Bull. Plankton Soc. Japan 46 (1): 50–59 1999

日本プランクトン
学会報
© The Plankton Society of Japan 1999

従属栄養性鞭毛虫の細菌捕食とその生態学的役割

深見公雄

高知大学農学部
〒783–8502　南国市物部乙200

Predation of heterotrophic nanoflagellates on bacteria and their roles in the ecosystem

KIMIO FUKAMI

Faculty of Agriculture, Kochi University
Monobe Otsu 200, Nankoku, Kochi 783–8502, Japan

Abstract: Grazing behavior of heterotrophic nanoflagellate (HNF) on bacteria and ecological roles of HNF in aquatic ecosystems are discussed. Seasonal fluctuation of bacterial densities in the surface water of a eutrophic coastal area ranged from 1.2 to 11 (average 4.3)$\times10^6$ cells ml^{-1} while HNF densities changed from 0.54 to 73 (average 16.4)$\times10^3$ cells ml^{-1}. Ratios of bacteria and HNF were about 260 in abundances and 1.7 in the biomass. They showed almost similar fluctuation patterns with a time lag of about 1 to 2 weeks. Grazing rates of HNF on bacteria were 4.8 to 17 (average 10) cells HNF^{-1} h^{-1} in the surface in summer. Turnover times of bacteria by HNF grazing were relatively constant of 40 to 60 h, however, it decreased to as low as 6 to 7 h when the HNF activity was highest. These results showed that HNF play important roles on the consumption of bacteria and that microbial loop functions significantly for the turnover of organic matter in the coastal ecosystem. Possible selectivity of prey-bacteria by HNF was then discussed. Several previous works and our study indicate that HNF have tendency to graze preferably on bacteria with relatively large cell size and motility, and on autochthonous bacterial strains. HNF also showed taxonomical preferability of prey-bacteria; they preferred *Pseudomonas* spp. at most and showed lower grazing rate for *Vibrio* spp. Finally, contributions of bacteria and HNF for the regeneration of inorganic nitrogen (ammonia) were investigated. In the environment with the level of organic nutrient as low as natural seawater, regeneration of ammonia was mainly performed by HNF and bacteria rather took up ammonia, indicating that bacteria compete with autotrophic plankton for the inorganic nutrient and HNF play major roles in regeneration of inorganic nutrients in the natural environments. However, along with increasing in the concentration of organic nitrogen, the contribution of bacteria to the regeneration increased. Relative contribution of grazing food chain and microbial loop, and linkage of organic matter to the grazing food chain and sinking down and recycling of organic matter to inorganic nutrient in the microbial loop should be clarified in the future.

1. はじめに

水圏生態系において，浮遊細菌は魚類や動物プランクトン等が効率よく利用できない溶存態有機物を増殖基質として取り込み，粒子化している．つまり細菌は菌体生産という形で有機物の質的変換を図っており，最近，筆者らは細菌類を有機物の“転換者(transformer)”と呼ぶことを提案している（鈴木1997）．

ところで細菌類は溶存態有機物を粒子状に転換するものの，他の従属栄養生物の餌としてはサイズ的に小型すぎる．ところが1960年代の後半から，光合成色素を持たない従属栄養性の微小鞭毛虫（heterotrophic nanoflagellate: HNF）の存在が発見され(Lighthart 1969)，それらは細菌捕食者として重要な役割を演じていることが確認された（Haas & Webb

1998年5月10日受付，1998年6月3日受理

1979, Fenchel 1982）．これらの知見をもとに，溶存有機物を粒子化した細菌が鞭毛虫や繊毛虫等の微生物により次々と捕食・大形粒子化され，ついには従来の捕食食物連鎖につながっているという考え方がAzamらによって提唱された（Azam et al. 1983）．このように，従来の食物連鎖（捕食食物連鎖と呼ばれる）の概念では，系外へ“廃棄”されたとみなされる溶存態有機物が微生物の働きにより再び食物連鎖へ戻るというエネルギーの流れを微生物食物連鎖（Microbial Loop）と呼ぶ．それ以来，世界中の様々な水域においてHNFの生態に関する研究が行われてきた．これらはすでにいくつかの総説にまとめられている（Fenchel 1986）．しかしながら，溶存態有機物を利用して増殖した細菌のHNFによる捕食・消費は微生物食物連鎖のなかでも最も重要な部分であるにもかかわらず，両者の関係はまだまだ不明の点が多い．

そこで本稿ではHNFの細菌捕食生態を明らかにするため，内湾域を中心にまず細菌とHNFの季節変動と両者の関係について記述し，HNFの細菌捕食速度やその餌選択性等について述べ，最後に海洋生態系の物質循環におけるHNFの役割について考察した．

2. 内湾海域における細菌と従属栄養性微小鞭毛虫（HNF）の分布と季節変動

細菌とHNFの相互関係について知るためには，まず両者の分布密度とその相関を明らかにする必要がある．そこで富栄養化した内湾海域の一つ，高知県浦ノ内湾における細菌とHNFの分布と季節変動について調べた．同湾中央部の水深約16m付近に定点を設定し，1991年から1992年にかけて，毎週1回程度の頻度で表層から底層までの7層から採水試料を採取し，細菌およびHNFの観察・計数を行った（Fukami et al. 1991, 1996）．

1991年4月から12月にかけての表層における両者の分布密度の変化をFig. 1に示した．細菌密度は5月下旬・8月上旬および9月中旬の3回極大値を示した．これらはそれぞれ，*Skeletonema costatum*等の珪藻類・*Gymnodinium mikimotoi*や*Ceratium* spp.等の渦鞭毛藻類・*Chaetoceros* spp.等の珪藻類のブルームの直後に対応していた．一方，HNFは細菌が極大を示したあと約1週間遅れてピークを示すことが多く，しかも両者の変動は1ないし2週間のずれを保ちつつ

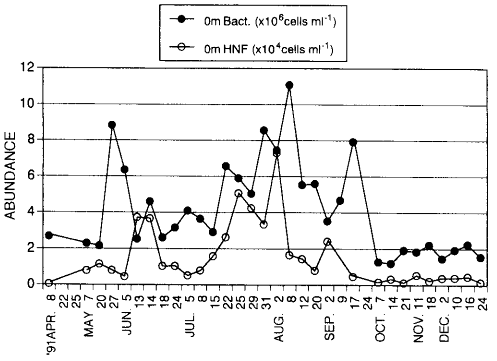

Fig. 1. Fluctuations of the density of bacteria (●) and HNF (○) in the surface water of a station in Uranouchi-wan Inlet in 1991.

Table 1. Abundance and biomass of bacteria and HNF and ratio in Uranouchi-wan Inlet in 1991.

	BACTERIA	HNF	RATIO
ABUNDANCE $\times 10^6$ cells l^{-1}	4300	16.4	262
BIOMASS μg-C l^{-1}	86	51	1.7

ほぼ同様の季節変動を示していた．これらの観察結果は細菌とHNFが被食者－捕食者の関係にあることを改めて示唆するものであり，同海域では増殖した細菌に対するHNFの量的な応答には10日前後の時間が必要であることを示している．

1991年に浦ノ内湾で得られた細菌およびHNFの平均密度および平均細胞体積から，両者の生物量比を計算した（Table 1）．その結果，密度の比は約260であった．また，細菌の平均炭素含量を20 fg-C cell^{-1} (Lee & Fuhrman 1987）とし，またHNFの平均細胞体積を直径3 μmの球と仮定し（未発表データ）その単位体積当たりの炭素含量を0.22 pg-C μm^{-3} (Børsheim & Bratbak 1987）とした場合，両者の現場におけるバイオマス比は1.7となった（Table 1）．これまでの文献によれば，一般に両者の比は密度で約1000またバイオマスとしては10程度と報告されている（Fenchel 1986, Sanders et al. 1992）．しかし一方で，周防灘や広島湾といった内湾海域においては，両者のバイオマス比が2.0および1.08という低い値が報告されている（今井・伊藤 1984, 岩本ら 1993）．このように浦ノ内湾や瀬戸内海という富栄養化の進行した内湾海域において，被食者と捕食者の生物量の違いがたかだか2

倍程度であったことは，細菌がきわめて大きな速度で生産・消費されていることを示しており，その回転速度が非常に速やかであることを示唆している．

3. HNFの細菌捕食速度の見積り

細菌とHNFの被食－捕食関係を直接明らかにするには，HNFの細菌捕食速度を何らかの方法で測定する必要がある．細菌捕食速度の見積方法には間接的な方法と直接的な方法の二つがある．間接法とは，濾過あるいは希釈によりあらかじめ捕食者（HNF）を除去した試水および捕食者を含んだ現場試水の二つを同じ条件で培養し，細菌数の変動の差からHNFの細菌捕食速度を推定するものである．一方，直接法とは細菌細胞に類似した何らかの小粒子をHNFに直接取り込ませ，その取込速度を見積もる方法で，細菌サイズのラテックスビーズ（Nygaard et al. 1988）やあらかじめ蛍光色素で染色した細菌株（FLB: fluorescently labeled bacteria）（Sherr et al. 1987a），あるいは放射性同位元素でラベルした細菌等（Wikner et al. 1986）が用いられる．それぞれ長所と短所がある．間接法は捕食者・被捕食者ともに天然の微生物群集を扱うことからより自然の状態に近い条件で実験が行えるものの，短時間での培養では細菌数の変化がそれほど顕著でない場合が多く，しばしば長時間の培養が必要となる．その結果，培養中のHNF密度の変化等当初の条件とは異なる可能性が生じる．このため一般的に間接法は過大評価を示すとされている．また直接法は，天然の細菌群集とは異なる粒子を用いるためどうしてもHNFが天然の細菌群集と同様の捕食速度で取り込まない場合が多く，そのため過小評価になる場合が多いことが知られている（Gonzalez et al. 1993）．したがってHNFによる細菌捕食速度の見積もりを行う際には，このようなそれぞれの方法の特徴をよく理解した上で用いなければならない．

現在比較的よく用いられているFLB法を用いて（Sherr et al. 1987a, Fukami et al. 1991, 1996），高知県浦ノ内湾でHNFの細菌捕食活性を測定した．高知県浦ノ内湾の0･5･10 m層から採取した海水試料に天然細菌密度の約20％に相当するFLBを添加し，現場水温で培養した．経時的に試料の一部を採取し，HNFに取り込まれたFLBの数を計数した．Fig. 2にHNFに取り込まれたFLB数の経時変化を示した．これまでの研究と同様，培養開始後20ないし30分までは原点を

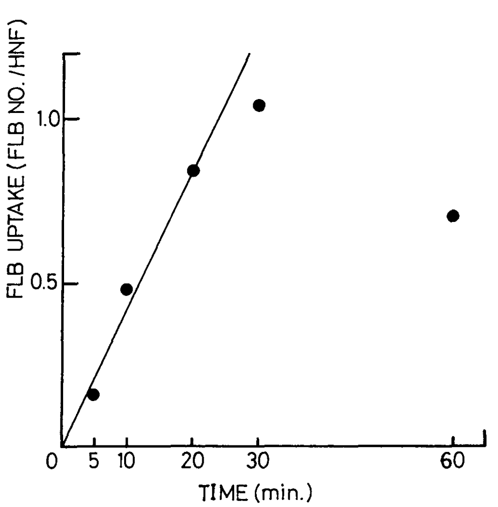

Fig. 2. Time course of the number of FLB ingested by HNF.

通る直線関係が得られるものの，それ以上の時間培養を継続すると，次第に取り込まれたFLBの数が減少していくことが分かる．つまりHNFは20ないし30分程度は時間とともにFLBを取込み細胞内に蓄積していくものの，それ以上の時間がたつと消化あるいは排泄等によりHNF細胞内のFLBが減少することを示している（Sherr et al. 1987a）．このため直線関係が得られる部分での傾きからHNFのFLB取込活性を測定した．あらかじめ天然細菌密度に対する添加FLBの割合を各試料について計数しておき，得られたFLB取込速度をFLBの割合で割ることにより，HNF 1細胞当たり単位時間当たりの細菌捕食速度（grazing rate）が計算できる．

このようにして得られたHNFの細菌捕食速度およびこの値に現場のHNFの細胞密度をかけて求めた全細菌消費速度（total consumption rate）をTable 2に示した．HNFの細菌捕食速度は最大で1時間当たりHNF 1個体当たり15～20細胞であった．これらの値はいずれも表層で得られ，深度の増加とともに減少し10 m層では観察期間を通して5 cells $HNF^{-1}h^{-1}$以下の低い値であった．また細菌消費速度は，浦ノ内湾の表層で4.3～99（平均37）$\times 10^4$ cells $ml^{-1}h^{-1}$であったが，5 m層や10 m層では1桁以上低くなり0.1～7.7（平均1.5）$\times 10^4$ cells $ml^{-1}h^{-1}$と非常に低い値であった．さらにこの細菌消費速度で現場の細菌密度を割ると現場の細菌群がHNFの捕食作用により消費しつくされるまでの時間，すなわち細菌の回転時間（turnover

Table 2. Vertical and temporal changes in rates of grazing (upper) and total consumption (bottom) on bacteria by HNF in the surface water of a station in Uranouchi-wan Inlet in 1991.

DEPTH (m)	JUL. 25	JUL. 29	JUL. 31	AUG. 2	AUG. 8	AUG. 12	AUG. 20
	GRAZING RATE (cells HNF^{-1} h^{-1})						
0	16.9	4.91	15.0	13.6	11.5	4.78	5.30
5	9.40	2.32	6.27	15.4	4.29	2.53	3.30
10	2.50	2.93	4.96	4.72	2.17	4.95	3.51
	TOTAL CONSUMPTION RATE ($\times 10^4$ cells ml^{-1} h^{-1})						
0	85.8	20.9	50.3	99.4	19.2	6.98	4.29
5	7.70	0.394	3.42	2.93	0.399	0.633	1.44
10	0.875	0.674	0.526	1.09	0.104	0.480	0.720

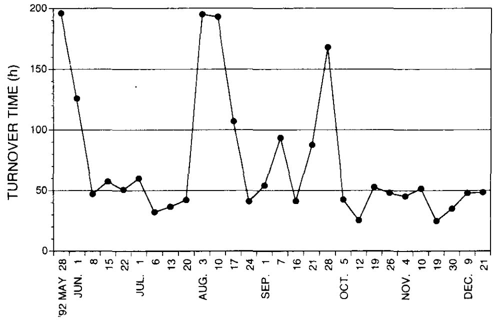

Fig. 3. Changes in turnover time of bacteria by HNF consumption in the surface water of a station in Uranouchi-wan Inlet in 1992.

time）が求められる．このようにして求めたHNFの捕食による細菌の回転時間は，表層で6.9~131（平均46.3）時間と計算された．このことは数時間で現場の細菌群がHNFの捕食作用により消費し尽くされる場合もあることを示しており，現場の細菌群の極めて速やかな回転速度が改めて示された．しかしながら，やはり5m層や10m層では回転時間も長くなり，とくに10m層では40~1910（平均475）時間と表層に比較して約10倍長いという結果が得られた（Fukami et al. 1996）．同様にして求めた，1992年5月から12月の浦ノ内湾表層における細菌のHNF捕食による回転時間をFig. 3に示した．このように浦ノ内湾における細菌の回転時間は，ときおり200時間近くになる場合が見られるものの，平均するとほぼ40ないし50時間であることが明らかになった．このことは浦ノ内湾のような富栄養化した内湾海域において，細菌はHNFの捕食作用によりかなりの部分が消費されていることを示唆するものであり，このことは見方を変えれば，それくらいの速度で細菌の生産が行われていることを示すものである．なお，ときおり観察された細菌の回転時間が200時間近くに増加していた時期は，植物プランクトンやその他何らかの原因により有機物が生産され細菌の増殖が起こったものの，そのエネルギーがまだHNFにまで流れる前であると考えられた．

細菌の生産速度は，放射性同位元素でラベルされたチミジン（^{3}H-TdR）の取込速度を測定することにより比較的容易に見積もることが可能である．我々は北ドイツの富栄養湖において，週に1ないし2回の頻度で細菌の生産速度とHNFによる消費速度を測定し，その間の細菌密度の変動と比較した（Fig. 4）．その結果，細菌の生産速度と消費速度はほとんど同じレベルでありどちらが大きくても一方が他方の高々2倍程度の違いでしかないこと，しかも細菌密度の短期的な変動は生産速度とHNFによる消費速度の相対的な大小でほとんど決定されていることが示された（Fukami et al. 1991）．すなわち，生産速度がHNFによる消費速度を上回っている時は細菌の密度が増加し，逆に生産速度が下回っていれば減少することが明瞭に示されることが分かった．このことは我々がFLBを用いて測定したHNFによる細菌捕食速度の値がそれほど真の値と大きく異なっているわけではないことを示唆するものである．

HNFの細菌捕食速度（grazing rate）を現場の細菌密度で割ると，その細菌捕食速度を得るためにHNFが海水を濾過・除去する速度（clearance rate）が計算できる．いいかえれば“除去速度”はHNF 1個体

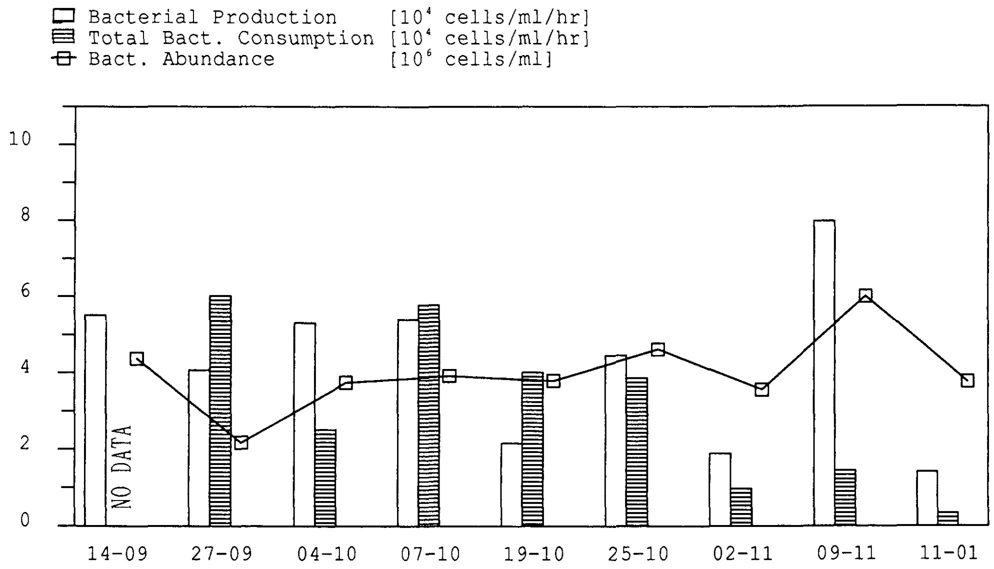

Fig. 4. Temporal changes in rates of bacterial production (open column) and total bacterial consumption by HNF (striped column), and bacterial abundance (square) in Lake Plusssee in September 1988 through January 1989.

が単位時間当たりに海水を濾過することでその試水中の細菌を除去する処理速度と考えることが出来る．そのようにして求めた除去速度は，浦ノ内湾表層で0.86~2.86（平均1.47）nl $HNF^{-1}h^{-1}$と計算された．ところがおもしろいことに，捕食速度・細菌消費速度あるいは回転速度のいずれもが表層に比較して非常に小さな値しか示さなかった10 m層のHNFの除去速度は1.1~3.1（平均1.99）nl $HNF^{-1}h^{-1}$と表層とほぼ同程度かむしろ高い値を示していた．このことは10 m層に生息するHNFは決して活性が低いのではなく，餌である細菌の密度が低いためむしろ活発に遊泳して餌細菌を求めていることを示している（Fukami et al. 1996）．

ところで，HNFの平均の大きさを直径3 μmの球形と仮定した場合その細胞体積は約14.1 μm^3となる．したがってHNFが単位時間当たり1 nl（$=10^6 \mu m^3$）の海水を除去するということはHNFが自らの細胞体積の約7×10^4倍の環境水を処理することを意味し，HNFの非常に活発な細菌捕食活動が想像される．

4. HNFの餌細菌に対する捕食選択性

HNFの餌粒子に対する捕食選択性に関しては，生物粒子か非生物粒子か，あるいは餌生物が従属栄養性のものか独立栄養性か，また細菌粒子についてはそのサイズや運動性の有無，さらには実験に用いるFLB調製の際の熱処理の有無などについて検討された研究例がこれまでいくつか報告されている．

HNFの細菌捕食速度の測定には当初ラテックスビーズがしばしば用いられていた（Cynar & Sieburth 1986, McManus & Fuhrman 1986）．その後の研究から，ビーズを取り込んでいたHNFの割合やその取込速度は細菌細胞を取り込ませた場合より低くなることが示された（Nygaard et al. 1988）．彼らはラッテクスビーズを牛血清アルブミン溶液に12時間浸漬処理してその表面をタンパクコーティングし，HNFによるその取込活性をFITCで染色した細菌FLBのそれと比較して調べた．その結果，全HNF数に占めるラテックスビーズを取り込んだHNF数の割合は2~29%であった．それに対し，FITC-FLBを取り込んだHNF数は平均約60%程度であること，また活性の高いHNFほどビーズを取り込んだHNFの割合が低下したことなどから，活性の高いHNFほど餌粒子の選択性が高くなることを予想した．現在ではラテックスビーズを用いて得られたHNFの細菌捕食速度は，多くの場合，過小評価になるとされている．

Lessard & Swift (1985) は ^{14}C-重炭酸塩および ^3H-チミジンでそれぞれ独立栄養微生物および従属栄養微生物をラベルし，従属栄養性の渦鞭毛虫に取り込ませる実験を行った．その結果，ある種の渦鞭毛虫に

おいては，^{3}H-チミジンでラベルされた微生物粒子しか取り込まなかったことから従属栄養性の餌粒子に対する選択性がみられたことを報告している．

一方，細菌細胞のサイズの面からは，やや大型の菌体サイズをもった細菌個体が選択的に捕食されているという結果がしばしば報告されている．Andersson et al. (1986) は鞭毛虫を混在させた培養系と除去した系をそれぞれ一定時間培養し，培養前後の細菌細胞サイズの分布スペクトラムを比較した．その結果，鞭毛虫の存在した実験系では，菌体体積が0.2 μm^3以上の細菌が特異的に減少しており，相対的に小型の細菌の割合が増加したことを報告している．このことは鞭毛虫が体積約0.2 μm^3以上の細菌に対して捕食選択性を有していることを示唆するものであり，彼らは夏季の鞭毛虫の活性が高くなる時期に天然細菌群集の平均菌体サイズが小型化する原因が鞭毛虫による捕食にあることを指摘している．Gonzalez et al. (1990) は平均細胞サイズが0.03 μm^3および0.08–0.1 μm^3のFLBをそれぞれ現場の鞭毛虫および繊毛虫群集に与え，その取り込みを比較した．その結果，HNF・繊毛虫ともに0.08–0.1 μm^3のFLBをより速やかに捕食することを報告しており，やはりAndersson et al. (1986) と同様にHNFによる大型細菌に対する選択的な捕食が，天然細菌群の大部分が小型の細胞で占められている理由の一つであろうと述べている．さらに彼らは，餌細菌をFLBに調製してしまえば，その分類学的な種類は取込速度にはほとんど影響しないとコメントしている．

ところでこれまでHNFの細菌捕食速度の測定にしばしば用いられてきたFLBは，一般に菌体を熱処理したのちDTAFという蛍光色素を使用して調製するため，細菌菌体が“生”のものとは大きく異なっており，HNFの細菌捕食活性を正しく見積もっていない可能性がある．そこでLandry et al. (1991) は，短時間の紫外線処理により増殖能力は消失しているものの生理活性は保持されたままの大腸菌株をローダミンイソチオシアネート（RITC）という蛍光色素により，生体染色したFLBを用いてHNF (*Paraphysomonas vestita*) に取り込ませ，従来のDTAF-FLBによる測定値と比較した．その結果，RITC-FLBおよびDTAF-FLBの両者を同時に*P. vestita*に与えたところ，同HNFは生体染色したRITC-FLBを選択的に取り込み，その差は時にはDTAF-FLBの約20倍にものぼることを報告している．生体染色された餌粒子が熱処理された餌より高い捕食速度を与えるという報告はPutt (1991) によってもなされている．彼女はヒドロエチジン（HYD）という蛍光色素で生体染色した15種類の微細藻類を8種類の繊毛虫に取り込ませ，従来の熱処理したDTAF染色による藻体と比較した．その結果，繊毛虫*Strombidinopsis* sp.にプラシノ藻*Pyramimonas* sp.を与えた場合において，生体染色した餌の方が熱処理した餌より約2倍程度高い捕食活性が示されたとしている．

Gonzalez et al. (1993) は運動性を保有する細菌株としない株を用いて，それぞれ熱処理したDTAF-FLBおよびFITCにより生体染色したFITC-FLBを調製し，天然のHNF群集に与えてその取込活性を比較した．その結果，HNFは運動性のある細菌を選択的に捕食しており，熱処理して運動性を消失させるとHNFによる取込が低下することを示した．すなわち，運動性のある菌株においては，熱処理したDTAF-FLBよりは運動性を失っていない生体染色されたFITC-FLBにおいて高いclearance rate（除去速度）が得られるものの，運動性のない菌株では，DTAF-FLBでもFITC-FLBでもそれほど大きな差はないことを報告した．以上の結果を考慮して彼らは，もし運動性を有する細菌が群集の多数を占めているような天然環境においてはDTAF-FLBで得られたHNFの細菌捕食速度は過小評価になるであろうが，ほとんどが非運動性の細菌群集で占められている環境では従来のDTAF-FLBでの結果はそれほど真の値とは異なってはいないであろうと予想している．

このようにHNFの餌粒子に対する選択性は，いくつかの側面から研究が見られる．しかしながら捕食される細菌の分類学的な種類に対する選択性に関する情報は今のところほとんどない．Sherr et al. (1983) はイスラエルのキンネレット湖から分離したHNFの*Monas* sp.に同じくキンネレット湖から分離した光合成硫黄細菌*Chlorobium phaeobacteroides*および一般細菌1株ならびに大腸菌およびサルモネラ菌の計4株を別々に与えて培養したところ，天然環境から分離したはじめの2株があとの2株よりHNFに対して高い増殖速度を与えたことを報告している．このことは，HNFが外来性の細菌より周辺の天然環境に存在する細菌をより好んで捕食する可能性があることを示しており，HNFによる餌細菌の選択性について分類学的な側面からの情報を与える数少ない研究例である．この研究は捕食するHNFが単一株での結果であり，

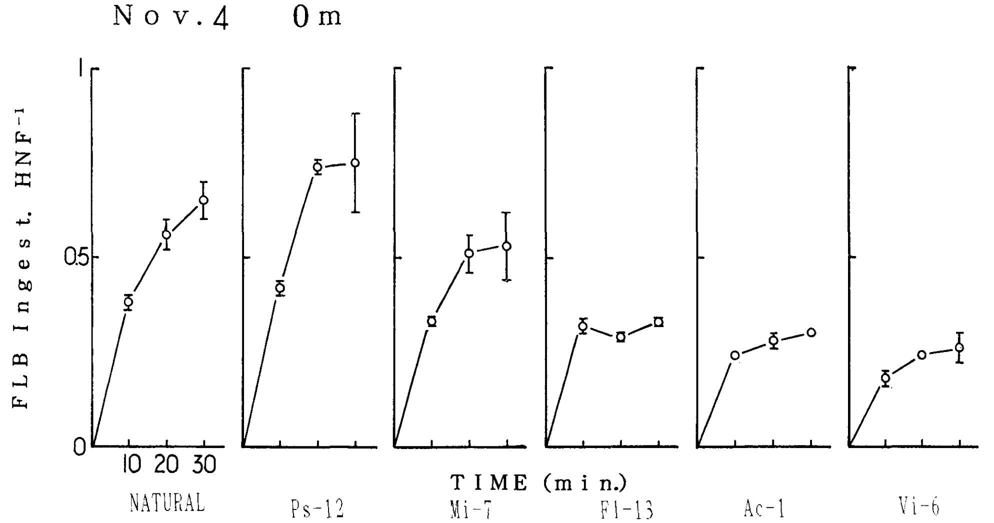

Fig. 5. Time courses of the number of FLB ingested by natural communities of HNF collected on November 4, 1991 in Uranouchi-wan Inlet. FLB were prepared by either of natural community (NATURAL), or strains of *Pseudomonas* sp. (PS-12), *Micrococcus* sp. (Mi-7), *Flavobacterium* sp. (Fl-13), *Acinetobacter* sp. (Ac-1), or *Vibrio* sp. (Vi-6).

天然の鞭毛虫群集に当てはまるかどうかは不明である．

そこで我々はHNFの餌細菌の選択性に分類学的な種類による違いが見られるのか否かについて検討した．天然環境から分離した細菌のうち，なるべく菌体サイズや形態が同じで分類学的に異なる菌株（*Pseudomonas* sp. Ps-12・*Vibrio* sp. Vi-6・*Flavobacterium* sp. Fl-13・*Acinetobacter* sp. Ac-1・*Micrococcus* sp. Mi-7）で作製したFLBおよび対照として現場の細菌群集を濃縮した菌体懸濁液でFLBを調製した“天然FLB”を従来と同様の方法で現場の細菌群集のほぼ20%になるように添加した．一定時間現場水温で培養し，天然試水中のHNF群集による各FLBの取り込みを比較することで，その捕食選択性を調べた．秋季から初冬にかけての高知県浦ノ内湾で実験を数回実施した結果，ほぼ毎回同様の傾向が得られた．その結果の一例をFig. 5に示した．取り込み実験に使用したFLBのうちで，常に最もよく取り込まれたのは*Pseudomonas*で調製されたFLBであり，逆に*Vibrio*で調製されたFLBが最も低いという結果が得られた．また現場の細菌群で調製された“天然FLB”は*Pseudomonas*に次ぐ比較的高い取り込み活性を安定して示すことが分かった．その他の3株で調製されたFLBはそれほど高い取り込み活性を与えなかったが，時には*Flavobacterium*のFLBが最も高い取り込み速度を与えた場合があった．そこで，*Pseudomonas*の取り込みが高く*Vibrio*では低いのが実験に用いた株のみについての結果なのか属レベルで見られる現象なのかを知るために，それぞれの属に含まれる別の菌株でFLBを調製し，同様の実験を行った．その結果，やはり*Pseudomonas*が高く*Vibrio*が低いという結果が得られた．以上の結果から，HNFの餌料細菌に対する選択性は細菌の分類学的な種類によっても存在する可能性の高いことが示唆された．

HNFによる細菌の選択性のメカニズムには，①ランダムに取り込んだあと不適当な餌を排出②細菌からの分泌物を認識し走化性を示す③接触による細菌表面の識別等，いくつかの可能性考えられる．ラッテクスビーズのような化学的に不活性な粒子の取り込み速度は遅い（Nygaard et al. 1988）ことや，細菌を熱処理されたFLBにすると種類は無関係になり選択性がなくなる（Gonzalez et al. 1990）という報告から，鞭毛虫が化学センサーをもち，細菌菌体から生産・排出される代謝産物等の何らかの化学物質の濃度勾配を感じとりそれに誘引されていることが予想される（Sibbald et al. 1987, 1988）．そこで細菌懸濁液を濾過除菌した培養濾液に対する鞭毛虫の走化性について調べた．各菌株の培養濾液をキャピラリーに収容してHNFの懸濁液に挿入し，一定時間放置した後キャピラリー内部に侵入してきた鞭毛虫の計数を行い，細菌を接種しない培地を用いた対照実験と比較した．その結果，ほとんどの菌株では対照区と有

意な差が見られず，鞭毛虫は細菌の培養濾液に対して正の走化性も負の走化性も示さなかったが，その中で*Flavobacterium* sp.の1株の培養濾液に対してのみは有意にHNFが走化性を示した．

前述（Fig. 5）のように分類学的に異なる細菌株で調製したFLBによる取込速度の違いは，FLBが熱処理された細菌菌体で調製されている以上，細菌細胞からの代謝産物等の化学物質とそれに誘引される化学走性の結果とは考えられず，その他の何らかのメカニズムを考えるべきであろう．鞭毛虫の餌細菌に対する選択性およびそのメカニズムに関する研究はまだ始まったばかりであり，今後に残された重要な検討課題である．

5. 栄養塩再生者としてのHNF

従来の古典的な捕食食物連鎖においては，有機物を分解して栄養塩を再生するのは主として従属栄養性細菌とされていた．しかしながらアンモニア態チッソやリン酸塩の再生には細菌類よりも動物プランクトン，特に細菌捕食性の原生動物プランクトンの方がより大きな寄与をしているのではないかとの指摘が1960年代半ばになされた（Johannes 1965, 1968）．その後の多くの研究結果から，細菌類による無機栄養塩の再生速度は極めて小さくむしろ栄養塩をめぐって細菌類と植物プランクトンは競合関係にあること（Güde 1985, Bloem et al. 1989），しかしHNF等の従属栄養性の原生動物プランクトンが混在することにより栄養塩の再生速度が大きく促進されることが明らかになってきた（Caron et al. 1985, Goldman et al. 1985, Andersen et al. 1986, Berman et al. 1987）．しかしながらこれらの研究のほとんどは，室内実験による純粋培養された単一種の原生動物プランクトンについての結果であり，様々な環境要因が絡み合い，しかも細菌・植物プランクトン・原生動物プランクトンの各群集組成が単一かつ均一でない天然環境における観察を行った例はそれほど多くない．

そこで我々は，土佐湾の沿岸フロントや紀伊半島沖の黒潮フロント海域において詳細な現場観察を行った（深見・宇野 1995）．その結果，フロントの周辺海域ではしばしば細菌類やHNF，あるいはアンモニアやクロロフィルaの濃度が分布極大を示すことが分かった．さらに詳しくその結果を解析してみると，細菌とHNFの分布は微妙にずれている場合があるものの，アンモニアの分布極大は細菌の分布極大とは一致せずむしろHNFの分布と一致する場合がしばしば観察されることが分かった．このことは，有機物の分解とそれに伴うアンモニアの再生が，細菌よりも主としてHNFにより行われていることを示唆するものである．そこで，これまで指摘されてきたように，栄養塩回帰者としての役割についてHNFおよび細菌を比較するために，次の様な実験を行った．内湾および沖合いの海水試料を孔径3 μm・GF/F (0.7 μm) および0.22 μmの各フィルターで濾過し，それぞれHNFと細菌が混在した「HNF区」・浮遊細菌のみが存在する「細菌区」および除菌した「無菌区」とした．これら3つの海水試料を一定時間培養し，その間経時的に試料の一部を採取し，有機態チッソ・アンモニア・亜硝酸・硝酸の各濃度および細菌数とHNF数を計数した．その結果，「無菌区」では栄養塩濃度の変化は全く見られず，「HNF区」ではわずかながらもアンモニア濃度の増加が見られたのに対し，「細菌区」ではむしろアンモニア態チッソ濃度が減少していくのが観察された．そこで有機態チッソとしてグルタミン酸をいくつかの初期濃度で人為的に海水中に添加し，同様の実験を行った．その結果，添加したグルタミン酸濃度が低い場合にはアンモニアの再生速度は「細菌区」より「HNF区」の方が高かったものの，初期濃度が50 μMになるよう添加して初めて「細菌区」の方で「HNF区」より高い

Table 3. Regeneration rates of ammonia in [Bacteria] and [HNF] fractions along with increasing in concentration of glutamate added to the natural seawater collected on July 3, 1995. Both fractions of [Bacteria] and [HNF] were prepared by filtering seawater through either 3 μm Nuclepore or GF/F (0.7 μm) filters, respectively.

	FRACTION	GLUTAMATE CONC. ADDED (μM)			
		0	5	10	50
REGENERATION RATE (μM h^{-1})	BACTERIA	−9.25	18.8	38.7	99.2
	HNF	15.8	60.4	95.4	70.4

アンモニア生成速度が得られた（Table 3）．このことは，環境中の有機物濃度が低い場合にはアンモニアの再生は主として細菌を捕食したHNFが行っており，細菌は植物プランクトンと栄養塩をめぐってむしろ競合関係にあるのに対し，有機物濃度が高くなるにつれて細菌の栄養塩回帰に対する寄与が高くなることを示唆するものである．

6. まとめ

これまで述べてきた様々な結果から，海洋生態系の物質循環における細菌捕食性鞭毛虫（HNF）の役割について考察した．HNFは微生物食物連鎖の中心的な存在として，一方では溶存有機物を利用して増殖した細菌類を捕食し自らもさらに大形の捕食者により消費されることより溶存有機物を捕食食物連鎖に結びつける役割を果たしているが，他方では捕食した細菌を分解・無機化することで栄養塩の再生に大きく寄与していることが明らかとなった．近年では鞭毛虫による細菌捕食の際，栄養塩のみならず有機態のチッソまで“生産”するという報告もある（Nagata & Kirchman 1991, 1992）．しかしながら，微生物食物連鎖におけるHNFを介したエネルギーフローや栄養塩の再生速度を天然環境においてきちんと定量化した研究はいまだほとんどないといっても過言ではない（Hagström et al. 1988）．海洋や湖沼の生態系において，植物プランクトンにより生産された有機物がどの程度捕食食物連鎖に流れどれくらいの部分が微生物食物連鎖に入っているのか，また微生物食物連鎖に流れたエネルギーのうちどれくらいが捕食食物連鎖に繋がっておりどの程度は原生動物プランクトンの異化作用により再び栄養塩に回帰されているのか，すなわちいわゆる“link or sink”論争（Ducklow et al. 1986, Sherr et al. 1987b）に対し明確な答えを示すことは，生態系における物質循環を知る上で非常に重要なことである．しかしながら食物連鎖におけるこのようなエネルギーの流れ方は，海域や季節あるいは深度等によって大きく異なることが予想される．今後はこれらのエネルギーの流れを定量化するとともに，環境条件との関係について一般的な法則を明らかにしていく必要があろう．

7. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり，高知大学農学部水族環境学研究室の村田憲之・森尾裕起・宇野 潔・小山浩明・井上隆彦の諸氏，ならびにマックスプランク陸水生物学研究所のProf. Dr. J. OverbeckとB. Meierの各氏に多大なる補助をいただいた．末筆ながらここに感謝の意を表する．

文 献

Andersen, O. K., J. C. Goldman, D. A. Caron & M. R. Dennett 1986. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: III. Phosphorus dynamics. *Mar. Biol. Prog. Ser.* **31**: 47–55.

Andersson, A., U. Larsson & A. Hagström 1986. Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **33**: 51–57.

Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil & F. Thingstad 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257–263.

Berman, T., M. Nawrocki, G. T. Taylor & D. M. Karl 1987. Nutrient flux between bacteria, bacterivorous nanoplanktonic protists and algae. *Mar. Microb. Food Webs* **2**: 69–82.

Bloem, J., C. Albert, M.-J. B. Bar-Gillissen, T. Berman & T. E. Cappenberg 1989. Nutrient cycling through phytoplankton, bacteria and protozoa, in selectively filtered Lake Vechten water. *J. Plankton Res.* **11**: 119–131.

Børsheim, K. Y. & G. Bratbak 1987. Cell volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **36**: 171–175.

Caron, D. A., J. C. Goldman, O. K. Andersen & M. R. Dennett 1985. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: II. Population dynamics and carbon cycling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **24**: 243–254.

Cynar, F. J. & J. McN. Sieburth 1986. Unambiguous detection and improved quantification of phagotrophy in apochlorotic nanoflagellates using fluorescent microspheres and concomitant phase contrast and epifluorescence microscopy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **32**: 61–70.

Ducklow, H. W., D. A. Purdie, P. J. LeB. Williams & J. M. Davies 1986. Bacterioplankton: A sink for carbon in a coastal marine plankton community. *Science* **232**: 865–867.

Fenchel, T. 1982. 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.

Fukami, K., B. Meier & J. Overbeck 1991. Vertical and temporal changes in bacterial production and its consump-

tion by heterotrophic nanoflagellates in a north German eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **122**: 129–145.

Fukami, K., N. Murata, Y. Morio & T. Nishijima 1996. Distribution of heterotrophic nanoflagellates and their importance as the bacterial consumer in a eutrophic coastal seawater. *J. Oceanogr.* **52**: 399–407.

深見公雄・宇野　潔　1995．土佐湾の沿岸フロントおよび黒潮フロント海域における細菌ならびに細菌捕食性鞭毛虫の分布と変動．沿岸海洋研究　**33**: 29–38.

Goldman, J. C., D. A. Caron, O. K. Andersen & M. R. Dennett 1985. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: I. Nitrogen dynamics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **24**: 231–242.

Gonzalez, J. M., E. B. Sherr & B. F. Sherr 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 583–589.

Gonzalez, J. M., E. B. Sherr & B. F. Sherr 1993. Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **102**: 257–267.

Güde, H. 1985. Influence of phagotrophic processes on the regeneration of nutrients in two-stage continuous culture systems. *Microb. Ecol.* **11**: 193–204.

Haas, L. W. & K. L. Webb 1979. Nutritional mode of several non-pigmented microflagellates from the York River estuary, Virginia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **39**: 125–134.

Hagström, A., F. Azam, A. Andersson, J. Wikner & F. Rassoulzadegan 1988. Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: Possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **49**: 171–178.

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の分布．南西海区水産研究所研究報告 **No. 17**: 219–233.

岩本典子・今井一郎・上　真一　1993．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．日本プランクトン学会報 **40**: 55–66.

Johannes, R. E. 1965. Influence of marine Protozoa on nutrient regeneration. *Limnol. Oceanogr.* **10**: 434–442.

Johannes, R. E. 1968. Nutrient regeneration in lakes and oceans, pp. 203–213. In *Advances in Microbiology of the Sea*, Vol. 1 (eds. Droop, M. R. & E. J. F. Wood). Academic Press, London.

Landry, M. R., J. M. Lehner-Fournier, J. A. Sundstrom, V. L. Fagerness & K. E. Selph 1991. Discrimination between living and heat-killed prey by a marine zooflagellate, *Paraphysomonas vestita* (Stokes). *J. Exp. Mar. Biol Ecol.*, **146**: 139–151.

Lee, S. & J. A. Fuhrman 1987. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1298–1303.

Lessard, E. J. & E. Swift 1985. Species-specific grazing rates of heterotrophic dinoflagellates in oceanic waters, measured with a dual-label radioisotope technique. *Mar. Biol.* **87**: 289–296.

Lighthart, B. 1969. Planktonic and benthic bacteriovorous protozoa at eleven stations in Puget Sound and adjacent Pacific Ocean. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **26**: 299–304.

McManus, G. B. & J. A. Fuhrman 1986. Bacterivory in seawater studied with the use of inert fluorescent particles. *Limonol. Oceanogr.* **31**: 420–426.

Nagata, T. & D. L. Kirchman 1991. Release of dissolved free and combined amino acids by bacterivorous marine flagellates. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 433–443.

Nagata, T. & D. L. Kirchman 1992. Release of macromolecular organic complexes by heterotrophic marine flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **83**: 233–240.

Nygaard, K., K. Y. Børsheim & T. F. Thingstad 1988. Grazing rates on bacteria by marine heterotrophic microflagellates compared to uptake rates of bacterial-sized monodisperse fluorescent latex beads. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **44**: 159–165.

Putt, M. 1991. Developments and evaluation of tracer particles for use in microzooplankton herbivory studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**: 27–37.

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 & T. Berman 1983. Grazing, growth, and ammonium excretion rates of a heterotrophic microflagellate fed with four species of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1196–1201.

Sherr, B. F., E. B. Sherr & R. D. Fallon 1987a. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 958–965.

Sherr, E. B., B. F. Sherr & L. J. Albright 1987b. Bacteria: Link or sink? *Science* **235**: 88.

Sibbald, M. J., L. J. Albright & P. R. Sibbald 1987. Chemosensory responses of a heterotrophic microflagellate to bacteria and several nitrogen compounds. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **36**: 201–204.

Sibbald, M. J., P. R. Sibbald & L. J. Albright 1988. How advantageous is a sensory prey detection mechanism to predatory microflagellates? *J. Plankton Res.* **10**: 455–464.

鈴木　款（編）1997．海洋生物と炭素循環．東京大学出版会，東京．193 pp.

Wikner, J., A. Andersson, S. Normark & A. Hagström 1986. Use of genetically marked minicells as a probe in measurement of predation on bacteria in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 4–8.