

# 生分解性プラスチック分解菌の水系生息調査研究

化学環境室 森 文彦, 海老原 昇, 上原 健  
食品化学部 田中 正男

## Investigation and Study of Microorganisms Degrading Biodegradable Plastics in Water Environment of Chiba Prefecture

Fumihiko MORI, Noboru EBIHARA, Ken UEHARA and Masao TANAKA

独立行政法人 産業技術総合研究所と協力して、県内4カ所の水域で生分解性プラスチックの分解性と生息する分解菌数を調査した。また、得られた菌のうち、有望と考えられるものに関して単離し、分解活性を調べるとともに菌種の同定を試みた。その結果、水域中に浸漬した生分解プラスチックシートのうち、スターチ系であるマタービー、微生物産生系であるバイオポールは分解性が比較的速く、乳酸系のレイシア、カーボネート系のユーペックは分解が極めて遅いこと、分解菌数は手賀沼が他に比べて10倍程度多く、分解菌は淡水湖沼や河川等で多いこと、一部の菌は複数の種類のプラスチックを分解する活性を有することなどの結果が得られた。

### 1. はじめに

生分解性プラスチックは、自然界に生息する微生物によって分解するプラスチックである<sup>1)</sup>。今後、環境に負荷を与えない有望な工業材料として、その生産量の増大が予想されるが、その分解菌の種類や生息状況について分かっていない点も多い。

当研究所では平成14年度から平成16年度に産総研関西センター(AIST)の実施する全国土壌の生分解菌データベース作成に関する共同研究に参加し、県内土壌の調査研究を実施してきたが、今回、AISTと協力して県内の水系(海水、淡水)における生分解性プラスチックの分解性や分解菌の生息状況・菌種についても調査・研究を行なったので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 採水及びプラスチック試験片の浸漬

- ①新富津漁港のり養殖場 (海水系)  
千葉県富津市沖 以後「富津沖」と略す。
- ②千葉中央港湾内 (海水系)  
千葉県千葉市 以後「千葉港」と略す。
- ③手賀沼我孫子市手賀沼公園沖 (淡水系)  
千葉県我孫子市 以後「手賀沼」と略す。
- ④市原市平蔵一般廃棄物最終処分場 集水ピット (その他)  
千葉県市原市 以後「平蔵」と略す。

以上4カ所の水域に生息する生分解プラスチック分解菌について調査するため、平成17年12月8日、9日に1000mlの試験水を採取した。また、表1

表1 生分解プラスチック種類(6種)

品名	品名略号	物質名略号	物質名
ビオノーレ	BN	PBSA	ポリ(ブチレンサクシネート・アジペート)
セルグリーン	CG	PCL	ポリカプロラクトン
マタービー	MT		デンプンとポリカプロラクトンのアロイ
ユーペック	IP	PBSC	ポリ(ブチレンサクシネート・カーボネート)
レイシア	LA	PLA	ポリ乳酸
バイオポール	BP	PHB/V	ポリ(3-ヒドロキシ酪酸・3-ヒドロキシ吉草酸)

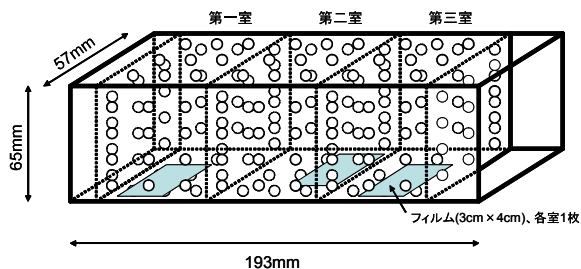


図 1 試料ケース

に示す6種の生分解性プラスチックシート(30mm×40mm)の重量を測定し、図1のケースの各試料室に1枚ずつこのシートを収納したものを浸漬地点ごとに各4セット用意した。これをケースごと試験地点の水中1~2mの深さに浸漬し、2週間、4週間後に各2セットずつ引き上げ、シートの重量を測定して試験後の残存量を水洗・風乾後、調査した。

## 2.2 分解菌数の測定

炭素源としてPBSA, PCL, PHBを用いた平板培地に試験水0.1mlを塗布して、ポリマーの分解によって形成されるハローの菌数を計測した。

## 2.3 分解菌種の同定

菌数測定時に明瞭で大きなハローを形成した16菌株についてPBSA, PCL, PHBの3つの培地に植菌して菌を単離するとともに、この3種のプラスチックに対するハローの大きさによって分解活性を調べた。

16菌株をLB培地上で増殖させて、シーケンス用の菌体とした。

LB培地から1~2白金耳を掻き取り、DNAを抽出し、16s rRNAをPCR増幅した後、TAクローニングを行い、得られたクローンからDNAを精製して塩基配列を調べた。得られた結果をNIAS DNA

表 2 試験時の気象条件

1 週目

	富津	千葉港	手賀沼	平蔵
浸漬日	12/8	12/9	12/9	12/8
天候	晴れ	曇り	曇り	晴れ
気温(°C)	21.0	13.0	10.0	16.0
水温(°C)	16.0	17.0	10.0	20.0

2 週目

	富津	千葉港	手賀沼	平蔵
採取日	12/22	12/24	12/24	12/22
天候	晴れ	晴れ	晴れ	晴れ
気温(°C)	12.0	6.0	11.5	14.0
水温(°C)	15.5	14.5	8.0	19.5

4 週目

	富津	千葉港	手賀沼	平蔵
採取日	1/7	1/5	1/5	1/5
天候	晴れ	晴れ	晴れ	晴れ
気温(°C)	8.0	4.0	6.0	6.0
水温(°C)	11.5	16.0	3.0	15.0

Bank Homology Search Servicesにてホモロジー検索を行い分解菌の属を調べた。

## 3. 結果

### 3.1 浸漬状況と試験水の水質

試験片の浸漬は、海水系2カ所、淡水系1カ所、その他1カ所で試験を実施し、海水系に関しては、海水の清浄度の差との関係を調べるため、湾口(富津沖)、湾内(千葉港)を試験地点として選定した。淡水系に関しては、汚濁が進んでいる湖沼と知られる手賀沼を選定し、その他として炭素源が多いと考えられる廃棄物処分場の集水ピットにおいて試験を実施した。4試験地での試験水の採取と試験片の浸漬は、平成17年12月8日、9日に

表 3 試験水の水質

	富津	千葉港	手賀沼	平蔵
pH	8.05	7.92	8.18	7.12
EC (mS/cm)	47.3	46.6	0.415	7.15
TC (ppm)	24.8	27.4	18.1	46.3
IC (ppm)	24.2	25.4	14.1	32.2
TOC (ppm)	0.6	2.0	4.0	14.1
塩濃度 (%)	35.0	32.5	0	5.0

EC : 電気伝導度

TC : 全炭素

IC : 無機炭素

TOC : 全有機炭素



写真1 試験地(富津)の遠景(左), 試験片の設置状況(右)



写真2 試験地(千葉港)の遠景(左), 試験片の設置状況(右)



写真3 試験地(手賀沼)の遠景(左), 試験片の設置状況(右)



写真4 試験地(平蔵)の遠景(左), 試験片の設置状況(右)

各写真中のシートの並びは、各列左よりビオノーレ、セルグリーン、マタービー、ユーベック、レイシア、バイオボールの順、各写真中の上下は2枚取り出した同種の試験片をである。

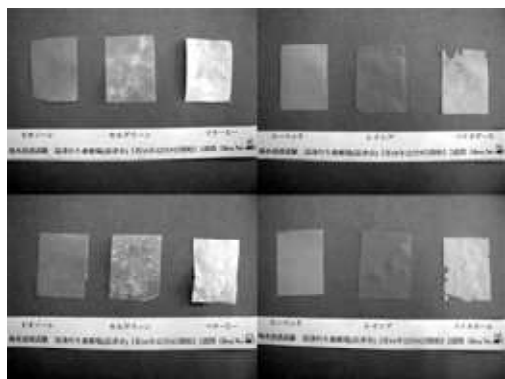


写真5 浸漬した試験片の状態，富津沖2週間後(左)，4週間後(右)

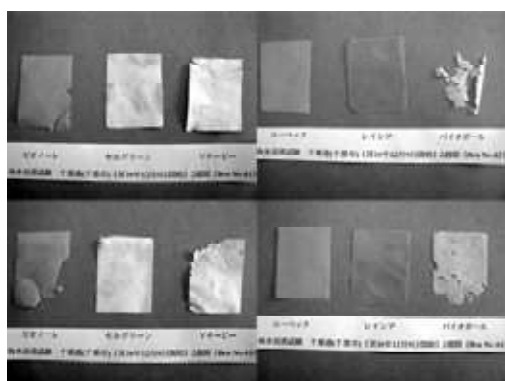


写真6 浸漬した試験片の状態，千葉港2週間後(左)，4週間後(右)

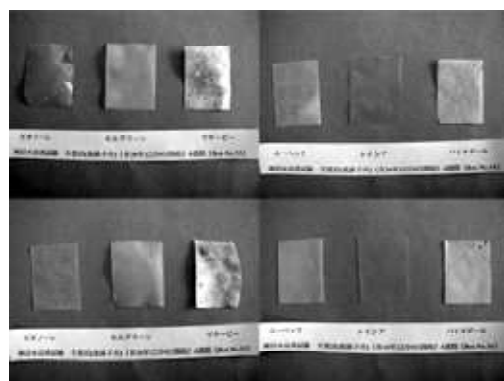
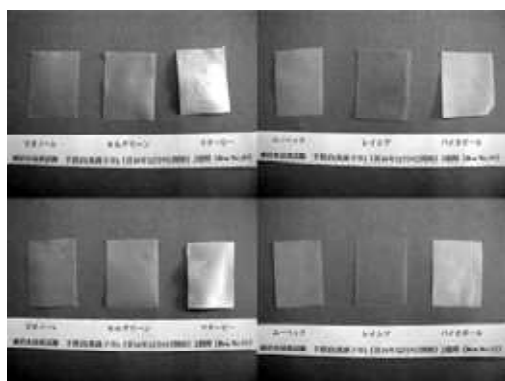


写真7 浸漬した試験片の状態，手賀沼2週間後(左)，4週間後(右)

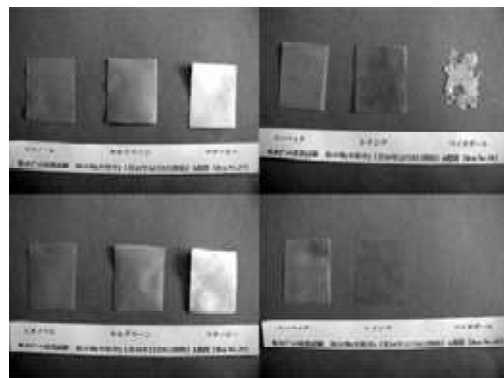
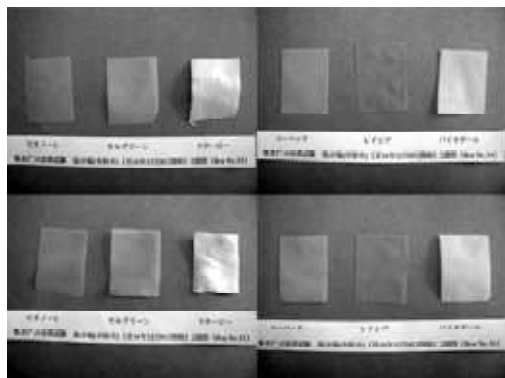


写真8 浸漬した試験片の状態，平蔵2週間後(左)，4週間後(右)

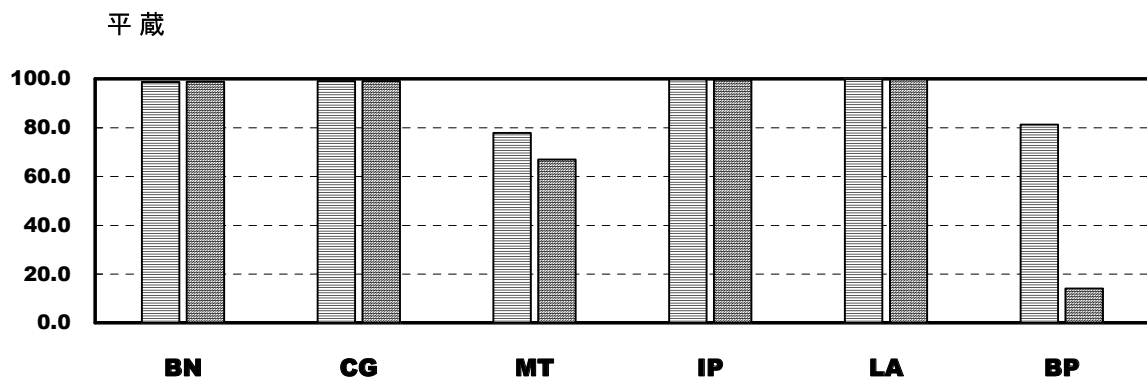
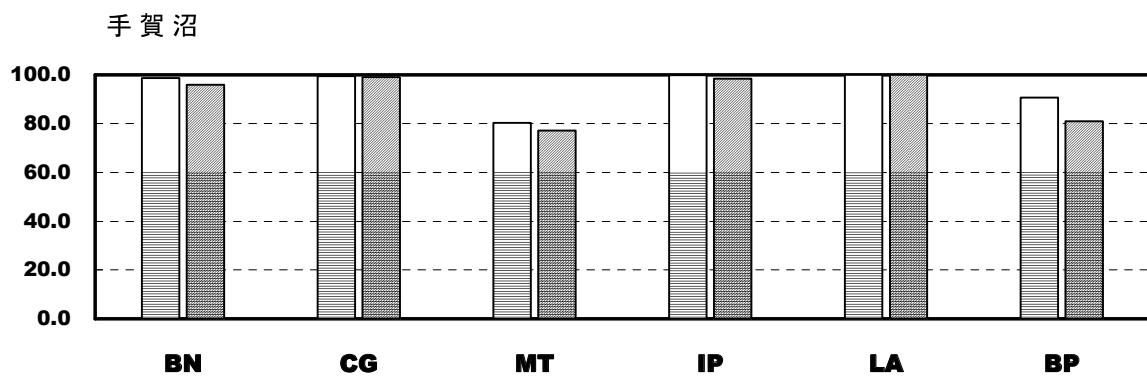
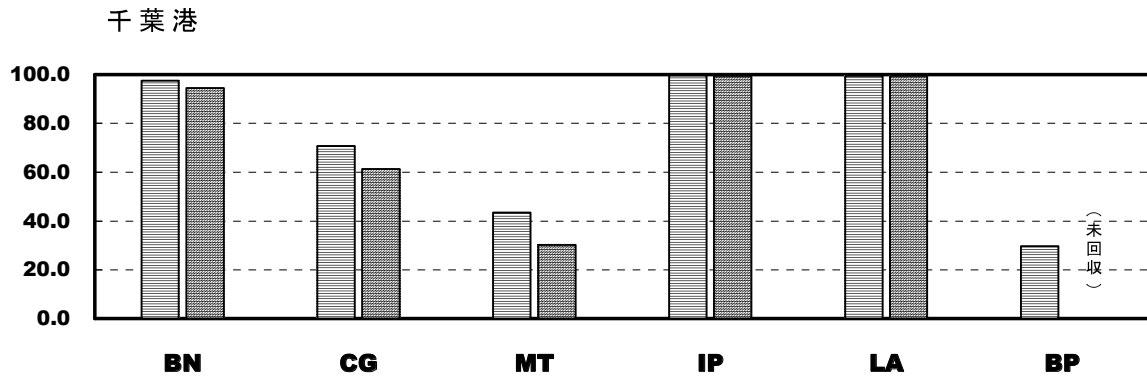
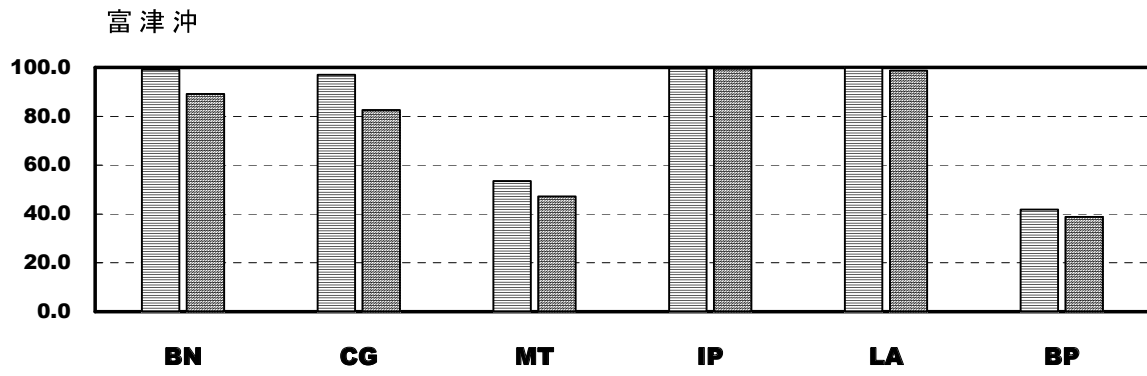


図2 プラスチックフィルムの質量変化

2週間後

4週間後

縦軸の数値：残存率 (%)

行った。また、試験片の取り出しはこれより2週間後、4週間後に実施した。この時の、気象条件を表2に示す。この間、冬場であったため、水温が低下した。特に手賀沼では4週間目では水温が3℃と測定開始時より大きく低下した。また、試験開始時に採取した試験水について、pH、電導度(東亜電波社製 CM-20S)、全有機炭素(島津製作所製 TOC-5000)を測定し、表3の結果を得た。淡水域が全有機炭素(TOC)が高く、平蔵は、無機、有機の炭素量ともに高かった。

### 3.2 生分解プラスチックシートの重量変化

表1に示す6種の生分解プラスチックシート(30mm×40mm)の重量を測定し、図1に示すケースに収納した。分解し、崩壊したシート片が外部に流失するの防ぐためケースの周辺を目の細かい洗濯袋で覆い、これを吊すための籠にいれ、4試験地の水面下1~2mの場所に設置した。富津沖のみは籠を海苔網に強固に固定する必要上、海面下20cmの場所に固定した。設置場所の概観及び設置状態を写真1~4に示す。2週間後、4週間後に各生分解プラスチックの試験を収めたケースを2個ずつ取り出した。各試験片の2週、4週目の洗浄後の回収状態を写真5~8に示す。2週間目では各プラスチックの多くは、原形を保っていたが、4週間目では、原型を留めていないものもあり、さらに2試験片とも回収できないものもあった。

回収したプラスチックは、原型を保っているものは、乾燥後、重量を測定した。また、破断し小片が流出したと思えるものは、残存した面積から全体重量を換算し、試験前の重量と比較し、補正值として残存率を算出した。この結果を各試験地について、各プラスチックごとにまとめたものが図2である。全般的にデンプンを含むマタービーや微生物ポリマーのバイオポールは、比較的分解しやすく、土壌中でも比較的安定な挙動を示すレイシアやユーペックは、この水系実験でもほとんど分解しなかった<sup>2)3)</sup>。

海水域と淡水域の重量変化をくらべると、海水域の方が淡水域よりも重量変化が大きかったが、これにはいくつかの原因が考えられる。まず、手賀沼は水深が浅く、水温の低下が著しかったことから微生物の分解力が低下してしまったことが考えられる。次に、海水域でのシートの分解崩壊は、微生物による分解と水流による破断が複合した結果と考えられ、微生物の分解性の差のみによって

引き起こされるものでないことが考えられる。すなわち、シートの重量減は、微生物による分解とポリマー強度減少の複合的な結果と考えられる。特に4週目は、試料採取前日に海が荒れたことなどから劣化が進んだポリマーの破断流失が進んだ可能性がある。さらに、海水中に浸漬していたサンプルボックスには様々な海洋生物が付着しており、微生物以外にもプランクトンや幼生等の影響も無視できないと考えられる。

水質とプラスチックの分解度の関係を調べるため、富津沖と千葉港とを比較すると水質の比較的良好な富津沖の方が、重量変化が総じて少なく、4週目では富津沖の方が重量変化が大きくなってしまったものがあるものの、全体的にはTOCが高い千葉港の方が分解が進む傾向があった。

手賀沼の試料ケースには、多くの藻類がついており、平蔵のケースには茶色の沈殿物が付着していた。平蔵の4週目におけるバイオポールは、手賀沼に比べ分解が進んでいた。

### 3.3 分解菌数

試験開始時に採取した試験水中に含まれていたPBSA、PCL、PHBの分解菌数を測定した。測定は各樹脂を懸濁した乳化液(AIST供給)を用い、表4に示す培地組成で滅菌後、平板培地を作成し、試験水を原液~10<sup>2</sup>程度に希釈したものをこれに塗布

表4 培地組成

一般微生物数用培地	
試験水(海水, 淡水)	100ml
Yeast extract	10mg
Bacto Agar	2.0g
PBSA, PCL 用培地	
試験水(海水, 淡水)	100ml
Yeast extract	10mg
Bacto Agar	2.0g
ポリマー乳化液	33ml
PHB 用培地	
試験水(海水, 淡水)	100ml
Yeast extract	10mg
Bacto Agar	2.0g
ブライサーフ	1ml
ポリマー微粉末	200mg



写真9 生成したハローの状態  
平蔵 PHB 7日目

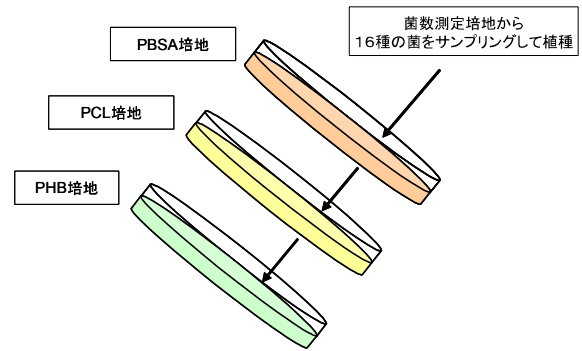


図3 各生分解性プラスチックに  
対する分解性の確認

し、3～14日間培養した。培養時に生じたハローの状態を写真9に示す。生じたハロー数を計測し、表5の結果を得た。

淡水系に比べ海水系では、分解菌の生息数は少なかった。一方、手賀沼の分解菌数は、他に比べて10～100倍程度多かった。分解菌は淡水系の湖沼、河川等で生息数が多いことが予想される。この結果は、前述のプラスチックシートで海水域の分解量が多かったのと同じではない。この原因は、前項で述べたのと同様に ①測定時の手賀沼の水温が低く菌の活動が活発でない。酵素の活性が低い。②海水系にいる菌の分解活性が高い。③浸漬シートが水流による物理的損傷を受けて見かけの分解率が上がった。④微生物以外の海洋生物の影響を受けた等が考えられる。

富津沖と千葉港のシートの分解度の差と菌数の相関については、一般微生物数が千葉港では高く、デンブン系のマタービーではその影響が現れている可能性がある。しかし、PBSA、PCL、PHB分解菌との明確な相関は得られなかった。この原因としては、プラスチックシートの分解は、その分解菌

数のみならず、菌の活性やプラスチックの分子構造・結晶性により影響を受けているものと考えられる。

平蔵については、手賀沼等に比してTOCが高く、特殊な生息状況であることが予想されたが、菌数測定ではPHB分解菌がやや多かったもの、塩濃度が高いためか、手賀沼に比して分解菌数は総じて少なかった。

### 3.4 選定菌の活性と菌の同定

菌数測定時に大きなハローを形成した16菌株について図3に示すように、PBSA、PCL、PHBの3つの培地に植菌してその菌の各プラスチックに対する分解活性を調べた。また、この16種をLB培地上で増殖させ、図4に示すフローに従い、16s rRNAによる菌種の同定を行った。この結果を表6に示す。

各生分解性プラスチックに対する分解菌の活性は、PHB分解菌では、PHBが生体由来の高分子であることから、その分解活性が高いものが多く得られた。一方、PCLやPBSA分解菌に関しては、PCLやPBSAが脂肪族ポリエステルであり、合成系の生分解性高分子であることからその分解菌の活性は、

表5 各生分解性プラスチック分解菌数

単位：cfu/ml

採取地	分類	一般生菌数	PBSA 分解菌数	PCL 分解菌数	PHB 分解菌数
富津沖	海水	$2.3 \times 10^3$	10	-	20
千葉港	海水	$5.6 \times 10^3$	10	-	10
手賀沼	淡水	$3.6 \times 10^4$	$2.2 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$3.5 \times 10^2$
平蔵	その他	$1.1 \times 10^3$	10	10	20

低いものが多かった。また、選別した16種の菌の内、PBSA, PCL, PHBの複数に活性を示すものがあり、その内のいくつかは、ハローも明確で活性が高いと考えられた。

菌種の同定ではLB培地上で増殖しなかつたり、PCRで増殖バンドが得られなかつたり、TAクローニング時に16s rRNAが挿入したクローンが得られなかつたものもあったが、16種のうちの7種について菌種の同定ができた。

#### 4. まとめ

産業技術総合研究所と協力し、県内4カ所の水域で生分解性プラスチックの分解性と生息する分解菌数を調査した。また、得られた菌の内、有望と考えられるものに関して同定を試みた。

その結果水域中に浸漬した生分解プラスチックシートの分解では、マタービー、バイオポールは分解性が比較的高く、レイシアやユーベックは分解が極めて遅い。また、分解菌数は手賀沼が他に比べて10~100倍程度多く、淡水湖沼や河川等で多い可能性が高い。また、活性の高い一部の菌は複数のプラスチックを分解する等の結果が得られた。また、いくつかの菌について同定を行い菌種を明らかにした。

最後に、本研究を行うにあたり、御指導、御助言をいただきました(独)産業技術総合研究所関西センター 環境化学技術研究部門 バイオベース

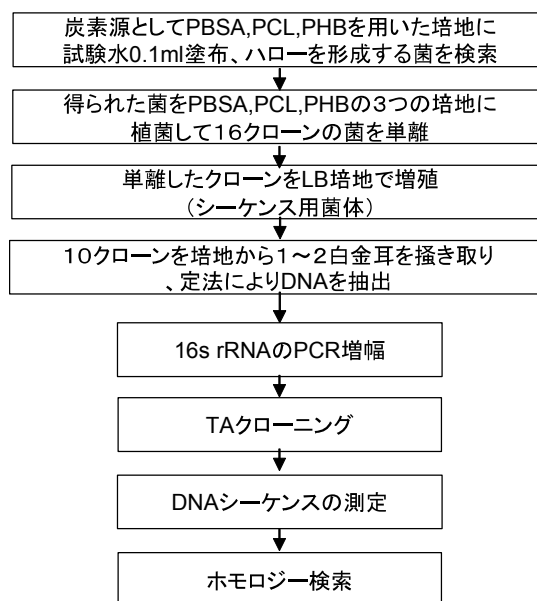


図4 16s rRNAによる菌種の同定フロー

ポリマーグループの中山敦好氏、山野尚子氏に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Tokiwa Y, Calabia BP: *Biotechnology Letter*, 26, 1181-1189 (2004)
- 2) 根本, 西口: 千葉県工業試験場報告 29, No. 14 (2000)
- 3) 根本, 西口: 千葉県工業試験場報告 7, No. 15 (2001)

表6 選抜した菌の活性と菌種

No.	採取地	採取培地	PBSA	PCL	PHB	属
1	富津沖	PHB	++	+	+++	<i>Streptomyces setonii</i>
2	富津沖	PHB			+++	
3	千葉港	PHB			+	
4	手賀沼	PCL			+++	<i>Acidovorax sp.</i>
5	手賀沼	PCL				
6	手賀沼	PCL	+	+		
7	手賀沼	PCL	+			<i>Acinetobacter sp.</i>
8	手賀沼	PCL	+			
9	手賀沼	PBSA	+			<i>Acinetobacter sp.</i>
10	手賀沼	PBSA		+		
11	手賀沼	PBSA				
12	平蔵	PCL	+			
13	平蔵	PHB			++	<i>Oerskovia xanthineolytica</i>
14	平蔵	PBSA	++	++		<i>Acinetobacter sp.</i>
15	手賀沼	PCL			++	<i>Acidovorax sp.</i>
16	手賀沼	PHB				