

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12217

研究課題名(和文) ウキクサ亜科植物の根への付着・定着性が高い微生物の検索と利用

研究課題名(英文) Screening and application of microbes adhering to the roots of Lemnoideae with stable affinity

研究代表者

田中 靖浩 (Tanaka, Yasuhiro)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：50377587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はウキクサ亜科植物の根に高い付着・定着性を持つ微生物を検索し、その中から有害化合物分解菌や植物生育促進細菌(PGPB)を利用して新しい植生浄化システムを開発することを目的とした。計14種のウキクサ試料を対象に微生物群集を解析・比較した結果、科レベルではComamonadaceae科等、属レベルではMethylophilus属細菌等が候補として見出された。このうち、Methylophilus属細菌についてはウキクサのPGPBとして5株を取得した。また、Comamonadaceae科に属するフェノール分解菌を導入したウキクサが、複合微生物系で安定的にフェノール分解活性を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Methylophilus属をはじめとしたメタノール資化性細菌がウキクサ亜科植物の根と親和性が高いことを明らかにした。また、Methylophilus属としては初めてウキクサの生育を促進する菌株(PGPB)を得た。ウキクサ亜科植物を利用した高効率なバイオマス生産、新しい汚水処理技術の開発につながる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify microbes with a high affinity for the roots of duckweed, which could be used to develop a new phytoremediation system for water purification. By comparing the microbial communities formed on the roots of 14 duckweed samples, the target microbes were identified. As a result, Comamonadaceae etc. were identified as the candidate at the family level. At the genus level, Methylophilus etc. were markedly dominant on the roots of duckweed, indicating that these microbes closely interact with duckweed with high affinity. Five strains of Methylophilaceae showing plant growth-promoting activity for duckweed were successfully obtained. Additionally, we introduced a phenol-degrading bacterial strain within the family Comamonadaceae to the roots of duckweed. The resultant functionally enhanced duckweed showed stable phenol-degrading activity after exposure to environmental water containing various types of indigenous microbes.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ウキクサ メタノール資化性細菌 植物生育促進細菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウキクサ亜科植物の多くは浮遊性の水生植物で、増殖速度が早く回収が容易であることから、東南アジア等で栄養塩除去に用いられてきたが、近年、難分解性有機化合物を含む様々な有害化学物質の浄化能も有することが明らかになってきた。また、デンプンを多く含有することから(最大で約65%)¹⁾、バイオエタノール等のエネルギー生産資源、家畜の飼料としての利用も検討されている。このような背景から、本課題担当者らはウキクサ亜科植物が持つ水質浄化能、バイオマス生産能を向上・利用することで、排水処理とエネルギー資源生産の両方を可能とする“コベネフィット型植生浄化ユニット”の開発に繋がると考え、これまでに、根部分をターゲットとして多数の有害化学物質分解菌や生育促進効果(バイオマス生産向上効果)を示す微生物(Plant Growth Promoting Bacteria; PGPB)を分離培養し、これらを根に再導入することで優れた水質浄化能を示しつつ高いバイオマス生産量を誇るウキクサ科植物の創製とこれを用いた植生浄化システムの開発を進めてきた^{2,3)}。しかし、現段階で構築したシステムを実排水処理に用いた場合、根に導入した分解菌あるいはPGPBが排水中に含まれる土着の微生物群集に淘汰され、安定的かつ継続的な排水処理およびバイオマス生産が達成できないという問題が残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、上述の問題点をクリアすべく、①どのような環境下でもウキクサの根に付着し、一定の割合で生息し続けることができる微生物を見出し、②それらを取得し、③その中からPGPBや有害化学物質分解菌を検索、当該微生物を根圏に導入することで上記問題を解決する技術開発のための予備的な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

山梨県森林公園内の池で生育していた3種のウキクサ(ウキクサ、アオウキクサ、コウキクサ)に加え、6種の微生物源(河川水、活性汚泥、土壌、雨水、嫌氣的アンモニア酸化汚泥)を接種・共培養したウキクサ、1種の河川水を接種・共培養したウキクサ、アオウキクサ、コウキクサ、ヒメウキクサの根の計14試料(表1)を対象に、ウキクサの根に分布する微生物群集を16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析にて調べた。得られたデータを比較することで、ウキクサ亜科植物の根に普遍的かつ一定以上の分布率で(1%以上を目安)生息する微生物種(属レベル)を検索した。

表1. 本研究で用いたウキクサ亜科植物試料

植物種	区分	採取場所*/微生物源	共培養培地
ウキクサ	野生	池水(森林公園)*	-
アオウキクサ	野生	池水(森林公園)*	-
コウキクサ	野生	池水(森林公園)*	-
ウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(相川)	修正 Hoagland 培地(低窒素)※
ウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(相川)	修正 Hoagland 培地(標準窒素)※
ウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(相川)	修正 Hoagland 培地(高窒素)※
ウキクサ	環境試料接種&共培養	活性汚泥	修正 Hoagland 培地
ウキクサ	環境試料接種&共培養	Anammox 汚泥	修正 Hoagland 培地
ウキクサ	環境試料接種&共培養	土壌	修正 Hoagland 培地
ウキクサ	環境試料接種&共培養	雨水	修正 Hoagland 培地
ウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(荒川)	修正 Hoagland 培地
アオウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(荒川)	修正 Hoagland 培地
コウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(荒川)	修正 Hoagland 培地
ヒメウキクサ	環境試料接種&共培養	河川水(荒川)	修正 Hoagland 培地

※低窒素：0.5 mg/L T-N、標準窒素：5 mg/L T-N、高窒素：50 mg/L T-N

各試料からの微生物分離も行い、その中から上記の結果により得られたターゲット微生物種の検索とコレクション化を試みた。また、構築したコレクションおよび研究室保存微生物菌株（すべてウキクサ由来）を対象に、ウキクサ亜科植物の生育を促進する微生物（PGPB）、有害化学物質のモデル化合物（今回はフェノールを使用）を分解する微生物の検索を進めた。

最後に、ウキクサ亜科植物由来の分解菌を無菌ウキクサに導入することで作出した機能強化ウキクサを環境試料中（種々の土着微生物が分布する環境下）で栽培した後も、導入した微生物の機能が持続するかを評価した。

4. 研究成果

(1) ウキクサ亜科植物の根に付着・定着しやすい微生物の検索

ウキクサ亜科植物根（計 14 試料）に付着していた微生物群集の 16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコン解析データ⁴⁾（一部データは未発表）を比較した結果を分類階級別に以下に示す。

[門レベル]

Pseudomonadota 門、*Bacteroidota* 門、*Verrucomicrobiota* 門、*Pranctomycetota* 門の 4 門が 14 試料中、過半数である 8 試料以上で 1%以上の分布率を示した（それぞれ 45.2~89.3%、5.0~31.6%、1.7~28.3%、2.1~10.8%）。これらのうち、*Verrucomicrobiota* 門に関しては微生物源あるいは生息環境試料（池水）での分布率が最大で 2.1%であったのに対し、ウキクサ根では最大で 28.3%にまで達するケースが見られた。そのため、本門に属する細菌はウキクサ根に付着後に優占化する傾向にあり、特にウキクサ根との親和性が高い可能性が示唆された。

[科レベル]

門レベルでの比較時と同様に、14 試料中 8 試料以上で 1%以上の分布率を示す科のみを抽出したところ、9 科が該当した（表 2）。このうち、*Comamonadaceae* 科はすべての試料で高い分布率を示し（13 試料で 10%以上の分布率）、最大で 55.5%を占める試料も見られた。また、*Methylophilaceae* 科の分布率も高く、14 試料中 7 試料で 10%以上の分布率を示した。

表 2. ウキクサ亜科植物根に高頻度で分布する細菌（%；科レベル）

分類系統	野生（池水）			接種&共培養													
	ウキクサ	アオウキクサ	コウキクサ	河川水（相川）			ウキクサ				ヒメウキクサ				アオウキクサ		
				河川水（荒川）			河川水（荒川）	活性汚泥	Annamox汚泥	土壌	雨水	河川水（荒川）					
				低密養	標準密養	高密養						河川水（荒川）	アオウキクサ	コウキクサ			
<i>Comamonadaceae</i>	17.2	18.8	18.1	55.5	24.4	31.7	35.4	8.0	16.2	23.2	20.8	29.4	20.2	49.1			
<i>Methylophilaceae</i>	4.6	12.0	9.9	4.3	12.0	12.3	9.0	16.7	28.1	17.7	21.2	2.4	0.8	3.0			
<i>Sphingomonadaceae</i>	0.8	1.0	1.7	3.9	4.3	6.0	4.4	6.3	1.3	3.5	1.1	2.8	2.7	3.0			
<i>Caulobacteraceae</i>	0.9	0.5	0.6	5.1	2.4	2.6	9.1	5.0	0.5	4.7	8.2	0.9	3.0	1.1			
<i>Cytophagaceae</i>	2.3	4.4	3.0	2.5	7.2	4.5	6.6	7.7	0.0	0.7	1.0	14.1	14.0	5.4			
<i>Chitinophagaceae</i>	4.1	5.0	5.1	2.0	3.0	4.9	0.6	3.5	5.1	2.2	0.1	4.0	0.8	2.4			
<i>Opiritaceae</i>	1.9	0.6	0.8	1.7	9.7	3.0	1.5	27.7	0.4	3.4	0.0	0.9	0.0	1.3			
<i>Planctomycetaceae</i>	3.4	3.7	2.4	0.1	2.0	0.6	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	10.7	2.1			
<i>Saprospiraceae</i>	15.5	18.8	7.6	0.2	2.3	2.3	1.0	0.2	0.0	0.0	0.0	2.9	0.5	1.8			

■：1%以上 ■：5%以上 ■：10%以上

以上から、ウキクサの栽培条件の違い（微生物接種源の違いを含む）、ウキクサの種類の違いに左右されず、*Comamonadaceae* 科と *Methylophilaceae* 科は当該植物根に高頻度で付着・優占化する（親和性が高い）細菌群であると考えられた。

[属レベル]

14 試料中 8 試料以上で 1%以上の分布率を示す科のみを抽出したところ、9 属（属レベル相当も含む）が該当した（表 3）。これらのうち、*Methylophilus* 属細菌、*Delftia* 属細菌、*Methylibium*

属細菌はいずれメタノールやメチルアミンなどの C1 化合物を資化できる細菌(メチロトロフ)として知られている。従って、本能力 (C1 化合物資化性) を有する細菌種は全般的にウキクサ亜科植物根との親和性が高いと推定されるが、すべてのウキクサ試料に高頻度で分布していた *Methylophilaceae* 科に属する *Methylophilus* 属は特に期待できると判断された。

表 3. ウキクサ亜科植物根に高頻度で分布する細菌 (% ; 属レベル)

分類系統	野生 (池水)			接種&共培養														
	ウキクサ	アオウキクサ	コウキクサ	ウキクサ							ヒメウキクサ	アオウキクサ	コウキクサ					
				河川水 (相川)			河川水 (荒川)		活性汚泥	Anaerob 汚泥				土壌	雨水			
				低窒素	標準窒素	高窒素												
<i>Methylophilus</i>	1.4	2.2	3.1	2.5	15.5	27.9	4.3	21.1	0.4	0.1	1.7	0.0	0.1	0.0				
Unclassified_Comamonadaceae	5.2	1.6	2.4	1.7	1.8	0.0	3.4	3.8	2.2	0.4	1.4	2.2	2.4	4.2				
<i>Pelomonas</i>	7.7	2.1	2.0	4.0	0.3	0.0	5.5	1.3	2.6	2.9	1.7	0.5	0.4	0.8				
<i>Novosphingobium</i>	3.1	1.9	2.0	0.5	5.5	0.8	3.4	0.1	0.2	2.3	1.2	0.6	0.8	1.1				
<i>Deftia</i>	4.9	2.1	1.7	1.4	0.1	0.6	0.3	6.1	1.2	0.9	0.9	0.5	1.3	1.4				
<i>Acidovorax</i>	4.0	1.8	4.2	3.8	0.1	0.0	3.5	0.2	1.8	0.8	1.6	0.1	0.5	1.9				
<i>Comamonas</i>	14.4	4.5	3.2	2.4	0.4	10.3	0.5	0.0	12.9	1.3	3.2	0.9	2.9	2.0				
<i>Azohydromonas</i>	1.7	2.6	2.8	1.6	0.2	0.0	2.6	0.0	1.0	1.4	1.0	1.5	0.8	2.4				
<i>Methylibium</i>	1.4	1.1	1.8	0.9	1.6	0.1	0.2	0.0	0.9	0.2	1.8	5.7	5.8	1.7				

■ : 1%以上 ■ : 5%以上 ■ : 10%以上

(2) ウキクサ亜科植物の根に付着・定着しやすい微生物の分離培養

4-1 に記述した結果より、ウキクサ亜科植物からの *Methylophilus* 属細菌の分離培養を試みた。具体的には、河川水を接種・共培養したウキクサ亜科植物 (ウキクサ、コウキクサ、アオウキクサ、ヒメウキクサ) と活性汚泥を接種し、0.1%または 1.0%メタノール共存下で共培養したウキクサを対象に、Tanaka らの方法⁵⁾に従って細菌の分離培養を行った。取得した全菌株の 16S rRNA 遺伝子を解析・データベース検索による簡易同定を行った結果、最終的に *Methylophilus* 属に該当する 140 株を取得できた。

(3) ウキクサ亜科植物の生育促進効果を示す菌株 (PGPB) の検索

取得した *Methylophilus* 属 140 株に加え、門レベルでウキクサ根との親和性が高いと考えられた *Verrucomicrobiota* 門に属する菌株 (研究室保存の 83 株) を対象に、コウキクサの生育を促進する菌株の検索を Iwashita らの方法⁶⁾に準じて行った。その結果、5 株の *Methylophilus* 属 (PGP 活性 : 1.4~1.7 倍)、1 株の *Verrucomicrobiota* 門細菌 (PGP 活性 : 1.9 倍) に当該活性が安定的に分布することが明らかとなった。今後、これらの PGPB 導入ウキクサに関しては、複数の微生物群集生息下においても PGPB 非導入ウキクサと比べて生育が向上しているか否かについての検証が必要である。なお、*Verrucomicrobiota* 門細菌に属する菌株に関しては、本門に属するウキクサ亜科植物の PGPB としては初の報告例となる。

また、上記以外にも系統的に新規あるいは *Methylophilus* 属と同様にメチロトロフとして知られる *Hyphomicrobium* 属や *Methylibium* 属の PGPB も多数見出すことに成功した^{6,7)}。

(4) 根圏強化ウキクサの作出と能力評価

研究室保存のフェノール分解菌 (ウキクサ試料由来) の中から、ウキクサ亜科植物根との親和性が高い分類系統の候補として判断された *Comamonadaceae* 科に属する *Rhodoferax* sp. 12R24 株と、候補外の *Pseudomonadaceae* 科に属する *Pseudomonas* sp. 22L7 株を選出し、Iwashita らの方法⁷⁾に準じてそれぞれ無菌ウキクサに導入することで根圏機能強化ウキクサを作出、両者の活性を比較した。作出した 2 種のウキクサは図 1-(A) に示すように、いずれも 48 時間後には培地 (修正 Hoagland 培地) 中のフェノール (50 ppm) をほぼ完全に分解する能力を有していた。この根圏機能強化ウキクサを様々な微生物群集が分布する河川水にて 3 日間栽培後、再度、50 ppm

のフェノールを含む修正 Hoagland 培地に投入したところ、12R24 株に関してはほぼ同等の分解活性を維持していたが、22L7 株ではフェノール分解速度が低下していた(図 1-(B))。以上より、根圏機能強化ウキクサを作出するにあたっては、ウキクサ亜科植物根との親和性が高い分類系統の菌株を使用することが当該機能の維持安定化に有効であることを支持する結果が得られた。

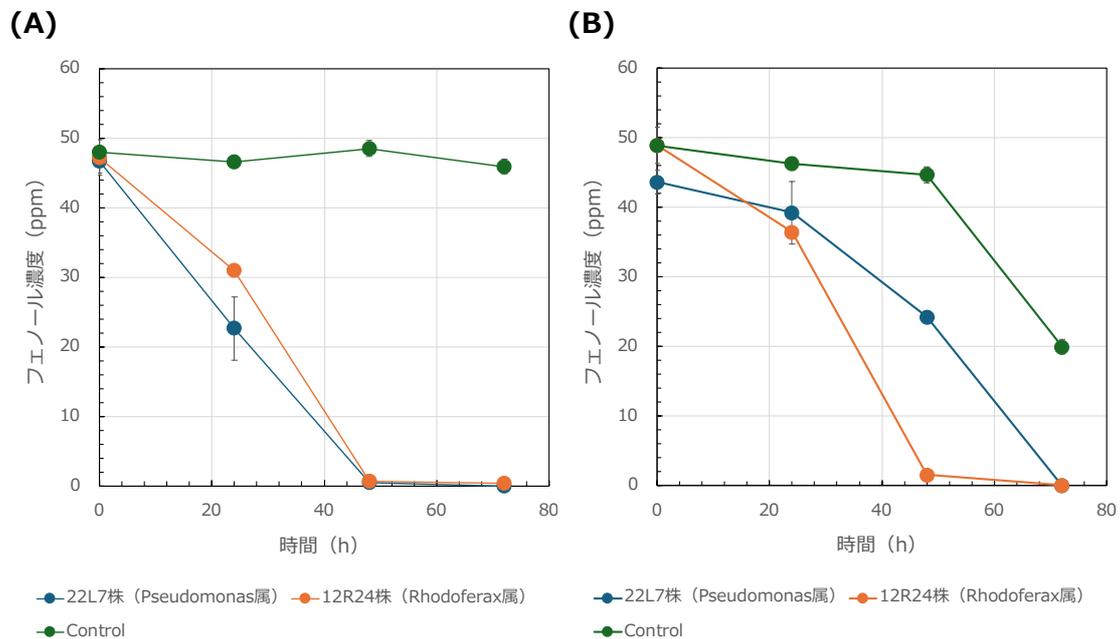


図 1. 根圏機能強化ウキクサによるフェノールの分解

(A) 複合微生物非存在下 (B) 複合微生物存在下 (河川水由来微生物群集接種後)

Control : (A) は無菌ウキクサ、(B) は河川水由来微生物群集接種ウキクサ

<引用文献>

- 1) Xu, J. *et al.* (2011) Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems engineering* **110**, 67–72.
- 2) Kristanti, R.A. *et al.* (2012) Isolation and characterization of 3-nitrophenol-degrading bacteria associated with rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*. *Environ. Sci. Poll. Res.* **19**, 1852–1858.
- 3) Toyama, T. *et al.* (2017) Enhanced biomass production of duckweeds by inoculating a plant growth-promoting bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* P23, in sterile medium and non-sterile environmental waters. *Water Sci. Technol.* **76**, 1418–1428.
- 4) Iwashita, T. *et al.* (2020) Comparative analysis of microbial communities in fronds and roots of three duckweed species: *Spirodela polyrrhiza*, *Lemna minor*, and *Lemna aequinoctialis*. *Microbes Environ.* **35**, ME20081.
- 5) Tanaka, Y. *et al.* (2020) "Duckweed-microbe co-cultivation method" for isolating a wide variety of microbes including taxonomically novel microbes. *Microbes Environ.* **33**, 402–406.
- 6) Iwashita, T. *et al.* (2021) Isolation and characterization of novel plant growth-promoting bacteria from the fronds of duckweed. *Jpn. J. Wat. Treat. Biol.* **57**, 1–9.
- 7) Makino, A. *et al.* (2022) Isolation of aquatic plant growth-promoting bacteria for the floating plant duckweed (*Lemna minor*). *Microorganisms* **10**, 1564.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ayaka Makino, Ryosuke Nakai, Yasuko Yoneda, Tadashi Toyama, Yasuhiro Tanaka, Xian-Ying Meng, Kazuhiro Mori, Michihiko Ike, Masaaki Morikawa, Yoichi Kamagata and Hideyuki Tamaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Isolation of Aquatic Plant Growth-Promoting Bacteria for the Floating Plant Duckweed (<i>Lemna minor</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10081564	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Tomoki Iwashita, Yasuhiro Tanaka, Hideyuki Tamaki, Yasuko Yoneda, Ayaka Makino, Yuka Tateno, Yan Li, Tadashi Toyama, Yoichi Kamagata, Kazuhiro Mori	4. 巻 35
2. 論文標題 Comparative Analysis of Microbial Communities in Fronds and Roots of Three Duckweed Species: <i>Spirodela polyrhiza</i> , <i>Lemna minor</i> , and <i>Lemna aequinoctialis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME20081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME20081	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森下陽介, 田中靖浩, 山村英樹, 菅野学, 玉木秀幸, 鎌形洋一, 森川正章, 遠山忠, 森一博
2. 発表標題 ウキクサ - 微生物共培養法により分離培養した新規細菌捕食性細菌の性質
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下陽介, 田中靖浩, 岩下智貴, 菅野学, 玉木秀幸, 鎌形洋一, 遠山忠, 森一博
2. 発表標題 精密ろ過膜と水生植物ウキクサを利用した難培養性細菌群 <i>Verrucomicrobia</i> 門細菌の集積
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学生命環境学部環境科学科・田中研究室 (note)
https://note.com/ev_tanaka_lab

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	遠山 忠 (Toyama Tadashi) (60431392)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	
研究分担者	森 一博 (Mori Kazuhiro) (90294040)	山梨大学・大学院総合研究部・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
---------	---------