

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

バイオフィルムを有する底部境界モデル培養系の確立と硫化物動態

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-01-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石橋, 矩久 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1484

博士学位論文

バイオフィルムを有する底部境界
モデル培養系の確立と硫化物動態

平成 29 年度

(2017 年 9 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用環境システム学専攻

石橋 矩久

博士学位論文

バイオフィルムを有する底部境界
モデル培養系の確立と硫化物動態

平成 29 年度

(2017 年 9 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用環境システム学専攻

石橋 矩久

目次

1. 研究の背景	1
2. セディメントミックスバイオフィルムの再構成と培養	11
2.1 飼育水槽底面バイオフィルムの再現	11
2.2 液体表面バイオフィルムの形成	13
2.3 固相底面へのバイオフィルム培養	19
2.4 考察：セディメントミックスバイオフィルムの再構成と培養	22
3. バイオフィルムを有する底部境界モデル	45
3.1 水分を含む底質のモデル系の作成	45
3.2 モデル底面でのバイオフィルムの再構成と培養	45
3.3 モデル底面直上の白濁層形成	46
3.4 底部境界モデルの硫化物等の挙動	49
3.5 考察：バイオフィルムを有する底部境界モデル	53
4. モデル底部境界域の硫化物代謝と溶存酸素消費	70
4.1 モデル底面上部・下部の硫化物生成	70
4.2 モデル底面直上の酸素消費	72
5. 総合考察	84
引用文献	88
謝辞	96

1. 研究の背景

バイオフィーム (biofilm) は微生物と微生物が分泌する細胞多糖 (EPS: Extracellular polysaccharides) から構成される集合体であり、多くの場合は細菌によって形成され、細菌の生活形の1つとも見なされている。バイオフィームは固体表面と水が接している環境であれば、自然環境と人工環境を問わずに存在する。自然環境ではバイオフィームは複数種類の微生物から構成されるミックスバイオフィーム(mixed biofilm)として存在している (Ghannoum and O'Toole, 2004; 濱崎・木暮, 2015)。

バイオフィームを構成する集合体付着生活形の細菌は細胞周囲に細胞外多糖を有している。このために同種の浮遊生活形の細菌と比較して、バイオフィームを構成する細菌は環境変動の流動、干出、浸透、水質変化等に対する耐性が強い。バイオフィーム内部では細菌の細胞が非常に密に隣接しているために、クオラムセンシング (Quorum sensing: 密度依存的遺伝子制御機構) などの細胞間情報伝達と集団的な遺伝子発現が起こりうるとされている (日本微生物生態学会バイオフィーム研究部会, 2005)。栄養の乏しい天然環境に生育する天然バイオフィーム (environmental biofilm) はバイオフィーム内部に通水チャネル (water canal) を有していることがあり、その場合にはバイオフィーム内部での物質の透過と伝達は非常に早いといわれる (Ghannoum and O'Toole, 2004; 濱崎・木暮, 2015)。バイオフィームバクテリア (biofilm bacteria) の新しい基盤への付着とバイオフィーム形成は、1) 有機物沈着によるコンディショニング・フィルム (Conditioning Film) の形成、2) バイオフィームバクテリアの定着、3) EPS 形成を伴うバイオフィーム形成、の順序で行われる (日本微生物生態学会バイオフィーム研究部会, 2005)。バイオフィームは沿岸、河口域の底質 (図 1.1) でよく見いだされる他、河川、温泉、深海熱水孔の近縁、土壌にも観察される (森崎ら, 1998)。大地震時に浅海と深海の海底でバイオフィーム形成が観察された例もある (図 1.2)。また、動植物の体表面や体内にもバイオフィームは存在している。人工物では、配管内部、金属・コンクリートなど構造物、食品な

どの表面にバイオフィームが存在することが知られている（森崎ら，1998）。バイオフィームは人間生活にマイナスとプラスの両方の働きをしている。バイオフィームのマイナス面の働きとして、医学分野では、薬剤耐性増大、医療器具等汚濁、歯疾患等などの深刻な問題につながる要因と考えられており、そのような観点からバイオフィームが研究されている（松山，1999）。バイオフィームのプラス面では、百年以前から水処理技術の1つである「ろ床法」としてのバイオフィーム利用などがある。細菌の吸着作用を利用した鉱物等の選別、廃棄物処理、汚濁底質改良（バイオレメディエーション，bioremediation）にもバイオフィームは用いられている。農業においては、バイオフィームは土壌改良等への利用が研究されている。近年は微生物燃料電池や消化管内細菌系と関連したバイオフィームの研究も進展している（岡部，2012、濱崎・木暮，2015）。バイオフィームは17世紀に顕微鏡が発明された直後に、レーウェンフックにより歯垢から観察記録された（日本微生物学会，2014）。その後は、長くバイオフィームの分離と培養が困難であったため、バイオフィームを構成する細菌は生きているが培養できない細菌、viable but nonculturable、(VBNC) と見なされることもあった（Colwell and Grimes, 2000）。しかし、1990年以降には細菌の分子生物学、分析機器、顕微鏡等の技術（共焦点レーザー顕微鏡、原子間顕微鏡、電子顕微鏡、低温度スキャン電子蛍光顕微鏡、フェーリ変換分光計等）の進展により、バイオフィーム研究は急速に進んでいる（Dech, 2000）。

海底に存在する細菌は底質の泥、砂の無機物や有機物等の表面に付着するとともに、底質の粒子等の中の間隙水中にも存在する。ミックスバイオフィームは海底表面のみならず、堆積物や底質の土壌粒子の間に付着して存在することもある（Boudreau and Jorgensen, 2001）。このように、底質に存在するミックスバイオフィームを本研究ではセディメントミックスバイオフィーム（sediment mixed biofilm）と呼ぶことにする。セディメントミックスバイオフィームは砂や泥の接着を高め、干潟や海底基盤の物理的安定に寄与することもある（原田ら，2010）。しかしながら、底質から複数種類の細菌の集合体としての細菌群叢の分離と培養は行われていない。このために、沿岸、河口域の底質に

存在するセディメントミックスバイオフィルムの機能は不明な点が多い。底質試料はクラブサンプラーやコアラーを使用して底質から採取され、サンプルは研究室で除菌海水を用いて懸濁される。超音波またはホモジナイザー処理により、懸濁液の細菌は土壌粒子から分散される。この懸濁液を再度ブレンダーで攪拌し堆積物中の細菌の希釈懸濁液が得られる。この方法で得られた希釈懸濁液から堆積物中の細菌の直接的な顕微鏡の計数や単離培養が行われている。また希釈懸濁液を用いて DNA シーケン解析法により、底質細菌群集の構成種類が明らかにされている。(田中ら, 2011)。

単一種類の細菌で構成されるバイオフィルムの培養については、上記の底質細菌と同じくサンプルを超音波振動またはホモジナイザーで粉碎し、底質から分離した抽出液を用いて、細菌の単離と培養が行われる。単離した培養株からのバイオフィルム形成は、マイクロタイタープレートによる静置培養 (Microtiter-plate culture; O`Toole and Kolter, 1998)、または流水条件の微小溝チェンバー Flow chamber による顕微鏡下の培養 (Flow chamber culture; Wolfarrdt *et al.*, 1994) などの方法で行われている。この様にバイオフィルムの細菌についての現在の研究では、天然サンプルの細菌が、それぞれ単離培養されるために、複数種から構成されるミックスバイオフィルムの培養研究は乏しい。天然のミックスバイオフィルムについては、最近、病因細菌のバイオフィルムにおける細菌間の共生についての研究 (Wolfarrdt *et al.*, 1994)、温泉域や熱噴出域の極限環境のミックスバイオフィルムのコミュニティの解析 (Kubo *et al.* 2011) 等の例がある。

沿岸域の海底は陸上由来と海洋で生産された多量の有機物が蓄積され、海底表面は多彩な微生物の代謝活動により有機物の分解と無機化が活発に生じる場所である (Fenchel *et al.*, 2012; Boudreau and Jorgensen, 2001)。堆積物表面と直上水との界面を中心とする、ある幅を持った領域は、水流の底面との摩擦により流速が変化することなどの影響を受けており、その領域の上部の水柱や、下部の堆積物内部と異って、狭い領域内で物理・化学・生物学的な強い環境勾配が見られる。海底直上の領域は一般に海底境界層 (the

benthic boundary layer) と呼ばれる (Ghannoum and O'Toole, 2004; 小池, 2000) が、本研究では堆積物表面直下の領域も含め、底部境界層と呼ぶことにする。

海洋は海水に高濃度の硫酸イオンを含むため、親生元素である硫黄の莫大な蓄積場である。特に浅海域では堆積物に存在する細菌による硫黄化合物の還元は活発であり、多様な硫黄細菌類の活動は、海洋や底質の環境に大きく影響する (Gemerden, 1993; Rickard, 2012)。しかし、底部境界で多く観察されているバイオフィームが、底部境界の環境、特に底部境界の硫黄サイクル等の化学環境へ、どのような働きをしているかは明らかではない。

底部境界層の硫化物と底部境界のバイオフィーム

岩礁域を除く沿岸の多くは砂や泥を含む水分を有する底質 (aquatic sediments) (Boudreau, 1997) であり、その底面は陸上や海域の由来の有機物が多く堆積しているのが特徴である。この底質の表面堆積物には $10^9/\text{cm}^3$ の細菌が生活しており (Fenchel *et al.*, 2012)、このために水分を有する底質の底部境界域では細菌による物質分解と生物生産が多様に活発に行われている。特に、底質表面では硫酸還元細菌が非常に多く存在し (Fenchel *et al.*, 2012)、海水域の堆積物内では硫黄の還元が最も優勢であり、汽水域と塩水域ではガス状硫化水素が大気や水中へ多く排出している。この硫黄の還元活動は海水中や地中の硫化物と酸素濃度の変化により変化し、沿岸底層の化学環境を大きくコントロールしている。海洋および陸水では有酸素域から無酸素域の領域までは、有酸素域 (Oxic) - 有酸素・無酸素移行域 (Oxic-Anoxic Transition) - 無酸素域 (Anoxic) と分類している。底質は有酸素域 (Oxic) - 亜酸素域 (Suboxic) - 無酸素域 (Anoxic) と分類している。酸素と硫化物の混在する不全状態 (dysoxic condition) 領域の名称は、有酸素・無酸素移行域 (海洋、陸水) と亜酸素域 (底質) と異なる。硫化物のみの領域は “euxinic sediment”、反対に酸素のみの領域では “fully oxic” の術語が使用される。

硫黄元素は -2 から $+6$ の価数を有し、硫黄を含む無機化合物と有機化合物は非常に多くの種類がある。硫黄化合物は好氣的環境における酸素と同じく電子受容体であり、還元環境では Fe と容易に反応する。硫黄の地球化学サイクルは、他の親生元素である炭素 C、窒素 N、リン P と比較して非常に複雑である (Howarth *et al.*, 1992)。海水には淡水よりもはるかに高い約 28mM 濃度の硫酸イオンが含まれている。海洋は、硫黄の地球化学サイクにおける大きな貯蔵場所であるために、特に沿岸の底質と海水の硫黄サイクルの解明は地球化学と沿岸環境を理解するうえで重要である (畑, 1974)。硫化水素は好気生物に毒性を示し、その生息域を制限している。一方、硫化水素濃度は、嫌気環境をコントロールする。酸揮発性硫化物 (AVS; Acid-volatile sulfide) は堆積物に酸を加えることによって発生する酸揮発性のイオウ量を硫化水素として定量した値で、Berner (1964) によって定義された実験操作上の分析値である。AVS として測定される硫化物種類は HS^- 、 H_2S 、 FeS 、 Fe_3S_4 である (Rickard and Morse, 2005; Meysman and Middelburg, 2005)。 FeS_2 は溶解度積が高いために硫化物 AVS には含まれず、 FeS_2 はクロム硫酸の溶解により別に測定される (寒川・日色, 1996)。酸揮発性硫化物の硫黄量 (AVS-S) は、検知管式ガス測定器 (JIS K 0804) のガステック法により簡易に再現性が高く測定できる。このために、この測定方法は浅海の底質調査に広く使用されている ((笠原ら, 2012)。海水中の AVS は堆積物中の AVS と異なり、粒状物は非常に少なく、ろ過された海水の AVS には溶存硫化物である H_2S 、 HS^- 、 FeHS^+ 、 FeS cluster (FeS 残渣物)、硫化イオン-ナノ粒子 (Ion sulfide nanoparticles) が含まれている (Rickard and Morse, 2005)。海水中の H_2S 、 HS^- 、 S^0 の存在比は海水の pH に支配されている。また海水中には鉄分は非常に少ないために、還元状態の海水中では、ほとんどの AVS は H_2S と HS^- と考えられる (寒川・日色, 1996)。

底質の基盤と上部の水相あるいは気相との境界域には、バイオフィームを含む微生物群叢のマット (バイオマット、microbial mat) が付着生育していることがある (Fenchel *et al.*, 2012)。バイオマットは、時間的および空間的な変動が大きい、複数の微生物で構成される複合的生態系である。バイオマットは干潟、砂浜などの浅海域底質表面、およ

び湖沼底質表面、河川底、温泉、深海の熱水域等で見いだされている。近年、微小電極法による酸素と硫化物等の化学物質の微小分布解析と遺伝子解析による微生物種組成解明の併用により、バイオマットを有する河口、砂浜等の堆積物の微細環境について詳細な解析がなされている (Kühl and Jørgensen, 1992)。こうした研究の結果、細菌と珪藻を有するバイオマットが、底質表面の酸素、窒素化合物、硫黄化合物の循環をコントロールして生物地球化学的サイクルに大きく寄与することなどが指摘されている (Canfield *et al.*, 2005)。しかし、底質表層に存在するバイオフィームや、バイオフィームがさらに重層化、複合化したバイオマットが底部境界層の物質循環においてどのように働いているかについては不明な点が多くある。これまでセディメントミックスバイオフィームと硫化物の挙動についての研究は多くない。

Jørgensen (1974)は放射性硫黄同位体を用いた砂浜底質のモデル試験より、砂浜の硫黄サイクルを詳細に解析した。彼は海水を含んだ小型水槽に砂を入れて、その砂上に海草を置いて、暴風後の砂浜の室内実験モデルとした。約 70 日間の試験期間中に、実験開始時に各深度の砂中に添加した放射性硫黄同位体で標識した硫酸から生成した硫化物を取り出し、それを用いて算出した硫酸還元量から各層における硫化物の存在量を求めて砂浜の硫黄サイクルを推定した。その結果、底質 10 cm 以浅の表層領域での硫酸還元活性は、それより深い領域の 10 倍以上の活性を示し、堆積物表面から近い領域で硫黄還元化が活発に行われていることを見いだした。この時、硫化物の一部は底質表面より下部の水中に蓄積されるが、多くの硫化物は底質表面から上部へ拡散することを見いだした。この試験の終了時に、複数種の硫黄細菌類から構成するバイオフィームが海草表面に育成しているのを観察し、バイオフィームと地球化学の硫黄サイクルの関連に始めて注目した。その後、このような培養試験系による底部境界層のバイオフィームと硫黄サイクルの研究はほとんど行われていない。

海水域の底部境界層の硫黄サイクルにおける、栄養、水温、溶存酸素等の変動要因の解析は重要であるにもかかわらず、不明点が多い (Jørgensen, 1974)。特に、沿岸の底層水

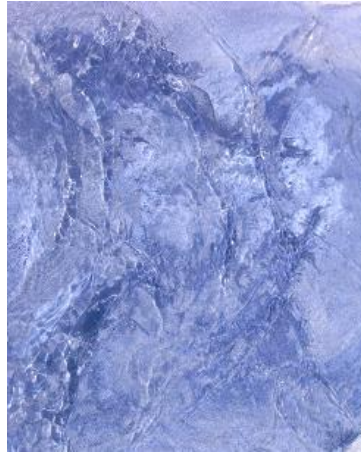
における硫化物生成メカニズムについては、次の3つのメカニズムが推定されている。すなわち、①有機物分解における酸素消費による底層水無酸素化に伴う硫化物生成、②底質に含まれる有機物分解に伴い底質中で生成した硫化物からの底層水への硫化物の移動と蓄積、③底質表面の細菌と有機物により底面付近で生成した硫化物の底層水への移動蓄積、である。沿岸の底層水の無酸素化は多くの水棲生物の分布を制限するために、無酸素水塊の形成について多く研究されている。しかし、潮汐や干出を伴う沿岸底部の環境は非常に複雑であり、硫化水素と容易に結合する鉄イオンの底質中の存在や生物攪乱等により、現場観測からの硫化水素生成と酸素消費等の解析は困難を伴う。このために底部境界層のモデル試験培養系を作成して、微生物を含む培養系を用いて実験室内で研究を行うことが非常に重要と考える。

本研究はバイオフィームを有する底部境界モデル培養系を作成して実験を行い、底部境界層の硫化物と溶存酸素等の動態を検討した。

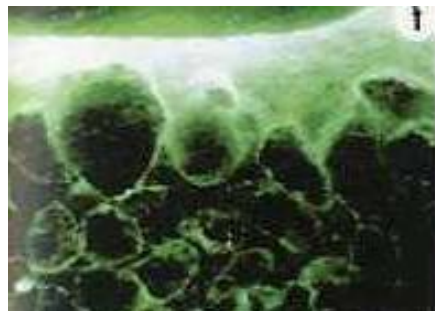
有孔虫石灰岩粉末（商品名フィッシュグリーン、富山県高岡市、通称名：貝化石粉末）は海水魚類の仔稚魚飼育の生残を高めるために、仔稚魚の量産飼育を行う栽培漁業センターで1990年ごろから使用されている。この有孔虫石灰岩粉末の飼育水への添加により、飼育環境が保持され、良好な仔稚魚の生残を得ている（本藤ら、2004；鈴木ら、2008）。しかし、この有孔虫石灰岩粉末の飼育水への添加が、仔稚魚の飼育に有効な理由は長く不明であった。筆者は2003年6月に南伊豆栽培センターにおいて、有孔虫石灰岩粉末を添加しているトラフグ稚仔魚の屋内飼育水槽の堆積物表面がバイオフィームに覆われているを観察した（Iijima *et al.*, 2009）（図1.3）。この水槽底のバイオフィーム生育から、培養が困難とされていたバイオフィーム培養と底面バイオフィームの飼育水への影響を検討できる可能性が示唆された。そのため、この飼育水槽の底部環境を模して、バイオフィームを有する堆積物からのバイオフィームの分離・再構成を行うことと、固相底面のバイオフィーム培養を試みる研究に取り組みはじめた。本研究は2003～2005年の期間は南伊豆栽培漁業センターにおいて、2009～2017年の期間は東京海洋大学において行った。



(a) 塩水池のバイオフィルム（百島栽培漁業センター、尾道；石橋撮影）



(b) 小河口域のバイオフィルム（ナチャン海岸、ベトナム；石橋撮影）



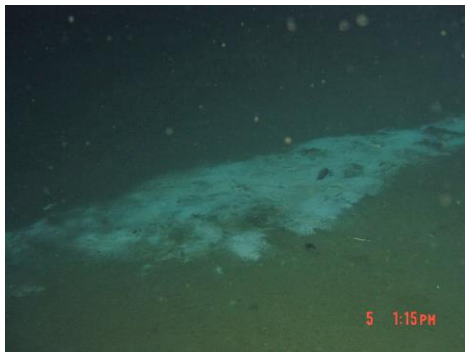
(c) 潮間帯の砂を覆うバイオフィルム（スケールは $50\mu\text{m}$ ；Krumbein, 2001）

図 1.1 底質表面のバイオフィルム



(a) 震災直後 2011.5 の気仙沼・舞根湾の海底バイオフィルム

(水深 20m ; 鳥取環境大学吉永郁生教授、私信)



(b) 2 回目の緊急地震速報により漂流中の「しんかい 6500」が撮影した微生物マット

(水深 3200m ; 海洋研究開発機構高井研研究室ホームページ)

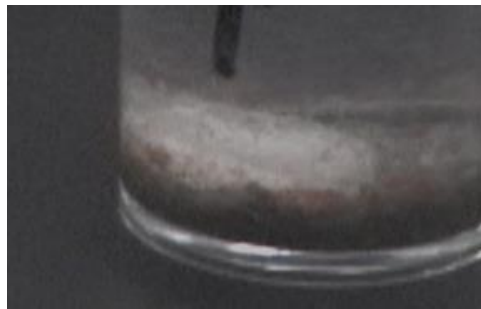
図 1.2 大地震直後の海底表面のバイオフィルム



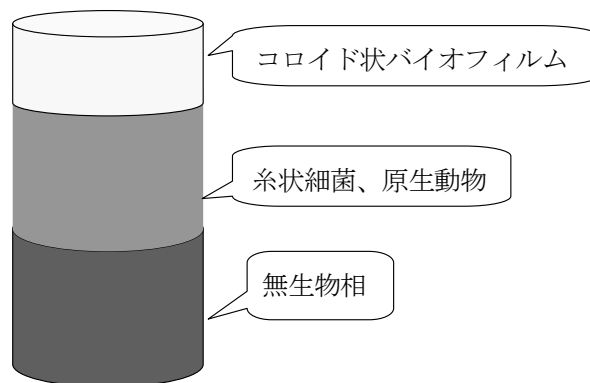
(a) 飼育水槽(南伊豆栽培センター)



(b) 飼育水槽堆積物表面のバイオフィルム



(c) セディメント・トラップ試料 (29日間設置)



(d) セディメント・トラップ試料の模式図

図 1.3 飼育水槽堆積物表面のバイオフィルム

(南伊豆栽培漁業センター、2002年6月)

2. セディメントミックスバイオフィルムの再構成と培養

複数種類の細菌から構成されるミックスバイオフィルムは単一種バイオフィルムと比べ、異なる細菌種類が密に接して生活しているために機能が多様化していることが報告されている (Elias and Banin, 2012)。

特に天然の底質にみられるミックスバイオフィルムについては、細菌を底質の砂や泥と分離するために、超音波やホモジナイザーでバイオフィルムを含むサンプルを粉砕する必要があり、一部の細菌がその操作による損傷を受ける可能性がある。また、こうして分離した微生物集団を培養する適切な方法も知られていない。このために、天然の底質に存在するミックスバイオフィルムについて、実験室内での培養による研究も知られていない。天然に生育する状態のミックスバイオフィルムが実験室内で構成し、培養することができれば、ミックスバイオフィルムの機能の研究が大きく進展すると考えられる。

現在、単一種の細菌が形成するバイオフィルム培養は、以下の二つの方法による研究例がある。すなわち、MTPによる静置培養 (O'Toole and Kolter, 1998) と、流水条件下での微小溝チェンバーによる培養 (Wolfarrdt *et al.*, 1994) である。これらの方法は、いずれもガラス管やガラススライド等の、固相の基盤上でバイオフィルムが培養されている。一方、水処理等では大量のバイオフィルムを人工的に管理する必要があるが、技術的には未だ不安定である (岡部, 2012)。第1章で述べた様に、天然の底質は固相基盤のみでなく、間隙に水分を含む砂、泥等の底質 (Aquatic sediments) の方が一般的で、こうした水分を含む底質の上にもバイオフィルムが見られる。水分を含む底質のミックスバイオフィルムについても、実験室での培養系による研究が可能になれば、沿岸環境を理解する上で、大きく役立つと考えられる。

2. 1 飼育水槽底面バイオフィルムの再現

目的および方法

堆積物表面にバイオフィルムの見られた南伊豆栽培センターの飼育水槽の底部環境を模倣し、実験室内で同様のバイオフィルムを再現することを目的として、以下の試験を行った。この飼育水槽では、飼育水の中間の深さにエアーストンが垂下されていたため、底層水の流動はほとんどなかった。それにもかかわらず、水槽の底層水には飽和度 70 %以上の酸素が溶存していた。このため、溶存酸素を保持しつつ、海水の流動が無い実験系を作成した。最初は、ろ過海水を流入、流出させて通水している 500L 容の水槽の底部に、500 mL のビーカーを設置する実験系を作成した (図 2.1)。このビーカーの底面に、飼育水槽底面からスコープにより採取したミックスバイオフィルムを有する堆積物、稚仔魚に与えている魚類初期用配合飼料 (アンブローズ 400、日本配合飼料 [現在は Feeds One] 製、粒径 420~650 μm 、表 2.1)、有孔虫石灰岩粉末 (Foraminiferal limestone; 商品名フィッシュグリーン、(株)グリーン・カルチュア、富山県高岡市、平均粒径 70 μm 、表 2.2) の 3 種類を置き、バイオフィルムの再現を試みた。その後、試験を容易に行うために、ガラス小型水槽 (底面 18 X 31 cm、高さ 24 cm) と 100 mL 容のガラスビーカーを用いてスケールダウンした実験系を作成した。水槽内に、多数の孔 (直径約 3 mm) のあるプラスチック円柱管 (長さ 12 cm、直径 5 cm) を鉛直に設置し、その内側の水面下 7 cm の位置にエアーストン (直径 3 cm) を垂下して通気し、水の動きを防止しつつ、溶存酸素を供給する系とした (図 2.2)。通気はエアーポンプ (03 PROOF 202、アデックス社) を使用した。飼育水槽底面からスコープにより採取したミックスバイオフィルムを有する堆積物 100 mg/cm^2 (重量/ビーカー底面積) と魚類初期用配合飼料 10 mg/cm^2 と有孔虫石灰岩粉末 5 mg/cm^2 の 3 種類を海水を含む 100 mL 容ビーカー底面 (底面積 24 cm^2) に置きつけた。このビーカーを上記の小型水槽の底面に置き試験した (図 2.2)。水温は 22 $^{\circ}\text{C}$ に保った。

結果

500L 容水槽、小型水槽の実験共に、培養開始直後から堆積物の直上水は懸濁し、培養開始後 5 日から 7 日にそれぞれのビーカーの底面の堆積物表面にポリマー状バイオフィルムが形成された。図 2.3 に小型水槽についてバイオフィルム形成過程についての写真を示した。

バイオフィームが形成された時、ビーカー内の水は透明となった。以上のように、水槽底面の堆積物表面と同様に、小型水槽内のビーカーに置いた堆積物の表面に、セディメントミックスバイオフィームを再現することが可能となった。

2. 2 液体表面バイオフィームの形成

a) バイオフィームを有する堆積物からの液体表面バイオフィームの構成

目的および方法

以上のような栽培漁業センターの飼育環境における水槽底面バイオフィームの再現が、自然水域の底質で見られるバイオフィームでも実施可能かどうかを検討した。検討にあたり、堆積物とバイオフィームが混合した状態ではなく、バイオフィームのみを再現できる方法を模索することとした。栽培漁業センターにおける実験で、偶然に培養液の表面にバイオフィームが形成されることがあり、気相と液相の界面にバクテリアが形成することが知られている液体表面バイオフィームと考えられた。このことから静置培養法により液体表面バイオフィームを形成させることで、堆積物から分離した状態のバイオフィームを得ることができると考えて、試験を行った。

バイオフィームバクテリアの試料は、水槽の堆積物と天然の底質の両者から得た。水槽の堆積物は、独立法人日本栽培漁業協会南伊豆栽培漁業センター（現在：国立研究開発法人 水産研究・教育機構南伊豆栽培漁業センター、静岡県南伊豆町、 $34^{\circ}36'43''$ N, $138^{\circ}50'55''$ E）の 20 m^3 容コンクリート製水槽の底面からバイオフィームを有する堆積物を剥離して採集を行い、南伊豆栽培漁業センターの屋内実験室で試験した。天然の底質試料は以下の4地点から採取した(図 2.4)。東京都港区の天王洲橋下の運河床 ($35^{\circ}37'24''$ N, $139^{\circ}44'42''$ E)、東京都大田区の大井海浜公園の地先の運河床 ($35^{\circ}35'19''$ N, $139^{\circ}44'58''$ E)、神奈川県鎌倉市の七里ヶ浜砂浜の汀線 ($35^{\circ}18'9''$ N, $139^{\circ}31'26''$ E) の3か所では、大潮干潮時に透明アクリル円柱管（長さ 20 cm、内径 3 cm）を水深 10cm の底質表面から突き刺して底質試料を採取した。また東京湾羽田沖 (F3、 $35^{\circ}30'42''$ N, 139°

49° 48' E) の水深約 30 m から、エクマンバージ採泥器（離合社製）により海底堆積物を採取した。採取した底質試料は海水と共に容器の両端を密封して東京海洋大学の実験室へ持ち帰り試験に供した。

堆積物と底質からのバイオフィルムの再構成は、気相と液相の界面にバクテリアが形成する液体表面バイオフィルムを形成させる静置培養法により行った（図 2.5）。バクテリアの栄養物として前述の魚類初期用配合飼料、バイオフィルム形成を促進する添加物として前述の有孔虫石灰岩粉末、の両者を使用した。培養に使用した海水の塩分は 15 psu 以上、室内照度は $6.8 \mu\text{Em}^{-2} \text{S}^{-1}$ 以下であった。バイオフィルム量は、バイオフィルムの体積として Packed Cell Volume (PCV) を用い、必要に応じて湿重量 (wet weight) を測定した。前者は体積計測後にバイオフィルムを培養に再利用できる利点があるが、微量の計測には不向きである。湿重量は感度が高い測定が可能であるが、測定後の培養は困難である。PCV は、ポリマー状の液体表面バイオフィルムを 10 ml 容のメモリ付スピッ管に掬い入れ、遠心分離機（国産遠心機株製、H107）で 3 分間、1 分間に 2000 回転した後に、体積を求めた。また、湿重量は以下の方法で求めた。ポリマー状の液体表面バイオフィルムをナイロンメッシュ（5 x 5 cm、目合い 50 μm 、NYTAL DIN1 10-50、Sefar Inc.）に、移し載せてメッシュの下から吸水紙でポリマーの表面の水分を吸水した。精密天秤で質量測定を繰り返し、ほぼ一定に達した測定値をバイオフィルム湿重量とした。水質は以下の方法を用いて測定した。水中の酸揮発性硫化物（Acid Volatile Sulfides; AVS）、すなわち酸性条件で硫化物として揮発する硫黄化合物の総量（主に硫化水素、硫化水素イオンと、その他の硫化物イオン、およおよび黄鉄鉱 [pyrite] を除く硫化鉄）（Samukawa and Hiro, 1996; David, 2005）は、検知管法（ヘドロテック-S330、ガステック社製）（菅原ら, 2012）により測定した。以下、本論文では、この方法で測定した揮発性硫化物を単に硫化物と呼ぶ。溶存酸素（以下、本論文では DO とする）は、溶存酸素計（YSI-55, YSI 社製）により測定した。酸化還元電位（以下、本論文では ORP とする）は、酸化還元電位計（RM-12P, 東亜電気）により測定した。

微生物については、目視観察と光学顕微鏡観察（オリンパス M021、オリンパス社製）を行った。培養水中のバクテリア密度の指標として、分光光度計（島津製作所、UV160）により 660 nm 吸光度（1 cm セル使用）を測定した（以下、この値を本論文では OD660 と表記、OD は Optical Density の略である）。

底質から採取したバイオフィームを含む堆積物 100 mg/cm²（重量/ビーカー底面積）、有孔虫石灰岩粉末 5 mg/cm²、魚類初期用配合飼料 10 mg/cm²、の 3 種類を 100 mL 容ガラスビーカーの底面に置き拵げた。ろ過海水 80 mL をビーカーへ加えた。蒸発を防ぐためにポリ塩化ビニリデンフィルム（クレハ、東京）で容器表面を覆い、これを室温 22 °C の机の上に静置して、培養を行った（図 2.5 c）。

結果

飼育水槽底面の底質を用いて培養を行ったところ、培養開始後に底面直上の水は懸濁した。培養開始 4 日後にビーカーの液体の表面に細菌被膜のポリマー状の液体表面バイオフィームの形成を観察した（図 2.5 a）。この液体表面バイオフィームの形成により、バイオフィームを構成する細菌群叢が堆積物から分離して液体表面に再構成できたと推察した。自然水域の 4 か所（天王洲橋下の川床、七里ヶ浜砂浜の汀線、大井海浜公園の地先の川床、東京湾内湾底部）から採取した底質を用い、同様な手法により培養を行った。その結果、これらの底質試料からも同様な液体表面バイオフィームが形成され（図 2.5 b）、バイオフィームを構成する細菌種類の少なくとも一部を底質から分離して再構成することができた。底質から分離したポリマー状の液体表面バイオフィーム（PCV 0.5~0.6 mL）を試験管に取り、20 mL のろ過海水を加えた。これをゴム付 5 mL ピペットにより 20 回以上のピペッティングで破碎し、ミックスバイオフィームの懸濁した破碎物を作成した。この破碎したバイオフィームと魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末を海水を入れたビーカー底面に置き培養したところ、液体の表面に液体表面バイオフィームが再度形成した。

b) 液体表面バイオフィームの形成と栄養

目的および方法

以上の方法で得られた液体表面バイオフィルムの形成過程と添加した栄養量の間を調べるため、以下の実験を行った。4つの異なる量の魚類初期用配合飼料 5、10、15、25 mg/cm²（重量/プラスチック容器底面積）と、天王洲橋下の川床から採取した底質 100 mg/cm² と有孔虫石灰岩粉末 3 mg/cm² を、それぞれ、ろ過海水 80 mL を入れた 220 mL 容円錐台形の透明プラスチック容器の底面に置き広げた。ろ過海水は東京湾内湾の表層から採水した海水をフィルター用マット（観賞魚用高級ろ過材、マット工房、東京）で、ろ過して使用した。これらの容器を 20 °C の室内に静置して培養を行った（図 2.5 c）。培養開始後の数日毎に、各々の容器の液体表面に形成されたポリマー膜を目視と顕微鏡で観察した。培養容器の液体表面（海水 80 mL 時の液体表面積 32.3 cm²）へ形成された液体表面バイオフィルムのポリマー膜をそれぞれ掬い取り、形成したバイオフィルムの PCV を求めた（図 2.7）。

結果

魚類初期用配合飼料 5 mg/cm² の培養では、液体表面バイオフィルムのポリマー膜の形成量は PCV として 0.01 mL 以下であり測定できなかった。魚類初期用配合飼料 10~25 mg/cm² の培養では、培養開始後 4 日の液体表面に PCV として 0.03 ~0.05 mL の非常に薄い流動性のある膜が形成され、膜の厚さは 12 μm であった（図 2.6 a）。培養開始後 7 日にポリマー膜は流動性を無くしたが弾性を有しており、PCV は 0.5~0.6 mL、厚さは約 190 μm となった。（図 2.6 b）。この期間に膜の厚さは約 15 倍増した。魚類初期用配合飼料の量が 5~15 mg/cm² では培養開始後約 10 日に表面が湿った膜を形成しバイオフィルム量は増加した（図 2.8）。しかし、栄養量が 25 mg/cm² の培養では、培養開始後 9 日には表面の水分の枯渇した膜となった。この表面の枯渇した被膜は割れ易く、液表面からの掬い取りが困難であった（図 2.6 c）。

c) 液体表面バイオフィルムの形成量と栄養量

目的および方法

同じく液体表面バイオフィルムの形成量と添加した栄養量の間関係を調べるため、以下の実験を行った。5つの異なる量の魚類初期用配合飼料、0、3、5、15、25 mg/cm²（重量/プラスチック容器底面積）と天王洲橋下の川床から採取した底質 100 mg/cm² と有孔虫石灰岩粉末 3 mg/cm² を、ろ過海水 80 mL を入れた複数の 100 mL 容の円錐台形の透明プラスチック容器の底面に置き拡げた。これを前記と同様に静置培養を行い、培養開始後 7 日のそれぞれの液体表面バイオフィルムの湿重量を測定した。

結果

栄養量が 3~15 mg/cm²の間では、栄養量の増加とともに液体表面バイオフィルムの湿重量は増した（図 2.9）。栄養量が 15 mg/cm²の培養では液体表面バイオフィルムの湿重量は、栄養量 5 mg/cm²の培養で形成した液体表面バイオフィルムの約 2 倍の湿重量であった。しかし、栄養量 15 mg/cm²の培養と 25 mg/cm²の培養では形成された液体表面バイオフィルムの湿重量はほとんど同じであった（図 2.10）。さらに 30 mg/cm²以上の栄養量を底質および有孔虫石灰岩粉末とともにビーカー底面へ置き拡げた時には、培養開始後に魚類初期用配合飼料の一部は底面より上方へ拡散し、水槽の水表面に浮遊するか容器の周囲に散乱した。栄養量が 25 mg/cm²以下では、この培養直後の魚類初期用配合飼料の底面から上方への拡散は目視されなかった。

d) 液体表面バイオフィルムの形成量と比重

目的および方法

液体表面バイオフィルムの比重と栄養量の間関係を調べた。4つの異なる栄養量 5、10、15、20 mg/cm²（重量/プラスチック容器底面積）と同一量の液体表面バイオフィルムの破碎および同一量の有孔虫石灰岩粉末を 80 mL の海水を入れた複数のビーカー底面に置き拡げ、水温 20 °C で 7 日間の培養を行った。それぞれの容器の表面に形成した液体表面バイオフィルムを掬い取り ± 1 mL のメモリ付試験管にて PCV を求めた。その後精度 1 mg の精密天秤によりバイオフィルムの湿重量を測定し、両者から液体表面バイオフィルムの比重を求めた。

結果

バイオフィルムの比重は栄養量の増加とともに直線的に増し、 $Y=0.0164x+0.4$ ($R^2=0.9859$) の相関が見られた。バイオフィルムの容量は栄養量とともに曲線的に増した (図 2.11)。栄養量 5 mg/cm^2 と 20 mg/cm^2 ではバイオフィルム容量の差は 1.79 倍であり、比重の差は 1.53 倍であった。栄養量が少ないほど形成された液体表面バイオフィルムの粘性は高く、栄養量が多いほど粘性は失われていた。栄養量により形成された液体表面バイオフィルムの比重が異なっていたことから、バイオフィルム内部の密度の違いが推察された。

e) 底質量と液体表面バイオフィルムの形成量

目的および方法

次に底質量と液体表面バイオフィルムの形成量の関係を調べた。ビーカー底面に、2つの異なる底質量、 10 mg/cm^2 (重量/シャーレ底面積) と 100 mg/cm^2 を用いた実験を行った。魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末はこれまでの実験と同量である。これらを 80 mL の海水を入れたビーカー底面に置き上げ、それぞれ 3 つの培養を行った。培養開始後 7 日の液体表面バイオフィルムを掬い取り、前記と同じ方法でバイオフィルムの湿重量を求めた。

結果

底質量 10 mg/cm^2 の実験でのバイオフィルム形成量は $33 \pm 0.1 \text{ mg}$ であり、底質量 100 mg/cm^2 の実験での形成量は $88 \pm 26.2 \text{ mg}$ であった (図 2.12)。底質量は 10 倍の差異があったが、形成されたバイオフィルム量は約 2.7 倍 (最大 4.8 倍) の違いであった。この時、底質量の多い方がバイオフィルム形成量の偏差が大きかった。また、培養開始後 7 日のビーカー内部の海水の酸化還元電位 (ORP) は底質量 10 mg/cm^2 では -338 mv 、底質量 100 mg/cm^2 では -380 mv で、大きな差は無かった。

f) 液体表面バイオフィルム形成と水質

目的および方法

液体表面バイオフィルムの形成と水質の関係を調べるため、以下の実験を行った。培養は天王洲橋下の川床堆積物を用い、前記と同様な方法で、複数の 100mL ガラスビーカーを使用して水温 20℃で行った。培養開始後、液体表面からバイオフィルムを静かに掬い、取り除いた直後のビーカー内部の海水の硫化物 (AVS)、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP) を測定した。

結果

培養開始後にビーカー内部の海水は濁り、溶存酸素濃度は急激に減少した。培養開始後 3～4 日には溶存酸素濃度は 0.01 mg/L 以下となった。酸化還元電位も同様に培養開始後から急激に下がり、培養開始後 6～7 日の酸化還元電位は -300 mA 以下に達した (図 2.13)。海水の濁りの様子は添加した栄養量によって異なった。培養開始後 6～7 日で栄養量 5～15 mg/cm² の水は透明となったが、栄養量 25 mg/cm² では水の濁りは継続していた。また、栄養量 5～15 mg/cm² では、培養開始後 6～7 日以降は酸化還元電位の著しい低下はみられなくなった。しかし栄養量 25 mg/cm² では、その後も酸化還元電位は低下した。栄養量 10 mg/cm² では、培養開始後 2 日では硫化物は検出されず、目視ではバイオフィルム形成は認められなかった。培養開始後 4 日に、湿重量約 0.03 mg のバイオフィルムが測定され、その時の硫化物は 0.02 mg - S/mL であった。培養開始後 6 日にバイオフィルムの湿重量は約 0.3 mg となり、硫化物は 0.04 mg - S/mL であった。培養開始後 4 日から培養開始後 6 日までの期間にバイオフィルム湿重量は 10 倍量増した。培養開始後 8 日にはバイオフィルムの湿重量は約 0.25 mg となり、この時の硫化物は 0.1 mg - S/mL であった (図 2.14)。

2. 3 固相底面へのバイオフィルム培養

a) 液体表面バイオフィルムからの固相底面バイオフィルムの形成

2. 2 の方法で得られた液体表面バイオフィルムを用いて、固相底面のバイオフィルムが形成可能かどうかの試験を行った。天王洲橋下川床から得られた堆積物を用いて得られた

液体表面バイオフィルムをゴム付 5 mL ピペットにより 20 回以上のピペッティングで破碎し、有孔虫石灰岩粉末 5 mg/cm²、魚類初期用配合飼料 10 mg/cm² と共に、100 mL 容ガラスビーカーの底面に置き拡げた。ろ過海水 80 mL をビーカーへ加え、25°C で培養した。

結果

培養開始後 3 日で、ビーカー底面にバイオフィルムが形成された。自然水域の 4 か所（天王洲橋下の川床、七里ヶ浜砂浜の汀線、大井海浜公園の地先の川床、東京湾内湾底部）から採取した底質を用い、同様な手法により培養を行った。その結果、これらの底質試料から得られた液体表面バイオフィルムからも、ビーカー底部にバイオフィルムを形成させることができた。

b) 有孔虫石灰岩粉末とバイオフィルムバクテリアの活性

目的および方法

液体表面バイオフィルムから固相底面へのバイオフィルムの再構成を行う際の有孔虫石灰岩粉末の効果について、以下の実験により検討した。異なる量の有孔虫石灰岩粉末 0、3、10 mg/20 cm²（重量/シャーレ底面積）をろ過海水(40 mL)入れた複数のガラスシャーレの底面に置き拡げたの実験系を用意した。魚類初期用配合飼料（5 mg/cm²）と液体表面バイオフィルムの破碎物（0.2mL/cm²）を加え、温度 22°C に保った室内の机上にガラスシャーレを置き静置培養を行った。培養開始後 7 日に各海水のバクテリア濁度（OD660）を測定してバクテリア活性を比較した。

結果 有孔虫石灰岩粉末 0、3、10 mg/20cm² の培養区のバクテリア濁度（OD660、2 試験区の平均値）は 0.78、0.85、0.93 であった。添加した有孔虫石灰岩粉末量が増すと、バクテリア密度が増し、バクテリア活性が高くなることが示唆された。

c) 有孔虫石灰岩粉末の添加効果

目的および方法

液体表面バイオフィルムから固相底面へのバイオフィルムの再構成を行う際の有孔虫石灰岩粉末の効果について、固相底面のバイオフィルム形成量と有孔虫石灰岩粉末の添加量

との関係から検討した。7L容の小型ガラス水槽4つを用い、相模湾で採水した海水をグラスファイバーフィルター（径25 mm、Whattmann GF）によりろ過して各5 Lを水槽へ入れた。ガラス水槽の底面にエアーストンを置きエアレーターにより通気して海水を好気環境とした。魚類飼育水槽の底面のバイオフィルムを有する堆積物から静置培養方法により分離構成した液体表面バイオフィルムの細片を使用した。水槽の底部に250 mLガラスビンを置き、バイオフィルム400 µg（湿重量）、魚類初期用配合飼料4.0 g、有孔虫石灰岩粉末14 gを次の通りに組み合わせてガラスビンの底面へ置きあげ、試験を行った。1つ目の試験区は、バイオフィルム、魚類初期用配合飼料、有孔虫石灰岩粉末の3種類、2つ目の試験区は魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末の2種類、3つ目の試験区はバイオフィルムと魚類初期用配合飼料の2種類をそれぞれ底面に置き、4つ目の試験区は対照として海水のみとした。27±1°Cに設定したインキュベーター内に水槽を入れ試験を行った。培養開始後34日に各水槽のガラスビン底部からバイオフィルムを10mLシリンダーに移し入れ、24時間静置後の沈殿量からバイオフィルム量を求めた。

結果

バイオフィルム形成量は、試験1区（バイオフィルム、魚類初期用配合飼料、有孔虫石灰岩粉末）、試験2区（魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末）、試験3区（バイオフィルムと魚類初期用配合飼料）で、それぞれ2.3、0.9、1.8 mLであった。対照区ではバイオフィルムの形成は無かった。バイオフィルム無添加の魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末のみでもバイオフィルムは形成した。バイオフィルムを添加した時はバイオフィルム無添加培養の2倍量をバイオフィルムが形成された。しかし、有孔虫石灰岩粉末を使用した培養では無有孔虫石灰岩粉末の培養よりバイオフィルムが多く形成され、バイオフィルム量は3試験区の中で最も高かった。

d) 固相底面におけるミックスバイオフィルムの形成と堆積物上の水質

目的および方法

固相表面バイオフィルムの形成が上部の海水の水質に及ぼす影響を調べるため、以下の実験を行った。前記 c) の有孔虫石灰岩粉末の添加効果の試験期間に、水槽内のガラスビン堆積物の直上水の硫化水素、溶存酸素、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素を測定した。溶存酸素は DO メーター (Central UD-1) により測定した。硫化水素はメチレンブルー法 (Cline, 1969)、アンモニア態窒素はサリチル酸法 (Muraki *et. al.*, 1992)、亜硝酸態窒素はジアゾ法 (Bendshneider, 1952) で測定した。水質測定は 3 日毎に行った。さらに、堆積物表面のミックスバイオフィルム形成による直上の水質を検討するために、培養開始後 34 日に各々の堆積物表面のミックスバイオフィルムを除去して、その前後の堆積物の直上水のアンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を測定した。

結果

ガラスビン内の海水は静水状態であった。硫化水素は対照区を除いた 3 試験区ともに培養開始直後から急激に増加し、培養開始後 6 日のバイオフィルム形成直後の硫化水素は最高濃度の 0.06~0.08 mg/L に達した。その後のバイオフィルム形成後は、3 試験区ともに硫化水素が急激に減少し、培養開始後 9 日には硫化水素は検出されなかった (図 2.15)。溶存酸素濃度は試験開始時は 5.6~8.0 mg/L であった。培養開始後 3 日に 3 試験区ともに溶存酸素は消失し、0 mg/L となった。培養開始後 6 日になると、バイオフィルムがガラスビン底部の堆積物表面を覆って発育した。培養開始後 9 日の 3 つの試験区のガラスビン内の溶存酸素は 1.5~5.0 mg/L となり、バイオフィルム形成後に溶存酸素濃度は回復した。培養開始後 15 日の 3 試験区の溶存酸素は 7.0~7.2 mg/L と高くなり試験開始時と、ほぼ同じ値を示した (図 2.16)。堆積物表面のバイオフィルムの除去前後の直上の水質を比べると、アンモニア態窒素はバイオフィルム除去前では 208~328 mg/L であり、除去後は 383~479 mg/L に増加した。亜硝酸態窒素はバイオフィルムの除去前では 0.07~1.42 mg/L であり、除去後は 0.46~9.14 mg/L に増加した。特にバイオフィルムの形成量が大きかった試験区 1 と 3 では、ミックスバイオフィルム除去後の亜硝酸態窒素の濃度は除去前の 6 倍に増加した (図 2.17)

2. 4 考察：セディメントミックスバイオフィルムの再構成と培養

一般にバクテリアの大量培養は、流動する液体培地を使用している。本研究は細菌の液体静置培養法により、バイオフィルムを含む底質、魚類初期用配合飼料、有孔虫石灰岩粉末を、海水を入れた小型容器のビーカー底面へ置き拡げて静置培養を試みた。小型容器の水の動きの無い液体表面へ、薄いバイオフィルムが形成された。これより底質中のバイオフィルムを構成する細菌の一部が、液体表面バイオフィルムを再構成したと推察した。

酸素を含む水を入れたビーカー底面に細菌と栄養が置かれた時、栄養のグルコースと酸素を用いる呼吸により、細菌は 2900 [kJ/mol] の大きな標準自由エネルギーを得る（和地, 2010）。この時に固体表面に置いた物質は表面化学反応により主に垂直方向に移動することから（Matsushima *et al.*, 1984）、培養直後に細菌バクテリアや配合飼料は底面から上方へ拡散し、底面直上の水は濁りを生じ、底面直上水の一部は還元状態になったと推察した。また、ある種の細菌類は酸素濃度勾配に対して走化性の運動を有しており、この走化性も細菌の底質から液体表面への移動に寄与する（Fenchel *et al.*, 2012; Morikawa, 2006）。また、液表面へ集積した細菌は細菌の個体の相互の集積反応により、液体表面細菌被膜を形成する（佐藤, 1990）。本研究では海水の酸化還元電位が -200 mA 以下となり、硫化物が検出された後に液体表面バイオフィルムの形成が観察されたことから、容器底部に出現した無酸素環境がバイオフィルム細菌の底質からの離脱に大きく関与したと推察した。

静置した液相と気相の界面、すなわち液体表面に細菌が細胞外多糖を産出して菌膜が形成されることは、枯草菌 *Bacillus subtilis*、結核菌、酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* 等で報告されている（柳田, 1981; 松下, 2008）。*Bacillus subtilis* は細菌の栄養が液体に存在するだけで、液体表面バイオフィルムを形成する（Morikawa *et al.*, 2006）。液体表面バイオフィルムの形成には転写制御因子（transcriptional regulator）のペリクラ形成遺伝因子が関与する（Kobayashi, 2007）。ペリクラ形成遺伝因子によるペ

リクラ形成機構は解明が進み、多くの土壌細菌がペリクラ形成遺伝因子を有していることが明らかになっている (Flemming *et al.*, 2017)。

細菌の単離培養により、南伊豆栽培漁業センターの飼育水槽と百島の塩水池のバイオフィルムを有する堆積物から 70 株の細菌種類が単離培養できた。そのうち 14 株が *Pseudoalteromonas* sp. を含む、細胞外部多糖を産生するバイオフィルム形成細菌株であった (岡原, 2005)

Shewanella oneidensis のみで構成される液体表面バイオフィルムは、始めに薄いフィルムが形成され、次に不均質なフィルムとなり、最後に均質な厚みを有するフィルムを形成することが、電子顕微鏡観察により示されている (Armitano *et al.*, 2013)。また、非破壊方法による観察から、スライドガラス表面への単一種細菌のバイオフィルム形成は、浮遊細菌の増殖と同様に誘導期、対数増殖期、定常期の過程をとることが明らかにされている (Lewandowski and Beyenal, 2013)。ガラススライド上のバイオフィルム細菌の細胞密度は増殖期には直線的に増加することが測定されている (Anderson, 2016)。しかしながら、複数種類の細菌から構成されるミックスバイオフィルムの形成過程や培養の研究は乏しい。本研究では底質から分離した液体表面バイオフィルムの破砕物を、魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末を加えて容器底面に置き広げ、この容器を溶存酸素を有する海水の静置した環境に置くことにより、南伊豆栽培漁業センターの飼育水槽で観察されたように固相底面の堆積物表面へミックスバイオフィルムが形成することを示した。単一種類細菌から構成するバイオフィルム培養は、前述の Microtiter-plate culture と Flow chamber culture が行われ、顕微鏡下での観察が行われている。この Microtiter-plate culture は本研究と同様な静置培養法であるが、プレート上の多数の円柱孔の壁面にバイオフィルムを生育する方法である。Flow chamber culture は、河口等の定常的に水の流が見られる場所にバイオフィルムが多く観察されることから、水の流れがバイオフィルム形成に必要と考えられて考案された培養方法である。定常的な水の流れは有機物や細菌細菌の底面との接触の機会を増し、バイオフィルム形成が行われると推察さ

れた。一方、本研究では、バイオフィーム形成には有酸素の静置した水環境が重要であると推察できた。本研究と類似したミックスバイオフィームの培養方法は、既往研究ではほとんど見られない。

細菌の粒子からなる液体表面バイオフィームの形成過程は、物質の粒子から形成される膜の形成過程と類似している（北原，1994）。本研究では、栄養量が特に多い時の液体表面バイオフィームは、さらにその表面が乾燥して水分を枯渇した様相を呈した。物質粒子の表面膜の形成では、過剰な粒子の存在により、表面の水分が枯渇した膜が形成される（日本化学会，1995）。本研究の過多の魚類初期用配合飼料の投与による表面水分が枯渇した液体表面バイオフィーム形成は、この過剰な化学粒子による表面の水分が枯渇したポリマー膜の形成と類似した。

本研究に使用した富山県立山産の有孔虫石灰岩粉末は、バイオフィーム細菌を活性化させ、バイオフィームの形成量を増加することが示された。鉱物である CaCO_3 やミネラル成分は細菌の核酸やタンパク質合成の活性を高める可能性があると言われている（Marshall，1978）。特に Ca はバイオフィーム形成成分多糖類の結合媒体として、重要な無機物である（Lewandowski and Beyenal，2013）。電子顕微鏡による観察では、立山産有孔虫石灰岩粉末の表面は凸凹が粘土粒子の表面より多く、鉱物の結晶体が折り重なるようにして結合した粒状であり、大きな口径をもつ多孔質が観察された（来田，1996）。このため、有孔虫石灰岩粉末の鉱物粒子の単位体積あたりの表面積は、粘土粒子などより大きく、粒子表面に多くの細菌が棲息することにより細菌の活性を高めていると推察される。一般に、石灰岩粉末の産地別の差異は、石灰岩に含まれる有機物由来の難分解性物質であるケロジェンの違いに由来する（仲谷秀夫，私信）。立山産有孔虫石灰岩の粉末は沿岸漁場の漁場改良、河川の環境修復、魚類・家畜類の飼料添加剤、耕作地の土壌改良剤としても使用されている（グリーン・カルチュア，2004）。

本研究では、固体底面にバイオフィームが形成されると、硫化水素、アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の底面直上水への溶出が抑制され、バイオフィームが形成されていた飼

育水と同様に水質が良好に保たれた。飼育水槽の堆積物表面に見られたバイオフィルムは、下水処理施設のバイオマットを構成する細菌と同様に、水の浄化機能を有したと推察された。飼育水槽底面のバイオフィルムは、養殖場やバイオレメディエーションにおける微生物マットの機能とよく一致していると考えられた (Bender and Peter, 2004)。

表 2.1 魚類初期用配合飼料の成分

成分	含有比
粗蛋白質	52%以上
粗脂肪	8%以上
粗繊維	3%以下
粗灰分	15%以下
カルシウム	2.0%以上
リン	1.4%以上

：（日本配合飼料, 2009）

表 2.2 有孔虫石灰岩粉末の成分

成分	含有量 (g/kg)
カルシウム	302
ケイソ	71.7
マグネシウム	5.94
アルミニウム	5.90
鉄	4.62
ナトリウム	2.70
カリウム	0.74
リン	0.21
マンガン	0.20
亜鉛	0.04

(グリーン・カルチュア, 2000)

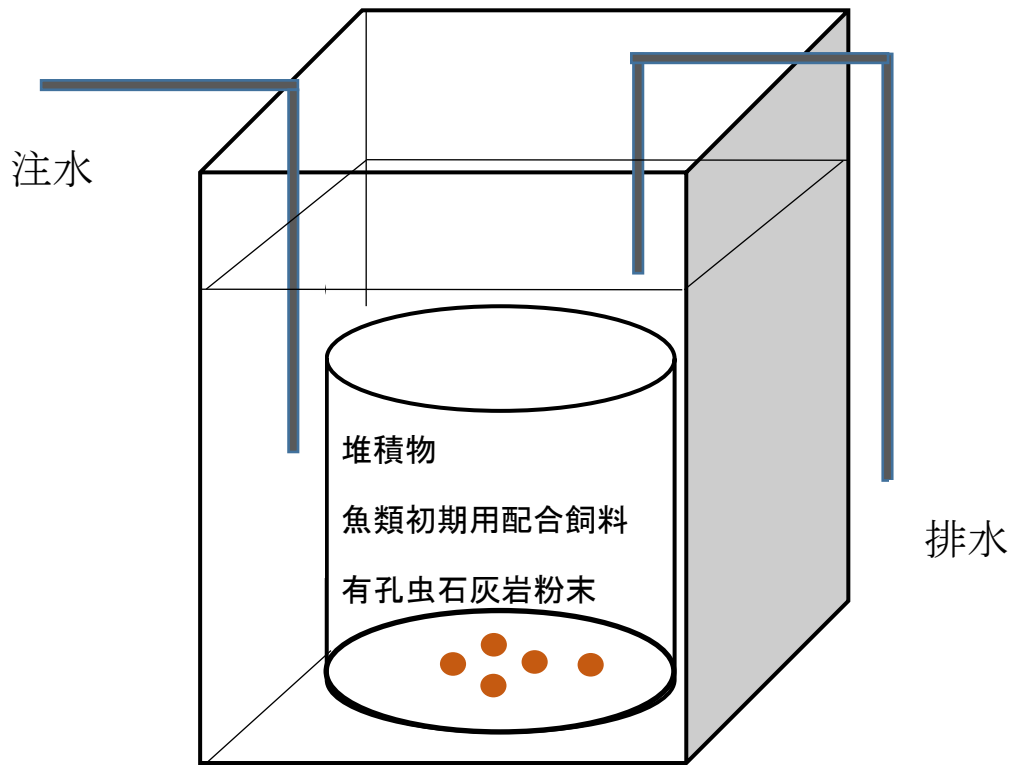
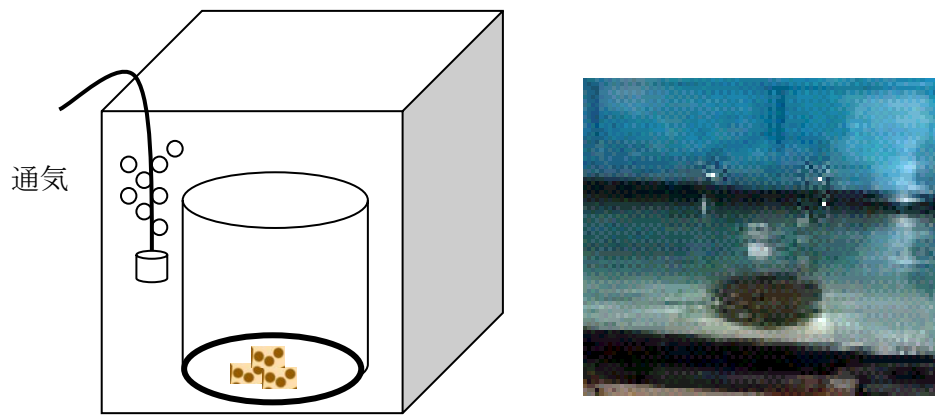
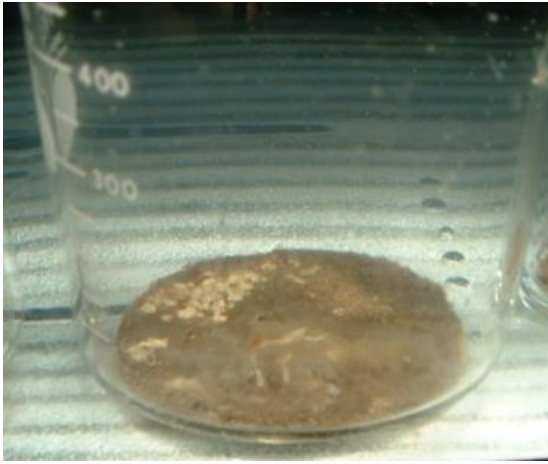


図 2.1 500L 容水槽を用いた実験系

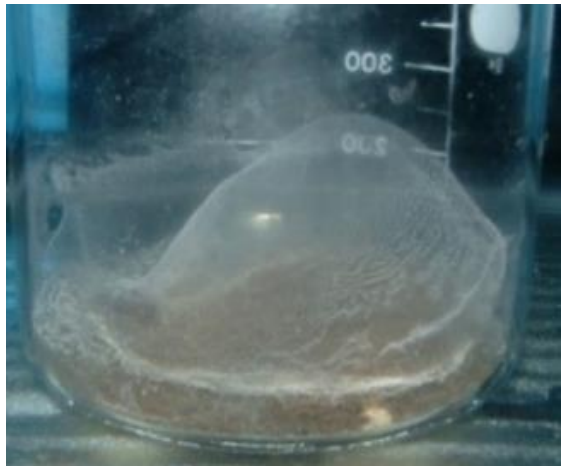


(堆積物・魚類初期用配合飼料・有孔虫石灰岩粉末)

図 2.2 小型水槽内のビーカー底面堆積物のバイオフィルム培養



(a) 培養開始時の底面



(b) 底面のバイオフィルム形成（培養開始後7日）

図 2.3 固相の底面堆積物へのバイオフィルム形成



(a) 天王洲橋下 (砂泥地)
東京都港区



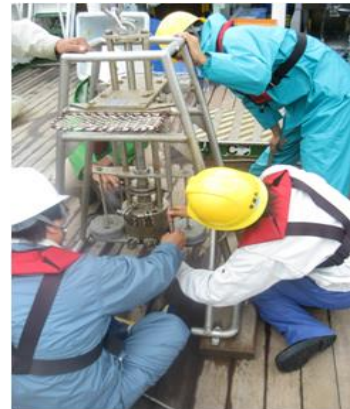
(b) 七里ヶ浜海岸 (砂地)
神奈川県鎌倉市



(c) 大井海浜公園地先
東京都大田区



(d) 底質コアと酸化還元域底質
(天王洲橋下)

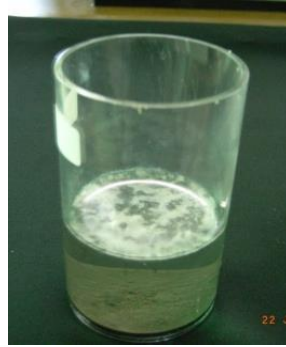
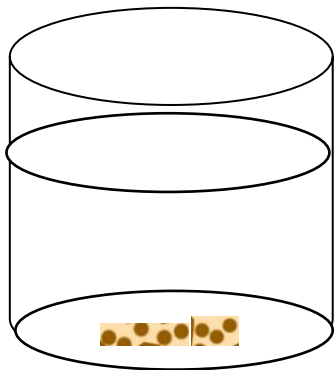


(e) 内湾海底からの採集
(東京湾羽田沖水深 20m)

撮影：大内田氏

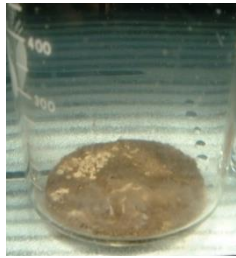


図 2.4 底質の採集地点と酸化還元境界を有する底質

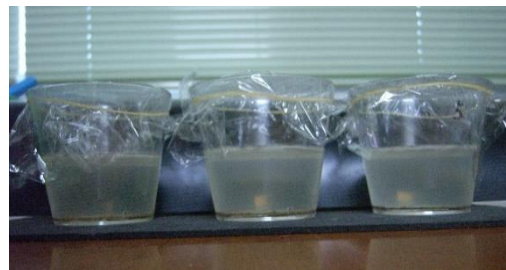


(堆積物・魚類初期用配合飼料・有孔虫石灰岩粉末)

(a) 飼育水槽の堆積物からの液体表面バイオフィルムの再構成



(b) 底質からのバイオフィルムバクテリアの再構成



(c) 液体表面バイオフィルムの形成試験

図 2.5 静置培養法による液体表面バイオフィルム形成



(a) ゾル状バイオフィルム
(培養開始後 4 日)

(b) ゲル状バイオフィルム
(培養開始後 7 日)

(c) 表面水分の枯渇した
バイオフィルム
(培養開始後 9 日)

図 2.6 液体表面バイオフィルムの再構成 (培養温度 20°C)



図 2.7 バイオフィルム Packed Cell Volume の測定 (2000 回転、3 分)

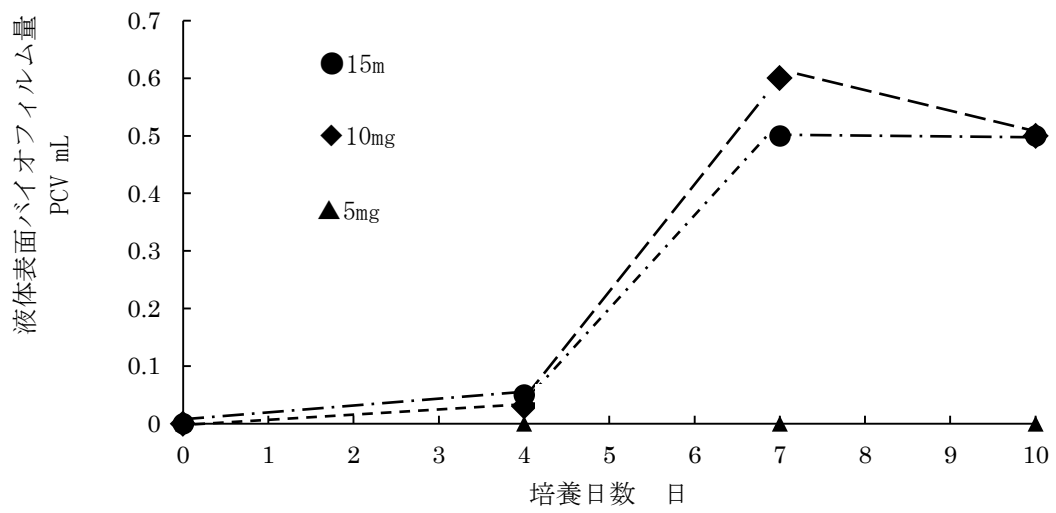


図 2.8 液体表面バイオフィルムの形成と栄養量 (mg/cm²、水温 20°C)

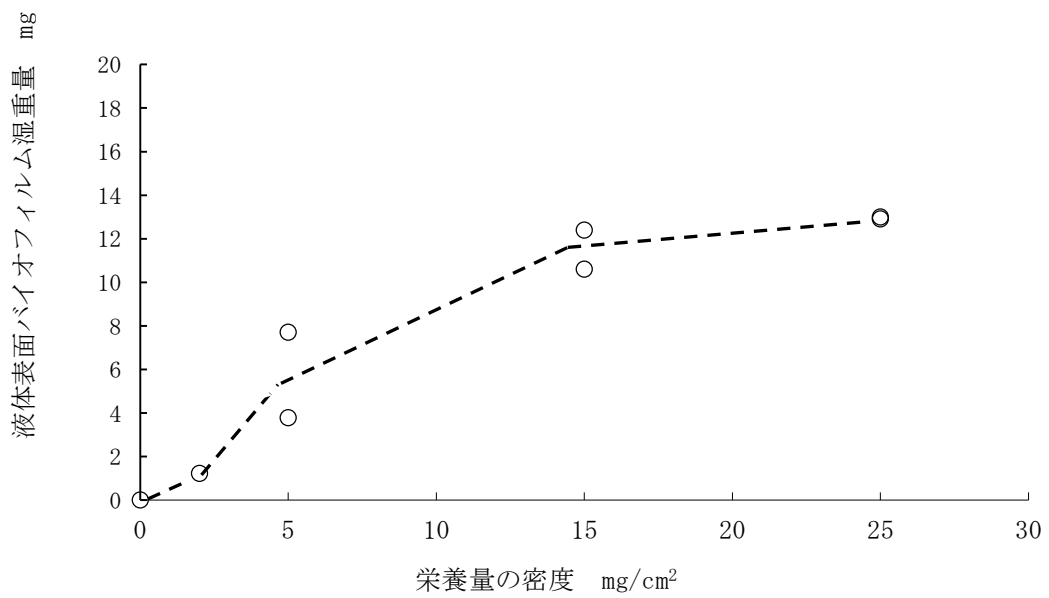


図 2.9 栄養量と液体表面バイオフィーム形成量

(培養開始後 7 日の湿重量 mg, 水温 20°C)

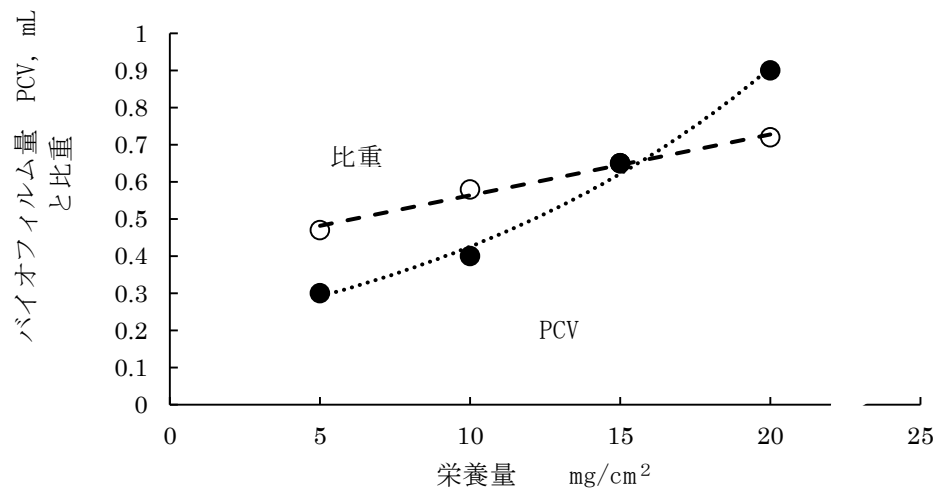


図 2.10 栄養量と液体表面バイオフィーム容量と比重

(培養開始後 7 日, 20°C)

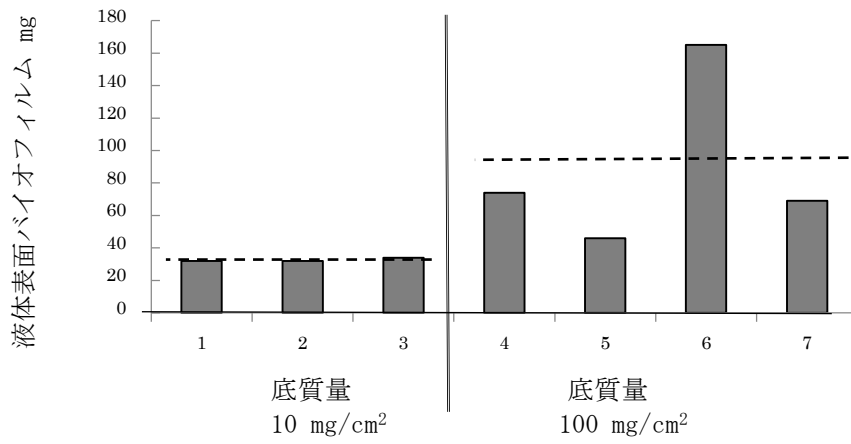


図 2.11 底質量と液体表面バイオフィルム形成量（培養後 7 日の湿重量 mg）

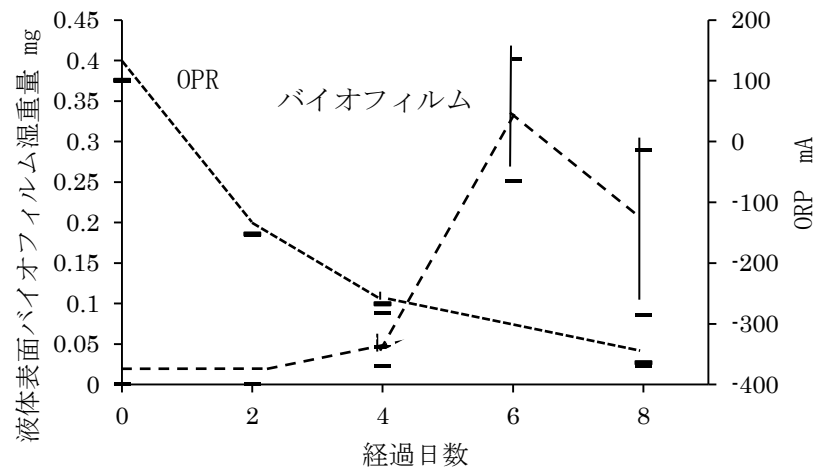


図 2.12 液体表面バイオフィームの形成と酸化還元電位 (ORP)

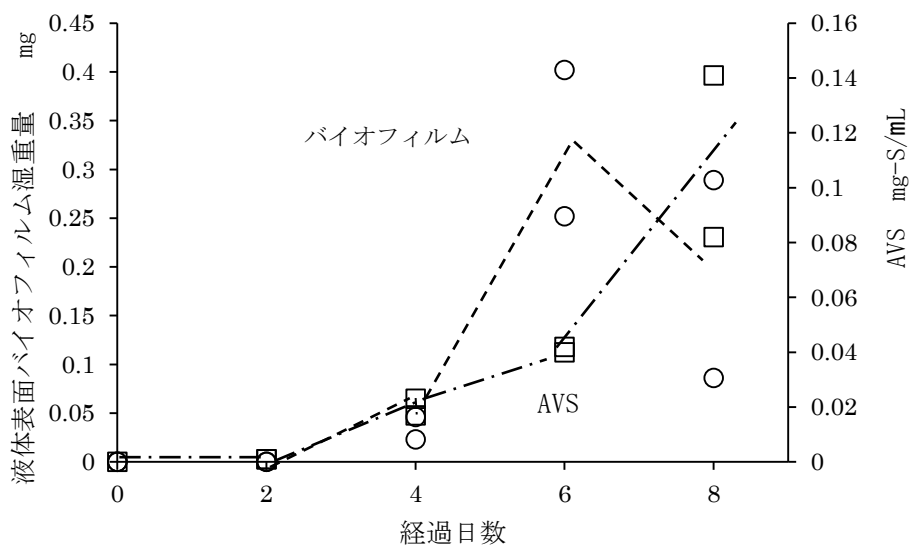


図 2.1 液体表面バイオフィルムの形成と硫化物 (AVS)

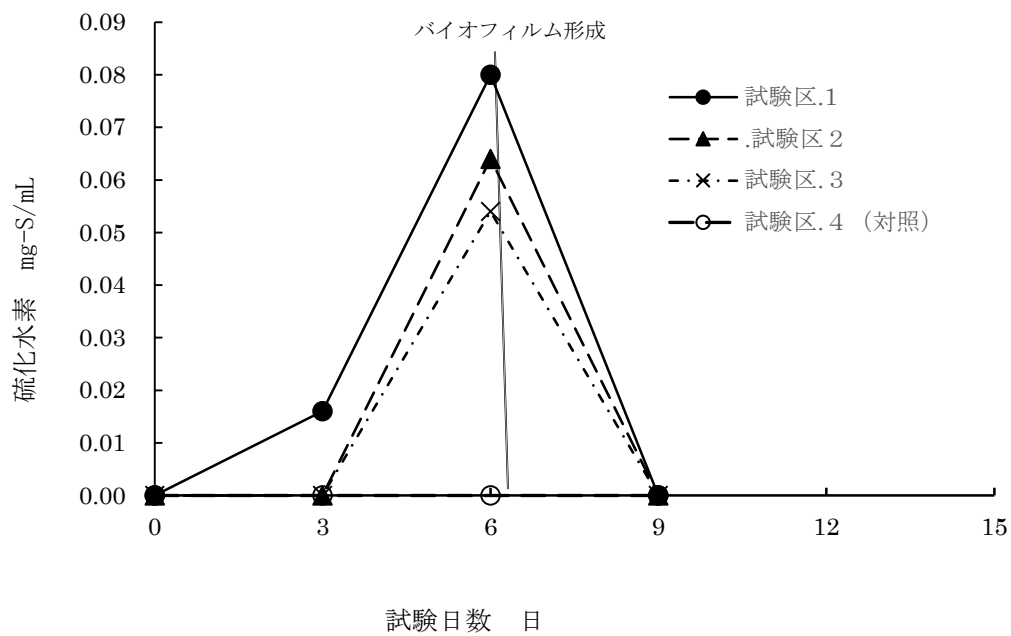


図 2.14 固相底面堆積物上バイオフィーム形成と直上水の硫化物

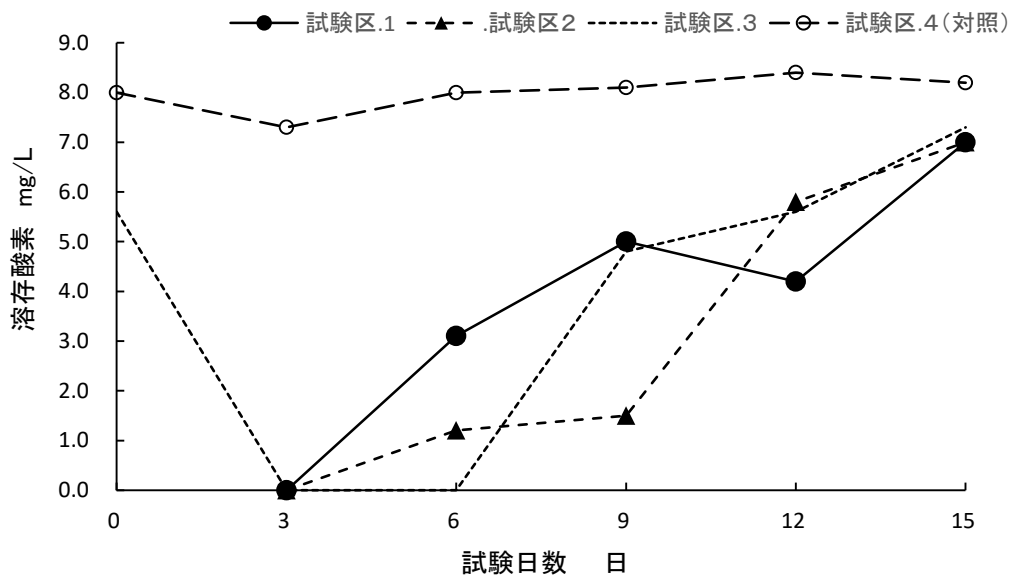


図 2.15 固相底面堆積物上バイオフィーム形成と直上水の溶存酸素

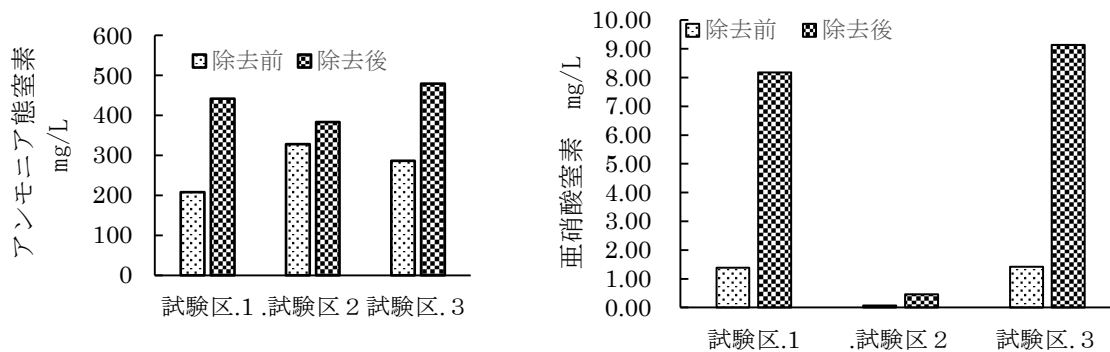


図 2.16 固相底面におけるバイオフィーム除去前後の堆積物上の水質

試験区 1 有孔虫石灰岩粉末、栄養、バイオフィーム

試験区 2 有孔虫石灰岩粉末、栄養

試験区 3 栄養、バイオフィーム、

試験区 4 (対照) : 有孔虫石灰岩粉末無し

3. バイオフィルムを有する底部境界モデル

3. 1 水分を含む底質のモデル系の作成

第2章では、固相底面にセディメントミックスバイオフィルムと考えられるバイオフィルムを形成させ、培養できることを示した。しかし第1章で論じたように、岩礁域を除く沿岸の多くは砂や泥を含む水分を有する底質 (aquatic sediments) (Boudreau, 1997) である。そこで、水分を含む底質の実験室モデルをまず作成し、その上で第2章の方法を適用したバイオフィルム形成を検討することとした。

水分を有する底質の底部境界のモデル培養系は以下のように作成した。底面を有する透明円柱容器 (アクリル製; 内径 9.5cm、高さ 15cm、1L 容) の中間にナイロンメッシュ (目合い 50 μm 、NYTAL DIN1 10-50, Sefar Inc.) を張りモデル底面とした。微生物化学反応による有機物の変質を防止するために、モデル底面材料はナイロンメッシュを用いた。魚類初期用配合飼料と有孔虫石灰岩粉末の落下を防ぐために 50 μm のメッシュフィルターを使用した。モデル底面下部は、硫化物と底質中の鉄との反応を除外するために砂等の底質は混入しないで、間隙水のモデルとして海水のみとした。この二重底の透明円柱容器を、前記と同じく海水を入れた有酸素の静置な環境の小型ガラス水槽の底面に置き、底部境界モデル培養系とした。図 3.1 に最終的に使用したモデル系の模式図を示した。

3. 2 モデル底面でのバイオフィルムの再構成と培養

目的と方法

3. 1 で作成した水分を含む底質の実験室内モデルを使用し、モデル底面へのバイオフィルムの再構成を行った。本試験の材料と測定方法は、第2章の「セディメントミックスバイオフィルムの再構成と培養」の材料と方法に準じた。天王洲橋下の川床底質から分離・再構成した液体表面バイオフィルムを用いて、底部境界モデル培養系のモデル底面上にバイオフィルムの形成を試みた。実験に用いた海水は、東京湾内湾の表層から採水し、

前述のフィルター用マットでろ過したものを使用した。液体表面バイオフィルムの破砕物 (0.2mL PCV)、魚類初期用配合飼料 (10 mg/cm²)、有孔虫石灰岩粉末 (3 mg/cm²) の 3 種類を、モデル底面に置き上げた。

結果

図 3.2 に示したように、培養開始後 3 日には、モデル底面上にバイオフィルムが形成された。一方、バイオフィルム形成と並行して、モデル底面上部の海水中に顕著な白濁相が形成された。図 3.3 に示すように、培養開始後 1 日には、モデル底面の直上約 2 cm までと、底面の下部に薄い懸濁を観察した。培養開始後 3 日には、底面の直上は薄い濁りを有する相と、その上の透明な相の 2 相に明確に分離できる境界が目視された。培養開始後 4 日から、モデル底面の直上に濃密な白濁層の形成が見られた。

3. 3 モデル底面直上の白濁層形成

a) 白濁層の一般的性質

目的と方法

3. 2 でバイオフィルム形成に伴って出現した白濁層は、バイオフィルムが物質循環に及ぼす作用を検討する上でも重要な位置を占めるものと考えられた。そこでこの白濁層の形成メカニズムを検討するため、白濁層の性質を検討した。材料と方法は、3. 1 と 3. 2 に準じている。

結果

図 3.3 に示した白濁層について光学顕微鏡観察を行ったところ、図 3.4 に示すように、粒子状の構造を有していると推察される画像を得た。白濁層内の濁度はほぼ均一で、OD660 は 0.04 程度であった。白濁層形成時と、モデル底面のナイロンメッシュ表面に粘質を有するバイオフィルムの形成は時期が良く一致していた (図 3.2、図 3.3)。DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) 染色して蛍光顕微鏡観察した結果 (図 3.4) から、細菌細胞が含まれていると考えられる。

底部境界モデル培養系のモデル底面直上に形成した白濁層の中央部から試水を採取すると、試水は白色で強い硫化水素臭を呈した。この白濁液の濁度 (OD660) は 0.03~0.045 の範囲であり、この白濁液を開栓したサンプル瓶に採集し 10 °C と 1 °C の空気中に放置した。室温 10 °C では 6 日後、1 °C では 12 日後に、それぞれのサンプル瓶内の溶液の白濁は消失して海水は透明となり、硫化臭も消失した。白濁液中の生物有機物の存在を調べるため、30 mL 容の栓付試験管に、白濁液とクロロホルム液を各 10 mL 採り、その後に強く攪拌混合した。混合溶液は直ちに白濁した。静置して数分後に、混合溶液は有機溶媒相と水相の二層に分かれた。白濁液に含まれていた物質は不溶化して、有機溶媒相と水相の間に沈殿した。このことより、白濁液にはタンパク質等の有機物を含むことが認められた (堀尾・山下, 1994)。

七里ヶ浜砂浜の汀線、大井海浜公園の地先の川床、東京湾内湾の 3 か所の、硫化臭を帯びて底質の色の変化の見られる還元層を含む底質から分離したミックスバイオフィームを用いた底部境界モデル培養系の試験でも、モデル底面にバイオフィームが形成され、モデル底面の直上に上記と同様な白濁層の形成が観察された。

b) 白濁層形成までのモデル底面直上の細菌グループ

目的と方法

白濁層に細菌が含まれることが示唆されたため、培養開始からモデル底面の直上に白濁層が形成されるまでの期間の、モデル底面直上水中の細菌群集の構成を、DGGE 解析 (Denaturing gradient gel electrophoresis; 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) および DGGE バンドの PCR (polymerase chain reaction) による遺伝子増幅後に塩基配列解析と簡易系統解析を行う PCR-DGGE 法により調べた (Muyzer and Smalla, 1993; Nishijima *et al.*, 2010; Ishi *et al.*, 2000)。16SrDNA の塩基配列を PCR により増幅するために、DNA を DGGE 試料から MORA-EXTRACT (極東製薬、東京) を用いて抽出した。プライマーとして GC-341f 及び 534r (細菌 16SrDNA 約 200 bp 増幅用) を用いて増幅した。PCR 増幅は、Touch Down 法 (Don *et al.*, 1991) を一部改変して行った。増幅した産物を用いて、アガロ

ースゲル電気泳動を行った。泳動装置は Dcode DGGE コンプリートシステム (BIO RAD, CA, USA) を用いた。泳動ゲルには 8 % (w/v) ポリアクリアルアミドゲルを用いて、変性剤濃度を 25 % から 65 % に増加させる条件で、100 V で約 12 時間泳動した。泳動後のゲルは、SYBR Green I (タカラバイオ) で染色し、UV 照射により確認した。切り出したバンドから DNA を抽出し、これを鋳型として PCR 増幅した産物を用いて再度 DGGE を行うことを数回くりかえして、バンドの純度確認を行った。DGGE の条件は上記と同様とした。バンド由来の DNA を鋳型として、PCR 増幅を行った試料について、塩基の蛍光ラベル試薬キット BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて、塩基配列を決定した。ラベルされた塩基配列用試料をシーケンサー (ABI 3130x1 Genetic Analyzer System (Applied Biosystem, CA, USA) に供して、塩基配列を解読した。ソフトウェア ChromasPro 1.4 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, USA) により、シーケンサーのデータから塩基配列決定を行った。相同性検索および簡易分子系統解析はアポロン 2.0 ソフトウェア (Techno Surga Laboratory Co., Ltd, Shizuoka) と国際塩基配列データベース (GenBank/DDBJ/EMBL)、アポロン基準株データベース DB-BA9.0 (Techno Surga Laboratory Co. Ltd, Shizuoka) を使用した (Muyzer and Smalla, 1998; Nishijima *et al.*, 2010; 石井ら, 2000)。

底部境界モデル培養系を用いて前記と同様に、底質から再構成したミックスバイオフィルムの破砕物 PCV 0.2 mL/cm²、魚類初期用配合飼料 10 mg/cm²、有孔虫石灰岩粉末 3 mg/cm² をモデル底面に置き拡げて培養した。培養期間中の水温は 25 ± 1 °C に保った。シリコンチューブ (内径 2.0 mm) に接続したガラス管 (内径 2.0 mm) を水槽上部から底面 2 cm 上部の位置に垂下・固定して、試水をシリコンチューブに接続した外部のシリンジ (5 mL) に採取した。採水は培養開始から白濁層が形成されるまで、ほぼ 24 時間毎に行った。同時に濁度 (OD660) を前記と同じ方法で測定した。細菌解析の試料は採水後、直ちに -80 °C で冷凍保存して DGGE 解析直前に試料を解凍した。

結果

培養開始後 1 日のモデル底面上部は約 3 cm 直上まで白濁し、底面直上 2 cm では濁度 (OD660) が 0.09 であった。この時、底面の下部は、一様に薄く白濁した。培養開始後 2 日のモデル底面の直上 2 cm の濁度は 0.26 まで増加し、モデル底面の約 7 cm 上部に濁度 0.07 と 0.00 の明確な濁度の境界面が形成された。この時、モデル底面の下部の白濁は前日より濃くなった。培養開始後 3 日に、モデル底面から約 4 cm 上部まで濁度 0.07 の白濁層が形成された (図 3.5)。この時、モデル底面には粘質を有するバイオフィームが形成されていた。また、目視観察ではモデル底面下部の白濁濃度は前日とほぼ同じであった。モデル底面直上 2 cm の固定点からの試水の DGGE 解析では、培養開始後 1 日、2 日、3 日に、それぞれ 3 本 (1 F-a, b, c)、3 本 (2 F-a, b, c)、4 本 (3 F-a, b, c, d) の明確なバンドが発現した (図 3.6)。特に底面直上に白濁層が形成された培養開始後 3 日の検体では、培養開始から見られたバンド 3 F-a, が増加し、他の 2 本 (3 F-b, c) のバンドは変わらなかった (図 3.6)。培養開始後 3 日に明瞭に発現した 4 本のバンド (3 F-a, b, c, d) の塩基配列 E 解析を行ったところ、以下の細菌の帰属分類群が推定された (図 3.7)。バンド 3 F-a は *Arcobacter* sp. (相同率 100 %、細胞内硫黄粒子を有する微好気性の硫黄細菌)、バンド 3 F-b は *Lutibacter* sp. (相同率 100 %、潮間帯の偏性嫌気性の炭素分解菌)、バンド 3 F-c は Clostridiales 目 (相同率 94 %、土壌細菌の偏性嫌気性の硫酸還元細菌)、バンド 3 F-d は Rhodobacterace 科 (相同率 99 %、S⁰ を利用する紅色非硫黄光合成細菌) であった (図 3.6)。培養開始後 1 日から白濁層の形成された培養開始後 3 日までは *Lutibacter* sp. と *Arcobacter* sp. と Clostridiales 目の 3 種類の細菌種類が認められた。培養開始後 3 日に光学顕微鏡の観察で確認された顆粒を有する細菌の *Arcobacter* sp. は前日と比較してバンドが増加し、*Lutibacter* sp.、Clostridiales 目の発現も継続して観察された。また培養開始後 3 日には、Rhodobacterace 科 (光合成細菌) の新しいバンドが見られた。

3. 4 底部境界モデルの硫化物等の挙動

a) 白濁層形成時の硫化物と溶存酸素の鉛直分布

目的と方法

白濁層には明瞭な界面があり、わずかな鉛直方向の距離で化学的環境が大きく変化していることが示唆された。また硫化水素臭や白濁が酸化条件で消失することなどから、白濁の一部は硫化物および硫化物が酸化して生じた元素状硫黄であると推定された。第1章で述べたように、セディメントミックスバイオフィームが出現する環境では硫黄代謝が極めて重要になる。そこでこの白濁層内外の微小な硫化物や溶存酸素の変化を精密に測定する実験装置を作成した (図 3.8)。

モデル底面の直上水中の溶存酸素は自作の微速度昇降装置により水の攪拌の生じない速度 (4 cm/min.) で溶存酸素センサーを垂下移動させ、水面からモデル底面の直上 2 cm までの間の 9 点で測定した (図 3.8)。また、溶存酸素センサーの側面にシリコンチューブ (内径 2.0 mm) を連結したガラス管 (内径 2.0 mm) を装着し、このシリコンチューブと連結して水槽外部に置いた 5mL 容シリンジにより、モデル底面の上部の 9 点の各層から採水し、モデル底面上部の硫化物と濁度を同時に測定した。モデル底面の下部の試料は、底面上部からの採水後に水槽上部から補助具付シリンジ (1 mL 容) を用いて、シリンジ針をメッシュに突き刺して、モデル底面の下部 2 cm から採取した。モデル底面上部の水質は硫化物 (AVS)、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP) を測定した。濁度は 660nm 吸光度 (OD660) を測定した。

結果

白濁層が形成された時、モデル培養系の底面の上部の溶存酸素 (DO) は、ガラス水槽表面から培養器白濁層の上端までは緩やかに減少したが、白濁層の上端から下方へかけて溶存酸素は急激に減少し、白濁層内の溶存酸素は、ほとんど 0.005 mg/L 以下であった。一方、モデル底面直上の白濁層内の硫化物濃度は、底面の下部の硫化物濃度より少し低かった。しかし、白濁層内の硫化物濃度は、ほぼ均一で 0.22~0.24 mg - S/mL あった。また、硫化物濃度は白濁層の上端から上方へかけて急激に減少し、白濁層の上部の透明水中

では硫化物は検出されなかった（図 3. 9）。 上記のように、モデル底面の直上に白濁層が形成された時、白濁層内では、ほとんど溶存酸素を含まない硫化物を有する還元状態であったが、白濁層の上方では好氣的環境が保持された。白濁層の上端では溶存酸素と硫化物の急激な化学的濃度の勾配が測定された。

b) 栄養量とモデル底部境界の白濁層形成、硫化物濃度推移

目的と方法

以上のような白濁層形成の進行と、硫化物濃度位の推移について、バイオフィーム形成のために加えた栄養（魚類初期用配合飼料）の量との関係を調べた。4つの底部境界モデル培養系を入れた4つの水槽を使用して、4段階の異なる魚類初期用配合飼料、5.0、7.5、10.0、20.0 mg/cm²と、同一量のポリマー状バイオフィームの破砕物（PCV0.2mL）と、同一量の有孔虫石灰岩粉末（3 mg/cm²）を、それぞれの水槽内のアクリル容器のモデル底面に置き、培養を行った。実験室内で水温を25℃に定に保った。モデル底面の直上の試料は底面の約2 cm上部から補助具付シリンジ（1 mL容）を用いて採水した。モデル底面の下部の試料は直上部の採水後に上部からシリンジ針をモデル底面のメッシュへ突き刺し、モデル底面の約2 cm下部から採水した。モデル底面の直上と下部の硫化物を測定し、同時にモデル底面直上の白濁層の形成を観察した。

結果

モデル底面下部では、培養2日目に硫化物が検出されたが、モデル底面の直上部では硫化物は検出されなかった。魚類初期用配合飼料の量が5.0、7.5、10.0 mg/cm²の試験区では、培養開始後3日から全ての試験区でモデル底面の直上部と下部で硫化物が検出された。また、それぞれの硫化物の最高濃度は、直上部では培養開始後3日目、下部では6日目に検出された。魚類初期用配合飼料の添加量が多いほど、モデル底面の直上部および下部の硫化物の最高濃度は高かった。3つの試験区ともに、モデル底面下部に硫化物が検出される期間に底面直上の白濁層が形成され、モデル底面に置いた魚類初期用配合飼料が多いほど、白濁層の形成期間は長かった（図 3.10）。培養開始後3日での魚類初期用配合飼料の量とモ

デル底面の下部水の硫化物濃度の関係は、魚類初期用配合飼料の量が 5.0 と 7.5 mg/cm² では、栄養量が多くなるほど硫化物濃度は増加した。しかし、7.5 と 10.0 mg/cm² では硫化物濃度はほぼ同じであった。モデル底面上部では、魚類初期用配合飼料の量が 5.0 mg/cm² では硫化物濃度は非常に小さかったが、魚類初期用配合飼料の量が多くなるとともに 10.0 mg/cm² まで硫化物濃度が増加した。しかし、モデル底面に魚類初期用配合飼料を 20 mg/cm² を置いた試験区では、培養開始後のモデル直上から硫化物は検出されず、また底面の直上の白濁層は形成されなかった (図 3. 10)。この試験区のモデル底面の表面は白色で粘性は乏しかった。

c) 水温とモデル底部境界の白濁層形成、硫化物濃度推移

目的と方法

白濁層形成の進行と、硫化物濃度位の推移について、水温との関係を調べた。3つの異なる水温 15、20、25 °C のモデル培養系を作成し、バイオフィーム碎片 (0.2mL)、魚類初期用配合飼料 (10mg/cm³)、有孔虫石灰岩粉末 (3mg/cm³) を加えて培養を行った。モデル底面の直上部と下部の硫化物を測定し、同時にモデル底面直上の白濁層の形成を観察した。水温は3台の恒温槽を用い、それぞれ一定に保った。

結果

水温 25、20 °C 区では、培養開始後 3 日目からモデル底面の直上部と下部で硫化物が検出された。水温 15 °C では、モデル底面の下部では培養開始後 6 日目から硫化物が検出された。水温 15 から 25 °C までは、下部の硫化物の最高濃度はほぼ同じであった。一方、直上部では水温が低いほど硫化物の最高濃度は高かった。モデル底面直上と下部の硫化物が検出される期間は水温が低いほど長かった (図 3. 11)。白濁層の形成開始は水温 25 °C では培養開始後 1 日目であり、水温 20 °C と 15 °C では培養開始後 2 日目であった。白濁層の存続する期間も水温が低いほど長かった。

培養開始後のモデル底面の直上の酸化還元電位は水温 15、20、25 °C の3例ともに急激に低下した。水温が高いほど直上の酸化還元電位は早く低下し、3例ともに培養開始後

3 から 5 日目に酸化還元電位は -300 mV に達した。また、3 例ともに直上の酸化還元電位が -100 mV 以下に低下した時に、白濁層形成が観察された(図 3.12)。逆に、直上の酸化還元電位が 0 mV 以上に回復して上昇した時には、白濁層は消失した。

3. 5 考察：バイオフィルムを有する底部境界モデル

マイクロセンサーの利用と細菌の遺伝子研究手法の進歩により、干潟や砂泥地の底部境界域の硫化物、溶存酸素、微生物群集の動態についてのフィールド研究の報告例は増えている (Llobet - Brossa *et al.*, 2002)。しかし内湾の環境は干出や陸水の影響があり、複雑な要因による変動があることから、解析には困難をともなう。第 1 章で述べた通り、屋内のモデル培養系を構成して底部境界域の硫化物および溶存酸素の挙動を研究した事例は、暴風後の砂浜に模したモデル培養系により、砂浜の硫黄サイクル研究を行った例のみである (Jørgensen, 1974)。この実験の終了時に、砂の上に置いた海草アマモの表面にバイオフィルムの形成が観察され、バイオフィルムと生元素のサイクルの関連が初めて指摘された。測定された放射性硫黄同位体量から、硫化物は海水の硫酸イオン由来であることが推察され、砂浜の硫黄サイクルにバイオフィルムが寄与することが見出された。その他の研究としては、小容器上部のメッシュ表面に沿岸の硫化物を含む堆積物を置き、容器上部の海水を流水にした培養系を作成し、メッシュ下の海水へ硫化物を注入すると、堆積物表面にビブリオ菌を含む粘液のあるバイオフィルムが形成されることを報告した例がある (Thar and Kuhl, 2002)。しかし、この研究では、硫化物を含む堆積物をナイロンメッシュ上に置いたため、バイオフィルム形成と堆積物内の硫化物蓄積との関連は必ずしも明らかではない。また、水処理施設のバイオフィルム研究では、アクリル容器上層のシリコンフィルム表面に水処理施設からのスラッジを置き、底面下の水に酸素を、底面上の水に窒素ガスを、それぞれ連続注入したモデル培養系が作成された。この培養系を用いて、シリコンフィルム表面に形成されたバイオフィルム内の硫酸還元菌の鉛直的活性分布と菌種構成が検討されている (Liau *et al.*, 2014)。

本研究では、水分を含む底質の底部境界モデル培養系を作成して、境界域の硫化物および溶存酸素の挙動と細菌の動態を調べた。モデル底面に底質から直接に分離した液体表面バイオフィルムを種株とし、複合栄養としての魚類初期用配合飼料、添加物としての立山産有孔虫石灰岩粉末を共にモデル底面に置き拡げて培養した。本研究で用いた二重底容器によるバイオフィルム培養方法は、他に報告されていない。また、バイオフィル細菌の栄養として、液体栄養ではなく顆粒栄養を使用した例は見当たらない。本研究で得られた結果は、砂浜の硫黄サイクルの研究結果 (Jørgensen, 1974) とほぼ同様であった。すなわち、バイオフィルムを有する底質境界域では、底面直下に硫化物が蓄積され、この硫化物は底面を透過して底面直上に移動することが示された。しかし、本研究と Jørgensen (1974) の研究とは以下の 3 点が異なっている。まず本研究では、試験開始時点からバイオフィルム破砕物、魚類初期用配合飼料、有孔虫石灰岩粉末をモデル底面に置き拡げて培養した。これによりバイオフィルムがモデル底面に形成されている時点での底部境界域の硫化物等の挙動を詳細に把握できた。また Jørgensen (1974) の予想した硫黄サイクルの変動要因である、底面の栄養量および水温との関係を実際に調べることができた。2 つ目の相違点は、本研究ではモデル底面下部に砂等の底質は置かずに、間隙水の海水のみを置いた。これにより底質の硫化鉄等の形成を無視することができ、モデル底面直下の海水への硫化物の蓄積と、モデル底面下部から上部への硫化物の移動を測定できた。3 つ目の相違点は、本研究ではモデル底面上部の水の動きを抑制して、モデル底面上部は溶存酸素を有する静水環境とした。これにより、モデル底面上部に沿岸域や汽水湖沼で観察される、水塊の成層構造と類似した静水環境が構築できた。このことを反映して、本研究の底部境界モデル培養系では、モデル底面下部から直上への硫化物の移動・蓄積と、モデル底面直上の白濁層形成が観察された。

水塊の成層構造が形成される汽水湖沼である水月湖(福井県)において、放射性硫黄同位体を用いて硫化物等の変動と微生物活動の研究が行われた。その結果、水月湖では硫酸還元菌による硫化物還元は、底層の水ではなく底質の表面で進行していることが明らかと

なり、底質の表面直下で硫化物の最大濃度が測定された。このことから、水月湖では硫化物は底面を通過して、嫌気的な直上水へ蓄積していると推察された (Matsuyama, 1978)。

この様に、本研究のミックスバイオフィルムを有する底部モデル培養系は、成層構造が形成される汽水湖沼の底部境界の硫黄サイクルと、ほぼ同じ硫化物の挙動を示していると考えられた。

閉鎖内湾では、高水温期に表層水が風などの何らかの外力によって移動することにより、底層に滞留していた硫化水素を含む無酸素水塊が表層へ湧昇して青潮が形成される。この青潮の水塊全体への拡散により、水産生物の大量へい死などの環境問題を生じている (相崎ら, 1990、丸茂・横田, 2012)。このために早急な青潮発生のメカニズムの解明が期待されている。今回の底部境界モデル培養系で観察された硫化物等の挙動は、青潮形成における底層域の硫化物生成と蓄積のメカニズムに近い可能性がある。内湾奥部の海底では、堆積した有機物の分解代謝により海底域で硫化物が生じ、硫化物を含む底層の水塊が、青潮の発現に大きく関与していると推察されている。しかし、底層における硫化物の生成メカニズムは、まだ不明な点がある (牧ら, 2013)。内湾底層水の硫化物生成は3つのメカニズムが推定されている。①底層水中の有機物の酸素消費により、底層水の無酸素化に伴って硫化水素が生成する。この場合には、水中の有機物、懸濁物の分解に伴う酸素消費を考慮しているものの、底質における酸素消費・硫化物生成を無視している (児玉ら, 2009)。しかしながら、沿岸の海岸域と浅い海底では、海底面下数 cm に黒色の酸化層と還元層の境界の存在が知られており、酸化層・還元層の境界域での硫化物生成は無視できない。実際に、有明海干潟では、底面下 2 から 20 cm の層に、有用生物の棲息限界濃度である 0.5mg-S/g dry-mud の硫化物が周年にわたって存在していることが報告されている (楠田, 2012)。②底質に含まれる有機物分解に伴い、底質中で生成した硫化物が底層水へ移動する。この堆積物における硫化物生成は、現場調査と数理モデルにより多く研究されているが、計算値と現場での測定値との間に不一致が存在することが指摘されている (入江ら, 2010)。2012 年 9 月 23 日～10 月 1 日に東京湾奥で規模の非常に大きな青潮が発

生し、その発生期間は8日間に達した。青潮の規模から、青潮発生の直前に海水中には大量の硫化水素が存在し、これは底泥から溶出したものが、海況が穏やかであった9月中旬までの間に海水中に蓄積され続けたものと推定された(大畑ら, 2014)。③底面の細菌による有機物分解に伴い底面直下に生成した硫化物が底層水へ移動する。この事例は、本研究の底部境界モデル培養系により再現された。近年、海底部境界の硫化物の直接測定が可能となり、夏期の東京湾奥では底質中の硫化物の存在と同時期に底面直上で硫化物が存在することが観測された。東京湾奥の海底平坦域の底面直上の無酸素層の層厚は、底面直上の硫化物層とほぼ同じ層厚であった(岡田ら, 2011)。この結果は、本研究のモデル底面の直上に形成された白濁層内の溶存酸素と硫化物の濃度の分布と一致している。塩分を有する底層水が存在する汽水湖沼では、成層構造が形成されると、底層の嫌気水中に硫黄粒子を有する細菌が繁殖して白濁を形成し、硫黄が底層水塊へ蓄積されると推察されている(Matsuyama, 1978)。クロアチアの汽水湖のロゴズニカ湖では、コロイド状単体硫黄により表層がミルク色となり、水棲生物に被害を生じている。この湖底層の硫化物の蓄積メカニズムは不明であったが、このコロイド状単体硫黄は生物起源の単体硫黄に由来していた(Bura-Nakić *et al.*, 2009)。

上記の検討から、青潮形成時の底層水の硫化物の蓄積と移動のメカニズムは以下のように推察することが可能と考えられた。海底の底質表面へ堆積した有機物を細菌が利用することにより、海底表層直上の海水と海底下の底質中の海水は溶存酸素を消失して嫌気環境となる。その後、硫酸イオンの還元を伴う嫌気性従属栄養細菌の寄与により、底質表層(底面下部)の間隙水中に硫化物が蓄積される。この底面下部に蓄積された硫化物は、底面と底層表層のバイオフィルムを透過し、底面の直上へ移動する。これにより底面直上の底層水では嫌気環境が拡がり、底面直上の底層水には硫化物とともに生物起源単体硫黄が蓄積される。物理的流れにより、この硫化物と単体硫黄を含む嫌気底層水が、急激に酸素を含む表層水塊と混合することにより、表層の溶存酸素は枯渇して硫化物は拡散する。海水は硫黄により青色を呈して、青潮を生じる。

汽水性の部分循環湖沼や黒海などの成層化した水塊では、細胞内に硫黄粒子を有する光合成細菌の濃密浮遊細菌叢が水塊の溶存酸素と硫化物の化学的勾配の近縁に存在する (Canfield *et al.* 2005)。汽水性湖沼の水月湖や貝池と黒海では、底質表面のバクテリアマットの存在が報告されている (小栗ら, 2002)。放射性硫黄同位体を用いた研究により、水月湖の浮遊濃密細菌群叢の形成は底質表面の硫酸還元細菌の硫化物に由来することが明らかにされた (Matsuyama 1978)。また、貝池の底面微生物マットから分離した微生物の代謝試験から、堆積物表面の硫黄代謝に重要な役割をする細菌は 16SrRNA の遺伝子塩基配列に基づいて定義されたプロテオバクテリア門 (Proteobacteria) のデルタプロテオバクテリア綱 (Deltaproteobacteria) とイプシロンプロテオバクテリア綱 (Epsilonproteobacteria) であることが明らかにされた (Koizumi *et al.* 2005)。本研究の白濁層の主要な細菌構成種と推察された細胞内硫黄粒子を有する *Arcobacter* sp. はイプシロンプロテオバクテリア綱に含まれる。

本研究のモデル底面培養系では、ミックスバイオフィームは単一種類の細菌を分離して培養したのではなく、複数種類の細菌を同時に底質から分離して再構成した液体表面バイオフィームを用いた。このため、異なる代謝系を持つ複数種類の微生物が共存してミックスバイオフィームを構成していた可能性がある。これらの異なる代謝系を有する微生物グループが、モデル底面の直上水中の白濁層の形成に関与したと推察した。

本研究の底部境界モデル系の培養試験から示されたモデル底面直上の白濁層形成のメカニズムは、Matsuyama (1978) の指摘した光合成細菌の濃密浮遊細菌群叢の形成が底質表面の硫酸還元細菌等に由来するメカニズムと同様である可能性もあるが、この点は今後の研究が必要である。仮にこれが正しければ、沿岸または汽水湖沼の成層水塊の下層に観察される濃密浮遊細菌群叢は、底面のバイオフィームバクテリアと直接的に関連するかも知れない。

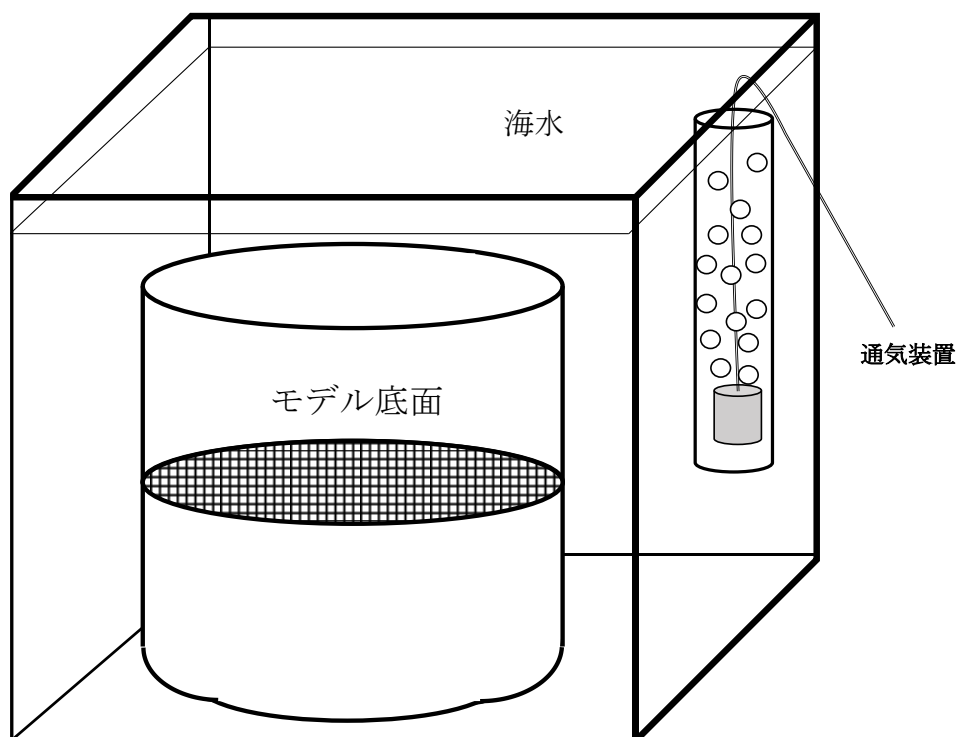
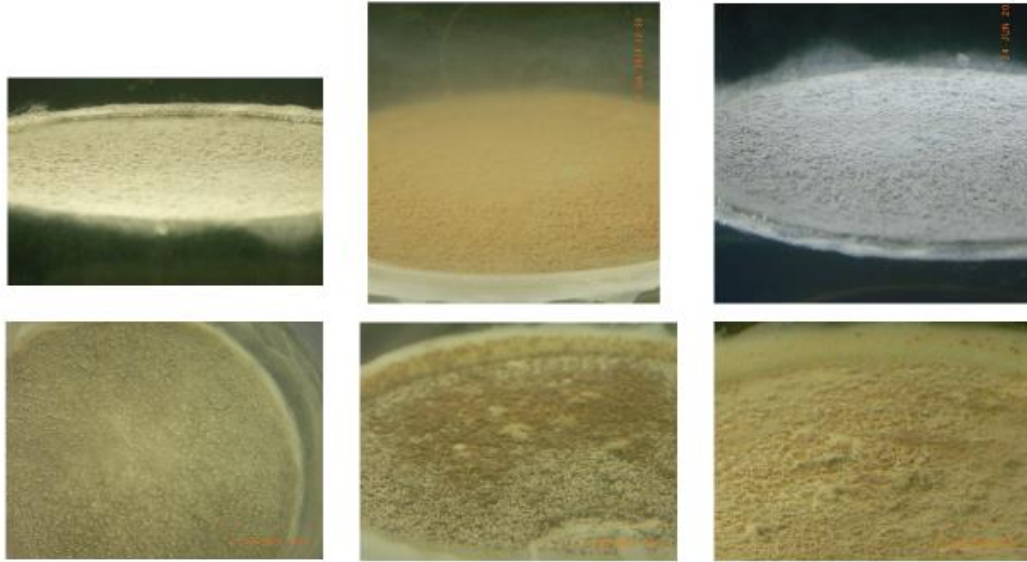


図 3.1 水分を含む底質の底部境界層のモデル培養系（模式図）

小型ガラス水槽（底面積 18 cmx 31 cm, 高さ 24 cm）

透明円柱容器（アクリル製；内径 9.5 cm 高さ 15cm）



(a) モデル底面に形成された微小な気泡を有するバイオフィルム

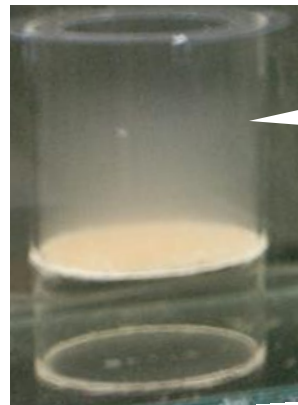


(b) 噴気孔様の構造を有するバイオフィルム

図 3.2 水分を含む底質のモデル底面に形成されたバイオフィルム

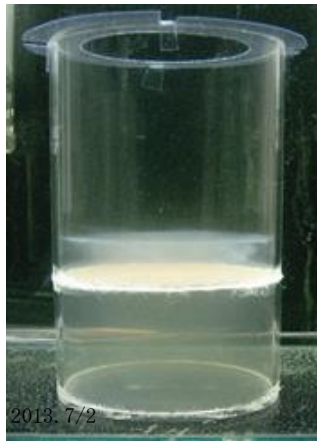


(a) 培養開始後の懸濁 6/30

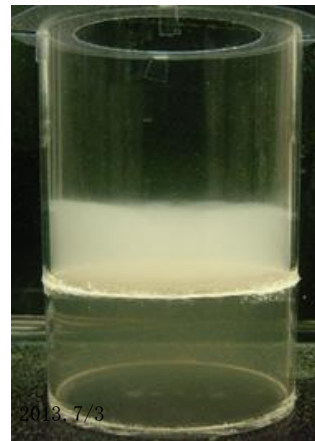


濁り境界

(b) 上部水の濁り境界形成 7/1



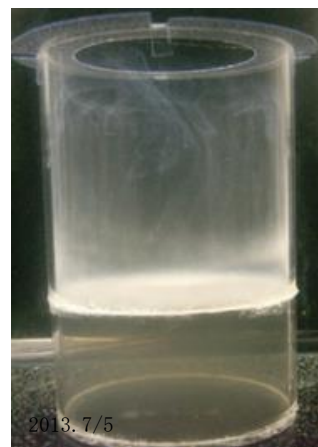
(c) 白濁層の形成開始 7/2



(d) 白濁層の形成 7/3

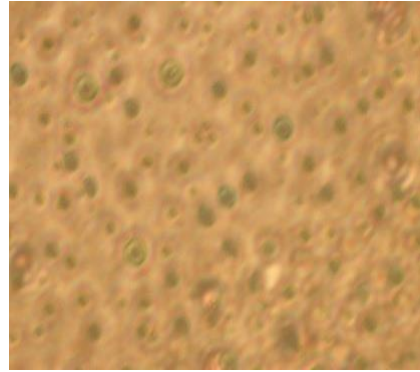
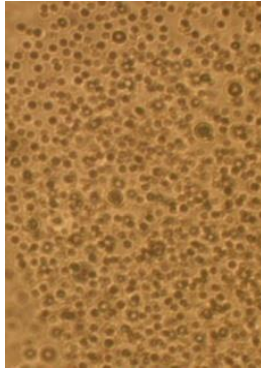


(e) 白濁層の消失前 7/4

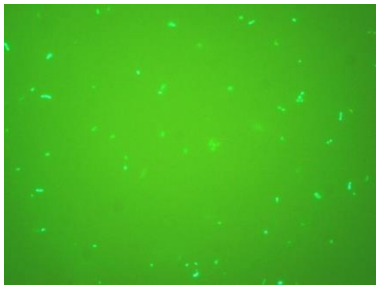


(f) 白濁層の消失直前 7/5

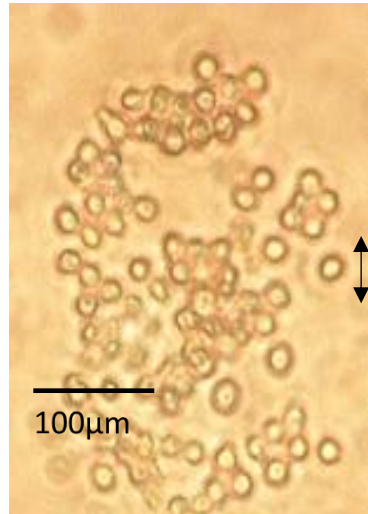
図 3.3 培養開始後のモデル底面直上の白濁層の形成から消失, 2013. 6. 30~7. 5



(a) 白濁層の粒状構造 (X100) (b) 白濁層の粒状構造 (X400)



(c) DAPI 染色



(d) 粒子の大きさ

図 3.4 白濁層の光学顕微鏡像



(a) 開始後 1 日

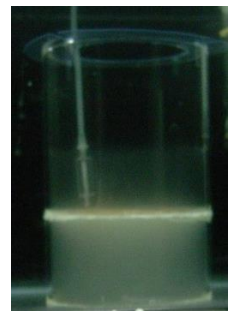


(b) 開始後 2 日



(c) 開始後 2 日の上部

(濁り境界形成)



(d) 開始後 3 日

(白濁層発現)

図 3.5 培養開始後のモデル底面直上の濁りと白濁層

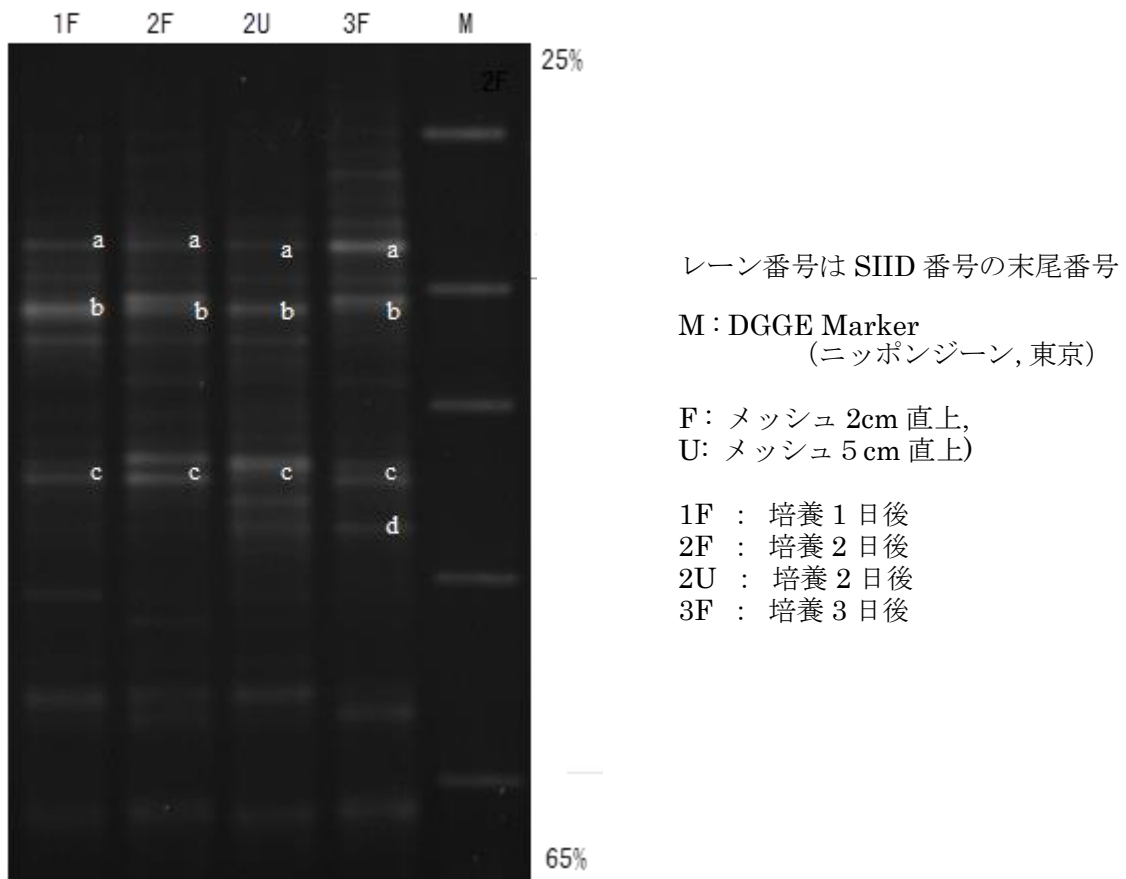


図 3.6 DGGE 解析による白濁層の構成細菌の電気泳動図

(テクノ スルガ ラボ SIID14330, 2014)

5a	帰属分類群
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGACGAAAGTCTGATGCAGCAACGC CCGGTGGAGGATGACACATTTCCGGTGGTAAACTCCTTTTATATAGGAAGATAATGACGG TACTATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT	バンド5aは <i>Acrobacter sp</i> (相同率100%) ,
5b	バンド5b は <i>Lutibacter sp.</i> (相同率100%),
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAGAGCCTGATCCAGCCATG CCGGTGCAGGAAGACGGTCCATGGATTGTAAACTGCTTTTATATAGGAAGAAACACTC GGACGTGCCAGCCTTGACGGTACTATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG CCCGGTAAT	バンド5cは Clostridiales 目 (相同率94%),
5c	バンド5d は Rhodbacterace 科 (相同率99%)
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACG CCGGTGGAGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTCTATGGGAAGAAAAAATG ACGGTACCATAGGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAT	
5d	
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCGATG CCGGTGGAGGATGAAGGCTTAGGGTCGTAAAGCTTTCGCCTGTGATGATAATGACA GTAGCAGGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT	

図 3.7 判別された DGGE バンド塩基配列解析と帰属分類解析



図 3.8 モデル底部境界域の測定
(微速度昇降装置, 4cm/分, を設置)

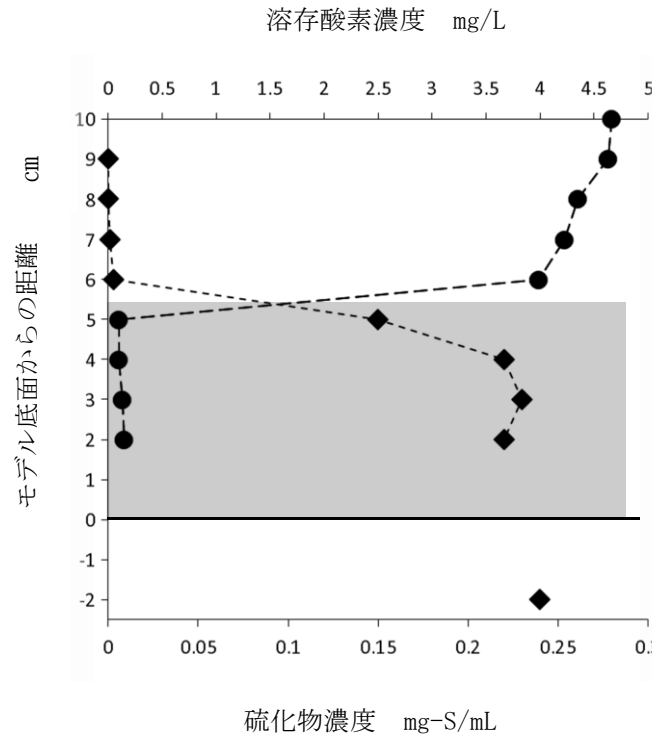
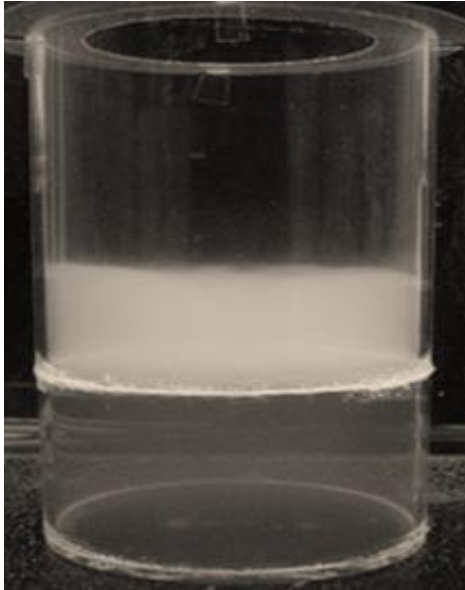


図 3.9 白濁層形成時の硫化物と溶存酸素の垂直分布

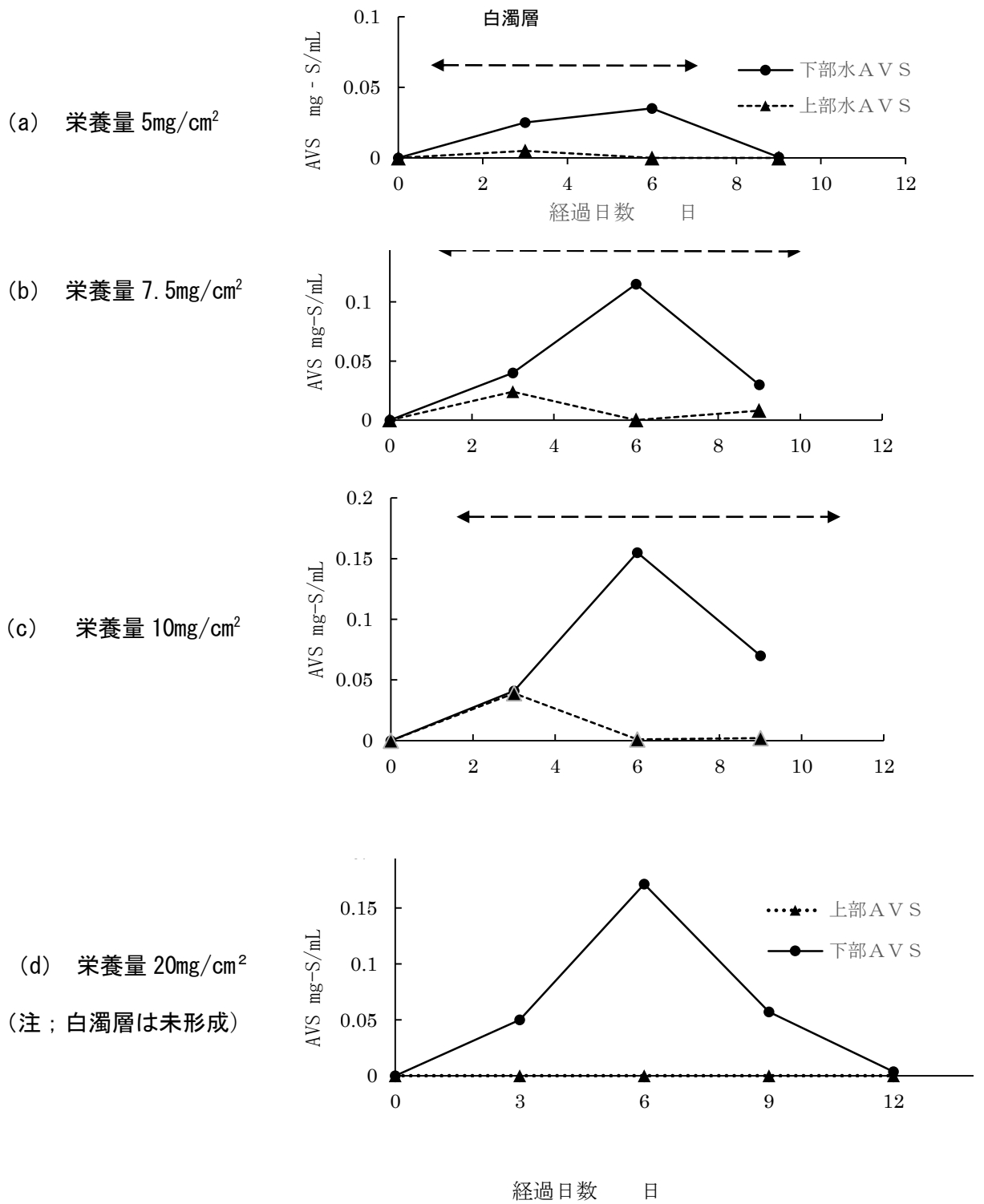
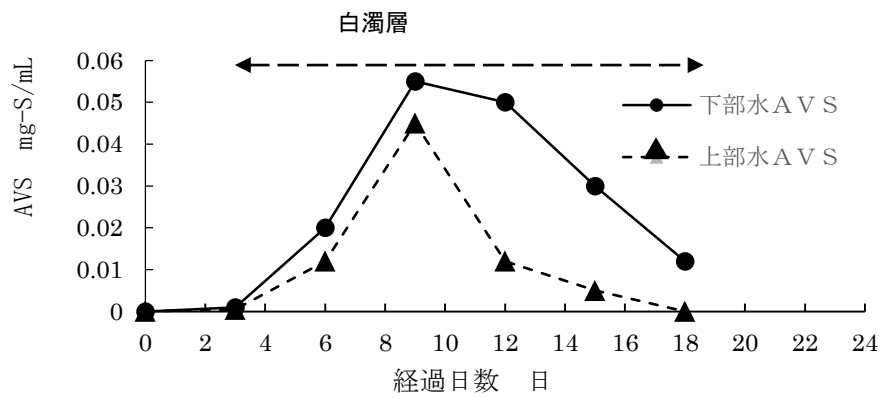
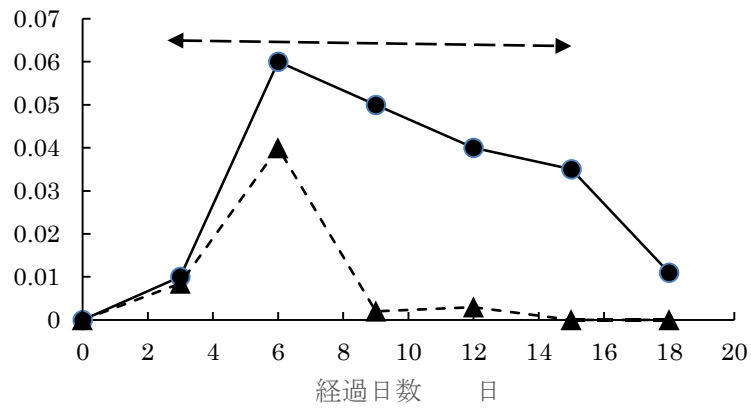


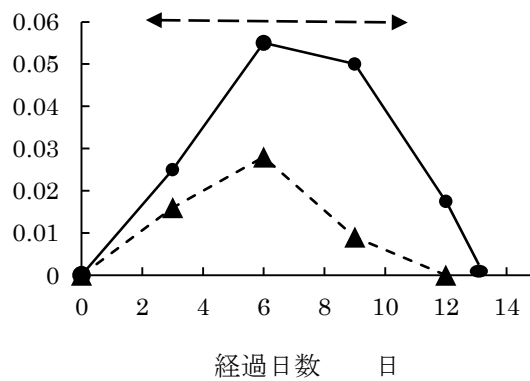
図 3.10 栄養量とモデル底面境界の硫化物と白濁層



(a) 培養水温 15°C

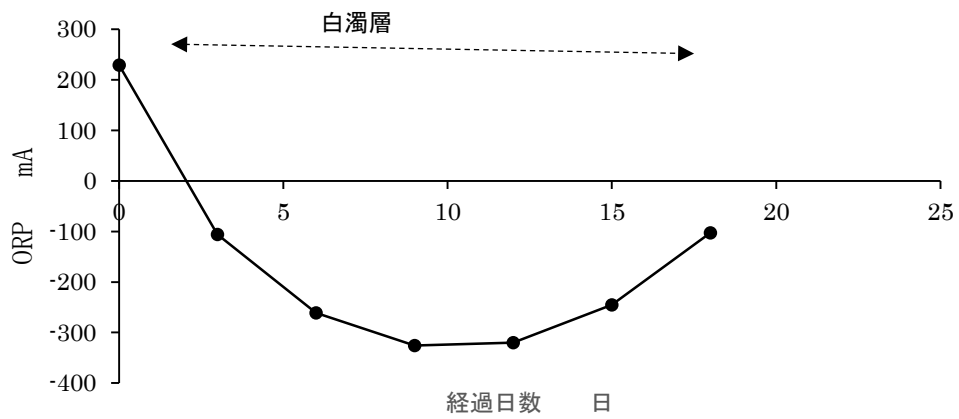


(b) 培養水温 20°C

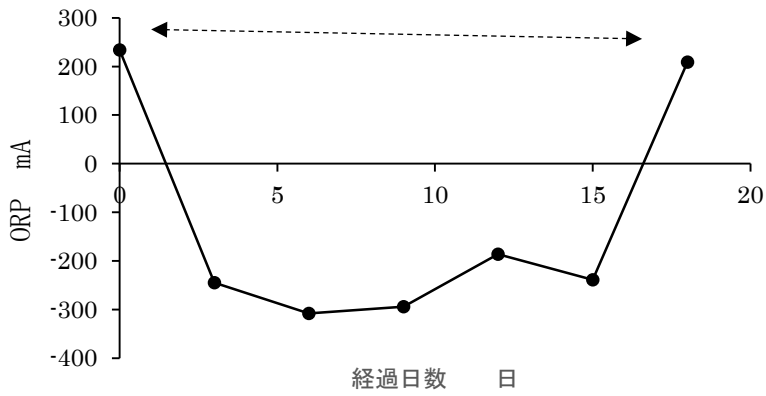


(c) 培養水温 25°C

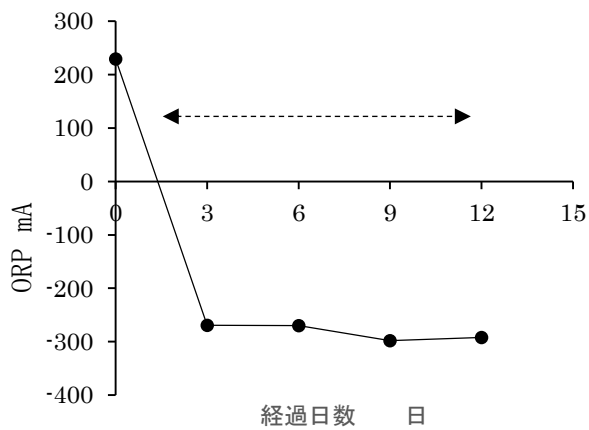
図 3.11 培養水温とモデル底面境界の硫化物と白濁層



(a) 培養水温 15°C



(b) 培養水温 20°C



(c) 培養水温 25°C

図 3.12 培養水温とモデル底面直上の酸化還元電位 ORP と白濁

4. モデル底部境界域の硫化物と溶存酸素

4. 1 モデル底面上部・下部の硫化物蓄積

a) 白濁層形成時のモデル底面上下の硫化物濃度

目的と方法

白濁層形成時のモデル底面の上部および下部の硫化物蓄積について検討するため、第3章の底部境界モデル培養系の異なる栄養量および水温の影響についての試験（3. 4

b) で得られたモデル底面下部の硫化物濃度と、その時のモデル底面上部の硫化物の濃度を、白濁層の濁度の増加と減少の期間に分けてプロットして検討した。

結果

培養期間中に白濁層の濁度が増加する時は、モデル底面の下部の硫化物濃度が高いほど、その上部の硫化物濃度も高かった。下部の硫化物濃度が 0.06 mg-S/mL 以下の時に、これらの硫化物濃度は直線的な相関 $Y=0.66 X$ （Y：上部の硫化物濃度、X：下部の硫化物濃度、 $R^2=0.967$ ）の関係が類推された（図 4.1）。

b) モデル底面下部の硫化物蓄積

目的および方法

モデル底面下部における硫化物の蓄積速度を底面下部の異なる深度で測定するため、以下の実験を行った。モデル底面下部の異なる深度から採水できるようにするため、モデル底面上部を長い円筒として水槽内に設置せず直接培養するタイプの底部境界モデル培養系を作成した（以後、直接タイプの培養系と呼ぶ）。直接タイプの培養系では、モデル底面の上部に高さ 200mm 長い円筒を用いた。この円筒の最上部に、エアーストンを入れた多数の小孔のある細管を設置し、これによりモデル底面の水の動きを抑制した。直接タイプの培養系は、外側の支柱により転倒を防止した。底面を有する透明アクリル円柱管（外径 60mm、内径 54mm、高さ 300mm）の底から 10 cm 上に、第3章のモデル培養系と同じナイロンメッシュを貼りつけモデル底面とした。モデル底面下部水を採水するため、アクリル円柱

管のモデル底面の直下から2本の微細シリコンチューブを差し入れ、その先端をモデル底面下1cmと9cm（円柱管底面上1cm）の位置に固定した（図4.26）。この円柱管の上端から1cm下まで、ろ過海水を入れた。培養試験は第3章の底部境界モデル培養系と同様に、液体表面バイオフィルムの破砕物（PCV 0.2mL/cm²）、魚類初期用配合飼料

（8.7mg/cm²）、有孔虫石灰岩粉末（3mg/cm²）をアクリル円柱管の上から静かにモデル底面表面へ置き拡げて培養を行った。水温は18℃に保持して第3章と同じ光環境で試験した。モデル底面上部の溶存酸素と硫化物の採水と測定は、第3章と同じ昇降装置を用いて、側部にシリコンチューブを固定したDOセンサーを使用した。モデル底面水上2cm（水表面下18cm）、モデル底面上8cm（水表面下12cm）、モデル底面上14cm（水表面下6cm）、水表面下2cm、の4点から採水・測定を行った。モデル底面下部の硫化物はモデル底面下方1cmと9cm（円柱管底面上1cm）に、それぞれに設けたシリコンチューブから採水して測定した。

結果と考察

培養開始後3日目に、モデル底面上にバイオフィルムの形成が見られた。この時、底面下部はやや濁ったが底面直上は透明であった。培養開始後6日から9日目にバイオフィルム表面に小型の気泡様の構造が出現して増加し、同時に底面下部の濁りは増加した。培養開始後12日目にはモデル底面の上部に白濁が観察された。モデル底面下2cmと9cmの硫化物の濃度はほぼ等しかった（図4.3）。底面下部の硫化物濃度は、培養開始から培養開始後3日目まで緩やかに増加したが、培養開始後3日目から9日目までは直線的に増加した。培養開始後9日目から12日目までの硫化物濃度は変わらなかった。この直接タイプの培養系の下部容器（高さ9.8cm、内径5.6cm）の容積は241.3cm³であった。培養開始後0、3、6、9、12日目の底面下部のみかけの硫化物蓄積量はは0、0.528、2.64、5.347、5.50mg-S/cm³をと算出された。培養開始後3日目から9日目までの期間では、みかけの硫化物量増加は $Y=0.83X-1.98$ （ $R^2=0.995$ 、Y:硫化物量、X:日数）の関係が得られた。傾きは0.8366であるからみかけ硫化物蓄積速度0.83mg-S/cm³/日と算出された。実際にはモ

デル底面上部へ輸送された硫化物があるため、真の硫化物生成速度（すなわち硫酸還元速度）は、これよりもかなり大きくなる。本試験の期間中にはモデル底面の直上部は透明であり、底面上部に白濁層の形成は無かった。また、底面上部の溶存酸素濃度は2~6.5mg/Lで濃度勾配がみられた（図4.4）。その後、モデル底面上部水を通気の改良により静水状態のところ、第3章の底部境界モデル系と同じく、モデル底面上部に白濁層が形成した（図4.5）。

モデル底面下部の硫化物は、培養日数とともにシグモイド曲線に類似した濃度増加がみられた。ガラススライド上のバイオフィーム細菌の細胞密度は、増殖期においては直線的に増加する（Anderson, 2016）。したがって、この硫化物濃度増加は、バイオフィーム細菌の直線的な増を反映しているのかも知れない。沿岸底質の硫酸還元速度（硫化物生成）は、砂浜の硫黄サイクル研究では0.64~2.56 mg-S/cm³/日が得られている（Jørgensen, 1974）。沿岸の底質の海底面下5-10 cmの硫酸還元速度として、1.6-16 S-mg/cm³/日が報告されている（Skyring, 1987）。しかし、硫黄同位体法やスラリー法による沿岸底質の硫酸還元速度（硫化物生成）は、底質の鉄による硫化物消費反応が早いために、測定された硫酸還元速度の値は実際より小さいのではないかと推論されている（Kasten and Jørgensen, 2000）。塩泥地（salt mash）やバクテリアマット中の硫酸還元速度は沿岸域の10-100倍で、塩泥地130 mg-S/cm³/日、バクテリアマット450 mg-S/cm³/日であった（Canfield and Marais, 1993; Hiens *et al.*, 1991）。嫌気環境のバイオリクターの硫酸還元速度は、沿岸底質の硫酸還元速度より100-1000倍高い値である（Kühl and Jørgensen, 1992）。本研究で得たモデル底面直下の硫酸還元速度（硫化物生成）は、0.83 mg-S/cm³/日であり、これまで報告されている沿岸底質の硫酸還元速度と同程度であった。

4. 2 モデル底面直上の酸素消費

a) 酸素消費速度

目的と方法

底部境界モデル培養系の底面直上水を一時的に有酸素環境にして、その後の溶存酸素濃度の低下を計測することで、酸素消費速度が算出できる。この算出を行うため、以下の実験を行った。この酸素消費は、硫化物の酸化に伴う酸素消費を含んでいる。モデル底面の上部 2 cm に DO センサーを垂下固定した。4. 1 と同様な培養を行い、モデル底面下部の硫化物が最高濃度に達した時に、底面上で 5 分間強の通気を行った。底面直上の白濁層の硫化物は消失して、底面直上の溶存酸素濃度は水槽上層の溶存酸素濃度とほぼ同じ値に達した。その後、通気を止めて約 5 分間、30 秒毎にモデル底面の上部の溶存酸素を測定した。実験は、水温 20、25°C、初期溶存酸素量 3.6、4.2、5.5、7.0 mg/L の条件をそれぞれ設定して、酸素消費速度を測定した。モデル底面下部の硫化物濃度は、試験の前後に測定した。

結果と考察

通気の開始後、モデル底面の直上水中の白濁は上層へ流出し数秒で消失した。その約 5 分後に、モデル底面直上の溶存酸素は、水槽の上層と同じ濃度に達した。水温 25°C では、初期溶存酸素濃度 7.0 mg/L では初期濃度 3.6mg/L の時よりも溶存酸素濃度の初期減少は大きかった。水温 20°C の初期濃度 4.2mg/L と水温 25°C の初期濃度 3.6mg/L では、濃度減少ほぼ同じであった。これから直上水の溶存酸素濃度減少は水温よりも初期溶存酸素の濃度が大きく影響すると推察した。(図 4.6)。モデル底面直上の溶存酸素消費量から、 $[O_2]$ の反応速度論係数を次式から求めた。

$$-d[A]/dt = K[A] \rightarrow 1/[A] = 1/[A]_0 + K \cdot T$$

異なる初期溶存酸素量の 3 回の試験では経過時間とともに $1/[A]$ は同じ傾きを示し、 $[O_2]$ 反応速度 K は 0.03 mg/L/min (=0.013 mM /min= 7.8mM/h) を得た (図 4.7)。実験期間前後の底面下部の硫化物濃度は 0.14 mg-S/mL (=4.3mM) であり変化は無かった。底面上で H_2S が 100%酸素により酸化されるときは、4.3mM の H_2S は 8.6mM の O_2 を消費する。従って、底面下部から底面上部へ供給される H_2S は、酸素消費に比較的大きな寄与をされると考えられる。瀬戸内海や東京湾の夏場の堆積物の酸素消費速度は 0.3~0.9 g/L /m²・day

(0.38~1.17mmol/L/m²・h) であり、今回のモデル底面直上の溶存酸素消費量の5~15%であった(左山, 2014)。

b) 上層水の溶存酸素とモデル底面直上の酸化還元不連続層

目的と方法

上層水の溶存酸素濃度に応じて底面上部の白濁層がどのように変化するかを調べるため、以下の実験を行った。上層水の溶存酸素濃度底部境界層のモデル培養系を用いて、第3章と同様な手法を用いて培養した。測定前2日間と測定中3日間の合計5日間は毎日通気量を調整し、上層水の溶存酸素を3つの異なる濃度、すなわち4.9、6.3、7.6 mg/Lで一定に保った。第3章と同じ微速度昇降装置を使用し、側面にシリコンチューブを連結したDOセンサーを、水槽表面からモデル底面上部の2cm上まで垂下移動させ、2cm毎の位置の硫化物と溶存酸素を測定した。モデル底面直上の還元層の厚さは、モデル底面から白濁層上端までの高さを水槽の外側から計測して求めた。同時に酸化還元濃度を測定した。試験期間中の水槽温度は10~11℃であった。

結果と考察

上層水の溶存酸素濃度が4.9、6.3、7.6 mg/Lの時にはモデル底面から白濁層上端までの白濁層の高さは7、6、5 cmであった。それぞれのモデル底面上部の酸化還元不連続層は白濁層の上端と同じ高さの位置に形成された。上層水の溶存酸素濃度が高いほど、白濁層の高さとモデル底面直上の酸化還元不連続層の高さは低くなり、モデル底面に近くに位置した(図4.8)。

東京湾では夏期に水塊は成層化して底部深層は無酸素の嫌気環境となる。このため海底面より上部の水塊中に有酸素と無酸素の境界面が観測される。一方、冬期は表層と下層の水塊が混合され、底部深層は有酸素の環境となる。これにより冬期の酸素の境界面は底面より下部の底質中に形成され、酸素は海底面の最大24 mm下方まで浸透する(左山2014)。沿岸底部の酸素境界面の変化は、底面からの硫化物による酸素消費が影響すると報告されている(Rickard, 2012)。本研究では底面下に硫化物が蓄積された環境におい

て、上層水が異なる溶存酸素濃度を有する時の底面上部の溶存酸素と酸化還元電位濃度の垂直分布を測定した。その結果、上層の溶存酸素濃度が高い時には酸化還元境界面は水面からは深い底面近くに位置した。また上層の溶存酸素濃度が低い時には、酸素境界面は水面から浅い底面から遠くくに位置した。この実験から、酸化還元不連続層の位置は、底面下の硫化物濃度よりも上層の溶存酸素濃度に強く依存して変化することを示した。これは内湾または湖水で観察される底層水の酸化還元境界面の季節的な移動と一致する。

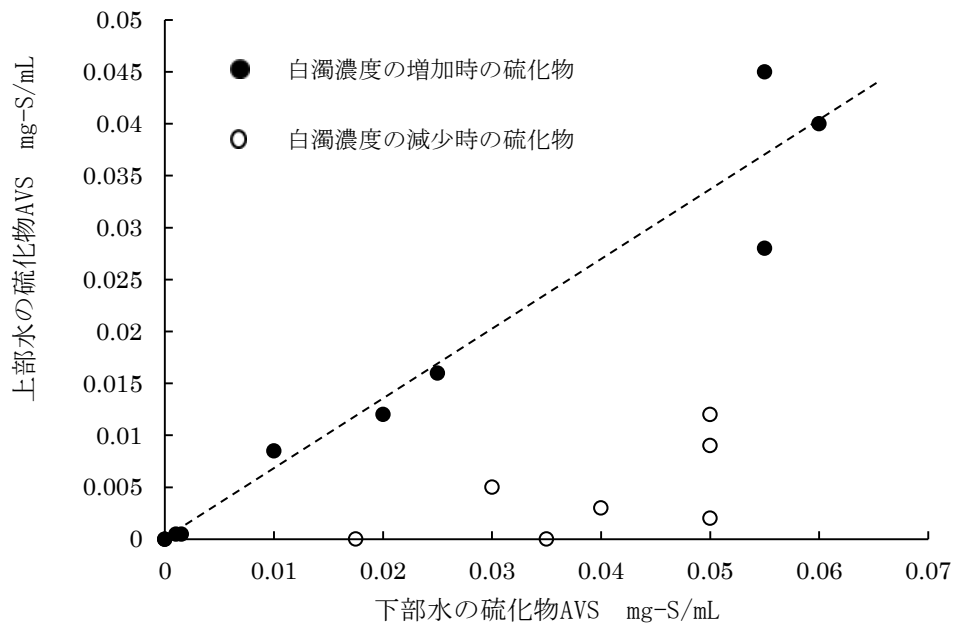


図 4. 1 白濁層形成時のモデル底面上下の硫化物濃度

(栄養量 5~10mg/cm²、培養水温 15~25°C)

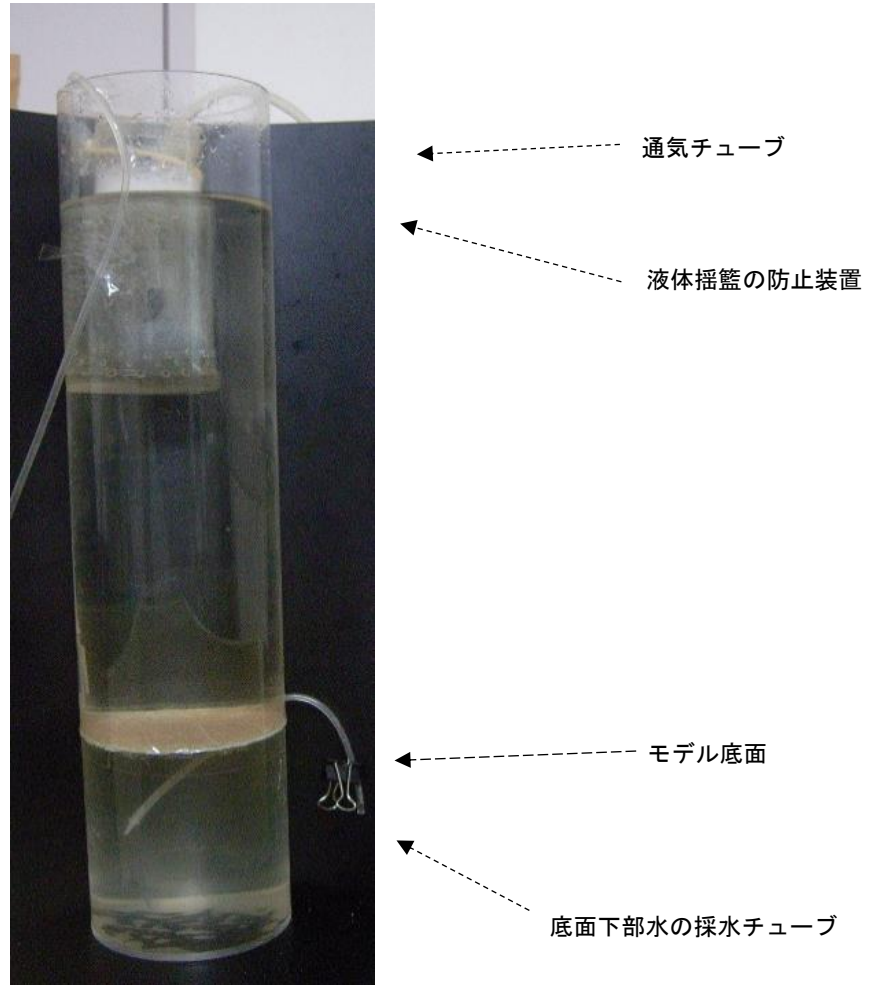


図 4.2 直接タイプ底部境界モデル培養系

高さ 40 cm (上部 30 cm + 下部 10 cm) 内径 9.5 cm

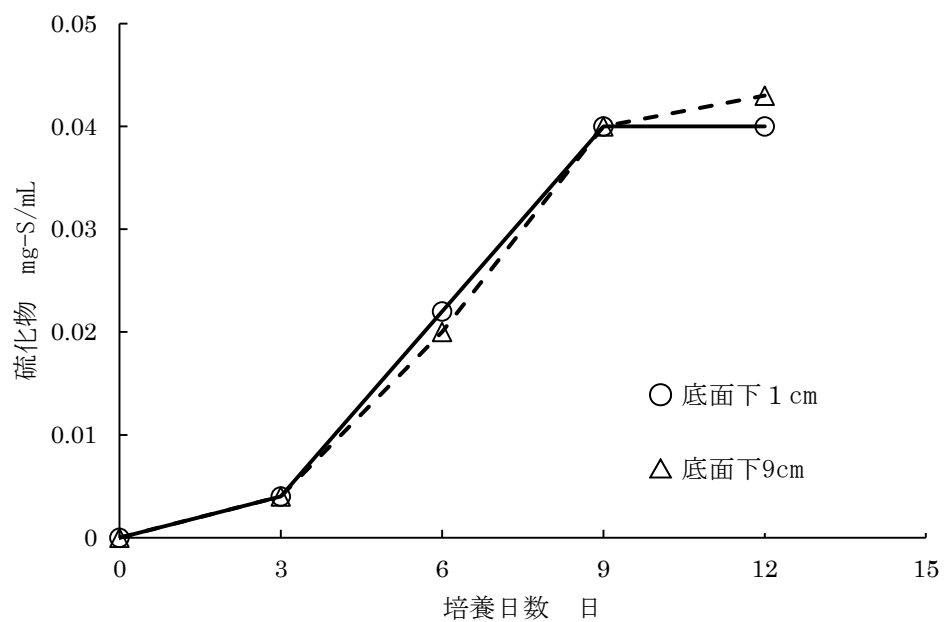


図 4.3 モデル底面下部 1cm と 9 cm の硫化物濃度

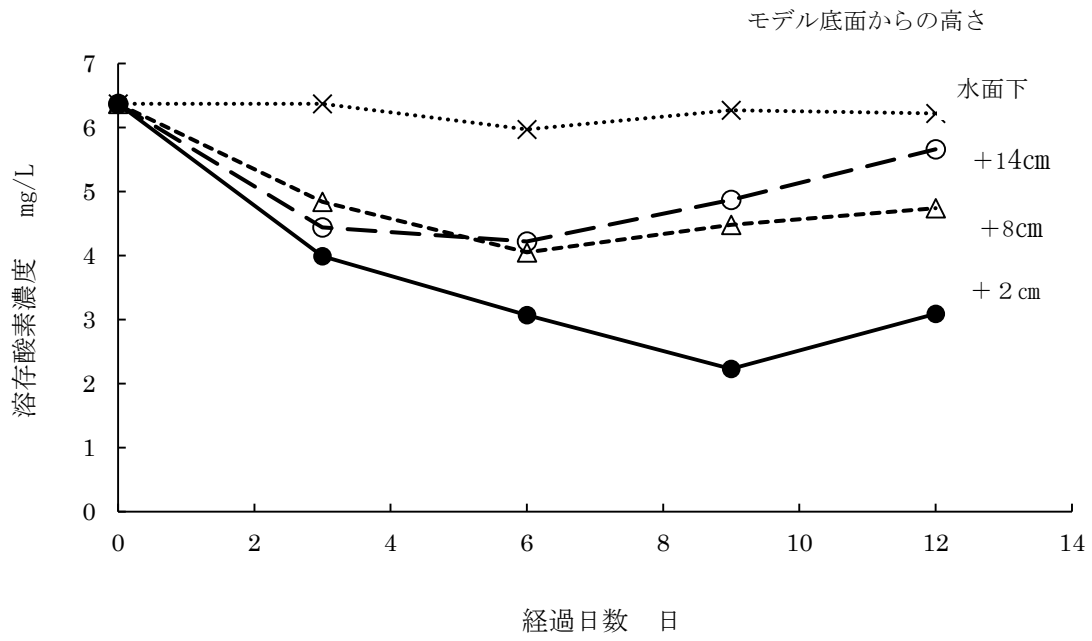


図 4.4 モデル底面上部の溶存酸素

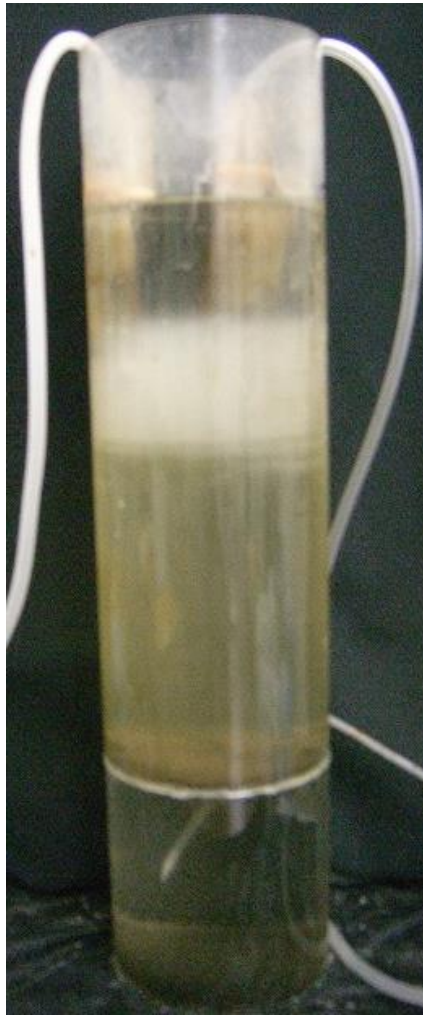


図 4.5 底面上部の白濁層形成(直接タイプ底部境界モデル培養系)

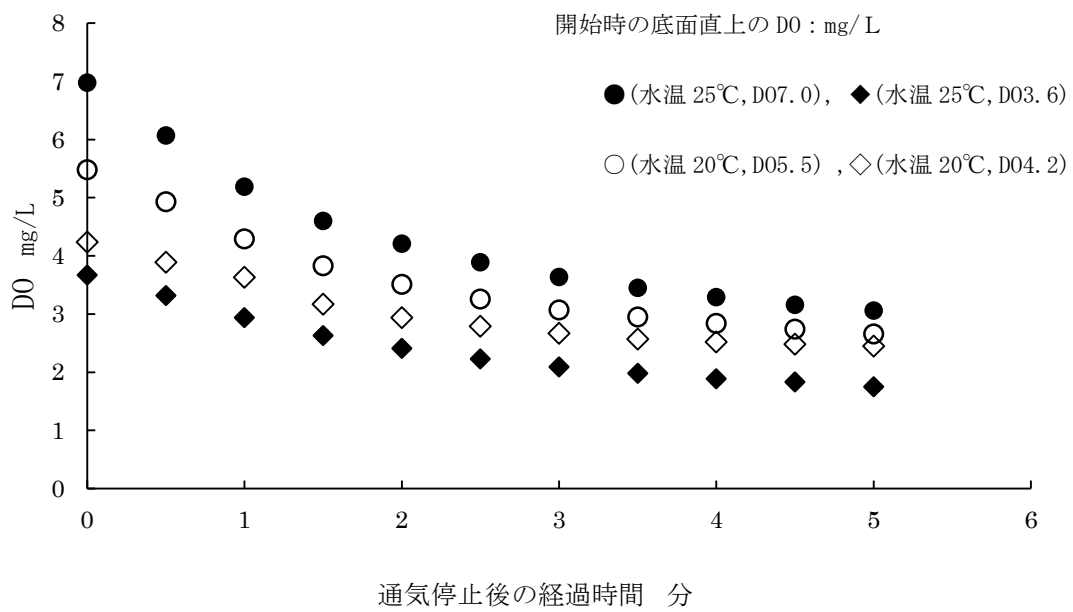


図 4.6 モデル底面直上の溶存酸素消費率

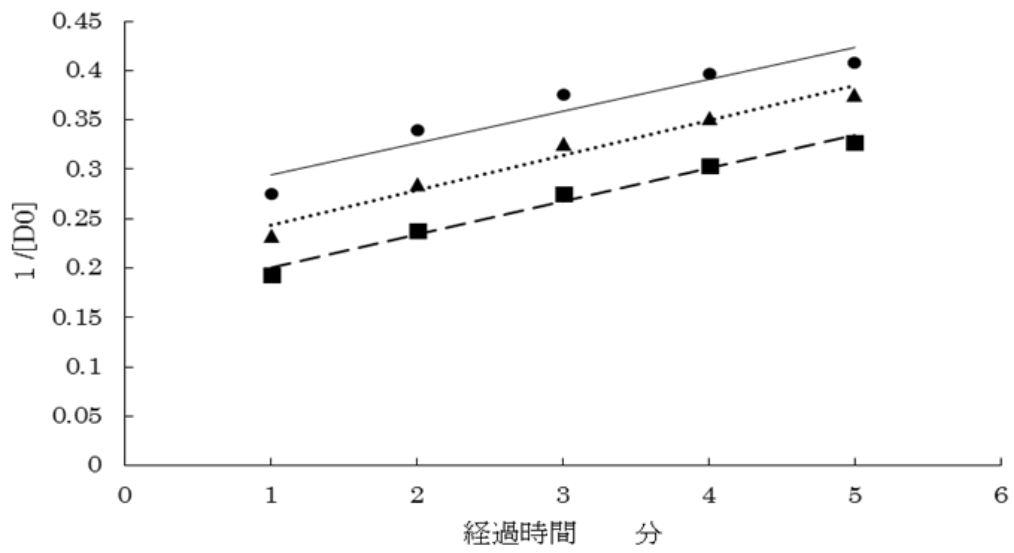
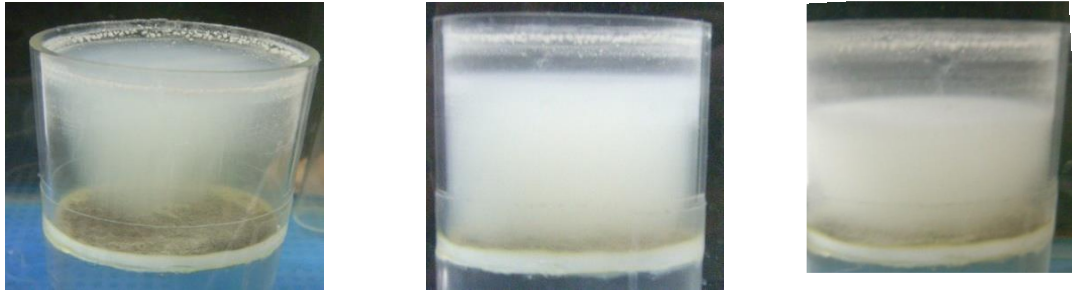


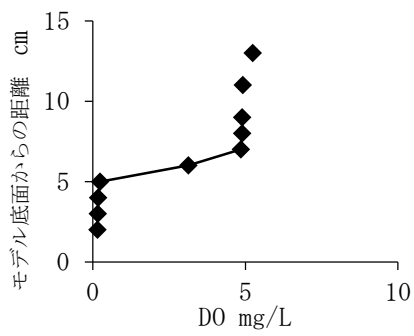
図 4.7 モデル底面直上の溶存酸素消費率



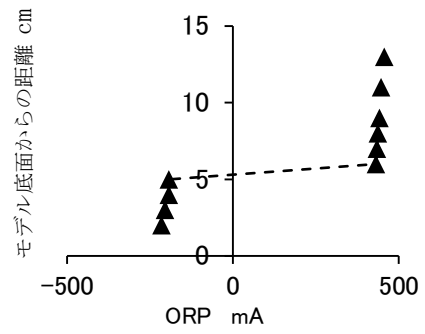
(a) DO 4.9mg/L の白濁層

(b) DO 6.3mg/L の白濁層

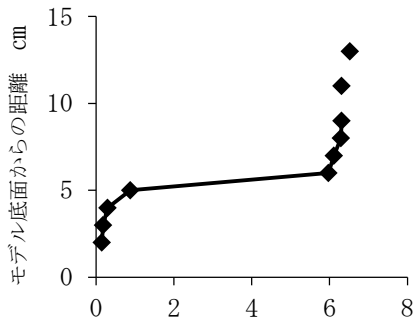
(c) DO 7.6mg/L の白濁層



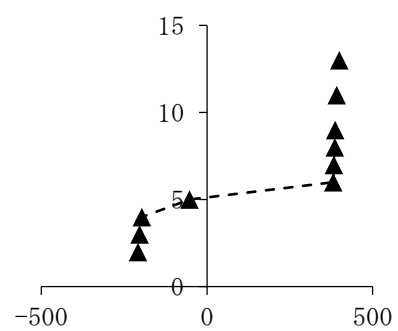
(a1) DO 4.9mg/L 時の DO 分布



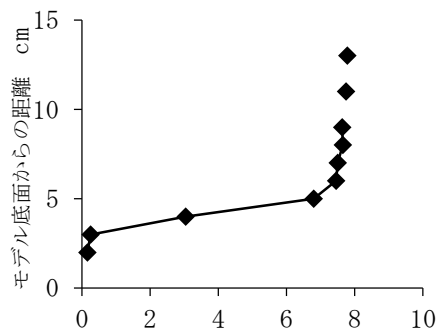
(a2) DO 4.9mg/L 時の ORP 分布



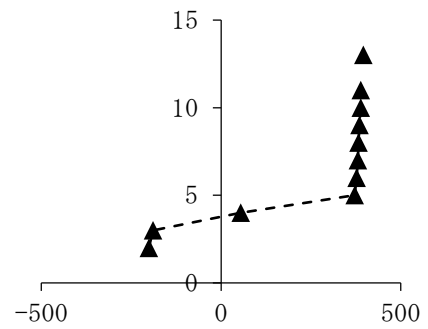
(b1) DO 6.3mg/L 時の DO 分布



(b2) DO 6.3mg/L 時の ORP 分布



(c1) DO 7.6mg/L 時の DO 分布



(c2) DO 7.6mg/L 時の ORP 分布

図 4.8 上層水の溶存酸素濃度と底面上部の溶存酸素と酸化還元電位の垂直分布

5. 総合考察

5. 1 底部境界モデル培養系の形状

当初の底部境界モデル培養系の容器は、アクリル円柱管(高さ 10 cm、内径 5.5 cm、0.24 L 容)の中央の深さに木綿ガーゼを貼ってモデル底面とし、二重底のモデルを試作した。この容器を小型ガラス水槽の底部に置いて、エアレーターの通気により水槽内の海水を好気環境に保ち、開孔のある保護管により海水の流動を抑制して静水環境とした。

このモデル培養系容器の使用開始後 50 日頃にモデル底面の木綿ガーゼは腐食により開孔した。以後、モデル底面は細菌による分解作用を受けないナイロンメッシュを使用した。モデル培養系の水質測定等を容易に行うことが出来るように、底面から 5cm 上にモデル底面を設けたアクリル円柱管(高さ 15.5 cm、内径 9.5 cm、1L 容)の容器を作成して改良し、試験を行った。試験期間の途中から測定センサーの通過の可能なドーナツ型の薄い透明アクリル板をアクリル円柱管の上端に置き、より海水の動きの無い環境を安定して得た。30 L 容ガラス水槽中の海水の酸素飽和量は 40~70%を保つことができたが、この水槽に 1 L 容のアクリル円柱管容器を 2 セット置いた時には十分な溶存酸素量を保てなかった。

モデル底面下部の異なる深さから採水するために、モデル底面上部の長い直接タイプ底部境界モデル培養系を作成した。直接タイプ・モデル培養系は底のあるアクリル円柱管(高さ 40 cm、内径 9.5 cm、2.5L 容)を使用してモデル底面上部は 30cm の長さで、モデル底面はアクリル底面から 10 cm 上に張り二重底とした。初期試験ではモデル底面上部の微動な海水の流れにより酸素が供給され、モデルは傾斜した酸素濃度分布が測定された。このために保護管の孔の位置を変更しモデル底面上部水を静水環境を保った。その培養試験ではモデル底面上に白濁層が形成された。さらに、大きな容量の底部境界モデル培養系の可能性を試みた。円柱ガラス水槽(直系 24 cm、高さ 30 cm、肉厚 1 cm、10L 容)を用いて、10L 容の直接タイプ底部境界モデル培養系を作成した。水槽の底面に高さ 7 cm プラスチック支柱を並べ置き、この上にモデル底面としてナイロンメッシュを張ったプラスチ

ック網目を置いた。10L 容の直接タイプ底部境界モデル培養系でも、2.5L 容モデル培養系と同様に静水環境のモデル底面上に白濁層が形成した。

底部境界モデル培養系のモデル底面下部の構造を検討した。底の無いアクリル円柱管の中央部にナイロンメッシュのモデル底面を張り、この容器を水槽底面に置いたアクリル小角材の上に載せてモデル底面上・下部を開放環境として培養試験した。培養開始後に底面上下の水の濁りは観察されず、また硫化物は両者から検出されなかった。モデル底面のバイオフィーム成育は目視観察からは見られなかった。

直接タイプ底部境界モデル培養系のモデル底面下部の長さは今後の課題である。底面下部の長さが 10 cm の時は、モデル底面下部 2cm と 9cm では硫化物の濃度変化は同じであった。モデル底面下部をさらに長くした時に底面下部の硫化物がどのように分布するかは不明である。

5. 2 セディメントミックスバイオフィームの栄養物

細菌の実験的培養で用いられる栄養物は、病因性細菌類の研究過程において開発されたものが主である。通常、細菌培養は固定培地の表面に細菌株を単離培養し、これを液体培地に移植して大量培養が行われている。細菌の栄養物は完全に化学的性質の明らかな栄養素組成の合成栄養培地と、化学組成の不明確な成分を含む複合栄養培地が使われている。細菌培地の形状は、栄養物を液体に溶かした液体培地と、液体培地に寒天などを入れ固化させた固体培地に分けられる（石田ら, 2006）。多くのバイオフィームの培養の研究はバクテリア培養と同様に液体栄養で試験されており、本研究に類似した顆粒状固体の栄養を底面表面へ置き培養した例は調べた限り存在しない。ミックスバイオフィームを構成する複数種細菌の機能発現を解明し、ミックスバイオフィームの共生系を解明するためには、異なる細菌種相互の栄養利用配分が重要である（Elias and Banin, 2012）。

5. 3 モデル底部境界域の硫化物と溶存酸素

本研究では、モデル底面下部の硫化物蓄積と底面上部の通気量の制御から、モデル底面上部の水塊の溶存酸素量をコントロールできた。これによりモデル底面上部は硫化物の存

在しない酸素のみ存在する状態（有酸素状態、oxic condition）と、酸素と硫化物の混在する状態（不全酸化状態、dysoxic condition）と、酸素の無い硫化物のみの存在する状態（無酸素状態、anoxia condition）の3つの環境を再現した。海水底質の表層では有機物の代わりに水素を電子受容体として利用する硫酸還元菌により、海水由来の硫酸を還元して硫化水素を生成する反応系が著しい（Canfield *et al.*, 2005,）。Jørgensen (1974)は砂浜の硫黄サイクルでは、ほとんどの底面境界の硫化物の硫黄は有機物分解の由来で無く、砂の中に浸漬した海水の硫酸イオンに由来することを明らかにしている。本研究の底部境界モデル培養系による試験からも、これらと同様な結果が類推された。

大阪湾北部の閉鎖海域の底泥の調査では、間隙水の硫化物イオン濃度は本研究と同じ検知管方法で測定された。底泥中の硫化物イオン濃度は、底泥表層 0-5cm では 25 mg-S/L (0.025 mg-S/mL), 底泥表層 10-15cm では 15 mg-S/L (0.015 mg-S/mL)を測定した（浅岡ら, 2016）。本研究のモデル底面下部の硫化物濃度は 0.01~0.045 mg-S/mL の間であり、本研究のモデル底面下部の硫化物濃度は、これらの現場測定と類似していた。

本研究ではモデル底面下部 2~9 cmの海水の硫化物生成（すなわち硫酸還元）速度として、0.83 mg-S/cm³/日を得た。この値は沿岸域底質の硫酸還元速度に近い値であった。

これらのことから本研究の底部境界モデル培養系は沿岸域底質のモデル系として適していると推察した。

5. 4 海水を有する底質の底部境界の硫化物と微生物共生系の連携

海水を有する底質の堆積物にバイオフィームが存在する底部境界域では、硫化物と微生物の挙動により複雑で多彩な微生物のコミュニティがある。本研究では、底質からグループとしてバイオフィーム細菌の分離と再構成を行ったために、モデル底面の直上水中にフラボバクテリアの偏性嫌気性の炭素分解菌 *Lutibacter* sp. と偏性嫌気性の硫酸還元細菌 Clostridiales 目と、細胞内硫黄粒子を有する微好気性の硫黄細菌 *Acrobacter* sp. の3種類の細菌が主に出現した。本研究で明らかになったモデル底面直上の微生物群叢を主に構成する3種類の細菌が、底質の微生物コミュニティ内で、どの様に存在するか、また他の

細菌との関係を解明することは、底部境界域の細菌コミュニティと生態系を理解するため非常に重要と考えられる。

最近の研究では、海洋の貧栄養な水塊では動植物プランクトンや有機物の集合体のマリンスノー、TEPに付着しているバイオフィルム細菌がN、P、Cサイクルに大きく寄与すると類推されている (Dang and Lovell, 2016)。また、干潟等の泥や砂の表面では、バイオフィルムの干潟生物への栄養としての役割のみならず、バイオフィルムがN、P、Cサイクルへ大きく寄与してCO₂代謝に影響することが指摘されている (Poitou-Charentes *et al.* 2014)。本研究では、これまで困難とされていたミツツクスバイオフィルムの底質からの分離再構成が出来、海水底部境界の硫黄サイクルと細菌の屋内の培養試験による研究の可能性を示した。本研究の培養手法と底部境界モデル培養系が様々な細菌の培養へ応用され、複合微生物叢の機能解明等の多くの分野に利用されることを切望する。

引用文献

- Anderson, O. R. (2016) Marine and estuarine natural microbial biofilms: ecological and biogeochemical dimensions. *AIMS Microbiology*, 2(3), 304-331.
- Armitano, J., Méjean, V. & Jourlin - Castelli, C. (2013) Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Environmental Microbiology*, 15(11), 3108-3118.
- Bendshneider, K. & Robinson, R.T. (1952) A new spectrophotometric method for determination of nitrite in sea water. Technical Report No.8, University of Washington.
- Baker, B. J., Lazar, C. S., Teske, A. P. & Dick, G. J. (2015) Genomic resolution of linkages in carbon, nitrogen, and sulfur cycling among widespread estuary sediment bacteria. *Microbiome*, 3(1), 14.
- Bender, J. & Peter, P. (2004) Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technology*, 94, 229-238.
- Berner, R. A. (1964) An idealized model of dissolved sulfate distribution in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 28(9), 1497-1503.
- Boudreau, B. P. & Jørgensen, B. B. /ed (2001) *The Benthic Boundary Layer*. Oxford University Press.
- Bura-Nakić, E., Helz, G. R., Ciglencčki, I. & Čosović, B. (2009) Reduced sulfur species in a stratified seawater lake (Rogoznica Lake, Croatia): seasonal variations and argument for organic carriers of reactive sulfur. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 73(13), 3738-3751.
- Canfield, D. E. & Des Marais, D. J. (1993) Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(16), 3971-3984.

- Canfield, D. E., Thamdrup, B. & Kristensen, E. (2005) Aquatic Geomicrobiology. Elsevier academic press, London, p.480-492.
- Cline, J. D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 14, 454-458.
- Colwell, R. R. & Grimes D. (2000) Nonculturable Microorganisms in the Environment. ASM Press. (遠藤圭子訳 (2004) 培養できない微生物たち. 学会出版センター, 東京)
- Dang, H. & Lovell, C. R. (2016) Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 91-138.
- David, R. & Morse, J. (2005) Acid volatile sulfide (AVS). *Marine Chemistry*, 97, 141-197.
- Dech, A.W. & Decho, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20, 1257-1273.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K. & Mattick, J. (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19(14), 4008.
- Elias, S, & Banin E. (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*, 36(5), 990-1004.
- Fenchel, T., King, G. M. & Blackburn, T. H. (2012) Bacterial biogeochemistry: The Ecophysiology of mineral cycling 3rd edition. Elsevier-Academic Press, London.
- Flemming, H., Neu, T. & Wingender, J. /ed. (2017) The Perfect Slime, Microbial Extracellular Polymeric Substance (EPS). IWA Publishing, London.
- Gemerden, H. (1993) Microbial mats, a joint venture. *Mar. Geol.*, 113, 3-25.

- Ghannoum, M. & O'Toole, G. A. /ed. (2004) *Microbial Biofilms*. ASM Press. 1-29.
- Howes, B. L., Howarth, R. W., Teal, J. M. & Valiela, I. (1981) Oxidation - reduction potentials in a salt marsh: Spatial patterns and interactions with primary production. *Limnology and Oceanography*, 26(2), 350-360.
- Iijima, S., Washio, K., Okahara, R. & Morikawa, M. (2009) Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudoalteromonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments. *Microbial biotechnology*, 2(3), 361-369.
- Jørgensen, B. B. (1974) The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Mar. Biol.*, 24, 189-204.
- Kasten, S. & Jørgensen, B. B. (2000) Sulfate reduction in marine sediments. In: *Marine Geochemistry*, Springer, Berlin Heidelberg, p.263-281.
- Kobayashi, K. (2007) *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *J. Bacteriol.*, 189(13), 4920-4931.
- Koizumi, Y., Kojima, H., & Fukui, M. (2005) Potential sulfur metabolisms and associated bacteria within anoxic surface sediment from saline meromictic Lake Kaiike. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52(3), 297-305.
- Kubo, K., Knittel, K., Amann, R., Fukui, M. & Matsuura, K. (2011) Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan. *Systematic and applied microbiology*, 34(4), 293-302.
- Kühl, M. & Jørgensen, B. B. (1992) Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1164-1174.
- Kuwae, T., Miyoshi, E., Hosokawa, S., Ichimi, K., Hosoya, J., Amano, T., Moriya, T., Kondoh, M., Ydenberg, R. C. & Elner, R. W. (2012) Variable and complex

- food web structures revealed by exploring missing trophic links between birds and biofilm. *Ecology Letters*, 15, 347-356.
- Lewandowski, Z. & Beyenal, H. (2013) *Fundamentals of biofilm research*, second edition. CRC Press, New York.
- Llobet-Brossa, E., Rabus, R., Böttcher, M. E., Könneke, M., Finke, N., Schramm, A., Meyer, R.L., Grotzschel, S., Rossello-Mora, S. & Amann, R. (2002). Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multi-method approach. *Aquatic Microbial Ecology*, 29, 211-226.
- Marshall, K. (1978) The Effects of Surfaces on Microbial Activity. In *Water Pollution Microbiology* 2nd edition, A Wiley-Interscience Publication. p.51-70.
- Matsuyama, M. (1978) Limnological Aspects of Meromictic Lake Suigetsu: Its Environmental Conditions and Biological Metabolism. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Nagasaki University*, 44, 1-66.
- Matsumura T, Masui T. & Hashimoto M. (1984) Kinetic studies on the CO oxidation on a RH(111) surface by means of angle-resolved thermal desorption. *Chem. Phys.*, 81, 5151-5160.
- Meysman, F. J. & Middelburg, J. J. (2005) Acid-volatile sulfide (AVS)—a comment. *Marine Chemistry*, 97(3), 206-212.
- Morikawa, M., Kagihiro, S., Haruki, M., Takano, K., Branda, S., Kolter, R. & Kanaya, S. (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. *Microbiology*, 152, 2801-2807.
- Morikawa, M. (2006) Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*,

- 101(1), 1-8.
- Muraki, H., Higuchi, K., Sasaki, M., Korenaga, T. & Tôei, K. (1992) Fully automated system for the continuous monitoring of ammonium ion in fish farming plant sea water by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 261(1), 345-349.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141.
- Nishijima, M., Lindsay, D., Hata, J., Nakamura, A., Kasai, H., Ise, Y., Fisher, C., Fujiwara, Y., Kawato, M. & Maruyama, T. (2010) Association of thioautotrophic bacteria with deep-sea sponges. *Marine Biotechnology*, 12(3), 253-260.
- O'Toole G.A. & Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 28(3), 449-461.
- Poitou-Charentes R., de la Charente Maritime, C. G., de La Rochelle, C. D. A., Dupuy, C., Van Colen, C., Agogu e, H. & Guizien, K. (2014) Trophic significance of microbial biofilm in tidal flats: the VASIREMI project and international Symposium on Tidal Flats. *Journal of Sea Research*, 92(1), 1-178.
- Rickard, D. (2012) *Sulfidic Sediments and Sedimentary Rocks*. Elsevier Amsterdam.
- Skyring, G. W. (1987) Sulfate reduction in coastal ecosystems. *Geomicrobiology Journal*, 5(3-4), 295-374.
- Thar R. & Kuhl, M (2002) Conspicuous Veils Formed by Vibrioid Bacteria on Sulfidic Marine Sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6310-6320.

- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., Caldwell, S. J. & Caldwell, D.E. (1994) Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 344-446.
- 浅岡聡, 青山克己, 与儀千尋, 太田敏明 (2016) 閉鎖性水域の底泥の環境条件と硫黄の化学形態. In: *Proceeding of 20th Hiroshima international symposium on synchrotron radiation*, 20, 125-126.
- 相崎守弘, 田中秀之, 北村博 (1990) 東京湾における無酸素水塊の形成と青潮. *用水と廃水*, 32(1), 41-45.
- 今井一郎, 山口峰生, 松岡数充 編 (2016) *有害有毒プランクトンの科学*. 恒星社厚生閣, 東京.
- 石井浩介, 中川達功, 福井学 (2000) 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用. *Microbes and Environments*, 15(1), 59-73.
- 石田 昭夫, 永田 進一, 大島 朗伸, 新谷 良雄, 佐々木 秀明 (2006) *細菌の栄養科学*. 共立出版, 東京.
- 入江政安, 西田修三, 寺中恭介, 辻陽平, 平澤充成, 藤原敏晴, 中筋みゆき (2010) 硫化水素の発生・溶出に着目した水底質モデルによる貧酸素水塊の動態解析. *土木学会論文集 B 2 (海岸工学)*, 66(1), 1066-1070.
- 小栗一将, 伊藤雅史, 平野 聡, 久光敏夫, 坂井三郎, 村山雅史, 北里洋, 小泉嘉一, 福井 学, 平朝彦 (2002) 鹿児島県上甕島貝池の水, 堆積物-無酸素海洋環境の理解にむけて. *地質学雑誌*, 108(12), 23-24.
- 上木勝司, 永井史郎 編 (1993) *嫌気微生物学*. 養賢堂, 東京.
- 大畑 聡, 長谷川健一, 梶山 誠 (2014) 2012年の貧酸素水塊の状況および定点における底泥性状の変化. *東京湾の漁業と環境*, 5, 23-25.
- 岡原良太 (2005) 水産種苗育成場より単離したバイオフィーム形成細菌に関する研究. 修士論文, 大阪大学大学院工学研究科.

- 岡田知也, 吉田潤, 古川 恵太 (2011) 現場型硫化物センサーを用いた硫化物の鉛直分布の測定及びその分布の特徴. 土木学会論文集 B3 (海洋開発), 67(2), 334-339.
- 岡部聡 (2012) バイオフィルムの理解・制御から共存へ. 日本海水学会誌 66 (4), 191-197.
- 管原庄吾, 坂本達也, 鮎川和泰, 木元克則, 千賀有希子, 奥村稔, & 清家泰. (2012) 有明海北東部タイラギ漁場における海底堆積物中溶存硫化物の経月変化. 陸水学雑誌, 73(1), 23-30.
- 北原文雄 (1994) 界面・コロイド化学の基礎. 講談社サイエンティフィック. p.124-125.
- 来田秀雄 (1996) スーパーグリーンによる汚濁海域の底質改善に関する研究報告 (グリーンカルチャ受託研究). (株) グリーンカルチャ, 富山県高岡市.
- グリーン・カルチャア (2000) スーパーグリーンの成分 (有孔虫石灰岩粉末の成分). (株) グリーンカルチャ, 富山県高岡市.
- 児玉真史, 徳永貴久, 木元克則 & 柴原芳一 (2009) 夏季の有明海奥部における基礎生産速度と有機懸濁物質の分解特性. 土木学会論文集 B2, 1006-1010.
- 小池勲夫/編 (2000) 海底境界層における窒素循環の解析手法とその実際. (社) 産業環境管理協会, p. 51-103.
- 楠田 哲也. 編著 (2012) 蘇る有明海 - 再生への道程. 恒星社厚生閣, 東京.
- 佐藤孝彦 (1990) 好気性微生物の凝集機構. 水質汚濁研究, 13(5), 268-272.
- 左山幹雄 (2014) 沿岸堆積物における酸素の動態, 詳論 沿岸海洋学. 恒星社厚生閣, 東京, p. 190-207.
- 寒川喜三郎, 日色和夫 (1996) 最新の底質分析と化学動態. 技法堂出版, 東京.
- 鈴木重則, 成生正彦, 榮健次 (2008) 飼育手法の改良によるトラフグ良質種苗の生産試験. 栽培漁業センター技報, 7, 18-22.
- 田中重光, 田代幸寛, 光武奈緒子, 中園唯, 小林元太, 加藤富民雄, 神田康 (2011) 有明海底泥中の細菌群集構造解析. 生物工学会誌, 89(4), 161-169.

- 日本化学編 (1995) コロイド科学. 東京化学同人, 東京.
- 日本海洋学会編 (1994) 海洋環境を考える. 恒星社厚生閣, 東京.
- 日本配合飼料株式会社 (2009) Formula feed for marine larval fish “ambrose” 東京.
- 日本微生物学会 編 (2014) 環境と微生物の事典. 朝倉書店, 東京.
- 日本微生物学会バイオフィルム研究部会 編 (2005) バイオフィルム入門. 日科技連出版社, 東京.
- 牧秀明, 金谷弦, 中村泰男, 東博紀 (2013) 都市沿岸海域の底質劣化の機構とその底生生物影響評価に関する研究 (特別研究). 国立環境研究所特別報告 SR-106.
- 丸茂恵右, 横田瑞郎 (2012) 青潮と硫化水素の生物影響に関する文献調査. 海生研研報, 15, 23-40.
- 松下一信 (2008) “酢酸菌が生成する菌膜ヘテロ多糖” バイオフィルムの基礎と制御. エヌ・ティー・エス, 東京, p. 54-63.
- 松山東平 (1999) バイオフィルムの生物学-Biology of biofilms. Microbes and Environments, 14(3), 163-172.
- 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治 編 (1998) バイオフィルム. サイエンスフォーラム, 東京.
- 濱崎恒二, 木暮一啓 編 (2015) 水圏微生物学の基礎. 恒星社厚生閣, 東京.
- 畑幸彦 (1974) “硫黄サイクルと微生物の関連” 海洋微生物 多賀信夫 編, 東京大学出版会, 東京, p. 187-199.
- 堀尾武, 山下仁平 (1994) 蛋白質・酵素の基礎実験法 (改訂版). 南江堂, 東京, p. 62-63.
- 本藤靖, 照屋和久, 高橋誠 (2004) 貝化石添加によるクエ種苗生産手法の有効性について. 栽培漁業センター技報, 1, 52-54.
- 柳田友道 (1981) 界面における増殖. 微生物科学 2, 学会出版センター, 東京.
- 和地正明 (2010) 微生物の増殖, (I F O微生物概論). 財団法人 発酵研究所監修, 培風館, 東京, p. 95-105.

謝辞

はじめに、佐藤博雄元東京海洋大学准教授にたいして本研究を行うことを許可され、また研究期間に多くの助言と励ましを頂いたことに感謝します。2003年から本研究の終了までの長い期間にバイオフィルムの貴重な文献資料を頂き、また本研究の助言と励ましを承り北海道大学大学院地球環境科学研究院 環境生物科学部門 森川正章教授に大変感謝申し上げます。遊佐なつみさん元東京海洋大学物質循環研究室 4年生には本研究を協力して頂き感謝します。筆者のバイオフィルムとの遭遇と、より深い研究の動機を与えて下さり元社団法人日本栽培漁業協会に感謝します。最後に、東京海洋大学神田穰太教授にたいして本研究の遂行と論文作成への多大な御指導と励ましを賜り大変感謝申し上げます。