

## 水曜海山カルデラ内熱水プルーム微生物の定量的群集解析

## Microbial community analysis of hydrothermal plume in Suiyou Seamount caldera

# 砂村 倫成[1], 東 陽介[1], 三朝 千稚[2], 石井 浩介[3], 石橋 純一郎[4], 丸山 明彦[1]

# Michinari Sunamura[1], Yowsuke Higashi[1], Chiwaka Miyako[2], Kousuke Ishii[3], Junichiro Ishibashi[4], Akihiko Maruyama[1]

[1] 産総研・生物, [2] 東大・農・水圏, [3] 産総研・海洋, [4] 九大・理・地惑

[1] AIST-BR, [2] Aquat Biosci, Tokyo Univ, [3] Mar. Res. Environ., AIST, [4] Dept. Earth & Planet. Sci., Kyushu Univ.

熱水噴出域では熱水循環に伴う熱水が海洋中に供給され、プルームを形成する。プルーム水中には熱水活動に伴う水素、メタン、アンモニア、硫黄などの様々な還元的化学成分が含まれており、それを利用する微生物群集の存在が期待される。このような化学成分の代謝に関わる微生物の分布や動態を明らかにすることで、海洋に対する直接的な化学成分の放出量だけでなく、噴出後に間接的に海洋に与える有機物負荷などの影響も見積もることが可能になると考えられる。本研究では、水曜海山熱水域を対象として、カルデラ内のプルーム水中に存在する微生物群集構造の鉛直的な変動を、Fluorescent in situ hybridization 法 (FISH) と顕微鏡画像解析手法を用いて明らかにし、カルデラ内微生物群集の分布や動態を解明することを目的として研究を行った。

海水試料はしんかい 2000-ニスキン採水器 (NT-01-09 次航海) および CTD-RMS (KR-01-15) を用いて、水曜海山カルデラ内プルーム水を採取した。試料の 100 - 200 mL に、船上にてただちに 38% 中性ホルマリン (終濃度 3.8%) を加え、4 で一晩固定後、PLL-filter に適切な微生物量となるよう濾過し、-80 にて研究室に持ち帰った。船上で濾過できなかった試料は、-80 で冷凍保存し研究室に持ち帰り、適宜解凍、濾過を行った。得られた試料について 1. SYBR Green II により染色を行った全微生物測定、2. FISH 法による各微生物群集 (Bacteria, Archaea, メタン酸化、硫黄酸化など) 測定、3. 画像解析手法を用いた微生物の大きさや形態解析を行った。微生物の観察には 100W 水銀ランプを蛍光源として蛍光顕微鏡 (Axio-plan2, Karl Zeiss) を用い、冷却 CCD カメラ (Micromax, Princeton instrument) を用いて微生物画像を取得した。画像解析は IP-Lab (Scanalytics) を用いて行った。

カルデラ内プルーム水中には、1mL あたり  $0.6 \sim 1.5 \times 10^5$  の微生物が計測された。海底面が最も少なく、プルーム上層にいくにつれて微生物数、サイズともに増加した。カルデラ外の 1000 m 層の海水中には 1mL あたり  $3 \times 10^4$  の細胞が確認され、細胞数、サイズともにカルデラ内の微生物に比べ、減少していた。カルデラ内の微生物は、DNA 染色剤である DAPI や SYBR Green II による全微生物数に比べ、Bacteria を標的として染色した FISH 法による計数値は 80% 程度にも及んでいない。一般的に FISH 法では、細胞内の rRNA を標的として染色を行う。したがって、タンパク合成などをほとんど行っていない活性が低い細胞では、rRNA 含量が低くなり蛍光顕微鏡下での検出が困難になる。一方で増殖過程にあるような活性の高い細胞では、蛍光物質の標識対象である rRNA 含量が高くなり、蛍光顕微鏡下における細胞の蛍光輝度が増加する。プルーム外の試料では、FISH によりほとんど微生物の検出はできなかったことに比べ、プルーム内の FISH 染色された微生物は細胞の蛍光輝度が明るく、活性も高いことが示唆される。以上のことから、カルデラ内の微生物はカルデラ内において活発に増殖しているものと考えられる。

本試料中で検出された微生物のほとんどは Bacteria であり、Archaea は検出できなかった。検出された Bacteria のほとんどは、一般海洋環境下の微生物群集中で優先している、プロテオバクテリア、Cytophaga-Flavobacterium に対するプローブで染色されなかったことから、これらの微生物群に属さないものと考えられた。また、全微生物群集に対する割合は少なかったものの、メタン酸化微生物や熱水域の大型生物に共生している硫黄酸化微生物の仲間が検出された。しかしながら、現在のところ、検出された微生物群集の大部分は未知の微生物であることが予想され、発表当日までに、検出された Bacteria の 16S rDNA 系統解析、それらに対する新規特異的プローブの作成および定量検出を行い、微生物群集構造の解明をはかる予定である。