

VII — 9

発泡スチロールゼロエミッション処理のためのポリスチレン分解微生物の同定と分解能測定

○東北学院大学工学部	学生員 遠藤 剛	東北学院大学大学院	鈴木 佑介
東北学院大学大学院	Khin Thida Linn	東北学院大学環境防災工学研究所	及川 栄作
(株) 創造的生物工学研究所	及川 胤昭	東北学院大学工学部	正会員 石橋 良信

1. はじめに

発泡ポリスチレン（発泡スチロール）はポリスチレンビーズを蒸気で過熱することによって形成され、衝撃緩衝性に優れ、任意の形に加工することが容易で、安価であることから、食品トレイや家電製品の梱包剤として大量に使用されている。発泡スチロールの再生利用と処理・処分の現状はリサイクル化が 58%、埋め立て処理が 29%、焼却処分が 13%である。このうち、リサイクル化の内訳は、発泡スチロール再生やビデオカセットなどのプラスチック製品に利用されるマテリアルリサイクルが 35%、温水プールなど焼却熱エネルギーに利用されるサーマルリサイクルが 23%となっている¹⁾。

溶剤を用いたマテリアルリサイクル工程において、オレンジの皮から精製されるモノテルペンの香り物質リモネンが注目されている。リモネンは人体に影響なく、安全で、減容スピードも速く溶剤に適した物質として利用する企業も知られてきた。演者らはリモネンをバイオ技術で作製した大腸菌を用いて、リモネンを生産する方法を開発した²⁾。

一方、いままで汚れたものなどリサイクルできないために埋め立て処理していた発泡スチロールを、生分解する処理方法についても検討している。この方法は前述のリモネン生産菌の生産したリモネンを用いた減容の後に、溶出したポリスチレンをポリスチレン分解微生物やスチレン分解微生物を用いてコンポスト化するものである。スチレン分解微生物の単離および分類については一昨年前に報告済みである³⁾。本研究は新たに単離したポリスチレン耐性菌の 16S リボソーム RNA(16S-rRNA)を用いた分類についての報告である。

2. 研究方法

1) ポリスチレン分解菌の単離

ポリスチレン分解菌の単離に用いた土壌は仙台市若林区六丁ノ目産業道路の路肩街路樹の根元より採取した。20g の土は 50mL 容の遠心チューブに移し、これに生理食塩水を加えて 50mL に調整した。調整した溶液をボルテックスミックスチャーを用いて混合し、3000 rpm で 5 分遠心した。500 μ L の遠心上清を 10PPm スチレントリマー-トルエン溶液（関東化学）をそれぞれ 10, 30, 50, 100, 300, 500 μ L 加えた 50 mL の基礎無機塩培養液に植え、100 mL 容の共栓付き三角フラスコを用いて、30 $^{\circ}$ C で一週間振とう培養した。濁りが確認された培養液（10, 30, 50 μ L を加えた培養液のみ）500 μ L を同じスチレントリマーを加えた基礎無機塩培養液に植え、30 $^{\circ}$ C で一週間振とう培養した。この操作をさらにもう一度繰り返した。最終的ににごりが確認された培養液（10, 30 μ L を加えた培養液）50 μ L をそれぞれ、2 枚ずつ予め 10PPm スチレントリマー-トルエン溶液を 10, 30 μ L 塗抹した基礎無機塩寒天培地（計 8 枚）に塗抹した。この寒天培地を 30 $^{\circ}$ C で 1 日静置した。翌日寒天培地上に形成したシングルコロニー 8 コ（1 枚あたり 1 コ）を 5ml の 1xLB 培地に植え継ぎ 30 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。増殖が確認された、6 株について、この培養液を -85 $^{\circ}$ C で 30%グリセロール溶液ストックにして保存し 16S-rRNA 塩基配列決定実験に用いた。

2) 16S-rRNA 塩基配列の決定および分類

トータル DNA の調製は 50mL の 1xLB 培養液から遠心分離して集めた菌体に、リゾチーム処理、SDS-proteinase K 処理、フェノール:クロロホルム処理、エタノール沈澱処理を行って調製した。DNA は 20~100 μ l の TE 溶液に溶解した。PCR は次の条件で行った。94℃ 45 秒、60℃ 45 秒、72℃ 2 分を 25 サイクル、72℃ 10 分を 1 サイクル。PCR プライマーは全微生物の 16S リボソーム RNA に対応する 520F プライマーおよび 1400R プライマーを用いた。PCR 産物は pGEM-Tvector (プロメガ) に挿入し、大腸菌に導入してクローン化した。塩基配列は 310 Genetic Analyzer(ABI)を用いて決定し、データベースとの相同性解析は遺伝情報解析ソフトウェア Genetyx MAC ver.9 を用いて行った。データベース相同性解析は National Center for Biotechnology Information(NCBI)ホームページ上で行った。

3.実験結果

1) 単離した 6 株の 16S-rRNA 塩基配列に基づく分類結果は表に示す通りである。PSD-1, -3, -4, -5, -4 株は同じ *Arthrobacter woluwensis* に、分類され、PSD-2 株は *Xanthomonas* 属に、また PSD-6 株は *Sphingobacteriu* 属に分類された。

表 分類結果

	Species Name	Homology (%)	No.
PSD-1	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	99.7%	AS16S1551
PSD-2	<i>Xanthomonas cynarae</i>	99.1%	AF208315
	<i>Xanthomonas gardneae</i>	99.1%	AF123093
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	99.1%	AF188831
PSD-3	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	99.7%	AS16S 1551
PSD-4	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	99.4%	AS16S 1551
PSD-5	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	99.8%	AS16S 1551
PSD-6	Uncultured bacterium clone Bisi 29	94.6%	UBA318173
	<i>Sphingobacterium-kike</i> sp.	94.3%	SS16PC19
	<i>Sphingobacterium comitans</i>	94.2%	CC16SRRN1

※No.:Accession Number

2. おわりに

分類した菌株のポリスチレン分解能の実験については発表に間に合うように現在検討中である。これらの減容剤リモノンの大腸菌生産とポリスチレン分解（耐性）微生物およびスチレン分解微生物を利用した発泡スチロール処理法を確立することができれば、発泡スチロールのリサイクル効率を高めるだけでなく、発泡スチロールのゼロエミッション処理法の開発につながるものと考えられる。

参考文献

- 1) 発泡スチロール再資源化協会, <http://www.jepsra.gr.jp/>
- 2) 第 29 回環境システム研究論文発表会講演集(2001 年 11 月)
- 3) 平成 11 年度土木学会東北支部技術研究発表会講演集(2000 年 3 月)