

## 論文の内容の要旨

論文題目 水稻根圏細菌叢の解析と生物学的水素生成への応用  
氏名 土肥 哲哉

今世紀に入っても増加を続ける地球人口を養うためには、食料の安定的な増産が必要不可欠である。従来の集約的な作物栽培では、窒素肥料を多用して高い生産をあげてきたが、同時に、硝酸態窒素による地下水の汚染や肥料製造に伴う化石エネルギーの消費によって、環境へ大きな負荷を与えてきた。その反省から、近年では、少量のエネルギーを効率的に利用して作物栽培を行う低投入持続的農業への転換が求められている。この低投入持続的農業を実現する一つの有効な方法として、根圏細菌を効果的に利用することが考えられる。そのためには、たとえば根圏と非根圏の細菌数や細菌叢の違い、根圏細菌への施肥の影響について解明しなければならないが、根圏微生物の動態を解析する方法が、十分に確立されていない。

一方、地球温暖化と化石燃料の枯渇も、人類にとっての重要、かつ緊急の課題である。その対策の一つとして水素を利用したエネルギーの生成が注目されているが、これは、エネルギー効率がよく、二酸化炭

素を排出しないからである。高い水素生成能を持つ嫌気性細菌叢が見つければ、有機性廃棄物などの再生可能なバイオマス資源を原料として、容易に水素を得ることができる。そこで、本研究では、最初に分子生物学的手法を利用してイネ根圏の細菌叢を解析する方法を確立したうえで、これらの方法を利用して、有機質肥料が水田土壌の細菌の群集構造に及ぼす影響について解析した。その過程で、イネの根圏細菌叢には水素生成能が高い細菌が生息している可能性が高いことが明らかとなったので、イネ根圏細菌叢を利用した嫌気性水素発酵について検討した。

## 1. 分子生物学的手法を用いたイネ根圏の細菌叢解析

本章では、分子生物学的手法である変性剤濃度勾配電気泳動法(PCR-DGGE)と蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法(FISH)を利用して、水田と畑地で栽培したイネの根圏細菌叢を比較検討した。その際、根圏土壌を採取するのに超音波処理を、また細菌を土壌粒子から分離するのにシヨ糖浮遊法を利用することを試みた。その結果、PCR-DGGE による根圏細菌叢の 16SrDNA バンドパターンは水田と畑地で異なり、水田では嫌気性細菌の *Clostridium bifementans*, 畑地では好気性細菌の *Bacillus fusiformis* がそれぞれ同定された。これらの細菌は、水田土壌(嫌気性)と畑地土壌(好気性)の環境を反映しているものと考えられる。また、FISH の結果から、水田と畑地のいずれにおいても、根圏細菌として低 GC グラム陽性菌グループ(LowGC)が優占していることが確認できた。PCR-DGGE で検出された *Clostridium* spp. や *Bacillus* spp. は LowGC に属することから、FISH と PCR-DGGE の解析結果は符合し、根圏細菌叢の研究に分子生物学的手法が有効であることが明らかになった。

## 2. イネ根圏細菌叢に及ぼす有機質肥料の影響

つぎに、水田で栽培したイネの根圏および非根圏における土壌細菌叢に対する有機質肥料の影響を、培養試験および PCR-DGGE を利用して検討した。すなわち、水田に化学肥料と堆肥を元肥として施用した堆肥区、化学肥料を元肥として施用した後、米ぬかと化学肥料を追肥した米ぬか区、元肥も追肥も化学肥料のみの対照区を設け、水稻品種日本晴を栽培した。栽培期間中に毎月1回、それぞれの処理

区の根圏土壌および非根圏土壌を採取し、細菌叢を調査した。培養試験の結果から、嫌気性細菌数は非根圏より根圏で著しく多いことが分かった。とくに、堆肥区および米ぬか区は高温の夏に根圏細菌数が著しく多く、根圏効果が著しかった。また、16SrDNA バンドパターンによる主成分分析の結果から、イネ細菌叢は根圏と非根圏とで大きく異なり、また同じ根圏でも堆肥区、米ぬか区および対照区では異なった。さらに、堆肥区および米ぬか区の根圏細菌叢は季節的な変化を示し、秋には対照区の細菌叢との差異が小さくなった。これは、夏は高温で細菌の活性が高く、堆肥や米ぬかの分解が急速に進んで土壌中の有機物が減ったため、秋以降は対照区との差異が小さくなったと考えられる。一方、非根圏では、細菌叢に対する施肥の影響は根圏に比べると小さかった。

合わせて、黒ボク土と荒木田土を充填したポットで同様の処理区を設けて水稻品種日本晴を栽培したところ、根圏細菌叢は土壌の種類によって大きく異なっていた。また、黒ボク土のポットでは、同じ黒ボク土の水田で得られた結果と同様、堆肥区と米ぬか区で根圏と非根圏の細菌叢が明確に異なっており、荒木田土のポットの根圏細菌叢は、米ぬか区より堆肥区の方が対照区との差が明瞭であった。一方、非根圏の細菌叢に対する土壌および施肥の影響は、いずれも明瞭ではなかった。

以上、本研究で開発した手法を利用して、水稻の根圏における土壌細菌叢が有機物や土壌の種類に対して明瞭に反応することを明らかにした。

### 3. イネ根圏細菌叢を利用した水素生成に関する研究

以上の研究を進める過程で、イネ根圏に嫌気性水素生成菌の *Clostridium bifermentans* が生息することが確認できた。そこで、イネ根圏細菌叢を利用してリンゴ搾り滓や廃パンなどの有機性廃棄物から水素を生成させることができるかどうかを検討した。まずグルコースを原料とした培養液を用いたバイアス実験を行い、イネ根圏細菌の水素生成能を検討した結果、ヘキソース 1mol 当たり 1.53(mol-H<sub>2</sub>/mol-hexose)の水素収率が確認できた。そこで次に、ジュース工場から廃棄されたリンゴ搾り滓を原料とした回分実験を実施し、水素生成量およびスラリー内の細菌叢を調査した。その結果、バイオガス生成は実験開始から 12 時間後にピークに達し、その後は徐々に減少して 24 時間以降は認められなかった。実験開始から 24

時間のバイオガスの総生成量は 6.1(L/L-slurry)で、そのうちの総水素生成量は 2.52(L/L-slurry)、水素収率は 2.28(mol-H<sub>2</sub>/mol-hexose)という高い値を示した。また、PCR-DGGE により、スラリーから *C. butyricum* EIB3-3 が検出された。これらの結果から、イネ根圏細菌叢由来の *C. butyricum* EIB3-3 などによりリンゴ搾り滓中の炭水化物から水素が生成されたこと、グルコースなどの易分解性炭水化物は実験開始から 12 時間以内で分解したのに対して、セルロースやペクチンなどの難分解性炭水化物は 12 時間以降、徐々に分解されたことが考えられる。さらに、パン工場から廃棄されたパンを原料としたパイロットスケールの連続水素醗酵実験を実施し、イネ根圏由来細菌叢の有用性を検討するとともに、あわせてスラリー内の細菌叢の経時変化を調査した。すなわち、廃パン 10(kg/day)と水 100(L/day)を混合攪拌してスラリーにした醗酵原料を 0.2m<sup>3</sup> の水素醗酵タンク内に投入し、イネ根圏細菌叢と反応させて水素生成を確認した。その結果、640~885(L/day)のバイオガスが生成されたが、そのうち 102~206(L/day)は水素ガスであった。最大水素生成量は廃パン1kg 当たり 16.8L、水素収率は 1.30(mol-H<sub>2</sub>/mol-hexose)であった。PCR-DGGE の解析結果、*Megasphaera* spp. と *Bifidobacterium* spp. が実験期間を通して検出され、また実験開始から 46 日目には *C. tyrobutyricum* も検出された。FISH やキノンプロファイルによる解析も PCR-DGGE による細菌叢の解析結果と整合しており、実験開始 46 日目には *Clostridium* spp. が優占細菌であることが判明した。

以上の結果から、最初にイネ細菌叢の *Megasphaera* spp. や *Bifidobacterium* spp. によって廃パン中の有機物がグルコースなどの易分解性炭水化物や酢酸などの有機酸に変わり、次に、*Clostridium* spp. が易分解性炭水化物や有機酸を分解して水素が生成したと考えられる。

以上のように、イネ根圏細菌の菌叢解析で開発した分子生物学的手法は、圃場における根圏細菌叢の解析だけでなく、水素醗酵における細菌叢の働きを解析するのに有効であることが実証された。