

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710069

研究課題名（和文）有機系有害化学物質汚染の高効率浄化のための植物-分解菌共生システムの開発

研究課題名（英文）Efficient polluted water treatment using aquatic plant-rhizosphere bacteria association

研究代表者

遠山 忠（TOYAMA TADASHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：60431392

研究成果の概要（和文）：ウキクサやヨシなどの水生植物の根圏からフェノール性内分泌攪乱化学物質を効率よく分解する分解菌を分離することに成功した。また、その根圏において、植物による微生物活性化作用と分解菌の化学物質分解触媒作用の協働作用によって、フェノール性内分泌攪乱化学物質の分解が促進されるメカニズムの一端を明らかにした。さらに、水生植物の根圏に分解菌を定着させた分解菌共生型水生植物植生システムを作製したところ、フェノール性内分泌攪乱化学物質汚染水を効率よく、かつ、長期間安定的に浄化処理することが可能であることが実証された。

研究成果の概要（英文）：Rhizosphere bacteria capable of degrading phenolic endocrine-disrupting chemicals, including nonylphenol, 4-*tert*-butylphenol and bisphenol A, were isolated from rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza* (duckweed) and *Phragmites australis* (common reed). Oxygen and organic compounds released by roots of the plants could accelerate biodegradation of endocrine-disrupting chemicals by the rhizosphere bacteria. The isolated rhizosphere strains colonized on the roots surface of the plants, and aquatic plant-rhizosphere bacteria association effectively and repeatedly removed endocrine-disrupting chemicals from polluted water. The results demonstrate the potential usefulness of using aquatic plant-rhizosphere bacteria associations to achieve efficient and sustainable treatment of polluted waters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：環境浄化、根圏微生物、水生植物、内分泌攪乱化学物質、分解、廃水処理

1. 研究開始当初の背景

植物は太陽光と大気中の二酸化炭素を用いて成長する光合成独立栄養微生物である。その植物を利用した環境保全・浄化技術は、

省エネルギー・省資源性と環境適合性を有しているため、低炭素化と自然共生を掲げた持続可能な発展社会を構築するキーテクノロジーのひとつと考えられている。しかし、現

状では、水生植物を利用した水質浄化（植生浄化）は主として窒素やリンなどの栄養塩類の除去を目的として、下排水二次処理水の仕上げ処理や、汚濁河川、湖沼などの直接浄化に限定されており、近年の水環境問題で最も重要なカテゴリーのひとつである有機系有害化学物質の浄化には効果がないものとされてきた。

一方、これまでに実施した先行研究において、ウキクサやヨシなどの水生植物の根圏（植物根の表面および近傍）において、芳香族化合物の分解が促進されていること、芳香族化合物分解微生物がその根圏に集積されていることなどを明らかにしてきた。そこで、その水生植物の根圏における植物と微生物の相互、協働作用を活用することによって、有機化学物質汚染に対応できないという植生浄化法の限界を打破できることが期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、内分泌攪乱化学物質汚染を主な浄化対象とし、水生植物の根圏機能を活用した汚染水システムを開発することを目標とした。そのため、水生植物から内分泌攪乱化学物質分解菌を探索、取得し、その分解菌の特性を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、その分解菌を根圏に再導入して定着させた植物-分解菌共生システム（図1）を作製し、そのシステムによる内分泌攪乱化学物質汚染水処理の有効性を実証することを第二の目的とした。

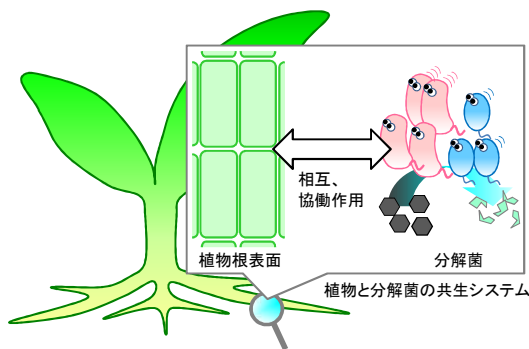


図1. 植物-分解菌共生システム

3. 研究の方法

(1) 内分泌攪乱化学物質分解菌の分離

ウキクサを環境水で、また、ヨシを湖沼底質で栽培しながら、各種内分泌攪乱化学物質を添加してウキクサとヨシの根圏に内分泌攪乱化学物質分解菌を集積した（これを水生植物共培養とする）。水生植物共培養操作から得られた集積分解菌群を、各種内分泌攪乱化学物質を唯一の炭素源とする液体培地に移し、集積培養を続けた。この集積培養液から内分泌攪乱化学物質分解菌を分離し、系統分類学的に細菌種を同定した。

続いて、分離した分解菌を純粋培養した後、種々の化学物質分解実験を行い、分解菌の化学物質分解特性を明らかにした。

(2) 水生植物と分解菌の協働作用による内分泌攪乱化学物質の効率的な分解除去の実験

ウキクサおよびヨシの根抽出物を調製し、その抽出物が化学物質分解菌の増殖と分解活性に及ぼす影響を調べた。また、化学物質分解菌をウキクサおよびヨシの根圏に再導入した後、その根圏において化学物質分解菌の増殖と化学物質分解活性を調べた。

(3) 植物-分解菌共生システムによる持続的な内分泌攪乱化学物質汚染水処理の実験

内分泌攪乱化学物質の代表例であるビスフェノールA (BPA) を対象とし、ウキクサ根圏から分離したBPA分解菌をウキクサ根圏に再導入したウキクサ-BPA分解菌共生システムを作製することを試みた。BPA分解菌(FID3)を無菌ウキクサの根圏に再導入するため、ウキクサをFID3懸濁液に10分間浮かべた。そのウキクサ-FID3共生系を10植物固体用意して10mg/LBPA含有の無菌培地100mLに浮かべ、培地中のBPA濃度をモニタリングした。

次に、BPA汚染水処理実験を実施するため、下水二次処理水にBPAを10mg/Lとなるように添加して実汚染水を模擬したBPA汚染水(FID3以外の他の微生物群集とBPA以外の他の有機物が共存するBPA汚染水)を調製した。そのBPA汚染水とウキクサ-FID3共生系を用いてBPA汚染水の連続バッチリアクター実験(SBR: BPA濃度10mg/L、汚染水量100mL、反応時間24時間処理時間/サイクル、ウキクサ-FID3共生系投入量10植物固体)を実施した。実験中に汚染水中のBPA濃度をモニタリングして、ウキクサ-FID3共生システムのBPA処理性能を調べた。

4. 研究成果

(1) ウキクサおよびヨシ根圏からの内分泌攪乱化学物質分解菌の分離

ウキクサおよびヨシの根圏から内分泌攪乱化学物質分解菌、および他の有害有機化学物質分解菌の分離を試みたところ、表1に示すような、BPA分解菌、ノニルフェノール(NP)分解菌、4-tert-ブチルフェノール

(4-tert-BP)分解菌やピレン分解菌などの様々な分解菌を取得することができた。特に、ヨシ根圏から分離した4-tert-BP分解菌は、4-tert-BPを唯一の炭素源として分解、資化できる世界初めての細菌であり、非常に価値の高い分解菌を取得できたものといえる。

表 1. 水生植物根圏から分離した分解菌の一例

化学物質	分解菌名	由来
BPA 分解菌	<i>Sphingobium</i> sp. FID1 <i>Novosphingobium</i> sp. FID3	ウキクサ
NP 分解菌	<i>Sphingobium</i> sp. IT4 <i>Sphingobium</i> sp. IT5	ヨシ
4-tert-BP 分解菌	<i>Sphingobium</i> sp. TIK1	ヨシ
ピレン分解菌	<i>Mycobacterium</i> sp. FIR	ヨシ
ニトロフェノール類分解菌	<i>Pseudomonas</i> sp. ONR1 <i>Pseudomonas</i> sp. PNR1 <i>Rhodococcus</i> sp. DNR2	ウキクサ

ここからは、フェノール性内分泌攪乱化学物質の代表物質である、4-tert-BP、NP と BPA に着目し、ヨシ根圏から分離した 4-tert-BP 分解菌 TIK1、ヨシ根圏から分離した NP 分解菌 IT4 とウキクサ根圏から分離した BPA 分解菌 FID3 に関する詳細な実験を実施した。その 3 種の分解菌は、対象とする化学物質を唯一の炭素源として利用して増殖した (図 2)。TIK1 はその液体培養において 1mM (150mg/L) の 4-tert-BP を 12 時間以内に、IT4 は 5mM (1100mg/L) NP を 7 日以内に、FID3 は 0.5mM (114mg/L) を 12 時間以内にほぼ全て分解した (図 2)。

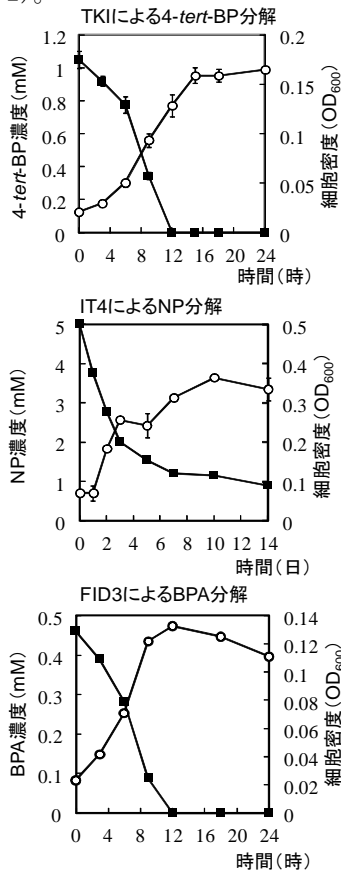


図 2. 分離した分解菌による 4-tert-BP、NP と BPA の分解 (■) と細胞増殖 (○)

いずれの分解菌も、これまでに報告されている分解菌の分解速度と同等、あるいはそれ以上の高い速度でそれぞれの化学物質を効率よく分解した。

さらに、それぞれの分解菌は図 3 に示すように異なる経路で 3 種類のフェノール性内分泌攪乱化学物質を分解していることが分かった。すなわち、TIK1 は 4-tert-BP のベンゼン環 2 位の水酸化反応と環開裂反応、IT4 は NP の ipso 位の水酸化反応 (ipso 置換反応)、そして FID3 は 2 つのフェノール環を繋ぐアルカンの水酸化反応 (骨格転移反応) によって分解反応が進行した。

このように、ウキクサおよびヨシの根圏から、フェノール性内分泌攪乱化学物質の優れた分解触媒作用を示す種々の分解菌を分離、取得することができた。

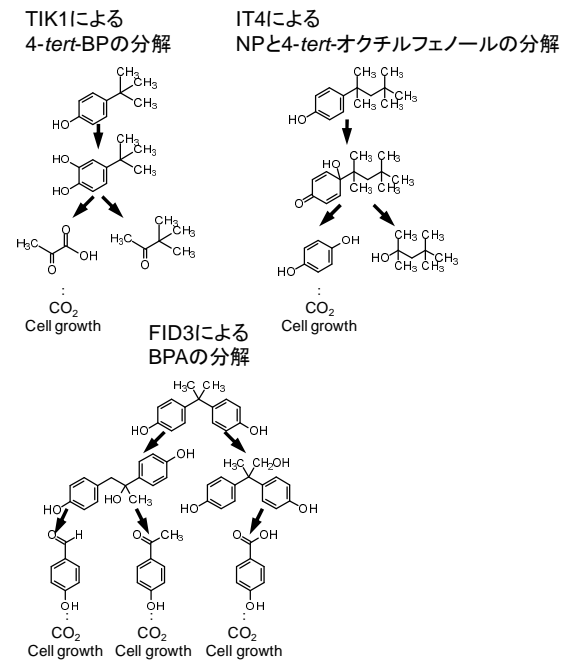


図 3. 分解菌によるフェノール性内分泌攪乱化学物質分解の経路

(2) 水生植物と分解菌の協働作用による内分泌攪乱化学物質の効率的な分解除去

水生植物と分解菌の協働作用によって内分泌攪乱化学物質の分解が効率的に分解するメカニズムを明らかにするため、ここでは、ヨシ根圏由来の NP 分解菌 IT4 をケーススタディとして実験を実施した。まず、ヨシの根抽出物が IT4 の増殖に及ぼす影響を調べた。その結果、ヨシの根が分泌する有機物は、IT4 の増殖基質として働いて増殖を促進した。このようにヨシの根由来の有機物を利用して増殖した IT4 細胞は高い NP 分解活性を示した。従って、ヨシの根が分泌する有機物は IT4 の増殖を促進し、その結果として NP 分解をも促進していることが明らかとなった。

次に、無菌化した底質に IT4 を植菌し、そこに無菌ヨシを植栽した場合（ヨシ-IT4 共生システム）と、IT4 単独でヨシを植栽していない場合の 2 つの実験において NP 分解を調べた（図 4）。IT4 が単独で底質に存在する場合には、その十分な分解活性と細胞増殖を發揮することができないが、ヨシと IT4 が共生する場合には、ヨシの根から底質層に供給される酸素が好気条件下でのみ生じる IT4 の分解反応を可能にし、さらにヨシの根が分泌する有機物がその分解と増殖をサポートしていることが分かった。

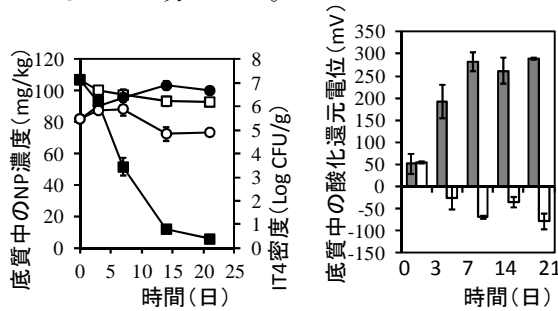


図 4. ヨシ-IT4 共生システム底質中の NP 分解 (■)、IT4 細胞密度 (●) と酸化還元電位 (■)、および IT4 単独底質中の NP (□)、IT4 細胞密度 (○) と酸化還元電位 (□)

ここまでの一連の実験から、水生植物の根圏では、図 5 に示すように、植物の酸素供給作用と有機物供給作用と、分解菌の分解触媒作用の協働作用によって NP などのフェノール性内分泌攪乱化学物質の分解が促進することが明らかとなった。

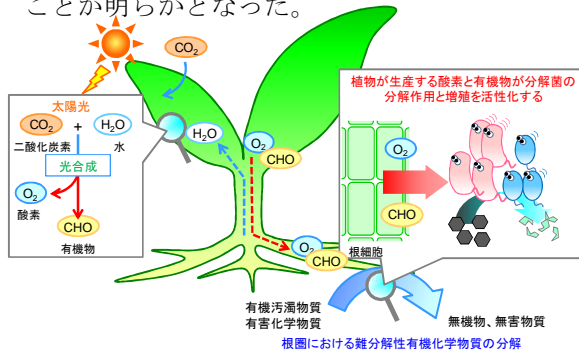


図 5. 水生植物根圏における植物と微生物の協働作用による化学物質分解促進のメカニズム

(3) 植物-分解菌共生システムによる持続的な内分泌攪乱化学物質汚染水の処理

ここでは、ウキクサ根圏から分離した BPA 分解菌 FID3 を無菌ウキクサの根圏に再導入して、ウキクサ-BPA 分解菌共生システムを作製した。ウキクサを FID3 懸濁液に 10 分間浮かべることにより、FID3 はウキクサの根表面に、1 植物固体当たり 10⁵ CFU 程度定着した。

ウキクサ-FID3 共生系を 10 植物固体用意して 10mg/LBPA 含有の無菌培地 100mL に浮かべたところ、24 時間以内に培地中の BPA をほぼ全て分解除去した（図 6）。さらに、ウキクサ-FID3 共生システムはその BPA 分解除去を繰り返し發揮し、3 連続試験後においてもそのウキクサの根に初期値と同程度の FID3 を保持した（10⁵ CFU/植物固体）。すなわち、無菌状態において、ウキクサ-FID3 共生システムは安定してその共生系を維持し、BPA 分解除去作用を持続的に發揮することが分かった。

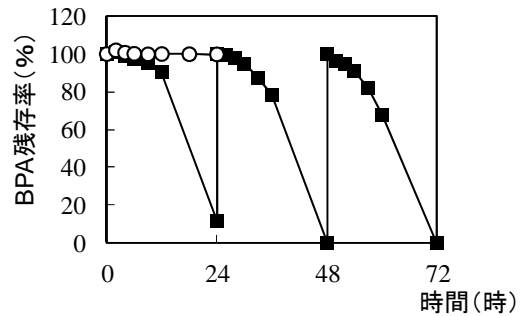


図 6. ウキクサ-FID3 共生システム (■) およびウキクサだけ (○) による無菌液体培地中の BPA 分解除去

続いて、他の微生物群集と有機物が共存する実際の BPA 汚染水に近い BPA 汚染水を処理する連続バッチリアクター実験 (SBR: BPA 濃度 10mg/L、汚染水量 100mL、反応時間 24 時間処理時間/サイクル、ウキクサ-FID3 共生系投入量 10 植物固体) を実施した。その結果を図 7 に示した。10 植物固体のウキクサ-FID3 共生系からなる処理システムは、24 時間以内に全ての BPA を分解除去し、さらに少なくとも 5 回連続以上、長期間安定的に BPA 汚染水を処理することが可能であることが実証された。すなわち、他の微生物が存在する BPA 汚染水においても、ウキクサ-FID3 共生システムは、BPA 分解除去作用を安定して持続的に發揮できることが分かった。一方、FID3 を導入していない通常のウキクサは BPA を全く分解除去することができなかった。

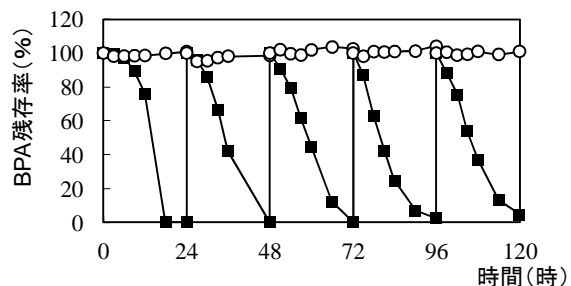


図 7. ウキクサ-FID3 共生システム (■) および通常のウキクサ (○) による BPA 汚染水中の BPA 分解除去

また、このような植物と分解菌の共生システムによる持続的な化学物質の分解除去は、他のウキクサ-分解菌共生システムおよびヨシ-分解菌共生システムにおいても観察された。以上の結果から、水生植物-分解菌共生システムによる内分泌攪乱化学物質汚染水処理の実用性と優位性を示すことができたものといえる。

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7件)

- ① Kristanti RA, Kanbe M, Hadibarata T, Toyama T, Tanaka Y, Mori K. Isolation and characterization of 3-nitrophenol-degrading bacteria associated with rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. Environmental science and pollution research international. In press. DOI: 10.1007/s11356-012-0836-x (査読有)
- ② Kristanti RA, Kanbe M, Toyama T, Tanaka Y, Tang Y-Q, Wu X, Mori K. Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. Journal of Environmental Sciences. 2012, 24:800-807. DOI: 10.1007/s11356-012-0836-x (査読有)
- ③ Toyama T, Kristanti RA, Tanaka Y, Mori K. Biodegradation of 4-*n*-butylphenol in *Phragmites australis* rhizosphere by interactions between roots and bacteria. Journal of Water Environment Technology. 2011, 9:411-422. DOI:10.2965/jwet.2011.41 (査読有)
- ④ Toyama T, Murashita M, Kobayashi K, Kikuchi S, Sei K, Tanaka Y, Ike M, Mori K. Acceleration of nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria. Environmental Science and Technology. 2011, 45:6524-6530. DOI: 10.1021/es201061a (査読有)
- ⑤ Toyama T, Furukawa T, Maeda N, Inoue D, Sei K, Mori K, Kikuchi S, Ike M. Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[*a*]pyrene in *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudate interactions. Water Research. 2011, 45:1629-1638. DOI: 10.1016/j.watres.2010.11.044 (査読有)
- ⑥ Toyama T, Momotani N, Ogata Y, Miyamori Y, Inoue D, Sei K, Mori K, Kikuchi S,

Ike M. Isolation and characterization of 4-*tert*-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. Applied and Environmental Microbiology. 2010, 76:6733-6740. DOI: 10.1128/AEM.00258-10 (査読有)

- ⑦ Toyama T, Kumada H, Sei K, Mori K, Fujita M, Ike M. Long-term performance and community analysis of *Spirodela polyrrhiza*-bacteria association treating phenol-contaminated water. Journal of Water Environment Technology. 2010, 8:239-250. DOI: 10.2965/jwet.2011.411 (査読有)

[学会発表] (計17件)

- ① Kristanti RA. Rhizoremediation of 4-*n*-butylphenol using *Phragmites australis* (common reed). The 9th International Symposium on Southeast Asian Water Environment. 2011.12.1-3. Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.
- ② 遠山忠. ヨシの根圏底質における窒素循環とそれに関与する微生物群集の解析. 日本水処理生物学会 第48回大会. 2011.11.16-18. 草津市, 立命館大学.
- ③ 古谷武. ウキクサ根圏からのビスフェノールA分解菌の分離とその根圏への定着特性. 日本水処理生物学会 第48回大会. 2011.11.16-18. 草津市, 立命館大学.
- ④ 神戸政広. ウキクサ根圏からのニトロフェノール分解菌の分離とその特徴づけ. 日本水処理生物学会 第48回大会. 2011.11.16-18. 草津市, 立命館大学.
- ⑤ Toyama T. Accelerated degradation of nonylphenol in sediment of by interactions between *Phragmites australis* and rhizosphere bacteria. The 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition. 2011.10.2-6. Tokyo International Forum, Tokyo, Japan.
- ⑥ 遠山忠. *Novosphingobium* sp. TYA-1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. 第63回日本生物工学会大会. 2011.9.26-28. 小金井市, 東京農工大学.
- ⑦ 合田昌平. 4-*tert*-ブチルフェノール分解菌 *Sphingobium fuliginis* OMI株によるビスフェノール類の分解. 第63回日本生物工学会大会. 2011.9.26-28. 小金井市, 東京農工大学.
- ⑧ Toyama T. Characterization of alkylphenol degradation and alkylphenol degradation gene cluster of *Sphingobium fuliginis* strain TIK-1.

- IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011). 2011. 9. 14-16. Congress Center of Torremolinos, Malaga, Spain.
- ⑨ Toyama T. Characterization of branched nonylphenol-utilizing *Stenotrophomonas* sp. strain IT-1 and *Sphingobium* spp. strains IT-4 and IT-5 isolated from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. International Union of Microbiological Societies 2011 (IUMS2011). 2011. 9. 6-10. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.
- ⑩ Ogata Y. Novel pathway of bisphenol-A transformation by *Sphingobium fuliginis* strains capable of degrading 4-*tert*-butylphenol. International Union of Microbiological Societies 2011 (IUMS2011). 2011. 9. 6-10. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.
- ⑪ Kristanti RA. Rhizosphere remediation of 3-nitrophenol using *Spirodela polyrrhiza*. International Conference of Environmental Pollution and Remediation. 2011. 8. 17-19. Ottawa, Ontario, Canada.
- ⑫ 遠山忠. ヨシ根圏におけるノニルフェノールの分解とその分解を促進するヨシの作用の解析. 日本水環境学会、第45回日本水環境学会年会. 2011. 3. 19-20. 札幌市, 北海道大学 (年会中止のため講演集紙面発表).
- ⑬ 遠山忠. ウキクサー根圏微生物共生系によるニトロフェノール類の分解とウキクサー根圏からのニトロフェノール分解菌の分離. 日本水処理生物学会 第47回大会. 2010. 11. 17-19. つくば市, 筑波大学.
- ⑭ 遠山忠. ヨシの根圏から分離した新規ノニルフェノール分解菌の分解特性と増殖特性. 日本生物工学会、第62回生物工学会大会. 2010. 10. 27-29. 宮崎市, ワールドコンベンションセンターサミット・シーガイアリゾート.
- ⑮ 尾形有香. ウキクサー根圏より分離した4-*tert*-ブチルフェノール分解菌の分解特性. 日本生物工学会、第62回生物工学会大会. 2010. 10. 27-29. 宮崎市, ワールドコンベンションセンターサミット・シーガイアリゾート.
- ⑯ Kristanti RA. Microbial Activity of Nitrophenols-Degrading Bacteria in Rhizosphere of Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). 日本生物工学会、第62回生物工学会大会. 2010. 10. 27-29. 宮崎市, ワールドコンベンションセンターサミット・シーガイアリゾート.
- ⑰ Toyama T. Long-term performance and community analysis of *Spirodela polyrrhiza*-bacteria association treating phenol-contaminated water. Water and Environment Technology Conference (WET2010). 2010. 6. 25-26. Yokohama, Yokohama National University.

〔図書〕 (計1件)

- ① 遠山忠. シーエムシー出版. 植物による水・土壌浄化および環境保全のポテンシャル—地球を救う超環境適合・自然調和型システム— 監修: 池道彦、平田収正、第4章-2 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. 2011. 160-167.

〔その他〕

ホームページ等

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DispInfo.Scholar/4_3_22/29D93025D712E1B7.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 忠 (TOYAMA TADASHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 60431392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし