

OF-011

科学海洋掘削におけるCAS凍結法を用いた
生物学的研究用サンプルの保管について

○ 肖 楠¹、諸野 裕樹¹、寺田 武志²、大和田 哲男²、菅野 正也²、稲垣 史生¹

¹海洋研究開発機構高知コア研究所、²株式会社アビー、³マリンワークジャパン

【目的】 科学海洋掘削による海底下生命圏の発見により、地球全体の微生物のバイオマス分布や代謝機能に関する研究が注目されている。地球深部探査船「ちきゅう」をはじめとする掘削プラットフォームで採取された試料は、地球科学や生命科学に関連する幅広い学術研究に用いられ、人類の貴重な科学資産の一つとして、その適切な保管・品質管理が必要となっている。本研究では、生物細胞を壊さない凍結技術として注目されているCell Alive System (CAS)を用いた低温掘削試料保管について検討を行った。【方法】 「ちきゅう」の試験航海で得られた掘削試料についてCASを用いて凍結して-80℃保管した試料、および4℃・-20℃・-80℃・-170℃(液体窒素タンク)で冷蔵、冷凍した試料をそれぞれの温度で保管した。6ヶ月及び2年後に試料中の微生物細胞数を計数し比較した。【結果と考察】 保存の結果、CASで凍結した試料以外には6ヶ月及び2年間保存後に微生物細胞数の減少が見られた。また、-80℃及び液体窒素で保存した試料は2年間の保存の後に微生物数がさらに減少していたが、CASで凍結した試料の微生物数はほぼ減少しないことが分かった。CASは試料に微弱な交流磁場を与え、水分子を振動させて冷却する。これにより試料全体を均一に氷点以下に冷却した(過冷却)後に凍結が起こるため、試料中に微細かつ均一な氷結晶が生じ、微生物細胞を破壊せずに保存できると考えられる。本技術は貴重な掘削試料の凍結保存に有用であり、海洋底下に広がる未知生命圏を将来の発展的な分析技術で研究するために必須の保管方法となると考えている。

Key words: Cell Alive System, subseafloor sediment, freezing preservation
E-mail: nanxiao@jamstec.go.jp

口頭発表 OG

生理・代謝・増殖

OG-001

水道水中の細菌再増殖に与える水温および
残留塩素の影響評価

○大坂 幸弘¹、古米 弘明¹、栗栖 太¹、春日 郁朗¹
¹東京大・院工

水道水では、残留塩素の保持が義務付けられている。残留塩素が低減すると、給配水系における細菌再増殖のリスクが高まることが懸念される。一方、残留塩素の他に水温も細菌再増殖に影響を与えると考えられる。そこで本研究では、水温や残留塩素が細菌再増殖に与える影響を考察するため、残留塩素を中和した水道水と中和しない水道水を用意し、それらを異なる水温(10、20、30℃)で10日間培養し、細菌再増殖の状況を比較した。実験に用いた水道水の全菌数は 4.0×10^3 cells/mL、遊離残留塩素濃度は0.35mg/Lであった。残留塩素を中和した場合、20、30℃での培養では、全菌数は 10^3 cells/mLオーダーまで増加したのに対し、10℃での培養では 10^4 cells/mLオーダーの増加にとどまり、低水温の場合には細菌再増殖が抑制されることが示された。残留塩素を中和せずに培養した場合、系内の残留塩素は、10、20、30℃での培養において、それぞれ10、7、5日後に完全に消失した。同水温における最大増殖量は中和の有無によらず同程度であったが、増殖の立ち上がりは中和した系の方が早く、例えば、30℃での培養の場合、培養2-3日における最大増殖速度は、残留塩素を中和した系では 0.095 h^{-1} であったのに対して、 $0.02\text{--}0.03 \text{ mg/L}$ の残留塩素が維持されていた系では 0.054 h^{-1} であった。また、20℃で培養した系においては、残留塩素濃度が 0.10 mg/L 残存する状況下でも、全菌数は 1.2×10^4 cells/mLまで増加しており、再増殖する細菌群の中には塩素耐性が高いものが存在することが示唆された。

Key words: bacterial regrowth, drinking water, residual chlorine, water temperature
E-mail: oosaka@env.t.u-tokyo.ac.jp

OF-012

海底下生命圏の空間規模や活性を規定する
諸因子について

○稲垣 史生¹
¹海洋研究開発機構・高知コア研

地球深部探査船「ちきゅう」を用いた統合国際深海掘削計画(IODP)第337次研究航海「下北八戸沖石炭層生命圏掘削調査」では、約半世紀におよぶ科学海洋掘削史上世界最深度記録である海底下2,466mまでのライザー掘削とサンプル採取に成功した。本掘削調査により得られたコア試料は、現在から過去約2500万年前までの日本東縁の地質形成史を記録していた。海底下深度約2000m付近には、かつて光合成植物やプランクトンが繁茂する温原~浅海で形成された未成熟の石炭層(褐炭)および鉄分に富む砂質堆積層の互層(夾炭層)を確認した。本掘削調査で得られたコア試料および学際的な知見は、同海域一帯のメタンハイドレート形成プロセスと海底下生命活動との関わりを解明する上で、極めて重要であるばかりでなく、同様の地質学的条件を持つ東アジア一帯の海底炭化水素資源環境を活用し、持続的な炭素循環システムを創出する上で重要である。一方、IODP第329次研究航海「南太平洋還流域海底下生命圏掘削調査」では、海水中の光合成基礎生産量が著しく乏しく、それ故に堆積速度や堆積物中の有機物含有量が著しく小さい南太平洋還流域を中心に、南北のトランセクトに沿った7カ所のサイトから、玄武岩基盤を含む堆積物コア試料を採取した。本発表では、下北八戸沖の大陸沿岸堆積物環境や南太平洋還流域の外洋堆積物環境を例として、地球規模での海底下生命圏の拡がり・空間規模を規定する諸因子について、最新の知見を交えた包括的な考察と議論を行う。

Key words: subseafloor biosphere, IODP, habitability, carbon cycle
E-mail: inagaki@jamstec.go.jp

OG-002

氷楔単離細菌の休眠状態への誘導と覚醒
に関する研究

○不野 健太郎¹、Indun Dewi Puspita^{1,2}、北川 航^{1,3}、田中 みち子¹、曾根 輝雄¹、浅野 行蔵¹、鎌形 洋一^{1,3}
¹北海道大・院農、²Faculty of Agriculture, Gadjah mada University、³産総研・生物プロセス

【背景・目的】 自然環境中での細菌の多様性や機能解明の研究に比べてそれらの菌がどのような生理状態で生存しているのかを明らかにした研究は少ない。永久凍土中の氷楔は零下の温度で水分活性が低く栄養や酸素などの供給律速のため、細菌の成長や分裂には不都合な環境である。一方、25,000年前の氷楔からそのほとんどが無孢子形成のバクテリア(約 10^4 CFU/ml)が平板培養で得られた。そこで我々は無孢子形成のバクテリアは非分裂性の休眠状態(生きてはいるが分裂などを行わずエネルギー消費を抑えた状態)になることで外部ストレスに耐え、氷楔という厳しい環境で長期にわたって生存してきたのではないかと仮説を立てた。本研究では氷楔単離株 *Arthrobacter* sp. AHU1770と *Glaciobacter superstes* AHU1791¹を用いて(1)休眠状態への誘導が人工的に可能か、そして一定条件下で再び増殖(覚醒)するのか(2)休眠状態の細胞はさまざまな環境ストレスに対して耐性を有するのかを明らかにすることを目的とした。【方法・結果】 (1)いくつかの誘導条件を設定して14~100日間培養を行ない、経時的にLive/Dead染色法と平板上でのコロニー数を計測し休眠細胞の割合の変化を追った。その結果、酸素制限または高温条件で二つの細菌は休眠状態へと誘導されることが明らかとなった。このうち *Arthrobacter* sp. は自身の培養上清で処理することにより休眠細胞が再び分裂可能な状態に戻った。(2)対数増殖期の細胞を比較対象に休眠細胞のストレス耐性を調べた。現在のところ、*Arthrobacter* sp. の休眠細胞が対数増殖期の細胞に比べ凍結融解・UV照射に対して顕著なストレス耐性を示すことがわかった。

Key words: permafrost ice wedge isolates, non-dividing state (dormant state), resuscitation, stress sensitivity
E-mail: funo@chem.agr.hokudai.ac.jp