

生分解性プラスチック分解菌分離方法の確立

静岡市立高等学校
2 年 小西巧真 他 2 名

1 動機

PET（ポリエチレンテレフタレート）など、自然界では分解されにくいプラスチックによる海洋汚染問題が深刻化している。そのため、プラスチックがゴミとして回収できず、環境中に放置されても、速やかに分解される生分解性プラスチックは、今後普及すると考えられる。僕たちは微生物などが関与して、環境に悪影響を与えない物質にまで分解される、生分解性プラスチックに注目し、その性質を調べた。今後一般的なプラスチックに代わり、生分解性プラスチックが普及した場合、それを速やかに分解することができる、生分解性プラスチック分解菌が活躍することが期待される。僕たちは、その分解菌を土の中から見つけ出す方法の確立を試みた。

2 目的

生分解性プラスチック分解菌を分離する方法を見つける。

3 仮説

生分解性プラスチックと呼ばれるものは、原料などの違いで複数種類がある。僕たちが実験に使用した生分解性プラスチックの素材は、ポリ乳酸であり、乳酸($C_3H_6O_3$)を重合させて作られている。乳酸とはヒトの体内にも存在する乳酸菌が分泌する物質として知られており、生物にとって無害である。しかもヒトを含め様々な生物において、比較的利用しやすい炭素源であることがわかった。そのため、このポリ乳酸でできた生分解性プラスチックは、自然界には存在しないものの、分解する菌は特別な存在でなく、身近なところに複数種存在すると考え、多種多様の菌が存在する土壌から分離することを試みた。生存に不可欠な炭素源をポリ乳酸のみとし、この環境下で生存できる菌は、生分解性プラスチック分解菌であるという仮説を立て、以下の実験を行った。

4 方法

(1) 土壌からの分離

(ア) 身近な場所の土壌(静岡県静岡市清水区蒲原、駿河区丸子など)を採取し、水と共に遠沈管に入れ、攪拌する。

(イ) 数分放置し、駒込ピペットを用いて上澄み液を 2 mL 取り出す。

(ウ) (イ)の液を原液とし、駒込ピペットとビーカーを用いて、約 10,000 倍に希釈する。

- (エ) クリーンベンチにて、この液を炭素源が入っていない寒天培地(組成は表1)にコンラージ棒を用いて塗り広げる。

表1 「炭素源が入っていない培養液の組成」

(Ogawa and Miyashita. 1995. Appl. Environ. Microbiol. 61:3788-3795. 参照)

CBA salt 1 (per liter); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -11g, K_2HPO_4 -22.9g, KH_2PO_4 -9.0g

CBA salt 2 (per 100mL); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1.0g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ -0.25g

CBA salt 3 (per 100mL); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.05g, L-ascorbic acid-0.05g

滅菌水:87mL

CBA salt 1:10mL

CBA salt 2:1mL

CBA salt 3:1mL

基質:1mL

計:100mL

- ・CBA salt 1、CBA salt 2はオートクレーブにかけ、CBA salt 3は熱に弱いアスコルビン酸を含むため、濾過滅菌を行う。
- ・寒天培地を作る際は、この溶液の1.5%となるよう、粉末寒天を加える。

- (オ) (エ)の上から、生存に必要な炭素源として粉末のポリ乳酸(生分解性プラスチック)を培地全体に振りかける。

- (カ) 数日放置し、ハロー(菌がポリ乳酸を食べた跡)の形成を待つ。

(2) 生じた菌の培養

- (ア) クリーンベンチ内にて、ハローが形成された部分の寒天を、白金耳でかき取り、培養液(組成は表1)に入れ、炭素源として粉末のポリ乳酸を加える。

- (イ) アルミホイルで蓋をし、試験管を恒温振とう培養器(58℃)で培養する。

・分解菌は、プラスチックそのものをかじるのではなく、崩れてきたポリマーまたはオリゴマーを取り込むと考え、培養温度は、ポリ乳酸が崩れやすく、かつ菌が生存できる条件の温度を考え58℃に設定する。

(3) 生じた菌の分離

- (ア) クリーンベンチ内にて、振とう培養を行った液を、標準寒天培地にコンラージ棒を用いて0.2mL塗り広げる。

(イ) 数日間放置し、コロニーを形成させ、生分解性プラスチック分解菌を分離する。

(4) 生分解性プラスチック分解菌であることの証明

(ア) ポリ乳酸でできたストロー1本を4つに切り、ビンに入れ、100mLの炭素源が入っていない培養液(組成は表1)を加える。そこに生分解性プラスチック分解菌培養液を20mL加え、培養器(58℃)で培養する。対照実験としてビンに同量のストローと、120mLの炭素源が入っていない培養液(組成は表1)を加えたものを用意し(図1)、培養器に入れる。



図1 方法(サ)ストロー分解が進んだ後CO₂量の比較をする装置

(イ) 明らかな違いが確認できるようになったところで、培養液中の二酸化炭素量を、水酸化ナトリウム水溶液(0.05mol/L)を用いた中和滴定により求める。

5 結果

- (1) 方法(1)(カ)では、常温で放置し、塗布後4日目に生分解性プラスチックの粉を食べた跡(ハロー)が形成された。
- (2) 方法(2)(イ)の振とう培養では、4週間継続観察した。始め無色透明だった溶液が3日目から白く濁り始めた。2週間目まで濁度が増していった。
- (3) 方法(2)(イ)の振とう培養液(3週間目)を採取し、顕微鏡観察した結果、白く濁った液が入っていた試験管のプラスチックの粒が、対照実験の試験管に比べ、明らかに小さくなっていった(図2, 3)。

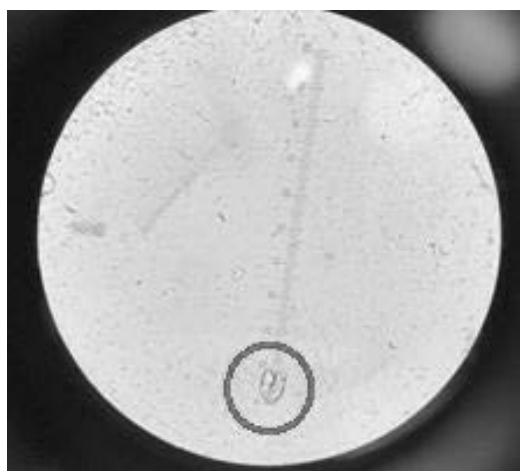


図2 小さくなったプラスチック片が多数見つかる。(菌あり)
平均的な破片の大きさ 25 μm



図3 対象実験(菌なし)
平均的な破片の大きさ 85 μm

- (4) 方法(3)(イ)では常温で放置し、4日後コロニーの形成を確認した。複数のシャーレに菌をまき、ほとんどが白色のコロニーのみ形成した(図4)。

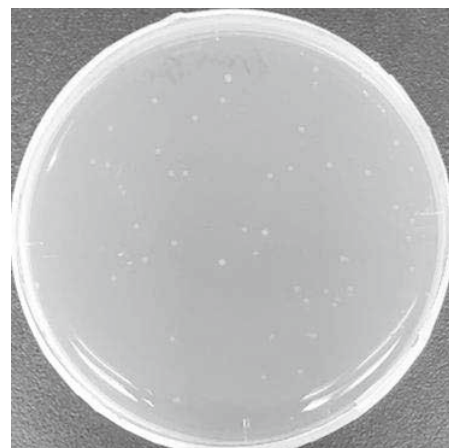


図4 複数のコロニーが
形成されたシャーレ

- (5) 方法(4)(イ)より、培養器に入れた後、3日目からストローの分解が目視できるようになった。2週間後に分解されたストローが、もやのようにビン底にたまるようになった。軽くゆすると、もやは消え液体がにごるため、もやの正体は細かいプラスチックの塊であることがわかった。
- (6) 方法(4)(イ)より、58℃の設定温度では、物理的な分解も進むため、生分解性プラスチック分解菌を入れていないビンでもストローの分解が確認できた。しかし菌を入れた方のビンは、入れていないほうのビンに比べ、明らかに濁度が大きく、顕微鏡観察でも細かいプラスチックの破片が多く見られ、両者の分解速度の違いは明らかだった。
- (7) 方法(4)(イ)より、中和滴定による二酸化炭素量の測定結果は、菌ありビンで62.8mg、菌なしビンで48.0mgであり、菌が存在することで分解が進んでいることがわかった。

6 考察

生存に必須の炭素源として、ポリ乳酸しか加えていない条件で培養した液から取り出した菌は、ポリ乳酸を分解する能力を持った、生分解性プラスチック分解菌であると考えられる。

7 今後の展望

取り出した菌が、本当に生分解性プラスチック分解菌かは、さらに調べる必要がある。

現在、分解菌が生分解性プラスチックを分解する際の最終生成物として放出する二酸化炭素の量を、より詳細に測る実験を始めている(図5)。



図5 分解で生じるCO₂をNaOH(aq)で受け取る装置

この実験でも、菌が存在することで、プラスチックの分解がより進む、ということを確認した後、どのような環境を用意すればより分解が進むのか、最適生育環境について調べたい。また大学に協力をお願いし rRNA の遺伝子解析を行うなどして、この菌の種類を特定したいと考えている。

最終的には、次のような実用化につなげたい。

- (1) 農業で一時的に用いられているビニールシート（生分解性の素材）を、使用後その場で分解する。
- (2) 生分解性プラスチック専用コンポストを設置し、プラスチックゴミをゴミ処理施設に頼らず処理する。
- (3) 生分解性プラスチック袋に入れた生ゴミ用コンポストを作り、ゴミ袋ごと分解して、水分を含んでいるため、処理に多くのエネルギーを必要とする生ゴミ処理問題を解決する。

8 研究の感想

僕たちは生分解性プラスチック分解菌を分離し、その性質を調べる実験を行う予定でいた。しかし調べても分離する方法が見つからず、試行錯誤を繰り返すうちに、何も成果が出ないまま、研究期間の半分(半年)が過ぎてしまった。それでも静岡大学の竹本先生、森内先生を始め、企業の金高さん、鹿島さん、研究所の糸賀さん、植松先生など様々な方に協力していただき、顧問の曲田先生と研究を前へ進めることができた。

もっと多くの結果を出したかった、という思いがあるが、製品として高額で売られている生分解性プラスチック分解菌判定培地に頼らず、土壌中に存在する生分解性プラスチック分解菌を取り出す方法を確立できたことは、大きな成果だと思っている。

今後僕たちのように、生分解性プラスチック分解菌について研究したいと考える人に、ぜひこの方法で分解菌を見つけ出してほしい。そしてさらに研究を前に進めてもらえたら、と思っている。