

## 6 顕微 FT-IR を用いた汚泥肥料の鑑定方法の開発

沼寄佳奈子<sup>1</sup>, 橋本良美<sup>2</sup>, 秋元里乃<sup>2</sup>

**キーワード** 肥料鑑定, 汚泥肥料, 堆肥, 実体顕微鏡, 顕微 FT-IR

### 1. はじめに

肥料法<sup>1)</sup>において廃水処理を行った際に排出される汚泥を原料とした汚泥肥料の利用には制限があり, 堆肥の原料に使用することはできない<sup>2)</sup>. 汚泥肥料を使用した際は登録を取得するが, それらを堆肥の原料に使用し, 肥料登録を取得せずに堆肥として生産流通させていたことが判明した事例を受け, 汚泥肥料と堆肥を識別するための鑑定方法を検討した.

肥料研究報告 12 号<sup>3)</sup>にて, 下水汚泥, し尿汚泥を原料に用いた汚泥肥料は, 酸またはアルカリ処理した後, 残留物で繊維状の物体及び色の付いた混入物が特徴的にみられ, 原料及び生産工程より家庭雑排水等に含まれるマイクロプラスチック等ではないかと示唆されていた. また, 肥料研究報告 13 号<sup>4)</sup>にて, それらをフーリエ変換形赤外分光光度計 (FT-IR) で測定したところ, 色の付いた混入物の一部はポリプロピレン (以下, PP) やポリエチレン (以下, PE) と同様の赤外吸収スペクトル (以下, スペクトル) が確認されたことが報告されていた. 一方で, 堆肥や動物の排泄物の分解後残留物からは色の付いた類似の混入物を確認できなかったことも同時に報告している.

本研究では, 既報と同様, 下水汚泥, し尿汚泥を原料として使用した汚泥肥料とそれ以外の肥料中に含まれるプラスチックに着目し, それらをより効率的に鑑定するための前処理方法と, 顕微赤外測定附属装置を搭載した FT-IR (以下, 顕微 FT-IR) を用いた鑑定方法を検討し, 汚泥肥料及び堆肥のプラスチック含有状況を調査し, プラスチックの含有状況により汚泥肥料と堆肥を識別する方法を整理したので報告する.

### 2. 材料及び方法

#### 1) 分析用試料

汚泥肥料 (原料に下水汚泥, し尿汚泥, 工業汚泥のいずれか一つもしくは複数を使用したもの) 16 点, 堆肥 6 点 (牛ふん堆肥 3 点, 豚ふん堆肥 1 点, 鶏ふん堆肥 1 点, 馬ふん堆肥 1 点) を使用した. 使用肥料は流通しているものを用い, 全て乾燥, 粉砕を実施せずに分析に使用した.

#### 2) 器具及び装置

(1) 恒温水槽: アズワン スマートウォーターバス TB-2NC

(2) 親水性 PTFE 製メンブレンフィルター: メルク 孔径 10  $\mu\text{m}$ , 直径 47 mm (測定及び洗浄用), 90 mm (洗浄用)

(3) フィルター用ホルダー: 直径 55 mm のアズワン アズノールシャーレを加工し, (2) の直径 47 mm のメンブレンフィルターを張った状態でセットし乾燥可能なものを自作して使用した.

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部 (現) 仙台センター

<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

- (4) 減圧ろ過用フィルターホルダー:アドバンテック東洋 有効ろ過面積 2.1 cm<sup>2</sup> (測定用), 9.6 cm<sup>2</sup>, 43.0 cm<sup>2</sup>(洗浄用)
- (5) アスピレータ:アズワン コンパクトドライアスピレータ DAS-1
- (6) 吸引ろ過瓶:アドバンテック東洋 減圧ろ過システム用器具 VT-500 0.5 L
- (7) 網ふるい:目開き 500 μm
- (8) 実体顕微鏡:ケニス ズーム式実体顕微鏡 LZ-LED-T, 観察は 23 インチのモニターに接続して行った.
- (9) 実体顕微鏡:ケニス 顕微鏡 E5-600T, 観察に用いたモニターは(8)に同じ
- (10) 顕微鏡デジタルカメラ:TUCSEN CMOS カラーカメラシステム Michrome 20
- (11) フーリエ変換形赤外分光光度計:Thermo Fisher Scientific Nicolet iN10 MX, 顕微赤外測定附属装置搭載, 検出器 MCT-A 検出器(冷却, 液体窒素使用), 測定, 解析ソフトウェア OMNIC Picta. 全反射(以下, ATR)法では Thermo Fisher Scientific Ge Tip ATR クリスタルを使用. 透過法は (2)のメンブレンフィルター上若しくは Thermo Fisher Scientific BaF<sub>2</sub> 製のクリスタル上で行った.

### 3) 試薬等の調製

- (1) 水:純水製造装置(日本ミリポア Elix Advantage 5)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 の水
- (2) 過酸化水素:JIS K 8230 に規定する特級試薬(富士フィルム和光純薬)
- (3) 0.5 mol/L 硫酸鉄(II)溶液:JIS K 8978 に規定する硫酸鉄(II)七水和物 特級試薬(富士フィルム和光純薬)139 mg を水 1 mL に溶かし, 0.5 mol/L の溶液とした. (用事調製)
- (4) 2 mol/L 塩酸:塩酸 有害金属測定用(富士フィルム和光純薬)40 mL に水を加えて 200 mL とし, 2 mol/L の溶液とした.
- (5) 比重液:よう化ナトリウム 特級試薬(富士フィルム和光純薬)40 g に水 40 mL を加えて混合し, 比重約 1.6 の溶液とした.
- (6) ポリタングステン酸ナトリウム:比重分離用 粉末タイプ(SOMETU)

### 4) 前処理方法及び観察, 測定方法の検討

プラスチックの分析方法は環境省より海洋中<sup>5)</sup>, 河川のプラスチック分析のガイドライン<sup>6)</sup>, 国連の海洋汚染専門家会議である GESAMP より海洋中プラスチック分析のガイドライン<sup>7)</sup>が発出されているほか, 同じく海洋中, 下水中のプラスチック分析方法の報告がされているが, 肥料を対象とした分析手法はない. 今回は, 以上のような海洋中, 河川, 下水中等のプラスチック分析の方法として公表されているもの<sup>5~12)</sup>を参考に次の(1)~(7)のとおり前処理方法及び観察, 測定方法の検討を行った.

#### (1) 過酸化水素処理方法の検討

既報<sup>4)</sup>を元に, 顕微 FT-IR を用いた観察, 測定, 識別を可能とするため適切な試料量を検討し, 分解方法の改良を行った.

#### (2) フェントン法による有機物分解促進の検討

有機物分解を促進する方法として, 排水処理その他でフェントン法が用いられる<sup>13), 14)</sup>が, しばしばプラスチック分析でも効果的に用いられている例があり<sup>8), 10), 11)</sup>, 今回検討を行った.

使用した 0.5 mol/L 硫酸鉄(II)溶液及び 2 mol/L 塩酸の調製方法は **2. 3) 試薬等の調製**(3)及び(4)に示

したとおりであり、処理方法を次に記載した。

### 処理方法

試料 1 g に過酸化水素を添加した後、0.5 mol/L 硫酸鉄(II)溶液 約 200  $\mu$ L を添加した。発泡が穏やかになり次第、60  $^{\circ}$ C以下の恒温水槽で加熱した。分解終了後、鉄イオン由来の褐色の沈殿が生じ観察、測定妨害となるため、減圧ろ過器内で 2 mol/L 塩酸による洗浄を行い沈殿の除去を行った。

### (3) 酵素処理による有機物分解の検討

加谷らの報告<sup>15)</sup>で、貝の消化管内のマイクロプラスチック分析に酵素処理を用いていたことから、この報告を参考に同様の処理剤を用いて酵素処理の検討を行った。用いたのは市販されている酵素入り洗剤であり、使用した処理剤及び処理方法は次のとおりである。

#### 使用した処理剤

SARAYA 社製 多酵素浸漬洗浄剤パワークイック

酵素として、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アミラーゼを含む。

#### 処理方法

試料 1 g に過酸化水素約 20 mL を添加し、発泡が穏やかになり次第 60  $^{\circ}$ C以下の恒温水槽で加熱した。分解終了後、親水性 PTFE 製メンブレンフィルター(以下、メンブレンフィルター)に試料を捕集したものをビーカーに入れ、酵素洗剤約 20 mL を添加し、メンブレンフィルターを取り除いてかき混ぜた後 5 日ほど静置した。その後比重分離を行い、最終的にメンブレンフィルター上に捕集した 500  $\mu$ m 未満の試料を実体顕微鏡で観察した。

### (4) 比重分離方法の検討

既報<sup>4)</sup>では過酸化水素を用いて酸分解を行った後、その残留物を直接観察していたが、その時点でプラスチック以外の無機物等の夾雑物も多く混在していた。そのため今回、プラスチックをより効率的に観察、測定するため、プラスチックと無機物の比重の違いを利用する比重分離操作の検討を行った。

比重分離の方法として、漏斗を用いた方法とビーカーを用いた方法の 2 種類の検討を行った。漏斗を用いた方法は環境省のガイドライン<sup>6)</sup>を、ビーカーを用いた方法は亀田の方法<sup>12)</sup>を参考に行った。

#### 漏斗を用いた方法

Fig.1 のように漏斗にシリコンチューブをつなぎ、チューブ部分をローラークランプで留めた。分解後に残留した試料をメンブレンフィルターに捕集し、比重液を入れたビーカー内に入れてメンブレンフィルターを取り除いてかき混ぜた後、その溶液を漏斗に流し込んだ。漏斗の上部を時計皿等で覆ってコンタミネーションが無いようにして数時間静置した。上澄みが澄み、分離が完了したら、チューブの下に容器を置いてローラークランプを外し、溶液の下層部分を流出させてから指などで流出を止め、上層部分のみ漏斗内に残した。チューブ下のビーカーを入れ替え、溶液の上層部分を流出させ、最後に漏斗の上から水で洗い込んだ。



Fig.1 Density separation using funnel

### ビーカーを用いた方法

漏斗を用いた方法と同じく、分解後に残留した試料をメンブレンフィルターに捕集し、比重液を入れたビーカー内に移し入れて振り混ぜた後、静置した。上澄みが澄み、分離が完了したら、浮遊物を上澄み液ごと別のビーカーに採取した。壁面に集まりやすい細かい試料は駒込ピペットを用いて採取し、駒込ピペットの先より大きな試料はさじを用いて採取した。

#### (5) 比重液の検討

比重液としてポリタングステン酸ナトリウム(以下、SPT)溶液とよう化ナトリウム溶液の2種類を検討した。

#### (6) 観察方法の検討

前処理を行った試料を全て観察、測定に用いると試料の重なりが多くなり操作が困難となったため、観察、測定用試料量の検討を行った。試料中に含まれるプラスチック片の個数を概算することを目指し、メンブレンフィルター上に捕集する量を減らすため、ビーカーに比重分離後の浮遊物を全て移し、水を添加して一定量とし、そこから分取する方法を検討した。

#### (7) 測定方法の検討

目開き 500  $\mu\text{m}$  の網ふるい上に残った試料(500  $\mu\text{m}$  以上の試料)及びメンブレンフィルター上に捕集した 500  $\mu\text{m}$  未満の試料それぞれについて、顕微 FT-IR での測定方法の検討を行った。

## 3. 結果及び考察

### 1) 前処理方法及び観察、測定方法の検討

#### (1) 過酸化水素処理方法の検討

分析に使用する試料量は、今回用いる減圧ろ過操作を一度に行うことができ、かつ観察、測定、識別に十分な量として 1 g とした。過酸化水素は試料が完全に浸る量(約 20 mL)を添加後、発泡が穏やかになり次第恒温水槽で加熱(60  $^{\circ}\text{C}$ 以下)し、発泡が完全に収まるまで酸分解を行った。加熱温度は、60  $^{\circ}\text{C}$ 以上ではプラスチックが破壊される恐れがある<sup>16)</sup>ため、60  $^{\circ}\text{C}$ 以下とした。発泡がなくなっても分解が不十分(黒い着色が残る等)であれば、過酸化水素を足してさらに分解した。分解の際、試料が粉碎されるのを防ぐため、スターラー等を用いたかき混ぜは行わないこととした。(Fig.2)



1. Analytical sample 1 g



2. Add hydrogen peroxide

Fig.2 Digestion



3. Heating in a constant temperature water bath under 60 °C



4. Continue digesting until finish to foaming  
(If digest was insufficient, add more Hydrogen peroxide)

Fig.2 (Continue) Digestion

## (2) フェントン法による有機物分解促進の検討

有機物の分解を促進する方法として、排水処理その他で使用されているフェントン法<sup>13), 14)</sup>を検討した。

試薬液を添加した直後の様子は Fig.3 のとおりであり、0.5 mol/L 硫酸鉄(II)溶液の添加により、過酸化水素のみの分解と比較して分解開始直後の有機物分解反応が強くなることを確認した。また、用意した PP 及び PE の 2 種類のプラスチック片を用いて、顕微 FT-IR により未処理、過酸化水素のみの前処理、過酸化水素とフェントン法を用いた前処理の 3 方法間による処理後のスペクトル比較を行ったところ、各前処理方法によるスペクトルへの影響は少ないことが分かった。(Fig.4)

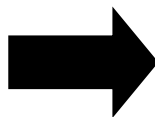
以上より、フェントン反応法は肥料中の有機物分解方法として有効であると判断した。



1. Add 0.5 mol/L Iron(II) Sulfate Heptahydrate

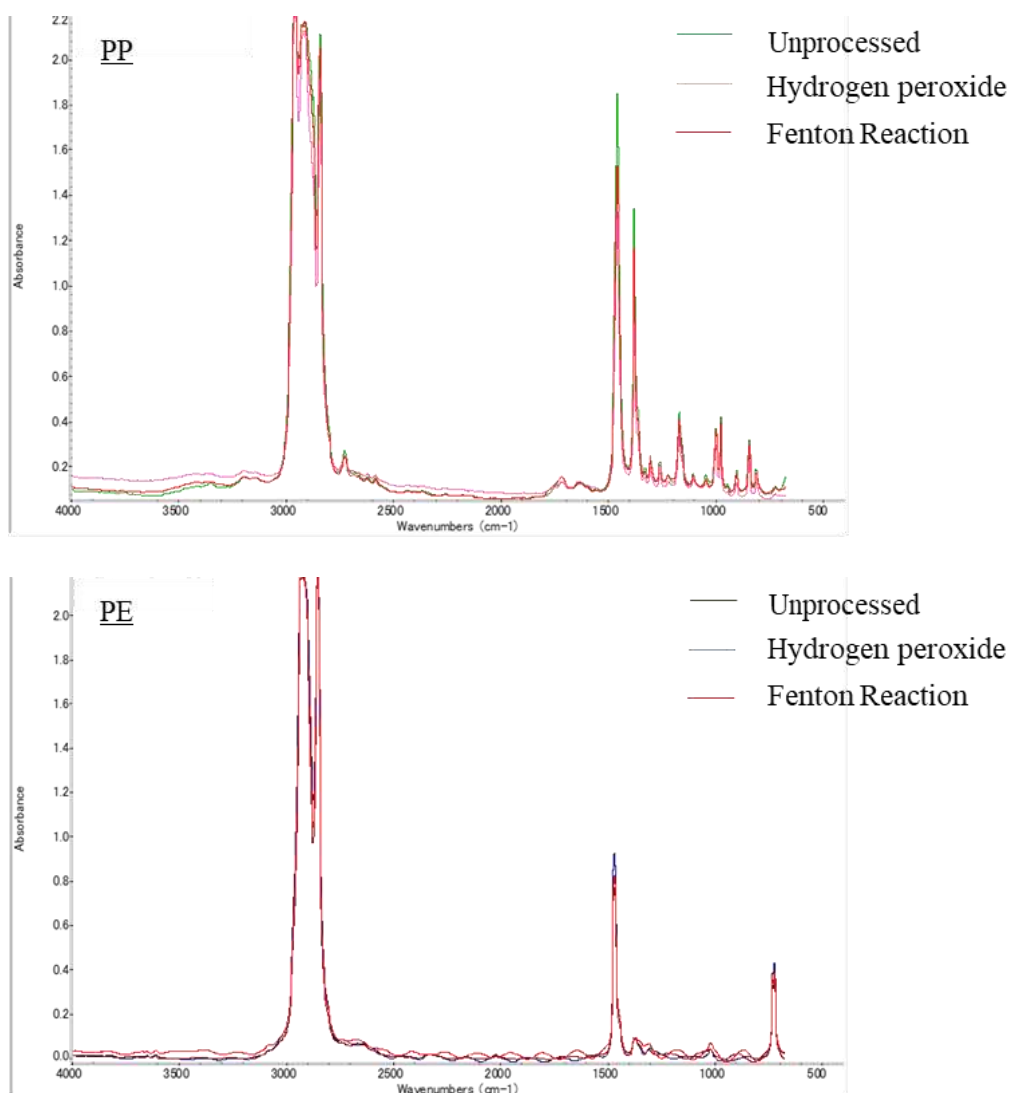


2. Cleaning by 2 mol/L Hydrochloric acid  
Brown precipitation generates in instrument



3. After cleaning sample  
Precipitation was removed

Fig.3 Digestion by Fenton reaction



Conditions follow Transmission mode in Table 2

Fig.4 Comparison of infrared absorption spectrum between different preprocessing

(3) 酵素処理による有機物分解の検討

加谷らの報告<sup>15)</sup>で、貝の消化管内のマイクロプラスチック分析に酵素処理を用いていたことから、使用されている酵素入り洗剤を用いて処理を行い、最終的にメンブレンフィルター上に捕集した 500 μm 未満の試料を実体顕微鏡で観察した。

結果、この処理方法では有効に分解を促進することはできなかった。肥料に含まれる有機物はセルロースが大半であり、使用した酵素洗剤にはセルラーゼも含まれているものの、断片として混入するそれら組織の分解は不可能であった。中嶋ら<sup>10)</sup>の総説で、酵素処理は生物のやわらかい組織を分解することを目的としており、硬い組織や植物繊維などは分解されないとのことから、堆肥及び汚泥肥料等のように植物片が多く含まれる試料には適さないことが分かった。

Fig.5 に、肥料の酵素処理後の試料の実体顕微鏡写真を示す。植物片が残存している様子が確認できた。

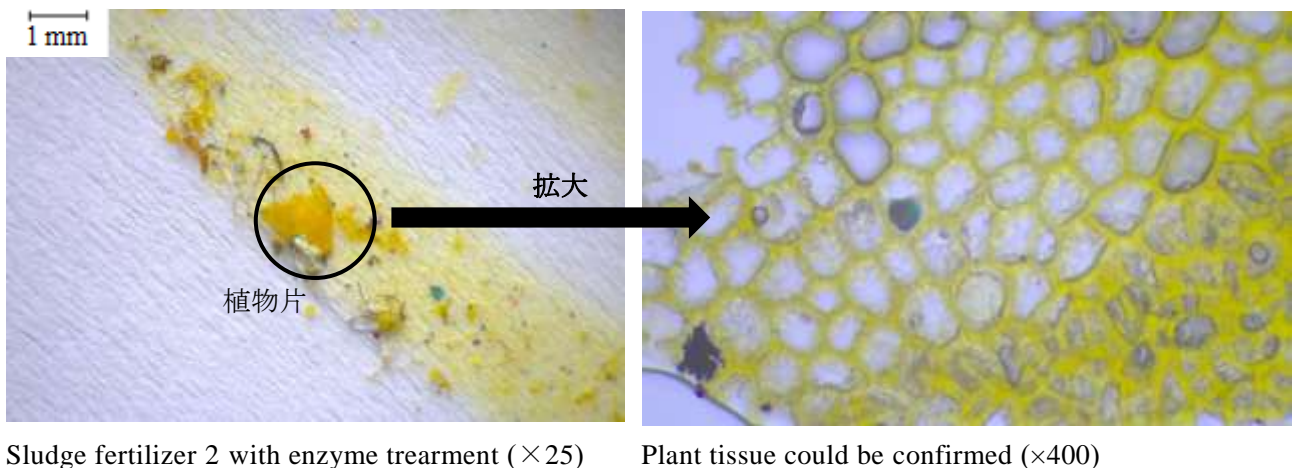


Fig.5 After treatment of Enzyme treatment (picture of stereoscopic microscope)

#### (4) 比重液の検討

比重液として SPT 溶液とよう化ナトリウム溶液の 2 種類を検討した. それぞれの最大比重は SPT 溶液で 3.1<sup>17)</sup>, よう化ナトリウム溶液は 1.8<sup>18)</sup>程度である. どちらも無害であり, 操作性に問題のないことを確認した. 岩波書店の理化学辞典<sup>19)</sup>及び織研新聞社の新・繊維総合辞典<sup>20)</sup>を参考に, 主要なプラスチックの比重を Table 1 に記載したが, これらを分離するにはよう化ナトリウム溶液の最大比重で十分である. また, SPT は高価であることから, 今回はプラスチック分析で広く用いられており比較的安価なよう化ナトリウム溶液を用いることとした.

比重は, 環境省のガイドライン<sup>6)</sup>, GESAMP の海洋中マイクロプラスチックモニタリングのためのガイドライン<sup>7)</sup>等の例示も踏まえて 1.6 程度とした.

比重分離の操作を追加したことで, Fig.6 に示す顕微鏡観察結果のように多くの夾雑物を取り除かれ, 観察が容易になった.

Table 1 Specific gravity of major plastics

material	density (g/cm <sup>3</sup> )
Low density polyethylene (LDPE)	0.91 ~ 0.93 <sup>a)</sup>
High density polyethylene (HDPE)	0.94 ~ 0.96 <sup>a)</sup>
Polypropylene (PP)	0.90 ~ 0.91 <sup>b)</sup>
Polystyrene (PS)	1.05 ~ 1.07 <sup>a)</sup>
Polyester (PET)	1.38 <sup>b)</sup>
Acrylic resin	1.14 ~ 1.17 <sup>b)</sup>
Acrylonitrile	0.8060 <sup>a)</sup>
Polyurethane (PU)	1.0 ~ 1.3 <sup>b)</sup>
Polyvinyl chloride (PVC)	1.39 <sup>b)</sup>
Nylon	1.14 <sup>b)</sup>

a) See Ref number 19

b) See Ref number 20

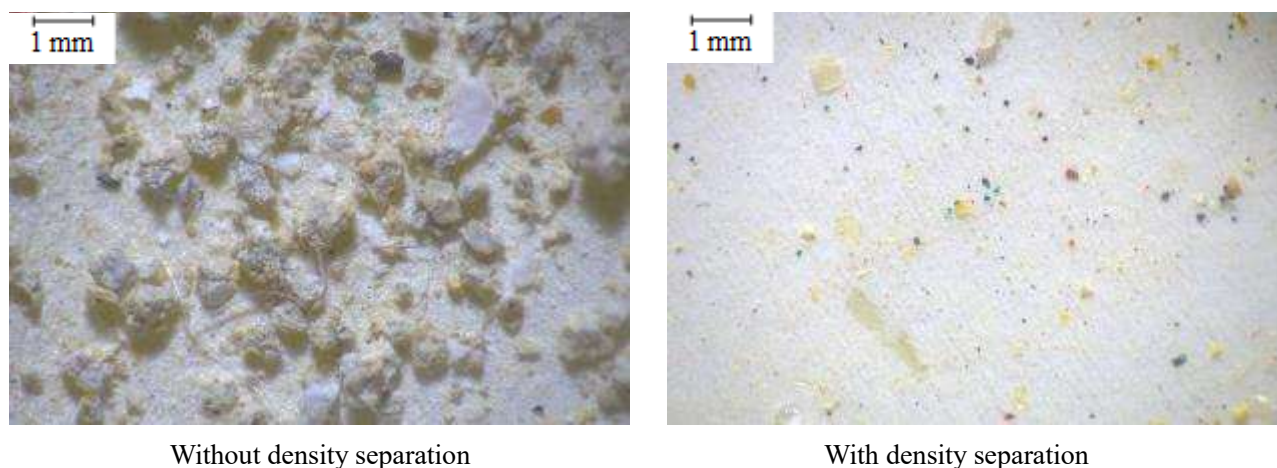


Fig.6 Comparison of contaminants with or without density separation  
(picture of stereoscopic microscope,  $\times 25$ )

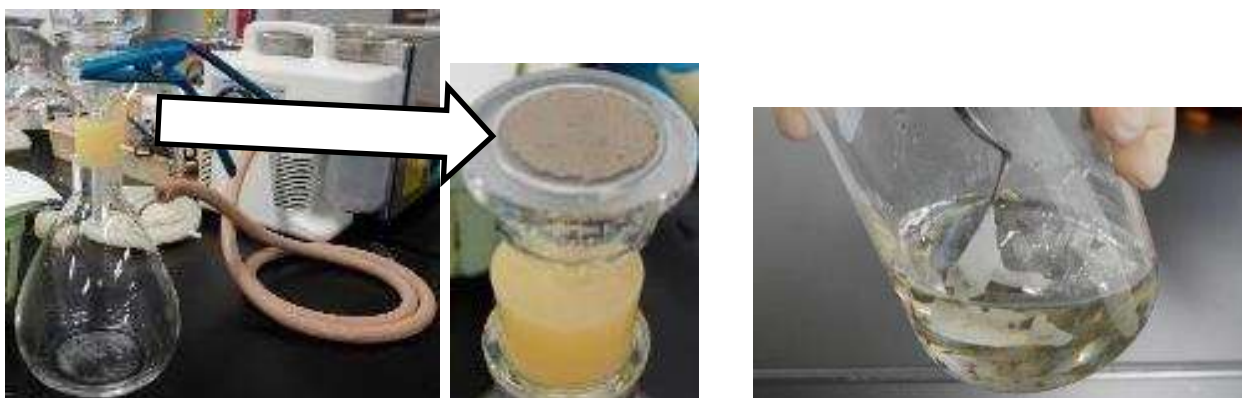
#### (5) 比重分離方法の検討

比重分離の方法として、漏斗を用いた方法とビーカーを用いた方法の 2 種類の検討を行った。漏斗を用いた方法は環境省のガイドライン<sup>6)</sup>を、ビーカーを用いた方法は亀田の方法<sup>12)</sup>を参考に行った。

漏斗を用いた方法を検討した結果、特に試料に大きな木片等が混ざる場合、漏斗上部や柄部分に固形物がたまって残り、溶液の下層部分と共に流れ出ない場合があった。一方、ビーカーを用いた方法では、壁面に集まりやすい細かい試料は駒込ピペットを用いて採取し、駒込ピペットの先より大きな試料はさじを用いて採取する等の作業により、試料をことごとく集めることが出来たことから、汚泥肥料等有機物が多い資材ではビーカーを用いて比重分離を行うことが適切と考えられた。

以上の検討から、比重分離の操作を次のとおりとした (Fig.7)。分解終了後、減圧ろ過器を用いて残留物をよく水で洗浄しつつメンブレンフィルターに捕集した。メンブレンフィルターを、ピンセット等を用いてよう化ナトリウム溶液約 50 mL を入れたビーカー内で洗うように振って残留物を洗い落とし、メンブレンフィルターは取り除いた。検討において、過酸化水素とよう化ナトリウムを混合すると酸化還元反応が起こり、液が高温となった。その場合プラスチック破壊の可能性があるため、よう化ナトリウム溶液の溶媒は水とし、酸分解後の減圧ろ過の際は試料を水でよく洗浄してからよう化ナトリウム溶液を添加した。ビーカーを軽く振り混ぜ、試料が十分に分散して塊がないことを確認した後、上澄みが澄み、試料がビーカーの底と液面に完全に分離するまで数時間～1 日静置して比重分離を行った。メンブレンフィルターから試料が剥がれにくい場合、又は比重液内で試料が塊になる場合は、ビーカーを超音波洗浄機に浸して振ることで分離させた。分離完了後、液上層の浮遊物を、駒込ピペット等を用いて別のビーカーに採取し、水で約 50 mL とした。細かな浮遊物はビーカーの壁面に集まりやすいため、注意して採取を行った。





1. Vacuum filtration

2. Drop sample into specific gravity liquid



3. After mixing



4. Leave to stand until solution become clear



5. Transfer all floating solids in the beaker to another beaker using komagome pipette etc.



6. Add water up to 50 mL

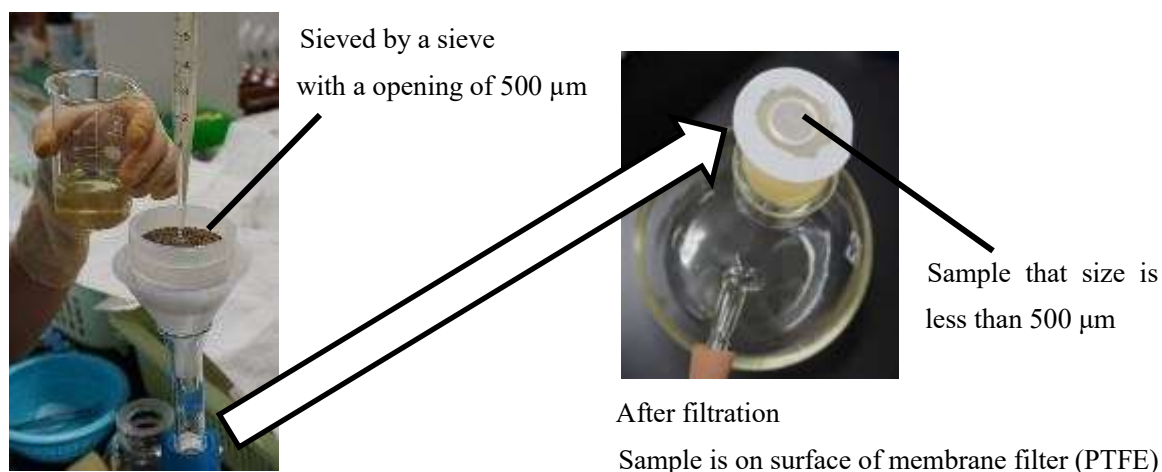
Fig.7 Density separation

6) 観察方法の検討

比重分離で得られた試料を全て観察及び測定に用いると, Fig.9 のように試料の重なりが多くなり操作が困難となったため, 観察及び測定用試料量の検討を行い, 以下のとおりとした(Fig.8).

試料のうち, 500  $\mu\text{m}$  以上の大きさのものはピンセット等で拾い上げることが可能であった. これらはふるい分けで取り除いて別途シャーレ等に洗い込み, 60  $^{\circ}\text{C}$ 以下の乾燥器で乾燥させてから目視及び実体顕微鏡を用いて観察を行った.

500  $\mu\text{m}$  未満のものは, 比重分離後に水で 50 mL とした液を振り混ぜて, なるべく試料が液中に分散する状態にしなが, メンブレンフィルター上に捕集したときに試料の重なりが多くならないように一部を分取してろ過した. その際の分取量は, 肥料により比重分離後の試料量が大きく異なるためそれぞれに応じて行った. Table 3 に示したとおり, 今回は 0.5 mL~50 mL とした. メンブレンフィルター上に捕集した試料は目視及び実体顕微鏡を用いて観察を行った.



1. Sieving, vacuum filtration  
Fractionating sample as needed



2-1. Collect sample on a sieve

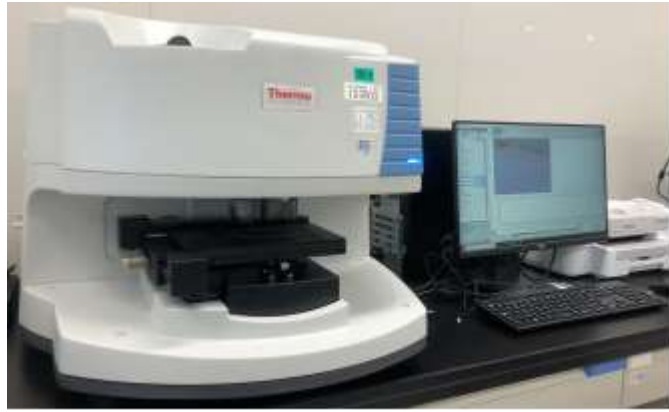


2-2. Set a membrane filter to folder and desiccate it

Fig.8 Observation and measurement



3. visual assess and observation  
by stereoscopic microscope



4. Measurement by Microscopy FT-IR ( $\mu$ -FT-IR)

Fig.8 (Continue) Observation and measurement



Sludge fertilizer 2 50 mL/50 mL

Sample piles up and difficult to observation and measurement



Sludge fertilizer 2 5 mL/50 mL

There are little overlap of sample, so it is easier to observation and measurement

Fig.9 Sample quantity on membrane filter (PTFE) (picture of stereoscopic microscope,  $\times 25$ )

#### (7) 測定方法の検討

目開き  $500\ \mu\text{m}$  の網ふるい上に残った試料 ( $500\ \mu\text{m}$  以上の試料) 及びメンブレンフィルター上に捕集した  $500\ \mu\text{m}$  未満の試料それぞれについて、顕微 FT-IR での測定方法の検討を行った。

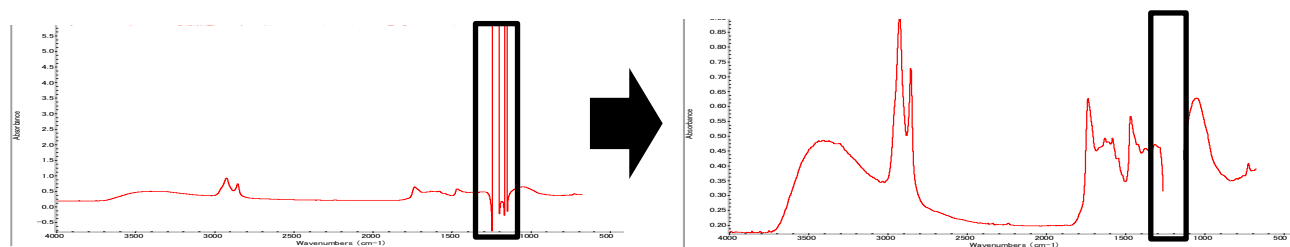
$500\ \mu\text{m}$  以上の試料については、顕微鏡観察を行い、プラスチックであることが疑われる試料があった場合、ピンセット等で拾い上げて ATR 法もしくは透過法を用いて測定を行った。  $500\ \mu\text{m}$  未満の試料については、透過法の条件を用いてマッピング測定 (多点測定) を行った。 ATR 法によるマッピング測定の検討も行ったが、メンブレンフィルター上の複数点を測定する際、測定器のレンズ部分 (Ge クリスタル) が移動する際に、試料に衝突し、Ge クリスタルの裏に測定済みの試料が付着したまま移動してしまうといった例が頻発したため、この方法は用いないこととした。

なお、使用した測定条件例は Table 2 のとおりである。

Table 2 Example of condition of  $\mu$ -FT-IR

Categories		Measuring method
Mode	Transmission	ATR (Attenuated Total Reflectance)
Ditector	MCT (Mercury Cadmium Telluride)	MCT
Spectral resolution	$8 \text{ cm}^{-1}$	$8 \text{ cm}^{-1}$
Cumulative number	64 times	64 times
Spectral range	$4000 \text{ cm}^{-1} \sim 650 \text{ cm}^{-1}$	$4000 \text{ cm}^{-1} \sim 650 \text{ cm}^{-1}$

解析は顕微 FT-IR に搭載されるライブラリの検索及びスペクトル形状による目視判断を行った。メンブレンフィルター上でマッピング測定を行った場合は、メンブレンフィルターの赤外吸収領域 ( $1200 \text{ cm}^{-1}$  前後) を Fig. 10 のようにblankとして削除した後ライブラリ検索を行った。

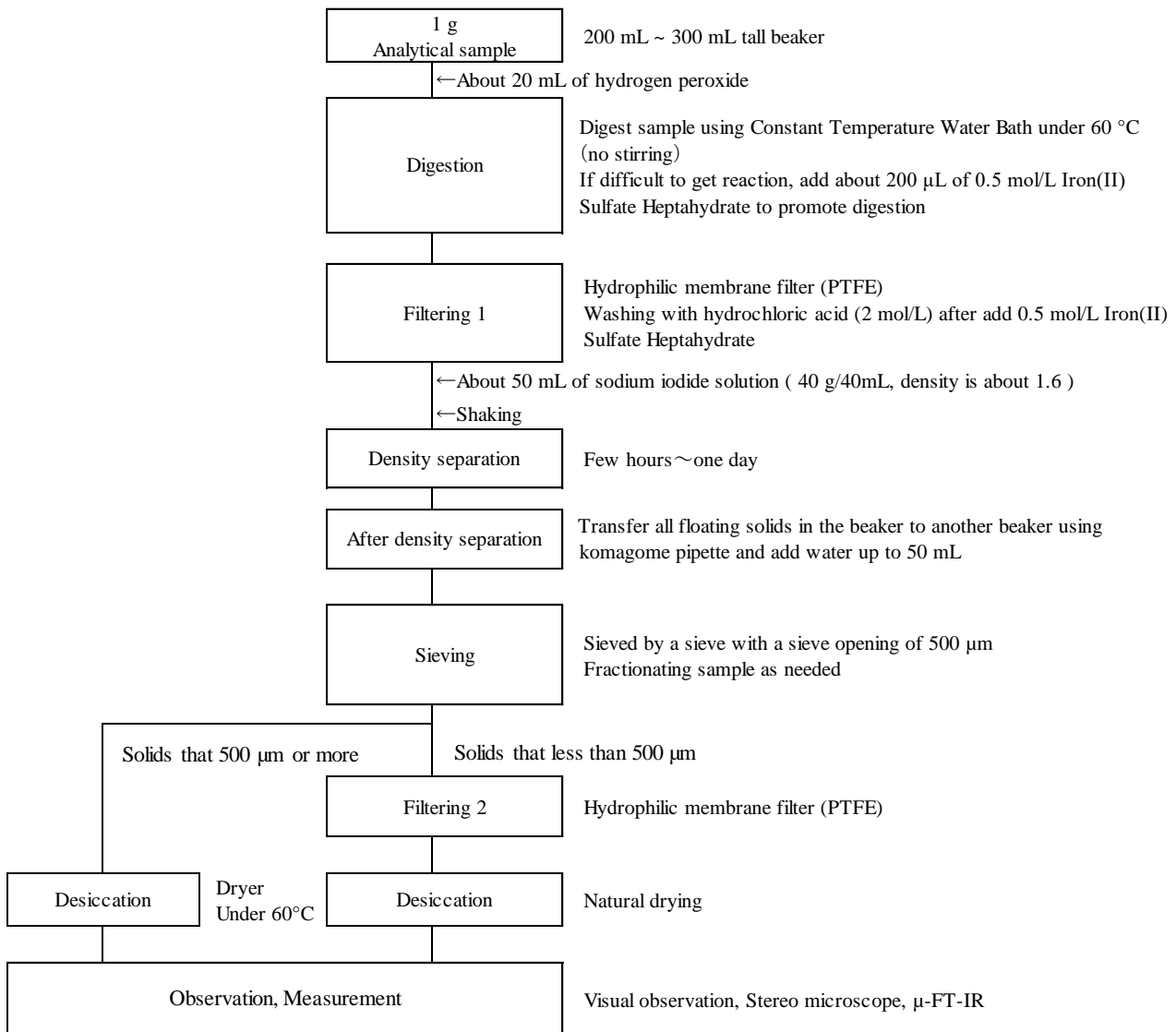


Left figure : Infrared absorption spectrum of sample + membrane filter (PTFE)

Right figure : Blank the region that infrared absorption spectrum of membrane filter (PTFE) ( $\square$ ) exists.

Fig.10 Processing of infrared absorption spectrum

以上の検討内容を踏まえ、鑑定のための処理方法を次のとおりとした (Scheme 1)。



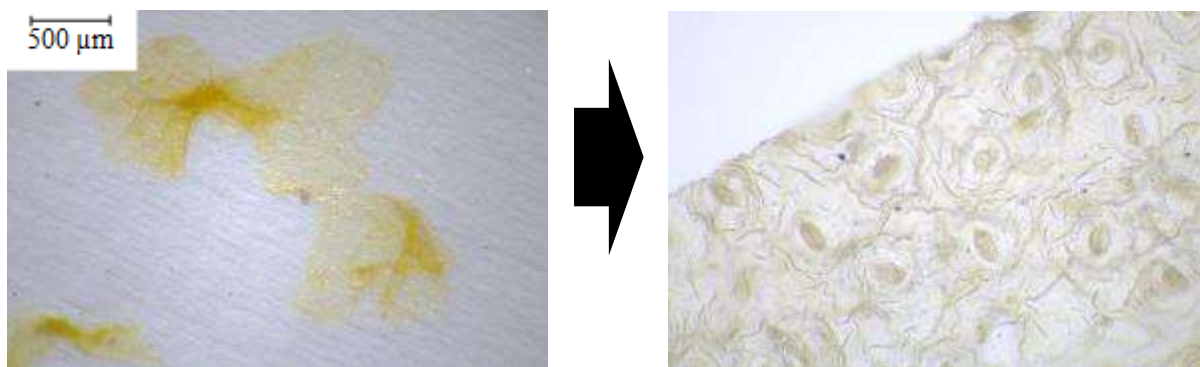
Scheme 1 Flow sheet for identification fertilizer by  $\mu$ -FT-IR

#### (8) 顕微 FT-IR ライブラリの拡充

肥料では、Fig.11 の実体顕微鏡写真で示すような、黄色っぽく薄い膜状の物質が頻繁に観察された。また、特にし尿汚泥を含む肥料では、Fig.5 で示したような、表面に艶があり硬く薄い、黄色い膜状の物質が多く混入していた。これらを顕微 FT-IR で測定してライブラリ検索をすると、Fig.12 のスペクトル比較図に示すとおりポリエチレンに非常に近い結果が得られる。しかし、表面に細かく規則的な模様が見られ、さらに拡大すると植物組織や気孔と思われるものが見られたことから、これらは植物であると推測した。様々な試料を分析するうちに、この黄色い膜状物質以外でも類似のスペクトルが得られるものが多数あることが判明し、これらの判別を誤ると肥料中のプラスチック個数の算出結果が実際と大きく異なってしまう恐れがあった。

また、汚泥の処理過程などで著しく劣化したプラスチックのスペクトルは劣化前のものと形状が異なる場合があった (Fig.13)。

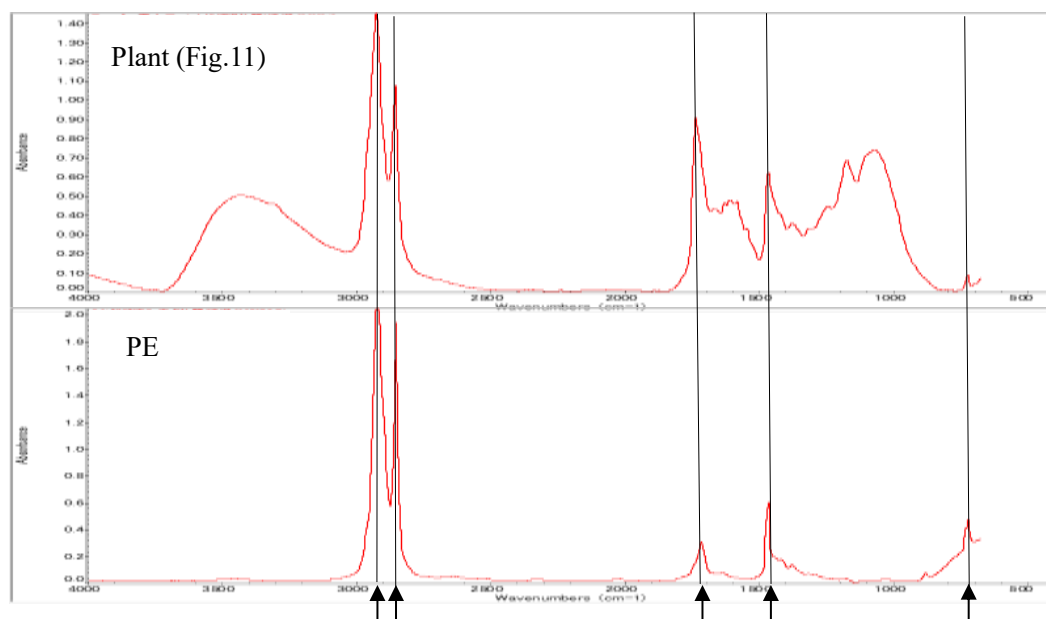
以上を踏まえ、今回は植物サンプル約 85 種類及び劣化 PE など肥料に混入しうると考えられるものや実際肥料中に混入していたもの 120 種類ほどについて、顕微 FT-IR にて測定し、得たスペクトルをライブラリに追加することでライブラリを拡充すると共に判断の材料にした。



Yellow, thin object in fertilizer  
Its spectrum resembles to PE's  
(picture of stereoscopic microscope, ×45)

The observed tissue seemed like stomata.  
(picture of stereoscopic microscope, ×400)

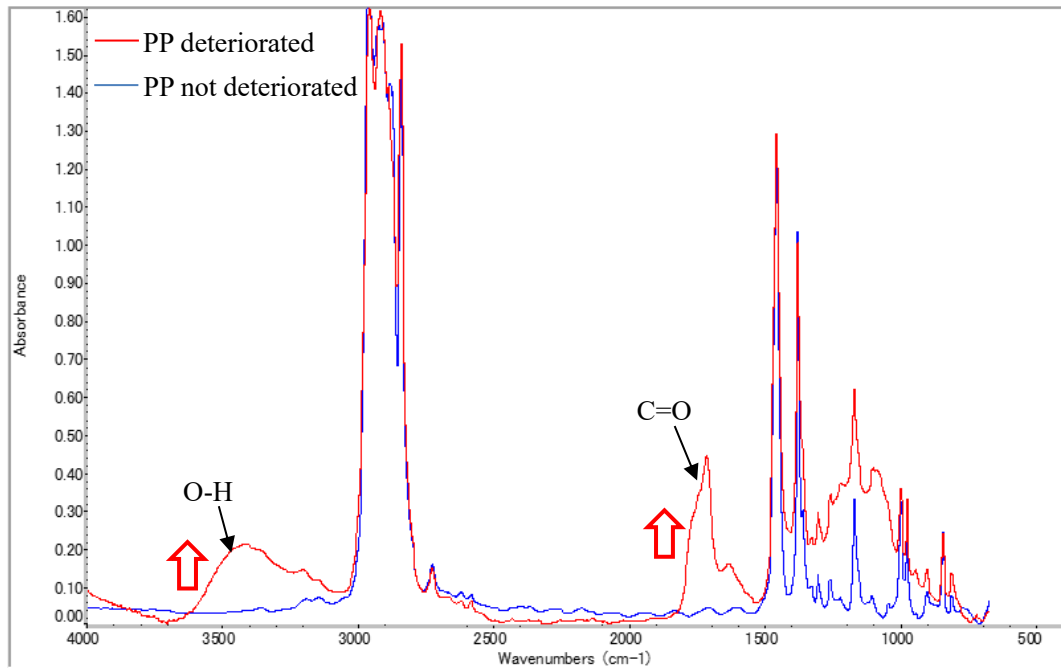
Fig.11 Plant in fertilizer (picture of stereoscopic microscope)



Conditions follow Transmission mode in Table 2

Some of spectrum peak position of Plant and PE (↑) are corresponding and there is a risk of leading wrong decision

Fig.12 Comparison of infrared absorption spectrum between plant (Fig.11) and PE



Conditions follow Transmission mode in Table 2


Some of spectrum peak position are changed (some peaks  are appeared)

Fig.13 Change of infrared absorption spectrum of PP by degradation

## 2) 各肥料でみられた特徴について

### (1) 実体顕微鏡観察

今回 Scheme1 により試料の前処理を行い、実体顕微鏡を用いて観察を行ったところ、下水汚泥、し尿汚泥（家庭雑排水の処理により生じる汚泥）を原料に使用した汚泥肥料に繊維状、断片状、フィルム状、球状等の物体が多く混入していることが確認された。これら肥料では、様々な形態、色、大きさの混入物が一つのサンプル中で混在していた。下水汚泥、し尿汚泥は、家庭雑排水等の汚水を処理場にて処理する際に発生する。処理場の流入水中のプラスチックは、処理過程で汚泥に移行することで処理水からのプラスチック除去が行われるが、田中ら<sup>21)</sup>によると、その除去率は国内の下水処理場 5 箇所の中央値で、100  $\mu\text{m}$ ~1 mm で 99.6%、10  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$  で 76.3%であったと報告されており、これら処理場で発生する汚泥はプラスチックを多く含む事が知られている。また、下水汚泥中のプラスチックの調査事例を扱った Koyuncuoğlu ら<sup>22)</sup>のレビュー中では、20 件の調査事例それぞれで繊維状、断片状、フィルム状、球状等の混入プラスチックが確認されたと紹介されている。

汚泥原料として工業汚泥（工場排水処理等で生じる汚泥）のみを使用した汚泥肥料では、混入物の色、形態の種類は多くのサンプルで概ね単一的であった。

一方、堆肥ではプラスチック片のような混入物の量は少なく、過酸化水素で分解しきれなかった木片等が多く見られた。

以上の実体顕微鏡観察の結果を Fig.14 に示す。汚泥肥料には使用する汚泥の種類を記載した。水で 50 mL とした後の、メンブレンフィルターへ捕集した分取量を合わせて示した。倍率は全て約 25 倍で撮影している。



Sludge fertilizer1 (Human waste sludge)  
0.5 mL/50 mL



Sludge fertilizer2 (Human waste sludge,  
Industrial sludge) 5 mL /50 mL



Sludge fertilizer 3 (Human waste sludge)  
5 mL /50 mL



Sludge fertilizer 4 (Sewage sludge, Industrial sludge,  
Human waste sludge) 5 mL /50 mL



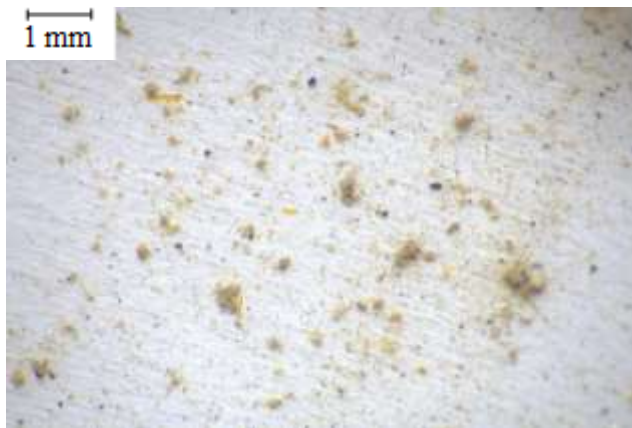
Sludge fertilizer 5 (Industrial sludge) 10 mL /50 mL



Sludge fertilizer 6 (Industrial sludge) 2 mL /50 mL

Fig.14 Sample after pre-processing (picture of stereoscopic microscope,  $\times 25$ )





Sludge fertilizer 7 (Industrial sludge) 10 mL/50 mL



Sludge fertilizer 8 (Industrial sludge) 1 mL/50 mL



Compost 1 (Cattle manure) 25 mL/50 mL



Compost 2 (Pig manure) 50 mL/50 mL



Compost 3 (Poultry manure) 50 mL/50 mL



Compost 4 (Horse manure) 5 mL/50 mL

Fig.14(Continue) Sample after pre-processing (picture of stereoscopic microscope,  $\times 25$ )

## (2) 顕微 FT-IR を用いた測定結果

得られた試料について、各肥料 1 g あたりのプラスチック推定個数を算出した結果を Table 3 に示す。試料名は、下水汚泥、し尿汚泥を原料に使用した汚泥肥料は「SF○」、汚泥原料として工業汚泥のみを使用した肥料は「IO」、堆肥は「CO」とした。

観察箇所は、Fig.15 のように、メンブレンフィルター上に円形状に捕集した 500 μm 未満の試料について、その円の縁付近 3 箇所、内側 3 箇所の計 6 箇所とし、これらについて各 0.3 cm 四方の面積内の試料を透過法(測定条件は Table 2 のとおり)を用いてマッピング(多点)測定した。測定試料は長辺がおよそ 25 μm 以上のものとして測定者が選定した。

また、500 μm 以上のサンプルについて、3. 1) (7) のとおり測定を行った結果プラスチックであった場合は、個数に計上することとした。

算出方法は以下のとおりである。なお、今回の個数の算出は、操作由来で生じる実際との誤差の検討は実施していないため、また試料の一部のみの測定結果であるため、個数は推定値である。

Estimated amount of plastics in fertilizer (pieces/g)

$$= \{ (S / 6S') \times N \times (50/V) \} + \{ N' \times (50/V) \}$$

• S : Area that sample was filtered on membrane filter

2.1 cm<sup>2</sup> (Effective filter area of filter holder)

• S' : Area of individual measuring spot

$$0.3 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm} = 0.09 \text{ cm}^2$$

• 6S' : Sum of area of 6 measuring spots

$$0.09 \times 6 = 0.54 \text{ cm}^2$$

• N : Estimated total amount of plastics of 6 measuring spots

• N' : Amount of plastics of 500 μm or larger

• V : Aliquot (floating solids of specific gravity liquid in 50 mL of solution)

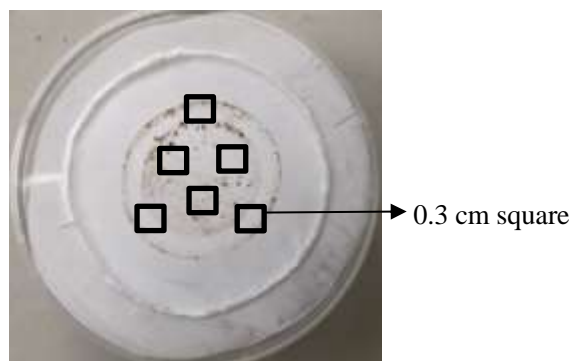


Fig.15 Example of measurement points

Table 3 には、測定箇所を確認されたプラスチックのおよその種類数を合わせて示した。種類数は、使用した顕微 FT-IR のライブラリ検索で得られた結果を元に分類した。また、汚泥を原料に用いた肥料について、サンプル毎に汚泥の使用割合が異なるため、その割合も示した。

し尿汚泥、下水汚泥を原料に用いた汚泥肥料について、肥料 1 g 中のプラスチック推定個数は 1361～31111 個であった。実体顕微鏡観察において混入物の色や形状が様々であることが見て取れたが、顕微 FT-IR で測定した結果、その種類数は 5～21 種類程度であった。混入の多かったプラスチックの種類は PP, PE, ポリエチレンテレフタレート(以下, PET), ポリスチレン(以下, PS), アクリロニトリル・スチレン・アクリル酸エステル重合体(以下, ASA), アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体(以下, ABS), メチルメタクリレートブタジエンスチレン共重合体(以下, MBS), アクリロニトリル, ポリエステル(以下, PEs), ポリウレタン(以下, PU)等であった。

汚泥原料として工業汚泥のみを用いた肥料では、プラスチック推定個数は、68～3889 個であった。また、その種類数は 1～5 種類程度であった。プラスチックの種類は PS, PP, PE, PET 等であった。

堆肥では、推定プラスチック個数は 19～233 個であった。また、その種類数は 1～3 種類程度であった。プラスチックの種類は PP, PE, PS, PU 等であった。

Table 3 Amount of plastics in fertilizers

Kind of fertilizers	Samples	Ratio of sludge in fertilizer (%)	Total amount of plastics (0.3 mm×0.3 mm×6 spots) (pieces)	Total amount of plastics on PTFE membrane filter (pieces)	Plastics on the sieve (pieces)	Aliquot (mL)	Estimated amount of plastics (pieces/g)	The number of kind of plastics that observed in this research
Sludge fertilizer that contains Sewage sludge and Human waste sludge	SF1	Human waste sludge : 100	90	350	1	5	3510	21
		Sewage sludge : 81						
	SF2	Industrial sludge : 7	154	599	1	5	5999	16
		Human waste sludge : 1						
	SF3	Human waste sludge : 100	80	311	0	0.5	31111	9
		Human waste sludge : 82						
	SF4	Industrial sludge : 11	46	179	3	5	1819	15
		Sewage sludge : 100	11	43	0	1	2139	11
	SF5	Human waste sludge : 100	70	272	0	10	1361	16
	SF6	Sewage sludge : 100	36	140	5	5	1450	8
SF7	Human waste sludge : 100	51	198	0	1	9917	18	
SF8	Human waste sludge : 100	50	194	0	5	1944	11	
SF9	Human waste sludge : 100	41	159	0	5	1594	16	
SF10	Sewage sludge : 14							
SF11	Industrial sludge : 11	59	229	0	1	11472	5	
	Human waste sludge : 1							
Industrial sludge fertilizer	I1	Industrial sludge : 100	10	39	0	5	389	3
	I2	Industrial sludge : 55	1	4	0	1	194	1
	I3	Industrial sludge : 55	20	78	0	1	3889	1
	I4	Industrial sludge : 29.5	66	257	91	5	3477	1
	I5	Industrial sludge : 100	7	27	0	20	68	5
Compost	C1	-	1	4	0	5	39	2
	C2	-	1	4	0	10	19	1
	C3	-	6	23	0	5	233	1
	C4	-	2	8	0	5	78	3
	C5	-	2	8	0	5	78	2
	C6	-	2	8	0	10	39	1

また、Table 3 の肥料 1 g 中の推定個数を縦軸に、観察されたプラスチック種類数を横軸にプロットした図を Fig.16 に示す。

下水汚泥、し尿汚泥を原料に用いた汚泥肥料とそれ以外の肥料は、大まかに図中の点線で分けることができた。下水汚泥、し尿汚泥を原料に用いた汚泥肥料について、今回観察されたプラスチックの種類数はおよそ 5 種類以上であり、推定個数は全ての試料で 1000 個/g 以上であった。

汚泥原料として工業汚泥のみを使用した汚泥肥料は、実体顕微鏡で観察した結果同様、混入するプラスチックの種類数は少なく概ね単一的である特徴が見られた。推定個数の多い試料では、1 種類のプラスチックのみが多数混入していた。

堆肥は、推定個数も種類数も少ない結果であった。Shengwei ら<sup>23)</sup>により、堆肥や有機質肥料中のプラスチック個数について、中国 22 地点、102 種類の有機質肥料中のマイクロプラスチック調査の結果、その個数は 0~2550 個/kg であったと報告がされている。これは今回分析に用いた試料量の 1 g 中に換算すると最大で 2.5 個となり今回の最大 233 個という結果と大きく異なったが、Shengwei らの研究では判別対象を 0.1 mm~5 mm のプラスチックとしているため観察個数が少なく、今回のおよそ 25 μm 以上を対象とした結果とは齟齬が生じたと考えられる。

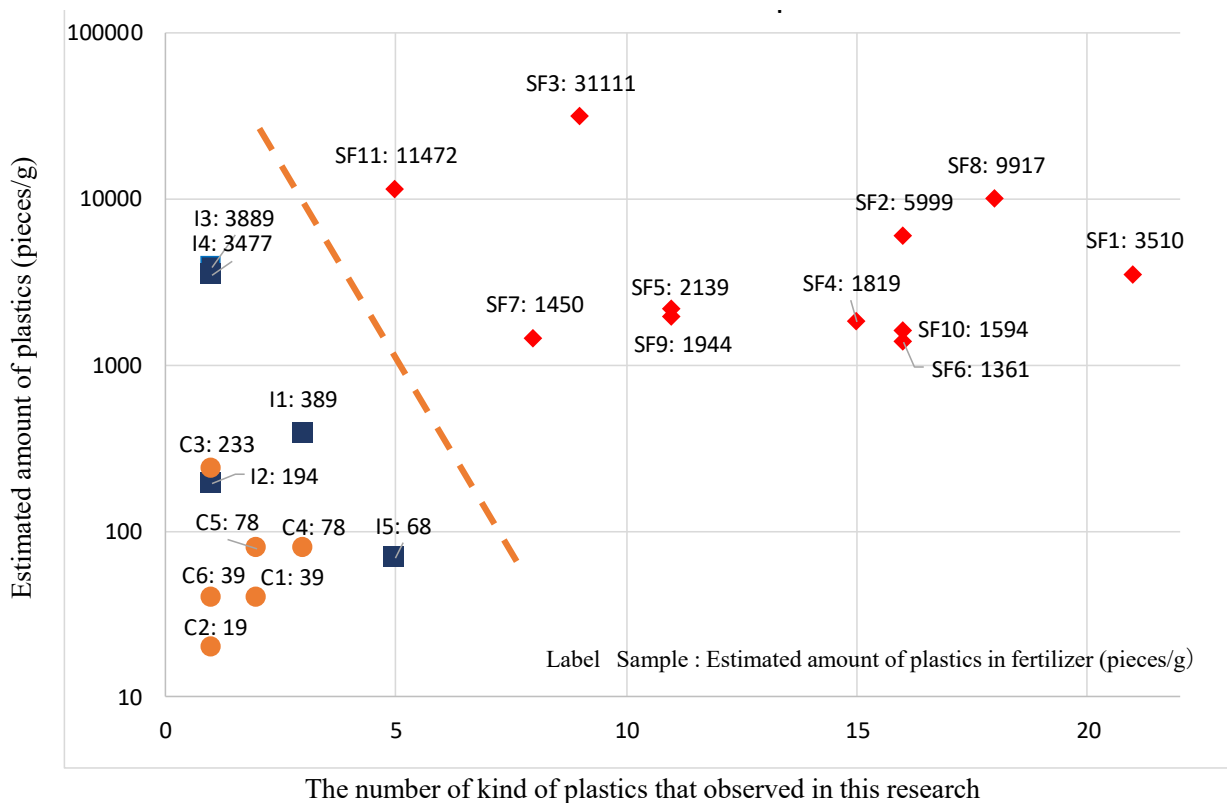


Fig.16 Result of estimated amount and number of kind of plastics in fertilizers  
(The points in the figure are Table 3)

次に、肥料 1 g 中プラスチック推定個数を縦軸に、汚泥の使用割合を横軸にプロットした図を Fig.17 に示す。汚泥の使用割合は、Table 3 中の汚泥使用割合(%)の項目に示した各汚泥の使用割合を足した数値を使用した。

Fig.17 より、プラスチック推定個数と汚泥使用割合に相関が見られなかったことから、推定個数は汚泥使用

割合の多寡によらず、試料により異なると考えられた。

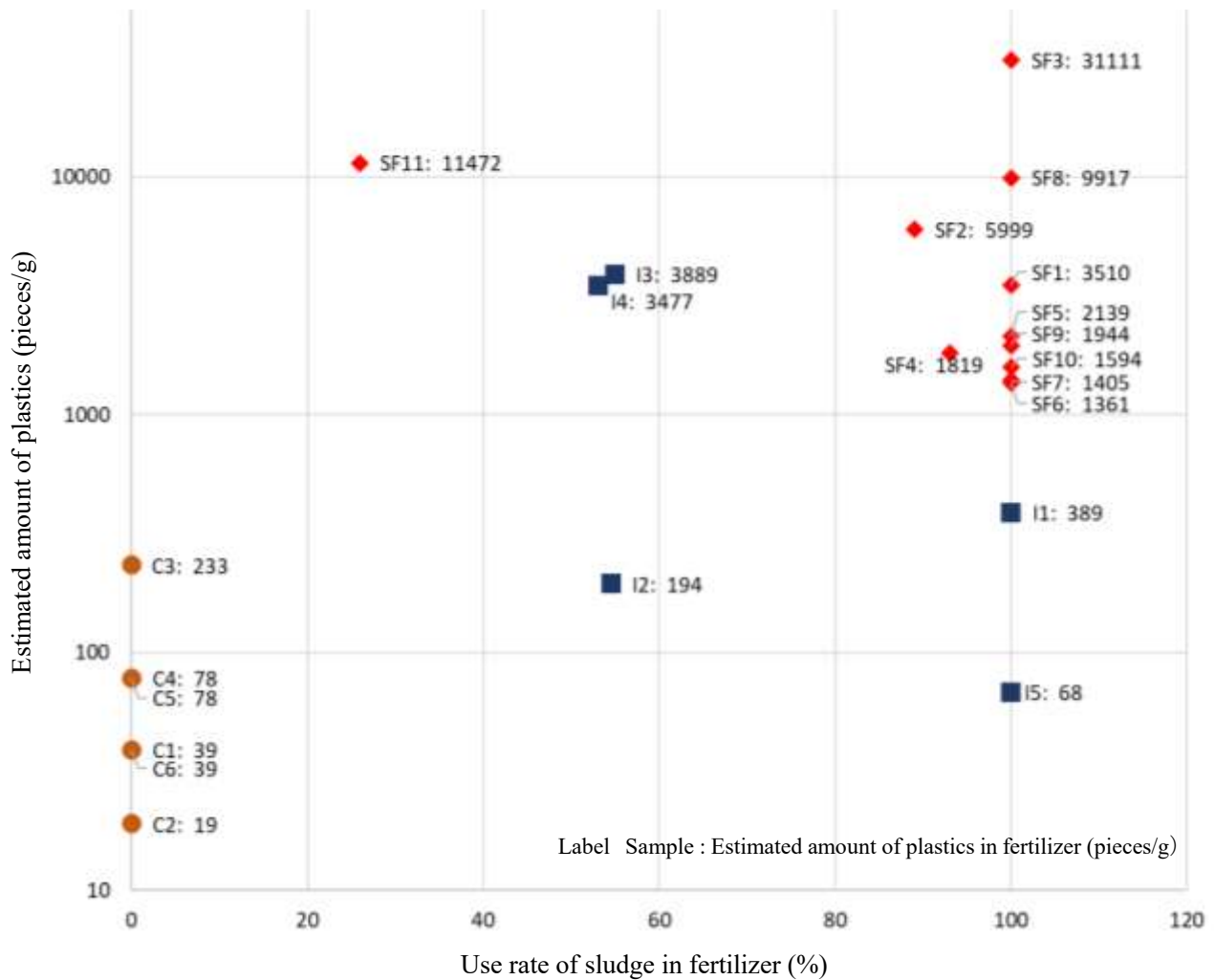


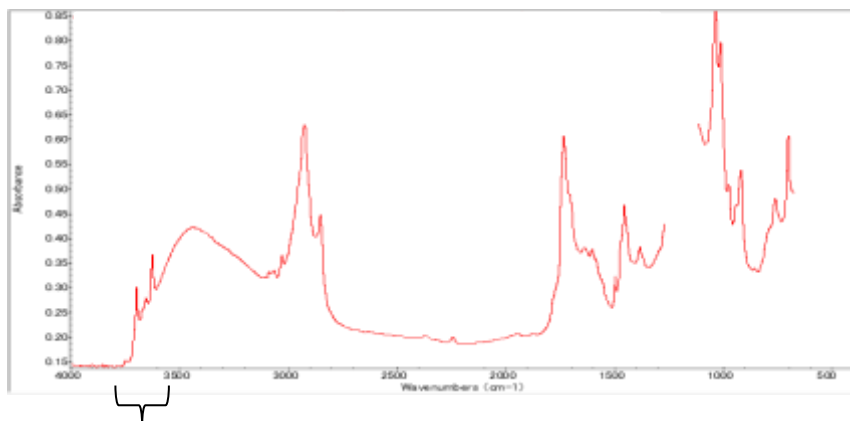
Fig.17 Result of estimated amount of plastics and use rate of sludge of fertilizers  
(The points in the figure are Table 3)

加えて、今回、実体顕微鏡観察や顕微 FT-IR での測定を行っていく中で、下水汚泥、し尿汚泥を原料に用いた汚泥肥料で特徴的な混入物があった。

まず、Fig.5 で示したような黄色く艶のある薄い植物片は、特にし尿汚泥を原料に用いた肥料で多く見られた。他には、粘土鉱物のスペクトルが多く得られた。スペクトルの例を Fig.18 に示す。特に多く見られた粘土鉱物のスペクトルはカオリンであり、これは肥料の粒状化促進材として用いられることもあるが、用いていない肥料にも混入が認められた。カオリンは陶磁器の原料となる他に製紙工程における塗工顔料、化粧品ほか様々な産業で使用されており、それら製品の断片が混入している可能性が示唆された。ライブラリ検索の結果として、カオリンそのものとしてヒットする他に、「polyester with Kaolin filler」としてヒットすることが特に多く、その見た目は Fig.19 のような鮮やかな色をしていることが多くあり、製品の塗工材料として用いられているものである可能性が示唆された。

他にライブラリ検索結果として頻繁にヒットしたものは、エポキシ樹脂の原料として使用される「Bisphenol A」、接着剤やシーリング材として用いられる合成樹脂である「poly isobutylene」、薄層フィルムの製造や乳化

剤として食品の添加材に用いられる「エチルセルロース」等があった。



Characteristical peak at 3500 cm<sup>-1</sup> or larger wavenumber

Fig.18 Example of infrared absorption spectrum that contains clay mineral's

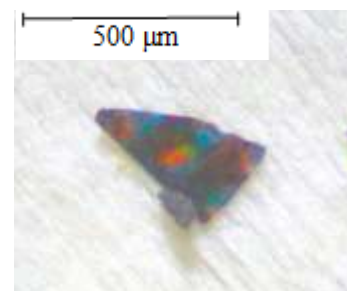


Fig.19 Example of sample that Result of library Search was polyester with Kaolin filler (picture of stereoscopic microscope, ×45)

(3) 肥料の使用原料の判別

今回得られた結果を元に、肥料の原料判別の参考表を Table 4 のとおりに作成した。判別は一つの項目のみで行わず、複数の視点から総合的に行うのが好ましいと考える。また、混入個数はおよそ大きさが 25 μm 以上のプラスチック片についての概算であり、プラスチック種類数も今回測定した範囲内で確認された数を記載するため、あくまで参考とする。

Table 4 Reference table distinction of raw material for fertilizers

Kind of fertilizers	Appearance of plastics	Amount of plastics	The number of kind of plastics
Sludge fertilizer that contains Sewage sludge and Human waste sludge	Shape of plastics are fragment, foam, film, line, pellet etc Their color, size are various	There's a possibility that the number of plastics are 1,000 pieces/g or more	About more than 5
Industrial sludge fertilizer	Shape of plastics are not rich in variety	Depends on raw material	About 5 or less
Compost	Shape of plastics are not rich in variety	There's a possibility that the number of plastics are 300 pieces/g or less	About 5 or less

4. まとめ

顕微 FT-IR を用いた汚泥肥料の鑑定方法を開発するため、以下の検討を行い、次の結果を得た。

- (1) 肥料の酸分解方法としてフェントン法及び酵素処理の検討を行い、フェントン法は有効であることを確認した。
- (2) 既報で用いられていた過酸化水素による分解に新たに比重分離の操作を加える事で、より効率的に肥料中のプラスチックの観察及び測定を行うことが可能となった。
- (3) 実体顕微鏡観察及び顕微 FT-IR を用いて観察及び測定を効率的に行うため、適切な試料量を得る希釈

方法の検討を行い、その目安を確定した。

(4) 顕微 FT-IR を用いて試料を測定する方法の検討を行い、大きな試料を網ふるいで取り除いた上で、メンブレンフィルター上に捕集した試料をフィルターごとマッピング測定する方法を用い、効率的に観察が可能となった。

(5) 試料に含まれる植物片の中には、顕微 FT-IR で測定した結果得られるスペクトルがプラスチックのものと誤判別される可能性が高いものが多く含まれることが分かり、植物及びプラスチックのスペクトルを合計 200 種類以上登録してライブラリを拡充することで判別の精度向上を図った。

(6) 前処理の試料の実体顕微鏡観察を行ったところ、下水汚泥、し尿汚泥を原料に用いた汚泥肥料では様々な形状、色、大きさの混入物が混在している様子が観察された。汚泥原料として工業汚泥のみを原料に用いた汚泥肥料では、混入物の色、形態の種類は概ね単一的であった。堆肥、有機質肥料ではそのような混入物の量は少なく、分解しきれなかった木片等が多く見られた。

(7) 顕微 FT-IR での測定結果から各肥料 1 g あたりのプラスチックの推定個数を算出した結果、下水汚泥、し尿汚泥を原料に用いた汚泥肥料について、その個数はそれらを原料に用いていないものに比べて多い傾向がみられた。また、観察されたプラスチックの種類数はおよそ 5 種類～21 種類と多い結果であり、具体的には PP, PE, PET, PS, ASA, ABS, MBS, アクリロニトリル, PEs, PU 等がみられた。

汚泥原料として工業汚泥のみを用いた肥料では、混入プラスチック数は試料により異なった。混入数の多い試料もあったが、実体顕微鏡で観察した結果同様、観察されたプラスチックの種類は概ね単一的である特徴が見られた。混入していたプラスチックの種類は PS, PP, PE, PET 等であった。

堆肥では、混入プラスチック数と種類数は少なかった。観察されたプラスチックの種類は PS, PP, PE, PU 等であった。

(8) 得られた結果のうち、肥料 1 g 中プラスチック推定個数と観察されたプラスチック種類数を点としてプロットした図を作成し、下水汚泥、し尿汚泥を原料として用いた汚泥肥料とその他の肥料で、グラフ中で大まかにグループ分けできることを確認した。

(9) 得られた結果のうち、肥料 1 g 中プラスチック推定個数と汚泥使用割合を点としてプロットした図を作成し、推定個数は汚泥使用率によらず試料により異なる結果となった。

(10) 今回得られた結果を元に、含有するプラスチックの量と種類により汚泥肥料と堆肥を判別するための参考表を作成した。

## 文 献

- 1) 農林水産省:肥料の品質の確保等に関する法律, 昭和 25 年 5 月 1 日法律第 127 号制定, 最終改正令和元年 12 月 4 日法律第 62 号  
<<https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=325AC0000000127>>
- 2) 農林水産省:肥料の品質の確保等に関する法律に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日農林水産省告示第 284 号, 最終改正令和 4 年 2 月 15 日農林水産省告示第 302 号
- 3) 平田絵理香, 添田英雄, 吉村英美, 八木啓二:肥料鑑定データベースの拡充 —顕微鏡観察—, 肥料研究報告, **12**, 195~207 (2019)
- 4) 平田絵理香, 小堀拓也, 吉村英美, 八木啓二, 白井裕治:汚泥肥料と堆肥の鑑定 —顕微鏡観察及び FT-IR による同定—, 肥料研究報告, **13**, 210~224 (2020)
- 5) 環境省 : Guidelines for Harmonizing Ocean Surface Microplastic Monitoring Methods Version

## 1.1(2020)

<[https://www.sherrimason.com/uploads/MOEJ\\_Guidelines%20for%20Harmonizing%20Ocean%20Surface%20Microplastic-June2020.pdf](https://www.sherrimason.com/uploads/MOEJ_Guidelines%20for%20Harmonizing%20Ocean%20Surface%20Microplastic-June2020.pdf)>

- 6) 環境省水・大気環境局水環境課：河川マイクロプラスチック調査ガイドライン (2022)  
<<https://www.env.go.jp/content/900543325.pdf>>
- 7) Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP) : GESAMP 2019 Guidelines for the monitoring & assessment of plastic litter in the ocean (2019)  
<[https://wesr.unep.org/media/docs/marine\\_plastics/une\\_science\\_division\\_gesamp\\_reports.pdf](https://wesr.unep.org/media/docs/marine_plastics/une_science_division_gesamp_reports.pdf)>
- 8) 国立大学法人京都大学, 国立研究開発法人土木研究所: 下水中に含まれるマイクロプラスチックの検出と挙動に関する共同研究報告書ー下水中の繊維状マイクロプラスチックの分析マニュアルー (2022)  
<<https://thesis.pwri.go.jp/files/87275739763b4c24560a18.pdf>>
- 9) サーモフィッシャーサイエンティフィック: マイクロプラスチックの分析ー前処理～測定～解析までー(2020)
- 10) 中嶋亮太, 山下麗: 海洋マイクロプラスチックの採取・前処理・定量方法, 海の研究(Oceanography in Japan), 29, 129~151 (2020)  
<[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kaiyou/29/5/29\\_129/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kaiyou/29/5/29_129/_pdf/-char/ja)>
- 11) 吉澤真人, 高橋 繁: マイクロプラスチック測定のための前処理方法の検討 (2019~2020)  
<<https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/machizukuri-kankyo/kasen-gesuido/gesuido/torikumi/happyo/R01happyokai.files/ronbun2019-20.pdf>>
- 12) 亀田豊: これからマイクロプラスチック分析を始める方へ～マイクロプラスチック分析はここまで簡単になった!～, 環境と測定技術, Vol 49 No.2, 13~19 (2022)
- 13) 岡山大学環境管理センター: 難分解性有機物質含有廃液のフェントン法による酸化処理, 岡山大学環境管理センター報, 11, 29~36 (1989)  
<[https://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/2/20883/20160528015051729890/erc\\_011\\_029\\_036.pdf](https://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/2/20883/20160528015051729890/erc_011_029_036.pdf)>
- 14) 徳村雅弘, 加藤久人, 川瀬義矩: フォトフェントン反応による余剰汚泥の減容化, SCEJ 73<sup>rd</sup> Annual Meeting(Hamamatsu) R304 (2008)  
<[https://www.jstage.jst.go.jp/article/scej/2008/0/2008\\_0\\_737/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/scej/2008/0/2008_0_737/_pdf/-char/ja)>
- 15) 加谷真悟, 藤田恵美子, 亀田豊: カキ体内マイクロプラスチック定量における酵素洗剤を用いた酵素処理法の開発, 環境化学物質 3 学会合同大会ポスター発表, P-157 (2022)
- 16) Keenan Munno, Paul A Helm, Donald A Jackson, Chelsea Rochman, Alina Sims: Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles, Environ Toxicol Chem., 37, 91~98 (2018)
- 17) Crawford C.B., B. Quinn: Microplastic Pollutants, Elsevier, Kidlington, UK. 336 pp (2016).
- 18) Michiel Claessens, Liseth Van Cauwenberghe, Michiel B. Vandegehuchte, Colin R. Janssen: New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organics, Marine Pollution Bulletin, 70, 227~233 (2013)
- 19) 長倉 三郎, 井口 洋夫, 江沢 洋, 岩村 秀, 佐藤 文隆, 久保 亮五: 岩波 理化学辞典, 第 5 版第 8 刷, 岩波書店 (1998)
- 20) 繊維総合辞典編集委員会: 新・繊維総合辞典, 繊維研新聞社 (2012)
- 21) 田中周平, 垣田正樹, 雪岡聖, 鈴木裕識, 藤井滋穂, 高田秀重: 下水処理過程におけるマイクロプラスチックの挙動と琵琶湖への負荷量の推定, 土木学会論文集 G(環境), Vol.75, No.7, III\_35-III\_40



(2019)

<[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jscej/75/7/75\\_III\\_35/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jscej/75/7/75_III_35/_pdf)>

- 22) Pelin Koyuncuoğlu, Gülbin Erden: Sampling, pre-treatment, and identification methods of microplastics in sewage sludge and their effects in agricultural soils: a review, *Environmental Monitoring and Assessment*, 193:175 (2021)
- 23) Shengwei Zhang, Yanxia Li, Xingcai Chen, Xiaoman Jiang, Jing Li, Liu Yang, Xiaoqi Yin, Xuelian Zhang : Occurrence and distribution of microplastics (MPs) in commercial organic fertilizers in China, *Chemosphere*, Vol.260 (2020)