微生物を利用した微量有機塩素化合物のモニタリング

Microbiological Monitoring Method of Organo-chlorides Compounds in Aquatic Environment

南部 特一* 相沢 貴子*
Shōichi NAMBU* Takako AIZAWA*

Abstract

The purpose of this study is to establish a monitoring method for the detection, identification and evaluation of persistent micro-pollutants in the aquatic environment.

The experimental studies on development of biological methods for concentration and estimation of the micro-pollutants in marine waters were carried out in order to improve the detection technique.

Regarding biological concentration, it could be found in this study that the activated sludge was applicable as an adsorption medium for concentration of the micro-pollutants in marine waters and its application was advantageous in the case that it could not be detect the persistent micro-pollutants by the concentration because of its minute concentration.

The activated sludge was cultivated in the specially designed apparatus to be operated continuously and automatically.

The sample water was prepared by addition of the substrate for cultivation of the activated sludge before feeding into the apparatus.

1. 緒言

自然水域に排出された有機物質は、自然界の物質循環機構のうち大きな役割を占める生物の自浄作用によって分解安定化される。

人工合成有機塩素化合物である PCB や有機塩素系農薬 (BHC, DDT, ドリン剤など) 等は、実用性、経済性が非常に優れた物質であるため、その合成に成功以来、その生産、使用量は急激に増加した。しかし、これらの物質の物理化学的に安定でかつ、親油性である等の長所は、一度環境中に放出されると、物質循環に関与する生物中の脂肪組織に簡単に取込まれたままで、これらが分解、代謝されないばかりか再び環境に排出されないという性質になる。そのため食物連鎖の高位にある生物ほど体内蓄積濃度が増加し、その生命を危険な状況に追いやるなど深刻な環境汚染^{1),2),3)}が生起してきた。

これらの問題を解決するため、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」が制定されている。しかし

ながら化学物質の種類は極めて多く、また生産工程における副産物や環境中での有害物質の生成等についても考慮が充分払われていないのが現状であろう。このような化学物質による環境汚染の未然止には、生産工程のみならず、環境における監視体制を確立する必要があると考えられる。ところが環境における PCB など有機塩素化合物は、従来の試験法では検出されないほど、極めて低濃度で、その実態を把握するのは非常に困難である。そこで自然界における濃縮機構を逆に利用して、これらの物質を監視する方法を検討したので、その結果を報告する。

2. 試験法

2-1 原理

水域における PCB や残留性有機塩素化合物は、Fig. 1 および Fig. 2 に示すように、直接、水から表面吸着や呼

* 厚生省、国立公衆衛生院、衛生工学部、東京都港区白金台、4-6-1

Dept. of Sanitary Engineering Institute of Public Health, 4-6-1, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo, Japan.

Fig. 1 Recycling and Mobile Mechanism of PCB's in Fresh Hydrosphere.

Fig. 2 Recycling and Mobile Mechanism of PCB's in Marine.

吸および皮膚を通して吸収されたり、食物連鎖により徐々に食物連鎖の高位の生物へと濃縮されつつ移動している。前者の直接生物へ吸収される経路は、水系に特有

な現象であり、しかもこの経路による濃縮率は高いとされている⁴⁾。したがって、環境汚染の実態を把握するためには、対象とする水域における水中濃度を必ず測定しなければならない。

しかし、発生源近傍の水域以外では、それらの物質が拡散ないし希釈され汚染物質濃度が低下し、汚染調査を行っても水から検出されないことがしばしば経験されている。そこで、水域の汚染調査には濃縮過程が複雑で、しかも移動等による試料の代表性または信頼性に問題があるにもかかわらず、分析感度上やむを得ず、濃縮率の高い魚類をはじめとする水生生物、底質等が用いられてきた。

そこで、人為的に制御できる装置内に水中微生物を培養し、その装置内に自然水域の水を通過させると、水中に存在する蓄積性を有する物質は、選択的にそこに培養している微生物に濃縮されることは、上に記したように明らかである。この生物濃縮した蓄積性有機物質濃度は、自然水域の濃度よりはるかに高くなり、充分、測定することができるようになる。これが研究の対象とした試験法の原理である。

なお、装置内で培養する微生物は、単一種の微生物ではなく、下水処理や産業排水処理に広く利用されている活性汚泥を用いることとした。活性汚泥を用いたのは、バクテリア、菌類、原生動物、その他の下等動物から構成されている混合微生物集団であるため、培養操作が易しいことや、PCBを濃縮係数が 10^4 程度まで濃縮する特性⁵⁾を持っているためである。

2-2 装置およびPCB、有機塩素系農薬の分析法

試料中のPCB等有機塩素化合物を活性汚泥に濃縮するために用いた実験装置は、Fig. 3に示すように、試料水の供給—エアレーション—沈殿分離—上澄液の排出、の単位操作を自動的に繰り返し行なうことができるものである。この装置の運転条件を下記のように設定し、海水およびVan't Hoffの人工海水に活性汚泥微生物の基質としてグルコースおよびグルタミン酸ソーダをBOD 100mg

Fig. 3 Experimental apparatus of Activated Sludge

1ℓになるように添加して、微生物を培養した。

運転条件

エアレーション時間：2時間 空気量：5ℓ/分

沈殿時間：1時間 汚泥返送比：15%

つぎに PCB および有機塩素系農薬の分析法の概略を

Table 1 に示す。分析試料とする活性汚泥は、エアレー

Table 1 Standard Procedure for Determination of PCB's and Organo-Chloric Pesticides in Activated Sludge.

ション開始後、1時間30分経過したのちに混合液として採取し、3000 rpm, 10分間の遠心分離を行ったのち、活性汚泥の湿重量を測定した。これをフラスコに移し入れ、エチルアルコール50mlを加え超音波破壊したのち、n-ヘキサン50mlを加えて振とう抽出し、その後エチルアルコール-n-ヘキサン(1:1)50mlで2回抽出をくり返す。溶媒をKD濃縮器を用いて約2mlに濃縮し、フロリジドライカラムにかける。これをアセトニトリル(20%含水)100mlで溶出し、溶出液を弱アルカリの食塩水(上にn-ヘキサン50mlを入れる)に受け、振とう、抽出したのち、食塩水をn-ヘキサン50mlで再び抽出し、n-ヘキサン層は合わせて脱水濃縮する。このn-ヘキサン濃縮液を、130°C 14時間、活性化したシリカゲルをn-ヘキサンの湿式で充填したガラスカラムにのせ、n-ヘキサンで溶出し、10~100mlの画分を集め、次に15%エチルエーテルを含有するn-ヘキサンで溶出し、0~150mlの画分を集める。各々の画分は1~2mlに濃縮し、一定量にメスアップしたのち、その一定量を下記条件のガスクロマトグラフに注入した。

ガスクロマトグラフィー条件

装置：島津 GC-5A (³H 300 mCi)

Vol.1 No.2 (1978)

充填剤：OV-1, YUNN, 1.5%, Chromosolb w, DMCS,

60~80メッシュ

カラム：3mm×2m, ガラス

試料注入口温度：240°C

検出器温度：251°C

カラム温度：190°C

N₂ ガス流量：60ml/分

3. 活性汚泥によるPCB濃縮特性について

3-1 実験方法

Van't Hoff の人工海水もしくは海水に基質を添加して、上記の装置を用いて活性汚泥を十分に馴養したのち、つぎに微量のPCBを添加した上記の試水約700ℓを用いて約1ヶ月間、活性汚泥を培養した。その期間、約3日間に1度づつ、エアレーション開始後1時間30分後に混合液を採取し、MLSS (活性汚泥浮遊物質濃度)、汚泥中のPCB濃度、放流水中のSS (浮遊物質濃度)、および活性汚泥を構成する原生動物について顕微鏡観察を行なった。なお、Van't Hoff の人工海水の組成は **Table 2** に示す。

Table 2 Composition of Van't Hoff's man made

Sea Water

NaCl	2.7g	} Total 100ml for water
KCl	0.07g	
CaCl ₂	0.10g	
MgCl ₂	0.34g	
MgSO ₄	0.21g	
NaHCO ₃	0.50g	

また、活性汚泥にPCBが濃縮すると、活性汚泥の活性がどのように変化するかを明らかにするため酸素消費速度を測定した。MLSS, 200mg/ℓに調整した活性汚泥を、BOD, 100mg/ℓの溶液に懸濁し、スターラーで攪拌しながらPCBを添加(水中濃度1mg/ℓ)した。このPCBを添加した汚泥をさらに24時間エアレーションし、時間経過ごとに適量を採取して、酸素消費速度、MLSS、PCBを速定した。

3-2 結果および考察

(1) 人工海水による実験

グルコースおよびグルタミン酸ソーダを添加した Van't Hoff の人工海水に、PCB (KC 500) 濃度が0.1 μg/ℓ, 0.01 μg/ℓとなるように調整した供試水を用いて活性汚泥を培養し、培養時間の経過に伴う活性汚泥中の濃度を測定した結果を **Fig. 4** に示す。

活性汚泥中の微生物量を揮発性浮遊物質(Volatile Suspended Solids)で表現すると、培養期間中のばっ気槽内混合液揮発性浮遊物質濃度(以下 MLVSS と略す)は約15,000mg/ℓであり、また放流水の VSS は約130mg/ℓ

Fig. 4 Concentration Curve of PCB (KC 500) in Activated Sludge by Cultivated man made Sea Water.

であった。したがってこの培養条件における平均微生物滞留時間は次の関係式から約 270 時間となる。

平均微生物滞留時間＝

$$\frac{\text{MLVSS} \times \text{エアレーションタンク容量}}{\text{放流水 VSS} \times \text{放流水量}} \times \text{エアレーション時間}$$

$$\text{ン時間} = \frac{15,000 \times 5}{130 \times (1 - 0.15) \times 5} \times 2 = 270 \text{ 時間}$$

実験の培養条件における PCB の濃縮平衡は、理論的にこの平均微生物滞留時間 270 時間において得られるものとなり、**Fig. 4** における結果と一致していた。

人工海水 490ℓ 以上を供給して、濃縮平衡に到達した後の活性汚泥中の PCB 濃度および、培養期間中に添加した総 PCB 量のうち活性汚泥に濃縮して残存している PCB 量（以下、平衡転移率）、Polikarpov の定義によって求めた濃縮係数を **Table 3** に示す。濃縮平衡に達した時の活性汚泥量当たり PCB の濃縮量は、水中 PCB 濃度が 0.1 μg/ℓ のとき 0.2 μg/ℓ MLVSS、0.01 μg/ℓ のとき 0.04 μg/ℓ

Table 3 Concentration of PCB (KC500) in Activated Sludge by Cultivated man made Sea water.

Items	PCB concentration in Raw water	
	0.1 μg/ℓ	0.01 μg/ℓ
Volume of Sample water until Concentrated Equilibrium	490ℓ	490ℓ
PCB Concentration in Activated Sludge in a state of Equilibrium	0.175 μg/g	0.032 μg/g
	0.216 μg/g	0.042 μg/g
	0.260 μg/g	0.037 μg/g
Average	0.217 μg/g	0.037 μg/g
Total amount of PCB in Sludge	14.1 μg/g	2.56 μg/g
Input PCB	49.0 μg	4.90 μg
Transfer Rate	28.8%	52.2%
Concentration Factor	2.5×10^4	7.4×10^4

MLVSS であった。また、その時の平衡転移率は 0.1 μg/ℓ のとき約 30%、0.01 μg/ℓ のとき約 50% と低濃度の方が高い傾向を示した。濃縮係数は 0.01 μg/ℓ 添加した方が若干高い傾向を示したが、いずれも 10^4 のオーダーであった。

PCB を活性汚泥微生物が濃縮することによって、活性汚泥を構成する生物集団の構成に、どのような影響を及ぼすかを知る目的で活性汚泥中の原生動物について観察した結果を **Fig. 5** に示す。PCB を添加した活性汚泥中の

Fig. 5 Changes of Protozoa Population Density in Activated Sludge at Various Concentration : Man made Sea Water in Containing PCB (KC 500)

原生動物数は、出現個体数が少ない状態でいったん安定したのち、再び個体数を増加して安定する。この定常状態における原生動物数は、PCB を添加した活性汚泥ほど多い傾向が見られたが、それを構成する原生動物は PCB を添加しないブランクを含めて、繊毛虫の Vorticella, Epistylis, Aspidisca が優先種で、根足虫、鞭毛虫がこれに続いて存在しており、その構成比に大きな差は認めることができなかった。なお、海水性活性汚泥を構成する原生動物は、淡水性活性汚泥のそれに比べて個体の寸法が増大する特徴がみられ、特に Aspidisca では 3～5 倍の体長となることが観察された。

(2) 海水による実験

八丈島沖から採取した清浄な海水に基質を添加して活性汚泥を馴養したのち、基質を添加した海水に、Tri, Hexa, Octa, Chlorobiphenyl を加え、その濃度がそれぞれ 0.1 μg/ℓ になるように調整した供試水を用いて濃縮実験を行なった。その結果を **Fig. 6** および **Table 4** に示す。

実際の海水で培養した活性汚泥の MLSS は、運転期間中、平均 5,800 mg/ℓ であった。MLVSS/MLSS は 0.95

Table 4 Concentration of PCB (Tri, Hexa, Octa chlorobiphenyl) in Activated Sludge by Cultivated Sea water : PCB Concentration in Raw water, $0.1\mu\text{g}/\ell$

Items	Type of PCB	Tri	Hexa	Octa
Volume of Sample water until concentrated Equilibrium		176ℓ	176ℓ	176ℓ
PCB Concentration in Activated Sludge in a State of Equilibrium		0.094 $\mu\text{g}/\text{g}$	0.138 $\mu\text{g}/\text{g}$	0.160 $\mu\text{g}/\text{g}$
		0.103 "	0.154 "	0.160 "
		0.120 "	0.173 "	0.168 "
		0.128 "	0.148 "	0.190 "
		0.156 "	0.194 "	0.218 "
Average		0.120 $\mu\text{g}/\text{g}$	0.161 $\mu\text{g}/\text{g}$	0.179 $\mu\text{g}/\text{g}$
Total amount of PCB in Sludge		3.48 μg	4.67 μg	5.19 μg
Input PCB		17.6 μg	17.6 μg	17.6 μg
Transfer Rate		19.8%	26.5%	29.5%
Concentration Factor		8.6×10^3	3.2×10^4	9.0×10^4

Fig. 6 Concentration Curve of PCB (Tri, Hexa, Octa) in Activated Sludge by cultivated Sea Water : PCB concentration in Raw Water $0.1\mu\text{g}/\ell$

であり、人工海水で培養した活性汚泥の MLVSS/MLSS 0.23 に比べ塩分など無機物の含有量が少なく、活性汚泥の生成状態にかなりの差が認められた。そのため MLVSS と放流水の VSS の値から求められる濃縮平衡時間は、エアレーション時間で 96 時間、供試水量で約 176ℓ となり、人工海水に比べ短時間のうちに濃縮平衡に達することが明らかとなった。この濃縮平衡に達した時の汚泥量当たりの PCB 濃縮量は、Tri < Hexa < Octa の順で大きく、多塩素化合物ほど濃縮されやすい傾向を示した。

PCB が活性汚泥生物に与える影響としては、慢性影響と急性影響が考えられる。ここでは後者の影響を明らかにするため、PCB が汚泥に蓄積される際の酸素消費速度の経時変化を求めた。この結果を Fig. 7 に示す。

活性汚泥に PCB を添加すると、酸素消費速度は約 1 時

Fig. 7 Aeration time Changes of Oxygen uptake rate in Activated Sludge by Various PCB's

間ほど高い値を示し、その後急減するが、その値はblankよりも高く、さきの濃縮量について見られたように酸素消費速度についても塩素数の多少による差異が認められた。また、PCB は活性汚泥の酸素呼吸活性を上昇させる作用があることが認められた。

4. 調査例

4-1 調査地点および方法

人工海水や海水を用いた実験室内における基礎実験から、筆者らの開発した活性汚泥微生物に PCB など有機塩素化合物を濃縮させ、この濃縮したものを分析することによって環境中の微量な蓄積性汚染物質濃度を測定する方法が可能であることが明らかとなった。そこで、Table 5 に示す 6ヶ所の水の PCB および有機塩素化合物を本法によって測定することとした。

東京湾内および三浦半島の St. 1~4 において、それぞ

Table 5 Location of Sea Water Sampling and Data of water qualities

Station No.	Date	Location	Latitude Longitude	PH	COD (mg/ℓ)	SS (mg/ℓ)	Cl- (mg/ℓ)
St. 1	S50. 8.27	Center of Tokyo Bay	35°30.7' N 139°55.6' E	7.98	6.30	11.0	18000
St. 2	S50. 8.27	Off Shinagawa in Tokyo Bay	35°37.8' N 139°46.1' E	8.02	5.00	4.5	14000
St. 3	S50.10. 9	Off Miura Peninsula	35°1.3' N 139°30.2' E	7.55	4.85	—	19000
St. 4	S50.10. 9	Off Miura Peninsula	34°56.4' N 139°30.2' E	8.18	3.23	—	19000
St. 5	S50.10.18	Nakagawa Canal's Estuary Region in Nagoya Harbor	—	7.19	8.94	7.85	—
St. 6	S50.10.20	Ikuta Estuary Region in Kobe Harbor	—	7.36	4.57	5.38	—

Table 6 PCB and organo-chloric Pesticides Concentration in Activated Sludge and Result of Calculative Concentration.

※

Station No.	Location	Average of Activated Sludge Concentration (mg/ℓ)	Volume of Sample water until concentrated Equilibrium (ℓ)	PCB and Organo-chloric Pesticides Concentration in Activated Sludge						Calculative Concentration of PCB in the Sea Water (μg/ℓ)
				PCB (μg/g)	Total BHC (μg/g)	O.P'-DDT (μg/g)	P.P'-DDE (μg/g)	Aldrin (μg/g)	Dieldrin (μg/g)	
St. 1	Center of Tokyo Bay	7800	170	0.036	Nd	0.008	0.005	Nd	Nd	0.017
St. 2	Off Shinagawa in Tokyo Bay	8600	170	0.050	Nd	0.011	0.004	Nd	Nd	0.025
St. 3	Off Miura Peninsula	8400	153	0.019	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.010
St. 4	Off Miura Peninsula	7300	140	0.016	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.008
St. 5	Nakagawa Canals' Estuary Region in Nagoya Harbor	2200	44	0.055	Nd	0.030	0.016	Nd	Nd	0.028
St. 6	Ikuta Estuary Region in Kobe Harbor	2400	48	0.041	Nd	Nd	0.059	Nd	Nd	0.021
Blank	Man made Sea water	19000 (MLVSS)	490	0.013	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.005

※Method of Calculation

PCB Concentration in Sea Water =

$$\frac{\text{PCB Concentration in Activated Sludge} \times \text{Average of Activated Sludge Concentration} \times 5 \times 100}{\text{Transfer Rate} \times \text{Volume of Sample Water until Concentration Equilibrium} \times 1000}$$

れ水中ポンプを使い、表層より1.5mの深さより、約1トンの海水をドラム缶に採取し、実験室に持ち帰り、前述したのと同様な操作を行ない、汚泥中のPCBの濃縮平

衡量、到達するまでの時間と供試水量を求めた。

名古屋港および神戸港の St. 5 および St. 6 では、名古屋港中川運河口の岸壁、神戸港新生田川河口のビルジ集

積船上に、設けた仮設の小屋に実験室内で用いたと同じ活性汚泥装置を搬入した。供試水は湾内の海水を貯留タンクに汲み上げ、そこで BOD 100mg/l に調整して用いた。なお、この実験は昭和50年10月から約2ヶ月間行なった。

4-2 結果および考察

3ヶ所の海水について活性汚泥微生物にPCBを濃縮させ、活性汚泥中のPCB濃縮平衡量を測定した。その結果、

海水の活性汚泥中のPCB濃縮平衡量は、前述したPCB (KC 500), 0.01 μ g/lを添加して行なった実験の活性汚泥中のPCB濃縮平衡量と近似しているため、その時の平衡転移率(50%)を基に、環境中のPCB濃度を算出した。その結果をTable 6に示す。また、各地点および標準品から得られたPCBのガスクロマトグラムをFig. 8に示す。これらの結果は、本法により海水中に極く少量しか存在しないPCBを測定することが可能であることを示し

Fig. 8 Gaschromatogram of PCB's Standard and PCB concentrated in Activated Sludge

ている。また、この表から汚染の影響を受けやすい沿岸域ほど海水中PCB濃度が高くなる傾向が予測される。

なお、名古屋港、神戸港内のモニタリングステーションでの運転は、10月から12月の季節的に不安定な時期に実験を行なったため、水温や塩素イオン濃度が不安定であったので、活性汚泥の安定性が悪く、信頼性に欠けるものと思われる。

5. 総括

活性汚泥生物を濃縮媒体として、多量の試料水中から微量蓄積性物質を生物濃縮し検出する方法について試みたが、実用化に際して次の点に留意する必要がある。

活性汚泥を常に安定した状態に保守しておく必要があり、活性汚泥性状を不安定にする水温、PH、塩素イオン濃度等の急激な変動は避けなければならない。この方法は、活性汚泥微生物を培養するため、多量の空気を要するので空気中の汚染物質の影響を受けやすい。従って、空気中の汚染物質のブランクを低く保つ必要がある。また、揮発性物質の濃縮には不向きである。生物濃縮の形態をとるため、生体内の物質が妨害して、物質の分画、同定に支障をきたす可能性がある。

これらの点を留意すれば、本方法を採用することにより、次のような利点が得られる。

多量の水を試料とするので、サンプルとしての代表性があり、なおかつ微量蓄積性物質の濃縮率が高い。数多い環境汚染物質の中から生体系に蓄積性を有する物質で、かつ微生物難分解性物質のスクリーニングができる。濃縮操作と同時に、微生物への影響を観察することができる。モニタリングステーション等を設置すれば長期間の連続運転が可能となり、定期的なサンプリングで汚染物質の経時変化が観察できる。汚染物質を濃縮した汚泥を適当な条件で保存すれば、その後、新たに特定の汚染物質が問題になった時、過去からの経時変化を知ることができる。

Table 6 には St. 1 から St. 6 で運転した活性汚泥中に濃縮した有機塩素系農薬の濃縮量を示した。各有機塩素系農薬の活性汚泥による濃縮特性については、実験を行っていないので結論は避けるが、BHCのように比較的、水から蒸発しやすいものは検出できるほど濃縮されず、DDT, DDE のように PCB と同程度の⁶⁾濃縮率を示すものは、検出限界まで濃縮可能と考えられる。

本研究を実施するに当たり吉田多摩夫教授（東京水産大学）、浜田昭教授（昭和大学）、竹下隆三技官（国立公衆衛生院）のご協力、ご援助に対して深く感謝の意を表します。なお、本報の一部は、第11回水質汚濁に関するシンポジウムにおいて発表したことを付記する。

一引用文献一

- 1) V, Zitko, P. M. K. Choi (1971) PCB and Other Industrial Halogenated Hydrocarbons in Environment Fish, Res, Board. Canada Tech Rep, 272.
- 2) Interdepartmental Task Force on PCB (1975) Polychlorinated biphenyl and the Environment. USA.
- 3) Panel on Monitoring Persistent Pesticides in Marine Environment of Committee on Oceanography (1971) Chlorinated Hydrocarbons in the Marine Environment USA (1976) P. 74-76.
- 4) 山形登ほか, (1976) 生物濃縮, P. 74-76, 産業図書, 東京。
- 5) M. Kaneko, K. Morimoto, and S. Nambu. (1976) The Response of Activated Sludge to Polychlorinated Biphenyl (KC 500). Water Research, 10, 157-163.
- 6) 上田喜一, 南部祥一, 吉田多摩夫, ほか, (1976) 化学物質の使用量とその環境レベル, 第II報, BHCおよびDDT. 公害と対策, 12(12), 69-79.