

深海底泥中における微生物の動態 — 分布特性及び呼吸速度 —

鋤崎 俊二^{*1} 辻 義人^{*1} 長沼 毅^{*1}
池本 栄子^{*1} 堀田 宏^{*1}

深海域の底次生産生態系を考察する場合において、まずその主要な構成群である微生物の分布や現存量及び、その基礎代謝速度等を見積ることが重要である。そこで、「しんかい 2000」を用いて水深 1,000m から 2,000m の間の深海底泥を、試作した無菌採泥器を用いて採取し、底泥中の微生物の分布を調査した。また、深海域の現場 (*in situ*) 培養により微生物の増殖速度及び呼吸速度を測定できる装置を試作し、海域試験を行った。

底泥中における微生物総数は、底泥の深度と共に減少する傾向にあることが明らかとなった。また、深海底泥中からは *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Vibrio-Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas-Alteromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter-Moraxera* に属するグループが分離された。

深海域での現場培養結果から推察された、深海微生物の呼吸速度及び増殖速度は、それぞれ $0.4\text{mgO}_2 \cdot \ell^{-1}$ 及び 0.0013hr^{-1} であった。深海域で直接微生物の代謝活性を測定する手法は、深海域における微生物の動態を考察する上において重要かつ有効であると考えられた。

キーワード：深海微生物, 分布, 呼吸速度, 増殖速度

Microbial Study in Deep Sea Sediments — Vertical Distribution and Respiration Rate —

Shunji SUKIZAKI^{*2} Yoshito TSUJI^{*2}
Takeshi NAGANUMA^{*2} Eiko IKEMOTO^{*2}
Hiroshi HOTTA^{*2}

Studies for Microbial distribution and respiration in deep sea sediments are important to comprehend the fate of organic substances and the ecosystem involved

^{*1} 深海研究部

^{*2} Deep Sea Research Department

in deep sea area. In order to study the vertical distribution of deep sea bacteria, deep sea sediments were collected by a sterile core sampler attached to "SHINKAI 2000". The growth rate and the respiration rate of deep sea bacteria were obtained using a *in situ* measuring device on the deep sea floor.

Total bacterial numbers in the deep sea sediments decreased with the depth of sediments. Isolated bacteria from deep sea sediments were consisted of *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Vibrio-Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas-Alteromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter-Moraxera*.

The estimated *in situ* values of the respiration rate and the growth rate of deep sea bacteria were $0.4 \text{ mgO}_2 \cdot \ell^{-1}$ and 0.0013 hr^{-1} , respectively. The importance and effectiveness of *in situ* studies for the activities of deep sea microbes were suggested to investigate microbial dynamics in deep sea area.

Key word: Deep sea Bacteria, Vertical distribution, Respiration rate, Growth rate

1 はじめに

1960年代、水深1540mの海底に沈没したアルビン号の事故は、深海の微生物研究にとって重要な手がかりを与えた。すなわち、潜水船内に取り残された食物が、約11ヶ月もの間腐敗せずに潜水船と共に回収されたことは、深海域の微生物分解が極めて遅いことを示唆した¹⁾。

この深海微生物の有機物分解に関する興味ある事実から、今日に至るまでの間、深海域を活動の場とする微生物に関する各種の調査研究が行われてきた。その結果、海洋の最深部にも微生物が存在し、深海域における低次生産機構の重要な位置を占めると考えられるようになってきた²⁾。また、深海域のような高い圧力条件下においても微生物が生存するという事実は、特殊環境条件下での生命維持のメカニズムを考察する上において格好の研究材料となるばかりでなく、生活廃棄物等による深海域の汚染を防御する意味からも重要視されるようになってきた³⁾。

一般に、水圏における従属栄養微生物の役割は、有機物の分解者 (Decomposer) のみでなく、処理屋 (Scavenger) としても重要な働きをされると考えられている⁴⁾。さらに、微生物細胞自身が、高次の捕食者にとって餌料源ともなり得る^{5) 6) 7)}。そのため、このような微生物食物環 (Microbial Loop) の考え方を背景にした、従属栄養微生物

の水中における分布構造や機能を調べることは、生態系の低次生産における物質収支を解明していくうえにおいて極めて重要なこととなる。このような課題に関連して、これまで陸水域あるいは海洋の表層域では、微生物の現存量や基礎代謝速度及び増殖速度等の見積りがなされてきた^{8) 9)}。

深海域の低次生産生態系を考察する場合においても同様に、その主要な構成群である微生物の分布や現存量及び、その基礎代謝速度等を見積ることが必要であると考えられる。しかしながら、深海域に生息する微生物は、高水圧、低水温あるいは低有機物濃度といった環境条件のために、その現存量や代謝活性は著しく低い。そのため、微生物の採取や代謝活性の測定には、これまで陸水や海洋の表層水中で用いられた手法をそのまま適用することはできない。

通常、底泥中の微生物を対象として、その採取を行う場合には採取装置の無菌性は考慮されていない。しかし、微生物数の少ない深海域での採取にあたっては、外部からの汚染によって測定値に影響を及ぼすことが考えられるため、無菌性を考慮した手法を用いる必要である。また、深海域に生息する微生物の代謝活性を陸上で測定する場合には、試料揚収時の圧力や温度変化が、試料中に生息する微生物に影響を与えることが予想される。したがって、深海域の微生物活性を測定する場合

には、現場水域で直接 (*in situ*) 測定操作を行うことが重要である。

そこで、本研究では、まず潜水調査船を用いて深海に生息する微生物を無菌的に採取する採泥器を製作し、これを用いて深海底泥中における微生物の分布に関する情報を入手することを目的とした。さらに、深海底において生息する微生物の増殖速度あるいは基礎呼吸速度を深海底において直接 (*in situ*) 測定する装置を試作し、その現場海域試験を試みた。

なお、本研究を遂行するにあたり、「しんかい2000」運行チーム及び調査母船「なつしま」乗員の皆様からは、多大の御協力を受けました。

また、現場における微生物の呼吸速度測定法に関しては、(株) 日本海洋生物研究所主任研究員中根徹氏に貴重な御意見をいただきました。紙上をお借りしてこれらの皆様に厚く御礼申し上げます。

2 材料と方法

2.1 微生物試料の採取

微生物試料の採取は、1988年4月から1989年8月までの間に、図1に示す、駿河湾、富山湾、及び南西海域の3海域8地点の水深1000mから2000mの海底上において「しんかい2000」を用いて行った。

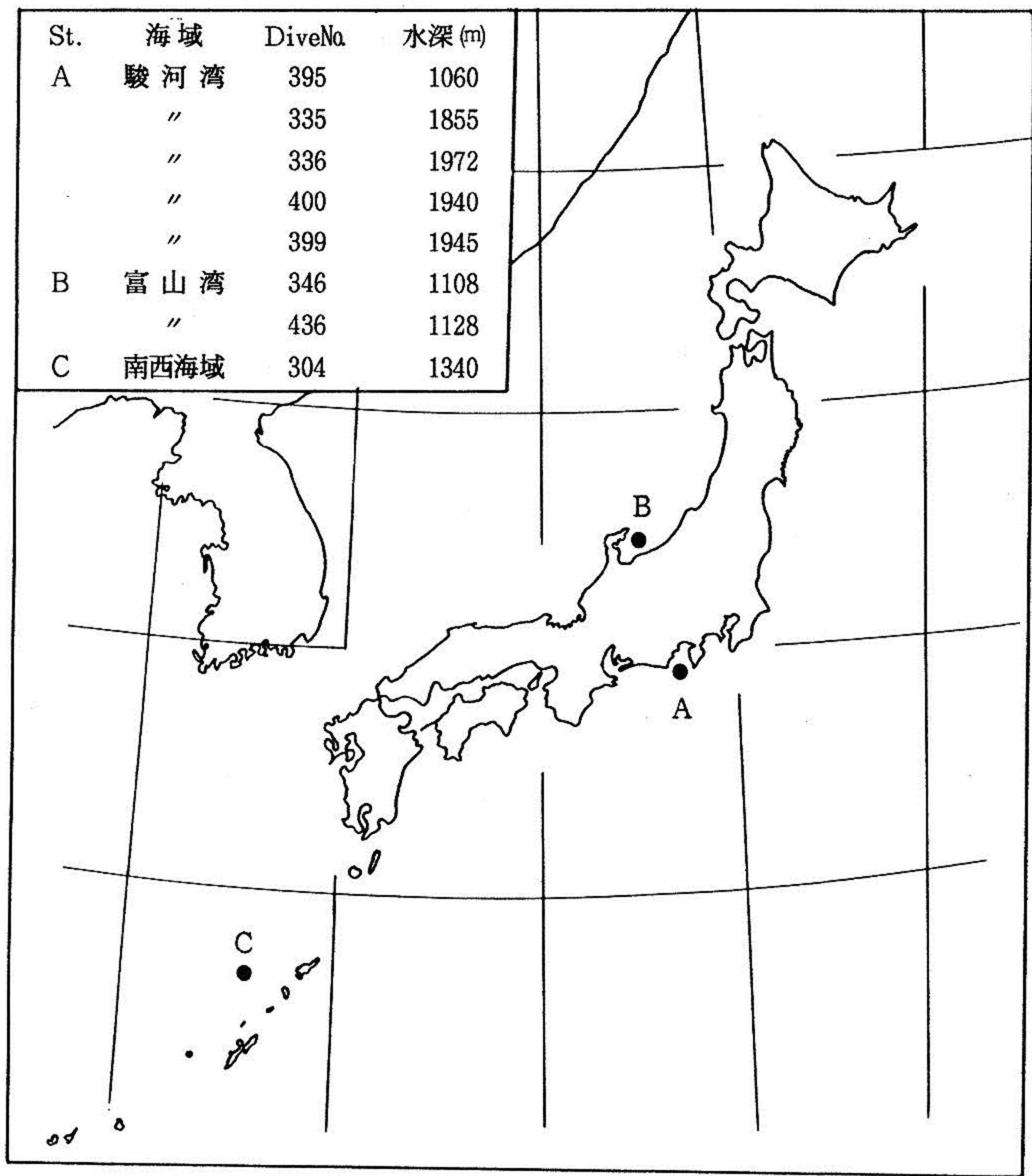


図 1 底泥試料採取地点
Fig. 1 Sampling locations of deep sea sediments sample.

微生物を含む底泥試料の採取は、図2に示す柱状採泥器を用いた。採泥器はステンレス製の外筒と柱状採泥器によって構成されており、事前に柱状採泥器を外筒に収容した状態で、中に孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルター（ミリポア，HAW P 04700）で口過した海水を充填し、採泥器全体をオートクレーブ滅菌した。一般に、海水の体積は、オートクレーブによる加熱や潜航・浮上時の圧力変動により数十から数%の増減があるため、容器内の海水の体積変動によって外部と内部との海水の交換がおり、微生物汚染が引き起こされる。この点を回避するため、採泥器の外筒上部には孔径 $0.2\mu\text{m}$ のヌクレポアフィルターを取り付けた。圧力及び温度変化にともなう容器内の海水の流入出は、フィルターを通して行われるため、外部からの微生物細胞の混入を防止することができると考えた。これを「しんかい2000」のサンプルバスケット部に装着して深海底に持込み、マニピュレータを用いて、外筒部の蓋を開け、柱状採泥器を取り出し採泥を行った後、再び蓋を閉じて、船上に持ち帰った。

なお、潜航・浮上時の、採泥器内への海水中からの微生物の混入の有無を測定するため、採泥作業を行わずに潜航・浮上を実施した。採取器内へ

の微生物混入の検定は、潜水船揚収後、柱状採泥器内に充填してある滅菌口過海水 1ml を採水し、平板培地に接種後、培養を行い、出現するコロニーの有無で判定した。

2.3 微生物の計数

採取された泥は、潜水船揚収後速やかに表層部から 2cm 間隔に分割し、その一定量を約6ヶ月間エージングさせた滅菌済み口過海水 30ml に懸濁させ、AUTOMATIC MIXER (Scientific Industries Inc., Model K-550 G)で2分間分散後、約20分間静沈させ、その上澄み液について微生物数の計数を行った。

微生物総数は、試料に最終濃度が約2%になるよう中性フォルマリンを添加して固定し、後日、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole; sigma Co.Ltd.) 染色による直接計数法¹⁰⁾により計数を行った。生菌数の測定は、試水に酵母エキス及びDNA合成阻害物質 (Nalidixic Acid ; TCI Co.Ltd.) を添加し、 20°C 暗条件下で6時間培養を行い、この間に伸長あるいは肥大した細胞を生菌数 (Direct Viable Count : DVC法)¹¹⁾とした。また、試水の一定量を炭素濃度が約 $1000\text{mgC}/\ell$ となるよう調整したAnderson培地¹²⁾とこれを、 $1/10$ 及び $1/100$ に希釈した3種の平板培

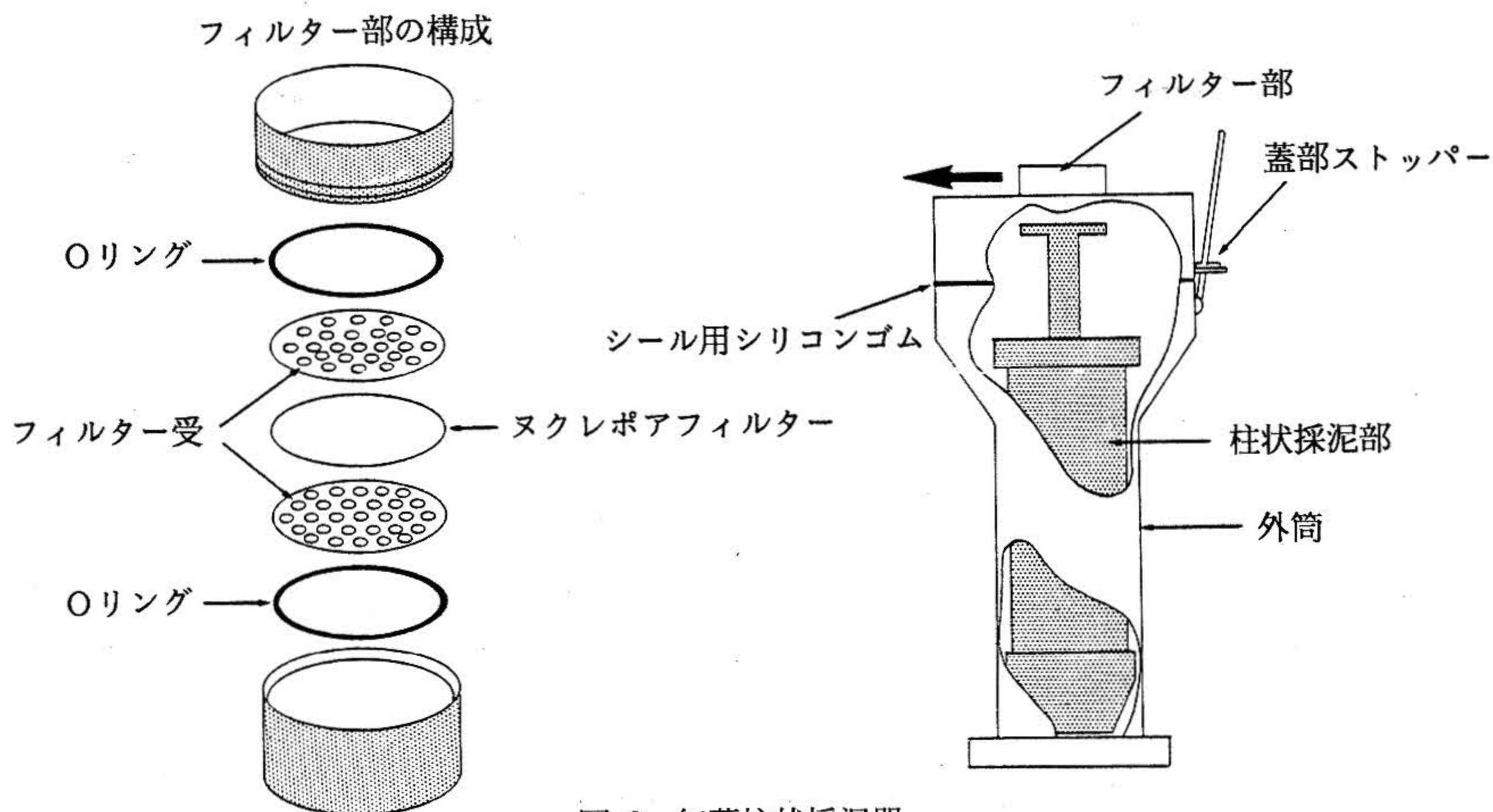


図2 無菌柱状採泥器

Fig. 2 Sterile core sampler.

地に接種し、30, 15, 4°C条件下でそれぞれ1~4週間培養し、形成されたコロニーを計数した。

2.4 微生物の分類

平板培養基上に形成されたコロニーは、そのほぼ全数を斜面培地に分離し、約2ヶ月に一度植え継ぎを繰り返しながら、グラム染色性、色素産生能、孢子形成能、鞭毛の存在、糖発酵、運動性等の生化学試験を行い、清水¹³⁾の簡易同定図式に従ってグループ別の区分を行った。

2.5 呼吸速度及び増殖速度の測定

2.5.1 現場海域試験

深海域における微生物の呼吸活性は、極めて低いと考えられる。そこでグルコースのような従属栄養微生物にとって有効な呼吸基質を添加した後、現場培養することによって、呼吸活性を高めた状況下で酸素消費量を測定できる装置を試作した(図3)。各容器内には事前に1から100 mgC/ℓの基質濃度になるようグルコースを添加し、オートクレーブ滅菌を行った。これを、1989年4月に、駿河湾の水深1945m(水温2.1°C)地点の底泥上に「しんかい2000」を用いて設置した。各容器内への現場試料の接種にあたっては、2mlの底泥懸濁海水を、マニピュレータでハンドポンプを操作して注入した。装置は、現場水域で48時間放置した後、潜水船により船上に回収した。

微生物総数は、容器内から20mlを採水し約2%になるよう中性フォルマリンで固定後、DAPI

染色による直接計数法により計数した。残りの試水中の溶存酸素量は、ウィンクラーアジカナトリウム変法¹⁴⁾により測定した。

微生物の呼吸量の見積りは、現場培養終了後の、1 mgC/ℓの有機物を添加した容器内の溶存酸素濃度と各添加有機物濃度条件下での溶存酸素濃度の差(ΔO_2)から推定した。また、1細胞当りの呼吸速度(R , cellular respiration rate: $\mu g O_2 \cdot cell^{-1} \cdot hr^{-1}$)は、培養期間中の微生物の増殖を加味することにより以下のような算出方法をとった。

$$\begin{aligned} SO_2 &= R \int_0^T N_t \cdot dt \\ &= R \cdot N_0 \int_0^T e^{\mu t} \cdot dt \\ &= R \cdot N_0 \left[\frac{e^{\mu t}}{\mu} \right]_0^T \\ &= \frac{R \cdot N_0}{\mu} (e^{\mu T} - e^{\mu 0}) \\ &= \frac{R}{\mu} (t = T \text{の総細胞数} \\ &\quad - (t = 0 \text{の総細胞数})) \\ &= \frac{R}{\mu} (\Delta \text{総細胞数}) \end{aligned}$$

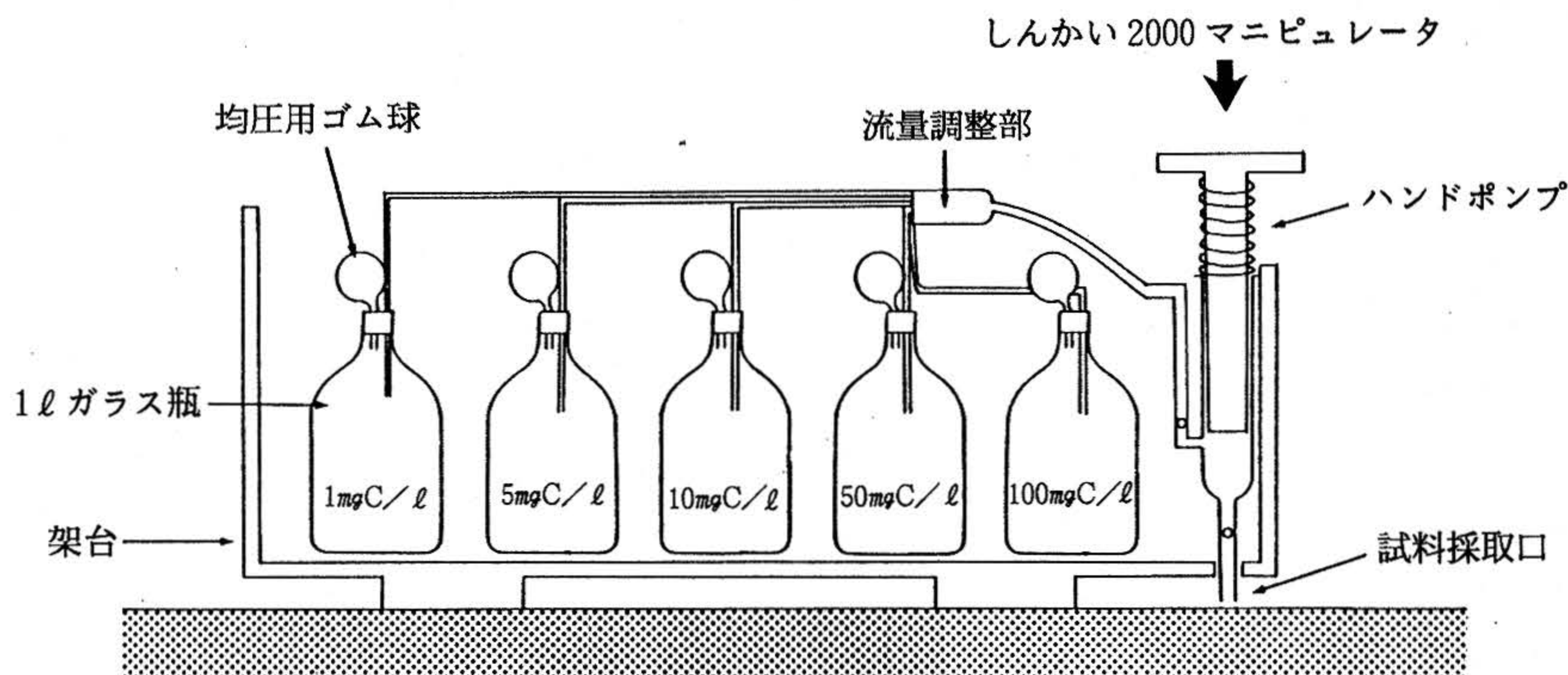


図3 現場型呼吸活性・増殖速度測定装置

Fig. 3 In situ measurement system of Bacteria respiration and growth rate.

ここで SO_2 は呼吸量(ΔO_2)であり、また N_0 , N_t は0時間及び t 時間後の微生物の細胞数($\text{cells} \cdot \ell^{-1}$), T は培養時間(hr), μ は微生物の増殖速度(hr^{-1})である。

さらに、微生物の増殖速度(μ , Growth rate constant: hr^{-1})は、次式¹⁵⁾によって導いた。

$$\mu = (\log_{10} Z - \log_{10} Z_0) \times 2.303/t$$

ここで Z および Z_0 の値は、それぞれ t 及び t_0 時間における微生物の細胞数である。

また、細胞倍加時間(G , Generation Time:hr)は、次式によって概算した。

$$G = \ln 2/\mu$$

2.5.2 室内試験

駿河湾の水深1972m地点の底泥から分離した、グラム陰性無芽胞菌2株を、Anderson液体培地とこれを、口過海水で1/10及び1/100濃度になるよう希釈した3種の培地に接種した。これを、30, 15, 2°Cの各温度条件下でマグネチックスターラを用いて攪拌しながら、約7日間培養を行い、その間の微生物総数の変化を直接計数法により測定した。

3 結果

3.1 柱状採泥器の無菌性試験

採泥器内への微生物混入試験の結果、柱状採泥

器内に充填してある口過海水中からは、微生物コロニーの出現は認められなかった。したがって、本採泥器を用いることにより、外部からの微生物の混入を防止した状況下で採泥を行うことができると考えられた。

3.2 微生物の分布

調査した3海域8地点における底泥表面(0~2 cm)中の微生物総数は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 \text{ cells/g}$ の範囲にあり測定地点間で微生物総数が異なった。同一のサンプルを用いた、DVC法による生菌数の測定結果は総微生物数のほぼ1/10であり、また、平板培養法によって計数された微生物数はDVC法のさらにその1/10程度の計数値であった(表1)。

図4には、底泥内における微生物総数の鉛直分布を示した。測定した4地点の内、駿河湾の水深1945m地点、富山湾の1108m及び1128m地点の底泥中の微生物総数は、底泥の深度が増すに伴い暫減する傾向が認められた。特に、富山湾の1108m及び駿河湾の1060m付近の底泥中では、底泥4 cm以深になると表層部の微生物総数のほぼ1/100程度に急減した。一方、駿河湾の水深1060m地点においては、表層から約10cmまでの底泥中の微生物総数はほぼ $1.2 \times 10^7 \text{ cells/g}$ 程度と変化は認められなかった。

3.3 微生物群集の構成

図5に、微生物の分類結果を示した。深海底泥から分離された微生物は、*Bacillus*, *Lactobacillus*,

表 1 深海底泥表層部における微生物総数と生菌数

Table 1 Number of total Bacteria and viable bacteria in the deep sea sediments.

調査海域	水深	微生物総数 ($\times 10^7 \text{ cells/g}$)	DVC法 ($\times 10^5 \text{ cells/g}$)	平板培養法 ($\times 10^3 \text{ cells/g}$)
駿河湾	1060	3.56	1.40	
	1855	0.06	0.19	5.27
	1972	0.01	0.12	1.49
	1940	2.8		
	1945	5.2		
富山湾	1108	0.04	1.26	8.05
	1128	0.04		
南西海域	1340	0.28	0.28	1.14

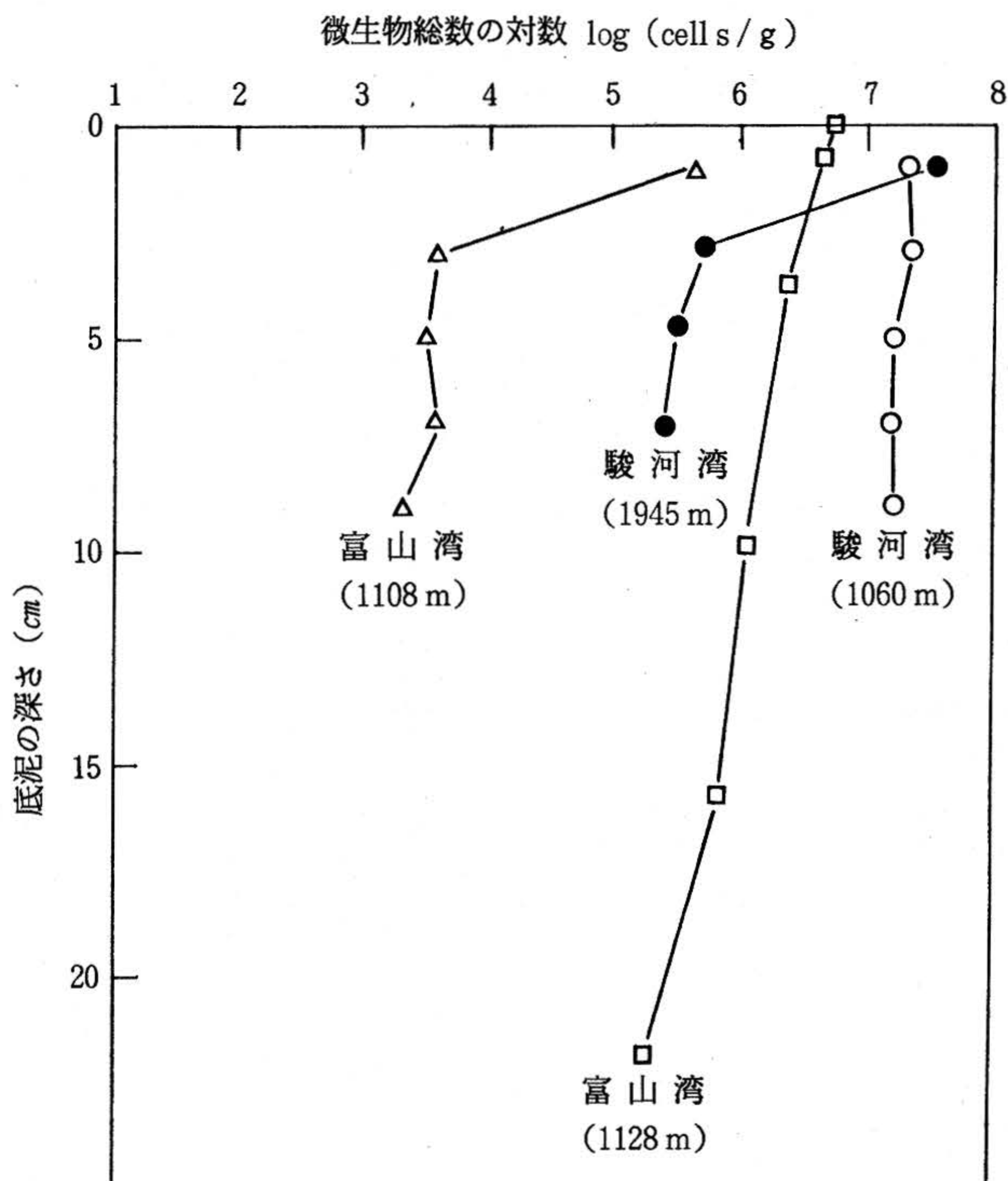


図 4 深海底泥中における微生物総数の鉛直分布

Fig. 4 Vertical distributions of total bacteria number in deep sea sediments.

Vibrio-Aeromonas, *Flavobacterium*, *Pseudomonas-Alteromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter-Moraxera*, に属するグループ及び、検索不可能な微生物群であった。地点別では、駿河湾の水深1855m地点で、*Flavobacterium* 及び *Pseudomonas-Alteromonas* に属すると考えられる微生物が相対的に多く出現したが、その他の地点においては、*Bacillus* 属と考えられる孢子形成微生物が最も多く見いだされた。また、*Vibrio-Aeromonas* に属するグループは、培養温度が4℃条件下のみで出現した。

図6には、富山湾及び駿河湾から分離された微生物のうち、*Bacillus* 属と考えられる微生物の、深度別の構成比の変化を示した。両地点共に、底

泥の深度が増すに伴い *Bacillus* 属に相当する微生物の比率が増加した。特に、駿河湾においては、表層部で、ほぼ10~30%程度の比率で *Bacillus* 属に相当する株が出現したが、深度と共に比率は急増し、底泥7cm付近ではほぼ80~90%にまで達した。さらに、分離する培地濃度が高いほど、*Bacillus* 属の出現が多くなる傾向が認められた。

3.4 微生物の酸素消費量及び増殖速度

3.4.1 現場水域における測定結果

2日間の現場培養の結果、5mgC/ℓ以上のグルコースを添加した容器内での微生物の増殖及びそれに伴う溶存酸素濃度の減少が認められた(表2)。各容器内の溶存酸素濃度から算出される酸素消費量(ΔO_2)は、1.2~2.1 mgO₂/ℓであり、

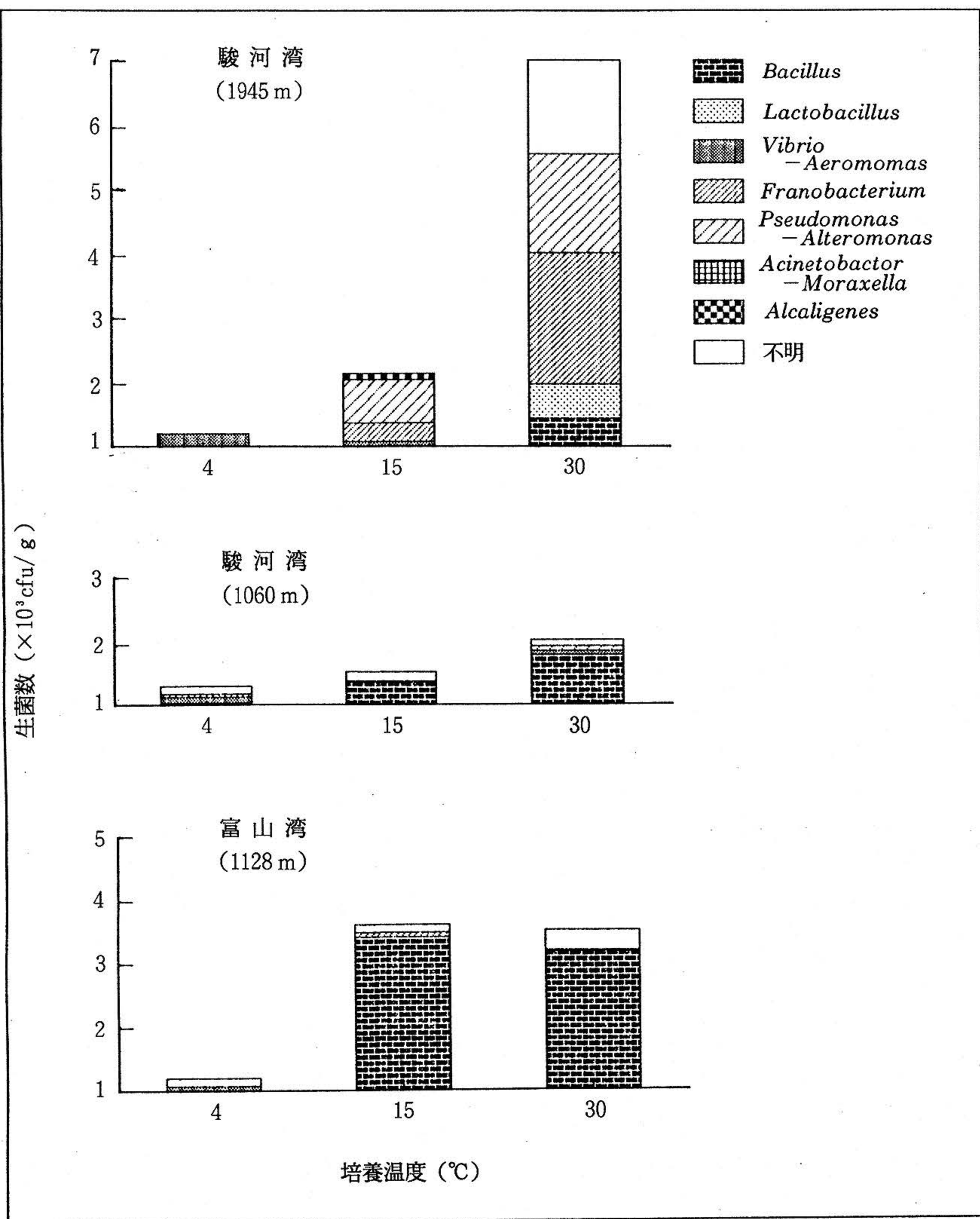


図 5 深海底泥から分離された生物の種類

Fig. 5 Classification of isolated bacteria from deep sea sediment.

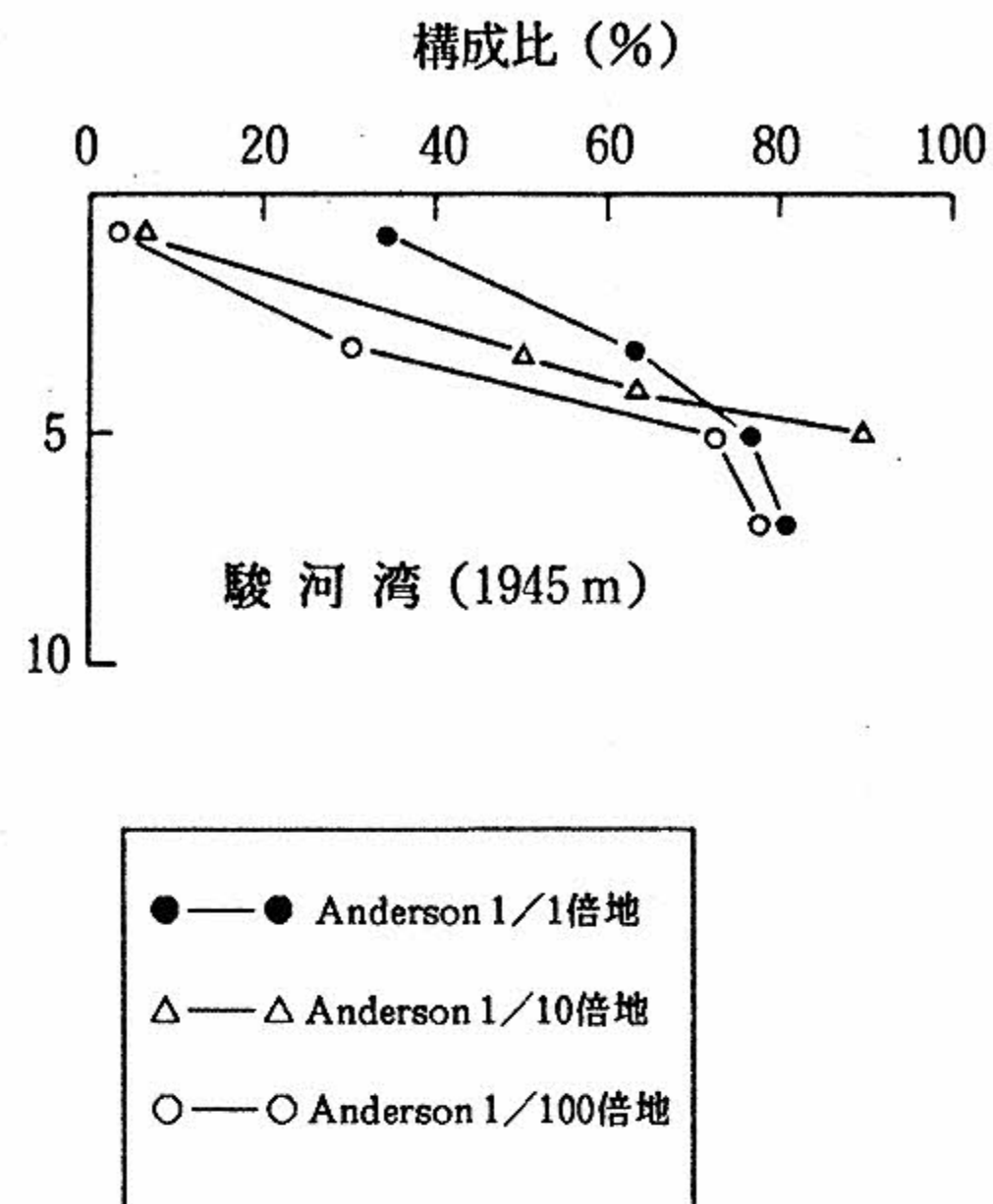
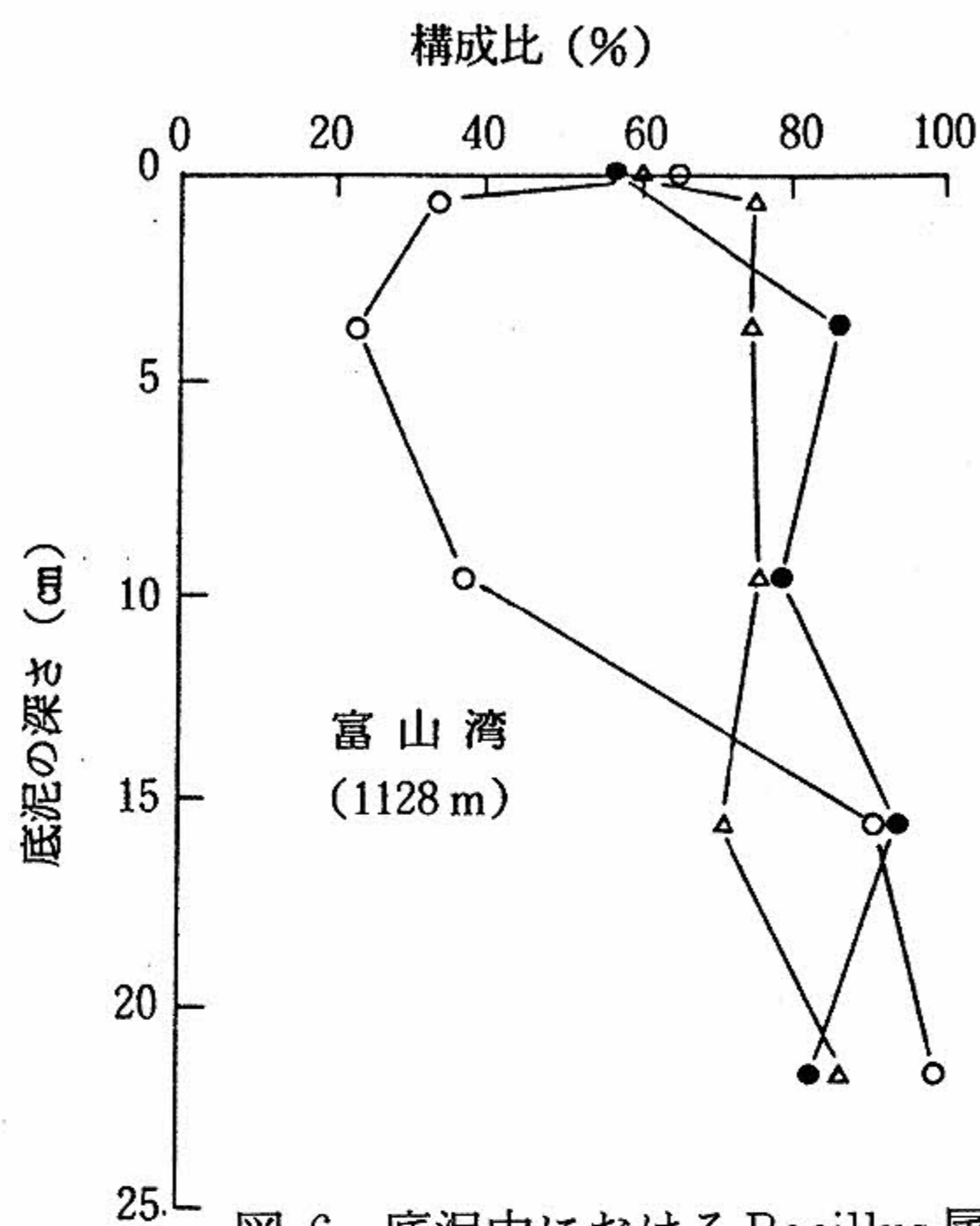


図 6 底泥中における *Bacillus* 属の構成比

Fig. 6 Ratio of *Bacillus* group to viable bacteria in deep sea sediments.

添加する有機物の濃度が高くなるに伴い増加する傾向が認められた。また、微生物数の変化から算出される増殖速度 (μ) の値は、 $-0.003 \sim 0.023 \text{ hr}^{-1}$ であり、細胞倍加時間 (G) は、77~26 時間程度であった。

3.4.2 室内における測定結果

図 7 には、陸上において、深海から分離した微生物株を用いて行った増殖速度の測定結果を示した。測定した2株共に、培養温度が15°Cで最も高い増殖速度が認められた。また、30°C及び15°Cで培養を行った場合には、培地の希釈の程度が大きくなると増殖速度も低下したが、現場水温に近い2°C条件下では、Anderson培地を1/10に希釈した場合の方が増殖速度が高くなる傾向が認められた。

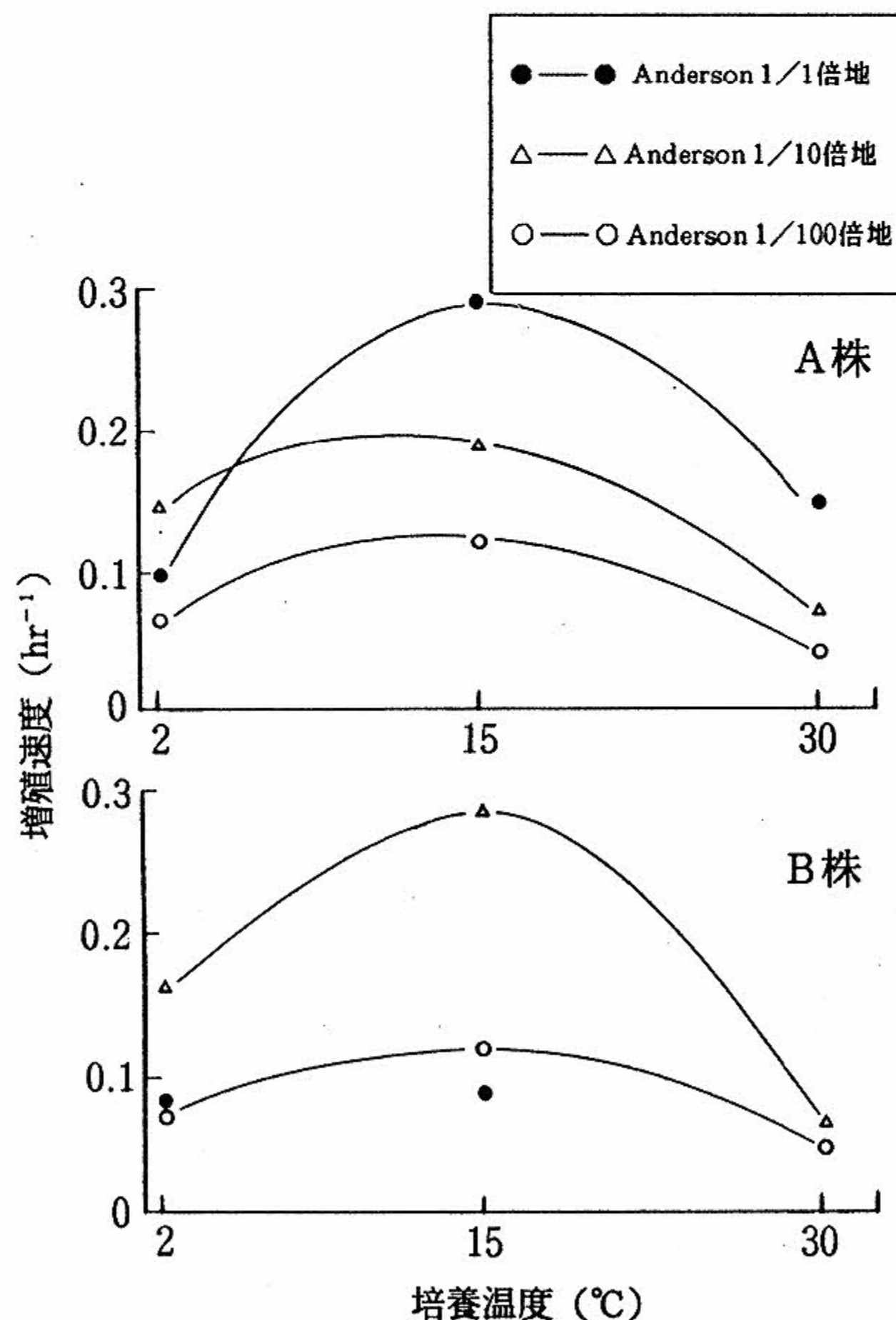


図 7 深海底泥中から分離した微生物株の、1気圧条件下での増殖速度

Fig. 7 Growth rate of isoratid bacteria from deep sea sediments.

表 3 数々の水域における微生物の増殖速度と倍加時間

Table 3 Growth rate and generation time of natural bacterial populations in various sea waters.

添加有機物 濃度 (mgC/ℓ)	培養終了時の 溶存酸素濃度 (mgO ₂ /ℓ)	培養終了時の 微生物総数 (×10 ⁵ cells/ ml)	ΔO ₂ ¹⁾ (mgO ₂ /ℓ)	Δ総細胞数 ²⁾ (×10 ⁵ cells/ ml)	増殖速度 (hr ⁻¹)	細胞倍加速度 (hr)
無添加		1. 1 2				
1	6. 8 6	0. 9 5		- 0. 1 7	- 0. 0 0 3	
5	5. 6 8	1. 7 6	1. 2 1	0. 8 1	0. 0 0 9	7 6. 7
1 0	5. 3 8	1. 9 3	1. 5 1	0. 9 8	0. 0 1 1	6 3. 0
5 0	4. 9 1	2. 4 1	1. 9 8	1. 4 6	0. 0 1 6	4 3. 3
1 0 0	4. 7 7	4. 0 6	2. 1 2	3. 1 1	0. 0 2 3	2 5. 7

1) ΔO₂: 1 mgC/ℓ 添加の試験区と各試験区との溶存酸素濃度の差

2) Δ総細胞数: 有機物無添加試験区と各試験区との差

4 考察

4.1 深海微生物の採取及び計数手法

水圏生態系中の微生物の現存量を正確に把握するためには、微生物が生息する水塊あるいは底泥等を外部から汚染することなく採取することが極めて重要である。このため、これまで海水試料の採取に関しては各種の無菌採水器が開発されてきた^{16) 17)}。一方、底泥試料に関しては、既存の採泥器により採泥を行い、汚染の少なそうな泥の中心部を滅菌した器具で分取するといった操作が行われてきた¹⁸⁾。これは、浅海域の底泥中の微生物数は海水中に比較して極めて多いため、多少の微生物汚染は、菌数や微生物活性の測定値に影響を与えない¹⁸⁾と考えられてきたからである。しかしながら、深海の底泥中の微生物のように浅海域に比較して微生物数が極めて少なく、また、微生物活性も低いものを測定する場合には、外部からの汚染によって測定値に大きく影響を及ぼすことが想定される。したがって、深海底泥中の微生物の採取を行う場合にも、無菌採水器と同様な無菌性の考慮が必要であると考えられる。本研究のために試作した柱状採泥器は、現場水域での採泥作業以外は外部海水との接触がおこりにくいため、汚染されることなく現場試料のみを採取することが可能であり、特に微生物数の少ない深海域では有効であると判断された。

また、現場水域に存在する微生物の総数を知る手法としては、一般に微生物細胞の持つ核酸を蛍光物質で染色し、蛍光顕微鏡下で計数する方

法^{19) 10)}が採用されるが、この手法では、生・死菌の区別を行うことはできない。生きた微生物の数を知らするためには、合成培地を用いた平板法²⁰⁾やMPN法²¹⁾あるいは、DNA合成阻害物質を用いたDVC法等の培養計数法を用いる必要がある。今回、深海の微生物を対象として同様の手法を適用した場合、微生物総数は、これまで数々の水域の底泥で測定された値 ($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ cells/g) の範囲内にあり、蛍光顕微鏡下で細胞を計数する手法は有効であると判断された。

しかし、深海域で活動している微生物の数(生菌数)を正確に知るには、多くの問題が残された。その最大の理由は、生菌数測定のための培養が、現場環境と著しく異なる条件下で行われたことにある。通常、培養基に用いられる培地濃度は、現場の有機物濃度のほぼ10~1000倍程度ある²²⁾。また、培養も常圧下で行われることが多い。深海から分離された微生物の一部には、1気圧状況下よりも、より高い圧力条件下の方が増殖が早い微生物が存在することが報告されており²³⁾、また、海洋細菌には、高い有機物濃度条件下では発育しないものが多く存在することが知られている²⁴⁾。かりにこのような好圧細菌(Barophilic Bacteria)あるいは、貧栄養細菌(Origotrophic Bacteria)が深海域の主要な微生物群であるとしたら、常圧下での高濃度培地を用いた計数では、出現しない可能性がある。DVC法あるいは平板培養法による測定結果が、総菌数の測定結果に比較して低い値しか得られないのは、培養計数時の条件が深海

域の環境条件と著しく異なったことに起因しているとも考えることができる。

したがって、今後、深海域で生息する微生物を計数するためには、水圧、水温あるいは低有機物濃度といった深海特有の環境条件を加味した手法を用いることが重要であると考えられる。

4.2 深海底泥中における微生物の分布

一般に沿岸域の底泥中の微生物総数は、その深度が増すに伴って減少することが明かにされている²⁵⁾。本調査によって測定された、各地点の微生物総数も深度とともに減少する傾向が認められ、深海域の底泥中の微生物は、海洋の沿岸域の底泥中と同様の分布様式を呈していると考えることができる。

また、駿河湾の水深1060m地点における微生物の構成は、*Bacillus*属と考えられるグループの構成が、深度が増加するに従い高くなった。一方、富山湾の水深1108m地点においては、底泥表面から下層まで*Bacillus*属と考えられるグループの構成比は駿河湾ほど大きく変化していない。このような微生物の構成の違いは、微生物総数の鉛直的な変化にも関連すると考えられる。すなわち、底泥中での、微生物総数の変化の大きい駿河湾においては、表層部に*Bacillus*属以外の微生物が相対的に多く存在するが、それ以深においては急速に減少したことが、微生物総数の変動に反映されたと考えることもできる。

*Bacillus*属の多くは、生息環境の悪化に伴い孢子を形成することが知られている²⁶⁾。*Bacillus*属に相当する微生物が、深海底泥中に存在する微生物群集の分布に影響を与える主要な微生物群であることから、この微生物群が現場海域で孢子の状態が存在するか、あるいは、栄養細胞の状態で活動しているかの研究が今後重要であると考えられる。

4.3 深海域における微生物の基礎代謝

通常、微生物活性を測定する手法としては、海水（あるいは底泥試料）を採取後、船上等で有機物の取り込み速度²⁷⁾や、呼吸速度²⁸⁾を測定する手法が採用されるが、深海域の場合には、試料揚収時の圧力や温度変化等により、試料中に生息する微生物の一部の種類は不活性化することが予想される。したがって、深海域の微生物活性を測定

する場合には、現場水域で直接 (*in situ*) 測定操作を行うことが必要となる。

しかし、深海域のように低い水温条件下では、微生物の代謝速度が極めて低いことが想定されるため、短期間の現場実験によって有意な測定結果を得ることはできない。そこで、Seki ら²⁹⁾やJannash ら³⁰⁾は、深海域の海水中に人為的に有機物を添加し、微生物の代謝活性を高めることによって、短時間にその増殖や有機物の分解を測定する試験を行った。その結果、現場海域での増殖が極めて遅く、しかも高い圧力条件でしか生育できない微生物の代謝活性を測定できることを明かにした。微生物の呼吸速度も、増殖や有機物の分解速度と同様に、新たな基質を与えることによって急速に高まることが明かにされている³¹⁾。基質を与られた微生物はより高い代謝活性を示し、呼吸速度もより速くなることが想定される。したがって、深海域に生息する微生物のように低い代謝活性しか持たない微生物でも、基質を添加することにより、呼吸速度の測定が可能になると考えられる。

本研究においても、有機物を添加することにより現場の微生物活性を高めた状況下での呼吸量及び増殖量の測定が可能であった。しかしながら、測定された各値は、現場の有機物濃度条件下での微生物の代謝活性を示しているわけではない。

そこで、各測定容器内に添加した有機物濃度に対する微生物の酸素消費量及び増殖速度の関係を、現場の有機物濃度まで外挿することにより、現場における微生物の代謝活性を推定した。今回の測定では、添加する有機物濃度に対する酸素消費量及び増殖速度の変化は、正の相関（酸素消費量； $r = 0.994$, 増殖速度； $r = 0.962$ ）を示した（図8）。

ここで、深海域の一般的な有機物濃度を約 $1\text{mgC}/\ell$ ³²⁾と仮定したときの酸素消費量及び増殖速度 (μ) を推定した。その結果、現場における微生物の実際 (*in situ*) の酸素消費量及び増殖速度は、それぞれ $0.38\text{mgO}_2/\ell$ 及び 0.0013 hr^{-1} であると推定された。今回得られた増殖速度の値とこれまで報告された測定値を表3に示した。報告されている深海での増殖速度は、海域によってオーダーが2桁異なっているが、本研究で得た増殖速

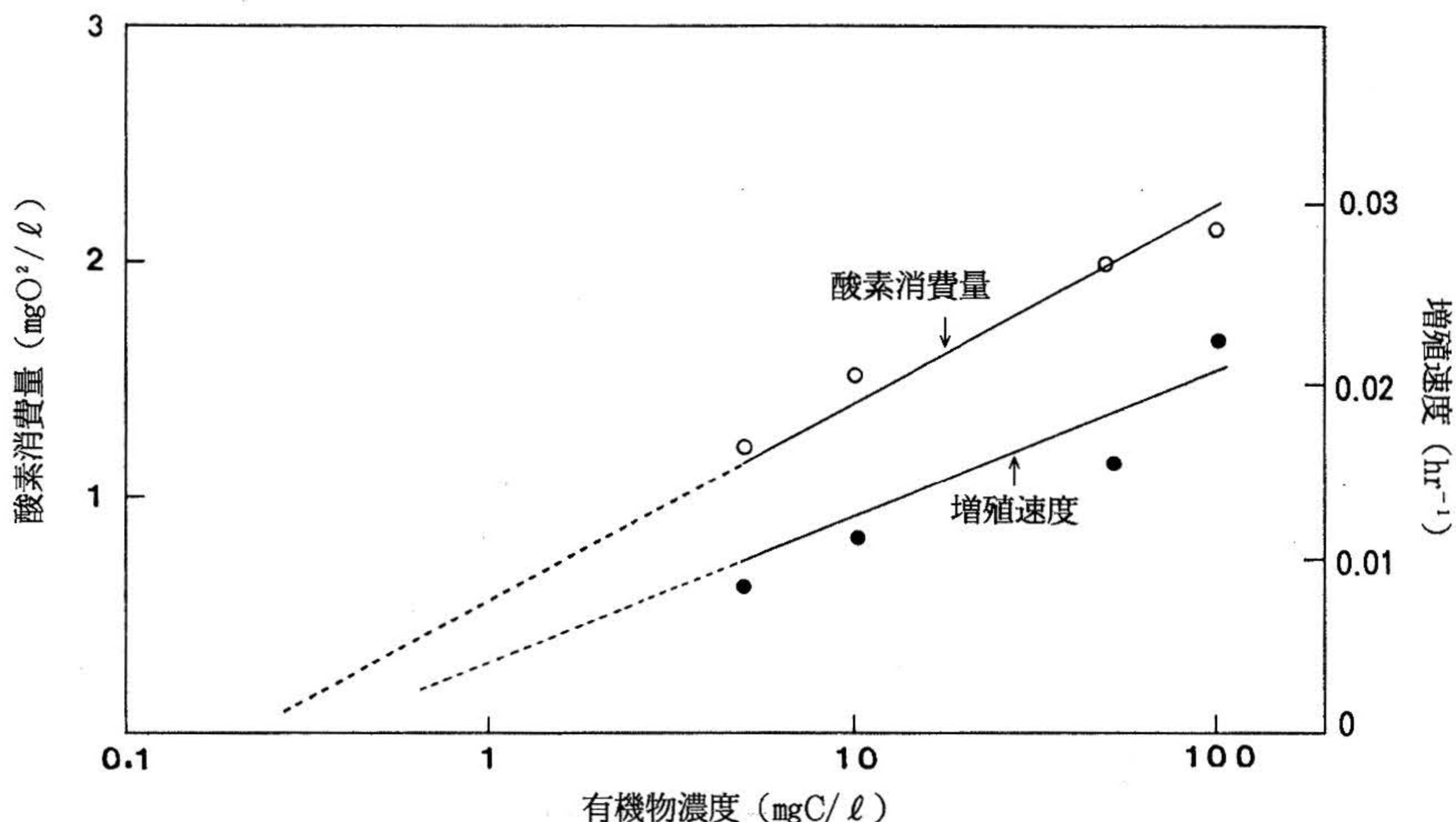


図 8 有機物濃度に対する微生物の酸素消費量及び増殖速度の関係

Fig. 8 Effects of organic matter concentration on oxygen consumption and growth rate of deep sea sediment bacteria.

表 2 現場型呼吸活性・増殖速度測定装置により得られた酸素消費量と増殖速度

Table 2 Oxygen consumption and growth rate of natural bacterial populations measured by *in situ* measurement system.

水域及び測定資料	水深 (m)	方 法	増殖速度 (hr ⁻¹)	倍加時間 (hr)	文 献
Narragansett Bay	表層水	Inoculated FSW*	0.22 ~ 0.25	3.2 ~ 2.7	Baxter and Sieburth(1984) ³⁴⁾
Scripps, Calif.	表層水	Continuous cultures	0.02 ~ 0.12	34.7 ~ 5.8	Hagstrom et al.(1984) ³⁵⁾
Scripps, Calif.	表層水	CEPEX 3 μm filtrate	0.02 ~ 0.11	32.0 ~ 6.3	Fuhrman and Azam(1980) ⁹⁾
Georgia coast	表層水	3 μm filtrate	0.03	23.1	Newell and Fallon(1982) ³⁶⁾
NW Atlantic Ocean	1500	1:20 dilution in FSW (lag phase)	-0.03		Hofle(1984) ³⁷⁾
		(exponential phase)	0.40		
Central N Pacific	2000	Inoculated FSW	0.003 ~ 0.06	231 ~ 11.6	Carlucci and Williams(1978) ³³⁾
駿河湾	1996	有機物添加法	0.0013	533	本研究
分離菌株	室内	バッチ培養法	0.05 ~ 0.28	1309 ~ 2.5	本研究

*: Filtered sea water

度は、Carlucci and Williams³³⁾ が水深2000mの海水中で測定した値とほぼ同じオーダーを示した。また、これは、海洋の表層水中に生息する細菌の増殖速度に比較するとほぼ1/10~1/100程度と、かなり遅いことが示唆された。一方、本研究によって、深海底泥中から分離した微生物の増殖速度を陸上において測定した結果は、深海域で

測定した値よりもかなり高い値となった。

また、図9には有機物濃度と1細胞当りの呼吸速度の関係を示した。微生物の呼吸活性は、有機物濃度に依存することが知られており³¹⁾、本試験においても、1~50mgC/lの有機物濃度範囲では有機物濃度の増加と共に呼吸速度は大きくなった。しかしながら、100mgC/lの状況下では逆

に小さくなる傾向にあった。 Kato³⁸⁾ は、有機物濃度が高くなりすぎると微生物の代謝活性は低下するを示唆している。したがって、このような結果が示される一つの要因として、深海域に生息する微生物は、高い有機物濃度条件下においては効率的に有機物を利用しないことが考えられる。さらに、表 4 にこれまで報告された、微生物の1

細胞当りの呼吸速度と本研究による結果を示した。1細胞当りの呼吸速度は、 *Vibrio anguillarum* 及び *Pseudomonas perfectomarinus* を用いた、室内におけるグルコースを添加した状況下での呼吸速度の測定結果³¹⁾ や、沿岸域での測定例³⁹⁾ に比較して約10倍高く、また外洋域での測定値³⁹⁾ より50倍程度大きな値であった。

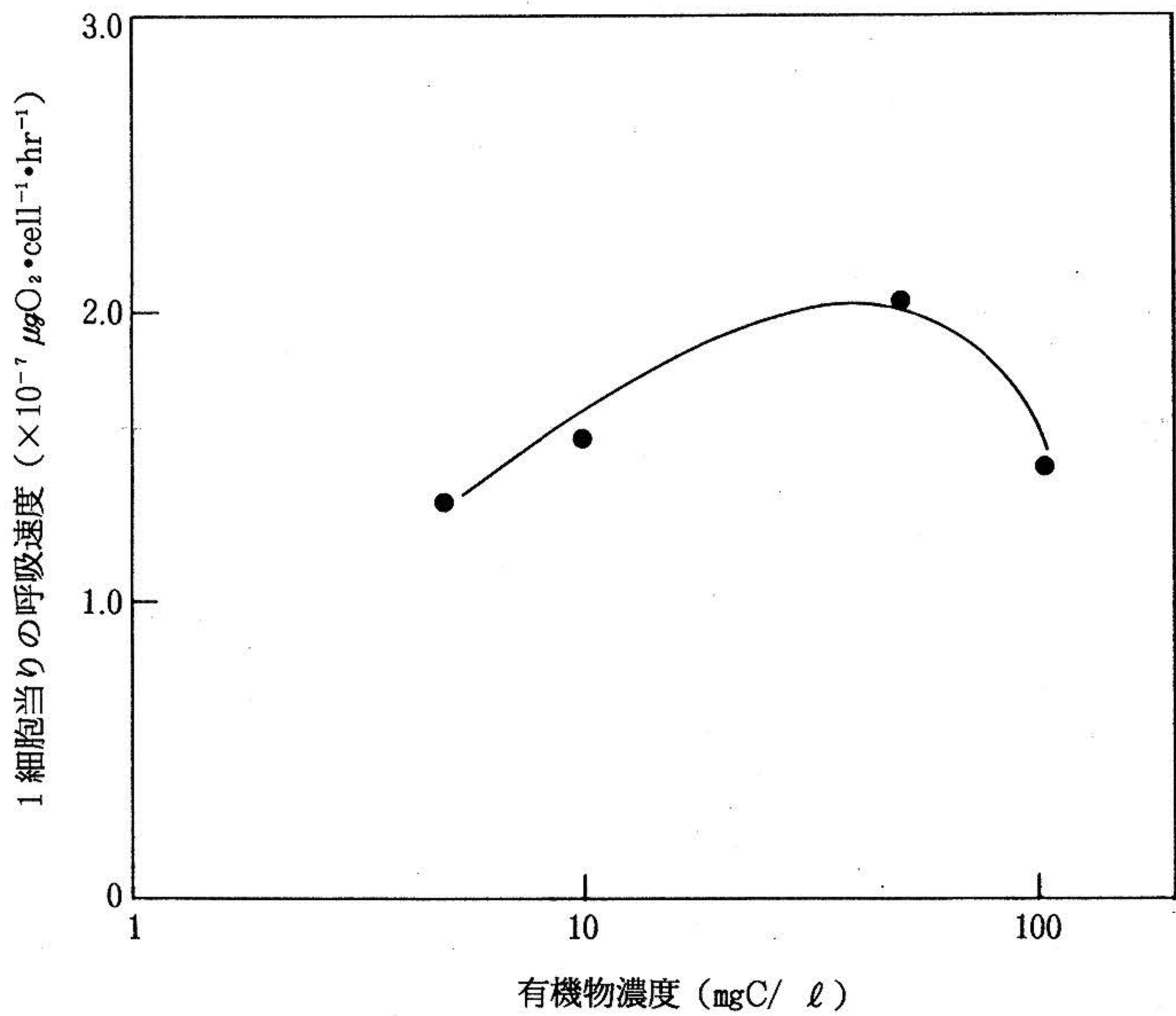


図 9 有機物濃度と1細胞当りの呼吸速度との関係
 Fig. 9 Relationship between oragamic matter concentration and cellular respiration rates.

表 4 微生物の酸素消費速度と1細胞当りの呼吸速度
 Table 4 Oxygen consumption rate and cellular respiration rates of deep sea bacterial populations and isolated bacteria.

水域及び測定資料	水深 (m)	酸素消費速度 (mgO ₂ ℓ ⁻¹ day ⁻¹)	1細胞当りの呼吸速度 (×10 ⁻⁸ μgO ₂ cell ⁻¹ hr ⁻¹)	文 献
<i>Vibro anguillarum</i>	室内		2.33±0.61	Christensen et al. (1980) ³¹⁾ より算出
<i>Pseudomonas perfectomarinus</i>	室内		2.13±0.26	"
油壺湾	表層水		1.2 ±0.7	Seki(1973) ³⁸⁾
西部北太平洋	表層水		0.47±0.24	"
駿河湾	1996	3.8×10 ⁻¹	13.4 ~ 20.8	本研究

深海域での微生物の増殖速度は、海洋の表層部で測定した値より小さくなるにもかかわらず、深海域での呼吸速度の推定値は、表層水中での測定値より大きくなるという結果は、深海域における微生物の代謝活性を考察する上では興味深い。このような特性が、微生物一般に認められるものか、あるいは深海域に生息する微生物特有のものであるかは、今後さらに詳細な研究を行わねば明かでない。

5 おわりに

深海底泥試料をより無菌的に採取すること、及び深海域で直接微生物の代謝活性を測定するという考え方は、深海域における微生物の動態を考察する上において重要かつ有効な手法であると考えられた。

本研究においては、微生物採取時の圧力変化や高い有機物濃度条件下での培養が、深海の微生物の代謝活性に与える影響等については考慮しなかったが、これらは今後の研究課題となろう。すなわち、深海の微生物の中には、一旦減圧すると死滅するものが存在することが想定されるため、その採取・培養・分離にあたっては、常に圧力を保持した手法を採用する必要がある。さらに、深海微生物の現場での代謝活性は著しく低いことから、放射性同位元素等を用いたより精度の高い測定手法の検討も必要となるであろう。

参考文献

- 1) Jannasch H.W. and C.O. Wirsen : 深海の微生物, サイエンス, No.8, pp.66-78, (1977)
- 2) Jannasch H.W. and C.D. Taylor : Deep-Sea Microbiology, Ann. Rev. Microbiol., Vol.38, pp.487-514, (1984)
- 3) 大和田 紘一 : 海洋微生物研究法, 学会出版センター, pp.150-156, (1985)
- 4) 加藤 憲二 : 水界生態系の中のバクテリア, —その働きと戦略—, 生物科学, Vol.55, No.4, pp.250-254, (1985)
- 5) Lenz J. : On detritus as a food source for pelagic filter-feeders, Mar. Biol., Vol.41, pp.39-48, (1977)
- 6) Azam F. and R.E. Hoodson : Size distribution and activity of marine microheterotrophs, Limnol. Oceanogr., Vol.22, pp.495-502, (1977)
- 7) Ducklow H.W. and D.L. Kirchman : Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hodoson River plume, USA, Plankton Res., Vol.5, No.3, (1983)
- 8) Ducklow H.W. and S.M. Hill : The growth of heterotrophic bacteria in the surface water of warm core rings, Limnol. Oceanogr., Vol.30, No.2, pp.239-259, (1985)
- 9) Fuhrman J.A. and F. Azam : Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. Appl. Environ. Microbiol., Vol.39, pp.1085-1095, (1980)
- 10) Porter K.G. and Y.S. Feig : The use of DAPI for indentifying and counting aquatic microflora, Limnol. Oceanogr., Vol.25, No.5, pp.943-948, (1980)
- 11) Kogure K., U. Simidu and N. Taga : Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan, Can. J. Microb., Vol.26, pp.318-323, (1980)
- 12) 林 孝市朗 : 海洋微生物研究法, 学会出版センター, pp.77, (1985)
- 13) 清水 潮 : 海洋微生物研究法, 学会出版センター, pp.223-233, (1985)
- 14) 日本気象協会 : 海洋観測指針, 気象庁編, pp.158-170, (1985)
- 15) 加藤 憲二 : 水圏生態系におけるバクテリアの新しい生態像, —現存量・増殖速度とその推定方法—, 公害, Vol.23, No.4, pp.1-9, (1986)
- 16) Taga N. : Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current, Bull. Misaki Mar. Bior. Inst. Kyoto Univ., Vol.12, pp.65-76, (1968)
- 17) Oppenheimer C.H. (ed) : Marine Biology. IV. Undissolved Problems in Marine Microbiology, New York Academy of Science, New York, pp.44-121, (1968)

- 18) 河合 章:海洋微生物研究法, 学会出版センター, pp.12-16, (1985)
- 19) Hobbie J.E., R.J. Daley and S. Jasper : Use of Nuclepor Filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, *App. Environ. Microbiol.*, Vol.33, pp.1225-1228, (1977)
- 20) Simidu U., W. Lee and K. Kogure : Comparison of different techniques for determining plate counts of marine bacteria. *日水誌*, Vol.49, pp.1199-1203, (1983)
- 21) 清水 潮 : 海洋微生物研究法, 学会出版センター, pp.33-52, (1985)
- 22) 木暮一啓 : 生態系の中の微生物, 微生物生態学Ⅱ, 共立出版株式会社, pp.12-90, (1985)
- 23) Jannasch H.W. and C.O. Wirson : Variability of pressure adaptation in deep sea bacteria, *Arch. Microbiol.*, Vol. 39, pp. 281-288, (1984)
- 24) Jannasch H.W. and C.O. Wirson : Retrieval of concentrated and under compressed microbial populations from the deep sea, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 33, pp.642-646, (1977)
- 25) ZoBell C.E. and D. Anderson : Vertical distribution of bacteria in marine sediments, *Bull. Amer. Ass. Petrol. Geologists*, Vol.20, pp.258, (1936)
- 26) 柳田 友道 : 微生物科学, 3, 形態形成, 学会出版センター, pp.105-165, (1982)
- 27) Fuhrman J.A. and F. Azam : Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results, *Mar. Biol.*, Vol.66, pp.109-120, (1982)
- 28) 田中 信彦 : 海洋微生物研究法, 学会出版センター, pp.201-209, (1985)
- 29) Seki H., J. Skelding, T.R. Parsons: Observation on the decomposition of a marine sediment, *Limnol. Oceanogr.* Vol.13, pp.440-447, (1968)
- 30) Jannasch H.W., K. Eimhjellen K., C.O. Wirsen, and A. Farmanfarmaian : Microbial degradation of organic matter in the deep sea, *Science*, Vol.171, pp.672-675 (1971)
- 31) Christensen J.P., T.G. Owens, A.H. Daval and T.T. Packard : Respiration and Physiological state in marine bacteria, *Mar. Biol.*, Vol.55, pp. 267-276, (1980)
- 32) 清水 潮 : 海洋の微生物とその研究の展望, *海洋科学*, Vol.20, No.1, pp. 4-6, (1972)
- 33) Carlucci A.F. and P.M. Williams : Simulated in situ growth rates of pelagic marine bacteria, *Naturwissenschaften*, Vol. 65, pp.641-644, (1978)
- 34) Baxter M., and J.M. Sieburth : Metabolic and ultrastructural response to glucose of two eurytrophic bacteria isolated from seawater at different enriching concentrations, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.47, pp.31-38, (1984)
- 35) Hagstrom A., J.W. Ammeraman, S. Henrichs, and F. Azam : Bacterioplankton growth in seawater: 2. Organic matter utilization during steady state growth in seawater cultures, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 18, pp. 41-48, (1984)
- 36) Newell S.Y., and R.D. Fallon : Bacterial productivity in the water column and sediments of the Georgia (USA) coastal zone: Estimates via direct counting and parallel measurement of thymidine incorporation, *Micro. Ecol.* Vol.8, pp.33-46, (1982)
- 37) Hofle M.G.: Degradation of putrescine and cadaverine in sea water cultures by marine bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.47, pp.843-849 (1984)
- 38) Kato K. : Heterotrophic activity, substrate-active bacteria and specific Vmax for DOC, *Arch. Hydrobiol. Beih.* No.19, pp.7-13 (1984)
- 39) Seki H. : Microbial respiration in marine environments during Summer, *La mer*, Vol. 11, No.3, pp.10-16 (1973)

(原稿受理 : 1989年12月5日)