

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Md. Rokunuzzaman
審査委員	主査 大西 浩平 副査 渡邊 彰 副査 渡邊 誠也 副査 加藤 伸一郎 副査 寺本 真紀

論文名

Study on soil bacterial communities in response to different agricultural activities  
(農業活動による土壌細菌叢の変動に関する研究)

審査結果の要旨

土壌中の微生物、特に細菌は、土壌の性質を決定する重要な因子のひとつである。土壌中の細菌叢の構成は様々な要因によって変化する。特に、農業活動による影響は大きい。これまでに、様々な農業活動に伴う土壌中の細菌叢の変動に関する研究が行われてきたが、本論文においては、3つの農業活動(種々の土壌消毒剤、中山間地域における土地利用遍歴、実験室内における栽培作物)による微生物叢に対する影響についての研究を行った。

土壌消毒には、様々な方法がある。本研究で用いたのは、化学燻蒸剤であるクロロピクリン、生物燻蒸剤であるカラシナ、土壌還元消毒剤としてフスマと低濃度エタノールを用いた。なお、カラシナは燻蒸剤としての作用に加えて炭素源としても働くため、土壌還元消毒の効果も期待できる。高知大学農学部附属農場の土壌を用い、コンテナに土壌をつめ、裁断したカラシナ、フスマ、低濃度エタノールを添加し、水槽にしずめカバーで覆うことで還元消毒を行った。その後、土壌を乾燥させ実験に用いた。クロロピクリンは直接土壌に注入した。実験開始から約3ヶ月後にトマト苗を定植し、果実ができるまで生育させた。定期的に5回、土壌をサンプリングし、細菌叢解析の試料とした。

サンプリングした土壌からビーズ破砕法を用いてメタゲノム DNA を抽出した。まず、抽出したメタゲノム DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子の超可変 V3 領域を PCR により増幅し、DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) を行い細菌叢の全体像の比較を行った。土壌消毒剤により処理を行っていないコントロールと比較してカラシナ処理、フスマ処理、低濃度アルコール処理した土壌中の細菌叢の全体像はほとんど差異が見られなかった。すなわち使用した土壌消毒剤による土壌細菌への影響は少ないことを意味している。一方、クロロピクリン処理土壌の DGGE 像は、他の像に比べて著しく異なっており、また処理後約3ヶ月後においても、細菌叢は変化しているものの、コントロール土壌とは異なるパターンを示した。

より詳細な細菌叢を解析するために次世代シーケンサー (ロシユ社 GS junior) を用いて、16S rRNA 遺伝子の超可変 V4-V5 領域をパイロシーケンスによって配列解析した。トマト定植直後と実験終了時 (最初の還元消毒から約6ヶ月後) におけるメタゲノム DNA を用いた。土壌における多様性を rarefaction curve によって評価したところ、クロロピクリン注入後直後の土壌は、他の土壌と比較して約半分の多様性しかなく、実験

終了時には、多様性は僅かに回復した。クロロピクリン注入直後の土壌における優占種は孢子を形成するファーミキューテス門細菌であり、優先度は80%にのぼっていた。実験終了時には、優先度は減少し、プロテオバクテリア門やバクテロイデス門が増加した。以上のことから、化学燻蒸剤であるクロロピクリンは土壌細菌に対して、多大な影響を与え、その効果は長く持続することが明らかとなった。一方生物燻蒸剤であるカラシナは土壌細菌叢に対しての影響は少ないことが判明した。

高知県大豊町は中山間地域であり、かつては棚田が作られ稲作が盛んに行われていた。しかし、近年は放棄田になったり、他の作物の栽培に利用されている。そこで、棚田に造成される前の自然土壌（畑）と棚田、および放棄田（ユズ畑、人工林を含む）における微生物叢の解析を行い、土地利用と微生物叢の変遷についての関連を調べた。実験の手法は前述の土壌消毒と同様である。標高380mから650mにわたり隣接する6箇所の棚田と放棄田、および他の棚田から転用された土地利用土壌、ならびに傾斜地に作られた畑2箇所から土壌を採取した。なお、採取時期の3月は、水田は灌水していない状態であるが、土壌は完全には乾燥していなかった。表層から0-2cm、2-4cmの土壌を利用しメタゲノムDNAを抽出した。

まず、DGGEによって細菌叢の全体像について解析したところ、水田に特有な細菌が数種類確認されたものの、全体としては土壌間での違いはあまり観察されなかった。そこで、パイロシーケンス解析を行った。水田土壌の細菌の多様性は、有意差は見られないものの他の土壌に比べてわずかに高い結果が得られた。ヒートマップ解析によっても土壌間での構成種に大きな違いはなかった。そこで、土壌間での相違を解析するための主座標分析(Principal Coordinate Analysis; PCoA)を行った。その結果、土壌は3つのクラスターに分類することができた。それぞれ、水田土壌、放棄田（ユズ畑、人工林を含む）土壌、畑土壌であった。この結果は、もともとの自然土壌である畑に存在する細菌叢が、棚田に変換することで水田特有の叢に変化し、水田を放棄することで更に新しい細菌叢へと変化したことを推測させる。すなわち、土壌の変遷に呼応して細菌叢も変化してきたことを示唆している。なお、ひとたび水田として利用されると、水田利用を中止しても数十年の間では、元の細菌叢には復帰しないことは興味深い。

3番目の農業活動としては、栽培する植物による土壌（特に根圏）細菌の違いについて研究を行った。従来の研究においては、野外で栽培される作物土壌の解析が主であり、栽培作物以外の要因も細菌叢の構成に複雑に関係していた。そこで、本研究においては同一の土壌を使用し、また植物由来の細菌の影響を除去するために、無菌的に栽培した実生を実験室内で栽培した。高知大学農学部附属農場のハウス内の乾燥土壌を採取し、ポットに移した。定期的に水と液肥を与えながら、別に無菌的に栽培したナスとタバコを移植し、定期的に根圏の土壌を採取し、メタゲノムDNAを抽出した。植物を移植していないコントロール土壌の一部において单子葉の雑草が生育したため、栽培植物ではない植物の根圏として利用した。

まず、DGGE解析により、細菌叢の全体像を解析したところ、各土壌において、時間経過による細菌叢の変化はほとんどみられなかった。そこで、定植後1.5か月の根圏土壌をパイロシーケンス解析に用いた。乾燥状態のコントロール土壌と湿った状態のコントロール土壌では、湿った土壌においてシアノバクテリア門に属する細菌の割合が非常に高くなっていた。同様のシアノバクテリア門の優先は植物の生育する土壌でも観察されている。これは液肥と蛍光灯の光によって土壌表面にシアノバクテリアが生育したものと考えられた。それ以外の細菌叢に大きな差異は見られなかった。

より詳細にパイロシーケンスの結果を解析したところ、ナスの根圏でのみ検出されたOTU#2820（バクテリオイデスに属する）とタバコの根圏のみで検出されるOTU#3300（プロテオバクテリアに属する）が見られた。これらの細菌は植物特異的に根圏で優先種になっているが、雑草の根圏においては、植物特異的な細菌の出現はみられなかった。

本論文に関する公開審査会は平成28年2月6日、愛媛大学農学部で開催され、申請者の論文発表と適切な質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査会で本論文の内容を慎重に審議し、審査委員全員一致して博士（学術）の学位を授与するに値するものと判定した。