

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00612

研究課題名(和文) 共生微生物により機能強化した水生植物の水質浄化・資源生産能力予測モデルの開発

研究課題名(英文) Model construction for water purification and resource production capability of aquatic plants functionally enhanced by symbiotic microorganisms

研究代表者

森 一博 (Mori, Kazuhiro)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90294040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は根圏機能強化型植物-微生物共生系の環境条件への応答を実験的に検討し、それをモデル化することで栽培条件を加味して機能を予測する手法を開発した。5つの課題(1)植物成長促進微生物(PGPB)強化水生植物の生育の環境応答のモデル化、(2)PGPB強化水生植物による無機栄養塩類吸収作用の環境応答のモデル化、(3)分解菌導入水生植物による有機化学物質分解の環境応答のモデル化、(4)PGPB強化水生植物による有用物質生産の環境応答のモデル化、(5)モデルの有効性と実用性の評価)を検討し、得られた各種モデルにより実排水における共生系が示す効果を予測できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水生植物を活用した水質浄化と資源生産では、浄化効果の改善と、効果の予測手法が課題となっている。本研究では、植物成長促進微生物などの植物の機能を向上させる微生物と、高いデンプン生産と栄養塩除去能力をもつウキクサ植物を組み合わせた機能強化型の植物利用技術を考え、その機能を環境条件の考慮のもとで予測するモデル手法の開発を試みた。得られたモデルは、実排水においても各種環境条件下での共生系の効果を概ね再現した。本手法は、環境条件の影響を加味した機能の予測に有用で、水質浄化や資源生産に植物と機能強化に資する微生物を利用する場合に、生物材料の選択、施設計画、設計、維持管理を合理的に進めることに貢献する。

研究成果の概要(英文)：Model construction for water purification and resource production capability of aquatic plants (duckweed plants) functionally enhanced by symbiotic microorganisms (plant growth promoting bacteria (PGPB) or organic chimerical degrading bacteria) was investigated. Experimental data of those plants-microorganisms symbiotic systems apparently indicated that plants growth rate, inorganic nutrients contents in the plant biomass, microbial degradation rate of organic chemical compounds in the rhizosphere of material plants and starch accumulation in the plant biomass were affected by various environmental conditions (nutrients concentration in the cultivation water, temperature, illuminance) and the relationships between these environmental conditions and detected biological functional data shown in the experiments were modeled. The constructed models successfully predicted the performance of symbiotic systems in the practical wastewater under various environmental conditions.

研究分野：生物環境工学

キーワード：ウキクサ 植物成長促進微生物 栄養塩除去 資源生産 モデル

1. 研究開始当初の背景

近年、水生植物に植物成長促進微生物 (PGPB) を付着導入することで、野外環境下でもバイオマス資源生産や栄養塩吸収除去を向上させられることが次々と明らかとなってきた¹⁾。また、植物と根圏微生物の協働作用により、従来適用が不可能と考えられていた排水中の有害化学物質分解除去へも水生植物を活用できることもわかっている²⁾。さらに、環境条件への植物の生育応答をモデル化できることも報告されている³⁾。しかし、微生物により機能を強化した水生植物 - 微生物共生システムの水質浄化とバイオマス資源生産能力を環境条件の影響を考慮して予測する技術は確立されていない。我々は予備検討から、PGPB を付着させたウキクサの生育に及ぼす栄養塩濃度の影響について通常のウキクサと大きく異なること、また、同様に機能強化を図ったウキクサのデンプン含有率が栄養塩濃度の影響により大きく変化することなどを確認しており、何れの地域でも容易に入手可能な環境データ (温度、日射量、水質) に対する、機能強化型の植物 - 微生物共生系の作用 (栄養塩の植物吸収、有害化学物質の根圏分解、植物のデンプン生産等) の応答を、植物ごとに定まる特性値 (パラメータ) を得た上でモデル化できると考えた。本研究は、PGPB や分解菌などの機能強化に資する有用微生物を付着させた植物栽培系の様々な環境条件への応答を実験的に確認し、それをモデル化することで、気象や水質条件を考慮しながら機能を予測することを試みた。

2. 研究の目的

本研究は根圏機能強化型植物 - 微生物共生系の環境条件への応答を実験的に検討し、それをモデル化することで地域特性を加味して機能を予測する手法を開発するものである。そのために本研究期間内に下記の 5 つの課題に取り組んだ。これらの検討には、供試植物として高いデンプン生産性をもち水質浄化での利用も検討されるウキクサなどの水生植物を、また、機能強化のための導入微生物として植物根圏より分離された各種植物成長促進微生物 (PGPB)、あるいは各種芳香族化合物分解作用を有する微生物資料を各々用いた。

- (1) PGPB 強化水生植物の生育の環境応答のモデル化
- (2) PGPB 強化水生植物による無機栄養塩類吸収作用の環境応答のモデル化
- (3) 分解菌導入水生植物による有機化学物質分解の環境応答のモデル化
- (4) PGPB 強化水生植物による有用物質生産の環境応答のモデル化
- (5) モデルの有効性と実用性の評価

3. 研究の方法

(1) 供試植物

研究室で長期間無菌的に栽培している 3 種類のウキクサ *Spirodela polyrhiza*、*Lemna minor* 及び *Wolffia globosa* を使用した。

(2) 供試機能性微生物

植物の生長を促進することで植生浄化機能の強化が期待される PGPB には *Sinorhizobium* sp.SP4³⁾ と *Acinetobacter calcoaceticus* P23⁴⁾ を用いた。有機性化合物分解微生物には、研究室で長期間、肉エキス・ペプトンからなる人工下水で培養している活性汚泥を用いた。

(3) 供試培地

供試植物の栽培には、Arnon&Hoagland 培地⁶⁾を必要に応じて栄養塩濃度を適宜調整して用いた。また、微生物の培養には、TS 培地 (Tryptic Soy Broth 30 g/L, pH 7.0) (SP4 株) と LB 培地 (Tryptone 10g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.0) (P23 株) を用いた。何れも高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分) したものを使用した。また、実下水二次処理水も必要に応じて試験に用いた。

(4) 供試微生物の供試植物根圏への導入

供試植物根圏への微生物の導入は、植物栽培培地に OD₆₀₀ で 1 程度に調整した菌体を懸濁させた溶液中で供試植物を 3 日程度共培養することで行った。

(5) 栽培試験

供試植物の栽培は、人工気象室または人工気象器を用い、28℃, 12000Lux, 16h 明 8h 暗を基本条件として、1 ~ 2L の培地を入れたシリコン栓で閉じたガラス容器内で行った。栄養塩濃度が植物の成長や含有物質に与える影響を検討する場合には、24 ~ 48 時間毎に新鮮な培地に植え継ぐ連続バッチ条件で栽培した。栄養塩吸収除去能力あるいは有機性物質分解除去能力を検討する場合には、植え継ぎを行わずに栄養塩あるいは供試有機性物質濃度が十分低下するまで栽培を継続した。各種試験では、経時的に植物体や栽培液のサンプリングを行い、植物バイオマス量、植物バイオマス中の窒素やデンプンなどの含有量、栽培液中の各種無機態栄養塩あるいは TOC 濃度を分析した。

(6) 分析方法:

バイオマス中の窒素含有量の測定には、安定同位体比質量分析計 (ANCA-NT system, PDZ Europa) を、デンプン含有量の測定には Total Starch Assay Kit (Megazyme) を用い、液中の各

種栄養塩濃度の測定は上水試験法⁷⁾に従った。TOC 濃度の測定には全有機炭素計(TOC-5000A 島津製作所)を用いた。

4. 研究成果

(1) PGPB 強化水生植物の生育の環境応答のモデル化

無菌のウキクサと植物成長促進微生物(PGPB)を付着させて機能強化を図ったウキクサを用いて、アンモニア態窒素と硝酸態窒素の濃度と生育速度の関係を詳細な栽培試験により検討した。無菌ウキクサでは比増殖速度に与える培地中の栄養塩濃度の影響について、何れの形態の窒素やリンに関しても Michaelis-Menten 型の関係が観察された。一方、PGPB で強化したウキクサでは、各種窒素濃度と、無菌ウキクサに対する比増殖速度の相対比の逆数との間に Michaelis-Menten 型の関係を確認した。図 1 に検討結果の一例を示す。また、無菌ウキクサ並びに PGPB 強化ウキクサ共に硝酸態窒素よりもアンモニア態窒素を選択的に利用する窒素の選択性も明らかになった。一方、光や温度が比増殖速度に与える影響については無菌植物の場合との相異は確認されなかった。既往の水生植物の生育モデル³⁾に以上の検討結果を反映させることで、無菌及び PGPB で強化したウキクサについて、比増殖速度を環境条件から予測するモデルと、関連するモデルパラメータを得ることに成功した。

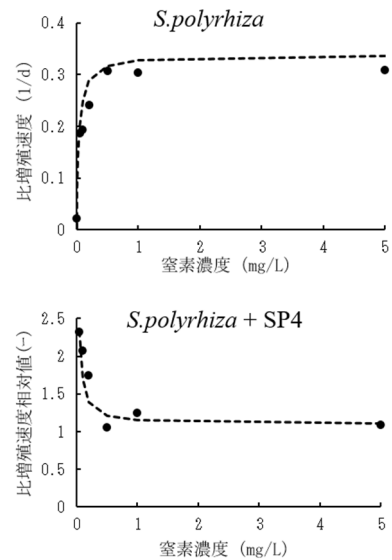


図 1 NH₄-N 濃度の増殖速度への影響例

(2) PGPB 強化水生植物による無機栄養塩類吸収作用の環境応答のモデル化

供試植物による影響塩の吸収除去能力を予測するには、バイオマス生産と共に、単位バイオマス中に蓄積される窒素等の含有量を予測する必要がある。そこで、栄養塩濃度が異なる条件下で栽培したウキクサバイオマスに含まれる窒素やリン含有量を測定した結果、無菌及び PGPB 強化ウキクサ共に、栽培溶液中の栄養塩濃度と植物体中の含有率の間に Michaelis-Menten 型の関係を確認し、これをモデル化すると共に、必要なモデルパラメータを実験結果より取得した。図 2 に検討結果の一例を示した。上述(1)の検討から得られた生育(バイオマス生産)を予測するモデルと、ここでの検討で得られたバイオマス中の栄養塩含有率を予測するモデル並びに各モデルパラメータを用いることで、生育に伴う栄養塩吸収量を予測することが可能となった。

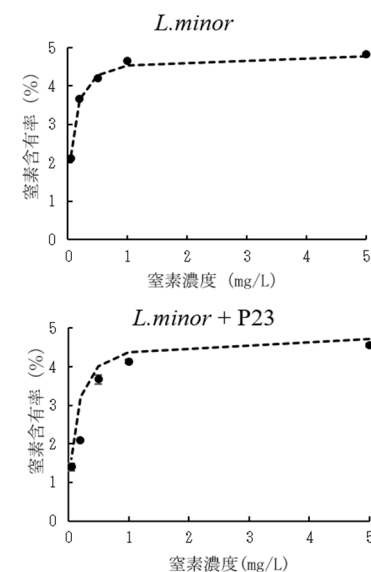


図 2 NO₃-N 濃度の N 含有率への影響例

(3) 分解菌導入水生植物による有機化学物質分解の環境応答のモデル化

水生植物の根圏には多様な微生物叢が報告されており、植物との相互作用により様々な有機性化合物の分解作用が生じている。そのため、環境条件が植物を介して根圏での微生物活性に影響を与えることが考えられる。そこで、様々な温度や光条件下で、活性汚泥微生物を付着させたウキクサによる有機性物質分解作用を検討した。供試物質にはフェノールを用い、ウキクサは微生物を付着後長期間フェノール含有培地で馴化したものと、馴化しないものを用意した。分解菌導入ウキクサによる分解試験の結果の一例を図 3 に示した。温度、照度共に、根圏におけるフェノールの分解に由来する TOC 除去速度に影響を与え、実験結果を近似するモデル式を導出した。無菌のウキクサではフェノールの分解は見られないことから、TOC の減少は根圏の微生物による分解によると考えられるが、特に、照度が TOC 除去速度に大きく影響したことから、光の影響を受ける植物を介して植物根圏微生物の活性が変化することが明らかとなった。

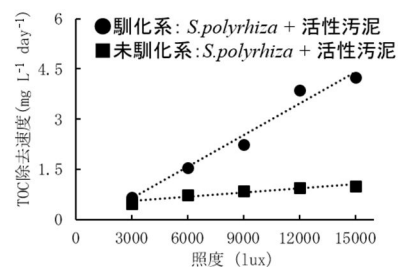


図 3 照度の TOC 除去への影響例

(4) PGPB 強化水生植物による有用物質生産の環境応答のモデル化

栄養塩濃度が供試植物のデンプン含有量に与える影響を様々な栄養塩濃度条件下での栽培試験により検討した。図 4 に結果の一例を示した。無菌の植物と PGPB で強化した植物の何れにおいても、栄養塩濃度が低下するとデンプン含有率が上昇することが確認された。また、本研究では、PGPB で強化すると無菌の植物に比べてデンプン含有率が高くなることも観察された。こ

ここで、デンブ含有率が高まる窒素濃度 0~1mg/L の各濃度におけるデンブ含有率の単位培養時間当たりの変化量は、図4のような曲線で近似されることが観察された。

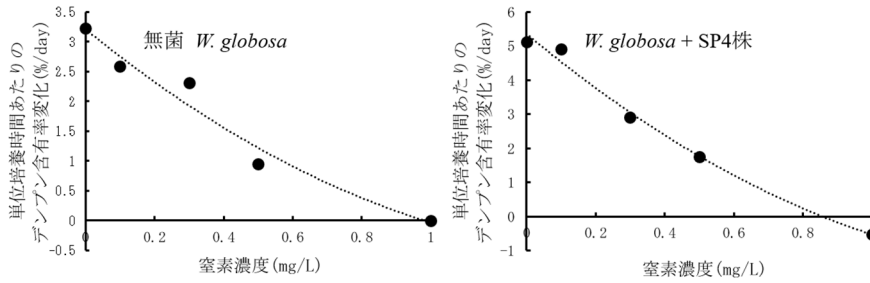


図4 窒素濃度がデンブ含有率の変化に与える影響の例

(5) モデルの有効性と実用性の評価

これまでの検討から得られたモデルの有効性を、滅菌していない実下水二次処理水中でPGPBにより強化した各種ウキクサを栽培することで検討した。図5に示した例のように、何れの供試植物も成長（増殖）と共に実排水中の栄養塩を吸収除去する効果を示した。窒素については、アンモニア態窒素を除去した後に、硝酸態窒素の除去が行われた。このときの除去効果を、上述の検討で得られた各種モデルとモデルパラメータを用いて予測した結果、実測値を十分に再現することに成功した。照度や温度を変えて行った同様の栄養塩除去試験においても、モデルによる予測により実測値を概ね再現できていた。以上の成果から、本研究で検討した機能性微生物により強化した水生植物に関する各種モデルを用いた手法は、環境条件の影響下での機能予測に有効であり、水質浄化や資源生産に植物と機能強化に資する微生物を利用する場合に、生物材料の選択、施設計画、設計、維持管理を合理的な判断に基づいて工学的に進められることに貢献できると考えられる。

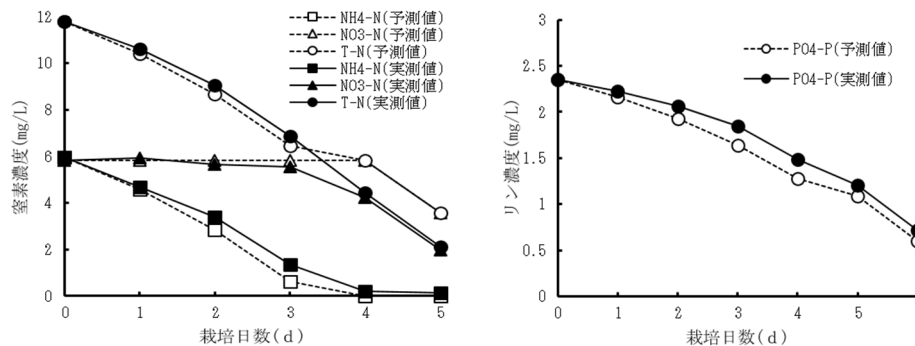


図5 PGPB強化ウキクサによる栄養塩除去効果の予測

(左図) *S. polyrhiza* + SP4株, (右図) *L. minor* + P23株

参考文献

- 1) 森川正章, 遠山忠, 田中靖浩, 森一博, 玉木秀幸, 清和成, 黒田真史, 三輪京子, 鎌形洋一, 池道彦: 廃水を肥料とするバイオマス生産技術の夜明け, 再生と利用, vol. 39, no. 149, pp. 50-53 (2015)
- 2) K.Mori, T.Toyama, K.Sei: Surfactants degrading activities in the rhizosphere of giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*), Japanese Journal of Water Treatment Biology, vol.41, no.3, pp.129-140 (2005)
- 3) R. Malla, N. Nagao, K. Maezono, Y. Tanaka, K. Mori: Formulation of a Simple Mathematical Biomass Model for Selected Floating and Emergent Macrophytes, Japanese Journal of Water Treatment Biology, vol.46, no.1, pp.1-15 (2010)
- 4) 遠山忠, 田中靖浩, 森一博, 森川正章, *Sinorhizobium* sp.SP4 によるウキクサの光合成能力, バイオマス生産性と水質浄化機能の向上, 日本生物工学会大会講演要旨集, p.67 (2013)
- 5) Yamaga, F., Washio, K., and Morikawa, M.: Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*, Environ. Sci. Technol., 44, 6470e6474 (2010).
- 6) Arnon, D. I. and Hoagland, D. R., Crop production in artificial culture solutions in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients Soil Sci.50, 463-484 (1940).
- 7) 上水試験法, 日本水道協会 (1984)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 加藤史章、田中靖浩、遠山忠、森一博	4. 巻 別巻38号
2. 論文標題 ウキクサによる栄養塩除去効果の予測	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本水処理生物学会誌	6. 最初と最後の頁 54-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 波田知樹、森一博、遠山忠、田中靖浩
2. 発表標題 栄養塩濃度や植物成長促進微生物が <i>Wolffia globosa</i> のデンプン生産に与える影響とそのモデル化
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 史章、田中 靖浩、遠山 忠、森 一博
2. 発表標題 植物成長微生物で強化したウキクサによる栄養塩除去効果の予測
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森一博
2. 発表標題 優れた機能をもつ生物の組合せが示す水質浄化作用
3. 学会等名 第4回大阪大学環境・資源技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森一博
2. 発表標題 生物の相互作用に着目した水質浄化作用の強化
3. 学会等名 日本水処理生物学会第56 回大会 排水・環境水研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤史章、田中靖浩、遠山忠、森一博
2. 発表標題 ウキクサによる栄養塩除去効果の予測
3. 学会等名 日本水処理生物学会第55回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 保坂雄一、田中靖浩、遠山忠、森一博
2. 発表標題 ウキクサによる窒素吸収のモデル化と植物成長促進微生物（PGPB）適用植生への応用
3. 学会等名 日本水処理生物学会第54回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森一博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 640（担当部分2）
3. 書名 (公社)日本水環境学会 編 水環境の事典（11-4-4-4 植生浄化法，pp.304-305）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学環境保全研究室
<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~5lab/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 靖浩 (Tanaka Yasuhiro) (50377587)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	
研究分担者	遠山 忠 (Toyama Tadashi) (60431392)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
タイ	Kasetsart University		