

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510093

研究課題名(和文)生物を利用した医薬品等由来難分解性化学物質(PPCPs)分解処理技術の開発

研究課題名(英文)Development of biological treatment method for pharmaceutical and personal care products

研究代表者

田中 靖浩(TANAKA, Yasuhiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50377587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：PPCPs分解菌として、医薬品や化粧品の乳化剤や皮膜形成剤として用いられるポリオキシエチレンアルキルエーテル(POE-AE)、沈痛剤のフェネチジンとアセトフェネチジンの原料で、指示薬、殺菌剤として利用されている4-ニトロフェノール(4-NP)を効率よく分解できる微生物の取得に成功した。このうちPOE-AE分解菌に関しては、活性汚泥への添加を想定した微生物製剤として有効利用できることを示した。また、4-NP分解菌に関しては浮遊性の水生植物であるウキクサとの相互作用を利用した持続的植生浄化ユニットの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in obtaining two types of pharmaceutical and personal care products (PPCPs)-degrading microbes. The first type of PPCPs-degrading microbe degraded polyoxyethylene alkyl ether (POE-AE) that is used as an emulsifying agent or coating reagent of medicines and cosmetics. Another PPCPs-degrading microbe targeted 4-nitrophenol (4-NP), which is used as a sanitizing agent, indicator or precursor of acesodyne. The POE-AE degrading microbe was applicable as microbiological agent to activated sludge wastewater treatment system. On the other hand, a new water treatment system using 4-NP degrading microbe-duckweed rhizosphere association, which indicated sustainable removal of the contaminant, has been developed.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境浄化 ウキクサ 活性汚泥 植生浄化

1. 研究開始当初の背景

PPCPsとは、処方薬及び販売薬、動物用医薬品、化粧品、日焼け止め、芳香剤、診断用医薬品、機能強化食品(ビタミン類など)とされているが、人に使用されたこれらの物質はすべてが代謝されるわけではなく、一部はそのまま排出され、下水処理場へ運ばれる。しかし、PPCPsの中には下水処理過程において完全に分解・除去されない難分解性化合物も含まれており、河川や海洋等水環境の新たな汚染原因として危惧されている。これらの中には代表的な下水処理法である活性汚泥法での除去が困難なものも多数含まれており、また、それらの難分解性 PPCPs を高効率かつ完全に分解できる微生物についての報告例も非常に少ない。

その一方で、自然界には難分解性化合物を分解する等、優れた環境浄化能を持つものの、分離培養が困難な微生物(難培養性微生物)が多く分布することが知られている。従って、これらを新たな微生物資源として利用できれば、上述のような難分解性の PPCPs を高効率で分解できる微生物をはじめ、数多くの有用微生物の取得率が飛躍的に向上するものと思われる。このような背景から、本研究代表者はこれまでに環境試料中の難培養性微生物を分離培養化する技術として、微生物分離培地の固化剤をアレンジする方法(*Environ. Microbiol.* **11**, 1827-1834 (2009))、微生物の生育因子を用いる方法(*Microbes Environ.* **20**, 110-116 (2005))や水生植物と微生物を共培養する方法(特願2008-38090)を考案し、門レベルで新規な微生物を含む数多くの難培養性微生物の分離に成功してきた。

2. 研究の目的

PPCPsによる水環境汚染への対応策としては、①活性汚泥を用いた下水処理システムの直接的な機能強化と、②活性汚泥処理システムの欠点を埋める新たな処理システムの提供が考えられる。本研究では、水環境の新興汚染物質である PPCPs を分解できる微生物を一般的な微生物分離培養法とは異なる手法(本研究代表者らが開発した微生物分離・培養法)によって取得し、上記2つの視点から次のような検討を行うこととした。

(1) 活性汚泥処理システムの機能強化

難分解性の PPCPs を高効率で分解除去できる微生物の取得および製剤化を試みる。その際、当該微生物の取得に関しては、一般的な微生物分離培養法に加え、本研究代表者らが開発した難培養性微生物の分離培養化技術を用い、従来法では取得できない微生物もターゲットとする。

(2) 新たな処理システムの提供

植物を用いた汚染浄化技術である植生浄化法を応用した手法を開発する。これまでに

本研究代表者らは水生植物とその根圏微生物の相互作用およびそれらを利用した有機化合物の分解に関する研究を進めてきた(日本水処理生物学会誌 45, 129-136 (2010)、*Environ. Sci. Technol.* 45, 6524-6530 (2011)他)。そこで、本研究ではこの経験を生かし、水生植物の根圏に上記で取得した PPCPs 分解菌を導入することによって根圏浄化能強化水生植物を創製し、これを用いた植生浄化ユニットの構築を試みる。

3. 研究の方法

(1) PPCPs 分解菌の分離・培養

PPCPs 分解菌の分離培養には一般的な微生物分離法に加え、本研究代表者が開発した難培養性微生物分離培養法である「水生植物と微生物を共培養する方法」(特願2008-38090)を用いた。なお、ターゲットとした PPCPs としては、医薬品や化粧品の乳化剤や皮膜形成剤として用いられるポリオキシエチレンアルキルエーテル(POE-AE)、沈痛剤のフェネチジンとアセトフェネチジンの原料で、指示薬、殺菌剤として利用されている4-ニトロフェノール(4-NP)を選定した。

(2) PPCPs 分解菌の系統解析

取得した PPCPs 分解菌に関しては、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析に供し、分類学上での新規性を評価した。

(3) 取得した PPCPs 分解菌の微生物製剤としての利用

簡易的に作製した活性汚泥処理システムに本研究で取得した分解菌を添加した場合の PPCPs 含有廃水の処理・浄化効率を測定し、微生物製剤としての能力を評価した。

(4) 根圏機能強化水生植物の創製と利用

取得した PPCPs 分解菌を浮遊性の水生植物であるウキクサの根圏に導入し、根圏機能強化水生植物の創製を試み、これを用いた植生浄化ユニットの浄化能を評価した。

4. 研究成果

(1) PPCPs 分解菌の取得

POE-AEを分解できる菌株として15株、4-NPを単一炭素源として利用できる菌株として5株の取得に成功した。これらの分解菌を16S rRNA 遺伝子をベースとした系統解析に供したところ、POE-AE分解菌には *Novosphingobium* 属、*Sphingobium* 属、*Pseudoxanthomonas* 属、*Pelomonas* 属、*Prosthecomicrobium* 属細菌に加え、既知菌種との相同性が88%と新規性の高い菌株も含まれていた。一方、4-NP分解菌は *Pseudomonas* 属、*Nocardioideis* 属、*Rhodococcus* 属のいずれかに属していることが分かった。

また、取得した上記 POE-AE 分解菌、4-NP 分解菌のいずれもターゲットとする PPCPs を単一炭素源として完全分解することを明ら

かにした。なお、これらの分解菌はいずれも「水生植物と微生物を共培養する方法」により取得したが、これとは別に一般的な集積培養法で各ターゲット物質の分解菌取得を試みたところ、いずれのケースにおいても上記の方法で取得した微生物とは分類系統が異なっており、さらにはターゲット物質に対する分解能も全体的に低いあるいは部分分解能を示すにとどまった。このことから、本研究で用いた「水生植物と微生物を共培養する方法」は通常とは異なる系統の有用微生物を取得する手段として非常に有効であることが示された。

(2) POE-AE 分解菌による活性汚泥処理システムの機能強化

取得した POE-AE 分解菌のうち、特に分解活性の高かった 3 株 (S15Y 株、S43Y 株、S45Y 株; いずれも *Sphingomonas* 属) を、ラボスケールの活性汚泥処理システムに添加することで POE-AE (50 ppm) を含む人工下水 (グルコース 1 g, ペプトン 2 g, デンプン 2 g, 硫酸アンモニウム 1.7 g, リン酸水素二カリウム 5.1 g, 炭酸水素ナトリウム 5 g; 1 L あたり) の処理能力にどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果、分解菌を添加しなかった活性汚泥、S15Y 株添加汚泥、S43 株添加汚泥では、POE-AE を含む有機物の 40~50%程度が反応開始 48 時間後も処理水中に残存していたが、S45Y 株を添加した汚泥においては、すべての有機物が 12 時間以内で完全分解し、この菌株が POE-AE を含む排水処理のための微生物製剤として効果的に機能していることが示された (図 1)。

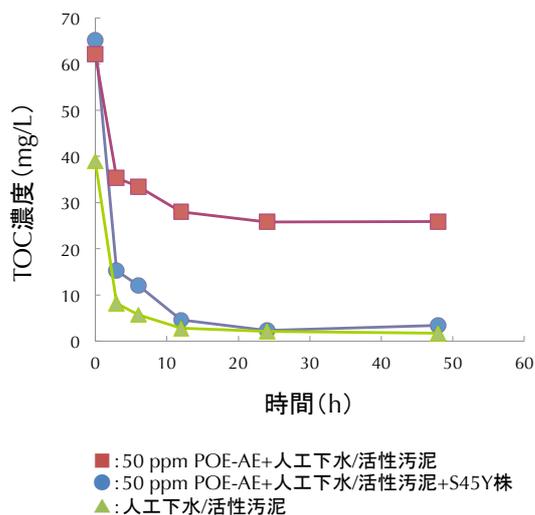


図 1. S45Y 株添加汚泥による POE-AE 含有人工下水の処理

(3) 根圏機能強化水生植物を用いた 4-NP 対応植生浄化ユニットの作製と性能評価
取得した 4-NP 分解菌のうち特に分解活性の高かった PKR1 株と DNR2 株 (いずれも *Rhodococcus* 属) を、無菌処理を施した浮遊

性の水生植物であるウキクサの根圏に導入し、根圏機能強化ウキクサの作製を試みた。このウキクサを 3 ppm の 4-NP を含む水生植物栽培用培地 (滅菌済) にて 2 日間栽培を 1 バッチとした計 5 回の連続バッチ栽培を行ったところ、5 バッチ目まで高い 4-NP 分解活性を発揮し続けることが分かった (図 2)。

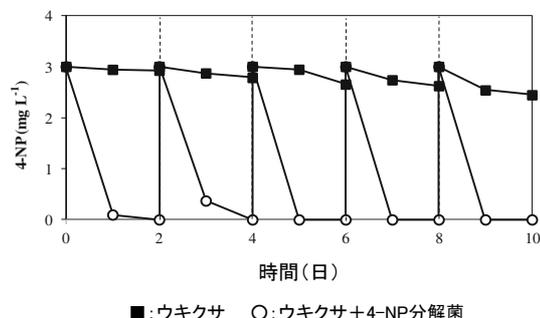


図 2. 根圏機能強化ウキクサによる 4-NP の分解

さらに、実際の下水処理に本ウキクサを用いた植生浄化ユニットを適用するケースを想定し、上記根圏機能強化ウキクサを用いた簡易的な植生浄化ユニットを作製し、4-NP を添加した下水二次処理水の処理を試みた。その結果、図 2 に示した結果と同様に、この実験系においても高い 4-NP 分解活性が 5 バッチ目まで維持することが明らかとなり、本浄化ユニットの有効性が示された (図 3)。

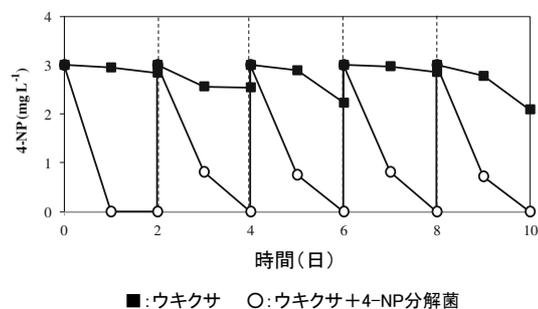


図 3. 根圏機能強化ウキクサによる下水二次処理水に含まれる 4-NP の分解

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Y. Li, T. Toyama, Y. Tanaka, Y. Tang, X. Wu and K. Mori (2014) Effects of various duckweed species on phenol degradation in environmental waters. *Japanese Journal of Water Treatment Biology* **50**, 95-103. (査読有)
- ② R. A. Kristanti, T. Toyama, T. Hadibarata, Y. Tanaka and K. Mori (2014) Sustainable removal of nitrophenols by rhizoremediation using four strains of bacteria and giant duckweed (*Spirodela polyrhiza*).

- Water, Air, & Soil Pollution* **225**, 1928.
(査読有)
- ③ DOI: 10.1007/s11270-014-1928-7 (査読有)
- ④ R. A. Kristanti, T. Toyama, T. Hadibarata, Y. Tanaka and K. Mori (2014) Bioaugmentation involving a bacterial consortium isolated from the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza* for treating water contaminated with a mixture of four nitrophenol isomers. *RSC Advances* **4**, 1616-1621.
DOI: 10.1039/C3RA44892D (査読有)
- ⑤ R. A. Kristanti, M. Kanbe, T. Toyama, Y. Tanaka, Y. Tang, X. Wu and K. Mori (2012) Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. *Journal of Environmental Sciences* **24**, 800-807.
DOI: 10.1016/S1001-0742(11)60839-5 (査読有)
- ⑥ R. A. Kristanti, M. Kanbe, T. Toyama, Y. Tanaka and K. Mori (2012) Isolation and characterization of 3-nitrophenol-degrading bacteria associated with rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 1852-1858.
DOI: 10.1007/s11356-012-0836-x (査読有)
- ⑦ Y. Tanaka, H. Tamaki, H. Matsuzawa, M. Nigaya, K. Mori and Y. Kamagata (2012) Microbial community analysis in the roots of aquatic plants and isolation of novel microbes including an organism of the candidate phylum OP10. *Microbes and Environments* **27**, 149-157.
DOI: 10.1264/jsme2.ME11288 (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 田中靖造, 立野由佳, 玉木秀幸, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. ウキクサ科植物の葉状体に生息する微生物群集の解析. 環境微生物系学会合同大会 2014. 2014年10月21日~24日. (アクトシティ浜松コンgresセンター; 静岡県浜松市)
- ② Y. Li, T. Toyama, Y. Tanaka, K. Mori. Effects of duckweed family (*Lemnaceae*) on phenol degradation in environmental waters. 第65回日本生物工学会大会 2013年9月18~20日. (広島国際会議場; 広島県広島市)
- ③ 遠山忠, 田中靖造, 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年3月17日. (東北大学川内北

キャンパス; 宮城県仙台市)

- ④ 立野由佳, 田中靖造, 遠山忠, 森一博, 玉木秀幸, 牧野彩花, 鎌形洋一, 森川正章. ウキクサ科植物の葉圏・根圏に生息する微生物群集の解析. 第48回日本水環境学会年会. 2014年3月17~18日. (東北大学川内北キャンパス; 宮城県仙台市)
- ⑤ 江崎希, 遠山忠, 田中靖造, 森一博. 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. 2013年11月13~15日. (神戸市水道局たちばな職員研修センター; 兵庫県神戸市)
- ⑥ 古屋勇人, 田中靖造, 落合知, 遠山忠, 金子栄廣, 森一博. 水生植物根圏からの生分解性プラスチック分解菌の分離. 第47回日本水環境学会. 2013年3月10日~12日. (大阪工業大学大宮キャンパス; 大阪府大阪市)
- ⑦ 遠山忠, 田中靖造, 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. 2013年3月10日~12日. (大阪工業大学大宮キャンパス; 大阪府大阪市)

[図書]

- ① 玉木秀幸, 田中靖造 (2014) 水生植物の微生物. 環境と微生物の事典 朝倉書店, 322-323.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 微生物、並びに、廃水の処理方法
発明者: 黒住悟, 田中靖造
権利者: 積水アクアシステム株式会社, 国立大学法人山梨大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-164219 号
出願年月日: 平成 25 年 8 月 7 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~51lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
田中 靖造 (TANAKA, Yasuhiro)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 50377587

(2) 研究分担者

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

遠山 忠 (TOYAMA, Tadashi)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 60431392