

平成 15 年度活動報告書

テーマ名：活性汚泥微生物由来有機物の挙動に関する研究

1. 概要

下水処理水は、流入下水由来有機物、活性汚泥微生物由来有機物、より構成される。再利用を目的とした処理水の制御を考えると、活性汚泥微生物由来有機物の挙動を明確にすることは重要である。本研究では、活性汚泥微生物由来有機物指標の開発を目標として、グラム陰性微生物細胞外膜に存在するリポ多糖(LPS)の構成糖の一つである2-ケト-3-デオキシオクトン酸(KDO)に注目し、活性汚泥の自己酸化過程におけるKDOの消長について調査を行った。また、これらの微生物由来有機物の持つ毒性を把握するために、自己酸化過程で生成される溶解性有機物の基礎細胞毒性試験を行った。

2. 研究内容

2.1 2-ケト-3-デオキシオクトン酸(KDO)測定手法の開発

KDOはシアル酸の一種であることから、シアル酸の分析手法を基本として、下水系試料中のKDO測定手法の開発を行った。本項目では、定量性の確認・標準試料及び活性汚泥試料HPLCピークのMS測定によるKDO確認・活性汚泥試料における測定の可否確認・最適加水分解方法の決定、を行った。

2.2 自己酸化過程におけるKDOの消長調査

KDOの測定は、シアル酸の分析方法を参考に開発した方法を用いた。KDO遊離のための加水分解操作は0.025N HClにて80℃、90分の条件で行った。下水処理場より採取した返送汚泥を、基質無添加にて最大約一週間連続通気し、経時的に試料を分析用採取し、DOC、KDO、他栄養細菌、VSSの測定を行った。他栄養細菌量は、酸素及び基質を飽和させた密閉培養器中に測定対象汚泥を適宜投入し、活性汚泥モデルシミュレーションにより、得られた酸素利用速度の経時変化を最も良く再現する他栄養細菌の初期値を推定値とした。また、活性汚泥微生物細胞構成有機物についての情報を得るために、採取活性汚泥を超音波処理した試料についても同様の調査を行った。

2.3 自己酸化過程における溶解性有機物の毒性試験

基礎細胞毒性試験には、ヒト由来神経芽細胞腫細胞NB-1及びヒト由来乳ガン細胞MCF7を用いた。凍結保存した各細胞を解凍後96ウェルプレートに播き込み、24時間(NB-1細胞)、48時間(MCF7細胞)培養した。資料濃度が最大80%となるように培地混合試料及び希釈系列を作成し、48時間曝露後、クリスタルバイオレット法により生存率を推定した。本試験では、活性汚泥を基質無添加にて連続通気した溶解性試料及びSep-PakC18カートリッジの透過試料(親水性分画)の双方を供試試料とした。

3. 結果

3.1 2-ケト-3-デオキシオクトン酸(KDO)測定手法の開発

- ・1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジアミノジオキシベンゼン(MDB), 60℃、150分の条件で蛍光標識化後、C18カラムを用いたHPLC法による分析で、標準試料、活性汚泥試料中KDOの定量性を確認した。
- ・得られたHPLCピーク試料をTOF-MSにて測定し、分子量より、該当ピークがKDO-MDB複合体であることを確認した。
- ・活性汚泥試料にKDO試料を添加した系列の測定結果より、混合試料中での定量性

を確認した。

- ・ 最適な加水分解条件は、0.025N HCl、80℃、60分の条件であった。

3.2 自己酸化過程におけるKDOの消長調査

- ・ 加水分解試料のKDO測定値が未加水分解試料の測定値より総じて高かったことから、自己酸化過程における溶液中のKDOは、遊離体及び結合形態(LPS及びその断片)の両形態で存在していると考えられる。
- ・ 超音波処理汚泥のKDO/DOCは処理時間に関わらずほぼ一定であったが、自己酸化過程におけるKDO/DOCは時間経過に伴い増加し、ある一定値に近づいた。
- ・ 超音波処理汚泥及び自己酸化汚泥試料ともに、他栄養細菌の減少量とKDOとの間に直線的な相関が見られた。

3.3 自己酸化過程における溶解性有機物の毒性試験

- ・ 自己酸化過程における細胞毒性は、曝気開始後30時間で最も強くなり、その後弱くなる傾向であった。
- ・ 親水性分画の容量-反応曲線は、試料濃度に関わらず同じ傾向を示したことから、自己酸化過程において毒性に關与している親水性有機物は、時間の経過に伴い変化しないほぼ同一な有機物群であると考えられた。
- ・ 150時間通気後試料の溶解性試料のEC50値は、親水性分画の値より高く、長時間の自己酸化過程において溶液中の毒性を支配しているのは、親水性有機物であると考えられた。実験条件から、これらの有機物は、活性汚泥微生物細胞由来有機物であると考えられる。

4. 平成16年度計画

4.1 KDOの実地調査

- ・ 実下水処理場内で採取した試料について、KDOの測定を行う。本調査では、流入下水・処理水・初沈汚泥・返送汚泥・濃縮槽越流水・脱水ろ液・嫌気消化脱離液などを対象とする。

4.2 毒性指標とKDOとの相関関係の明確化

- ・ EC50や、容量-反応曲線などの毒性とKDOとの相関関係を明確にする。

平成 15 年度研究成果リスト

テーマ名：活性汚泥微生物由来有機物の挙動に関する研究

1. 学会発表

- 1) **Hiroki Narita, Naoyuki Funamizu, Testuo Takakuwa Behavior of inert soluble organic matter of return flow from sludge treatment process, 9th IWA Specialised Conference Design, Operation and Economics of Large Wastewater Treatment Plants 1st-4th September 2003 – Praha, Czech Republic**
- 2) 成田裕樹, 船水尚行, 高桑哲男, 活性汚泥由来有機物の毒性評価に関する研究, 第 40 回環境工学研究フォーラム, 2003 年 11 月 14 日 - 15 日, 和歌山
- 3) 成田裕樹, 船水尚行, 高桑哲男, 活性汚泥由来有機物の挙動に関する研究, 第 38 回日本水環境学会年会, 2004 年 3 月 17 日 - 19 日, 札幌
- 4) 阿部順, 成田裕樹, 船水尚行, 高桑哲男, ヒト由来培養細胞系を用いた下水処理系試料の毒性評価に関する研究, 第 38 回日本水環境学会年会, 2004 年 3 月 17 日 - 19 日, 札幌

2. 論文投稿

- 1) **Hiroki Narita, Naoyuki Funamizu, Testuo Takakuwa (2003) Inert soluble organic matter in return flow from sludge treatment process and its control by coagulation.(Now submitting for Environmental engineering science)**