

生分解性プラスチック分解菌の検索*

鮫島 暁子*¹・藤田 芳和*²・友行眞美子*¹・山内 博利*³

Study on the Microbial Degradation of Biodegradable Polymers

Akiko SAMESHIMA, Yoshikazu FUJITA, Mamiko TOMOYUKI
and Hirotoshi YAMAUCHI

九州各地の土壌を採取し、生分解性プラスチックの一つであるユーベック（PEC）の分解菌の検索を行い、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。また、水系における生分解性プラスチックフィルム6種の分解性を調査した。

キーワード：生分解性プラスチック、土壌細菌、PEC、フィルム、河川

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。しかし、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の一つである「ユーベック（PECーポリブチレンサクシネートカルボネート系）」に関する分解能力の強い菌について、分類同定を行った。さらに、生分解性プラスチックフィルム6種を河川中に浸漬し、分解性を調査した。

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

前年度試験同様、九州各地の公設試敷地内土壌を5月に提供を受けた。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）及び産業技術総合研究所（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	工業技術センター
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	産業技術総合研究所関西センター

* 土壌環境微生物の応用に関する研究（第3報）

*1 資源環境部

*2 現 宮崎県環境森林部環境管理課

*3 前 資源環境部長

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、超音波槽にて攪拌3分、静置1分の工程を3回繰り返した後、懸濁液上清を土壌抽出試料液とし、河川水の生菌数試験においては、河川水を濾紙No. 5 Bで濾過したものを試料液とした。なお、春の試験では、一般生菌数、糸状菌数、放線菌数の3項目を試験し、冬の水系試験では、一般生菌数試験のみ行った。

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：日水）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）にクロラムフェニ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（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/l)：Difco社製）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

春の試験には、ユーベック（PEC-ポリブチレンサクシネートカルボネート系）を使用した。

秋の水系試験では、PHB、PCL、PBSAを使用した。

2-2-2 乳化培地の作成

微生物における生分解性プラスチックの分解能の評価は、プラスチックを乳化させた寒天培地に植菌を行い、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）の有無を調べることで行う。

生分解性プラスチック粉末を溶媒で溶解した後、乳化剤を添加した無機塩培地（表2）に加えて乳化させ、溶媒を蒸散させて乳化培地を作製した。

春の試験では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を用いてスク

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。

秋の水系試験では、作成した乳化培地に採取した河川水を塗抹し、発生したハロー菌数を計測し

表2 無機塩培地組成 (g/l)

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(乳化剤)	100

た。

2-3 水系試験（フィルム浸漬試験）

産総研関西センターより送付されたフィルム入りボックスを大淀川中流域沿岸、水深1 m程度のところに浸漬した。2週間、4週間後に採取し、重量変化を調査した。

2-4 分解菌の同定

2-4-1 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に、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、シーケンス反応及び微生物の同定には、MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing kit (PE Applied Biosystems社)、ABI Prism 310 Genetic Analyzerにより解析した。また、微生物の同定には、同社製の解析ソフトMicroSeq Analysis Softwareを使用した。また、あわせてMicroSeq 16S rDNA Sequence Data-bases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、表3に冬（12月）の結果を示す。

一般生菌数、糸状菌数、放線菌数は、前年度¹⁾、前々年度²⁾とほぼ変わらない値と傾向を示した。また、気候等により多少の変動はあるものの、土壌中の菌数及び菌相はほとんど変わらなかった。

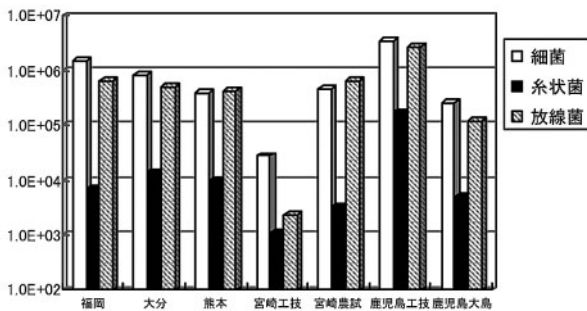


図1 九州各地の生菌数測定結果 (春: 5月)

表3 大淀川の生菌数測定結果 (冬: 12月)

日/項目	一般生菌数 (cfu/ml)
3日目	1.4 × 10 ³
7日目	1.5 × 10 ³

水系試験における生菌数は、今回行われた全国の河川、湖等の生菌数と同等の値を示した。

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を採取し、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た後、ハローの確認を行った。その結果、試験を行った各県で明瞭なハローが得られ、分解菌が存在することが明らかになった。

また、表4に水系の試験におけるハロー試験の結果を示す。発生したハロー数は、土壌の場合と

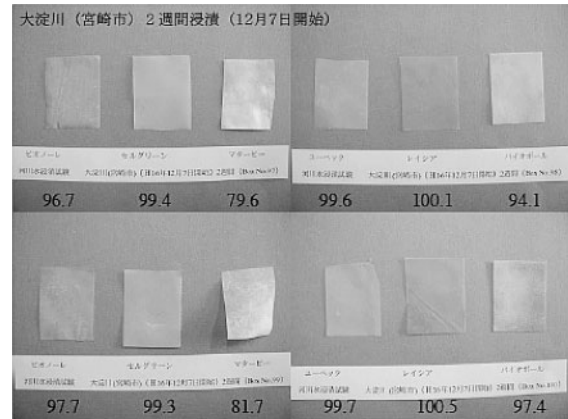
表4 水系ハロー試験結果

プラ/日数	7日目	14,21日目
PBSA	90	計測不能
PHB	8.1 × 10 ²	計測不能
PCL	70	計測不能

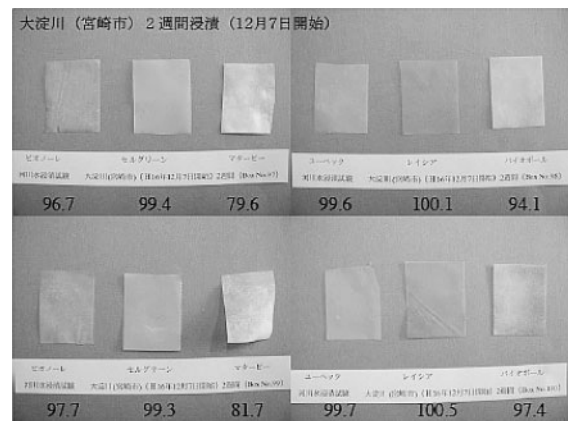
比較すると大変少ないものであるが、分解菌が存在することが明らかになった。この数値は、全国河川等で行われた菌数の平均とほぼ同じ値であった。

3-3 水系試験 (フィルム浸漬試験)

図2に浸漬したフィルムの変化を、表5に重量変化 (%) の結果を示す。



(2週間後)



(4週間後)

図2 浸漬したフィルムの変化

表5 生分解性プラスチックの浸漬水系試験における重量変化

生分解性プラスチック	重量変化 (残存率% g/g)	
	2週間	4週間
バイオノーレ	97.2	92.6
セルグリーン	99.4	98.6
マタービー	80.7	69.6
ユーペック	99.7	91.8
レイシア	100.0	100.0
バイオポール	95.8	94.0

試験は、各フィルムについて2枚（上下）づつ実施した。左から順にビオノーレ（PBSA）、セルグリーン（PCL）、マタービー（デンプン系）、ユーベック（PEC）、レイシア（PLLA）、バイオポール（PHB）となっており、形自体に変形は認められない。特にレイシア（PLLA）においては、土壌と同様、分解されていないことが明らかになった。

大淀川における生分解性プラスチックの分解率は、全国と比べると平均的なものであり、期間も2週間と短いものであったため、さらに長期的な試験が必要と考えられた。

3-4 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ユーベック分解菌株の16S rDNA塩基配列を解析し、相同性検索を行った結果を図4に示す。今回の16S rDNA塩基配列は、500bp程度の解析を行ったが、相同性は85～99%であった。

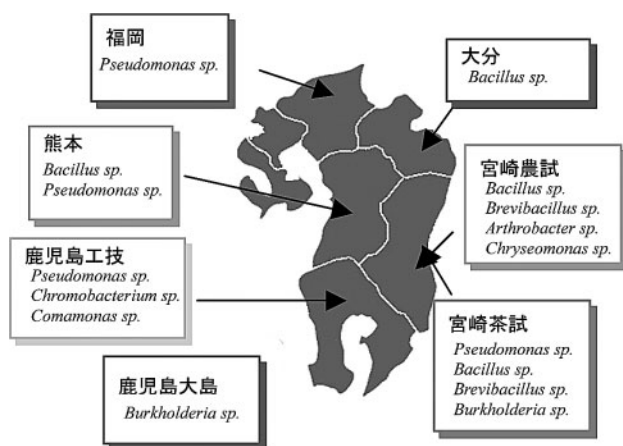


図3 ユーベック分解菌の分布
(宮崎茶業支場は参考)

ユーベック分解菌同定の結果、最も多種多様な菌層を持つのは、鹿児島県、本県（農試）であった。分解菌の中で*Bacillus sp.*、*Pseudomonas sp.*等の土壌に常在する菌種が分解菌として存在することが明らかになったことから、ビオノーレ（PBSA）やセルグリーン（PCL）と同様、ユーベック（PEC）も特殊な土壌環境を整えることなしに分解が可能であることが推測された。

Pseudomonas sp. は、ユーベック分解菌として試験を行ったほとんどの県で確認され、また、その他の生分解性プラスチック分解菌としても見られたことから、生分解性プラスチック分解菌として有望であると考えられた。

4 まとめ

- 1) 一般生菌数、糸状菌数、放線菌数を春の試験で比較したとき、すべての年度においても宮崎県工業技術センターの土壌が最も菌数が少ないことが明らかになった。その他の箇所において、菌数に大きな差異は認められなかった。また、土壌中の生菌数は、3ヶ年を通して大きな増減は見られなかったことから、通常土壌中の菌層は変化しないことが推測された。
- 2) 水系試験の結果、生菌数は全国平均と同等の値を示した。
- 3) 生分解性プラスチックの大淀川での浸漬試験の結果、少々の分解は認められたものの、レイシア（PLLA）に関しては、分解されておらず、分解の向上にむけては、さらなる検討が必要と考えられた。
- 4) ユーベック分解菌同定の結果、最も多種多様な菌層を持つのは、鹿児島県、本県（農試）であった。
- 5) ユーベック分解菌として*Pseudomonas sp.* は、今回試験を行ったほとんどの県で検出され、前回、前々回に行ったその他の生分解性プラスチック分解菌として検出されたことから、有望な菌種であることが確認された。

5 参考文献

- 1) 藤田芳和, 鮫島暁子, 山内博利, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 45, 9(2003)
- 2) 高橋克嘉, 鮫島暁子, 山内博利, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 44, 1(2002)