

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

Biodegradation of Organic Chemicals in the Rhizosphere by Plant-Bacteria Interactions

遠山 忠*, 田中 靖浩, 森 一博

TADASHI TOYAMA, YASUHIRO TANAKA and KAZUHIRO MORI

山梨大学大学院医学工学総合研究部 〒400-5811 山梨県甲府市武田 4-3-11

* TEL: 055-220-8346

* E-mail: ttohyama@yamanashi.ac.jp

Department of Research, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi,
4-3-11 Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8511, Japan

キーワード: 根圏, 内分泌攪乱化学物質, 多環芳香族化合物, 微生物分解

Key words: rhizosphere, endocrine-disrupting chemicals, polycyclic aromatic hydrocarbons, biodegradation

(原稿受付 2013年11月5日/原稿受理 2013年11月12日)

1. はじめに

植物は、地球に降り注ぐ太陽光のエネルギーを利用し、大気中から二酸化炭素を固定して自らのバイオマスをつくりながら生育する生物である。このような植物を再生可能な浄化触媒として利用した環境保全・浄化技術は、外部からのエネルギー投入が極めて少ない省エネルギー性と高い経済性を併せ持った技術であると同時に、環境適合性も有する環境技術といえる。一方、植物バイオマスの再生可能エネルギーとしての価値が高まってきており、環境浄化プロセスから必然的に生じる植物バイオマスを燃料や各種素材の原料として利用するというバイオマスエネルギー・資源生産のコベネフィットな側面も含めると、植物利用型環境技術は21世紀の持続可能な低炭素社会を構築するための一つの理想的なオプションといえる。

植物の環境保全・浄化への利用は、植生浄化法、人工湿地法やファイトレメディエーションと呼ばれる実用レベルの技術になっている。その基本的な浄化メカニズムは、植物が光合成によるバイオマス合成に伴って水中や土壌中から窒素、リンなどの栄養塩類やカドミウム、鉛、ニッケル、銅などの重金属類をその体内に取り込む作用である。このような独立栄養プロセスを基本とした植物利用技術の浄化ターゲットは無機元素に限定され、各種有機化合物に対しては効果がないものとされてきた。これは独立栄養生物である植物を利用していることの宿命であるといえる。しかし、筆者らの研究グループでは、モデル植物として浮遊水生植物のウキクサや抽水植物のヨシを用いた研究を実施するなかで、フェノールやアニリンなどの単純な分子構造を持つ単環芳香族化合物¹⁷⁾、2,4-ジクロロフェノールなどの塩素芳香族化合物¹⁷⁾、2,4-ジニトロフェノールなどのニトロ芳香族化

物⁸⁾、ピレンやベンゾ [a] ピレンなどの多環芳香族化合物²¹⁾、ビスフェノール A やノニルフェノールなどの内分泌攪乱化学物質^{18,20,23)}、さらに直鎖アルキルベンゼンスルホン酸やノニルフェノールポリエトキシレートなどの合成界面活性剤¹¹⁾ など多様な化学物質が水生植物の根圏において効率よく分解されていることをつきとめた。ここでの根圏とは植物の根の周辺部を指しており、「植物の根からの影響を受ける領域」と定義されている^{1,3,15)}。さらに、その水生植物根圏には芳香族化合物を分解する微生物が選択的に集積され、高密度で存在していること、これまでにほとんど報告例のない化学物質分解菌が生息していることなどを明らかにしてきた。すなわち、水生植物の根圏では、光独立栄養的な植物作用だけでなく、根圏微生物の従属栄養的な有機物分解も活発に働いていることが考えられる。このような植物と根圏微生物の相互作用を積極的に利用した環境保全・浄化技術は根圏浄化法 (リゾレメディエーション) といわれ、植生浄化やファイトレメディエーションの適応範囲を有機汚染にまで拡大し得る環境浄化技術として注目されるようになってきた¹⁵⁾。

ここでは、我々の研究グループが実施してきた水生植物を利用した根圏浄化法に関する研究のうち、ヨシと根圏微生物の協働作用による内分泌攪乱化学物質と多環芳香族化合物の効率的な分解について、その現象とメカニズムを解説するとともに、その根圏浄化技術の廃水処理への応用可能性について紹介したい。

2. ヨシ根圏での内分泌攪乱化学物質と多環芳香族化合物の分解

ここでの浄化ターゲットには内分泌攪乱化学物質としてビスフェノール A、ノニルフェノールと 4-tert-ブチ

ルフェノールを、多環芳香族化合物としてピレンとベンゾ [a] ピレンを選択した (図 1)。過去に内分泌攪乱化学物質あるいは多環芳香族化合物による重度な汚染歴がない自然の水域からヨシとその根圏底質を実験室に持ち帰り、バイアル瓶に植え付けてヨシ植栽根圏底質を再現した。そこにノニルフェノール (最終濃度 25 mg/kg dry sediment), ビスフェノール A (25 mg/kg dry sediment), 4-tert-ブチルフェノール (25 mg/kg dry sediment), ピレン (40 mg/kg dry sediment) とベンゾ [a] ピレン (40 mg/kg dry sediment) をそれぞれ混合した後、これらのヨシ植栽根圏底質を人工気象室 (温度 28°C, 光強度 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 光サイクル 16 h 明 / 8 h 暗) で静置培養した。そのバイアル瓶の底質から化学物質を抽出 (内分泌攪乱化学物質の場合は酢酸エチル / ヘキサン混合溶媒を用いた抽出, 多環芳香族化合物の場合はジクロロメタン / メタノール混合溶媒を用いた抽出, 多環芳香族化合物抽出の場合はジクロロメタン / メタノール混合溶媒を用いた往復振とう 20 min, 超音波処理 20 min, 再往復振とう 20 min) してその濃度をモニタリングした。対照実験として, ヨシ植生から 3 m 以上離れた同じ水域の非植生帯の底質 (非根圏底質) を用いた同様の実験を実施した。その結果, ヨシ植栽根圏底質では 42 日間の実験期間中に, 添加したビスフェノール A の

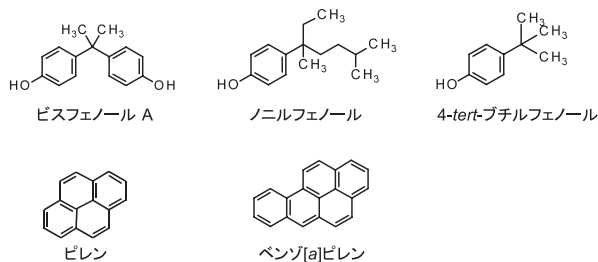


図 1. ビスフェノール A, ノニルフェノール, 4-tert-ブチルフェノール, ピレンとベンゾ [a] ピレンの分子構造

90%, ノニルフェノールの 51%, 4-tert-ブチルフェノールの 91% が除去され, また, 28 日間の実験期間中に添加したピレンの 51%, ベンゾ [a] ピレンの 62% が除去された (図 2)^{18,20,21,22}。一方, ヨシ植栽なしの非根圏底質を用いた実験での化学物質除去率は, ビスフェノール A では 20%, ノニルフェノールでは 9.7%, 4-tert-ブチルフェノールでは 0%, ピレンでは 3%, ベンゾ [a] ピレンでは 13% であった (図 2)^{18,20,21,22}。このようにヨシ植栽根圏底質はフェノール性内分泌攪乱化学物質と多環芳香族化合物に対して高い除去能を有していることが確認された。また, 種子を次亜塩素酸溶液とエタノールで殺菌処理して無菌的に 2 ヶ月栽培したヨシをオートクレーブ滅菌した根圏底質に植栽した。その無菌ヨシ植栽底質において 5 種類の化学物質の濃度変化を調べた。その結果, 微生物活性がないヨシ植生根圏底質では, いずれの場合も明確な濃度低下は確認されなかった (図 2)^{18,20,21,22}。この結果から考えて, ヨシ植栽根圏で確認された 5 種類の化学物質に対する分解除去は, ヨシ自身による吸収作用や分解作用ではなく, その根圏に存在する根圏微生物の分解作用であることが強く示唆された。

では, ヨシの根圏では, どのような微生物がどのようにして 5 種類の化学物質を効率的に分解しているのだろうか。一般論として植物においては, 光合成によって生産された酸素と糖, アミノ酸やビタミンなどの有機物が根に輸送され, そこから植物外部の根圏へ分泌されることが知られている。このような酸素と有機物の供給によって, 根圏に微生物が高密度に集積され, 活性化されていることが知られており, これを根圏効果という^{1,3,15}。そこで, 根圏で繰り返されている化学物質分解に係わるヨシと根圏微生物の協働作用を, (1) ヨシの根圏に集積する内分泌攪乱化学物質分解菌と多環芳香族化合物分解菌の特性, (2) ヨシによる根圏への酸素輸送の効果, (3) ヨシの根分泌物の微生物増殖基質としての効果と (4) ヨシの根分泌物による化学物質分解促進効果に分けて紹介したい。

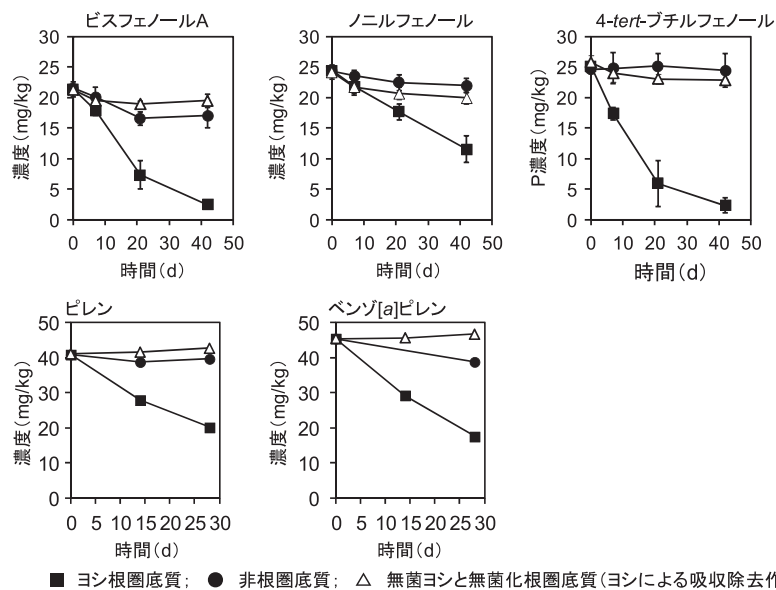


図 2. ヨシの根圏底質におけるビスフェノール A, ノニルフェノール, 4-tert-ブチルフェノール, ピレンとベンゾ [a] ピレンの分解除去

3. ヨシの根圏に集積する内分泌攪乱化学物質分解菌と多環芳香族化合物分解菌

ヨシ根圏では微生物作用によってフェノール性内分泌攪乱化学物質（ビスフェノール A, ノニルフェノールと 4-tert-ブチルフェノール）と多環芳香族化合物（ピレンとベンゾ [a] ピレン）が効率よく分解されることが強く示唆されたことから、ヨシ根圏からそれらの化学物質分解菌を取得することを試みた。前述の化学物質分解が見られたヨシの根圏底質混合物（根および底質）をトリポリリン酸ナトリウム溶液（5 mg/L）とともに超音波処理して微生物を分散させた後、この懸濁液を各化学物質が唯一の炭素源となるように調製した無機塩液体培地に添加して振とう培養した。このような液体培地での集積培養を数回繰り返した後、同寒天平板培地に塗布した。この結果、ビスフェノール A 分解菌（*Novosphingobium* sp. TYA1 株）¹⁸⁾、ノニルフェノール分解菌（*Stenotrophomonas* sp. IT1 株, *Sphingobium* sp. IT4 株）²²⁾、4-tert-ブチルフェノール分解菌（*Sphingobium fuliginis* TIK1 株）²⁰⁾とピレン分解菌（*Mycobacterium* sp. IPF 株）²¹⁾を取得することに成功した。しかしながら、ベンゾ [a] ピレンの有意な分解が見られた根圏底質からベンゾ [a] ピレンを唯一の炭素源として増殖する微生物は分離されなかった。ベンゾ [a] ピレン資化性細菌以外の微生物が根圏でのベンゾ [a] ピレン分解に寄与していたものと思われたが、これについては、「6. ヨシの根分泌物による化学物質分解促進効果」で説明したい。一方、これらのヨシ根圏底質と同じ水域から採取した非根圏底質からは、内分泌攪乱化学物質分解菌とピレン分解菌の集積、分離は成功しなかった。

これまでにビスフェノール A 分解菌としてグラム陰性細菌 MVI 株⁹⁾、*Sphingomonas paucimobilis* FJ4 株⁵⁾や *S. bisphenolicum* AO1 株¹³⁾などが分離されているが、今回根圏から分離された TYA1 株もこれらの既往分解菌と近縁種であった。ノニルフェノール分解菌として *Sphingobium* 属や *Sphingomonas* 属などの *Sphingomonad* 細菌^{3,4,16,24)}がこれまでに報告されており、ヨシ根圏から分離された分解菌も同様に *Sphingobium* 属細菌であったが、新規な分解菌として *Stenotrophomonas* sp. IT1 株も分離された。4-tert-ブチルフェノールに関してはこれまでに微生物分解の報告は全くなく、今回のヨシ根圏での 4-tert-ブチルフェノール分解と分解菌の分離が初めての報告となる。また、ピレン分解菌として *Mycobacterium* 属細菌が分離されているが¹¹⁾、根圏から分離されたピレン分解菌も同属細菌であった。これまでに報告されているこれらの分解菌は、分解菌に対する化学物質の高い選択圧が働いていた化学物質汚染現場や化学物質汚染廃水処理プラントから分離されるケースがほとんどであった。今回ヨシの根圏からこれまでに報告されているような難分解性化学物質分解菌や特殊な分解菌が分離できたことは、ヨシ根圏底質では何らかの影響が分解菌の集積に対してプラスの要因を与えていたものと考えられた。

続いて、ヨシ根圏から分離されたビスフェノール A 分解菌、ノニルフェノール分解菌、4-tert-ブチルフェノール分解菌とピレン分解菌をそれぞれの化学物質を唯

一の炭素源として添加した無機塩培地で培養して分解実験を行い、それらの分解特性を調べた。ここで、ノニルフェノールは純物質が入手しにくいいため、分子構造が類似している 4-tert-オクチルフェノールを用いた。TYA1 株は液体培養において増殖を伴いながら 1 mM (228 mg/L) BPA を 24 時間以内に分解した (図 3)¹⁸⁾。IT4 株は液体培地上に固体として浮遊している 5 mM (1030 mg/L) 4-tert-オクチルフェノールを炭素源として利用しながら 3 日以内に分解した (図 3)²²⁾。TIK1 株は増殖を伴いながら 1 mM (150 mg/L) 4-tert-ブチルフェノールを 12 時間以内に全て分解した (図 3)²⁰⁾。そして IPF 株は増殖を伴いながら液体培地上に粉末として浮遊している 0.5 mM (101 mg/L) ピレンを 3 日以内に全て分解した (図 3)²¹⁾。これらの液体培地を用いた分解実験によって得られた分解速度は、いずれの場合も既報の分解菌と同等、あるいはそれ以上であり、ヨシ根圏から分離した分解菌は高い分解活性を有しているといえる。

さらに、それぞれの化学物質分解経路を確認するために、分解過程において生成される代謝物を液体培地から抽出して GC-MS などで分析した。その結果、図 4 のような経路で化学物質を分解していることが分かった^{18,20-22)}。すなわち、ビスフェノール A の分解では 2 つのフェノールを繋ぐアルカンの水酸化反応（骨格転移反応）、ノニルフェノールと 4-tert-オクチルフェノールの分解ではフェノールの ipso 位の水酸化反応（ipso 置換反応）、4-tert-ブチルフェノールの分解ではフェノールの 2 位の水酸化反応とそのカテコール生成物の環開裂反応、そしてピレンの分解では芳香環の水酸化とそのメタ開裂が重要な初発分解反応であることが分かった。

このようにヨシの根圏底質は、フェノール性内分泌攪乱化学物質や多環芳香族化合物などに対して多様な修

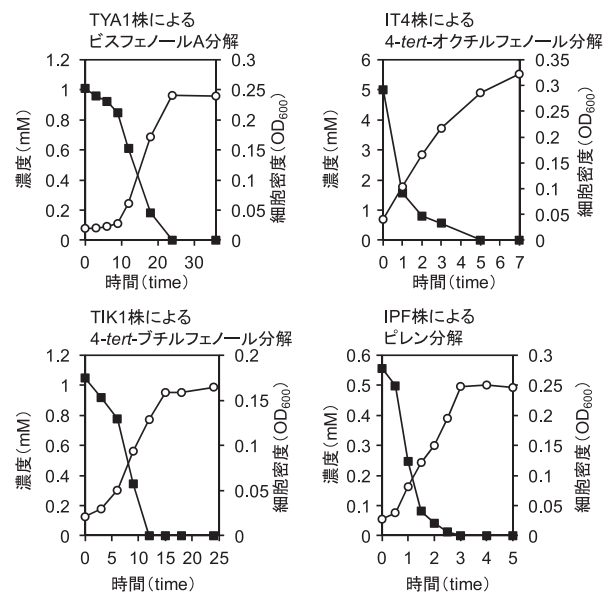


図 3. *Novosphingobium* sp. TYA1 によるビスフェノール A 分解 (■) と細胞増殖 (○), *Sphingobium* sp. IT4 による 4-tert-オクチルフェノール分解 (■) と細胞増殖 (○), *S. fuliginis* TIK1 による 4-tert-ブチルフェノール分解 (■) と細胞増殖 (○) と *Mycobacterium* sp. IPF 株によるピレン分解 (■) と細胞増殖 (○)

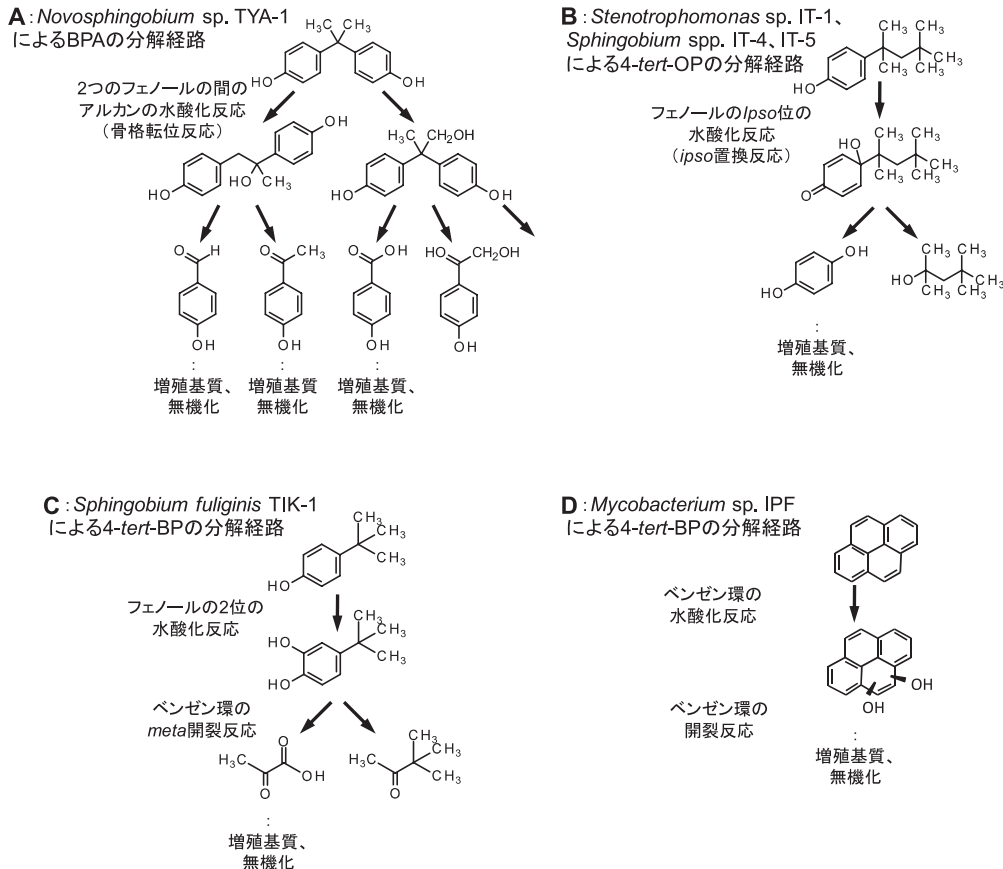


図4. ビスフェノール A 分解経路, 4-tert- オクチルフェノール分解経路, 4-tert- ブチルフェノール分解経路とピレン分解経路

飾・分解活性を有する優れた浄化触媒である微生物が集積するホットスポットであるといえる。

4. ヨシによる根圏への酸素輸送の効果

ここではヨシの水中および底質への酸素輸送を検討した。実験室で3ヶ月栽培したヨシ（地上部約5g dry weight, 根部約1g dry weight）を環境水で2週間栽培して環境水中の微生物をヨシの根に共生させた。そのヨシの根に付着している微生物をトリポリリン酸ナトリウム溶液（5 mg/L）中での超音波処理とボルテックスによって懸濁させて1/100TS寒天平板培地を用いてカウントしたところ、大よそ 10^{10} CFU/g dry rootの密度で微生物がヨシの根に付着していた。そのヨシの根と微生物共生系を広口瓶に入れ、植物栽培用無機塩培地（Hoagland培地）を広口瓶に満たした。あらかじめ二つの穴を開けておいたゴム栓の一つの穴にヨシを通し、もう一つに溶存酸素（DO）メーターをセットして広口瓶を密閉した。このヨシと微生物共生系を人工気象室（温度28°C, 光強度80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 光サイクル16h明/8h暗）で静置栽培しながら培養液中のDO濃度を測定した。また、ヨシ地上部を切り取ったもの、つまり、光合成が起きないヨシの根と微生物の共生系を広口瓶に入れ同様に栽培し、これをコントロール実験とした。その結果、ヨシの水耕栽培槽では明暗のサイクルとほぼ連動したDO濃度の上昇と低下が観察された（図4）。一方、光合成が起きないようにしたコントロール実験では実験

期間を通じて培養液中のDO濃度は低い状態のままであった（図4）。同様に、ヨシを底質で栽培し、その底質中の酸化還元ポテンシャル（ORP）をモニタリングした（図4）。その結果、ヨシ植栽底質中では、地上部の明条件と暗条件と連動するようにORPが上昇と下降、すなわち好気条件と嫌気条件を繰り返した。しかし、このようなORPの上昇と下降はヨシ地上部を切り取った根圏底質では見られず、光合成が起きない根圏底質のORPは低い値のままであった。

この実験では、ヨシは光合成で生産した酸素と大気中から取り込んだ酸素の一部をその通気組織を通じて根圏へ活発に輸送し、根圏では地上部の光合成と連動するように好気性状態と嫌気性状態が繰り返される微生物生態系が形成されていることを実証したものと見える。ヨシは太く丈夫な根茎と微細なひげ根からなる根をネット状に広く伸ばしており、天然の酸素供給装置としての魅力がある。好気条件で反応が進みやすい微生物による化学物質分解においては、このヨシの酸素輸送装置としての効果は大きいといえる。

5. ヨシの根分泌物の微生物増殖基質としての効果

植物は光エネルギーを利用した物質代謝を通じて糖、アミノ酸、脂肪酸や二次代謝物などの様々な有機物を生産するが、それらの一部は根分泌物として根圏に分泌されている^{1,3,15}。ここでは、特に芳香族化合物の分解が促進されているという我々の先行実験の結果を考慮し、

表 1. 通常のヨシおよびピレン暴露したヨシの根分泌物の画別成分とその分泌量

	根分泌物の分泌量 (mg/d/g root)					
	全有機物 (TOC)			フェノール性物質 (TOC に対する割合%)		
	水溶画分	根付着画分	全体	水溶画分	根付着画分	全体
通常のヨシ	44.5	24.9	69.4	0.0684 (0.15)	0.523 (2.10)	0.591 (0.85)
ピレン暴露したヨシ	47.8	60.6	108	0.592 (1.24)	3.04 (5.02)	3.63 (3.35)

フェノール性物質に焦点を当ててヨシの根の分泌物を調べた。

種子を殺菌処理して2ヶ月間無菌栽培したヨシを滅菌超純水で1日静置培養することでヨシの根分泌物を溶出させた。これを水溶画分とした。また、根表面に付着して滅菌超純水に溶出しなかった成分を超音波処理とポルテックス処理によって回収し、これを根付着画分とした。この両画分の根分泌物の全有機炭素 (TOC) と全フェノール性物質 (4-アミノアンピチリン法により検出されるフェノール性物質群) を測定した。その結果、ヨシは両画分を合わせて有機物として 69.4 mg-TOC/g wet root/d, 全フェノール性物質として 0.59 mg-phenol/g wet root/d を分泌することが分かった (表 1)²¹⁾。ヨシの根の分泌物は TOC ベースで全体の 64%以上が水溶画分に存在していたのに対し、フェノール性物質ベースでは 88%が根付着画分に存在していた。

ヨシはフェノール性物質を豊富に含む有機物を根から分泌しており、その大部分は水中に拡散することなく根の表面に蓄積している。そのため、根圏にはフェノール性物質を求めて集積する微生物も多いと予想される。ヨシででないが、水生植物のウキクサの根圏に集積する微生物を調べたところ、培養法および非培養法を用いた微生物カウントにおいてフェノール性物質を分解する微生物が多く集積していることが明らかとなり、培養可能な全従属栄養細菌の 40%程度がフェノール資化性を有しているという結果も得られている^{17,19)}。

続いて、ヨシの根分泌物が分離した化学物質分解菌の増殖基質として働いているのかを調べた。前述のように調製したヨシの根分泌物を唯一の炭素源となるように添加した無機塩培地で分解菌を培養したときと、各種増殖基質を添加した無機塩培地で分解菌を培養したときの細胞増殖を比較した (図 5)。その結果、ヨシの根分泌物はいずれの分解菌に対しても優れた細胞増殖基質として働くことが実証された。つまり、ヨシは光合成を駆動力とした炭素・エネルギー源供給装置として根圏微生物の増殖をサポートしていることが分かった。

6. ヨシの根分泌物による化学物質分解促進効果

植物が根圏に分泌する有機物には微生物が炭素源、エネルギー源として利用しやすい糖やアミノ酸などに加えて、微生物の細胞内で生理活性物質として働くフェノール性物質、フラボノイドやテルペノイドなどが含まれている^{1,3,15)}。それらの生理活性物質の一部は化学物質分解酵素生産の誘導基質 (一次基質) として働き、共代謝分解が起こることが知られている¹⁴⁾。ここでは、ヨシの根分泌物とピレン分解菌 (IPF 株) によるベンゾ [a] ピ

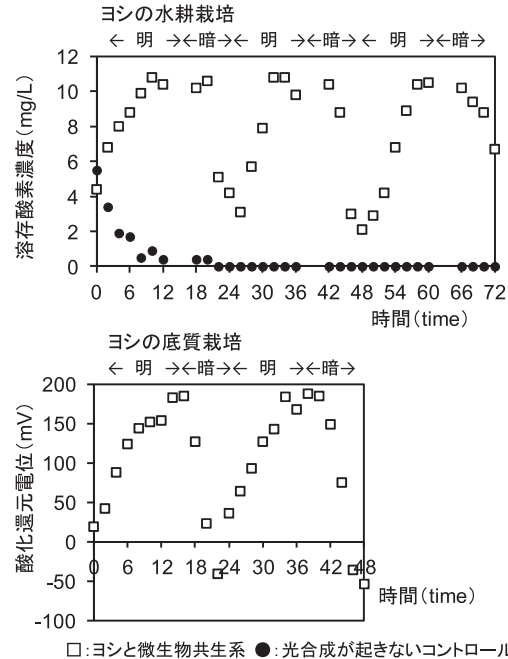


図 5. ヨシの水耕栽培における根圏の溶存酸素変化とヨシの底質栽培における根圏の酸化還元電位変化

レンの共代謝分解について紹介したい。

ピレン (1 mg/L) を添加した Hoagland 培地で無菌ヨシを1週間栽培した後、そのヨシから根分泌物 (水溶画分と根付着画分) を調製し、その成分を分析した。その結果、通常のヨシの根分泌物に比べ、ピレンに暴露したヨシが分泌する水溶画分および根付着画分の根分泌物に含まれるフェノール性物質の割合が上昇した (表 1)²¹⁾。また、この両画分を合わせた根分泌物を市販のカートリッジを用いてフェノール性物質を選択的に濃縮、回収して HPLC 分析した (図 6)²¹⁾。HPLC 分析によって得られたピークの成分特定には至らなかったものの、ピレン暴露ヨシの根分泌物と通常のヨシの根分泌物は成分が異なることが確認された。続いて、ヨシの根分泌物をピレン分解菌 IPF 株培養液に添加し、IPF 株の細胞増殖とピレン、ベンゾ [a] ピレン分解への効果を調べることを試みた。ピレンを添加した無機塩液体培地あるいはベンゾ [a] ピレンを添加した無機塩液体培地で IPF 株を培養し、そこに通常のヨシの根分泌物あるいはピレン暴露したヨシの根分泌物を添加した。これらを振とう培養しながら、IPF 株細胞密度の上昇とピレンまたはベンゾ [a] ピレンの濃度低下をモニタリングした (図 7)²¹⁾。その結果、ヨシの根分泌物を添加することによって IPF 株の細胞増殖とピレン分解が促進されるこ

とが明らかとなった。さらに、通常、IPF株細胞は、それだけではベンゾ [a] ピレンを分解しないが、ヨシの根分泌物存在下でベンゾ [a] ピレンを分解することが観察された。さらに、通常のヨシの根分泌物に比べ、ピレン暴露したヨシの根分泌物を添加することにより、IPF株によるベンゾ [a] ピレンの分解速度が上昇することが観察された。ベンゾ [a] ピレン分解酵素誘導に係わる成分の特定には至らなかったものの、ヨシが化学物質の暴露の有無によって根分泌物を変化させることを通じて根圏微生物の分解触媒作用を活性化していること、いわば、化学物質の存在を感知して分解菌活性化装置としての効果を增強しているという興味深い特徴が明らかとなった。これまでにベンゾ [a] ピレンを唯一の炭素源として資化する微生物の報告例はない^{6,7)}。我々の研究においても、ヨシ根圏でベンゾ [a] ピレンの明確な分解は確認されたものの、ベンゾ [a] ピレン資化性細菌は根圏から分離されず、どのようにしてベンゾ [a] ピレンが分解されるのか疑問が残っていた。ここでその答えが見出された。すなわち、ヨシ根圏ではピレン分解菌が根分泌物を一次基質として利応しながら、ベンゾ [a] ピレンを共代謝的に効率よく分解していたものと示唆された。

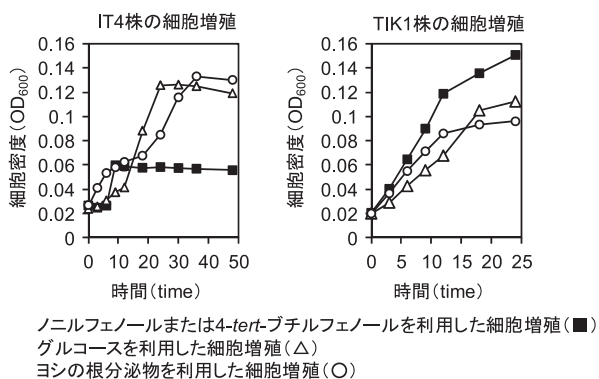


図6. 根分泌物を利用した *Sphingobium* sp. IT4 の細胞増殖と *S. fuliginis* TIK1 の細胞増殖

7. ヨシと分解菌共生システムの廃水処理への応用に関する基礎的検討

ここでは4-tert-ブチルフェノール分解菌 TIK1 株をヨシの根に再導入したヨシ-TIK1 共生システムを構築し、その内分泌攪乱化学物質廃水処理への応用性を検討した例を紹介する²³⁾。

先の項で記述したとおり、TIK1 はヨシの根分泌物を利用して活発に増殖する。ここでは、まず、根分泌物によって増殖した TIK1 細胞が内分泌攪乱化学物質分解活性を十分に発揮するのかを検討した。4-tert-ブチルフェノールあるいはヨシ根分泌物で増殖させた TIK1 株細胞を回収し、その細胞を無機塩培地に再懸濁して TIK1 株細胞懸濁液を調製した。その細胞懸濁液にフェノール性内分泌攪乱化学物質としてアルキルフェノール類およびビスフェノール類をそれぞれ1物質ずつ添加して分解実験を行った。その結果、4-tert-ブチルフェノールまたは根分泌物のいずれの炭素源を利用して細胞合成した TIK1 株も、アルキル基の炭素の数や構造にかかわらず幅広く多様なアルキルフェノール類を分解し、また、ビスフェノール A、ビスフェノール B やビスフェノール S などの多様なビスフェノール類も分解した (表2)²³⁾。このように TIK1 株はヨシの根分泌物を利用して増殖し、アルキルフェノール類とビスフェノール類を幅広く分解する微生物材料であることが分かった。

次に、TIK1 株のヨシの根面への定着性を評価した。無菌ヨシ (地上部 1.5 g dry weight, 根部 0.5 g dry weight) を栽培している Hoagland 培地 (500 mL) に TIK1 を濁度が OD₆₀₀=0.3 となるように接種して1時間静置した。その後、ヨシの根を滅菌 Hoagland 培地で2回洗浄して余分な TIK1 株細胞を除去した。そのヨシを無菌 Hoagland 培地 (500 mL) で栽培し、24時間ごとに Hoagland 培地を新しいものに換えることを5回繰り返す過程で TIK1 株の付着数をモニタリングした。TIK1 株を接種して洗浄した直後のヨシの根には 9×10^{10} CFU/g dry root の TIK1 株付着数が確認され、5回の wash out を経た5日後のヨシの根においても $5 \times$

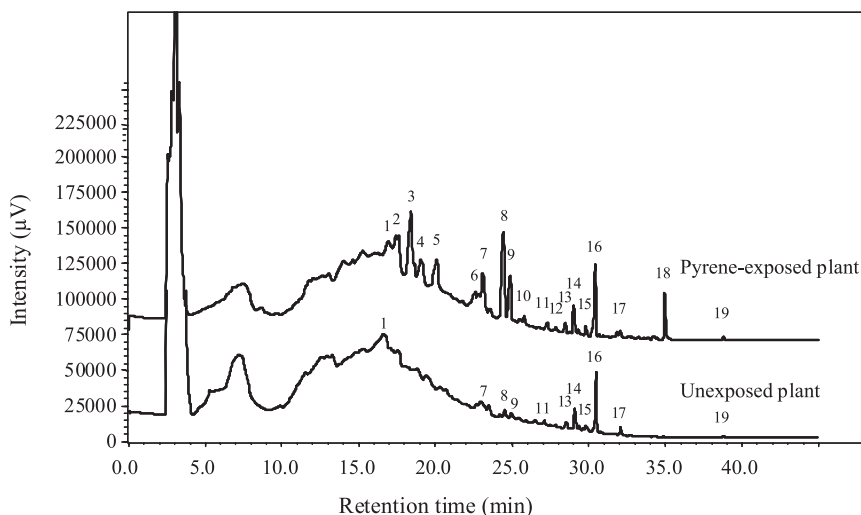


図7. ヨシ根分泌物の HPLC クロマトグラム

10¹¹ CFU/g dry root の TIK1 株付着数が確認された。5 日後にヨシの根に付着している TIK1 株の様子を LIVE/DEAD® BacLight 蛍光染色キットを用いて蛍光顕微鏡観察したところ、オレンジ色に蛍光した根細胞に緑色に蛍

光した TIK1 株細胞がマイクコロニーのような高次立体構造体として部分的に高密度に付着していることが観察され、特に、成長活性が高い根先端に多く付着していた(図9)²³⁾。このように TIK1 株はヨシの根への付着、定

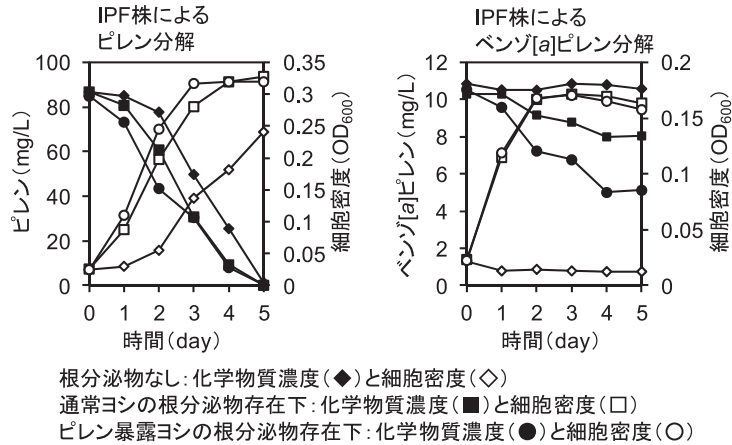


図 8. 根分泌物存在下における *Mycobacterium* sp. IPF 株によるピレン分解とベンゾ [a] ピレン分解

表 2. *Spingobium fuliginis* TIK1 株が分解するフェノール性内分泌攪乱化学物質

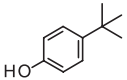
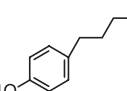
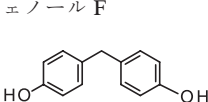
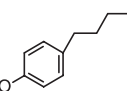
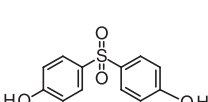
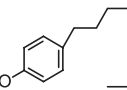
アルキルフェノール類		ビスフェノール類	
物質名と分子構造	分解率 (%)	物質名と分子構造	分解率 (%)
4-tert- プチルフェノール 	100.0	ビスフェノール A 	100.0
4-sec- プチルフェノール 	100.0	ビスフェノール B 	99.0
4-n- プチルフェノール 	100.0	ビスフェノール E 	100.0
4-tert- オクチルフェノール 	100.0	ビスフェノール F 	100.0
4-n- オクチルフェノール 	100.0	ビスフェノール P 	78.2
分枝型ノニルフェノール 	64.0	ビスフェノール S 	100.0
4-n- ノニルフェノール 	100.0		

表 3. ヨシ-TIK1 共生システムリアクターと通常ヨシのコントロールリアクターによるフェノール性内分泌攪乱化学物質除去性能

	ヨシ-TIK1 共生リアクター除去率 (%)			コントロールリアクター除去率 (%)		
	サイクル数			サイクル数		
	1	5	10	1	5	10
ビスフェノール A	100	100	100	1.9	2.6	9.0
ビスフェノール S	100	100	100	1.7	3.5	1.4
4-tert-ブチルフェノール	100	100	100	2.1	2.5	4.1
4-tert-オクチルフェノール	100	100	100	23.4	26.8	25.2
ノニルフェノール	100	100	100	31.8	33.6	33.2

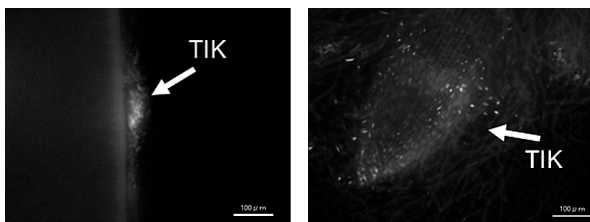


図 9. ヨシの根に付着した *S. fuliginis* TIK1 株の蛍光顕微鏡観察

着性も良い微生物材料であることが分かった。

TIK1 株の内分泌攪乱化学物質分解特性とヨシ根への定着性が分かったことから、ヨシと TIK1 株の共生システム (ヨシ-TIK1 共生システム) を用いたラボスケールの内分泌攪乱化学物質複合廃水処理リアクターを試作した。ここでは実下水二次処理水に 5 種類の内分泌攪乱化学物質 (4-tert-ブチルフェノール 5 mg/L, 4-tert-オクチルフェノール 2.5 mg/L, ノニルフェノール 2.5 mg/L, ビスフェノール A 5 mg/L, ビスフェノール S 5 mg/L) を添加したものを内分泌攪乱化学物質複合汚染水とした。発芽後 3 ヶ月栽培したヨシ (地上部 10 g dry weight, 根部 2 g dry weight) の根に前述のとおり TIK1 株を接種して洗浄した後、広口瓶 (1000-mL) に入れ、そこに内分泌攪乱化学物質複合廃水を 500 mL 入れた。その 12 時間後にリアクター内の内分泌攪乱化学物質廃水を全て取り除き、新しい内分泌攪乱化学物質複合廃水を入れた。このような廃水量を 500 mL, 廃水滞留時間 (処理時間) を 12 時間とした連続バッチ方式処理を 10 サイクル繰り返した。これをヨシ-TIK1 共生システムリアクターとした。また、TIK1 株を接種していないヨシを用いて同様の連続バッチ方式処理をしたものをコントロールリアクターとした。ヨシ-TIK1 共生リアクターでは、5 種類の内分泌攪乱化学物質が 12 時間内に全て分解され、この内分泌攪乱化学物質に対する 100% 除去率が 10 サイクルを通して安定に維持された (表 3)²³⁾。これに対して通常のヨシを用いたコントロールリアクターでは、ノニルフェノールと 4-tert-オクチルフェノールに対する除去率が 20~35% を示したものの、それ以外の内分泌攪乱化学物質に対しては有意な分解、除去は見られなかった (表 3)。10 サイクル終了後のコントロールリアクターのヨシの根表面から高濃度のノニルフェノールと 4-tert-オクチルフェノールが検出されたことから、コントロールリアクターで見られたこれらの除去は根表面への吸着と示唆された。このように実廃水処理

に近い条件において、ヨシ-TIK1 共生システムリアクターは内分泌攪乱化学物質に対する高い分解除去性能を持続的に発揮することが実証された。

6. おわりに

ヨシの根圏において、ヨシの光合成を原動力とした微生物集積作用と微生物活性化作用、その作用に連動した根圏微生物の化学物質分解作用によって、内分泌攪乱化学物質や多環芳香族化合物をはじめとする様々な化学物質の分解が促進されるメカニズムの一端が解明された。これは、植物と微生物があたかも一体となり、光独立栄養的な機能 (有機物と酸素の生産) と従属栄養的な機能 (有機化合物の分解) が連動して作用しているものといえる。このような根圏で繰り広げられている植物と微生物の協働作用については未だ解決されていない部分も多いが、従来の植物利用技術の欠点の一つとして指摘されていた有機化学物質汚染浄化能の低さを克服し、高効率で浄化処理が可能な根圏浄化システムの基礎を構築できたものといえる。

文 献

- Anderson, T.A., E.A. Guthrie, and B.T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636.
- Chaudhry, Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta, and E.J. Joner. 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12: 34-48.
- Corvini, P.F.X., R.J.W. Meesters, A. Schäffer, H.F. Schröder, R. Vinken, and J. Hollender. 2004. Degradation of a nonylphenol single isomer by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 leads to a hydroxylation-induced migration product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6897-6900.
- Fujii, K., N. Urano, H. Ushio, M. Satomi, and S. Kimura. 2001. *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 603-610.
- Ike, M., C.-S. Jin, and M. Fujita. 1995. Isolation and characterization novel bisphenol A-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4. *Jpn. J. Water Treat. Biol.* 31: 203-212.
- Juhász, A.L. and R. Naidu. 2000. Bioremediation of higher molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 45: 57-88.
- Kanaly, R.A. and S. Harayama. 2000. Biodegradation of high-

- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2059–2067.
- 8) Kristanti, R.A., M. Kanbe, T. Toyama, Y. Tanaka, Y.-Q. Tang, X. Wu, and K. Mori. 2012. Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. *J. Environ. Sci.* 24: 800–807.
 - 9) Lobos, J.H., T.K. Leib, and T.M. Su. 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1823–1831.
 - 10) Miller, C.D., K. Hall, Y.N. Liang, K. Nieman, D. Sorensen, B. Issa, A.J. Anderson, and R.C. Sims. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microb. Ecol.* 48: 230–238.
 - 11) Mori, K., T. Toyama, and K. Sei. 2005. Surfactants degrading activities in the rhizosphere of giant duckweed (“*Spirodela polyrrhiza*”). *Jpn. J. Water Treat. Biol.* 41: 129–140.
 - 12) Ogata, Y., T. Toyama, N. Yu, X. Wang, K. Sei, and M. Ike. 2003. Occurrence of 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza* and isolation of a 4-*t*-BP-utilizing bacterium. *Biodegradation* 24: 191–202.
 - 13) Oshiman, K., Y. Tsutsumi, T. Nishida, and Y. Matsumura. 2007. Isolation and characterization of a novel bacterium, *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1, that degrades bisphenol A. *Biodegradation* 18: 247–255.
 - 14) Rentz, J.A., P.J.J. Alvarez, and J.L. Schnoor. 2005. Benzo[*a*]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: implications for phytoremediation. *Environ. Pollut.* 136: 477–484.
 - 15) Shaw, L.J. and R.G. Burns. 2003. Biodegradation of organic pollutants in the rhizosphere. *Adv. Appl. Microbiol.* 53: 1–60.
 - 16) Tanghe, T., W. Dhooge, and W. Verstraete. 1994. Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 746–751.
 - 17) Toyama, T., N. Yu, H. Kumada, K. Sei, M. Ike, and M. Fujita. 2006. Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 346–353.
 - 18) Toyama, T., Y. Sato, D. Inoue, K. Sei, Y.-C. Chang, S. Kikuchi, and M. Ike. 2009. Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. *J. Biosci. Bioeng.* 108: 147–150.
 - 19) Toyama, T., K. Sei, N. Yu, H. Kumada, D. Inoue, H. Hoang, S. Soda, Y.-C. Chang, S. Kikuchi, M. Fujita, and M. Ike. 2009. Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: a mechanism of accelerated biodegradation of phenol. *Water Res.* 43: 3765–3776.
 - 20) Toyama, T., N. Momotani, Y. Ogata, Y. Miyamori, D. Inoue, K. Sei, K. Mori, S. Kikuchi, and M. Ike. 2010. Isolation and characterization of 4-*tert*-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6733–6740.
 - 21) Toyama, T., T. Furukawa, N. Maeda, D. Inoue, K. Sei, K. Mori, S. Kikuchi, and M. Ike. 2011. Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[*a*]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudate interactions. *Water Res.* 45: 1629–1638.
 - 22) Toyama T., M. Murashita, K. Kobayashi, S. Kikuchi, K. Sei, Y. Tanaka, M. Ike, and K. Mori. 2011. Acceleration of nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 45: 6524–6530.
 - 23) Toyama T., T. Ojima, Y. Tanaka, K. Mori, and M. Morikawa. 2013. Sustainable biodegradation of phenolic endocrine-disrupting chemicals by *Phragmites australis*-rhizosphere bacteria association. *Water Sci. Technol.* 68: 522–529.
 - 24) de Vries, Y.P., Y. Takahara, Y. Ikunaga, Y. Ushiba, M. Hasegawa, Y. Kasahara, H. Shimomura, S. Hayashi, Y. Hirai, and H. Ohta. 2001. Organic nutrient-dependent degradation of branched nonylphenol by *Sphingomonas* sp. YT isolated from a river sediment sample. *Microbes Environ.* 16: 240–249.