

## ◆ 水質リスクマネジメント特集 ◆

# 下水道における内分泌搅乱化学物質の微生物処理

小越真佐司\* 山縣弘樹\*\*

## 1. はじめに

ホルモン(内分泌物質)は生体内で作られ様々な情報伝達に携わっている物質の総称である。内分泌搅乱化学物質とは外部から生体内に取り込まれるとホルモンと同じ作用をしたり、ホルモン作用を妨げたりする物質であり、環境省(旧環境庁)によって67種類<sup>1)</sup>あげられている。

これらの中には広く日常的に使われる食器に含まれているものや、洗剤の成分或いはその原料として用いられているものがあり、下水中にも排出されている。したがって、下水道は環境中への主な排出ルートの一つであり、下水処理場における除去が環境汚染防止の立場から重要である。

下水処理場に流入する内分泌搅乱関連物質として主要なものは女性ホルモン( $17\beta$ エストラジオール等)、ノニルフェノール(アルキルフェノール類の代表的な物質)及び生物作用によってノニルフェノールに変わりうる物質で洗剤成分として多く使用されているノニルフェノールエトキシレートである。筆者らは、これらの物質の活性汚泥による処理水準を向上させる手法を開発するため、分解微生物や除去機能影響要因について平成11年度より調査を行っている。ここでは、平成12年度末までの調査結果について報告する。

## 2. 女性ホルモン及びノニルフェノール分解微生物の探索

### 2.1 分解微生物探索の方法

女性ホルモン(以下E2と記す)あるいはノニルフェノール(以下NPと記す)の流入濃度が下水処理場相互の比較において高いと判断される6カ所の下水処理場と、し尿処理場1カ所を選び、エアレーションタンク末端の活性汚泥及び返送汚泥を微生物の分離源として採取した。この活性汚泥の一定量を、E2又はNPの何れか一方だけを有機基質として含む培地(集積培地)に接種し、28℃

で好気性培養した。3~4日培養し、基質が消耗すると微生物を同じ組成の新しい培地に移すことを数回繰り返し、E2またはNPを利用できない微生物を淘汰した。得られた最終の培地の一部を薄層クロマトグラフィーにかけ、培地中の有機基質の減少をクロマトグラフ上で判定し、基質が減少していないものを除外した。基質減少有りと判定された培地は、その一部を従属栄養細菌用平板培地に薄く塗り広げて28℃で培養し、出現したコロニーから単一株を分離した。このようにして分離された各単一株を、再度、集積培地で培養し、有機基質減少の薄層クロマトグラフによる判定を行って株を選別した。E2又はNPを減少させる株(以下、資化性株という)について、再び従属栄養細菌用平板培地上で單一性を確認した後、対象物質の減少速度を計測した。

減少速度は、培養温度、時間、初期基質濃度を一定の条件で培養し、培養終了時の基質濃度を機器分析によって計量して初期基質濃度との差を求めて算定した。

### 2.2 分解微生物探索の結果

7カ所の活性汚泥と返送汚泥、計14種の分離源から、2種類の集積培地を用いて探索した結果、E2の減少が確認された集積培地から83株、NPの減少が確認された集積培地から21株が分離され、そのうちE2資化性株14株、NP資化性株6株が確認された。活性汚泥に生息するNP分解微生物はE2分解微生物より種類が少ないという結果であり、下水中にはE2より高濃度で存在するNPも自然界では最近出現した新しい物質で、分解微生物の分布が限られていることを示すものと考えられる。資化性株による基質減少速度測定結果は表-1に示す通りであった。

表-1から、E2資化性株には初期濃度7mg/lの99%以上を分解するものが存在するのに対し、NP資化性株では初期濃度30mg/lの高々62%を分解できるものが見出されただけである。このようにNPの分解性が低い原因としては異性体の存在が

考えられる。即ち、工業的に製造され実際に使用されているNPには、図-1に示すようにノニル基の位置が異なるものの他、ノニル基が直鎖型であるものと側鎖型であるもの等、様々な異性体が含まれることが知られている。一般的に微生物は異性体毎に分解性が異なるのが普通であるから、様々な異性体の混合物であるノニルフェノールを全て分解する單一種の微生物は特異であり、今回

表-1 資化性株による基質減少速度測定結果

基質	株番号	初濃度 mg/ℓ	10日後濃度 mg/ℓ	分解率 %
17βエストラジオール	F1		2.87	59.2
	F2		0.02	99.8
	F3		2.52	64.2
	F4		0.31	95.5
	T21		3.69	47.6
	T22	7.03	0.38	94.6
	T23	mg/ℓ	2.49	64.6
	T31		0.12	98.3
	T41		3.76	46.5
	T42		3.2	54.5
ノニルフェノール	T43		2.04	70.9
	T44		1.54	78.2
	T45		2.73	61.2
	T46		0.9	87.2
	FN1		12.27	59.7
	T2N1		18.82	38.1
ノニルフェノール	T2N2	30.43	19.66	35.4
	T3N1	mg/ℓ	25.74	15.4
	T3N2		11.51	62.2
	FN2		20.66	32.1

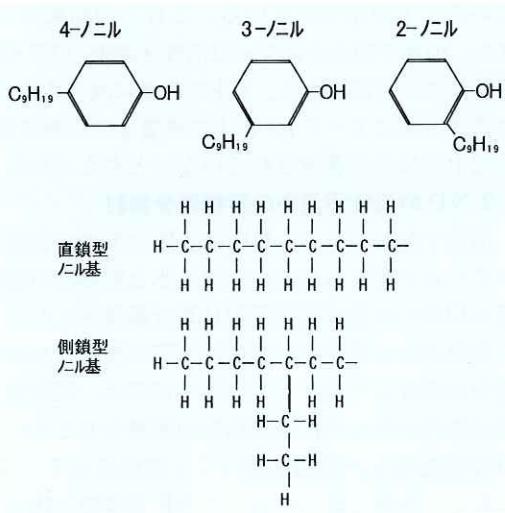


図-1 ノニルフェノールの異性体

の探索では見つからなかったものと考えられる。図-2はE2集積培地の薄層クロマトグラフ(以下TLCと記す)の例である。11と15の位置に置いた集積培地以外はE2に相当するバンド(図中の矢印の位置にある)が消失もしくは薄くなってしまっており、E2が分解されていることを示している。一方、図-3は單一株のE2資化性を判定したときのTLCの例である。図に示されている2つのバンドの下のものはE2、少し上にあるものはE2が少し変化したエストロン(以下E1と記す)である。2、4の位置に置いた培地からはE2が消滅してE1に変換されており、3、5の位置に置いた培地ではE2の一部は残り、一部はE1に変化していることが示されている。表-1に示されたE2資化性株は

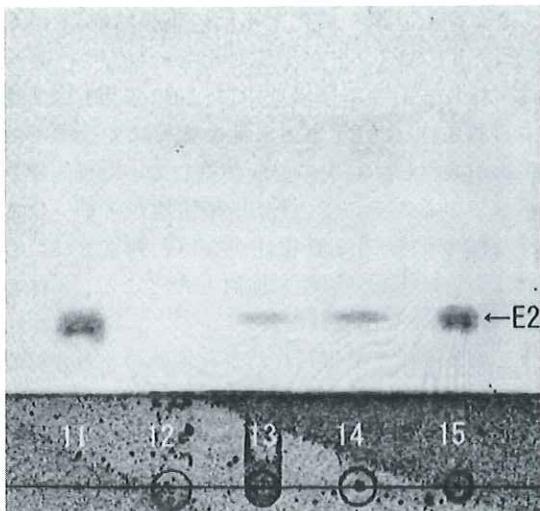


図-2 集積後の培地 TLC の例 (E2 基質)

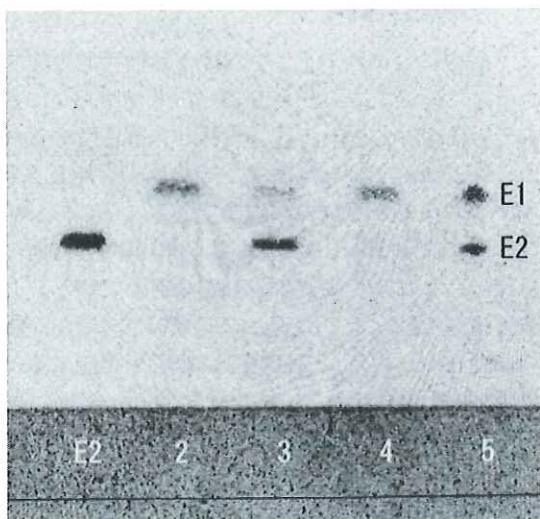


図-3 単一株培養後の培地 TLC 例 (E2 基質)

表-2 単離された資化性株の同定属名

株No.	分解物質	同定属名	特徴
T45	E2	<i>Rhodococcus</i>	グラム陽性 橙色コロニー
T31	E2	<i>Candida</i>	グラム陽性 硝酸還元+
T3N2	NP	<i>Micro-monospora</i>	グラム陰性 黒色コロニー-硝酸還元+
FN1	NP	<i>Moraxella</i>	グラム陽性 硝酸還元+
F5	E1	<i>Micrococcus</i>	グラム陽性球菌
T53	E1	<i>Rhodococcus</i>	グラム陽性 桃色コロニー-硝酸還元+

全て E2 を E1 に変えるものであった。

図-2 と図-3 は同じ方法で得られた TLC であり、E2 と E1 は同じ位置のバンドとして出現する。しかし、単一株化する前の集積培地の TLC では、E1 のバンドが出現したものはなく、単一株化される前の集積培地中には E2 を E1 に変換する微生物と、E1 を更に他の物質に変換する微生物が共存し、高次の分解が生じていた可能性を示している。そこで、E2 集積培地から単一化された株のうち、E2 資化性がないと判定されたものについて E1 分解性を検討したところ、8 株の E1 分解株が見出された。

このようにして得られた資化性株のうち分解能力が高い代表株各 2 株について同定を行った結果、これらの微生物は各々表-2 に示すようなグループに属していることが判明した。

### 3. 活性汚泥処理による内分泌搅乱化学物質等の除去機構

下水中に含まれる E2 や NP は活性汚泥処理プロセスで除去される場合が多いことが明らかにされている<sup>2)</sup>。しかし、除去機構が未解明であるため、除去が不十分な処理場で採るべき改善手法を示すことができないのが現状である。そこで、活性汚泥による E2 や NP の除去機構解明を当面の目標に、これらの物質の挙動を検討している。なお、検討を行う上で障害となる分析上の問題が幾つか存在し、現時点では完全に挙動を把握するには至っていない。

#### 3.1 E2 及び NP の挙動

図-4 は、実下水を処理している実験プラントで行った、活性汚泥プロセスの物質収支調査結果<sup>3)</sup>である。NP は流入水中の濃度に較べて汚泥中の



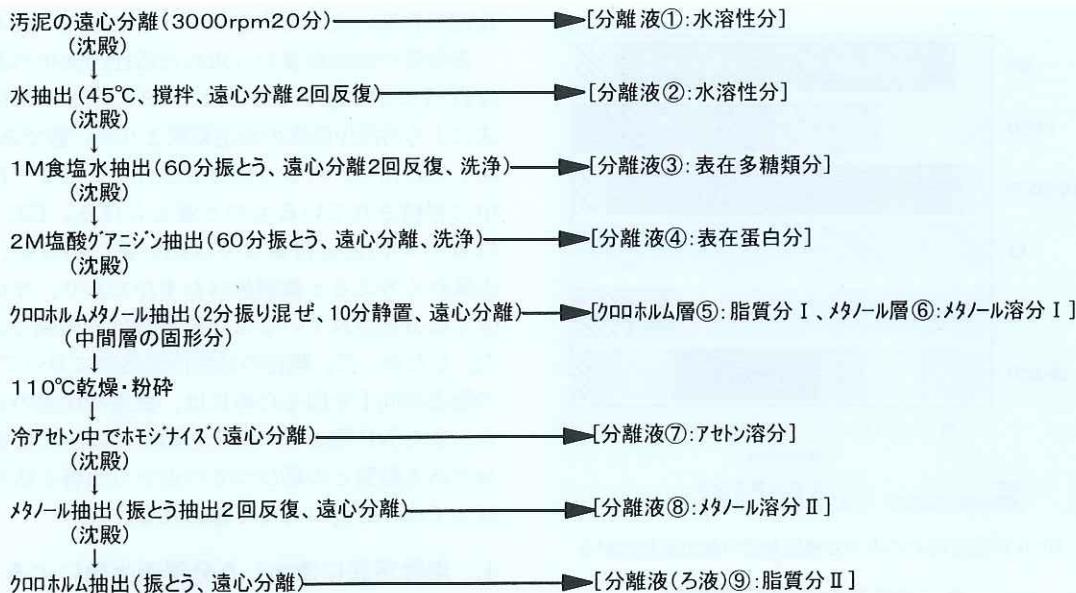


図-5 活性汚泥中の内分泌擾乱物質の抽出法

の可能性も否定できない。

そこで活性汚泥中に移行した NP 等の内分泌擾乱物質が活性汚泥中のどの様な物質と共存しているか検討し、抽出法の改善や除去機構の詳細な解明に必要な情報を得ることとした。

NP は疎水性物質であり、汚泥中の脂質等に吸着されて存在しているものと考えられる。しかし、予備的に行った抽出試験では、脂質類の抽出に通常用いられるヘキサンやメタノール等の単一の抽出液による短時間操作では抽出できることが判明している。生物試料中の脂質は糖、蛋白との複合体として存在しており単一溶媒での抽出は困難とされ<sup>4)</sup>ており、予備試験結果はこれを裏付けているようであった。また、細菌の中には細胞膜の外側に多糖類等から成る層(莢膜)を有するものもあり、これらとの結合も考えられた。そこで、生物試料から特定成分を抽出する様々な方法の中から、細菌脂質の抽出法を核に、比較的容易に抽出操作ができる方法を幾つか選び、それらを組み合わせて図-5に示す段階的な抽出を試みた。各段階の抽出液について、NP の他に、E1、E2、NPEO(ノニルフェノールエトキシレート：非イオン界面活性剤で環境中で分解され NP に変わると云われている)、NPEC(ノニルフェノールエトキシ酢酸：NPEO が NP に分解される過程で生じる物質の一種) および女性ホルモン受容体と競合結合反応を示す物質の総量(女性ホルモン

表-4 抽出液成分の分析法

分析項目	前処理法	分析法
NP	固相抽出 (ヘキサン・クロロホルム)	GC-MS法
NPEO	同上	高速-LC法
NPEC 及び ノニルフェノ キシ酢酸	固相抽出	GC-MS法
E2 及び E1	固相抽出	LC-MS法
BEACON	固相抽出 (酢酸エチル・メタノール)	蛍光偏光度法

G:ガス、L:液体、C:クロマトグラフィー、MS:質量分析

作用を擾乱すると考えられる物質の総量で、以下 BEACON と略記) を分析した。各成分の分析に用いた方法は表-4 に示す通りである。

図-6 は抽出試験の結果を、各物質が汚泥中のどの部分に主に含まれていたかを全抽出量に対する構成比で示したものである。図-6 から、各成分の汚泥中の存在部位について以下のように考えることができる。

NP は 2 つの脂質画分中にはほぼ同量含まれ、両者の合計で全体の 80% を占めることから、脂質成分と共に存在している。2 回目の脂質抽出は、液状汚泥からの抽出が終了した後、残った汚泥を乾燥粉砕して再度行ったものであり、元の汚泥組織が破壊された状態で抽出可能になった成分であると考えられる。従って、NP の一部は生物体を構成する組織の深部に蓄積されているものと考えられる。

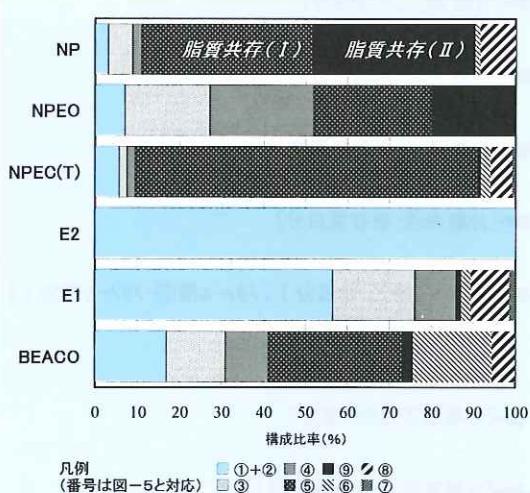


図-6 活性汚泥中の内分泌擾乱物質の抽出部位別割合

表-5 活性汚泥中の濃度 (積算値)

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\ell$ )
NP	61.8
NPEO	27.5
NPEC 及びノニルフェノキシ酢酸	194.1
E2	0.00306
E1	0.00568
BEACON*	1794

\* BEACON の値は  $17\beta$  エストラジオール換算値

E2 は全て水溶性画分に含まれており、そのほとんどは温水によって抽出されたものである。E1 はおよそ半分が水溶性画分に含まれ、残りは多糖類や蛋白質と共に存在し、E2 より強固に汚泥組織と結びついていると考えられる。

NPEO は水溶性やメタノール画分に含まれる割合が小さく、主として脂質と共存し、多糖類や蛋白質と共に存在する割合も多い、という結果であった。NP と同様に 2 回目の脂質抽出画分にも含まれており、組織深部の脂質にも蓄積されていると考えられる。

NPEC は NP と同様に全体の 80%が脂質画分に含まれるという結果であるが、2 回目の脂質抽出画分からはほとんど検出されなかった。したがって、NPEC は比較的表層の脂質と共存しているものと考えられる。

BEACON で示された女性ホルモン作用擾乱物質総量は脂質画分のものが最大であるが、全体の 30%強に過ぎない。様々な部分に分布しているが、2 回目の抽出画分に含まれる割合は低く、多くは

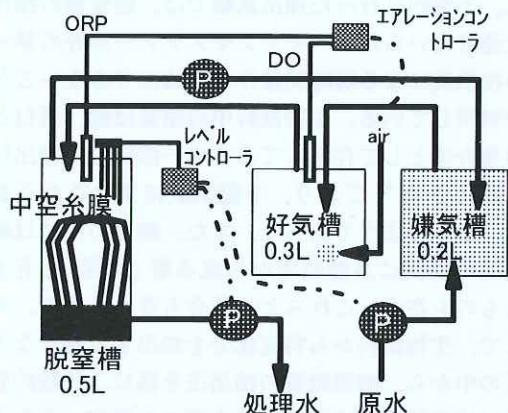
比較的表層の成分と共存していると考えられる。

各物質の総抽出量から求めた活性汚泥中の濃度は表-5に示す通りであった。NP に関しては従来法による汚泥中濃度の測定結果より高い値であり、除去された NP の多くは分解されることなく汚泥中に蓄積されているものと考えられる。E2、E1 は表-3 の汚泥分析値よりは高い値であるが、除去量から考えると蓄積量はわずかであり、やはり多くは分解されていることを裏付ける結果であった。したがって、既存の活性汚泥処理において E2 の除去率向上を図るために、微生物反応の点から、また NP 除去率の向上を図るには主な蓄積部分である脂質との結びつきの点から改善手法を検討してゆく必要があると思われる。

#### 4. 活性汚泥に添加した分解微生物によるノニルフェノールの処理

##### 4.1 実験方法

膜分離活性汚泥法室内実験装置(図-7)を 2 系列用い、NP 1mg/l を添加した K 下水道浄化センターの流入水を約 1 ヶ月供給して、活性汚泥を NP に馴致した後、一方の系(SY1)に NP 資化性株を添加し、無添加系(SY3)と処理水の NP 濃度を GC-MS 法によって分析して比較した。膜分離活



SY1 分離膜面積 740cm<sup>2</sup>

好気槽 300ml  
脱窒槽 500ml  
嫌気槽 200ml

SY3 分離膜面積 73cm<sup>2</sup>  
他は SY1 と同じ

図-7 膜分離活性汚泥実験装置

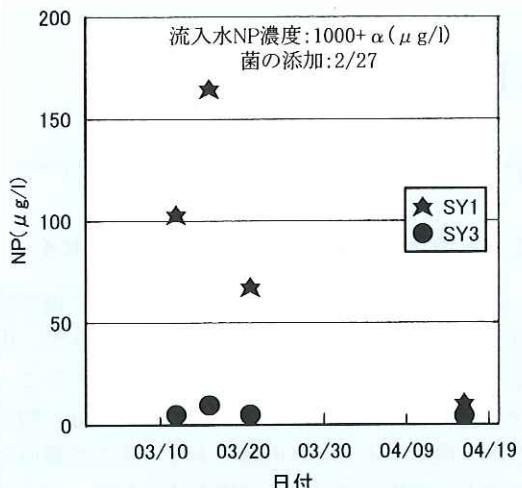


図-8 NP 分解微生物添加結果

活性汚泥処理装置は HRT12~16 時間で好気槽 DO を  $1.5\text{mg}/\ell$  以下に制御した。添加した NP 資化性株は表-2 のノニルフェノール分解微生物のうち *Rhodococcus* 属の放線菌であり、この培養菌液  $10\text{ml}$  を SY1 系の好気槽活性汚泥に添加した。

#### 4.2 実験結果

図-8 に示すように、SY1 系処理水の NP 濃度は、分析を始めたノニルフェノール分解微生物添加後 2 週間目から、暫くの間 SY3 処理水より 10 倍以上高い状態が続き、次第に濃度は低下したが、添加から 52 日経過しても SY3 より 2 倍以上高濃度であった。即ち、用いた NP 分解微生物は活性汚泥中では良く機能しないことがわかった。

## 5. おわりに

下水処理場での内分泌搅乱物質除去率を高めるため、下水処理場での除去が不安定な女性ホルモン様物質であるノニルフェノールと女性ホルモンそのものである  $17\beta$  エストラジオールの分解微生物を探査し、これらの物質を分解する微生物を活性汚泥中から、複数種見出すことができた。また、活性汚泥による内分泌搅乱物質除去機構を詳細に検討し、 $17\beta$  エストラジオールは分解によって、ノニルフェノールは汚泥中の脂質画分への蓄積によって除去されている可能性が高いことが判明した。しかし、発見したノニルフェノール分解微生物の一種を活性汚泥に添加して除去率を高める試みは不成功であった。今後は分解微生物の特性を詳細に検討し、実際の下水処理過程で役立てる方法を考えて行く予定である。

## 参考文献

- 1) 環境ホルモン戦略計画 SPEED'98, 環境庁, 1998.
- 2) 下水道における内分泌搅乱化学物質に関する調査報告書, 建設省, 1999.
- 3) 建設省土木研究所: 平成 11 年度下水道関係調査研究年次報告書集, p193-198, 平成 12 年 10 月
- 4) 阿南功一他編: 基礎生化学実験法 2-抽出・分離・精製-, 丸善(株), 1974.

小越真佐司\*



山縣弘樹\*\*



国土交通省国土技術政策  
総合研究所下水道研究部  
下水処理研究室主任研究官  
Hiroki Yamagata  
Masashi Ogoshi