

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710060
 研究課題名 (和文) 植物と微生物機能のハイブリッドバイオレメディエーションによる高度水質浄化法の開発
 研究課題名 (英文) Enhanced bioremediation using aquatic plant-bacterial association

研究代表者
 遠山 忠 (TOYAMA TADASHI)
 室蘭工業大学・工学部応用化学科・助教
 研究者番号：60431392

研究成果の概要：ウキクサやヨシなどの水生植物とその根圏微生物の共生系では、ビスフェノール A やブチルフェノールなどの内分泌攪乱化学物質の分解が促進されることが明らかとなった。また、内分泌攪乱化学物質を効率的に分解する微生物が根圏に多く棲息し、水生植物がそれらの内分泌攪乱化学物質分解を促進していることも明らかとなった。本研究の成果は、水生植物とその根圏微生物を用いることで、水環境の内分泌攪乱化学物質汚染を効率的に浄化することができる可能性を示したものと見える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物環境工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオレメディエーション、ファイトレメディエーション、根圏微生物、水生植物、生分解、アルキルフェノール

1. 研究開始当初の背景

近年の重大な水環境問題の一つに有機系有害化学物質による水質汚染があり、人の健康、生活環境及び生態系を脅かす問題となっている。有害な有機化学物質の多くは、活性汚泥法を主流とする通常の下 wastewater 処理では除去が不十分であり、さらに農薬などのように直接フィールドで使用されるものもあるため、低濃度ながら水環境中から頻りに検出されている。内分泌攪乱化学物質をはじめと

する有害な有機化学物質は、一般的には生物難分解性であり、極微量で生体及び生態系に悪影響を及ぼすことから、これらの環境負荷を低減するためには高度な有機化学物質の処理、浄化技術が必要となる。

水環境中へ放出され、拡散した有害化学物質による低濃度かつ広範囲な汚染に対しては、微生物機能を活用したバイオレメディエーションが有効であるといわれているが、一般に有機化学物質分解菌の増殖速度は遅く、

土着微生物や化学物質が複雑に混合している実汚染サイトでは、分解菌の菌数と活性を高く維持するのは困難といわれている。しかし、近年、ある種の植物が根から糖質、アミノ酸や微生物活性物質等を分泌し、また、根から酸素を放出することから、根圏（根の周辺）では微生物の増殖及び生理活性が促進されているとともに、有機化学物質の好気分解が促進されていることも明らかとなってきた。このことから、植物をいわば微生物の stimulator（活性化装置）として用い、植物と微生物の機能を活用した根圏浄化法が注目されるようになってきた。

これまでの水生植物を利用した水質浄化法（植生浄化法）の適用は、栄養塩類の吸収除去による富栄養化対策か、重金属の吸収除去に限られており、近年の水環境汚染問題において最も重要な問題ともいわれる有機系化学物質汚染の浄化には適さないことが指摘されてきた。しかし、水生植物とその根圏に棲息する根圏微生物を組み合わせることで、栄養塩類や重金属の除去のみならず、有機汚染物質の分解をも可能とする新たな浄化法を構築することができる。

2. 研究の目的

本研究では、水生植物とその根圏に棲息する根圏微生物の機能を組み合わせたハイブリッドバイオレメディエーションにより、内分泌攪乱化学物質汚染を効率的に浄化する水質浄化法を構築することを目的とした。

本研究では、ウキクサとヨシをモデル水生植物として用い、その根圏における内分泌攪乱化学物質（ビスフェノール A、ビスフェノール F、ブチルフェノール及びピレン）の浄化作用を評価し、その浄化メカニズムを解明するため、以下の具体的な研究目標を立て、実験を行った。

(1) ウキクサ及びヨシとその根圏微生物の共生系が有する内分泌攪乱化学物質浄化能力の評価

(2) 根圏における内分泌攪乱化学物質分解を促進するウキクサとヨシの役割の解明

(3) 根圏において内分泌攪乱化学物質を効率的に分解する根圏微生物の分離及びその機能の解析

3. 研究の方法

水生植物とその根圏に棲息する根圏微生物の機能を活用して水環境の内分泌攪乱化学物質汚染を効率的に浄化する新たな浄化法を構築することを目的として、以下の研究を行った。

(1) 水生植物-根圏微生物共生系を用いた内分泌攪乱化学物質除去実験

①自然の水環境中から採取した底質にヨシを植え付けたものと、ヨシを植え付けていな

いものにビスフェノール A、ビスフェノール F をそれぞれ添加して分解実験を行った。

②自然の水環境中から採取した底質にヨシを植え付けたものと、ヨシを植え付けていないものにピレンを添加して分解実験を行った。

③ウキクサを植え付けた河川水と、ウキクサを植え付けていない河川水にブチルフェノールを添加して分解実験を行った。

(2) 根圏における内分泌攪乱化学物質分解を促進する水生植物の役割の解明

ウキクサとヨシが根から放出する酸素と、根から分泌する有機物（根分泌物）が分解菌の増殖と分解作用を促進すると考え、酸素放出と根分泌物の特徴を調べた。

(3) 内分泌攪乱化学物質を効率的に分解する根圏微生物の分離とその分解菌の機能解析

ウキクサとヨシの根圏における内分泌攪乱化学物質分解に重要な役割を果たす根圏微生物を特定するため、根圏からビスフェノール A、ビスフェノール F、ピレン及びブチルフェノール分解菌を分離し、その分離菌株を同定した。さらに、分離菌株による内分泌攪乱化学物質分解実験を行った。

4. 研究成果

水生植物とその根圏に棲息する根圏微生物の機能を活用して水環境の内分泌攪乱化学物質汚染を効率的に浄化する新たな浄化法を構築することを目的として行った検討から、以下の研究成果が得られた。

(1) ヨシと根圏微生物共生系によるビスフェノール A とビスフェノール F の分解

ヨシが存在しない底質にビスフェノール A とビスフェノール F を添加したところ、両物質は僅かに分解を受け、その大部分は長期間残留した。これに対して、ヨシ根圏底質ではいずれの物質も速やかに分解、除去された（図 1）。

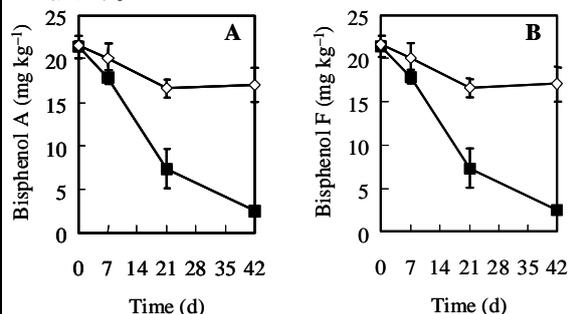


図 1. ヨシ根圏とヨシが存在しない底質でのビスフェノール A (A) とビスフェノール F (B) の分解除去

ヨシ根圏 (■) ヨシが存在しない底質 (◇)

ビスフェノール A やビスフェノール F などは、嫌気的な底質中では微生物分解を受けず、

その底質汚染が長期化する問題が指摘されていたが、ヨシとその根圏微生物を組み合わせることで、汚染底質中のビスフェノール類を効率的に除去可能であることが示された。

(2) ヨシと根圏微生物共生系によるピレンの分解

ヨシが存在しない底質にピレンを添加したところ、ピレンは明確な分解を受けず長期間残留した。これに対して、ヨシ根圏底質ではピレンが速やかに分解、除去された(図2)。

ピレンは生物難分解性で、水環境底質中に長期間残留することが問題となっており、その効率的な浄化法の確立が望まれていたが、ヨシとその根圏微生物を組み合わせることで、汚染底質中のピレンを効率的に除去可能であることが示された。

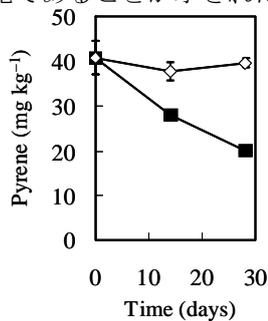


図2. ヨシ根圏(■)とヨシが存在しない底質(◇)でのピレンの分解除去

(3) ウキクサと根圏微生物共生系によるブチルフェノールの分解

ウキクサが存在しない河川水にブチルフェノールを添加したところ、ブチルフェノールは明確な分解を受けず長期間残留した。これに対して、ウキクサが存在する河川水では、ブチルフェノールが速やかに分解、除去された(図3)。

この結果より、一般的には生物難分解性であるブチルフェノールによる水環境汚染の浄化には、ウキクサと根圏微生物を組み合わせる浄化法が有効であることが示された。

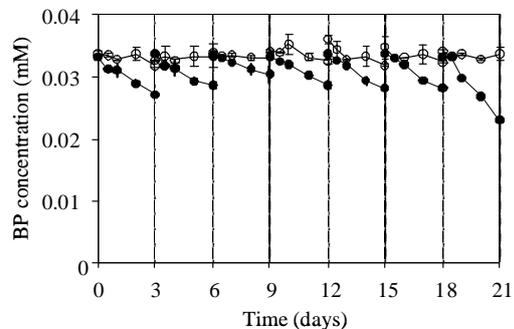


図3. ウキクサが存在する河川水(●)とウキクサが存在しない河川水(○)でのブチルフェノールの分解除去

(4) 内分泌攪乱化学物質分解を促進するウキクサとヨシの役割

ウキクサ及びヨシは根圏に酸素を供給して根圏微生物による好気的な内分泌攪乱化学物質分解を促進していることが示唆された。また、ウキクサ及びヨシは有機物質を根分泌物として根圏に供給していることが明らかとなったが、その根分泌物中には大量のフェノール性物質が含まれていることも明らかとなった。このことから根圏にはフェノール性物質を資化・分解する微生物が多く存在するとともに、根分泌物がそれらの分解作用を活性化していることが示唆された。

(5) 内分泌攪乱化学物質を効率的に分解する根圏微生物

ヨシ根圏からビスフェノールAを分解する *Novosphingobium* sp. strain TYA-1 (図4)、ビスフェノールFを分解する *Sphingobium yanoikuyae* strain TYF-1 (図5) 及びピレンを分解する *Mycobacterium gilvum* strains (図6) を分離することに成功した。いずれの分離菌株も高い分解能を有していることが明らかとなった。また、ウキクサ根圏からブチルフェノールを分解する *Pseudomonas veronii* を分離することに成功した。この分離菌株も高い分解能を有していることが明らかとなった。これらの分離菌株が水生植物の根圏での内分泌攪乱化学物質分解において重要な役割を果たしている根圏微生物であるものと考えられる。

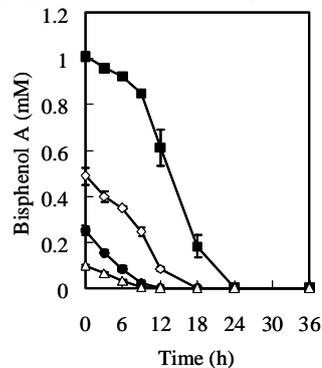


図4. *Novosphingobium* sp. strain TYA-1によるビスフェノールAの分解

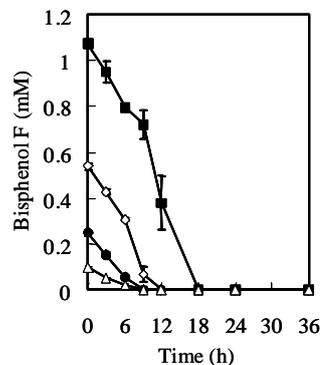


図5. *Sphingobium yanoikuyae* strain TYF-1によるビスフェノールFの分解

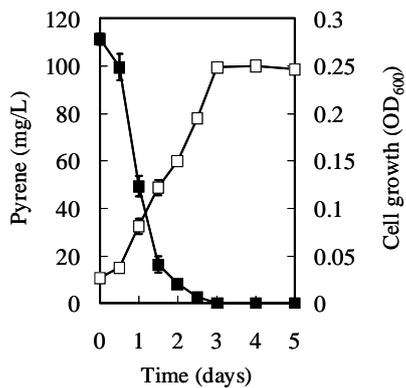


図6. *Mycobacterium gilvum* strain IPF によるピレンの分解と細胞増殖

(6) まとめ

ヨシやウキクサなどの水生植物とその根圏微生物の共生系では、ビスフェノール A、ビスフェノール F、ピレンやブチルフェノールなどの内分泌攪乱化学物質が効率的に分解除去されることが明らかとなった。また、その内分泌攪乱化学物質の微生物分解を促進する水生植物の作用の一端を明らかにすることができた。さらに、水生植物の根圏において内分泌攪乱化学物質を効率的に分解する根圏微生物を特定し、その特徴の一部を明らかにすることができた。本研究で得られた知見から、一般的に生物難分解性である内分泌攪乱化学物質による水環境汚染の浄化には、水生植物と根圏微生物機能のハイブリッドバイオレメディエーションが有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Tadashi Toyama, Yusuke Sato, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Young-Cheol Chang, Shintaro Kikuchi and Michihiko Ike. Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. Journal Bioscience and Bioengineering. (2009). In press. 査読有
- ② Hoang Hai, Daisuke Inoue, Naonori Momotani, Ning Yu, Tadashi Toyama, Kazunari Sei, Michihiko Ike. Characterization of Novel 4-*n*-butylphenol degrading *Pseudomonas veronii* strains isolated from rhizosphere of giant duckweed, *Spirodela polyrrhiza*. Japanese

Journal of Water Treatment Biology. (2009). In press. 査読有

- ③ Tadashi Toyama, Kazunari Sei, Ning Yu, Hirohide Kumada, Daisuke Inoue, Hai Hoang, Satoshi Soda, Young-Cheol Chang, Shintaro Kikuchi, Masanori Fujita, and Michihiko Ike. Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: A mechanism of accelerated biodegradation of phenol. Water Research. (2009). In press. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Yuka Ogata, Occurrence of 4-*tert*-butylphenol degradation in aquatic samples caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza*, 3rd IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, 2009. 10. 18-21, Taipei, Taiwan
- ② 遠山忠、ヨシ根圏におけるピレン及びベンゾ[a]ピレンの分解、日本水処理生物学会第 45 回大会、平成 20 年 11 月 13 日、秋田市、秋田市文化会館
- ③ 遠山忠、ヨシ根圏における 4-*n*-ブチルフェノール分解菌と 4-*tert*-ブチルフェノール分解菌の集積、第 60 回生物工学会大会、平成 20 年 8 月 28 日、仙台市、東北学院大

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 忠 (TOYMA TADASHI)

室蘭工業大学・工学部応用化学科・助教
研究者番号：60431392

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：