研究発表 3

微生物の高活性化による海洋生分解性の加速評価法の開発

発　表　者：田口　浩然（東京事業所高分子技術部）
共同研究者：尾坂　奈生（東京事業所高分子技術部）
菊地　貴子（東京事業所高分子技術部）

1.　緒言

プラスチックは，日用品から農林・水産業用、工業用、医療用など幅広い分野で利用され、社会・経済活動にとって必要不可欠な材料である。しかし、使用後に適切に回収・廃棄されずに海洋中に流出したプラスチックが生態系に影響を及ぼしており、近年、プラスチックごみによる環境汚染は世界的に解決すべき課題となっている。海洋プラスチックごみ問題の解決策の一つとして、海洋流出しても影響の少ない海洋生分解性プラスチックへの素材代替が期待されている。海洋生分解性プラスチックの開発・普及を促進するためには、プラスチックの海洋中での生分解性や安全性の評価が必要不可欠である。海洋生分解性の評価は、海洋環境の一部を想定し、材料が微生物により二酸化炭素や水などに無機化する完全生分解性を評価する試験方法が ISO（International Organization for Standardization）で規格化されており、海洋を想定した ISO 23977-1[1)]、潮間帯を想定した ISO19679[2)]等がある。

生分解性試験は、活性汚泥、コンポスト、土壌等を植種として ISO 規格化されてきたが、海水中の微生物量は、他の植種と比較し著しく少なく、季節によっても変動し、採取場所によって微生物量や菌叢が異なることから、植種が試験の再現性やばらつきに影響し、試験が長期化する等の課題も多い[3)]。そこで本研究では、生分解性評価における試験期間の短縮するために、ISO 23977-1 を基に海洋生分解性を加速的に評価する手法を開発した。

2.　実験

2.1　植種源

海水及び堆積物を神奈川県の一色海岸から採取した。採取した海水はフィルターバッグを用いてろ過し、堆積物はふるいを用いて 2 mm 以下に分級して試験に用いた。海水中の生菌数は、微生物検査装置 Bioplorer KB-VKH02（光洋産業製）を用いて蛍光染色法で測定した。海水及び堆積物は、次世代シーケンサーMiSeq system（illumina 製）を用いて 16s rRNA 菌叢解析を行った。

2.2　生分解度の測定

生分解速度を評価するために、海水を植種とする ISO 23977-1 の試験系を用いて二酸化炭素（CO_2）発生量から生分解度を測定した。図 1 に試験装置の概略図を示す。

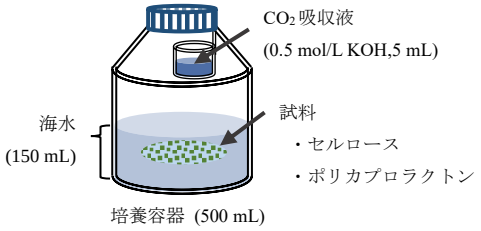


図 1　装置概要

試料は ISO 23977-1 で陽性対照試料として利用されているセルロース（ろ紙 / Whatman 製 No.42）及び生分解性プラスチックであるポリカプロラクトン（PCL / Sigma Aldrich 製）を冷凍粉砕し、250～125 μm に分級した粉体を用いた。植種を培養容器に入れ粉末試料を混合し、25±2 ℃で培養した。培養容器中で発生した CO_2 量を測定し、試料の生分解度に換算した。また、培養開始時に栄養塩として、リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）を 0.1 g/L、塩化アンモニウム（NH_4Cl）を 0.05 g/L になるように添加し、栄養塩の添加効果について検証した。

3.　結果と考察

3.1　植種の高活性化

本研究では、海洋生分解性評価に菌数や菌叢を増強し、高活性化した植種を用いることで、評価期間の短縮、ばらつきの低減及び再現性の向上を検討した。

堆積物中の微生物数は海水中の微生物数よりも多く、菌叢も豊富な傾向がある。そこで、堆積物中の微生物を海水中へ抽出し、菌数を増加させ、菌叢の多様化した海水の調製を検討した。海水 600 mL と堆積物 100 g を 1000 mL のフラスコに採取し、超音波照射装置を用いて 10 秒間超音波照射し、堆積物中の微生物を抽出した海水（以下、抽出海水）を調製した。蛍光染色法により測定した抽出前の海水（以下、原海水）の生菌数は 2.8×10^3 個/mL であった一方で、抽出海水の生菌数は 4.2×10^4 個/mL であり、海水中の生菌数の増加が確認された。また、海水及び堆積物の菌叢解析の結果を図 2 に示す。堆積物中の微生物の一部が海水中へ抽出され、原海水よりも菌叢が多様化したことが確認された。したがって、抽出海水は原海水よりも生菌数が多く、菌叢が多様であることが示された。

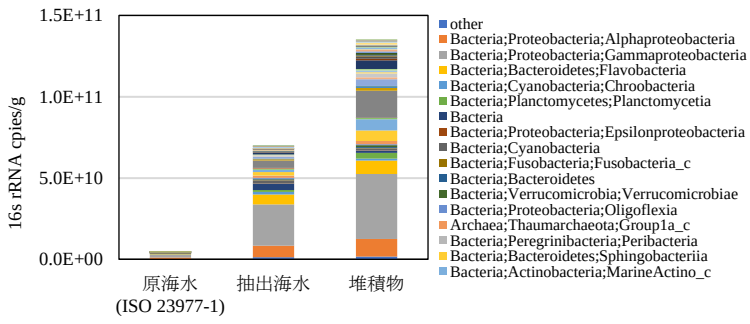


図 2　海水及び堆積物の門レベルの菌叢（16s rRNA コピー数補正）

3.2　生分解速度の評価

3.2.1　生分解性評価の加速化

調製した抽出海水及び原海水を用いて、セルロース及び PCL の海洋生分解性を評価した。培養 32 日間の各材料の生分解度を図 3､4 に示す。培養 32 日後のセルロースの平均生分解度は、原海水で 3 %、抽出海水で 35 %であり、抽出海水を用いたことでセルロースの生分解速度が加速した。PCL でも、培養 32 日後の平均生分解度は、原海水で 2 %、抽出海水で 11 %であり、セルロースと同様に抽出海水を植種に用いたことで生分解速度の加速が認められた。

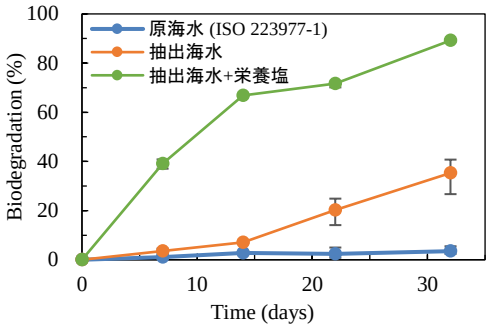


図 3　セルロースの生分解度

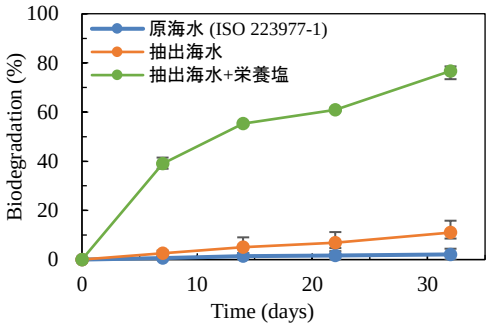


図 4　PCL の生分解度

ISO の海洋生分解性評価法である ISO23977-1 では､試験開始時に栄養塩として KH_2PO_4 と NH_4Cl の添加が認められている。本研究では、抽出海水を用いた評価において、試験開始時に栄養塩として KH_2PO_4 と NH_4Cl を添加し、添加効果について検証した。栄養塩を添加した場合のセルロースの培養 32 日後の平均生分解度は 89 %であり、栄養塩の添加により生分解速度が加速した。PCL でも、栄養塩を添加した場合の培養 32 日後の平均生分解度は 77 %であり、セルロースと同様に栄養塩の添加により生分解速度の加速が認められた。

3.2.2　海洋生分解性の加速評価法の有効性検証

本加速評価法の有効性を検証するために、日本全国の 10 地点より採取した海水と堆積物を用いてセルロース及び PCL の海洋生分解性を評価した。各地点における培養 32 日後の生分解度を図 5、6 に示す。培養 32 日後のセルロースは、原海水を用いた場合では、培養 32 日後の生分解度は 10%未満であった。一方で、原海水に栄養塩を添加した場合では、一部の海域において著しく生分解速度が加速した。また、抽出海水を用いた場合では、人口密集地域である甲子園、一色、八景島では原海水と比較して生分解速度が加速された。そして、抽出海水に栄養塩を加えた場合では、全ての海域において生分解速度が加速されることが示された。また、PCL でもセルロースと同様に、抽出海水に栄養塩を加えた場合では、全ての海域において生分解速度の加速が認められた。したがって、様々な海域において、堆積物を利用し、試験開始時の海水中の生菌数を増加、菌叢を多様化させた抽出海水を用い､栄養塩を添加する本加速評価法は､原海水を用いる ISO 23977-1 の評価方法よりも、海洋生分解性を加速的に評価できること示された。

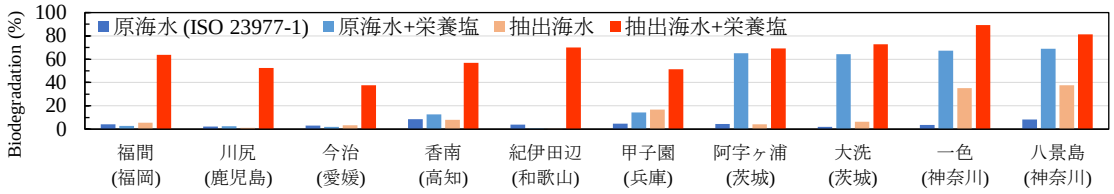


図 5　培養 32 日後のセルロースの生分解度（日本国内 10 地点で採取した植種）

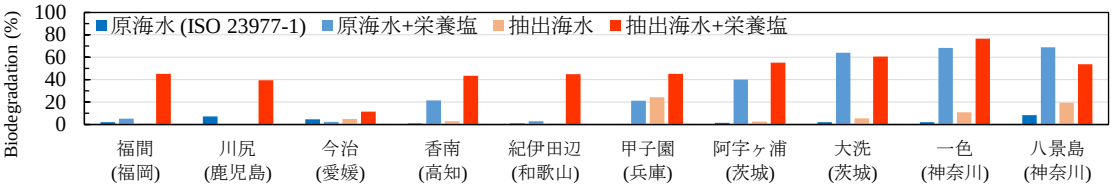


図 6　培養 32 日後の PCL の生分解度（日本国内 10 地点で採取した植種）

4.　まとめ

堆積物を用いた抽出海水を調製することで植種の活性を高め、海洋生分解性を加速的に評価できる手法を開発した。開発した加速評価法で、日本国内の 10 地点の海域から採取した植種を用いて検証した結果、生分解の加速化が認められており、幅広い海域において適用されることが確認された。また、堆積物を用いた抽出海水の調製は簡便に植種を活性化できることも利点である。現行の ISO 規格による評価法は長期の試験期間を要し、植種によりばらつきを生じることが課題とされているが、開発した加速評価法では、短期間で再現性よく材料の海洋生分解性を評価できるため、材料開発におけるスクリーニング法等への適用が期待される。今後、さらに海洋生分解の速度や分解菌叢等に関して、実海域との相関性の検証を行い、海洋生分解性プラスチックの社会実装に向けた開発、普及促進に貢献していきたい。

5.　謝辞

本成果は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のムーンショット型研究開発事業の「非可食性バイオマスを原料とした海洋分解可能なマルチロック型バイオポリマーの研究開発」で得られたものです。

6.　参考文献

1)　ISO 23977-1 : 2020 Plastics Determination of the aerobic biodegradation of plastic materials exposed to seawater Part 1: Method by analysis of evolved carbon dioxide
2)　ISO 19679 : 2016 Plastics Determination of aerobic biodegradation of non floating plastic materials in a seawater/sediment interface Method by analysis of evolved carbon dioxide
3)　田口浩然，菊地貴子 : マテリアルライフ学会誌，32，58（2020）
4)　田口浩然，尾坂奈生，菊地貴子 : マテリアルライフ学会誌，33，57（2021）
5)　尾坂奈生，菊地貴子ら : 高分子年次大会，71，（2022）