

**研究課題：**

**ポリオレフィン系樹脂被覆肥料コーティング材の微生物分解と分解生成物の環境影響評価**

境 雅夫 \*・菊池 政道・山田 直隆（九州大学大学院農学研究院、\* 研究代表者）

**背景・目的：**

肥効調節型被覆肥料は、速効性肥料を樹脂などで被覆した機能性肥料である。肥料成分の溶出速度を任意に調節できるため、肥料を最適な条件で無駄なく植物に吸収させることができる。近年、追肥作業の省力化や肥料による環境汚染の軽減を目的として、このような被覆肥料の利用が進められている。特に、地下水への硝酸態窒素流出量の低減については多くの実績があり、環境保全型農業において重要な役割を担っている。しかし、肥料成分溶出後に農地へ残留する被膜が問題視され、その解決が課題となっている。

この課題を解決する一つの手段として、自然環境中で分解する性質を持つ樹脂を被覆材に利用することが考えられる。この観点から、ポリオレフィン系樹脂被覆肥料などでは、その被覆材として光分解性ポリエチレンを用いてきた。光分解性ポリエチレンには、エチレン・一酸化炭素共重合体（ECO）や鉄錯体添加ポリエチレン（FePE）がある。これらの光分解性ポリエチレンは、太陽光（紫外線）により構成ポリマーが切断・低分子量化する。この過程で、樹脂の分子量低下に伴う強度低下が起こり、砕けやすくなるため、自然環境中では一見無くなったように見える。しかし、このとき光分解物としてアルカン様物質が生成されている（図1）。したがって、残留被膜が生態系に及ぼす影響を明らかにするためには、この光分解生成物の土壌中における動態および影響を明らかにする必要がある。

この観点から本研究では、残留被膜の土壌中での変化、特に微生物による生分解過程の解明および被膜成分が植物や土壌微生物に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

**研究成果：**

**1) 光分解性ポリエチレンの畑土壌における生分解性**

ポリオレフィン系樹脂被覆肥料の被覆材として用いられる光分解性ポリエチレン（ECO および FePE）の光分解生成物を対象として、その生分解性を2種類の畑土壌において調査した。光分解性ポリエチレンの光分解生成物は、耐候試験機（スガ試験機（株）製 WEL-SUN-DC 型）にて、ECO および FePE フィルムに紫外線を 1000～1500 時間、照射することによって調製した。生分解性試験は、土肥らの BOD (biochemical oxygen demand) 法を用いて行った。

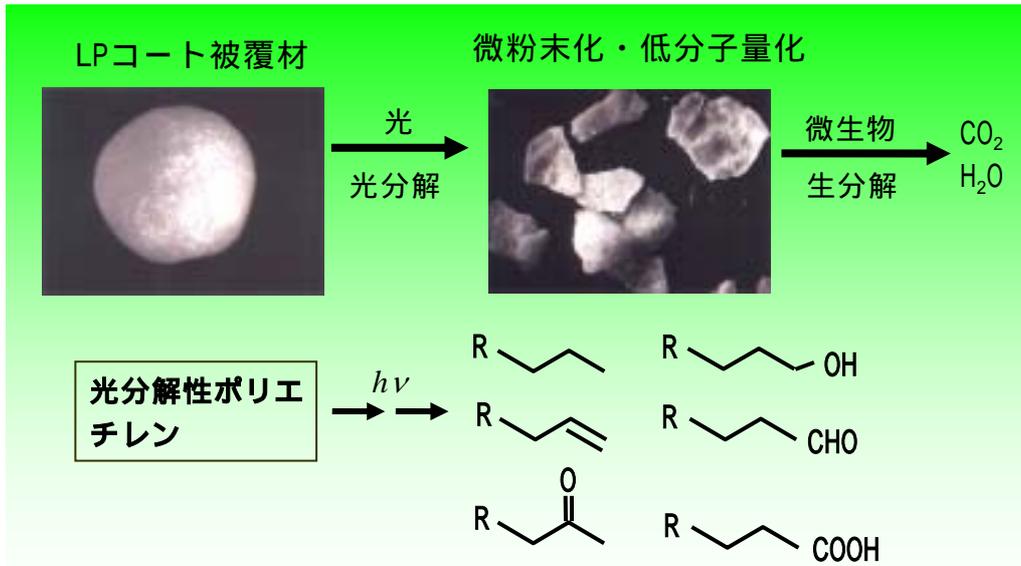


図1 光分解性ポリエチレンの分解過程

21日間の生分解性試験の結果、光分解生成物が高分子の状態では生分解がほとんど認められなかった。しかし、光分解生成物からヘキサンにて抽出した低分子量画分(ECO-Hex および FePE-Hex)は、21日間で8%から18%の生分解度を示した。

2種の光分解性ポリエチレン間では、21日目の最終的な生分解度に違いが認められ、FePE-HexよりもECO-Hexの方が高い生分解度を示した。高温GPCを用いた分子量測定の結果、ECO-Hexの方がより多くの低分子量画分を含むことが示され、このことが生分解度の差の要因として推定された。また、2種の土壌間では、その生分解性のパターンが異なっており、光分解生成物を資化する微生物の種類や菌数が両土壌間で異なることが推察された。

以上の結果から、光分解により低分子量化した光分解性ポリエチレン分解生成物は、畑土壌に生息する微生物によって資化されることが明らかとなった。

## 2) 生分解に関与する微生物の特定

生分解性試験の結果から、畑土壌中には低分子量化した光分解性ポリエチレンの光分解生成物を分解・資化する微生物の存在を見出した。そこで、畑土壌において光分解性ポリエチレン分解生成物の生分解に関与する微生物の分離・特定を行った。低分子量化した光分解性ポリエチレン分解生成物の代用として長鎖 *n*-alkane (*n*-triacontane; C<sub>30</sub>)を用いて、長鎖 *n*-alkane分解細菌の液体培養による集積培養を行った。この液体集積培養から、長鎖 *n*-alkane分解細菌として *Pseudomonas* sp. , *Nocardioides* sp. , *Streptomyces* sp. , *Ralstonia* sp. に属する数種の細菌を分離した(図2)。これらの分解細菌は、C<sub>30</sub>を唯一の炭素源として添加した無機塩培地中で増殖した。ガスクロマトグラフを用いて、分離菌株の長鎖 *n*-alkane分解能を測定した結果、*Nocardioides* sp.の分解能が最も高く、培養7日目には液体培地に添加したC<sub>30</sub>を完全に分解した。

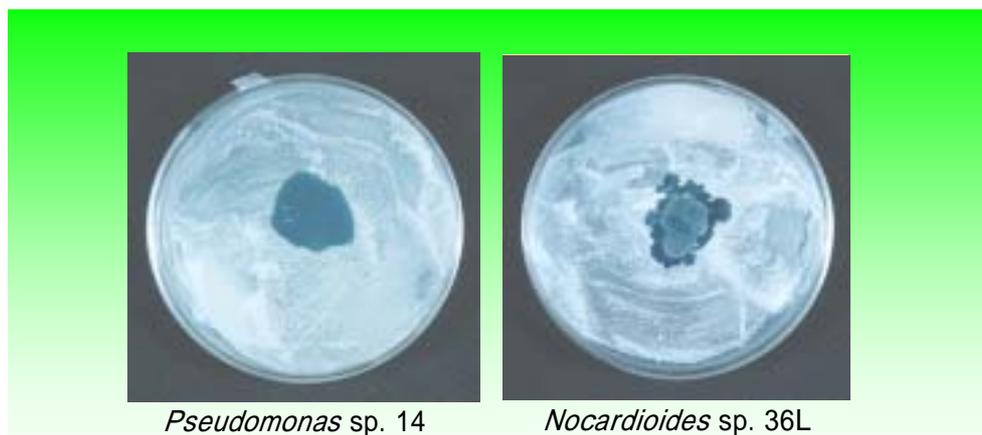


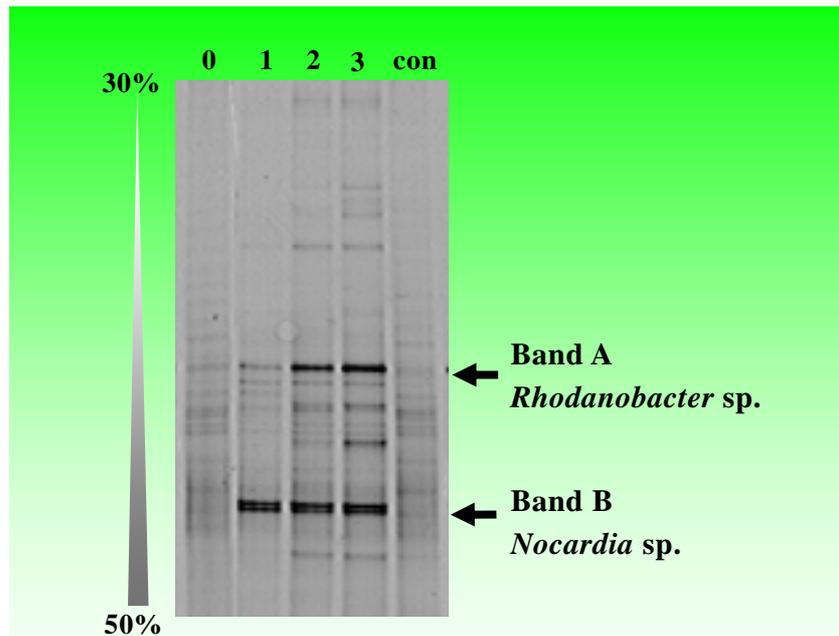
図2 長鎖 *n*-alkane 分解細菌による  $C_{30}$  の分解  
中央に接種した細菌により固体の  $C_{30}$  に形成されたクリアゾーン

### 3) 土壌中の微生物群集に及ぼす影響

土壌中の微生物群集に及ぼす影響を調査するため、畑土壌に長鎖 *n*-alkane を添加した場合の細菌群集構造の変化を調べた。大部分の土壌細菌は培養困難であるため、細菌群集の検出には、培地による培養を用いない 16S rDNA の PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 解析法を用いた。畑土壌に 0.3% (w/w) になるように  $C_{30}$  を添加し、経時的に 16S rDNA の PCR-DGGE 解析およびガスクロマトグラフによる  $C_{30}$  分解量を測定した。16S rDNA の PCR-DGGE 解析は、土壌から直接抽出した全 DNA を鋳型として細菌 16S rDNA の PCR 増幅を行い、これを変性剤濃度勾配 30-50% の DGGE で解析した。

土壌中における  $C_{30}$  は、1 週間目で 80% が分解され、3 週間後には完全に消失した。この  $C_{30}$  の減少に対応して、細菌群集構造は、図 3 の DGGE 解析結果に示すような変化を示した。すなわち、 $C_{30}$  添加によって、増加する 2 種の細菌種が認められた。この DNA バンドを DGGE ゲルより切出し、配列をシーケンスした結果、バンド A は *Rhodanobacter* sp. , バンド B は *Nocardia* sp. と推定された。さらに、これらのバンドに対応する 2 種の細菌を土壌より分離した。この分離菌株の  $C_{30}$  分解能を調べた結果、*Nocardia* sp. 14N 株は  $C_{30}$  の分解・資化能を有していたが、*Rhodanobacter* sp. 17 株は  $C_{30}$  の分解能を示さなかった。すなわち、*Nocardia* sp. は土壌中で  $C_{30}$  を分解・資化することにより増殖し、*Rhodanobacter* sp. はその代謝産物を利用して、後から増殖したものと推定された。

長鎖 *n*-alkane 分解細菌 *Nocardia* sp. は、上記 2) の液体培地による集積培養では分離されなかった。これは、*Nocardia* sp. が培地中での増殖速度が遅いことが原因として考えられる。しかし、畑土壌環境下では、この *Nocardia* sp. が主要な分解細菌であり、光分解性ポリエチレン分解生成物の生分解に関与していることが推定された。



**図3 DGGEによるC<sub>30</sub>添加土壌における細菌群集の変化**  
 0：開始時，1：C<sub>30</sub>添加1週間後，2：C<sub>30</sub>添加2週間後，  
 3：C<sub>30</sub>添加3週間後，con：無添加3週間後

### 3) 分解生成物の植物への影響

光分解性ポリエチレン分解生成物が微生物による生分解を受けず、蓄積した場合を想定し、植物に及ぼす影響を調べた。イネ(品種:日本晴)を用いた実生試験法(菊池, 1991)で、供試化合物20mg/200mLでも茎葉の伸長に影響はみられなかった。

肥効調節型被覆肥料は、作物栽培における省力化や環境水質への負荷軽減が可能な次世代の肥料として期待されている。しかし、残留したコーティング被膜の環境への影響が懸念され、その使用が消極的になりがちである。本研究では、化合物・土壌微生物・植物の3点からコーティング被膜の土壌中における影響実態を明らかにした。この結果は、今後の機能性肥料の発展に寄与するものと考えている。

### 論文：

- 1) Sakai M. *et al.* (2003) Biodegradability of photodegradable coating materials used for coated fertilizers in agricultural soils, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **49**, 647-650
- 2) 境 雅夫ら (2003) 被覆肥料の被覆材として使用される光分解性ポリエチレンの畑土壌における生分解性，日本土壌肥料学雑誌，(in press)