

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651004

研究課題名(和文) 海洋有光層下水中古細菌群集の増殖および代謝活性の現場測定手法の構築

研究課題名(英文) Development of in situ measurement method for growth and metabolic activity of marine archaeal community under euphotic zone in the ocean

研究代表者

内海 真生 (UTSUMI, Motoo)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60323250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：海洋中深層の微生物群集の増殖速度や活性を正確に把握するためには、現場水深で直接培養を行う培養装置の開発が必要である。本研究では、海洋中深層微生物群集の現場増殖速度を測定することを目的に申請者が開発したROCS現場培養機の改良と培養実験を行った。その結果、ROCS現場培養機により海洋中深層での基質添加を伴える系とコントロール系の2系による現場培養実験系を確立することに成功した。駿河湾400m水深での現場培養と船上培養実験の結果、全海洋微生物群集、真正細菌群集、クレンアーキオータ群集のすべてにおいて、船上培養法により得られた比増殖速度が現場培養法により得られた比増殖速度を上回ることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To know real marine prokaryotic growth rate, I developed in situ incubation machine named ROCS incubation system. This machine collects sea water, and then, incubates marine prokaryotes at the same depth directly with adding some substrate and fixing a certain volume of incubated samples at programmed time interval. A field incubation experiment was performed at Suruga Bay, and the ROCS system was worked at 400 m depth for one day long. It was also sampled 400 m depth seawater with a water sampler, and did incubation under near in situ temperature on board. As a result, I have succeeded in establishing in situ incubation system, and the results showed that the growth rates of total bacteria, eubacteria and cyanobacteria under onboard incubation were faster than these growth rates under in situ incubation.

研究分野：水圏環境工学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：生物海洋 微生物代謝測定

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの海洋微生物群集の増殖および代謝活性測定研究で用いられてきた手法は、大気圧下の地上とは大きく環境条件の異なる水深で採取した海水サンプルを一度研究調査船上まで持ち帰り、その後船上の実験室において各種の培養・分析に使用し解析するというものであった。

こうした研究手法では、

- (1) 一定水深で採取してから、船上での分注・培養実験に用いるまでに輸送や船上処理に長い時間が必要となり、採取してからの時間経過と共に現場環境との乖離やサンプルボトル内での2次的な環境形成が生じること、
- (2) 採取した現場環境とかけ離れた環境下(水圧、水温、各種ガス圧、他)での培養や実験を余儀なくされること、
- (3) 船上での培養実験で培養可能な微生物個体群の割合は非常に低い可能性が高いこと、

等の問題点が存在し、現場環境での微生物群集の様々な活動を定量的に評価することは難しい。申請者は2001年からの5年間、科学技術振興調整費「海底熱水系における生物・地質相互作用の解明に関する国際総合研究」(代表者; 東京大学 浦辺徹郎教授)に分担研究者として参加する機会を得た。その際、国内および海外で使用されてきた各種採水装置を調査し、それぞれの利点・欠点を洗い出し、その利点を最大限組み込んだ研究用潜水艇に装着し艇内から操作・採水する新規採水機: ロータリー式現場海水採水機(ROCS)を作成した。さらに、ROCSには噴出熱水の各種化学物質の時間変動や微生物活動の変化を海底熱水噴出孔生態系で直接研究することも想定し本体に蓄電池装着のオプションを持たせ、蓄電池装着の際にはあらかじめプログラムされた時間での時系列採水を海底において自実行できる制御部とソフトを組み込んだことにより、上述の(1)から(3)の問題点を解消可能な現場培養実験研究を考案するに至った。

海洋中層の微生物研究に関して、これまで現場での微生物の増殖や各種活性を直接測定する目的の研究は世界的に見てほとんど例がない。しかしながら近年、遺伝子情報による群集構造解析や加速器質量分析計を用いた微生物膜脂質組成研究から、海洋性古細菌群集が普遍的に存在し、その多くが独立栄養性を有し活性も高い可能性があることが示されたことから、海洋中層の微生物活性の再定量化は世界的に関心の高いテーマとなっている。海洋中層で直接微生物の増殖や活性測定を行うことは、変化に乏しく海洋炭素循環にもあまり寄与していないと考えられてきた海洋中層の物質循環を再考する糸口になる。また、こうした現場培養や測定手法の構築は、海洋遺伝子資源探索と遺伝子資源の確保・保全にも充分寄与することが可能で

ある。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者自身が開発した採水機ROCS(Rotary Clean SeaWater Sampler)の時系列採水機能と、本申請で新たに開発・改良を行う海洋中層で使用可能な新型微生物培養装置を用い、海洋有光層下(水深200~2,000m)水中に生息する微生物群集の増殖速度や増殖特性について現場培養から定量評価することを目的とした。

ROCSを母体とするROCS現場培養機を用いた現場培養実験を通じて、海洋中層水中の各種微生物群集、特にその細胞密度が海洋細菌の中でも大きいとその活性等、未だ明らかでない海洋性古細菌群集の増殖速度や物質代謝速度の測定を試みるため、3年間の研究期間で、低温、高圧下で使用可能な新型培養機の改良、漁船を利用した現場培養実験手法の確立、ならびに採水機ROCSの制御プログラムのさらなる改良と現場培養実験を行った。



図1. ROCS現場培養機(H25年9月).

### 3. 研究の方法

本研究は、海洋有光層下(水深200~2,000m)水中に生息する微生物群集の増殖速度や増殖特性について現場培養から定量評価することを目的としている。

#### ROCS現場培養機の改良

3年間の研究期間を通じて毎年の現場実験をフィードバックしながらROCS現場培養機に対して以下の改良を実施した(図1)。

コンテナなどの柔軟素材を利用した培養槽作成による培養装置内の培養用現場環境海水の純度100%の達成、

培養槽への任意の基質物質の培養開始時での自動添加の実行による基質特異的な微生物活性の定量的評価(安定同位体ラベル基質の添加とその微生物細胞への取り込み量および取り込んだ微生物の系統解析を行

う SIP 法の適用)を満す為の ROCS に装着する培養槽の改良、

ROCS 現場培養機の採水、配水、排水ラインの見直しと、現場培養実験用 ROCS 制御プログラムの改良。

### 現場培養実験

H23 年 4 月、H24 年 5 月、H25 年 9 月に静岡県焼津市沖駿河湾中央部において漁船を利用した海洋調査を行い、ROCS 現場培養機の動作確認を含む海洋中層微生物の現場培養実験を行った。各年度の現場培養実験手順はほぼ同様であるが、最終年度の H25 年 9 月の実験は以下の通り実施した。

静岡県駿河湾水深 1,000 m 地点を調査点に設定し、ロープシステムにより水深 400 m で ROCS 現場培養機が定位するように調整した後培養機を投下した(図 2)。なお、ROCS 現場培養機の採水、配水(6 本)計画はあらかじめ船上でプログラムし培養機 IC に記憶させている。24 時間後、再び調査点に漁船で行き、現場培養実験を終了した ROCS 現場培養機を船上に引き上げ各培養試料を回収した。

ROCS 現場培養機投下後、ただちに同一水深(400 m)海水試料をスキン採水器を用いて採水し、船上にて試料を分取後、現場水深水温に調整したクーラーボックス内で船上培養実験を実施し、経時的に培養試料を回収した。

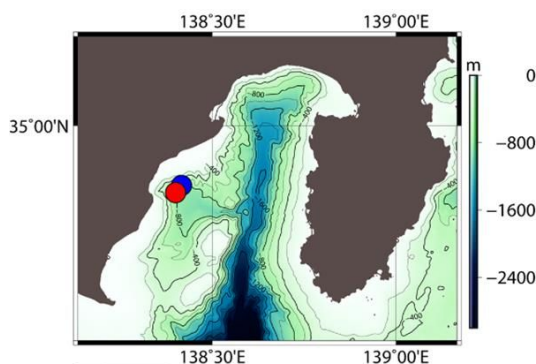


図 2 . 静岡県駿河湾調査点 .

各培養試料について、フィルター濾過後、CARD-FISH 法を用いて微生物群集を染め分け(真正細菌群集、クレンアーキオータ群集)直接計数した細胞数の経時変化からそれぞれの増殖速度を算出した。なお、全菌数の計測には DAPI 染色を用いた。

### 漁船を利用した効率的海洋調査方法の確立

漁船が持つシステムを最大限に活用した海洋調査法を確立するため、各調査前および後に船長と詳細な打ち合わせを行った。

## 4 . 研究成果

### ROCS 現場培養機の改良

3 年間の研究期間中に ROCS 現場培養機に対して以下の改良を行った(図 3)。

- ・現場海水のみを使用した培養実験を行うため、本研究開始前まで使用していたチタン製培養槽(12 L: 高圧環境に投下するので濾過海水を最初に充填する必要があり、現場水深での採水工程を経ても槽内が 100% 現場海水に置換されない)から、プラスチックバッグ(投入時は濾過海水等で充填する必要がなく、現場水深での採水で 100% 現場海水で充填可能)に変更した。

- ・基質を添加した際の微生物群集の反応を確認するため、基質を添加しない系(コントロール)用のプラスチック培養槽を現場培養機に新たに装着し、採水および排水ラインを修正した。また、培養槽数の変更に伴い、ROCS 現場培養機の構造、ならびに培養用プログラムの修正を行った、

- ・1 年目の実験で原生動物による微生物(細菌)の捕食圧が存在する可能性が示されたことから、2 年目以降、採水ラインに原生動物を排除する目的でプレフィルターを挿入した。

- ・採水し培養槽に送り込んだ現場海水試料の配水ライン内逆流防止のために使用する逆止弁について、深海の低温・高圧環境下で不具合なく作動するものを選定した。

上記の主な改良の結果、研究最終年である H25 年 9 月に駿河湾で実施した現場培養実験は成功裏に終了することができた。

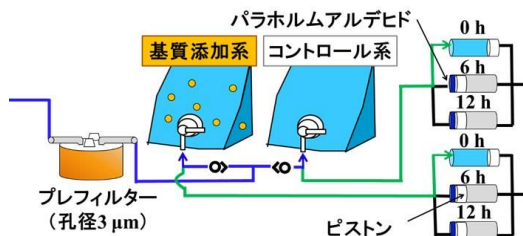


図 3 . ROCS 現場培養機配水図 .

### 現場培養実験

H25 年 9 月の駿河湾調査で得られた水深 400 m 試料の現場培養、船上培養実験から、全海洋微生物群集、真正細菌群集、クレンアーキオータ群集のすべてにおいて、船上培養法により得られた比増殖速度が現場培養法により得られた比増殖速度を上回ることが判明した。

表 1 . 両培養法における微生物群集ごとの比増殖速度  $\mu$  (/h) .

	船上培養法		現場培養法	
	コントロール系	基質添加系	コントロール系	基質添加系
全海洋微生物群集	0.038	0.029	0.009	0.012
真正細菌群集	0.030	0.028	0.013	0.016
クレンアーキオータ群集	0.026	0.023	0.017	0.013



### 漁船を利用した効率的海洋調査方法の確立

本研究期間の3年間、情報交換と具体的な作業内容や希望を共有することで、年度が進行するに従い、調査がスムーズに効率よく実施できることが確認された。船長との信頼関係、使用する機器類などの事前確認などをしっかりやる必要があるが、沿岸からそれほど離れていない海域での海洋調査に関して、漁船を活用することが十分に可能であることが示されたと言える。

以上の結果より、漁船を有効活用する沿岸域での海洋調査研究計画はもっと普及できる可能性があること、ROCS 現場培養機を用いた現場水深培養実験研究の目途がたったと言える。また、今後結果を積み重ねることが必要であるが、船上培養法は、海洋微生物群集の代謝を活性化させる可能性が認められること、この原因として船上培養法の際に生じる圧力変化により海洋微生物群集の代謝が活性化されていることが強く考えられることから、海洋微生物群集の代謝活性の測定を行う際は環境変化を考慮した実験系の再構築が今後は必要となると考える。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Amano-Sato, C., Akiyama, S., Uchida, M., Shimada, K., and Utsumi\*, M. 2013. Archaeal distribution and abundance in water masses of the Arctic Ocean, Pacific sector. *Aquat. Microb. Ecol.*, 69: 101-112. (doi: 10.3354/ame01624) (査読有)

#### 〔学会発表〕(計 10 件)

高橋聖弥、天野(佐藤)千恵、李沁潼、内海真生。駿河湾中層の海洋微生物群集増殖速度の測定 - ROCS 現場培養機による現場水深培養と船上培養との比較 - 第 48 回日本水環境学会年会 (2014 年 3 月 17 日、東北大学)

Chie Amano, Qintong Li, Seiya Takahashi, Motoo Utsumi. In situ incubation for marine prokaryotes using ROCS incubation system. 2014 Ocean Sciences Meeting (2014 年 2 月 23 - 28 日、USA ハワイホノルル Hawaii Conventtion)

Qintong Li, Chie Amano, Minoru Ijichi, Motoo Ustumi. Ammonia-oxidizing Archaea in the Pacific cector of the Arctic Ocean: Characteristics of distribution and diversity. 2014 Ocean Sciences Meeting (2014 年 2 月 23 - 28 日、USA ハワイホノルル Hawaii Conventtion)

Li Qintong, Ijichi Minoru, Amano Chie,

Utsumi Motoo. Abundance and characteristics of ammonia-oxidizing Archaea in the Arctic Ocean. 第 47 回日本水環境学会年会 (2013 年 3 月 12 日、大阪工業大学)

天野千恵、秋山昇平、鈴木祐喜、内田昌男、内海真生. Distribution and structure of planktonic archaea in the Arctic Ocean. 第 28 回日本微生物生態学会 (2012 年 9 月 21 日、愛知県豊橋市豊橋技術科学大学) 内海真生. 海洋中深層・海底での微生物現場培養への挑戦. 第 28 回日本微生物生態学会 (2012 年 9 月 21 日、愛知県豊橋市豊橋技術科学大学)

Chie Amano (Sato), Qintong Li, Shohei Akiyama, Masao Uchida, Motoo Utsumi. In situ measurement of marine bacterial growth rate and community structure using the ROCS incubation system. 2012 Aquatic Sciences Meeting (Association for the Sciences of Limnology and Oceanography), (2012 July 8-13, Ootsu, Shiga, Japan)

Chie Amano (Sato), Shohei Akiyama, Masao Uchida, Motoo Utsumi. Distribution and structure of planktonic Archaea in the Arctic Ocean using 2008 - 2010 R/V Mirai cruise samples. 2011 AGU Fall Meeting (2011 December 04-09, San Francisco, USA)

Shohei Akiyama, Chie Amano (Sato), Masao Uchida, Motoo Utsumi. Vertical profile and components of marine planktonic archaea in the Pacific sector of the Arctic Ocean. 2011 AGU Fall Meeting (2011 December 04-09, San Francisco, USA)

天野(佐藤)千恵、秋山昇平、山本智子、鈴木祐喜、内海真生. ROCS 現場培養機を用いた海洋細菌群集の増殖速度及び代謝評価 2. 第 27 回日本微生物生態学会 (2011 年 10 月 8 日、京都大学)

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

内海 真生 (UTSUMI, Motoo)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：60323250