【解説】

持続的環境浄化技術を拓く ウキクサと根圏微生物の共生系

山賀文子，鷺尾健司，森川正章

微生物活性を利用した環境浄化法は、地球への負荷が少ない技術として広く認知されている。しかし、実用的技術としては、有用微生物の現場での定着率の低さによるコスト高や浄化後に危惧される微生物の異常増殖や生態系の攪乱などの問題が常に指摘されてきた。近年、この問題を解決する一つの方向性として根圏微生物の活用が注目されている。植物の光合成作用と微生物の汚染物質分解活性をリンクさせるこの手法の一例を紹介するとともに、今後の可能性を展望する。

バイオレメディエーションの課題

生物は環境との相互作用の中で動的平衡を保ちながら生きてゆく宿命にある。また、生物間には直接あるいは間接的な共生関係が成立しているので、快適な地球環境は生態系の維持に欠かすことのできない根底条件である。2005年に発効した京都議定書もいよいよ今年（2008年）から5ヵ年間の第一約束期間に入り、温暖化防止策をはじめとする環境技術の開発は待たなしの急務となっている。

微生物を活用した環境浄化技術（狭義のバイオレメ

ディエーション技術）は環境負荷の少ない技術であるが、汚染現場で有効な微生物の細胞数とその活性をいかに持続させるかが実用の鍵である。つまり、実験室で検証された有効な微生物活性を発揮するためには、自然環境中で不足しがちな窒素化合物やリン酸塩、さらに汚染物質を好氣的に分解する場合には電子受容体としての酸素を外部から供給することが必要となる。ところが、これらの投入は、コストを高める要因となるばかりでなく、過剰な栄養塩類による、お呼びでない微生物の異常増殖および生態系の攪乱といった新たな二次的な汚染をひき起こすことが危惧される。また、原生動物などによる捕食を含めた土着微生物との生存競争による定着性の低さも無視することのできない問題である。つまり、栄養分や酸素を投入することなく、微生物を汚染現場に定着させその活性を持続的に発現させることができれば、より低コストで安全なバイオレメディエーション技術として広く普及することが期待される⁽¹⁾。

一方、植物を用いたバイオレメディエーション技術は特にファイトレメディエーション技術と呼ばれる⁽²⁾。たとえば、ファイトケラチンやメタロチオネインといった植物固有の含硫ペプチドおよび発達した維管束系は重金属や炭化水素類の吸着あるいは蒸散除去に有効であり、これらの活用はファイトレメディエーションの重要な方

Duckweed-Rhizobacteria Symbiosis that Develops Sustainable Remediation Technology
Fumiko YAMAGA, Kenji WASHIO, Masaaki MORIKAWA,
北海道大学大学院地球環境科学研究院

法であることが実証されている^(3, 4)。特にアブラナ科ゲンバイナズナ属 *Thlaspi caerulescens* などは亜鉛やカドミウムなどを高濃度に蓄積するためハイパーアキュムレーターと呼ばれ、これらの重金属汚染地への適用が検討されている⁽⁵⁾。ただ、植物体を媒介した環境浄化法は、適用範囲が植物体周辺に限られることと、その効果が認められるまでに長期間を要するため、微生物を利用した浄化法に比べて効率的とはいえない。しかし、植物を利用する最大のメリットは、太陽エネルギーを利用する経済性および環境適合性という点であり、成長の早いポプラ科植物による土壌汚染浄化、また湖沼の水質保全あるいは富栄養化対策としてホテイアオイやアシなど水耕植物の活用に関する取り組みも進んでいる。

根圏浄化技術の可能性

近年、微生物と植物双方のメリットを生かした技術、すなわち植物の根周囲に生息する微生物（根圏微生物）と植物の共生的関係を利用した“根圏浄化（リゾレメディエーション）”と呼ばれる浄化法が注目されている^(6, 7)。実は、ファイトレメディエーションのうちトリクロロエチレンや原油など有害有機物の分解や窒素化合物除去による環境浄化法の多くは根圏微生物の分解活性を利用したものである⁽⁸⁾。

根圏とは、「植物の根から影響を受ける土壌領域」と定義される（1904年ドイツ人科学者 Lorenz Hiltner による）。根圏は、根浸出液が微生物を活性化し、またこれら微生物も植物の栄養分摂取および健全性へ多大な影響を及ぼすなど、興味深い相互作用が存在する領域である。具体的にいうと、根の周囲 0.1 mm 程度の土壌領域が根圏であり、この領域では、植物体からアミノ酸、糖、有機酸といった二次代謝産物が供給され、これらは根圏微生物にとって豊富な栄養源となる。また、植物の優れた酸素輸送能のお蔭で、根圏には酸素も豊富に存在し、微生物の付着と生育および好氣的代謝反応が促進されやすい^(9~11)。一方、微生物から植物への作用として代表的なものとして、根圏微生物によるジベレリンなど植物成長ホルモンの分泌や、植物に利用できないかたちで土壌粒子に結合しているリン、窒素などを可溶化または固定することで植物へ栄養物質を供給することが第一にあげられる^(12~14)。第二に、根圏微生物が産生する抗生物質などの作用により、植物を病害微生物から防御することが知られている^(15~17)。このような作用を有する根圏微生物は PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) と呼ばれ、植物との共生関係について多くの研究がなされて

いる^(18, 19)。

このような植物根圏の活性をバイオレメディエーションへ適用し、より効率のよい浄化を目指す技術が根圏浄化である。クウェートの原油汚染砂漠で生育している土着植物の根圏を調べたところ、1 グラム当たり数億個もの原油分解細菌細胞が付着していた⁽²⁰⁾。また、陸生植物と特定の根圏細菌の組み合わせを用いてクロロニトロベンゼンやナフタレンを効率的に除去することに成功した報告例がある^(21~23)。芳香族化合物汚染浄化に関して、植物根圏ではポリフェノール類やフラボノイド類など多種の芳香族化合物が根から分泌されていることから、根圏はこれらの資化性細菌を集積しており、それらの働きにより類似構造をもつ芳香族化合物の浄化が効率よく行なえると考えられている⁽²⁴⁾。さらに、植物根に強く依存して生育する微生物であれば、外部から栄養塩や酸素を投入する必要もなく、汚染浄化後に植物体を根こそぎ除去すれば同時に微生物も除去されるので、残留微生物による二次汚染のリスクも低減できる。このように、根圏における植物と微生物の相利的な相互作用を活用することで、微生物や植物単独では解決できない課題を克服し、より持続的で二次汚染のリスクの低い安全な環境浄化法の開発が期待できる。

筆者らは、有用細菌群をバイオフィーム化させることで汚染現場など過酷な自然環境中における定着率を向上させることができるのではないかと考えている⁽²⁵⁾。バイオフィームとは固体表面に付着した微生物が形成する高次構造体のことで、この状態になるとフリーで存在するより物理的および化学的ストレスに対する耐性が飛躍的に上昇することが知られている。また、環境微生物の主要な自然存在形態でもある。つまり、根圏微生物群は植物根細胞という生きた固体表面上に形成されたバイオフィームと見ることもできる。以下、浮遊水生植物の代表種であるアオウキクサ表面からフェノール、ナフタレン、およびアルカン分解細菌を単離し、その諸特性解析と滅菌アオウキクサへの再付着によるフェノール分解活性の持続性について検討した筆者らの研究を紹介する。

1. アオウキクサ表面からの炭化水素分解細菌の単離

まず水生植物個体表面に生息する炭化水素分解細菌の多様性を調べるために、代表的な環境汚染炭化水素類であるフェノール、ナフタレン、およびアルカン分解細菌の集積とその単離を試みた。モデル水生植物としては、北海道大学植物園に自生しているアオウキクサ (*Lemna perpusilla*) が取り扱いが容易なので、これを実験に用いた。アオウキクサが属するウキクサ科植物は、その分布

図 1 ■ アオウキクサより単離した細菌の炭化水素分解活性

培養温度 25℃ における 3 回の分解実験の平均値を示した。略号は表 1 参照。(A) フェノール 20 mg l⁻¹, (B) ナフタレン 30 mg l⁻¹, (C) 標準ガスオイル(アルカン) 1,000 mg l⁻¹

性, 増殖の速さから環境指標水生植物として広く利用されている^(26, 27)。植物用無機塩培地 (Hoagland 培地⁽²⁸⁾) にそれぞれの炭化水素類 (10~100 ppm) を単一炭素源として添加し, アオウキクサを 25℃, 照度 4,500~6,500 lux, 16 時間明/8 時間暗条件で約 1 ヶ月間培養することによってアオウキクサ表面細菌からそれぞれ分解細菌を集積した。トリポリリン酸ナトリウム/超音波処理によってアオウキクサ表面から付着細菌を回収し, Hoagland 寒天平板培地で安定に生育した細菌コロニーから形態の異なるもの約 200 株を候補株とした。

これらの候補株について, フェノール 20 mg l⁻¹, ナフタレン 30 mg l⁻¹, 標準ガスオイル (アルカン混合物) 1,000 mg l⁻¹ の濃度で分解実験を行なった。その結果, フェノール分解細菌 5 菌株 (P2, P11c, P22, P23, P24a), ナフタレン分解細菌 6 菌株 (N1b, N3, N4a, N7a, N9c, N12b), アルカン分解細菌 5 菌株 (O1, O2, O3, O7, O8) を得ることができた (図 1)。フェノール分解細菌 5 菌株はいずれも 20 mg l⁻¹ のフェノールを数時間で速やかに分解したが, ナフタレンと標準ガスオイル分解細菌については 80% 以上の分解に数日間を要した。また, O7 株

は中鎖アルカンのみ (炭素数 8~11) を分解し, O1, O2, O3 および O8 株は中鎖 (炭素数 8) から長鎖アルカン (炭素数 20) までを幅広く分解した。

2. 分解細菌の 16S rRNA 塩基配列比較による同定

上記実験で取得した分解細菌について, 16S rRNA 遺伝子の後半領域約 700 bp を PCR 増幅後, 塩基配列を決定した。データベースに対する相同性検索 (BLAST-N) 結果を表 1 に示す。今回単離した分解細菌は, ほとんどが *Acinetobacter* 属, *Pseudomonas* 属, *Janthinobacterium* 属細菌などのグラム陰性細菌 (γ -, β -プロテオバクテリア) であった。これは, 根圏あるいは水圏の微生物群ではグラム陰性細菌が大部分を占めているというこれまでの研究結果と一致した。

一方, フェノール分解細菌の 1 種はグラム陽性細菌である *Rhodococcus* 属細菌であった。土壌根圏微生物のうちグラム陽性細菌として *Rhodococcus* 属や *Bacillus* 属, *Arthrobacter* 属, *Paenibacillus* 属細菌などが報告されているが, グラム陰性細菌に比較してその報告例は少ない⁽²⁹⁾。主要なグラム陽性土壌細菌でありかつさまざま

表 1 ■ 各分解細菌と高い相同性を示した細菌の属名

フェノール分解細菌	ナフタレン分解細菌	アルカン分解細菌
P2: <i>Pseudomonas</i> sp.	N1b: <i>Pseudomonas</i> sp.	O1: <i>Amorphomonas</i> sp.
P11c: <i>Rhodococcus</i> sp.	N3: <i>Pseudomonas</i> sp.	O2: <i>Asticcacaulis</i> sp.
P22: <i>Acinetobacter</i> sp.	N4a: <i>Janthinobacterium</i> sp.	O3: <i>Pseudomonas</i> sp.
P23: <i>Acinetobacter</i> sp.	N7a: <i>Pseudomonas</i> sp.	O7: <i>Pseudomonas</i> sp.
P24a: <i>Acinetobacter</i> sp.	N9c: <i>Janthinobacterium</i> sp.	O8: <i>Azospirillum</i> sp.
	N12b: <i>Pseudomonas</i> sp.	

な抗生物質生産菌として報告されている *Streptomyces* 属細菌が根圏から単離された例がほとんどないのは少々興味深い。

また、3種類の炭化水素類を分解する細菌に共通して *Pseudomonas* 属が含まれていた。 *Pseudomonas* 属には炭化水素類をはじめとしたさまざまな有機化合物の分解菌が多数含まれている。また、根圏微生物あるいは植物病害細菌 (*P. syringae*, *P. fluorescens*) も同属細菌として多く単離されており、 *Pseudomonas* 属細菌と植物との関連性の深さが示唆される⁽¹⁴⁾。

アルカン分解細菌のうち O1 や O8 も根圏との関連性が示唆される属であるが、炭化水素類の分解は報告されていない。 O2 については近縁の *Caulobacter* 属細菌が強力な粘着性を有していることが知られており、根圏での付着性について興味もたれる。

3. 各細菌のバイオフィーム形成能

微生物の固体表面付着に関与する特性のひとつである、ポリプロピレンチューブ内壁へのバイオフィーム形成能をフェノールおよびナフタレン分解細菌について評価した。バイオフィーム形成能は、クリスタルバイオレット染色法により、その吸光度 (590 nm) を指標として測定した (図2)。培地は栄養の豊富な L 培地、最少培地である BM 培地、およびさらに細菌にとって貧栄養と考えられる植物培養用 Hoagland 培地の3種類を使用した。これらの培地による比較では、多くの細菌に共通して富栄養な L 培地での形成量が顕著に高かった。貧栄養

である BM 培地および Hoagland 培地では増殖またはバイオフィーム形成が少ないか、起こらなかった。これは根圏が富栄養環境であることと関係しているのかも知れない。

バイオフィーム形成能について菌株間で比較してみると、フェノール分解細菌として単離された *Acinetobacter* sp. P22 株と P23 株が24時間で590 nmの吸光度が8.0近くに達するほどきわめて高いバイオフィーム形成能を有していた。また、いずれも48時間後にはその形成量が減少していたが、これは栄養分の枯渇によるものと思われる。一方、ナフタレン分解細菌のバイオフィーム形成能については590 nmの吸光度が最大2.0程度であり、フェノール分解細菌と比較するとそれほど高くなかった。

4. フェノール分解細菌のアオウキクサへの付着活性

次に、フェノール高分解細菌である *Pseudomonas* sp. P2 株, *Rhodococcus* sp. P11c 株, *Acinetobacter* sp. P23 株について、アオウキクサへの付着能を評価した。各細菌の前培養液を終濁度 $OD_{600}=0.3$ となるよう調製し、あらかじめトリポリリン酸ナトリウムによって洗浄処理したアオウキクサ20個体とともにそれぞれ Hoagland 培地フラスコ内で静置培養した。その結果、図3に示すように P2 株および P23 株を含む培地にアオウキクサを加えたフラスコにおいて、72時間後の濁度が1%以下 ($OD_{600}=0.02$) まで減少する様子が観察された。 P11c 株を含むフラスコではこのような顕著な濁度変化は見られ

図2 ■ 各炭化水素分解細菌のバイオフィーム形成能
25℃にて培養。培地：Hoagland 培地 (□), BM 培地 (■), L 培地 (■)

図3 ■ *Acinetobacter* sp. P23 株細胞のアオウキクサへの付着

(A) P23 株とアオウキクサ共存直後 (OD₆₀₀=0.3), (B) P23 株とアオウキクサ共存 72 時間後 (OD₆₀₀=0.02)

図4 ■ 蛍光顕微鏡を用いた細菌付着の観察

洗浄アオウキクサ：トリポリリン酸処理後の滅菌アオウキクサ。P2 株：アオウキクサ+P2 (48 時間後)。P23 株：アオウキクサ+P23 (24 時間後)。細菌が付着して形成されるマイクロコロニーや付着構造体を矢印で示した。

なかった。また、72 時間後のアオウキクサから超音波処理によって付着細菌を遊離させ、コロニーカウント法により計数したところ、アオウキクサ 1 個体あたり $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ CFUs (Colony Forming Units: コロニー形成単位) の付着細菌数が確認された。この値は 3 菌株間にそれほど差は見られなかった。このことから、ポリプロピレンチューブ表面にはバイオフィルムを形成しない P11c 株においてもアオウキクサ根には付着して増殖できることが示唆される。また、各菌株ともにアオウキクサへの付着量は 24 時間後に比べ、48 時間後にはおよそ 2 倍に増加 (増殖) していた。

根表面への強い付着特性を示した *Pseudomonas* sp. P2 株と *Acinetobacter* sp. P23 株がアオウキクサ根へ付着する様子を、LIVE/DEAD® BacLight 蛍光染色キット (Invitrogen 社製) を使い蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キーエンス社製) で観察した。植物根細胞は、緑色蛍光色素 (propidium iodide) と赤色色素 (SYTO9) の両方を取り込み、オレンジ蛍光色で観察された。洗浄して細菌を付着させていない植物根表面には細菌は見られなかった (図 4- 上)。一方、洗浄後細菌を付着させたアオウキクサ根の表面には、生細菌付着構造体や斑点状のマイクロコロニーと推定される緑色蛍光が多数確認された (図 4- 中, 下)。また、付着構造体は培養 24 時間後に比べて 48 時間後に、より多く観察され、P2 株に比べて P23 株のほうが根表面全体に広く付着する傾向が見られた。以上のことから、これらの細菌は単独で根に付着することを確認した。

5. P23 株を付着させたアオウキクサを用いたフェノール浄化実験

まず、トリポリリン酸ナトリウム処理によって滅菌ウキクサを調製した。これに上記と同様の条件で 72 時間 *Acinetobacter* sp. P23 株を付着させた (図 5 中の○)。また対照区として、細菌を付着させずに 72 時間培養した滅菌アオウキクサ (■)、滅菌処理をしないすなわち根に

図5 ■アオウキクサと *Acinetobacter* sp. P23 株によるフェノール分解活性

アオウキクサはそれぞれのフラスコに10個体ずつ入れた。40 mg l⁻¹ フェノールを0, 40, 96 時間後に添加した (矢印)。添加した時点におけるフェノール残存量を1として相対値で分解活性を示した。グラフ各点は異なるフラスコで3回行なった実験の平均値。■: 滅菌アオウキクサ, ○: アオウキクサ+P23, □: 未処理アオウキクサ, ●: P23のみ (5×10⁸ CFUs), ●: P23のみ (5×10⁹ CFUs), ◆: 培地のみ

常在細菌を保有する未処理アオウキクサ (□), さらに○と同程度 (5×10⁸ CFUs, ●) および約10倍量 (5×10⁹ CFUs, ●) のP23株浮遊細胞を含む培地 (アオウキクサなし) を準備した。それぞれのフラスコに40 mg l⁻¹ のフェノールを加えて (実験開始0, 40, 96 時間後), その減少量をHPLCにより経時的に測定した (図5)。

滅菌したアオウキクサのみでは, 各サイクルにおいてフェノールの減少は少なかった (■)。1サイクル目においては, P23株を付着させた場合 (○) と常在細菌を保有する未処理アオウキクサ (□) はフェノールを速やかに

図6 ■ *Acinetobacter* sp. P23 株の付着がアオウキクサ個体数の増加に及ぼす影響

□: 滅菌アオウキクサ, ■: アオウキクサ+P23. いずれも10個体から実験を開始

減少させた。2サイクル目では, 未処理アオウキクサのフェノール減少速度は低下したが, アオウキクサ+P23の系においてはその活性は維持された。さらに3サイクル目に入ると, その差はさらに顕著となり, 後者のみにおいてフェノールの減少が観察された。また, P23株浮遊細胞のみのフェノール除去 (分解) 活性はアオウキクサと共存する場合に比べて顕著に低かった (●, ●)。一方, アオウキクサ+P23を40時間後および96時間後に新しい培地を含むフラスコに移植してフェノール浄化実験を行なったところ, 3サイクル目においても1サイクル目と同等の分解活性が持続することも別途確認している。以上の結果から, P23株をアオウキクサ根に付着させることによって, アオウキクサや細菌単独に比べてはるかに持続的なフェノール浄化システムを構築できることが明らかとなった。

続いて, *Acinetobacter* sp. P23 株の付着がアオウキク

図7 ■ *Acinetobacter* sp. P23 株の付着の有無によるアオウキクサの個体数と根長の比較

A, b: アオウキクサ+P23, B, c: 滅菌アオウキクサ, a: 未処理アオウキクサ. (A, B) 培養開始96時間後, (a, b, c) 培養開始160時間後. それぞれ10個体の各平均根長は (a) 4.2 cm, (b) 3.8 cm, (c) 6.5 cm

サヘドのような影響を及ぼすかについて調べるために、フェノール分解実験期間中のアオウキクサ+P23 個体数の変化(増殖率)、および根の伸長について滅菌アオウキクサ個体と比較した。その結果、アオウキクサ+P23 個体は、滅菌アオウキクサに比べて160 時間後に1.7 倍の増殖率を示した(図6, 図7-A, B)。その原因についてはまだ明らかではないが、P23 株はアオウキクサにとってPGPR の一種であるといえる。さらに、160 時間後の根の長さを比較したところ、未処理アオウキクサ個体(常在細菌あり)、アオウキクサ+P23 個体、および滅菌アオウキクサ個体の根の平均長さはそれぞれ4.2, 3.8, 6.5 cm であった(図7-a, b, c)。これまでにウキクサはリン、窒素の欠乏状態になると栄養確保のために根を伸長させることが報告されている^(30, 31)。このことから、P23 株が根圏に存在することによってウキクサのリンあるいは窒素摂取が促進された可能性が示唆される。

*

今回、北大植物園に生息するアオウキクサからフェノール分解細菌P23 株を単離し、これを再度付着させることによって両者の共生関係を明らかにするとともに、二次汚染リスクが少ない持続的な水質汚染浄化技術開発への足がかりを得ることができた⁽³²⁾。最近、根圏微生物の植物への作用物質としてシアン化物やピロロキノリンキノンなどが報告されている^(33, 34)。今後、ウキクサと根圏微生物および複合種微生物間の相互作用を分子レベルで解明するとともに、さらに適用範囲の広い根圏浄化システムの開発を進めてゆきたいと考えている。

謝辞：ウキクサの取り扱いに関してご指導いただきました清和成助教、于寧氏(大阪大学大学院工学研究科)に厚くお礼申し上げます。また、本研究に協力いただいた蔵崎正明助教、鈴木和也氏、羽山亨氏に感謝します。

文献

- 1) V. Sasek, J. A. Glaser & P. Baveye (ed.): "The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2003.
- 2) E. Pilon-Smits: *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**, 15 (2005).
- 3) B. Suresh & G. A. Ravishankar: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **24**, 97 (2004).
- 4) L. C. Marr, E. C. Booth, R. G. Andersen, M. A. Widdowson & J. T. Novak: *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 5560 (2006).
- 5) M. J. Milner & L. V. Kochian: *Ann. Bot. (Lond)*, **102**, 3 (2008).
- 6) T. A. Anderson, E. A. Guthrie & B. T. Walton: *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2630 (1993).
- 7) I. Kuiper, E. L. Lagendijk, G. V. Bloemberg & B. J. Lugtenberg: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **17**, 6 (2004).
- 8) B. T. Walton & T. A. Anderson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1012 (1990).
- 9) P. B. Christensen, N. P. Revsbech & K. Sand-Jensen: *Plant Physiol.*, **105**, 847 (1994).
- 10) M. B. Leigh, P. Prouzová, M. Macková, T. Macek, D. P. Nagle & J. S. Fletcher: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2331 (2006).
- 11) J. Yao & C. Allen: *J. Bacteriol.*, **189**, 6415 (2007).
- 12) R. Atzorn, A. Crozier, C. T. Wheeler & G. Sandberg: *Planta*, **175**, 532 (1998).
- 13) V. Salmeron, M. V. Martinez-Toledo & J. Gonzalez-Lopez: *Chemosphere*, **20**, 417 (1990).
- 14) B. Shaharoon, G. M. Jamro, Z. A. Zahir, M. Arshad & K. S. Memon: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 1300 (2007).
- 15) B. R. Glick & Y. Bashan: *Biotechnol. Adv.*, **15**, 353 (1997).
- 16) J. S. Buyer, J. M. Wright & J. Leong: *Biochemistry*, **25**, 5492 (1986).
- 17) D. Haas & C. Keel: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **41**, 117 (2003).
- 18) E. Somers, J. Vanderleyden & M. Srinivasan: *Microbiology*, **30**, 205 (2004).
- 19) H. P. Bais, T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy & J. M. Vivanco: *Ann. Rev. Plant Biol.*, **57**, 233 (2006).
- 20) S. Radwan, N. Sorkhoh & I. E. I. Nemr: *Nature*, **376**, 302 (1995).
- 21) I. Kuiper, G. V. Bloemberg & B. J. J. Lugtenberg: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 1197 (2001).
- 22) I. Kuiper, L. Kravchenko, G. V. Bloemberg & B. J. J. Lugtenberg: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **15**, 734 (2002).
- 23) L. Liu, C.-Y. Jiang & X.-Y. Liu: *Environ. Microbiol.*, **9**, 465 (2007).
- 24) T. Toyama, N. Yu, H. Kumada, K. Sei, M. Ike & M. Fujita: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 346 (2006).
- 25) M. Morikawa: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 1 (2006).
- 26) M. G. Miranda & K. Ilangovan: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**, 1000 (1996).
- 27) W. Wang: *Environ. Res.*, **52**, 7 (1990).
- 28) D. R. Hoagland & D. I. Arnon: *Crit. Rev. Plant Sci.*, **347**, 1 (1938).
- 29) M. M. Jussila, G. Jurgens, K. Lindström & L. Suominen: *Environ. Pollut.*, **139**, 244 (2006).
- 30) M. S. Reid & R. L. Bielecki: *Aqua. Bot.*, **59**, 127 (1995).
- 31) M. S. Reid & R. L. Bielecki: *Plant Physiol.*, **46**, 609 (1970).
- 32) 森川正章, 山賀文子, 鷲尾健司: 特願2008-099213「新規水草根圏微生物」
- 33) T. Rudrappa, R. E. Splaine, M. L. Biedrzycki & H. P. Bais: *PLoS ONE*, **30**, e2073 (2008).
- 34) O. Choi, J. Kim, J. G. Kim, Y. Jeong, J. S. Moon, C. S. Park & I. Hwang: *Plant Physiol.*, **146**, 657 (2008).