微生物による海水中の溶存含窒素化合物 の微量定量法—Ⅱ.

海洋性硝酸還元細菌による硝酸の定量法

吉 田 陽 一*

(1936 年 10 月 7 日受理)

Microdeterminations of Nitrogenous Compounds in Sea Water, Using Marine Bacteria—II.

Determination of Nitrate, Using a Marine Nitrate Reducing Bacterium

Yoichi YOSHIDA*

A study was carried out on the microquantitative determination of nitrates present in sea water, the marine nitrate reducer AH 1 being used.

1. Five milliliters of the sample in which the particulate matters such as bacteria have been eliminated by means of centrifugation, 0.5 ml of cell suspension (O. D. = 1.0) of the bacterium AH 1 and 0.2 ml of 1% Na-acetate solution are mixed in the plastic centrifuge tube. The mixture is incubated for 90 min. at 30°C, the cells in it is eliminated by means of centrifugation, and the nitrite concentration of the supernatant fluid is measured according to the ordinary method.

2. Nitrates present in sea water can be determined by this method, even in low concentrations such as 0.1~10 N $\mu\text{g at./l.}$

海水中における硝酸(塩)の定量法には、従来、海水中に多量に存在する塩類に阻害されない方法として、還元ストリキニン法^{1,2)}、ストリキニデン法^{3,4)}、デフェニルベンジデン法⁵⁾、ヒドラジン還元法^{6,7)}などがみられる。しかし、これらの方法はいずれもあまり鋭敏でなく硝酸塩が極く微量の場合には定量できない。また、反応液の温度、水素イオン濃度、その他の諸条件により影響をうけやすいなど多くの欠点がある。

したがって、本報では海洋性硝酸還元細菌を用いて海水中の硝酸を還元させ、生成した亜硝酸を測定して、海水中に極めて微量に存在する硝酸を定量する方法を試みた。

なお、このように硝酸還元細菌を用いて硝酸を定量する方法は、最初、GARNER ら⁸⁾ によつて試みられ、HILL ら⁹⁾ によつて改良が加えられたが、同氏らの方法は家畜の飼料や組織液中の硝酸の定量を目的としたものであり、また反応液中には growing cell の状態で培養液そのまゝが加えられているため、測定範囲がかなり高濃度(2~200 KNO₃ mg/l)にある。このため、同氏らの方法ではきわめて微量に存在している海水や淡水中の硝酸の定量には適さない。

本文に入るに先立ち、御懇切なる御指導および御校閲をいただいた京都大学農学部木俣正夫教授に深く感謝する。

* 京都大学農学部水産学教室 (Dept. Fish, Fac. Agr., Kyoto Univ., Maizuru, Japan)

実験方法

供試菌 海洋性硝酸還元細菌 AH1* を用いた。この細菌は数十種の淡水性および海洋性細菌から選んだもので、硝酸を亜硝酸に還元するが、亜硝酸を還元せず、またその cell suspension は比較的小量の水素供与体（酢酸ナトリウム）を加えるだけで、海水中のきわめて微量の硝酸をほとんど 100 % 亜硝酸に還元する。

なお、細菌の保存培養は、寒天斜面培養基に接種して 25°C で培養を行ない、2 週間毎に新しい培養基に植えかえて保存する。この場合の培養基は ZoBELL の 2216⁽⁹⁾ と同様のもの（硝酸塩を添加）を用いる。

培養基および培養法 細菌の多量培養を行なう場合の培養基はつぎのようにして調製する。海水 1 l に対しペプトン 5 g、硫酸第 1 鉄 0.05 g、第 1 磷酸カリウム 0.05 g、硝酸カリウム 0.3 g を加え、さらにフェノールレッドの微量と 50 % 炭酸カリウム溶液数滴を加えて溶液の色を橙色とする。この溶液を 15×150 mm の試験管に 6 ml、および 1 l 容の三角フラスコに 800 ml を入れ、15 ポンドで 15 分間高圧滅菌をする。また細菌の培養はつぎのようにして行なう。すなわち、試験管に調製した培養基に、前記保存培養の一部を白金線で接種し、30°C で 24 時間静置培養を行なつた後、この培養液の 3 ml を 1 l 容の三角フラスコに調製した前記培養基に接種し、ふたたび 30°C で 24 時間静置培養する。

Cell suspension の調製 前記の培養液を 8,000 g、30 分間の遠心分離（富永製遠心器、ローター No. 9 使用）により集菌し、得られた菌体を 50 ml の硝酸塩を含まない海水中に suspend し、ふたたび 8,000 g、10 分間の遠心分離を行なつて集菌する。この操作を 2~3 回くり返して菌体の洗浄を行ない、洗浄液中に亜硝酸の存在が認められなくなった後、ふたたび菌体を適量の、硝酸塩を含まない海水中に suspend し、吸光度 O. D. を 1.0 に調整する（ライツ光電比色計、A フィルター使用）。この cell suspension はそのまま定量に用いるか、または -20°C 前後で凍結して保存し、使用直前に解凍したものを用いる（凍結期間は 2 週間以内とする）。

器具の洗浄 使用器具はすべて器壁に微量の硝酸が残存付着しないように十分注意深く洗浄しなければならないが、特に反応に用いるプラスチック製のセントリチューブは蒸留水をチューブ内一ぱいに満たして一昼夜放置し、後蒸留水を捨て、水を十分切り、よく乾燥したものを用いる。

測定操作 まず試水中の細菌その他の particulate matter を除くために、試水を低温（+2°C 前後）のもとで、8,000 g、10 分間の遠心分離を行ない、その上澄液をとる。つぎに、この上澄液の 5.0 ml をプラスチック製のセントリチューブ（15×100 mm）に入れ、これに 1 % の酢酸ナトリウム溶液 0.2 ml と、前記の cell suspension 0.5 ml を加え、チューブをよく振つてこれらの液をよく混合した後、30°C で 90 分間反応させる。反応後、チューブをとり出し、10,000 g で 5 分間の遠心分離（富永製ローター No. 2 使用）して菌体を集め、チューブを傾けて菌体が混じらないように注意深く上澄液を試験管（15×105 mm）に移す。これにグリース・ロミン試薬を 0.05 g 加えて発色させ、30 分間放置した後、1 cm の cuvette を用いて、535 mμ における吸光度を測定する。また、試水の代りに硝酸を含まない海水を用いて同様の操作を行ない、得られた値を control とする。この値を先に得られた値から差引き、別に作製した検量曲線を用いて硝酸量を求める。

なお、試水中に最初から亜硝酸が含まれている場合には、常法にしたがつてこの亜硝酸量を求め、この値を先に得られた値から差引いて真の硝酸量とする。

実験結果

亜硝酸生成量の経時的変化 海水中に硝酸カリウムを 5 μM (5 N μg at./l) および 10 μM 添加したものを試水として用い、反応時間の経過に伴う亜硝酸生成量の変化をしらべた。得られた結果は Fig. 1 に示すとおりで、亜硝酸の生成量は 1 時間前後でほとんど最大に達し、それ以後は亜硝酸の生成がほとんどみら

* 同定中である。

Fig. 1. Reduction of nitrate to nitrite by the marine nitrate reducing bacterium AH 1.

れなくなる。硝酸カリウムの代りに、亜硝酸カリウムを $10 \mu\text{M}$ 加えた試水について同様の操作を行ない、検討を加えたところ、本法では加えた硝酸のほとんど 100 % が約 1 時間で亜硝酸に還元されることがわかった。

検量曲線の作成と測定範囲について 海水中に硝酸カリウムを種々の濃度に添加して硝酸カリウムの標準液列を調製し、これらについて測定した結果、添加した硝酸量と吸光度（生成した亜硝酸量）との関係は Fig. 2 に示すとおりで、両者の間にはほとんど直線的な関係がみられる。また測定範囲は $0.1 \sim 10 \text{ N } \mu\text{g at./l}$ であり、きわめて微量の硝酸を測定しうることがわかる。

Fig. 2. Standard curve of ammonia determined by the present method using the marine nitrate reducing bacterium AH1. Karium nitrate was dissolved in nitrate free sea water.

考 察

この方法によれば上述のように海水中に存在するきわめて微量の硝酸を定量することができる。したがって、従来非常に困難とされていた、200 m 以浅の、硝酸含量のきわめて少ない海水中的硝酸の定量法としてこの方法は非常に好適であると思われる。なお現在菌体の長期保存法について研究中である。

要 約

海洋性硝酸還元細菌 AH1 を用いて、海水中に微量に存在する硝酸（塩）を $0.1 \text{ N } \mu\text{g at./l}$ まで測定し得る新しい硝酸の微量定量法を考案した。

文 献

- 1) 日本海洋学会編：海洋観測指針，167 (1955).
- 2) R. FUKAI: *Jour. Oceanog. Soc. Jap.*, **11**, 19~23 (1955).
- 3) B. M. G. ZWICKER and R. J. ROBINSON: *J. Mar. Res.*, **5**, 214~232 (1944).
- 4) E. MARVIN: *ibid.*, **14**, 79~87 (1955).
- 5) W. R. G. ATKINS: *Jour. Conseil*, **20**, 153~155 (1954).
- 6) J. B. MULLIN and J. P. RILEY: *Anal. Chim. Acta*, **12**, 464~480. (1955).
- 7) J. D. H. STRICKLAND and T. R. PARSONS: *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, **125**, 61~69 (1960).
- 8) G. B. GARNER, J. S. BAUMSTARK, M. E. MUHRER, and W. H. PFANDER: *Anal. Chem.*, **28**, 1589~1591 (1956).
- 9) R. M. HILL, H. PIVNICK, W. E. ENGELHARD, and M. BOGARD: *Agric. Food Chem.*, **7**, 261~264 (1959).
- 10) C. E. ZOBELL: "Marine Microbiology", p. 41, Chromica Botanica Company, Waltham (1946).