

夏季の広島湾における細菌と従属栄養性微小鞭毛虫類 の出現密度の変動¹⁾

岩本典子^{2),3)}・今井一郎⁴⁾・上 真一²⁾

広島大学生物生産学部²⁾, 南西海区水産研究所⁴⁾

Numerical Fluctuation of Bacteria and Heterotrophic Microflagellates
in Hiroshima Bay of the Inland Sea of Japan in Summer 1990¹⁾

NORIKO IWAMOTO^{2),3)} ICHIRO IMAI⁴⁾ AND SHIN-ICHI UYE²⁾

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 724²⁾ and
Nansei National Fisheries Research Institute, Ohno-cho, Saeki-gun, Hiroshima 739-04⁴⁾*

Abstract

Numerical fluctuations of bacteria, heterotrophic microflagellates (HMF) and autotrophic nanoplankton (ANP) were investigated at a station in Hiroshima Bay at two days intervals during the period from 18 July to 17 August, 1990. The average density of bacteria and HMF within the water column was highest at the beginning of the investigation, decreased to the end of July, and then was relatively constant. The cyclic oscillation pattern of the population abundance of bacteria and HMF was not found in the present study. The ranges of density observed were $1.16-4.30 \times 10^6$ cells·ml⁻¹ for bacteria (mean: 2.40×10^6 cells·ml⁻¹), and $3.27-9.09 \times 10^3$ cells·ml⁻¹ for HMF (mean: 5.07×10^3 cells·ml⁻¹). The average numerical and biomass ratios of bacteria to HMF were 481 and 1.08, respectively, which were smaller than the ratios previously reported. This means that HMF occurred more abundantly relative to bacteria in the present study area comparing to other areas. The density of ANP was more fluctuated than that of HMF, ranging from 2.41×10^3 to 59.00×10^3 cells·ml⁻¹ (mean: 12.9×10^3 cells·ml⁻¹).

Keywords: bacteria (細菌), heterotrophic microflagellates (従属栄養性微小鞭毛虫類), autotrophic nanoplankton (独立栄養性ナノプランクトン), Hiroshima Bay (広島湾)

細菌は有機物を分解して無機栄養塩を再生する分解者としての役割だけでなく、主として溶存態有機物を摂取して自らが増殖することにより、粒状態有機物の生産を行う役割も果している。細菌は沿岸や外洋水域では 10^3-10^7 cells·ml⁻¹ の濃度で存在することが報告されており (SOROKIN 1978), 細菌による生産速度は平均的には一次生産量の20-40%に相当すると見積られている (WILLIAMS 1981, COLE et al. 1988). 一方、海洋の動物プランクトンとして優占する橈脚類などの後生動物プランクトンは、細菌の単一細胞 (サイズは通常 $1 \mu\text{m}$ 以下) を直接捕食するための効率的な摂餌機

1) 1993年5月1日受理 (Accepted 1 May 1993)

3) 現在: 日立造船(株)環境技術研究センター, 〒554 大阪市此花区桜島1-3-22

Present address: Environmental Technology Research Center, Hitachi Zosen Co., 1-3-22 Sakurajima, Konohana-ku, Osaka 554

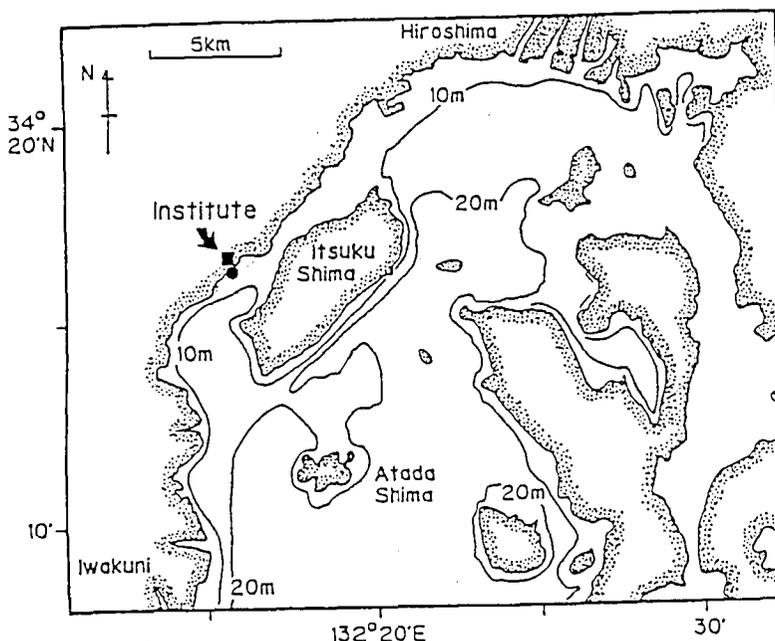


Fig. 1. Location of the sampling station (●) in Hiroshima Bay, the Inland Sea of Japan.

能をもっておらず、細菌は主に原生動物プランクトンによって捕食されると考えられる。そのうち従属栄養性微小鞭毛虫類 (Heterotrophic microflagellates: HMF) が最も強力な細菌捕食者であることが報告されている (FENCHEL 1982a, 1986)。しかし、本邦沿岸域における細菌と HMF の分布の時・空間的変動に関する調査例は少なく、わずかに周防灘 (今井 1984, 今井・伊藤 1984) や函館湾 (山本・絵面 1985) で行われているのみである。

細菌と HMF は微生物食物連鎖 (microbial food chain) の根幹に位置する生物群であるので、沿岸域の物質循環における微小生物群の役割を明らかにするためには、その出現量の変動と相互関係を解明する必要がある。ここでは生物活動の最も盛んな夏季において、細菌、HMF および独立栄養性ナノプランクトン (Autotrophic nanoplankton: ANP) の出現密度の時間的、鉛直的変動を広島湾で調査したので、その結果を述べる。

材料および方法

本調査は広島県佐伯郡大野町にある南西海区水産研究所の棧橋 (水深: 6.0–8.5 m) において (Figure 1), 1990年7月18日から8月17日まで行った。観測と採集は1日おきに、原則として午前9時15分から9時45分までの間に行った。表層 (0 m), 中層 (3 m), および底層 (海底から1 m 上の層) の3層の水温と塩分を YEO-KAL 社のポータブル S-T 計 (Model 602) により測定し、バケツあるいはニスキン採水器を用いて各層から採水した。海水を研究室に持ち帰り、直ちにその約100 ml を2本の100 ml 容のポリエチレン瓶にとり、グルタルアルデヒド (最終濃度: 1%) を加えて生物を固定し、暗所に冷蔵保存した。またクロロフィル *a* 測定用に海水500 ml をグラスファイバーフィルター (Whatman GF/C) で濾過し、濾紙は -20°C に凍結保存した。

後日、クロロフィル α 測定用の濾紙は90%アセトンで抽出し、その蛍光度を蛍光光度計 (Turner Designs) で測定した。細菌、HMF および ANP は、落射蛍光顕微鏡を使った直接検鏡法によって計数を行った。HMF、ANP用試料は、それらの細胞内蛋白質を染色する Fluorescein isothiocyanate (FITC) と、DNA を特異的に染色する4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた二重染色 (最終濃度: FITC $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, DAPI $0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) を行った (SHERR & SHERR 1983 a, b)。また、細菌用試料はDAPIによる染色 (最終濃度: $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) を行った (PORTER & FEIG 1980)。これらの試料は予め Sudan Black B で染色した孔径 $0.2\mu\text{m}$ (細菌用) および $1.0\mu\text{m}$ (HMF, ANP用) のスクレポアフィルターで濾過した後、直ちにフィルターをスライドガラス上に置き、無蛍光イマージョンオイルとカバーガラスで封入した。封入試料を落射蛍光顕微鏡 (ニコン EFD2, EFDA2, $\times 100$ 対物レンズ, 無蛍光イマージョンオイル使用) 下で観察計数した。細菌の観察はUV励起光を照射して行い、青白い蛍光を発する一定視野中の細菌を10視野以上計数した。HMFとANPの計数はUV励起光と青色励起光を併用して行い、それぞれ25視野以上計数して合計50細胞以上になるようにした。UV励起光下ではHMF, ANPの核が青白い蛍光を発することから、これらが生物であることが確認され、また青色励起光下ではHMFは緑色の蛍光を発し、葉緑体をもつANPは赤色あるいはオレンジ色の蛍光を発するので、両者は容易に区別できた。なお、予備調査において本調査海域に出現するHMFは平均直径が $2\text{--}10\mu\text{m}$ の範囲にあったので、本研究ではHMFとANPは細胞径が約 $2\text{--}10\mu\text{m}$ の範囲のものを対象とした。

結 果

1. 環境要因の変動

本調査期間中の水温と塩分の鉛直分布の変動をFigure 2に示す。表層水温は $26.2\text{--}28.1^\circ\text{C}$ の範囲で、底層水温は $20.1\text{--}24.9^\circ\text{C}$ の範囲でそれぞれ変動し、調査期間を通して水柱は成層していた。表層塩分は $24.1\text{--}30.4$ の範囲で大きく変動したが、底層塩分は $29.9\text{--}31.4$ と比較的狭い変動範囲であった。観測初期には顕著な塩分成層が認められたが、次第に弱くなり、観測終了時には塩分は鉛直的にほぼ一様になった。

クロロフィル α の鉛直分布および平均値 (3層の値をもとに水柱の積算濃度を算出し、それを水深で除した値) の変動をFigure 3に示す。クロロフィル α は通常中層で最も高く、水柱の平均値は観測初期に高く、その後7月下旬にかけて急激に減少し、観測後半の変動は比較的小さかった。

2. 細菌密度の変動

細菌密度は $1.16\text{--}4.30 \times 10^6\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の範囲で変動し (Table 1), 全体的に表層において高かった。その水柱平均密度は観測初期の7月20日には最高の $3.55 \times 10^6\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ であったが、その後減少し、7月26日以降は $1.50\text{--}2.50 \times 10^6\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の狭い範囲で変動した (Figure 4)。

3. 従属栄養性微小鞭毛虫類 (HMF) の変動

HMFの密度は $3.27\text{--}9.09 \times 10^3\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の範囲で変動し (Table 1), 鉛直的には細菌と同様に表層で高かった。HMFの水柱平均細胞密度は調査開始時の7月18日には $6.33 \times 10^3\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ と最も高かったが、7月末にかけて次第に減少し、8月に入ると再び増加するものの、その後はほとんど

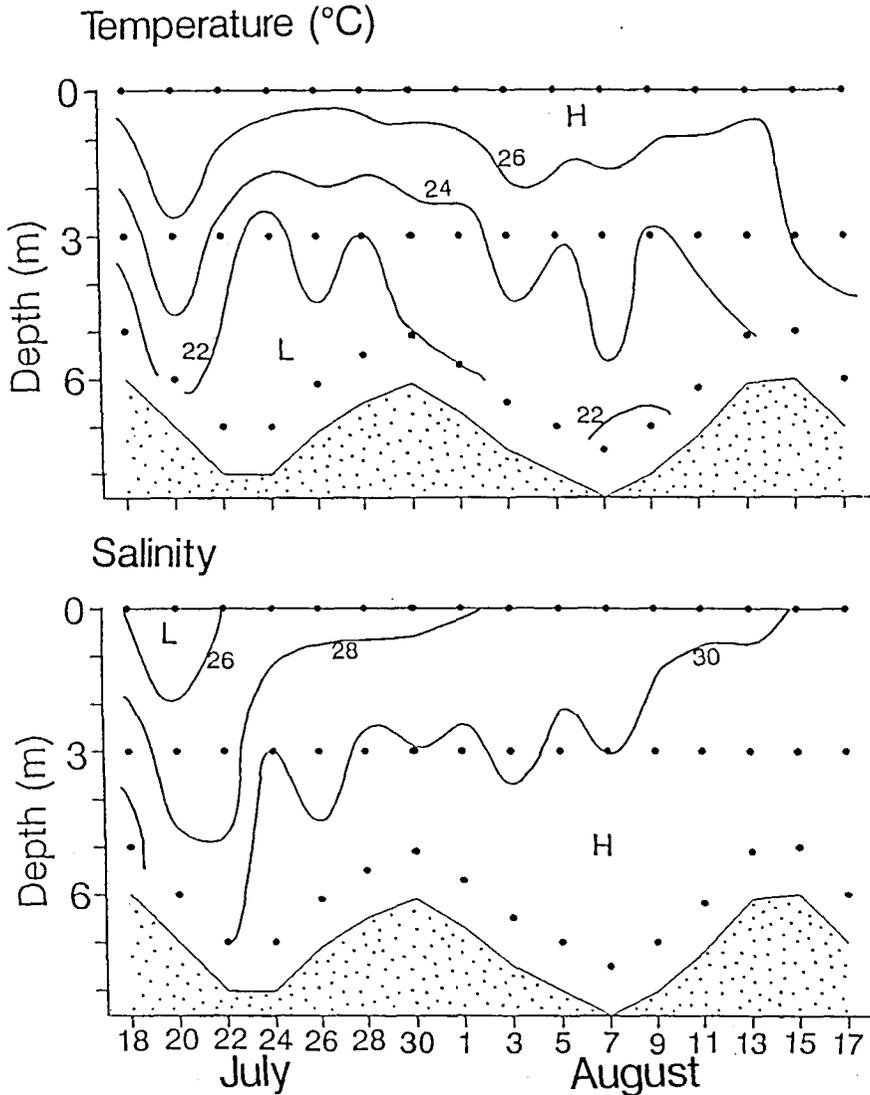


Fig. 2. Temporal variations in vertical distribution of temperature (top) and salinity (bottom). The depth varied with a neap-spring tidal cycle.

変動しなかった (Figure 5).

4. 独立栄養性ナノプランクトン (ANP) の変動

ANPの密度は $2.41-59.00 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の広い範囲で変動した (Table 1). ANPの細胞密度は表層では $5.67-59.00 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の広い範囲で変動し、底層では $2.41-12.40 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ と変動範囲は狭かった。細菌やHMFと同様に観測期間の前半でANPの分布の鉛直差は大きく、後期になると鉛直差は小さくなった。ANPの水柱平均細胞密度は観測開始時から7月22日にかけて急速に増加して最高値に達した後、急速に減少した。その後8月3日に再び小さなピークを形成し

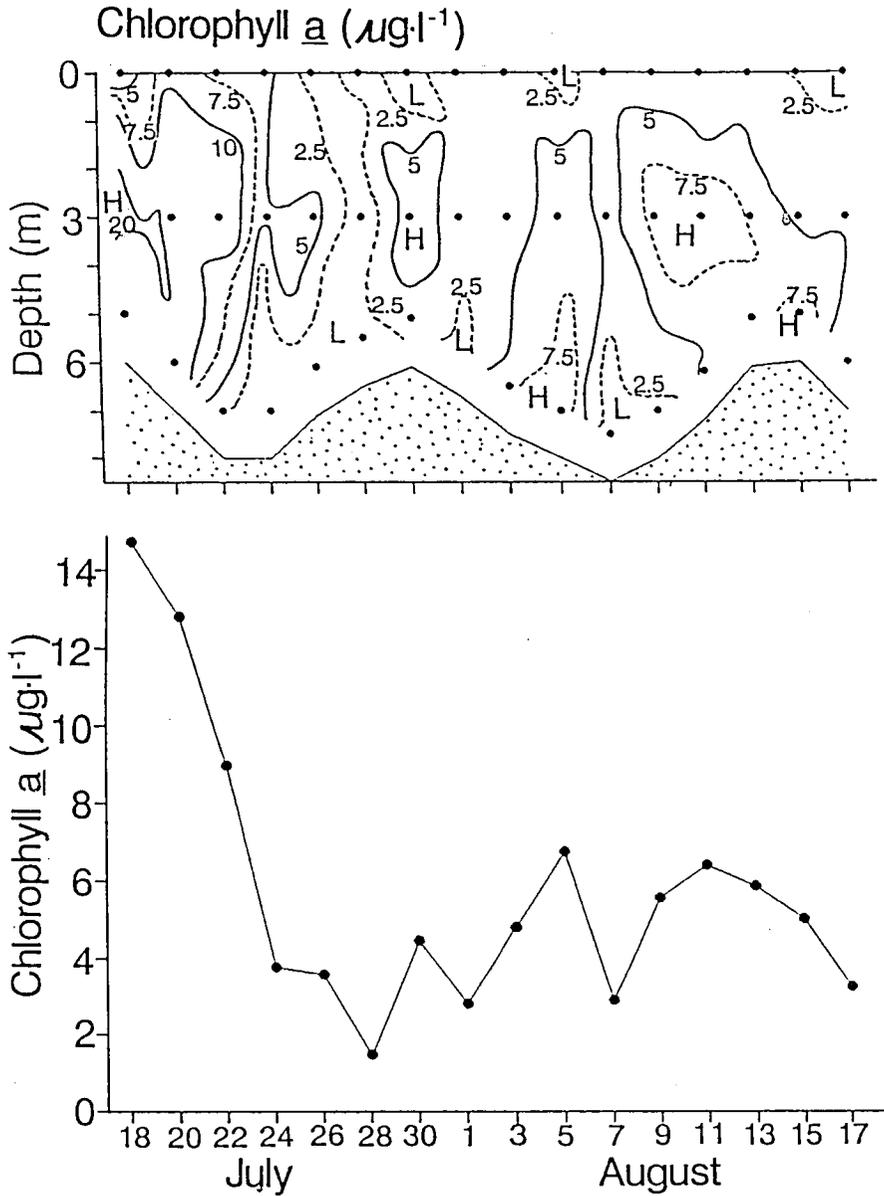


Fig. 3. Temporal variations in chlorophyll *a*. Top: vertical distribution, bottom: average in the water column.

た後減少し、視測終了時にかけて増加した (Figure 6).

5. 細菌, HMF, ANP の変動と環境要因との関係

表層, 中層, 底層の各層について, および水柱全体について, 細菌, HMF, ANP の各密度, 水温, 塩分, クロロフィル *a* の各パラメーター間の相関関係を調べた (Table 2 は水柱全体の場合のみの相関係数と有意性を示す). 表層, 中層, 水柱全体において, 細菌, HMF, ANP の 3 者の密

TABLE 1. RANGE AND MEAN DENSITY OF BACTERIA, HETEROTROPHIC MICRO-FLAGELLATES (HMF) AND AUTOTROPHIC NANOPLANKTON (ANP) DETERMINED AT A STATION IN HIROSHIMA BAY, IN SUMMER OF 1990.

Depth (m)	Bacteria ($\times 10^6$ cells \cdot ml $^{-1}$)		HMF ($\times 10^3$ cells \cdot ml $^{-1}$)		ANP ($\times 10^3$ cells \cdot ml $^{-1}$)	
	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
0	1.36-4.30	2.74	3.27-9.09	5.98	7.98-59.0	19.4
3	1.50-3.91	2.41	3.99-6.84	5.16	4.40-36.7	12.2
Bottom-1	1.16-3.37	2.04	3.30-4.86	4.09	2.41-12.4	6.98
Overall mean		2.40		5.07		12.9

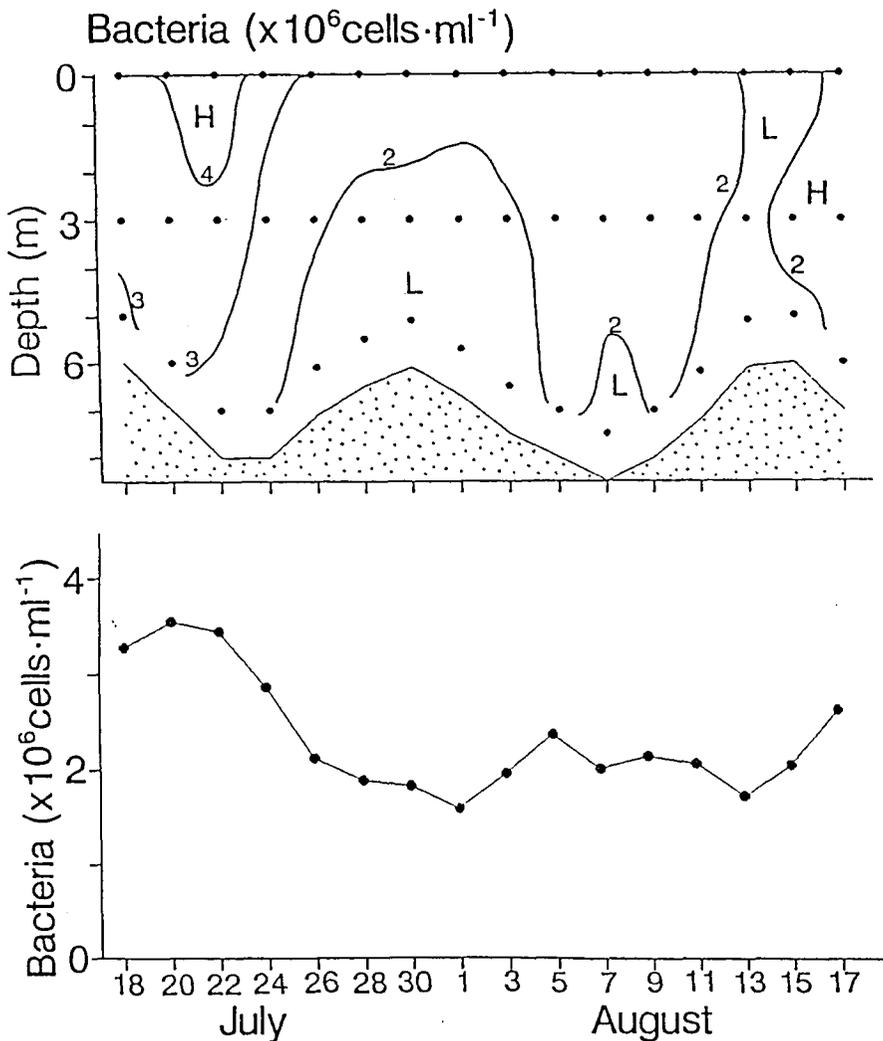


Fig. 4. Temporal variations in density of bacteria. Top: vertical distribution, bottom: average in the water column.

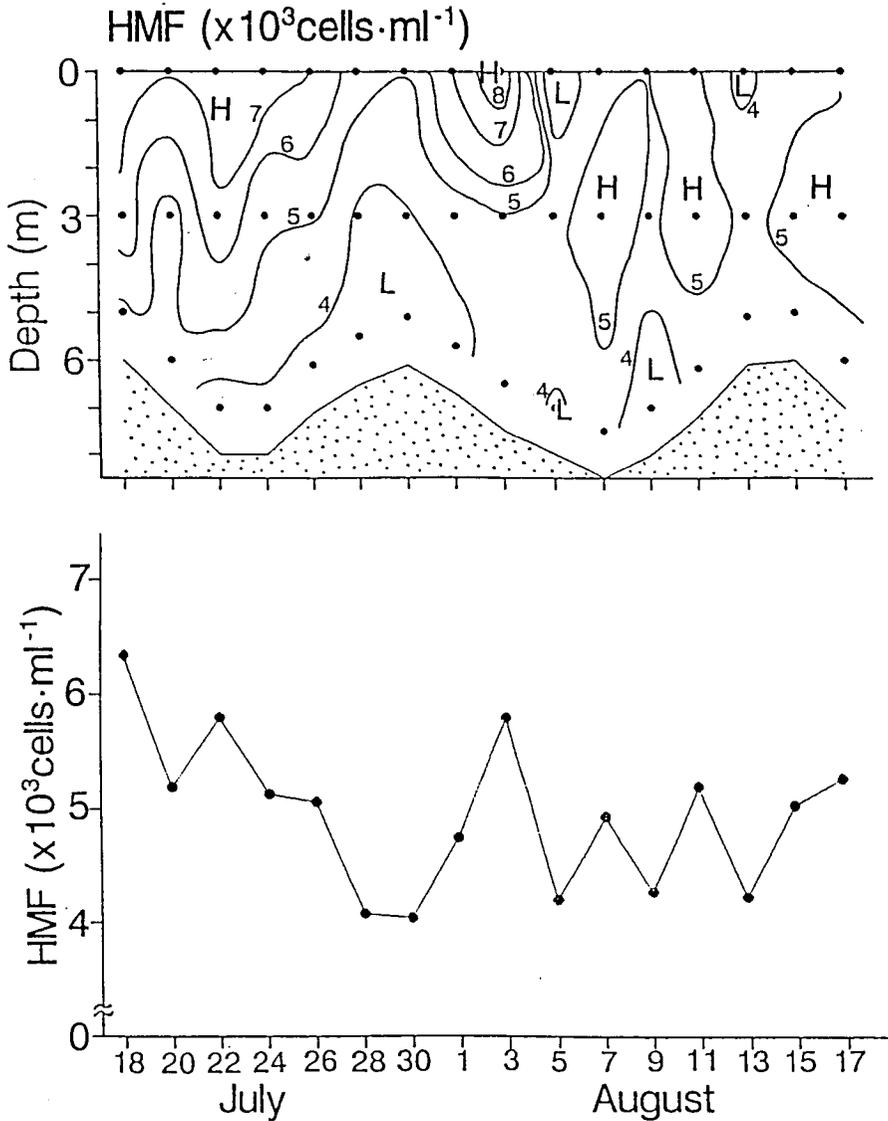


Fig. 5. Temporal variations in density of heterotrophic microflagellates (HMF). Top: vertical distribution, bottom: average in the water column.

度はそれぞれ相互に有意な ($p < 0.001$) 正相関を示したが、底層では有意な相関は得られなかった。細菌とHMFは一般に餌-捕食者の関係にあるといわれているので (FENCHEL 1982a, 1986), それらの相関関係を Figure 7 に図示した。HMF の出現密度は低溶存酸素濃度層では減少することが知られているので (FENCHEL et al. 1990), 底層での相関がなかった理由として、調査期間中の底層における溶存酸素濃度の低下 (広島県水産試験場 1991) が関与していたのではないかと考えられる。

表層, 水柱全体の場合において, 細菌, HMF, ANP の 3 者は塩分とは有意な ($p < 0.01$) 負相関を示し, またいずれの場合も細菌とクロロフィル *a* とは有意な ($p < 0.05$) 正相関を示した。

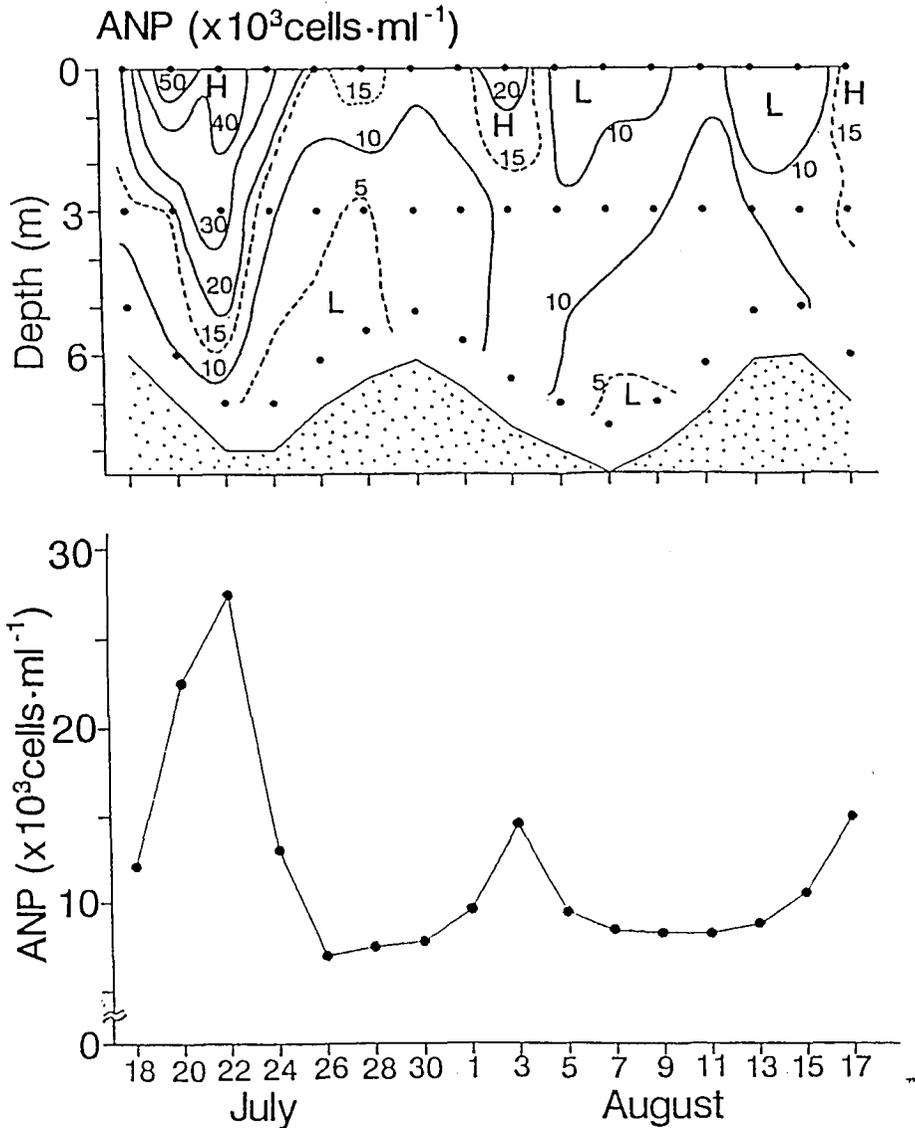


Fig. 6. Temporal variations in density of autotrophic nanoplankton (ANP). Top: vertical distribution, bottom: average in the water column.

考 察

一般に瀬戸内海のように浅くてしかも富栄養あるいは中栄養の沿岸域において、細菌は 10^6 cells·ml⁻¹のオーダーで存在することが報告されており (FENCHEL 1982b, 今井 1984, 1989, SANDERS et al. 1992), 本研究の観測値 ($1.16\text{--}4.30 \times 10^6$ cells·ml⁻¹) は従来の報告値と同レベルであった。また、同様環境におけるHMFの出現密度は 10^3 cells·ml⁻¹のオーダーであると報告されており (SHERR et al. 1984, 今井・伊藤 1984, 今井 1990, McMANUS & FUHRMAN 1990), 今回の結果

TABLE 2. CORRELATION COEFFICIENTS AMONG VARIOUS PARAMETERS.

	HMF	ANP	Temperature	Salinity	Chlorophyll <i>a</i>
Bacteria	0.713***	0.744***	0.353*	-0.740***	0.474***
HMF		0.721***	0.560***	-0.683***	0.278
ANP			0.523***	-0.764***	0.271
Temperature				-0.581***	0.0907
Salinity					0.0158

*: $p < 0.05$

***: $p < 0.001$

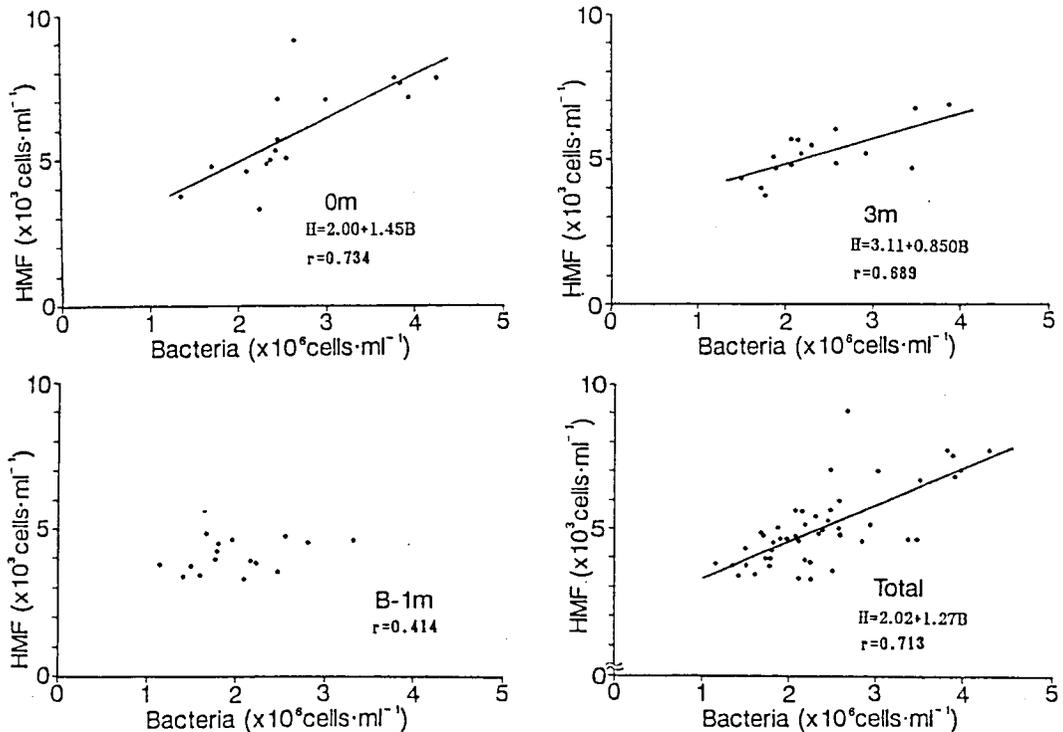


Fig. 7. Relationship between densities of bacteria and heterotrophic microflagellates (HMF).

($3.27\text{--}9.09 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) も同レベルであった。ANPの密度は $2.41\text{--}59.00 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の範囲で変動し、ほぼ同一サイズであるHMFの密度より平均的に1オーダーも高く、しかもより大きな変動範囲を示した。本研究では、葉緑体の有無によってHMFとANPを区別しているのだから、ANPの中には葉緑体を持ちながら細菌などを捕食している混合栄養性原生動物 (mixotrophic protista) も含まれると考えられるが、その存在割合は不明である。

表層でのクロロフィル *a*、細菌、HMF、ANPの4者と塩分は有意な負相関があったことから、それらの増減は以下のように考察される。河川水の流入した低塩分の海水中には高濃度の栄養塩が

含まれることが予測され、その栄養塩を利用して植物プランクトンが増殖し、その結果、細胞外に分泌される溶存態有機物の供給量が増加する。溶存態有機物を利用して細菌が速やかに増殖し、その結果、細菌を捕食するHMFが増殖するという連環が働いていることが想定される。

通常この連環における各プロセス間には時間的遅れが存在すると考えられる。FENCHEL (1982b) は、デンマークのLimfjordenにおいて、細菌の増減を遅くするようにHNFが変動し、細菌のピークに約4日遅れてHMFのピークが出現し、両者の増減のサイクルはおよそ16日であったと報告している。また同様な周期的増減はANDERSON & FENCHEL (1985) によっても得られている。しかし今回の調査では、細菌とHMFの密度変動の位相のずれは認められなかった (Figures 4, 5)。Limfjordenは細く入りくんだ狭湾であるので水の移動が小さく、FENCHEL (1982b) は同一水塊内の個体群を追跡したと思われるが、本調査定点では水塊の移動のため両者の増減の時間的ずれが不明瞭になったものと思われる。

本調査で観察された細菌とHMFの細胞密度比は294-747の範囲であり、平均値は481であった。今井・伊藤 (1984) は周防灘における両者の比を約1000と報告している。また、海洋、陸水での細菌とHMFとの出現密度の平均的な比は約1000であると報告されており (FENCHEL 1986, SANDERS et al. 1992), 本調査海域では相対的にHMFの細胞密度が高かった。

細菌とHMFの生物量を炭素量を基準として比較検討した。周防灘での細菌およびHMFの平均体積はそれぞれ $0.098\mu\text{m}^3$ (今井 1984), $43\mu\text{m}^3$ (今井 1989) と報告されており、炭素-体積係数を共に $0.12\text{pgC}\cdot\mu\text{m}^{-3}$ と仮定して (WATSON et al. 1977, FENCHEL 1982b) それらの生物量を算出した。その結果、調査期間中の細菌、HMFの平均炭素量はそれぞれ $28\mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$, $26\mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、細菌のHMFに対する比は1.08であった。この値は周防灘 (約2.0, 今井・伊藤 1984), デンマークのLimfjorden (6.3-18, FENCHEL 1982b), 英国海峡 (3.8-25, LINLEY et al. 1983), アメリカ合衆国Chesapeake Bay (4.0-33, McMANUS & FUHRMAN 1990) で報告されている比より低く、生物量を基準とした場合でも、本調査海域では相対的にHMFの占める割合が高かった。

HMFは、餌として細菌の他に直径 $1\mu\text{m}$ 程度の単細胞藍藻類 (Cyanobacteria) や原始緑藻類 (Prochlorophyta) などの植物性ピコプランクトンも捕食している (GOLDMAN & CARON 1985)。本調査ではこのサイズに相当する植物プランクトンの定量を行わなかったが、今井 (未発表) は本調査地点で単細胞藍藻類の季節的変動を調査し、高水温期における平均密度は $2.8\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ であることを見いだしている。この値から換算した体積生物量は細菌の体積生物量よりほぼ1オーダー低い。したがって、本調査海域ではHMFの餌の大半は細菌であったことが推定され、その結果細菌に対するHMFの捕食圧が高くなり、細菌とHMFとの比が小さくなっていただのではないかと推測される。

謝 辞

本研究を遂行する機会を賜った広島大学生物生産学部遠部卓教授に心から感謝の意を表します。また、実験および観測に御協力を戴いた南西海区水産研究所板倉茂氏、神山孝史氏に深く感謝の意を表します。

引用文献

- ANDERSON, P. & T. FENCHEL, 1985. Bacterivory by microheterotrophic flagellates in seawater samples. *Limnol. Oceanogr.*, **30**: 198-202.
- COLE, J. J., S. FINDLAY & M. L. PACE, 1988. Bacterial production in fresh and salt-water ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **43**: 1-10.
- FENCHEL, T., 1982a. Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **8**: 225-231.
- FENCHEL, T., 1982b. Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **9**: 35-42.
- FENCHEL, T., 1986. The ecology of heterotrophic microflagellates, pp. 57-97. In *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 9 (ed. MARSHALL, K. C.). Plenum Press, New York.
- FENCHEL, T. L. D. KRISTENSEN & L. RASMUSSEN, 1990. Water column anoxia: vertical zonation of planktonic protozoa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **62**: 1-10.
- GOLDMAN, J. C. & D. A. CARON, 1985. Experimental studies on an omnivorous microflagellate: implications for grazing and nutrient regeneration in the marine microbial food chain. *Deep-Sea Res.*, **32**: 899-915.
- 広島県水産試験場, 1991. 広島県水産試験場事業報告. 平成2年度, 広島県, 94 pp.
- 今井一郎, 1984. 周防灘における海洋細菌の粒子径組成と現存量. 南西水研研報, **17**: 183-196.
- 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**: 85-101.
- 今井一郎, 1990. 海洋における従属栄養性微小鞭毛虫類の細菌捕食者としての役割. 月刊海洋, **22**: 60-66.
- 今井一郎・伊藤克彦, 1984. 1983年5月周防灘における従属栄養性微小鞭毛虫類の分布. 南西水研研報, **17**: 219-233.
- LINLEY, E. A. S., R. C. NEWELL & M. I. LUCAS, 1983. Quantitative relationships between phytoplankton, bacteria and heterotrophic microflagellates in shelf waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **12**: 77-89.
- MCMANUS, B. G & J. A. FUHRMAN, 1990. Mesoscale and seasonal variability of heterotrophic nanoflagellate abundance in an estuarine outflow plume. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **61**: 207-213.
- PORTER, K. G. & Y. S. FENG, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 943-948.
- SANDERS, R. W., D. A. CARON & I. -G. BERNINGER, 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an interecosystem comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **86**: 1-14.
- SHERR, B. F. & E. B. SHERR, 1983a. Enumeration of heterotrophic microprotozoa by epifluorescence microscopy. *Estuar. coast. Shelf Sci.*, **16**: 1-7.
- SHERR, E. B. & B. F. SHERR, 1983b. Double-staining epifluorescence technique to assess frequency of dividing cells and bacterivory in natural population of heterotrophic microprotozoa. *Appl. environ. Microbiol.*, **46**: 1388-1393.
- SHERR, E. B., B. F. SHERR & S. Y. NEWELL, 1984. Abundance and productivity of heterotrophic nanoplankton in Georgia coastal waters. *J. Plankton Res.*, **6**: 195-202.
- SOROKIN, Y., 1978. Decomposition of organic matter and nutrient regeneration, pp. 501-616. In *Marine Ecology*, Vol. IV (ed. KINNE, O.). John Wiley & Sons. New York.
- WATSON, S. W., T. J. NOVITSKY, H. L. QUINBY & F. W. VALOIS, 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. environ.*

- Microbiol.*, 33: 940-954.
- WILLIAMS, P. J. leB., 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.*, 5: 1-28.
- 山本啓之・絵面良男, 1985. 海洋における細菌捕食性鞭毛虫類の分布および生態. *La mer*, 23: 81-88.