水生植物の根圏における界面活性剤分解作用とその強化

要　旨
1. はじめに
2. 実験方法および材料
2.1　実験材料
2.1.1　供試水生植物
2.1.2　供試界面活性剤
2.2　実験方法
2.2.1　根圏微生物の解析方法
2.2.2　浄化能に関する実験方法
3. 実験結果および考察
3.1　水生植物の根に付着する微生物の多様性
3.1.1　根に付着する微生物の生菌数
3.1.2　根に付着する微生物群集の解析
3.2　浮遊水生植物による界面活性剤分解ポテンシャルの評価
3.2.1　植生系による界面活性剤の分解除去
3.2.2　植生系が持つ界面活性剤分解除去能の評価
3.2.3　根付着微生物がもつ界面活性剤分解能
3.3　植生による浄化メカニズムの検討
3.3.1　根からの酸素供給能の検討
3.3.2　植生における浄化因子の検討
4. おわりに
参考文献

山梨大学　工学部　土木環境工学科　　森　一博・遠山　忠
清　和成・河野　哲郎

要旨

ウキクサとボタンウキクサの２種類の浮遊水生植物の根に付着する微生物の生菌数を測定したところ、単位栽培面積あたりウキクサで1.6×10^{10}CFU/㎡、ボタンウキクサでは2.6×10^{11}CFU/㎡もの非常に高密度に多様な微生物が付着していることがわかった。さらにこのような微生物群集は様々な界面活性剤を添加した環境にも適応し、生菌数や多様性を維持できることが分かった。つづいてこれら植生系による４種類の界面活性剤（LAS、AS、AE、NPE；初期濃度5mg-TOC/l）の分解を試みたところ、植生系がいったん馴化されれば何れの界面活性剤も速やかに分解され、水環境試料で報告されているような中間代謝物の蓄積も見られず、５日間以内にTOCとして85～100％の界面活性剤が除去された。またウキクサとボタンウキクサの浄化能力は同じ栽培面積で比較するとほぼ同じであった。このときのウキクサによる平均界面活性剤除去速度は、LASで108mg-TOC/d/㎡、ASで561mg-TOC/d/㎡、AEで160mg-TOC/d/㎡、NPEで98mg-TOC/d/㎡であった。さらに浄化のメカニズムを検討した結果、高密度に根に付着する微生物の分解ポテンシャルが馴化により高められることに加えて、植物の光合成にともなう酸素供給により根圏微生物の浄化作用が活性化されていることが明らかとなった。ここでは４種類の界面活性剤について検討したが、これ以外の有機化学物質にも水生植物根圏の浄化作用は有効に作用すると考えられる。本研究では根圏の浄化ポテンシャルが比較的短期間（２～４週間）の馴化栽培によって十分に高められ、植物の栽培条件を制御することで根圏微生物の浄化作用を活性化できることが示された。今後より生分解性の低い難分解性物質に対しては、根圏に適した分解微生物の根圏への導入や植物を介した根圏活性化手法の確立が望まれる。

1.　はじめに

水環境に流入する汚濁、汚染物質（窒素・燐などの栄養塩や有機物質）への対策手法の一つとして、植物を利用した植生浄化法が知られる。栄養塩の吸収に加えて、植物の根が浄化微生物の付着担体となるため易分解生の有機物（BOD）の除去にも有効である[1)～3)]。水生植物を利用した植生浄化法は、マイルドながら低コスト・低エネルギーでの浄化効果が期待でき、栄養塩による内部生産の抑制を図る必要からも植生浄化法が見なおされている。一方、汚染土壌の修復では植物と根圏微生物の作用により汚染物質を吸収・分解させるファイトレメディエーション技術[4)、5)]が注目されている。この場合、無機栄養塩や重金属に限らず、難分解性のものを含む油、農薬、溶剤といった様々な有機化学物質が浄化の対象物質となっている。しかし、残念ながら水生植物を中心とした植生（根圏を含めて）がどの程度難分解性の有機化学物質の分解に寄与するのかは明らかではない。近年使用される化学物質は生分解性や毒性が検討され、残留性の高い化学物質による環境汚染の問題は改善されつつある。しかし、水環境には様々な生理活性を有する物質が流入しており、近年クローズアップされた内分泌撹乱化学物質のように新たな課題も生じており、依然として化学物質による環境への負荷は大きいものと考えられる。生態系への影響を低減し水質の安全性を高めるためには、水域における有害化学物質の浄化技術が重要となろう。そこで、水生植物を活用した植生浄化法が栄養塩や易分解性有機物の除去能に加え、有害化学物質の除去に効果を示せば、水域の保全に資するところが大きいと考えられる。本研究では、水質浄化への利用が検討されている２種類の浮遊水生植物と日常生活や産業での使用量が多い４種類の界面活性剤を材料に、根と周辺部（以下根圏とする）における化学物質分解能力とメカニズムの解明を試みた。最初

に有機化学物質の分解・除去で主要な役割を演じると考えられる根圏微生物の数と多様性について基礎的検討を加えた後、様々な条件下で植生による４種類の界面活性剤の分解・除去能を検討した。さらに、その作用を工学的に強化することの可能性を評価した。

2. 実験方法および材料

2.1 実験材料

2.1.1 供試水生植物

本研究では浮遊水生植物としてウキクサ（*Spirodela polyrhiza*）とボタンウキクサ（*Pista stratiotes*）を用いた。これらの植物は人工気象器内（25℃、6900lux、16時間照明/日）で液体肥料ハイポネックス（ハイポネックス ジャパン、N:P:K=5:10:5）を水道水で１万倍に希釈したもの１ℓを栽培水に用いて長期間前培養したものを用いた。なお、栽培水は３日に一度新しいものに取り替えた。また、必要に応じてウキクサを無菌化する場合には、ウキクサの冬芽を有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌した後、滅菌した栽培水で発芽させたものを用いた。根付着微生物の解析試験では、学内の池水あるいはHutner無機培養液[6)]を1/10の濃度に調整したものを、植生による分解試験や酸素供給試験には同じくHutner無機培養液1/10に希釈したものを用いた。また、植生系を界面活性剤に馴化させる場合には、栽培水に界面活性剤を最終的にTOCに換算して5mg/lとなるように徐々に添加しながら長期間（2～４週間）栽培した。

2.1.2 供試界面活性剤

本研究では植生系の馴化や分解試験に、陰イオン界面活性剤の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）とドデシルベンゼンスルホン酸（AS）、非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン$_{(10)}$ラウリルエーテル（AE）とポリオキシエチレン-4-ノニルフェニルエーテル$_{(平均重合度10)}$の４種類の界面活性剤を用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 根圏微生物の解析方法

根圏微生物群集の解析は、生菌数測定、分離微生物の生理試験[7)]、PCR-DGGE解析により行った。根に付着する微生物は、トリポリリン酸5mg/lの分散液中で撹拌することで分散液中に回収されるものを根との付着強度の弱いもの、さらに根をホモジナイザー（15000rpm、5～10秒）により破砕することで回収されるものを根に強く付着しているものとして回収し解析試験に供した。生菌数の測定は、1/10LB培地（ペプトン10g/l、酵母エキス5g/l、塩化ナトリウム10g/l、寒天17g/l、pH7.0）に希釈プレーティングし、25℃で３週間培養した後コロニーを計数することで行った。分離微生物の生理学的特徴づけは、細胞形態の観察、運動性の観察、グラム染色試験、好気・嫌気条件下での発育試験、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、O-F試験、芽胞形成試験により行い分離株のグループ分けを行った。PCR-DGGE解析に用いるDNAの調整は、根からの回収菌液から凍結融解、リゾチウム処理、並びにフェノール-クロロホルム処理を組み合わせたDNA回収法[8)]と、eubacteria検出用のユニバーサルプライ

マー（EUB-f-933GC（40塩基のGC-Clampを付加した）、EUB-r1387）によるTouch down PCR（熱変性94℃（1min）、アニーリング65 ～ 55℃（-0.5℃ /cycle）（1min）、伸長72℃（3min）を20サイクル、熱変性94℃（1min）、アニーリング55℃（1min）、伸長72℃（3min）を9サイクル、熱変性94℃（1min）、アニーリング55℃（1min）、伸長72℃（10min）を1サイクル）により行った。DGGEによる解析は、Dcode System（Bio-Rad）を用いて、変性剤濃度勾配（25%-45%:100% denature;7M urea、40%（vol/vol）formamide）をつけた6.0%（wt/vol）ポリアクリルアミドゲルを用いて0.5×TAEバッファー（20mM Tris、10mM acetic acid、0.5 mM disodium EDTA）中で電気泳動（60℃、200V、5h）することで行った。バンドの確認はエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射により行った。

2.2.2　浄化能に関する実験方法

植生による分解試験は、1 ℓ容のポリビーカー中で、先に示した栽培水1 ℓに界面活性剤を添加しウキクサ120株あるいはボタンウキクサ1株を植え付けて特にことわらない限り先に示した条件で栽培し、経時的に栽培液中のTOC、界面活性剤濃度および根圏の生菌数を測定して行った。界面活性剤の分析は、LASおよびASの場合はメチレンブルー活性（MBAS）を、AEおよびNPEの場合には非イオン界面活性剤とテトラチオシアン酸コバルト（Ⅱ）酸アンモニウムとの反応生成物（CTAS）を4-（2-ピリジアルアゾ）-レゾルシノール（PAR）による吸光光度法を用いて上水試験法[9)]に準じて測定した。なお、各界面活性剤の残存率は、界面活性剤を添加していない対象系と試験系との差から求めた。ウキクサの根から回収した微生物菌液による分解試験では、TOC阪大法[10)]に準じて、界面活性剤を終濃度で15mg-TOC/lとなるように添加した人工河川水180mlに30株の根から回収した微生物菌液20mlを植種し、暗条件で振盪培養（110rpm、25℃）し、経時的に人工河川水中のTOC濃度を測定した。TOC残存率の算出は植生による分解試験に準じた。酸素供給量の測定は、減圧下での超音波処理により溶存酸素濃度を低下させた栽培水900mlにウキクサを植え付けて溶存酸素の変化を測定した。溶存酸素濃度を低下させた栽培水を培養器に注ぎ、微小な穴をあけウキクサを合計100株植え込んでウキクサと穴との間隙をシリコングリースで埋めた蓋により密栓して、DO計により栽培水中の溶存酸素濃度を測定した。なお、培養液中の溶存酸素濃度を一様にするために、マグネットスターラーを用いて緩やかに撹拌した。植物体による根圏への酸素供給速度は、蓋にあけた穴に根を切り取り葉部のみをかぶせてシリコングリースで間隙を埋めた対象系と試験系との溶存酸素濃度の差から求めた。

3.　実験結果および考察

3.1　水生植物の根に付着する微生物の多様性

3.1.1　根に付着する微生物の生菌数

池水試料で栽培したウキクサとボタンウキクサの根に付着している微生物を回収し、生菌数を測定した。この結果、**表1**に示す通り、10^9 ～ 10^{10}CFU/g-dryrootもの多くの微生物が根に付着していることが明らかとなった。この値は根が長く（10 ～ 15cm）大きなボタンウキクサでは栽培水1m^3に分散している微生物とほぼ同量が、栽培面積1m^2内の植物体の根に付着している計算となる。また植物体が小さく根も短い（1 ～ 2cm）ウキクサにおいてもボタンウキクサの1/10量程度もの多くの微生物が根に付着していることがわかった。さらに、撹拌により根から回収されるもの（付着強度の弱いもの）と根の

表1　ウキクサとボタンウキクサの根に付着する微生物の生菌数

植物種	根に弱く付着	根に強く付着
ウキクサ	1.1×10^{10}	1.4×10^{9}
ボタンウキクサ	6.3×10^{9}	1.8×10^{9}

（単位：CFU/g-dry root、池の水の生菌数：1.8×10^{5}CFU/ml）

破砕処理により回収できるもの（付着強度の強いもの）の生菌数を比較すると、いずれの植物においても80～90%ほどは根に弱く付着しており、強く付着しているものはわずかであった。単位栽培面積中の植物体の根に付着している微生物数は、ウキクサで1.6×10^{10}CFU/㎡、ボタンウキクサでは2.6×10^{11}CFU/㎡となった。

3.1.2　根に付着する微生物群集の解析

ウキクサの根から回収した微生物菌液を生菌数測定と同様の寒天培地に植種したところ、多種類のコロニーが得られた。これらを生理試験に供してグループ分けを行い､付着強度の強いもの（24コロニー、5グループ）と弱いもの（26コロニー、10グループ）について、各グループの個体数からシンプソンの多様性指数[11)]を算出すると、それぞれ3.1と5.8となり、付着強度の弱いものの方が多様性に富むことが示唆された。つづいて、このウキクサを長期間NPEに馴化させた後に同様にコロニーを付着強度の強いもの（70コロニー、10グループ）と弱いもの（46コロニー、4グループ）について分離し多様性を評価したところ、多様性指数は3.3と2.8となり馴化により付着強度の弱いものでは多様性が減少していたが､付着強度の強いものでは多様性が維持されていた。またこのとき､生菌数の減少は見られなかった。これらの結果から、根には多様な微生物が付着していることが明らかとなり、NPEのような比較的難分解性で生態毒性が危惧される有機化学物質存在下でも、多様性が一部減少するものの、多くの微生物が存在することが示された。

そこで、根圏微生物群集の界面活性剤への応答をPCR-DGGE法により検討した。池の水で長期間栽培したウキクサをHutner無機培養液およびこれにLAS、AS、AE、NPEをそれぞれ単独に添加した培養液で長期間馴化栽培した。馴化開始とともに根に付着する微生物群集のDNAバンドの位置と数が変化し、馴化栽培３週間後には**図1**のように界面活性剤の有無や種類によりバンドパターンが異なり、各系で異なる微生物群集が形成されたことが示された。一方、いずれの系においても観察されるバンドがあったことから、ここで検討した条件下では普遍的に根に付着している微生物の存在も示された。

以上の検討より、ウキクサの根には高密度に多様な微生物が生息しており、様々な界面活性剤に適応した微生物群集が形成されることが示された。一般に、構造が複雑な化学物質の無機化には様々な微生物の異化や共代謝が関与するため、そのような物質の浄化には多様性に富む従属栄養微生物の存在が望ましい。既往の報告により農薬や溶剤に汚染された土壌の浄化に植物と根圏微生物からなる根圏が効果的であることが示されている[12)～16)]。しかし水生植物による有機化学物質の浄化について詳細な報告は少ない。そこで以降の項では、これら根付着微生物と植物体からなる根圏が界面活性剤にいかなる浄化能力をもつのかと、これを工学的に強化することの可能性を検討した。

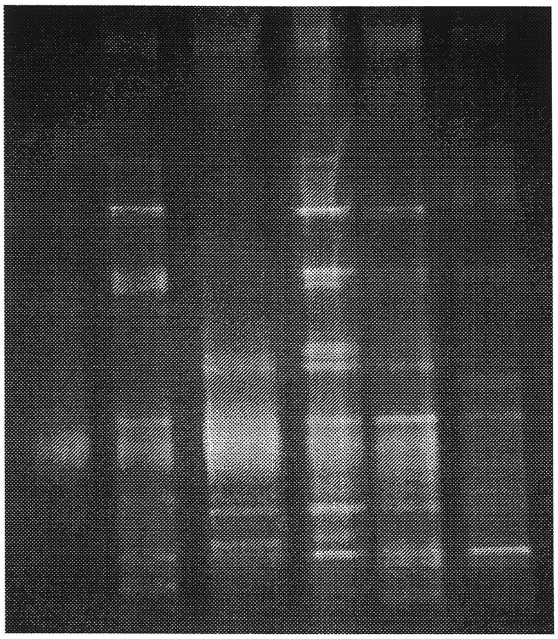

図１　各界面活性剤で馴化した根付着微生物のPCR-DGGEバンドパターン
①：池の水で栽培したもの　②：Hunter培養液で栽培したもの
③：LAS添加Hunter培養液で馴化したもの　④：AS添加Hunter培養液で馴化したもの
⑤：AE添加Hunter培養液で馴化したもの　⑥：NPE添加Hunter培養液で馴化したもの

3.2　浮遊水生植物による界面活性剤分解ポテンシャルの評価

3.2.1　植生系による界面活性剤の分解除去

ウキクサおよびボタンウキクサ植生系がもつ界面活性剤分解除去能を評価するため、界面活性剤で十分に馴化した植物を予め滅菌しておいた１ℓの界面活性剤含有培養液に植え付け分解試験を行った。なお、植物を栽培することで培養液中の無機栄養塩が減少しウキクサの生育を適正に保つことが困難となるので、実験期間は５日間とした。**図2**にウキクサを用いた実験の結果を示した。なお、別途無菌ウキクサを植え付けて行った微生物を含まない試験系ではいずれもTOC、CTASは減少しなかった。しかしLASとASについてはMBAS値のみそれぞれ25%、11%の減少が確認された。界面活性剤を含まない系で前栽培した非馴化のウキクサを用いた系では、ASを除いて培養液中のTOCの減少が非常に緩やかで５日の試験期間内での除去率は20～40%であった。LASの場合、実験開始直後よりMBAS値は速やかに減少していることから、難分解性の中間代謝物の蓄積が示唆された。AEおよびNPEではCTAS値の減少も極めて遅く初期分解が生じにくいことが示唆された。一方、長期間各界面活性剤で馴化したウキクサを用いた系では、いずれの界面活性剤も実験開始とともに速やかにMBASあるいはCTAS値並びにTOCが減少し、ほぼ100%の除去率が得られた。つづいて、ボタンウキクサを用いた同様の実験結果を**図3**に示した。ウキクサとほぼ同様の傾向を示し、非馴化の系ではASを除き実験期間内のTOC除去率は０～10%に留まった。一方馴化した植物を用いた系では速やかな初期分解（MBASやCTAS値の減少）とTOCの除去による完全分解が達成された。ただし、LASについてはMBAS値はほぼ除去されたがTOCの除去率は50%に留まった。これらの実験に際して、系内の生菌数を根に付着するものと培養液中に分散するものに分けて測定した。実験結果をウキクサについて**図4**にボタンウキクサについて**図5**

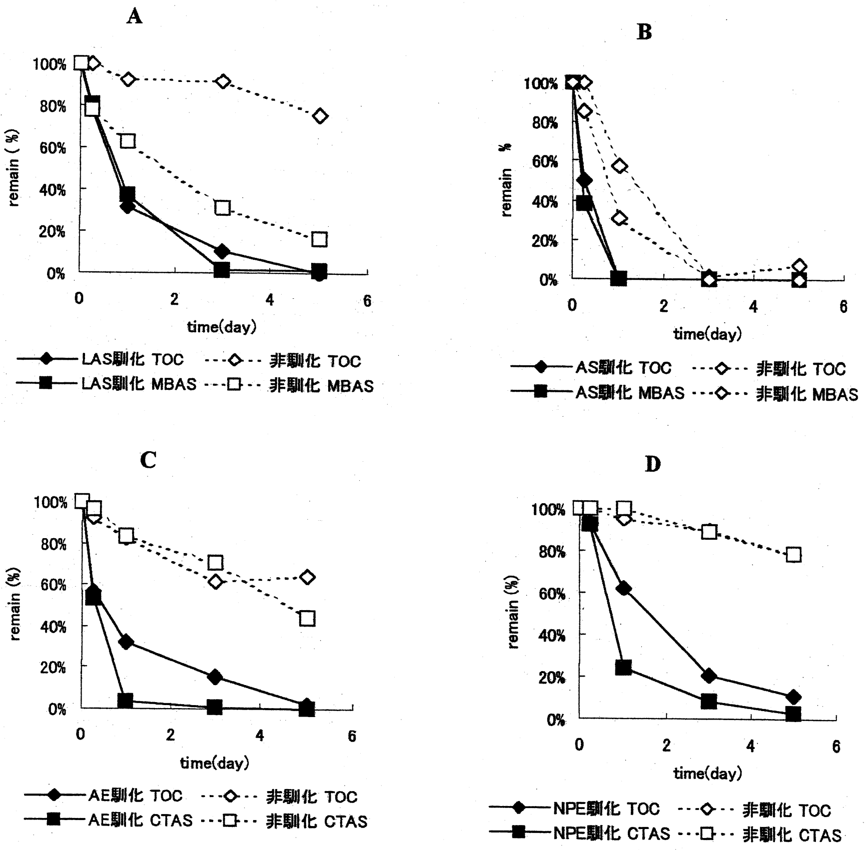

図2　ウキクサ植生系による界面活性剤の除去
A:LAS, B:AS, C:AE, D:NPE

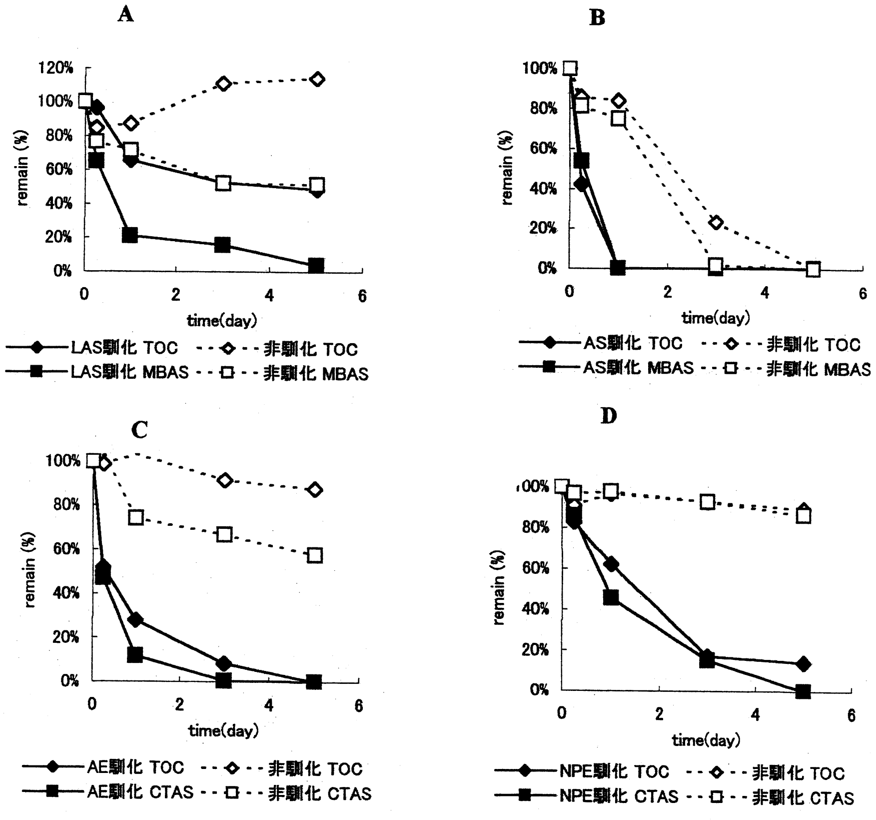

図3　ボタンウキクサ植生系による界面活性剤の除去
A:LAS, B:AS, C:AE, D:NPE

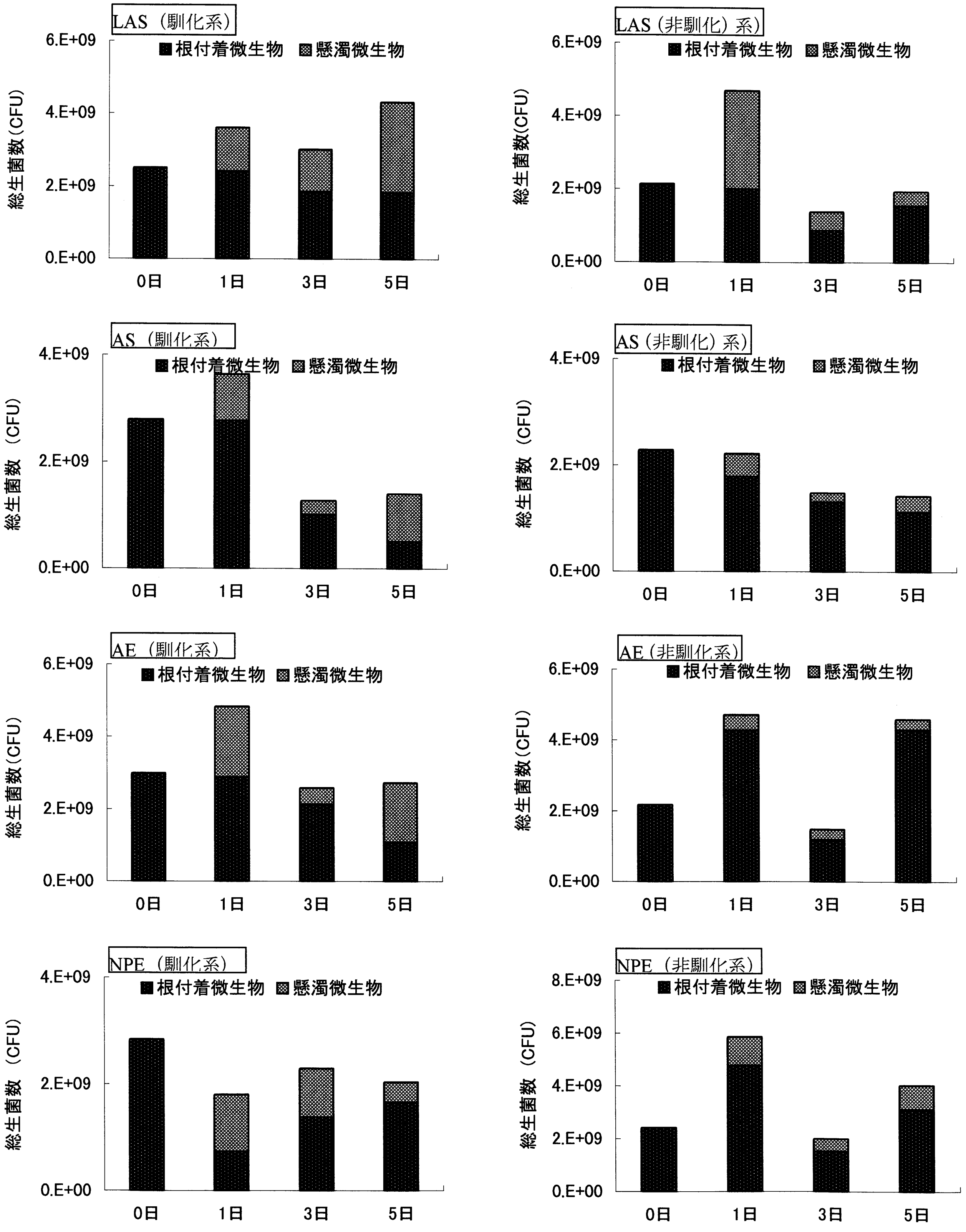

図４　界面活性剤分解に伴うウキクサ根圏における生菌数の経日変化

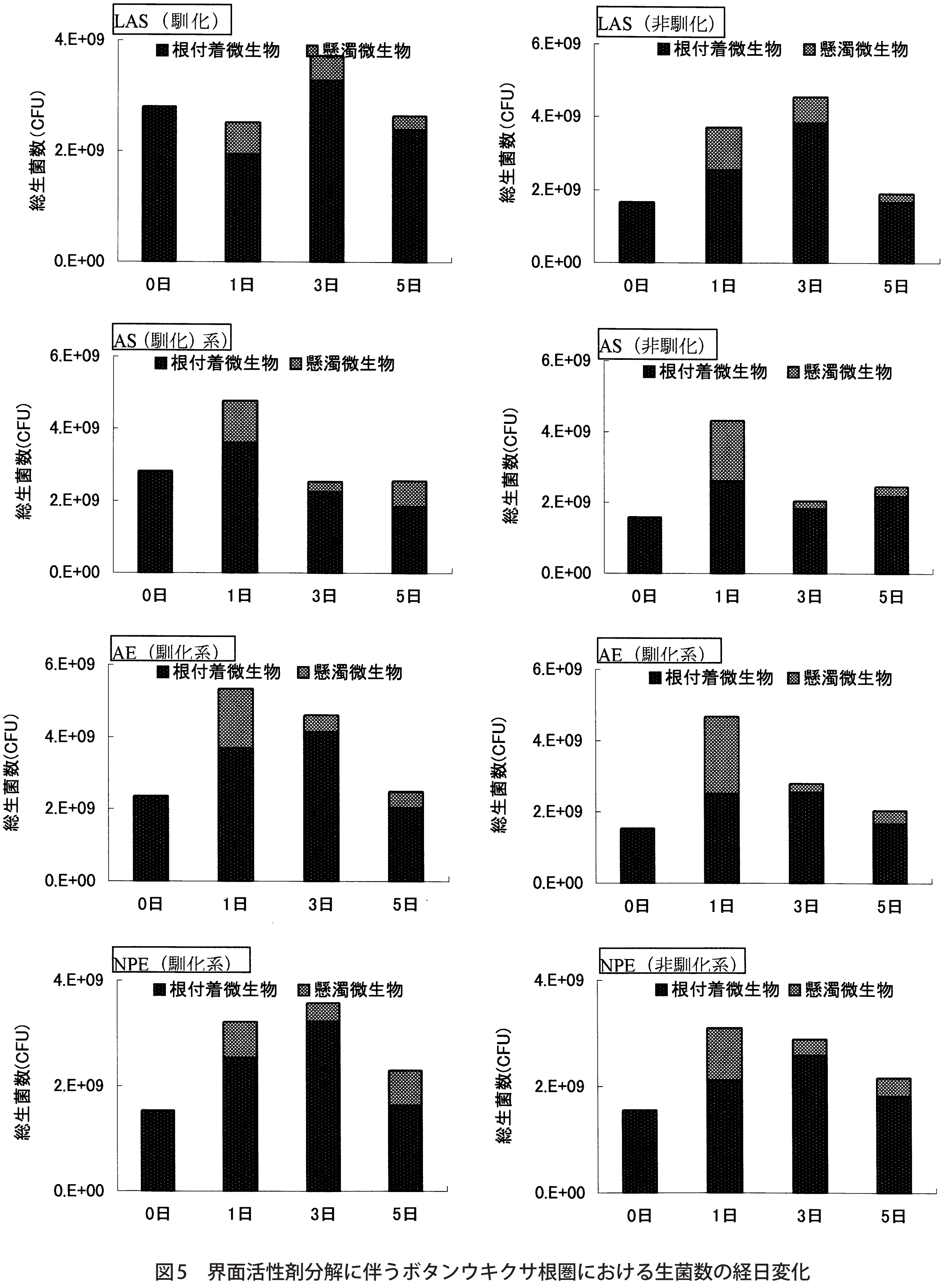

図5　界面活性剤分解に伴うボタンウキクサ根圏における生菌数の経日変化

に示した。これより、いずれの系も馴化の如何や界面活性剤の種類に関わらずほぼ同程度の生菌数が実験期間を通して確認され、実験開始後もその過半数が根に付着していることが明らかとなった。なお、Hutner培養液によって栽培したウキクサとボタンウキクサでは、根に付着している微生物の生菌数に違いは見られなかった。以上の結果から、両植物の植生系ともに界面活性剤への馴化が進めば根に付着している微生物の作用によりいずれの界面活性剤も速やかに分解除去できることが明らかとなった。

3.2.2　植生系が持つ界面活性剤分解除去能の評価

ウキクサおよびボタンウキクサ植生系がもつ界面活性剤除去能を、先に示した分解除去試験の結果より分解速度定数（1/day）、除去率（%）、および濃度減少期間の平均除去速度（mg/l/d）として求めた。分解速度定数の計算は、MBAS、CTASおよびTOCの減少を一次反応と仮定して、

$$-\frac{dC}{dt}=KC$$ （C:基質濃度、t:時間、K:分解速度定数）

とおき、実験結果より分解速度定数Kを求めた。MBASおよびCTASは初期分解の指標として、TOCは完全分解の指標として扱った。ウキクサとボタンウキクサの分解除去能を**図6**に、除去率を**図7**に示した。両植物ともに、非馴化の状態ではLAS、AE、NPEの除去率は低いが、馴化されれば初期分解とともに完全分解も高い除去率（85 ～ 100%）で達成されることが明らかとなった。またASは極めて生分解性がよく、非馴化の植物を用いても完全分解が達成された。馴化により分解除去能力が高まると、TOC分解除去速度定数は5 ～ 50倍に、平均TOC除去速度は2 ～ 8倍に向上し、高い除去速度を示すこ

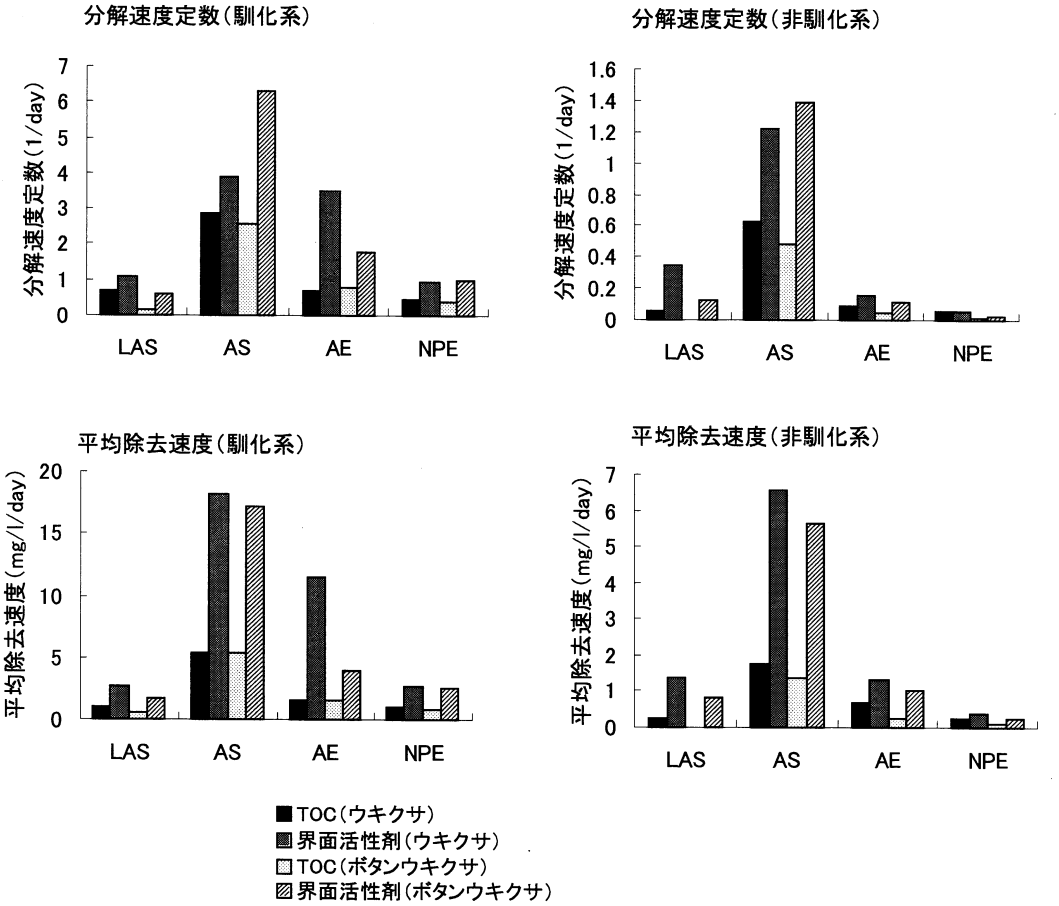

図6　各植生系の界面活性剤分解除去能

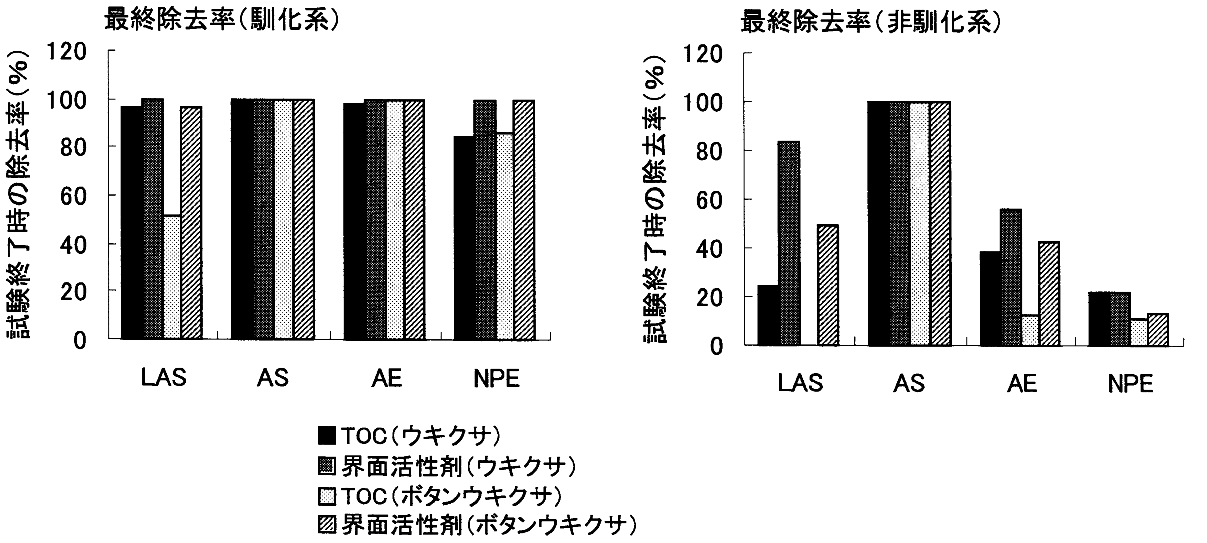

図7　各植生系における最終除去率

とが明らかとなった。このとき、環境中での生分解速度が他の2つにくらべて低いLASやNPE[17]を含めて供試界面活性剤の半減期はいずれも1～2日と短く、中間代謝物の蓄積も見られずに完全分解することから、植生系の浄化ポテンシャルの高さが示された。また、当初ボタンウキクサに比べて根が短く、単位栽培面積当たりの付着微生物数が1/10程度（池水試料で栽培時）のウキクサの方が浄化作用が低いことも予想されたが、**表2**に示すように両植物で単位栽培面積ではほぼ同じ浄化速度が得られ、微小な植物体ではあるが条件が整えばウキクサにもボタンウキクサに匹敵する微生物が付着し高い浄化作用を示すことが明らかとなった。

表2　ウキクサとボタンウキクサ植生系による単位栽培面積当たりの界面活性剤除去速度

		平均除去速度（mg/d/m^2）	
		TOC	界面活性剤
LAS	（ウキクサ）	I08	283
	（ボタンウキクサ）	57	175
AS	（ウキクサ）	561	1920
	（ボタンウキクサ）	563	1810
AE	（ウキクサ）	160	1210
	（ボタンウキクサ）	159	414
NPE	（ウキクサ）	98	285
	（ボタンウキクサ）	91	263

3.2.3　根付着微生物がもつ界面活性剤分解能

先の検討でウキクサおよびボタンウキクサ植生系がここで用いた４種類の界面活性剤に対して高い浄化能力を持つこと、無菌のウキクサは界面活性剤由来のTOC除去能を示さないこと、また根の表面には高密度に多様な微生物が付着していることが示された。よって、植生系における界面活性剤の除去を直接的に担っているのは根圏微生物がもつ有機物質の生分解能によるものと考えられた。そこで、根より分離・回収した微生物がもつ界面活性剤分解能を直接検討した。分解試験は、TOC阪大法に準じて根からの回収菌液を界面活性剤を添加した人工河川水に植種し、経時的にTOCを測定した。得られた結果を**図8**に示した。ASは何れの植物から回収した微生物も馴化の如何に関わらず速やかに分解し２～３日でAS由来のTOCが完全に除去された。LAS、AE、NPEについては、非馴化の植物体より回収した微生物による生分解は極めて遅く最も良かったLASにおいても２週間で40%のTOCが除去されるに留まった。一方、馴化した植物から回収した微生物菌液には高い分解能が確認され実験開始とともにTOCの減少が確認された。馴化によりTOC除去速度は２～７倍に向上した。このように、根から回収した微生物がもつ界面活性剤浄化能は植生系がもつ浄化能力と同様の傾向を示している。しかし、２週間の分解試験の結果20～30%のTOCが残存し、中間代謝物の残存が示唆された。ここで得られた分解速度と分解系に植種した生菌数の値から、生菌数あたりの界面活性剤由来TOC除去能力を求めると**表3**のようになった。ここでは、先に示した馴化した植生を用いた界面活性剤除去試験で得られた除去速度を生菌数で除して求めた値も比較のため示した。生菌数あたりの分解能力はウキクサの方がボタンウキクサに比べて高い値を示した。植生系としての能力は系内の分解に関与する微生物数によるところが大きいと思われるが、日本各地に見られるウキクサの由来の微生物の方が単位生菌数あたりでは高い浄化能力を示したことはおもしろい。植生系による分解試験と根から回収した微生物による分解試験では培養液の成分が異なるなど条件が異なる。しかし、ここで求めた根から回収した微生物の分解能力は、植物から供給される他の有機物等が微生物を活性化させることも考慮する必要はあるが、酸素や無機栄養塩が十分に供給される条件下での最大の分解ポテンシャルと考えることができる。植生系内では、根

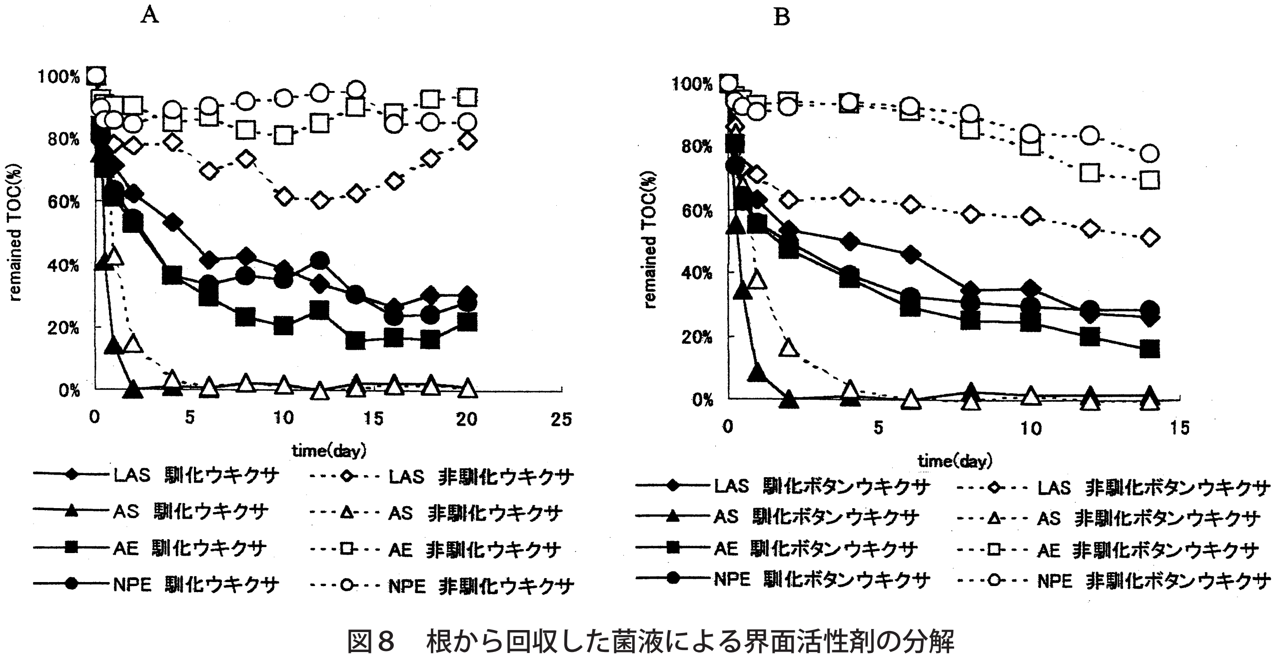

図８　根から回収した菌液による界面活性剤の分解
A：ウキクサ、B：ボタンウキクサ

表3　馴化したウキクサとボタンウキクサの根付着微生物が持つ界面活性剤除去能力

		平均除去能力（mg − Toc/l/d/CFU）	
		根回収微生物による分解試験	植生による分解試験
LAS	（ウキクサ）	7.46×10^{-10}	4.10×10^{-10}
	（ボタンウキクサ）	5.27×10^{-10}	1.96×10^{-10}
AS	（ウキクサ）	1.55×10^{-7}	1.92×10^{-9}
	（ボタンウキクサ）	1.99×10^{-8}	1.89×10^{-9}
AE	（ウキクサ）	9.97×10^{-9}	5.36×10^{-10}
	（ボタンウキクサ）	9.99×10^{-10}	6.45×10^{-10}
NPE	（ウキクサ）	8.44×10^{-9}	3.12×10^{-10}
	（ボタンウキクサ）	7.65×10^{-10}	5.68×10^{-10}

に付着あるいは根からはずれて根圏の水中に分散・懸濁している微生物が分解を担うことになるが、先の検討結果が示すようにその多くが根に付着している。このためこれら微生物による界面活性剤分解作用は、溶存酸素や基質の供給などが制限されるため、最大の分解ポテンシャルに比べて活性が低くなっていると推測される。そこで、分解ポテンシャルを十分に引き出すためには、植物体による根圏微生物の活性化が重要となる。つづく項では、植生における界面活性剤の浄化メカニズムを検討した。

3.3　植生による浄化メカニズムの検討

3.3.1　根からの酸素供給能の検討

根圏微生物による有機物の分解では酸素の供給が律速因子の一つとなる。そこで、溶存酸素濃度を低下させた培養液を入れた培養槽の蓋に穴を開け、無菌のウキクサの根を通して葉部と蓋との間隙をシリコングリスで埋めてから、溶存酸素濃度を経時的に測定した。明条件では溶存酸素濃度が速やかに上昇する一方、暗条件では溶存酸素濃度の上昇はわずかで光合成とともに根から根圏に酸素が供給されることが示された。明条件の結果より、実験装置の間隙を通した大気からの酸素の溶け込みを補正して、ウキクサ植物体から根圏への酸素供給速度を求めたところ、単位植物体あたり385mg-O_2/h/g root-d.w.、単位栽培面積あたり176mg-O_2/h/㎡の値が得られた。つづいて、根に微生物が付着している通常のウキクサを用いて明暗二つの条件を設定して生分解性の最も良いASの浄化試験を行い、TOCと溶存酸素濃度の経時変化を検討した。AS分解に伴う消費酸素量は、ASを添加していない系とASを添加した系の溶存酸素濃度の差から求めた。その結果、**表4**に示す結果が得られた。これより、明条件下で植物体から根圏部に酸素が供給されることによりAS除去速度と酸素消費速度が高まることが分かる。このように、根圏微生物による分解活性が植物根からの酸素供給により活性化されることが明らかとなった。

3.3.2　植生における浄化因子の検討

これまでの検討から、植生系では根圏微生物の分解作用と植物から根圏への酸素供給作用の結果、高い浄化作用を示すことが分かった。ここでは、根圏微生物のうち根に付着している微生物（以下、根付着微生物）と水中に分散・懸濁している微生物（以下、懸濁微生物）の分解作用および植物からの酸素

表4　ウキクサによる酸素供給がAS分解に与える影響

	TOC 除去速度（mg-TOC/l/h）	DO 消費速度（mg-O_2/l/h）
ウキクサ（明条件）	0.406	0.595
ウキクサ（暗条件）	0.204	0.203

供給作用が各界面活性剤の初期分解と完全分解にどの程度寄与するのかを、5つの条件下での分解試験により検討した。各条件で作用する浄化因子を**表5**に示した。

実験の結果、何れの界面活性剤も馴化した植生あるいは馴化した植生を栽培した培養液により速やかな初期分解とTOC除去による完全分解が見られた。各界面活性剤についての実験結果を**図9～12**に示した。つづいて、各浄化因子の影響を検討するため、先の検討と同様に分解速度定数Kを求めた。ここでは、各栽培条件で得られた分解速度定数Kを**表6**に示す6通りに比較することで浄化因子の影響を検討した。各界面活性剤について検討した結果を**図13～16**に示した。

表5　各栽培条件で作用する浄化因子

栽培条件	浄化因子
（1）ウキクサ植生系（明条件）	根付着微生物＋懸濁微生物の作用、酸素供給作用
（2）ウキクサ植生系（暗条件）	根付着微生物＋懸濁微生物の作用
（3）ウキクサ栽培後の培養液に無菌ウキクサを植え付けた系	懸濁微生物の作用、酸素供給作用
（4）ウキクサ栽培後の培養液に根付着微生物菌液を添加した系	懸濁微生物（根から回収した微生物を含む）の作用
（5）ウキクサ栽培後の培養液	懸濁微生物の作用

表6　浄化能の比較条件

比較条件	浄化因子
（1）$K_{(1)}$ ／ $K_{(5)}$	植生の効果
（2）$K_{(2)}$ ／ $K_{(5)}$	暗条件での根付着微生物の効果
（3）$K_{(4)}$ ／ $K_{(5)}$	根圏微生物数の効果
（4）$K_{(1)}$ ／ $K_{(3)}$	明条件での根付着微生物の効果
（5）$K_{(1)}$ ／ $K_{(2)}$	酸素供給作用の根圏微生物への効果
（6）$K_{(3)}$ ／ $K_{(5)}$	酸素供給作用の懸濁微生物への効果

K: 分解速度定数、（1）～（5）は栽培条件を示す

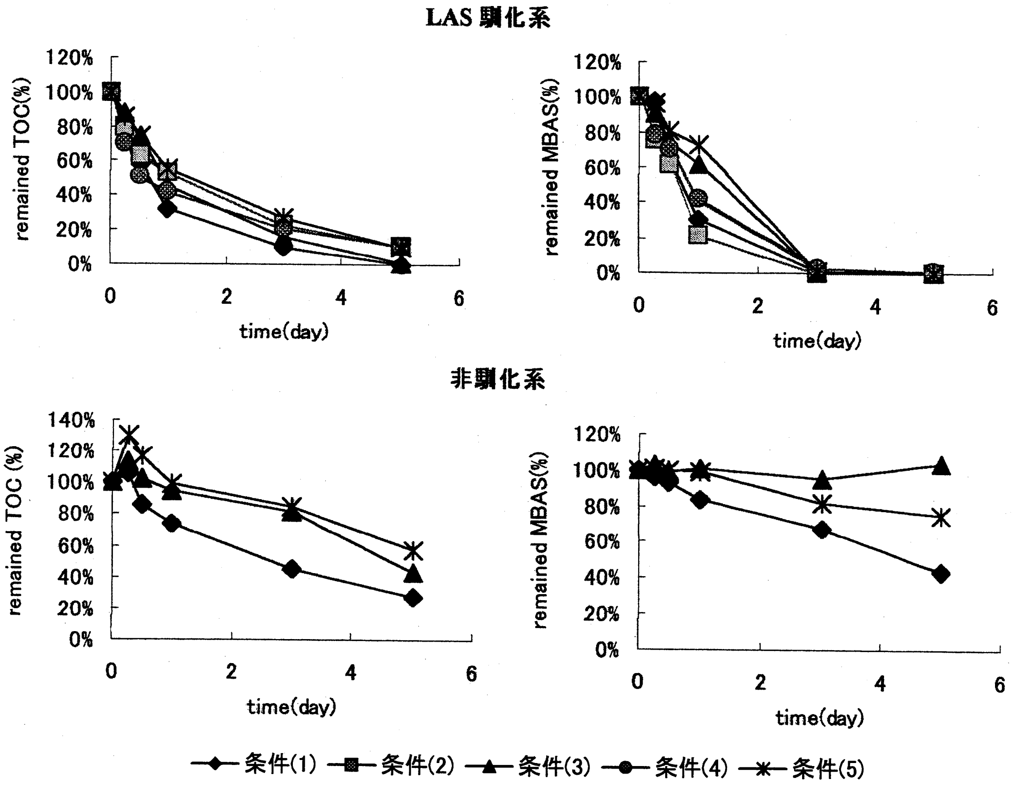

図9　各条件でのLASの分解

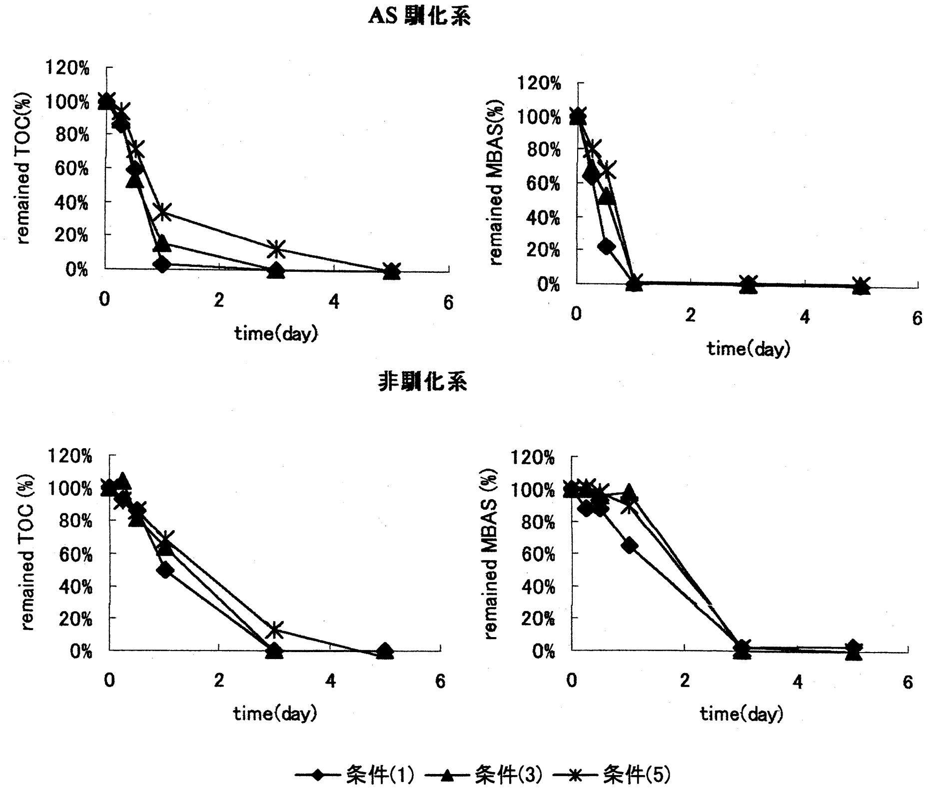

図10　各条件でのASの分解

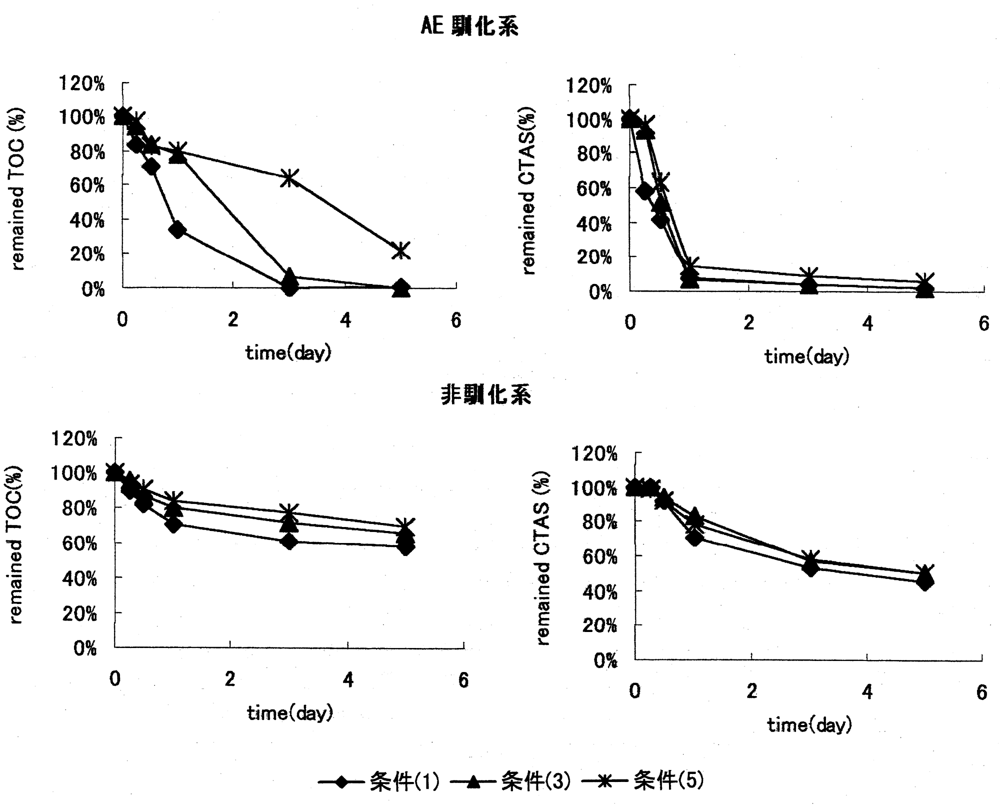

図11　各条件でのAEの分解

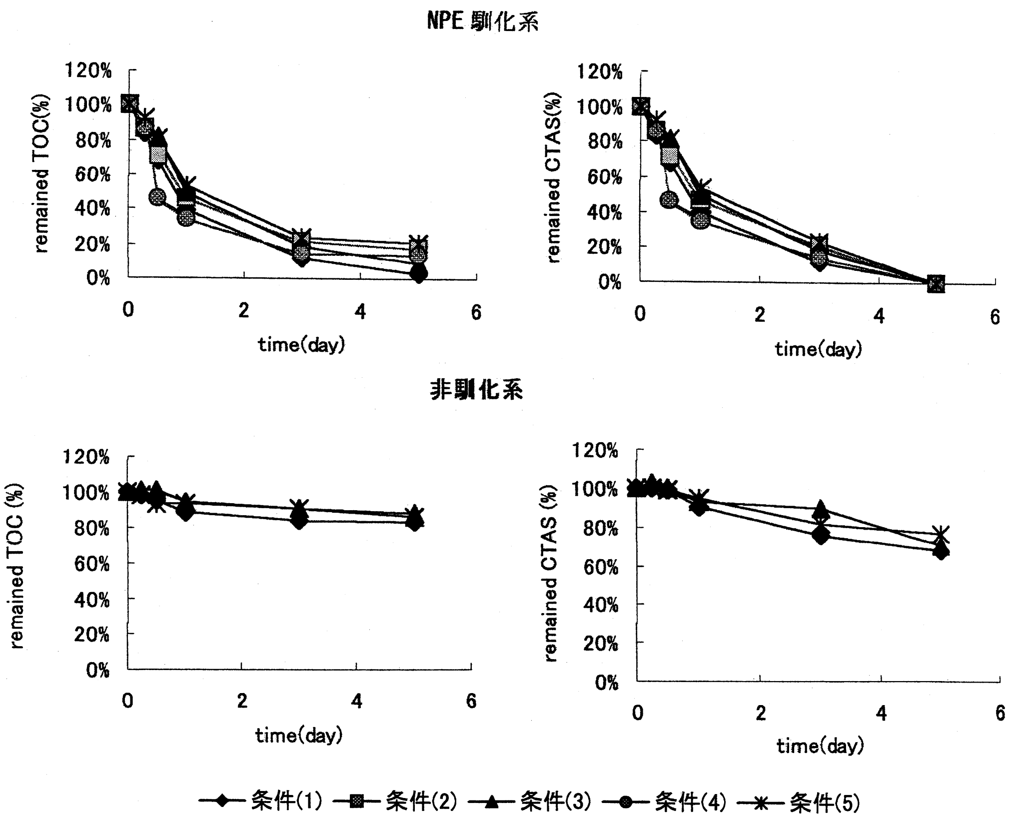

図12　各条件でのNPEの分解

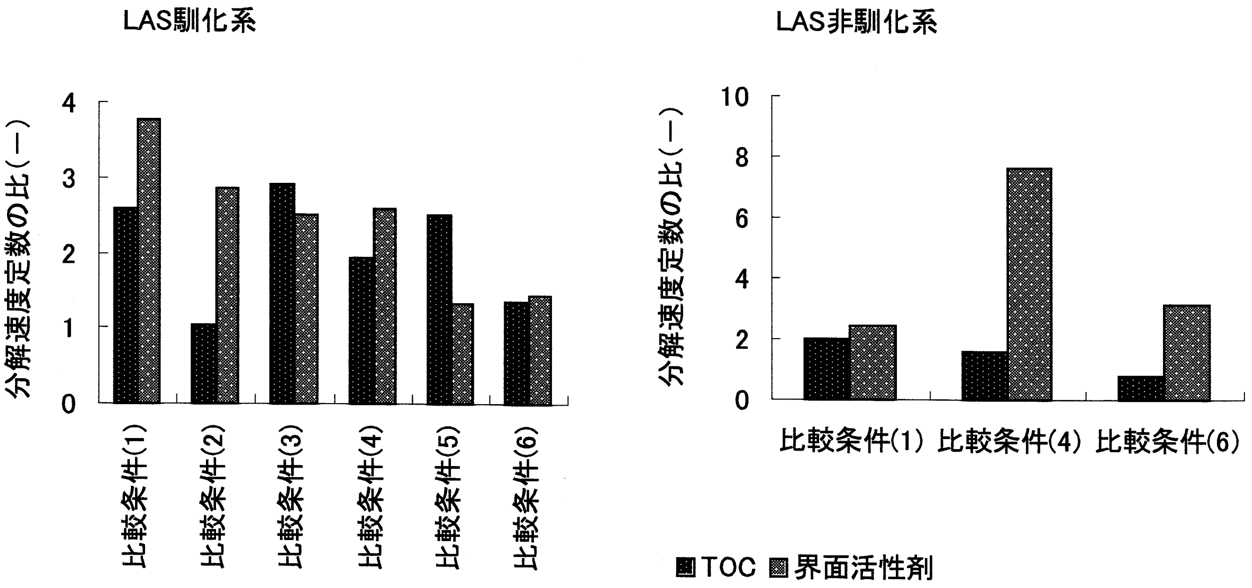

図13　LAS分解における各浄化因子の影響

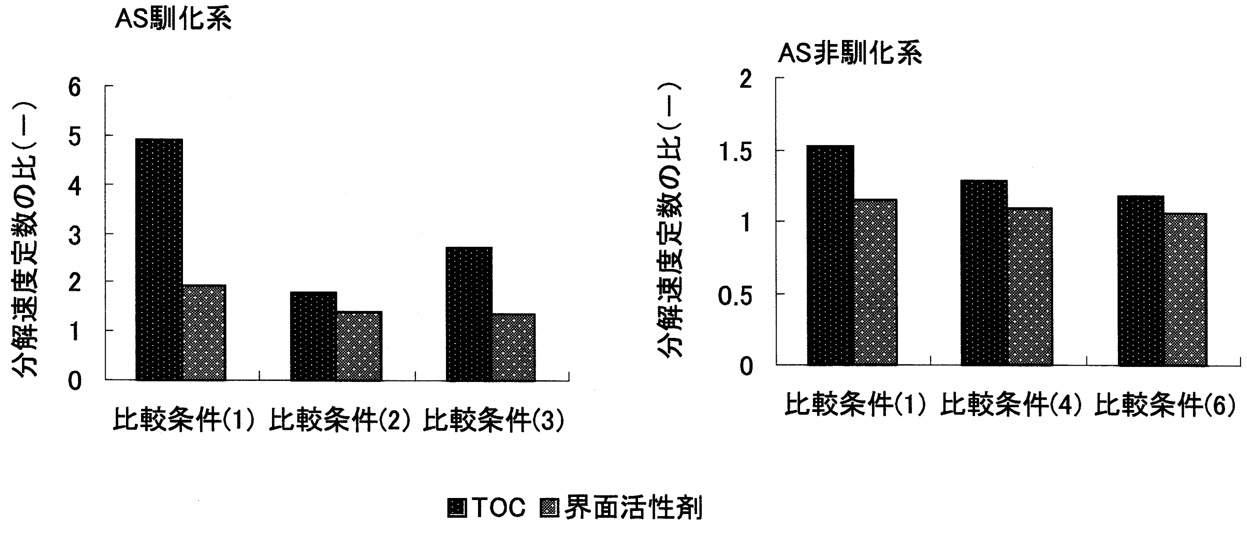

図14　AS分解における各浄化因子の影響

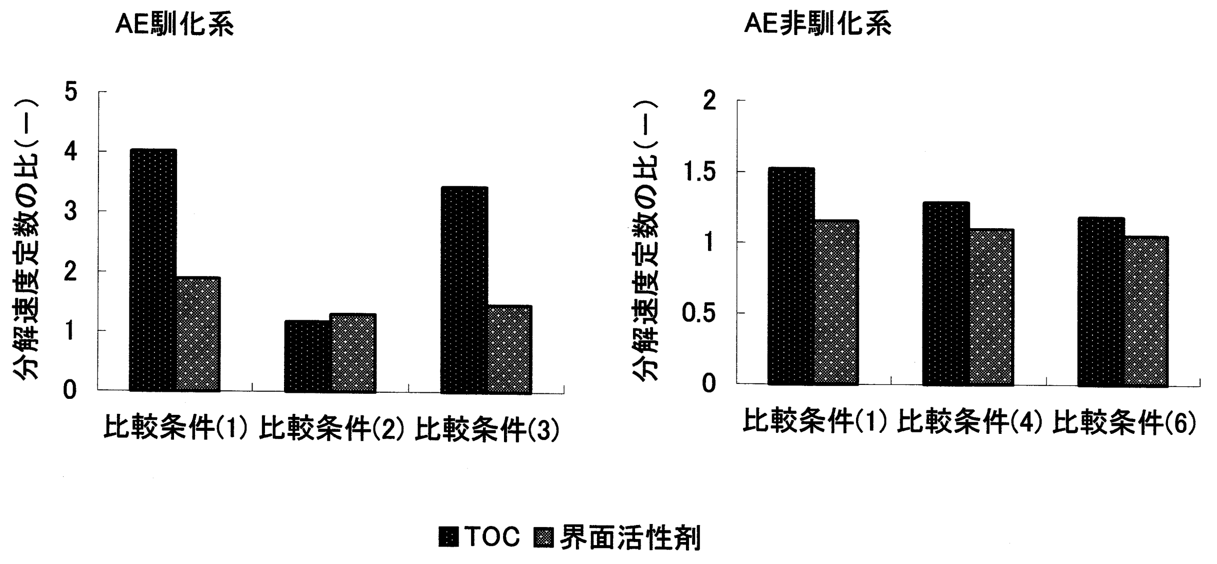

図15　AE分解における各浄化因子の影響

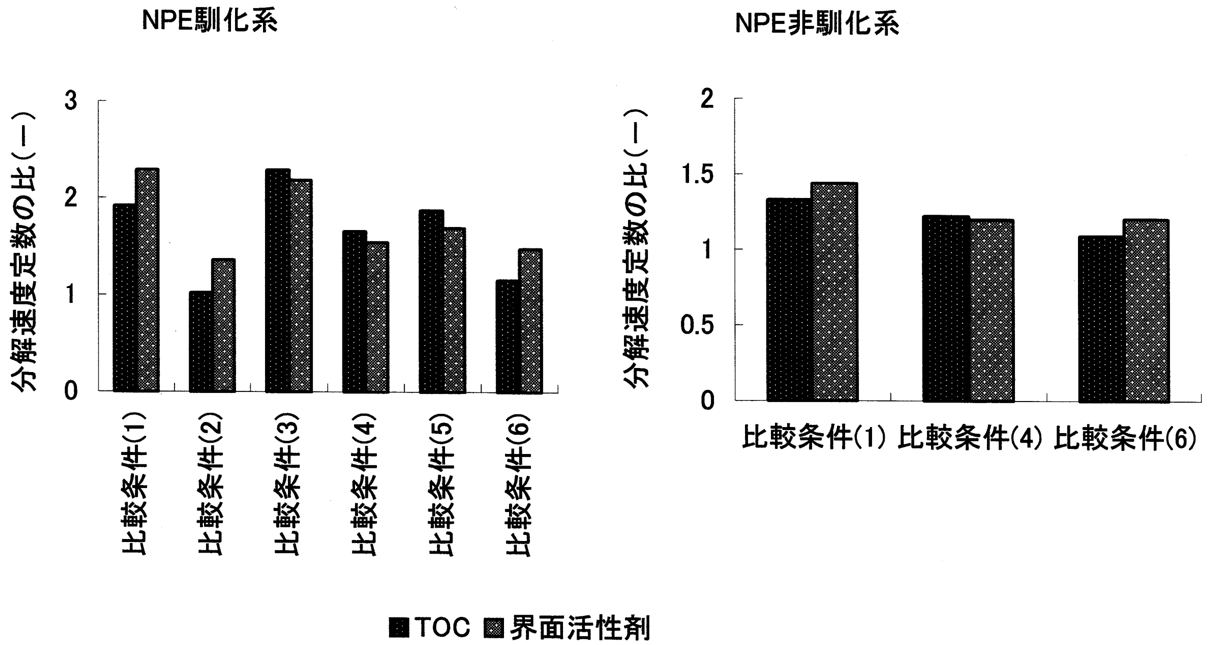

図16　NPE分解における各浄化因子の影響

図より、何れの界面活性剤の分解も槽内に植物体および根付着微生物が加わることで浄化能が高まることが明らかとなった。特に馴化系では、初期分解、完全分解ともに植生があることで生分解速度定数は２～５倍に上昇しており、その効果が高かった。酸素供給条件を同じにして根付着微生物の効果を比較すると、根付着微生物の存在により分解速度定数が１～２倍上昇した。一方、酸素供給作用の効果を見ても同様に浄化能の向上が見られ、特に馴化系では１～３倍の上昇が見られた。各界面活性剤について見ると、LASの初期分解では、植物による酸素供給作用よりも付着と懸濁の微生物数の効果が大きく影響していた。しかし、TOCを指標とした完全分解では微生物数とともに明条件での植物体からの酸素供給作用が分解を促進しており、特に、根付着微生物の作用は明条件における酸素供給により促進されることが明らかとなった。生分解性の良いASとAEでは、特に馴化系における完全分解に植生の効果が大きく表れ、酸素供給効果の重要性が示された。NPEの分解では、初期分解、完全分解ともに微生物数と酸素供能の影響を受けて分解能の向上が見られた。また、LASと同様に根付着微生物による浄化作用は明条件で活性化していることが明らかとなった。以上の検討から水生植物の根圏では懸濁微生物とともに根に付着している微生物が界面活性剤のような有機化学物質の分解に寄与しており、その活性は植物体が光合成を行うことにより活発化していることが明らかとなった。また、特に生分解性の悪いLASやNPEなど分解に様々な微生物が関与している物質では、分解に関与する微生物を十分に保持することが重要で、根に付着することで系内に高い微生物数が維持されることが植生系の利点の一つといえる。

4. おわりに

本研究では、ウキクサやボタンウキクサといった浮遊水生植物の根には非常に高密度に多様な微生物が付着していることを明らかにした。さらにこのような微生物群集は様々な界面活性剤を添加した環境にも適応し、生菌数や多様性を維持できることが分かった。またこのような特徴をもつ微生物群集を保持する植生では、いったん馴化が進めば何れの界面活性剤も速やかに分解され、水環境試料で報告されているような中間代謝物の蓄積も見られず完全分解に達していることが示唆された。そのメカニズムを検討した結果、高密度に保持されている根圏微生物の分解ポテンシャルが馴化により高められる上に、植物の光合成にともなう酸素供給によりその作用が活性化されていることが明らかとなった。ここでは４種類の界面活性剤について検討したが、多くの土壌植物根圏では様々な難分解性の農薬、溶剤、油の浄化に根圏が有効であることが示されており、ここで検討した界面活性剤以外の有機化学物質にも水生植物根圏の浄化作用は有効に作用すると考えられる。さらに、本研究では根圏の浄化ポテンシャルが比較的短期間（２～４週間）の馴化栽培によって十分に高められたことと、植物の栽培条件を制御することで根圏微生物の浄化作用を活性化できることが示された。このことから、より難分解性で浄化微生物の数が少ない場合には、根に付着し残存性に長けた微生物の中から様々な難分解性物質の分解菌を検索したり、あるいは遺伝子工学的手法を応用して育種できれば、水生植物の根圏に高機能な分解微生物を導入（オーグメンテーション）して工学的に根圏の分解ポテンシャルを高めることも可能である。また、植物自体の活性を制御することで、根圏の浄化作用を間接的に活性化（スティムレーション）することも有効であろう。そのためには、根圏微生物群集や植物と微生物の相互作用に関する詳細な知見が望まれる。

参考文献

1）藤田正憲,森本和花,河野宏樹,Silvana Perdomo,森一博,池道彦,山口克人,惣田訓:水質浄化に利用可能な水生植物データベースの構築. 環境科学会誌, 14,）,1-13（2001）

2）須藤隆一:生物処理の管理164エコテクノロジーの活用21.水,36-1,501,82-83（1994）

3）藤田正憲,森一博:富栄養化の防止.713-727. 新名惇彦,吉田一哉監修:植物代謝工学ハンドブック,エヌティーエス（2002）

4）森川弘道:ファイトレメディエーションの新展開.バイオンインダストリー,19,1,51-62（2002）

5）Salt D. E., Smith R. D., and Raskin I.:Phytoremediation. Annul. Rev. Plant Physiol.Plnat Mol. Biol.,49, 643-668（1999）

6）Hutner S. H.:Comparative physiology of heterotrophic growth. 417-446. In Loomis.W.E.（ed）,Growth and differentiation in plants. Iowa State College. Press, Ames（1953）

7）長谷川武治:微生物の分類と同定. 学会出版センター（1984）

8）Sei K., Sugimoto Y., Mori K., Maki H., and Kohno T.:Monitoring of alkane-degrading bacteria in seawater microcosm during crude oil degradation by PCR based on alkane-catabolic genes. Environmental Microbioloby（in press）

9）上水試験法2001年版,日本水道協会

10）Nasu M., Song S., Yamaguti N., Shimazu A., and Kondo M.:Effect of chemical compounds on microbial population in fresh water. Fresenius Environmental Bulletin 2,7-12（1993）

11）Simpson,E. H.: Measurment of Diversity. Nature163,688（1949）

12）Hsu T. S. and Bartha R.:Accelerated Mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, 37,1,36-41（1979）

13）Reddy B. R.,and Sethunathan N.:Mineralization of parathion in the rice rhizoshere. Applied and Environmental Microbiology, 45,3,826-829（1983）

14）Mandelbaum R. T., Wackett L. P., and Allan D. L.:Rapid hydrolysis of atrazine to hydroxyatrazine by soil bacteria. Environmental Science and Technology, 27,9,1943-1946（1993）

15）Yee D. C., Maynard J. A., and Wood T. K.:Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing Pseudomonas fluorescens strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. Applied and Environmental Microbiology, 64,1,112-118（1998）

16）Daane L. L., Harjono I., Zylstra G. J., and Haggblom M. M.:Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. Applied and Environmental Microbiology, 67,6,2683-2691（2001）

17）藤田正憲,森一博:化学物質の微生物分解-近畿の河川の生分解活性度-.日本水環境学会編: 日本の水環境5近畿編,169-176（2000）