

HPLCによる生物処理過程の評価について

野尻 喜好 稲村 江里 山口 明男 新井 妥子

要 旨

ハードゲルカラムを利用したHPLCによる都市下水などのゲルクロマトグラフィーの検討を行った。その結果、溶離液が水のみであると溶出パターンの分離がみられず、再現性も悪かった。ホウ酸緩衝溶液を溶離液に使用すると再現性の良いクロマトグラムが得られた。また、このホウ酸緩衝溶液を溶離液とする溶出条件で、都市下水を好気性処理及び嫌気性処理したときのクロマトグラムのパターン変化から、都市下水の好気的生物処理、嫌気的生物処理に関する情報が短時間で得られた。今後、このHPLCによる評価は下水処理状況の把握に用いられることが可能だと思われる。

1 はじめに

従来、水処理における生物処理過程や高度処理過程の評価法としてゲルクロマトグラフィーの手法が利用されている。ゲルクロマトグラフィーを用いれば原理的に試料中の有機物成分の分子量分画を知ることができ、下水処理過程や、排水処理過程での有機物成分の分子量に関する処理特性などが得られる。丹保らによる河川水や都市下水、下水処理水などの都市用水、排水系のマトリックス的な評価^{1, 2)}、富士元らによる都市下水に関する活性炭処理、砂ろ過処理、オゾン酸化処理、逆浸透膜処理などの高度処理装置の評価³⁾など、ゲルクロマトグラフィーを用いた多くの研究が行われている。

従来のゲルクロマトグラフィーは、セファデックスG-15、G-25などデキストラン系のソフトゲルを充填材としている。そのため、低圧でのカラムクロマトグラフィーにより試料が展開される。よって、溶出試料を多量に得ることが可能なことから、UV吸収、TOC、COD、BODその他多項目の検出ができる利点がある。しかしながら、クロマトグラムを得るのに長時間を要する。

また、HPLC装置を用いてハードゲルを展開カラム

としソフトゲルと同様なクロマトグラムを得る研究も行われている^{4, 5)}。この場合、ソフトゲルと比較し分析時間の短縮、クロマトグラムの成分の分離の良さなどの利点がある。ただし、検出項目は、UV吸収や示差屈折が主となる。R.Gloorらは、HPLCで使用可能なTOC検出器を開発し、河川水や、湖沼水などに関するクロマトグラムを得ている⁵⁾。

本実験では、HPLCでのゲルクロマトグラフィーから、都市下水の好気的、嫌気的な生物分解の評価を検討した。あわせて、ハードゲルカラムを使用したときの溶出条件の検討も行った。

2 実験方法

2・1 装置及び試薬

送液ポンプはLC-6A(島津製作所製)、UV検出器はSPD-M6A(島津製作所製)、カラム恒温槽はCTO-6AS(島津製作所製)、インジェクターはレオダイン7125(レオダイン社製)を使用した。

カラムは合成高分子系ハードゲルタイプのTSKgel G3000PW_{XL}とTSKgel G2500PW_{XL}(各長さ300mm、内径7.5mm東ソー製、以後G3000、G2500と略記)を使用した。それぞれのカラムのポリエチレンオキサ

ドでの排除限界分子量は80,000, 5,000である⁹⁾。

使用した試薬は、和光純薬特級以上とした。溶離液の調整に使用した純水は、蒸留水を更にトレピュア(東レ製)で精製したものである。

今回の検討で使用した各試料の詳細は表1に示すとおりである。

溶出条件の検討では、測定試料にし尿処理水A, Bを使用し、水-メタノール溶液、水-アセトニトリル溶液およびリン酸緩衝溶液、ホウ酸緩衝溶液を溶離液として用いた。

生物処理評価の検討では、都市下水、下水処理水、曝気処理水及び、嫌気性処理水3種類(5日, 10日, 25日)を試料とした。

各種測定試料は、試料を0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過し用いた。

表1 クロマトグラム測定試料の一覧

試料名	内容
し尿処理水A	循環式硝化脱窒処理施設の沈殿池流出水
し尿処理水B	嫌気性消化処理施設の活性汚泥処理水
都市下水	下水処理場流入下水
下水処理水	下水処理場(標準活性汚泥法)沈殿池流出水
曝気処理水	都市下水に活性汚泥を加え実験室内で24時間曝気処理
嫌気性処理水(5日間)	都市下水を25 $^{\circ}$ C恒温室内で5日間放置
嫌気性処理水(10日間)	同10日間放置
嫌気性処理水(25日間)	同25日間放置

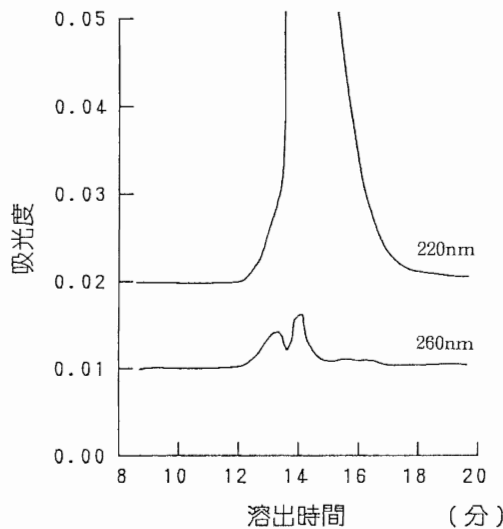


図1 し尿処理水Aのクロマトグラム
溶離液 H₂O; 溶出速度 0.5ml/分; 溶出温度 45 $^{\circ}$ C; サンプル量 5 μ l; カラム TSKgel G3000PW_{XL}; 検出波長 220, 260nm

3 結果及び考察

3.1 溶出条件の検討

図1, 図2は、カラムG3000で、溶離液を純水及び20%アセトニトリル溶液としたときのし尿処理水Aのクロマトグラムである。溶離液を純水とすると、セファデックスゲルでのゲルクロマトグラムで見られるような分離した溶出パターン^{7, 8)}は認められなかった。また、アセトニトリルを添加し溶離液の極性を下げてもあまり効果はなかった。メタノール添加についてもアセトニトリル添加の場合と同様であった。

また、水-アセトニトリル、及び水-メタノール溶液が溶離液の場合、クロマトグラムの再現性が悪かった。

図3, 図4は、カラムG3000で、溶離液をリン酸緩衝溶液及びホウ酸緩衝溶液としたときのし尿処理水Aのクロマトグラムである。どちらの緩衝溶液でも分離したパターンが認められた。とくに、ホウ酸緩衝溶液はクロマトグラムの再現性がよく、リン酸緩衝溶液と比較し、繰り返しによる溶出パターンの変化はほとんど認められなかった。

図5から図7は、G3000とG2500の2本の分離カラムとし、pHを水酸化ナトリウムにより8.9, 9.4, 10に

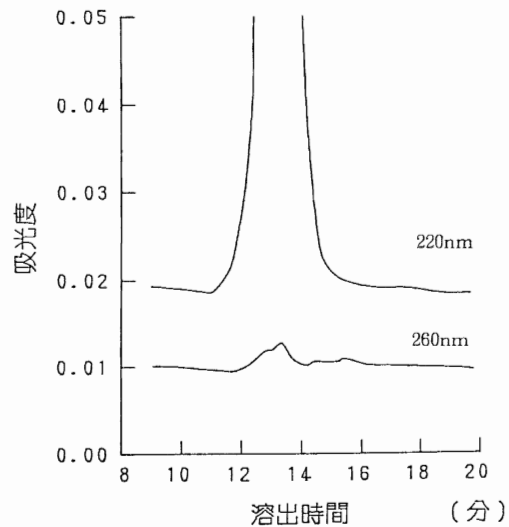


図2 し尿処理水Aのクロマトグラム
溶離液 20%アセトニトリル; 他の条件は図1と同じ

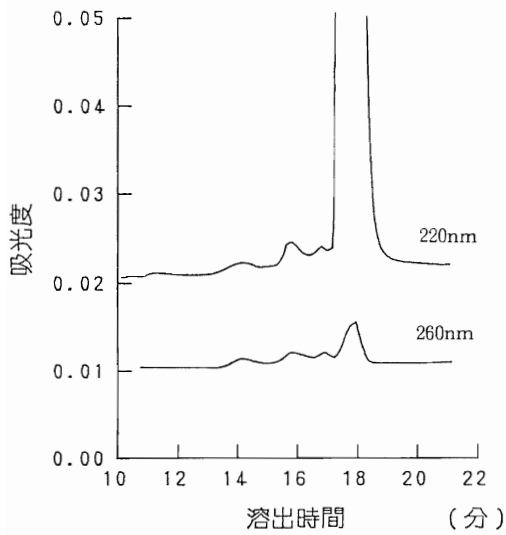


図3 し尿処理水Aのクロマトグラム
 溶離液 0.005M HNa_2PO_4 (pH7.2); 他の条件は図1と同じ

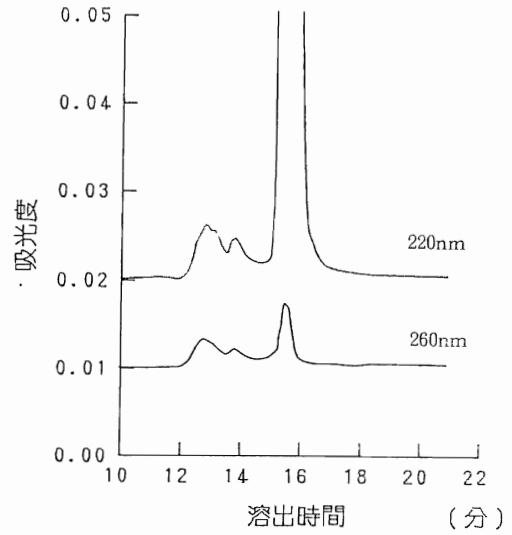


図4 し尿処理水Aのクロマトグラム
 溶離液 0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ (pH8.9); 他の条件は図1と同じ

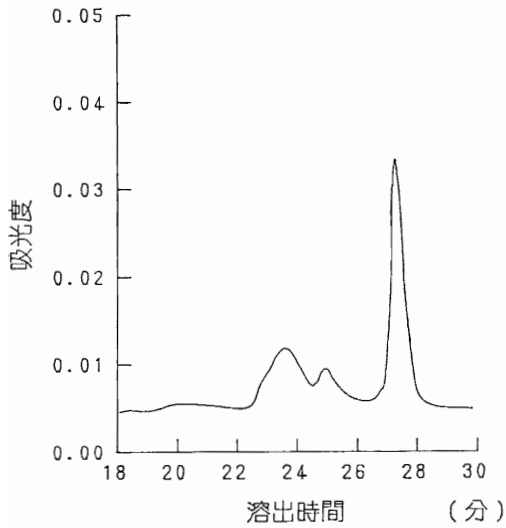


図5 し尿処理水Bのクロマトグラム
 溶離液 0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ (pH8.9); 溶出速度0.5ml/分; 溶出温度 45°C; サンプル量 10 μl ; カラム TSKgel G3000PW_{XL}+G2500PW_{XL}; 検出波長 220nm

調整したホウ酸緩衝溶液を溶離液とした, し尿処理水Bのクロマトグラムである。し尿処理水Bはし尿処理

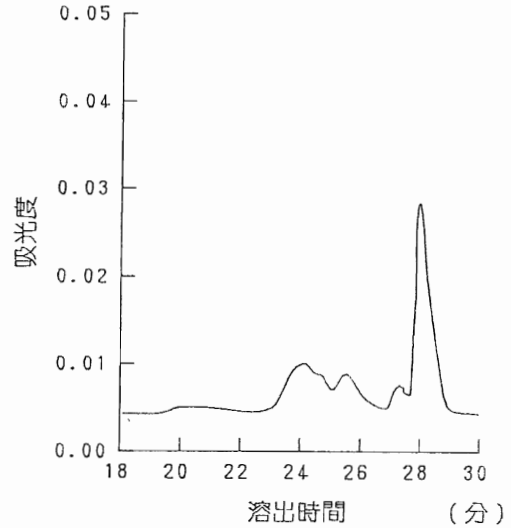


図6 し尿処理水Bのクロマトグラム
 溶離液 0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ (pH9.4); 他の条件は図5と同じ

水Aと比較し硝酸イオンの含有がかなり少ない試料である。

図4と図5は溶出条件は同じであるが, G2500を接

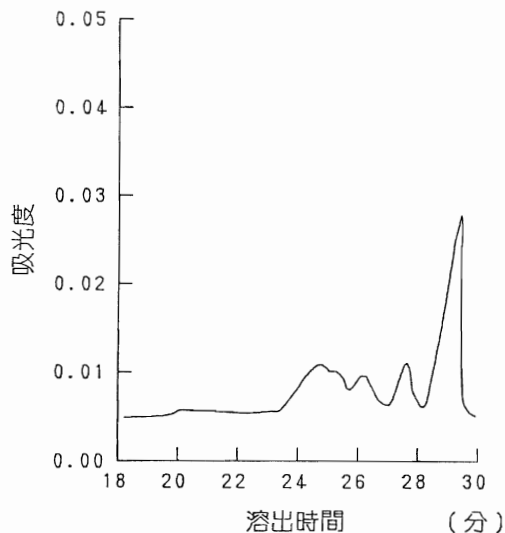


図7 し尿処理水Bのクロマトグラム
 溶離液 0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ (pH10); 他の条件は図5と同じ

続したことによりピークの分離が良くなることがわかった。

溶離液のpH変化については、pH8.9 (図5)で、27.5分付近に溶出した硝酸イオンのピークが、溶離液のpHが高くなるにつれ遅れて溶出し、他の溶出ピークとの分離がよくなっているのが認められた。ただし、pH10を超えるとクロマトグラムのベースが安定せず良好なクロマトグラムが得られなかった。

溶出温度に関しては、35~45℃ではほとんどクロマトグラムの溶出パターンに影響を及ぼさなかった。

以後の都市下水の生物処理による影響の検討には、pH9.8のホウ酸緩衝溶液 (0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ 溶液をNaOHでpH調整) を溶離液とし、分離カラムにG3000、G2500の2本をつなげ使用した。表2にこの溶離液条件での標準物質の溶出時間と溶出容量を示す。ブルーデキストラン2000 (分子量200万) の溶出より、このカラムでの排除物質の溶出時間は、20.4分であった。好気的条件下での生物処理過程で生成する、亜硝酸イオン、硝酸イオンの溶出時間はそれぞれ、28分、28.5分であり、分離して溶出する。

セファデックスゲルでのゲルクロマトグラフィーでは、試料中の塩濃度の影響により、有機物質の溶出パターンが変化することが知られている⁹⁾。本実験で使用したカラム及び溶離液の条件においても、試料中の塩分濃度の違いによる溶出ピークの変化が認められ

た¹⁰⁾。

表2 標準物質の分子量、溶出時間及び溶出容量

物質名	分子量	溶出時間(分)	溶出容量(ml)
ブルーデキストラン2000	200万	20.4	10.2
酢酸	60	28.5	14.3
亜硝酸イオン	46	28.0	14.0
硝酸イオン	62	28.5	14.3
アセトン	58	50.4	25.2

溶離液 0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ (pH9.8); 溶出速度 0.5ml/分

溶出温度45℃, カラム TSKgel G3000PW_{XL}+G2500PW_{XL}

3・2 クロマトグラムによる生物処理過程の評価

図8,図9は都市下水及び下水処理水(標準活性汚泥法)を試料としたときのクロマトグラムである。都市下水は、下水処理水と比較し種々のピークが認められるように、その組成が複雑で多くの有機物が含まれていた。下水処理水は、活性汚泥による好氣的処理で、その組成がかなり単純化していることが示された。また、図4~図9のし尿処理水と比較し24分付近の大きな硝酸イオンによるピークが認められない。このことから、有機汚濁物質は、活性汚泥により好氣的条件下で摂取されたが、硝化菌によってアンモニア性窒素が酸化されるほどの好氣的条件下ではないことがわかった。図10では、この都市下水に活性汚泥を加え、実験室内で十分通気(24時間)し、曝気処理した試料のクロマトグラムである。溶出パターンは図8の下水処理水とほぼ同様であるが、28分付近に大きな硝酸イオンのピークが出現しており、アンモニア性窒素の酸化が進行していることが認められる。

図11~図13は都市下水をそれぞれ5日間、10日間、25日間、25℃の恒温槽内に嫌氣的に放置したもののクロマトグラムである。図8と比較し5日目のクロマトグラムでは、20分から24分にかけてピークが出現した。これは嫌氣的条件下での微生物の作用で、下水中の懸濁していた有機汚濁成分が溶解性成分に分解したことによる。さらに10日目になると、20分から24分に出現したピークは小さくなり、25分から30分の領域に多くのピークが出現した。これは、5日目で溶解した成分が、さらに嫌氣的に分解し低分子化したことによる。この傾向は、25日目ではいっそう顕著に現れた。また、図9~図13の25.5分付近に出現するピークは、曝気処理水、下水処理水、都市下水、嫌気性処理水(5日)、嫌気性処理水(10日)、嫌気性処理水(25日)の順に相

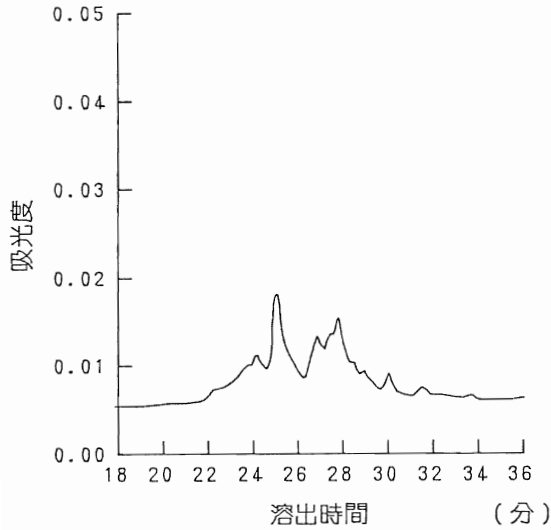


図8 都市下水のクロマトグラム
 溶離液 0.002M $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_7$ (pH9.8); 溶出速度0.5ml/分; 溶出温度 40°C; サンプル量 50 μl ; カラム TSKgel G3000PW_{XL}+G2500 PW_{XL}; 検出波長 220nm

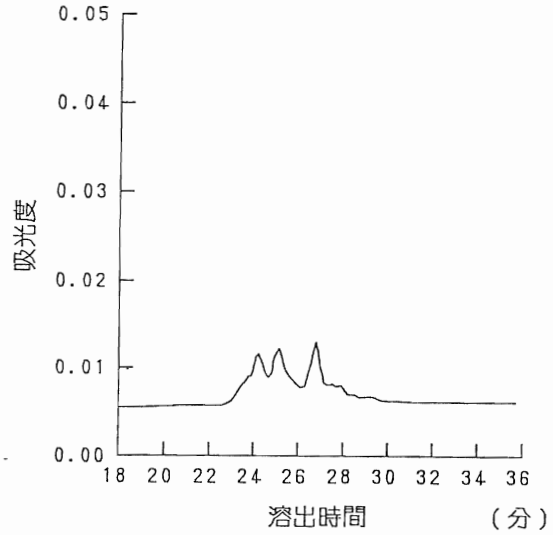


図9 下水処理水(標準活性汚泥法)のクロマトグラム
 測定条件は図8と同じ

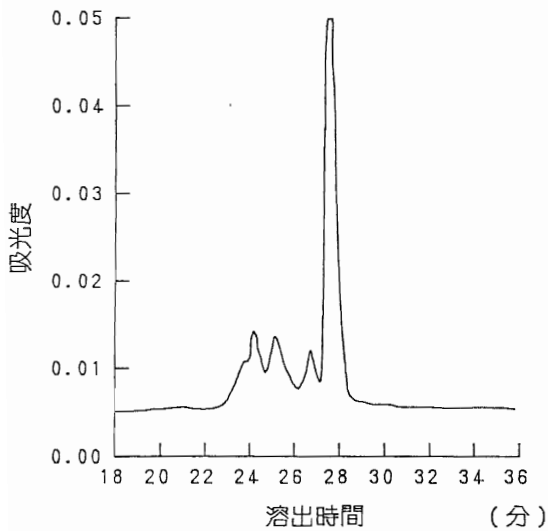


図10 曝気処理水のクロマトグラム
 測定条件は図8と同じ

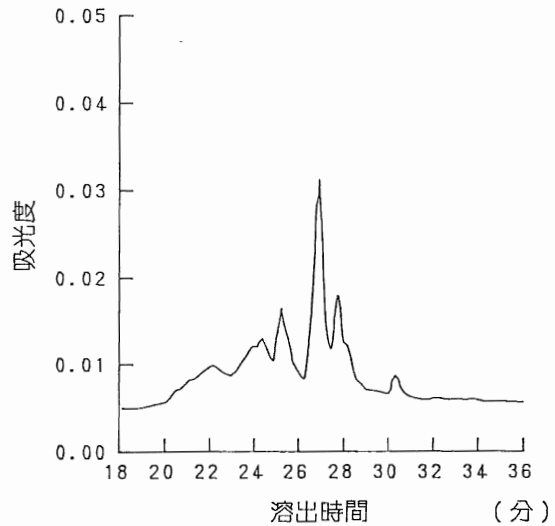


図11 嫌気性処理水(5日間)のクロマトグラム
 測定条件は図8と同じ

対的な高さが高くなっている。これから、この位置に出現するピークの相対的な高さが、都市下水に関する生物処理過程の好氣的(または嫌氣的)な程度の指標として扱えると考えられる。

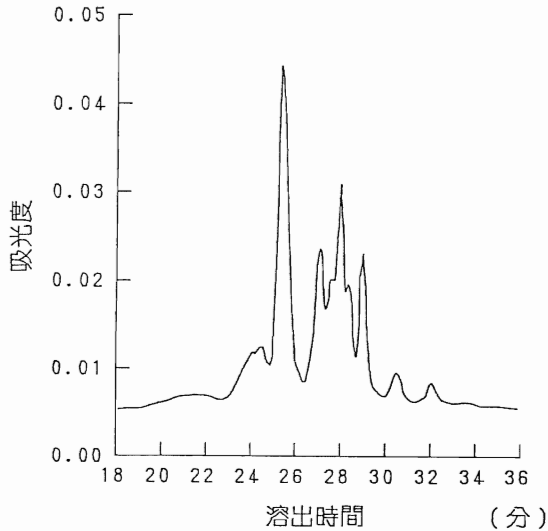


図12 嫌気性処理水（10日間）のクマロトグラム
測定条件は図8と同じ

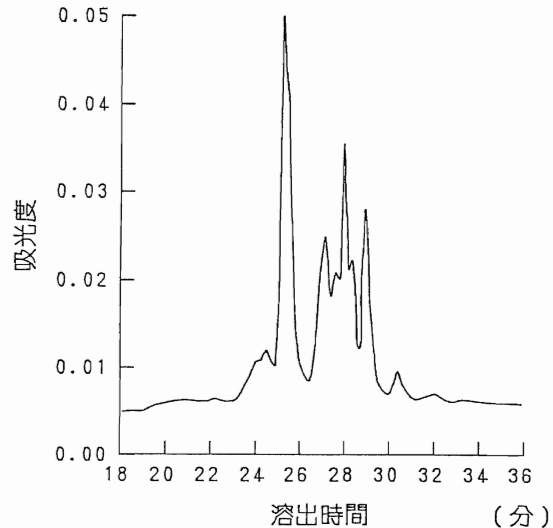


図13 嫌気性処理水（25日間）のクマロトグラム
測定条件は図8と同じ

4 まとめ

都市下水について、HPLCによるゲルクロマトグラフィーでの溶出パターン変化による、生物処理の評価を検討した結果は、次のとおりであった。

- (1) 今回使用したカラムTSKgel G3000PW_{XL}およびTSKgel G2500PW_{XL}では、ホウ酸緩衝溶液を溶離液に用いることにより、再現性の良いクロマトグラムが得られた。
- (2) 都市下水、下水処理水、曝気処理水、及び嫌気性処理水についてのクロマトグラムから、好気性処理による組成の単純化、硝化作用の確認、また、嫌気性処理による、懸濁性有機物質の可溶化などの情報が得られた。

本実験で用いた、HPLCによるゲルクロマトグラムは、1時間で十分測定できた。よって、このクロマトグラムによる評価は、下水処理施設やし尿処理施設での日常の処理状況の把握、処理水中の形態別窒素の割合の推定などに用いられることが可能であると思われた。

文 献

- 1) 丹保恵仁・亀井翼：マトリックスによる都市水代謝の水質評価，水道協会雑誌，**502**，2～22，1976。
- 2) 丹保恵仁・亀井翼：水質のマトリックス的評価のためのゲルクロマトグラフィー，水道協会雑誌，

519，24～41，1977。

- 3) 富士元英二ら：ゲルろ過法による高度処理プロセスの評価，用水と廃水，**26**，1284～1294，1984。
- 4) Y. Saito and S. Hayano：Application of High-Performance Aqueous Gel Permeation Chromatography to Humic Substance from Marine Sediment，*J. Chromatogr.*，**177**，390～392，1979。
- 5) R. Gloor et. al：Exclusion Chromatography with Carbon Detection. A Tool for Further Characterization of dissolved Organic Carbon，*Water Research*，**15**，457～462，1981。
- 6) 東ソー株式会社：HPLC Separation Report TSK-GEL No037，1981。
- 7) 黒澤文雄ら：ゲルクロマトグラフィーによるし尿処理水の水質評価，群馬県衛生公害研究所年報，**[16]**，75～80，1985。
- 8) 八巻さゆりら：ゲルクロマトグラフィーにおけるUV，TOCデータの連続同時測定とその適用，埼玉県公害センター研究報告，**[14]**，83～89，1987。
- 9) 松原英隆・精松洋一：下水処理水中の有機物のゲルクロマトグラフィーにおける無機塩の影響，水質汚濁研究，**11**，783～789，1988。
- 10) 野尻喜好ら：河川水のハードゲルを用いた高速ゲルクロマトグラフィー，（用水と廃水，投稿）。