

マイクロプラスチックが大腸菌の増殖に与える影響

班員 押切 貴晴、佐竹 美洗、高田 蒼大、山本 愛佳
担当教諭 高畠 侑馬

The purpose of this study is to determine the effects of microplastics on the inhibition of *Escherichia coli* growth. Microplastics inhibited *E.coli* growth and polyurethane showed higher transmittance. Styrofoam soaked in LB medium for 48 hours showed higher transmittance. In conclusion, microplastics inhibited *E.coli* growth; their inhibitory capacity varied depending on the type of plastic and may be influenced by the amount of chemicals present.

1 はじめに

近年、プラスチック製品の大量生産と廃棄により、環境中のプラスチックゴミは急速に増加している。特に、直径5 mm以下の微細なプラスチック粒子であるマイクロプラスチックは海洋・河川・土壌・大気など様々な環境中に広く分布しており、地球規模の環境問題として注目されている。マイクロプラスチックは紫外線や物理的摩耗によって形成され、長期間分解されずに環境中に蓄積するため生態系への影響が懸念されている。さらに、マイクロプラスチックは生物に摂取されやすく、食物連鎖を通して生体内に取り込まれる可能性や、表面に有害物質を吸着して運ぶ可能性も報告されている(1)。

中でも微生物は有機物の分解や物質循環を担う、生態系の基盤となる存在である。そのため、マイクロプラスチックが微生物にどのような影響を与えるかを明らかにすることは、環境汚染の影響を理解する上で重要である。

マイクロプラスチックによる影響の対象として、海洋生物中心に研究が進められてきた。また、近年では土壌生態系への影響も注目されており、特にミミズは土壌生態系において分解や物質循環を担う重要な生物であり、マイクロプラスチックの影響を評価する指標生物として広く利用されている(2)。

一方で、マイクロプラスチックが生態系の基

盤となりうる微生物そのものの生育や代謝活動にどのような影響を与えるのかについては十分に研究されていない。そこで私たちはマイクロプラスチックが微生物群集に与える影響を明らかにすることは、環境汚染の実態を理解するうえで重要であると考えた。

本研究では、微生物の影響を検討するためのモデル生物として大腸菌に着目した。大腸菌は培養が容易であり、増殖の変化を比較的観察しやすいことから高校の課題研究の材料として適切であると判断した。

2 材料・方法

【材料・実験器具】

ポリウレタン

発泡スチロール

大腸菌 (*Escherichia coli*)



図1 シェイキングバス SB-20
アズワン株式会社



図2 PID制御
デジタル形恒温器
株式会社 日伸理化

【実験1】（大腸菌の増殖への影響評価）

まず、試験管に液体LB培地を7 ml注いだ。この試験管の中に攪拌を促し、より多くの空気を送り込むためのプラスチック片 (Jiangsu Huida Medical Instruments社製のイノキュレーションループを2 mm×2 mm×6 mmに切断)を3つ投入し、大腸菌10 μLと、菓さじ一杯分のマイクロプラスチックを培地に加えた。ポリウレタンと発泡スチロールを削って1 mm以下に選別したものをマイクロプラスチックとして培地に加えた。この試験管を振とう培養機(図1)に配置し、振とう培養機内の水の温度を大腸菌の増殖が活発に行われる37 °Cに保ち(図2)、1 分間に130 回の振動を維持したまま4 時間の培養を行った。また、培地内に酸素を多く送り込むために、試験管を振とう培養機に斜めに配置した。培養後、マイクロプラスチックを加えた培地には濾過を行ってプラスチックを取り除いた。その後、大腸菌の増殖の程度を調べるために吸光光度計を用いてそれぞれの培地の透過率を測定した。

【実験2】（マイクロプラスチックを培地に浸す時間による変化）

実験1と同様の条件にした試験管にポリウレタンと発泡スチロールを加え、培地にプラスチックを浸す時間を48 時間とした培地と0 時間とした培地の2種類を用意した。48 時間浸したものは冷蔵庫で保管した。それらを振とう培養機で水の温度を37 °Cに保ち、1 分間に130 回の振動を維持したまま4 時間の培養を行った。培養後に吸光光度計を用いてそれぞれの培地の透過率を測定した。

【実験3】（ポリウレタンの加水分解による影響の検証）

ポリウレタンは加水分解し、pHが低下することが明らかになっている(3)。2本の試験管を用意し、片方の試験管にはLB培地のみ、もう一方の試験管には、LB培地にポリウレタンを浸し、これまでの実験同様、振とう培養機で4 時間揺らし、2つの培地のpHを測定した。それぞれ3

回ずつpHを測定し、その平均値を出した。また、実験3ではポリウレタンが加水分解することにより培地のpHが変化したかに焦点を当てたため、大腸菌は入れずに実験を行った。

3 結果

【実験1】

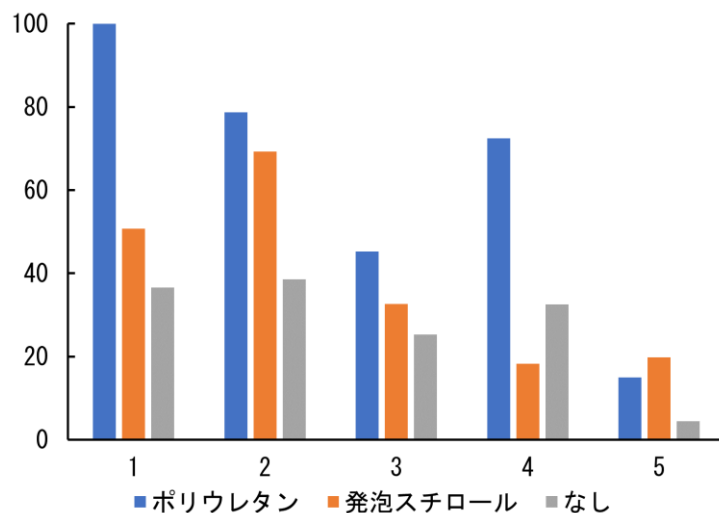


図3 1回目から5回目までの実験ごとの培養後の培地の透過率。それぞれ、培養前の培地の透過率を100とした時の相対値である。

図3が示すようにマイクロプラスチックを加えなかった培地のほうが透過率が低い傾向があった。

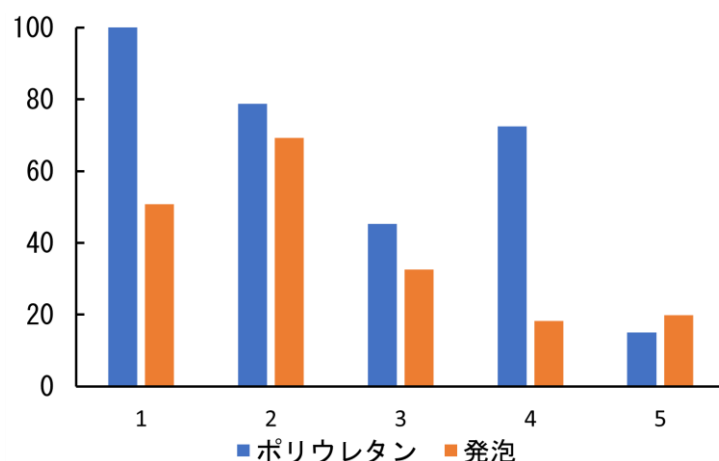


図4 1回目から5回目までの実験ごとの培養後の培地の透過率。ポリウレタンと発泡スチロールについて比較した。それぞれ、培養前の培地の透過率を100とした時の相対値である。

図4が示すようにポリウレタンを加えた培地のほうが透過率が高い傾向にあった。

【実験2】

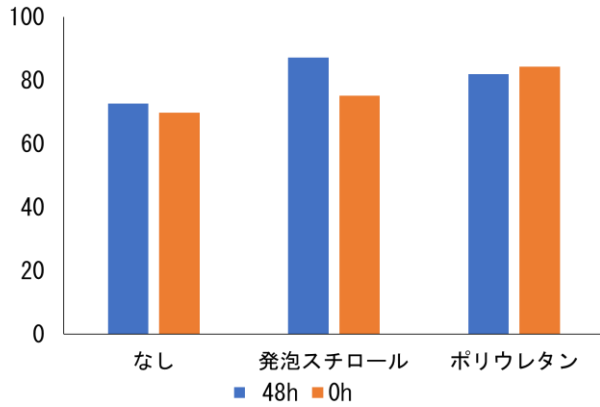


図5 48時間マイクロプラスチックを浸した培地と0時間マイクロプラスチックを浸した培地の透過率。それぞれ、培養前の培地の透過率を100とした時の相対値である。

図5が示すように発泡スチロールでは、48時間浸した培地のほうが透過率が高くなった。ポリウレタンとマイクロプラスチックなしのものでは透過率の大きな変化は見られなかった。

【実験3】

ポリウレタン …7.03

発泡スチロール…7.02

これらはそれぞれ3回ずつ測定したpHの平均値である。ポリウレタンを加えた培地と加えなかった培地の間でpHに大きな差は見られなかった。

4 考察

【大腸菌数の定量について】

透過率とはある波長の光を当てた際にどれほどの光が通過するかを示す値である。大腸菌の数が多ほど透過率は低くなることから、大腸菌の増殖の度合いを透過率を用いて調べることができる。また、今回吸光度計は600nmの波長を用いた。これは、一般的に吸光度計で大腸菌の増殖の程度を測定する際に用いられる波長であるためである。

【ろ過操作について】

今回、マイクロプラスチックを加えた培地のみ濾過を行ったのは、濾過に使用した濾紙の目が5μmのものであったため、マイクロプラスチックのみを取り除くことができ、約3μmの大

きさの大腸菌のみが含まれる培地には濾過を行う必要がないと判断したためである。実際、ろ過前後での透過率の値の差は、マイクロプラスチックなしの培地では約6の差であり、マイクロプラスチックを加えた培地では約20の差があったことから、大腸菌のみが含まれる培地に濾過を行う効果が少ないと考えた。

【実験1】(大腸菌増殖への影響について)

マイクロプラスチックを加えていない培地と加えた培地では、前者のほうが透過率が低かった。つまり大腸菌がより多く増殖したことから、マイクロプラスチックは大腸菌の増殖を阻害する可能性があると考えられる。また、ポリウレタン、発泡スチロールをそれぞれ加えた培地では、ポリウレタンを加えた培地のほうが、発泡スチロールを加えた培地より透過率が高かったことから、プラスチックの種類によって大腸菌の増殖を阻害する作用機序に違いがある可能性が考えられる。

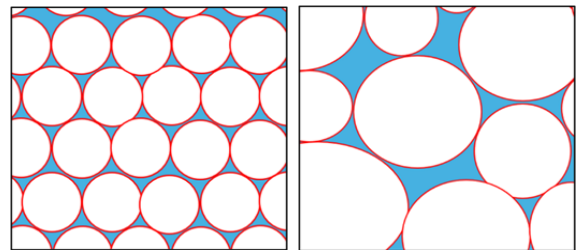


図6 ポリウレタン (左) のイメージ図
発泡スチロール (右) のイメージ図

今回用いたプラスチックの構造の特徴として、ポリウレタンは密度が大きく、発泡スチロールは体積の大部分を空気が占める(図6)。また、先行研究よりプラスチックは含まれる化学物質が溶け出すという性質を持つことが明らかになっている(4)。これらのことを踏まえると、ポリウレタンは密度が大きいため含まれていた化学物質の量も多く、培地に溶け出した化学物質の量が発泡スチロールよりも多かったのではないかと考えられる。

【実験2】(マイクロプラスチックを培地に浸す時間による影響)

発泡スチロールは培地に浸す時間を長くすると透過率が高くなったことから、発泡スチロールを

培地に浸す時間を長くすることによって、阻害作用の程度が大きくなる可能性が考えられる。また、ポリウレタンでは透過率に大きな差は見られなかったことから、ポリウレタンと発泡スチロールでは異なる要因で阻害作用を示している可能性が考えられる。以上より、我々はポリウレタンが加水分解する性質が関係するのではないかと考えた。

【実験3】（ポリウレタンの加水分解による影響の検証）

ポリウレタンを加えた培地と加えていない培地の間で、pHに大きな差が見られなかったことから、ポリウレタンは4時間では加水分解されず、加水分解によって生成される化学物質が大腸菌の増殖を阻害した可能性は低いと考えられる。

5 展望

現時点では以下の実験を行いたいと考えている。

○化学的要因の特定実験

マイクロプラスチックから化学物質が溶け出すことは先行研究により明らかになっている。本研究ではそれらの化学物質が実際に培地に溶け出しているかどうかまでは確認できていない。しかし、化学的要因であると仮定するならば、実験3の考察より、プラスチックに含まれる化学物質が溶け出して大腸菌の増殖を阻害したことが考えられる。そのため、その物質を特定し、その物質の特性を調べることによって大腸菌の増殖に与える影響を調べることができると考えている。そこで「化学物質だけを溶かし、大腸菌の増殖阻害作用を調べる実験」として、プラスチックから溶け出すとされている物質(ビスフェノールA、フタル酸エステル類など)を培地に加えて大腸菌を培養する追加実験を行うことにより、プラスチックから溶け出る物質が実際に大腸菌の増殖に影響を与えているのかを検証すること、また、この実験結果とマイクロプラスチックを加えた結果との近似の程度を検証することができると考えている。

○物理的要因の有無特定実験

本研究では主に化学的要因に焦点を当てて研究を行ったが、実験と考察を重ねるにつれ、物理的

要因が関係する可能性も考えることができると気づいた。そのため、「マイクロプラスチック以外の微細な物質を培地に加えて、大腸菌の増殖を調べる実験」として追加実験を行うことにより、実際に物理的要因が関係しているかどうかを調べたいと考えている。具体的には、プラスチックではない、ガラスや金属を粒子化させたものを培地に加えて大腸菌の増殖を行う実験を考えている。この実験を行うことにより、加えた物質が持つ、培地を攪拌して培地に酸素を送り込む能力によって、大腸菌の増殖の程度に差が生じるかを検証することができると考えている。

6 参考文献

- (1)高田秀重.マイクロプラスチック汚染の脅威1“生態系汚染”.野鳥.2021,5・6月号.
- (2)D. Cao, X. Wang, X. Luo, G. Liu and H. Zheng. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. *Earth and Environmental Science* 61. 2017.p.A136
- (3)Johansen.M. tert-AmylAlcohol-Mediated Deconstruction of Polyurethane for Polyol and Aniline Recovery. *ACS Sustainable Chem.* 2022, vol10,p.11191–11202.
- (4) 江河明日香. プラスチック製品からの低分子化合物の溶出について. *生活工学研究*.2000,vol2,p.44-47