

氏 名 (本 籍)	さい だ はる お 才 田 春 夫 (石 川 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2537 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	Photometrical Studies on Natural Microbial Community Structure in Aquatic Environments (水圏の微生物群集構造に関する測光学的研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 前 川 孝 昭
副 査	筑波大学教授 農学博士 佐 竹 隆 顕
副 査	筑波大学教授 農学博士 天 田 高 白
副 査	筑波大学教授 工学博士 松 村 正 利

論 文 の 内 容 の 要 旨

湖沼河川や海洋の沿岸域などの水圏では、生活廃水や畜産廃水等による水質の汚染が重要な環境問題の一つとして取り上げられている。この種の水質汚染度を評価する方法として、プランクトンやユスリカなどの生物指標が一般的に用いられているが、環境変化へのホリスティックな対応として、生物群集生態学的手法を持ち込んだ定性定量評価は困難であった。ここに、環境変化への反応が速く、極限環境下にも生息している微生物群集を評価対象として、環境の動的変動に伴う微生物群集の性格付けを行なう指標法が確立されれば、汚染と改善対策との評価を迅速に行なうことが可能となる。

グラム染色は細菌の同定上から、最も一般的かつ重要な染色法の一つとして用いられている。この方法によって、従来は、細菌形質がグラム陽性とグラム陰性とに分別されるに過ぎなかった。しかし、細胞壁構造の種特異性によって、グラム陽性或いはグラム陰性に属する細菌のすべてが同一な染色体を示すわけではない。さらには、細菌種によってグラム変性であることが知られている。分類学上はグラム陽性菌またはグラム陰性菌に分類されている種であっても、栄養、pH、温度などの生息環境によって染色性が変動することすら報告されている。この細胞壁の構造変化は、細菌のグラム染色性が生息環境に少なからぬ影響を受けることを示すものであり、その関係を詳細に研究することによって、天然細菌群集のグラム染色性から、それらの生息環境や群集を構成する種組成を知ることが可能になるばかりでなく、環境動態を把握することができると考えられる。

本研究の第 2 章においては、環境要因とグラム染色性との関連を詳細に解明するための新たな研究手法として、画像解析装置によるグラム染色定量評価法を実用化に向けて開発して、その応用例として水圏における天然細菌群集の構造解析を行なった。すなわち、染色された菌体の顕微鏡像を CCD カメラで赤、緑、青の 3 原色に分解して取り込み、画面上の各画素について画像解析装置で赤、緑、青の各色の強度を 256 階調でデジタル化した。そして、このデジタル画像から菌体の像を抽出し、その面積及び各菌体での赤及び青色強度の平均値を求め、グラム染色性を Gram stain index (GSI) として数値化した。

その結果、(1) グラム陰性、グラム陽性では GSI ヒストグラムに明らかな差があること、(2) 細菌の生長期によって、GSI ヒストグラム形状が種ごとにそれぞれ陰性あるいは陽性の範囲内で特異的な変動を示すことが判明した。また、湖沼栄養型の異なる水域に生息する天然細菌群集は、それぞれに特徴的なヒストグラム形状を示すことも判明した。

次に、天然細菌群集の示す GSI と栄養条件との関係を追求した。すなわち、新たに開発した半開放系現場栄養環境傾斜実験装置を貧栄養型池（筑波大学構内の兵太郎池）に設置して、装置内培養槽へのペプトン添加によって貧栄養型から富栄養型にいたる有機物濃度勾配を形成させ、季節ごとに 1 週間単位での培養実験を行なった。すなわち、擬似現場的に貧栄養型から富栄養型環境にいたるまでの湖沼学的遷移を水圏現場において実験的に形成させ、その遷移過程の GSI を画像解析法によって追求したのである。

その結果、細菌群集の示す GSI ヒストグラム形状は、各栄養型環境、増殖過程および季節によってそれぞれ特徴的な形状を示した。夏季の場合を代表例に示すと、装置外側の池水（貧栄養型）では実験期間を通して裾幅の広い形状を示したが、富栄養型池水である実験装置の第一槽では実験開始後 6 時間には GSI ヒストグラムが陽性側に広がり示す複雑な形状となり、その後は徐々に収束傾向に至った。裾広がり傾向は複数の細菌優占種増殖による菌相構成の多様化によるものであり、その後の収束は単純な優占個体群による遷移の結果を示した。

本研究の第 3 章では、細菌と同じく原核生物に分類されている高度好塩古細菌が示す GSI について研究し、代表的な高度好塩古細菌の一種である *H. salinarum* の GSI が細菌のそれと特異的に異なる形状を示すことを明らかにした。

最後に、本研究の第 4 章では、異なる塩分環境に生息する天然微生物群集が示す GSI に関する研究を行ない、高度好塩古細菌が優占する中国塩湖（Aidingkol-Hu Lake）の微生物群集が *H. salinarum* に似た GSI 形状を示すことを明らかにした。又、高度好塩古細菌の GSI が細菌と特異的に異なる形状を示すことが判明した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の主旨は、重要な環境問題の一つである農業排水が原因となる水質汚染を、天然細菌群集を対象とした新たなモニタリング法の確立を行ない、その応用性について実験生態学的に証明したものである。

本論文の独創性は、これまで目視による二分類評価しか出来なかったグラム染色を、画像解析装置を応用した数値評価システムを確立することによって、その使用範囲を細菌分類に留まらず、微生物叢の生態学的評価や環境評価にも応用を可能にしたことにある。すなわち、天然細菌群集が示すグラム染色体（GSI）が有機栄養濃度と強い相関を示すことから、河川や湖沼及び海洋と言った水圏における農業排水や生活排水が原因となる有機物汚染のモニタリングに応用することが可能となった。また、この研究成果は、様々な環境において、より具体的な環境評価の遂行と有機物以外による水質汚染の評価への応用を示すものである。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。