〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
33 (6) 415-422 (1987)

嫌気条件下における界面活性剤の生分解性の比較

伊藤伸一,^a 内藤昭治,^a 畝本 力^b
神奈川県衛生研究所,^a 千葉大学薬学部^b

Comparative Studies on the Anaerobic Biodegradations of Anionic and Nonionic Surfactants

SHIN-ICHI ITOH,^a SYOJI NAITO^a and TSUTOMU UNEMOTO^b
*Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories,^a 52-2 Nakao-cho, Asahi-ku,
Yokohama 241, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chiba University,^b 1-33, Yayoi-cho, Chiba 260, Japan*

(Received May 19, 1987)

We examined anaerobic biodegradations of sodium linear alkylbenzenesulfonate (LAS), sodium alkyl sulfate (AS), sodium alkylpoly(oxyethylene) sulfate (AES), sodium alkylphenyl(oxyethylene) sulfate (NES), sodium α -olefinsulfonate (AOS), sodium salt of fatty acid (Soap), alkyl poly(oxyethylene) ether (AE) and *p*-alkylphenyl poly(oxyethylene) (APE) by bacterial sources from sewage sediments. In the course of biodegradation, the productions of H₂, H₂S, CO₂ and CH₄ were determined. Assuming that the final products were CO₂ and CH₄, the results of the anaerobic biodegradabilities of surfactants were as follows: (AS, Soap) > AE > (APE, AES, NES) > (AOS, LAS). These results indicated that the surfactant having benzene ring, branched alkyl chain or ethoxylate chain [-(EO)_n-] was resistant to anaerobic biodegradations. The biodegradability of surfactants was also influenced by the structure of hydrophilic group. When the hydrophobic group was identical, the extent of biodegradation decreased in the following order: -OSO₃Na > -(EO)_nH > -(EO)_nSO₃Na, -SO₃Na.

Keywords—anaerobic biodegradation; surfactants; methanogenesis; hydrogen; methane; carbon dioxide; sulfide; sewage bacteria

緒 言

1960年代まで、界面活性剤の生分解に関する研究は、主に分子の一次的な生分解又は環境に受け入れられる程度までの生分解¹⁾が中心で、それまでの研究成果は Swisher の成書²⁾によくまとめられている。1970年代以降、人の健康を含めた生態系全体の安全性を考慮して、生分解は究極的生分解の立場に立って議論されるようになってきた。特に有機炭素の物質収支を測定するのに適した全有機炭素 (TOC) 分析計等の発達によって、界面活性剤の究極的生分解に関しては、好気条件下で数多くの研究³⁾がなされてきた。

ところが現実の環境生態系では、一部の界面活性剤が、好気的な環境水系だけでは十分分解されずに、嫌気的環境下にある底泥中に沈降堆積する。例えば、河川の

河口域や湖沼の底泥を中心に、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) の存在が報告されている。⁴⁻⁸⁾したがって、環境保全上、生態系全体の中での界面活性剤の生分解性を、総合的に評価するためには、好気条件下ばかりでなく、嫌気的な環境下にある底泥中での究極的生分解性についても明らかにする必要がある。しかしながら今日まで嫌気条件での研究は非常に少なく、⁹⁾ほとんど検討がなされていない。まして試験法を統一して同一次元で各種界面活性剤の生分解性を比較検討した報告はない。

そこで今回著者らは、界面活性剤が最終的な段階の CH₄ と CO₂ まで代謝分解されることを生分解の評価基準と考え、先に開発した嫌気条件下における生分解試験方法¹⁰⁾を用い、アニオン及び非イオン界面活性剤 11 種類

について、その分子構造と生分解性との関係を比較検討した。

試験方法

1. 試薬 実験に用いた界面活性剤の構造式と略号を Table I に示した。LAS と AS は和光純薬製、それ以外の界面活性剤は(株)ライオンの好意により提供されたものを用いた。また、グルコースは Difco 社製の Bacto-Dextrose を用いた。

2. 微生物源 前報¹⁰⁾に従い、家庭下水を主体とした下水溝(当研究所の近くの二俣川支流)から採取した黒色を帯びた湿泥 2g を、BOD 希釈水 2000 ml に懸濁させ、27℃の恒温槽で2—3週間嫌氣的に培養した。こうして得られた培養液の上澄 200 ml を微生物源とした。

なお微生物源の TOC 濃度は、10 mg/l 前後であった。

3. 生分解試験及び分析法 すでに報告した通り、嫌気条件での界面活性剤の生分解反応は、極めて遅く実験によって分解が一定に達するまでの期間が変動する。しかしグルコースを等量添加することによって、再現性が向上することが明らかになった。¹⁰⁾ そこで界面活性剤の生分解性を検討するに当たっては、等量混合実験を採用した。すなわち前報¹⁰⁾に準じて、炭素量として 10 mg の界面活性剤と 10 mg のグルコースを 3200 ml の培養瓶内に投入して、生分解試験を行った。

CO₂, CH₄, H₂, H₂S の分析は前報¹⁰⁾に従った。すなわち気液平衡理論に基づき、CO₂, CH₄, H₂ はガスクロ

マトグラフ分析法、H₂S はメチレンブルー比色法を用いた。またメチレンブルー活性物質 (MBAS) は Abbott の方法¹¹⁾に従って分析した。

結果

1. Soap の生分解

等量混合実験を行う際に、毎回対照実験としてグルコース単独の生分解試験と基質を添加しない空試験を行った。グルコース単独では、実験に用いた底泥の採取時期が異なってもほぼ同様の結果が得られた。その代表例を Fig. 1(A) に示す。また Fig. 1(B) は、Soap とグルコースを等量混合した場合の生分解試験の結果である。ただし Fig. 1—4 の数値は空試験の値で補正していない値である。なお、毎回の空試験では、CO₂ はわずかに生成されたが、CH₄ は全く生成されなかった(前報¹⁰⁾ 参照)。

グルコース単独では、培養初期の1—5日の間で CO₂ の急激な増加が認められた。一方 H₂ は、培養初期の2—5日の間だけ認められた。この H₂ 生成に引き続いて H₂S が生成され、H₂ は減少した。この間の CH₄ 生成は極めてわずかであった。しかしその後 CH₄ 生成は、培養70—100日の間に急激で大きな上昇を示した。

これに対して、Soap を加えた場合、CH₄, CO₂ 生成は、ともにきれいな2段階生成曲線を示した。まず培養初期の H₂, CO₂, H₂S の生成は、グルコース単独の試験結果から、主にグルコースの分解に由来するものと考え

TABLE I. Surfactants Used in the Experiment

Type and composition		Abbreviation
Sodium alkylbenzenesulfonate R-C ₆ H ₄ SO ₃ Na	Derived from 1-dodecene	LAS
Sodium alkyl sulfate R-OSO ₃ Na	R : lauryl alcohol	AS
Sodium alkylpoly(oxyethylene) sulfate R-O(CH ₂ CH ₂ O) _n SO ₃ Na	R : coco alcohol, $\bar{n}$: 3.0 R : C ₁₂₋₁₅ , $\bar{n}$: 8.7	AES 3.0 AES 8.7
Sodium alkylphenylpoly(oxyethylene) sulfate R-C ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) _n SO ₃ Na	R : branched C ₉ , $\bar{n}$: 9.7	NES 9.7
Sodium α -olefinsulfonate R-CH=CHCH ₂ SO ₃ Na R-CH(OH)CH ₂ SO ₃ Na	R : C ₁₂ (alkane sulfonate : hydroxy-alkane sulfonate=7 : 3)	AOS
Sodium salt of fatty acid R-COONa	R : C ₁₅₋₁₇	Soap
Alkyl poly(oxyethylene) ether R-O(CH ₂ CH ₂ O) _n H	R : C ₁₂₋₁₃ , $\bar{n}$: 8.2 R : C ₁₂₋₁₅ , $\bar{n}$: 8.7	AE 8.2 AE 8.7
p-Alkylphenyl poly(oxyethylene) ether R-C ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) _n H	R : branched C ₉ , $\bar{n}$: 9.0 R : branched C ₉ , $\bar{n}$: 9.7	APE 9.0 APE 9.7

Fig. 1. Time Courses of Production of H₂, CO₂, CH₄ and H₂S from Glucose (A) and Soap Plus Glucose (B)

The reaction mixture containing sewage bacteria and carbon sources was anaerobically incubated at 27°C in the dark. The production of H₂, CO₂, CH₄ and H₂S was determined by a headspace technique. H₂, CO₂ and CH₄ were analyzed on a gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector and a 3 mm i.d. × 1 m stainless column with Unibeads C (60/80). H₂S was measured by the colorimetric method.

られる。また培養2—5日の間に認められた H₂ は大部分が H₂S の生成に利用され、この間の CH₄ 生成は極めてわずかであった。その後 H₂ は7—40日に検出され、この H₂ の生成に伴い前半の CH₄ が生成された。なお、この後半の H₂ は、Soap の分解により生成されたものと推測される。更に CH₄ は70—100日に急激な増加を認めた。この間 H₂ は全く検出されず、また CO₂ もはっきりと増加傾向を示していることから、この後半の CH₄ 生成は、Soap とグルコースの分解中間体から直接生成されたものと推測される。

2. AE の生分解

Fig. 2 は、AE の生分解試験の結果である。培養10日間の H₂, CH₄, CO₂, H₂S のガス発生パターンの傾向は、

グルコースの場合 (Fig. 1(A)) と類似していた。H₂ については、20—40日に大きな生成ピークを認め、その時期と前後して H₂S と CO₂ の増加が認められた。このように、H₂ 生成については、Soap と同様に、グルコースに由来する H₂ 生成の終了後に再び認められた。ところが、Soap の場合は H₂ の生成に伴い CH₄ が生成されたが、AE の場合には CH₄ の生成開始時期が Soap に比べて遅れた。これはおそらく、AE がメタン生成細菌の生育を抑制しているためと考えられる。

3. AES と AOS の生分解

Fig. 3 は、すでに報告した好気条件における生分解試験¹²⁾において中程度の生分解性を示した AES (A) と AOS (B) の嫌気条件における生分解試験の結果である。

Fig. 2. Time Courses of Production of H₂, CO₂, CH₄ and H₂S from AE 8.2 Plus Glucose. The experiment was performed as described in Fig. 1 except for carbon sources as described.

Fig. 3. Time Courses of Production of H₂, CO₂, CH₄ and H₂S from AES 3.0 Plus Glucose (A) and AOS Plus Glucose (B).

The experiment was performed as described in Fig. 1 except for carbon sources as described.

いずれの場合も、培養初期の H_2 , CH_4 , CO_2 , H_2S のガス発生パターンは、 H_2 生成量が少ない点を除いて、グルコースの場合 (Fig. 1(A)) と類似していた。 CH_4 と CO_2 を合わせた最終的な全ガス発生量は、グルコース単独の場合とほぼ同程度又はわずかに上回った程度であった。したがって、生成した CO_2 , CH_4 の大部分は、グルコースの分解に由来するものと推測される。一方、分解停止時の106日目の MBAS 除去率を測定したところ、AES が42%、AOS が17%であった。このことから、AES と AOS は共に究極的生分解には至っていないが、一次的生分解は進行しているものと考えられる。

4. LAS と APE の生分解

Fig. 4 は、分子内にベンゼン環を持つ LAS (A) と APE (B) の生分解試験の結果である。 CH_4 , CO_2 , H_2S のガス発生パターンは、全体的にグルコース単独の場合

と類似していたが、メタン発酵開始までの時間が、他の界面活性剤と比べて最も長く、90日以上を要した。LAS について、メタン発酵が停止している182日目の MBAS 除去率を測定したところ、23%であったことから、究極的生分解には至っていないが、LAS 自身も何らかの一次的生分解を受けているものと考えられる。この一次的生分解は、最終的な CO_2 の発生量がグルコース単独の場合とそれほど変わらないことから、脱スルホン化の可能性も考えられる。一方、AE と同じポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤の APE は、AE と同様にグルコースに由来する H_2 生成の終了後に、AE の場合より遅れて H_2 の生成が認められた。また CH_4 の生成時期も AE より20日程遅れた。これは APE 分子中の分枝鎖型アルキル基とベンゼン環の存在が分解を遅らせる原因になっているものと考えられる。

Fig. 4. Time Courses of Production of H_2 , CO_2 , CH_4 and H_2S from LAS Plus Glucose(A) and APE 9.0 Plus Glucose(B)

The experiment was performed as described in Fig. 1 except for carbon sources as described.

5. 各種界面活性剤の生分解率の比較

Fig. 5 は、各界面活性剤の生分解曲線を示したもので

Fig. 5. Anaerobic Biodegradation of LAS, AOS, AES 3.0, APE 9.0, AE 8.2 and Soap in the Presence of Glucose

The percent biodegradation was calculated from the following equation: $[(CH_4-C) + (CO_2-C)] / TOC \times 100$. The estimated value of final biodegradation of glucose (10 mg TOC) was shown by dotted lines. Symbols: ●, LAS (10 mg TOC) plus glucose (10 mg TOC); ▲, AOS (10 mg TOC) plus glucose (10 mg TOC); ■, AES 3.0 (10 mg TOC) plus glucose (10 mg TOC); ○, APE 9.0 (10 mg TOC) plus glucose (10 mg TOC); △, AE 8.2 (10 mg TOC) plus glucose (10 mg TOC); □, Soap (10 mg TOC) plus glucose (10 mg TOC).

ある。また Table II は、分解停止時における究極的生分解の結果である。生分解率は、嫌気条件下の炭素源の最終分解産物を CH_4 と CO_2 と考え、投入炭素量に対する CH_4-C と CO_2-C の和の百分率で表した。なお Table II に示した NES は、一般の家庭用合成洗剤には含まれていない界面活性剤であるが、構造と生分解性との関係を詳細に検討するために用いた。

一連の生分解実験を通して、最も易分解性を示した AS が分解停止までに要した期間の105日、15週¹⁰⁾ を基準にして、各々の界面活性剤の生分解性を比較すると、

Fig. 5 の結果から、

(AS, Soap) > AE > (AES, AOS) > (APE, LAS)

の順であった。ただし、AS は前報¹⁰⁾ の結果を用いた。

この場合、APE と LAS は CH_4 生成が遅れるために、105 日では想定されるグルコース分の生分解率に達していない。そこで、最終的な生分解度 (Table II) から生分解性を比較すると、

(AS, Soap) > AE > (APE, AES, NES) > (AOS, LAS)

の順であった。ただし AE, APE, AES については、オキシエチレンの付加モル数が異なる同族体の平均値で生分解性を比較した。

TABLE II. Production of CH_4 and CO_2 in the Anaerobic Biodegradation of Various Surfactants, and its Percent Biodegradation

Carbon source (mg TOC)	Experiment ^{a)}	Incubation time (d)	Gas production		Biodegradation ^{b)} (%)
			CH_4-C (mg)	CO_2-C (mg)	
AS (10) +glucose (10) ^{c)}	1	103	8.5	6.6	76
	2	105	9.3	6.2	77
Soap (10) +glucose (10)	4	112	9.4	5.7	76
AE 8.2 (10) +glucose (10)	4	112	6.8	6.5	67
	5	112	6.5	5.8	62
AE 8.7 (10) +glucose (10)	5	112	6.9	6.1	65
APE 9.0 (10) +glucose (10)	4	126	5.0	4.8	49
APE 9.7 (10) +glucose (10)	6	98	5.1	5.1	51
AES 3.0 (10) +glucose (10)	3	98	4.0	4.8	44
	5	98	3.8	4.6	42
AES 8.7 (10) +glucose (10)	5	84	3.1	4.4	38
NES 9.7 (10) +glucose (10)	6	84	3.4	4.3	39
AOS (10) +glucose (10)	3	98	2.3	4.5	34
	6	91	3.1	4.1	36
LAS (10) +glucose (10)	3	126	2.5	4.1	33
	6	112	2.0	4.7	34

a) Sewage sediments used were collected in the following period: 1, April 1984; 2, August 1984; 3, April 1985; 4, May 1985; 5, November 1985; 6, December 1985.

b) Biodegradation (%) = $[(CH_4-C) + (CO_2-C)] / TOC \times 100$.

c) Reference: Itoh *et al.* (1986).

考 察

環境生態系には、界面活性剤以外にも有機物が多種多量に存在している。Horvath ら¹³⁻¹⁵⁾ は有機塩素系農薬等の環境汚染物質の分解に、共代謝が非常に重要な役割を果たし、界面活性剤のアルキルベンゼンスルホン酸塩の分解時にも、エネルギー源としてグルコースを添加すると、分解速度の向上が認められたと報告している。また Wickbold¹⁶⁾ も栄養物存在下で同様の現象が起こると報告している。我々も、アルキル硫酸塩 (AS) の分解時にグルコースを AS と等量添加すると、グルコースの添加により AS の分解速度が促進され、再現性も向上することを認めた。¹⁰⁾ そこで今回の実験でも、有機物が多種多量に共存する複雑な環境生態系の最も単純なモデルとして、等量混合実験を採用した。

等量混合実験の場合、生分解率は界面活性剤単独の値ではなく、グルコースの分解量も含んだ値になる。したがって理論的には生分解率が50%以上になってはじめて、界面活性剤分の分解が確実に証明されるが、実際にはグルコース単独でも100%の生分解率に達しない。おそらく、炭素の一部が細菌体内に資化利用されるためと考えられる。炭素量 10 mg のグルコース 単独添加実験

の結果では、グルコース単独の生分解率は67—72%で平均 ($n=4$) 70%であった。この量は炭素量 20 mg の等量混合実験の最終分解率に換算すると $35 [70 \times (10/20)]$ %に相当する。したがって、この等量混合実験において界面活性剤に起因する分解量は、生分解率が35%を超える分と判断できる。

Fig. 6 は、今回の一連の実験 (Table II 参照) から得られた界面活性剤の分子構造と生分解性との関係を要約したものである。なお、AE, APE, AES については、それぞれの同族体の結果を網羅するように図示した。一般に疎水基が直鎖型の炭化水素から構成されている界面活性剤は、易分解性であった。例えば、AS+glucose の生分解率は76—77%、Soap+glucose は76%で、グルコース (炭素量 20 mg) 単独の平均分解率79%と比較して、AS, Soap がグルコース並に易分解性であることが認められた。ところが、分子内にベンゼン環、オキシエチレン鎖などの構造を持つ界面活性剤は、生分解率が低くなることが認められた。例えば、ベンゼン環を持つ APE 9.0+glucose の生分解率は49%、持たない AE 8.7+glucose は65%であった。オキシエチレン鎖についてみると、AES 3.0+glucose の生分解率は42—44%、AS+

Fig. 6. Biodegradabilities of Surfactants in the Presence of Glucose under Anaerobic Condition
 Symbols: R, alkyl group; n, average number of ethylene oxide; squares, anionic surfactants; circles, nonionic surfactants; , surfactants containing straight-chain alkyl group; , surfactants containing ethoxylate chain, branched alkyl group or benzene ring.

glucose は76—77%で、オキシエチレン鎖を含む AES は含まない AS より生分解性が極めて悪いという結果であった。またベンゼン環とオキシエチレン鎖の2つの構造を持つ NES 9.7+glucose の生分解率も非常に悪く、39%であった。このように難分解性の程度は、ベンゼン環、オキシエチレン鎖などの構造の種類、数等によって支配されていることが明らかになった。

次に親水基の構造をイオン型別に検討したところ、オキシエチレン鎖を含む界面活性剤の中では、親水基の末端が非イオン型の方が、硫酸エステル塩型より易分解性であるという興味ある結果が得られた。例えば、AE 8.7+glucose の生分解率は65%、AES 8.7+glucose は38%で、非イオン型の AE の方が、硫酸エステル塩型の AES より易分解性であった。また APE 9.7+glucose は51%、NES 9.7+glucose は39%で、非イオン型の APE の方が、硫酸エステル塩型の NES より易分解性だった。

更に、直鎖の疎水基を持つアニオン界面活性剤について検討したところ、AS+glucose, Soap+glucose, AOS+glucose の結果から、硫酸エステル塩型、カルボン酸塩型の界面活性剤は、スルホン酸塩型より極めて易分解性であった。また同じ硫酸エステル塩型でも、AES のようにオキシエチレン鎖を含むと、生分解性が一転してスルホン酸塩並に悪くなることが明らかになった。

オキシエチレン鎖の付加モル数が生分解性に及ぼす影響をみてみると、アニオン界面活性剤の AES の場合も、また非イオン界面活性剤の APE, AE の場合にも、今回の付加モル数 (n) 程度の違い ($3 \leq n \leq 9.7$) では、生分解性への影響は認められなかった。

以上のように、同一試験法を用いて、ほとんど知られていなかった嫌気条件における界面活性剤の分子構造と生分解性との間の関係の一端を明らかにすることができた。

引用文献

- 1) Standard Methods Committee on Biodegradability, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **39**, 1232 (1967).
- 2) R.D. Swisher, "Surfactant Biodegradation," Marchel Decker, Inc., New York, 1970.
- 3) 北原文雄, 早野茂夫, 原 一郎編, "界面活性剤の分析と試験法," 講談社, 東京, 1982, pp.329—355.
- 4) 安部喜也, 陸水学雑誌, **33**, 44 (1972).
- 5) 環境庁保健調査室発行, 化学物質と環境, 昭和54年度版ケミカルアセスメントレポート.
- 6) H. Hon-Nami, T. Hanya, *Jpn. J. Limnol.*, **41**, 1 (1980).
- 7) 宇都宮暁子, 伊藤伸一, 内藤昭治, 下里武治, 衛生化学, **26**, 159 (1980).
- 8) 吉村孝一, 林 克己, 川瀬次朗, 辻 和郎, 陸水学雑誌, **45**, 51 (1984).
- 9) J. Steber, P. Wierich, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 530 (1985).
- 10) 伊藤伸一, 内藤昭治, 畝本 力, 衛生化学, **32**, 101 (1986).
- 11) D.C. Abbott, *Analyst* (London), **87**, 286 (1962).
- 12) 伊藤伸一, 節田節子, 宇都宮暁子, 内藤昭治, 油化学, **28**, 199 (1979).
- 13) M.A. Benarde, B.W. Koft, R. Horvath, L. Shaulis, *Appl. Microbiol.*, **13**, 103 (1965).
- 14) R.S. Horvath, B.W. Koft, *Appl. Microbiol.*, **23**, 407 (1972).
- 15) R.S. Horvath, *Bacteriol. Rev.*, **36**, 146 (1972).
- 16) R. Wickbold, *Tenside Deterg.* **12**, 25 (1975).