

# 生分解性プラスチック分解菌の検索

藤田 芳和\*・鮫島 暁子\*・山内 博利\*

## Study on the Microbial Degradation of Biodegradable Polymers

Yoshikazu FUJITA, Akiko SAMESHIMA and Hirotochi YAMAUCHI

九州各地（7カ所）で採取した土壌を用いて、生分解性プラスチック（PHB/V及びPCL）の分解菌の検索を行った。各地土壌中の一般生細菌・糸状菌・放線菌を調査し、菌数・性状等の比較を行い、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塩基配列解析により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、PHB/V、PCL

### 1 はじめに

生分解性プラスチックは、従来のプラスチックと比べ、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は検索はされているものの、体系化されていない。そこで、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、「PHB/V」、「PCL（セルグリーン）」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

##### 2-1-1 土壌の採取

今回の実験を行うにあたり、土壌は、九州各地の公設試験地内土壌を春（5月）、秋（10月）に

それぞれ提供していただいた。実験には、福岡、熊本、大分、鹿児島（×2）宮崎（×2）計7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

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、懸濁液上清を土壌抽出試料液とした。一般生菌数の測定は、標準寒天培地を用いた表面塗抹平板法により行った。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にクロラムファニコールを添加したもの、放線菌数の測定は、放線菌用分離培地にシクロヘキシミドを添加したものを用いて、それぞれ25℃で1週間培養を

\* 資源環境部

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、PHB/Vを、秋の試験では、PCLを用いた。PHB/Vは、植物澱粉（飼料用とうもろこし等）を原料として、発酵・生成されるポリヒドロキシ酪酸で、微生物による分解性の優れた生分解性プラスチックである。

PCLは、高分子量のポリカプロラクトンで、結晶性を有する低融点（融点60℃）の熱可塑性のプラスチックである。現在、年間約1000トン生産されており、主に農業用マルチシートに使用されている。

### 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。

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 DNAPurification Matrixを用い、プロトコールに従って遺伝子を抽出した。得られた抽出物を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。解析はABI Prism 310 Genetic Analyzerにより行い、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。

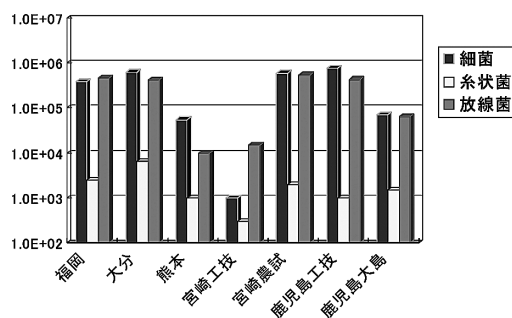


図1 九州各地の生菌数測定結果（春：5月）

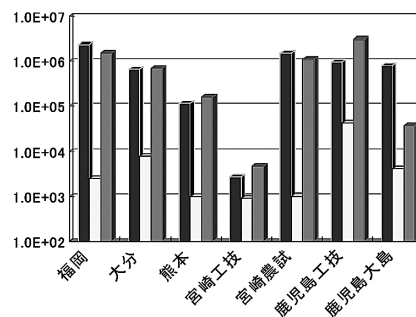


図2 九州各地の生菌数測定結果（秋：10月）

春と秋の生菌数を比較すると、全体的にみて秋の試験結果のほうが菌数が多い傾向が確認できた。また、春・秋の2回の試験で、鹿児島工技の土壌が最も多くの菌数（一般生菌数、糸状菌数、放線菌数の合計）が認められた。全地点のうち、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、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)。PHB/V乳化培地では、当工業技術センター以外の地点ではっきりとしたハローが現れ、当工業技術センターでは、不明瞭なハローが得られた。また、PCL乳化培地では、全地点で明瞭なハローが得られた。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。

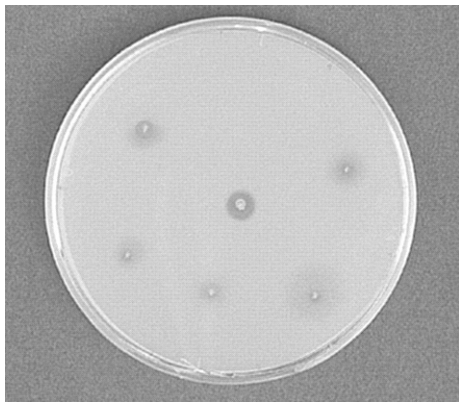


図3 プラスチック乳化培地 (PHB/V)でのハロー形成

分解菌は*Streptomyces sp.*がほとんどの県で検出された。このことは、*Streptomyces sp.*がPHB/V分解菌の中でも優先種であることを示していると考えられた。また、PCL分解菌も同様に検査した結果、それぞれの県において、検出された菌株が異なったことから、PCL自体が多様な菌種によって分解されやすい性質を有しているのではないかと推測された。

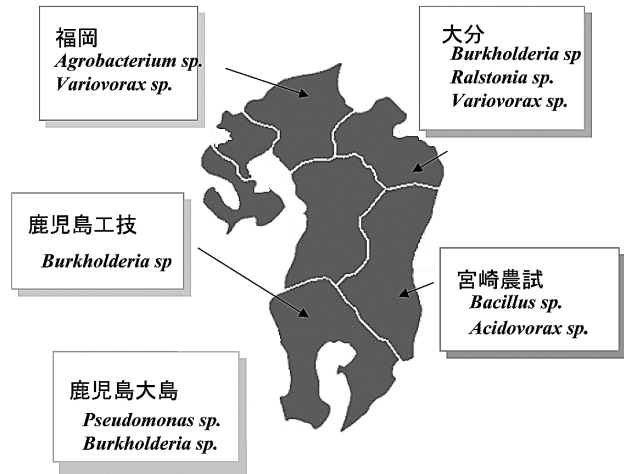


図5 PCL分解菌の分布

### 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、PHB/V分解菌を図4に、PCL分解菌を図5に示す。

今回、各県多数の分解菌の中から無作為に菌株を抽出し、16S rDNA同定を行った結果、PHB/V

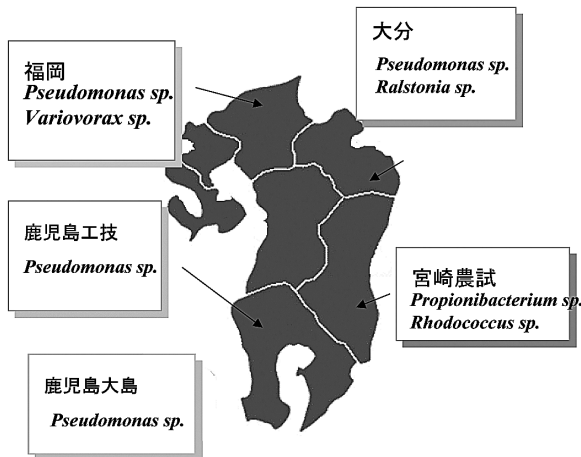


図4 PHB/V分解菌の分布

### 4 まとめ

- 1) 生菌数を春と秋で比較したとき、全体的にみて、秋の試験では春の試験より多い菌数が認められた。また、当工業技術センター敷地内の土壌においては、春秋いずれも最も低い値を示した。
- 2) PHB/V乳化培地では、当工業技術センター以外の地点ではっきりとしたハローが現れ、また、PCL乳化培地では、全地点で明瞭なハローが得られた。
- 3) PHB/V分解菌として、多くの地点で*Streptomyces sp.*が優先的に検出され、また、PCL分解菌として、多種の分解菌が検出された。

### 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)
- 2) 高橋克嘉, 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, 47, 1 (2002)