

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	サトウ キヨシ 佐藤 聖
審査委員	主査 佐賀大学 准教授 上野 大介
	副査 佐賀大学 教授 鈴木 章弘
	副査 鹿児島大学 教授 境 雅夫
	副査 琉球大学 教授 鬼頭 誠
	副査 鹿児島大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	佐賀大学 名誉教授 染谷 孝
題目	水耕栽培環境における大腸菌と原生動物の相互作用に関する研究 Studies on the interaction between bacteria and protozoa in the hydroponic environments

本研究では、水耕栽培液に接種された大腸菌と常在する原生動物との相互作用を解明することを目的とし、作物体内部への大腸菌の侵入条件、特に侵入に必要な最少菌密度（閾値）や原生動物の動態、作物種、及び常在細菌の動態等について検討した。

1. 各種葉菜類栽培中の水耕液に堆肥由来の非病原性大腸菌を接種し、植物体内部へと侵入するかどうか試験した。レタス、ホウレンソウ、及びコマツナでは大腸菌が植物体内部へと侵入したのに対し、コネギでは侵入しなかった。その際の大腸菌密度は、数日間の試験期間中に著しく減少した。このため、侵入の閾値を正確に求めることができなかった。

このように大腸菌が急激に減少する原因を解明するため、希釈平板法およびマイクロコロニー蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法（ μ C-FISH法）を用いて大腸菌密度を測定した。接種直後の大腸菌密度は、 $3.3 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ CFU or cells/mLであったが、7日後には大幅に（4～7桁）減少し、希釈平板法と μ C-FISH法での菌密度にほとんど差はなかった。このことから、水耕液に接種した大腸菌が急激に減少する原因はviable but non-culturable (VNC)化したためではないことが判明した。栽培後の水耕液を顕微鏡観察したところ、原生動物が多数確認された。

2. 水耕液に接種した大腸菌の減少の原因を解明するために、0.2 μm または1.0 μm のフィルターを用いて水耕液をろ過し、そのろ液に大腸菌を接種した。その結果、未ろ過の水耕液では大腸菌が大幅に減少したのに対し、ろ過した水耕液では大腸菌が全く減少しなかった。さらに、蛍光標識した大腸菌菌体 (FLB) を水耕液に添加し30分間インキュベートしたところ、原生動物体内にFLBが多数取り込まれていることを確認した。以上のことから、水耕液に接種された大腸菌を原生動物が捕食していることが示唆された。さらに、細菌と原生動物のバイオボリュームを測定し、原生動物のバイオボリュームの増加量と大腸菌のバイオボリュームの減少量に矛盾がないことを確かめた。

3. 原生動物による捕食作用が、水耕液に接種した大腸菌減少の主要因であることを解明したことから、水耕栽培作物への大腸菌侵入閾値の正確な解明のためには、原生動物の捕食作用を抑制する必要があると判断した。そこで、有望と思われる抗原生動物薬 (メトロニダゾールおよびピランテルパモ酸塩) を用いて、原生動物を抑制することを試みた。高濃度のメトロニダゾール (500~1,000 mg/L) により原生動物の運動性は抑えられたが、水耕液に同濃度を添加したところ原生動物の捕食作用を抑制するには至らなかった。一方、ピランテルパモ酸塩はDMSOに溶解させる必要があるため、原生動物に有効な濃度を水耕液に添加すると、DMSOの影響によりレタスに生育障害が出ることが判明した。そこで両薬剤の混合使用により原生動物を抑制することを試みたが、抑制できなかった。これらのことから、抗原生動物薬による水耕液中の原生動物を抑制することは適切でないことが判明した。

4. 水耕液中の大腸菌密度を維持するために、大腸菌を水耕液に繰り返し接種した。その結果、水耕液中の大腸菌密度を5日間ほぼ一定に維持することに成功し、原生動物存在下におけるレタスへの侵入の閾値を解明することができた。それは、大腸菌密度が 2×10^4 CFU/mLから 1×10^5 CFU/mLの範囲で5日間維持されることであった。

従来、植物体への大腸菌等の侵入の閾値に関しては、同一作物・同一菌種であっても、比較的低い菌密度でも侵入する場合と、高い菌密度でも侵入しない場合とがあり、定説がなかった。しかし本研究で菌密度の変化に注目することにより閾値の決定が可能となった。

以上のように本論文は、水耕液の衛生管理において、原生動物と細菌の相互作用の重要性を明らかにし、植物体内への大腸菌侵入の閾値を解明することに初めて成功した。今日まで、水耕液中の原生動物の動態に着目した研究はなく、本研究の成果は、水耕栽培の衛生管理技術の基盤として価値が高く、学位論文として十分価値のあるものと判定した。