土壌からの分離菌による非イオン界面活性剤の分解

田 中 広 範・小 西 一 生

花王石鹼株式会社産業科学研究所（和歌山市湊薬種畑1334）

Biodegradation of Nonionic Surfactants by Bacteria Isolated from Soil

Hironori TANAKA and Kazuo KONISHI

Industrial Research Laboratories, Kao Soap Co., Ltd.
(1334, Minato-Yakushubata, Wakayama)

Polyoxyethylene(POE) alkylether-assimilating bacteria were isolated from soils by enrichment culture technique. Four isolated strains were all identified as genus *Pseudomonas* and their substrate specificities for some compounds related to nonionics were discussed. Moreover, assimilating ability of other species of standard genus *Pseudomonas* were also studied. The biodegradability of nonionic surfactants by these isolated and standard strains decreased in the following order, POE acyl ester, POE sorbitan fatty acid ester, POE alkyl ether and POE alkyl phenyl ether. Ester-type nonionics were first hydrolyzed at ester linkage in a relatively short time and fatty acid parts were gradually degraded. Polyether parts, however, were found to be hardly degraded within several days.

1 緒 言

非イオン界面活性剤は乳化剤、分散剤、洗浄剤およびあわ消し剤などに広く用いられ、近年その使用量や応用範囲はますます拡大する傾向にある。それに伴って、界面活性剤のうちで最も生産量の多いアニオン界面活性剤とともに、自然界における非イオン界面活性剤の生分解についても大きな関心と呼んでいる。わが国においてもこれらの動向に対応して、非イオン界面活性剤の生分解度の測定方法を統一するため、最近 JIS¹⁾ で試験法が規定された。

一般にポリエーテル結合を持つ化合物は化学的に安定で生分解されにくい、Fincher と Payne²⁾、大亦ら³⁾ および緒方ら⁴⁾ は PEG を唯一の炭素源とする菌株を土壌より分離し、その分解経路に考察を加えている。また原田ら⁵⁾ も低級アルキルエーテル化合物を資化する菌株を同じく土壌より分離して、これらの菌の作用特異性を検討している。また一方、非イオン界面活性剤の生分解に関しても、これまで数多くの研究がなされており、特にアルコールエトキシレートやアルキルフェノールエトキシレートについては、Frazee と Osburn⁶⁾ による赤外スペクトル法を用いた研究や Patterson ら⁷⁾ の薄層クロマトグラフィーによる生分解機構の研究などのほか、多くの報告があり、これらの研究例も含め、非イオン界面活性剤の生分解に関しては Swisher の成書⁸⁾ などに詳しく

まとめられている。しかしこれまでの研究では微生物源としてはほとんどが汚水や河川水などのいわゆる複合微生物であり、実際の分解に関与している細菌は不明であるといつてよく、分解菌の分離同定まで行われている研究は少ないと思われる。他方、単一微生物による非イオン界面活性剤の生分解についての研究も少なく Wedderburn⁹⁾、Barr ら¹⁰⁾ および Hasunuma ら¹¹⁾ が防腐剤の研究の中で、数種のよく知られた細菌あるいはカビの非イオン界面活性剤資化能を検討しているにすぎない。

我々は界面活性剤分解菌を得る目的で研究をすすめており、その一環として、今回土壌より POE デシルエーテルを唯一の炭素源とする菌を4株分離し、これらの菌株の諸性質を検討した。さらに形態的な観察と各種の生理試験から、これらはいずれも *Pseudomonas* 属と推定されたので、15種の *Pseudomonas* 属の標準株を入手し、上記の分離菌株によって比較的良好に資化された、POE アシルエステル、POE ソルビタン脂肪酸エステル、および POE アルキルエーテルに対する標準菌株の分解能を検討し、合わせて薄層クロマトグラフィーなどを用い、その生分解過程についてもいくらか調べた。本報ではこれらの結果について述べることにする。

2 実 験

2・1 界面活性剤と関連化合物

本研究で使用した界面活性剤および関連する化合物は

下記の通りである。

非イオン界面活性剤		HLB
(1) POE オクチルフェニルエーテル (Triton X-100)	13.5	
(2) POE ソルビタンモノドデカノエート (Tween 20)	16.7	
(3) POE モノドデカノエート (Emanone 1112)	13.7	
(4) POE デシルエーテル ($\bar{p}=8$)	—	
(5) POE ドデシルエーテル (Emulgen 108)	12.1	
(6) POE ドデシルエーテル (Emulgen 120)	15.3	
(7) POE ドデシルエーテル (Emulgen 147)	17.1	
(8) POE 9-オクタデセニルエーテル (Emulgen 409)	12.1	
(9) POE 9-オクタデセニルエーテル (Emulgen 420)	13.6	
(10) POE 9-オクタデセニルエーテル (Emulgen 430)	16.2	

関連化合物

- (1) エチレングリコール (EG)
- (2) トリエチレングリコール (TEG)
- (3) ポリエチレングリコール 400 (PEG 400)
- (4) ポリエチレングリコール 1000 (PEG 1000)
- (5) エチレングリコールモノメチルエーテル
(EGMM)
- (6) エチレングリコールモノエチルエーテル
(EGME)
- (7) ジエチレングリコールモノエチルエーテル
(DGME)
- (8) ジエチレングリコールモノブチルエーテル
(DGMB)
- (9) ジエチレングリコールジメチルエーテル
(DGDM)

2.2 分離培養法

培地には炭素源として POE デシルエーテル ($\bar{p}=8$) を含む A 培地を用いた。A 培地の組成は **Table-1** に示した。菌の分離は集積培養法によった。すなわち A 培地の入った振とうフラスコに花王石鹸 (株) 和歌山工場より採集した土壌を接種し、30°C で 5 日間振とう培養を行った。その後無菌水で培養液を希釈した後、ベトリザらに入れ、普通寒天培地で 37°C 2 日間平板培養を行った。外観が最も代表的であると思われたコロニーを再び A 培地に接種し、続いて同様な平板培養を行った。この操作を 2 度繰り返すことによって、POE デシルエーテル資化性菌を得た。また分離菌の保存には普通寒天培地を用いた。

2.3 菌の生育度の測定法

菌の生育を比較検討するために用いた B 培地を同じく

Table-1 に示す。B 培地は炭素源となる化合物を 1% 含む合成培地である。実験を行う前日に菌を保存株から新しいスラントに植え替え、これから 2 白金耳の菌をとり、無菌生理食塩水 10 ml に加え菌の懸濁液を調製した。次いで 100 ml の B 培地の入った 500 ml 用の振とうフラスコに菌の懸濁液 1 ml を加え、30°C で振とう培養を行った。菌の生育は濁度 (OD at 610 nm) で表した。

Table-1 Media composition for screening test and growth experiment.

Compound	Medium A screening test* (%)	Medium B growth experiment (%)
NH ₄ Cl	0.05	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05	0.1
Na ₂ HPO ₄	0.3	0.15
KH ₂ PO ₄	0.2	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	0.02
Carbon source	POE decyl ether 1.0	1.0
Yeast extract	—	0.03

* pH 6.7

3 結果および考察

本研究では実験 2.2 で述べた集積培養法により得られた菌株のうち、最終的には比較的良好な資化能を示した 4 種の菌株、KW-22, KW-42, KW-61 と KW-73 を選び出し、まずこれらの菌株の諸性質を検討した。

3.1 分離菌の資化能

非イオン界面活性剤と関連化合物に対する資化能を検討した結果を **Table-2** に示した。**Table-2** から 4 種の分離菌株の資化能はいずれも同じ傾向を有していることがわかった。つまり、

(1) 非イオン界面活性剤のうちでは生育の順位は Emanone > Tween > Emulgen > Triton であり、エステル結合を持つ化合物で大きな濁度が観察された。ベンゼン環を有する Triton X-100 では培養液にほとんど変化は認められなかった。

(2) POE アルキルエーテル同族体間の比較から、KW-73 株を除いて、エチレンオキシド鎖の小さい化合物ほど生育は良いことが認められた。

(3) EG, TEG および EGMM などの 5 種のエーテル化合物は分解されず、PEG においても培地の濁度増加は観察されなかった。

これらの結果より、本分離菌の分解性は既に知られた微生物の一般的な非イオン界面活性剤分解能とよく一致すると考えられる。

3.2 分離菌の経時的な生育

ここでは **Table-2** で良好な生育を与えた Emanone 1112, Tween 20 と Emulgen 108 の 3 種類を炭素源と

Table-2 Utilization of nonionics and various ether compounds by isolated strains.

Compound	Growth (OD at 610 nm)			
	Isolated strain			
	KW-22	KW-42	KW-61	KW-73
Triton X-100	0.002	0.001	0.003	0.005
Tween 20	0.287	0.281	0.407	0.243
Emanone 1112	0.425	0.367	0.545	0.481
POE decyl ether	0.181	0.150	0.180	0.113
Emulgen 108	0.128	0.082	0.142	0.010
Emulgen 120	0.044	0.028	0.042	0.018
Emulgen 147	0.020	0.015	0.016	0.010
Emulgen 409	0.032	0.104	0.120	0.125
Emulgen 420	0.006	0.011	0.021	0.157
Emulgen 430	0.001	0.001	0	0.004
EG	0.001	0.001	0.003	0.002
TEG	0.001	0.002	0.005	0.003
PEG 400	0.001	0.001	0.003	0.003
PEG 1000	0.001	0.003	0.003	0.003
EGMM	0	0	0	0
EGME	0.009	0.001	0.008	0.007
DGME	0.008	0.001	0.004	0
DGMB	0	0	0	0
DGDM	0.002	0	0.002	0.002

Cultivation period : 3 days

して用い、分離菌株の経時的な生育状態を検討した。また本実験ではあらかじめじゅん化した菌を使用した。すなわち上記の界面活性剤を 0.5% 含む B 培地に菌を接種し、6 日間、30°C でじゅん養した後、界面活性剤を含む同じ培地に培養液を加え、同じく 30°C で振とう培養を行った。一定日数経過ごとに菌の生育に従う濁度と pH

Fig.-1 Growth curves of isolated strains on three nonionics.

変化を測定した。結果を **Fig.-1** に示す。

Fig.-1 より、Emanone や Tween のようなエステル結合を持つ化合物はよく分解され、濁度は 1~3 日の間で最高に達し、その後減少することが認められた。また pH は逆に培養後すぐに最低値となり、その後再び増加する傾向があり、特に KW-42 の菌株は 1 日で pH 6.71 から 4.64 になり、急激な酸性側への移行があった。一方 Emulgen では前二者と異なり、日数の経過とともに菌は生育し続け、同時に pH は漸次減少し、酸性化合物の遊離が考えられた。

3.3 分離菌の同定

常法に従って行った分離菌の形態的観察と生理試験の結果を **Table-3** に示す。

Table-3 から分離菌株は次のように推定した。なお同定には "Bergey's manual of determinative bacteriology (8th edition)" を参考とした。

KW-22; *Pseudomonas aeruginosa*

non motile variety

KW-42
& ; *Pseudomonas aeruginosa*
KW-61

KW-73; *Pseudomonas putida*

すなわち 4 株とも *Pseudomonas* 属と同定された。そのうち KW-22 株についてはトレハロースを資化し、非運動性であるという二点において *Ps. aeruginosa* の普遍的な性質に一致しないが King A 培地における特徴的な濃緑色色素産生などの点から上記のように同定した。

3.4 *Pseudomonas* 標準菌株による非イオン界面活性剤の経時的分解

本研究で土壌より分離した非イオン界面活性剤資化性菌はすべて *Pseudomonas* 属であったので、次に *Pseudomonas* 属の他種との比較を行うために標準株を入手し、同様に非イオン界面活性剤の分解性を検討することとした。本項ではじゅん化の操作を省いた。用いた界面活性剤は同様に Emanone 1112, Tween 20 および Emulgen 108 であり、15 種類の標準菌株による 10 日培養後の濁度と pH の変化を **Table-4** に示した。培地としては B 培地を使用した。

Table-4 の結果は本質的には分離菌株の場合 (**Fig.-1**) の結果とほぼ同じである。すなわち Emanone と Tween は全ての標準菌株に対して同じ傾向を示し、Emanone で生育の良い菌株は Tween においても生育は良好で、かつ pH の変化についても、濁度増加の著しい菌株の培養液の pH は初発 pH よりも大きく酸性側に移行した。検討した菌の中では特に *Ps. diminuta*, *Ps. perlurida* および *Ps. pavonacea* の生育は良くなかった。一方、Emulgen では *Ps. aeruginosa* を除いていずれの標準菌株においても濁度は増加しなかった。また

Table-3 Taxonomical studies of isolated strains.

	Morphological and physiological characteristics			
	Isolatrain			
	KW-22	KW-42	KW-61	KW-73
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	Non-motile	Motile	Motile	Motile
Flagellation	Non-flagella	Polar	Polar	Polar
Gram staining	—	—	—	—
Optimum pH	6.5~7.2	6.5~7.2	6.5~7.5	6.5~7.5
Growth at 37°C	+	+	+	+
41°C	+	+	+	—
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+
Denitrification	+	+	+	—
Hydrolysis of gelatin	+	+	+	—
starch	—	—	—	—
H ₂ S production	—	—	—	+
O-F test (Hugh-Leifson's method) ⁽¹²⁾	Oxidation	Oxidation	Oxidation	Oxiation
Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate	—	—	—	—
Pigment production on King A	Diffusible blue-green	Diffusible blue-green	Diffusible blue-green	—
King B	Fluorescent yellow-green	Fluorescent yellow-green	—	—
Glycerol	Fluorescent yellow-green	Fluorescent yellow-green	Fluorescent green	—
Glucose-glutamate	—	—	brown	—
Assimilation of carbon compounds				
Ribose	+	+	+	—
Rhamnose	—	—	—	+
Glucose	+	+	+	+
Sucrose	—	—	—	+
Trehalose	+	—	—	—
Ethanol	+	+	+	+
Geraniol	+	+	+	—
Adonitol	—	—	—	—
Inositol	—	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—
Arginine	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+
Alanine	+	+	+	+
Na-acetate	+	+	+	+
Amygdalic acid	+	+	+	—
Sebacic acid	+	+	+	+
Mucic acid	—	—	—	+
Acetamide	+	+	+	—

+ : positive — : negative

Table-4 Growth of genus *Pseudomonas* strains on three nonionics.

No.	Standard strain	Emanone 1112		Tween 20		Emulgen 108	
		OD* ¹	pH* ²	OD* ¹	pH* ²	OD* ¹	pH* ²
1	<i>Ps. acidovorans</i> ATCC 15668	0.92	5.67	0.84* ³	6.27	0	6.89
2	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 10145	1.17	4.32	0.41* ³	6.19	0.38* ³	5.71
3	<i>Ps. diminuta</i> ATCC 11568	0.08	6.63	0.09	6.62	0	6.80
4	<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	1.10	6.30	0.28* ³	6.54	0	6.77
5	<i>Ps. fragi</i> ATCC 4973	0.38	6.66	0.25	6.79	0	6.81
6	<i>Ps. maltophilia</i> ATCC 13637	0.44	6.49	0.26	6.70	0	6.86
7	<i>Ps. oleovorans</i> ATCC 8062	1.07* ³	6.27	0.31	6.72	0.10	6.80
8	<i>Rs. cepacia</i> ATCC 17759	0.93* ³	5.41	0.23	6.20	0.02	6.61
9	<i>Ps. perlurida</i> ATCC 490	0	6.65	0.05	6.53	0	6.70
10	<i>Ps. putida</i> ATCC 12633	1.68	5.82	0.88	6.42	0.09	6.71
11	<i>Ps. reptilivora</i> ATCC 14836	1.28	5.97	0.78	6.37	0.04	6.73
12	<i>Ps. stutzeri</i> ATCC 17588	0.72	5.96	0.78	6.25	0.07	6.80
13	<i>Ps. taetrolens</i> ATCC 4683	1.02	6.00	0.63	6.43	0.02	6.85
14	<i>Ps. testosteroni</i> ATCC 11996	1.54	6.37	0.21* ³	6.71	0	6.76
15	<i>Ps. pavonacea</i> ATCC 951	0	6.71	0	6.69	0.01	6.73

*¹ Calculated by subtracting blank values (610nm) *² Initial pH values of media containing Emanone 1112, Tween and Emulgen 108 were 6.75, 6.71 and 6.74, respectively. *³ Slightly flocculated Cultivation period: 10 days

Ps. aeruginosa 以外はほとんど pH 変化は認められなかった。

3.5 *Ps. aeruginosa* による Emanone 1112 と Tween 20 の分解物の分析

Emanone および Tween の培養 4 日後の培養液のシリカゲル薄層クロマトグラムを Fig.-2 に示した。なおクロマトグラムの番号は Table-4 における菌の No. を S は標準物質を意味する。

Fig.-2 より培養液は標準物と比較して明らかなパターン変化が認められ、とくに、*ps. aeruginosa* による Emanone の分解物では R_f 値が 0.2 以上のスポットがなくなり、Tween においても分解物は原点にとどまり、試料化合物の分解ないしは極性化が観察された。

Developing solvent; Ethylacetate-Acetic acid-Water (76:16:15 vol/vol/vol)
Detection: Dragendorff method

* S and other numbers represent standard materials and "strain No." in Table-4, respectively.

Fig.-2 TLC of Emanone 1112 and Tween 20 degraded by genus *Pseudomonas*.

次に Table-4 および Fig.-2 において比較的分解能が大きいと考えられた *Ps. aeruginosa* を分解菌に選び、Emanone および Tween の培養分解物の分析を行った。

培養液を塩酸性にした後、硫酸ナトリウムを加えエチルエーテルで抽出し、さらに水層部をクロロホルム抽出した。

濃縮後、エーテル抽出物は IR より脂肪酸であることがわかった。得られた抽出脂肪酸量を Table-5 に示した。Table-5 では Emanone および Tween のアルコ

ール性アルカリによる加水分解-エチルエーテル抽出で得られた脂肪酸量をブランク値とし、同量の界面活性剤を含む培地の培養後に抽出される脂肪酸量をブランク値と比較した。

Table-5 Ratio of the amount of fatty acid extracted from the culture solution.

Nonionic surfactant	Amount of fatty acid			
	Cultivation time (day)			
	0 (Blank)*	2	6	10
Emanone 1112	1.00	0.98	0.81	0.67
Tween 20	1.00	0.19	0.03	0

* When 750 mg of Emanone 1112 and Tween 20 were hydrolyzed by alcoholic KOH followed by extraction with ethyl ether, 287 and 125 mg of fatty acid were respectively obtained.

Table-5 より、Emanone の培養液からは 2 日経過後ブランク値に近い脂肪酸が得られ、かつこの脂肪酸は経時的に減少していることが認められた。一方、Tween 培養液のエーテル抽出物は 10 日後になると全く得られず、さらに脂肪酸の存在しないことを薄層クロマトグラフィーで確認した。続いて Emanone 培養液から得られた脂肪酸のアルキル組成分布をジアゾメタンによるメチルエステル化-ガスクロマトグラフ分析で調べたが、アルキル組成は全く変化がなかった。従って脂肪酸のアルキル鎖の特異的な分解はないと考えられる。

一方、培養 10 日後の Emanone および Tween の培養液のクロロホルム抽出物は IR によりカルボニルの吸収は全くなくなり、これらはともに EO 鎖をもつポリエーテルであると判明した。さらに Tween の培養液より得られたポリエーテルについては、辻ら¹³⁾の方法に従ってエーテル開裂-ガスクロマトグラフ分析を行い、ソルビドおよびソルビタンの存在を確認したので、ソルビタンの EO 付加物であると決定した。

このような薄層クロマトグラフ分析および抽出物の分析の結果から、Emanone 1112 と Tween 20 は *Ps. aeruginosa* によって 1~2 日程度の短期間に加水分解作用を受け、次いで、一次分解された脂肪酸とポリエーテルは徐々に分解されるものと考えられる。またその際脂肪酸の方がポリエーテルに比較して圧倒的に速く分解されており、これらの結果は *Micrococcus tweenis* による Tween 80 の代謝を研究した南ら¹⁴⁾の結果とよく一致する。しかし本研究においては Tween の培養後液からは脂肪酸がほとんど得られず、特に脂肪酸の分解が速いと考えられるが、これらの詳細についてはさらに検討する必要があると思われる。

本研究にあたり、分離菌の同定に関し御協力いただいた花王石鹼(株)東京研究所 清水治夫および井上恵雄 両氏に深く感

謝いたします。

(昭和 51 年 5 月 14 日受理)

文 献

- 1) JIS K3364 (1975)
- 2) E.L. Fincher, W.J. Payne, *Appl. Microbiol.*, **10**, 542 (1962)
- 3) 大亦正次郎, 小島信彰, 坂井拓夫, 醸酵協会誌, **32**, 196 (1974)
- 4) K. Ogata, F. Kawai, M. Fukaya, Y. Tani, *J. Ferment. Technol.*, **53**, 757 (1975)
- 5) T. Harada, Y. Nagashima, *J. Ferment. Technol.*, **53**, 218 (1975)
- 6) C.D. Frazee, Q.W. Osburn, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 808 (1964)
- 7) S.J. Patterson, C.C. Scott, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 37 (1970)
- 8) R.D. Swisher, "Surfactant Biodegradation" Marcel Dekker Inc., (1970), New York
- 9) D.L. Wedderburn, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **210** (1958)
- 10) M. Barr, L.F. Tice, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **46**, 442 (1957)
- 11) K. Hasunuma H. Futagoishi, 防菌防黴, **3**, T 311 (1975)
- 12) R. Hugh, E. Leifson, *J. Bact.*, **66**, 24 (1953)
- 13) K. Tsuji, K. Konishi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 109 (1975)
- 14) 南一守, 尾形英三郎, 日本細菌学雑誌, **14**, 987 (1959)

書 評

“SEIYU ROKU” (製油録)

大 蔵 永 常 著

松 川 半 山 画

EIKO ARIGA 訳 (英)

C. Litchfield 編

A 5 判 80 ページ (美装箱入り)

定 価 7:00 ドル

送 料 40 セント

発 行 所 Olearius Editions

P.O. Box 525, New Jersey

08903, U.S.A.

わが国における製油技術に関する古典として、衛重兵衛著“搾油濫觴”並びに大蔵永常著“製油録”が知られている。前者は 1810 年に、後者は 1836 年に出版された。この両書の抜粋が、辻本満丸著“日本植物油脂”(1912)に掲載されている。

本書は製油録の全文を英訳し、和綴にしたもので、訳者は日本名 EIKO ARIGA である。編者は米国ニュージャージー州ラトガース大学生化学科の教授 C. Litchfield である。同教授はトリグリセリドの分析の本“Analysis of Triglycerides”Academic Press (1972)の著者である。

内容は序文、関東流の油搾り方、水車搾り、大阪流油搾り方、淡色ごま油の製法、大阪-江戸の油の市価の比較、しぼるという字の考察等である。また、さし絵は原画のままで、英文の説明をしている。さらに、注 (1~19)、大蔵永常略伝及び製油録に書かれた技術を同時代の西欧の油脂技術と比較した章がある。この章によれば、搾油技術は両者とも同程度のものではあったが、種子の粉碎及び圧搾技術の進歩とアルカリ精製の点で、日本の技術は劣っていた。

原典が入手困難な現在、英文にせよ本書が復刻に近い形で刊行された意義は深く、江戸時代の製油技術を知るための貴重な資料と思われる。

(東京工業試験所 加藤秋男)