化学物質の生分解度試験に関する研究(第 2 報)^{注1)}発生 CO₂ を指標とした界面活性剤の生分解性の検討

伊藤 伸一・節田 節子・宇都宮 暁子・内藤 昭治

神奈川県衛生研究所 (横浜市旭区中尾町 52-2)

Studies on the Biodegradation Test Method of Chemical Substances. II.

Ultimate Biodegradabilities of Some Anionic, Nonionic, and Cationic Surfactants Estimated by CO₂ ProductionShin-ichi ITOH, Setsuko SETSUDA, Akiko UTSUNOMIYA, and Syōji NAITO
Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories (52-2 Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama)

The ultimate biodegradabilities of ten anionic, three cationic and five nonionic surfactants, were studied. As test surfactants, sodium linear alkylbenzenesulfonates (LAS), sodium alkyl sulfates (AS), sodium alkylpoly(oxyethylene) sulfates (AES), sodium α -olefinsulfonate (AOS), sodium *N*-acyl-L-glutamate (LG), sodium salt of fatty acid (Soap), alkyltrimethylammonium chloride (ATM), dialkyl=dimethylammonium chloride (ADM), alkylbenzyltrimethylammonium chloride (ABDM), alkyl poly(oxy=ethylene) ether (LPE), *p*-alkylphenyl poly(oxyethylene) ether (NPE), *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)alkanamide (LDEA), poly(oxyethylene) ester of fatty acid (PAE) and *N,N*-bis[poly(oxyethylene)]alkylamine (PEA) were used, and glucose was served as readily biodegradable control in each test set.

The test solutions were incubated at 27°C under an aerobic condition. The rate and degree of biodegradation in the 10-d test period were followed by measuring CO₂ production, total organic carbon (TOC), methylene blue active substances (MBAS) for anionics and iodobismuthate active substances (BIAS) for nonionics.

The results of the comparative biodegradabilities of the surfactants, estimated by biodegradation index, were as follows; (AS, LG) > Soap > (AES, AOS, PAE) > LDEA > LPE > LAS >> (NPE, PEA, ATM, ADM, ABDM).

1 結 言

近年環境中へ放出される化学物質に対して、実際の環境レベルに近い濃度条件で最終的生分解を追跡できる数々の試験法が開発されてきた。特に界面活性剤についてはこれまでに数多くの研究がなされている。最近では、発生 CO₂ 量から生分解性を検討した Sturm²⁾ や Gledhill³⁾、著者ら¹⁾の報告、全有機炭素 (TOC) の減少量から検討した関口ら^{4),5)} や Cordon ら^{6),7)} の報告、消費酸素量から検討した梶田ら⁸⁾ の報告など多くの研究報告がある。しかしアニオン、非イオン、カチオン界面活性剤の生分解性について、生分解試験方法及び分析法を統一

して、同一次元で比較検討した研究例は少なく、最近では TOC 法を用いてアニオン、非イオン界面活性剤の生分解性を検討した関口らの報告⁴⁾ がある程度である。

そこで今回著者らは、先に開発した発生 CO₂ 測定法を用いた生分解試験方法¹⁾ に試験方法を統一して、アニオン、非イオン、カチオン界面活性剤 18 種類の生分解性について比較検討した。生分解性の評価に当たっては、著者らが提案している生分解指数 Biodegradation index を用いて、培養 10 d 目の界面活性剤の生分解性を比較検討した。また発生 CO₂ 量の測定と平行して TOC 量、メチレンブルー活性物質質量、ヨウ素ビスマス活性物質質量、一般細菌数なども同時に測定し、多次元から界面活性剤の生分解過程を追跡したのであわせて報告する。

注1) 前報: 衛生化学, 22, 254 (1976)

Table-1 Samples of surfactant.

Type	Composition	Abbreviation	
Sodium alkylbenzenesulfonate R-C ₆ H ₄ SO ₃ Na	R : <i>n</i> -C ₁₀₋₁₅	L A S	A B S
	1-Dodecene derived LAS	D-1-LAS	
Sodium alkyl sulfate R-OSO ₃ Na	R : lauryl alcohol	L S	A S
	R : coco alcohol	C S	
Sodium alkylpoly(oxyethylene) sulfate R-(OCH ₂ CH ₂) _{<i>n</i>} OSO ₃ Na	R : coco alcohol, $\bar{n}$: 3.0	C E S	A E S
	R : oxo alcohol(C ₁₂₋₁₅), $\bar{n}$: 3.0	O E S	
	R : <i>s</i> -alcohol(C ₁₂₋₁₅), $\bar{n}$: 3.0	<i>s</i> -DES	
Sodium α -olefinsulfonate R-CH=CHCH ₂ SO ₃ Na R-CH(OH)CH ₂ SO ₃ Na	R : C ₁₂ (alkanesulfonate : hydroxyalkanesulfonate = 7 : 3)	A O S	
Sodium <i>N</i> -acyl-L-glutamate R-CO·NHC ₃ H ₅ (COONa) ₂	R : lauric acid	L G	
Sodium salt of fatty acid R-COONa	R : C ₁₅₋₁₇	Soap	
Alkyltrimethylammonium chloride [R-N(CH ₃) ₃] ⁺ Cl ⁻	R : tallow(C ₁₆₋₁₈)	A T M	
Dialkyldimethylammonium chloride [$\overset{R'}{R}$] ₂ N(CH ₃) ₂ ⁺ Cl ⁻	R', R : tallow(C ₁₆₋₁₈)	A D M	
Alkylbenzyltrimethylammonium chloride [R-N(CH ₃) ₃ CH ₂ C ₆ H ₅] ⁺ Cl ⁻	R : coco	A B D M	
Alkyl poly(oxyethylene) ether R-O(CH ₂ CH ₂ O) _{<i>n</i>} H	R : lauryl alcohol, $\bar{n}$: 8.5	L P E	
<i>p</i> -Alkylphenyl poly(oxyethylene) ether R-C ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) _{<i>n</i>} H	R : branched C ₉ , $\bar{n}$: 9.5	N P E	
<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl) alkanamide R-CO·N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	R : C ₁₁	L D E A	
Poly(oxyethylene) ester of fatty acid R-COO(CH ₂ CH ₂ O) _{<i>n</i>} H	R : coco, $\bar{n}$: 10.0	P A E	
<i>N,N</i> -bis[poly(oxyethylene)]alkylamine R-N $\langle \begin{smallmatrix} (CH_2CH_2O)_mH \\ (CH_2CH_2O)_nH \end{smallmatrix} \rangle$	R : C ₁₈ , $\overline{m+n}$ = 15	P E A	

2 実 験

2.1 試料

Table-1 に示した 10 種類のアニオン界面活性剤, 3 種類のカチオン界面活性剤, 5 種類の非イオン界面活性剤及び対照としてグルコース (DIFCO 社製 BACTO-DEXTROSE) を用いた。以下本報において界面活性剤の名称は Table-1 の略号で示した。

2.2 生分解試験法¹⁾

2.2.1 培養液及び試験溶液の調製

生分解試験に先立ち, BOD 測定用の希釈水²⁾を 27℃ の恒温室で 2 d 間暴気し, 落下細菌など環境から自然に混入する微生物を増殖させたものを培養液とした。この

培養液に唯一の炭素源として供試界面活性剤またはグルコースの 2000 mg/l 溶液を, 一定濃度 (10mg/l または 20 mg/l) になるように添加したものを試験溶液とした。

2.2.2 培養装置

Fig.-1 に示したような気相部と液相部から構成された半閉鎖系のかっ色試験びんを培養装置として用いた。かくはんには, 空試験用に単独スターラーを, その他には六連式スターラーを用いた。

2.2.3 ダイアウエイ試験

培養装置に供試物質の試験溶液 1700 ml を入れて, 27℃ の恒温室で 10 d 間かくはん培養した。これと平行して, 対照のグルコース溶液と空試験の培養液だけのものについても同様に試験を行った。測定に必要なサンプル

Fig. -1 Experimental apparatus for CO₂ production test.

ルは、Fig. -1 に示したようにシリンジを用いて静かに採取し、以下の分析に供した。

2.3 分析法

2.3.1 発生 CO₂ 量

気相部の気体をガスタイトシリンジで正確に 1.0 ml 採取し、以下に示した条件でガスクロマトグラフ分析を行い、気相部の CO₂ 濃度を測定した。

ガスクロマトグラフィーの条件

- ①機種：島津製 TCD-4 BPT (血中ガスサンプラー BGS-1 A 付)
- ②カラム：ステンレスカラム (3 mm×1 m), モレキュラシープ 5 A (30/40)
- ③カラム温度：200℃
- ④検出器温度：150℃
- ⑤キャリアーガス：水素

供試物質が完全に生分解された場合の理論上の CO₂ 発生量に対する実際の CO₂ 発生量の割合 (発生 CO₂ 量に基づく生分解率) % は次式により求めた。

$$y = \frac{1}{0.025 \times \alpha} \times \frac{M}{\alpha} \times \left(\frac{V}{v} + 0.22 \right) \times (C - C_b) \quad \dots\dots\dots (1)$$

ただし、初期濃度を a mg/l, 1 分子中の炭素原子数を α , 分子量を M , 試薬びんの全容積を V ml, 試験溶液量を v ml, 空試験値を差し引いた気相部の CO₂ 濃度を $(C - C_b)$ とした。

また培養 10 d 目の生分解指数 (BI) は次式から算出した。

$$BI = \frac{B}{A} \quad \dots\dots\dots (2)$$

ただし、 A は初期濃度 a mg/l のグルコースの CO₂ 発生率, B は初期濃度 a mg/l の供試界面活性剤の CO₂ 発生率とする。

2.3.2 メチレンブルー-活性物質 (MBAS) 量

メチレンブルー法¹⁰⁾に準じて定量した。

2.3.3 ヨウ素ビスマス活性物質 (BIAS) 量

節田ら¹¹⁾が検討した方法を用いて、エチレンオキシド鎖 (EO) を有する非イオン界面活性剤量を定量した。以下に本法の概要を記す。

Wickbold 法^{12), 13)}に準じて Dragen-dorff 変法試薬 (KBiI₄+BaCl₂+氷酢酸) と非イオン界面活性剤とを反応させ、生成した橙赤色沈殿を分別後、温酒石酸アンモニウム溶液で溶解し、遊離したビスマス量を DDTC-IBMK 原子吸光度法¹⁴⁾を用いて定量し、あらかじめ標準物質 (ドデシル=ポリオキシエチレン=エーテル, EO : 7) について作成した検

量線から先のビスマス量に相当する非イオン界面活性剤量 (標準物質換算量) を求めて、これをヨウ素ビスマス活性物質量とした。

2.3.4 TOC 量

試料は遠心分離などの前処理を行わず、そのまま常法¹⁵⁾に準じて、東芝ベックマン社製 102 A 型 TOC 分析計により定量した。

2.3.5 一般細菌数

標準寒天培地を用いて、常法¹⁶⁾に準じ 37℃ で 48 h の培養を行い、検水 1 ml 当たりの菌数を求めた。

3 結 果

試験条件の確認のために、再現性のよいグルコース¹⁷⁾やアニリン^{17), 18)}などが対照として広く用いられている。本研究では試験条件の確認及び生分解指数を求めるために、対照としてグルコースを用いたところ、初期濃度条件 20 mg/l では培養 10 d 目で理論量の 80~85%, 10 mg/l では 65~75% の CO₂ の発生が認められた。なお各グラフ中の供試界面活性剤 (初期濃度条件 20 mg/l) の試験結果の下段に平行して行ったグルコース (初期濃度条件 20 mg/l) の試験結果を図示した。

3.1 アニオン界面活性剤の生分解性

3.1.1 ABS

Fig. -2 に ABS の試験結果を示した。初期濃度 10 mg/l の場合、D-1-LAS, LAS とともに培養 10 d 目までに MBAS は 100% 消失したが、CO₂ の発生は 10 d 目でもわずか 20% 程度であった。一方 20 mg/l 条件では培養期間中 CO₂ の発生及び TOC の減少, MBAS の消失が全く認められなかった。

3.1.2 AS

Fig. -3 に AS の試験結果を示した。CS, LS は、10, 20 mg/l いずれの初期濃度条件でも誘導期が観察されず、速やかに生分解された。培養 2~5 d で MBAS は 100% 消失し、10 d 目で理論量の 70% 程度の CO₂ の発生が認められるなど、下段に示したグルコースの生分

解曲線と類似したパターンが観察された。

3.1.3 AES

CES の試験結果を **Fig.-4** に示した。MBAS は 9 d 目までに 100% 消失したが、CO₂ の発生量は 10 d 目でも理論量の 50~60% 程度しか認められず、類似構造を有する AS に比べて生分解性がいくらか劣っていた。

Fig.-2 Biodegradation of ABS.

Fig.-3 Biodegradation of AS.

Fig.-4 Biodegradations of CES, Soap, AOS and LG.

原料アルコールの違いによる生分解性の差を調べた結果を **Fig.-5** に示した。天然アルコールのやしアルコール、合成アルコールのオキソアルコール、第二アルコールの間では特に顕著な差異は認められなかった。

3.1.4 AOS

AOS の試験結果を **Fig.-4** に示した。10, 20 mg/l いずれの初期濃度条件でも、MBAS は 10 d 目までに 100% 消失し、CO₂ の発生は 10 d 目で理論量の 40~50% 程度で、AES と類似した生分解性が認められた。

3.1.5 LG

LG は **Fig.-4** に示したように誘導期が観察されず、対照のグルコースと同様にすみやかに生分解され、培養 10 d 目で理論量の 60% 以上の CO₂ の発生が認められた。

3.1.6 セッケン

Fig.-4 に示したように、セッケンはグルコースと同様に誘導期は観察されなかったが、10, 20 mg/l いずれの初期濃度条件でも類似構造を有する AS と比較して生分解速度はやや遅かった。これはセッケンが試験溶液中で金属イオンと反応して不溶性の金属セッケンに変化したためと思われる。

3.2 非イオン界面活性剤の生分解性

初期濃度 20 mg/l 条件での NPE, LPE, PAE, LDEA の生分解試験の結果を **Fig.-6** に示した。

3.2.1 NPE

分枝鎖型の NPE は、10, 20 mg/l いずれの初期濃度でも培養期間中 CO₂ の発生、TOC の減少及び BIAS の消失が全く認められなかった。

3.2.2 LPE

LPE は 10, 20 mg/l いずれの初期濃度条件の場合も、培養 10 d 目で理論量の 20% 程度しか CO₂ の発生が認められなかった。

3.2.3 PAE

PAE は AS, LG と同様に誘導期が観察されず、培養 10 d 目で理論量の約 50% の CO₂ の発生が認められた。PAE と LPE とは一見類似した構造を有するが、親水基と疎水基との結合構造が、PAE はエステル結合、LPE はエーテル結合と異なっているために、生分解性の上では両者間に顕著な差が認められた。

Fig.-5 Biodegradation of AES.

Fig.-6 Biodegradations of NPE, LDEA, LPE and PAE.

Fig.-7 Biodegradations of ADM and ATM.

3.2.4 LDEA

LDEA は 10, 20 mg/l いずれの初期濃度条件でも, 培養 10 d 目で理論量の 30% 程度の CO_2 発生が認められた。また第三アミン構造の PEA についても同様の試験を行ったところ, 10 d 間の培養期間中全く生分解が

認められなかった。

3.3 カチオン界面活性剤の生分解性

初期濃度 20 mg/l 条件での ATM と ADM の生分解試験の結果を Fig.-7 に示した。

ATM, ADM とともに, 10, 20 mg/l いずれの初期濃度条件でも, 培養 1 d 目には一般細菌数が試験溶液 1/ml 当たり 100 個以下に下がり, その後も増殖傾向が認められず, 全く生分解が観察されなかった。また ABDM についても初期濃度条件を 5, 10 mg/l に下げて試験を行ったが, ATM や ADM と同様に全く生分解が認められなかった。

4 考 察

2.3.1 の式 (2) に従って培養 10 d 目の界面活性剤の生分解指数 (BI) を求めたところ Table-2 に示したような結果

Table-2 Biodegradation index of surfactants on the 10th day.

Surfactants	Biodegradation Index	
	Initial concentration	
	10 mg/l	20 mg/l
LAS	0.43	0.00
D-1-LAS	0.27	0.00
LS	0.88	0.90
CS	1.20	1.09
CES	0.65	0.62
OES	—	0.70
s-DES	—	0.52
AOS	0.65	0.49
LG	0.87	0.85
Soap	0.86	0.64
ATM	0.00	0.00
ADM	0.00	0.00
ABDM	0.00	—
LPE	0.25	0.30
NPE	0.00	0.00
LDEA	0.46	0.39
PAE	0.60	0.55
PEA	0.00	0.00

Biodegradation index was calculated from the following equation, where A indicates the percent theoretical CO_2 production of glucose, B that of surfactant, on the 10th day.

$$\text{Biodegradation index} = \frac{B}{A}$$

が得られた。この BI 値をもとに初期濃度 10~20 mg/l 条件下における界面活性剤の生分解性を比較したところ、生分解性の順位は (AS, LG) > Soap > (AES, AOS, PAE) > LDEA > LPE > LAS ≫ (NPE, PEA, ATM, ADM, ABDM) であった。

AS, LG, セッケングループは、BI 値が 0.64 以上とグルコースと同程度の易分解性が認められた。この理由としては、従来から言われているように、分子が直鎖型の炭化水素から構成されているため特に誘導酵素などを必要とせず構成酵素だけで生分解されうると考えられる。しかし生分解の際に誘導酵素を必要とすると言われているようなオキシエチレン鎖、ベンゼン環、分枝鎖型のアルキル基、第四級アンモニウム塩などの原子団を分子内に有する界面活性剤は、じゅん化期間を必要とするために生分解速度が遅く、LAS, LPE グループは BI 値が 0~0.4, NPE, ATM, ADM, ABDM, PEA グループにいたっては BI 値が 0 と、AS, LG グループと比べて明らかに難分解性が認められた。また分子内の一部に難分解性を示す原子団を多少なりとも有する AES, PAE や AOS グループは、BI 値が 0.4~0.7 で中程度の生分解性が認められた。AES, PAE の BI 値が類似構造を有する AS, LG, セッケングループに比べて低かったが、これは易分解性の原子団は優先的に生分解されるが、誘導酵素を必要とするようなオキシエチレン鎖の存在が生分解速度に影響を与えるためと推測される。また分子内の原子団間の結合構造も生分解速度に影響を与えるようで、エーテル結合<エステル結合<ペプチド結合の順に生分解速度が速くなる傾向が認められた。

以上のように、落下細菌など自然に混入する細菌を主な微生物源とした発生 CO₂ 測定法に試験方法を統一して、界面活性剤の分子構造と生分解性との間の関係を検討したところ、従来からの知見^{19)~21)} とほぼ一致した結論が得られた。

終わりに、本研究を行うのにあたり各種界面活性剤を提供下

さった、味の素(株)、花王石鹸(株)、日光ケミカルズ(株)、日本油脂(株)、ライオン油脂(株)に感謝致します。また有益なる御助言ならびに御指導を賜ったライオン油脂中央研究所、大場健吉博士に深謝いたします。

なお本研究の一部は日本薬学会第 97 年会(昭和52年4月東京)において報告した。

(昭和53年7月28日受理)

文 献

- 1) 伊藤伸一, 節田節子, 宇都宮暁子, 内藤昭治, 衛生化学, **22**, 254 (1976)
- 2) R.N. Sturm, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 159 (1973)
- 3) W.E. Gledhill, *Appl. Microbiol.*, **30**, 922 (1975)
- 4) H. Sekiguchi, K. Miura, K. Ōba, A. Mori, 油化学, **24**, 145 (1975)
- 5) 関口 一, 三浦千明, 大場健吉, 油化学, **24**, 451 (1975)
- 6) T.C. Cordon, E.W. Maurer, A.J. Stirton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 203 (1970)
- 7) T.C. Cordon, E.W. Maurer, A.J. Stirton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 174 (1972)
- 8) F. Masuda, S. Machida, M. Kanno, 7th Intern. Cong. Surface-active Substances (1976) で発表 "Studies on the biodegradability of some cationic surfactants"
- 9) JIS K 0102 (1974), 工場排水試験方法, p. 33
- 10) JIS K 3363 (1976), 合成洗剤の生分解度試験方法
- 11) 節田節子, 宇都宮暁子, 伊藤伸一, 内藤昭治, 神奈川衛研年報, **26**, 94 (1976)
- 12) R. Wickbold, *Tenside detergents*, **10**, 179 (1973)
- 13) R. Wickbold, *Tenside detergents*, **9**, 173 (1972)
- 14) 菅野三郎, 福井昭三, 節田節子, 内藤昭治, 金子幹宏, 松崎淳三, 衛生化学, **17**, 24 (1971)
- 15) 神奈川県公害センター編, "公害関係の分析法と解説", 神奈川県公害対策事務局 (1974) p. 83
- 16) JIS K 0102 (1974), 工場排水試験方法, p. 161
- 17) 御園光信, 石油と微生物, No. 14, 28 (1975)
- 18) 財団法人通商産業調査会編, "化学物質の審査及び製造等の規制に関する法規集一解説・関係政省令・通関手続等一", 財団法人通商産業調査会 (1974)
- 19) R.D. Swisher, "Surfactant Biodegradation", Marcel Dekker, Inc., (1970), New York
- 20) 大場健吉, 油化学, **23**, 120 (1974)
- 21) 大場健吉, 油化学, **23**, 665 (1974)