プラスチックを生成する細菌とその生息環境

研究者
藤澤 瑞樹　　古田 琳太郎　　山田 夕葵

指導教諭
三上 賢司　先生

要旨(Abstract)

近年,プラスチックの生成に用いられる石油の代替資源として,微生物の代謝によって合成されるプラスチックが注目されている.プラスチックは,ポリ3-ヒドロキシ酪酸・P(3HB)などの構成する高分子化合物の種類や数によって性質が決まる.単一な種類の成分で構成されるバイオマスプラスチックは,室温下で二次結晶化し,脆化してしまうために日常生活で用いる製品には利用しづらい特徴を持つ.そこで,これからのプラスチックのさらなる日常生活への実用化を鑑みては,それらのプラスチックが「複数の成分で構成されていること」この条件を有することが必要不可欠である.プラスチック成分を生成する細菌が生息する環境とその種類について更に詳しく調べることが,諸条件を満たすプラスチック成分の生成を行う細菌の発見につながり,バイオマスプラスチックの開発・発展に寄与できると考えた.そこで,小黒河川を中心とした長野県伊那市内の河川を含めた様々な環境の土壌を採取し,土壌中にいる細菌がプラスチック成分を生成しているかを調べた.結果,全てのサンプルから,プラスチック成分を生成する細菌を見つけられたことから,水辺に固執せず同細菌は生息していると考えられる.また,小黒川では全てのサンプルから,複数種類のプラスチック成分を発見することができた.加えて,シュードモナス属,クリセオバクテリウム属などの細菌が複数種類のプラスチック成分を生成していることが分かった.

1. はじめに

プラスチックは,私達の生活で欠かせない材料の一つとなっている.このプラスチックが私達の日常生活を豊かにする一方,日本では,年間約 9400 千トンのプラスチックがゴミとして排出されるなど,現代社会の問題の一端を担っている.[1]

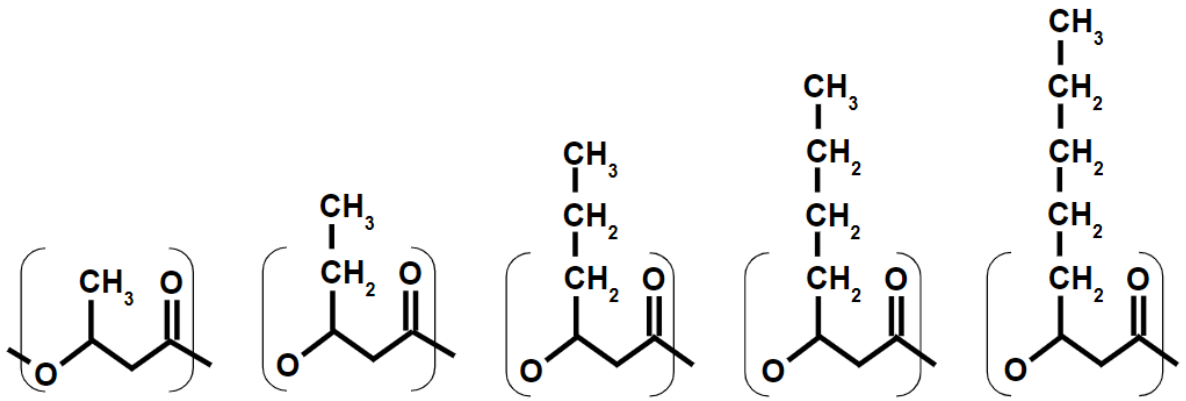
今日,プラスチックの原料である石油は,プラスチックなどの製造による二酸化炭素の排出や,石油自体の枯渇が世界的な問題として懸念されている.また,今日の日常生活で使われるプラスチックは,自然界で分解されないため,マイクロプラスチックによる海洋汚染などの社会や自然界,生態系に深刻且つ重大な影響を与えている.石油の使用に関する問題点には,化学的,生物的に合成することで得られる物質によって生成されるバイオマスプラスチックを利用することが解決策として挙げられる.またマイクロプラスチック問題に関する問題点には,微生物の働きにより,分子レベルまで分解し,最終的には二酸化炭素と水となって自然界へと循環していくという性質を持つ生分解性プラスチックが解決策として挙げられる.[2][3]

上記 2 つのプラスチックの性質を合わせ持った物質の一つとして,ポリヒドロキシアルカン酸系のプラスチック成分がある.この成分は細菌の代謝によって生成される貯蔵物質で,水と二酸化炭素にまで分解されるという特徴を持つ.よって,上記の成分を持つプラスチックが大量生産できるようになり,実用化すれば,私達が提示した現代社会の問題を同時に解決できると考える.

現状,株式会社カネカ社のバイオポリマーなど,実用化に成功している例もあるが,数が少なく,その要因として細菌から生成されるプラスチックは単調なものが生成されやすく,剛直であるが結晶化が遅くガラス転移点が室温より低いという特徴を持ち, 室温で放置すると 2 次結晶化を起こし固くなるため,加工に向かないという特徴が挙げられる.[4][5]

単調なものに比べ,複数のプラスチック成分で構成される物質は,柔らかい特徴を持つため,「ペットボトル」のような日常的に使い捨てプラスチックとして使われる製品には利用することができる.したがって,我々が日常生活で生物由来の生分解性プラスチックを利用するにあたっては,それが複数の成分で構成されていることが望ましい.詳しいプラスチック成分については図 1 に示す.

昨年のミニ課題研究より,これらの成分を生成する化学合成細菌が土壌中にいることを知った私達は①3HB 以外のプラスチックになり得る成分を生成する細菌を見つけ,どのような場



①：3-ヒドロキシ酪酸 (3HB)　②：3-ヒドロキシバレリル酸 (3HV)　③：3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HHx)　④：3-ヒドロキシヘプタン酸 (3HHp)　⑤：3-ヒドロキシオクタン酸 (3HO)

図 1:プラスチック成分の構造式[5]

3-ヒドロキシ酪酸は, 室温で結晶化するため,硬くてもろいという性質を持つ.[6]

また,3-ヒドロキシバレリル酸,3-ヒドロキシヘキサン酸,3-ヒドロキシヘプタン酸は, 単体の①の成分よりも融点が低く,物性は柔軟である物質を生成することができる.[7][8]

3-ヒドロキシオクタン酸は,単体のポリマーを形成する.特徴について,先行研究では,「*Psudomonas putida* のオクタン酸流加培養により得られた」と示されている.

所にそういった細菌がいるのかを調べることに決めた. この研究によって, ①3HB 以外の成分も含まれたより有用なプラスチックが生成される環境や細菌を判別でき, これからのプラスチック生成に役立てることができると考える.

2. 研究の目的

複数のプラスチック成分を生成する細菌の種類と当該細菌の生息域との関係を明らかにする.

3. 実験 1

3-1 目的

本実験の目的とした, 成分を生成する化学合成細菌が昨年のミニ課題研究より, 水辺の土壌にいることが分かったため, 私達は①3HB 以外のプラスチック成分を生成する細菌を水辺の土壌中から見つけ, どのような条件にそういった細菌がいるのかを調べた. 実験 1 をすることで, ①3HB 以外の成分も含まれたより有用なプラスチック成分を生成する細菌を発見し, これからのプラスチック生成に役立てることができると考える.

3-2 仮説

私達は水辺に絞り実験を行う上で, その生息環境の比較が地点ごとに行いやすい水辺地域である河川において実験を行うこととした.

複数の成分を生成するには, その成分を生成する材料とその成分同士の結合のためのさらに大きなエネルギーとが必要になる. したがって, より豊富な栄養が堆積し, そこから大きなエネルギーと多くの材料を得ることが可能な場所の土壌サンプルから複数のプラスチック成分を検出できると考える.

河川の栄養環境について比較したとき, 流れの遅い場所の方が, 速い場所に比べて, 栄養が堆積しやすいと考える. 加えて, 周囲の環境について, 周囲に田畑のある環境は, 農耕作に用いる肥料を含んだ肥沃な土地を持ち, それらからもたらされる栄養が河川へ供給されると予想できる. この点において, 供給源の近さ故に栄養が継続的に供給されやすい点と, もたらされる栄養が長い距離の運搬を経ないために栄養の量が相対的に多くなる点も考えられる. 以上のことより, 河川に栄養をもたらし得る肥沃な土地があること, 流速が比較的遅いこと, 上記の 2 つの要件を満たした環境, 特に肥沃な土地が近くにある環境が栄養豊富な場所であると考えられる. そのため, 近辺に田畑があり, 且つ比較的流速が緩やかな環境が最初に示したような大きなエネルギーを得られる環境に近づくと予想する. したがって我々は周囲に田畑があり, 且つ比較的流速が緩やかな環境で採取される細菌が複数のプラスチック成分を生成すると仮説を立てる.

3-3 調査地点について

採取場所は, 天竜川の支流であり, 長野県伊那市西部に位置する小黒川で行った.

選定理由は, 仮説に基づいて細菌採取場所の環境を区分する際に, 比較的それを行いやすかったためである.

仮説より, 周囲の環境に注目して場所を分けた. Site1・Site2・Site3 の周辺は林, Site4・Site5・Site6 の周辺は田畑, Site7 の周辺は市

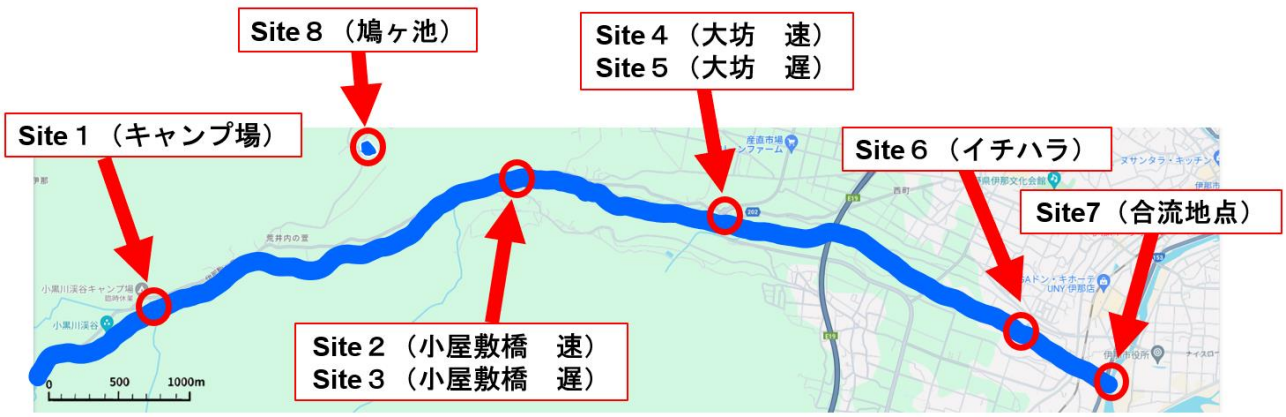


図 2:実験 1 土壌サンプル採取地点

青い線は, 長野県伊那市の西部を流れる河川である小黒川を示している. また, 赤丸は実験 1 で使用した土壌サンプルの採取地点を示す. Site2, 3, 4, 5 は, 流れの速い地点と遅い地点の両方から採取した.

街地である.水の流れが遅い場所の方が栄養が堆積しやすく,複数の成分からなるプラスチック成分を生成しやすくなるという仮説から,水の流れがほとんどない池(Site8)でもサンプルを採取することにした.

3-4 実験方法

各環境の細菌がどのようなプラスチック成分を生成したか明らかにするため,以下の手順で調査を行った.

3-4-1 土壌の採取

川底の土を 3cm ほど掘り下げ,遠沈管で,土壌部分を直接すくって土壌サンプルを採取した.
同時に,紐をつけたペットボトルが 1m を動いた時間によって河川の流れの速さを計測し,加えて気温・水温・位置情報も記録した.

3-4-2 培地の生成

乳糖ブイヨン JP'栄研'(局方対応処方)・寒天・ナイルレッドを用いた寒天培地と,乳糖ブイヨンを使用した液体培地を用いて実験を行った.寒天は 1000ml あたり 15g 使用した.

なお,ナイルレッドとは,親油性の染料で,紫外線に反応して赤い光を発する試薬であり[10],
プラスチック成分の有無を確認するために用いた.

3-4-3 細菌の培養

3-3-1 で採取した土壌 10g を滅菌水 30ml と混ぜたものをろ紙を用いてろ過し,100μl ずつ培地に播いた.この時,ポジティブコントロール用の細菌も同時に播き,30℃のインキュベーターで 4 日間培養した.培養後,培地を紫外線に当て,ナイルレッドの蛍光を観察できたものを液体培地に入れて,振とう培養器を用いて,3 日間 90～100rpm で 30℃を保ちながら培養した.

3-4-4 水分量の測定

3-3-3 で使用した土壌の余りを乾燥させ,乾燥させる前の質量の何%を水分が占めていたかで調査した.

表 1:実験 1 における土壌採取地点に関するデータ
実験 1 においての土壌を採取した地点に関するデータを示す.水分量は,採取した土壌を乾燥させ後日体積と質量から計測したものである.また,速度は,実地計測したが Site5,8 では流れがほとんどなかったため,速度は計測不可となっている.

	緯度		経度		気温〔℃〕	水温〔℃〕	速度〔mm/s〕	水深〔mm〕	水分量〔%〕
St1（キャンプ）	N	35.8312021	E	137.7876834	15.1	9.3	44.6	69.5	11.7
St2（小屋敷速）	N	35.8394	E	137.9061	17.1	11.7	571	95.00	13.5
St3（小屋敷遅）	N	35.8395	E	137.9062	17.1	11.8	165	40.00	10.3
St4（大坊速）	N	35.836301	E	137.919855	20.8	12.6	362	116	18.4
St5（大坊遅）	N	35.836302	E	137.919856	20.8	15.8	計測不可	37.00	10.3
St6（イチハラ）	N	35.8293461	E	137.9441562	19.3	14.3	53.9	73.00	19.5
St7（合流地点）	N	35.825789	E	137.949915	20.2	15.1	48.2	60.00	17.5
St8（鳩ヶ池）	N	35.8407	E	137.8922	15.2	11.7	計測不可	257	44.6

3-4-5 成分分析

液体クロマトグラフィーを用いて,生成されたプラスチック成分を調べた.

液体クロマトグラフィーで使用したカラムは Waters XBridge™(4.6×150mm,C18 3.5μm)を使用した.抽出液はアセトニトリル 8% と 0.025%硫酸 92%で作成し,50 分かけてアセトニトリルの濃度を高めアセトニトリルが 8%から,100%になるように 60℃で 1ml/min でカラムに流した.検出には,波長の長さが 220nm の UV 検出器を用いた.[11][12]

コントロールとして,同じ条件で培養したメチロバクテリウムを使用した.物質量によって分離したため,断定はできないが,特定のピークで出現した物質は,全てプラスチック成分であるとする.

3-5 結果

3-5-1 土壌採取場所について

各 Site の気温・水温・速度・水深・水分量を計測し,表 1 に示す.水深は,河川の水面から土壌までの深さを表す. Site2・Site4 では,他の場所に比べて,流れが速く,Site2 における流れの速さが 1 番速い.水分量については,Site8 が最も多かった.

3-5-2 寒天培地から単離した細菌

各培地から図 3 のように紫外線に反応して赤く光った細菌を発見することができた.

また,Site7 では,共に発光する黄色と白色の細菌が発見されたため,別々に単離して培養することにした.赤丸の部分は,液体培地に投入したコロニーを示している.

3-5-3 液体クロマトグラフィーの結果

表 2 に示されるように,全ての Site において,今回の研究で目的としたプラスチック成分が検出された.コントロールであるメチロバクテリウムを除く全ての Site において,プラスチック成分が 2 種類以上検出された.特に,Site2 では,④3HHp,Site6 では⑤3HO などの他の Site では検出されなかった,複雑な成分も検出された.各 site で検出された成分を種類ごとの割合で示した表を表 3 に示す.

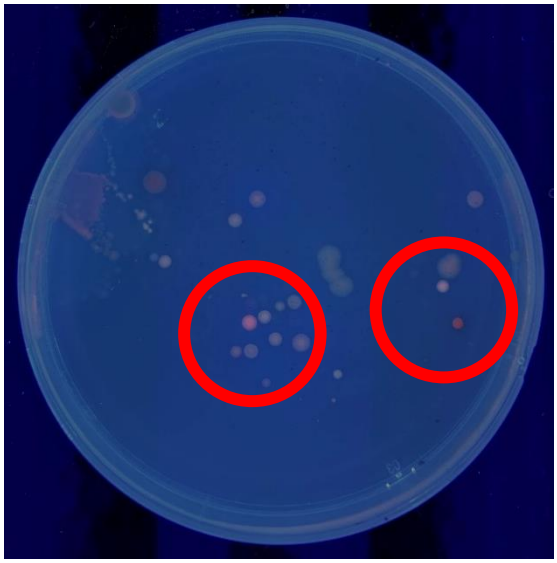


図 3:ナイルレッドによる蛍光
図中の赤丸で示したように蛍光したコロニーはプラスチック成分を生成している.

図 4:合流地点で採取した土壌サンプルを培養したプレート
図中に示した赤丸のコロニーを合流地点黄と名付け培養した.

図 5:合流地点で採取した土壌サンプルを培養したプレート
図中で示した赤丸のコロニーを合流地点白と名付け培養した.

表 3 より,Site2,Site7,Site8 においては①3HB ではなく,②3HV,⑤3HO などのより複雑な成分が全体の割合の多くを占めていた.

3-6 考察

すべての Site でプラスチック成分を生成する細菌を確認できたことから,河川,池の場所に関係なく水辺にはプラスチック成分を生成する細菌がいることが示唆される.仮説では,流速が遅い場所の細菌が複数のプラスチック成分を生成すると考えたが,今回の実験においては,規則性などを見出すことができなかった.一方,どのサンプルからもプラスチック成分を 2 種類以上検出したため,今回河川や池で採取した細菌は①3HB のみを生成する細菌よりも有用なプラスチック成分を生成することが分かった.他の Site の多くで①3HB が割合の大半を占めるのに対し,Site2 や Site7 では,②3HV や⑤3HO のような複雑な成分が,半数以上の割合を占めている.これらは,Site2 や Site7 に私たちの求める理想的なプラスチック成分を生成する細菌がいる可能性を示す.

4. 実験 2

4-1 目的

実験 1 で採取した細菌の種の同定を目指した.細菌の種を同定することは,本実験の題意である細菌とその生成するプラスチック成分及び環境に関する包括的な関係をより鮮明とすることを可能とし,本実験の成果並びに考察作成の段階において,一定量の効果を発揮しうるものである.

表 2:液体クロマトグラフィー結果
乳糖ブイヨン液体培地で培養させた各 Site の土壌に生息している細菌のプラスチック成分の量を示す.①～⑤は,図 1 で示したプラスチック成分を示す.

	①3HB	②3HV	③3HHx	④3HHp	⑤3HO
St1（キャンプ）	77989	31733			
St2（小屋敷速）	137325	276904	10706		271572
St3（小屋敷遅）	190850	30988	1202		
St4（大坊速）	74206	54886			
St5（大坊遅）	72232	45429	4847		
St6（イチハラ）	110618	71789	8315	5432	
St7（合流地点白）	28987	28239			
St7（合流地点黄）	31253	104638			
St8（鳩ヶ池）	201994	270481			
メチロバクテリウム	481453				

表 3:液体クロマトグラフィー結果(割合)
表 1 で示した細菌が有すプラスチック成分の量の成分ごとの割合を示す.①～⑤は,図 1 で示すプラスチック成分を示す.

	①3HB	②3HV	③3HHx	④3HHp	⑤3HO
St1（キャンプ）	71.00%	29.00%			
St2（小屋敷速）	19.70%	39.80%	1.50%		39.00%
St3（小屋敷遅）	85.60%	13.90%	0.50%		
St4（大坊速）	57.50%	42.50%			
St5（大坊遅）	59.00%	37.10%	4.00%		
St6（イチハラ）	56.40%	36.60%	4.20%	2.80%	
St7（合流地点白）	50.70%	49.30%			
St7（合流地点黄）	23.00%	77.00%			
St8（鳩ヶ池）	42.80%	57.20%			
メチロバクテリウム	100.00%				

4-2 実験方法

冷凍保存してあった細菌を,再度実験 1 で作成したものと同じ乳糖ブイヨン寒天培地で繁殖させ単離した.PCR 法を用いて 16S rRNA 領域の配列を,DNA を増幅させ,シーケンスを行った.

PCR 法は, Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED 25ml,プライマー 2ml,水 23ml を用いて,95℃で 1 分を 1 サイクル,95℃で 30 秒,58℃で 30 秒,72 度で 1 分を 30 サイクル,72℃で 5 分を 1 サイクルの 3 ステップで行った.使用したプライマーについては表 4 に示す.シーケンスは株式会社マクロジェン・ジャパンにシーケンスを委託し,GenBank データと比較し,種同定を行った.

表 4:PCR 法で使用したプライマー

プライマー	DNA配列	量
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1ml
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT(Y:CとTが1対1)	1ml

今回の実験では,細菌を再度培養することができた実験 1 における Site2(小屋敷速),Site6(イチハラフーズ前),Site7(合流地点黄)のサンプルについてのみ実験を行った.

4-3 結果

Site2(小屋敷速),Site6(イチハラフーズ前),Site7(合流地点黄)のサンプル内の細菌の配列を特定できた.本実験の DNA 解析の配列結果と GenBank の DNA 配列データとの比較により,一番近いその属を推定し,表 5 に示す.

データの上では,Site6 の細菌に関しては,細菌の単離ができず,複数の細菌の DNA 配列が検出されたため,細菌の属名について一種に絞って推定することはできなかった.Site7 に関してはクリセオバクテリウム属,Site2 に関してはシュードモナス属とそれぞれ推定される.

表 5:DNA 解析結果から推定される細菌の属名

	推定される細菌の属名
Site2	*Pseudomonas* sp.（シュードモナス属）
Site6	*Pseudomonas* sp.（シュードモナス属）
	Klebsiella sp.（クレブシエラ属）
	Rahnella sp.（ラーネラ属）
Site7	*Chryseobacterium* sp.（クリセオバクテリウム属）

4-4 考察

Site6 において細菌が混在してしまった理由としては,乳糖ブイヨン寒天培地での繁殖段階で特定の細菌の単離が上手くいかなかったことが考えられる.液体クロマトグラフィーの結果と合わせると,Site2 に生息するシュードモナス属の細菌は,表 2 より

①3HB, ②3HV, ③3HHx⑤3HO を生成していることが分かる.

また, クリセオバクテリウム属の細菌は①3HB, ②3HV を生成してと考えられる. これらの複雑な成分を生成する細菌に着目することは, 同細菌の生成する成分を利用した加工しやすく, 分解される生物由来のプラスチックの生成とその実用化につながると考え, 今後①3HB よりも複雑な成分を複数もつプラスチックの実用化を目的として研究を続けるにあたり, 上記の属を特定した細菌を利用することは目的を満たし得ると考える.

5. 実験 3

5-1 目的

実験 1 の結果は, プラスチック成分を生成する細菌の生息環境に関して, 我々が昨年のミニ課題研究より得た情報との一致が確認できるものであり, 河川, 池にプラスチック成分を生成する細菌が生息していた. しかし, 河川, 池に代表される水辺区域とは異なる環境下でのプラスチック成分を生成する細菌の生息の有無については依然として判明していない.

そこで河川, 池以外の環境も含んだ地点を対象とした調査を行い, 河川, 池以外の環境に生息している細菌がプラスチック成分を生成するか明らかにしたいと考えた.

5-2 仮説

水辺にいる細菌から, プラスチック成分を生成する細菌が見つかるという情報から, 実験 1 を始めたため, 河川や池よりも水分が少ない陸上からは, 生物由来のプラスチック成分を生成する細菌は発見できないのではないかと考えた.

5-3 調査場所について

上記の通り, 水辺も含め, 様々な環境を調査対象とした. 環境については, 植生の遷移を参考に大まかに河川・陰樹林・陽樹林・荒原・草原・竹林の 6 つとし, 長野県伊那市内で, 12 か所の土壌サンプルを採取した. SiteC, D は実験 1 の土壌サンプル採取場所の小黒川である.

小黒川, 三峰川, 藤沢川はいずれも天竜川の支流である.

詳しい地点情報については図 6 と表 6 の緯度, 経度, 環境に示した通りである.

5-4 実験方法

液体培地での培養を除いて 3-4 と同様の方法で実験を行った.

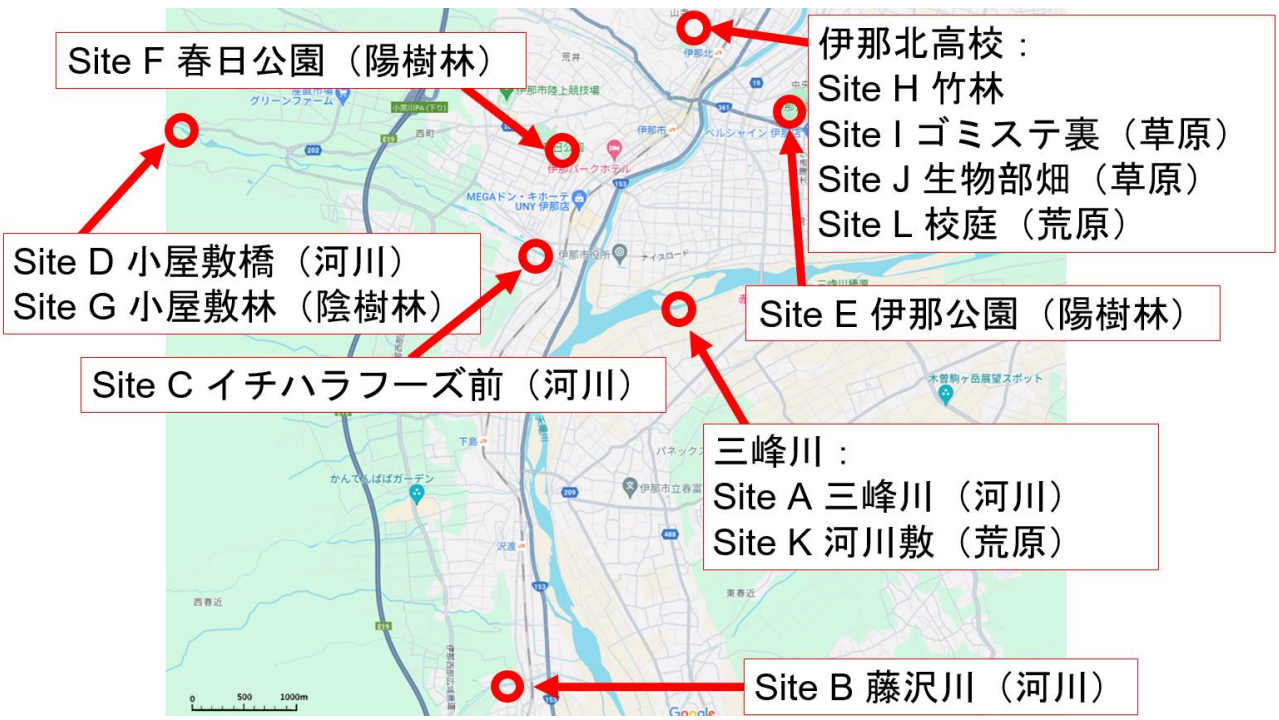


図 6: 実験 3 土壌サンプル採取地点

実験 3 で使用した土壌の採取地点は長野県伊那市内であり, 赤丸は土壌サンプルの採取地点を示す.

5-4-1 土壌の採取

採取地点で土を 3cm ほど掘り下げ,遠沈管で,土壌部分を直接すくって土壌サンプルを採取した.

同時に,河川では紐をつけたペットボトルが 1m を動いた時間によって河川の流れの速さを計測した.加えて気温・水温・位置情報も記録した.

5-4-2 培地の生成

乳糖ブイヨン JP'栄研'(局方対応処方)・寒天・ナイルレッドを用いた寒天培地と,乳糖ブイヨンを使用した液体培地を用いて実験を行った.寒天は 1000ml あたり 15g 使用した.

なお,ナイルレッドとは,親油性の染料で,紫外線に反応して赤い光を発する試薬であり[10],
プラスチック成分の有無を確認するために用いた.

5-4-3 細菌の培養

5-4-1 で採取した土壌 10g を滅菌水 30ml と混ぜたものをろ紙を用いてろ過し,100μl ずつ培地に播き,30℃のインキュベーターで 4 日間培養した.培養後,培地を紫外線に当て,光った菌を観察した.

5-4-4 水分量の測定

5-4-1 で使用した土壌の余りを乾燥させ,乾燥させる前の質量の何%を水分が占めていたかを調査した.

5-4-5 pH 測定方法

乾土 1:蒸留水 2.5 の割合の懸濁液を作り,その懸濁液をろ過して,pH テスター(HI 98103S,ハンナインスツルメンツ・ジャパン株式会社)を用いて,ろ過した液体の pH を計測した.[13]

5-5 結果

5-5-1 土壌採取場所について

荒原と区別した環境において,水分量が最も少なかったが,その他の Site 内での比較においては,目立った差が確認できなかった.

また,表 4 より,計測した土壌 pH データについて,各 Site はその pH の値により,ⒶpH5.40～pH5.90 とⒷpH6.20～pH6.40 の 2 つのグループに分けられた.Ⓐグループは弱酸性区域,Ⓑグループは中性区域にそれぞれ包括される.以

表 6:実験 3 における土壌採取地点に関するデータ
実験 3 において土壌を採取した地点に関するデータを示す.深さ,速度の項目については,河川独自の評価項目であるため,河川以外の地点については,斜線をもって示す.

	緯度		経度		環境	気温〔℃〕	地温〔℃〕	速度〔mm/s〕	深さ〔mm〕	水分量〔%〕	pH
StA（三峰川）	N	35.8250239	E	137.9622762	河川	5.70	4.70	93.70	170.0	16.9	6.40
StB（藤沢川）	N	35.7928535	E	137.9441948	河川	4.80	4.50	228.0	70.00	15.6	5.90
StC（イチハラ）	N	35.8293461	E	137.9441562	河川	8.20	5.60	45.20	128.0	26.0	5.90
StD（小屋敷橋）	N	35.8394	E	137.9061	河川	11.7	4.70	250.0	99.00	16.4	5.80
StE（伊那公園）	N	35.839896	E	137.970242	陽樹林	2.30	3.00			19.1	5.40
StF（春日公園）	N	35.8376385	E	137.947638	陽樹林	11.8	6.70			27.8	5.30
StG（小屋敷林）	N	35.8393648	E	137.9059331	陰樹林	12.3	6.30			35.2	5.70
StH（竹林）	N	35.8474928	E	137.9618555	竹林	14.2	9.00			23.0	5.50
StI（ゴミステ裏）	N	35.8474628	E	137.9618555	草原	14.1	4.70			32.7	6.20
StJ（生物部畑）	N	35.8474628	E	137.9618555	草原	13.1	6.80			16.0	6.20
StK（河川敷）	N	35.8250239	E	137.9622762	荒原	5.40	3.90			1.64	6.40
StL（校庭）	N	35.8474928	E	137.9618555	荒原	13.9	12.3			5.06	6.40

上のことより,本実験において採取した各 Site の土壌は弱酸性土壌と中性土壌の 2 つに大別された.

5-5-2 ナイルレッドでの蛍光

全ての土壌サンプルでナイルレッドへの反応による蛍光が確認できた.
ナイルレッドに反応し,蛍光を発するコロニーの特徴にバリエーションが見られた.

5-6　考察

pH の値に関して,弱酸性,中性に分けられるものの,値の間に大きな差は認められず,値の存在範囲には一定程度のまとまりを確認した.

全ての土壌サンプルでナイルレッドへの反応を確認できたことから,今回採取した環境においては,仮説において予想した採取場所が水辺であることと生物由来のプラスチック成分を生成する細菌の当該土壌への生息の可否は関係がないと考える.加えて,実験 1 と合わせて,プラスチック成分を作る細菌は,河川・池固有のものではないと考える.
また,今回計測した採取地点のデータについて,生息条件との関連を見出すことはできなかった.

6. 結論

生息域と細菌の種類の関係については私達が今実験で設定した条件においては,その関連性を認めることができなかった.

しかし,実験 1 から,すべての河川,池において,本研究の目的であるプラスチック成分を生成する細菌を,土壌を採取したすべての地点で発見することできた.加えて,実験 3 よりプラスチック成分を生成する細菌を河川・池以外の陸上地点においても発見することができた.これらの実験により,プラスチック成分を生成する細菌は水辺を生息域とすることに固執せず様々な場所に生息していることが分かった.

また,実験 2 では,本研究で提示した理想的なプラスチックに必要な複数のプラスチック成分を生成する細菌として,シュードモナス属,クリセオバクテリウム属などの菌を池,河川から発見することができた.特にシュードモナス属の細菌に関してはより複数の成分を生成しており私たちの求めるプラスチック製品の実用化に際してはより有用であると考える.これらの細菌にこれから注目し,よりコストがかからず大量にプラスチックを製造する方法を探すことにも合わせて取り組むことにより,研究の動機によって提示した,石油の使用やマイクロプラスチック問題などの課題を解決することに繋がると考える.

7. 今後の展望

河川の環境とその河川に生息する細菌が生成するプラスチック成分との関係を明らかにすること,河川以外の場所に生息する細菌の生成するプラスチック成分の分析,土壌成分の分析などに関する実験を実施できなかった.これらを行うことで,より実用的な複数のプラスチック成分を生成する細菌の選別とその細菌が生息する環境条件の特定,採取段階のさらなる効率化を図ることが可能となると考えられる.結果的にバイオプラスチックの日常生活へのさらなる拡充につながるため,プラスチックなどの製造による二酸化炭素の排出や,石油自体の枯渇,マイクロプラスチック問題について解決することに繋がると確信し,私達はこれを今後の展望とする.

8. 謝辞

鳩ヶ池管理者唐木新詠様に,鳩ヶ池での土壌の採取許可をいただき実験に協力していただきました.また,信州大学農学部農学生命科学科生命機能科学コース生物有機化学研究室の伊原正喜准教授,ならびに研究室の方々,機器の使用や研究の進め方,実験についての助言など,様々な面で協力をしていただきました.この場を借りて深く御礼申し上げます.

9. 参考文献

[1] 消費者庁 第 1 部 第 2 章 第 3 節 (1)プラスチックごみ問題の現状
https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_research/white_paper/2020/white_paper_135.html
[2] 生分解性プラスチック入門
http://www.jbpaweb.net/gp/
[3] バイオマスプラスチック入門
http://www.jbpaweb.net/bp/

[4] カネカ生分解バイオポリマーGreen Planet®でなぜ世界が健康になるの？
https://www.kaneka.co.jp/solutions/phbh/
[5] 猪野 光太郎・佐藤 俊(2021)'超高分子量ポリヒドロキシアルカン酸: 微生物生産とその物性'
https://www.jstage.jst.go.jp/article/oleoscience/21/12/21_517/_pdf/-char/ja
[6] 田口 精一(2020)「多元ポリ乳酸」の生合成と生分解メカニズム解明の鍵'オリゴマー'
https://katosei.jsbba.or.jp/view_html.php?aid=1289
[7] 岩田 忠久(2013)'微生物産出ポリエステルの構造,物性及び生分解性'
https://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/db/seeds/qa2014_39.pdf
[8] Neetu Israni, Srividya Shivakumar(2020)'Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from directly valorized ragi husk and sesame oil cake by Bacillus megaterium strain Ti3: Statistical optimization and characterization'
https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019385150
[9] 前田 勇(2007)'細菌ポリエステル及び関連代謝の新規利活用システムに関する研究'
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8502_sogo_02.pdf
[10] R&Dsystem 'ナイルレッド'
https://www.rndsystems.com/products/nile-red_7387
[11] Stefanie Duvigneau· Alexander Kettner· Lisa Carius· Carola Griehl · Rolf Findeisen· Achim Kienle(2021)'Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)'
https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11265-3
[12] Hiroyasu Satoh, Toshihiko Sakamoto, Yusuke Kuroki, Yuko Kudo, Takashi Mino(2016)'Application of the Alkaline-Digestion-HPLC Method to the Rapid Determination of Polyhydroxyalkanoate in ActivatedSludge'
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jwet/14/5/14_16-027/_pdf
[13] 【土作り】土壌 pH はどう測る？作物の生育に適した pH 値の測定&調整方法
https://minorasu.basf.co.jp/80402