

走査電子顕微鏡観察による赤潮プランクトン試料調整法と2・3の観察例*

芳 養 晴 雄

はじめに

赤潮プランクトンを走査型電子顕微鏡(SEM)で観察すると、プランクトン全体の三次元的特徴や表面の微細構造を鮮明に見ることができる。それは光学顕微鏡(LM)にくらべて分解能、焦点深度が特に優れているためである。反面、観察のための処理操作に多くの時間がかかること、また、内部構造が直接見られないなどの欠点もある。

赤潮プランクトンは大半が水分で占められ、そのまま電子顕微鏡内に挿入すれば真空であるため水分気化による乾燥や収縮が起こる。そのため、電子顕微鏡に入れる前に何らかの固定処理をほどこさないとプランクトン自体の分解、変形が起こり原形に近い状態が維持できなくなり、得られた結果が全く実体と異なったものにもなりかねない。従って、赤潮プランクトンを観察する場合は、前処理として固定、脱水、乾燥それに通電性を良くするために表面を金属イオンでコーティングする蒸着といった操作が必要となる。

著者は高山(1981)¹⁾ の沈澱法を用いて *Gymnodinium* sp.、*Heterosigma* sp. 等の比較的細胞の壊れやすい赤潮鞭毛虫について前処理を行ってきた。しかし、処理に4時間以上も費やされ、途中の処理工程の一部を短縮すれば、塩分が除去できなかったための白濁、脱水が不十分なため酢酸アミルに置換したときの変形、収縮等の起るケースが多々あった。そこで、試行錯誤の後、これらの点を考慮して、脱塩、脱水、時間の短縮等の改良を行ない、比較的良好な観察結果が得られた。

以下、この処理方法と、この処理過程で得られた2・3の観察結果を報告する。

処 理 方 法

図1はプランクトン試料製作処理工程の概略図として示し、以下、順次この処理工程を説明する。

準 備

装置は日立製作所製走査電子顕微鏡 S-430、日立工機製臨界点乾燥装置 HCP-2、エイコーエンジニアリング社製イオンコータ IB-3 を使用して赤潮プランクトンの調整及び観察を行なった。

固定液にはろ過海水ベースの2%オスミウム酸を使用した。

* 赤潮予察調事業費による。

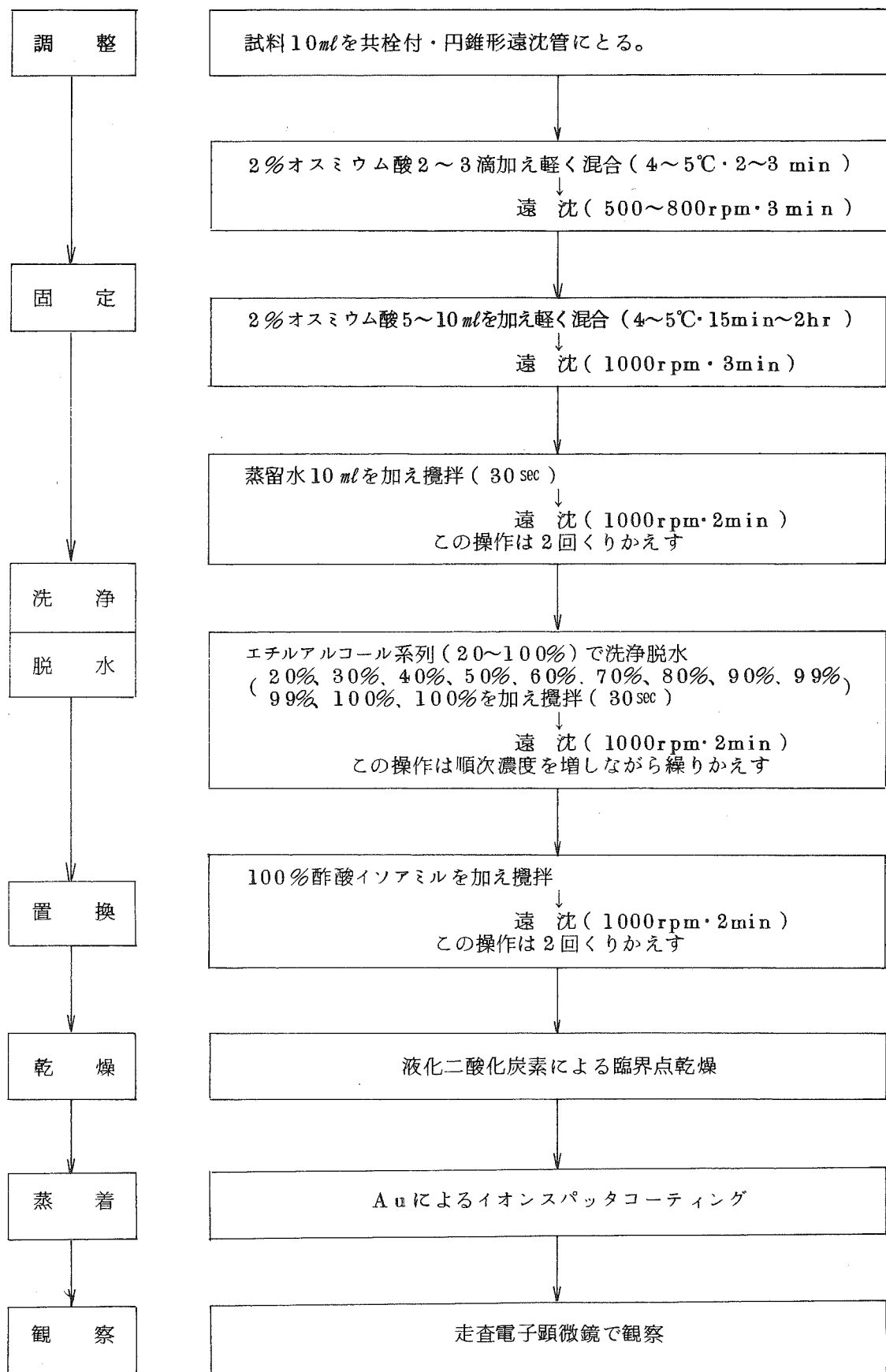


図 1 試料作製法の操作手順

固定から酢酸アミルに置換する工程はすべて円錐形共栓付遠心沈澱管(10 ml)を用いる沈澱法による。つまり、同一遠沈管内で、処理液の添加→攪拌混合→遠沈→上澄み液の除去→次の処理液の添加の繰返しである。

赤潮プランクトンは赤潮状態となった野生個体を採水し試料に供した。この方法は試料が少ない場合は行なうことができないが、ろ過等による濃縮、あるいは、培養でプランクトンを集めることにより可能となる。

固 定

赤潮プランクトン10 mlを遠沈管にとり、氷水の容器(4~5℃)に1~2分浸す。その後、2%オスミウム酸2~3滴滴下し、栓をしてゆるやかに攪拌混合する。再び冷水容器に戻して2~3分静置し仮固定を行なう。

仮固定後、遠沈管を数回軽く上下逆にして試料の固定状態を見る。ここで、試料がペースト状の塊団となっていた場合は固定操作がうまく行なわれなかった事を意味する。この場合は、プランクトンの脆弱、あるいは固定液がプランクトンに合わない等が考えられ再検討を要する。固定処理を行なう前、光学顕微鏡で固定状態をチェックする方が望ましい。

試料が微粒子状に散在していたなら、遠心分離器で遠沈する。その際、試料が沈澱するのに必要な最小限の回転数(500~1000 rpm・2 min)を選ぶ。赤潮プランクトンが大きく容易に沈降する試料は遠沈せず自然沈降させる。

上澄み液は駒込ピペットで除去する。このときピペットの先端は遠沈管の器壁に沿わせないように、かつ、沈澱した試料のまき上げを防ぐため残りの上澄み液を0.5 ml程度残し試料の流出を極力さける。この上澄み液の除去は酢酸アミルに置換する工程まで同じ操作を続ける。

再度冷水容器に移し同2%オスミウム酸を5~10 ml加え軽く混合、15分~2時間放置し本固定を行なう。本固定後、遠心分離器(以後、最終工程まで1,000 rpm・2 min)で遠沈し上澄み液を棄てる。ただし、オスミウム酸は有毒であるため取り扱いにはドラフト内等換気の良い所で注意して行なう必要がある。

洗浄・水洗

固定後、蒸留水10 mlを加え30秒程度攪拌する。以後、各処理液を入れたときの攪拌はすべて30秒程度とする。このとき、一部細胞がくっつき合っている場合はこれらを解きほぐすように強く振る。遠沈、上澄み液の除去後、うも一度同じ操作を繰返す。高山¹⁾の沈澱法は固定剤を除くため、ろ過海水による洗浄とこの塩分を除くため蒸留水による水洗の操作工程となっているが、ここでは、水洗から次の脱水工程の一部を含めて洗浄・水洗とする。

脱水・置換

脱水はエチルアルコールで行なう。加える量はそれぞれ10 mlとする。20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%と順次アルコール濃度を高めながら1工程ずつ処理し、次に99%以上のアルコールを2工程、無水硫酸ナトリウム処理した100%アルコールを2工程繰返す。

当然、各工程の途中には攪拌、遠沈、上澄み液の除去操作が入る。

置換は100%酢酸イソアミルによって2工程繰返し、アルコールによる脱水と同じ操作を行なう。

臨界点乾燥・蒸着

臨界点乾燥は移行液として液化炭酸ガスを用いた。また、蒸着は導体化コーティング金属としてAuを用い、コーティング膜厚は約80~100 Åに設定した。概ね装置の取扱説明書に準ずるので詳細は省略する。

結果及び考察

試料調整

Plate(A)~(D)は以上の処理過程で得られた写真結果であり(Plate(C)-8,9は除く)赤潮プランクトンの固定状態は変形、収縮等あまり認められず十分観察に対応できうと考えられる。

以下、この試料調整における要点を整理してみると、水洗からエチルアルコールによる20%~50%脱水処理は固定剤の除去、脱塩、脱水も同時に行なっている。

遠心分離、攪拌混合は試料に対して処理液の作用を速め時間の短縮につながる。

エチルアルコールを100%程度のところで4工程、置換に2工程、その他の工程で数多く繰返すのは試料流出防止に際し、最終上澄み液をたえず約0.5 ml残すためである。そうしないと、脱水、置換が完全に行なえず試料の変形、収縮という悪い結果になる。従って、試料が多いときは上澄み液を全部とりさり、この工程の一部を省いても多い。

オスミウム酸による固定を長時間(一昼夜以上)行ない、それと同時に、各処理工程での遠沈を強く(1,000 rpm以上)すると、細胞表面が壊れ細胞内部が見える事がある。Plate(A)-7の右上は細胞表面の脱落、Plate(A)-8は細胞表面が剥がれ色素体と思われる部分が露出したものである。いずれもHeterosigma sp.である。Plate(C)-7のGymnodinium nagasakienseも細胞内部の一部が見える。部位は腹面上錐部右側であり、このような方法を取り入れることにより細胞内部の観察もできる。ただし、外的要因が強くなると全く壊れてしまうので観察は不可能となる。

以上の処理操作は多くのプランクトンを必要とし、光学顕微鏡で見られた1細胞ないし、数細胞についての電子顕微鏡観察は困難である。今後、そのような少ない細胞の試料調整と観察が必要となろう。しかし、この沈澱法は主赤潮プランクトン以外に赤潮を構成する他のプランクトンの観察ができることも見過すわけにはいかず、この方法も固定剤、処理剤の簡略化が待たれる。

観察結果

Plate(A)~(D)の中でG.nagasakienseは上述の処理方法で行なっていない。理由としては脱水が完全にできていないためか収縮、変形が認められる。また、個体そのものも脆弱であったことが一因と思われる。このG.nagasakienseは1982年8月田辺湾で赤潮²⁾となったが、漁業被害等にまで至らなかった。しかし、どの個体も溝周辺に多数の細菌の付着が見られた。今後、これら

細菌とプランクトンの関係が明らかにされてくるかも知れない。

Plate(A)-1~9は1982年2月浦神湾で発生した *Heterosigma* sp. 赤潮である。冬期発生した点で特異的な赤潮で、養殖魚に若干の漁業被害をともなった³⁾。この赤潮プランクトンの外形は円、楕円形と変化に富んだものであった(Plate A-1, 4)。細胞の表面は比較的整然と小顆粒が並んでいる(Plate A-5, 6)。また、その表面全体が粘液状物質で覆われているように思える。Plate(A)-7の右上は小顆粒が粘液状物質といっしょに剥れたものだが、壊れた後も規則性を保っている。特徴的な溝の確認はできないものの、2本の鞭毛が出ている部分でくぼみが見える。Plate(A)-9は *Heterosigma* sp. に一部混入していた *Eutreptilla* sp. である。

Plate(B)-1~6は1982年6月下旬、田辺湾で発生した *Prorocentrum dentatum* 赤潮である。細胞は長楕円形を呈し形態変化が大きいと思われる(Plate B-1~3)。殻板と殻板は縫合線(Plate B-1~4)でつながれ、殻板上より微小棘や毛胞孔と思われるものが見られる。細胞の先端(Plate B-5~6)は鞭毛孔や翼片と思われる部分が見られる。表面に堅い殻を持つため、この種のプランクトンは上述の操作をしなくとも観察できる。

Plate(C)-1~7は1984年7月三重・和歌山両県にまたがって発生した *G. nagasakiense* 赤潮で、多大の漁業被害をともなった。いずれの細胞も高山⁴⁻⁵⁾らによる *G. nagasakiense* と一致した。体幅は体長より小さく、扁平なプランクトンである。上錐体は半円形ドーム状(Plate C-2~6)であり縦横溝の深さより小さな溝が上錐体の腹部(Plate C-3~5)から始まって上方に伸び頂端を通して背側(Plate C-6)に達する。

Gymnodinium 赤潮の末期 *G. nagasakiense* 赤潮に変わって *Gyrodinium fissm.* *Polykrikos* sp. が優占し海面下が白濁を呈した。そのときの写真結果を Plate(D) に示す。Plate(D)-1~6は *P. schwartzii* と思われるが断定はしにくい。形状はタル型を呈し、横断面は円形である。*Gymnodinium* と似た細胞が群体を形成して一つの細胞として成り立つ⁶⁾といわれる。どの細胞も横溝が4条となっており、2条、8条等の細胞は見られなかった(Plate D-1~4)。細胞の頂端はほぼ円形で、*G. nagasakiense* の上錐体背面に達する縦溝に相当すると思われる溝が認められる(Plate D-5)。また、各小細胞の横溝は段差がある。光学顕微鏡でいわれる条線、あるいは条紋は下端の円周に沿って存在する凹と思われる(Plate D-6)以外、他の小細胞下錐部について見られない。

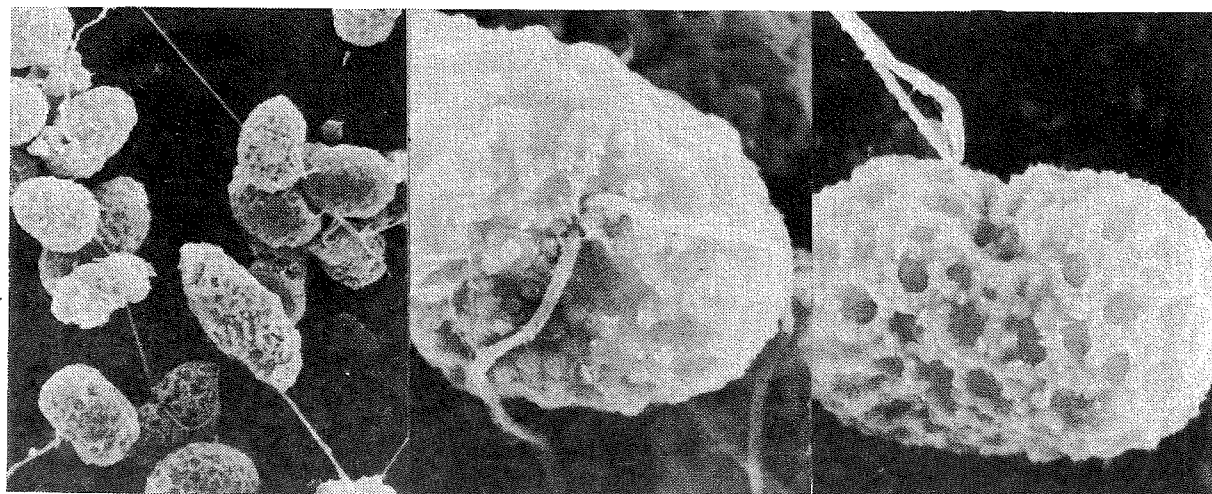
その他、この *Gymnodinium* 赤潮の発生期間中以下の種類がときどき見られた。Plate(D)-7は *Polykrikos* sp.、Plate(D)-8は *Gyrodinium fissm.*、Plate(D)-9は *Prorocentrum micans* である。ただし、Plate(D)-7の *Polykrikos* sp. は分類上よくわからない。*G. fissm* は *G. nagasakiense* 赤潮が消えかかり、*Polykrikos* 赤潮が出る前に多く見られたが、この写真は *G. nagasakiense* 赤潮発生期間中に見られたものである。

参 考 文 献

- 1) 高山晴義、1981：赤潮プランクトンの走査電子顕微鏡試料作製法、広島県水産試験場研究報告、11、101-112。

- 2) 竹内照文・芳養晴雄・中西一、1984 : 赤潮予察調査事業、昭和57年度和水試事業報告、43 - 47.
- 3) 中西一・竹内照文・芳養晴雄、1982 : 浦神湾における1982年冬期の *Olisthodiscus* 赤潮について、昭和56年度和水試事業報告、63 - 74.
- 4) 高山晴義、1981 : 走査電子顕微鏡による *Gymnodinium* 属2種の観察、日本プランクトン学会報、28(2)、121 - 129.
- 5) H 1984 : *Gymnodinium nagasakiense* sp. nov, a Red-tide Forming Dinophyte in the Adjacent Waters of Japan, Bull. Plankt. Soci. Jap., 31(1), 7 - 14.
- 6) 鳥海三郎、1980 : *Polykrikos schwartzii*, 赤潮生物シート, 赤潮問題研究会分類班, No. 55.

Plate (A)



10 μ

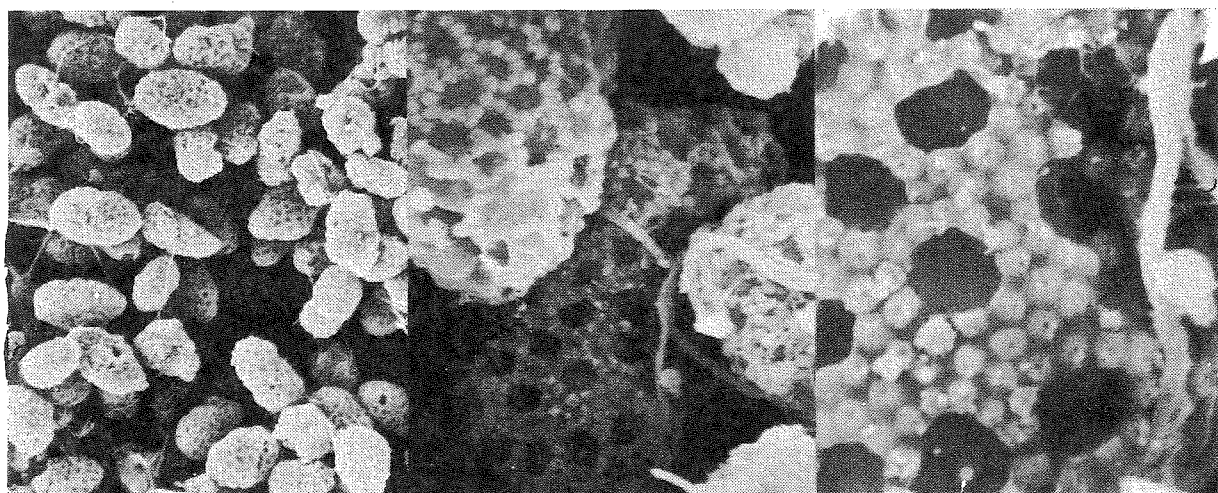
1

2.5 μ

2

5 μ

3



10 μ

4

5 μ

5

1 μ

6



5 μ

7

5 μ

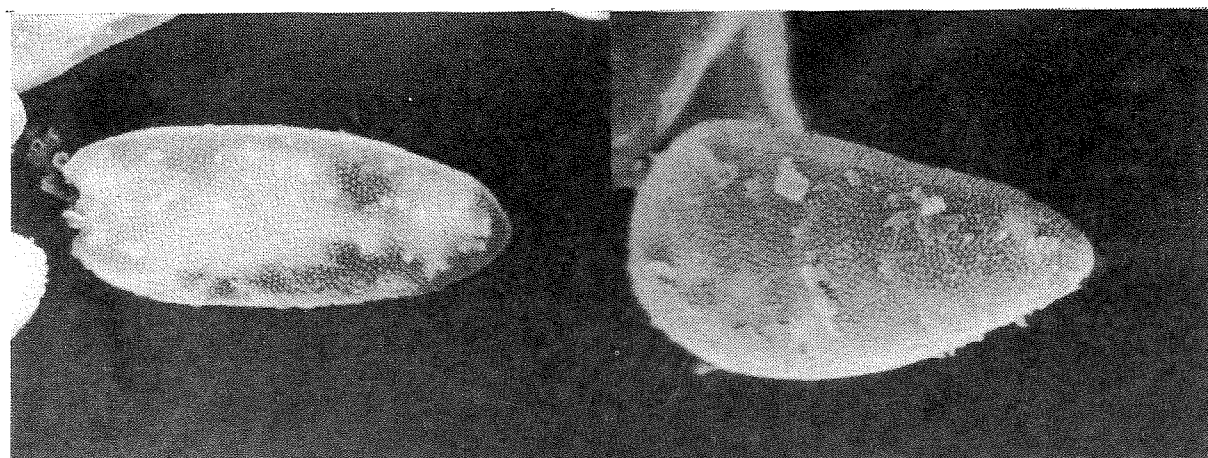
8

5 μ

9

1~8 : *Heterosigma* sp. 9 : *Eutreptilla* sp.

Plate (B)

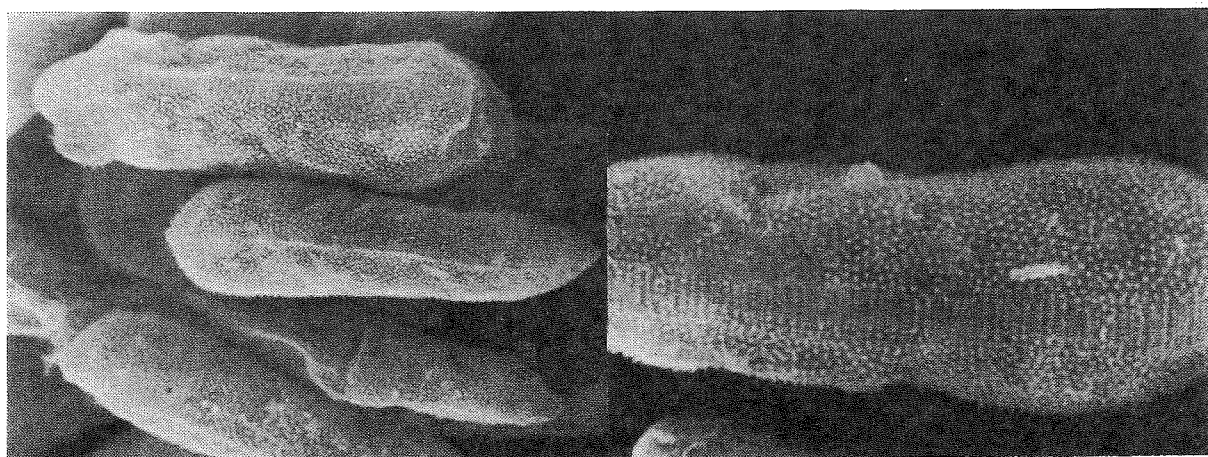


5 μ

1

5 μ

2

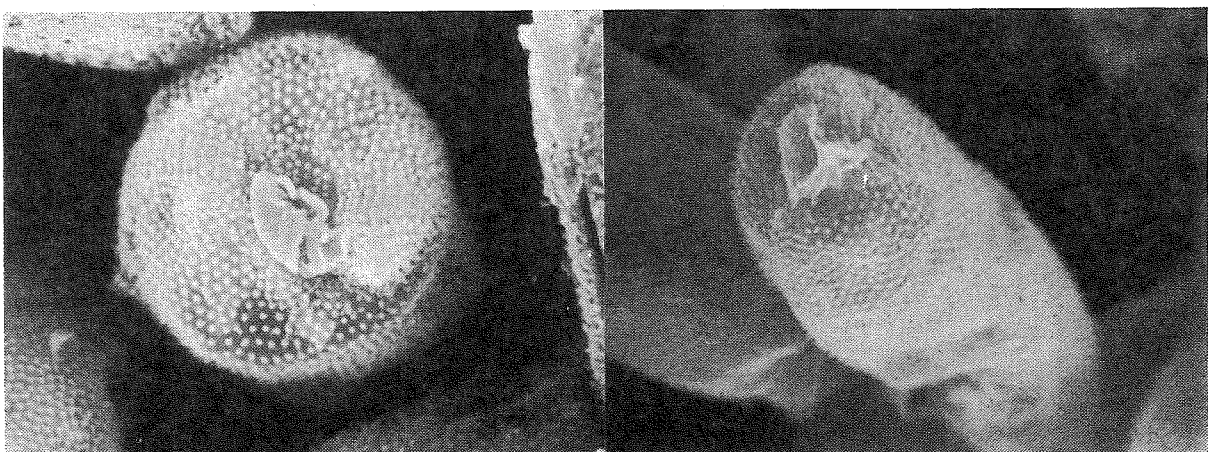


5 μ

3

5 μ

4



5 μ

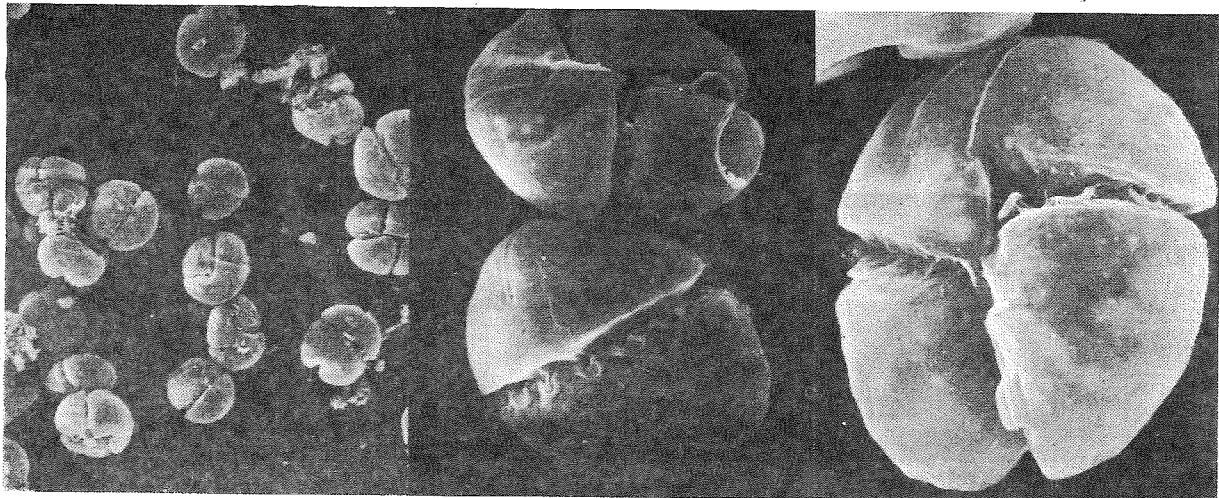
5

5 μ

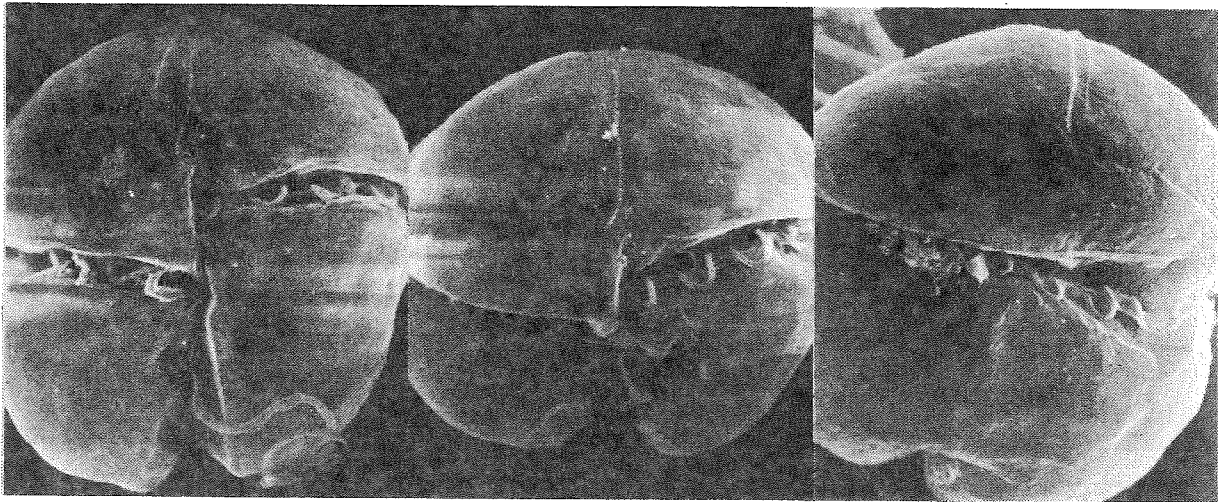
6

1~6 : *Prorocentrum dentatum*

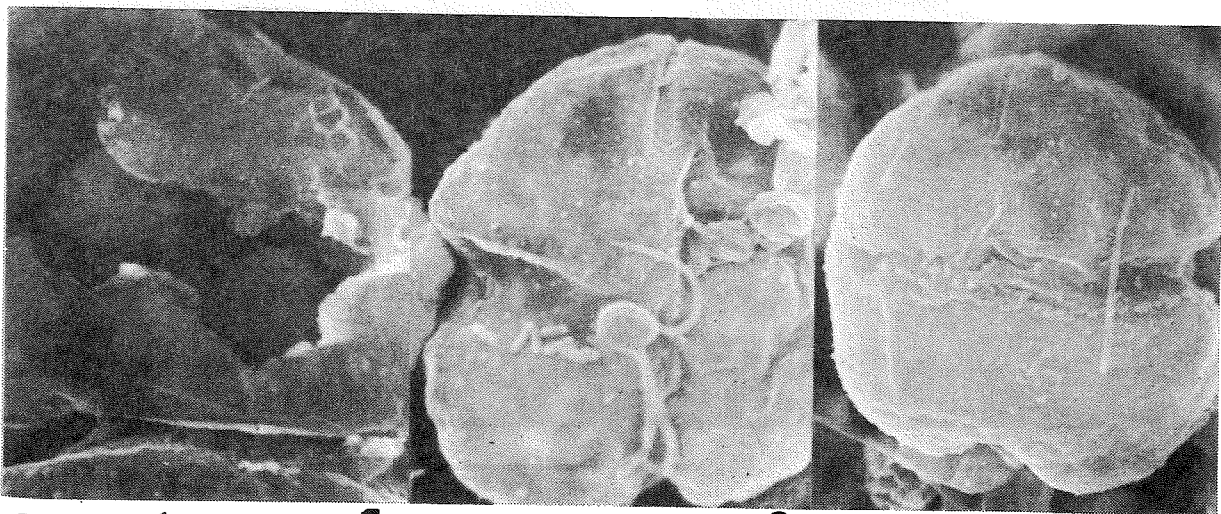
Plate (C)



50 μ 1 10 μ 2 5 μ 3



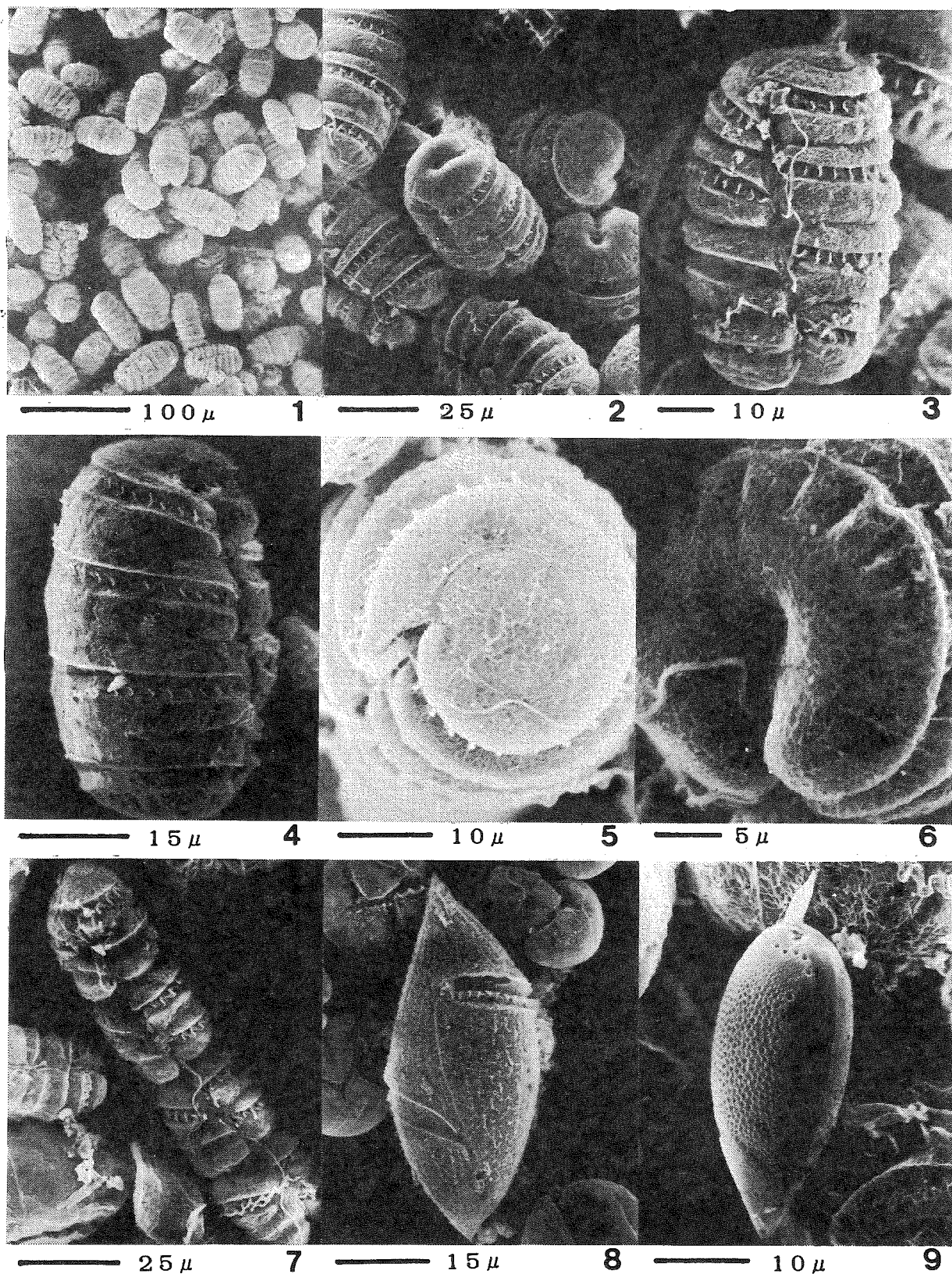
5 μ 4 5 μ 5 5 μ 6



1 μ 7 5 μ 8 5 μ 9

1~9 : *Gymnodinium nagasakiense*

Plate (D)



1~6 : *Polykrikos schwartzii* 7 : *Polykrikos* sp. 8 : *Gvrodinium fissum* 9 : *Prorocentrum micans*