

(23)  $^{14}\text{C}$ を用いたLASの活性汚泥による分解性の検討

BIODEGRADATION OF  $^{14}\text{C}$  RING-LABELED LINEAR  
ALKYLBENZENE SULFONATE(LAS) IN ACTIVATED SLUDGE PROCESS

○楠井 隆史\*・中西 準子\*\*\*・北村 充成\*\*\*

Takashi KUSUI\*, Junko NAKANISHI\*\*\*, Mitsunari KITAMURA\*\*\*

**ABSTRACT** ; The ultimate biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate(LAS) in the activated sludge process has been studied using the  $^{14}\text{C}$  ring-labeled LAS. By using the methylene blue method and the tracer method, primary degradation and benzene ring degradation were evaluated respectively. In batch experiments, 30-40% of ring carbon was converted to carbon dioxide after 24 hrs' aeration in the acclimated system, but only 2-10% in the unacclimated system.  $^{14}\text{CO}_2$  evolution and primary degradation proceeded simultaneously, but the rate of  $^{14}\text{CO}_2$  evolution was slow. In 24 hrs., primary degradation proceeded completely, 46-52% of ring carbon remained in the sludge and 14-18% in the solution in the acclimated system.  $^{14}\text{CO}_2$  evolution rate was affected by addition of glucose and initial concentration of LAS. This study shows the biodegradation mechanism of LAS in the activated sludge process.

**KEYWORDS** ; Biodegradation, Activated sludge, Linear alkylbenzene sulfonate, Benzen ring, Radioisotope

1. はじめに

合成洗剤の水質汚濁への影響については助剤に含まれる磷酸塩だけでなく、界面活性剤についても研究されてきた。近年、ソフト化された界面活性剤成分であるLASについても、生分解性、下水処理への影響などの点で疑問がもたれている。また、種々の生分解実験の結果、LASは他の界面活性剤に比して、中間代謝物が残存すると報告されており<sup>2)</sup>、ベンゼン環が最終分解を遅らせているのではないかととの疑問がもたれる。

筆者らは汚泥中の蓄積物を直接定量するという手法を用いて、一連の基質の活性汚泥における浄化機構を研究してきた。LASについて行った研究において、①汚泥一液相間にLASの吸着平衡関係が成立する、②LAS異性体間において吸着性と生分解性との間に相関がある、との結果を得た<sup>3)</sup>。一次分解(メチレンブルー活性消失)後の中間代謝物のGC分析を試み、特定の物質が有意に蓄積する傾向は認められなかったが、分析上の限界もあり、ベンゼン環の生分解性については十分な知見が得られなかった<sup>4)</sup>。

このように、LASの一次分解に関しては明らかとなり、筆者らと同様の研究結果<sup>5)</sup>も報告されている。しかし、LASの最終分解、特にベンゼン環の生分解性に関しては分析上の困難もあり、十分には明らかにされていない。そこで、本研究ではLASのベンゼン環を $^{14}\text{C}$ で標識した $\text{C}_{12}$ -LASを用いて活性汚泥のバッチ実験を行い、(1)LASのベンゼン環の生分解性、(2)中間代謝物の挙動について検討を行った。

\* 富山県立技術短期大学 Toyama Prefectural College of Technol. \*\*\* 東京大学 Univ. of Tokyo

## 2. 実験方法

実験に用いた  $C_{12}$ -LAS はベンゼン環を  $^{14}C$  でランダムに標識したものである (日本原子力研究所にて合成)。実験時には、ABS 測定用  $n$ -DBS ( $C_{12}$ -LAS) で 7 倍程希釈したものを供した (比放射活性  $39.1 \mu Ci / mM$ )。

汚泥は Table. 1. の条件で一日一回の fill & draw で半年以上室内で培養したものを用いた。対照として用いた南多摩下水処理場汚泥 (家庭下水のみ) は採取後、一晚、空曝気して実験に供した。

装置は、同じ汚泥で条件を変更して実験を行うため、Fig.1. に示したものを 2 系列用意した。装置の構成については、①装置内を減圧

状態に保つ ( $^{14}CO_2$  漏れ対策)、②還流冷却器 (反応槽内の水分蒸発防止)、③流入空气中  $CO_2$  の除去 (後段  $CO_2$  トラップの負荷軽減) の諸点を考慮した。

温度条件は特に制御していないが、実験期間中の気温は  $20 \pm 2^\circ C$  であった。

分析は、 $^{14}C$  と LAS (MBAS) について Fig.2. の手順で行った。

MBAS はメチレンブルー法 (J I S K 0 1 0 1) で行った。汚泥中 MBAS の分析 (下水道試験法) も行ったが、装置の制約上、試料が少量しかとれず、バラツキが大きかったため結果には示していない。 $^{14}C$  の測定は  $CO_2$ 、上澄、汚泥について行った。 $CO_2$  の捕

捉は 2 系列の  $CO_2$  トラップ (2 連) を切換えて行った。 $^{14}C$  の測定方法の詳細は Table. 2. に示す。

測定結果は、各 RUN における LAS 投与量を 100% として、汚泥、上澄、 $^{14}CO_2$  の各部分での回収率として示した。 $^{14}CO_2$  回収率は次式で算出した。

$$r_n(\%) = \frac{n(a_n \times \frac{200}{V_n})}{\sum a_o} \times \frac{100}{a_o}$$

$r_n$ :  $n$  回目サンプリング時の  $^{14}CO_2$  回収率 (%)

$a_n$ :  $n$  回目サンプリング時の  $^{14}CO_2$  計測値 (nCi)

$a_o$ : LAS 投与量 (nCi)

$V_n$ :  $n$  回目サンプリング時の汚泥混合液体積 (ml)

Table.1. Feeding condition

|                                       | Acclimated sludge                                       | Unacclimated sludge               |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Substrate (per day)                   | Glucose 200mg/l<br>LAS ( $C_{10}$ - $C_{13}$ ) 5-10mg/l | Glucose 500mg/l<br>Peptone 50mg/l |
|                                       | Mineral salts                                           |                                   |
| Mixed liquor withdrawal rate(per day) | 1/50-1/100                                              | 1/80                              |
| Supernant withdrawal rate(per day)    | 1/2                                                     | 3/8                               |

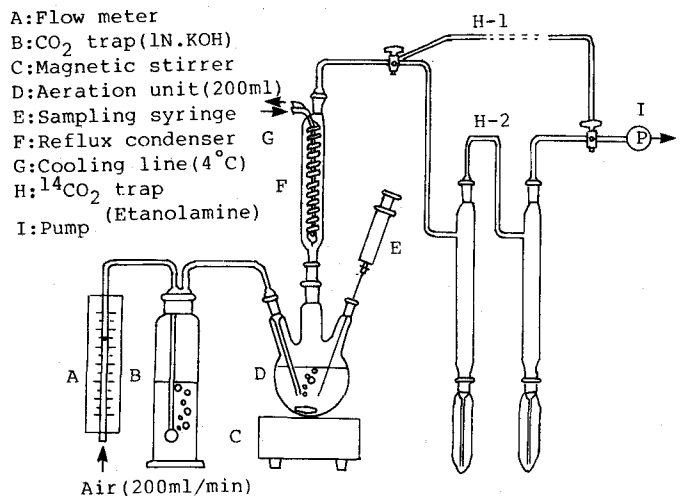
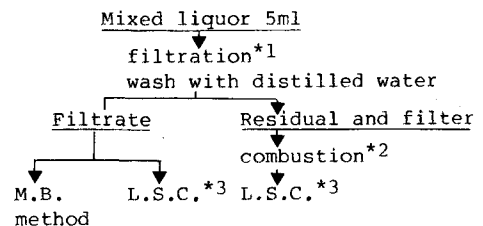


Fig.1. Biodegradation test unit



\*1: 1.2  $\mu m$  MILLIPORE filter.

\*2: Combusted by Model B306 Tricarb Sample Oxidizer (Packard) and evolved  $^{14}CO_2$  was trapped by Carbsorb 6ml (Packard).

\*3: Liquid scintillation counter (Packard Tricarb 3255, 3380)

Fig.2. Analytical procedure

投与直後の0+(5分)~1時間において、上澄中MBASと上澄中 $^{14}\text{C}$ が一致せず、上澄中MBASの方が高目にでた。LAS以外に起因するMBAS成分の溶出、分析誤差等が原因として考えられる。

実験条件をTable.3.に示す。 $^{14}\text{C}$ の回収率は平均して各RUNとも90%以上であり、 $^{14}\text{C}$ 収支に関しては満足な結果を得た。

### 3. 実験結果

各RUN毎の単位初期MLSS当りの $^{14}\text{CO}_2$ 発

生速度をFig. 3,

4. $^{14}\text{C}$ 収支をFig.

5~13に示す。

#### 3.1 馴致汚泥の場合

RUN 1-1

(Fig.5)の場合、

反応は次のように

進行している。ま

ず、上澄液中のL

AS (MBAS)

は10時間位で消失している。一方、上澄液中の $^{14}\text{C}$ は一度減少した後、再び増加し、6~9時間でピークに達したのち、再び減少している。汚泥中の $^{14}\text{C}$ は1~2時間以後は単調に減少し、 $\text{CO}_2$ は単調に増加している。 $\text{CO}_2$ の発生速度の最大値は、上澄中のLASが消失するところである。

上澄中のLASと上澄中の $^{14}\text{C}$ の差は中間代謝物であると考えられる。上澄中 $^{14}\text{C}$ が一度減少し、再び増加するのは、一度吸着されたLASが一次分解を受けて液中に放出されたためと思われる。

初期濃度の異なるRUN 1-2 (Fig.6.)についても基本的にはかわらない。24時間後の $^{14}\text{CO}_2$ の割合はLAS初期濃度12.6mg/l (RUN 1-1)の場合、30.9%、25.1mg/l (RUN 1-2)の場合、28.4%でこの値はほぼ同じである。

#### 3.2 未馴致汚泥の場合

馴致汚泥に比べ、反応速度がすべて遅い。LASの一次分解も24~30時間後でも終了していない。

$^{14}\text{CO}_2$ 発生速度も馴致汚泥の場合の1/3~1/4である。

24時間での $^{14}\text{CO}_2$ 発生割合がLAS濃度12.6

Table.2. Radioactivity measurement

| Type of sample     | Content                                     | Scintillator                 |
|--------------------|---------------------------------------------|------------------------------|
| $^{14}\text{CO}_2$ | Etanolamine 1.5ml                           | Toluene scintillator*8ml     |
|                    | Metanol 5ml                                 |                              |
| Sludge             | Carbosorb 6ml<br>( $\text{CO}_2$ absorbent) | Permafluor 10ml<br>(Packard) |
| Filtrate           | Filtrate 2ml                                | ACSI 10ml<br>(Amarcham)      |

\*:Mixture of toluene containing PPO 10g/l, DMPOPOP 0.2g/l.

Each sample was placed into a scintillation vial and then assayed by L.S.C.

Table.3. Experimental condition

| Run No. | Sludge       | MLSS (mg/l) | LAS added mg/l | nCi*1 | Supplement      | % recovery of $^{14}\text{C}$ (average) |
|---------|--------------|-------------|----------------|-------|-----------------|-----------------------------------------|
| 1-1     | Acclimated   | 1830        | 12.6           | 281   |                 | 86.1-95.5 (93.1)                        |
| 1-2     | sludge       |             | 25.1           | 561   |                 | 88.7-96.2 (93.0)                        |
| 2-1     | Unacclimated | 1970        | 12.6           | 282   |                 | 72.0-98.7 (90.3)                        |
| 2-2     | sludge       |             | 25.1           | 564   |                 | 88.7-104 (93.5)                         |
| 3-1     | Acclimated   | 1720        | 12.6           | 276   | Glucose 500mg/l | 91.5-108 (98.0)                         |
| 3-2     | sludge       |             |                |       |                 | 96.4-110 (103)                          |
| 4-1     | Unacclimated | 1630        | 12.6           | 281   | Glucose 500mg/l | 93.3-101 (97.1)                         |
| 4-2     | sludge       |             |                |       |                 | 82.5-105 (97.1)                         |
| 5       | *2           | 630         | 12.6           | 281   |                 | 91.5-97.7 (94.5)                        |

\*1:measured before each experiment.

\*2:sludge collected from Minamitama municipal sewage plant.

Mineral salts were added at the same concentration as feeding condition.

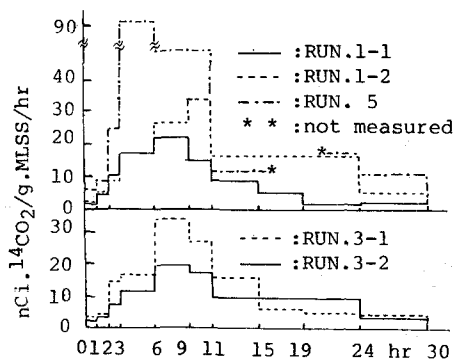


Fig.3.  $^{14}\text{CO}_2$  evolution rate

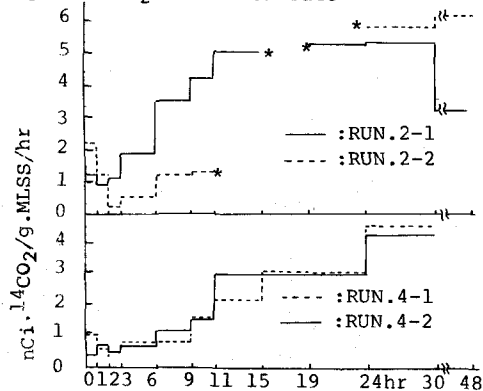


Fig.4.  $^{14}\text{CO}_2$  evolution rate

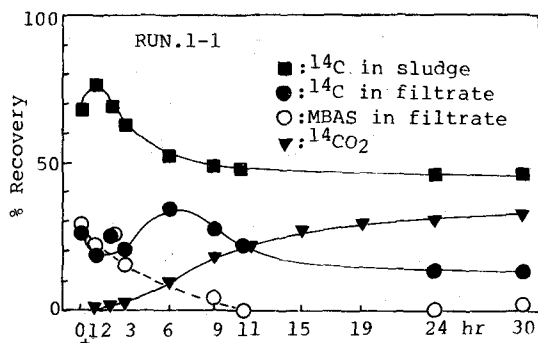


Fig.5. Distribution of  $^{14}\text{C}$

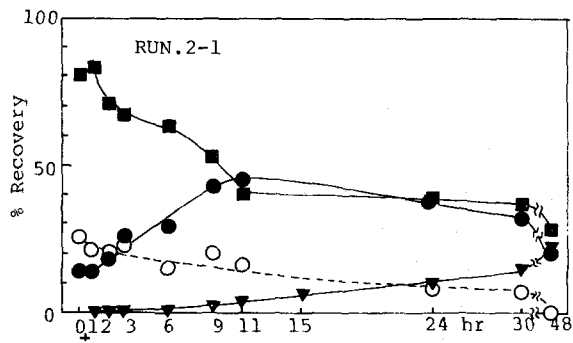


Fig.7. Distribution of  $^{14}\text{C}$

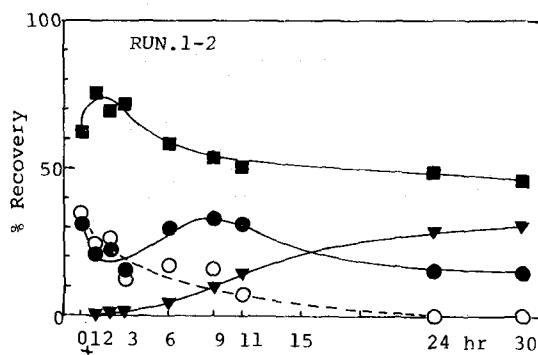


Fig.6. Distribution of  $^{14}\text{C}$

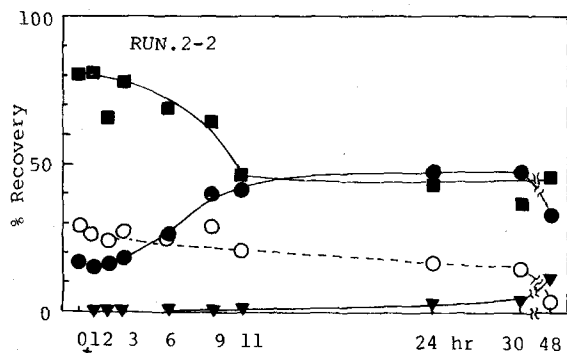


Fig.8. Distribution of  $^{14}\text{C}$

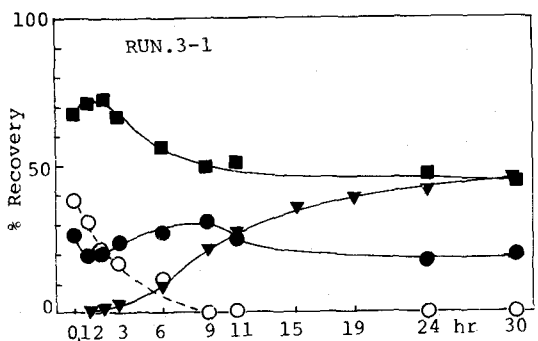


Fig.9. Distribution of  $^{14}\text{C}$

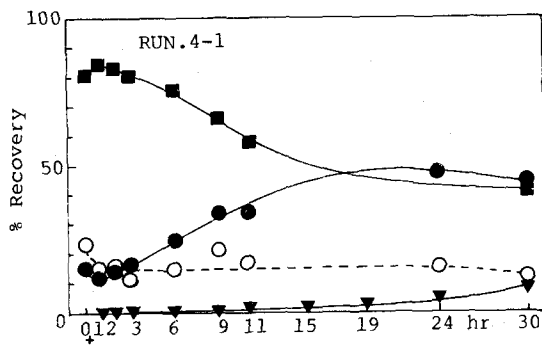


Fig.11. Distribution of  $^{14}\text{C}$

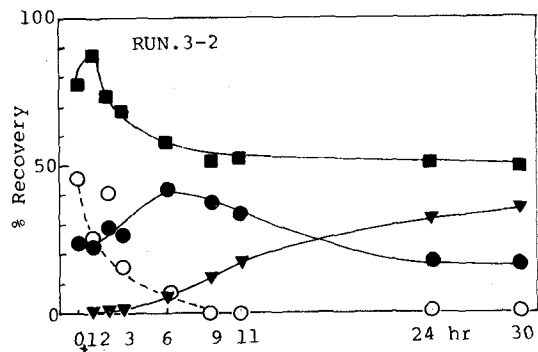


Fig.10. Distribution of  $^{14}\text{C}$

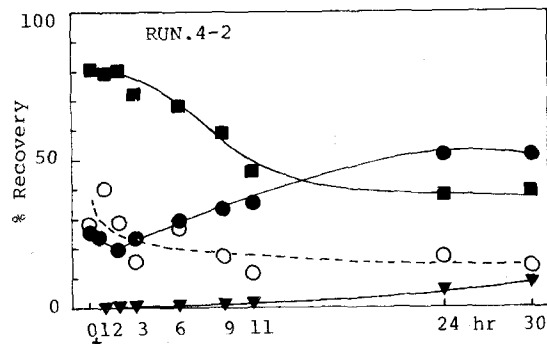


Fig.12. Distribution of  $^{14}\text{C}$

mg/ℓ (RUN 2-1) で 10.5%, 25.1 mg/ℓ (RUN 2-2) の場合, 1.6% と濃度の高いとき低下しているのは, 馴致していない汚泥にとって, LAS の濃度が高いと阻害効果があらわれやすいことを示している。

### 3.3 グルコース同時投与の影響

同時に, グルコースを添加した場合を比較したのが RUN 3 と RUN 4 である。馴致汚泥の場合, 上澄中 MBAS の挙動からみると, グル

コース添加をしない場合と比較して一次分解において差は認められない (Fig. 9, 10)。しかし,  $^{14}\text{CO}_2$  の割合でみると, 11 時間後に RUN 3-1 で 27.1%, RUN 3-2 で 17.1%, 24 時間後に RUN 3-1 で 41.3%, RUN 3-2 で 32.4% と, グルコース投与によって  $^{14}\text{CO}_2$  発生量が増加している。

一方, 未馴致汚泥の場合は影響が認められない (Fig. 11, 12)。

### 3.4 下水処理場汚泥の場合

対照に行った南多摩下水処理場汚泥に  $^{14}\text{C}$ -LAS を加えた実験結果を Fig. 13 に示す。汚泥の調子が悪く初期 MLSS が 630 mg/ℓ と低かったが, そのまま用いた。

基本的には馴致汚泥と同じパターンを示している。

## 4. 考 察

実験結果から  $^{14}\text{C}$  の挙動に関して Fig. 14 に示すようなモデルが考えられる。以下, このモデルに従って検討する。

### 4.1 汚泥中 $^{14}\text{C}$ の内訳

サンプル量が少ないため, 汚泥中 LAS の測定はできなかったが, これまでの実験結果<sup>4)</sup> から得たフロインドリッヒ型吸着等温線 ( $X_m/M = k \times X_{en}$ ,  $X_m$ : 汚泥中 LAS 濃度,  $X_e$ : 上澄中 LAS 濃度,

$M$ : MLSS,  $k \cdot n$ ; 定数) を利用して汚泥中 LAS を推定した。その結果をまとめると以下のごとくである。

#### (1) 馴致汚泥

9~11 時間以内に一次分解が完了している (RUN 1-2 を除く)。この時間以後では汚泥中にも LAS は残存せず, 汚泥中  $^{14}\text{C}$  の大部分は中間代謝物, 貯蔵物又は細胞質になっていると考えられる。

#### (2) 未馴致汚泥

11~30 時間後の汚泥中 LAS は汚泥中  $^{14}\text{C}$  の 1/2 以上を占めている。

#### (3) 処理場汚泥

馴致汚泥と同様に 24~30 時間後は汚泥中  $^{14}\text{C}$  の大部分は中間代謝物, 貯蔵物又は細胞質と考えられる。

### 4.2 上澄中の中間代謝物

上澄中  $^{14}\text{C}$  と上澄中 LAS の差は前述のように中間代謝物と考えられる。これには, ①ベンゼン環開裂以前の段階の代謝物質 (スルホフェニルカルボン酸など), ②ベンゼン環開裂以後の代謝物質 (脂肪酸化

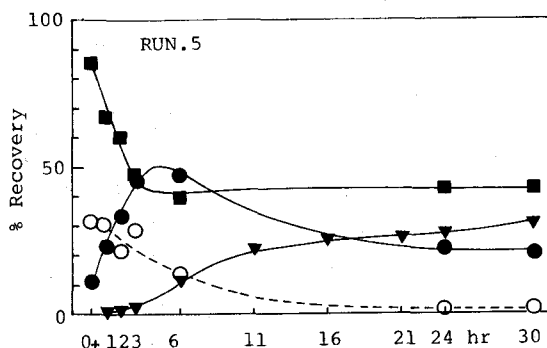


Fig.13. Distribution of  $^{14}\text{C}$

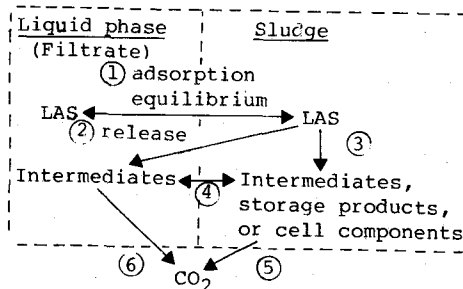


Fig.14. Behavior of  $^{14}\text{C}$

合物など)の可能性がある。しかし、ベンゼン環開裂以後の中間代謝物(コハク酸、酢酸など)は、一般の有機物の中間代謝物と共通しており、②の中間代謝物が蓄積することはあまりないと考えられる。

また、測定の問題として、上澄中 $^{14}\text{C}$ の中に溶存 $^{14}\text{CO}_2$ 、炭酸塩、重炭酸塩が含まれている可能性もあるので、この点を検討した。沱液サンプル1 mlをシンチュレーション測定用バイアルびんにとり、濃硫酸1、2滴を加え、pH 1以下にし、窒素ガスで曝気後(10分間)、中和し、 $^{14}\text{C}$ を測定した(Fig.15)。馴致汚泥の場合(RUN 1-1、1-2)は、ややバラツキがみられるが、全体としては、処理による変化は少ない。未馴致汚泥の場合は、この処理によって $^{14}\text{C}$ の低下が認められ、最大時には投与量の20数%に達して

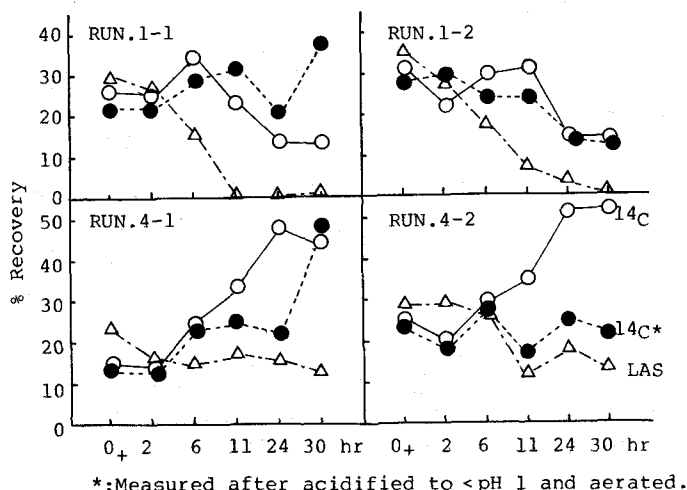


Fig.14. Fractionation of  $^{14}\text{C}$  in filtrate

いる。しかし、 $^{14}\text{CO}_2$ 発生量の多い馴致汚泥において差がない点、実験時のpHが各RUNともほぼ6~7である点から考えると、この差は前述の無機性 $^{14}\text{C}$ でなく、弱酸性の中間代謝物に起因すると考えられる。スルホン基が強酸性である点を考えると、この中間代謝物は、ある程度、 $\beta$ 酸化等の代謝が進み、脱スルホン化を生じた後の代謝物質ではないかと推測される。

#### 4.3 $^{14}\text{CO}_2$ 発生

先に指摘したように、馴致汚泥の場合(Fig.3)、 $^{14}\text{CO}_2$ 発生速度のピークの低下が一次分解完了の時期とはほぼ一致している。この時点では、Fig.14の②、③の代謝経路が終了し、主に④、⑥の経路を経て、 $^{14}\text{CO}_2$ 発生が起きていると考えられる。

未馴致汚泥の場合はFig.4に示したように、各RUNとも30時間まで $^{14}\text{CO}_2$ 発生速度が増加傾向にある。これは、未馴致汚泥では当初、一次分解以後の代謝に関連する酵素系が存在せず、代謝過程で徐々に酵素が誘導されてくる為と考えられる。Swisher<sup>9)</sup>が指摘しているように、何らかの“Key-intermediate”が生成され、それによって代謝酵素が誘導されたと考えられる。先に述べた、弱酸性の成分に関与する酵素ではないかと推測される。

また、 $^{14}\text{CO}_2$ 発生に影響を与える因子として、①グルコースの同時投与、②LAS濃度、が挙げられる。

ある種の有機物においてはグルコースの存在によって代謝の抑制を生ずるが、LASに関しては認められなかった。LASの最終分解に関しては代謝酵素系の有無が問題であり、代謝酵素の存在している系(馴致汚泥)では汚泥の増殖等で最終分解が促進され、存在していない系(未馴致汚泥)では影響がなかったと解釈できる。また、未馴致汚泥の場合は、LAS自体、又は中間代謝物によって阻害を受けたと思われる。

#### 4.4 ベンゼン環の生分解性について

以上の考察から推定した投与24時間後の $^{14}\text{C}$ 収支をTable.4に示す。

今回の実験結果から、ベンゼン環の分解速度は確かに一次分解に比して遅いが、一応分解が進行することがわかった。

ただ、今回の実験時間内(30~48時間)では馴致汚泥でさえ、最終分解率( $\text{CO}_2$ )は3~4割であったが、時間をかければ残りの分解するのは、今のところ不明である。

Table.4. Percentage distribution of  $^{14}\text{C}$  after 24hrs' aeration

| Run No. | L Filtrate | A Sludge*1 | S Total | Intermediates in filtrate | non MBAS $^{14}\text{C}$ in sludge*2 | $^{14}\text{CO}_2$ | Primary degradation |
|---------|------------|------------|---------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------|
| 1-1     | 0.2        | 0.1-1      | 0.3-1.2 | 13.6                      | 46.0                                 | 30.9               | 99-100              |
| 1-2     | 0          | 0          | 0       | 15.0                      | 48.7                                 | 28.4               | 100                 |
| 3-1     | 0          | 0          | 0       | 17.2                      | 46.4                                 | 41.3               | 100                 |
| 3-2     | 0          | 0          | 0       | 17.8                      | 51.5                                 | 32.4               | 100                 |
| 2-1     | 8.0        | 20-23      | 28-31   | 29.2                      | 7-11                                 | 10.5               | 69-72               |
| 2-2     | 16.7       | 31-41      | 47-58   | 31.1                      | 2-12                                 | 1.6                | 42-53               |
| 4-1     | 15.4       | 28-34      | 43-49   | 32.4                      |                                      | 5.3                | 51-57               |
| 4-2     | 17.1       | 30-37      | 47-54   | 34.3                      | 12-19                                | 5.7                | 46-53               |
| 5       | 1.4        | 1.5-1.6    | 2.9-3.0 | 20.7                      | 41.0                                 | 28.1               | 97                  |

\*1:Calculated from adsorption isotherms.

\*2:Intermediates,stored products and cell components.

Fig. 3 の  $^{14}\text{CO}_2$  発生速度が極端に低下していることから、このまま実験を継続しても、100% 分解することはないように思える。この原因として以下のことが考えられる。

- (1) 二種類以上の代謝経路を通じて生成された中間代謝物のうちに難分解性のものが存在する。
- (2) バッチ実験の限界としてこういう現象が起きている。つまり、バッチ実験では基質が十分に存在しないと体内に貯蔵した物質を分解しない傾向にあり、この場合も、更に2~3度、LAS 又はグルコースを与える実験をすればよかったと思っている。

こうした可能性が考えられるが、現時点では結論が出せない。

未馴致汚泥のベンゼン環分解能は、極端に低く(1.6~10.5%)、主に中間代謝物として蓄積される。

日常的にLASの含まれている家庭下水を処理している下水処理場の汚泥は、馴致汚泥とはほぼ同じ一次分解能とベンゼン環分解能を示した。

Table. 5 に、ベンゼン環を  $^{14}\text{C}$  で標識したLASを用いた他の研究者による実験の結果を示す。

Table.5. Biodegradation study using  $^{14}\text{C}$  ring-labeled LAS

| Type of test unit                   | MLSS*1 (mg/l) | Substrate                                                     | Percentage distribution of $^{14}\text{C}$ Soluble |         |                              |         |       | Ref. |
|-------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------|------------------------------|---------|-------|------|
|                                     |               |                                                               | $\text{CO}_2$                                      | Biomass | Intermediate                 | LAS     | Total |      |
| Batch (SCAS method) Vol.300ml       | 2500±500      | LAS 10mg/l ( $\text{C}_{11}\text{-C}_{13}$ ) Synthetic Sewage | 62 (after 24hr cycle)                              | 28      | 8.5                          | 1.5     | 10    | 7)   |
| Continuous flow (OECD model) RT.3hr | 3000          | LAS 10mg/l*2 Synthetic sewage                                 | 42-52                                              | 21-26   | 10- (cumulated for 2-5 days) | 0.9-1.4 | 14-20 | 8)   |

\*1:Estimated value.

\*2:Continuously fed for initial 24hrs.

## 5. おわりに

LASの生物分解性を論ずるのに、メチレンブルー活性だけを指標にして議論する時代は終わったといえる。本研究では、ベンゼン環の分解性に視点をあてて、活性汚泥の分解性を検討した。

その結果、馴致汚泥では24~30時間でベンゼン環のはば30~40%が分解したが、未馴致汚泥では2~10%であった。ベンゼン環は生物によって分解できないものではないが、やはりその分解速度は一次分解に比して遅いことは事実である。残りは、ベンゼン環を残したまま、汚泥と放流水に含まれるが、汚泥中に存在する割合の方がかなり高いと思われる。

最後に、本実験の計画、遂行にあたり、御指導頂いた東京大学アイソトープ総合センター森川尚威助教授、野川憲夫技官、実験の遂行にあたり多大な尽力を頂いた東京大学中西研究室の大学院生高橋康夫君に

謝意を表します。尚、本実験は東京大学アイソトープ総合センター共同利用施設で行った。

〈参考文献〉

- 1) Sekiguchi, H, et al. : 油化学, Vol. 24, No. 3, pp. 145 (1975)
- 2) Pitter, P, Fuka : Tenside, Vol. 16, No. 6, pp. 298 (1979)
- 3) 高橋, 楠井, 中西 : 土木学会第136回年次学術講演概要集, 第2部, pp. 229 (1981)
- 4) 楠井, 高橋, 中西 : 第18回衛生工学研究討論会講演論文集, pp. 66 (1982)
- 5) 吉村, 中栄 : 水質汚濁研究, Vol. 5, No. 1, pp. 19 (1982)
- 6) Swisher, R. D. : 油化学, Vol. 21, No. 3, pp. 130 (1972)
- 7) Nielsen, A. M., R. L. Huddleston : Developments in Industrial Microbiology, Vol. 22, pp. 414 (1981)
- 8) Steber, J. : Tenside, Vol. 16, No. 3, pp. 140 (1979)