

氏名(本籍)	星 ^{ほし} 和 ^{かず} 浩 ^{ひろ} (青森県)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第725号
学位授与年月日	平成2年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	本邦水田土壌における水稻根圏の共同窒素固定細菌に関する研究
主査	筑波大学教授 農学博士 大羽 裕
副査	筑波大学教授 農学博士 石塚 皓造
副査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠篤
副査	筑波大学助教授 農学博士 今井 勝
副査	千葉大学教授 P h . D 吉田 富男

論文の要旨

共同 (Associative) 窒素固定細菌は、多くの作物根圏に存在して作物の窒素栄養供給に貢献しているものと考えられるが、共同窒素固定細菌に関する基礎的知見についてはまだ十分に明らかにされてはおらず、とくにわが国の土壌についてはほとんどなされていない。そこで本研究は、わが国の水田土壌を対象とし、水稻根圏に分布する共同窒素固定細菌の検索を行なうとともに、有効利用のための人工接種実験について以下の検討を行った。

1) 水稻根圏における細菌相の変動

福島農試水田圃場の水稻根圏土壌及び水稻根内部の嫌気性細菌と好気性細菌について細菌数の測定を行った結果、水稻根圏土壌の嫌気性細菌数は栽培期間中ほとんど変化せず、有機物施用による変動も見られないが、落水により好気性細菌数が増加して両者の比率が変化した。また対照として埼玉農試の畑土壌で栽培したキュウリについても調べた結果、キュウリ根圏にも嫌気性細菌が多数生存しているが、その好気性細菌に対する割合は低かった。嫌気性細菌の大部分は *Clostridium* であり、グラム陽性無芽胞桿菌、グラム陰性無芽胞桿菌も検出された。また根部からもかなりの数の嫌気性細菌が分離された。

2) 水稻根部に分布する共同窒素固定細菌の検索

わが国の代表的な水田土壌3種(グライ土、灰色低地土、淡色黒ボク土)について水稻根の窒素固定活性を測定した結果、グライ土>灰色低地土>淡色黒ボク土の順となり、分けつ期よりも出穂開花期の活性が高く、また窒素固定細菌数はグライ土で高く、根圏土壌・根部ともに窒素固定細菌が生菌数に占める割合は、グライ土>灰色低地土>淡色黒ボク土の順であった。

さらに窒素固定細菌は、好気性ならびに通性嫌気性細菌は6群に、絶対嫌気性細菌は3群に類別され、化学分類的手法により同定した結果、*Enterobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium* が検出され、また細菌数の変動から見て好気性細菌が根圏の窒素固定に重要な役割を果すことが考えられた。

3) 窒素固定活性に及ぼす酸素濃度の影響

同定された好気性窒素固定細菌について、窒素固定活性が最大を示す酸素濃度は、菌種による差はあるが0.3~2.0KPaの範囲にあり、窒素固定性発現には微量の酸素の存在が必要とされることが示された。また菌株の増殖には、微量の有機窒素源が必要であった。

4) 標識窒素固定細菌の接種効果

Rifampicin 耐性変異株 *Pseudomonas* sp. C2601 rif⁺ を標識細菌として用い、窒素固定細菌の挙動と接種効果を調べた。その結果、3種の土壌とも標識細菌の生存率は4週間で2オーダー減少したが、接種により根毛の伸長が促進された。また標識細菌数は、根圏土壌及び根部とも10⁴~10⁵オーダーで検出され、水稻の生育に伴い根圏土壌で減少し、根部で増加した。生菌数に占める標識細菌数の割合は、根圏土壌では灰色低地土、淡色黒ボク土で減少し、根部においてはグライ土で増加、灰色低地土で減少、淡色黒ボク土でほぼ同数であったが、窒素固定細菌数に占める標識細菌数の割合は、窒素固定細菌数の少ない土壌ほど標識細菌数の割合が高かった。しかしながら水稻の生育並びに収量については、特に接種効果は観察されなかった。

5) 共同窒素固定細菌の水稻根圏での挙動解析法の確立

酵素免疫測定法を用いて、グライ土に生育した水稻根圏の酵素標識細菌 *Pseudomonas* sp. C2601 の菌数測定を行った。酵素標識細菌数は、根圏土壌において10⁴~10⁶オーダーで検出され出穂開花期に減少したが、根部においては10⁵~10⁶で検出され出穂開花期に増加した。生菌数に占める酵素標識細菌数の割合は、根圏土壌では出穂開花期に著しく減少したが、根部ではほとんど変化しなかった。

また FITC 標識した *Pseudomonas* sp. C2601 の水稻根部の顕微鏡観察を行った結果、標識細菌は根表面に単独であるいはコロニーを形成していること、細胞と細胞との間隙及び側根に多く存在することが観察され、また根毛上またはムシゲル様部分にコロニーの形成が確認され、さらに水稻根表面部位より内側に存在している菌株も観察された。

審 査 の 要 旨

水稻根圏において、微生物による共同空中窒素固定作用があることは知られていたが、本研究は、はじめてわが国の土壌について水稻根圏に分布する窒素固定菌の純粋分離、同定、接種効果を検討したもので、高く評価される。

分離・同定された窒素固定菌のうち、*Xanthobacter* については、従来この分野の報告になかったものである。各種分離菌はすべて分子状酸素 (O₂) に対する感応性が、水稻根圏環境に適応していることを見出したこと、さらには分離菌 *Pseudomonas* については、薬剤耐性や酵素免疫測定法 (ELICA)

を用いて根圏における挙動を追跡した研究は貴重なものである。

申請者は、絶えず新しい研究手法の導入に意欲を示し、積極的に取組んできたため、手法の検討や設定に多くの時間を必要とした。とくに後半の接種菌の挙動解析に当っては精力的に取り組み、一応定性的な接種菌の追跡はできたものの、定量的な動態把握までには至らなかった。

しかし総合的に見て、この分野の研究に新しい基礎的知見を加えたものと評価され、今後の共同窒素固定細菌の研究に役立つものである。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。