<ノー卜>

酢酸資化性メタン生成に対する芳香族化合物の阻害影響

張 岩* 李 玉友* 野池達也*

Inhibitory Effect of Aromatic Compounds on Acetotrophic Methanogenesis

Yan ZHANG*, Yu-You LI* and Tatsuya NOIKE*

* Department of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Tohoku University, Aoba, Sendai 980 Japan

Abstract

The inhibitory effects of six kinds of aromatic compounds (benzoate, phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol) on the acetotrophic methanogenesis were investigated by batch anaerobic toxicity assays. The relative methanogenic activity remaining after addition of aromatic compounds decreased with an increase in the concentration of all aromatic compounds tested. The concentrations (IC_{50}) of benzoic acid, phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone and phloroglucinol resulting in 50% inhibition of methanogenic activity were 49.2, 18.6, 22.7, 27.7, 40.0, and 51.6 $mmol \cdot l^{-1}$, respectively. The inhibitory effect caused by aromatic compounds varied with the kind of substituent, as well as the number and position of the substituent in the benzene ring. The toxicity of phenol with OH substituent was greatly higher than that of benzoic acid with COOH substituent. The toxicity of hydroxyl group compounds was found to decrease with increase of the number of OH substituent. For dihydroxy-benzenes, the relative toxicity of isomer decreased in the order of ortho > meta > para. For all the phenolic compounds tested, a good correlation between their inhibition effect and hydrophobicity was observed, and the logarithm of the octanol/water partition coefficient ($\log P$), an indicator of hydrophobicity, was found to be correlated with the inhibition of methanogenic activity, according to the following equation: $\log IC_{50} = -0.283 \log P + 1.68$ ($n=5$, $r^2=0.953$).

Key words: aromatic compounds, inhibition, kinetics, methanogenesis, octanol-water partition coefficient

1. はじめに

芳香族化合物は石炭転化，石油精製，パルプ，製紙および写真製版プロセス等の工業排水の主成分であり，10～10,000 $mg \cdot l^{-1}$ の濃度範囲で排出されている^{1),2)}。これらの化合物は生物に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ている³⁾。

嫌気性処理法を芳香族化合物含有排水の処理に適用させるためには，まだいくつかの研究課題が残されている。とりわけ，嫌気性細菌の活性に対する芳香族化

合物の阻害影響を正しく把握しておかなければならない。O'Connor and Young⁴⁾は8種類のフェノール系化合物について別々に馴致した汚泥を用いてそれらのメタン生成能と阻害効果を検討した。また，Sierra-Alvarez and Lettinga⁵⁾は蒸留酒製造排水を処理するグラニユール汚泥を用いて酢酸からのメタン生成に及ぼす34種類の芳香族化合物の阻害影響を研究した。しかし，これらの研究において芳香族化合物含有排水中の代表的芳香族化合物と言われている安息香酸，カテコール，レゾルシノール，リドロキノン，フロログルシノールなどが取り扱われていない。

* 東北大学工学部土木工学科 〒980 仙台市青葉区荒巻字青葉

本研究ではフェノールの他にこれら5種類の化合物を加え、酢酸からのメタン生成に対するそれらの阻害特性を検討し、いくつかの知見が得られたので、ここに報告する。

2. 実験材料および実験方法

2.1 供試汚泥

本研究に用いた供試汚泥は、酪酸を基質として2年間以上馴致したメタン生成汚泥であった。この汚泥をn-酪酸 ($5,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) を単一有機炭素原として、容積8 l、水理学的滞留時間10日のケモスタット型反応槽を用いて35°Cで連続的に培養した。定常状態において、反応槽内のMLVSS平均濃度は $375\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。

2.2 試薬および培地

本研究に用いた6種類の芳香族化合物の化学構造をFig. 1に示す。試薬は和光純薬分析特級を用いた。気

Fig. 1 Chemical structure of aromatic compounds used in this study

相に充填するガスは、あらかじめ還元銅カラムを通すことにより微量の酸素を除去した。阻害実験用の基礎培地はTable 1に示すように、酢酸を単一有機基質とした。この基礎培地に芳香族化合物を添加し、その濃度を変化させて実験を行った。

2.3 阻害実験の操作および分析方法

本研究に用いた実験装置は120mlのバイアル瓶を35°Cの恒温振動培養槽に設置したものである。実験の操作手順は、回分実験と同じであった⁶⁾。

本研究では、pHを7.1程度にコントロールした。このような条件においてpHによるメタン生成細菌への阻害影響が無視できる。またフェノール系化合物の解離については、Table 2に示すpKa値を用いて計算した結果、フェノール系化合物の化学種はほとんど未解離部分であることから、解離による阻害の差が生じないことが分かった。

ガス生成量はバイアル瓶に注射器を差し込むことに

Table 1 Composition of basal medium used for anaerobic toxicity assays

Components	Concentration (per liter)
Sodium Acetate	2.0 g
KH_2PO_4	0.054 g
K_2HPO_4	0.696 g
NH_4Cl	1.0 g
MgCl_2	0.1 g
NaHCO_3	1.2 g
Mineral solution ^{a)}	10 mL
Vitamin solution ^{b)}	10 mL
Yeast extract	0.1 g
Resazurine	0.002 g
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
pH	7.0-7.2

a), Contains in grams per liter of distilled water: nitrilotriacetic acid, 4.5; $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.40; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.12; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, 0.01; Na, 1.0; CaCl_2 , 0.02; Na_2MoO_4 , 0.01; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.10; ZnCl_2 , 0.10; H_3BO_3 , 0.01; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02.

b), Contains in milligrams per liter of distilled water: biotin, 2; folic acid, 2; pyridoxine HCl, 10; thiamine HCl, 5; riboflavin, 5; nicotinic acid, 5; DL-calcium pantothenate, 5; vitamin B_{12} , 0.1; p-aminobenzoic acid, 5; lipoic acid, 5.

Table 2 The chemical properties of aromatics and its concentrations resulting in a 50% inhibition of the methanogenic activity

Compound	Chemical Property ⁷⁾			$\text{IC}_{50}(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$
	Molecular Weight	log P	pKa ₁ (pKa ₂)	
Benzoic acid	122.0	1.87	5.44	49.2
Phenol	94.1	1.46	9.74	18.6
Catachol	110.1	1.01	9.45 (12.80)	22.7
Resorcinol	110.1	0.77	9.30 (11.06)	27.7
Hydroquinone	110.1	0.50	9.91 (11.56)	40.0
Phloroglucinol	126.0	-0.19	7.97 (9.23)	51.6

よって定量した。pH は GST-5211C 型電極を用い、HM-18E pH メーターで測定した。MLVSS 濃度の測定は「下水道試験方法」により行った。

3. 実験結果および考察

3.1 異なる芳香族化合物濃度条件下のメタン生成曲線と活性の求め方

6 種の芳香族化合物を用い、メタン生成に対する芳香族化合物の影響を調べた。Fig. 2 には一例としてメタン生成に及ぼすレゾルシノール添加の影響を示している。同じ時間において累積メタン生成量は、添加したレゾルシノール濃度の増加につれて減少し、レゾルシノールの濃度が高濃度 ($5,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上) になるとメタン生成が完全に停止した。Fig. 2 より明らかなように、ラグフェースを除いて実験の初期において累積メタン生成量は直線的に増加している。これらの直線の傾きを各芳香族化合物添加濃度条件下でのメタン生成活性と定義できる。

3.2 置換基の影響

Fig. 3 には相対メタン生成活性に及ぼすフェノールおよび安息香酸の添加濃度の影響を示す。フェノールおよび安息香酸の濃度が $1,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の条件では、相対メタン生成活性は大きな変化がなく、約 1.0 であったが、芳香族化合物の濃度が高くなると、相対メタン生成活性はほぼ直線的に低下した。また、安息香酸の場合と比較して、フェノールを添加した場合の相対メタン生成活性がより急激に低下した。この結果はフェノールによる阻害がより強いことを示唆している。フェノールと安息香酸が置換基以外は同じ化学構造を有しているから、それらの阻害効果の差はベンゼン環に置換された置換基の種類によるものであると考えら

れる。すなわち、カルボキシル基 ($-\text{COOH}$) に比較して、ヒドロキシル基 ($-\text{OH}$) の方はより強い阻害影響をもたらすわけである。

各芳香族化合物によるメタン生成活性への影響の強さを定量的に把握するために、Fig. 3 に示すように 50% の阻害 (相対メタン生成活性が 0.5 になった) をもたらす芳香族化合物の濃度を IC_{50} と定義し、それを阻害強度の指標とした。フェノールおよび安息香酸の IC_{50} 値はそれぞれ $1,750\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($18.6\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) および $6,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($49.2\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) であった。

Fig. 4 に相対メタン生成活性と各フェノール系化合物濃度との関係を示す。相対メタン生成活性はフェノール系化合物がある限界濃度以上になると急激に低下しはじめた。Table 2 に、本研究で得られた各フェノール系化合物の IC_{50} 値を示す。これらのデータと Fig. 1 に示した化学構造式と関連させて考察すると、酢酸資化性メタン生成細菌に対するフェノール系化合物の阻害影響はベンゼン環に置換された置換基の数および位置によって異なることが分かる。フェノールの IC_{50} が $18.6\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ で最も高い毒性を示したのに対して、ヒドロキシル基を三つ有するフロログルシノールは IC_{50} が $51\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ で一番低い毒性を示している。この結果はフェノール系化合物によるメタン生成への阻害が置換基である $-\text{OH}$ 基の数の増加につれて減少することを示唆している。また、置換基の位置が異なる三つの二価フェノールについて比較すると、 IC_{50} 値はカテコール (オルト)、レゾルシノール (メタ) およびヒドロキノン (パラ) の順で高くなっていることがわかる。これは置換基の数が同じ場合、置換基の位置が異なるフェノール系化合物の阻害性はオルト > メタ > パラという順で減少することを示唆している。

Fig. 2 Cumulative methane production of acetate at different concentrations of resorcinol

Fig. 3 Comparison of both effects of phenol and benzoate on the relative methanogenic activity

Fig. 4 Relative methanogenic activity at various concentrations of phenolics

3.3 阻害効果と疎水性の関係

オクタノール／水の分配係数の対数 ($\log P$) は有機化合物の疎水性を表す指標の一つとして広く用いられている⁹⁾。この $\log P$ の値は有機化合物の薬理学および

毒性特性と密接な関係があることが報告されている。Sierra-Alvarez and Lettinga⁵⁾は蒸留酒製造排水を処理するグラニュール汚泥を用いて酢酸からのメタン生成に及ぼす34種類の芳香族化合物の阻害影響を検討し

た結果、阻害効果 ($\log IC_{50}$) と疎水性 ($\log P$) の間に大体直線の相関関係がみられ、特に同じ置換基を有するグループ(アルカリベンゼン, アルカリフェノール, クロルベンゼンおよびクロルフェノール)に限定した場合、良好な相関関係を得られた。

本研究では、メタン生成活性に対する OH 基だけを有するフェノール系化合物の阻害の強さおよび疎水性をそれぞれ $\log IC_{50}$ および $\log P$ で表し、それらの相関関係を定量的に解析した。Fig. 5 に示すように、ヒドロキシル基 (-OH 基) を有するフェノール系化合物による阻害の強さ ($\log IC_{50}$) と疎水性 ($\log P$) との間に良好な反比例的な相関関係が存在することが明らかである。その関係式は次の通りであった。

$$\log IC_{50} = -0.283 \log P + 1.68$$

$$(n = 5 ; r^2 = 0.953)$$

しかし、-COOH 基を有する安息香酸はこの直線から離れている。

5. ま と め

酢酸資化性メタン生成活性に対する 6 種類の芳香族化合物の阻害影響を定量的に検討した結果、以下の結論が得られた。

1) 酢酸資化性メタン生成活性に対する芳香族化合物の阻害影響は芳香族化合物の濃度によって異なる。低濃度では、阻害影響が見られなかったが、限界濃度を越えると、メタン生成活性が急激に低下した。酢酸資化性メタン生成活性が 50% 阻害された時の安息香酸、フェノール、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、フロログルシノール濃度 IC_{50} はそれぞれ 49.2, 18.6, 22.7, 27.7, 40.0, 51.6 mmol $\cdot l^{-1}$ であった。

2) 酢酸資化性メタン生成活性に対する芳香族化合物の阻害影響はベンゼン環に置換された置換基の種類、数および位置によって異なった。カルボキシル基 (-COOH) より、ヒドロキシル基 (-OH) の方は阻害影響が大きかった。また同じヒドロキシル基の場合、阻害の強さは置換基の数の増加および位置の変化に伴い、次の順序で減少した。

数の影響：一価フェノール > 二価フェノール > 三価フェノール >

二価フェノールの位置の影響：オルト > メタ > パラ

3) 酢酸資化性メタン生成活性に対する 5 種類のフェノール系化合物の阻害影響は、オクタノール/水の分配係数の対数 ($\log P$) の増大に伴い増大した。

Fig. 5 Relationship between the hydrophobicity ($\log P$) of phenolics and its inhibition effect ($\log IC_{50}$)

$\log IC_{50}$ と $\log P$ との間には次のような良好な反比例関係が得られた：

$$\log IC_{50} = -0.283 \log P + 1.68$$

$$(n = 5 ; r^2 = 0.953)$$

(原稿受付 1993年12月6日)

(原稿受理 1994年8月2日)

引用文献

- 1) Fedorak, P.M. and Hruday, S.E. (1987) Inhibition of anaerobic degradation of phenolics and methanogenesis by coal coking wastewater, *Wat. Sci. Tech.*, **19** (Rio.), 219-228.
- 2) Luthy, R.G. (1981) Treatment of coal coking and coal gasification wastewater, *J. Wat. Poll. Control Fed.*, **53**, 325-339.
- 3) 佐々木素喜, 河合直土, 中村和憲, 三上栄一 (1992) 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, *水環境学会誌*, **15**, 113-120.
- 4) O'Connor, O.A. and Young (1989) Toxicity and anaerobic biodegradability of substituted phenols under methanogenic conditions, *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, 853-862.
- 5) Sierra-Alvarez, R. and Lettinga, G. (1991) The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 544-550.
- 6) 李玉友, 野池達也 (1987) 嫌気性消化の酸生成相における余剰活性汚泥の分解特性, *水質汚濁研究*, **10**, 729-740.
- 7) Leo, A., Hansch, C. and Elkins, D. (1971) Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.*, **71**, 525-616.