

粒子捕獲能力を持つ海洋細菌の動態

2008年3月 物質循環学分野 66714 菅友美

指導教官 教授 木暮一啓

キーワード;海洋細菌、サブミクロン粒子、粒子捕獲

1. はじめに

海水中には様々な粒子が存在する。1990年に、いわゆる溶存態とされてきた画分に約 10^7 個 mL^{-1} のサブミクロン粒子が存在することが報告され(Koike et al. 1990)、海水中の粒子はそのサイズが小さいほど数が多いことが明らかになった。サブミクロン粒子とは、 $0.38\text{--}1.0\ \mu\text{m}$ のサイズで、主に生物起源と考えられる。一方、海洋細菌は海水 1mL に約 10^6 細胞程度存在するので、微細なコロイド粒子等を含めれば、海洋細菌はその $10\text{--}100$ 倍量の微小粒子に囲まれていることになる。

細菌は、あらかじめ菌体外で有機物を酵素によって分解し、分子量数百程度以下にまでに小さくした後、菌体内に取り込む。細菌がデトリタスやマリンスノーなどの大きな有機物粒子に付着している場合、その化学組成を認識し、適切な酵素を合成、分泌して分解することができる。では、菌体より小さな微小粒子の場合、細菌はそれらの存在をどのように認識し、どのような酵素を生産してどのように分解するのだろうか。従来の付着細菌のシナリオではこの説明ができない。Seo et al. (2007) は、微小な粒子を菌体表面に保持する能力のある“捕獲細菌”の概念を提案した。磁性有機物粒子をモデル粒子として用い、海水中の細菌群集の約 1 割に粒子捕獲能力があること、これらの捕獲細菌は固有の分類群からなることを示した。しかし、実際に細菌が天然海水中の微小粒子を捕獲しているのか、捕獲がより効率のよい分解に繋がっているかは不明である。

そこで本研究では、サブミクロン粒子を捕獲する海洋細菌の自然環境下での動態を明らかにすることを目的に、沿岸から外洋域の海水中の捕獲細菌数、その群集構造、酵素活性を調べるとともに、高解像度の顕微鏡を用いて、実際に粒子を保持している細菌数、それらの粒子数などを調べた。

2. 試料及び方法

2006年12月の淡青丸の航海で得られた Sta.T、P、S の3測点と、相模湾西部真鶴沖の観測定点 Sta.M において2006年10月から2007年11月まで毎月採取した海水を試水として用いた。デキストランベースの $0.5\ \mu\text{m}$ の磁性ビーズをモデル粒子として海水 1mL に加え、1時間ゆっくりと振とうさせた後、磁石で回収される細菌を粒子捕獲細菌とした。分離した捕獲細菌の菌数・群集構造・活性を、また自然海水中の細菌の観察から、実際に粒子を持つ細菌数とその粒子数を測定した。さらに捕獲細菌の変動が何によって影響されているのかを知るために環境パラメーターを測定し解析した。以下に測定項目と、その方法をまとめた。

- ①捕獲細菌数: $0.5\ \mu\text{m}$ のモデル粒子で分離した細菌を DAPI 染色後、蛍光顕微鏡計数
- ②捕獲細菌の変動要因: 海水の環境データから捕獲細菌の数や割合の予測式を、解析ソフト JMP を用いて重回帰分析
- ③群集構造: $0.5\ \mu\text{m}$ のモデル粒子で分離した細菌の DNA を抽出し、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法により群集構造解析
- ④有機物分解活性: $0.5\ \mu\text{m}$ と $0.17\ \mu\text{m}$ のモデル粒子で分離した細菌を使って蛍光標識基質を用いてロイシンアミノペプチダーゼ活性の測定
- ⑤粒子を持つ細菌数とその粒子数: 自然海水を孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、原子間力顕

微鏡(AFM)で観察することで菌体上に粒子をもつ細菌を 100 細胞計数し、そこに存在する 0.2～0.5 μm および 0.5～1 μm の範囲にあたるサブミクロン粒子を計数

環境データとしては、温度、塩分、クロロフィル濃度、懸濁態有機物濃度(POC、PON)、全菌数、ウイルス数、直径 0.2～0.5 μm のサブミクロン粒子数、直径 0.5～1 μm のサブミクロン粒子数、浮遊細菌、付着細菌の生産速度をそれぞれ測定した。

3. 結果及び考察

得られた結果とその考察を以下にまとめる。

①磁性モデルビーズを用いて求めた捕獲細菌数は一般にいずれの海域でも約 $10^3\sim 10^5\text{cells mL}^{-1}$ で、全菌数の 0.4～29.5%を占めた。沿岸域の Sta.M、T では捕獲細菌の全菌に対する割合が低く、1000m 以深の外洋域、Sta.P、S では高くなった。このことより、捕獲細菌は特定の海域や全菌数に依存することなく広く分布することが確認された。

②捕獲細菌の全菌数に対する割合に及ぼす変動要因は、浮遊細菌の生産速度、懸濁態窒素量、直径 0.5 μm 以上の粒子数、水温、塩分であった。浮遊細菌の生産速度は負の大きな影響を及ぼすことから、貧栄養的な環境下で捕獲能力がより重要になることを示している。

③Sta.M における群集組成の解析から、捕獲細菌の群集構造は浮遊細菌全体のそれとは違うことがわかった。また捕獲細菌群集の方が浮遊細菌群集より季節変動が大きいことがわかった。この結果は、限定的なグループの細菌が粒子捕獲を行っているのではなく、その環境条件に応じて様々な細菌がそれを行っていることを示している。

④捕獲細菌の単位細胞あたりの有機物分解(ロイシンアミノペプチダーゼ)活性は、粒子を捕獲しなかった浮遊細菌の平均 5.8 倍高い値を示した。また、直径 0.5 μm の粒子を捕獲する細菌のほうが、0.17 μm の粒子捕獲細菌よりも高い活性を示した(0.5 μm で 7.2 倍、0.17 μm で 4.4 倍)。この結果は、粒子の捕獲が有機物の酵素分解能とカップルしていることを示す。

⑤自然環境中の細菌を高解像度の原子間顕微鏡で観察したところ、全細菌のうち 47～64%はその表面に粒子を持っていた。また 1 細胞あたりの粒子数を平均すると 2.8 個であった。さらに、海水中の粒子を同様の方法で計数した結果と比較すると、海洋の 30～79%の粒子は、細菌上にあることが明らかになった。この結果はモデルビーズで得られた結果を支持するとともに、粒状有機物の代謝過程が菌体上で進むことを強く示唆している。

以上の結果から、磁性モデルビーズおよび原子間力顕微鏡を使った方法により細菌の粒子捕獲能力の存在を確認するとともに、この能力が酵素活性とカップルしていること、より貧栄養海域での栄養獲得に有利に働くことを示すことができた。また全海洋の粒子のうち、かなりの量が細菌の菌体上にあることを初めて明らかにした。これらの結果はいずれも初めての知見であり、細菌の新たな分解様式として細菌学に大きなインパクトを与えるとともに、海洋の粒子状有機物の分解プロセスに新たな概念を加えることになると考える。

4. 引用文献

Isao, K., Hara, S., Terauchi, K., & Kogure, K. (1990). Role of Submicrometer Particles in the Ocean. *Nature*, 345(6272), 242-244.

Seo, Y., Ikemoto, E., Yoshida, A., & Kogure, K. (2007). Particle Capture by Marine Bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 49, 243-257.

The Dynamics of Marine Bacteria with Particle Capturing Activity

Mar. 2008, Marine Biogeochemical Cycles, 66714, TOMOMI SUGA

Supervisor; Professor, Kazuhiro KOGURE

Keywords; Marine bacteria, Sub-micrometer particles, Particle capture

1. Introduction

It has been recognized that the concentration of particles in the ocean increase with the decrease of their particle sizes. In 1990, Koike et al (1990) reported the presence of so called sub-micrometer particles (SMPs). The number of SMPs is about 10^7 particles ml^{-1} , which is about one order of magnitude larger than those of bacterial cells. This means that one bacterium is surrounded by 10-100 particles including colloidal particles.

When bacteria degrade organic compounds, they synthesize and excrete the enzyme to degrade into small size (around 100Da), before taking up into the cells. This scenario fits well when bacteria degrade large organic material such as marine snow and has been investigated by many workers, whereas virtually no work has been accomplished for small particles. Recently, Seo proposed a concept that bacteria have the ability of “particle capturing (PC)” (Seo et al 2007). This means, cells retain the submicron particles on their surfaces prior to utilizations as nutrient sources. Seo reported that 10% of total bacteria possessed particle capturing activity in the coastal sea water, and the community structure of those PC bacteria differed from that of free-living bacteria or attached bacteria. However, Seo used model paramagnetic beads to collect PC bacteria and it was not clear whether natural marine bacteria actually possess particles, or the particle capturing process links to efficient hydrolysis-uptake.

The aim of this study is to clarify the dynamics of PC bacteria in the ocean. I focused on the abundance, distribution, community structure and enzyme activity of PC bacteria. In addition, the presence and number of SMPs on the cells were directly observed and quantified under the atomic force microscopy (AFM).

2. Sampling and Methods

Sea water samples were collected at three sampling stations (Sta.T, P, S) during the KT-06-31 cruise of RV Tansai Maru cruise (Ocean Research Institute, the University of Tokyo and JAMSTEC) from 6 to 10, December in 2006. For observation of seasonal dynamics of PC bacteria, monthly samplings were made from October 2006 to November 2007 at Sta.M in Sagami Bay. To isolate PC bacteria, dextran-based paramagnetic particles (0.5 μm diameter) were used as model particles. One ml of subsamples were incubated with the particles for 1h. The bacteria collected with paramagnetic particles together by a magnet were defined as PC bacteria. I analyzed 5 parameters below using PC bacteria and natural sea water;

①Number: PC bacteria were stained with DAPI and counted with epifluorescence microscopy

②Community composition: DNA of PC bacteria were extracted and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) were carried out

③Enzyme activity: PC bacterial enzymatic activities were assayed using fluorogenic peptide analog substrate (Leu-MCA)

④Particle number on the cell: Natural sea water were filtered through 0.2 μ m filter and SMPs were observed by Atomic Force Microscopy (AFM) and the particles were counted from the image

⑤Environmental factors which varied PC bacterial abundance/percentage: Environmental parameters and PC bacterial numbers/percentages were examined with Multiple regression

Water temperature, salinity, chlorophyll *a* concentration, particular organic carbon (POC), particular organic nitrogen (PON), total bacterial number, virus number, 0.2-0.5 μ m SMPs number, 0.5-1 μ m SMPs number, and bacterial production rates were measured.

3. Results and Discussion

①The numbers of PC bacteria were 10^3 - 10^5 cells ml⁻¹ which was 0.4-29.5% of total bacteria. The relative number of PC bacteria to total bacteria increased from coastal towards oceanic area.

②Environmental factors which varied PC bacterial abundance/percentage were bacterial production rates, PON, 0.5-1 μ m SMPs, temperature and salinity. The percentage of PC bacteria increased with the decrease of bacterial production rate. This indicates that particle capturing activity play more important roles in low nutrient condition.

③Dominant PC bacterial members and free-living bacterial members were distinct from each other and gradually shifted over the sampling period. MDS analysis clarified that the extent of diversity of PC bacterial community was larger than that of free-living bacteria. This means that varieties of bacteria are involved in PC processes.

④The specific enzymatic activities of PC bacteria were 5.8 times higher than those of non-PC bacteria. The activity collected by 0.5 μ m model particle was higher than that by 0.17 μ m particle (0.5 μ m PC bacteria had 7.2 times higher, 0.17 μ m PC had 4.4 times higher).

⑤From the observation by AFM, 47-64% of marine bacteria have particles on the cell. The average number of particles on a PC cell was 2.8. This result represent that 30-79% of total particles in sea water are on the surface of bacterial cell.

From these results, the presence of bacteria possessing PC activity was confirmed by both paramagnetic particle method and direct observation by AFM. PC activity was coupled with enzymatic activity and SMPs on the cell account for about half of total SMPs in the ocean. The PC activity is expected to play important roles in biogeochemical cycle of particulate organic material in the ocean, especially in oligotrophic environments.

4. References

Isao, K., Hara, S., Terauchi, K., & Kogure, K. (1990). Role of Submicrometer Particles in the Ocean. *Nature*,

345(6272), 242-244.

Seo, Y., Ikemoto, E., Yoshida, A., & Kogure, K. (2007). Particle Capture by Marine Bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 49, 243-257.