

氏名 安 田 道 恵

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第203号

学位授与の日付 平成8年3月21日

学位授与の要件 数物科学研究科 極域科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 極域海洋におけるバクテリア群集の増殖

－研究方法の確立と海水域への応用－

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 内 藤 靖 彦

教 授 福 地 光 男

助教授 大 山 佳 邦

教 授 谷 口 旭（東北大学）

助教授 廣 海 十 朗（日本大学）

論文内容の要旨

細菌は食物連鎖の中で、従来、分解者として位置づけられ、海洋生態学における物質生産の研究ではそれほど重要視されてはいなかった。1970年代に海洋の微細な生物群集の研究に落射蛍光顕微鏡等の新技術が導入され、詳細な生物量の推定が開始され、細菌とその捕食者群集の生物量が基礎生産者群集のそれに匹敵するという事実が種々の海域で見出されはじめた。この細菌を起点とする新たな食物網の発見は、細菌について分解者としての役割のほかに増殖を通じた物質の生産や循環に果たす役割の評価の必要性を導き、多数の研究者の興味を引くところとなった。しかし、極域海洋における微小生物食物網の研究は、他の海洋に比べ非常に遅れているのが現状である。それは極域特有の海氷の消長に伴う環境変化が著しく、現場での研究が極めて困難なためである。本研究では、海氷域における自然細菌群集の物質の生産や循環に関する役割の評価を行う一環として、群集の増殖および減少を量的に把握するための新しい研究方法を提案するとともに、実際に海氷域細菌群集についての現場観測を行った。

細菌群集の増殖の推定には分裂途中の細胞と単独細胞の識別計測を基本情報として利用した。まず、分裂途中の細胞の識別を正確に行うため、細胞染色法と分裂途中の細胞の識別計数の基準について従来用いられている方法を再検討した。

細菌の生物量推定に使用されるアクリジンオレンジと4'6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI)をそれぞれ蛍光染色剤とするの2種類の細胞染色法を用い、細菌群集内で分裂途中にある細胞(分裂過程細胞および分離過程細胞)を識別し比較した。その結果、明らかに、DAPI染色法の方が正確に分裂途中にある細胞を識別することができ、また、分裂過程細胞だけではなく分離過程細胞も分裂途中の細胞とみなして計数することにより、分裂途中の細胞の全体を精度良く計数できることを初めて明らかにした。

この識別計数法を用いて、分裂・分離過程細胞の割合($FDDC$: frequency of dividing-divided cells)と分裂・分離過程に要する時間(t_{dd})から細菌群集の瞬間増殖速度(μ)を求める関係式

$$\mu = 1/t_{dd} \times \ln(1 + FDDC) \quad (1)式$$

を提案した。

この関係式を用いるためには、 t_{dd} の正確な推定が必要である。そこで、サロマ湖海氷下から単離培養した細菌(*Shewanella* sp.)を用い、300時間以上の連続バッチ培養実験を行った。その結果、 t_{dd} は3.01時間($n=9$, $SE=0.157$)と推定することができた。しかし、培養開始後176時間目以降に現れた見掛け上細胞数変動がない定常期においても27.2%に上る $FDDC$ 値が見られた。この値は細菌の増殖速度の大小にかかわらず常に作用している死亡による減少速度とつりあう大きさの分裂・分離過程細胞の割合($FDDC_d$ で表す)と理解される。従って、低温下の*Shewanella* sp.の見掛け上の瞬間増殖速度 μ は(1)式の $FDDC$ 値から $FDDC_d$ を減じた、

$$\mu = 1/3.01 \times \ln(1 + FDDC - 27.2\%) \quad (2)式$$

と表すことが妥当と推察された。

更に、冬季サロマ湖の海氷下海水中の自然細菌群集についても同様に t_{dd} を求める現場実験を

行った結果、 t_{dd} は *Shewanella* sp.のそれに非常に近いことが分かった。また、南極海自然バクテリア群集についての研究報告から推算した t_{dd} 値も本研究で求められた t_{dd} の 95%信頼区間に含まれていた。これらより、本研究で得られた t_{dd} の値、3.01 時間は、低温海中の自然バクテリア群集に対して適用できる値であると考えられる。しかし、培養系内での $FDDC_s$ は、バクテリアの死亡が何によって引き起こされるのかがいまだ明らかではないので、観測現場の群集毎に求める方が良いと判断した。以上より、低温下の海洋バクテリア群集の瞬間増殖速度推定式は、

$$\mu = 1/3.01 \times \ln(1 + FDDC - FDDC_s) \quad (3)式$$

と表すことができた。この式を用いることにより、現場海中のバクテリア群集の $FDDC$ と $FDDC_s$ の情報から瞬間増殖速度を求めることが可能となった。これは、培養実験が困難な現場においても試料採取が可能ならば瞬間増殖速度を求めることができることを意味している。また、 $FDDC$ より、自然海中のバクテリア群集の増殖のみならず、自然死亡などの潜在的減少の両方を同時に見積もることができるようになった。

北極域のノルウェー領スバルバル諸島スピッツベルゲン島のコングスフィヨルドにおいて、1994 年 5 月 26 日から 6 月 22 日にかけて海水中・海氷下海水中・開水面下海水中のバクテリア群集の観測を行い、(3)式を用いて極域海洋バクテリア群集の増殖速度の評価を試みた。

海氷下部 5cm の海氷中に含まれるバクテリア群集の生物量は平均 1.43×10^5 cells/ml で、過去の海氷中からの報告値 ($10^5 \sim 10^6$ cells/ml) においては低い値に位置していた。また、海水中の値は、他の極域からの報告値 ($10^4 \sim 10^5$ cells/ml) と同等で、低中緯度のそれよりも 1 桁低かった。しかし、観測期間を通して生物量には時系列的に顕著な変動はなかった。増殖速度に関しては、潜在的な瞬間増殖速度は 1 時間当たり 0.05~0.09 で海氷中で比較的小さい値を示したものの値のばらつきは小さかった。一方、顕在的な瞬間増殖速度の値は 1 時間当たり 0.03 以下だったが、定着氷下で高い値を示し、生物量や潜在的増殖速度に比べると値のばらつきが非常に大きいという傾向が見られた。

全試料に共通して、群集に対する単位時間当たりの全増殖量と減少量において顕在的な増殖量と減少量の割合は少なかった。すなわち、融氷期のコングスフィヨルドのバクテリア群集は、一日当たり生物量の 1.48 倍から 1.95 倍に相当する細胞を生産しているが、顕在的な増殖量は潜在的増殖量の 22% 以下であった。これは、一日当たり生物量の 1.47~1.81 倍もの細胞が自然環境によらない死亡によって常に減少しているため、この潜在的減少量は群集の総減少量の 76% にあたる。

このように潜在的減少に伴い、バクテリア群集から海氷・海水中に多量の溶存態有機物の再放出があることが考えられる。すなわちバクテリア群集が生態系において、多量の溶存態有機物のソースとしての新たな位置づけを持つ可能性が示唆される。そして、潜在的増殖量が顕在的な増殖量の何倍にも上るとは、その過程で従来の方法では推定されなかった多量の溶存態有機物の無機化が行われている可能性を示唆している。今後、バクテリア群集における潜在的な変化量の内容を明らかにすることが、生態系の物質循環におけるバクテリア群集の役割を評価する上で重要な課題になると考えられる。

論文の審査結果の要旨

博士論文の審査申請のあった安田道恵君の論文は、「極域海洋におけるバクテリア群集の増殖-研究方法の確立と海氷域への応用-」と題して、6章から構成されている。内容は大きく二つに分かれ、ひとつは題目にあるように、バクテリア群集の増殖に関する研究方法を見直し、より応用範囲の広い新たな方法の提案である。他方は、この方法を用い北極域の海氷域における増殖過程の研究である。ともに独創的な発想が高く評価される内容である。

1～2章では海洋生態学の研究の流れを整理し、とりわけ1970年代以降注目されてきた微小生物食物網の概念を総説している。この中ではバクテリア群集が単なる分解者としてのみならず、海洋中の溶存態有機物を直接利用し、自己増殖する粒状有機物の生産者としての側面を報告し、同時に、増殖過程の研究の現状分析を行い、研究方法の問題点を明らかにした。

3章では増殖速度を推定する上で基本となるバクテリア細胞の識別計測法を再検討した。細胞の染色法として広く使われているアクリジンオレンジ法とDAPI法の2方法について初めて相互検定を行い、細胞分裂途中の細胞を精度良く計測する上ではDAPI法が優れていることを明かにした。更に従来増殖速度推定法にかわり細胞分裂に要する時間 (t_{dd}) が一定である点に注目し、バクテリア群集中に占める分裂途中の細胞の割合と t_{dd} とから瞬間増殖速度を求める理論的推定法を提案した。この方法では t_{dd} を実測する必要があり、そのため冬期北海道サロマ湖海氷下より単離培養したバクテリアを長期培養し、 t_{dd} を3.01時間と求めた。

本研究による理論的推定法はバクテリア群集の増殖速度の他に、これまで全く未知とされていた自然死亡率に相当する減少率をも推定することができる画期的な方法である。 t_{dd} の妥当性については十分に検討が加えられており、本推定法の有用性が確かめられた。

次いで4～5章において、現場観測への応用を試みた。ノルウェー領スバルバル諸島スピッツベルゲン島のコングスフィヨルドにおいて1994年5月26日～6月22日の間、海氷中及び海水中のバクテリア群集の増殖速度を推定した。まず、バクテリア群集の現存量とその中の分裂途中細胞の割合を観測した。次いで本推定法により潜在的増殖量、顕在的増殖量、潜在的減少量、顕在的減少量を見積った。これらの見積りは本研究が初めて行った独創的な点である。その結果、潜在的増殖量は現存量に対して1日当り1.5～2.0倍に相当するが、この内のおよそ78%は捕食や自然環境変化によらない原因での死亡量となる事が明らかになった。この事はバクテリアに対する生態学的認識に新たな側面を加える。すなわち、分解者そして粒状有機物の生産者に加えて、海洋生態学において溶存有機物の供給者としての位置付けである。

6章では今後の微小食物網研究の展望が明確に記述されている。

このように申請された論文は、バクテリア群集の研究分野へ独創的なアプローチを試み、極域海洋生態学に新しい知見を加えたものと判断できる。よって、安田道恵君の申請した論文は博士(理学)論文に値すると判断した。