

(52) ボタンウキクサと根圏微生物の相互作用を利用した芳香族化合物の分解促進

Accelerated degradation of aromatic compounds utilizing synergy between *Pistia stratiotes* L. and rhizosphere microbes

遠山忠*, 吉仲賢晴*, **, 清和成*, 池道彦*, 藤田正憲*, ***

Tadashi TOYAMA*, Masaharu YOSHINAKA*, **, Kazunari SEI*, Michihiko IKE*, Masanori FUJITA*, ***

ABSTRACT; A novel phytoremediation strategy “rhizoremediation” which utilizes synergy between macrophytes and microbes in the rhizosphere was proposed and its feasibility was investigated. *Pistia stratiotes* L. (water lettuce) was used as a model macrophyte and its ability to accelerate of degradation of aromatic compounds in the rhizosphere was evaluated. *P. stratiotes* could promote the growth of microbe, retain a large microbial population in the rhizosphere, 10^9 CFU plant⁻¹, and efficiently transport oxygen to stimulate the rhizospheric microbial activity, leading to accelerated phenol degradation. *P. stratiotes* showed accelerated removal of aniline and 2,4-dichlorophenol in the rhizosphere in addition to phenol, through the following mechanisms: (1) retaining a large population of the aromatic compound degraders, (2) stimulating bacterial growth and degradation activity, and (3) directly removing of aromatic compounds. In long-term phenol degradation process, phenol degradation performance in the rhizosphere of *P. stratiotes* was enhanced gradually and stabilized at a high phenol degradation rate, approximately 0.9 mg-phenol h⁻¹ plant⁻¹. Based on these results, the use of *P. stratiotes* and its rhizosphere can be a novel mean of effective remediation of contaminated aquatic environment.

KEYWORDS; Water purification, *Pistia stratiotes* L., Rhizosphere, Rhizoremediation, Aromatic compounds

1. はじめに

都市近郊の水域においては下廃水処理水等の特定汚染源および流域内の非特定汚染源を汚染源とした水質汚濁が慢性化している。また、様々な経路で水環境中に流入する多様な有機化学物質による生態系への悪影響が顕在化し、良好な水源および親水性の確保、保全が重要な課題となっている。さらに、従来の発生源対策中心の水質保全施策に加え、流域全体の水循環や生態系をも含めた多角的な視点から長期的な視野で水環境を浄化・修復する対策が求められている。この対策技術の一つとして、水生植物を利用した水質浄化法が注目されるようになり、富栄養化防止対策として利用されるケースが増大している。水生植物による水質浄化は光合成を通じて行われるため、極めて経済的に栄養塩類や重金属類を吸収・除去できるうえ、生態系の再生・保全などの環境調和型技術となるメリットがあり、生活排水処理あるいは水域の直接浄化技術として世界的に広く適用されている^{1,2,3)}。しかし、その水質浄化への適用は、主に栄養塩の除去に限定されてきた。

一方、近年、陸生植物の根の近傍である根圏が持つ有機化学物質分解促進機能が注目されるようになってきた^{4,5,6)}。陸生植物の根圏では根から分泌される根分泌物(糖類, アミノ酸, ビタミン, 芳香族炭化水素など)の影響により、非根圏と比べて数多くの微生物(根圏微生物)が生息しており、根圏微生物の増殖活性および

*大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 (Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University)

**大阪市立工業研究所 (Osaka Municipal Technical Research Institute) (現所属)

***高知工業高等専門学校 (Kochi National College of Technology) (現所属)

生理活性も高い状態で維持されていることが知られている^{7,8)}。また、ある種の陸生植物では、生理活性物質や酸素を根圏に供給し、根圏微生物の増殖および分解活性を促進することで、有機化学物質分解が促進されることが確認されている^{4,5,6)}。このような植物-微生物共生系を利用した浄化法は、根圏浄化法とも呼ばれ、農薬、石油系炭化水素、多環芳香族化合物(PAHs)、ポリ塩化ビフェニル(PCBs)などの多様な難分解性化学物質に汚染された土壌の浄化に利用され始めている^{4,5,6)}。水生植物においても根圏が持つ有機化学物質の浄化機能が確認できれば、水生植物を利用した水質浄化法は、栄養塩除去に加え、現在の水環境中で問題となっている有機化学物質汚染の浄化にも対応できる新たな水質浄化法へと飛躍する可能性を持っている。しかし、水生植物の根圏における有機化学物質の分解を検討した研究は数例しかなく^{9,10)}、水質浄化への積極的な利用を検討したものや浄化メカニズムを検討した研究はない。

本研究では、水生植物を利用した新規の水質浄化技術を提案することを最終目的として、水生植物の根圏における有機化学物質の浄化促進機能の確認とそのメカニズムを解明することを試みた。供試植物には、栄養塩除去能に優れ、下水二次処理水の栄養塩除去にも適用されているボタンウキクサ(*Pistia stratiotes* L.)を用いた^{11,12,13)}。また、供試物質として水環境中で頻繁に検出され、水生生物への悪影響が懸念される優先検討対象物質であるフェノール、アニリンおよび2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP)¹⁴⁾を用いた。はじめに、根圏の分解促進機能として微生物の増殖促進作用と酸素輸送による微生物活性化作用がボタンウキクサ根圏に備わっているかを確認した。続いて、根圏での有機物分解においてボタンウキクサおよび根圏微生物がそれぞれどのような効果をもたらしているのかを検討した。加えて、この浄化機能を実用可能な水質浄化技術に応用するための基礎的検討として、根圏が持つ有機化学物質浄化能の長期的安定性についての検討を行った。

2. 実験材料および方法

2.1. 供試植物

供試植物として浮遊水生植物ボタンウキクサを用いた。ボタンウキクサは大阪大学吹田キャンパス内の犬飼池で栽培しているものを実験に供した(犬飼ボタンウキクサ)。また、ボタンウキクサの種子を30%過酸化水素水で30分間滅菌処理を行い、無菌条件下で発芽、栽培したものを無菌ボタンウキクサとして実験に供した。無菌ボタンウキクサの栽培は、植物栽培用の無機塩培養液 Hoagland 培養液¹⁵⁾を用いた。

2.2. ボタンウキクサによる微生物増殖促進作用の解析

540mL 容のガラス瓶に500mLの犬飼池の池水を入れ、無菌ボタンウキクサを1株植え付け、温室内(水温および気温: 25°C, 30000lux, 16h-light/8h-dark)で栽培した。栽培に用いた池水と栽培開始1日後、3日後および7日後の池水とボタンウキクサの根を回収し、生菌数を計数した。コントロール実験として無菌ボタンウキクサを植付けていないものを作製し、同様に池水を経時的に回収した。いずれの場合も3つの実験系を作製して同時に実験を行い、結果はその平均値で評価した。

2.3. ボタンウキクサの根圏への酸素輸送能の測定

ボタンウキクサによる酸素供給以外には酸素が混入しないように作製した実験装置(Fig. 1)を用いて、溶存酸素濃度が 0.4mgL^{-1} 以下となるように調製した Hoagland 培養液で犬飼ボタンウキクサを栽培した。この実験装置における培養液中の溶存酸素濃度を経時的に測定して、酸素輸送速度を測定した。また、同様の実験装置に終濃度 10mgL^{-1} となるようにフェノールを添加して犬飼ボタンウキクサを栽培し、フェノールの分解実験を行った。実験期間中にフェノール濃度と溶存酸素濃度を経時的に測定して、ボタンウキクサの酸素輸送能とフェノール分解の関連性を評価した。コントロール実験として、ボタンウキクサの酸素輸送が行われない

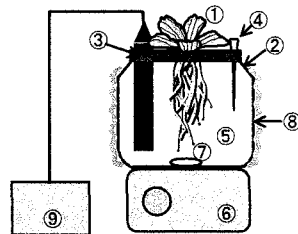


Fig. 1. Schematic diagram of oxygen transport test.

①*P. stratiotes*., ②540 mL glass vial, ③rubber stopper, ④sampling needle, ⑤500 mL of Hoagland solution, ⑥magnetic stirrer, ⑦string bar, ⑧aluminum foil, and ⑨O₂ meter

よう、犬飼ボタンウキクサの根を切断して培養液に入れ、フェノール分解実験を行った。全ての実験は3回繰り返し、結果はその平均値で評価した。

2.4. ボタンウキクサ根圏における芳香族化合物の分解実験

540mL容のガラス瓶に犬飼池水を満たし、犬飼池ボタンウキクサあるいは無菌ボタンウキクサを1株植付けた系をそれぞれ実験系1および実験系3とし、犬飼ボタンウキクサ1株の根に付着している根圏微生物を回収し、その菌液を添加した系を実験系2とした。また、何も添加せず犬飼池水だけのものを実験系4としてコントロール系とした。さらに、滅菌処理した犬飼池水と無菌ボタンウキクサを用いて、微生物による影響を除いたものを実験系5とした。作製した実験系の概要をTable 1に示す。外部からの微生物の混入を防ぐため、ガラス瓶の開口部はメンブレンシールを用いて栓をした。全ての実験系にフェノール(10mgL^{-1})、アニリン(10mgL^{-1})あるいは2,4-DCP(5mgL^{-1})をそれぞれ添加した。分解実験は温室内(水温および気温: 25°C , 30000lux, 16h-light/8h-dark)で静置して行い、経時的に各芳香族化合物の濃度を測定した。いずれの場合も2つの実験系を作製して同時に実験を行い、結果はその平均値で示した。なお、実験系2における根圏微生物の添加は、2.6(1)に示す方法に準じて行い、根由来の有機物が混入しないように行った。

実験系1と実験系4の結果を比較することにより、ボタンウキクサ根圏の分解除去促進効果を評価した。また、実験系5によりボタンウキクサ自身による芳香族化合物の除去効果を評価し、実験系1と実験系2, 3および5を比較することでボタンウキクサ根圏における芳香族化合物の分解において、それぞれボタンウキクサおよび根圏微生物がどのような効果をもたらしているかを評価した。

Table 1. Characteristics of the five test systems as performed for aromatic compounds degradation tests

Test system	Composition of test system			Aromatic compounds (initial concentration mg L ⁻¹)	
	Pond water bacteria	<i>P. stratiotes</i>	Rhizobacteria		
<i>P. stratiotes</i> -rhizobacterial association					
T-1 + pond water system	○	○	○	Pheno(10 mg L ⁻¹) Aniline(10 mg L ⁻¹) 2,4-DCP(5 mg L ⁻¹)	
Rhizobacteria(<i>P. stratiotes</i> -free)					
T-2 + pond water system	○		○		
Sterile- <i>P. stratiotes</i>					
T-3 + pond water system	○	○			
T-4 Pond water system	○				
Sterile- <i>P. stratiotes</i>					
T-5 + sterile-pond water system		○			

2.5. 連続バッチ方式によるフェノールの分解実験

1650mL容の植物栽培槽に終濃度 10mgL^{-1} となるようにフェノールを添加した培養液 1500mL を入れ、犬飼ボタンウキクサを1株植付けた。経時的に培養液中のフェノール濃度を測定し、24時間後、全ての培養液を系内から排出し、新たにフェノールが添加された培養液 1500mL を入れ、経時的にフェノール濃度を測定することを繰り返した。1サイクルを24時間とした連続バッチ方式(HRT=1 day)によるフェノール分解実験を21サイクル(21日間)行い、この期間を馴養期間とした。さらに、馴養栽培の後、フェノールを添加していない培養液で同様にボタンウキクサを栽培することによって脱馴養栽培を行い、その7日後および14日後に再びフェノール分解実験を行った。実験は3つの実験系を作製して同時にを行い、結果はその平均値で評価した。

2.6. 微生物群集の解析

(1) 生菌数の計数

ボタンウキクサの根に付着している微生物を根圏微生物(rhizosphere fraction)、池水中に懸濁している微生物を懸濁微生物(suspended fraction)としてそれぞれ区別して微生物群集の解析を行った。ボタンウキクサの根を採取し、乳鉢に移してすり潰した後、 5mgL^{-1} トリポリリン酸溶液 30mL を加え、超音波破碎処理した。この根破碎液をアイソポアメンブレンフィルター(孔径: $10\mu\text{m}$)で濾過して根の固形物を除去し、濾液をアイソポアメンブレンフィルター(孔径: $0.2\mu\text{m}$)で濾過して微生物をフィルター上に捕捉した。このフィルターを5

mL のトリポリリン酸溶液とともに超音波処理して微生物を溶液中に分散させたものを根圏微生物菌液とした。また、実験系内の池水を回収したものを懸濁微生物菌液とした。得られた菌液を希釈平板培養法により、28℃で14日間培養し、形成されたコロニーを計数して生菌数を求めた。1/10LB 培地(1.0 g L⁻¹ Bact peptone, 0.5 g L⁻¹ Yeast extract, 1.0 g L⁻¹ NaCl, 1.5% Agar, pH 7.0) を用いて全生菌数を定量した。また、BSM 培地(1.0 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1.0 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.01 g L⁻¹ FeCl₃, 0.05 g L⁻¹ NaCl, 0.01 g L⁻¹ CaCl₂, 1.5% Agar, pH 7.2)に単一炭素源として、フェノール、アニリンあるいは2,4-DCP を100mg L⁻¹ となるように添加した培地を用いて、それぞれの芳香族化合物分解菌を定量した。

(2) Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)による微生物群集構造の解析

proteinase K 法¹⁶⁾によりDNAを抽出し、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)を用いて精製したものをDNA テンプレートとした。調整したDNA テンプレートをもとに、5'末端を6-FAM で蛍光標識した forward primer 27F-FAM と reverse primer 1392R¹⁷⁾を用いて16S rDNA を標的としたPCR増幅を行った。PCR反応は熱変性 95℃(1 min), アニール 57℃(1 min), 伸長反応 72℃(3 min)とし、サイクル数はDNA テンプレートのDNA濃度に応じて20~25サイクル間で適宜調整した。PCR産物をMicrocon PCR (QIAGEN)で精製・濃縮した後、制限酵素 *Hha*I で断片化した。断片化産物1μLを脱イオンホルムアミド12μL, サイズスタンダード0.5μLと混合し、変性処理(95℃, 3 min)を行った後、DNA シーケンサー(ABI PRISM 310 Genetic analyzer, Applied Biosystems)によって電気泳動を行った。断片長解析ソフト(version 3.7, Applied Biosystems)を用いて、蛍光末端断片(T-RF; Terminal Restriction Fragment)パターンから断片のサイズを求めた。

2.7. 化学物質濃度の測定

各芳香族化合物の濃度は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析により測定した。HPLC分析はHPLCシステム(LC-10A series, SHIMADZU), Shim-pack VP-ODS カラム(150×4.6 mm i.d., particle size 5μm, SHIMADZU)を用い、溶離液流速を1.0mL min⁻¹としてUV-VIS 検出器を用いて行った。フェノールの測定は溶離液としてアセトニトリル:超純水=1:1の溶液を用い、波長270 nmで行った。アニリンの測定は溶離液としてアセトニトリル:超純水=7:3の溶液を用い、波長254 nmで行った。2,4-DCPの測定は溶離液としてアセトニトリル:超純水:酢酸=60:38:2の溶液を用い、波長225 nmで行った。

3. 実験結果および考察

3.1. ボタンウキサによる微生物の増殖促進作用

無菌ボタンウキサを犬飼池水で栽培し、ボタンウキサが池水の微生物の増殖に及ぼす影響を評価した。微生物数を経時的に測定した結果をFig. 2に示す。Fig. 2では、実験系内の全微生物を表すとともに、ボタンウキサが存在する系では、根に付着している根圏微生物と懸濁している微生物を区別して同時に示した。実験開始時には無菌状態であったボタンウキサの根には、1日後に2×10⁷CFU plant⁻¹さらに7日後に8×10⁸CFU plant⁻¹の微生物が検出された。また、ボタンウキサが存在する系では、ボタンウキサが存在しないコントロール系に比べて、系内の全微生物数の増殖が促進

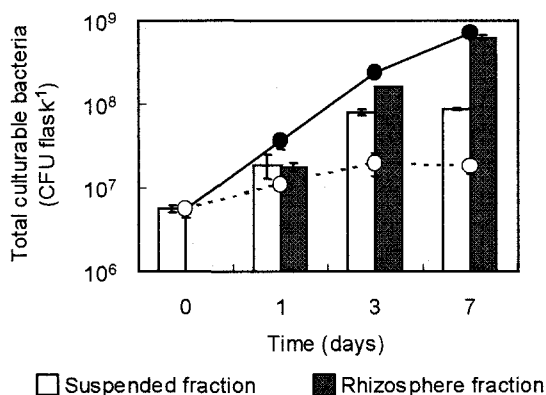


Fig. 2. Effect of the rhizosphere of *P. stratiotes* on the growth of Inukai pond bacteria. The behavior of number of culturable bacteria in sterile *P. stratiotes* rhizosphere system (●) and control (non-rhizosphere system) (○) during 7 days, relatively. The bar graphs show the bacterial numbers of suspended fraction and rhizosphere fraction in the sterile *P. stratiotes* rhizosphere system. Error bars represent 95 % confidence intervals.

されていることが確認された。実験終了時の7日目においては、ボタンウキクサが存在する系では、コントロール系の約39倍の微生物が検出された。さらに、それぞれの微生物菌液からDNAを抽出し、16S rDNAを標的遺伝子としたPCRを行った。増幅された16S rDNAに基づいたT-RFLP解析により微生物群集の構造を解析した結果、ボタンウキクサが存在している系とコントロール系とでは微生物群集が大きく異なり、ボタンウキクサが存在している系においても、ボタンウキクサの根に形成される微生物群集と池水中に懸濁している微生物群集とでは、その微生物群集構造が異なっていることが確認された(Fig. 3)。

一般的に陸生植物は根から糖類、有機酸、アミノ酸、ビタミン類や芳香族炭化水素などの有機物を分泌しており、これらの根分泌物は微生物の増殖基質や生理活性基質となる^{7,8,18)}。このため陸生植物の根圏では、非根圏と比べて5~20倍、時には100倍以上もの微生物が生息していることが報告されており、このように根圏において微生物数が多い現象は根圏効果(rhizosphere effect)と呼ばれ、根圏微生物(R)と非根圏土壌微生物(S)の菌数の比(R/S)でその根圏効果を定量的に評価されている^{4,5)}。また、陸生植物の根圏には、非根圏とは代謝活性や生理活性が異なる根圏特有の根圏微生物群集が形成されていることが知られている⁹⁾。今回の研究結果より、陸生植物の根圏で見られるような微生物増殖促進効果(根圏効果)が、水生植物ボタンウキクサにおいても明確に確認され、根圏効果 R/S=39 という結果が得られた。ボタンウキクサはその根に数多くの微生物を保持し、その根圏微生物は池水中と異なった特有の微生物群集構造をしていることが確認された。

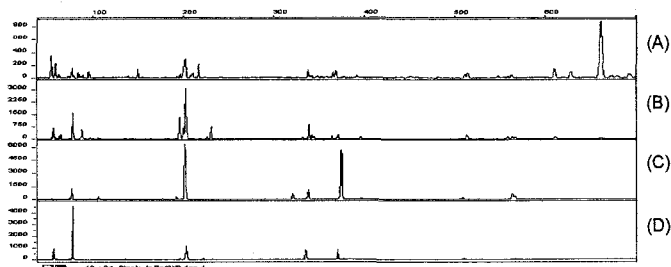


Fig. 3. Comparison of 16S rDNA-based T-RFLP profile patterns obtain Inukai pond water at day 0 (A), suspended fraction in non-rhizosphere system at day 7 (B), rhizosphere fraction in rhizosphere system at day 7 (C), and suspended fraction in rhizosphere system at day 7 (D).

3.2. ボタンウキクサの根圏への酸素輸送能によるフェノール分解促進作用

ボタンウキクサの酸素輸送に伴う培養液中の溶存酸素濃度を経時的に測定した結果をFig. 4に示す。ボタンウキクサを植付けていないコントロール系では、溶存酸素の増加は見られず、実験期間を通じて溶存酸素濃度は 0.4mgL^{-1} 以下に保たれていた。ボタンウキクサを植え付け照度を 30000lux に制御した条件では、溶存酸素濃度の増加が確認され、その増加速度は水温に依存し、水温 25°C の条件で溶存酸素濃度の増加速度が一番速くなった。この結果をもとに、ボタンウキクサの根乾燥重量あたりの酸素輸送速度を算出したところ、 27.8 (at 25°C), 23.1 (at 20°C), 8.3 (at 15°C) $\text{mg-O}_2\text{g}^{-1}\text{ dry root weigh day}^{-1}$ となった。

さらに、ボタンウキクサの酸素輸送能と根圏におけるフェノールの分解能の関連性を調べるため、Fig. 1の実験装置を用いてフェノールの分解実験を行った。分解実験は、先の酸素輸送の検討で酸素輸送速度が最

Table 2. Comparison of oxygen transport into sewage effluent by selected aquatic macrophytes¹⁵⁾

Macrophyte	Oxygen transport into sewage effluent ($\text{mg-O}_2\text{g}^{-1}\text{ dry root weight day}^{-1}$)	
	Primary sewage effluent	Secondary sewage effluent
Floating aquatic macrophytes		
Pennywort	116	30
Water hyacinth	57	21
Water lettuce	50	20
Emergent aquatic macrophytes		
<i>Pontederia cordata</i>	37	11
Common cattail	5	2
Common arrowhead	21	8
<i>Canna flaccida</i>	14	9
<i>Scirpus pungens</i>	13	8
<i>Scirpus validus</i>	30	17

も高かった照度 30000lux, 水温 25℃の条件で行い, その結果を Fig. 5 に示す. 大飼ボタンウキクサの根を切断し, 実験装置に組込んだ系ではボタンウキクサによる酸素輸送が行われないため, 実験期間中の系内の溶存酸素濃度は 0.4mgL^{-1} 以下に保たれていた. また, 完全滅菌系ではフェノールの減少が見られなかったが, 大飼ボタンウキクサの根を入れた系では根圏微生物による緩やかなフェノールの減少が確認され, 最終的に約 60% のフェノールが分解除去された. 一方, ボタンウキクサを植付けた系では溶存酸素濃度の増加が確認され, 根のみコントロール系に比べて速やかにフェノールが減少し, 最終的に 90% 以上のフェノールが分解除去された. この結果より, 根圏微生物のフェノール分解作用は, 植物の光合成をはじめとする生理活動との相互作用により促進されることが示された. 植物による微生物分解作用の活性化は, 有機物の分泌と酸素供給が考えられるが, 本実験においては, 特に酸素供給に着目し, 予め DO を 0.4mgL^{-1} 以下の嫌気条件下で行い, ボタンウキクサによる酸素供給とフェノールの分解の関連性を検討した. 一般的に微生物によるフェノールの生分解は好気および嫌気条件下で起こるが, 好氣的生分解の方が分解速度が速いことが知られている¹⁹⁾. 今回の実験でボタンウキクサを植付けた系のフェノール分解が促進された結果は, ボタンウキクサの酸素輸送により実験系が好気条件に保たれ, 根圏微生物によるフェノールの好氣的生分解が促進されたことが一つの要因であることが推測された. このことから, ボタンウキクサは根圏への酸素輸送装置として機能し, 結果として根圏微生物のフェノール分解を促進している可能性が示された. これまでに Reddy (1989)らの研究によって代表的な水生植物の酸素輸送速度が求められているが, ボタンウキクサは比較的高い酸素輸送能を示すことから, 根圏浄化法への応用性に優れた植物種の一つであることが分かる(Table 2). また, Reddy らはボタンウキクサの根圏において酸素輸送の効果により下水一次および二次処理水中の BOD 分解が促進することを確認しているが²⁰⁾, 今回の実験結果から, 酸素輸送による浄化促進は, BOD といった易分解性有機物だけでなく, フェノールといった有毒な有機化学物質に対しても有効であることが示された. しかし, 植物は光合成に伴い, 酸素だけでなく微生物の増殖・生理活性基質も根圏に供給し, 微生物分解作用を促進していることが知られるが, 本研究ではその 2 つの作用がどの程度寄与しているのかは評価できなかった.

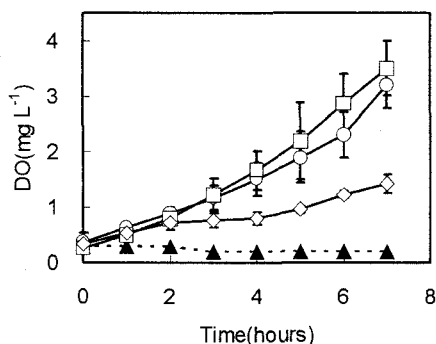


Fig. 4. Effect of temperature change on dissolved oxygen concentration at temperature 15°C (◇), 20°C (○), 25°C (□), and control test (without *P. stratiotes* at 25°C) (▲). Error bars represent 95 % confidence intervals.

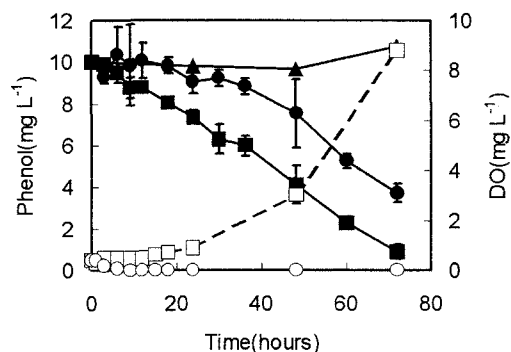


Fig. 5. Effect of oxygen transport by *P. stratiotes* on phenol degradation in the rhizosphere. Change in the phenol concentrations in *P. stratiotes* planted system (■), *P. stratiotes* roots-added system (●), and sterile control test (▲) were shown. Change in the dissolved oxygen concentrations in *P. stratiotes* planted system (□) and *P. stratiotes* roots-added system (○) were shown. Error bars represent 95 % confidence intervals.

3.3. ボタンウキクサの根圏における芳香族化合物の分解促進

先の検討により, ボタンウキクサ根圏には, 微生物の増殖を促進する機能と好氣的生分解を促進する一つの機能として酸素輸送が備わっていることが確認された. また, ボタンウキクサ根圏では, 周辺水中とは異

なる特有の微生物が共存し、これらが有機化学物質の分解に関与していることが示唆された。そこでボタンウキクサ根圏において有機化学物質の分解が促進されているかを確認するため、犬飼池水とボタンウキクサを用いてフェノール、アニリンおよび2,4-DCPの分解実験を行った。

(1) ボタンウキクサ根圏におけるフェノールの分解促進

フェノール濃度の経時変化を Fig. 6A に示す。実験系 4 に対し、実験系 1 の方がフェノールの減少が促進されていることから、ボタンウキクサのフェノール分解除去促進効果が確認された。実験系 5 においても 72 時間で約 37% のフェノールが除去されたが、完全な除去には至らず、実験系 1 および 3 に比べて、フェノール除去速度が顕著に低かったことから、ボタンウキクサの根圏では、微生物による分解作用に比べ、ボタンウキクサ自身のフェノールの吸収あるいは分解による除去作用は低いことが示された。実験系 1 に対し、これと同等のフェノール分解が実験系 2 で確認されたことから、ボタンウキクサ根圏におけるフェノール分解促進に及ぼす主な要因は、根圏微生物が持つ高いフェノール分解能であることが示唆され、根圏微生物は必ずしもボタンウキクサに共生していなくても高い分解能を発揮することが示された。また、実験系 4 に対して実験系 3 では、フェノールの分解が促進されていることから、ボタンウキクサの酸素輸送や根分泌物の影響により、池水中のフェノール分解菌の増殖あるいは分解活性が促進されたことが考えられた。

分解実験前の生菌数を調べた結果、根圏微生物が存在する実験系 1 と実験系 2 において、フェノール分解菌の数が多く、全生菌数におけるフェノール分解菌の割合も高い値を示したことから、ボタンウキクサ根圏にはフェノール分解菌が比較的多く保持されていることが分かった (Table 3)。この結果は、Fig. 6A において実験系 1 と実験系 2 のフェノール分解速度が速かったことと一致する。また、フェノール分解実験後には全ての系において全微生物およびフェノール分解菌が増加していることが確認された。フェノール分解過程において、ボタンウキクサが全微生物あるいはフェノール分解菌の増殖を促進しているかを確認するため、先に記した根圏効果 (R/S 値) を算出した。なお、実験系 1 の生菌数と実験系 2 の生菌数の比 (R/S 値) を根圏微生物と池水微生物に対する根圏効果、実験系 3 の生菌数と実験系 4 の生菌数の比 (R/S 値) を池水微生物に対する根圏効果として評価した。いずれの場合も、全生菌数およびフェノール分解菌に対する根圏効果が確認され、特に池水中のフェノール分解菌に対して選択的に根圏効果が働いていることが分かった (Table 4)。

(2) ボタンウキクサ根圏におけるアニリンの分解促進

分解実験におけるアニリン濃度の変化を Fig. 6B に示す。実験系 4 に対し実験系 1 の方が速やかにアニリン濃度が減少したことから、ボタンウキクサのアニリン分解除去促進効果が確認された。実験系 5 ではアニリン濃度の減少がほとんど見られなかったことから、ボタンウキクサ自身によるアニリンの吸収または分解除去効果は低いことが示された。また、フェノール分解実験の結果とは異なり、実験系 2 よりも実験系 3 の方がアニリンの分解が速いことから、アニリンの分解には酸素や根分泌物の供給といったボタンウキクサによるアニリン分解菌の活性化作用が重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、根圏微生物はボタンウキクサの根に共生していない状態では十分なアニリン分解能を発揮できないことが示唆された。

分解実験前の生菌数を計数した結果、フェノール分解実験と同様に、ボタンウキクサの根圏微生物が存在する系において、アニリン分解菌の菌数が多いことが確認された (Table 3)。また、分解実験後の生菌数の結果より、ボタンウキクサの全生菌数およびアニリン分解菌に対する根圏効果が確認され、特に池水中のアニリン分解菌に対して選択的に根圏効果が働いていることが示された (Table 4)。

(3) ボタンウキクサ根圏における2,4-DCPの分解促進

分解実験における2,4-DCP濃度の変化を Fig. 6C に示す。実験系 4 に対して実験系 1 の方が速やかに2,4-DCP濃度が減少したことから、ボタンウキクサによる2,4-DCP分解除去促進効果が確認された。フェノールおよびアニリンの分解実験の結果とは大きく異なり、実験系 1 と実験系 3 および実験系 5 において同等の2,4-DCP濃度の減少が見られた。このことからボタンウキクサの2,4-DCP分解除去効果は、ボタンウキクサ自身の吸収あるいは分解による除去が大きく寄与することが示された。また、実験系 2 では実験系 4 に比べ速やかに、

2,4-DCP が減少していることから、根圏微生物による 2,4-DCP の分解作用も確認された。生菌数を調べた結果、2,4-DCP 分解菌の菌数は少ないものの、フェノールとアニリンと同様に、ボタンウキクサ根圏には池水中と比べて多くの 2,4-DCP 分解菌が存在した(Table 3)。また、2,4-DCP 分解過程において、ボタンウキクサが池水中の 2,4-DCP 分解菌の増殖を促進していることが示された(Table 4)。

(4) ボタンウキクサ根圏における芳香族化合物の分解促進効果のまとめ

ボタンウキクサと犬飼池水を用いてフェノール、アニリンおよび 2,4-DCP の 3 種類の芳香族化合物の分解実験を行った結果、ボタンウキクサ根圏では池水に比べ、3 種類全ての芳香族化合物の分解除去が促進されることが確認された。その分解除去においてボタンウキクサが果たす役割には、①多くの分解菌を根圏に保持すること、②分解菌の増殖と分解活性を促進すること、さらに③吸収等により直接除去することがあることが示唆された。これらの機能が分解除去の促進に寄与する度合いは芳香族化合物の種類によって大きく異なり、フェノールに対しては根圏に保持されたフェノール分解菌による分解、アニリンに対してはボタンウキクサによる分解菌の活性促進作用、2,4-DCP に対してはボタンウキクサによる直接除去が主なメカニズムであることが示されたことは非常に興味深い結果である。また、ある種の水生植物は、2,4-DCP をはじめとするクロロフェノール類を根から吸収し、体内でそのグルコシド抱合体へと代謝することにより無毒化していることが報告されている²¹⁾。本実験においても、ボタンウキクサは 2,4-DCP を吸収・除去し、長期間 2,4-DCP に暴露されてもその毒性による生育阻害は見られなかった。さらに、ボタンウキクサ根圏ではもともと芳香族化合物分解菌の数が多く、芳香族化合物分解過程において分解菌の増殖を選択的に促すことが確認された。一般に植物の根からは芳香族炭化水素が分泌され、それが微生物の増殖、生理活性基質となっていることが知られており^{16,22)}、ボタンウキクサ根圏においても、これらを増殖基質とする芳香族化合物分解菌の割合が高い根圏微生物群集が形成されていたことが考えられた。また、陸生植物の根圏では、有機化学物質の分解過程において分解菌が選択的に増殖し、この選択的分解菌の増殖の結果として有機化学物質の分解が促進されることが報告されているが^{4,5,6)}、水生植物でこの現象を確認したのは本研究が初めてである。

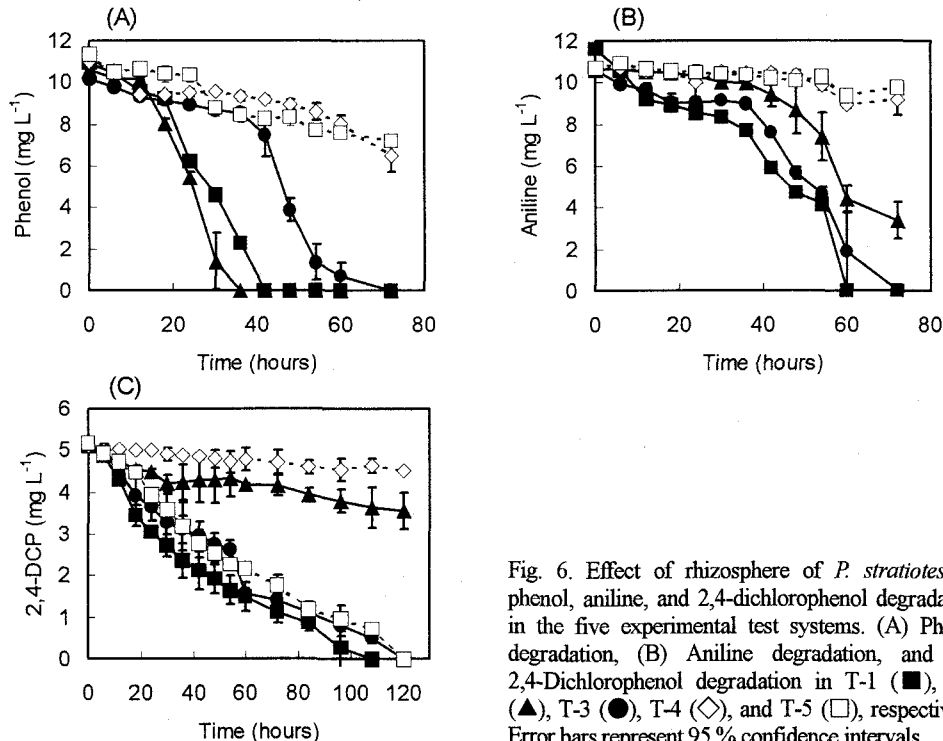


Fig. 6. Effect of rhizosphere of *P. stratiotes* on phenol, aniline, and 2,4-dichlorophenol degradation in the five experimental test systems. (A) Phenol degradation, (B) Aniline degradation, and (C) 2,4-Dichlorophenol degradation in T-1 (■), T-2 (▲), T-3 (●), T-4 (◇), and T-5 (□), respectively. Error bars represent 95 % confidence intervals.

Table 2. Comparison of bacterial population in each test system at the inception of degradation test

Test	Number of total culturable bacteria and aromatic compound-degrading bacteria (CFU/flask)			
	Total culturable bacteria	Culturable aromatic compound-degrading bacteria (% of aromatic compound-degrading bacteria) ^b		
		Phenol	Aniline	2,4-DCP
T-1 Total ^a	2.1×10^9	1.4×10^9 (66.5%)	1.6×10^8 (7.6%)	8.6×10^7 (4.1%)
S	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^6$	$(4.7 \pm 0.1) \times 10^5$ (8.1%)	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$ (1.9%)	$(5.4 \pm 0.3) \times 10^4$ (9.3%)
R	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^9$	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^9$ (66.7%)	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^8$ (7.6%)	$(8.6 \pm 0.3) \times 10^7$ (4.1%)
T-2 Total	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^9$	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^9$ (66.5%)	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^8$ (7.6%)	$(8.6 \pm 0.3) \times 10^7$ (4.1%)
T-3 Total	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^6$	$(4.7 \pm 0.1) \times 10^5$ (8.1%)	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$ (1.9%)	$(5.4 \pm 0.3) \times 10^4$ (9.3%)
T-4 Total	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^6$	$(4.7 \pm 0.1) \times 10^5$ (8.1%)	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$ (1.9%)	$(5.4 \pm 0.3) \times 10^4$ (9.3%)

^a S: suspended fraction and R: rhizosphere fraction.^b Percentage of the number of total culturable bacteria / the number of aromatic compound-degrading bacteria.

Table 3. Summary of bacterial population and rhizosphere effect in each test system at the end of degradation test

Number of total culturable bacteria and aromatic compound-degrading bacteria (CFU/flask)				Rhizosphere effect ^c (The bacterial number in rhizosphere system/ the bacterial number in non-rhizosphere system)		
Total culturable bacteria		Aromatic compound-degrading bacteria (% of aromatic compound-degrading bacteria) ^b		Total culturable bacteria	Aromatic compound-degrading bacteria	
Test						
Phenol degradation	T-1	Total ^a	2.3×10 ¹⁰	1.4×10 ¹⁰ (61.7%)	2.4 ^d	2.0 ^d
		S	(8.7±1.2)×10 ⁹	(4.4±0.9)×10 ⁹ (50.5%)		
		R	(1.4±0.1)×10 ¹⁰	(9.6±1.1)×10 ⁹ (68.6%)		
	T-2	Total	(9.6±1.9)×10 ⁹	(6.9±1.0)×10 ⁹ (71.9%)		
	T-3	Total ^a	4.1×10 ⁸	2.8×10 ⁸ (51.2%)	14 ^e	85 ^e
		S	(2.2±0.2)×10 ⁸	(1.3±0.1)×10 ⁸ (59.1%)		
		R	(1.9±0.2)×10 ⁸	(1.5±0.1)×10 ⁸ (78.9%)		
	T-4	Total	(2.9±0.1)×10 ⁷	(3.3±0.4)×10 ⁶ (11.4%)		
Aniline degradation	T-1	Total ^a	2.1×10 ¹⁰	4.3×10 ⁹ (20.5%)	2.3 ^d	4.9 ^d
		S	(9.0±1.1)×10 ⁹	(1.6±0.1)×10 ⁹ (17.8%)		
		R	(1.2±0.1)×10 ¹⁰	(2.7±0.1)×10 ⁹ (22.5%)		
	T-2	Total	(9.0±1.2)×10 ⁹	(8.8±1.4)×10 ⁸ (9.8%)		
	T-3	Total ^a	3.2×10 ⁸	4.2×10 ⁷ (13.1%)	15 ^e	18 ^e
		S	(1.8±0.1)×10 ⁸	(2.0±0.2)×10 ⁷ (11.1%)		
		R	(1.4±0.1)×10 ⁸	(2.2±0.2)×10 ⁷ (15.7%)		
	T-4	Total	(2.1±0.2)×10 ⁷	(2.4±0.2)×10 ⁶ (11.4%)		
2,4-DCP degradation	T-1	Total ^a	6.8×10 ⁹	6.0×10 ⁸ (5.7%)	1.2 ^d	1.0 ^d
		S	(5.6±0.7)×10 ⁸	(8.8±0.9)×10 ⁶ (1.6%)		
		R	(6.2±0.1)×10 ⁹	(5.9±0.2)×10 ⁸ (9.4%)		
	T-2	Total	(5.6±0.2)×10 ⁹	(5.8±0.8)×10 ⁸ (10.4%)		
	T-3	Total ^a	2.0×10 ⁸	1.8×10 ⁷ (9.1%)	22 ^e	55 ^e
		S	(1.0±0.1)×10 ⁸	(8.8±0.7)×10 ⁶ (8.8%)		
		R	(1.1±1.6)×10 ⁸	(9.2±0.5)×10 ⁶ (9.4%)		
	T-4	Total	(8.9±0.9)×10 ⁶	(3.3±0.5)×10 ⁵ (3.7%)		

^a S: suspended fraction and R: rhizosphere fraction.^b Percentage of the number of total culturable bacteria / the number of aromatic compound-degrading bacteria.^c Ratio of the number of bacteria in rhizosphere system (T-1 or T-3) / the number of bacteria in non-rhizosphere system (T-2 or T-4).^d Ratio of the number of bacteria in T-1 / T-2, which means rhizosphere effect on rhizobacteria and pond bacteria.^e Ratio of the number of bacteria in T-3 / T-4, which means rhizosphere effect on pond bacteria.

3.4. ボタンウキクサの根圏が持つフェノール分解促進機能の長期的安定性

ボタンウキクサ根圏が持つ有機化学物質分解能の長期的安定性を調べるため、ボタンウキクサのフェノール馴養栽培(21日間)と脱馴養栽培(14日間:21-35日目)を連続して行い、フェノール分解能の変化とボタンウキクサ根圏のフェノール分解菌数の挙動をモニタリングした。フェノール濃度の変化をFig. 7に示す。馴養を開始した1日目は緩やかにフェノールの分解が進み、24時間で約30%のフェノールが分解された。2日目にはフェノール分解速度が上昇し、24時間で80%以上フェノールが分解され、3日目にはさらにフェノールの分解が速まり18時間以内に全てのフェノールが分解された。その後の馴養栽培期間中は、3日目の結果と同等の高いフェノール分解速度が確認された。21日間の馴養栽培後に脱馴養栽培を7日間行った後でも(Day 28), 馴養時とほぼ同程度の速やかなフェノールの分解が確認され、14日目(Day 35)においても若干速度は低下したものの24時間以内に全てのフェノールが分解された。

さらに、分解実験をもとに算出したボタンウキクサ1株あたりのフェノール分解能とボタンウキクサ1株あたりに生息しているフェノール分解菌数の変化をFig. 8に示した。フェノール馴養栽培が進むにつれ、ボタンウキクサ根圏に生息するフェノール分解菌数の増加とともにボタンウキクサ根圏のフェノール分解能が向上していく傾向が見られた。分解実験を開始してから、3日目においてボタンウキクサ根圏には約 3×10^9 CFU plant⁻¹のフェノール分解菌が保持されていることが確認され、約0.9 mg-phenol h⁻¹ plant⁻¹の高い分解能を示した。その後、21日目までボタンウキクサ根圏は多くのフェノール分解菌を保持し、高いフェノール分解能を維持することが確認された。馴養期間を終え、脱馴養栽培を14日間行ったボタンウキクサ根圏(day 35)においても約 2×10^9 CFU plant⁻¹のフェノール分解菌が保持されていることが確認され、約0.7 mg-phenol h⁻¹ plant⁻¹の高い分解能を示した。

このようにフェノールの馴養過程において、ボタンウキクサの根圏ではフェノール分解菌の集積によりフェノール分解能が向上し、一旦獲得したフェノール分解能は選択圧がなくなった脱馴養期間においても比較

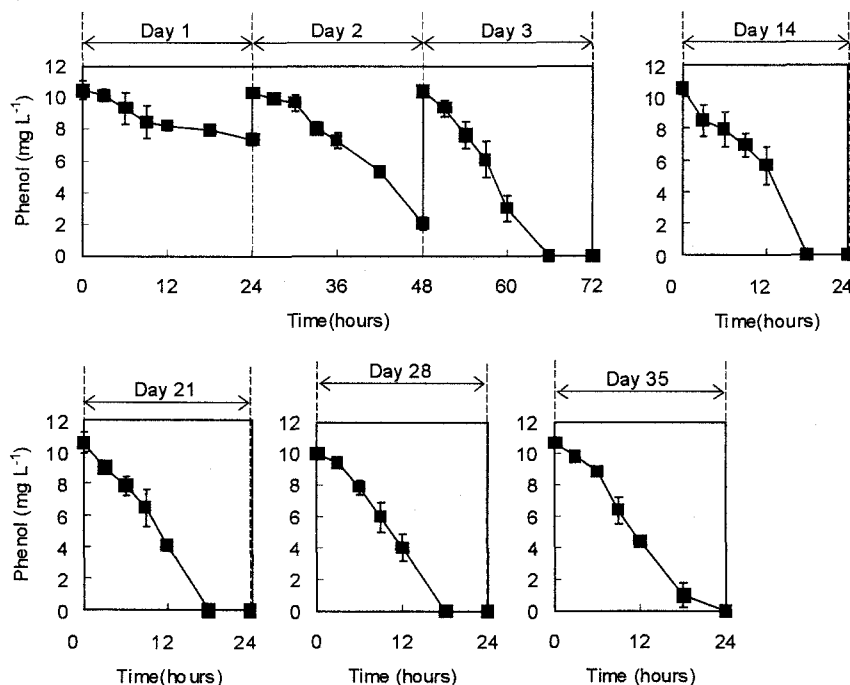


Fig. 7. The degradation of phenol in the rhizosphere of *P. stratiotes* in 1 day-cycle sequencing batch mode (HRT=1 day) during phenol acclimation mode (between days 1 and 21) and following phenol deacclimation mode (between days 21 and 35). Error bars represent 95 % confidence intervals.

的長期に渡って安定していることが確認された。従って、根圏の浄化能力を強化させる手法として馴養操作が有効であることが示された。

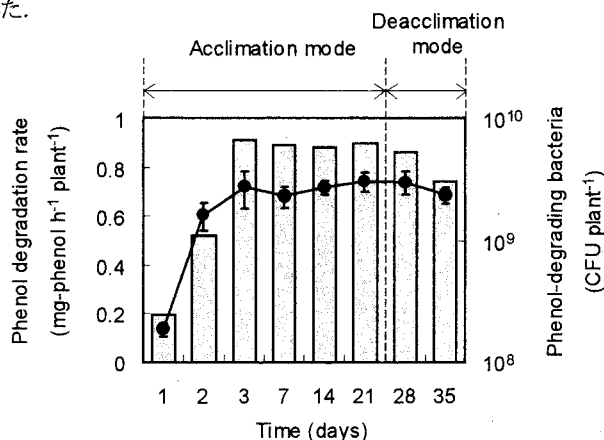


Fig. 8. The behavior of the number of phenol-degrading bacteria (●) and corresponding the phenol degradation rate (bar graph) in 1 day-cycle sequencing batch mode (HRT=1 day) during phenol acclimation mode (between days 1 and 21) and following phenol deacclimation mode (between days 21 and 35). Error bars represent 95 % confidence intervals.

4. まとめ

本研究では、水生植物ボタンウキクサの根圏が持つ芳香族化合物の分解促進機能を確認することを試みた。その結果、ボタンウキクサは芳香族化合物分解菌を含む微生物の増殖を促進する機能(根圏効果)を有することが確認された。また、ボタンウキクサは根圏に酸素を輸送することにより微生物の分解活性を促進する機能を有していることが確認された。さらに、ボタンウキクサ自身による芳香族化合物の除去機能があることが示され、これら複数の有機化学物質の浄化促進機能によりフェノール、アニリンおよび2,4-DCPの浄化が促進されることが明らかとなった。これら3物質は水環境中から頻繁に検出され、水生生物への悪影響が危惧されていることから、浄化技術の確立が求められている。本研究で得られた結果は、ボタンウキクサと根圏微生物の相互作用を利用した浄化技術が、その浄化技術として有効であることを示したものであり、現在の水環境中で問題となっている広範な有機化学物質の浄化に適用できる可能性を示している。

さらに、ボタンウキクサ根圏をフェノールで馴養することにより、根圏においてフェノール分解菌が速やかに集積されることが確認され、フェノール分解性能が向上することが確認された。ボタンウキクサ根圏ではフェノールの馴養に伴って一旦獲得した高いフェノール分解性能が、フェノールの選択圧がなくなった状態でも長期的に維持できたことから、ボタンウキクサと根圏微生物の浄化能力は長期的に安定であり、馴養操作により強化できることが示された。

謝辞

本研究の一部は、(財)クリタ水・環境科学振興財団平成16年度研究助成を得て実施したことを記し、謝意を表する。

参考文献

- 1) Kivaisi, A.K. 2001. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecol. Eng.* 16:545-560.
- 2) Jing, S.-R., Y.-F. Lin, D.-Y. Lee, and T.-W. Wang. 2001. Nutrient removal from polluted river water by using constructed wetlands. *Bioresour. Technol.* 76:131-135.

- 3) Miretzky, P., A. Saralegui, and A. F. Cirelli. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57:997-1005.
- 4) 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.
- 5) Shaw, L. J., and R. G. Burns. 2003. Biodegradation of organic pollutants in the rhizosphere. *Adv. Appl. Microbiol.* 53:1-60.
- 6) Chaudhry, C., 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.
- 7) Curl, E.A., and B. Truelove. 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin.
- 8) Somers, E., J. Vanderleyden, and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a lullaby beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30:205-240.
- 9) Federle, T.W. and B.S. Schwab. 1989. Mineralization of surfactants by microbiota of aquatic plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2092-2094.
- 10) Bankston, J.L., D.L. Sola, A.T. Komor, and D.F. Dwyer. 2002. Degradation of trichloroethylene in wetland microcosms containing broad-leaved cattail and eastern cottonwood. *Wat. Res.* 36:1539-1546.
- 11) Reddy, K. R., and W. F. DeBusk. 1985. Nutrient removal potential of selected aquatic macrophytes. *J. Environ. Qual.* 14:459-462.
- 12) Sooknah, R.D., and A.C. Wilkie. 2004. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecol. Eng.* 22:27-42.
- 13) Kengne, I.M., F. Brissaud, A. Akoa, R.A. Etame, J. Nya, A. Ndikeyfor, and T. Fonkou. 2003. Mosquito development in a macrophyte-based wastewater treatment plant in Cameroon (Central Africa). *Ecol. Eng.* 21:53-61.
- 14) 須藤隆一. 2004. 水生生物保線環境基準策定の背景と今後の展望. *水環境学会誌*. 27:8-13.
- 15) Hoagland, D.R., and D.R. Arnon. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Crit. Rev. Plant Sci.* 347:1-39.
- 16) Sei, K., K. Asano, N. Tateishi, K. Mori, M. Ike, T. Kohno, and M. Fujita. 2000. Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for monitoring microbial community based on PCR. *Japan J. Wat. Treat. Biol.* 36:193-204.
- 17) Amann, R.L., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- 18) Peters, N.K., and D. P. S. Verma. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:4-8.
- 19) Melo, J.S., S. Kholi, A.W. Patwardhan, and S.F. D'Souza. 2005. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process Biochem.* 40:625-628.
- 20) Reddy, K.R., E.M. D'Angelo, and T.A. DeBusk. 1989. Oxygen transport through aquatic macrophytes: the role in wastewater treatment. *J. Environ. Qual.* 19:261-267.
- 21) Pascal-Lorber, S., E. Rathahao, J.-P. Cravedi, and F. Laurent. 2004. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dechlorophenol in macrophytes. *Chemosphere* 56:275-284.
- 22) Singer, A.C., D.E. Crowley, and I.P. Thompson. 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* 21:123-130.