

スポットライト

～第11回「高校生・高専学生ポスター発表」優秀賞～

糸状菌の菌種の違いによる生分解性プラスチックの分解能力の差について 第2報

北海道旭川西高等学校 理数科

大橋実愛 千貝一矢 松井宏翼
松浦 旦 松村 慧

1. はじめに

本研究は、令和4年度理数科1班の継続研究である。先行研究では、イチゴとキュウリの葉面に付着した糸状菌が生分解性プラスチックを分解することが分かった。また、イチゴとキュウリの葉面に付着した糸状菌の生分解性プラスチック分解能力の比較では、キュウリ由来の糸状菌の方が分解能力が高いことが分かった。そこで、私たちは糸状菌の菌種の違いによって生分解性プラスチック分解能力に差が生じていると考え、本研究ではイチゴが所属するバラ科とキュウリが所属するウリ科の葉面に付着した糸状菌の菌種を同定し、分解能力との関係を調べた⁽¹⁾。

2. 使用した糸状菌

バラ科：イチゴおよびバラの葉面由来の糸状菌。

ウリ科：キュウリおよびカボチャの葉面由来の糸状菌。

- ・イチゴとキュウリは、先行研究で培養していた糸状菌を使用した⁽¹⁾。
- ・バラとカボチャは、苗から育てた葉面由来の糸状菌を使用した。どちらも5月9日から育て始め、51日後の6月28日にバラの葉面に糸状菌の付着が見られ、一方カボチャは78日後の7月25日に糸状菌の付着が見られた。

3. 実験方法と結果

(1) 糸状菌の培養

ポテトデキストロース寒天(粉末)とクロラムフェニコール、精製水で培地を作成し、2種(バラ、カボチャ)の葉面由来の糸状菌をそれぞれ培地に載せ、クリーンベンチ内において室温で培養した。

(2) 単離

既培養のイチゴ・キュウリ由来菌と本研究で培養したバラ・カボチャ由来菌の4種類の糸状菌を単離した。その結果、単離したシャーレ上の菌を電子顕微鏡で確認したところ、糸状菌の特徴を持つ菌のみ確認できたことや、今回の研究に協力してくださった酪農学園大学の小八重善裕准教授に

も糸状菌のみ存在が認められることを確認して頂いたため、私たちは正確な単離をすることができたと判断した(図1)。

(3) 耐久実験(9月6日～10月6日)

対象植物の葉面に付着した糸状菌を培養し、その培地上に5cm角に切った生分解性プラスチックを載せて接触させた。この生分解性プラスチックフィルムは、市販の農業用マルチシートを使用しており、材料はポリプロピレンアジペートテレフタレートである。そして、耐久実験器具(図2)に生分解性プラスチックの一端を固定し、反対端にクリップと糸でペットボトルを吊り下げた。その後、ペットボトルに水を注ぎ、生分解性プラスチックがちぎれた時の水の質量(荷重)を記録した。キュウリ葉由来およびイチゴ葉由来の糸状菌を付着させた生分解性プラスチックを5, 10, 15, 20, 25, 30日間放置したサンプルをそれぞれ3つずつ作製し、耐久実験を行った。

その結果、図3より、本研究で実施した30日間の耐久試験において、放置した日数にかかわらずキュウリ葉由来の糸状菌が付着した生分解性プラスチックのほうがイチゴ葉由来の糸状菌が付着した生分解性プラスチックよりも低い荷重でちぎれていることがわかる。したがって、キュウリ葉面由来の糸状菌の方がイチゴ葉面由来の糸状菌より生分解性プラスチック分解能力が高いと考えられる。この結果は先行研究とよく一致している。



図1 バラ葉面由来の糸状菌。(オンラインカラー)



図2 耐久実験器具。(オンラインカラー)

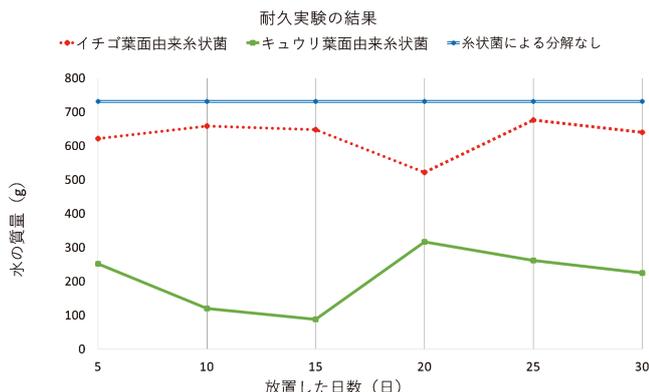


図3 経過日数と生分解性プラスチックがちぎれた時の水の質量(荷重). (オンラインカラー)

(4) 糸状菌の塩基配列同定

PCR法とシーケンス解析を用いて糸状菌の塩基配列を同定した。同定した糸状菌はイチゴ・キュウリ・バラ・カボチャ(赤)・カボチャ(白)の5つである。カボチャの糸状菌は赤と白の2種類のコロニーが形成されたため、両方とも同定した。

【手順】

- ①単離した培地から菌糸を取り、スライドガラス押しつぶし法を用いてDNAを取り出した。
- ②マイクロチューブに5サンプル分のPCRに必要な試薬(75 μL)(表1)を入れた。
- ③試薬が入ったマイクロチューブから8連チューブのうち5個のチューブに試薬15 μLとそれぞれのDNAを1 μLずつ入れた。
- ④サーマルサイクラーを使って増幅プログラム(表2)でPCRを行った。
- ⑤PCR産物に電気泳動を行い、1800塩基対付近のバンドを取り出し、DNAを再び抽出してシーケンス解析を行った。
- ⑥シーケンス解析より得た塩基配列(図4)をBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)検索にかけ菌種を同定した⁽²⁾。

【結果】

イチゴ由来の糸状菌: *Fsarium venenatum*
 キュウリ, バラ, カボチャ由来の糸状菌: *Fsarium oxysporum*

このことから、イチゴとキュウリで糸状菌の菌種が異なっていたため生分解性プラスチック分解能力に差が生じたと推察した。

4. 新たな課題

イチゴの糸状菌の塩基配列をBLAST検索したところ、*F. venenatum*とともに*F. oxysporum*も候補に挙がった。さらに、バラとイチゴのシーケンス解析時の波形が同じだったこと、1塩基しか変わらないことからシーケンスのエラーの可能性もあるため再び同定を行う必要があると考えている。

表1 試薬とその添加量.

試薬	添加量(μL)
KODImix	40
Forward プライマー(NS1)	2.5
Reverse プライマー(EF3)	2.5
脱イオン水	30,000

表2 増幅プログラム.

操作	設定温度(°C)	設定時間(s)
予備加熱	98	10
熱変性	98	10×40回
アニーリング	58	5×40回
伸長反応	68	1×40回
反応停止	68	10
冷却	12	∞

バラ	-GTTGGTTTCTAGGACCGCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAA
イチゴ	TGTTGGTTTCTAGGACCGCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAA
キュウリ	-GTTGGTTTCTAGGACCGCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAA
カボチャ白	-GTTGGTTTCTAGGACCGCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAA
カボチャ赤	-GTTGGTTTCTAGGACCGCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAA

図4 シーケンス解析より得た糸状菌の塩基配列. (オンラインカラー)

5. 今後の展望

- 再び糸状菌の塩基配列同定実験を行い結果を比較する。
- (i)今回と同じ結果になった場合、バラ葉由来およびカボチャ葉由来の糸状菌で耐久実験を行い、同じ菌種でも生分解性プラスチック分解能力に差が生じるか調べる。
 - (ii)今回の結果と異なり、キュウリ葉由来およびイチゴ葉由来の糸状菌の菌種が同じだった場合、培地に載せた菌の量の違いに着目して生分解性プラスチック分解能力に差が生じた理由を調べる。

旭川医科大学助教 春見達郎先生, 酪農学園大学准教授 小八重善裕先生, 並びに私たちに協力してくださった西高3年生の皆様へ感謝申し上げます。

文献

- (1) 北海道旭川西高等学校理科数科探究1班: 植物の違いによる生分解性プラスチックの分解調査, (2022).
- (2) Y. Hosino and S. Morimoto: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54** (2007), 701-710.

(2024年7月1日受理) [doi:10.2320/materia.63.794]
 (連絡先: 〒070-0815 旭川市川端町5条9-1-8)