

(3) 汚泥脱水に用いる有機高分子凝集剤の毒性試験とその評価

Toxicity Assays and their Evaluation on Organic Polymer Flocculants Used for Municipal Sludge Dewatering

滝上英孝*, 谷口暢子*, 清水芳久*, 松井三郎*

Hidetaka TAKIGAMI*, Nobuko TANIGUCHI*, Yoshihisa SHIMIZU*, Saburo MATSUI*

ABSTRACT ; The toxicity of organic polymer flocculants (e.g., polyacrylamide) used for the dewatering of municipal sludge was evaluated by using two different toxicity assays: *Closterium ehrenbergii* algal toxicity test and *Bacillus subtilis* rec-assay.

First, the algal toxicity of the effluent from a pilot-scale sewage treatment plant was investigated with and without addition of a flocculant (0, 0.05, 0.10, and 0.20 mg/L). No clear evidence on the algal toxicity caused by the flocculant was observed on both asexual and sexual reproduction tests of *Closterium ehrenbergii*. Also it was found that the algae growth inhibition of various types of flocculants (i.e., cationic, anionic, ampholytic and non-ionic) was in the order of 1 to 20 mg/L, which was mainly due to the molecular weight (MW) fraction of greater than 100,000.

Then, DNA damaging toxicity of these flocculants was investigated by the rec-assay, which indicated that eight among ten flocculants caused the direct DNA damages with $LC_{50} = 0.1$ to 10 mg/L. The DNA damaging flocculants were also fractionated into their components and by MW. The experimental results showed that the lethal effects were mainly contributed by the polymer fraction of MW greater than 100,000, although the DNA damaging toxicity was not detected in that fraction. Therefore, the detected DNA damaging toxicity of the flocculants could be manifested as the combined effects of various components, such as polymers, oligomers, monomers, and additives.

KEYWORDS ; Organic polymer flocculants, Algal toxicity, *Closterium ehrenbergii*, *Bacillus subtilis* rec-assay, DNA damaging toxicity

1. はじめに

現在、汚泥脱水には、広くポリアクリルアミド系の有機高分子凝集剤が使用されるようになっているが、下水処理場によっては、処理放流水域の飲料水源、水産資源の保全、環境生態系の保全等の意味から、汚泥脱水工程において有機高分子凝集剤を使用せずに、無機凝集剤（消石灰）を添加して、加圧脱水する方法が採用されているところがある。これは、ポリアクリルアミド系凝集剤の安全性を評価する際に、不純物として含まれるアクリルアミドモノマーの毒性、およびカチオン基を有する高分子凝集剤の水棲生物に及ぼす毒性が懸念されてきた経緯による。しかるに、こうした処理場ではより一層の脱水効率の向上を図り、スラッジ発生量を低く抑える観点から有機高分子凝集剤の導入を検討する転機にさしかかっている。WHOの勧告やUSEPAの指針に基づき、1973年に厚生省は浄水処理においては、その汚泥処理にのみ有機高分子凝集剤の使用を認め、またモノマー含有量を0.05%にする基準を設けている¹⁾。下水汚泥脱水に用いる製品においてもモノマー含有量を0.2%以下になるようメーカーが自主規制を行うなど、安全性に対する配慮がなされるようになってきている。

本研究では、有機高分子凝集剤が下水処理系および放流水域に及ぼす毒性面での影響について評価するた

*京都大学工学部附属環境質制御研究センター

(Research Center for Environmental Quality Control, Kyoto Univ.)

めに、下水処理ミニプラントを利用して、流入下水に直接、有機高分子凝集剤を添加し、流入水および処理水の有する生物毒性をミカツキモ (*Closterium ehrenbergii*) を用いて測定した。この試験は試料水の濃縮が不要で、ミカツキモは栄養環境により無性と有性の両生殖を行うので多角的な毒性の情報が得られる。また、有機高分子凝集剤のもつ毒性をより詳細に検討するために、ミカツキモを用いた毒性試験に加え、DNA損傷性試験である枯草菌Rec-assayを実施した。凝集剤製品、限外濾過膜による凝集剤の分子量分画試料、また、凝集剤の構成成分試料にこれらの毒性試験を適用し、毒性因子の解明を試みた。

2. 実験方法

2.1 ミカツキモを用いた毒性試験と枯草菌Rec-assay

(1) ミカツキモを用いた毒性試験

ミカツキモ (*Closterium ehrenbergii*) は淡水産で、水道水の取水源としても利用される貧腐水性や β -中腐水性位の水域に棲息する²⁾。ミカツキモには、互いに形態上区別のつかない雌雄異源性の二株 (A1株とA2株) があり、栄養環境により無性と有性の二種類の生殖を行う (Fig. 1)。

Table 1 無性生殖および有性生殖に用いられる培地

薬品名	C培地 [mg/L]	MIH培地 [mg/L]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	150	0
KNO_3	100	0
$\beta\text{-Na}_2\text{glycero-PO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	50	50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40	40
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0	100
Vitamine B12	0.0001	0.0001
Biotin	0.0001	0.0001
Thiamine HCl	0.01	0.01
Tris	500	0
HEPES	0	400

本培地にさらにP IV metalsを3mL/Lずつ加え、pHを7.5に調整する。

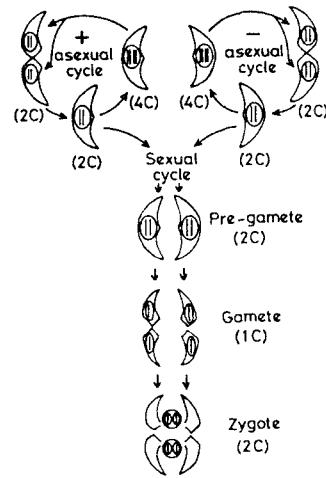


Fig. 1 ミカツキモの生活環の模式図²⁾

1) 前培養

ミカツキモの無性および有性生殖試験を実施するためには、対数増殖期にあるミカツキモの栄養細胞を使用する必要がある。前培養は、まずA1株、A2株のそれぞれについて、100 mLの三角フラスコに2×C培地 (Table 1) を16 mL入れたものを用意する。次にこれらの三角フラスコに約2,000細胞のミカツキモを注入し、前培養を開始する。無性および有性生殖試験には、22~25℃で、1,000~3,000 luxの16/8時間の明/暗条件で、10日間前培養したミカツキモを使用する。なお、これらの前培養期間中においては、A1株およびA2株ともに対数増殖期にあり、前培養期間の違いによる無性および有性生殖試験への影響は無視できると考えられる。

2) 無性生殖試験

まず、A1株、A2株それぞれ別に、前培養した細胞を、窒素源を含む2×C培地約3 mLに加える。この溶液をスライドグラスにとり、顕微鏡で細胞数を確認する。次にプラスチック製24穴培養プレート (Linbro tissue multi-plate) の各wellに、2×C培地を380 μL 、試料水を400 μL 、上で準備した細胞溶液を20 μL (10~20細胞) 入れる。本研究では各試料水濃度 (あるいは希釈率) につき3 wellを割り当てた。次に実体顕微鏡 (Nikon SMZ-10A) を用いて、各wellに存在する細胞数を数える。その後、温度22~25℃、光1,000~3,000 luxの16/8時間の明/暗条件で、5日間培養し、その間24時間ごとに細胞数を実体顕微鏡を利用して計測する。無性生殖試験においては試料を作用させた直後より以降の対数増殖期を通しての、ミカツキモへの毒性を評価した。指標としては、試料水を含まないNegative Controlが対数増殖を行っている期間のうち、2日間における増殖率を採用した。即ち、

各wellごとにある時間= t の細胞数を、その2日前（時間= t - 2）の細胞数で割り増殖率を求め、各濃度ごとに平均増殖率とその標準偏差を求めた。次に、Negative Controlの平均増殖率でそれぞれの濃度において算出した平均増殖率を割り、これを相対増殖率として計算した。また、その相対標準偏差も求めた。

3) 有性生殖試験

硝酸態窒素もアンモニア態窒素も含まないMIH培地（Table 1）約3 mLに前培養した細胞を約50 μ L入れ、10 μ Lあたり40~50細胞になるようにA1株、A2株それぞれ別に調整し、これらをスライドグラスにとって、顕微鏡で細胞数を確認する。次に培養プレートの各wellに、MIH培地を300 μ L、試料水を400 μ L、上で準備したA1株およびA2株の溶液をそれぞれ50 μ Lずつ入れる。この場合も無性生殖試験の場合と同様に、各試料水濃度（あるいは希釈率）につき3 wellを準備した。その後、温度25~28℃、光3,000~5,000 luxの16/8時間の明/暗条件で9~10日間培養し、8~9日後に各well内の正常接合子数、異常接合子数および細胞数を実体顕微鏡を利用して計測した。有性生殖試験においては、いくつかの変異原物質において、濃度を上げると接合子が形成されなくなる、また接合子が形成されても正常な形状をなしていないものが増えるといった現象が検証されているため³⁾、これらを数値化し毒性を評価することを試みた。

ミカツキモは2個の細胞から2個の接合子を形成するため、細胞が無性生殖をせず死ぬこともないと仮定すると、有性生殖の任意の時間に計数した全接合子数と細胞数を合計したものが、始めに注入した細胞数と一致するはずである。従って、

$$\text{全接合子形成率} = \text{全接合子数} / (\text{全接合子数} + \text{細胞数}) \quad (1)$$

となる。ただし実際には、細胞は有性生殖中に無性生殖を少し行うこともあり、また毒性物質の濃度が高すぎると、細胞が死ぬこともある。従って本研究では、接合子の中に正常なものと異常なものがあることについての数値化は、以下の2式によるものとした。

$$\text{正常接合子形成率} = \text{正常接合子数} / \text{全接合子数} \quad (2)$$

$$\text{異常接合子形成率} = \text{異常接合子数} / \text{全接合子数} \quad (3)$$

無性生殖試験と同様に、各wellごとに式（1）、（2）および（3）で導出される値を計算し、濃度ごとに平均値および標準偏差を計算した。なお式（1）、（2）および（3）によって導出される値は、これらの値自身が有性生殖試験における毒性評価としての意味を有することから、Negative Controlによる基準化は行わなかった。

（2）枯草菌Rec-assay

試験方法の詳細については、文献に譲る⁴⁾。本研究では、代謝活性化を行わない直接試験（-S9-mix）のみを行い、試験結果はProbit法により解析した。

2.2 ミニ下水処理プラントを利用した凝集剤添加の差異による処理水のみカツキモに対する毒性の変化の調査

ミニプラント実験で用いた処理槽の諸元および運転条件をTable 2、Fig. 2に示す。処理方式は、ポリ塩化アルミニウム添加活性汚泥循環変法であり、A、B両系列に共通の都市下水初沈流入水を導入し、A系列には、実際に下水処理場で使用されているカチオン系有機高分子凝集剤E（X社製）を添加し、B系列はコントロールとして、凝集剤を添加せずに処理を行った。A系列への有機高分子凝集剤の添加量は、4段階（0 mg/Lも含む）に設定し（Table 3）、1段階につき2週間ミニプラントを運転することによって段階的に増加させた（Run1→Run4）。この4段階の凝集剤Eの添加量は、余剰汚泥の脱水に有機高分子凝集剤を使用するとき、脱水ろ液中に残存すると考えられる濃度を基に設定した（汚泥脱水プロセスでの有機高分子凝集剤残存率約5%で、処理槽内の有機高分子凝集剤濃度は約0.05 mg/L）。実際の処理場においては、高分子凝集剤を含んだ脱水濾液は、沈砂池や最初沈殿池の入り口などに戻され、生物処理を受けるようになっている。なお、添加方法は、凝集剤E溶液（10~40 mg/L）を1日に24回、85 mL/分の流量で2分間（4.1 L/日）脱窒タンクに流入する原水に加えた。

このミニプラントから、凝集剤Eの濃度を各段階に設定してそれぞれ2週間運転後、即ち凝集剤濃度を次段階に上昇させる直前に、原水（初沈流出水）、A系処理水、B系処理水を試料水として採取した。これらの試料水

は、採取後直ちに孔径1 μm のろ紙（Run1ではGF/B、Run2~4ではGF/C）で吸引ろ過し、引き続き孔径0.2 μm のアルミろ紙（Whatman Anodisc 25）を利用して約20 mLろ過滅菌したものを希釈して、ミカヅキモによる毒性試験に供した。

Table 2 ミニプラント運転条件

原水量	0.82 m ³ /日
滞留時間	脱窒タンク7時間、硝化タンク7時間
返送汚泥量	1.23 m ³ /日（150%）
ポリ塩化アルミニウム	2.2 mL/分（原液3%希釈液）
注入量	注入率60 ppm
汚泥日令	22日
硝化タンクMLSS	3,100~3,700 mg/L
硝化タンクDO	1.5~2.5 mg/L
上記運転条件は、Run1~Run4、A,B両系列とも共通	

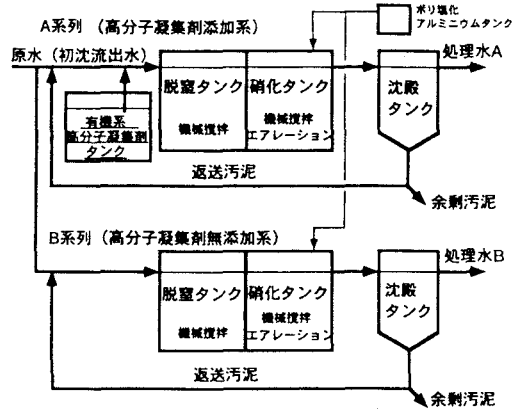


Fig. 2 ミニプラント実験装置

Table 3 A系列への有機高分子凝集剤添加量

Run	有機高分子凝集剤添加量	処理槽内濃度
Run1	0mg/L×85mL/分×2分×24回/日	0.00 mg/L
Run2	10mg/L×85mL/分×2分×24回/日	0.05 mg/L
Run3	20mg/L×85mL/分×2分×24回/日	0.10 mg/L
Run4	40mg/L×85mL/分×2分×24回/日	0.20 mg/L

2.3 凝集剤製品の毒性調査

(1) 凝集剤製品の毒性試験

ポリアクリルアミド系の有機高分子凝集剤として、国内メーカー3社より市販されているカチオン系凝集剤10種、両性イオン系凝集剤5種、ノンイオン系凝集剤1種を入手した（Table 4）。Table 4中のA1~A8、B1~B5はそれぞれ、同一メーカーの製造するカチオン系、両性イオン系の凝集剤を示す。下水汚泥脱水の分野では、負に帯電している汚泥の微生物フロックを凝集させるために、主としてカチオン系の高分子凝集剤が使用されている。カチオン系凝集剤として広く用いられているものはDAM（ジメチルアミノエチルメタクリレート）系のものと、DAA（ジメチルアミノアクリレート）系のものである。それらの凝集性能を表す物性値は、カチオン度と分子量であり、これはTable 4中のコロイド当量と固有粘度をそれぞれ指標値として評価される。両性イオン系凝集剤はアニオン性の解離基とカチオン性の解離基の両方を有し、無機凝集剤との併用で汚泥脱水に使用されるものである。ミカヅキモ毒性試験にはこれらのうち9種（A1、A2、A4、A5、A6、A7、B2、C、および、E）を、また枯草菌Rec-assayには入手した凝集剤全てを供試試料とした。有機高分子凝集剤は、滅菌蒸留水中で攪拌子を利用して2時間攪拌溶解させて、約100 mg/Lの溶液を作成し、作製当日中に希釈してそれぞれの毒性試験に供した。

(2) 凝集剤製品の分画と毒性試験

ポリマーは通常、原料モノマーを所定比率で混合した後、脱酸素（脱気）を行い、開始剤（ラジカルやRedox）を添加して熱、光によって重合させて製造する。高分子凝集剤製品の質的構成はFig. 3のように主成分のポリマーの他、分子量の小さなオリゴマーなどの副生成物、残存モノマー、添加剤、水分からなると考えられる。本研究では、凝集剤製品の分画は、以下に示す2通りで行った。

Table 4 毒性試験に使用した有機高分子凝集剤

Sample No.	外観	イオン性	固有粘度*(dl/g)	コロイド当量** (meq/g)	有効pH域
A1	白色粉末状	DAM系高カチオン	5.3	4.8	5~8
A2	白色粉末状	DAM系高カチオン	6.0	4.8	5~8
A3	白色粉末状	DAA系高カチオン	14.0	4.9	5~8
A4	白色粉末状	DAA系中高カチオン	6.5	4.2	5~8
A5	白色粉末状	DAA系中高カチオン	8.0	3.9	5~8
A6	白色粉末状	DAA系中カチオン	9.0	3.0	5~8
A7	白色粉末状	DAA系中カチオン	15.0	3.1	5~8
A8	白色粉末状	DAA系低カチオン	13.0	1.1	5~8
B1	白色粉末状	両性イオン	8.0	2.2	4.2~5.5
B2	白色粉末状	両性イオン	10.0	2.2	4.7~6.0
B3	白色粉末状	両性イオン	10.0	2.1	4.7~6.5
B4	白色粉末状	両性イオン	6.0	2.0	3.8~4.8
B5	白色粉末状	両性イオン	9.0	2.0	4.2~5.5
C	白色~淡桃色粉末状	高カチオン			3~10
D	白色粉末状	ノンイオン			4~10
E	白色粉末状	中カチオン			4~5

* 1N NaCO₃中 (30℃) で測定、** pH4における値

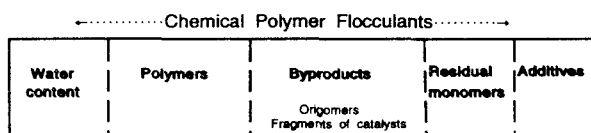


Fig.3 高分子凝集剤製品の組成

1) 分子量分画

市販の遠心式限外ろ過器を使用して、有機高分子凝集剤溶液の分子量分画を行い、ミカヅキモを用いた毒性試験および枯草菌Rec-assayに供した。選択した凝集剤はミカヅキモに対する毒性の調査を行ったもの9種（うち、枯草菌Rec-assayについては、凝集剤Cの1種類のみ）である。限外ろ過膜は、タンパク質やDNA溶液の脱塩、濃縮に用いられる市販の遠心式のもの（表示分画分子量3,000および100,000、最大容量10 mLのセントリプラスと、分画分子量10,000、30,000および50,000、最大容量500 μ Lのマイクロコンの2種、アミコン社製）を用いた。これらは、セルロース系のポリサッカライドでつくられた親水性メンブレンでタンパク質の吸着が非常に少ないとされている⁵⁾。限外ろ過膜カートリッジ一式はまず、オートクレーブで蒸気滅菌し、フィルター部は遠心によって洗浄し、水分を除いた後、所定の濃度の凝集剤溶液を一定量入れて、3,000 gでフィルター表面の水分が減少しなくなるまで遠心操作を行った。次にフィルター部を逆向きにしてフィルター上の捕捉分を遠心操作

(2,000 g、3分) によって回収した。ろ液およびフィルター上からの回収液はそれぞれ、ろ過前の原液の液量までメスアップし、その希釈液をミカヅキモの毒性試験および枯草菌Rec-assayの試料とした。

2) 構成成分による分画

分子量数十万~数百万のポリマーそのものは細胞膜を透過しないために遺伝毒にはならないと考えれば、その他の低分子物質による毒性を調査する必要がある。そこで、DNA損傷性陽性を示した（後述、3.2参照）カチオン系凝集剤Cについて高分子凝集剤メーカー側の協力の下に、添加剤（pH調整剤、食品添加剤としても用いられるスルファミン酸および少量の界面活性剤からなる）を加えないサンプルと原料モノマー（アクリルアミドおよび、DAAのメチルクロライド4級塩）を準備し、これらの水溶液を枯草菌Rec-assayに供した。

3. 実験結果および考察

3.1 ミニプラント調査の結果

ミニプラント実験試料水のA2株による無性生殖試験の結果を、Fig. 4 (1)～(4)に示す。なお、無性生殖試験における増殖率は2日後と4日後の細胞数より計算した。Fig. 4における横軸は、各試料水のマイクロプレートwell内における(1/希釈倍数)の値である。従って横軸の最大値は、無希釈の試料水をwellに添加したときの値、即ち1/2となる。これらを見ると、A2株による無性生殖試験においては、凝集剤添加量が最大(0.2 mg/L)のRun4においても、エラーバーの幅(標準偏差、測定数=3)を考慮に入れば、A系(添加系)処理水とB系(未添加系)処理水との相対増殖率曲線間には有意な差は認められていない。また、Run1、Run2およびRun4の試料水においては、希釈倍数の減少(横軸の値の増加)に伴って相対増殖率が減少していく傾向が認められた。これは原水および処理水のいずれについても観測されており、処理水もミカヅキモにとって全く無害ではないことを意味する結果である。さらに、原水の相対増殖率が、処理水のそれよりも低くなる傾向がRun1、Run2およびRun4の試料水の低希釈域において顕著である。A系処理水とB系処理水において差が認められないこと、原水の方が処理水よりも毒性が強いことを考慮すると、A2株において検出された処理水の毒性は、原水中に存在する毒性物質が、生物処理によって低減はするが、十分に分解されずに処理水中に残存することを示すものであると考えられる。なお、Run3の試験結果において、相対増殖率が1に比較して大きな値をとり、かつ、エラーバーの幅も大きくなっているのは、相対増殖率を計算するために利用したNegative Controlの増殖率が他のRunに比して低くなったことに起因するものである。

Fig. 5 (1)～(4)にミニプラント実験試料水の有性生殖試験結果を示す。有性生殖試験においては、原水や処理水中に存在する窒素分の影響を受け、ミカヅキモが無性生殖によって増殖し、well内の細胞数が非常に多くなった。また、無性生殖によって増えた細胞からも接合子形成が起こったために接合子数も多く、実体顕微鏡を利用した目視による計数が非常に困難であった。しかし、Run1、Run2およびRun4の試料水において、低希釈域における正常および異常接合子形成率の値から原水の毒性が処理水よりも強いことが確認できた。更に、有機高分子凝集剤の添加の有無によるA系処理水とB系処理水との差は、有性生殖試験においても検出することができなかった。

図表としては示さないが、処理水の一般水質項目(pH、BOD、COD、TOC、SS、窒素、リン等)についても並行して調査を行っている。A系とB系の処理水の間には顕著な差はみられず、凝集剤が活性汚泥の処理能力に及ぼした影響は少なかったものと考えられる。

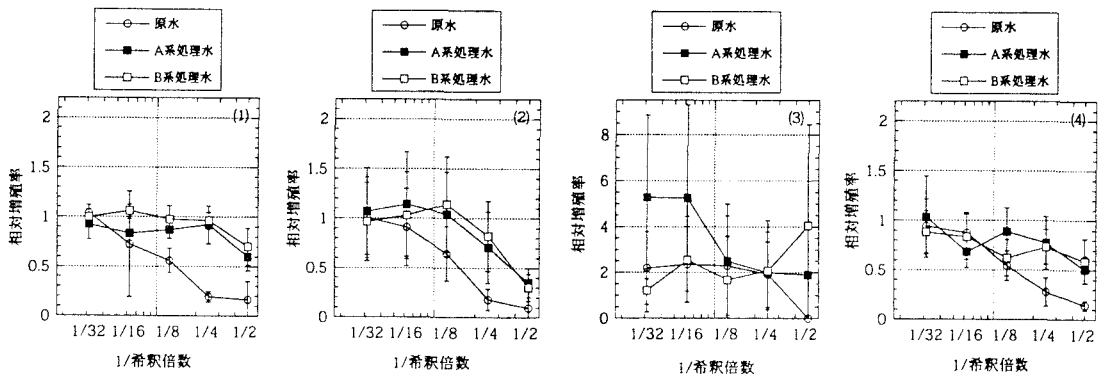


Fig. 4 ミニプラント実験試料水のA2株による無性生殖試験結果：

(1) Run1、(2) Run2、(3) Run3、(4) Run4

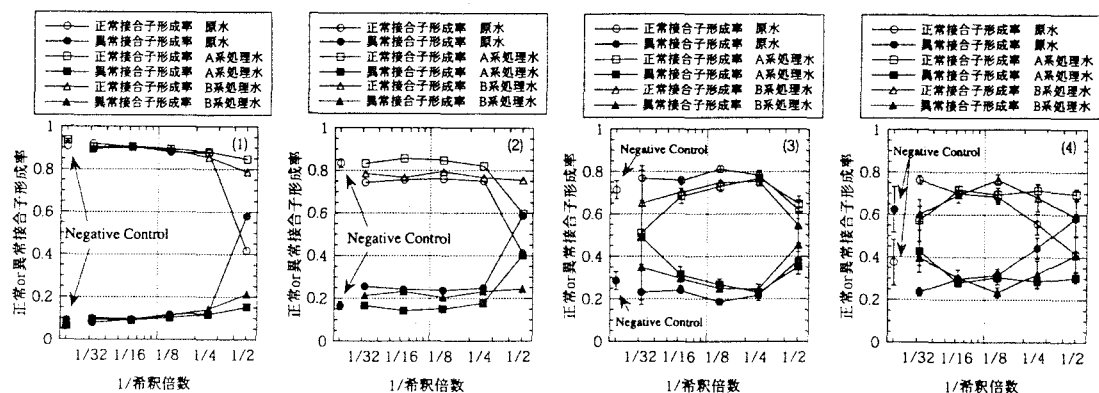


Fig. 5 ミニプラント実験試料水の有性生殖試験結果：

(1) Run1、(2) Run2、(3) Run3、(4) Run4

3.2 有機高分子凝集剤の毒性

ミカツキモの毒性試験結果について、カチオン系凝集剤 C を例にとり、その無性および有性生殖試験結果を Fig. 6(1)～(3) に示す。Fig. 6中、凡例の日付は異なるシリーズの実験の測定日を示している。無性生殖試験においては5 mg/L以上でNegative Controlと有意な差が生じた。また有性生殖試験においては、全接合子形成率は3 mg/L以上でNegative Controlと有意な差が検出でき、正常接合子形成率および異常接合子形成率は3～10 mg/L以上においてNegative Controlとの差が生じた。他の7種のカチオン系有機高分子凝集剤についても、凝集剤 C の場合と同様に、無性および有性生殖試験の約10 mg/Lの濃度において、Negative Controlとの有意な差が検出された。なお、有性生殖試験の方が、無性生殖試験よりもやや低い濃度でNegative Controlとの差が生じることが多かった。形態観察の点からは、無性生殖試験においては、10 mg/L以上で細胞質が縮む様子や細胞質が消失する様子が観察された。また、約10～20 mg/Lにおいてwellの底に茶色の粒が生じているのがみられ、これは有性生殖試験においてもみられた。両性イオン系のB2については、カチオン系のものよりはやや高濃度（無性生殖においては30 mg/L、有性生殖試験では20 mg/L）でNegative Controlとの有意な差が検出された。また、カチオン系の試料と同様の形態変化が見られた。以上の9種の有機高分子凝集剤のミカツキモによる無性および有性生殖試験の結果より、有機高分子凝集剤が汚泥脱水に使用された場合、処理水中に残存すると予想される濃度（約0.05 mg/L）においては、ミカツキモに及ぼす影響はないことが示唆された。これらの実験データより、各々の凝集剤の無性および有性生殖試験における最大無作用濃度を求めた結果をTable 5に示す。

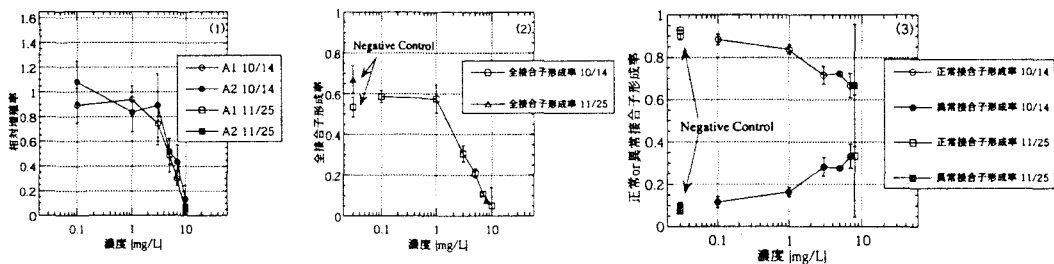


Fig. 6 凝集剤 C の (1) 無性生殖試験結果、(2) 有性生殖試験結果（全接合子形成率）および (3) 有性生殖試験結果（正常および異常接合子形成率）

Table 5 ミカツキモ試験における各凝集剤の最大無作用濃度 (mg/L)

有機高分子凝集剤	無性生殖試験	有性生殖試験	
		全接合子形成率	正常接合子形成率
カチオン系	A1	3	1
	A2	3	1
	A4	3	1
	A5	8	7
	A6	10	15
	A7	5	1
	C	3	1
	E	10	10
両性イオン系	B2	20	10

Fig. 7 に枯草菌Rec-assayの試験結果 (LC50とDNA損傷性判定) を示す。また、凝集剤Cを試料としたときの枯草菌の生存率曲線をFig. 8 に示す。なお、Fig. 8において、各濃度段階での生存率 (3 値の平均値) を示すプロットに付したエラーバーの両端は、測定された生存率の最大値と最小値を示す。同じ凝集剤濃度においてRec+ (枯草菌の野生株)、Rec- (枯草菌の変異株) の生存率の範囲が重なるのは80~100%の付近のみであり、それ以外の高濃度域においては、生存率の変動幅は最大でも10%であり、生存率が重なり合うことはない。このことから、凝集剤CについてはRec+とRec-の生存率に差がみられる、すなわち、凝集剤CはDNA損傷性を有していると考えられる。被験試料のDNA損傷性 (Fig. 7 で、++で示したものはDNA損傷性強陽性、+は陽性、-は陰性である) をS-probit (枯草菌の野生株と変異株の生存率曲線の差の面積) ⁴⁾ によって判定すると、カチオン系10種のうち8種がDNA損傷性陽性と判定された。両性イオン5種については、DNA損傷性を示したものは1種に留まったが、致死レベルはカチオン系のものとほぼ同じであった。両性イオン系1種および、ノニオン系1種については、粘性が顕著に生じ枯草菌に影響 (菌のフロック化) を及ぼすと考えられる高濃度 (100 mg/L) にまで試料を調製、曝露したが致死効果を得るには至らなかった。LC50が算出できたものについては、その濃度段階は0.1mg/L前後から10mg/Lの間にあり、典型的な発がん性物質、有機塩素化合物、アルデヒド類のLC50⁶⁾ と同様のレベルにある。つまり、DNA損傷性が検出されなかったものについても強い細胞毒性を有していると判断できた。

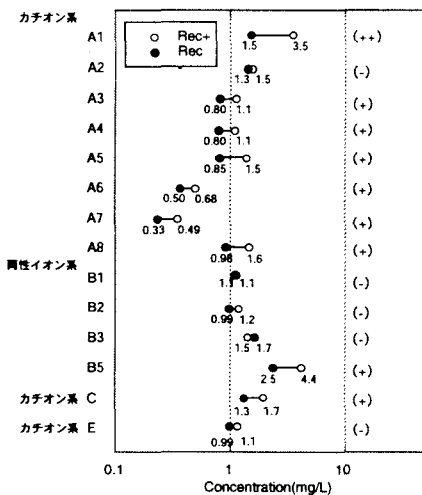


Fig. 7 高分子凝集剤の枯草菌Rec-assay試験結果 (LC50およびDNA損傷性)

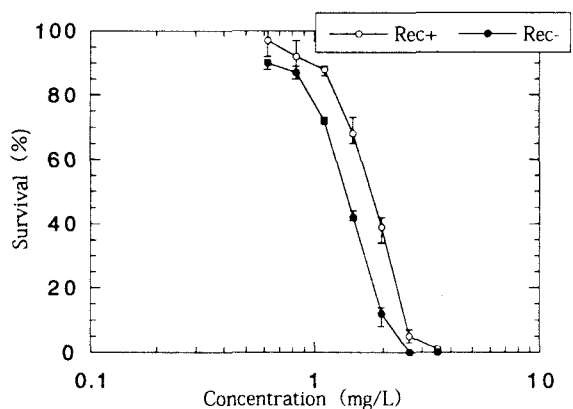


Fig. 8 カチオン系凝集剤 C の枯草菌Rec-assay試験結果

有機高分子凝集剤の水棲生物への影響については、塩化第二鉄やミョウバンといった無機凝集剤に比べて、毒性の強いことが、ミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いた急性毒性試験で確かめられている^{7),8)}。Beim⁹⁾は種々のイオン性をもつ有機高分子凝集剤の生態影響を9種の供試生物で調査しており、カチオン系のものの急性、慢性毒性がとりわけ強いことを報告している。淡水水棲生物へのカチオン系凝集剤の毒性の強さの理由として、高分子のカチオン系凝集剤が鯉などの生物体表面に吸着しやすく、呼吸や物質移動を阻害するからだと考えられている¹⁰⁾。しかし、枯草菌Rec-assayの結果を解釈する場合、Rec+とRec-の間に生じている致死感受性、すなわちDNA損傷性は、このような理由のみに起因しているとは考えにくく、生体細胞膜を通過しDNAを標的とする低分子物質に因るものと考えられる。

3.3 有機高分子凝集剤の分画と毒性試験結果

カチオン系凝集剤Cを無性生殖において毒性を発現し始める濃度(10 mg/L)に調整し、この溶液を100,000、50,000、30,000、10,000および3,000の分子量でそれぞれ分画し、無性生殖試験を行った結果をFig. 9 (1)に示す。Fig. 9 (1)より、100,000以上、50,000以上、30,000以上、10,000以上および3,000以上の相対増殖率がそれぞれの分子量以下の分画における相対増殖率よりA1株、A2株共に低くなっていることがわかる。また、100,000以上の分画において細胞質が縮み茶色の粒が生じるなど、凝集剤Cを分画しないときに観察された形態変化に似た現象が観察された。これらの結果より、ミカヅキモに凝集剤Cを与えた場合、10 mg/L以上の濃度において徐々に増殖率が減少するのは、分子量が100,000以上の成分に主な原因があると考えられた。同様に、8 mg/Lにおいて分子量分画し、有性生殖試験を行った結果をFig. 9 (2), (3)に示す。分子量の大きい分画において、全接合子形成率と正常接合子形成率が減少し、異常接合子形成率が上昇している傾向が認められた。この結果より、8 mg/Lにおいて全接合子形成率と正常接合子形成率が下がり異常接合子形成率が上がるのは、分子量が100,000以上の成分が主な原因であると考えられた。その他の凝集剤についても100,000でのみ分子量分画を行った。それらの結果もカチオン系凝集剤Cの場合と同様に、分子量が100,000以上の成分が主たる毒性成分であることが確認された。

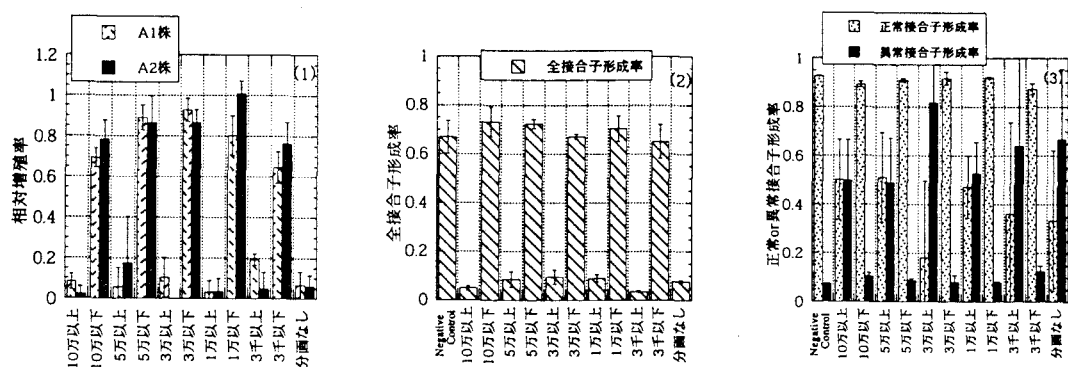


Fig. 9 凝集剤C分画試料の(1) 無性生殖試験結果(10 mg/L)、(2) 有性生殖試験結果(全接合子形成率)(8mg/L)、(3) 有性生殖試験結果(正常および異常接合子形成率)(8mg/L)

カチオン系凝集剤C(DNA損傷性判定は陽性)を用いて分子量100,000で分画を行い、各分画をRec-assayに供した結果、100,000以下の低分子分画については、高濃度でもほとんど枯草菌に致死効果を及ぼさなかった(生存率は、80~100%)のに対し、100,000以上の分画で凝集剤本体の場合(Fig. 8)と同様の濃度段階で致死効果が得られた(Fig. 10)。ただし、Rec+とRec-の生存率に差がみられなくなり、DNA損傷性は陰性に転じた。

カチオン系凝集剤Cの構成成分試料の枯草菌Rec-assay試験結果をTable 6に示す。添加剤抜きサンプルについては、DNA損傷性が認められ、毒性が製品よりも強まる結果を得た。このことから、添加剤は毒性因子にはならないと考えられる。一方、アクリルアミドモノマーは、DNA損傷性を示した。LC50値にして凝集剤製品の結果を上回っており、製品中のアクリルアミドの混入割合がおおよそ1~2 mg/gであることから、凝集剤製品中のアクリルアミドそれ自体は、枯草菌の致死効果を支配する物質ではないものと考えられる。また、もう一方の原料モノマーであるDAAについては、未反応物として製品中に残存すると考えられる以下の濃度から100 mg/Lを超える高濃度まで試料を調整、曝露したが致死効果を全く得られなかった。

Table 6 カチオン系凝集剤Cの各成分の枯草菌Rec-assay試験結果

試料	LC50Rec+ (mg/L)	LC50Rec- (mg/L)	S-probit
凝集剤C	1.67	1.31	0.216 (+)
添加剤抜きC	1.28	0.849	0.356 (+)
アクリルアミド	28.0	14.3	0.583 (+)
ジメチルアミノエチル アクリレート (DAA)	1.40~140 mg/L で致死効果なし		

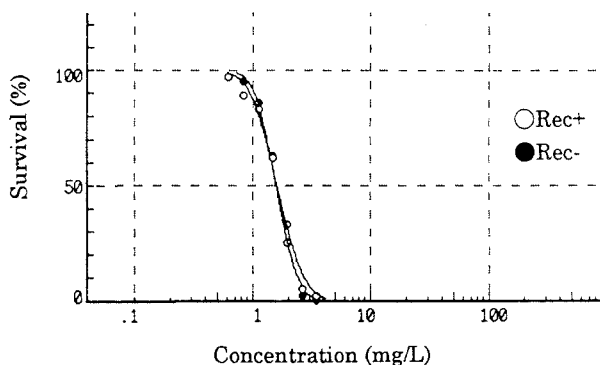


Fig. 10 カチオン系凝集剤Cの高分子画分の生存率曲線

以上の分子量、構成成分毎の分画試料の毒性試験の結果を踏まえれば、カチオン系凝集剤Cの製品総体で検出されたDNA損傷性は、高分子成分と低分子成分の複合作用による可能性が示唆された。凝集剤のポリマーの平均分子量は数百万単位であり、この高分子成分が枯草菌の体表面に作用して、致死効果を及ぼしたものと考えられる。ただし、枯草菌のDNAに作用してRec+とRec-の生存率の差をもたらした物質は、実験結果からも高分子成分に存在していたとは考えにくく、微量に製品中に存在する低分子成分、例えば単品でDNA損傷性を示したアクリルアミドのような物質の作用によるものと推測される。

4.まとめ

本研究においては、下水汚泥の脱水に使用される有機高分子凝集剤の毒性について、ミカツキモを用いた毒性試験および枯草菌Rec-assayにより評価する試みを行った。得られた知見を以下にまとめる。

(1) カチオン系有機高分子凝集剤の使用を想定したミニプラント実験を行い、その処理水をミカツキモ毒性試験に供した結果、実際のプラントで使用される凝集剤の濃度（最大で処理槽内濃度 0.20 mg/L）においては、その毒性影響が無視できることがわかった。

(2) 有機高分子凝集剤製品の毒性をそれぞれの毒性試験により調査した。ミカツキモに対しては、対象とした凝

集剤9種はいずれも、無性および有性生殖試験ともに1~20mg/Lの濃度で毒性が検出され始めた。一方、枯草菌Rec-assayによれば、カチオン系凝集剤は試験を行った10種類のうち8種がDNA損傷性陽性と判定され、LC50値は1 mg/L前後の強い毒性を示した。

(3) 限外ろ過膜を用いて有機高分子凝集剤を分子量により分画した結果、ミカツキモに対しては、調査した凝集剤は全て分画分子量100,000以上の高分子域に主たる毒性があることが分かった。また、DNA損傷性が陽性と判定されたカチオン系凝集剤1種の分画試料について枯草菌Rec-assayを行った結果、凝集剤の枯草菌にもたらす致死作用は、低分子域にはみられず、分子量100,000以上の高分子域からの寄与によるものであることが分かった。ただし、高分子画分だけではDNA損傷性は陰性に転じた。低分子域の物質としては、アクリルアミドモノマーがDNA損傷性を有しており、このカチオン系凝集剤の製品総体で検出されたDNA損傷性は、高分子成分とアクリルアミドモノマーのような低分子成分の複合作用による可能性が考えられた。

謝辞

本研究の実施にあたり、日本下水道事業団技術開発部、滋賀県、有機高分子凝集剤メーカーの御協力をいただいたことを記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 日本水道協会規格, JWWA K-126, 1980
- 2) 濱田仁, 水質の汚染と指標生物としてのミカツキモ-重金属と抗生物質の場合を例にして-, 環境技術, Vol.24, No.4, pp. 207-214, 1995
- 3) Hamada J., S. G. Kim and S. Matsui, Morphological and Lethal Effects of Mitomycin C, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Benzo(a)pyrene and 4-nitroquinoline 1-oxide on a Large Unicellular Indicator Organism, *Closterium ehrenbergii* (Green Algae), *Wat. Sci. Tech.* Vol.33, No.6, pp. 305-312, 1996
- 4) 土木学会衛生工学委員会編, 環境微生物工学研究法, 技報堂出版, pp. 367-370, 1993
- 5) セントリプラステクニカルデータ, グレースジャパン株式会社アミコン事業部, 1994
- 6) Matsui S., R. Yamamoto and H. Yamada, The *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay for the detection of DNA damaging substances which may occur in chlorinated and ozonated waters, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 21, Brighton, pp 875-887, 1989
- 7) Fort D. J., E.L. Stover and M. D. Matlock, Impacts of Organic and Inorganic Flocculants/Coagulant Aids on Whole Effluent Toxicity testing, *Proc. Ind. Waste. Conf.*, Vol.47, pp. 41-47, 1993
- 8) Fort D. J. and E.L. Stover, Impact of Toxicities and Potential Interactions of Flocculants and Coagulant Aids on Whole Effluent Toxicity testing, *Wat. Environ. Res.*, Vol. 67, No.6, pp. 921-925, 1995
- 9) Beim A. A. and A. M. Beim, Comparative ecological-toxicological data on determination of maximum permissible concentrations (MPC) for several flocculants, *Environ. Tech.*, Vol. 15, pp. 195-198, 1994
- 10) 高分子凝集剤懇話会, ポリアクリルアミド系(カチオン性)高分子凝集剤の安全性について 改訂版