

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340068

研究課題名(和文) 機能性微生物を用いた植物根圏への芳香族化合物の吸着・濃縮と分解の促進

研究課題名(英文) Accelerated biosorption and biodegradation for aromatic compounds in the rhizosphere of aquatic plants

研究代表者

森 一博 (MORI, Kazuhiro)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：90294040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：複数の水生植物の根面などから多数の菌株を分離し、生菌液による各種芳香族化合物の吸着試験を行ったところ、ビスフェノールA(BPA)に特異的な吸着作用を示す菌株の分離に成功した。本菌株による吸着反応は試験開始後5分以内に平衡に達し、幅広い環境条件で安定的であり、Freundlich吸着等温式に良く適合していた。また、吸着菌を分解菌と併せて、ウキクサ(Spirodela polyrhiza)の根圏に導入した系や固定化担体として用いた系では、いずれかを単独で用いた系よりも優れた浄化効果が示された。以上より、吸着菌を分解菌と併用することで、各種生物学的処理の効果が促進される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Bacterial strains were isolated from various environmental samples and applied for aromatic compounds biosorption tests. An isolate showed high adsorption activity against bisphenol A and its biosorption reaction was stable under wide range of pH and temperature. It can be characterized by Freundlich isotherm. Both of duckweed rhizosphere system and calcium alginate immobilized carrier system co-inoculated with adsorbing bacteria combined with degrading bacteria showed efficient removal of BPA comparing with single-inoculated system. These results indicate that not only degrading bacteria but also adsorbing bacteria in the biological treatment system for aromatic compounds play important roles and are useful target of system development.

研究分野：生物環境工学

キーワード：生物吸着 芳香族化合物 根圏

1. 研究開始当初の背景

植物を用いた環境浄化法は、コスト、消費エネルギー、温室効果ガス排出量が低いのが特徴で、エネルギー回収などの余剰バイオマスの有効利用法も開発されつつあることから改めて注目されている技術である。しかし、従来型の植生浄化法では他の手法に比べて浄化速度が劣ることが大きな課題であった。そこで我々の研究グループでは、広く水環境中から検出され内分泌攪乱作用などから生態系への影響が危惧されている多様な芳香族化合物の新規性に富む分解微生物が根圏に存在することを明らかにしてきた¹⁻³⁾。一方、活性汚泥法などでも知られるように、有機性汚濁物質についていわゆる初期吸着による汚濁濃度の低減と浄化反応相への濃縮は重要な効果を示している。しかし、有機性化学物質の生物吸着のメカニズムは不明で機能制御への応用も検討されていない。そこで、植物の根圏部に流入した有機性化学物質の根圏微生物相への吸着・濃縮を促進すれば、分解微生物にも有利に作用し、課題であった浄化効果を飛躍的に向上させるのではないかと考えた。特に、水質浄化の場合は、低濃度から比較的高濃度まで幅広い濃度に対応することが求められることから、濃縮と分解の効果を制御できれば実用性向上に極めて効果的である。

2. 研究の目的

本研究では生態系への影響が危惧される各種芳香族化合物を特異的に吸着し濃縮する微生物と効率的に分解する微生物(以降、合わせて機能性微生物と呼ぶ)を水生植物の根圏に安定的に維持しながら高い水質浄化作用を得る植物浄化システムを開発する。そのために、(1)芳香族化合物を特異的に吸着・分解する機能性微生物の探索、(2)分離微生物の機能特性の解明、(3)機能性微生物の根圏での残存特性の解明、(4)機能性微生物を活用した浄化システムの有用性の評価を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、水環境への生態影響が危惧される各種の芳香族化合物の中から 2-ニトロフェノール(2-NP)、3-ニトロフェノール(3-NP)、4-ニトロフェノール(4-NP)、2,4-ジニトロフェノール(2,4-DNP)、2-クロロフェノール(2-CP)、3-クロロフェノール(3-CP)、4-クロロフェノール(4-CP)、ビスフェノールA(BPA)、ビスフェノールF(BPF)、アニリン(AN)の10種の芳香族化合物に焦点を絞り検討を行った。供試菌株は野外人工池で栽培した浮遊性水生植物のウキクサ(*Spirodela polyrhiza*)やコウキクサ(*Lemna minor*)と抽水性水生植物のヨシ(*Phragmites australis*)の根面、並びに活性汚泥より平板法により網羅的に分離したものをを用いた。有用菌株の探索は、各分離株の懸濁液中での供

試化学物質の吸着試験により行った。供試物質の測定には液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた。また、根圏浄化機能の改善に寄与する機能性微生物が、水生植物の根圏において多様な微生物との共存条件でどのような残存特性を持つのかを選択培地を併用した生菌数測定により行った。さらに、浄化システムの検討では、根圏での浄化試験には供試植物として無菌的に継代培養したウキクサ(*S. polyrhiza*)を用いた。浄化試験は、菌体濃度を等しく調整した吸着菌液、吸着菌や分解菌を付着させたウキクサ、あるいはこれら菌体をアルギン酸カルシウムビーズに固定化した微生物担体を用いて行い、液中に添加した供試物質の残存を HPLC により経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) 芳香族化合物を特異的に吸着・分解する機能性微生物の探索

芳香族化合物を特異的に吸着する微生物を選抜することを目的に、予備検討として活性汚泥を用いて 2NP、3NP、4NP、2CP、3CP、4CP、BPA、BPF、2,4-DNP、AN の10種類の芳香族化合物について菌体濃度 OD600=1、初期濃度 0.1 mM で吸着実験を行ったところ、何れにおいてもほぼ 30 分以内に濃度の減少は終了したが、2,4-DNP、4-CP、BPA、BPF

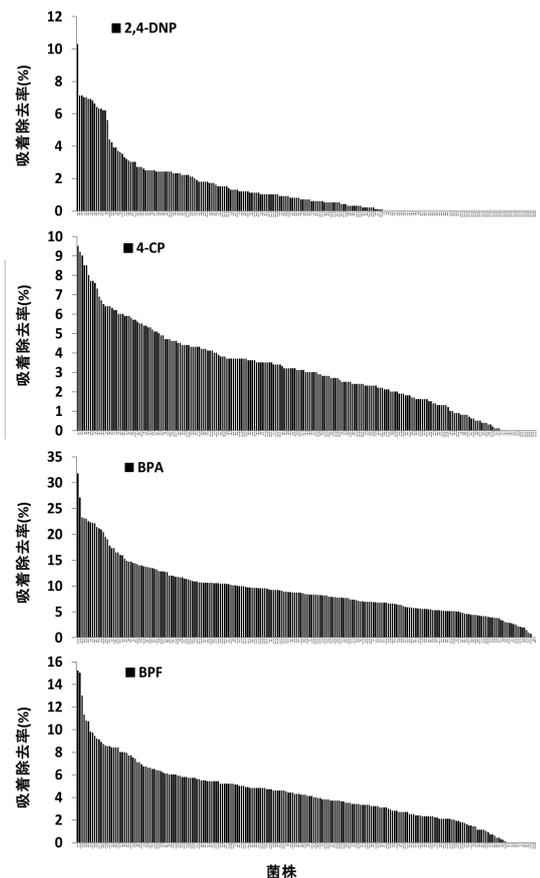


図1 網羅的に分離した菌株による芳香族化合物吸着試験の結果

において比較的高い吸着作用が確認された。続いて、植物根圏や活性汚泥から 300 株を超える菌株を分離し、それらについて、上記 4 種類の化合物それぞれに対する吸着効果を確認することで有用株の探索を行った。結果の一部を図 1 に示した。分離菌株の平均吸着除去率は 2,4-DNP, 4-CP, BPA, BPF それぞれ 1.1, 2.9, 9.3, 4.2%であったが、最大吸着率として 2,4-DNP で 10.3%, 4-CP で 9.5%, BPA で 31.7%, BPF で 15.2%の吸着効果を示す菌株など多数の有用菌株の取得に成功した。特に BPA に高い吸着効果を示す菌株が得られたため、本菌株の BPA 吸着特性を詳細に評価することとした。なお、ウキクサ(*S. polyrhiza*)の根圏より BPA に高い分解作用を示す *Novoshingobium* sp. FID3 が分離されたので、分解菌供試株として以後の試験に用いた。

(2) 分離微生物の機能特性

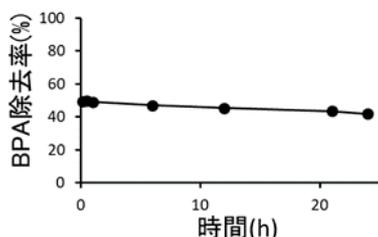


図2 供試菌株による BPA 吸着除去試験の結果

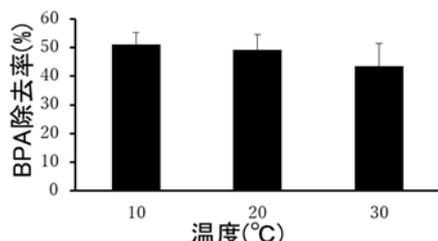


図3 BPA 吸着除去に及ぼす温度の影響

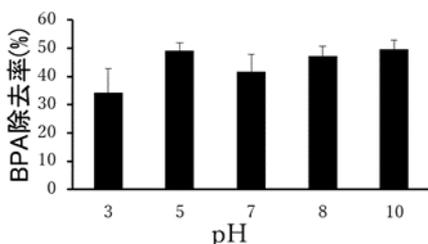


図4 BPA 吸着除去に及ぼす pH の影響

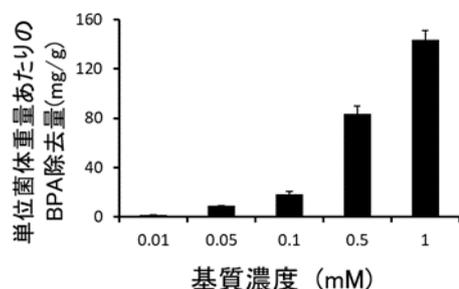


図5 BPA 吸着除去に及ぼす基質濃度の影響

予備検討において最も高い BPA 吸着効果を示した菌株を BPA 吸着除去試験 (菌体濃度: 0.5 g-DW/L, 吸着基質濃度: 0.1mM, pH: 7.0, 温度: 28) を基本条件として適宜各条件を制御した試験) に供した。

その結果を図 2 ~ 5 に示した。供試菌株の菌液は試験開始直後 (10 分以内) に BPA 濃度を 50% 低減した。なお、吸着試験後の菌体を回収しエタノールで洗浄すると除去された BPA のほぼ全量が回収されたことから、本菌株による BPA 除去効果は吸着によるものと判断した。本菌株は幅広い温度 (10 ~ 30) や pH (3 ~ 10) の条件下で安定した吸着効果を示すと共に、基質濃度を適宜変えた試験で Freundlich の吸着等温式に従う除去特性を示すこと (決定係数 0.998) が確認された。

(3) 機能性微生物の根圏での残存特性

上記の検討において優れた効果が確認された吸着菌株と、優れた BPA 分解作用をもつ分解菌株を併せてウキクサ (*S. polyrhiza*) の根圏に導入し、BPA を添加した Hoagland 液中での連続バッチ栽培を行い、両菌株の残存性を検討した。連続バッチ試験を通して両菌株とも生菌数は安定的であったが、特に分解菌は吸着菌と併用することで菌数を高く安定的に維持することが観察され、吸着菌の存在が分解菌のウキクサ根圏での残存に有利に作用することが示唆された。

(4) 機能性微生物を活用した浄化システムの有用性

機能性微生物のウキクサ根圏での活用

ウキクサの根圏部に吸着菌と分解菌の両者を導入し、BPA 除去試験 (初期濃度 0.04mM) を行った。このとき得られた除去速度を図 6 に示す。試験開始直後と処理後半の低濃度域 (0.01mM 以下) において分解菌のみを導入した系に比べて高い除去速度が観察された。このことから、比較的低濃度の BPA 含有排水等の処理においては、吸着菌と分解菌を導入し機能強化を図った植生システムが有効であることが示された。

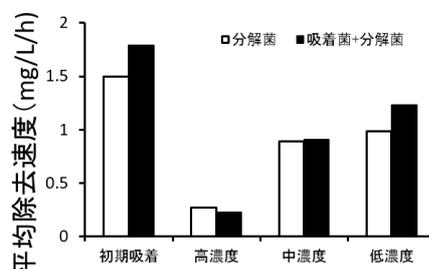


図6 吸着菌と分解菌を導入したウキクサ根圏による BPA 除去速度

機能性微生物の固定化担体での活用

吸着菌と分解菌の併用は、植生浄化系だけでなく、微生物主体の浄化システムでの利用も期待できる。特に BPA が高い濃度で含まれ

る排水等処理する場合には後者が有用と考えられる。そこで、両菌株のアルギン酸カルシウム固定化担体によるBPA除去連続バッチ試験(初期濃度 0.4mM)を行った。その結果を図7に、この際の初期吸着における除去速度を図8に示した。吸着菌を分解菌と併用した場合、初期吸着が強化されることで分解菌単独の固定化系よりも優れた除去効果が確認された。

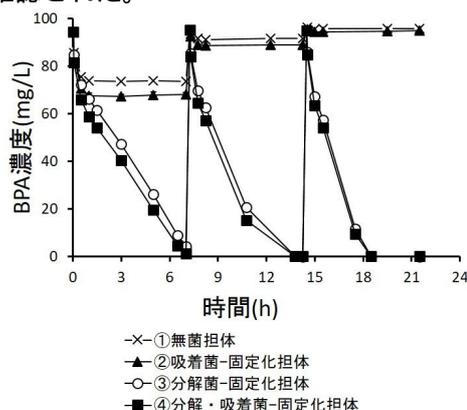


図7 吸着菌と分解菌を用いた固定化担体によるBPA除去試験の結果

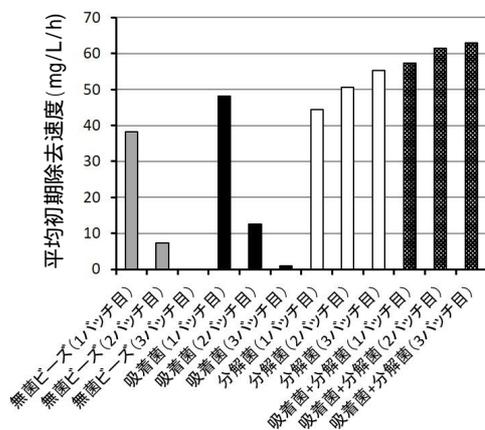


図8 固定化担体によるBPA除去試験における初期吸着速度

(5) 結論及び今後の展望

以上に示したとおり、生菌の状態では芳香族化合物を特異的に吸着する作用をもつ菌株を多数獲得することに成功した。特に、ビスフェノールAを特異的に吸着する分離株の効果は高く、幅広い環境条件下で安定した吸着効果が確認された。また、本菌株を高いBPA分解作用をもつ分解菌と併用することで、植物根圏を活用した植生浄化系や固定化担体浄化系などの各種生物学的処理系におけるBPA除去を促進できることが示された。さらに、吸着菌の存在が分解菌にも有利に働く可能性も示唆された。従来、生物浄化系における有機化学物質の浄化では、主として分解微生物の作用に焦点が当てられた検討が行われてきた。しかし、本研究が示したように、混合微生物浄化系では吸着作用も重要な働きを示しており、これを強化することで分解

作用の向上にも寄与する可能性が出てきた。今後、より詳細な浄化系における汚染・汚濁物質の動態メカニズムの解明とそれに基づく浄化促進技術の開発が期待される。

<参考文献>

Tamaki H et.al.: *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61(6), 1442-1447 (2011)

遠山忠, 森一博: 抽水植物ヨシの根圏における内分泌攪乱化学物質の分解促進, 植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術 - 地球を救う超環境適合・自然調和型システム -, シーエムシー出版, 160-168 (2011)

Toyama T et.al. : Acceleration of nonylphenol and 4-tert-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria, *Environmental Science & Technology*, 45(15), 6524-6530 (2011)

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 4件)

Kazuhiro Mori: Development of high performance phytoremediation techniques for environmental polluted water treatment, 2016 Annual Conference of Korea Wetland Society, Inha University(Inchon, South Korea), 2016年8月26日(招待基調講演)

森一博, 水野寛之, 遠山忠, 田中靖浩: 吸着菌と分解菌を活用したビスフェノールA除去の検討, 日本水処理生物学会第52回大会, 北九州国際会議場(福岡県・北九州市), 2015年11月11日~2015年11月13日

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, 山梨県JA会館(山梨県・甲府市)2014年11月12日~2014年11月14日

江崎希, 遠山忠, 田中靖浩, 森一博: 2,4ジニトロフェノールの微生物吸着, 日本水処理生物学会第50回大会, 神戸市水道局たかな職員研究センター(兵庫県・神戸市), 2013年11月13日~2013年11月15日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~5lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森一博(MORI, Kazuhiro)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号: 90294040

(2) 研究分担者

田中靖浩(TANAKA, Yasuhiro)
山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：50377587

(3)連携研究者

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