

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 胡 偉

細菌は、霧や雲水、雨、雹、雪などの大気中の水中に大量に存在し、降水によって地表へ撒き散らされることで、生態系の発達や進化を促進すると考えられる。一方では、環境や公衆衛生への悪影響も懸念されている。細菌は、大気の物理や化学のプロセスにおいても重要な役割を果たしている可能性が高い。例えば、雲凝結核および氷晶核として雲の形成および降水過程に作用することで、大気中の物質循環および放射伝達に影響を与える。

降水中の細菌の濃度、生存状態および遺伝子組成に関する定量的データは、細菌の生態系および公衆衛生への影響を評価し、また大気圏-生物圏-水圏間のリンクにおける挙動と役割を良く理解しモデル化するために不可欠である。しかし、降水中の細菌の濃度、生存率および遺伝子組成に関する研究は非常に限られているのが現状である。

降水中の細菌の存在量と生存状態を定量するために、細菌を測定する汎用の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色法をコントロールにして、LIVE / DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (LIVE / DEAD BacLight 染色) を用いた落射蛍光顕微鏡法の計数の適用可能性を検証した。LIVE / DEAD BacLight 染色により計数した細菌細胞の総数は DAPI 染色によるものと一致し、平均検出効率は  $109 \pm 29\%$  であった。グルタルアルデヒド固定したサンプルと固定なしの同じサンプル中カウントした細胞数の比は、平均  $106 \pm 5\%$  であった。本法において、ネガティブコントロール (ブランク) における細菌濃度は、おおむね雨水試料における細菌濃度よりも一桁低かった。ただ、降水量が少ない場合、ブランク中の細菌の存在量は雨水試料の細菌より多い結果もあった。これらの結果は、グルタルアルデヒド固定の影響と慎重なネガティブコントロールの確認を行えば、LIVE / DEAD BacLight 染色による計数が、雨水中の細菌の濃度および生存率の測定に適用可能なアプローチであることを示している。

総観気象によって引き起こされる雨水中の細菌は様々な特徴を有する可能性がある。大気中の細菌が雲降水プロセスに果たす役割を正確に理解するためには、それらのデータが基礎的な情報となる。我々の知る限りでは、異なる総観気象における、雨水中の細菌の濃度、生存率および遺伝子構成についての研究はほとんどなされていない。

2014 年~2015 年の間に、熊本県立大学のキャンパス ( $32.806^{\circ}\text{N}$ 、 $130.766^{\circ}\text{E}$ ) で雨水のサンプルを採取した。上記の開発された LIVE / DEAD BacLight 染色法を用いて、低気圧 (寒冷前線)、停滞前線 (梅雨期および非梅雨期) および台風による雨水中の細菌の存在量および生存率を測定し、それらの特徴を調べた。雨水中の細菌の平均濃度は  $2.3 \pm 1.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  であり、細菌の生存率 (全細菌濃度に対する生存可能な細菌濃度の比) は  $80 \pm 10\%$  であった。アジア大陸気団の侵入に伴って雲が生成された低気圧の雨水中では、細菌濃度はほかのタイプの雨水中より高く

( $3.5 \pm 1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>)、生存率は低かった (75±8%)。雲が海域の影響を強く受けている梅雨前線と台風の場合、バクテリア濃度はそれぞれ  $1.5 \pm 0.5 \times 10^4$ 、 $1.2 \pm 0.3 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> であり、バクテリアの生存率は 84±7% と 85±7% であった。梅雨ではない停滞前線の雨水中では、バクテリア濃度は  $2.4 \pm 1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> であり、生存率は 78±14% であった。バクテリア濃度は雨水中の水溶性イオン nss-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、nss-Ca<sup>2+</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> と関連していたが、浮遊粒子濃度と降水量とは明らかな関係がなかった。バクテリアと水溶性イオンを組み合わせた相関分析や主成分分析を行ったところ、雨水中のバクテリアは雲形成の段階で雲の中に閉じ込められている可能性が高いことが分かった。

14 雨水サンプル中のバクテリアの遺伝子組成を、16S rRNA 遺伝子配列解析を用いて同定し、低気圧 (寒冷前線)、停滞前線 (梅雨期および非梅雨期) および台風の雨のタイプ別にバクテリアの種類を検討した。4 タイプの雨水中に多様なバクテリアが存在し、*Proteobacteria* (37%)、*Bacteroidetes* (16%)、*Cyanobacteria* (14%)、*Actinobacteria* (9%)、*Acidobacteria* (8%)、*Firmicutes* (5%) 門のバクテリアが優占していた。約半数 (33 のうち 16) の門が 4 タイプの雨水中に共通して存在していた。共通の Operational Taxonomy Unit (OTU) が全配列の大部分 (平均的に 74%) を構成し、雨の種類にかかわらず共通のバクテリア OTU が優占的に存在していた。一方で、雨に関連する気団の起源と総観気象の条件によって細菌組成は異なっていた。土壌起源のバクテリア指標菌の割合が高いことは土壌起源のバクテリアの寄与が大きいことを示している。おそらく、土壌起源のバクテリアは雲凝結核および氷晶核として雲中プロセスに関与していたと考えられる。台風時の雨の 1 サンプルを除いて、その他のサンプルには、*Pseudomonas*、*Xanthomonas* および *Erwinia* 属のメンバーのような氷核形成活性バクテリアがあった。いくつかのサンプルから海洋起源バクテリアに属する種、例えば *Pseudoalteromonas*、*Synechococcus* と *Marinobacter* が検出され、雲および雨水を介した海洋起源バクテリアの大気中拡散が示唆された。ヒトおよび動物の病気の潜在的な病原体である糞便指標バクテリアもすべてのサンプルで検出された。これらのことから、降水は大陸、海洋と島の生態系をつなぐ、自然界のバクテリア群集の普及にとって非常に効率的な経路であるといえる。

以上の結果をまとめると、降雨イベントと関連する総観気象によって、雨水中のバクテリアの濃度、生存率および群集組成には相違が見られた。雨水中には様々なバクテリア群集が検出された。総観気象が異なるにもかかわらず、共通するバクテリアが OTU を優占していた一方で、群集組成は雨水のタイプによって異なっていた。また、大陸起源のバクテリアは雨水中で大きな割合を占めていた。雨水中のバクテリアの重要なソースとして、雲の下で除去された大気中のバクテリアだけではなく、雲中凝結核および氷晶核として働いたバクテリアも含まれると考えられる。

この研究では、新たな方法の確立が果たされ、総観気象によって引き起こされる雨水中のバクテリアの濃度、生存状態及び遺伝子特性を明らかにされた。浮遊微生物が雲及び降水過程を介して生態系の進化、気候変動、公衆衛生などに与える影響の評価に貴重な・独創的なデータが得られた。報告された情報は浮遊微生物の挙動とその地球環境の進化と変遷における働きに関する研究に大きく貢献するものと考えられる。以上のように、胡偉君の研究は、博士 (環境共生学) の学位に相応しいものと判定する。