<論 文>

2-クロロフェノール馴養嫌気性汚泥による 各種塩素化芳香族化合物の分解

佐々木 素 喜* 河 合 直 士*
中 村 和 憲** 三 上 栄 一**

Degradation of Chlorinated Aromatic Compounds by Anaerobic Digested Sludge Acclimatized with 2-Chlorophenol

Motoki SASAKI*, Naoshi KAWAI*
Kazunori NAKAMURA** and Eiichi MIKAMI**

* Technical Research Section, Sanki Engineering Co., LTD., Yamato-Shi, Kanagawa 242 Japan

** Fermentation Research Institute, 1-1-3, Higashi, Tsukuba 305 Japan

Abstract

Sludge from wastewater treatment plant of petrochemical industry was acclimatized to 2-chlorophenol under anaerobic conditions. The sludge could degrade $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of 2-chlorophenol to methane in a day *via* phenol and benzoate. Addition of unacclimatized activated sludge at appropriate intervals was effective to stabilize the degradation activity.

Optimum temperature for degradation of 2-chlorophenol was 40°C and the optimum pH was 7.5. Of three monochlorophenols, only 2-chlorophenol was degraded. As for dichlorophenols, only the Cl group *ortho* to phenolic OH was reductively dechlorinated and 3- or 4- chlorophenol was formed from 2,3- or 2,4-dichlorophenol without further degradation. 2,6-Dichlorophenol was degraded to methane completely. Among the trichlorophenols, 2,3,6- and 2,4,6-trichlorophenols were dechlorinated to produce 3- and 4-chlorophenols, respectively.

We also discuss the mechanism of reductive dechlorination by the sludge.

Key words: Chlorophenols, anaerobic degradation, chlorinated aromatic compounds, biodegradation, digested sludge

1. はじめに

ハロゲン化芳香族化合物は農薬や殺菌剤としてこれまでに広く利用されるとともに、製紙工場排水などにも含まれていることが知られている^{1),2)}。これらの化合物は有害であるのみならず、生物学的にも難分解性であることから環境汚染物質として注目され、これまで生分解性について種々検討されてきた。とくに、好気性細菌による分解については古くから検討され、その

代謝系も明らかにされている³⁾⁻⁶⁾。しかし、嫌気性微生物によるこれら化合物の分解に関する研究はまだ少なく、今後検討すべき課題が多い。また、近年ランニングコストが低く、しかも高負荷処理が可能であることから排水の嫌気処理法が見直されつつあり、その適用範囲も広がってきている。このような中でハロゲン化芳香族化合物の嫌気分解特性を明らかにすることはきわめて重要と思われる。本研究においては、嫌気性消化汚泥を2-クロロフェノールに馴養し、2-クロロ

* 三機工業㈱技術研究所 〒242 神奈川県大和市下鶴間1742-7

** 微生物工業技術研究所 〒305 つくば市東1-1-3

フェノール分解に及ぼす各種要因について検討するとともに、その他のクロロフェノール類の分解性についても検討したので以下に報告する。

2. 実験方法

2.1 接種汚泥

石油系排水処理施設の汚泥濃縮槽より採取した汚泥を種汚泥として使用した。

2.2 使用培地

Shelton らの嫌気性細菌分離用の基本培地⁷⁾を一部改変し、本研究の基本培地として使用した。培地の組成を Table 1 に示す。汚泥の馴養あるいは分解試験においては、2-クロロフェノールあるいは関連化合物を、とくに述べた場合以外は $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となるよう添加し実験を行った。活性汚泥あるいはフェノール馴養嫌気性消化汚泥、およびそれらのオートクレーブ処理物の添加実験においては、各々、乾燥重量で約 $10,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 相当となるよう添加した。活性汚泥は、グルコース、ペプトンを主成分とする合成排水を用い回分法で培養を行ったもの⁸⁾、フェノール馴養汚泥は、下水消化汚泥を種汚泥として前記基本培地にフェノールを添加した培地を用い馴養を行ったものを用いた。

2-クロロフェノール分解に対する pH の影響を検討する場合には、pH7.0以下では0.2M のリン酸緩衝液を pH7.5以上では0.2M のトリス緩衝液を使用した。

2.3 馴養方法および分解試験

汚泥の馴養には、ブチルゴム栓およびアルミキャップでシールした120ml および 1 l 容のバイアル瓶を用い、液量は50ml もしくは500ml とした。気相は高

純度 N_2 ガスで置換し、約 $0.5\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 程度の陽圧とした。汚泥の馴養は、基本培地の Casamino Acids と Yeast extract の濃度を20倍とし、 $2,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の2-クロロフェノールを加えた培地を混合液量の1/20量添加して行った。2-クロロフェノールの消失が確認された場合には汚泥混合液の上清を1/20量排出し、新たに2-クロロフェノールを含む培地を1/20量添加した。

2-クロロフェノール関連化合物の分解試験はすべて120ml のバイアル瓶を使用し、主な操作は汚泥の馴養方法に準じて行った。

2-クロロフェノールをはじめ実験に使用した芳香族有機化合物は、和光純薬工業(株)、東京化成工業(株)または Aldrich 社から入手できる最も純度の高い試薬を使用した。

2.4 分析方法

反応混合液中の各化合物および分解生成物は、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンプレフィルターで濾過した後、高速液体クロマトグラフ(島津 LC-6A)を用い波長210 nm における吸光度によって定量した。使用カラムは Shim-Pack CLC-ODS、カラム温度は 40°C 、移動相は pH2.5 に調整した60%メタノール水溶液を使用した。

気相中のメタンガス濃度は TCD-ガスクロマトグラフ(島津 GC-8AIT)により定量した。分離カラムにはモレキュラーシーブ 5 A を使用した。

3. 実験結果および考察

3.1 2-クロロフェノール分解汚泥の馴養

石油系排水処理施設の汚泥濃縮槽より採取した汚泥

Fig. 1 Degradation of 2-chlorophenol by the acclimatized anaerobic sludge.

2-chlorophenol was added to the sludge mixture repeatedly after degradation was recognized.

Symbols: ○ 2-chlorophenol, ▲ phenol
× benzoate

Table 1 Composition of basal medium

Component	Concentration
KH_2PO_4	$0.270\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
K_2HPO_4	$0.350\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
NH_4Cl	$0.530\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.100\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.075\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0.020\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$0.500\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
NaHCO_3	$1.200\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
Yeast extract	$0.030\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
Casamino acids	$0.300\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
Trace minerals*	$1.0\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$
0.2% Resazurin	$1.0\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$

Final pH7.0

*See reference 7)

を濃度約 $1,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となるよう 100ml のバイアル瓶にとり、一年以上2-クロロフェノールに馴養した。分解活性が明らかに認められるようになった汚泥を用い、さらに馴養を行った経過をFig. 1に示す。実験開始直後の分解速度はそれ程速くなかったものの、2-クロロフェノールの添加回数が増すに伴って速くなり、添加した $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の2-クロロフェノールは最終的に約1日で分解されるようになった。このような馴養の過程では、2-クロロフェノール分解の中間体と考えられるフェノールの蓄積が、次にフェノール分解の中間体と考えられる安息香酸の蓄積が認められた。蓄積した安息香酸は45日目以降はほとんど検出されなくなったが、フェノールはその後とも検出され、60日目以降からようやく低いレベルの濃度となった。またこの間、発生するガス中にはメタンが検出された。以上の結果から、Fig. 2に示すように、2-クロロフェノールははじめに還元的に脱塩素されフェノールとなり、フェノールが安息香酸へと変換された後、メタンと炭酸ガスに分解されるものと推定された。フェノールと安息香酸の嫌気分解特性についてはすでに前報で報告したが^{9),10)}、2-クロロフェノール分解汚泥系におけるフェノールの分解も、フェノール分解汚泥系と同様に安息香酸を経由することが明らかとなった。

3.2 2-クロロフェノール分解汚泥の分解活性の安定化

2-クロロフェノール分解馴養汚泥を大量に得るこ

とを目的として、 100ml バイアル瓶馴養汚泥を 1 l のバイアル瓶に移し同様に馴養操作を行った。 $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の2-クロロフェノールを約1日で分解するようになった汚泥を約10倍に希釈することにより、2-クロロフェノールの分解速度は低下し、 $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を分解するのに5日から10日程度を要するようになった。本希釈馴養汚泥の2-クロロフェノール分解活性を上げるために2-クロロフェノールの添加を繰り返したが、活性は必ずしも安定しなかったため、各種汚泥の添加効果について検討を行った。

まず、2-クロロフェノールの脱塩素で生成するフェノールの分解活性を上げるために、フェノール馴養嫌気性消化汚泥あるいは対照としてオートクレーブした汚泥を添加したが、いずれの場合も2-クロロフェノールの分解はわずかに促進されるものの顕著な効果は認められなかった。一方、活性汚泥を添加した場合には明らかな2-クロロフェノールの分解促進効果が認められ、対照としてオートクレーブした活性汚泥を添加したときよりも明らかに効果的であった。このような活性汚泥添加による2-クロロフェノール分解活性の促進と安定化の例をFig. 3に示した。本図から明らかに徐々に活性が低下してきている2-クロロフェノール分解系に活性汚泥を添加すると、添加直後から分解活性の促進が認められ、その後2-クロロフェノールのみを添加しても活性は維持された。Fig. 2に示したように、2-クロロフェノールは還元的脱塩素反

Fig. 2 Proposed pathway for anaerobic degradation of 2-chlorophenol

Fig. 3 Effect of activated sludge addition on the degradation of 2-chlorophenol. Arrow means the addition of activated sludge. Symbols: ○ 2-chlorophenol, ● phenol

応によってフェノールに分解されることから、この反応には何らかの電子供与体が必要である。したがって、添加された活性汚泥は電子供与体としての役割を果たしたものと推定される。なお、このような電子供与体を供給する意味も含めて、馴養あるいは分解試験に用いた培地には Casamino acids や微量栄養源としての Yeast extract が添加されている。これらの有機物の添加効果を確認するため添加濃度を変え 2-クロロフェノールの分解速度を測定した。結果を Fig. 4 に示したが、無添加の系に比較し添加した系の分解速度はわずかに高くなるが、無添加系でも分解された。この他にも、有機酸や糖などの添加効果について種々検討を行ってみたが明確な結果は得られなかった。活性汚泥あるいは各種の有機物の添加効果については今後さらに詳しく検討する必要があると思われる。

3.3 2-クロロフェノールの分解特性

馴養汚泥の 2-クロロフェノール分解特性を明らかにするため、初発 2-クロロフェノール濃度を 100, 200, 400, 600, 800 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の 5 段階の濃度に設定し、その分解性を検討した。Fig. 5 に示すように、100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の場合は約 1 日で分解されたが、200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では分解速度が低下し、完全に分解するまでに約 4 日間を要

した。400 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上ではさらに分解速度が低下し、800 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では分解が完全に停止した。

次に 2-クロロフェノール分解に対する pH の影響について、培地の初発 pH を 6.0 から 9.0 まで変化させて分解試験を行った。検討した pH 範囲内で分解活性が認められ、最適 pH は約 7.5 であった (Fig. 6)。同様に分解に対する温度の影響について検討を行ったところ、25~50 $^{\circ}\text{C}$ では活性が認められたが、55 $^{\circ}\text{C}$ では分解が完全に停止した (Fig. 7)。最適温度は約 40 $^{\circ}\text{C}$ であった。

3.4 2-クロロフェノール関連化合物の分解

2-クロロフェノール馴養汚泥による 2-クロロフェノール以外の種々の塩素化合物の分解性について検討した。3 種類のモノクロロフェノールの分解性について検討した結果を Fig. 8 に示した。2-クロロフェノール馴養汚泥は 2-クロロフェノールに対して特異的に分解活性を有しており、3-および 4-クロロフェノールを全く分解しなかった。Horowitz ら¹¹⁾あるいは Boyd ら¹²⁾は湖の底泥や下水消化汚泥を用いて各種芳香族化合物の分解特性について検討し、2-クロロフェノールが最も早く分解されるものの、3-および 4-クロロフェノールも分解されることを明らかにしている。本研究に用いた汚泥は 2-クロロフェノールのみを用いて長期間馴養を重ねてきたことから、このよ

Fig. 4 Effect of casamino acids and yeast extract on the degradation of 2-chlorophenol.

Symbols: casamino acids yeast extract
 ○ 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
 ● 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
 ▲ 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
 △ 0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
 □ 0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Fig. 5 Effect of initial 2-chlorophenol concentration on the degradation

Fig. 6 Effect of pH on the degradation of 2-chlorophenol.

Degradation percentage was calculated based on the initial concentration and residual concentration after 24 hours incubation.

Fig. 7 Effect of temperature on the degradation of 2-chlorophenol.

Degradation percentage was calculated based on the initial concentration and residual concentration after 24 hours incubation

Fig. 8 Degradation of 2-, 3- and 4-chlorophenol
Symbols: ○ 2-chlorophenol, △ 3-chlorophenol, □ 4-chlorophenol

うな分解特異性を有するに到ったものと推定される。

次にジクロロフェノールの分解性について検討した。用いた5種類のジクロロフェノールのうち、3,4-および3,5-ジクロロフェノールは50日経過後もほとんど分解されなかったが、2,3-, 2,4-および2,5-ジクロロフェノールはいずれも2-の位置の塩素のみが特異的に脱塩素され、Fig. 9に示すようにそれぞれに対応する3-クロロフェノール、4-クロロフェノールがほぼ量論的に生成した。また、2,6-ジクロロフェノールは2-の位置および6-の位置のいずれの塩素も脱塩素され、フェノールを経由して完全に分解された。

トリクロロフェノールについては、2,3,4-, 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,5-および2,4,6-トリクロロフェノールについて分解試験を行った。この中で脱塩素反応が認められたのは2,3,6-および2,4,6-トリクロロフェノールの2種であり、Fig. 10およびFig. 11に示すように、いずれも2-および6-の位置の塩素が脱塩素され、最終的に3-クロロフェノールあるいは4-クロロフェノールが生成した。2,4,6-トリクロロフェノールの分解においては分解中間体として2,4-ジクロロフェノールが検出された。また、2,3,6-ジクロロフェノールの場合、中間体として2,3-ジクロロフェノールはほとんど検出されず、2,5-ジクロロフェノールが蓄積することから、最初の脱塩素は2-の位置で起こるものと推定された。なお、2,3,4-, 2,3,5-, 2,4,5-トリクロロフェノールについては2-の位置に塩素を有するものの脱塩素反応は確認できなかった。また、2-, 3-および

Fig. 9 Degradation of 2,3-, 2,4-, 2,5- and 2,6-dichlorophenol

4-クロロ安息香酸は分解されなかった。

このように2-クロロフェノールを用い長期間馴養を行った汚泥は、各種のクロロフェノール化合物の2-の位置（あるいは6-の位置）の塩素のみを特異的に脱塩素することが明らかとなった。Boyd らが用いた未馴養の下水消化汚泥は、分解速度は遅いものの2-, 3-, 4-クロロフェノールのいずれも分解し、2-クロロフェノールに馴養したものには2-, 4-クロロフェノールを、3-クロロフェノールに馴養したものは3-, 4-クロロフェノールを、4-クロロフェノールに馴養したものは2-, 3-, 4-クロロフェノールのいずれをも分解した¹²⁾。このような分解特性の差は、使用した

汚泥源や馴養方法あるいは馴養期間によるものと思われるが、本研究で用いた2-クロロフェノール馴養汚泥はOH基からオルトの位置の塩素のみを特異的に分解することから、塩素の置換位置に対応し異なる分解菌が存在する可能性もあるものと思われる。本研究においては、2-クロロフェノールのみを用いて馴養を行ったが、Boyd らと同様に、3-および4-クロロフェノールによる馴養汚泥の育成およびその分解特性の検討も今後必要であろう。芳香族塩素化合物を分解する嫌気性細菌としては、これまでに唯一、硫酸還元菌の一種である *Desulfomonile tiedjei* が純粋に分離、同定されている¹³⁾。しかし本菌株は、3-の位置が置換され

Fig. 10 Degradation of 2,3,6-trichlorophenol

Symbols: ○ 2,3,6-trichlorophenol, △ 2,5-dichlorophenol, □ 3-chlorophenol

Fig. 11 Degradation of 2,4,6-trichlorophenol

Symbols: ○ 2,4,6-trichlorophenol, △ 2,4-dichlorophenol, □ 4-chlorophenol

たハロゲン化安息香酸を脱ハロゲンすることができるが、ハロゲン化フェノール類から脱ハロゲンすることはできない。したがってハロゲン化フェノール類から脱ハロゲンすることのできる嫌気性細菌の分離については今後の課題といえる。

4. ま と め

2-クロロフェノールを用い長期間馴養した嫌気性汚泥の2-クロロフェノールおよび関連化合物の分解特性について検討し、以下の結果を得た。

1) 石油系排水処理施設の汚泥濃縮槽より採取した汚泥を種汚泥として2-クロロフェノール分解能を有する嫌気性消化汚泥を得ることができた。

2) 活性汚泥を比較的高濃度に添加することにより、2-クロロフェノール分解活性を安定化することができた。

3) 初発濃度200mg·l⁻¹以上の2-クロロフェノールでは分解に阻害が認められた。

4) 2-クロロフェノール分解の至適pHは約7.5、至適温度は約40℃であった。

5) 2-クロロフェノール馴養汚泥は、モノクロロフェノール、ジクロロフェノールおよび2,3,6-トリクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノールのOH基に最も近い2-あるいは6-の位置の塩素を特異的に脱塩素することが明らかとなった。

本研究は「水総合再生利用システムの研究開発」の

一環として、工業技術院微生物工業技術研究所とアクアルネサンス技術研究組合（NEDOから委託）とによる共同研究として実施されたものである。

（原稿受付 1991年7月3日）

（原稿受理 1991年10月15日）

参 考 文 献

- 1) Hakulinen, R. and Salkinoja-Salonen (1982) Treatment of pulp and paper industry wastewaters in an anaerobic fluidized bed reactor, *Process Biochem.*, **17**, 18-22.
- 2) Sahm, H., Brunner, M. and Schoberth, S.M. (1986) Anaerobic degradation of halogenated aromatic compounds, *Microbiol. Ecol.*, **12**, 147-153.
- 3) Dagley, S. and Stopher, D.A. (1959) A new mode of fission of the benzene nucleus by bacteria, *Biochem. J.*, **73**, 16-17.
- 4) Ribbons, D.W. and Evans, W.C. (1960) Oxidative metabolism of phthalic acid by soil pseudomonads, *Biochem. J.*, **76**, 310-316.
- 5) Trippett, S., Dagley, S. and Stopher, D.A. (1960) Bacterial oxidation of protocatechuic acid, *Biochem. J.*, **76**, 9.
- 6) Dagley, S., Evans, W.C. and Ribbons, D.W. (1960) New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms, *Nature*, **188**, 560-566.
- 7) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984) Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 840-848.
- 8) Nakamura, K. and Dazai, M. (1986) Growth characteristics of batch-cultured activated sludge and its phosphate elimination capacity, *J. Ferment. Technol.*, **64**, 433-439.
- 9) Kobayashi, T., Hashinaga, T., Mikami, E. and Suzuki, T.

- (1989) Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludge, *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 55-65.
- 10) 小林敏昭, 橋永忠志, 三上栄一, 中村和憲 (1990) フェノール及び安息香酸のメタン発酵特性, *水質汚濁研究*, **13**, 29-38.
- 11) Horowitz, A., Shelton, D.R., Cornell, C.P. and Tiedje, J.M. (1982) Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge, *Dev. Ind. Microbiol.*, **23**, 435-444.
- 12) Boyd, S.A. and Shelton, D.R. (1984) Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 272-277.
- 13) DeWeerd, K.A., Mandelco, L., Tanner, R.S., Woese, C.R. and Sufita, J.M. (1990) *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfatereducing bacterium, *Arch. Microbiol.*, **154**, 23-30.