

ハニーワームのポリエチレン分解と摂食の選択性

田岡 友輝 末吉 良

1. 概要

現在、プラスチックごみの環境への負荷が世界中で問題になっている。そんな中、プラスチックを分解してその過程でエネルギーを得る昆虫や細菌の研究が注目されている。

本研究では、生分解が難しいとされるポリエチレンを消化し、代謝することがわかっているハニーワーム（ハチノスツリガの幼虫）に焦点を当て、「蜜蝋とポリエチレン分解細菌」について調べた実験群 α と、「ハニーワームの摂食の選択性」について調べた実験群 β を行い、ハニーワームのポリエチレン消化と摂食に関する探究を試みた。実験群 α では実験は失敗したが、新たな培地の開発など一定の成果が得られた。実験群 β ではハニーワームがセルロースを分解できる可能性があることがわかった。

2. 先行研究

①ハニーワームについて

ハニーワームとはハチノスツリガの幼虫の通称であり、成虫はミツバチの巣に産卵し、孵化したハニーワームはミツバチの巣の主成分である蜜蝋や花粉、ハチミツ、巣の老廃物を食べ生活している。一般的には養蜂における害虫として知られており、ポリエチレンの分解作用だけでなく防除に関する研究も進められている。また人口環境下での繁殖、育成が容易であり、ペットの餌や釣り餌などにも利用されている。

②ハニーワームとポリエチレンについて

ハニーワームはポリエチレンを消化し、エチレングリコールを液体の状態で排出する。またハニーワームのポリエチレン分解にはハニーワームの腸内フローラが関係し、ハニーワームと腸内細菌の相互作用によりポリエチレン分解が促進される。さらにポリエチレン分解の過程でC-C単結合が切断されている。

③ポリエチレンと蜜蝋について

蜜蝋の主成分はパルミチン酸ミリシル ($C_{15}H_{31}COO_3H_{63}$) であり、ポリエチレンと同様に長い脂肪族鎖を持つ。

④ポリエチレン分解細菌の分離について

ポテトグルコース培地とポリエチレンを含むペトリ皿に $100\mu l$ の腸内懸濁液を摂取し、 $30^\circ C$ で培養する。その後ポリエチレンに接触した個々のコロニーを、新鮮な培地に入れることで分離できる。

3. 研究目的

今日、ハニーワームのポリエチレン分解に関する研究は多く進められているが、分解の具体的な過程については不透明な部分がある。そこで本研究で「蜜蝋とポリエチレン分解細菌の関係性」について調べることで、ポリエチレン分解の過程の解明の一端になれば良いと考えている。さらに「ハニーワームの摂食の選択性」について調べることで、ハニーワームの応用性が高まればよいと思う。

4. 実験群 α

実験群 α の概要

先行研究②④を行った研究者はハニーワームがポリエチレンと似た性質を持つ蜜蝋を消化できることから、ハニーワームがポリエチレンを消化できるのではないかと仮説を立て研究を始めたようだが、ポリエチレン分解細菌と蜜蝋の関係、さらにはポリエチレン分解細菌と蜜蝋を分解している細菌の関係はわかっていない。そこで実験群 α では、ハニーワームの腸内細菌と蜜蝋の関係性を調べる実験を試みた。

蜜蝋培地について

実験群 α を行う上で、培地に栄養として蜜蝋を入れた「蜜蝋培地」が必要になった。「蜜蝋培地」は本研究のオリジナルであるため、以下にその制作過程について記す。

制作方法（初期）

- ①寒天 (1.5 g) 蜜蝋 (1.5 g) 蒸留水 (100ml) を混ぜる。
- ②寒天、蜜蝋が溶けるまで加熱しながら混ぜる。

③シャーレに②で作ったものを流し込み冷却する。

問題点…蜜蝋が水に難溶性であるため冷却時に寒天と蜜蝋が分離し、培地上に均等に広がらない。



改善方法…界面活性剤の作用を利用し、水と蜜蝋をなじませる。

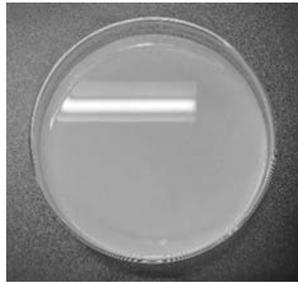
制作方法②

制作方法（初期）①に石鹼（無添加のもの）を 0.1g, 0.2g, またはスキムミルク（カゼインを含む）を 0.3g, 0.4g, それぞれ加え、以下は同じ方法で行い、蜜蝋と水がなじむ組み合わせを見つける。

蜜蝋培地の完成

石鹼を 0.2g 使用したときに蜜蝋と水がなじんだ。

→シャーレ（中）の蜜蝋培地 1 個作るには水 100ml, 蜜蝋 1.5g, 石鹼 0.2g を用いると良い。



実験α - 1 「蜜蝋培地を用いたハニーワームの腸内細菌の分離, 培養実験」

仮説…蜜蝋培地上でもハニーワームのポリエチレン分解細菌は増殖が可能なのではないか

実験方法

①ハニーワーム 2 匹の腸と 5ml の生理食塩水を攪拌した腸内懸濁液と 5ml の生理食塩水のみのもを作る。

②①で作ったものをそれぞれ蜜蝋培地に接種し、経過を観察する。

実験α - 1 の結果

- ・培地が乾燥し縮んだ。
- ・腸内細菌が生えたような跡は確認できなかった。
- ・うっすらとカビのようなものが生えていた。

実験α - 1 の考察

- ・シャーレを密閉できていなかったため、培地が乾燥し、細菌が繁殖できなかったのではないかと。
- ・カビ等の増殖により腸内細菌の増殖が抑制されたのではないかと。
- ・細菌の繁殖には蜜蝋以外の栄養も必要なのではないかと。
- ・蜜蝋培地に使用した石鹼が腸内細菌の繁殖に不利な何らかの影響を及ぼしたのではないかと。

実験α - 2 「ポテトグルコース培地によるポリエチレン分解細菌と蜜蝋培地による培養」

仮説…蜜蝋を分解する細菌とポリエチレン分解細菌は同じであり分離されたポリエチレン分解細菌は蜜蝋培地でも繁殖できるのではないかと。

実験方法

①ハニーワーム 2 匹の腸と 3ml の生理食塩水を攪拌した腸内懸濁液を 8 セット, 3ml の生理食塩水のみ溶液を 2 セット作る。

②先行研究を参考にして、①で作ったものをそれぞれポリエチレン断片を含むポテトグルコース培地に広げ

30°Cで培養する。

③ポリエチレン断片に摂食したコロニーを蜜蝋培地に移し経過を観察する。

実験α - 2の結果

- ・ポテトグルコース培地上でポリエチレン断片に摂食したコロニーは見られなかった。
- ・ポテトグルコース培地で菌のようなものが確認されたが、腸内懸濁液を接種した培地と生理食塩水のみを接種した培地で結果にあまり差が見られなかった。
- ・すべてのポテトグルコース培地上でカビが確認された。
- ・ポリエチレン分解細菌を分離することができなかったため、実験方法③以降の実験を行うことができなかった。

実験α - 2の考察

- ・滅菌と密閉が不十分であったため雑菌やカビが繁殖したのではないかと。
- ・雑菌やカビの繁殖によりポリエチレン分解細菌の繁殖が抑制されたのではないかと。
- ・腸内懸濁液の濃度が濃すぎたため腸内細菌のコロニーが培地上に広く広がってしまい、ポリエチレン断片に腸内細菌が正の走性を示し摂食したのかが半断できなかった。

5. 実験群β

実験群βの概要

実験群βでは「ハニーワームの摂食の選択性」に焦点を当て実験を行っている。ハニーワームのポリエチレン以外の物質の摂食の傾向、選択性を調べることでポリエチレン分解プロセスの一端の解明に結び付くのではないかと。さらには、ハニーワームが摂食行動を行うか分かっていない物質に対しての、ハニーワームの振る舞いを観察することでハニーワームの生態や摂食、消化に関する新たな事実がわかるのではないかと考え、以下の実験を設定した。今回は、以前の予備実験でハニーワームに与えた物質の中で比較的積極的な摂食行動が確認されたセルロースに注目して実験を行った。

実験β 「ハニーワームのセルロースに対する摂食の選択性」

仮説…ハニーワームはセルロースに対しても摂食行動を示すのではないかと。

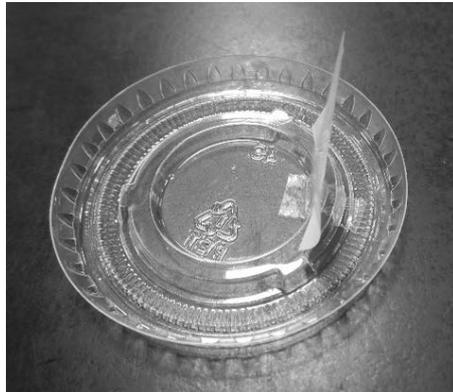
実験方法

- ①プラスチック容器の蓋に20 mm×20 mmのポリエチレン、蜜蝋、セロファン、ろ紙、蜜蝋をしみ込ませたろ紙を固定する。
- ②一種類の物質につき30匹、計150匹のハニーワームを用意し物質とともにプラスチック容器に入れる。
- ③25°Cの恒温槽で1週間程度飼育し、その後ハニーワームとともに入れておいた物質を観察する。



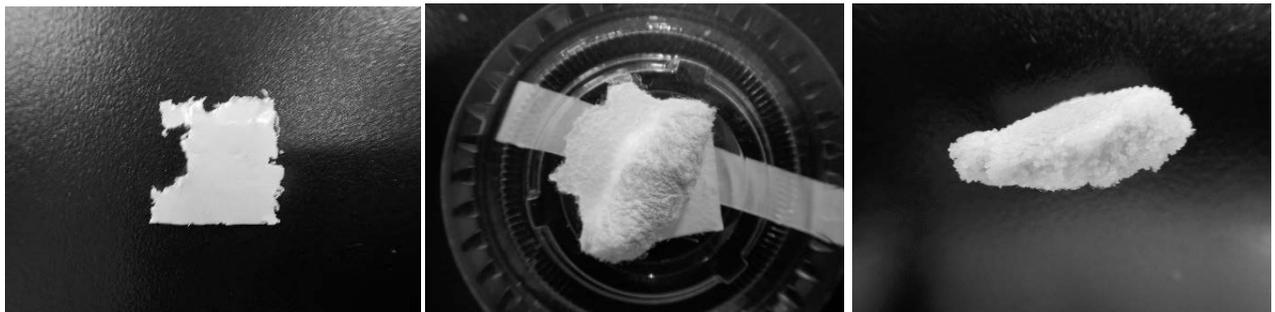
プラスチック容器の蓋への物質の固定について

これまでの私たちが行ったハニーワームのポリエチレンの摂食実験で、ハニーワームはポリエチレンを引っ張るようにかじっていることが分かった。そこで与える物質を固定することで、摂食する確率が向上するのではないかと考えた。



実験βの結果

- PE では 29 匹，蜜蝋をしみ込ませたろ紙では 30 匹，セロファンでは 24 匹，ろ紙では 29 匹，蜜蝋では 30 匹のハニーワームの摂食が確認できた。
- ろ紙蜜蝋に関して、摂食時の残滓または糞を繭の周りにまとわりつけていた。
- 物質の種類によってハニーワームのかじった量に差があった。

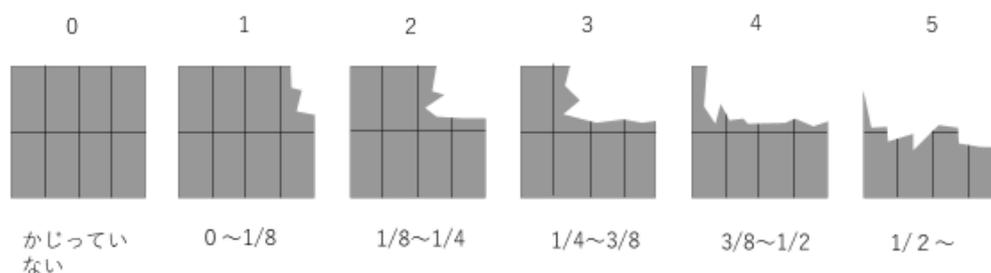


実験βの考察

- ろ紙やセロファンも PE や蜜蝋などと同程度の数かじったことから、ハニーワームはセルロースも消化できるのではないかと。
- 蜜蝋とろ紙を与えたハニーワームの繭に物質のかげらのようなものが付いているものがあり、それらが摂食時の残滓なのか、排泄物なのか判断できないため、さらに観察する必要がある。
- 以前のポリエチレンをプラスチック容器の蓋に固定せずに行った摂食実験では、PE への摂食する確率は 50%程度だったが、今回の実験では 90%以上になったことから、摂食実験を行う上で物質の固定は重要である。

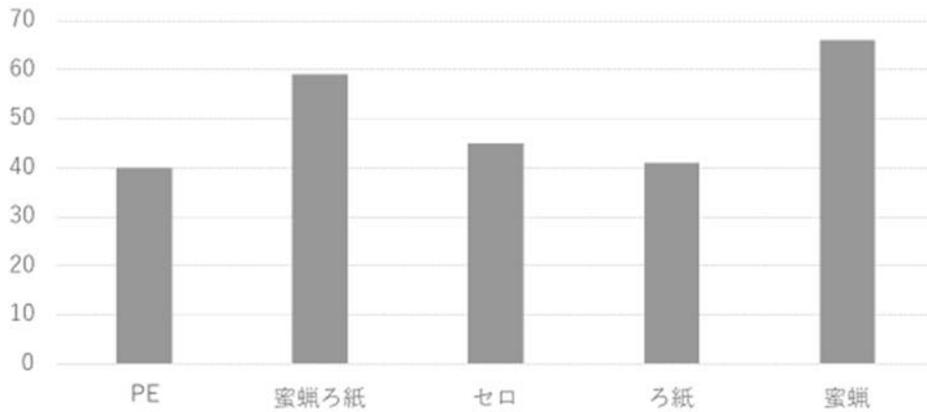
参考

物質のかじった量の差を可視化するために、かじった程度によって 0~5 の 6 段階で評価することにした。ただし、今回は目測で評価した。



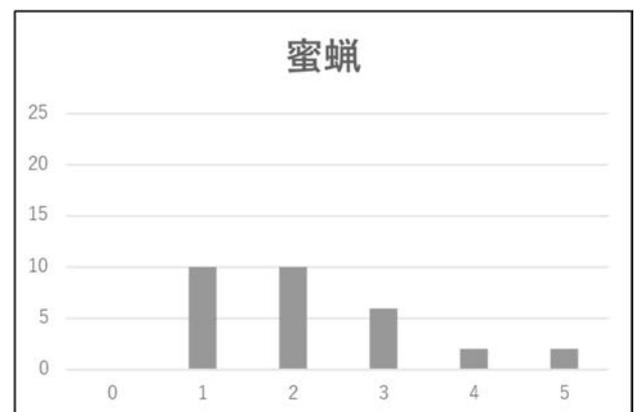
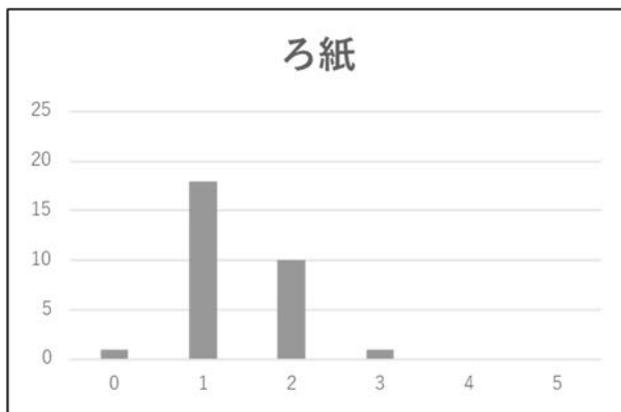
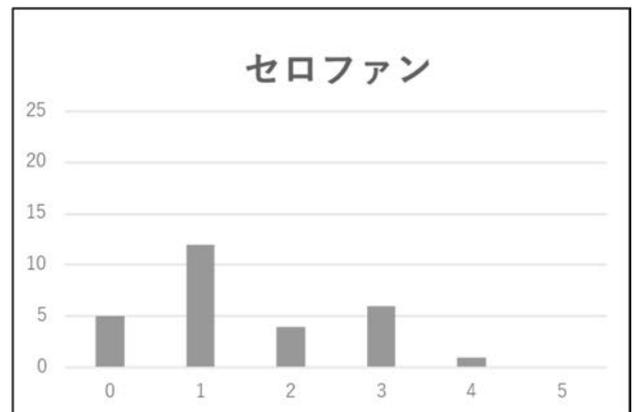
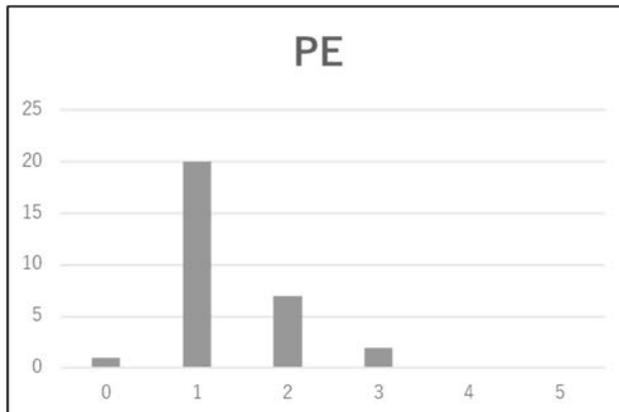
参考の考察

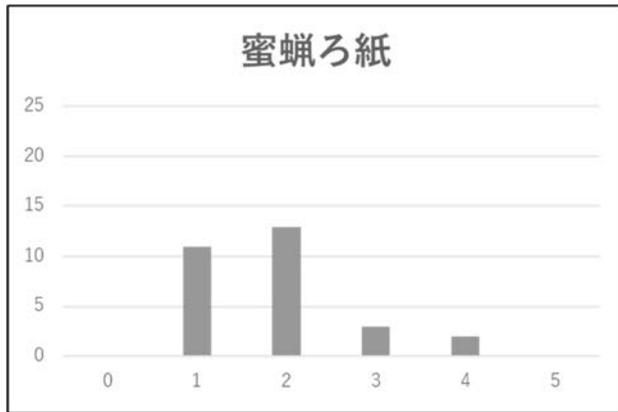
各物質の合計点数



(縦軸：合計点数 横軸：物質の種類)

- 蜜蝋や蜜蝋を染み込ませたろ紙はハニーワームの通常の餌であるためかじった量が多いのではないか。
- ポリエチレン，セロファン，ろ紙は同程度の量かじったことから，ハニーワームはセルロースもポリエチレンと同程度に消化できる可能性がある。
- ろ紙よりも蜜蝋を染み込ませたろ紙を多くかじっていることから，蜜蝋を染み込ませたことが積極的な摂食につながったのではないか。





(縦軸：個体数 横軸：点数)

- ・セロファンとろ紙は、同じセルロースからできているにも関わらず摂食の程度に差があることから、摂食の選択性には材質も関係している。

6. 研究の総括

本研究の成果

- ・摂食実験を行う上でハニーワームに与える物質を容器に固定することで摂食行動を行う確率が向上することが分かった。
- ・研究を行っていく過程で蜜蝋を培地に栄養として添加した「蜜蝋培地」を開発することができた。さらに培地に栄養として油脂を添加したのも例が無かったが、界面活性剤の作用を利用することで水と油脂を均等に混ぜ、培地に添加する方法も考案した。

本研究の応用と展望

- ・実験αのような腸内細菌を用いた実験によって、ポリエチレン分解や蜜蝋の分解に関わる細菌の密接な関係の一端がわかり、ポリエチレン分解プロセスの解明につながる。
- ・実験βのようなハニーワームの摂食実験においてポリエチレン以外の物質の摂食の傾向、選択性などを調べることで、ポリエチレン分解プロセスの解明につながり、他の物質の処理にも応用できる可能性がある。

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、元高松第一高校（現高松西高校）教諭 岡田先生、高松第一高校 教諭 小谷先生をはじめとする先生方にご指導ご鞭撻を賜りました。この場を借りてお礼申し上げます。ありがとうございました。

8. 参考文献

- [1] Role of the intestinal microbiome in low-density polyethylene degradation by caterpillar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*
(<https://ideasforgood.jp/2020/03/26/wax-worm>)
- [2] スムシ (その2)
(<http://cerana.blog.fc2.com/blog-entry-83.html>)
- [3] Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*
(https://www.researchgate.net/publication/316470874_Polyethylene_bio-degradation_by_caterpillars_of_the_wax_moth_Galleria_mellonella)
- [4] The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*
(<https://doi.org/10.3390/insects8020061>)
- [5] ポリエチレンテレフタレート (PET) を分解して栄養源とする細菌を発見
(https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2015/osa3qr000001fh3n-)