

河川水における溶存態有機物の粒径画分の特性解析と

生体・生態影響評価

研究予算：運営交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 27

水質チーム	上席研究員	岡本誠一郎
	主任研究員	對馬 育夫
	研究員	真野 浩行
中央大学	准教授	山村 寛（共同研究者）

【要旨】

近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノマテリアル生産量が増加し、これらのナノ成分による人の健康や生態系に与える影響が危惧されている。一方で、下水、河川・湖沼等におけるナノ物質の挙動については、国内外での研究事例は希有である。本研究では、(1) 河川中に含まれる金属ナノ粒子の濃度の把握、(2) 水中でナノ粒子のキャリアとして作用しうる溶存態有機物がヒト細胞および水生生物に与える影響および(3) 下水処理過程におけるナノ粒子及び溶存態有機物の挙動を解明すべく、調査を実施した。その結果、平成 26 年度は、河川中に含まれる溶存態有機物が毒性に影響していることを確かめた。平成 27 年度は、実下水処理場における溶存態物質の実態調査をするとともに、各処理工程から採取した水に銀粒子を添加し、その挙動を調査した。

キーワード：ナノ物質、下水処理場、挙動調査、水質分析

1. はじめに

河川や湖沼などの環境水中から様々な人間活動に由来する微量汚染物質が検出されており、これら成分による健康・生態リスクの把握および制御技術の開発が求められている。特に近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノマテリアル生産量が増加し、ナノ成分による環境汚染が危惧されるようになってきている[1]。ナノ粒子は 0.1 μm 以下の粒径を持つ成分全般を指し、炭素等の有機系とシリカや金・銀などの無機系に分類される。これらのナノ粒子は医療やエレクトロニクス分野、環境エネルギー分野において既に実用的に利用されており、製造工場や都市下水処理場から流出していることが過去の研究により報告されている[2]。また、全般的に、ナノ粒子は生態毒性が極めて高いことが明らかになっており、既存の微量汚染物質に加えて、注意を要する成分とされる[2-6]。

既往の研究では、あるナノ粒子成分に着目し、各浄水プロセスでの処理性や下水処理場内での挙動に着目した研究が多く見られる。それらの研究の多くは、ナノ粒子を添加し、その増減を調査しているが、自然環境中に存

在するナノ粒子の形態と大きく異なるため、これらの研究により得られた結果では、実環境を反映していないことが予想される[5]。実環境下では、ナノ粒子の存在濃度が極めて低いことに加え、塩や有機・無機コロイドなどが存在することから、ナノ粒子の挙動解明は極めて難しいとされる。そのため、これまでに自然水中に存在するナノ粒子の挙動を検討した例は一例も存在しない。過去のラボ実験によるスパイク実験の結果から、自然水中でナノ粒子は、有機物の総称である **Natural Organic Matter (NOM)** と共存することで、安定化していると考えられている[4]。NOM は、広い分子量分布を示し、複雑な分子構造、かつ多くの官能基を有することから有機・無機物のキャリアとして機能する[7-10]。よって、ナノ粒子の自然界での挙動を明らかにするためには、ナノ粒子が共存しやすい NOM の粒径画分や有機物特性を明らかにする必要があると考える。

自然界に存在するナノ粒子の毒性について、既往の研究では、単独のナノ粒子による毒性評価に関する研究が多く見られる。一方で、2 種以上の微量汚染物質による

複合作用や夾雑物と微量汚染物質の相互作用により、毒性の強度や効果が変化することが Escher ら[11]の研究により明らかになっている。ナノ粒子は、自然環境水中で NOM と共存していることが予想されるため、ナノ粒子の毒性を評価するにあたっては、単独のナノ粒子ではなく、NOM と共存した状態で毒性を評価することが重要になると考える。

以上より、本研究では河川水中に含まれる微量なナノ粒子成分の定量・定性方法を確立し、これらのナノ粒子がヒト細胞および水生生物に与える影響を評価することおよび下水処理過程における溶存態有機物の挙動を把握することを目的とする。平成 26 年度は、利根川を対象として、河川水を濃縮することによるナノ粒子分析を実施した他、濃縮サンプルを用いた生体毒性試験および水生生物毒性評価試験を実施した。その結果、河川中に含まれる溶存態有機物が毒性に影響していることを示唆した[12]。平成 27 年度は、実下水処理場における溶存態物質の実態調査をするとともに、現在、生活用品にも広く利用される銀粒子に着目し、各処理工程から採取した水に銀粒子を添加し、その挙動を調査することで、銀粒子が下水処理場に流入した場合、下水処理過程で汚泥に移行するか検討した。

2. 実験方法

2.1 採水およびサンプルの調整

本調査は、処理区内に工場・事業場が比較的多く存在する下水処理場（標準活性汚泥法）を対象に行った。採取箇所は、流入原水、最初沈殿池出口、曝気槽槽内、最終沈殿池出口の 4 箇所とし、1 時間に 1 回 2 L を採水し、24 時間継続した。採水したサンプルは即時に、0.1 μm の PVDF 膜によりクロスフロー過することで、バクテリアなどの懸濁成分を除去した後、コンポジットサンプルとした。

2.2 銀粒子添加試験

本実験では、下水処理水に含まれる有機物による銀粒子の粒径やゼータ電位の変化を把握するため、まずリファレンスとして、pH や電気伝導度が下水処理水と同様の銀粒子の標準液を作成した。1 L ビーカーに Milli Q を 1 L 入れ、スターラーを用いて 500 rpm で攪拌させながら、NaHCl, NaCl を添加し、pH と電気伝導度が流入原水と類似になるように調整した。その結果、22.0°C で、電気伝導度; 1.672 S/m, pH; 7.51 となった。この溶液 100 mL に銀粒子（平均粒径 2.0-3.5 μm , 粉末状）を 1 g 添加して、500 rpm で攪拌しながら高出力ホモジナイザーで約 1 時間分散さ

せ、これを標準液とした。

次に、0.1 μm の膜ろ過を行った各処理プロセスから採取した水を 200 mL ずつ三角フラスコに入れ、銀粒子の標準液を各 1 mL 添加し、スターラーを用いて 200 rpm で 2 時間攪拌した。その後、これらのサンプルと標準液の粒径とゼータ電位を測定した。

2.3 分析方法

水中に存在する金属の分析は ICP 質量分析計(ICP-MS) (X7CCCT:サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いて行った。水中の溶存態の金属を分析するため、前処理として、分析試料 50 mL に硝酸 1 mL を添加して加熱分解を行い、放冷させた後に孔径 4 μm の濾紙(定量濾紙 No.5B: ADVANTEC)を用いてろ過した。

有機物を網羅的に高感度で分析するため、蛍光分光光度計(F-2700 形分光蛍光光度計:日立製作所)を用いて、3 次元励起蛍光スペクトルを分析した。励起・蛍光バンド幅は 5 nm に設定し、220 nm から 550 nm の範囲でスペクトルを取得した。また、有機物の二重結合の量を推定するため、紫外可視分光光度計(UV-1800:島津製作所)を用いて UV₂₅₄の測定を行い、有機物の構造を推定するため、フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR) (IRAffinity-1:島津製作所)を用いて測定を行った。さらに、不揮発性有機炭素(NPOC)と全窒素(TN)を TOC-L(島津製作所)を用いて分析した。

ゼータ電位分布及び粒系分布はゼータ電位・粒系分布測定装置(ZEEMOM ZC-3000:マイクロテック・ニチオン社)を用いて測定した。今回は粒径が μm レベルの粒子を中心に測定することが目的だったので、LED 散乱光を用いて測定した。カウント粒子数は、測定用セルの前の静止層および後ろの静止層から 100 個ずつ、合計 200 個カウントした。ただし、他の粒子と比較して明らかな外れ値だと判断したものは、その粒子を分析から除外した。

3. 結果と考察

3.1 水質分析

各処理工程から得られたサンプルの不揮発性炭素(NPOC)濃度および全窒素(TN)濃度を図 1 に示す。下水処理過程において、NPOC は、最終沈殿池に至るまでに減少し、最終沈殿池ではほとんど減少していなかった。また、TN は処理過程全体を通して若干減少しているのみであった。254 nm の波長で計測した UV₂₅₄を図 2 に示す。254 nm の波長での吸光度と芳香族化合物の濃度には一定の正の相関がある[13]。図 2 より、最初沈殿池から曝気槽にかけて、吸光度が減少していることから、サンプル内の

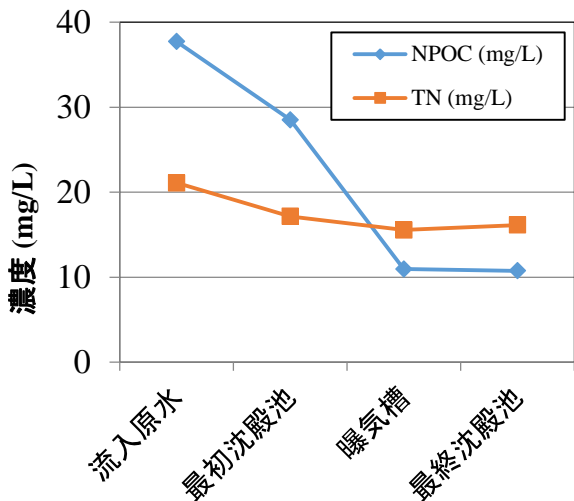


図1 各処理過程におけるNPOCおよびTN濃度

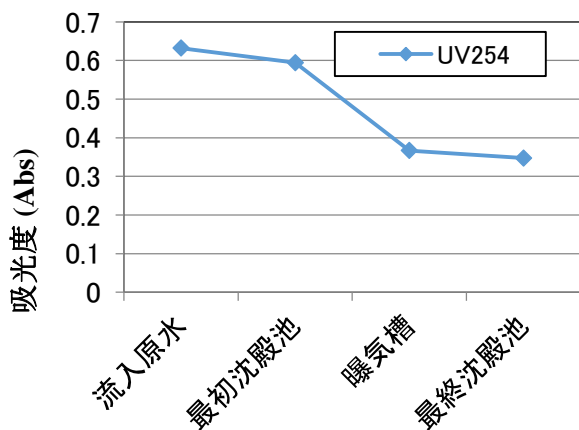


図2 各処理過程における吸光度 (UV₂₅₄)

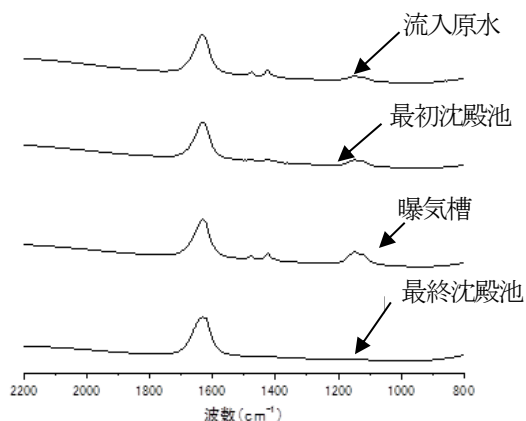


図3 各処理過程におけるFT-IR計測結果

芳香族化合物の濃度が多く減少している可能性が考えられる。FT-IRの結果を図3に示す。1,600~1,700 cm⁻¹のレンジでピークが検出されることから、COO-またはC=C結合を有する有機物が主要であったことが推定できる。蛍光分光計で測定した三次元励起蛍光マトリクスを図4に示す。その結果、下水処理過程において、芳香族化合物を持つタンパク質(トリプトファン様成分)のピークが減少した。また、フミン酸に起因するピークが少しずつ増加した。各処理工程の金属濃度をICP-MSで計測した結果を表1に示す。採取した水には、様々な金属が入っていることが確認でき、一部の金属を除いて、処理が進むと濃度が減少していることから、汚泥に移行していることが推察される。しかしながら、銀に関しては、流入原水においても定量下限未満だったことから、本研究で対象にした下水処理場には銀ナノ粒子はほとんど流入していないと考えられる。

3.2 銀粒子の挙動解析

本研究で対象とした下水処理場において、銀が検出されなかったため、銀が下水処理場に流入した場合を想定し、各工程から採取した水に銀粒子を添加することにより、その挙動を把握した。標準液および銀粒子を添加した下水処理サンプル(流入下水、最初沈殿池、曝気槽、最終沈殿池)の粒径およびゼータ電位を図5、図6に示す。最終沈殿池から採取した水に銀粒子標準液を添加した系では、銀粒子の粒径が大きくなっていることがわかる。また、ゼータ電位の絶対値は、流入原水、最初沈殿池からの系より、小さくなっていた。ゼータ電位の減少は、処理工程を経ることにより水質が変化し、銀粒子が凝集しやすくなったと考えることができる。最終沈殿池からの系において添加された銀粒子は、フミン質等の有機物と結合することにより、表面電位が大きく変化し、凝集していた可能性が考えられる。

標準液に含まれる銀粒子と下水処理水に添加した場合の銀粒子の粒径に有意な差があるかどうか確認するためMann-WhitneyのU検定を行った(表2および表3)。表3の最初沈殿池以外の値が0.05未満であり、銀粒子を添加したことによる粒径の変化およびゼータ電位の変化は最初沈殿池を除き統計的に有意であることが確認できた。また、最初沈殿池の粒径も、効果量の計算から、測定に用いるサンプル数を増やすことによって、有意であることが確認できる可能性が高いと考えられる[14]。

以上のことより、下水処理場に銀粒子が流入する場合、処理過程で凝集しやすい形態に変化し、汚泥に移行することが示唆された。

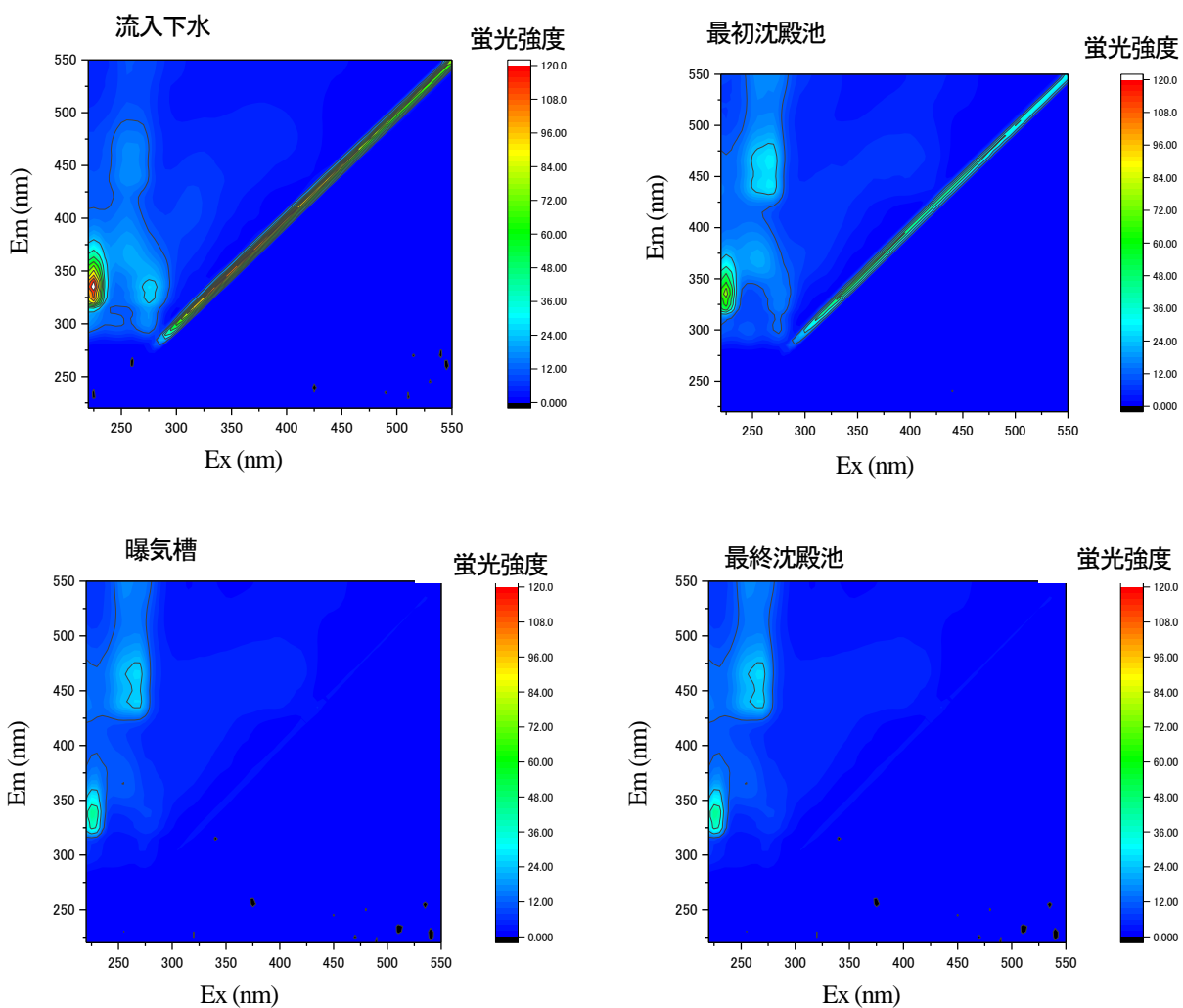


図4：各処理過程における3次元励起蛍光スペクトル強度変化

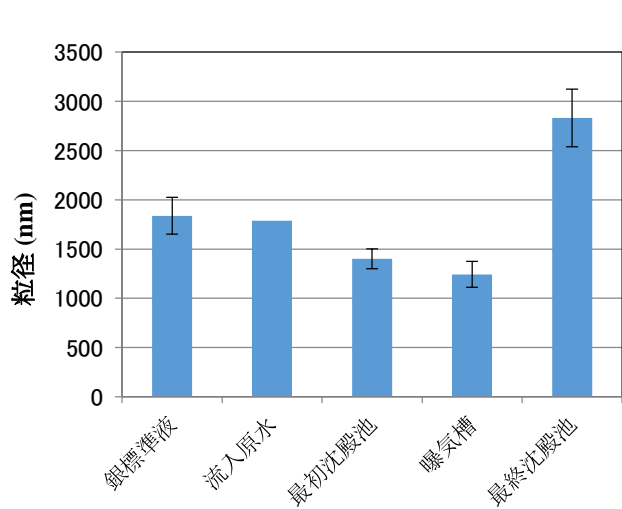


図5 各サンプルにおける銀粒子の粒径の変化

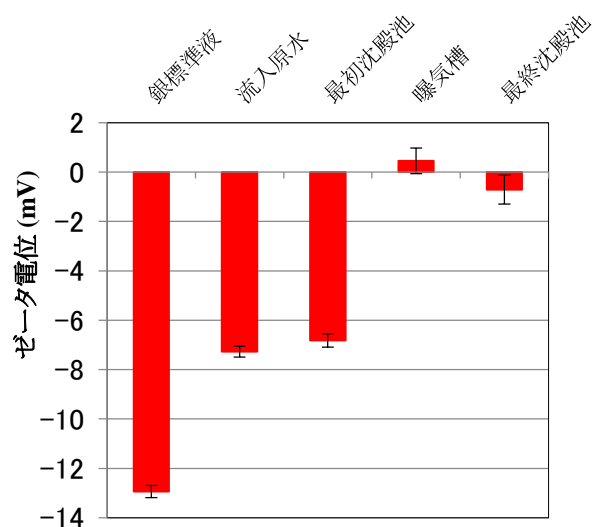


図6 各サンプルにおけるゼータ電位の変化

表1 各処理過程の排水に含まれていた金属

試料名	①流入下水	②初沈流出水	③反応槽	④終沈流出水
Li	72.07	71.90	69.24	68.16
Be	0.00	0.00	0.00	0.00
B	248.94	156.09	163.04	163.57
Al	180.05	165.85	11.45	9.93
V	77.06	79.34	100.97	77.09
Cr	3.19	1.26	0.66	0.63
Mn	189.67	208.97	218.33	221.62
Fe	53.40	21.59	25.81	17.82
Co	6.99	6.36	6.49	6.64
Ni	396.19	387.15	421.02	429.57
Cu	6.59	8.13	3.63	2.91
Zn	23.70	21.23	22.29	27.67
As	10.05	9.94	10.19	9.68
Se	37.14	39.08	36.97	36.68
Sr	3,070.38	2,802.07	2,744.72	2,689.49
Mo	26.13	24.91	23.46	23.78
Ag	0.03	0.05	0.01	0.01
Cd	1.40	0.81	1.47	0.87
In	0.02	0.02	0.01	0.01
Sn	0.53	0.41	0.32	0.26
Sb	2.21	1.80	1.69	1.69
Te	0.71	0.50	0.53	0.36
Ba	71.33	69.14	59.86	61.23
Tl	0.13	0.07	0.04	0.01
Pb	0.11	0.15	0.14	0.37

単位は全て $\mu\text{g/L}$ 、灰色の箇所: 定量下限未満

表2 各サンプルにおける銀粒子の粒径の変化に対する Mann-Whitney のU 検定結果

	対応サンプルの差					Mann-Whitney の U	Z	漸近 有意確率 (両側)
	平均値 (nm)	標準 偏差	平均値の 標準誤差	差の 95%信頼区間				
				下限	上限			
Reference- 最初沈殿池	435.9	3019	214.0	13.81	854.0	1.980 $\times 10^4$	-0.084	0.933
Reference- 曝気槽	595.2	3245	230.0	141.5	1049	1.651 $\times 10^4$	-2.941	0.003
Reference- 最終沈殿池	-983.3	5204	368.0	-1709	-257.7	1.701 $\times 10^4$	-2.584	0.010

表3 各サンプルにおけるゼータ電位の変化に対する Mann-Whitney のU 検定結果

	対応サンプルの差					Mann-Whitney の U	Z	漸近 有意確率 (両側)
	平均値 (mV)	標準 偏差	平均値の 標準誤差	差の 95%信頼区間				
				下限	上限			
Reference- 流入原水	-5.666	4.792	0.3389	-6.334	-4.998	3884	-13.940	<0.001
Reference- 最初沈殿池	-6.120	5.039	0.3563	-6.822	-5.417	4582	-13.337	<0.001
Reference- 曝気槽	-13.39	8.040	0.5684	14.51	-12.26	545.0	-16.828	<0.001
Reference- 最終沈殿池	-12.23	8.983	0.6352	-13.48	-10.98	942.0	-16.485	<0.001

表4 各サンプルにおける粒径およびゼータ電位の変化に対する効果量算出結果

種類	ゼータ電位分布の効果量	粒径分布の効果量
Reference-流入原水	-0.70 (効果量大)	—
Reference-最初沈殿池	-0.67 (効果量大)	-0.01 (効果量小)
Reference-曝気槽	-0.84 (効果量大)	-0.15 (効果量小)
Reference-最終沈殿池	-0.83 (効果量大)	-0.13 (効果量小)

4 まとめ

本研究では、実下水処理場における溶存態物質の実態調査をするとともに、各処理工程から採取した水に銀粒子を添加し、その挙動を調査した。その結果、以下の知見が得られた。

- ・本研究で対象とした下水処理水では、銀ナノ粒子はほとんど含まれないことが明らかとなった。
- ・最終沈殿池から採取した水に銀粒子を添加した系では、最初沈殿池からの水に添加した系より、添加された銀粒子の粒径は大きく、ゼータ電位の絶対値は小さくなっていた。
- ・下水処理場に銀粒子が流入した場合でも、処理過程で凝集し、汚泥に移行することが示唆された。

今後は、下水や公共用水域に含まれるナノ物質の検出方法の構築を目指すとともに、公共用水域でのナノ物質のモニタリングを通して実態把握を行い、今後の水環境におけるナノ物質の影響について検討する必要がある。

参考文献

[1] S. Bakand, A. Hayes, F. Dechsakulthorn, Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure,

Inhal Toxicol, 24 (2012) 125-135.

[2] K. Donaldson, C.A. Poland, Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity, Curr Opin Biotech, 24 (2013) 724-734.

[3] T. Walser, D. Meyer, W. Fransman, H. Buist, E. Kuijpers, D. Brouwer, Life-cycle assessment framework for indoor emissions of synthetic nanoparticles, J Nanopart Res, 17 (2015).

[4] S.J. Lin, A.A. Taylor, Z.X. Ji, C.H. Chang, N.M. Kinsinger, W. Ueng, S.L. Walker, A.E. Nel, Understanding the Transformation, Speciation, and Hazard Potential of Copper Particles in a Model Septic Tank System Using Zebrafish to Monitor the Effluent, Acs Nano, 9 (2015) 2038-2048.

[5] N.C. Mueller, B. Nowack, Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment, Environ Sci Technol, 42 (2008) 4447-4453.

[6] B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K.A. Dawson, I. Lynch, Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications, Materials, 6 (2013) 2295-2350.

- [7] V.K. Sharma, Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment-A Review, *J Environ Sci Heal A*, 44 (2009) 1485-1495.
- [8] A.J. Pelley, N. Tufenkji, Effect of particle size and natural organic matter on the migration of nano- and microscale latex particles in saturated porous media, *J Colloid Interf Sci*, 321 (2008) 74-83.
- [9] D.H. Lin, J. Ji, Z.F. Long, K. Yang, F.C. Wu, The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Chlorella* sp., *Water Res*, 46 (2012) 4477-4487.
- [10] T. Hiemstra, J. Antelo, R. Rahnemaie, W.H. van Riemsdijk, Nanoparticles in natural systems I: The effective reactive surface area of the natural oxide fraction in field samples, *Geochim Cosmochim Ac*, 74 (2010) 41-58.
- [11] B.I. Escher, K. Fenner, Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products, *Environ Sci Technol*, 45 (2011) 3835-3847.
- [12] 山村寛、原宏江、對馬育夫、真野浩行、岡本誠一郎：河川水における溶存態有機物の粒径画分の特性解析と生体・生態影響評価、第43回関東支部技術研究発表会 (2016)
- [13] Juan L. Acero, F. Javier Benitez, Francisco J. Real, Fernando Teva, Micropollutants removal from retentates generated in ultrafiltration and nanofiltration treatments of municipal secondary effluents by means of coagulation, oxidation, and adsorption processes, *Chemical Engineering Journal* 289 (2016) 48-58
- [14] 水本篤、竹内理：効果量と検定力分析入門 - 統計的検定を正しく使うために - 、より良い外国語教育研究のための方法 外国語教育メディア学会 (LET) 関西支部 メソドロジー研究部会 2010年度報告論集

CHARACTERIZATION OF NATURAL ORGANIC MATTER IN PARTICLE SIZE FRACTION IN RIVER WATER AND BIO/ECOLOGICAL EVALUATION

Budget: Grants for operating expenses (General Account)

Research Period: FY2014-2015

Research Team: Water Environment Research Group (Water Quality)

Authors: OKAMOTO Seiichiro, TSUSHIMA Ikuo, MANO Hiroyuki,
YAMAMURA Hiroshi (Chuo University)

Abstract:

The aim of this study is to understand the influence of a small amount of organic matter such as nanoparticles dissolved in river on human cells and aquatic organisms. To that end, toxicity evaluation tests were conducted using concentrated river water sampled at 4 sampling points in Tone River in Japan and, likewise, characteristic analyses (such as organic matter components by excitation-emission matrix and heavy metals and) were also conducted. As a result, the toxicity to human hepatoma (HepG2) cells was the highest in uppermost stream and decreased with downward flow. Furthermore, acute immobilisation test using a daphnid species (*Daphnia magna*) and short term toxicity test on embryo and sac-fry stages of zebrafish (*Danio rerio*) showed no significant effect of the concentrated water sample of uppermost stream, whereas algal growth inhibition test using a green alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) showed statistically significant inhibitions of the growth of *P. subcapitata* in 10 times more concentrations of the water sample. Consequently, each fractionated sample filtrated and concentrated by 0.2 μm , 200 kDa and 50 kDa filters indicated that toxic components in each fraction were different depending on sampling points.

Keywords: nanoparticle, toxicity evaluation test, human hepatoma, aquatic organisms, river water