

生分解性マルチ使用による土壤微生物への影響評価*

里岡 嘉宏*¹・溝添 暁子*¹・中田 一則*¹

The Effect of Biodegradable Plastic Film for Mulching Injection to Soil Microbe

Yoshihiro SATOOKA, Akiko MIZOZOE and Kazunori NAKATA

農地において生分解性マルチフィルム（以下 生分解性マルチ）を継続的に使用した場合の土壤環境微生物への影響を調査するため、昨年から継続して3種類の生分解性マルチを使用した作物栽培試験を実施し、土壤環境中における微生物群集の健全性評価を行った。その結果、すべての生分解性マルチについて分解菌が検出されたが、PCR-DGGE法による微生物群集解析の結果では土壤中の微生物叢への影響は低いと推察された。

キーワード：生分解性マルチフィルム、微生物、土壤、PCR-DGGE法

1 はじめに

現在、農業等ではポリエチレン系等のマルチフィルムが主に使用されているが、使用後の回収作業や廃棄処分が不要な生分解性マルチが注目されている。しかしながら、生分解性資材はそれらの資化過程において土壤微生物への影響が指摘されており、特に、農地においては、生分解性マルチなどを継続的に使用するため、長期的、局所的に投入した場合に分解菌の増大が土壤環境微生物叢のバランスを崩し、作物や家畜など生態系への影響が懸念されている。

本研究は、平成18年度から20年度までの3年間、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「生分解性資材の持続的投入を受ける土壤環境の健全性維持管理システムの構築に関する研究」として、産業技術総合研究所関西センターを中心に、大阪府立産業技術総合研究所、大阪市立工業研究所と共同で実施している。

今年度も、宮崎県総合農業試験場野菜部の協力を得て昨年と同じ畑地で生分解性マルチを使用した栽培試験を実施し、土壤環境中における微生物群集の健全性評価を行った。

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）、テラマック（ポリ乳酸系）、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）を使用してスイートコーン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、定期的に土壤をサンプリングした。採取した土壤は、小石などを取り除くためフルイにかけ試験土壤とした。



写真1 栽培試験の状況

2-2 生菌数測定

2-2-1 土壤試験液の作製

乾燥重量10 g相当の試験土壤を滅菌した生理食

* 生分解性資材投入における土壤微生物への影響評価（第2報）

*1 資源環境部

塩水90 mlに加え、超音波1分、氷冷静置3分を3回繰り返して抽出した後、懸濁液上清を分取し土壤試験液とした。

2-2-2 測定方法

標準寒天培地（酵母エキス2.5 g、ペプトン5.0 g、ブドウ糖1.0 g、寒天15.0 g/L）を用いた混釈法により30°C48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

生分解性マルチを塩化メチレンに溶解させ、無機塩組成の培地（KH₂P₄O₄ 1.0 g K₂P₄O₄ 1.0 g (NH₄)₂S₄O₄ 1.0 g NaCl 0.1 g MgSO₄・7H₂O 0.2 g FeSO₄・7H₂O 0.01 g CaCl₂・2H₂O 0.02 g Yeast extract 0.1 g Plysurf 0.1 g/L）に加えて攪拌して乳化させた後、溶媒を蒸散させて作製した。

2-3-2 試験方法

乳化培地に土壤試験液を希釈塗抹し、30°Cで培養後、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分解菌を判別した。

2-4 土壤微生物群集解析

2-4-1 土壤からのDNA抽出

各栽培試験区画から定期的にサンプリングした試料土壌について、Isoil for Beads Beating Kit (NIPPON GENE 社製)を用いてDNA抽出を行った。しかし、試験土壌はアロフェン質の黒ボク土壌であるため、KitのLysis Solution BBにスキムミルク20mg/サンプルを添加し、プロトコールに従って抽出操作を実施した。

2-4-2 DGGEサンプルの調製

上記により試料土壌から抽出したDNAサンプルについて、16SrDNA増幅用に5Fと907Rのプライマーを用いてPCRを行った後、V3領域を対象としてGC-Clamp付き341Fと534Rのプライマーを用いてHot Start Touchdown法でNested PCRを行いDGGE用サンプルとした。

2-4-3 PCR-DGGE法

DGGE電気泳動装置はD-Code system(Bio Rad社)を用いた。変性剤濃度勾配35~65%（変性剤100%は7M尿素、40%ホルムアミドに相当）の8%ポリアクリルアミドゲルを作製して、60°C、60V、16.5hrの条件でDGGE電気泳動を行った。泳動後、SYBR-

Green I (Lonza社)を用いてUV検出したバンドを比較することで菌叢の経時的变化を調査した。

Primer name	Nucleotide Sequence(5'-3')
5F	TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
341F(GC-clamp)	CCTACGGGAGGCAGCAG
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG
907R	CCCGTCAATTCCTTTGAGTTT

GC-clamp

CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGGCAGGGGGG

表1 本研究で用いたプライマー

3 結果および考察

3-1 生菌数測定結果

図2に示すとおり、生菌数は昨年の栽培試験開始時が最も多く、両年度とも10月に増加する傾向が見られた。この傾向は、各マルチ及び対照区ともほぼ同様な傾向を示しており、これは季節的変動によると考えられる。また、作物栽培終了後のマルチフィルム鋤込みに起因すると思われる生菌数の増減は見られなかった。

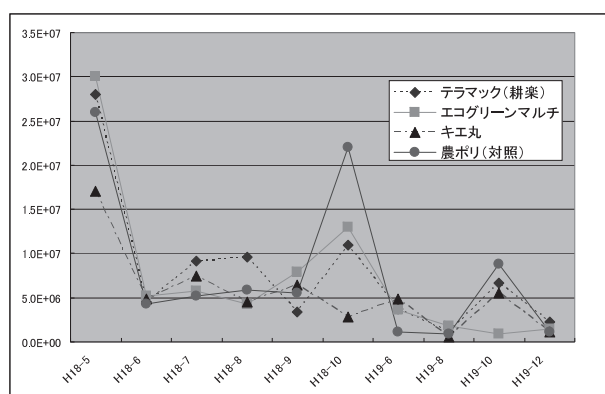


図1 生菌数測定結果

3-2 プラスチック分解試験結果

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分解試験を行った結果、全ての培地よりハローが検出され、分解菌の存在が確認された。キエ丸(PBSA系)とエコグリーンマルチII(スターチ系)は鋤込み後にフィルムが分解されるのを確認できたが、テラマック(PLA系)はフィルムの崩壊が遅く、他の2種類のマルチに

比較して分解されにくいことが確認された。

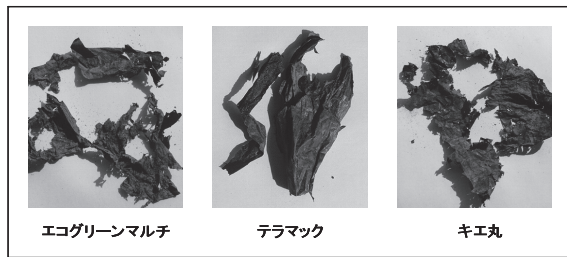


写真2 生分解マルチの分解状況

3-3 土壌微生物群集解析結果

PCR-DGGE法により昨年度の栽培試験開始時からの土壌微生物叢の変化を調べた結果を図3に示す。各マルチ試験区とも特定のバンドの蛍光が強くなっていくパターン変化は見られなかったことから、生分解性マルチの使用により土壌中で特定の分解菌が増加していく可能性が低いことが推察された。これまでの試験では生分解性マルチ投入による既存の微生物群集への影響は低いと考えられる。

4 まとめ

- 1) 生菌数測定の結果、生分解性マルチ分解によると思われる菌数の増減は見られなかった。
- 2) プラスチック分解試験の結果、各マルチにおいて分解菌を検出したが、テラマック（PLA系）はフィルムの崩壊が遅く、他の2種類のマルチに比較して分解されにくいことが確認された。
- 3) 微生物群集解析の結果、生分解性マルチ投入による既存の微生物群集への影響は低いと考えられる。

5 参考文献

- 1) 鮫島暁子, 藤田芳和, 友行眞美子, 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)
- 2) 地頭所眞美子, 溝添暁子, 里岡嘉宏, 中田, 一則, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 51, 9(2006)

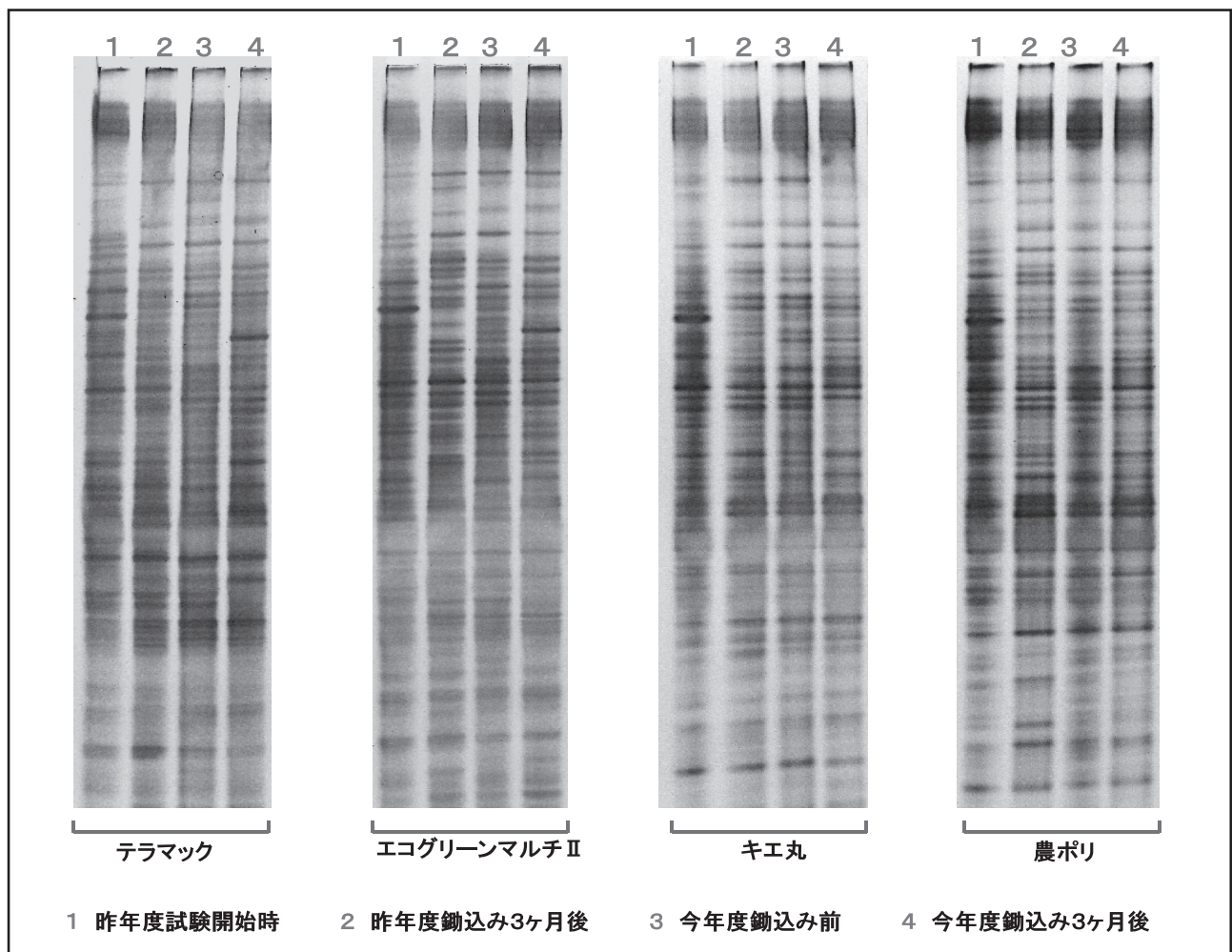


図2 PCR-DGGE法による解析結果