海洋性硝酸化成細菌に関する研究—Ⅲ.

亜硝酸生成細菌の亜硝酸化成作用について

木俣正夫・河合 章・吉田陽一

(1963 年 8 月 2 日受理)

STUDIES ON MARINE NITRIFYING BACTERIA (NITRITE FORMERS AND NITRATE FORMERS)—III. ON THE NITRITE FORMATION OF THE MARINE NITRITE FORMERS

Masao KIMATA, Akira KAWAI and Yoichi YOSHIDA*

We obtained two kinds of almost pure culture of the marine nitrite former (ammonia-oxidizing bacteria), one (M 2) from the bottom muds of Maizuru Bay and the other (A 6) from the filter-sand of the sea-water aquarium with circulating system. The cultures included a species of heterotrophic bacteria, *Vibrio adaptatus* like strain, as a sole contaminant.

In this paper, the effects of some of the environmental factor on the nitrite formation were examined, by using of the resting bacterial cells adhering to the sand.

The results which were obtained are as follows:

1. The marine nitrifying bacteria show the maximum nitrite formation in sea water or in the solution with ca. 30‰ NaCl concentration, and the lower the salt concentration, the less the activity. This reduction of the activity seems to be caused by the decrease in the enzyme activity of the resting cells themselves rather than by the fact that the low salted solution is unsuited for their enzymatic reaction.

2. The maximum nitrite formation occurs at about 35°C, and at around pH 8.0. Most of the activity is lost above 45°C, however, the formation gradually changes within the range from pH 6.0 to pH 10.0.

3. The substrate concentration which gives the maximum nitrite formation of M 2 is ca. 30 mg/l ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), and somewhat lower than that of A 6.

著者らはさきに海洋性硝酸化成細菌（亜硝酸生成細菌および硝酸生成細菌）の培養法を考案し、その方法を用いて種々の海水、海底土などにおけるこれらの細菌の分布を調査した結果、両種の細菌はともに沿岸海域の底土や循環濾過式海水魚飼育水槽の濾過砂中にきわめて多数 ($10^3 \sim 10^6$ cells/g) 常在することを明らかにした¹⁾。

著者らがこれまで行なってきた研究結果によつてもすでにある程度明らかになったのであるが、同じ硝酸化成反応に関与する細菌でも、これまでに研究されてきた土壌中の硝酸化成細菌 (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter* など) と著者らが研究の対象としている海洋性のものとは自然界における分布はもちろんのこと、その生化学的諸性質に関してもかなり異なっているように思われる。

このような見地から、本報においては、沿岸海域の海底土ならびに循環式海水魚飼育水槽の濾過砂から得た 2 種類の海洋性亜硝酸生成細菌（アンモニウム塩酸化細菌）について、その resting cell の亜硝酸化成作用におよぼす若干の環境要因の影響をしらべ、あわせて土壌中の亜硝酸生成細菌との差異についても検討した。

* 京都大学農学部 (Fac. Agr. Kyoto Univ., Maizuru, Japan).

なお海洋性硝酸化成細菌の純粋分離はきわめて困難であつて、いろいろの方法を試みたがいまだ成功していない。よつてここで、実験に供した 2 種類の細菌もできるだけ他の細菌を除いてあるが、まだ *Vibrio adaptatus* に類似した従属栄養細菌 1 種を混在したままの、いわゆる almost pure culture である。

また前報でも述べているように海洋性硝酸化成細菌は細砂のような固形物を加えて培養すると、その増殖が極めて良好となる。本報では、このような方法で細菌を培養した後、細菌の附着した砂をそのまま resting cell とみなして実験に供した。

実験方法

1. 供試細菌

舞鶴湾の海底土、ならびに研究室内に設けた循環濾過式海水魚飼育水槽の濾過砂中の亜硝酸生成細菌を計数するとき¹⁾、この細菌の存在が認められた最高稀釈の試験管培養を試料として新しい培地に培養をくりかえした後、再び最高稀釈の試験管培養を得た。このような操作をくりかえし、他の細菌をできるだけ除いて最後に *Vibrio adaptatus* に類似した細菌 1 種のみを混在する almost pure culture を得た。この従属栄養細菌はペプトンを含む海水培地によく増殖するが、人工海水に硫酸アンモニウム (30 mg/l)、第 1 磷酸カリウム (2 mg/l)、EDTA-Fe (0.2 mg/l) を添加した無機培地にも $10^6 \sim 10^7$ cells/ml 程度増殖する。

供試細菌は実験に供するまで、砂を添加した亜硝酸生成細菌培地で 25°C において培養し、2 週間毎に新しい培地に植えかえて保存した。

2. 供試砂の調製

容量 300 ml の三角フラスコに亜硝酸生成細菌用培地 200 ml および細砂 (約 40 メッシュ) 30 g を入れて高圧滅菌する。これに前記の供試細菌の培養 1 ml を接種し、25°C で 2 週間培養を行なつた後、砂を器底に残して培養液を新しい培地と無菌的にとりかえる。この操作を 2 日毎にくり返して 2 週間経た後、砂を容量 500 ml の三角フラスコにとり、200 ml の濾過海水を入れ、ゆるやかにフラスコを傾けて砂を洗浄し、再び新しい濾過海水ととりかえる。このような洗浄を 3 回行なう。

その後砂を濾紙上にとつて水分を除き実験に供する。

3. 亜硝酸化成作用の測定

容量 100 ml の三角フラスコに上記の供試砂 1.0 g および反応液 (特記する場合を除いては、硫酸アンモニウム 100 mg/l を含む濾過海水、苛性ソーダで pH 8.2 に調整) 20 ml を加え、一定温度 (特記する場合を除き 25°C) に保つた恒温水槽に静置する。2 時間後反応混液を乾燥濾紙で濾過し、この濾液についてグリースロミン試薬を用い、常法によつて亜硝酸塩を定量する。

なお硫酸アンモニウムを含まない反応液について同様の操作を行ない、このときの値をさきの定量値から差し引いて、100 g の砂が 1 時間に生成する亜硝酸態窒素量を算出し、亜硝酸化成作用を比較する。

実験結果

1. 反応液の海水濃度の影響

海水を 0.02% の重炭酸ナトリウム溶液で種々の濃度に稀釈し pH 8.2 に調整したものを反応液として用い、亜硝酸生成細菌の resting cell の亜硝酸化成作用におよぼす海水濃度の影響をしらべた。得られた結果は Fig. 1 に示すとおりであつて、実験に供した 2 種類の細菌では、いずれも海水濃度が 60~100% の範囲で、その亜硝酸化成作用がほとんど変わらないが、それ以下の濃度では濃度の低下とともに次第に亜硝酸化成作用が低下し、海水濃度が 5% 以下の場合には亜硝酸化成作用はきわめて微弱である。

2. 反応液の食塩濃度の影響

反応液として種々の濃度の食塩を含む 0.02% 重炭酸ソーダ溶液 (苛性ソーダで pH 8.2 に調整) を用いて、前記と同様の実験を行ない、Fig. 2 のような結果を得た。図に示したように、両細菌とも、食塩濃度が 20~30‰ のとき亜硝酸生成作用が最も大きく、これ以下あるいはこれ以上の濃度では食塩濃度の低下あ

Fig. 1. The effect of sea water concentration on the nitrite formation of the marine ammonia-oxidizing bacteria. M2: the bacteria obtained from sea-bottom.

A6: the bacteria obtained from the filter-sand of the aquarium.

Fig. 2. The effect of NaCl concentration on the nitrite formation of the marine ammonia-oxidizing bacteria.

Fig. 3. The effect of temperature on the nitrite formation of the marine ammonia-oxidizing bacteria.

Fig. 4. The effect of hydrogen-ion concentration on the nitrite formation of the marine ammonia-oxidizing bacteria.

るいは上昇に伴って、亜硝酸化成作用が低下する。

3. 反応温度の影響

種々の温度における亜硝酸生成作用をしらべた結果は Fig. 3 に示したとおりであつて、その最適温度はいずれの細菌においても 30~35 $^{\circ}$ C にあるように思われる。そして 45 $^{\circ}$ C 以上ではほとんどその活性がみら

れないのに反して、最適温度以下では 20°C になつてもまだかなり亜硝酸化成作用が行なわれる。

4. 反応液の水素イオン濃度の影響

反応液の水素イオン濃度を苛性ソーダあるいは塩酸で種々の pH 値になるように調整し 25°C で亜硝酸化成作用をしらべた結果を Fig. 4 に示した。図でみられるように両細菌の亜硝酸生成作用は pH 8 附近で最も大きく、この pH 値をはなれるにしたがつて次第に小さくなるが、中性からやや酸性側の pH 6 附近、あるいはアルカリ側の pH 10 附近でもまだある程度の活性が認められる。

5. 反応液の基質濃度の影響

反応液の硫酸アンモニウム濃度が 0~300 mg/l となるように反応液を調製し、これを用いて細菌の亜硝酸化成作用におよぼす基質濃度の影響をしらべた。得られた結果は Fig. 5 に示すとおりである。図に見られるように細菌の亜硝酸化成作用におよぼす基質アンモニウム塩濃度の影響は細菌の種類によつてやや異なり、循環水槽から得た細菌では基質濃度が 30~300 mg/l の範囲でその亜硝酸化成作用にほとんど差が認められないが、海底土から得た細菌では、10~30 mg/l 付近でもつとも活性が強く、これ以上の濃度になると次第に亜硝酸生成量が小さくなる。また両細菌とも前記以下の濃度では濃度の低下に伴つて亜硝酸化成作用が次第に減少する。

Fig. 5. The effect of ammonium-ion concentration on the nitrite formation of the marine ammonia-oxidizing bacteria.

Fig. 6. The effect of the immersion in diluted sea water before the enzymatic reaction on the nitrite formation of the ammonia-oxidizing bacteria.

6. 低濃度海水に浸漬した細菌の亜硝酸化成作用

さきの実験で細菌の亜硝酸化成作用が低濃度の海水あるいは食塩水中で著しく低下することを見た。その原因が低濃度海水が細菌の酵素作用の環境として不適当であるためか、または他の理由によるものかを確かめるため次の実験を行なつた。すなわち、最初の実験のときと同様に種々の濃度の稀釈海水を調製し、これに供試砂を 25°C において 2 時間浸漬した後、おのおのを 100% 海水で調製した反応液を用いて常法にしたがつてその亜硝酸化成作用をしらべた。得られた結果は Fig. 6 に示すとおりであつて、細菌を一たん浸漬すればその亜硝酸化成作用は低下する。その低下の程度は反応液として低濃度海水を用いた場合とはほぼ同じである。

論 議

近年硝酸化成細菌の研究がさかんになり、土壌から分離された *Nitrosomonas europaea* などの菌株については、細菌学的諸性質はもとより、cell free extract を用いてその生化学的作用が研究されるようになってきた²⁾。

しかしながら海洋性の硝酸化成細菌については、この細菌が海洋の生産力を直接支配する要因として、また循環濾過式海水魚飼育水槽の設計、管理においてきわめて重要な意義をもっているにもかかわらず、いまだこれに関する研究はほとんどなく、その性質も全く明らかにされていない。その原因の一つは海洋性硝酸化成細菌の分離培養がきわめて困難であるためと思われる。

著者らも海洋性亜硝酸生成細菌（アンモニウム塩酸化細菌）の亜硝酸化成作用をしらべるにあたって、この細菌を純粋分離するためいろいろ試みたが、いまだ完全には成功せず、本報の実験に用いた2種類の細菌も *Vibrio adaptatus* に類似した1種類の雑菌を混在したままのものである。

しかしながらこの従属栄養細菌についてしらべた結果、本実験の条件下では、アンモニウム塩、亜硝酸塩の酸化ならびに亜硝酸塩、硝酸塩の還元を示さなかつた。したがってたとえこの細菌を含んだ培養について得られた結果であつても、本質的な誤りはないと考えてよいであろう。

また本報においては、細菌の附着した細砂をそのまま亜硝酸生成細菌の resting cell と考えて、これを実験に用いたが、一部の試験においては、この細砂を滅菌海水とともに振盪して細菌を砂から離脱させ、砂を除いた細菌懸濁液を遠心分離によつて集菌した後実験に供したが、ほぼ同様の結果が得られている。

ここで用いた両細菌は、おのおのの分離源は異なつているが、その resting cell の亜硝酸化成作用におよぼす種々の環境要因のうち、基質アンモニウム濃度以外の影響については、ほとんど差異はみられなかつた。これまで土壌から分離された亜硝酸生成細菌 *Nitrosomonas europaea* などの菌株ではその亜硝酸化成作用もかなり詳細に研究されている。いま本研究で得られた実験結果をこれと直接比較することはできないとしても、そこにかかなり異なつた点がみられるようである。すなわち、細菌の亜硝酸化成作用におよぼす水素イオン濃度および温度の影響に関してはほぼ同様であるが、反応液の海水あるいは食塩濃度の亜硝酸化成作用におよぼす影響は、ここで用いた海洋性細菌と土壌から分離した菌株では全く異なつている。前者では天然の海水濃度あるいはほぼこれに相当する食塩濃度のとき、亜硝酸化成作用がもつとも大きく、これより塩濃度が低下するにしたがつてその活性は著しく減少するのに対して、高濃度の食塩溶液中でもかなりの亜硝酸生成が見られる。これに反して後者では食塩によつてその亜硝酸生成作用が阻害され、0.5 M (約 29 ‰) で完全に活性が失なわれると報告されている³⁾。

このような相違の原因を明らかにするには、さらに詳細な研究にまたなければならないが、実験の結果から、海洋性細菌の亜硝酸化成作用が低塩濃度溶液で著しく低下するのは、このような環境が酵素反応に適していないというよりは、滲透圧の低下などの原因で resting cell の酵素活性そのものが小さくなるためと考えることができる。

また亜硝酸生成における基質濃度の影響に関しても、ここで用いた海洋性細菌では、土壌から分離された細菌の場合よりもその最適濃度がかかなり低く、両者の間に大きな差異があるように思われる。これはおそらく海洋性細菌の生息している海洋などでは土壌などの環境とくらべて、細菌によつて代謝されるこれらの物質の濃度が稀薄であることと関係があるのであろう。さらにここで実験に用いた両細菌の間でも、その最適基質濃度にはある程度の差が認められ、アンモニウム塩の多量に存在する循環式飼育水槽から得た細菌の方が自然海域から得たものより最適基質濃度が高かつたが、このことに関してはさらに多数の分離細菌について比較検討する必要があるであろう。

摘 要

1. 沿岸海域の海底土および循環濾過式海水魚飼育水槽の濾過砂から、従属栄養細菌 *Vibrio adaptatus*

類似菌 1 種のみを混在する海洋性亜硝酸生成細菌の almost pure culture を得た。細砂を添加した培地で培養した後、細菌の附着した細砂を用いてその亜硝酸化成作用におよぼす二、三の環境要因の影響についてしらべた。

2. 細菌の亜硝酸化成作用は、低濃度の海水中では天然の海水のときと比較して著しく減少する。また食塩水の場合にもほぼ同様の傾向がみられ、食塩濃度が 30‰ 付近でその活性がもつとも大きく、この濃度を離れるにしたがつてその亜硝酸生成作用は低下する。しかし 50‰ 程度の食塩濃度においても、まだかなりの活性が認められる。このような性質は海洋性亜硝酸生成細菌の特質の一つと考えられる。

3. 細菌の亜硝酸生成作用が低塩濃度溶液中で著しく低下するのは、このような環境が酵素反応に不适当であるというよりは、resting cell としての酵素活性そのものを低下させるためと思われる。

4. 細菌の亜硝酸化成作用の最適温度は 35°C 付近にあり、45°C 以上ではその活性はほとんど認められない。また最適水素イオン濃度は pH 8 付近にあるが、pH 6 あるいは pH 10 付近においてもかなりの活性が認められる。

5. 亜硝酸化成作用における最適基質濃度は、海底土から得た細菌では循環濾過式飼育水槽のものよりかなり低く、硫酸アンモニウムの濃度が 10~30 mg/l のときもつとも多量の亜硝酸が生成される。

文 献

- 1) 木俣正夫・河合 章・吉田陽一：本誌，27，593~597 (1961).
- 2) 例えば ENGEL, M. S. and M. ALEXANDER: *J. Bacteriol.*, 76, 217~222 (1958).
BURGE, W. D., E. MALAVOLTA and C. C. DELWICHE: *J. Bacteriol.*, 85, 106~110 (1963).
- 3) 有馬 啓・浅野浩司：醗酵協会誌，20，437~448 (1962).