

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310057

研究課題名(和文)植物と微生物のスーパーシンビオーム系の創出とそれを利用した排水処理

研究課題名(英文)Development of super-symbiotic plant and microorganisms association and its application for wastewater treatment

研究代表者

遠山 忠 (TOYAMA, Tadashi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：60431392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水生植物の根圏における植物と微生物の共生・相互作用が発揮する新しい現象、能力と効果を分子レベルで解明するとともに、その作用効果を最大限発揮させること、さらにその効果を利用した効率的な窒素・リン除去と有機化学物質除去技術を開発することを目的とした。

研究を通じて、1. ウキクサ科植物やヨシなどの水生植物の生長、光合成活性と窒素・リン取り込みを2倍程度促進する植物成長促進細菌(PGPB)の分離、植物-PGPB共生作用の解明と窒素・リンの高効率除去の実証、2. 内分泌攪乱化学物質を効率よく分解する微生物の分離と特徴付け、植物-分解菌共生作用の解明と長期持続排水処理の実証に成功した。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were (i) to develop the super-symbiotic plant and microorganisms association for wastewater treatment, (ii) to clarify the mechanisms of the symbiotic association and (iii) to demonstrate high-efficient wastewater treatment by using the super-symbiotic association. First, plant growth promoting bacteria (PGPB) of duckweed and common reed were isolated. The PGPB could promote growth, biomass production, photosynthesis and nitrogen uptake of duckweed/common reed. I demonstrated the accelerated nitrogen removal from wastewater by using the symbiotic association. Second, endocrine-disrupting chemicals (EDCs)-degrading bacteria were isolated and characterized. Duckweed and common reed could promote degrading activity/growth activity of the EDC-degrading bacteria. I constructed the symbiotic plant and EDC-degrading bacteria association, and demonstrated the efficient and sustainable removal of EDCs from contaminated wastewaters by using the association.

研究分野：環境工学

キーワード：環境保全技術 環境修復技術 排水処理 植物根圏 水生植物 植生浄化 内分泌攪乱化学物質 植物・微生物共生

## 1. 研究開始当初の背景

太陽光をエネルギー源、大気中二酸化炭素を炭素源として生育可能な植物を利用した植生浄化法は、外部からのエネルギー投入が不要な経済的技術であると同時に、省エネルギー・省資源性と環境適合性を持った持続可能な水質浄化・保全技術である。植生が持つこのような機能を最大限に引き出し、その利用を促進することができれば、安全で良質な水資源確保のための排水処理の高度化と排水処理系での省エネルギー・温室効果ガス削減対策のトレードオフを解消し、低炭素・循環型社会の実現に大きく貢献する。しかしながら、浄化速度が遅いことや難分解性有機化学物質汚染には十分に対応できないことなどがブレーキとなり、植生浄化法の普及が立ち遅れている状況にある。

一方、植物根圏(根の周辺)には植物と共生する微生物が存在しており、その共生・相互作用により、個々の植物と微生物では見られない効果や機能を発揮することが知られるようになってきた。その微生物には、植物の成長を促進する細菌(植物成長促進細菌、Plant Growth-Promoting Bacteria、以下PGPB)や化学物質分解菌などの有用微生物がいる。そこで植物根圏において有用微生物群を適切にデザインすることができれば、植生浄化法の制約、課題を払拭し、植生浄化システムのステップアップが期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、水生植物の根圏における植物-微生物相互作用が発揮する新しい現象、能力と効果を分子レベルで解明し、その作用効果が最大限に発揮されるような微生物デザイン化技術を開発することにより、植物-微生物スーパーシンビオーム系(共生系)を創出することを目指した。具体的には、内分泌攪乱化学物質分解菌と水生植物の共生系による排水処理からの効率的な内分泌攪乱化学物質除去と PGPB と水生植物の共生系による効率的な窒素除去のシステムを開発し、その実用性を評価する。

本研究では水生植物としてウキクサとヨシを使用し、以下の4つの研究を実施した。

(1) 水生植物 PGPB の探索とその特徴づけ

(2) 水生植物に共生する内分泌攪乱化学物質分解菌の特徴づけ

(3) 水生植物-微生物共生・相互作用の分子レベル解析

(4) 水生植物-微生物共生系を構築する方法の検討

(5) 実証試験と実用性評価

## 3. 研究の方法

(1) 水生植物 PGPB の探索とその特徴づけ

ウキクサとヨシを自然水環境中や下水二次処理水で栽培し、その根圏から PGPB を探索、分離し、そのカルチャーコレクションを整備した。ここでは、無菌化植物に分離

PGPB を接種し、植物成長促進効果(PGPB 植物/無菌植物)を判定した。また、各種植物成長ホルモン生産活性や鉄キレート(シデロフォア)生産活性、リン可溶化などの植物成長促進に係わる各種試験を実施した。

(2) 水生植物に共生する内分泌攪乱化学物質分解菌の特徴づけ

既に分離した内分泌攪乱化学物質分解菌の特徴を分解酵素・遺伝子レベルで再解析した。また、新しい分解菌をウキクサあるいはヨシの根圏から探索し、その特徴を調べた。

(3) 水生植物-微生物共生・相互作用の分子レベル解析

PGPB とウキクサあるいはヨシの共生系を構築し、光合成活性測定、光合成色素含有量測定やメタボロミクス解析、遺伝子発現解析を駆使してその共生・相互作用を解析した。

また、内分泌攪乱化学物質分解菌とヨシの共生系を構築し、化学物質分解実験、微生物増殖実験や遺伝子発現解析を駆使して、その共生・相互作用を解析した。

(4) 水生植物-微生物共生系を構築する方法の検討

植物根表面あるいはその周辺に有用微生物群を固定する手法を検討し、その持続性を評価した。

(5) 実証試験と実用性評価

人工気象室や温室内において数~数 10L スケールの PGPB-ウキクサ共生系リアクターを試作して排水処理実験を行い、排水中の窒素・リン濃度をモニタリングした。また、内分泌攪乱化学物質分解菌-水生植物共生系リアクターを試作して排水処理実験を行い、排水中の内分泌攪乱化学物質濃度をモニタリングした。

## 4. 研究成果

(1) 水生植物 PGPB の探索とその特徴づけ  
ウキクサの成長を2倍程度促進する PGPB

(*Sinorhizobium* sp. SP4、*Pelomonas* sp. SPE11、他 20 株以上) ヨシの成長を2倍程度促進する PGPB (*Asticcacaulis* sp. PAWW6、他 10 株以上)を分離することに成功した。さらに、それらの PGPB が有する植物成長ホルモン(オーキシン)生産性、シデロフォア生産性、リン可溶化能などの植物成長促進作用の特徴を明らかにすることができた。その PGPB の一部を表1にまとめた。

表1. ウキクサの PGPB の一例

PGPB	成長促進	特徴
<i>Sinorhizobium</i> sp. SP4	1.9 倍	Si+, Chl. +
<i>Sinorhizobium</i> sp.SP8	1.8 倍	Si+, Chl. +
<i>Xanthobacter</i> sp. SPR1	1.9 倍	IAA +
<i>Starkeya</i> sp. SPE6	1.9 倍	Si +
<i>Pelomonas</i> sp. SPE11	1.8 倍	Chl. +

成長促進, PGPB ウキクサバイオマス / 無菌ウキクサ; Si, シデロフォア生産性; IAA, オーキシン生産性; Chl., クロロフィル含有量促進

(2) 水生植物に共生する内分泌攪乱化学物質分解菌の特徴づけ

これまでに分離した内分泌攪乱化学物質分解菌 (*Sphingobium* sp. IT4, *Sphingobium* sp. TIK1, *Sphingobium* sp. OMI, *Sphingobium* sp. FID1) ニトロフェノール分解菌 (*Pseudomonas* sp. ONR1, *Pseudomonas* sp. PNR1, *Rhodococcus* sp. DNR2) などの有用な化学物質分解菌の化学物質分解特性と phenol monooxygenase や catechol 2,3-dioxygenase、catechol 1,2-dioxygenase などの分解酵素・遺伝子の特徴を明らかにすることができた。特に、TIK1 株や OMI 株は、これまでにない特殊な分解特性、分解酵素・遺伝子を有していることを突き止めた。

また、数種類のウキクサ科植物の根圏に共生するフェノール分解菌の存在と特徴を突き止め、水生植物の周辺は化学物質分解菌が住みやすい生息域になっていること、さらに通常環境とは異なる特殊なフェノール分解菌が根圏に共生していることを明らかにした。

(3) 植物根圏における植物-微生物共生・相互作用の分子レベル解析

PGPB とウキクサの共生・相互作用を分子レベルで調べた結果、PGPB がウキクサのクロロフィル合成経路、カルビンサイクル、光合成活性、窒素代謝を 2 倍以上促進することを突き止めた (図1 および 2)。

一方、ヨシと内分泌攪乱化学物質分解菌の共生・相互作用を分子レベルで調べた結果、ヨシが内分泌攪乱化学物質分解菌の増殖・エネルギー基質を供給していること、さらに、化学物質分解遺伝子の発現活性を高めていることを突き止めた (図3)。

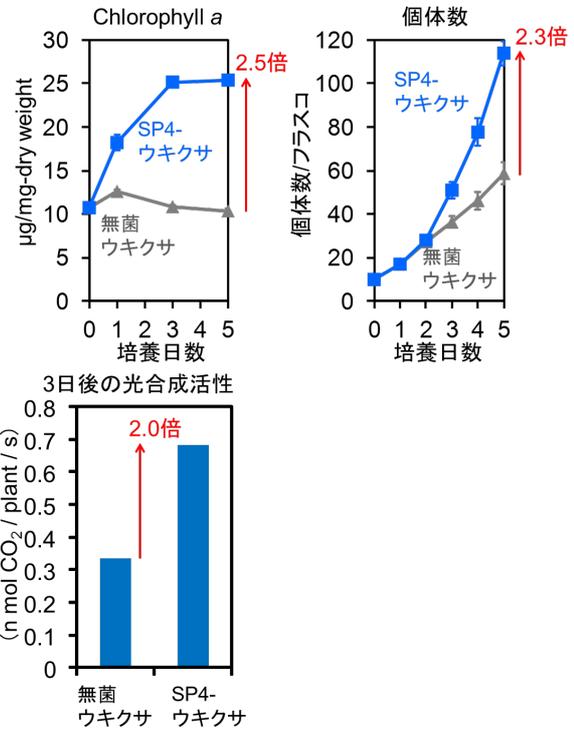
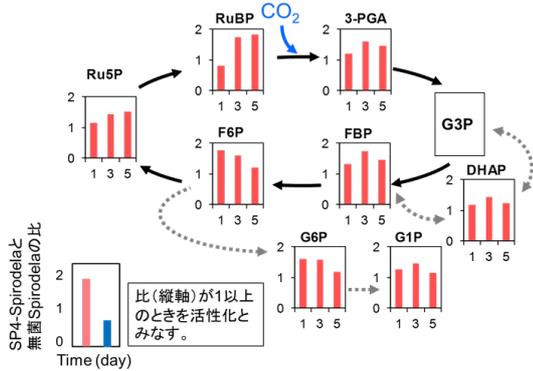


図1. PGPB (SP4 株) によるウキクサのクロロフィル含有量増加、バイオマス生産促進と光合成活性促進

ウキクサカルビンサイクルに関する代謝物濃度の変化



ウキクサ窒素代謝に関する代謝物濃度の変化

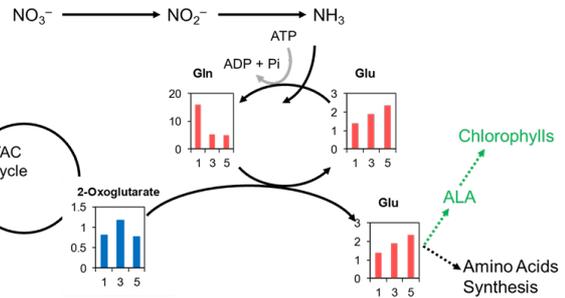


図2. PGPB (SP4 株) によるウキクサのカルビンサイクルと窒素代謝の活性化

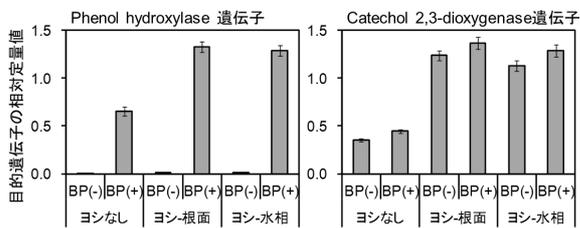


図 3. ヨシによる内分泌攪乱化学物質分解菌 (TIK1 株) の phenol hydroxylase 遺伝子と catechol 2,3-dioxygenase 遺伝子の発現活性の上昇。BP(-) プチルフェノールなし、BP(+) プチルフェノールあり

(4) 植物根圏における微生物デザイン化技術の開発

ウキクサと PGPB の共生系のデザインに関しては、ウキクサを高密度の PGPB 菌液に浮かべることにより 1 日後からウキクサの代謝が変化・活性化すること、さらに、一度活性化されたウキクサの光合成、物質代謝やバイオマス生産は PGPB から離れても 1 週間以上持続することを明らかにした。

ヨシと内分泌攪乱化学物質分解菌の共生系のデザインに関しては、ヨシ根毛が高い分解菌保持力を有していることが分かり、ヨシを分解菌液に数時間漬けることにより、高密度で安定的に分解菌を維持できることを実証した (図 4)。

また、ヨシ根圏から分離した分解菌をアルギン酸ビーズなどに包括固定化することによっても、高い分解活性を長時間持続することを確認した。このように、植物根圏から分離した有用微生物を必ずしも植物を共生させるだけでなく、包括固定化して利用できることも明らかとなった。

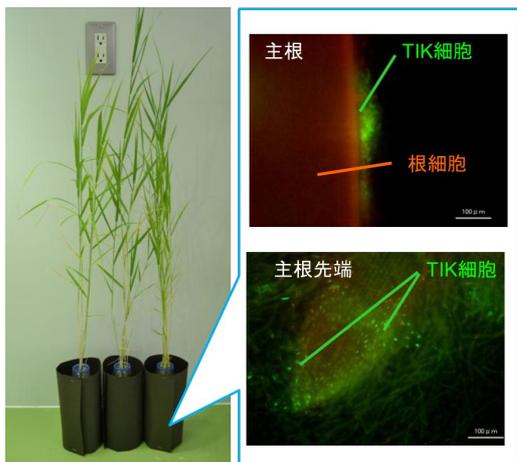


図 4. 内分泌攪乱化学物質分解菌 (TIK1 株) を用いたヨシ根圏の化学物質浄化強化デザイン。ヨシの根に定着する TIK1 細胞株の様子

(5) 実証試験と実用性評価

ウキクサと PGPB の共生系を利用した下

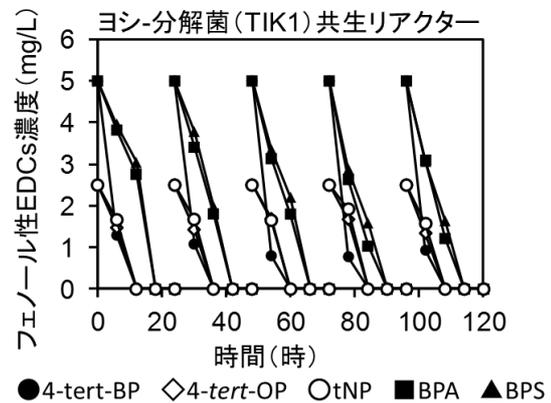
水二次処理水または都市河川水からの窒素除去リアクター (数 ~ 20L スケール) を試作し、長期連続バッチ実験を行った。その結果、通常のウキクサリアクターに比べて、窒素除去速度とバイオマス生産速度が 2 倍以上効率化し、それが持続することを実証した。

また、ヨシと内分泌攪乱化学物質共生系、あるいはアルギン酸ビーズに固定した内分泌攪乱化学物質分解菌のリアクターを試作し、長期連続バッチ実験を行った。その結果、複数の内分泌攪乱化学物質 (アルキルフェノール類、ビスフェノール水) を実排水から高効率で、かつ持続的に除去できることを実証した。さらに、ニトロフェノール類やアルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) の除去リアクターも試作し、その効率的かつ安定的な除去を実証した。

このような実証実験を通じて、植物と有用微生物のスーパーシンビオーム系 (共生系) による効率的な排水処理の実現可能性を示すことができた。



図 5. ウキクサと PGPB の共生系リアクターによる下水二次処理水からの窒素除去



●4-tert-BP ◇4-tert-OP ○tNP ■BPA ▲BPS  
図 6. ヨシと内分泌攪乱化学物質共生系による内分泌攪乱化学物質複合排水 (4-tert-プチルフェノール、4-tert-オクチルフェノール、ノニルフェノール、ビスフェノール A、ビスフェノール S) の連続バッチ処理

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 9 件)

Y. Li, T. Toyama, Y. Tanaka, Y. Tang, X. Wu, K. Mori, Effects of various duckweed species on phenol degradation in environmental waters. Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2014, URL: 50:95-103. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jswtb/-char/ja/> ( 査読有 )

R. K. Kristanti, T. Toyama, T. Habiharata, Y. Tanaka, K. Mori, Bioaugmentation involving a bacterial consortium isolated from the rhizosphere of *Spirodela polyrhiza* for treating water contaminated with a mixture of four nitrophenol isomers. Royal Society of Chemistry, 2014, 4:1616-1621. DOI: 10.1039/c3ra44892d ( 査読有 )

R. A. Risky, T. Toyama, T. Habiharata, Y. Tanaka, K. Mori, Sustainable removal of nitrophenols by rhizoremediation using four strains of bacteria and giant duckweed (*Spirodela polyrhiza*). Water, Air and Soil Pollution, 2014, 225:1-10 DOI: 10.1007/s11270-014-1928-7 ( 査読有 )

Y. Li, T. Toyama, T. Furuya, K. Iwanaga, Y. Tanaka, K. Mori, Sustainable biodegradation of bisphenol A by *Spirodela polyrhiza* and *Novosphingobium* sp. FID3. Journal of Water Environment Technology, 2014, 12:43-45. URL: [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jwet/12/1/\\_contents](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jwet/12/1/_contents) ( 査読有 )

T. Toyama, T. Ojima, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, Sustainable biodegradation of phenolic endocrine-disrupting chemicals by *Phragmites australis*-rhizosphere bacteria association. Water Science and Technology, 2013, 68:522-529. DOI: 10.2166/wst.2013.234 ( 査読有 )

遠山忠、田中靖浩、森一博、総説：植物根圏での植物と微生物の相互作用による化学物質の分解. 環境バイオテクノロジー学会誌, 2013, 13:69-77. URL: <http://www.jseb.jp/jeb/jeb.html> ( 査読無 )

Y. Ogata, T. Toyama, N. Yu, X. Wang, K. Sei, M. Ike, Occurrence of 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrhiza* and isolation of a 4-*t*-BP-utilizing bacterium. Biodegradation, 2013, 24:191-202.

DOI: 10.1007/s10532-012-9570-9 ( 査読有 )

Y. Ogata, S. Goda, T. Toyama, K. Sei, M. Ike, The 4-*tert*-butylphenol-utilizing bacterium *Sphingobium fuliginis* OMI can degrade bisphenols via phenolic ring hydroxylation and *meta*-cleavage pathway. Environmental Science and Technology, 2013, 47:1017-1023. DOI: 10.1021/es303726h ( 査読有 )

T. Toyama, Y. Kainuma, S. Kikuchi, K. Mori, Biodegradation of bisphenol A and 4-alkylphenols by *Novosphingobium* sp. strain TYA-1 and its potential for treatment of polluted water. Water Science and Technology, 2012, 66:2202-2208. DOI: 10.2166/wst.2012.453 ( 査読有 )

### 〔学会発表〕(計 32 件)

遠山忠、神戸政広、田中靖浩、森一博、成長促進細菌による微細藻類の光合成能力とバイオマス生産性の向上、第 49 回日本水環境学会年会、2015.3.16-2015.3.18、金沢市、金沢大学

T. Toyama, Y. Nishimura, Y. Ogata, K. Sei, K. Mori, M. Ike, Effects of common reed (*Phragmites australis*) on nitrogen removal and abundance of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in freshwater sediment, 9<sup>th</sup> IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries, 2014.11.24-2014.11.26, Kochi, The Crown Palais New Hankyou Kochi.

水野寛之、田中靖浩、遠山忠、森一博、芳香族化合物の微生物吸着に関する研究、日本水処理生物学会第 51 回大会、2014.11.12-2014.11.14、甲府市、山梨 JA 会館

戸田勇貴、田中靖浩、遠山忠、森一博、水生植物による栄養塩吸収モデルと植物成長促進微生物 (PGPB) 適用植生への応用、日本水処理生物学会第 51 回大会、2014.11.12-2014.11.14、甲府市、山梨 JA 会館

Y. Li, T. Toyama, Y. Tanaka, K. Mori, Characterization of phenol-degrading bacteria in the rhizosphere of duckweeds、日本水処理生物学会第 51 回大会、2014.11.12-2014.11.14、甲府市、山梨 JA 会館

遠山忠、田中靖浩、森一博、池道彦、森川正章、Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 のウキクサ科植物に

対する成長促進とその応用性について、日本水処理生物学会第 51 回大会、2014.11.12-2014.11.14、甲府市、山梨 JA 会館  
遠山忠、黒田真史、田中靖浩、森一博、池道彦、成長促進細菌の共培養による微細藻類の増殖と光合成の促進、第 65 回日本生物工学会大会、2014.9.9-2014.9.11、札幌市、札幌コンベンションセンター  
影本敬太、菅原雅之、尾島拓也、三輪京子、森川正章、遠山忠、ウキクサ成長促進細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* P23 の陸上植物への影響評価、第 65 回日本生物工学会大会、2014.9.9-2014.9.11、札幌市、札幌コンベンションセンター  
遠山忠、ヨシ植生による底質からの窒素除去とそのメカニズム解明、日本水環境学会・東北支部・人工湿地ワークショップ、2014.8.29、仙台市、東北工業大学一番町ロビー  
T. Toyama, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, Enhancement of photosynthesis, biomass production and nutrient uptake of duckweed by plant-growth promoting bacteria, International Union of Microbiological Societies Congresses 2014, 2014.7.27-2014.8.1, Montreal, Convention Center.  
T. Toyama, Y. Tanaka, K. Mori, Enhanced biodegradation of endocrine-disrupting chemicals by cooperative relationship between common reed and rhizosphere bacteria, Water and Environment Technology Conference 2014, 2014.6.28-2014.6.29., Tokyo, Waseda University.  
遠山忠、田中靖浩、森一博、ヨシと *Sphingobium* sp. TIK1 株の相互作用によるフェノール性内分泌攪乱化学物質の効率的な分解、第 48 回日本水環境学会年会、2014.3.17-2014.3.19、仙台市、東北大学  
遠山忠、田中靖浩、森一博、ウキクサと plant growth-promoting bacteria を利用した下水からの効率的な栄養塩除去とデンプン系バイオマス生産、日本水処理生物学会第 50 回大会、2013.11.13-2013.11.15、神戸市、神戸水道局たちばな職員研修センター  
遠山忠、田中靖浩、森一博、森川正章、*Sinorhizobium* sp. SP4 によるウキクサの光合成能力、バイオマス生産と水質浄化機能の向上、第 65 回日本生物工学会大会、2013.9.18-2013.9.20、広島市、広島国際会議場  
T. Toyama, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, Enhanced photosynthesis,

biomass production and nutrient uptake of duckweeds by plant growth-promoting bacterium, *Sinorhizobium* sp. SP4, The second International Conference on Duckweed Research and Applications, 2013.8.21-2013.8.24, USA, New Jersey, The State University of New Jersey.  
T. Toyama, T. Nakayama, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, Plant growth-promoting bacterium, *Sinorhizobium* sp. SP4, enhances biomass growth, nutrient uptake and starch production of giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*), Water and Environment Technology Conference 2013, 2013.6.15-2013.6.16, Tokyo, Tokyo University of Agriculture and Technology.  
遠山忠、水生植物の根圏強化による省エネ型水質浄化、環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会年会シンポジウム、2013.5.30-2013.6.1、北九州市、北九州国際会議場  
遠山忠、田中靖浩、森川正章、森一博、Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) によるヨシの成長と水質浄化の促進、第 47 回日本水環境学会年会、2013.3.13、大阪市、大阪工業大学大宮キャンパス  
遠山忠、田中靖浩、森一博、ヨシとシュードモナス細菌の共生系によるフェノール性内分泌攪乱化学物質の分解とその廃水処理への応用、日本水処理生物学会第 49 回大会、2012.11.25、東京都、北里大学白金キャンパス  
遠山忠、田中靖浩、森一博、ウキクサの成長を促進する Plant Growth-Promoting Rhizobacteria の分離とその特徴づけ、第 64 回日本生物工学会大会、2012.10.24、神戸市、神戸国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~51ab/>

<http://www.ce.yamanashi.ac.jp/research/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠山 忠 (TOYAMA Tadashi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：60431392

### (2) 研究分担者

なし