

学 位 論 文 題 名

Studies on the functionalities of plant
growth-promoting rhizobacteria from wild dipterocarp
saplings naturally growing on medium-strongly acidic,
tropical peat soil in Central Kalimantan, Indonesia

(インドネシア中央カリマンタンの中強酸性・熱帯泥炭土壤に自生する

フタバガキ幼木根圏から分離した植物生育促進根圏細菌

(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) の機能性に関する研究)

学位論文内容の要旨

Tropical peat swamp forests are rich in biodiversity despite their unique ecosystem and the world's largest terrestrial organic carbon sink making it import resource regionally and globally. The over-exploitation of tropical peat swamp forest by reclamation and peat fires over the last few decades have drawn attention from the ecological and conservation experts for the revitalization and regeneration of degraded forest. Tropical peat swamp soil is medium-strongly acidic, rich in humic substances and polyphenols, enough to inhibit better establishment and growth of tree seedlings. The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) has long been practiced for better growth of field crops, and the use of PGPR in complex forest ecosystem is increasingly drawing attention from researchers. In our preliminary study, rhizobacteria isolated from rhizosphere of local dipterocarp seedlings and saplings from Central Kalimantan, Indonesia, showed plant growth promoting activities. The present study was done to understand the ability of phytohormone production by isolated rhizobacteria in medium containing L-tryptophan, their polyphenol (tannic acid) degradation and siderophore production under iron deficient conditions.

L-Tryptophan Metabolizing Activity of Rhizobacteria

Rhizobacteria isolated from collected wild dipterocarp seedlings and saplings naturally grown in Central Kalimantan Indonesia were subjected to Salkowski's reagent test, often used for detection of indolic substances. Among the 69 rhizobacteria isolated from these seedlings and saplings, approximately half of them showed positive color reactions to Salkowski's reagent and accordingly grouped them as pink-colored type, red-colored type and intermediary type, and tentatively identified up to genus level using PCR technique. Among

the rhizobacteria positive to Salkowski's reagent, pink-colored type isolates produced indole-3-acetic acid (IAA) as their characteristic product of L-tryptophan (TRP) bioconversion, while red-colored types isolates were characterized by indole-3-ethanol (TOL) production. *Serratia* sp. CK67 proved to be the most effective in producing IAA as the single product from exogenous TRP under both aerobic and anaerobic culture conditions. On the other hand, red-colored type rhizobacteria showed three distinct types of TRP metabolic activity. *Erwinia* sp. CK12 produced TOL as the major product of TRP with little amount of indole-3-lactic acid (ILA), representing it as TOL producing bacteria. *Erwinia* sp. CK10 and CK24, *Enterobacter* sp. CK23, *Pantoea* sp. CK36 and CK53 produced TOL and ILA as the major product of TRP metabolism (TOL-ILA-producing rhizobacteria). *Enterobacter* sp. CK23 also produced *O*-acetyl TOL along with TOL and ILA.

Polyphenol Biodegradation by Rhizobacteria

Tropical peatland soils, mostly made-up of tree litters, branches and stems of forest trees and other plant debris and are rich in polyphenols like tannins, and often take several years to be decomposed and converted into humic substances. Salkowski's reagent positive rhizobacteria was investigated under tannic acid (TA) exposure. The pink-colored type rhizobacteria produced only gallic acid (GA) as the major product of TA biodegradation, while some of them produced only traces or no pyrogallol (PY) when cultured in TRP-containing culture medium under TA exposure for two days. Four pink-colored type isolate, *Pseudomonas* sp. CK2, *Enterobacter* sp. CK13, *Burkholderia* sp. CK28 and CK43 produced catechol (CA) from TRP and suppressed the IAA production, indicating conversion of TRP to CA via anthranilic acid. On the other hand red-colored type rhizobacteria produced both GA and PY as major product of TA bioconversion. Thus, Salkowski's reagent test might also be used as a primary index for screening tannin-degrading rhizobacteria, along with its use for screening IAA-producing rhizobacteria.

Bacterial Siderophore Production

Most of the microorganisms respond to iron (III)-deficiency by secreting siderophores, high-affinity iron-chelators that selectively form complex with insoluble or sparingly soluble, organically-bound iron (III) and increase their bioavailability. When tested for potential siderophore production on CAS-agar plate assay, 3 rhizobacteria, *Burkholderia* sp. CK28 and CK43, and *Citrobacter* sp. CK42, all pink-colored type rhizobacteria, showed strong siderophore producing ability indicating that they can solubilize the scarcely available iron in acidic peat soil and utilize them as siderophore-iron complex.

Conclusions

Isolation and selection of PGPR with desirable characteristics, particularly those having

high potential to produce phytohormone and siderophore in the rhizosphere and degrade the tannins in polyphenol- and humic substance-rich peat soil are very important to reforest and revitalize tropical peat swamp forest in ecologically sustainable manner. The use of Salkowski's reagent as a primary index for screening such potential PGPR was proved very crucial in our studies and could be used to as a characteristic index to isolate more PGPR from other native tree species of tropical peat swamp forest and their neighboring vegetation.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 床 泰 之

副 査 教 授 鍋 田 憲 助

副 査 准教授 橋 本 誠

学 位 論 文 題 名

Studies on the functionalities of plant
growth-promoting rhizobacteria from wild dipterocarp
saplings naturally growing on medium-strongly acidic,
tropical peat soil in Central Kalimantan, Indonesia

(インドネシア中央カリマンタンの中強酸性・熱帯泥炭土壤に自生する

フタバガキ幼木根圏から分離した植物生育促進根圏細菌

(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) の機能性に関する研究)

本論文は英文 96 頁, 図 33, 表 11, 8 章からなり, 参考論文 2 編が付されている。

熱帯泥炭林は, 世界で最も大きな有機炭素の陸上貯蔵庫であり, ユニークな生態系を保ちながら生物多様性に富んだエコシステムである。過去 10 年の過剰な開発と泥炭火災によって破壊された森林の再生に大きな注目が集まっている。泥炭土壤は中強酸性であり, ポリフェノールやフミン質に富んでおり, 幼植物の生育阻害が必須微量元素の欠乏というかたちで現れやすい。植物生育促進根面細菌は長らく実践されており, その促進メカニズムを含めて注目されている。所属研究室では, インドネシア・カリマンタンの野生フタバガキ芽生えや幼木から分離した根面細菌が, ポット試験でフタバガキ芽生え生育を著しく促進することを見いだしている。

本研究は, 中央カリマンタンの熱帯泥炭土壤に自生するフタバガキ科植物の芽生え根や幼木根から分離した根圏細菌 69 株について, 培地に添加された L-トリプトファンからのインドール-3-酢酸 (IAA) 生成能の検証と, タンニン分解能, さらに鉄欠乏条件下での鉄可溶化と吸収にかかわる細菌シデロフォア生成能を調べたものである。検索に当たって, IAA 検出試薬である Salkowski's 試薬に対する呈色 (ピンク色ならびに緋色) の違いが上述の機能性にリンクするかどうかを検証することで, Salkowski's 試薬が多機能性根圏細菌の一次スクリーニングにおける指標として使えるか否かを特に検討したものである。

1. 根面細菌の L-トリプトファン代謝活性の検討

現地野生フタバガキ芽生えから分離した根面細菌を、インドール酢酸の検出に汎用される Salkowski's 試薬を用いた呈色試験に供した。分離細菌 69 菌株中、およそ半数のものが Salkowski's 試薬陽性を示し、それぞれの呈色の差異からピンク色型と緋色型の 2 グループに大別することができた。これらについて、各 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行い、属レベルでの同定を試みた。さらに L-トリプトファン代謝産物に特徴があるか否かを検討した。ピンク色型 (pink-colored type) のものが比較的緩やかに IAA やインドール-3-ピルビン酸 (IPyA) を生成しているのに対し、緋色型 (red-colored type) ではインドール-3-エタン-1-オール (tryptophol, TOL) 生成が特徴として示された。一連のスクリーニングの結果、系外から供給された L-トリプトファン代謝分解に極めて高い選択性を示し、極微量の L-トリプトファンを選択的に IAA に変換できる菌株として、ピンク色型に分類される *Serratia* sp. CK67 を見いだした。

2. フタバガキ根面細菌によるポリフェノール分解

ポリフェノールを豊富に含む熱帯泥炭林のリターは、その土壤中にフミン質を大量に貯め込んでいる。上述の Salkowski's 試薬陽性の細菌群について、タンニン酸に晒された菌体の応答をみた。ピンク色型の根面細菌はタンニン酸から gallic acid を生成するものがほとんどであったが、これをさらに pyrogallol まで脱炭酸するものが幾つか見いだされた。ピンク色型の 4 菌株 (*Pseudomonas* sp. CK2, *Enterobacter* sp. CK13, *Burkholderia* sp. CK28 および *Burkholderia* sp. CK43) は、L-トリプトファンを catechol まで分解し、IAA の産生は著しく抑制された。一方、緋色型の根面細菌群のほぼ全てが、タンニン酸を pyrogallol にまで分解したが、L-トリプトファンを catechol まで分解するものはなかった。このように、Salkowski's 試薬による呈色試験は、IAA 産生細菌のスクリーニング指標に加え、タンニン分解細菌のスクリーニング指標としても使うことができると考えられた。

3. シデロフォアー産生能をもつ細菌の検索指標としての Salkowski's 試薬

多くの微生物は、不溶化した鉄やカテコール基と強く結びついた鉄原子を可溶化して菌体内に効率よく取り込むため、3価の鉄イオンと錯塩を形成するシデロフォアーを分泌する。CAS-平板プレートを用いるアッセイ法により、Salkowski's 試薬陽性の 31 株から 3 株 (*Burkholderia* sp. CK28, *Burkholderia* sp. CK43 および *Citrobacter* sp. CK42) を、極めて強力なハロゾーン形成菌株として特定した。これら CAS 試験陽性菌株は、全てが Salkowski's 試薬に対しピンク色型の呈色を示すグループに属しており、Salkowski's 試薬による呈色試験が細菌性シデロフォアー産生細菌のスクリーニングにも使えることが分かった。

4. 結論

熱帯泥炭土壌での植物生育、特に初期生育に、根圏微生物の存在が重要な役割を果たすことが示されているが、それらの機能性に関わる IAA 産生能、ポリフェノール分解能、鉄可溶化能の 3 項目について、効率的な予備スクリーニング方法として Salkowski's

試験が適用出来るかどうかを検討した. 試薬に対する呈色 (ピンク色型および緋色型) から 2 グループに分けた細菌群について L-トリプトファン代謝能と代謝分解物の同定と HPLC による定性分析による比較を行い, これと平行して他の機能性を調べた結果, Salkowski's 試薬が多機能検索指標として使用できる可能性を示した. この手法は, 機能性微生物のスクリーニングにおいて有望であると評価できる.

よって審査員一同は, アティクル ラーマンが博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた.