

黒島海丘におけるバクテリアマットのバイオマーカー組成

荻原 成騎^{*1} 戸丸 仁^{*1} 松本 良^{*1} 町山 栄章^{*2}

2001年「ドルフィン-3K」第506潜航において、黒島海丘より採取されたバクテリアマットに被覆される堆積物について有機地球化学分析を行った。その結果、バイオマットは以下の有機化合物で特徴付けられる。(1) $CPI_{11-23}=0.39$ で示される著しく偶数炭素数優位性をもつ *n*-alkane, (2) 奇数炭素数の 3,7-dimethylalkane, (3) 偶数炭素数の alkylcyclopentane, (4) 少量の alkylcyclohexane と 3,4-dimethylalkane, (5) deoplene と C_{31} 以下の炭素数を持つ hopane, (6) カルボン酸は C_{18} が卓越し、特に $18:1 \Delta^9$ が最も多い。また、個別同位体組成は、*n*-アルカンについて $-27.4\text{‰} \sim -31.9\text{‰}$ 、アルキルシクロペンタンについて $-26.5\text{‰} \sim -35.6\text{‰}$ であった。

キーワード: アルキルシクロペンタン, ドルフィン-3K, 低CPIアルカン, バイオマーカー, バクテリアマット。

Biomarker composition of bacterial mats collected from Kuroshima Knoll

Shigenori OGIHARA^{*3} Hitoshi TOMARU^{*4} Ryo MATSUMOTO^{*3} Hideaki MACHIYAMA^{*4} Akira IJIRI^{*4}

This reports the results of organic geochemical analysis of the surface marine sediment covered with bacterial mats which collected by Dolphin-3K Dive 506 at Kuroshima Knoll. As a result of the biomarker analysis, bacterial mat was characterized by the following organic compounds. (1) Extremely even carbon number dominated *n*-alkane which CPI_{11-23} value is 0.39, (2) 3,7-dimethylalkanes with the carbon of odd number, (3) alkylcyclopentanes with the carbon of even number, (4) relatively small quantity of alkylcyclohexanes and 3,4-dimethylalkanes, (5) deoplene and hopanes which carbon number is lower than 32, (6) C_{18} monocarboxylic acids, especially $18:1 \Delta^9$. Individual carbon isotope compositions of *n*-alkanes and alkylcyclopentanes were $-27.4\text{‰} \sim -31.9\text{‰}$ and $-26.5\text{‰} \sim -35.6\text{‰}$, respectively.

Keywords : alkylcyclopentanes, Dolphin-3K, low CPI alkanes, biomarker, bacterial mat.

* 1 東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻

* 2 海洋科学技術センター

* 3 Department of Earth & Planetary Science, The University of Tokyo

* 4 Japan Marine Science and Technology Center

1. はじめに

メタンガスの生成と酸化分解に関与する微生物の関与をバイオマーカー(biomarker: 生物指標有機物)を用いて特定することは、メタンハイドレートの起源を検討する上で重要な情報となる。バイオマーカーを用いたメタン湧出孔周囲における堆積物の研究は、メタン酸化によって生じる炭酸塩沈澱中のバイオマーカーについて行われた研究が多い。これらの研究の結果、メタン湧出孔付近に生息するメタン酸化細菌は、主に-100%以下の軽い炭素同位体組成を持つcrocetane (2, 6, 11, 15-tetramethylhexadecane)とPME (2, 6, 10, 15, 19-pentamethyleicosane)によって特徴付けられる(Theil et al., 1999 Peckman et al., 1999など)。本研究では、黒島海丘における白ウリ死貝コロニー周囲のメタン湧出に関係して生息していると考えられるのバクテリアマットについて有機地球化学分析を行い、バイオマーカーによる特徴付けを行った。

2. 試料

本研究に用いた堆積物試料は2001年5月1日「ドルフィン-3K」による潜航調査(Dive #506)で採取された試料を用いた。本潜航は「しんかい2K」による潜航調査(Dive #1263~#1266)の事前調査として行われたドルフィン-3Kの5潜航(Dive #505~509)のうちの1潜航である。これらの潜航については、町山ら(2001)が詳しい。

本潜航(Dive #506)は黒島海丘頂部を西から東へ横断する側線に沿って行われた。着底地付近には黒色の砂礫状ノジュールが広がっており、東へ進むと深度約630m付近でマンガンコーティングされた倒壊したチムニーが多数見られた。さらに東進するとシロウリガイ死貝のコロニーが出現した。コロニー周囲におけるバクテリアマットの分布が見られる部分において、プッシュコアを用いて堆積物を採取した(C-1)。プッシュコアは、長さ約30cm、直径約5cmのアクリル製である。さらに東方には深さ7m程度の窪地のほか、倒壊したチムニーや立っているチムニーが見られた。また深度647m付近でシロウリガイの破片の群集と共に白色のバクテリアマットが見られた。この地点についてもバクテリアマット上でプッシュコアによる試料採取を行った(C-2)。バクテリアマットの表面は白色であるが、堆積物中は黒色であった。本研究には、採取した2本のプッシュコアのうちC-1を用いた。

3. 分析方法

採取したプッシュコアは船上で速やかに凍結し、実験室に持ち帰った後に凍結乾燥を行った。正確に測り取った試料2gを遠沈管に移し、溶媒(DCM:MeOH/93:7)30mlに浸し、bitumenの超音波抽出を行った。抽出溶媒は、遠心分離の後ナス型フラスコに移した。抽出操作は、3回繰り返した。抽出溶媒はロータリーエバポレーターを用いて乾固した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、N-1(脂族炭化水素画分)、N-2(PAH; 多環芳香族炭化水素画分)、N-3(ケトン、メチルエステル画分)、N-4(アルコール、ステロール画分)に分画した。N-3とN-4についてはGC/MS分析を行わずに1molKOH/MeOHを用いてケン化を行い、このうち酸性成分

についてBF₃/MeOHによってメチルエステル化を行なった後、再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーによってモノカルボン酸メチルエステル(A-1)を分画した後にGC/MS分析を行った。

本研究では、脂族炭化水素画分(N-1)とモノカルボン酸メチルエステル画分(A-1)について、GC/MS分析を行った。使用したGCはTermoQuest社製GC8000Top, MSは同社製Voyagerである。注入口はオンカラムインジェクター、カラムは溶融石英キャピラリーカラム(HP-5, 25m×0.25mm I.D., 膜厚0.25 μm)を使用した。オープン温度は40°Cで1分間保持し、10°C/分で175°Cまで、6°C/分で225°Cまで、更に4°C/分で300°Cまで上昇させた後、20分間保持した。インターフェイスの温度は280°Cである。モノカルボン酸メチルエステルの同定は、標準試薬の保持時間と質量スペクトルを基に決定した。モノカルボン酸メチルエステルの同定のために使用した標準試薬は、16:1 Δ^{7z}, 16:0, 17:0, 18:1 Δ^{9z}, 18:1 Δ^{9e}, 18:0である。また、炭化水素画分については、GC/IR/MSを用いて、個別炭素同位体分析を行った。用いたGCは、HP-6800, 同位体質量分析計は、FinniganMat delta-plusである。GCの使用条件については、試料導入にスプリットレス法を用いた以外は、GC/MS分析と同条件である。

4. 分析結果

Figure 1に黒島海丘で採取したバクテリアマットの脂族炭化水素画分のGC/MS分析の結果を示す。Fig.1(a)がTIC(Total Ion Chromatogram)であり、図中に n で示した n -alkaneと c で示したalkylcyclopentaneが卓越する。Fig.1(b)に m/z 85のマスキロマトグラムを示す。本試料中での n -alkaneの分布は、C₁₁からC₃₁の範囲であり、C₁₁からC₂₄までは、C₁₆を頂点とした対象形を呈する。特筆すべきはC₁₆に続いてC₁₄, C₁₈が卓越する偶数炭素数優位の分布である。ここでC₁₁からC₂₃までの範囲におけるCPI(Carbon Preference Index)は、0.39と異常に低い値を持っている。また、C₁₇以上の領域では、奇数炭素数 n -alkaneと偶数炭素数 n -alkaneのほぼ中間に3,4-dimethylalkaneが見られる。3,4-DimethylalkaneはC₁₆からC₂₄までの範囲で検出され、主にC₂₀, C₂₂, C₂₄の偶数炭素数が卓越する。Fig.1(c)に m/z 68のマスキロマトグラムを示す。ここでは、alkylcyclopentaneの分布を示している。AlkylcyclopentaneはC₁₄からC₂₄までの範囲で偶数炭素数のみが検出される。特にTIC(Fig.1(a))中で示されるようにC₁₈-alkylcyclopentaneは、脂族炭化水素画分中で最も高い濃度を示している。

Fig.1(d)には m/z 127のマスキロマトグラムを示す。このイオンは、3,7-dimethylalkaneを特徴付けるイオンであると同時に n -C₈イオンでもある。3,7-dimethylalkaneは、奇数炭素数がC₂₁を頂点にC₁₅からC₂₇の範囲で分布する。奇数炭素数を持つ3,7-dimethylalkaneは、炭素数が1小さい偶数炭素数 n -alkaneの直後に湧出する。このためFig.1(d)中では n -alkaneと3,7-dimethylalkaneの分離は明確でない。しかし、炭素数18までは n -alkaneが、19以上では3,7-dimethylalkaneが入れ代わって分布する。両者のマススペクトルの違いは、Fig.5に示すように3,7-dimethylalkaneについて m/z 127が強いピーク

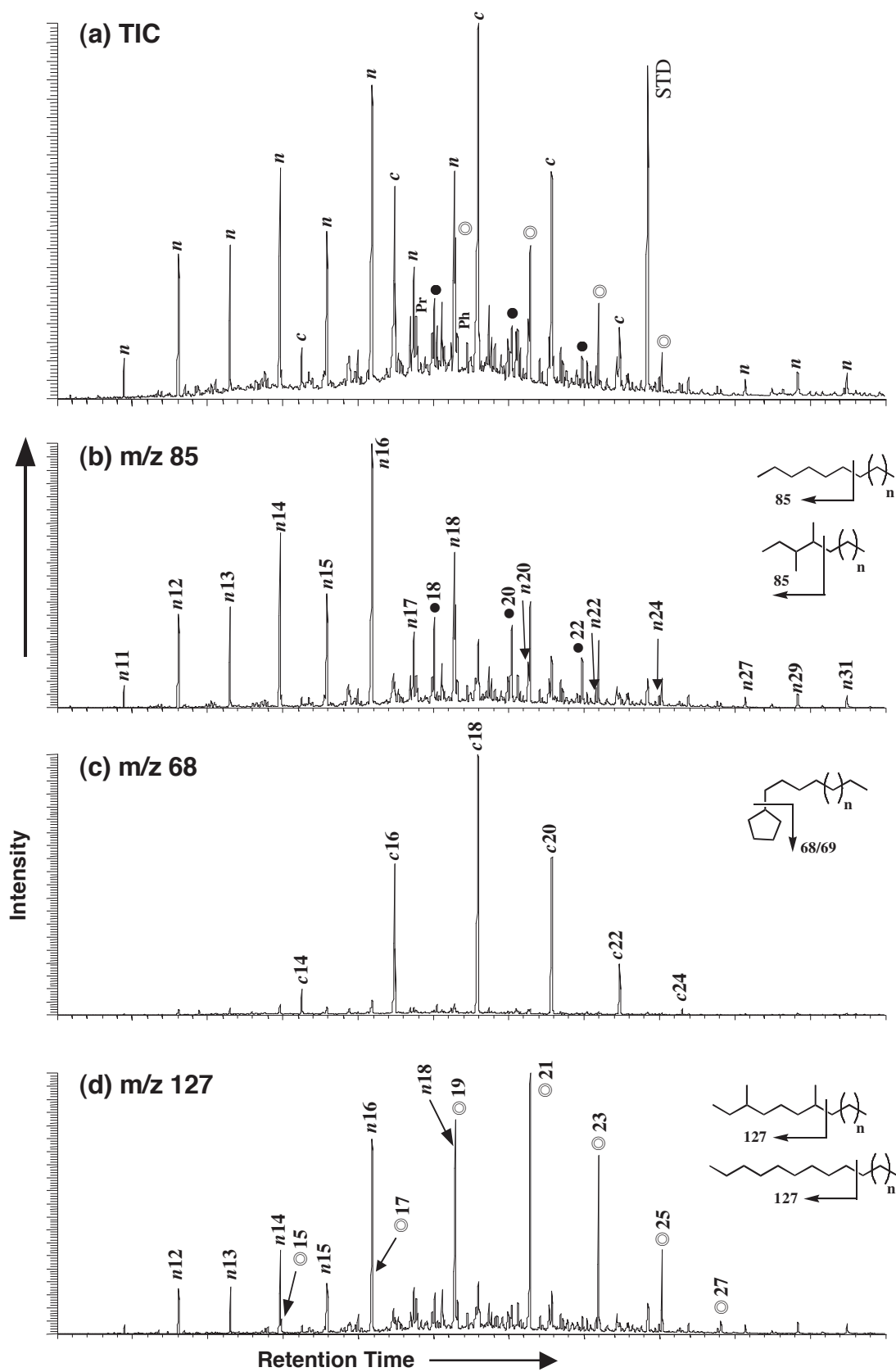


図1 N-1画分のトータルイオンクロマトグラムおよび m/z 85, 68, 127マスキロマトグラム。数字は各化合物の炭素数を示す。 n は n -アルカン、 c はアルキルシクロペンタン、●は3,4-ジメチルアルカン、○は3,7-ジメチルアルカンを示す。

Fig. 1 TIC (Total Ion Chromatogram) and mass fragmentgrams (m/z 85, 68 and 127) of N-1 fraction. Number indicates each carbon number of compound. n = n -alkanes, c = alkylcyclopentanes, ● = 3,4-dimethylalkanes, ○ = 3,7-dimethylalkanes.

を示すことである。

Figure 2に n -C₁₆から n -C₁₈の区間を拡大して示す。各化合物はピークに打った番号によってTableに化合物名を示した。Fig.2中では、 n -alkaneと3,7-dimethylalkaneの分離は容易に確認される。すなわち、12 (octadecane)と13 (3,7-dimethylheptadecane)および22 (eicosane)と23 (3,7-dimethylnonadecane)である。また、不飽和を持つ化合物 (5, 11, 21)が検出された。さらにこの図からはalkylcyclohexane (9と19), 3-methylalkane (anteisoalkane; 4と20)が検出され、本試料を特徴付けている。

Figure 3に m/z 191のマスキロマトグラムを示す。分子量191はホパノイド炭化水素がC環で壊裂時におけるAB環の分子量である。C₂₉hopaneについては、17 β (H), 21 α (H)型に比べやや多い α β 型が見られ、C₃₀hopaneについては、多量の α β 型と相対的に少量の β β 型が見られる。C₃₀ α β がこのマスキロマトグラムにおいて最も高い強度を示している。C₃₁についてはこの関係が逆で、多量の β β 型に対して相対的に少量の α β 型が検出される。また、多量のhop-22 (29) -ene (deplotene)が検出されることが本試料の特徴であり、さらにhop-17 (21) -eneおよびneohop-13 (18) -eneの2種類のhopeneが相対的に少量検出される。C₃₂以上の炭素数をもつhopanoid炭化水素は含まれていない。

Figure 4にモノカルボン酸画分のGC/MS分析の結果を示す。C₁₆とC₁₈脂肪酸が卓越し、奇数炭素数脂肪酸は相対的にわずかである。また、C₁₆に比べC₁₈が多量に検出され、18:1>18:0である。18:1については、 Δ^9 が最も多い。また、18:1 Δ^9 >18:0である。18:1はこの他に3種類の異性体が確認された。C₁₆については、逆の傾向が見られた。すなわち16:0>>16:1である。16:1は Δ^9 が他の異性体と比べて相対的に多く含まれる。

Table 2に炭化水素画分の個別同位体組成を示す。 n -

No	Compound
1	hexadecane
2	undecylcyclopentane
3	2-methylhexadecane
4	3-methylhexadecane
5	prist-1-ene
6	heptadecane
7	pristane(2,6,10,14-tetramethylpentadecane)
8	3,4-dimethylhexadecane
9	undecylcyclohexane
10	3-methylheptadecane
11	octadecene
12	octadecane
13	3,7-dimethylheptadecane
14	phytane(2,6,10,14-tetramethylhexadecane)
15	tridecylcyclopentane
16	2,6,10,14-tetramethylheptadecane
17	nonadecane
18	3,4-dimethyloctadecane
19	3,4-dimethyloctadecane
20	3-methylnonadecane
21	eicosene
22	eicosane
23	3,7-dimethylnonadecane

表1 黒島海丘より採取したバクテリアマット中の炭化水素画分に認められた化合物

Table 1 Compounds identified in the hydrocarbon fraction of sea floor bacterial mat from Kuroshima Knoll.

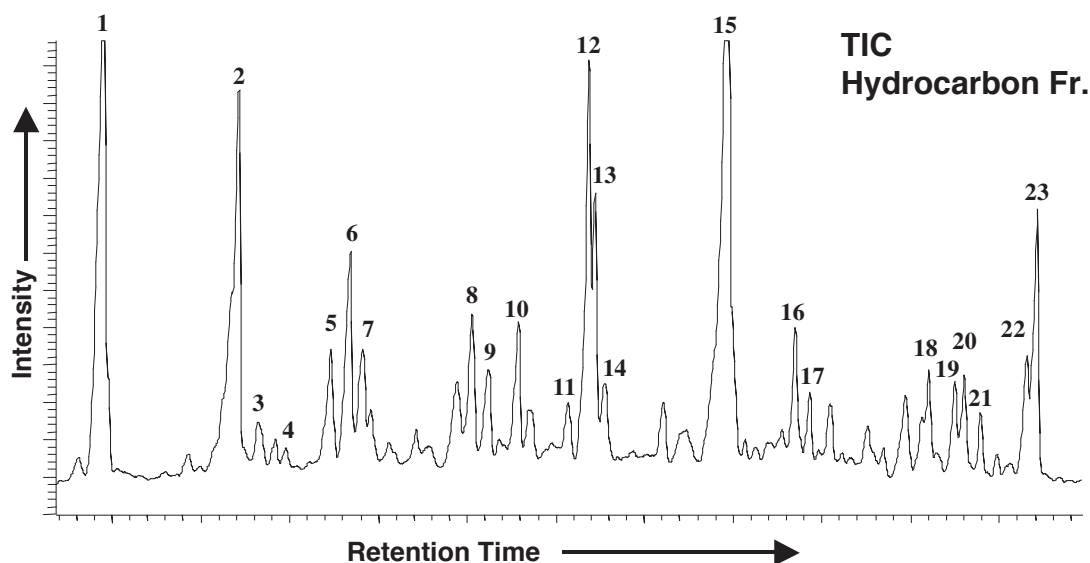


図2 N-1画分のトータルイオンクロマトグラム。番号は表中の化合物に対応する。

Fig. 2 Total Ion Chromatogram of N-1 fraction. Numbers refer to components identified in Table.

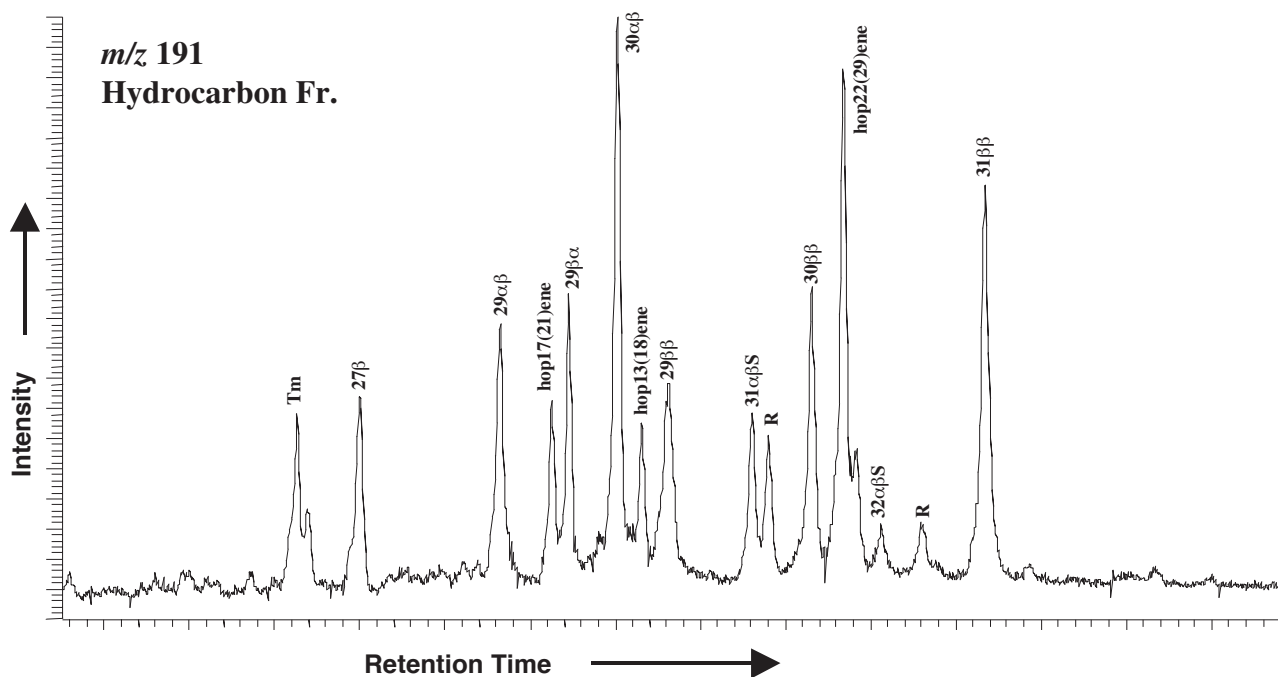


図3 N-1画分中のホパノイド炭化水素の m/z 191マスキロマトグラム。
Fig. 3 m/z 191 Mass chromatogram of hopanoid hydrocarbons in N-1 fraction.

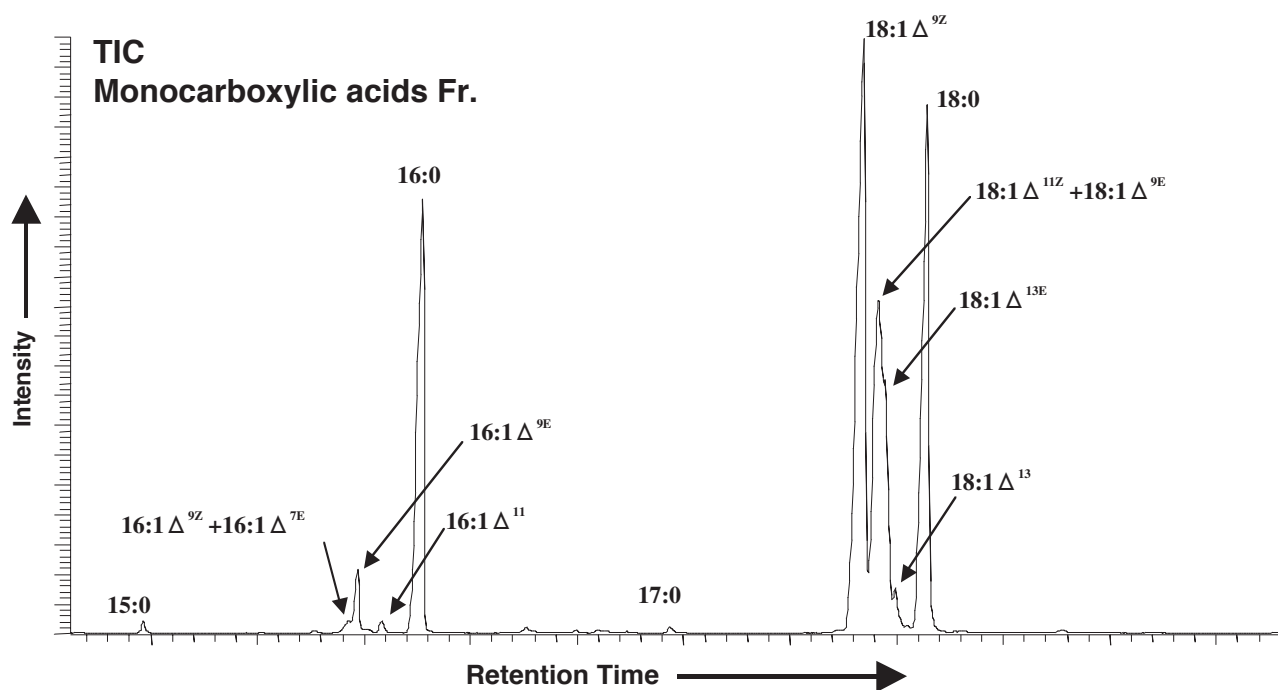


図4 モノカルボン酸画分のトータルイオンクロマトグラム。
Fig. 4 Total Ion Chromatogram of monocarboxylic acids fraction.

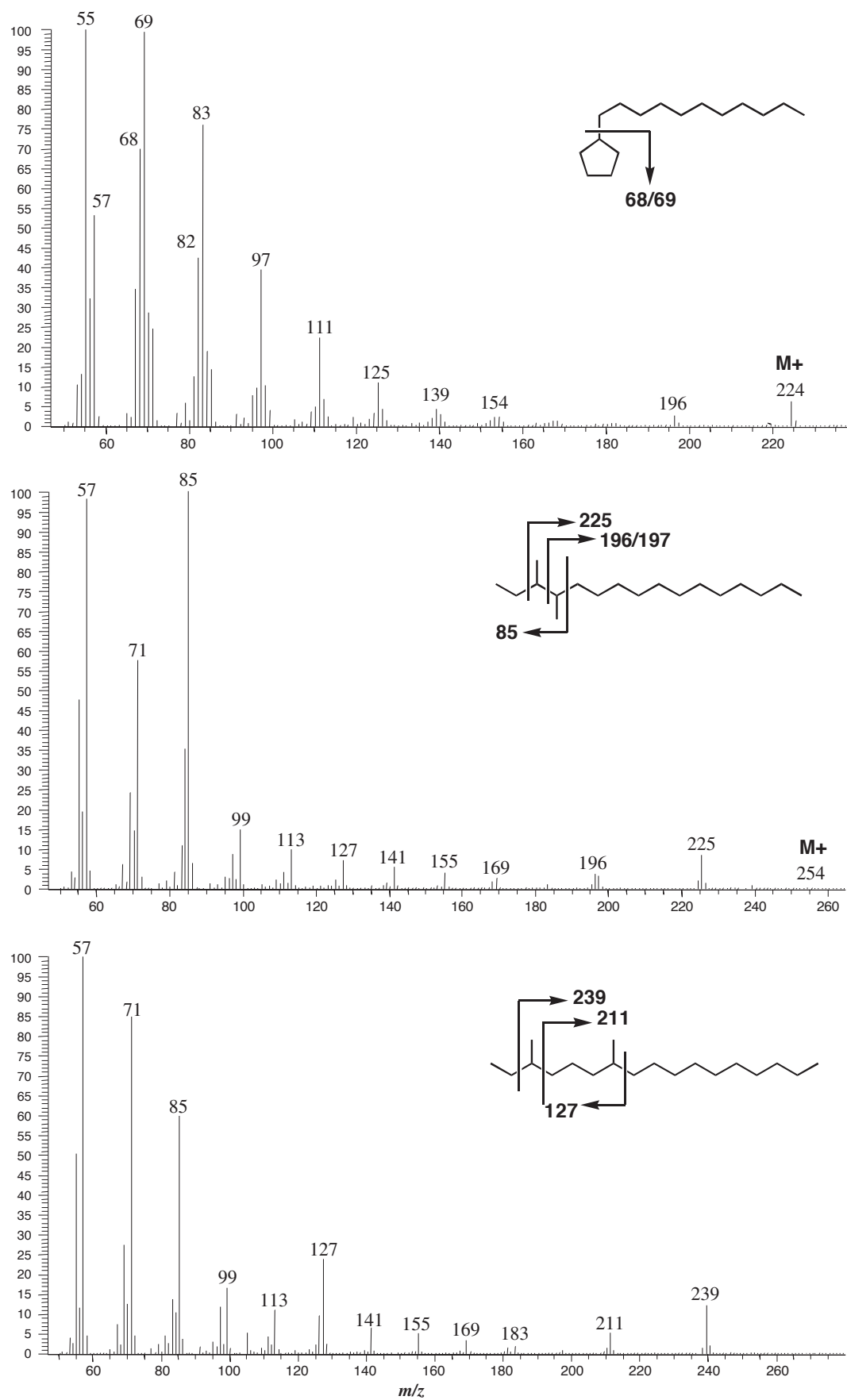


図5 特徴的化合物のマススペクトル。2(ウンデシルシクロペンタン)、8(3,4-ジメチルヘキサデカン)、13(3,7-ジメチルヘプタデカン)。
 Fig. 5 Mass spectrum of 2 (undecylcyclopentane), 8 (3,4-dimethylhexadecane) and 13 (3,7-dimethylheptadecane).

<i>n</i> -alkane	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
<i>n</i> -12	-27.6
<i>n</i> -13	-28.8
<i>n</i> -14	-28.0
<i>n</i> -15	-27.9
<i>n</i> -16	-27.4
<i>n</i> -17	-27.6
<i>n</i> -18	-27.6
<i>n</i> -20	-31.9
alkylcyclopentane	
C16	-26.6
C18	-26.5
C20	-35.6
monocarboxylic acids	
16:00	-24.4
18:00	-24.5

表2 黒島海丘より採取したバクテリアマット中の*n*-アルカン、アルキルシクロペンタンとモノカルボン酸の個別炭素同位体組成。

Carbon isotopic composition of *n*-alkane, alkylcyclopentane and monocarboxylic acids in sea floor bacterial mat from Kuroshima Knoll.

alkaneについては、*n*-C₁₂から*n*-C₁₈までは、-27.4‰～-28.8‰の狭い組成範囲に入る。*n*-C₂₀については、-31.9‰とこの範囲を超えて、軽い炭素同位体組成を示している。これに対して、alkylcyclopentaneについては、C₁₆とC₁₇が-26.5‰から-26.6‰であるのに対し、C₁₈は-35.6‰と高炭素数側で軽い炭素同位体組成を示している。また、モノカルボン酸については、16:0と18:0の飽和カルボン酸について分析値が得られ、それぞれ、-24.4‰と-24.5‰であった。

5. まとめ

「ドルフィン-3K」による潜航調査 (Dive #506) によって黒島海丘より採取したバイオマットに被覆される堆積物について有機地球化学分析を行なった結果、バイオマットは以下の有機化合物で特徴付けられる。

- (1) $\text{CPI}_{11-23}=0.39$ で示される著しく偶数炭素数優位性をもつ *n*-alkane。
- (2) 奇数炭素数の dimethylalkane。
- (3) 偶数炭素数の alkylcyclopentane。
- (4) 少量の alkylcyclohexane と 3,4-dimethylalkane。
- (5) C₃₁ 以下の炭素数を持つ hopane と deoptene
- (6) カルボン酸は C₁₈ が卓越し、特に 18:1 Δ^{oz} が最も多い。

また、個別同位体組成は、*n*-アルカンについて -27.4‰～-31.9‰、アルキルシクロペンタンについて -26.5‰～-35.6‰であった。

謝辞

本研究を進めるにあたり、岩谷科学技術研究助成 (平成13年度・荻原) を使用させて頂いた。記して感謝します。

文献

- 1) 町山栄章・松本 剛・松本 良・服部陸男・岡野眞治・岩瀬良一・戸丸 仁, “しんかい2K黒島海丘潜航調査 (NT-01-05Leg1航海) の概要,” JAMSTEC 深海研究, 19, 45-60, (2001)
- 2) Peckman, J., Theil, V., Michaels, W. Clari, P., Gaillard, C., Martire, L. and Reitner, J., "Cold seep deposits of Beauvoisin (Oxfordian; southeastern France) and Marmorito (Miocene; Northern Italy): microbially induced authigenic carbonates," Int. Joun. Earth Sci., 88, 60-75 (1999)
- 3) Theil, V., Peckman, J., Seifert, R., Wehrung, P., Reitner, J. and Michaels, W. "Highly isotopically depleted isoprenoids: Molecular markers for ancient methane venting," Geochim. Cosmochim. Acta, 63, 3959-3966 (1999)

(原稿受理: 平成14年8月5日)

