

(48) 好気と嫌気条件下における 17β エストラジオールの貯水池底泥中での
分解挙動と経路に関する検討

Biodegradation and Biotransformation Pathways of 17β -estradiol by Reservoir
Sediment under Aerobic and Anaerobic Conditions

李富生*, 津森ジュン*, 山下尚之*, 田中宏明**, 鈴木稔*

Fusheng LI*, Jun TSUMORI*, Naoyuki YAMASHITA*, Hiroaki TANAKA**, Yutaka SUZUKI*

ABSTRACT; Batch experiments using sediment mud liquors spiked with 17β -estradiol (E2) were performed at 5°C and 20°C under well-controlled aerobic and anaerobic conditions. The sediment mud liquors were prepared from the sliced surface, middle and bottom layers of sediment cores collected at a pre-reservoir of the Miharu Dam, respectively. By measuring the concentration profiles of E2 and its major biotransformation compound, estrone (E1), the great dependency of E2's behavior upon the vertical position of the sediment and temperature was clearly demonstrated; and the differences in the time course of E1 under both the aerobic and anaerobic conditions were clearly revealed. Besides, by assuming a first-order rate reaction, the disappearance rate (k) of E2 under the aerobic condition was estimated to vary in the range of 0.002-0.12 hr⁻¹/(g-dry/l), while that under the anaerobic condition in the range of 0.002-0.062 hr⁻¹/(g-dry/l). Larger k values were found to be associated with the surface sediment layers operated under the aerobic condition and with the higher temperature of 20°C. The addition of ammonia and nitrate to runs carried out under the aerobic and the anaerobic conditions, respectively, seemed to be responsible for promoted dissipation of E2 from solutions. Furthermore, through combined analysis of the behavior of E2 and E1 in both the liquid and the solid phases of the mud liquors, possible biotransformation pathways of E2 under both aerobic and anaerobic conditions were proposed.

KEYWORDS; sediment, estrogen, biodegradation, biotransformation, bioaccumulation, sorption

1. はじめに

都市下水処理場や浄化槽などの排水処理施設から水環境中に排出されるエストロゲン様物質は、ヒトや家畜の排泄物に由来するもの、食物や医薬品に由来するものなど、多様な原因が考えられている。なかでも、エストロゲン活性が最も高く、水環境への放出量も多いと考えられているのは一つに、 17β -エストラジオール (E2) がある。一方、し尿から排泄される E2 の殆どは硫酸やグルクロン酸などの抱合体として存在しているが、一部は遊離体となっている。E2 抱合体の活性は遊離体に比べて弱く、かつ、環境中に排出されると次第に脱抱合され、遊離体へと変換して行く。これまでの魚類や酵母を用いたバイオアッセイの研究結果によると、下水処理施設の放流水、及び河川や湖沼などに存在するエストロゲン活性は、人畜由来のホルモン物質のなかでは、主に E2 とエストロン (E1) に起因するものである¹⁻⁶⁾。

河川や湖沼などの水環境に排出されるエストロゲン様物質は、他の多くの微量有機汚染化合物と同様に、水中や水底堆積物中に含まれる多種多様な生物やフミン質などの高分子有機物との生物的・物理的・化学的な相互作用によって、その挙動が決まると考えられる。特に、ダムや貯水池のような閉鎖性水域については、長年にわたって堆積した底泥に硝化・脱窒・硫酸塩還元などの様々な役割を担う菌種が混在し^{7,8)}、その上層の水質と相互に関係しているため、このような水域におけるエストロゲン様物質の挙動を総合的に評価するには、対象物質の底泥中での挙動、つまり、底泥への蓄積速度、底泥に存在する微生物群集による分解速度や質的変換といった動態に着目した研究が不可欠である。

* (独) 土木研究所水質チーム (Water Quality Research Team, Public Works Research Institute)

** 京都大学大学院 環境質制御研究センター (Research Center for Environmental Quality Control, Kyoto Univ.)

E2 やその抱合体の生分解性に関しては、下水処理施設への流入と流出濃度に対する調査・研究が数多くなされ、処理施設内における対象物質の挙動の解明と処理施設の維持管理や運転条件の改善に資する情報が蓄積されつつある^{5,9-11)}。また、処理施設から採取した活性汚泥を用いた生分解試験より、エストロゲン様物質の分解機構や分解経路についても解明されつつある¹²⁻¹⁵⁾。しかしながら、これまでの活性汚泥を用いた試験の殆どは好気性微生物に着目したものであり、嫌気条件下において、E2 がどのような挙動を示すか、その分解経路はどのようなものであるかについては情報が殆どない。一方、河川・湖沼などの水環境の汚染は、東京湾・霞ヶ浦・琵琶湖・手賀沼などの閉鎖性水域も含めて、水質と底泥の両面からエストロゲン様物質に関する調査・研究がなされている¹⁶⁻¹⁸⁾。しかしながら、これらの調査・研究の殆どは関連物質の存在濃度の実態を把握することを主要目的として行われたものであり、生分解性の視点に立った検討が少なく、水相の浮遊性微生物を対象にしたものに限られている¹⁹⁾。嫌気化がよくみられる閉鎖性水域の底泥に生息する微生物群による関連物質の分解速度と分解経路についての知見は殆どない。

そこで本研究では、三春ダム牛轡前貯水池の底泥を用いて E2 に対する回分式生分解実験を行い、E2 の分解とそれに伴って形成した E1 の挙動を液相と固相の二つの相で追跡することにより、好気と嫌気条件下における貯水池底泥中での E2 及び E1 の分解挙動とそれに及ぼす温度や共存する硝化反応などの影響を検討した。また、採取した底泥の深さによって存在する微生物群集が異なることが考えられるため、採取底泥の位置による影響も検討した。これらの結果から、好気と嫌気条件下における底泥生息微生物による E2 の分解経路の提案を試みた。

2. 実験条件と方法

2.1 底泥の採取と調整

国土交通省東北地方整備局三春ダム管理所所管の三春ダム牛轡前貯水池をフィールドとし、本ダムに近い水深が約 6m の地点を対象に、2003 年 12 月 20 日、2004 年 1 月 17 日および 3 月 22 日に直径 4cm のアクリル樹脂製重力式コアサンプラーによる採泥をそれぞれ行った。採取した底泥試料を窒素充填した袋に入れて実験室に運び、窒素雰囲気下で底泥の上下混合が生じないように直上水を吸引排除したのち、速やかに切り分けた (2cm づつ)。その切り分け分のうち、表層 (SL, 0~2cm)、中層 (ML, 14~16cm) および下層 (BL, 28~30cm) の底泥について、遠心分離による間隙水の分離 (3000rpm で 5 分) と Milli-Q 水によるすすぎ (2 回) を行った。このようにして遠心分離管の底に沈殿した底泥 (以下、遠沈泥と称す) を回分式実験用の底泥試料とした (以降、それぞれ SL, ML 及び BL と記す)。遠沈泥の含水率は遠心分離前の原試料の含水率と遠心分離した間隙水の量から求めた。実験に用いた遠沈泥の一般性状項目や底泥間隙水の水質項目、及び湿潤重量濃度基準と乾燥重量濃度基準による遠沈泥の添加率を表-1 に示す。

2.2 エストラジオールの標準原液の調整

17 β -エストラジオール(E2)を唯一の系外からの有機炭素源とするため、市販の E2 標準物質 (和光純薬) 約 20mg を秤とって Milli-Q 水 (1L) に移し、室温 10℃の恒温室にて 24 時間攪拌したのち、孔径 0.2 μ m のメンブランフィルターにてろ過し、そのろ液を標準原液として用いた。その濃度は約 1.0mg/L と定量した。

2.3 E2 生分解に関する回分式実験

回分式実験はそれぞれ平成 15 年 12 月 20 日、平成 16 年 1 月 17 日および 3 月 22 日の遠沈泥を用いて計 3 回行った。一回目と二回目の実験は好気と嫌気下における E2 の分解挙動を評価するために、それぞれ平成 15 年 12 月 20 日と平成 16 年 1 月 17 日の遠沈泥 (SL, ML, BL の 3 層) を用いて、好気と嫌気、20℃と 5℃の条件下で行った。三回目の実験は前二回の実験結果を参考に、E2 の分解機構と分解経路の解明を図るために実施したものであり、平成 16 年 3 月 22 日の上層泥 (SL) を用いて好気/20℃と嫌気/20℃の条件下で行った。一回目と二回目の回分式実験の条件を表-2 に示す。

一回目の実験期間中には、底泥による E2 の物理的吸着性をも評価するため、オートクレープにて滅菌し

た中層の遠沈泥による対照実験も好気と嫌気、20℃と5℃の条件下で実施した（平衡時における E2 の平均減少率は約 15%と確認した）。二回目の実験では、E2 の分解に伴って生成した E1 の挙動を追跡するため、2004/1/17 の上層の遠沈泥による 4 実験系（好気と嫌気/20℃）に対して、後半から（運転開始約 290 時間後）E2 を再添加すると共に、NO₃-N（嫌気の場合）または NH₄-N（好気の場合）の添加も行った。実験の実施期間は一回目（約 100 時間）と二回目（約 370 時間）に比べて、三回目の方をより長く設定した（約 850 時間）。

表-1 回分式実験における底質試料の含水率、性状、間隙水の水質項目など

Sample	Sediment layer characteristics						Quality indices in the pore water					
	Water content	VSS	C	N	P	Sediment dose (g/l)		PO ₄ -P	NH ₄ -N	NO ₃ -N	NO ₂ -N	DOC
	(%, w/w)	(%, w/w on the dry basis)				wet	dry			mg/l		
SL	63.4	12.6	3.07	0.32	0.22	10.0	3.7	0.41	3.78	0.25	0.02	21.2
ML	57.9	11.2	2.31	0.20	0.17	10.0	4.2	0.21	16.84	0.03	0.05	45.6
BL	49.5	10.2	1.80	0.13	0.13	10.0	5.0	0.27	14.59	0.05	0.02	37.8
Sediment core sampled on 2003/12/20												
SL	59.9	13.1	3.04	0.24	0.19	6.7	2.7	0.73	3.23	0.15	0.16	92.5
ML	55.7	11.6	2.56	0.19	0.16	6.7	3.0	0.32	17.65	0.01	0.08	52.7
BL	41.4	8.6	1.72	0.13	0.11	6.7	3.9	0.17	13.31	0.01	0.05	45.1
Sediment core sampled on 2004/1/17												
SL	64.2	14.5	2.50	0.29	0.18	6.7	2.4	0.67	5.88	0.46	0.26	6.6
Sediment core sampled on 2004/3/22												

SL, ML and BL represent the surface (0~2 cm), middle (14~16 cm) and bottom (28~30 cm) layers sliced from sediment cores.

*The values are related to the sediment layers after centrifugation prior to batch test use. The initial values for these layers are 81.5, 62.1 and 58.3 % (for 2003/12/20), 81.3, 62.6 and 50.8% (for 2004/1/17), and 82.2% (for 2004/3/22), respectively.

表-2 回分式実験の条件

Run no.	Sediment sample	E2 dose μg/l	TMPT °C	Oxygen condition	NH ₄ -N dose mg/l (under aerobic)	NO ₃ -N dose mg/l (under anaerobic)
1	SL	30	20	2 cases		Sediment core sampled on 2003/12/20
2	ML			(aerobic and anaerobic)		
3	BL					
4	SL	30	5	2 cases		
5	ML			(aerobic and anaerobic)		
6	BL					
7	SL	30	20	2 cases		Sediment core sampled on 2004/1/17
8	ML			(aerobic and anaerobic)		
9	BL					
10	SL	30	5	2 cases		
11	SL			(aerobic and anaerobic)		
12	ML					
13	BL	15.9 ~	20	2 cases (aerobic and anaerobic)	0.8	E2 re-spiked after 287.5 hrs for runs 7 and 10
7'	SL					
10'	SL					

回分式実験を始めるに当たっては、所定量の遠沈泥を pH 調整済みの Milli-Q 水（嫌気の場合では脱酸素済み Milli-Q 水）を入れた反応器(500mL 又は 3000mL の三角フラスコ)に加えたのち、E2 の標準原液を素早く添加した。一部の実験については、設定条件により E2 の添加と同時に NH₄-N 又は NO₃-N の標準液の添加も行った。反応器内における底泥試料の均一化を図るため、反応器を 10 秒程度激しく振り混ぜたのちに振盪培養器にセットし、光を遮断した条件下で 120rpm の回転速度で培養を開始した。反応器から経時的に採取した混合液（一回目と二回目の実験では約 10mL）を直ちに遠心分離（3000rpm×3min）し、その上澄み液を 0.45μm のメンブランフィルター（PTFE 材質）でろ過したのち、水質分析に供した。分析項目は E2, E1, エ

ストリオール (E3) のほかに、底泥微生物による硝化・脱窒、および、リンの溶出挙動をも評価するため、窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$), リン ($\text{PO}_4\text{-P}$), および、溶存態有機炭素 (DOC) とした。

ただし、三回目の実験では、E2 と E1 の液相での挙動のみではなく、底泥への付着と生物体内への蓄積の経時変化も評価するため、採取した混合液に対して、滅菌や抽出などの処理を以下のように行った。一定の時間で反応器から混合液 50mL を採取し、遠心分離 (3000rpm×3 min) 後に上澄み液を 0.9 μm のガラス繊維フィルターにて全量ろ過し、そのろ紙を小さく切って遠沈泥とあわせた。ついで、遠沈管に遠沈泥とろ紙を完全に浸せるように、一定量 (10mL) のメタノールを速やかに加えて生物の活性を停止させた。その後、遠沈管を振盪培養器にセットし、120rpm で 5 分間回転させたのちに、遠心分離 (3000rpm×3min) を行った。メタノールの上澄み液から 2mL を採集し、E2, E1, E3 の定量分析に供した。このように定量したものは分解過程における底泥試料への付着分とみなして評価した。その残り (遠沈泥+ろ紙+8mL のメタノール) については、超音波粉碎・固相抽出・精製・濃縮乾固・溶出などの諸手順²⁰⁾を経て対象物質に対する同定と定量を行った。底泥試料への収着は底泥粒子表面への付着分と生物体内への蓄積分 (生物濃縮分) を合わせたものとみなされるので、その付着分を差引いた後の値を生物体内への蓄積分として評価した。

いずれの実験系についても、E1, E2 および E3 の同定・定量はサロゲート (E1-d2, E2-d3, E3-d2) を用いた内部標準 LC-MS/MS 分析法^{20,18)}によって行った。測定イオンはいずれも daughter ion とし、分析試料の最初・中間・最後にそれぞれセットした標準液に対する検量線の測定結果より、相対感度係数 (RRF) の変動は 3 物質とも 2%以下と小さく、再現性と感度が比較的高い条件下で分析が実行されたことを分析するたびに確認した。また、実際の滅菌した実験用混合液に E2 を加えた予備実験より、E2 の回収率は 97% (標準偏差約 1.5%) と確認した。実験期間中における好気と嫌気の保持状況を確認するため、反応器内における溶存酸素 (DO) の濃度を断続的に測定した。好気実験の場合には、DO の値が 8.5 mg/L 付近で変動し、振盪撹拌により酸素が十分に供給されていたこと、また、嫌気実験の場合には、湿潤窒素ガスを連続的に導入する実験方式の採用により、DO が常に 0.1 mg/L 以下に制御されていたことが確認された。

3. 結果と考察

3.1 好気条件下における E2 の挙動

(1) E2, E1 濃度の経時変化

好気条件下における液相中 E2 の挙動を Run 7 の場合を例に図-1 に示す。E2 濃度は時間の増加に伴って低下し、その度合は初期において急激であった。実験開始 24 時間後における E2 の濃度値は 0.25 $\mu\text{g/L}$ の低レベルに達し、添加した E2 (30 $\mu\text{g/L}$) の約 99% が液相から消失した。しかしながら、消失した E2 は無機化された形で系外へ排出されたのではなく、その大半は脱水素反応によりエストロン(E1)に変換されたのちに系内から取り除かれたことが、E2 と E1 の経時変化の動きから分かる。E2 濃度が低下するにつれて E1 が上昇し、その後、徐々に低下していくことは、E1 の方が E2 に比べて比較的除去されにくいことを示している。E1 が液相中から完全に消失したのは 48 時間を経過した時点であった。また、いずれの実験条件の場合も、図-1 に示すように、エストリオール (E3) は液相から検出されず、好気条件下における E2 の分解過程において、その分解中間物として E1 は生成されるが、E3 は生成されることが明らかになった。

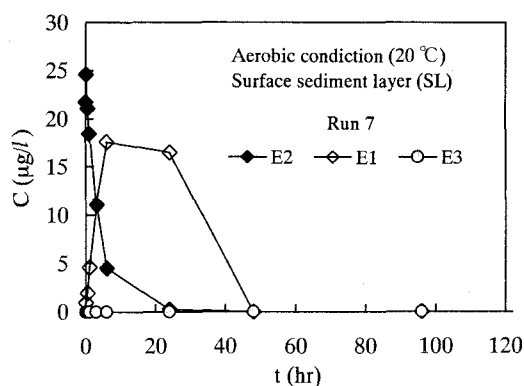


図-1 好気下におけるE2, E1及びE3の挙動

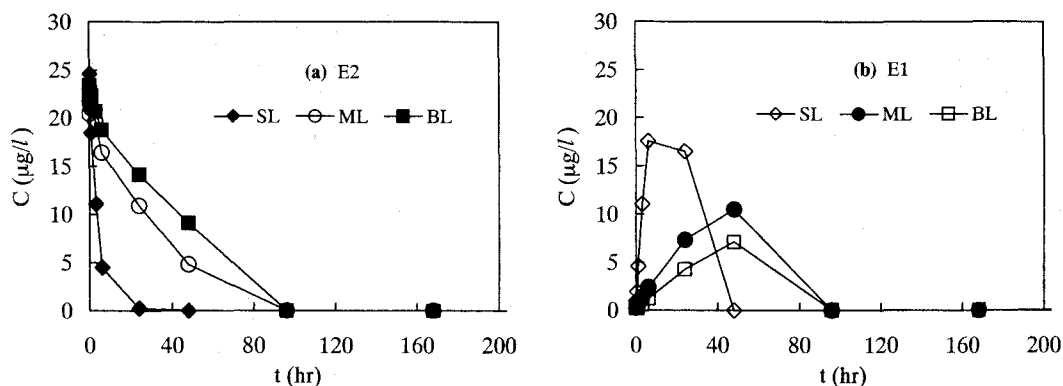


図-2 好気/20°CにおけるE2とE1の経時変化 (Run 7, Run 8, Run 9)

上層、中層、および下層の底泥層による E2 の生分解挙動の違いについて比較したものを Run 7, Run 8, および Run 9 の場合を例にして図-2 に示す。E2 の濃度は時間の増加に伴って減少し、その減少の度合は中層と下層に比べて上層の方が著しく大きい。E1 については、上層の底泥の場合には急激な増加と減少の傾向を示し、中層・下層の場合にはその傾向がより緩やかであった。また、上層から中層と下層へと、底泥の位置が深くなるにつれて形成した E1 の最大濃度値が低下している。

E2 の挙動に及ぼす温度の影響を Run 8 と Run 12 (中層の底泥) の結果を例にして図-3 に示す。20°C の場合に比べて5°C の場合の方が E2 の消失が遅く、96 時間経過した時点における E2 の残留濃度は 20°C の場合では検出されないのに対し、5°C の場合では 7.1 $\mu\text{g/L}$ と、添加した E2 の約 24% が依然液相に残存している。生成した E1 についても、その挙動は E2 の動きに随伴するように温度によって大きく異なっている。

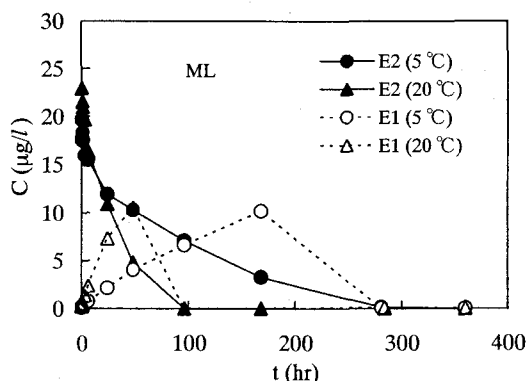


図-3 好気下におけるE2とE1の経時変化に及ぼす温度の影響 (Run 8, Run 12)

E2 を再添加した場合の挙動については、図-4 のように、再添加した E2 (16 $\mu\text{g/L}$) は時間の増加に伴って速やかに減少した。再添加した E2 が系内から完全に消失したのは $\text{NH}_4\text{-N}$ を添加していない実験系 (Run 7)

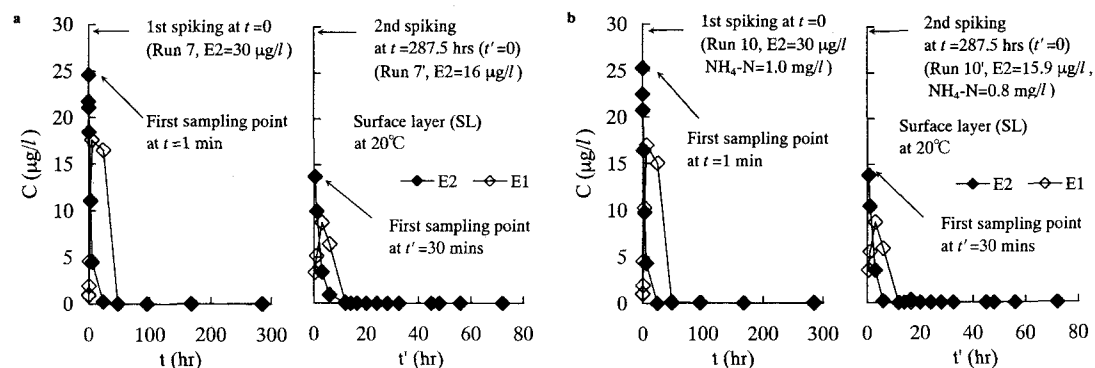


図-4 好気/20°CにおけるE2の再添加に伴うE2とE1の経時変化

では再添加後 12 時間以降であったのに対し、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (0.8 mg/L) を同時に添加した実験系 (Run 10') では再添加後 6 時間を経過した時点であった。Run 7 と Run 10 における $\text{NH}_4\text{-N}$ の濃度は実験開始 5 分後の時点ではそれぞれ 0.32 と 0.94 mg/L であったのに対して、168 時間後では 0.06 mg/L にまで減少していたことから、E2 分解微生物にとって $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が増殖の律速因子になっていたこと、あるいは、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の添加により底泥中に生息する硝化菌による硝化反応が促進され、その反応によって E2 の消失速度が増大されたことの 2 つの可能性が考えられる。その機構については今後の実験を通して追及していきたい。

(2) E1, E2 挙動の速度論的解析

好気条件下における E2 濃度の経時変化を生分解の一次反応と仮定し、図-5 のように各々の実験条件で得たデータに対する数値解析を行い、得た近似直線の勾配係数の値と底泥試料の添加濃度から、底泥の乾燥重量基準における E2 の消失速度係数 (k) を推定した。その結果を表-3 に示す。

2004 年 1 月 17 日の上・中・下の 3 層の底泥試料を用いた場合、 k の値は 20℃ の場合 (Run 7, Run 8 及び Run 9) ではそれぞれ 0.12, 0.01, 0.005 $\text{hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ であったのに対し、5℃ の場合 (Run 11, Run 12 及び Run 13) では 0.047, 0.004, 0.002 $\text{hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ となっている。この結果

から、好気条件下における E2 の貯水池底泥による消失速度は中層・下層の底泥に比べて上層の底泥の方が、また、5℃ の場合に比べて 20℃ の場合の方が著しく速いことが明らかになった。このことは、2003 年 12 月 20 日の底泥試料を用いた Run 1~Run 6 の実験結果と解析結果からも認められている。上層と下層の両底泥層の鉛直方向での位置差は 30 cm であり、かつ、添加した E2 濃度に比べて底泥中における N や P の含有量 (表-1) は両底泥層ともに大きいので、E2 の消失速度の底泥位置への依存性は主に底泥生物の生息密度や種類に起因するものと推察される。二回の採泥日 (2003 年 12 月 20 日と 2004 年 1 月 17 日) に約 2 ヶ月の間隔を設け

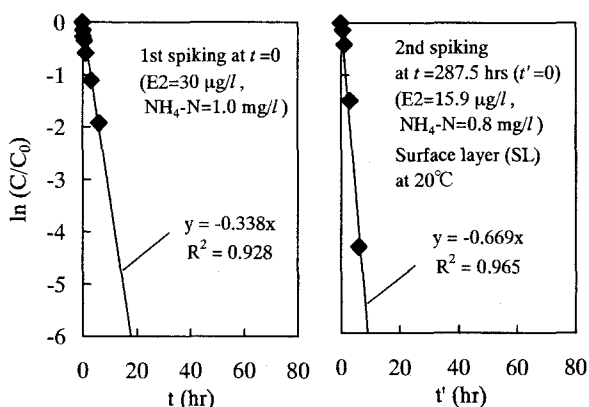


図-5 生分解一次反応式による解析 (Run 10, Run 10')

表-3 好気と嫌気下におけるE2の消失速度係数

Run no.	Sediment sample	TMPT °C	Aerobic condition			Anaerobic condition		
			$\text{NH}_4\text{-N}$ dose mg/l	k (1/hr)/(g-dry/l)	R^2	$\text{NO}_3\text{-N}$ dose mg/l	k (1/hr)/(g-dry/l)	R^2
1	SL	20	1	0.113	0.98		0.062	0.97
2	ML			0.009	0.69		0.025	0.94
3	BL			0.010	0.95		0.006	0.98
4	SL	5		0.041	0.97		0.028	0.99
5	ML			0.003	0.97		0.004	0.95
6	BL			0.002	0.99		0.003	0.89
7	SL	20		0.120	0.92		0.057	0.99
8	ML			0.010	0.96		0.011	0.98
9	BL			0.005	0.99		0.005	0.91
10	SL		1	0.127	0.91		0.056	0.99
11	SL	5		0.047	0.98		0.019	0.91
12	ML			0.004	0.80		0.003	0.96
13	BL			0.002	0.92		0.002	0.94
7'	SL	20	0.8	0.181	1.00	0.8	0.111	0.98
10'	SL			0.250	0.96		0.181	0.99

たが、いずれも低温期に入ったため、E2の消失速度には大差が認められず、生物の密度や活性からみた底泥の相違はまた生じていないことが窺われる。硝化・脱窒、および、リンの溶出挙動の評価のため、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、およびDOCの計測も並行に行っていたが、同様に大差は認められなかった。

また、上層の底泥を用いた場合、E2を最初に添加した実験系（Run 7; $k=0.12 \text{ hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ ）に比べて、実験開始287.5時間後にE2を再度添加した実験系（Run 7'; $k=0.181 \text{ hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ ）の方が k の値が約51%と高くなっている。これはE2が再添加されるまでの間に、E2分解能力を有する微生物量の増加あるいは馴致が生じたこと、あるいは、E2と競合的な分解関係を有する底泥由来の有機物が分解されたことが原因であると考えられる。また、E2の再添加時に $\text{NH}_4\text{-N}$ （0.8 mg/L）をも添加したRun 10'（ $k=0.250 \text{ hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ ）では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ を添加していないRun 7'の場合（ $k=0.181 \text{ hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{L}$ ）に比べて、 k の値が約38%と更に増大している。これは、前述したように、E2分解微生物にとって増殖の濃度律速因子になっていた $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が増加されたこと、あるいは、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の添加により底泥中硝化細菌の硝化反応が促進されたことに関連した挙動と考えられる。

閉鎖性水域の底泥中には硝化細菌、脱窒細菌、硫酸塩還元菌、メタン生成菌などの様々な生物が生息している。今回の実験において、時間の増加に伴って $\text{NH}_4\text{-N}$ が減少し、代わりに $\text{NO}_3\text{-N}$ が明確に増加していく傾向が確認されたことや、初期における $\text{NO}_3\text{-N}$ の経時変化から推定した硝化速度係数の値は下層にいくほど小さくなること（例えば、上層、中層、下層に対応したRun 7, Run 8, Run 9の場合ではそれぞれ2.1, 0.32及び0.13 $\mu\text{g-NO}_3\text{-N}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ）は検討対象とした貯水池の底泥中にE2分解微生物と同様な分布で硝化細菌が存在していることを示している。

3.2 嫌気条件下におけるE2の挙動

(1) E2, E1 濃度の経時変化

嫌気条件下におけるE2の挙動を中層/20℃の場合（Run 8）を例にして図-6に示す。時間の増加に伴ってE2の濃度が低下し、その度合は初期において急激であった。また、DOが常に0.1mg/L以下に制御されたにもかかわらず、E2の消失過程において脱水素反応が生起し、それによりE1が形成された。ただし、形成されたE1は上述の好気条件の場合とは異なり、一旦減少したのちに再び増加し、以降再び減少していくという、これまでに報告されていない傾向が示された。こうした傾向は再現試験と実験期間を長くさせた二回目の全ての嫌気実験（Run 7～Run 14）でも確認された。

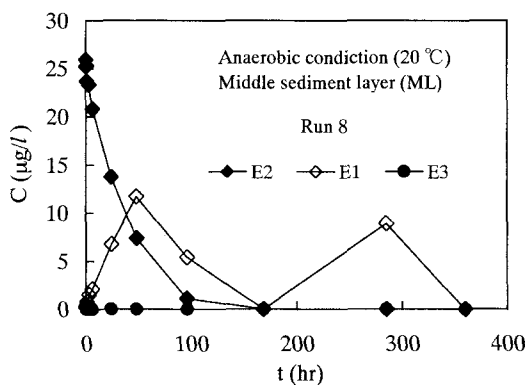


図-6 嫌気下におけるE2, E1及びE3の挙動

嫌気条件下でE2の脱水素反応が生じた理由については、現時点では判明されていないが、複雑な生物的・化学的な底泥反応系内における通気性微生物の役割や、酸化態として底泥粒子に存在する Fe^{3+} や Mn^{4+} などの無機物質の関与が排除できない。今後は、長期間のコア溶出試験を通じて得られる、底泥中の酸化物を完全に還元・溶出させた底泥試料を用いた回分式・連続カラム式実験の実施も含めて、その原因と機構の解明を図っていきたい。また、いずれの実験条件でも、エストリオール（E3）は液相から検出されておらず、嫌気条件下におけるE2とE1の消長過程においても、E3は生成されることが確認された。

嫌気条件下における上層、中層及び下層の底泥による液相中E2の挙動の違いを、水温20℃の場合（Run 7, Run 8, Run 9）を例として図-7に示す。好気条件の場合と同様に、嫌気条件下におけるE2の消失は上層底泥が最も速く、上層・中層・下層の順となっている。E2の消失に伴うE1の生成は上・中・下層のいずれの底泥においても確認された。ただし、前述のように、好気の場合と違って、生成されたE1はある時点で（上層では実験開始96時間後、中層と下層ではともに168時間後）液相中から全て消失したが、285時間後の採

水時点で再び大きな値として出現し、実験終了直前の採水時点で再び消失した。2度目の E1 のピークが現れた時点では、E2 の残留は上・中・下層のいずれの底泥でも確認されなかった。

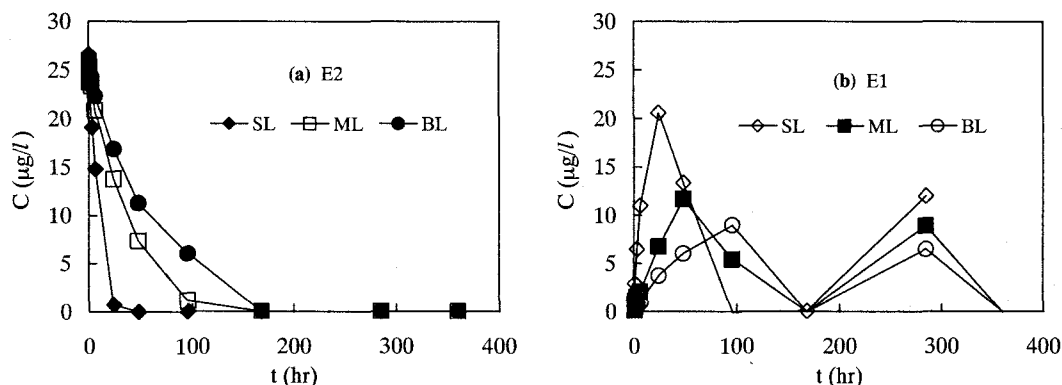


図-7 嫌気/20℃におけるE2とE1の経時変化 (Run 7, Run 8, Run 9)

(2) E1, E2 挙動の速度論的解析

生分解の一次反応式に基づいて推定した E2 の消失速度係数 (k) の値を表-3 (前掲) に示す。2004 年 1 月 17 日に採取した底泥による二回目の結果を例にしてみると、上・中・下の 3 つの底泥層における k の値は 20℃ の場合 (Run 7, Run 8 及び Run 9) では $0.057, 0.011, 0.005 \text{ hr}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ であったのに対し、5℃ の場合 (Run 11, Run 12 及び Run 13) では $0.019, 0.003, 0.002 \text{ hr}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ であった。嫌気条件下における E2 の消失速度は中層・下層に比べて上層の底質の方が、また 5℃ の場合に比べて 20℃ の場合の方が著しく速いことがわかった。好気の場合と比べると、嫌気の場合における k の値は上層では半分程度小さく、中層と下層では好気の場合とほぼ同レベルであった。このことは、底泥に生息の好気性微生物と嫌気性微生物の種類と密度が底泥の深さ方向の位置によって異なっていることに起因したものと考えられる。また、E2 を最初に添加した実験系 (Run 7; $k=0.057 \text{ hr}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$) に比べて、実験開始 287.5 時間後に E2 を再度添加した実験系 (Run 7'; $k=0.112 \text{ hr}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$) の方が k の値が大きいが、これは好気の場合と同様に、E2 分解微生物量の増加あるいは馴致、あるいは、E2 と競合的な分解関係を有する底泥由来有機物の分解が可能性として考えられる。また、E2 の再添加と同時に $\text{NO}_3\text{-N}$ (0.8 mg/L) を加えた実験系 (Run 10') では、 k がより大きな値 ($0.181 \text{ hr}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$) を示した。これは、脱窒反応が促進されたことが一因であると推測される。

3.3 好気と嫌気条件下における E2 の分解経路の考察

好気と嫌気下における E2 の挙動の違いと経路を解明するため、2004 年 3 月 22 日に採取した底泥のうちの上層底泥を用いた三回目の回分式分解実験を行い、長い実験期間 (約 850 時間) における E2 の液相での挙動のほか、底泥粒子への付着量と生物体内への蓄積量の経時変化についても、液/液抽出と固層抽出の前処理法によって評価した。好気条件下における E2 と E1 の液相での濃度変化、底泥粒子への付着分濃度および生物体内への蓄積分濃度の経時変化を図-8 (a, b, c) に示す。同様に、嫌気条件下における E2 と E1 の濃度変化を図-9 (a, b, c) に示す。底泥粒子への付着分と生物体内への蓄積分の濃度は、各々の採水時間で採取した混合液中の固相に対する抽出結果 (単位は $\text{ng-E2 or E1/g-dry sediment}$) と、混合液中における底泥試料の濃度 (添加率) から換算した値である。

まず、好気条件の場合をみると、液相において E2 から生成した E1 は図-8a のように次第に減少し、実験開始 69 時間後で完全に消失した。その後、実験を 837 時間にまで継続させても、E1 の出現は一回目と二回目の実験の場合と同様に認められなかった。生成した E1 は実験開始 20 時間後の時点で最大値 (E2 添加濃度の 75% に相当する $28 \mu\text{g/L}$) を示した。その値は底泥への付着分 (図-8b) と生物への蓄積分 (図-8c) を大き

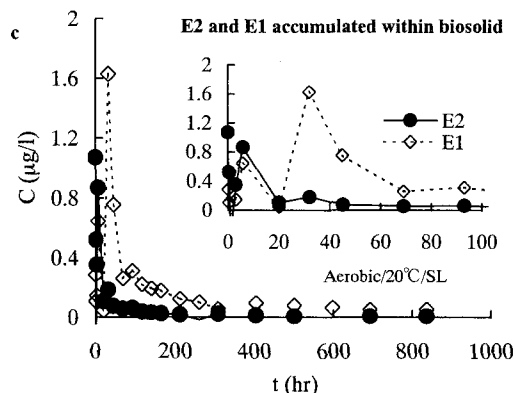
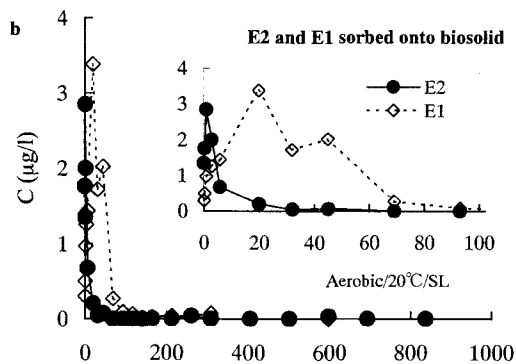
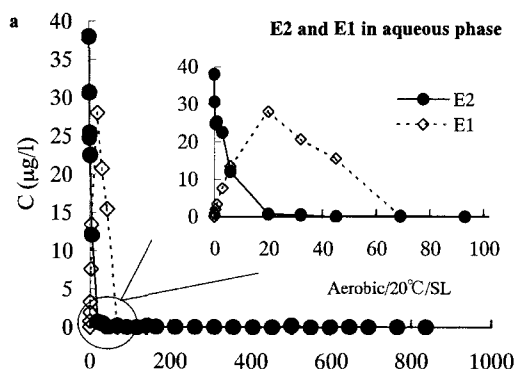


図-8 好気条件下におけるE2とE1の液相残留濃度
底泥への付着分の濃度及び生物体内への
蓄積分の濃度の経時変化

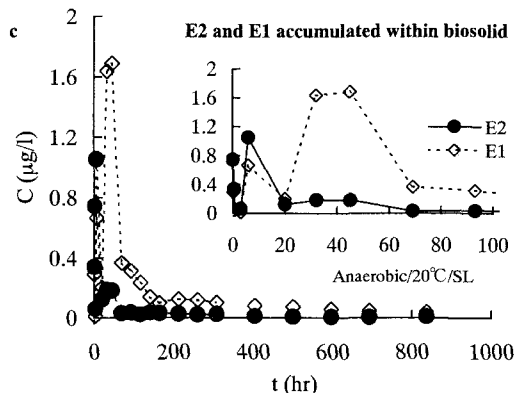
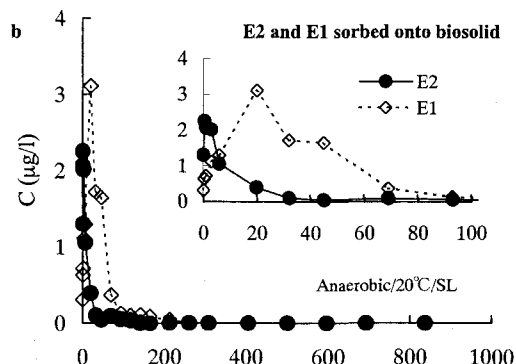
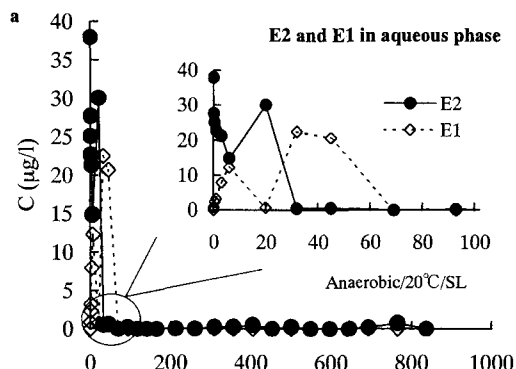


図-9 嫌気条件下におけるE2とE1の液相残留濃度
底泥への付着分の濃度及び生物体内への
蓄積分の濃度の経時変化

く上回っており、好気条件下における E2 の消失は図-10a のように、主に E1 への変換を通して行われていることが明らかである。この経路はこれまでに提案した活性汚泥による E2 の分解経路と同様であり、下水処理施設のアエレーション槽から採取した混合液を用いた E2 の分解実験の結果から立証される^{12,13)}。

これに対し、嫌気の場合では、一回目と二回目の実験でも確認されたように、E1 は一旦減少したのち（実験開始 20 時間後で $0.72 \mu\text{g/L}$ にまで低下）、再び増加する傾向に転じた（図-9a）。実験開始 32 時間後に E1 濃度が $32 \mu\text{g/L}$ にまで達し、それは E2 の添加濃度の約 85% に相当する値であった。実験系外からの E1 の持ち

込みがないことから、高濃度の E1 は系内で生成したものとは考えられない。これらの現象から、以下の 3 つの機構が関与している可能性が高いと考えられる：① 実験開始 20 時間($t=20$ hr)までに液相で減少した E2 の一部は固相へ蓄積（底泥粒子への付着と生物体内への蓄積）され、その後の $t=20\sim32$ hr の間で徐々に液相へ放出され、さらに E1 へと変換された；② 最初の段階 ($t=6\sim20$ hr) で減少傾向を示した E1 はすぐに無機化されたのではなく、一旦、固相へ蓄積され、その後 ($t=20\sim32$ hr) 液相に放出された；③ 実験に用いた底泥試料の持ち込み分（即ちバックグラウンド分）が攪拌によって $t=20\sim32$ hr の間で徐々に放出されてきた。

E2 と E1 の底泥粒子への付着量と生物体内への蓄積量の測定結果に基づいた濃度値の動きをみると、図-9b と図-9c のように、これらの両化合物の付着濃度と蓄積濃度は時間に伴って変化するものの、その最大値はそれぞれ E2 の場合では 2.2 と 1.1 $\mu\text{g/L}$ 、E1 の場合では 3.1 と 1.7 $\mu\text{g/L}$ であり、両化合物の付着分と蓄積分の最大値を加算しても、実験開始 32 時間後で検出した E1 (32 $\mu\text{g/L}$) の 25% に過ぎず、①と②の機構だけから現象を説明することはできない。一方、機構③については、著者らは対象貯水池の底泥を対象に、E2 と E1 を含めたエストロゲン様物質の鉛直方向及び水平方向における含有量の分布状況を調査した¹⁸⁾。その結果、E2 は殆ど検出されていないのに対して、E1 は 0.15~1.1 $\mu\text{g/kg-dry}$ の範囲で分布していた。その最大値 (1.1 $\mu\text{g/kg-dry}$) に基づいて濃度換算しても、今回の回分式実験で用いた底泥試料からの実験系内への E1 の持ち込み分は 0.003 $\mu\text{g/L}$ と極めて小さく、③での説明も嫌気条件下の回分式実験で見られた E1 の増加現象を解釈することはできない。

図-9a に示す E2 の液相での挙動に注目すると、実験開始 6 時間後の採水時点で 14.8 $\mu\text{g/L}$ にまで減少傾向をたどってきた E2 が、20 時間の時点で 30.1 $\mu\text{g/L}$ にまで上昇し、その後 ($t=32$ hr) 完全に消失していくという興味深い傾向がみられた。この傾向を同嫌気条件下での E1 の挙動と対応して考察すると、20 時間後に E1 が再び現れたのは、 $t=6\sim20$ hr の間に減少した E1 が E2 に還元され、次いで還元された E2 が脱水素反応により再び E1 に変換されたことによるものと推測される。E1 から E2 への還元はヒドロキシステロイド脱水素酵素の関与によってヒトの乳房組織内においても生じるとのこと²¹⁾を考慮すれば、上述のように推測した分解経路は底泥環境中でも十分に生起しうものと考えられる。それを模式図に描くと、図-10b のようになる。こうした変換プロセスは嫌気化した実験系内において、常に生起していると考えられる。一回目と二回目の嫌気実験の場合に、E1 から E2 への還元現象を表すデータは捉えられなかったが、これは実験中における採水間隔や、微生物群による E2 と E1 の両物質間の交換・消失速度の釣合などの因子が複雑に絡んだ結果であると推察される。

図-8 と図-9 に示す結果に基づいて、実験系に添加した E2 をモル濃度基準にて消失した分、液相での残留分、底泥粒子への付着分、および、生物体内への蓄積分の 4 つの画分に分画した。これらの分画分の動きから、E2 の除去過程を図-11 のように、概ね 3 つの段階に分けることができる。実験開始から 20 時間までの段階(I)では、好気の場合では E2 から E1 への変換、嫌気の場合では E2 から E1 への変換に加えて E1 から E2 への還元が生起しているため、系外への除去が緩慢であり、その割合は 20% 付近で推移している。これに対して、実験開始 20 時間から 69 時間までの段階(II)では、液相における残留分が急激に減少したことに対応

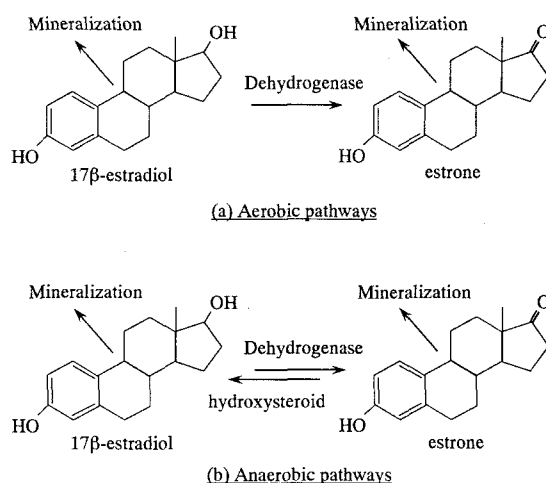


図-10 好気と嫌気下における底泥微生物によるE2分解経路

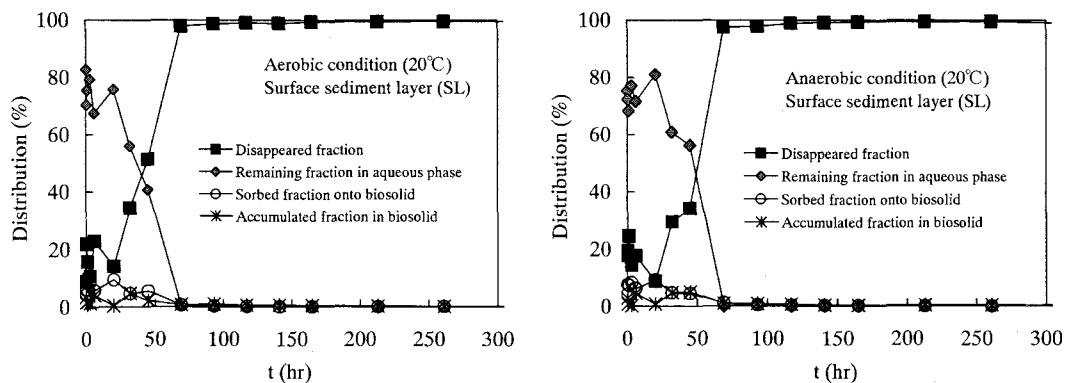


図-11 好気と嫌気下におけるE2とE1全体のモル濃度による分画分の動き

して、消失分が直線的に増加し、E2 とそれに由来の E1 が効率良く除外された。これらに比べて、実験開始 69 時間以降の第 3 段階(Ⅲ)では、主に生物体内に蓄積された E1 がゆっくりと系内から消滅した。

また、好気と嫌気の両条件下とも、実験開始 200 時間以降で、E2 と E1 の両物質の底質への付着分はそれぞれ図-8b と図-9b に示すように消失した。これに対し、生物体内への蓄積とみなす分については、図-8c と図-9c のように、E2 は消失したものの、E1 は実験を打ち切る時点(継続運転 837 時間後)でも依然残留していることが確認された。その残留量は混合液中での濃度として表すとそれぞれ $0.05 \mu\text{g/L}$ (好気の場合)と $0.04 \mu\text{g/L}$ (嫌気の場合)であり、乾燥底質重量当たりの含有量として表すと、約 $21.9 \mu\text{g/kg-dry}$ (好気の場合)と $16.1 \mu\text{g/kg-dry}$ (嫌気の場合)であった。閉鎖性水域におけるエストロゲン様物質の分布状況に関して、著者らはこれまでに、手賀沼¹⁶⁾と三春ダム牛糞前貯水池の底泥¹⁸⁾を対象にした調査研究を水平と鉛直の両方向で行ったが、いずれの場合も、E1 は異なるレベルで検出されたのに対し、E2、EE2 及び E3 は検出されなかった。こうした調査結果を図-8 と図-9 に示した動きとあわせて考えると、E1 は E2 に比べて自然水域の底泥に残存し易く、かつ、その殆どは底泥に生息する生物体内に蓄積されていることが推測される。

4. まとめ

本研究では、好気と嫌気の両条件下における 17β エストラジオールの貯水池底泥中での分解挙動と分解経路を三春ダム牛糞前貯水池の底泥を用いた回分式生分解試験により検討し、以下のような知見が得られた。

- 1) 好気と嫌気とも、E2 は時間の増加に伴って液相から消失し、消失したものの殆どは底泥に生息する微生物による生物分解と E1 への変換によるものであり、底泥への付着や生物体内への蓄積による割合は小さいこと； 5°C に比べて 20°C の場合の方が E2 の消失が数倍程度速く、消失速度の温度への依存性が大きいこと；E2 の消失速度は深層部の底泥に比べて表層部の底泥の方が、また、嫌気の場合に比べて好気の場合の方が大きいこと、などの挙動を明らかにした。
- 2) E2 が消失するにつれて E1 が生成され、生成された E1 は、好気下では次第に減少していくが、嫌気下では一旦減少したのちに再び増加する。最初に添加した E2 が完全に消失したのちに E2 を再添加すると、E2 分解微生物の増殖あるいは E2 と競合する底泥中のバックグラウンド有機物が減少したことなどにより E2 の消失速度が増加し、その増加は好気下ではアンモニア性窒素、嫌気下では硝酸性窒素を添加することによって増幅された。
- 3) 底質による E2 の分解経路は好気下では活性汚泥の場合のように、E2 から変換された E1 の分解を通して行われている。これに対し、嫌気下では、E2 が脱水素反応により E1 にまで変換されるものの、変換された E1 の一部がさらに E2 へ還元されるといった、E2 と E1 との間での交換を繰り返しながら E2 を系内から除

去されていく、といったこれまでに殆ど検討されていない分解挙動と経路を推測した。

4) 好気と嫌気下における系内の E2 の挙動として、系内から消失した分、液相での残留分、底泥粒子への付着分および生物体内への蓄積分の 4 つの画分に分画して評価した結果、E2 とその中間産物 E1 は、系外への排除過程がやや遅い、速い、緩慢の 3 つの段階に分別しうることを示した。その上で、E1 は E2 に比べて底泥に残存し易く、かつ、その殆どは底泥に生息する生物体内に蓄積されていることが示された。

湖沼・貯水池などの閉鎖性水域における底泥微生物の種類や密度は季節によって大きく変化すると考えられるため、年間を通して E2 の底泥微生物による分解の挙動を検討するとともに、嫌気下における E2 の分解機構を連続式分解試験の実施も含めてさらに追究していきたい。本研究の遂行にあたって、現地調査・採水・採泥などの面において多大なご協力を三洋テクノマリン株式会社の和田順之輔氏と共和技術株式会社の木島年幸氏より頂きました。ここに記して心より感謝致します。

参考文献

- 1) 松井三郎, 足立淳, 松田知成, 滝上英孝, 清水芳久: 天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動, 内分泌かく乱物質研究の最前線, 季刊化学総説, No. 50, 86-92, 2001.
- 2) 田中宏明: 尿尿と環境ホルモン, トイレ考・尿尿考, 技報堂出版, pp.187-199, 2003.5.
- 3) Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Beighty GC, Waldock M, Sumpter JP. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. Environ. Sci. Technol., 32, 1559-65, 1998.
- 4) U.S. Environmental Protection Agency. In special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis; EPA/630/R-96/012, 59-65, 1997.
- 5) Tanaka H, Sato C, et al.: Occurrence of endocrine disruptors in sewage and their behavior in sewage treatment plants in Japan. Environmental Science, 10(1), 1-24, 2003.
- 6) Nakada N., Nyunoy H., Nakamura M., Hara A., Iguchi T., Takada H., Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent, Environ. Toxicology Chemistry, 23(12), 2004 (in press).
- 7) 相崎・大槻ら: 霞ヶ浦高浜入における栄養塩類の収支. 国立公害研究所研究報告, 第 22 号, pp. 281-307, 1981.
- 8) 岡部聡, 井野場誠治, 乗松直生子, 渡辺義公: 嫌気化した茨戸湖底泥の硫黄循環を中心とした生物化学的現状把握, 環境工学研究論文集, 第 33 巻, 331-340, 1996.
- 9) Belfroid, AC, Van der Horst A, et al.: Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in The Netherlands, Sci. Total Environ, 225, 101-108, 1999.
- 10) D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R.: Fate of estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Sci. Total. Environ, 302, 199-209, 2003.
- 11) Andersen H, Siegrist H, Halling-Sorensen B, Ternes TA.: Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. Environ. Sci. Technol., 37, 4021-4026, 2003.
- 12) Ternes TA, Kreckel P, Mueller J: Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- II. Aerobic batch experiments with activated sludge, Sci. Total. Environ, 225, 91-99, 1999.
- 13) Layton AC, Gregory BW, Seward JR, Schultz TW, Saylor GS.: Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee U.S.A., Environ. Sci. Technol., 34, 3925-3931, 2000.
- 14) 斉野秀幸, 山縣弘樹, 中島英一郎, 重村浩之, 鈴木稜: SRT 制御による下水中内分泌かく乱物質の除去, 水環境学会誌, Vol. 27, No.1 61-67, 2004.
- 15) Li FS, Yuasa A, Obara A, Mathews AP.: Aerobic batch degradation of 17- β estradiol (E2) by activated sludge: effect of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures (submitted for Wat. Res.)
- 16) Mibu K, Wada J, Okayasu Y, Tsumori J, Komori K, Tanaka H, Li J. H: Distribution of estrogen, nonylphenol and its derivatives in the sediments of a shallow lake, Wat. Sci. Technol (in press).
- 17) Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y.: Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France), Sci. Total. Environ, 324, 55-66, 2004.
- 18) Li FS, Tsumori J, Tanaka H, Suzuki Y.: Distribution of estrogens, NP and NPEO in the sedimented mud of a reservoir (to be submitted).
- 19) 磯部友彦, 白石寛明, 芳沢滋子, 森田昌敏: エストラジオール関連物質の環境水を用いた分解, 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会要旨集(PC-37), pp. 285, 2001.
- 20) 小森行也, 高橋明広, 矢古宇靖子, 田中宏明: LC/MS/MS による下水試料中のエストロゲンの測定, 世界湖沼会議, 9, 225-228, 2001.
- 21) Metzler M.: The Hand Book of Environmental Chemistry: Endocrine Disruptors Part II, Springer, Berlin, 2002.