

生分解性プラスチック分解菌の検索

高橋 克嘉*¹・小玉 義和*²・鮫島 暁子*³・山内 博利*³

Study on the Microbial Degradation of Biodegradable Polymers

Katsuyoshi TAKAHASHI, Yoshikazu KODAMA, Akiko SAMEISHIMA and Hirotoishi YAMAUCHI

九州各地の土壌（地域限定的ではあるが）を採取し、ビオノーレ（PBSA）及びラクティ（PLLA）、2つの生分解性プラスチックの分解菌の検索を行った。各地土壌中において生分解に関わっている微生物がどのような菌層であるかを調査し、さらにハロー試験においてプラスチック分解能を示した微生物に関して、16S rDNA塩基配列解析を行い菌種を明らかにした。

キーワード：生分解性プラスチック、土壌細菌、PBSA、PLLA

1 はじめに

現在、生分解性プラスチックの利用が各分野において始まっている。生分解性プラスチックは汎用プラスチックと比較して、土水中における分解率が良いという評価があるが、環境中での分解に関与する微生物について、検索されているものの、体系化されていない。そこで本研究は、土壌中での分解特性の予測と生分解性プラスチックの適正使用に資するため、土壌中の分解菌のデータベース化を図ることを目的とする。今年度は、生分解性プラスチック2種、「ビオノーレ（PBSA系）」、「ラクティ（ポリ乳酸系）」に関する分解能力の強い菌についての諸性質の検討を行い、分類同定を行った。本研究は、平成14年度から16年度までの期間、環境省の地球環境保全等試験研究費においてプロジェクト名「生分解性プラスチックの適正使用のための分解菌データベース作成に関する研究」で採択され、産業技術総合研究所（産総研）関西センターを中心とする産総研2グループと全国公設試11機関で取り組んでいるものである。

2 実験方法

2-1 土壌中における生菌数の測定

- * 1 現 小林保健所
- * 2 現 衛生環境研究所
- * 3 資源環境部

2-1-1 土壌の採取

今回の実験を行うにあたり、土壌は、九州各地の公設試敷地内土壌を春（5月）、秋（10月）にそれぞれ提供していただいた。土壌採取箇所は、平成12年度に物質工学連合部会高分子分科会において生分解性プラスチックのフィールドテスト（全国55公設試参加）が行われたところであり、実験には、福岡、熊本、大分、鹿児島（×2）宮崎（×2）及び産総研関西センター計8カ所の土壌を使用した（表1）。

表1 土壌提供機関名

県名	機 関 名
福岡	工業技術センター
熊本	工業技術センター
大分	産業科学技術センター
鹿児島	工業技術センター
〃（大島）	大島紬技術指導センター
宮崎	工業技術センター
宮崎	総合農業試験場
大阪	産総研関西センター

送付された土壌は、小石・小枝等を取り除き、2メッシュのふるいにかけて、均一試料とした。

2-1-2 生菌数の測定

採取した土壌10gを滅菌生理食塩水に加え、超

音波槽における攪拌3分、静置1分の行程を3回繰り返した後、懸濁液上澄を土壌抽出試料液とした。一般生菌数の測定は、標準寒天培地（酵母エキス2.5g、ペプトン5.0g、ブドウ糖1.0g、寒天15.0g）を用いた表面塗抹平板法により25℃、48時間培養で行った。同様に糸状菌数の測定は、ポテトデキストロース寒天培地（ポテト浸出液末4.0g、ブドウ糖20.0g、寒天15.0g：日水製薬(株)）にクロラムファンコールを添加したものの、放線菌数の測定は、放線菌用分離培地（Difco社、Actinomycete Isolation Agar；カゼイン酸ナトリウム2、アスパラギン0.1、プロピオン酸ナトリウム4、 K_2HPO_4 0.5、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001、寒天15.0 (g/1)) にシクロヘキシミドを添加したものをを用いて、それぞれ25℃で1週間培養を行った。

2-2 プラスチック分解試験（ハロー試験）

2-2-1 プラスチックの種類

実験に使用するプラスチックの種類、乳化培地の作製法は、産総研関西センターを中心とする産総研2グループと全国公設試11機関で決められており、春の試験では、以前当センターでも独自に実験したこともあるビオノーレを、秋の試験では、ラクティを用いた。ビオノーレは、コハク酸ジメチルとブタンジオールとの縮重合により得られるポリブチレンサクシネートにアジピン酸を共重合させ分解性能の向上した脂肪族ポリエステル、Polybutylenesuccinate/adipate（昭和高分子(株)/昭和電工(株)）であり、マルチシート、生ゴミ袋など需要が高まってきているプラスチックである。ラクティ(株)島津製作所）は、ポリ乳酸を主成分とし、世界的な規模で需要が見込まれているが、他の生分解性プラスチックと比較し、生分解性が劣ることから、分解菌の検索が急務となっているプラスチックである。

2-2-2 乳化培地の作製

生分解性試験の方法は培地にプラスチックを溶かし、植菌を行いプラスチックの分解により生じるコロニーの周りの透明部分（ハロー）の有無を調べ、微生物の分解能の評価を行う。この試験においてハローを形成したものをプラスチック分解菌と判断して単離を行い、その分解能の評価を行

うことにした。まず始めにビオノーレ粉末を溶媒で溶解した後に乳化剤を添加した無機塩培地（表2）に加えて乳化させ、溶媒を蒸散させてビオノーレ乳化培地を作製した。同様にラクティ乳化培地の作製も行った。

表2 無機塩培地組成

組成	(mg/l)
KH_2PO_4	1,000
K_2HPO_4	1,000
$(NH_4)_2SO_4$	1,000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200
NaCl	100
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	20
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10
Yeast Extract	250
Plysurf	100

土壌抽出試料液を乳化培地に塗抹し、発生したコロニー菌体周辺に透明部分（ハロー）の形成が見られたものをプラスチック分解菌と判断し、採取した菌株を標準寒天培地でのスクリーニングを行った。さらに純粋分離した菌株を再度プラスチック乳化培地に植菌し、ハローの確認を行った。

2-3 分解菌の同定

2-3-1 遺伝子の抽出

純粋分離した分解菌の遺伝子の調製には、BIO-RAD社製のInstaGene DNA Purification Matrixを用い、プロトコルに従って遺伝子を抽出した。すなわち、純粋分離した分解菌1白金耳を滅菌水1mlが入ったマイクロチューブに懸濁し、15,000rpmで2分間遠心した後上清を取り除き、InstaGene 200 μ lを加え、56℃、30分間処理した。10秒間の攪拌の後、100℃のヒートブロックで8分間処理し、さらに10秒間攪拌を行った後に15,000rpmで2分間遠心分離した上清をDNA試料とし、後述のPCR用鋳型とした。

2-3-2 PCR及びシーケンス

純粋分離した微生物の同定を行うため、菌体から抽出した遺伝子を鋳型としたPCRによって16S rDNAを増幅し、塩基配列を解析した。PCR及びシーケンス反応には、Microseq 500 16S rDNA

Bacterial Sequencing kit (PE Applied Biosystems 社) を用い、ABI Prism 310 Genetic Analyzer により解析した。また、微生物の同定には、解析ソフト (MicroSeq Analysis Software) を用い、ライブラリー (MicroSeq 16S rDNA Sequence Databases) 及びインターネット上データベースによる検索を行った。

3 結果及び考察

3-1 生菌数測定試験

図1に春5月の結果を、図2に秋10月の結果を示す。

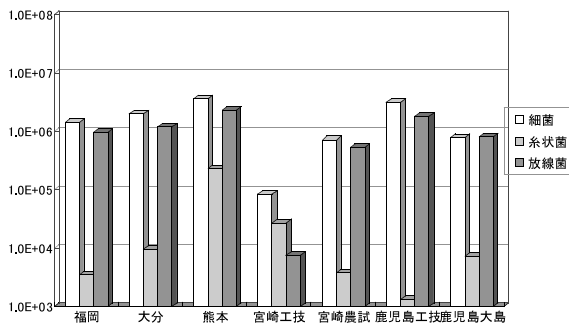


図1 九州各地の生菌数測定結果 (春: 5月)

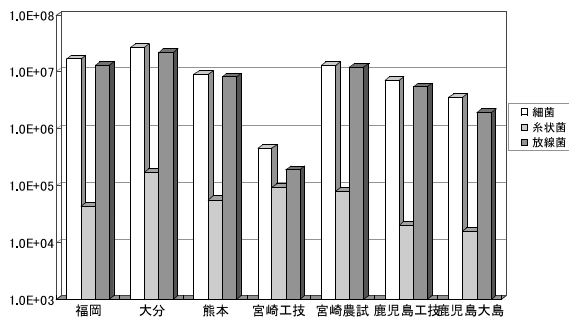


図2 九州各地の生菌数測定結果 (秋: 10月)

一般生菌数、糸状菌数、放線菌数を春と秋で比較したとき、秋の試験ではどの県においても春の試験結果の約10倍の菌数が認められた。また、春の試験では、熊本の土壌が一般生菌、糸状菌、放線菌において最も多くの菌数が認められたが、秋の試験では、大分の土壌に最も多くの菌数が認められた。本県の農業試験場の土壌は、他と比較してほとんど変わらない値を示したのに対し、当工業技術センター敷地の土壌は、春、秋いずれも最

も低い値を示した。これは、工業技術センター敷地が、山林を崩し造成した土地であり、現在の表面土壌に地中の土壌が出てきたため、生菌数が少ない結果になったと推測された。

3-2 ハロー試験

ハロー試験は、3日、1週間、2週間、1ヶ月で観察を行った。その中でハローを形成した菌の採取を行い、さらに純粋分離した菌株を再度プラスチック乳化培地に植菌し、ハローの確認を行った(図3)。ビオノーレ乳化培地では、はっきりとしたハローが現れたが、ラクティ乳化培地では、ビオノーレのハローと比較すると少々曖昧でハロー自体が薄いものが多い傾向が見られた。このことにより、ラクティはビオノーレと比較して微生物による分解は難しいということが確認された。

乳化培地の白色部分が透明に変化したのは、培地中の乳白色のプラスチック成分を分解しているものと考えられるが、ハロー形成の速度や程度は菌株によって差が見られ、ハロー形成能のある菌株は概ね1週間から2週間で現れた。

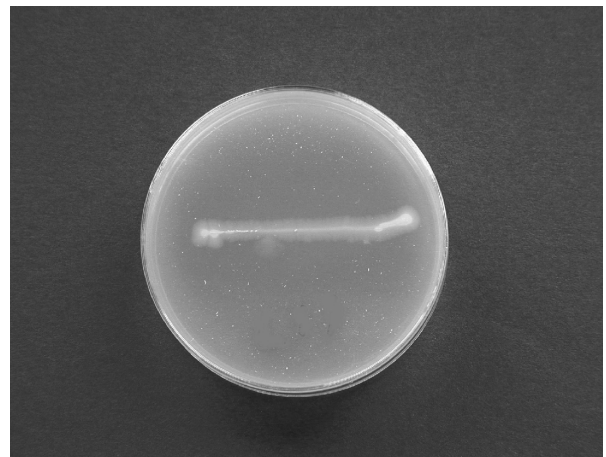


図3 プラスチック乳化培地でのハロー形成

3-3 16S rDNA塩基配列解析による分解菌の同定

ハロー形成が確認された菌株の16S rDNA塩基配列を解析し、相同性検索を行った結果のうち、ビオノーレ分解菌を図4に、ラクティ分解菌を図5に示す。今回の16S rDNA塩基配列は、500bp程度の解析を行ったが、一致率は85~99%であった。

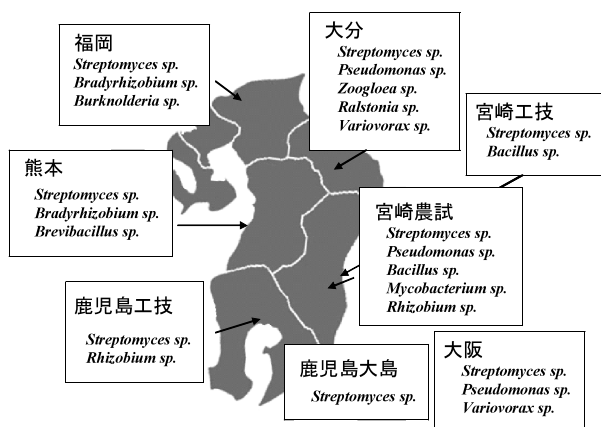


図4 ビオノーレ分解菌の分布

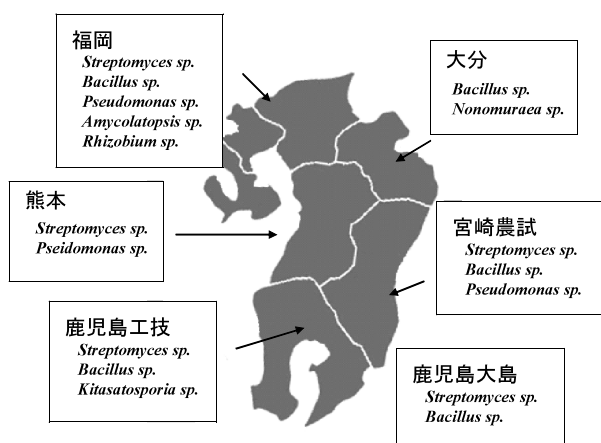


図5 ラクティ分解菌の分布

ビオノーレ分解菌同定の結果、最も多種多様な菌層を持つのは、大分県、本県（農試）であった。前回の試験¹⁾と同様に、*Bacillus sp.*、*Pseudomonas sp.*、*Streptomyces sp.*等の土壤に常在する菌種が多数分解菌として存在したことにより、ビオノーレは土壤に埋設しても、特殊な環境を整えることなく分解されることが推測された。これは、土壤埋設試験の際、全国的に分解率が良かったことをも裏付ける結果となった。ラクティについては、ハ

ロー形成もビオノーレに比較して少々曖昧だったこともあり、さらなる分解菌の検索を行うと同時に分解菌にとって生育しやすい条件を検討する必要があると考えられた。

*Streptomyces sp.*は、ビオノーレ分解菌として今回試験を行ったすべての県で確認され、またラクティ分解菌としてもほとんどの県で見られたことから、生分解性プラスチック分解菌として有望であった。同様に*Pseudomonas sp.*、*Bacillus sp.*も有望株である考えられた。これらの中のハロー形成能が強い菌については、さらに詳細な16S rDNA解析による同定を行う予定である。

4 まとめ

- 1) 一般生菌数、糸状菌数、放線菌数を春と秋で比較したとき、秋の試験ではどの県においても春の結果より多い菌数が認められた。
- 2) 春の試験では、熊本の土壤において最も多い生菌数が認められたが、秋の試験では、大分の土壤に最も多くの生菌数が認められた。当工業技術センター敷地内の土壤においては、春秋いずれも最も低い値を示した。
- 3) ビオノーレ分解菌同定の結果、最も多種多様な菌層を持つのは、大分県、本県（農試）であった。
- 4) ビオノーレ分解菌として*Streptomyces sp.*は、今回試験を行ったすべての県で確認され、土壤に常在する多種多様な菌種が分解菌として明らかになった。

5 参考文献

- 1) 鮫島暁子, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 45, 1 (2000)