

土壌における各種生分解プラスチック分解菌の定量

福田和弘*

抄 録

各種生分解性プラスチックの土壌中での生分解性を予測する技術を確立するため、共同研究（独立行政法人産業技術総合研究所関西センターよりの委託研究）の一環として、平成14年度から平成16年度にかけて徳島県下の土壌について年2回採取し、当該土壌の微生物叢の検討及び5種類の生分解性プラスチック分解菌の定量を行った。供試土壌（徳島県農林水産総合支援センター農業研究所の畑地）中の微生物は、細菌及び放線菌が主体で糸状菌は少なかった。供試生分解性プラスチックの分解菌数は、3-ヒドロキシ酪酸（PHB）>ポリ-ε-カプロラクトン（PCL）>ポリエステルカーボネート（PEC）>ポリブチレンサクシネート・アジペート（PBSA）>ポリL-乳酸（PLLA(分子量10万)）の順で多かった。

1 はじめに

近年、環境低負荷材料として非常に注目されている生分解性プラスチックは、使用時は従来のプラスチックと同じ様な機能を保ち、使用後は自然界の土や水中に生息する微生物の働きによって、環境に悪影響を与えない低分子化合物に分解され、最終的には水や二酸化炭素に分解される高分子素材であると定義されている¹⁾。現在、様々な当該プラスチックが開発、上市されているものの、それらの環境中での分解に関与する微生物についてのデータは乏しく、体系化されていない。折しも平成11年度～13年度には、産業技術連携推進会議物質工学部会の高分子分科会において、地方公設試の共同研究として、「生分解性プラスチックの全国フィールドテスト」が実施され、各分担土壌中での各種生分解性プラスチックの分解性が調べられた。さらに、その成果をもとに、当該土壌を主な対象として土壌微生物の分析等を行い、土壌中での分解性を的確に予測することを目的とした環境省よりの委託研究「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」（平成14年度～16年度）が、独立行政法人産業技術総合研究所を中心に当センターを含めた11の地方公設試が参画した共同研究として実施された。

今回は、当センターが担当した土壌の微生物叢及び各種生分解性プラスチック分解菌の定量結果につ

いて報告する。

2 方法

2・1 供試土壌及び試料の調製

供試土壌は、以前実施した生分解性プラスチックフィールド試験²⁾にて、土壌埋設試験を行った箇所（徳島県農林水産総合支援センター農業研究所の畑地：写真1）から採取した（年2回、春及び秋）。なお、採取時は以下の点に注意した。

- ・ 採取日は雨が頻繁に降っている時は避ける。降雨があった場合は、できるだけ2日後以降。
- ・ 土壌は不均一なので、数カ所から採取し混合する。
- ・ 採取場所は、プラスチックを埋めていた近傍で地表から5-10cm。
- ・ 運搬までの保存は低温（4℃）で行う。



写真1 土壌採取箇所（星印）

供試試料（土壌懸濁液）の調製は、土壌を10メッシュのふるいを通した後、滅菌した生理食塩水90mlに土壌10gを加え、攪拌、懸濁後、1分間の超音波処理（3回）にて分散、1分静置後、その上清をさらに順次

*食品技術課

10 倍希釈し、各希釈段の土壌懸濁液とした。

2・2 供試生分解性プラスチック

以下に示した生分解性プラスチックの乳化液及び粉末を用いた。なお、乳化液は、独立行政法人産業技術総合研究所関西センターにて調製(0.01%プライサーフ水溶液に供試プラスチックのジクロロメタン溶液(最終濃度 0.1%)を加え、溶媒を留去した乳化液)されたものを用いた。

- ・3-ヒドロキシ酪酸(PHB,アルドリッチ社製)粉末
- ・ポリ-ε-カプロラクトン(PCL,和光純薬社製)乳化液
- ・ポリエステルカーボネート(PEC,三菱ガス化学社製)乳化液
- ・ポリブチレンサクシネート・アジペート(PBSA,昭和高分子・昭和電工社製)乳化液
- ・ポリ-L-乳酸(PLLA,高分子量(10万):島津製作所社製)粉末及び(PLLA 低分子量(5,000):ナカライテスク社製)乳化液

2・3 一般微生物及び供試生分解性プラスチック分解菌の定量

(1) 一般微生物の測定

供試土壌中の細菌、放線菌及び糸状菌の定量には、以下に示した培地を用いて、適宜希釈した土壌抽出液を試料として混釈培養法にて 25℃, 所定の期間培養後、計数した。

細菌：普通寒天培地(日水製薬社製)

糸状菌：ストレプトマイシン添加ポテトデキストロース寒天培地(ポテトデキストロース寒天培地(日水製薬社製)をオートクレーブ滅菌した後、滅菌済 0.22 フィルターでろ過滅菌したストレプトマイシン(和光純薬社製)水溶液を最終濃度 30ppm となるよう無菌的に添加した。)

放線菌：シクロヘキシミド添加 Bacto Actinomycete Isolation Agar (Bacto Actinomycete Isolation Agar (Difco 社製)に最終濃度としてグリセロール(和光純薬社製)が 0.5%, シクロヘキシミド(和光純薬社製) 50ppm となるよう添加し、121℃, 15分オートクレーブ滅菌した。)

(2) 生分解性プラスチック分解菌の定量

供試培地は、供試プラスチック乳化液もしくは粉末、酵母エキス(Difco 社製)、Bacto Agar(Difco 社製)及び無機塩類(下記 A,B,C 液を希釈)を表 1 の配合例にて調製した。

- ・ A 液(50 倍濃縮)

KH_2PO_4 5g

K_2HPO_4 5g
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g / 100ml

- ・ B 液(100 倍濃縮)

NaCl 1g
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2g / 100ml

- ・ C 液(100 倍濃縮)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g / 100ml

表 1 供試プラスチック培地配合例(250ml 用)

	乳化液	粉末
A 液	5ml	5ml
B 液	2.5ml	2.5ml
C 液	2.5ml	2.5ml
Yeast extract	25mg	25mg
Bacto Agar	5g	5g
乳化液	250ml	-
粉末	-	750mg
蒸留水	-	250ml

各プラスチック培地に適宜希釈した土壌懸濁液を 0.1ml ずつ各希釈(3 段階)3 枚、計 9 枚のプレートにコンラージ棒にて塗布した。いずれのプレートも 25℃ で所定の日数培養し、分解菌は、供試プラスチック培地で出現したコロニーの中でハロー形成菌として計数した。

3 結果及び考察

3・1 供試土壌の一般微生物

図 1 に平成 14 年春の供試土壌中(1 g 乾燥土壌換算)の一般微生物数を示した。

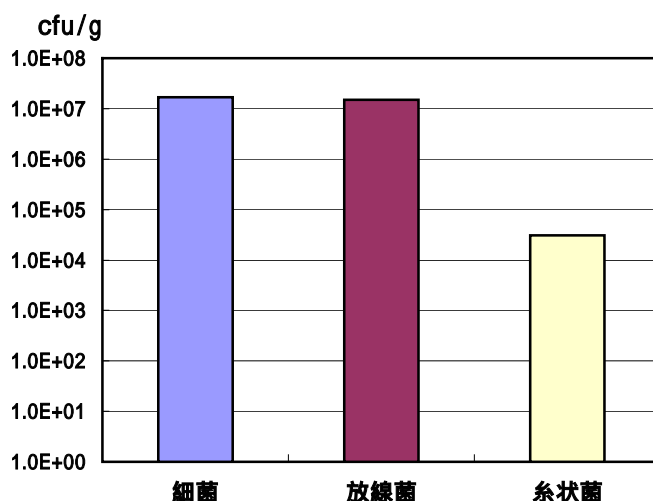


図 1 供試土壌中の一般微生物数(平成 14 年春)

当該土壌については、同年度の秋にも同様に微生物数を測定したところ、若干総菌数が減少(細菌; 4.7×10^6 cfu/g, 放線菌; 4.6×10^6 cfu/g 及び糸状菌; 8.6×10^3 cfu/g)したものの、検出された微生物種の比率はほぼ変化無く、糸状菌は少なく、細菌と放線菌が主体の土壌であった。

3・2 分解菌

写真2～5は、比較的明瞭なハローが確認できた各種生分解性プラスチック培地での培養14日目のハロー形成(写真ではグレー部)を示した。

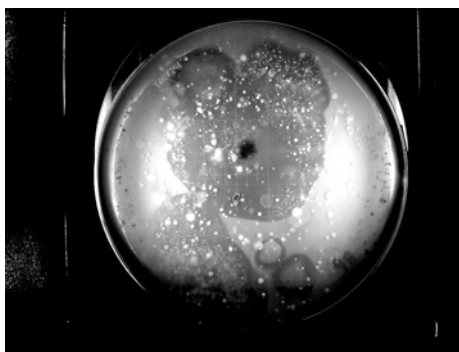


写真2 PBSA 培地



写真3 PHB 培地

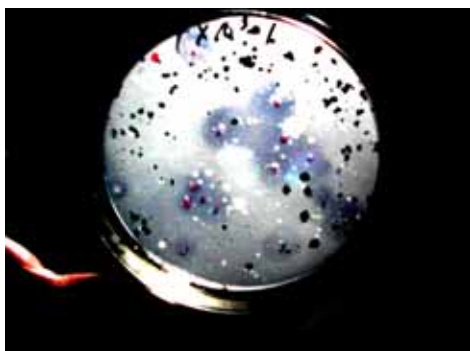


写真4 PCL 培地

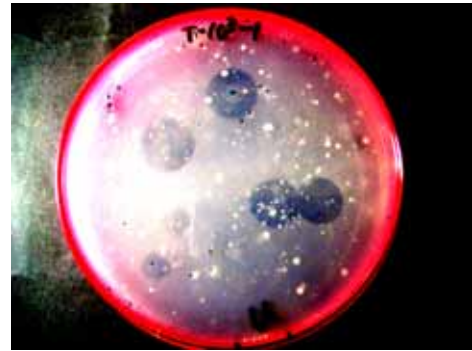


写真5 PEC 培地

なお、ここには示していないが、ポリ乳酸として通常いられている PLLA (NMW; 分子量 10 万) については、明瞭なハローを確認することができなかったものの低分子量 (5000) では、やや不明瞭ながらもハローが計数できた (1.7×10^5 cfu/g)。

供試プラスチックによっては、乳化液の濁度等により背景の濃淡が生じ、ハロー形成が確認しづらい場合があった。さらに、培養日数や分解菌によっても、隣接するハローの重なりもしくは明瞭さの強弱が認められ、正確なハロー計数には培養3日以降4週間毎日でもプレート観察した方が良いと考えられた。また、ハロー形成菌の種類については、コロニーの形状等からいずれの供試プラスチックにおいても放線菌もしくは細菌が主体であったが、PCL 及び PHB ではカビ類も認められた。

図2に示した様に、供試プラスチックの分解菌数(ハロー検出数)は、PHB > PCL > PEC > PBSA > PLLA の順に多かった。なお、PLLA は、フィールドテスト等との比較も考え高分子量(10万)の結果を示した。

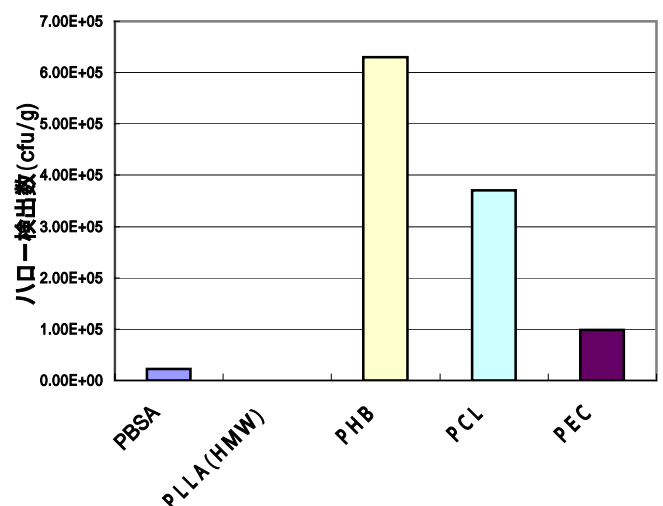


図2 各種生分解性プラスチック培地でのハロー数

ちなみに各種生分解プラスチックフィルム片を担当土壤に埋設し、その重量保持率(減少率)を測定したフィールドテスト²⁾においては、今回の供試プラスチック素材のフィルム重量減少率は、バイオグリーン(PHB) > セルグリーン(PCL) > ビオノーレ(PBSA) > ユーベック(PEC) > レイシア(PLLA)の順に大きかった。このことから、今回実施した土壤中の当該プラスチック分解菌数の結果は、PBSAとPECで順序が異なるが、ほぼフィールド試験結果と一致し、分解には土壤微生物の関与が示唆された。

4 まとめ

各種生分解性プラスチックの土壤中での生分解性を予測する技術を確立するため、平成14年度から平成16年度にかけて徳島県下の土壤について年2回採取し、当該土壤の微生物叢及び5種類の生分解性プラスチック分解菌の定量を行い、以下の結果を得た。

(1) 供試土壤(徳島県農林水産総合支援センター農業研究所の畑地)中の微生物は、細菌及び放線菌が主体で糸状菌は少なかった。

(2) 供試生分解性プラスチックの分解菌数は、PHB > PCL > PEC > PBSA > PLLA(分子量10万)の順で多かった。

謝辞

本研究は、「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」事業の一部として行った。実施にあたり、取りまとめ実施機関の責任者として御指導いただいた独立行政法人産業技術総合研究所主任研究員中山敦好氏に感謝いたします。また、土壤採取にあたりお世話いただきました徳島県農林水産総合技術支援センター農業研究所栽培育種担当科長板東一宏氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) 土肥義治 編:「生分解性プラスチックのおはなし」,日本規格協会(1992)
- 2) 正木孝二・新居佳孝・福田和弘・井内晃:「生分解性プラスチックの分解性の評価方法の確立」,徳島県立工業技術センター研究報告,9, pp21-24(2000).