



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Establishment of artificial symbiosis between <i>Lemna minor</i> and the diazotrophic bacterium <i>Azotobacter vinelandii</i> , and elucidation of the mechanisms of bacterial plant growth promotion [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Kamal, Shuvro Sajjad
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第7173号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89671
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kamal_Shuvro_Sajjad_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）

氏 名 Kamal, Shuvro Sajjad

審査委員	主査	教 授	森 川 正 章
	副査	教 授	田 中 亮 一
	副査	教 授	福 井 学
	副査	准教授	三 輪 京 子

学 位 論 文 題 名

Establishment of artificial symbiosis between *Lemna minor* and
the diazotrophic bacterium *Azotobacter vinelandii*, and elucidation of
the mechanisms of bacterial plant growth promotion
(ウキクサ *Lemna minor*と窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* の
人工共生系構築と植物成長促進機構の解析)

本論文は、以下の7章より構成されている。第1章では、浮遊性小型水生植物ウキクサの植物分類学的、生理学的、形態学的特徴を解説した。続いて、顕花植物として比類ない成長速度、高タンパク質含量、高炭水化物含量、および低リグニン含量を有すること、環境浄化資材、家畜飼料原料、機能性食品原料、バイオ燃料として利用可能な高付加価値バイオマスであることについて説明した。さらに、その安定生産に向けた植物成長促進細菌の機能および細胞外多糖類活用の意義について論じ、本研究のもうひとつの主役である土壌由来の植物非共生型窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* について諸特性を詳述した。第2章では、*A. vinelandii* NBRC13581（以下、A81）がウキクサと相利共生できることを初めて実証することに成功した。具体的には、*Lemna minor* および *Wolffia hyalina* の2種のウキクサの成長を顕著に促進し、10日後の乾燥重量ではそれぞれ無菌ウキクサに比べて1.7倍および1.6倍に達することを示した。次に、窒素化合物を含まない水でもA81は、大気中窒素をウキクサ *L. minor* に供給することによってその成長を回復できることを強く示唆した。また、A81共存下において *L. minor* のデンプン含量は3分の1以下に低下する反面、タンパク質含量は約倍増した。ウキクサはストレス環境下においてデンプンを蓄積し、良好な環境下ではタンパク質含量が高くなることが知られている。以上のことから、A81はウキクサにとって有益な共生細菌となり得ることが示された。一方、A81はウキクサ表層に30日以上に渡って付着し、その付着細胞数は激増した。さらに、A81の細胞当たりの窒素固定活性は、単独浮遊細胞にくらべてウキクサ表層付着細胞において上昇することが判明した。この現象は、高い成長促進活性を示した *L. minor* においてより顕著であった。これらの結果は、土壌由来の植物非共生型窒素固定細菌 *A. vinelandii* A81が浮遊性水生植物ウキク

サ *L. minor*から棲み良い環境および付着の場を提供されていることを示すものである。走査型電子顕微鏡観察から、A81は非生物固体表面とウキクサ植物根表面において異なる形態のバイオフィルムを形成することも観察した。特に後者においてA81は、細胞外高分子化合物 EPSを著量生産していた。第3章では、窒素含量の低い食品工場処理廃水においてもA81はウキクサの成長を促進することを確認した。興味深いことに、ウキクサの生育に伴って処理廃水中の NH_4 、Na、Mg、Ca、K濃度は低下した。無菌ウキクサに比べてA81共生ウキクサにおいてその効果はより高く、A81はウキクサの成長を促進することに伴い水質浄化機能も向上させることが示された。第4章では、A81の高いウキクサ定着能によって、共存する別種のウキクサ成長促進細菌の定着能も向上させるのか、成長促進活性に相加性はあるのか、という2つの疑問に答えた。その結果、4種類のウキクサ成長促進細菌のうち3種に対してA81がそれぞれの定着能を倍増させることを明らかにした。しかし、ウキクサ定着能（付着細胞数）の上昇に伴う成長促進活性は認められなかった。第5章では、A81の窒素固定活性上昇の度合いがウキクサ種によって異なる理由の解明に挑戦した。その結果、A81がウキクサ表層に局所的なバイオフィルムを形成していることが重要であることを示唆した。バイオフィルムは固体表面に付着した微生物が形成する3次元構造体であり、その高い細胞密度によって内部の酸素を消費する。A81の窒素固定酵素の活性は酸素によって低下することが知られており、バイオフィルム内の低酸素濃度環境は窒素固定酵素の活性を高く維持することに役立っていることが推定できた。第6章では、*A. vinelandii* CAの細胞外多糖が特に高いウキクサ成長促進活性を有することを見出した。さらに、その構造がA81など多くの *Azotobacter* 属細菌のEPS主成分であるアルギン酸とは異なることを、糖組成分析およびFT-IR測定によって明らかにした。第7章では本研究で得られた数々の新たな知見を総括すると共に、将来の展望について述べた。

本論文では土壌由来の非植物共生型窒素固定細菌が水生植物ウキクサと安定した相利共生関係を構築できることを発見し、窒素肥料に頼らないウキクサバイオマス生産に向けた技術基盤を提供するものであり、環境科学分野における進歩性ならびに波及性は十分に高いと評価された。以上、審査員全員の合意のもと Kamal, Shuvro Sajjadの業績は、博士（環境科学）学位を授与するに相応しいと結論した。