

活性汚泥によるエストロゲン分解に関する基礎的検討

東京大学大学院工学系研究科 学生会員 ○田中美奈子
正会員 栗栖太、矢木修身

1. はじめに

近年、多くの河川・湖沼で、「内分泌攪乱物質」と呼ばれる一連の物質群が引き起こす、水棲生物の内分泌系の異常が問題となっており、人体に対しての影響も懸念されている。そのような物質の中で、唯一、人畜由来の物質である 17β -エストラジオール(以下 E2)は、エストロン(E1)、エストリオール(E3)と共に、エストロジェンの一種であり、高い内分泌攪乱作用を持つ。このように内分泌攪乱への寄与率が高いこと、人畜由来のため、排出規制による削減が不可能であるにもかかわらず、下水処理施設における見かけの処理率が低いことなどから、E2 が環境中に及ぼす影響の重大性が指摘されている。また、E2 の一部は、抱合体という活性を持たない状態で生体から排出される。しかし、下水処理課程で、抱合体解離による活性化が起きている可能性も指摘されており、これらの物質の分解・挙動の把握が必要とされている。

これらのことをふまえ、活性汚泥中でのエストラジオール分解経路、分解速度、並びに分解菌等について測定・解析を行い、活性汚泥のエストラジオール分解能を調べるとともに、分解能の強化手法を開発する必要がある。そこで、本研究では、活性汚泥を用いてエストロジェンの微生物分解に関する検討を行った。

2. 実験方法

本研究では、3 つの実験を行った。

<実験 1> 予備実験として、E2 の分解性、汚泥ごとの E2 分解能の違いを調べるため、東京都内の下水処理場 2 ヶ所、埼玉県内の屎尿処理場 1 ヶ所から採取した活性汚泥を用いて、E2 濃度 30mg/l での分解実験を行った。MLSS 濃度は、東京都内処理場 2 ヶ所の汚泥が 1,100mg/l、埼玉県内屎尿処理場の汚泥が 10,600mg/l であった。容量 300ml の三角フラスコに汚泥 25ml を入れ、無機栄養塩培地を 25ml 補充し、E2 を添加した後、シリコ栓をつけ、25、160rpm で一定期間振盪培養を行った。実験期間は 7 日間である。試料は、水溶液画分と汚泥画分に分離し、汚泥画分はメタノールで E2 を抽出した。その後、固相抽出(Varian 社製 Bond Elut を使用)によって濃縮を行った。洗浄には水、ヘキサンを用い、溶出には酢酸エチル・メタノール混合溶液を用いた。窒素気流下で蒸発乾固した後、メタノールに溶解し、GC/FID (Hewlett Packard 社製 HP 6890) を用いて、E2、E1 残存濃度の測定を行った。なお、試料は全量を分析に供した。

<実験 2> E2 分解の経時変化を追跡するため、E2 濃度 5mg/l で、予備実験より短い時間間隔での E2 分解実験を行った。容量 61ml の試験管に活性汚泥 10ml を入れ、E2 または E2 抱合体を添加した後、シリコ栓をつけ、25、160rpm で一定期間振盪培養を行った。試料は、定期的にサンプリングを行い、水溶液画分と汚泥画分に分離し、汚泥画分はメタノールで E2 を抽出した。その後、固相抽出(Varian 社製 Bond Elut を使用)によって濃縮を行った。洗浄には水、ヘキサンを用い、溶出には酢酸エチル・メタノール混合溶液を用いた。窒素気流下で蒸発乾固した後、メタノールに溶解し、GC/FID (Hewlett Packard 社製 HP 6890) を用いて、E2、E1 残存濃度の測定を行った。なお、試料は各時間毎に、全量を分析に供した。実験期間は約 4 日間である。活性汚泥は東京都内下水処理場のものを用いた。MLSS 濃度は 1,500mg/l であった。

<実験 3> 抱合体分解の経時変化を追跡するため、 17β -D-グルクロニド、 3β -D-グルクロニド、 $17,3$ -ダイサルフェート、 3 -サルフェートの 4 種類の E2 抱合体を用いて、分解実験を行った。各抱合体は、解離した際の E2 濃度に換算して 5mg/l となるように添加した。活性汚泥は東京都内下水処理場のものを用いた。MLSS 濃度は 1,600mg/l であった。その他の条件は実験 2 と同様である。また、GC/MS (GC: Hewlett Packard 社製 HG6890、MSD: 同社製 MSD5973) による分析も行った。

キーワード: 17β -エストラジオール(E2)、エストロン(E1)、E2 抱合体、活性汚泥

連絡先: 〒113-8656 文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 03(5841)6238

3. 結果・考察

実験 1 における、E2、E1 濃度の測定結果を表 1 に示す。この結果から、E2 は 7 日間で、汚泥中の微生物によって 98%以上が分解されること、また、汚泥の違いによる分解力の差は小さい、ということが判明した。また、E2 が E1 に変化していることも示された。

実験 2 における、E2、E1 濃度の測定結果を図 1 に示す。実験開始後、汚泥中の微生物によって速やかに E2 が E1 に酸化されていると考えられる。また、E1 も減少しているが、その速度は E2→E1 の反応に比べて非常に遅く、完全に分解されるまでに 92 時間を要した。このことは、下水処理場流出水や放流先河川のモニタリング調査で、E1 が他のエストロゲンに比べて高頻度で検出される、という事象とも一致している。

実験 3 において、17-β-D-グルクロニド、3-β-D-グルクロニドを添加した試料では、E1 の濃度変化が見られた（図 2）。ただし、E2 は検出されなかった。実験 2 の結果を合わせると、グルクロニド抱合体は、抱合体解離→E2→E1 という経路を経て分解される、と考えられる。

17,3-ダイサルフェート、3-サルフェートを添加した試料からは、E2、E1 いずれのピークも検出されなかった。このことから、サルフェート抱合体は、汚泥中の微生物による分解を受けないか、または、抱合体解離→E2→E1 以外の経路を経て分解される、と考えられる。

その他、実験 3 では、抱合体無添加の系(コントロール)ではほとんど見られなかったピークが、抱合体添加系で検出された。E1 分解産物である可能性が考えられたため、GC/MS を用いてピーク物質の同定を行った。その結果、それらの物質は脂肪酸の一種であり、E1 分解産物である可能性は低い、ということが明らかになった。E1 分解産物を検出するためには、抽出、分析方法の検討が必要であると考えられる。

4. まとめ・今後の課題

今回行った実験から、E2 は汚泥中の微生物によって E1 に酸化され、E1 も微生物によって分解されるが、E1 の分解速度は、E2→E1 への分解に比べて非常に遅い、ということが判明した。また、グルクロニド抱合体が抱合体解離→E2→E1 という経路を経て分解される一方で、サルフェート抱合体は、微生物分解を受けないか、もしくは E2、E1 以外の物質に分解されると考えられる。

今後の課題としては、分解経路の追跡（特に、サルフェート抱合体の分解経路と、E1 以降の分解経路の追跡）及び低濃度系での実験の 2 点が考えられる。

表 1 予備実験における E2,E1 残存濃度測定結果

		添加濃度 (mg/l)	残存濃度 (mg/l)	E2 分解率 (%)
東京都 下水処理場 1	E2	30	0.35	99
	E1	—	3.14	
東京都 下水処理場 2	E2	30	0.53	98
	E1	—	3.52	
埼玉県 尿尿処理場	E2	30	0.25	99
	E1	—	4.30	

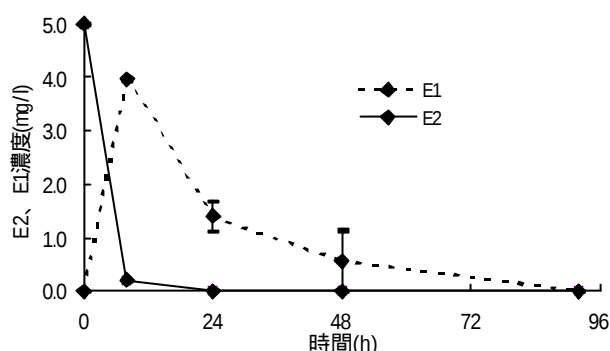


図 1 E2 分解実験における E2,E1 濃度の経時変化

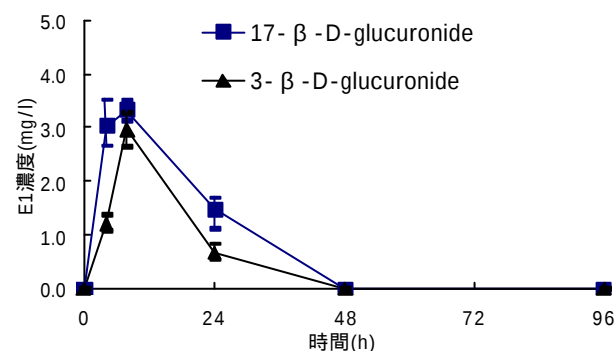


図 2 抱合体分解実験における E1 濃度の経時変化