



生分解性プラスチックの天然海水中での分解性及び生態毒性評価

丸山, 絢加 ; 中村, 章生 ; 中山, 敦好 ; 増井, 昭彦 ; 堀江, 好文 ; 岡村, 秀雄

(Citation)

神戸大学大学院海事科学研究科紀要, 20:16-26

(Issue Date)

2023

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/0100482732>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482732>



生分解性プラスチックの天然海水中での分解性及び生態毒性評価 Degradability and Ecotoxicity Assessment of Biodegradable Plastics in Natural Seawater

丸山絢加¹、中村章生²、中山敦好^{1,3}、増井昭彦⁴、堀江好文⁵、岡村秀雄⁵
Ayaka Maruyama, Akinori Nakamura, Atsuyoshi Nakayama, Akihiko Masui,
Yoshifumi Horie and Hideo Okamura

¹ 神戸大学大学院海事科学研究科

¹Graduate School of Maritime Sciences, Kobe University

² 神戸大学海事科学部

²Faculty of Maritime Sciences, Kobe University

³ 国立研究開発法人産業技術総合研究所

³National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

⁴ 地方独立行政法人大阪産業技術研究所

⁴Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology(ORIST)

⁵ 神戸大学内海域環境教育研究センター

⁵Kobe University Research Center for Inland Seas

(受付 2023 年 7 月 7 日)

Abstract

In recent years, attention has been focused on the development of plastics that biodegrade in marine environments in order to solve the problem of marine plastic pollution. It is important to evaluate production, dissipation, and ecotoxicity of the decomposition intermediates during biodegradation as well as the biodegradability in seawater for the development of marine biodegradable plastics. The purposes of this study using four types of the biodegradable plastics (PBSA, PCL, PA4, and PHBH) were to evaluate disintegration properties through field test as well as biodegradability and ecotoxicity through laboratory tests using BOD test. Films molded from the test plastics were immersed in ship mooring pond at the Fukae Campus of Kobe University, and their disintegration properties were evaluated using weight loss after 2-11 weeks immersion. Laboratory tests were conducted to evaluate the biodegradability of pulverized plastics using OxiTop apparatus to determine mineralization, and ecotoxicity of the decomposition solution at the end of the BOD test was evaluated using a series of marine organisms such as bacteria, microalgae, rotifer and crustacean. As a result, all the test plastics disintegrated in the field test and biodegraded in the laboratory BOD test. No ecotoxicity was observed in the decomposition solution with PBSA, PCL, and PHBH, however, the solution with PA4 showed weak inhibition to microalgal growth. Re-analysis of the stored samples to quantify algal growth inhibition failed to reproduce any inhibition. We thought that the putative toxic substances could decompose afterwards even if they were present at the end of BOD test.

(Received July 7, 2023)

1. はじめに

近年、海洋中に存在しているプラスチックが、波や紫外線により細かく粉砕されて 5 mm 以下のプラスチック片であるマイクロプラスチックとして海洋中に存在し、回収が困難になることが問題視さ

れている。このマイクロプラスチック問題を解決するために、微生物によって二酸化炭素と水に完全分解される生分解性プラスチックの研究開発に注目が集まっている。先行研究にて報告されている生分解性プラスチックの生分解性についてのデータを表1にまとめた。フィールドテストでの分解性については、主に土壌を対象にした研究が進められているが、海洋環境中での生分解性プラスチックの分解性に関する報告例は少なく、室内 BOD 試験と実海域での浸漬試験、安全性試験まで評価した報告は少ない現状である。また、Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) ナノプラスチックが淡水産の藻類と甲殻類に対して有害性がある[1]という報告がされているなど、生分解性プラスチックが環境中の生物にとって安全であるかも未だ定かではない。そこで本研究では、Poly(buthylene succinate / adipate) (PBSA)、Polyamide 4 (PA4)、Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)、Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) の4種類の生分解性プラスチック試料の天然海水中での生分解性を評価することを目的として、室内と実海域にて試験を行った。また室内 BOD 試験後のろ過海水の毒性評価も行った。これらのプラスチック試料のうち PBSA、PCL、PHBH はすでに上市され、もっとも社会実装が早く進むと思われる化学合成系のポリエステル、生合成系ポリエステルで、PA4 はナイロンであるにもかかわらず生分解するユニークな材料であるが、それらの生態毒性は十分に評価されていないことから選定した。

表1 PBSA、PBS、PCL、PHBHの研究の現状

試料	実験方法	試験期間(w)	試料形状	試験地点	分解率(%)	文献
PBSA	土壌	4	フィルム	-	80	[2]
	実海域	6(11月～)	フィルム	岬町	20～30	[3]
		6(11月～)	フィルム	大阪湾	85	[3]
	室内BOD	4	フィルム	岬町	2.6	[3]
		4	粉末	大阪湾	29.2	[3]
PCL	土壌	4	フィルム	-	80	[4]
	実海域	6(11月～)	フィルム	岬町	60	[3]
	室内BOD	4	粉末	大阪湾	14.5	[3]
PHBH	土壌	15	フィルム	-	60	[5]
	実海域	6(11月～)	フィルム	岬町	20～34	[3]
		6(11月～)	フィルム	大阪湾	100	[3]
	室内BOD	4	粉末	岬町	30	[6]
		4	粉末	大阪湾	58	[3]
PA4	実海域	6	フィルム	岬町	15	[7]
		6	フィルム	大阪湾	70	[7]
	室内BOD	4	粉末	那覇港	10	[3]
		4	粉末	大阪湾	40	[3]

2. 実験材料及び方法

2.1. 実験材料

本研究では4種類のプラスチックを用いた。それらの特徴を以下に示す。

PBSA (三菱ケミカル社製、図 1) は石油化学由来の汎用ポリオレフィンに比べて二酸化炭素排出量が低く、比較的疎水性で、生分解性、熱可塑性、加工性といったバランスのとれた特性を持つ生分解性ポリマーである。従来の幅広い技術(シート押出、射出成形、熱成形、ブロー成形、発泡、繊維紡糸、フィラメントなど)を通じて比較的良好な加工性を備えており、日常使用するために設計された様々な材料(包装、自動車、繊維、スポーツ、レジャー産業)の製造に適している。

PA4(図 2)は、開環重合により 2-ピロリドンから合成できるナイロンの一種である。ナイロンは一般に非生分解性であることが知られている。しかし、PA4 は自然界に広く存在する 4-アミノ酪酸を繰り返し単位に持つ材料であり、活性汚泥によって容易に生分解され、室内 BOD 試験では粉体試料で大

阪湾の海水を用いた場合は40%生分解し、那覇港の海水を用いた場合の生分解率は10%であったとの報告[7]があるなど、PA4の劣化も報告されている。

PHBH(図3)は、PHA(ポリヒドロキシアルカノエート)の一種で、(R)-3-ヒドロキシ酪酸と(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸を構成単位とする共重合ポリエステルであり、柔軟さ(例えば、袋を生産)と硬質さ(スプーンやストローなど)の両方をカバーする様々な加工製品を添加剤なしで作ることができるプラスチックである。

PCL(図4)はε-カプロラク톤の開環重合によって得られる高分子脂肪族ポリエステルであり、石油化学のプロセスを介して得られる。また様々なポリマーと相溶性を有し、ブレンド試料の調製を可能にする試料である。低い融点(60℃)の熱可塑性のプラスチックとして、マルチフィルムやコンポスト用袋や、医療用途として縫合糸などに使われている。

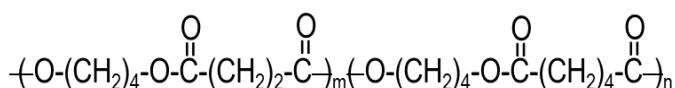


図1 PBSAの構造式

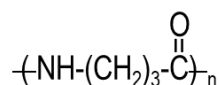


図2 PA4の構造式

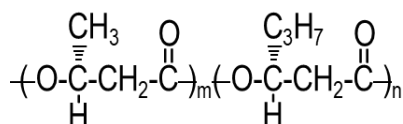


図3 PHBHの構造式

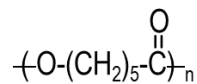


図4 PCLの構造式

2.2. 野外での崩壊性評価試験

浸漬試験には比重の大きなポリ塩化ビニル製で、全面に8mmφの孔が配置された海水が自由に入りできるように工夫を施した専用容器(図5)を用い、神戸大学海事科学部キャンパス内のポンドに浸漬させた(図6)。試料は3×4cmの大きさに切り取って使用し、N=3で行った。専用容器から回収した試料は、超音波洗浄機で試料に付着した汚れを洗浄した後、乾燥機にて40℃で4時間乾燥させた。その後、重量を計測し、実験前の値と比較し重量減少率から試料の崩壊性について評価した。重量減少率は以下のように求めた。

$$\text{重量減少率(\%)} = 100 - (\text{実験後の重量} / \text{実験前の重量}) \times 100$$

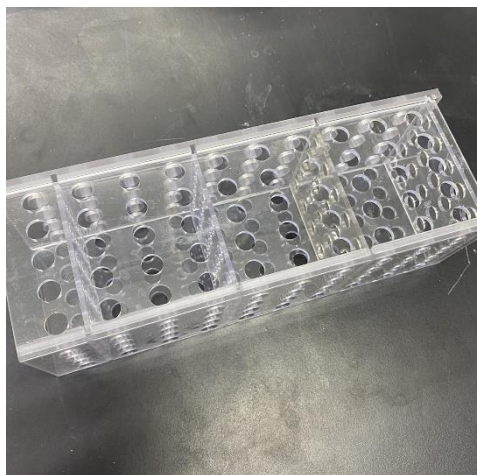


図5 専用容器



図6 専用容器を配置したカゴ



図7 カゴを浸漬させる途中経過



図8 カゴを水深1.5mで固定させた様子

2.3. 室内での生分解性評価試験

2.3.1. OxiTop を用いた BOD 試験方法

本試験は ISO23977-2[8] に準拠して実施した。実験に用いる天然海水は試験の前日または当日に神戸大学海事科学部キャンパス内のポンドにて採取した。採水した海水に 100 g/l の NH_4Cl を 150 μl 加えて $\text{N} = 13.1 \text{ mg/l}$ に、100 g/l の KH_2PO_4 を 300 μl 加えて $\text{P} = 22.8 \text{ mg/l}$ になるように調製し、NP 強化海水とした。1000 ml 容量のガラス容器に 300 ml の NP 強化海水を入れ、PHBH、PBSA、PA4、PCL の粒径 100 μm の粉体を添加し、二酸化炭素吸収剤存在下で、25°C の暗所でスターラーを回転させ、1 か月間の容器内の圧力変化を生分解による酸素消費量として計測し、BOD 値に換算した。

2.3.2. 生分解性(%)の計算方法

生分解は以下の式で表す。

$$\text{Biodegradation}(\%) = ((\text{BODg} - \text{BODbt}) / (\rho\text{TC} \times \text{ThOD})) \times 100$$

ただし、

BODg: フラスコ内で測定された BOD(mg/l)

BODbt: 試験終了時のブランクのフラスコ内で測定された BOD(mg/l)

ρTC : フラスコ内の反応混合物中の試験物質の濃度(g/l)

ThOD: 理論酸素消費量(mg/g)

である。

2.4. 生態毒性試験方法

生態毒性を、海産微細藻類 *Phaeodactylum tricornutum*、海産発光細菌 *Aliivibrio fischeri*、塩水性甲殻類 *Artemia salina*、海産ワムシ *Brachionus plicatilis* を用いて評価した。室内 BOD 試験後の海水をメンブレンフィルター(ポリカーボネート製、孔径 0.2 μm 、直径 47 mm)でろ過し、このろ過海水を試料として生態毒性を評価した。

海産微細藻類 *P.tricornutum*(NIES-4392)は、10°C で保存培養している細胞を新鮮 MAS 培地で 20°C、連続照明で 3~4 日間前培養した。MAS 培地は人工海水 1000 ml に、栄養塩類として MAS1(metals)を 15 ml、MAS2(ビタミン類)を 0.5 ml、MAS3(N, P, Si)を 1 ml 加えて調製した。この前培養した海産微細藻類をろ過した海水に加えて藻類増殖阻害試験[9]を行った。生態毒性を評価するろ過海水試料 2 ml に MAS1 を 30 ml、MAS2 を 1 ml、MAS3 を 2 ml 加えた後、1 M NaOH を用いて pH を 8.0 ± 0.2 に調整し

て100%試料とした。96 well マイクロプレートを用いて対照区、ポジティブコントロール区(3,5-dichlorophenol, 5 mg/l)、試験区を設定して、それぞれの試料を6ウェルに分注し、蒸発を防ぐためにマイクロプレートの蓋を本体とテープで閉じて、連続光照射光のもとで3日間培養した。培養開始時から1日ごとにマイクロプレートを取り出して沈殿した藻類を攪拌した後に、蛍光マイクロプレートリーダー(Corona, MTP-900Lab)を使用して各ウェルの *in vivo* chlorophyll 量を測定し、これをバイオマス量とした。対照区および試験区でのバイオマス量から50%増殖阻害濃度(72h-EC50)および無影響濃度(NOEC)を算出し、ポジティブコントロール区(3,5-dichlorophenol, 5 mg/l)での増殖阻害があることを確認した。

海産発光細菌 *A.fischeri*(ATCC 49387)は、-60℃で保存している菌体をクールアルミバスにて15℃で解凍した後に用いた。この海産発光細菌を用いて発光阻害試験[10]を行った。生態毒性を評価するろ過海水試料(100%, 2 ml)を、希釈液として2% NaCl 溶液を用いて4段階濃度(12.5、25、50、100%)に希釈して試験を行った。ルミチューブに入れた試料中に発光細菌(10~50 ml)を加え、直ちにタッチミキサーで3秒間攪拌し、ルミノメーター(キッコーマン、ルミテスター C-1000)にて暴露開始時の発光量を測定した。測定後は15℃に設定したアルミバスに戻して暴露30分後の発光量を測定した。対照区および試験区での発光量から、50%発光阻害濃度を算出した。ポジティブコントロール区(3,5-dichlorophenol, 5 mg/l)で発光阻害があることを確認した。

塩水性甲殻類 *A.salina* (JBL Artemio pur, Germany) は、試験前日に人工海水20 mLを入れたシャーレ(直径9 cm)にアルテミアの休眠卵を加え、25℃の連続光下に置いて翌朝、孵化した生後24時間以内の幼生を用いてアルテミア致死試験を行った[11]。生態毒性を評価するろ過海水試料を24 well マイクロプレートの各ウェルに1 mLずつ分注し、アルテミアを10個体ずつ移して25℃の暗所にて静置し、48時間後の死亡数を計数、供試濃度ごとに致死率を算出した。対照区および試験区での致死率から50%致死濃度(48h-LC50)を算出し、ポジティブコントロール区(3,5-dichlorophenol, 5 mg/l)で致死が生じることを確認した。

海産ワムシ *B.plicatilis* (ROTOXKIT M, Microbiotest Inc. Belgium) は、標準海水と超純水を加えて調製した培地を入れたシャーレ(直径6 cm)にツボワムシの休眠卵を加え、25℃の連続光下に置いて翌朝、孵化した生後24時間以内の幼生を用いて試験を行った。生態毒性を評価するろ過海水試料をキット専用マイクロプレートの楕円形ウェルに分注し、ツボワムシを5個体ずつ移して25℃の暗所にて静置し、24時間、48時間後の死亡数を計数、供試濃度ごとに致死率を算出した。対照区および試験区での致死率から50%致死濃度(48h-LC50)を算出し、ポジティブコントロール区(3,5-dichlorophenol, 5 mg/l)で致死が生じることを確認した。

3. 実験結果及び考察

3.1. 野外での崩壊性評価

3.1.1. PHBH

PHBHを用いて行った試験の条件と結果を表2示す。それぞれ試験開始日、試験期間、ボックスを固定した深度が異なり、フィルム試料は3×4cmの大きさで膜厚は平均63 μmであり、それぞれの深度で供試したフィルムは3枚の繰り返し試験を行った。PHBHフィルム(2021/11/26~)の重量減少率は表2より全ての深度での重量減少率の平均は37.5%であった。

PHBHフィルム(2022/7/7~)は3週後にフィルム試料がボックス内から無くなっていたため、重量減少率を100%とした。これは完全にフィルム試料が崩壊したか、崩壊の過程の中でボックスに開いている穴から流出したと考えられる。

これらの実験から、PHBHは海水中で崩壊しやすいことがわかった。中山らの報告[3]では11月、12月の水温14.3℃～19.2℃の大阪湾にて、PHBHのフィルム試料(2×3cm)は2週間で49%、4週間で93%、6週間で100%分解し、11月、12月の水温12.5℃～14℃の大阪の岬町ではPHBHのフィルム試料(2×3cm)は2週間で17%、4週間で25%、6週間で34%分解することが報告されており、神戸の深江でもPHBHのフィルム試料も同様の結果を得られた。

表2 PHBHの重量の減少率

試料	試験開始日	試験期間	深度	初期重量(mg)	重量減少率(%)
PHBH フィルム	2021/11/26	2週間	1.5m	42.2	37.6±4.2
	2021/11/26	2週間	3m	40.7	27.3±12.6
	2021/11/26	2週間	着底	40.1	47.7±6.7
PHBH フィルム	2022/7/7	3週間	1.5m	105.4	100
	2022/7/7	3週間	1.5m	100.5	100
	2022/7/7	3週間	1.5m	95.8	100

3.1.2. PBSA

PBSAを用いて行った試験の条件と結果を表3に示す。それぞれ試験開始日、試験期間、ボックスを固定した深度が異なるが、用いたフィルム試料は全て同じ素材であり、フィルム試料は3×4cmの大きさで膜厚は平均84μmである。PBSAフィルム(2021/11/26～)の重量減少率は表3より全ての深度での重量減少率の平均は1.5%であり、2週間でPBSAはわずかに分解した。

PBSAフィルム(2022/7/8～)の4週後の重量減少率は56%であった。6週後、9週後は、フィルム試料にフジツボがしっかりとフィルムにくっついており、フィルム試料を回収・洗浄の手順の間に崩壊してしまったため測定不可能であった。

これらの結果より、11月の2週間の浸漬で1.5%分解したPBSAは7月では4週間で56%分解することからPBSAは夏場においてより顕著に海洋環境で生分解されることが考えられる。

中山らの報告[3]では11月、12月の水温14.3℃～19.2℃の大阪湾にて、PBSAフィルム試料(2×3cm)は2週間で1.8%、4週間で25%、6週間で85.4%分解し、11月、12月の水温12.5℃～14℃の大阪の岬町ではPBSAのフィルム試料(2×3cm)は6週間で約20～30%分解することが報告されており、本実験からは、時間とともに分解が進んだため長期期間で分解することがわかった。また夏季にフジツボの影響を受けやすく、フジツボはフィルム試料に密着するため、試料を洗浄する過程で崩壊してしまい、データを取得することができなかったため、定期的に試料表面の付着物の除去を行うことが必要である。

表3 PBSAの重量減少率

試料	試験開始日	試験期間	深度	初期重量(mg)	重量減少率(%)
PBSA フィルム	2021/11/26	2週間	1.5m	61.7	1.4±0.7
	2021/11/26	2週間	3m	59.7	1.5±0.8
	2021/11/26	2週間	着底	49.0	1.7±1.3
PBSA フィルム	2022/7/8	4週間	1.5m	106	56.8±18.7
	2022/7/8	6週間	1.5m	180.4	*
	2022/7/8	9週間	1.5m	183.5	*

※:評価不可能

3.1.3. PA4

PA4を用いて行った試験の条件と結果を表4に示す。それぞれ試験開始日、試験期間が異なるが、用いたフィルム試料は全て同じ素材であり、フィルム試料は3×4cmの大きさで膜厚は平均101μmである。PA4フィルム(2022/2/10～)の重量減少率は表4より、11週後の減少率は10%以下となった。これは実験を行った2月の平均水温が9.3℃、3月の平均水温が15.6℃であり、同年8月の平均水温である29.7℃と比べて低いため微生物の活性が低く、分解が遅かった可能性がある。

PA4フィルム(2022/7/8～)の重量減少率は4週後の重量減少率は12%で、6週後の重量減少率は2.1%と逆転したが、6週間後の試料では貝類の表面付着が多く、その除去が不十分だった可能性が高い。9週後はフィルム試料にフジツボ等の汚れがしっかりとくっついており、フィルム試料を回収・洗浄の手順の間に崩壊したため測定不可能であった。

山野らの報告[7]では大阪湾にて、PA4フィルム試料(10×10mm、厚さ100μm)は2週間で10%以下、4週間で約50%、6週間で約70%分解し、大阪の岬町ではPA4フィルム試料(10×10mm、厚さ100μm)は2週間で約5%、4週間で約10%、6週間で約15%分解することが報告されており、神戸で実験を行った場合は岬町と同等もしくはそれよりも低い分解性を示した。

これらの実験から、PA4は、時間とともに分解が進んだため長期期間で分解することがわかった。また、夏季では分解する可能性はあるが、フジツボが付着したためにデータを取得することが困難であった。

表4 PA4の重量減少率

試料	試験開始日	試験期間	深度	初期重量(mg)	重量減少率(%)
PA4 フィルム	2022/2/10	2週間	1.5m	128.3	0
	2022/2/10	6週間	1.5m	137.6	0
	2022/2/10	11週間	1.5m	170.5	8.9±9.7
PA4 フィルム	2022/7/8	4週間	1.5m	121.6	12±6.7
	2022/7/8	6週間	1.5m	170.9	2.1±3.6
	2022/7/8	9週間	1.5m	126.1	*

※:評価不可能

3.1.4. PCL

PCLを用いて行った試験の条件と結果を表5に示す。それぞれボックスを固定した深度が異なる。PCLフィルム(2021/11/26～)の重量減少率は異なる3つの深度での重量減少率の平均は73.7%であり、PCLは海水中で分解することがわかった。着底させたボックス内のPCLは回収不可能であり、これは全て分解したか、通水ボックスの穴から抜け出す程度に崩壊したと考えられる。着底させたボックスでは、底泥中の微生物が作用したために分解が促進されたと考えられる。

中山らの報告[3]では11月、12月の水温12.5℃～14℃の大阪の岬町ではPCLのフィルム試料(2×3cm)は6週間で60%以上分解することが報告されており、神戸でも同様の結果を得る事ができた。

表5 PCLの重量減少率

試料	試験開始日	試験期間	深度	初期重量(mg)	重量減少率(%)
PCL フィルム	2021/11/26	2週間	1.5m	42.4	62.4±9.3
	2021/11/26	2週間	3m	45.6	58.8±9.3
	2021/11/26	2週間	着底	42.4	100.0

3.2. 室内での生分解性評価

3.2.1. PHBH

室内 BOD 実験で用いた PHBH の初期濃度とその生分解率を表 6 に示す。浸漬試験で用いたのと同じ PHBH フィルムを凍結粉碎した粉末試料を用いて、浸漬試験を行った場所で採水した海水にて生分解性試験を行い、その生分解率は平均 45.8%と高い生分解性を示した。中山らの報告[3]によると、大阪湾の北港の海水を用いて行った室内 BOD 実験では粉体の PHBH は 40 日で 60%以上生分解したことから、神戸の N,P で活性を強化した海水を用いた本実験では大阪港で得られた生海水を用いたデータと同等の結果が得られた。

表6 PHBHの生分解性

番号	試料	試験開始日	濃度	生分解率
		試験期間	mg/l	%
A1	PHBH 粉体(試薬)	2022/8/30 1カ月	80.3	37.5
A2			80.3	56.9
A3			85.3	42.9

3.2.2. PBSA

室内 BOD 実験で用いた PBSA の初期濃度とその生分解率を表 7 に示す。浸漬試験で用いたのと同じ PBSA フィルムを凍結粉碎した粉末試料を用いて、浸漬試験を行った場所で採水した海水にて生分解性試験を行い、その生分解率は平均 68.8%と高い生分解性を示した。イオン交換水に標準的な活性汚泥を使用した OECD301F 試験にて PBSA の粉末試料は 28 日間で $74.7\pm6.0\%$ 生分解したこと[12]、大阪湾の海水を用いて PBSA のフィルム試料を用いて 1 カ月室内 BOD 試験を行った場合の生分解率は 2.6%で、PBSA の粉体試料を用いた室内 BOD 試験での生分解率は 29.2%であることが報告されており[3]、神戸の海水を用いた場合、PBSA の粉体は大阪湾の海水を用いた場合よりも生分解率が高かった。

表7 PBSAの生分解性

番号	試料	試験開始日	濃度	生分解率
		試験期間	mg/l	%
B1	PBSA 粉体	2022/8/30 1カ月	156.7	73.8
B2			152.3	61.3
B3			157.3	71.2

3.2.3. PA4

室内 BOD 実験で用いた PA4 の初期濃度とその生分解率を表 8 に示す。浸漬試験で用いたのと同じ PA4 フィルムを凍結粉碎した粉末試料を用いて、浸漬試験を行った場所で採水した海水にて生分解性試験を行い、その生分解性は 56.1%であった。イオン交換水に標準的な活性汚泥を加えた OECD301F 試験にて、PA4 の粉末は 28 日間までに 60%以上生分解した[12]こと、大阪湾の海水を用いて PA4 の

表8 PA4の生分解性

番号	試料	試験開始日	濃度	生分解率
		試験期間	mg/l	%
C1	PA4 粉体	2022/8/30 1カ月	155.7	56.3
C2			148.3	58.8
C3			155.7	53.1

粉体試料を用いて1カ月室内BOD試験を行った場合の生分解率は約40%で、那覇港の海水を用いた場合の生分解率は約10%であることが報告されており[3]、神戸の海水を用いた場合でも生分解は大阪湾の海水を用いた場合と同様に進行することがわかった。

3.2.4. PCL

室内BOD実験で用いたPCLの初期濃度とその生分解率を表9示す。浸漬試験で用いたのと同じPCLフィルムを凍結粉碎した粉末試料を用いて、浸漬試験を行った場所で採水した海水にて生分解性試験を行い、その生分解性は平均69.8%であり、本研究で用いた生分解性プラスチック試料の中で最も高い生分解率を示した。PCLは河川水を用いた試験では28日間で75%生分解し[13]、標準的な活性汚泥を使用した試験では28日間で80%を超える生分解性を示した報告があり[4]、本研究の結果から海水を用いた場合でも生分解は同様に進行することがわかった。

表9 PCLの生分解性

番号	試料	試験開始日 試験期間	濃度 mg/l	生分解率 %
D1	PCL 粉体	2022/8/30 1カ月	80.0	73.4
D2			91.7	72.2
D3			79.0	63.6

3.3. 室内実験での生分解に伴う分解産物の生態毒性

4種類のプラスチック（PHBH、PBSA、PA4、PCL）を用いて実施した室内BOD実験の1ヶ月後の海水（分解溶液）をろ過した試料を用いて生態毒性試験を実施した。1ヶ月後の海水を孔径0.2μmのフィルターでろ過した試料を希釈することなく、4種類の生態毒性試験（海産微細藻類、海産発光細菌、海産ワムシ、塩水性甲殻類）に供試した。その結果を表10に示す。表中の試料番号は、表6、7、8、9に対応している。表10より、4種類のプラスチックから得た分解溶液の100%濃度試料は、海産発光細菌*A.fischeri*、塩水性甲殻類*A.salina*、海産ワムシ類*B.plicatilis*の3種に対して有意な阻害を示さなかった。海産発光細菌*A.fischeri*の阻害率がマイナスとなっているのは、コントロール

表10 PHBH、PBSA、PA4、PCLの生態毒性

試料	生分解率(%)	海産微細藻類	海産発光細菌	塩水性甲殻類	海産ワムシ類
		<i>P.tricornutum</i> 阻害率(%)	<i>A.fischeri</i> 阻害率(%)	<i>A.salina</i> 致死率(%)	<i>B.plicatilis</i> 致死率(%)
A1	37.5	0	-50.3	3.3	0
A2	56.9	0	-55.6	6.7	3.2
A3	42.9	0	-44.9	6.7	0
B1	73.8	0	-74.2	0	0
B2	61.3	0	-49.6	0	0
B3	71.2	0	-75.6	0	0
C1	56.3	36.5	-58.9	0	0
C2	58.8	21.8	-74.1	0	0
C3	53.1	16.9	-58.4	0	0
D1	73.4	0	-51.4	3.3	0
D2	72.2	0	-46.1	0	0
D3	63.6	0	-53	3.3	0

に2%NaCl溶液を用いているのに対して、海水試料サンプルは *A.fischeri* の発光を刺激する高濃度のCa、Mgイオンを含むことから試験前よりも発光量が多かったと考えられる。PA4の分解溶液のみが、海産微細藻類に対して25 ±10.2%の増殖阻害率を示した。そのため、同じPA4の分解溶液を藻類増殖阻害試験に供試したところ、表10に示す100%試料を供試して得られた阻害率(17~37%)は得られず、阻害は認められなかった。そこで、試験終了時に分解溶液に阻害成分が存在したと仮定しても、冷蔵保存中に分解したと推測した。

4. 結論

生分解性プラスチック4試料の天然海水中での崩壊性/生分解性と生分解過程での中間生成物の生態毒性を評価することを目的として、実海域と室内で試験を行い、次の結論を得た。

- 1) PHBHは、実海域試験で2021年11月から2週間で38%、室内BOD試験では46%生分解したことから、実海洋環境中で分解すると考えられた。また、室内BOD試験後の海水には生態毒性は認められなかった。
- 2) PBSAは、実海域試験で2021年11月から2週間で1.4%、2022年7月から4週間で57%分解し、室内BOD試験では69%生分解したことから、実海洋環境中で分解すると考えられた。また、室内BOD試験後の海水には生態毒性は認められなかった。
- 3) PA4は、実海域試験で2022年7月から6週間で2.1%、2022年2月から11週間で8.9%分解し、室内BOD試験で56%生分解したことから、実海洋環境中で分解すると考えられた。また、室内BOD試験後の海水は、海産微細藻類に弱い増殖阻害を示したことから同じ試料を用いて再試験を行ったが阻害は認められず、その他の3種の生物に対する生態毒性は認められなかった。
- 4) PCLは、実海域試験で2022年7月から2週間で73.7%分解し、室内BOD試験で70%生分解したことから、実海洋環境中で分解すると考えられた。また、室内BOD試験後の海水の生態毒性は認められなかった。

謝辞

本研究の一部は、NEDO ムーンショット型研究開発事業「光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究 (JPNP18016)」による援助を受けた。

参考文献

- [1] M. Gonzalez-Pleiter, M. Tamayo-Belda, G. Pulido-Reyes, G. Amariei, F. Leganes, R. Rosal and F. Fernandez-Pinas, Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environment, *Environmental Science Nano*, 6, pp.1382-1392 (2019)
- [2] HL Chien, YT. Tsai, WS. Tseng, JA. Wu, SL. Kuo, SL. Chang, SJ. Huang and CT. Liu, Biodegradation of PBSA Films by Elite Aspergillus Isolates and Farmland Soil, *Polymers* 2022, 14(7), pp.1320 (2022)
- [3] A. Nakayama, N. Yamano and N. Kawasaki, Biodegradation In seawater of aliphatic polyesters, *Polymer Degradation and Stability*, 166, pp.290-299 (2019)
- [4] Y. Yakabe and M. Kitano, Evaluation of biodegradability of biodegradable plastics in activated sludge, 12, pp.331-336 (1994)
- [5] W. Guo, J. Tao, C. Yang, C. Song, W. Geng, Q. Li, Y. Wang, M. Kong and S. Wang, Introduction of Environmentally Degradable Parameters to Evaluate the Biodegradability of Biodegradable Polymers, *PLOS ONE* 7, pp.38341 (2012)

- [6] H. Sashiwa, R. Fukuda, T. Okura, S. Sato and A. Nakayama, Microbial Degradation Behavior in Seawater of Polyester Blends Containing Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx), *Marine Biodegradable Polymers*, 16(1), pp.34 (2018)
- [7] N. Yamano, N. Kawasaki, S. Ida and A. Nakayama, Biodegradation of polyamide 4 in seawater, *Polymer Degradation and Stability*, 166, pp.230-236 (2019)
- [8] ISO23977-2:2020 Plastics - Determination of the aerobic biodegradation of plastic materials exposed to seawater - Part 2: Method by measuring the oxygen demand in closed respirometer, 12 (2020)
- [9] ISO 10253:2016 Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*, 19 (2016)
- [10] ISO 11348-1:2007 Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 1: Method using freshly prepared bacteria, 23 (2007)
- [11] ISO/TS 20787:2017 Nanotechnologies - Aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using *Artemia* sp. Nauplii, 15 (2017)
- [12] R. Nabeoka, H. Suzuki, Y. Akasaka, N. Ando and T. Yoshida, Evaluating the ready biodegradability of biodegradable plastics, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40, pp.2443-2449 (2021)
- [13] K. McDonough, N. Itrich, K. Casteel, J. Menzies, T. Williams, K. Krivos and J. Price, Assessing the biodegradability of microparticles disposed down the drain, *Chemosphere*, 175, pp.452-458 (2017)