グアニル化合物の生分解性についての検討

戎野棟一, 滝本道明

東邦大学理学部化学科

Examination on the Biodegradability of Guanyl Compounds

TOICHI EBISUNO, and MICHIAKI TAKIMOTO

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Toho**University, Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba, 274*

(Received September 11, 1980)

Biodegradability of several guanyl compounds was estimated by the use of activated sludge under aerobic conditions and soil bacteria under anaerobic conditions and soil perfusion apparatus. Soil bacteria were isolated from the sediment in a sewage drainage.

Activated sludge did not biodegrade guanidine, cyanoguanidine and guanylurea which were formed from calcium cyanamide fertilizer and known to be biodegraded to ammonia in soil. Activated sludge biodegraded some guanyl compounds such as methylguanidine, hexamethylenediguanidine, creatine and creatinine. The change of nitrogen source from polypeptone to guanidine or cyanoguanidine affected the composition and population of microorganisms in activated sludge but it did not endow activated sludge with the biodegrading activity for guanidine and cyanoguanidine.

Soil bacteria anaerobically degraded guanidine, cyanoguanidine and guanylurea which were not degraded by activated sludge. Soil bacteria under anaerobic conditions, however, did not degrade any of methyl derivatives of guanyl compounds—methylguanidine, which was degraded by activated sludge, 3-methylcyanoguanidine and 5-methylguanylurea—and hexamethylenediguanidine.

By soil perfusion method, biodegradability of such eight guanyl compounds as guanidine, methylguanidine, hexamethylenediguanidine, 3-methylcyanoguanidine, guanylurea, 5-methylguanylurea, creatine and creatinine was estimated. Methylguanidine might be degraded to nitrate *via* another guanyl compound in soil.

Neither guanylguanidine nor 1,1-dimethylguanylguanidine was degraded by any of estimation methods for biodegradation.

Keywords — activated sludge ; biodegradation ; guanyl compound ; soil bacteria ; soil perfusion

緒 言

石灰窒素肥料の有効成分であるシアナミドは、土壌中でグアニジン、シアノグアニジン、グアニル尿素などに変化することが知られている。¹⁾ そして、最終的にはいずれの生成物もアンモニア態窒素に分解されることが報告されている。²⁾ ところが、これらを被検物質として、「化学物質の審査、および製造等の規制に関する法律(化審法)」に基づく活性汚泥法³⁾を用いた好気的な生分

解性試験を行なったところ、いずれの被検物質も全く分解されないという結果を得た。

そこで、メチルグアニジン、3-メチルシアノグアニジン、5-メチルグアニル尿素など数種のグアニル化合物を被検物質に加えて、活性汚泥法によるグアニル化合物の生分解性についての検討を行なった。また、嫌気条件下に土壌細菌を用いる方法を用いて、グアニル化合物の嫌気条件下での生分解を検討するとともに、土壌環境に近

づけた環流土壌法⁴⁾を用いて、グアニル化合物の土壌環境中での挙動を追究した。

実験材料

1. 活性汚泥の育成と管理 化審法に規定された活性汚泥の育成管理方法³⁾にしたがい、千葉県下の団地の下水処理場より入手した活性汚泥を0.1%合成下水（グルコース、ポリペプトン、リン酸一カリウム各1gを水1lに溶解し、水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整したもの）を含む培養槽に接種し、 $25 \pm 2^\circ$ の恒温水槽中で、培養液の上澄液の溶存酸素量が5mg/l以上になるよう十分に曝気を行ないながら培養した。1日1回曝気を止め、汚泥を沈殿させた後、上澄液の1/3量を捨て、これと同量の0.1%合成下水を加え、再び曝気して汚泥を培養した。活性汚泥を出来るだけ一定の条件下に培養するため、適宜、懸濁物質濃度、活性汚泥容量を測定し、活性汚泥指標が、50—100の間に納まるよう汚泥量を調節した。

2. 土壌細菌の採取と培養 東邦大学（千葉県船橋市）周辺の水の淀んでいる下水溝の底より、黒ずんでいる底質を採取し、5l容のポリエチレン容器に入れ、0.1%合成下水（pH 7.0）で容器の口まで満たし、暗所に7日間放置した。土壌を東洋汙紙 No. 131を用いて汙別した後、汙液を4600×g 15分間遠心分離し集菌した。この菌を0.1%合成下水で口まで満たした1l三角フラスコに入れ、気相を窒素ガスで置換した後、暗所で7日間静置培養した。一定期間毎に集菌し、新しい0.1%合成下水に移し、嫌気条件下に静置培養した。

本実験に用いた土壌細菌をグラム染色後検鏡したところ、グラム陽性の連鎖状球菌がすべてのプレパラートで認められたが、少数のグラム陰性桿菌の混在するプレパラートもあった。

試薬 標準物質：アニリン（小宗化学製試薬特級）

被検物質：グアニジン、メチルグアニジン、ヘキサメチレンジグアニジン、グアニルグアニジン、1,1-ジメチルグアニルグアニジン、グアニル尿素、5-メチルグアニル尿素、シアノグアニジン、3-メチルシアノグアニジン；クレアチン、クレアチニン、N-アミジノグリシン、アロクレアチン、タウロシアン、4-メチルグアニジノプロピオン酸

被検物質は、日本カーバイド工業および東京工業大学工学部大戸研究室製である。

活性汚泥や土壌細菌の培養に用いた試薬類は一級以上、定量法に用いた試薬類はすべて特級である。

実験方法

1. 生分解性試験法 1.1. 活性汚泥法——化審法

による試験法³⁾に準拠して、BOD テスター（大洋科学工業製）を用いて行なった。アニリンおよび各被検物質を、最終濃度が100mg/lになるよう基礎培養基⁵⁾にそれぞれ溶解して200mlの標線つきの試験容器に入れ、育成した活性汚泥を懸濁物質濃度が30mg/lになるように接種した後、通気した基礎培養基で標線まで満たした。 $25 \pm 2^\circ$ の恒温水槽中で攪拌しながら、14日間培養をつづけ、生物化学的酸素要求量（biological oxygen demand, BOD）の変動を経日時に測定した。活性汚泥のみを基礎培養基に添加した対照液のBOD値を求め測定値から減じた後、理論的酸素要求量（theoretical oxygen demand, TOD）に対する比率を求め、各被検物質の生分解率とした。標準物質のアニリンの生分解率が、5日後に40%未満の場合には、各被検物質に対する生分解性試験の結果を棄却した。

また、培養14日後の被検物質の残存量を比色定量し、化学定量からの生分解率を測定した。対照値として、同一期間被検物質のみを添加し、恒温水槽中に入れておいた空試験用容器中の被検物質の残存量を用いた。

別に、被検物質が活性汚泥によって生分解を受ける過程で生成すると考えられるアンモニアおよび硝酸イオンの定量も適宜おこなった。

1.2. 嫌気的分解試験法——西ドイツ Becton Dickinson and Company 製 Gas Pak-50 嫌気ジャー装置を用いた。被検物質は最終濃度が100mg/lになるように基礎培養基に溶解して、100ml三角フラスコに入れた。土壌細菌の嫌気性培養液を菌量が70mg/lになるように接種後、三角フラスコをジャー内に納め、嫌気状態にして暗所に静置培養した。5日毎に、被検物質を含む培養液を適量採取し、被検物質の残存量を求め、菌を接種直後（0日目）の培養液の上清中の被検物質の定量値を対照として生分解率を求めた。

1.3. 環流土壌法⁴⁾——大学構内のグラウンド隅の深さ10cmの位置の土壌100g（湿重量）を長さ30cm、内径3.6cmのガラス管カラムに入れ、両端にガラスウールを詰め、環流液を通す細いガラス管をつけたゴム栓で固定した。土壌カラムの下に500ml三角フラスコを置き、基礎培養基に溶かした各被検物質の100mg/l溶液を環流液としてこの中に入れ、ペリスタポンプを用い毎分4mlの速さで土壌カラムに環流させ、環流液はカラムからこの三角フラスコ内へ流下させた。三角フラスコより適宜環流液を採取し、環流液中の各被検物質の残存量から各被検物質の生分解率を求めた。また、環流液中のアンモニアおよび硝酸イオンの生成量を、適宜測定した。

2. $\text{NH}_3\text{-N}$ 転換率

$\text{NH}_3\text{-N}$ 転換率(%)=

$$\frac{\text{NH}_3\text{-N}}{\left(\frac{\text{被検物質の } 100 \text{ mg/l}}{\text{溶液中の窒素量分}}\right) \times \left(\frac{\text{残存量の化学定量}}{\text{求めた生分解率}}\right)} \times 100$$

3. 定量法 各生分解性試験に用いた培養液を $10000 \times g$ 15分間遠心分離して得た上清画分を、各被検物質の検量線の定量範囲に納まるよう適宜希釈した後定量を行なった。

3.1. グアニル化合物——Voges-Proskauer (VP と略記する) の改良法⁶⁾ を用いた。各グアニル化合物と VP 試薬との反応生成物の可視部の吸収スペクトルを、基礎培養基に VP 試薬を添加した空試験液を対照として測定したところ、その差スペクトルの最大吸収波長は次の通りであり、一定の濃度範囲で検量線は直線であった。測定値は N 量に換算して示した。

グアニジン (545 nm), メチルグアニジン (530 nm), ヘキサメチレンジグアニジン (530 nm), グアニルグアニジン (565 nm), 1,1-ジメチルグアニルグアニジン (557 nm), グアニル尿素 (555 nm), 5-メチルグアニル尿素 (528 nm), シアノグアニジン (552 nm), N-アミジノグリシン (540 nm), アロクレアチン (535 nm), タウロシアミン (540 nm), 4-メチルグアニジノプロピオン酸 (540 nm)

また、3-メチルシアノグアニジンは、VP 試薬によつ

て発色しないので、紫外部における最大吸収波長 214 nm の吸光度測定により定量した。

3.2. クレアチン, クレアチニン——クレアチニンは Folin らの方法⁷⁾ にしたがって定量し、クレアチンはクレアチニンに定量的に誘導⁸⁾ した後、同じ方法で定量した。

3.3. $\text{NH}_3\text{-N}$ ——アンモニア電極 AE-235 (東亜電波工業製) を用いた。

3.4. $\text{NO}_3\text{-N}$ ——JIS-K-0102-1971 の 17.3.1 の方法⁹⁾ にしたがった。

4. メチルグアニジン代謝物の確認 培養液をエチルエーテルで抽出し、減圧濃縮後、東洋汙紙 No. 50 につけ、 n -ブタノール:プロピオン酸:水=10:7:5 を展開溶媒としてクロマトグラフィーを行なった。その際、標準のメチルグアニジン、メチルアミン、アンモニアの各々と同時に展開し、VP 試薬あるいはニンヒドリンを発色試薬として用いて、 R_f 値の比較により、メチルグアニジンの代謝物の同定を試みた。

結果および考察

1. 活性汚泥法

1.1. グアニル化合物の生分解性 Table I に活性汚泥法によるグアニル化合物の生分解性試験の結果を示した。

グアニジン, シアノグアニジン, 3-メチルシアノグアニジン, グアニル尿素, 5-メチルグアニル尿素, グアニ

TABLE I. The Biodegradation of Guanyl Compounds by Activated Sludge

Sample	Biodegradation extent (%)		$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/l)	$\text{NH}_3\text{-N}$ conv. ratio ^{c)} (%)
	BOD ^{a)}	chem. det. ^{b)}		
Guanidine	0	0	—	—
Methylguanidine	8.3—9.3	98.3—98.6	33.1—39.8	58.4—70.4
Hexamethylenediguanidine	28.2—34.6	98.2—98.4	30.1—30.7	73.1—74.5
Cyanoguanidine	0	0	—	—
3-Methylcyanoguanidine	0	0	—	—
Guanylurea	0	9	—	—
5-Methylguanylurea	0	0	—	—
Guanylguanidine	0	0	—	—
1,1-Dimethylguanylguanidine	0	0	—	—

a) Biodegradation Extent (%), BOD: $\frac{\text{BOD}_s - \text{BOD}_c}{\text{TOD}} \times 100$ (%), where BOD_s and BOD_c represent the biological oxygen demand in the sample solution and the endogenous respiration by activated sludge in the control solution, respectively; TOD the theoretical oxygen demand.

b) Biodegradation Extent (%), chem. det.: Biodegradation Extent (%) chemical determination was calculated from the residual amounts of guanyl compounds determined by spectrophotometry.

c) $\text{NH}_3\text{-N}$ conv. ratio: $\text{NH}_3\text{-N}$ conversion ratio

$$= \frac{\text{NH}_3\text{-N}}{(\text{nitrogen content in the sample solution}) \times \text{biodegradation extent (chem. det.)}} \times 100 (\%)$$

Activated sludge cultured on a 0.1% synthetic waste water for a longer period than one month was used in the final concentration of 30 mg/l. Test period was for 14 days.

TABLE II. The Biodegradation of Guanidinoorganic Acids by Activated Sludge

Sample	Biodegradation extent (%)		NH ₃ -N (mg/l)	NH ₃ -N conv. det. (%)
	BOD	chem. det.		
Creatine	26.7	99.5	10.4	34.0
Cretinine	20.0	99.4	28.7	79.3
4-Methylguanidino propionic acid	0	0	-	-
Allocreatine	13.3	59.6	15.4	79.0
N-Amidinoglycine	11.6	98.5	23.1	67.7
Taurocyamine	23.5	95.4	16.7	73.6

A sample solution contained each guanidinoorganic acids in the final concentration of 100 mg/l. Activated sludge and inoculation condition were the same as described in the legend of Table I.

ルグアニジン, 1,1-ジメチル グアニル グアニジンは, BOD の測定結果からも, 残存物の定量結果からも分解は全く認められなかった. しかし, メチルグアニジン, ヘキサメチレンジグアニジンの生分解率は, 残存物の定量結果からは, とともに98-99%とほぼ完全に分解していた. しかし, BOD の測定結果から求めたメチルグアニジン, ヘキサメチレンジグアニジンの生分解率は, それぞれ8-9%, 28-35%と低かった. これは, それぞれの含有窒素の NH₃-N 転換率が59-70%, 73-75%にとどまっていたためと考えられる. また, メチルグアニジンについては, 代謝物の同定を薄紙クロマトグラフィーで行なったところ, 標準のメチルアミンと同一 Rf 値 (0.42) にニンヒドリンで発色するスポットが認められ, 被検物質中の窒素が完全に酸化されず, メチルアミンとして留まっていることが推定された.

1.2. グアニジノ有機酸の生分解性 クレアチン, クレアチニン, タウロシアミン等の生体関連の グアニジノ有機酸の 活性汚泥法による 生分解性 試験の結果を Table II に示した. クレアチン, クレアチニンの微生物による分解については, N-アミジノグリシン,¹⁰⁾ 1-メチルヒダントイン,¹¹⁾ メチルグアニジン,¹²⁾ あるいはサルコシン¹³⁾を経る4つの分解経路が知られているが, 本実験でもいずれも活性汚泥によって分解され, しかも, 培養基中にアンモニアの生成が認められることから, これらの有機酸はグアニル基を含めて分解していると考えられる.

活性汚泥は, グアニジノ有機酸に対しては広い分解性を示したが, クレアチンより1つメチレン基 (-CH₂-) の多い 4-メチル グアニジノプロピオン酸 に対しては, BOD の測定結果および 残存物の定量結果から全く分解性を示さなかった.

1.3. 馴養汚泥によるグアニジン, シアノグアニジンの生分解性 土壌環境中で分解することが知られているグアニジン等の被検物質が, ポリペプトンで培養した

汚泥では分解されなかったもので, ポリペプトンの代りに窒素源としてグアニジン, シアノグアニジンを用い, 汚泥の馴養効果を検討した. ポリペプトンを窒素源とする汚泥では, 輪虫の *Philodina* が下等動物の優占種で, *Zoogloea* 群も多かったのに対して, グアニジンおよびシアノグアニジンを用いた馴養汚泥では, とともに鞭毛虫の *Mastigophora* が優占種で, *Fusarium* 群も多くなるなど, 馴養によって汚泥の生物相には明らかな変化が認められた. しかし, いずれの馴養汚泥によっても, グアニジン, シアノグアニジンは生分解を受けなかった.

2. 嫌気的生分解試験法

Fig. 1 に, グアニジン, シアノグアニジン, グアニル尿素, グアニルグアニジンおよびこれらのメチル誘導体の Gas Pak による嫌気的生分解試験の結果を示した.

活性汚泥では分解されなかったグアニジン, グアニル尿素, シアノグアニジンはいずれも分解したが, その分解速度は本実験に用いた条件下では大きく違い, グアニジンとグアニル尿素はほぼ類似した経過を示し, それぞれ30日, 35日後で残存量が0となったのに対して, シアノグアニジンは40日後でも60%が残存していた. また, 活性汚泥法で分解を受けたメチルグアニジンとヘキサメチレンジグアニジン, 活性汚泥法で分解されなかった5-メチルグアニル尿素, 3-メチルシアノグアニジンとグアニルグアニジンおよび 1,1-ジメチル グアニルグアニジンは本実験条件下では分解しなかった.

3. 環流土壌法

環流土壌法によるグアニジン-N の濃度変化を Fig. 2 に示した.

グアニジン-N の残存量は 1 日後に大きく減少し, 以後徐々に少なくなり, およそ43日で0となった. この1日目の著しい減少は土壌による吸着に基づくものと考えられ, それ以降グアニジンが徐々に生分解を受けていることは, NH₃-N および NO₃-N の消長から推察される.

被検物質のグアニル化合物のうち, グアニジンのよう

Fig. 1. The Biodegradation of Several Guanyl Compounds by Soil Bacteria in Anaerobic Condition

Residual amounts of guanyl compounds were spectrophotometrically determined. Soil bacteria which were isolated from the soil in a sewage drainage in Funabashi, Chiba, were cultured in a 0.1% synthetic waste water for a several weeks. Soil bacteria were added to 100 ml of the sample solution which contained 100 mg/l of each compounds in the final concentration of 70 mg/l. ○—○: guanidine, ●—●: methylguanidine, △—△: cyanoguanidine, ▲—▲: 3-methylcyanoguanidine, □—□: guanylyurea, ■—■: 5-methylguanylyurea, ▽—▽: guanylguanidine, ▼—▼: 1,1-dimethylguanylguanidine.

に環流液中の被検物質-N が単調に減少し、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が徐々に増加するものに、ヘキサメチレンジグアニジン、3-メチルシアノグアニジン、5-メチルグアニル尿素、クレアチン、およびクレアチニンがあった。

対照として、グアニル化合物を含まない基礎培養基だけを土壌カラムに環流したとき、環流液中には VP 試薬と反応する物質の出現は認められず、 $\text{NH}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ とともに環流日数の多少にかかわらず、ほとんど検出されなかった。また、グアニル化合物を環流した場合にも、メチルグアニジンを環流した場合を除いて、被検物質以外に VP 試薬と反応する物質の出現を示唆する実験結果は得られていない。

環流土壌法を用いた場合のグアニル尿素-N の濃度変化を Fig. 3 に示した。

8日まで急激に減少した後、再び上昇しているが、10—20日にかけてのピーク時の環流液につき VP 試薬との反応生成物の最大吸収波長を測定したところ、グアニル尿素と VP 試薬との反応生成物の最大吸収波長 555 nm から変化しなかった。このことは、グアニル尿素が土壌へ吸着された後、脱着環流液中への再溶解を示すものであるが、同時に $\text{NH}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ への分解という経過がみられ、徐々に生分解を受けていることが認められる。

Fig. 2. The Fate of Guanidine in Soil

Guanidine was added to the basal medium in the final concentration of 100 mg/l. Glass column (3.6×30 cm) was packed with 100 g of soil and perfusion was carried out at the flow rate of 4 ml/min. The residual amounts of guanidine in perfused solution were determined by the modified Voges-Proskauer's method and nitrogen contents in guanidine were calculated from the residual amounts of guanidine. ○—○: guanidine-N, △—△: $\text{NH}_3\text{-N}$, ●—●: $\text{NO}_3\text{-N}$.

Fig. 3. The Fate of Guanylyurea in Soil

Guanylyurea was added to the basal medium in the final concentration of 100 mg/l. Determination methods for nitrogen contents and perfusion condition were the same described in the legend of Fig. 2. ○—○: guanylyurea-N, △—△: $\text{NH}_3\text{-N}$, ●—●: $\text{NO}_3\text{-N}$.

土壌環境中で分解されると報告されているにもかかわらず、活性汚泥法では分解しなかったグアニジン、シアノグアニジン、グアニル尿素のうち、シアノグアニジンは環流土壌法によっても生分解が認められなかった。

メチルグアニジン-N の環流土壌法における濃度変化を Fig. 4 に示した。

環流開始3日後に、見かけ上、最初の添加量を約40%上まわったメチルグアニジン-N量は、環流液と VP 試薬との反応生成物の 530 nm における吸光度より求めた

TABLE III. Biodegradability of Guanyl Compounds

Sample	Test method		
	Activated sludge in aerobic condition	Soil bacteria in anaerobic condition	Soil perfusion
Guanidine	×	○	○
Methylguanidine	○	×	○
Hexamethylenediguanidine	○	×	○
Cyanoguanidine	×	○	×
3-Methylcyanoguanidine	×	×	○
Guanylurea	×	○	○
5-Methylguanylurea	×	×	○
Guanylguanidine	×	×	×
1,1-Dimethylguanylguanidine	×	×	×
Creatine	○	—	○
Creatinine	○	—	○

—: not tested

Fig. 4. The Fate of Methylguanidine Soil

Methylguanidine was added to the basal medium in the final concentration of 100 mg/l. Determination method for nitrogen content of methylguanidine and perfusion condition were the same described in the legend of Fig. 2.

が、環流開始3日後の環流液とVP試薬との反応生成物の吸収スペクトルは、メチルグアニジンとは異なり、最大吸収波長は517 nmであった。VP試薬の発色機構はVP試薬中のジアセチルとグアニル基との反応であることが知られており、¹⁴⁾メチルアミンとは反応しない。このことは、メチルグアニジンの分解過程で、別のグアニ

ル基を有する中間代謝物が生成していることを示しているが、¹⁵⁾紙クロマトグラフィーではメチルグアニジンと同じRf値(0.55)のスポットのみが認められ、中間代謝物を分離同定するにいたっていない。

グアニルグアニジンおよびそのジメチル誘導体の環流液中の残存量は、2—4日目までは漸減したが、それ以降一定値を保ち続け、また、 $\text{NH}_3\text{-N}$ や $\text{NO}_3\text{-N}$ は全試験期間を通して全く検出されなかった。したがって、初期の残存量のわずかな減少は土壌による被検物質の吸着によるものと考えられる。

ま と め

グアニル化合物についての生分解性試験の結果をまとめたのがTable IIIである。

被検物質としたグアニル化合物のうち、好気条件下の活性汚泥法で分解したのは、クレアチン、クレアチニン、その中間代謝物であるメチルグアニジンなどのグアニジノ有機酸関連化合物およびヘキサメチレンジグアニジンであった。

グアニジン、シアノグアニジン、グアニル尿素は好気的な活性汚泥法では分解されず、嫌氣的分解試験法で分解された。これらグアニル化合物が、畑地土壌では分解を受け難いが、水田土壌中では比較的速かに分解され、しかも、グアニル尿素の方がシアノグアニジンより速かに分解されるという知見¹⁵⁾が報告されているが、畑地土壌は通常好氣的であり、水田土壌は比較的嫌氣的である¹⁶⁾ことを考慮すると、著者らの知見とほぼ一致し、これらが土壌中で嫌氣的に分解されることを示している。

活性汚泥法あるいは嫌氣的分解試験法のいずれかの方法で生分解が認められたグアニル化合物は、シアノグア

ニジンを除き、環流土壌法によって生分解が認められた。このような結果は、環流土壌法においては、好氣的分解と嫌氣的分解がともに進行しうることによると考えられる。

グアニルグアニジンおよびその1,1-ジメチル誘導体は、いずれも生分解性が認められなかった。

このように、グアニル化合物の生分解性は、化審法による活性汚泥法だけでは評価することはできず、嫌氣的

な生分解をも検討して判定することが必要である。

謝辞 本研究にあたり、グアニル化合物の貴重な試料を提供していただいた日本カーバイド工業株式会社ならびに東京工業大学工学部大戸研究室に深謝する。また、活性汚泥中の生物種の分類と分布についての同定を実施いただいた本学理学部生物学科、青山莞爾助教授に深謝する。

引用文献および注

- 1) J.E. Milks, R.H. Janes, *Anal. Chem.*, **28**, 846 (1956); K. Latassach, *Landw. Forsch.*, **6**, 116 (1955); 手島周太郎, 土肥誌, **9**, 269 (1935).
- 2) K.D. Jacob, J.M. Braham, *J. Agr. Res.*, **28**, 38 (1924); 村田久次, 農化誌, **6**, 269 (1930).
- 3) 新規化学物質に係る試験法について, 昭49.7.13. 環保業第5号, 葉登第615号, 49葉, 392号.
- 4) J.H. Quastel, H. Lee, *Chem. and Ind.*, No. 26, 238 (1944); 佐藤 匡 “土壌微生物入門,” 古坂澄石編, 共立出版, 東京, 1969, pp. 44—53.
- 5) “水質試験法” 日本工業用水協会編, 日本工業用水協会発行, 東京, 1974, pp. 182—185.
- 6) M.J. Micklus, I.M. Stein, *Anal. Biochem.*, **54**, 545 (1973).
- 7) O. Folin, H. Wu, *J. Biol. Chem.*, **17**, 469 (1914).
- 8) 湊 顯, “新生化学実験,” 南山堂, 東京, 1959, pp. 159—162.
- 9) JIS-K 0102, 工場排水試験法 (1971).
- 10) A. Brunel, G. Brunel-Capelle, A. Grazina-Santier, *C.R. Acad. Sc. Paris. Ser. D.*, **273**, 1799 (1971).
- 11) J. Szulmajester, *J. Bacteriol.*, **75**, 633 (1958).
- 12) H.G. van Eyk, R.J. Vermoat, H.J. Leijnse-Ybena, B. Leijnse, *Enzymologia.*, **34**, 198 (1968).
- 13) D. Tsuru, I. Oka, T. Yoshimoto, *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1011 (1976).
- 14) T. Nishimura, S. Tanabe, H. Toku, T. Kono, Y. Sakabe, T. Sakaguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 639 (1969); T. Nishimura, H. Toku, T. Ueno, S. Shibamoto, T. Imai, *Chemistry Letters*, pp. 649—652 (1972).
- 15) 手島周太郎, 土肥誌, **9**, 31 (1935); A.F. Mc Guinn, *Soil Science.*, **XVII**, 487 (1924).
- 16) 古坂澄石, “微生物の生態1 方法論をめぐって,” 微生物生態研究会編, 学会出版センター, 東京, 1974, pp. 145—162.