

## プラスチック分解微生物の探索 Search for microorganisms that degrade plastics

○脇方 大地<sup>1</sup>, 谷川 実<sup>2</sup>, 鎌田 健一<sup>2</sup>, 西村 克史<sup>2,3</sup>

Daichi Wakikata, Minoru Tanikawa, Kenichi Kamata, Katsushi Nishimura

Abstract : Plastic-degrading microorganisms hold the promise of establishing new plastic disposal methods. In this study, the goal was to identify microorganisms capable of degrading plastic by collecting microorganisms from soil, water, etc., and then conducting plastic degradation tests in 96-well PET plates and in mixed cultures of microorganisms and PET pieces. Plastic degradation tests in 96-well plates were conducted using 84 microorganism strains collected in advance. Two strains of microorganisms produced significant irregularities on the plate surface, suggesting their potential for plastic-degrading ability. Therefore, these two strains were used in a mixed culture plastic degradation test, but no irregularities were observed on the surface of the PET pieces. This suggests that these two strains are unlikely to have the ability to degrade plastic.

### 1. 緒言

海洋に流れ込んだ廃プラスチックが劣化し、マイクロプラスチックとなって海洋を汚染したりと、廃プラスチックの環境汚染は深刻なものとなっている<sup>[1]・[2]</sup>。

プラスチックの多くは自然に分解されることはないと言われていた。しかし、近年になって発見された *Ideonella sakaiensis* 201-F6 株という微生物がポリエチレンテレフタレート(PET)をポリエチレンテレフタレート加水分解酵素 (PETase)・モノヒドロキシエチルテレフタレート加水分解酵素 (MHETase) でテレフタル酸とエチレングリコールまで分解することが判明した<sup>[3]</sup>。

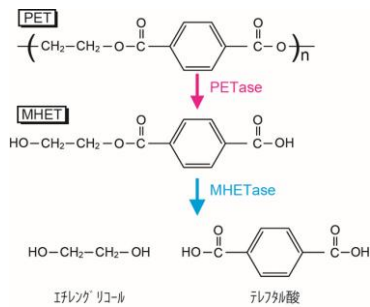


Figure 1. Mechanism of PET degradation by *Ideonella sakaiensis* 201-F6<sup>[3]</sup>

本研究では、土壌や河川などの様々な場所から微生物を採取した後、炭素源を抜いた YNB 液体培地と 96 ウェルプレートを用いたプラスチック分解試験・液体培地に微生物と PET 片を入れた混合培養によるプラスチック分解試験を行い、プラスチックを分解することが出来る微生物の単離を試みた。

### 2. 実験操作

#### 2.1 微生物の採取

魚・土壌・河川・池・木片・落ち葉などからサンプルを採取し、4 種類の寒天培地 (LB 培地・PD 培地・YM 培地・MB 培地) 上で培養、単離した微生物 84 株を実験で使用した。

#### 2.2 96 ウェルプレートを用いたプラスチック分解試験

ポリエチレンテレフタレート製の 96 ウェルプレートの吸光度 (610 nm) を測定し、各ウェルに YNB 液体培地 (炭素源を含有せず、窒素源として 1.00 %の硫酸アンモニウムを含む) 100 μL と少量の微生物コロニーをそれぞれ入れ、インキュベーター内 (30°C) で 2~3 日静置培養した。培養後、96 ウェルプレートを洗浄・乾燥し、吸光度 (610 nm) を測定した。最後に、培養前後の吸光度差を算出した。



Figure 2. Plastic degradation test using a 96 well plate

#### 2.3 プラスチック分解試験

本実験では、96 ウェルプレートのプラスチック分解試験にて培養前後の吸光度差が特に大きく、プレート表面に多くの凹凸を発生させた微生物 2 株を用いた。

三角フラスコあるいは坂口フラスコに液体培地 (LB 培地と YM 培地) を用いた。LB 培地ではペプトン、YM 培地では D-グルコースを 10 分の 1 にすることで、培地中

1:日大理工・院 (前) ・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大理工・教員・短大

の炭素源を減らした) と微生物, オートクレーブ滅菌した PET 片を入れた. 三角フラスコではインキュベーター内で静置培養 (30°C, 1 week) を行い, 坂口フラスコでは振とう培養機で振とう培養 (30°C, 1 week) を行なった (この時, 液体培地に PET 片のみを入れた control も用意した). 培養完了後, PET 片の表面を顕微鏡 (400 倍) で観察した.

### 3. 実験結果

#### 3.1 96 ウェルプレートを用いたプラスチック分解試験

プラスチック分解微生物の探索では調査した微生物 84 株のうち, 吸光度差の最大値は LB お-1 の 0.061 で, 次いで大きい値となったのは YM F-2-2 の 0.044 であった. そして, その微生物を培養した後の 96 ウェルプレート表面を顕微鏡で観察した結果, 多くの凹凸が見られ, 96 ウェルプレートの表面が微生物によって分解されたことが示唆された.

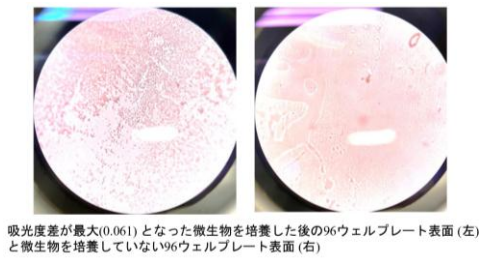


Figure 3. Microscopic observations of plate surface (400x magnification)

#### 3.2 プラスチック分解試験

96 ウェルプレートのプラスチック分解試験にて培養前後の吸光度差が特に大きく, プレート表面に多くの凹凸を発生させた LB お-1 と YM F-2-2 を用いてプラスチック分解試験を行なった結果, いずれも表面に変化が生じていなかった. これに関しては, 培養期間が短かった, あるいは微生物がプラスチック分解能を有していなかった可能性があると思われる.

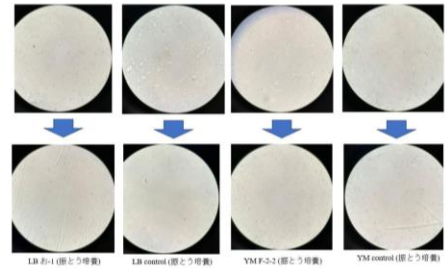
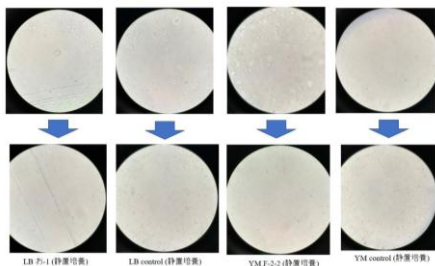


Figure 5. Microscopic observations of PET fragment surface (400x magnification)

### 4. 結言

本研究にて, 96 ウェルプレートによるプラスチック分解試験では, LB お-1 と YM F-2-2 の 2 株の微生物がプラスチック分解能を有することが示唆された. しかし, 混合培養によるプラスチック分解試験では PET 片に変化が生じていなかったことから, 96 ウェルプレートの凹凸は微生物が付着したもの, 実験操作に一部問題がある, あるいは使用した 2 株はプラスチック分解能を有していない可能性があると思われた.

ゆえに, 96 ウェルプレートの凹凸を調べる, 培養期間などの条件を一部見直した上で再度実験を行う必要があると思われた. また, 使用した 2 株がプラスチック分解能を有していない可能性もあるため, 新たに採取した微生物を用いたプラスチック分解試験も行うべきであると思われた.

### 5. 参考文献

- [1] Atsuhiko Isobe · Shinsuke Iwasaki : “The fate of missing ocean plastics: Are they just a marine environmental problem? ”, Science of the Total Environment, Vol.825, 2022
- [2] Atsuhiko Isobe · Keiichi Uchida · Tadashi Tokai · Shinsuke Iwasaki : “East Asian seas: A hot spot of pelagic microplastics”, Marine Pollution Bulletin, Vol.101, No.2, pp.618-623, 2015.
- [3] Shosuke Yoshida etc.: “A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate)”, Science, Vol.351, No.6278, pp1196-1199, 2016.