

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：13501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0146

研究課題名（和文）塩生植物-微生物共生系を用いた高機能なファイトレメディエーションの創出

研究課題名（英文）Creation of advanced phytoremediation on salinity soil using halophytes-microbe complex systems

研究代表者

片岡 良太（Kataoka, Ryota）

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：00635104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：Mesembryanthemum属植物を用いて耐塩性試験を実施した。M. chilensisは塩濃度が100 mMまでは旺盛に生育したが、200 mM以上になると急激に生育不良を示した。しかし、M. eduleはNa含有土壌で生育良好となり、600 mMでも抑制することなく生育した。内生微生物相も、M. chilensisとM. eduleで異なり、多様性指数はM. chilensisで高い値となった。吸塩量の推定モデルで吸塩係数を考慮すれば、処理区に関わらずM. chilensisの吸塩量を正確に予測できた。今後、塩による成長促進作用についても解明し、モデル化する必要があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトレメディエーションによる土壌修復は時間がかかるという問題点がある。しかし、植物生育促進内生細菌の利用で改善できる可能性を示した。Mesembryanthemum属植物3種を用いたが、M. chilensisやM. eduleでは植物成長を促進する効果的な菌株を選抜できたが、その応用までは達成できなかった。しかし、M. crystallinumについては有用内生細菌を選抜し、その効果も明らかにすることができた。本研究で選抜した植物内生細菌を活用し、Mesembryanthemum属植物の生育を促進することで吸塩能を高めることが出来ればファイトレメディエーションの弱点克服が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Salt tolerance experiment were carried out using Mesembryanthemum chilensis and M. edule. M. chilensis was grown in an artificial climate chamber in Yamanashi University, and M. edule was grown in a glass greenhouse at Ankara University. M. chilensis grew vigorously up to a salt concentration of 100 mM, but showed rapid growth retardation when the salt concentration was 200 mM or higher. In contrast, M. edule grew well in Na-containing soil and grew without inhibition even at 600 mM. The endophytic bacteria also differed between M. chilensis and M. edule, with the diversity index being higher in M. chilensis. When the salt absorption coefficient was taken into account in the salt absorption estimation model, the salt absorption of M. chilensis could be accurately predicted regardless of the treatment area. It is considered necessary to clarify and model the growth promotion effect of salt in the future.

研究分野：土壌学・土壌微生物学

キーワード：塩類集積土壌 Mesembryanthemum属 植物内生細菌 植物成長促進効果

耐塩性菌株の分離：採取した植物体を表面殺菌処理し、乳棒と乳鉢ですり潰し、植物組織液を5倍に希釈した。希釈液は、NaCl 513mM 含有の R2A 培地 (pH 7.0) に 50 μ l ずつ塗布した。その後、25°C で 4 日間培養し、培地上に生育した耐塩性分離菌株を得た。

分離菌株の植物成長促進メカニズム：IAA 生産能、リン酸可溶化能、シデロフォア生産能を測定し、窒素固定及び ACC デアミナーゼ活性についてはそれぞれの特異的プライマーを用いて酵素遺伝子の有無を指標とした。

16S rRNA による属種同定：各分離株の 16S rRNA 遺伝子は 341F/1378R プライマーを用い増幅し、ダイレクトシーケンスによって決定した。シーケンス配列は、日本 DNA データバンク DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>) による相同性検索を行った。

選抜菌株を用いたポット栽培：表面殺菌した種子を選抜した菌株の培養液 (PDB 培地) 5ml に入れ、3 日間発芽させた。栽培実験は、低地土を 300g 充填したポットを利用し、1 週間おきに菌株培養液 (PDB 培地) 1ml を植物の根元に添加しながら行った。計 2 か月間の栽培後、収穫した植物体の地上部と根の新鮮重量及び乾燥重量を測定した。

塩濃度ごとの細菌増殖の関係：0, 50, 200, 400mM 含有の PDB 培地 3ml に被試験菌株を接種し、25°C, 3 日間振とう培養した。培養後、吸光度計を用いて濁度 660nm を測定し、菌株の耐塩性を評価した。

マイクロバイオーム解析：*Mesembryanthemum* 属植物の根もしくは葉茎から DNA を抽出・精製し、NGS (次世代シーケンス) 解析に供した。

4. 研究成果

耐塩性評価および吸塩性：アイスプラントについては、供試土壌全てで 50mM と 200mM の塩濃度に比べて、350mM では地上部新鮮重量が著しく低下した。よって、200mM を超えると生育が悪化することが明らかになった。Na の大部分は、根より地上部に蓄積した。地上部の植物体 1 株あたりの Na 吸収量は、どの土壌においても、200mM で最大になり、350mM 時に著しく低下する傾向がみられた。よって、高塩濃度環境下になると、地上部の吸塩性が低下することが明らかとなった。一方、*M. chilensis* は塩濃度が 100 mM までは旺盛に生育したが、200 mM 以上になると急激に生育不良を示した。対照的に、*M. edule* は Na が含まれていない土壌よりも Na が含まれている土壌で生育が良くなり、600 mM でも抑制することなく生育した。また、吸塩性評価試験結果から *M. chilensis* では、塩濃度 600 mM で栽培すると植物体中の塩濃度が 150,000 mg/kg に達することから本植物種も吸塩力は高いことが明らかになった。しかしながら、高塩濃度下で生育が良好だったトルコの *M. edule* の植物体中 Na 濃度は、最大で 27000mg/kg に留まった。

塩濃度ごとの細菌増殖の関係：アイスプラントでは、生育を促進した根圏土壌細菌 350mM-褐色森林土-5 菌株は、塩濃度 200mM で最大の増殖した後に減少する傾向を示し、根圏土壌細菌 200mM 低地土-11 菌株は 400mM で最大の増殖を示す特徴が見られた。一方、バクヤギクの根からは内生細菌が 20 株 (R1~R20) 分離された。耐塩性を持ち、高いリン酸可溶化能と IAA 生産能を示した R14, R20 株、中程度のリン酸可溶化能と IAA 生産能を示した R9 株、IAA 生産能のみを示した R17 株、いずれの植物生育促進形質も示さなかった R7 株を選抜して、ポット栽培試験に用いた。*M. edule* では、合計 190 菌株の内生細菌を分離し、IAA 生産能、リン酸可溶化能、シデロフォア生産能を調査したところ、17 菌株のみ調査した全ての能力を有していなかったが、残りの 173 菌株では何らかの能力を有していた。特にリン酸可溶化能を有する菌株が多く見られた。

選抜菌株を用いたポット栽培試験:アイスプラント

では、根圏土壌細菌の 350 mM-褐色森林土-5 菌株と 200 mM-低地土-11 菌株は、無接種区よりも有意に高い値を示した。バクヤギクでは、内生細菌処理区では、内生細菌無処理区と比較して成長比率が高い傾向にあった。特に、リン酸可溶化能と IAA 生産能を示した R14, R20 株を接種したポットでは成長比率が高い傾向にあった。同様に、R14, R20 株を接種したポットでは、根の乾燥重量が重い傾向にあった (図 2)。これらの結果は、R14, R20 株が持つリン酸可溶化能と IAA 生産能がバクヤギクの生育に影響を与えたことが理由として考えられるが、いずれの処理区においても、有意な差が見られるほどでは

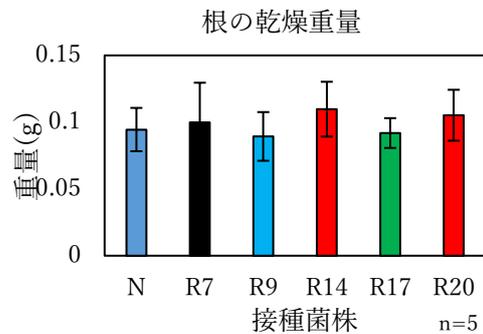
なかった。*M. edule* では、塩濃度を 0、100、200、400、600mM に設定し、IAA 生産能の高かった 1 菌株 (P2 株) を選抜し、ポット試験に供した。しかし、全ての処理区で内生細菌の成長促進効果は認められなかった。

マイクロバイーム解析:アイスプラントでは、根から抽出した DNA を NGS 解析したところ、科レベルの菌叢解析が得られた。低地土は *Xanthomonadaceae* (56.6%) と *Rhodobacteraceae* (25.55%) が占めており、褐色森林土は *Methylobacteriaceae* (36.92%)、黒ボク土では *Sphingomonadaceae* (92.23%) が優先して生育していたことが判明した。根内生細菌の選抜菌株として得られた *Bacillus* 属細菌は、各土壌の菌叢組成において、低地土で 0.14%、褐色森林土で 1.82%、黒ボク土で 0.07%であることが分かった。褐色森林土において、最も高い割合で占めており、TOP10 以内にも含まれていた。*M. chilensis* と *M. edule* では、内生細菌叢は大きく異なり、多様性指数は *M. chilensis* のほうが大きな値となった。両植物種で *Enterobacteriaceae* 科が共通して多く検出されたが、内生細菌の構成は大きく異なっていた。

吸塩量のモデルシミュレーション:図 3 に植物成長-吸塩モデルを用いた吸塩量、蒸散量および成長量のモデルシミュレーション結果を示した。蒸散量と成長量の推定値に基づいて吸塩量を算出した場合、50 および 100 mmol kg⁻¹ 区で吸塩量を過小評価した。このとき蒸散量は全処理区で著しく過小評価しており、成長量は吸塩量と同様に 50 および 100 mmol kg⁻¹ 区で過小評価していた。蒸散量または成長量の実測値に基づいて吸塩量を算出した場合でも 50 および 100 mmol kg⁻¹ 区で吸塩量を過小評価していたが、その程度は比較的小さかった。一方、蒸散量および成長量の実測値に基づいて算出した吸塩量については、いずれの処理区においても実測値と概ね一致した。

Microbe assisted phytoremediation の課題

塩生植物は、作物として直接、またはバイオテクノロジーの遺伝子資源として、人間の利益のために使用できる貴重な資源である。そして、塩生植物に関連する植物生長促進微生物は、耐塩性と収量を高めるために塩生植物作物に適用できる有望な資源であると言える。我々も高塩濃度下における土壌の塩類集積土壌の解決に向けて、生育促進能を有する細菌を利用した *Mesembryanthemum* 属植物の生育促進効果を目指したところ、*M. chilensis* やアイスプラントの植物体内から有益な微生物を見つけ出すことができた。これらの微生物はいずれも高い耐塩性を有することから、塩類土壌の指標である 4 dS/m を大幅に超える実際の圃場においても、機能し得る細菌株として期待が持てる。こうした植物の生長を促進する細菌の接種により、



Tukey test 同一アルファベット間有意差なし (P<0.05)

図 2 *M. chilensis* に選抜した内生細菌を接種したポット試験、リン酸可溶化能と IAA 生産能を示した R14, R20 株を接種したポットでは、根の乾燥重量が高い傾向にあった。

Mesembryanthemum 属植物に対する塩ストレスの影響を減らし、ファイトレメディエーションの実用化につながると考えられる。しかし、実際の除塩効果を明らかにするまでに至っていないことから、今後、細菌自身の根への定着に関連する生態解析（運動性、増殖及び根定着）を行い、その解析結果に基づいた接種効果の高い手法を用いることも含め、土壌中からどの程度の除塩ができるのか調査を行い、実用化の検討について明らかにしていく必要がある。また、塩類集積土壌中の重金属汚染も今後調査していく必要がある。ファイトレメディエーションでは汚染物質を吸収した植物体の処理が問題になることがあるが、我々は食用塩生植物を用いることで吸塩した植物体の処理問題を解決する狙いがあるため、Na と同時に重金属も吸収してしまうと食用できなくなってしまうという別の問題が生じてくる。また、食用できる点は農業生産性の維持からも重要なため、早急に検討すべき課題である。一方で、吸塩モデルについては、吸塩量の推定モデルで吸塩係数を考慮することで、処理区に関わらず *M. chilensis* の吸塩量を正確に予測可能であった。植物成長-吸塩モデルを用いた吸塩シミュレーションでは、50 および 100 mmol kg⁻¹ 区で著しい過小評価が認められた。その原因として、同処理区における成長量を過小評価したことや、植物体の塩濃度の計算値が高くなって吸塩係数が低下したことや、蒸散量を過小評価したことが考えられる。そのため、*M. chilensis* の吸塩量を精度良く推定するためには、蒸散量と成長量の正確な推定が必要であり、50 および 100 mmol kg⁻¹ 区で特に成長量を過小評価したが、同処理区では植物体の含水率が高かったことから、吸塩に伴う浸透圧上昇によって吸水ひいては光合成が活発になった可能性がある。今後は塩による成長促進作用についても解明し、モデル化する必要があると考えられる。

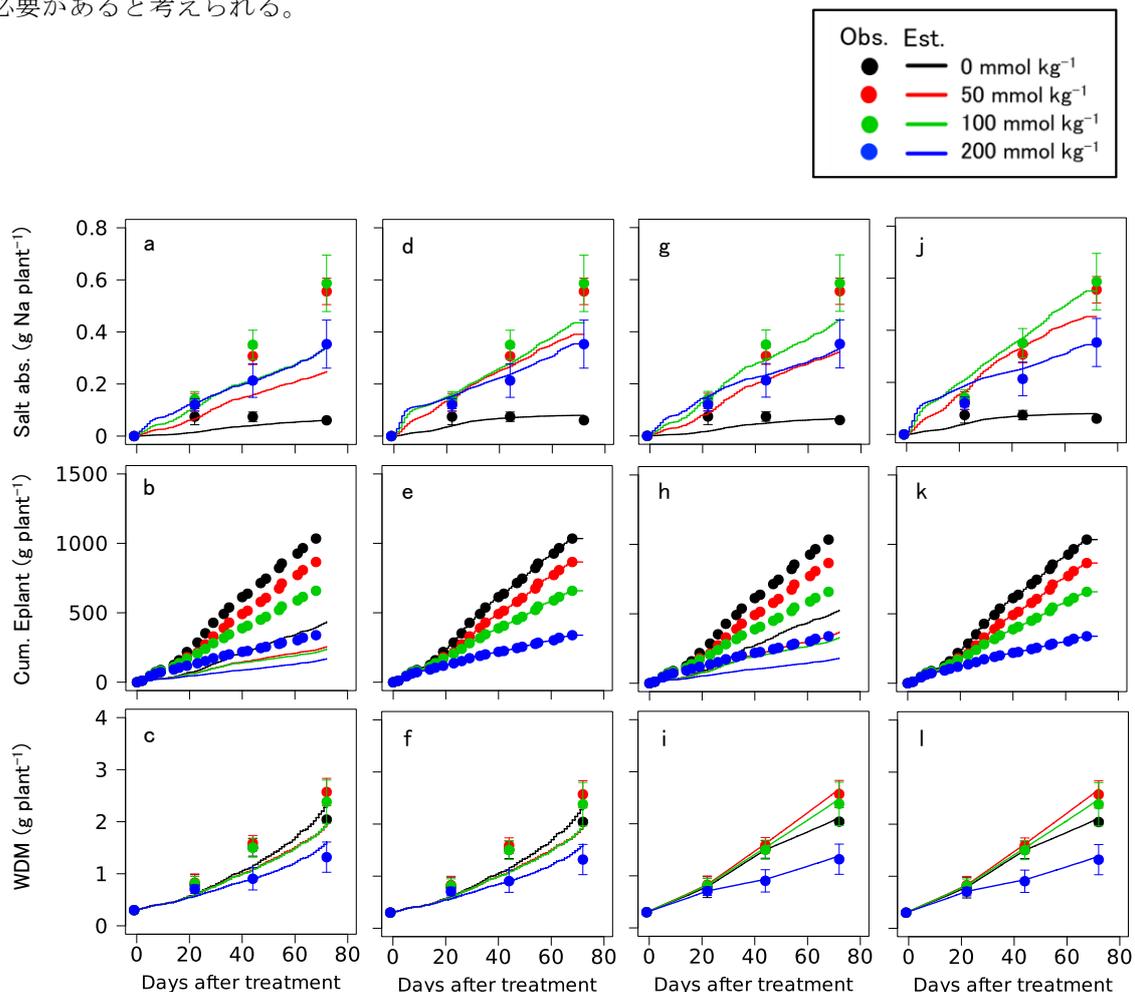


図 3 *M. chilensis* の推定または観測された累積蒸散量と全葉乾燥質量に基づく塩分吸収量の検証とシミュレーション、0、50、100、および 200 mmol kg⁻¹ は栽培した土壌の塩分濃度を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kataoka Ryota, Akashi Mami, Taniguchi Takeshi, Kinose Yoshiyuki, Yaprak Ahmet, Turgay Oguz	4. 巻 22
2. 論文標題 Metabolomics Analyses Reveal Metabolites Affected by Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria in Roots of the Halophyte Mesembryanthemum crystallinum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111813	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 片岡 良太	4. 巻 76
2. 論文標題 植物 - 微生物複合系を利用した塩類集積土壌の浄化技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本海水学会誌	6. 最初と最後の頁 11-17
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryota KATAOKA, Oguz Can Turgay, Ahmet Emre Yaprak, Yoshiyuki KINOSE, Takeshi TANIGUCHI
2. 発表標題 The Research on Endophytic Microbial Community of Halophytic Plant and Its Application to Phytoremediation of Salinity Soils in Turkey
3. 学会等名 GSS2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黄瀬佳之, 遠藤美玲, 塚田康司, 片岡良太
2. 発表標題 塩類集積土壌のファイトレメディエーションモデル開発に向けた実験的研究
3. 学会等名 大気環境学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Waleed Asghar, Muhittin Onur Akca, Hanife Akca, Ommolbanin Jafari Tarf, Ryota Kataoka and Oguz Can Turgay	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 562
3. 書名 New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering	

1. 著者名 Ahmad Mahmood, Hande Bardak, Duygu Bozdoan, Taku Yamaguchi, Ali Hamed, Ryota Kataoka, and Oguz Can Turgay	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 589
3. 書名 Plant Stress Mitigators	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	谷口 武士 (Taniguchi Takeshi) (10524275)	鳥取大学・乾燥地研究センター・准教授 (15101)	
研究分担者	黄瀬 佳之 (Kinose Yoshiyuki) (00818528)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (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
---------	---------