合成洗剤の微生物による生分解に関する研究

Studies on Biodegradation of Synthetic Detergents by Microorganisms

千葉大学腐敗研究所 (主任 相磯和嘉教授)

大 場 健 吉

Kenkichi Ōba

The Institute of Food Microbiology, Chiba University, Chiba

Most houses in Japan were provided with cesspool- or septic tank-percolation field system for domestic sewage disposal. The author carried out a two-year test on biodegradation of linear alkylate sulfonate (LAS) under the cesspool-percolation field, prior to the detergent conversion to biodegradable surfactants. Good drainage was sustained with the test LAS cesspool in comparison with the former ABS cesspool; so the test cesspool-percolation field system maintained an unsaturated soil condition.

Under aerobic and anaerobic conditions, analysis on bacterial flora of the LAS cesspool was carried out on soil and waste taken from the cesspool. Among LAS assimilable bacterial species as *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacter*, *Paracolibacterium*, *Alcaligenes* and *Pseudomonas*, a *Pseudomonas* sp. appeared to play the main role in the process of surfactant biodegradation. The *Pseudomonas* was named as *Pseudomonas surfactassimilis* nov. sp..

Taxonomical characteristics of *Pseudomonas surfactassimilis* nov. sp. are as follows;

The strain is Gram-negative rods and motile with a polar flagellum. Branching is not found.

Rods: 0.4 to 0.6 by 1.2 to 1.5 microns.

Nutrient agar colonies: Circular, smooth, entire, flat, yellowish gray.

Nutrient agar slant: smooth, glistening, translucent, yellowish gray, medium unchanged.

Potato: Growth moderate, creamy to yellowish gray.

Litmus milk: Unchanged.

Aerobic, facultative.

Non fluorescence on King's media.

Catalase: Negative.

Kovacs' oxidase test: Positive.

Gelatin Stab: No liquefaction.

Nitrates: Not reduced.

Acetylmethyl carbinol: Not produced.

Urease: Negative.

Indol: Not produced.

Hydrogen sulfide: Not produced.

Ammonium citrate: Not utilized.

Starch: Not hydrolyzed.

Casein: Not hydrolyzed.

Cellulose: Not attacked.

Glucose, lactose, sucrose: Not fermented.

Citric acid, tartaric acid, succinic acid, acetic acid, fumaric acid: Used as a sole source of carbon.

Valeric acid, propionic acid, butyric acid: Not utilized as a sole source of carbon, but used under existence of vitamins.

Phenol (1%): Growth observed after twice inoculation on synthetic broth as a sole source of carbon.

Surfactants with straight alkyl chain: Utilized as a sole source of carbon.

Temperature relations: 20-37°C, optimum 30°C.

Optimum pH: 7.0

Source: Isolated from soil and waste of cesspool.

When waste water was treated under aerobic circumstances, surfactants with straight alkyl chain could be decomposed by biological oxidation to the extent comparable with, or more than, the degradation of general organic substances. The cesspool-percolation field system easily maintained an unsaturated condition to avoid excessive ponding in the percolation field by periodic supply of waste water which provided aerobic condition.

1. 緒 言

欧米先進国に比べわが国の一人当たりのセッケンおよび洗剤の消費量は世界30位程度と依然低いとはいえ、その総生産量は近年目ざましいのびを示している。すなわち、1969年度の総生産量約78万7千トンは1950年と1960年に比べそれぞれ8.2倍、1.8倍にあたり、そのうち合成洗剤の占める割合は80%強である。

合成洗剤原料(界面活性剤)は多種多様であるが、なかでもテトラプロピレン系のアルキルベンゼンスルホン酸塩(ABS)は家庭用合成洗剤の主原料として世界的に広く活用されていた。しかし、このABS系合成洗剤は自然環境中で微生物による分解をうけにくく、水質汚濁の一因子となった¹⁾。その解決策として微生物によって分解されやすい生分解性洗剤への転換(合成洗剤のソフト化)が、イギリス、ドイツ、アメリカ、ついで日本で計られており^{2)~7)}、その主流は直鎖ABS(Linear Alkylate Sulfonate: LAS)である。

排水が活性汚泥法などの終末処理設備で好氣的に処理される状況下では、BOD、CODを指標とした下水中の可溶性一般有機物の除去と同程度以上にLASは生分解により除去されるので、下水道普及率の高い欧米では合成洗剤ソフト化の成果がえられている^{8)~13)}。しかしながら、わが国では下水道普及率が極めて低いため¹⁴⁾、著者らの報告^{15)~17)}のように、合成洗剤ソフト化の効果は十分発揮されていない。また、多くの家庭排水はそのまま河川へ放流されたり、地下吸込式家庭排水処理槽(セスプール)や一部浄化槽で処分されている現状である。とくにこのような地下吸込式の排水処分方法は、有機物一般の生分解効率も悪い比較的酸素のとばしい条件である。このため、このような排水処分系におけるLASを中心とした生分解性洗剤の挙動についての研究が、わが国では必要である。

著者らは合成洗剤ソフト化の開始に先だち1963年末1家庭にセスプールを新設して、LAS系洗剤を専用する2年間の野外試験を行なった。この試験の経緯として、間けつ的な排水の流入によってセスプールは水不飽和の状態で維持でき、近接した浅井戸への洗剤残分の混入が

実験期間中認められなかったことおよび下部土壌と汚水を生物源とした好氣的、嫌氣的条件下でのLASの生分解性などについてはすでに報告した^{18)~20)}。本報においては、LASの生分解に関与するセスプールのBacterial floraの構成と順化過程におけるその変化の状況、主要分解菌の確認と同定、吸着および生分解の様相並びに生分解生成物の代謝状況など該当菌によるLASの分解機序についての従来報告されていない微生物学的情報、およびアルキル硫酸エステル塩系界面活性剤の生分解性を例とした、酸素のとばしい条件下での界面活性剤の生分解性を考える際に必要な基礎的知見、一般有機物の生分解性という立場からみた際のセスプール中の微生物による界面活性剤の生分解性の程度とセスプールによる排水処分法の限界、などの問題点について研究した。

2. 実験および結果

2.1 LAS生分解菌の検索

2.1.1 セスプール土壌のBacterial floraとそのLAS生分解能力

LAS専用セスプールの底部から約10cm下、地表面下1.3mの所から採取(1965年1月15日)した土壌を試料として、普通ブイオン寒天培地とLAS合成培地[NH₄Cl: 0.5g, KH₂PO₄: 2.0g, (NH₄)₂SO₄: 0.5g, Na₂HPO₄: 3.0g, Mg₂SO₄·7H₂O: 0.01g, agar: 15.0g, LAS(Continental Oil Co. 製直鎖アルキルベンゼン Nalkane 500のスルホン酸ナトリウム): 2.0g, 水: 1L]とを用いた平板培養法により、好氣的および嫌氣的(黄リン燃焼法)条件下で生菌数の測定を行ない、計数後適当な深部コロニーの発生をみた平板から全コロニーの釣菌を行ない、Bacterial floraの構成をしらべた。

好氣的培養の場合は普通寒天培地およびLAS合成培地のいずれからも菌株の分離を行なったが、嫌氣的培養の場合深部コロニーの発育状況が悪いため、LAS合成培地からは菌株の分離は行なえなかった。

そのため、LAS合成寒天培地の組成から寒天を除いた組成のLAS合成液体培地に同じ土壌試料少量を添加し、好氣的、嫌氣的に30℃、115hr培養して増菌処理を行なった。この菌懸濁液をLAS合成培地に塗抹し、30℃、

Table 1 Bacterial flora of soil of bottom of LAS cesspool analyzed without acclimatization procedure

Isolation	Medium	Viable count	Bacterial flora	Frequency (%)
Aerobic	Nutrient agar	2.5×10 ⁶ /g	LAS assimilable <i>Escherichia freundii</i> (Citrobacter) <i>Aerobacter cloacae</i> (Cloacae) <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> (Hafnia) LAS non-assimilable	92 44 16 32 8
	LAS synthetic agar	4.6×10 ⁵ /g	LAS assimilable <i>Aerobacter aerogenes</i> (Klebsiella) <i>Escherichia freundii</i> (Citrobacter) <i>Aerobacter cloacae</i> (Cloacae) <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> (Hafnia) LAS non-assimilable	83 24 4 18 37 17
Anaerobic	Nutrient agar	1.4×10 ⁶ /g	LAS assimilable <i>Escherichia freundii</i> (Citrobacter) LAS non-assimilable	79 79 21
	LAS synthetic agar	2.8×10 ⁵ /g	Isolation impossible. Poor growth	—
Aerobic*	LAS synthetic agar	—	LAS assimilable <i>Aerobacter aerogenes</i> (Klebsiella) <i>Escherichia freundii</i> (Citrobacter) <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> (Hafnia)	100 4 4 92
Anaerobic*	LAS synthetic agar	—	LAS assimilable <i>Aerobacter aerogenes</i> (Klebsiella) <i>Escherichia freundii</i> (Citrobacter) <i>Aerobacter cloacae</i> (Cloacae) <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> (Hafnia)	100 12 6 23 59

* Isolated after incubation of LAS synthetic liquid medium containing soil sample for 115hr at 30°C

96hr 好氣的，嫌氣的培養を行なってそれぞれ生育菌株を分離した。分離菌株の継代は好氣性分離株の場合普通スラントで，嫌氣性分離株の場合肝片加ブイヨンあるいは普通高層寒天で行ない，菌株の同定を行なった。この結果を Table 1 にまとめて示す。

普通寒天培地から分離した菌株は LAS 合成寒天培地上での生育性を調べ，LAS を利用できる菌株について，形態，グラム染色性，Kovacs' oxidase test と Hugh and Leifson's test を行なった結果 Enterobacteriaceae であったので，Kauffmann の分類に準じて同定を行なった。

次いでこれらの菌株は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th. Ed.) の記載に準じた分類を行なった。

Table 1 では Bergey による分類と，カッコ内に Kauffmann の分類による結果を付記した。

人工下水²¹⁾に 22.3mg/l の LAS を添加したものに *Aerobacter aerogenes* (Klebsiella), *Paracolobactrum aerogenoides* (Hafnia), *Aerobacter cloacae* (Cloacae), *Escherichia freundii* (Citrobacter) を移植して好氣的(振とう培養)および嫌氣的に 30°C に保ち，LAS の生分解性をしらべた。生分解度は培養期間内の LAS 濃度の減少率として求め，その濃度測定は LAS を検量用標準物質としたメチレンブルー比色法²²⁾によった。その結果は Table 2 のようで，LAS の生分解は緩慢であった。

これらの Enterobacteriaceae を約 4 ヶ月間に 3 回普通寒天培地に継代したのちその生分解能力を検討した結果，純培養菌株による LAS 生分解度は 8 日後ほぼゼロであったが，全菌株を混合した場合 16.0% の生分解度を示した。このように継代によって生分解能力の低下がみとめられた。

Table 2 のように，嫌氣的条件下における純培養菌株

Table 2 Biodegradability of LAS by Enterobacteriaceae isolated from LAS cesspool

Condition	Isolated culture	Biodegradability*	
		10days (%)	18days (%)
Aerobic (shaking)	<i>Escherichia freundii</i> (<i>Citrobacter</i> B-14)	8.5	22.4
	<i>Paracolobactrum aerogenoides</i> (<i>Hafnia</i> D-3)	21.1	35.0
	<i>Aerobacter cloacae</i> (<i>Cloacae</i> D-23)	14.8	98.7**
	<i>Aerobacter aerogenes</i> (<i>Klebsiella</i> D-22)	13.0	100.0
Anaerobic (storage)	<i>Escherichia freundii</i> (<i>Citrobacter</i> B-14)	8.5	18.4
	<i>Paracolobactrum aerogenoides</i> (<i>Hafnia</i> D-3)	12.1	17.5
	<i>Aerobacter cloacae</i> (<i>Cloacae</i> D-23)	21.1	23.8
	<i>Aerobacter aerogenes</i> (<i>Klebsiella</i> D-22)	30.0	31.0

* Synthetic sewage containing LAS
Initial LAS concentration: 30mg/l

** After 45 days

による LAS の生分解性は良好ではなく、好氣的にはほぼ100%の生分解性を示す *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella* D-22) の例でも嫌氣的には約30%程度であった。

以上のように、LAS セスプールには污水細菌である通性嫌気性の Enterobacteriaceae が存在し、好氣的あるいは嫌氣的に、緩慢ながら LAS の生分解に関与していることがわかる。

2.1.2 順化混合汚水中の LAS 生分解菌

セスプールの污水に人工下水²¹⁾を順次加えつつ開放放置することにより、LAS が迅速に生分解される順化混合汚水系が調製できることはすでに報告した¹⁹⁾。このような順化系の Bacterial flora を調べるため、LAS セスプールの底部の土壌 (1965年10月28日採取) を生物源とし、既報¹⁹⁾の方法に準じて、LAS が迅速に生分解される順化混合汚水系を調製した。えられた順化混合汚水系の LAS の生分解能力は、LAS 20mg/l 添加 24hr 後83.2%、48hr 後91.9%であった。

この順化混合汚水を LAS 合成培地²³⁾組成の寒天平板を用いて10倍希釈法で混釈し、30℃、48hr 培養後生育した深部コロニーを鈎菌することにより、その中の菌株を分離同定し、Bacterial flora を調べた。また、その代表的純培養菌株の LAS 生分解能力を前項記載と同様に測定した。その結果を Table 3 に示す。

順化混合汚水中には *Aerobacter* sp. (以下 Species を

Table 3 Bacterial flora of LAS-acclimated mixed liquor originating from soil of LAS cesspool and biodegradability of LAS by isolated cultures

Culture	Frequency (%)	Biodegradability*(%)
<i>Micrococcus</i> (K-1, 7, 8) sp.	39	19
<i>Aerobacter</i> (<i>Cloacae</i> , K-2, 9) sp.	13	45
<i>Alcaligenes</i> (K-3) sp.	8	8
<i>Aerobacter</i> (K-4) sp.	20	23
<i>Pseudomonas</i> (K-5) sp.	16	97
<i>Flavobacter</i> (K-6, 10) sp.	4	19
Mixed culture (K-1~10)	—	95-97
Acclimated liquor (Source)	—	98

* Shaking culture; 30℃, 24hr. Synthetic sewage containing LAS

Initial LAS concentration; 20mg/l

sp. と略す), *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp. が多く存在し、全純培養菌株はいずれも LAS を生分解する。*Pseudomonas* 純培養株の場合および全分離株を共存させた場合、いずれも順化混合汚水と同程度の高い LAS の生分解性が再現されることから、順化混合汚水系中で *Pseudomonas* sp. が LAS の生分解に支配的であるとみられる。

2.1.3 LAS セスプールからの代表的分離株による LAS の生分解性

さらに、LAS セスプールから分離した代表的な全菌株11種を用いて、おのおの純培養の場合および全株を共

Table 4 Biodegradability of LAS by typical cultures obtained from LAS cesspool

Culture	Biodegradability*(%)
<i>Proteus</i> (<i>Morganella</i> , L-2)	33
<i>Aerobacter</i> (<i>Klebsiella</i> , L-4)	37
<i>Micrococcus</i> (L-5)	28
<i>Aeromonas</i> (L-6)	27
<i>Escherichia</i> (<i>Citrobacter</i> , L-10)	22
<i>Paracolobactrum</i> (<i>Hafnia</i> , L-11)	23
<i>Aerobacter</i> (K-4)	35
<i>Pseudomonas</i> (K-5)	74
<i>Flavobacter</i> (K-6)	31
<i>Aerobacter</i> (<i>Cloacae</i> , K-9)	32
<i>Alcaligenes</i> (J-20)	20
Mix culture excluding <i>Pseudomonas</i> (K-5)	22
Mix culture including <i>Pseudomonas</i> (K-5)	98

* Shaking culture; 27℃, 24hr. LAS synthetic medium

Initial LAS concentration; 30mg/l

存させた場合と *Pseudomonas* (K-5) sp. だけを除く菌株を共存させた場合の LAS の生分解試験を行なうことにより、LAS の生分解に対する *Pseudomonas* sp. の関与を確かめようとした。その結果は Table 4 に示すとおりであり、*Pseudomonas* sp. が LAS の生分解に主要な役割をもつことが確認された。

2.1.4 順化処理過程における LAS セスプールの Bacterial flora の変化

2.1.2 に述べたように順化系において LAS の生分解には *Pseudomonas* sp. が主要であるが、このような順化の間に Bacterial flora の変化があるものと考えられた。それを調べるため、LAS セスプールの汚水と土壌(1965 年 7 月 15 日採取)をそれぞれ LAS 合成培地²³⁾に接種し、6 日間 27°C で振とう培養した。さらに同じ合成培地に移植し、6 日間培養し順化処理を行なった。その間の Bacterial flora の変化を Table 5 に示す。

LAS セスプールの汚水を生物源とした場合は一次の培養時に、土壌の場合は二次の培養時に、それぞれ急激な LAS の生分解が認められ、その際いずれも *Pseudomonas* sp. が dominant となっていることが認められた。

Table 5 Change of Bacterial flora of LAS cesspool during LAS-acclimatization process

Source of microorganisms	Culture	Frequency (%)	
		After 1st incubation	After 2nd subculture
Soil	<i>Paracolibacterium aerogenoides</i> (Hafnia) sp.	nearly 100	—
	<i>Pseudomonas</i> (K-5) sp.	—	74*
	<i>Aerobacter cloacae</i> (Cloacae) sp.	—	4
	<i>Alcaligenes</i> (K-3) sp.	—	22
Sewage	<i>Pseudomonas</i> (K-5) sp.	99*	3
	<i>Paracolibacterium aerogenoides</i> (Hafnia) sp.	1	3
	<i>Aeromonas liquefacience</i> (<i>Aeromonas</i>) sp.	—	94

* LAS biodegradation in progress

2.1.5 純培養菌株混合による LAS 生分解時の Bacterial flora の変動

2.1.3 で述べた代表的な全分離株をあらかじめ同量比で共存させて LAS の生分解を行なわせ、その間の各純培養菌株の存在比率の変化を調べた。これは前項に述べたセスプールの Bacterial flora のように順化培養処理の過程で LAS の生分解時に *Pseudomonas* sp. が dominant となり、次いで *Aeromonas* sp. が dominant

となる変化を確かめる上の一傍証として行なったモデル実験である。供試菌株はすべて LAS 合成培地であらかじめ 24hr 培養し、移殖継代による順化を 3 回行なったものを用いた。生菌数の測定は普通寒天培地を用いて 10 倍希釈による 30°C 培養法によった。結果をまとめて Table 6 に示す。この結果からも、LAS の生分解の過程で *Pseudomonas* sp. から *Aeromonas* sp. へ Bacterial flora が変化することが示された。

Table 6 Change of Bacterial flora during LAS biodegradation test with mix culture of typical isolates obtained from LAS cesspool

Incubation time		at start	24hr	48hr
Viable count		6.5×10^7 /ml	4.3×10^9 /ml	4.1×10^8 /ml
Inocula				
<i>Pseudomonas</i> (K-5)			36(%)	6(%)
<i>Micrococcus</i> (L-5)			8	—
<i>Aeromonas</i> (L-6)			16	94
<i>Paracolibacterium</i> (L-11)			10	—
<i>Aerobacter</i> (K-9)			10	—
<i>Escherichia</i> (L-10)			6	—
<i>Aerobacter</i> (L-4)			14	—
<i>Alcaligenes</i> (J-20)			—	—
<i>Proteus</i> (L-2)			—	—
<i>Flavobacter</i> (K-6)			—	—
<i>Aerobacter</i> (K-4)			—	—

2.2 LAS 生分解に関与する主要菌、*Pseudomonas* sp. の同定と LAS の生分解能力

2.2.1 主要 LAS 生分解菌 *Pseudomonas* sp. の同定

LAS セスプールから分離される *Pseudomonas* sp. は LAS の生分解に主要な役割をもつ。分離株の type culture である *Pseudomonas* K-5 株の同定を、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th. Ed.) の記載に準じて行なった。*Pseudomonas* Strain No. K-5 の分類上の特性を調べた結果をまとめて示す (Photograph 1. 参照)。

0.4~0.6 μ ×1.2~1.5 μ のグラム陰性桿菌

単毛、Branching せず

普通寒天集落：類円形，周縁平滑，表面滑らか，偏平，黄色がかった灰色

普通寒天斜面培地：表面滑らか，光沢，透明，黄色がかった灰色，培地不変

馬鈴薯培地：発育良好，クリーム色から灰色

通性嫌気性

螢光：陰性 (King の培地)

カタラーゼ：陰性
 Kovacs' oxidase test：陽性
 ゼラチン：液化せず
 リトマスミルク：不変
 硝酸塩：還元せず
 アセチルメチルカルビノール：産生せず
 尿素：分解せず
 インドール：産生せず
 硫化水素：産生せず
 クエン酸アンモニウム：利用せず
 デンプン：水解せず
 カゼイン：水解せず
 セルロース：分解せず
 グルコース、シュクロース、ラクトース：酸を産生せず
 クエン酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、フマル酸：唯一の炭素源として利用する
 吉草酸、プロピオン酸、酪酸：ビタミン混液存在下のみ唯一の炭素源として利用する
 フェノール(1%)：唯一の炭素源として2回継代まで発育
 増殖温度：25~37℃ 最適 30℃
 pH：最適 7.0

Photograph 1. Morphology of *Pseudomonas surfactassimilis* cultured 24hrs. at 30°C on nutrient agar. Gram stain. ×1500

以上の生物性状からみて、この菌株は従来の記載にある *Pseudomonas oleovorans* および *Pseudomonas denitrificans* に類似した生物性状をもつものである。しかしながら、*Pseudomonas oleovorans* はスターチを加水分解し特性として螢光を示し好気性であるのに対し、本菌株はそれらの特性がなく、通性嫌気性である点で異なる。

また、*Pseudomonas denitrificans* とは本質的な脱窒作用がない点で異なり、最適温度などにおいても異なるものである。Bergey の分類においても、また、このような生物性状をもつ点で一致した既報告もみられないことから新種とみなしうる。この type culture は界面活性剤の酸化分解、資化を容易に行ないうるものである点に着目して、*Pseudomonas surfactassimilis* (nov. sp.) と命名することとした(微生物工業技術研究所寄託保存)。

2.2.2 *Pseudomonas surfactassimilis* の増殖とLASの生分解

a) 静置培養時

普通寒天培地上で 30℃, 48hr 培養した *Pseudomonas surfactassimilis* を LAS 合成液体培地²³⁾に移殖し、30℃で静置培養を行なうことにより、その増殖の状況とLASの生分解性との関係を検討した。生菌数の測定は普通寒天培地を用いる10倍希釈による平板混釈法 (30℃, 96hr 培養後判定) で行ない、全菌数の変動は LAS 合成液体培地の濁度を 10mm 厚セルを用いて日本精密光学製 HTR メーターで測定することによりしらべた。LAS の生分解性はメチレンブルー比色法²⁴⁾で測定した液体培地中の残存 LAS 濃度の変化として求めた。その結果を Fig. 1 に示す。

培養期間中、生菌数と全菌数の変化はいずれも同様な経時的増加の傾向を示した。また、LAS の生分解が一次直線的に急激に進行する際、両菌数はいずれも対数直線的な増加を示した。さらにメチレンブルー比色法で測

Fig. 1. Growth curve of *Pseudomonas surfactassimilis* on LAS synthetic medium and biodegradability of LAS in case of aerobic storage test at 30°C

定した液体培地中の残存 LAS がほとんどなくなったのちに、再び両菌数が対数的増加を示すことが認められた。

b) 振とう培養時

普通寒天培地上で48hr, 30°Cで培養した*Pseudomonas surfactassimilis*の1白金耳をDodecene-1 LAS 30mg/lを含む合成液体培地²³⁾に移殖し, 30°C, 24hr 振とう培養を行なったのち, 新しく同じ合成培地に継代する。この操作をくりかえし4回行なって LAS に順化させたものを供試菌とした。この順化菌液 50ml を 20mg/l および 30mg/l の LAS を含む合成液体培地 500ml 中に混合し, 30°Cで振とう培養を行ないつつ, 経時的に前項と同様にして生菌数と全菌数および LAS の生分解度²⁴⁾を調べた。その結果を Fig. 2 と Fig. 3 にそれぞれ示す。

Fig. 2 のように, 振とう培養中の生菌数と全菌数が

Fig. 2. Growth curve of *Pseudomonas surfactassimilis* on LAS synthetic medium in case of shake flask test at 30°C (Initial LAS concentration; 20mg/l, 30mg/l)

Fig. 3. Biodegradability of LAS by *Pseudomonas surfactassimilis* in case of shake flask test at 30°C (Initial LAS concentration; 20mg/l, 30mg/l)

いずれもともに同様な経時的増加の傾向を示す点は静置培養の場合と同じであるが, 増殖の程度の点では振とう培養の場合の方が静置培養時よりも1オーダー余も大であった。LAS の生分解性については, Fig. 3 のように静置培養時に比べてやや迅速であった。メチレンブルー比色法による判定で LAS の生分解がほぼ終了したあと, 静置培養の場合著明に認められた両菌数の増加は, 振とう培養の場合には明瞭でなかった。さらに, LAS の初発濃度のちがいが菌の増殖および LAS の生分解性におよぼす影響については, 初発濃度の高い場合の方が対数的増殖とそれに伴う LAS の生分解性の急激な進行に到るまでの遅滞期が長いという結果であった。

なお, *Pseudomonas surfactassimilis*の実験室的保存は, 普通寒天斜面培地による2~3ヶ月ごとの継代あるいは凍結乾燥(保存期1年間)によって行なうことができるが, 普通寒天培地による継代を3~4回くりかえすと LAS の生分解能力は若干低下した。それは LAS 合成培地に移殖し順化することによって容易に回復される。LAS への順化処理は, LAS 濃度をたとえば 10, 20, 30mg/l と順次高める方法によっても, またははじめから 30mg/l 程度でそのまま継代しても, ほぼ同様な結果を示した。

2.3 LAS の菌体への吸着と生分解性

*Pseudomonas surfactassimilis*が LAS などを生分解する際, まず菌体への吸着ととりこみが行なわれるとみられる。また, 一般に生物処理により排水を処分する場合, 生物酸化による物質の除去のほか, 生物体への吸着による除去も比較的重要な役割をはたすとされている。そこで *Pseudomonas surfactassimilis* に対する LAS の吸着性と引きつづいておこる生分解の過程を, LAS 非生分解菌である *Escherichia coli* (F-1) と *Bacillus subtilis* (PCI) を対照として検討した。

2.3.1 LAS³⁵ の菌体吸着性

Pseudomonas surfactassimilis, *Escherichia coli* (F-1) および *Bacillus subtilis* (PCI) の3種を普通寒天培地上で48~72hr, 30°Cで培養して, 供試菌とした。

LAS の菌体吸着性および生分解時の挙動を調べるため, S³⁵ 標識 LAS³⁵ (Sp. activity: 348.4cpm/100μg) を調製して用いた。この LAS³⁵ を pH 3.5, 7.2 および 8.5 の3種の緩衝液 (M/30, M/15 McIlvaine 氏緩衝液) に溶解し, それぞれの pH の緩衝液ごとに LAS³⁵ 濃度を 2, 20 および 100μg/ml の3種とし, 計9種の溶液を調製した。

上記菌体を遠沈管に一定量 (55~90mg 乾燥重量) と

り、20ml の pH 7.2 緩衝液に 20℃, 10min 懸濁させ菌体を洗浄した後、遠心分離 (3,000rpm, 20min) して上清を除去する。残った菌体に 20ml の上記 LAS³⁵ 溶液を加え、27℃ で 1hr 放置後同様に遠心分離して上清を採取する。この上清中の LAS³⁵ を β 線測定 (TEN-Counting SA-20 使用) により定量し、吸着 LAS³⁵ 重量 (菌体添加前の LAS³⁵ 量から遠心分離上清中の LAS³⁵ 量を差し引いたもの) を菌体重量で除した値を LAS³⁵ の菌体に対する吸着量とした。

Pseudomonas surfactassimilis, *Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* に対する LAS³⁵ の吸着性をそれぞれ Fig. 4, 5, 6 に示す。

LAS³⁵ の各種の菌体への吸着は、Fig. 4~Fig. 6 にみられるように、Freundlich の吸着式によくしたがうことがわかった。これより、Freundlich の吸着式 $A=A_0 \cdot C^{1/n}$ [C: LAS³⁵ の濃度 (mg/l), A_0 : C=1 のときの吸着量 (mg/g), A: LAS³⁵ 濃度 C のときの吸着量 (mg/g)] において、 A_0 と $1/n$ をもとめた結果を Table 7 にまとめて示す。

Pseudomonas surfactassimilis は *Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* と比べて A_0 値が小さく、LAS³⁵ の低濃度域で菌体へのとりこみ吸着性が低い、 $1/n$ 値

Table 7 Adsorption constants in the Freundlich isotherm equation in case of LAS³⁵ on three species of microorganisms
 $A=A_0 \cdot C^{1/n}$

<i>Pseudomonas surfactassimilis</i>			<i>Escherichia coli</i>		
const- pH	A_0	$1/n$	const- pH	A_0	$1/n$
3.5	0.14	1.19	3.5	0.28	0.93
7.2	0.13	0.94	7.2	0.28	0.84
8.5	0.10	1.03	8.5	0.28	0.86

<i>Bacillus subtilis</i>		
const- pH	A_0	$1/n$
3.5	0.35	0.93
7.2	0.34	0.83
8.5	0.35	0.83

Fig. 4. Adsorption of LAS³⁵ on *Pseudomonas surfactassimilis*

Fig. 5. Adsorption of LAS³⁵ on *Escherichia coli*

Fig. 6. Adsorption of LAS³⁵ on *Bacillus subtilis*

が他の2菌株の場合よりも大きく、LAS³⁵濃度の増加につれてとりこみの増大が顕著であった。

2.3.2 連続負荷時における *Pseudomonas surfactassimilis* による LAS³⁵ の吸着性と生分解性

LAS³⁵ を pH 7.2 の緩衝液 (M/30, M/15 McIlvaine 氏緩衝液) に溶解し、89.1 μ g/ml および 2,252.6 μ g/ml の2種の濃度の溶液を調製した。

LAS³⁵ 溶液 (89.1 μ g/ml) 50ml 中に前項記載と同じ菌体220.9mg (乾燥重量) を加え 27 $^{\circ}$ C に静置した。この間所定の経過時間ごとに溶液の一部にホルマリンを終濃度で1%添加して生分解反応を止め、遠心分離 (3,000 rpm, 30min) 後、上清中の LAS³⁵ をメチレンブルー比色法²²⁾で定量した。

Pseudomonas surfactassimilis の場合上清の LAS³⁵ の濃度が経時的に減少したので、LAS³⁵ 溶液 (2,252.6 μ g/ml) を適当量添加し、約 100 μ g/ml となるよう濃度補正を4回まで行なった。*Escherichia coli* と *Bacillus subtilis* の場合には、はじめ与えた LAS³⁵ は一部 *Pseudomonas surfactassimilis* の場合と同様に吸着されるが、その後は生分解されなかった。この状況を Fig. 7 に示す。

この結果から、生分解能力をもつ菌種とたたないもの

Fig. 7. Bio-sorption and/or biodegradation of LAS³⁵ by *Pseudomonas surfactassimilis*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in medium (McIlvaine buffer pH 7.2) at 27 $^{\circ}$ C

との相違は明確であり、LAS³⁵の連続的負荷において分解菌である *Pseudomonas surfactassimilis* の生分解能力は増強されている。

2.3.3 *Pseudomonas surfactassimilis* による LAS³⁵ の生分解時における S³⁵ の分布

前項で述べた *Pseudomonas surfactassimilis* による LAS³⁵ の生分解試験において、4 回目の LAS³⁵ の添加操作の 30min 後にホルマリンを添加して生分解反応を止めた。この LAS³⁵ の生分解溶液全量を遠心分離 (10,000 rpm, 5min) し、上清と菌体を分取して菌体について次の処理を行なった。

菌体全量に緩衝液 (pH 7.2, McIlvine 氏緩衝液) 10ml を加え、超音波破壊器で菌体を破壊 (10kc, 20min) したのち、遠心分離 (10,000rpm, 5min) して細胞質区分と細胞壁区分を分取し、細胞壁区分は緩衝液 5ml 中に懸濁させた。

えられた上清、細胞質液および細胞壁懸濁液の3区分について、S³⁵の分布状態を分析した。すなわち、S³⁵の放射能強度を測定して LAS³⁵ としての量に換算した値をもって分布状態をしらべた。また、上清および細胞質液の区分に存在する S³⁵ のうち、LAS³⁵ として存在する S³⁵ はメチレンブルー比色法²²⁾で測定することによってとめ、さらに S³⁵O₄⁻² は常法より BaS³⁵O₄ としてえられる結晶について S³⁵ の放射能強度を測定し、LAS³⁵ 換算値としてその存在量をもとめた。その結果をまとめて Table 8 に示す。

Pseudomonas surfactassimilis に LAS³⁵ を与えて生分解させると、Table 8 のように S³⁵ の分布は大部分培養液中にあり、その形態はメチレンブルーと複合体を形

Table 8 Distribution of S³⁵ after successive degradation of LAS³⁵ by *Pseudomonas surfactassimilis*

Fraction	Distribution of S ³⁵		Form of S ³⁵		
	Amount as LAS ³⁵	%	Type	Amount as LAS ³⁵	%
Supernatant	5,009μg	85.5	LAS ³⁵ ** SO ₄ ⁻² *	554μg 240	9.5 4.1
Protoplasm	426	7.3	LAS ³⁵ ** SO ₄ ⁻² *	267 201	4.6 3.4
Cell wall	420	7.2	LAS ³⁵ **	428	7.3
Total	5,885	100.0	—	—	28.9

* Radioisotopic measurement

** Methylene blue colorimetric measurement

成しえず界面活性剤として定量されない程度にまで変化をうけているが、無機質までの酸化分解には到っていない形のものが多い。菌体成分内に分布存在する S³⁵ の形態は、メチレンブルーとの複合体を形成し LAS³⁵ として定量されるものと無機質の S³⁵O₄⁻² とから成っており、とくに細胞壁区分に存在する S³⁵ は LAS³⁵ だけであった。また、S³⁵O₄⁻² が菌体の細胞内と培養液中の両方に存在していたことをも考慮に入れると、該当菌株による LAS³⁵ の生分解は菌体吸着ととりこみにより細胞内において進行するものとみられる結果であった。

2.4 セスプールの Microflora による各種の界面活性剤の嫌気的生分解性

既述したように合成洗剤に配合される界面活性剤 (洗剤原料) はほとんど陰イオン系であり、なかでも LAS が主流である。そのほか量的には比較的少ないとはいえ、直鎖の炭化水素鎖をもつ硫酸エステル塩系のアルキルサルフェートとアルキルエトキシサルフェートもかなり使われている。既述のようにセスプールは比較的酸素のとばしい条件下になりやすいことを考慮し、とくにセスプールの Microflora による嫌気的条件下におけるこれら各種の界面活性剤の生分解性を調べた。また、アルキル硫酸塩系の界面活性剤の場合メチレンブルー活性の消失度で判定すると、そのような状況下でも生分解性である結果を与えるが、全有機成分の分解・除去が望ましいという観点に立った時、それがどのように解釈されるものかを中心に検討した。

2.4.1 各種陰イオン界面活性剤の嫌気的生分解性

Table 9 に示すスルホン酸塩系2種および硫酸エステル塩系2種計4種の陰イオン界面活性剤を用いた。

LAS セスプールの底部 (地表面下1.2m) から採取した土壌と汚水の混合物 (絶乾固型物量45.0%) を生物源として、培養基 100ml 当たり 1ml の割合で JIS K-3363 (1968) の記載²⁴⁾による培養基に接種した。

培養温度 25±1°C で嫌気培養 (黄りん燃焼法) を行なった。

各供試界面活性剤の培養基への添加量および一定期間

Table 9 Test surfactants

	Surfactants (Sodium salt)
LAS	Sulfonate of n-alkylbenzene, Nalkane 500
ABS	Sulfonate of tetrapropylbenzene, Alkane 56
DAS	Sulfate of C ₁₂ fraction of coco alcohol
DES	Sulfate of ethylene oxide (3mol) adduct of C ₁₂ alcohol

培養後の残存濃度の測定は JIS K-3363 (1968)²⁴⁾ によった。したがって各界面活性剤の濃度はすべてスルホコハク酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウムとしての値で表示されるメチレンブルー-活性物質 (MBAS) の濃度で示される。また生分解度は培養開始前後の MBAS 濃度の減少率としてもとめた。

活性汚泥を生物源として4種の界面活性剤の嫌気的条件下における生分解度を測定した結果を Fig. 8 に示す。

DES 以外のものの生分解度は培養開始後およそ3～7日以内に上昇し、以後4週間の培養期間後に到るまではほぼ一定であった。DES の生分解度は約3週間後までゆるやかに増大するが、その後一定となった。4週間内ではほぼ一定となる各界面活性剤の生分解度は、硫酸エステル塩系の場合約60～100%と高い値を示したが、スルホン酸塩系の場合では約10～30%程度と低い値にとどまっていた。

スルホン酸塩系ではアルキル鎖の分岐状況と生分解性の関係をみると、分岐の多い試料の方が低い生分解性である。

エチレンオキシドの付加の影響のためか、同じ硫酸エステル塩系でも DES が DAS に比べて低い生分解性を示した。

2.4.2 硫酸エステル塩系界面活性剤の嫌気的生分解時の MBAS 消失度と COD 減少度

嫌気的条件下でとくに硫酸エステル塩系の界面活性剤について顕著に認められるメチレンブルー-反応性の消失はアルキル基の酸化分解による短鎖化という変化よりはむしろ SO_3 基の脱離によるためと考えられたので、高度の生分解度を示した DAS を代表例として、メチレンブルー-活性度の消失で示される界面活性剤の生分解性と COD 測定による培養基中の一般有機物の生分解による除去性とを対比を行なった。

供試界面活性剤は Table 9 のものを用い、培養基と培養方法は2.4.1の場合に準じた。CODの測定は下水試験法記載²⁵⁾の 100℃, 30min 加熱酸化方法によった。

嫌気培養によって DAS はきわめて短期間でメチレンブルー-との反応性を失い、メチレンブルー-比色法による評価では高生分解性であるという結果を与えたため、約 100mg/l の DAS を培養基に添加して7日間嫌気培養し、その間の培養基の COD 除去性を検討した。COD と MBAS の測定は培養基を 3,000rpm で 30min 遠心分離してえられた上清について行なった。

Fig. 9 に DAS の添加および無添加の培養基の COD 除去率の経日的変化を示す。

Fig. 8. Anaerobic biodegradation of anionic surfactants by microflora of LAS cesspool

Fig. 9. Removal of COD and MBAS in biodegradation of DAS under anaerobic condition

この実験結果から、CODの除去率はMBASの除去率と平行せず、6～7日培養後 DAS がメチレンブルー-活性を完全に失った状態でも、なお60%余の有機物が培養基中に残存していることが認められた。なお、対比のために先の嫌気培養の場合と同様な培養基と生物源を用い、DAS の生分解度と培養基の COD 除去性についての実験を、JIS K-3363 (1968)²⁴⁾ の振とう培養法に準じて好気的条件下でも行なった。その結果を Fig. 10 に示す。

このように、メチレンブルー-活性が完全に消失する24 hr という短期間内に着目すると、嫌気培養の場合のように COD の除去が緩慢であることが確かめられた。しかし、メチレンブルー-活性の消失後もさらに振とう培養

Fig. 10. Removal of COD and MBAS in biodegradation of DAS under aerobic condition

を8日間継続すると、嫌氣的条件下の場合とちがい、COD 除去率は培養開始後2日以降 DAS 添加の場合も無添加の場合もほぼ同じ値を示し、7～8日後に77～88%に達することが認められた。

2.5 セスプールの Microflora による嫌氣のおよび好氣的条件下における有機物の生分解性

セスプールにおける一般有機物の生分解による除去性をみるため、可溶性の一般有機物源として人工下水²¹⁾を用い、LAS を添加した場合と添加しない場合の嫌氣的および好氣的条件下における COD と LAS の生分解による除去性を検討した。

人工下水をそのまま、およびそれに約20mg/l の LAS を添加して、それぞれに LAS セスプールの土壌を 100 ml あたり約 1g の割合で接種した。黄リン燃焼法による嫌氣的条件下と開放式の好氣的条件下で 25℃、7 日間静置培養を行ないつつ、経日的に COD と MBAS を定量してこれらの生分解除去率をしらべた。

COD の測定は下水試験法²⁵⁾記載の 100℃、30min 加熱酸化法によったが、この方法による LAS (1,000mg/l) の COD 値は 400mg/l であるから、20mg/l の LAS 含有量は COD で 8mg/l にあたる。

好氣的、嫌氣的条件下における COD と MBAS の除去性は Fig. 11 に示すようであった。これによれば、LAS は嫌氣的条件下ではわずか 25% 程度の生分解除去率を示すにすぎなかったが、強制曝氣など行なわず単に静置するだけの好氣的条件下では 97% 生分解された。他方、COD を指標とする可溶性一般有機物の生分解による除去率は LAS の存在によって若干抑制されるが、完全嫌氣的の場合よりも好氣的条件下では 20～30% も高く、

Fig. 11. Removal of COD and LAS by microflora of LAS cesspool under aerobic and anaerobic storage test by use of synthetic sewage

一般有機物の生分解による除去が良好であることを示している。

3. 考 察

3.1 セスプールの Bacterial flora とその LAS の生分解能力

従来、セスプールの Microflora に関する研究は行なわれていない。

著者らの試験用の LAS セスプールの底部土壌と汚水について、好氣的および嫌氣的条件下で LAS を炭素源とする合成培地に生育できる菌株を直接検索してみると、*Aerobacter aerogenes*, *Escherichia freundii*, *Aerobacter cloacae*, *Paracolonobacter aerogenoides* など Enterobacteriaceae が多く存在することがわかった。これらの菌株のうち、好氣的にはほぼ完全に LAS を生分解する *Aerobacter aerogenes* や *Escherichia freundii* の場合でも、LAS セスプール中の汚水をそのまま生物源とした場合より、生分解速度は緩慢であった。嫌氣的にはもっとも生分解能力の強い *Aerobacter aerogenes* でも、約 30% の生分解度を示すにすぎなかった。

しかしながら、土壌を生物源として LAS 添加人工下水を用いて順化処理を行なうことにより強い生分解能力をもった順化混合汚水系がえられるので、この汚水系の Bacterial flora を検索してみると、それぞれ異なった LAS 生分解能力をもつ *Micrococcus* sp., *Aerobacter* sp., *Pseudomonas* sp. などが主体の Bacterial flora へ変化していることがわかった。

分離された *Pseudomonas* sp. の純培養菌株は順化混

合汚水を生物源とした場合とほぼ同程度の生分解能力をもち、さらにその他上記の菌株の共存下ではさらに若干高い生分解度を与える (Table 4)。

セスプールの土壌と汚水を生物源として移殖継代による順化処理を行なうと、LAS の生分解の進行時にはセスプールの汚水と土壌のいずれの生物源の場合も、*Pseudomonas* sp. が dominant となる (Table 5)。この傾向は、セスプールから分離される代表的な LAS 生分解菌の純培養菌株をそれぞれ同比率で混合して LAS を生分解させた直後に各菌株の占める比率を調べた結果からも、うらづけられる (Table 6)。

Table 5 および Table 6 のように、LAS の生分解がほぼ完全に終了した後、LAS 生分解能力の低い *Aeromonas* sp. が dominant となる理由については不詳であるが、利用する基質とこれら菌株の LAS の *Pseudomonas* sp. による代謝中間生産物に関係するとも考えられる。

LAS の生分解に *Pseudomonas* sp. が主要な役割を演ずるが、その type culture の生物性状は 2.2.1 で述べたように従来の記載にない特性をもち、*Pseudomonas surfactassimilis* とした。既述したように *Pseudomonas denitrificans* とは脱窒能の点で、また *Pseudomonas oleovorans* とはスターチ水解性と蛍光の有無と好気性の点で、それぞれ異なる。

McKinney ら²⁶⁾は ABS 合成培地を使用して土壌、下水および活性汚泥から 34 株を分離し、Bergey の分類法によって Genus までの同定をしている。それによれば、*Alcaligenes* 10 株、*Pseudomonas* 15 株、*Aerobacter* 3 株、*Paracolonobacterium* 3 株および *Flavobacterium*、*Escherichia*、*Bacillus* の各 1 株ずつであり、*Pseudomonas* sp. のうち 11 株は Species unknown としている。この結果は、ABS あるいは LAS を資化できる菌株の土壌中の Bacterial flora の構成と *Pseudomonas* sp. が主役である点において、本報の報告ときわめてよく類似している。

Payne ら²⁷⁾や Klein ら²⁸⁾は DAS や LAS の合成培地を用いて下水処理場の放流水口近くの土壌から 2 種の *Pseudomonas* sp. を分離し、DAS、ABS、LAS などを含む種々の炭素源について基質特異性を検討している。同菌株についての同定の記載はないが、Payne らの分離株はフェノールの資化性をもつ点など *Pseudomonas surfactassimilis* と近いものと思われる。

また、Robeck ら²⁹⁾は土壌カラム (soil lysimeter) を用いた実験手法により、水不飽和土壌中で ABS を含む有機化合物が吸着し生分解されていることを報告している

が、間接的に汚水と接触する lysimeter の土壌上部に *Pseudomonas* sp., *Achromobacteriaceae* が主に存在すると述べている。

従来、土壌や活性汚泥など種々の生物源から分離された純培養菌株について、LAS、ABS あるいは DAS の資化性を検討した研究報告はいくつかある。これらの資化性が報告されている菌株のうち、本研究においてセスプールから著者が分離できた LAS の生分解能力をもった菌株に含まれていないものとしては、*Achromobacter* sp. (Williams³⁰⁾)、*Escherichia coli* (Williams³⁰⁾, Von Riesen³¹⁾, Huddleston³²⁾, Kölbel^{33), 34)}), *Proteus vulgaris* (Williams³⁰⁾), *Salmonella enteritidis* (Von Riesen³¹⁾), *Serratia marcescens* (Williams³⁰⁾, Von Riesen³¹⁾, Huddleston³²⁾), *Sphaerotilis* sp. (Pipes³⁵⁾), *Pseudomonas fluorescens* (Williams³⁰⁾, Huddleston³²⁾) および *Pseudomonas aeruginosa* (Williams³⁰⁾, Von Riesen³¹⁾, Lambin³⁶⁾) がある。

また一方、著者が LAS 生分解性菌としてセスプールから分離した純培養菌株のうち、従来の文献報告において ABS、LAS あるいは DAS の資化性を認められている菌株には、*Aerobacter aerogenes* (Williams³⁰⁾), *Aerobacter cloacae* (Von Riesen³¹⁾), *Aerobacter* sp. (McKinney²⁶⁾), *Alcaligenes faecalis* (Marion³⁷⁾), *Alcaligenes* sp. (McKinney²⁶⁾), *Flavobacterium* sp. (Cook³⁸⁾), *Klebsiella* sp. (Cook³⁸⁾), *Micrococcus* sp. (Cook³⁸⁾), *Paracolonobacterium aerogenoides* (Von Riesen³¹⁾, McKinney²⁶⁾), *Pseudomonas* sp. (Payne³⁰⁾, Heyman^{40), 41)}, Huyser⁴²⁾, Williams³⁰⁾, Skinner⁴³⁾, Hsu⁴⁴⁾, McKinney²⁶⁾), *Escherichia* sp. (McKinney²⁶⁾), *Proteus morganii* (Williams³⁰⁾) および *Bacillus* sp. (McKinney²⁶⁾) がある。

このほか、Nyns⁴⁵⁾の純培養菌株を用いた包括的な研究もある。このように *Pseudomonas* sp. が主要なものであるとされているが、いずれも同定されていない。

Pseudomonas surfactassimilis が利用できる炭化水素類の基質特異性については本報告の範囲外とするが、2.2.1 に記載のもののほか予備的に検討した結果では、燈油ケロセンやベンゼンスルホン酸ナトリウムもそれぞれ唯一の炭素源として発育できる。

ベンゼン環の分解については Swisher⁴⁶⁾が混合微生物系によって確認しているが、*Pseudomonas* sp. による分解は Stainer⁴⁷⁾によって報告されている。

Krüger⁴⁸⁾は活性汚泥による LAS の生分解を検討し、生分解後、変化をうけていないアルキルベンゼンスルホ

ン酸塩 5~10%, 界面活性をもつ芳香族の生分解中間生成物 35~40%, 非界面活性の脂肪族の生分解中間生成物 10~20%, 無機質の硫酸塩までの生分解分 35~45% という結果を報告している。これに比べて本報告の結果 (Table 8) では、メチレンブルー法で測定可能な型 (界面活性を完全に消失してはいない程度) で存在する量ではほぼ同じであるが、無機質の $S^{35}O_4^{2-}$ までの生分解はかなり少ない。

ここで注意すべきことは、 Ba^{+2} 添加による $S^{35}O_4^{2-}$ の沈殿の分取が微量の場合とくに困難なため、十分定量的な知見とはみなし難いことである。しかし、生分解された LAS^{35} のかなりの部分は不活性の型にまで生分解されているが、完全に無機質となるまでは生分解されていない状態にあるものとみられる。もっとも、界面活性をもつ生分解残分とそれ以外のものとに大別してみれば、本報告の結果は Borstlap⁴⁹⁾ の報告と大差ないものである。このような代謝基質としての LAS の生分解機構に注目するならば、単に純培養菌株による以外に実際の分解に関与する全生物群を用いる検討がさらに必要であろう。

LAS の生分解能力をもった種々の菌株をそれぞれ純培養の状態では LAS を生分解させた場合とそれらの菌株を共存させて生分解させた場合、Table 4 のように後者の方が高い生分解度を与えた。これに類似した現象は純培養菌株による一般有機物の酸化分解性を調べた研究でもすでに認められている。すなわち McKinney ら⁵⁰⁾ は活性汚泥源の純培養菌株を用い BOD 除去率を調べた結果、*Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Paracoloclostridium aerogenoides*, *Flavobacterium* sp. がそれぞれ 66, 76, 76, 78% の BOD 除去率を与えるのに対し、それらの共存系の BOD 除去率は 94~99% であることを報告している。

3.2 *Pseudomonas surfactassimilis* による LAS^{35} の吸着と生分解性および S^{35} の分布

Pseudomonas surfactassimilis に対する LAS^{35} の吸着性は酸性域で大きく、この傾向は LAS 非分解菌の *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* と同様である。いずれも Freundlich の吸着式にしたがう吸着を示すが、*Pseudomonas surfactassimilis* は $1/n$ と A_0 の値からみて *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* よりも若干吸着性は大きい。*Bacillus subtilis* や *Escherichia coli* の場合と異なり、*Pseudomonas surfactassimilis* は発育に好的な条件下では吸着した LAS を生分解させる。

Hartman^{51), 52)} は *Escherichia* sp. や *Bacillus* sp. についての $1/n$ と A_0 値として本報告の結果 (Table 7) と

かなり異なる数値を示しているが、同研究の結論は生分解による LAS などの除去よりもむしろ吸着除去が主要であるということにおかれている。しかし、本実験の結果からは、生分解能力をもつ菌株を用いて対比することにより吸着の占める割合は低く、また、その LAS が容易に生分解資化されることが明らかとされ、吸着除去が支配的とはみなしえない。

Pseudomonas surfactassimilis を LAS に曝露すると、きわめて短時間内にはじめ 60~80% の LAS が菌体に吸着され、生分解された時新たに LAS を加えると再び同様に吸着され、ついで生分解が行なわれる。このように LAS^{35} を連続的にフィードして生分解を行なわせた後の S^{35} の分布からみて、 LAS の生分解は菌体内の「とりこみ」によるものとみられる。

3.3 嫌気的生分解時のメチレンブルー活性の消失度と有機性残分

陰イオン界面活性剤はアルキル鎖の生分解のほかには SO_3 基が脱離するような変化をうけるとすれば、メチレンブルー法で定量されないから、微生物による作用をうけてメチレンブルー活性を失っても有機性残分の消失を必ずしも意味しない。

好気的生分解の過程においては、硫酸エステル塩系の DAS の生分解に酵素反応による加水分解が関与することはすでに報告されている^{8), 53)}。嫌気的生分解時における DAS の挙動を調べてみると、Fig. 9 のように培養開始 3~5 日後までにメチレンブルー活性の消失が急激に認められるが、COD の除去率は低い。このことから、嫌気的条件下においては SO_3 基の脱離が特に顕著に関与していることが明らかとなった。

好気的条件下でも生分解の初期においては嫌気分解の場合と同様に、酵素による加水分解がアルキル鎖の酸化分解に先だって生ずるとみられる (Fig. 10)。 SO_3 基に始め変化が起こるとすれば、アルキル鎖の末端炭素からの酸化分解過程以外の経路が関与しうるとみられ、生分解の進行が容易であるとも考えられる。

水質汚濁防止の面からは、洗剤原料 (界面活性剤) も、排水中の一般有機物と少なくとも同程度に生分解除去され、有機性残分が残らないことが本来望まれる。このことは、生分解度の測定や評価においても考慮されていなければならない。好気的生分解において β -酸化によるアルキル基の酸化分解がすでに確かめられて⁵⁴⁾、生分解度の測定にメチレンブルー法が適用されている^{8), 21), 23)}。

嫌気的生分解の場合は、もっともメチレンブルー活性を消失しやすい DAS を例とした本実験では有機分が残

存しており、好氣的生分解のときと作用機序が異なる点注目された。しかしながら、ここで一般有機物の生分解に着目してみると、2.4の実験で界面活性剤無添加の培養基のCOD除去率が7日間の培養後も50~55%にとどまっているというように、嫌氣的条件下ではきわめて緩慢かつ不完全である。他方、好氣的条件下では2.4.2で述べたように1日の培養で約70%、8日間で80%程度のCOD除去率を示しており、一般有機物の生分解による除去は迅速かつ良好である。好氣的条件下では直鎖型界面活性剤は一般有機物と同様に容易に生分解されるものである。

3.4 セスプールの排水の処分の条件と洗剤の生分解性

汚水処分効率の悪いセスプールやセプティックタンク(浄化槽)一地下浸透(パーコレーションフィールド)系に帰因する地下水汚濁の例は、アメリカの一部にもみられる。すなわち、公共下水道がなく、このような排水処理施設しか持たない家庭が密集し、しかも、砂質の地帯では不十分な処理のまま家庭排水が地下水に浸透し、井戸水中に洗剤残分が混入することがおこった^{55), 56)}。この著しい例は、ニューヨーク州ロングアイランドのサホーク郡地方、南カルホルニア、南部フロリダおよびミシガン湖上部の東部ミネソターウィスコンシンなどにみられている^{56)~59)}。

U. S. Public Health Serviceの推定によれば、セプティックタンクやセスプールによる下水処分法をとっている割合は34.2%といわれている。このような背景の下で、比較的酸素のとばしい条件下における地下水汚濁防止の一環としての直鎖型洗剤の生分解性も検討されている⁶⁰⁾。

1962年~1969年の長期間にわたって、ニューヨーク州衛生局⁶¹⁾はロングアイランド地方においてセプティックタンク、あるいはセスプール一地下水系の水質汚濁問題の研究を行なっている。それによれば、LAS, ABS, DAS, セッケンあるいはシュガーエステル系の試験用洗剤をモデル家庭に供給し、該当の汚水処分系におけるCODを指標とした一般有機物の除去性と洗剤成分の除去性を調査した結果、セププールによるCODの除去性はいずれの洗剤の場合も不完全であり、また、洗剤成分の除去性はシュガーエステル、セッケン>LAS, DAS, ABSの傾向にあるが、顕著な差はないとしている。また、試験井戸の水の溶存酸素量は井戸ごとに著しく異なり0~6.4ppmにわたっており、汚水が浸透し土中で水飽和の状況になるところでは溶存酸素量がきわめて低いものであった。

一般に水飽和の状態にあるセスプール内での洗剤の生分解はほとんど認められていない。しかし、LAS⁵⁵⁾が試用された例をみると、LASの生分解はセスプールと水不飽和土壌層との間、および水不飽和セスプールと水飽和土壌層との間で認められている。なお、Robeck²⁹⁾, Klein⁶²⁾も、このような不飽和層におけるABS洗剤の挙動を土壌カラムによる研究で認めている。

このような不完全な設備で下水の処分を行なっているところで、真に必要とされ、また理想的な解決策は公共下水道設備の整備であり、まずそれが行なわれてはじめて水質汚濁防止の効果が達成され、同時に生分解の容易な洗剤の効果も発揮されるといわれている^{61), 63)}。

セプティックタンク-パーコレーションフィールド(地中浸透)系を模したパイロットプラントを用いたモデル実験によってLAS⁵⁵⁾, DAS⁵⁵⁾およびABS⁵⁵⁾の除去性を調べたMcGauheyら^{28), 64)}の研究によれば、間欠つのあるいは連続的な排水の負荷方法によりパーコレーションフィールドを水不飽和あるいは水飽和の状態にした場合のLASの生分解度(吸着を含めた全除去率)は、それぞれ83.3% (97.4%), 66.4% (97.1%)であった。また、全4ヶ月にわたる期間中水飽和の土壌フィールドでも完全な嫌気状態にはならず、流出水中の溶存酸素量は約1.5ppmであり、通常の管理状態である水不飽和の条件下では7~8ppmの溶存酸素量であることが認められている。

本報の実験用セスプール-土壌系では、既報¹⁹⁾のように試験開始後約8ヶ月ないし12ヶ月まで水はけは良好で水不飽和の状態にあり、溶存酸素量1.5~4.5ppm程度(20ヶ月後0~1.5ppm)であった。このような条件下にあって、多くの種類の通性嫌気性のLAS生分解菌が分離されたわけであり、比較的酸素のとばしい条件下でも、これらの菌株が有効に働いて生分解が行なわれることがわかる。

著者の別報告^{59), 65), 66)}にも述べたように、わが国における浅井戸の汚濁は、セスプールなど不完全な污水处理によってもたらされている場合が多い。地下水、井戸水の洗剤含有量の調査が科学技術庁から報告されているが、全国10都道府県442ヶ所の井戸のうち0.5mg/l以上含むものは1.6%で、そのほとんどが5m以下の浅井戸であり、大腸菌陽性などの理由で飲用不適であった。このように構造や位置の悪い井戸では洗剤以外に危険な汚染物が入る可能性があり、根本的な対策が必要とされる。

すなわち、このような場合、井戸の構造や立地条件の改良もさることながら、一般有機物による汚濁防止には

効果的に終末処理ができる下水道施設の整備が、まず第一になされなければならない。セスプールなどによる比較的酸素のとばしい条件下での汚水処分法においては、好氣的な下水処理に比べ、合成洗剤をも含めて排水中の一般有機物の生分解性がおとる。したがって、セスプールなどについては何らかの改良を加えたり、管理と使用上の配慮によって、好氣的に排水処分がなされるように工夫されるべきであろう。

排水の負荷を間接的にして、セスプール—浸透土壌系が水飽和の状態とならないようはかることは容易であり、それによって溶存酸素もおよそ1.5~4.5ppmに保たれる。このような一般有機物の分解が効果的に行なわれる好氣的条件下での排水処分においては、LASを例とする直鎖型のいわゆる生分解性洗剤は、その他の排水中の可溶性一般有機物と同様に良好な生分解性を示す。

4. 結 論

わが国では地下吸込式排水処分法が多くとられているため、合成洗剤のソフト化に先だちこの処分系におけるLASの生分解性に着目し、2年間の野外実験を行なった。好氣的、嫌氣的条件下でLASセスプールのBacterial floraを検索した結果、Enterobacteriaceaeを中心とする各種のLAS生分解性菌株のうち*Pseudomonas* sp.が生分解に主要な役割を演じていることを認めた。その代表的菌株(*Pseudomonas* Strain No. K-5)の分類特性を調べた結果、従来の記載にない生物性状をもつ新種であることを認め、これを*Pseudomonas surfactassimilis*とした。LASはFreundlichの吸着式に従い菌体に吸着し、引きつづき菌体内にとりこまれて生分解される。排水は一般有機物の生分解除去が効果的に行なわれる好氣的条件下で処分されることが望ましく、その際直鎖炭化水素鎖の界面活性剤は同程度もしくはそれ以上に生分解されることが示された。排水の地下浸透系においても、土壌を水不飽和の状態に維持でき、そのような状況下では生分解性洗剤は容易に生分解される。

本研究の要旨は1965年10月第2回日本水処理生物学会全国大会、1966年4月第39回日本産業医学会総会、および1967年4月第17回日本医学会総会衛生関係六分科会連合学会で講演した。

本研究を行なうにあたり終始懇切なる御指導をいただいた千葉大学腐敗研究所主任教授相磯和嘉博士に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 大場健吉：わが国の合成洗剤問題の実情，油化学，15,651-662 (1966)。
- 2) Gesetz über Detergentien in Wasch-und Reinigungs mitteln : Bundesrat Blatt, (72), 1953-1954, Sept. 5 (1961)。
- 3) Ministry of Housing and Local Government: Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents, Her Majesty's Stationary Office, London, Dec. 30 (1955)。
- 4) Soap and Detergent Association : Facts about Detergent, Target date for conversion of Hard ABS, Information Bull., Aug. 4 (1964)。
- 5) O.E.C.D. Report : The Pollution of Water by Detergents, No. 16601, O.E.C.D. Publication, France (1961)。
- 6) 通産省軽工業技術審議会合成洗剤部会：今後の合成洗剤のあり方について，答申書，1967年2月10日。
- 7) 通産省化学工業局：生産技術審議会合成洗剤の答申について，通達42化局第79号，1967年2月21日。
- 8) Ministry of Housing and Local Government : Eighth Progress Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents, Her Majesty's Stationary Office, London (1966)。
- 9) Bueltman, C. G.: The Detergent Industry's Conversion to Biodegradable Detergents, Presented at SDA Meeting, Fairleigh Dickinson University, Madison, Aug. 24 (1966)。
- 10) Husmann, W.: Auswirkungen des Detergentien-gesetzes, Gas und Wasserfach, 107(2), 39 (1966)。
- 11) Husmann, W.: Über die Auswirkungen der Detergentien in der Bundesrepublik, Fette Seifen Anstrichmittel, 68, 557-560 (1966)。
- 12) Buchsteeg, W.: Detergentienabbau in Kläranlagen und Vorflutern vor und nach der Umstellung auf weiche Waschrohstoffe, Wasser Luft und Betrieb, 10(1), 1-4 (1966)。
- 13) Deutschen Bunderministerium für Gesundheitswesen : Auswirkungen des Detergentiengesetzes, Information, (47), Nov. 29 (1965)。
- 14) 日本下水道協会：公共下水道統計第25号（昭和43年度版），日本下水道協会，東京（1970）。
- 15) 大場健吉，吉田幸雄，富山新一：合成洗剤の生分解に関する研究（第2報）各種水中の直鎖および分岐鎖型アルキルベンゼンスルホン酸塩の測定，油化学，17,455-460 (1968)。

- 16) 吉田幸雄, 大場健吉, 富山新一: 下水および河川水中の直鎖型, 分岐鎖型アルキルベンゼンスルホン酸塩の分析(第一報), 第5回下水道研究発表会講演集, p. 247-249, 日本下水道協会, 東京 (1968).
- 17) 吉田幸雄, 大場健吉, 富山新一: 下水および河川水中の直鎖型, 分岐鎖型アルキルベンゼンスルホン酸塩の分析(第二報), 第6回下水道研究発表会講演集, p. 210-212, 日本下水道協会, 東京, (1969).
- 18) Ōba, K. and Tomiyama, S.: Biodegradation of Alkylbenzene Sulfonates by Microorganisms in a Private Cesspool, *Agricultural Biological Chemistry, Japan*, 29(6), 591-592 (1965).
- 19) 大場健吉: アルキルベンゼンスルホン酸塩の生化学的研究(第三報) 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩の家庭用吸込式排水処理ソウにおける生物学的分解性, *油化学*, 14(10), 565-571 (1965).
- 20) 大場健吉, 吉田幸雄: 家庭用吸込槽と洗剤の分解について, 第3回衛生工学研究討論会講演論文集, p. 29-31, 衛生工学会, 東京, (1966).
- 21) Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergentien in Wasch- und Reinigungsmitteln: Bundesgesetz Blatt, (49), 698-706 (1962).
- 22) Abbott, D. C.: The Colorimetric Determination of Anionic Surface-active Materials in Water, *Analyst*, 87, 286-293 (1962).
- 23) The Subcommittee on Biodegradation Test Methods of the Soap and Detergent Association: Procedure and Standards for Determination of the Biodegradability of Alkyl Benzene Sulfonate and Linear Alkylate Sulfonate, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 42, 986-993 (1965).
- 24) 通産省日本工業規格: 合成洗剤の生分解試験方法, JIS K-3363 (1968).
- 25) 日本下水道協会: 下水試験法(1967年版), 日本下水道協会, 東京 (1967).
- 26) McKinney, R. E. and Symons, J. M.: Bacterial Degradation of ABS, Sewage and Industrial Wastes, 31(5), 549-556 (1959).
- 27) Payne, W. J. and Feisal, V. E.: Bacterial utilization of dodecyl sulfate and dodecyl benzene, *Applied Microbiology*, 11, 339-344 (1963).
- 28) Klein, S. A. and McGauhey, P. H.: Degradation of Biologically Soft Detergents by Wastewater Treatment Processes, *Journal Water Pollution Control Federation*, 37, 857-866 (1965).
- 29) Robeck, G. G., et al.: Degradation of ABS and Other Organics in unsaturated Soils, *Journal Water Pollution Control Federation*, 35, 1225-1236 (1963).
- 30) Williams, O. B. and Rees, H. B.: Bacterial utilization of anionic surfactants, *Journal of Bacteriology*, 58, 823-824 (1964).
- 31) Von Riesen, W. L.: Studies on bacteria-surfactant relationships. I. Decomposition of anionic surfactants by bacteria, *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 55, 337-344 (1955).
- 32) Huddleston, R. L. and Allred, R. C.: Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes, *Developmental Industrial Microbiology*, 4, 24-38 (1963).
- 33) Kölbel, H. Böhn, W. and Mach, F.: Efficiency of Biological Treatment Systems in Biodegradation of Detergents, *Wasserwirtsch.-Wassertech.*, 19, 15-19 (1969).
- 34) Kölbel, H., Kurzendorfer, P. and Werner, C.: Constitution and Properties of Surfactants. V. The Effect of the Position of the Quaternary Carbon Atom on the Biodegradability of Alkyl Benzene Sulfonates, *Tenside*, 4, 33-40 (1967).
- 35) Pipes, W. O. and Jones, P. H.: Decomposition of organic wastes by *Sphaerotilus*, *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 287-307 (1963).
- 36) Lambin, S., et al.: Biodegradation of synthetic detergents by wastewater microorganisms, *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 24(3), 161-166 (1965).
- 37) Marion, C. V.: Oxidation of sodium lauryl sulfate, alkylbenzene sulfonate and chemically related compounds. Ph. D. Thesis, Ohio State University, Columbus (1966).
- 38) Cook, R.: The bacterial degradation of synthetic anionic detergents, *Water Research*, 2, 849-876 (1968).
- 39) Payne, W. J.: Pure culture studies of the degradation of detergent compounds, *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 355-365 (1963).
- 40) Heyman, J. J. and Molof, A. H.: Initiation of biodegradation in surfactants, *Journal Water Pollution Control Federation*, 39, 50-62 (1967).

- 41) Heyman, J. J. and Molof, A. H. : Biodegradation of linear alkylated sulfonates, *Environmental Science & Technology*, 2, 773-778 (1968).
- 42) Huyser, H. W. : Relation between the structure of detergents and their biological degradation, *Surfactant Congress III*, 3, 295-301 (1960).
- 43) Skinner, F. A. : Decomposition of anionic surfactants by soil bacteria, *Nature*, 183, 548-549 (1959).
- 44) Hsu, Y. C. : Detergent-splitting enzyme from bacteria, *Nature*, 200, 1091-1092 (1963).
- 45) Nyns, E. J., et al. : Comparative biodegradation of detergents. I. Comparative bacterial biodegradation of lauryl sulfate and tridecylbenzene sulfonates, *Fette Seifen Anstrichmittel*, 71, 232-236 (1969).
- 46) Swisher, R. D. : Biodegradation of LAS benzene rings in activated sludge, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44, 717-724 (1967).
- 47) Stranier, R. Y. : Problem of bacterial oxidative metabolism, *Bacteriological Reviews*, 14, 179 (1950).
- 48) Krüger, R. : Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Alkylbenzolsulfonate, *Fette Seifen Anstrichmittel*, 66(3), 217-221 (1964).
- 49) Borstlap, C. : Intermediate biodegradation products of anionic detergents, their toxicity and foaming properties, *Surfactant Congress IV*, 3, 891-901 (1967).
- 50) McKinney, R. E. and Horwood, M. P. : Fundamental approach to the activated sludge process. I. Floc-producing bacteria, *Sewage and Industrial Wastes*, 24, 117-123 (1952).
- 51) Hartman, L. : The removal of ABS by micro-organisms, *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 331-345 (1963).
- 52) Hartmann, L. and Mosebacht, H. : Adsorption experiments with new detergents, *Tenside*, 3, 349-354 (1966).
- 53) 大場健吉, 吉田幸雄, 富山新一 : 吸込式汚水だめによる浅井戸汚染, 日本水道協会第18回全国水道研究発表会講演要旨集, p. 200, 日本水道協会, 東京 (1967) : 水道協会雑誌, (398), 47-49 (1967).
- 54) Swisher, R. D., O'Rourke, J. T. and Tomlinson, H. D. : Fish bioassays of LAS and Intermediate biodegradation products, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41, 746-752 (1964).
- 55) Orsanco Detergent Subcommittee : Components of household synthetic detergents in water and sewage, *Journal American Water Works Association*, 55, 369-402 (1963).
- 56) Andres, B., et al. : Effect of Synthetic Detergents on Ground Waters of Long Island, New York Report prepared for New York States Water Pollution Control Board, June (1960).
- 57) Flynn, J. M., et al. : Study of Synthetic Detergents in Ground Water, *Journal American Water Works Association*, 50, 1551-1562 (1958).
- 58) Sigworth, E. A. : Activated Carbon for Treatment of Conditions Attributed to Synthetic Detergents, *Journal American Water Works Association*, 53, 1003-1006 (1961).
- 59) Public Health Service, U. S. Dept. of HE & W : Proceedings of 1961 Symposium Ground Water Contamination, The Robert A. Taft Sanitary Engineering Center Technical Report W 61-5, April (1961).
- 60) Robeck, G. G., et al. : Factors influencing the design and operation of soil systems for waste treatment, *Journal Water Pollution Control Federation*, 36, 971-983 (1963).
- 61) Nassau-Suffolk Research Task Group : Final Report of the Long Island Ground Water Pollution Study, State of New York Department of Health, New York, April (1969).
- 62) Klein, S. A., et al. : The fate of ABS in soils and plants, *Journal Water Pollution Control Federation*, 35, 636-654 (1963).
- 63) Coughlin, F. J. : Detergents and Water Pollution Abatement, *American Journal of Public Health*, 55, 760-771 (1965).
- 64) McGauhey, P. H. and Klein, S. A., Degradable pollutants—a study of the new detergents, The third Water Pollution Research Conference, 1, 353-374 (1967).
- 65) 吉田幸雄, 大場健吉 : 井水中の ABS の研究, 第16回全国水道研究発表会講演集, p. 216-217, 日本水道協会, 東京 (1965).
- 66) 吉田幸雄, 大場健吉 : 井水中の ABS の分析研究, 水道協会雑誌, (371), 16-21 (1965).

(受付1970年12月11日)