

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04758

研究課題名(和文) 下水汚泥に含まれる繊維状マイクロプラスチックの緑農地での挙動の解明

研究課題名(英文) Fate of microplastic fibers in agricultural soils with sewage sludge application

研究代表者

浦瀬 太郎 (Urase, Taro)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60272366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエステル繊維由来のマイクロプラスチック(MP)や路面廃水由来のタイヤ片が下水処理施設に流入し下水汚泥に移行すると、汚泥の農業利用の妨げになる。本研究では、下水汚泥や土壤に含まれるマイクロプラスチックの熱分解ガスクロマトグラフ質量分析法による定量法を確立するとともに、MPの都市域での輸送や分解性に着目した。各種プラスチックの土壤中での分解は、生分解性があるとされるポリ乳酸を含めても極めて遅かった。また、路面堆積物中のベンゾチアゾールは路上での加熱によって損失することが少なく、タイヤ片のマーカールとみなし解析することができ、その追跡から、タイヤ片は降雨で水環境に容易に流出することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロプラスチックの問題は国民の関心の高い環境問題の一つであり、レジ袋からストローまでさまざまな形で生活に関連している。また、多くの研究者が精力的に研究している学術的課題である。しかし、この問題については海での研究が多く、陸域での問題は十分に解明されていない。下水汚泥の農業での有効利用は、リン資源のほとんどを輸入に頼るわが国では重要な課題である。本研究は下水汚泥に含まれるマイクロプラスチックの分析法や陸域での分解挙動に関して知見を深めることで、下水汚泥の有効利用を阻害する要因を緩和し、マイクロプラスチックの陸域での挙動の一端をあきらかにしており、社会的あるいは学術的な意義が十分大きい。

研究成果の概要(英文)：Microplastics (MPs) including PET-fibers from clothes and tire particles from roadside deposits are of concern in utilizing sewage sludge for agricultural purposes. This study aimed to clarify the fate of MPs in urban water systems with reliable measurement methods for MPs in soil matters by pyrolysis gas chromatograph-mass spectrometry (GC/MS). The pyrolysis-products were determined for several materials including HDPE, PP, PET, PA6 and so on. Two-year observation showed no obvious degradation of several plastic materials either in agricultural soil matters or in compost fertilizer made from sewer sludge. Benzothiazole contained in the roadside deposits could be used as an indicator for tire particles because its concentration was not decreased during heated environment. Tire particles were shown to be easily transported from roadside to water environment on rain events judging from the analysis of benzothiazole.

研究分野：土木環境システム

キーワード：マイクロプラスチック 水環境 下水汚泥 路面堆積物 農地 タイヤ片

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロプラスチック(MP)が海洋に多く存在する問題が、2015年ごろからG7あるいはG20で繰り返しとりあげられ、国際政治や社会的な側面から注目されている。一方、学術的には、1950年代より、プラスチックの劣化に対し関心がもたれてきており、微生物を専門とする研究者らにより、プラスチックを分解する微生物や酵素が数多く単離、確認されてきた。環境科学の観点では、1970年代から海洋汚染の問題としてのMPに関する先駆的研究があり、2000年代に入り、流体力学系の研究者や、POPsなどの難分解化学物質の輸送と関連して環境化学分析の研究者がMP研究に加わるようになった。

下水汚泥の適切な処理、処分、および、利活用は、土木工学/環境システム分野における重要な課題である。エネルギー回収(メタン、水素、燃料化など)、資源回収(リンなど)、および、建設資材としての活用など、さまざまな下水汚泥の利活用方式が提案されているが、汚泥中のMP含有が緑農地利用では懸念の一つとなる。

下水中には洗濯排水由来の繊維状ポリエステルをはじめ様々なMPが含まれ、下水処理プロセスでかなりの程度の除去が見込まれるが、そのことはMPの分解を必ずしも意味せず、MPが汚泥に移行していると考えられる。ポリエチレン(PE)やポリプロピレン(PP)のような比較的分解されやすいMPもあるが、繊維状ポリエステルの主流であるポリエチレンテレフタレート(PET)の分解は極めて遅いことが示されている。微生物学の研究者らによりPETの分解酵素が同定されているが、PET分解微生物やPET分解酵素が、実際の土壌で有効にはたらくのか、時間をかければMPが分解するのかについて、否定的な研究者も多い。微生物量の違いから、土壌中での分解の方が海中での分解より大幅に速いと想定されるが、アジア圏に特有の水田(つまり嫌気的な環境)では、MP分解が進まない可能性もある。

2. 研究の目的

土試料(下水汚泥を含む)のなかに含まれるMPの効果的な分析法を開発し、土試料に含まれるMPを定量し、MP分解に寄与する微生物の定量を行うこと、下水汚泥中にMPが濃縮される過程を調べ、都市システムでのMPの挙動を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 水田土壌/下水汚泥中のMPs分析のための前処理

直径27 μm のポリエステルファイバー(比重1.38)を1cm長に切断し、50本を水田土試料(湿重5g)に添加し、水20mL、5mol/L塩化ナトリウム水溶液(比重1.2)20mL、5mol/Lヨウ化ナトリウム水溶液(比重1.6)20mLで順に抽出し(10分攪拌、2000rpmで15分遠心分離)、浮上した繊維を含む水をポリカーボネート製孔径0.8 μm の膜で回収し、顕微鏡で繊維数を計数し、回収率を求めた。また、洗濯排水を想定し、綿、麻、羊毛、PET繊維、洗濯ごみ(混合物)に対して70%硫酸(室温で30分)、もしくは、5%水酸化ナトリウム処理(300 $^{\circ}\text{C}$ ホットプレート上30分)による前処理を試みた。

(2) 熱分解GC/MS法によるMPの分析

洗濯排水に含まれるポリエステル繊維や路面排水に含まれるタイヤ片が下水処理過程で下水汚泥に移行し、農地にMPとして残留する状況を想定して、下水中や下水汚泥中のMPの分析法の確立と都市域でのMP挙動について研究した。従来主流のマイクロプラスチック分析法であるラマン分光法やフーリエ赤外分光法を顕微鏡と組み合わせた方法にくらべて、熱分解/GC/MS法は、試料サイズや試料の劣化によらない分析が可能であることから、同法の土壌試料中のマイクロプラスチック分析への応用を検討した。熱分解温度500および800 $^{\circ}\text{C}$ で標準樹脂サンプル(低密度ポリエチレン(PE)、ポリプロピレン(PP)、ポリスチレン(PS)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリアミド6(PA)、ポリカーボネート(PC)、ポリ乳酸(PL)の熱分解を行いGC/MSへ導入した。さらに、環境試料として、公園土壌(片倉つどいの森、みなみ野丘、栃谷戸公園、多摩平第一公園、ヤマブキ公園)、水底土砂(浅川、川口川、平井川、北多摩1号処理場放流口、北多摩2号処理場放流口)、銚子君ヶ浜の海浜砂、東京工大前道路わき粉塵を採取し、分析に供した。

(3) 土壌中でのプラスチックの分解

牛糞退避を施肥した畑土壌、および下水汚泥で作成したコンポストを用いて、3mm径の粒子状PP、PS、PE、LP、PET、PL、PA、PC、熱可塑性ポリウレタン(TPU)の分解を好気/嫌気、4/28/37 $^{\circ}\text{C}$ で測定した。分解の程度は、土壌から当該プラスチックを取り出し洗浄/乾燥し、重量を測定する方法で評価した。

(4) 都市域でのMPの挙動

都市域において量的に主要なMPであるタイヤ片(天然ゴム、スチレンブタジエンゴム)の代替指標として、タイヤ用ゴムへの添加剤であるベンゾチアゾール類を利用できる可能性を検討した。路面等の堆積物の500 μm ふるいの通過画分を105 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥し、500 $^{\circ}\text{C}$ で熱分解しGC/MS分析した。また、都市域での運命を推定するため、夏の路上での加熱を模擬して、105 $^{\circ}\text{C}$ で21日間堆

積物を加熱し、ベンゾチアゾール濃度の変化を調べた。また、降雨を模擬して、1.5 mL チューブに堆積物 50 mg をはかり取り、1 mL の純水を加え転倒混和したのち、600 g で遠心分離した残渣を乾燥し、同様にベンゾチアゾール濃度を測定した。堆積物は、大学内自然土壌、八王子みなみ野駅ロータリー、主要道の道路わき、郵便局大型車出入口、主要道停止線脇、主要道交差点、国道道路わき、大学内駐車場から採取した。

(5) 下水汚泥からの微小細菌の単離

プラスチックフィルム状をゆっくり移動する細菌を検索し、そのプラスチック分解への寄与を推定するため、活性汚泥を孔径 0.2 μm のシリンダー状の整った孔構造を持つポリカーボネート膜で1日ろ過を継続し、その間に膜を通過する細菌を R2A 培地上で培養し、16S rRNA 遺伝子により、生じたコロニーの菌種を同定した。

(6) 公共用水域における薬剤耐性大腸菌の存在の経年変化

マイクロプラスチックの調査での試料採取と同時に、水を採取し、試料水に含まれる大腸菌、および、腸内細菌科細菌の薬剤耐性の保持について調べ水底堆積物のなかでの細菌の生残性について検討を加えた。試料の適量を滅菌済み孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、細菌を集菌し、クロモアガーECC 培地で培養し、大腸菌および大腸菌群を単離し、単離細菌に対して、さらに、ディスク拡散法で各種抗生物質に対する耐性を調べた。また、16S rRNA 遺伝子による菌種同定、マルチプレックス PCR 法による耐性遺伝子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 水田土壌/下水汚泥中の MPs 分析のための前処理

水田土壌中のマイクロプラスチック回収のための試料の前処理法として、比重選別処理を試みたところ、PET ファイバーの回収率として、30~76%(平均 58%, n=15)を得た。960 μm のメッシュを通過させる前処理の有無によっての回収率の差はなかった。回収された繊維の 80%以上がヨウ化ナトリウム水溶液画分から回収されたが、試料の由来によっては、塩化ナトリウム水溶液画分から 20%程度が回収された。水画分からは 5%以下しか回収されず、比重分離が有効であった。比重の大きい、洗濯排水由来のポリエステルファイバーの回収率として、7割程度の回収率を得ることに成功した。洗濯排水からの PET 繊維の分析前処理法として、PET 以外の繊維を除去する検討した結果、70%硫酸(室温で 30 分)によって綿、麻を溶解除去することが可能で、熱アルカリ処理による羊毛の溶解除去が可能であった。酸とアルカリによる両分解法を併用することで、PET ファイバーのみを洗濯排水から回収し、のちの分析操作が容易になると考えられた。

(2) 熱分解 GC/MS 法による MPs の分析

PE の熱分解物として、Dodecane(C12)~Tetracosane(C24)の直鎖アルカンが得られた。PP に対しては、PE の熱分解物と似ているが、それに加えて、2,4-Dimethyl-1-heptene, 7-Methyl-1-undecene など分岐のあるアルケンが得られた。PS の熱分解物としては、Styrene, 1,3,7-Octatrien-5-ene, 1,3-Diphenyl propaneなどが得られた。PETの熱分解物として Acetophenone, 1-phenyl-1,2-propanedione, 1,4-Diacetylbenzene など低極性成分とともに極性成分として、Benzoic acid, Terephthalic acid が得られた。極性成分を微極性 GC カラムで分離することが難しく、定量においてはさらに熱分解物の誘導体化を検討した。PA の熱分解物として、Caprolactam や 4-Methyl-8-aminoquinoline などの含窒素有機化合物が得られた。PC については元の骨格を大きく残した 4-(1-Methyl-1-phenylethyl)phenol が熱分解物として得られた。PL の熱分解物として、2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane と 3,6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione が得られた。

低極性熱分解物をターゲットとして環境試料を測定した場合、公園土壌から 0.02~1.2 mg/g、河川底泥から 0.00~0.03 mg/g、清浄海浜砂から 0.0 mg/g、大学前道路わき粉塵から 0.3 mg/g の PET 換算 MP を検出した。極性成分のテレフタル酸をシリル化して GC 定量した場合、公園土壌から 0.15~2.4 mg/g、河川底泥から 0.05~0.27 mg/g、清浄海浜砂から 0.24 mg/g の PET 換算 MP を検出した。

ただし、試料によって各種の熱分解物への親化合物からの分岐比にばらつきがあり、熱分解温度、GC への導入方法、濃度補正方法などに課題が残った。

(3) 土壌中でのプラスチックの分解

畑土壌、および、下水汚泥コンポスト中でのマイクロプラスチックの分解性を調べたところ、14 か月の期間で TPU のみ 0.5%の重量減少がみられたが、これは、重量測定の乾燥の際の熱劣化であり、生物分解の結果ではないと考えられた。また、PL は 37 の条件でのみ 13 か月目より特に嫌気条件で重量減少がみられたが、これについても、微生物による分解であるとの確信が得られず、加水分解による重量減少の可能性が高かった。生分解性プラスチック(PL)以外のプラスチックでは、2年経過後でも 0.1%以下の重量減少しか生じておらず、PL も含めて、土壌中および下水汚泥コンポスト中で数年の単位での分解が無視しうるほど小さいと考えられた。

(4) 都市域での MP の挙動

路面堆積物中のベンゾチアゾールをタイヤ片のマーカーとして測定した。図 1 に示

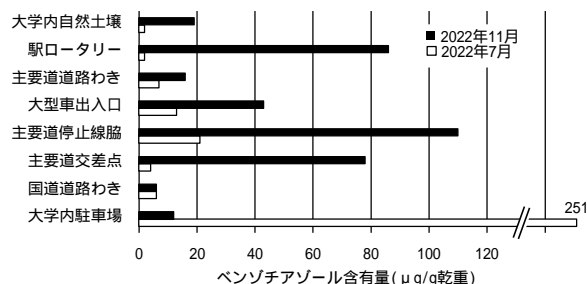


図1 路面堆積物試料などに含まれるベンゾチアゾール

すように、路面堆積物乾重 1g あたり 2~251 μg のベンゾチアゾールが検出された。タイヤ片には最大 5%の加硫促進剤が含まれるとされるが、熱分解 GC/MS 法での測定では、それよりも大幅に小さい 0.1%程度が熱脱着し測定されたと考えられた。仮に交通量の多い場所で堆積物に 20 μg/g のベンゾチアゾールが平均的に含まれると考え、この 0.1%のベンゾチアゾール脱着率を適用すると、路面堆積物の 2%程度がタイヤ粒子であることが考えられる。図-2 に模擬降雨実験および路面での長期加熱再現実験の結果を示す。

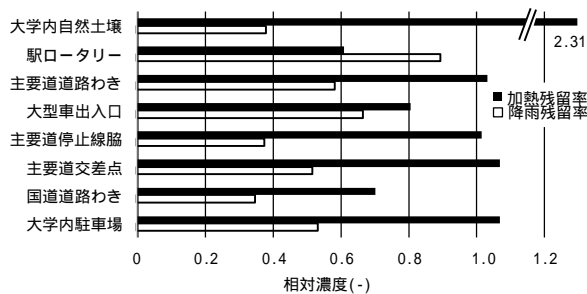


図2 降雨や路面加熱を想定した場合のベンゾチアゾールの残留率

長期加熱によって、ベンゾチアゾール含有量が 10%~62% (平均 44%) 低下することが示された。この結果は、タイヤ粒子の密度が水より小さいことと整合しており、降雨時にタイヤ片は容易に流亡し、合流下水あるいは分流雨水として下水道へ取り込まれることが示された。また、105℃で 21 日間加熱した場合、大学内自然土壤のひとつの試料を除くと、ベンゾチアゾール含有量はもとの試料の 62%~107%の範囲にあり平均 9%の減少にとどまったことから、路面で長期にわたって加熱しても、タイヤ片粒子に取り込まれているベンゾチアゾールは容易に大気へ揮発することではなく、ある程度まで、ベンゾチアゾールをタイヤ粒子の指標と見なすことが可能と考えられた。

(5) 下水汚泥中に含まれる微小細菌の調査

下水汚泥中での MP の分解に関連して、その微生物群集の補足情報として、活性汚泥中のプラスチック表面付着性があると考えられる膜透過性の微小細菌の群集を調べた。*Ralstonia*, *Microbacterium* などのサイズの小さい細菌以外に *Methylobacterium* や *Methylorubrum* といった比較的サイズの大きいバクテリアが時間をかけて膜を透過することがあきらかとなった。これらは、プラスチックフィルム上に付着し、時間をかけて、膜透過側へ移動、もしくは、膜透過側へ娘細胞を形成することが考えられた。マイクロプラスチック分解とこうした膜透過性細菌との関連については今後検討する必要がある。

(6) カルバペネム耐性菌に関連した環境調査

河川底泥中の MP の調査と並行して、河川水中の抗生物質耐性大腸菌の存在状況について調べ、地域の農業や都市化の状況と検出される薬剤耐性の経年変化について調べた。下水道の普及率が高い地域においても、セフトキシム耐性などをもったヒト由来の大腸菌が多く検出され、採水場所付近の合流式下水道の越流水の影響や伴侶動物の関与が示唆された。一方で、2000 年代初頭の同じ場所での大腸菌における耐性調査と比較して、今回の調査では、畜産に関連すると考えられるテトラサイクリン耐性や一般的な耐性であるアンピシリンへの耐性率が有意に減少した。また、検出されたカルバペネマーゼの遺伝子型は NDM 型や IMP 型であり、一方で、我が国の地域性から KPC 型、OXA 型、VIM 型の検出はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Zhou Shuai、Ninoseki Manae、Kusaba Asahi、Nakagawa Kazuma、Urase Taro | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Bacterial Species Identified in the Filtrate of Microfiltration Membranes in the Separation of Activated Sludge | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology | 6. 最初と最後の頁 294 ~ 301 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2965/jwet.21-086 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 URASE Taro、KAWANO Yuito、SATO Mio | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 A Case Study for the Change in Antibiotic-Resistant Ratios of <i>Escherichia coli</i> Taken from Rivers in the Suburbs | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Japan Society on Water Environment | 6. 最初と最後の頁 83 ~ 90 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2965/jswe.45.83 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Urase Taro、Okazaki Mitsuhiro、Tsutsui Hirofumi | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Prevalence of ESBL-producing Escherichia coli and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in treated wastewater: a comparison with nosocomial infection surveillance | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Water and Health | 6. 最初と最後の頁 899 ~ 910 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/wh.2020.014 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Matsui Toru、Asano Miho、El-Bassi Leila | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Alkane Biodegradation Under Saline Conditions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Exploratory Environmental Science Research | 6. 最初と最後の頁 127 ~ 127 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.47204/EESR.2.1.2021.127-132 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Urase Taro, Goto Saki, Sato Mio | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Monitoring Carbapenem-Resistant Enterobacterales in the Environment to Assess the Spread in the Community | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Antibiotics | 6. 最初と最後の頁 917 ~ 917 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics11070917 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤美桜, 浦瀬太郎 |
| 2. 発表標題 下水処理水中のカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の種構成 |
| 3. 学会等名 第57回環境工学研究フォーラム (講演番号B-24) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 浦瀬太郎, 川野唯人, 佐藤美桜 |
| 2. 発表標題 神奈川県内河川から採取した大腸菌の各種薬剤への耐性率 |
| 3. 学会等名 第55回水環境学会年会 (講演集ページ105) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池部美優, 浦瀬太郎, 後藤早希 |
| 2. 発表標題 ベンゾチアゾールを標的とした道路脇堆積物に含まれるタイヤ粒子の分析 |
| 3. 学会等名 第14回大学コンソーシアム八王子学生発表会, PB1-25 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水環境工学(浦瀬)研究室の研究紹介
<https://urase-lab.bs.teu.ac.jp/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 松井 徹 (Matsui Toru) (90372812) | 東京工科大学・応用生物学部・教授 (32692) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|