

生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 30

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一、
真野浩行、武田文彦

【要旨】

日本でも化学物質管理の一環として総排水毒性（WET）試験の導入が検討され、国立環境研究所より試験法が公表されている。しかし日本の下水・下水処理水の生物影響について、公表された試験法に基づき評価した知見は乏しく実態が良く分かっていない。そこで本研究は標準活性汚泥法を用いた下水処理場で得た流入下水と塩素消毒した放流水を対象とし、藻類ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を行うことにより、生物影響の評価や生物影響物質の推定を行うことを目的とした。その結果、流入下水では3種の試験生物いずれも生物影響が確認されたが、放流水ではいずれの生物も影響がなかった。よって下水処理によって水生生物に対する生物影響が改善されたことが明らかになった。流入下水に対する毒性同定評価により、藻類に対しては界面活性剤、ゼブラフィッシュに対しては複数の化学物質が影響していると推定された。

キーワード：WET 試験、下水処理、生物影響、ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュ

1. はじめに

近年、個別の化学物質の毒性を評価するのではなく、生物学的な応答から毒性の判定などの生物影響を評価する生物応答試験が世界的に注目されている。個別の化学物質等の定量などによる従来の物理化学的分析方法と比べて、生物応答試験は試験水中に含まれる全ての化学物質による複合影響を評価できる、生物への直接的な影響により評価するため一般市民が評価結果を実感しやすいなどの特長がある。海外では排水中の化学物質の生物影響について、米国で導入されている総排水毒性 WET (Whole Effluent Toxicity) 試験¹⁾のように生物応答を用いた試験により定量的に評価がなされている。日本でも国立環境研究所が生物応答を用いた排水試験法（検討案）²⁾を公表するなど、生物応答に基づく排水管理の制度化と導入が検討されている。

下水処理水は主要な排水のひとつであるが、国内では公表された試験法に基づいて下水を試験した研究例^{3,4)}は極めて少ないのが現状である。よって下水に対する生物応答試験を行い、生物影響の有無や、下水処理によって生物影響が低減できるかどうかなどの知見を収集する必要がある。また、生物影響が確認され、その影響を低減させることを検討する場合、生物影響を引き起こす化学物質を明らかにした上で影響物質の除去方法を考案することになると考えられる。しかしながら公表された試験法に基づいて下水に含まれる影響

物質を評価した知見⁴⁾はほとんどなく、情報の収集が必要である。

そこで本研究では下水処理場から得た実下水を対象に緑藻ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を行うことにより、下水による生物影響の評価を行った。また、影響が見られた排水に対して毒性同定評価 TIE (Toxicity Identification Evaluation) を行い、排水中の生物影響物質の推定を行った。

2. 実験材料および実験方法

2. 1 下水試料の採水

2014年11月に標準活性汚泥法で処理するA下水処理場で採水を行った。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は24時間とし、1時間ごとに1リットルずつ、合計24リットル採水した。採水箇所は生物反応タンクの流入口および塩素混和池の出口付近で実施し、それぞれ流入下水、放流水とした。これらの排水は採水後すぐに土木研究所に持ち帰り、それぞれの24リットルの排水をコンポジットした。コンポジットした流入下水、放流水に対し水質分析を行い、表-1に示す結果が得られた。また、流入下水と放流水は60 μ mポアサイズのメッシュでろ過を行い、ろ液を4 $^{\circ}$ Cの冷暗所で保管した。これらのろ液は下水試料として以下に示す生物応答試験に用いた。

2. 2 藻類生長阻害試験

2. 2. 1 排水試験

本試験は藻類を下水試料に一定期間曝露し、対数増殖期における生長速度を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生長に対する下水試料の影響を明らかにする。

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法（検討案）²⁾の推奨種となっている単細胞緑藻ムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*, NIES-35 株) を用いた。各試料に対して蒸留水による希釈で 5 段階の割合（試料割合 80%、40%、20%、10%、5%）の試料を作製し、各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加した。対照系は AAP 培地とした。これらの試料は細胞濃度の測定に支障がないよう、0.22 μ m ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行った。容量は 30mL/容器とし、生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾に基づき対照区は 6 連、各下水試料は 3 連とした。培養条件は初期細胞濃度 1.0×10^4 cells/mL、温度 24°C、光強度 3000 Lux 連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に粒子計数分析装置（CDA-1000B、100 μ m アパチャー、Sysmex 社）を用いて対照区と各下水試料での細胞濃度を求め、その結果に基づき各試験水での生長速度を算出した。下水試料による生長阻害率は、以下の式(1)により算出した。生長阻害率 (%) = (対照区の生長速度 - 下水試料での生長速度) \div 対照区の生長速度 $\times 100$ ……(1)

2. 2. 2 毒性同定評価を組み合わせた藻類生長阻害試験

2. 2. 1 の試験で流入下水では生長速度に影響が

表-1 コンポジットした流入下水、放流水の水質

項目	単位	流入下水	放流水
水温*	°C	21.2	21.3
pH		7.17	6.98
電気伝導度	mS/cm	0.457	0.429
DO	mg/L	1.72	8.17
塩分濃度	%	0.0	0.0
TRC	mg/L	-	0.08
水の硬度	mg/L	96	91
T-N	mg/L	27.3	13.7
T-P	mg/L	2.47	0.286
NH ₄ -N	mg/L	16.8	8.10
NO _x	mg/L	0.093	1.46
PO ₄ -P	mg/L	1.26	0.134
TOC	mg/L	26.4	10.7

*コンポジット時の水温

DO：溶存酸素濃度 (Dissolved Oxygen)、TRC：総残留塩素濃度 (Total Residual Chloride)、TOC：全有機炭素濃度 (Total Organic Carbon)、-：未測定。

見られたため、米国環境保護庁 (USEPA) が公布する慢性毒性同定評価⁵⁾を参考に毒性同定評価 TIE (Toxicity Identification Evaluation) を行った。表-2 に、各前処理と生物影響に寄与する化学物質 (群) との関係を示す。流入下水 20%に対し、無処理、チオ硫酸ナトリウム添加 (5mg/L)、EDTA[エチレンジアミン四酢酸]添加 (0.25mg/L、EDTA 二水素二ナトリウムを使用)、ばっ気 (流入下水 100% 1L/1L air、1 時間、ばっ気後に 20%に希釈)、pH 調整 (pH 約 6.5 に調整) の前処理を行った。また、SPE [Solid Phase Extraction、

表-2 試験水に対する各種前処理により生物影響が変化する物質の一覧⁵⁾

	pH	ろ過	ばっ気	SPE	チオ硫酸ナトリウム	EDTA	備考
酸化物			○		○		4°C保存で時間とともに生物影響消失
アンモニア	○ ¹⁾						
無極性有機物				○			SPEカラムのメタノール溶出物に生物影響あり
界面活性剤		○	○	○			4°C保存で時間とともに生物影響消失
陽イオン金属		○ ²⁾		○	○	○	
全溶解固形分 (TDS)							

○：生物影響が低下

○¹⁾：pHが低いほど生物影響小

○²⁾：pH調整とろ過を組み合わせると生物影響低下

SPE：固層抽出 (Solid Phase Extraction)、EDTA：エチレンジアミン四酢酸

固層抽出] カラム (Sep-Pak C18, Waters 社) を用い、試料を 1.0 μ m ポアサイズフィルターでろ過後に SPE カラムに通水したもの (SPE カラム通過水)、及び SPE カラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの (メタノール溶出物) も前処理水として同様に試験した。ろ過の系については、藻類試験では全ての試験水に対して 0.22 μ m ポアサイズのフィルターでろ過することから実施していない。各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22 μ m ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行ったものを藻類試験に供した。対照区は AAP 培地とし、試験条件は 2. 2. 1 と同一とした。

2. 3 オオミジンコ繁殖試験

本試験は、オオミジンコを下水試料に一定期間曝露し、ミジンコの繁殖に対する下水試料の慢性毒性を明らかにする。生物応答を用いた排水試験法 (検討案)¹⁾では、ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いた試験を行うが、本試験では、OECD テストガイドライン No.211⁶⁾を参考に、初産ではない親個体から 24 時間以内に生まれたオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いて実施した。

本試験には藻類試験と同様に 4 段階の割合 (試料割合 80%、40%、20%、10%) の下水試料および対照区を用意した。容量は 50mL/容器とし、試験連数は 10 連/試験区とした。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、脱塩素水道水を用いた。試験区ごとに生後 24 時間以内の個体を 10 匹 (1 容器 1 匹) 曝露し、曝露期間を 17 日間とした。曝露方式は半止水式 (少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水) とし、照明は白色蛍光灯で明期 16 時間、暗期 8 時間、水温は 21 \pm 1 $^{\circ}$ C とした。餌としてクロレラ (*Chlorella vulgaris*) を使用し、試験個体ごとに炭素含有量で 0.15mg のクロレラを 1 容器ごとに毎日与えた。曝露終了後まで、試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、下水試料の試料割合ごとに生存率と累積産仔数を求めた。

なお、オオミジンコでは下水試料が多量に必要であり、試験期間が長期にわたるため、毒性同定評価を実施しなかった。

2. 4 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

2. 4. 1 排水試験

本試験は、胚仔魚期の魚類を下水試料に一定期間曝露し、ふ化率などを調べ、対照区と比較することにより、胚・仔魚期の魚類に対する下水試料の急性および

亜慢性毒性を明らかにする。国立環境研究所より分譲されたゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を使用し、環境省が提案している生物応答を用いた排水試験法 (検討案)²⁾に基づき実施した。

試験には藻類試験と同様に 5 段階の割合 (試料割合 80%、40%、20%、10%、5%) の下水試料および対照区を用意した。各下水試料の希釈および対照区に使用する試験水として、脱塩素水道水を用いた。容量は 50mL/容器とし、試験連数は 4 連/試験区とした。試験区ごとに受精 4 時間以内の胚を 40 個 (1 容器 10 個) 曝露し、曝露期間を 9 日間 (対照区の生存胚の半数以上がふ化した日をふ化日とし、ふ化日から 5 日後まで²⁾) とした。曝露方式は半止水式 (少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水) とし、ふ化率、生存率を求めた。照明は白色蛍光灯で明期 16 時間、暗期 8 時間とし、水温は 26 \pm 1 $^{\circ}$ C とした。

2. 4. 2 毒性同定評価を組み合わせたゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

2. 4. 1 の試験で影響が見られた流入下水に対し、藻類試験同様に TIE を行った。流入下水 80% に対し、前処理は 2. 2. 2 に示したものにに加え、ろ過 (1.0 μ m ポアサイズフィルター使用) も行った。対照系には脱塩素水道水を用い、曝露期間は 8 日、それ以外の試験条件は 2. 4. 1 と同一とした。

2. 5 統計解析方法

各試験でのエンドポイント (藻類: 0-72 時間の生長速度、オオミジンコ: 累積産仔数、ゼブラフィッシュ: ふ化率と生存率) について、Bartlett 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnnett 検定による多重比較 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区と下水試料との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照系と下水試料との生長速度の比較を実施した。これらの解析にはフリーの統計解析ソフト R⁷⁾を用いた。排水試験では、対照系と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC (No Observed Effect Concentration) として求めた。全ての下水試料割合で対照系と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合を NOEC とした。毒性同定評価においては、各試料での生長速度、ふ化率および生存率について、Bartlett 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnnett 検定による多重比

較 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) で対照区との比較を実施した。無処理区と比較して統計学的に生長速度、ふ化率あるいは生存率の有意な増加が認められた場合、前処理による生物影響の改善が見られたと評価した。メタノール溶出物については対照区と同様に AAP 培地 (藻類)、脱塩素水道水 (ゼブラフィッシュ) に添加して試験しているため、対照区との比較を行い、生長速度、ふ化率あるいは生存率の有意な低下が見られた場合はメタノール溶出物による影響があったと評価した。

3. 実験結果

3.1 藻類生長阻害試験

図-1 に各下水試料割合に対する藻類の生長速度を示す。流入下水は、割合が 10%以上の試料割合で対照区よりも生長速度が有意に低下した ($p < 0.05$)。放流水では最大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられず ($p > 0.05$)、藻類の生長速度への影響はなかった。

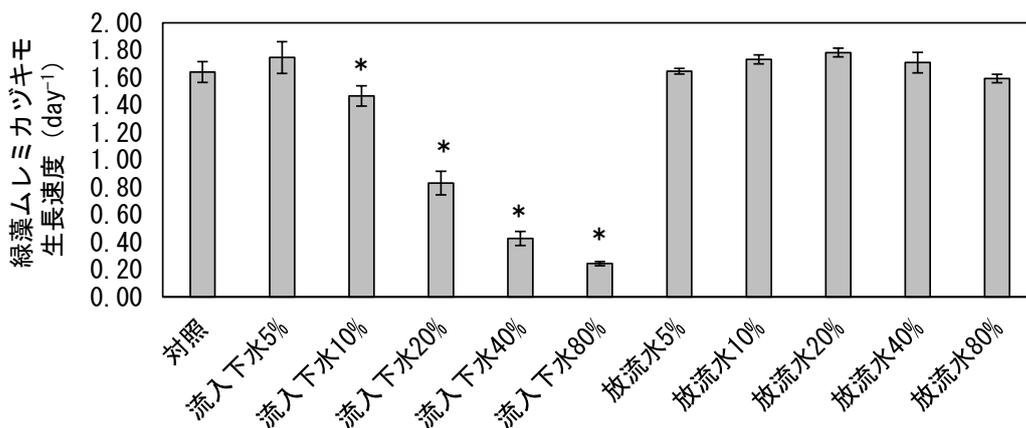


図-1 流入下水、放流水に曝露した緑藻ムレミカヅキモの生長速度。* : 対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

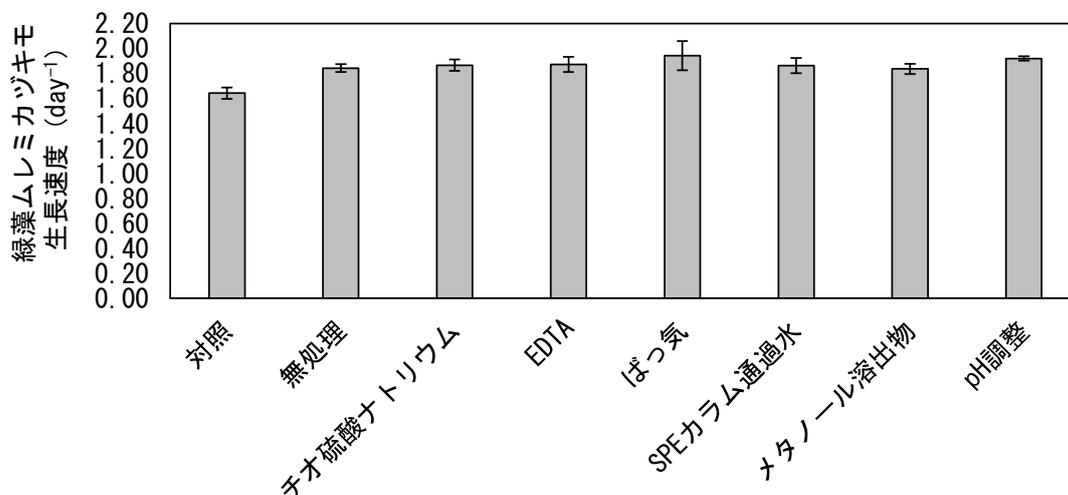


図-2 流入下水 (割合 20%) に対する緑藻ムレミカヅキモを用いた毒性同定評価

よって NOEC は流入下水で 5%、放流水で 80%と求められた。流入下水 (割合 20%) に対する毒性同定評価の結果を図-2 に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加する前処理区はなかった。一方、メタノール溶出物でも生長速度に対する悪影響は確認されなかったため、無極性物質は藻類に対して無影響であると分かった。TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、排水試験 (図-1) では影響があったのに対し毒性同定評価 (図-2) では影響がなかった。このことから、流入下水を 4°C 暗所で保管している間に生物影響は低下したことが明らかになった。

3.2 オオミジンコ繁殖試験

図-3 に、オオミジンコの累積産仔数と生存率を示す。対照区の死亡率は 20%以下で、試験個体あたりの産仔数の平均値は 60 を超えた。流入下水は 20%以外の区では産仔数が対照区に比べて有意に低下した ($p < 0.05$)。流入下水 20%では対照区と同等 ($p > 0.05$) であったことから、累積産仔数に関する流入下水の NOEC は 20%

と判断した。一方、放流水での累積産仔数は全ての試験区において対照区よりも多くなった。このことから、放流水によるオオミジンコの産仔数への生物影響は検出されなかった。よって累積産仔数に関する放流水のNOECは80%と求められた。生存率は累積産仔数と類似した変化を示し、流入下水では0~40%の範囲に低下していた。放流水では40%以上で低下する傾向にあったが、総じて高い生存率を示した。

3. 3 ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験

図-4に各試料におけるゼブラフィッシュのふ化率と生存率を示す。流入下水の割合が80%の場合のみふ化率と生存率は対照区よりも有意に低下した ($p < 0.05$)。このため両指標に対する流入下水のNOECは40%と求められた。一方、放流水では全ての試験区でふ化率および生存率は対照区と有意差はなく ($p > 0.05$)、影響は見られなかった。よって両指標に対する放流水のNOECはいずれも80%と求められた。

流入下水80%に対し毒性同定評価を実施した結果を図-5に示す。ふ化率では全ての系で対照系と同等であった ($p > 0.05$)。メタノール溶出物の系では対照系とふ化率と生存率が同等となり、 ($p > 0.05$) 無極性有機物は影響しないことが分かった。一方、無処理区に比べてばっ気区でふ化率が有意に大きくなった ($p < 0.05$)。以上のことから、ふ化率を改善したのはばっ気処理のみであることが明らかになり、生存率を改善する前処理は導出できなかった。

毒性同定評価は排水試験より2週間後に実施したが、各試験での対照区のふ化率と生存率はt検定(有意水準 $\alpha = 0.05$)より有意差がなく ($p > 0.05$)、試験生物の性状として同等であると判断した。また、排水試験での流入下水80%と毒性同定評価での無処理(流入下水80%)におけるふ化率と生存率は有意差がないことが確認され ($p > 0.05$)、藻類とは異なり4°C暗所で保管している間に生物影響が低下しなかったことが明らかになった。

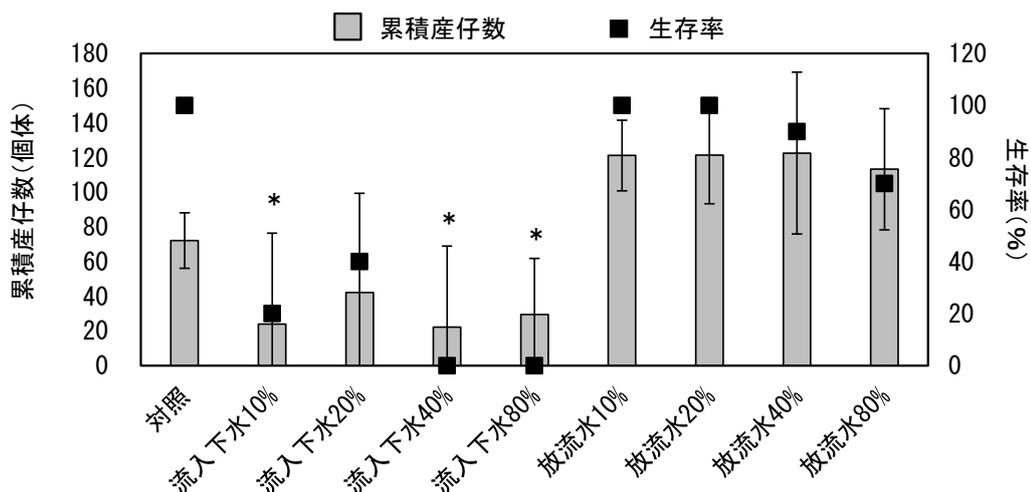


図-3 流入下水、放流水に曝露したオオミジンコの累積産仔数と生存率。*:対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

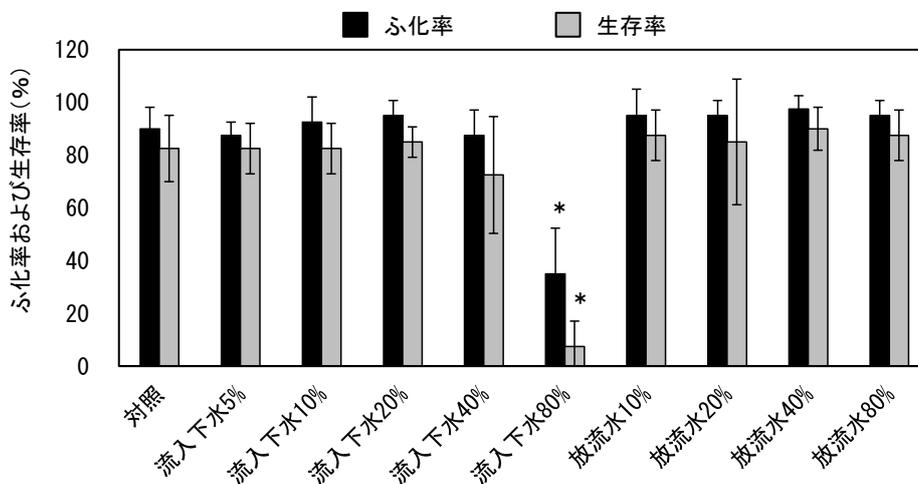


図-4 流入下水、放流水に曝露したゼブラフィッシュのふ化率と生存率。*:対照区よりも有意に低下 ($p < 0.05$)

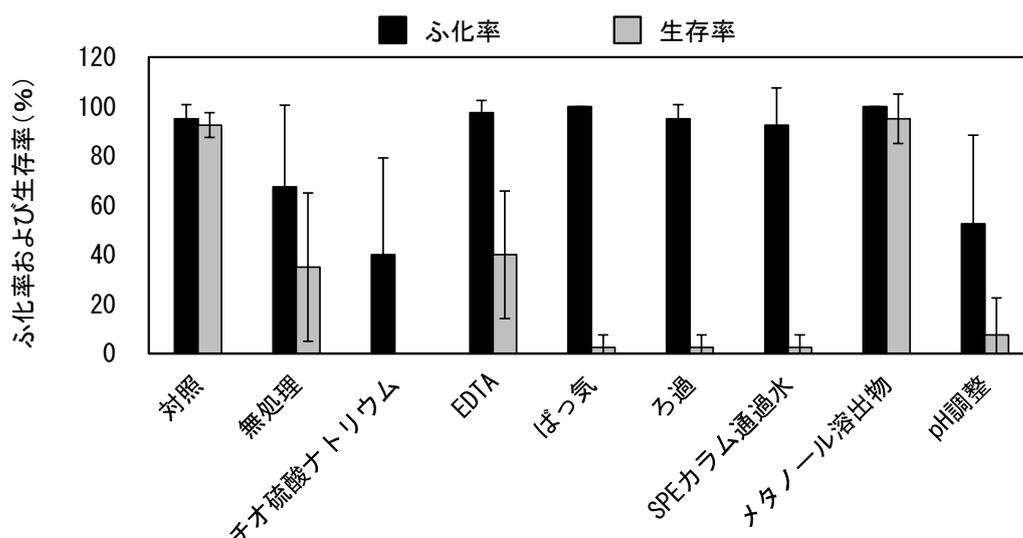


図-5 流入下水（割合 80%）に対するゼブラフィッシュ胚・仔魚を用いた毒性同定評価

4. 考察

藻類に対する TIE は排水試験の 4 週間後に実施し、その間は下水試料は 4℃冷暗所で保管していた。表-2 より酸化物と界面活性剤は 4℃保存で生物影響が失われると考えられている。一方、平成 25 年度のデータを用いた「PRTR けんさくん」⁹より、A 下水処理場では界面活性剤であるポリ=（オキシエチレン）=アルキルエーテルの年間推定移動量が極めて多いと推定された。これらを鑑みれば、藻類を用いた排水試験（図-1）の流入下水で見られた生長速度に対する影響は界面活性剤が原因物質であると考えられた。

ゼブラフィッシュに対する毒性同定評価は排水試験の 2 週間後に実施した。毒性同定評価よりばっ気でふ化率が改善したこと、また有意差こそなかったものの毒性同定評価において無処理のふ化率と生存率の平均値が排水試験よりも大きかったことから、ゼブラフィッシュに対しても藻類と同様に界面活性剤が生物影響を引き起こしている可能性があると考えられた。しかし藻類と異なり 4℃保存で生物影響が完全には失われ

ないこと、個々の前処理ではほとんど改善が見られないことから、ゼブラフィッシュに対して生物影響を引き起こす化学物質群は複数存在することが推定された。

表-3 に各試験生物に対する流入下水、放流水の NOEC を示す。いずれの試験生物においても流入下水では低い NOEC を示したが、放流水では最高割合の 80%となった。このことから A 下水処理場における標準活性汚泥処理によってこれらの試験生物に対する生物影響を削減できることが明らかになった。希釈系の設定条件のため NOEC は 80%となり 1.25 倍以上の希釈で生物影響が見られなくなると判定されるが、通常の下水処理場では環境水中に処理水を放流しており、この程度の希釈倍率は確保されることが考えられることから、本試験結果からは放流水の水生生態系への影響は見られないと判定できると考えられる。しかしながら放流水の性質、特に生物影響物質の種類や量、排水処理能力は季節においても変化すると考えられるため、今後も繰り返し生物応答試験を行い、情報を蓄積する

表-3 各試験生物に対する流入下水、放流水の無影響濃度 NOEC のまとめ

試験生物	評価指標	NOEC (%)	
		流入下水	放流水
ムレミカツキモ	生長速度	5	80
オオミジンコ	累積産仔数	20	80
ゼブラフィッシュ	ふ化率	40	80
	生存率	40	80

ことが必要であると考えられる。

下水の生物影響は時期や地域によって異なることが推定されることから、今後は複数の下水処理場において季節ごとに採水した下水に対する生物応答試験と毒性同定評価を実施し、更なる知見の収集に努める。また、下水処理水の放流先での環境水に対する生物影響評価の実施や、下水処理水で生物影響が見られた場合にその影響を低減可能な高度処理方法についても検討する予定である。

5. まとめ

標準活性汚泥法を用いた下水処理による生物影響の低減効果を明らかにするとともに、生物影響を引き起こす化学物質を推定するために、本研究では流入下水と塩素消毒した放流水に対して藻類、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いた生物応答試験を実施した。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

- 1) 藻類生長阻害試験により、流入下水の割合が 10% 以上の場合において生長速度への影響がみられた。放流水による生長速度への影響はいずれの試料割合においても検出されなかった。よって下水処理により藻類生長への影響の低減が確認できた。流入下水中の主要な生物影響物質は界面活性剤であると考えられた。
- 2) オオミジンコ繁殖試験により、流入下水は 10、40、80% において累積産仔数が低下し影響が見られた。放流水ではいずれの試料割合においても産仔の低下は確認されなかった。生存率は流入下水の場合は全ての試料割合で大きく低下したが、放流水では総じて高かった。よって下水処理によりオオミジンコの産仔・生存への影響の低減が確認できた。
- 3) ゼブラフィッシュ胚・仔魚試験により、ふ化率、生存率は流入下水 80% のみ影響があり、放流水ではいずれの試料割合においても影響がなかった。よって下水

処理によりゼブラフィッシュのふ化・生存への影響の低減が確認できた。流入下水中の主要な生物影響物質は界面活性剤であると考えられるものの、複数の化学物質群が影響していると推定された。

参考文献

- 1) USEPA, Draft National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance, EPA832-B-4-003, 2004
- 2) 国立環境研究所・環境省：生物応答を用いた排水試験法（検討案）、排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会、2013
- 3) 山本裕史、安部香緒里、池幡佳織、安田侑右、田村生弥、中村友紀、鑑迫典久：徳島県内の下水処理施設放流水を対象にした WET 試験、環境工学研究論文集、47、727-734、2010
- 4) 山本裕史、矢野陽子、森田隼平、西家早紀、安田侑右、田村生弥、鑑迫典久：下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価、土木学会論文集 G（環境）、69(7)、III_375-III_384、2013
- 5) USEPA, Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 1999
- 6) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2012) *Daphnia magna* Reproduction Test. No. 211. OECD, Paris, France.
- 7) R Core Team : R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austraria. <http://www.r-project.org/>, accessed on May 2015
- 8) 経 済 産 業 省 ホ ー ム ペ ー ジ http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、平成 27 年 5 月アクセス

A STUDY ON EVALUATION OF TREATED SEWAGE USING BIOLOGICAL RESPONSES

Budget: Grants for operating expenses (General account)

Research Period: FY2014-2019

Research Team: Water Quality Research Team,

Author: Seiichiro OKAMOTO, Koya KOMORI,
Tomokazu KITAMURA, Hiroyuki MANO,
Fumihiko TAKEDA

Abstract:

The introduction of Whole Effluent Toxicity (WET) testing has been considered for the management of chemicals in effluent in Japan. Although sewage water is one of the main effluent, there is little knowledge of the biological effect of sewage water in Japan. This study aimed to evaluate a biological effect of influent and final effluent from a sewage treatment plant and to seek biologically affecting chemicals in sewage water. Influent and final effluent were examined referring to the draft Japanese WET testing guidelines using 3 kinds of aquatic organisms (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*).

As a result, some influents had some effects on all of the organisms, but final effluents had no effect. These results suggested that biological impacts by sewage water were improved by conventional activated sludge process. Toxicity Identification evaluation indicated that the biologically affecting chemicals in the influent were surfactants for *P. subcapitata*, and some kinds of chemicals for *D. rerio*.

Key words: Whole Effluent Toxicity, sewage treatment, biological effect, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*.