

審査の結果の要旨

氏名 魏 巍

温室効果ガスの一つでありオゾン層破壊作用も有する一酸化二窒素 (N_2O) ガスの大気中濃度が近年急激に上昇している。 N_2O の主要な発生源として農耕地土壌が知られている。特に、畑土壌に窒素肥料を施用すると肥料中の窒素が土壌微生物による形態変化を受けて大量の N_2O が発生する。 N_2O の主な生成経路として硝化反応ならびに脱窒反応がある。硝化能を有する細菌・古細菌、脱窒能を有する細菌・古細菌・糸状菌として幅広い分類群に属する微生物が知られているが、畑土壌で実際に N_2O 発生に寄与している土壌微生物についてこれまでに得られている知見は少ない。本研究は化学肥料または有機質肥料を施用した畑土壌における N_2O 生成微生物を特定・分離することを目的とし、(1) 土壌中の脱窒微生物を幅広く検出できる新規 PCR プライマーの設計、(2) 有機質肥料や化学肥料を混合施用した土壌における N_2O 生成微生物の特定、(3) 有機質肥料を表面施用した土壌における N_2O 生成微生物の特定と分離、を試みている。

第1章では、農耕地土壌における N_2O フラックスに関するこれまでの知見についてレビューし、本研究の目的について述べている。

第2章、第3章では、土壌中の脱窒微生物を幅広く検出するための新規プライマーを設計し、有効性を検証した結果について述べている。まず、第2章では脱窒細菌ならびに古細菌の亜硝酸還元酵素をコードする *nirK* ならびに *nirS* 遺伝子配列情報をデータベースから収集して系統解析し、両遺伝子はそれぞれ複数のクラスターに分かれ、従来汎用されているプライマーでは PCR 増幅できないクラスターが存在することを明らかにした。そこで、それらのクラスターに属する *nirK*、*nirS* も PCR 増幅できる新規なプライマーセットを設計した。これを用いた定量 PCR により、畑、水田、森林の各土壌ならびに底質にはこれまでに知られていたよりもはるかに多様な *nirK*、*nirS* 遺伝子配列が存在することを明らかにした。第3章では、脱窒能を有する糸状菌の *nirK* を PCR 増幅で

きる新規プライマーを設計し、分離菌株を用いてその有効性を確認した。

第4章と第5章では、化学肥料あるいは粒状有機質肥料を土壤に混合施用（基肥）した灰色低地土からの N_2O 発生に寄与している土壤微生物の特定を試みた。 N_2O 発生土壤への抗生物質添加・硝化抑制実験ならびに、土壤から抽出した RNA と上記で設計した *nirK*、*nirS* プライマーを用いた定量 PCR 解析から次のことを明らかにした。（i）化学肥料施用直後の土壤からの少量の N_2O 発生には細菌脱窒の寄与が大きく、その後の大量の N_2O 発生には細菌脱窒と糸状菌脱窒が同等に寄与している。（ii）有機質肥料施用直後の N_2O 発生には細菌脱窒、後期の N_2O 発生には糸状菌脱窒の寄与が大きい。（iii）いずれの場合にも、従来用いられてきた PCR プライマーでは検出されなかった *nirK*、*nirS* を保有している微生物が N_2O 生成に関わっている。（iv）施肥後の後期の N_2O 発生に糸状菌脱窒の寄与が大きいのは土壤 pH の低下が関係している可能性が高い。

さらに、粒状有機質肥料の混合施用により N_2O を発生している土壤ミクロコズムから抽出した RNA を用いた *nirK*、*nirS* 遺伝子の PCR-クローンライブラリ解析から、この時の N_2O 発生原因脱窒細菌として *Bradyrhizobium* sp.、*Achromobacter* sp.、*Ralstonia* sp.、*Curvibacter* sp.、*Streptomyces* sp.、*Micromonospora* sp.、*Azospira* sp.、*Cupriavidus* sp.ほか複数の細菌群を特定した。

第6章では粒状有機質肥料を表面施用した黒ボク土からの N_2O 発生原因微生物の特定と分離を行った。 N_2O 発生の時期に肥料表面に糸状菌の生育が見られたことと土壤への抗生物質添加実験から、 N_2O 発生に糸状菌が大きく寄与していることを見出した。土壤 DNA を用いた解析と分離培養実験の結果から、Eurotiales、Hypocreales、Sordariales に属する糸状菌が N_2O 発生原因微生物であることを明らかにした。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。