

10. 初期付着生物の光学的測定について

辻 義人^{※1}、原 俊明^{※1}

付着生物は海洋で用いられる機器等にとって多くの場合有害である（たとえば各種海洋計測センサーへの付着は感度を低下させる。）

この付着生物の初期段階における付着推移を観測する手法として光学的な計測法を試みた。試料ガラス上の付着生物の吸光スペクトル（波長350～570nm）を測定する方法である。

この光学的手法の実験により、初期付着生物の総生物体量および生物種の組成の推移を把握し得る見通しが得られた。

The Optical Measurement of Marine Early Fouling

Yoshito TSUJ^{※2}, Toshiaki HARA^{※2}

This experiment was planned in order to apply the optical measuring method to the study of fouling over glasses. Added to microscopic observation, this physical technique provides a simple and new method for obtaining quantitative information on fouling.

Slide glasses fixed to the frame were suspended in an aerated sea water bath. The optical density of fouled slide glasses between 350 nm and 750 nm was measured by the opal glass method.

Five samples in the same frame were observed similarly under the microscope and the optical density spectra of them showed the same pattern. Statistical analysis of variance showed no significance within the five samples at the 5% critical region.

The gross fouling biomass was responsible for the integrated value of optical density calculated from 350 nm to 750 nm wave lengths. The integrated optical density showed two steps of growth, suggesting the succession from bacteria and protozoa to algae.

It seemed that the ratio of optical density (wave length ; 439 nm to 750 nm) gave the gross estimation of the ratio of non-pigment micro-organisms (bacteria, several kinds of protozoa, etc) to micro-plants, and the another ratio of optical density (wave length; 439 nm to 677 nm) gave the gross estimation of the plants-species-composition.

It was concluded that optical measurements of fouling over slide glasses are effective for gross estimations in the early fouling of micro-organisms.

※1 海洋保全技術部

※2 Marine Conservation Technology Department

1. はじめに

海中の構造物の機能と材質を劣化させる要因の1つとして生物付着をあげることができる。このために付着防止という立場からの付着生物研究が多い(Woods Hole Oceanographic Institution, 1952)。ところが、大型生物の付着が始まる前に付着に適した環境を作り出す役目を担う初期付着(Wood, 1967)に関する研究は少ない(Benson et al, 1973)。これは、今までの微生物学が主に顕微鏡を使用する形態分類に頼ってきたために、複雑な各種微生物の共存系としての初期付着の研究が困難であったためと思われる。近年このような複合系の生物群集へのアプローチの重要性が唱えられ、研究手法の模索が始められた(微生物生態研究会 1975)。

一方、付着生物の光学的測定(吸光スペクトル測定)は、①迅速に(10分以内に)データを得ることができる、②光を照射すること以外、試料に対して特別な影響を与えないので、同一の試料について付着状況を連続して追跡できる、③得られたデータが物質組成と物質の濃度を推定できる総合的な情報を含んでいるので、付着生物のような複合系の総合的な解析にとって都合がよい、などの利点を持つ。しかしながら、付着生物への光学的なアプローチに関しては、熱によって生物付着を防止しようとした実験で付着生物体量を光学的に測定した(Plotner, 1968)程度であり、報告は少ない。

本研究では初期付着生物群集の生態学的特性と関連すると考えられる光学的な指標を仮定し、これらの指標の特性を検討した。

なお本研究は昭和47年度の経常研究として1973年2月～3月に行われた。

2. 光学的測定のための仮定

付着生物群集は各種の個体の集合体であるが、適当な操作(たとえばオパールグラス法など)を行えば液体に準じた吸光スペクトルを、付着生物より得ることができる。従って本研究では次のような仮定を行った。

仮定1; 液体に関して定義された Lambert—Beer の法則が付着生物群集に関しても適用できる。

Lambert—Beer の法則は、他の条件が一定ならば物質の濃度とその吸光度が正比例することを示している。また各物質は固有の吸光スペクトルを保有する。そして同じ波長の吸光度は加算することができるので、吸光スペクトルは同じ波長範囲で相互に加

え合わせることができる。微生物に限ってみれば、各生物種はライフサイクルの特別な時期を除いてほぼ一定の物質組成を示すと考えられるので、各生物種はほぼ一定の吸光スペクトルを示すと考えられる(仮定2参照)。従って生物群集の吸光スペクトルは、それを構成するそれぞれの生物種の吸光スペクトルを合計した総吸光スペクトルと一致する。

初期付着生物群集のような複合生物種系における、生物種組成の変化と総吸光スペクトルの変化の関係をここで検討しておく。この関係は以下の3つのケースに分けられる。

A; スペクトルの変化と種組成の変化が1:1に対応する。

B; スペクトルは変化するが種組成は変化しない。

C; 種組成は変化するがスペクトルは変化しない。
ここで、次のような仮定を行った。

仮定2; これらの3つのケースのうち、初期付着生物群集では主にAのケースが起こる。

同一生物種の体構成物質組成が変化したために起こるBのケースは、単一培養系で一般的に見られる。藻類を主とする複合系においても、生理的な原因によって体内の色素組成が多少変化することが報告されている(Vince et al, 1973)。しかしながら、各種の栄養段階を備えた複合系では環境の変化により他種類の生物が増殖を始める(succession) ことの方が、今まで優占種であった生物種の体内の物質組成がこの環境の変化により変化することよりも、より機会が多いと考えられるであろう。また、これらの変化が同時に起こっているとしても、複合系内の全物質組成に与える影響は前者の方が後者にくらべて量的にかなり大きいと考えられる。よって、付着生物群集では、Bのケースは無視できるであろう。

Cのケースは、ある生物種のスペクトルがその他の生物種のスペクトルを合成して得られる場合にのみ起こり得る。付着生物種が多くなればそれだけこのケースの可能性は増えるが、水槽中では主な生物種の数に限られているので、本研究の場合Cのケースはほとんど起こり得ないと考えられた。

仮定1、仮定2を踏まえて、ここで光学的な指標について仮定を行う。

仮定3; 350 nm から 750 nm までの各波長の吸光度の積分値は、付着生物群集の総量と関係する光学的な指標と考えることができる。

これを Integrated Optical Density(I. O. D.) とする。また、吸光スペクトルの変化は各波長での吸光度の比を比較することで知ることができる。

仮定4;波長別吸光度の比は、付着生物群集の生物種組成と関係する光学的指標と考えることができる。

吸光スペクトルの変化と生物種組成の変化を関連づけるためには、できる限り多数の波長で吸光度の比を計算し、それらを組み込んだ計算式の作成と演算を行わなければならない。しかし本研究では指標の妥当性を検討することを目的としたので、複雑化を避けるため、簡便な指標として2種類の波長による吸光度の比を使用した。

3. 実験方法

3.1. 付着試験用水槽

ガラス水槽（縦、横、深さがそれぞれ30、69、35 cm）中に横須賀湾の表層水（塩分濃度;31‰）を50 l 入れ、エアレーションを行い、3週間後にガラスの壁面が緑褐色の付着物におおわれてから実験を開始した。特に温度のコントロールを行わなかったので水温は9℃～15℃の範囲を示した。エアレーションによる水分の蒸発については塩分濃度31‰の海水で時々補充を行ったので、実験中の塩分濃度は32‰～36‰を示した。なお水槽のよこ側面は東方向に位置したので、午前中の数時間だけ窓ガラスを通して日光を受けた。

3.2. 付着用スライドガラス

スライドガラス（マツナミ製）の一端を切断し、付着用の試料スライドガラス（縦、横、厚さがそれぞれ25、50、1.5 mm）とした。試料スライドガラスを海水中に垂下するために、プラスチックのはさみの上端に針金を通したものを作製し、このはさみに一枚ずつスライドガラスをはさんだ（図1）。各スライドガラスはエアレーション端より十分離れた水槽の中層部に吊し、付着面を東側とした。前処理として、あらかじめクロム硫酸中に一昼夜浸し、蒸留水で洗浄したスライドガラスを使用した。

吸光スペクトル測定と検鏡時には、できるだけ空中でのばく露時間を少なくするために、試料スライドガラスをろ過海水入りのペトリ皿に入れて運んだ。このとき、付着面がペトリ皿と接触しないようにした。測定と観察のために試料ガラスを水槽より取り出していた時間は、1回につき30分以内であった。

3.3. 吸光スペクトルの測定

ダブルビームの吸光光度計（島津製作所製、UV-200）を使用しオパールガラス法（田宮など、1965）によって350 nm から750 nm までの波長間の吸光スペクトルを測定した（図2）。試料ガラスの下端にロ

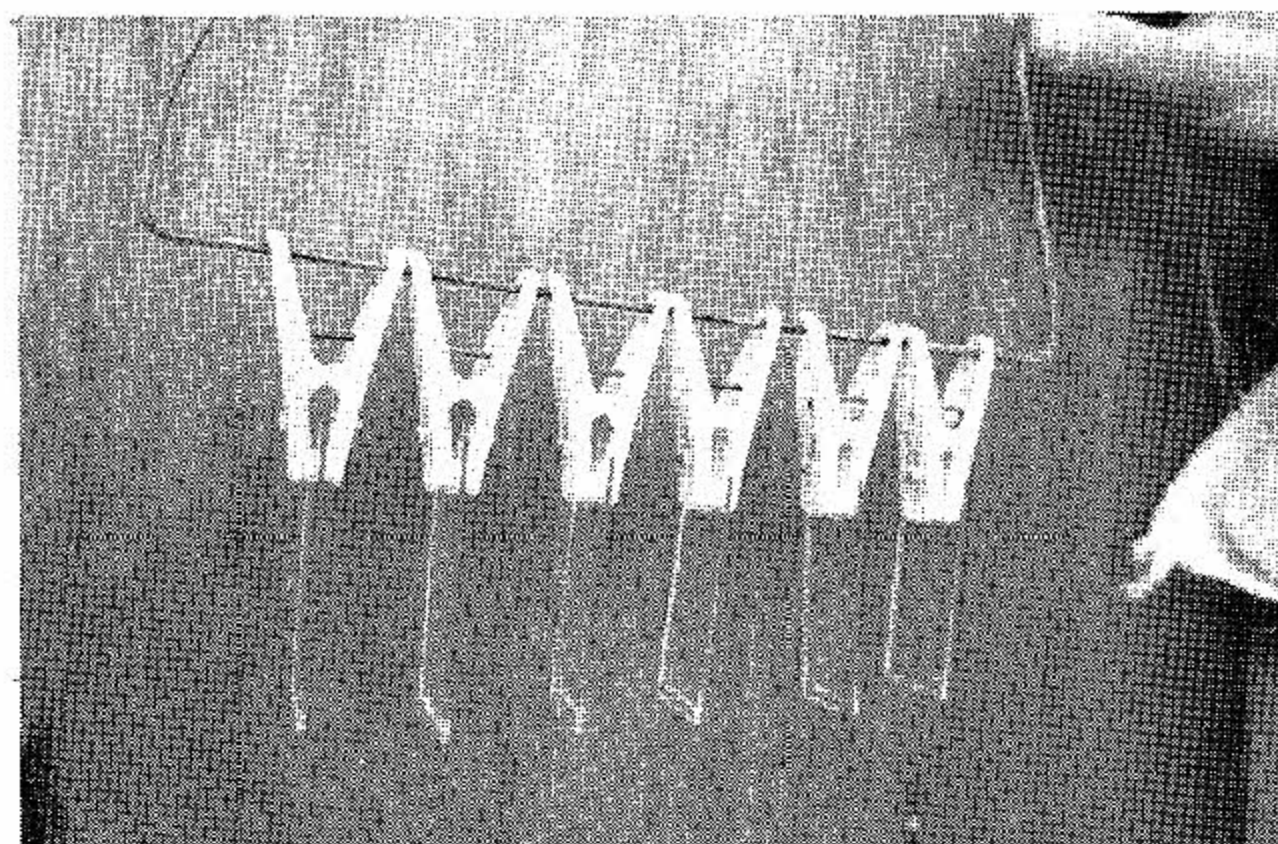


図1 試料用スライドガラス
Sample slide glasses

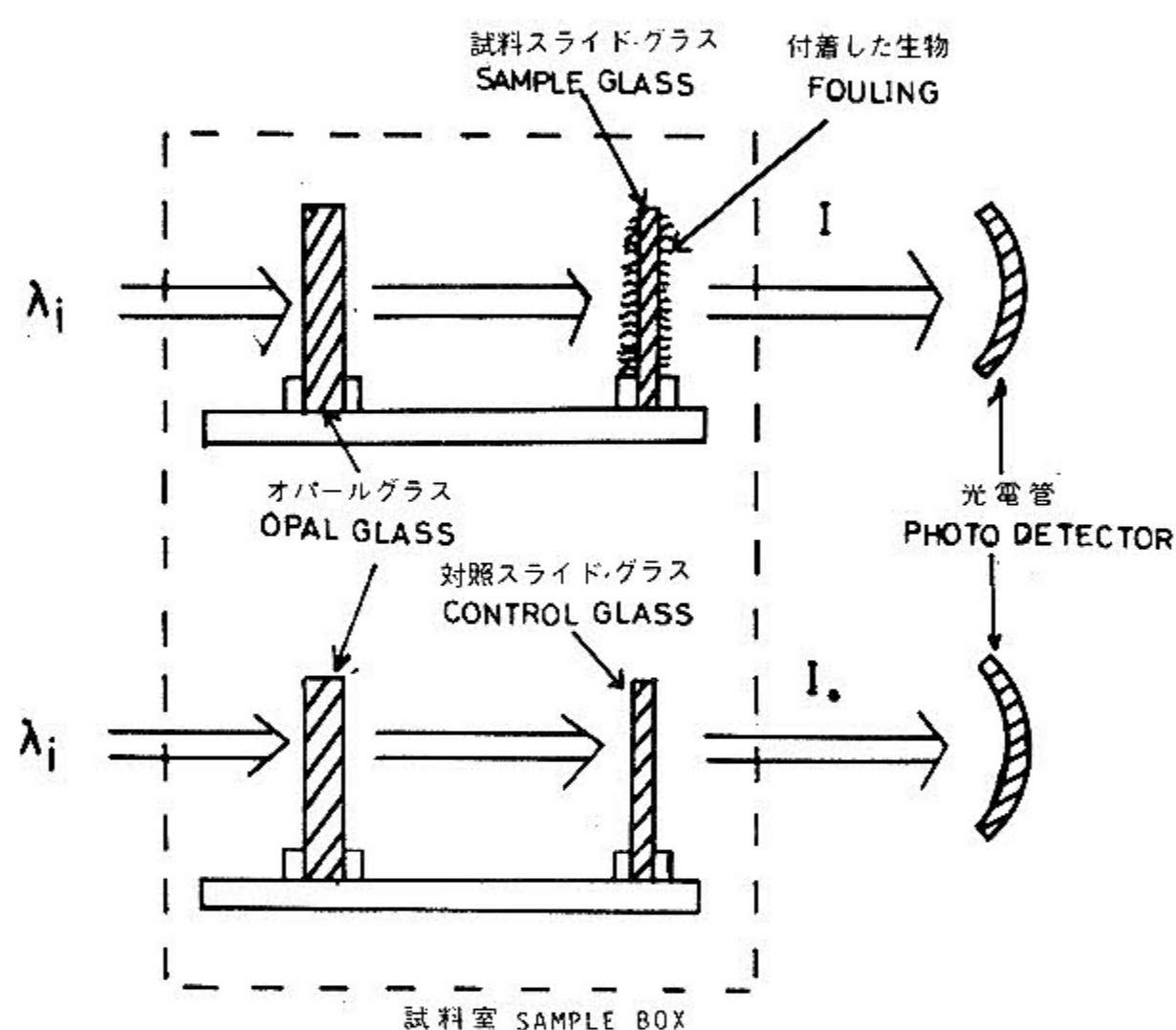


図2 付着試料ガラスの吸光度の測定方法
Measuring method of optical density of fouled sample glass.

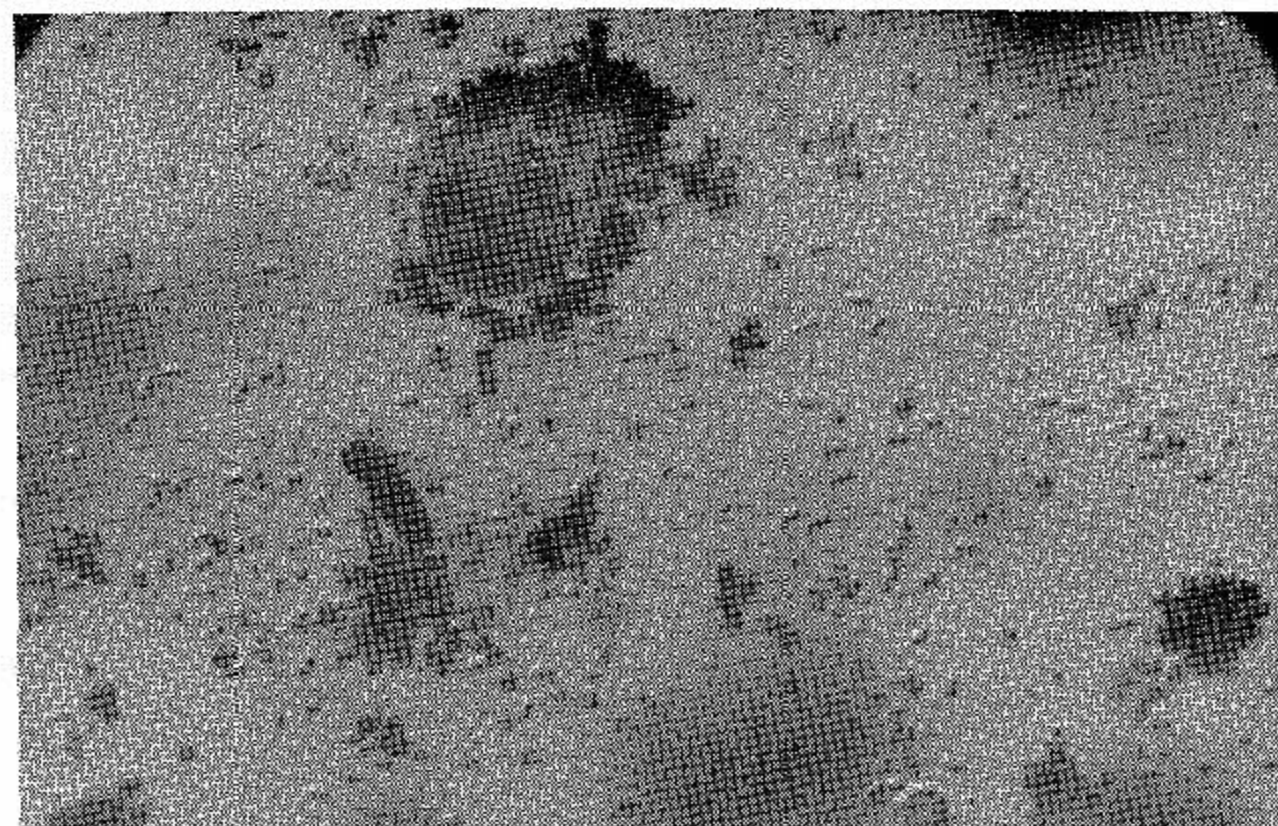


図3 有鐘纖毛虫のまわりの珪藻
Attached Diatoms around Tintinnida.

紙を触れさせて余分な海水を取り除いた後手早く測定を行ったので 測定終了後に付着面が乾燥するようなことはなかった。対照としては試料スライドガラスと同様の処理を行ったスライドガラスを乾燥させて使用した。

3.4. 試料間の差異の検討

同一水槽内に置かれた試料ガラスの位置の違いによって付着量が異なるならば、試料ガラスの位置が実験要因となりデータの解析が複雑となるであろう。これを検討するために5枚の試料ガラスを水槽の東端（窓側）から数cmの間隔で並べ、吸光スペクトルの経日変化を測定し、得られたI.O.D.より分散分析を行った。

3.5. 測定頻度の影響の検討

測定のために付着生物を空中にばく露したり、350 nm から750 nm までの波長の光線で照射することによる付着の発達に与える影響を調べるために、4枚の試料ガラスを水槽中に吊した。このうち2枚を1組として、数日間隔で測定を行う組と20日間連続して水中に保持しておいた後数日間隔で測定を行う組に分けた。このとき、後者の測定頻度を、前者とくらべてできるだけ小さくした。

3.6. 検 鏡

実体顕微鏡（ニコン製）を使用し、16～80倍の倍率で検鏡と写真撮影を行った。このとき試料の表面が乾燥して付着生物に影響を与えないため、および海水中での付着生物の動きを観察するために、運送時に使用したペトリ皿中の口過海水に試料スライドガラスを浸し検鏡を行った。

4. 結果および考察

4.1. 検 鏡 結 果

実験開始後1昼夜以内にデトリタスの吸着とバクテリアらしいものの増殖が認められた。このころから非付着性の原生動物類（主に繊毛虫類）が試料ガラス表面を活発に動き、2日目には付着性の有鐘繊毛虫がふえてきた。3日目より有鐘繊毛虫のまわりを中心として、付着珪藻が増えてきた（図3）。このために試料ガラスは黄褐色を呈した。7日目より緑藻の付着が増え始め、14日目には有鐘繊毛虫の一部は緑藻のマットの中に埋もれた（図4）。このグリーンマットは凹凸に富んだ3次元の構造をしており、その中を非付着性の原生動物が動き回っていた。なお本実験での初期付着パターンは他の報告（Wood, E. J. F., 1967）と似た傾向を示した。

4.2. 吸光スペクトル

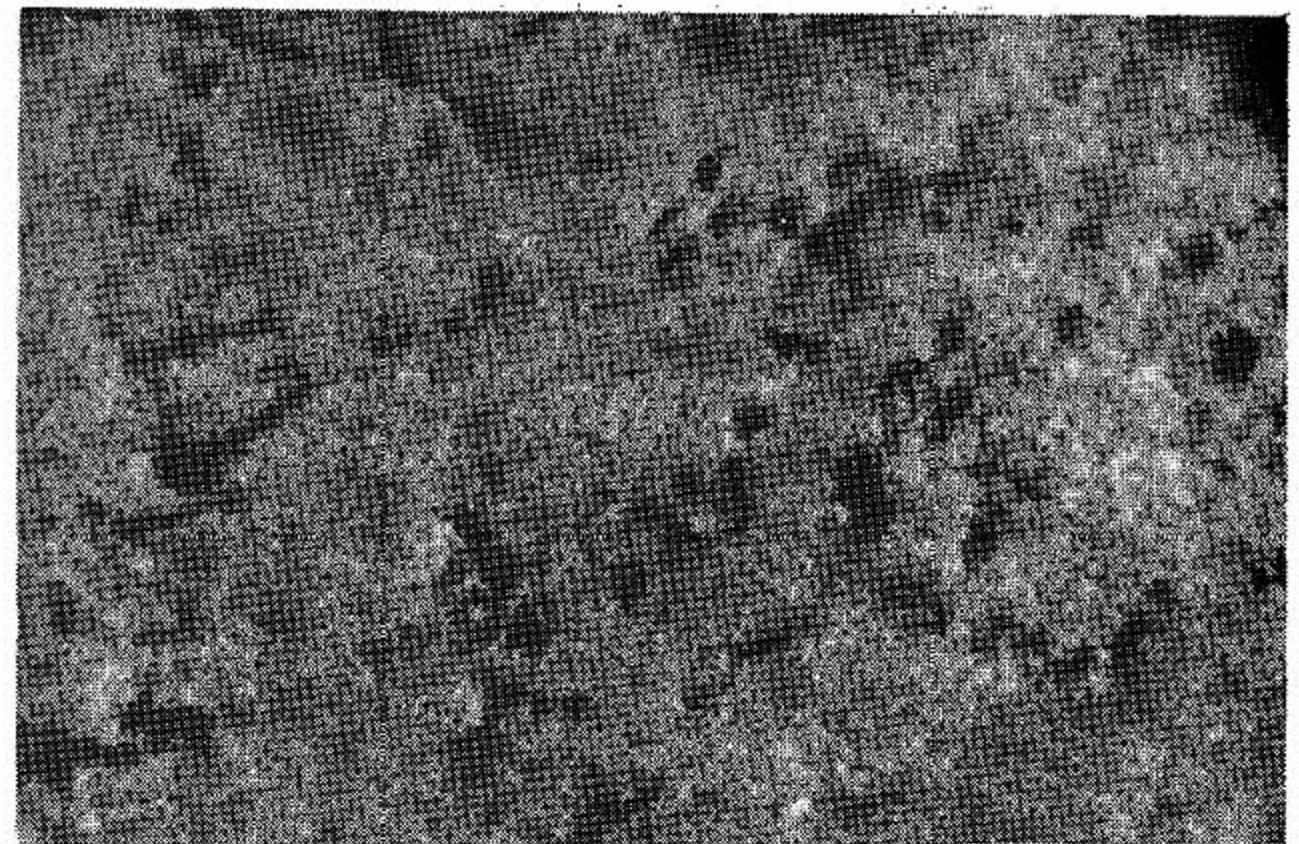


図4 グリーンマット

Green mat.

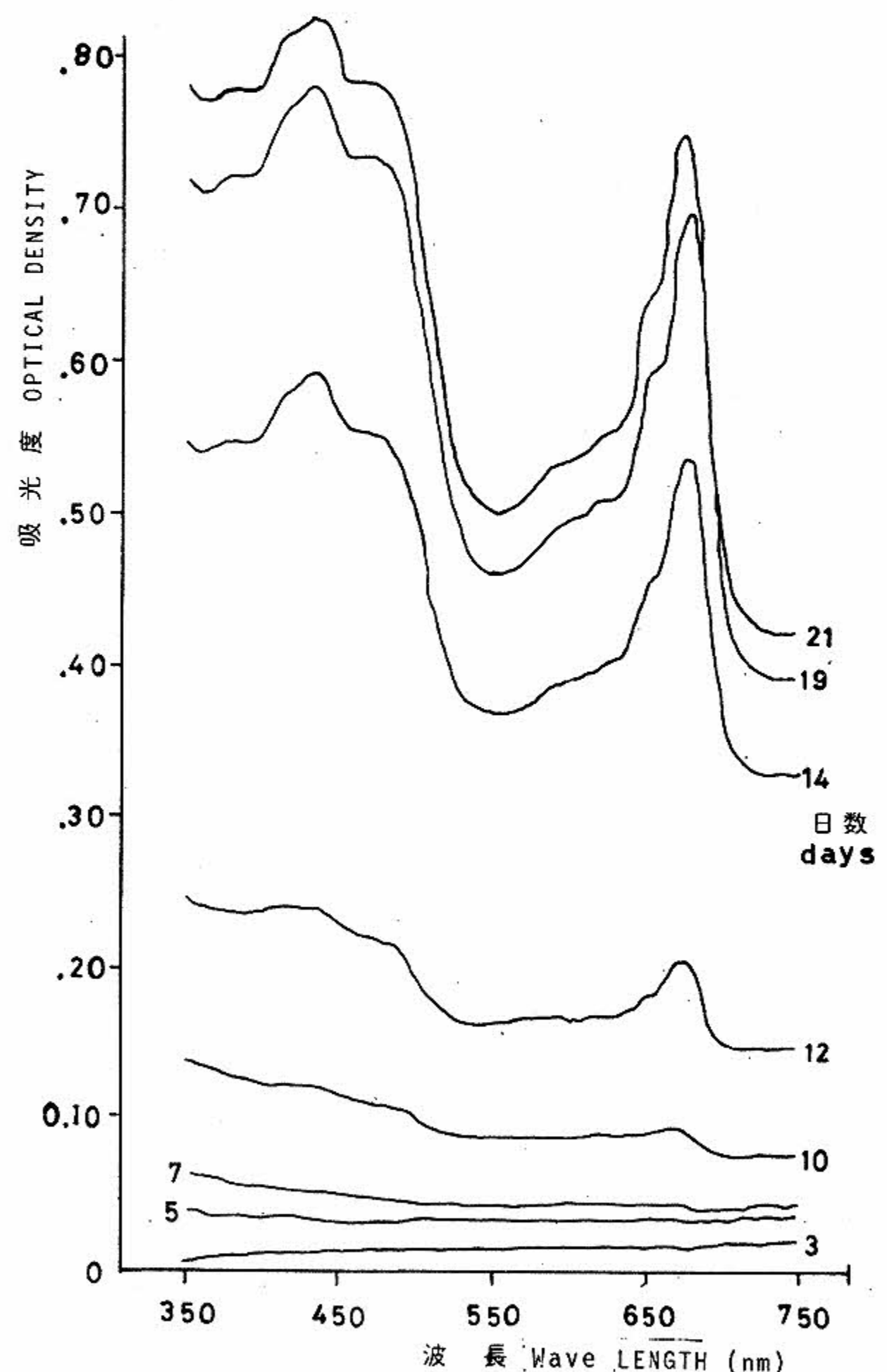


図5 付着試料ガラスの吸光スペクトル変化

The changes of optical density spectra of fouled sample glass within 21 days.

表1 2元分類表

Table of two way layout. The figures mean the values of I. O. D. of fouled sample glasses.

試料 日数 SAMPLE DAYS	A	B	C	D	E
5	8	8	9	8	6
14	85	97	116	103	103
19	138	142	152	120	131
21	156	149	159	130	154
24	220	184	207	178	211

表2 分散分析表

Table of analysis of variance.

S. V.	D. F.	S. S.	M. S.
試料 SAMPLE	4	1181.8	295.4
日数 DAYS	4	102,519	25,629.8
誤差 ERROR	16	1,746.2	109.1
TOTAL	24	105,447	

吸光スペクトルの経日変化を図5に示した。初期(約1週間以内)のうち350nmから750nmまでの全波長にわたって、吸光度はほぼ同じ比率で増加した。これは、この波長域で特別に大きい吸収を示さない物質(非色素系)の付着量が増加したことを示していた。検鏡結果から推測すると、これはバクテリアや原生動物の付着が進行したことを示していた。その後、短波長側と677nm付近の吸光度の増大が目立ち始めた。約2週間以後は439nmと677nmをピークとする複雑なスペクトルとなりある程度波形を保ちながら吸光度を増した。この2つのピークは藻類の増殖によるクロロフィルaを主とする光合成色素の増加に対応するものと考えられた。

4.3. 吸光度の積分値(I. O. D.)

5個の試料によるI. O. D.の経日変化を図6に示した。I. O. D.の値は図5の各日における350nmから750nmまでの吸光スペクトルの面積として計算した。図中の黒丸は5個の試料の平均値を示した。

I. O. D.は4日目までと6日目から14日目までの2回の指数函数的増大を示した。その速度は前者の方が圧倒的に大きかった。4日目から6日目に停滞期が見られた。14日目以後についても徐々に増加速度が減少し停滞期に向っているようであった。

このグラフは閉鎖系における成長曲線に似ていた。I. O. D.の仮定からすれば、図6の2つの停滞期と2種類の増加速度は以下のように考えられるであろう。①4日目まで急速な増殖を行う生物の付着が続き、その後増殖が停止した。②6日目より他の生物がゆっくりと増殖を行い、14日目より増加速度を減少させた。これを検鏡結果から推論すれば、①はバクテリアと原生動物の急激な増加を、②は藻類のゆっくりとした増加を示しており、図6の中間の停滞期や増加速度のちがいはこれらの付着生物の遷移を現しているものと考えられた。

これらのことから、I. O. D.は付着生物総量の粗指標として妥当であろうと考えられた(仮定3)。

4.4. 試料間の差異

経過日数と各試料のI. O. D.の2元分類表を表1に、分散分析表を表2に示した。表2よりF検定を行った。データによるF値は

$$F = 295.4 / 109.1 = 2.71$$

検定のためのF値(5%有意水準)は

$$F_{16}^4(0.05) = 3.01$$

であった。

$$F_{16}^4(0.05) > F$$

となるので、位置の異なる5枚の試料ガラス上の付着は量的に差異を示さない(5%の有意水準)と結論できる。これによって、本実験では試料ガラスの

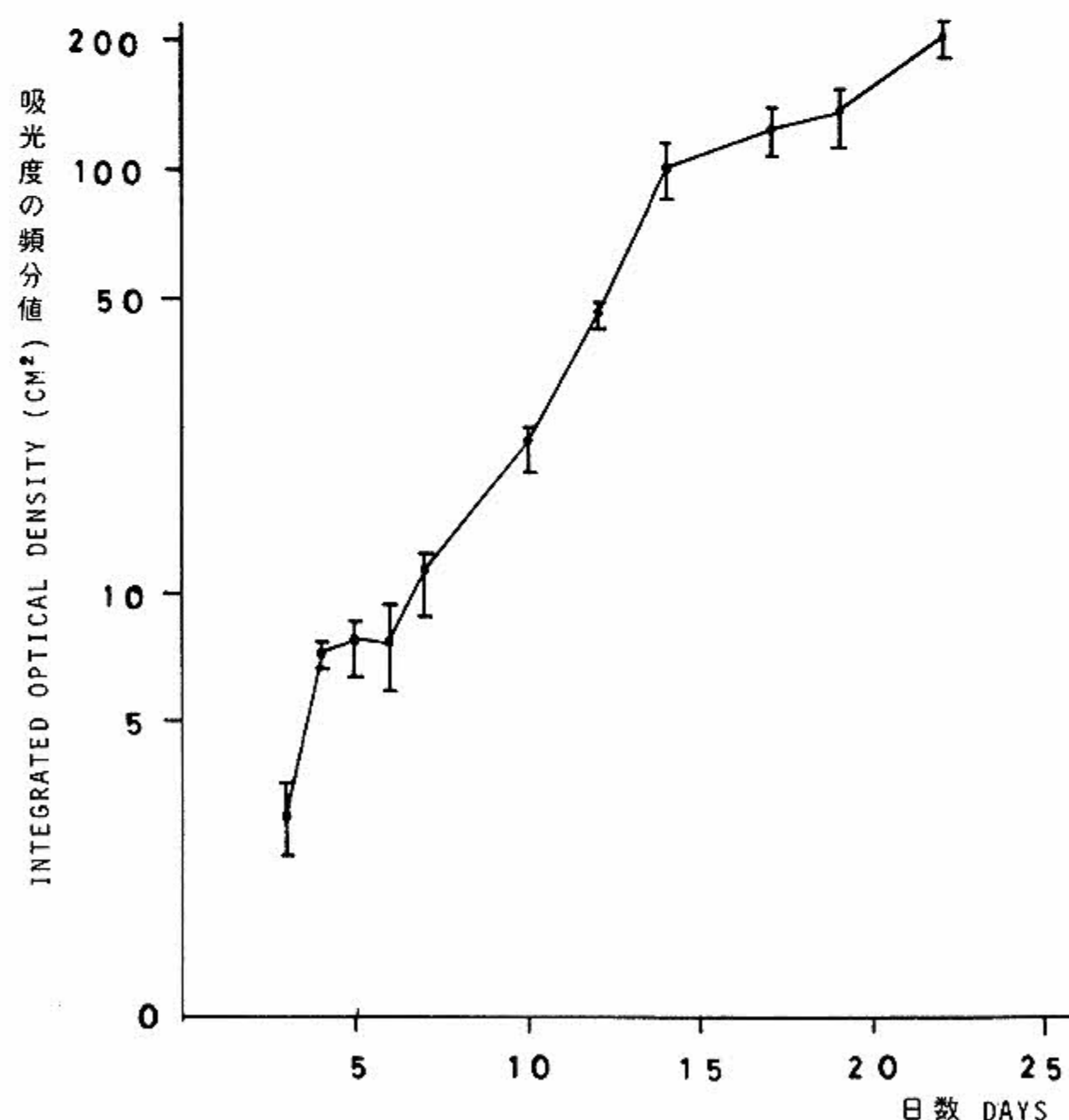


図6 22日間における付着試料ガラスのI. O. D.の変化

The change of integrated optical density of fouled sample glasses within 22 days. The value of integrated optical density corresponds to the area of each day's spectrum between 350nm and 750nm as in Figure 5.

置き場所を実験要因に入れる必要はないと考えた。

4.5. 測定頻度の影響

測定頻度の大きい(数日間隔)試料と20日間連続して水槽中に没していた試料のI.O.D.を、図7に示した。20日間常時海水中に没し続けていた試料は、その間10回の測定が行われた試料に比べて、ほぼ2倍だけI.O.D.が高かった。28日目から38日目の間では、逆に、測定頻度の大きい方が高い成長率を示した。これらの測定頻度の影響を減少させるためには、空中暴露の影響を取り除かなければならないであろう。そのためには水没型の吸光度計を導入することにより、海水中の試料を直接測定できるシステムが必要であろう。

4.6. 波長別吸光度の比

439 nm と 750 nm の波長での吸光度の比 (D_{439}/D_{750}) と 439 nm と 677 nm の波長での吸光度の比 (D_{439}/D_{677}) の経日変化を図8に示した。439 nm と 677 nm の波長を選んだ理由はこれらが吸光スペクトルの2つのピークを示したからである。750 nm の波長については以下の理由で選定した。①クロレラの熱アルコール抽出液の吸光スペクトルでは700 nm 以上の吸収を示さないが、生きたクロレラの懸濁液の場合は本研究と同様に700 nm 以上の吸収を示すこと(田宮ら、1965)。②バクテリアと原生動物を主とする付着初期の吸光スペクトルは、350 nm から 750 nm までの全波長でほぼ同一の吸光度を示しながら(波長軸に平行に)吸光度を増加させたこと。③したがって、750 nm の吸光度が色素 を含まない 物質の濃度と関係している、と考えられたからである。

D_{439}/D_{750} は 0.4~2.0 まで変化した。つまり、7日目まで急激な増加を示し、その後14日目まで徐々に増加した後、ほぼ一定値を保った。 D_{439}/D_{677} は 0.67~1.4 まで変化した。急激に増加して6日目で最高値となり、その後16日目までは1.1まで徐々に減少し、16日目以後はほぼ一定値を保った。

D_{439}/D_{750} の変化は、これらの波長での吸収の特性と仮定4からすれば以下のように考えられるであろう。色素系物質が非色素系物質の上に加わったので、この比を増加させた。つまり、色素系物質は7日目まで急激に増加し、その後引続いて14日目までゆっくりと増加した後一定値を保った。

D_{439}/D_{677} の変化は、これらの波長での光学的特性と仮定4からすれば、少なくとも2種類の藻類の遷移を示すと考えられた。これらの藻類のうち D_{439}/D_{677} の値の高い方をA種、低い方をB種とすれば次のように推論できる。既存の付着物の上に、4日

目ごろよりA種が急激な増殖を行い、7日目ではほぼ飽和した。その後B種が徐々に増加して、16日目以降は大部分がB種で占められた。

これらの推測は検鏡結果と一致した。まずバクテリアと原生動物(既存の付着物、非色素系物質)の付着が起こり、その後珪藻(A種)が増殖し、最終的に緑藻(B種)が増えてグリーンマットを形成し、これがすべてをおおい尽くした。この一致は、波長別吸光度の比の変化が生物種組成の変化の粗指標として妥当なことを示している(仮定4)。

植物プランクトンの種組成の変化は色素指標と関係がある(マーガレフ、1972)とされている。本実

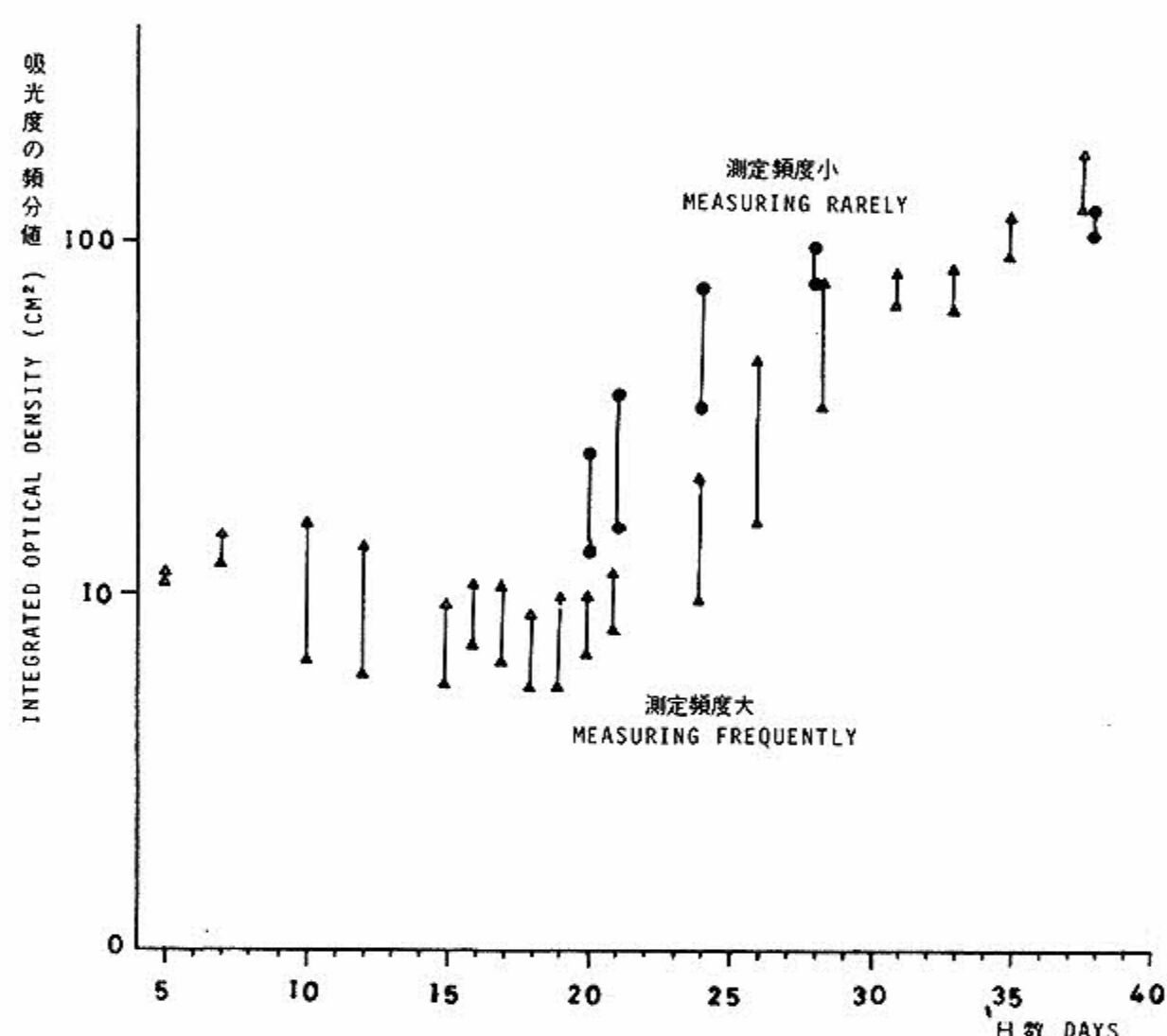


図7 測定頻度が成長に与える影響

The effect of measuring frequencies on the growth rate of fouling on the sample glasses.

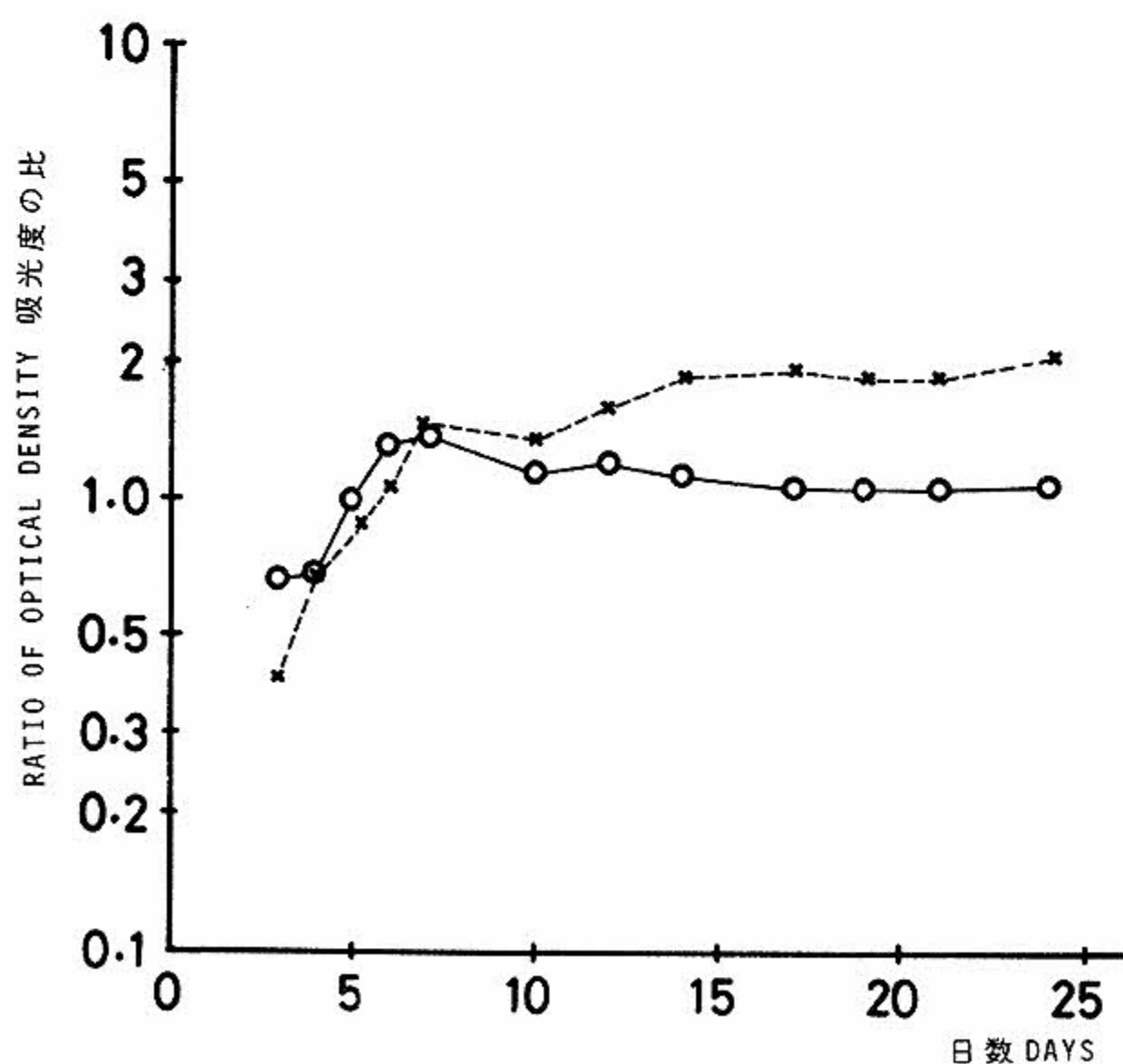


図8 吸光度の比の変化

The change of ratio of optical density. Solid line denotes r.o.d. of 439nm to 677nm, dashed line denotes r.o.d. of 439nm to 750nm.

験での D_{439}/D_{677} はこの色素指標 (D_{430}/D_{665}) に比べてかなり低い値を示している。色素指標がアセトンによる色素の抽出液の吸光度から計算されているのに対して、本実験ではバクテリアや原生動物をも含めた複合系の生きた組織の測定値を使用している。両者を直接に比較することはできないであろう。しかし、緑藻が付着表面をおおい尽したために色素指標の値が低下したことは、多様性と色素指標が正の相関を持つという報告 (マーガレフ、1972) と一致した。

5. 結 論

初期付着生物を光学的に調査することは、初期付着生物総量や種組成の変化を推定する迅速な測定手法として有効であろう。しかし、定期的に空中に暴露し光学的な測定を行うことにより、付着生物の発達は影響を受けるようであった。

I. O. D. は付着生物総量の粗指標として妥当であろう。 D_{439}/D_{750} は全植物と全動物の割合の粗指標として妥当であり、 D_{439}/D_{677} は植物種の組成の変化を示す粗指標として妥当であろうと考えられた。 D_{439}/D_{677} はマーガレフの色素指標に比べてかなり小さかったが、多様性の変化に対しては色素指標と同様な傾向を示した。

参 照 文 献

- 1) Benson, P. H., Brining, D. L., et al
"Marine Fouling and Its Prevention."
Mar. Technol. 10 (1), P. 30-37 (1973).
- 2) 微生物生態研究会編。“微生物の生態(1); 方法論をめぐって。” 東京大学出版会、1975. 204 P.
- 3) マーガレフ, R. “将来の生態学説”。森主一、今福宏司、他訳。築地書館、1972. 141 P.
- 4) Plotner, R. "Sensor Fouling on Deep Submergence Vehicles." Marine Sciences Instrumentation. 4, P. 267-295 (1968).
- 5) 田宮博、渡辺篤。“藻類実験法。” 南江堂、1965、P. 229-230.
- 6) Vince, S., Valiela, I. "The Effects of Ammonium and Phosphate Enrichments on Chlorophyll- a, Pigment Ratio and Species Composition of Phytoplankton of Vineyard Sound." Mar. Biol. 19(1), P. 69-73 (1973).
- 7) Wood, E. J. F. "Microbiology of Oceans and Estuaries." Elsevier, 1967, P. 206-225. (Elsevier Oceanography Series Vol. 3)
- 8) Woods Hole Oceanographic Institution. "Marine Fouling and Its Prevention." United States Naval Institute, 1952. 300P.