
海水温 5℃上昇の細菌へのインパクト

16310024

平成16年度～17年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)) 研究成果報告書

静岡大学附属図書館



000652243 7

平成 18 年 3 月

研究代表者 加 藤 憲 二

静岡大学・理学部・教授

目 次

報 告	1
成 果 1	Planktonic bacterial population dynamics and environmental change in coastal system 沿岸海洋における微生物個体群の変動と環境因子(投稿準備中) Takayuki Takenaka, Tomokazu Tashiro, Ayumi Ozaki, Hitomi Takakubo, Yutaka Yamamoto, Kazuyo Nagaosa, Yoshihiro Kimura and Kenji Kato	3
成 果 2	沿岸および河口域における細菌群集の動態と <i>Vibrio cholerae</i> の検出・定量方法の検討 (中間報告) 竹中貴之・加藤憲二	15
成 果 3	海洋細菌群集の増殖に対する水温上昇の影響 山本 完・加藤憲二	23
成 果 4	沿岸海洋における浮遊性古細菌の生態 田代智一・加藤憲二	51
成 果 5	Selective Phylogenetic Analysis (SEPA) Targeted at 16S rRNA Genes of Hyperthermophilic Archaea in Deep-Subsurface Hot Biosphere Hiroyuki Kimura, Satoshi Hanada and Kenji Kato	83

成果報告

本研究は、地球温暖化の海洋細菌への影響について、生態系の基盤を構成して物質循環の主要な担い手となる細菌の群集構造の変化が生態系に影響を及ぼさないか、また熱帯域から病原性を有する細菌個体群の北上と定着はどのようなようになるか、を明らかにするための研究に着手することを目的とし手取り組まれた。

申請書において目的を以下のように記載した。

3. 何を明らかにするか

微生物は単独で消長するものではない。水環境の変化、栄養段階を異にする生物との相互作用、増殖と捕食の関係あるいは微生物間の競争が温度上昇という大きな環境変動の中で複雑に絡まり合った結果、その場の微生物相と群集を構成する個体群のバイオマスの多寡が決定される。従ってある特定の細菌の個体群変動を理解するためには群集構造の変化を把握する必要がある。本研究ではこのような考えにたち、いくつかの細菌個体群を特定する遺伝子プローブを用いた

- (1) Fluorescence in situ hybridization (FISH)法によって細菌群集構造の全体を把握し、
- (2) さらに海水中のコレラ菌(*Vibrio cholerae*) にターゲットを絞った遺伝子プローブによって、その変動を追跡する。
- (3) これに加えて、DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)と遺伝子クローニングを複合させた方法によりさらに詳細な構成群集構造の温度上昇に伴う変化を把握することを試みる。
- (4) 温度上昇の影響を抽出するためには、現場観測と並行して擬似現場培養実験を採用する。これは、現場環境のうち温度条件だけを変動させた短期培養実験により、温度の影響を抽出しようというものである。又、培養実験において採用する5℃は、21世紀末に想定される地球環境温度の最大上昇値である。
- (5) 現場観測と擬似現場培養実験を、黒潮にそった本州中部の駿河湾と九州南部の志布志湾（候補）で実施することにより、海水温上昇の影響を比較検討する。

- (1) については、成果1にまとめたように、目下投稿準備が進んでいる。
- (2) については、成果2に研究状況をまとめたとおり、容易ではないが、研究手法上の問題は克服し、研究を鋭意継続している。
- (3) は、特にコレラ菌の検出に際してこれを実施している。
- (4) については、研究申請段階ですすでに取り組んでいた成果を3として示す。これについては、捕食実験を継続しており、実験結果の再現性が認められ次第論文とする。
- (5) これについては直接大がかりな観測は実施できなかった。ただし、特にコレラ菌の分布については、これを広く太平洋沿岸にそったサンプリングを開始した。

また申請時に、以下の予想を行った。

予想される結果と意義

- (1) 温度上昇の影響は、細菌群集全体には増殖速度を上昇させる方向で働くであろう。
 - (2) しかしながら、季節や海域で異なった程度に影響があらわれるのではないか。
 - (3) また、Bacteria（真正細菌）と Archaea（古細菌）に対して、さらには Bacteria のなかのサブグループに対して異なった影響が出ると予想される。影響は、温度上昇幅（たとえば、3℃、5℃、10℃など）によっても異なるであろう。また、温度上昇によって、捕食者も生態にも変化がでることが予想される。
 - (4) コレラ菌(*Vibrio cholerae*) は、温度上昇に対して敏感に反応し、高い温度上昇（10℃）にも正の影響がでるのではないだろうか。
- これらの知見から、海水温上昇の細菌への影響のシナリオ書きを始めることができるであろう。

- (1) については、これを支持する結果が得られた。
- (2) については、比較に足るデータの取得にはまだいたってはいない。
- (3) については、古細菌が温度をはじめとする環境因子では説明がつかない分布を示すことから、新たな研究テーマとして成果が上がりつつある（成果4）。
- (4) これについては実験を継続中である。なお、当初予想しなかった成果として、リアルタイム PCR を用いた細菌個体群の定量が私どもの研究室の独自な成果として可能になり（成果5として論文投稿準備中）、これを用いたコレラ菌に関する成果の一部は成果2に示した。

2006年6月8日

研究代表者
研究分担者

静岡大学 理学部 教授 加藤憲二
助手 木村浩之

成果 1

**Planktonic bacterial population dynamics and environmental
change in coastal system**

沿岸海洋における微生物個体群の変動と環境因子（投稿準備中）

**Takayuki Takenaka, Tomokazu Tashiro, Ayumi Ozaki, Hitomi Takakubo, Yutaka Yamamoto,
Kazuyo Nagaosa, Hiroyuki Kimura and Kenji Kato**

Intriduction

Molecular analysis of natural bacterial assemblages has provided us knowledge of bacterial community structure directly and precisely without cultivation bias, which leads a concept of bacterial diversity in various environments and predominance of a certain bacterial population under a certain milieu. One of preceding studies revealed difference in bacterial community constituents between aggregates-attached and free-living bacterial assemblages (DeLong et al. 1993). Findings as alpha-*Proteobacteria* are abundant in estuarine and coastal environments (Gonzalez & Moran, 1997) and abundance of Archaea in coastal waters were obtained (Murray et al. 1998) through molecular analyses. Environmental control of bacterial assemblage (Casamayor et al. 2002; Nishimura & Nagata, 2005) and relation between aquatic environment and distribution of functional bacterial group (Cottrell & Kirchman, 2000; Langenheder et al. 2005) are also shown by molecular analysis of bacterial community. Among molecular analyses fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques given by DeLong et al. in 1989 (DeLong et al. 1989) provides quantitative information of bacterial community structure with cell abundance of individual population. Direct comparison of bacterial community structure quantitatively thus became to be possible (Glokner et al. 1999). Population shift responding to environmental change as enrichment of nutrients is also revealed by using this technique (Eilers et al. 2000). In coastal environment, e.g., a trend of the distribution of individual bacterial group shown by FISH as alpha-, beta- and *Cytophaga*-like group is explained salinity (Kirchman et al. 2005). Following these findings, we attempt to reveal an environmental regulation of bacterial abundance focusing in particular on temperature and salinity. Impact of temperature on bacterial community structure might be greater according to its increasing caused by Earth warming. When consider the influence of terrestrial origin bacteria on marine microbial community is probably under the effect of freshwater dilution thus to be shown by salinity.

Materials and Methods

Study site and sample collection

Observation of natural environment and water sampling were carried out from December 2001 to August 2005 in Simizu-Port of Suruga Bay (**Fig. 1**). Water samples were collected from surface and 10 m deep at St. 1 (35°00'55.9"N, 138°30'58.3"E) which locates inside the port and St. 2 (35° 00'46"N, 138° 33'12"E) of outside the port. Surface water was collected with a sterilized Pyrex bottle at each sampling site. Water of 10m deep was collected with a 10-litter Niskin sampler and sampled water was immediately subsampled into sterilized a Pyrex bottle for microbial analysis, measurement of chlorophylla and chemical analysis. All

samples were transported to the laboratory on ice within a few hours.

Sample processing

In laboratory, a sub-sample was fixed with neutralized formaldehyde (pH 7.4, final concentration 5%) for total bacterial direct count. Sub-sample for FISH analysis was fixed with paraformaldehyde (pH 7.4, final concentration 3%) for up to 24 h at 4°C. Fixed sample was then filtered gently on a 0.22- μ m Nuclepore filter (25 mm diameter). Cells trapped on the filter were rinsed 3 times with PBS and dehydrated with 1 mL of 50%, 80%, and 99% ethanol for 3 min each, and the filter was air-dried. Filters were stored at -20°C until hybridization.

Measurement of environmental parameter

Surface and 10m depth water temperature, salinity, pH, conductivity and dissolved oxygen (DO) were measured at the site by using a WATER QUANTITY CHACKER U-10 (HORIBA, Co Ltd, Tokyo, Japan). Chlorophyll *a* was measured after UNESCO method. Dissolved organic carbon (DOC) was analyzed with Total Organic Analyzer, TOC-5000 (Shimadzu, Co Ltd, Japan).

Total bacterial direct count

Fixed sample was stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, final concentration, 0.01 μ g mL⁻¹) and bacterial cells were enumerated by using epifluorescence microscopy (BX50-FLA, Olympus, Co, Ltd, Japan).

Whole cell in situ hybridization

The 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used in this study are shown in Table 1. They comprised a domain-specific probe for Bacteria (EUB338) and Archaea (ARCH915), phylogenetic-group-specific probes for γ -Proteobacteria (GAM42a). These probes were labeled with rhodamine obtained from Nihon Bioservice Co, Ltd.

Hybridization stringency was adjusted by varying the concentration of formamide in the hybridization buffer and NaCl in the washing solution. Hybridizations were performed at 46°C for 90 min on filters placed on slides coated with gelatin, with hybridization buffer containing 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% SDS, formamide (20% for EUB338, 35% for ARCH915 and GAM42a), and 5 ng μ L⁻¹ of the respective labeled probe. Each filter was washed at 48°C for 15 min in prewarmed washing buffer containing NaCl (0.225 M for EUB338, 0.070 M for ARCH915, and 0.080 M for GAM42a), 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.01% SDS, rinsed with distilled water, and air-dried. The preparations, which were counterstained with 0.1 μ g mL⁻¹ DAPI on glass slides for 5 min, were observed under a universal epifluorescence microscopic system, BX50-FLA with a digital camera

(DP-70, Olympus, Co Ltd, Japan) with an image analysis system (DP controller, Olympus).

Results

In situ observation with sampling for chemical and microbial analyses were carried out nine times from December 1 of 2001 to August 2 of 2005 at inside and outside of Shimizu Bay (Fig.1). Environmental fluctuation throughout the observation is summarized in Fig. 2.

Salinity(Fig.2 a)

Salinity fluctuated large at surface both inside and outside the bay ranging from 25.4~31.2 psu while it fluctuated from 29.7 to 33.0 psu at 10 m deep. Except unusually low salinity observed on 6 August 2002 at surface outside the bay, fluctuation pattern of salinity was similar between inside and outside, which leads an idea that the deep water was not strongly affected by freshwater supply from the river even inside the bay.

Temperature(Fig. 3 b)

The observed water temperature ranged from 12.5 to 28.9°C, without significant difference between inside and outside the bay. Water temperature was relatively high at surface in summer, while it was high at 10 m deep in winter.

PH

The observed pH fluctuated between 7.4 and 8., being stable at pH 8 except that measured somewhat lower value twice at surface inside the bay on November 8, 2002 and August 30 in 2003.

Chlorophyll a (Fig.2 c)

Chlorophyll a concentration fluctuated widely at surface from 0.29 to 16.31 mg Chla./m³, being high numbers were not necessarily measured in summer. Compared the density between surface and 10 m deep higher numbers were sometimes observed outside the bay as was on February 28 in 2004, when relatively high values were observed at both sites.

Dissolved oxygen (Fig.3 d)

Dissolved oxygen concentration did not fluctuate widely so far observed, while relatively higher number was observed at surface.

NO₃⁻ (Fig.3)

High concentration of nitrate ion was observed at surface inside the bay in general ranging from 0.49 to 17.91 μM. But any significant correlation was found between NO₃⁻ and Chlorophyll a.

NO₂⁻ (Fig.3)

The value was not high ranging between 0.17 and 1.27 μM.

NH₄⁺ (Fig.3)

High number was sometimes observed at surface inside the bay, but clear tendency was not

found in general being 0 to 11.33 μ M.

PO₄³⁻

If compared the two sites observed relatively high concentration was found inside(St.1) but the measured concentration was low being 0.01~1.05 μ M.

Si(OH)₄

Concentration of Si(OH)₄ showed high at surface fluctuating between 3.10 and 28.82 μ M, but any significant correlation was found between Si(OH)₄ concentration and that of Chla.

DOC

Except the high concentration measured on August 6 2002 being 164.7~206.6 μ M, other samples showed relatively stable numbers being 61.7 and 107.4 μ M. Any good correlation between DOC concentration and that of Chla, major supply of DOC, was not found so far examined. Supply of DOC from terrestrial environment through rivers are to be considered.

Characteristics of observation sites

Horizontal comparison: Inside the bay (St.1)

Nutrients and Chlorophyll a concentrations showed high value in particular at surface, being salinity was low compared with outside the bay.

Outside the bay (St.2)

A similar fluctuation pattern with St.1 was observed at St.2 for temperature, salinity and dissolved oxygen concentration.

Vertical comparison

Surface water showed large fluctuation for temperature and salinity and high numbers were found for nutrients, Chlorophyll a and DO.

Bacteria

Total direct count (Fig.4)

The total direct count (TDC) was generally ca. 1×10^6 cells/mL, except on August 6, 2002, with $2-3 \times 10^6$. Total number of bacteria did not fluctuate seasonally, the TDC number at surface showed a tendency to be higher than 10m deep both for St.1 and St.2.

Total bacterial number in St.1 showed larger number than that in St. 2

The ratio of hybridized cell to TDC (Fig.4)

About 10 to 75 % of total bacteria identified with their DNA were hybridized with 16SrRNA targeted gene probes, which suggests that constituents of active bacteria certified with FISH fluctuated widely from 10 % being only minority was active to 75 % which meant the most bacteria were active. It is remarkable that summer bacteria sampled in August did not necessarily show high proportion of FISH reactive bacteria. Generally surface bacteria

showed higher proportion of FISH reactive than 10 m deep ones both for St.1 and St. 2.

Apparently low hybridization ratio was observed on August 30 in 2003, which seemed to relate with low phytoplankton biomass (Table 1).

domain Bacteria (Fig.4)

The number of domain Bacteria fluctuated between 1.0×10^5 and 1.0×10^6 cells/mL throughout observation period. Domain Bacteria showed was high number at surface when compared vertically. Domain Bacteria shown by FISH comprised from 11.8%~76.1% of total bacteria. The proportion of domain Bacteria was high at surface than at 10 m deep. When compared the same depth of 10 m St. 2 being outside of the port showed higher than that of St.1 being inside.

A remarkably large number of domain Bacteria was found on August 6 of 2002 being 2.6×10^6 cells/mL, but the ration to total bacterial number was not large as 47 %.

The ratio of domain Bacteria to TDC was highest on June 14 in 2003 among any other sampling days, except at surface in St. 1. The ratio of domain Bacteria to TDC did not fluctuate seasonally.

γ - Proteobacteria (Fig. 4)

The number of γ -Proteobacteria fluctuated between 1.0×10^4 and 1.0×10^5 cells/mL throughout observation period. The ratio of γ -Proteobacteria detected by FISH to TDC ranged from 1.0 to 10.8 % except that in St.1 at surface on December 1 in 2003 of 20.8%. γ -Proteobacteria did not dominate in the bacterial community of the seawater because the ratio of γ -Proteobacteria to TDC did not exceed 6% except three cases. The ratio of domain Bacteria ranged from 1.9 to 30.4%, the highest number was found on August 30, 2003. The proportion of γ -Proteobacteria at 10m depth in St.1 showed a tendency to be higher than any other sampling points. Both of the number and the proportion of γ -Proteobacteria did not fluctuate seasonally.

domain Archaea (fig. 4)

The number of domain Archaea fluctuated between 2.0×10^3 and 3.0×10^4 cells/mL. The number of domain Archaea was very low but we detected domain Archaea from all samples so far examined. The ratio of domain Archaea detected by FISH ranged from 0.1 to 3.2 % of total bacteria except in St.2 at surface on December 1 in 2001 of 12.0%. Both of the number and the proportion of domain Archaea did not fluctuate seasonally.

Discussion

1. When we compared the whole data set of bacterial abundance with related environmental,

- 1) Temperature showed positive correlation with total bacterial number ($P < 0.01$) and domain Bacteria ($P < 0.05$). 2) Negative relationship with salinity were found for total bacteria ($P < 0.01$), domain Bacteria ($P < 0.01$), gamma-Proteobacteria ($P < 0.01$) and domain Archaea ($P < 0.05$). 3) Phytoplankton abundance represented by Chl.a showed higher correlation with domain Bacteria ($P < 0.01$) and that of somewhat lower correlation with gamma-Proteobacteria than total bacterial number ($P < 0.05$).
2. These findings give us an overview of planktonic bacterial abundance in studied coastal area were governed by fresh water supply with rivers and bacterial abundance was affected by the shift of temperature, though this didn't affect Archaeal abundance. Phytoplankton were then another regulator of bacterial abundance.
3. When analyzed relation between bacterial abundance and environmental at each observed site a correlation between temperature and total bacterial number became weak in Stn.1 at surface ($R^2 = 0.389$, $P < 0.10$) and 10 m deep ($R^2 = 0.521$, $P < 0.05$), and in Stn.2 at surface ($R^2 = 0.375$, $P < 0.10$) and 10 m deep ($R^2 = 0.394$, $P < 0.10$).
4. A strong correlation between dissolved organic carbon (DOC) and total bacterial number ($R^2 = 0.732, 0.853, 0.856$) were found except the sample taken from 10 m deep at Stn.2. When analyzed bacterial dynamics at individual population.
5. Another apparent correlation was found between salinity and total bacteria ($R^2 = 0.751$) and domain bacterial group ($R^2 = 0.656$).
6. An interesting negative correlation was found between salinity and the abundance of domain Archaea inside of the harbor: $R^2 = 0.587$ at surface and $R^2 = 0.891$ at 10 m deep.

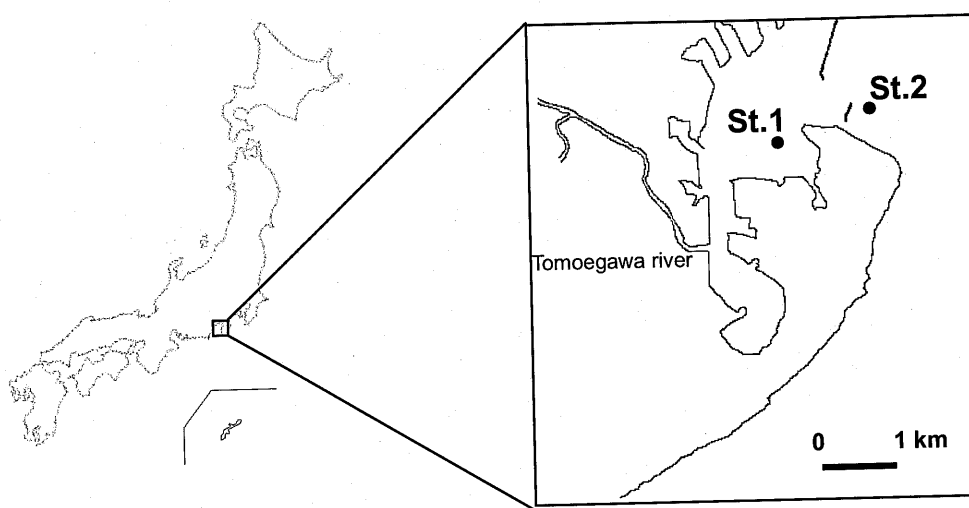


Fig1. :Sampling site, St.1 ($35^{\circ}00' 56''$ N, $138^{\circ}30'$ E), St. 2 ($35^{\circ}00' 46''$ N, $138^{\circ}33' 12''$ E)

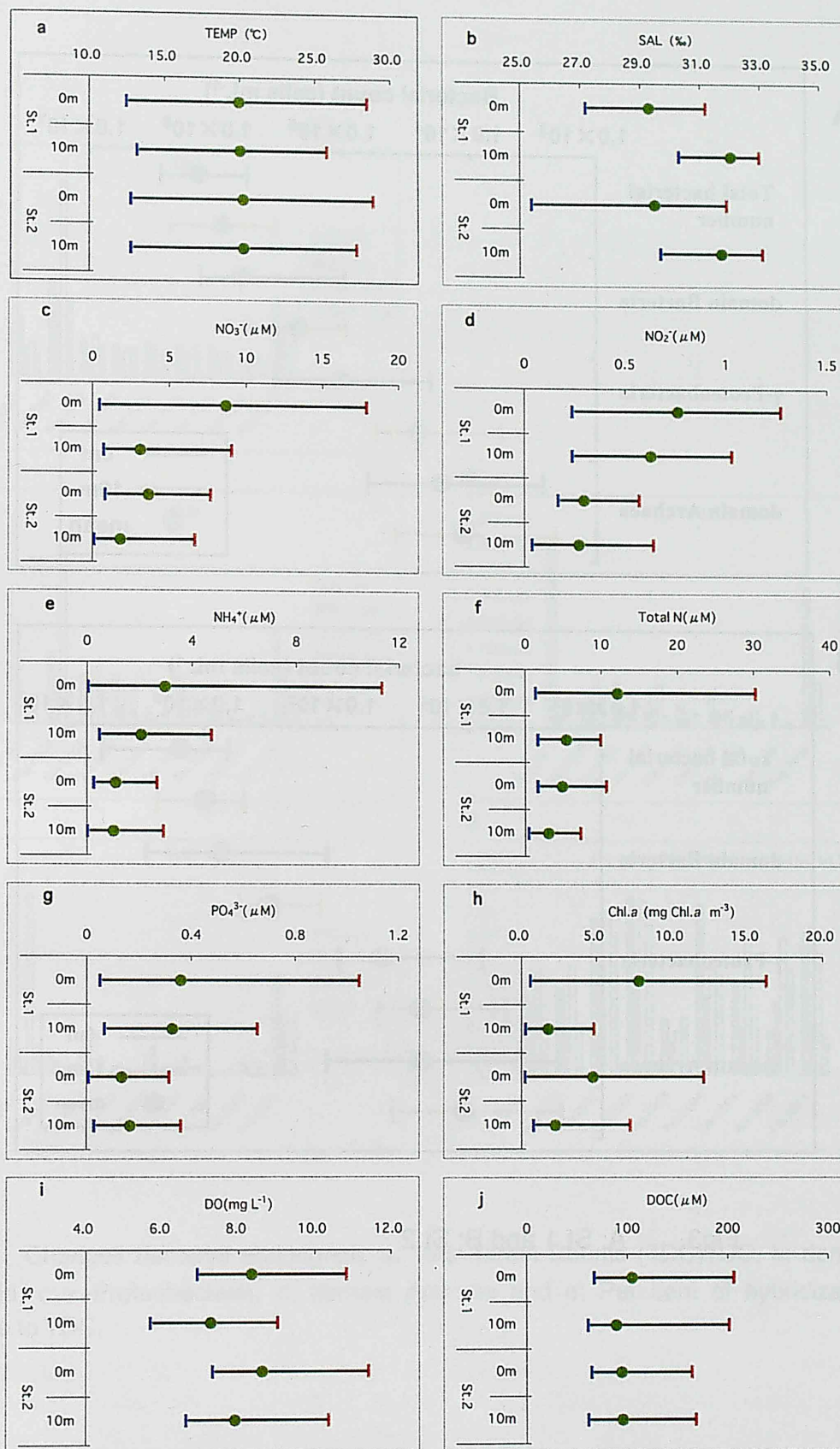


Fig.2. Fluctuation range of environmental parameters; a: temperature, b: salinity, c: NO_3^- , d: NO_2^- , e: NH_4^+ , f: Total N, g: PO_4^{3-} , h: Chlorophylla, i: DO, j: DOC.

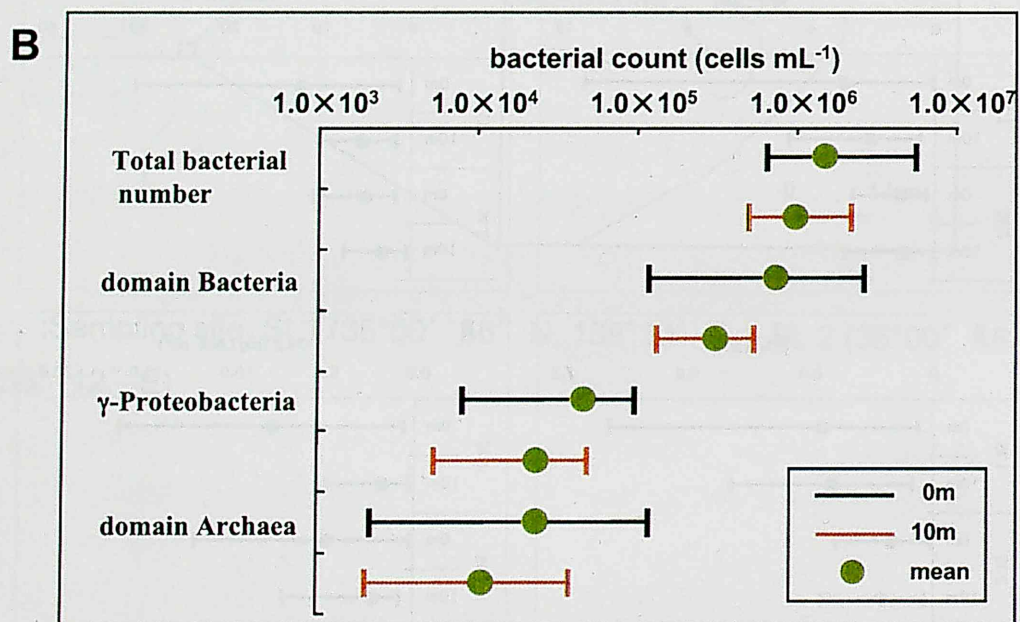
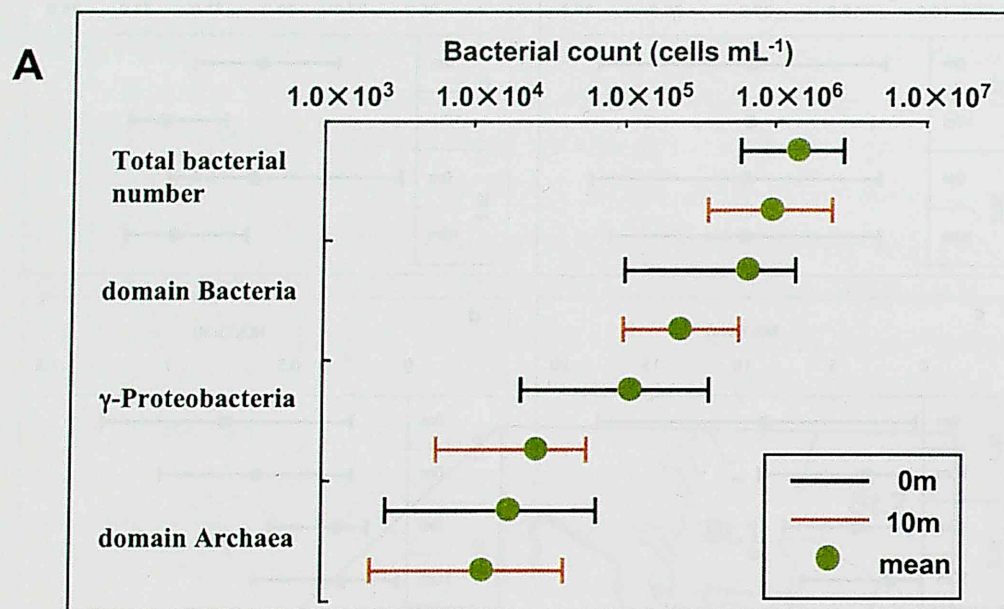


Fig3. A; St.1 and B; St.2

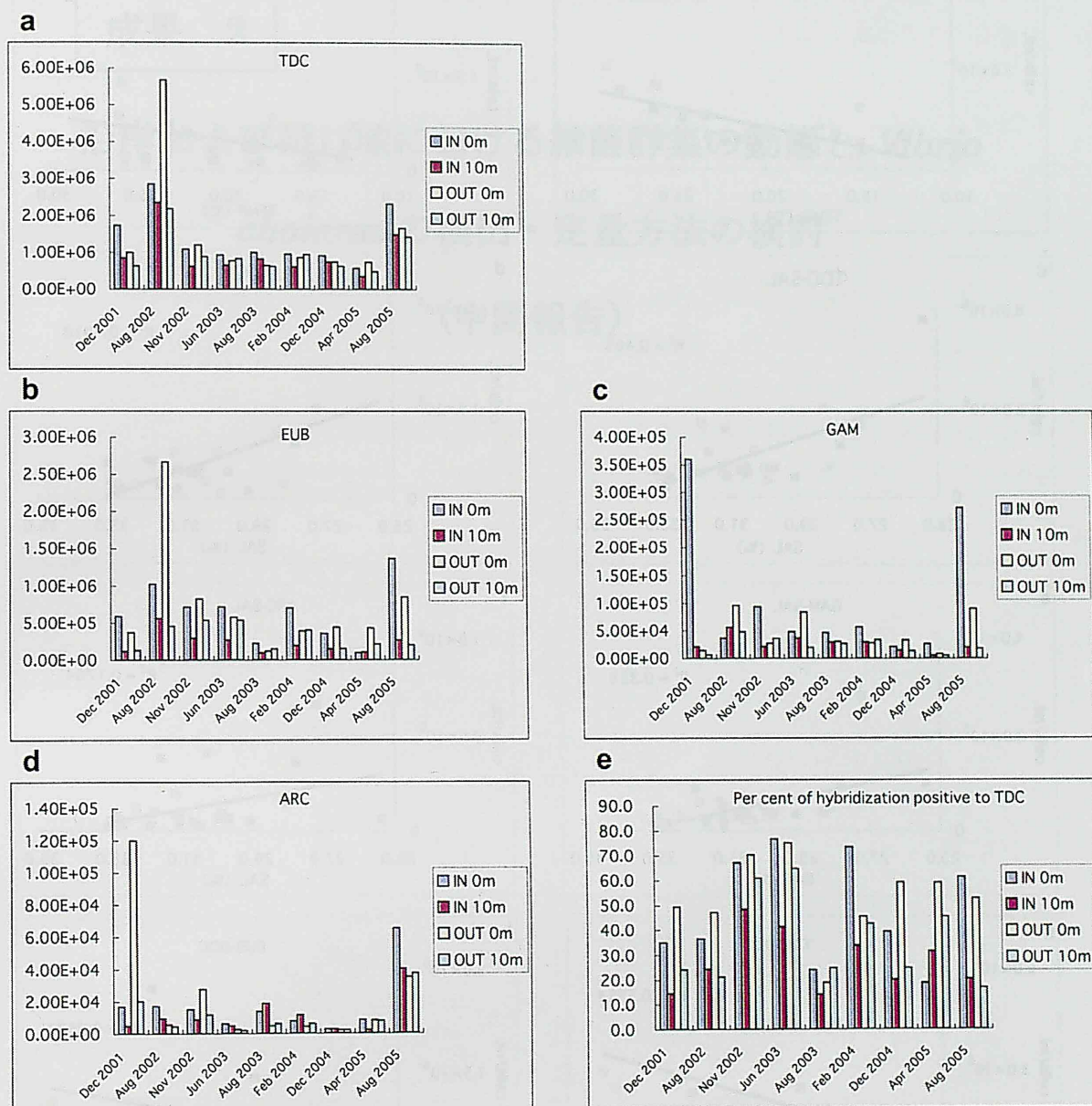


Fig. 4. Changes bacterial abundance, a: Total Direct Counts (TDC), b: domain Bacteria, c: γ -Proteobacteria, d: domain Archaea and e: Per cent of hybridization positive to TDC.

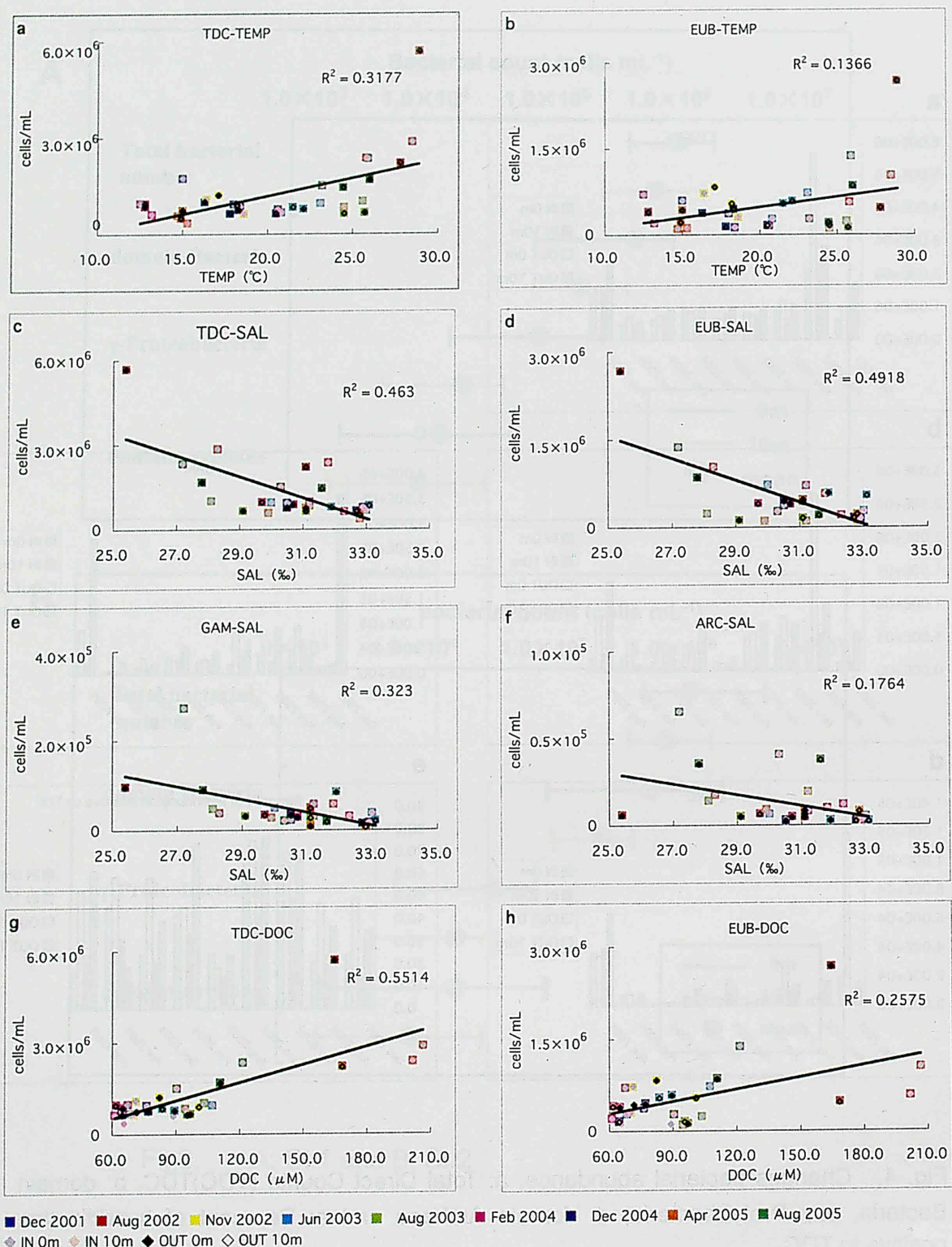


Fig. 5. a: correlation between TDC and Temperature, b: correlation between domain Bacteria and temperature, c: correlation between TDC and salinity, d: correlation between domain Bacteria and salinity, e: correlation between γ -Proteobacteria and salinity, f: correlation between domain Archaea and salinity, g: correlation between TDC and DOC, h: correlation between domain Bacteria and DOC

成果 2

沿岸および河口域における細菌群集の動態と *Vibrio*

cholerae の検出・定量方法の検討

(中間報告)

竹中貴之・加藤憲二

1. 目的

16S-23S ITS 領域に特異的なプライマーセットを用いた PCR, リアルタイム PCR から

(1) 定量 PCR による *Vibrio cholerae* 株検出法の検討 (検出感度).

(2) 駿河湾沿岸域, 河口域における *Vibrio cholerae* の検出と定量.

を行うことを目的とする。

2. 方法

2-1. サンプルング

日時: 2006 年 4 月 4 日

サンプル

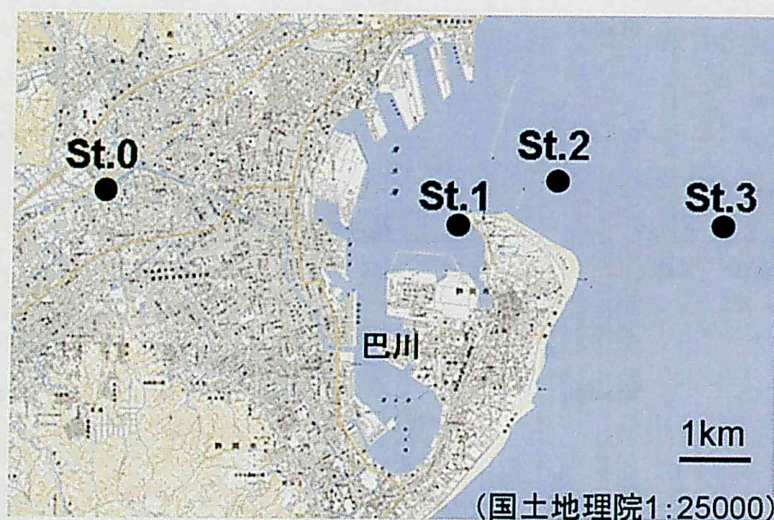
- ・河川水 (St.0, 1m) バンドン採水器を用いて採水 (塩分約 15‰)
- ・海洋表層水 (St.1, 2, 3) ※採水時に 20mm プランクトンネットで濾過処理

環境データ

水温, pH, 電気伝導度溶存酸素濃度 (HORIBA U-10)

塩分 (TOA CM-14P (CGP-110P))

サンプルングサイト



St.0:	巴川	(35° 01' 20" N, 138° 28' 08" E)
St.1:	港内	(35° 00' 56" N, 138° 30' 58" E)
St.2:	港外	(35° 01' 18" N, 138° 31' 45" E)
St.3:	沖合	(35° 00' 46" N, 138° 33' 13" E)

図 1. サンプルングサイト.

2-2. サンプル処理

PCR, 定量 PCR サンプル

V. cholerae 株

- (1) 遠心機にかけ (10000rpm, 10min) 細菌を沈殿させる
- (2) Et-OH を除去

環境サンプル

- (1) 河川水, 海水をペリスタポンプを用いて大量濾過 (1, 2L)
- (2) ハウジングフィルターに細菌をトラップ
- (3) DNA 抽出 ⇒ DNA 濃度測定 (分光光度計: 260nm)
- (4) 希釈
- (5) PCR, 定量 PCR

表 1. PCR に用いたプライマー.

Primer	target	Sequence (Chun <i>et al.</i> 1999)
VC-F	<i>Vibrio cholerae</i>	5'-TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G-3'
VCM-R	16S-23S ITS	5'-AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G-3'

※ *V. cholerae* 株: 東京大学海洋研究所 木暮教授より譲渡

TDC (*V. cholerae* 株, 環境サンプル)

- (1) サンプルを中性ホルマリン固定 (最終濃度 2%, 5%)
- (2) 蛍光色素 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) で染色
- (3) 蛍光顕微鏡下で計数

※ 得られた細菌数から DNA サンプル中の細菌数を算出
⇒ *V. cholerae* を cells/mL の値で定量

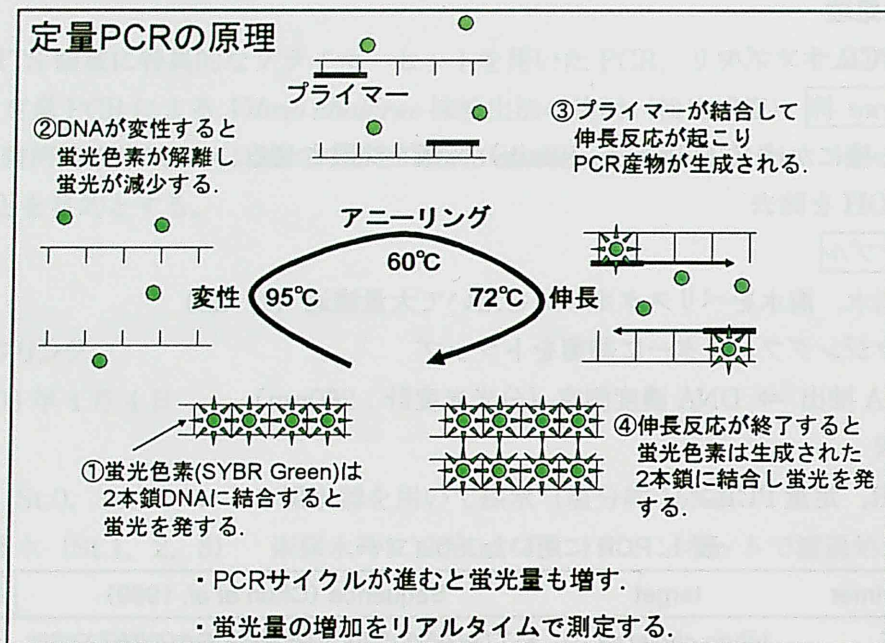


図 2. 定量 PCR の原理 模式図.

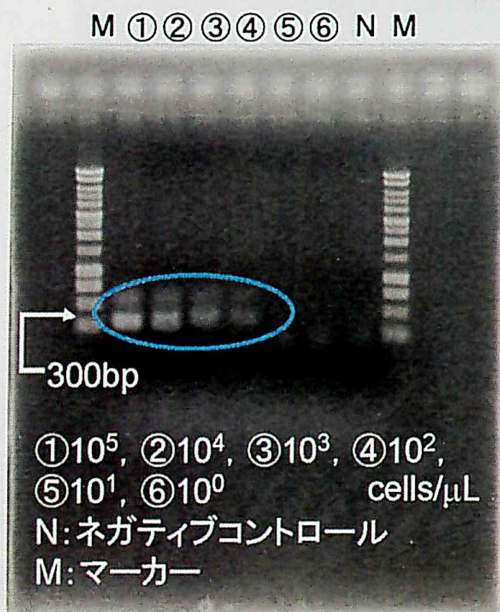
3. 結果と考察

3-1. PCR : *Vibrio cholerae* 株

V. cholerae 株 (細菌数 : 2.51×10^7 cells/mL) $\Rightarrow \times 10^2 \sim 10^7$ 希釈

($\Rightarrow 2.51 \times 10^5 \sim 10^0$ cells/mL)

PCR (*V. cholerae* 16S-23S ITS 領域)



- ・ $10^5 \sim 10^2$ cells/mL でバンドを検出。
- ・ 10^2 cells/mL 以上であれば PCR で検出可能。



V. cholerae 株から抽出した DNA を

- ① プライマーに対するポジティブコントロール
 - ② 定量 PCR におけるスタンダード
- として使用。

図 3. *V. cholerae* 16S-23S ITS 領域に特異的な
プライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図(*V. cholerae* 株).

3-2. 環境サンプル

表 2. 細菌数および環境データ.

サイト	水温 °C	塩分 ‰	pH	電気伝導度 mS/cm	DO mg O ₂ /L	全菌数 cells/mL
St.0(巴川)	15.3	15.0	7.86	28.6	4.77	4.14×10^6
St.1(港内)	15.1	30.7	8.41	51.0	14.29	1.38×10^6
St.2(港外)	14.6	30.7	8.40	51.3	12.29	1.59×10^6
St.3(沖合)	14.2	31.2	8.14	52.8	11.91	1.52×10^6

- ・ 巴川河川水で最も細菌数が多い (海洋の 2.6~3 倍).

3-3. 環境サンプルの PCR

PCR (*V. cholerae* 16S-23S ITS 領域)

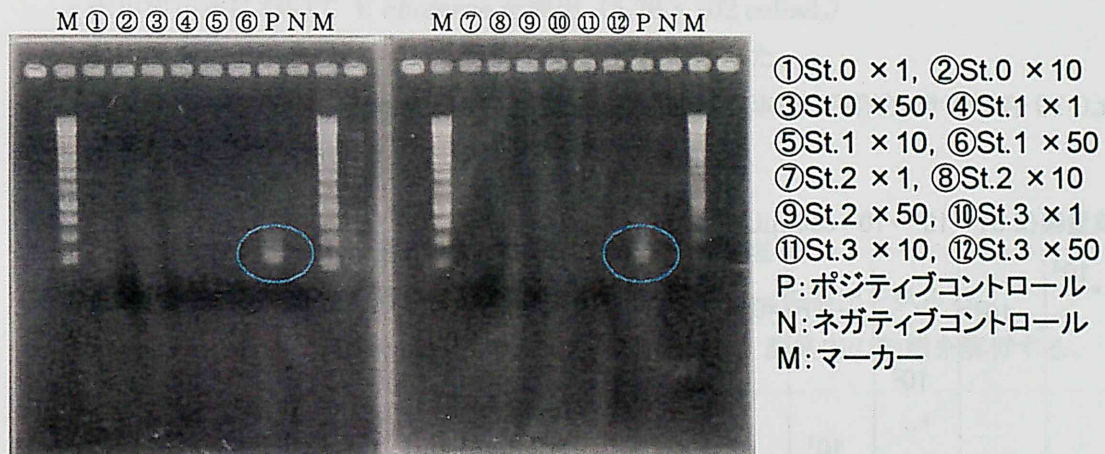


図 4. *V. cholerae* 16S-23S ITS 領域に特異的なプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図(環境サンプル).

- ・ ポジティブコントロールでのみバンドを確認.
- ・ 全ての環境サンプルから *V. cholerae* を検出できなかった.



感度の高いリアルタイム PCR で再度検出を試みる. (×1, 5, 10, 50 希釈)

3-4. リアルタイム PCR

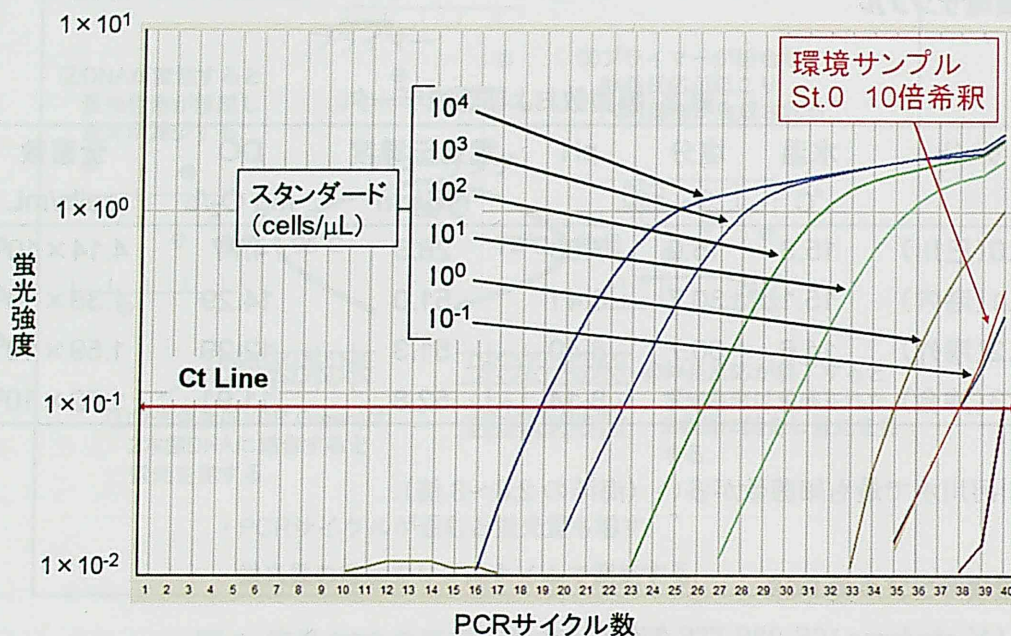


図 5. *V. cholerae* 16S-23S ITS 領域に特異的なプライマーを用いた定量 PCR の結果.

- ・ St.0 10 倍希釈サンプルでのみ *V. cholerae* を検出

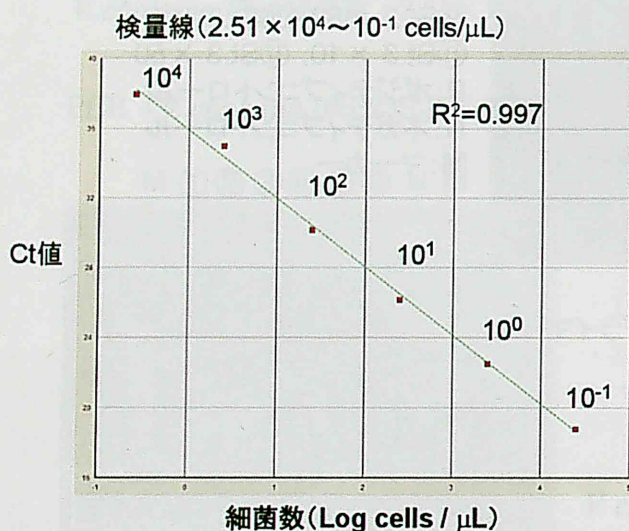


図 6. *V. cholerae* 株をスタンダードとして用いたときの定量 PCR の検量線.

10⁻¹cells/mL でも検出可能.

- ・ *V. cholerae* の 16S-23S ITS 領域は DNA 内に約 10 箇所ある.
- ・ 定量 PCR により環境中の *V. cholerae* の定量が可能.

駿河湾沿岸域, 巴川河口域における *V. cholerae*

St.0 (巴川河川水) においてのみ *V. cholerae* を検出

⇒ 5.76 × 10² cells/L の *V. cholerae* が存在

3-5. *Vibrio cholerae* の検出

- ・ 巴川河川水において *V. cholerae* を検出
- ・ 駿河湾海洋表層水では *V. cholerae* は検出されなかった。
⇒塩分が *V. cholerae* の検出に影響を与えている。

しかし、

- ・ 巴川河口域と海洋表層とでは DOC, 栄養塩の濃度に大きな差がある。
DOC (mM) : 港内, 港外 76~77 ⇔ 巴川河口 216 (高久保, 2004)
- ・ *Vibrio cholerae* は従属栄養細菌



- ・ 他のファクター (特に DOC, 栄養塩) についても *V. cholerae* 検出との関係を考察する必要性。

4. まとめ

- ・ 定量 PCR により環境中の *Vibrio cholerae* を検出, 定量が可能
- ・ 巴川河川水において *V. cholerae* を検出 (5.76×10^2 cells/L)
- ・ 駿河湾海洋表層水では *V. cholerae* は検出されなかった。
⇒塩分が *V. cholerae* の検出に影響を与えている可能性。

5. 今後の課題

- ・ 塩分以外のサイト間の違いを検討する (DOC, 栄養塩等)。
- ・ 汽水湖である浜名湖や他の河口域について *V. cholerae* の検出を試みる。
- ・ Enterobacteria, *Vibrio* spp. についても検出を試み, 群集内の動態を解析する。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり, *Vibrio cholerae* 株を譲渡していただいた東京大学海洋研究所海洋生態系動態部門木暮一啓教授, 西村昌彦助手, 塚本久美子先生に深く御礼申し上げます。

成果 3

海洋細菌群集の増殖に対する水温上昇の影響

山 本 完 ・ 加 藤 憲 二

目次

I. はじめに	1
II. 方法と材料	2
1. サンプルング	2
2. 環境データの測定	2
3. 培養実験	2
3-1. 培養実験の方法	2
3-2. ディフュージョンチャンバー	3
4. 全細菌数の測定	3
4-1. サンプルの固定	3
4-2. DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)染色による プレパラートの作成	3
4-3. 蛍光顕微鏡下での全細菌の計数	3
5. 細菌の群集構造の解析	4
5-1. サンプルの固定	4
5-2. 細菌の濃縮と脱水	4
5-3. 遺伝子プローブ	4
5-4. Whole cell in situ hybridization	4
5-5. 試料の観察	4
6. 増殖速度の測定	5
III. 結果	5
1. 環境データ	5
2. 全細菌数の変化	5
3. 全細菌の増殖速度の変化	6
4. FISH 法による細菌の群集構造の解析	6
5. 各グループの増殖速度の変化	7
IV. 考察	8
1. 環境データ	8
2. 全細菌に対する水温上昇の影響	8
3. 細菌の群集構造の解析	8
4. 現場環境と培養後における細菌の群集構造の比較	9
5. 各グループに対する水温上昇の影響	10
V. まとめ	10
VI. 今後の課題	11
VII. 引用文献	11

図の目次

図1. サンプルングポイント	1
図2. 培養実験の模式図	1
図3. ディフュージョンチャンバーの模式図	2
図4. ディフュージョンチャンバー内へのチトクロム C の拡散速度	2
図5. 培養実験における全細菌数の経時変化	3
図6. 培養実験により測定した各温度における全細菌 の増殖速度	3
図7. 2002 年 11 月 8 日に行った培養実験における細菌 の群集構造	3
図8. 2003 年 4 月 18 日に行った培養実験における細菌の 群集構造	4
図9. 2003 年 8 月 30 日に行った培養実験における細菌の 群集構造	4

図 10. 各培養実験におけるグループごとの増殖速度	5
図 11. 現場環境における各グループの細菌数と増殖速度 の関係	5
図 12. FISH 法により解析したドメイン・バクテリアの 蛍光顕微鏡写真	6
図 13. FISH 法により解析したドメイン・アーキアの 蛍光顕微鏡写真	6
図 14. FISH 法により解析した α -プロテオバクテリアの 蛍光顕微鏡写真	6
図 15. FISH 法により解析した β -プロテオバクテリアの 蛍光顕微鏡写真	7
図 16. FISH 法により解析した γ -プロテオバクテリアの 蛍光顕微鏡写真	7
図 17. FISH 法により解析した <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> group の 蛍光顕微鏡写真	7
図 18. FISH 法により解析した <i>Vibrio cholerae</i> の 蛍光顕微鏡写真	8

表の目次

表 1. FISH 法で用いたプローブの塩基配列	1
表 2. サンプルング時における清水港内表層の環境データ	1
表 3. 培養実験における全細菌数の変化	1
表 4. 培養実験における全細菌の増殖速度	2
表 5. 培養実験における細菌の群集構造	2
表 6. 培養実験におけるグループごとの増殖速度	3

I. はじめに

細菌は、水圏生態系において重要な役割を担っている。例えば、細菌は硝化や脱窒反応などにより窒素循環を機能させている。細菌は植物プランクトンの光合成により細胞外へ放出された有機基質や、捕食により放出された有機基質を取り込み、それらを無機化する。その無機栄養塩を用いて植物プランクトンが成長し、それを高次消費者が捕食する。また、細菌は微小鞭毛虫に捕食され、それをさらに高次消費者が捕食する。このような微生物ループにおいて、細菌は必要不可欠である。また細菌は貝や魚などの他の海洋生物に対して、または人に対して病原性を示す。このように細菌が水圏生態において重要な役割を果たしているのにもかかわらず、90年代に入るまでは、現場環境において細菌の分類構成や機能を直接見積もることが困難であったことから、水圏環境における細菌の群集構造やその動態について詳しく知ることができなかった。それまでは、微生物生態学では、細菌を主に培養法と核酸染色による直接計数により検出してきた。培養法は培養条件に適した細菌だけを検出するため、環境に生息する細菌の1%以下しか検出できないといわれている(Cottrell and Kirchman, 2000)。また、核酸染色による直接計数は、環境中に存在する全細菌を検出できるが、分類やそれぞれの細菌の活性についての情報を与えない。しかしながら、90年代に Fluorescent in situ hybridization(FISH)法(Delong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990)による直接計数や denaturing gradient gel electrophoresis analysis (DGGE)法(Muyzer *et al.*, 1993)などの分子生物学的手法が発達したことにより、培養を必要とせず直接現場環境における細菌の分類や活性についての情報を得ることができるようになってきた。

分子生物学的手法が発達したことにより水圏環境における細菌の群集構造が明らかになってきた。水圏環境における細菌はドメイン・バクテリアとドメイン・アーキアに大分され、その大部分をドメイン・バクテリアが占める。ドメイン・バクテリアの中にはいくつかのグループが存在し、環境の違いによりその構造が異なる。Glockner *et al.* (1999)は、数多くの水圏環境における細菌の群集構造を、FISH 法を用いて解析し、河川や湖沼においては β -プロテオバクテリアが優占し、一方海洋においては α -プロテオバクテリアと *Cytophaga/Flavobacterium* が優占することを報告している。

細菌の数や群集構造を決める要因は、詳しくはわかっていないが、栄養塩(Pinhassi and Hagstrom, 2000)、溶存有機物質(Cottrell and Kirchman, 2000a)、塩分(Bouvier and del Giorgio, 2002)、水温(Heidelberg *et al.*, 2002a)、原生動物による捕食(Suzuki, 1999; Hofle, 1999)が細菌の数や群集構造に影響を与えるといわれている。

細菌の主な死滅要因の一つは微小鞭毛虫などの原生動物による捕食である。水圏環境において原生動物は、小さいサイズの細菌より大きいサイズの細菌を捕食することが知られている(Chrzanowski and Simek, 1990)。また、Sherr *et al.* (1992)は、原生動物は分裂中の細菌を選択的に捕食すること、del Giorgio *et al.* (1996)は、原生動物による捕食圧が活性の低い細菌が存在するときより活性の高い細菌が存在するほうが強いことを報告している。これらの報告は、水圏環境の細菌は捕食から逃れた小さいサイズの細菌からなり、低い生理学的代謝状態にあるというKjelleberg *et al.* (1987)の仮説を支持する。またFISH法を用いた研究により、 α -プロテオバクテリアと β -プロテオバクテリアが異なった戦略で捕食から逃れることが報告された(Pernthaler *et al.*, 1997)。

水温は温帯域の海洋において季節に応じて 20℃近く変動する。水温の変動は海洋環境において物理的、化学的または生物学的に重要である。例えば表層の海水温の上昇により水温躍層が形成され、また逆に表層の海水温が降下することにより海水が混合され、深水層から栄養塩が供給される。また海水温の変動は水圏環境に生息する微生物の代謝に影響を及ぼすであろう。

近年温室効果ガスの増加による地球温暖化により、海水温が上昇する傾向にある。海水温の上昇が、細菌の数や活性、群集構造に影響を与えることは大いに考えられる。特に病原菌については問題視されている。水圏環境に広く分布し、病原菌であり、 γ -プロテオバクテリアに属する *Vibrio cholerae* は腸内細菌であるため、温帯域における現在の海水温より高い水温のほうが増殖に適していることが考えられる。そ

のため、地球温暖化によって病原菌による感染症が世界中で蔓延する危険がある。実際、バングラディッシュにおいて海水温の高い夏にコレラ病の症例が多いことが報告されている(Colwell 1996)。また、Heidelberg *et al.* (2002a)は Chesapeake 湾の Choptank 川で FISH 法により9ヵ月間にわたり細菌の数と群集構造を調査し、海水温の高い夏にドメイン・バクテリア、*Vibrio cholerae*-*Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus* の細胞数が多いことを報告している。

そこで本研究では、細菌と水温との関係を詳しく調べるために、研究室において培養実験を2002年11月8日、2003年4月18日、2003年8月30日に行い、海水温の上昇が細菌の増殖にどのような影響を与えるかを考察した。水温上昇が細菌群集に与える影響のみを考察するために、水温だけを現場海水温、現場海水温プラス5℃、現場海水温プラス10℃と3段階に変化させて培養実験を行った。細菌は、FISH法により、ドメイン・バクテリア、ドメイン・アーキア、 α -プロテオバクテリア、 β -プロテオバクテリア、 γ -プロテオバクテリア、*Cytophaga/Flavobacterium* group, *Vibrio cholerae* に分類分けされ、それぞれのグループについての水温上昇による増殖速度の変化を調べた。

II. 方法と材料

1. サンプルング

2002年11月8日、2003年4月18日、2003年8月30日に静岡県静岡市清水港内(北緯35° 00' 55", 東経138° 30' 58")の表層海水を採取した(図1)。表層水を培養液として20Lポリタンクに、培養サンプルとして500mLパイレックスビン(SCHOTT DURAN, Germany)と1Lパイレックスビンに、クロロフィル a 、栄養塩(NO_3^- , PO_4^{3-})用サンプルとして10Lポリタンクに、溶存有機炭素(Dissolved Organic Carbon [DOC])用サンプルとして500mLパイレックスビンにそれぞれ採取した。採取したサンプルを冷蔵保存して研究室へ持ち帰り、それぞれのサンプルを処理した。

2. 環境データの測定

11月8日のサンプルングにおいては、サンプルングポイント表層の水温、pH、電気伝導度を水質チェッカー U-10(HORIBA, Ltd., Tokyo, Japan)、溶存酸素濃度を YSI DO メーター 58 型(Nikkaki, Ltd., Kyoto, Japan)、塩分をポータブル電気伝導率計 CM-14P(TOA, Ltd., Tokyo, Japan)で計測した。4月18日のサンプルングにおいては、サンプルングポイント表層の水温、pH、電気伝導度、溶存酸素濃度を水質チェッカー U-10、塩分をポータブル電気伝導率計 CM-14P で計測した。8月30日のサンプルングにおいては、サンプルングポイント表層の水温、pH、電気伝導度、溶存酸素濃度、塩分を水質チェッカー U-10 で計測した。

クロロフィル a を、研究室においてユネスコ法(西條と三田村, 1995)にて測定した。11月の栄養塩の測定には、クロロフィル a 測定における濾液を用い、東亜 DKK 株式会社においてイオンクロマトグラフを用いて解析した。DOC 用サンプルを450℃で滅菌した GF/F で濾過処理し、その濾液を500℃で滅菌したアンプルに入れて、冷凍保存した。またその残りを4月と8月の栄養塩のサンプルとしてポリビンに入れて冷凍保存した。DOC、4月と8月の栄養塩はまだ解析されていない。

3. 培養実験

3-1. 培養実験の方法

培養実験を2002年11月8日、2003年4月18日、2003年8月30日に行った。原生動物による捕食の影響を取り除くため、採取された培養サンプルを孔径1.0 μm 、直径47mmのヌクレポアフィルター(Whatman, Ltd., Maine, U.K.)で濾過した。濾過処理を行った培養サンプルをディフュージョンチャンバー数個に封入し、培養前のサンプルを採取した。海水が循環し、水温を設定できるユニット恒温槽サーモミューンダーSD mini(TAITEC, Ltd., Saitama, Japan)を3つ用意し、培養液として採取した未濾過の表層海水7Lをそれぞれに入れ、水温を現場海水温、現場海水温プラス5℃、現場海水温プラス10℃に設定した。濾過処理した培養サンプルを封入したディフュージョンチャンバーをそれぞれのインキュベーターに数個設置して培養実験を行った。蛍光灯(70~80 μmol)を用いて12時間ごとに明暗条件を切り替えた。11月8日と8月30日の培養実験においては12、24時間後に1つずつ、48時間後に、2つずつそれぞれのインキュ

ベーターからディフュージョンチャンバーを取り出し、サブサンプルを採取した。4月18日の培養実験においては、12時間後に1つ、24時間後に2つディフュージョンチャンバーを取り出し、サブサンプルを採取した。各培養実験において、培養前とすべてのサブサンプルにおける全細菌数を測定した。11月の培養実験においては培養前と48時間培養後に採取したサブサンプルに対して、4月と8月の培養実験においては培養前と培養24時間後のサブサンプルに対してFISH法による細菌の群集構造の解析を行った。

3-2. ディフュージョンチャンバー

水圏環境において、藻類の光合成による細胞外への有機基質の放出や、原生動物による細菌の捕食による有機基質や栄養塩の放出が、細菌の増殖に影響を与えることが考えられる。濾過海水を用いた培養実験においては、現場環境と培養環境の間で栄養状態の違いが生ずる。そこで、本研究においては、現場環境をより近く再現するために培養サンプルを封入したディフュージョンチャンバー(図3)を現場海水に浸漬して培養実験を行った。ディフュージョンチャンバーの内外は、孔径 $0.2\mu\text{m}$ 、直径47mmのヌクレポアフィルター(Whatman, Ltd., Maine, U.K.)により遮られている。つまりディフュージョンチャンバー内と外では、 $0.2\mu\text{m}$ 以上のサイズの細菌は移動できないが、 $0.2\mu\text{m}$ 以下の栄養塩や有機基質などは濃度拡散により移動できる。ディフュージョンチャンバーの拡散速度を分子量12000のチトクロムCを用いて確認した。チトクロムC水溶液の入った容器の中へ蒸留水を封入したディフュージョンチャンバーを入れ、ディフュージョンチャンバーにおけるチトクロムC濃度の経時変化を調べた。その結果ディフュージョンチャンバーが十分に物質を拡散していることがわかった(図4)。

4. 全細菌数の測定

4-1. サンプルの固定

サンプルに最終濃度2%になるように濾過した中性ホルマリン溶液(ホルムアルデヒド[Wako, Ltd., Osaka, Japan]にヘキサメチレンテトラミン[Junsei chemical, Ltd., Tokyo, Japan]を少量加え、pH7.0に調整する)を加え、固定した。固定したサンプルは暗所で冷蔵保存された。

4-2. DAPI(4, 6-diamidino-2-phenylindole)染色によるプレパラートの作成

全細菌数の測定のためにDAPI染色をPorter and Feig (1980)の方法を改良して行った。

セットした濾過器に孔径 $1.2\mu\text{m}$ セルロースフィルター(MILLPORE Co., Ltd., Massachusetts, U.S.A.)をのせ、濾過緩衝液(以下F-PBSと表記)(Dulbecco's PBS (-)[NISSUI, PHARMACEUTICAL, Co., Ltd., Tokyo, Japan] 9.6g/L)を吸引させ、湿らせておいた。その上に孔径 $0.2\mu\text{m}$ 、直径47mmのヌクレポアフィルター(Whatman, Ltd., Maine, U.K.)を1/4にカットし、6.7% Sudan black 溶液(Wako, Ltd., Osaka, Japan)で染色したフィルターを濾過面からはずれないようにピンセットを用いてのせ、その上にファンネルをのせてクリップで固定した。サンプル中の細菌を均等に分散させるため、サンプルをブレンダーで攪拌し、用意したファンネルに入れ、サンプル量が1mLになるまで濾過した。そこに濃度 $0.1\mu\text{g/mL}$ のDAPI溶液(Nacalai tesque Inc., Kyoto, Japan)を0.1mL加え、ファンネルをゆすって均一に混ぜ、5~7分間そのままの状態細菌を染色し、その後濾過した。その後、ヌクレポアフィルターをピンセットで取り出し、スライドガラス(Matsunami glass Ind., Ltd., Osaka, Japan)の上に濾過面を上にして置き、無蛍光のイマージョンオイル(OLYMPUS, Co., Ltd., Tokyo, Japan)を一滴フィルターに垂らし、カバーガラス(Matsunami glass Ind., Ltd., Osaka, Japan)を被せてピンセットの尻でオイルを広げるように軽く押さえた。

4-3. 蛍光顕微鏡下での全細菌の計数

作成したプレパラートにイマージョンオイルを滴下し、接眼マイクロメーターを入れた落射型蛍光鏡BX50(OLYMPUS, Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、倍率1000倍、UV励起光(波長330~385nm)で、100グリッド内におけるDAPIで染色された細菌を計数した。本研究においては、20視野で900細胞以上を計数し、100グリッド当たりの平均値を求めた。

全細菌数(サンプル1mLあたりの全細菌数)を以下のように計算した。

$$\text{全菌数 (cells/mL)} = n \times A/a \times 1/V \times 20/19$$

n は 100 グリッド当たりの平均細胞数, A は濾過面積(μm^2), a は 100 グリッド当たりの面積(μm^2), V は

サンプルの濾過量(mL)を示す。

5. 細菌の群集構造の解析

FISH 法(Amann *et al.*, 1995)を用いて細菌の群集構造を解析した。

5-1. サンプルの固定

サンプルに最終濃度が 3%になるように濾過したパラホルムアルデヒド溶液(4% パラホルムアルデヒド [Wako, Ltd., Osaka, Japan], PBS 9.6g/L, NaCl 15.9g/L)を加え、固定した。固定は 5~8 時間、暗所、冷蔵状態で行われた。

5-2. 細菌の濃縮と脱水

濾過器に湿らせた直径 25mm の GF/C (Whatman, Ltd., Maine, U.K.)を置き、その上に 3 分の 1 にカットした孔径 0.2 μ m, 直径 47mm のヌクレポアフィルター(Whatman, Ltd., Maine, U.K.)をのせ、濾過器とファンネルをしっかりとクリップで固定した。そこに固定したサンプルを適当量濾過した後、F-PBS 1mL で 3 回洗浄した。次に、50%エタノール (Wako, Ltd., Osaka, Japan)1mL をファンネル部分に滴下して、2~3 分間静置した後濾過した。同様の作業を 80%, 99.5%エタノールを用いて行い、脱水した。その後フィルターを室温で乾燥させた。そのフィルターを、ハイブリダイゼーションを行うまで -20°C で冷凍保存した。

5-3. 遺伝子プローブ

本研究では、ドメイン・バクテリア、ドメイン・アーキア、 α -プロテオバクテリア、 β -プロテオバクテリア、 γ -プロテオバクテリア、*Cytophaga/Flavobacterium* group, *Vibrio cholerae* の rRNA をターゲットにした EUB338, ARC915, ALF1b, BET42a, GAM42a, CF319a, CHO.1 プローブを用いた(表1)。これらのプローブは宝酒造(Takara Biotechnology (DALIAN) Co., Ltd., Kyoto, Japan)で作成された。用いたプローブはすべてローダミン(tetramethylrhodamine isothiocyanate または X-rhodamine isothiocyanate)で標識された。

5-4. Whole cell in situ hybridization

サンプルを濃縮、脱水したフィルターを 6 等分し、液だれを防ぐために 0.2%ゼラチン(Wako, Ltd., Osaka, Japan)を塗布したスライドガラス(Giovannoni *et al.*, 1989)に置き、暖めておいたハイブリダイゼーション緩衝液(HB:0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl[pH7.4], formamide[EUB338, ALF1b, CF319a は 20%, ARC915, BET42a, GAM42a は 35%], 0.01% SDS)16 μ L と遺伝子プローブ 2 μ L を直接フィルター上で混合した。乾燥を防ぐために、50mL ポリプロピレン遠沈管(Iwaki, Co., Ltd., Tokyo, Japan)に HB2mL を浸したケイドライを入れ、あらかじめ 46°C に温めておき、そこに上記のスライドガラスを素早く入れ、46°C で 90 分間インキュベートした。インキュベーションが終わったフィルター試料を、あらかじめ 48°C に温めておいた洗浄溶液(WS: NaCl[EUB338, ALF1b は 0.225M, ARC915 は 70mM, BET42a, GAM42a, CF319a は 80mM], 20mM Tris-HCl[pH7.4], 5mM 4H EDTA, 0.01% SDS)で軽く洗い流した後、残りの洗浄溶液に浸し、48°C で 15 分間インキュベートした。その後、フィルターを金網上に出し、蒸留水 100mL で濾過面を洗浄してドライヤーで乾燥させた後、フィルターをスライドガラスにのせた。そこに DAPI を直接 3 μ L 滴下し、5分間暗所で染色後、乾燥させ、マウント剤 antifade reagent in glycerol buffer(Molecular Probes Inc., Oregon, U.S.A.)をフィルターに適当量滴下し、カバーガラスで覆った。

なお、*Vibrio cholerae* の Whole cell in situ hybridization については Young-Tae *et al.* (1996)の手法を用いて行った。上記の FISH 法と異なる点は、ハイブリダイゼーションと洗浄の温度が 39°C であること、ハイブリダイゼーションの前に、フィルターに HB2 μ L を添加し、15 分間、39°C でプレハイブリダイゼーションを行うこと、HB の組成が 0.9M NaCl, 50mM sodium phosphate buffer(pH7.0), 5mM EDTA, 0.1% SDS, poly (A) 0.5mg/mL, 10×Denhard's solution であること、WS の組成が 0.9M NaCl, 0.1% SDS, 50mM sodium phosphate buffer(pH7.0)である点である。

5-5. 試料の観察

ハイブリダイゼーションを行ったサンプルを落射型蛍光顕微鏡 BX-50 において、倍率 1000 倍で直接観察し、3CCD カメラ C5810(Hamamatsu photonics, Shizuoka, Japan)で同一視野の UV 励起(波長 330~385nm)画像と IG 励起(波長 520~550nm)画像を取り込み、画像解析装置 SP500F(Olympus, Co, Ltd.,

Tokyo, Japan)を用いて解析を行った。UV 励起画像において合計 500～4000 細胞をカウントした。UV 励起画像において DAPI により染色され、かつ同一視野の IG 励起画像においてハイブリダイズされた細胞のみをプローブで検出された細胞とみなした。その細胞数に対する UV 励起画像における DAPI により染色された細胞数の割合を計算し、求めた。

なお、プローブで検出された細菌数を以下のように計算して求めた。

$$N=n \times P/D$$

N はプローブで検出された細菌数, n は DAPI 染色による直接計数で求めたサンプルにおける全細菌数, P は UV 励起画像において DAPI により染色され、かつ同一視野の IG 励起画像においてハイブリダイズされた細胞数, D は UV 励起画像において DAPI で染色された細胞数を示す。

6. 増殖速度の測定

Stanier *et al.* (1989) の以下の式を用いて、それぞれの培養実験における全細菌、または各グループの増殖速度を求めた。

$$k=(\ln Z - \ln Z_0)/(t - t_0)$$

k は増殖速度(h^{-1}), Z および Z_0 の値はそれぞれ t および t_0 時間における細胞数に相当する。

III. 結果

1. 環境データ

サンプリング時の清水港内表層の環境データを図2に示す。水温は 16.4℃～25.6℃であった。11 月と4 月の水温の間には 1.4℃しか差がなかったが、8 月の水温は、11 月と4 月より 7～9℃高い値を示した。

クロロフィル a 濃度は 1.90～10.26mg·chl·m⁻³ であった。4 月のクロロフィル a 濃度は 11 月と8 月に比べ 5 倍近い値を示した。

pH は 7.39～8.04 であった。溶存酸素濃度は 7.85～10.26mg/L であった。4 月の pH と溶存酸素濃度は 11 月と8 月より高い値を示した。

電気伝導度は 43.5～73.4mS/cm であった。塩分は 28.1～31.6‰ であった。8 月の電気伝導度と塩分は、11 月と4 月より高い値を示した。

2. 全細菌数の変化

11 月, 4 月, 8 月と 3 回行った培養実験における全細菌数の経時的変化を図5に示した。

11 月の培養実験において、培養前の全細菌数は $0.720(\pm 0.195) \times 10^6$ cells/mL であった。12 時間後には、現場水温(16.4℃)培養では $1.79(\pm 0.255) \times 10^6$ cells/mL, プラス 5℃(21.4℃)培養では $4.82(\pm 1.48) \times 10^6$ cells/mL, プラス 10℃(26.4℃)培養では $5.16(\pm 0.928) \times 10^6$ cells/mL へと全細菌数が増加した。24 時間後には、現場水温培養では $1.88(\pm 0.774) \times 10^6$ cells/mL, プラス 5℃培養では $8.14(\pm 2.75) \times 10^6$ cells/mL へと全細菌数が増加した。プラス 10℃培養の 24 時間後の全細菌数は、ディフュージョンチャンバーのフィルターが壊れ、サブサンプルを採取できなかったために示すことができない。48 時間後には、最も全細菌数が多くなり、現場水温培養では $3.65(\pm 1.22) \times 10^6$ cells/mL, プラス 5℃培養では $9.42(\pm 2.04) \times 10^6$ cells/mL, プラス 10℃培養では $7.39(\pm 1.38) \times 10^6$ cells/mL へと全細菌数が増加した。

4 月の実験において、培養前の全細菌数は $1.59(\pm 0.197) \times 10^6$ cells/mL であった。12 時間後には、現場水温(18.0℃)培養では $2.90(\pm 0.250) \times 10^6$ cells/mL, プラス 5℃(23.0℃)培養では $4.04(\pm 0.475) \times 10^6$ cells/mL, プラス 10℃(28.0℃)培養では $4.41(\pm 0.438) \times 10^6$ cells/mL へと全細菌数が増加した。24 時間後には、最も全細菌数が多くなり、現場水温培養では $3.77(\pm 0.335) \times 10^6$ cells/mL, プラス 5℃培養では $4.80(\pm 0.413) \times 10^6$ cells/mL, プラス 10℃培養では $5.20(\pm 0.487) \times 10^6$ cells/mL へと全細菌数が増加した。

8 月の培養実験において、培養前の全細菌数は $1.17(\pm 0.147) \times 10^6$ cells/mL であった。12 時間後には、現場水温(25.6℃)培養では $6.95(\pm 1.85) \times 10^6$ cells/mL, プラス 5℃(30.6℃)培養では $8.45(\pm 1.14) \times 10^6$ cells/mL, プラス 10℃(35.6℃)培養では $7.92(\pm 1.85) \times 10^6$ cells/mL へと全細菌数が増加した。24 時間

後には、最も全細菌数が多くなり、現場水温培養では $10.6(\pm 1.84) \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、プラス 5℃培養では $10.3(\pm 2.07) \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、プラス 10℃培養では $8.85(\pm 1.04) \times 10^6 \text{ cells/mL}$ へと全細菌数が増加した。48 時間後には、現場水温培養では $5.08(\pm 1.02) \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、プラス 5℃培養では $5.66(\pm 1.69) \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、プラス 10℃培養では $5.87(\pm 1.63) \times 10^6 \text{ cells/mL}$ へと全細菌数が減少した。

3. 全細菌の増殖速度の変化

すべての実験において、培養開始から 12 時間の間で全細菌の増殖速度が最も大きかったため(表4)、その増殖速度と水温との関係を図6に示した。

11 月の培養実験における全細菌の増殖速度は、現場水温培養では 0.0761 h^{-1} 、プラス 5℃培養では 0.159 h^{-1} 、プラス 10℃培養では 0.164 h^{-1} であった。4 月の培養実験における全細菌の増殖速度は、現場水温では 0.0504 h^{-1} 、プラス 5℃培養では 0.0780 h^{-1} 、プラス 10℃では 0.0852 h^{-1} であった。11 月と 4 月の培養実験においては、現場水温培養に比べ水温を上昇させた培養のほうが全細菌の増殖速度が大きかったが、プラス 5℃とプラス 10℃培養における全細菌の増殖速度の間にはほとんど差が見られなかった。一方、8 月の培養実験における全細菌の増殖速度は、現場水温では 0.149 h^{-1} 、プラス 5℃培養では 0.165 h^{-1} 、プラス 10℃培養では 0.160 h^{-1} と大きい増殖速度の値を示したが、3 つの培養温度における全細菌の増殖速度の間にはほとんど差が見られなかった。

11 月と 4 月の培養実験は、似たような温度で行われたが、11 月の方が温度上昇による全細菌の増殖速度の増大が明らかに大きかった。

4. FISH 法による細菌の群集構造の解析

11 月に行った培養実験における細菌の群集構造を図7、4 月に行った培養実験における細菌の群集構造を図8、8 月に行った培養実験における細菌の群集構造を図9に示した。以後ドメイン・バクテリアを EUB、ドメイン・アーキアを ARC、 α -プロテオバクテリアを ALF、 β -プロテオバクテリアを BET、 γ -プロテオバクテリアを GAM、*Cytophaga/Flavobacterium* group を CF、*Vibrio cholerae* を CHO.1 と表記する。

培養前における細菌の群集構造と現場水温培養における細菌の群集構造を比較すると、大きな違いがあった。

培養前における EUB と ARC の割合の合計(以後 FISH 検出率と表記)は、11 月の培養実験では 64%、4 月の培養実験では 62%、8 月の培養実験では 15%であった。現場水温培養における FISH 検出率は、11 月の培養実験では 91%、4 月の培養実験では 78%、8 月の培養実験では 71%と培養前に比べ高い値を示した(図7, 8, 9)。

11 月の培養前は、CF が 14.9%、BET が 12.1%、ALF が 9.32%と高い割合を示し、ARC が 3.78%、GAM が 3.24%と低い割合を示した。現場水温培養後は、培養前に割合が高かった BET と ALF がそれぞれ 6.58%と 3.79%へと低くなり、培養前に割合の低かった ARC と GAM の割合がそれぞれ 10.5%と 20.4%へと高まった。CF の割合は培養後 16.8%とやや増加した(図7)。

4 月の培養前は、各グループの割合がほとんど同じであったが、CF の割合 8.0%と若干高く、BET の割合が 3.5%と若干低かった。現場水温培養後の割合は GAM が 5.7%から 12%へ、CF が 8.0%から 16%へ、BET が 3.5%から 5.9%へと高まり、ALF の割合は培養前(6.2%)と培養後(6.4%)でほとんど変化がなかった(図8)。

8 月の培養前は、ALF が 7.5%、CF が 4.3%と高い割合を示し、GAM が 1.0%、BET が 0.83%と低い割合を示した。現場水温培養後の割合は ALF が 15%へ、BET が 24%へ、GAM が 26%へと高まった。CF の割合は 2.3%へと低下した(図9)。

次に培養後の各温度における細菌の群集構造を比較する。

11 月の培養実験におけるプラス 5℃培養の細菌の群集構造は、現場水温培養に比べ、ALF の割合が 14.5%と高く、ARC が 3.02%、CF が 11.1%と低かった。プラス 10℃培養の細菌の群集構造は、プラス 5℃培養に比べ、GAM の割合が 33.3%と高く、ARC が 0.944%、CF が 3.91%と低かった(図7)。

4 月の培養実験におけるプラス 5℃培養の細菌の群集構造は、現場水温培養に比べて ALF の割合が 10%と高く、CF の割合が 13%と低かった。プラス 10℃培養の細菌の群集構造は、プラス 5℃培養の細菌の

群集構造と比べ、GAM が 30%、BET が 12%と高く、ALF が 6.3%、CF が 7.6%と低かった(図8).

8 月の培養実験におけるプラス 5℃培養の細菌の群集構造は、現場水温培養と比べ、GAM が 51%と高く、BET が 15%と低かった. プラス 10℃培養の細菌の群集構造は、プラス 5℃培養に比べて BET が 23%と若干高かっただけで大きな違いはなかった(図9).

CHO.1 は 3 回の実験において、検出限界以下であった. また、ARC は 4 月と 11 月の培養実験において検出限界以下であった(表5).

8 月の培養実験におけるプラス 5℃とプラス 10℃培養において、EUB である ALF と BET と GAM と CF の割合の合計は、EUB の割合より高くなった(プラス 5℃: EUB71%, グループの合計 86%, プラス 10℃: EUB73%, グループの合計 89%)(図7, 8, 9).

8 月の培養実験における培養前の FISH 検出率は、11 月と 4 月に比べかなり低かった(11 月: 64%, 4 月: 62%, 8 月: 15%)(図7, 8, 9).

5. 各グループの増殖速度の変化

各培養実験におけるグループごとの増殖速度を図 10 に示した.

11 月の現場水温培養(16.4℃)における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0339h^{-1})に比べ、GAM が 0.0722h^{-1} , ARC が 0.0599h^{-1} , CF が 0.0364h^{-1} と大きく、BET が 0.0212h^{-1} , ALF が 0.0151h^{-1} と小さかった. プラス 5℃培養における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0542h^{-1})に比べ、GAM が 0.0914h^{-1} , ALF が 0.0634h^{-1} と大きく、CF が 0.0497h^{-1} , BET が 0.0270h^{-1} , ARC が 0.0212h^{-1} と小さかった. プラス 10℃培養における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0485h^{-1})に比べ、GAM が 0.0969h^{-1} , ALF が 0.0590h^{-1} と大きく、BET が 0.0338h^{-1} , CF が 0.0207h^{-1} , ARC が 0.0147h^{-1} と小さかった. プラス 5℃培養における各グループの増殖速度は、現場水温培養に比べ、ALF, BET, GAM, CF が大きく、その中でも特に ALF が現場水温培養に比べ大きく、ARC の増殖速度は小さかった. プラス 10℃培養における増殖速度は、プラス 5℃培養に比べ BET と GAM の増殖速度は大きかったが、CF と ARC と ALF の増殖速度は小さく、その中でも特に CF の増殖速度は現場水温培養に比べ小さかった.

4 月の現場水温培養における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0361h^{-1})に比べ GAM が 0.0666h^{-1} , CF が 0.0656h^{-1} , BET が 0.0573h^{-1} と大きく、ALF が 0.0344h^{-1} と小さかった. プラス 5℃培養における各グループの増殖速度は、GAM が 0.0771h^{-1} , BET が 0.0700h^{-1} , CF が 0.0663h^{-1} , ALF が 0.0662h^{-1} と 4 つのグループすべてが全細菌の増殖速度(0.0462h^{-1})より大きかった. プラス 10℃培養における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0495h^{-1})に比べ GAM が 0.118h^{-1} , BET が 0.100h^{-1} と全細菌より大きく、ALF が 0.0489h^{-1} , CF が 0.0472h^{-1} と小さかった. プラス 5℃培養における各グループの増殖速度は、現場水温培養に比べ ALF, BET, GAM の増殖速度が大きく、その中でも特に ALF の増殖速度が現場水温培養に比べ大きかった. CF の増殖速度はほとんど変わらなかった. プラス 10℃培養における各グループの増殖速度は、プラス 5℃培養と比べ GAM と BET が大きく、ALF と CF が小さかった.

8 月の現場水温における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0918h^{-1})に比べ BET が 0.233h^{-1} , GAM が 0.227h^{-1} , ALF が 0.120h^{-1} と大きく、CF が 0.0647h^{-1} と小さかった. プラス 5℃培養における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0908h^{-1})に比べ GAM が 0.254h^{-1} , BET が 0.211h^{-1} , と ALF が 0.125h^{-1} と大きく、CF が 0.0825h^{-1} と小さかった. プラス 10℃培養における各グループの増殖速度は、全細菌(0.0844h^{-1})に比べ GAM が 0.247h^{-1} , BET が 0.223h^{-1} , と ALF が 0.107h^{-1} と大きく、CF が 0.0726h^{-1} と小さかった. プラス 5℃培養における各グループの増殖速度は、現場水温培養と比べ GAM と CF が大きく、ALF はほぼ同じで、BET の増殖速度は小さかった. プラス 10℃培養における増殖速度は、プラス 5℃培養に比べ BET が大きかったが、現場水温と比べると小さかった. また GAM はほぼ同じ値を示し、ALF と CF は小さかった. 8 月の各グループの増殖速度は、11 月と 4 月に比べ、特に GAM と BET の増殖速度が大きく、ALF と CF の増殖速度との差が大きかった.

以上の結果をまとめると、1)GAM は 16.4℃～30.6℃, 2)BET は 16.4℃～28.0℃, 3)ALF は 16.4℃～23.0℃, 4)16.4℃～21.4℃までの水温上昇により増殖速度が増大した. 5)ARC は 16.4℃～26.4℃の水温

上昇により増殖速度が小さくなった。6)海水温が上昇するにつれて、GAM と BET の増殖速度が増大し、ALF と CF の増殖速度との差が大きくなった。

IV. 考察

1. 環境データ

4月のクロロフィル *a* 濃度は11月と8月と比べ5倍近い値を示した。また、顕微鏡観察において、多くの藻類が観察された。これらの結果から、4月の清水港内表層においてプランクトンブルームが起きていたことが考えられる。その植物プランクトンの光合成により4月の清水港内表層におけるpHと溶存酸素濃度は、11月と8月に比べ高い値を示したと考えられる。

8月の水温は11月と4月に比べ7~9℃高い値を示した。また、8月の塩分と電気伝導度は11月と4月に比べて低い値を示した。以上の結果から8月の清水港内表層の海水温が高いために水塊の鉛直混合が起こらず、河川からの塩分の低い水塊が分布していたのではないかと考えられる。

2. 全細菌に対する水温上昇の影響

3回行った実験において、培養により全細菌数はすべての実験系で増加した。特に培養開始から12時間の間で最も全細菌数が増殖し、それ以後は、全細菌の増殖が緩やかになった。8月の培養実験においては、24から48時間の間で全細菌数が減少した(図5)。これは、全細菌の増殖が、基質の制限や密度効果などにより弱まり、細菌の死滅要因がそれを上回ったためだと考えられる。本研究の培養実験では孔径1.0 μm のフィルターで濾過処理を行っているため、ここで言う死滅要因は、原生動物による捕食ではなく、ウイルスによる溶菌であると考えている(ウイルスについては調べていない)。

水温上昇により全細菌の増殖速度が劇的に増大したのは、11月の培養実験における16.4℃~21.4℃の水温上昇と4月の培養実験における18.0℃~23.0℃の水温上昇であった。それよりも高い水温上昇では若干増殖速度が増大するだけであった。また8月の培養実験における全細菌の増殖速度は大きい値を示したが、水温上昇による全細菌の増殖速度の変化はほとんど見られなかった(図6)。このことから、現場環境における細菌群集の増殖速度は21℃~23℃付近の水温上昇により急激に増大するが、それより高い水温上昇は現場環境における細菌群集の増殖速度に対して大きな増殖促進要因にならないことが考えられる。またこの結果は、海水温の低い夏以外の季節では、水温が細菌数をコントロールし、海水温の高い夏では基質の制限が細菌数をコントロールするのに重要だという Shiah (1993)の仮説を指示する。

11月と4月の培養実験における水温上昇に対する全細菌の増殖速度の変化を比較すると、同じような水温設定であったにもかかわらず、4月に比べ11月のほうが、水温上昇に対する増殖速度の増大の程度が大きかった(図6)。11月は水温が高い夏を経験し、そこから水温が低下する段階にある。一方4月は水温が低い冬を経験し、そこから水温が上昇する段階にある。そこから、11月では高い水温に適応しやすい細菌群集を残して、4月ではそれらが少なかったため、4月に比べ11月のほうが水温上昇に対する増殖速度の増大の程度が大きかったと考えられる。実際、培養前の細菌の群集構造において、水温上昇により増殖速度が増大したALFとBETとGAMの割合を合計した値は、4月(15.6%)より11月(24.7%)のほうが高かった(図7, 8)。

3. 細菌の群集構造の解析

CHO.1は3回の実験において全てのサブサンプル中で検出限界以下であった。また、ARCは4月と、11月の実験で検出限界以下であった(表5)。FISH法による群集構造の解析は、DAPIで染まった細菌を1視野につき約100細胞、20視野で約2000細胞カウントし、その中でプローブにハイブリダイズされた細菌を全体に対する割合として求めている。そこで、もし20視野中にハイブリダイズされた細菌が1つもなかった視野が11視野以上あった場合、そのサンプル中にハイブリダイズされた細菌がない確率のほうが高い。よって私は0.5%未満の値は信頼に値と考えている。

チェサピーク湾における細菌の季節的変化を追う調査(Heidelberg *et al.*, 2002a)において *Vibrio*

cholerae-*V. mimicus* の細胞数は、32cells/mL \sim 4.3 \times 10³cells/mL でドメイン・バクテリアの 0.01 \sim 0.3%を構成した。また、Glockner *et al.* (1999)は、Baltic Sea, North sea, Pacific Ocean, Antarctic OceanにおいてFISH法による細菌の群集構造の解析を行い、ドメイン・アーキアは水圏環境中に広く存在するが、細胞数は非常に少なく、North Sea で3%、Pacific Ocean で2%、その他の地域では検出限界以下であったことを報告している。これらの報告から、環境中に生息する *V. cholerae* とドメイン・アーキアの細胞数は非常に少ないことがわかる。本研究における検出方法は、全細菌のカウント数が少なかったため、検出限界以下という結果になったと考えられる。今後 *V. cholerae* とドメイン・アーキアの検出を行う場合、より多くの細菌をカウントする必要がある。また、*Vibrio cholerae* は藻類の粘質中に存在すること(Islam *et al.*, 1994)や、動物プランクトンに付着していること(Heidelberg *et al.*, 2002b)が知られている。今後、環境中において *Vibrio cholerae* を検出する場合、植物プランクトンや動物プランクトンに対する付着にも注目すべきである。

8月の培養実験におけるプラス5℃とプラス10℃培養において、EUBであるALFとBETとGAMとCFの割合の合計は、EUBの割合より高くなった(図7, 8, 9)。これは、EUB338プローブは1つのプローブで多種多様な細菌種をターゲットにしているため、ハイブリ条件に合わないEUBを検出できず、EUBを実際より過小評価していたためかもしれない。または、BET42aが γ -プロテオバクテリア、GAM42aが β -プロテオバクテリアにそれぞれ交差反応を示し(Manz *et al.*, 1992)、その結果GAMとBETを実際より過大評価していたかもしれない。

4. 現場環境と培養後における細菌の群集構造の比較

現場水温培養におけるFISH検出率は、11月の培養実験では91%、4月の培養実験では78%、8月の培養実験では71%であり、培養前におけるFISH検出率(11月: 64%、4月: 62%、8月: 15%)に比べ、高い値を示した(図7, 8, 9)。これは、培養により細菌のrRNA含有量が高まった、つまり、現場環境の細菌群集に比べ、培養条件下の細菌群集の活性が高かったことを示唆する。現場環境では捕食者が存在していたのに対して、培養条件下では捕食者が不在である。del Giorgio *et al.* (1996)は、原生動物による捕食圧は活性の低い細菌が存在するときより、活性の高い細菌が存在するほうが強いことを報告している。これらの結果と報告から、現場環境において捕食者が活性の高い細菌を選択的に捕食していたために、現場環境の細菌群集の活性が低く、培養条件下においては捕食者が不在であったために活性の高い細菌が増えたと考えられる。

各実験において、現場水温で培養することにより、細菌の群集構造が大きく変化した。注目すべき点は、培養前に最も割合の低かったグループが、培養後最も大きい割合を占めた点である(図7, 8, 9)。そこで、実験別に各グループの培養前の細菌数と現場水温における増殖速度との関係を図11に示した。どの実験においても、増殖速度が大きいグループほど、現場環境における細菌の群集構造において優占する結果にはならなかった。11月、8月、4月の培養実験におけるGAMと8月と4月の培養実験におけるBETは、増殖速度が大きいにもかかわらず現場環境において他のグループより細菌数が少なかった(青)。このことから、GAMとBETは環境に適応し増殖が促進しても、現場環境においてより強く捕食圧を受けるため、結果として細菌の群集構造における小さい部分を占めると考えられる。また、増殖速度が小さいグループは比較的細菌群集の大きい部分を占めた(緑)。このことから、増殖速度が小さいグループは、捕食圧から逃れやすく、現場環境における細菌の群集構造の比較的大きい部分を占めると考えられる。一方、11月と4月の培養実験におけるCF、8月の培養実験におけるALFは、増殖速度が比較的大きいのに細菌の群集構造において優占した(赤)。このことから、CFとALFは捕食圧から逃れるための何らかの戦略を持ち、現場環境において細菌群集の大きい部分を占めると考えられる。Pernthaler *et al.* (1997)は、湖水を用いて培養実験を行い、原生動物による細菌群集に対する捕食の影響を考察し、 β -プロテオバクテリアが、捕食圧を受けることによりフィラメント状になることで捕食から逃れることを報告した。本研究の研究サイトである清水港内表層でも多くのフィラメント状細菌が見られ、それはCFであった(図14 \sim 17)。CFはフィラメント状になることで捕食圧から逃れ、結果として海洋環境における細菌の群集構造において優占しているのかもしれない。

FISH 法による解析では、リボソーム含有量の低い細菌を検出することができない。現場環境における FISH 検出率は培養後における FISH 検出率より低かったことから、現場環境における FISH 法により解析した群集構造を過小評価していることが考えられる。Eilers et al. (2000)は、孔径 1.2μ フィルターで濾過した海水に、原核生物の細胞分裂を抑制する *nalidixic acid* を添加して培養し、細菌の群集構造の変化を FISH 法により調べた。その結果、GAM の細菌数だけ培養前に比べて増加したが、ALF と CF の細菌数は変動しないため、培養前最も少なかった GAM が培養後最も多くなった。このことから現場環境における GAM の細菌数は、他のグループより多いが、活性が低い状態で多く存在するため、FISH 法による解析では特に GAM を過小評価していることが考えられる。本研究では、GAM の割合は培養前割合が低い、培養後最も割合が高くなった。これはもしかしたら、培養により数が増えたわけではなく、培養前に活性の低かった細菌の活性が高まったため、検出率が高まったのかもしれない。そのため、GAM の増殖速度を過大評価している可能性もある。また、Eilers et al. (2000)の結果を考慮すると、GAM は捕食圧の存在する現場環境においては、活性の低い状態に保つことで捕食圧から逃れ、捕食圧のかからない環境においては、活性を高く保つ戦略を持っているのかもしれない。

ここでは、濾過海水を用いた培養実験における群集構造の変化から、現場環境における各グループに対する選択捕食とそれに対する戦略を議論してきた。しかしながら、実際にそれらが捕食されているかどうかを直接調べていないため、あくまで推論に過ぎない。

5. 各グループに対する水温上昇の影響

GAM は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 30.6^{\circ}\text{C}$ 、BET は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 28.0^{\circ}\text{C}$ 、ALF は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 23.0^{\circ}\text{C}$ 、CF は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 21.4^{\circ}\text{C}$ までの水温上昇により増殖速度が増大し、ARC は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 26.4^{\circ}\text{C}$ の水温上昇により増殖速度が小さくなった。また、海水温が上昇するにつれて、GAM と BET の増殖速度が増大し、ALF と CF の増殖速度との差が大きく開いた(図 11)。

この結果より、地球温暖化に伴う海水温の上昇が起こると、中部日本の沿岸海洋における細菌の群集構造では、GAM と BET が優占することが予想される。しかしながら、水圏環境における細菌の群集構造は、増殖速度だけでは判断できない。現場環境において細菌は原生動物により捕食されているためである。本研究において、GAM と BET は現場環境において、捕食圧を強く受けていたことが示唆された。逆に ALF と CF は捕食圧を弱く受けることが示唆された。これらのことから、海水温の上昇により、GAM と BET は増殖速度が促進されるが他のグループより捕食圧を強く受けること、CF と ALF は水温上昇により増殖があまり促進されないが、捕食圧をあまり受けないこと、結果として海水温が上昇しても、細菌の群集構造は変動しないのではないかと予想される。しかし、これはあくまで予想に過ぎない。それは、原生動物による捕食圧が細菌に対してどの程度影響を及ぼしているのか、また、海水温の上昇により、細菌捕食者である原生動物がどのような挙動を示すのかがわかっていないからである。

V. まとめ

- 海水温の上昇により、全細菌の増殖速度は増大した。現場環境における細菌群集の増殖速度は $21^{\circ}\text{C}\sim 23^{\circ}\text{C}$ 付近の水温上昇により急激に増大するが、それより高い水温上昇は現場環境における細菌群集の増殖速度に対して大きな増殖促進要因にならないことが考えられる。
- 現場環境において、増殖速度が大きいグループが、細菌群集の優占種になることはなかった。これは増殖速度が大きい GAM と BET は現場環境においてより強く捕食圧を受け、増殖速度が小さいグループは、捕食圧から逃れやすく、CF と ALF は増殖速度が比較的大きくても捕食圧から逃れる何らかの戦略を持っているためと考えられる。
- 水温上昇によるグループごとの増殖速度の変化は異なった。GAM は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 30.6^{\circ}\text{C}$ 、BET は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 28.0^{\circ}\text{C}$ 、ALF は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 23.0^{\circ}\text{C}$ 、 $16.4^{\circ}\text{C}\sim 21.4^{\circ}\text{C}$ までの水温上昇により増殖速度が増大し、ARC は $16.4^{\circ}\text{C}\sim 26.4^{\circ}\text{C}$ の水温上昇により増殖速度が小さくなった。また、海水温が上昇するにつれて、GAM

と BET の増殖速度が増大し, ALF と CF との差が大きく開いたことから, 海水温の上昇により増殖がより促進されるのは GAM と BET だということが考えられる.

VI. 今後の課題

- 8月の培養実験におけるプラス5℃とプラス10℃培養において, EUBであるALFとBETとGAMとCFの割合の合計がEUBの割合より高くなったことから, BET42aが γ -プロテオバクテリア, GAM42aが β -プロテオバクテリアにそれぞれ交差反応を示し(Manz *et al.*, 1992), GAMとBETを過大評価していた可能性が考えられる. そこで, GAM42aとBET42aにそれぞれ蛍光色素をラベルしないBET42aとGAM42a(competitor)を加えてハイブリダイゼーションを行い, 交差反応があったのかどうかを確認する.
- Vibrio cholerae*の検出はYoung-tae *et al.* (1996)による方法を用いて行った. しかし著者からそのHBは古い論文を参考にしているため, TrisベースのHBを用いたほうが良いと指摘された. そこでCHO.1プローブの塩基配列からハイブリダイズの温度とTrisベースのHBとWSの組成を計算し, *Vibrio cholerae*の菌株に対してハイブリダイゼーションを行い検討する.
- 本研究においては濾過海水を用いて水温を変化させた培養実験を行った. そのため, 水温変化に対する細菌の増殖速度の変化を見ることができた. しかし, 現場環境において細菌は原生動物に捕食されているため, 水温上昇による群集構造の変動を見積もるためには, 水温上昇により原生動物の捕食圧がどのように変わるのか, 加えて細菌サイズがどのように変化するかを調べる必要がある.
- 本研究の培養実験では濾過海水を用いているため, 浮遊性細菌しかターゲットにしていない. 付着細菌において優占するグループは γ -プロテオバクテリアと *Cytophaga/Flavobacterium* group である(DeLong *et al.*, 1993). また, サイズ選択捕食の観点から考えると, 付着細菌は原生動物からの捕食を受けにくいだろう. 今後は付着細菌に注目することも重要である.

VII. 引用文献

- Amann, R. I., Binder, J. R., Olson, R. J., Chrischold, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A., 1990, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, **56**, 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H., 1995, Phylogenetic Identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.
- Bouvier, T. C. and del Giorgio, P. A., 2002, Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, **47**, 453-470.
- Chrzanowski, T. M. and Simek, K., 1990, Prey-size selection by freshwater flagellated protozoa. *Limnology and Oceanography*, **35**, 1429-1436.
- Colwell, R. R., 1996, Global climate change and infectious disease: The cholera paradigm. *Science*, **274**, 2025-2031.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L., 2000, Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5116-5122.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L., 2000, Natural assemblage of marine proteobacteria and members of *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1692-1697.

- del Giorgio, P. A., Gasol, J. M., Vaquer, D., Mura, P., Agusti, S. and Duarte, C. M., 1996, Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography*, **41**, 1169-1179.
- DeLong, E. D., Franks, D. G. and Alldredge, A. L., 1993, Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*, **38**, 924-934.
- DeLong, E. F., Wichham, G. S. and Pace, N. R., 1989, Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science*, **243**, 1360-1363.
- Eilers, H., Pernthaler, J. and Amann, R., 2000, Succession of pelagic Marine Bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shift. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4634-4640.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E., Olsen, G. J. and Pace, N. R., 1988, Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cell. *Journal of Bacteriology*, **170**, 720-726.
- Glockner, F. O., Fuchs, B. M. and Amann, R., 1999, Bacterioplankton composition of lakes and oceans: A first comparison based on Fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3721-3726.
- Hahn, M. W. and Hofle, M. G., 1999, Flagellate predation on bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4863-4872.
- Heidelberg, J. H., Heidelberg, K. B. and Colwell, R. R., 2002a, Seasonality of Chesapeake bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5488-5497.
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B. and Colwell, R. R., 2002b, Bacteria of the γ -subclass *Ploteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake bay. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5498-5507.
- Islam, M. S., Drasar, B. S. and Sack, R. B., 1994, Probable role of blue-green algae in maintaining endemicity and Seasonality of cholera in Bangladesh: a hypothesis. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, **12**(4), 245-256.
- Kjelleberg, S., Hermansson, M., Marden, P. and Jones, G. W., 1987, The transient phase between growth and non growth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annual Review Microbiology*, **41**, 25-49.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K.-H., 1996, Application of a suite of 16SrRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacterioides in natural environment. *Microbiology*, **142**, 1097-1106.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H., 1992, Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria; problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 593-600.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Nishimura, M., Kita-Tsukamoto, K., Kogure, K. and Ohwada, K., 1992, Enumerations of *Vibrio cholerae* in aquatic environments by MPN-16S rRNA hybridization method. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, **7**, 43-46.
- 西條八束, 三田村緒佐武, 1995, 新編 湖沼調査法, 講談社, 東京, 189-191p.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R. and Psenner, R., 1997, Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, **63**, 596-601.
- Pinhassi, J. and Hagstrom, A., 2000, Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 245-256.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S., 1980, The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnology and Oceanography*, **25**, 943-948.
- Sherr, B. F., Sherr, E. B. and McDaniel, J., 1992, Effect of protists on grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2381-2385.
- Shiah, F. -K., 1993(MS), Multi-scale variability of bacterioplankton abundance, production and growth rates in the temperate estuarine ecosystems. University of Maryland.
- Stahl, D. A., and Amann, R., 1991, Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, New York, 205-248.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. and Painter, P. R., 共著, 高橋甫, 斎藤日向, 手塚泰彦, 水島昭二, 山口英世, 共訳, 1989, 微生物学 [上] 原書第 5 版, 培風館, 東京, 168p.
- Suzuki, M. T., 1999, Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 261-272.
- Young-Tea, P., Nishimura, M. and Ohwada, K., 1997, Detection and enumeration of marine sulfate-reducing bacteria using in situ hybridization with 16S rRNA oligonucleotide probes. *Fisheries Science*, **63**(1), 99-104.



図1. サンプルングポイント
静岡県静岡市清水港内(北緯 $35^{\circ} 00' 55''$, 東経 $138^{\circ} 30' 58''$)

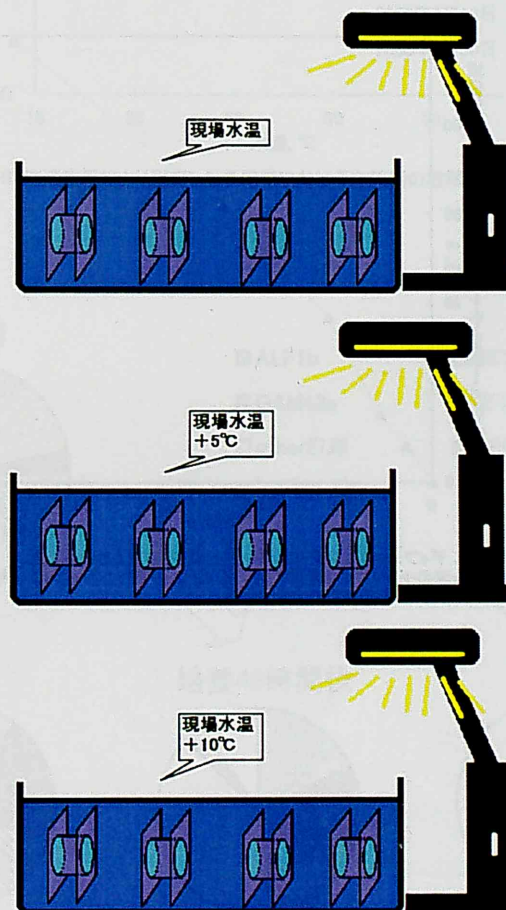


図2. 培養実験の模式図

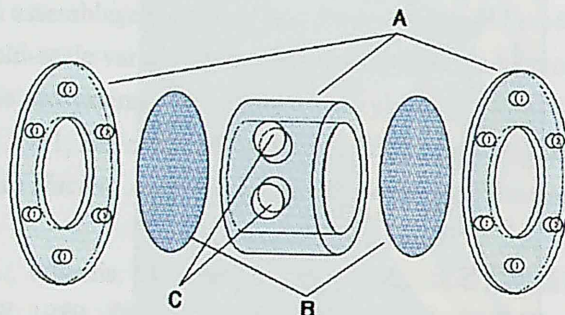


図3. ディフュージョンチャンバーの模式図。Aはアクリル製ディフュージョンチャンパー、Bは孔径 $0.2\mu\text{m}$ ヌクレポアフィルター、Cはサンプル孔を示す。蓋の部分の小さな穴にネジを反対側の蓋まで通し、ビスで留め固定する。

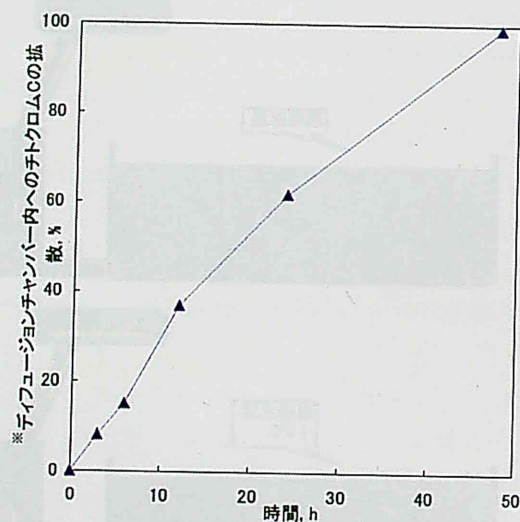


図4. ディフュージョンチャンパー内へのチトクロムCの拡散速度
※外液のチトクロムC濃度に対するディフュージョンチャンパー内のチトクロムC濃度の割合で示される。

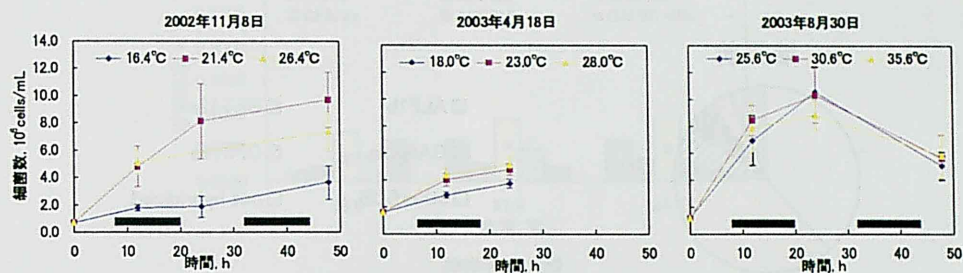


図5. 培養実験における全細菌数の変化。黒いバーは暗条件の期間を示す。

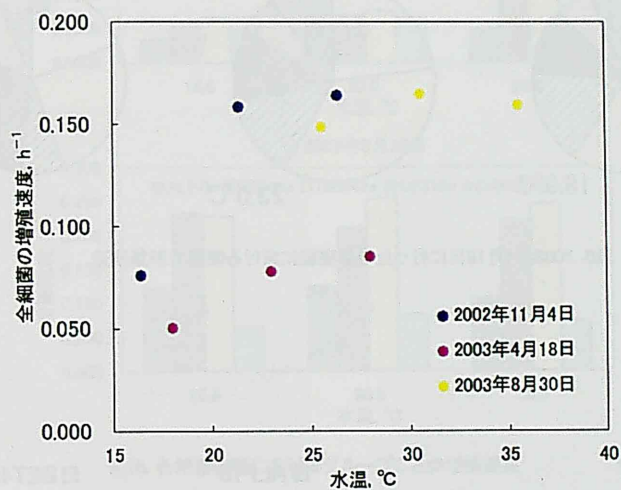


図6. 培養実験により測定した各温度における全細菌の増殖速度

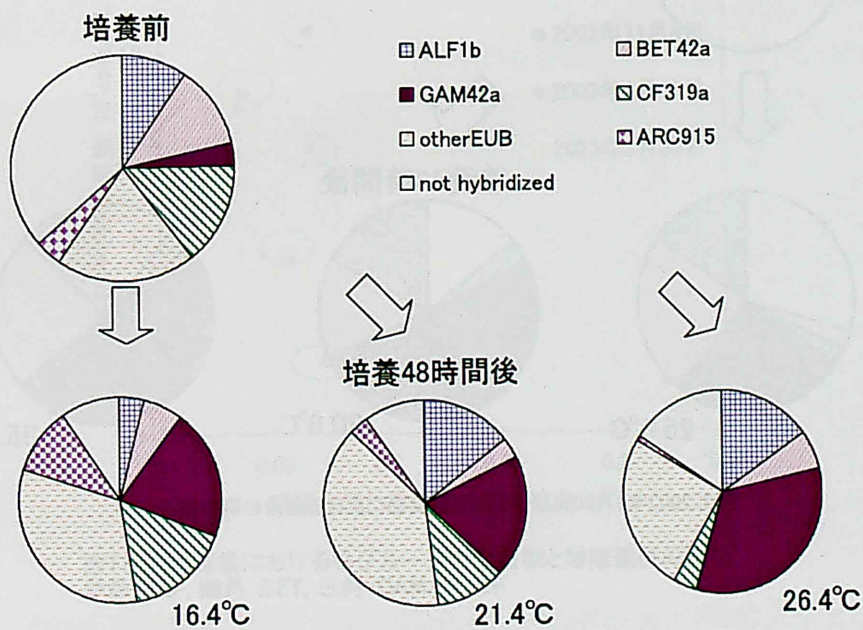


図7. 2002年11月8日に行った培養実験における細菌の群集構造

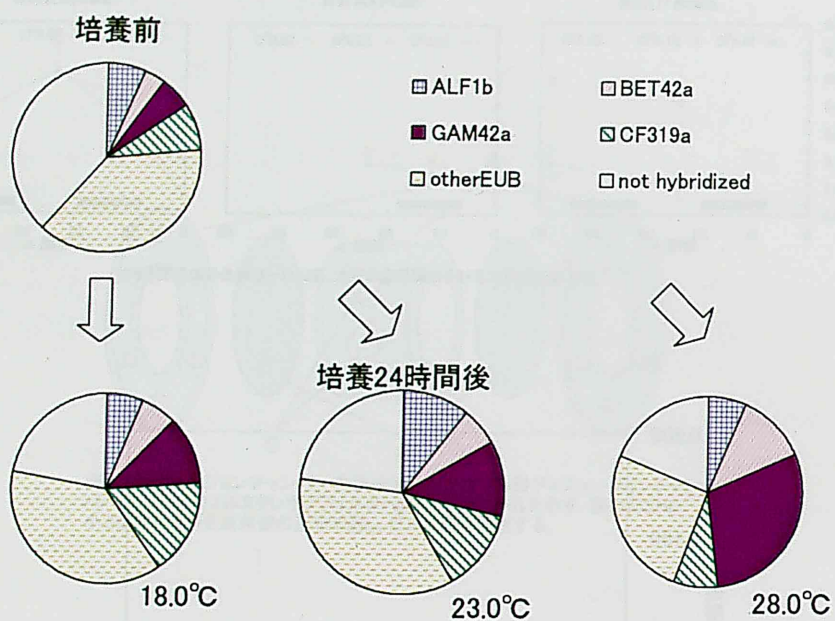


図8. 2003年4月18日に行った培養実験における細菌の群集構造

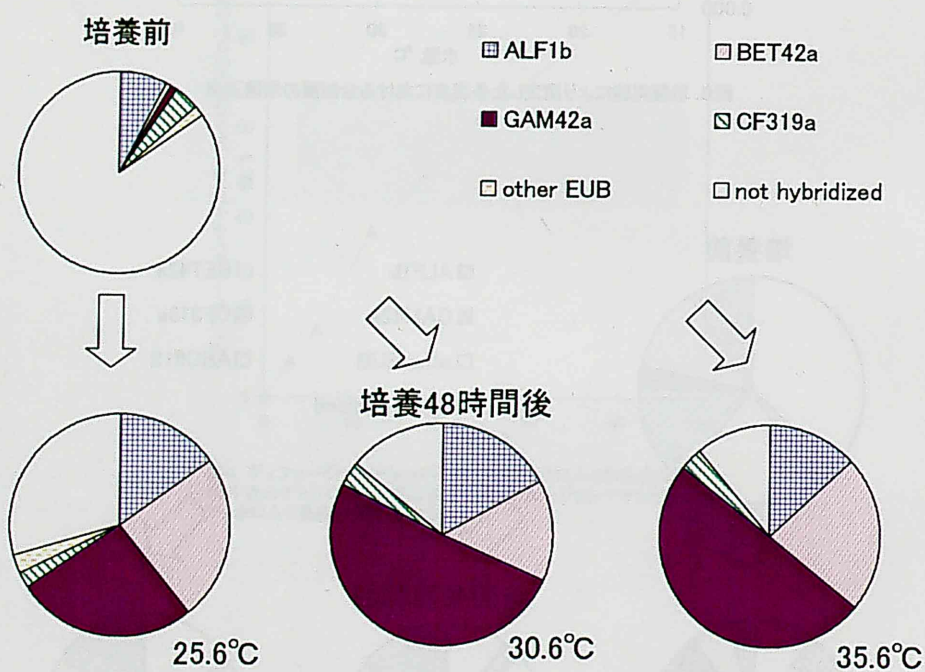


図9. 2003年8月30日に行った培養実験における細菌の群集構造

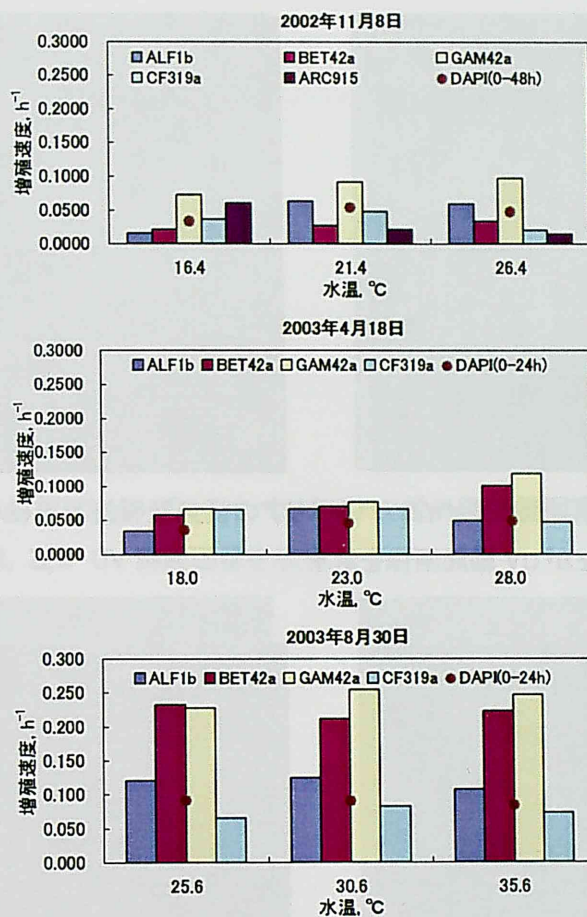


図10. 各培養実験におけるグループごとの増殖速度

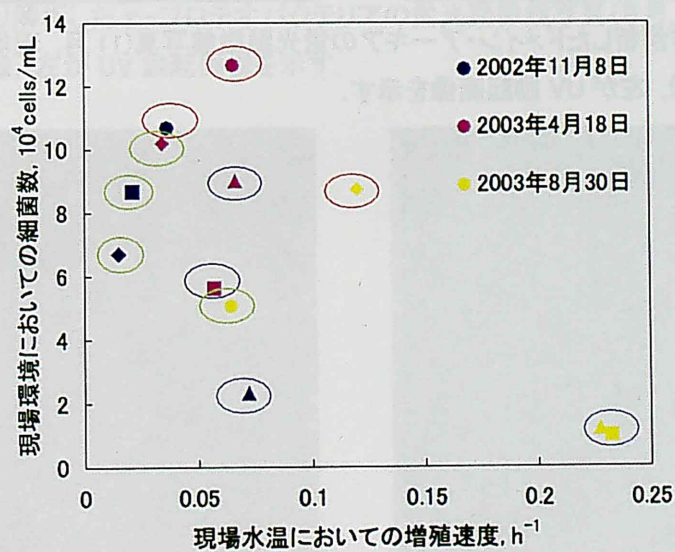


図11. 現場環境における各グループの細菌数と増殖速度の関係.
菱形: ALF, 四角: BET, 三角: GAM, 丸: CF

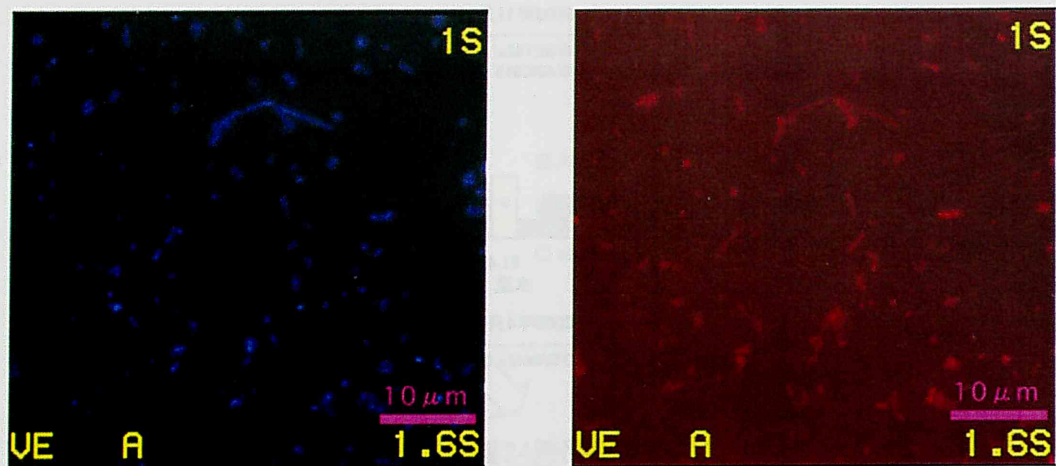


図 12. FISH 法により解析したドメイン・バクテリアの蛍光顕微鏡写真(8月, +5°C培養後). 右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

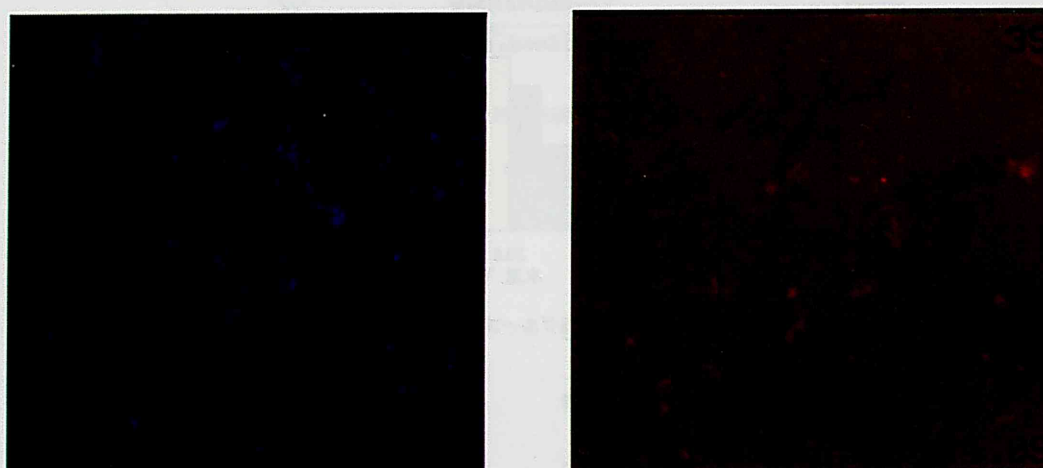


図 13. FISH 法により解析したドメイン・アーキアの蛍光顕微鏡写真(11 月, 現場水温培養後). 右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

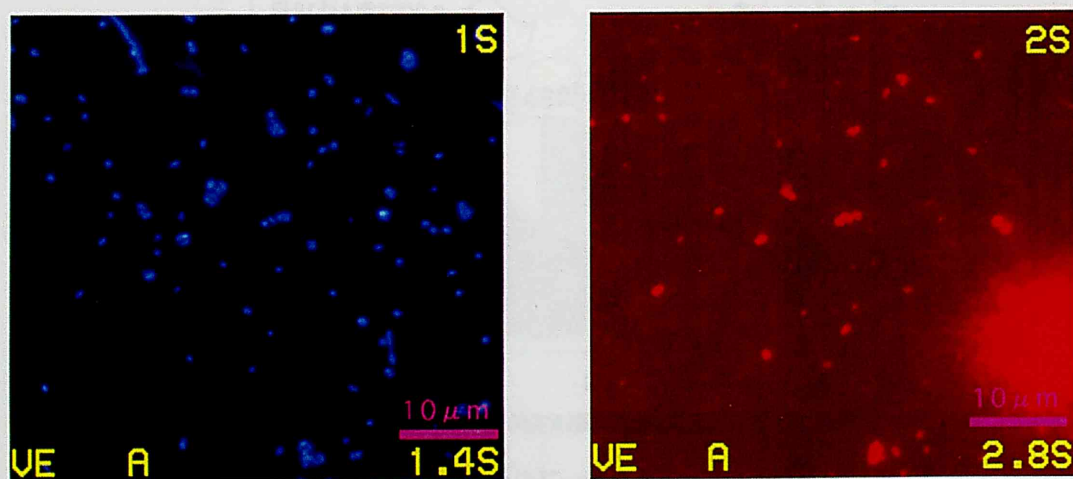


図 14. FISH 法により解析した α -プロテオバクテリアの蛍光顕微鏡写真(8月, +5°C培養後). 右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

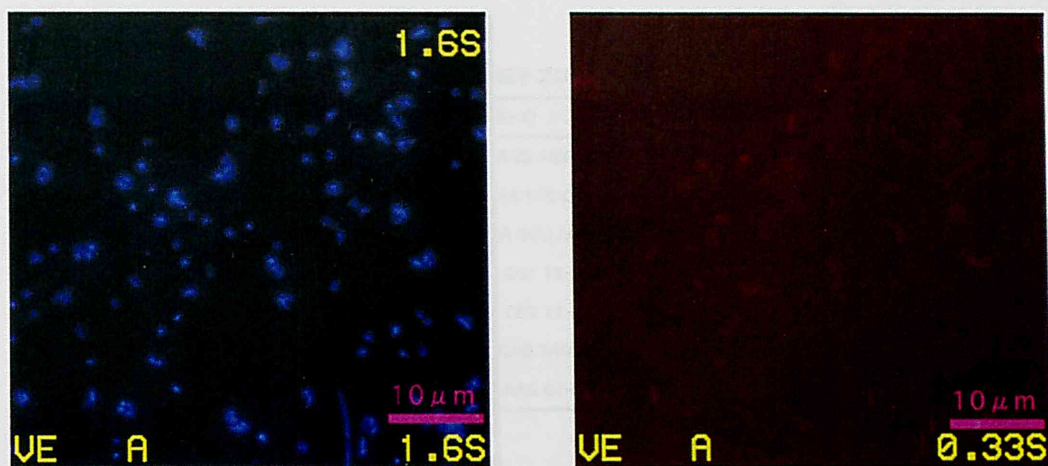


図 15. FISH 法により解析した β -プロテオバクテリアの蛍光顕微鏡写真(8月, 現場水温培養後).
右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

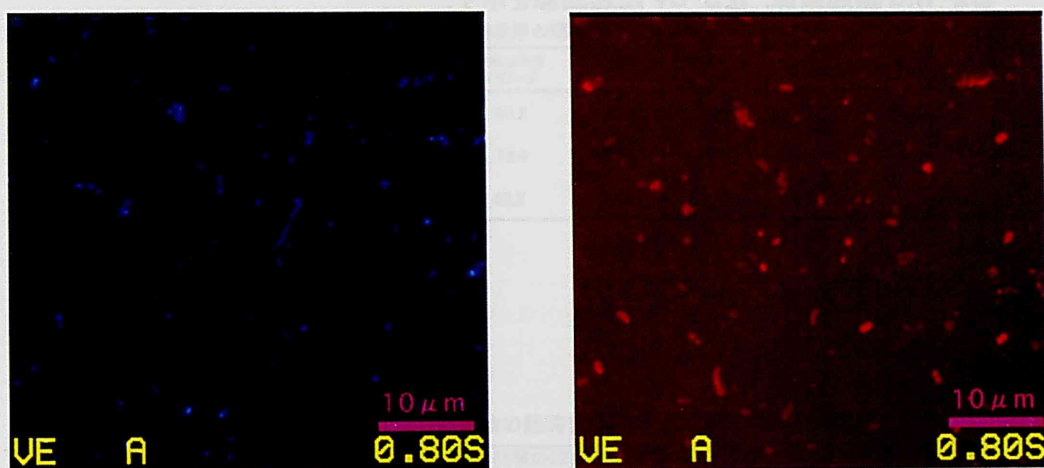


図 16. FISH 法により解析した γ -プロテオバクテリアの蛍光顕微鏡写真(8月, +5°C培養).
右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

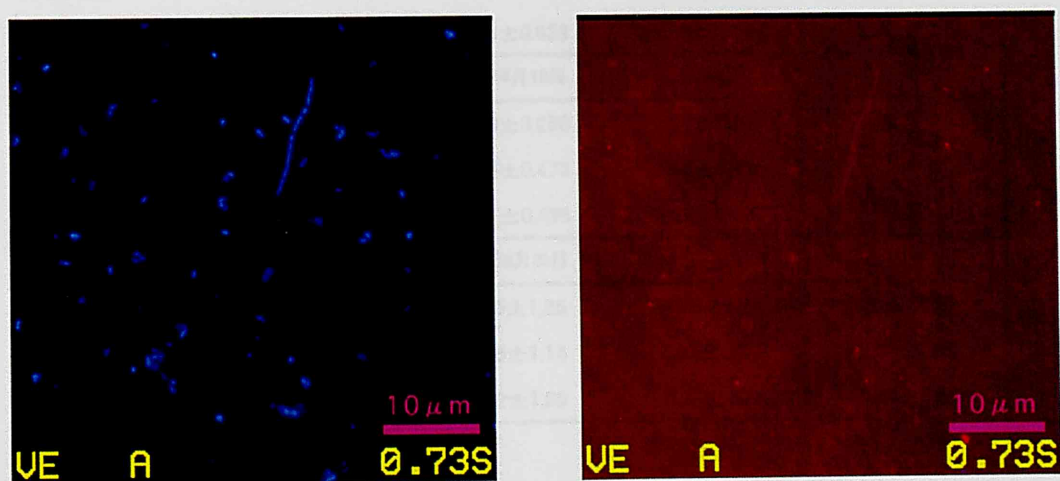


図 17. FISH 法により解析した Cytophaga/Flavobacterium group の蛍光顕微鏡写真.
右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

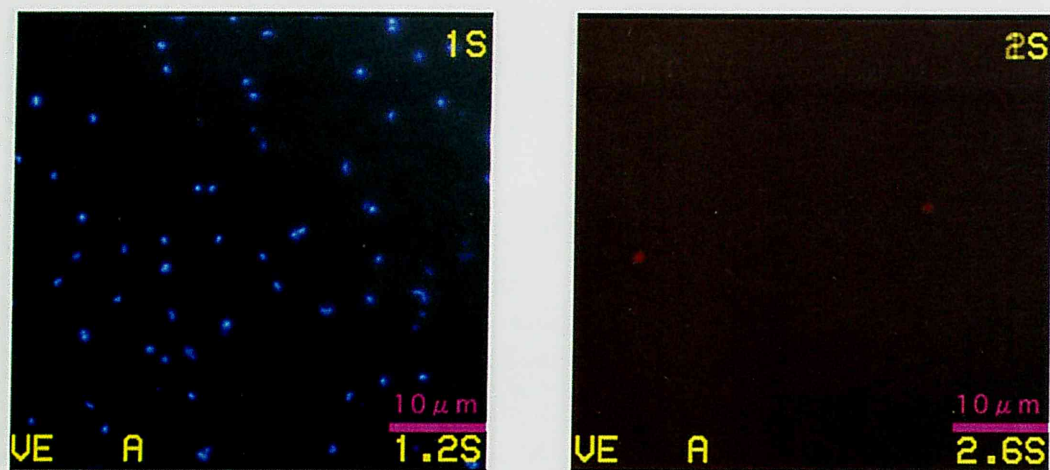


図 18. FISH 法により解析した *Vibrio cholerae* の蛍光顕微鏡写真(8月, 培養前).
右が WIG 励起画像, 左が UV 励起画像を示す.

表1. FISH法で用いた遺伝子プローブの塩基配列

Probe	Specificity	Probe sequence(5'-3')	target site* rRNA Position	Reference
EUB338	domain Bacteria	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	16S, 338-355	Amman et al., 1990
ARC915	domain Archaea	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'	16S, 915-935	Stahl and Amann, 1991
ALF1b	α -Proteobacteria	5'-CGT TCG (C/T)TC TGA GCC AG-3'	16S, 19-35	Manz et al., 1992
BET42a	β -Proteobacteria	5'-GCC TTC CCA CTT CGT TT-3'	23S, 1027-1043	Manz et al., 1992
GAM42a	γ -Proteobacteria	5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'	23S, 1027-1043	Manz et al., 1992
CF319a	Cytophaga / Flavobacterium group	5'-TGG TCC GTG TCT CAG TAC-3'	16S, 319-336	Manz et al., 1996
CHO.1	Vibrio cholerae	5'-CGT CAA ATG ATT AAG GT-3'	16S, 468-484	Nishimura et al., 1992

*Escherichia coli numbering(Brosius et al., 1981)

表2. サンプルング時における清水港内表層の環境データ. n.d.はno dataを示す.

Date	温度(°C)	塩分(‰)	pH	電気伝導度 (mS/cm)	溶存酸素濃度 (mg/L)	クロロフィルa (mg·chl.a·m ⁻³)	NO ₃ ⁻ (μg/L)	PO ₄ ³⁻ (μg/L)
2002/11/8	16.4	31.1	7.39	60.2	8.30	1.90	122.5	27.1
2003/4/18	18.0	31.6	8.04	73.4	10.26	10.90	n.d.	n.d.
2003/8/30	25.6	28.1	7.56	43.5	7.85	2.07	n.d.	n.d.

表3. 培養実験における全細菌数の経時変化. n.d.はno dataを示す.

培養条件	培養前の細菌数 (10 ⁶ cells/mL)	培養12時間後の細菌数 (10 ⁶ cells/mL)	培養24時間後の細菌数 (10 ⁶ cells/mL)	培養48時間後の細菌数 (10 ⁶ cells/mL)
2002年11月8日				
現場水温(16.4°C)	0.720±0.195	1.79±0.255	1.88±0.774	3.65±1.22
現場水温+5°C(21.4°C)	0.720±0.195	4.82±1.48	8.14±2.75	9.72±2.04
現場水温+10°C(26.4°C)	0.720±0.195	5.16±0.928	n.d.	7.39±1.38
2003年4月18日				
現場水温(18.0°C)	1.59±0.197	2.90±0.250	3.77±0.335	n.d.
現場水温+5°C(23.0°C)	1.59±0.197	4.04±0.475	4.80±0.413	n.d.
現場水温+10°C(28.0°C)	1.59±0.197	4.41±0.438	5.20±0.487	n.d.
2003年8月30日				
現場水温(25.6°C)	1.17±0.147	6.95±1.85	10.6±1.84	5.08±1.02
現場水温+5°C(30.6°C)	1.17±0.147	8.45±1.14	10.3±2.07	5.66±1.69
現場水温+10°C(35.6°C)	1.17±0.147	7.92±1.85	8.85±1.04	5.87±1.63

表4. 培養実験における全細菌の増殖速度. n.d.はno dataを示す.

培養条件	0~12時間後 の増殖速度(h ⁻¹)	0~24時間後 の増殖速度(h ⁻¹)	0~48時間後 の増殖速度(h ⁻¹)
2002年11月8日			
現場水温(16.4℃)	0.0761	0.0400	0.0339
現場水温+5℃(21.4℃)	0.159	0.101	0.0542
現場水温+10℃(26.4℃)	0.164	n.d.	0.0485
2003年4月18日			
現場水温(18.0℃)	0.0504	0.0361	n.d.
現場水温+5℃(23.0℃)	0.0780	0.0462	n.d.
現場水温+10℃(28.0℃)	0.0852	0.0495	n.d.
2003年8月30日			
現場水温(25.6℃)	0.149	0.0918	0.0306
現場水温+5℃(30.6℃)	0.165	0.0908	0.0329
現場水温+10℃(35.6℃)	0.160	0.0844	0.0336

表5. 培養実験における細菌の群集構造. n.d.はnot detectedを示す.

培養条件	EUB338(%)	ARC915(%)	ALF1b(%)	BET42a(%)	GAM42a(%)	CF319a(%)	CHO1(%)
2002年11月8日							
培養前	60	3.87	9.32	12.1	3.24	14.9	n.d.
現場水温(16.4℃)	80.1	10.5	3.79	6.58	20.4	16.8	n.d.
培養48時間後 現場水温+5℃(21.4℃)	87.3	3.02	14.5	3.26	19.3	11.0	n.d.
現場水温+10℃(26.4℃)	83.6	0.944	15.4	5.94	33.0	3.91	n.d.
2003年4月18日							
培養前	62	n.d.	6.4	3.5	5.7	8.0	n.d.
現場水温(18.0℃)	78	n.d.	6.2	5.9	12	16	n.d.
培養24時間後 現場水温+5℃(23.0℃)	77	n.d.	10	6.3	12	13	n.d.
現場水温+10℃(28.0℃)	81	n.d.	6.3	12	30	7.6	n.d.
2003年8月30日							
培養前	15	n.d.	7.5	0.83	1.0	4.3	n.d.
現場水温(25.6℃)	71	n.d.	15	24	26	2.3	n.d.
培養24時間後 現場水温+5℃(30.6℃)	71	n.d.	17	15	51	3.6	n.d.
現場水温+10℃(35.6℃)	73	n.d.	13	23	50	3.3	n.d.

表6. 培養実験におけるグループごとの増殖速度. n.d.はnot detectedを示す.

培養条件	ALF1b 増殖速度(h ⁻¹)	BET42a 増殖速度(h ⁻¹)	GAM42a 増殖速度(h ⁻¹)	CF319a 増殖速度(h ⁻¹)	ARC915 増殖速度(h ⁻¹)
2002年11月8日					
現場水温(16.4℃)	0.0151	0.0212	0.0722	0.0364	0.0599
現場水温+5℃(21.4℃)	0.0634	0.0270	0.0914	0.0479	0.0212
現場水温+10℃(26.4℃)	0.0590	0.0338	0.0969	0.0207	0.0147
2003年4月18日					
現場水温(18.0℃)	0.0344	0.0573	0.0666	0.0656	n.d.
現場水温+5℃(23.0℃)	0.0662	0.0700	0.0771	0.0663	n.d.
現場水温+10℃(28.0℃)	0.0489	0.100	0.118	0.0472	n.d.
2003年8月30日					
現場水温(25.6℃)	0.120	0.233	0.227	0.0647	n.d.
現場水温+5℃(30.6℃)	0.125	0.211	0.254	0.0825	n.d.
現場水温+10℃(35.6℃)	0.107	0.223	0.247	0.0726	n.d.

成果 4

沿岸海洋における浮遊性古細菌の生態

田代 智一・加藤 憲二

目 次

Abstract	i
はじめに	1
方法	2
1. サンプルング	2
2. 環境データの測定	2
3. 全菌数の直接計数	2
3-1. サンプルの固定	2
3-2. DAPI 染色によるプレパラートの作成	2
3-3. 蛍光顕微鏡下での全菌数の計数	3
3-4. 全菌数の求め方	3
4. FISH 法による細菌の群集構造の解析	3
4-1. サンプルの固定	3
4-2. 細菌の濃縮と脱水	3
4-3. 淡青丸航海におけるサンプルの固定	4
4-4. 遺伝子プローブ	4
4-5. Whole cell in situ hybridization	4
4-6. 試料の観察	4
結果	5
1. 環境データ	5
1-1. 清水港沖合い St. 3	5
①水温	5
②pH	5
③溶存酸素濃度	5
④塩分	5
⑤電気伝導度	5
⑥溶存有機炭素	5
⑦栄養塩濃度	5
⑧クロロフィル <i>a</i> 濃度	6
1-2. 駿河湾 St. 4	6
2. 細菌の群集構造	6
2-1. 清水港沖合い St. 3	6
①2004 年 8 月 31 日	6
②2004 年 12 月 1 日	7
③2005 年 4 月 15 日	7
④2005 年 8 月 2 日	8
2-2. 駿河湾 St. 4(2005 年 12 月 15 日)	8
考察	9
1. 環境データ	9
1-1. 清水港沖合い St. 3	9
1-2. 駿河湾 St. 4	9
2. 細菌の群集構造	10
2-1. 全菌数	10
2-2. ドメイン・バクテリア	11
2-3. γ -プロテオバクテリア	11
2-4. ドメイン・アーキア	12
まとめ	13
今後の課題	13
引用文献	13

図の目次

図1. 清水港沖合いにおけるサンプルング地点	1
図2. 駿河湾におけるサンプルング地点	1
図3. 清水港沖合い St. 3 における水温, pH, 溶存酸素濃度, 塩分, 電気伝導度の鉛直分布	2
図4. 清水港沖合い St. 3 における溶存有機炭素, 栄養塩濃度の鉛直分布	2

図5. 駿河湾 St. 4 における水温, 溶存酸素濃度, 電気伝導度, 塩分, クロロフィル <i>a</i> 濃度の鉛直分布	3
図6. 駿河湾 St. 4 における栄養塩濃度の鉛直分布	3
図7. 清水港沖合い St. 3 における細菌の群集構造	4
図8. 清水港沖合い St. 3 における各細菌の全菌数に対する割合	4
図9. 駿河湾 St. 4 における細菌の群集構造と各細菌の全菌数に対する割合	5
図10. FISH 法によって検出される細菌群集の概念図	5
図11. ドメイン・バクテリアの蛍光顕微鏡画像	6
図12. ドメイン・アーキアの蛍光顕微鏡画像	6
図13. γ -プロテオバクテリアの蛍光顕微鏡画像	6

表の目次

表1. FISH 法で用いた遺伝子プローブの塩基配列	1
表2. 各プローブのハイブリダイゼーション緩衝液, 洗浄溶液の組成と Hybridization, Washing 条件	1
表3. 清水港沖合い St. 3 における水温, pH, 溶存酸素濃度, 塩分, 電気伝導度	2
表4. 清水港沖合い St. 3 における溶存有機炭素, 栄養塩濃度	3
表5. 駿河湾 St. 4 における環境データ	4
表6. 清水港沖合い St. 3 における細菌の群集構造	4
表7. 清水港沖合い St. 3 における各細菌の全菌数に対する割合	5
表8. 駿河湾 St. 4 における細菌の群集構造	5
表9. 駿河湾 St. 4 における各細菌の全菌数に対する割合	5

The ecology of planktonic Archaea in the coastal marine

Abstract

Recently, cultivation independent ribosomal RNA gene analysis have indicated that marine planktonic archaea distributed ubiquitous all ocean. But planktonic archaea have resisted all attempts at culture. Consequently, nothing is known about their metabolic requirements and ecology. To better understand the ecology of planktonic archaea, we investigated the abundance and vertical distribution of planktonic archaea by Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Simizu Port coast and the Suruga Bay. Sampling was conducted throughout the water column (0m to 90m) in the Simizu Port coast and 0m to 1000m in the Suruga Bay. Archaea were detected in all samples. In the Simizu Port coast the abundance of planktonic archaea amounted 1.0×10^3 - 9.6×10^4 cells/ml and the relative abundance of planktonic archaea was 0.2~16.7% of total DNA-containing picoplankton detected. In the Suruga Bay the abundance of planktonic archaea amounted 1.3×10^2 - 5.7×10^3 cells/ml and the relative abundance of planktonic archaea was 1.1~2.4%. Both in the Simizu Port coast and the Suruga Bay, the abundance of planktonic archaea was lower than examples taken from other ocean. In the Simizu Port coast vertical distribution of domain bacteria had a certain trend, but planktonic archaea didn't show any relation and the relative abundance of planktonic archaea was as same as domain bacteria or more abundant at some depths where all bacterial activity was low. Thus, planktonic archaea were detected both in the Simizu Port coast and the surface to the depth of Suruga Bay. In the Simizu Port coast planktonic archaea might play a significant role as same as domain bacteria or more significant at some depths where all bacterial activity was low.

Key word: planktonic archaeae, FISH, vertical distribution, coast, activity

はじめに

1970年代後半 Woese・Fox はリボソーマル RNA(以下 rRNA と表記)の解析から生物が三大生物群に分けられることを発見し、この三大生物群に対して分類学上の界(Kingdom)より上の階級として domain を創設し、ドメイン・アーキアという名称を提唱した(Woese and Fox, 1977). ドメイン・アーキアは分子系統樹ではドメイン・バクテリアよりもドメイン・ユーカリアの近くに位置しており、またメタン生成を行うなどドメイン・バクテリア、ドメイン・ユーカリアにはみられない独自の生化学的性質を持っている。また近年の遺伝子系統解析の結果、いわゆる極限環境といわれる高温、高塩分などの環境や、その他さまざまな環境に生息していることが分かってきた(Delong, 2003). このように、系統樹での位置、生化学的独自性、生育環境の異常性(八杉ほか, 1996)などのためにドメイン・アーキアは急速に関心がよせられ、それは生命の進化、特に原核生物から真核生物への進化についての探究のための手がかりとなることが考えられる。

海洋においてもドメイン・アーキアは熱水噴出孔のような極限環境から発見されてきた。1980年代前半にドイツの Segerer らがイタリアの浅海熱水孔より 100℃前後に至適増殖温度をもつドメイン・アーキアを分離した(Segerer *et al.*, 1985). しかし、90年代に入り Fluorescence in situ hybridization(FISH)法(DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990)による直接観察法が確立したり、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis(DGGE)法(Muyzer *et al.*, 1993)などの分子生物学的手法の発達によって、培養を必要とせず直接現場環境での細菌の分類や活性についての情報を得ることができるようになると、ドメイン・アーキアは極限環境だけではなく世界中の海洋に偏在していることが明らかになってきた(Delong, 2003). また rRNA の系統解析からドメイン・アーキアは、クレンアーキオータ、ユーリアーキオータの 2 つのグループに大きく分類されるが、海洋から検出されてきたドメイン・アーキアもこの 2 つのグループに属するものである。

サンタバーバラ沿岸においては、原核生物の現存量中ドメイン・アーキアの占める割合は表層では 2-10%と低かったが、100m 以深になると 20-30%を占めていること、またドメイン・アーキア内では表層においてユーリアーキオータの占める割合が大きく、表層以深においてはクレンアーキオータの占める割合が大きいことが報告された(Massana *et al.*, 1997). Massana らは 8 つの海洋と 2 つの水深からサンプリングを行い、太平洋、大西洋、地中海の温帯の海洋においては表層でユーリアーキオータがドメイン・アーキア内で優占しており、深層でクレンアーキオータがドメイン・アーキア内で優占していること、また南極海、亜南極帯の海洋においてはユーリアーキオータが検出されなかったことを報告した(Massana *et al.*, 2000). Karner らはハワイ沖でサンプリングを行い、全海洋においてドメイン・バクテリアの現存量は 3.1×10^{28} cells であるのに対して、ドメイン・アーキアの存在量は 1.3×10^{28} cells にも見積もられ、原核生物の約 3 分の 1 を占めることを報告した(Karner *et al.*, 2001). また表層以深において、クレンアーキオータは原核生物内で大きな割合をしめていることも報告した。以上のようにドメイン・アーキア、特にクレンアーキオータは海洋における原核生物の現存量中で大きな割合を占めており、また鉛直方向にその群集構成が特徴付けられることが分かってきた。

海洋においてドメイン・アーキアの現存量は大きいことが分かってきたが、海洋のドメイン・アーキアの培養はとりわけその生態がわかっていないので困難である。そのためにその生理学的知見は少なく、未知な部分が多いのが現状である。しかし、最近になり海洋のクレンアーキオータグループに属するアンモニア酸化細菌が単離培養され、クレンアーキオータが地球上の炭素、窒素循環において重要な役割を果たしている可能性が示唆された(Konneke *et al.*, 2005). その現存量と地球上での偏在性から海洋のドメイン・アーキアは注目され、その生態はこれからも研究されていくであろう。

当研究室においても過去の研究から、極限環境ではない清水港沿岸の表層においてドメイン・アーキアは検出されてきた。その現存量は低く、全菌数に対する割合も 0.24-1.87%と低かったが清水港の沿岸域にもドメイン・アーキアは存在していることが示された。また環境データと相関は見られなかった(高久保, 2004MS).

以上のように、ドメイン・アーキアが世界中の海洋に偏在していること、その存在量や群集構成が鉛直的

に変化していること、また清水港沿岸の表層でもドメイン・アーキアは存在していることが報告されてきた。ドメイン・アーキアの偏在性や鉛直的な群集構成の変化などはある程度報告されてきたが、海洋における生態系の中でドメイン・アーキアが果たしている役割や、その重要性などの生態学的情報はほとんど報告されていない。そこで今回の研究はドメイン・アーキアの生態解明のために、当研究室における過去の清水港の研究よりもより深い水深からサンプルを採取しドメイン・アーキアの空間的、季節的分布を調べることを目的とした。サンプリングは清水港沖合いステーション 3(以下 St. 3 と表記)から水深 0-90m、駿河湾ステーション 4(以下 St. 4 と表記)から水深 0-1000m の海水を採水した。環境データを測定し、細菌の群集構造解析は FISH 法を用いて行った。

方 法

1. サンプリング

2004 年 8 月 31 日, 2004 年 12 月 1 日, 2005 年 1 月 15 日, 2005 年 1 月 2 日に静岡県静岡市清水港沖合い St. 3(北緯 35° 00' 46", 東経 138° 33' 12", 図 1)で水深 0, 10, 30, 60, 90m の海水をニスキン採水器(容量 10L)を用いて採水した。また 2005 年 12 月 13 日から 18 日に淡青丸 KT-05-32 次研究航海(主席研究員柳 哲夫)において駿河湾 St. 4(北緯 35° 00' 04", 東経 138° 59' 95", 図 2)の水深 0, 100, 300, 500, 1000m の海水をニスキン採水器で採水した。海水はそれぞれパイレックスビン(SCHOTT DURAN Co. Ltd., Germany)に採取し研究室に持ち帰り処理を行った。

2. 環境データの測定

2004 年 8 月 31 日, 2004 年 12 月 1 日, 2005 年 4 月 15 日, 2005 年 8 月 2 日の清水港沖合いにおけるサンプリングでは、サンプリングポイントの各水深の水温、電気伝導度、pH を水質チェッカー U-10(HORIBA Co. Ltd., Tokyo, Japan), 溶存酸素濃度を YSI DO メーター 58 型(Nikkaki Co. Ltd., Kyoto, Japan), 塩分(Salinity)をポータブル電気伝導計 CM-14P(TOA Co. Ltd., Tokyo, Japan)で計測した。溶存有機炭素(dissolved organic carbon, 以下 DOC と表記)用サンプルを 450℃で処理し炭素フリーとした GF/C フィルターで濾過処理し、その濾液を 500℃で処理し炭素フリーとしたアンプルにいれて-20℃で冷凍保存した。またその残りを栄養塩(NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-})のサンプルとしてポリビンにいれて保存した。クロロフィル *a* はサンプルを GF/C フィルターに 1 サンプルについて 3 枚濾過し、濾紙をアルミホイルに包み、-20℃で冷凍保存したのち、ユネスコ法(西條・三田村, 1995)にて測定した。2005 年 12 月 15 日の駿河湾におけるサンプリングでは Conductivity Temperature and Depth profiling system(CTD)によって各水深の水温、電気伝導度、溶存酸素濃度、塩分、クロロフィル *a* 濃度を測定した。DOC 用サンプルは採水器に直接濾過器を取り付け、GF/C フィルターで濾過し、濾液をバイアル瓶に入れ-20℃で冷凍保存した。栄養塩サンプルは濾液をポリ瓶に入れ-20℃で冷凍保存した。DOC は京都大学農学研究科徳地研究室、栄養塩(NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-})は静岡大学理学部鈴木研究室において測定された。

3. 全菌数の直接計数

3-1. サンプルの固定

採取したサンプルはそれぞれポリプロピレン遠沈管(SARSTEDT AG & Co. Ltd., Numbrecht, Germany)に入れ、サンプルの 19 分の 1 量の 4%中性ホルマリン溶液{ホルムアルデヒド(Wako Co. Ltd. Osaka, Japan)にヘキサメチレンテトラミン(Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)を少量加え、pH7.0 に調整する}を加え、固定した。固定したサンプルは暗所にて 4℃で冷凍保存した。

3-2. DAPI 染色によるプレパラートの作成

全細菌数計測のために DAPI 染色を Porter and Feig (1980)の方法を改変して行った。

濾過器に孔径 1.2 μ m セルロースフィルター(RAWP02500, MILLIPORE Co. Ltd., Massachusetts, U.S.A)をのせ、濾過燐酸緩衝液(Filtrate phosphate buffer saline, F-PBS, Nissui Co. Ltd., Tokyo, Japan)(以下 F-PBSと表記)で湿らせた。その上に4分の1にカットした孔径 0.2 μ m, のヌクレポアフィルター(Whatman Co. Ltd., Maine, U.K)を sundan black(Wako Co. Ltd., Japan)溶液で染色したフィルターを濾過面にピンセットを用いてのせ、その上にファンネルをのせてクリップで固定した。サンプル中の細菌を均等に分散させるため、サンプルをブレンダーで攪拌し、マイクロピペットで取り、用意したファンネルに入れ、適量濾過した。その次に洗浄として、F-PBS1mL をマイクロピペットでファンネルに回し入れ、濾過した。これを 3 回繰り返した。その後 F-PBS1mL と濃度 0.1 μ g/mL の DAPI 溶液を試料の 10 分の 1 量(0.1mL) 加え、染色を均一にするためファンネルを振って混ぜ、7 分間そのままの状態細菌を染色し、その後濾過した。その後、ヌクレポアフィルターをピンセットで取り出し、市フィルターの裏からドライヤーをあてて乾かした。スライドガラス(厚さ 1.2-1.5mm, 76 \times 26mm, 水切放フロスト, Matsunami glass Ind. Co. Ltd., Osaka, Japan)の上に濾過面を上にして置き、無蛍光のイマージョンオイル(OLYMPUS Co. Ltd., Tokyo, Japan)を一滴フィルターに垂らし、カバーガラス(厚さ 0.12-0.17mm, 24 \times 50mm, Matsunami glass Ind. Co. Ltd., Osaka, Japan)を被せて、ピンセットの背でオイルが全体に行き渡るように軽く押さえた。

3-3. 蛍光顕微鏡下での全菌数の計数

作成したプレパラートにイマージョンオイルを滴下し、接眼マイクロメーターを入れた落射型蛍光顕微鏡(ユニバーサル落射蛍光装置 BX50-FLA, OLYMPUS Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 100 倍、UV 励起光(波長 330-385nm)で観察、計数した。計数は 100 グリット(グリット面積 100 μ m²)20 視野における DAPI で染色された細菌を計数した。本研究においては、約 1000 細胞以上を計数した。

3-4. 全菌数の求め方

計数結果から全細菌数(サンプル 1mL あたりの全細菌数)を以下のように計算し、求めた。

$$\text{全菌数 (cells/mL)} = n \times A/a \times 1/V \times 19/20$$

n は 100 グリットあたりの平均細胞数、A は濾過面積(μ m²)、a は 100 グリットあたりの面積(μ m²)、V はサンプルの濾過量(mL)を示す。19/20 は固定試薬中性ホルマリンの換算分である。

4. FISH 法による細菌の群集構造の解析

FISH 法(Amann *et al.*, 1995)を用いて細菌の群集構造を解析した。

4-1. サンプルの固定

サンプルに最終濃度が 3%になるように濾過したパラホルムアルデヒド溶液{4% パラホルムアルデヒド(Wako Co. Ltd., Osaka, Japan), PBS 9.6g/L, NaCl 15.9g/L}をサンプルの 3 倍量加え、固定した。固定は 2-24 時間、暗所にて-4℃の冷蔵状態で行われた。パラホルムアルデヒド溶液は変性が早く、作成時から 24 時間以内に使用しなくてはならないので、使用時にはその都度作成する。

4-2. 細菌の濃縮と脱水

濾過器に湿らせた直径 25mm の GF/C(直径 25mm Whatman Co. Ltd., Maine, U.K.)を置き、その上に 3 分の 1 にカットしたヌクレポアフィルター(孔径 0.2 μ m, 直径 47mm, Whatman Co. Ltd., Maine, U.K.)をのせ、濾過器とファンネルをしっかりとクリップで固定した。そこに固定したサンプルを適量濾過した後、洗浄として F-PBS1mL を回し入れ濾過し、これを 3 回繰り返した。次に、50%エタノール(Wako Co. Ltd., Osaka, Japan)1mL をファンネル部分に滴下して、3 分間静置した後濾過した。同様の作業を 80%, 99.5% エタノールを用いて行い、脱水した。その後フィルターを室温で乾燥させた。そのフィルターを、ハイブリダイゼーションを行うまで -20℃で冷凍保存した。

1-3. 淡青丸航海におけるサンプルの固定

2005 年 12 月の駿河湾 St. 4 における淡青丸の航海において、FISH 法のサンプル固定は船上において多量のパラホルムアルデヒドの作成が困難であったため通常とは異なる方法で行った。

まず採取したサンプルを直接濾過器で適量濾過、洗浄した。濾過、洗浄の方法は 4-2 の方法と同様である。次に、ガラスシャーレに濾紙をのせそこにパラホルムアルデヒド溶液 (4% パラホルムアルデヒド, PBS 1.6g/L, NaCl 15.9g/L) 5mL を加えたものを用意し、その濾紙の上に濾過面を上にしてフィルターをのせ固定した。ガラスシャーレは蓋をし、周囲をビニールテープで密閉した。固定は 2-24 時間、暗所、冷蔵状態で与われた。固定した後フィルターを取り出し、再び濾過器を設置し洗浄、脱水を行った。洗浄、脱水の方法は 4-2 の方法と同様である。

1-4. 遺伝子プローブ

本研究では、清水港沖合い St. 3 における 2004 年 8 月 31 日, 2004 年 12 月 1 日, 2005 年 4 月 15 日, 2005 年 8 月 2 日のサンプルではドメイン・バクテリア, ドメイン・アーキア, γ -プロテオバクテリアをターゲットにした EUB338, ARCH915, GAM42a (表 1), 2005 年 8 月 2 日のサンプルではこの 3 つに加えユーリア-キオータ, クレンアーキオータをターゲットとした EURY498, CREN499 (表 1) のプローブを用いた。プローブはすべてローダミンで標識されたものを用いた。駿河湾 St. 4 のサンプルでは EUB338 と ARCH915 を使した。

5. Whole cell in situ hybridization

サンプルを濃縮、脱水したフィルターを面積 $0.5\text{--}1.0\text{cm}^2$ になるように 6 等分し、液だれを防ぐために 0.2% ラチンを塗布したスライドガラスに置く。各プローブに対応するハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄溶液、インキュベートの時間、温度は表 2 に示した。まず、インキュベートの温度と同じ温度で暖めておいたハイブリダイゼーション緩衝液 {0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.4), 0.01% SDS, formamide (EUB338 は 20%, ARCH915, GAM42a は 35%, EURY498, CREN499 は 0%)} 16 μ L と遺伝子プローブ 2 μ L を直接フィルターで混合した。乾燥を防ぐために、50mL ポリプロピレン遠沈管にハイブリダイゼーション緩衝液 2mL を浸したケイドライを入れ、あらかじめインキュベートの温度と同じ温度で温めておき、そこに上記のスライドガラスを入れ、46°C で 90 分間インキュベートした。ポリプロピレン遠沈管を温めておく温度と、インキュベートの温度と時間はプローブ EUB338, ARCH915, GAM42a を使用した時は 46°C で 90 分間だが、プローブ EURY498, CREN499 を使用した時は 45°C で 120 分間である。インキュベートが終わったフィルター試料を、あらかじめ 48°C に温めておいた洗浄溶液 {4H EDTA, 20mM Tris-HCl (pH7.4), 0.01% SDS, NaCl (EUB338 0.225M, ARCH915 は 0.07M, GAM42a は 0.08M, EURY498, CREN499 は 0.9M)} で軽く洗い流した後に、別の洗浄溶液に浸し、48°C で 15 分間インキュベートした。この洗浄溶液の温度とインキュベートの時間もプローブごとに異なっており、プローブ EUB338, ARCH915, GAM42a を使用した時は 48°C で 15 分だが、プローブ EURY498, CREN499 を使用した時は 48°C で 20 分である。その後、フィルターを金網上に出し、留水で濾過面を洗浄してフィルターをスライドガラスにのせ、乾燥させる。そこに DAPI を直接 3 μ L 滴下し、染色する。その後乾燥させ、マウント剤 antifade reagent in glycerol buffer をフィルターに適当量滴下し、カバーガラスを被せ、ピンセットの背でマウント剤が全体に行き渡るように軽く抑えた。

6. 試料の観察

ハイブリダイゼーションを行ったサンプルを落射型蛍光顕微鏡 BX-50 において接眼レンズ 10 倍, 対物レンズ 100 倍で直接観察し、3CCD カメラ C5810 (Hamamatsu photonics, Co. Ltd., Shizuoka, Japan) で同一視の UV 励起 (波長 330-385nm) 画像と IG 励起 (波長 520-550nm) 画像を取り込み、画像解析装置 SP500F において解析を行った。UV 励起画像において合計 500-4000 細胞をカウントした。UV 励起画像において

DAPIにより染色され、かつ同一視野のIG励起画像においてハイブリダイズされた細胞のみをプローブで検出された細胞とみなした。その細胞数に対するUV励起画像におけるDAPIにより染色された細胞数の割合を計算し求めた。なお、プローブで検出された細菌数を以下のように計算して求めた。

$$N=n \times P/D$$

Nはプローブで検出された細胞数、nはDAPI染色による直接計数で求めたサンプルにおける全細菌数、PはUV励起画像においてDAPIにより染色され、かつ同一視野のIG励起画像においてハイブリダイズされた細胞数、DはUV励起画像においてDAPIにより染色された細胞数を示す。

結 果

1. 環境データ

1-1. 清水港沖合い St. 3

清水港沖合い St. 3における水温、pH、溶存酸素濃度、塩分、電気伝導度は図3、表3に、溶存有機炭素、栄養塩濃度は図4、表4に示す。

①水温

水温は時期ごとに大きな差が見られ、夏季に全体的に高くなっていた。また水深が深くなるにつれ低くなっていく傾向が見られ、水深0mと水深90mでは大きな差が見られた。一方、冬季や春季では全体的に低くなっており、水深ごとの差も少なくほぼ一定の値を示していた。

各時期における値は14.5℃-28.8℃であった。2004年8月31日は28.8-22.1℃であり他の時期と比較すると各水深で最も高い値を示していた。また水深0-30mで27.0-28.8℃、水深60-90mで22.1-25.1℃と水深が深くなるにつれ低くなる傾向が見られた。2004年12月1日は水深ごとの差が小さく、18.3-20.5℃の間であった。2005年4月15日も水深ごとの差が小さく14.5℃-15.3℃であった。また他の時期と比較すると各水深で最も低い値を示していた。2005年8月2日は17.3-26.9℃であり、水深が深くなるにつれ水温が低くなっていた。

②pH

pHは各時期、各水深で差はほとんど見られなかった。値は7.98-8.88であった。

③溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は各時期とも水深が深くなるにつれ減少していた。時期ごとの差は各水深でほとんどなかった。値は2004年12月1日で8.27-5.8mg/L、2005年4月15日で8.23-5.58mg/L、2005年8月2日で8.71-6.70mg/Lであった。2004年8月31日は水深0-30mでは信頼性のあるデータを得られなかった。

④塩分

塩分は各時期で水深0mの値が水深10-90mの値に比べて低くなっていた。値はそれぞれ2004年8月31日の水深0mで30.7、水深10-90mで31.1-32.1、2004年12月1日の水深0mで30.7、水深10-90mで32.5-32.7、2005年4月15日の水深0mで30.1、水深10-90mで33.1-33.3、2005年8月2日の水深0mで27.3、水深10-90mで32.4-32.7であった。

⑤電気伝導度

電気伝導度も塩分と同様に水深0mの値が水深10-90mの値に比べて低くなっていた。値はそれぞれ2004年12月1日の水深0mで47.1mS/cm、水深10-90mで50.1-50.8mS/cm、2005年4月15日の水深0mで46.6mS/cm、水深10-90mで51.0-51.1mS/cm、2005年8月2日の水深0mで42.8mS/cm、水深10-90mは49.3-49.7mS/cmであった。2004年8月31日は信頼性のあるデータを得られなかった。

⑥溶存有機炭素

DOCは各時期において水深0-60mで水深が深くなるにつれ減少していく傾向が見られた。しかし、各時期とも水深90mで再び増加していた。各時期における値は31.9-103.8μM Cであった。

⑦栄養塩濃度

硝酸イオン(以下 NO_3^- と表記)は各時期とも水深 0-10m で減少し, 水深 10-90m では増加していく傾向が見られた。2004 年 8 月 31 日の水深 10, 30m, 2005 年 4 月 15 日の水深 90m, 2005 年 8 月 31 日の水深 10m はデータが得られなかった。各時期における値は 0-12.52 μM であった。亜硝酸イオン(以下 NO_2^- と表記)は 0.01-0.85 μM と全体的に低い値であった。アンモニウムイオン(以下 NH_4^+ と表記)は 2004 年 12 月 1 日の水深 0m で 2.76 μM , 2005 年 4 月 15 日の水深 0m で 1.40 μM と他の水深と比較すると大きな値を示した。各時期における値は 0.10-2.76 μM であった。リン酸イオン(以下 PO_4^{3-} と表記)は全体的に少なかったが, 各時期とも水深 10m 以深で増加していく傾向が見られた。各時期における値は 0.01-0.90 μM であった。

⑧クロロフィル a 濃度

クロロフィル a 濃度はユネスコ法で測定したが, ユネスコ法は本来湖沼調査で使用されているため海洋には適しておらず信頼性のあるデータが得られなかったため, 今回清水港沖合い St. 3 についてのクロロフィル a 濃度については議論しない。

1-2. 駿河湾 St. 4

駿河湾 St. 4 における水温, 溶存酸素濃度, 電気伝導度, 塩分, クロロフィル a 濃度は図 5, 表 5 に, 栄養塩濃度は図 6, 表 5 に示す。

水温, 溶存酸素濃度, 電気伝導度は水深が深くなるにつれて減少していた。水温は 16.8-3.5 $^{\circ}\text{C}$ であり水深 1000m では 3.5 $^{\circ}\text{C}$ と低い値であった。溶存酸素濃度は 4.97-1.45mg/L であり, 水深 0m では 4.97mg/L と清水港沖合い St. 3 と比較すると低い値であった。電気伝導度は 44.3-32.1ms/cm であった。塩分は 34.3-34.6 とほぼ一定の値を示していた。クロロフィル a 濃度は水深 0-100m で大きく減少し 100m 以深ではほぼ一定の値であった。値は 0.228-0.030mg Chl.a m^{-3} であった。

栄養塩濃度は NO_3^- と PO_4^{3-} が水深が深くなるにつれ増加していた。 NO_3^- は 6.27-40.43 μM , PO_4^{3-} は 0.51-3.00 であった。 NO_2^- は 0.01-0.39 μM と非常に小さな値であった。 NH_4^+ も 0-0.17 と非常に小さな値であった。

2. 細菌の群集構造

2-1. 清水港沖合い St. 3

清水港沖合いにおける細菌の群集構造は図 7, 表 6 に, 各細菌の全菌数に対する割合は図 8, 表 7, に示す。

①2004 年 8 月 31 日

全菌数は水深 0m で $9.7 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$ cells/mL (標準偏差は計数誤差から算出), 水深 10m で $7.3 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$ cells/mL, 水深 30m で $5.7 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$ cells/mL, 水深 60m で $5.0 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$ cells/mL, 水深 90m で $1.8 \times 10^5 \pm 6.8 \times 10^4$ cells/mL であった。全菌数は水深が深くなるにつれ減少していた。

ドメイン・バクテリアの細菌数は水深 0m で 5.5×10^4 cells/mL, 水深 10m で 6.9×10^4 cells/mL, 水深 30m で 2.5×10^4 cells/mL, 水深 60m で 1.6×10^4 cells/mL, 水深 90m で 2.7×10^3 cells/mL であった。ドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 5.6%, 水深 10m で 9.5%, 水深 30m で 4.3%, 水深 60m で 3.1%, 水深 90m で 1.5% であった。細菌数は水深 10m で最大となったが, 全体的に水深が深くなるにつれ減少する傾向が見られた。全菌数に対する割合も水深 10m で最大となったが全体的に 1.5-9.5% と低い値であった。

γ -プロテオバクテリアの細菌数は水深 0m で 4.9×10^4 cells/mL, 水深 10m で 5.1×10^4 cells/mL, 水深 30m で 9.0×10^4 cells/mL, 水深 60m で 4.7×10^4 cells/mL, 水深 90m で 3.7×10^3 cells/mL であった。 γ -プロテオバクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 5.0%, 水深 10m で 7.0%, 水深 30m で 15.8%, 水深 60m で 9.4%, 水深 90m で 21.0% であった。 γ -プロテオバクテリアはドメイン・バクテリア内の 1 グルー

プである。そのためドメイン・バクテリアの細菌数を γ -プロテオバクテリアの細菌数が上回ることはない。しかし水深 30-90m において γ -プロテオバクテリアの細菌数がドメイン・バクテリアの細菌数を上回っている。この点については考察で述べる。

ドメイン・アーキア細菌数は水深 0m で 9.6×10^4 cells/mL , 水深 10m で 3.4×10^4 cells/mL , 水深 30m で 3.5×10^4 cells/mL , 水深 60m で 4.8×10^4 cells/mL , 水深 90m で 4.4×10^3 cells/mL であった。ドメイン・アーキアの全菌数に対する割合は水深 0m で 9.9% , 水深 10m で 4.7% , 水深 30m で 6.1% , 水深 60m で 9.6% , 水深 90m で 2.5% であった。ドメイン・アーキアの全菌数に対する割合はどの水深も 10% 以下と低い値であった。

② 2004 年 12 月 1 日

全菌数は水深 0m で $1.2 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$ cells/mL , 水深 10m で $5.2 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$ cells/mL , 水深 30m で $5.2 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$ cells/mL , 水深 60m で $2.0 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^4$ cells/mL , 水深 90m で $1.7 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$ cells/mL であった。全菌数は水深が深くなるにつれ減少していた。

ドメイン・バクテリアの細菌数は水深 0m で 6.2×10^5 cells/mL , 水深 10m で 1.3×10^5 cells/mL , 水深 30m で 9.5×10^4 cells/mL , 水深 60m で 3.4×10^4 cells/mL , 水深 90m で 1.5×10^4 cells/mL であった。ドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 52.9% , 水深 10m で 25.3% , 水深 30m で 18.5% , 水深 60m で 17.3% , 水深 90m で 9.3% であった。2005 年 12 月 1 日のドメイン・バクテリアの細菌数と全菌数に対する割合は各水深で他の時期よりも大きな値を示した。特に水深 0m では全菌数に対する割合が 52.9% と大きな値を示した。

γ -プロテオバクテリアの細菌数は水深 0m で 3.1×10^4 cells/mL , 水深 10m で 1.3×10^4 cells/mL , 水深 30m で 5.7×10^3 cells/mL , 水深 60m で 5.7×10^3 cells/mL , 水深 90m で 2.2×10^3 cells/mL であった。 γ -プロテオバクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 2.7% , 水深 10m で 2.6% , 水深 30m で 1.1% , 水深 60m で 2.7% , 水深 90m で 1.3% であった。全菌数に対する割合は 1.1-2.7% と低い値であった。

ドメイン・アーキアの細菌数は水深 0m で 2.6×10^4 cells/mL , 水深 10m で 4.3×10^4 cells/mL , 水深 30m で 8.6×10^4 cells/mL , 水深 60m で 3.8×10^3 cells/mL , 水深 90m で 2.8×10^3 cells/mL であった。ドメイン・アーキアの全菌数に対する割合は水深 0m で 2.2% , 水深 10m で 8.4% , 水深 30m で 16.7% , 水深 60m で 1.9% , 水深 90m で 1.7% であった。全菌数に対する割合はドメイン・バクテリアが大きな割合を占めている一方で、ドメイン・アーキアが占める割合は低く、水深 30m 以外では 10% 以下であった。しかし、水深 30m では 16.7% と高い値を示した。

③ 2004 年 4 月 15 日

全菌数は水深 0m で $7.5 \times 10^5 \pm 6.5 \times 10^4$ cells/mL , 水深 10m で $7.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ cells/mL , 水深 30m で $5.5 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^4$ cells/mL , 水深 60m で $5.5 \times 10^5 \pm 5.8 \times 10^4$ cells/mL , 水深 90m で $4.7 \times 10^5 \pm 4.4 \times 10^4$ cells/mL であった。2004 年 4 月は各水深間の差が他の時期と比較すると小さかった。

ドメイン・バクテリアの細菌数は水深 0m で 1.7×10^5 cells/mL , 水深 10m で 2.5×10^4 cells/mL , 水深 30m で 2.5×10^4 cells/mL , 水深 60m で 2.0×10^4 cells/mL , 水深 90m で 1.7×10^4 cells/mL であった。ドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 22.8% , 水深 10m で 3.5% , 水深 30m で 4.6% , 水深 60m で 3.7% , 水深 90m で 3.5% であった。全菌数に対する割合は水深 0m で 22.8% と高い値を示したが、水深 10-90m では 3.5-4.6% と低い値であった。

γ -プロテオバクテリアの細菌数は水深 0m で 8.4×10^4 cells/mL , 水深 10m で 3.2×10^4 cells/mL , 水深 30m で 1.3×10^5 cells/mL , 水深 60m で 4.1×10^3 cells/mL , 水深 90m で 2.8×10^3 cells/mL であった。 γ -プロテオバクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 11.1% , 水深 10m で 4.4% , 水深 30m で 23.5% , 水深 60m で 0.7% , 水深 90m で 0.6% であった。2005 年 4 月 15 日も水深 10, 30m で γ -プロテオバクテリアの細菌数がドメイン・バクテリアをこえてしまう結果となった。

ドメイン・アーキアの細菌数は水深 0m で 4.3×10^4 cells/mL , 水深 10m で 5.5×10^4 cells/mL , 水深 30m で 2.1×10^4 cells/mL , 水深 60m で 2.0×10^4 cells/mL , 水深 90m で 1.9×10^4 cells/mL であった。ド

メイン・アーキアの全菌数に対する割合は水深 0m で 5.8%, 水深 10m で 7.6%, 水深 30m で 3.7%, 水深 60m で 3.6%, 水深 90m で 4.0%であった。水深 30m 以深ではドメイン・バクテリア, ドメイン・アーキアの全菌数に対する割合はほぼ 1:1 であった。しかし共に割合は小さく約 3%ほどであった。

④ 2005 年 8 月 2 日

全菌数は水深 0m で $9.3 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$ cells/mL, 水深 10m で $8.4 \times 10^5 \pm 8.5 \times 10^4$ cells/mL, 水深 30m で $4.8 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ cells/mL, 水深 60m で $4.2 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^4$ cells/mL, 水深 90m で $3.7 \times 10^5 \pm 7.0 \times 10^4$ cells/mL であった。

ドメイン・バクテリアの細菌数は水深 0m で 1.5×10^5 cells/mL, 水深 10m で 2.5×10^4 cells/mL, 水深 30m で 1.2×10^4 cells/mL, 水深 60m で 5.8×10^3 cells/mL, 水深 90m で 1.1×10^4 cells/mL であった。ドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 15.7%, 水深 10m で 3.0%, 水深 30m で 2.5%, 水深 60m で 1.4%, 水深 90m で 3.0%であった。全菌数に対する割合は水深 0m で 15.7%と他の水深と比較すると大きな割合を占めていた。

γ -プロテオバクテリアの細菌数は水深 0m で 5.7×10^3 cells/mL, 水深 10m で 1.8×10^4 cells/mL, 水深 30m で 2.0×10^3 cells/mL, 水深 60m で 8.7×10^3 cells/mL, 水深 90m で 5.8×10^3 cells/mL であった。 γ -プロテオバクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 0.6%, 水深 10m で 2.1%, 水深 30m で 0.4%, 水深 60m で 2.1%, 水深 90m で 1.6%であった。全菌数に対する割合は 0.4-2.1%と低い値であった。

ドメイン・アーキアの細菌数は水深 0m で 9.1×10^3 cells/mL, 水深 10m で 1.4×10^4 cells/mL, 水深 30m で 1.0×10^3 cells/mL, 水深 60m で 2.9×10^4 cells/mL, 水深 90m で 4.6×10^3 cells/mL であった。ドメイン・アーキアの全菌数に対する割合は水深 0m で 1.0%, 水深 10m で 1.6%, 水深 30m で 0.2%, 水深 60m で 6.7%, 水深 90m で 1.3%であった。ドメイン・アーキアの細菌数, 全菌数に対する割合は各水深で低く, 細菌数は 1.0×10^3 - 2.9×10^4 cells/mL, 全菌数に対する割合は 10%以下であった。

2005 年 8 月 2 日のサンプルではプローブ EURY498 と CREN499 を使用してユーリアーキオータとクレンアーキオータの検出を試みた。しかし今回は実験方法に問題があったため検出できなかった。

2-2. 駿河湾 St. 4(2005 年 12 月 15 日)

駿河湾 St. 4 における細菌の群集構造は図 9, 表 8 に, 各細菌の全菌数に対する割合は図 9, 表 9 に示す。

全菌数は水深 0m で $5.4 \times 10^5 \pm 8.3 \times 10^4$ cells/mL, 水深 100m で $1.2 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^4$ cells/mL, 水深 300m で $6.0 \times 10^4 \pm 9.3 \times 10^3$ cells/mL, 水深 500m で $5.8 \times 10^4 \pm 6.5 \times 10^3$ cells/mL, 水深 1000m で $4.2 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^3$ cells/mL であった。全菌数は水深が深くなるにつれ減少していた。水深 300m 以深では 10^3 cells/mL であった。

ドメイン・バクテリアは水深 0m で 1.5×10^5 cells/mL, 水深 100m で 1.3×10^4 cells/mL, 水深 300m で 5.4×10^3 cells/mL, 水深 500m で 4.4×10^3 cells/mL, 水深 1000m で 9.3×10^5 cells/mL であった。ドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は水深 0m で 28.0%, 水深 100m で 11.4%, 水深 300m で 9.0%, 水深 500m で 7.6%, 水深 1000m で 22.2%であった。全菌数に対する割合は, 清水港沖合い St. 3 での 2004 年 12 月 1 日は他の時期と比較するとドメイン・バクテリアが細菌群集の中で大きな割合を占めており, 今回の駿河湾 St. 4 でも同様に 7.6-28.0%と比較的大きな値を示していた。また水深 1000m で 22.2%と増加していた。

ドメイン・アーキアは水深 0m で 5.7×10^3 cells/mL, 水深 100m で 2.8×10^3 cells/mL, 水深 300m で 8.8×10^2 cells/mL, 水深 500m で 1.3×10^3 cells/mL, 水深 1000m で 8.0×10^2 cells/mL であった。ドメイン・アーキアの全菌数に対する割合は水深 0m で 1.1%, 水深 100m で 2.4%, 水深 300m で 1.5%, 水深 500m で 2.2%, 水深 1000m で 1.9%であった。ドメイン・アーキアは細菌数, 全菌数に対する割合が共に低い値を示していた。

考 察

1. 環境データ

1-1. 清水港沖合い St. 3

水温は2004年8月31日、2005年8月2日に他の時期と比較すると各水深で高くなり、水深が深くなるにつれて水温も低くなっている。夏季に海面水温が日射によって上昇し、風が弱まり季節的水温躍層が形成されることが報告されており(關・長沼, 1996)今回の結果もこの季節的水温躍層の影響だと考えられる。2004年12月1日、2005年4月15日では全体的に水温が低くなり水深ごとの差も小さくなっている。冬季は風が強まり海水の冷却も始まり、季節的水温躍層が壊されることが報告されており(關・長沼, 1996), その影響が考えられる。また2004年12月1日の水深10m, 2004年8月31日の水深10, 30mはそれぞれ水深0mよりも水温が高くなっている。これは清水港沖合い St. 3で海水の混合が起こっているためと考えられる。

pH は空間的にも季節的にも大きな変化はほとんどなかった。溶存酸素濃度の季節的变化はほとんどなかったが、各時期で水深が深くなるにつれて減少していた。これは表層からの酸素の供給が減少しているためと考えられる。塩分と電気伝導度は季節的な変化はほとんどなかったが、各測定日で水深0mの値は他の水深と比較して低い値を示した。水深0mでは降水や河川水などの陸域からの影響を受けやすいため今回の結果になったと考えられる。しかし今回は、その影響を示すデータはない。

DOCは各測定日において水深0-60mにおいて水深が増すにつれ減少していく傾向が見られた。表層で陸域からの流入や生物によって生産されたDOCが微生物ループによって消費され、消費されなかった一部分がさらに深層へと沈降していくことが報告されている(石田・杉, 2005)。今回も微生物ループで消費されなかったDOCが沈降していったためこのような結果になったと考えられる。また各時期とも水深90mで増加していることについては、深層からの湧昇流の影響が考えられるが、その影響を示すデータはない。またDOCの全てが微生物によって消費されるわけではなく、DOCの種類によっては消費されないものもある。これら消費されなかったDOCが水深90mで多く検出された可能性も考えられる。

栄養塩濃度については NO_3^- が2004年12月1日と2005年4月15日の水深0mを除いては水深が増すにつれて増加していく傾向が見られた。有光層において植物プランクトンが NH_4^+ をめぐって硝化細菌と競争関係にあること、アンモニア酸化細菌が光により著しく阻害を受けることが報告されている(石田・杉田, 2005)。このように NO_3^- が水深が深くなるにつれ減少していくのは、 NO_3^- が植物プランクトンによって消費され、また硝化細菌による NH_4^+ の硝化も行われていないためと考えられる。しかし今回、硝化細菌、アンモニア酸化細菌の検出は行っていない。またここでも栄養塩を多く含む深層からの湧昇流の影響も考えられる。 NH_4^+ は2004年12月1日と2005年4月15日の水深0mを除いて非常に少なかった。 NH_4^+ はエネルギー消費の上で硝酸よりも有利であるために植物プランクトンや従属栄養生物に活発に取り込まれているという報告があり(石田・杉田, 2005)、今回も NH_4^+ が植物プランクトンや従属栄養生物に取り込まれてこのような結果になったことが考えられる。2004年12月1日と2005年4月15日の水深0mで NH_4^+ 、 NO_3^- が他の水深より多いことは降水や河川水などの陸域からの影響が考えられるが、これもその影響を示すデータは得られていない。 PO_4^{3-} 、 NO_2^- 、 NH_4^+ は非常に量が少なく、季節的、空間的な傾向も見られなかった。

以上のことから清水港沖合い St. 3の環境は、季節的に水温が大きく変化しており、空間的には表層の水深0mでは塩分、電気伝導度、栄養塩類、DOCが陸域からの影響を受けている可能性があり、さらに栄養塩、DOCは植物プランクトンや従属栄養細菌、深層からの湧昇流の影響も考えられる。また水深が増すごとにDOCは減少し、 NO_3^- は増加する傾向があるといえる。

1-2. 駿河湾 St. 4

駿河湾 St. 4では水温、溶存酸素濃度、電気伝導度が水深が深くなるにつれて減少していた。DOCにつ

いては測定が行われていないが、栄養塩濃度については NO_3^- , PO_4^{3-} が水深が深くなるにつれて増加していた。深層では植物プランクトンによる一次生産がほとんど行われていないため深層では通常栄養塩濃度は高くなる。今回の結果もそのような影響によるものだと考えられる。またクロロフィル *a* 濃度は水深 0-100m で減少し 100m 以深ではほとんど検出できなかった。海洋における有光層は約 150m であり、今回の結果から駿河湾 St. 4 においても 100m 以深ではほとんど植物プランクトンが存在していないと考えられる。

2. 細菌の群集構造

2-1. 全菌数

清水港沖合い St. 3 において全菌数は水深 0m で 10^6 cells/mL であり水深 10m 以深では 10^5 cells/mL であった。全菌数は空間的にも季節的にも変動は小さい結果となった。清水港沖合い St. 3 において水深 0-100m では季節的にも空間的にも全菌数が 10^5 - 10^6 cells/mL で安定しているといえる。

次に空間的な変化に注目すると、各時期とも水深が深くなるにつれて減少していく結果となっている。海洋中の細菌の大部分は海水に溶けている溶存態有機物を利用している従属栄養細菌である。この溶存態有機物の由来として考えられるのは植物プランクトンの光合成による有機物の生産や、ウイルスによる溶菌などが考えられる。植物プランクトンが生産した有機物のうち約 50% が溶存有機物を経て従属栄養性細菌へと流れると見積もられている報告もある(石田・杉田, 2005)。そのため植物プランクトン由来の溶存有機物は重要である。今回測定した DOC は水深が深くなるにつれ減少していく傾向が見られた。また、今回は信頼性のあるクロロフィル *a* 濃度のデータは得られなかったが、駿河湾 St. 4 でのデータを参照すると水深 0-100m でクロロフィル *a* 濃度が減少していた。このことから清水港沖合い St. 3 においても水深が深くなるにつれ植物プランクトン量は減少していくことが考えられる。以上のようなことから植物プランクトンによる一次生産量の減少が、全菌数の減少に影響を与えている可能性がある。また環境データ中で水温は季節的な変化が大きかったが、全菌数の季節的な変化は空間的な変化と比較すると小さく、また水温と全菌数の間に相関も見られないことから、水温の変化は全菌数に対してあまり影響を与えていないと考えられる。

駿河湾 St. 4 において水深 0-100m では全菌数は 10^5 cells/mL であったが、水深 300-1000m では 10^4 cells/mL であった。駿河湾 St. 4 ではクロロフィル *a* 濃度の結果から植物プランクトンは 100m 以深においてほとんど存在していないと考えられる。そのため駿河湾 St. 4 では水深 300m 以深で全菌数が 10^4 cells/mL と表層と比較して少なくなっていたと考えられる。

次に全菌数中の遺伝子プローブによって検出された割合(ドメイン・バクテリア+ドメイン・アーキア)について注目すると、清水港沖合い St. 3 水深 10-90m においてその割合は 2.7-35.2% であった。清水港沿岸では過去の研究からその割合は 14.1-76.7% であった(高久保, 2004MS)。また、北海沿岸の水深 0-200m では約 80% であることが報告されている(Pernthaler *et al.*, 2002)。これらと比較すると今回は検出された割合が少ない結果となった。FISH 法は rRNA をターゲットしているため、活性の高いものほどよく検出される。つまり今回のデータでは清水港沖合い St. 3 において細菌全体の活性が低い状態にあったといえる。また、栄養塩が細菌の群集構造に影響を与えることも報告されている(Pinhassi and Hagstrom, 2000)。今回の DOC、栄養塩データは清水港港内、港外と比較すると沖合い St. 3 では減少していた。これは沖合い St. 3 の方が沿岸域の影響を受けにくいためだと考えられる。これらのことから DOC、栄養塩の減少が細菌全体の活性の減少に影響していることが考えられる。また遺伝子プローブによって検出された割合は各時期とも水深 0m で最も大きな割合を占めていた。これは水深が深くなることによって、植物プランクトンの一次生産量が減少したためと考えられる。駿河湾 St. 4 における遺伝子プローブによって検出された割合は約 10-30% であった。北大西洋の水深 0-1000m では今回の FISH 法よりも検出率を高めた方法で解析を行った結果、70-80% であることが報告されている(Teira *et al.*, 2004)。このように駿河湾 St. 4 も他の海洋と比較するとその割合は低く、細菌全体が活性の低い状態であったといえる。

2-2. ドメイン・バクテリア

清水港沖合い St. 3 におけるドメイン・バクテリアの細菌数は 10^3 - 10^5 cells/mL であった。また全菌数と同様に各時期で水深が深くなるにつれ減少していく傾向が見られた。しかしその減少していく割合は全菌数のそれと比較すると大きい結果となった。今回、全菌数は DAPI 染色により検出されているが、ドメイン・バクテリアは FISH 法によって rRNA をターゲットとして検出されている。そのため FISH 法で検出されたドメイン・バクテリアのほうが環境の変化に対して敏感に反応すると考えられる。このことがドメイン・バクテリアの減少していく割合が全菌数よりも大きいことに影響していると考えられる。

ドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は清水港沖合い St. 3 の 2004 年 8 月 31 日, 2005 年 12 月 1 日, 2005 年 8 月 2 日で 1.4-22.8%, 2004 年 12 月 1 日は 9.3-52.9% であった。清水港沿岸ではその割合は 18.1-74.9% であり(高久保, 2004MS), 北海沿岸では 60-80% であること(Pernthaler *et al.*, 2002)が報告されている。またデラウエア河口の表層においては約 45% であることが報告されている(Yokokawa and Nagata, 2004)。これら他の海洋の例と比較すると清水港沖合い St. 3 特に 2004 年 8 月 31 日, 2005 年 4 月 15 日, 2005 年 8 月 2 日はドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合が低い、つまり活性が低いことが分かる。沖合い St. 3 は先にも述べたように沿岸域と比較すると陸域からの影響を受けにくい、DOC、栄養塩が沿岸域と比較すると少なくなっている。このことがドメイン・バクテリアの活性が沿岸域と比較すると低くなっていることに影響していると考えられる。駿河湾 St. 4 においてもバクテリアの全菌数に対する割合は 7.6-28.0% と低い値を示しており、活性が低いことが分かる。

次にドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合の空間的な変化について注目すると、清水港沖合い St. 3 における 2004 年 12 月 1 日, 2005 年 4 月 15 日, 2005 年 8 月 2 日では水深 0m, 2004 年 8 月 31 日では水深 10m で最大となっている。また駿河湾 St. 4 でも水深 0m で最大となっていた。今回の駿河湾 St. 4 におけるクロロフィル a 濃度は水深 0m で最大となっており、清水港沖合い St. 3 における DOC の測定結果も各時期において水深 0m, 10m で大きな値を示している。これらのことから表層は植物プランクトンの一次生産量が深層と比較すると多いと考えられる。つまり、清水港沖合い St. 3, 駿河湾 St. 4 において、表層で多く存在している溶存有機物をドメイン・バクテリアが栄養源と利用していることにより、活性が他の水深よりも高くなっていると考えられる。しかし細菌の群集構造に影響を与えているものは溶存有機物の他に、水温(Heidelberg *et al.*, 2002)、塩分(Bouvier and del Giorgio, 2002)、栄養塩、原生動物による捕食(Suzuki, 1999)などが報告されており、今回の結果も溶存有機物だけでなく他にもさまざまな要因が影響していると考えられる。清水港沖合い St. 3 においては水深 30m 以深では各時期ともドメイン・バクテリアの全菌数に対する割合は減少しており、2004 年 8 月 31 日, 2005 年 4 月 15 日, 2005 年 8 月 2 日においてはその値が 5% 以下と非常に低い値を示している。また駿河湾 St. 4 でも水深 100-500m では 12% 以下であった。つまり、清水港沖合い St. 3 水深 30m 以深、駿河湾 St. 4 水深 100-500m ではドメイン・バクテリアは非常に活性が低い状態にあるといえる。清水港沖合い St. 3 の水深 30m 以深では植物プランクトン量も減少していき、溶存有機物などのドメイン・バクテリアが栄養源として利用する物質が少なくなっていることが考えられる。今回測定した DOC も清水港沖合い St. 3 において 2004 年 8 月 31 日の水深 90m と 2005 年 8 月 31 日の水深 90m を除けば全体的に水深が増すにつれ減少していく傾向が見られた。これらの結果から清水港沖合い St. 3 の水深 30m 以深ではドメイン・バクテリアの栄養源となる物質が水深 0, 10m と比較すると少なかったためドメイン・バクテリアの活性が低くなったと考えられる。駿河湾 St. 4 の水深 1000m で再びドメイン・バクテリアの割合が 22.2% となっていたことについては栄養塩を多く含む深層水の影響などが考えられるが、今回は解明できていない。

2-3. γ -プロテオバクテリア

γ -プロテオバクテリアの全菌数に対する割合は清水港沖合い St. 3 のにおける 2004 年 8 月 31 日の水深 10, 30, 90m, 2004 年 12 月 1 日の水深 0, 60m, 2005 年 4 月 15 日の水深 0, 30m, 2005 年 8 月 2 日の水深 10, 30, 90m でドメイン・バクテリアの割合をこえてしまう結果となった。今回行った FISH 法では、フィルタ

一断片 1 枚にたいして遺伝子プローブは 1 つしかハイブリダイズさせていない。そのためフィルター上にサンプルのばらつきがあるとフィルター断片 1 枚ごとにプローブによって検出される細菌数も異なってくる。今回はこのフィルター上のサンプルのばらつきが影響したと考えられる。また細菌ごとに細胞壁の構造は異なっており、遺伝子プローブによって検出される割合は細菌ごとに異なる。そのためプローブ EUB338, GAM42a がターゲットとしている細菌にどれくらいの精度でハイブリダイズしているのかを確かめることも必要となってくる。これらを確認するためにも、プローブ EUB338, GAM42a のネガティブコントロールを行い、データの信頼性を高めることが必要である。

2-4. ドメイン・アーキア

過去の研究から清水港沿岸域で検出されてきたドメイン・アーキアは、今回、清水港沖合い St. 3, 駿河湾 St. 4 から各水深から検出された。ドメイン・アーキアの細菌数は清水港沖合い St. 3 において 10^3 - 10^4 cells/mL であり、駿河湾 St. 4 において 10^2 - 10^3 cells/mL であった。清水港港内、港外でも 10^3 - 10^4 cells/mL であることが報告されており(高久保, 2004MS), 清水港沖合い St. 3 は港内、港外とはあまり大きな差はなかった。またカリフォルニア州モスランディング沿岸の水深 0-100m では 10^3 - 10^5 cells/mL であり(DeLong *et al.*, 1999), ハワイ沖の水深 0-100m で 10^4 cells/mL であった(Karner *et al.*, 2001)。これら他の海洋の例と比較すると、清水港沖合い St. 3, 駿河湾 St. 4 でのドメイン・アーキアの細菌数は少ない結果となった。また清水港沖合い St. 3 においてアーキアの細菌数の分布には、全菌数やドメイン・バクテリアにみられたような水深が深くなるにつれ減少していく傾向はみられなかった。また環境データとの相関も見られなかった。

ドメイン・アーキア的全菌数に対する割合は清水港沖合い St. 3 において 0.2-16.7% であった。清水港沿岸域では水深 0-10m でその割合は 0.2-1.0% であったことが報告されている(高久保, 2004MS)。今回の結果と比較すると少しではあるが沖合い St. 3 のほうが割合は増加している。清水港では沿岸域よりも沖合い St. 3 で全菌数に対する割合がやや大きいことが示された。また北海の沿岸域ではその割合は水深 0-100m で約 10-20% であること(Pernthaler *et al.*, 2002), サンタバーバラ沿岸では水深 0-100m で約 3-20% であること(Massana *et al.*, 1997), またハワイ沖でも水深 0m-100m ではドメイン・アーキアが細菌群集内を占める割合は約 10% 以下であった(Karner *et al.*, 2001) ことが報告されている。これらと比較すると今回の清水港沖合い St. 3 の結果はやや低い結果となった。また 2004 年 12 月 1 日の水深 30m で 16.7% 高い値を示したが、その理由については今回のデータからでは解明できなかった。清水港沖合い St. 3 においては全菌数に対する割合の変化について空間的、季節的な傾向は見られなかった。また、清水港沖合い St. 3 において細菌全体の活性が低い 2004 年 8 月 31 日の水深 0, 30, 60, 90m, 2004 年 12 月 1 日の水深 30m, 2005 年 4 月 15 日の水深 10, 30, 60, 90m, 2005 年 8 月 2 日の水深 60m ではドメイン・アーキア的全菌数に対する割合がドメイン・バクテリアと同じかそれ以上の値を示す結果となった。

細菌全体が活性の低い水深においては、ドメイン・アーキアがその水深における生態系の中で果たしている役割がドメイン・バクテリアの役割と同じかそれ以上の重要性をもつ可能性があると考えられるかもしれない。2005 年 8 月 2 日にはクレンアーキオータとユーリアーキオータの検出を試みたが、サンプルの量が少なく、フィルター上にドメイン・アーキアが非常に少なかった。そのためクレンアーキオータとユーリアーキオータを蛍光顕微鏡下で観察することができず、検出限界以下という結果になった。

駿河湾 St. 4 でも検出されたドメイン・アーキア的全菌数に対する割合は水深 0-1000m で 1.1-2.4% であり、駿河湾 St. 4 では水深 0-1000m で細菌群集内に一様に存在していた。また他の海洋の例と比較すると、ハワイ沖では水深 100-1000m で約 10-30% であること(Karner *et al.*, 2001), 北大西洋では今回の FISH 法よりも検出率が高い方法で解析を行った結果、100m 以深ではドメイン・アーキアの割合が 50% を超えていたこと(Herndl *et al.*, 2005) ことが報告されており、これらの結果と比較すると駿河湾での値は小さいものであった。

まとめ

今回ドメイン・アーキアは清水港沖合い St. 3, 駿河湾 St. 4 の表層から深層においても検出され, 清水港沿岸域から駿河湾にかけてドメイン・アーキアが存在していることが確認された. 清水港沖合い St. 3 についてはその細菌数は 10^3 - 10^4 cells/mL であり, 清水港港内, 港外と大きな差はなかったが, 他の海洋の例と比較すると小さい値であった. また全菌数, ドメイン・バクテリアの細菌数は水深が深くなるにつれ減少していく傾向がみられたが, ドメイン・アーキアについてはそのような傾向がみられなかった. また環境データとの相関もなかった. 清水港沖合い St. 3 において細菌全体の活性が低い水深においてはドメイン・アーキアの全菌数に対する割合がドメイン・バクテリアと同じかそれ以上の値を示すところがあった. このことから, 細菌全体の活性が低い状態ではドメイン・アーキアがその水深における生態系の中で果たしている役割がドメイン・バクテリアと同じかそれ以上の重要性をもつ可能性があると考えられるかもしれない.

駿河湾 St. 4 でもドメイン・アーキアは深層からも検出された. 細菌数は 10^2 - 10^3 cells/mL であり, 他の海洋の例と比較すると小さい値であった. 全菌数に対する割合は 1.1-2.4%であった. 値は小さいが駿河湾でドメイン・アーキアは細菌群集内で一様に存在していることが確認された.

今後の課題

今回の研究では清水港沿岸域から駿河湾深層にかけてもドメイン・アーキアが存在していることは確認された. しかしその分布の様子に一定の傾向は今回のデータからではみられなかった. 海洋のドメイン・アーキアの生理学的知見については未知なる部分が多い, そのため海洋生態系の中でどのような役割を果たしているのかを解明するにはまだまだ必要な段階がいくつも残っている.

そこで今後の課題として, まず FISH 法の検出率を上げることが必要である. ドメイン・アーキアの細胞壁はドメイン・バクテリアと異なり, シュードムレイン構造を持つものなどが含まれている. そのためドメイン・バクテリアなどと比較すると通常の FISH 法では検出率が低くなると考えられる. 今回の結果もドメイン・アーキアの検出率は全体的に低い値であった. このことを改善するために細胞壁に酵素処理を行うことで, プローブが rRNA とハイブリダイズしやすくなるようにした CARD-FISH(Catalyzed Reporter Deposition-FISH)法(Pernthaler *et al.*, 2002)を行っていく必要がある. さらに CARD-FISH 法と同時に遺伝子解析も行い, 種の同定も行っていきたい. 種の同定をすることにより, 種レベルでの海洋のドメイン・アーキアの比較ができるようになると考えられる. また, ドメイン・アーキアが海洋中で捕食圧を受けている可能性も考えられ, それを確認するための培養実験も行う必要がある. 現在海洋のドメイン・アーキアの代謝活性についてはアミノ酸を摂取しているという報告(Ouverney *et al.*, 2000)などがあるがほとんど分かっていない. CARD-FISH 法や種レベルでの比較が行えるようになったら, アーキアの代謝活性にも注目していきたい. 現在 Microautoradiography と CARD-FISH 法を組み合わせ, 現場環境における細菌の分類と代謝活性を同時に行う MICRO-CARD-FISH 法(Microautoradiography-CARD-FISH)などが報告されている(Teira *et al.*, 2004). しかしこのような方法を使用してドメイン・アーキアの分布, 代謝活性などを解明してもその海洋環境中での生態解明にはまだ至らない. 海洋には細菌群集に影響を与えるさまざまな環境要因があり, また細菌群集内におけるドメイン・アーキアとそれ以外の細菌との関係も非常に重要である. 以上のように海洋のドメイン・アーキアの生態解明というのは非常に大きなテーマであり, 課題はいくつも残っている. しかし, だからこそこのテーマは挑戦しがいのある興味深いテーマともいえるのである.

引用文献

- Amann, R. I., Binder, J. D., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A., 1990,

- Combination of 16SrRNA-targeted oligonucleotideprobes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, **56**, 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H., 1995, Phylogenetic Identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.
 - Bouvier, T. C. and del Giorgio, P. A., 2002, Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, **47**, 453-470.
 - Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R., Schadhauer, S., Woese, C. R. and Stetter, K. O., 1994, Identifying members of the domain Archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3112-3119.
 - DeLong, F. E., 1989, Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, **243**, 1360-1363.
 - DeLong, F. E., 2003, Ocean of Archaea. *ASM News*, **69**, 503-511.
 - DeLong, F. E., Taylor, L., Marsh, L. M. and Preston, M. C., 1999, Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probe and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5554-5563.
 - Heidelberg, J. H., Heidelberg, K. B. and Colwell, R. R., 2002, Seasonality of Chesapeake bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5488-5497.
 - Herndl, J. G., Reinthaler, T., Aken, V. H., Veth, C., Pernthaler, A. and Pernthaler, J., 2005, Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2303-2309.
 - 石田祐三郎・杉田治男, 2005, 海の環境微生物学, 恒星社厚生閣, 47-96.
 - Karner, M. B., DeLong, F. E. and Karl, M. D., 2001, Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, **409**, 507-510.
 - Konneke, M., Bernhard, E. A., de la Torre, R. Jose., Walker, B. C., Waterbury, B. J. and Stahl, A. D., 2005, Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, **437**, 543-546.
 - 古賀洋介, 1988, 古細菌, 東京大学出版, 134-143.
 - Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wanger, M. and Schleifer, K.H., 1992, Phylogenetic oligonucleotide probe for the major subclasses of proteobacteria; problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 593-600.
 - Massana, R., DeLong, F. E. and Pedros-Alio, C., 2000, A few cosmopolitan phylotypes Dominate Planktonic Archaeal Assemblages in widely different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1777-1787.
 - Massana, R., Taylor, T. L., Murray, E. A., Wu, Y. K., Jeffrey, H. W. and DeLong, F. E., 1998, Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic archaea in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. *Limnology and Oceanography*, **43**, 607-617.
 - Massana, R., Murray, E. A., Preston, M. C. and DeLong, F. E., 1997, Vertical Distribution and Phylogenetic Characterization of Marine Planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 50-56.
 - Muyzer, G., del Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
 - 西條八束, 三田村緒佐武, 1995, 新編 湖沼調査法. 講談社, 189-191.
 - Ouverney, C. C. and Forman, A. J., 2000, Marine planktonic archaea take up amino acids. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, **66**, 4829-4833.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R., 2002, Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3049-3101.
 - Pernthaler, A., Preston, M. C., Pernthaler, J., DeLong, F. E. and Amann, R., 2002, Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probe for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 661-667.
 - Pinhassi, J. and Hagstrom, A., 2000, Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 245-256.
 - Porter, K. G. and Feig, Y., 1980, The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, **25**, 934.
 - 關 文威・長沼 毅, 1996, 生物海洋学入門. 講談社, 12-26.
 - Segerer, A., Stetter, K. O. and Klink, F., 1985, Two contrary modes of chemolithotrophy in the same archaeobacterium. *Nature*, **313**, 787-789.
 - Stahl, D. A. and Amann, R., 1991, Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.) *Nucleic acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, New York, 205-248.
 - Suzuki, M. T., 1999, Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 261-272.
 - 高久保瞳, 2004, Fluorescence in situ hybridization(FISH)法を用いた駿河湾清水港港内, 港外における細菌の群集と環境要因の関係. 静岡大学理学部生物地球環境科学科卒業論文.
 - Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Herndl, J. G., 2004, Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4411-4414.
 - Woese, R. C. and Fox, E. G., 1977, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5088-5090.
 - Yokokawa, T. and Nagata, T., 2004, Growth rate of the major phylogenetic bacterial groups in the Delaware estuary. *Limnol and Oceanography*, **49**, 1620-1629.
 - 八杉龍一, 小関治男, 小谷雅樹, 日高敏隆, 1996, 生物学辞典 第4版. 岩波書店, 433-434.

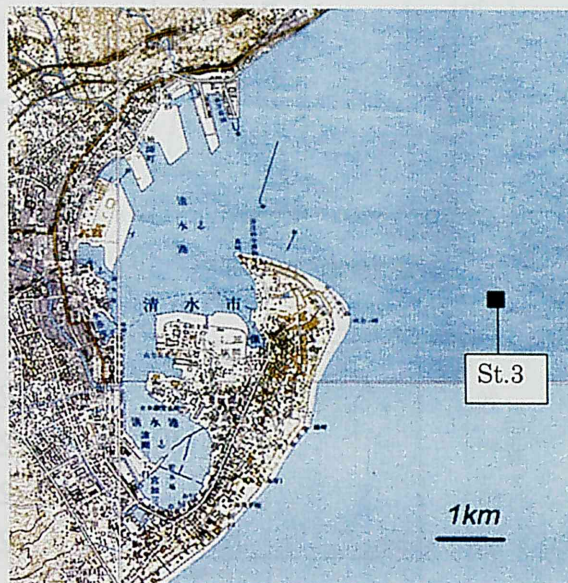


図1. 清水港沖合いにおけるサンプリング地点.

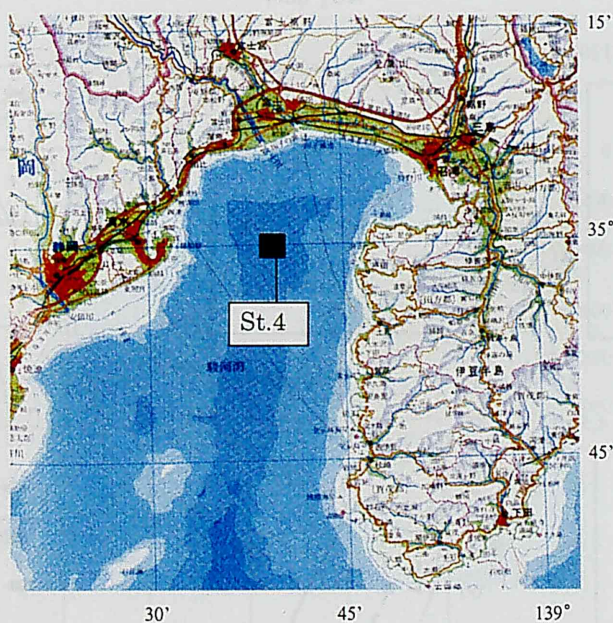


図2. 駿河湾におけるサンプリング地点.

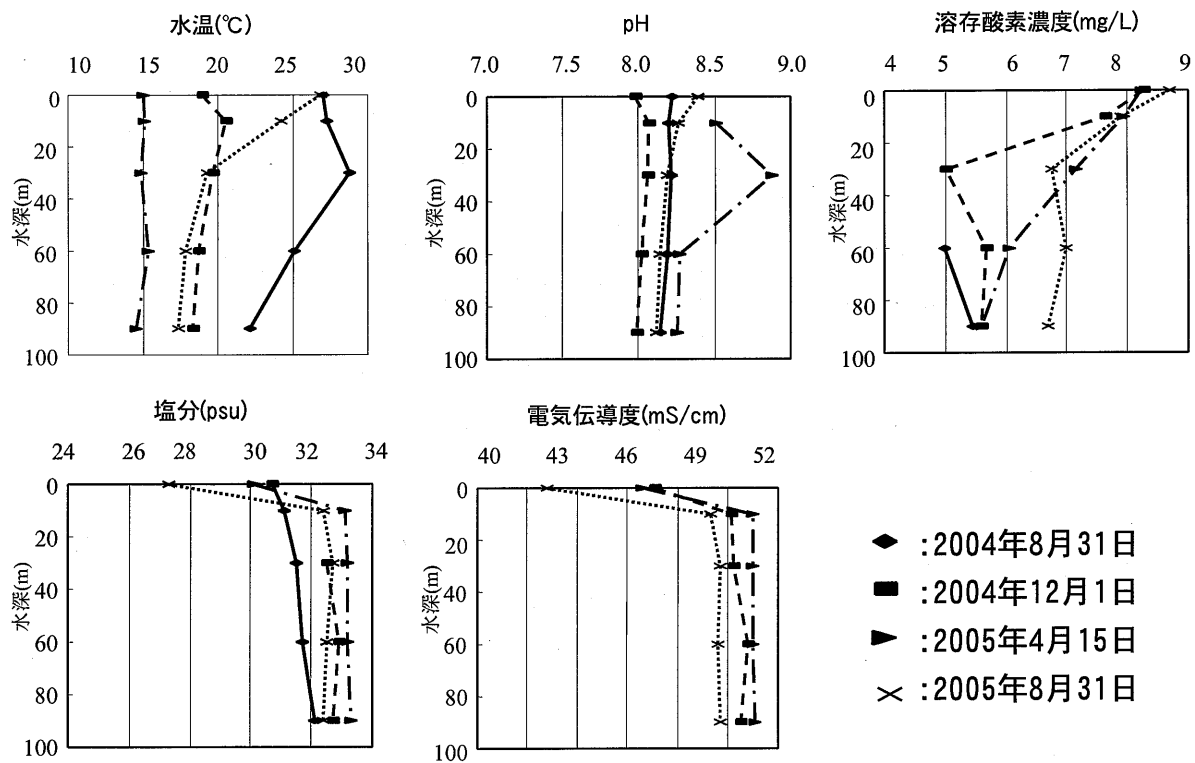


図3. 清水港沖合い St. 3 における水温, pH, 溶存酸素濃度, 塩分, 電気伝導度の鉛直分布.

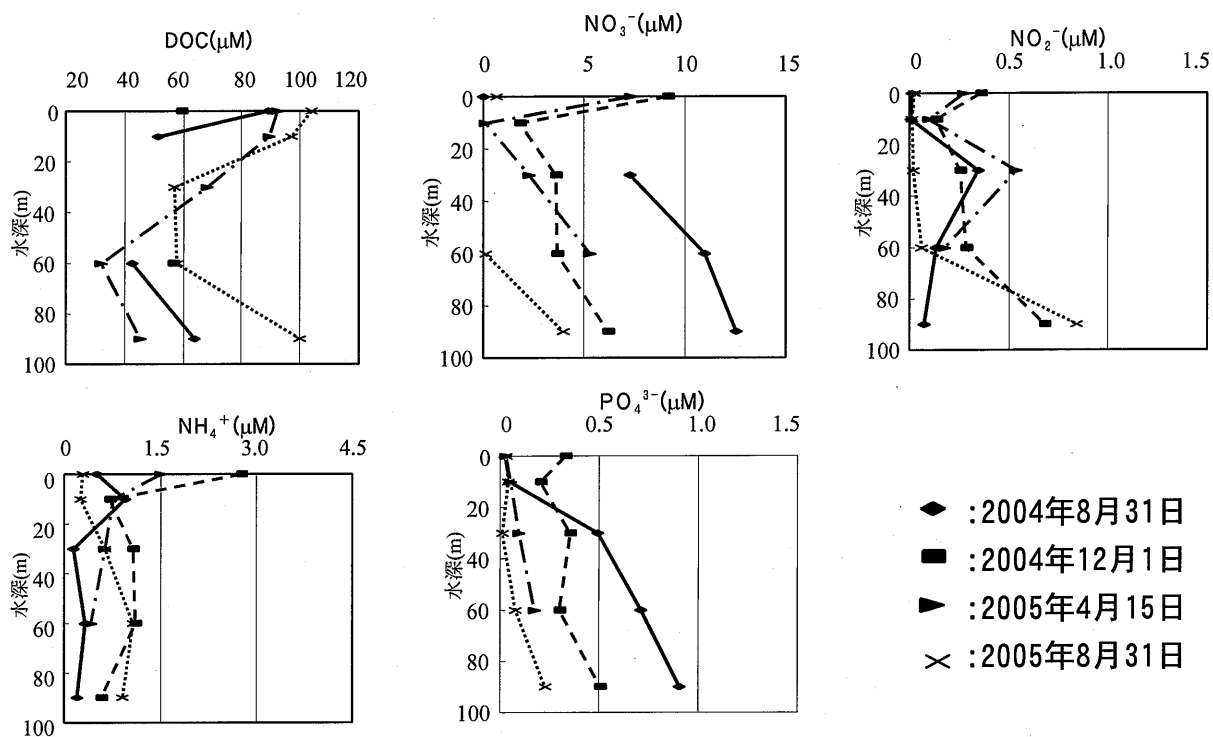


図4. 清水港沖合い St. 3 における溶存有機炭素(DOC), 栄養塩濃度 (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) の鉛直分布.

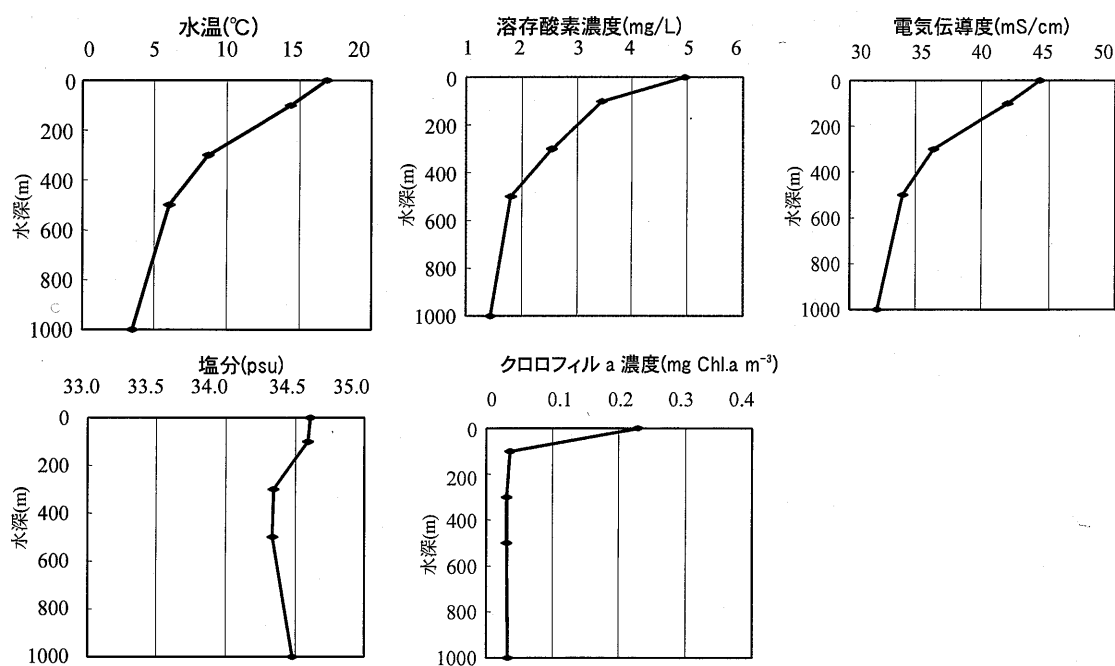


図5. 駿河湾 St. 4 における水温, 溶存酸素濃度, 電気伝導度, 塩分, クロロフィル a 濃度の鉛直分布.

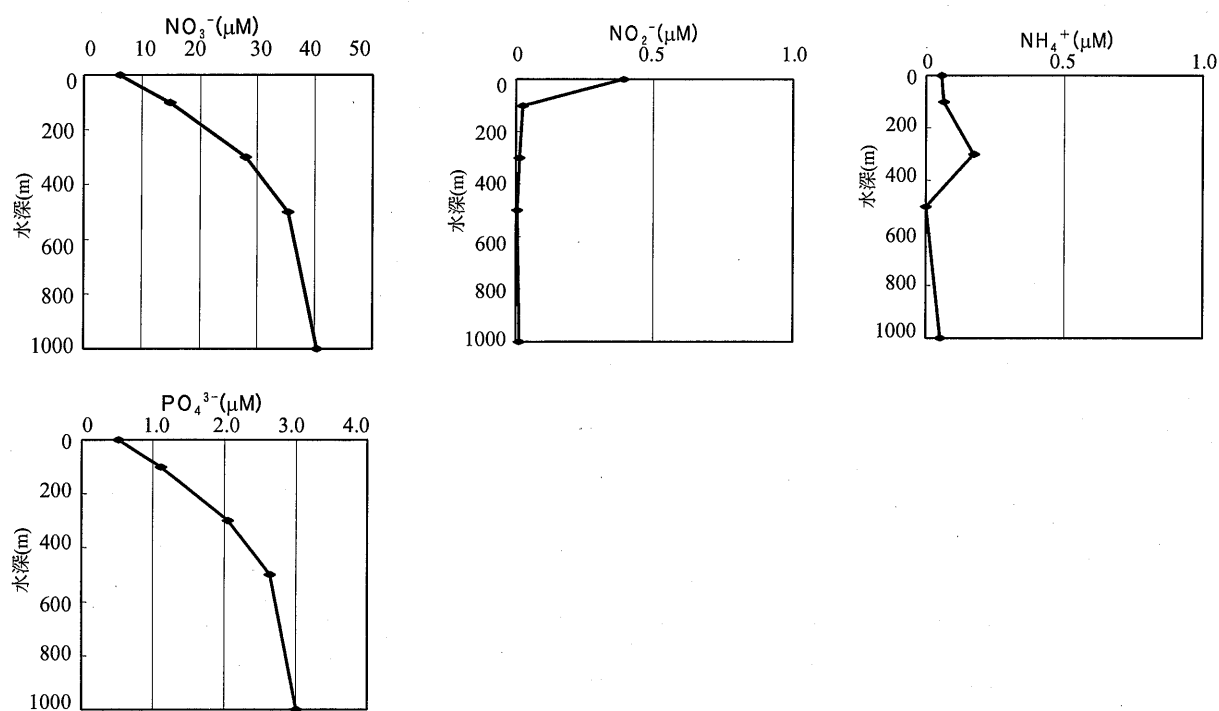


図6. 駿河湾 St. 4 における栄養塩濃度 (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻) の鉛直分布.

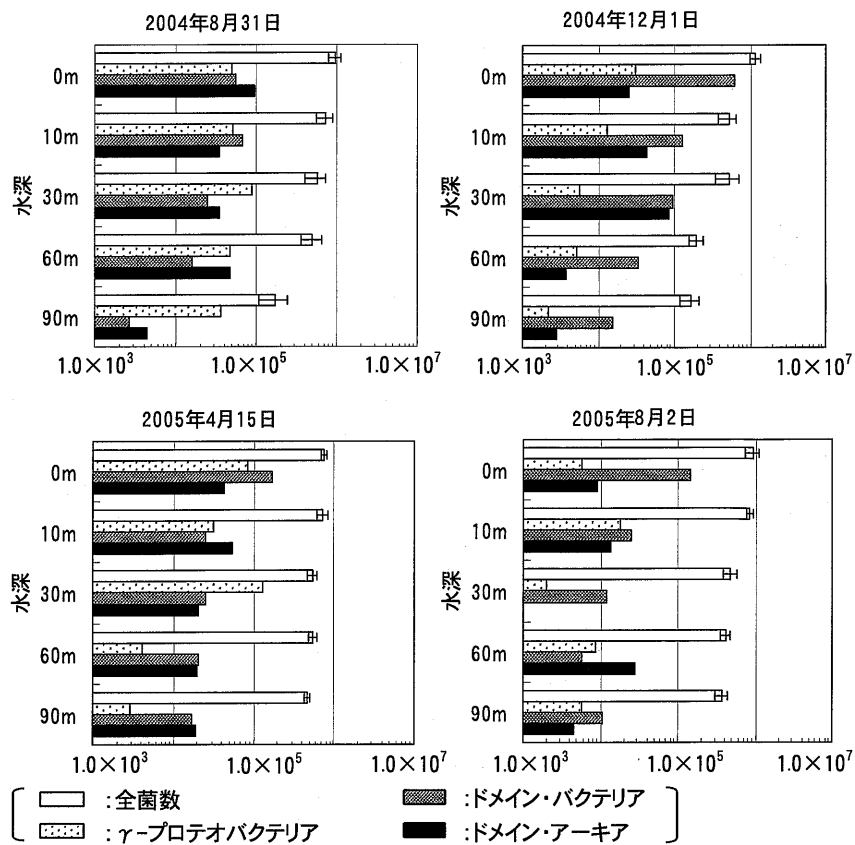


図7. 清水港沖合い St. 3 における細菌の群集構造(cells/mL).

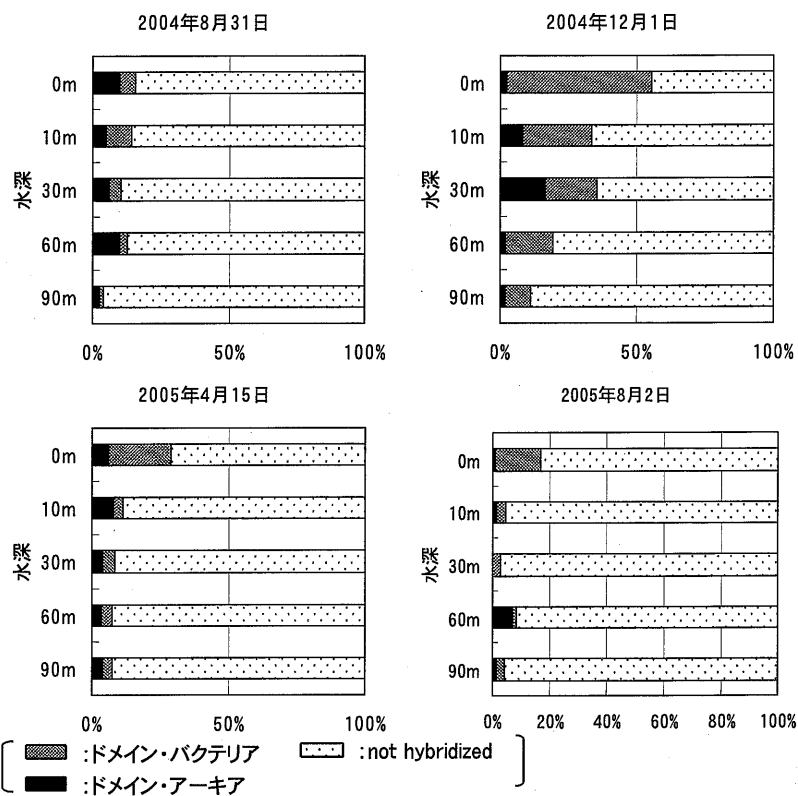


図8 . 清水港沖合い St. 3 における各細菌の全菌数に対する割合.

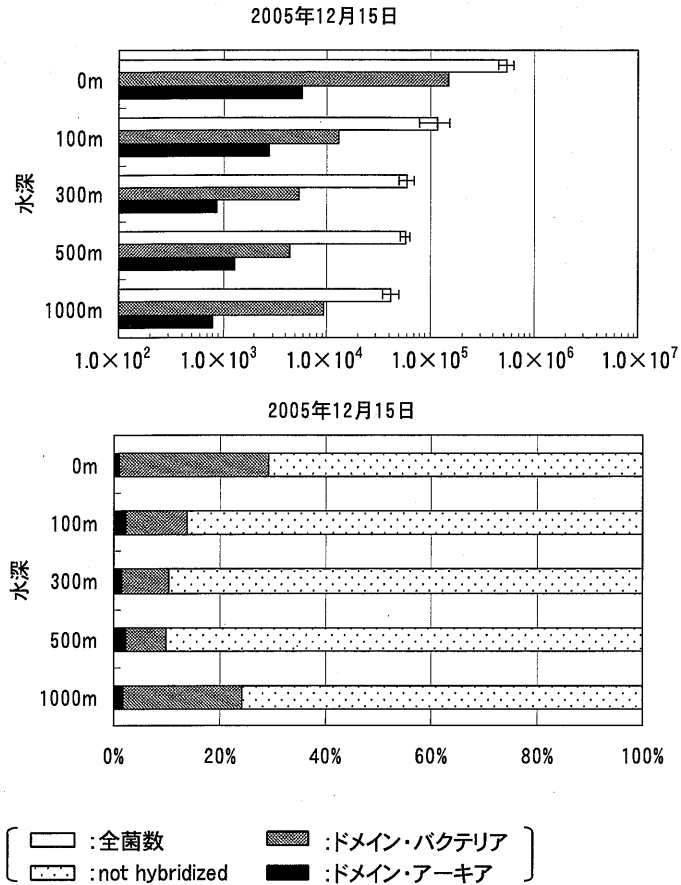


図 9. 駿河湾 St. 4 における細菌の群集構造(cells/mL)(左)と各細菌の全菌数に対する割合(右).

全細菌数(DNA 染色より検出)					
ドメイン・バクテリア (FISH 法: プローブ EUB338 より 検出)			ドメイン・アーキア (FISH 法: プローブ ARCH915 より検出)		
プロテ オバク テリア 界	シアノ バクテリ ア界	その他の 界	ユーリ アーキ オータ 界 (FISH 法: プローブ EURY498 より検出)	クレン アーキ オータ 界 (FISH 法: プローブ CREN499 より検出)	その他 の界
Not hybridized					
死滅 休眠状態					

図 10. FISH 法によって検出される細菌群集の概念図.

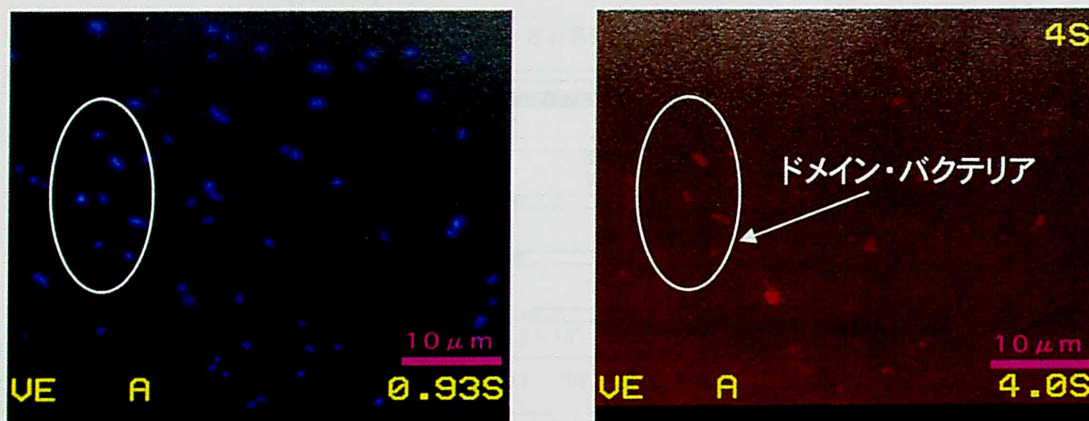


図 11. FISH 法により解析したドメイン・バクテリアの蛍光顕微鏡画像(2004 年 12 月水深 0m).
上が IG 励起画像、下が UW 励起画像を示す.

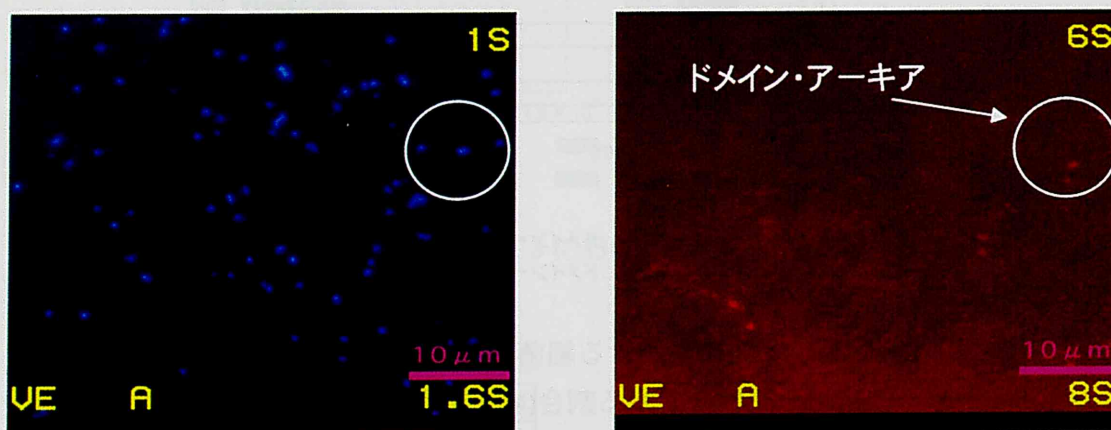


図 12. FISH 法により解析したドメイン・アーキアの蛍光顕微鏡画像(2004 年 12 月水深 30m).
上が IG 励起画像、下が UW 励起画像を示す.

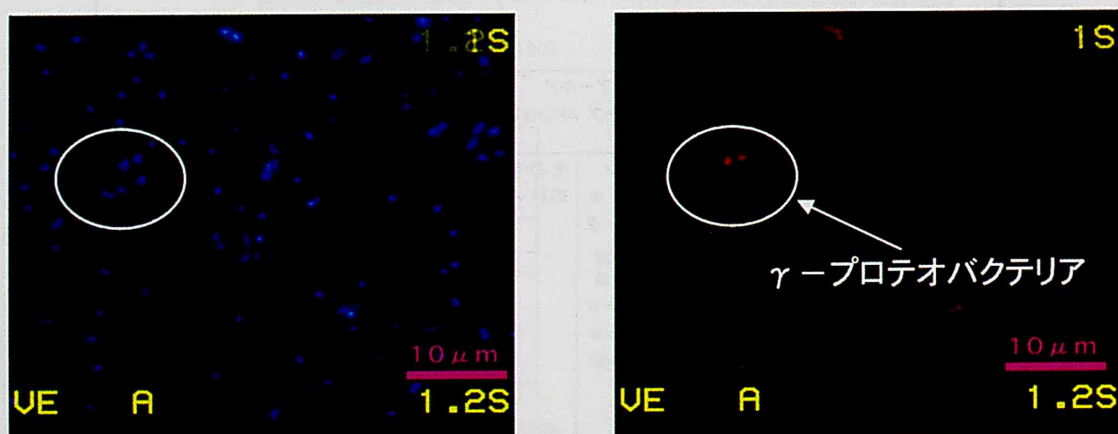


図 13. FISH 法により解析した γ -プロテオバクテリアの蛍光顕微鏡画像(2004 年 12 月水深 0m).
上が IG 励起画像、下が UW 励起画像を示す.

表1. FISH法で用いた遺伝子プローブの塩基配列.

probe	specificity	probe sequence(5'-3')
EUB338	domain Bacteria	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'
ARC915	domain Archaea	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'
GAM42a	γ -Proteobacteria	5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'
EURY498	Euryarchaeota	5'- CTT GCC CRG CCC TT -3'
CREN499	Crenarchaeota	5'- CCA GRC TTG CCC CCC GCT -3'

probe	target site rRNA position	references
EUB338	16S, 338-335	Amman <i>et al.</i> , 1990
ARC915	16S, 915-935	Stahl and Amann., 1991
GAM42a	23S, 1027-1943	Manz <i>et al.</i> , 1992
EURY498	16S, 498 - 511	Burggraf <i>et al.</i> , 1994
CREN499	16S, 499 - 516	Burggraf <i>et al.</i> , 1994

表2. 各プローブのハイブリダイゼーション緩衝液(1), 洗浄溶液の組成(2). Hybridization, Washing条件(3).

(1)

probe	specificity	ハイブリダイゼーション緩衝液組成			
		NaCl	Tris-HCl	SDS	formamide
EUB338	domain Bacteria	0.9M	20mM	0.01%	20%
ARCH915	domain Archaea				35%
GAM42a	γ -proteobacteria				0%
CREN499	Crenarchaeota				
EURY498	Euryarchaeota				

(2)

probe	specificity	洗浄溶液組成			
		NaCl	Tris-HCl	SDS	4H EDTA
EUB338	domain Bacteria	0.225M	20mM	0.01%	5mM
ARCH915	domain Archaea	0.07M			
GAM42a	γ -proteobacteria	0.08M			
CREN499	Crenarchaeota	0.9M			
EURY498	Euryarchaeota				

(3)

probe	specificity	Hybridization		Washing	
		temp(°C)	time	temp(°C)	time
EUB338	domain Bacteria	46	90min	48	15min
ARCH915	domain Archaea				
GAM42a	γ -proteobacteria				
CREN499	Crenarchaeota	45	120min	48	20min
EURY498	Euryarchaeota				

表3. 清水港沖合いSt. 3における水温, pH, 溶存酸素濃度, 塩分, 電気伝導度.
n.d.:no data.

水温(°C)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	27.0	18.9	15.0	26.9
10m	27.3	20.5	15.1	24.2
30m	28.8	19.6	14.8	19.2
60m	25.1	18.7	15.3	17.8
90m	22.1	18.3	14.5	17.3
pH				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	8.22	7.98	n.d	8.39
10m	8.20	8.07	8.51	8.26
30m	8.21	8.06	8.88	8.19
60m	8.19	8.02	8.27	8.14
90m	8.14	7.99	8.25	8.12
溶存酸素濃度(mg /L)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	n.d.	8.27	8.23	8.71
10m	n.d.	7.63	7.94	7.89
30m	n.d.	5.01	7.16	6.76
60m	4.98	5.67	6.05	7.00
90m	5.44	5.58	5.58	6.70
塩分(psu)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	30.7	30.7	30.1	27.3
10m	31.1	n.d.	33.1	32.4
30m	31.5	32.5	33.2	32.7
60m	31.7	32.9	33.2	32.5
90m	32.1	32.7	33.3	32.4
電気伝導度(mS/cm)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	n.d.	47.1	46.6	42.8
10m	n.d.	50.1	51.0	49.3
30m	n.d.	50.2	51.0	49.7
60m	n.d.	50.8	51.0	49.6
90m	n.d.	50.5	51.1	49.7

表4. 清水港沖合いSt. 3における溶存有機炭素(DOC)

栄養塩濃度(NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}).

n.d.:no data.

DOC(μM)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	89.2	59.5	92.3	103.8
10m	51.1	n.d.	89.6	97.2
30m	n.d.	n.d.	68.1	57.1
60m	42.5	56.7	31.9	57.9
90m	63.9	n.d.	45.4	99.8

NO_3^- (μM)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	0.65	9.15	7.38	0.00
10m	n.d.	1.82	0.13	n.d.
30m	n.d.	3.64	2.29	7.29
60m	0.11	3.70	5.28	10.94
90m	4.00	6.23	n.d.	12.52

NO_2^- (μM)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	0.02	0.36	0.27	0.01
10m	0.01	0.13	0.10	0.00
30m	0.02	0.25	0.53	0.34
60m	0.06	0.28	0.17	0.13
90m	0.85	0.68	n.d.	0.07

NH_4^+ (μM)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	0.29	2.76	1.50	0.51
10m	0.25	0.70	0.75	0.94
30m	0.63	1.07	0.64	0.14
60m	1.07	1.10	0.42	0.33
90m	0.90	0.58	n.d.	0.20

PO_4^{3-} (μM)				
水深	2004年 8月31日	2004年 12月1日	2005年 4月15日	2005年 8月2日
0m	0.03	0.33	0.03	0.02
10m	0.04	0.20	0.05	0.05
30m	0.01	0.35	0.10	0.49
60m	0.08	0.30	0.18	0.71
90m	0.23	0.51	n.d.	0.90

表6. 清水港沖合いSt. 3における細菌の群集構造(cells/mL).

2004年8月31日				
水深	全菌数	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	$9.7 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	5.5×10^4	9.6×10^4	4.9×10^4
10m	$7.3 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$	6.9×10^4	3.4×10^4	5.1×10^4
30m	$5.7 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	2.5×10^4	3.5×10^4	9.0×10^4
60m	$5.0 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$	1.6×10^4	4.8×10^4	4.7×10^4
90m	$1.8 \times 10^5 \pm 6.8 \times 10^4$	2.7×10^3	4.4×10^3	3.7×10^4

2004年12月1日				
水深	全菌数	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	$1.2 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$	6.2×10^5	2.6×10^4	3.1×10^4
10m	$5.2 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$	1.3×10^5	4.3×10^4	1.3×10^4
30m	$5.2 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	9.5×10^4	8.6×10^4	5.7×10^3
60m	$2.0 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^4$	2.5×10^4	3.8×10^3	5.7×10^3
90m	$1.7 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$	1.6×10^4	2.8×10^3	2.2×10^3

2005年4月15日				
水深	全菌数	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	$7.5 \times 10^5 \pm 6.5 \times 10^4$	1.7×10^5	4.3×10^4	8.4×10^4
10m	$7.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$	2.5×10^4	5.5×10^4	3.2×10^4
30m	$5.5 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^4$	2.5×10^4	2.1×10^4	1.3×10^5
60m	$5.5 \times 10^5 \pm 5.8 \times 10^4$	2.0×10^4	2.0×10^4	4.1×10^3
90m	$4.7 \times 10^5 \pm 4.4 \times 10^4$	1.7×10^4	1.9×10^4	2.8×10^3

2005年8月2日				
水深	全菌数	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	$9.3 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$	1.5×10^5	9.1×10^3	5.7×10^3
10m	$8.4 \times 10^5 \pm 8.5 \times 10^4$	2.5×10^4	1.4×10^4	1.8×10^4
30m	$4.8 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$	1.2×10^4	1.0×10^3	2.0×10^3
60m	$4.2 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^4$	5.8×10^3	2.9×10^4	8.7×10^3
90m	$3.7 \times 10^5 \pm 7.0 \times 10^4$	1.1×10^4	4.6×10^3	5.8×10^3

表7. 清水港沖合いにおける各細菌の全菌数に対する割合(%).

2004年8月31日			
水深	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	5.6	9.9	5.0
10m	9.5	4.7	7.0
30m	4.3	6.1	15.8
60m	3.1	9.6	9.4
90m	1.5	2.5	21.0

2004年12月1日			
水深	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	52.9	2.2	2.7
10m	25.3	8.4	2.6
30m	18.5	16.7	1.1
60m	17.3	1.9	2.7
90m	9.3	1.7	1.3

2005年4月15日			
水深	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	22.8	5.8	11.1
10m	3.5	7.6	4.4
30m	4.6	3.7	23.5
60m	3.7	3.6	0.7
90m	3.5	4.0	0.6

2005年8月2日			
水深	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア	γ -プロテオバクテリア
0m	15.7	1.0	0.6
10m	3.0	1.6	2.1
30m	2.5	0.2	0.4
60m	1.4	6.9	2.1
90m	3.0	1.3	1.6

表8. 駿河湾St. 4における細菌の群集構造(cells/mL).

水深	全菌数	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア
0m	$5.4 \times 10^5 \pm 8.3 \times 10^4$	1.5×10^5	5.7×10^3
100m	$1.2 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^4$	1.3×10^5	2.8×10^3
300m	$6.0 \times 10^4 \pm 9.4 \times 10^3$	5.4×10^3	8.8×10^2
500m	$5.8 \times 10^4 \pm 6.5 \times 10^3$	4.4×10^3	1.3×10^3
1000m	$4.2 \times 10^4 \pm 7.5 \times 10^3$	9.3×10^3	8.0×10^2

表9. 駿河湾St. 4における各細菌の全菌数に対する割合(%).

水深	ドメイン・バクテリア	ドメイン・アーキア
0m	28.0	1.1
100m	11.4	2.4
300m	9.0	1.5
500m	7.6	2.2
1000m	22.2	1.9

成果 5

**Selective Phylogenetic Analysis (SEPA) Targeted at
16S rRNA Genes of Hyperthermophilic Archaea
in Deep-Subsurface Hot Biosphere**

Hiroyuki Kimura,^{1*} Satoshi Hanada,² and Kenji Kato¹

Department of Geosciences, Faculty of Science, Shizuoka University, Shizuoka, Shizuoka 422-8529,¹ and Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Ibaraki 305-8566,² Japan

Running title: Selective phylogenetic analysis of hyperthermophilic archaea

*Corresponding author. Mailing address:

Department of Geosciences, Faculty of Science, Shizuoka University, Shizuoka, Shizuoka 422-8529, Japan.

Phone: 81-54-238-4784. Fax: 81-54-238-0491.

E-mail: shkimur@ipc.shizuoka.ac.jp.

Abstract: Since core samples obtained by deep drilling are likely to be contaminated with mesophilic microbes in drilling fluid, a novel method for eliminating ribosomal RNA genes PCR-amplified from the mesophiles and for phylogenetic analysis of rRNA genes of thermophiles in core samples recovered from deep-subsurface geothermal environments has been developed (H. Kimura, M. Sugihara, K. Kato, and S. Hanada, *Appl. Environ. Microbiol.* 72:21-27, 2006). The method consists of thermal denaturation and digestion with exonuclease I (Exo I), based on a strong correlation between optimal growth temperatures of prokaryotes and the G+C (guanine + cytosine) nucleotide contents of their 16S rRNA genes. In this study, deep-sea hydrothermal fluid (117°C) and surface seawater (29.9°C) were used to mimic even deep-subsurface geothermal samples and drilling fluid, respectively. Bulk DNAs were extracted from two environmental samples, and archaeal 16S rRNA genes were amplified by PCR separately. The PCR amplicons from the surface seawater were denatured at 82°C and completely digested by Exo I, while PCR amplicons from the deep-sea hydrothermal fluid remained intact after denaturation at 84°C and subsequent digestion. Equal amounts of bulk DNAs extracted from two samples were further blended and used as template for PCR of archaeal 16S rRNA genes. The PCR amplicons from the DNA mixture were denatured at 84°C and digested with Exo I, and clone library was constructed. The results demonstrated that archaeal 16S rRNA genes from the surface seawater were completely eliminated by thermal denaturation and digestion with Exo I, and all clones agreed with clones derived from 16S rRNA genes of hyperthermophilic archaea in deep-sea hydrothermal fluid. This method showed a quite effective for phylogenetic analysis of 16S rRNA genes of hyperthermophilic microbes, which ought to exist in core samples recovered by deep drilling from deep-subsurface geothermal environments such as over 100°C.

INTRODUCTION

The temperature of subsurface environment increases steadily with the depth and at a fairly uniform rate. The thermal gradient is between approximately 15°C and 30°C per kilometer of depth in non-volcanic regions (Gold, 1999). The deep-subsurface crusts are therefore considered to be extremely hot environments. To date, a number of thermophilic and hyperthermophilic prokaryotes have been isolated from geothermal and hydrothermal environments such as terrestrial hot spring and deep-sea hydrothermal vent fields (reviewed by Reysenbach et al. [2002]). The most hyperthermophilic prokaryotes, *Pyrolobus fumarii*, are known to have maximum growth temperature of 113°C (Blöchl et al., 1997). In addition, archaeal strain that is closely related to *Pyrodicticum occultum* and *Pyrobaculum aerophilum* keeps a record of the highest growth temperature of 121°C (Kashefi and Lovley, 2003). This means that life can survive down to a depth of 8 km in regions of crust that exhibit the low thermal gradient (15°C per kilometer or less) and 4 km where the thermal gradient is high (30°C per kilometer). Many microbiologists have been therefore interested in subsurface biosphere in the deep-subsurface geothermal environments (Gold, 1992).

In recent years, international deep drilling projects have been expanded for scientific study including microbiology. Geothermal core samples have been already recovered from extremely hot subsurface environments such as over 250°C, e.g., in the German Continental Deep Drilling Project "KTB" (Descher et al., 1998; Emmermann, 1995) and in the Ocean Drilling Program Leg 193 cruise (Shipboard Scientific Party, 2002; Kimura et al., 2003; Lackschewitz et al., 2004). In the study of subsurface microbial communities with core samples obtained by drilling, a major problem is contamination with mesophilic microbes in the drilling fluid, which consists primarily of surface seawater or river water. The cell density of the mesophiles in drilling fluid is likely to be much higher than the cell density of thermophiles and hyperthermophiles in core samples recovered from deep-subsurface geothermal environments. This contamination by mesophilic microbes invalidates especially culture-independent phylogenetic analysis based on sequences of ribosomal RNA gene, because PCR targeted at rRNA genes tends to amplify genes from indigenous thermophiles as well as genes from contaminating mesophiles. At present, tracer monitoring with perfluorocarbon chemicals or fluorescent microspheres has been used

to test for microbial contamination (Smith et al., 2000a, 2000b). However, this type of tracer monitoring is only applicable to the investigation of complete and dense core samples. Since deep-subsurface materials are likely to be frequently altered and cracked by heat from magma, the tracer monitoring is difficult to apply for determining microbial contamination in deep drilling.

Kimura et al. (2006) have reported a novel method for eliminating 16S rRNA genes of the contaminating mesophiles into core samples in drilling process. This method is based on the following findings that optimal growth temperatures of prokaryotes are strongly correlated with G+C contents of 16S rRNA genes (Galtier et al., 1999); the rRNA genes of thermophiles and hyperthermophiles show high G+C contents; and these high-G+C-content rRNA genes are indicative of higher melting temperatures (T_m) than those of mesophiles. Because of the differences in T_m values, the 16S rRNA genes of mesophiles can be selectively denatured by moderate heat treatment, followed by digestion with exonuclease I (Exo I) that has a strict specificity for single-stranded DNAs. Kimura et al. (2006) has attempted a test of this technique by using a mixture of terrestrial hot spring (76°C) and river water (14°C) to mimic a deep-subsurface geothermal sample contaminated with drilling fluid. The PCR-amplified 16S rRNA genes from the mixture of bulk DNAs extracted from hot spring and river water are denatured and digested with Exo I, and clone library is constructed. The result has indicated that almost 16S rRNA genes of mesophiles originated from the river water can be removed, however, some clones (7% of all clones) have survived the heat treatment and digestion with Exo I.

Here, we describe a selective phylogenetic analysis (SEPA) targeted at 16S rRNA genes of hyperthermophilic archaea, which are likely to inhabit the deeper and hotter subsurface environments. In this study, we used deep-sea hydrothermal fluid (117°C) and surface seawater (29.9°C) to simulate deep-subsurface geothermal samples and drilling fluid, and elucidated whether 16S rRNA genes of mesophilic archaea derived from surface seawater were perfectly eliminated by the SEPA.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Samples of deep-sea hydrothermal fluid were collected from a white smoker with maximal fluid temperature of 117°C in Archaean site (12°56.34'N, 143°37.89'E, depth = 3,001 m) that was located at off-axial seamounts of back-arc spreading in the southern Mariana Trough. During the YK05-09 cruise in July to August 2005 using deep-sea submersible vehicle (DSV) *Shinkai 6500* and R/V *Yokosuka*, the hydrothermal fluid was sampled with a water pumping system (Sakai, 1990) that was equipped with the DSV. In addition, surface seawater (29.9°C) was collected at the southern Mariana Trough area from the deck of R/V *Yokosuka*. The surface seawater was obtained with a clean plastic bucket that was pre-washed with distilled water and re-rinsed with the surface seawater. Exactly four liters of water samples were each aseptically filtered with a Sterivex-GV filter unit (pore size, 0.22 µm; Millipore, Bedford, MA) via sterile silicon tubes and tubing pumps. The microbial cells trapped in the filter units were frozen immediately at -80°C in the shipboard laboratory until DNA extraction.

DNA extraction, real-time PCR, and melting curve analysis. The bulk DNAs of microbes trapped by the filter units were extracted according to the method previously described by Somerville et al. (1989). The filters were washed with 10 ml of SET buffer (20% [wt/vol] sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), and 1.8 ml of SET buffer was added into the filter units. The microbial cells were lysed with a lysozyme and proteinase K solutions in the filter units. The bulk DNAs were then purified with phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture (25:24:1 [vol/vol/vol], pH 8.0) and concentrated by ethanol precipitation.

The archaeal 16S rRNA genes were PCR-amplified with archaea universal primer set, Arch109F (Großkopf et al., 1998) and Arch915R (Stahl and Amann, 1991), and real-time PCR reagents (SYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems, Foster City, CA). To measure the T_m value of the PCR amplicons, melt-curve analysis were performed immediately after the real-time PCR. Fluorescence signals during the real-time PCR and melting curve analysis were monitored by using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

PCR, cloning, and sequencing. The archaeal 16S rRNA genes from bulk DNAs extracted from the deep-sea hydrothermal fluid and the surface seawater were PCR-amplified using KOD DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) and the archaea universal primer set that was used in the real-time PCR. The resultant PCR amplicons were cloned using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA); clone libraries of archaeal 16S rRNA genes were constructed separately.

The sequences of insert PCR amplicons selected from recombinant colonies determined with a capillary DNA sequencer (RISA-384 system; SHIMADZU, Kyoto, Japan). The vector-specific primers (T7 and T3) were used for the sequencing reactions. The sequences of archaeal 16S rRNA gene were checked for chimera formation by using the CHIMERA_CHECK program of the Ribosomal Database Project II website (Maidak et al., 2001). Nonchimeric sequences were aligned, and pairwise similarity values were calculated with GENETYX-MAC (GENETYX, Tokyo, Japan). A similarity of 99% was used as a cutoff value for grouping the sequences into different operational taxonomic units (OTUs). The representative sequences in each OTU were homology-searched using the FASTA program (Lipman and Person, 1985; Person and Lipman, 1988) in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>).

Heat treatment and digestion with exonuclease I (Exo I). Archaeal 16S rRNA genes were PCR-amplified from bulk DNAs in the deep-sea hydrothermal fluid and the surface seawater using the archaea universal primer set, Arch109F and Arch915R. In addition, a DNA mixture was prepared in which equal amount of bulk DNAs extracted from each of two environmental samples was blended. The archaeal 16S rRNA genes in this DNA mixture were then amplified using the same primer set. These three PCR amplicons were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA) and were resuspended in sterile distilled water. The purified PCR amplicons were denatured at various temperatures between 78°C and 86°C for 30 s, and immediately chilled on ice in order to prevent re-hybridization of denatured PCR amplicons. Exo I (TaKaRa, Kyoto, Japan) was then added to the chilled reaction tubes followed by incubation at 37°C for 30 min to allow for sufficient digestion of the denatured PCR amplicons. Since Exo I is a 3' to 5' exonuclease

specific to single-stranded DNA (ssDNA) (Brody et al., 1986), all ssDNAs in a reaction tube were completely digested, leaving any double-stranded DNA intact (Flow chart of this method is shown in Fig. 1). Prior to the cloning of the surviving PCR amplicons, the Exo I was inactivated by heating the sample at 80°C for 15 min. Subsequently, the PCR amplicons that were amplified from the DNA mixture and survived the heat treatment and digestion with Exo I were cloned by using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced with a capillary DNA sequencer (RISA-384 system; SHIMADZU, Kyoto, Japan). The sequencing was performed using the vector-specific primer T7, determining approximately 600 bp. The obtained sequences were aligned with GENETYX-MAC (GENETYX, Tokyo, Japan), and pairwise similarity values were calculated for grouping them into OTUs. The similarity described above was used as cutoff value for grouping the sequences into different OTUs. The at least one representative in each OTU was homology-searched using FASTA program in the DDBJ, and were compared with sequences obtained from the original deep-sea hydrothermal fluid and surface seawater.

Nucleotide sequence accession numbers. The archaeal 16S rRNA gene sequences obtained from deep-sea hydrothermal fluid and surface seawater have been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank database under the following series of accession numbers: AB257406 to AB257411 (deep-sea hydrothermal fluid) and AB257412 to AB257418 (surface seawater).

RESULTS AND DISCUSSION

Melting curve analysis of archaeal 16S rRNA genes. The archaeal 16S rRNA genes from the bulk DNAs in deep-sea hydrothermal fluid (117°C) and surface seawater (29.9°C) were PCR-amplified and their T_m values were measured by melting curve analysis (Fig. 2A and 2B). The T_m value of the 16S rRNA gene fragments from the deep-sea hydrothermal fluid was 90.2°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) on average, whereas T_m value of the 16S rRNA gene fragments from the surface seawater was much lower, namely,

85.2°C ($\pm 0.2^\circ\text{C}$). These two peaks of the melting curves were completely separated, which showed that there was a great difference between G+C contents of the archaeal 16S rRNA genes derived from the deep-sea hydrothermal fluid and the surface seawater.

The archaeal 16S rRNA genes from a DNA mixture that blended equal amounts of the bulk DNAs extracted from the deep-sea hydrothermal fluid and the surface seawater were PCR-amplified, and the melting curve of the PCR amplicons was plotted (Fig. 2C). Two peaks of the melting curve were consequently detected and they were completely consistent with the T_m values of the PCR amplicons from the surface seawater and the deep-sea hydrothermal fluid. The result clearly indicated that the polymerase chain reaction using the DNA mixture as templates amplified archaeal 16S rRNA genes derived from both surface seawater and deep-sea hydrothermal fluid.

Archaeal community in deep-sea hydrothermal fluid. Approximately 800 bp of archaeal 16S rRNA gene fragments from the bulk DNAs in deep-sea hydrothermal fluid were amplified. A clone library was constructed, and then 53 clones were randomly selected and sequenced (Table 1). The clones were divided into 6 operational taxonomic units (OTUs) based on alignment analysis of the sequences (ARCS-01 to ARCS-06). The phylogenetic analysis revealed that these OTUs belonged to the genera *Vulcanisaeta*, *Archaeoglobus*, *Methanotorris*, and *Thermococcus*. ARCS-01 and ARCS-02 were closely related to *Vulcanisaeta distributa* belonging to *Crenarchaeota*, which is known to be a heterotrophic, anaerobic hyperthermophilic archaea isolated from terrestrial hot springs (Itoh et al., 2002). The clones in ARCS-01 and ARCS-02 comprised 79.2% of the total clones. ARCS-03 and ARCS-04 showed the highest homology to *Archaeoglobus profundus* belonging to *Euryarchaeota* (Kashefi et al., 2002), and accounted for 15.1% of the total clones. ARCS-05 showed the closest match to *Methanotorris* sp. Mc-I-70, which was obtained from deep-sea hydrothermal vents field (Takai et al., 2004). The clones in ARCS-05 accounted for 3.8% of the total clones. ARCS-06 was closely related to *Thermococcus kodakaraensis* obtained from the terrestrial geothermal area (Fukui et al., 2005), and the clone number was the lowest percentage in the all OTUs. The phylogenetic analysis indicated that all clones belonged to the clusters primarily composed of hyperthermophilic archaeal strains or environmental clones that were

collected from the geothermal and hydrothermal hot environments.

The G+C nucleotide contents of the 16S rRNA gene sequences ranged between 65.5% (ARCS-05) and 68.0% (ARCS-01), with an overall average of 67.3% (Table 1), the extremely high G+C contents reflected the high T_m value, which was actually measured by the melting curve analysis (Fig. 2A).

Archaeal community in surface seawater. A 16S rRNA gene clone library was constructed in the same manner as clone analysis of the deep-sea hydrothermal fluid sample, and 52 clones in the library were analyzed (Table 1). The clones were divided into 7 OTUs based on alignment analysis of their sequences (SURF-01 to SURF-07). The phylogenetic analysis indicated that the 7 OTUs could not be placed within currently known archaeal divisions, as the closest database match was <82% similarity to the clone sequence SRI-298 (Skirmisdottir et al., 2000) and DJ3.25-13 (Cytryn et al., 2000). These clones may be therefore candidates for novel archaeal divisions. The G+C nucleotide contents of the 16S rRNA gene sequences ranged from 54.0% (SURF-01) to 56.4% (SURF-06), with an overall average of 54.5% (Table 1). The overall average G+C content was much lower than that of archaeal 16S rRNA genes originated from the deep-sea hydrothermal fluid. The low G+C content ought to lead to the low T_m value of 16S rRNA gene fragments, which were determined based on melting curve analysis (Fig 2B).

Heat treatment, digestion, and cloning of archaeal 16S rRNA genes. The respective archaeal 16S rRNA genes derived from the hydrothermal fluid and surface seawater were again amplified. In addition, a DNA mixture of equal amounts of bulk DNA extracted from the deep-sea hydrothermal fluid and the surface seawater was prepared, and the archaeal 16S rRNA genes in the DNA mixture PCR-amplified under the same conditions as before. The PCR products from these three amplifications were purified and resuspended in sterile DW. They were then heat-denatured between 78°C and 86°C and digested by Exo I. The extent of survival 16S rRNA gene fragments was visualized by electrophoresis (Fig. 3). The PCR products amplified from the surface seawater were denatured by heat treatment at 82°C, 84°C and 86°C, and were completely removed by the subsequent digestion with Exo I. In contrast, the 16S rRNA gene fragments from the deep-sea hydrothermal fluid survived

heat treatment even at 84°C, as well as subsequent digestion. Furthermore, part of the PCR amplicons from the deep-sea hydrothermal fluid could also survive the heat treatment at 86°C and digestion with Exo I.

In PCR-amplified 16S rRNA genes from the DNA mixture that was blended bulk DNAs extracted from surface seawater and deep-sea hydrothermal fluid, the survival pattern of the heat treatment and digestion with Exo I almost agreed with that of PCR products derived from the deep-sea hydrothermal fluid (Fig. 3). A clone library was constructed from 16S rRNA gene fragments originated from the DNA mixture and survived heat treatment at 84°C and digestion with Exo I. Seventy clones in the library were analyzed and divided into 6 OTUs (MIX-01 to MIX-06) based on alignment analysis of the 16S rRNA gene sequences (Table 2). The phylogenetic analysis suggested that these OTUs belonged to the genera *Vulcanisaeta*, *Archaeoglobus*, *Methanotorris*, and *Thermococcus*. The composition of these OTUs was very similar to that of the OTUs of hyperthermophilic archaea obtained from the deep-sea hydrothermal fluid. The results lead to the conclusion that 16S rRNA genes of mesophiles in the surface seawater were completely eliminated by heat treatment at 84°C and subsequent digestion.

Elimination efficiency of 16S rRNA genes of mesophiles. Kimura et al. (2006) has reported the selective phylogenetic analysis (SEPA) using terrestrial hot spring (76°C) and river water (14°C). The approach almost removed 16S rRNA gene fragments of mesophilic bacteria in the river water, and the 16S rRNA genes of thermophilic bacteria in the hot spring were selectively cloned and sequenced. However, some clones originated from mesophilic bacteria in river water have survived heat treatment and subsequent digestion with Exo I, namely, 7% of clones in the library were not removed by SEPA. The reason for the imperfect elimination of mesophilic rRNA genes seems that there is not a serious difference between T_m values of 16S rRNA gene fragments of thermophilic bacteria in hot spring and mesophilic bacteria in river water; namely, 86.8°C and 84.5°C, respectively (Kimura et al., 2006).

In contrast, the approach in this study could completely eliminate the 16S rRNA gene fragments of mesophilic archaea in surface seawater. This perfect elimination is likely to result in a great difference in T_m values of 16S rRNA genes of hyperthermophiles in deep-sea hydrothermal fluid and mesophiles in surface seawater.

These T_m values are mainly determined by the G+C contents of PCR amplicons. Since the G+C contents of the 16S rRNA genes strongly correlated with the optimal growth temperatures of prokaryotes (Galtier et al., 1999; Kimura et al., 2006), a difference in the optimal growth temperatures of microbial communities is essential to efficiency for SEPA that has been developed in the series of studies.

Applicability of the SEPA to deep drilling. In recent years, deep drilling projects targeted at deep crust, such as the Integrated Ocean Drilling Program (IODP) and International Continental Scientific Drilling Program (ICDP), have been expanded for the scientific study. In the microbiological study targeted at subsurface biosphere, a major problem is contamination of mesophilic microbes in drilling fluid. Since deep-subsurface materials are likely to be frequently altered and cracked by heat from magma, deep drilling has a great risk of such contamination compared with shallow drilling targeted at cold and hard crust. On the other hand, a difference in temperatures between subsurface environments and drilling fluid, which consists of surface seawater or river water, is widening with drilling depth. In addition, a difference in optimal growth temperatures of prokaryotes inhabiting subsurface environments and drilling fluid is also likely to increase with the depth. This method is therefore useful for phylogenetic analyses targeted at hyperthermophilic prokaryotes in contaminating core samples, which are recovered from deep-subsurface geothermal environments such as over 100°C.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the captains and crews of the R/V *Yokosuka* and *Shinkai* 6500, and operation teams of *Shinkai* 6500 for helping us to collect deep-sea hydrothermal fluid samples. This work was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (16310024) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

REFERENCES

1. **Blöchl, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch, and K. O. Stetter.** 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**:14-21.
2. **Brody, R., K. Doherty, and P. Zimmerman.** 1986. Processivity and kinetics of the reaction of exonuclease-I from *Escherichia coli* with polydeoxyribonucleotides. *J. Biol. Chem.* **261**:7136-7143.
3. **Cytryn, E., D. Minz, R. S. Oremland, and Y. Cohen.** 2000. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3269-3276.
4. **Drescher, J., T. Kirsten, and K. Schafer.** 1998. The rate gas inventory of the continental crust, recovered by the KTB continental deep drilling project. *Earth Planet. Sci. Lett.* **154**:247-263.
5. **Emmermann, R.** 1995. Abenteuer Tiefbohrung. *Geowissenschaften* **13**:114-128.
6. **Fukui, T., H. Atomi, T. Kanai, R. Matsumi, S. Fujiwara, and T. Imanaka.** 2005. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res.* **15**:352-363.
7. **Galtier, N., N. Tourasse, and M. Gouy.** 1999. A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms. *Nature.* **283**:220-221.
8. **Gold, T.** 1992. The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6045-6049.
9. **Gold, T.** 1999. Life at borders, p. 11-36. *In* T. Gold (ed.), *The deep hot biosphere: the myth of fossil fuels*. Springer-Verlag, New York.
10. **Großkopf, R., P. H. Janssen and W. Liesack.** 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.
11. **Itoh, T., K. Suzuki, and T. Nakase.** (2002) *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., novel hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1097-1104.

12. **Kashefi, K., J. M. Tor, D. E. Holmes, C. V. Gaw Van Praagh, A. L. Reysenbach, and D. R. Lovley.** 2002. *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:719-728.
13. **Kashefi, K., and D. R. Lovley.** 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science* **301**:934.
14. **Kimura, H., R. Asada, A. Masta, and T. Naganuma.** 2003. Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus Basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:644-648.
15. **Kimura, H., M. Sugihara, K. Kato and S. Hanada.** 2006. Selective phylogenetic analysis targeted at 16S rRNA genes of thermophiles and hyperthermophiles in deep-subsurface geothermal environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:21-27.
16. **Lackschewitz, K. S., C. W. Devey, P. Stoffers, R. Botz, A. Eisenhauer, M. Kummert, M. Schmidt, and A. Singer.** 2004. Mineralogical, geochemical and isotopic characteristics of hydrothermal alteration processes in the active, submarine, felsic-hosted PACMANUS field, Manus Basin, Papua New Guinea. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **68**:4405-4427.
17. **Lipman, D. J., and W. R. Person.** 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**:1435-1441.
18. **Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, C. T. Parker, P. R. Saxman, R. J. Farris, G. M. Garrity, G. J. Olsen, T. M. Schmidt, and J. M. Tiedje.** 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic. Acids. Res.* **29**:173-174.
19. **Pearson, W. R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2444-2448.
20. **Reysenbach, A.-L., D. Götz, and D. Yernool.** 2002. Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs, p. 345–421. *In* J. T. Staley and A.-L. Reysenbach (ed.), *Biodiversity of microbial life. Foundation of Earth's biosphere.* Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y.
21. **Sakai, H., T. Gamo, E.-S. Kim, K. Shitashima, F. Yanagisawa, and M. Tsustumi.** 1990. Unique chemistry of the hydrothermal solution in the mid-Okinawa trough backarc basin. *Geophys. Res. Lett.* **17**:2133-2136.
22. **Shipboard Scientific Party.** 2002. Site 1188, p. 1-305. *In* R. A. Binns, F. J. A. S.

- Barriga, D. J. Miller, et al (eds.) Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports, 193. Ocean Drilling Program.
23. **Skirnisdottir, S., G. O. Hreggvidsson, S. Hjörleifsdottir, V. T. Marteinson, S. K. Petursdottir, O. Holst, and J. K. Kristjansson.** 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2835-2841.
 24. **Smith, D. C., A. J. Spivack, M. R. Fisk, S. A. Haveman, H. Staudigel, and the Leg 185 Shipboard Scientific Party.** 2000. Methods for quantifying potential microbial contamination during deep ocean coring. *Ocean Drill. Prog. Tech. Note* **28**. [Online.] <http://www-odp.tamu.edu/publications/tnotes/tn28/INDEX.HTM>.
 25. **Smith, D. C., A. J. Spivack, M. R. Fisk, S. A. Haveman, H. Staudigel, and Ocean Drilling Program Leg 185 Shipboard Scientific Party.** 2000. Tracerbased estimates of drilling-induced microbial contamination of deep-sea crust. *Geomicrobiol. J.* **17**:207-219.
 26. **Somerville, C. C., I. T. Knight, W. L. Straube, and R. R. Colwell.** 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:548-554.
 27. **Stahl, D. A. and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: Stackebrandt, E. and M. Goodfellow. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY. pp 205-248.
 28. **Takai, K., T. Gamo, U. Tsunogai, N. Nakayama, H. Hirayama, K. N. Nealson, and K. Horikoshi.** 2004. Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. *Extremophiles* **8**:269-282.

TABLE 1. 16S rRNA gene sequences obtained from deep-sea hydrothermal fluid (117°C) and surface seawater (29.9 °C) in south Mariana area

Library	OTU	No. of clones	16S ribosomal RNA gene		Archaeal division	Closest database match (%)
			Length (bp)	GC cont. (%)		
Hydrothermal fluid	ARCS-01	24	810	68.0	<i>Crenarchaeota</i>	<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-065 (95.2)
	ARCS-02	18	810	67.2	<i>Crenarchaeota</i>	<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-065 (95.3)
	ARCS-03	6	814	66.2	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Archaeoglobus profundus</i> (98.5)
	ARCS-04	2	814	66.0	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Archaeoglobus profundus</i> (97.5)
	ARCS-05	2	794	65.5	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanotorris</i> sp. Mc-I-70 (97.3)
	ARCS-06	1	797	65.6	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> (99.8)
	Total	53				
Surface seawater	SURF-01	18	789	54.0	<i>Crenarchaeota</i>	SRI-298 (81.1)
	SURF-02	11	791	54.4	<i>Crenarchaeota</i>	SRI-298 (78.7)
	SURF-03	8	791	54.7	<i>Euryarchaeota</i>	DJ3.25-13 (82.1)
	SURF-04	7	778	54.9	<i>Crenarchaeota</i>	SRI-298 (81.4)
	SURF-05	4	791	54.2	<i>Euryarchaeota</i>	DJ3.25-13 (81.4)
	SURF-06	2	792	56.4	<i>Crenarchaeota</i>	SRI-298 (78.0)
	SURF-07	2	792	56.1	<i>Crenarchaeota</i>	SRI-298 (78.5)
	Total	52				

TABLE 2. Frequency and homology of 16S rRNA genes that were amplified from a DNA mixture (bulk DNAs extracted from deep-sea hydrothermal fluid and surface seawater) and that survived heat treatment at 84°C and subsequent digestion by Exo I

OTU	No. of clones	Archaeal division	Closest database match (%)
MIX-01	23	<i>Crenarchaeota</i>	ARCS-02 (100)
MIX-02	29	<i>Crenarchaeota</i>	ARCS-01 (99.9)
MIX-03	8	<i>Euryarchaeota</i>	ARCS-03 (99.8)
MIX-04	7	<i>Euryarchaeota</i>	ARCS-04 (100)
MIX-05	2	<i>Euryarchaeota</i>	ARCS-05 (99.8)
MIX-06	1	<i>Euryarchaeota</i>	ARCS-06 (99.8)
Total	70		

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Flow chart showing the concept of the approach used for elimination of low G+C 16S rRNA genes, generally found in mesophilic archaea, and for selective phylogenetic analysis of higher G+C 16S rRNA genes derived from thermophilic and hyperthermophilic archaea.

FIG. 2. Melting curve profiles of the PCR products amplified from bulk DNAs that were extracted from deep-sea hydrothermal fluid (A); surface seawater (B); and a DNA mixture that was a blend of equal amounts of bulk DNAs extracted from surface seawater and deep-sea hydrothermal fluid (C). The profiles display the negative first derivative of relative fluorescence units (RFU) [$-d(\text{RFU})/dT$] against temperature.

FIG. 3. Heat denaturing and digestion with exonuclease I of archaeal 16S rRNA genes, as visualized in 1.0% agarose gel. Lines: 1, archaeal 16S rRNA gene fragments obtained from surface seawater; 2, archaeal 16S rRNA genes derived from a DNA mixture that was a blend of equal amount of bulk DNAs obtained from deep-sea hydrothermal fluid and surface seawater; 3, archaeal 16S rRNA gene fragments obtained from deep-sea hydrothermal fluid; M, DNA marker (1kb DNA Ladder, Promega, Madison, WI). The temperatures of the heat treatments are indicated at the top of the lines. The size of each 16S rRNA gene fragments was approximately 800 bp (arrow).

FIG. 1

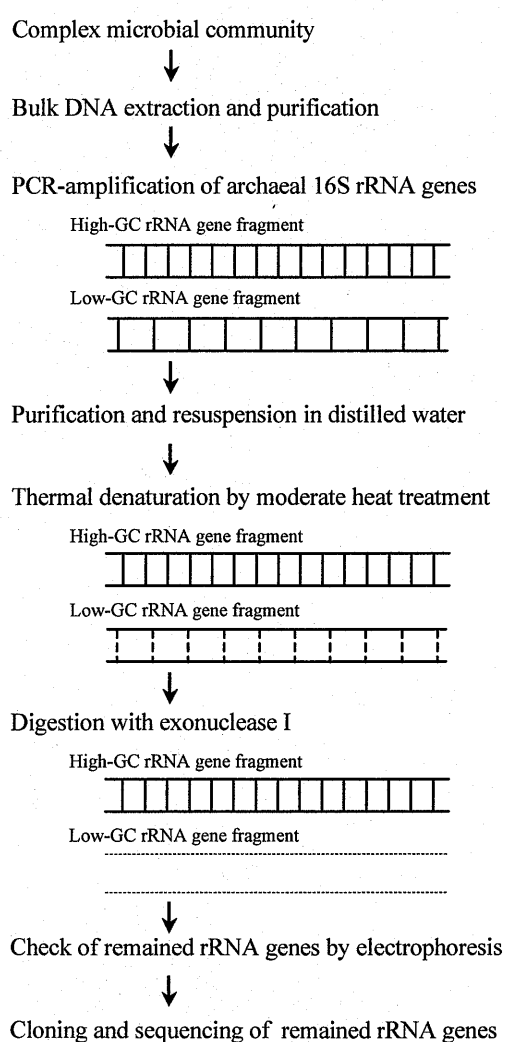


FIG. 2

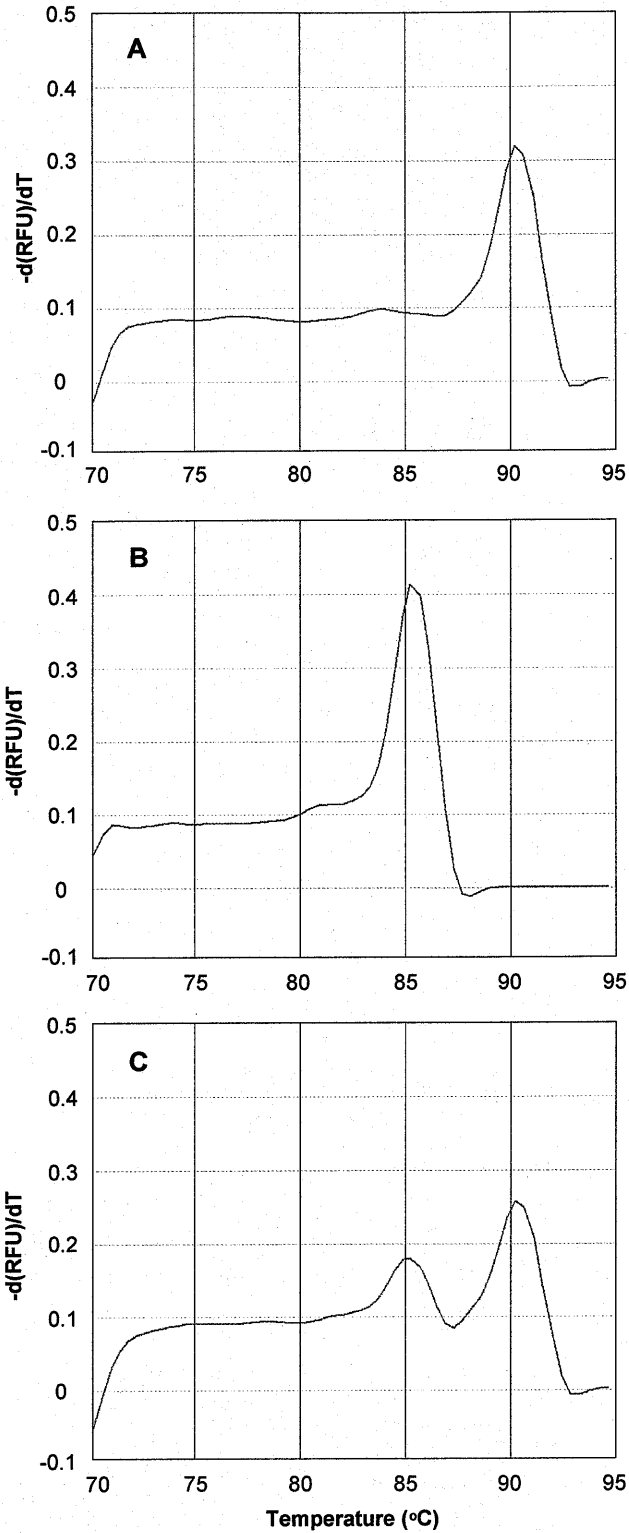


FIG. 3

