

生分解性マルチ使用による土壌微生物への影響評価

里岡 嘉宏^{*1}・鬼塚 浩子^{*2}・溝添 暁子^{*1}・中田 一則^{*1}

Influence of Biodegradable Agricultural Films to Soil Microbes

Yoshihiro SATOOKA, Hiroko ONITSUKA, 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）を長期間、継続使用した場合の土壌環境微生物への影響を調査するため、生分解性マルチを使用した作物栽培試験を3年間継続して実施し、土壌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。また、PCR-DGGE法による微生物群集解析の結果からは土壌中の微生物叢への影響は低いと推察されたが、マルチ表面土壌とバルク土壌で微生物叢に違いが認められた。

キーワード：生分解性マルチ，微生物，土壌，PCR-DGGE法

1 はじめに

生分解性資材はそれらの資化過程において土壌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壌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。

当センターでは、平成11年度から生分解性プラスチックのフィールドテストおよび分解菌の検索を実施してきたが、引き続き平成18年度から20年度までの3年間、当県総合農業試験場野菜部の協力を得て、同一畑地で生分解性マルチを使用した栽培試験を継続実施し、土壌環境中における微生物群集の長期的な健全性評価を行ったので、その結果を報告する。

なお、本研究では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壌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た。

2 実験方法

2-1 栽培試験

実環境での長期評価を行うため、当県総合農業試験場内畑地で3年間継続して栽培試験を実施した。試験には4種類の生分解性マルチ（キエ丸（PBS系）、耕楽（PCL系）、テラマック（PLA系）、エコグリーンマルチ（スターチ系））、および対照として生分解性でない農業用ポリマルチ（ポリエチレン）を使用した。平成18年度は大根を栽培し、平成19年度および平成20年度はスイートコーンを同一区画で試験栽培した。栽培後はそれぞれのマルチを畑地に鋤き込み、定期的に各試験区画土壌をサンプリングして試験土壌とした。



図1 栽培試験の状況

2-2 生菌数測定

2-2-1 土壌試験液の作製

乾燥重量10g相当の試験土壌を滅菌した生理食塩水90ml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壌試験液とした。

* 生分解マルチ使用による土壌微生物への影響評価（第3報）

*1 資源環境部

*2 前 資源環境部 非常勤職員

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) を用いて混釈法により30 で48時間培養した。

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し、無機塩組成の培地 (KH₂PO₄ 1.0 g K₂PO₄ 1.0 g (NH₄)₂SO₄ 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、かくはん乳化後、溶媒を蒸散させて作製した。

2-3-2 判別方法

乳化培地に土壤試験液を希釈塗抹し、30 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) の有無で分解菌を判別した。

2-4 分解菌の検索

2-4-1 DNAサンプルの調製

分離培養を繰り返して単離した分解菌から、InstaGene Matrix kit (BIO-RAD社製) によりDNAテンプレートを調製し、16SrDNAをターゲットにPrimer 5Fおよび531Rを用いてPCRにより増幅した後、アガロース電気泳動 (エチプロ染色) によりDNAの増幅を確認してDNAサンプルとした。

また、PCR-DGGE法を実施後のDNAサンプル調製は、目的のバンドをゲルから切り出し凍結融解後、DNAを再抽出し、MICROCON (Millipore社製) を用いて精製した。

2-4-2 シーケンス解析

調製したDNAサンプルをテンプレートとしてCycle Sequence Kit (Applied Biosystems社製) を用いてサイクルシーケンス後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerで塩基配列の解析を行った。得られたデータはNCBI BLASTデータベースを用いて分解菌の検索を行った。

2-4-3 系統解析

検索した分解菌についてClustal W (DDBJ : 日本DNAデータベース) を利用して系統解析を行った。

2-5 土壤微生物群集解析

2-5-1 土壤試料からのDNA抽出

各栽培試験区画から定期的にサンプリングしたバルク土壌およびフィルム表面土壌について、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 Solusion 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。

2-5-2 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、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。

2-5-3 PCR-DGGE法

DGGE電気泳動装置はD-Code sysem (Bio Rad社製) 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 , 60V, 16.5hrの条件でDGGE電気泳動を行った。泳動後、SYBR-Green (Lonza社製) 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変化を調査した。

表1 本研究で用いたプライマー

Primer name	Nucleotide Sequence(5'-3')
5F	TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG
531R	TACCGCGGCTGCTGGCAC
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG
907R	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT

GC-clamp

CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGG

3 結果および考察

3-1 生菌数試験結果

土壌中の生菌数は栽培試験開始時が最も多く、平成18年度および平成19年度は10月に、平成20年度は7月に増加する傾向が見られた。(図2) この傾向は、各マルチおよび対照区ともほぼ同様な

傾向を示しており、季節変化や鋤込み、マルチの有無、平均地温、土壤水分等の要因が考えられたが特定できなかった。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。

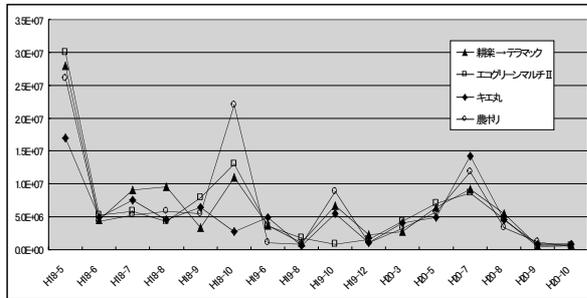


図2 土壤中の生菌数変化

3-2 生分解性プラスチック分解試験結果

全ての乳化培地でハローが検出され、それぞれの生分解性マルチについて分解菌の存在が確認された。キエ丸 (PBS系) および耕楽 (PCL系), エコグリーンマルチ (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、他のマルチに比較して分解されにくいと思われた。

3-3 分解菌の検索結果

Burkholderia属およびRalstonia属の菌が最も多く検出され、その他にAcinetobacter属, Enterobacter属, Pseudomonas属などが検出された。生分解性プラスチックとしては、PCL乳化培地から最も多くの分解菌が検出された。(表2)

また、シーケンス解析の結果をもとに、主な分解菌について系統解析を実施して類縁関係を推定した。(図3)

表2 各培地から検出された分解菌

PCL	PBS	スターチ	属名
●			<i>Acinetobacter</i> sp.
	●		<i>Acidovorax</i> sp.
	●		<i>Agrobacterium</i> sp.
		●	<i>Aquabacterium</i> sp.
●			<i>Arthrobacter</i> sp.
●	●	●	<i>Burkholderia</i> sp.
●		●	<i>Enterobacter</i> sp.
●			<i>Herbaspirillum</i> sp.
●			<i>Klebsiella</i> sp.
●			<i>Pseudomonas</i> sp.
●			<i>Ralstonia</i> sp.
●	●		<i>Roseateles</i> sp.

3-4 土壤微生物群集解析結果

PCR-DGGE法により栽培試験開始時から3年間の土壤微生物叢の変化を調べた結果、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バンドパターンの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壤中で特定の分解菌が増加していく可能性は低いことが推察された。以上の結果より、生分解性マルチ使用による既存の土壤微生物群集への影響は低いと考えられる。しかし、バルク土壌とフィルム表面土壌では、バンドパターンに違いが認められ(図5)、微生物叢に違いがあることが推定されたことから、生分解性資材の大量長期使用による土壤微生物叢への影響について、さらに調査が必要と思われる。

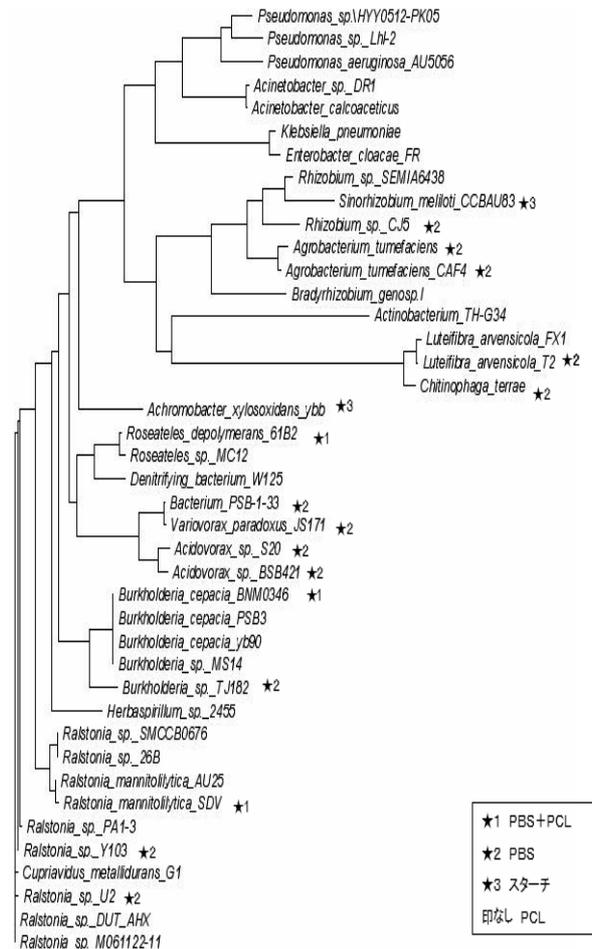


図3 主な分解菌の系統解析結果

4 まとめ

1) 土壤中の生菌数測定結果では、各年度とも栽培期間中に生菌数の増減が見られたが、生分解性プラスチックの分解によると思われる菌数の

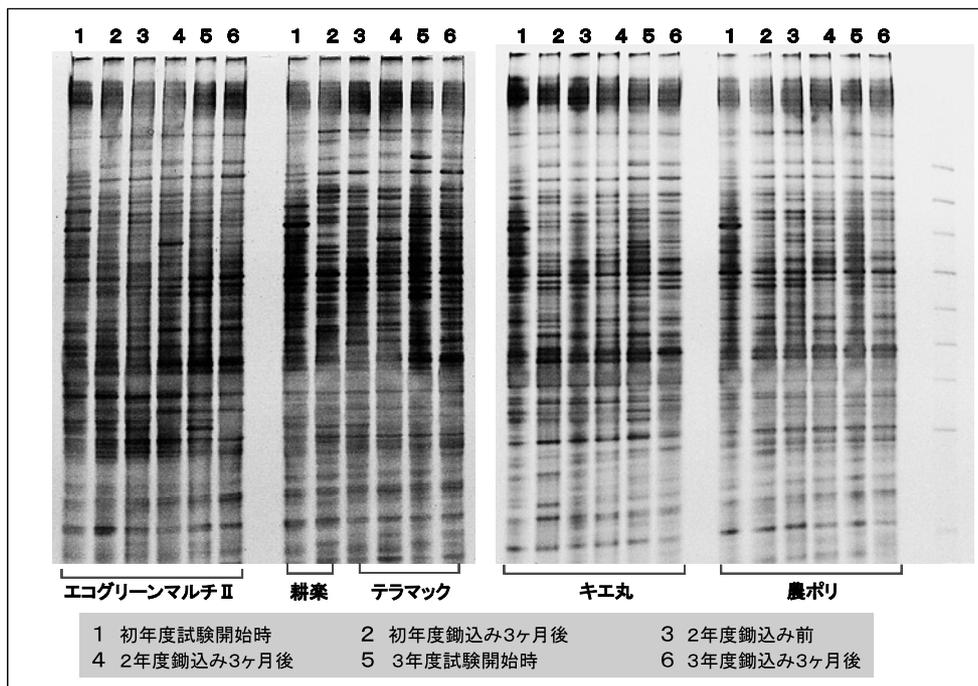


図4 PCR-DGGE法による土壌微生物叢解析結果（3年間）

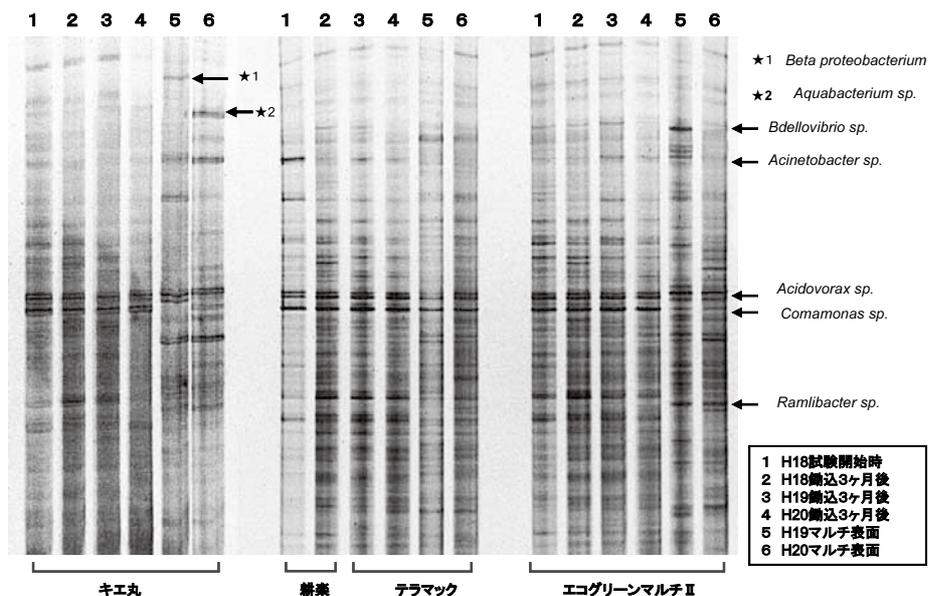


図5 PCR-DGGE法によるフィルム表面土壌との比較

増減は認められなかった。

- 2) プラスチック分解試験の結果，すべての培地から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3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) 分解菌としては，*Burkholderia*属および*Ralstonia*属の菌が最も多く検出された。
- 4) 微生物群集解析の結果，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バンドパ

ターンの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。しかし，バルク土壌とフィルム表面土壌では，微生物叢に違いが認められた。

5 参考文献

- 1) 里岡嘉宏，溝添暁子，中田一則，宮崎県工業技術センター研究報告，52，7-9（2007）