

腸炎ビブリオの海底層別分布の検討

浅 川 末 三

(広島大学水産学部水産学科)

A Study on the Vertical Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Sea Bottom

SUEZO ASAKAWA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University

(Figs. 1-2; Tables 1-10)

さきに著者は、瀬戸内海における腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* (FUJINO *et al.*, 1951) SAKAZAKI *et al.*, 1963の地域的分布状態を調査し報告¹⁾²⁾をした。その調査結果にもとづいて本菌の検出頻度を底質別に取り纏めると、生物1型菌は砂質に高く、生物2型菌は砂・泥質に無関係に広く検出された。このことは、著者が報文¹⁾中に指摘したように、調査に使用した採泥器(文献1のFig. 1に写真で示してある)が泥質では海底面下ある深さまで突入するのに対し、砂質では突入が浅くほとんど底表層部のみを採泥した相違が現われているのではないかという疑点があった。この点を明らかにするため、砂質と泥質との人工海底に本菌を接種して菌の底質中の分布状態を調べた。一方、天然海底の数地点につき垂直採泥器を使用して本菌の層別分布を調べた。

その結果、生物1型菌は砂質では主として表層部に生存しており、泥質では深層部にまで分布することがある。生物2型菌は砂・泥質ともに深層部にまで生存分布することが判つた。従って、上記の底質別の検出頻度は生物1型菌については採泥方法によるカタヨリが含まれていることが明らかになった。ここにこれらの検討結果を報告する。

本検討を行なうに当り、今城和彦・吉村徹夫の両君には実験実施上多大の労を煩らわしたことを感謝する。又垂直採泥器を貸与して下さった水産庁内海区水産研究所杉本仁弥技官の御厚意に心から御礼申し上げる。

実 験 方 法

1 人工海底

瀬戸内海の福山沖から海砂と海泥を採取して礫・貝殻・海藻などを取り去り、これを内径22cm、深さ20cmの蓋付き塩化ビニール製ポット2個に夫々15cmの深さに入れて海水を満した。内径14mm、長さ15cmのビニール管10本ずつを各底質中に垂直に挿入し、管内には底質を完全につめた。この人工海底ポットを65°Cの恒温器内に約20時間放置して中心温度を62°Cに達せしめた。この殺菌処理でポット内に本菌が生存していないことを、上記ビニール管の1本を引き抜き培養試験で確認した。殺菌放置中に海水が蒸発濃縮してCl 18.4%となったので滅菌蒸留水を追加しCl 17%に修正した。更に海水1lに対しポリペプトン1g、マンニット1g、リン酸カリウム0.05gの割合の栄養源を添加した。

この殺菌済み人工海底ポットに、当教室保存海洋由来の生物1型菌と2型菌とを3%食塩加ペプトン

水 (pH7.2) で別々に 30°C 20 時間増菌した菌を混合接種した。接種菌数は計測しなかったが、ペプトン水が増菌のために十分に溷濁していたので菌量不足とは思われない。

菌を接種した人工海底ポットは、中央にバブル用のガラス管を装置し、蓋をして研究室内に設置した。挿入したビニール管を経日的に 1 本ずつ抜き出し、上下に滅菌ゴム栓を施し、外側を昇汞水で洗い、カミソリ刃で無菌的に 5 cm, 10 cm の箇所を切断し、底質表面から 0~1 cm, 4~5 cm, 9~10 cm, 14~15 cm の底質各層を分取した。

Fig. 1 は挿入されたビニール管が未だ 2 本残っている時の人工海底ポットの設置状態を示す写真である。なお、人工海底に使用した海砂及び海泥の組成を日本農学会法³⁾で測定した結果を Table 1 に示した。



Fig. 1. Photograph of the 'artificial sea bottom' fabricated in plastic pots

Table 1. Grain size composition of the sediment applied to the artificial sea bottoms as determined by mechanical analysis (%)

Grain fraction Bottom type	Gravel (>2mm)	Coarse sand (0.25-2mm)	Fine sand (0.05-0.25mm)	Silt (0.01-0.05mm)	Clay (0.01mm >)
Sandy bottom	5.5	91.0	1.2	0.3	2.0
Muddy bottom	0.6	2.9	12.1	24.4	60.0

2 天然海底

前報¹⁾²⁾で用いた採泥器の代わりに、底質を垂直的に採泥できる採泥器* (垂直採泥器と仮称しその寸法を Fig. 2 に示す) を使用し、瀬戸内海水島灘の西部海域の 5 地点につき 2 本ずつのビニール管 (あらかじめアルコール滅菌した) に底質を採泥し、直ちに上下に滅菌ゴム栓を施して研究室に持ち帰った。帰途中の運搬による管内の底質の攪乱は少しも見られなかった。

* 本採泥器は水産庁内海区水産研究所考案作製の "Gore Sampler" 試作 1 号を借用したものである。

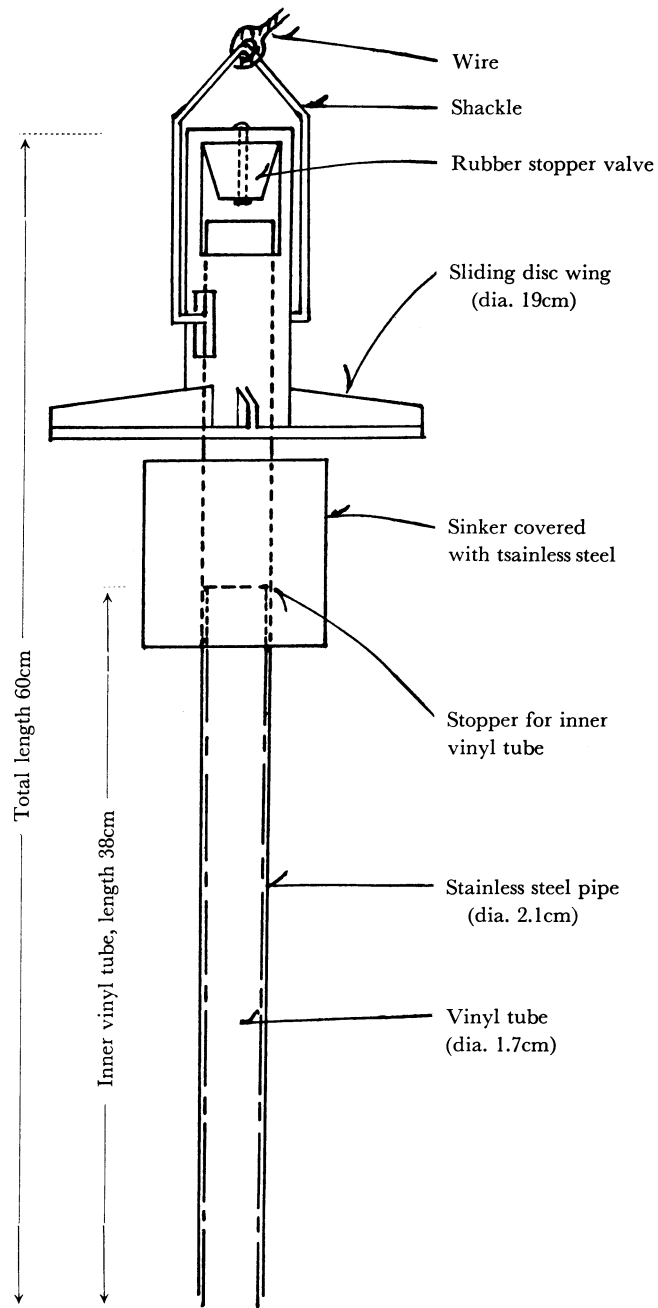


Fig. 2. The core sampler

研究室へ帰着後直ちに、人工海底のビニール管と同様操作によって底質上の海水及び底表面から 0~1cm, 4~5cm, 9~10cm, 14~15cm, 19~20cmの各層を分取した。

採泥地点は、1963年に著者¹⁾が、1962年に岡山県衛生研究所¹⁾が本菌を検出した海域であるので、恐

らく今回も本菌が検出されるであろうと予想をして設定をした。なお St. 1~3 は1965年9月16日に採泥したが、底質は全くの泥質であった。St. 4 と 5 は1965年9月27日に採泥したが、St. 4 は約 5cm まで、St. 5 は約 2cm までが砂質で以深は次第に泥質が多く混じていた。

今回使用の垂直採泥器は泥質では 20~25cm の採泥が可能であったが、砂質では船上への引き上げ時に砂の流失があって採泥が満足にできなかった。従って相当深い砂質海底の試料が得られなかった。又内部のビニール管の内径が細いため、例えば管内に 20cm の底質が入っていたとしても実際の海底の 20cm 層の採泥とはいえない。本文中で何 cm 層というのは、採取されたビニール管内での層を指すものである。

3 腸炎ピブリオの検出と同定法

海水中あるいは底質中の本菌の検出と同定は、既報¹⁾ と全く同じ方法で行なった。

4 pH の測定法

海水及び底質試料を小型ビンに入れ、日本ペーハー測器製携帯用複合型ガラス電極を挿入して測定した。

5 酸化還元電位 (ORP) の測定法

東亜電波工業製携帯用酸化還元電位差計で測定した。この電位安定予備実験を行なった所、海水試料は 1~2分 で安定したが、底質試料では仲々に安定しなかった。砂質では 5~10分後、泥質では 10~15分後に一応指針が安定した。この電位は、亀高⁵⁾ も指摘するように平衡電位に数時間を要するので真の平衡電位ではない。しかし、実験実施上時間的余裕がなかった上に、各試料の比較値としては使用できるのではあるまいかと考えて 15分後の電位を読み取った。又計器の指示は飽和カロメル電極に対する電位差が直接読み取れるようになっているが、標準水素電極に対する電位差 (Eh, mV) に全て換算して表示した。

6 有機炭素の定量法

採取した底質を恒量になるまで 100°C で乾燥し、その粉碎試料についてチューリン氏の簡易滴定法⁶⁾ で全炭素を定量した。但し、Cl による誤差を除くために硫酸銀液を添加した。

7 全窒素の定量法

上記乾燥粉碎試料についてガンニング氏変法⁷⁾ で処理をし、セミマイクロゲルダール装置を用いて窒素を定量した。

8 海水塩素量の測定法

海洋観測指針の記載⁸⁾ によった。

結果および考察

1 人工海底実験

人工海底ポットに菌を接種した半日後には、砂質ポットも泥質ポットも海水面上に菌膜が生じ、ポット内に接種菌が十分に増殖したことが見られた。挿入したビニール管を表に示す日数毎に 1本ずつ抜き出し、接種菌の層別分布を調べた結果を Table 2 と Table 3 に示した。なお、表の172日目 (1966年1月27日) の調査は、菌の越冬を見るために行ったのであるが、生物 1型菌も 2型菌も砂・泥両ポット共に検出されずに死滅したものと思われる。これは栄養条件の悪化か、低温によるものであろう。

生物 1型菌の分布を示す Table 2 を見ると、海水と 0~1cm 層には砂・泥共に 22日目まで検出された。しかし、砂質では 3日目に 15cm 層まで侵入したが、それ以後は検出されない。(但し、15cm 層の+はビニール管を抜き出すときの不手際によって、菌が生存する海水が浸入したために、本来-が+になっ

た誤りを含むので不確実である。以下同断。) これに対して泥質では1日目に15cm層まで侵入し、以後ときに深層部でも検出された。即ち、1型菌は砂・泥質共に海底表層部に分布しても深層部には生存(生残あるいは増殖)し難く、特にこの傾向は砂質で強いようである。

Table 2. Occurrence of the biotype 1 organisms of *Vibrio parahaemolyticus* in overlying water and different sediment layers of the artificial sea bottom

Days after inoculation	1	3	6	10	15	22	172
Bottom type	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud
Sea water on the bottom	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
0-1 cm	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
Sediment layers							
4-5 cm	+ +	+ -	- -	- +	- -	- +	- -
9-10 cm	- +	+ -	- -	- +	- -	- +	- -
14-15 cm	- +	+ +	- +	- -	- -	- +	- -
Room temperature (°C)	26-27	23-26	24-28	23-28	23-27	22-28	> 7

Experiment date : 1965/9/7-1966/1/27

Table 3. Occurrence of the biotype 2 organisms of *Vibrio parahaemolyticus* in overlying water and different sediment layers of the artificial sea bottom

Days after inoculation	1	3	6	10	15	22	172
Bottom type	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud	Sand Mud
Sea water on the bottom	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
0-1 cm	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
Sediment layers							
4-5 cm	+ +	+ -	- -	- +	+ +	+ +	- -
9-10 cm	+ +	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
14-15 cm	+ +	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	- -
Room temperature (°C)	26-27	23-26	24-28	23-28	23-27	22-28	> 7

Experiment date : 1965/9/7-1966/1/27

生物2型菌の分布を示すTable 3を見ると、接種1日目に砂・泥質共に15cm層まで侵入し、以後二三の不検出はあるが両底質共に表層部から深層部に至り広く分布検出された。即ち2型菌は底質のいかんを問わず1型菌よりも広く深く生存する性質があるものと思われる。

もしこの実験結果が正しいとすると、前報¹⁾²⁾で用いた採泥器が砂質は表層を、泥質は深層を採泥した場合が多かったために、砂質の方が泥質よりも生物1型菌の検出率が高くなったものといえる。従って前報での調査結果以上に、泥質海底に1型菌が分布している可能性があると推察される。又生物2型菌が底質に無関係に広く検出されたことも理解できると思われる。

さて生物1型菌が海底深層部には生存し難く、特に砂質においてその傾向が強いという理由について、参考のために測定をしたpHをTable 4に、ORPのEhをTable 5に示した。但し両者共に本菌の分布を調べた層の試量が少なかったため、それらの中間層での測定値である。

Table 4のpH値を見ると天然海底のそれ(Table 7)に較べて全体にやや高い。特に砂質に高く6日目の5~14cm層はpH 9.4~9.5である。しかし、このpHがやや高いために生物1型菌が生存できなかったとは考え難い。なぜならば、腸炎ビブリオは酸性には弱いアルカリ性には強い⁹⁾からである。

次にTable 5のORPを見ると砂・泥質共に殆んど各層が還元型である。天然海底ではTable 8に示

Table 4. pH of overlying water and different sediment layers of the artificial sea bottom

Days after inoculation	1		3		6		10		15		22		172	
Bottom type	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud
Sea water on the bottom	8.3	8.4	8.3	8.5	8.2	8.1	8.5	8.3	8.6	8.4	8.6	8.3	8.5	8.3
1—4 cm			7.9	8.1	8.5	8.8	8.5	7.9	8.5	8.0	8.6	8.0	8.2	7.8
Sediment layers	8.3	8.3	7.8	8.4	9.4	8.7	8.5	7.6	8.4	7.9	8.4	7.8	8.8	7.7
5—10 cm														
11—14 cm	8.5	7.9	8.5		9.5	8.5			8.6	7.9	8.7	7.7	8.4	7.8
Room temperature (°C)	26—27		23—26		24—28		23—28		23—27		22—28		> 7	

Experiment date : 1965/9/7—1966/1/17

Table 5. ORP of overlying water and different sediment layers of the artificial sea bottom (Eh, mV)

Days after inoculation	1		3		6		10		15		22		172	
Bottom type	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud	Sand	Mud
Sea water on the bottom	-133	-147	+54	+44	+316	+264	+330	+305	+301	+301	+245	+190	+355	+393
1—4 cm			-111	-195	-135	-190	-70	-199	-55	-155	-83	-193	-48	-157
Sediment layers	-76	-190	-127	-201	-106	-186	-90	-175	-95	-175	-122	-198	+145	-172
5—10 cm														
11—14 cm	-66	-206		-183	-93	-190			-65	-175	-73	-202	+181	-179
Room temperature (°C)	26—27		23—26		24—28		23—28		23—27		22—28		> 7	

Experiment date : 1965/9/7—1966/1/17

されるように酸化型である。この電位が低いのは添加した栄養源によると思われるが、詳細については判らない。底質が還元型であるため、即ち何か還元物質が多いため、生物1型菌が生存し難かったとも考えられない。なぜなら3日目の砂質は -127mV 附近で検出され、又泥質では10日目の -199mV あるいは22日目の -198mV 即ち、 -200mV 近くでも検出されたのに対し、不検出層はいずれもそれよりは電位が高いからである。

pHやORPが本菌の生死に、測定範囲内で重大影響を及ぼさなかったとすれば、ポット内で生物1型菌が死滅したことは、2型菌あるいは他の菌種との拮抗作用あるいは栄養条件などが考えられるが、それらの点を調査しなかったので何とも考察しかねる。但し、1型菌と2型菌の拮抗作用は、次の天然海底の調査でも見られるように殆んど存在しないのではあるまいか。

2 天然海底調査

人工海底という限られた条件下での実験結果から、天然状態を推定することは危険なので、この調査を行なった。調査結果をTable 6に示した。

試料数が少ないので確実なことはいえないが、同一地点でも少しの採泥位置の相違によって本菌の分布状態が相当に異なった。但し菌数の定量を行なっていないので、本菌の濃度については何もいえないが、本調査地域の本菌濃度は小さいものと推定された。又10cm以深(実際にはもう少し深い層)から本菌が検出されなかったこと、及び生物1型菌が検出された層からは常に2型菌もが検出されたことは注目すべき点であった。なお、砂質の深層試料が採取できなかったので、本菌の砂質での分布に関する検討ができないことは残念である。しかし、多少の砂質を含むSt. 4, St. 5から生物1型菌が1株も検出されなかったことは、人工海底実験の裏付けを多少ともなしているように思われる。更に注目すべき点は

Table 6. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in overlying water and different sediment layers of natural sea bottom, with some oceanographic data for the sampling stations

I: Biotype 1 organism of the bacteria
 II: Biotype 2 organism of the bacteria

Station No. Core No.	1		2		3		4		5	
	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2	5-1	5-2
Sea water on the bottom	II	—	—	II	II	—	II	—	—	—
0—1 cm	I, II	—	—	—	—	I, II	—	—	—	—
4—5 cm	—	—	—	—	II	—	—	II	—	—
Sediment layers	I, II	—	II	—	—	I, II	—	—	—	—
9—10 cm	I, II	—	II	—	—	I, II	—	—	—	—
14—15 cm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19—20 cm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bottom type	Mud		Mud		Mud		Sandy mud*		Sandy mud**	
Water depth (m)	9		11		10		9		17	
Water temperature (°C)										
Surface layer	24.4		24.4		23.6		24.5		24.2	
Bottom layer	23.8		23.3		22.4		24.4		24.2	
Chlorinity (%)										
Surface layer	16.91		16.92		16.89		17.15		16.92	
Bottom layer	13.52		9.48		10.00		16.85		16.36	

* 0-5cm was sandy, the deeper layers were composed of sand and mud.

** 0-2cm was sandy, the deeper layers were composed of sand and mud.

Survey date: St. 1-3, 1965/9/16; St. 4-5, 1965/9/27

Core No. 1-1 と 3-2 に見るように、生物 1 型菌が深層（両地点共に 9~10cm 層だが、偶然か否か判らない）に検出されればその表層にも検出されたことである。これは人工海底において、海水即ち表層に接種された菌が泥質では深層部に侵入生存することがあった事実と一致することを示すものであろう。

人工海底実験のときと同様、参考のために測定した pH を Table 7 に、ORP を Table 8 に示した。本菌の分布（一応検出をもって分布とみなす）と pH あるいは ORP とは相関が認められない。即ち、pH、ORP というような環境物質の総合活性度の大小（測定範囲内の）と本菌の分布とは密接な関係がないものように思われる。そこで栄養源の一部と考えられる炭素量と窒素量を定量し、その結果を Table 9 と Table 10 に示した。

Table 9 を見ると、St. 1・2・3 の泥質海底は 12.3~14.7mg/g で野村ら¹⁰⁾ が女川湾の泥質海底で得た値

Table 7. pH of overlying water and different sediment layers of natural sea bottom

Station No. Core No.	1		2		3		4		5	
	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2	5-1	5-2
Sea water on the bottom	8.00	8.00	8.10	8.00	8.05	8.05	8.10	8.00	8.00	8.00
1—4 cm	7.95	8.00	7.90	8.10	7.90	8.05	7.80	7.70	7.90	7.80
5—9 cm	—	—	—	—	—	7.90	7.80	7.75	7.80	7.90
Sediment layers	—	—	—	—	—	7.80	8.00	7.90	—	7.90
10-14 cm	—	—	—	—	—	7.80	8.00	7.90	—	7.90
15-19 cm	7.95	7.85	7.80	7.40	7.85	7.80	—	7.90	—	—
20-25 cm	—	—	—	—	—	7.75	—	—	—	—

Table 8. ORP of overlying waetr and different sediment layers of natural sea bottom (Eh, mV)

Station No. Core No.	1		2		3		4		5	
	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2	5-1	5-2
Sea water on the bottom	+345	+335	+318	+320	+320	+310	+289	+304	+284	+289
1—4 cm	+45	+66	+36	+16	+56	+146	+165	+46	+86	+46
5—9 cm	—	—	—	—	—	+156	+61	+16	+26	+61
Sediment layers	—	—	—	—	—	+131	+121	+66		+111
10—14 cm										
15—19 cm	+85	+140	+31	+36	+146	+176		+106		
20—25 cm						+196				

Table 9. Organic carbon content of different sediment layers of natural sea bottom (mg/g, dry basis)

Station No. Core No.	1		2		3		4		5	
	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2	5-1	5-2
1—4 cm	13.2	13.9	13.6	13.9	12.3	13.6	8.5	10.1	2.8	3.3
5—9 cm	13.5	13.5	14.6	13.5	13.6	13.0	7.0	6.7	8.8	5.9
Sediment layers	13.7	13.9	12.9	13.5	13.9	13.5	5.5	4.5		4.1
10—14 cm										
15—19 cm	12.8	12.9	13.8	14.7	12.9	12.8		4.6		

Table 10. Total nitrogen content of different sediment layers of natural sea bottom (mg/g, dry basis)

Station No. Core No.	1		2		3		4		5	
	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2	5-1	5-2
1—4 cm	1.8	1.6	1.6	1.7	1.4	1.8	1.0	0.9	0.3	0.2
5—9 cm	1.7	1.6	1.6	1.6	1.6	1.3	0.7	0.8	0.9	0.5
Sediment layers	1.6	1.5	1.5	1.4	1.3	1.4	0.6	0.5		0.3
10—14 cm										
15—19 cm	1.4	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1		0.5		

と一致しているが、田中ら¹¹⁾がクルマエビ養殖場で観測したように下層ほど減少する傾向は見られない。St. 4・5の砂質混り海底はオーダーが1つ小さいが、この値は亀高¹²⁾が兵庫県下の干潟で測定した値とよく似ている。Table 10を見ると、各地点各層共に窒素量は炭素量の凡そ1/10であり、泥質に多く砂質に少ない。なおこの窒素量は田中ら¹¹⁾の結果と同じように下層ほど減少する傾向が見られた。

即ち、泥質は有機物や窒素源が多く、砂質は少ない。木俣ら¹³⁾が海洋性硫酸塩還元細菌の分布について述べているのと同様に、これらの栄養源の多少と本菌の棲息とが何か関係あり、砂質よりも泥質に本菌が広くかつ深く分布するものと考えられる。しかし、例えばSt. 1の1—1で本菌が検出されたのに近接の1—2でいずれの層からも検出されなかったこと、あるいは表層と下層で検出され、その中間層からは検出されなかったことなどは、上記の栄養源のみでは説明できない。更に検討すべき点である。

摘 要

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* の底質における垂直分布状態を知るために、人工海底へ本菌を接種した実験、及び天然海底を垂直的に採掘した調査を行なった。その結果次のことが推定された。

- (1) 本菌の生物1型菌は、底質の表層部に棲息分布しても深層部には生存し難い。この傾向は砂質において特に強かった。従って、前報¹⁾²⁾ で使用した採泥器の性能上砂質で1型菌が高率に検出された。
- (2) 生物2型菌は底質の砂・泥質にかかわらず、又浅・深層に広く生存し得る。従って、前報¹⁾²⁾ で2型菌が砂・泥質に広く検出された。
- (3) 生物1型菌が棲息する所には2型菌も分布する傾向があった。
- (4) 生物1型菌あるいは2型菌の生存とその環境底質のpH及び酸化還元電位とは、殆んど相関が認められなかった。
- (5) 泥質は、砂質に較べ有機物や窒素源が多量に含まれていた。このことは、本菌の分布と重要な関係があるものと考えられた。

引用文献

- 1) 浅川末三：本紀要，**6**，213—221 (1965)
- 2) ————：本紀要，**6**，222—228 (1965)
- 3) 東大農芸化学教室：実験農芸化学，上巻，p. 65，朝倉書店，東京（昭和39年）
- 4) 北村直次・浅沼喜嗣雄・牛沢 勇・仁科 讓・赤沢政志・加納奎一：岡山県衛生研究所年報，(12)，11—15 (1962)
- 5) 亀高洋介：神戸商科大学紀要，(2)，153—161 (1954)
- 6) 東大農芸化学教室：実験農芸化学，上巻，p. 53，朝倉書店，東京（昭和39年）
- 7) 同 上，pp. 54—55.
- 8) 日本海洋学会：海洋観測指針，pp. 136—147 (1964)
- 9) 柳沢文徳：食品衛生研究，**10**，(6)，35—43 (1960)
- 10) S. NOMURA・K. KAGAWA： *Science Rep. of the TOHOKU Univ., 4th Ser. (Biology)*, **XVIII**, 145—151 (1949)
- 11) 田中啓暢・井上裕雄：日水学誌，**31**，991—998 (1965)
- 12) 亀高洋介：神戸商科大学記念論文集，第2集，28—40 (1958)
- 13) 木俣正夫・間田 元・畑 幸彦・田島卓明：日水学誌，**21**，102—108 (1955)

SUMMARY

The present study was undertaken to investigate the distribution of *Vibrio parahaemolyticus* within columns of marine sediments in relation to the distance from the water-bottom interface. Both the laboratory experiment employing the 'artificial sea bottom' and the field survey in nearshore waters were conducted. The biotype 1 organisms of the bacteria were found only in the upper layers of the sediment in the case of sandy bottom, while their occurrence sometimes extended to somewhat deeper layers in the muddy bottom. The biotype 2 organisms inhabited both sandy and muddy bottom, ranging from water-bottom interface to a depth of 10 or 15 cm. It is therefore suspected that the tendency for the biotype 1 organisms to have been detected at high ratios from the sandy bottom, which was reported in the previous papers¹⁾²⁾, was most probably due to the functional deficiency of the employed bottom sampler which was prone to sample the surface layer of sandy bottom and the deeper layers of soft muddy bottom.

It is inferred that the want of nutriment was one of the major factors which precluded the occurrence of the biotype 1 organisms in deeper layers of sandy sea bottom.