

海底での有機物分解による冷湧水型微生物相の形成 —海底比較実験タフオノミー (CETUS) へのアプローチ

長沼 毅*¹ 服部 陸男*² 秋元 和實*³
門馬 大和*⁴ 橋本 惇*⁴

海底堆積物における微生物群集のバイオマスと種組成に影響する要因の一つはエネルギー源・有機物源であり、熱水噴出域や冷水湧出域ではメタンや硫化水素が海底微生物群集のエネルギー源になっている。メタンや硫化水素は有機物の嫌氣的分解（腐敗）過程でも生じるので、有機物分解（タフオノミーの一過程）に伴う微生物相の変遷を、堆積物脂肪酸をマーカーとして実験的に調査した。海底現場実験として、既知の冷湧水帯の直近に豚頭を設置したところ、豚頭にシロウリガイが誘引され、同時に堆積物脂肪酸組成もシロウリガイ・コロニー内のそれに類似するよう変化したことが分かった。これにより、海底での有機物分解により冷湧水型の微生物群集が形成され、さらに一時的ではあるがシロウリガイなど大型底生生物のコロニー形成をも引き起こすことが示唆された。

キーワード：堆積物脂肪酸，有機物分解，微生物相，冷湧水，タフオノミー

Formation of a Cold Seep-type Microflora by Organic Degradation on Deep-sea Floor : An Approach to Comparative Experimental Taphonomy at Underwater Stations (CETUS)

Takeshi NAGANUMA*⁵ Mutsuo HATTORI*⁶ Kazumi AKIMOTO*⁷
Hiroyasu MOMMA*⁸ Jun HASHIMOTO*⁸

Biomass and species composition of sediment microflora are affected by the sources of energy or organic material as well as many other factors. Methane and sulfides are known to be the major energy sources for the microflora of hydrothermal vents and cold seeps. Methane

* 1 海洋科学技術センター深海研究部（現在：広島大学生物生産学部）

* 2 海洋科学技術センター深海研究部（現在：海洋科学技術センター海底下深部構造フロンティア）

* 3 名古屋自由学院短期大学

* 4 海洋科学技術センター深海研究部

* 5 Deep Sea Research Department, Japan Marine Science and Technology Center (present : Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University)

* 6 Deep Sea Research Department, Japan Marine Science and Technology Center (present : Oceanic Crust Dynamics Research Frontier)

* 7 Nagoya Jiyu Gakuin Junior College

* 8 Deep Sea Research Department, Japan Marine Science and Technology Center

and sulfides are also known to be produced during anaerobic degradation of organic matters which is a taphonomic process. We investigated the influence of organic degradation on microflora changes in deep-sea sediment. As an *in situ* experiment, pig heads were placed near a known cold seep colonized by *Calyptogena* clams. Within one month after the first pig head placement, a small *Calyptogena* colony was newly formed in close vicinity of the pig head. Sediment fatty acid composition just beneath the pig head showed remarkable changes and became similar to that from inside of the nearby *Calyptogena* colony. These results suggest that organic degradation stimulates the formation of cold seep-type microflora and that the colonies of macrobenthos may be formed temporarily.

Key words : Sediment fatty acids, organic degradation, microflora, cold seep, taphonomy

1. はじめに

海底堆積物における微生物群集の量（バイオマス）と質（組成）は、微生物活動のエネルギー源や有機物源により、また物理的・生物的攪乱によっても、大きく変動する（Baird *et al.*, 1985; Findlay *et al.*, 1990a, 1990b）。逆に言うと、微生物群集のバイオマスと組成を調べれば、その海底環境を微生物生態学的に特徴づけられると期待できる。ただし、微生物群集からすべての微生物種を分離・培養する直接法は現況では不可能なので、微生物の細胞構成成分を抽出・分析する間接法がとられている。この間接法にはデオキシリボ核酸（DNA；遺伝子物質）や脂肪酸などが用いられている。DNAは遺伝情報を担っており、特定遺伝子の解析とデータベース検索により、種レベルまでの同定すら可能である。しかし、DNAの解析だけでその微生物群集全体の種組成や優占微生物グループを推定するのは不可能ではないが、労力や時間、費用がかかる。一方、脂肪酸分析はその微生物群集のバイオマスと種組成の概観的な把握には有効である（Baird *et al.*, 1985; Findlay *et al.*, 1990a, 1990b）。脂肪酸には多くの種類があるが、ある種の脂肪酸はある微生物グループに特に多いという相関関係が見られ、ここから脂肪酸が微生物グループの指標（バイオマーカー）に利用されている（*e. g.*, Rajendran *et al.*, 1994）。さらに、脂肪酸組成はその微生物群集ごとに特有であり、ある時間・ある場所の海底堆積物の‘指紋’として利用できるばかりでなく、‘指紋’同士の比較・似ているか似ていないか—を行うことで、海底堆積物の近縁度を定量し、視覚的に図示することができる。

われわれは今までに日本近海の数地点の堆積物について脂肪酸分析を行い、底生生物バイオマスの高い海底では堆積物中の微生物バイオマスも高いこと、冷湧水

活動が知られている場所とそれが想定されている場所での堆積物脂肪酸組成がよく似ていること、そして、冷湧水域と鯨骨生物群集の堆積物脂肪酸組成もよく似ていることを明らかにしてきた（長沼, 1995; 長沼ほか, 1996; Naganuma *et al.*, 1996, 1997）。冷湧水域ではメタン及び硫化水素が主なエネルギー源だが、鯨遺骸でも鯨体の腐敗・分解に伴って生じたメタンや硫化水素が類似の微生物群集を形成したと考えられている（Allison *et al.*, 1991）。本研究では、有機物分解（タフ・ノミーの一過程）に伴う微生物相の変遷を、堆積物脂肪酸をマーカーとして実験的に調査した。海底現場実験として、既知の冷湧水帯（初島沖シロウリガイ・コロニー; Hashimoto *et al.*, 1989）の直近に豚頭を設置した結果、豚頭にシロウリガイが誘引され、同時に堆積物脂肪酸組成もシロウリガイ・コロニー内のそれに類似するよう変化したことが分かった。これにより、海底での有機物分解により冷湧水型の微生物群集が形成され、さらに一時的ではあるがシロウリガイなど大型底生生物のコロニー形成をも引き起こすことが示唆された。

2. 材料と方法

2.1 有機物塊（豚頭）の海底設置

初島沖のシロウリガイ・コロニー近くの海底に豚頭を設置した。豚頭を用いた理由は、(1)有機物分解の大部分が頭蓋骨内部で進行し、頭蓋骨内部に嫌気状態が生じるのでメタンや硫化水素など還元的物質の生成が促されると期待されたこと、(2)サイズがほぼ30×30×50 cm以内、重量は約4 kgと、潜水船や無人探査機のペイロードラックに収容しやすいこと、の2点である。豚頭は2個設置された。まず、1995年4月18日に最初の豚頭が設置され、422日後の1996年6月13日にほぼ1 m

表 1 相模湾初島沖冷水湧水域における豚頭設置、観察、堆積物採取の日程

Table 1 Time table of pig head placement and sediment collection at the off-Hatsushima cold seep, Sagami Bay, central Japan.

Dive	Date (DD/MM/YY)	Days elapsed	Sediment sample
3K*-211	18/04/95	0 (1st placement)	Pre-placement & <i>Calyptragenacolony</i>
2K**-788	20/05/95	32	Observation only
3K-222	03/06/95	46	0 m & 1 m
3K-267	19/11/95	215	0 m & 1 m
2K-872	13/06/96	422 (2nd placement)	0 m from the 1st
3K-297	24/07/96	463 [41 from the 2nd]	0 m from the 2nd & <i>Calyptragenacolony</i>

* Remotely operated vehicle, "Dolphin 3K". ** Manned submersible, "Shinkai 2000"

離れて2個目が設置された(表1)。豚頭は各々ペーパーオルデくるみ、鉄鎖とともに網で覆った状態で設置したので、魚・カニなどの捕食をまぬがれ、また、鉄鎖が重錘となり海底流による移動を防ぐことができた。

2.2 豚頭設置地点

豚頭は初島沖冷水湧出域のシロウリガイ・コロニー近くに設置された(34°59.9'N, 139°13.7'E; 水深 1,167 m; Hashimoto *et al.*, 1989; 図1)。初島沖冷水湧出域は相模トラフ沈み込み帯に沿ったメタン湧水域であり、世界的にも大規模なシロウリガイ群生地として知られている。また、1923年の関東大地震の震源域にも近い。このため、初島沖海底には1993年に長期観測ステーションが設置され、以来、海底流や水温、地震活動、海底観察な

どが続けられている(門馬ほか, 1994)。これら生物・地球科学的特徴や海底施設があるために、初島沖海底には潜水調査船「しんかい2000」や無人探査機「ドルフィン3K」が頻繁に訪れている。本研究では、それらのうち幾つかの機会に便乗することで、豚頭の観察や堆積物採集を繰り返し行うことができた。

2.3 堆積物の採取

豚頭の設置及び堆積物採取の実施日を表1に示す。なお、表3の試料名は、経過日数一採取位置一堆積物表面からの深さ(上層・下層など)の順で表示した。堆積物採取地点は、豚頭設置予定地(設置前; -0-), 豚頭直近(-0-), 豚頭から1 m (-1-), 付近のシロウリガイ・コロニー内(-Cpg-)とした。堆積物は内管内径 43 mm, 長さ 25 cm のコア・サンプラーで採取し、上層(-U; 堆積物表面から 0-5 cm, 以下 0-5 cmbs と表す; cmbs は cm below sediment surface の意) と下層(-L; 同 5-10 cm, 以下 5-10 cmbs と表す) を試料とした。また、463日目の豚頭直近堆積物については堆積物表面から 1 cm ごとに 7 cmbs まで試料採取し、必要に応じて 0-5 cmbs の平均を上層試料データ、5-7 cmbs の平均を下層試料データとした。

最後の堆積物採取は 463 日目に行われた(表1)。その後も堆積物採取を予定していたが、1997年3月の伊豆半島沖群発地震で乱泥流が生じた。これにより豚頭設置地点の海底環境が大きく攪乱され、それまでのデータとの比較が困難になると思われるので、463日目までのデータを取りまとめて解析を行った。

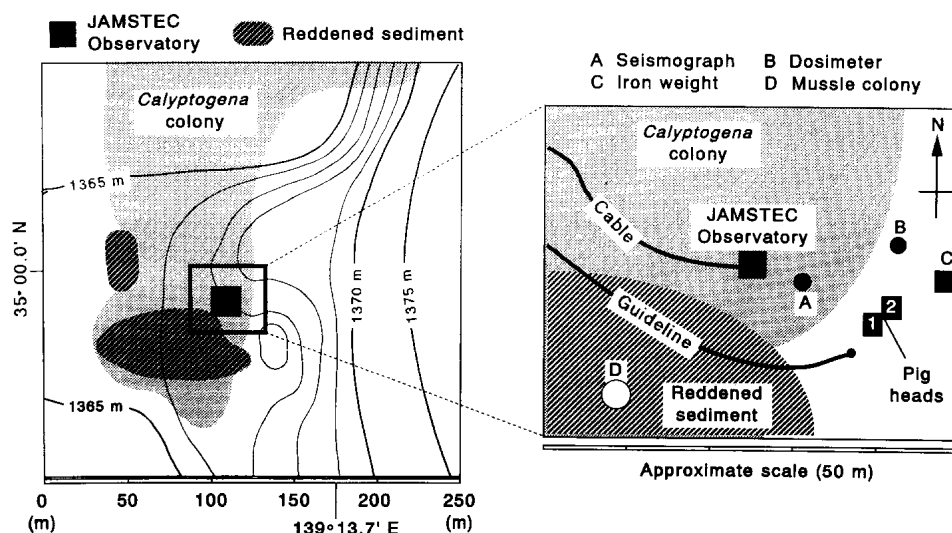


図 1 相模湾初島沖の冷水湧水域における豚頭設置地点付近の海底地形及び位置指標。左図は服部ほか(1996)による

Fig. 1 Topography and position markers around the pig-head placement site at the off-Hatsushima cold seep site in Sagami Bay, central Japan. Large-scale map (left) based on Hattori *et al.* (1996).

2.4 堆積物の脂肪酸分析

採取した堆積物は潜水船揚収後直ちに「なつしま」船上にて上層(0-5 cmbs)・下層(5-10 cmbs)等に分取し、 -80°C にて保存した。その後、冷凍状態のまま研究室に持ち帰り、凍結乾燥した。凍結乾燥後はできるだけ早く脂肪酸の抽出と分析を行った。

脂肪酸の定量と組成分析はガスクロマトグラフィー法で行った (Sasser, 1990a)。まず、凍結乾燥した堆積物に含まれる全脂肪酸をアルカリ溶液 (30 g NaOH in 100 ml methanol and 100 ml distilled water) で鹸化し、さらにメチル化して (325 ml 6N HCl mixed with 275 ml methanol), 脂肪酸メチルエステル (FAME) をつくった。この FAME を有機溶媒 (mixture of hexane and tert-butyl ether, 1:1 by volume) に抽出し、各堆積物試料の FAME の含量と組成をガスクロマトグラフ装置 (HP 7673 A201; カラムは HP 1909 B-102, Ultra 2) で分析した (e. g. Rajendran *et al.*, 1994)。

得られた FAME 組成から脂肪酸組成を読み取り、これにもとづいて堆積物試料間の類似度 (近縁度) をクラスター解析した。解析結果はユークリッド距離を用いてデンドログラムで図示した (Sasser, 1990 b)。デンドログラムでは、類似度 (近縁度) の高いものほどユークリッド距離が短く、脂肪酸組成にもとづく関係の遠近が直観的に把握できる。

3. 結果と考察

3.1 豚頭及び海底の観察

豚頭を設置した地点はシロウリガイ・コロニーの外側であり、メタン湧水の直接的な影響はそれほど強くないと思われた (図1)。実際、豚頭設置前には、湧水の存在を示す堆積物表面の黒変・赤変も見られなかった。ところが、豚頭設置後、最初の採集時 (46日目) には豚頭にシロウリガイが群がっていた (写真1)。その多くは死んでいるように見えたが、それは豚頭有機物の分解によるメタンや硫化水素の供給が急速に不足したためであろう。逆に言うと、設置直後には、シロウリガイを誘き寄せるほどの量のメタンや硫化水素が生成したということになる。また、422日目の観察時には豚頭近辺にシロウリガイがほとんど見られなかった。この時、第2の豚頭を設置したが、463日目 (2回目の設置から41日目) には第2の豚頭近辺に若干のシロウリガイが見られた。

設置した豚頭にはヨコエビ類やエゾバイ貝類、ゲンゲ類が寄っていた。豚頭を覆うペーパータオルや頭骨外側

の組織を摂食していたものと思われる。特に最後の観察時 (463日目) にはゲンゲの仲間が豚頭 (初めに設置した方) と網の間にはさまっていた。網の目を通して入り込んだものの、出るに出られなくなったのだろう。調査期間中に豚頭は堆積物で覆われ、詳細な分解過程の追跡は困難であった。また、堆積の状況も大きく変化しており、一様な堆積過程というよりもむしろ、底泥の堆積と剝離が繰り返されながら、結果として徐々に堆積していくという複雑なプロセスが示唆された。

1997年2-3月の伊豆半島沖群発地震の影響で、1997年3月4日に豚頭設置地点に乱泥流が生じ、長期観測ステーションの海底観察によると付近海底は大きく攪乱され様相が一変していた。したがって、豚頭の観察計画もこの時点で中止を決定した。

3.2 堆積物脂肪酸の含有量

豚頭設置地点の堆積物脂肪酸 (SFA) 含量は当初、 $0.40\text{--}0.64\text{ ng g}^{-1}$ (乾燥堆積物1g当たりの脂肪酸ng) であり、付近のシロウリガイ・コロニーの SFA $0.55\text{--}0.64\text{ ng g}^{-1}$ とほぼ同レベルであった (図2)。豚頭設置から463日後のシロウリガイ・コロニーの SFA 含量はわずかに 0.69 ng g^{-1} まで増加しただけであり、この期間の SFA 含量はほぼ一定だったと思われる。これらの値の平均をバックグラウンド値とすると、それは $0.58\pm 0.11\text{ ng g}^{-1}$ になる (図2の陰影部)。

最初の豚頭の設置直後から、SFA 含量の顕著な増加が0m地点 (豚頭直近) の上層堆積物で見られ、豚頭から1m離れた地点でも増加していた (図2)。これは豚頭設置の影響が少なくとも46日以内に1mの距離まで及んだことを示す。ここから、豚頭設置の影響が水平的に広がる速さは約 2 cm day^{-1} と推定できる。一方、下層堆積物 (5-10cmbs) の SFA 含量は、0m地点で 0.38 ng g^{-1} (46日目) あるいは 0.40 ng g^{-1} (215日目) と、当初の 0.64 ng g^{-1} からやや減少したが、上層堆積物の初期 SFA 含量の 0.40 ng g^{-1} を考えると、自然に起こり得る変動範囲内にあると思われる。また、1m地点の下層堆積物の SFA 含量は 0.76 ng g^{-1} (46日目) あるいは 0.67 ng g^{-1} (215日目) と、初期 SFA 含量 0.64 ng g^{-1} に比べてほとんど変化していなかった。下層堆積物の SFA 含量が有意に増加したのは0m地点の422日目であり、深さ5-10cmに豚頭設置の影響が及ぶのに215-422日を要したことが分かる。ここから、豚頭設置の影響が鉛直的に広がる速さは $0.2\text{--}0.3\text{ mm day}^{-1}$ と推定できる。つまり、豚頭設置の影響は水平方向には広がりやすく、鉛直方向には広がりにくいことが

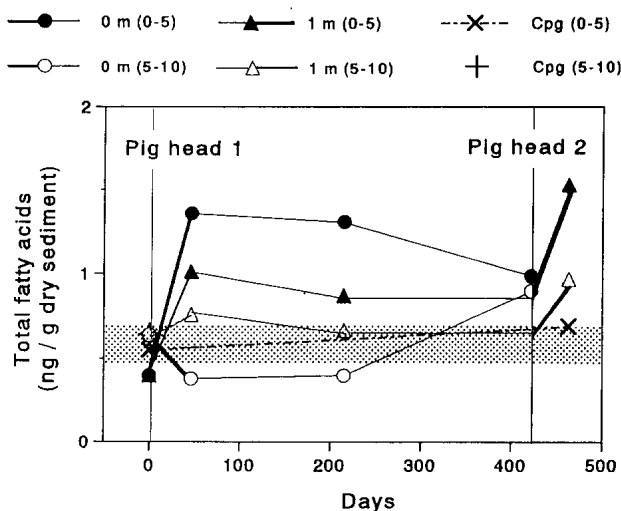


図 2 豚頭設置後の堆積物脂肪酸含量の経時の変化。陰影部は推定されるバックグラウンド値

Fig. 2 Temporal changes in the total content of sediment fatty acid after pig-head placements. Shaded area indicates the presumed background level of this site.

示唆される。これは堆積物内部で鉛直方向に、硫酸イオン/硫化水素や酸素/メタンなどの化学躍層ができていたためと思われる (Masuzawa *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1995)。

豚頭設置による顕著な SFA 含量増加は、第 2 回目の豚頭設置直後にも見られた (図 3)。もっとも、ここでは 215 日目以降、SFA 含量が一定だったという前提を置いている。もし、この SFA 含量増加が第 2 回目の豚頭設置によるものとしたら、その増加率は $0.017 \text{ ng g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (41 日間で 0.69 ng g^{-1} の増加) となり、第 1 回目の豚頭設置時の $0.021 \text{ ng g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (46 日間で 0.96 ng g^{-1} の増加) とほぼ同じになる。

第 2 回目の豚頭設置では、堆積物下層 (5-7 cm) の SFA 含量も直ちに増加した。これは第 1 回目の豚頭設置とは対照的である。これは、第 1 回目の豚頭設置により、旧 1 m 地点の下層堆積物の微生物群集が慣らされていて、新たな豚頭設置に直ちに反応して増殖したためと思われる。

3.3 堆積物脂肪酸の多様性

堆積物脂肪酸 (SFA) の種類数は、その堆積物における微生物相の多様性に関連すると考えられる。本研究では、各試料中の SFA の種数は 6 から 12 であった。一般的に 14:0 (炭素数 14, 二重結合数 0) の脂肪酸が多く、次いで 16:0, 16:1 $\omega 7c$ (炭素数 16, 二重結合数 1, 二重結合位置は ω 位炭素から 7-8 番目の炭素原子間, 二重結合はシス cis 型), 18:1 $\omega 7c/9t/12t$ (//は

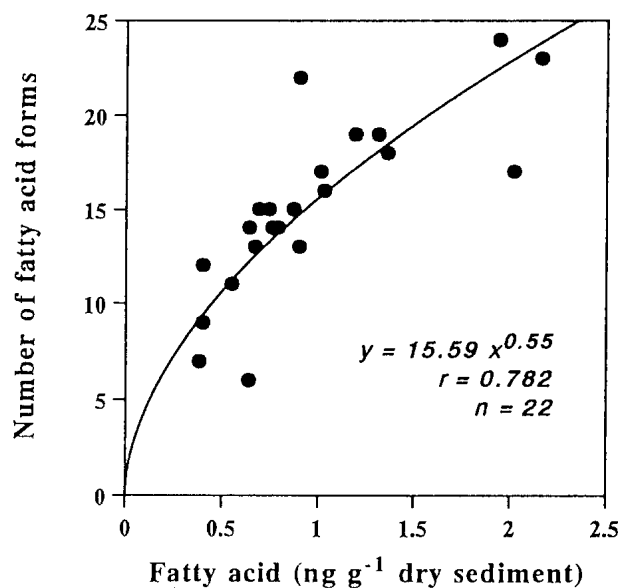


図 3 堆積物中の全脂肪酸含量と全脂肪酸種数の関係
Fig. 3 Relationship between the total amount of sediment fatty acids and the number of fatty acid forms.

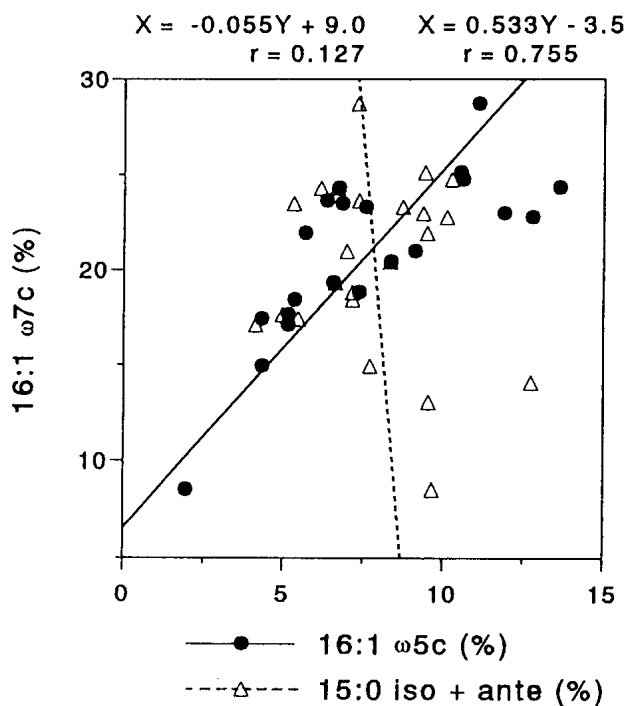


図 4 全脂肪酸中の脂肪酸 16:1 $\omega 7c$ (15:0 iso 20H を含む可能性あり) の割合と脂肪酸 16:1 $\omega 5c$ (メタン酸化菌バイオマーカー) 及び 15:0 iso+ante (硫酸還元菌のバイオマーカー) の割合の関係

Fig. 4 Relationship between the percentage of 16:1 $\omega 7c$ (and/or 15:0 iso 20H) to total fatty acids and the percentage of 16:1 $\omega 5c$ (a biomarker for methane-oxidizers) or the 15:0 iso+ante (a biomarker for sulfate-reducers).

and/or のこと ; t は二重結合がトランス trans 型ということ)。

SFA の種類数は SFA 含量と正の相関関係にあった(図 3)。つまり, SFA (微生物) が多ければ, SFA (微生物) 多様性も高い, あるいは, 微生物が多ければ微生物多様性も高いということである。図 4 では累乗関数を用いてこの相関関係を表したが, この場合に累乗関数が適用できるか否かは不明である。ただし, 少なくとも次のことは言えるだろう。すなわち, SFA の増加は新たな SFA 種類の加入によるものであり, 特定の SFA 種類だけが増えたというわけではなさそうである。同様なことは日本海において沈み込みが想定されている海底域の堆積物についても報告されている(長沼ら, 1996)。ただし, 本研究では, 種や属レベルで異なる微生物でも, メタン酸化性・イオウ酸化性・硫酸還元性などの特徴により同じグループにまとめているので, 新規脂肪酸の加入が直ちに微生物相の変化に結びつかない場合もあった。

SFA 多様性が最高だった試料は 463 日目(第 2 回豚頭設置後 41 日目)の新規 0 m 地点における 1-2 cmbs

層と 2-3 cmbs 層で, SFA の種類数は各々 23 と 24, SFA 含量も 1.94, 2.19 ng g⁻¹ と高かった。この直下の 3-4 cmbs 層の SFA 含量も 2.02 と高く, SFA 種類数も 17 とやはり高かった。この 1-4 cmbs という層でメタンや硫化水素に関する微生物/地球化学プロセスが活発に進んでいることが予想される。詳しい鉛直構造については後述する。

3.4 バイオマーカーとしての堆積物脂肪酸

本研究を行った初島沖メタン湧水域では, メタンを用いた嫌氣的硫酸還元 (=硫化水素生成) が想定されており(Masuzawa *et al.*, 1992), これに関連した微生物グループの存在が微生物相の研究の焦点となる。ここでは, メタン湧水域の地球化学プロセスや酸素濃度に関して, メタン酸化細菌・イオウ酸化細菌・硫酸還元菌・ε-プロテオバクテリアを選び, それらの“バイオマーカー”(生物指標)になり得る脂肪酸に焦点を絞る。選ばれた微生物グループとそれに対応する SFA バイオマーカーを表 2 に示す。また, 各堆積物試料における脂肪酸組成一覧を表 3 に示す。

表 2 と表 3 から, まず, シロウリガイ・コロニー内

表 2 堆積物微生物相の指標となるバイオマーカー脂肪酸
Table 2 Biomarker fatty acids as indicators of sediment microbial populations.

<i>Fatty acid</i>	<i>Microorganisms</i>	<i>Reference*</i>
14:0 3-OH	Some ε-Proteobacteria (campylobacters)	(8)
15:0	SRB (<i>Desulfobulbus</i>)	(11)
15:0 iso/anteiso	SRB (<i>Desulfovibrio</i>), anaerobes	(4) (9) (12)
15:1	SRB (<i>Desulfobulbus</i>), marine sediments	(18)
16:0 3-OH	Some ε-Proteobacteria (campylobacters)	(8)
16:1 w7	SRB (<i>Desulfovibrio</i>), campylobacters?, anoxic sediments	(11) (12)
16:1 w5/w7/w8/w11	Type I methane-oxidizers (seep-mussel symbionts)	(7) (10)
17:1 iso/anteiso	SRB (<i>Desulfovibrio</i>), marine sediments	(12) (13)
18:1 w7	SRB (<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobulbus</i>), anaerobes, sediments	(3) (12) (13)
18:1 w7c	Type II methane-oxidizers	(10)
19:0 cyclo (9)	Campylobacters, thiobacilli, aerobes,	(1) (2) (5) (6)

* (1) Baird & White 1985, (2) Baird *et al.* 1985, (3) Bobbie & White 1980, (4) Edlund *et al.* 1985, (6) Goodwin *et al.* 1985, (6) Goodwin *et al.* 1989, (7) Jahnke *et al.* 1995, (8) Kerger *et al.* 1986, (9) Mancuso *et al.* 1990, (10) Nichols *et al.* 1985, (11) Parkes & Calder 1984, (12) Parkes & Taylor 1983, (13) Taylor and Parkes 1983

の堆積物微生物相はメタン酸化的だったことが分かる。一方、豚頭設置点の堆積物微生物相は当初、メタン酸化的というよりもむしろ硫酸還元的だったが、豚頭設置後からメタン酸化的に変化したことが分かる。ここで、バイオマーカー脂肪酸のうち、16:1 ω 7 を硫酸還元菌あるいはメタン酸化菌の指標と見るかが問題となるが、他の明らかなバイオマーカー脂肪酸（硫酸還元 15:0 iso/ante, メタン酸化 16:1 ω 5c）との相関関係を調べたところ、メタン酸化菌指標と正の相関を示したので、16:1 ω 7 はメタン酸化菌の指標と考えた（図4）。

Campylobacter が属する ϵ -プロテオバクテリアは海底熱水噴出孔の微生物相の優占種である（Haddad *et al.*, 1995 ; Moyer *et al.*, 1995 ; Polz and Cavanaugh, 1995）。熱水噴出孔の種類についてはまだ培養が進んでいないが、既に培養されている種では微好気性という生理的特徴が知られている。つまり、好氣的から嫌氣的への勾配途上にある微妙な酸素濃度でのみ生育できるということである。逆に言うと、この微生物の存在は、嫌氣的環境から好氣的環境への中間環境的の指標となる。本研究では、14:0 3OH 及び 16:0 3OH の脂肪酸を ϵ -プロテオバクテリアのバイオマーカーとして、その分布を調べたところ、14:0 3OH 及び 16:0 3OH の脂肪酸は、シロウリガイ・コロニー内の 0-5 cmbs と豚頭直近（463日目）の 0-4 cmbs にのみ分布することが分かった。463日目の試料では、0-4 cmbs が黒色層（硫化水素層）、それ以深はオリーブ～緑色層であり、黒色層において微好氣的環境が形成されていたことが分かる。

豚頭直近（463日目）0-4 cmbs の黒色層（硫化水素層）にはまた、イオウ酸化菌の指標である 19:0 cyclo の脂肪酸が存在していた。すなわち、この層において、湧水由来のメタンと海水由来の硫酸イオンが反応して硫化水素が生成し、それを微少なながらも海水由来の酸素で酸化するという反応系が形成されていることが示唆される。19:0 cyclo の脂肪酸はなぜか、豚頭とは直接に触れていない 1 m 地点（46日目）の 0-5 cmbs 層で顕著に多かった。これは、豚頭腐敗の進行により嫌氣環境が水平方向に広がり、ちょうど 1 m 地点辺りに嫌氣/好氣境界が達したものと思われる。豚頭設置後 46 日前後で豚頭腐敗の影響が極大に達したことは、シロウリガイが多数誘引されていたことから支持される。

3.5 デンドログラム

各試料間の脂肪酸組成の類似度をクラスター解析し、その結果を視覚的に表したものがデンドログラムである。これにより、場所や時間の異なる多くの試料の近縁

関係を直観的に把握し、豚頭設置による SFA 組成、すなわち微生物相の変遷を明らかにすることができる。

図5 (A)に SFA 組成に基づく各堆積物のデンドログラムを示す。堆積物間の類似度はクラスター解析で計算される‘ユークリッド距離’で表される。微生物の細胞脂肪酸については一般に、ユークリッド距離が 25, 10, 6 以下の場合、それらの微生物はそれぞれ属、種、亜種以下のレベルで類似すると考えられる（Sasser, 1990 b）。一方、堆積物脂肪酸の場合、微生物相同士の類似度とユークリッド距離の直接対応はまだなされていない。

図5 (B)は最も類似度の低い、つまり他とはかけ離れた堆積物が分かるようにした。これによると、豚頭設置前（0-0-U と 0-0-L）と設置後は SFA 組成が大きく異なること、また、豚頭設置直後の豚頭から 1 m 離れた地点（46-1-U）の微生物相はまだそれほど変わっていなかったことが示唆された。ただし、“46-1-U”試料では SFA 含量は増えていたので、豚頭設置の量的影響はあったものの、質的な変化はそれほど顕著ではなかったと言えよう。一方、豚頭設置時と 463日目のシロウリガイ・コロニー内の堆積物（0-Cpg-U, 0-Cpg-L, 463-Cpg-U）を含む塊（クラスター）は、ユークリッド距離 16 以内で一つにまとめられた。

図5 (C)は、(B)のクラスターをさらに分けたもので、堆積物下層同士の類似性を示すクラスター（小さい塊 2つ）と、シロウリガイ・コロニー内と豚頭直近の堆積物の類似性を示すクラスター（大きい塊 1つ）に分けられる。豚頭の設置によりシロウリガイ生息地と同じ微生物相が形成されたことが示唆される。これは、設置された豚頭にシロウリガイが寄ってきた現象とよく合致している。

図5 (D)は、(C)の大きいクラスターをさらに細分化したもので、シロウリガイ・コロニー内と豚頭直近の堆積物の類似性、特に 3-4 cmbs 層との類似性を示している。これは、豚頭直近でも 3-4 cmbs 層において特徴的に、メタン/硫化水素に関する微生物・地球化学プロセスが進んでいることを示す。同じ豚頭直近の堆積物でも、3-4 cmbs 層は他の層と明らかに異なることが分かる。また、3-4 cmbs 層を挟むように 1-2-3 cmbs 層と 4-5 cmbs 層が類似し、さらにそれを挟むように 0-1 cmbs 層と 5-6 cmbs 層が類似するのも興味深い。この様子を図6に示す。

豚頭直近の堆積物は 0-1-2-3-4 cmbs が黒色で、4-5-6-7 cmbs はオリーブ～緑色だった。つまり、0-4 cmbs

表 3 豚頭設置点 (1 回目 0 m, 2 回目 0' m), 豚頭から 1 m 地点及びシロウリガイコロニー内 (C) の堆積物における脂肪酸含量, 脂肪酸組成。試料名は [1 回目の豚頭設置からの経過日数] - [採取地点; 0 m, 0' m, 1 m, C] - [深さ; U (0-5 cmbs), L (5-10 cmbs), 1' (0-1 cmbs), 以下同様]

Table 3 Total fatty acid contents, fatty acid from numbers and fatty acid compositions of sediments from beneath pig heads (0 m and 0' m), 1 m from a pig head, and a *Calyptogena* colony (C). Sample designation is [days elapsed after the first pig placement] - [sampling site; 0 m, 0' m, 1m, and C] - [depth; U (0-5 cmbs), L (5-10 cmbs), 1' (0-1 cmbs), and so on].

Sample	FA ng/g	FA forms	9.521*	10:0	10:0 2OH	10:0 3OH	12:0 ante	11.798*	12:0 iso	12:0	14:0 iso	14:1 ω5	14:0	15:0 iso	15:0 ante	15:1 ω8c	15:0	14:0 3OH	16:1 ω7c OH	16:1 iso
0-C-U	0.55	11	-	-	-	-	-	-	2.71	4.91	-	-	11.97	3.64	6.59	-	-	-	-	-
0-C-L	0.54	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.60	-	9.34	-	-	-	-	-
0-0-U	0.40	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.77	4.41	8.33	-	-	-	-	-
0-0-L	0.64	14	3.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.26	3.09	6.56	3.01	-	-	-	-
46-0-U	1.36	18	2.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.36	2.20	4.40	-	1.60	-	3.61	4.36
46-0-L	0.38	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.14	-	6.65	-	-	-	-	-
46-1-U	1.01	17	-	-	-	-	-	-	-	-	1.55	-	6.29	1.44	2.67	13.03	-	-	2.38	3.44
46-1-L	0.75	14	-	2.10	-	-	-	-	-	-	-	-	10.59	3.48	6.61	-	2.52	-	5.72	7.04
215-0-U	1.31	19	1.74	1.40	-	-	-	-	-	-	0.91	-	9.46	1.99	3.30	-	0.92	-	1.52	2.67
215-0-L	0.40	12	-	2.24	-	-	-	-	-	-	-	-	12.58	2.41	4.89	-	-	-	2.97	-
215-1-U	0.87	15	-	-	-	-	-	-	-	5.46	-	-	13.10	2.33	3.81	-	-	-	4.32	4.81
215-1-L	0.67	13	2.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.01	3.15	6.25	-	-	-	4.33	5.97
422-0-U	1.19	19	1.60	1.11	-	-	-	-	-	2.20	1.16	-	9.68	2.74	4.60	-	1.86	-	2.53	3.53
422-0-L	0.90	22	1.91	0.96	-	0.90	-	-	-	1.97	1.35	1.12	10.02	3.03	5.67	-	2.23	-	3.53	4.56
463-C-U	0.69	15	-	-	-	-	-	-	-	2.88	-	-	13.87	3.79	5.68	-	1.94	3.84	-	-
463-0'-1'	0.79	14	6.64	-	-	1.69	-	-	-	3.58	-	-	10.97	2.43	4.72	-	2.30	3.78	-	-
463-0'-2'	2.16	23	6.21	0.75	-	1.54	-	0.69	-	1.56	-	-	8.53	2.23	3.22	-	1.52	-	2.20	3.13
463-0'-3'	1.94	24	7.46	0.84	-	1.37	-	0.92	-	2.21	0.99	-	8.69	1.86	3.09	-	-	-	2.31	3.10
463-0'-4'	2.02	17	4.65	-	-	-	-	-	-	3.22	-	-	14.51	2.84	4.12	-	1.62	3.64	2.79	-
463-0'-5'	0.74	13	6.38	-	-	-	-	-	-	2.73	-	-	9.28	2.87	5.45	-	-	-	3.36	4.37
463-0'-6'	0.90	15	6.25	-	-	-	-	-	-	2.35	-	-	9.93	2.81	4.33	-	-	-	1.91	-
463-0'-7'	1.03	16	6.06	-	2.85	-	3.84	2.16	-	-	-	-	10.02	2.82	4.88	-	1.97	-	-	3.34

Sample	16:0 OH	16:1 ω 7c **	16:1 ω 5c	16:0	17:1 ω 5c iso	17:1 ω 7c	18:1 iso	16:0 iso 3OH	17:0 10 Me	16:0 3OH	18:3 ω 6c	18:2*** ω 6,9c	18:1 ω 9c	18:1 ω 7/9/12	18:1 ω 5c	18:0	19:0 cy ****	18:0 2OH	19:0 10 Me	20:1 ω 9c
0-C-U	-	24.76	10.60	23.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.85	-	3.96	2.19	-	-	-
0-C-L	-	23.01	11.89	31.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.72	-	-	-	-	-	-
0-0-U	-	14.08	-	30.16	-	-	-	-	8.05	-	-	-	-	4.87	-	4.60	6.74	-	-	-
0-0-L	6.11	8.53	1.95	18.25	-	-	-	-	7.69	-	4.67	-	-	5.35	-	-	7.74	-	8.18	-
46-0-U	2.92	19.34	6.55	17.30	-	-	-	3.16	-	-	1.69	-	4.54	4.07	-	3.27	4.09	-	2.72	-
46-0-L	-	24.35	13.63	25.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.92	-	-	-	-	-	-
46-1-U	1.41	17.13	5.14	10.50	-	1.78	2.81	-	-	-	-	-	-	3.49	2.35	-	22.51	-	-	-
46-1-L	4.68	22.80	12.77	12.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.10	-	2.83	2.12	-	-	2.10
215-0-U	1.72	23.52	6.81	20.84	-	-	-	-	-	-	-	2.32	6.84	5.12	-	4.84	1.98	-	2.11	-
215-0-L	1.94	28.73	11.08	20.27	-	-	-	-	-	-	-	-	4.03	4.68	-	4.18	-	-	-	-
215-1-U	3.21	24.31	6.71	13.40	-	5.08	-	-	5.50	-	-	-	2.15	3.08	-	-	2.75	-	-	-
215-1-L	4.04	25.13	10.53	16.65	-	-	-	-	3.15	-	-	-	-	4.22	-	-	3.43	-	-	-
422-0-U	2.31	23.67	6.34	20.42	-	-	-	-	-	-	-	1.11	4.38	4.38	-	4.87	1.53	-	-	-
422-0-L	3.00	23.34	7.56	14.17	-	-	-	-	-	-	1.85	-	2.17	4.34	-	2.08	2.54	-	1.59	-
463-C-U	3.69	21.96	5.66	21.38	3.57	-	-	-	-	-	-	-	2.37	3.96	-	2.57	2.86	-	-	-
463-0'-1'	2.97	18.44	5.34	23.71	-	-	-	-	-	-	-	-	5.01	2.93	-	5.47	-	-	-	-
463-0'-2'	2.39	17.44	4.31	20.25	-	-	-	1.61	-	1.37	-	1.29	7.49	4.71	-	4.62	1.62	-	1.35	-
463-0'-3'	1.64	17.66	5.15	17.72	-	-	-	1.10	-	-	1.17	1.15	6.94	4.09	-	3.97	2.04	1.21	1.77	-
463-0'-4'	1.56	21.00	9.11	19.01	-	-	-	-	-	-	1.62	-	1.90	3.09	-	2.25	2.96	-	-	-
463-0'-5'	2.89	20.46	8.35	20.57	-	-	-	-	-	-	-	-	4.67	4.56	-	4.06	-	-	-	-
463-0'-6'	3.13	18.83	7.36	25.21	-	-	-	-	-	-	-	-	8.84	3.36	-	5.69	-	-	-	-
463-0'-7'	2.82	14.95	4.33	24.25	-	-	-	-	-	-	-	-	4.24	2.51	-	8.95	-	-	-	-

* Unknown fatty acid having the equivalent chain length (ECL) of 9.521 or 11.798.

** Complex of 16 : 1 ω 7c and 15 : 0 iso 2OH

*** Complex of 18 : 2 ω 6,9c and 18 : 0 ante

**** Complex of 19 : 0 cyclo and 2 unknown fatty acids.

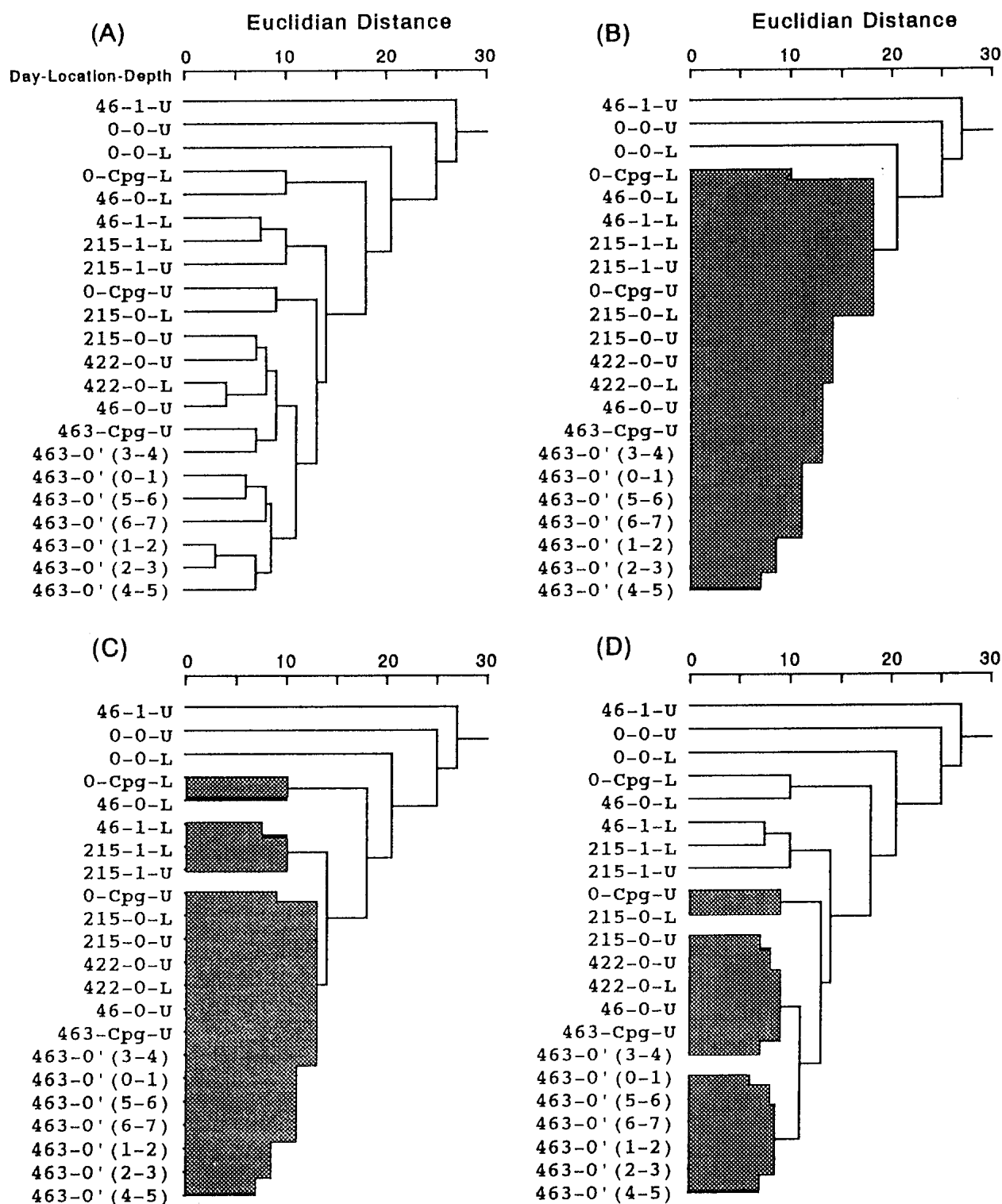


図 5 脂肪酸組成に基づいて各堆積物の近縁関係を示すデンドログラム。(A) は全体図。(B) は豚頭設置の前後の差を日立たせたもの。(C) はシロウリガイ・コロニー内外の差を強調したものの。(D) は柱状試料中 3-4 cmbs 層の特徴を際立たせたもの

Fig. 5 Dendrograms showing the similarity relationship of various sediment samples based on fatty acid compositions. (A) shows the general and detailed relationship. (B) outgroups the sediments before the pig head placement. (C) stresses the difference between the sediments inside and outside of Caplyptogena colony. (D) focuses the feature of the 3-4 cmbs section of a sediment core sample.

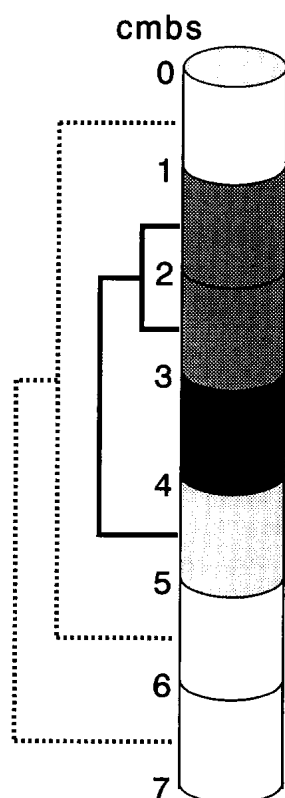


図 6 豚頭直近の堆積物柱状試料における 1 cm 各層の近縁関係
Fig. 6 Similarity relationship of 1 cm-sections from a sediment core sample beneath a pig head.

という上層で硫化水素の酸化(酸素消費)が活発であり、3-4 cmbs はその中でも最下層なので海水由来の酸素が少ない。したがって、3-4 cmbs 以深はおおむね嫌氣的であり、硫酸イオンによるメタン酸化、つまり、硫化水素生成のフロントであると考えられる。

4. 微生物相の経時的变化—まとめ

豚頭設置による堆積物脂肪酸組成の時間的・空間的变化を概略的に視覚化すると図7のようになる。まず、豚頭設置前の SFA 組成はやや従属栄養的であったが、第1回目の豚頭設置により、豚頭直近の SFA 組成はシロウリガイ・コロニー内のそれに類似してメタン酸化・硫酸還元的な‘冷湧水型’になった。これは豚頭周辺に多数のシロウリガイが誘引されたことと整合性がある。一方、豚頭から約 1 m 離れた地点の SFA 組成は一時的にせよ硫酸酸化になった点で、豚頭直近とは異なる応答をした。しかし、この 1 m 地点（第1回目の豚頭から半径 1 m の円周上）第2回目の豚頭を設置したところ、1回目と同じように‘冷湧水型’へと変化した。SFA 組成はその堆積物中の微生物相を反映するので、豚頭設置—海底での有機物分解により、堆積物中の‘冷湧水型’の微生物相が形成されたと考えられる。化学合

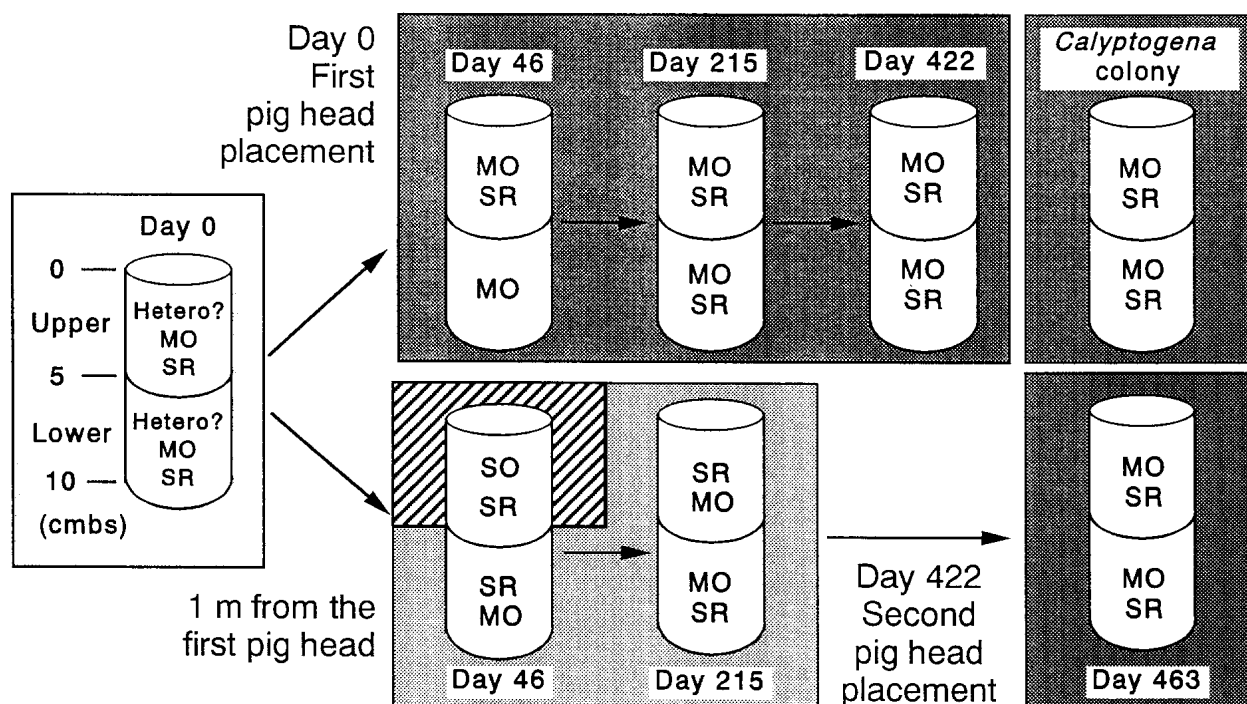


図 7 豚頭設置による堆積物微生物相の経時的变化。Hetero, 従属栄養的。MO, メタン酸化的。SR, 硫酸還元的。SO, 硫酸酸化
Fig. 7 Schematized change of sediment microflora after pig head placement. Hetero, heterotrophic. MO, methane-oxidizing. SR, sulfate-reducing. SO, sulfur-oxidizing.

成に依存した冷湧水性生物群集の分布と伝播において、テクトニックな地学的条件とともに、鯨など大型生物の分布・回遊経路なども関与している可能性を示唆するものである。

謝 辞

本調査研究を可能にして下さった「しんかい2000」運航チーム、「ドルフィン3K」操縦班、「なつしま」クルーの皆様に深く感謝いたします。横浜市食肉衛生検査所の岩間公男先生には豚頭の入手で便宜を図って頂きました。また、船上作業に協力して下さった蟹江康光博士、他の乗船研究者の皆様にも感謝いたします。この研究の一部は文部省科学研究費補助金（09740642）により行われた。

引用文献

- Allison, P. A., C. R. Smith, H. Kuckert, J. W. Deming and B. A. Bennett (1991) : Deep-water taphonomy of vertebrate carcasses : a whale skeleton in the abyssal Santa Catalina Basin. *Paleobiology*, **17**, 78–89.
- Baird, B. H. and D. C. White (1985) : Biomass and community structure of the abyssal microbiota determined from the ester-linked phospholipids recovered from Venezuela Basin and Puerto Rico Trench sediments. *Mar. Geol.*, **68**, 217–231.
- Baird, B. H., D. E. Nivens, J. H. Parker and D. C. White (1985) : The biomass, community structure, and spatial distribution of the sedimentary microbiota from a high-energy area of the deep sea. *Deep-Sea Res.*, **32**, 1089–1099.
- Bobbie, R. J. and D. C. White (1980) : Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 1212–1222.
- Edlund, A., P. D. Nichols, R. Roffey and D. C. White (1985) : Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species. *J. Lipid Res.*, **26**, 982–988.
- Findlay, R. H., M. B. Trexler, J. B. Guckert and D. C. White (1990a) : Laboratory study of disturbance in marine sediments : response of a microbial community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **62**, 121–133.
- Findlay, R. H., M. B. Trexler and D. C. White (1990b) : Response of a benthic microbial community to biotic disturbance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **62**, 135–148.
- Goodwin, C. S., R. K. McCulloch, J. A. Armstrong and S. H. Wee (1985) : Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.*, **19**, 257–267.
- Goodwin, C. S., W. McConnell, R. K. McCulloch, C. McCullough, R. Hill, M. A. Bronsdon and G. Kasper (1989) : Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 938–943.
- Haddad, A., F. Camacho, P. Durand and S. C. Cary (1995) : Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1679–1687.
- Hashimoto, J., S. Ohta, T. Tanaka, H. Hotta, S. Matsuzawa and H. Sakai (1989) : Deep-sea communities dominated by the giant clam, *Calyptogena soyoe*, along the slope of foot of Htsushima Island, Sagami Bay, central Japan. *Paleobiology, Paleoclimatology, Paleoecology*, **71**, 179–192.
- Hashimoto, J., S. Ohta, K. Fujikua, Y. Fujiwara and S. Sukizaki (1995) : Life habit of vesicomid clam, *Calyptogena soyoe*, and hydrogen sulfide concentration in interstitial waters in Sagami Bay, Japan. *J. Oceanogr.*, **51**, 341–350.
- 服部陸男・蟹江康光・大場忠道・秋元和実・菅野三郎 (1996) : 相模湾および陸上の沈み込み帯の冷湧水域に伴う炭酸塩類と独立栄養動物群集の生成環境. *JAMSTEC 深海研究*, **12**, 117–132.
- Jahnke, L. L., R. E. Summons, L. M. Dowling, and H. D. Zahiralis (1995) : Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills : Chemical and isotopic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 576–582.
- Kerger, B. D., P. D. Nichols, C. P. Antworth, W. Sand, E. Bock, J. C. Cox, T. A. Langworthy and D. C. White (1986) : Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacillus* spp.: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS*

- Microbiol. Ecol., **38**, 67–77.
- Mancuso, C. A., P. D. Franzmann, H. R. Burton and P. D. Nichols (1990) : Microbial community structure and biomass estimates of a methanogenic Antarctic lake ecosystem as determined by phospholipid analyses. Microb. Ecol., **19**, 73–95.
- Masuzawa, T., N. Handa, H. Kitagawa and M. Kusakabe (1992) : Sulfur reduction using methane in sediments beneath a bathyal “cold seep” giant clam colony off Hatsushima Island, Sagami Bay, Japan. Earth Planet. Sci. Lett., **110**, 39–50.
- 門馬大和・満澤巨彦・海宝由佳・堀田 宏 (1994) : 相模湾初島沖「深海底総合観測ステーション」の設置と長期観測. JAMSTEC 深海研究, **10**, 363–371.
- Moyer, C. G., F. C. Dobbs and D. M. Karl (1995) : Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 1555–1562.
- 長沼 毅 (1995) : 後志海山の堆積物脂肪酸-冷水湧出域との比較. JAMSTEC 深海研究, **11**, 403–410.
- 長沼 毅・藤倉克則・仲 二郎・加藤幸弘・竹内 章 (1996) : 北部奥尻海嶺の開口割れ目における堆積物脂肪酸-メタン湧水域および海底火山火口域との比較. JAMSTEC 深海研究, **12**, 83–94.
- Naganuma, T., H. Wada and K. Fujioka (1996) : Biological community and sediment fatty acids associated with the deep-sea whale skeleton at the Torishima Seamount. J. Oceanogr., **52**, 1–15.
- Naganuma, T., Y. Fukuda, K. Fujikura, J. Naka, Y. Kato and A. Takeuchi (1997) : Methane seepage in the Japan Sea?—Sediment fatty acids from the Northern Okushiri Ridge, compared those from a methane seep and a submarine volcano. JAMSTEC J. Deep Sea Res., special volume “Deep Sea Research in Subduction Zones, Spreading Centers and Backarc Basins”, 119–124.
- Nichols, P. D., G. A. Smith, C. P. Antworth, R. S. Hanson and D. C. White (1985) : Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signature for methane-oxidizing bacteria. FEMS Microbiol. Ecol., **31**, 327–335.
- Parkes, R. J. and A. G. Calder (1985) : The cellular fatty acids of three strains of *Desulfobulbus*, a propionate-utilising sulphate-reducing bacterium. FEMS Microbiol. Ecol., **31**, 361–363.
- Parkes, R. J. and J. Taylor (1983) : The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. Estuarine Coastal and Shelf Sci., **16**, 173–189.
- Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh (1995) : Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 7232–7236.
- Rajendran, N., O. Matsuda, Y. Urushigawa and U. Shimidzu (1994) : Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka Bay, Japan, by phospholipid fatty acid analysis. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 248–257.
- Sasser, M. (1990a) : Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note (MIDI, Newark, Delaware), **101**, 1–7.
- Sasser, M. (1990b) : “Tracking” a strain using the microbial identification system. MIDI Technical Note (MIDI, Newark, Delaware), **102**, 1–4.
- Taylor, J. and R. J. Parkes (1983) : The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp., and *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Gen. Microbiol., **129**, 3303–3309.

(原稿受理 : 1997 年 7 月 1 日)

(注) 写真は次ページ以降に掲載

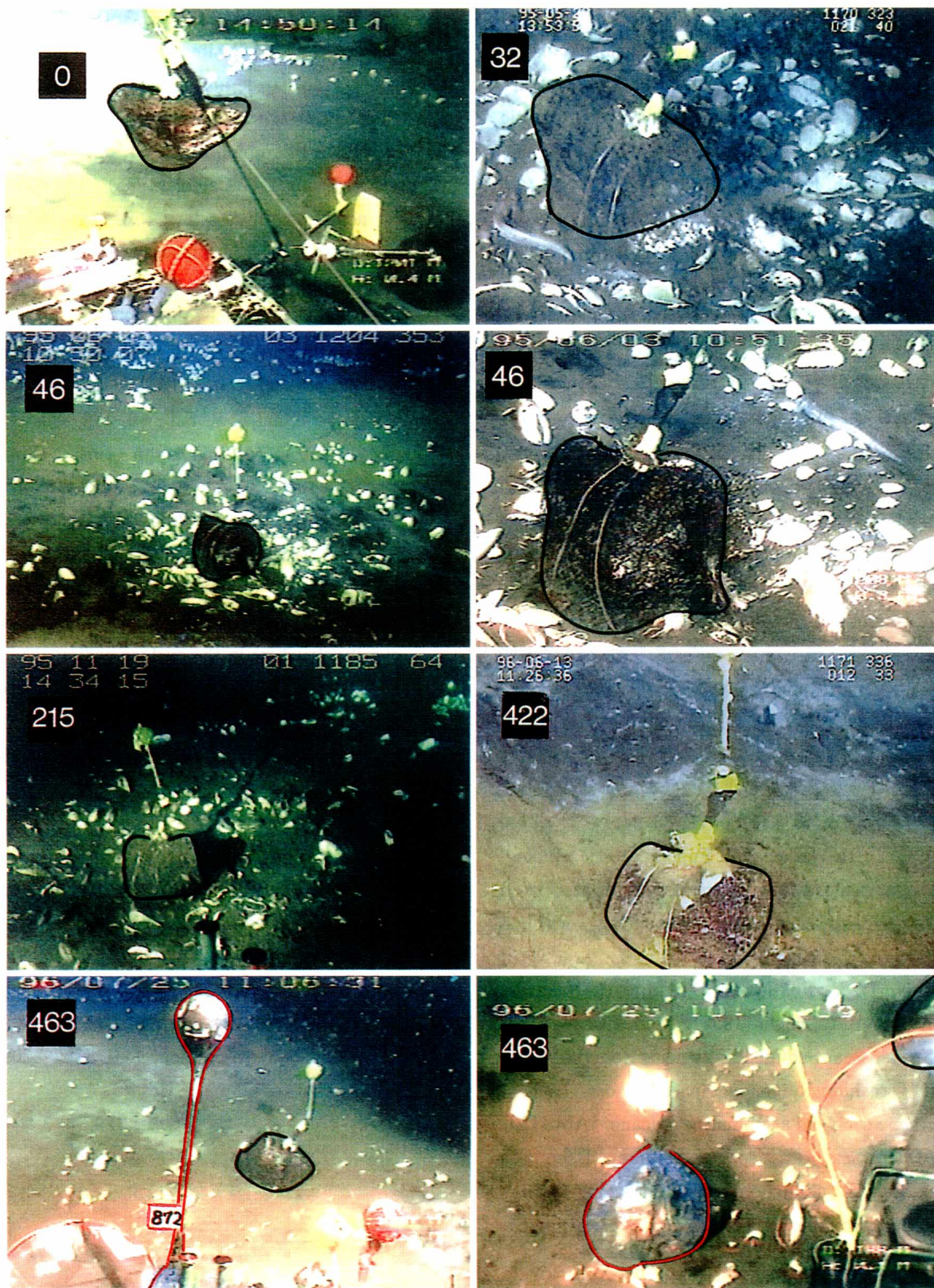


写真 1 設置した豚頭及び周辺域の経時的観察。各写真左上に第1回目の豚頭設置からの経過日数を示す。また、見やすくするために豚頭の輪郭を強調してある

Photo 1 Temporal monitoring of the placed pig heads and the vicinity. Elapsed days are indicated at top-left of each picture. Pig heads are outlined for visual convenience.