

化学物質に対する活性汚泥の酸素吸収速度と生物吸着の関連性

三原 祐一,^a 井上 達明,^b 横田 勝司^{*,b}

The Relation between Oxygen Uptake Rate and Biosorption of Activated Sludge against Chemical Substance

Yuichi MIHARA,^a Tatsuaki INOUE,^b and Katsushi YOKOTA^{*,b}Wastewater Treatment Center,^a and First Department of Hygienic Chemistry,^b Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received October 8, 2004; Accepted November 25, 2004)

In this study, the elucidation of the toxicity mechanism was undertaken regarding the IC₅₀ of the oxygen uptake rate (OUR) with relevance to the biosorption as a toxicity evaluation of chemical substances for activated sludge (AS). At the IC₅₀ of <100 mg/l, malachite green (MG) and crystal violet (CV) were confirmed in the group showing relatively strong OUR inhibition. These dyes were markedly biosorbed by AS in a short time. The biosorption for AS showed a weak tendency in linear alkyl benzene sulfonate (LAS), alkyl ethoxy sulfonate (AES), alpha-olefine sulfonate (AOS), sodium dodecyl sulfate (SDS), formaldehyde (FA), benzalkonium chloride (BZaC), benzethonium chloride (BZeC), rhodamine 6G (R-6G) and fuchsine (Fuc) in which the IC₅₀ belonged to the 100—1000 mg/l group, when it was compared with CV and MG. In ethanol (EtOH), isopropanol (PrOH), Nile blue (NB), Evans blue (EB), methylene blue (MB), methyl orange (MO), paraquat (PQ), chlorophyllin (Chl) and auramine (Aur), the IC₅₀ was large, and the biosorption of AS was weak at 0—15%. The biosorption of MG for AS followed the adsorption isotherm equation $Y=0.002X^{0.511}$ of Freundlich. The correlation coefficient was $r=0.998$ ($n=8$), and a very high correlation was obtained. In the qualitative OUR curve by AS pretreated with MG or CV which belonged to the IC₅₀ small group, the inhibition of remarkable OUR was observed. Therefore, the findings of the present investigation suggest that the inhibition of the OUR for AS by the tested chemical substances was markedly affected by the biosorption.

Key words—activated sludge; biosorption; oxygen uptake rate; adsorption isotherm; chemical substance

はじめに

近年、科学技術の進展に伴って、多種多様の化学物質が広く用いられ、すぐれた製品を多数生産し、生活の向上に貢献してきた。現在、データベース Chemical abstracts service に登録されている化学物質の総数は 2000 万種を超えており、日本ではその内の 5—7 万種程度が医薬品や生活関連物質の製造を目的として日常利用されている。これらの化学物質の中には環境に放出される有害な化学物質も多い。このような意図的生成物や内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）によって生態系に悪影響を与えることが危惧されている。

これらの問題を解決するための対策としては、これまでに人の健康を損なう恐れがある化学物質によ

る環境汚染の防止を目的とした「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」があるが、それとは異なり、新たに「特定化学物質の環境への排出その把握等及び管理の改善の促進に関する法律（PRTR 法）」が施行されるに至っている。この PRTR 法は環境へ排出される化学物質を確実に管理し、有害性は勿論のこと、生体影響も評価することで環境保全の強化を図るものである。

筆者らは、これまでに環境保全を重視した立場から経済協力開発機構（OECD）で定めている生体影響試験法 10 種の 1 つである分解者としての活性汚泥（AS）の呼吸阻害試験（No. 209）に注目してきた。酸素吸収速度（OUR）測定装置を用いて AS の OUR に対する化学物質の 50% OUR 阻害濃度（IC₅₀）の算出方法を確立¹⁾するとともに、様々な化学薬品や市販製品の IC₅₀ を算出し、報告^{2,3)}したが、その他に、多くの研究者によっても AS を用い

^a東北薬科大学廃水処理施設, ^b同第一衛生化学教室
e-mail: k-yokota@tohoku-pharm.ac.jp

た化学物質の毒性評価法である IC_{50} の算出がなされているが、OUR 阻害のメカニズムについては全く不明であった。

そこで本報では、化学物質による AS の OUR 阻害メカニズムを解明するための基礎的研究として、AS に対する化学物質の親和性、いわゆる生物吸着と OUR の関連性について検討を加えた。

実験の部

1. 試薬 Paraquat (PQ) は和光純薬工業㈱の残留農薬試験用 PQ 標準品、Alkyl ethoxy sulfonate (AES, 平均分子量 428) と α -Olefin sulfonate (AOS, 平均分子量 308) は、いずれもライオン㈱研究所より供与されたものである。その他の試薬については、いずれも市販の特級品を使用した。

2. 分析方法 Sodium dodecyl sulfate (SDS), Linear alkyl benzene sulfonate (LAS), AES, AOS などの陰イオン界面活性剤は Methylene blue (MB) による比色法, Ethanol (EtOH) Isopropanol (PrOH) はガスクロマトグラフ法, Formaldehyde (FA) は 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (AHMT) による比色法,⁴⁾ Benzalkonium chloride (BZaC), Benzethonium chloride (BZeC) は Orange II による比色法,⁵⁾ PQ はアルカリ還元法による比色法,⁶⁾ Crystal violet (CV), Malachite green (MG), その他の色素類は、いずれもベックマン製 DU-68 型分光光度計による各極大吸収波長における比色法で分析した。

3. 活性汚泥 AS は宮城県内のかまぼこ製造工場の廃水処理施設から分取したものを前報⁷⁾の合成下水-I (ペプトン 3 g, カツオ製魚肉エキス 2 g, 尿素 500 mg, NaCl 150 mg, KH_2PO_4 500 mg, KCl 70 mg, $CaCl_2$ 70 mg, $MgSO_4$ 50 mg, 精製水 1 l, pH 6.2, 生物化学的酸素要求量 (BOD) 4200 mg/l) に加え、これを 2.5 l 容量の宮本製作所製連続式活性汚泥装置 (ASS 2.5P) で水理的滞留時間を 24 h に設定し、 $20 \pm 2^\circ C$ の恒温条件下で連続的に 3 年以上馴化培養したものを使用した。

4. 酸素吸収速度 (OUR) 測定装置 クラーク型ポーラログラフ溶存酸素 (DO) センサーはセントラル科学製オキシグラフ 8 型を使用し、反応セルは主として注入口が中央部に 1 ヶ所の 2 ml のも

のをを用い、各化学物質の各濃度による 20 μ l を添加することによって活性汚泥 OUR の阻害について測定した。

5. IC_{50} の測定方法 AS に対する化学物質の IC_{50} の測定は、合成下水-I にグルコース (1 g/l) を加えた合成下水-II⁷⁾ を上記 4 項の 2 ml の反応セルに入れたものについて、前報¹⁾と同様の操作法を行い、50%前後の阻害濃度となる 2 点を求め、これを片対数方眼紙にプロットして算出した。

6. 生物吸着試験 化学物質に対する AS の生物吸着試験は、OUR 阻害のメカニズムを解明する目的から実施したもので、合成下水-II と活性汚泥浮遊物質 (MLSS) 2000 mg/l の AS 10 ml に 100 mg/l の化学物質 10 ml を加え、経時的に 4 ml を抜き取り、遠心分離 (4000 rpm, 10 min) した遠心上清液 (2 ml) を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したろ液を用いて、AS に吸着されなかった化学物質の量を間接的に算出した。

7. 等温吸着線 IC_{50} が小さく、OUR の阻害作用が強い MG と CV の等温吸着線は次の方法で求めた。精製水 2 ml に MG 及び CV の様々な濃度溶液に MLSS 6000 mg/l の AS 2 ml を加え、室温 (約 $21^\circ C$) でスターラーを用いて 30 分間攪拌した。ついで遠心分離 (4000 rpm, 10 min) した遠心上清液を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過した。そのろ液について比色定量を行い、各色素の AS への吸着量を求め、色素の残存濃度と吸着量のプロットから等温吸着線を作成した。

8. 一定過剰の化学物質で処理した AS の調製法 合成下水-I で馴化培養した AS の 100 ml を遠心分離と水洗によって洗滌した AS の各 2 ml (乾燥 AS 量として約 200 mg 含有) を出発材料とした。ついで、これに終濃度が 100 ppm となるように各化学物質を加え、 $30^\circ C$ で 1 h 反応後、遠心分離と水洗の操作を 10 回繰り返すことによって過剰の化学物質を除去した系を化学物質前処理 AS 群とした。また Control としての AS 群は、化学物質を加えないで全く同じ操作法によって調製したものをを用いた。

結果と考察

1. AS による化学物質の吸着 Table 1 には LAS から Auramine (Aur) までの供試した化学物質 20 種について AS の 50% OUR 阻害より算出し

Table 1. Effects of Various Chemical Substances on the IC₅₀ Value and the Biosorption by Activated Sludge

Chemical substance	IC ₅₀ value (mg/l)	Residual chemical substance in the supernatant ^{a)}		
		5 min	30 min	60 min
Linear alkyl benzene sulfonate (LAS)	360	90	72	67
Alkyl ethoxy sulfonate (AES)	480	92	84	80
Alpha-olefine sulfonate (AOS)	260	96	88	83
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	290	91	80	76
Ethanol (EtOH)	>10000	100	100	100
Isopropanol (PrOH)	>10000	100	100	100
Formaldehyde (FA)	400	67	47	37
Benzalkonium chloride (BZaC)	270	46	13	12
Benzethonium chloride (BZeC)	180	42	10	9
Crystal violet (CV)	32	18	9	7
Malachite green (MG)	28	20	14	10
Nile blue (NB)	>1000	90	82	80
Evans blue (EB)	>1000	92	87	85
Rhodamine 6G (R-6G)	690	89	60	55
Fuchsine (Fuc)	960	92	68	64
Methylene blue (MB)	>1000	93	89	85
Methyl orange (MO)	1500	100	99	99
Paraquat (PQ)	>12500	100	100	100
Chlorophyllin (Chl)	>1250	100	98	99
Auramine (Aur)	>25	100	99	99

a) The concentration of each chemical substance which remained at reaction 0 min was regarded as 100%.

た IC₅₀ と AS による生物吸着の時間経過による変動結果を示した。

OUR 阻害が比較的強く、IC₅₀ (100 mg/l 以下) の小さなグループに MG (28 mg/l) と CV (32 mg/l) の存在が確認された。この 2 つの化学物質は、いずれも反応開始 5 分後より著しく減少することから AS に対し強い生物吸着がみられた。その吸着は時間の経過とともに増大する傾向が示され、反応 60 min において CV で 93%、MG では 90% が吸着を受け、両色素の AS による生物吸着は反応 1—2 h でプラトーに達した。

次に IC₅₀ が 100—1000 mg/l のグループに属する LAS (360 mg/l)、AES (480 mg/l)、AOS (260 mg/l)、SDS (290 mg/l)、FA (400 mg/l)、BZaC (270 mg/l)、BZeC (180 mg/l)、Rhodamine 6G (R-6G; 690 mg/l)、Fuchsin (Fuc; 960 mg/l) などでは、AS による生物吸着は CV や MG と比較し、弱い傾向が示された。また IC₅₀ の大きなグループの EtOH、PrOH、Nile blue (NB)、Evans blue (EB)、MB、Methyl orange (MO)、PQ、Chlorophyllin (Chl)、Aur などでは、AS に対しほとんど吸着しないか、又は吸着が

微弱であった (0—5%)。

なお、AS に対し供試した化学物質の減少は吸着、結合、粘着、凝集あるいは生物分解などの様々な反応形態が予測されるが、本論文ではこのような現象をすべて生物吸着なる用語で統一することとした。

2. MG の AS に対する等温吸着線 AS に吸着され易く定量法が比較的簡単な MG と CV を用いて等温吸着線を作成した。Figure 1 には MG の吸着線 Y (g-MG/g-MLSS) とその時の水中残存 MG 濃度 X (mg/l) を対数方眼紙にプロットした結果を示した。これら 2 つのパラメータはいずれもほぼ直線関係にあることから、MG の AS への吸着は Freundlich の等温吸着式に、まとめられることが分かった。Figure 1 の MG に関するグラフより次式 (1) $Y=0.002X^{0.511}$ の関係式が導かれ、その相関係数は $\gamma=0.998$ ($n=8$) となり、極めて高い相関性が観察された。上述の式から MG の平衡濃度 1 ppm での AS への吸着量は乾燥 AS 1 g 当たり 24.5 mg [24.5 g-MG/kg-AS (dry)] と算出されることから、MG が AS に非常に吸着され易い物質であることが

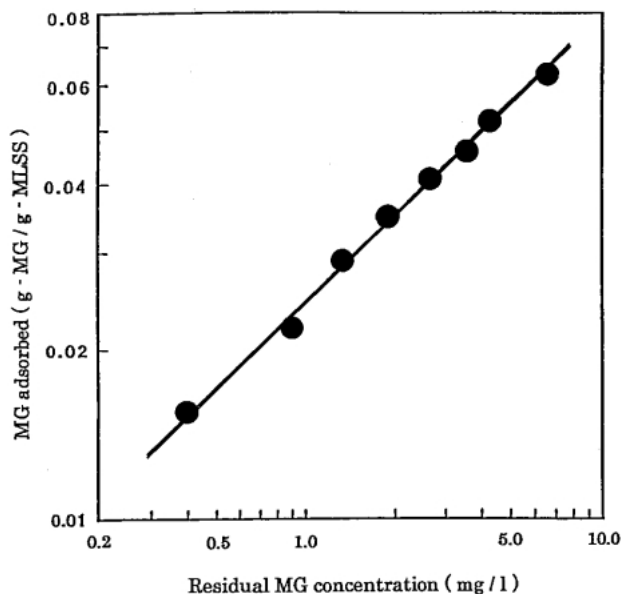


Fig. 1. Adsorption Isotherm for Activated Sludge of Malachite Green (MG)

MG at various concentrations was added to 2 ml AS (6000 mg/l MLSS). The mixture was allowed to react at room temperature for 30 min and filtrated. The absorption of the filtrate was measured, and the amount of MG adsorption was obtained from the residual concentration, and an adsorption isotherm was produced.

確認できた。なお、CVについてもMGと同様にプロット（結果は略す）したところ、乾燥AS 1 g当たり 13.3 mg [13.3 g-CV/kg-AS (dry)]（データ示さず）とMGよりは弱い傾向を示したが、CVもASに効率よく吸着することが認められた。

このようにASに対するMG及びCVの吸着は、これまでの報告⁸⁾と同様に Freundlich の等温吸着式に従うことが示された。

3. 過剰の化学物質で前処理したASのOUR曲線 あらかじめ2 mlのセル内で攪拌によって曝気した合成下水-IIの1.8 mlに、終濃度100 ppmの各供試した化学物質で30°C、1 h前処理を行ったAS並びに未処理AS (Control) の各0.2 ml (乾燥ASとして20 mg相当量)を加えたものをDO 100%とした。ついで直ちに密栓し、時間の経過とともに glucoseの酸化によるOURを測定し、その結果をFig. 2に示した。図からも明らかなように Mercury (II) chloride, Copper (II) chloride, BZaC, BZeC, FA, MG, CVなどでは著しいOURの阻害が観察された。Tin (II) chlorideでは中程度、NBではわずかなOUR阻害がそれぞれ認められた。しかし、PQ, MO, Phenol, EtOH, PrOHなどではControlと同様に、およそ2-3分程度でDOを消費することから、

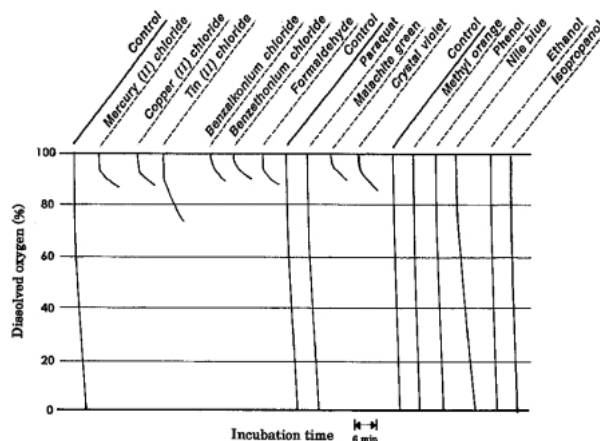


Fig. 2. The Comparison of the Qualitative OUR between Untreated Activated Sludge (Control) and the Activated Sludge Pretreated by Each Chemical Substance

OUR curves are shown for AS treated with each chemical substance at a final concentration of 100 ppm at 30°C for 1 h and untreated AS. For measurement, 1.8 ml synthetic sewage-II and 0.2 ml AS were placed in a reaction cell (2 ml) with the stopper open. DO was adjusted to 100% by exposure to air by stirring, and OUR after sealing the cell was serially measured.

OURには全く影響を与えなかった。なお、水溶性の高いPQ, EtOH, PrOHについては10倍濃度の1000 ppmでASを処理しても、そのOURはControlと同様に影響を受けることはなかった。

以上の結果から、供試した各化学物質のIC₅₀は文献値⁹⁻¹³⁾とほぼ一致することが示された。このようにASのOUR阻害の強弱はASを構成する微生物の細胞膜あるいはその周辺 (OUR関連酵素系など) に対する化学物質の吸着力の差に起因することが推察された。Gutiérrezら¹⁴⁾は最近、化学物質の毒性評価法として Microtox[®]とASによる3 hのIC₅₀を用いている。このことはASで算出したIC₅₀が今日でも重要な役割を果たしていることを意味している。筆者らは前報⁷⁾において代表的な有害化学物質10種による化学的酸素要求量 (COD) 除去率, OUR, 生物吸着の3つのパラメータを用いた予備試験でOUR阻害の1つとして生物吸着の可能性を示唆した。したがって、本研究から得られた知見のすべては前報⁷⁾をさらに強く支持する結果となった。しかし、ASのOUR阻害の詳細なメカニズムについては現在のところ不明である。このメカニズム解析の困難な最大の原因は、ASの細胞膜をより温和な方法で破壊することが不可能な点にあり、その早急な解決が待たれるところである。

近年、わが国でも環境ホルモンの作用が類似している化学物質としての医薬品や石鹸・シャンプー・

化粧品などの日常品, すなわち Pharmaceuticals and Personal Care Product が水環境や下水道に流入することによる水生生物やヒトへの影響が強く懸念されるようになってきた. 筆者らは現在, 医薬品についても検討を進めており, その詳細を近く続報する予定である.

REFERENCES

- 1) Mihara Y., Furusawa N., Akiba M., Ikeda S., Saito K., Shiroto N., Yokota K., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **37**, 179–184 (1991).
- 2) Mihara Y., Hagioita K., Furusawa N., Kondo T., Ogasawara T., Yokota K., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 523–528 (1992).
- 3) Hagioita K., Mihara Y., Goto M., Yokota K., Ishida M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 172–177 (1995).
- 4) “Methods of Analysis in Health Science 2000,” ed. by The Pharmaceutical Society of Japan, Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, 2000, pp. 414–415.
- 5) Kato M., Izawa K., Ogata Y., Kimura K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 1449–1451 (1963).
- 6) Miura O., Sasaki Sa., Sasaki Sh., Kagaya S., Sugaya T., Suzuki Y., Mizugaki M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **32**, 167–170 (1986).
- 7) Hagioita K., Mihara Y., Ishida M., Yokota K., *J. Jpn. Soc. Water. Environ.*, **19**, 508–512 (1996).
- 8) Paolo B., Gabriele F., Maria L. R., *Water. Res.*, **27**, 821–827 (1993).
- 9) Dutka B. J., Nyholm N., Petersen J., *Water. Res.*, **17**, 1363–1368 (1983).
- 10) Nirmalakhandan N., Arulgnanendran V., Mohsin M., Sun B., Cadena F., *Water. Res.*, **28**, 543–551 (1994).
- 11) Ishii H., Kaji T., Noguchi J., *Jpn. J. Water. Pollu. Res.*, **4**, 197–203 (1981).
- 12) Yoshioka Y., Ose Y., Goto M., Hikino H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **33**, 11–19 (1987).
- 13) Anderson K., Koopman B., Bitton G., *Water. Res.*, **22**, 349–353 (1988).
- 14) Gutiérrez M., Etxebarria J., Fuentes L. de las., *Water. Res.*, **36**, 919–924 (2002).