

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 土肥 哲哉

水田には稲わらを鋤き込むほか、有機質肥料を施用することがあるが、これらが根圏細菌叢に及ぼす影響については十分に研究が進んでいない。一方、地球温暖化や化石燃料枯渇の対策として、バイオマスエネルギーの利用が提案されており、その 1 つに、細菌によって生成するバイオ水素がある。イネ根圏では多様な有機物分解が起こっていることから、根圏細菌叢を利用して有機性廃棄物からバイオ水素を生成させることが期待できる。そこで、本研究では根圏細菌叢の解析方法を確認したうえで、水田に施用した有機質肥料がイネ根圏細菌叢に与える影響を検討した。また、イネ根圏細菌叢を種菌として、有機性廃棄物からの水素生成についても検討した。

### 1. イネ根圏細菌叢の解析への分子生物学的手法の利用

水田と畑で栽培したイネ (*Oryza sativa*) の根圏細菌叢を、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) を用いて比較した。PCR-DGGE の結果、水田では嫌気性菌、畑地では好気性菌と高い相同性を示す DNA バンドが検出され、それぞれの菌種はそれぞれの土壌環境を反映していた。また、FISH の結果、根圏では低 GC 含有グラム陽性菌が優占していた。このように、FISH と PCR-DGGE の結果は矛盾しておらず、根圏細菌叢の解析に分子生物学的手法が有効であることが確認できた。

### 2. イネ根圏細菌叢に及ぼす有機質肥料の影響

有機質肥料が根圏と非根圏の細菌叢に及ぼす影響について検討するため、堆肥区と米ぬか区を設置し、PCR-DGGE の 16SrDNA バンドパターンに基づく主成分分析を行った。また、根圏効果を評価するための培養試験を実施した。さらに、土壌の影響を検討するため、黒ボク土と荒木田土

を利用したポット実験も行った。その結果、両区とも非根圏より根圏の方が菌種や菌数が多かった。とくに、夏期に根圏細菌叢の増殖が著しく、根圏効果が高かった。また、土壌の酸化還元電位は低下したが、これは、根圏細菌による有機物分解に伴って根圏土壌の酸素が消費され、還元化が進んだためと考えられた。また、ポット実験でも同様の結果が得られた。以上のように、水稻の根圏細菌叢は有機質肥料によって著しく影響を受けることが分かり、根圏には有機物分解能力をもつ多様な細菌種が生息することが確認できた。

### 3. イネ根圏細菌叢を利用した水素生成

イネ根圏細菌叢を利用して、グルコース基質のバイアル実験を行ったところ、水素生成能があることが確認された。そこで、リンゴ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たところ、バイオガス生成が確認できた。また、PCR-DGGE 解析の結果、*Clostridium butyricum* EIB3-3 が検出された。このことから、果糖などの易分解性炭水化物が実験開始から 12 時間以内に分解し、12 時間以降にセルロースやペクチンなどの難分解性炭水化物が徐々に分解されたと考えられる。つぎに、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てイネ根圏由来細菌叢の有用性を検討したところ、水素ガスの生成が確認された。PCR-DGGE, FISH およびキノンプロファイルの結果から、本実験の水素生成では、最初にイネ細菌叢の一部によって難分解性物質がグルコースなどの易分解性炭水化物に変わり、その後、別の細菌叢によって易分解性炭水化物が分解されて水素が生成したと考えられる。

以上のように、分子生物学的手法を用いてイネ根圏の菌叢解析を行った結果、水田のイネ根圏細菌は有機質肥料によって著しい影響を受けること、またイネ根圏細菌叢には有機物分解能力を持つ多様な細菌種が生息することが確認された。さらに、イネ根圏細菌叢を利用した有機性廃棄物からの水素生成が可能であることを明らかにされた。これらの知見は学術上また応用上、極めて価値が高いものである。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)に値するものと認めた。