



Title	活性汚泥微生物由来有機物の毒性評価に関する研究
Author(s)	成田, 裕樹; 船水, 尚行; 高桑, 哲男; 国本, 学
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 12, 101-104
Issue Date	2004-10-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/1240
Type	bulletin (article)
Note	第12回衛生工学シンポジウム（平成16年11月4日（木）-5日（金）北海道大学クラーク会館）. 一般セッション. 3 上下水道管理. 3-4
File Information	3-4_p101-104.pdf



[Instructions for use](#)

3-4 活性汚泥微生物由来有機物の毒性評価に関する研究

○成田裕樹, 船水尚行, 高桑哲男 (北海道大学工学研究科)
国本学 (北里大学薬学 (当時))

1. はじめに

排水の再利用や, 放流先の生態系への影響を評価する上で, バイオアッセイは重要な方法である^{1),2)}. その中でもヒト由来培養細胞系を用いた手法は, 環境水のヒトや生態系への有害性を簡易かつ多角的に評価, 監視可能な方法として注目されている³⁾.

下水処理水中に残存する有機物としては, 1) 流入下水中に含まれる難生物分解有機物, 2) 活性汚泥微生物由来有機物が考えられる. これらの有機物の由来を明確にするとともに, ヒトや生態系への有害性を評価することは, 処理水の毒性を制御する上で重要であると考えられる.

本研究では, 活性汚泥の自己酸化過程における毒性物質の生成調査と, それら有機物の由来を明らかにすることを目的として, 活性汚泥系試料の細胞毒性試験を行った.

2. 方法

2. 1 活性汚泥の長時間曝気

活性汚泥を基質無添加で連続送気することにより, 活性汚泥微生物の死滅により菌体由来有機物が増加することを想定して連続送気試験を行った. 活性汚泥試料として, 標準活性汚泥法にて運転されている下水処理施設の返送汚泥を用いた. サンプル時間は, 6, 30, 102, 150, 174 時間とし, 0.45 μ m メンブレンフィルターろ過試料について, DOC の測定及びバイオアッセイを行った.

2. 2 活性汚泥の超音波処理

活性汚泥微生物由来有機物の毒性評価を行うために, 活性汚泥微生物の超音波処理を行い, バイオアッセイに供した. 活性汚泥は, 超純水にて遠心洗浄したものを用いた. 超音波処理は浸漬型の装置を用いて室温にて行った. アッセイには処理時間 6, 9, 12 時間のろ過試料を用いた. また, 試料の Sep-Pak C18 カートリッジ透過水を親水性分画とし, アッセイに供した.

2. 3 超音波処理活性汚泥試料の生物処理

生物処理後の活性汚泥微生物由来有機物の毒性評価を行うために, 超音波処理活性汚泥試料のろ過試料を生物処理後, 試料をアッセイに供した. 供試汚泥及び超音波処理条件は 2. 2 に準じた. 生物処理として, 超音波処理後のろ過試料と活性汚泥との混合液を 12 時間エアレーションした. このろ過試料及び生物処理前後の親水性分画について, DOC の測定及びバイオアッセイを行った.

2. 4 バイオアッセイ

培養細胞として, ヒト由来神経芽細胞腫細胞 NB-1 及びヒト由来乳がん細胞 MCF7 を用いた. 凍結保存した各細胞を解凍後, 96 ウェルマイクロプレートに播き込みを行い, 48 時間培養した.

試料濃度が最大 80%となるように培地混合試料及び希釈系列を作成し、48 時間曝露した。曝露終了後、クリスタルバイオレット染色法によって生存率を推定した。EC₅₀ 値は、データ解析ソフトを用い、細胞生存曲線をシグモイド曲線にカーブフィットした後算出した。

3. 結果及び考察

3. 1 長時間曝気活性汚泥試料のバイオアッセイ

長時間曝気活性汚泥試料の LogEC₅₀ 値の経時変化を図-1 に示す。親水性分画の LogEC₅₀ 値は、曝気時間の経過に関わらずほぼ一定であり、長時間自己酸化過程において毒性を呈する親水性有機物の質はほぼ不変であると考えられた。対照的に、全分画の LogEC₅₀ 値は曝気開始後 30 時間目で最も低くなり、その後増加する傾向であった。親水性有機物の EC₅₀ 値が一定であることから、溶解質中の疎水性有機物の質が時間に応じ変化している可能性が示唆された。自己酸化過程において質変化を伴う疎水性有機物ということから、これらの有機物はフロック吸着性の有機物であると考えられる。

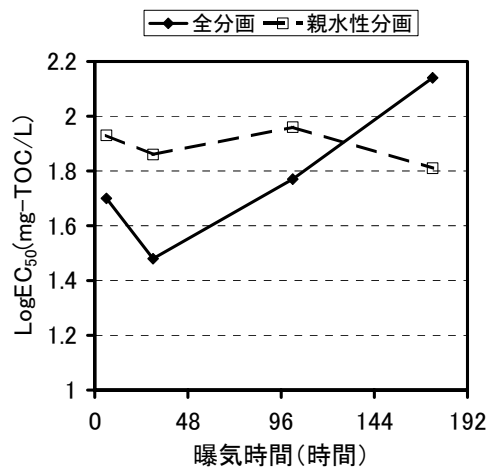


図-1 長時間曝気活性汚泥試料の LogEC₅₀ 値の経時変化

3. 2 超音波処理活性汚泥試料及び生物処理試料のバイオアッセイ

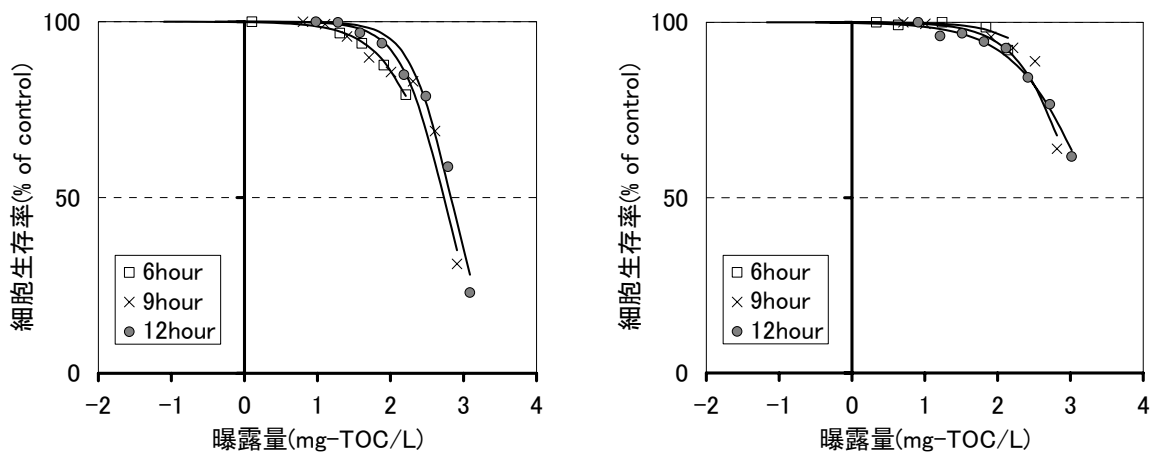
超音波処理活性汚泥試料の DOC 測定結果を表-2 に示す。全 DOC 濃度は、超音波処理時間の増加に応じて増加した。特に親水性有機物の存在割合が高かった。活性汚泥微生物細胞由来有機物の多くが親水的性質を持つことが確認できた。

表-1 超音波処理活性汚泥試料の DOC 測定結果

Sonication time(hour)	6	9	12
Hydrophobic fraction(mg/L)	29.8	202.5	229.2
Hydrophilic fraction(mg/L)	173.1	813.6	1298.3
DOC(mg/L)	202.9	1016.1	1527.3

超音波処理活性汚泥試料全分画のバイオアッセイ結果を図-2(a)に、同じく親水性分画の結果を図-2(b)示す。全分画、親水性分画双方の結果とも有意な用量-反応曲線を示し、微生物由来有機物が本アッセイ系で毒性を示すことが確認された。用量-反応曲線は、全分画・親水性分画試料それぞれ、超音波処理時間に関わらずほぼ同様の傾向を示し、超音波処理時間の長短に寄らず、

均質な試料が得られていることを示唆した。



(a)全分画

(b)親水性分画

図-2 超音波処理活性汚泥試料全分画の用量－反応曲線

超音波処理活性汚泥試料の生物分解試料についての DOC 測定結果を図-3 に示す。全 DOC 濃度は 1,438mg/L であった。12 時間の活性汚泥処理で分解可能な部分の割合は、全有機物濃度に対して約 70%であった。生物処理後に残留した難生物分解性部分のうち、約 90%が親水性分画であった。

図-4 に、超音波処理試料及び生物処理試料中親水性分画のアッセイ結果を示す。図中には 172 時間曝気試料中親水性分画のアッセイ結果も示した。172 時間曝気後の試料の毒性は、超音波処理試料及び生物処理試料より強い傾向を示した。超音波処理汚泥を生物処理した試料の細胞生存率は超音波処理試料のそれよりも高いが、この毒性が同種の有機物の影響によるものであれば、二つの試料の曲線は一致するはずである。しかし、図より、生物処理後の試料の曲線は図中左側にシフトしている。このことから、超音波処理試料中の親水性有機物の中で、毒性を呈する物質の方が生物分解性が低いと推察される。本実験では生物処理時間を 12 時間としたが、処理時間を延長することにより親水性有機物中の毒性物質は濃縮され、172 時間曝気試料の曲線に一致すると考えられる。

以上より、自己酸化過程において生成される毒性物質は、活性汚泥微生物細胞由来有機物中であり、親水性で難生物分解性であると考えられる。

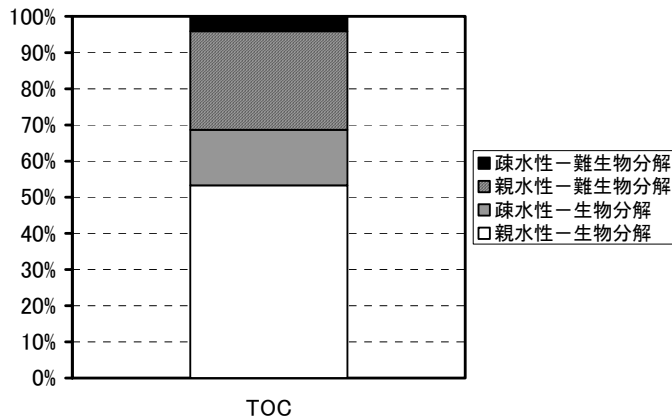


図-3 超音波処理活性汚泥試料の有機物分類

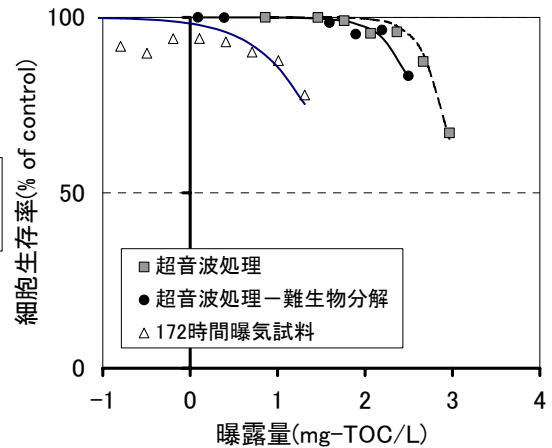


図-4 超音波処理試料及び生物処理試料親水性分画のアッセイ結果

4. まとめ

- 1) 長時間通気を行った活性汚泥試料の全分画及び親水性分画の LogEC_{50} 値の比較より、曝気開始後 30 時間までに毒性を呈する物質は、フロック吸着性の疎水性有機物であると推察された。
- 2) 超音波処理試料のアッセイ結果より、微生物由来有機物は、疎水性・親水性有機物ともに本アッセイ系で毒性を呈することが確認された。
- 3) 長時間通気活性汚泥試料、超音波処理活性汚泥試料及びその生物処理試料について、アッセイを行った結果、自己酸化過程において生成される毒性物質は、活性汚泥微生物細胞由来有機物中であり、親水性かつ難生物分解性であると考えられた。

参考文献

- 1) 国本 学, 安原 昭夫, 相馬 悠子, 中杉 修身(1996)哺乳動物培養細胞系を用いた水環境試料の毒性評価, 水環境学会誌, 19,855-860.
- 2) 鈴木 基之, 内海 英雄(1998)バイオアッセイ 水環境のリスク管理, 講談社, 42-54
- 3) 福島 寿和, 藤原 朋広, 杉浦 則夫, 本田 靖, 須戸 幹, 井上 隆信, 花里 孝幸, 大久保 卓也, 国本 学(2002)ヒト由来培養細胞系を用いた簡易バイオアッセイによる湖水試料中の有害性総合評価の試み, 水環境学会誌, 25,119-124.