*, Vol.621, pp.713-724, 2018
- 11) 国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課：ダム貯水池水質改善の手引き、2018
- 12) 佐々木秀孝、村田昭彦、川瀬宏明、花房瑞樹、野坂真也、大泉三津夫、水田亮、青柳曉典、志藤文武、石原幸司：気象研究所非静力学地域気候モデルによる日本付近の将来気候変化予測について、気象研究所技術報告、第 73 号、pp.63-74, 2015
- 13) 末次忠司、河原能久、賈仰文、倪广恒：都市河川流域における水・熱循環の統合解析モデルの開発、土木研究所資料、3713 号、2000
- 14) 鈴木伴征、石川忠晴、銭新、工藤健太郎、大作和弘：利根川河口堰下流部における貧酸素水塊の発生と流動、水環境学会誌、Vol.23, No.10, pp.624-637, 2000
- 15) 山下洋正、對馬育夫、服部啓太、石神孝之、宮川仁、中西哲：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）、土木研究所 令和元年度 研究開発プログラム報告書、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に関する研究、pp.33-38, 2020
- 16) 中田喜三郎：生態系モデル・定式化と未知のパラメータの推定法、海洋工学コンファレンス論文集 1993、Vol. 8, pp. 99-138, 1993
- 17) 土木研究所 HP: 研究成果・技術情報 WEP システム、https://www.pwri.go.jp/jpn/results/tec-info/kielkiyoukai_r/index.html#01, 2022 年 12 月閲覧
- 18) Takashi Asaeda and Jörg Imberger: Structure of bubble plumes in linearly stratified environments, *Journal of Fluid Mechanics*, Vol.249, pp.35-57, 1993
- 19) 関根秀明、吉田延雄、梅田信、浅枝隆：曝気式循環施設の理論とその効果に関する考え方、ダム工学、Vol.13 (1), pp.5-18, 2003
- 20) 梅田信：曝気循環を考慮した貯水池内流動に関する数値解析 モデルの構築と検証、水工学論文集、Vol.49, pp.1165-1170, 2005
- 21) 工藤啓介：地球温暖化に伴う気候変動が積雪寒冷地の

水環境に及ぼす影響の定量評価手法の研究、室蘭工業
大学、博甲第 441 号、2019

13.3.3 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（異高同時取水を用いた放流水温調整の有効性の検討）

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、猪股広典、櫻井寿之、
宮川仁、中西哲

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、小川文章、南山瑞彦、
平山孝浩、對馬育夫、服部啓太、
金子陽輔

【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、気候変動影響下において貯水池の水温が上昇した際に、放流水温を下げるための方策の一つとして考えられる異高同時取水の取水特性について検討した。具体的には、多孔式取水ゲートを有するダムを対象として、貯水池上方及び下方の取水孔から同時に取水した際の、それぞれの取水孔からの取水率について水理実験及び数値計算により検討した。ここでは、下方取水孔からの取水量を下げるための試みとして、下方取水孔のゲートを半開とした場合の取水率についても検討した。結果として、取水塔内の流速が小さいほど下方取水孔からの取水率が大きくなることや、下方取水孔のゲートを半開とすることで下方取水孔からの取水率を抑えることが可能であること等が確認された。得られた結果は、実ダムにおける異高同時取水の導入検討において、異高同時取水を実施した場合の放流水温の概算等に用いられることが期待される。

キーワード：地球温暖化、湖沼・ダム貯水池、異高同時取水、取水率

1. はじめに

地球温暖化により、貯水池等の停滞性水域の水温が上昇することが懸念されている。例えば、琵琶湖では表層の水温が 1.1～1.3℃程度上昇することが予測されており、これに伴って全循環不全やその影響による下層の溶存酸素濃度の低下等が予測されている¹⁾。その他にも貯水池水温の上昇に伴って下流への放流水温が上昇し、魚類等へ影響を及ぼすことが懸念される。この問題に対し、ダム運用による改善余地について検討することが必要である。対策案の一つとして、近年「異高同時取水」が提案されている。異高同時取水は、異なる高さに存在する水温の異なる水を同時に取水することで、表層からのみ取水する場合と比較して放流水温を抑えることを図るものである。放流水温の抑制に加え、水温の低い下層の水を取水することにより全循環の促進や底層貧酸素化の回避が期待される。

異高同時取水については、これまで多段のサイフォンが備わっている連続サイフォン形式を対象とした水理特性について検討が行われている²⁾³⁾⁴⁾。連続サイフォン形式は取水口が高さ方向に多く存在するため、

きめ細かく放流水温を制御することが期待できる。しかし、連続サイフォン形式は国直轄管理ダムの一部において採用されている形式であり、県管理ダムに多く採用されている多孔式取水方式は、複数の取水口があるものの取水口の位置が固定されているため、連続サイフォン形式と比較するときめ細かく放流水温を設定することは難しいと考えられる。さらに、多重式ゲートを対象とした既往研究では、複数の開口部が存在する場合、密度の違いに起因して下方の開口部からの取水が上方からの取水と比較して多くなることが報告されている⁵⁾。

以上の背景を踏まえ、県管理のダムにおいて多く採用されている多孔式取水を対象とした異高同時取水の水理特性について検討する。具体的には、異高同時取水を行ったときの、下方の開口部と上方の開口部からの取水比率に関する水理実験及び数値計算を行った。さらに、上述した通り多項式取水形式は連続サイフォン形式と比較して、高さ方向に多くの開口部を有していない。そのため、数少ない開口部で温度調整を行う必要が出てくる。その場合、既往研究に従えば下

方開口部から多くの水が取水されることが想定される。これを防ぐための案として、下方開口部の開度を調節した場合の取水率についても検討を行った。本報告は下記の手順で一連の検討を実施した。

- ① 異高同時取水に関する水理実験
- ② 数値計算モデルの構築
- ③ 数値計算モデルを用いた取水率の計算

2. 水理実験

2.1 水理実験の概要・模型

異高同時取水では、温度が異なる水を扱うものであり、言い換えると密度の異なる水を扱うものである。そのため、水理実験は密度の違いを扱う実験となる。実験の目的は、異なる高さから水を取水する際に、下方開口部からと上方開口部からの取水比率を求めることである。この目的に沿った実験を実施しようと考えた場合、1つの水槽において高さ方向に温度の異なる水を配置して異なる高さから取水することが考えられるが、その場合密度の異なる水がすぐに混合して鉛直方向の温度分布を維持できず定常状態とみなすことができなくなることが予想される。そこで本研究では、温度の異なる水槽を別々に用意し、取水塔に見立てた水槽に異なる高さから給水することで定常状態の確保を試みた。図1が本研究において製作した異高同時取水の模型であり、以下概要を述べる。

- 高水温の水が貯水されている水槽1と、水槽1と比較して低水温の水が貯水されている水槽2を配置する。水槽1と水槽2の間に取水塔に見立てた水槽3を配置する。水槽1は管路1を経由して水槽3の高い位置で接続し、水槽2は管路2を経由して水槽3の低い位置で接続する。
- 管路1、管路2及び管路3には超音波式流量計を配置し、流量を測定する。
- 水槽3の出口には、流量を制御できるバルブを設置する。水槽3のバルブを開けて放流することにより水槽1及び水槽2から管路1及び管路2を経由して水槽3への流れが発生する。
- タンク1及びタンク2から水槽1及び水槽2に対して、管路1及び管路2の流量よりも大きい流量で給水を行う。水槽1及び水槽2には余水吐きが設置されており、余水吐きから水がこぼれることにより水槽1と水槽2の水位を一定に保つ。このことと管路3からの放流を一定とすることで、水槽1及び水槽2から水槽3への流れを定常状態とみなすことができる。

- 水槽1、水槽2、水槽3、管路3、タンク1及びタンク2に温度計（熱電対）を設置（水槽3のみ高さ方向に3つ、他は1つずつ）し、各水温を測定する。

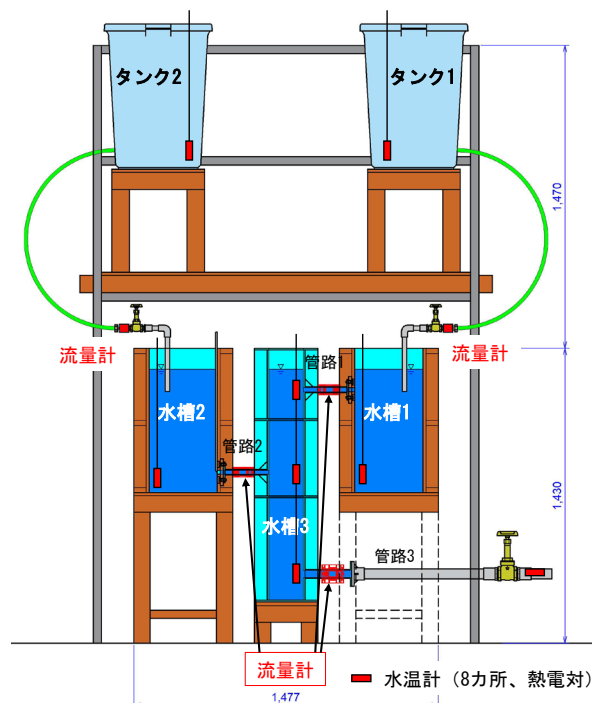


図1 異高同時取水の水理模型

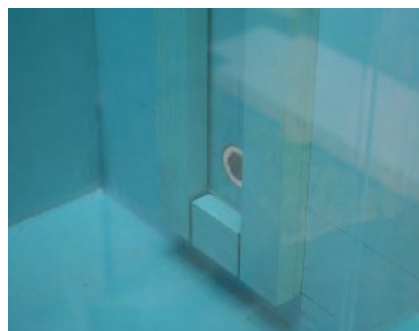


図2 全開



図3 半開

- 水槽 2 と管路 2 の接続部（以下、ゲート 2）は、全開設定（図 2）に加え流量を調整することを目的として半開設定（図 3）を可能とする。

2.2 実験方法

水槽 1、水槽 2、水槽 3 の水温を変化させて異高同時取水の実験を実施した。表 1 が実施した実験ケースの一覧である。水温調整はヒーターを使って行った。表 1 は初期条件として設定したものであるが、実際には外気温等の影響を受けたため、表 1 に示す設定値から±1℃程度の離れた状態から実験を開始した。

また、管路 3 からの放流量は 5.0 L/min とするよう調整し、管路 1 及び管路 2 の流量や水温が安定した時の流量及び水槽 3 の水温や管路 3 からの放流水温の値を取得した。得られた管路 2 の流量値から、水槽 2 からの取水率を（管路 2 の流量値 / 放流量 (=5.0 L/min)）として計算した。また、管路 3 に設置されている水温計により放流水温を計測した。

2.3 実験結果

図 4 は実験結果である。ゲート 2 を全開とした場合、いずれのケース（1-1, 1-2, 1-3, 1-4）においても水槽 2 からの取水率が 50%を超えた。これは、多重式ゲートや連続サイフォンを対象として行われた既往研究²³⁾⁴⁾⁵⁾と同様の結果である。また、水槽 2 と水槽 1 の水温差が小さいケース（1-3）と比較して、例えば 1-4 のように水温差が大きいほど下方からの取水率が高くなる結果が得られた。また、同じ水温設定でゲート 2 の開度が異なる条件同士（1-1 と 2-1、1-2 と 2-2、1-3 と 2-3、1-4 と 2-4）で比較した場合、半開とすることで全開の場合と比較して下方である管路 2 からの取水率を 7%程度低減できることが確認された。

3. 数値計算

3.1 モデル構築

次に、前節で述べた水理実験について数値計算モデルを構築して再現計算を行った。解析には、流体解析ソフト PHOENICS を用いた。図 5 は PHOENICS で図 1 の水理模型をモデル化したものである。寸法は 2.3 で実施した水理実験模型と同じとした。また、実験と同様に管路 3 から 5 L/min の放流を行う境界条件とすることで、水槽 1 及び水槽 2 から水槽 3 に水が流入する構造とした。表 1 に示した計 8 ケースについて計算を行い、水槽 2 からの取水率及び管路 3 からの放流水温の計算結果を実験値と比較して精度検証した。

表 1 実施実験ケース

ケース	ゲート	水槽 1 の水温 (°C)	水槽 2 の水温 (°C)	水槽 3 の水温 (°C)
1-1	全開	25.0	10.0	18.0
1-2		30.0	15.0	23.0
1-3		25.0	20.0	23.0
1-4		35.0	20.0	28.0
2-1	半開	25.0	10.0	18.0
2-2		30.0	15.0	23.0
2-3		25.0	20.0	23.0
2-4		35.0	20.0	28.0

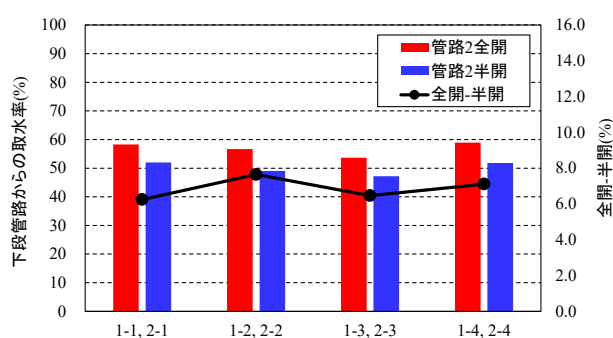


図 4 実験結果

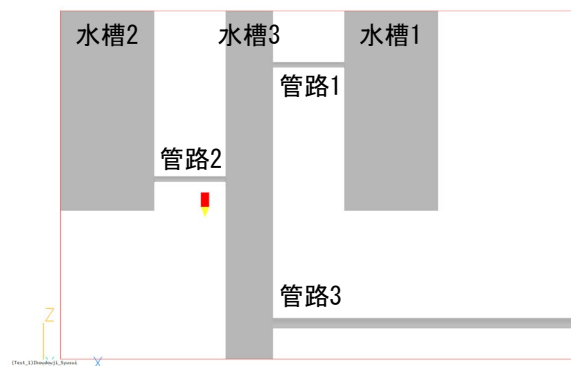


図 5 数値計算ソフト上で構築した水理模型

3.2 計算・検証結果

図 6 は、ケース 1-1 について実施した計算結果に関する水温と流速ベクトルの分布図である。水槽 1 から流入する温かい水と水槽 2 から流入する冷たい水が管路 2 周辺で混合することで、水槽 3 の下部において水温分布が一樣となり、その水が管路 3 から放流されていることが確認できる。以上から、定性的な傾向として水理実験結果との矛盾がないことは最初に確認できる。

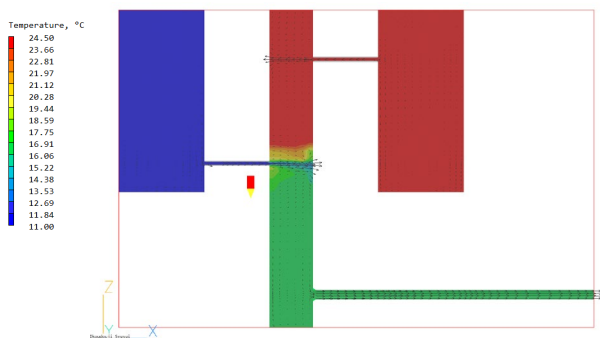


図6 水温分布・流速ベクトル分布の計算結果事例 (ケース 1-1)

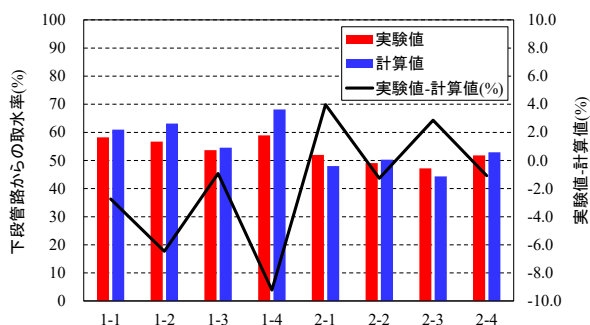


図7 下段からの取水率に関する実験値と計算値の比較

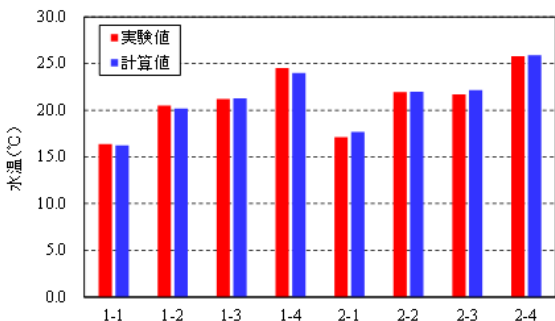


図8 放流水水温に関する水理実験と数値計算結果の比較

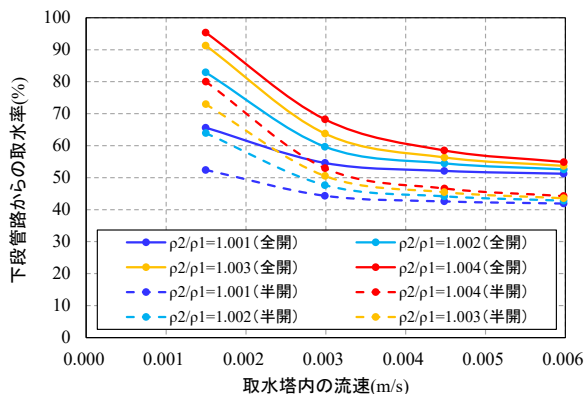


図9 異高同時取水計算結果

次に計算結果と実験値の比較について述べる。図7は水槽2からの取水率に関する実験値と計算値の比較である。全ての計算ケースについて計算結果と実験値は概ね整合しており誤差は最大で-10%、概ね±5%程度に収まっている。また、図8は管路3からの放流水温に関する実験と数値計算の結果の比較である。全ての計算ケースについて誤差は±0.5°C程度に収まっており、両者は概ね一致していると言える。以上の点から、構築した数値計算モデルは水理模型実験の結果を適切に再現できていると考えられる。

4. 数値計算モデルを用いた取水率の計算

3.において構築した数値計算モデルを利用し、水温、ゲート2の開度、流量を変化させた数値計算を実施した。ここでは、水槽1と水槽2の水の密度比を4通り(1.001, 1.002, 1.003, 1.004)、放流量を4通り(2.5, 5.0, 7.5, 10.0 L/min)、ゲート2の開度を2通り(全開、半開)の合計32通りの計算を実施した。

実施した計算結果について、水槽2からの取水率と水槽3内(管路2と管路3の中間箇所)の流速の関係を表示したものが図8となる。図9において、水槽2からの取水率は「下段管路からの取水率」、水槽3内の流速は「取水塔内の流速」と表記されている。実線はゲート2全開、鎖線は半開の計算結果を示し、色の違いは密度比の違いを示している。図9より、以下のことが分かる。

- 取水塔内の流速が小さく、かつ密度比が大きい場合、下段からの取水率が100%近くになる場合が存在する。ただし、その場合にゲート2を半開とすることで取水率を80%程度まで低減可能である。
- 流速が大きくなるにつれて、密度比による取水率の差が縮まる。流速0.006 m/sのところでは、取水率はどの密度比においても概ね50%~55%程度に収束することが分かる。また、密度比による取水率の違いは数%程度である。これらの値がゲート2を半開とすることでおよそ40%~45%程度の値となり、全開の場合と比較して10%程度下げることが分かる。
- 取水塔内の流速が大きくなるにつれて、ゲート2全開・半開ともに値が概ね収束し、流速0.006 m/sにおいては全開の場合約50%、半開の場合約40%であることが分かる。これ以上の流速の場合でもこの取水率からは大きく下らないことが推測される。

5. まとめ

多孔式取水方式を対象とした異高同時取水の取水特性について、水理実験及び数値計算により検討した。その結果、以下の結論を得た。

- 上層と下層のゲート開度を同開度とする場合、下層からの取水量が上層からの取水量を上回ることが確認された。
- 取水塔内の流速が小さく、かつ上層と下層の水温に応じた密度比が大きくなるにつれて、下層からの取水率が高くなることが確認された。その逆に、取水塔内の流速が大きくなるにつれて下層からの取水率は小さくなることを確認された。
- 下層のゲートを半開とすることにより、下層からの取水量を制限し、上層からの取水率を高くできることが確認された。上層と下層の取水率の差は、密度比や取水塔内の流速によって異なり、一定以上の流速となると密度比によらず取水率の差は概ね収束すると推察された。

このように多孔式取水形式における異高同時取水の取水率について検討し、その実施可能性を示した。今回の水理実験や数値計算は上述した取水特性の把握を目的として実施したものであり、異高同時取水を実施することで放流水を所定の水温に制御できるのかについては検討していない。今後は今回得られた取水率の結果を用いて、所定の放流水温への制御実施可能性について、水理実験、数値計算、実ダム貯水池を対象とした検討を通じて確認する必要がある。さらに、取水率を考慮した異高同時取水により、貯水池内の全

循環の促進や水質改善にどの程度の効果が得られるのかを定量的に検討することが望まれる。

また、貯水池水質シミュレーション結果から得られる鉛直方向の温度分布の結果と図9の結果を用いることで下流への放流水温を概ね推定することが可能となるため、実ダムにおける異高同時取水の導入検討において貢献することが期待される。

本検討ではゲート構造については検討対象外としており、異高同時取水の実施に向けてはゲート構造に関する検討が別途求められることに留意が必要である。

参考文献

- 1) 文部科学省、気象庁、環境省：日本の気候変動とその影響（2012年度版）、
http://www.env.go.jp/earth/ondanka/rep130412/report_full.pdf, 2013
- 2) 鈴木伴征、矢島啓、泉谷隆志：殿ダムの異高同時取水に関する数値解析的検討、土木学会論文集 B1(水工学)、Vol.74, No.5, I_523-I_528, 2018
- 3) 泉谷隆志、矢島啓、鈴木伴征：ダム貯水池の異高同時選択取水による取水特性の検討、土木学会論文集 B1(水工学)、Vol.72, No.4, I_685-I_690, 2016
- 4) 矢島啓、吉川栄：異高同時選択取水によるダム貯水池の水質保全効果に関する研究、水工学論文集、第49巻、pp.1135-1140, 2005
- 5) 柏井条介、野仲典理：多重式ゲートの選択取水特性、ダム技術、No. 135, pp.11-16, 1997