〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
37 (3) 179-184 (1991)

活性汚泥に対する化学物質の影響と毒性評価法（第2報）酸素電極
による酸素吸収速度の迅速定量とその応用について

三原祐一, 古沢奈緒美, 秋葉雅子, 池田智子
斉藤桂子, 白戸尚子, 横田勝司
東北薬科大学

Method for Estimating the Toxicity of Chemicals to Activated Sludge. II.¹⁾
A Rapid Determination and Application of Oxygen Uptake Rate
by Using Oxygen Electrode

YUICHI MIHARA, NAOMI FURUSAWA, MASAKO AKIBA, SATOKO IKEDA,
KEIKO SAITO, NAOKO SHIROTO and KATSUSHI YOKOTA

First Department of Hygienic Chemistry, Tohoku College of Pharmacy, 4-Chome, 4-1,
Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981, Japan

(Received November 28, 1990)

This paper deals with the investigation of simple and rapid method to determine the toxicity value (IC_{50}) of chemicals to activated sludge by using oxygen electrode. In this method, activated sludge was added to various concentrations of test chemicals and 50% inhibition of the oxygen uptake rate (OUR) was measured within 10 min. The IC_{50} values calculated to be 1.5 mg/l, 1.5 mg/l, 4.0 mg/l, 7.2 mg/l, 14 mg/l, 14mg/l, 20 mg/l, 75 mg/l, 108 mg/l and 2500 mg/l for mercury (II) chloride, copper (II) chloride, mercury (II) acetate, copper (II) acetate, 2,3,5-trichlorophenol, pentachlorophenol, *p*-nitrophenol, 3,4-dimethylphenol, cyclohexylamine and aniline, respectively, agreed almost well with those reported in the literatures.

In addition, the OUR of activated sludge inhibited specifically by mercury (II) chloride was easily recovered by the addition of thiol compounds such as 2-mercaptoethanol, thiosulfate and reductive glutathione, respectively. Reactivation by thiol compounds suggested that mercury (II) form reversible mercaptides with sulfhydryl groups of enzymes concerned in OUR.

From these results, the OUR method would be applicable to a rapid determination for biochemical field or biodegradation test in the Law Concerning the Examination and Regulation of Manufacture, etc. Chemical Substances.

Keywords — activated sludge ; oxygen uptake rate ; toxicity ; IC_{50} value ; chemical

緒 言

各種工場から排出が予想されるさまざまな化学物質の流入によって終末処理場での活性汚泥に与える悪影響を迅速に評価することができれば浄化障害の防止は勿論のこと環境汚染の防止にも役立つことが予想される。

このような観点から、前報¹⁾では特定の化学物質に対し活性汚泥の酵素吸収速度 (oxygen uptake

rate, OUR と略)の抑制, 化学的酸素要求量 (chemical oxygen demand, COD と略) 除去率の低下, 硝化反応の阻害, トリフェニルテトラゾリウムクロライド (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC と略)-コハク酸脱水素酵素活性並びにアルカリ性ホスファターゼ活性の低下など5つのパラメータで比較検討し, なかでも OUR が最も簡単で, しかも, 迅速, 感度の良い毒性評価法の1つと考えた。

OURの測定法には, 従来から用いられている

ワールブルグ検圧計²⁾や各種市販の生物化学的酸素要求量 (biochemical oxygen demand, BOD と略) 自動測定器による検容計などがある。また、ガルバニ電池やポーラログラフ法は直接酸素の吸収を測定する方法として知られている。前者については、操作が複雑で、多数の試料を短時間内に測定することが難しく後者の代表的なクラーク型ポーラログラフ溶存酸素 (dissolved oxygen, DO と略) 電極方式³⁾は生化学の研究領域で繁用されており、著者ら¹⁾も前述したように活性汚泥に対する化学物質の流入を予測した定性的な毒性評価法で本法を用い良好な結果を得ている。しかし、この時の OUR の変化は、迅速で高感度ではあったが、必ずしも化学物質の毒性を正確な値として定量的な観点から評価したものはなかった。

そこで本研究では、OUR の 50%酸素消費阻害濃度 (IC_{50}) を求める方法を調べ、代表的な化学物質の IC_{50} を算出した。塩化第二水銀で活性汚泥の OUR を阻害した系に対する各種回復剤の添加効果については従来のオキシグラフ装置の反応セルを利用し、また、塩化第二水銀による OUR の阻害速度については反応セルの注入口を改良して2カ所備えたものを製作し、合成下水の同時添加系でも検討し、いずれも良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬 塩化第二水銀、塩化第二銅、酢酸第二水銀、酢酸第二銅は、いずれも和光純薬工業製の特級を用い、2,3,5-トリクロロフェノール (2,3,5-Cl) とペンタクロロフェノール (Penta-Cl) は半井化学薬品製ペプチド合成用特級試薬、シクロヘキシルアミン及びアニリンは半井化学薬品製 (特級)、*p*-ニトロフェノールは東京化成工業製の特級を用いた。その他の試薬は、いずれも市販の特級試薬を使用した。

2. 試験溶液の調製 塩化第二銅と酢酸第二銅は、水に溶解して試験溶液とし、その他の水に難溶性の薬品は 50%エチルアルコール (EtOH) またはジメチルスルホキシド (DMSO) で可溶化後、用いた。なお EtOH 及び DMSO の溶解補助剤に対する OUR の影響については試験のつど影響がないことを確認した。

3. 装置 クラーク型ポーラログラフ DO センサはセントラル科学製オキシグラフ 8 型を用い、Fig. 1 に測定装置の概要を示した。

特に、化学試薬による OUR の阻害速度を調べる際には、図の中央に示すような硬質ガラス製反応セル (2 ml) の注入口を V 字状に D_1 と D_2 の2カ所設けた改良型反応セルを製作し、測定した。また、従

Fig. 1. Schematic Diagram of the Apparatus for the Determination of Oxygen Uptake Rate

A: reaction vessel, B: water-jacket, C: DO electrode, D_1 : injection port 1, D_2 : injection port 2, E: magnetic stirrer, F: DO meter, G: recorder, H: water-bath, I: pump.

来からの中央部に注入口が1カ所(D)の反応セル(図左)を用い各化学試薬の IC_{50} の算出並びにOUR阻害に対する回復剤の添加効果について測定した。

4. 活性汚泥の培養法 前報¹⁾で用いたかまぼこ製造工場の廃水処理施設から分取した活性汚泥を人工下水で2週間以上馴化したものを使用した。なおOUR測定時の活性汚泥は、DO消費を高めるため対数増殖期に相当する活性汚泥を用い、少なくとも3回以上水洗、遠心し、内部呼吸を小さくしたものをを用いた。

5. 活性汚泥のOURより IC_{50} 値の測定 活性汚泥のOURを50%阻害する化学物質の濃度(IC_{50} 値)を求めるため2mlの反応セルに人工下水と活性汚泥の混合液浮遊物質濃度(mixed liquor suspended solid, MLSSと略)2000 mg/lを入れ、20°Cの恒温下を開栓したままマグネチックスターラーで攪拌し、DOを20°C、飽和量(100%)とした後、密栓と同時に時間の経過と消費するDOの測定

Fig. 2. Calculation of Inhibition % of Chemicals Based on Inhibition of OUR of Activated Sludge

Chemicals were added when dissolved oxygen in the reaction vessel had decreased to approximately 50% as indicated by arrow. Inhibition (%) was calculated according to the following equation: Inhibition (%) = $\frac{(A-B)}{A} \times 100 = 73$ where $A=23.3\%$ and $B=6.3\%$.

を開始し、活性汚泥によってDOが50%消費するまでをコントロール(DO 100%→50%)とし、このDO消費に要する時間は、2分程度を目安とし、MLSSで微調整した。次いで、50%消費した時点で一定濃度の被検物質に相当する分10 μ lを注入口よりマイクロシリンジで分取すると共に、速やかにマイクロシリンジで一定量の被検物質10 μ lを注入し、経時的にOURを記録した。なお、チャート上ではDO 100%からDO 30%付近まで直線関係が成立するが、これよりもDOが低くなると徐々に対数曲線に移行するためDO 50%を境にして IC_{50} の測定を実施した。Fig. 2には塩化第二水銀による測定の一例を示した。

なお、被検物質によるOURの阻害率は、次式によって算出した。

$$\text{阻害\%} = (A-B)/A \times 100$$

Aは反応開始(DO:100%)1分後から1分間に消費する酸素量(%), Bは50%酸素消費時に被検物質を添加1分後から1分間に消費する酸素量(%)をそれぞれ示し、図に示した化学薬品濃度の例は、塩化第二水銀の7.5 mg/lで、Aは23.3%, Bは6.3%を示すことから計算式より阻害率は72.96%(約73%)となる。以下、さまざまな被検物質の濃度に対する阻害率を求め、これらの数値は片対数グラフを用いて、対数軸に被検物質の濃度を、算数軸には阻害率を各々プロットし、50%前後の用量曲線を作成後、50%との交点を IC_{50} とした。

結果と考察

1. 塩化第二水銀に対する IC_{50} の測定

MLSS 2000 mg/lの活性汚泥に対し、まず最初に塩化第二水銀によるOURのおよその阻害濃度を求

Fig. 3. Estimation of IC_{50} Value for Mercuric (II) Chloride

めるため塩化第二水銀を 100 mg/l より 10 倍ずつ段階希釈した 10 mg/l, 1 mg/l, 0.1 mg/l の各濃度であらかじめ試験を行ったところ, 10 mg/l で完全な阻害がみられ, 0.1 mg/l では塩化第二水銀無添加の対照とほぼ同じ結果が得られ影響のないことが分かった。そこで塩化第二水銀の 1 mg/l から 10 mg/l の各濃度に対する OUR の阻害%を求め, 片対数グラフにプロットしたものが Fig. 3 である。

図より OUR 50%阻害濃度の前後は, 塩化第二水銀の 1 mg/l で 43%, 2.5 mg/l で 59%を示すことから, この 2 点を直線で結び, その 50%の交点より 1.5 mg/l が算出され, 本測定法による塩化第二水銀の IC_{50} 値は, 1.5 mg/l となった。なお, 塩化第二水銀の IC_{50} 値を算出するに要した測定時間は, 6 つの試料に対して, およそ 45 分程度であった。我が国では昭和 48 年に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」が制定, 一部昭和 62 年に改正⁴⁾され, 難分解性, 蓄積性及び毒性を有する化学物質に適用, 難分解性については活性汚泥など微生物による分解試験がとりあげられている。石井ら⁵⁾は自社の廃水処理管理を北開試式クーロメータを用いて活性汚泥による酸素吸収速度を測定し, 50%に半減させる化学物質濃度を LC_{50} とした。測定は 300 ml の反応フラスコで求めているが, 1 個の測定に数時間を要し, 6 連のクーロメータ 1 台で 1 物質の LC_{50} を算出するには予備テストと本試験で 2 日間を必要とし, 年間約 130 物質の測定が可能と試算している。著者らが用いたオキシグラフ装置では, 1 日あたり平均 10 個の被検物質の IC_{50} 値を測定できることから, 効率の点では極めて良好と考える。Dutka ら⁶⁾は活性汚泥の OUR に対する Hg^{2+} ($HgCl_2$) の IC_{50} は接触時間 30 分で 1.3 mg/l, 3 時間では 0.96 mg/l を報告している。この値は活性汚泥と Hg^{2+} が一定時間接触後の値であり, 接触させないで直ちに測定したならば, これよりも大きくなることが予想された。また, Anderson ら⁷⁾は 300 ml の反応セルを用い, ポーログラフ方式で Hg^{2+} ($HgCl_2$) による活性汚泥の OUR を IC_{50} で求め, 4.6 mg/l を得ている。いずれも測定方法並びに測定条件が異なっており, これら 2 つの IC_{50} 値と著者らが得た IC_{50} 値を比較することは困難と思われるが, 類似した値のものと幾分異なった値が得られており, これは活性汚泥の種類, 接触時間, 反応時間などによるものと推察した。

2. 代表的な化学物質の IC_{50} 値

Table I には 10 種の化学物質の IC_{50} 値を示した

TABLE I. IC_{50} Values for Typical Chemicals
MLSS: 2000 mg/l, Reaction temperature: 20 °C.

Compound	IC_{50} (mg/l)
Mercury (II) Chloride	1.5
Copper (II) Chloride	1.5
Mercury (II) Acetate	4.0
Copper (II) Acetate	7.2
2,3,5-Trichlorophenol	14
Pentachlorophenol	14
<i>p</i> -Nitrophenol	20
3,4-Dimethylphenol	75
Cyclohexylamine	108
Aniline	2500

が, 無機塩としての塩化第二水銀と塩化第二銅の IC_{50} 値は, いずれも 1.5 mg/l であったが, 酢酸第二水銀と酢酸第二銅は, それぞれ 4.0 mg/l と 7.2 mg/l となり, 無機塩と比較した場合, 共に IC_{50} 値が大きくなる傾向を示した。このような塩の形態による IC_{50} 値の相違は, 活性汚泥の DO 消費に関与する酵素に重金属が結合する際, 重金属塩の分子量に影響を受けるものと予想した。

Anderson ら⁷⁾は Cu^{2+} ($CuSO_4$) の IC_{50} 値として 6 mg/l を, Dutka ら⁶⁾は Cu^{2+} ($CuSO_4$) と接触 30 分で 34 mg/l, 接触 3 時間で 17 mg/l の IC_{50} 値を, それぞれ報告しており, Cu^{2+} でも数値は若干異なるが, 前述の Hg^{2+} と同じような阻害傾向が得られた。また, フェノール誘導体に関する IC_{50} は, 2,3,5-Cl と Penta-Cl では各々 14 mg/ml, *p*-ニトロフェノール 20 mg/l 及び 3,4-ジメチルフェノールは 75 mg/l であった。シクロヘキシルアミンの IC_{50} は 108 mg/l で, アニリンでは 2500 mg/l と活性汚泥に対する毒性の著しい低下がみられ, これは活性汚泥によってアニリンが生分解を受けている可能性が示唆された。茂岡ら⁸⁾はクロロフェノール類の活性汚泥微生物に対する OUR 阻害について Penta-Cl の 30 mg/l では, 全く影響を与えないと述べている。Klecka ら⁹⁾は OECD respiration 阻害 (活性汚泥) で Penta-Cl は 2.5 mg/l を報告し, 吉岡ら¹⁰⁾は MLSS 1600 mg/l の活性汚泥呼吸阻害試験 (3 h EC_{50}) でシクロヘキシルアミン 870 mg/l, *p*-ニトロフェノール 59 mg/l, Penta-Cl 21 mg/l を報告しているが, いずれも MLSS 濃度が異なるにもかかわらず OUR の阻害傾向は同じであった。

3. 塩化第二水銀による活性汚泥の OUR 阻害速

度

前報¹⁾で用いた人工下水と活性汚泥の混液を反応セルに入れ、開栓しながら攪拌、混和し、十分に DO を飽和させたものを Fig. 4 に示すように密栓後 DO が 50% 消費された時、直ちに終濃度 30 mg/l となるよう塩化第二水銀を添加した A は OUR の阻害が強く現れたのに対し、1 分後の B では、A よりも反応阻害が弱く、さらに 2 分後では C にみられるように塩化第二水銀による OUR の阻害は一段と弱いものとなった。このように塩化第二水銀の添加時間が早ければ早いほど OUR の阻害が強く観察されたが、本法において特に DO が少ない状態での塩化第二水銀による OUR の阻害は、コントロールにみられるような酸素濃度が少ない 0-20% 付近では幾分直線から対数曲線になるので、阻害の強弱を判定することが難しく、B の 30% 付近が阻害を観察できる限界と思われる。また、図には示さなかったが、注入口が 2 個付いた反応セルを用いて基質としての人工下水と阻害剤の塩化第二水銀を同時に活性汚泥に加えた系と、あらかじめ活性汚泥に塩化第二水銀を

Fig. 4. Effect of the Addition of Mercuric (II) Chloride on OUR of Activated Sludge

Arrows indicate the points where HgCl_2 (final concentration; 30 mg/l) was added to synthetic sewage-activated sludge system. ●—●, Control (no HgCl_2 added). HgCl_2 was added when DO had decreased to approximately 50% (A), 30% (B) or 12% (C).

1-2 分間接触させ、次いで基質の人工下水を加えた系では、いずれも OUR の阻害が A と同様の結果を得ることから、活性汚泥の水銀に対する親和性が基質よりも強いことを示唆するものである。

4. 塩化第二水銀による活性汚泥の OUR 阻害の可逆性

活性汚泥の OUR 阻害剤として IC_{50} 値が小さな塩化第二水銀の 30 mg/l を用い、生化学領域における応用例として Hg^{2+} の結合力による OUR の阻害系に対し、チオール化合物の代表的な 2-メルカプトエタノール (2-ME) の添加による OUR の回復効果を検討し、その結果を Fig. 5 に示した。

図からも明らかなように Hg^{2+} 無添加のコントロール群①に対し、DO が 50% 消費された時、30 mg/l の塩化第二水銀を添加した系では OUR が著しく阻害を受けていることが、曲線②より観察された。この OUR 阻害に対し、2-ME の 10 μl を添加すると曲線③より OUR の回復がみられた。その他のチオール化合物の添加効果については図には示さなかったが、システインの 5 mg/10 μl またはチオ硫酸ナトリウム並びに還元型グルタチオンの各 1 mg/10 μl の添加は、2-ME ほどではないが、OUR の回復が認められた。これは 2-ME の原液 10 μl は、およそ 10

Fig. 5. Effect of the Addition of 2-Mercaptoethanol on OUR of Activated Sludge Inhibited with Mercuric (II) Chloride

①, Control, ② HgCl_2 (30 mg/l) was added when dissolved oxygen in the reaction vessel had decreased to approximately 50% as indicated by arrow (↓), ③ The arrow (▲) indicated the addition of 2-mercaptoethanol (10 μl).

mg 量に相当するが、チオ硫酸ナトリウムと還元型グルタチオンは、その 10 分の 1 量と少ないことが原因しているものと推察された。いずれにしても Hg^{2+} が活性汚泥の酸素利用に関与する諸酵素の活性基であるスルフヒドリル基と結合しメルカプチドを形成した結果、OUR を阻害しているものと思われた。この水銀阻害系に対し、2-ME やチオ硫酸ナトリウム、還元型グルタチオン等のチオール化合物の添加は、活性の回復に差がみられるものの OUR の活性を回復することが明らかとなり、したがって塩化第二水銀による活性汚泥 OUR の阻害は、可逆阻害が示唆された。

以上の実験で用いたオキシグラフ装置による OUR の測定で、使用した反応セルは、主として注入口が 1 個のものと、新たに製作した注入口 2 個のもので測定したが、操作が簡単で迅速、しかも感度の良い方法として微生物の OUR をはじめ酸化的リン酸化反応などの生化学領域の研究に多く活用されよう。

また、化審法での微生物による分解性の有無や 1984 年の OECD¹¹⁾ で採用された活性汚泥の呼吸阻害によるテストガイドライン 209 などで化学物質の IC_{50} や EC_{50} を算出する際の予備試験として利用すれば、時間の短縮に寄与することは勿論のこと、被験物質の使用量が百分の一以下となり、測定後に生ずる廃水処理量も少なく済むものと思われた。

ま と め

終末処理場に流入が予想される化学物質の影響を活性汚泥の呼吸抑制に基づく酸素吸収速度 (OUR) の減少をパラメータとし、毒性の評価を調べた。

1) クラーク型ポーラログラフ DO センサによるオキシグラフ装置を用い OUR が半減する化学物質の濃度を IC_{50} 値とし、その算出方法を確立した。

2) 塩化第二水銀、塩化第二銅、酢酸第二水銀、酢酸第二銅、2,3,5-トリクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、 p -ニトロフェノール、3,4-ジメチルフェノール、シクロヘキシルアミン及びアニリンの化学物質の IC_{50} 値は、それぞれ 1.5 mg/l, 1.5 mg/l, 4.0 mg/l, 7.2 mg/l, 14 mg/l, 14 mg/l, 20 mg/l, 75 mg/l, 108 mg/l, 2500 mg/l となり、文献の値とほぼ一致した。

3) 水銀による活性汚泥の OUR 阻害は、2-メルカプトエタノール、チオ硫酸ナトリウムや還元型グルタチオンなどの添加によって回復がおこることから可逆的であることが明らかとなった。

4) 本測定法は感度良く、短時間に簡単な操作で測定ができることから化審法における毒性試験である分解性の予備テストとして、さらに改良した反応セルを用いれば、生化学の研究分野にも広く利用できるものと考えた。

引 用 文 献

- 1) 三原祐一, 古沢奈緒美, 飯岡孝浩, 氏家直美, 渡辺はるみ, 横田勝司, 衛生化学, **36**, 509 (1990).
- 2) W.W. Umbreit, R.H. Burris, J.F. Stauffer, "Manometric Techniques," 4th ed., Minn., Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1964, p.305.
- 3) L.C. Clark, Jr. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **2**, 41 (1956).
- 4) 化審法 昭和 48 年法律第 117 号, 同改正 昭和 61 年法律第 44 号.
- 5) 石井久雄, 梶 寿勝, 野口淳平, 水質汚濁研究, **4**, 197 (1981).
- 6) B.J. Dutka, N. Nyholm, J. Petersen, *Water Res.*, **17**, 1363 (1983).
- 7) K. Anderson, B. Koopman, G. Bitton, *Water Res.*, **22**, 349 (1988).
- 8) 茂岡忠義, 吉田喜久雄, 保坂千登勢, 早月陽子, 山内文雄, 衛生化学, **34**, 266 (1988).
- 9) G.M. Klecka, L.P. Landi, *Chemosphere*, **14**, 1239 (1985).
- 10) 吉岡義正, 小瀬洋喜, 後藤幹保, ヒキノヒロシ, 衛生化学, **33**, 11 (1987).
- 11) OECD, "Guidelines for Testing of Chemicals 209," 1984.