

下水処理プロセスにおける化学物質の制御技術に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一

【要旨】

本研究では、社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質の一部に生物影響が指摘されているものがあることから、下水道を経由する化学物質等の環境インパクト低減を目的として下水処理プロセスにおけるこれら化学物質（医薬品類）及び総毒性の挙動把握とリスクを低減するための制御技術の検討を行った。

その結果、活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動把握と処理水中に残存する医薬品の除去手法として微生物担体処理が有効であることが分かった。また、流入下水、2次処理水に曝露したメダカのマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析から、流入下水には、ホルモン刺激、酸化ストレス、DNA 修復、再生産、外部刺激、免疫反応への様々な影響因子が存在していることがわかったが、これらの影響は、活性汚泥処理で低減していることが明らかとなった。

キーワード：医薬品、下水処理、挙動把握、担体処理、メダカ、マイクロアレイ、バイオアッセイ

1. はじめに

社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質（462 物質）については、環境分野や水道分野において実態調査が進められており、医薬品類では、クラリスロマイシン等の抗生物質の一部に生態影響が指摘されているものがある。また、PRTR 制度では、人の健康や生態系に悪影響を及ぼすおそれがある物質を（化管法）第一種指定化学物質としている。医薬品類、PRTR 対象物質の一部の物質については、既往調査により下水処理場での除去特性について明らかになっているものがあるが、多くの物質についての実態は不明である。下水道を経由する化学物質の環境影響の可能性を考慮すると調査未実施の多く化学物質についての実態解明は急務であり、早期に下水道での実態を把握するとともに、処理水中に残存する物質については新たな除去手法の開発と併せて、リスクを低減するための制御技術の開発を行う必要がある。

本研究は、①優先的に調査が必要な化学物質を選定し、その分析方法を提案する。②下水処理プロセスにおける除去特性の把握と下水処理プロセスにおける総毒性の除去特性の把握を行う。③下水処理水中に残存する化学物質と総毒性の除去手法を提案することを目的としている。

平成 25 年度は、①活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動把握、②下水処理水中に残存する医薬品類の微生物担体処理における除去特性、③各下水処理水に曝露したメダカのマイクロアレイによる網羅的遺伝

子解析による総毒性の低減効果に関する調査を行った。

2. 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動把握

2. 1 医薬品類分析方法

調査対象とした医薬品類は、本研究において平成 23 年度に選定した 10 物質を対象とし、分析方法は本研究で提案した方法に従った。

アジスロマイシン(AZM)、バザフィブラート(BF)、カフェイン(CF)、クラリスロマイシン(CAM)、クロタミトン(CT)、イブプロフェン(IP)、ケトプロフェン(KP)、レボフロキサシン(LVFX)、スルファメトキサゾール(SMZ)の 9 物質は、分析前処理（抽出・濃縮・精製）の後 LC/MS/MS により分析した。また、トリクロサン(TC)は、分析前処理（抽出・濃縮・精製）の後、アセチル誘導体化を行い GC/MS で分析した。

2. 2 調査方法

調査は、有効水深が約 2m の最初沈殿池 (0.5m³)、エアレーションタンク (0.5m³ × 4 槽)、最終沈殿池 (0.7m³) と塩素混和槽 (0.1m³)、生汚泥貯留槽 (0.15m³)、余剰汚泥貯留槽 (0.15m³) で構成される活性汚泥処理実験装置 (図-1 参照) を用いて行った。実下水処理場の流入下水をピットに受けた後、定量ポンプを用いて装置に導入した。生汚泥、余剰汚泥の引扱はタイマーコントロールによる間欠運転で行った。また、次亜塩素酸ナトリウム溶液を定量ポンプにより塩素混和槽に注入した。本装置は、流入量 6.8m³/d、

汚泥返送率約 38%、HRT 約 7 時間で運転した。

分析試料は、平成 26 年 2 月 5 日～6 日においてそれぞれ 2 時間間隔で採取した各試料を等量混合したコンポジット試料とした。採取箇所は、流入下水、初沈流出水、終沈流出水（二次処理水）、生汚泥、余剰汚泥の 5 箇所である。一般水質項目分析結果を表-1 に示す。本実験装置の BOD 除去率は 94% であり、本装置の処理水質は標準活性汚泥法の実下水処理場と同レベルであった。流入水中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ の濃度は、それぞれ 20mg/L、0.05mg/L 以下であるのに対し、二次処理水では 0.47mg/L、18mg/L で十分に硝化が進行していた。また、エアレーションタンク混合液の MLSS、余剰汚泥引き抜き量より計算した SRT は約 13 日であった。

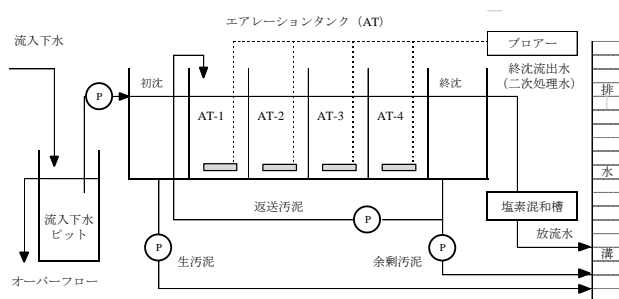


図-1 活性汚泥処理実験装置

表-1 一般水質項目分析結果 (mg/L)

	BOD	DOC	$\text{NH}_4\text{-N}$	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$	TN	TP	MLSS
流入水	150	35	20	<0.05	33	3.2	-
初沈流出水	140	37	21	<0.05	31	3.2	-
終沈流出水	9.1	7.8	0.47	18	20	1.6	-
生汚泥	-	-	-	-	-	-	2,300
余剰汚泥	-	-	-	-	-	-	3,600

2. 3 医薬品挙動調査結果

分析対象とした医薬品類 10 物質の測定結果を表-2 に示す。本調査における流入下水の医薬品濃度は、成宮らの報告（中央値）とほぼ同程度かやや高い値を示した。

水処理プロセスの初沈での各医薬品濃度（溶存態+懸濁態）変化は、溶存態、懸濁態の双方とも検出された BF、CF、CAM、CT、KP、SMZ、TC の 7 物質についてみると、流入下水と初沈流出水の値はほぼ同じであり、滞留時間が 2 時間程度の初沈ではほとんど除去されていないことがわかる。また、生物処理反応槽のエアレーションタンクを経た二次処理水での除去率を計算すると BF、CF、KP、SMZ、TC の 5 物質は、70% 以上であり活性汚泥処理で一定の除去が行われて

表-2 医薬品分析結果 (ng/L)

		本研究		既報値（中央値） ¹⁾	
		溶存態	懸濁態	溶存態	懸濁態
AZM	流入下水	310	-	279	26.7
	初沈流出水	360	-		
	二次処理水	270	-	40.3	
	生汚泥	320	-		
	余剰汚泥	270	-		
BF	流入下水	4,500	52	1,580	37.0
	初沈流出水	4,800	34		
	二次処理水	450	1.4	186	
	生汚泥	3,700	650		
	余剰汚泥	64	45		
CF	流入下水	46,000	280	37,900	
	初沈流出水	45,000	200		
	二次処理水	1,100	5.8	34.3	
	生汚泥	27,000	2900		
	余剰汚泥	160	220		
CAM	流入下水	1,600	37	1,530	114
	初沈流出水	1,700	29		
	二次処理水	1,400	17	528	
	生汚泥	1,800	850		
	余剰汚泥	810	1,300		
CT	流入下水	1,700	17	1,240	53.5
	初沈流出水	1,900	16		
	二次処理水	1,800	4.4	1,080	
	生汚泥	1,500	170		
	余剰汚泥	1,400	260		
IP	流入下水	1,300	-		
	初沈流出水	1,400	-		
	二次処理水	11	<0.068		
	生汚泥	790	-		
	余剰汚泥	11	19		
KP	流入下水	950	17	1,260	27.8
	初沈流出水	850	13		
	二次処理水	240	0.84	124	
	生汚泥	930	220		
	余剰汚泥	120	93		
LVFX	流入下水	1,600	-	451	240
	初沈流出水	1,500	-		
	二次処理水	400	-	66.0	
	生汚泥	3,500	-		
	余剰汚泥	11,000	-		
SMZ	流入下水	170	2.0	176	
	初沈流出水	200	1.8		
	二次処理水	49	<0.21	90.1	
	生汚泥	200	20		
	余剰汚泥	80	17		
TC	流入下水	340	1,300		
	初沈流出水	340	1,200		
	二次処理水	69	12		
	生汚泥	210	10,000		
	余剰汚泥	97	7,600		

注：- は Surrogate 物質の回収率が低いため濃度計算せず。

いた。CAM の除去率は約 13% で、活性汚泥処理による除去率は小さく、CT は流入水濃度より高い値を示した。

また、これら 7 物質について各試料の負荷量を算出し、成宮らの定義により全処理過程除去率 R_{all} 、初沈汚泥移行率 T_{raw} 、余剰汚泥移行率 T_{exc} 、生物処理消滅率 D を求めた。各医薬品の R_{all} 、 T_{raw} 、 T_{exc} 、 D を表-3 に示す。

BF、CF、TC は、 R_{all} が 90% を超え活性汚泥処理により大きく除去された。除去の内訳をみると BF、CF の T_{raw} 、 T_{exc} は 2% 以下と小さく汚泥引抜きによる除去

表-3 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品の除去

	R_{all}	T_{raw}	T_{exc}	D
BF	90.3	1.6	0.02	88.7
CF	97.7	1.1	0.01	96.6
CAM	15.7	2.7	1.3	11.8
CT	-2.3	1.6	1.0	-4.9
KP	75.8	2.0	0.2	73.6
SMZ	72.3	2.1	0.6	69.6
TC	95.2	10.4	4.7	80.1

が主要な除去機構ではないことが示され、 D が大きいことから生分解が主要な除去機構であることが示唆された。TC は、BF、CF と異なり T_{raw} が約 10%、 T_{exc} が約 5% と汚泥引抜きによる除去が 15% 程度あることがわかった。

CAM は R_{all} が約 16% と低く活性汚泥処理による除去が困難な物質であることがわかった。また、CT は R_{all} がマイナスとなり、活性汚泥処理後に負荷量が増加する結果となった。これは、分析のバラツキが一つの原因と考えられる。

汚泥引抜きによる除去機構の理解を深めるため、溶存態と懸濁態の間での固-液分配係数¹⁾ K_d (L/kg) を算出した。常用対数値 ($\text{Log}_{10}K_d$) として表-4 に示す。

$$K_d = C_s / C_w$$

ここで、 C_w : 溶存態の濃度 (ng/L)

C_s : 懸濁態中の濃度 (ng/kg・dry)

分配係数の算出にあたり、生汚泥、余剰汚泥の医薬品濃度は、溶存態と懸濁態の間で平衡状態に達していると仮定した。本調査により求めた $\text{Log}K_d$ の値は、成宮ら¹⁾の報告値とはほぼ同程度であった。

また、 $\text{Log}K_d$ と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の関係を図-2 に示す。生汚泥では $\text{Log}K_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向が見られた。余剰汚泥では、BF、CF を除く 5 物質については生汚泥同様 $\text{Log}K_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向が見られた。引抜き汚泥による除去割合が非常に小さいなかでの関係であるが、 $\text{Log}K_d$ と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の間に弱い関係がみられた。

3. 下水処理水中に残存する医薬品類の微生物担体処理における除去特性

3.1 調査方法

下水処理場に流入する医薬品類の一部は下水処理に

表-4 固-液分配係数 ($\text{Log}K_d$)

	本研究		既報値 ¹⁾	
	生汚泥	余剰汚泥	生汚泥	余剰汚泥
BF	1.9	2.3	1.8	2.3
CF	1.7	2.6	1.2	2.7
CAM	2.3	2.6	2	2.3
CT	1.7	1.7	1.9	1.8
KP	2.0	2.3	1.8	2.3
SMZ	1.6	1.8	1.6	1.7
TC	4.3	4.3	3.3	

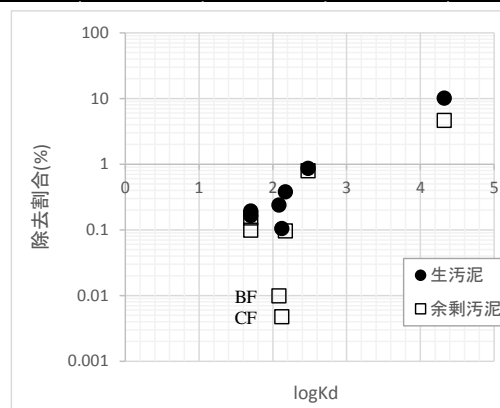


図-2 $\text{Log}K_d$ と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の関係

より除去されることが知られているが、放流水に残存する医薬品類も少なくない¹²⁾。また、医薬品類には藻類生長阻害、ミジンコ繁殖阻害を起こす物質があることが報告³⁴⁾⁵⁾されている。

本研究では、下水処理水に残存し藻類生長阻害又はミジンコ繁殖阻害があることが報告されている医薬品類の 4 物質 (AZM、CAM、KP、TC) を対象として、微生物担体を用いた高度処理について検討を行った。

標準活性汚泥法で運転している活性汚泥処理実験装置の二次処理水を原水として実験を行った (図-3 参照)。微生物保持担体を添加した各反応槽は、容量:10L、HRT:30min、担体の嵩比率:35%である。反応槽下部よりエアレーションし、担体表面に自然発生的に付着した生物膜により高度処理した。運転開始から 2 ヶ月以上経過した後、担体処理実験装置の流入水及び各反応槽の処理水を採取し医薬品類を分析した。AZM、CAM、KP は、Oasis HLB を用い固相抽出した後、LC-MS/MS により分析、また、TC は、Oasis HLB を用い固相抽出した後、アセチル誘導体化し GC-MS により分析した。

3.2 調査結果

担体処理実験装置流入水の BOD、COD、DOC は 2mg/L、9mg/L、7mg/L 又、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は 0.3mg/L、17mg/L であり通常の標準活性汚泥法の処理水と同等

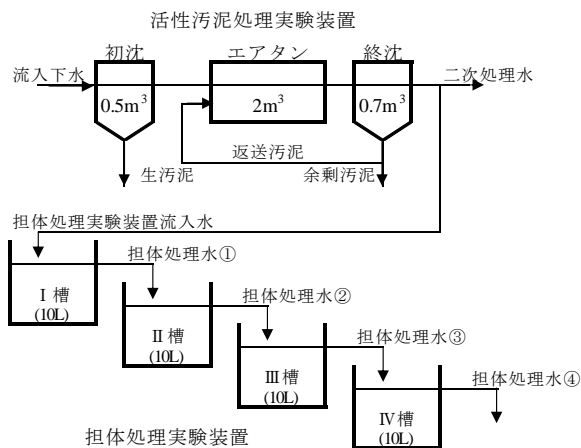


図-3 担体処理実験装置

の水質であった。

担体処理実験装置の流入水及び各反応槽処理水の医薬品類4物質の分析結果を図-4に示す。各物質とも処理が進むにつれ減少し、担体処理水④では流入水の1/5以下となった。合計HRTが2時間の担体処理水④の医薬品類除去率は、AZMが90%、CAMが81%、KPが97%、TCが82%であり、DOC除去率6%に比べ大きな値を示した。本実験で対象とした医薬品類4物質は、二次処理水に残存する有機物の中でも担体微生物により更に除去できることが確認された。

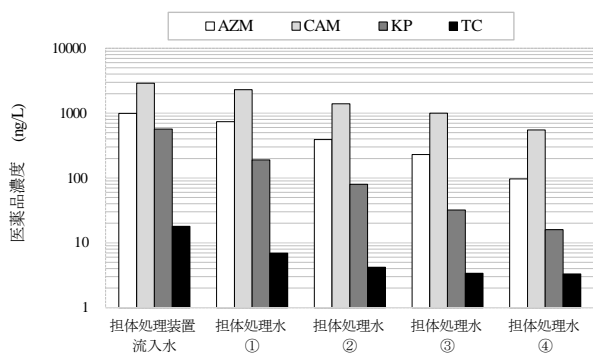


図-4 担体処理における医薬品の除去特性

4. 下水処理プロセスにおける総毒性の低減効果

医薬品などの化学物質は活性汚泥処理過程で、種類によるが、ある程度除去されていることが明らかになった。しかし、個別の化学物質の濃度から生物影響を予測することは困難である。下水処理過程での生物影響評価の低減効果は、直接的なバイオアッセイから確認することも重要である。

本研究では、流入下水、2次処理水、塩素処理水に曝露したメダカについて、毒性の多角的な評価が可能と考えられているマイクロアレイによる網羅的遺伝子

発現解析⁶⁾から、下水処理過程での毒性低減効果の評価を試みた。

4. 1 実験方法

都市下水を連続処理している図-1の活性汚泥実験処理装置から、平成26年10月23日～24日にかけて、流入下水、2次処理水、塩素処理水（残留総塩素0.8mg/L）を24時間連続採水し、本試料をメダカの曝露実験に供した。

メダカの曝露および遺伝子発現解析は、表-5のとおり行った。遺伝子発現解析はDFCI(Dana Farber Cancer Institute)のMedaka Gene Index(Release 8.0)のデータベースを基にe-Arrayでプローブ配列を設計したAgilent製8×60Kのカスタムアレイで行った。マイクロアレイに搭載した遺伝子の機能は、DFCIのMedaka Gene Indexサイトからは十分に得られなかったため、NCBI(National Center for Biotechnology Information)のゼブラフィッシュとヒューマンのリファレンスシーケンス(Refseq)に対してプローブの基になったメダカ配列を用いてblastxで同源性検索をかけ、メダカと同源性の高い種のRefseqIDを取得し、Gene Ontology機能情報を得た。

表-5 メダカの曝露条件と遺伝子発現解析の方法

試験魚	d-r系 雄 ヒメダカ(6~7カ月齢)
曝露水	流入下水 2次処理水 塩素処理水 脱塩素水道水(対照区)
曝露匹数	9匹
曝露水量	5L
曝露時間	96時間
曝露方式	半死水式(1換水/日)
設定水温	24℃
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	なし
曝気	緩やかに曝気
解析臓器	肝臓
RNA抽出法	RNeasy mini kitにより1個体毎に抽出
RNA試料の調整	同曝露区の3匹分1つに混合し、3検体で解析
遺伝子発現解析法	マイクロアレイ法(Agilentのプロトコルに従う)
規準化法	グローバルノーマライゼーション
遺伝子発現の数値化	3検体の平均

4. 2 実験結果

各処理水の毒性の評価は、各毒性を反映する遺伝子群を抽出し、対照区とのピアソン相関により評価した。毒性の種類は、GO:0048545(response to steroid hormone stimulus ホルモン刺激), GO:0006979(response to oxidative stress 酸化ストレス), GO:0006281(DNA repair DNA修復),

GO:0032504(multicellular organism reproduction 再生産), GO:0009410(response to xenobiotic stimulus 外部刺激), GO:0006955(immune response 免疫反応)とした。毒性の定量化は、ピアソン相関係数 $= \cos \theta$ とおける θ ことから、 θ で行った。 θ は遺伝子発現が大きく影響されるに従い、大きい値となる。図-5~10 に各下水曝露水とその θ の関係を示した。

図より流入下水には、様々な影響因子が存在していることがわかったが、これらの影響は、活性汚泥処理で低減していることが明らかとなった。また、塩素処理水でもその影響が増加することはなかった。

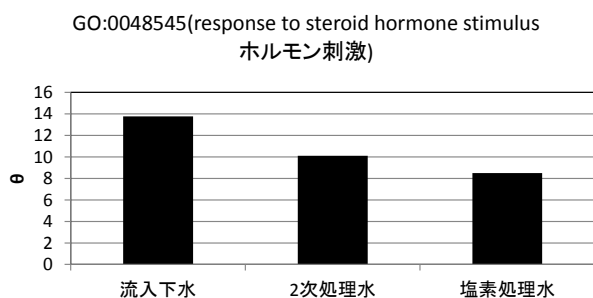


図-5 各下水試料のホルモン刺激への影響

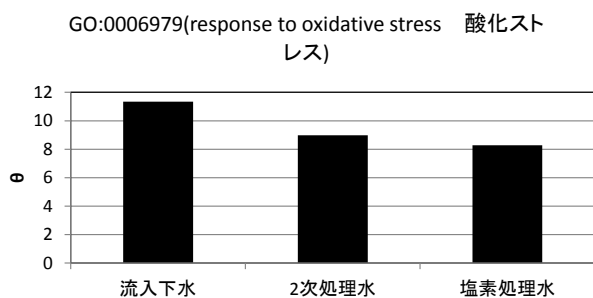


図-6 各下水試料の酸化ストレスへの影響

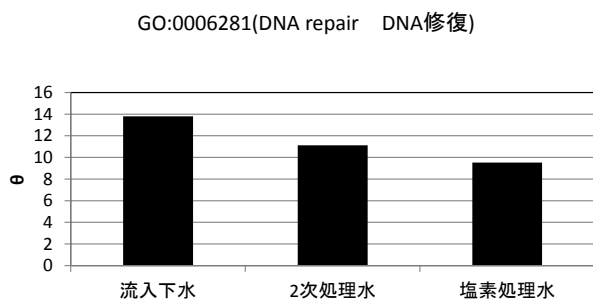


図-7 各下水試料のDNA修復への影響

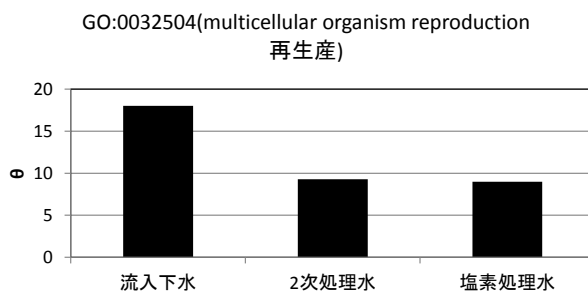


図-8 各下水試料の再生産への影響

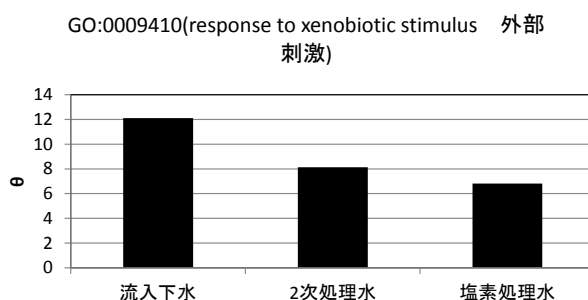


図-9 各下水試料の外部刺激への影響

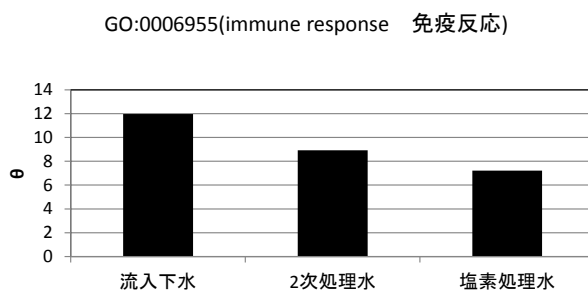


図-10 各下水試料の免疫反応への影響

5. まとめ

活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類 (10 物質) の挙動把握、下水処理水に残存する医薬品類 (4 物質) の微生物担体処理における除去特性、各下水処理水に曝露したメダカのマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析による総毒性の低減効果に関する調査を行い以下の結果を得た。

1) 10 物質中、溶存態、懸濁態から検出された 7 物質の挙動把握ができた。活性汚泥処理による各医薬品の除去率は BF、CF、KP、SMZ、TC が 70%以上、CAM が約 13%であった。CT は二次処理水中の値が流入下水濃度より高い値を示した。また、90%以上の高い除去率を示した BF、CF はその主要な除去機構が生分解であり、TC は生分解が約 80%、汚泥引抜きによる除去が約 15%であることがわかった。

2) 汚泥引抜きによる除去機構について固-液分配係数 ($LogK_d$) との関係調べたところ $LogK_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向がみられた。

3) 下水処理水に残存する医薬品類4物質の微生物担体を用いた処理における除去特性を調査した。DOC 除去率に比べ調査医薬品類の除去率は大きな値となり、微生物担体処理は残存医薬品類の除去手法として有効であることが分かった。

4) 流入下水、2次処理水、塩素処理水に曝露したメダカのマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析から流入下水には、ホルモン刺激、酸化ストレス、DNA 修復、再生産、外部刺激、免疫反応への様々な影響因子が存在していることがわかったが、これらの影響は、活性汚泥処理で低減していることが明らかとなった。また、塩素処理水でも影響が増加することはなかった。

参考文献

1) 成宮他, 下水処理過程における医薬品類の存在実態

と挙動,環境工学研究論文集, 46, pp.175-185, 2009

2) 小森他, 下水処理における医薬品(92 物質)の除去特性, 第 45 回下水道研究発表会講演集, pp.91-93, 2008

3) 福永他, 藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価,環境工学研究論文集, 43, pp.57-63, 2006

4) A. Harada et al., Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river water, Water Science & Technology, Vol.58, No.8, pp.1541-1546, 2008

5) 環境省, 化学物質の生態影響試験について, <http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/seitai.html>, 2006

6) 池田他, 水生生物の生体反応を用いた下水処理水の毒性評価に関する研究, 土木研究所資料 平成24年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp.119-145,2013

7) K., Kishi et al., Expression analysis of sex-specific and 17-estradiol-responsive genes in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*, using oligonucleotide microarrays, Genomics, 88, pp.241-251, 2006

A STUDY ON OCCURRENCE AND CONTROL OF MICRO POLLUTANT IN ACTIVATED SLUDGE PROCESS

Budget: Grants for operating expenses (General account)

Research Period: FY2011-2015

Research Team: Water Quality Research Team,

Author: Seiichirou OKAMOTO, Koya KOMORI,
Tomokazu KITAMURA

Abstract:

The occurrence and fate of physiologically active substances (e.g., pharmaceuticals) in the water environment are emerging issues in environmental chemistry. Although there have been various reports on the efficiency of removing pharmaceuticals at wastewater treatment plants (WTP), many pharmaceuticals still exist in WTP effluent, and sometimes at concentrations exceeding environmental risk levels. Further studies on techniques for removing pharmaceuticals in WTP effluent are required to control these compounds. The objectives of this research are to determine the occurrence and fate of selected pharmaceuticals in activated sludge process and to develop new technique the removal of to remove pharmaceuticals in WTP effluent using the microbial carrier process.

In FY 2013, this research was a study of the behavior of selected 10 pharmaceuticals was investigated at experimental sewage treatment plant to clarify their complete mass balance and the use of the microbial carrier process to perform advanced treatment to remove four residual pharmaceutical compounds, triclosan, clarithromycin, azithromycin, and ketoprofen from wastewater treatment plant effluent. As a result of gene expression analysis of medaka exposed to untreated sewage and activated sludge treated water. The untreated sewage water contained various toxicity. This toxicity was reduced in the activated sludge treatment process.

Key words: bioassay, microarray, medaka, microbial carrier, pharmaceuticals, wastewater