

極域アイスコアおよびピットを対象とした微生物定量法の改良

植竹淳^{1,2}、東久美子²、藤井理行²、本山秀明²

¹ 新領域融合研究センター

² 国立極地研究所

Improvement of quantitative detection for microorganisms in polar ice core and snow pit

Jun Uetake¹, Kumiko Azuma², Fujii Yoshiyuki² and Hideaki Motoyama²

¹ *Transdisciplinary Research Integration Center*

² *National Institute of Polar Research*

Ice core show the record of environmental changes through glacial-interglacial cycles and contain many particle like dust, cosmic dust, pollen and microorganisms. Biological study in Vostok ice core show that cell concentration of airborne microorganisms change with glacial-interglacial cycles and microorganisms peak well match to the peak of dust in the end of glacial age (Abyzov et al. 1998). As source area of airborne dust particle had changed through glacial-interglacial cycles, microorganisms also have information about its source area. However, studies focused on the glacial-interglacial changes of microorganisms are a few and necessary to consider other ice core records.

In this study, we examine the improvement of detection for micro organisms in the polar ice core and surface snow by fluorescence and confocal laser microscopic observations.

First we apply to improve the glass funnel for the filtration of melting ice core samples onto polycarbonate, track-etched membrane. We newly made the small filtration diameter (ϕ 5mm) glass funnel, and were able to filter onto the membrane. Second, we had tested the 16 kinds of dye solution (for nuclear acid, cell membrane, protein and lipid) for cell stain. We had selected the dye in consider for fluorescence intensity of microorganisms and non-organic particles by using fluorescence and confocal laser microscope. In all dye, nuclear acid stain "YOYO-1" (Molecular Probes, Invitrogen, USA) is most bright intensity and less fading and most suitable to stain the cell with mineral particle. By using this method, we had analyzed the ice core from Greenland from low volume of melted ice core (0.3-1 ml) and were able to detect 40-2800cells/ml (detection limit: 1.2cells/ml).

南極や北極の氷床アイスコアは、数万年～数十年以上の環境変動の記録と環境変動に対応し飛来してきた微生物の量や種類の情報を含んでいると考えられる。氷床中に飛来してくる風送粒子の量や発生源は氷期・間氷期とでは異なる事が報告されており [Abvizov et al. 1999]、同じく周辺の大陸起源と考えられる微生物も風送微粒子と同様に量や種類が変動している可能性がある。しかし、極域のアイスコア中に含まれる微生物は非常に微量であり、定量的に分析するのは困難であった。

そこで本研究では、蛍光顕微鏡を用いたアイスコア、氷床表面のサンプルを対象とした微生物定量法の改善を目的として、サンプル処理、染色試薬の選定、観察方法の改良を行い、微量なサンプルから感度良く微生物を検出する方法を検討した。

融解したアイスコアサンプルを高濃度でメンブレン上に凝集する為に、市販のガラスファンネルよりも口径が小さな（直径5ミリ）ガラスファンネルを設計し、低濃度の微生物を狭い面積上に濾過する事が可能となった。また微生物の染色には核酸、タンパク質、細胞膜などに特異的に結合する計16種類の蛍光試薬の微生物への染色特性、非生物粒子への非特異的な結合などを考慮し、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡解析に適した蛍光色素の選出をおこなった。この結果、核酸染色試薬においては YOYO-1(Molecular Probes, Invitrogen 社)が蛍光観察、レーザー観察において最も明るく、かつ退色が少ない事が明らかとなり、アイスコア試料を対象とした微生物カウントにおいて適している事が明らかとなった。

改良した方法を用いて、グリーンランドのアイスコア試料の解析を行ったところ 0.3-1ml のサンプル量から、40-2800cells/ml（検出濃度：1.2cells/ml）の濃度の微生物の検出する事ができ、アイスコア中における微生物の増減を確認する事ができた。