

水耕栽培したソルガムのカドミウム吸収に対するマンガンの効果

太田裕貴¹、河合成直¹、工藤洋晃¹、後藤祥子²、世良耕一郎³

¹岩手大学農学部

020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

²日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

³岩手医大サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

カドミウム (Cd) は動植物にとって必須性が無く、有害な重金属である。その一方で、Cd は工業的には電池などに使用され有用な元素である。しかし、Cd は毒性が高く、その毒性は他の重金属の2から20倍である。土壌中のCdは植物を経由して、食物連鎖を通じて人に蓄積する。昭和の時代のイタイイタイ病の発生は我が国の公害の歴史において大きな記憶として残されている。

1960年代以降、世界でCdの人体への毒性が認識されるようになった。1946年頃から富山県婦中町熊野地区(現富山市)において、患者が原因不明の骨折により痛い痛いと訴えるイタイイタイ病が発生した。この病気は、腎臓の尿細管障害が起これ尿中にタンパク質とカルシウム(Ca)が増加し、骨中のCaが減少することで骨粗鬆症および骨軟化症様の症状を引き起こすことが知られた¹⁾。このような症状を持つ病は世界にもほとんど例がなく、発見当初原因は全く不明であった²⁾。その原因はCd汚染米を食べ続けたことによると考えられている。

このCdの土壌汚染は、現在も完全になくなったわけではなく、現在も、潜在的なCd汚染地は存在する(図1)。Cd汚染米の発生は我が国の稲作にとって潜在的な問題点である。故に、農業においては、生産物中のCd含量に留意する必要がある、土壌中のCd低減技術が必要である。図1に示されているように、東北地方には土壌のCd含量が高い地域が存在する。その地域のCd汚染は鉱山由来のCdがその河川に流れ出し、その河川水が流域の田畑に灌漑水として長年導入されたことによる。

現在、国際的には、国際的な食品添加物および汚染物質等について基準を定めることを目的としたCodex alimentarius commision (CAC、コーデックス食品規格委員会)があり食品の有害重金属の含量の基準値を定めている。CACは1963年に国際連合食料農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)によって設置された政府間組織である。日本は1966年に加盟した。現在のコーデックス委員会の国際基準値は以下である⁴⁾。精米は $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ 風乾物、小麦と葉菜は $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ 現物、根菜、茎菜は $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ 新鮮物、鱗茎類・アブラナ科野菜(結球するもの)・ウリ科果菜、その他、果菜は $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ 新鮮物、海産二枚貝と頭足類 $2 \mu\text{g g}^{-1}$ 新鮮物。

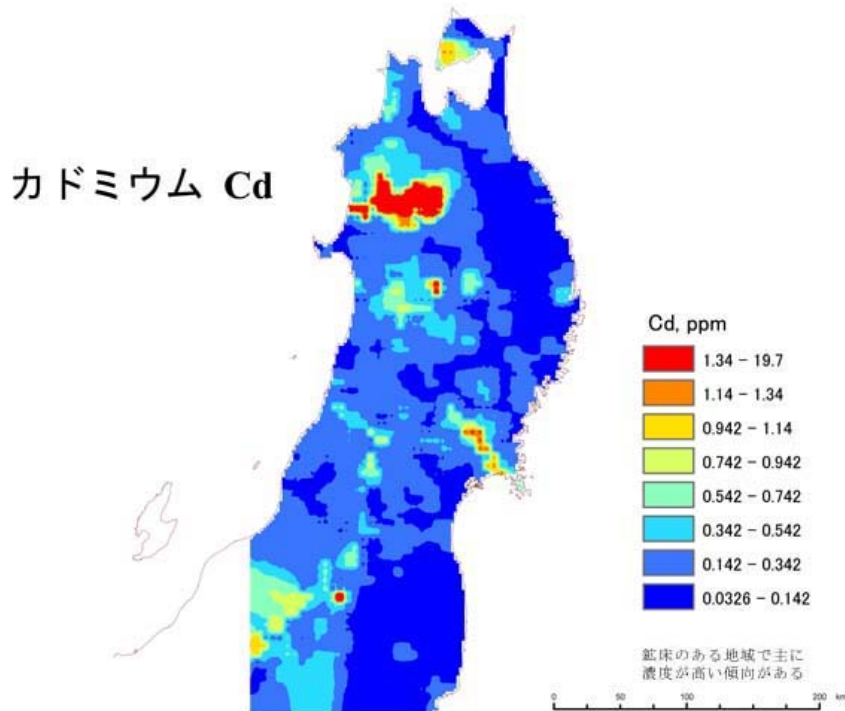


図1 東北地方の土壌のカドミウム含量 (地球化学図³⁾ より)

農業現場においては、Cdを多量に含む野菜などの食料を生産しないようにするために、汚染地の土壌を浄化する必要に迫られている。その方法は、大別して3種類あると考えられる。

1. 重篤な汚染地に対しては、有害金属を含む土壌を取り除く（または、取り除かずその上に）有害金属を含まない土壌を客土する方法が取られる。この方法は、時間がかからず、確実であるが土壌の購入代などのコストが高い点が問題である。
2. 中程度の汚染地に対しては植物により有害金属を吸収し、その植物を取り除き廃棄することによりその土壌より有害金属を除去する方法であり、ファイトレメディエーション (phytoremediation) と呼ばれている。この方法の長所は、数年間かかるなど時間を要するが経費が少ないことである。
3. 最も軽度な汚染地については土壌改良資材を投入することにより作物に吸収される有害金属の量を低下させようとするものである。現在は、研究中のものがあるが、現在劇的な効果を持つものは無いと思われる。Cdについては、石灰資材の投入により、土壌のpHを上昇させることが最も有効であると考えられている。さらに、水田などでは、イネ刈り直前まで湛水することで、コメのCd含量を低下させられることが知られている。

本研究は、上記のファイトレメディエーションに用いる植物に対し、Cdと微量必須元素の間にどのような関係が有るかを検討した。それにより、ファイトレメディエーションにおいて、微量必須元素の施用により、1回の耕作において効率良くCdを収奪できる方法を考案したいと考えた。

2 実験方法

2.1 ソルガムの育成方法・期間

(1) 種子殺菌・育苗

ソルガム (*Sorghum bicolor* cv. Sudax、カネコ種苗株式会社) の種子を 2% さらし粉溶液に入れてスターラーで攪拌しながら 30 分間種子殺菌した後、流水で塩素臭がなくなるまで洗浄した。殺菌した種子を湯で湿らせたタオルで包みバットに乗せてラップで覆った。このバットを 23 °C の恒温器内に 24 時間静置した。

(2) 播種・育苗

塩素消毒した 15 L バケツに 1 mM CaCl₂ 溶液を 12 L 入れ、塩素消毒したネットを溶液面の高さに合わせ固定し、この上に播種した。この時、ピンセットを用いて種子の間隔が一定になるように並べた。播種後、バケツにアルミホイルを被せ遮光し、約 2 日後に外した。1.2 葉期になるまで育苗した後、1/2 濃度の Hoagland & Arnon No.2 培地⁵⁾ (pH 5.5) に移し 1 週間生育させた。

(3) 本培養

1.2 葉期から 1 週間同培地で生育させたソルガムのうち、同程度生育したものを選抜し、岩手大学温室内での本培養に用い Cd 処理を開始した。実験 1、2 共にカドミウム(Cd)の濃度は 2 μM とした。実験 1 においてはイオウ (S) 濃度が Cd 吸収に関与するとの知見がある⁶⁾ので、S 濃度を S 濃度を 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM の 4 段階設定した。各試験区の培地は S 濃度を合わせるために Na₂SO₄ や MgCl₂ を用いて調製した。実験はそれぞれ 4 連で行った。実験 2 においては、Cd 2 μM、Mn 濃度 0, 0.25, 12.5 μM とした。

また、2 μM Cd の培地でソルガムは生育が著しく妨げられ、2-3 週目にかけて枯死してしまい試験培養としては不適切と考えられたので、実験 1 ではソルガムの水耕栽培は本培養期間を 2 週間 (14 日間) とした。なお、pH は一日おきに 5.5 に調整した。実験 2 では 1 週間目の植物を採取して分析した。なお、実験 2 においては、人工気象室内(明期 14 時間、10°C、暗期 10 時間、10°C)において同様の実験を行い生育の様子を観察した。この時、上記の 1 mM CaCl₂ 溶液において 1 週間、1/5 濃度の Hoagland & Arnon No.2 培地で 1 週間、1/2 濃度の Hoagland & Arnon No.2 培地で 2 週間栽培した後、Cd 処理を開始した。

2.2 元素分析

(1) 元素量測定用試料の採取

試験開始後、実験 1 においては 3 週間目に、実験 2 においては 2 週間目に植物体を採取し、50 μM EDTA 溶液に 15 分間浸した後、脱イオン水に 15 分間浸し洗浄した。その後、水分をふき取り、紙製の封筒に入れ 70 °C の恒温器で 24 時間以上かけて完全に乾燥させたものを元素量測定用の試料とした。

(2) 元素含量測定用試料の調製 (硝酸-過塩素酸分解法⁷⁾)

乾燥させた植物体を地上部と根部に分け、それぞれの乾燥重量を測定した後、各試料を細かく切断し、管ビンに入れた。特級濃硝酸を 5 ml 加え、時計皿で蓋をし、ブロックダイジェスターで 60-120 °C で加熱分解した。硝酸が不足した場合には随時追加した。固形物が視認できなくなった時点で過塩素酸 (HClO₄) を硝酸 : 過塩素酸 = 5 : 1 になるように加え加熱し、溶液が無色になった時点で加熱を停止した。放冷後、結晶が沈殿したものを濾紙 (No.5C、アドバンテック東洋株式会社) を用いて濾過し、50 ml に定容したものを試料溶液とした。

(3) 元素含量の測定

実験 1 においては、フレイム式原子吸光光度計 (170-30 型 原子吸光/炎光分光光度計、(株)日立製作所または AA-6200 島津原子吸光分光光度計、(株)島津製作所) を用いて、試料溶液の Cd、Fe、Zn、Mn を測定した。この時、一定濃度の標準溶液も測定し、試料溶液の吸光度がその範囲に収まらない場合には希釈した。各元素含量は標準液の吸光度から求めた検量線に測定値を代入し算出した。

また、実験2においては、上記の硝酸-過塩素酸で分解した溶液1mlを容器に入れ、日本アイソトープ協会滝沢研究所に運搬し、PIXEにてその元素量を測定した。

2.3 葉緑素含量の測定

葉緑素計（葉緑素計 SPAD-502、ミノルタカメラ株式会社）を用いて、上位葉、中位葉、下位葉のそれぞれの葉の先端、中央、基部近辺の葉緑素含量の指数（Soil and Plant Analyzer Development：以下、SPAD値と呼ぶ）を測定した。本実験では1個体あたり、9ヶ所で測定し平均値を求めたものをSPAD値とした。

2.4 統計分析

岩手大学情報処理センター内の大型電算機 IBM eServer xSeries 336 を用いて、SAS statistics の分散分析（SAS Institute, 2004）を行った。処理区間の有意差は Tukey のスチューデント化範囲（HSD）検定（ $p < 0.05$ ）で評価し、有意差があった処理区間には、図表中に異なるアルファベットを付した。

3 結果及び考察

3.1 実験1 Cdを添加した水耕培地のイオウ濃度とソルガムの元素含量の関係

(1) 植物の生育

視覚的には0 μM Cd区においては1 mM Sか10 mM Sで最も地上部生育が良いように見えた。2 μM Cd区においても同様の傾向がみられたが、明らかに生育が悪くなっており、10 μM S区ではS欠乏とCd害の両方の影響により非常に生育が悪いと思われた(図2)。

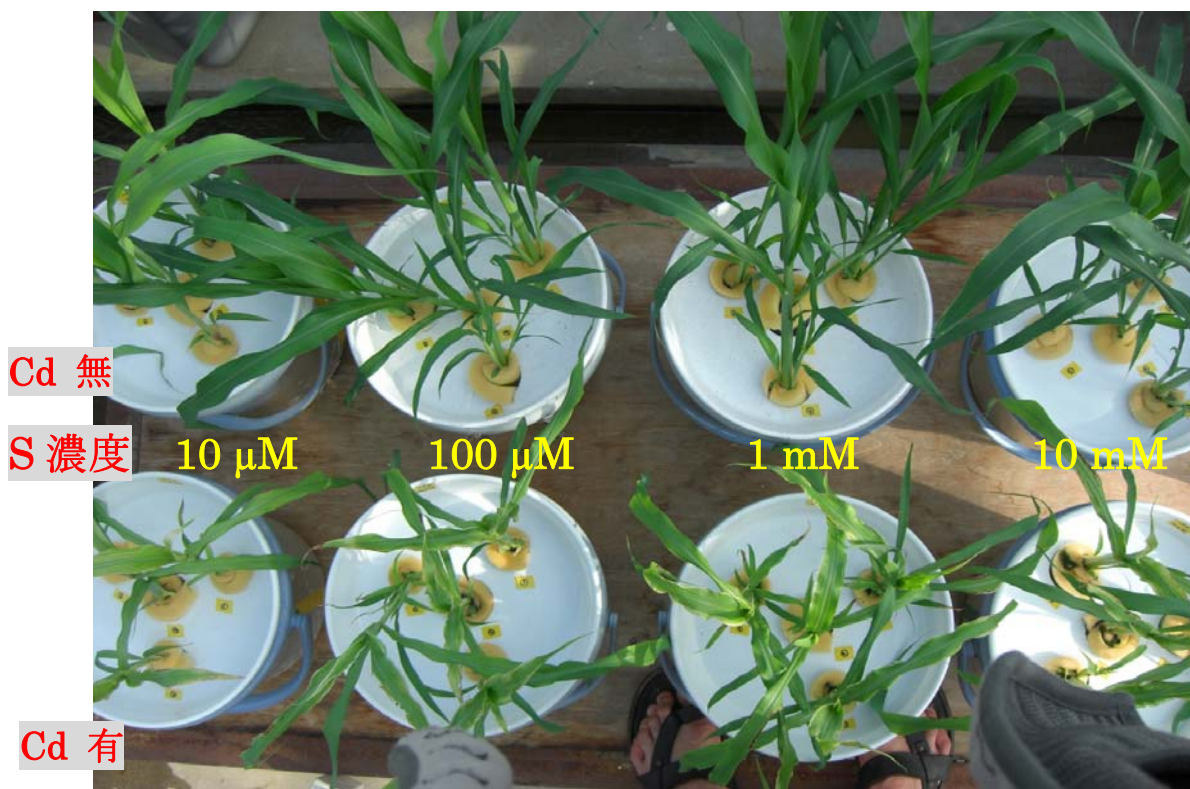


図2 S濃度とCd濃度を変化させた水耕栽培のソルガムのサンプリング直前（移植後2週間目）の様子（左から10 μM S、100 μM S、1 mM S、10 mM Sで、上の4ポットが-Cd、+Cdとなっている。）

ソルガムの葉には Ca 欠乏のような症状⁸⁾やクロロシス、ネクロシスが見られた (図3)ことから、Cd 害が生じたものと考えられる。Cd 無添加区 (0 μM Cd) では 10 μM S よりも 1 mM S において地上部乾物重量が有意に増加した。また、2 μM Cd では、0 μM Cd に比べて根部乾物重量は有意に減少した (図4)。よって、2 μM Cd 条件では地上部も根部も生育が悪くなる傾向が見られたが根部において特に顕著であった。ソルガムにおける Cd 害は根部の生育に特に悪くすることがわかった。また、2 μM Cd という植物生育にとってはかなり高い Cd 濃度で2週間生育できることから、ソルガムは Cd 害に比較的耐性をもっていることが分かる。



図3 水耕ソルガムの葉の Cd 障害

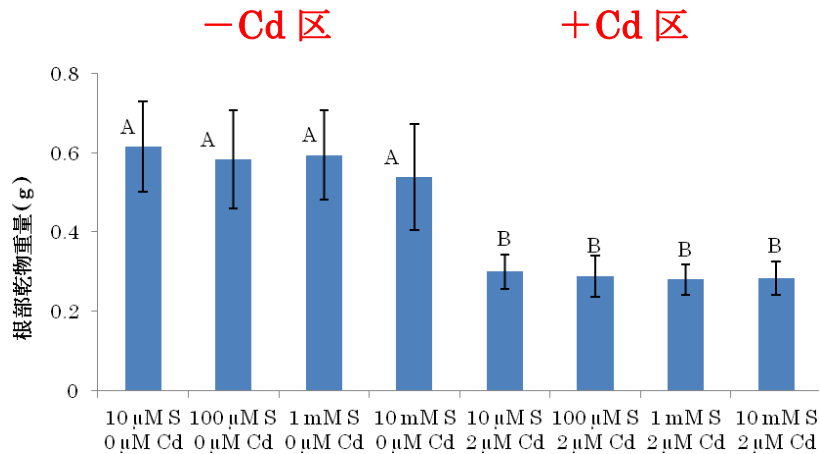


図4 S 濃度と Cd 濃度を変化させた水耕栽培におけるソルガムの乾物重量 (上は地上部、下は根部)。値は4連の平均で、図中の異なるアルファベットは統計的有意差 (Tukey 法) を示す。(信頼限界 5%未満)。

(2) 葉緑素含量

−Cd 区において 10 μ M S では他の S 濃度に比べて葉緑素含量の指標である SPAD 値が有意に減少した。また、2 μ M Cd 区において 10 μ M S 区では他の区に比べて SPAD 値が有意に減少した。100 μ M~10 mM S 区は Cd 添加によって SPAD 値が有意に減少した (図 5)。よって、Cd によってソルガムの葉緑素合成は妨げられると言える。ソルガムにおいては S 欠乏が Cd 添加と共に葉緑素合成を抑制すると考えられる。Cd 添加した 1 mM S (通常濃度) に比べて 10 μ M S 区でソルガムの地上部生育が悪くなる傾向にある点と葉緑素合成が有意に減少している点から、S 要求性が高い、あるいは S 欠乏に敏感であるのではないかと考えられる。

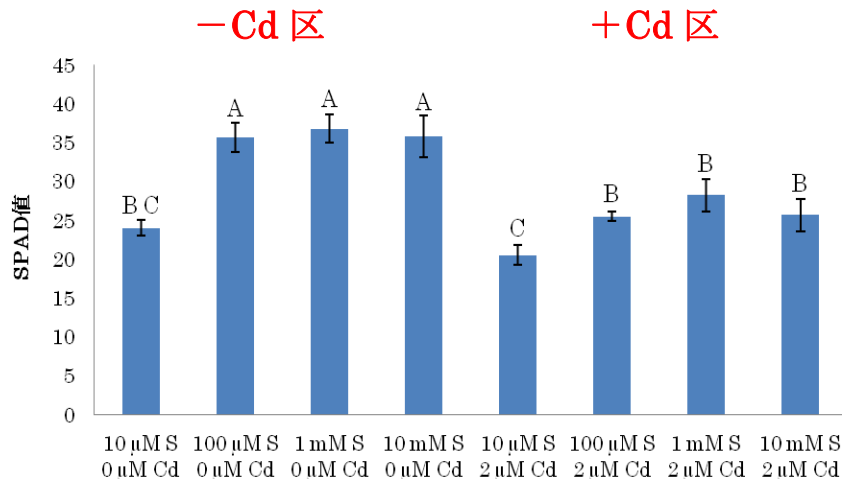


図 5 S 濃度と Cd 濃度を変化させた水耕栽培におけるソルガムの葉緑素含量。値は 4 連の平均で、図中の異なるアルファベットは統計的有意差 (Tukey 法) を示す (信頼限界 5 %未満)。

(3) 植物体の元素含量

S 濃度の変化によって地上部 Cd 含量に有意差は無かった。根部 Cd 含量は 10 μ M S、1 mM S、及び、10 mM S、100 μ M S の順で根部 Cd 含量は有意に高かった。また、地上部 Cd 吸収量は生育がよかった S の充足区で高くなり、根部 Cd 吸収量は根部 Cd 含量と同様の傾向になった (図 6)。

地上部と根部のいずれでも Mn 含量は 0 μ M Cd 区に比べて 2 μ M Cd 区では、全体的に低くなる傾向にあった (図 7)。また、2 μ M Cd 区において、地上部では 1 mM S 区で有意に低く、根部では 100 μ M S と 10 mM S で有意に低くなっていた。この結果は、Cd と Mn が競合関係にあることを示す可能性がある。このことから培地の Mn 濃度が高い場合には植物中 Cd 含量が減少するのかどうかを再度検証する必要があると思われた。また、地上部 Fe 含量は Cd の添加によって有意に増加し、根部 Fe 含量は Cd 添加区の 10 μ M S のみ他試験区に比べ有意に増加し、Cd がいない場合に比べ Cd 添加区で増加する傾向にあった (図 8)。Cd 添加によって地上部 Cu 含量、及び、Zn 含量は有意に増加した (図 9、10)。根部の Cu、Zn 含量も Cd 添加区で増加する傾向にあった。しかし、Cu、Zn の個体あたりの吸収量は地上部と根部のいずれにおいても、各試験区で同程度であった (データ示さず)ため、Cd 添加により植物体が小さくなったことによる濃縮効果であると考えられる。

これらの結果に基づき、微量必須元素 Mn、Fe、Cu、Zn において、最もその含量が低下した元素は Mn であった。Cd と Mn が根圏での吸収において競合している可能性があると考えられた。つまり、培地の Mn 濃度を上昇させれば、Cd の吸収が抑えられて、Cd 害が軽減されるのではないかと仮説が考えられた。そこで、次の実験として、水耕培地の Mn 濃度を上昇させた時、植物の Cd 含量がどのように影響されるかを検討した。

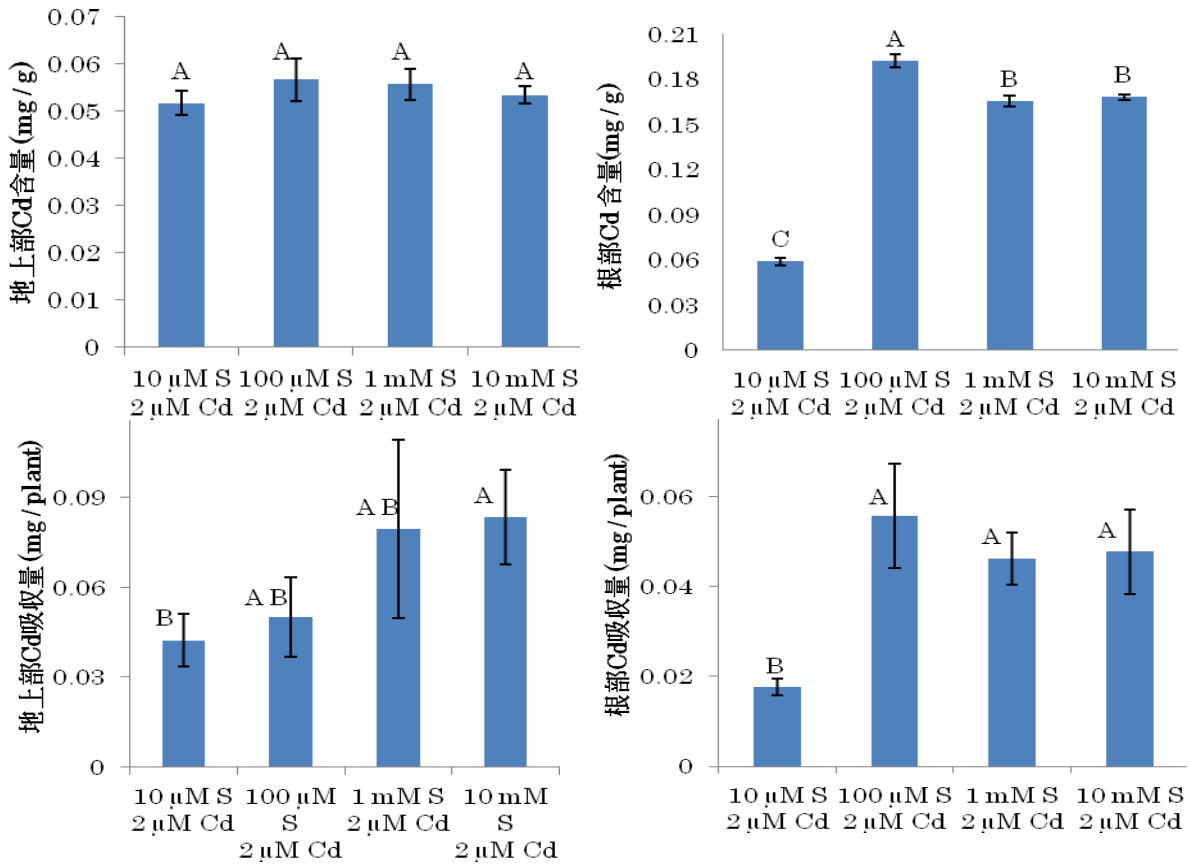


図6 S濃度と変化させたCd添加の水耕栽培におけるソルガムのCd含量と吸収量 (左が地上部、右が根部)

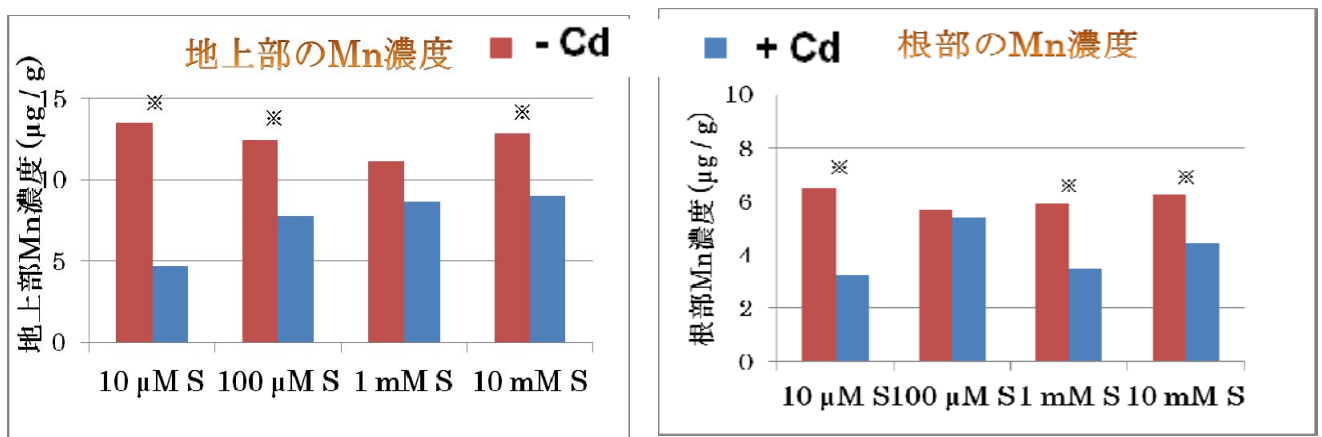


図7 S濃度とCd濃度を変化させた水耕栽培におけるソルガムのMn含量 (*を付けたカラムは-Cdと+Cdの間に有意差があることを示す)

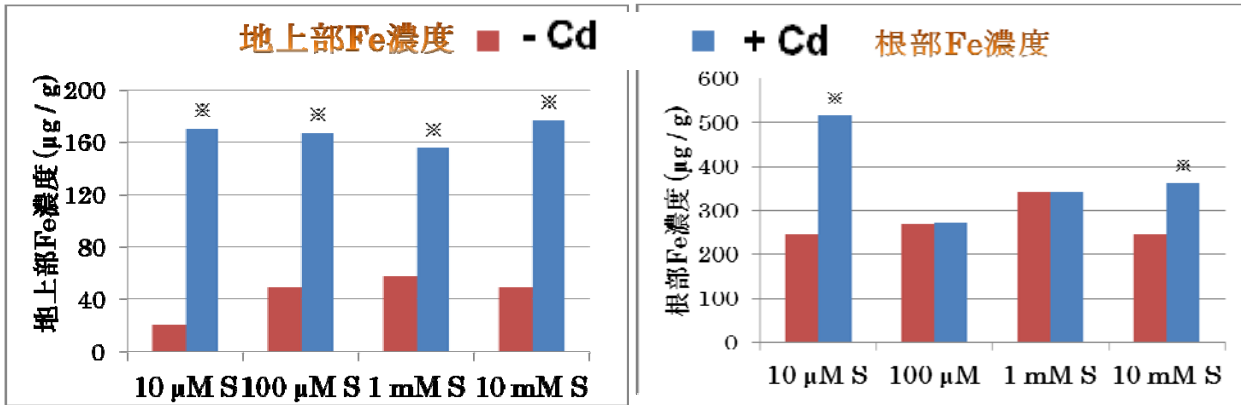


図8 S濃度とCd濃度を変化させた水耕栽培におけるソルガムのFe含量

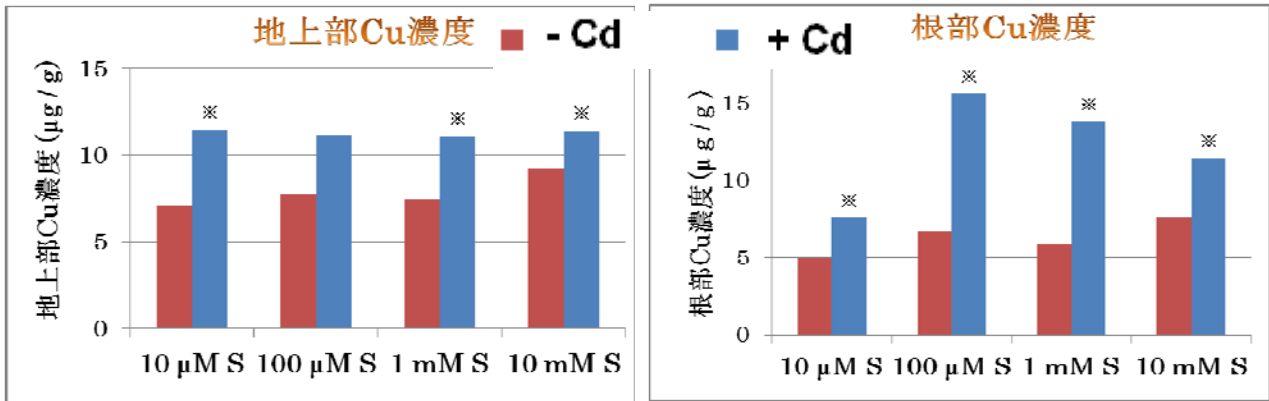


図9 S濃度とCd濃度を変化させた水耕栽培におけるソルガムのCu含量

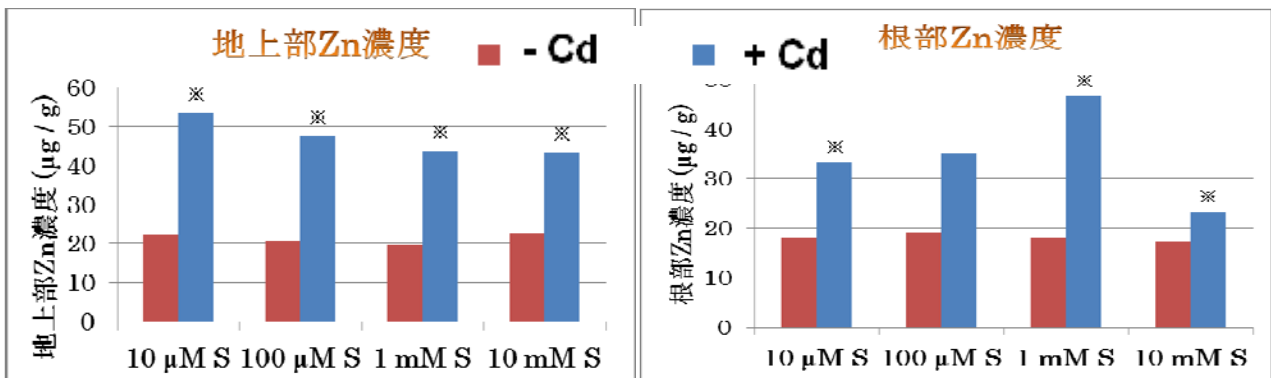


図10 S濃度とCd濃度を変化させた水耕栽培におけるソルガムのZn含量

3.2 実験2 ソルガムのカドミウム害に対する根圏のマンガン濃度の影響

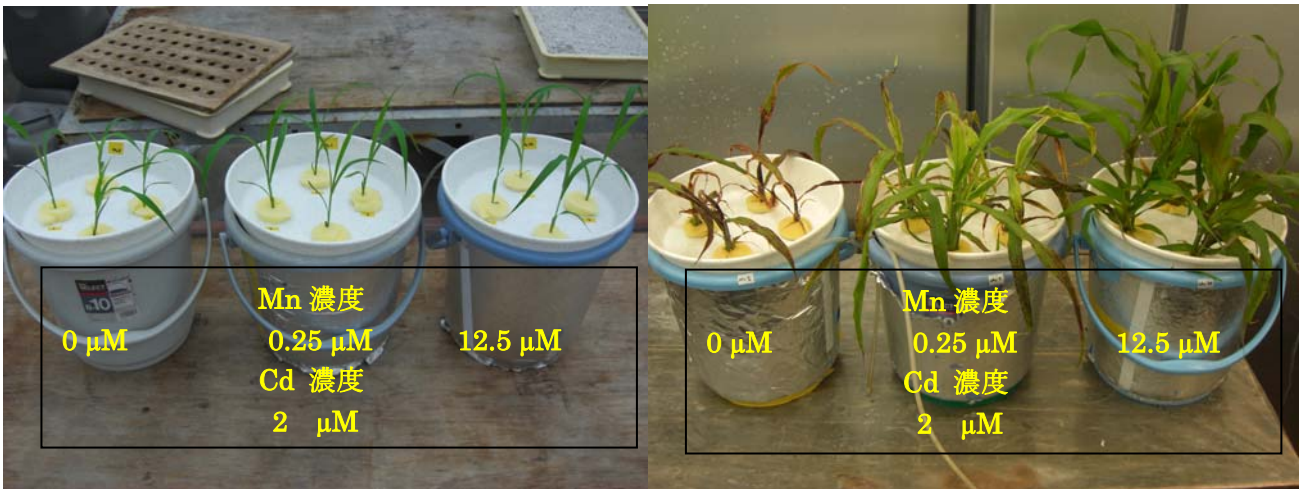


図11 Mn濃度を変えてCd処理して水耕栽培したソルガムの生育の様子
(左 元素分析に供した温室内で移植後1週間目の植物、右 人工気象室内で移植後3週間目の植物)

図11にMn濃度を変えてCd処理したソルガムの生育の様子を示した。生育初期からMn濃度の上昇に伴い生育がよくなり、3週間目には生育量、葉色がかなり差が付いていることが分かる。Mn濃度の上昇がソルガムの生育を改善することは明らかであるように思われる。

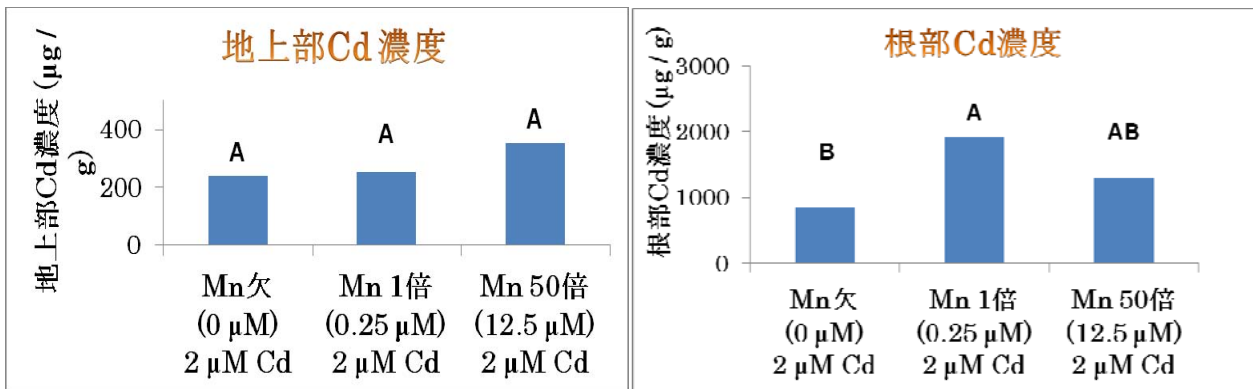


図12 Mn濃度を変えてCd処理して水耕栽培したソルガムのCd含量

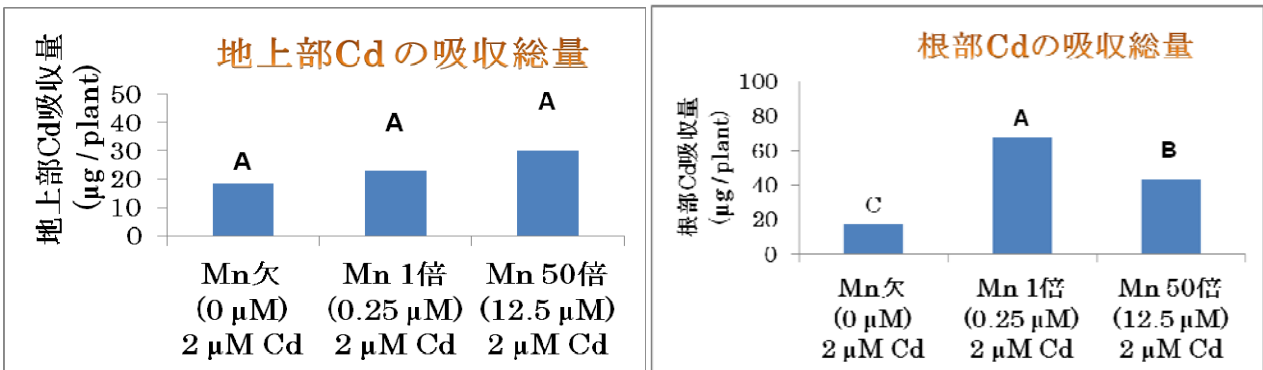


図13 Mn濃度を変えてCd処理して水耕栽培したソルガムの個体あたりのCdの吸収量

図12に植物のCd含量を示した。Mn濃度の上昇により、外見上明らかな生育改善がみられるにも関わらず、Cdを与えた植物により高濃度のMnを与えてもCdの含量は低下しなかった。故に、MnがCd害を軽減する生理学的機構を研究する必要がある。最も考えられるのはCd害の少なくとも一部は、組織内での活性酸素の発生を助長であると思われ、Mn多量施用により体内のMn-SOD⁹⁾の活性化が起こり、活性酸素の害作用を軽減していることであると思われる。MnがCd毒性を軽減することは海外においてもトウモロコシを用いて報告されている。その報告の条件はやや本研究の条件とは異なるが、それによってもMnを根圏に加えてもCd含量の大きな低下が無い点で同様の結果であった¹⁰⁾。また、イネにおいて最近、MnがCdと共通のトランスポーターにより吸収されるとの報告¹¹⁾もある。本研究の結果は、この報告の知見によって必ずしも説明できないが、これらの点も含めて、今後、植物の吸収においてCdとMnの生理学的関連性について研究される必要がある。

また、図13に個体あたりのCd吸収量を示した。地上部のCd吸収量はやや増加傾向がみられる。この実験では、移植後1週間目の幼植物を用いたが、その後の研究により、生育期間が長くなれば、地上部のCd吸収量は増加することが示された。この現象はファイトレメディエーションにおいてMnを多量施肥すると、CdのCd汚染土壌からの収奪量が増えることを示しており、今後のファイトレメディエーションの技術向上を考える時に有益な知見であると思われる。

4 結論

ソルガムにCdを与えると、植物体のMnの含量が低下した。Cdを与えた植物において高濃度のMnを与えてもCdの含量は低下しなかったが、Cd害が軽減された。MnがCd害を軽減する生理学的機構を研究する必要がある。

参考文献

- 1) 富山大百科事典(1994年 北日本新聞社/富山大百科事典編集事務局編) 「特集 イタイイタイ病」,p.104
- 2) <http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%A4%E3%82%BF%E3%82%A4%E3%82%A4%E3%82%BF%E3%82%A4%E7%97%85>
- 3) <http://riodb02.ibase.aist.go.jp/geochemmap/Tohoku/gazou/tohokuCd-s.jpg>
- 4) 農林水産省ホームページ (1) 食品中のカドミウムに関する国際基準値
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/kizyunti/index.html
- 5) Hewitt, E.J. & Smith, T.A. (1975) Experimental methods for the investigation of plant nutrients. Plant Mineral Nutrition (E.J. Hewitt and T.A. Smith eds) p.30-52. The English Universities Press Ltd., London.
- 6) Anjum, N.A. et al. (2008) Sulphur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione., Plant Growth Regul., 54, 271-279.
- 7) 後藤重義 (1990) 灰化法、植物栄養実験法、植物栄養実験法編集委員会、p. 125-128.
- 8) 渡辺和彦 (2002) 原色 野菜の要素欠乏・過剰症 症状・診断・対策、社団法人 農山漁村文化協会 15.
- 9) 長谷川功 (2010) マンガン、新植物栄養・肥料学、米山忠克他著、朝倉書店、p. 154-155.
- 10) Pal'ove-Balang et al. (2006) Effect of manganese on cadmium toxicity in maize seedlings., Plant Soil Environ., 52(4), 143-149.
- 11) Sasaki, A. et al. (2012) Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice., doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.096925>.

Effect of manganese on the absorption of cadmium of sorghum grown on hydroponical culture

Y. Ohta¹, S. Kawai¹, H. Kudo¹, S. Goto² and K. Sera³

¹Faculty of Agriculture, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

²Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

Cadmium (Cd) is one of the toxic heavy metal to plants and animals. The metal may be incorporated through food to human body. In fact, there are areas whose soil is polluted by Cd. The soil of the Cd-contaminated area must be cleaned up by some methods. Phytoremediation is one of the ways to remove the toxic metal. Sorghum (*Sorghum bicolor*) is one of the plants utilized in the technique of phytoremediation. We investigated the relationship between Cd application and concentration of metal micronutrients in the plant tissues. Our first experiment showed that application of Cd (2 μM) to root medium lowered the concentration of Mn of the plants whereas the other metal micro nutrients were not decreased. The result gave us the hypothesis that Mn might compete with Cd in the rhizosphere and reduce Cd. Thus, in the second experiment, the plants were treated with Cd with varied concentration of Mn (0, 0.25, 12,5 μM). The results showed that the plant growth was enhanced and visual symptoms of Cd toxicity were alleviated by the elevated concentration of Mn. The Cd concentration, however, was not reduced. The result showed that application of Mn as fertilizer to the soil may be effective when the plants will be grown for the purpose of phytoremediation of Cd in the practical Cd-contaminated field.