

堆積物中に存在する従属栄養性微小鞭毛虫類の計数方法

鋤崎 俊二・鈴木 信也

1. はじめに

バクテリア、微小鞭毛生物および原生動物などの微小な生物群を中心にした物質循環(微生物環; Microbial loop)の動態を明らかにするうえで、構成する生物群の数と量を知ることは極めて重要である。一般に、バクテリアは有機物の分解者(Decomposer)ないし処理屋(Scavenger)の機能を有し、有機物を分解することで、一次生産者にとって必要な無機栄養塩を回帰させる“Remineralizer”として位置づけられている(今井, 1989)。一方で、バクテリア自身が高次の捕食者にとっての餌料源にもなり、植物プランクトンと同様に基礎生産者としての位置づけも有していることが明らかになっている(Azam et al., 1983)。バクテリアは、微小鞭毛生物や原生動物などの生物群によって捕食されることが知られている(多賀, 1982)。特に、微小鞭毛生物のうち従属栄養性微小鞭毛虫類(Heterotrophic microflagellates: 以下 HMF と称す。)は、活発にバクテリアを捕食し、その捕食量は、バクテリアの生産量に近い値を示す(Wikner et al., 1986; Nagata, 1988)場合もあることから、Microbial loop の中で極めて重要な位置にあると考えられる。

HMF の観察や細胞数の計数は、落射式蛍光顕微鏡を用いた手法が一般に用いられている。これは、微小鞭毛生物の中には、光合成色素を有する独立栄養性微小鞭毛藻類(Autotrophic microflagellates: 以下 AMF と称す。)も存在するため、通常の生物顕微鏡による細胞形態と鞭毛の有無の確認からのみでは、両者の区別をつけることができないことによる。

水試料を対象にした HMF の細胞数計数のための

試料固定方法や、計数方法に関してはすでに多くの報告があり(Fenchel, 1982; Haas, 1982; Caron, 1983; Sherr and Sherr, 1983; Lee et al., 1996 など)、これらを使用することで単位水試料あたりの細胞数(例えば、cells/ml)が計数できる。

一方、堆積物中に存在する HMF の細胞数を正確に計数し、単位堆積物試料あたりの細胞数(例えば、cells/g 乾泥)として表記する方法を報告した例(例えば、Ekeboom, 1999)は少ない。堆積物中に存在する HMF は堆積物の間隙水中に生息すると考えられるが、通常、その生息密度はバクテリアに比較し数桁少ない。このため、精度良く細胞数を計数するためには、堆積物から効率良く HMF のみを分離させる前処理方法を採用する必要がある。ただし、HMF はバクテリアに比較し細胞膜が脆弱なため、堆積物中に生息するバクテリアの計数で用いられる前処理方法(例えば、Epstein and Rossel, 1995; 高津と加藤, 2003; 鋤崎ら, 2010)と同様に、超音波分散器などを使用すると細胞の破損を招く恐れがある。

ここでは、これら細胞破損の防止方法を示しながら、筆者らが用いている海底堆積物中に存在する HMF の細胞数を計数する方法を紹介する。

2. 試料の採取

2.1 固定液と試料採取容器

最終濃度が 1% になるようグルタルアルデヒド(Glutaraldehyde)を添加した海水を用意する。一般にバクテリアなどの固定に多用されるホルマリン(Formalin)は、細胞への浸透性が良い(重中, 1998)が、細胞の変形や破壊をおこしやすい(Pace and

Orcutt, 1981; Throndsen, 1978) ため、微小鞭毛生物の固定には不向きである。また、使用する海水は事前に試料採取場所から採取したものか、試料採取場所の塩分に調整した人工海水を用いる。これを、孔径 0.2 μm 以下のヌクレポアフィルターを用いて濾過する。

濾過除菌したグルタルアルデヒド添加海水の 10 ml を、容積 15 ml のガンマ線滅菌済みのポリプロピレン製容器(例えば、Corning 社製の遠沈管)に分注し、固定容器とする(鋤崎ら, 2010)。堆積物の湿重量あたりの細胞数が知りたい場合には、この時点で固定容器の総重量を測定しておく必要がある。

固定容器は、保存期間中の固定液の揮発を防止するため、密栓し冷蔵保管する。

2. 2 堆積物試料の採取

清浄な小型のスパテラなどを用い、干出した干潟面などは直接に、海底堆積物は採泥器で取得したものから約 1 cm^3 程度を採取し、固定容器に収容する。筆者らは、1 ml 用の滅菌済みマイクロピペットチップを 1 本ずつアルミ箔で包んだものをスパテラの代用品に用いている(鋤崎ら, 2010)。堆積物を 10 ml の固定液量に対して 1 cm^3 以上を収容すると、次項に示す試料の前処理操作において十分な攪拌ができない。また、収容する堆積物が少なすぎる(約 0.1 cm^3 以下)と、細胞数の計数結果が過大評価されてしまう傾向にある。

堆積物を収容した固定容器は、試料の前処理段階まで冷暗状態で保存する。

なお、固定試料を保存できる時間は 50 時間以内である。Lee et al. (1996) は、保存時間が 50 時間を超えると AMF が有するクロロフィル色素などの急速な分解が始まり、計数値に影響を与えると指摘している。Bloem et al. (1989) も培養細胞を用いた実験結果から、固定後 6 日目には自家蛍光が完全に消失することを報告している。自家蛍光が消失した AMF 細胞は、蛍光顕微鏡下での観察や計数時に HMF として認識してしまうため、細胞数の過大評価を招く。このため、精度良く HMF の細胞数を計数するためには、2 日以内に前処理を完了する必要がある。

3. 試料の前処理

3. 1 堆積物からの細胞の分離

堆積物を収容した固定容器の重量を測定する。事前に容器と固定液の総重量が測定されているため、両者の差分が堆積物の湿重量に相当する。

堆積物中に生息するバクテリアの場合には、堆積物粒子に付着している細胞を剥離させるために、界面活性剤(例えば、Tween 80 やピロリン酸(sodium pyrophosphate))を添加した後、超音波分散器を用いて分散させる方法が採用される(Epstein and Rossel, 1995; 鋤崎ら, 2010)。しかし、微小鞭毛生物はバクテリアに比較し細胞が脆弱なため、超音波分散器を使用すると細胞の破損を招く恐れがある。

國弘ら(2004)は、水処理で用いられる浸漬濾床に付着する微生物細胞を破損させずに剥離や分離させる方法として、直径 8 ~ 10 mm の浸漬濾床材の数を 0.03 M のピロリン酸ナトリウム溶液 50 ml に浸し、10 分間、手で激しく攪拌させ、溶液中に懸濁させたものを微生物観察試料に用いている。この方法では、超音波分散器を用いないため、微生物細胞の破損を低減させることができると考えられる。

筆者らも、ピロリン酸を固定試料 10 ml に対して 2.7 mg (0.001 M) 添加(Epstein and Rossel, 1995) した後、試験管攪拌器(写真 1)で、3 分間、攪拌し堆積

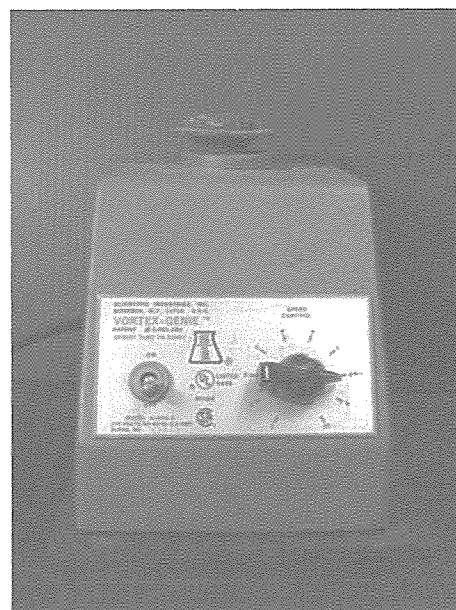


写真 1 試験管攪拌器の例

物から微小鞭毛生物を分離させる方法を採用している。微小鞭毛生物は、堆積物の間隙水中に生息している (Ekebom, 1999) ため、堆積物からの分離に際しては 3 分間の攪拌で十分であると判断している。多数の試料がある場合には、固定試料容器を往復振とう器などに装着し、攪拌することも効率的である。

3. 2 細胞数計数用試料の作成

分離処理後、堆積物を 10 分間静沈させ、その上澄み液の 3 ml 程度を取り出して試料とする。砂質泥の場合には 10 分間の静沈で上澄み液は半透明になるが、シルト質や粘土質の堆積物の場合には、10 分間の静沈では微細粒子は完全に沈殿しない。微細粒子を完全に沈殿させるためにより長い時間の静沈をおこなうことも考えられるが、微小鞭毛生物も沈殿してしまう懸念があるため、筆者らは全ての試料について 10 分間の静沈をおこなうことで統一させている。

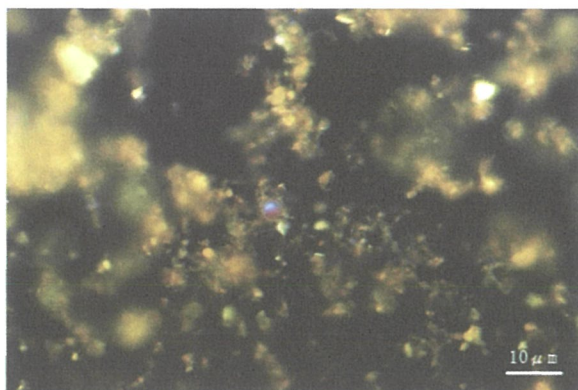


写真 2 独立栄養性微小鞭毛藻類 (AMF)

通常、堆積物中に生息する微小鞭毛生物の細胞数は、バクテリア細胞に比較して単位堆積物重量あたりの数が数桁少ない (Ekebom, 1999)。このため、濾過捕集する試料の量は 0.1 ~ 1.0 ml (バクテリアの場合には 0.05 ~ 0.2 ml) を目安にする。これ以上を濾過した場合には、試料中に混在する微細な懸濁粒子がフィルター面を覆い、微小鞭毛生物の細胞が見えづらくなる。

3. 3 細胞の染色

微小鞭毛生物のうち、AMF は光合成色素 (クロロフィル a など) の有無によって判断することができる。クロロフィル a は蛍光顕微鏡の下、B 励起で赤色の蛍光を発するため、独立栄養性として容易に判別できる (写真 2 と写真 3)。なお、微小な珪藻類や藍藻類もクロロフィル a を有するため同様に赤色の蛍光を発するが、AMF との区別は細胞形態の違いや鞭毛の有無によって判別できる。

一方、HMF は、光合成色素を有しないため B 励起でも細胞は赤色の蛍光を発しない。そこで、細胞を各種の蛍光染色剤によって染色し判別する方法が採用されている (今井, 1989)。筆者らも蛍光染色剤の DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) と Proflavine (3,6-diamino-acridine hemi-sulfate) を用いた二重染色法 (Haas, 1982) を採用している。本手法では、DAPI により核を染色し、Proflavine により細胞質内のタンパク質を染色する。DAPI で染色された核は U

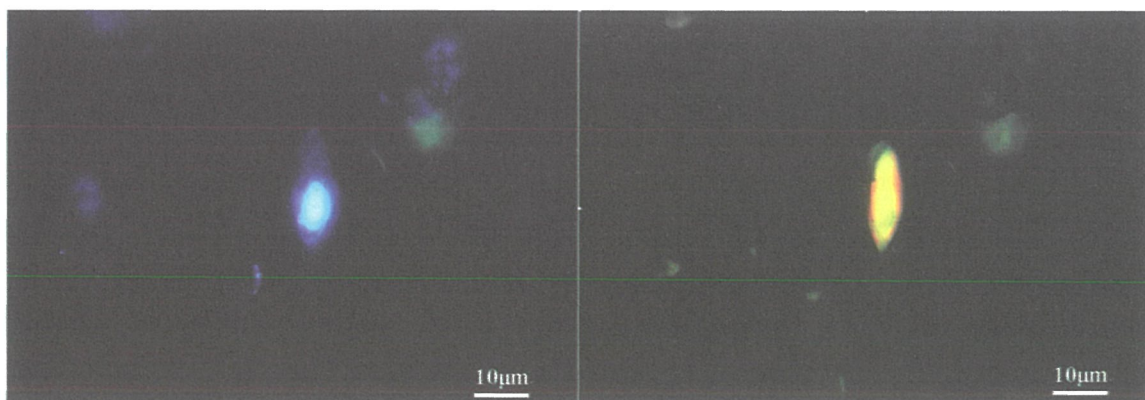


写真 3 独立栄養性微小鞭毛藻類 (AMF)

左: B 励起、右: U 励起。U 励起ではクロロフィル色素が分布する部分のみが赤色に発光する。

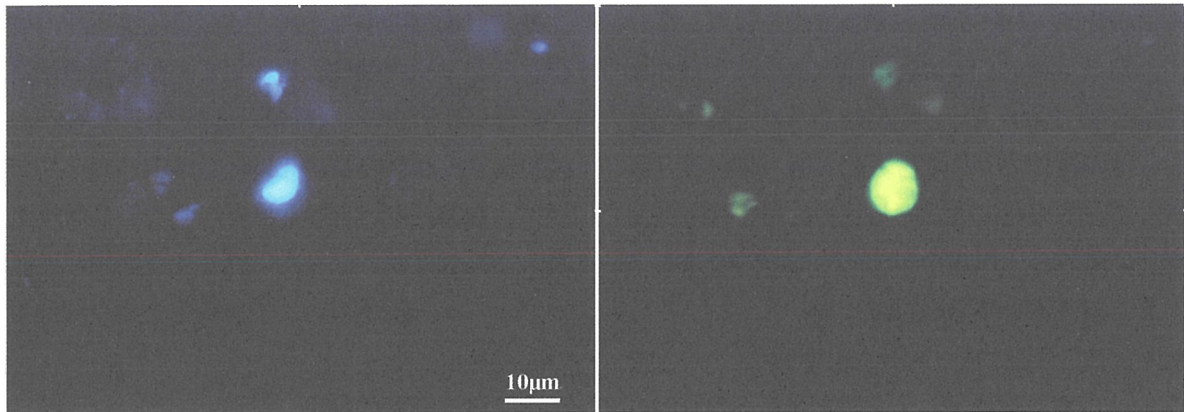


写真4 従属栄養性微小鞭毛虫類(HMF)

左：B励起、右：U励起。U励起でも赤色に発光する部位はない。

励起で淡青色に発光する(写真4)。Proflavineで染色された部分は、B励起で黄緑色に発光する(写真4)。

このように、微小鞭毛生物が有する色素の有無や異なる蛍光染色剤で染色することで、AMFとHMFを区別することができる。

Haas(1982)によるDAPIとProflavineを用いた二重染色法では、試料にDAPIを0.01 μg/mlの濃度になるよう滴下し3分間染色する。その後、Proflavineを0.06 μg/mlになるよう滴下し、1分間染色することになっている。なお、染色操作は自家蛍光の低下を防止するため暗条件下でおこなう。

3.4 プレパラートの作成

染色終了後直ちに、黒暗色に染色した孔径0.8 μmのヌクレポアフィルター(直径25 mm)で濾過捕集する。濾過捕集する場合には、フィルター面に捕集される細胞を均一に分散させる必要があるが、濾過量が少なすぎるとフィルター面に捕集される細胞の分布に粗密を生ずる恐れがある。そこで、試料に3 ml程度の濾過除菌した1%のグルタルアルデヒド固定海水を加えて希釈し、濾過捕集する方法を採用している。

濾過に際しては吸引ポンプを用いるが、減圧量は3 kPa(約2.28 cmHg)を超えてはならない。これ以上の圧力で減圧した場合には、細胞の破損を招く恐れがある(Bloem et al., 1989)。

また、筆者らはヌクレポアフィルターと濾過器の間にサポートフィルター(孔径3 μmのミリポアフィ

ルター;直径25 mm)を挿入し、より細胞へのダメージを少なくするように工夫している。

濾過捕集したヌクレポアフィルターは、無蛍光イマルジョンオイルとカバーガラスを用いてプレパラート上に包埋し、プレパラートボックスに収納後、細胞数を計数するまで-20°Cに設定した冷凍庫内で保存する。Bloem et al. (1989)は、この状態で保存すれば、16週間は細胞数に変化がないことを報告している。

4. 細胞数の計数

プレパラートを蛍光顕微鏡に装着し、1,000倍の倍率で、U励起で淡青色に発光する粒子を確認する。バクテリア細胞は細胞全体に核酸が分散しており、細胞全体が発光する。一方、微小鞭毛生物は核を有し、その部分のみが発光し、周辺の原形質部分は半透明に見えることで、バクテリア細胞とは容易に区別される。核の存在が確認された細胞について、B励起に切り替え再度形状と色素を確認する。B励起によって明瞭な赤色蛍光を発し、かつ珪藻類や藍藻類とは色素の配置状態や細胞形態が異なるもの、あるいは明瞭な鞭毛が確認される細胞をAMFとして計数する。B励起によって、赤色蛍光を発しないもののうち、鞭毛を有する細胞をHMFとして計数する。B励起によって、赤色蛍光を発しないものの中には微小繊毛虫類も混在する場合があるが、こ



写真5 落射式蛍光顕微鏡

れらは形態や繊毛の有無によって容易に区別することができる。

なお、U励起によって細胞内に明らかに核と異なる淡青色の粒子の存在が確認され、かつB励起によって明瞭な赤色蛍光を発する細胞が確認される場合がある。核と異なる粒子は、この細胞が捕食したバクテリア細胞の可能性がある(今井, 1989)。このような細胞は混合栄養性の微小鞭毛生物(Mixotrophic nanoflagellate; Safi and Hall, 1999)の可能性があるため、別途計数しておく。

当社で使用している落射式蛍光顕微鏡(写真5)では、1,000倍の倍率で観察できる面積は1視野あたり、約47,000 μm^2 である。通常、この視野面積では微小鞭毛生物の細胞数は5細胞以下しか確認されない。そこで、総計数値が100細胞以上に達するまで、濾過捕集したヌクレポアフィルター面をランダムに20~200視野を観察する。

5. 単位堆積物量あたりの総菌数の算出

堆積物湿重量あたりの細胞数は、固定液の量(A (ml))、試料の濾過量(B (ml))、ヌクレポアフィルターの濾過捕集面の面積(C (μm^2))、落射式蛍光顕微鏡で観察したヌクレポアフィルター面の総面積(D (μm^2))と、そこで計数された細胞数(E (n))、堆積

物湿重量(F (g))から以下の式を用いて算出することができる。

$$\text{細胞数 (cells/g 湿泥)} = (A/B \cdot C/D \cdot E) / F$$

堆積物乾燥重量あたりの総菌数は、別途、固定液中の堆積物の乾燥重量を測定し、この値から上記と同様の換算式で細胞数を算出する。

6. まとめ

このように、堆積物中に生息するHMFの細胞数をより精度良く計数するためには、試料の前処理段階において、①細胞の破損を招くことがない固定剤を使用すること、②堆積物からの細胞の分離操作時には、細胞の破損が懸念される超音波分散器などの使用は避けること、③フィルターへの細胞の濾過捕集も細胞の破損をおこさないような減圧量(3 kPa以下)でおこなうこと、④堆積物試料採取からプレパレーションまでの時間は2日以内におこなうこと、などの留意が必要である。

また、堆積物中に存在するHMFの細胞数はバクテリアに比較して数桁少ないため、総計数細胞数が100細胞を超えるまで、濾過捕集面をランダムに20~200視野を観察・計数する。さらに、HMFの観察や計数時には、B励起とU励起によってAMFとの区分をおこなうが、両生物群が有する特徴を併せ持った混合栄養性微小鞭毛生物が確認される場合もあることにも留意する。

筆者らは、これらの事項に留意しながら堆積物中に存在するHMFの細胞数計数を行っているが、シルト質や粘土質の堆積物では微細な堆積物粒子とHMF細胞を分離することが難しいなどの課題も残されている。今後は、これら課題についても検討を加えながら、より精度の高い堆積物中のHMF細胞数の計数手法を確立したいと考えている。

引用文献

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil L. A. and Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol.*

- Prog. Ser. 10: pp. 257–263.
- Bloem, J., Ellenbroek, F., Bar-Gilissen, M. J. B. and Cappenberg, TE. 1989. Protozoan grazing and bacterial production in stratified Lake Veichten, estimated with fluorescently labelled bacteria and thymidine incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(7): pp. 1787–1795.
- Caron, D. A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: pp. 491–498.
- Ekebom, J. 1999. Heterotrophic nanoflagellates and bacteria in sediment of a brackish water sill basin in the Baltic Sea. *Hydrobiologia.* 393: pp. 151–161.
- Epstein, S. S. and Rossel, J. 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11(7): pp. 289–298.
- Fenchel, T. 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9: pp. 35–42.
- Haas, L. W. 1982. Improved epifluorescence microscopy for observing planktonic micro-organisms. *Ann. Inst. Oceanogr. Paris.* 58(s): pp. 261–266.
- 今井一郎. 1989. 沿岸域における微生物の生態. 沿岸海洋研究ノート. 27(1): pp. 85–101.
- 國弘忠生・藤田昌史・胡 洪營・藤江幸一. 2004. キノンプロファイルと PCR-DGGE を併用した汚染修復細菌の特定と微生物群集の挙動解析. *統計数理.* 52(1): pp. 329–342.
- Lee, J. W., Sukizaki, S. and Ishikawa, K. 1996. Counting procedure of autotrophic microflagellates by fluorescence microscopy. *資源と環境.* 5: pp. 61–65.
- Nagata, T. 1988. The microflagellate-picoplankton food linkage in the water column of Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.* 33: 504–517.
- Pace, M. L. and Orcutt, Jr. 1981. The relative importance of protozoans, rotifers, and crustaceans in a freshwater zoo-plankton community. *Limnol. Oceanogr.* 26: pp. 822–830.
- Safi, K. A. and Hall, J. A. 1999. Mixotrophic and heterotrophic nanoflagellate grazing in the convergence zone east of New Zealand. *Aquat. Microb. Ecol.* 20: pp. 83–93.
- Sherr, E. B. and B. F. Sherr. 1983. Double-staining epifluorescence technique to assess frequency of dividing cells and bacterivory in natural populations of heterotrophic microprotozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: pp. 1388–1393.
- 重中義信 監修. 1998. 原生動物の観察と実験法. 共立出版株式会社. 東京. 259pp.
- 鋤崎俊二・鈴木信也・江里口悦子. 2010. 堆積物中に存在するバクテリアの細胞数計数方法. (株)日本海洋生物研究所 2010 年年報. pp. 29–33.
- 多賀信夫. 1982. 海洋生態系の食物網における被食者としての細菌の役割. 微生物の生態 10. 微生物生態論の諸側面. 微生物生態研究会. 学会出版センター. 東京. pp. 45–63.
- 高津知明・加藤憲二. 2003. 地球環境調査計測辞典. 第 3 巻. 沿岸域編. フジ・テクノシステム. pp. 272–273.
- Thronsdon J. 1978. Preservation and storage. In: *Phytoplankton Manual.* (ed Sournia A). UNESCO, Paris, pp. 69–74.
- Wikner, J., Andersen, A., Normark, S. and Hagstrom, A. 1986. Use of genetically marked minicells as a probe in measurement of predation on bacteria in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: pp. 4–8.