

マイクロファイバー汚染のポリエステル繊維の細菌による分解と生態毒性

大河原凜太、柳原千穂、梅田若葉

大阪桐蔭高等学校 理科研究部

(〒574-0013 大阪府大東市中垣内 3-1-1)

研究概要

合成繊維のポリエチレンテレフタレート (PET) などのマイクロファイバーが分解されず汚染が深刻である。これまで、PET 分解能を示す土壌細菌 201-F6 株由来の酵素が非結晶性や結晶性の PET に対して高い分解活性を示すことや、KT2440 株の細菌が非結晶性 PET を分解することが報告されているほか、海洋細菌による海洋 PET 汚染の生物的処理が示唆されている。我々はこれまで、201-F6、KT2440、海洋細菌 DSM 44555 株を M9 培地で継代培養してきた。本研究では、これらの継代培養している細菌株が分解酵素 PETase や MHETase を持っているか確認すること、およびポリエステル繊維の分解能を示すか調べることを目的とした。培地中の 201-F6、KT2440、DSM 44555 株へのビス(2-ヒドロキシエチル)テレフタレート (BHET) の暴露試験では、BHET がモノヒドロキシエチルテレフタレート (MHET)、テレフタル酸 (TPA) に分解されていることが HPLC の測定で確認されたことから、これらの株が分解酵素 PETase や MHETase を持つことがわかった。ポリエステル繊維を培地、河川へドロ、河川砂、海洋砂中に入れ、細菌を加えると分解生成物の TPA が生成した。特にへドロ中や砂中で TPA が多量に生成した。この結果は、へドロ中や砂中では細菌に含まれている PETase や MHETase が細胞外に分泌されやすく、分解生成物の TPA が多量に生成したためだと考えられる。さらに、PET の分解生成物 TPA の安全性をオオミジンコを用いた慢性毒性試験 (21 日間繁殖試験) により評価した結果、濃度 20 mg/L 以下で毒性を示さなかった。このことから、ポリエステルファイバーが河川や海洋で分解されても安全性に問題がないことがわかった。以上の結果から、マイクロファイバー汚染の対策として、201-F6、KT2440、DSM44555 の細菌を培養し河川のへドロや海洋底に投与すればポリエステルファイバーの分解に利用できることが示唆された。

Keyword: マイクロファイバー汚染、ポリエステル繊維、細菌による分解、HPLC、TPA

1. 研究の背景

1.1. マイクロファイバー汚染

マイクロプラスチックの海洋汚染やマイクロファイバー汚染が近年注目されている。洗濯時に生じたマイクロファイバーは、下水処理場で処理される (図 1)。一部はすり抜けて海底の泥から見つかっていて、生態系への影響が心配されている¹⁻⁴⁾。ゴカイなどの環形動物は泥底に、ヨコエビなどの節足動物は砂底に多く、河川や海洋で底に沈んだマイクロファイバ

ーが、底生動物に食べられる。誤食されて体内に入ったマイクロファイバーが海洋動物の内臓に詰まって腸閉塞を引き起こしたり繁殖力の低下を招き、さらには死に至らしめることもある。

Lucy らは深海堆積物 50 mL から、ポリエステルやアクリル繊維を大西洋で 2~10 本、地中海で 10~20 本、インド洋で 1~2 本検出したと、マイクロファイバー汚染の蔓延を報告している⁵⁾。彼らの報告では、検出されたマイクロファイバーの中で特にポリエステルが多くを占めていた。

1回の洗濯で約0.5~1.3gのマイクロファイバーが抜け落ちる
70万~150万本(1,000本がおよそ1mgに相当)²⁾

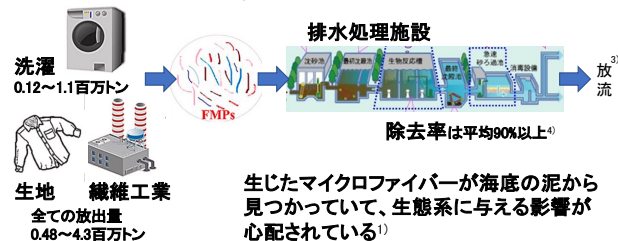


図 1 マイクロファイバー汚染 洗濯で出たマイクロファイバーが排水処理施設をすり抜け、河川・海洋に放出される。

合成繊維のナイロン、ポリエステル、アクリルは河川のへドロ中や海水浴場の砂中で分解されないことが知られている。そのために、生分解性ポリエステル繊維の開発も行われているが、まだ商業段階ではない⁶⁾。

1.2. 酵素による PET 分解細菌の発見

2016 年吉田らはポリエチレンテレフタレート (PET) に汚染された堆積物から、非結晶性 PET を分解できる細菌として *Ideonella sakaiensis* 201-F6 株を発見した⁷⁾。この論文では、この細菌株遺伝子がコードする酵素タンパクが結晶性 PET の分解能も持つことも報告されている。2021 年 Werner らは *Pseudomonas putida* KT2440 株の細菌でも非結晶性 PET を分解することを報告した⁸⁾。2023 年 Guo らは、海洋細菌の *Rhodococcus pyridinivorans* P23 株による PET の生分解を示し、海洋 PET 汚染の処理ができると示唆した⁹⁾。

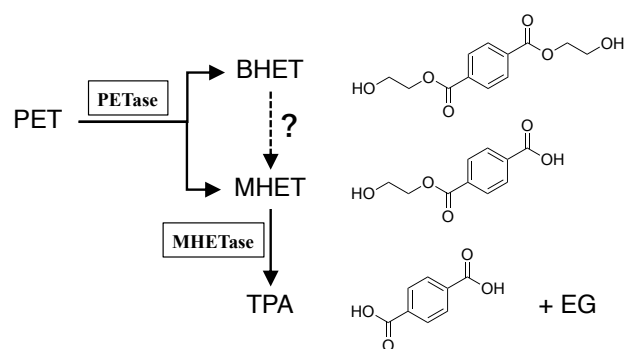


図 2 BHET(bis(2-hydroxyethyl)-terephthalate)の分解経路、MHET: mono(2-hydroxyethyl)terephthalate, TPA: Terephthalic acid, EG: ethylenglycol

1.3. 分解のメカニズム

PET は細胞外に分泌された 2 つの酵素により、構成要素のテレフタル酸 (TPA) とエチレングリコール (EG) に分解される。2 つの酵素の一方は PET ヒドロラーゼ (PETase) でエステル結合を加水分解して切断しビス(2-ヒドロキシエチル)テレフタレート (BHET)、モノ(2-ヒドロキシエチル)テレフタレート (MHET)、および TPA を遊離させる。第二の酵素 MHET ヒドロラーゼ (MHETase) は、可溶性 MHET をさらに加水分解して TPA とエチレングリコール (EG) を生成する¹⁰⁾。

1.4. マイクロファイバー汚染対策と廃 PET のバイオリサイクル

マイクロファイバー汚染では主としてポリエステル繊維が多い。201-F6 などの細菌は酸素の少ない条件でも生きることができる。これらの細菌が非結晶性 PET や結晶性 PET だけでなく、ポリエステル繊維も分解できれば、細菌を培養し河川や海洋に投与することで、汚染を軽減できると考えられる。さらに、これらの細菌から PETase や MHETase を取り出し、廃 PET などから TPA を取り出し、回収できれば、まだ完成していない PET のバイオリサイクルができるようになると考えられる。そのためには細菌の性質や培地の条件、pH などを細かく調べる必要がある。

1.5. 生態毒性試験

高分子のプラスチックやマイクロファイバーは細胞と比べて大きいので、捕食されなければ直接的な影響はない。しかし、分解された生成物は細胞膜を通過できるようになるため、生物に直接取り込まれ、逆に悪影響が出る可能性が指摘されている。このことから、PET の分解生成物について、生態毒性試験 (オオミジンコを使った慢性毒性試験) をして安全性を確かめる必要がある。

1.6. 研究の目的

我々はこれまでに、PET 分解能を持つとされる細菌 201-F6 株、KT2440 株および *Rhodococcus pyridinivorans* DSM44555 株 (*Rhodococcus pyridinivorans* P23 に

近い海洋性)を製品評価技術基盤研究機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)より入手し継代培養を繰り返してきた。これらの継代培養した細菌株がPET分解酵素(PETase、MHETase)を持っているか未確認であった。そこで、先ずこれらの菌株によってPETの分解中間体のBHETが分解されて、TPAが生成するか調べることを第1の目的とした。また、マイクロファイバー汚染の中で主要なポリエステル繊維を201-F6、KT2440、DSM44555の細菌で、河川・海洋のヘドロ中や砂中で分解した先行研究が見当たらないことから、実際にこれらの細菌がポリエステル繊維を分解できるか調べることを第2の目的とした。最後に、ポリエステル繊維の分解実験(研究目的2)において認められた分解生成物は主にTPAのみであったことから、オオミジンコを用いた慢性毒性試験を行い、分解生成物のTPAが生物に安全か調べることを第3の目的とした。

2. 方法

2.1. 材料、試薬、器具

2.1.1. 材料

201-F6、KT2440、DSM44555の菌株は、製品評価技術基盤研究機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)よりガラスアンプルに封入されたL-乾燥標本NBRC 110686、NBRC 100650、NBRC100608をそれぞれ入手したものを使用した。



図3 恩智川(a)で採取したヘドロの様子(b)、海砂を採取した大阪湾の海水浴場(c)

分解実験に供したポリエステル繊維は、優良教材株式会社の標本用カット布地ポリエステル約3.0×3.0 cm角布地¹⁾を用いた。

ポリエステル繊維分解試験に用いた環境媒体の河川ヘドロを学校近くの恩智川(図3a,b)で2023年5月25日に、川砂は恩地川で2023年5月8日に、海砂を大阪湾の海水浴場(図3c)で2023年6月8日に採取した。

2.2. 試薬類

TPA(昭和化学)、BHET(東京化成工業KK)、HPLCの移動相に用いたCH₃OH、蒸留水は富士フィルム和光純薬製のHPLC用を、H₃PO₄は富士フィルム和光純薬の試薬特級、NaH₂PO₄は関東化学の一级をそれぞれ使用した。菌株の復元水、培地、飼育水の調製その他実験に用いた水は、イオン交換水を高圧蒸気滅菌したものを使用した。

2.2.1. 器具

使用したガラス器具は全て実験用洗剤で洗浄後、水道水、イオン交換水で濯いでから、高温蒸気滅菌したものを用いた。

2.2.2. 装置

オートクレーブはクラヤクレーブ KG-17A(湯山瀬作所)、恒温培養器はインキュベーターIN802(ヤマト科学 KK)を、pHメーター(堀場製作所 型式、D-23電極 9625-10D)を使用した。菌保存用デシケーターには、ガラス製の20 L水槽にポリカーボネート板で蓋をして用いた。高速液体クロマトグラフ装置(HPLC)は、CCP&8020 システム(CCPS、CO8020、SD-8022、UV-8020; 株式会社東ソー分析会社)を用いた。分離カラムとしてコスモシール 5C18-AR-II(4.6mm I.D.×25 cm、ナラライテスク)を40°Cに保温し、移動相として30%メタノール/60 mMリン酸緩衝液(pH 2.0)を流速1.0 mL/minで流して分離を行い、UV検出器の検出波長を240 nmに設定して化合物を検出した。クロマトグラムはペンレコーダー(横河電機 LR4100)で速度30 cm/h、Range 2.0 mV、5.0 mVの設定で記録用紙に出力し、化合物の保持時間とピークの面積を調べた。

慢性毒性試験の飼育水の溶存酸素(DO)の測定には溶存酸素計(堀場 OM-12)を、吸収スペクトルの測定には紫外可視分光光度計 UVmini-1240(島津製作所)を用いた。

2.3. 実験方法

2.3.1. 培地・飼育水の作製

i) 復水液：イオン交換水 50 mL にイーストエキス末 0.10 g、ペプトン 0.50 g、MgSO₄ 0.050 g を加え、高圧蒸気滅菌した。

ii) 復元用寒天培地：イオン交換水 100 mL にイーストエキス末 0.20 g、ペプトン 1.0 g、MgSO₄・7H₂O 0.10 g、寒天 1.5 g を加え、高圧蒸気滅菌後、15 mL ずつ滅菌シャーレに入れた。

iii) M9 培地：イオン交換水 200 mL に Na₂HPO₄ 1.75 g、Na₂HPO₄ 0.60 g、NaCl 0.10 g、NH₄Cl 0.20 g、MgSO₄・7H₂O 0.099 g、グルコース 0.50 g、ビタミン B1(チアミン) 2.0 mg、CaCl₂ 6.0 mg、イーストエキス末 0.20 g、トリプトン 0.40 g を入れ、高圧蒸気滅菌した。

iv) YSV 培地：イオン交換水 200 mL にイーストエキス末 20 mg、NaHCO₃ 40 mg、(NH₄)₂SO₄ 0.20 g、CaCO₃ 20 mg、Na₂HPO₄ 0.358 g、NaH₂PO₄ 0.156 g、FeSO₄・7H₂O 2.0 mg、25 倍液を 2.0 mL (50 mL の 25 分の 1) 加え (pH 7.0)、高圧蒸気滅菌した。25 倍液は、イオン交換水 50 mL に CuSO₄・5H₂O 5.0 mg、MnSO₄・7H₂O 5.0 mg、ZnSO₄・7H₂O 5.0 mg、MgSO₄・7H₂O 50 mg、チアミン塩酸塩 12.5 mg、ビオチン 0.25 mg、ビタミン B12 2.5 mg を溶解させて調製した。

v) ElendtM4 (400 倍液)：CaCl₂・2H₂O 117.52 g、MgSO₄・7H₂O 49.2 g、KCl 2.40 g、NaHCO₃ 26.0 g をそれぞれ別にイオン交換水 1 L に溶解させ、高圧蒸気滅菌した。

2.3.2. BHET の分解実験

(1) M9 培地での 201-F6、KT2440、DSM44555 の細菌の事前培養

開封した L-乾燥標本のアンプルに復水液を 0.20 mL 加え、数分間置いてからよく懸濁させた。これらの 201-F6 株、KT2440 株、DSM44555 株の復水液を、シャーレに入れた復元用寒天培地にそれぞれ播種し、

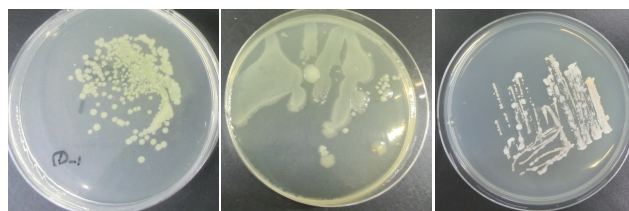


図 4 復元した 201-F6(左)、KT2440(中央)、DSM44555 (右)

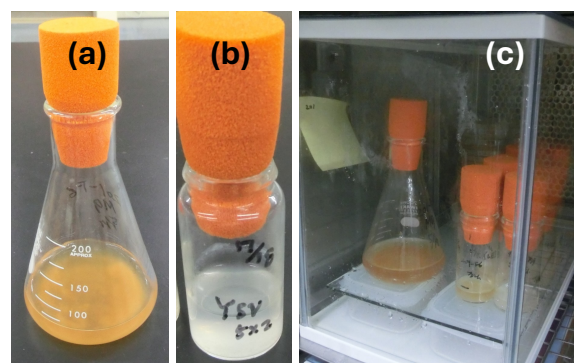


図 5 (a) M9 培地で事前培養した 201-F6 の細菌、(b) YSV 培地中での BHET の分解実験、(c) 飽和水溶液を入れたデシケーター(水槽)とインキュベーター

30 °C で培養し復元した(図 4)。復元した細菌株を白金耳で 300 mL 三角フラスコに入れた M9 培地に移植し、バイオシリコセンをして 30 °C で培養し菌液を作った(図 5a)。

(2) BHET、TPA の溶液の調整

BHET 20 mg を 50 mL サンプル管に入れ、イオン交換水 20 mL を加え、15 分間超音波をかけて溶解させた。これをビーカーに移し、イオン交換水を加えて 500 mL にし、マグネチックスターラーで数時間攪拌した BHET 溶液(40 mg/L、160 μmol/L)とした。

TPA 40 mg を 20 mL サンプル管に入れ、0.50 mol/L NaOH を 2 mL 加えて、10 分間超音波をかけて溶解させた。これをビーカーに移し、イオン交換水を加えて 2.0 L にし、TPA 溶液(20 mg/L、120 μmol/L)とした。TPA 溶液の pH は調整直後に 10.8 で、調整 2 日後に pH は 8.8 になった。また、調整後 1 週間程度は TPA は分解されず安定であった。研究 3(オオミジンコを使った慢性毒性試験)の TPA 希釈水溶液作成は 20 mg/L の水溶液調整 2 日後(pH 8.8)の水溶液を使用した。

(3) YSV 培地中の BHET の分解実験

20 mg/L(80 μmol/L) BHET 5.0 mL と YSV 培地 4.8

mL と、菌液 0.20 mL を 20 mL サンプル管に混合し (BHET の濃度 40 $\mu\text{mol/L}$)、バイオシリコセンをした (図 5b)。

底部に $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 飽和水溶液 (乾燥して水の蒸発を防ぐため) を入れたデシケーター (水槽で代用、図 5c) に入れ、30 $^\circ\text{C}$ のインキュベーター (恒温培養器) に一定期間入れた。数日後遠心分離 (12000 rpm 5 min) した後 HPLC で測定した。

(4) YSV 培地、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 緩衝液中の BHET の分解実験

0.050 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 緩衝液 (pH 6.5、7、8、8.5) 4.0 mL、40 mg/L (160 $\mu\text{mol/L}$) BHET 2.5 mL、YSV 培地 3.3 mL と、事前培養した菌液 0.20 mL を 20 mL サンプル管に混合し (BHET の濃度 40 $\mu\text{mol/L}$)、バイオシリコセンをした。30 $^\circ\text{C}$ のインキュベーターに一定期間入れ、数日後遠心分離 (12000 rpm 5 min) した後 HPLC で測定した。

(5) 分解生成物 MHET、TPA の HPLC による測定

数日後、遠心分離した液を HPLC (カラム 5C18-AR-II 4.6mm I.D. \times 25 cm 40 $^\circ\text{C}$ 、溶離液 CH_3OH 30 % / 7.5 mM NaH_2PO_4 、 H_3PO_4 70 % pH 2.0、検出 UV 240 nm、流速 1.0 mL/min) で MHET、TPA が生成するか、ペンレコーダー (横河電機 LR4100、速度 30 cm/h、Range 2.0 mV、5.0 mV) の記録用紙で留出物の保持時間とピーク面積を調べた。

TPA の保持時間は 9 分であった (図 6a)。BHET の

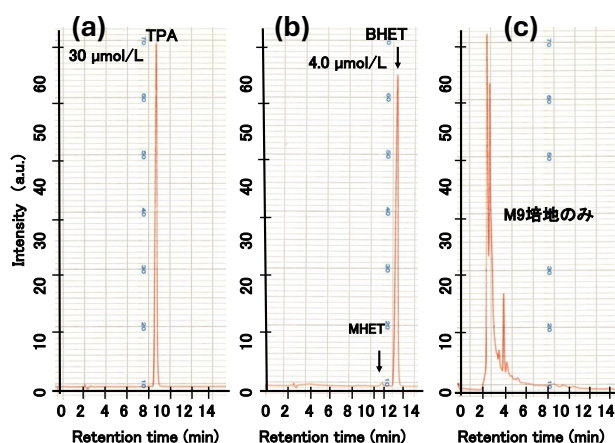


図 6 HPLC の記録用紙、測定レンジ 5.0 mV (a) 30 $\mu\text{mol/L}$ TPA、9 分後 TPA のピーク、(b) 40 $\mu\text{mol/L}$ BHET、10 分 30 秒後微量の MHET のピーク、12 分後 BHET のピーク、(c) M9 培地のみ、6 分後以降ピークなし

保持時間は 12 分 (図 6b) であった。MHET のピークが 10 分 30 秒に微量に出たのは、東京化成工業 KK の BHET 試薬の純度が 85.0% 以上だったので不純物として MHET が含まれていたためと考えられる。

M9 培地のみでは、遠心分離後の上澄み液のピークの保持時間はほぼ 6 分以内 (図 6c) で、重なることなく TPA を測定できることがわかった。

2.3.3. ポリエステル繊維の分解実験

(1) M9 培地中の分解

生成する TPA が菌により分解されるのを防ぐために、50 mL サンプル管にポリエステル繊維 (3.0 cm \times 3.0 cm) 70 mg と 201-F6、KT2440、DSM44555 の M9 培地中の菌液 1.0 mL を M9 培地、河川ヘドロ、河川砂、海砂に入れ、菌が通り抜けないようにメンブレンフィルタ (親水性 PTFE 孔径 0.1 μm) を被せた。その上に 0.050 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 緩衝液 (pH 9.0) 5.0 mL を加えバイオシリコセンをして (図 7a)、30 $^\circ\text{C}$ のインキュベーターに一定期間入れた。数日後遠心分離した後 HPLC で測定した。

(2) 河川ヘドロ中の分解

50 mL サンプル管に河川のヘドロを 10 g 入れ、その上にポリエステル繊維を入れ、201-F6、KT2440 の M9 培地中の菌液 1.0 mL を入れ、その上にさらにヘドロ 10 g を被せ、菌が通り抜けないようにメンブレンフィルタ (親水性 PTFE 孔径 0.1 μm) をかぶせた。その上に河川水 4.0 mL、0.050 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 緩衝液 (pH 8) 5.0 mL、バイオシリコセンをして (図 7b) 一定期間 30 $^\circ\text{C}$ のインキュベーターに保管した。数日後遠心分離した後、HPLC で測定した。

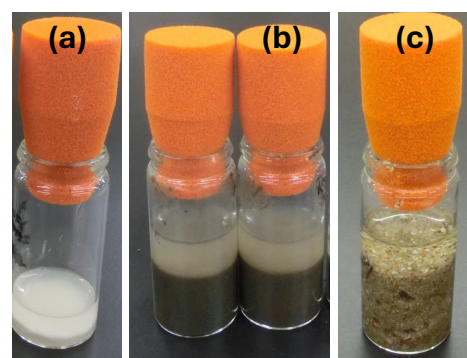


図 7 (a) M9 培地の細菌による分解実験、(b) 河川のヘドロ中の 201-F6 (左)、KT2440 (右) によるポリエステル繊維の分解実験、(c) 河川砂中の分解実験

(3) 河川砂および海砂中の分解

河川砂 50 mL サンプル管に河川砂を 27 g 入れ、その上にポリエステル繊維と 201-F6、KT2440 の M9 培地中の菌液 1.0 mL を入れ、さらに河川砂を入れ、菌が通り抜けないようにメンブレンフィルタ(親水性 PTFE 孔径 0.1 μm)をかぶせた。その上に河川水 4.0 mL、0.050 mol/L Na₂B₄O₇緩衝液(pH 8) 5.0 mL を加え、バイオシリコセンをして(図 7c)、30°Cのインキュベーターに一定期間入れた。遠心分離した後 HPLC で測定した。

海砂 河川砂のかわりに海水浴場の砂を使い、DSM44555 の M9 培地中の菌液 1.0 mL を入れ同様に実験した。

(4) ブランク試験

ブランク試験として、使用したヘドロ、河川砂、海砂、河川水、海水、Na₂B₄O₇緩衝液、M9 培地中の 201-F6、KT2440、DSM44555 に TPA が含まれているか HPLC で測定したところ、TPA のピークは得られなかった。さらに、繊維と菌液以外の組み合わせのものについても HPLC で測定したところ、TPA のピークは得られなかった。

2.3.4. オオミジンコを使った慢性毒性試験

TPA が生物に安全かを評価するために、環境省新規化学物質等に係る試験の方法(平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号通知)¹²⁾に準拠し、オオミジンコに対する慢性毒性試験を行なった。

カルキなしのイオン交換水で濃度 0, 0.63, 1.3, 2.5, 5.0, 10, 20 mg/L となるように調製した TPA 水溶液を 400 mL ずつ別々の 500 mL ビーカーに入れ、ElendtM4(400 倍液)をそれぞれ 1.0 mL ずつ加えた。さらに CH₃COONa(1.66 g/L)を入れ、pH を 8.4~8.5 にしたものを飼育水とした。それぞれのビーカーにオオミジンコ(甲殻類)を 10 個体ずつ入れ、照明(3000 lx 8 時間/日)のある室内の光が入る場所(窓際)で飼育した。餌は 1 日に PSB 光合成細菌 1.0 mL を与え、1 週間に 3 回全換水し慢性毒性試験(21 日間繁殖試験)を行なった。換水時に産仔数を数えた。親オオミジンコの生死、幼体の数の観察を行なった(図 13)。

飼育水の硬度が基準値(140 mg/L 以上)を満たすことを確認するために EBT を支持薬とした EDTA 滴定法¹³⁾により硬度を確認した。飼育水中の TPA の濃度は吸収スペクトルで確認した。

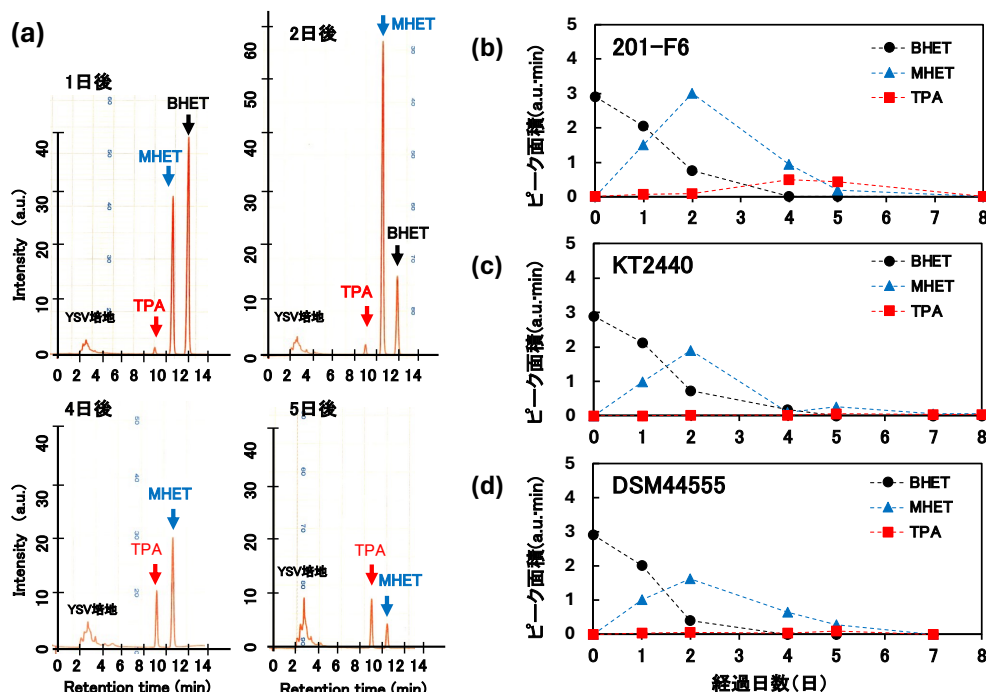


図 8 YSV 培地中での BHET の分解と TPA の生成の様子 (a)201-F6 株による分解実験中の HPLC のクロマトグラムの変化(測定レンジ 5.0 mV)、(b, c, d) 各ピーク面積の経過日数に伴う変化

3. 結果と考察

3.1. BHET の分解 (研究1)

3.1.1. YSV 培地中での 201-F6、KT2440、DSM44555 による BHET の分解

図 8a に 201-F6 株による分解実験中の培地を HPLC で測定した際のクロマトグラムの変化を示す。2 日目に BHET のピークが減少する一方、MHET のピークが増大した。4 日目には MHET のピークが減少し、TPA のピークが増大、BHET のピークは検出されなくなった。5 日目には MHET のピークがさらに減少した。201-F6 だけでなく、KT2440、DSM44555 菌液を用いた場合にも、培地中で日数の経過とともに BHET のピークが減少し、MHET のピークが増加した。ただし、MHET のピークは途中から減少に転じ、TPA のピークが増加した(図 8b-d)。この結果から、BHET→MHET→TPA の分解過程(図 2)が確認できた。

また、図 8b-d では BHET の減少量と MHET の増加量はほぼ対応しているが、MHET の減少量と TPA の増加量が対応していない。このことから、TPA も細菌により分解されたと考えられる。

今回培養した 201-F6、KT2440、DSM44555 の菌株が PET 分解酵素 PETase や MHETase を持つことが確

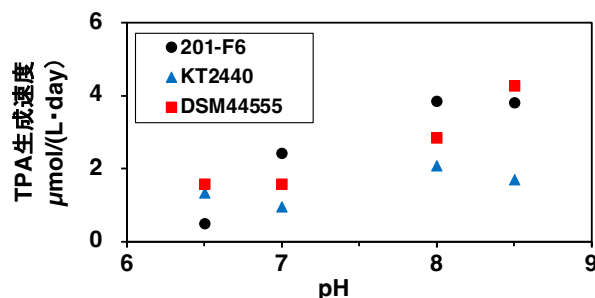


図 9 BHET の分解による TPA 生成速度に及ぼす培地の pH の影響

認できた。

3.1.2. YSV 培地中での 201-F6、KT2440、DSM44555 による BHET 分解の pH 依存性

TPA の 5.0 mg/L (30 μmol/L) のピーク面積との比較から、培養中の TPA 濃度の変化を求め、生成速度を算出した。培地の pH を変えて、TPA 生成速度を比較すると、201-F6、KT2440 の菌液では pH 8 で TPA の生成速度が速かったが、海洋性の DSM44555 の菌液では pH 8.5 で TPA の生成速度が速かった(図 9)。

3.1.3. YSV 培地 (pH 8) 中での 201-F6、KT2440、DSM44555 による BHET の分解

201-F6、KT2440、DSM44555 の菌液により、pH 8.0 に調整した YSV 培地中で、日数が経過するにつれて、BHET のピークが減少し、MHET のピークが増加した。TPA のピークがかなり増加したが、途中

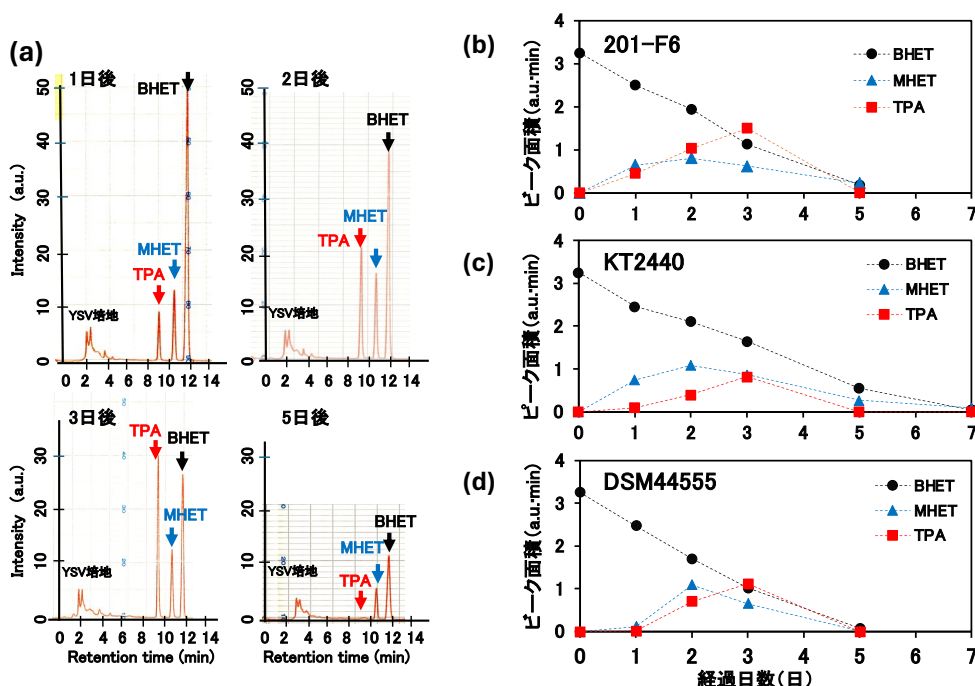


図 10 YSV 培地 (pH 8) 中での BHET の分解と TPA の生成の様子 (a) 201-F6 株による分解実験中の HPLC のクロマトグラムの変化(測定レンジ 5.0 mV)、(b, c, d) 各ピーク面積の経過日数に伴う変化

から減少した(図 10)。図 10 の濃度変化が図 8 と異な
った原因は、TPA は中性付近では不安定で自然に分
解するが、塩基性(pH 8 以上)では安定であるため
TPA の濃度が途中まで増大したと考えられる。ただ
し、生成した TPA が途中から減少したのは、細菌に
より分解されたためと考えられる。

3.2. ポリエステル繊維の分解(研究 2)

3.2.1. M9 培地中での 201-F6、KT2440、DSM44555 に よるポリエステル繊維の分解実験

ポリエステル繊維から TPA が微量に生成した(図
11)。細菌外に分泌された微量の分解酵素 PETase や
MHETase によりポリエステル繊維が加水分解された
と考えられる。ただし、KT2440 と DSM44555 では 3
日目から、201-F6 では 8 日目から TPA 濃度が減少し
た(図 11b)。

3.2.2. 河川へドロ中での 201-F6、KT2440 によるポリエ ステル繊維の分解実験

へドロ中の実験で、へドロの上に入れた溶液(直上
水)から TPA が検出され、ポリエステル繊維が分解さ

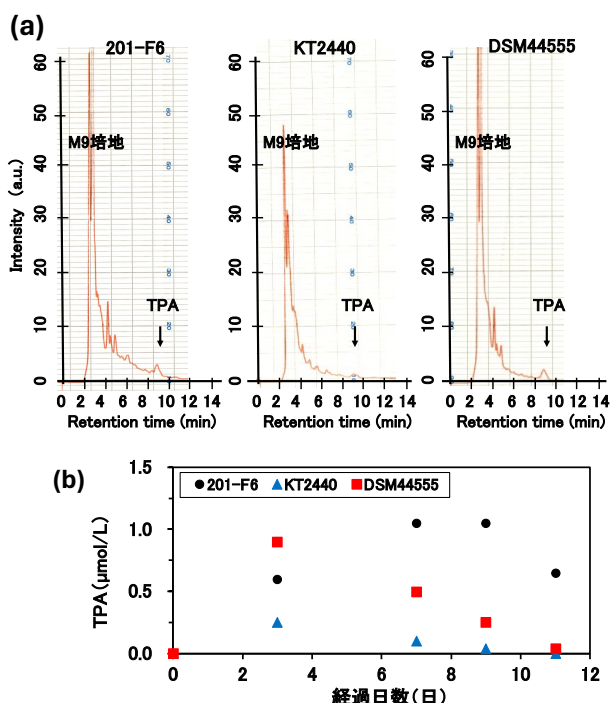


図 11 M9 培地中でのポリエステル繊維の分解と TPA の生成の様子 (a) 各菌液試験培地の HPLC 測定で検出された TPA ピーク(測定レンジ 5.0 mV、3 日後)、(b)201-F6、KT2440、DSM44555 により生成した TPA 濃度の経過日数に伴う変化

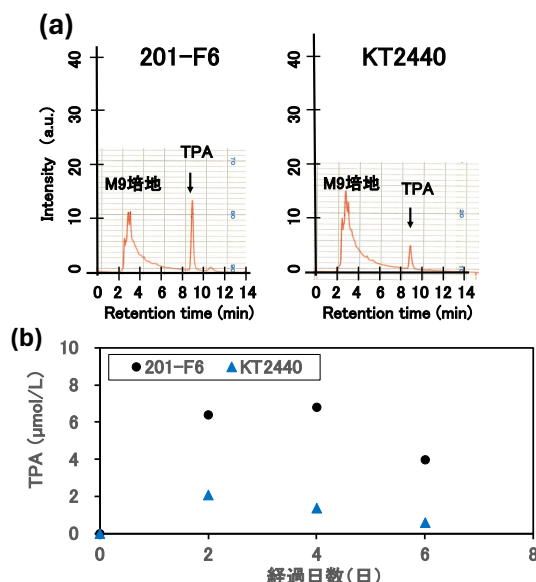


図 12 河川へドロ中でのポリエステル繊維の分解と TPA の生成の様子 (a) 各菌液試験培地の HPLC 測定で検出された TPA ピーク(測定レンジ 5.0 mV、2 日後)、(b)201-F6、KT2440 により生成した TPA 濃度の経過日数に伴う変化

れたことが確認された(図 12)。M9 培地の結果(図 11b)と比べて直上水にしみ出した TPA の濃度は 201-

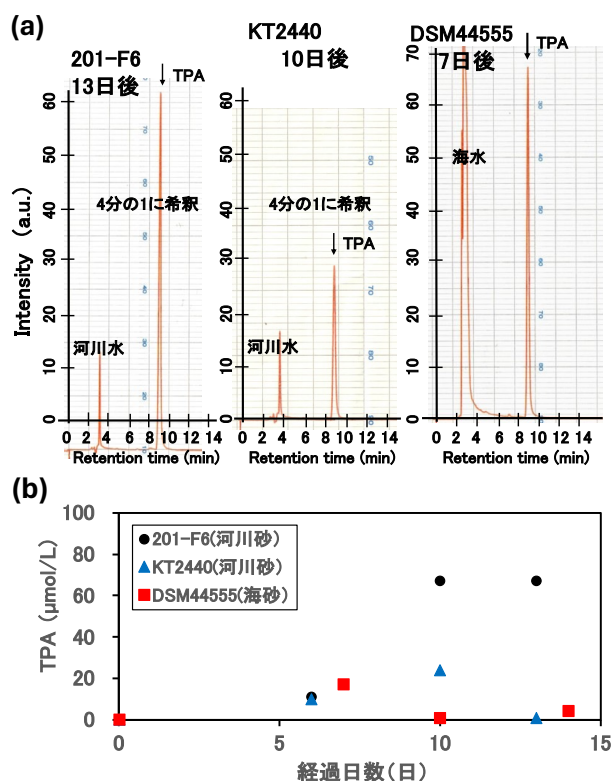


図 13 砂中でのポリエステル繊維の分解と TPA の生成の様子 (a) 各菌液試験培地の HPLC 測定で検出された TPA ピーク(測定レンジ 2.0 mV)、(b)経過日数と河川砂中 201-F6 と KT2440、海砂中 DSM44555 により生成した TPA 濃度の経過日数に伴う変化

F6の場合10倍以上だった。このことは、ヘドロ中では細菌から細胞外にPET分解酵素PETaseやMHETaseが分泌されやすいためだと考えられる。ただし、直上水のTPA濃度は201-F6で4日後、KT2440で2日後に最大濃度を示したが、それ以降は減少した。

3.2.3. 河川砂中の201-F6、KT2440による分解と海砂中のDSM44555による分解

河川砂中、海砂中からTPAがかなり高濃度で検出された(図13)。河川砂中や海砂中では、細菌から細胞外にPET分解酵素PETaseやMHETaseが分泌されやすと考えられる。また、分解により生成されたTPAが砂中から直上水へ放出されると、砂中の細菌や酵素による分解を受けにくくなるので、河川ヘドロの場合よりも1桁以上高濃度になったと考えられる。ただし、直上水のTPA濃度はDSM44555で約1週間、KT2440で約2週間経過後から減少した。

3.3. オオミジンコを使った慢性毒性試験(研究3)

オオミジンコは脱皮すると仔が沢山産れた(図14)。2日後の全換水時のTPAの濃度は、実験前と変化がなく、濃度が維持されていた(図15a)。水溶液のpHは8.4~8.5が7.8~7.9に下がった。DOは9.6~9.8 mg/Lから5.6~5.8 mg/Lに下がったが、基準の3 mg/L以上で問題なかった。硬度は基準の140 mg/L以上の250 mg/Lで、実験前後で変化しなかった(図15b)。

TPAは20 mg/L以下では親オオミジンコの生死に問題がなく、報告されている生態毒性値(21日間繁殖阻害無影響濃度: 20 mg/L)¹⁴⁾と整合性のある結果であった(表1)。

今回のサンプル管を使った閉鎖系では、ポリエステル繊維から生成したTPAは11 mg/L(66 μmol/L)をやや上回ったが、環境中の河川や海の砂中にあるマ

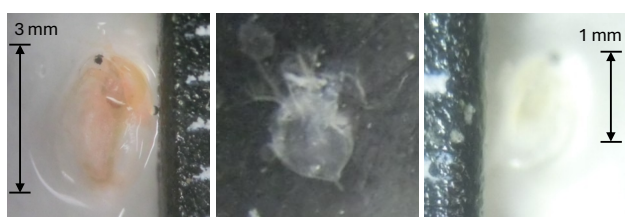


図14 オオミジンコ: (a)親、(b)脱皮後の殻、(c)産れた仔

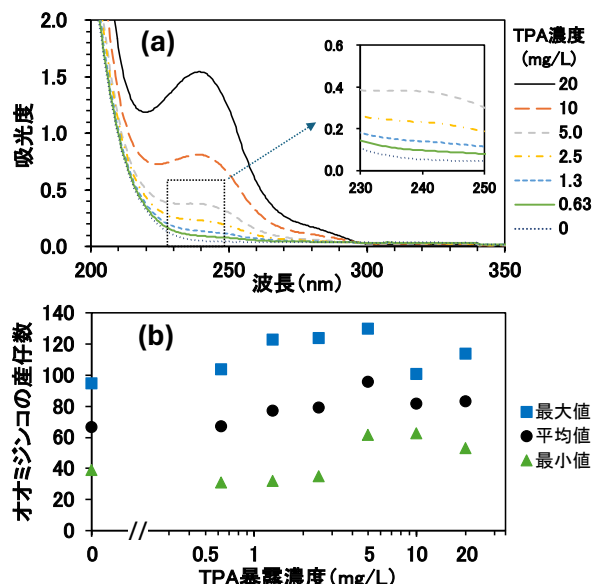


図15 (a) 飼育水の2日後(全換水時)の吸収スペクトル、(b) TPA濃度と21日間の産仔数

イクロファイバーのポリエステル繊維が細菌で分解されて生成すると予想されるTPA濃度は、周りに大量にある水や海水によって希釈されるので、甲殻類への毒性値に生態系安全係数の1/100を考慮した0.20 mg/L(1.2 μmol/L)を大きく下回ると考えられる。したがってオオミジンコを使った慢性毒性試験結果から安全性に問題がないと考えられる。

表1 オオミジンコの21日間の慢性毒性試験結果

TPA暴露濃度 (mg/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)	硬度 (mg/L)	阻害数 (個)	産仔数 (個)
基準→	18~22	6~9	≥3	≥140		
0	20	8.4~7.8	9.6~5.6	250	0	39~95
0.63	20	8.4~7.8	9.6~5.6	250	0	31~104
1.3	20	8.4~7.8	9.7~5.7	250	0	32~123
2.5	20	8.4~7.8	9.7~5.7	250	0	35~124
5.0	20	8.4~7.8	9.7~5.7	250	0	62~130
10	20	8.5~7.9	9.7~5.7	250	0	63~101
20	20	8.5~7.9	9.8~5.8	250	0	53~114

4. 考察

1) 201-F6、KT2440、DSM44555の細菌によりBHETがMHETを経てTPAまで分解されたことから、今回事前培養した菌液にはPET分解酵素PETaseやMHETaseが存在することが確認できた。生成したTPAは中性付近で不安定で、四ホウ酸ナトリウム緩衝液の塩基性溶液で明確な増加を示した。ただし、日数が経過するとTPAが減少したことから、生成し

た TPA が菌液により分解されたと考えられる。

2) 201-F6、KT2440、DSM44555 の細菌により培地、河川のヘドロ、河川砂、海砂中でポリエステル繊維が分解され、TPA が生成することが確認された。いずれの環境媒体の場合も 201-F6 の方が KT2440 より TPA を多く生成した。

3) 特に、河川のヘドロ、河川砂、海砂中では、高濃度に TPA が生成した。『細菌の細胞外に分泌された PET 分解酵素 PETase や MHETase の作用により TPA が生成する¹⁰⁾』ことを踏まえ、河川のヘドロ、河川砂、海砂中では細菌から PET 分解酵素 PETase や MHETase が分泌されやすいと考えるとこの現象を合理的に説明できる。

4) 201-F6、KT2440、DSM44555 は酸素のある条件下でも、酸素がない条件下でも発育できる通性嫌気性菌である。マイクロファイバー汚染の対策として、これらの細菌を培養し環境汚染の河川のヘドロや海洋の底に投与すればポリエステルファイバーの分解に利用できると考えられる。

5) ポリエステル繊維の分解で生成された TPA は、さらに細菌により分解されるが、河川のヘドロ、河川砂、海砂中での分解実験では、分解された TPA が溶液中に放出されて、ヘドロや砂中の細菌と溶液中の TPA を自然に分離されることがわかった。この方法を発展させれば、使用済み PET 製品を TPA に分解した後に回収するバイオリサイクル技術の開発につながることも考えられる(今後の展望へ)。

6) オオミジンコを使った TPA の慢性毒性試験の結果、濃度 20 mg/L 以下で問題ないことがわかった。ポリエステル繊維の分解生成物は HPLC の検出の結果 TPA のみで他のピークが見られなかったことから、ポリエステルファイバーが河川や海洋で分解されても、分解生成物により生物への影響はないと考えられる。

5. 結論と今後の展望

従来の PET ケミカルリサイクル手法は、膨大なエネルギーを消費し、危険なアルカリを高温で使用す

るなど高コスト・高環境負荷という問題がある。

本研究により、201-F6、KT2440、DSM 44555 の細菌から分泌された PET 分解酵素 PETase や MHETase で PET が分解されることがわかった。今回得られた知見は次の 3 点である。①PETase や MHETase は、一週間程度は有効であるが追加が必要になる。②生成した TPA は溶液が中性の条件では自然に分解する。TPA を安定化させるには、溶液の pH は 8 以上にすることがある。③細菌が存在すると、生成した TPA がさらに分解される。

これらの知見を生かして、(1) 菌液の量、(2) PETase や MHETase の添加の頻度、(3) メンブレンフィルタの孔径、(4) ヘドロ又は砂による生成した TPA の分離、(5) 緩衝液の種類(Na を含む溶液)、(6) 水溶液の pH、などの条件を調べ、使用済み PET 製品から TPA に分解した後に回収する低コスト・温和な環境中でのバイオリサイクル技術を完成させたい(図 16)。

6. 謝辞

細菌の取り扱いについて、大阪産業技術研森之宮センター生物・生活材料研究部研究室長の桐生 高明氏にご指導していただいた。お礼申し上げます。

7. 文献

- 1) MUFUG ファースト・センティアサステナブル投資研究所: マイクロファイバー: 繊維製品による見えない環境汚染 発生源、分布、対策 2022 年 2 月, https://www.mufg-firstsentier-sustainability.jp/content/dam/sustainabilityinstitute/assets/research/MUFUG-FSI_Sustainability-Investment-Institute-report_final2.pdf(2025 年 4 月 14 日閲覧)
- 2) Browne, M. A. *et al.*: Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9175-9179 (2011). doi: [10.1021/es201811s](https://doi.org/10.1021/es201811s)
- 3) Sugiura, M. *et al.*: Microplastics in urban wastewater and estuarine water: Importance of street runoff.

- Environ. Monit. Contam. Res.* **1**, 54-65 (2021). doi: [10.5985/emcr.20200006](https://doi.org/10.5985/emcr.20200006)
- 4) 鈴木裕識、山下洋正: 下水道におけるマイクロプラスチックの存在実態に関する研究動向と繊維状マイクロプラスチック簡易検出法の構築に向けた取組み. 環境システム計測制御学会誌, **24**, 35-39 (2020).
 - 5) Lucy C. Woodall *et al.*: The deep sea is a major sink for microplastic debris. *Royal. Soc. Open Sci.*, **1**, 140317 (2014). doi: [10.1098/rsos.140317](https://doi.org/10.1098/rsos.140317)
 - 6) StarTex: 240T 生分解性ポリエステル, <https://www.startextile.com.cn/ja/240t-bio-degradable-polyester-product/> (2025年4月14日閲覧)
 - 7) Yoshida, S. *et al.*: A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* **351**, 1196–1199 (2016). doi: [10.1126/science.aad6359](https://doi.org/10.1126/science.aad6359)
 - 8) Werner, A. Z. *et al.*: Tandem chemical deconstruction and biological upcycling of poly(ethylene terephthalate) to β -ketoadipic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Metab. Eng.* **67**, 250–261 (2021). doi: [10.1016/j.ymben.2021.07.005](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.07.005)
 - 9) Guo, W. *et al.*: Biodegradation of PET by the membrane-anchored PET esterase from the marine bacterium *Rhodococcus pyridinivorans* P23. *Commun. Biol.* **6**, 1090 (2023). doi: [10.1038/s42003-023-05470-1](https://doi.org/10.1038/s42003-023-05470-1)
 - 10) 吉田昭介: 細菌のポリエチレンテレフタレート代謝とその応用, NAIST Edge BIO 2023.03.01 <https://bsw3.naist.jp/bsedge/0010.html> (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 2025年4月14日閲覧)
 - 11) 優良教材株式会社 2025 家庭分野総合カタログ p.93 <https://my.ebook5.net/URYO/kDC25/> (2025年4月14日閲覧)
 - 12) 環境省: 化学物質の生態影響試験について, <https://www.env.go.jp/chemi/sesaku/01.html> (2025年4月14日閲覧)
 - 13) 愛知県総合教育センター: 水の硬度測定, 理科の広場高等学校化学, <https://apec.aichi-c.ed.jp/kyouka/rika/kagaku/2018/mijika/mizunokoudo/mizunokoudo.htm> (2025年4月14日閲覧)
 - 14) 環境省環境リスク評価室: 化学物質の環境リスク初期評価第3巻 [1 4] テレフタル酸, 平成16年9月

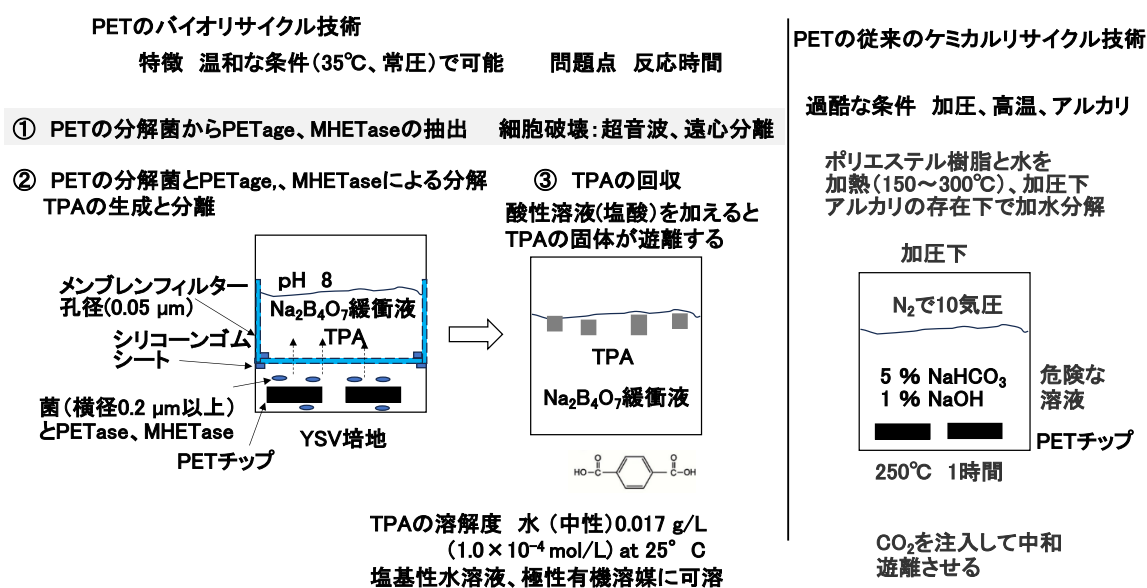


図 16 PET のバイオリサイクル技術