



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on physiological characteristics of Pseudomonas denitrifiers isolated from post-harvest soil of dent corn Andisol farmland, and regulative approach of those nitrous oxide (N ₂ O) emitters relevant to active N ₂ O efflux from the soil [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	李, 莉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11548号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57171
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Li_LI_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（農学）	氏 名	Li LI
審査担当者	主査	教授	波多野隆介
	副査	教授	橋床 泰之
	副査	教授	石黒 宗秀
	副査	准教授	橋本 誠

学位論文題名

Studies on physiological characteristics of *Pseudomonas* denitrifiers isolated from post-harvest soil of dent corn Andisol farmland, and regulative approach of those nitrous oxide (N₂O) emitters relevant to active N₂O efflux from the soil

(収穫後デントコーン畑地黒ボク土壌から分離した *Pseudomonas* 属脱窒細菌群の生理学的特徴と、その土壌の高い亜酸化窒素（N₂O）放出を担う N₂O 生成細菌群の制御に関する研究）

本論文は英文 107 頁，図 25，表 5，5 章からなり，参考論文 1 編が付されている。

北海道大学付属静内実験牧場の黒ボク土デントコーン圃場は，活発な亜酸化窒素（N₂O）生成を示すことで知られている．本学位論文では，培養による N₂O 生成検定法を指標として，活発な N₂O 生成に関わっているであろう細菌をコーン畑地の黒ボク土壌から分離し，これらを *Pseudomonas* 属脱窒細菌と同定した．これら高 N₂O 生成細菌分離株を用いて，幾つかの化学物質について圃場からの N₂O 放出抑制効果について検討した．

1. N₂O 放出 *Pseudomonas* 属細菌の分離とそれらの特徴

2011 年秋の収穫後および 2012 年春の耕起および施肥作業前に採取した黒ボク土壌の土壌懸濁液上清を接種源として，過剰量の KNO₃ (3.6 mg mL⁻¹) を含むジェランガム培地で強い N₂O 生成が認められた培養物を modified Winogradsky's 寒天平板に広げ，識別可能なコロニーをトータル 76 株分離し，それぞれについて N₂O 生成試験を行った．収穫後土壌のゲル培養物から 4 株，春先の耕起前土壌培養物からは 6 株の N₂O 生成細菌をそれぞれ選抜した．16S rRNA 遺伝子解析から，これらは全て脱窒能を有する *Pseudomonas* 属細菌と同定された．同時に行ったアセチレン阻害試験および *nosZ* 遺伝子の PCR 検定によって，このうち 6 株（うち収穫後土壌からの分離株は 3 株）が *nosZ* を機能させていない不完全脱窒細菌であることが強く示唆された．季節変動による N₂O 放出量の変動は，施肥による土壌中硝酸塩ならびにアンモニア量のみならず，土壌中有機炭素量が脱窒細菌の活動と消長に大きく影響することが示唆された．

2. C- および N-源添加が黒ボク土壌微生物群集構造およびそれらの N_2O 生成に及ぼす影響についての培養モデル系での検討

収穫後圃場の生土壌 5 g を密封ガラスバイアルに入れ 20 μl , 暗所で培養すると, 6 ng/日の N_2O を放出した. 一方, 1.5 mM ショ糖と 0.1 mM 無機窒素 (NO_3^- あるいは NH_4^+ , あるいは両者混合物として) を同量の生土 5 g に添加したところ, その N_2O 生成量は 20~30 倍高くなった. しかしながら, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) で供試土壌中の真正細菌相を比較したところ, その DNA バンドのパターンにはほとんど違いが認められず, トラッピング培養で選抜できた *Pseudomonas* 属脱窒細菌は, N_2O 放出アッセイを兼ねた高濃度 KNO_3 下で極めて効率的に選抜されていたことが示唆された. 土壌あるいは土壌洗浄液を接種するソフトゲル培地にあらかじめ炭素源として 0.05%~0.5% ショ糖溶液, 窒素源として 5 mM NO_3^- , NH_4^+ , あるいは NH_4NO_3 を培地に添加する組み合わせで, N_2O 発生量を測定しながら, どのような微生物群集構造が培養物中に発達するかを DGGE 解析により追跡した. その結果, 特徴的な細菌が窒素源や炭素源の違いで優占することが分かった.

3. 除草剤やその他の関連する化学物質が N_2O 生成に及ぼす影響

幾つかの除草剤, コーンの代表的な抗菌性二次代謝産物である 6-methoxy-2-benzoxazolone (MBOA), ならびに MBOA と構造的類似性をもつ N-複素環化合物について, N_2O 生成細菌 *Pseudomonas* sp. 10CFM5-1B 株と 10CFM5-2D 株 (ともに収穫後コーン圃場の黒ボク土壌から分離したもので, 不完全脱窒細菌と考えられる) に対する影響を調べた. ソフトゲル培養による N_2O 放出アッセイで, N_2O と競合する電子受容体である methyl viologen dichloride (商標名 Paraquat[®]) は, 2 μM で強い N_2O 放出抑制活性を示した. 一方, MBOA も 10 μM で有意な N_2O 生成抑制活性を示した. これとは逆に, かつて除草剤として汎用された simazine と amitrole は, 2~10 μM で *Pseudomonas* sp. 10CFM5-1B の N_2O 生成を亢進させた. これらの研究結果は, methyl viologen dichloride に代表される電子伝達阻害系除草剤は, N_2O 生成抑制という形で農地からの温室効果ガス放出抑制に寄与し, amitrole のようなアミノ酸生合成阻害系薬剤はむしろ農地からの N_2O 生成を助長していた可能性を示した.

以上のように Li LI 氏の研究は, コーン畑地黒ボク土壌から N_2O 放出活性の高い脱窒細菌を効率的に取得できるジェランガムゲルトラップ法の科学的データを示したのみならず, これによって得た高活性 *Pseudomonas* 属 N_2O 生成細菌株を用いて N_2O 生成抑制化学資材の検索を行い, 極めて強力な N_2O 生成抑制作用を methyl viologen dichloride に見出すという実学的な農学研究成果を得たことから, この博士論文の内容を高く評価できる.

よって審査員一同は, Li LI 氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた.