

(39) 発泡スチロールゼロエミッション処理構築のためのポリスチレン
分解微生物の単離と分解特性

Isolation and Characterization of Polystyrene Degrading Microorganisms
for Zero Emission Treatment of Expanded Polystyrene

○及川 栄作¹、キン チダ リン²、遠藤 剛²、及川 胤昭³、石橋 良信⁴
Eisaku OIKAWA¹, Khin Thida Linn², Takeshi ENDO², Taneaki OIKAWA³, Yoshinobu ISHIBASHI⁴

ABSTRACT: Isolation of bacteria which could decompose styrene and polystyrene as carbon source was achieved to actualize the biological zero emission treatment of expanded polystyrene. Isolated microorganisms by 16S ribosomal DNA analysis were *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. for styrene decomposition, and *Xanthomonas* sp. and *Sphingobacterium* sp. for polystyrene decomposition. Especially, *Bacillus* sp. STR-Y-O strain decomposed both styrene and polystyrene. Styrene and polystyrene were reduced 40 % (9g) and 56 % (34g) of initial concentrations (quantity), respectively, in 8 days by strain STR-Y-O. The result is the first report for polystyrene biodegradation. It became possible that limonene melted expanded polystyrene, and styrene and polystyrene as melting matter were decomposed by the isolated microorganisms. In a series of experiments, the possibility that the zero emission process of expanded polystyrene was shown by those microorganisms.

KEYWORDS; Zero Emission; Expanded Polystyrene; Degradation; Soil Microorganism

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64.7%、埋め立て処理が24.7%、焼却処分が10.6%である。この内の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39.1%、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25.6%となっている¹⁾。

¹オルガノ株式会社, 新エネルギー産業技術総合開発機構フェロー (Organo Corporation, New Energy Industrial Technology Development Organization Fellow)

²東北学院大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku Gakuin University)

³株式会社創造的生物学研究所 (Research Institute of Creative Biotechnology Corporation)

⁴東北学院大学工学部環境土木工学科 (Department Civil and Environmental Engineering, Tohoku Gakuin University)

マテリアルリサイクル工程の始めは発泡スチロールを有機溶剤などによって溶かしたり（溶剤減溶）、または熱などによって粉砕されることによって減容される。溶剤減容された場合は、溶剤とポリスチレンがそれぞれ分離精製され両者が再利用される。粉砕減容された場合は、インゴット（ポリスチレン塊）として再び発泡スチロールの原料となっており、ポリスチレンペレットとしてプラスチック製品に再利用される。

筆者らは従来オレンジの皮から精製される減溶剤の一種リモネンを組換え大腸菌を用いることによって、より低コストに大量生産する方法に取り組んできた。一方、今後さらなるリサイクル率を向上させるために、単純消却処理や埋め立て処理していた発泡スチロールの生分解処理法についても提案している。これは前述のリモネンを用いた減容の後に、溶出したポリスチレンやスチレンを微生物によってコンポスト化する方法である。減容剤リモネンの大腸菌生産とスチレン分解微生物を併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、リサイクル効率を高めるだけでなくゼロエミッション処理法の構築につながるものと考えられる。

このような発泡スチロールゼロエミッション処理構想²⁾実現のために、本研究ではスチレン分解菌や、いまだ報告がないが構想実現にとって不可欠である、ポリスチレン分解菌を環境中から単離して役立てることを目的とした。

2. 実験方法

1) スチレン酸化細菌の単離

スチレンを酸化分解できる能力を持つ微生物はO'Connorらの報告³⁾より、スチレン分解における初期段階で働くスチレンモノオキシゲナーゼ(SMO)によってインドール（無色）をインディールブルー（青色）に酸化させる反応も触媒できることが明らかになっている。スチレン酸化細菌はインドールを塗抹した寒天培地上に青色のコロニーとして容易に識別できる。

スチレン酸化菌の単離に用いた土壌試料は仙台市内の国道4号線の路肩または山形市大字八森の畑より採取した。20 gの土壌試料を生理食塩水で懸濁し、室温30℃で10分遠心した。遠心後の上清500 μ lを各種の濃度添加したスチレンモノマーを炭素源とする50 m lの0.001% (w/v) 酵母エキスを含む基礎無機塩培地⁴⁾に植え継いだ。スチレンは原液をそれぞれ10 μ l (1.74 mM), 30 μ l (5.24 mM), 50 μ l (8.72 mM), 100 μ l (17.4 mM), 300 μ l (52.4 mM), 500 μ l (87.2 mM)を添加した（カッコ内は終濃度）。スチレンを添加した培養液を100 m l容の供給付三角フラスコに移し、30℃, 130 rpm, 7日間振とう培養した。増殖を示すにぐりが確認された、スチレンを10 μ l添加した試料の培養液100 μ lを基礎無機塩寒天培地に塗抹し、室温の暗所で静置培養した。寒天培地には予め100 mMのインドール（N,N-ジメチルホルムアミドに溶解）を100 μ l塗抹した。7日間程度培養して、青く発色したコロニーを同様の寒天培地に白金耳で画線し、さらに室温で7日間程度静置培養した。寒天培地に形成された単一の青色コロニーを10 m lのLB培地⁵⁾に植え、30℃で1～2日間振とう培養した。この培養液に等量の60%グリセロールを加え、-85℃で凍結保存した。

2) スチレントリマー耐性菌の単離

ポリスチレン分解菌はSMO活性を保有することが明らかでないことから、スチレントリマー耐性菌として単離を試みた。スチレントリマー耐性菌は仙台市若林区六丁ノ目産業道路わきの街路樹根元の土壌の試料から単離した。採取した20 gの土壌試料を生理食塩水で懸濁し、室温、3,000 rpmで5分遠心した。遠心後の上清500 μ lを各種の濃度添加したスチレントリマーを炭素源とする50 m lの0.001% (w/v) 酵母エキスを含む基礎無機塩培地に植え継いだ。スチレントリマー（10 μ g/m lトルエン溶液、関東化学）は原液をそれぞれ10 μ l (1.56 μ M), 30 μ l (4.68 μ M), 50 μ l (7.8 μ M)

M), 100 μ l (15.6 μ M), 300 μ l (46.8 μ M), 500 μ l (78 μ M)を添加した(カッコ内は終濃度)。スチレントリマーを添加した培養液を100 m l 容の供給付三角フラスコに移し, 30℃, 130 rpm, 7日間振とう培養した。濁りが確認された, 10 μ l, 30 μ l, 50 μ l スチレントリマーを添加した試料の培養液500 μ l を新しい同じ培地に植え継ぎ, さらに7日間培養した。同じ操作をもう一度行った。この集積培養液100 μ l を基礎無機塩寒天培地に塗抹し, 室温の暗所で7日間静置培養した。寒天培地には予めスチレントリマーをそれぞれ10 μ l, 30 μ l, 50 μ l 塗抹した。出現したコロニーを同様の寒天培地に白金耳で画線し, さらに室温の暗所で3日間培養した。それぞれのプレートから単一のコロニーを10 m l のLB培地に植え, 30℃で1~2日間振とう培養した。この培養液に等量の60%グリセロールを加え, -85℃で凍結保存した。スチレントリマー耐性菌のSMO活性試験は上述のスチレン酸化細菌の単離実験と同様にインドールを塗抹した基礎無機塩寒天培地にグリセロールストックしておいたポリスチレン耐性菌を植え, 形成されたコロニー色が青く発色するのを観察する方法によって行った。

3) 抗生物質耐性試験

スチレン酸化細菌およびスチレントリマー耐性細菌の抗生物質耐性能を4種類の抗生物質に対して検討した。-85℃でグリセロールストックしておいた細菌を, 終濃度50 μ g/m l の抗生物質入り1×LB寒天培地に画線して植え, 30℃で2~7日間静置培養した。抗生物質はアンピシリン, カナマイシン, テトラサイクリンを用いた。耐性はコロニー形成能力から判定した。

4) 16SリボソーマルDNA塩基配列の決定

スチレン酸化細菌およびスチレントリマー耐性細菌からのトータルDNAの調製は口野らの方法⁶⁾に従った。調製したトータルDNAからのPCRによる16SリボソーマルDNA(16S-rDNA)のクローニングは及川らの方法⁷⁾に従った。PCRプライマーは520Fプライマー5'-GCCAGC (AC) GCCGCGGT-3' および, 1400Rプライマー5'-ACGGGCGGTGTGT(GA)C-3'を用いた。スチレン酸化細菌の分類には16S-rDNAと23S-rDNAスペーサー領域を増幅するためのプライマー⁸⁾ITS-A-f; 5'-CCTTGTACACACC GCCCGT-3' および ITS-A-r; 5'-AAAATAGCTTTTGTGGAG-3'を用いた。DNA塩基配列は310 Genetic Analyzer(ABI)を用いて決定し, DNA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。

5) スチレン酸化菌のスチレン分解能測定

スチレン分解実験は単離した6株のスチレン酸化細菌の内のSD-10株とSTR-Y-O株について試みた。-85℃でグリセロール溶液に保存しておいたスチレン酸化細菌をLB寒天培地に画線し, 30℃で一晩静置培養した。翌日, 単一のコロニーを白金耳でかき取り, 50 m l のM9最小培地⁵⁾に植え継ぎ, 100 m l 容の供給付き三角フラスコを用いて, 30℃で一晩振とう培養した。500 μ l の培養液を新しい50 m l のM9最小培地に植え継ぎ培養を続けた。コントロールとしてM9最小培地のみを用いた。吸光度OD_{600 nm}が0.2に達したところで, ヘキサンで希釈した0.1 μ l/m l の濃度のスチレンモノマー溶液を200 μ l (18 μ g)添加した。その後, 30℃で8日間振とう培養を続けた。培養液を24 時間おきに4 m l 分取し, 2 m l のヘキサンと混合した。混合した溶液を遠心分離し, ヘキサン層を回収した。回収したヘキサン溶液はふた付きのバイアルビンに移し, ガスクロマトグラフ分析まで4℃で保存した。この内の5 μ l をガスクロマトグラフ(GC)分析に用いて, スチレン濃度を測定した。GC装置は島津のGC-9Aを用いた。カラムはFFAP(島津)を用いた。GC分析の条件はキャリアーガスをHe, カラム温度を130℃, 検出器温度を250℃で行った。

6) スチレントリマー耐性菌のポリスチレン分解能測定

ポリスチレン分解実験は16S-rDNAの塩基配列より分類された微生物のうち PSD-1株, PSD-2株, PSD-3株, PSD-6株およびスチレン酸化細菌STR-Y-O株を用いた。-85℃でグリセロール溶液に保存しておいた菌株をLB寒天培地に画線して、30℃で1～2日間静置培養した。単一のコロニーを白金耳でかき取り、15 mℓのLB培地に植え継ぎ、50 mℓ容の三角フラスコを用いて、30℃で一晩振とう培養した。250 μℓの培養液を25 mℓのM9培地それぞれの耐性菌につき4本ずつに植え継ぎ、100 mℓ容の共栓付き三角フラスコを用いて、30℃で培養した。コントロールとして M9 培地のみを用いた。吸光度OD600 nmが0.2に達したところで、ジクロロメタンで溶解した0.3 mg/mℓのポリスチレンビーズ（重合度 $n=3,000$ ）溶液を200 μℓ（60 μg）添加した。その後、30℃で8日間振とう培養を続けた。0, 2, 5, 8日目の培養液25 mℓを、50 mℓ容のガラス製の遠心管に移した。2.5 gのNaClを加え良く混合して溶解した。続いて2 mℓのジクロロメタンを加え良く混合した。混合した溶液を室温、3,000 rpm, 5 分遠心分離し、ジクロロメタン層を2 mℓ容のマイクロチューブに移した。0.1gのNa₂SO₄無水を加え良く混合し、室温、10分静置した。フラッシュ遠心し、上清をふた付きのバイアルビンに移し、分析まで4℃で保存した。この内の10 μℓを高速液体クロマトグラフ分析(HPLC)に用いてポリスチレン濃度を測定した。HPLC装置は島津のLC-10ADを用いた。カラムはShim-pack GPC-803(島津)を用いた。HPLC分析の条件は移動相をテトラヒドロフラン、流速を1 mℓ/min, カラム温度を30℃, 検出波長254 nmで行った。

3. 実験結果および考察

1) スチレン酸化細菌の分類結果

環境中から10株以上のインドール（無色）をインディーゴブルー（青色）に酸化させる能力

表-1 16S-rDNA 塩基配列に基づく分類結果

株 名	微生物名	相同性	Accession NO.
スチレン酸化細菌			
SD-1, SD-4, SD-9	<i>Aerobacterium resistens</i>	99.3%	Y14699
"	<i>Microbacterium nematophilum</i>	99.3%	AF319539
SD-2	<i>Arthrobacter wolowensis</i>	99.8%	X93353
SD-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	99.9%	AJ417068
STR-Y-O	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.9%	AF290545
"	<i>Bacillus cereus</i>	99.9%	AF290546
スチレントリマー耐性細菌			
PSD-1, PSD-3, PSD-4,	<i>Arthrobacter wolowensis</i>	99.8%	X93353
PSD-5	"	99.8%	X93353
PSD-2	<i>Xanthomonas cynarae</i>	99.1%	AF208315
"	<i>Xanthomonas gardneri</i>	99.1%	AF123093
"	<i>Xanthomonas campestris</i>	99.1%	X95917
PSD-6	Uncultured bacterioides	94.6%	AJ296577
"	<i>Sphingobacterium</i> -Like sp.	94.3%	X89912
"	<i>Sphingobacterium comitans</i>	94.2%	X91814

を有する細菌を単離することができた。SD-1～SD-10株は仙台市の国道沿いから単離された細菌であり、STR-Y-O株は山形市の畑から単離した細菌である。単離した細菌のうち、6株の16S-rDNA塩基配列に基づく分類を試みた結果を表-1に示す。SD-1, SD-4 およびSD-9 株はいずれも *Aureobacterium resistens*および*Microbacterium nematophilum*と99.3% の相同性が示された。SD-2株は *Arthrobacter woluwensis*と99.8%, SD-10株は *Pseudomonas* sp.と99.9%, STR-Y-O株は *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*と99.9% の相同性が示された。ここで、*Bacillus anthracis*は炭疽菌として知られる病原菌であるので、Ameurらの方法⁸⁾に従って、16S-rDNAと23S-rDNAの塩基配列の間のスパーサー領域の塩基配列を決定して炭疽菌か否か確認した。その結果、約400塩基の3塩基に炭疽菌に存在せず、*B. cereus*と *B. thuringiensis*のみに存在する塩基が確認されたことから、炭疽菌でないことを確認できた。

2) スチレントリマー耐性細菌の分類結果

10株のスチレントリマーに対して耐性を示す細菌を単離することができた。この内の6株の16S-rDNA 塩基配列に基づく分類の結果、PSD-1, PSD-3 および PSD-4 株は *Arthrobacter woluwensis*と99.8%の相同性が示された(表-1)。これらの株は同じ仙台市内の道路沿いで単離されたスチレン酸化細菌のSD-2株と同株でないかと考えている。また、PSD-2株は*Xanthomonas cynarae*, *Xanthomonas gardneri* および *Xanthomonas campestris*といずれも99.1%の相同性が示された。PSD-6株は *Uncultured bacterioides*, *Sphingobacterium*-Like sp. および*Sphingobacterium comitans*とそれぞれ94.6%, 94.3%および94.2%の相同性が示された。

3) 抗生物質耐性およびSMO活性

3種類の抗生物質に対する耐性を調べた結果とスチレンモノオキシゲナーゼ(SMO)活性の有無を調べた結果を表-2に示す。スチレン酸化細菌とスチレントリマー耐性細菌はSTR-Y-O株以外はカナマイシン耐性があり、スチレン酸化細菌はすべてアンピシリン耐性であり、またスチレントリマー耐性細菌はPSD-2株を除いてテトラサイクリン耐性であることが特徴である。これまで遺伝子まで特定されている3株^{9,10,11)}のいずれも*Pseudomonas* 属のスチレン分解菌は、すべてSMOをコードする *strA* および *strB*遺伝子を含む*str*オペロン有することが明らかになっている。これら3株の *strA* 遺伝子間の相同性は92%ありPCRによりクローン化がなされている⁹⁾。単離したスチレントリマー 耐性菌においてもすべての株にSMO活性が示された。既存の *strA* 遺伝子に対するPCRプライマーを合成して、単離した7株のスチレン およびポリスチレン分解菌からのトータルDNAを鋳型としてPCRを行い、*strA* 遺伝子の所在の確認を試みた。その結果、*strA*遺伝子と相同性のあるクローンは得られなかった(データは示してない)。

表-2 抗生物質耐性およびSMO 活性

株名	抗 生 物 質 耐 性			SMO 活性
	Ap	Km	Tc	
SD-1	+	+	-	+
SD-2	+	+	-	+
SD-4	+	+	-	+
SD-9	+	+	-	+
SD-10	+	+	-	+
STR-Y-O	+	-	-	+
PSD-1	-	+	+	+
PSD-2	+	+	-	+
PSD-3	-	+	+	+
PSD-4	-	+	+	+
PSD-5	-	+	+	+
PSD-6	-	+	+	+

Ap: Ampicillin, Km: Kanamycin, Tc: Tetracycline,

SMO: Styrene Monooxygenase

4) スチレンおよびポリスチレン分解能実験結果

2株のスチレン酸化細菌を用いてスチレン分解能実験を試みた結果を図-1に示す。SD-10株は培養8日目で初期濃度の50% (9 g)の分解を示し、STR-Y-O株は初期濃度の40% (7.2 g)の分解を示した。また、スチレントリマー耐性菌3株とスチレン分解が明らかになったSTR-Y-O株を用いて、ポリスチレン分解能実験を試みた。その結果、4株すべてがポリスチレン分解を示し、PSD-1株、PSD-2株、PSD-6株およびSTR-Y-O株は培養8日目でそれぞれ47%、24%、43%および56% (34g)の分解を示した(図-2)。発泡スチロールはポリスチレンビーズに空気を吹き込んで50倍の体積に膨らませて作製される。よってSTR-Y-O株は体積が1700cm³の約12cm立方体発泡スチロール片を8日間で分解できる能力があると見積もることができる。

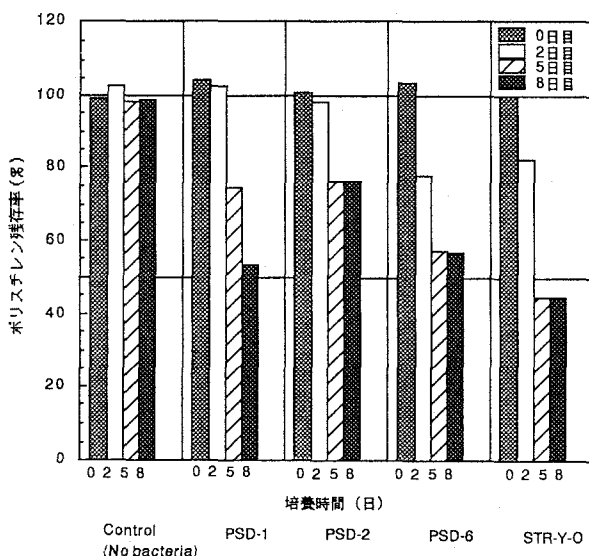
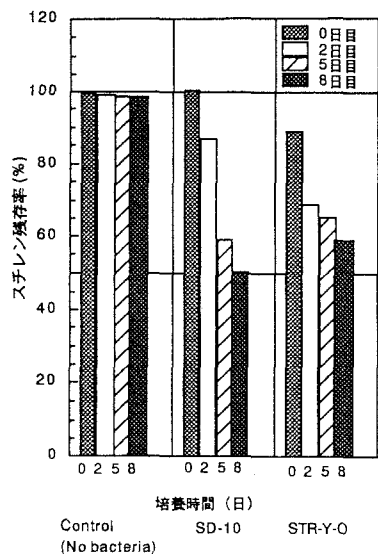


図-1 スチレン酸化細菌のスチレン分解能経日変化

図-2 スチレン酸化細菌およびスチレントリマー耐性菌のポリスチレン分解能経日変化

STR-Y-O株はスチレン分解能を有すると共に単離した細菌の中で最も高いポリスチレン分解能を有していた。これまで、ポリスチレンを分解する細菌の報告はなく、単離した細菌のポリスチレン分解メカニズム解明が今後の課題である。しかしながら、ポリスチレン分解菌すべてにSMO活性が認められたことから、既存の*str*オペロン⁹⁾と同様にスチレンを酸化させてスチレンオキシドを生成し、その後フェニルアセトアルデヒドを経由してフェニルアセチル-CoAに至る分解経路を有する可能性がある。一方前述の実験ではDNA相同性に基づくPCRによって、*strA*をクローン化ができなかった事実もあり、新規のSMOの可能性やポリスチレンの側鎖に反応して低分子化するメカニズムが不明であることなどから*str*オペロン全体の構造解析を行って、既存のデータと比較して見る必要がある。

これまで知られているスチレン分解菌は*Pseudomonas*属と*Xanthobacter*属¹²⁾などであったが、新たに*Bacillus*属の微生物を同定することができた。また、ポリスチレンを分解する*Arthrobacter woluwensis*, *Xanthomonas*属, *Sphingobacterium*属の多属種の細菌を単離することができ、ポリスチレン分解細菌の多様性が示された。さらに自動車タイヤの磨耗による、スチレンやポリスチレンが多く含まれる道路沿いの土壌は、多種の分解細菌生息場所の一つであることを示すことができた。

4. おわりに

ポリスチレン分解菌の発見によって、発泡スチロールゼロエミッション処理構想を実現できる可能性を示すことができた。リモネンを低コストに生産する方法が今後の課題であるが、オレンジの皮のしぼり汁からリモネンを大量精製する事業を始めた企業も知られ、リモネンが低価格で入手できるようになりつつあることも考慮する必要がある。今後は、単離した細菌を用いて、リモネンで溶解した発泡スチロールの分解についての実験など、発泡スチロールのゼロエミッション処理の実現のためにより具体的な実験研究を試みる考えである。最後に本研究の協力者である、当時大学院生の鈴木祐介君に謝意を表する。

参考文献

- 1) 発泡スチロール再資源化協会, <http://www.jepsra.gr.jp/> (2003年5月23日)
- 2) 及川榮作, 鈴木祐介, Khin Thida Linn, 及川胤昭, 石橋良信 (2001) リモネン産生遺伝子組換え大腸菌を主体とする発泡スチロールのゼロエミッション処理への提案, 29回環境システム研究論文発表会講演集, 215-220
- 3) O'connor K. E., Dobson A. D. W., and Hartmans S. (1997) Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4287-4291.
- 4) 芳倉太郎, 北野政昭, 西尾孝之, 森下日出旗, 池田勝洋, 新妻啓寿 (1991) 2-MIB分解菌の高度上水処理過程からの分離と2-MIB分解, 用水と廃水, 33: 463-470
- 5) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 6) 口野嘉幸, 平井久丸, 桜林郁之介編 (1987) 遺伝子・タンパク質実験操作プロット法, ソフトサイエンス社, 32-38.
- 7) 及川榮作, 石橋良信, 阿部隆弘, 梅津 洋 (2000) かび臭および毒素産生藍藻類の系統発生的分類, 土木学会環境工学研究論文集, 37:183-191.
- 8) Ameer Cherif, Sara Borin, Aurora Rizzi, Hadia Ouzari, Abdellatif Boudabous, and Daniele Daffonchio. (2003) *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes. Appl. Environ. Microbiol. 69:33-40.
- 9) Niall D. O'Leary, Kevin E. O'Connor, Wouter Duetz and Alan D. W. Dobson. (2001) Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3. Microbiology 147: 937-979.
- 10) Ana Velasco, Sergio Alonso, Jose L. Garcia, J. Perera, and Eduardo Diaz. (1998) Genetic and Functional Analysis of the Styrene Catabolic Cluster of *Pseudomonas* sp. Strain Y2. J. Bacteriol. 180:1063-1071.
- 11) Pedro Miguel Santos, Janet Martha Blatny, Ilaria Di Bartolo, Svein Valla, and Elisabetta Zennaro. (2000) Physiological Analysis of the Expression of Styrene Degradation Gene Cluster in *Pseudomonas fluorescens* ST. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1305-1310.
- 12) Hartmans, S., Smits, J. P., van der Werf, M. J., Volkering, F. and de Bont, J. A. M. (1989) Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene degrading *Xanthobacter* strain 124X. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2850-2855.