

# 下水処理水に残存するアンモニア性窒素の低減技術と水生生物の影響評価に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：令和元～令和3

担当チーム：流域水環境研究グループ（水質）

研究担当者：山下洋正、北村友一、對馬育夫、

村田里美、服部啓太、厚朴大祐

## 【要旨】

本研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中アンモニア性窒素について、微生物保持担体とアンモニアセンサーを用いて、異なる担体流動性保持方法におけるアンモニア性窒素処理性能を比較し、効率的な低減方法を検討した。その結果、担体流動性保持を機械攪拌で行うことにより、効率的にアンモニア性窒素を低減できた。また日本河川に優占する淡水性付着藻類（緑藻、珪藻、藍藻）7種を選抜し、種感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）解析を用いてアンモニア性窒素の影響評価を行った。その結果、*S. aestivale*と*N. pelliculos*は低濃度アンモニア性窒素を栄養塩として利用し、プラスの影響を受けることを明らかにした。また高濃度アンモニア性窒素存在下での影響試験を基にSSD解析を行った結果、HC5は7.6 NH<sub>4</sub>-N mg/Lであることが明らかになった。結合性塩素であるモノクロラミンの影響評価についてSSD解析を用いて行ったところ、HC5は0.01 mgCl<sub>2</sub>/Lであることを明らかにした。下水処理水が魚類に与える影響を把握するための評価手法として、動画解析を用いた影響評価について基礎的な検討を行い、基本的な定量化手法を構築した。検討の結果、下水処理水に連続暴露したヒメダカと脱塩素水道水（Control）に連続暴露したヒメダカの行動の傾向の違いが確認されたが、添加したNH<sub>4</sub>-Nの影響を含め、生物影響を表しているかの判断は難しかった。

キーワード：アンモニア性窒素、クロラミン、微生物保持担体、付着藻類、画像・動画解析

## 1. はじめに

下水中のアンモニア性窒素（以下、NH<sub>4</sub>-Nとする）は主に、し尿、生活排水、工場排水から流入する可能性がある<sup>1)</sup>。これまでの水質チームの研究により、小規模下水処理場の処理水中のNH<sub>4</sub>-N濃度が2 mg-N/Lを超える処理場は44%であることが明らかになっており<sup>1)</sup>、濃度の目標値が低く設定された場合は、多くの処理場で低減対策が必要となる可能性が考えられる。またアンモニアの水生生物への影響も報告されており<sup>2,3)</sup>、処理水が河川を経由し放流される場合には、NH<sub>4</sub>-Nが淡水性水生生物に及ぼす影響を把握することが重要である。一方、下水処理水の消毒に広く用いられている次亜塩素酸Naについては、処理水中に残存するNH<sub>4</sub>-Nと反応してクロラミンを生成する現象が知られている。そのため処理水の河川放流において、NH<sub>4</sub>-Nだけでなく、NH<sub>4</sub>-Nが残留する処理水に対する塩素消毒（クロラミン）が淡水性水生生物に及ぼす影響も把握することが重要である。本研究は下水処理水中のNH<sub>4</sub>-Nの除去と生物影響の観点から、以下の3つの観点で取りまとめた。

- ・ 小規模下水処理場への導入を想定した下水二次処

理水に残存するアンモニア性窒素の生物反応槽後担体硝化処理特性の把握（2章）

- ・ 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いたアンモニア性窒素の影響評価（3章）
- ・ 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いた結合塩素モノクロラミンの影響評価（4章）
- ・ 下水処理水に連続暴露したヒメダカの動画解析による生物影響評価手法の検討（5章）

## 2. 小規模下水処理場への導入を想定した下水二次処理水に残存するアンモニア性窒素の生物反応槽後担体硝化処理特性の把握

### 2.1 目的

1. で述べたとおり、アンモニアの水生生物影響が報告されており<sup>2,3)</sup>、下水処理水のNH<sub>4</sub>-N濃度の低減について今後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は、多くの下水処理場で低減対策が必要となる可能性がある。下水二次処理水に残存するNH<sub>4</sub>-Nの低減対策として、活性汚泥法の好気槽への微生物保持担体投入を試みる報告や実用化された報告は数多くあるが<sup>4,5,6,7,8,9)</sup>、生物反応槽後段にNH<sub>4</sub>-

Nを低減するための担体処理を追加する報告は数少ない<sup>10)</sup>。更に、後段に追加した担体処理装置に対して、下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N の負荷変動に応じた曝気量制御のために、NH<sub>4</sub>-N センサーを設置し、NH<sub>4</sub>-N センサーを用いた曝気量のフィードバック制御を行った例はない。本研究では、小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N の硝化について微生物保持担体と NH<sub>4</sub>-N センサーを用いて、異なる担体流動性保持方法における省エネ効果と水質改善効果を検討した。検討においては、昨年度の結果も含めて整理した。

## 2. 2 研究方法

### 2.2.1 実験装置の概要

本研究で用いた微生物保持担体処理実験装置の概要を図-1に示す。容量 60 L の反応槽を 2 つ連結し、各反応槽には微生物保持担体を投入した。本研究で使用した担体は、事前検討により<sup>11)</sup>、NH<sub>4</sub>-N 除去性が高く、担体流動性保持が容易なポリプロピレン製中空円筒状 (4 mm<sup>OD</sup>×3 mm<sup>ID</sup>×5 mm<sup>L</sup>) である。担体充填率は、事前検討により<sup>11)</sup>、高比率 35% に設定した。反応槽有効容積は 92% となった。微生物保持担体処理のための原水は、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 NH<sub>4</sub>-N を残留させたものを用いた。NH<sub>4</sub>-N 濃度のリアルタイムモニタリングと流入負荷変動に応じた曝気量制御のために、NH<sub>4</sub>-N センサーを下水二次処理水貯留槽および各担

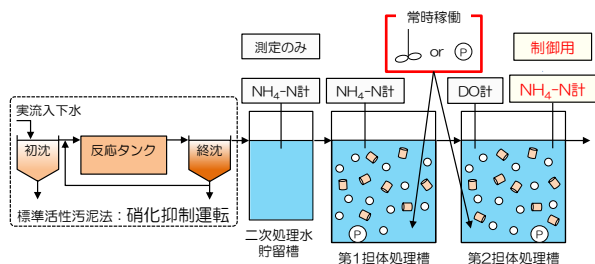


図-1 NH<sub>4</sub>-Nセンサーを用いた微生物保持担体処理実験のフロー

表-1 担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験における曝気量制御方法

第2担体処理槽NH <sub>4</sub> -N濃度	1槽目曝気量 (L/min)	2槽目曝気量 (L/min)
0.9 mg-N/L 未満	2.75	2.75
0.9 mg-N/L 以上	4.15	2.75
1.1 mg-N/L 以上	4.15	4.15
1.4 mg-N/L 以上	5.55	4.15
1.7 mg-N/L 以上	5.55	5.55

体処理槽に設置し、DO センサーを第 2 担体処理槽に設置した。本実験で使用した NH<sub>4</sub>-N センサーの定量

下限値は 0.1 mg-N/L であり、測定原理は液膜式イオン電極法である。本研究では、担体流動性保持を曝気攪拌および機械攪拌で行い、担体付着微生物量と菌叢の差異および NH<sub>4</sub>-N 処理性能を比較した。

### 2.2.2 NH<sub>4</sub>-N センサーの校正

各 NH<sub>4</sub>-N センサーの測定値に対して、イオンクロマトグラフの分析値を用いた校正を、実験期間中に週に 1 回程度行った。校正手順は次の通りである。NH<sub>4</sub>-N センサーの測定瞬時値をセンサーのコントローラー内に記録し、その後、速やかにセンサー設置箇所の採水を行った。採水試料はイオンクロマトグラフによる分析を行い、分析値によるセンサー測定値の校正を行った。NH<sub>4</sub>-N センサーの使用期間は、2019 年 10 月 9 日から 2021 年 1 月 13 日である。

### 2.2.3 NH<sub>4</sub>-N センサーを用いた曝気量制御方法

#### a) HRT の予備的検討実験

HRT (= 反応槽有効容積 / 流入水量) の違いが NH<sub>4</sub>-N の処理性に及ぼす影響を調べるための予備的検討実験を行った。HRT は 180 分および 120 分に設定し、曝気量制御は第 2 担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度が 1 mg-N/L を超過すると第 1 担体処理槽の曝気装置が稼働し、第 2 担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度が 2 mg-N/L を超過すると第 2 担体処理槽の曝気装置が稼働する方式とした。担体流動性保持のための曝気は、事前検討により<sup>11)</sup>、1 槽当たり送気倍率 4.5 倍で行った。本実験期間は HRT180 分および 120 分の実験それぞれで、2019 年 12 月 3 日から 2020 年 1 月 14 日および 2020 年 2 月 1 日から 2020 年 3 月 14 日である。

#### b) 担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験

本実験における NH<sub>4</sub>-N センサーを用いた曝気量制御方法を表-1に示す。曝気量制御は、担体流動性保持用に常時稼働の曝気装置とは別に、各担体処理槽に制御用曝気装置を 2 台設置し、第 2 担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度に応じて、曝気装置を台数制御した。第 2 担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度に応じた各担体処理槽の曝気装置の ON/OFF 制御値は、第 2 担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度を 1-2 mg-N/L で推移させることを目標として、曝気装置の性能・台数および第 2 担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N センサーの測定精度を考慮し、設定した。本実験期間は 2020 年 7 月 7 日から 2020 年 9 月 15 日である。

#### c) 担体流動性保持を機械攪拌で行った実験

本実験における NH<sub>4</sub>-N センサーを用いた曝気量制御方法を表-2に示す。担体流動性保持のための攪拌は、

表-2 担体流動性保持を機械攪拌で行った実験における曝気量制御方法

第2担体処理槽NH <sub>4</sub> -N濃度	1槽目曝気量 (L/min)	2槽目曝気量 (L/min)
0.8 mg-N/L 未満	0	0
0.8 mg-N/L 以上	1.85	0
1.0 mg-N/L 以上	3.70	0
1.2 mg-N/L 以上	5.55	0
1.3 mg-N/L 以上	5.55	1.85
1.5 mg-N/L 以上	5.55	3.70
1.7 mg-N/L 以上	5.55	5.55

1槽当たり回転数 80 rpm で行った。曝気量制御は、各担体処理槽に制御用曝気装置を3台設置し、第2担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度に応じて、曝気装置を台数制御した。担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験における曝気量制御では、第1担体処理槽の余剰 DO を有効に利用できていないことが示唆されたため、本実験における曝気量制御は、第2担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N 濃度に応じて、第1担体処理槽の曝気装置を段階的に全て稼働させた後に、第2担体処理槽の曝気装置を稼働する制御とした。本実験における各担体処理槽の曝気装置の ON/OFF 制御値は、担体流動性保持に曝気装置を用いた実験と同様の方法で設定した。本実験期間は2020年10月14日から2021年1月13日である。

#### 2.2.4 水質測定

下水二次処理水および各担体処理水に対して、水質測定のための採水を、実験期間中に週に1回程度行った。測定項目は、pH、TOC濃度、SS濃度およびアルカリ度であり、測定方法は下水試験方法<sup>12)</sup>に従った。

#### 2.2.5 担体付着微生物量の測定

各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。測定方法は次の通りである<sup>13)</sup>。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<sup>12)</sup>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。

#### 2.2.6 担体付着微生物の菌叢解析

各担体処理槽の担体付着微生物と活性汚泥処理実験装置反応槽末端の活性汚泥（対照系）について、16S rRNA 遺伝子配列に基づく菌叢解析を行った。各実験終了日である2020年9月15日と2021年1月13日に試料の採取を行った。測定方法は次の通りである<sup>14)</sup>。各担体処理槽から採取した担体は液体窒素で凍結させ、粉碎したのち DNA を抽出した。活性汚泥については、10倍濃縮したのち 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 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・古細菌種の同定および統計解析は 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。

### 2.3 結果と考察

#### 2.3.1 NH<sub>4</sub>-N センサーの測定精度確認

本実験で使用した NH<sub>4</sub>-N センサー測定値とイオンクロマトグラフの分析値の比較結果を図-2 に示す。NH<sub>4</sub>-N センサーを設置した下水二次処理水貯留槽、第1担体処理槽および第2担体処理槽における、センサー測定値とイオンクロマトグラフの分析値との相関関係を表す一次回帰式はそれぞれ、 $y = 0.97x$  ( $R^2 = 0.97$ ,  $N = 50$ )、 $y = 0.99x$  ( $R^2 = 0.99$ ,  $N = 50$ )、 $y = 0.84x$  ( $R^2 = 0.88$ ,  $N = 45$ ) となった。NH<sub>4</sub>-N センサー使用期間における水温や水質の変動にも関わらず、NH<sub>4</sub>-N センサーの測定精度は安定していたことを確認した。第2担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N センサーの測定精度は、他の NH<sub>4</sub>-N センサーに比べて低くなったが、一般的にイオン電極法において、定量下限近くでは、応答時間が長くなることが知られているため<sup>15)</sup>、測定した NH<sub>4</sub>-N 濃度が定量下限値近くである第2担体処理槽の NH<sub>4</sub>-N センサーの測定精度は、他の NH<sub>4</sub>-N センサーに比べて低くなったと考えられる。

#### 2.3.2 HRT の予備的検討結果

HRT を 180 分と 120 分に設定し、NH<sub>4</sub>-N の処理性を検討した実験における、NH<sub>4</sub>-N センサーと DO センサーの測定値の経時変化を図-3 に示す。実験期間中の各槽の水温（最小 - 最大、本論文の - 表記において以下同様）は HRT180 分および 120 分の実験それぞれで、12 - 19°C 程度および 10 - 19°C 程度であった。平均 NH<sub>4</sub>-N 除去率および反応槽容積当たりの硝化速度は HRT180 分および 120 分の実験それぞれで、94%、85% および 2.8 - 6.9 (平均 4.7) mg-N/(L・h)、3.7 - 8.4 (平均 6.4) mg-N/(L・h) となった。HRT を 120 分に設定した実験における、下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度の最大値は 22.2 mg-N/L であり、反応槽容積当たりの平均硝化速度から、処理槽末端の NH<sub>4</sub>-N 濃度を 2 mg-N/L に低減するために必要な HRT を算出すると 172 分程度であることを確認したため、これ以降の実験では HRT を 180 分に設定した。

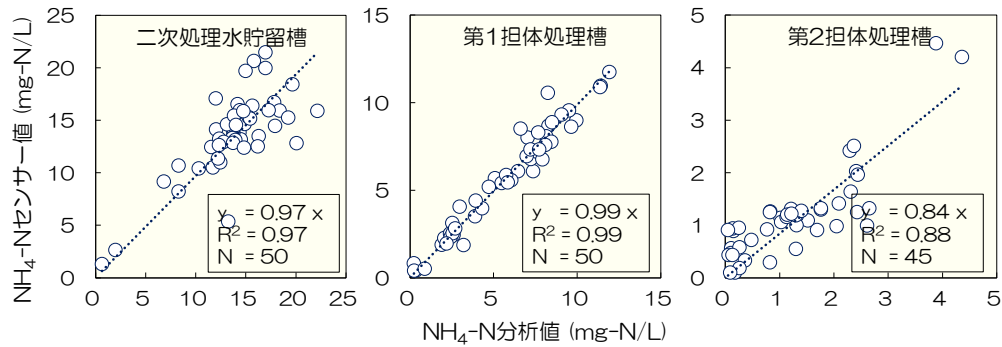


図-2 本実験で使用したNH<sub>4</sub>-Nセンサー測定値とイオンクロマトグラフ分析値の比較

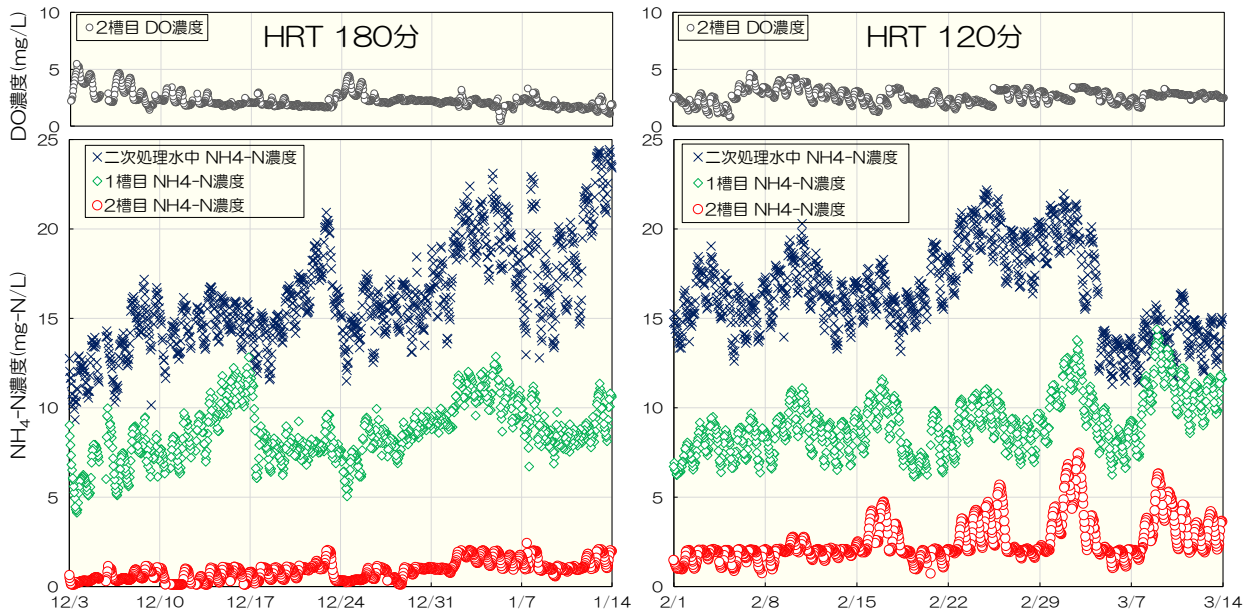


図-3 HRTを180分および120分に設定した実験におけるNH<sub>4</sub>-N濃度とDO濃度の経時変化

### 2.3.3 異なる担体流動性保持方法における担体付着微生物量の比較

担体流動性保持を曝気攪拌および機械攪拌で行った実験における、担体 1 L 当たりの担体付着微生物量の測定結果を表-3 に示す。担体流動性保持方法の違いによる担体付着微生物量に大きな差異はないことを確認した。このことから、馴致期間および運転期間を考慮すると、担体付着微生物量が飽和に達している可能性が示唆された。

### 2.3.4 異なる担体流動性保持方法における担体付着微生物の菌叢比較

担体流動性保持を曝気攪拌および機械攪拌で行った実験における、それぞれの門レベルおよび属レベルの微生物菌叢解析結果を図-4 に示す。塩基配列解析の結果、各サンプルから約 6・11 万本の塩基配列を取得し、約 1,600 種類に分類することができた。図-4 には系内に 0.1%以上存在する属を示す。活性汚泥処理実験装置反応槽末端の活性汚泥の菌叢を構成する主な門は、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Patescibacteria*

であった。各担体処理槽の担体付着微生物の菌叢を構成する主な門は *Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Acidobacteria*、*Nitrospirae*、*Chloroflexi* であった。属レベルの分類では、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* sp. とアンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas* sp. が、それぞれ活性汚泥中からはほとんど検出されなかった。一方で、担体処理槽からは *Nitrospira* sp. は 10・18%程度、*Nitrosomonas* sp. は 1・10%程度の割合で検出されたことから、本実験で使用した担体には硝化細菌が保持されていたことを確認した。*Nitrospira* sp. と *Nitrosomonas* sp. の検出割合は、担体流動性保持を機械攪拌で行った実験の担体の方が高くなった。担体流動性保持を機械攪拌で行った実験で使用した担体は、担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験で使用した担体を流用したため、より長期間、低有機物濃度高 NH<sub>4</sub>-N 濃度条件下で馴養されたことで、硝化細菌の検出割合がより高くなったと考えられる。硝化促進型標準活性汚泥法の活性汚泥から、*Nitrospira* sp. は 10%程度、*Nitrosomonas* sp. は 2%程



表-3 異なる担体流動性保持方法における担体1 L当たりの担体付着微生物量の比較（平均±標準偏差）

担体採取箇所 担体1 L当たりの 担体付着微生物量 (mg/L)	曝気攪拌		機械攪拌	
	第1担体処理槽	第2担体処理槽	第1担体処理槽	第2担体処理槽
	673 ± 272 (N = 9)	679 ± 207 (N = 9)	717 ± 152 (N = 8)	803 ± 208 (N = 8)

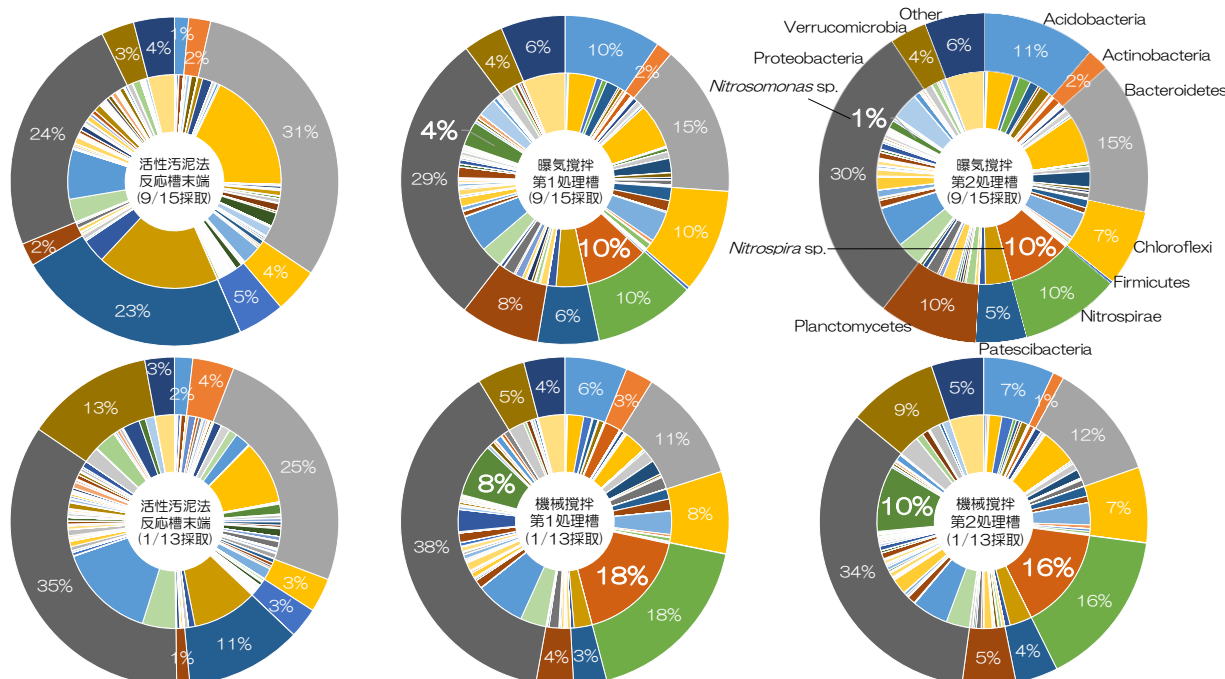


図-4 異なる担体流動性保持方法における担体付着微生物の菌叢比較（外側：門レベル，内側：属レベル）

度の割合で検出された<sup>16)</sup>。水道水に  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{PO}_4\text{-P}$  を添加した人工二次処理水を実験原水として用いた、担体処理実験報告において、担体付着細菌から、*Nitrospira sp.*は20%程度、*Nitrosomonas sp.*は3-6%程度の割合で検出された<sup>10)</sup>。この報告では、使用原水の組成が水道水、 $\text{NH}_4\text{-N}$  および  $\text{PO}_4\text{-P}$  のみであったことや、DO濃度が7.5-8.0 mg/Lに維持されていたことにより、硝化細菌が優占化しやすい環境下での実験であった。本実験で得られた硝化細菌の検出割合とこれらの報告における硝化細菌の検出割合を比較した結果を表-4に示す。本実験で用いた担体には、硝化細菌が硝化促進型標準活性汚泥法の活性汚泥と同程度以上の割合で存在することが示唆された。

### 2.3.5 異なる担体流動性保持方法における $\text{NH}_4\text{-N}$ 処理性能の比較

#### a) 担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験

本実験における  $\text{NH}_4\text{-N}$  センサーと DO センサーの測定値の経時変化を図-5に示す。2020年8月16日および2020年9月8日から2020年9月10日までは実験施設停電により、センサー測定を行うことができなかった。本実験における水質測定結果を表-5に示す。下水二次処理水および第2担体処理水の  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度

はそれぞれ5.2-25.8（平均13.8）mg-N/L、0.1-2.5（平均0.7）mg-N/Lであった。本実験における平均  $\text{NH}_4\text{-N}$  除去率は95%となった。第2担体処理水におけるDO濃度（平均±標準偏差、本論文の±表記において以下同様）は2.5 ± 1.6 mg/Lとなった。反応槽容積当たりの硝化速度は1.5-7.5（平均4.0）mg-N/（L・h）となった。雨天時など流入  $\text{NH}_4\text{-N}$  低負荷期間（2020年7月10日、2020年8月1日、2020年8月27日）においては、第2担体処理槽の  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度が測定下限値である0.1 mg-N/Lとなった。この期間には担体流動性保持のための曝気のみが行われており、 $\text{NH}_4\text{-N}$  処理の観点からは過剰なエネルギーが投入されていることを確認した。

#### b) 担体流動性保持を機械攪拌で行った実験

本実験における  $\text{NH}_4\text{-N}$  センサーと DO センサーの測定値の経時変化を図-6に示す。2020年11月17日から2020年11月19日および2020年11月24日から2020年11月26日までは実験施設停電により、センサー測定を行うことができなかった。本実験における水質測定結果を表-6に示す。下水二次処理水および第2担体処理水の  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度はそれぞれ9.2-29.3（平均17.4）mg-N/L、0.6-2.3（平均1.3）mg-N/Lで

表-4 運転方式の違いによる硝化細菌検出割合の比較

運転方式	<i>Nitrospira</i> sp. (%)	<i>Nitrosomonas</i> sp. (%)	出典
標準活性汚泥法 硝化抑制運転	-	-	-
標準活性汚泥法 硝化促進運転	10	2	山崎ら <sup>16)</sup> (2013)
二次処理水 + 担体処理 (曝気攪拌)	10	1 - 4	-
二次処理水 + 担体処理 (機械攪拌)	16 - 18	8 - 10	-
人工下水 + 担体処理	20	3 - 6	Svobodová et al. <sup>10)</sup> (2021)

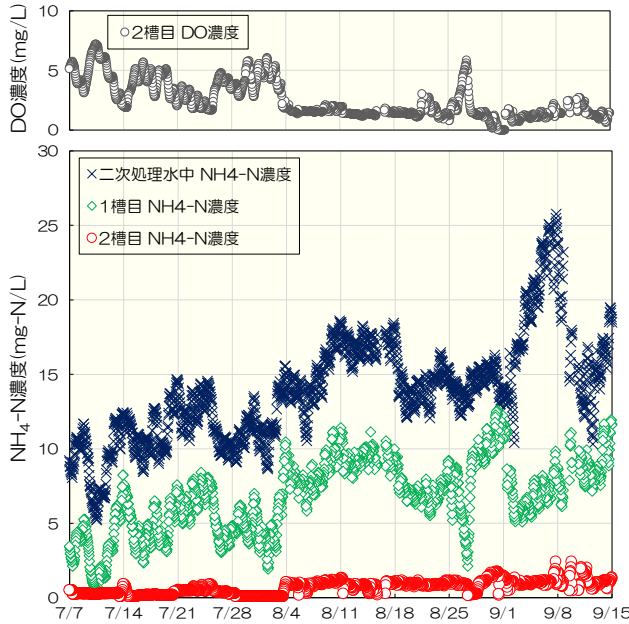


図-5 担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験におけるNH<sub>4</sub>-N濃度とDO濃度の経時変化

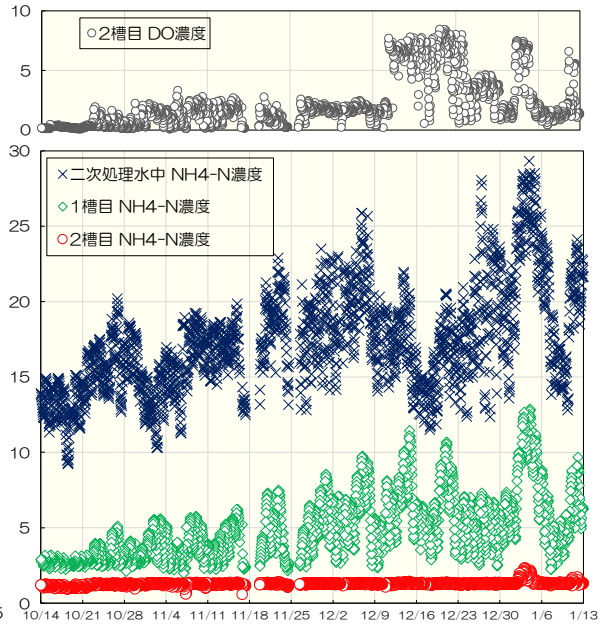


図-6 担体流動性保持を機械攪拌で行った実験におけるNH<sub>4</sub>-N濃度とDO濃度の経時変化

表-5 担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験における水質測定結果

水質項目	下水二次処理水	第1担体処理水	第2担体処理水
水温 (°C)	23 - 31	23 - 32	23 - 32
pH (-)	7.15 ± 0.02	6.95 ± 0.06	6.67 ± 0.08
TOC濃度 (mg/L)	2.1 - 7.3	2.2 - 5.7	2.9 - 5.7
SS濃度 (mg/L)	1.3 - 7.5	未測定	1.3 - 6.4
アルカリ度 (mg-CaCO <sub>3</sub> /L)	147 ± 18	84 ± 15	31 ± 5

※ pHおよびアルカリ度以外は、最小 - 最大表記

表-6 担体流動性保持を機械攪拌で行った実験における水質測定結果

水質項目	下水二次処理水	第1担体処理水	第2担体処理水
水温 (°C)	13 - 24	11 - 24	10 - 24
pH (-)	7.03 ± 0.09	6.63 ± 0.11	6.52 ± 0.16
TOC濃度 (mg/L)	3.1 - 4.1	3.8 - 4.4	4.0 - 4.3
SS濃度 (mg/L)	1.3 - 8.8	未測定	未測定
アルカリ度 (mg-CaCO <sub>3</sub> /L)	152 ± 7.8	54 ± 5.3	39 ± 4.7

※ pHおよびアルカリ度以外は、最小 - 最大表記

あった。本実験における平均 NH<sub>4</sub>-N 除去率は 93% となり、担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験と同程度の NH<sub>4</sub>-N 除去率となった。第 2 担体処理槽における DO 濃度は 2.2 ± 2.1 mg/L となり、担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験に比べて、平均 DO 濃度は 12% 程度低くなったことから、雨天時など流入 NH<sub>4</sub>-N 低負荷期間における、担体流動性保持のための過剰なエネルギー投入を抑制できたことが示唆された。反応槽容積当たりの硝化速度は 2.5 - 8.3 (平均 4.9) mg-N/

(L・h) となり、担体流動性保持を曝気攪拌で行った実験に比べて、1.2 倍程度の平均硝化速度となった。嫌気無酸素好気法の好気槽に担体を投入した際の反応槽容積当たりの硝化速度は 3.1 - 5.2 mg-N/ (L・h) 程度 (平均流入 NH<sub>4</sub>-N 濃度 19.7 mg-N/L、水温 17 - 20°C、DO 濃度 2 mg/L) であり<sup>4)</sup>、循環式硝化脱窒法の好気槽に担体を投入した際の反応槽容積当たりの硝化速度は 6 - 13 mg-N/ (L・h) 程度 (水温 15 - 25°C) との報告から<sup>9)</sup>、本実験で得られた反応槽容積当たりの最大

硝化速度 8.3 mg-N/ (L・h) は、嫌気無酸素好気法もしくは循環式硝化脱窒法の好気槽に担体を投入した際の硝化速度の 0.6 - 1.6 倍程度であった。本実験期間における下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度と反応槽容積当たりの硝化速度の関係を硝化細菌の活性が顕著に低下するとされる水温 16°C<sup>9)</sup>を境目として整理した結果を図-7 に示す。本研究における下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度範囲においては、水温変動に関わらず、下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度増加に応じて反応槽容積当たりの硝化速度も大きくなることを確認した。このことから本実験における下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度範囲に対して、本実験装置の硝化能力に余力があることが示唆された。また、水温低下の硝化影響が顕著でない理由として、担体に十分な量の硝化細菌が保持できているため、硝化速度の低下の影響が顕在化しないことが考えられた。また、担体保持により、必要な A-SRT を確保できているため、硝化細菌の wash-out は起こ

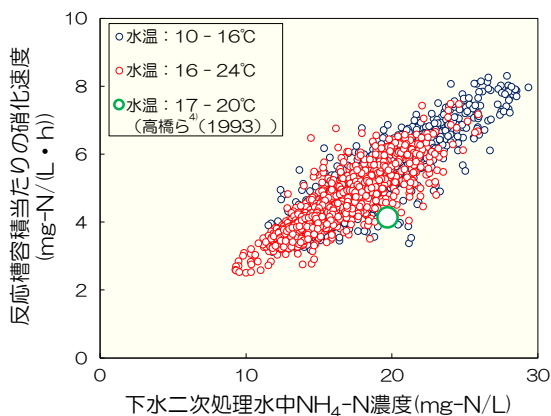


図-7 下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度と反応槽容積当たりの硝化速度の関係 (水温 16°Cを境目とする)

表-7 異なる担体流動性保持方法における硝化窒素量当たりの平均曝気量の比較

	曝気攪拌		機械攪拌	
	1槽目	2槽目	1槽目	2槽目
常時曝気量 (m <sup>3</sup> /d)	3.96	3.96	0	0
制御曝気量 (m <sup>3</sup> /d)	0.94	0.35	7.54	0.99
曝気量 (m <sup>3</sup> /d)	9.21		8.53	
処理流量 (m <sup>3</sup> /d)	0.88			
送気倍率 (-)	10.5		9.7	
硝化量 (g-N/d)	11.5		14.2	
硝化窒素量当たりの曝気量 (m <sup>3</sup> /g-N)	0.80		0.60	

らず、硝化阻害が発生しないためであると考えられた。

### 2.3.6 異なる担体流動性保持方法における硝化窒素量当たりの曝気量の比較

担体流動性保持を曝気攪拌および機械攪拌で行った実験における、硝化窒素量当たりの平均曝気量の比較結果を表-7 に示す。担体流動性保持を曝気攪拌で行った場合に比べて、機械攪拌で行った方が硝化窒素量当たりの曝気量を 25%程度削減できることを確認した。機械攪拌による担体流動性保持に係るエネルギーは、曝気攪拌による担体流動性保持に係るエネルギーに比べて微々たるものであることを考慮すると<sup>17)</sup>、本実験における下水二次処理水中 NH<sub>4</sub>-N 濃度範囲においては、担体流動性保持は機械攪拌で行った方が、より効率的に NH<sub>4</sub>-N を除去できることが示唆された。循環式硝化脱窒法の好気槽 (本実験装置容積比 2,500 倍) に担体を投入した際の送気倍率は 6 倍程度であるが<sup>9)</sup>、スケールメリットを考慮すると、本実験における送気倍率は、スケールアップにより減少する可能性があることが示唆された。

### 2.3.7 本処理方法の実施設への導入可能性の検討

本処理方法の導入先は、特に小規模下水処理場において、下水二次処理水に残存する NH<sub>4</sub>-N を既存の運転方式の変更や機械設備の更新等では低減することが困難な場合が予想される小規模下水処理場を想定している。一例として嫌気好気ろ床法を採用している小規模下水処理場を想定した場合、嫌気槽と好気槽の滞留時間はそれぞれ、22 時間 (標準設計値)<sup>18)</sup>および 3 時間程度 (実施設の例) であるため、本実験装置の必要設置スペースは嫌気好気ろ床法の反応槽容積の 12% 程度と試算された。このため、本処理方法は設置スペースの大幅な増加を必要とすることなく導入可能と考えられた。また、硝化に影響する有機物や SS 濃度の観点からは、嫌気好気ろ床法を採用している下水処理場 45 箇所における、処理水中 BOD 濃度および SS 濃度の年間平均値はそれぞれ、1.4 - 13 (平均 5.2) mg/L、0 - 17 (平均 5.3) mg/L であった<sup>19)</sup>。本実験では有機物濃度として BOD ではなく TOC を測定しているため単純比較はできないものの、本実験で処理対象とした二次処理水は、これらの実施設での処理水と水質面で大きく異なっていないと考えられた。このため、本処理方法をこれらの実施設に導入した場合、本実験で得られた硝化性能と同程度に処理可能となると期待できた。以上より、設置スペースおよび処理対象水質の観点で、本処理方法の実施設への導入可能性が示唆された。

### 3. 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いたアンモニア性窒素の影響評価

#### 3.1 目的

近年、下水道の普及や排水規制の強化等により水質改善が進む海域もある中で、貧栄養化が懸念される場合もあり、下水道でも処理水中の NH<sub>4</sub>-N 等の濃度を季節により増加させる運転が試行も含め取り組まれている。一方 NH<sub>4</sub>-N は、魚類に及ぼす影響が報告されており<sup>2)</sup>、今後、濃度の低減について議論される可能性がある。下水中の NH<sub>4</sub>-N は主に、し尿、生活排水、工場排水から流入する可能性があることから<sup>20)</sup>、処理水が河川を経由し放流される場合には、NH<sub>4</sub>-N が食物連鎖の底辺にある淡水性藻類に及ぼす影響を把握することが重要であると考えられる。藻類を用いた影響評価法は、一般的に浮遊性藻類であるムレミカヅキモ (*Raphidocelis subcapitata*) が使用されているが、日本の河川には生息していない外来種である。日本河川では付着藻類が優占しており、そこに生息する付着藻類を用いて評価を行うことが、より実環境での影響を反映できると考えられる。そこで本研究では、日本河川に生息する淡水性付着藻類 (緑藻、珪藻、藍藻) を選抜し、種感受性分布 (Species Sensitivity Distribution, SSD) 解析を用いることで NH<sub>4</sub>-N の影響評価を行った。

#### 3.2 実験材料および実験方法

##### 3.2.1 使用藻類と培養方法

使用株の選定条件は、①日本河川で優占的に生息する藍藻、珪藻、緑藻であること、②(国研) 国立環境研究所 (NIES) から購入可能であること、③生育温度が 20–25℃であること、④扱いが容易であり、安定して培養が可能であることとした。その条件下で付着藻類を選抜し、NIES より分譲された 7 株を用いて実験を行った (表-8)。緑藻 (3 株) は *Desmodesmus serratus* (NIES-97)、*Desmodesmus subspicatus* (NIES-797)、*Stigeoclonium aestivale* (NIES-531) を用い、C 培地を用いて培養した<sup>21)</sup>。珪藻 (2 株) は *Navicula pelliculosa* (NIES-4280) と *Achnanthydium minutissimum* (NIES-71) を用い、CSi 培地を用いて培養した<sup>21)</sup>。藍藻 (2 株) は *Pseudanabaena foetida* (NIES-512) と *Phormidium jenkelianum* (NIES-507) を用い、それぞれ CT 培地と CSi 培地を用いて培養した<sup>21)</sup>。保存飼育時は全てフラスコで培養し、22℃、1000-2000Lux (白色蛍光灯下) で連続照射を行い、2 週間おきに継代培養を行った。また比較対象株として *R subcapitata* (NIES-35) を用いた。*R*

表-8 実験に使用した付着藻類株

分類群	種名	② NIES No.	使用培地	③ 生育至適温度 (°C)	④ 安定培養
緑藻	<i>Desmodesmus serratus</i>	97	C	20(25)	○
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	797	C	20(25)	○
	<i>Stigeoclonium aestivale</i>	531	C	20	○
珪藻	<i>Navicula pelliculosa</i>	4280	Csi	20	○
	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	71	CSi	20	○
藍藻	<i>Pseudanabaena foetida</i>	512	CT	20	△
	<i>Phormidium jenkelianum</i>	507	CSi	20	○

*subcapitata* は C 培地を用いてフラスコで培養し、25℃、3000Lux (白色蛍光灯下) で照射を行い (明期 18h、暗期 6h)、2 週間おきに継代培養を行った。

##### 3.2.2 付着藻類の至適増殖照度の検討

OECD201 を基に、96 穴平底プレートを用いて検討を行った<sup>22)</sup>。1 週間前培養を行った各株を、各々に適した培地に初期細胞数 20,000~30,000 cells/mL になるよう添加し、23℃、7 日間培養を行った。至適照度の検討は、1000、2000、3000Lux、連続照射下で行った。

藻類の増殖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) を用いて測定した。緑藻と珪藻はクロロフィル a (励起 435 nm / 蛍光 685 nm) を、藍藻はフィコシアニン (励起 600 nm / 蛍光 650 nm) を測定した。各藻類の比増殖速度は以下の式から求めた。各実験は n=6 で行った。

$$\text{比増殖速度} = \frac{\ln(X) - \ln(X')}{t - t'}$$

X および X' は、それぞれ培養時間 t および t' (day) における蛍光強度を示す。

##### 3.2.3 付着藻類を用いたアンモニア性窒素の影響評価

NH<sub>4</sub>-N として NH<sub>4</sub>Cl (富士フィルム和光純薬株式会社) を用い、低濃度区 (0.03~6.39 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mg/L) と高濃度区 (8.38~268 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mg/L) で検討を行った。各株は 1 週間前培養を行い、各々に適した培地に初期細胞数 20,000~30,000 cells/mL になるよう添加し、至適照度下で 23℃、7 日間培養を行った。藻類の増殖は 3.2.2 付着藻類の至適増殖照度の検討と同様の方法で測定した。

##### 3.2.4 SSD 解析

各株における定常期のクロロフィル a 量とフィコシアニン量から EC<sub>50</sub> を算出し、SSD 解析を行った。EC<sub>50</sub> は SigmaPlot 14.5 (株式会社ヒューリンクス) を用いて算出し、SSD 解析は SSDcals.xlsx を用いて算出した<sup>23)</sup>。



### 3.2.5 解離アンモニアの分析

各培地における解離アンモニア (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 濃度は、サンプルを 0.45 μm の親水性 PTFE 膜に通し、イオンクロマトグラフィー (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社製) で測定した。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 付着藻類の選抜

はじめに、試験に使用する付着藻類の選定を行った。永井らは長野県広井川の付着藻類の調査結果を基に、河川の付着藻類を用いた農薬等の SSD 評価を行っている<sup>22)</sup>。また内田らは 2001-2014 年にかけて、愛知県矢作川に対する付着藻類の種類構成に関する調査報告を行っている<sup>24)</sup>。内田らと永井の論文を基に、愛知県矢作川と長野県広井川に生息する付着藻類を優占順にまとめたデータを表-9 に示す。両河川とも、珪藻類が最も多く、次に藍藻類もしくは緑藻類が優占した。本試験では各藻網から優占種として 2 属ずつ選抜した。珪藻類において最も優占率が高い株は、矢作川では *Achnanthydium* 属、広井川では *Navicula* 属であり、どちらも両河川で検出されていることから、これら 2 属を選択した。藍藻では両河川で *Homeothrix* 属が検

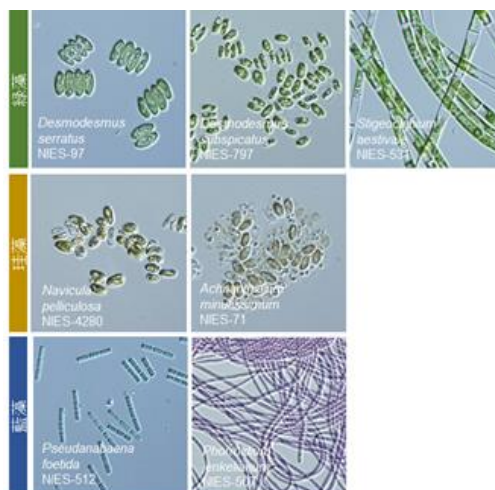


図-8 選抜した付着藻類株

出されたが NIES 寄託株がないことから、矢作川で優占した *Phormidium* 属と、広井川で優占した *Pseudanabena* 属を選択した。緑藻類は、矢作川では *Ulothrix* 属が優占種として検出されたが、生育至適温度が 15°C と低いため、広井川で優占している種属から *Demodesmu* 属と *Stigeoclonium* 属を選択した。

本試験で使用した株を表-8 と図-8 に示す。使用し

表-9 国内河川に生息する付着藻類の優占順をふまえた試験付着藻類の選定

愛知県矢作川

	順位	属	NIES株	検出率 (%)
珪藻網 (79.8%)	1	<i>Achnanthydium</i>	○	38.29
	2	<i>Fragilaria</i>	○	10.86
	3	<i>Encyonema</i>	×	7.27
	4	<i>Nitzschia</i>	○	6.09
	5	<i>Cymbella</i>	×	5.88
	6	<i>Navicula</i>	○	3.00
	7	<i>Gomphonema</i>	○	2.30
	8	<i>Rhoicosphenia</i>	×	1.70
	9	<i>Gomphoneis</i>	×	1.19
	10	<i>Melosira</i>	○	0.90
	11	<i>Achnanthes</i>	○	0.78
	12	<i>Hannaea</i>	×	0.45
	13	<i>Diatoma</i>	×	0.28
	14	<i>Ulnaria</i>	○	0.18
	15	<i>Asterionella</i>	○	0.18
	16	<i>Surirella</i>	×	0.16
	17	<i>Cocconeis</i>	○	0.14
	18	<i>Ampora</i>	×	0.14
	19	<i>Meridion</i>	×	0.04
藍藻網 (19.3%)	1	<i>Homeothrix</i>	×	15.82
	2	<i>Phormidium</i>	○	3.39
	3	<i>Calothrix</i>	○	0.07
緑藻網 (0.7%)	1	<i>Ulothrix</i> **	○	0.62
	2	<i>Cladophora</i>	×	0.04
紅藻網		<i>Batrachospermum</i>	○	0.25
		合計		100.00

長野県広井川

	順位	属	NIES株	検出率 (%)
珪藻網 (78.5%)	1	<i>Navicula</i>	○	27.57
	2	<i>Nitzschia</i>	○	17.05
	3	<i>Gomphonema</i>	○	7.62
	4	<i>Cymbella</i>	×	3.60
	5	<i>Synedra</i>	○	3.51
	6	<i>Rhoicosphenia</i>	×	3.01
	7	<i>Melosira</i>	○	2.73
	8	<i>Achnanthydium</i>	○	2.67
	9	<i>Surirella</i>	×	2.16
	10	<i>Coccoreis</i>	○	1.97
	11	<i>Diatoma</i>	×	1.84
	12	<i>Pinnularia</i>	×	1.81
	13	<i>Amphora</i>	×	1.00
	14	<i>Frustulia</i>	×	0.95
	15	<i>Meridion</i>	×	0.52
	16	<i>Cosmarium</i>	○	0.45
藍藻網 (10.6%)	1	<i>Pseudanabaena</i>	○	9.13
	2	<i>Lyngbya</i>	×	1.28
	3	<i>Homeothrix</i>	×	0.22
緑藻網 (10.9%)	1	<i>Desmodesmus</i>	○	4.85
	2	<i>Coleochaete</i>	○	2.73
	3	<i>Stigeoclonium</i>	○	1.71
	4	<i>Ankistrodesmus</i>	○	1.62
		合計		100.00

\* 赤字は両河川で検出された藻類を示す。

\*\* 生育温度: 15°C

た付着藻類は、主に日本の河川から分離された淡水種 7 株とした。珪藻の *N. pelliculosa* と緑藻の *D. subspicatus* は OECD テストガイドライン 201 において推奨株として報告されている<sup>22)</sup>。また珪藻の *A. minutissimum* と藍藻の *P. foetida* は、「河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル」で使用されている<sup>22)</sup>。選択した株はいずれも俵状や糸状の形状であり(図-8)、*S. aestivale* (糸状) 以外は、細胞を均等に分散させることができた。

選抜した付着藻類株の最適照度条件の検討結果を表-10に示す。OECD テストガイドライン 201 では試験条件として①比増殖速度が  $0.92\text{day}^{-1}$  以上、②日間変動係数が 35%以下、③繰り返し変動係数が 7%以下、であることが条件となっている<sup>25)</sup>。検討した 7 株において、②と③の条件は全て満たしていた。一方、①比増殖速度は緑藻と藍藻では条件を満たしていたが(緑藻: $1.21\text{--}1.41\text{day}^{-1}$ 、藍藻: $0.94\text{--}1.15\text{day}^{-1}$ )、珪藻は  $0.54\text{--}0.63\text{day}^{-1}$  と増殖速度が遅かった。自然界では増殖速度が遅い藻類も生息していることから、本試験では条件①が満たさない株でも試験に使用した。緑藻の *D. serratus* と *D. subspicatus* は 2000Lux 以上の照度で

比増殖速度が  $0.92\text{day}^{-1}$  以上であったことから、試験条件②と③でデータのばらつきが少ない照度 (*D. serratus*: 3000Lux、*D. subspicatus*: 2000Lux) を選択した。また藍藻の *P. foetida* と *P. jenkelianum* は比増殖速度が大きい場合でも照度が高いと色抜けする現象が見られたため、至適照度をそれぞれ 2000Lux と 1000Lux とした。

### 3.3.2 付着藻類に対するアンモニア態窒素の影響

$\text{NH}_4\text{-N}$  は藻類に対し、プラス(低濃度区: 栄養塩)の影響とマイナス(高濃度区: 毒性)の影響を及ぼすことが考えられる。そこで 7 株に対する低濃度区と高濃度区の  $\text{NH}_4\text{-N}$  の影響を検討した。

図-9 は各培地における  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加時の解離アンモニア ( $\text{NH}_4^+$ ) の濃度を示す。 $\text{NH}_4\text{-N}$  を含む水溶液においては溶液の pH と温度により  $\text{NH}_4^+$  濃度が変動し、中性付近ではそのほとんどが  $\text{NH}_4^+$  として存在することが報告されている<sup>26)</sup>。各培地の pH は pH 7.28~8.16 であった。MillQ 水に  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を溶解した場合、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加量から算出される  $\text{NH}_4^+$  とほぼ同程度の

表-10 選抜した付着藻類株の最適照度条件の検討

	分類群	種名	増殖速度 計算期間 (day)	①比増殖速度			②至適照度 での日間変 動係数	③至適照度 での繰り返し 変動係数	至適照度 (Lux)
				1000Lux	2000Lux	3000Lux			
付着藻類	緑藻	<i>D. serratus</i>	1-5	0.97	1.33	1.21	18%	4%	3000 <sup>*1</sup>
		<i>D. subspicatus</i>	0-3	0.85	1.21	1.44	9%	5%	2000 <sup>*2</sup>
		<i>S. aestivale</i>	1-4	0.61	1.19	1.41	19%	5%	3000
	珪藻	<i>N. pelliculosa</i>	0-3	0.63	0.51	0.43	4%	3%	1000
		<i>A. minutissimum</i>	1-4	0.39	0.54	0.50	15%	2%	2000
	藍藻	<i>P. foetida</i>	1-4	0.89	1.15	1.21	6%	5%	2000 <sup>*3</sup>
		<i>P. jenkelianum</i>	1-3	0.94	1.13	1.17	2%	1%	1000 <sup>*4</sup>
浮遊藻類	緑藻	<i>R. subcapitata</i>	0-3			1.31	28%	3%	3000

赤字: 至適照度に用いた比増殖速度

#### 選択理由

- \* 1: 2000Luxより3000Luxの方が②と③の条件をより満たしていた
- \* 2: 3000Luxより2000Luxの方が②と③の条件をより満たしていた
- \* 3: 2000Luxより3000Luxの方が比増殖速度が大きい、色抜けが生じる
- \* 4: 1000Luxより3000、2000Luxの方が比増殖速度が大きい、色抜けが生じる

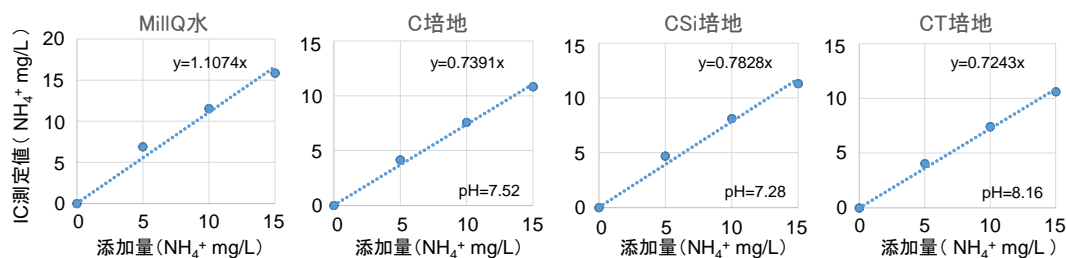


図-9 各培地における  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加時のアンモニウムイオン濃度

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が測定されたが、C 培地、CSi 培地、CT 培地では添加した NH<sub>4</sub><sup>+</sup>量の 0.72~0.78 倍の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が測定された。培地の pH が中性であったことから、培地中に含まれるキレート剤が NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を捕捉していることが推察される。

低濃度 NH<sub>4</sub>-N 存在下における、各付着藻類株の定常期の細胞数を図-10 に示す。*S. aestivale* と *N. pelliculosa* では、コントロールに比べて 2.36 NH<sub>4</sub>-N mg/L もしくは 4.98 NH<sub>4</sub>-N mg/L 濃度までは細胞数が増加する傾向が確認された。最も影響を受けた NH<sub>4</sub>-N 濃度は、*S. aestivale* では 2.36 NH<sub>4</sub>-N mg/L (151.1% コントロール比) であり、*N. pelliculosa* では 0.5 NH<sub>4</sub>-N mg/L (162.6% コントロール比) であった。使用した培地は KNO<sub>3</sub> が 0.1 g/L 含まれているが、更に NH<sub>4</sub>-N が共存する場合は、それを栄養塩として利用することで増殖する株が存在することが推察された (プラスの影響)。

高濃度 NH<sub>4</sub>-N 存在下での各付着藻類の EC<sub>50</sub> を表-11 に示す。比増殖速度と定常期の細胞濃度 (最終濃度法) から EC<sub>50</sub> を求めた場合、比増殖速度より定常期の細胞濃度から算出した EC<sub>50</sub> の値が小さいことが明らかとなった。これらの結果から NH<sub>4</sub>-N は、付着藻類の生長速度より定常期の細胞濃度に影響を生じる傾向が強いことが推察される。OECD テストガイドライン

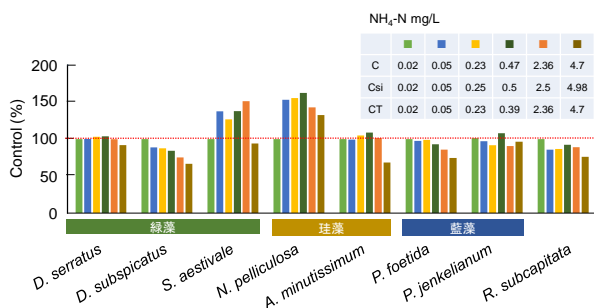


図-10 付着藻類の低濃度アンモニア性窒素に対する定常期細胞数

表-11 付着藻類の高濃度アンモニア性窒素に対する EC<sub>50</sub>

株	EC <sub>50</sub> (NH <sub>4</sub> -N mg/L)	
	比増殖速度	定常期の細胞濃度
<i>D. serratus</i>	209.04<	12.81
<i>D. subspicatus</i>	209.04<	70.49
<i>S. aestivale</i>	209.04<	15.13
<i>N. pelliculosa</i>	221.52<	52.09
<i>A. minutissimum</i>	17.01	8.22
<i>P. foetida</i>	30.90	20.22
<i>P. jenkelianum</i>	221.52<	35.10
<i>P. subcapitata</i>	205.76	86.13

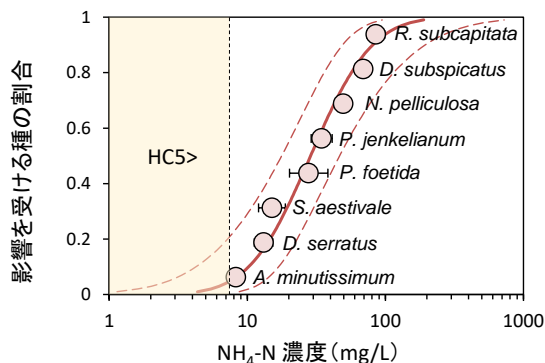


図-11 付着藻類の増殖へのアンモニア性窒素の影響に関する SSD 解析

201 では指数関数モデルを基本としているが<sup>25)</sup>、本試験では以上の結果を考慮して最終濃度法を用いた。定常期の細胞濃度より算出した EC<sub>50</sub> を用いて、付着藻類 7 種とムレミカヅキモに対する NH<sub>4</sub>-N の SSD 解析を行った。その結果、SSD 解析の 5 パーセント値に相当する濃度 (HC5: Hazardous Concentration 5、95%の種が保護される濃度) は 7.6 NH<sub>4</sub>-N mg/L (90%信頼区間 2.7-13.3 NH<sub>4</sub>-N mg/L) であることが明らかになった。付着藻類の分類群間 (緑藻、珪藻、藍藻) では NH<sub>4</sub>-N に対する感受性に差異の傾向は見られなかったが、ムレミカヅキモは付着藻類に比べて感受性が低いことが推察された。ムレミカヅキモは国際的なモデル藻類として毒性評価に使用されているが、より実環境の影響を踏まえるためには、評価対象の環境で優占している生物種を使用することが必要であると推察される。

#### 4. 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いた結合塩素モノクロラミンの影響評価

##### 4.1 目的

下水処理水の消毒に広く用いられている次亜塩素酸 Na については、処理水中に残存するアンモニア性窒素と反応してクロラミンを生成する現象が知られている。そのため処理水の河川放流において、クロラミンが淡水性水生生物に及ぼす影響を把握することが重要である。藻類を用いた影響評価法においては、外来種の浮遊性藻類であるムレミカヅキモが一般的に使用されているが、日本の河川で生息・優占している付着藻類を用いて評価を行うことで、より実環境に近い影響評価を実施できると考えられる。そこで本研究では、日本河川に生息する淡水性付着藻類 (緑藻、珪藻、藍藻) を用いて、SSD 解析からモノクロラミンの影響評価を行った。また実際の下水処理水を用いて、

モノクロラミン存在下での藻類の生育について検討を行った。

## 4. 2 実験方法

### 4. 2. 1 モノクロラミン溶液の調製

試薬はすべて富士フイルム和光純薬株式会社を用いた。25 mL 次亜塩素酸 Na 溶液（遊離塩素 1000 mg Cl<sub>2</sub>/L）と 6.25 mL 塩化アンモニウム溶液（1000mg NH<sub>4</sub>/L-N 濃度）を、250 μL 水酸化ナトリウム溶液（2N）の存在下で攪拌し、30 分間室温で放置したものをモノクロラミン溶液として使用した<sup>32)</sup>。生成されたモノクロラミンはインドフェノール法を基本とした、HACH DR300 ポケットモノクロラミン/遊離アンモニア計（HACH 社製）を用いて測定した。本条件下で生成されたモノクロラミン濃度は 800~1000mg Cl<sub>2</sub>/L であった。モノクロラミン溶液は使用時ごとに調製し、実験に供した。

### 4. 2. 2 付着藻類を用いたモノクロラミンの影響評価

前章（3. 3. 1 付着藻類の選抜）を基に、NIES より分譲された付着藻類を用いて検討を行った。ただし、本研究ではモノクロラミンの特性から AAP 培地での生育が前提となるため、AAP 培地で生育ができない *P. jenkelianum* を除いた 6 種を用いて検討を行った。緑藻（3 種）は *D. serratus* (NIES-97)、*D. subspicatus* (NIES-797) 及び *S. aestivale* (NIES-531) を用い、保存飼育時は C 培地<sup>21)</sup>を用いて培養した。珪藻（2 種）は *N. pelliculosa* (NIES-4281) 及び *A. minutissimum* (NIES-71) を用い、保存飼育時は CSi 培地<sup>21)</sup>を用いて培養した。藍藻（1 種）は *P. foetida* (NIES-512) を用い、保存飼育時は CT 培地<sup>21)</sup>を用いて培養した。これらの株はフラスコで培養し、22°C、2000~3000 Lux（白色蛍光灯下）で連続照射を行い、2 週間おきに継代培養を行った。また比較対象株としてムレミカヅキモ（*R. subcapitata*, NIES-35）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°C、3000 Lux（白色蛍光灯下）で照射を行い（明期 18h、暗期 6h）、1 週間おきに継代培養を行った。

モノクロラミンの影響試験は OECD201 を基に、96 穴平底プレートを用いて検討を行った<sup>25)</sup>。緑藻と藍藻は C 培地と CT 培地を AAP 培地に置換し、前培養を 1 週間行った後、試験に供した。珪藻は CSi 寒天培地で 2 週間前培養後、試験に供した。初期細胞数 20,000~30,000 cells/mL として、モノクロラミンを添加した各培地（緑藻と藍藻は AAP 培地、珪藻は AAP+Si 培地）に接種し、それぞれの株に適した光照射下（連続照射）で 23°C、7 日間培養を行った。ムレミカヅキモ

は AAP 培地を用いて、3500 Lux（連続照射）、25°C、7 日間培養を行った。試験したモノクロラミン濃度は 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mgCl<sub>2</sub>/L とした。藻類の増殖は 3. 2. 2 付着藻類の至適増殖照度の検討と同様の方法で測定した。比増殖速度から各株のモノクロラミンに対する EC<sub>50</sub> を求めた。EC<sub>50</sub> は SigmaPlot14.5（株式会社ヒューリンクス）を用いて算出し、SSD 解析は SSDcals.xlsx を用いて算出した<sup>23)</sup>。各実験は n=6 で行った。

### 4. 2. 3 クロラミン存在下における処理水中の藻類の影響試験

300 mL ビーカーに市販のセラミックスタイル（4 cm×4 cm）を入れ、①高アンモニア性窒素濃度処理水（13.7~16.8 NH<sub>4</sub>-Nmg/L）、②低アンモニア性窒素濃度処理水（1.1~1.4 NH<sub>4</sub>-Nmg/L）、③低アンモニア性窒素濃度処理水（1.1~1.4 NH<sub>4</sub>-Nmg/L）+次亜塩素酸 Na（1 mg Cl<sub>2</sub>/L）を用いて、3500 Lux（連続照射）、25°C条件下で静置培養を行った（藻類の添加は行っていない）。各処理水は 1 週間に 2 回交換し、③ではモノクロラミンが平均 0.63 mg Cl<sub>2</sub>/L 生成された条件下で培養を行った。タイルを各サンプルから取り出し、経時的に観察を行った。培養 17 日後、タイルから藻類を回収し、DNA を抽出後、18S rRNA 遺伝子配列の解読を行い、参照データベース Silva132 と比較することで種の同定を行った。各実験は n=3 で行った。

## 4. 3 結果

### 4. 3. 1 各培地中のモノクロラミンの濃度の経時的変化

はじめに各培地についてモノクロラミン量の検討を行った。各培地にモノクロラミンを約 2 mgCl<sub>2</sub>/L となるよう添加し、直ちにモノクロラミン濃度を測定した。AAP 培地では、MillQ 水に添加した場合と比べてほぼ同等濃度（95%）のモノクロラミン量が検出されたが、CT 培地では 75.9%、CSi 培地では 36.8%、C 培地では 6.4%濃度のモノクロラミン量が検出された。CT 培地、CSi 培地、C 培地にはキレート物質（C 培地：Tris (hydroxymethyl) aminomethane、CSi 培地：HEPES、CT 培地：TAPS）が含まれており、それらがモノクロラミンと反応することで、酸化分解を生じることが推察された。一方 AAP 培地の場合、モノクロラミンの減衰量は MillQ 水と同程度の傾向で過剰な減衰が見られなかったことから（図-12）、付着藻類を用いたモノクロラミンの影響評価は AAP 培地を基本とした無機塩培地が適当であるとし、以下の実験を行った。



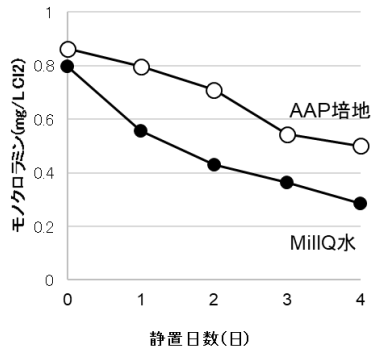


図-12 AAP 培地におけるモノクロラミン濃度の経時的変化

#### 4.3.2 付着藻類を用いたモノクロラミンの影響評価

本試験で使用した付着藻類は、3.3.1 付着藻類の選抜を基に、①20℃前後で培養可能であること、②日本の河川に優占的に生息している淡水種であること<sup>22, 24</sup>、③AAPを基本とした培地で生息できることを条件に6株選択した。選択した株は俵状、球状、または糸状の形状であり、*S. aestivale* (糸状) 以外は、均等に細胞を分散させることができた。OECD201のテストガイドラインでは、試験条件として比増殖速度が0.92 day<sup>-1</sup>以上であることが要求される<sup>25</sup>。AAP培地を基本とした培地で生育させた場合の比増殖速度は、*D. serratus*、*D. subspicatus*、*P. foetida* は1.00-1.21 day<sup>-1</sup>と条件を満たしたが、*S. aestivale*、*N. pelliculosa*、*A. minutissimum* は0.62-0.81 day<sup>-1</sup>と増殖速度が遅く条件を満たさなかった。AAP培地が最適培地ではない株もあったが、本研究ではモノクロラミンの影響評価を行う上で、モノクロラミンの濃度維持が重要であることから、AAPを基本とした培地を用いて付着藻類の増殖に及ぼす影響評価を行った。

比較対象株であるムレミカヅキモのEC<sub>50</sub>は0.049 mgCl<sub>2</sub>/Lであり、既報の値(0.018 mgCl<sub>2</sub>/L)とほぼ類

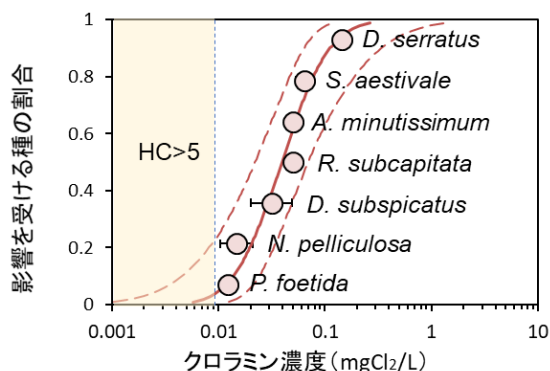


図-13 6種付着藻類とムレミカヅキモを用いたモノクロラミンのSSD解析

似した値を示した<sup>32</sup>。図-13は6種付着藻類とムレミカヅキモを用いたSSD解析によるモノクロラミンの影響評価の結果を示している。HC5は0.01 mgCl<sub>2</sub>/Lであり、その信頼区間IC90は0.0028~0.0191 mgCl<sub>2</sub>/Lであった。HC50は0.039 mgCl<sub>2</sub>/Lであり、その信頼区間IC90は0.022~0.07 mgCl<sub>2</sub>/Lであった。

#### 4.3.3 クロラミン存在下における処理水中の藻類の影響試験

実際の処理水を用いてセラミックスタイルに生育する付着藻類について検討を行った(図-14)。①高アンモニア性窒素濃度処理水と②低アンモニア性窒素濃度処理水では培養7日目からタイル上に藻類の増殖が確認されたが、③低アンモニア性窒素濃度処理水+次亜塩素酸Naでは培養14日目からタイル上に藻類の増殖が確認された。培養17日目のタイルに増殖した藻類の次世代シーケンシング(NGS)を行った結果、①と②の系列で緑藻が優占的に検出された(図-15)。また、②低アンモニア性窒素濃度処理水では、緑藻の他、Nitzschia(珪藻)が3.2%~14.0%程度検出された。③低アンモニア性窒素濃度処理水+次亜塩素酸Naでは、①、②で優占的に検出された緑藻の他、Spheeroplealesに属する緑藻が多く検出された(45.4%~92.0%)。モノクロラミンに対する付着藻類のSSD解析の結果では、HC5=0.01 mgCl<sub>2</sub>/Lであり、HC50=0.039 mgCl<sub>2</sub>/Lであった。SSD解析は培養1週間での実験結果を用いており、本実験では培養17日

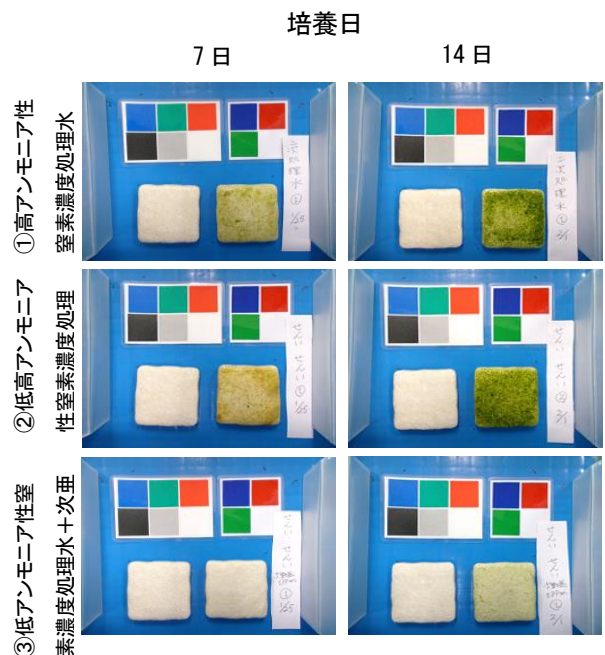


図-14 処理水暴露によるセラミックスタイルに生育する付着藻類

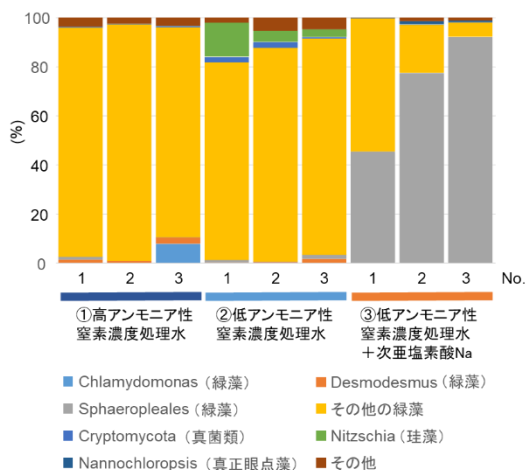


図-15 タイルに生育した付着藻類の相対存在比 (培養 17 日目、各処理水で 3 回試験)

目の実験結果を用いている。そのため培養時間を長くすることにより、SSD 解析で得られたモノクロラミン濃度より高い値においても、モノクロラミンに耐性のある藻類が生育することが推察される。Sphaeropleales がモノクロラミンに対して耐性があるかは、今後検討が必要であると考えている。

## 5. 下水処理水に連続曝露したヒメダカの動画解析による生物影響評価手法の検討

### 5.1 目的

下水処理水には様々な化学物質が含まれる可能性があり、水生生物に対する影響が懸念されている。そのため、必要に応じて放流生態系に対する下水処理水の安全性を確認できる生物影響評価手法の構築が重要であり、OECD テストガイドライン等で水生生物を用いた生物試験方法が各種提案されている。しかし、一般的に魚類を用いた試験は時間・労力がかかり、生死などの指標でしか影響を評価できない。また、排水による魚類への影響は様々な反応 (異常行動、摂食量の減少、産卵数の減少等) が考えられるが、それらの反応に対する排水の影響を把握することは難しく、慢性的な影響による魚類の行動変化を把握可能な試験方法の開発が望まれる。一方で、近年では PC スペックや画像解析技術の向上に伴い、排水による生物影響を画像・動画解析を用いて把握する試みが多くなされている<sup>27, 28, 29)</sup>。浄水処理においては水質監視として動画撮影による魚類の行動モニタリングを行っている事例<sup>30)</sup>は存在するが、下水処理において処理水を魚類に曝露し画像解析を行った事例はほとんどない。そこで、

表-12 本研究で用いた試験水

	添加なし	NH <sub>4</sub> 添加 (20 N-mg/L に調整)
脱塩素水道水	Control	A-1
三次処理水	B-1	B-2

### 曝露系の概要

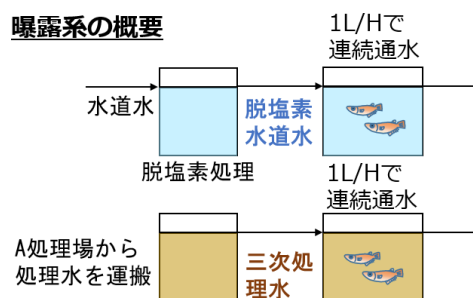


図-16 連続曝露実験系の概要図

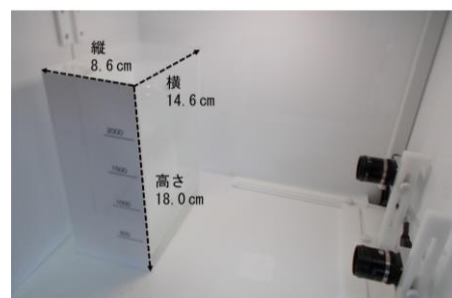


図-17 実験に用いた画像撮影装置

本研究では下水処理水を含む試験水を連続通水曝露したヒメダカを試験生物として動画撮影を行い、画像解析による下水処理水の生物影響評価手法の基礎的な検討を行った。

### 5.2 実験方法

#### 5.2.1 曝露に用いた試験水とヒメダカの飼育方法

本実験では、下水処理水及び下水処理水に残存しやすく高濃度での短期毒性が報告されている<sup>27)</sup> NH<sub>4</sub>-N の影響 (平衡状態で存在する NH<sub>3</sub> の影響を含む) を把握することを目的として、曝露用に 3 種の試験水及び対象系として脱塩素水道水を用いた。詳細を以下と表-12 に示す。

A-1: 脱塩素水道水に NH<sub>4</sub>Cl を添加し、20 N-mg/L に調整した試験水

B-1: A 処理場の三次処理水

B-2: A 処理場の三次処理水に NH<sub>4</sub>Cl を添加し、20 N-mg/L に調整した試験水

C: 脱塩素水道水 (Control)

これらの試験水は、曝露系と対照系で座標・速度を比較し、行動差異を検出することを目的として設定した。

本実験では、国立研究開発法人国立環境研究所より分譲され継代・維持したヒメダカ (*Oryzias latipes*) の生後 6~10 ヶ月の個体を対象として連続曝露を行った。曝露系については図-16 に示す通り、試験水を 1 L/h で通水し、2 L 水槽 (縦 8.6 cm×横 14.6 cm×高さ 18.0 cm) に 2 匹 (オスとメス 1 匹ずつ) を飼育した。また、試験水の水温は約 25℃に調整し、光源は明 16 時間、暗 8 時間の周期で設定した。これらの曝露系で 5 週間の飼育を行い、曝露期間においては 2 回/週の頻度で水槽交換を行い、壁面の汚れを取り除いて撮影に適した状態を維持した。

## 5.2.2 動画撮影と画像解析手法

5.2.1 の条件で飼育を行ったヒメダカを対象とし、画像解析用データの取得を試みた。各試験水のヒメダ

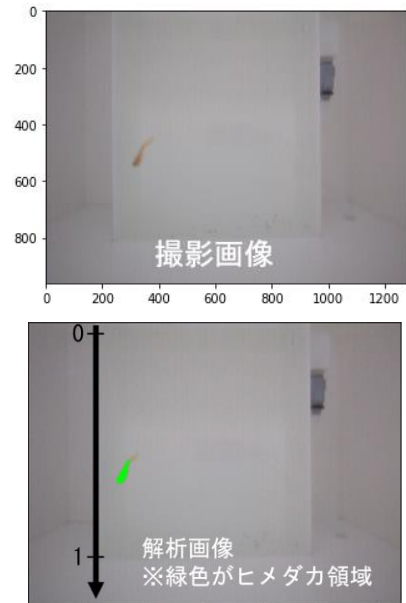


図-17 撮影画像とヒメダカの領域認識

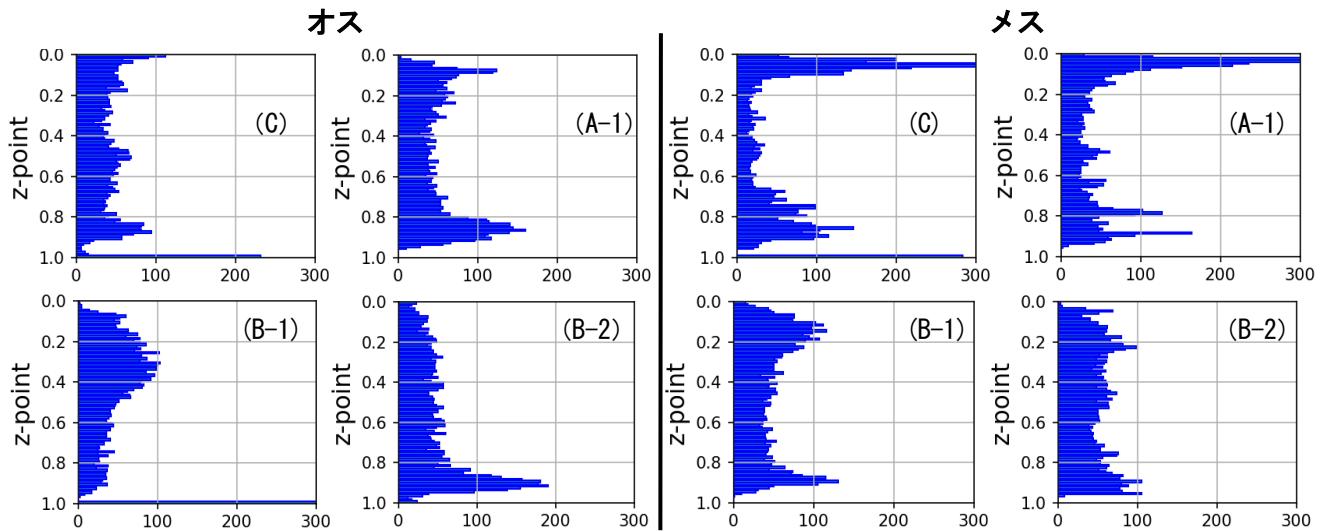


図-18 2週目時点のz方向座標のヒストグラム

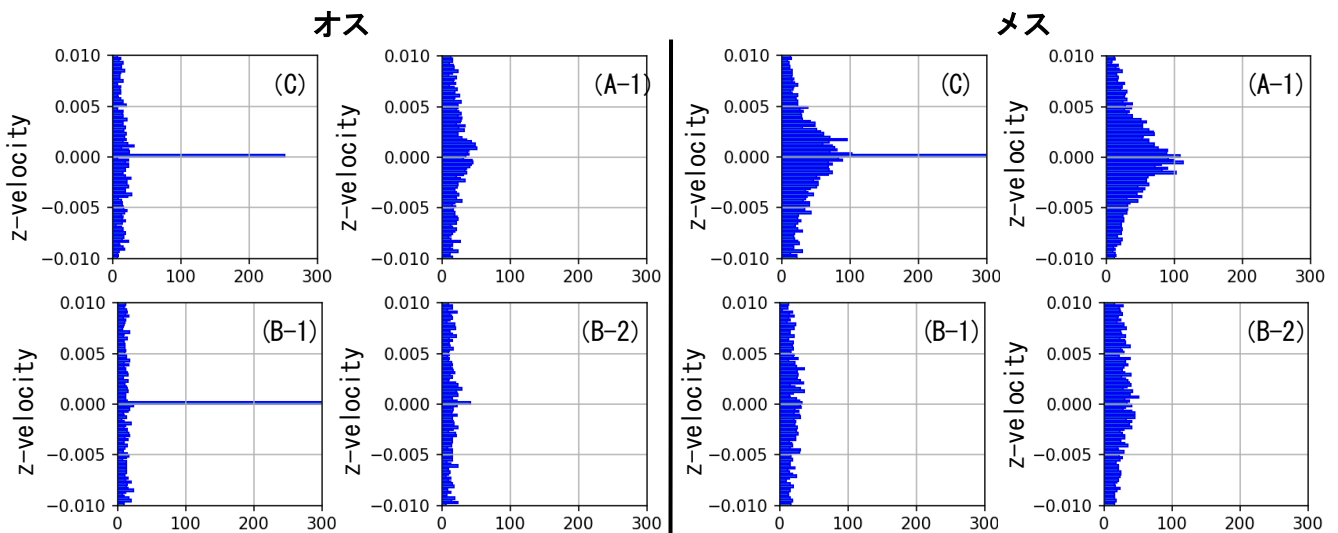


図-19 2週目時点のz方向速度のヒストグラム

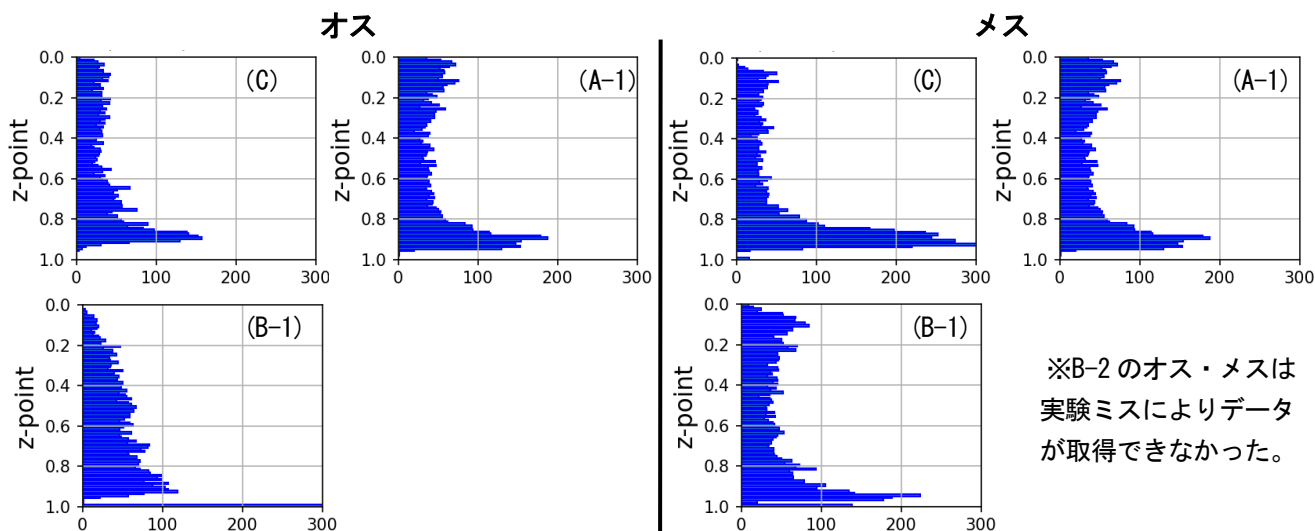


図-20 4週目時点のz方向座標のヒストグラム

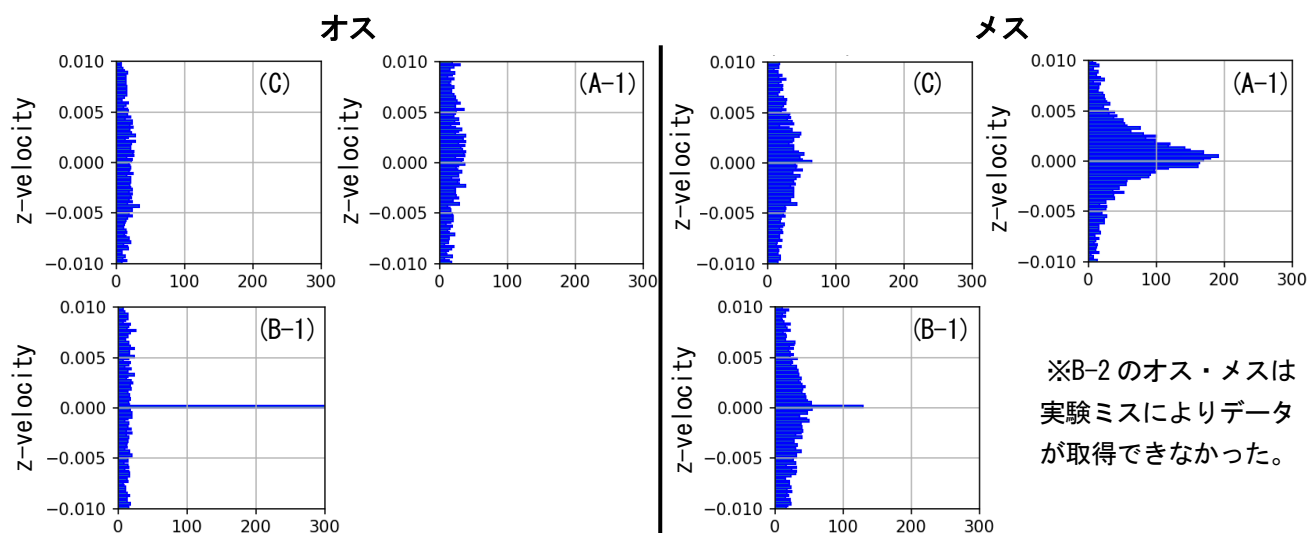


図-21 4週目時点のz方向速度のヒストグラム

カの撮影を1週間に一度の頻度で1回につき10分間の撮影を行った。魚類の行動周期の影響をなくすために13時から16時の間で設定し、撮影時は水槽にヒメダカを1匹にして、オス1匹とメス1匹の両方の撮影を行った。撮影には画素数960×1200 pixelのカメラ(Basler社製、daA1280-54uc)を使用し、フレームレート9.14 fpsで動画を取得した。これらの試験・撮影条件は魚類の行動解析に関する既報研究等<sup>28、29)</sup>や筆者らの予備検討を基に設定した。

撮影した画像の解析については、背景差分法<sup>31)</sup>を用いてヒメダカの領域認識を行い、ヒメダカ領域の重心を算出して各撮影時間における座標とした。撮影した画像のヒメダカの領域認識の例を図-17に示す。2台のカメラで撮影することで同時点の2画像の重心からエピポーラ線を計算し、3次元の座標を算出した。3次元座標の算出後、x、y、z座標をそれぞれ水槽の横・

縦・高さを基に0・1の範囲で規格化した。これらの解析にはPython OpenCVライブラリを主に使用した。

### 5.3 結果と考察

暴露開始から2週目の撮影における各試験水のオス及びメスのヒメダカのz方向座標のヒストグラムを図-18に、z方向速度のヒストグラムを図-19に示す。座標については脱塩素水道水と三次処理水を比較した際の明確な特徴はオスとメスともに見られず、NH<sub>4</sub>Clの添加の有無を比較しても特徴は見られなかった。速度については、メスのA-1とCの系列で0付近の頻度が高く、それらと比べてB-1やB-2では移動速度が大きくなる傾向が見られた。この結果から三次処理水によるヒメダカの行動に対する影響が存在する可能性が示唆された。

加えて、4週目の撮影におけるオス及びメスのヒメダカのz方向座標のヒストグラムを図-20、z方向速度



のヒストグラムを図-21 に示す。座標については 2 週目と同様に脱塩素水道水と三次処理水を比較した際の明確な特徴はオスとメスともに見られなかった。速度については、A-1 のメスにおいては 0 付近の頻度が高く、C や B-1 と比較して移動速度が小さくなる傾向が見られた。この結果から  $\text{NH}_4\text{-N}$  による影響が存在することが疑われたが、B-2 のメスのデータが取得できなかったため相互の比較はできなかった。

上記の結果から、2 週目や 4 週目のそれぞれの試験水のヒメダカの鉛直移動速度を比較すると三次処理水の水質や  $\text{NH}_4\text{-N}$  の存在が行動に対する影響を及ぼす可能性が示唆された。一方で、2 週目では C と B-1 の比較から三次処理水の影響が存在することが考えられたが、4 週目ではそれらの傾向が見られなかった。本実験では、1 週間に一度の撮影のため、2 - 4 週目の間の行動傾向の変化について 3 週目のデータを用いて追加の検討が必要と考えられた。また、暴露時間増加に伴う行動傾向の変化が著しい場合は、撮影頻度を増やした実験を行う必要があることも考えられた。

また、本実験では実験環境の制限により、一つの排水に対してヒメダカの個体サンプル数は  $n=1$  となっており、影響の個体差を考慮・評価するまでに至らなかった。加えて、動画の撮影も 10 分の撮影を週に 1 回の頻度であったため、動画データの取得も限定的であった。影響評価手法の構築に当たって、ヒメダカの個体サンプル数や動画の撮影頻度及び時間等については技術的検討が必要であると考えられた。

## 6. まとめ

### 6.1 アンモニア性窒素の担体処理特性把握

小規模下水処理場に適した簡易追加処理法として、下水二次処理水中  $\text{NH}_4\text{-N}$  について微生物保持担体と  $\text{NH}_4\text{-N}$  センサーを用いて、異なる担体流動性保持方法における省エネ効果と水質改善効果を検討した。本研究で使用した担体には、硝化細菌が高い割合で存在していることを確認した。反応槽容積当たりの硝化速度は、担体流動性保持を機械攪拌で行った実験において、嫌気無酸素好気法もしくは循環式硝化脱窒法の好気槽に担体を投入した際の最大硝化速度の 0.6-1.6 倍程度であった。担体流動性保持を曝気攪拌および機械攪拌で行った実験における、硝化窒素量当たりの曝気量はそれぞれ、 $0.80 \text{ m}^3/\text{g-N}$ 、 $0.60 \text{ m}^3/\text{g-N}$  となった。本研究における下水二次処理水中  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度範囲においては、担体流動性保持は機械攪拌で行った方が、より効率的に  $\text{NH}_4\text{-N}$  を除去できることが示唆された。嫌

気好気ろ床法を採用している、小規模下水処理場における、嫌気槽と好気槽の計画滞留時間の合計から、本実験装置の必要設置スペースは嫌気好気ろ床法の反応槽容積の 12%程度となることを確認したため、スペースの大幅な増加を必要とすることなく本処理装置を設置可能であることが示唆された。

### 6.2 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いたアンモニア性窒素の影響評価

日本河川に生息する淡水性付着藻類（緑藻、珪藻、藍藻）を選抜し、種感受性分布（Species Sensitivity Distribution, SSD）解析を用いて  $\text{NH}_4\text{-N}$  の影響評価を行った。愛知県矢作川と長野県広井川に生息する付着藻類について、優占状況や培養の安定性等に基づき、緑藻 3 種、珪藻 2 種、藍藻 2 種を選抜した。低濃度  $\text{NH}_4\text{-N}$  在下の影響試験では、*S. aestivale* と *N. pelliculos* が  $\text{NH}_4\text{-N}$  を栄養塩として利用し、プラスの影響を受けることを明らかにした。また高濃度  $\text{NH}_4\text{-N}$  存在下での影響試験を基に SSD 解析を行った結果、HC5 は  $7.6 \text{ NH}_4\text{-N mg/L}$  であることが明らかになった。これらの結果から、付着藻類に対する  $\text{NH}_4\text{-N}$  の影響は、プラスとマイナスの両面から考慮する必要があると推察される。

### 6.3 付着藻類を用いた種感受性分布解析を用いた結合塩素モノクロロミンの影響評価

日本河川に生息する淡水性付着藻類（緑藻、珪藻、藍藻）を用いて、SSD 解析によるモノクロロミンの影響評価を行った。本研究から、①モノクロロミンの影響評価は無機塩培地（AAP 培地）で検討する必要があること、②SSD 解析による淡水性付着藻類に対するモノクロロミンの影響濃度が、HC5 では  $0.01 \text{ mgCl}_2/\text{L}$  であること、③モノクロロミンが存在する処理水中では、モノクロロミンに強い種類の藻類が選択されて生育する可能性があることを明らかにした。クロロミンは処理水中に残存する遊離アンモニアが消毒に用いられる次亜塩素酸 Na と反応して生成されることが明らかになっている。このため、中和による影響低減の可能性も含め、水処理と塩素消毒の合理的な管理方法や紫外線等の代替消毒技術の効果的な適用等、環境影響と合わせた全体としての「水質安全性」の確保に向けて、さらなる検討が期待される。

### 6.4 下水処理水に連続暴露したヒメダカの動画解析による生物影響評価手法の検討

下水処理水に連続暴露したヒメダカの動画撮影を行い、画像解析手法を用いてヒメダカの行動を定量化した。それらの結果、脱塩素水道水に暴露した場合と

比べて、三次処理水または  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を添加した試験水に暴露した場合に、ヒメダカの行動の傾向の違いが確認された。しかし、それらの傾向の違いがヒメダカに対する生物影響を表しているかの判断には至らなかった。この結果より、下水処理水の魚類の行動への影響を定量的に評価する際に利用可能な基本的な動画解析手法を構築することができた。また、魚類を用いた動画撮影について撮影上の注意点や暴露を行うための実験設備や試験条件等についての課題を見出すことができた。このような動画解析手法を用いた生物影響評価手法により、排水に対する影響を調べていくことが期待される。

## 参考文献

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部：下水処理工程における化学物質等の除去特性及び生物影響に係る検討業務報告書、pp.22-30、平成30年3月
- 2) U.S. EPA: Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia – Freshwater 2013
- 3) U.S. EPA: Ambient water quality criteria for ammonia (Saltwater)-1989
- 4) 高橋正宏、鈴木穰：固定化微生物を用いた高度処理プロセスの実用化に関する調査、平成6年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.169-178、1993
- 5) 公益社団法人日本下水道協会：高度処理施設設計マニュアル(案)、1994
- 6) M. Christensson and T. Welander: Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area, *Water Science and Technology*, Vol.49, pp.207-214, 2004
- 7) Water Environment Federation: *Biofilm Reactors*, McGraw-Hill, 2010
- 8) Metcalf and Eddy: *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*, fifth edition, McGraw-Hill Education, 2003
- 9) 日本下水道事業団：包括固定化担体を用いた硝化促進型循環変法「ペガサス」の評価に関する報告書、平成5年4月
- 10) L. Svobodová, K. Havlíček, M. Nechanická, R. Špánek, B.K. Sirková, I. Lenfeldová, O. Louda, E. Moučková, T. Lederer: Microfiber structure for enhanced immobilization of nitrifying bacteria in a post-nitrification reactor, *Environmental Technology & Innovation* Vol.21, Article 101373, 2021
- 11) 厚朴大祐、北村友一、山下洋正：第57回下水道研究発表会講演集、pp.832-834、2020
- 12) 公益社団法人日本下水道協会：下水試験方法 平成24年度版、2012
- 13) S.J. Khan, S. Ilyas, S. Javid, C. Visvanathan, V. Jegatheesan: Performance of suspended and attached growth MBR systems in treating high strength synthetic wastewater, *Bioresource Technology* Vol.102, pp.5331-5336, 2011
- 14) S. Takahashi, J. Tomita, K. Nishioka, T. Hisada, M. Nishijima: Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing, *PLOS ONE*, 9 (8) : e105592, 2014
- 15) JIS K 0122：イオン電極測定方法通則、1997
- 16) 山崎廉予、出口浩：5か所の下水処理場における活性汚泥内細菌叢の分類比較、*日本水処理生物学会誌* 第49巻 第4号、pp.123-132、2013
- 17) S. Longo, B.M. d'Antoni, M. Bongards, A. Chaparro, A. Cronrath, F. Fatone, J.M. Lema, M.M. Iglesias, A. Soares, A. Hospido: Monitoring and diagnosis of energy consumption in wastewater treatment plants. A state of the art and proposals for improvement, *Applied Energy* Vol.179, pp.1251-1268, 2016
- 18) 公益社団法人日本下水道協会：小規模下水道計画・設計・維持管理指針と解説、2004
- 19) 公益社団法人日本下水道協会：平成29年度版 下水道統計
- 20) 公益社団法人日本下水道協会：下水試験方法上巻-2012年版- pp.292 (2012)
- 21) 微生物系統保存施設：培地リスト、[https://mcc.nies.go.jp/02medium.html#check\\_medium](https://mcc.nies.go.jp/02medium.html#check_medium)
- 22) 永井孝志：河川付着藻類を用いた農薬の毒性試験マニュアル Ver. 1.0、独立行政法人農業環境技術研究所
- 23) 永井孝志：農薬の生態リスク評価のための種の感受性分布解析 Ver. 1.0、国立研究開発法人農業環境技術研究所
- 24) 内田朝子、洲澤多美枝：早春における矢作川の付着藻類群集(種類組成)、2001-2014年、矢作研究会、No.21：21-43 (2017)
- 25) OECD：Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2011
- 26) 公益社団法人日本水産資源保護協会：53) アンモニア態窒素 (2020)
- 27) 川端雅博、亀屋隆志、小林剛、浦野絃平：ヒメダカの活動低下に着目した画像解析による水質異常検知特性、*水環境学会誌*、Vol.30、No.11、pp.645-650、2007
- 28) 竹内健一郎、加藤信介、金鐘訓、徐長厚、千野聡子、熊谷一清：室内ホルムアルデヒドがメダカに及ぼす影響の検討、*日本建築学会環境系論文集*、第74巻、第645号、pp.1237-1242、2009
- 29) Fatma Khalil, Ik Joon Kang, Suzanne Undap, Rumana Tasmin, Xuchun Qiu, Yohei Shimasaki, Yuji Oshima: Alterations in social

behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure, *Chemosphere*, 2013

30) 日本水道協会：上水試験方法 2011 年版 VI.生物編、2011

31) Gary Bradski, Adrian Kaehler, 松田晃一：詳解 OpenCV—コンピュータビジョンライブラリを使った画像処理・認識、

2011

32) 金俊：生物応答試験を用いた下水道放流水の生態影響評価, 富山県立大学大学院, 学位論文, 2019

# RESEARCH ON REDUCTION TECHNOLOGY OF AMMONIA NITROGEN REMAINING IN TREATED SEWAGE AND EVALUATION OF ITS EFFECT ON AQUATIC ORGANISMS

Research Period: FY2019-2021

Research Team: Water quality Team, Water Environment Research Group

Author: YAMASHITA Hiromasa

KITAMURA Tomokazu

TUSHIMA Ikuo

MIZUKAMI-MURATA Satomi

HATTORI Keita

HOUNOKI Daisuke

**Abstract:** Reduction of ammonia nitrogen concentration in treated wastewater may be discussed in the future in terms of the adverse effects of ammonia on aquatic life. Many wastewater treatment plants may require reduction measures when the target value of ammonia nitrogen concentration in treated wastewater is set to low concentrations. In this study, a post-nitrification process was evaluated for its treatment performance of ammonia nitrogen in secondary effluent. Moreover, the effects of ammonia nitrogen on aquatic life were examined by the SSD analysis using Japanese periphyton and the video analysis of fish behavior using Japanese medaka.

**Keywords:** Ammonia nitrogen, Chloramine, Biological reactor, Japanese periphyton, Image and Video Analysis.