

沿岸海域の底土堆積物中における硫化物の生成*

畑 幸 彦

Microbial Production of Sulfides in
Marine and Estuarine Sediments

By
Yoshihiko HATA

In the bottom sediments of coastal and estuarine regions of the sea, hydrogen sulfide and metallic sulfides are often found in abnormally high concentrations. It is well known that such sulfides cause serious damages to the animals and plants inhabiting these environments. It is generally believed that the sulfides occurring in the sea result chiefly from the microbial reduction of sulfate in sea water, though a part of them may be produced by the microbial decomposition of some albuminous compounds.

In the former papers the writer and his co-workers have discussed the various environmental conditions affecting the distribution and sulfide-producing activity of sulfate-reducing bacteria, on the basis of the data of ecological observations conducted in several coastal and estuarine regions. In these papers they have also dealt in detail with the influences of various factors on the growth and activity of the pure cultures of sulfate reducers isolated from such regions. The data obtained from the ecological survey, however, seem to show only a limited profile of the processes of the changes which are taking place in nature, and the results obtained by the pure culture studies are presumed not always to explain the behavior of these microorganisms in complicated natural environments.

Accordingly, to investigate more details of the mechanism of sulfide production in the sediments the writer attempted in the present study to carry out the experiments on the physiological activities of sulfate reducers, in relation to the activities of other microorganisms, in the sediment samples under artificially controlled conditions.

A brief of the methods employed in these experiments is as follows:

The bottom mud obtained at Shimonoseki fishing harbor was air-dried and pulverized fine enough to pass through a 20 mesh sieve. Twelve grams of this air-dried mud was added with 100 ml of sea water and various supplements such as organic matters or metallic compounds and then incubated at 30°C (except in an experiment on the effect of temperature) in the dark under anaerobic condition, using a large injector or test tube having about 110 ml capacity. These sediment samples were inoculated prior to incubation with small amounts of the sediments which were freshly taken from the Shimonoseki coasts. At suitable intervals the amount of

* 水産大学校研究業績 第457号, 1965年7月26日受理
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 457
Received Jul. 26, 1965

sulfides and the population of sulfate-reducing bacteria in these sediment samples were determined. *Eh*, pH, the amounts of acid soluble ferrous and ferric irons, ionic ferrous iron (ferrous iron which was directly detectable without acid treatment), organic acids and gases, and the numbers of general aerobes and anaerobes were also determined at the same time. For the enumeration of bacterial cells the media having the compositions given in table 1 were employed.

1. The participation of microbes in the development of reducing conditions in bottom sediments

With the aim of elucidating the mechanism of the participation of microorganisms in the development of reducing conditions in bottom sediments, the various microbial activities were investigated in the sediment samples supplemented with cellulose powder (300 meshes) and minced fish meat (a house-mackerel) in concentration of 1% each in the dry materials.

The results obtained are shown in figures 1 to 6, and the following steps were distinguished in the course of microbial processes which were taking place in the sediments:

- (1) At the early stage of the incubation occurs the vigorous growth of aerobes which is accompanied with the rapid consumption of oxygen and prompt fall in *Eh*. The reduction of ferric iron also takes place at this stage.
- (2) At the second stage the population of aerobes including facultative anaerobes reach the maximum level. The drop in *Eh* and pH, and the reduction of ferric iron are increasingly accelerated, and the decomposition of organic matter results in the formation of organic acids and carbon dioxide. At this stage sulfate reducers begin to grow vigorously; the growth of sulfate reducers commences after the establishment of anaerobic conditions which are created chiefly by the activity of aerobes.
- (3) At the next stage the fall of *Eh* and the reduction of ferric iron cease almost completely and the anaerobic decomposition of organic matter flourishes. Despite reaching the maximum growth period of sulfate reducers, the sulfide production is not so vigorous at this stage.
- (4) At the final stage obligate anaerobes including sulfate reducers exhibit intense activity and sulfides are accumulated in very high concentrations. The active metabolism of organic acids and that of gases proceed, and the decrease of carbon dioxide is followed by methane formation at the final period.

2. Influence of temperature on sulfide production in bottom sediments

Air-dried materials of marine bottom mud added with organic matters (cellulose powder and minced fish meat in 1% each) and sea water were incubated at 15, 22 and 30°C under anaerobic conditions, and the growth and metabolism of microorganisms in them were traced. The results obtained are illustrated in figures 7 to 11 and may be summarized as follows:

- (1) The growth of microorganisms and the fall in *Eh* and pH, the reduction of ferric iron, and sulfide production were accelerated by the raising of temperature, in the range from 15 to 30°C.
- (2) The development of sulfate reducers and sulfide production were more remarkably affected by temperature, as compared with other microbial activities.

3. Influence of salinity on sulfide production in bottom sediments

Air-dried materials of marine bottom mud and paddy soil were mixed in equal volume and were enriched with organic matters (cellulose powder and minced fish meat in 1 % each). This mixture was added with sea water having the full, the half or a tenth strength as given in table 2, and the sulfide production and other physiological activities of microorganisms in them were investigated during the incubation at 30°C under anaerobic condition.

The results obtained are illustrated in figures 12 to 23, and may be summarized as follows:

- (1) The growth of microorganisms, especially of sulfate reducers, was markedly affected by the strength of sea water, in the case of anyone of marine types and fresh-water types. However, the total population of them including both types was almost similar regardless of the salinity of water.
- (2) The amount of sulfides accumulated was hardly influenced by the salinity of water, though the greater the salinity of water the greater the rate of sulfide production at the earlier stages.

From these results it seems that in estuarine regions the total population of sulfate reducers is not limited by the salinity of water, or the sulfide production is hardly suppressed by the salinity, at least within the range of the full to a tenth strength of normal sea water.

- (3) The formation of acetic acid, carbon dioxide and methane was prompted by reducing the salinity of water, while the patterns of the fall in *Eh* and pH and the reduction of ferric iron hardly varied with the salinity.

4. Influence of quality of added organic matters on sulfide production in bottom sediments

The sulfide production and other microbial activities in the sediment samples which were added either with cellulose powder or with minced fish meat in concentration of 2 % in the dry materials, were traced during the incubation at 30°C under anaerobic condition.

The results obtained are given in figures 25 to 33, and may be summarized as follows:

- (1) By the addition of fish meat the growth and sulfide-producing activity of sulfate reducers were markedly accelerated in the earlier period of incubation. By the addition of fish meat the growth and sulfide-producing activity of sulfate reducers were markedly accelerated in the earlier period of incubation. By the addition of cellulose powder, on the other hand, their growth and activity were retarded in the earlier period but were remarkably activated in the later period.

These results may prove the difference between these organic substances in the decomposability or availability, and suggest that not only easily decomposable organic matter but also some refractory substances such as cellulose may play important roles in the sulfide production in natural bottom sediments.

- (2) No significant difference between these samples in the lowering of *Eh* and the reduction of ferric iron was observed. However, there was considerable difference between them in the metabolism of organic acids and gases; with the addition of cellulose the accumulation of some acids and carbon dioxide was accelerated after the middle period of incubation, whereas

with the addition of fish meat the production of some acids seemed to be active in a relatively earlier period.

These results may reflect the difference between these organic matters in the rate of decomposition.

5. Influence of organic contents on sulfide production in bottom sediments

Air-dried materials of marine mud were added with cellulose powder and/or minced fish meat in different concentrations as shown in table 3, and with sea water. These sediment samples were incubated at 30°C under anaerobic condition, and the sulfide production and other microbial activities in them were traced.

The results obtained are given in figures 34 to 40, and may be summarized as follows:

- (1) The growth of aerobes accompanied with the fall in Eh and pH was somewhat promoted by the increase of organic contents.
- (2) The growth of sulfate reducers and sulfide production were strikingly stimulated by raising the contents of organic matter, not only with fish meat, but also with cellulose.

These results suggest that in marine and estuarine sediments the sulfide production may be limited primarily by the supply of available organic matter for sulfate reducers, and the organic substances utilized by these bacteria may be relatively easily provided even by some refractory substances such as cellulose brought on the sediments, through the action of a variety of organisms co-existent.

6. Influence of iron and manganese on sulfide production in bottom sediments

The sulfide production and other microbial activities in the sediment samples added with iron and manganese in various concentrations (as given in table 4) together with organic matters were investigated during the course of incubation at 30°C under anaerobic condition. In this experiment a fine mud (No. 1) having a composition of particle size as shown in table 5 was employed as the basal mud.

The results obtained are given in figures 41 to 60, and may be summarized as follows:

- (1) Although the growth of sulfate reducers was not practically affected by the concentration of manganese nor of iron, the sulfide production was remarkably inhibited by the increase of manganese contents, but not by iron contents.
- (2) The fall in Eh and pH, and the reduction of ferric iron were retarded by manganese to some extent.
- (3) Free hydrogen sulfide was not detected in the bottom sediments nor in the overlying water.

7. Influence of particle size on the sulfide production in bottom sediments

A coarse mud (No. 2) having a composition of particle size as shown in table 6 was added with iron in different concentrations, as given in table 5, and with organic matter (cellulose

powder and minced fish meat in 1 % each) and sea water.

Sulfide production and other microbial activities were traced in these sediment samples during the course of incubation at 30°C under anaerobic condition. The results obtained are illustrated in figures 61 to 67.

The influence of particle size on sulfide production and the liberation of free hydrogen sulfide was discussed in connection with the iron contents, by comparing the results obtained this experiment with those in the preceding section. The results may be summarized as in follows:

(1) No appreciable difference between fine and coarse particles was noticed in the growth and activity of sulfate reducers as well as of general aerobes.

This result indicates that the low population and activity of microorganisms which are generally found in coarse particles of sediments in nature may be due principally to the lack of available organic substances, and that if a large amount of organic matter is brought onto the bottom the physiological activities of microbes may be strikingly stimulated even in the coarse particles of sediments.

(2) In the case of coarse particles, the accumulation of sulfides in bottom sediments was accelerated by the increase in iron contents, and the liberation of free hydrogen sulfide into overlying water was heavily suppressed by raising iron contents. In the case of fine particles, on the other hand, no significant influence of iron contents was observed in the sulfide accumulation in sediments, and the liberation of free hydrogen sulfide did not occur.

These results suggest that the particle size of sediments may be a very important factor for sulfide production or accumulation and the liberation of free hydrogen sulfide in natural environments.

沿岸海域あるいは河口水域の底土堆積物中には、しばしば多量の硫化水素および硫化物が生成され、これらが直接または間接に水生生物に甚大な被害を与えることがある¹⁾。海域における硫化物の生成は、一部はシスチンなど有機イオウ化合物の微生物による分解にもとづくと思われる²⁾が、大部分は硫酸還元菌の硫酸塩還元作用によると信じられている³⁾。

著者は協同研究者とともに、沿岸海域および河口水域において生態学的調査を行ない、これらの水域の底土堆積物中における硫酸還元菌の分布および硫化物生産活性を支配する環境諸要因について解析する^{4)~6)}とともに、このような水域から硫酸還元菌を純粋分離して、培養実験によりこの細菌の増殖および活性におよぼす各種要因の影響を明らかにした^{7)~14)}。

しかし現地における調査の結果は、絶えまなく進行する変化過程の一断面をあらわすにすぎず、一方、培養実験の成績は複雑な自然環境下の生態をかならずしも反映していないと思われる。そこで両者の中間段階として、底土堆積物モデルを実験室内に組み立て、天然の堆積物中における微生物活動を、規制された条件下で再現させようと試み、その結果を予備的に報告した¹⁵⁾。

本報では、このような堆積物モデル中における微生物の増殖と代謝を、硫化物の生産、集積を中心として追跡し、既報の現地調査および培養実験の結果と総合して、沿岸海域の底土堆積物中における硫化物の生成機構について検討した結果を述べる。

実験の一般的方法

既報¹⁵⁾の結果にもとづき、風乾された海底細土を大型試験管または大型注射筒内にとり、水を加え混和し、密栓して各種条件下に incubate した。この底堆積物中における *Eh* および pH の変化、第2鉄の還元、イオン状2価鉄の消長、硫化物の生成、硫化水素の遊離、有機酸およびガスの消長、および微生物（一般好気性菌、一般嫌気性菌、硫酸還元菌）の増殖を追跡した。その方法は下のとおりである。

1. 底土堆積物モデルの組み立て：風乾細土（2に示す）を大型試験管または先端を軸と直角に切断した大型注射筒内にとり、水を加えて混和後、ゴム栓で密栓し、立てて incubate した。すなわち、*Eh*, pH, 鉄, 硫化物, 有機物, 有機酸および細菌数の測定用には、30×300 mm 試験管に細土 12 g を添加物とともに秤りこみ、ガラス棒でよく混和しながら海水約 100 ml を加え、気泡を除き懸濁物を沈降させるため約 10 分間放置し、空気を残さぬようゴム栓で密栓した。炭酸ガス測定用には 50 ml 注射筒に細土 12 g と海水約 100 ml を入れ、上と同様に密栓した。加えた海水は、正常沿岸海域の約 2 m 層から新たに採ったものである。incubation は、温度試験以外はすべて 30°C で行なった。このような試料を同一系列について多数調製しておき、4～6 週間にわたり適当間隔でとり出し、1回の試験ごとに1試料の全部を供試した。

2. 風乾細土の調製：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、室内で風乾後、指で塊をつぶし 20 メッシュのフルイを通して細土を得た。塩分濃度の試験には、このほかに水田土壌を同様に処理したものを併用し、また土壌粒径の試験には下関市吉見地先の海底砂質土を同様に処理して用いた。

3. 堆積物の接種：上の風乾細土のマイクロフロラは、処理過程中原土のそれとは変化していると思われるので、新たにとった沿岸底堆積物を実験のはじめに少量（風乾細土 1 g あたり約 0.001 g）接種混合した。また塩分濃度の試験には、海底堆積物と河川堆積物を等量混合して接種した。

4. *Eh* および pH の測定：*Eh* 測定には最初から白金電極を底堆積物層のほぼ中央にさし込んだまま incubate し、一つの試料について経時的に、電位差計を用いて測定した¹⁶⁾。pH は堆積物を2倍容の、炭酸ガスを含まない蒸留水に懸濁し、常法¹⁶⁾によりガラス電極 pH メーターで測定した。

5. 第2鉄還元量の測定：小山¹⁷⁾の方法に準じ、試料堆積物に 3N 硫酸を加え沸とう水中で1時間加熱し、浸出液中の Fe^{II} および浸出液にヒドロキシルアミンを加え Fe^{III} を還元して得た Fe^{II}+Fe^{III}を、それぞれ α , α' -dipyridyl 法で光电比色定量し、Fe^{II}/Fe^{II}+Fe^{III} を求めた。

6. イオン状2価鉄の定量：高井¹⁸⁾（小山¹⁷⁾にしたがいがい、 α , α' -dipyridyl と直接反応する鉄はイオン状2価鉄の状態にあると考え、試料堆積物にそのまま α , α' -dipyridyl 試薬を加えて発色させ、乾燥濾紙で濾過後、濾液を光电比色定量した。

7. 全硫化物および遊離硫化水素の定量：全硫化物量は富山¹⁹⁾の方法により試料を塩酸酸性下で水蒸気蒸留し、ST・LORANT 法²⁰⁾で光电比色定量した。遊離硫化水素量は、試料にアルゴンで 30°C で 30 分間通気し 10% 酢酸亜鉛溶液中に捕集し、上と同様に比色定量した。

8. 有機酸の定量：堆積物試料の全量（風乾物として 12 g）を 3,000 r.p.m. で 30 分間遠心して得られる上澄液、およびこの残渣を蒸留水約 20 ml で2回遠心洗浄した洗液を合わせ、塩酸酸性下で 24 時間エーテル抽出して有機酸の試料とした。これを MUELLER ら²¹⁾の方法にしたがいがい、シリカゲル・カラムクロマトグラフィーにより分析した。

9. ガスの定量：試料堆積物中の炭酸ガスは小山²²⁾の方法に準じ、水素で駆出して水酸化バリウム溶液に吸収させ、残りの水酸化バリウムを塩酸で滴定して定量した。しかし、原報にしたがいがい水素発生のために試料に亜鉛を加えて塩酸酸性とすると、試料中に混在する貝殻破片から炭酸ガスが発生するので、別に発生させた水素を、先端膨大部に多数の細孔をもつガラス管を通じて試料懸濁物中に導き、はげしく噴出させて炭酸ガスを駆出した。

その他のガスは小山²²⁾の方法にしたがって炭酸ガスで追出し、水酸化ナトリウム溶液をくぐらせてガスビュレットに捕集した。これを山根²³⁾の方法によって水銀封鎖下で VAN SLYKE マノメーターに導き、全容積および酸素、水素、メタンの各量を検圧法で測定し、残りを窒素とした。

10. 細菌数の測定：試料堆積物 5g を、100 ml 容三角フラスコ中の 45 ml 滅菌海水に懸濁させ、約 5 分間はげしく振とう分散させたのち、滅菌海水で 10 倍段階に順次希釈した。懸濁液の振とうにあたって、硫酸還元菌および一般嫌気性菌用の試料では、酸素との接触を防ぐためフラスコ内空気を無菌水素ガスで置換した。このような希釈試料を下の方法で第 1 表の各培地に接種し、30°C で培養、計数した。

なお、塩分濃度の影響の実験では海洋性および淡水性の両細菌数を別々に求めたが、後者のための希釈試料には上の滅菌海水のかわりに滅菌生理的食塩水を用いた。その他の実験では海洋性種のみを計数した。

1) 一般好気性菌：Medium 1 (海洋性種) または Medium 2 (淡水性種) を用いて平板混和計数した。

2) 一般嫌気性菌：9 ml の Medium 3 (海洋性種) に希釈試料 1 ml を接種し、変型 WEINBERG tube (内径 3 ~ 4 mm のガラス管に内容積 2 ml の標線を刻んだもの) 中で混和深層培養し、コロニーを計数した。

3) 硫酸還元菌：Medium 4 (海洋性種) または Medium 5 (淡水性種) を用い、最小希釈法により MPN を求めた。

Table 1. Compositions of media employed for the determination of bacterial number.

Medium 1 (for the population of marine types of aerobes; plate count method)	
Beef extract 1.0 g,	peptone 5.0 g, agar 15.0 g, aged sea water 1000 ml, pH 7.5
Medium 2 (for the population of fresh-water types of aerobes; plate count method)	
Beef extract 3.0 g,	peptone 5.0 g, agar 15.0 g, tap water 1000 ml, pH 7.2
Medium 3 (for the population of marine types of anaerobes; deep culture with a modified WEINBERG tube)	
Beef extract 1.0 g,	peptone 5.0 g, L-ascorbic acid 0.1 g, agar 15.0 g,
aged sea water 1000 ml,	pH 7.5
Medium 4 (for the MPN of marine types of sulfate reducers; minimum dilution method)	
Cc-lactate 3.5 g,	beef extract 1.0 g, peptone 2.0 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.2 g,
K ₂ HPO ₄ 0.2 g,	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.2 g, L-ascorbic acid 0.1 g, agar 3.0 g,
aged sea water 1000 ml,	pH 7.5
Medium 5 (for the MPN of fresh-water types of sulfate reducers; minimum dilution method)	
Ca-lactate 3.5 g,	beef extract 1.0 g, peptone 2.0 g, Na ₂ SO ₄ 1.5 g,
MgSO ₄ · 7H ₂ O 2.0 g,	K ₂ HPO ₄ 0.5 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.2 g, L-ascorbic acid 0.1 g,
agar 3.0 g,	tap water 1000 ml, pH 7.5

実験および考察

I. 底土堆積物中における還元状態の発達過程

底土堆積物中における硫化物の生成は、全体としての還元状態発達の過程と密接に関連するから、硫化物の生成、集積の機構を明らかにするには、これを還元状態発達過程の一段階あるいは一面として把握しなけ

ればならない。そこでまず、底堆積物中における還元状態の全過程を明らかにし、硫化物生成段階がそのなかにおいて占める位置について検討した。

1. 実験方法および結果

風乾海底細土 No. 1* に粉末セルロース（東洋濾紙株式会社製，300メッシュ）およびアジ細刃肉（ホモジェナイザーで細切）を，おのおの1%の割合に加え，海水を満たし密閉して 30°C で incubate し，各種の微生物活動を追跡した。

結果を第1～6図に示すが，要点はつぎのとおりである。

1) Eh および pH: Eh は最初の +340 mV 付近から，実験開始とともに急激に低下しはじめた。 Eh 低下曲線は最初の約5日間がことに急激で，その後やや緩慢となり，約2週間後に終局電位 -250 mV 付近に達した。pH は最初の 7.8 付近から3日目ごろに低下しはじめ，10日後に最低値 7.0 付近となったが，4週間後にはふたたび上昇して最初の値に近づいた。

2) 細菌数: 一般好性菌は最初から急激に増殖して1週間後には最高数 $10^9/g$ となったが，その後いくぶん減少した。一般嫌気性菌数の増加は好気性菌のそれより多少おくれ，菌数は常にその $1/2$ 程度であった。硫酸還元菌の増殖は，これら2者よりかなりおくれではじまったが，2週間前後にはこれらを上まわる最高数に達した。

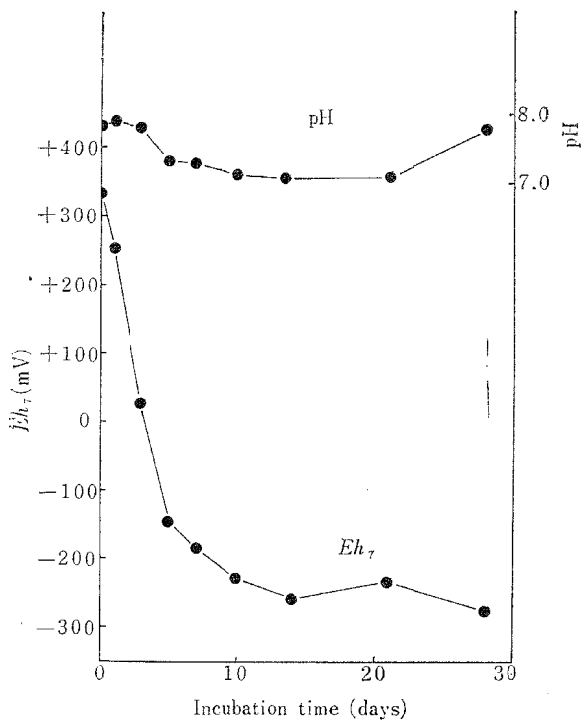


Fig. 1. Changes in Eh and pH of sediment.

3) 硫化物: 硫化物の生成は5日目より認められ，その後ほぼ直線的に増加し，4週間後にもなお増大傾向にあった。すなわち，硫化物生産は硫酸還元菌の増殖よりおくれながら，ほぼこれに付随することを示す。

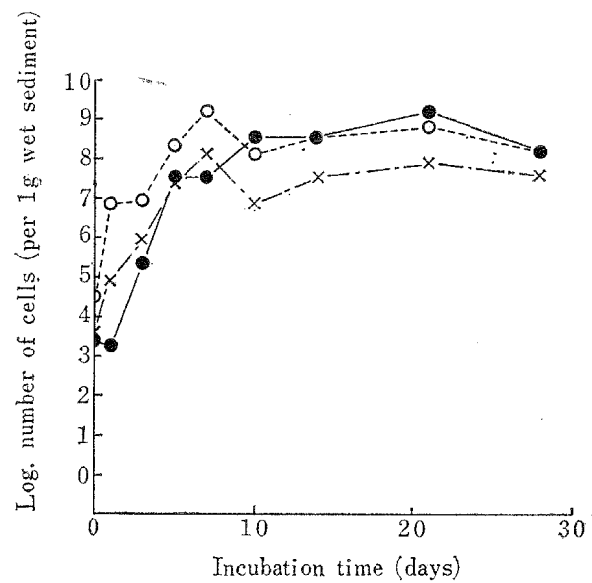


Fig. 2. Growth of bacteria in sediment.

—●—: sulfate reducers;
—○—: aerobes;
—×—: anaerobes.

* 下関漁港より採取された底土で，実験 VII を除くすべての実験にはこれを基本細土として用いた。

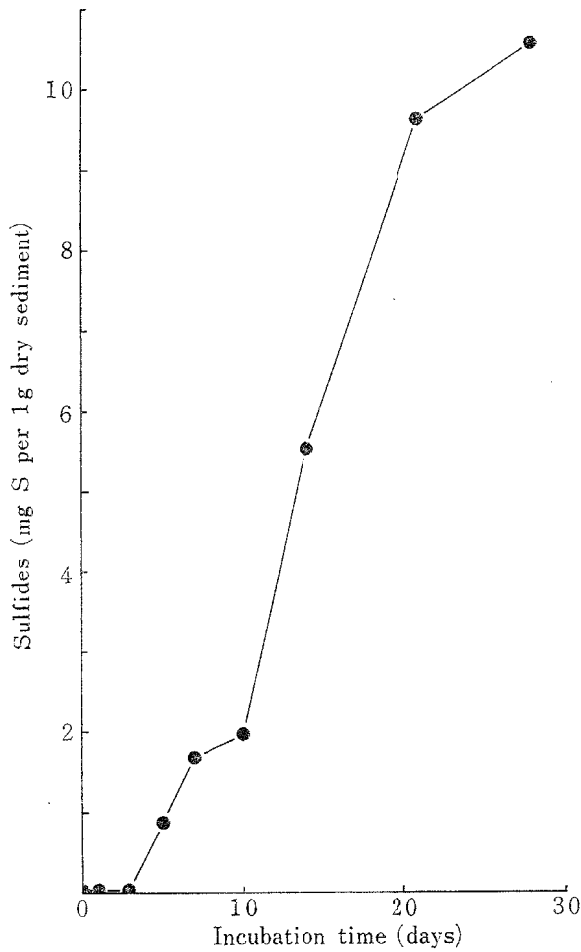


Fig. 3. Production of sulfides in sediment.

4) 第2鉄の還元およびイオン状2価鉄: 第2鉄還元は当初から急激で、1週間後には還元量 ($Fe^{II}/Fe^{II}+Fe^{III}$) 60%付近の最大値に達した。この模様は *Eh* 降下および好気性菌増殖の曲線と密接に対応し、硫化物生成曲線よりかなり先行した。また、イオン状2価鉄の生成は第2鉄還元よりおくれたが、その後急激に増加した。1週間後に最大値に達したのち、ふたたび急激に減少したが、この減少は硫化物生成と関連するようみえる。

5) 有機酸: 当初には酢酸およびピルビン酸が比較的多く、ギ酸、乳酸も存在した。ただちに増加するものはなかったが、酢酸は3日ごろより、ピルビン酸ははじめ減少して1週間ごろより、それぞれ活発に集積した。ギ酸と乳酸は一旦減少し

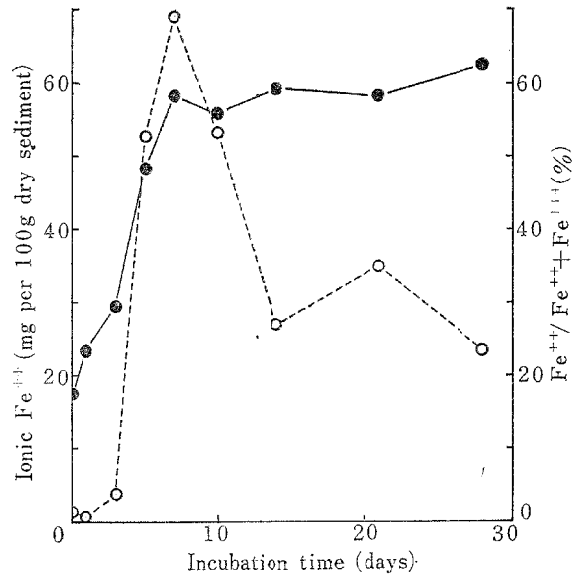


Fig. 4. Changes in ionic Fe^{2+} concentration and $Fe^{2+} / Fe^{2+}+Fe^{3+}$
 ---○---: ionic Fe^{2+} ;
 —●—: $Fe^{2+} / Fe^{2+}+Fe^{3+}$.

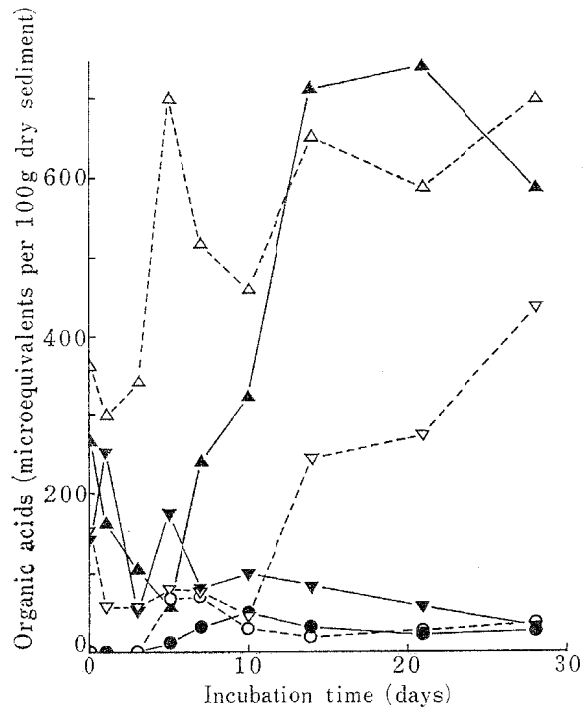


Fig. 5. Changes in the amounts of organic acids in sediment.
 ---○---: butyric; —●—: propionic;
 ---△---: acetic; —▲—: pyruvic;
 ---▽---: formic; —▼—: lactic.

2週間ごろよりギ酸の集積がみられたが、乳酸は増加しなかった。ラク酸およびプロピオン酸は、5日ごろ少量の生成が認められた。

6) ガス：酸素はただちに減少して3日後には消失した。炭酸ガスは5日ごろより活発に集積して1週間後には最大量に達したが、のち急激に減少した。この減少にほぼ付随してメタンが生成した。窒素は当初から存在し、いくぶん増加した。水素の集積は全くみられなかった。

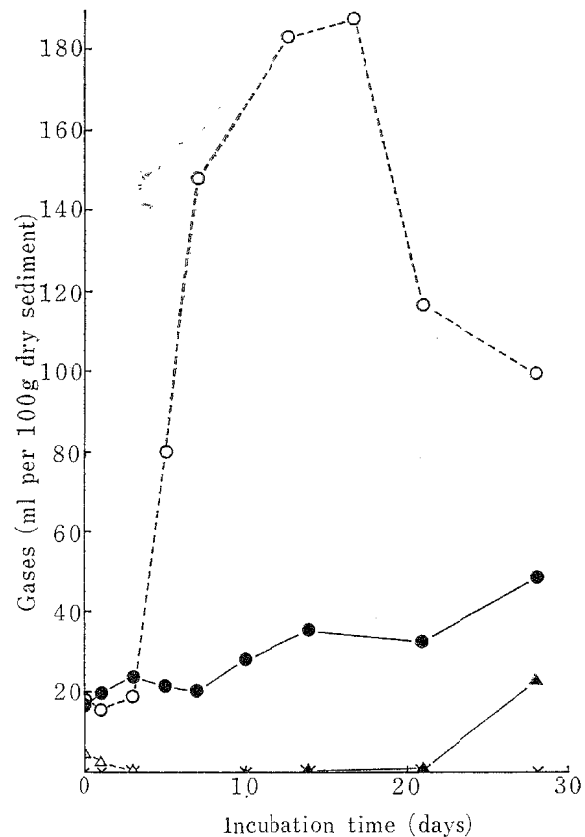


Fig. 6. Changes of gaseous components in sample.

—○—: CO₂; --△--: O₂; —●—: N₂;
—▲—: CH₄; —·—×—·—: H₂.

2. 考 察

以上の結果にもとづき、底土堆積物中における還元状態の発達過程を総合的に考察してみよう。

Eh は実験開始直後から急激に降下しはじめたが、当初におけるこの降下は硫酸還元菌の増殖および硫化物生成よりかなり先行し、好気性菌（通性嫌気性菌もおそらく含まれる*）の増殖および酸素の消失と密接に対応している。この事情は既報¹³⁾の培養実験におけるくわしい成績と同様であって、堆積物中における還元状態の発達はず先好気性菌の活発な増殖、活動によることを示している。第2鉄の還元も当初からさかんで、*Eh* 降下および好気性菌増殖の様態とよく対応するが、これは第2鉄還元の少なからぬ部分が好気性菌の還元作用によることを示すようにみえる。すなわち、BROMFIELD²⁴⁾が明らかにしたように、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得るからである。また、pH は初期にはほとんど変動しないが、有機酸、炭酸ガスなどの生成の低さにみられるとおり、この時期には有機物代謝が活発でなく、pH を支配する物質の動きが低調のためと思われる。

以上のように初期数日間（3日間ぐらい）には、好気性菌（通性嫌気性菌をふくめて）の活発な増殖と、これともなう酸素の消失、環境 *Eh* の急激な降下および第2鉄の還元がみられるが、硫酸還元菌など偏性

* ここで一応、平板計数で得られた菌数を好気性菌の総数とし、WEINBERG 管深層培養にあらわれた菌数を嫌気性菌の総数としたが、この両者には通性嫌気性菌がおそらくかなり存在し、これが両方の計数にあらわれたと考えられる。

嫌気性菌の増殖はまだ低調であり、有機物代謝および硫化物生成ははなはだ微弱である。このような、初期数日間における好気性菌の活発な増殖にともなう Eh 降下の過程を還元状態発達の第1段階と考える。

ついで実験開始後1週間ぐらいで、好気性菌の増殖は最高に適し Eh 降下および第2鉄還元は直線的に進行する。有機物代謝はしだいに活発となり、酢酸、炭酸ガスなど一部の metabolite の集積とこれに対応する pH の低下が明瞭である。このような還元状態発達にともない、硫酸還元菌など偏性嫌気性菌の増殖がさかんになるが、硫化物の集積はまだ低い。

すなわちこの期間は、好気性菌（および通性嫌気性菌）の最高増殖と活動により有機物代謝がさかんになり還元状態がいつそう進行する時期である。それにともない硫酸還元菌など偏性嫌気性菌の増殖はたかまるが、その活動はまだ十分でない。以上のような、好気性菌（および通性嫌気性菌）の活動にともなう還元状態の発達と、硫酸還元菌増殖の過程を第2段階と考える。

硫酸還元菌の増殖はますます旺盛になり、10日ないし2週間ぐらいで好気性菌を上まわる最高数となる。この間に Eh 降下と第2鉄還元が完了する。この Eh 降下には、既報¹⁰⁾ の培養実験の結果に示されるとおり、硫酸還元菌のはたらきも一部はあずかっていると思われるが、しかしこの時期には硫化物生成量はまだ十分大きくないことからみて、還元状態の発達は前期に最高増殖をとげた好気性菌（および通性嫌気性菌）の活動によりほぼ完成され、硫酸還元菌など偏性嫌気性菌の活動はこれを増強しあるいは維持するのに役立っていると考えらるべきであろう。第2鉄の還元が硫化物の大量集積以前にほぼ終了したことも、上述のようにこれが主として細菌の還元作用に帰せられるとみられ、還元状態発達過程における鉄化合物の電動能物質としての重大さを示すものといえよう。また前期に顕著な生成を示したイオン状2価鉄がこの時期に急激に減少したのは、一旦遊離された Fe^{2+} が硫化水素の生成にともない FeS として沈降したためであろう。

一方、有機物代謝についてみると、この時期には酢酸、ピルビン酸およびギ酸のさかんな集積と、ラク酸、プロピオン酸の少量の生成および乳酸の減少が認められる。前期よりさかんに生成された炭酸ガスはこの時期に最高に集積されるが、その他のガスは窒素をのぞいては全くみられない。このような微生物の混合系における有機酸代謝およびガス代謝ははなはだ錯雑しているので解析は困難であるが、少なくとも上のような metabolite の生産は、有機物の分解がすでに嫌氣的形式にうつっていることを示すものといえよう。ところで、海洋性硫酸還元菌の有機物代謝に関しては、既報⁹⁾ のようにこの細菌が増殖および硫化物生産反応に利用できるのは乳酸、ピルビン酸、ギ酸、アラニン（おそらくグリセリンも）であり、門田・三好²⁵⁾ の結果によると増殖には乳酸、ピルビン酸、アラニン（ときにはリンゴ酸、フマル酸、コハク酸も）が、また硫酸還元反応には乳酸、ピルビン酸、ギ酸およびアラニンが利用される。したがって、硫酸還元菌の増殖と硫化物生産活性は、これら乳酸、ピルビン酸、ギ酸など可利用有機酸の供給量に大きく依存すると思われる。上に示したように、この時期にはこれら可利用有機酸がすでに多量に存在することは、一応、その後続く高い硫化物生産活性を暗示するものといえよう。また、ガス代謝に関しては、炭酸ガスは硫酸還元菌をふくむ各種の微生物によって有機物の好氣的あるいは嫌氣的分解にともない生産されるので、これの大量集積は特定の代謝系の旺盛さをあらわすものではないが、しかしいづれにしても高い有機物分解活性の証拠である。窒素の増加は、嫌気性菌たる脱窒細菌の硝酸還元活性によると思われるが、これの分析法における精度の低さ（実験方法の項参照）からみてあまり確かでない。また、この時期にはメタンの生成がみられないことは、硫化物生産の状況とも考えあわせて、一般に偏性嫌気性菌の活動がまだ十分でないことを意味すると思われる。

結局、実験開始後1週間から2週間ぐらいの間は、前期に最高増殖をとげた通性嫌気性菌の主たる活動により有機物の分解が進む時期で、還元状態の発達はこの期に完了する。硫酸還元菌など偏性嫌気性菌はこの間に最高増殖をとげ、有機物代謝はしだいに嫌氣的型式に移るがその活性は十分でなく、硫化物の生成量も比較的低い。このような還元状態発達の完了と硫酸還元菌の最高増殖の過程を第3段階とする。

ついで2週間ぐらい以降では、 Eh は依然最低値を保つ。前期にすでに最高増殖をとげた硫酸還元菌が顕

著な活性をあらわし、硫化物集積量は直線的に増大する。酢酸、ピルビン酸、ギ酸の集積量が高く、嫌氣的有機物代謝の旺盛さがうかがわれる。一方、ガスについては前期に飛躍的に増加した炭酸ガスが急激に減少し、メタンの生成がこれにほぼ対応する。メタンの生成は偏性嫌気性菌であるメタン細菌によって営まれ、炭酸ガスが、水素供与体である有機酸（ギ酸、プロピオン酸、ラク酸など）、アルコール類、水素などの存在下で還元されて生ずる²⁶⁾が、酢酸の CH_3 基からの直接的な生成も知られている²⁷⁾。この場合のメタンがいずれを基質として生じたかは明らかでないが、上の有機酸およびガス代謝の成績は基質となり得る化合物がこの環境に十分存在することを示している。メタンが実験の最終期においてはじめて検出されたことは、メタン細菌が極度の偏性嫌気性菌であることから説明される。また、最終期において pH がふたたび上昇した理由は不明であるが、炭酸ガスの減少と関連するか、あるいは炭水化物の分解におくれる有機窒素化合物の分解によりアンモニアなど塩基性物質がもたらされたためであろう。

すなわち、最終期であるこの期間は、前期に最高増殖をとげた硫酸還元菌など偏性嫌気性菌が顕著な活性をあらわし、硫化物集積量の直線的な増大とメタンの集積などがみられ、有機物の嫌氣的代謝もいちじるしい。このような硫酸還元菌の最高活動期を第 4 段階と考える。

以上に示した海底堆積物における還元状態発達の過程は、高井ら²⁸⁾および山根²³⁾が明らかにした水田土壤におけるそれと本質的には異ならないが、つぎの点において特徴的である。

1) 海底堆積物では水素の集積が全くみられず、メタンも終期に少量生成されたにすぎないが、水田土壤ではこれらの活発な集積がみられており、また、小山²⁹⁾が行なった湖底泥土の incubation 実験でも、これらの生成がさかんであった。メタンについては後述(実験 III)のとおり、環境が淡水に近づくほどこの生成がさかんであることからみて、海洋環境ではメタン細菌の生育あるいは活性が微弱であると思われる。このことについては小山³⁰⁾もまた、高濃度の海塩によって土壤中のメタン生成がいちじるしく阻害されると述べている。水素は主として嫌気性菌によって、炭水化物あるいは有機酸（ギ酸、乳酸）などを基質として生産されることが知られている。この実験において、これら基質の存在にもかかわらず水素の集積がみられないのは、これに関与する細菌の活性の弱さによるというよりは、硫酸還元菌の高い水素消費活性にもりづくのではなかろうか。硫酸還元菌は既報⁹⁾のとおり、硫酸還元の際して分子状水素を水素供与体として利用できるものが多いから、水田環境にくらべて著しく高い硫酸還元菌の活性により、生産された水素がただちに消費される可能性が考えられる。ZOBELL³¹⁾ は、海底堆積物中では水素を生成する有機物分解や化学反応があるにもかかわらず一般に水素が存在しない理由の一部を、硫酸還元菌のこのような活性に帰している。

2) 水田土壤では実験開始後ただちに pH のいちじるしい上昇がみられるのに反して、海底堆積物では、はじめ明らかに降下し終期においてふたたび回復する。この相違の理由は不明であるが、海洋環境における高い無機イオン濃度や緩衝作用が関係するのではなかろうか。なお、OPPENHEIMER ら³²⁾ は、海底堆積物の反応が硫化水素および炭酸ガスの生成にもなって下降し、これらの消失によって上昇することをみて、天然における嫌氣的な堆積物が低い pH を示す原因の少なくとも一部は硫化水素および炭酸ガスの集積にあると述べている。

3) ほぼ同一条件下で行なわれた水田土壤の実験にくらべて、海底堆積物中での硫酸還元菌数と硫化物集積量がいちじるしく大きい。これは海洋環境の方が基質 SO_4^{--} の供給をはじめ、その他の条件において好都合のためであろう。このことは、海底堆積物の還元状態発達において硫化物生成過程の占める位置の重大さを示すと思われる。

3. 要 約

風乾された海底細土に有機物を加えて海水を満たし、これを密閉して 30°C で incubate し、底堆積物中における還元状態発達にあずかる微生物活動を各種の面から追跡した。その結果、海底堆積物中における還元状態の発達過程はつぎの 4 段階に区別されることをみた。

第 1 段階：好気性菌の活発な増殖ともない、酸素の消失、環境 Eh の急激な降下、第 2 鉄のさかんな還

元がみられる。

第2段階：好気性菌および通性嫌気性菌の最高増殖と活動にともない Eh 降下，第2鉄還元が進み有機物分解がしだいに盛んになる。このような嫌氣的条件の発達後，硫酸還元菌の増殖が顕著になる。

第3段階：通性嫌気性菌の活動により有機物の嫌氣的分解（有機酸とガスの生成）が顕著になり， Eh 降下，第2鉄還元が完了する。硫酸還元菌など偏性嫌気性菌は最高増殖をとげるが，硫化物の集積は十分高くはない。

第4段階：偏性嫌気性菌の活動期であって，硫酸還元菌の活動が最高にたかまり，きわめて多量の硫化物が集積される。メタン細菌によるメタンの生成も，この最終期に認められる。

II. 底土堆積物中における硫化物生成におよぼす温度の影響

さき⁷⁾に報告した培養実験において，海洋性硫酸還元菌の増殖にともなう硫化物の生産は $30\sim 35^\circ\text{C}$ において最もさかんに行なわれ，これらの温度を離れるにしたがって弱くなり， 15.5°C 以下および 45°C 以上では硫化物生成がほとんど停止することをみた。ここでは，海底堆積物中で他の微生物群と共存する場合，この細菌の増殖，硫化物生産活性およびその他の微生物代謝が温度によってどのような影響を受けるかを検討した。

1. 実験方法および結果

実験Iと同様に，風乾海底細土 No.1 に有機物（粉末セルロースと，アジ細切肉をおのおの1%）を加え海水を満たし，密閉して15，22 および 30°C の各温度で incubate した。各種の微生物代謝を経時的に追跡した結果は，第7～11図に示されるが，要点はつぎのとおりである。

1) Eh および pH: Eh 降下はどの温度でもただちにはじまったが，その速度は高温ほど急速であった。 30°C と 22°C では降下速度に大差がなく終局電位もほとんど等しかったが， 15°C でははなはだしく緩慢であった。pH は初期に低下したのち終期に上昇，回復したが，その速度と変動の程度は高温ほど大きかった。

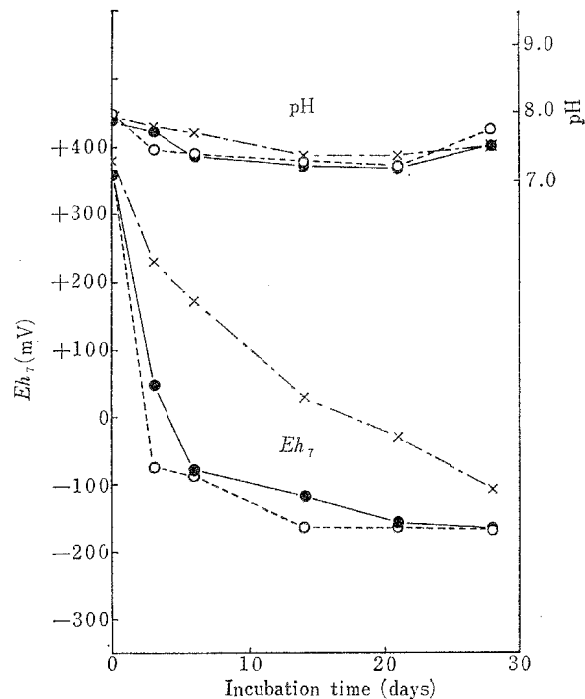


Fig. 7. Changes in Eh and pH of sediments at different temperatures.

—●—: 15°C ; —●—: 22°C ; --○--: 30°C .

2) 細菌数：好気性菌の増殖は高温におけるほど急速であったが、長時間後にはどの温度でもほぼ同じ最高数に達した。終期には、かえって高温ほど菌数が少なかったが、死滅速度が温度の影響を敏感に受けたためであろう。硫酸還元菌の増殖も高温ほどさかんであった。温度によるその差異は好気性菌の場合よりもいちじるしく、15°Cでの増殖はことに緩慢であった。

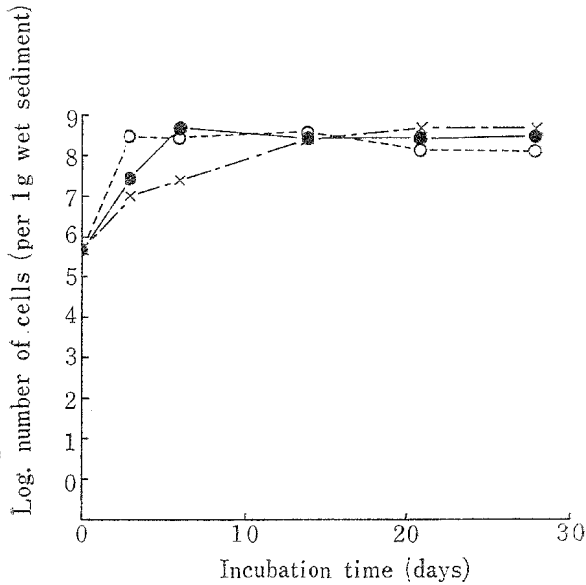


Fig. 8. Growth of aerobes in sediments at different temperatures.

—·—×—·—: 15°C; —●—: 22°C;
--○--: 30°C.

3) 第2鉄の還元：第2鉄の還元も高温ほど急激であったが、長時間後にはほとんど同程度の還元量に達した。

4) 硫化物：硫化物生産もまた、高温ほどさかんであり、この模様は硫酸還元菌の増殖曲線とよく対応し、15°Cのものがことに低調であった。

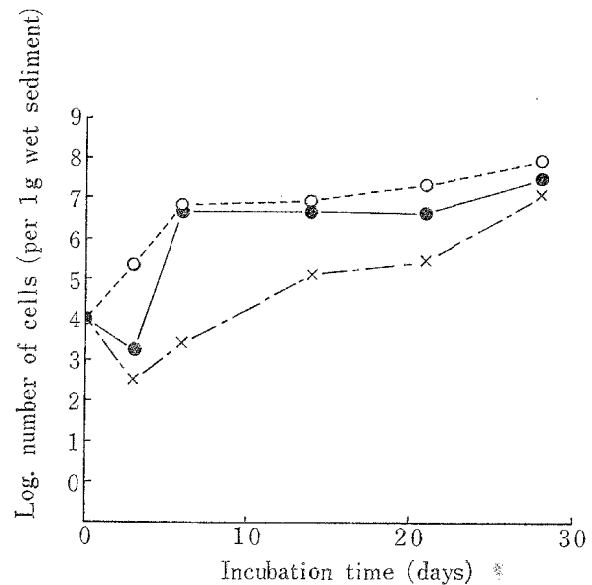


Fig. 9. Growth of sulfate reducers in sediments at different temperatures.

—·—×—·—: 15°C; —●—: 22°C;
--○--: 30°C.

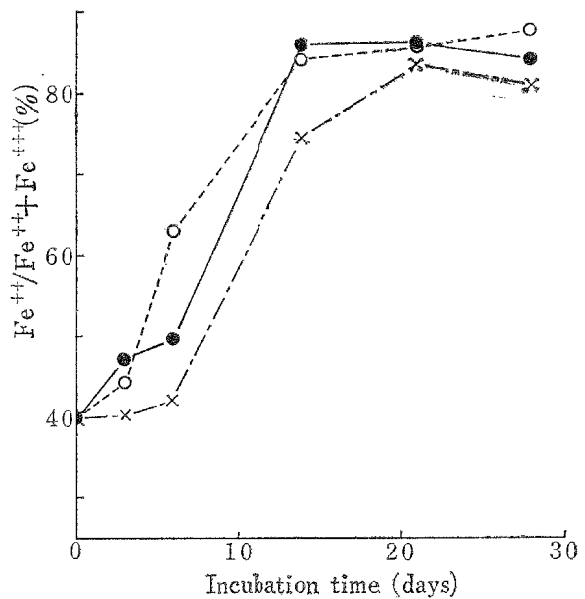


Fig. 10. Reduction of ferric iron in sediments at different temperatures.

—·—×—·—: 15°C; —●—: 22°C;
--○--: 30°C.

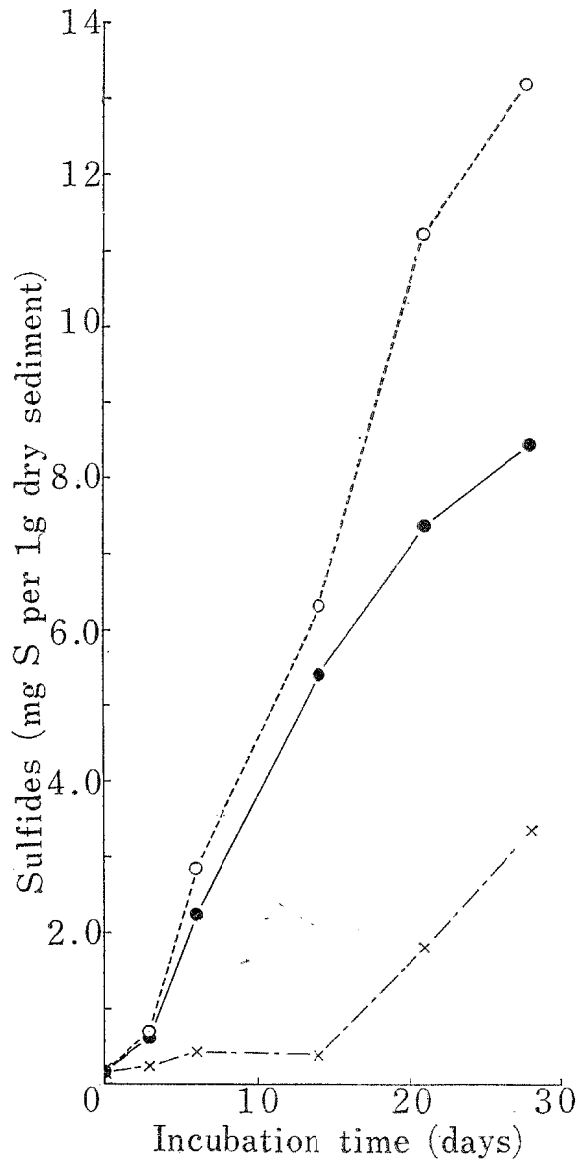


Fig. 11. Production of sulfides in sediments at different temperatures.

—•—x—•—: 15°C; —●—: 22°C; --○--: 30°C.

2. 考 察

上の結果を総合すると、海底堆積物中における微生物の増殖と代謝は温度によって大きな影響を受け、15～30°C の範囲では高温におけるほどそれらの速度と程度が大きかった。ことに硫酸還元菌の増殖速度は一般好気性菌のそれにくらべて温度の影響を敏感に受け、この細菌による硫化物集積にも、その影響がいつそう顕著にあらわれた。このことから、海底堆積物中における硫化物の生成は一般に高温ほどさかんで、季節的には夏季に、地形的には底土の温度が上昇しやすい浅海域において、とくにいちじるしいと考えられる。

上の実験結果では15°Cにおいても、その速度はおそいが、硫酸還元菌の増殖と硫化物生産が十分みられたことは、既報⁷⁾の培養実験において15.5°C以下では硫化物が生産されなかったという結果と矛盾するようにみえる。しかし、さきの培養実験では期間が1週間にすぎなかったことが、この差異を生じた理由ではなからうか。

一方、現地調査⁴⁾⁶⁾の結果においても、15°C以下の底温の時期にも、海底堆積物中に多数の硫酸還元菌と多量の硫化物がみ出された。現地調査の結果は変化する過程の時間的な一断面であって、そこにあらわれた値はそれ以前における過程の累積であるから、現地調査の結果が培養実験の結果と必ずしも一致しないことは、この意味からも理解できる。また一般に、適温付近の高温においては細菌の増殖速度が大きい反面、死滅速度もまた大きく、低温では増殖速度も死滅速度もともに小さいから、増殖と死滅の差としてあらわれる生菌数は、第8図にもみられるとおり、高温における方が必ずしも大きくはない。硫化物集積量についても同様であって、生成量と(酸化、逸散による)消失量との差をあらわすとみられる集積量が、低温の時期に極端に減少するとは思われない。おそらくこの理由から、天然環境における硫酸還元菌数や硫化物集積量にはさほど顕著な季節的変動はみられないようである。しかし、高温におけるほどこの細菌の増殖と硫化物生産の速度が大きいことは、たとえその時相における生存量や集積量に大差はなくても、回転のはやさの理由から、環境におよぼす作用は低温期にくらべていちじるしく大きいと推察される。

結局、硫酸還元菌の増殖速度と硫化物生産活性は、天然における通常の温度範囲内では高温におけるほど大きく、環境におよぼす影響もまた顕著であると考えられる。

3. 要 約

海底細土に有機物を加えて海水を満たし、15、22 および 30°C の各温度で incubate して、微生物の増殖および代謝におよぼす温度の影響を追跡した。その結果、微生物の増殖およびそれにとまらう *Eh* 降下、硫化物集積などは高温におけるほど大きく、ことに硫酸還元菌の増殖と硫化物生産活性は温度の影響を敏感に受けることが明らかになった。

Ⅲ. 底土堆積物中における硫化物生成におよぼす塩分濃度の影響

硫酸還元菌は、生育における塩分要求に関して、海洋性種(好塩性種)と淡水性種(非好塩性種)の少なくとも2群に分けられる。海洋性種の生育は2.5~3.0%付近に至適塩分濃度をもち^{7) 11)}、一方、淡水性種の生育はこれより遙かに低い濃度を至適条件とする。感潮河川の河口付近における生態学的調査⁹⁾の結果、硫酸還元菌のこれら2群の分布と活性が環境塩分濃度および塩類組成によってきわめて興味ある支配を受けていることが明らかになったが、現地におけるこれらの生態は培養実験^{7) 11) 14)}によるくわしい解析によって説明された。

ここに述べる実験は、天然環境における硫酸還元菌の生育と活性が、還元状態発達過程と関連して塩分濃度によりどのような影響を受けるかを、モデルを用いてさらにくわしく追跡したものである。

1. 実験方法および結果

風乾海底細土 No. 1 と風乾水田細土を等量混合し、有機物(粉末セルロースとアジ細切肉をおのおの1%)を加え、第2表に示すように海水、あるいはこれを蒸留水で2倍および10倍にうすめた希釈海水を満たし、密閉下に30°Cで incubate した。細菌の増殖および各種の微生物代謝を追跡した結果は第12~23図に示されるとおりで、要点はつぎのようである。

Table 2. Strengths of sea water employed for the preparation of sediment samples.

Sample A	: full strength (original sea water)
Sample B	: half strength (diluted with distilled water)
Sample C	: a tenth strength (diluted with distilled water)

1) *Eh* および pH: *Eh* の降下速度は高濃度海水ほどいくぶん大きかったが、大差はなかった。pH の変動は、どの試料でも大きくなかった。

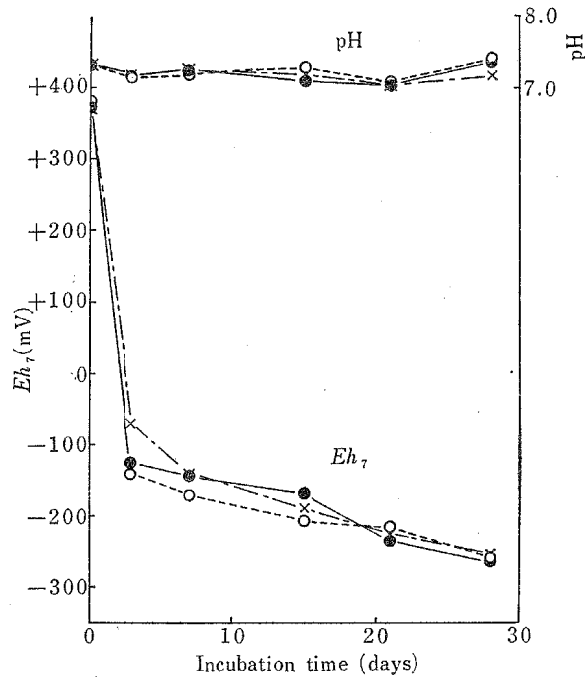


Fig. 12. Changes in Eh_7 and pH of sediments with the addition of water having different salinity.
 --○--: sample A; ●—: sample B;
 —·—×—·—: sample C.

2) 細菌数: 原海水 (A) では好気性菌, 硫酸還元菌ともに海洋性種の旺盛な増殖がみられ, 淡水性種の生育は緩慢であった。ことに淡水性硫酸還元菌の増殖は微弱であった。2倍希釈海水 (B) でも上と同様に,

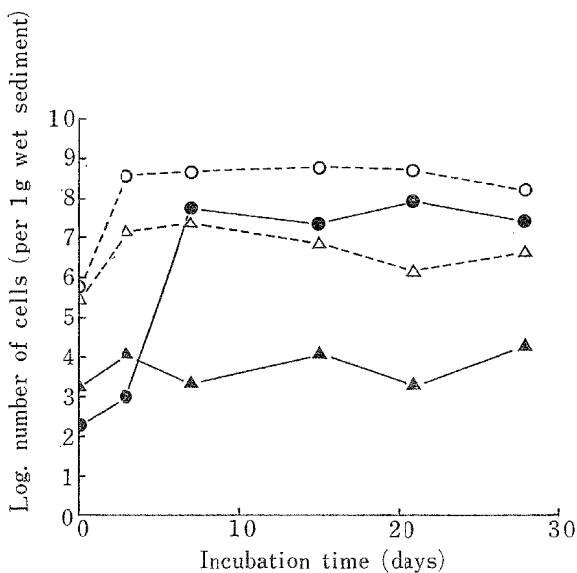


Fig. 13. Growth of bacteria in the sediment of sample A.
 --○--: marine aerobes;
 ●—: marine sulfate reducers;
 --△--: fresh-water aerobes;
 —▲—: fresh-water sulfate reducers.

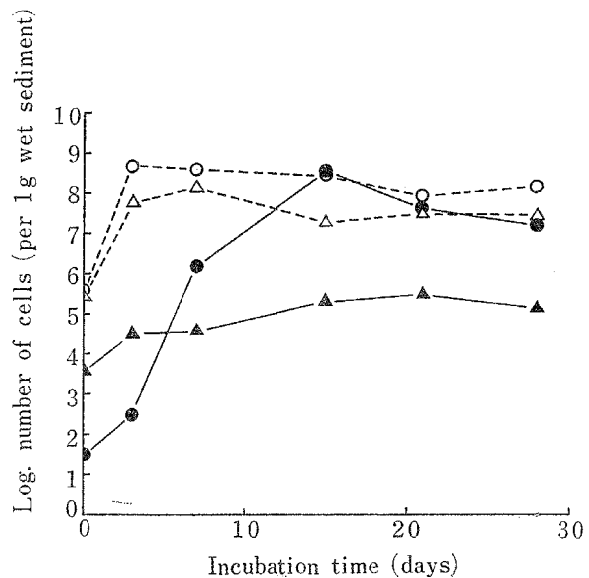


Fig. 14. Growth of bacteria in the sediment of sample B.
 --○--: marine aerobes;
 ●—: marine sulfate reducers;
 --△--: fresh-water aerobes;
 —▲—: fresh-water sulfate reducers.

好気性菌、硫酸還元菌ともに海洋性種のさかんな増殖と淡水性種の緩慢な増殖がみられ、硫酸還元菌では、ことに両菌種の差が顕著であった。この場合の海洋性種の増殖速度を上海水(A)の場合にくらべると、好気性菌の増殖には大差がなかったが、硫酸還元菌のそれは海水の場合よりかなり緩慢であった。

10倍希釈海水(C)の場合は、上の二者とは異なり、好気性菌は海洋性、淡水性両種ともそろって旺盛な増殖を示し、硫酸還元菌は淡水性種の増殖が、海洋性種のそれよりきわめて活発であった。この場合の淡水性硫酸還元菌の増殖は、海水(A)の場合の海洋性硫酸還元菌のそれより多少緩慢で、この模様は下の硫化物集積における差をうら書きするように見える。

結局、上のことから、好気性菌も硫酸還元菌もともに海水環境に近い条件におけるほど海洋性種が、また淡水環境に近づくほど淡水性種が、それぞれ活発に増殖し、この傾向は好気性菌よりも硫酸還元菌においてことに顕著であることがわかった。

3) 第2鉄の還元: どの海水濃度でもほぼ同様に第2鉄のさかんな還元が示されたが、初期には高濃度

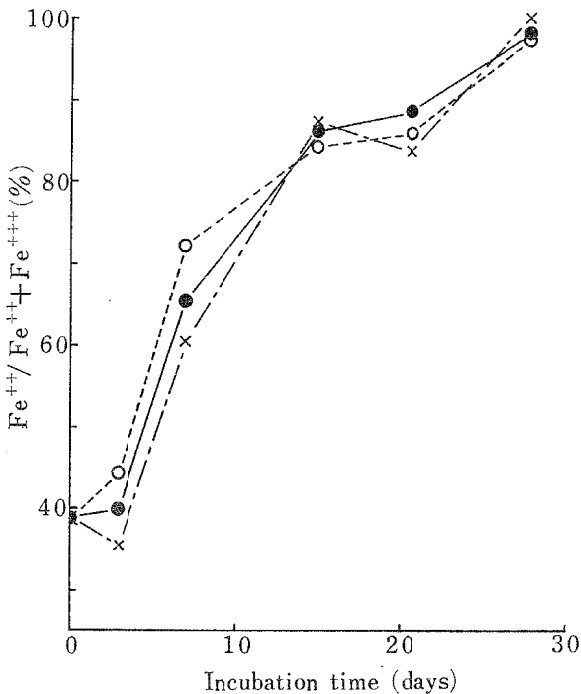


Fig. 16. Reduction of ferric iron in the sediments with the addition of water having different salinities.
 --○--: sample A; --●--: sample B;
 --×--: sample C.

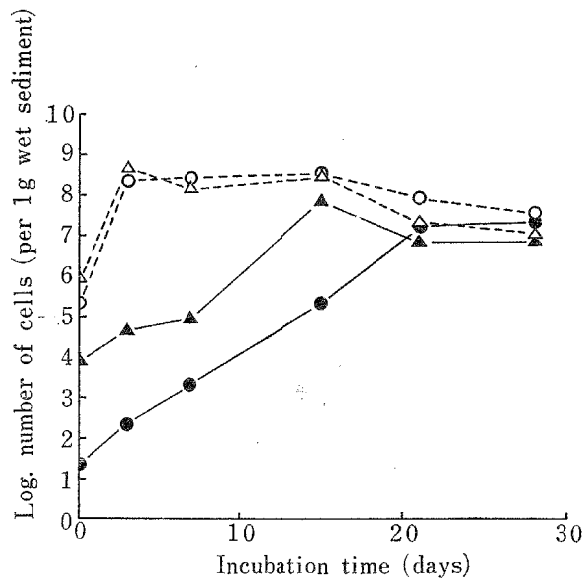


Fig. 15. Growth of bacteria in the sediment of sample C.
 --○--: marine aerobes;
 --●--: marine sulfate reducers;
 --△--: fresh-water aerobes;
 --▲--: fresh-water sulfate reducers.

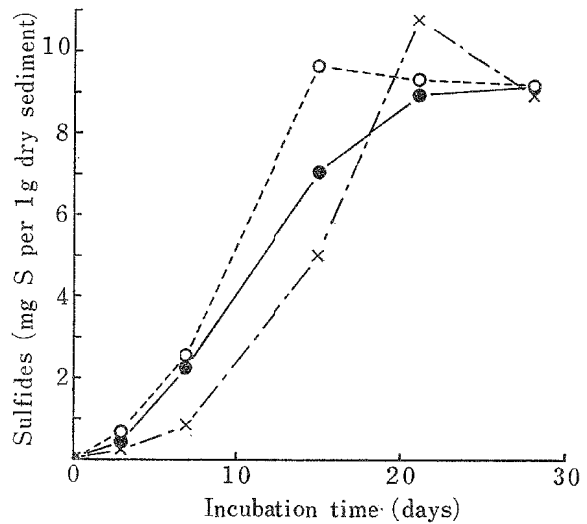


Fig. 17. Production of sulfides in the sediments with the addition of water having different salinities.
 --○--: sample A; --●--: sample B;
 --×--: sample C.

海水ほどいくぶん急速で、 Eh 降下における模様と対応するようにみえる。

4) 硫化物：硫化物集積は初期には高濃度海水ほど活発であったが、中期を過ぎると低濃度海水でも急激に増大し、最大集積量はどの濃度でもほとんど等しかった。

5) 有機酸：有機酸代謝は海水濃度によってかなり特徴的で、ことに酢酸の集積は低濃度海水ほど大きかった。硫酸還元菌の可利用有機酸のうち、乳酸とギ酸の消長には海水濃度による差がほとんどなかったが、ピルビン酸量は原海水では初期に高く10倍希釈海水では終期に増大して、硫化物集積との関連を考えさせる。

6) ガス：ガスの集積状態も海水濃度によって特徴がみられ、低い海水濃度ほど炭酸ガスおよびメタンの集積が顕著であった。メタンの生成は、終期における炭酸ガスの減少と対応した。水素の集積はどの海水濃度でもみられなかった。

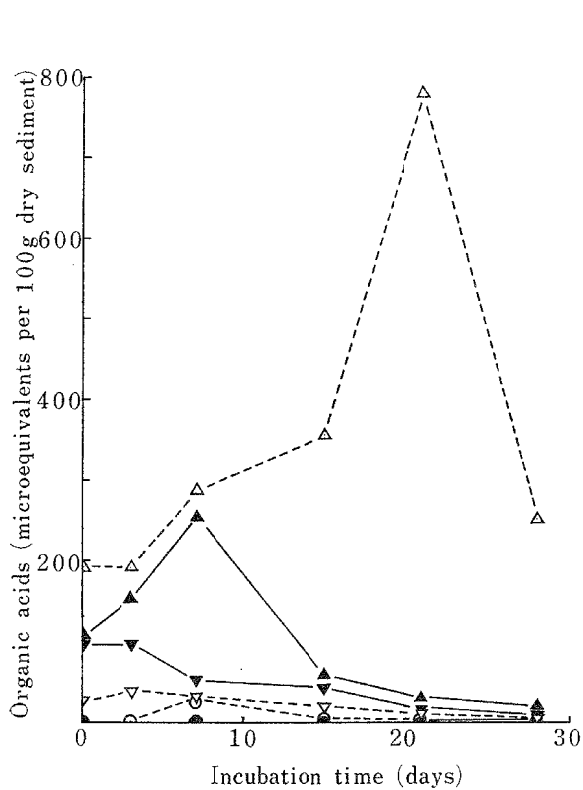


Fig. 18. Changes in the amounts of organic acids in the sediment of sample A.

--○--: butyric; ●: propionic;
 --△--: acetic; ▲: pyruvic;
 --▽--: formic; ▼: lactic.

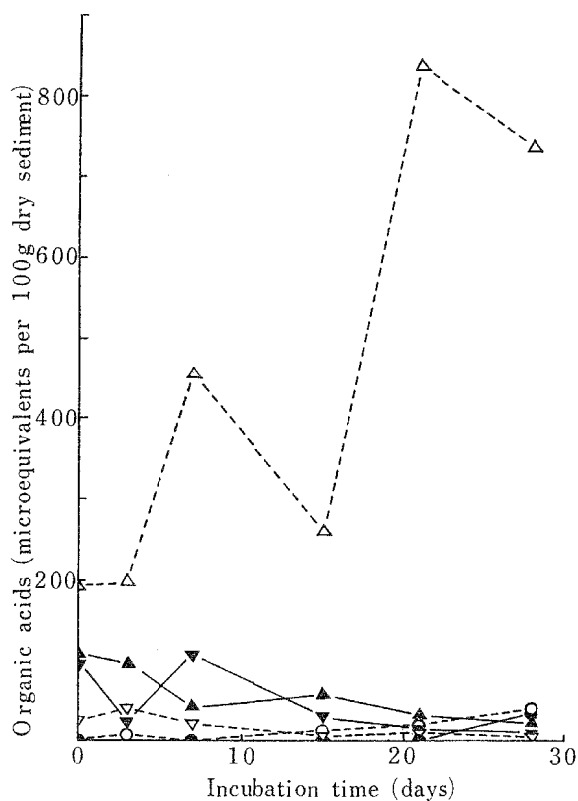


Fig. 19. Changes in the amounts of organic acids in the sediment of sample B.

--○--: butyric; ●: propionic;
 --△--: acetic; ▲: pyruvic;
 --▽--: formic; ▼: lactic.

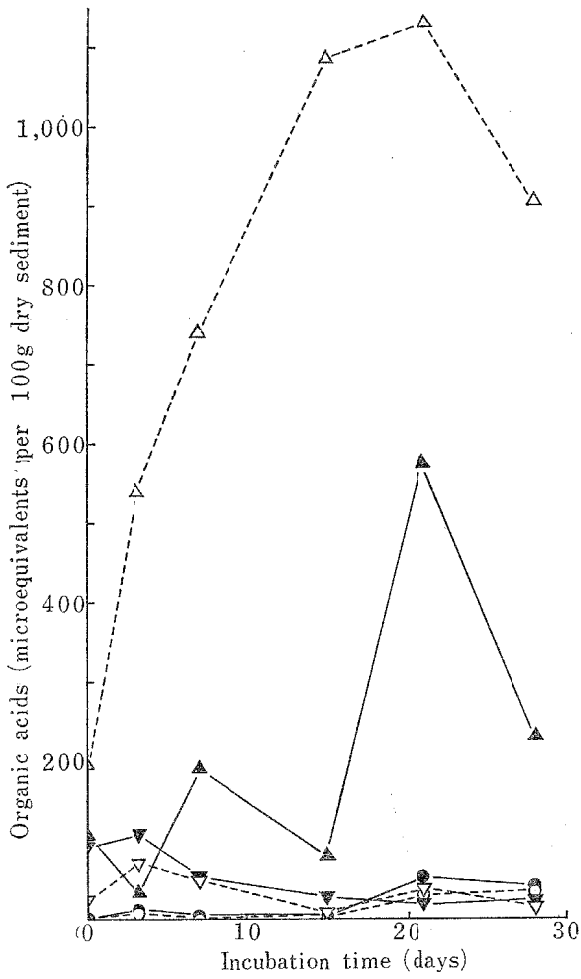


Fig. 20. Changes in the amounts of organic acids in the sediment of sample C.

--○--: butyric; --●--: propionic;
 --△--: acetic; --▲--: pyruvic;
 --▽--: formic; --▼--: lactic.

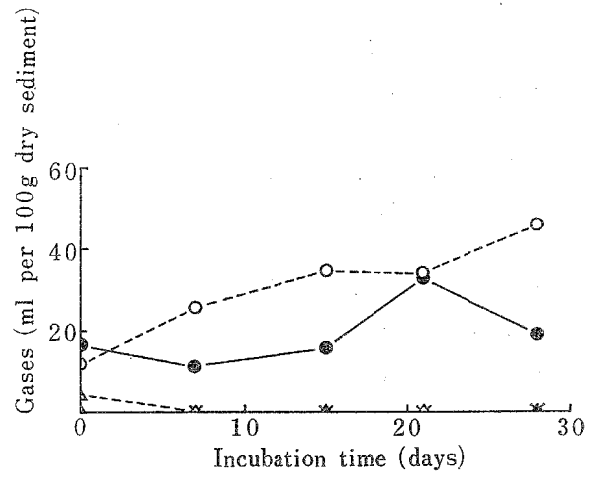


Fig. 21. Changes of gaseous components in sample A.

--○--: CO₂; --△--: O₂; --●--: N₂;
 --▲--: CH₄; --×--: H₂.

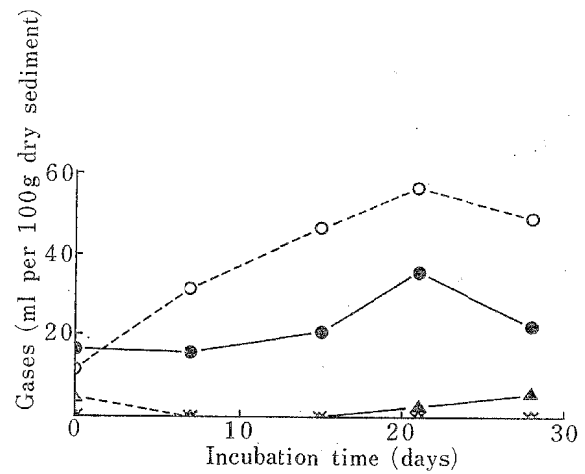


Fig. 22. Changes of gaseous components in sample B.

--○--: CO₂; --△--: O₂; --●--: N₂;
 --▲--: CH₄; --×--: H₂.

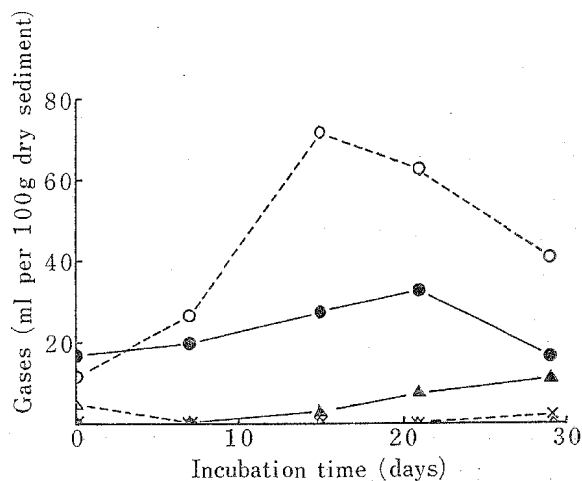


Fig. 23. Changes of gaseous components in sample C.

--○--: CO₂; --△--: O₂; ●: N₂;
 --▲--: CH₄; --×--: H₂.

2. 考 察

上の結果から、水圏底堆積物中における微生物の増殖と活性は環境塩分濃度によって大きな影響を受け、海水環境に近い場合ほど海洋性種が、また淡水環境に近づくほど淡水性種が、それぞれ活発に増殖し、これにともなう物質変遷の内容にもかなりの差異を生ずると思われる。すなわち有機物代謝においては、淡水環境に近づくほど酢酸および炭酸ガスの集積が多く、メタンの生成も活発のようにみえる。これら3つの物質は微生物の metabolite としてたがいに関係が深いから、淡水環境ではおそらく、これらの代謝系に關与する微生物群あるいは酵素系が、海水環境より強く活動するのであろう。高濃度海水の環境ほどメタン集積が低調であったことは、小山³⁰⁾の得た、湖底におけるメタン生成が高濃度の sea salt によって阻害されたという結果と対立しない。

一方、硫酸還元菌増殖の成績によれば、この細菌の海洋性種と淡水性種のおのおのは、環境塩分濃度の影響をきわめて強く受けることが明白である。この事情は、第 24 図に示された硫酸還元菌の両菌種の、食塩濃度に対する態度における顕著な相違によって理解される。しかし環境塩分濃度の高低に応じて、これら海洋性種と淡水性種のどちらかが旺盛な増殖をとげるので、両菌群を合わせた総数は（高濃度海水ほど多少増殖速度が大きかったが）海水濃度の高低にかかわらず、ほぼ同程度とみることができよう。このような硫酸還元菌増殖の模様は、硫化物集積にも反映され、（高濃度海水ほど多少その初期速度が大きかったが）海水濃度の高低による差異がいちじるしくは

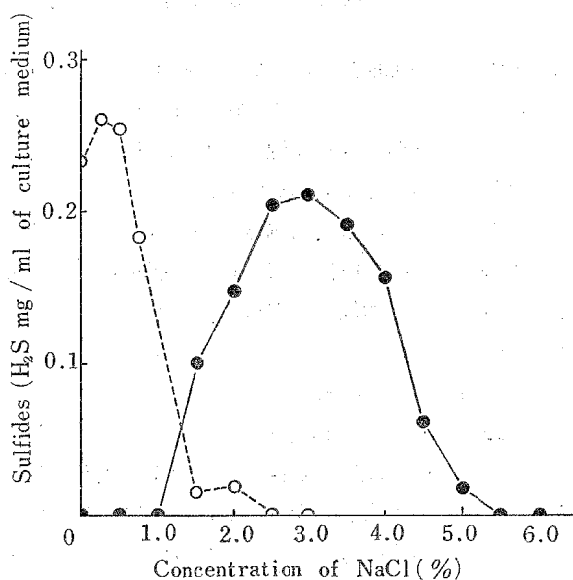


Fig. 24. Influence of NaCl concentration in culture media on sulfide production by sulfate reducers.

--○--: fresh-water types;
 ●: marine types.

なかった。

希釈海水では硫酸還元菌の必須代謝基質である硫酸塩の濃度が当然少ないが、培養実験¹⁴⁾によると、この細菌の最高増殖に必要な SO_4^{2-} 濃度はきわめて微量（至適濃度は正常海水中の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{10}$ 程度）であるから、この実験条件下では SO_4^{2-} 濃度は増殖に対する制限要因となっていない。一方、硫化物集積量は、ある範囲内では当然基質 SO_4^{2-} の供給に対応するはずであるが、培養実験¹⁴⁾ の成績によれば、 SO_4^{2-} の還元速度自体に対する至適 SO_4^{2-} 濃度もまた比較的lowく、10倍希釈海水中の濃度でもこれを制限しないようである。すなわち、このような実験条件下では 10 倍希釈海水ですら硫酸還元菌の増殖と活性をほとんど制限していないとみられる。しかし、天然において SO_4^{2-} のさらに少ない環境下では、たとえ硫酸還元菌の生育が十分であっても、硫酸還元反応に対する基質 SO_4^{2-} の欠乏によって当然、硫化物集積量が制約を受けるであろう。既報⁵⁾ の現地調査の結果は、この例である。

3. 要 約

風乾細土（海底細土と水田細土を等量混合）に有機物（粉末セルロースとアジ細切肉をおのおの 1%）を加え、海水、2倍希釈海水または 10 倍希釈海水を満し、30°C で密閉下に incubate して微生物の増殖と代謝におよぼす塩分濃度の影響をしらべ、つぎの結果を得た。

1) 微生物の増殖は、海洋性種は海水濃度が高いほど、淡水性種はその濃度が低いほど、それぞれ活発であったが、両者を合わせての総数には海水濃度による差がほとんどなかった。

2) 硫酸還元菌の増殖は海水濃度の影響をことに顕著に受け、この濃度の高低に応じて海洋性種と淡水性種による支配的増殖が明らかに交替した。しかし、両菌群を合わせての総数は海水濃度にかかわらずほぼ同程度であり、この細菌による硫化物集積の速度と量にも大差がなかった。

3) *Eh* 降下、第 2 鉄還元のパターンにも海水濃度による差異がほとんどみられなかったが、有機物代謝はかなり特徴的で、淡水環境に近くなるほど酢酸、炭酸ガスおよびメタンの集積が活発であった。

IV. 底土堆積物中における硫化物生成におよぼす有機物の種類の影響

既報^{4) 5) 6)} の現地調査において、底堆積物中の硫酸還元菌の生菌数密度と活性が、環境に存在する有機物の質および量によってつよく支配されていることを観察し、また培養実験⁹⁾ でも、この細菌の増殖と活性がエネルギー源（および炭素源）または硫酸還元反応の水素供与体としての有機物の種類と濃度によって著しい影響を受けることを明らかにした。

ここでは、一般に水質汚濁被害の大きいといわれる³³⁾パルプ・製紙工業廃水の主体をなすセルロース、またはきわめて腐敗分解性に富む魚肉が底堆積物に供給された場合、硫酸還元菌の増殖と活性、およびこれと関連する他の微生物代謝の過程が、これら有機物の種類の相違によりどのような影響を受けるかをモデルを用いて追究した。

1. 実験方法および結果

基本海底細土 No. 1 に粉末セルロース（東洋紙製、300 メッシュ）または新鮮なアジ筋肉（ホモジェネート）を 2% の濃度に添加混合し、海水を満し密閉下で 30°C に incubate した。これらの底堆積物中における各種の微生物活動を追跡した結果は、第 25~33 図に示すとおりで、要点はつぎのようである。

1) *Eh* および pH : *Eh* はどちらの試料でも全く同様に急速に降下した。pH は魚肉の場合は初期より低下したが、セルロースでは中期以降になってはじめて降下し、その程度が大きかった。

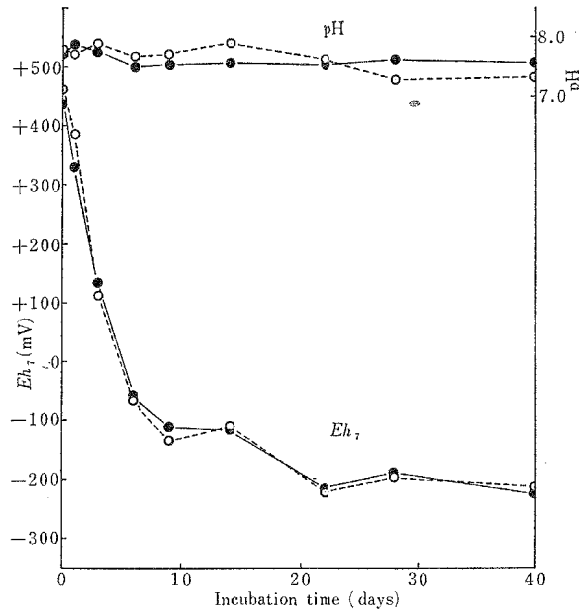


Fig. 25. Changes in Eh and pH of the sediments added with different kinds of organic matter.
 --○--: sample A; —●—: sample B.

2) 細菌数: 好気性菌の増殖には試料による差がほとんどなく, 嫌気性菌の増殖は初期に魚肉添加の方がいくぶん旺盛であったが大差はなかった。硫酸還元菌の場合にはかなりの相違がみられ, 初期には魚肉の方が明らかに旺盛であったが, 中期以降になるとセルロース添加のものに, きわめて活発な増殖がおり魚肉のそれを凌いだ。

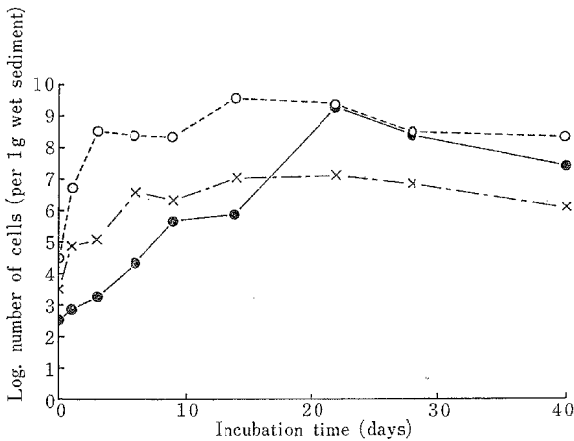


Fig. 26. Growth of bacteria in the sediment of sample A.
 —●—: sulfite reducers; --○--: aerobes;
 -·-x-·-: anaerobes.

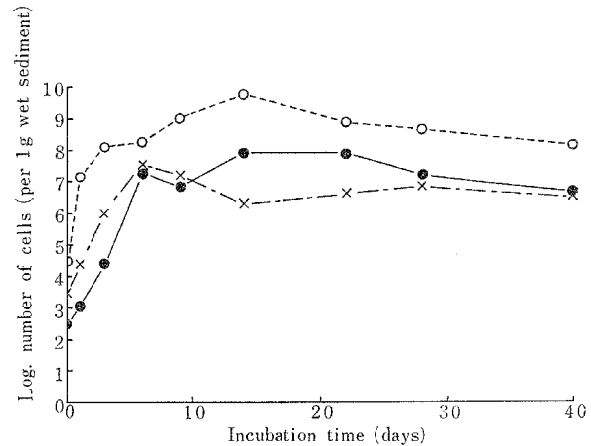


Fig. 27. Growth of bacteria in the sediment of sample B.
 —●—: sulfite reducers; --○--: aerobes;
 -·-x-·-: anaerobes.

3) 第2鉄還元とイオン状2価鉄: 第2鉄還元は両試料ともほぼ同様であった。イオン状2価鉄の生成は魚肉の方がいちじるしかった。

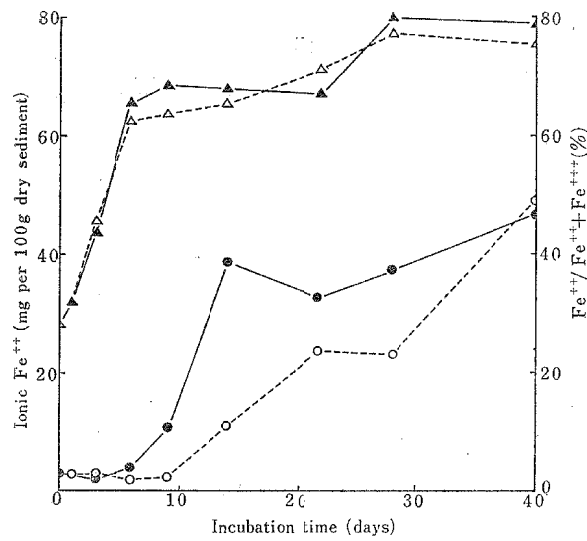


Fig. 28. Changes of ionic Fe²⁺ concentration and Fe²⁺/Fe²⁺+Fe³⁺ in the sediments added with different kinds of organic matter.

- : ionic Fe²⁺ in sample A;
- : ionic Fe²⁺ in sample B;
- △--: Fe²⁺/Fe²⁺+Fe³⁺ in sample A;
- ▲—: Fe²⁺/Fe²⁺+Fe³⁺ in sample B.

4) 硫化物：硫化物の集積は硫酸還元菌の増殖と対応し、初期より中期にかけては魚肉添加がセルロース添加をかなり上まわったが、中期以降ではセルロース添加に飛躍的な集積がみられ魚肉のそれを凌ぐ量となった。

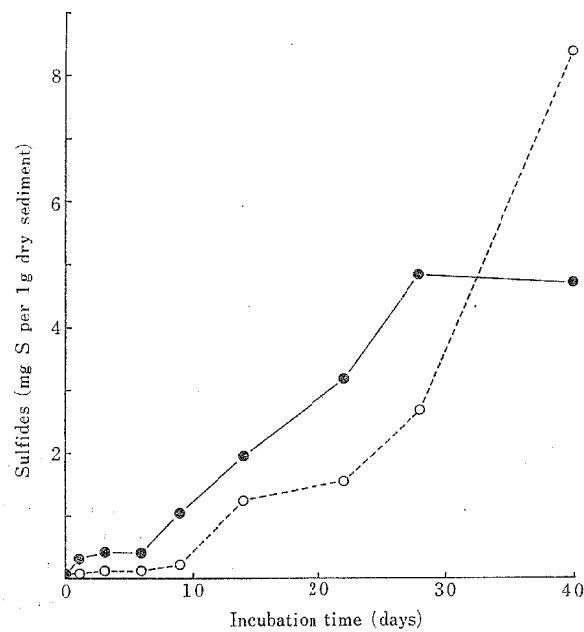


Fig. 29. Production of sulfides in the sediments added with different kinds of organic matter.

- : sample A;
- : sample B.

5) 有機酸：有機酸の消長はきわめて錯雑であったが、セルロース添加のものでは中期に酢酸とピルビン酸の集積が多く、魚肉では初期にピルビン酸量が比較的高かった。

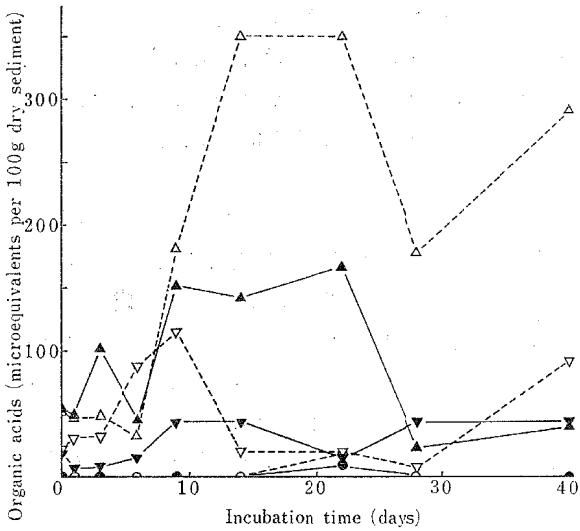


Fig. 30. Changes in the amounts of organic acids in the sediment of sample A.

--○--: butyric; ●--: propionic;
--△--: acetic; ▲--: pyruvic;
--▽--: formic; ▼--: lactic.

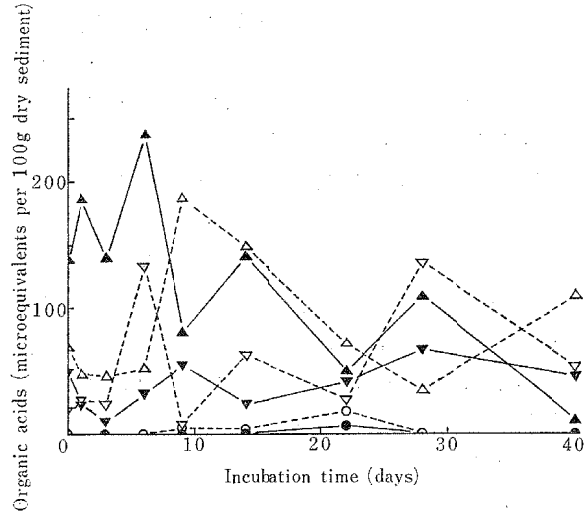


Fig. 31. Changes in the amounts of organic acids in the sediment of sample B.

--○--: butyric; ●--: propionic;
--△--: acetic; ▲--: pyruvic;
--▽--: formic; ▼--: lactic.

6) ガス：ガス代謝では、セルロース添加において中期ないし終期に炭酸ガスの集積がきわめて活発であった。

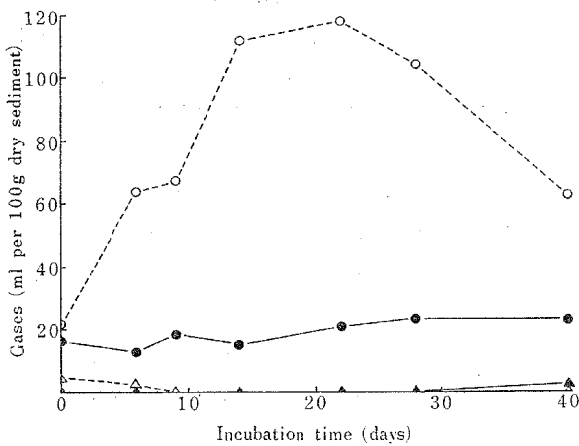


Fig. 32. Changes of gaseous components in sample A.

--○--: CO₂; --△--: O₂; ●--: N₂;
--▲--: CH₄; --×--: H₂.

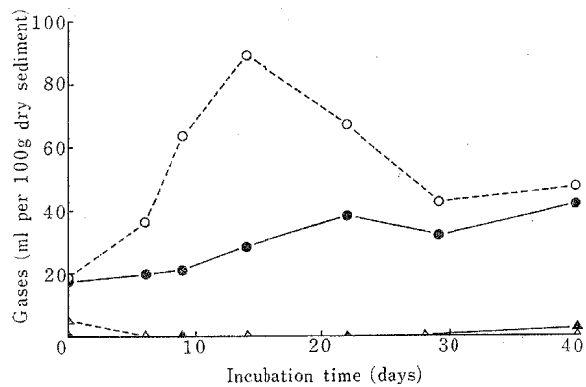


Fig. 33. Changes of gaseous components in sample B.

--○--: CO₂; --△--: O₂; ●--: N₂;
--▲--: CH₄; --×--: H₂.

2. 考 察

この実験に用いられた基本細土には、すでに相当量の有機物がふくまれていると思われるが、さきの子備的試験¹⁵⁾によると、これに有機物を添加すれば無添加の対照にくらべて微生物活動がいちじるしく促進されたから、この実験でも添加有機物による代謝過程の差が十分反映されたものと考えられる。

セルロース添加と魚肉添加の相違は、一般好気性菌、嫌気性菌の増殖および *Eh* 降下、第2鉄還元などに対しては顕著な差を与えなかったが、硫酸還元菌の増殖と活性にはかなりの影響をおよぼし、魚肉添加のものが初期より活発な増殖と硫化物集積を示したのに対して、セルロース添加では初期には低調で、中期以降になつてはじめて飛躍的な増殖と活性がみられた。

このような結果は、硫酸還元菌の有機物利用性における特徴により説明できよう。すなわち、この細菌がエネルギー源（炭素源）あるいは硫酸還元反応の水素供与体として直接利用できる有機物は乳酸、ピルビン酸、ギ酸など少数の種類に限られる^{9) 25)}ので、基本細土はこれらが欠乏の状態にあり、これに魚肉が加えられると容易に分解されて*、この細菌の可利用有機物が早期から供給されるのに対して、セルロース添加の場合は比較的難分解性のため、これら可利用基質の供給がおくれたと考えられる。このようなセルロースの分解の遅延は、後述の有機物代謝に明らかである。一方、一般好気性菌、嫌気性菌の増殖と、主としてこれらの細菌の活動による *Eh* 降下、第2鉄還元などが添加有機物の種類によってそれほどの影響を受けなかったのは、基本細土中の有機物によってこの要求が満たされたためであろう。

有機物の種類が一般細菌の増殖や全体としての還元状態発達につよい影響を与えなかったのは上のとおりであるが、有機酸、ガスの代謝には当然ながら差異を生じた。それらの解析は、ここに得られた結果からは錯雑のため容易でないが、セルロース添加において中期に酢酸、ピルビン酸、炭酸ガスの集積が多く、魚肉では初期にピルビン酸量が比較的高かったことは、pH 低下がセルロースでは中期以降に魚肉では初期から、それぞれ開始されたことと対応して、これらの有機物の分解速度とその経路における相違をあらわしていると思われる。このような有機物分解の遅速は、硫酸還元菌の活動にそのまま反映されている。

セルロースの分解は特異なセルロース分解菌によるが、門田³⁴⁾はパルプ工場廃水の流入する海底土中における好気性セルロース分解菌の分布が、とくに硫化物量の多いところを除いては、底土中の有機物量と密接に相関することをみている。海底堆積物中には嫌気性セルロース分解菌の存在も知られている³⁵⁾から、硫化物量に富む還元状態でも、おそらくこのような細菌の活動によりセルロースの分解が進行するのであろう。

セルロースはこのように比較的難分解性のため、硫酸還元菌の活動に対する促進作用は、上のように魚肉などにくらべておくれで現われるが、その影響はむしろ大きく、かつ長く持続するから、天然海域がこのような物質を含む製紙・パルプ工業廃液などによって汚濁された場合の、影響の重大性が推察される。

3. 要 約

風乾海底細土にセルロースまたは魚肉を2%の濃度に加え、海水を満たして密閉下で30°Cに incubate し、微生物の増殖と代謝におよぼすこれら有機物の種類の影響を追跡した結果、つぎのことをみた。

1) 一般好気性菌および嫌気性菌の増殖には、添加有機物による差異がほとんどなく、*Eh* 降下、第2鉄還元にも差が現われなかった。

2) 硫酸還元菌の増殖と硫化物生産活性には、添加有機物の種類の影響が顕著にあらわれ、魚肉添加の場合は早期より増殖と活性が高く、セルロース添加では初期には低調で中期以降に飛躍的に促進された。両有機物における代謝速度の遅速を反映するとみられる。

3) セルロース添加の場合は、魚肉にくらべて、中期に酢酸、ピルビン酸、炭酸ガスの集積が多く、魚肉では初期にピルビン酸量が比較的高かった。このことは、pH 低下が魚肉では初期より、セルロースでは中期よりはじまったことと対応し、有機物の分解速度とその内容をあらわしていると思われる。

* 魚肉では、肉中の含硫アミノ酸の分解によっても硫化物が生成されると考えられるが、この添加量からみると、それに由来する部分は硫酸還元によるものにくらべて、きわめて少ないと考えられる。

V. 底土堆積物中における硫化物生成におよぼす有機物濃度の影響

上の実験 IV において、底土堆積物中における硫化物生成およびこれと関連する各種の微生物活動が、環境に存在する有機物の種類によってつよい影響を受けることを明らかにしたが、ここでは、有機物濃度がこれら微生物の増殖と活性におよぼす影響を、モデルを用いて検討した。

1. 実験方法および結果

風乾海底細土 No. 1 を基本とし、これに粉末セルロース（東洋瀆紙製、300メッシュ）または新鮮なアジ筋肉（ホモジネート）を、第3表に示すとおり、おのおの 0.5, 2, 10% あるいは両者を2%ずつ加え、海水を満たして密閉下で 30°C に incubate し、各種の微生物活動を経時的に追跡した。その結果を第34~40 図に示すが、つぎのように要約される。

Table 3. Preparation of sediment samples containing organic matters in different concentrations.

Samples	Concentrations of organic matters added to basal air-dried fine mud (%)	
	Cellulose powder (300 meshes in inch)	Minced fish meat (a horse-mackerel)
A	0	0
B	0.5	0
C	2.0	0
D	10.0	0
E	0	0.5
F	0	2.0
G	0	10.0
H	2.0	2.0

1) *Eh* および pH: *Eh* 降下は、セルロースでも魚肉でも、添加濃度の高いものほど概して急激であった。pH は一般に、有機物濃度の高いものほど低下速度が大きかったが、魚肉 10% では他の場合と異なり、初期の急速な降下に続くいちじるしい上昇がみられた。蛋白質分解にともなうアンモニアなど塩基性物質の生成を反映するようにみえる。セルロースと魚肉の両者を加えた場合には、それぞれ単独のものにくらべて *Eh* と pH の変動が大きかった。

2) 細菌数: 一般好気性菌の増殖は、有機物量の高いほどいくぶん旺盛であったが、大差はなかった。硫酸還元菌の増殖には、有機物濃度の促進的影響がきわめて顕著であった。セルロースと魚肉とでは、後者の方が初期の増殖をつよく促進した。また、これらの両方を加えたものでは、それぞれ単独の場合より増殖がはるかに活発であった。

3) 硫化物: 硫化物集積は硫酸還元菌の増殖とよく対応し、有機物濃度に比例していちじるしく促進された。この期間中には魚肉添加の方がつねにセルロース添加を上まわったが、終期には前者での減少傾向に對して、後者ではまだ増加の傾向がみられた。

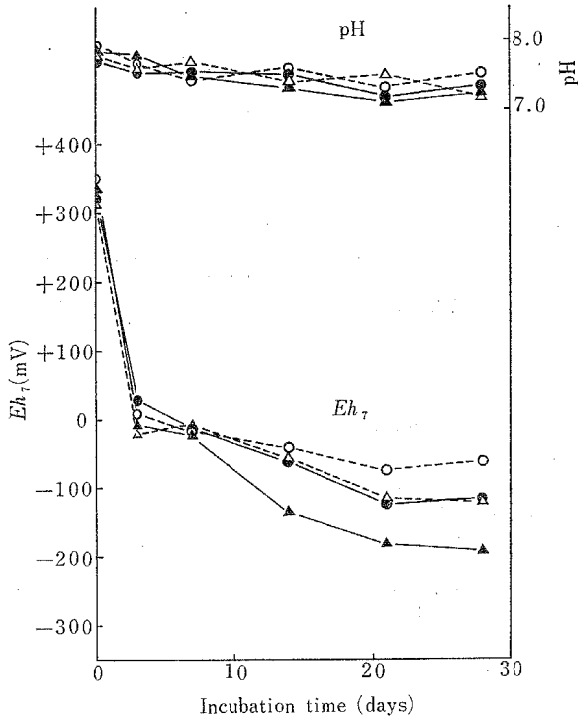


Fig. 34. Changes in *Eh* and pH of the sediments added with cellulose in different concentrations.
 --○--: sample A; ●—: sample B;
 --△--: sample C; ▲—: sample D.

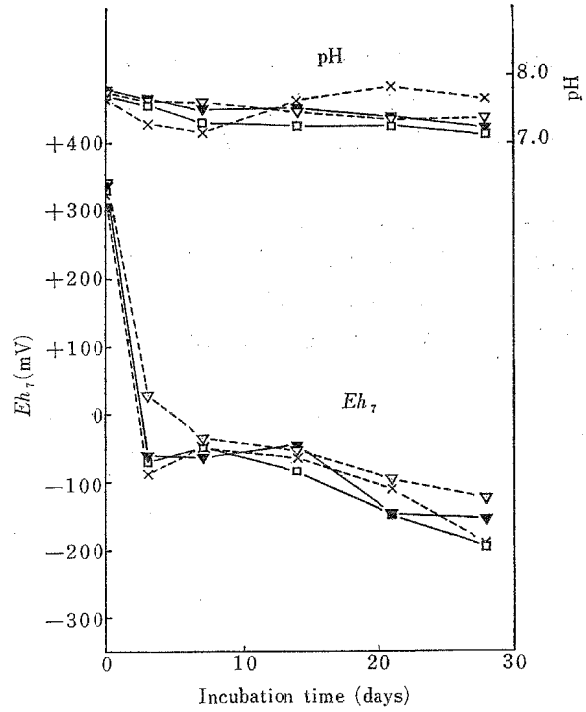


Fig. 35. Changes in *Eh* and pH of the sediments added with fish meat in different concentrations.
 --▽--: sample E; ▼—: sample F;
 --×--: sample G; □—: sample H.

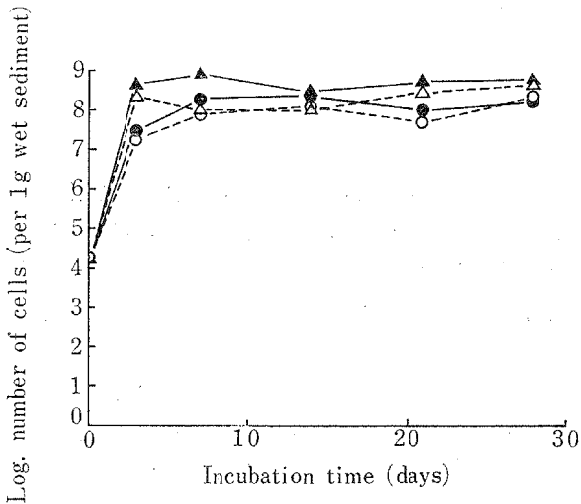


Fig. 36. Growth of aerobes in the sediments added with cellulose in different concentrations.
 --○--: sample A; ●—: sample B;
 --△--: sample C; ▲—: sample D.

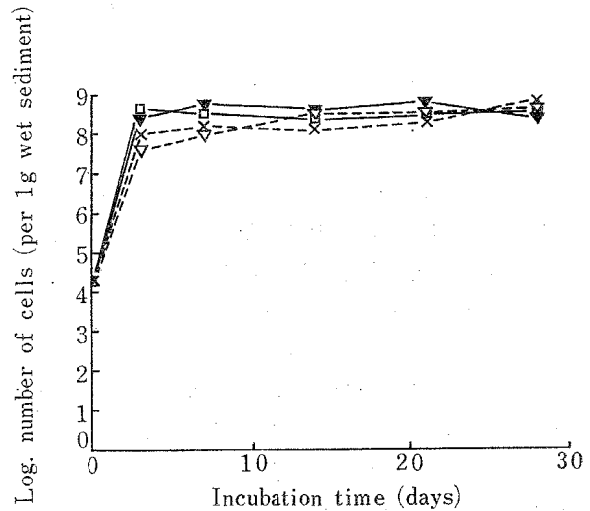


Fig. 37. Growth of aerobes in the sediments added with fish meat in different concentrations.
 --▽--: sample E; ▼—: sample F;
 --×--: sample G; □—: sample H.

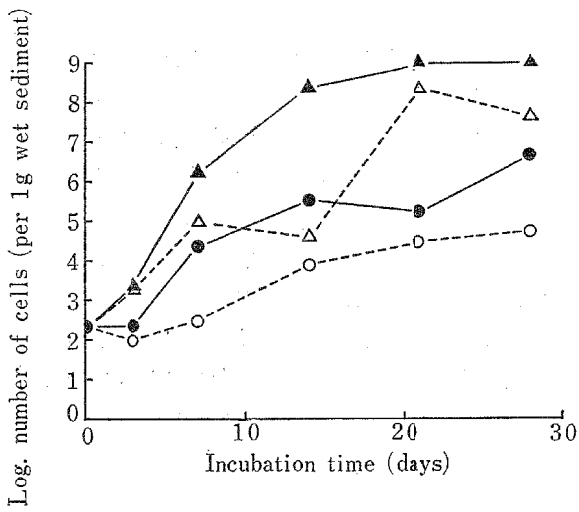


Fig. 38. Growth of sulfate reducers in the sediments added with cellulose in different concentrations.

--○--: sample A; ●—: sample B;
 --△--: sample C; ▲—: sample D.

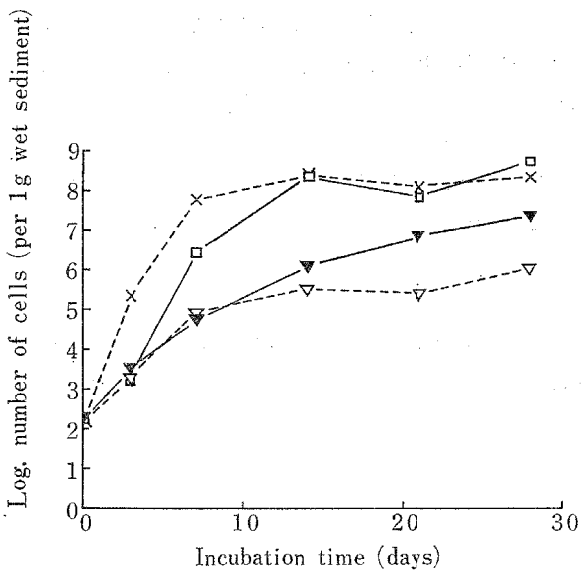


Fig. 39. Growth of sulfate reducers in the sediments added with fish meat in different concentrations.

--▽--: sample E; ▼—: sample F;
 --×--: sample G; □—: sample H.

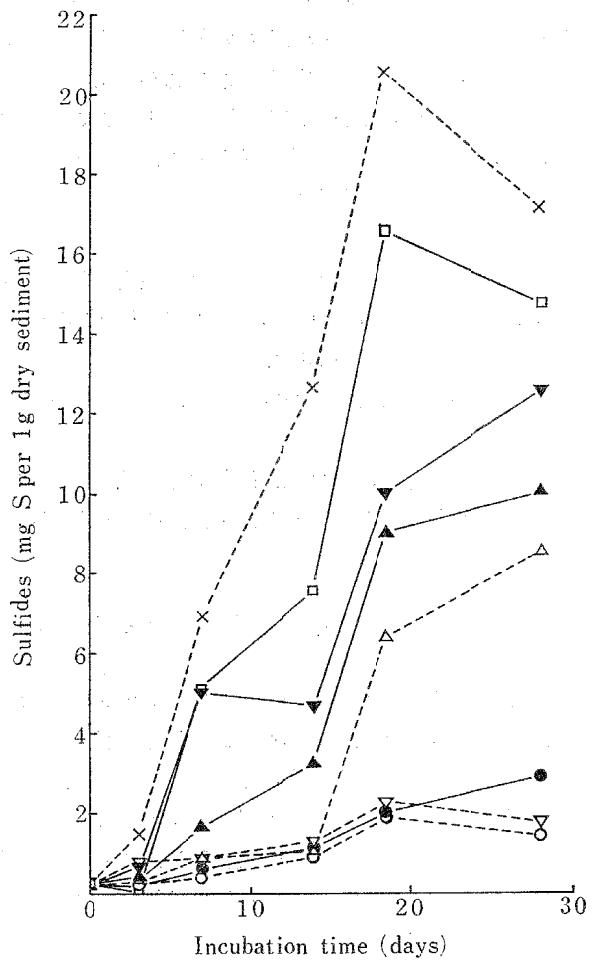


Fig. 40. Production of sulfides in the sediments added with organic matters in different concentrations.

--○--: sample A; ●—: sample B;
 --△--: sample C; ▲—: sample D;
 --▽--: sample E; ▼—: sample F;
 --×--: sample G; □—: sample H.

2. 考 察

上の結果から、底堆積物中での一般好気性菌の増殖と、主としてこれらの活性が関与すると思われる *Eh* 降下、pH の低下は有機物添加濃度とともに増進するが、この実験条件下では、それほど顕著でないのに対して、硫酸還元菌の増殖と硫化物生産活性は、有機物添加量に比例してきわめて強く促進されることがわかった。これは、硫酸還元菌の有機物濃度に対する response が一般細菌のそれにくらべて著しく高いことによると思われる。このことはまた、実験 IV にも述べたとおり、海底泥土中にはこの細菌の直接可利用有機物が一般には欠乏状態にあり、これに有機物がもたらされると、蛋白質のような分解を受けやすいものばかりでなくセルロースのような難分解性のものでも、その濃度に比例して硫化物生成が高まることを意味する。この実験では、蛋白質と炭水化物がともに与えられれば、それぞれ単独の場合にくらべて、促進作用がいっそう著しかったが、培養実験⁹⁾によるとこの細菌の窒素源としての有機物要求はきわめて微量であるから、この場合の蛋白質は窒素源としてよりもエネルギー源（炭素源）としての、主として有機酸の給源として役立っていると考えられる。

3. 要 約

風乾海底細土に、セルロースまたは魚肉を種々の濃度 (0.5, 2, 10%) に加え、海水を満たして密閉下で 30°C に incubate し、硫化物生成その他の微生物活動におよぼす有機物濃度の影響をしらべた。その結果つぎのことが明らかになった。

- 1) 一般好気性菌の増殖と、これにともなう *Eh* 降下、pH 低下は有機物濃度が高まるにつれて増進した。
- 2) 硫酸還元菌の増殖と硫化物生産活性は有機物濃度にいっそう敏感に対応し、比較的難分解性のセルロースの場合でさえ、これの添加濃度に比例して増殖と活性がきわめて顕著に増大した。

VI. 底土堆積物中における硫化物生成におよぼす鉄およびマンガンの影響

既報¹²⁾の培養実験の結果によれば、硫酸還元菌は増殖に Fe^{2+} を不可欠とするばかりでなく、ある範囲内ではこの濃度に比例して増殖と硫化物生産活性が促進されるが、 Mn^{2+} はこれと拮抗的に阻害する。小山・菅原³⁶⁾および村上³⁷⁾も湖底泥土についての実測と incubation 実験により、硫酸還元反応が Fe^{2+} の存在下で進行し、 Mn^{2+} によって Fe^{2+} と拮抗的に阻害されることを明らかにした。

このように鉄とマンガンは硫化物生産に対して重大な影響をおよぼすと考えられるので、ここでは海底堆積物中における硫酸還元菌の増殖と活性、およびその他の微生物活動におよぼす鉄とマンガンの作用を、モデルを用いて追究した。

1. 実験方法および結果

風乾海底細土 No. 1 に水酸化鉄* および二酸化マンガン (いずれも 200 メッシュ以下) を第 4 表の割合に加え、これに有機物 (粉末セルロースとアジ細切肉をおのおの 1%) を添加して海水を満たし、密閉下で 30°C に incubate した。

種々の微生物活動を追跡した結果は第 41~60 図に示すとおりで、要点はつぎのようである。

* 水酸化鉄の調製は塩化第二鉄にアルカリを加えて水酸化第二鉄とし、透析と洗浄後、室温で風乾し、その量を酸化第二鉄に換算してあらわした。

Table 4. Preparation of fine sediment samples containing iron and manganese in different concentrations.

Samples	Amounts of iron and manganese added to basal air-dried fine mud (No.1) (%)		Total iron contents of samples* (Fe mg/g dry sediments)
	Fe ₂ O ₃	MnO ₂	
A	0	0	38.6
B	0	0.5	
C	0	2.0	
D	2.0	0	51.1
E	2.0	0.5	
F	2.0	2.0	
G	5.0	0	105.3
H	5.0	0.5	
I	5.0	2.0	

* analytical value

1) *Eh* および pH: *Eh* 降下は、鉄のどの含量についても、マンガン量の多いものほど概して急激であった。一方、鉄含量と *Eh* 降下との間には、どのマンガン量においても関係がほとんどみられなかった。pH 低下は鉄のどの含量でも、マンガン最大添加量(二酸化マンガン2%)のものが他の試料にくらべて著しく緩慢であった。

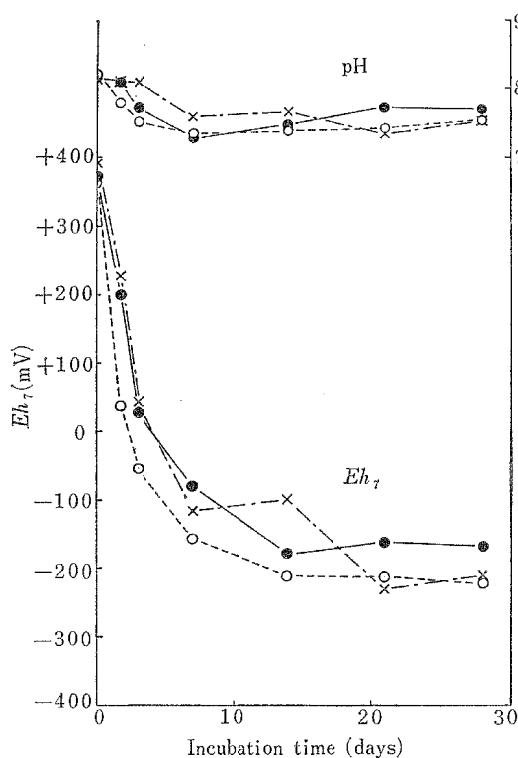


Fig. 41. Changes in *Eh* and pH of the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.

--○--: sample A; —●—: sample B;
--x--: sample C.

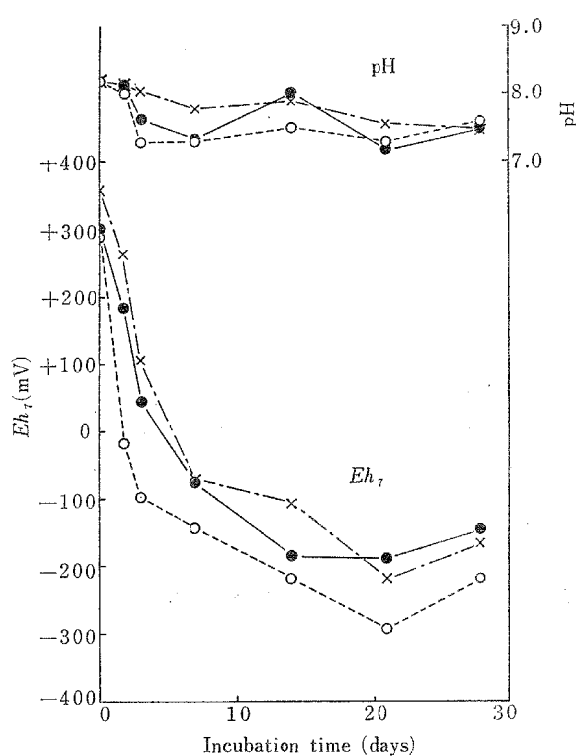


Fig. 42. Changes in *Eh* and pH of the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.

--○--: sample D; —●—: sample E;
--x--: sample F.

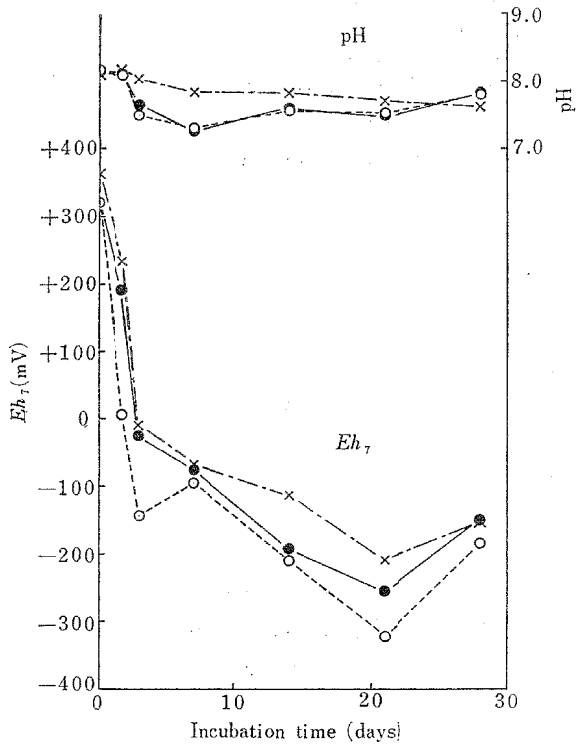


Fig. 43. Changes in Eh and pH of the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.

—○—: sample G; —●—: sample H;
—×—: sample I.

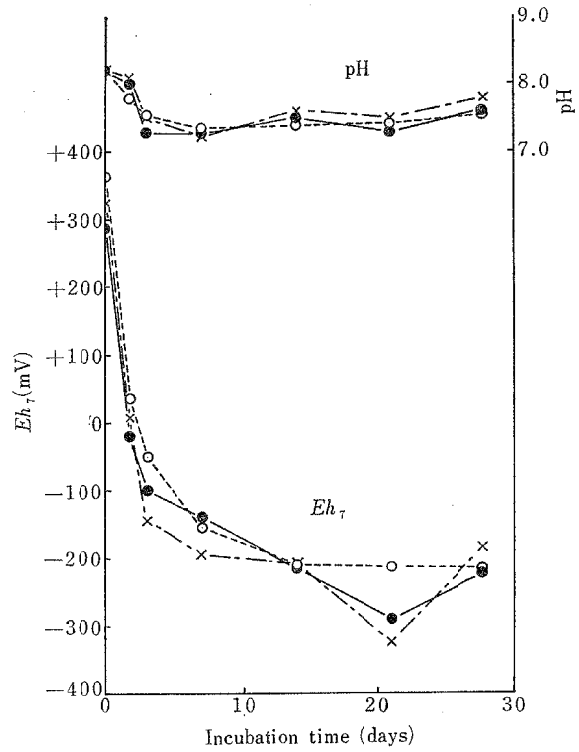


Fig. 44. Changes in Eh and pH of the fine sediments (No.1) added with Fe in different concentrations.

—○—: sample A; —●—: sample D;
—×—: sample G.

2) 細菌数: 一般好気性菌の増殖にも, 硫酸還元菌の増殖にも, 鉄およびマンガン添加量による差異がほとんどみられなかったが, 二酸化マンガン2%を含む試料では, 硫酸還元菌が共通して初期に一旦減少した。

3) 第2鉄還元およびイオン状2価鉄: 第2鉄還元はマンガン添加量の大きいものほどおそく, ことに最大添加量(二酸化マンガン2%)では著るしく緩慢であった。鉄の添加量による, 還元速度と還元率の差異は大きくなかった。イオン状2価鉄の増減はきわめてはげしく, どの試料でもほぼ同じ傾向をもって変動した。

4) 硫化物: 硫化物の集積は, 鉄のどの量においてもマンガン添加量の多いものほど緩慢であった。しかし, 鉄の量自体による硫化物集積量の相違はほとんどなかった。遊離硫化水素は, 堆積物中にも水中にもほとんど全く検出されなかった。

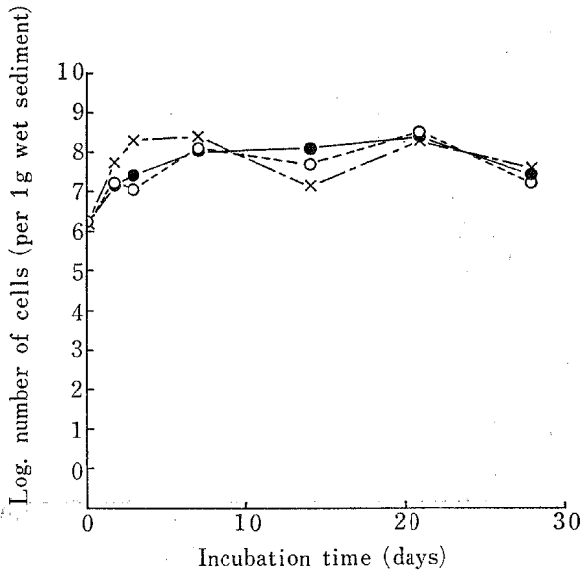


Fig. 45. Growth of aerobes in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 --○--: sample A; ●: sample B;
 --x--: sample C.

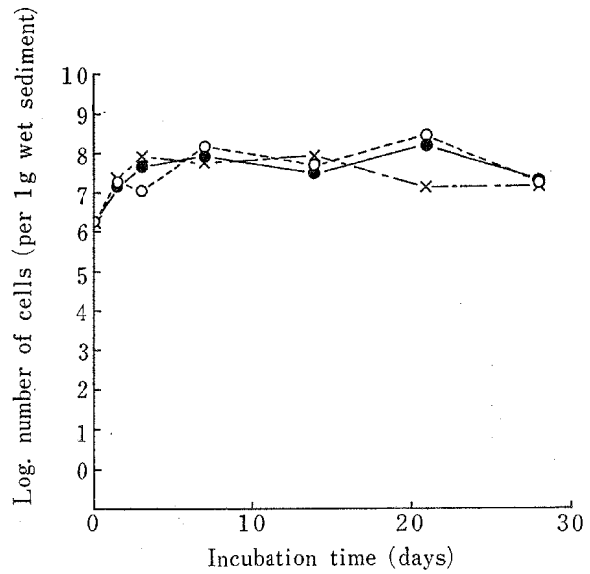


Fig. 46. Growth of aerobes in the fine sediments (No.1) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample A; ●: sample D;
 --x--: sample G.

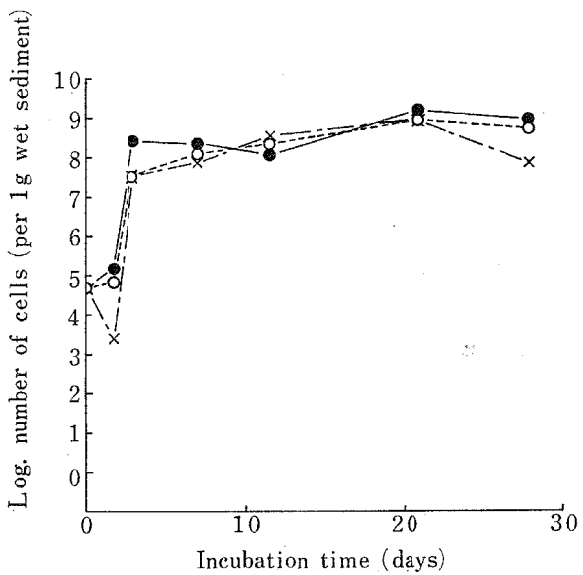


Fig. 47. Growth of sulfate reducers in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 --○--: sample A; ●: sample B;
 --x--: sample C.

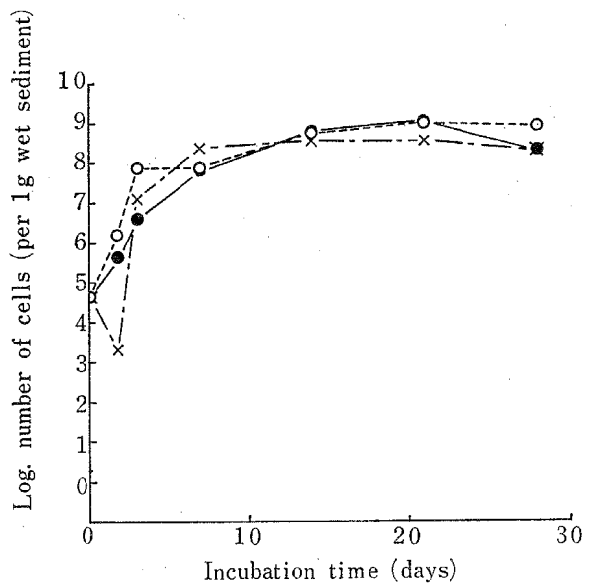


Fig. 48. Growth of sulfate reducers in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 --○--: sample D; ●: sample E;
 --x--: sample F.

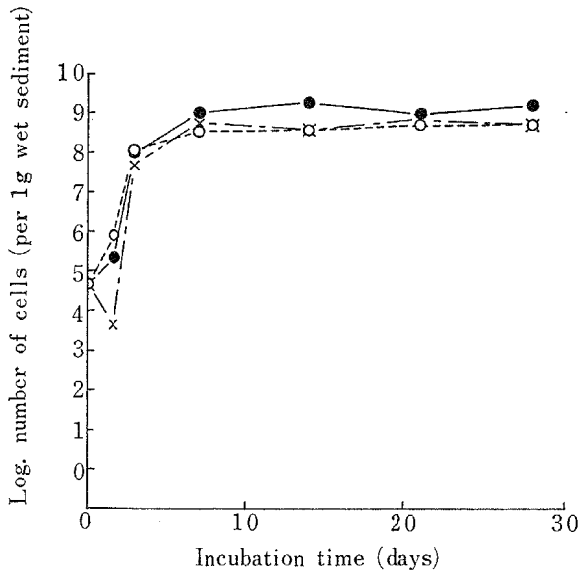


Fig. 49. Growth of sulfate reducers in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 -○-: sample G; ●: sample H;
 -·-x-·-: sample I.

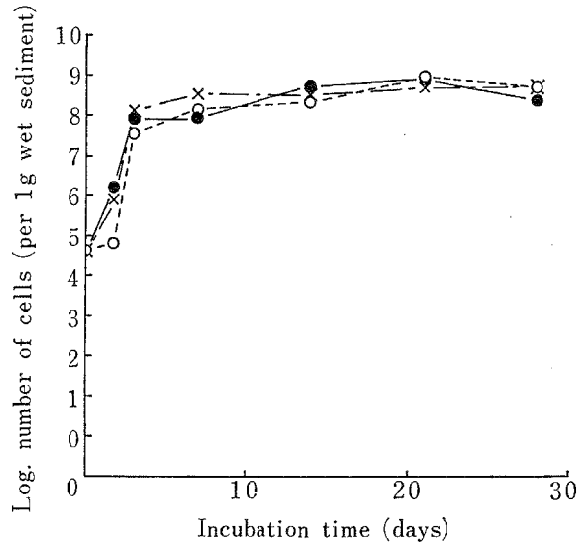


Fig. 50. Growth of sulfate reducers in the fine sediments (No.1) added with Fe in different concentrations.
 -○-: sample A; ●: sample D;
 -·-x-·-: sample G.

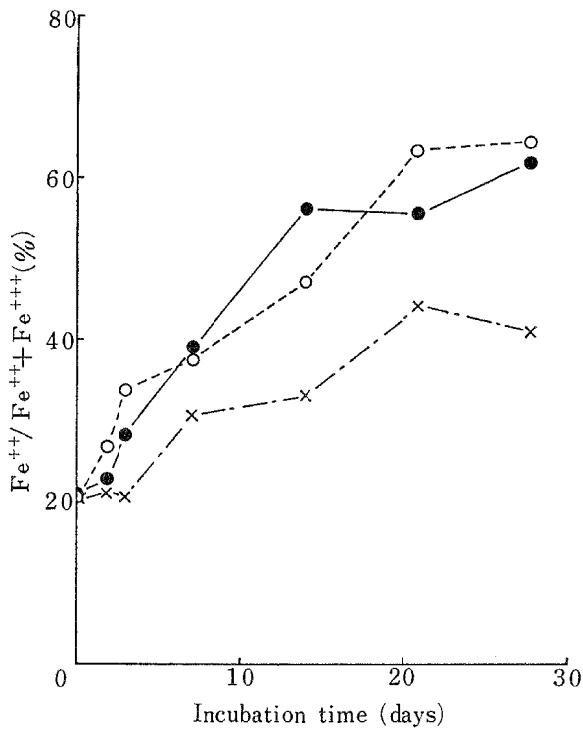


Fig. 51. Reduction of ferric iron in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 -○-: sample A; ●: sample B;
 -·-x-·-: sample C.

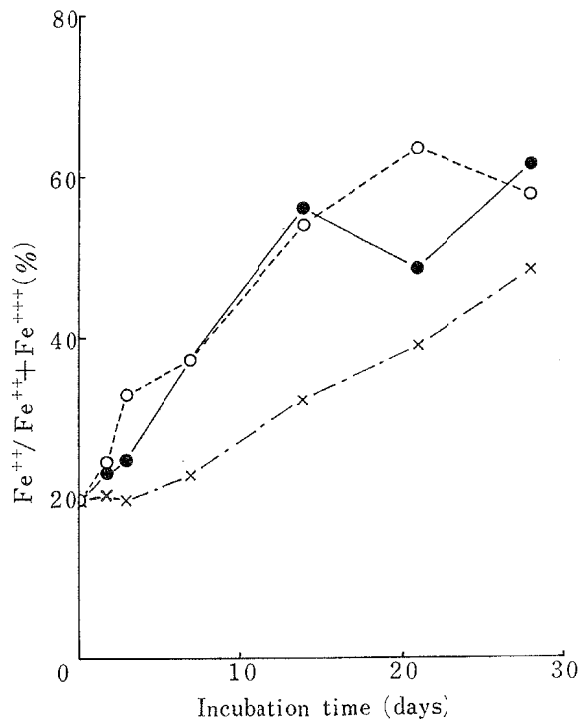


Fig. 52. Reduction of ferric iron in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 -○-: sample D; ●: sample E;
 -·-x-·-: sample F.

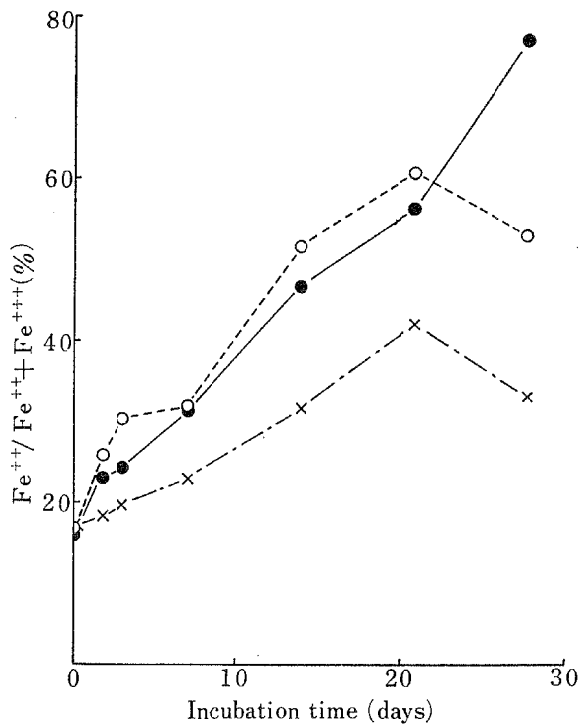


Fig. 53. Reduction of ferric iron in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 --○--: sample G; ●--: sample H;
 -.-x-.-: sample I.

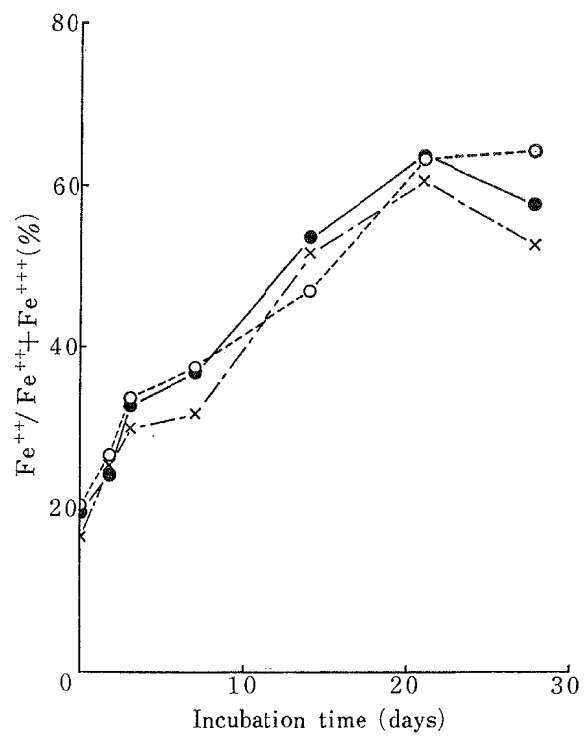


Fig. 54. Reduction of ferric iron in the fine sediments (No.1) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample A; ●--: sample D;
 -.-x-.-: sample G.

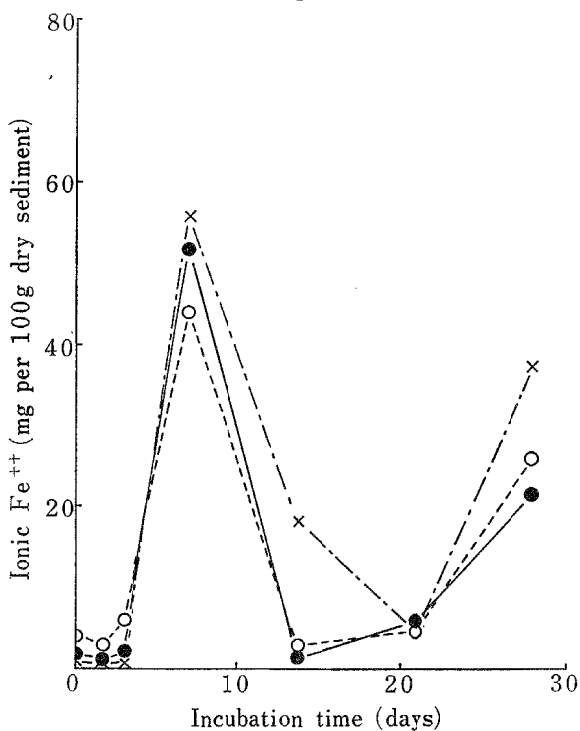


Fig. 55. Changes in the concentration of ionic Fe^{2+} in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 --○--: sample A; ●--: sample B;
 -.-x-.-: sample C.

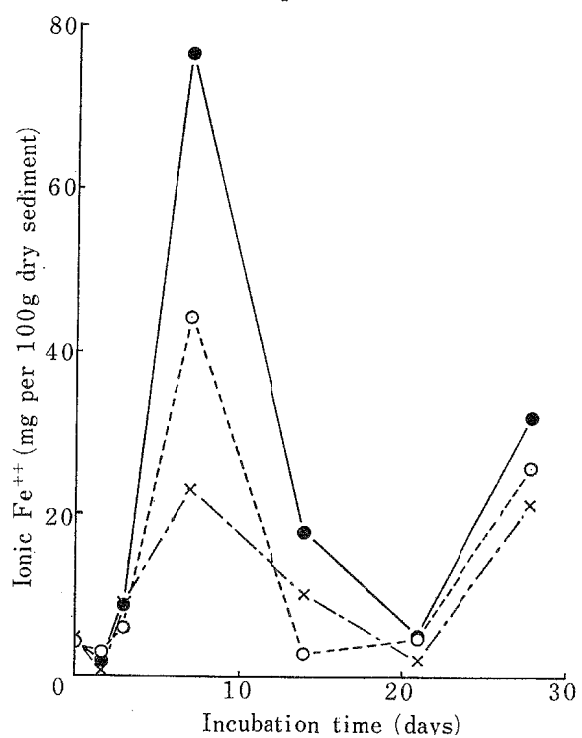


Fig. 56. Changes in the concentration of ionic Fe^{2+} in the fine sediments (No.1) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample A; ●--: sample D;
 -.-x-.-: sample G.

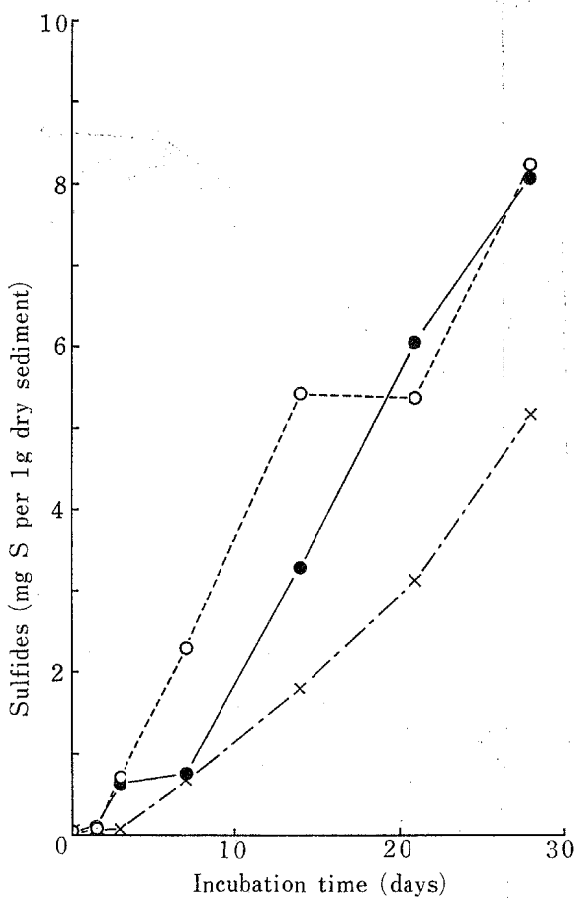


Fig. 57. Production of sulfides in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.

--○--: sample A; ●—: sample B;
—●—: sample C.

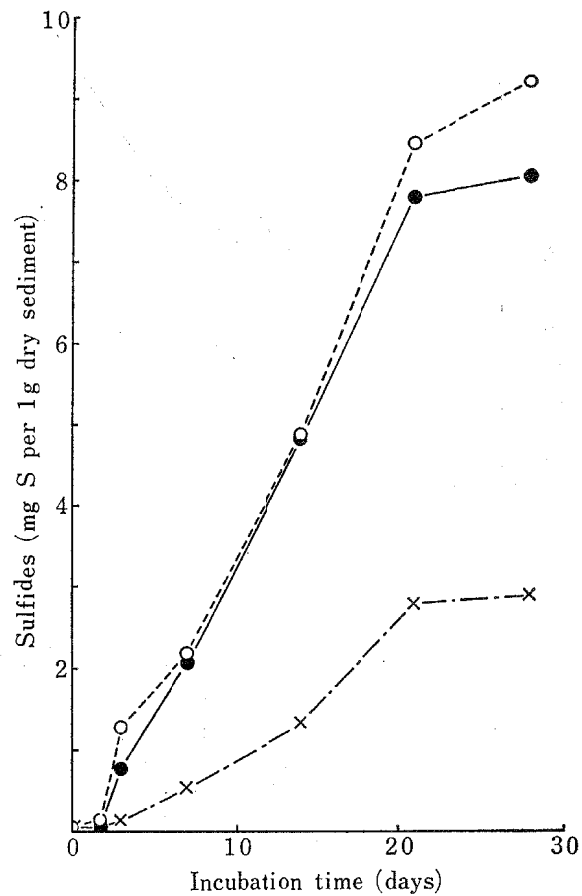


Fig. 58. Production of sulfides in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.

--○--: sample D; ●—: sample E;
—●—: sample F.

2. 考 察

既報¹²⁾のとおり、硫酸還元菌に対する鉄の効果は最初からイオン状態でなくても、不溶性化合物または金属鉄を加えた場合にもみられ、またマンガンについても同様であったから、この実験では天然における通常の存在形態を考慮して、水酸化第二鉄ないし酸化第二鉄および二酸化マンガンとして加えた。このように不溶性形態で加えられた鉄およびマンガンが還元状態の発達、pH 低下などにもない部分的にイオン化して効果を発揮することは、イオン状二価鉄の成績からみても推察される。

上の実験で、硫酸還元菌の増殖が鉄およびマンガンのいずれの添加量によってもほとんど影響を受けなかったことは、培養実験¹²⁾において Fe^{2+} による促進と Mn^{2+} によるこれと拮抗的な阻害がみられた事実と矛盾するように見える。しかし、第4表に示したとおり、この基本細土にはすでにかんりの量の鉄（おそらくマンガンも）が存在しており、しかも増殖促進効果があらわれる Fe^{2+} の濃度範囲は低いので、添加された鉄（おそらくマンガン）の効果があらわれなかったのであろう。

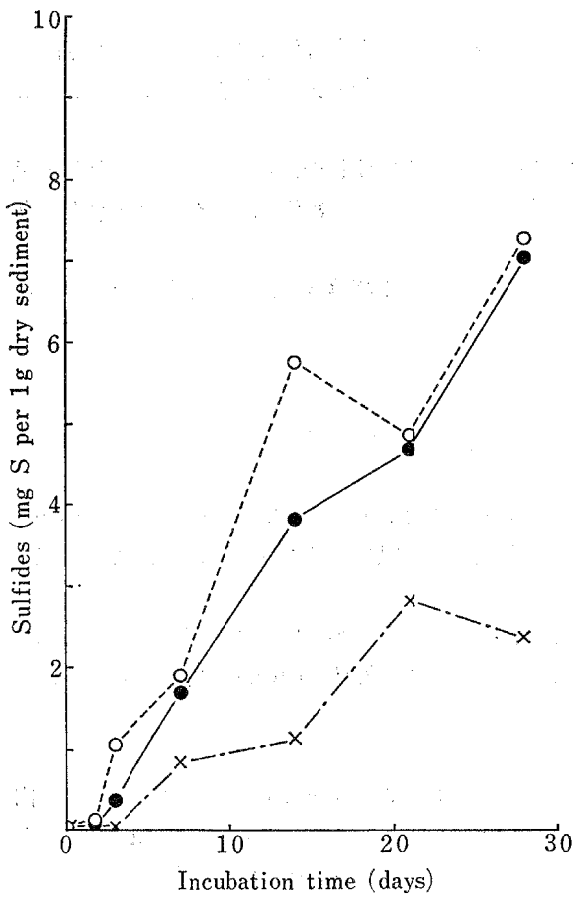


Fig. 69. Production of sulfides in the fine sediments (No.1) added with Mn in different concentrations.
 --○--: sample G; —●—: sample H;
 -·-x-·-: sample I.

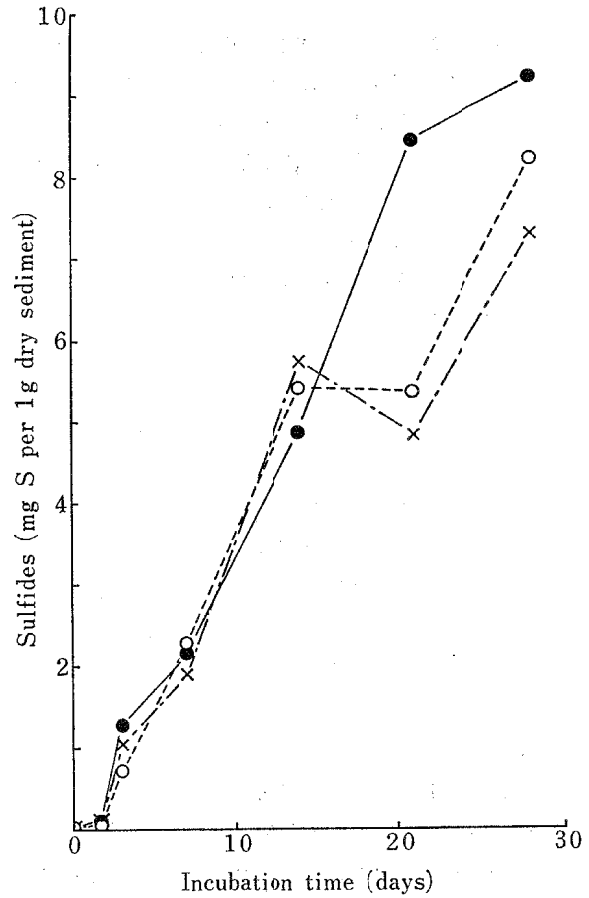


Fig. 60. Production of sulfides in the fine sediments (No.1) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample A; —●—: sample D;
 -·-x-·-: sample G.

一方、この細菌の活性にもとづく硫化物集積量はマンガン添加量の多いほど小さかったことは、この細菌の活性に対するマンガンの阻害濃度の限界が、増殖に対するその限界よりも著しく高いことを意味するように見える。

この実験では、どの試料においても底堆積物中にも水中にも遊離硫化水素が検出されなかったが、これは鉄など金属の含有量が高く、生成された硫化水素がただちに不溶性金属硫化物として沈降したためであろう。

Eh の降下速度がマンガン添加量の多いほど小さかったことは、硫化物集積量の相違によるよりは、加えられた二酸化マンガンの電動能にもとづく差異ではなからうか。また、 pH 低下がマンガンの最大量において共通して緩慢であった理由は不明であるが、OPPENHEIMER ら³²⁾の述べているように、一部は硫化物集積における差が反映された結果かもしれない。

3. 要 約

風乾海底細土に鉄（水酸化第二鉄）およびマンガン（二酸化マンガン）を各種濃度に加え、海水を満たして密閉下で 30°C に incubate し、硫酸還元菌の増殖と活性、およびその他の微生物活動におよぼす鉄およびマンガンの影響を調べ、つぎの結果を得た。

1) 硫酸還元菌の増殖は、この実験条件下では鉄およびマンガンのいずれの添加量によっても影響を受けなかったが、硫化物集積はマンガン添加量の多いほど明らかに阻害された。鉄添加量自体による硫化物集積の差異はみられなかった。

2) *Eh* 降下はマンガン量が多いほど多少ともおそく、pH 低下および第2鉄還元も多量のマンガンにより阻害された。

Ⅶ. 底土堆積物中における硫化物生成におよぼす堆積物粒径の影響

底土堆積物中における微生物の生育と活動は堆積物粒子の粒径組成によって著しい影響を受けることが知られている³⁸⁾。一般に、微粒からなる堆積物には多くの生菌が見出され、粗砂にはこれが少ない。また、硫化物含量の高い沿岸や河口の底土堆積物の多くは、微粒からなっている。

ここでは、硫酸還元菌の増殖、硫化物生産活性およびその他の微生物活動が、堆積物粒子の粒径組成によってどのような影響を受けるかをモデルを用いて追究した。また同時に、堆積物中の鉄含有量との関係についても検討した。

1. 実験方法および結果

吉見地先より採った海底砂質土の風乾細土 No. 2 を用い、これに有機物（粉末セルコースとアジ細切肉をおのおの1%）と第5表に示す量の水酸化鉄を加え、海水を満たし密閉下で 30°C に incubate して、各種の微生物活動を追跡した。これを粗粒の堆積物モデルとし、上の実験 VI のそれを微粒の堆積物モデルとして同時に並行して実験を進め、両者の結果を比較検討した。

Table 5. Preparation of coarse sediment samples containing iron in different concentrations.

Samples	Amount of Fe ₂ O ₃ added to basal air-dried coarse mud (No. 2) (%)	Total iron contents of samples* (Fe mg/g dry sediments)
J	0	34.9
K	2.0	60.4
L	5.0	111.0

* analytical value

前者（粗粒）についての結果は第 61~67 図に示すとおりで、要点はつぎのようである。

1) *Eh* および pH: *Eh* 降下と鉄添加量との間には著しい関係はなかったが、中期以降において鉄無添加のものが他よりかなり低い値を示した。pH の変動は不規則であったが、概して鉄量の多いほど降下速度と程度が大きかった。

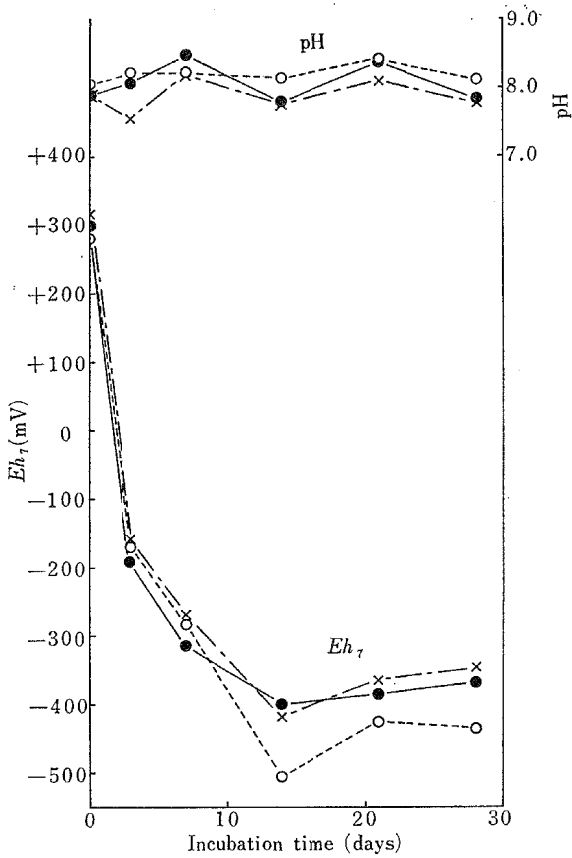


Fig. 61. Changes in Eh and pH of the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample J; —●—: sample K;
 -·-·-×-·-·-: sample L.

2) 細菌数: 一般好気性菌も硫酸還元菌もともに鉄含量との間に一定の関係が見出されなかった。

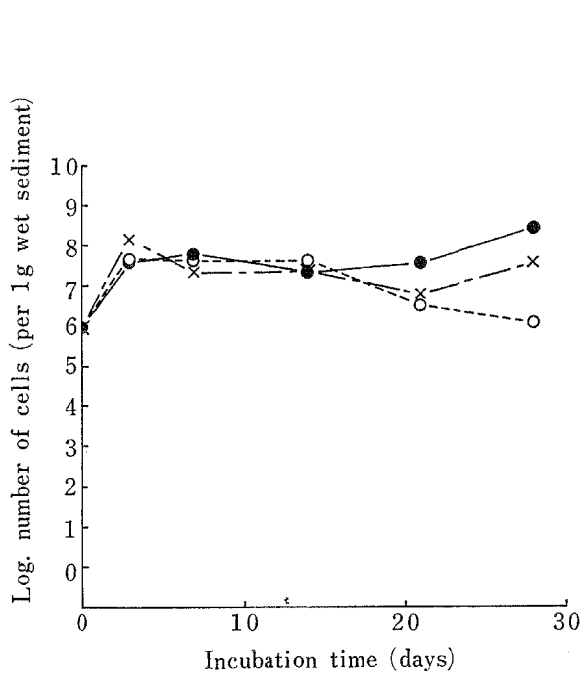


Fig. 62. Growth of aerobes in the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample J; —●—: sample K;
 -·-·-×-·-·-: sample L.

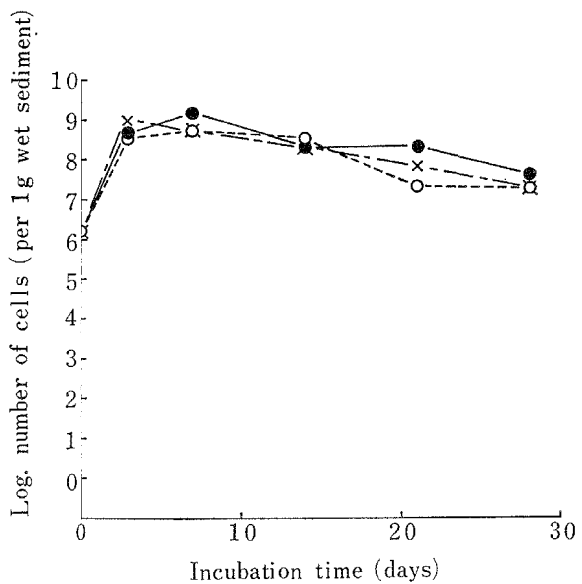


Fig. 63. Growth of sulfate reducers in the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample J; —●—: sample K;
 -·-·-×-·-·-: sample L.

3) 第2鉄還元およびイオン状2価鉄：第2鉄還元率は酸化第二鉄2%において最大で、5%は最小の傾向がみられた。イオン状2価鉄量は、鉄添加量の多いほど大きかった。

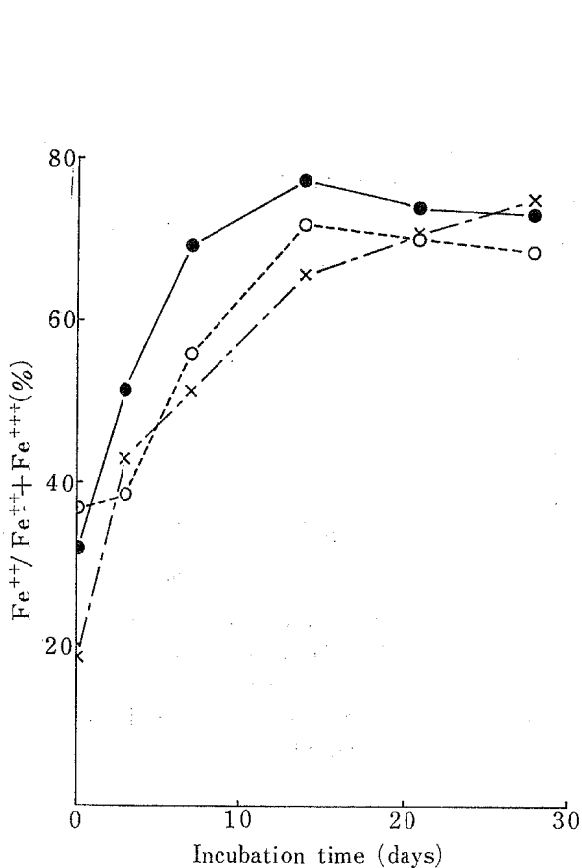


Fig. 64. Reduction of ferric iron in the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 -○-: sample J; ●-: sample K;
 -·-x-·-: sample L.

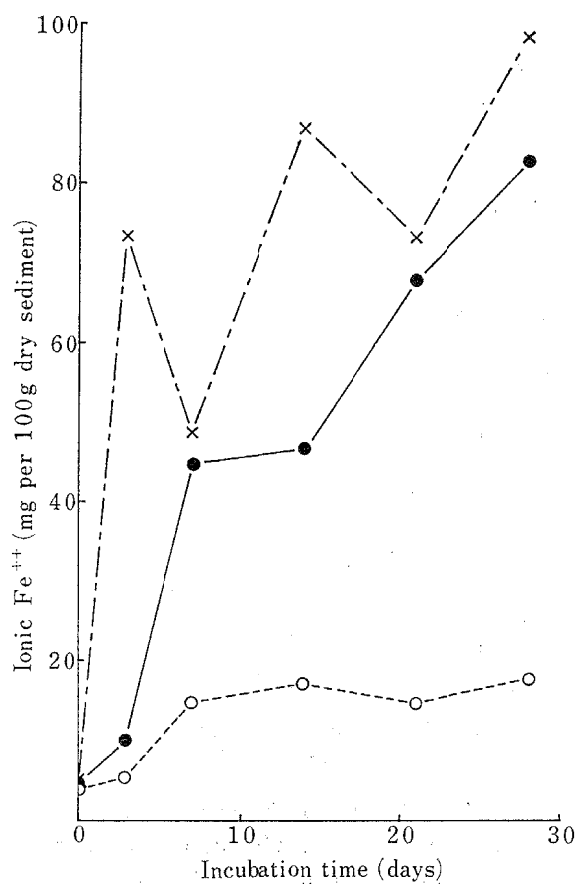


Fig. 65. Change of ionic Fe^{++} concentration in the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 -○-: sample J; ●-: sample K;
 -·-x-·-: sample L.

4) 硫化物：底堆積物中の硫化物集積量は、鉄添加量の多いものほど著しかった。遊離硫化水素は、堆積物中にはどの試料にも検出されなかったが、水中にはかなりの量が見出され、その量は鉄添加量の小さなものほど大きかった。

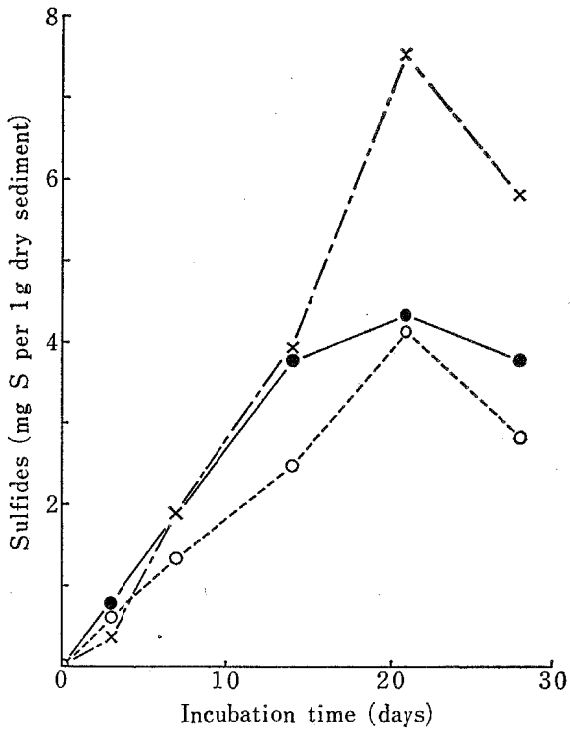


Fig. 66. Production of sulfides in the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample J; —●—: sample K;
 - - - x - - - : sample L.

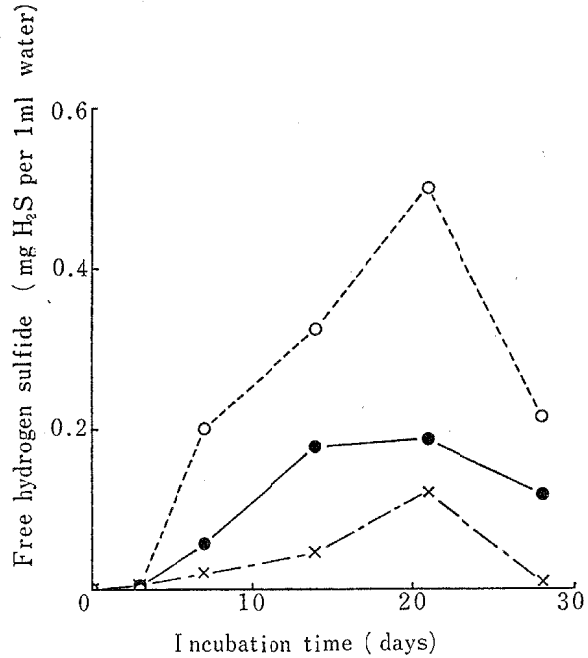


Fig. 67. Amount of free hydrogen sulfide in the overlying water of the coarse sediments (No.2) added with Fe in different concentrations.
 --○--: sample J; —●—: sample K;
 - - - x - - - : sample L.

2. 考 察

上の砂質堆積物中では、硫酸還元菌の増殖が鉄添加量の多少にかかわらず、ほとんど差を示さなかったのは、最初の菌数が高かったことも一因かもしれないが、第5表にみるとおり基本細土中に多量の鉄が存在していたため添加効果があらわれなかったものと思われる。しかし、硫化物集積状態には鉄添加量の影響がみられ、底堆積物中の硫化物量は鉄量の多いものほど大きく、一方、水中の遊離硫化水素は鉄量の多いほど少なかった*。この結果は、微粒の堆積物についての実験VIにおいて、硫化物集積に鉄量の影響がみられず、水中には鉄量の多少にかかわらず遊離硫化水素が見出されなかった* ことと考えあわせて興味深い。

これらの堆積物中に実際に含まれる全鉄量は、第4および5表にみるとおり両者ほぼ同程度であるから、全鉄量の差異がこのような相違を与えたのではない。一方、堆積物粒子の粒径分布は第6表に示すとおりで、

Table 6. Distribution of particle size in basal mud (by pipette method).

Basal mud	Distribution of particle size (% of dried mud)				Name
	Coarse sand	Fine sand	Silt	Clay	
No.1	8.9	33.7	36.8	21.0	Clay loam
No.2	18.5	58.2	15.2	8.3	Fine sandy loam

* この場合、遊離硫化水素量と pH 値との間には、全く関係がみられない。

両者間に著しい相違があり、前(VI)の実験のものは小径に富む clay loam (粘壤土)であるのに対して、この(VII)実験では砂に富む fine sandy loam (微砂壤土)であるから、おそらくこのような粒径組成の相違あるいはこれに付随する何らかの要因が、上の結果を与えたものと思われる。

佐藤・山根³⁹⁾は水田土壌の湛水 incubation 実験において、遊離硫化水素の発生が砂質土では水酸化鉄の添加によって抑えられたのに対して、黒泥土ではこの抑制効果が小さかったことをみて、黒泥土中に多い有機コロイドが加えられた鉄と複合体をつくるか、あるいは何らかの干渉作用によって鉄と硫化水素との結合を妨げたためであろうと述べている。

しかし本実験の結果では、上と反対に、有機コロイドが多いとみられる粘質土では水中への硫化水素の溶出がなく、有機コロイドの少ない砂質土ではこれの溶出がみられた。このことは、粘質土中の鉄あるいは有機コロイドが硫化水素と結合しやすくこれの遊離を抑えたのに対して、砂質土中に存在する鉄にはこの作用がないか、あるいはこの抑制作用と関連のある有機コロイドが不足しているためではなかろうか。そして、これに加えられた水酸化鉄は硫化水素と結合しやすい形に変化し、この濃度に応じて硫化水素の遊離を抑制したのではなかろうか。粘質土を用いた実験 VI にくらべて、この場合の *Eh*, pH, 第2鉄還元, イオン状2価鉄に対する鉄添加量の影響がかなり大きかったことは、この事情と何か関連があるようにみえる。また、砂質土では堆積物中の硫化物量が鉄添加量の増加とともに増大したが、水中溶存の硫化水素の全量と底堆積物中の硫化物の全量とを合わせた全硫化物総量(風乾細土 12g と水 100 ml 中の全量)は、鉄含有量の多少にかかわらずほぼ同程度となる。すなわち、この系全体としての硫化物生産活性は鉄含有量の多少によっては影響を受けず、生成された硫化水素の大部分が底堆積物中で不溶性硫化物として固定されたか、またはそのかなりの部分が遊離硫化水素として水中へ溶出したかの相違にすぎないように思われる。このような点を究明するには、底堆積物に含まれている鉄および有機コロイドの形態あるいは機能について、多くの問題が解明されねばならない。

ZOBELL³⁸⁾は、海底堆積物中の細菌の総数は堆積物粒径が小さくなるほど多いことをみて、これは微細な粒子からなる底土ほど有機物含有量が高いことが主な理由であると、さらにその他の理由を挙げている。OPPENHEIMER⁴⁰⁾は、小粒径からなる底堆積物では細菌の生育に有効な固体表面が大きく、有機物などの栄養分、細菌およびその酵素などの吸着が強く、それらが濃縮された状態であると述べている。他方、VOLKMANN・OPPENHEIMER⁴¹⁾は、海底堆積物中での有機物の分解は粘質土中でよりも砂質土中での方が活発であることをみたが、OPPENHEIMER⁴⁰⁾はこの理由として、砂質土の間隙中にはきわめて多種類の微生物が存在するが、粘質土中には間隙が小さいので種類の限られた細菌しか生息しないためとしている。さらに彼⁴⁰⁾は、底堆積物中の有機物を可利用有機物と、細菌や酵素には利用され得ない粘土格子をつくる有機物とに区別して考えねばならないと述べている。上に示した佐藤・山根³⁹⁾の努力も、この方向に向けられている。

この実験では粘質土と砂質土の間には、一般細菌、硫酸還元菌の増殖およびそれらの活性に量的差異がほとんどみられなかったが、これら堆積物モデルには強制的に有機物が同様に加えられたので、有機物量や有機物の存在形態における本来の相違がほとんど反映されなかったためと考えられる。このことは反面、天然堆積物においては粒径の差異そのものよりは、むしろそれに付随する因子(可利用有機物の量と形態など)が重大であることを思わせるものであって、一般に細菌数が少なくその活性も低いと考えられている砂質土であっても、何らかの原因で可利用有機物が大量に供給されれば、細菌の増殖と活性は十分増進することを示すものであろう。

底堆積物中における微生物の増殖と活性に対する堆積物粒径の影響については、さらに多くの成果が集積されなければならないが、上の結果から、硫酸還元菌の場合にも硫化物生産あるいは遊離硫化水素放出と粒径組成との間に深い関連のあることが想像される。生物に対する硫化物の毒性は主として遊離硫化水素によるとみられるので、粒径組成の相違あるいはその関連因子による硫化水素遊離の差異は、水面管理上きわ

めて重大であると考えられる。

3. 要 約

底堆積物中における硫酸還元菌の増殖と硫化物生産、およびその他の微生物活動におよぼす堆積物粒子の粒径の影響を明らかにするため、粒径組成の異なる海底細土に有機物（粒末セルロースと魚肉）を加え、海水を満たして 30°C に incubate し、つぎの結果を得た。

1) 砂質土では、鉄含有量の高いものほど堆積物中の硫化物集積が高く、水中への遊離硫化水素の溶出が少なかったが、一方、粘質土の場合には硫化物集積に対する鉄含有量の影響がみられず、またどの鉄含量についても遊離硫化水素の水中への溶出が認められなかった。このことは、水圏での硫化物生産および遊離硫化水素発生に対する堆積物の粒径組成、あるいはこれと関連する何らかの要因の重大性を示すものであろう。

2) 有機物が同程度に加えられたこの実験条件下では、砂質土と粘質土の間には、一般細菌、硫酸還元菌の増殖および活性にほとんど差異がみられなかったことから、粒径組成を異にする天然堆積物間にみられる細菌の増殖と活性の差異は、粒径組成の相違によるよりは、この相違に関連する有機物の量的あるいは質的な差異によるのではないかと推測される。

総括および結論

自然界における微生物による硫化物生産の一部は、シスチン、システインあるいはメチオニンなど含硫アミノ酸の分解にもとづく。GUNKELら²⁾は、この活性をもつ細菌の海底堆積物中における分布状態と、硫黄化合物の存在形態の変化を追跡して、このような機構による硫化物生産がかなりの部分を占める場合があると推測している。たしかに、自然界にはこれら有機窒素化合物から硫化物を生産する細菌が広く見出され、その生菌数が硫酸還元菌数をはるかに上まわり一般細菌数のなかで占める割合がきわめて高率におよぶこともある⁴²⁾。しかし、この生菌数の高いことは、その場における活性の高さを必ずしも表現するものではない。培養実験⁴²⁾によると、含硫アミノ酸よりの硫化水素生産菌の活性は、通常、硫酸還元菌のそれにくらべてかなり低く、しかも多量の硫化水素と *Eh* 低下にともないその活性は著しく抑制される。通常、底堆積物中における基質含硫アミノ酸の不足と低い *Eh* などの環境条件は、この細菌の旺盛な活動にとって、はなはだ不利であろう。したがって、硫酸塩欠乏の淡水域に蛋白質系有機物がとくに豊富に供給された場合のような特殊な事情を除いては、通常、自然環境における硫化物生産は、大部分、硫酸還元菌による硫酸塩の還元由来すると考えられる。

はじめに述べたように、この実験は現地における生態学的調査と純粋培養実験の中間段階として、海底堆積物モデルを実験室内に組み立て、微生物混合系の代謝を、硫化物生成を中心として総合的に追跡しようと試みたものである。規制された各種条件下のモデル底堆積物中における、硫酸還元菌の増殖と硫化物生産活性およびこれと関連のある種々の微生物代謝に対する各種因子の影響を検索したところ、底堆積物中における硫酸還元菌の増殖と活性は、一般好気性菌および嫌気性菌にくらべて環境要因の影響をきわめて敏感に受けることが明らかになった。

その結果を総括すると、つぎのとおりである。

1. 15~30°C の温度範囲では、温度の上昇とともにこの細菌の増殖と硫化物生産活性が顕著に増大する。
2. 海水環境に近くなるほどこの細菌の海洋性種が、また淡水環境に近くなるほどその淡水性種がそれぞれ活発に増殖するが、これら両種を合わせたの総数に環境塩分濃度の高低にかかわらずほぼ同程度であって、増殖にともなう硫化物集積量は（硫酸塩が十分存在する限り）塩分濃度によってほとんど影響を受けない。
3. この細菌の増殖および活性は、可利用有機物濃度が高くなるほど、きわめて著しく促進される。

4. この細菌が直接利用できる有機基質は少数の種類に限られるので、有機物の種類によってその利用性には遅速がみられるが、セルロースのような比較的難分解性の有機物であっても共存細菌の働きによって硫化物生成に対する促進作用が十分高くあらわれる。
5. この細菌による硫化物生産に対して、鉄は促進的に、マンガンは阻害的に作用する。堆積物粒子の粒径が大きいときは水中へ遊離硫化水素が溶出しやすいが、鉄はこれを抑制する。

なお、底堆積物中における還元状態の発達過程およびそのなかで硫化物生成段階が占める位置については実験1で明らかにしたが、上の諸実験を通じて種々の環境条件下でもこの基本的過程には相違がなく、条件によって、ある段階に多少の長短あるいは強弱がみられたにすぎない。

以上のモデル実験で得られた結果は、さきの純粋培養あるいは混合培養実験^{7~14)}の成績によって矛盾なく説明され、一方、天然水域における現地調査^{4)~6)}の結果をよく再現している。これらの諸実験の結果をまとめて、沿岸海域の底土堆積物中における硫化物の生成、集積の過程と、これに影響をおよぼす各種環境要因の重要性について、総合的に考察してみよう。

沿岸浅海域あるいは河口水域の底堆積物中にみられる硫化物の生成は、ほとんど大部分、硫酸還元菌による硫酸塩還元反応にもとづく。この細菌は低い酸化還元電位のもとでのみ生育できる偏性嫌気性菌であって、その生育と活性は環境電位の高さによって著しい影響を受ける。しかし天然では、この細菌の生育に必要な還元状態は好気性菌の先行する活動によって比較的容易にもたらされるから、通常は環境の初期電位の高さが、この細菌の生育、活動を制限する要因とはならない。しかも、この細菌の生育と硫化物生産にともない環境電位は急激に降下するから、たとえ局部的にでも低電位の部分が得られれば、そこに増殖がはじまり、生育と活動が加速度的に高まると考えられる。

この細菌の増殖と硫化物生産活性は、温度、pH、塩分の濃度と組成、金属化合物、有機物の量および質など各種の環境条件によって支配されるが、一般にその影響のつよさは、増殖に対するよりも活性に対して著しい。そのため、この細菌の天然における分布はきわめて広く、その生菌数密度に顕著な差異のあらわれない場合であっても、活性にもとづく硫化物集積量には著しい相違のみられることがある。

硫酸還元菌の生育、活動は、通常温度範囲内では温度の上昇とともに高まるから、季節的には夏季に、地形的には温度の上昇しやすい浅海において硫化物生産が促進される。高温では一方、死滅速度も硫化物逸散速度も大きいので、生菌数および硫化物集積量そのものには低温とくらべて大差のないことが多いが、回転の早さから考えて環境に対する高温の影響が重大である。

この細菌の増殖は中性付近の比較的せまいpH範囲でのみおこるが、海水や底堆積物のpHはほとんど中性付近であり、また酸性あるいはアルカリ性の廃水が流入しても緩衝作用によってほぼ中性付近に保たれるから、一般にはpHが自然環境におけるこの細菌の活動を制限することはない。しかし、活発な有機物代謝にともなう一時的なpHの低下は硫化水素の遊離を促がすと思われる。

一方、塩分濃度に対しては硫酸還元菌はきわめて高い感受性をもつが、海水環境に近いところではその海洋性種が、また淡水環境に近い場合には淡水性種がそれぞれ支配的に活動するので、全体としての生菌数と硫化物集積量には(硫酸塩が十分存在する限り)塩分濃度そのものにもとづく差異はみられない。この細菌の増殖に必要な硫酸塩はきわめて微量であるから、たとえ純淡水域でも硫酸塩濃度が生育を制限することはないが、その活性にもとづく硫化物集積量は、当然、基質硫酸塩(その他の可利用硫黄化合物)の濃度に依存する。

硫酸還元菌の増殖と活性に対して環境の鉄は促進的に、マンガンは阻害的に作用し、これらの両者間には明らかな拮抗関係が存在する。高濃度に生産された遊離硫化水素はこの細菌の増殖と活性を阻害するが、これが鉄の存在によって不溶性硫化鉄として固定されれば、その阻害作用は除かれ極度に高い硫化物集積量が得られる。コバルト、クロム、鉛、亜鉛その他多くの金属は生育を多少とも阻害するが、一方、生産された硫化水素を不溶性硫化物として不活性化させるため、硫化物の最終集積量は増大する。このようにして、

生物に直接的被害を与える遊離硫化水素の水中への溶出は、堆積物中に比較的多い鉄によって主として抑制される。

一般に砂質底土では粘質土にくらべて硫化物集積量が小さいが、これは主として易分解性有機物に乏しいためであり、このような粗大粒子よりなる堆積物であっても有機物さえ豊富に供給されれば、細密な粒子の堆積物と同様に硫酸還元菌の増殖と活性が高められる。また、砂質底土では粘質土にくらべて遊離硫化水素が溶出しやすいが、この溶出に対する鉄の抑制効果は顕著である。

以上のように、この細菌の生育と活動は諸種の因子の影響を受けるが、通常の天然海域では多くの場合これら因子は硫化物生産に対して不都合な条件にはない。天然環境でこの細菌の分布と活性を制限する可能性の大きいのは、この細菌がエネルギー源あるいは炭素源として利用する有機物の濃度であろう。硫酸還元菌が直接利用できる有機物の種類は限られた少数にすぎないから、通常海底堆積物にはこれらが欠乏した状態にある。しかし、これら可利用有機物は種々の天然有機物が各種微生物によって分解するとき生ずる通常の代謝生産物であるから、このような底土へ有機物が豊富に供給されれば、たとえ直接可利用有機物が少なくても共存微生物によって容易に可利用態に変化させられ、セルロース質のような難分解性の物質でさえも、きわめて高い促進効果をもたらすようになる。したがって、有機物の種類によってその利用性に遅速はみられるがきわめて広範囲にわたる各種有機物が間接的には利用され、比較的難分解性の物質の場合にはかえってその効果が長く継続すると予想される。水質汚濁あるいは漁場の老化現象における有機物の重大な役割がいっそう強調されなければならない。

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あげます。また、ガス分析法その他多くについて懇切なご教示とご助言をいただいた東北大学 山根一郎助教授につつしんで深謝する。

文 献

- 1) たとえば、
清石礼造・富山哲夫, 1942 : 海洋会誌, 1, 75.
土屋靖彦, 1947 : 日水産, 13, 113.
富山哲夫・山川朝義, 1949 : 日水産, 15, 491.
- 2) GUNKEL, W. and C. H. OPPENHEIMER, 1963 : "Symposium on Marine Microbiology", p. 674, Charles C Thomas, Publisher, Springfield, U. S. A.
- 3) ZOBELL, C. E., 1958 : *Producers Monthly*, 22, no. 7, 12.
STARKEY, R. L., 1961 : "Lectures Theoret. Appl. Aspects Modern Microbiol.," p. 1, Univ. Maryland, U. S. A.
- 4) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明, 1955 : 日水産, 21, 102.
KIMATA, M., H. KADOTA, Y. HATA and T. TAJIMA, 1955 : *Rec. Oceanogr. Works Japan*, 2, 85.
- 5) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・三好英夫, 1957 : 日水産, 22, 701.
KIMATA, M., H. KADOTA, Y. HATA and H. MIYOSHI, 1958 : *Records Oceanogr. Works Japan*, Special No. 2, 187.
- 6) KIMATA, M., H. KADOTA, Y. HATA and H. MIYOSHI, 1960 : *Records Oceanogr. Works Japan*, Special No. 4, 53.

- 7) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明, 1955 : 日水産, 21, 109.
- 8) ———・————・————・————, 1955 : ———, 21, 113.
- 9) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦, 1955 : 日水産, 21, 229.
————・————・————, 1955 : ———, 21, 235.
- 10) 畑 幸彦・三好英夫・門田 元・木俣正夫, 1959 : 本報告, 8, 135.
- 11) 畑 幸彦, 1960 : 本報告, 9, 329.
————, 1960 : ———, 9, 347.
- 12) ———, 1960 : ———, 9, 363.
- 13) ———, 1960 : ———, 10, 57.
- 14) ———, 1960 : ———, 10, 79.
- 15) ———, 1963 : ———, 12, 215.
- 16) 京大農化, 1957 : “農芸化学実験書” 1, p, 247, 産業図書.
- 17) 小山忠四郎, 1958 : “実験化学講座” 14, 地球化学, p. 369, 丸善.
- 18) 高井康雄, 1956 : 土肥誌, 26, 467.
- 19) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫, 1951 : 日水産, 17, 115.
————・小島良夫, 1953 : ———, 18, 687.
- 20) 田宮信雄, 1958 : 化学の領域, 増刊 34, p. 1.
LORANT, ST., 1929 : *Z. Physiol. Chem.* 185, 245
- 21) MUELLER, H. F., T. E. LARSON and W. J. LENNARZ, 1958 : *Anal. Chem.*, 30, 41.
- 22) KOYAMA, T., 1953 : *J. Earth Sci.*, Nagoya Univ., 1, 107.
小山忠四郎, 1958 : “実験化学講座” 14, 地球化学, p. 71, 丸善.
- 23) 山根一郎, 1961 : 東北大農研彙, 12, 261.
- 24) BROMFIELD, S. M., 1954 : *J. Soil. Sci.*, 5, 129
————, 1954 : *J. Gen. Microbiol.*, 11, 1.
- 25) 門田 元・三好英夫, 1964 : 京大食研報告, No. 27, 9.
- 26) BARKER, H. A., 1956 : “Biological Formation of Methane” Bacterial Fermentation,
CIBA Lecture Microbial Biochem., p. 1, John Wiley Sons Inc. Publisher, New York,
U. S. A.
- 27) 高井康雄, 1960 : 第3回日本アイソトープ会議報告 A—9. p. 897.
- 28) ———・小山忠四郎・加村崇雄, 1955 : 農化, 29, 967.
————・————・————, 1957 : ———, 31, 211.
————・————・————, 1957 : ———, 31, 215.
- 29) KOYAMA, T., 1955 : *J. Earth Sci.*, Nagoya Univ., 3, 65.
- 30) ———, 1964 : “Advances in Organic Geochemistry”, p. 303, Pergamon Press,
Inc. New York, U. S. A.
- 31) ZOBELL, C. E., 1947 : *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol.*, 31, 1709.
- 32) OPPENHEIMER, C. H. and L. S. KORNICKER, 1958 : *Publ. Inst. Mar. Sci.*, Univ. Texas,
5, 5.
- 33) 新田忠雄, 1960 : “水質保護論”, 恒星社厚生閣.
- 34) KADOTA, H., 1956 : *Memoirs Coll. Agr.*, Kyoto Univ., 74, 1.
- 35) WAKSMAN, S. A., C. L. CAREY and H. W. REUSZER, 1933 : *Biol. Bull.*, 65, 57.
- 36) KOYAMA, T. and K. SUGAWARA, 1953 : *J. Earth Sci.*, Nagoya Univ., 1, 24.

- 37) 村上枝彦, 1952 : 愛知学大研報, 1, 77.
- 38) ZOBELL, C. E., 1946 : "Marine Microbiology", p. 94, Chronica Botanica Co., Waltham, U. S. A.
- 39) 佐藤郁生・山根一郎, 1959 : 東北大農研彙, 11, 145.
- 40) OPPENHEIMER, C. H., 1960: *Geochimica Cosmochimica Acta*, 19, 244.
- 41) VOLKMANN, C. and C. H. OPPENHEIMER, 1959 : Bacteriological Proceedings 59th General Meeting, p. 11.
- 42) 畑 幸彦・村上正忠 : (未発表)