

氏名	Ahmad Mahmood
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記番号	医工農博甲第30号
学位授与年月日	令和2年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	環境社会創生工学専攻
学位論文題目	Development of remediation technique utilizing plant-microbe synergy on persistent organic pollutants contaminated soil (残留性有機汚染物質汚染土壌に対する植物-微生物の相乗効果を利用した浄化技術の開発)
論文審査委員	主査 教授 御園生 拓 准教授 岩田 智也 准教授 遠山 忠 准教授 山村 英樹 准教授 田中 靖浩 助教 片岡 良太

学位論文内容の要旨

Plant growth and productivity is compromised due to lack of nutrition, soil salinity and organic pollutants contamination. All these problems have been dealt with the support from microbes to some extent, thus this study aimed at exploring the potential of different-sourced and unlike habitat bacteria in sustainable crop production, amelioration of salinity, biodegradation of persistent organic pollutants and improvement of phytoremediation. For this purpose, cucumber along with other Cucurbitaceae plants and common ice plant were used, endophytic bacteria from former, and rhizosphere bacteria from latter were isolated, characterized and identified. In first part, diversity of culturable and non-culturable endophytic bacteria associated to cucumber was explored. Results revealed that diversity tended to increase with the age of plants until fruiting stage and decreased later on. It was observed that some endophytic bacterial genera prevailed regardless of plant age and cultivability, but others disappeared or reduced in number. For the plant growth promoting endophytic bacteria, all the selected endophytic bacterial strains enhanced plant growth at certain levels when compared with nontreated plants while strains 4 and 227 showed maximum plant

growth and yield in pot and field experiments, respectively. It was noticeable that the PGP traits, checked axenically, held by endophytic bacterial strains did not depict the potential of plant growth enhancement in practical scenarios. Metabolomic analysis revealed that although both strains 4 and 227 enhanced plant growth at similar levels, yet the physiological response of plants was quite different. In the bio-degradation experiments, none of the endophytic bacteria associated to target plants except the strain 96 (from zucchini) could degrade dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and/or its derivatives. The strain 96 was only capable of transforming DDT to dichlorodiphenyldichloroethane (DDD). However, strain 885C from DDT contaminated soil, imported from Pakistan, could degrade DDT until 4,4' dichlorobenzophenone (DBP) as a terminal metabolite. For instance, an endophytic bacterial strain, strain 14, from cucumber was also found which could degrade pentachlorophenol (PCP) up to 99% within 7 days of incubation. Lastly, plant uptake of PCP was also observed significantly enhanced by application of plant growth promoting endophytic bacteria but there was no significant effect in case of DDTs. Concluding, plant growth promoting endophytic bacteria can be used for enhancing plant growth and yield besides improving phytoremediation efficiency.

論文審査結果の要旨

Ahmad Mahmood 氏の学位論文タイトルは「Development of remediation technique utilizing plant-microbe synergy on persistent organic pollutants contaminated soil (残留性有機汚染物質汚染土壌に対する植物-微生物の相乗効果を利用した浄化技術の開発)」であり、POPs に登録されている DDT と PCP (ペンタクロロフェノール) で汚染された土壌を植物と微生物を用いて浄化するための包括的かつ新しい浄化技術が提案された。つまり、土壌中に低濃度かつ広範囲に広がる汚染を効率よく効果的に除去するために植物を用いた除去 (ファイトレメディエーション) に加えて植物の生育を促進する内生細菌と汚染物質を分解する内生細菌を組み合わせることで、ファイトレメディエーションの強化を図るものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. ウリ科植物の内生細菌多様性を従来の培養法に加えて、次世代シーケンス解析による非培養法でも評価した。これまでウリ科植物の内生細菌については培養法でのみ報告があったが、本研究で初めて非培養法の知見を加えることに成功した。その結果、ウリ科の植物体内に生息する内生細菌は植物体の成長ステージに伴い、多様性が増加する傾向にあり、

植物体が十分に成長し、収穫末期には内生細菌の多様性も減少した。これは、培養法でも同様の傾向が見られた。苗場で生長した植物体を農地へ定植すると、植物体内の細菌相も変化することが明らかになった。実験を行った 2 圃場で同様の現象が確認され、Site 1 では *Bacillus* 属菌が定植後 2 か月目には分離されなくなり、Site 2 では *Curotobacterium* 属菌が定植後 2 か月目には分離されなくなった。これらの結果から栽培環境の変化により植物体中の内生細菌相が変化することが明らかとなった。

2. ウリ科植物内生細菌から植物生育促進活性を有する菌株を選抜することに成功した。特に *Curtobaerium* 属菌 No.4 株と *Microbacterium* 属菌 No. 227 株をウリ科植物に感染させることで、根の伸長を有意に促進した。この結果は、小スケール（バイアル）から大スケール（野外実験）を通し共通して得られている。また、両菌株を感染させたウリ科植物のメタボローム解析を行ったところ、内生細菌を感染させることで代謝物質の 42.5%が上方制御された。一方で、植物生育促進微生物の促進メカニズムとして IAA 生産やシデロフォア生産、ACC デアミナーゼ、窒素固定、リン酸可溶化などが多数報告されているが、本研究結果から、必ずしも従来言われていたメカニズムが植物促進の全てを担っているわけではなく、非常に複雑な代謝変化が生じて起きている可能性を示した。

3. ウリ科植物体内に生息する内生細菌から PCP を分解する細菌を見出した。16S rRNA の配列から *Bacillus* 属菌であることが明らかとなった。植物内生細菌による PCP 分解を詳細に示した研究はこれまでになく、新規性が高い。一方で DDT 分解内生細菌は見つけることが出来なかったが、根圏土壌から分離した *Streptomyces* 属菌が DDT を分解し、DBP にまで代謝することを明らかにした。

以上のように本論文は、ファイトレメディエーションを微生物で機能強化した新たな汚染物質除去技術であり、ファイトレメディエーションに寄与する内生細菌の多様性解析から分離・選抜、機能解析を通じて植物-微生物間相互関係や微生物の生存戦略などに関する興味深い知見を与えるものであり、環境科学のみならず、土壌学、農薬科学、分析化学の発展に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（学術）の学位論文として価値あるものと認める。なお、令和 2 年 1 月 29 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（学術）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。