報 文

ポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)の生分解性と
その分解中間体塩素処理生成物の検討

伊藤伸一*・綿貫知彦*・内藤昭治*・畝本 力**

* 神奈川県衛生研究所(〒241 横浜市旭区中尾町 52-2)

** 千葉大学薬学部(〒263 千葉市稲毛区弥生町 1-33)

The Aerobic Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB)
by Sewage Bacteria and the Chlorinated Biodegradation Intermediates

Shin-ichi ITOH*, Tomohiko WATANUKI*, Syoji NAITO*, and Tsutomu UNEMOTO**

* Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories,
(52-2, Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama-shi, 〒241)** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University
(1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, 〒263)

The aerobic biodegradation of poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB), a biodegradable plastic, through the action of sewage bacteria was followed by the production of CO₂ at 5~10 mg carbon/L. The degradation started at after 2~3 d of lag phase and was 71~79 % complete in 30 d. PHB is metabolized *via* acetoacetic acid, a potential precursor of trihalomethanes (THM). The biodegradation intermediates of PHB were thus chlorinated and THM production and the toxicity of other chlorinated products were examined. THM as volatile product could not be detected (less than 10 µg/L). Other non-volatile chlorinated products were not mutagenic (rec-assay) and no growth inhibitory (algae-assay) activity was noted. PHB at 5~10 mg carbon/L is thus shown to be extensively degraded by sewage bacteria and degradation intermediates are unlikely to produce toxic materials even following chlorination.

1 緒 言

環境中で極めて安定なプラスチック類の廃棄物は、自然界の物質循環系に速やかに受け入れられず環境中にいつまでも残留するため、難分解性の環境汚染物質として世界的に問題になっている。こうした中、地球環境保護の観点から、微生物によって分解されやすい生分解性プラスチックが注目されている。生分解性プラスチックは完全分解性型と生物崩壊性型に分類され¹⁾、前者に当たる微生物のつくり出す生分解性が高いプラスチックが日本でも実用化されてきた^{2)~4)}。そこで、これらの新しいプラスチックが廃棄物として埋立処分されたり、また公共下水道に排出された場合を想定して、まず生分解試験を行い環境への残留性を検討した。また現在の生分解試験においては、生分解過程に生成される分解中間体の安全性まで考慮されていない。そこで今回一つの新しい試みとして生分解過程に有害物質の前駆体が生成される

かどうかを検討した。すなわち、分解中間体が地下水あるいは河川等へ混入し、水道水として利用されたり、また下水処理場の放流時に塩素処理されることを想定して、分解中間体の塩素処理生成物についても検討を試みた。

2 実 験

2.1 試 料

現在、微生物がつくる共重合ポリエステル〔ポリ(ヒドロキシアルカノエイト)〕としては、PHB とそのコポリマーが知られている⁴⁾。今回は、その中の代表物質である PHB の粉体について検討を行った。

PHB 及びアセト酢酸は Sigma 社製、グルコースは Difco 社製の Bacto-Dextrose を用いた。

2.2 微生物源

家庭下水を主体とした下水溝(当研究所の近くの二俣川支流)から、試験開始日に採水した生下水 100 mL と BOD 希釈水 900 mL とを混合し、これを微生物源と

連絡者: 伊藤伸一

した。

2.3 生分解試験

本試験法の培養装置及び分析法は前報⁵⁾に従った。すなわち、培養瓶の中に BOD 希釈水 2000 mL、微生物源 10 mL 及び炭素量として 10 または 20 mg の試料を投入し密栓してから、20℃ の恒温室で 30 d 間好氣的にダイヤウェイ試験を行った。また、これと並行して炭素源を添加しない空試験についても同様の操作を行った。なお、発生 CO₂ 量は気体の気液平衡理論に基づいたガスクロマトグラフ法を用いて測定した。

2.4 塩素処理生成物の安全性試験 (バイオアッセイ)

炭素量として 20 mg の PHB を投入した培養瓶を測定回数分用意して、2.3 の項に従って生分解試験を行い、必要に応じて一本分の培養液 (2000 mL) を 2.4.1 の塩素処理用の試料とした。なお PHB を投入しない空試験用の培養瓶もいくつか用意し同様の操作を行った。

2.4.1 塩素処理

塩素濃度が 5 mg/L になるように、培養液 2000 mL に塩素溶液 (1000 mg/L, pH 7.2) 10 mL を添加し、直ちに密栓後、20℃ の恒温室で遮光して 24 h 反応させた。これを塩素処理試料とした。

2.4.2 トリハロメタン (THM) 生成量

THM は水中の有機物質と塩素とが反応して生成される揮発性の有機塩素化合物で、クロロホルム、ブromoジクロロメタン、ジブromoクロロメタン及びブromoホルムの 4 種の総称である。このうちクロロホルムについては、マウスやラットに対して発がん性が認められている⁶⁾。

THM 生成量は、溶媒抽出法⁷⁾に準じて測定した。塩素処理試料 50 mL にヘキサン 5 mL を添加し、試料中の THM を含む有機塩素化合物をヘキサン層に回収し、ガスクロマトグラフ分析 [検出器: ECD, カラム: ガラスカラム (3 mm×3 m) 20 % シリコーン DC-550 クロモソルブ W (AW-DMCS)] によって THM 生成量を求めた。なお今回の実験では、培養液中に臭素イオンがほとんど存在しないため、クロロホルム値で THM 量を代表させた。

2.4.3 アセト酢酸生成量の推定

アセト酢酸濃度が低い (0.2 μM 以下) 場合、酵素を用いる分光光度法⁸⁾では、アセト酢酸を直接定量できない。そこで、アセト酢酸水溶液を塩素処理したときにガスクロマトグラム上に認められる未同定ピーク (Fig. 1 の矢印 B、以後ピーク B と呼ぶ) 量とアセト酢酸量との関係を利用して検量線を作成し、生分解試験溶液中のアセト酢酸濃度を間接的に求めた。なお、ガスクロマトグラフ分析の条件等は 2.4.2 に従った。

2.4.4 大腸菌を用いた変異原性試験

① 前処理

Chlorination was performed at the chlorine dose of 5 mg/L and chlorinated compounds were analyzed as described in 2.4.2.

Fig. 1 Gas chromatograms of hexane extracts from chlorinated solutions: (1), biodegraded PHB (10 mg-carbon/L) after 4 d; (2), acetoacetic acid (2 μM).

塩素処理試料 2000 mL に、1 M 塩酸を加えて pH 2.0 とした後、ジクロロメタン (100 mL×2 回) で塩素処理生成物を回収した。次に、ジクロロメタン層に硫酸ナトリウム (無水物) 5 g を加えて脱水を行い、ロータリーエバポレータを用いて全量が約 3 mL になるまで濃縮した。このジクロロメタン層に更に窒素ガスを吹き付けて溶媒を留去した後、変異原性試験等を行うまで冷蔵保存した。試験直前にジクロロメタン 1.0 mL を加え、これを変異原性試験及び増殖阻害試験用の試料とした。

なお、前処理の操作段階で揮発性成分は揮散してしまうので、変異原性試験及び増殖阻害試験では難揮発性成分の毒性だけを検討した。

② 変異原性試験

変異原性試験は Rec-assay を採用し、明間の方法⁹⁾に準じて行った。

トリプトソイ・ブイオン培地で一夜培養した大腸菌 AB 1157 (野生株, rec+) 及び AB 2463 (DNA 損傷修復能欠損株, recA-) の菌液をトリプトソイ・寒天培地に rec+ は 1 %, recA- は 2 % 加え、シャーレ (直径 90 mm) 当たり 10 mL 分注し、寒天平板を作製した。次に変異原性試験用試料を抗生物質検定用汚紙 (ペーパー

ディスク、直径 8 mm) に浸み込ませて、平板上に静置し、37℃ で一夜培養後、汚紙周囲に生じた菌の増殖阻止円の直径を測定した。阻止円の直径の差 [(recA)-(rec+)] が陰性対照のカナマイシンのそれより大きい場合を陽性とした。なお陽性対照としては AF-2 を用いた。

2.4.5 ラン藻を用いた増殖阻害試験

増殖阻害試験は寒天重層法^{10)~11)}を用いた。

1.5 % 寒天培地約 20 mL を角型シャーレに流し込み平板状に固め、これに *Anabena cylindrica* (IAM-M-1) の懸濁液 1 mL を混合した 0.8 % 寒天培地 2 mL を重層し、ラン藻を含む寒天重層平板を作製した。次に 2.4.3 の①で調製した増殖阻害試験用試料を抗生物質検定用汚紙 (ペーパーディスク、直径 8 mm) に浸透させ平板上に置き、裏側から照射し数日間培養後、ラン藻に対する増殖阻害度を汚紙周囲に生じた阻止円の直径を測定して判定した。なお陽性対照としてはカナマイシン及び AF-2 を用いた。

3 結 果

3.1 PHB の生分解性の検討

Fig.-2 は、究極的生分解 (CO_2 と H_2O までの生分解) を指標に検討した PHB の生分解試験の結果である。(3) のグルコースを対照物質として、(1) PHB 単

The concentrations of each compound were indicated in the figure as mg-carbon/2 L.

Fig.-2 Time courses of biodegradation of poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB) (1), PHB plus glucose (2) and glucose (3) under aerobic conditions.

独実験及び (2) PHB とグルコースの等量混合実験を行った。等量混合実験⁵⁾は、試験物質以外にも共存有機物が多種多量に存在する環境生態系の最も単純なモデルを想定した。

PHB 単独では、2~3 d 程度の誘導期が観察され、培養 5 d の分解度は PHB 単独が 14~16 %, グルコース単独が 66~76 %, と培養初期の PHB の分解速度はグルコースと比べて約 1/5 と非常に遅かった。培養 10 日目以降の分解曲線は緩やかな上昇カーブを示し、30 d の最終分解度は 71~79 % とグルコース単独の 87~88 % と比べると若干分解度が低い程度であった。

一方等量混合実験では、PHB 単独の場合と異なり、速やかに CO_2 の発生が認められ、培養 5 d の分解度は 39 %, 培養 30 日目の最終分解度は 75 % であった。

3.2 PHB の分解中間体塩素処理生成物の検討

生分解試験の分解ステージが異なる、培養 0, 4, 7, 11, 14, 21 d の生分解試験溶液をそれぞれ塩素処理して、分解中間体の塩素処理生成物の揮発性成分および難揮発性成分について検討を行った。

まず、分解中間体塩素処理生成物の主な揮発性成分である THM について検討を行った。Fig.-3 に示したように生分解試験の期間中、生分解試験溶液の塩素処理液のガスクロマトグラム上に、アセト酢酸を塩素処理したときに認められるピーク B 及び微生物源だけを添加した空試験の塩素処理液中に認められたピーク (矢印 C の位置、以後ピーク C と呼ぶ) など塩素処理に由来する数本のピークが認められた。しかしながら、クロロホルム (矢印 A の位置) は、全期間を通して定量限界値 (10 $\mu\text{g/L}$) 以下であった。

次に、培養 0, 4, 7, 11, 14, 21 d の分解中間体塩素処理生成物の難揮発性成分を含むジクロロメタン抽出液について、毒性物質の存在をバイオアッセイを用いて検討した。

Fig.-3 に大腸菌に対する変異原性及びラン藻に対する増殖阻害性試験の結果を示した。ガスクロマトグラム上に認められた有機塩素系化合物のうち、アセト酢酸に由来すると考えられるピーク B は、培養 4, 7 d に極大に達し以後減少した。一方、培養初期に認められたピーク C は、7 d 以降減少したが培養 21 d に再び顕著な増加を示した。このように塩素処理によって生分解過程に応じて有機塩素系の化合物が生成されたが、すべてのステージで大腸菌に対する変異原性及びラン藻に対する増殖阻害性は認められなかった。

3.3 アセト酢酸の塩素処理生成物の検討

PHB の代表的な分解中間体であるアセト酢酸に的を絞って、その塩素処理生成物の変異原性について更に検討を行った。Fig.-3 に示したように、アセト酢酸に由来すると考えられるピーク B は培養 4 d に最大であ

む試験の場合、バイオアッセイでは個々の未知物質の安全性評価は困難であるが、未知物質間の複合作用を含めた総合的な安全性評価が可能となり、化学分析の弱点も補うことができる。今回、初期濃度 10 mg-C/L の生分解試験溶液の塩素処理液についてバイオアッセイを行ったが、生分解過程に大腸菌に対する変異原性物質およびラン藻に対する増殖阻害性物質の存在は認められなかった。

しかし念のために、PHB の代表的な分解中間体であるアセト酢酸について更にバイオアッセイを試みた。今回、生分解過程に生成されたと考えられるアセト酢酸の推定最大値の 25 倍量のアセト酢酸の塩素処理液についても変異原性試験を行ったが、変異原性は認められなかった。

一般に生分解試験における対象物質濃度は、実際の環境で起こり得る濃度レベルに即して設定されることが望ましいが、現状では生分解性プラスチックの今後の消費動向等が、把握できないことから、将来 PHB が環境にどの程度暴露されてくるかが予測できない。今回の研究では、環境汚染物質の 1 つである界面活性剤の場合を参考に設定された 5~10 mg-C/L レベルでの生分解試験であり、またバイオアッセイである。従って、今後環境中に大量の PHB が排出されたり、分解中間体のアセト酢酸が環境水から今回の濃度レベル以上に検出されるような事態になった場合には、更に検討が必要になってくるものと思われる。しかしながら、今回程度の濃度レベル以下であれば、PHB の環境生態系への影響は小さい

ものと考えられる。

終わりに、変異原性試験について適切なご助言、ご指導を頂いた神奈川県衛生研究所病理科長 明間鯉一郎氏に深謝致します。

〔平成 5 年 (1993 年) 9 月 22 日受理〕

文 献

- 1) 常盤 豊, 科学朝日, 50, 30 (1990)
- 2) 土肥義治, 現代化学, 1988, 12 月号, 44
- 3) 土肥義治, 化学と工業, 42, 1218 (1989)
- 4) 土肥義治, 化学と生物, 27, 628 (1989)
- 5) 伊藤伸一, 内藤昭治, 畝本 力, 油化学, 37, 1006 (1988)
- 6) National Cancer Institute, "Carcinogenesis bioassay of chloroform", Bethesda MD, National Cancer Institute (1976)
- 7) 厚生省生活衛生局水道環境部監修, "上水試験方法", 日本水道協会 (1985)
- 8) S-I. Itoh, S. Naito, T. Unemoto, *Water Res.*, 19, 1305 (1985)
- 9) 明間鯉一郎, 岡崎則男, 滝沢金次郎, 神奈川県衛生研究所研究報告, 1985 (15), 25
- 10) 山本鎔子, 日本微生物生態学会報, 2, 77 (1988)
- 11) 綿貫知彦, 貝瀬利一, 峯尾 光, 日本水処理生物学会誌, 26, 1 (1990)
- 12) E.A. Dawes, P.J. Senior, *Advan. Microbiol. Physiol.*, 10, 136 (1973)
- 13) G.N. Barnard, J.K.M. Sanders, *J. Biol. Chem.*, 264, 3286 (1989)