資 料

化 学 物 質 の 生 分 解 性

化学物質の生分解度試験法および非イオン
界面活性剤の生分解性について

大 場 健 吉・杉 山 豊 樹

ライオン油脂株式会社環境衛生研究室（東京都江戸川区平井 7-13-12）

The Biodegradation of Chemical Substances

The Biodegradation Test Methods and Biodegradability of
Nonionic Surface Active Agents

Kenkichi ŌBA and Toyoki SUGIYAMA

Lion Fat & Oil Co. Ltd., Environmental Hygiene Laboratory
(Hirai, Edogawa-ku, Tokyo)

非イオン界面活性剤の生分解度試験法に関しては、国際的にみて公式に採用されている方法がない。その主たる理由は、使用されている非イオン界面活性剤が多種多様であること、非イオン界面活性剤の微量測定法に関しては満足できるまでは解明されていないことにある。

しかしながら、イギリス、アメリカ、日本およびOECDにおいて非イオン界面活性剤の生分解性に関し種々検討されており、難分解性のものについては自主規制している国もみられる。このような状況にかんがみ、非イオン界面活性剤の生分解性を中心にとりまとめたので、御参考に供したい。

1 化学物質の生分解度試験法

1・1 生分解とは

生分解という言葉は biodegradation を訳した言葉であり、微生物による有機炭素化合物の分解とでも表現すべきものである。この生分解の過程を 図-1 に示す¹⁾。

図-1 有機炭素化合物の一般的な生分解過程（好気的条件下）

すなわち、資化性有機炭素化合物は炭素源およびエネルギー源としてこれら有機炭素化合物を利用しうる微生物によって作用を受け、分子状酸素の存在下において、生合成機能を経て細胞物質に転化され、さらにエネルギー源として利用されるときに炭酸ガスと水になる。

生分解試験を行うに際して基本となる考え方については次のようである²⁾。

(i) 第1次的な生分解 (primary biodegradation)

該当物質の本体をかえるに必要な最小限の生分解作用。

(ii) 環境が受け入れる程度までの生分解 (environmentally acceptable biodegradation)

発泡ウなど美観上の問題や水セイ生物への毒性など好ましくない物性を示さなくなるまでの生分解作用。

(iii) 最終的な生分解 (ultimate biodegradation)

無機質までにする生分解作用。

ここで重要なことは、化合物の生分解性およびその代謝最終産物は環境に及ぼす影響という点で評価されなければならないことである。さらにまた有機化合物による水質汚濁を質的観点からみるならば、最終的な生分解をも考慮に入れる必要がでてこよう。

生分解性の表わし方には分解速度 (rate)、生分解度 (extent)、半減期等が用いられている。

1・2 生分解度試験法について

生分解度試験法には、供試物質の微生物への暴露の過程と供試物質の分解消失度を評価する定量分析の過程とが含まれる。

微生物への暴露の方法を考える場合次のような要因を考慮する必要がある。まず第一に、化学物質の生分解が期待される場所は河川、湖沼、海洋など自然水系中や底泥、土壌中であるのか、あるいは下水処理装置や排水処理装置のような人為的な系であるのかの問題となる。第

二に、それらは好氣的条件下で行われるのか、嫌氣的条件下で行われるのかが問題となる。さらに微生物へのジェン化方法と期間についても考慮を払わなければならない。また試験物質濃度は、実際に環境中に存在しう程度の濃度で試験を行うことが望ましく、一般的に微量分析の技術も必要とされることが多い。

分解消失度を評価するには、採用する定量分析によって結果が異なる点に留意すべきである。すなわち、生分解の過程でいかなる構造の化学物質が定量されているのかという問題が大切である。

生分解度試験に用いられる分析方法は、大別すると次のように分類できる。

(i) 残存物質量の測定 (物理・化学的分析法, 全有機炭素測定法など)

(ii) 吸収 O_2 量の測定 (ワールブルグ法, BOD 法, 溶存酸素測定法, クローメーター法など)

(iii) 発生 CO_2 量の測定

これらの方法の長所, 短所, 適応性, 操作上や時間的問題点および経済性について 表-1 に示す。

実験室で生分解度試験に用いられる方法には次のようなものがある。

(i) 開放 (または密セン) 放置法 (静置法)

(ii) 振とう培養法

(iii) 半連続活性汚デイ法

(iv) 連続活性汚デイ法

(v) ワールブルグ法

(vi) BOD 法

(vii) CO_2 測定法

これらの方法の詳細 (微生物源, 接種法, 培養基, ジェン化, 供試物質濃度, 培養条件, 本試験法) について界面活性剤を化学物質の一つの例として 表-2 にまとめた。また野外試験として用いられる方法には次のようなものがある。

(i) モデル河川を用いた試験

(ii) Soil lysimeter を用いた試験

2 非イオン界面活性剤の生分解性

2.1 非イオン界面活性剤の環境中 (河川, 下水) 濃度

河川水中あるいは下水中の非イオン界面活性剤の測定は、使用されている非イオン界面活性剤が多種多様であり現在のところ満足のできるまでには解明されていない。河川水中の微量エトキシレート系非イオン界面活性剤を測定する種々の方法に関しては Heinerth¹¹⁾ によって要約されている。ここにまとめられている大部分の測定法はエトキシレートのエーテル酸素との反応に基づいたものである。Heinerth¹¹⁾ はイギリスで広く用いられている Patterson と Hunt の方法³⁾ を将来性のある方法として紹介している。

Patterson らの方法³⁾ は、250 ml の試料水から硫酸マグネシウムを塩析剤としてクロロホルムで4回抽出し、抽出したクロロホルム層を酸とアルカリで洗浄した後溶媒を除去し、クロロホルムを溶媒として、残分を薄層クロマトグラフィーにより展開し、展開後のスポットを既知量のスポットと比較分析するものである。

このような方法によって 1966 年から 1971 年まで測定されたイギリスの河川水, 下水処理場放流水中の非イ

表-1 生分解度試験に用いられる分析法の特徴

測定項目	消費酸素量	発生二酸化炭素量	残 存 物 質 量	
			全 有 機 炭 素	物 理 化 学 的 定 量
意 味 ・ 内 容	好氣的分解 (酸化分解) のみ表現	好氣的条件のみ (嫌氣的には発生メタン を測定 メタン $\xrightarrow{\text{燃焼}}$ CO_2 測定)	好・嫌氣的ともに可	同 左
	長所: ほぼ酸化分解がわかる 速度, 程度共にわかる		長所: すべての有機炭素の 定量可能	
	短所: 無機物の酸化も加わる	短所: 菌体中にとりこまれた 部分は、 CO_2 として は検出されない場合 があるので、生分 解されていないもの として評価される	短所: 菌体に吸着された部 分は測定されないの で生分解されたもの として評価される	短所: 分析限界あり, 個々 に定量法を定めねば ならない
適 用 性	油溶性物質困難	油溶性物質は可能か?	中間生成物にも適用可	中間生成物は分析できない 場合あり
操作のはん 雑性	簡 単	簡 単	同一条件ですべての有機物 を対象としうる	対象物個々により異なる
時 間 的	比較的短時間	比較的長時間	短 時 間	短 時 間
経 済 性	測定機器購入要		測定機器購入要	

表-2 界面活性剤の生分解度試験法

	生物源	接種	培養基	ジュン(馴)化	洗剤濃度	培養条件	試験方法	特徴	公定法採用国	目標生分解度
開放放置式	風乾活性汚ディ	30 mg/l	BOD希釈水	なし	10 ppm	20±1°C ゆるいかくはん	残存洗剤濃度が5日間にわたり2%以下になるまで測定, 最長3週間	操作簡単 経済的 短期間	イギリス ⁹⁾ (1966)	90%以上
	河川水中の微生物	なし	河川水	なし	適量	室温	残存洗剤濃度を随時測定		—	—
振とう培養法	下水処理場の返送汚ディ	1 ml/100 ml	基礎培養基	72 hr 2 回繰り返す	30 ppm	25±3°C 振とう	7日目と8日目の生分解度の平均をとる	操作簡単	日本 ⁴⁾ JIS-K3363 (1968)	85%以上
	ジュン化活性汚ディ天然微生物特殊菌株	1 ml/100 ml	"	"	30 ppm	"	"	経済的 再現性良好	アメリカ ⁹⁾ (1964)	90%以上
	土 下水処理場の二次放流水	0.5 ml/l	"	なし	5 ppm	25±1°C 暗所, 振とう	接種後5日目および8日目から毎日測定, 4日間の差が0.15 mg/l 以下になるまで測定	比較的短期間	OECD ⁶⁾ (1971)	80%以上
半連続活性汚ディ法	ジュン化活性汚ディ天然微生物特殊菌株	MLSS 2,500 ±500 mg/l	人工下水	MBAS を日がかわるごとに, 4→8→12→18→20 mg/l と増してゆく	20 ppm	23 hr 暴気後上・出液交換	安定期間中の7日間の平均, 連続した2日間の分解度差2%以内のこと	下水処理場のモデル化, 連続式よりは操作簡単, プロセス複雑で不経済, 活性汚ディ量多く吸着多い	アメリカ ⁹⁾ (1964)	90%以上
連続活性汚ディ法	主として空中落下菌	3,000 mg/l	"	汚ディ生成まで1週間	20 ppm	下水処理場のモデル化装置, 室温	安定期間3週間毎日の生分解度の平均	下水処理場の忠実なモデル化, 長期間を要す, 管理・経済性に難点	西ドイツ ⁷⁾ (1965)	80%以上
	活性汚ディ	2.5 g/l	"	"	20±2 ppm	"	"		OECD ⁶⁾ (1971)	80%以上
ワールブルグ法 ⁸⁾	活性汚ディジュン化培養菌	適量	緩衝液	なし	適量	ワールブルグ検圧計使用, 20~25°C	酸素消費量の測定	好気的分解のみを表わす。	—	—
BOD法 ⁹⁾	活性汚ディ一般微生物天然の水微生物	適量	BOD希釈水	なし	適量	密センプラスコ 20°C	溶存酸素消費量の測定 5日目……BOD ₅	好気的分解を表わす	—	—
CO ₂ 量測定法 ¹⁰⁾	下水処理場初沈上澄み液	150 ml/1,500 ml	BOD希釈水	あり	20 ppm	室温	試験容器からの空気をBa(OH) ₂ 溶液に通してCO ₂ を捕足する。	最終的生分解まで測定できる。	—	—

表-3 イギリスの河川水中の陰イオン, 非イオン界面活性剤およびポリグリコールの濃度 (mg/l)
(陰イオン系: Manoxol OT として, 非イオン系: Lissapol NX として)

年 月	Calder 川(Wakefield)			Aire 川						Don 川
				Castleford 上流			Castleford 下流			(Don-caster)
	陰イオン	非イオン	ポリグリコール	陰イオン	非イオン	ポリグリコール	陰イオン	非イオン	ポリグリコール	陰イオン
1966 B...	0.75	0.50	0.13	0.72	0.40	Tr.	0.8	0.41	0.10	0.9
1967 A...	0.97	0.69	0.36	0.80	0.51	0.01	0.7	0.42	0.07	0.8
B...	0.97	0.56	0.42	0.96	0.49	0.03	0.7	0.23	0.05	0.9
1968 A...	1.13	0.53	0.33	0.83	0.39	0.02	0.8	0.38	0.14	0.9
B...	0.69	0.22	0.16	0.68	0.18	0.02	0.56	0.15	0.09	0.53
1969 A...	0.88	0.38	0.27	0.76	0.26	0.03	0.62	0.20	0.08	0.63
B...	1.47	0.72	0.66	1.16	0.50	0.08	0.92	0.40	0.17	0.67
1970 A...	1.07	0.62	0.43	0.86	0.48	0.21	0.59	0.42	0.29	0.56
B...	0.87	0.38	0.31	0.77	0.24	0.06	0.71	0.31	0.17	0.48
1971 A...	0.86	0.86	0.81	0.69	0.49	0.13	0.53	0.31	0.17	0.64
1969 A...										400
B...	採水時の平均流量									493
1970 A...	(mgd)									738
B...										712
1971 A...	(19 mgd=1 m³/s)									586

A=1月~6月, B=7月~12月, Tr.……Trace

オン界面活性剤濃度を Lissapol NX (分岐型ノニルフェノール・エチレンオキシド (EO) 9 mol 付加物) の濃度として表-3, 4¹²⁾に示す。

さらに同様の方法によるテムズ川とリー川の非イオン界面活性剤濃度を表-5に示す¹³⁾。

ドイツではWickbold^{14), 15)}により非イオン界面活性剤の微量分析法について新しい試みがなされている。その

操作の概要を示す。

図-2 のような装置を用いて, 非イオン界面活性剤を試験水から酢酸エチル層に N₂ ガスを5 min 吹き込むことにより移動させる。その後有機溶媒層を新しい酢酸エチルにとり換え同様の操作を行う。酢酸エチル層を合一し, 必要ならばろ過, 蒸発乾固する。そして残分を水に溶解する。pH を4~6に調製し, 改良 Dragendorffs 試薬 (KBiI₄ + BaCl₂ + 酢酸) を加える。トウ(橙) 赤色の沈殿が形成されるので別して

取り出す。次にこの沈殿を酒石酸アンモニウム溶液に溶解し, この中に含まれているビスマス (pyrrolidindithiocarbamate) で電位差滴定することにより非イオン界面活性剤濃度を求める。このようにして得られたドイツのリップ川, ライン川の水中非イオン界面活性剤濃度を表-6に示す¹⁵⁾。

Gerike 等¹⁶⁾は, 1972 年4月から9月までライン川の

表-4 イギリスの下水処理場放流水中の陰イオン, 非イオン界面活性剤およびポリグリコールの濃度 (mg/l)

試料 No.	年月日	下水処理場	陰イオン界面活性剤	非イオン界面活性剤	ポリグリコール*
1	7.10.69	Lund Wood	2.6	0.8	---
2	8.10.70	Mitchell Laithes	2.5	2.7	4.0
3	2.10.70	Knostrop	2.4	1.0	0.15
4	17.12.70	Spondon	1.7	0.4	0.1
5	17.12.70	Mickleover	1.7	0.6	Tr.
6	17.12.70	Chellaston	1.7	0.4	Tr.
7	8. 5.69	South	1.5	0.8	---
8	5.12.69	Cippenham	1.3	0.4	---
9	2.10.70		1.1	0.4	0.05
10	29. 7.71	Ham	1.0	0.3	Tr.
11	17.12.70	Finham	0.9	0.5	Tr.
12	3.12.70	Chalton	0.9	0.15	N.D**
13	2.10.70		0.8	1.2	0.2
14	8. 5.69	North	0.8	0.4	---
15	23. 9.70	Rodbourn	0.7	0.4	Tr.
16	7.10.69	Carlton	0.7	0.1	---
17	1. 4.71	Houghside	0.6	0.4	Tr.
18	1.10.70		0.6	0.3	0.4
19	6.10.70		0.4	0.1	N.D**
20	1.12.70		0.2	0.4	Tr.

* エチレンオキシド 3 mol 以上を含む ポリエチレングリコール型物質

** 検出せず

陰イオン系: Monoxol OT として

非イオン系: Lissapol NX として

表-5 河川水中の非イオン界面活性剤濃度

(Lissapol NX として mg/l)

年		1966	1967	1968	1969	1970	1971
テムズ川 (Laleham)	平均値	0.018	0.015	0.018	0.020	0.021	0.017
	最大値	0.03	0.02	0.03	0.04	0.05	0.03
	最小値	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
リー川 (Cingfold Mill)	平均値	0.020	0.017	0.020	0.017	0.023	0.019
	最大値	0.05	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04
	最小値	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

MBAS 濃度, Wickbold 法による非イオン界面活性剤濃度を調査した(表-7)。平均非イオン界面活性剤濃度は 0.036 mg/l であり, これは陰イオン界面活性剤濃度の約 10% であった。測定された MBAS と非イオン界面活性剤を仮に Na-tetrapropylene benzene sulfonate と nonylphenol+EO 10 mol 付加物として計算すれば, ライン川の全有機物負荷量 (40 mg COD/l) の 2, 3% が陰イオン, 非イオン界面活性剤由来の汚濁であった。

一方, Brown と Hayes ら¹⁷⁾の微量の非イオン界面活性剤を測定するための比色法は多くの研究者の注目を浴びたが, 感度の低さおよびきょう雑物による妨害が障害となり, 改良法がいくつか提案された。

Crabb と Persinger ら¹⁸⁾は, 試料水溶液より連続石

図-2 非イオン界面活性剤の濃縮装置

表-6 ドイツの河川水中の非イオン界面活性剤濃度 (ppm)

河川名	取水地	濃度	平均値
リップ川	Wasserwerk CWH	0.019~0.019	0.019
	Oelder Brücke	0.020~0.025	0.023
	Hervest	0.022~0.025	0.024
	Friedrichsfeld	0.014~0.017	0.016
ライン川	Wesel	0.019~0.023	0.021
	Rees	0.015~0.017	0.016
	Emmerich	0.021~0.026	0.024

表-7 ライン川水中の MBAS, 非イオン界面活性剤濃度

水 位 (Düsseldorf) (cm)	MBAS (mg/l)	非イオン界面 活性剤 (mg/l)	COD (mg/l)
268	0.37	0.044	31
302	0.31	0.033	32
284	0.40	0.035	45
268	0.32	0.035	43
266	0.26	0.025	45
184	0.45	0.046	---
平均値	0.35	0.036	39.2

油エーテル抽出により非イオン界面活性剤を濃縮した後, 比色定量を行った。

Greff と Setzkorn ら¹⁹⁾はチオシアン酸コバルトアンモニウム試薬とポリオキシエチレン化合物により青色の錯体を形成させ, この錯体を飽和塩溶液からベンゼン中に抽出し, 比色定量した。

Hey と Jenkins ら²⁰⁾は試料水中のポリオキシエチレン化合物をエアーストリッピング法を用いて抽出し, これを分析しようとした。

大越, 秋野, 須藤ら²¹⁾は生下水中のポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤を測定するため, 試料水 1 l から石油エーテルで連続抽出し, エーテルを留去した後,

水 50 ml に再溶解し、Greff らの方法に従って非イオン界面活性剤を測定し、既知濃度の試料においては 93% の回収率を得た上で、昭和 40 年 10 月の生下水中には 0.3~0.5 ppm (標準; ノニルフェノールエトキシレート, EO 6 mol 付加) 程度の存在を報告している。

2.2 各国における非イオン界面活性剤の生分解度試験法

非イオン界面活性剤の生分解度試験法は国際的にみても公定法として公式に採用されている方法はないが、現在までにイギリス、アメリカ、日本、OECD で行われた検討状況は次のようである。

イギリスにおいては 1966 年に官民合同の公的機関である合成洗剤技術委員会 (Standing Technical Committee on Synthetic Detergents) が、リバー・ダイ・アウェイ法の改良法を陰イオン界面活性剤の生分解度測定法に採用した。この第 8 次の年次報告³⁾の中には、溶媒抽出を行った後薄層クロマトグラフィー法で分析することにより、ポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤定量への適応性を検討している。さらに Patterson ら^{22), 23)}は、アルコールポリエトキシレートおよびアルキルフェノールポリエトキシレート系の非イオン界面活性剤の生分解度を薄層クロマトグラフィーおよび発泡試験を分析手段として検討し、分解のどの段階でも発泡性は薄層クロマトグラフィーからえられた結果とよく一致することを見いだした。

アメリカセッケン洗剤協会 (SDA) は、1965 年に陰イオン界面活性剤である ABS/LAS の生分解度試験法を定めた⁵⁾。それに引き続き、家庭用・工業用洗剤の成分として量的にはわずかながら使用されている非イオン界面活性剤についてもその生分解度試験法の検討が行われてきている。

1969 年には過去 3 カ年にわたる SDA の生分解に関する専門小委員会の非イオン界面活性剤の生分解度試験法の検討状況を要約した中間報告²⁾が出された。委員会は生分解性の基本を、環境に受け入れられるまでの生分解すなわち、“生分解性の主たる関心は排水処理設備における処理の可能性という点におかれるが、大気、土、水という環境に対して完全に受け入れられるような物質になるということ”においている。

第一次の検討段階において考慮の払われた各種の生分解度試験法としては、振とうフラスコ法、半連続活性汚泥法、パンチ・チャンパー (Bunch-chamber) 法およびリバー・ダイ・アウェイ (River Die Away) 法がある。しかし、再現性が高いこと、野外試験結果との相関性より半連続活性汚泥法が注目され、第一次から第三次までの三段階に分けて半連続、活性汚泥法の適用可能性が検討された。

第 4 回合同実験の結果より、23 hr 暴気後 1 hr 静置

により培養液の交換を行い、SS 濃度 2500(±500) mg/l、界面活性剤濃度 20 mg/l、人工下水 (グルコース 300 mg/l、ポリペプトンブロス 200 mg/l、 K_2HPO_4 130 mg/l) が採用され、汚泥は都市下水処理場から採取したものとし、期間は 32 日以内という条件で評価されている。検討された分析方法としてコバルトチオシアネートによる比色法、デ・ヌイ表面張力計などの表面張力低下能変化の測定法、および発泡性の試験などがある。その結果、アワをたてその量を定量して生分解度評価の尺度とする方法がまず可能性のあるものであった。比色法は発泡性、表面張力との相関性に欠け、表面張力測定はきょう雑物が再現性のある結果を妨害する点で利用しえないものであった。しかし、アワの量を測定して生分解度を評価することにも、分析者が異なるとばらつきが大きいという問題がみられた。最後の合同実験で採択された半連続活性汚泥法は最終的な決定ではないが高い再現性と野外試験結果との相関性より非イオン界面活性剤の生分解性の良否を判断するにはまず満足できるものと考えられている。

日本においても陰イオン界面活性剤を適用範囲とした日本工業規格 JIS K-3363(1968)を制定⁴⁾の際、今後の検討課題として非イオン界面活性剤の生分解度試験法が残された。油化学協会内に設けられた合成洗剤生分解度判定小委員会では検討を開始するに当たり、生分解の意味を環境に好ましくない影響を与えないまでの分解除去 (Foam pollution の消失) におき、界面活性を消失する程度を目安として、3 研究機関を中心として合同実験を行い、1971 年に中間報告²⁴⁾を出した。この合同実験においては、微生物への暴露方法として、前述の日本工業規格に準じる振とうフラスコ法とアメリカの SDA で高い評価の与えられた半連続活性汚泥法を用い、分析法はコバルトチオシアネート法による比色分析とアワ量測定を行い、非イオン界面活性剤のなかでも代表的なポリオキシエチレン系界面活性剤やアルカノールアミドを中心として生分解度試験法の検討を行った。これらの実験において振とうフラスコ法による測定結果は各実験機関ともほぼ一致し、比色分析法とアワ容量測定法の両評価法ともに近い値をえた。しかし、半連続活性汚泥法による測定結果では実験機関の間で差が大きいなど難点がみられた。

ちなみに、油化学協会では非イオン界面活性剤生分解度試験法に関する日本工業規格作製の委託を受け、上述の結果を基礎にして、活性汚泥を試験に供する非イオン界面活性剤でジェン化した後、振とう培養しその生分解度をコバルトチオシアネート法もしくはアワ量測定で分析する日本工業規格原案をまとめている。

OECD においては 1971 年に国際的に受け入れられた陰イオン界面活性剤生分解度試験法が公けにされた⁶⁾。

あわせてこの報告のなかで、非イオン界面活性剤の生分解試験法の必要性が指摘された。その後 OECD は、3 回の協同 Ring test を行っている。この試験に参加しているドイツやスイスの研究では Wickbold の方法を広く使っており、イギリスでは Wickbold^{14), 15)} や Patterson ら³⁾ の方法を検討している。2 回の Ring test の後、非イオン界面活性剤の生分解試験方法を検討する新しい Expert group が 1972 年 6 月に設立された。1973 年 1 月にその group の第 1 回公式会議が開催され、分析方法が討議された。始めに Wickbold 法を評価するために 3 種のノニルフェノールエトキシレートを使得行われた実験よりエチレンオキシド (EO) 6 mol 付加程度の場合に抽出操作の改良が望まれるが、総合的な結論においては Wickbold 法は今後さらに検討、標準化してゆく価値をもつ方法であることが認められた。次回の合同試験は第一アルコールエトキシレートについて行われる予定である。しかし、現在のところ group は微生物への暴露方法については検討を行っていない。

その他非イオン界面活性剤に関するヨーロッパの状況として、スウェーデンでは 1973 年以降ハード型のノニルフェノールエトキシレート (EO 5 mol 付加以上) を自主規制している。EC では非イオン界面活性剤の生分解度試験法を 1976 年までに作製するというタイムスケジュールが発表されている。

2.3 代表的な非イオン界面活性剤の生分解機序

2.3.1 置換基のないグリコール、ポリグリコール

酢酸菌 *Gluconobacter* や *Acetobacter* によるグリコールやポリグリコールの酸化に関する総説の中で De Ley²⁵⁾ はエチレングリコールはグリコール酸 HOCCO-OH へ転換し、ときにはシュウ酸 HOCCOOH まで変化するとしている。ジエチレングリコールも、速度は遅いが同様な経路で HOCCOCCOOH や HOCCOCCOOH を生ずることを報告した。またトリエチレングリコールもさらに遅くなるが、同じような経路をたどるとしている。

Abeles²⁶⁾ は、*Aerobacter aerogenes* を嫌氣的にグリセリンで生育させた後、無細胞抽出液を調製し、プロピレングリコールをプロピオンアルデヒドに、エチレングリコールをアセトアルデヒドに転換することを見いだした。

このようにポリグリコールの好氣的生分解における第一段階は末端-CH₂OH がアルデヒドさらにはカルボキシルに酸化されることであろうと考えられる。しかし、次の段階における機構、特にエーテル結合の切断について詳細はまだ明らかにされていない。

2.3.2 アルコールエトキシレート

直鎖第一アルコールエトキシレート (LPAE) の生分

解は、もとの型を急速に消失して分子中のエトキシレート部分をポリエチレングリコールのような型で遊離する。LPAE の場合、このような加水分解とアルキル鎖の酸化分解が考えられる²⁷⁾。

Frazer と Osburn²⁸⁾ は、直鎖テトラデシルアルコールエトキシレート (EO 8.3 mol 付加) を河川水中で分解させ、アワ・ストリップング法により残存している界面活性剤を単離して赤外線吸収スペクトル法で分析した。5 日目に界面活性剤含量は 0 を示し、溶液は起泡性を示さなかった。そしてクロロホルム抽出によってアルキル鎖のないポリエチレングリコール E_x を約 5.7 ppm 得た。実験開始時の LPAE 濃度は 19 ppm であり、EO 8.3 mol としては約 13 ppm に相当する。このことから疎水基が最初に分解し、ポリグリコールを残存させ、これも徐々に分解したことを示した。

Patterson ら²⁹⁾ は薄層クロマトグラフィーを用いて分解機序の検討を行い、アルコールエトキシレートの場合には、(i) 疎水部と親水部への分子の開裂、(ii) 疎水基の急速な酸化、の二つの経路があり、これらが同時に進行していると考えている。Patterson らは、300 mg/l のセチル・ステアリルエトキシレート (EO 9 mol 付加) を同量の乾燥汚デイを用いて分解を行い、薄層クロマトグラフィーで調べた出発物質濃度は 2 週間後に 10 mg/l に落ちていた。このときのクロロホルム抽出物を薄層クロマトグラフィーで分離した。薄層プレートの中心のバンドをかきとり溶媒抽出を行い、抽出物をさらにメチルエチルケトン (MEK)-水分配法で極性の差による分離を行った。MEK 画分、水画分に含まれる物質の分離を薄層クロマトグラフィーで行い、分別された物質の赤外線吸収スペクトル、NMR スペクトルを調べた。水画分からは分子量約 400 のポリグリコールタイプの物質を得、これは酸化を示すカルボニル基を含んでいた。アルキル基物質はみられなかった。MEK 画分にはもとの非イオン界面活性剤由来の物質であるが、アルキル部とエトキシル部の割合が未分解のものに比べより大きい、カルボニル基をもったエトキシレートを含んでいた。3 週間後に水画分に現れた物質の赤外線吸収スペクトルから、カルボニル基に対してエトキシル部の割合はさらに低くなっていることが明らかになった。このことはアルキル基とエトキシル基の間に加水分解開裂が生じたことを示している。また、セチル・ステアリルエトキシレート (EO 9 mol 付加) を同様に分解させ、通常のクロロホルム抽出を行った後、液を酸性にして再びクロロホルム抽出を行った。抽出物を MEK-水分配法で分離した後、薄層クロマトグラフィーにより分析した。水画分にはエトキシル基を含む物質が存在し、これはもとの非イオン界面活性剤よりも極性の大きい物質で、生成してから完全に消失するまで連続して認められ

た。赤外線吸収スペクトルから、カルボニル基とエトキシ基を含み、NMR スペクトルより1個のメチレン基はカルボキシル基に対して α 位にあることを示した。

Nooi ら³⁰⁾は ^{14}C -標識ステアリルアルコール EO 付加物6種を用い、バッチ式活性汚水法により $^{14}\text{CO}_2$ の生成、 ^{14}C の液中分布、および汚水への ^{14}C の結合よりそれらの生分解機序を調べた。まずはじめに、非イオン界面活性剤は CO_2 の生成のほとんどないまま汚水に吸着し、ついでアルキル鎖から分解する。この過程は大半のアルキル鎖が分解されると止まる。こうして生じた親水性の分解生成物は汚水から離れ、しばらくの後急速に分解される。また、EO 鎖が長くなるとEO 鎖の分解自体と同じくアルキル鎖の分解も遅くなることがわかった。

2.3.3 アルキルフェノールエトキシレート

アルキルフェノールエトキシレートの生分解過程²⁷⁾の中で最も著しいのはEO 鎖の短鎖化である。多分EO 鎖は疎水基についたまま、EO を一個ずつ短くしてゆくものと考えられている。そして末端のグリコールの-OHは、いずれの段階でもそのまま残されている。

$\text{R}\phi\text{OE}_n\text{OCCOH} \rightarrow \text{R}\phi\text{OE}_n + \text{HOCCOH} \rightarrow \text{HOCCOOH}$
短鎖化は純粋に加水分解によるものであり、エチレングリコールを生じ、これは引き続いて酸化されてゆくものと考えられる。一方、疎水基末端においても酸化が起こり、 ω -酸化さらには構造的に可能ならば β -酸化へ入ってゆくと考えられる。

アルキルフェノールエトキシレートの生分解過程は、Frazee と Osburn ら²⁸⁾やささらには Osburn や Benedict ら³¹⁾により赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル法により詳しく調べられた。赤外線吸収スペクトル法においては、脂肪族エーテルによる 1120 cm^{-1} の吸収と芳香族エーテルによる 1250 cm^{-1} の吸収を調べることからEO 濃度の測定を行うものである。Osburn らはこれらの分析方法を直接河川水溶液に用いることができないので単離、濃縮の手段として次の方法をとった。

(i) アフストリッピングを行って界面活性物質を分離し界面活性を失った物質を残存させる。

(ii) 中性もしくはアルカリ性でクロロホルム抽出を行う。

(iii) 強酸性化した後、再びクロロホルム抽出し、カルボキシル化合物を取り出す。

(iv) ときにはイオン交換樹脂処理を行い、イオン性のカルボキシルその他中間物質を除いた後、非イオン性の物質を活性炭に吸着させる。

Frazee と Osburn ら^{28), 30)}は分岐型ノニルフェノールエトキシレート (EO 10 mol 付加) を河川水で34日間生分解させ、その生分解の過程を前述の分離・分析法を用いて次のように報告している。試験期間の第2週から

第3週の間にはエチレンオキシドはかなりの分解を示した。0日目と34日目の残存界面活性剤の赤外線吸収スペクトルの分析から明らかにエトキシ基に減少がみられた。34日目に得られた抽出物はノニルフェノールエトキシレート (EO 4 mol 付加) と同じスペクトルを示した。ノニルフェノールエトキシレート (EO 4 mol 付加) を河川水で分解させると、10日目にアフストリッピング法で単離した界面活性剤は赤外線吸収スペクトルでカルボニル領域に吸収を示さなかったが、クロロホルム抽出物は明らかに 1700 cm^{-1} に吸収を示した。34日目には起泡性を示さず全界面活性性能を失ったが、クロロホルム抽出物濃度は最初の濃度の約60%を示した。一方、強酸性にしてクロロホルム抽出すると最初の濃度の75%が抽出されこれは強いカルボニルの吸収を示した。

Patterson ら²⁹⁾は、アルキルフェノールエトキシレートの最も通常の分解経路をアルキル基、芳香環、エトキシ鎖のゆっくりした酸化と加水分解が同時に起きることとしている。分岐型ノニルフェノールエトキシレート (EO 9 mol 付加) 20 mg/l を乾燥汚水 100 mg/l , pH 7 で分解させ6週間目に薄層クロマトグラフィーで分析して 9 mg/l まで分解させた。

分解物の薄層クロマトグラムによればスポットのパターンはそのまま、その R_f 値をやや下げていた。このことはアルコールエトキシレートのような開裂のないことを示すものである。通常のクロロホルム抽出後、液を酸性にして再抽出してもエトキシレートは見いだせなかった。そこで、より極性の分解物を分離するためにアルミナカラム法を用い、まず $\text{CHCl}_3\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ (50:47.5:2.5 vol/vol) で溶出し、次いで割合を(50:42.5:7.5 vol/vol)にかえ2番目の溶出を行った。6週間分解させた場合、アルミナカラムの1番目の溶出液中にはかなりエトキシ鎖長を短くしたエトキシレートのみを微量含んでいた。2番目の溶出液中に含まれていた物質は著しく芳香族の吸収が少なく、強いカルボニルとカルボキシルの吸収を示した。これはアルキル基末端への攻撃とエトキシ鎖のゆっくりした加水分解から生じた極性物質の存在を示している。Patterson らはアルキルフェノールエトキシレートとアルコールエトキシレートの初期経路の差異を芳香環と急速な酸化に抵抗性を示す分岐型のアルキル基の存在によるものと考えている。

浅原ら²⁴⁾はノニルフェノールエトキシレートを活性汚水を微生物源として振とうフラスコ法で5日間生分解させ、コバルトチオシアネート法による分析で生分解度98.2%を示したとき、培養液をクロロホルム抽出した。抽出物をガスクロマトグラフィーで分析すると図-3のようなクロマトグラムを示した。すなわち、エチレンオキシド2mol付加物に代表される低エチレンオキシド

図-3 ノニルフェノールエトキシレートの
ガスクロマトグラム

付加物が多量に検出され、出発物質と比較してエチレンオキシド鎖が短くなっていることが確認された。

2.4 非イオン界面活性剤生分解度試験法の問題点

非イオン界面活性剤の生分解度試験方法は国際的にみて、いまだ公式に採用されているものがない。そのおもな技術上の問題点としては、第一に非イオン界面活性剤は構造上多種多様であり分析法の制定が困難であることである。すなわち、このように幅広い化合物に適用しうる分析法を確立することが極めて困難なところに大きな問題がある。第二に、ある定量法で評価される生分解の程度とそれに伴う分子構造の質的变化との関係が一義的につながり難いなどの難点があげられる。

Mausner ら²⁾も非イオン界面活性剤の微生物分解性の試験に関して標準の実験室の方法を確立する場合に同じことを指摘している。

以上のように困難は多いが、しかし生分解度試験法を開発するため新しい試みもなされている。

Sturm ら¹⁰⁾は、分解性のスクリーニング試験を CO₂ 発生試験法を用いて検討した。この方法の長所は第1に非常に多くの有機物質の迅速なスクリーニング法として特別な分析技術を確立しなくてよい点である。第2に第一次の分解よりもむしろ最終的な分解の速度と分解度を予備的に判断することができることである。さらにこの方法は、非イオン界面活性剤の微生物分解をみる場合に、広い範囲の条件下で行うことができ容易に条件をかえて実施しうることである。この基本的な試験は、嫌気条件、低温、限られた酸素条件(微好气的)および ¹⁴C でラベルした物質を用いて分解の機序を決定する試験法に改良が行われている。

本稿は、日本油化学協会関西支部主催の第30回界面化学部会(昭和48年11月27日)にて講演したものである。

(昭和48年11月1日受理)

文 献

- 1) C.A. Vath, *Soap Chem. Spec.*, **40** (2), 56, 182 (1964)
- 2) M. Mausner, J.H. Benedict, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **46**, 432 (1969)
- 3) Ministry of Housing and Local Government, "Eighth

Progress Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents", Her Majesty's Stationery Office, (1966), London

- 4) 日本工業標準調査会, 合成洗剤の生分解度試験方法, JIS K 3363-1968
- 5) The Subcommittee on Biodegradation Test Method of the SDA. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 986 (1965)
- 6) OECD Expert Group on Biodegradability of Synthetic Detergent, "Determination of The Biodegradability of Anionic Synthetic Surface Active Agents" (1971)
- 7) Bundesgesetz Blatt, Teil No. 49, s. 698, Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergentien in Wasch- und Reinigungsmitteln, (1962), Bonn
- 8) 日本化学会編, 実験化学講座 24, 生物化学Ⅱ, p. 85, 丸善, 東京
- 9) 日本工業標準調査会, 工場排水試験方法, JIS K 0102-1971
- 10) R.N. Sturm, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **50**, 159 (1973)
- 11) E. Heinerth, *Tenside*, **3**, 109 (1966)
- 12) Department of the Environment, "Thirteenth Progress Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents", Her Majesty's Stationery Office, (1972), London
- 13) Department of the Environment, "Fourteenth Progress Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents", Her Majesty's Stationery Office, (1973), London
- 14) R. Wickbold, *Tenside*, **8**, 61 (1971)
- 15) R. Wickbold, *Tenside*, **9**, 173 (1972)
- 16) P. Gerike, R. Schmid, *Tenside*, **10**, 186 (1973)
- 17) E. Brown, T.J. Hayes, *Analyst*, **87**, 755 (1955)
- 18) N.T. Crabb, H.E. Persinger, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **41**, 752 (1964)
- 19) R.A. Greff, E.A. Setzkorn, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 180 (1965)
- 20) A.E. Hey, S.H. Jenkins, *Water Research*, **3**, 887 (1969)
- 21) 大越, 秋野, 須藤, 用水と廃水, **8**, 220 (1966)
- 22) S.J. Patterson, C.C. Scott, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **44**, 407 (1967)
- 23) S.J. Patterson, C.C. Scott, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 528 (1968)
- 24) 浅原, 関口ら, 油化学, **21**, 33 (1972)
- 25) J. De Ley, K. Kersters, *Bacteriological Reviews*, **28**, 164 (1964)
- 26) R.H. Abeles, H.A. Lee Jr., *J. Biol. Chem.*, **236**, pc 1 (1961)
- 27) R.D. Swisher, "Surfactant Biodegradation", Marcel Dekker Inc., (1970), New York
- 28) C.D. Frazee, Q.W. Osburn, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **41**, 808 (1964)
- 29) S.J. Patterson, C.C. Scott, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **47**, 37 (1970)
- 30) J.R. Nooi, M.C. Testa, *Tenside*, **7**, 61 (1970)
- 31) Q.W. Osburn, J.H. Benedict, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **43**, 141 (1966)