

# 海底堆積物の還元状態発達過程中 における微生物活動（予報）※

畑 幸 彦

Microbial Activities in the Development of Reducing Conditions  
in Marine Sediments (Preliminary Report) ※

By

Yoshihiko HATA

In the previous papers the author and his co-workers have discussed the factors affecting the distribution and the activity of sulfate-reducing bacteria in marine sediments, on the basis of various ecological data obtained by the microbiological survey of marine environments. In these papers they have also reported some physiological characters of the pure cultures of sulfate-reducing bacteria isolated from marine materials.

The data obtained from the ecological survey, however, seemed to show only a limited profile of complicated changes which take place in these environments, and the results obtained by pure culture studies did not always express the behavior of these organisms in the natural environments.

Accordingly, the author attempted in the present work to investigate the factors affecting sulfide formation in marine sediment samples under controlled conditions in the laboratory. The aim of this work is to elucidate the details of mechanism of sulfide formation by sulfate-reducing bacteria in relation to the activities of other microorganisms which might be responsible for stimulating the development of reducing conditions in marine environments.

The experimental methods employed in this work were as follows :

Air-dried materials of the bottom mud which were collected from Shimonoseki fishing harbor were added with sea water and then incubated in the dark under various conditions as shown in Table 1. To examine the effect of organic matter on the development of reducing conditions some samples were additionally supplemented with cellulose powder and minced fish muscle. All samples were inoculated prior to incubation with small amounts of the fresh sediments which were collected from the

---

※ 水産大学校研究業績 第390号, 1963年1月25日 受理.  
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 390.  
Received Jan. 25, 1963.

Shimonoseki coasts.

Determinations of Eh, pH, the amounts of acid soluble ferrous and ferric irons, ionic ferrous iron (ferrous iron which was directly determined without acid treatment), sulfides, and the population of bacteria in these sediment samples were carried out at intervals of a definite time.

The results obtained are shown in Figs. 1-13, and may be summarized as follows :

- (1) In any sample, the rapid drop of Eh, the prompt reduction of ferric iron, the rapid fall followed by the slow rise of pH, the vigorous formation of sulfides, and the abundant growth of sulfate reducers as well as aerobes were observed during the course of incubation. Although no essential differences in patterns of changes of the above factors were found among the samples tested, the rate and the amount of changes in these factors were larger in the samples supplemented with organic matter than the others. And the changes detected with the samples which were incubated at room temperature under aerobic condition were generally smaller than those with the samples incubated anaerobically at 30°C. These results suggest that the activities of microorganisms participating in the development of reducing conditions in marine sediments are accelerated by high organic content, high incubation temperature and low oxygen tension of the environments.
- (2) In the course of changes which were taking place in the sediments the following steps were often observed :
  - i) The vigorous growth of aerobes accompanied with rapid falls of Eh and pH occurred at the early stage of incubation. The reduction of ferric iron also took place in this stage.
  - ii) In the second step the number of aerobes (including facultative anaerobes) reached the maximum value. The falls of Eh and pH, and the reduction of ferric iron were increasingly accelerated. At this stage sulfate-reducing bacteria began to develop vigorously. The anaerobic environments which were created by aerobes seemed to enable sulfate reducers to initiate the growth.
  - iii) In the next step sulfate reducers showed the maximum counts and the reduction of ferric iron ceased almost completely.
  - iv) At the final stage sulfate-reducing activity exhibited the maximum value, and the sulfides were accumulated in very high concentration.

著者は、協同研究者とともに、浅海堆積物中における硫化物の生成、集積の機構を明らかにするため、まず現地調査の結果から硫酸塩還元細菌の分布および活性に影響を与える各種環境要因について解析し、1) 2) 3) つぎに、このような水域から分離された硫酸塩還元細菌の純粋培養あるいは混合培養について、その発育ならびに活性を支配する各種要因の影響を明らかにした。4) 5) 6) 7) 8)

自然環境下の海底堆積物中には各種の微生物が共存しており、これらはその活動によって環境に絶え間ない変化を与えるが、一方、微生物自体はこれら変化する環境条件の影響を敏感に受けると考えられる。したがって、現地調査の結果は連続する変化過程の一断面をあらわすに過ぎず、また培養実験の結果は複雑な自然環境下の生態を必ずしも反映していないと思われる。しかし、現地において一つの試料の連続的な変化過程をくわしく追っていくには海洋環境はあまりにも不均一で変動しやすいから、常に同一場所から同一試

料を得ることは実際上できない。

そこで著者は、自然環境と純粋培養との中間段階として、海底堆積物を実験室内で規制された条件下に保ち、このなかで行なわれる各種の微生物代謝を、硫化物の生成、集積を中心として総合的に追跡しようとした。

本報では、その予備的段階として、沿岸海域から採った底土の風乾物に海水を加え、実験室内で有機物含有量、換水状態、保温条件などの異なった条件下に保ち、これら堆積物模型中における微生物の増殖、活動を比較検討し、あわせて堆積物の還元状態発達段階について概観した結果を報告する。

## 試料および実験方法

1. 海底堆積物模型の組立て：風乾された海底細土（2に示す）に、正常な沿岸水域（約2m層）から新らたにとった海水を加え、よく混和して気泡を除き、つぎに示す各種の条件下に保った。

試料A. 小型水槽を用いて、風乾細土約500gに海水約3,000mlをたたえ室温（28~33°C）に保つ。

試料B. 小型水槽を用い、粉末せんい素（東洋濾紙製、300メッシュ）およびアジの細切肉（ホモジナイザーで細切）をおのおの約1%加えた風乾細土に、Aと同様に海水をたたえて室温に静置する。

試料C. Bと同様に調製し、海水を徐々に（毎分約100ml）あふれさせて交換しながら室温に放置する。

試料D. 先端を軸と垂直に切った100ml容注射筒に、Bと同様に有機物を加えた細土を入れて海水を満たし（風乾細土約12g：海水約100ml）、ゴム栓で密栓して30°Cに保つ。この試料を多数調製しておき試験ごとに2本ずつ供試する。

なお、実験期間中これら堆積物模型をすべて黒色紙でおおって光をさえぎった。

2. 風乾細土の調製：上の海底堆積物の組立てに用いた風乾細土はつぎのようにして調製した。下関漁港内の比較的有機物の少ない地点から底土をとり、室内で風乾したのち指で塊をおしつぶし20メッシュのフルイを通した。

3. 底堆積物の接種：上の風乾細土に含まれる微生物の内容は、処理過程中的変化によって原土の状態とはかなりちがったものと思われるから、新らたにとった沿岸海底堆積物を実験のはじめに少量（風乾細土1gあたり約0.01g）接種混合した。

4. 試料堆積物の採取：試料A、BおよびCからは、先端を切った50ml容注射筒を底土層におしこみ内筒を引き上げて底土（堆積物）をとり、全層を手早く混合して分析に供した。試料Dについては、注射筒の内筒をおし上げて水を捨て全層を混合して試験した。

5. Eh および pH の測定：Eh は白金電極を底土層のほぼ中央にさし入れ飽和甘汞電極と組合わせて電位差計で測定した。pH は採取された試料堆積物についてガラス電極 pH メーターで測定した。

6. 第2鉄の還元量の測定：小山<sup>9)</sup>の方法に準じ、試料堆積物に3N硫酸を加えて沸とう水中で1時間加熱し、浸出液中のFe<sup>2+</sup>および浸出液にヒドロキシルアミンを加えて第2鉄を還元して得たFe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>（全鉄）を $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl 法で光電比色定量し、Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>を求めた。

7. イオン状2価鉄の定量：高井<sup>10)</sup>の方法にしたがい、試料堆積物にそのまま $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl を加え、これと直接反応するFe<sup>2+</sup>を上と同様に定量した。

8. 硫化物の定量：富山・神崎<sup>11)</sup>の方法で、塩酸酸性下で試料堆積物中の全硫化物を水蒸気蒸溜し、ST. LORANT 法<sup>12)</sup>で光電比色定量した。

9. 細菌の計数：試料堆積物5gを、100ml容三角フラスコに入れた45mlの滅菌海水に懸濁させ約5分間はげしく振とう分散させ、これを滅菌海水で10倍ごとくうすめながらつぎの培地に接種し、30°Cで培養して計数した。

- (i) 一般好気性細菌：ZOBELL の培地\* を用い平板混和培養した。  
 (ii) 硫酸塩還元細菌：Medium 1<sup>1)</sup>\*\* を用い最小稀釈法により M. P. N. を求めた。

Table 1. Preparations of sediment samples.

---

Sample A :	After the addition of 500 g of air-dried mud, a cistern was filled with 3 l of sea water and then incubated at room temperature (28—33°C).
Sample B :	Air-dried mud which was supplemented with cellulose powder and minced fish muscle in concentration of 1 % respectively was incubated in the same way as the above.
Sample C :	Air-dried mud which was prepared in the same manner as sample B was incubated at room temperature under the continuous supply of sea water.
Sample D :	A syringe of 100 ml capacity was employed as the container of sediment samples to be tested. Twelve gram of air-dried mud, a small amount of the same organic matter as in sample B and 100 ml of sea water were poured into the syringe, and mixed together. Then the syringe was sealed tightly and incubated at 30°C.

---

## 実 験 結 果

上の各堆積物模型中における各種の変化過程を追跡した結果は第 1—13 図に示すとおりであって、要点はつぎのようである。

### 1. Eh

どの試料でも Eh ははじめの 2, 3 日間に急激に下り、その後降下はやや緩やかとなったが、一般に 3—4 週間後にもなお降下が続いた。しかし有機物を加えない試料 A では、はじめの 2, 3 日でほぼ平衡となり、それ以後のいちじるしい降下はみられなかった。一方、30°C で密栓保温された試料 D では、Eh 降下の速度と程度がもっとも大きかった。試料 B と C では、上の二者のほぼ中間の傾向を示した。

### 2. pH

各試料ともはじめの 1 週間ごろまではかなり明瞭に下ったが、その後ふたたび上昇して約 3 週間後には最初の値またはそれを上まわる値を示した。しかし有機物を加えない試料 A では、この傾向があまりいちじるしくなかった。

### 3. 細菌数

一般好気性細菌の増殖はどの試料でも最初からさかんにはじまり、1 週間後には各試料ともほぼ同程度の最高数となった。

硫酸塩還元細菌はこれよりかなりおくれて増殖しはじめたが、試料 A を除いては、2—3 週間後に一般好気性細菌数を上まわる最高数に達した。しかし試料 A では、この細菌の増殖がきわめてゆるやかで、1 週間後には一般好気性細菌より少数のまま増殖が止まった。一方、試料 D では、他の試料にくらべてこの細菌の増殖がはなはださかんであった。試料 B および C におけるこの細菌の増殖は、上の二者のほぼ中間程度であった。

\* Peptone 5.0 g, Ferric phosphate 0.1 g, Agar 15.0 g, Aged sea water 1,000 ml, pH 7.5.

\*\* Ca-lactate 3.5 g, Beef extract 1.0 g, Peptone 2.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, Agar 3.0 g, Aged sea water 1,000 ml, pH 7.5.

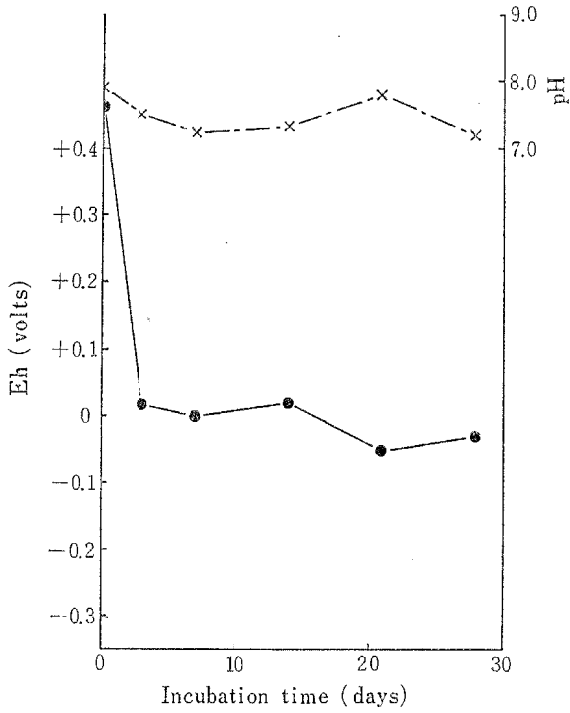


Fig. 1. Changes of Eh and pH in sample A.  
 —●— : Eh ; - - x - - : pH.

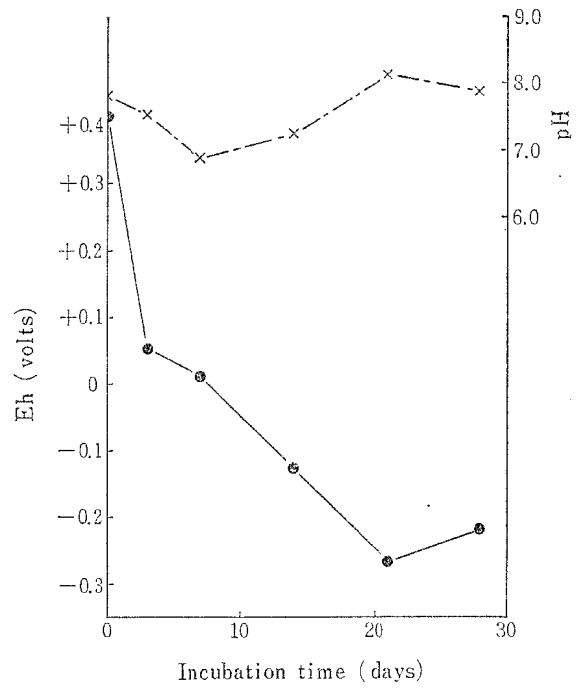


Fig. 2. Changes of Eh and pH in sample B.  
 —●— : Eh ; - - x - - : pH.

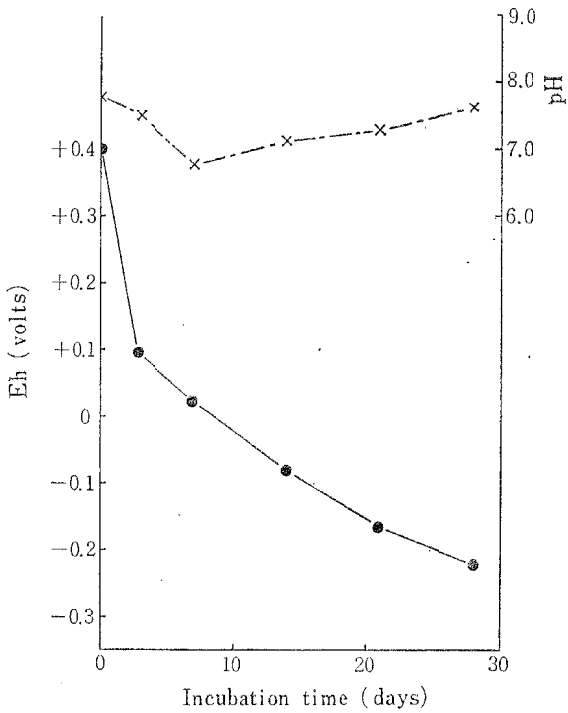


Fig. 3. Changes of Eh and pH in sample C.  
 —●— : Eh ; - - x - - : pH.

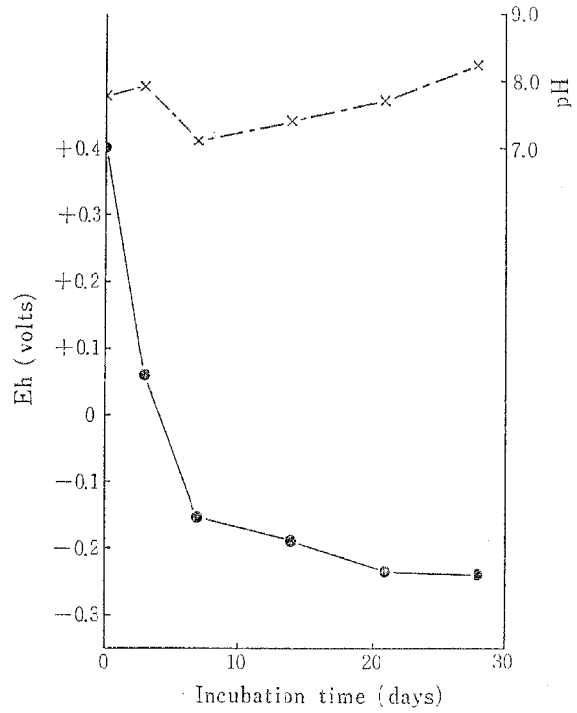


Fig. 4. Changes of Eh and pH in sample D.  
 —●— : Eh ; - - x - - : pH.

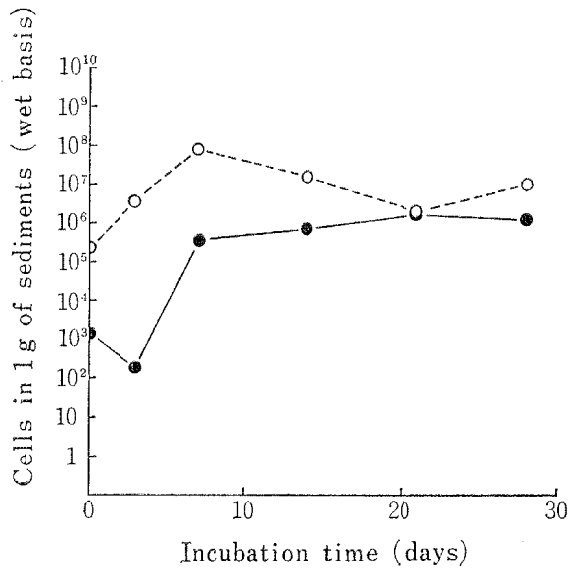


Fig. 5. Growth of bacteria in sample A.  
 ...○... : total aerobes ; —●— : sulfate reducers.

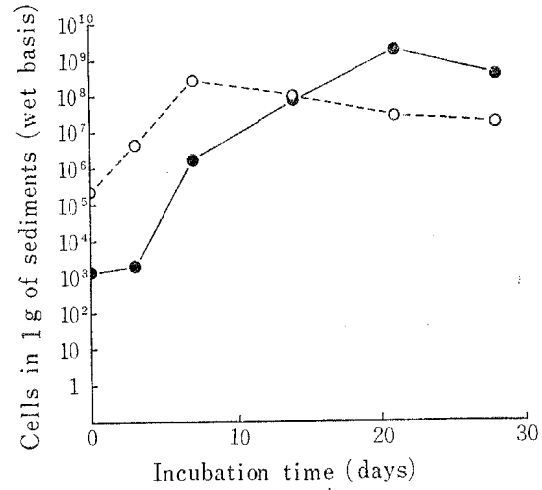


Fig. 6. Growth of bacteria in sample B.  
 ...○... : total aerobes ; —●— : sulfate reducers.

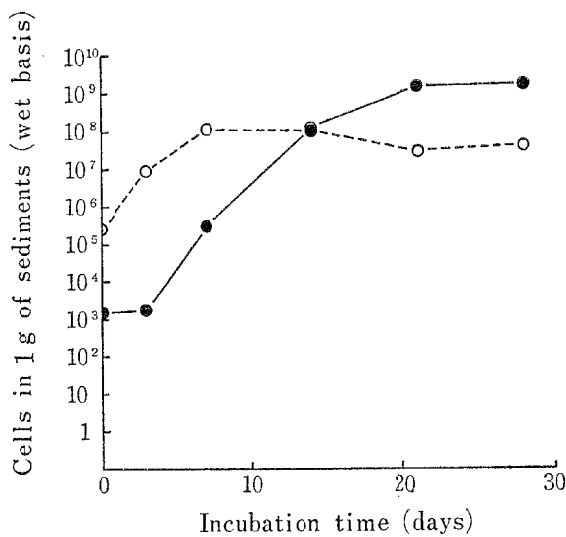


Fig. 7. Growth of bacteria in sample C.  
 ...○... : total aerobes ; —●— : sulfate reducers.

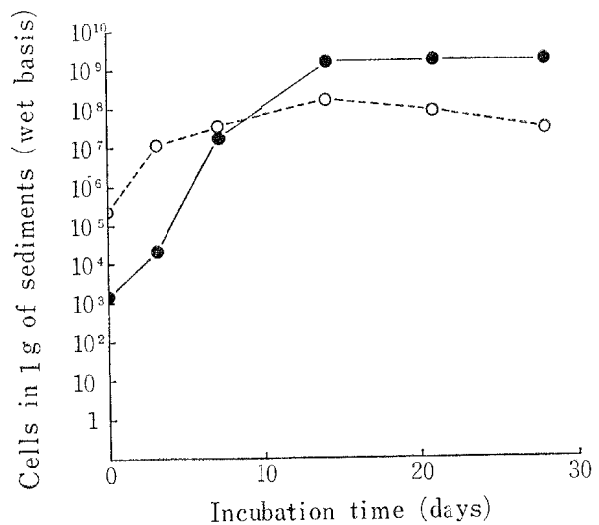


Fig. 8. Growth of bacteria in sample D.  
 ...○... : total aerobes ; —●— : sulfate reducers.

#### 4. 硫化物

硫化物の生成は、どの試料でも硫酸塩還元細菌の増殖よりいくぶんおくれながら、ほぼこれと並行した。すなわち、試料間における硫化物生成のちがいは硫酸塩還元細菌の増殖にみられる傾向をよく反映して、試料Aでは生成速度も最高蓄積量ももっとも小さく、Dではこれらをもっとも大きく、BとCでは上の二者の中間の様子が示された。

5. 第2鉄の還元およびイオン状2価鉄

第2鉄の還元は、どの試料でもはじめの2週間ぐらいの間に急速にすすみ、その後はほぼ平衡となった。試料Aでは還元の数値も程度もいく分小さく、Dではこれらをもっとも大きく、BおよびCでは上の二者の中間の傾向がみられた。

イオン状2価鉄はどの試料でも多少とも増加したが、増加の速度と程度は試料Dにおいてもっとも大きく、Aではもっとも小さく、BとCではこれらのものであった。

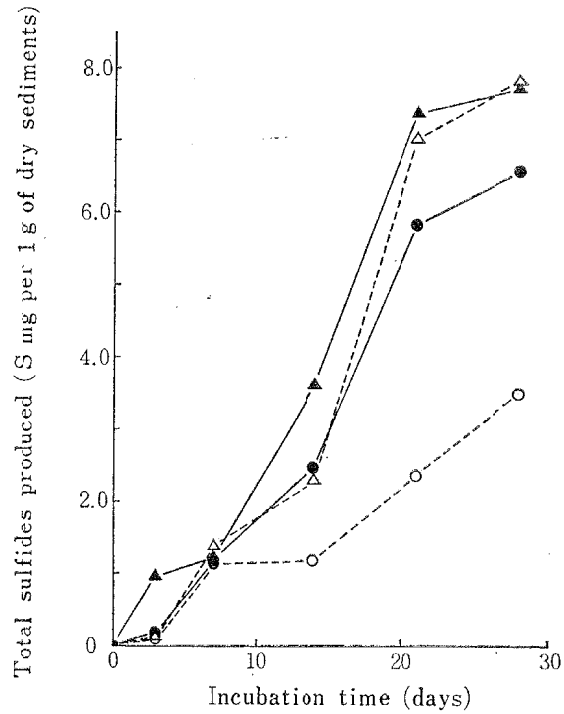


Fig. 9. Production of sulfides in different samples. ...○... : sample A ; —●— : sample B ; ...△... : sample C ; —▲— : sample D.

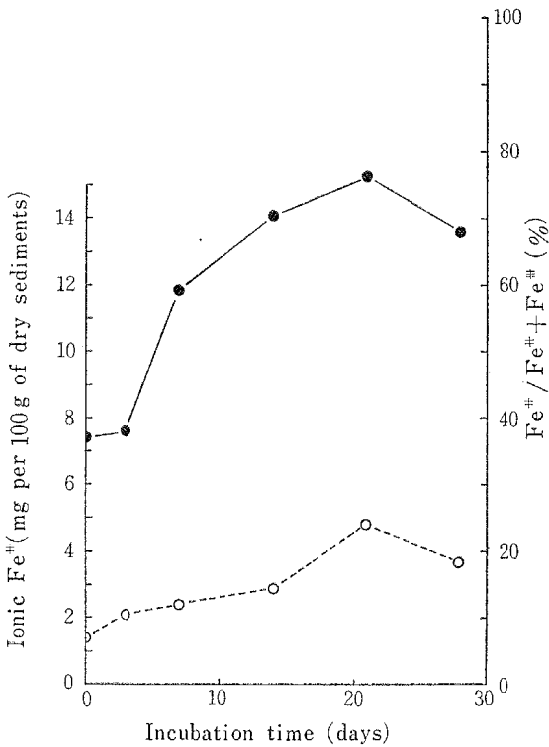


Fig. 10. Changes of ionic Fe<sup>2+</sup> concentration and Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup> in sample A. ...○... : ionic Fe<sup>2+</sup> ; —●— : Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>.

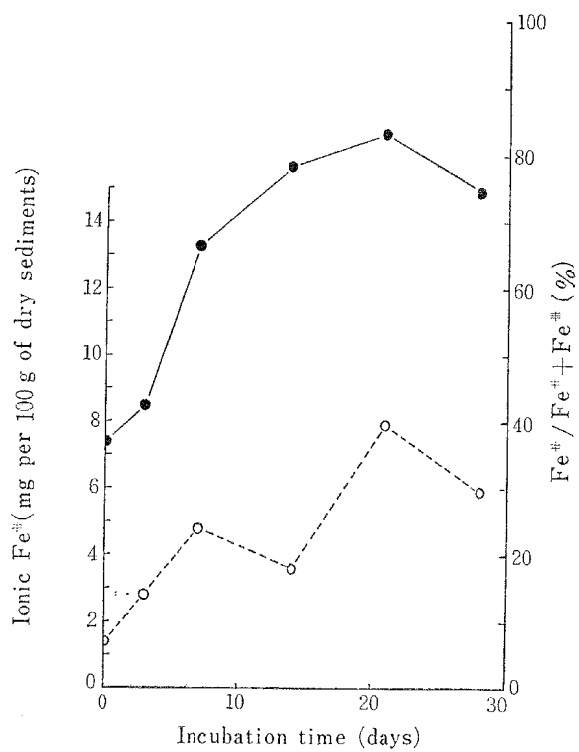


Fig. 11. Changes of ionic Fe<sup>2+</sup> concentration and Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup> in sample B. ...○... : ionic Fe<sup>2+</sup> ; —●— : Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>.

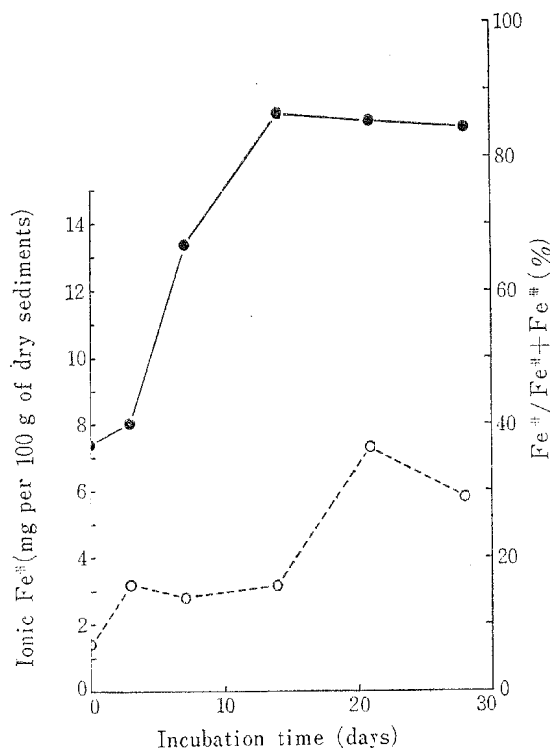


Fig. 12. Changes of ionic Fe<sup>2+</sup> concentration and Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup> in sample C.  
 ...○... : ionic Fe<sup>2+</sup>; —●— : Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>.

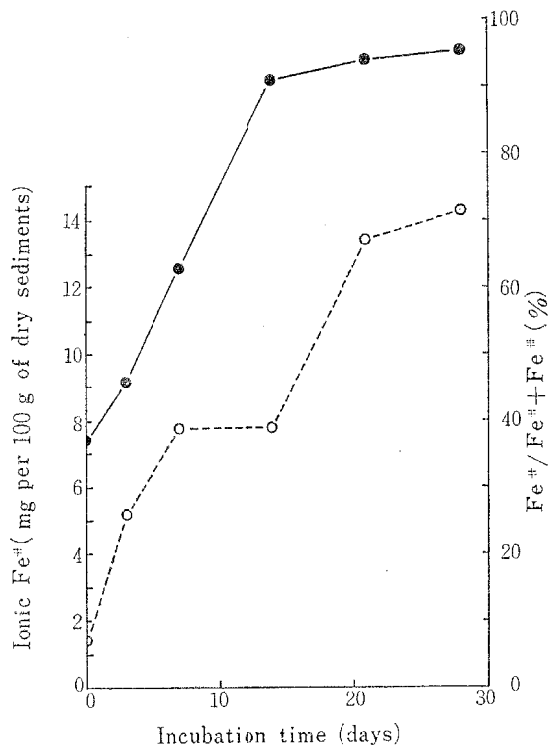


Fig. 13. Changes of ionic Fe<sup>2+</sup> concentration and Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup> in sample D.  
 ...○... : ionic Fe<sup>2+</sup>; —●— : Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>.

## 論

## 議

上の実験で示された物質代謝が自然環境下でのそれをどの程度再現しているかはわからないが、関係する因子が比較的簡単であることは別として、その方向は自然状態におけるものと、それほどかけはなれてはいないと思われる。そして、換水された条件下の試料 C は、堆積物と水との間にたえず物質交換が行なわれている天然環境にもっとも近づくる目的でつくられたものであるが、この試料での物質変化が他の試料のものとは基本的には大差がなかったことから、これらのどの試料においても、そこにみられる代謝過程は自然環境でのものに本質的にはかなり近いと考えられる。

これらの代謝過程については、さらに詳細な実験結果にもとづいて後報でくわしく解析するが、ここでは一応その概略を検討したい。

どの試料においても Eh は実験開始直後から急激に降下しはじめたが、初期におけるこの Eh 降下は硫酸塩還元細菌の増殖および硫化物の生成よりはかなり先行し、好気性細菌の活発な増殖と密接に相関している。これは既報<sup>9)</sup>の培養実験の結果と同様であって、堆積物中における還元状態の発達はず好気性細菌のさかんな増殖、活動によっていちじるしく進行することを示している。また第 2 鉄の還元およびイオン状 2 価鉄の増加も初期からさかんであり、Eh 降下および好気性細菌増殖の傾向とよく対応する。これは、第 2 鉄還元の少なくともかなりの部分が好気性細菌の還元作用によって行なわれることを意味する。すなわち、BROMFIELD<sup>13) 14)</sup>の述べているように、第 2 鉄はある種の細菌によって呼吸の電子受容体として利用されるからである。また pH の低下も初期からさかんにみられるが、好気性細菌による有機物分解の結果、酸



が生成されることを示すものであろう。

以上のように実験開始後はじめの数日間に、好気性細菌の活発な増殖によって環境 Eh が急激に降下し、第2鉄の還元、および有機物分解による pH 低下が明瞭にみられるが、硫酸塩還元細菌の増殖および硫化物の生成はまだはなはだ低調である。初期数日間のこの過程を第1段階と考える。

つぎに、実験開始後数日ないし10日ぐらいの間に、好気性細菌の増殖は最高に達し、Eh の降下、pH の低下および第2鉄の還元はいちじるしく進行する。このようにして嫌気の状態がつくられた後、硫酸塩還元細菌の増殖ははじめて活発となる。しかし、硫化物の生成はまだ、それほどさかんでない。以上嫌気状態の発達にともない硫酸塩還元細菌が活発に増殖しはじめる過程を第2段階と考える。

硫酸塩還元細菌はさかんに増殖し、やがて実験開始後10日ないし2週間ぐらいで好気性細菌数を上まわる最高値に達する。この間に Eh の降下、鉄の還元もほぼ完了する。これらの変化の一部は硫酸塩還元細菌の活動に帰せられよう。しかし、硫化物の生成量はこの時期にもまだ十分大きくないから、Eh の降下、鉄の還元は主として好気性細菌（通性嫌気性細菌をふくむ）の活動によってほぼ完成され、偏性嫌気性細菌である硫酸塩還元細菌の活動はこれを増強し持続するのにあずかっていると考えるべきであろう<sup>8)</sup>。pH はこの間にいったん最低値に下った後、ふたたび上昇する。この上昇は生成された有機酸が硫酸塩還元細菌によって利用されることと関連があると思われる。以上の硫酸塩還元細菌の最高発育期を過程の第3段階とする。

実験開始後2週間ぐらい以降では、前期に最高発育をとげた硫酸塩還元細菌がきわめて顕著な活性をあらわし、硫化物集積量は飛躍的に増大する。おそらく他の嫌気性細菌の活動もこの時期に最高に達すると思われる。これを過程の第4段階と考える。

以上に示した海底堆積物中における還元状態発達の段階は、高井ら<sup>15)</sup>が水田土壌においてみたものと本質的に異なるものではない（ガス代謝においてかなり相違することがわかったが、このことについては後報する）。しかし水田土壌の場合にくらべて、本実験の条件下では硫酸塩還元細菌数も硫化物集積量もともにいちじるしく大きかったことは、海底堆積物の還元状態発達過程における硫化物生成段階の占める位置の重大さを示すものと思われる。また水田土壌の場合には湛水直後より pH がいちじるしく上昇しているが、本実験の場合には、はじめ明瞭に降下して、いったん最低値に達した後ふたたび上昇した。このちがいの理由は不明であるが、有機酸代謝の検索によってある程度解明できるかもしれない。

以上のように、この実験で示された物質代謝の方向にはどの試料の場合でも大差がなかったが、その速度と程度には試料間にかんがいのちがいが認められた。すなわち、有機物を加えた試料では、これを加えないものにくらべて微生物の発育および物質変化の速度と過程が明らかに大きく、また一般に閉鎖された嫌気的条件下、および高温におけるほどこれらの速度と程度が大きかった。これらのことは、還元状態発達にあずかる物質代謝が一般に高い有機物含有量、厳しい嫌気の状態、および高温において著しく促進されることを示すものである。さらにまた、以上の結果は基本泥として用いた風乾細土中に可利用有機物がある程度ふくまれてはいるが、その量は比較的少ないので、あとから添加される有機物の影響が結果に十分反映されること、および密栓して全く閉鎖された環境下でも、底土（堆積物）と水との割合がこの程度（乾土12g：水100ml）であれば、基質の欠乏や生産物の蓄積の程度は正常な代謝をさまたげるほど重大でないことを示すものといえよう。

したがって、条件が規制されやすく、均一な試料が得られやすく、短期間に物質変化の特徴が強くあらわれるなどの点から、この種の代謝の検索には試料Dのように注射筒（あるいは大型試験管）内に密栓して保温する方法がよいと思われる。

## 摘 要

1. 風乾された海底細土に海水を加え、実験室内で異なった条件下（有機物含有量、換水状態、保温条件）

に保ち、底土（堆積物）中における各種の微生物活動を比較検討した。

2. これらの実験条件下では、どの試料においても著るしい還元状態の発達がみられた。微生物活動、物質変化の方向には実験条件による相違がほとんどなかったが、その速度と程度は高い有機物含有量、厳しい嫌氣的条件および高い温度における方が大きかった。
3. 海底堆積物中における還元状態発達の過程は、つぎの4段階に区別された。
  - (1) 好気性細菌の活発な増殖と活動によって環境 Eh の急激な降下、第2鉄のさかんな還元および pH の低下がおこる。
  - (2) 好気性細菌（おそらく通性嫌気性細菌をふくむ）の最高発育にともない Eh 降下、第2鉄の還元は、いっそう活発となる。このような嫌氣的条件の発達後、硫酸塩還元細菌の増殖は顕著となる。
  - (3) 硫酸塩還元細菌は最高発育期に達し、Eh 降下、第2鉄の還元はほぼ完了するが、硫化物の生成量はまだ比較的小さい。
  - (4) 硫酸塩還元細菌のさかんな活動により、きわめて多量の硫化物が生成される。

おわりに、本研究をご指導いただいた京都大学木俣正夫教授、おなじく門田 元 教授に厚くお礼申し上げる。

## 文 献

- 1) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明, 1955: 日水会誌, **21**, 102—108.
- 2) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・三好英夫, 1957: 日水会誌, **22**, 701—707.
- 3) KIMATA, M., H. KADOTA, Y. HATA, and H. MIYOSHI, 1960: *Rec. Oceanogr. Works Japan*, Special No. 4, 53—54.
- 4) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明, 1955: 日水会誌, **21**, 109—112.  
———, 1955: ———, **21**, 113—118.
- 5) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦, 1955: 日水会誌, **21**, 229—234.  
———, 1955: ———, **21**, 235—239.
- 6) 畑 幸彦・三好英夫・門田 元・木俣正夫, 1959: 本報告, **8**, 135—145.
- 7) 畑 幸彦, 1960: 本報告, **9**, 329—345.  
———, 1960: ———, **9**, 347—362.  
———, 1960: ———, **9**, 363—375.  
———, 1960: ———, **10**, 79—87.
- 8) 畑 幸彦, 1960: 本報告, **10**, 57—77.
- 9) 小山忠四郎, 1958: “実験化学講座”, **14**, 地球化学, 丸善, 369—382.
- 10) 高井康雄, 1956: 土肥誌, **26**, 467—470
- 11) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫, 1951: 日水会誌, **17**, 115—121.
- 12) ST. LORANT, I., 1929: *Z. Physiol. Chem.*, **185**, 245.  
田宮信雄, 1958: 化学の領域, 増刊 **34**, 1—2.
- 13) BROMFIELD, S. M., 1954: *J. Soil Sci.*, **5**, 129.
- 14) BROMFIELD, S. M., 1954: *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 1.
- 15) 高井康雄・小山忠四郎・加村崇雄, 1955: 日農化, **29**, 967—972.  
———, 1957: ———, **31**, 211—215.  
———, 1957: ———, **31**, 215—220.