

生分解性資材投入における土壌微生物への影響評価

地頭所 眞美子*², 溝添 暁子*¹, 里岡 嘉宏*¹, 中田 一則*¹

The Research of Effect of Biodegradable Material Injection to Soil Microbe

Mamiko JITOUSYO, Akiko MIZOZOE, Yoshihiro SATOOKA and Kazunori NAKATA

農業用畑地に生分解性マルチフィルムを鋤き込み、経時的にサンプリングを行った土壌についてPCR-DGGE法を用い菌叢変化の観察を行った。また、ハロー試験において分解能を示した微生物に関して16SrDNA塩基配列解析を行い菌種の特定制を行った。特定された菌種の中で植物病原性を持つ分解菌Verticillium属を特異的に検出できるプローブを設計し、土壌中からの検出を試みた。

キーワード：生分解性マルチフィルム，土壌，PCR-DGGE法，FISH法

1 はじめに

化石燃料を原料として化学合成したプラスチックは目的に応じて加工でき、安価で安定な材料であることから数多くの製品に使用されている。しかし、その一方で種類によっては焼却により有害ガスが発生し、また、埋め立てにおいても分解しにくいといった問題が指摘されている。その解決策の一つとして、地中や水中で微生物により分解される生分解性プラスチックの利用があり、農業用資材、コンポスト用生ゴミ袋、包装用資材等にも使用されている。

そうした中、生分解性資材を実環境中で使用した際、特に農地においては同一箇所を繰り返し使用した時の土壌微生物への影響が懸念されている。本研究では、土の乾燥防止や雑草抑制などの目的で用いられている生分解性マルチフィルム（以下生分解性マルチ）を使用した農地での微生物群集健全性の評価を行い、生分解性マルチの安全性、適正使用に寄与することを目的としている。

2 実験方法

2-1 栽培試験

宮崎県総合農業試験場内畑地にて、3種類の生分解性マルチ（キエ丸（PBSA系）、耕楽（PCL系）、エコグリーンマルチII（スターチ系））、対照として生分解性のない農業用ポリマルチ（ポリエチレン）を使用して大根の試験栽培を実施した。栽培後はそれぞれのマルチを畑地に鋤き込み、定期的に土壌をサンプリングした。採取した土壌は、小石などを取り除くため2mmのふるいにかけて試験土壌とした。



図1 マルチを使用した栽培風景

2-2 生菌数測定

試験土壌10gを滅菌した生理食塩水90mlに加え、超音波3分、静置1分の工程を3回繰り返す

* 1 資源環境部

* 2 資源環境部（現 産業技術総合研究所関西センター）

た後、懸濁液上清を土壌抽出液とした。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/L）を用いた塗抹平板法により30°C, 48時間培養で行った。

2-3 プラスチック分解試験

2-3-1 乳化培地の作製

生分解性試験の方法は各種生分解性マルチを乳化させた培地に植菌を行い、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その微生物の分解能の評価を行う。このハロー試験においてハローを形成したものをマルチ分解菌と判断し、分離を行うことにした。

まずはじめに、各種生分解性マルチをそれぞれ塩化メチレンに溶解させた後、無機塩組成の培地（KH₂PO₄ 1.0g, K₂PO₄ 1.0g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, NaCl 0.1g, MgSO₄・7H₂O 0.2g, FeSO₄・7H₂O 0.01g, CaCl₂・2H₂O 0.02g, Yeast extract 0.1g Plysurf 0.1g/L）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。この乳化培地に土壌抽出液を塗抹し、ハローを形成したものを分解菌と判断し分離培養を行った。

2-4 分解菌の同定

2-4-1 DNAの抽出

単離出来た分解菌についてタカラバイオ社製DNA抽出キットに供しDNAの抽出を行った。抽出したDNAをテンプレートとし、Primer 5F, 531Rを用いてPCRでDNA断片の増幅を行い、エチジウムブロマイド染色による1.5%アガロースゲル電気泳動（100V, 15分間）で確認を行った。

2-4-2 分解菌の同定

アガロースゲル電気泳動で確認できたPCR産物について、Applied Biosystems社のCycle sequence Kitを用いてサイクルシーケンスを行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerで塩基配列の解析を行った。同様に真菌についても、Applied Biosystems社のMicroSeq D2 rDNA Fungal Kitを用いて塩基配列解析を行った。得られたデータはNCBI BLASTデータベースを用いて分解菌の同定を行った。

2-5 PCR-DGGE法による菌叢解析

定期的にサンプリングした試験土壌についてEPICENTRE Biotechnologies社製Soil Master

DNA Extraction Kitを用いてDNA抽出を行い、GC-Clamp付きPrimer GM5Fと531Rを用いてホットスタートタッチダウン法でPCRを行った。

アクリルアミド濃度は8%, 変性剤濃度40~70%（変性剤100%は7M尿素, 40%ホルムアミドに相当）に調製した。PCR-DGGEには、D code system（Bio Rad社）を用い、泳動条件は、電圧120V, 泳動槽温度60°C, 泳動用緩衝液1×TAEで7時間で行い、菌叢の経時的変化を調査した。

表1 本研究で用いたPrimer sequence

Primer name	Nucleotide Sequence (5' - 3')
5F	TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
GM5F (GC-clamp)	CCTACGGGAGGCAGCAG
531R	TACCGCGGCTGCTGGCAC
GC-clamp	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG

2-6 FISH法を用いた植物病原性分解菌の検出

2-6-1 プローブの設計

ARBのProbe Designを用いて植物病原性分解菌として検出されたVerticillium dahliaeを特異的に検出するプローブの設計を行った。（5' (Cy-3) - AAGAAGTCAGTACTACCCG-3'）プローブにはCy-3を蛍光標識として付加した。

2-6-2 FISH法による検出

FISH法はAmannの方法に準拠して行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー（0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.2), ホルムアミド5%, 0.01% SDS）を試料に滴下し、プローブ溶液を加えて46°Cで2時間ハイブリダイズした。プローブの洗浄は、プローブを含まないハイブリダイゼーションバッファーを用い、48°Cで20分間行った後、存在する全ての菌を検出するためDAPIを用いて全菌染色し、蛍光顕微鏡下で観察を行った。

3 結果および考察

3-1 各マルチ土壌中における生菌数の経時変化

生菌数の測定結果を表2に示す。

季節の変動による菌数の変化は見られたものの生分解性マルチの鋤き込み前後での顕著な菌数増

表2 一般生菌数測定

	キエ丸	耕楽	エコグリーン	農ポリ
4月	4.70E+07	1.10E+08	1.10E+08	6.00E+07
6月	4.90E+06	4.50E+06	5.20E+06	4.30E+06
8月	4.50E+06	9.60E+06	4.30E+06	5.90E+06
10月	2.80E+06	1.10E+07	1.30E+07	2.20E+07

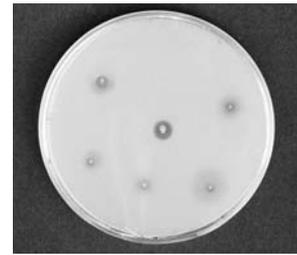


図2 ハロー試験

加は見られなかった。6月から9月にかけて菌数が減少しているのは、雨により微生物が流出したためではないかと考えられた。

3-2 ハロー試験結果

3種類の生分解性マルチを乳化させたプラスチック培地についてハロー試験を行った結果、全ての培地よりマルチ分解菌が検出された。このことより各種マルチ分解菌が土壌に存在することが確認された。

また、キエ丸Mや耕楽に比べ、エコグリーンマルチIIはハローが薄い分解菌が多い傾向が見られた。このことから、エコグリーンマルチIIはキエ丸や耕楽に比べ分解しにくい可能性が示唆された。

3-3 マルチ分解菌の同定

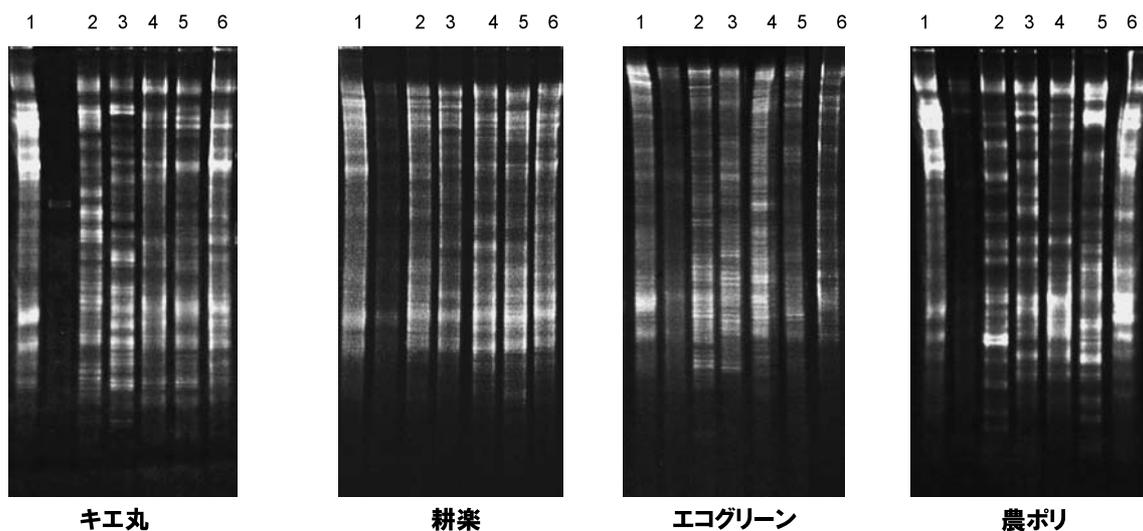
図2のようにハローを形成した菌について純粋分離し、16S-rDNA遺伝子解析を行った結果、キ

エ丸M分解菌として*Bacillus sp.*, *Bacterium sp.*, *Acremonium sp.*, *Verticillium sp.*など、エコグリーンマルチII分解菌としては*Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*など、および耕楽分解菌としては*Roseateles sp.*や*Aspergillus sp.*などが検出された。

3-4 PCR-DGGE法による菌叢解析

図3に生分解性マルチを鋤き込んだ土壌のPCR-DGGE結果を示す。

それぞれ3種類のマルチ鋤き込み前後において、(微生物群のバンドに大きな変化は見られなかった)特定のバンドの蛍光が強くなっていくパターンは見られなかった。このことより、マルチ鋤き込みによって特定の分解菌が優先種となり増加していく可能性が低いことが推察され、マルチ添加による既存の微生物群集への影響は低いと考えられた。



1. 鋤き込み前 2. 鋤き込み直後 3. 鋤き込み2週間後
4. 鋤き込み 1ヶ月後 5. 鋤き込み2ヶ月後 6. 鋤き込み5か月後

図3 PCR-DGGE法による解析結果

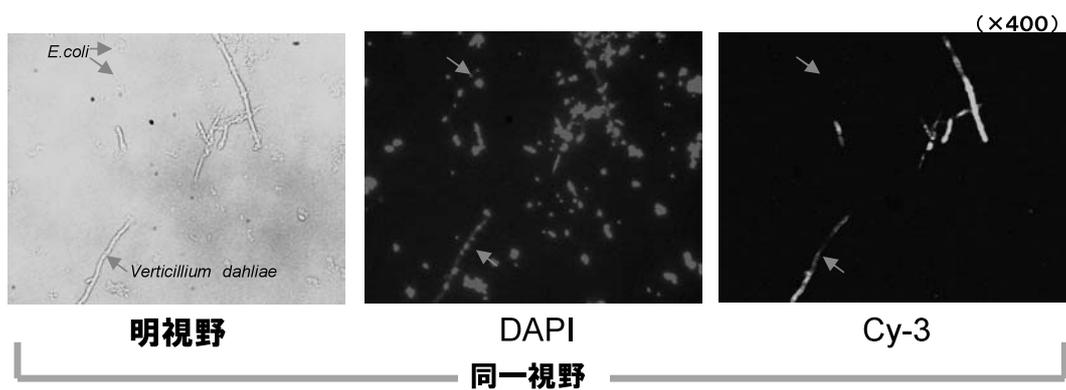


図4 FISH法によるVerticillium dahliaeの検出条件検討

3-5 FISH法を用いた植物病原性分解菌の検出

今回設計したプローブを用いて *Verticillium dahliae* の検出を試みた。まず、プローブの選択性を確認するため、単菌の *E. coli* (ネガティブコントロール) と *Verticillium dahliae* (ポジティブコントロール) を混合したものをサンプルとし観察を行った。その結果、図4のBのように全菌染色のDAPI視野では *Verticillium dahliae* と *E. coli* どちらの菌も観察されているのに対し、プローブの蛍光色素Cy-3視野では、*Verticillium dahliae* のみが光っていることが確認された。このことより、今回、設計を行ったプローブの選択性が確認された。

4 まとめ

- 1) 生菌数測定の結果、生分解性マルチ鋤き込み前後での菌数の増加は見られなかった。
- 2) ハロー試験の結果より、各種マルチにおいて分解菌を確認することができた。キエ丸Mや耕楽に比べ、エコグリーンマルチIIはハローが薄いものが多い、キエ丸や耕楽に比べエコグリーンマルチIIは分解しにくいことが推察された。
- 3) 分解菌の同定結果より、数種類の生分解性マルチ分解菌が明らかになり、以前実施していた生分解性プラスチック分解菌と同一のものも検出された。
- 4) PCR-DGGE法による解析の結果、鋤き込み前後において微生物のバンドに大きな変化はみられないことから特定の菌のみが増加していく傾

向は低いことが示唆された。

- 5) FISH法での条件検討の結果、*Verticillium dahliae* のみに結合するプローブの選択性の確認ができた。

5 参考文献

- 1) Muyzer G, de Waal EC. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Mar;59 (3) :695-700.
- 2) Amann, R.I, Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 1992 Sep;58 (9) :3007-3011.
- 3) 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, 48, 9 (2003)
- 4) 鮫島暁子, 藤田芳和, 友行真美子, 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, 49, 9 (2004)