

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05566

研究課題名(和文)水生植物の元素集積に関与する生物学的・非生物学的環境要因の解析と有効利用

研究課題名(英文)Analyses of biotic and abiotic environmental factors involved in elemental accumulation of aquatic plants

研究代表者

原田 英美子(Harada, Emiko)

滋賀県立大学・環境科学部・教授

研究者番号：20232845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖水圏に生育する沈水植物オオカナダモには高濃度のマンガン(Mn)が検出される。この現象には、Mn酸化能を持つ付着微生物の関与が考えられる。本研究では、放射光を用いたX線吸収端微細構造法により、野外のオオカナダモが酸化型のMnを含むことを明らかにした。福島県内の水路で生育するバイカモからMn酸化能を持つ微生物株を単離し、特徴付けを行った。一方、琵琶湖水圏で採取したバイカモの付着微生物はMnの酸化能を持たなかった。生物的Mn酸化物の生成はオオカナダモ以外の水生植物表面でも起こるが、環境要因に影響されることが推定された。放射性セシウム(Cs)の集積には、水生植物の生育形により差が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マンガンはレアメタルの一種であり、国内消費量のほぼ全量を輸入に依存している。本研究は、環境中から有用金属を回収する手法の開発として、これまで研究例が少ない水生植物に着目した。水生植物と付着微生物の相互作用により、植物体表面でマンガンの酸化反応が起こっており、この現象が金属の集積に重要であることを見出した。オオカナダモは琵琶湖水圏での過剰な繁茂が問題視されていることから、未利用バイオマスの有効利用法としても期待される。福島第一原発事故に起因する環境中の放射性セシウムの消長への、水生植物の関与について調べた。植物の生育形により元素動態が大きく異なる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Manganese (Mn) concentrations in a submerged freshwater macrophyte *Egeria densa* (Brazilian waterweed) in Lake Biwa basin were generally above those of terrestrial hyperaccumulators. Accumulation of Mn in *E. densa* might be mediated by the production of Mn oxide by epiphytic bacteria on the plant surfaces. Oxidized Mn was detected in *E. densa* in Lake Biwa by synchrotron radiation-based Mn K-edge XANES (X-ray absorption near edge structure). A bacteria isolate obtained from *Ranunculus nipponicus* var. *submersus* in Fukushima Prefecture showed Mn oxidizing capacity, whereas the isolates did not mediate Mn oxidation from the same variety in Lake Biwa basin. These results indicate that Mn oxidation on the aquatic plants generally occur in the hydrosphere, however, the environment factors strongly affect the interaction between plants and bacteria.

研究分野：環境科学、植物科学

キーワード：オオカナダモ 水生植物 セシウム マンガン マンガン酸化細菌 バイオフィルム 16S rRNA 放射光蛍光X線分析

## 1. 研究開始当初の背景

水生植物はしばしば水環境中の金属を効率的に吸収することから、その有効利用法の開発が期待されている。特定の元素を集積する植物に関する研究は、これまで主に陸生植物で進められており、水生植物に着目した研究例は少なかった。また、陸生植物の根における無機栄養の吸着や取り込みに根圏微生物が関与していることは近年注目されているが、水生植物と水圏微生物の相互作用については未解明の点が多く残されていた。

研究代表者らは、琵琶湖水圏の環濠で生育するオオカナダモ (*Egeria densa*) から高濃度のマンガン (Mn) が検出されることを見出した。その金属集積機構には、付着微生物を介した水溶性の還元型マンガン  $Mn(II)$  の生物学的酸化による不溶性のマンガン酸化物 ( $Mn(IV)$ ,  $Mn(III)$ ) の産生、ならびに葉の表面でのバイオフィーム (微生物構造体) の生成が関与していることが考えられた。環境中では、微生物が触媒する生物学的マンガン酸化反応が化学的な反応よりもしばしば優先するが、水生植物の表面にマンガン酸化物が集積している例はほとんど報告されていなかった。野外の環境中で生じている現象に関与すると考えられる植物微生物相互作用を理解するため、微生物による植物の認識機構、マンガン酸化物の生成および植物への集積機構の解明を行う必要があった。

また、福島第一原発事故後に飛散した放射性セシウム (Cs) の水圏での挙動に水生植物が寄与していることが考えられた。本研究組織は 2012 年から福島県内の数か所で水生植物および生育地の水・底泥を採集し、放射性セシウム量の消長をモニタリングするとともに、実験室内での栽培系を用いて、植物へのセシウムの移行および蓄積機構を調べた。水生植物は生育様式によって、沈水植物・浮葉植物・浮遊植物・抽水植物の 4 つの生育形に大別されている。植物の生育形により元素動態が大きく異なる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、環境中で水生植物の元素集積に関与する生物学的・非生物学的な要因を明らかにすることを目的とした。生物学的要因として、元素集積に関連すると考えられる付着微生物の性質や機能を調べた。また、水生植物の生育形により元素集積性が異なるかどうかを検討した。非生物学的要因の影響を総合的に評価するため、異なる環境条件で生育する同種の植物を採取して調査した。

## 3. 研究の方法

### 水生植物表層での Mn 酸化物生成現象の実験室内での再現

Mn 酸化能を持つことが確認されている付着微生物株を、無菌化したオオカナダモに添加し実験室内で培養した。この方法で、野外で観察されている Mn 酸化物の生成現象が再現できるかどうかを調べた。日本で生育するオオカナダモは雄株だけとされており、栄養繁殖により増殖している。一般的に無菌植物を作成するには種子消毒を行って発芽させるが、この手法はオオカナダモに使うことはできない。そのため、この実験に用いる無菌植物を得るため、オオカナダモを種々の殺菌剤を用いて表面滅菌する手法を検討した。

### 水生植物の付着微生物が生成する Mn 酸化物の化学形態分析

Mn 酸化物の検出には、LBB (ロイコベルベリンブルー) と Mn 酸化物の反応で生成する青色色素を利用していった。しかし、この手法は、還元型と酸化型の比率を明らかにすることができないなど、定量的な議論には不向きであった。そこで、放射光を用いた Mn K-edge XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure, X 線吸収端微細構造法) を用い、オオカナダモおよび表面のバイオフィームに含まれる Mn の酸化状態を分析した。

### 付着微生物の種特異性と環境要因の影響調査

オオカナダモ以外の水生植物から Mn 酸化能を持つ付着微生物が得られるかどうかを調べるため、沈水植物のバイカモに着目した。また、琵琶湖水圏と環境が大きく異なる生育地からオオカナダモを採取し、同様に調査した。得られた微生物株の 16S rRNA の配列から種判別を行った。

### 水生植物より単離した付着微生物株の性質調査

オオカナダモより単離した微生物株を用いた予備的な検討では、固形寒天培地を用いて培養すると Mn 酸化物が生成するが、液体培地を用いて振盪培養すると生成しない。酸素の供給量が生物学的 Mn 酸化現象に関連している可能性を検討するため、嫌気環境調整剤を用いて、酸素濃度が低い雰囲気を設定し、単離した微生物株の振盪培養を行った。また、琵琶湖湖水から得

られた Mn 酸化細菌 BIWAKO-01 株の研究結果から、低酸素条件とともに多糖類が共存していることが Mn 酸化物形成に重要であることが知られている。このため、少量の寒天を添加した半流動培地を調製し、微生物株を添加した。Mn 酸化物の検出は、LBB による呈色反応を利用した。

#### 水生植物の生育形が野外での放射性セシウム集積に及ぼす影響

福島県東部で調査を行い、異なる生育形の水生植物を採取した。ゲルマニウム半導体検出装置を用いて放射性セシウム濃度を測定した。併せて、生育地の環境条件に加えて、底泥や水の分析も行った。

#### 4. 研究成果

##### 実験室で栽培した水生植物表面での Mn 酸化物生成現象

オオカナダモ植物体表面での酸化 Mn 生成機構を明らかにする必要がある。オオカナダモと特定の微生物株との相互作用を調べるため、まず植物を無菌化する実験を行った。茎頂培養法および表面滅菌法の 2 種を検討した。茎頂を切り出して寒天培地上で培養し、種々の植物ホルモンを添加する等の条件検討を行ったが、無菌植物体を得ることができなかった。一方、ごく希薄な次亜塩素酸ナトリウム水溶液で植物体を長時間処理すると、確率は低いながらも滅菌処理後に側芽が生長することが明らかになった。この結果をもとに条件検討を行い、次亜塩素酸カルシウムとナタマイシンを含有する殺菌剤を併用して滅菌処理を行った。実験の過程で、植物を完全に無菌化すると成長が著しく阻害されることが判明した。そこで、滅菌処理後に Mn 酸化細菌の除去を確認した植物を以降の実験に用いた。オオカナダモから分離した付着微生物株と先の条件で滅菌処理した植物を実験室内で共培養した。LBB で検定を行うと、青色物質が産生されていた(図 1)。このことから、Mn 酸化細菌とオオカナダモの共培養により、Mn 酸化物が形成されることが明らかになった。

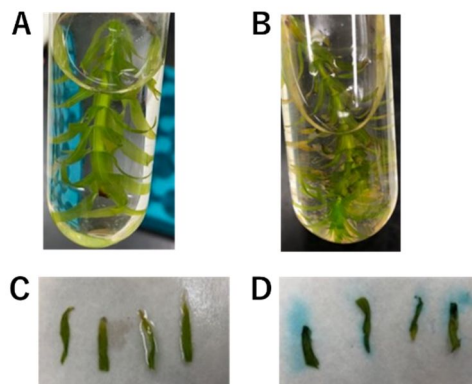


図 1 滅菌処理したオオカナダモに付着微生物株を添加し、3 週間培養した結果

- A : 微生物を添加せずに培養した
- B : 微生物を添加して培養した
- C : A の植物体に LBB を添加した
- D : B の植物体に LBB を添加した

##### 水生植物の付着微生物が生成する Mn 酸化物の化学形態分析

放射光蛍光 X 線法を用いて、オオカナダモに集積されている Mn 酸化物の化学形態を分析した。彦根市石寺町集落環濠から採取したオオカナダモおよび生育地の底泥を試料とし、放射光施設 Photon Factory (BL-9C、12C) にて、XANES スペクトルを測定した。琵琶湖水圏のオオカナダモからは酸化型の Mn が検出され、これまでに得られていた LBB 呈色反応の結果が裏付けられた。一方、底泥に含まれているのは還元型の Mn 化合物であった。滅菌処理を行って得られた植物体の Mn は 2 価の還元型であった。植物表面のバイオフィームから採取した試料からは、酸化型 Mn が検出された。植物を採取した箇所の底泥には還元型 2 価の Mn が含まれていた。これらの結果は、環境中の Mn の酸化がオオカナダモに付着する微生物によって触媒されることと、Mn 酸化物が水生植物表面のバイオフィームに蓄積されていることを強く示唆していた。

##### 付着微生物の種特異性と環境要因の影響調査

福島県内の水路および琵琶湖流域の水路において、オオカナダモ、バイカモ (*Ranunculus nipponicus* var. *submersus*)、ナガエミクリ (*Sparganium japonicum*) を採取し、着生微生物の採取を行った。バイカモから得られた細菌株 (Rn\_isolate\_01) は、16S rRNA 遺伝子配列の決定と系統解析から *Serratia marcescens* と判別された。一方、福島県でバイカモと同じ箇所にも生育するオオカナダモや、琵琶湖流域で採取したバイカモからはこの菌は分離されなかった。これらの結果は、水生植物への Mn 酸化物の生成は、琵琶湖水圏に限らず、広い範囲で起こっていることを示唆している。その一方で、付着微生物には種特異性があること、環境要因

が植物と微生物の相互作用に影響することを示していた。

#### 水生植物より単離した付着微生物株の性質調査

Rn\_isolate\_01 は、ブラジル Mn 鉱山の坑内水から得られた *S. marcescens* と類縁であり、強い Mn 耐性を有していた。また、固形寒天培地で Mn 酸化物を形成することが明らかになった。嫌氣的雰囲気の中で微生物を培養するために、嫌気環境調整剤を用いた。密閉容器に培地と入れておくことで、酸素を二酸化炭素に変換でき、空間の O<sub>2</sub> 濃度を最大 0.1% 程度まで減らすことが可能となる。固形寒天培地、少量の寒天を加えた半流動培地および寒天を加えない液体培地に微生物を添加し、密閉容器に入れて嫌気環境調整剤を用いて酸素濃度低下させ、人工気象器内で静置培養した。また半流動培地および流動培地は 120rpm、25 °C の条件とし、聖地培養と振盪培養の 2 つの条件で調査を行った。その結果、LBB 反応はいずれも陰性であった。嫌気条件下でも好気条件下と同様、振盪培養では Mn 酸化物を生成しないことと、多糖の添加は反応に影響しないことが明らかになった。

#### 水生植物の生育形が野外での放射性セシウム集積に及ぼす影響

まず、2019 年 8 月に福島県東部で調査を行い、同一地点に生育する 3 種の水生植物（オオカナダモ、バイカモ、ナガエミクリ）を採取して、放射性 Cs と K を測定して、これまでの経年変動の結果と比較した。オオカナダモ及びバイカモでは、<sup>137</sup>Cs は葉で高く、<sup>40</sup>K は茎で高い値を示し、2017 年の結果と一致した。いずれの植物も <sup>137</sup>Cs 濃度は低下傾向にあった。水の <sup>137</sup>Cs 濃度は 2017 年から 2019 年にかけてほぼ変わらなかった。堆積物の <sup>137</sup>Cs 濃度は見かけ上は上昇した。コアサンプラーを用いて表層から 5 cm を正確に採取したことが理由と考えられた。

水生植物の <sup>137</sup>Cs 濃度は 2019-2021 年間を通じて、ほぼ全ての水生植物で低下傾向であったが、飯舘村で採取した抽水植物（ヒメガマ及びカンガレイ）では <sup>137</sup>Cs 濃度の上昇が見られた。抽水植物の地下茎が存在している底泥の深さに <sup>137</sup>Cs が到達した、あるいは地下茎に蓄積された <sup>137</sup>Cs が濃度の上昇に寄与した可能性が示唆された。

南相馬市では水生植物及び環境媒体（水と底泥）の <sup>137</sup>Cs 及び <sup>40</sup>K 濃度の季節変動も評価した。水の <sup>137</sup>Cs 濃度は春から夏にかけて上昇し秋から冬に減少する傾向を見せ、<sup>40</sup>K 濃度は季節変動がみられなかった。底泥及び水生植物では <sup>137</sup>Cs 及び <sup>40</sup>K のいずれとも季節変動は見られなかった。

南相馬市の沈水植物（バイカモ及びナガエミクリ）では 2020-2021 年を通じて <sup>137</sup>Cs 濃度の低下が見られたのに対し、抽水植物（イグサ及びクサヨシ）の <sup>137</sup>Cs 濃度低下は沈水植物よりも小さかった。抽水植物では <sup>137</sup>Cs 濃度の低下が遅い可能性が示唆された。水生植物の生育形により、放射性元素の集積が異なることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 原田英美子	4. 巻 91
2. 論文標題 メタロミクスと琵琶湖の水理現象．琵琶湖集水域の環境メタロミクス 連載第1回	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 964-970
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 -

1. 著者名 奥井啓介、原田英美子	4. 巻 91
2. 論文標題 水生植物の金属集積 植物に微生物が作用して鉱物ができる現象 ．琵琶湖集水域の環境メタロミクス 連載第2回	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 1058-1066
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 -

1. 著者名 保倉明子、原田英美子	4. 巻 92
2. 論文標題 環境科学研究への放射光蛍光X線分析の応用．琵琶湖集水域の環境メタロミクス 連載第3回	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 66-72
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 -

1. 著者名 原田英美子	4. 巻 91
2. 論文標題 メタロミクスと琵琶湖の水理現象．琵琶湖集水域の環境メタロミクス連載第1 回	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 964-970
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 -

1. 著者名 奥井啓介, 原田英美子	4. 巻 91
2. 論文標題 水生植物の金属集積 植物に微生物が作用して鉱物ができる現象 . 琵琶湖集水域の環境メタロミクス連載第2回	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 1058-1066
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 -

1. 著者名 保倉明子, 原田英美子	4. 巻 92
2. 論文標題 環境科学研究への放射光蛍光X線分析の応用. 琵琶湖集水域の環境メタロミクス連載第3回	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 66-72
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 -

1. 著者名 黒沢高秀	4. 巻 32(2)
2. 論文標題 国史跡名勝南湖公園 (福島県白河市) のスイレンの由来と近年の生育面積拡大	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 福島大学地域創造	6. 最初と最後の頁 205-214
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 永川栄泰, 黒沢高秀, 長谷川博, 原田英美子	4. 巻 2020-4
2. 論文標題 放射性Cs及びKの水生植物体内分布の比較	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedins of the 21st Workshop on Enviordmental Radioactivity	6. 最初と最後の頁 110-115
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 有
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 奥井啓介, 市之瀬智生, 黒沢高秀, 永川栄泰, 長谷川博, 保倉明子, 原田英美子
2. 発表標題 沈水植物オオカナダモに集積するマンガン酸化物 - 植物に付着する微生物の評価と放射光による化学形態分析 -
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Okui, Tomoki Ichinose, Takahide Kurosawa, Yoshiyasu Nagakawa, Hiroshi Hasegawa, Akiko Hokura, Emiko Harada
2. 発表標題 Manganese oxides accumulated in submerged plant <i>Egeria densa</i> : evaluation of epiphytic bacteria and synchrotron radiation-based characterization of Mn.
3. 学会等名 4th UST-USP Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emiko Harada, Daiki Hokoyama, Shohei Yoshizaki, Miyuki Sawada, Yoshitaka Ichikawa, Kousuke Tsuji, Kazuhiro Kumagai, Akiko Hokura, Shoko Hosoi-Tanabe
2. 発表標題 Mn-oxidation by epiphytic bacteria flora in a submerged plant <i>Egeria densa</i> .
3. 学会等名 7th International symposium on metallomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田英美子、奥井啓介、鋒山大輝、市之瀬智生、保倉明子
2. 発表標題 沈水植物オオカナダモ ( <i>Egeria densa</i> ) に集積するマンガン酸化物 放射光蛍光X線分析による化学形態の評価と金属資源回収の試み
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 (新型コロナウイルスのため中止, 大会講演要旨集 (PDF)のウェブ掲載をもって発表成立)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永川栄泰、黒沢高秀、長谷川博、原田英美子
2. 発表標題 放射性 Cs 及び K の水生植物体内分布の比較 .
3. 学会等名 第 21 回「環境放射能」研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagakawa Y, Kurosawa T, Hasegawa H, Harada E.
2. 発表標題 Distributions of 137Cs and 40K in aquatic plants affected by the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident.
3. 学会等名 IER International Symposium, Fukushima 10 years: Forest, River, Ocean, and Food -Remaining issues for restoration (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田英美子、奥井啓介、東 友夢、田中佐和、水田洋一、保倉明子
2. 発表標題 X線吸収分光法を用いたオオカナダモ (Egeria densa) に集積する Mnの化学形態調査 .
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

講演会および授業 1) 原田英美子 (2022) 水生植物バイオマスを利用した湖沼からの有用金属資源回収 . 第2回「SDGsパートナーシップ・プログラム」シンポジウム . (2022年3月24日, オンライン) . 2) 原田英美子 (2021) 琵琶湖とその周囲に生育する植物資源の理解と利用 植物の重金属集積性を手掛かりに . 比叡山高等学校模擬授業, 比叡山高等学校 (2021年7月9日) 3) 原田英美子 (2021) 琵琶湖集水域の水生植物バイオマス その理解と有効利用 . 2021年度滋賀県立大学Webオープンキャンパス模擬講義 (2021年9月~, オンデマンド動画)
Webサイト PDF1_研究の流れオオカナダモ_原田 <a href="https://researchmap.jp/cabinets/cabinet_files/download/468977/4aa8e6c304daabea05f60ecd10bdcc22?frame_id=959541">https://researchmap.jp/cabinets/cabinet_files/download/468977/4aa8e6c304daabea05f60ecd10bdcc22?frame_id=959541</a>



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	保倉 明子  (Hokura Akiko)  (20343569)	東京電機大学・工学部・教授    (32657)	
研究分担者	永川 栄泰  (Nagakawa Yoshiyasu)  (30587415)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・マテリアル応用技術部・バイオ技術グループ・主任研究員    (82670)	
研究分担者	黒沢 高秀  (Kurosawa Takahide)  (80292449)	福島大学・共生システム理工学類・教授    (11601)	

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