大腸菌株による雨水中硫酸イオンの微生物学的定量法¹⁾

山本丈夫, 大場 浩

静岡薬科大学²⁾Microbiological Assay Method for Sulfate in Rain Water by Means of Cultivation of *Escherichia coli*¹⁾

TAKEO YAMAMOTO and HIROSHI ÔBA

Shizuoka College of Pharmacy²⁾

(Received June 11, 1969)

In order to analyse oxidized sulfur compounds in air, determination of sulfate in rain water is important. For this purpose, it is necessary to analyse many samples containing a small amount of sulfate.

Previously, a microbiological assay of sulfate in water using cultivation of *Escherichia coli* B was developed by Omura. We applied Omura's method on our object and determined sulfate in rain water using *Escherichia coli* B (H). The standard curve was established by measuring turbidity of the culture medium, and showed linearity in the range from 0 to 12 ppm of sulfate. The amount of 0.5 to 20 ppm of sulfate in rain water was determined by this method with an accuracy of standard deviation $n < \pm 3\%$.

緒 言

大気中の硫黄酸化物は主として雨水とともに降下し, 大気汚染測定器の1つであるデポジットゲージ, またはダストジャー中に SO_4^{2-} の形で存在すると考えられる. この SO_4^{2-} を定量することは硫黄酸化物による大気汚染物質の解析のために重要な意義がある.

SO_4^{2-} の化学的定量法としては, 衛生試験法で採用されている EDTA 法, トリン法, BaMoO_4 法, 重量法のほか BaCrO_4 固体法,³⁾ BaCrO_4 酸懸濁法,⁴⁾ イオン交換による濃縮法⁵⁾ などがあるが, いずれも 10 ppm 前後より 20 ppm 程度までの微量の SO_4^{2-} を正確, かつ再現性よく定量することは困難である.

著者等は, 大村⁶⁾ 等の *E. coli* B による水中の SO_4^{2-} 定量法を応用し, 比濁法による微生物定量法により雨水中定量を行ない, なお BaCrO_4 固体法, 重量法とも比較し検討した.

実験の部

実験方法

1. *E. coli* B (H) 株による微生物定量法

1-1. 供試菌株——東大応微研より株分けされた *Escherichia coli* B (H) 株を寒天斜面培地に植え, 37° で 24 時間培養後, 冷蔵庫中に保存し 2 週間ごとに B. B. L. 培地に移植したものを貯蔵菌株とした. なお培地は蒸留水 100ml に B. B. L. 培地 3g を加え, 2 気圧, 121°, 10 分間滅菌して斜面に固めたものを使用した.

1-2. 基礎培地組成——

TABLE I. Basal Medium for Experiments

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4 g	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.072 g
KH_2PO_4	0.8 g	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.033 mg
NH_4Cl	0.4 g	glucose	2.0 g
		distilled water	100 ml
		pH	7.0

1) 日本薬学会89年会において発表, 名古屋, 1969年4月.

2) Location: Oshika-160 Shizuoka (静岡市小鹿 160).

3) 岩崎岩次, 内海 諭, 荻野 堅, 樽谷俊和, 小沢竹二郎, 日化, **79**, 32 (1958).4) I. Iwasaki, S. Utsumi, K. Hagino, T. Tarutani, T. Ozawa. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 847 (1957).5) 水谷義彦, 分化, **5**, 620 (1956).6) T. Omura, *Natural Science* (Shizuoka University), **7**, 43 (1955).

1-3. 接種菌液——基礎培地 2 ml, 10 ppm SO_4^{2-} 2 ml を 10 ml 遠沈管にとり, 綿栓をし 2 気圧, 121°, 10 分間滅菌したのち, 貯蔵菌株をエーゼで接種し, 37°, 10—13 時間前培養ののち遠心分離し, 0.9% 生理食塩水 4 ml で 3 回洗滌し, 再び 0.9% 生理食塩水 8 ml で均一に懸濁させたものを接種菌液とした。

1-4. SO_4^{2-} 標準液の調製—— K_2SO_4 (特級, 和光) を再結晶し, 1.815 g を蒸留水にとり 1 liter とする。これは 1000 ppm SO_4^{2-} 溶液になる。これを蒸留水で希釈して 100 ppm SO_4^{2-} および 10 ppm SO_4^{2-} 標準液を調製した。

1-5. 定量操作——試験管 (1.8×18cm) に基礎培地 5 ml, 検液 5 ml を入れアルミキャップをしたのち滅菌 (2 気圧, 121°, 7 分間⁷⁾) する。冷後 37° に 12 時間以上放置し, 滅菌した 2 ml メスピペットで接種菌液 1 滴⁸⁾ を添加して, 37° 孵卵器で 39—41 時間培養後, 630 m μ で吸光度を測定する (日立 101 型分光光度計)。同時に同様に操作した SO_4^{2-} 標準液で検量線を作製し, それにより検液中の SO_4^{2-} を定量する。

2. BaCrO_4 固体法 岩崎, 内海等の方法に準じたが, 操作の上で著者等が若干検討を加えて行なった。

陽イオン交換樹脂 (IR—120) で処理した検液 10 ml を共栓付比色管 (50 ml) にとり緩衝液 1 ml, エタノール (特級, 和光) 10 ml を加える。つぎに BaCrO_4 固体試薬 60 mg を加え, 振盪器で 10 分間振盪しガラスフィルター (No. 4) でゆっくり吸引濾過し, 濾液 10 ml を試験管にとりジフェニルカバジド試薬 1 ml, 6N HCl 0.2 ml を加えて発色させ, 5 分後波長 545 m μ で吸光度を測定した。 SO_4^{2-} 標準液についても同様操作し, 検量線より検液中の SO_4^{2-} を定量した。

3. 重量法 検液 300 ml に 1N HCl 6 ml を加え, 沸騰水浴上ではげしく攪拌しながら 10% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ をピペットで徐々に滴加し, もはや白濁を生じなくなるまで加えたのち, 1 時間沸騰水浴上で加温熟成させ, 冷後濾紙 (東洋濾紙 No 5c) で濾過し, 0.1N AgNO_3 で白濁を生じなくなるまで温水 (40—70°) で洗滌した。洗滌後あらかじめ恒量にした磁製ルツボに入れ, 800° 1 時間マッフル炉にて灰化し, 再び恒量にして重量を測定した。対照, SO_4^{2-} 標準液についても同様に操作した。

結 果

1. 検 量 線

Fig. 1 は Table I に示した基礎培地による増殖曲

Fig. 1. Growth Curve of *E. coli* B (H) in Basal Medium
final concentration of SO_4^{2-} : 80 $\mu\text{g}/10\text{ml}$

Fig. 2. Calibration Curve of SO_4^{2-}
Absorbance was measured after incubating for 41 hours at 37° without shaking.

線である。基礎培地の組成中の glucose 量を 0.5%, 0.75%, 1.0%, 2.0% と変え, また他の培地組成の量をも変えてみた結果, Table I に示した組成が適当であった。

Fig. 2 は SO_4^{2-} 標準液による検量線である。

2. 前培養時間, 培養時間の検討

Fig. 1 に示した増殖曲線によれば, 33 時間後の吸光度はほぼ一定となるが, 33, 36, 38, 40, 42, 48 時間で行なった結果, 39—42 時間が検量線もよく直線性を示し, 適当と思われた。また前培養時間は, Fig. 1 の増殖曲線から, 培養後 8—10 時間の対数期が適当と考えられるが, 前培養 10 時間と, 36 時間とでは標準液での検量線は差が認められなかった。⁹⁾

3. 菌体総N量と濁度 (Optical Density) の関係

濁度 (optical density) と SO_4^{2-} のとりこみによる菌の増殖との相関関係を知るため, 菌体総N量と培地中 SO_4^{2-} 濃度とを検討し, その結果を Fig. 3 に示した。なお総

7) 10 分間行なうと糖の分解により着色が大となる。
8) 1—3 滴では培養後の吸光度に差は認められない。
9) 前培養を省略すると検量線が曲線となる。

Fig. 3. Relation between the Multiplication of Bacteria and the Amount of Sulfate

N量の定量法は、セミマイクロケルダール法¹⁰⁾を用い、装置は柴田化学KK、マイクロケルダール窒素定量装置を使用して行ない、1試験管当たり、すなわち培養液 10 ml 中の菌体窒素量を求めた。

4. 共存イオンの影響

TABLE II. Influence of Some Coexistent Ions^{a)} on Microbiological Determination of Sulfate

Coexistent Ion	ppm	SO ₄ ²⁻	
		2 ppm	10 ppm
Cl ⁻	<500	—	—
I ⁻	<500	—	—
NO ₃ ⁻	<500	—	—
CN ⁻	<30	—	—
	>50	+	+
Cu ²⁺	<0.2	—	—
	>0.5	+	+
Zn ²⁺	<1.0	—	—
	>1.0	+	+
Hg ²⁺	<10	—	—
	>50	+	+
Ca ²⁺	<10	—	—
	>30	+	+
Pb ²⁺	<0.5	—	—
	>1.0	+	+
Fe ²⁺	<5	—	—
	>10	+	+

—: No interference of growth was observed.

+: Interference of growth was observed.

a) The ions were selected among those usually contained in rain water.

雨水中に含有していると考えられる若干のイオンについてその影響を調べ、その結果を Table II に示した。SO₄²⁻ 標準液の濃度を 2 ppm の低濃度と、10 ppm の高濃度の両者にし、陰イオンの Cl⁻, NO₃⁻, I⁻, CN⁻ として

NaCl, KNO₃, KI, KCN を個々に加え、また陽イオンの Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺ として Cu(NO₃)₂ · 2H₂O, ZnCl₂, HgCl₂, CaCl₂, PbCl₂, FeCl₃ · 6H₂O を個々に加えた。この表から陰イオンの Cl⁻, I⁻, NO₃⁻ は妨害しないが、CN⁻ は 50ppm 以上で妨害し、陽イオンは一般に妨害が大で特に Cu²⁺, Pb²⁺ は著しく、1 ppm でも妨害する。これらの妨害陽イオンは陽イオン交換樹脂で除いて定量すべきである。¹¹⁾ しかし著者等の行なった雨水中の SO₄²⁻ 定量で、イオン交換樹脂を使用したもの、未使用のものの結果では定量値に差異が認められなかった。このことから著者等の使用した試料では雨水中の妨害イオン濃度は低かったと考えられる。

なお S₂O₃²⁻, SO₃²⁻, cysteine などの硫黄化合物の混入は SO₄²⁻ 定量を妨害した。

5. 段階稀釈および回収率

ある地域の降下粉じん捕集器デポジットゲージ (D. G.) 中の雨水 5 検体 A, B, C, D, E につき Table III に示すような稀釈倍数で段階稀釈を行なった。また 2 倍稀釈した検体について、その検体 2.5 ml にさらに 10 ppm SO₄²⁻ 標準液 1 ml を添加し添加回収率を求めた。Table III から明らかなように、精度再現性の点で良好な結果を得た。しかし高稀釈倍数で行なうと誤差を生ずる。

TABLE III. Microbiological Determination of Sulfate in Gradationally Diluted Samples

Sign of sample	Gradational dilution					Recovery ^{a)}
	×1	×5/3	×2	×10/3	×5	
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%
A	4.1	2.5	1.9			100
B	4.6	2.5	2.3			98
C	4.0	2.3	1.8			104
D			7.3	4.6	2.7	101
E			6.3	3.7	2.4	103

a) Recovery was obtained from the following assay system: 10ml of total volume, containing 2.5ml of sample, 1.0ml of 10 ppm standard sample, 5.0ml of basal medium and 1.5 ml of dist. water.

6. 化学的定量法との比較

E. coli B (H) 株による微生物定量法と、10 ppm 程度の定量に適すると考えられる BaCrO₄ 固体法および従来からよく用いられる重量法の 3 法の定量法を比較した。SO₄²⁻ 標準液として 5 ppm, 10ppm, 30 ppm, 50 ppm について行ない、検体として、G, H, I, J の検体についてそれぞれ行なった。

10) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 1965, p. 71.

11) SO₄²⁻ 標準液 2 ppm, 10 ppm に Cu²⁺ 5 ppm を添加後陽イオン交換樹脂 (IR-120) で処理した検液, また同様に Pb²⁺ 5 ppm についても行なったところ波長 630 mμ での吸光度低下は 0.01 以下であった。

TABLE IV. Comparison of Microbiological Method with Chemical Methods for Determination of Sulfate

		Concentration of sulfate determined (ppm)									
		By microbiological method			By barium chromate solid method ³⁾			By gravimetric method			
Concentration of sulfate in standard sample (ppm)	5	5.1	5.2	5.1	5.5	5.5	5.1	4.3	4.1	4.7	
	10	10.1	9.8	10.0	11.0	9.9	10.4	8.4	8.9	8.6	
	30	32.0	29.5	31.0	32.9	33.1	33.8	29.2	28.5	28.8	
	50	48.0	51.1	50.0	53.8	53.3	52.7	52.4	47.9	50.5	
Sign of sample	G	8.6			7.8			5.9			
	H	16.0	$\sigma < 0.5^a)$			16.5	$\sigma < 1.9$		15.4	$\sigma < 2.4$	
	I	17.5				17.0			16.9		
	J	9.7			8.8			7.0			

^a) The largest σ value of those obtained was shown here.

Table IV から SO_4^{2-} 標準液 5 ppm, 10 ppm では *E. coli* B (H) による微生物定量法はばらつきが少なく, 検体の標準偏差も $\alpha = 0.5$ 以下と小さいことから D.G 中の試料のようにほとんどが SO_4^{2-} 20 ppm 以下のような低濃度の SO_4^{2-} 定量に適すると考えられる. しかし 30—50 ppm のような高濃度では希釈して定量するので希釈誤差を考慮すべきである.

総 括

1. 雨水中の微量 (20 ppm 以下) の SO_4^{2-} 定量法として *E. coli* B (H) 株による微生物定量法を応用して良好な結果を得た.

2. 陽イオンの Cu^{2+} , Pb^{2+} などの妨害イオンもイオン

交換樹脂を用いて容易に除去できる.

3. SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ や cysteine などの含硫有機化合物は本定量法を妨害する.

4. 化学的定量法との比較でも 20 ppm 以下では良好な結果を示した.

5. 定量範囲は 0.5—20 ppm であり, 標準偏差は $\pm 3\%$ 以下である.

謝辞 終りに *E. coli* B (H) 株を提供して頂いた東大応微研, 日下 巖博士, および実験の 1 部を担当して頂いた浅岡竜郎, 住岡栄子両氏に深く感謝します.