

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

今井 一郎・伊藤 克彦

Distribution of Heterotrophic Microflagellates in Suō-Nada,
Western Seto Inland Sea, in May 1983.

Ichiro IMAI and Katsuhiko ITOH

Distribution of heterotrophic microflagellates (HMF, $<10\mu\text{m}$) and bacteria were investigated in Suō-Nada, western Seto Inland Sea, in May 1983. Measurements of number of cells and size were made using epifluorescence microscopy with the DAPI-FITC double stained samples. HMF can easily be distinguished from autotrophic nanoplankton by this method.

The majority of HMF cells (59%) was smaller than $4\mu\text{m}$ in diameter, with the mean cell volume of $57\mu\text{m}^3$.

The number of HMF ranged from 0.5 to $3.5 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$. They occurred in higher concentrations in the bottom layer of inshore areas. The proportion of HMF to the total nanoplankton in number increased below 20-30m in the offshore areas, although the number was not so abundant there. The greater part of HMF (average 85%) appeared to be free-living.

The number of bacteria ranged from 0.4 to $2.2 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$, and the amount of carbon from 3.2 to $17.4 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-3}$. A correlation ($r=0.57$, $P<0.001$) was obtained between the number of bacteria and HMF. The mean number of bacteria was three orders of magnitude larger than HMF. The carbon amounts of HMF were found in the range between 1.9 and $13.9 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-3}$. Thus, the carbon of HMF occupied about 50% of bacterial carbon, which indicate the quantitative importance of them as a constituent of plankton population.

従属栄養性微小鞭毛虫類 (Heterotrophic microflagellates: HMF) は海洋環境中に数多く存在し (POMEROY and JOHANNES 1968, SOROKIN 1977), 細菌を捕食する (HAAS and WEBB 1979, FENCHEL 1982a, b, YAMAMOTO *et al.* 1982) ことから, 食物連鎖において細菌と動物プランクトンを結ぶ重要な生物群であると認識されるようになった (SIEBURTH *et al.* 1978, FENCHEL 1982c)。また, 細菌と共に, 食物連鎖モデルの中にこの生物群を明確に位置付けする努力も払われてきている (WILLIAMS 1981, AZAM *et al.* 1983)。

しかし, HMF を定量的に把握した研究は少ない。これは HMF の大きさが植物性ナノプランクトン (Autotrophic nanoplankton: ANP) に近く, 分類学的にも同じ仲間に属する場合が

多いことから、両者の識別が非常に困難であったためである。

近年落射蛍光顕微鏡を用い、光合成色素の有無を両者の識別の基準にして、HMF をかなり正確に計数できるようになった (SHERR and SHERR 1983a, CARON 1983)。そこで、本研究においてはこの HMF の計数法 (SHERR and SHERR 1983a) に改良を加えて計数精度を高め、瀬戸内海西部に位置する周防灘において HMF の細胞数と粒子径分布を測定した。同時に、海洋細菌の全細胞数および炭素量を測定し、HMF と細菌の量的関係について検討した。なお本報において HMF と ANP は共に $10\ \mu\text{m}$ 以下の大きさのものを対象としている。

本研究は科学技術庁科学技術振興調整費による「海洋生物資源の生産能力と海洋環境に関する研究」の一部として実施したものである。

本稿を草するにあたり、懇篤なる御指導と御助言を賜った京都大学農学部水産学科石田祐三郎教授、ならびに南西海区水産研究所赤潮部長安楽正照博士に心から感謝の意を表す。また、採水などの海上作業において御協力いただいた南西海区水産研究所調査船しらふじ丸の乗員各位に深謝する。

材料および方法

1. 採水と採水地点

1983年5月14日と15日に、Fig. 1 に示した周防灘の調査定点において、バンドーン採水器を用いて0 m, 5 mと10 m以深は10 m間隔の各層、および海底より1 m上層のB-1 mから採水を行った。採水試料は100 ml ポリ容器 (HMF 用) とねじ口試験管 (海洋細菌用) に分取し、両方共グルタルアルデヒドで固定 (最終濃度0.5%) した後、暗所に冷蔵保存した。

2. HMF の細胞数と粒子径

HMF と ANP は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) による細胞質蛋白の染色 (SHERR and SHERR 1983a) と DNA に特異的に結合する4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (PORTER and FEIG 1980) による核染色の二重染色を施し、落射蛍光顕微鏡 (オリンパス BH 2-RFL, $\times 100$ 対物レンズ使用) を用いて観察計数を行なった。この二重染色法は、SHERR and SHERR (1983b) によってごく最近発表されたものと原理的には同じであるが、FITC と DAPI の使用濃度および染色処理操作が相違している。

各試料を共栓試験管あるいは共栓三角フラスコに10—50 mlとり、DAPIを最終濃度 $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、および FITC を2—4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ になるように各々加えた。5分間以上染色した後、Sudan black B で染めた孔径 $1.0\ \mu\text{m}$ の Nucleopore フィルター (ZIMMERMANN *et al.* 1978) 上に染色試料をろ過捕集し、除菌海水で洗浄を行ない、フィルターを乾燥させないでスライドガラス上に置いてただちにカバーガラスと共に無蛍光イマージョンオイルで封入して計数用標本を作成した。落射蛍光顕微鏡を用いて、青色励起光と紫外線励起光を使い分け、接眼格子 (10×10) 内あるいは全視野内に見える HMF を25視野以上、合計50細胞以上計数し、同時に ANP を計数することによって、試料中のそれぞれの細胞数 ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$) を求めた。ただし、ANP のうち単細胞性の微小

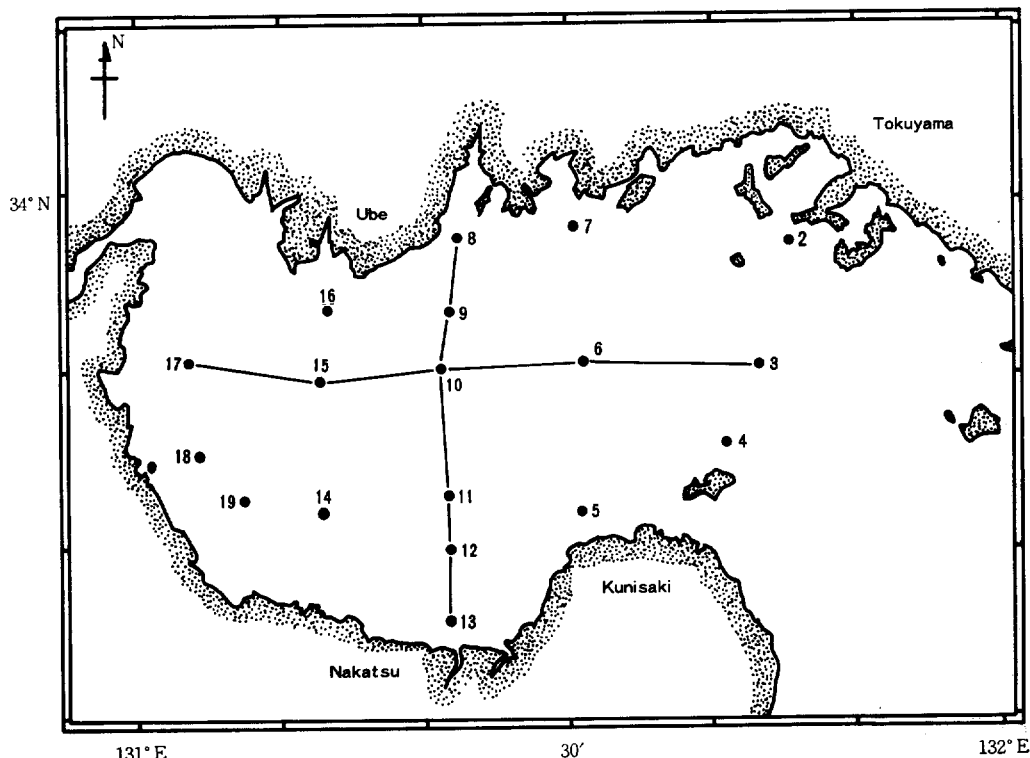


Fig. 1. Location of sampling stations in Suō-Nada, western Seto Inland Sea. East-West and North-South sections are shown by solid lines.

な藍藻 (Chroococcoid cyanobacteria) (JOHNSON and SIEBURTH 1979) は除外した。細胞数と粒子径の測定は試料採集後約 4 週間以内に行なった。

染色に用いた DAPI 溶液は、 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ の濃度で蒸留水中に溶解し、 $0.22 \mu\text{m}$ メッシュの Millipore フィルターでろ過した後グルタルアルデヒドを少量 (最終濃度 0.5%) 加えて冷蔵保存したものである。FITC 溶液は、Na-carbonate buffer (0.05M, pH=9.4) 中に $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ の濃度で溶解させ、DAPI と同様に処理したものである。

HMF の粒子径の測定には、Sts. 3, 6, 10, 11, 15 と 17 の表層 (0m)、中層 (5mあるいは 10m) および底層 (B-1m) の試料を用い、各試料につき 48—63 細胞の粒子径を接眼マイクロメーターで測定した。球状に見える細胞についてはその直径を、その他の形状のものは長径と短径を測定し、各々球形および回転楕円体として体積を計算した。HMF の 1 細胞あたりの炭素含量は、各試料における平均体積から得た全体の平均体積に炭素量変換係数 $0.07\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ (SOROKIN 1979) を乗じて求めた。これに HMF 数を乗じて炭素量 ($\text{mgC}\cdot\text{m}^{-3}$) を算出した。

3. 海洋細菌の細胞数と炭素量

DAPI で蛍光染色した試料を、Sudan black B で染めた $0.2 \mu\text{m}$ 孔径の Nuclepore フィルター上にろ過捕集し、常法 (今井 1984) によって落射蛍光顕微鏡を用いて細菌数 ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$) を求めた。

細菌体積の測定には、Sts. 3, 10, 11 および17の4定点の各層試料を用いた。各試料について、116—160細胞の体積を、画像解析処理法（今井1984）に従って求め、各定点における平均体積の値から細菌の全平均体積を算出した。これに炭素量変換係数 $0.087\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ (FERGUSON and RUBLEE 1976) を乗じて1細胞あたりの炭素含量を求め、さらに細菌数を乗じて炭素量 ($\text{mgC}\cdot\text{m}^{-3}$) を計算した。

結 果

1. HMF の細胞数と炭素量

(i)HMF の観察 DAPI-FITC 二重染色による HMF の蛍光顕微鏡写真の例を Plate I に示した。(A)は、青色励起光を用いて撮影したもので、ANP はクロロフィルの一次蛍光によって細胞内の葉緑体が赤—橙色に輝くのに対し、HMF は FITC によって細胞全体が緑色に見えるので、両者は容易に区別できる。(B)も(A)と同じ励起光を用いたもので、Choanoflagellate が中央に見える。同じ視野のものを紫外線励起光で撮影したものが(C)である。核は DAPI によって青色の蛍光を発生し、核を持たない非生物粒子との区別が容易である。また、Choanoflagellate の細胞内には、細菌とほぼ同じ大きさの青色の粒子が多数みとめられた。他にも、HMF の食胞と思われる細胞内の袋の中に、小さな青色粒子が詰まっているのがしばしば観察された。また、無色の Cryptophyceae の細胞内に単細胞性の微小な藍藻が時折みとめられた。

(ii)HMF の粒子径 総計979細胞の HMF の粒子径分布を Fig. 2 に示した。球形換算の直径で $2 - 3\ \mu\text{m}$ の粒子径画分のものが全体の33%と最も数多く存在し、 $4\ \mu\text{m}$ 以下の比較的小形のもので59%を占めた。 $3\ \mu\text{m}$ 以上の画分では粒子径が大きくなるにつれて数が減少した。なお、データとして示さなかったが、 $10\ \mu\text{m}$ 以上の HMF は光合成色素を持たない Dinoflagellates が

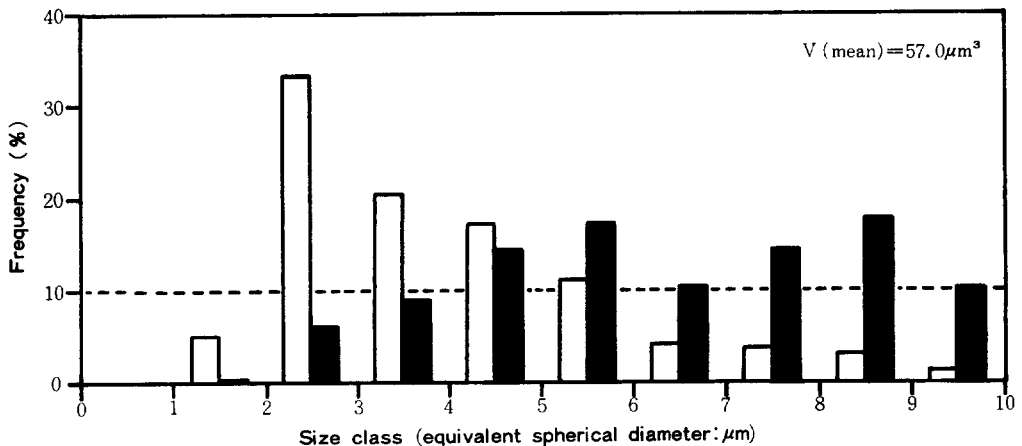


Fig. 2. Frequency of size distribution of heterotrophic microflagellates. Open column means percentage of the total cell number ($n=979$), and closed column indicates percentage of the total volume.

きわめてまれに見られる程度であった。一方、全体の体積に対して占める各粒子径画分の割合は細胞数の場合と異なり、 $4\mu\text{m}$ までの画分では粒子径が大きくなるにつれて高くなるものの、合計しても全体の15%を占めるに過ぎなかった。 $4\mu\text{m}$ 以上では各画分とも10—20%であり、比較的一定した割合を占めた。

各層試料の HMF の平均体積は23.6

Table 1. Number and carbon of heterotrophic microflagellates (HMF) and bacteria in Suō-Nada, western Seto Inland Sea, in May 1983.

		Min.	Max.	Mean
HMF	No. ($\times 10^3 \text{ml}^{-1}$)	0.5	3.5	1.4
	Carbon ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$)	1.9	13.9	5.5
Bacteria	No. ($\times 10^6 \text{ml}^{-1}$)	0.4	2.2	1.4
	Carbon ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$)	3.2	17.4	11.2

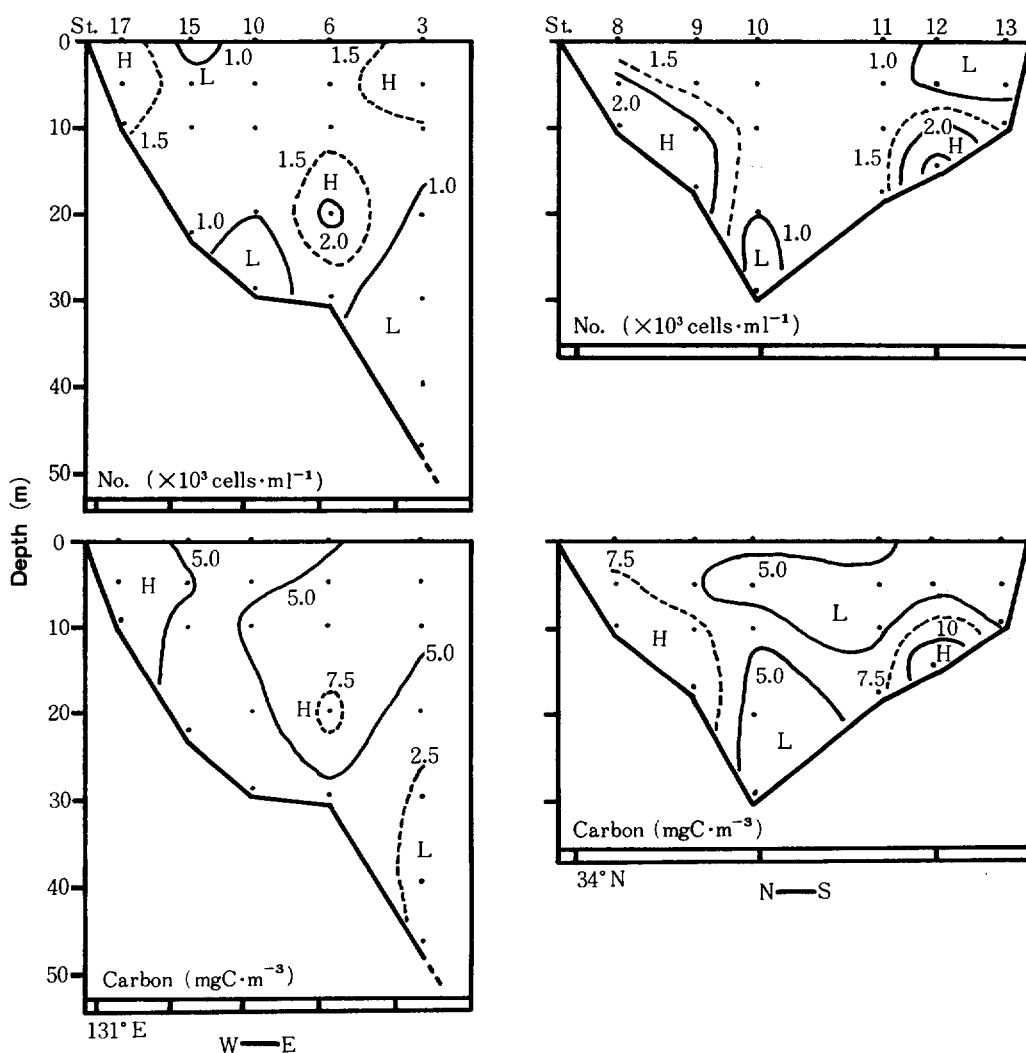


Fig. 3. Distribution of heterotrophic microflagellates in number and carbon along the East-West and North-South sections.

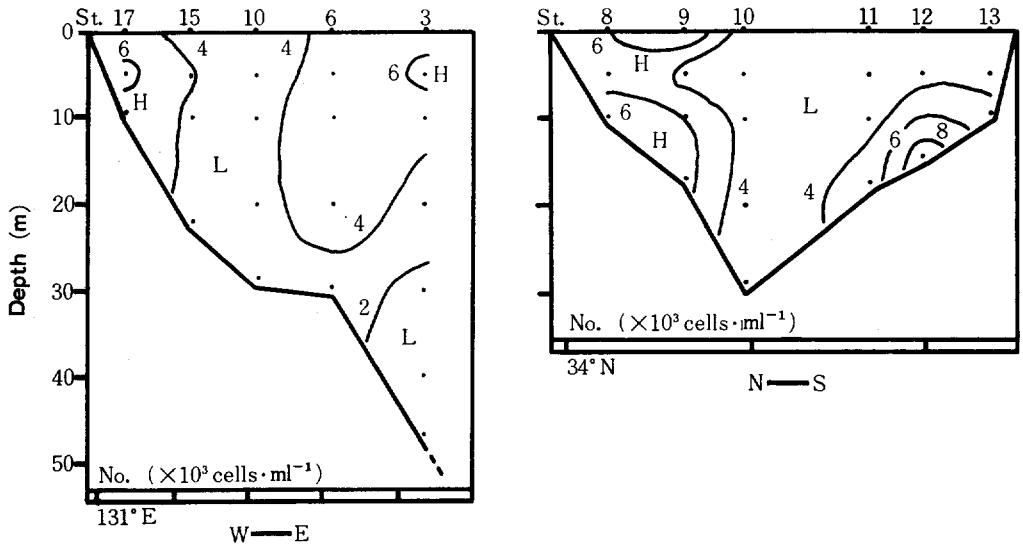


Fig. 4. Distribution of total nanoplankton (heterotrophic microflagellates + autotrophic nanoplankton) in number along the East-West and North-South sections.

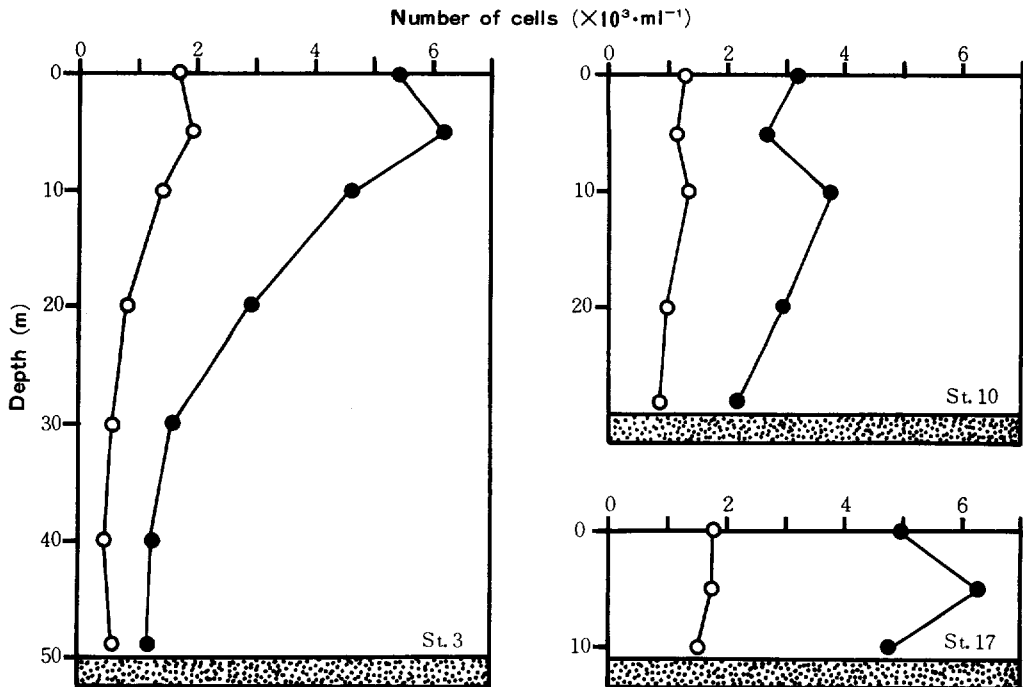


Fig. 5. Vertical profiles of heterotrophic microflagellates (open circle) and total nanoplankton (closed circle) in number at Sts. 3, 10 and 17 in Suō-Nada, western Seto Inland Sea.

μm^3 (St. 11, 0 m)- $102.5 \mu\text{m}^3$ (St. 10, B-1m) の範囲の値を示し、全体の平均値は $57.0 \mu\text{m}^3$ (球形換算の直径で $4.8 \mu\text{m}$) であった。

(iii)HMF の細胞数と炭素量 HMF の細胞数と炭素量の値の範囲はそれぞれ、 $0.5\text{-}3.5 \times 10^3 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ と $1.9\text{-}13.9 \text{ mgC}\cdot\text{m}^{-3}$ であった (Table 1)。灘の東西・南北両断面における HMF の細胞数と炭素量の鉛直分布を Fig. 3 に示した。東西断面においては、東部(St. 3)の20m以深と中央部 (Sts. 10と15) で少なく、灘東部 (Sts. 3 と 6) の表—中層と西部沿岸域の St. 17で多かった。南北断面では、全般的に表層と中央部で少なく、南部および北部沿岸域の底層に多く分布した。とくにSt. 12の底層では、 $3.5 \times 10^3 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ と際立って高密度に分布していた。

(iv)HMF と全ナノプランクトンの細胞数 HMF と ANP を合せた全ナノプランクトン (Total

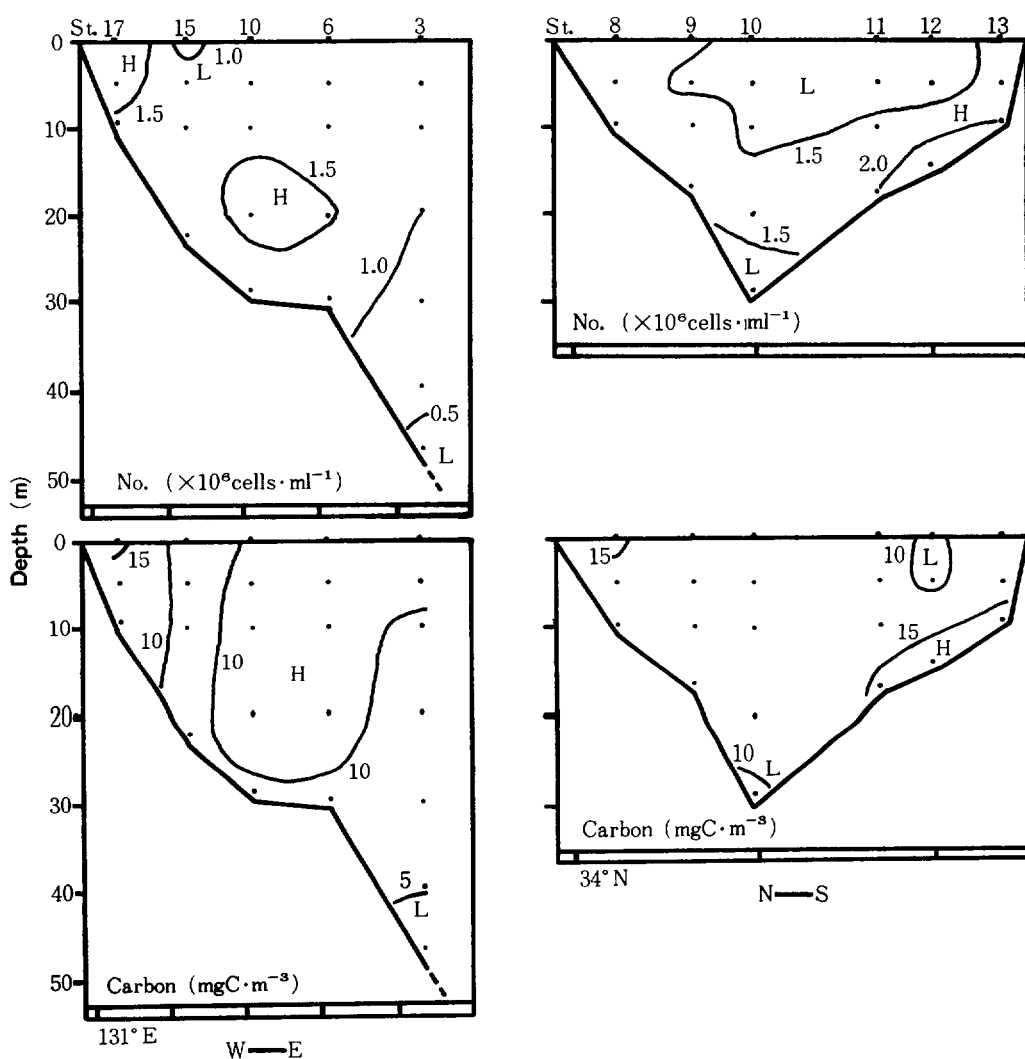


Fig. 6. Distribution of bacterial cell number and the amount of carbon along the East-West and North-South sections.

nanoplankton: TNP) は、灘全体で $1.1-9.5 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の範囲で分布した。東西および南北の両断面における鉛直分布は、HMF と類似した様相を示した (Fig. 4)。東西断面では西部沿岸域と東部の表層に多く、中央部 (Sts. 10, 15) と東部 (St. 3) の深層部に少なかった。南北断面においては、北部に多く、また北部および南部両沿岸域の底層に多く見出されたが、中央と南部表層で少なかった。

次に、灘東部の St. 3, 中央部の St. 10 および西部沿岸域の St. 17 における HMF と TNP の細胞数の鉛直分布を Fig. 5 に示した。水深の大きい St. 3 では、深くなるに従い TNP と HMF は共に減少した。しかし、HMF の TNP に占める割合 (H/T) は、0—20m で 28—31%、30m—B-1 m では 35—48% と、底層になるほど HMF の割合が高くなった。それに対し、Sts. 10 および 17 では、St. 3 のような際立った特徴は見出せなかった。全試料を平均した H/T は約 32% である。

2. 海洋細菌と HMF の分布

(i) 海洋細菌数と炭素量 Sts. 3, 10, 11 および 17 の試料から画像解析によって求めた細菌の平均体積は $0.089 \mu\text{m}^3$ であった。細菌数および炭素量は、各々 $0.4-2.2 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$, $3.2-17.4 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-3}$ の範囲にあった (Table 1)。東西および南北の両断面における細菌数と炭素量の鉛直分布を Fig. 6 に示した。東西断面においては西部沿岸域に多く、東部沖合の St. 3 の深層で少なかった。南北断面においては中央部の表層と底層に少なく、南部沿岸域の底層に多く分布した。

(ii) HMF と海洋細菌の炭素量と細胞数 HMF と細菌の炭素量における鉛直分布を、Sts. 3, 10 および 17 を例にして Fig. 7 に示した。St. 3 においては、細菌と HMF いずれも深度と共に

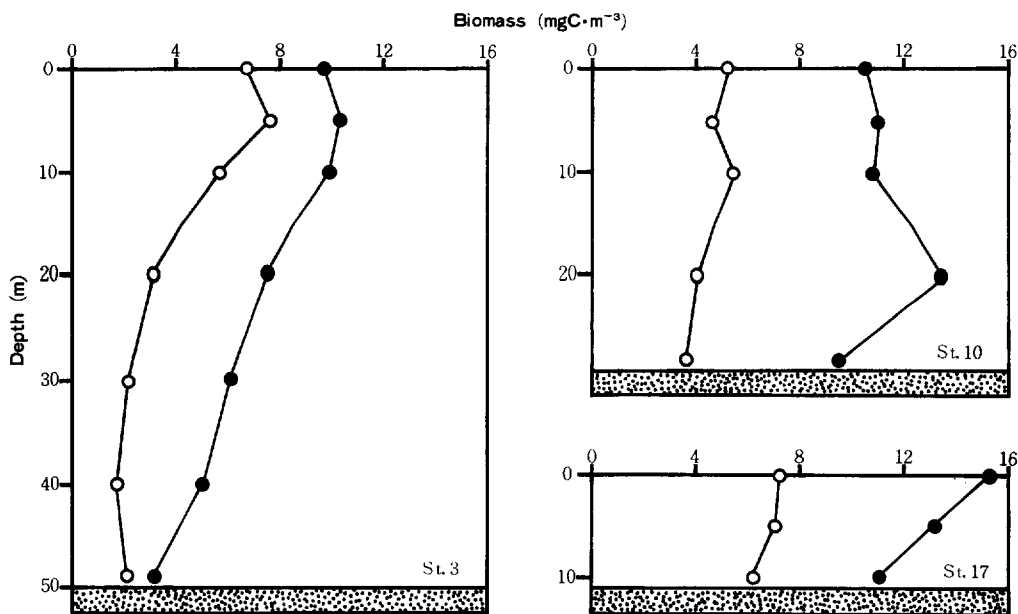


Fig. 7. Vertical profiles of heterotrophic microflagellates (open circle) and bacteria (closed circle) in carbon at Sts. 3, 10 and 17 in Suō-Nada, western Seto Inland Sea.

減少した。Sts. 10と17についてはこのような特徴はみとめられず、鉛直的な分布の変化は大きくなかった。炭素量で表わした海洋細菌に対する HMF の割合は、全試料で23—102%の範囲で、平均は約50%であった。

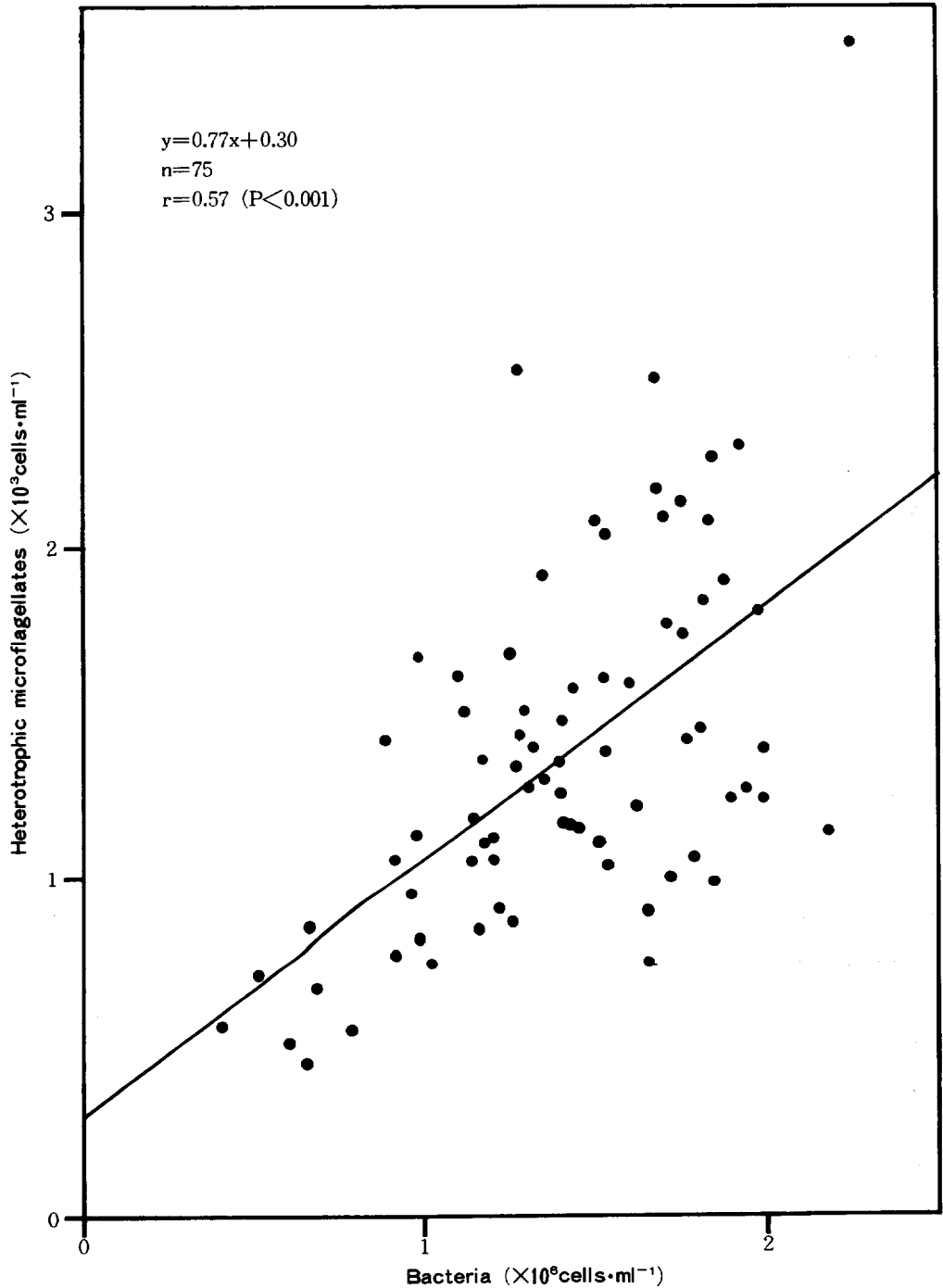


Fig. 8. Relationship between the number of bacteria and heterotrophic microflagellates in Suō-Nada, western Seto Inland Sea, in May 1983.

各定点の全試料について測定した細菌数と HMF 数の関係および両者の間に回帰直線を当てはめた結果 [$y=0.77x+0.30$ (y : HMF 数 ($\times 10^3$ cells \cdot ml $^{-1}$), x : 細菌数 ($\times 10^6$ cells \cdot ml $^{-1}$))] を Fig. 8 に示した。相関係数 r は 0.57 ($P<0.001$) で、両者の間の相関はかなり高いことがわかる。また、全域における細菌の平均細胞数は 1.4×10^6 cells \cdot ml $^{-1}$ であり、それに対して HMF は 1.4×10^3 cells \cdot ml $^{-1}$ の値を示し、前者は後者の約 10^3 倍であった。

考 察

DAPI-FITC 二重染色と落射蛍光顕微鏡による HMF の観察計数方法の特徴は、①FITC によって HMF の細胞全体が緑色の蛍光を発し形態を確認できる、②ANP は葉緑体が赤—橙色に見えるため HMF との区別が容易である、③DAPI によって HMF の核や細菌が青く見えるので形状の似た非生物粒子との区別が容易である、④デトライタスが多くても紫外線励起下ではバックグラウンドが少なく、青色に見える核を探すことによって HMF の検出が簡単にできる、等である。CARON (1983) によると、FITC を高濃度で用いた場合、葉緑体の発する一次蛍光が FITC による蛍光に干渉されて ANP を過少評価してしまうことがあり、逆に低濃度で用いた場合は、HMF の染色が弱くなって HMF の過少評価が起ることが指摘されている。また、FITC はある種のデトライタスを著しく染色してしまうので、デトライタス上あるいはその周辺に位置する HMF の検出が困難であるとも指摘されている。しかし、著者らの用いた方法は、使用した FITC 濃度が SHERR and SHERR (1983a) の約 0.4 mg \cdot ml $^{-1}$ よりも低いうえに、DAPI によって核も染めているので、染色の過不足に原因する HMF や ANP の過少評価の問題はほとんど克服できたと考えられる。また、FITC による、ある種のデトライタスの染色の問題も④の利点によって克服されている。さらに、Plate I (C) に示したように、DAPI によって HMF の細胞内に取り込まれた細菌を検出できる可能性も示唆された。

周防灘における HMF の細胞数および炭素量はそれぞれ、 $0.5-3.5 \times 10^3$ (平均 1.4×10^3 cells \cdot ml $^{-1}$) と $1.9-13.9$ (平均 5.5 mgC \cdot m $^{-3}$) で、沿岸域において高く、灘中央部や東部の中層以深で低かった。HMF 細胞数に関しては、米国ジョージア州の河口域の最大 4.0×10^3 cells \cdot ml $^{-1}$ から沖合水域での最小 0.3×10^3 cells \cdot ml $^{-1}$ (SHERR and SHERR 1983a) の値や、デンマークのフィヨルドにおける夏季の 0.2×10^3 以下— 3.0×10^3 (平均 1.0×10^3 cells \cdot ml $^{-1}$) (FENCHEL 1982c) の値、また炭素量においては米国ジョージア州沖合での最小値 0.6 から沿岸の最大値 9.5 mgC \cdot m $^{-3}$ (SHERR *et al.* 1984) や、ペルー沿岸の富栄養湧昇水域の 50.4 mgC \cdot m $^{-3}$ や北赤道海流の貧栄養水域での最小値 0.35 mgC \cdot m $^{-3}$ (SOROKIN 1979) 等の値が報じられており、著者らの報告も含めて、富栄養化の程度に応じて HMF の細胞数と炭素量が増加することが明らかである。

全ナノプランクトン (TNP) に対して占める HMF の割合 (H/T) は、鉛直的には全般に euphotic zone 以深の深層で高くなる傾向があり、これは POMEROY and JOHANNES (1968) の観察にも同様にみられている。一方、水平的には SHERR and SHERR (1983a) のように、H/T が河口域で 8.5% と低く沖合域では 39% と高くなるような傾向は、著者らの周防灘における測定結

周防灘の従属栄養性微小鞭毛虫類

果では顕著に認められなかった。両者の結果の相違の原因は不明である。

ところで、海水中の有機物凝集体 (Macroaggregates) 上には、細菌や HMF、繊毛虫等が多く存在すると言われている (CARON *et al.* 1982)。FENCHEL (1982c) は、海水を 20 μm の篩でろ過した場合とろ過しない場合の HMF 数を比較し、前者で $3.6 \times 10^2 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、後者で $8.5 \times 10^2 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の結果を得て、HMF の大部分が懸濁粒子に関係していると述べている。しかしながら、周防灘の Sts. 3, 10, 11 および 17 の 4 定点の試水 16 試料において、目合い 20 μm のナイロン網地を篩として自然落下でろ過した海水中の HMF 数の、未処理海水中の HMF 数に対する比率をみると、59.8—129.6% (平均 84.5%) と高く、これらの値は FENCHEL (1982c) の結果と著しく異なった。その原因は明確ではない。ただ細菌の場合、懸濁粒子濃度の高い水域で粒子付着細菌数の割合が高くなるという報告 (GOULDER 1977) を考え合わせると、FENCHEL (1982c) の用いた海水試料は浅いフィヨルドから得たものであり、懸濁粒子濃度が周防灘の場合より高かったのかもしれない。

次に、周防灘の全試料における細菌数と HMF 数の相関関係は $r = 0.57$ ($P < 0.001$) であり、SHERR *et al.* (1984) の場合 ($r = 0.83$) ほど相関は高くなかったが、周防灘全域における細菌の平均細胞数に対する HMF 細胞数の割合は約 10^{-3} 倍であり、FENCHEL (1982c) や SHERR *et al.* (1984) の結果と類似した割合であった。炭素量で HMF と細菌の関係をみると、ほぼ 1 : 2 であり、植物プランクトンに対する細菌の炭素量の割合が約 20% であること (今井 1984) から考えて、HMF は海洋プランクトンの中で細菌と並んで量的に重要な位置を占める生物群であり、FENCHEL (1982a, b, c) や AZAM *et al.* (1983) の言うように、食物連鎖の中で細菌と動物プランクトンを結ぶ仲介者として重要な役割を演じているものと推察される。今後、細菌の生産速度や HMF による細菌捕食速度の測定を通じて、両者の関係をさらに詳細に研究することが必要であろう。

摘 要

1983年5月に周防灘から採水試料を得て、従属栄養性微小鞭毛虫類 (HMF, 10 μm 以下) および海洋細菌の分布を調べ、下記の知見を得た。

1. DAPI-FITC 二重染色と落射蛍光顕微鏡を用いる方法によって、HMF と植物性ナノプランクトンの識別が容易になり、HMF の正確な観察・計数が可能になった。
2. HMF は、球形換算の直径で 4 μm 以下のものが全数の 59% と大部分を占めたが、体積では 4 μm 以上のものが全体の 80% 以上を占めた。平均体積は 57.0 μm^3 (直径 4.8 μm) であった。
3. HMF の細胞数は $0.5 - 3.5 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の範囲にあり、灘沿岸域底層部に多く分布し、中央部や東部の中層以深で少なかった。全ナノプランクトンに対する HMF の割合は、平均 32.4% であったが、東部の水深の大きい定点では 20—30m 以深でこの割合が高くなる傾向を示した。
4. 海水の 20 μm 以下の画分に HMF の大部分 (平均 84.5%) が存在した。
5. 海洋細菌の平均体積は 0.089 μm^3 であった。細菌数および炭素量は、 $0.4 - 2.2 \times 10^6 \text{ cells} \cdot$

ml⁻¹, 3.2-17.4 mgC·m⁻³の範囲で各々分布した。

6. 細菌と HMF の細胞数の間にはかなりの相関 ($r = 0.57$, $P < 0.001$) がみとめられた。細菌数は HMF 数の平均約10³ 倍であった。

7. HMF の炭素量は1.9-13.9 mgC·m⁻³の範囲で分布し、細菌炭素量の平均50%を占めており、海洋プランクトンの中で量的に相当重要な生物群であることが示唆された。

引用文献

- AZAM, F., T. FENCHEL, J. G. FIELD, J. S. GRAY, L. A. MEYER-REIL and F. THINGSTAD, 1983 : The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, 257-263.
- CARON, D. A., P. G. DAVIS, L. P. MADIN and J. McN. SIEBURTH, 1982: Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *SCIENCE*, **218**, 795-797.
- CARON, D. A., 1983: Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 491-498.
- FENCHEL, T., 1982a: Ecology of heterotrophic microflagellates. I. Some important forms and their functional morphology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **8**, 211-223.
- FENCHEL, T., 1982b: Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **8**, 225-231.
- FENCHEL, T., 1982c: Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **9**, 35-42.
- FERGUSON, R. L. and P. RUBLEE, 1976: Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 141-145.
- GOULDER, R., 1977: Attached and free bacteria in estuary with abundant suspended solids. *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 399-405.
- HAAS, L. W. and 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.
- 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. 南西海区水産研究所報告, (17) 183-196.
- JOHNSON, P. W. and J. McN. SIEBURTH, 1979: Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.*, **24**, 928-935.
- POMEROY, L. R. and R. E. JOHANNES, 1968: Occurrence and respiration of ultraplankton in the upper 500 meters of the ocean. *Deep-Sea Res.*, **15**, 381-391.
- PORTER, K. G. and Y. S. FEIG, 1980: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- SHERR, B. and E. SHERR, 1983a: Enumeration of heterotrophic microprotozoa by epifluorescence microscopy. *Est. Coast. Shelf Sci.*, **16**, 1-7.
- SHERR, E. B. and B. F. SHERR, 1983b: Double-staining epifluorescence technique to assess frequency of dividing cells and bacterivory in natural populations of heterotrophic microprotozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1388-1393.
- SHERR, B. F., E. B. SHERR and S. Y. NEWELL, 1984: Abundance and productivity of heterotrophic nanoplankton in Georgia coastal waters. *J. Plankton Res.*, **6**, 195-202.

- SIEBURTH, J. MCN., V. SMETACEK and J. LENZ, 1978: Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1256-1263.
- SOROKIN, YU. I., 1977: The heterotrophic phase of plankton succession in the Japan Sea. *Mar. Biol.*, **41**, 107-117.
- SOROKIN, YU. I., 1979: Zooflagellates as a component of the community of eutrophic and oligotrophic waters in the Pacific Ocean. *Oceanology*, **19**, 316-319.
- WILLIAMS, P. J. LEB., 1981: Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the plankton food web. *Kieler Meeresforsch., Sonderh.*, **5**, 1-28.
- YAMAMOTO, H., Y. EZURA and T. KIMURA, 1982: Evaluation of biological agents affecting on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1433-1439.
- ZIMMERMANN, R., R. ITURRIAGA and J. BECKER-BIRCK, 1978: Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 926-935.

Explanation of Plate I.

Plate I. Epifluorescence microphotographs of heterotrophic microflagellates in the samples collected in Suō-Nada. The samples were stained with DAPI and FITC.

- (A) A heterotrophic microflagellate and an autotrophic nanoplankton observed under blue light excitation. A heterotrophic microflagellate (green fluorescence) can easily be distinguished from an autotrophic nanoplankton, which has two chloroplasts with orange fluorescence.

- (B) Heterotrophic microflagellates observed under blue light excitation. A choanoflagellate cell is indicated by an arrow.

- (C) An identical picture to (B) when observed under ultra violet excitation. Nuclei of heterotrophic microflagellates were clearly visible by blue fluorescence. Many blue spots of bacterial size are observed inside the cell of choanoflagellate.

