

微生物実験用簡易加圧培養装置 の試作及び加圧培養試験

池本 栄子^{*1} 鋤崎 俊二^{*1} 辻 義人^{*1} 大関 和正^{*2}

深海に生息する微生物は高圧環境下で生命活動を営んでいる。従ってそれらを対象とした研究を行うにあたっては、それらが生息している現場の環境を十分に加味しなくてはならない。そこで我々は微生物実験用簡易加圧培養装置を試作することによって加圧条件下での微生物の簡便な基礎研究を可能にした。

本装置は手動水圧ポンプ・水槽・低温恒温循環機・加圧容器からなる。加圧容器の材質は高張力アルミ材で、安全・安価・低重量で簡便な装置が試作された。

作動試験を兼ねて、「しんかい2000」で採取し保存している深海微生物株について高圧培養試験を行った。400気圧下では微生物細胞の形態変化が認められた。200気圧では常圧培養時よりも値は小さいものの増殖は認められたが、400、600気圧ではほとんど増殖は認められなかった。

今後、本装置とすでに試作されている保圧型深海底微生物採集器を連結する予定である。

キーワード：深海微生物・高圧環境・微生物実験用簡易加圧培養装置・増殖

Development of Microbiological Experiments using a Simple High-Pressure Incubation Chamber

Eiko IKEMOTO^{*3}

Shunji SUKIZAKI^{*3}

Yoshito TSUJI^{*3}

Kazumasa OZEKI^{*4}

Deep sea microorganisms live in a high-pressure environment. The environment, therefore, must be fully taken into account for the study of deep sea microorganisms.

We developed a simple high-pressure incubation chamber which enabled us to perform a fundamental study of deep sea microorganisms under high-pressure. The chamber was placed in a temperature-controlled pool of water. The material used for the pressure chamber is high ten-

*1 深海研究部

*2 新日本製鐵（株）

*3 Deep Sea Research Department

*4 Nippon Steel Corp.

sion aluminum alloy, which provided a light and safe structure at moderate cost.

To test the chamber, incubation experiments under high-pressure conditions were conducted for strains of bacteria which were isolated from deep sea sediments collected by "SHINKAI 2000". Changes in the shape of the microorganisms were observed at 400 atm. Growth under 200 atm was lower than at 1 atm. Almost no growth was observed at 400 and 600 atm.

Connect the high pressure type deep sea microprobe collector to this chamber for future experiments.

Key words : Deep sea microorganisms, High-pressure environment, Simple high-pressure incubation chamber, Growth

1 はじめに

よく知られているように、海洋は地球の約70%の表面積を占めている。そして「深海」という言葉の定義をJannaschの提案している1000mより深い海域¹⁾とするならば、全海域の88%が深海であるといえる。

深海は熱水噴出孔付近の高圧高温の環境域を除けば、一般に高圧で低温、そして暗黒の環境である。近年このような環境においても微生物が生命活動を営んでいることが明らかにされてきた²⁾。

深海に生息する微生物を対象とした研究の歴史はそれほど古いものではない。19世紀後半、タバリア号とタスマリン号の探険航海において、水深5000mから採集された海水と底泥から微生物が発見されたことで深海における微生物の存在が明らかになった³⁾。その後、主にZoBellらを中心とした研究グループによって、深海から採取した微生物に関する研究が陸上で行われてきた^{3) 4) 5)}。その結果、高圧下において常圧よりも良好な増殖を示す微生物の存在の示唆や、圧力による微生物細胞の形態変化などが報告されてきた。このように深海に生息する微生物は陸上や浅海の微生物と異なった特性を持っているものも存在していると推察される。従って深海微生物の研究を行うにあたっては、それらが生息している現場の環境を十分に加味した研究が必要となる。すなわち現場で培養などを行う現場実験や、試料を現場の圧力・温度を保持して採取・保管し、陸上の高圧環境下で分離・培養等の実験を行うことが望ましい。そこで、我々

は高圧下で深海微生物に関する基礎的研究を行う為に、加圧環境で培養をする為の簡便な装置、すなわち微生物実験用簡易加圧培養装置の試作を行った。

本報告は微生物実験用簡易加圧培養装置の概要及び本装置の作動試験をかねた加圧培養試験についてのべる。

2 微生物実験用簡易加圧培養装置

2.1 装置の概要

本装置は手動水圧ポンプ・加圧容器・水槽・低温恒温循環機からなる(図1・写真1)。表1に各装置の仕様を示した。できる限り安価にする為に手動水圧ポンプ・水槽・低温恒温循環機は市販品を利用した。

加圧容器を試作するにあたってはつぎの基本条件を考慮した。すなわち第一に陸上の実験室以外船上で使用する場合も考慮して、大人2人で持ち運べる重量であること、第二に多少取扱いが不便でもできる限り安価であること、第三に試料の大量処理を考慮して内容量ができるだけ大きいことである。

当センターには各種深海用機器などの耐圧、疲労および作動試験等を実施できる小型高圧実験水槽装置がある。これは本装置と同様700気圧まで加圧でき、また容量約100ℓと大きいがクロムモリブテン鋼(SCN440)製で重量は約2tもある。本装置の場合クロムモリブテン鋼製だと重くなり基本条件には合わないの、比較的軽いアルミ合

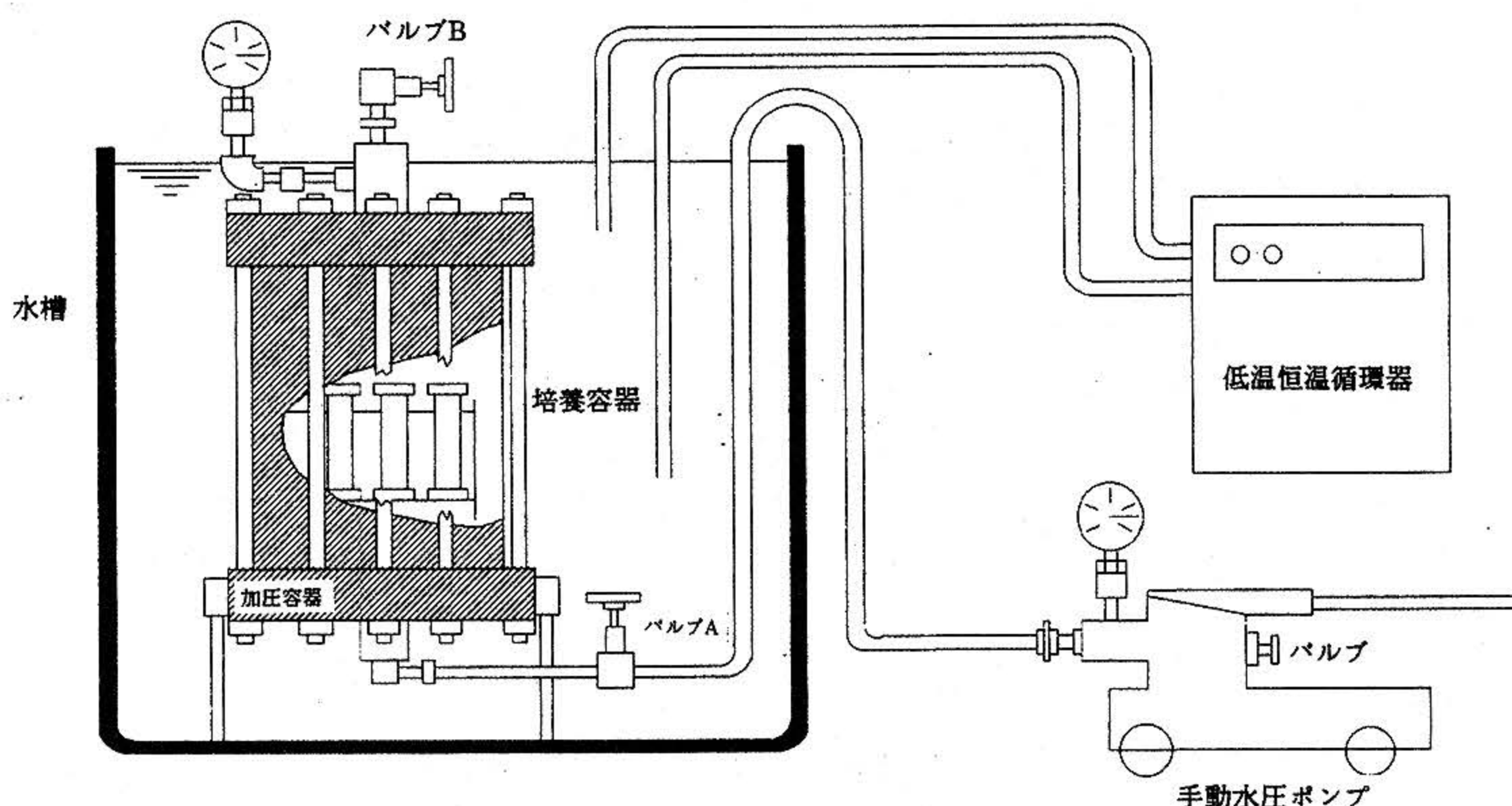


図 1 微生物実験用簡易加圧培養装置の構成図

Fig. 1 Schematic view of high-pressure chamber

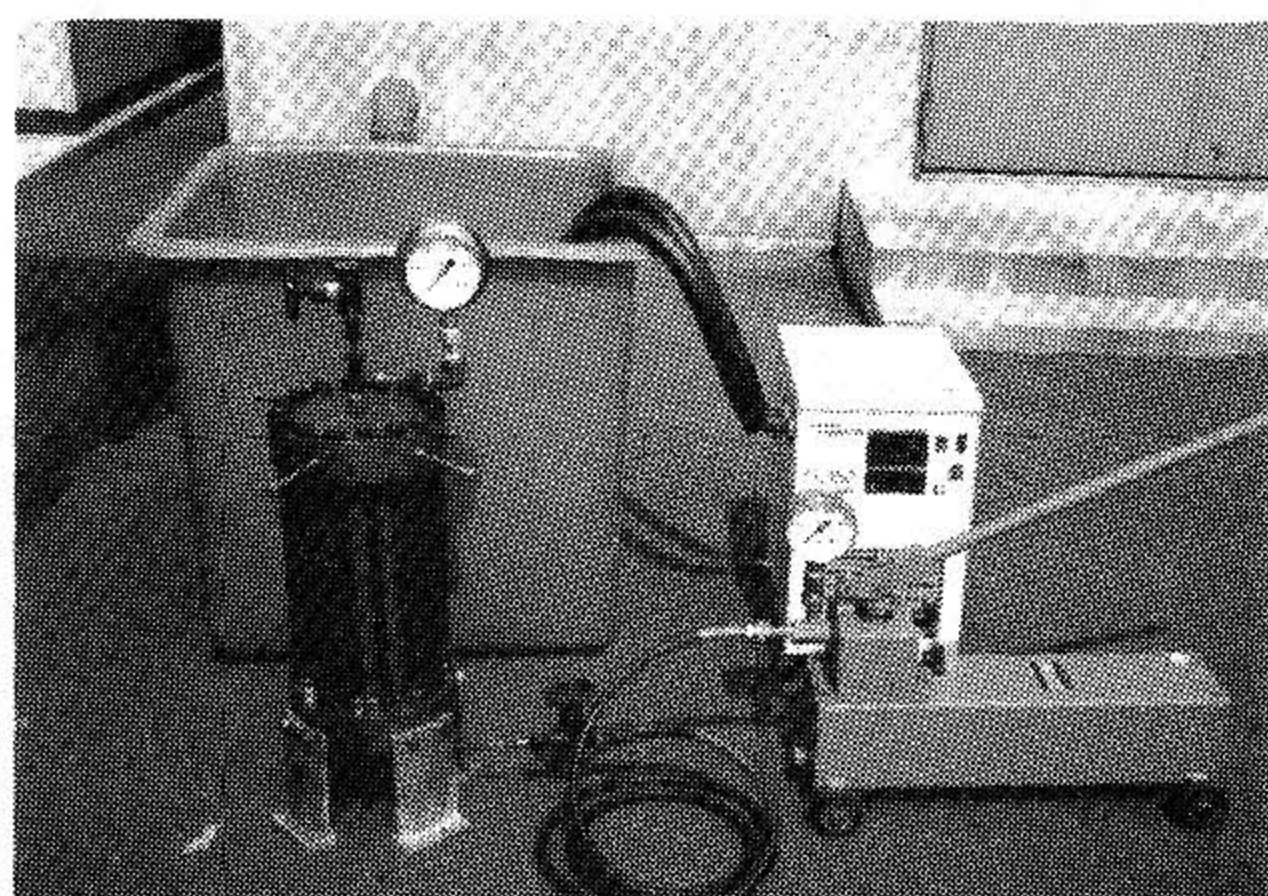


写真 1 微生物実験用簡易加圧培養装置

Photo 1 A simple high-pressure incubation chamber

金を材質に選んだ。また蓋をボルトで抑えるという簡単な構造にすることによって、多少取扱いが不便ではあるが、700気圧までの圧力に充分耐えるだけの装置が試作された。

2.2 操作方法

(1) 加圧時

- ① 試料を入れた容器を加圧容器内にいれた後、加圧容器に水道水を満たす。
- ② 容器の蓋をしめ、16組のボルト及びナットを順次固くしめつける。
- ③ 加圧容器のバルブAと手動水圧ポンプのホースをつなぐ。
- ④ 加圧容器を水槽に入れ、加圧容器の蓋の所

が没するまで水道水を注入する。

- ⑤ 加圧容器のバルブBを開けたまま数回手動水圧ポンプをおして容器内筒内の空気を抜く。
- ⑥ 加圧容器のバルブBをしめた後、手動水圧ポンプで加圧する。
- ⑦ 適当な圧力まで加圧したら加圧容器のバルブAをしめ、手動水圧ポンプのバルブもしめる。
- ⑧ 水槽の水温を一定に保つために低温恒温循環機を常時運転する。

(2) 減圧時

- ① 加圧容器のバルブAを開ける。
- ② 手動水圧ポンプのバルブを開ける。
- ③ 圧力が完全に下がったら加圧容器のバルブBを開ける。
- ④ 16組のボルト及びナットを順次ゆるめる。
- ⑤ 容器の蓋をはずし、加圧容器より試料の入った容器をとりだす。

2.3 考察

これまで深海微生物等を対象として、いくつか高圧条件下で単離や培養を行える装置の開発がなされている(表2)。微生物の単離を目的とした装置は主にガス加圧が主体であり、加圧培養を目的とした場合は液中での加圧が主体である。これらの装置の多くは取扱いが煩雑であり、高圧ガスを使用するものについては危険性、および微生物へ

表 1 各装置の仕様
Table 1 Equipment specifications

手動水圧ポンプ	山本水圧工業所製	PH-60
低温恒温循環機	大洋科学工業製	COOLNIT-CL150
水 槽	井内盛栄堂製	K-420 (390 l)
加 圧 容 器	材質	高張力アルミ材 (A707T6)
	加圧範囲	0~700 kg/cm ²
	内径	120 mm
	内部高さ	300 mm
	内容量	3、4 l
	重量	約50 kg
	防蝕処理	タフラム処理

表 2 高圧条件下での単離や培養を行える装置の例
Table 2 Other studies using isolation and cultivation in high-pressure conditions

装置名	最大使用圧力 (kgf/cm ² G)	加圧媒体	特 徴	文 献
高圧単離装置	1000	O ₂ -Heガス	サンプリングから培養まで 減圧することなく実験できる	Jannasch et al. 1982 ⁶⁾
微生物単離装置	600	Heガス	温度範囲 4-40℃ 内視鏡により観察、 容量 4.7 l	上村ら、1988 ⁷⁾
高温高圧培養装置	346	CO ₂ -He-H ₂ ガス	温度範囲 260℃まで、 試料容器は透明の合成サファ ィアで反応を観察できる	Miller, J.F. et al. 1988 ⁸⁾
高圧培養装置	600	海 水	温度範囲 5-35℃、 容量 0.53 l、ステンレス製	岡見ら、1987 ⁹⁾
高圧培養装置	3000	グリセロールと 水の等量混合液	圧力容器内に10×50mmの培 養管を20~24本収容して加 圧して加圧培養することが できる	ZoBell and Oppenheimer 1950 ¹⁰⁾

のガスの影響の恐れもある。一方、本装置は16組のボルト及びナットをしめつけるという不便さはあるものの安全で簡便である。また、内容量が3.4ℓと大きく、多くの試料を同時に処理することができる。内径も大きいので単離のためにかかせない手法であるコロニー形成には、市販のシャーレやパウチ（酒井医科器械舗）等を使用することも可能である。

今後の改良点としてつぎのことがあげられる。培養期間中、温度を一定に保つ為に加圧容器を水に浸しているの、加圧容器につながるパイプ類の接続部分等が電蝕をおこす。その防止の為に一部材質の改良が必要である。

また、すでに当センターで試作されている保圧

型深海底微生物採集器¹⁰⁾と本装置を連結することによって、現場圧力を保持したまま採取した試料を減圧することなく加圧培養することが可能となる。現在その準備を進めている。

3 加圧培養試験

3.1 目的

本装置の作動試験をかねて、加圧条件下による微生物の増殖や細胞形態の変化を検討するために加圧培養試験を行い、また同時に常圧培養試験も行い比較対照とした。

3.2 試験方法

表3に示すように、「しんかい2000」DIVE335, 336, 364, 395, 436において採取した深海底泥よ

表 3 加圧培養試験に用いた微生物株
Table 3 Strains of bacteria used in experiments

微生物グループ	保存菌株NO.	採取DIVE	採取海域	採取水深 (m)
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	陸上	—
<i>Alcaligenens</i>	166	335	駿河湾	1855
	777	335	駿河湾	1855
<i>Bacillus</i>	30	335	駿河湾	1855
	1321	395	駿河湾	1060
	1558	436	富山湾	1121
<i>Flavobacterium</i>	17	335	駿河湾	1855
	93	335	駿河湾	1855
	772	335	駿河湾	1855
<i>Lactobacillus</i>	53	335	駿河湾	1855
	56	335	駿河湾	1855
<i>Pseudomonas-Alteromonas</i>	26	335	駿河湾	1855
	86	335	駿河湾	1855
	776	335	駿河湾	1855
<i>Vibrio</i>	1	336	駿河湾	1972
	697	364	南西海域	1340

り分離・保管している各種微生物株15株 (*Vibrio*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas-Alteromonas*, *Lactobacillus*, *Alcaligenes*), 及び陸上細菌の一つである *Staphylococcus aureus* の計16株について試験を行った。これらの微生物株はいずれも圧力・温度を保持することなく採取され、常圧下で分離・培養・保管されているものである。今回試験に用いた培養容器は内径12mm, 長さ70mmのガラス管の両端にシリコン製のダブルキャップをはめたものである。

それぞれの微生物株を事前に Anderson 培地 (表4) を1/10に希釈した培地で振とう培養を行った。この培養液をあらかじめ滅菌しておいた培養容器に滅菌済みの注射器を用いて無菌的に注入した。これを加圧培養装置の操作方法 (2.2) に従い加圧培養を行った。なお、加圧培養時の条件は200, 400, 600気圧の各圧力条件下にて25°C, 7日間培養である。また、比較対照の常圧培養試験は圧力以外は同条件で培養を行った。

表4 Anderson培地の組成
Table 4 Medium of Anderson agar

ペプトン	2.5 g
酵母エキス	2.5 g
FePO ₄	0.1 g
濾過海水	900ml
蒸溜水	100ml

培養終了後直ちに減圧し、培養容器内の試料を最終濃度が2%になるように中性ホルマリンで固定した。常圧培養試験の試料及び培養開始前の試料も同様にホルマリン固定した。

固定後すみやかに試料の一定量をアクリジンオレンジ (東京化成) で蛍光染色し、ズーダンブラックB (東京化成) で染めた孔径0.2 μ mヌクレポアフィルターで濾過後、落射蛍光顕微鏡 (NIKON OPTIPHOT X) 下で微生物の計数及び観察を行った。また、一部の細胞については走査型電子顕微鏡 (日立 S-415) での形態観察を行った。

微生物の計数結果より、次式¹²⁾によって増殖速

度 (μ , Growth rate constant : hr⁻¹) を算出した。

$$\mu = \frac{\log_{10}N_t - \log_{10}N_0}{t} \times 2.303$$

μ ; 増殖速度 (hr⁻¹)

N_t ; 培養終了時の細胞数

N₀ ; 培養開始時の細胞数

t ; 培養時間

3.3 試験結果

各加圧培養条件下で得られた増殖速度の値を表5に示した。

200気圧においては細胞数の増加が認められたが、1気圧に比べて増殖速度はいずれも小さい値であった。また、特に著しい細胞の形態変化は認められなかった。

400気圧においては、著しい形態変化 (写真2, 3) のため計数不能の微生物株がほとんどであったが、*Pseudomonas-Alteromonas*グループは明らかな形態変化は認められず、また細胞数の増加は認められなかった。形態変化が認められた細胞を走査型電子顕微鏡で観察したところ、細胞が連鎖していたり、細胞がくびれている様な現象は認められなかった (写真4)。

600気圧においては、各グループ1株ずつの培養試験であったが、いずれも増殖速度は小さく細胞数の増加はほとんど認められなかった。

一方陸上細菌の一つである *Staphylococcus*

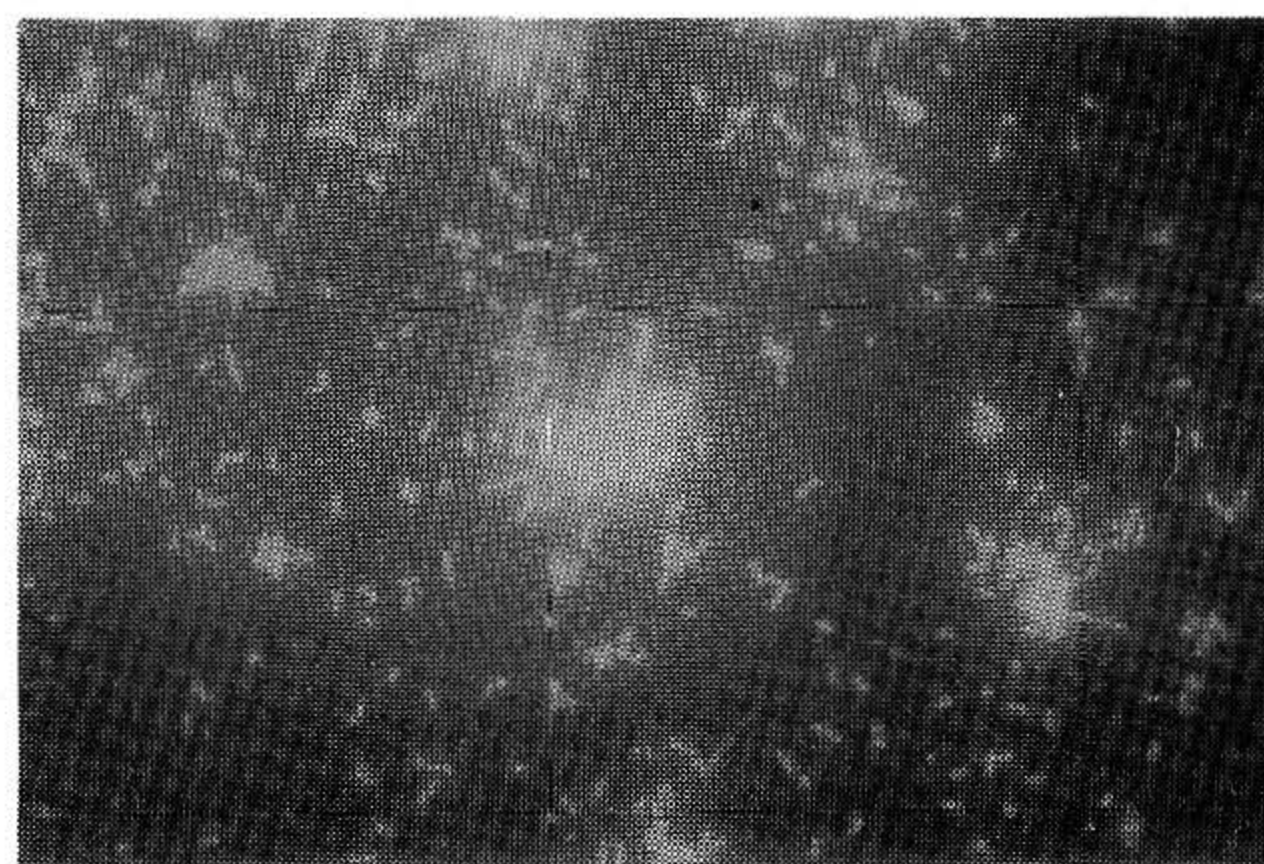


写真2 加圧開始前の微生物の顕微鏡写真
(No. 17, *Flavobacterium*)

Photo 2 *Flavobacterium* cells under 1 atm condition ($\times 1000$)

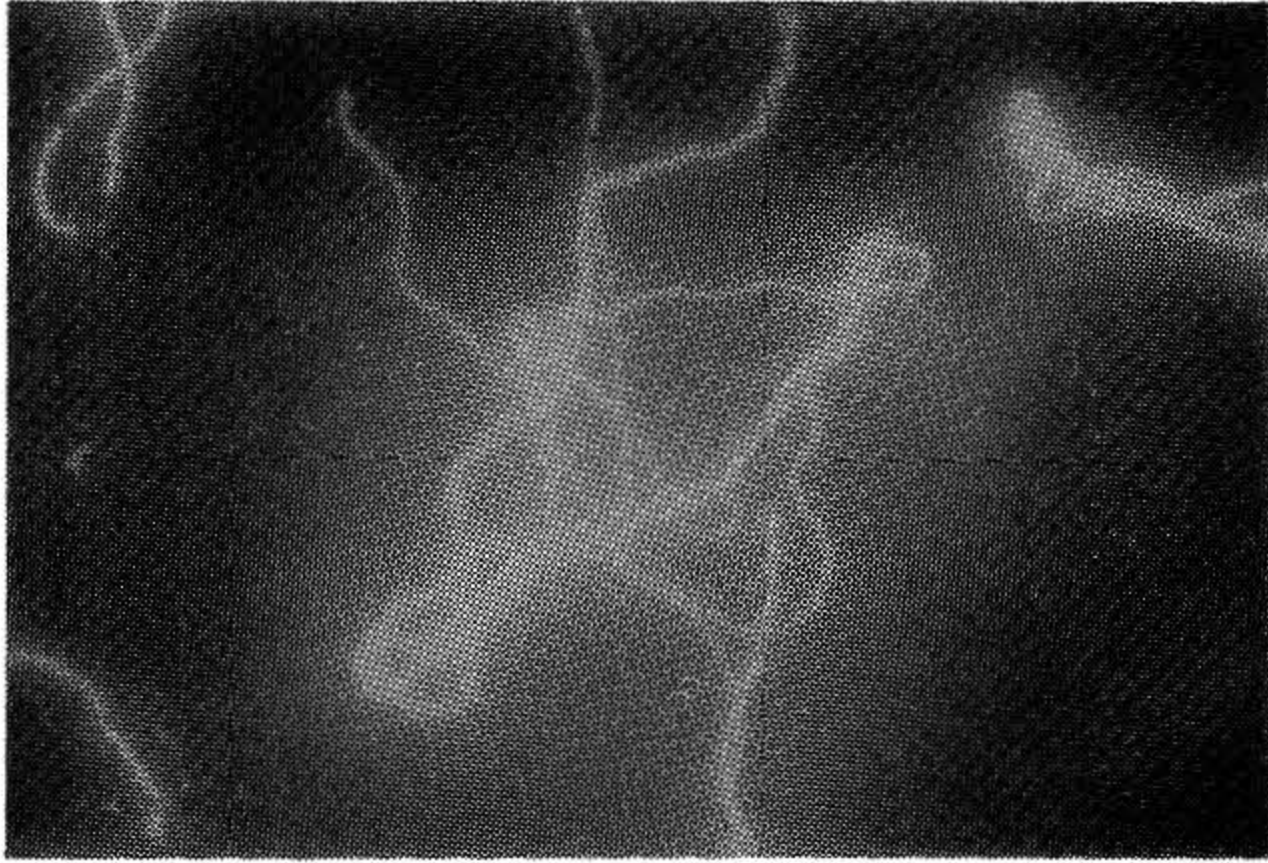


写真 3 加圧終了時の微生物の顕微鏡写真
(No. 17, *Flavobacterium*)

Photo 3 *Flavobacterium* cells under 400 atm condition ($\times 1000$)

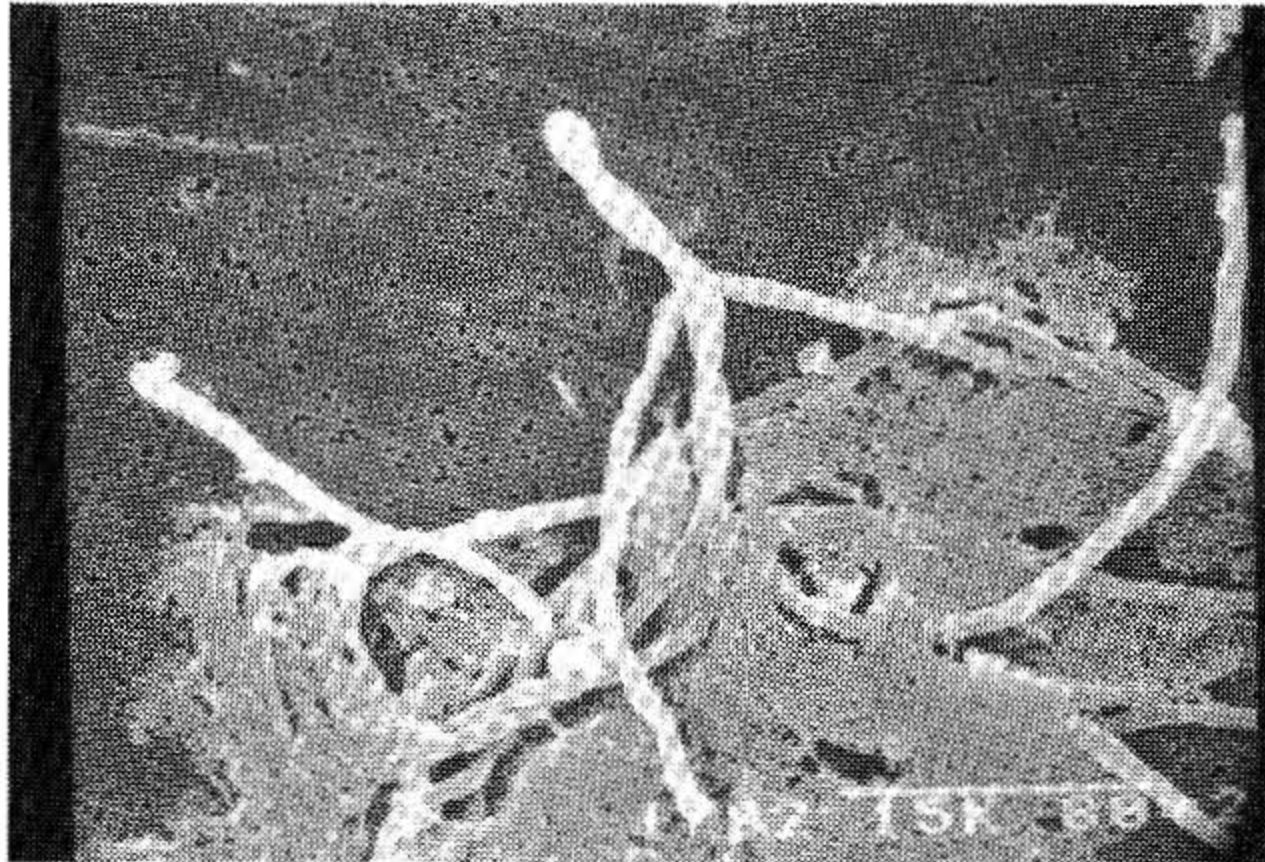


写真 4 加圧終了時の微生物の走査型電子顕微鏡写真 (No. 17, *Flavobacterium*)

Photo 4 Scanning electron microscope of abnormal *Flavobacterium* cells shown in photo4.

*aureus*は常圧下では増殖速度は0.040と大きい値を示したが、試験を行った400気圧では0.006と小さい値であった。

3.4 考 察

微生物細胞の形態変化は本試験においては400気圧においてのみ認められた現象である。走査型電子顕微鏡の観察結果も合わせて、おそらく一細胞が伸長したものではないかと推察された。この伸びた細胞を再び1気圧、25℃、3日間、Anderson培地で培養すると、正常な細胞形態に復帰する現象が認められた。本試験結果と同様の現象について、ZoBell¹⁴⁾及びZoBell and Cobet¹⁵⁾は海洋細菌

や大腸菌を用いた加圧試験で、400気圧前後の圧力で微生物細胞が糸状に伸長することを報告している。また、このような微生物細胞は、圧力が取り除かれると再び正常な細胞に復帰することも観察している¹⁰⁾。

ZoBell and Cobet¹⁵⁾は、加圧下の微生物細胞内のDNA合成能は、圧力の増加とともに減少するが、タンパク合成及びRNA合成は比較的高い圧力条件下でもある程度行われることを報告している。すなわち、高圧下においては微生物のDNA複製が行われにくくなり、細胞分裂の抑制が引き起こされる。これによって、微生物細胞は分裂することなく増殖方向に進み、最終的には細胞が伸長すると考察している。

このように圧力環境は微生物の形態変化におよぼす重要な要因の一つであると言えよう。従って、今後は圧力条件を細かく設定し、圧力条件と細胞の形態変化の程度、形態変化を遺伝子レベルで解析する、また正常細胞に復帰するのに要する時間などより詳細な検討が必要である。

一方、細胞数の増加については、常圧下の増殖速度の値より小さいものの200気圧ではある程度細胞数の増加が認められた。しかし400気圧や600気圧ではほとんど細胞数の増加は認められなかった。本試験の結果からこれらの微生物株は好圧菌とはいえないが、少なくとも200気圧までの耐圧菌であるといえよう。本試験では圧力は3条件、温度は25℃の1条件、培養期間も7日間のみであったが、さらにより細かい圧力条件、温度も採取時の温度に近い温度から本試験より高い温度までの広範囲の条件、培養期間もさまざまな設定条件にする等、圧力ばかりでなく温度や培養期間との関係も検討していく必要があると思われる。

また、1気圧及び200気圧での各微生物株の増殖速度とその微生物が採取された水深の関係を図2に示した。深い水深から採取された微生物ほど1気圧、200気圧で共に、増殖速度は小さくなる傾向が認められた。今後更に深い水深から採取された微生物について同様の試験を行い同じ様な傾向が認められるか、または1気圧より高圧下でより増殖速度が大きくなるような傾向が認められるかについても検討を行いたい。

表 5 各加圧培養条件下における増殖速度 (μ ; hr^{-1})

Table 5 Growth rate of microorganisms under high-pressure conditions

微生物グループ	株No.	1 気圧	200気圧	400気圧	600気圧
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	0.040	—	0.006	—
<i>Alcaligenens</i>	166	0.017	0.009	*	0.001
	777	0.012	0.011	*	—
<i>Bacillus</i>	30	0.018	0.012	0	0
	1321	0.038	0.034	*	—
	1558	0.025	0.021	*	0
<i>Flavobacterium</i>	17	0.014	0.009	*	0.002
	93	0.014	0.009	*	—
	772	0.014	0.007	*	—
<i>Lactobacillus</i>	53	0.009	0.008	0.008	0
	56	0.016	0.012	*	—
<i>Pseudomonas-Alteromonas</i>	26	0.019	0.012	0	0
	86	0.018	0.009	0	—
	776	0.008	0.005	0	—
<i>Vibrio</i>	1	0.015	0.011	*	0
	697	0.030	0.015	*	—

(— : 欠測、* : 細胞形態変化の為、計測不能)

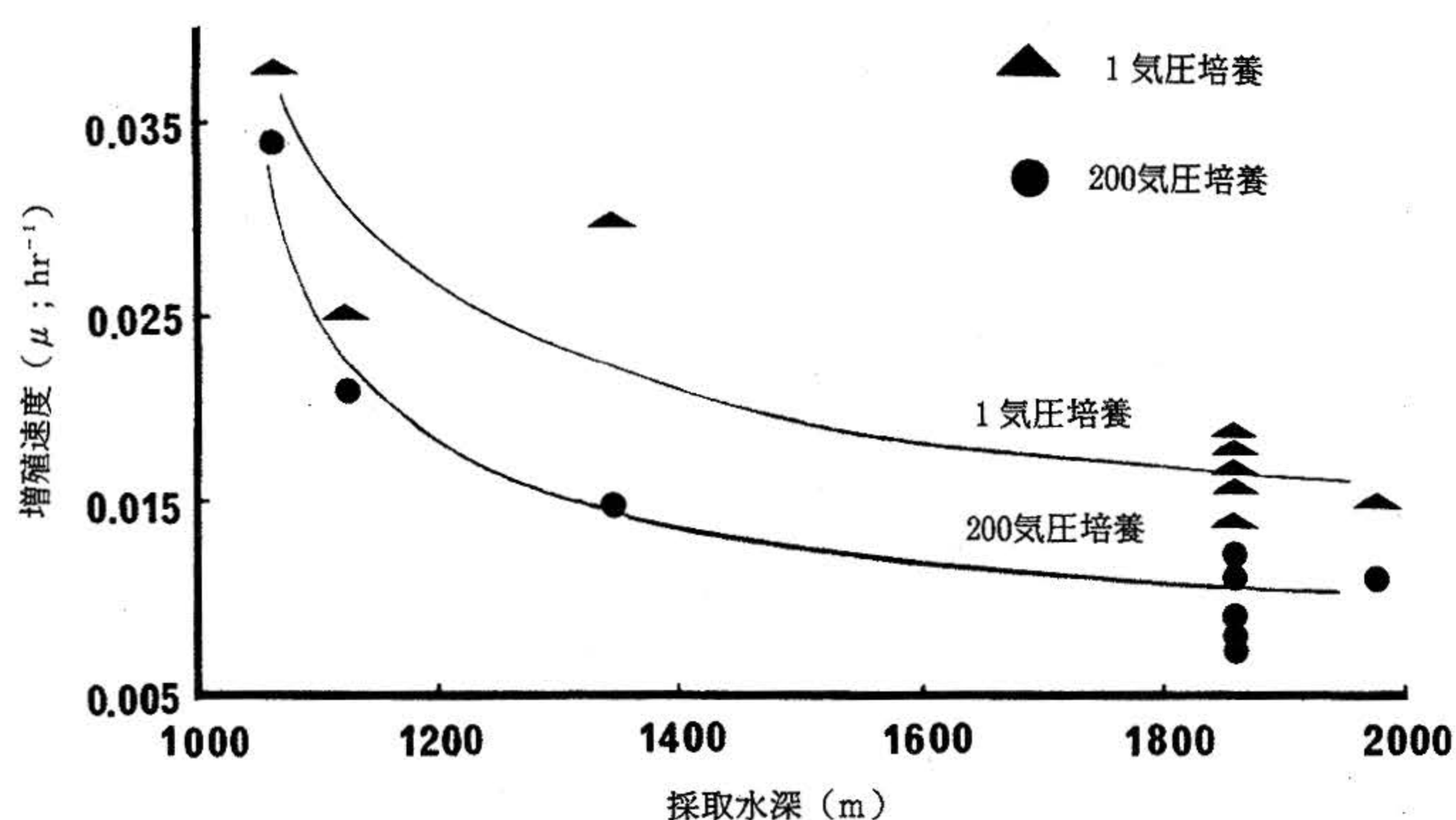


図 2 1 気圧及び200気圧での各微生物株の増殖速度とその微生物が採取された水深の関係
Fig. 2 Relationship between growth rate of microorganisms under high-pressure and the depth in the ocean at which they were originally collected.

4 おわりに

若干の改良を必要とするものの、本装置の試作によって加圧条件下での微生物の簡便な基礎研究が可能になった。

しかしながら、深海にはより高圧下で高い増殖が認められる微生物や¹⁶⁾、常圧下では増殖せず、ある一定の圧力以上のみで増殖の認められる微生物¹⁷⁾が存在していることが明らかにされている。したがって、深海微生物の研究をするにあたって最も望ましいのは、試料の採取から分離、培養その他の研究を保温・保圧させたままの状態で行うことである。今後、本装置と保圧型深海底微生物採集器を連結することによって、少なくとも現場圧力や温度を保持して採取・培養ができ、減圧に伴う影響を考慮することなく、より正確に現場の微生物の細胞数、生細胞数、また現場での細胞形態を検討することができるようになるだろう。

今後このような微生物を対象とした加圧培養試験を進めてゆけば、深海での微生物の生態をかいまみることができるようになるかもしれない。

参考文献

- 1) Jannasch H. W. and C. D. Taylor : Deep-Sea Microbiology, Ann. Rev. Microbiol., Vol. 38, pp. 487-514, (1984)
- 2) Cetre A. : Sur la culture, a l'abri des germes atmospheriques, des sediments rapportes par les expeditions du Travailleur et du Talisman, Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), pp. 690-693, (1884)
- 3) ZoBell C. E. and F. H. Johnson : The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria, J. Bacteriol., 57, pp. 179-189, (1949)
- 4) ZoBell C. E. and R. Y. Morita, Barophilic bacteria in some deep sea sediments, J. Bacteriol., 73, pp. 563-568, (1957)
- 5) Morita R. Y. and C. E. ZoBell : Occurrence of bacteria in pelagic sediments collected during the Mid-Pacific Expedition, Deep Sea Res., 3, pp. 66-73, (1955)
- 6) Jannasch H. W., Wirsen C. O. and C. D. Taylor : Deep-Sea bacteria isolation in the absence of decompression, SCIENCE, Vol. 216, pp. 1315-1317, (1982)
- 7) 上村一雄, 布施博之, 山岡到保 : 高圧下における微生物単離装置の試作, 中国工業技術試験所報告, No. 31, pp. 73-80, (1988)
- 8) Miller J. F., E. L. Almond, N. N. Shah, J. M. Ludlow, J. A. Zollweg, W. B. Streett, S. H. Zinder and D. S. Clark : High-pressure-temperature bioreactor for studying pressure-temperature relationships in bacterial growth and productivity, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 31, pp. 407-413, (1988)
- 9) 岡見芳郎, 倉沢璋悟 : 海洋深層資源の有効利用技術の開発に関する研究 (深海微生物), 科学技術庁研究開発局海洋開発課 昭和61年度研究成果, pp. 174-179, (1987)
- 10) ZoBell C. E. and C. H. Oppenheimer : Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria, Journal of Bacteriology, Vol. 60, pp. 771-781, (1950)
- 11) 許正憲, 高川真一, 橋本惇, 松沢誠二 : 保圧型深海底微生物採集器の開発, 海洋科学技術センター試験研究報告, 20, pp. 19-30, (1988)
- 12) 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・増殖とその推定方法-, 公害, Vol. 23, 4, pp. 1-9, (1986)
- 13) Oppenheimer C. H. and C. E. ZoBell : The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure, J. mar. Res., 11, pp. 10-18, (1952)
- 14) ZoBell C. E. Hydrostatic pressure as a factor affecting the activities of marine microbes. In editorial Comm. Sugawara Festival Vol. Recent researches in the field of hydrosphere, Maruzen Co., Ltd., pp. 83-116, (1964)
- 15) ZoBell C. E. and A. B. Cobet : Filament formation by *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressure, J. Bact., Vol. 87, pp. 710-719, (1964)
- 16) Yayanos A. A., A. S. Dietz and R. Van Boxtel, Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics,

Science, 205, pp. 808–810, (1979)

17) Yayanos A. A., A. S. Dietz and R. Van
Boxtel, Obligately barophilic bacterium from
the Mariana Trench., Proc. Natl. Acad. Sci.
(USA), 78, pp. 5212–5215, (1981)

(原稿受理：1990年11月2日)