

保圧型微生物採取・培養装置を用いた 深海微生物の培養

鋤崎俊二^{*1*2} 辻 義人^{*1}

深海域において、高圧条件は最も重要な環境要因の一つである。したがって、深海に生息する微生物の研究を行うには、高圧条件を充分考慮したもで行う必要がある。そこで「しんかい2000」に搭載することのできる、保圧型微生物採取・培養装置を試作し、その作動試験を実施した。

1991年9月に行われた海域試験で、深海微生物を含む底泥懸濁海水を保圧したまま採取することに成功した。

本装置を用いて推定された、深海微生物の増殖速度は $0.0025 \sim 0.0045 \text{ hr}^{-1}$ の範囲にあった。この値はこれまで *in situ* で測定された値に近似することから、今後は本装置を使用することにより、陸上で深海微生物の増殖速度を推定することが可能になると考えられた。

Incubation of deep sea bacteria at pressure-retaining sampling and incubating system.

Shunji SUKIZAKI^{*3*4} Yoshito TSUJI^{*3}

Hydrostatic pressure is one of the most important environmental factors in the deep sea. Therefore, the study of deep sea microorganisms must be taken into account at high-pressure conditions. We have developed a sampling and incubating system which can also retain pressure. During the experiment performed in September, 1991, we have succeeded in obtaining sediment-suspended sea water containing deep sea microorganisms while the pressure was being retained at the same time.

Using the pressure-retaining sampling and incubation system, the growth rate of the deep sea microorganisms ranged between $0.0025 \sim 0.0045 \text{ hr}^{-1}$. Since these values obtained *in situ* in the past experiments, we thought that we can measure the growth rate of the deep sea microorganisms when brought on board.

*1 海洋科学技術センター 深海研究部

*2 財団法人海洋生物研究所 研究調査部

*3 Japan Marine Science and Technology Center, Deep Sea Research Dept.

*4 Marine Biological Research Institute of Japan Co., LTD.

1. はじめに

微生物は水圏における有機物の分解者 (Decomposer) であり、かつ処理屋 (Scavenger) としても重要な役割を果たすと考えられる。深海域においても同様に、そこに生息する微生物は低次生産生態系内部の物質輸送に重要な役割を持つと想定されるため、種々の深海域で微生物による各種物質の分解 (取り込み) 速度や増殖速度等の代謝活性に関する測定が試みられてきた (Seki *et al.*, 1974; Alongi, 1990; 鋤崎ら, 1990)。

ただし、深海域に生息する微生物を対象とした場合には、温度や圧力といった条件を常に考えねばならないことから、代謝活性測定に当たっては特別な手法が必要となる。従来から用いられてきた深海微生物の代謝活性測定方法は、主に2つに区分することができる。

1つは、現場海域で直接 (*in situ*) 微生物の代謝活性を測定する手法である。*in situ*で測定する場合には、圧力や水温環境を人為的にコントロールする必要はなく、現場環境下での値をより正確に推定することができる。通常は、切り出し装置を付けたフリーホール型の培養装置を、船上から投入して測定する (Seki *et al.*, 1974) か、潜水調査船で装置の設置・回収を行う (鋤崎ら, 1990) 手法が採用される。しかし、深海底で一定の培養期間が必要なため、装置の設置・回収時に調査船や潜水船を頻繁に使用するのはいわゆる難しい。

いま1つは、各種採水器あるいは採泥器によって採取された水や泥試料を用いて、*in vitro*で代謝活性を測定する方法がある (Alongi, 1990)。この場合には温度や圧力条件を任意に設定することが可能なため、特に圧力変化が深海微生物にどのように影響するかを追跡するには有効な手法となる。ただし、深海に生息する微生物群は常に高圧状況下におかれているため、試料採取時から測定に至る一連の操作段階において圧力条件等を加味しなければ、現場での状況を充分考察することはできない (鋤崎ら, 1991a)。このため、採取から測定に至る一連の操作すべてを減圧することなく実施することのできる装置の開発がなされてきた (例えば Taylor and Jannasch, 1974; Tabor *et al.*, 1981; 許ら, 1988など)。これらの装置の特徴は、海水中に生息する深海微生物を現場圧を確

実に保持したまま採取・培養することが出来る。一方で、これらの装置の多くは、微生物採取部あるいは培養部が1台のみによって構成されている。したがって、これらの装置を用いて、種々の条件下で深海微生物を培養する場合には、微生物採取器等から、一旦保圧状況のまま別の加圧培養器に分取する等の操作が必要であった。

深海微生物を対象として現場での代謝活性速度を推定する場合には、試料採取から速やかに測定操作を開始することが必要である。そこで、保圧状況下のまま深海微生物群を採取し、8種の異なる培養条件下でそのまま加圧培養することのできる装置を試作し、「しんかい2000」を用いた実海域での作動試験を実施した。

なお、本研究を実施するにあたり、「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頂きました。また、Masayuki Matukawa (Briar Cliff College) には、本報告書を作製するにあたり、ディスカッション等で貴重な時間を割いて頂きました。紙上をお借りしてこれらの皆様に厚くお礼申し上げます。

2. 材料と方法

2. 1 保圧型深海微生物採取・培養装置の概要

2. 1. 1 装置の概要

本装置は、容量100mlの保圧培養容器8台と各容器に試料を注入する分配部 (写真1)、試料を採取する油漬け水中ポンプ、試料採取口及び装置の両端に取り付けたボールバルブによって構成されており (写真2)、各部はステンレス製パイプによって連結されている (図1)。保圧培養容器及び分配部は超硬力アルミ合金を用い、テフロンコーティングを施してある。また、各保圧容器内にはテフロン製のフリーピストンが装着されており (図2)、添加した培養部と均圧用に充填した蒸留水充填部とを隔離する構造になっている。なお、本装置の使用可能圧力は装置両端に取り付けたボールバルブの保圧性能によって決定され、最大500気圧 (常用450気圧) まで保圧できる構造になっている。

本装置の特徴は最大8種類の培養条件を同時に設定することができ、採取器と培養器が一体化し

ているため深海微生物採取後直ちに培養を開始することができる点にある。また、*in situ* 測定では、end-point でしか微生物の数を測定できないが、本装置の場合には適当な分取器（許ら，1988）と組み合わせることによって、時系列的に微生物の変化が追跡可能となる。

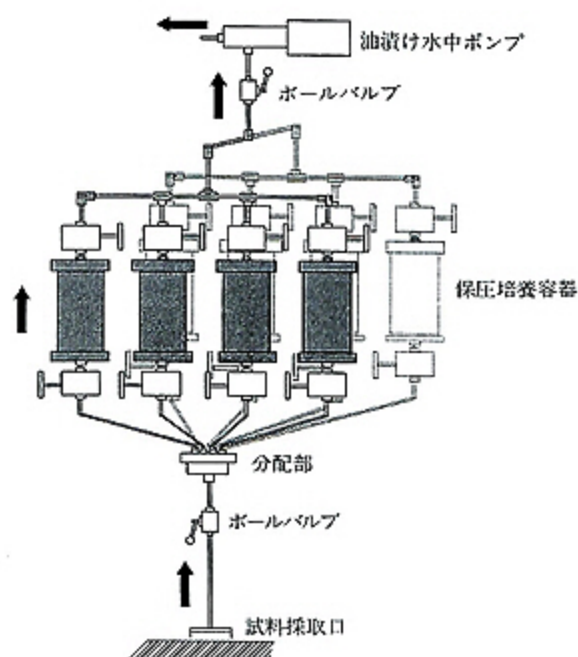


図1 保圧型微生物採取・培養装置の構造
(矢印は試料の流入出方向を示す)

Fig. 1 Schematic view of pressure-retaining sampling and incubating system. (Arrow indicates inlet and outlet directions)

2. 1. 2 操作方法

各耐圧培養容器内の培養部に、事前に各種培地 5 ml を注入する。さらに、フリーピストンを介した蒸留水充填部に蒸留水を満たした後、両端のバルブを閉鎖し（図2）、培養容器毎オートクレープ滅菌する。各培養容器の接続等は、グローブボックス内で行うことにより、無菌性を確保できる。

装置は潜水船のサンプルバスケット内に搭載して（写真3）深海域に持ち込み、深海底泥付近で採水口をマニピュレータを用いて底泥上に設置する。その後、マニピュレータで底泥表層部を攪乱し、海水中に底泥を懸濁させる。採取口及び排出口に取り付けたボールバルブをマニピュレータを用いて開放し、直ちに水中ポンプを作動させる。装置内への試水（底泥懸濁水）注入に伴い、耐圧容器内の培養部に試水が流入し培地と混合する。一方、均圧用に充填してある蒸留水はスリーピストンの動きに伴って装置外に排出される。油漬けポンプは1回のピストン作動で約130mlの試水を採取することができるため、ポンプ作動を約7回行い、培養部に試水が満水になるよう充填する。

試水採取作業終了後、採取及び排出口に取り付けたボールバルブを閉鎖し船上に回収する。回収した装置から各培養器をとりはずし、任意の培養温度条件に設定したインキュベータ内に放置し（写真4）、培養を開始する。

なお、現在までのところ本装置は保温材（シンクチックホーム等；許ら，1988）内に収容して

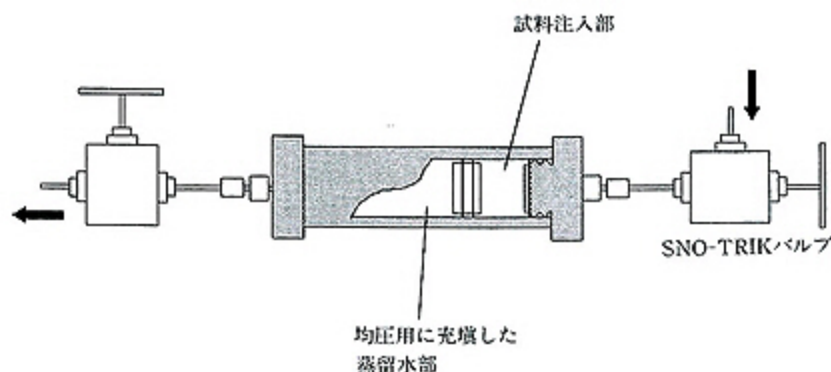


図2 保圧容器の構成図
(矢印は試料の流入出方向を示す)

Fig. 2 Schematic view of pressure-retaining chamber. (Arrow indicates inlet and outlet directions)

いないため、潜水船浮上途中における試料温度の上昇を防ぐことはできない。ただし、保圧容器はアルミ合金性であるため、さほど大きな温度上昇は起こらないと考えられる。

2. 2 深海域での作動試験

1991年9月の後志海山の北斜面（水深約1800m；DIVE, 568）の「しんかい2000」による潜航調査時（図3）に装置を搭載し、その作動状況を確認した。

各保圧培養器内に充填した培地材料は、グルコース及び後志海山頂上付近（水深約137m）に生息する、腕足類（Brachiopoda）（藤倉ら，1991）である。Brachiopodaは肉質部のみをブレンダーで破碎し、孔径0.2 μ mのヌクレポアフィルターで濾過した。濾液をガラスアンプルに封入しオートクレーブ滅菌後、凍結保存したものを培地材料とした。

保圧培養器8台のうち、4台には試料注入後の

濃度がそれぞれ1, 5, 10, 50mgC/lとなるようグルコースを添加した。残る4台にはBrachiopodaからの抽出物を同様の炭素含有濃度になるよう添加したものを作製した。

現場海域で底泥懸濁海水を採取した保圧容器は、船上に回収後直ちに2 $^{\circ}$ Cに設定した保冷库に収容し、40日間静置培養した後、圧力を開放した。試料は最終濃度が1%となるよう中性フォルマリンで固定後、DAPI染色（Porter and Feig, 1980）による微生物総数の計数及び細胞形態の観察を行った。

3. 結果と考察

3. 1 装置の作動状況

水中モーターの作動不良のため、目的の約1/3量（約30~40ml）の試水採取となった。その原因は明らかでないが、油漬け水中ポンプのパワー不足あるいはパイプ内での目詰り等いくつかの原因が考えられる。したがって添加した有機物の最終濃度は、初期目的濃度の3倍近い値となった。一方、保圧性能は、船上での圧力ゲージ測定でいずれの保圧容器共に、170~180気圧の現場圧を保持しており、正常な保圧性が確認された。

3. 2 増殖速度の推定

表1に培養開始時及び培養終了時の微生物細胞総数から算出される、増殖速度（ μ :hr $^{-1}$ ）及び細胞倍加時間を示した。Brachiopodaからの抽出物を培地材料に用いた場合の増殖速度は0.0029~0.0040hr $^{-1}$ の範囲にあり、細胞倍加時間は約175~237時間であった。一方、グルコースを培地材料とした場合には、増殖速度値で0.0025~0.0045hr $^{-1}$ 、細胞倍加時間は153~273時間程度であると推定された。表2には、数々の海域においてこれまで測定された微生物の増殖速度値と細胞倍加時間（鋤崎，1992）を示した。浅海域の測定値では細胞の倍加時間はほぼ数時間~数十時間程度である。一方、深海微生物を対象として *in situ* 下で測定した値では、200時間を越えている。本海域での測定値は200時間前後であり、これまで測定された深海域での微生物群集の増殖速度値に近似している。深海域に生息する微生物群がこのような遅い増殖速度しか示さない原因について

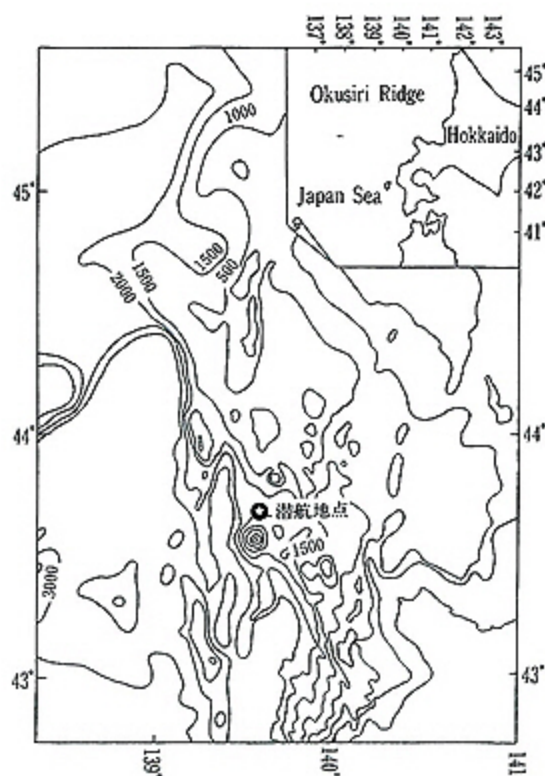


図3 深海微生物採取地点

Fig. 3 Sampling location of bacteria population in sediment suspension at the bottom of the deep-sea.

表1 深海微生物の増殖速度と細胞倍加時間

Table 1 Growth rate and generation time of deep sea bacteria population.

有機物	有機物濃度 (mg C/l)	増殖速度 (hr ⁻¹)	倍加時間 (hr)
Brachiopoda	5.8	0.0036	192
	9.8	0.0040	175
	34.8	0.0036	194
	133.0	0.0029	237
Glucose	9.2	0.0045	153
	10.5	0.0042	166
	18.7	0.0034	202
	56.3	0.0025	273

表2 数々の水域における微生物の増殖速度と倍加時間 (鋤崎, 1992)

Table 2 Growth rate and generation time of natural bacteria population in various sea waters (Sukizaki, 1992).

水域及び測定試料	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)
Scripps, Calif.	表層水	Continuous cultures	0.02~0.12	34.7~5.8	Hagstrom et al.(1984,b)
Scripps, Calif.	表層水	CEPEX 3µm filtrate	0.02~0.11	32.0~6.3	Fuhrman and Azam(1980)
Georgia coast	表層水	3µm filtrate	0.03	23.1	Newell and Fallon(1982)
NW Atlantic Ocean	1500	1:20 dilution in FSW (lag phase)	-0.03		Hofle(1984)
		(exponential phase)	0.40	1.7	
Central N Pacific	2000	Inoculated FSW	0.003~0.06	231~11.6	Carlucci and Williams(1978)
駿河湾	1945	有機物添加法	0.0013	533	鋤崎ら(1990)
駿河湾	1945	FDC法	0.013	53.3	◇
駿河湾	1940	FDC法	0.038	18.2	◇
駿河湾からの分離株	室内	ハッチ培養法	0.05~0.28	13.9~2.5	◇

※ FSW : Filtered sea water

※※ Ducklow and Hill(1985)から算出した

は、主に圧力 (Alongi, 1990) と水温 (Yayanos et al., 1984) 条件から考察が加えられてきた。一方で、有機物の質や量の違いが深海微生物群の増殖速度に影響を及ぼすことも考えられている。鋤崎ら (1991b) は、グルコースと深海底に生息する各種甲殻類や軟体類から抽出した有機物を用いて深海微生物を培養し、有機物の質的違いによって増殖速度がその程度異なるかを検討した。その結果、各種深海生物から抽出した有機物を添加した方が、グルコース添加より増殖速度が大きくな

ることを明らかにした。また、培地材料とした深海生物の種類によっても増殖速度は異なった。

通常、微生物の増殖速度測定には、微生物にとっても最も取り込みやすいと考えられるグルコース等の純粋な試薬を栄養源として用いることが多い。しかし、一般的な海洋の鉛直的な有機物分布の考え方は、易分解性の有機物は海洋の表層部で分解および生物体に転換され、深海域では難分解性物質の占める割合が高くなるとされている。すなわち、深海域ではグルコース様の易分解性物質

が微生物の主要な栄養源になることは少ないと考えられよう。このことは、従来まで深海微生物の増殖速度測定に用いられてきたグルコース等の単純な有機物のみを使用した測定値では、深海微生物群の増殖速度を正確には推定できないことを示唆している。

また、鋤崎ら (1990) は、駿河トラフの中軸部でグルコースを添加した培養装置を4日間放置し、深海微生物の増殖速度を測定した。その結果、微生物の増殖速度は添加する有機物濃度が高くなると増殖速度も早くなることを報告した。しかし、本試験では、添加する有機物濃度が高くなると微生物の増殖速度は遅くなる傾向にあった (図4)。海域によって、有機物濃度に対する微生物の増殖応答が異なる原因については明確でない。しかし、調査海域の水温特性等からいくつかの推察はできる。本調査を実施した海域の水温は0.1°Cを下回り、極めて低温条件にある。一方、駿河トラフ中軸部の水温は4°Cを越える。この水温条件の違いが、そこに生息する微生物群集の組成及び生理的特性に影響を与える可能性が考えられる。

深海微生物の多くは、低温微生物 (psychophilic bacteria) が主体となり、かつ、低温微生物の大半は貧栄養微生物 (oligotrophic bacteria) であると考えられている (Jannasch and Wirsen, 1977)。貧栄養微生物は高濃度の有機物条件下より、低濃度の有機物条件下でより速い増殖速度を示すことが知られている (Kato, 1984)。本海域

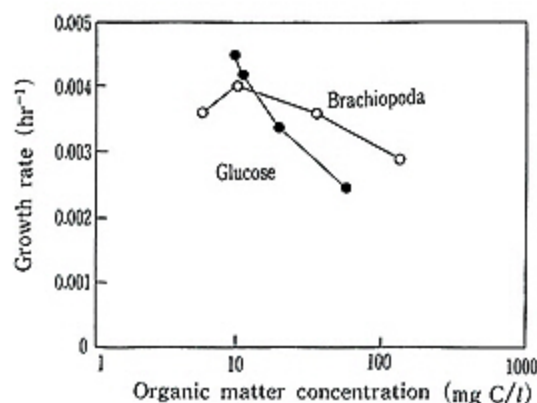


図4 添加有機物濃度と増殖速度の関係

Fig. 4 Effect of organic matter concentration on growth rate of deep sea sediments bacteria. (○-○, Brachiopoda; ●-●, Glucose)

における微生物群集の、有機物濃度に対する増殖応答の様式が同様の傾向を示すということは、低温微生物及び貧栄養微生物が微生物群集の主要な構成群であることに起因しているためとも考えられる。

4. おわりに

深海域にはより高圧状況下で高い増殖が認められるものや、常圧下では全く増殖せず、ある一定の圧力以上でのみ増殖の認められる微生物が存在することが明らかにされている (Jannasch and Wirsen, 1983)。これらの微生物は一旦減圧することによって、微生物活性の失活や死滅を引き起こすことが考えられる。したがって、現場での増殖速度等を推定する場合には、深海域で直接 (*in situ*) 測定するか、圧力や温度等の条件を加味して微生物を回収し、*in vitro* で測定する必要がある。本装置は、後者のタイプであるが、取得された増殖速度値から推察するかぎり *in situ* 法と同様のデータが取得できると考えられた。したがって、今後は本装置を使用することにより、培養装置等を長時間現場海域に設置せずとも深海微生物の増殖速度等に関するデータが陸上で取得できるものと考えられる。

参考文献

- Alongi D. M., 1990, Bacterial growth rates, production and estimates of detrital carbon utilization in deep-sea sediments of the Solomon and Coral Seas. *Deep Sea Res.*, 37, 5, 731-746.
- 藤倉克則, 橋本 淳, 田中武男, 堀田 宏, 1991, 北海道西方の後志海山の生物群集, 第7回「しんかい2000」研究シンポジウム報告書, JAMSTEC DEEPSEA RESEARCH, 7, 283-291.
- Jannasch H. W. and C. O. Wirsen, 1977, Retrieval of concentrated and under-compressed microbial populations from the deep sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 642-646.
- Jannasch H. W. and C. O. Wirsen, 1983, *Microbiology of the deep sea*, Deep-Sea Biology, John Wiley & Sons Inc, New York, 231-259.
- Kato K., 1984, Heterotrophic activity, substrate ac-

- tive bacteria and specific V_{max} for DOC, Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol., 19, 7-13.
- 許 正憲, 高川真一, 橋本 惇, 松沢誠二, 1988, 保圧型深海底微生物採取器の開発. 海洋科学技術センター試験研究報告, 20, 19-30.
- Porter K. G. and Y. S. Feig, 1980, The use of DAPI for indentifying and counting aquatic microflora, Limnol. Oceano., 25, 5, 943-948.
- Seki H., Wada, E., Koike, I. and Hattori A., 1974, Evidence of high organo-trophic potentiality of bacteria in the deep ocean. Mar. Biol., 26, 1-4.
- 鋤崎俊二, 辻義人, 池本栄子, 1990, 駿河湾深海底泥中における微生物の増殖速度, 第6回「しんかい2000」研究シンポジウム報告書, JAMSTECTR DEEPSEA RESEARCH, 6, 225-232.
- 鋤崎俊二, 池本栄子, 辻 義人, 1991a, 深海底泥中から分離した微生物の加圧培養時における増殖応答, 第7回「しんかい2000」研究シンポジウム報告書, JAMSTECTR DEEPSEA RESEARCH, 7, 79-87.
- 鋤崎俊二, 1992, 深海微生物の圧力変化による増殖特性, 高圧生命科学—水溶液から深海生物まで—, シンポジウム講演要旨集, 35-37.
- Tabor P. S., Deming J. W., Ohwada K., Davis H., Waxman M. and Colwell R. R. 1981, A pressureretaining deep ocean sampler and transfer system for measurement of microbial activity in the deep sea. Microb. Ecol., 7, 51-65.
- Taylor C. D. and Jannasch H. W., 1976, Subsampling technique for measuring growth of bacterial cultures under high pressure. Appl. Environ. Microbiol., 32, 355-359.
- Yayanos A. A., Van Boxtel R. and Dietz A. S., 1984, High-pressure-temperature gradient instrument: Use for determining the temperature and pressure limits of bacterial growth. Appl. Environ. Microbiol., 48, 771-776.

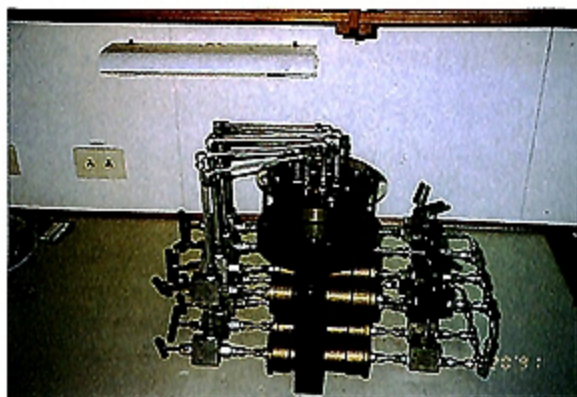


写真1 保圧型微生物採取・培養装置本体

Photo. 1 Incubation chamber (lower) and division device (upper) of pressure-retaining sampling and incubating system.

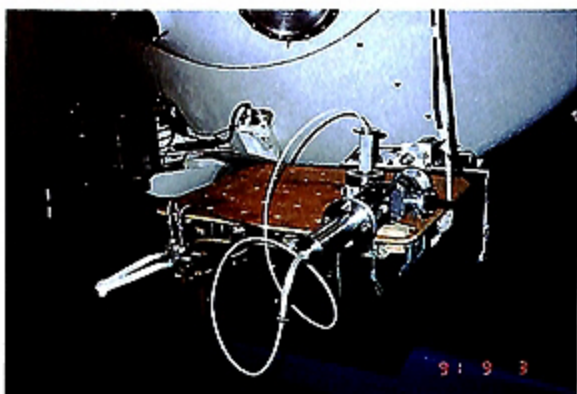


写真2 試料採取口とボールバルブ

Photo. 2 Sampling inlet and ball-valve of pressure-retaining sampling and incubating system.

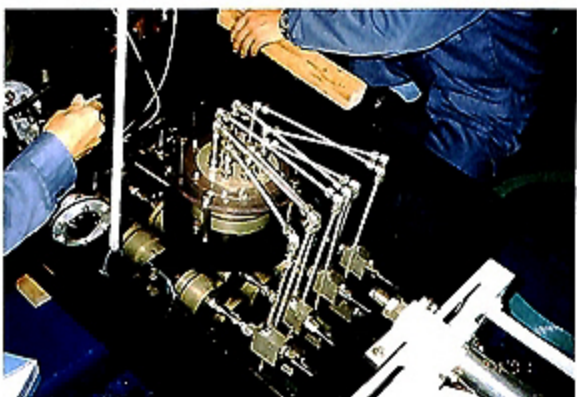


写真3 潜水船への取付状況

Photo. 3 Condition of attached submersible equipments.

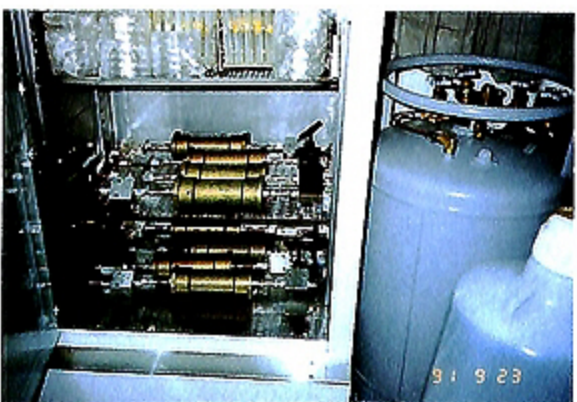


写真4 インキュベータ内での培養状態

Photo. 4 Condition of incubation on board.