

アセチレンブロック法による脱窒量測定法の検討

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	佐藤, 立夫 関根, 靖彦 和田, 秀徳
巻/号	59巻6号
掲載ページ	p. 557-562
発行年月	1988年12月

アセチレンブロック法による脱窒量測定法の検討*

佐藤立夫**・関根靖彦***・和田秀徳**

キーワード 脱窒の測定, アセチレンブロック法, 汚水処理, 脱窒菌

1. 緒言

還元状態の発達した場(湛水土壤など)に硝酸塩が加えられた場合, 硝酸態窒素は①脱窒によって失われる, ②微生物によって同化される, ③異化的に還元されてアンモニアになる等の運命をたどる¹⁾。この事実は脱窒が従来考えられていたよりも多くの要因に規制されていることを意味している。したがって脱窒に関与している多数の要因を解析するには, まず, 脱窒を迅速・正確に, しかも24時間程度継続的に測定する実験方法を確立する必要がある。

ところで, 脱窒を調べるために最も簡便かつ有効な方法としてはアセチレンブロック法が知られている。このアセチレンブロック法を土壤の脱窒能の測定に適用する試みは, これまでにもいくつか報告されている²⁻⁴⁾。それらのなかで福士・陽⁴⁾の方法が著者らの目的に最も適していると考えられた。しかし福士・陽の方法はあまり簡便ではない。また, アセチレンが脱窒以外の生化学反応に及ぼす影響も検討されていない。そこで, これらの点を検討し, 簡便な脱窒測定法を確立することにした。

2. 供試土壤, 活性汚泥および菌株

1) 供試土壤

供試土壤の性質を第1表に示した。これらの土壤はいずれも水田の落水期に採取した。鴻巣土壤は風乾して2mmにふるって保存し, 田無土壤は風乾せずに, 2mmにふるってそのまま冷蔵保存した。

2) 供試活性汚泥

神奈川県相模川流域下水道四之宮管理センターより採取した余剰汚泥を室温で保存し, 使用前に以下の方法

* 湛水土壤中における脱窒と異化的硝酸還元(第1報)
本研究の概要は昭和62年度日本土壤肥科学会北海道大会および昭和63年度神戸大会において発表した。

** 東京大学農学部(113 東京都文京区弥生 1-1-1)

*** 同上(現在, 東京大学応用微生物研究所 113 東京都文京区弥生 1-1-1)

昭和63年6月10日受理

日本土壤肥科学雑誌 第59巻 第6号 p.557~562 (1988)

で前培養した。

人工汚水(硝酸ナトリウム 607mg, Difco 社製の Bacto Nutrient Broth 53.3 mg, リン酸一カリウム 2mg, 水道水 1 l)に沈降させた活性汚泥を 10 ml (1%) とグルコース 1g を加え, 25°C で1週間静置した。この上澄をイオンクロマトグラフィーで分析し, 硝酸および亜硝酸が残っていないことを確認して実験に供した。

3) 供試菌株

供試菌株を第2表に示した。これらはすべて東京大学応用微生物研究所有用菌株保存施設より分譲を受けた。

3. 実験方法の概要

1) 培養容器および密封法

先に著者ら⁵⁾が確立した方法に準じて試料を培養容器内に密封した。すなわち試料が土壤あるいは活性汚泥の場合には三角フラスコを, 試料が微生物の場合には綿栓を施した試験管を用い, 試料を入れたそれぞれの容器を二重ゴム栓で密封した。容器内の気相をアルゴンまたはアセチレン約10%を含むアルゴンで置換した後, 培養3日以内の場合には注射針跡にボンドを塗り, それ以上の培養日数の場合にはリン酸をしみ込ませた濾紙を二重ゴム栓上にのせ, サランラップで覆った。

2) 土壤の保温静置法

30~50ml 容三角フラスコに乾土1~3.5g 相当量の土壤を入れ, 硝酸ナトリウムやグルコースを目的量含む水溶液を0.5~9ml 加えた。三角フラスコを密封後容器内の気相をガス置換し, 30°C で保温静置した。各実験ごとに, 同一条件での保温静置の連数を多くし, 亜酸化窒素以外の種々の分析も実施できるようにした。

3) 活性汚泥添加汚水の保温静置法

人工汚水を30ml 容三角フラスコに5ml 入れ, 50% 活性汚泥を10μl 加えた(現場で通常行われている, 1% 汚泥を汚水の10% 添加する場合と同じ比率)。三角フラスコを密封した後ガス置換し, 30°C で保温静置した。

4) 微生物の純粋培養法

Difco 社製の Bacto Nutrient Broth に硝酸カリウム

第 1 表 供試土壌の性質

土 壤 名	土 壤 群	土 性	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	水 分		最大含水量 (%)	全炭素 (%)	全窒素 (%)	
					湿潤土	風乾土				
鴻巣NF*	水田作土層	灰色低地土	CL	6.3	5.1	29.0	2.04	57	2.1	0.19
鴻巣IF**	水田作土層	灰色低地土	CL	5.5	4.6	28.8	2.75	52	2.7	0.24
田無***	水田作土層	黒ボク土	L	6.3	5.6	38.5	—	106	4.0	0.27
田無***	水田心土層	黒ボク土	L	6.2	5.8	52.0	—	89	1.6	0.11
田無***	畑作土層	黒ボク土	L	6.2	5.6	35.3	—	87	3.0	0.21
田無***	畑心土層	黒ボク土	L	6.1	5.8	54.8	—	91	1.0	0.072

* 旧農林水産省農業センター鴻巣試験地長期肥料連用水田無肥料区。

** 同無機質肥料区。

*** 東京大学農学部付属農場多摩農場(東京都田無市)。

第 2 表 供試菌 株

学 名	菌 株
<i>Paracoccus denitrificans</i>	IAM 12479
<i>Escherichia coli</i>	IAM 12119
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IAM 1514
<i>Erwinia carotovora</i> *	IAM 12633

* *E. carotovora* subsp. *carotovora*。

第 3 表 保温静置した土壌の分析項目および分析法

分析項目	抽出液	分析 方 法
硝酸態窒素	水	イオンクロマトグラフィー
亜硝酸態窒素	水	イオンクロマトグラフィー
アンモニア	10% KCl 溶液	水蒸気蒸留, 滴定
グルコース	水	アンスロン法
第 一 鉄	pH2.8 酢酸緩衝液	o-フェナントロリンによる 比色法
二価マンガン	10% KCl 溶液	原子吸光法

0.1% を加え, 18×150mm の試験管に 2~10ml 入れて綿栓を施して滅菌後, あらかじめ同じ培地で前培養した微生物の培養液を 5% 接種した。綿栓を中に押し込んだ後, 密封, ガス置換して 30°C で保温静置した。

5) 分析 方 法

いずれの試料の場合も気相をガスクロマトグラフィー(島津製作所製 GC-3BT, カラムは Porapak Q 50-80 mesh を充填した 2m のステンレスカラム, 検出器は TCD, 導入部, カラム, 検出部とも温度は 50°C) で分析した。

ガス分析終了後, 培養容器内の試料を他の分析に供した。試料が土壌の場合の分析項目, 分析法は第 3 表のとおりである。試料が活性汚泥を加えた污水や微生物を培養した培地の場合には, イオンクロマトグラフィーによって硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の分析のみを行った。

4. 実験結果および考察

1) 保温静置における土壌と水との比率

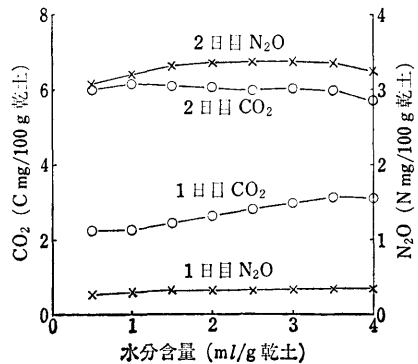
富士・陽⁴⁾ は最大含水量の 120% の水分で, アセチレンブロックの効果が十分に認められると述べている。しかし, 実験の目的によっては, 120% よりも高い水分含量で保温静置することがあるので, 水分量をさらに増加させた場合についても検討した。

30ml 容三角フラスコに乾土 1g 相当量の鴻巣土壌無肥料区風乾土を取り, 硝酸態窒素 0.1mg 相当量の硝酸ナトリウムと蒸留水 0.5ml (最大含水量の 88.3% に相当)~4ml (同 706.7%) を加えた。これを密封後, 気相をアセチレン約 10% を含むアルゴンで置換し, 保温静置した。

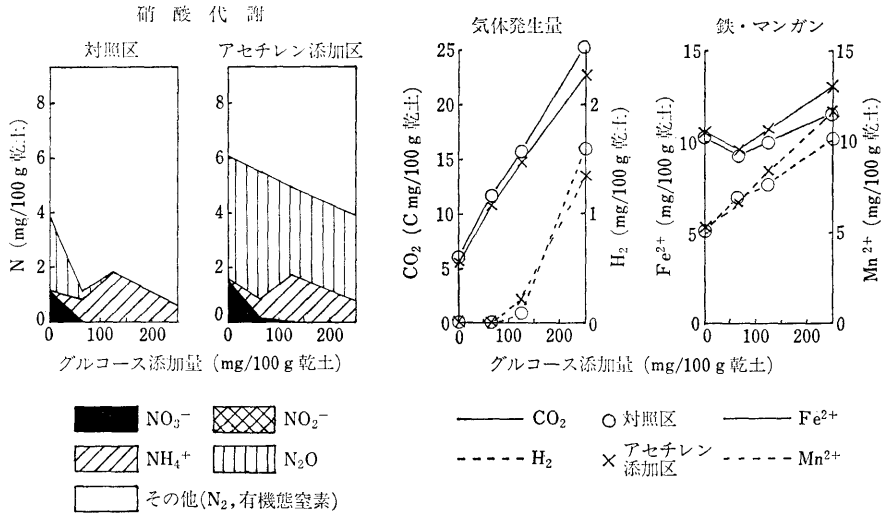
保温静置開始 1 日後, 2 日後における気相の分析結果を第 1 図に示した。この図から明らかなように本実験条件では水分を最大含水量の数倍にしても, アセチレンブロックの効果が十分に認められた。

2) 各種生化学反応に及ぼすアセチレンの影響 (1)

畑状態土壌ではアセチレンは硝化などの生化学反応を阻害するので, アセチレンブロック法は脱窒を必ずしも



第 1 図 土壌と水との比率の検討



第2図 アセチレンが湛水土壤中の各種生化学反応に及ぼす影響(風乾土)
 グルコースは両区ともすべての添加量についてほぼ完全に消失していた。

正しく測定していないといわれている⁶⁾。そこで湛水土壤中で行われている主要な生化学反応がアセチレンの存在下でどのような影響を受けるかを検討した。

50ml 容三角フラスコに乾土 3.5g 相当量の鴻巣土壤無機質肥料区の風乾土を取り、それに乾土 100g 当たり硝酸態窒素 9.3g 相当量の硝酸ナトリウム、乾土 100g 当たり 0~250 mg のグルコース、蒸留水 9ml をそれぞれ加えた。これを 1) と同様に密封し、保温静置した。

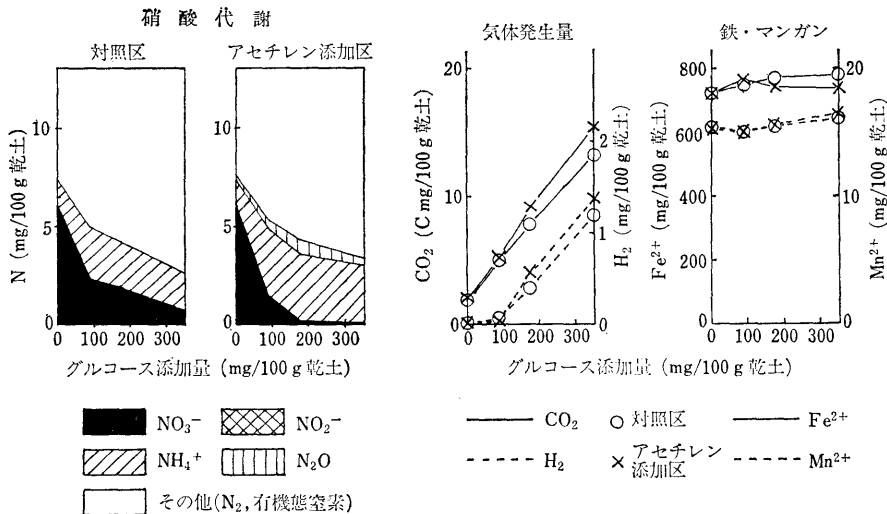
実験結果を第2図に示した。この図から、アセチレン

は湛水土壤中のさまざまな代謝にほとんど影響を与えず、亜酸化窒素還元のみを抑える(そのために亜酸化窒素を電子受容体とする分の二酸化炭素発生量も減少する)ことを読み取ることができる。

3) 各種生化学反応に及ぼすアセチレンの影響(2)

2) では風乾土を供したが、この実験では還元状態が十分に発達した土壤を実験に供した。

鴻巣土壤無機質肥料区の風乾土 100g を 200ml 容ビーカーに取り、湛水し、30℃ で 153 日間保温静置した。こ



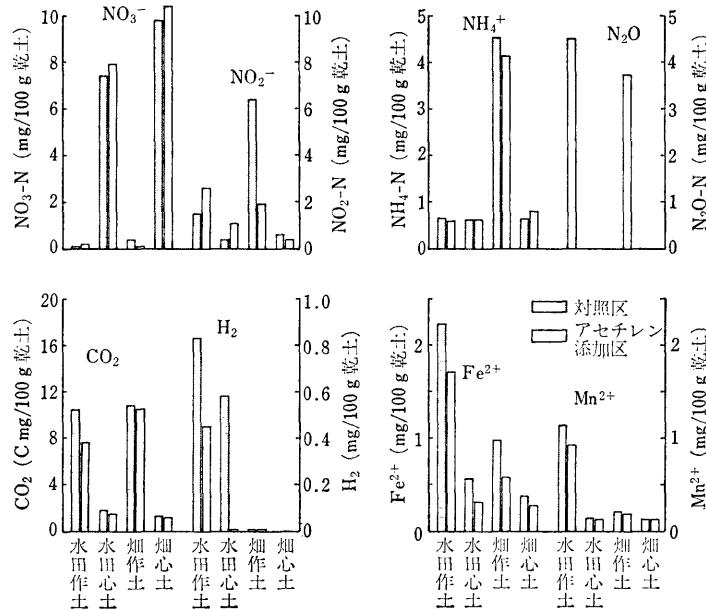
第3図 アセチレンが湛水土壤中の各種生化学反応に及ぼす影響(湿潤土)
 グルコースは両区ともすべての添加量についてほぼ完全に消失していた。

の土壤の還元層（酸化還元電位は -222mV ）のみを取り、実験に供した。この土壤（以下湿潤土と呼ぶ）の乾土 2.5g 相当量を 50ml 容三角フラスコに取り、硝酸ナトリウム（乾土 100g 当たり 13mg の硝酸態窒素相当量）、グルコース（乾土 100g 当たり $0\sim 355\text{mg}$ ）、蒸留水 7ml （最大容水量の 530% ）を加えた。

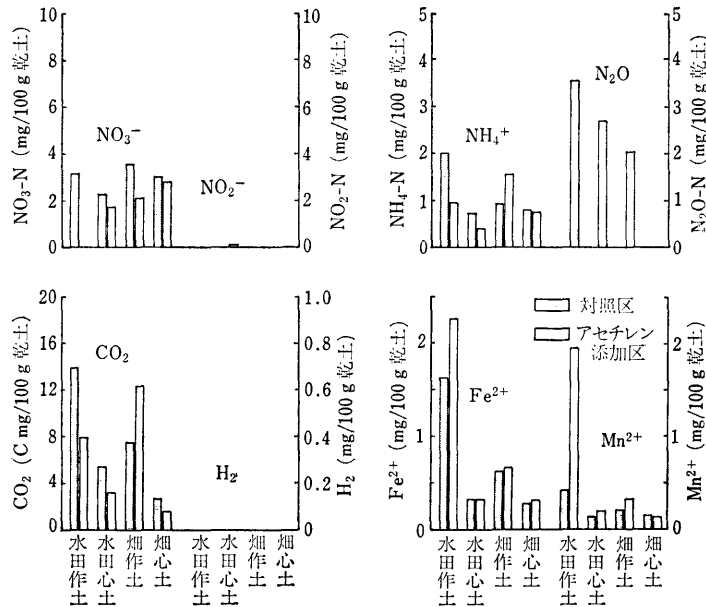
分析結果を第 3 図に示した。湿潤土を用いた場合にも亜酸化窒素還元以外の生化学反応に及ぼすアセチレンの影響は問題にならない。

4) 黒ボク土への応用

1)~3) では沖積土に由来する水田土壤（鴻巣土壤）を対象としてきた。本実験ではこれと性格が著しく異なる



第 4 図 アセチレンが黒ボク土中の各種生化学反応に及ぼす影響（1日目）



第 5 図 アセチレンが黒ボク土中の各種生化学反応に及ぼす影響（7日目）

火山灰性黒ボク土を対象として同様の検討を加えた。

30ml 容三角フラスコに各種の田無土壌乾土 1g 相当量、硝酸態窒素 0.1 mg 相当量の硝酸ナトリウム（乾土 100g 当たり 10 mg）、蒸留水 5ml をそれぞれ加えた。それにグルコースを 2 mg（乾土 100g 当たり 200 mg）添加し、30℃ で 24 時間保温静置して、アセチレンの影響を調べた結果を第 4 図に示した。また、グルコースを添加しないで 7 日間保温静置した結果を第 5 図に示した。

第 4 図から、24 時間の保温静置ではアセチレンは土壌中の各種生化学反応に対してほとんど影響を与えないと判断できた。一方、第 5 図から 7 日間の保温静置ではアセチレンの存在がさまざまな生化学反応に影響を及ぼすと考えられた。

以上の検討によって、著者らが採用した実験法を用いて、湛水土壤中で進行する脱窒を 24 時間程度までは迅速・正確に追跡できると考えられた。

5) 活性汚泥を加えた汚水への応用

1)~4) で検討してきた実験法を活性汚泥法による汚水処理の脱窒の評価に用いることを検討した。

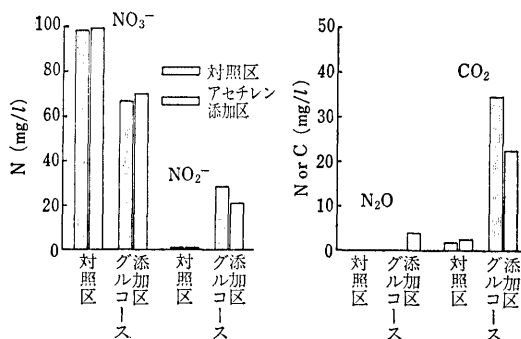
人工汚水に活性汚泥のみを加えた対照区のほかに、脱窒の基質としてグルコース 0.1% を加えた区を設けた。

分析結果を第 6 図に示した。対照区ではほとんど脱窒が進まなかったが、グルコース添加区では脱窒が進行した。アセチレンは微生物活動に対して若干阻害的に働いているようであるが、相対的な脱窒活性を調べる実験には十分応用できると考えられた。

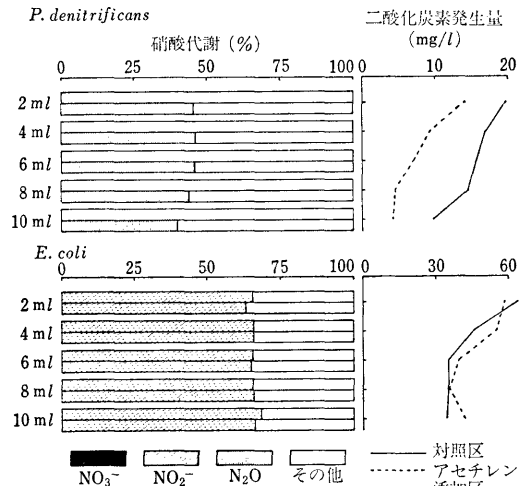
6) 微生物の純粋培養系への応用

著者らの実験法を個々の微生物の脱窒の評価に応用する際の問題点を検討した。

(1) 培地の量：試験管に培地を 2~10ml 入れて微生物を接種し、培養・分析した。微生物は脱窒能のある *Paracoccus denitrificans* と、硝酸を亜硝酸にまで還元



第 6 図 活性汚泥添加汚水に及ぼすアセチレンの影響



第 7 図 培地の量の検討

それぞれの培地の量について上のグラフが対照区、下のグラフがアセチレン添加区。

する *Escherichia coli* を用いた。

分析結果を第 7 図に示した。いずれの菌の場合も硝酸は完全に消失していた。

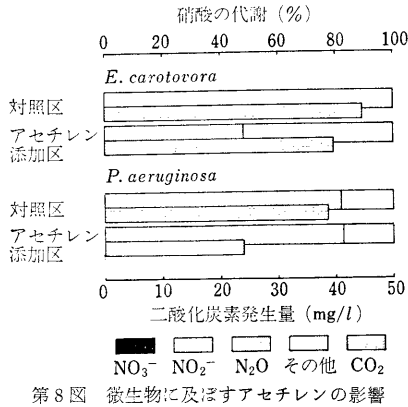
P. denitrificans の場合、培地の量が 8ml 以上になると亜酸化窒素の蓄積量が減少した。これはアセチレンブロックの効果が不十分になったためと考えられた。また、培地に溶存する二酸化炭素の量は培地の pH のわずかな変化で大きく変動するはずなので、培地の液量が多くなると、気相の二酸化炭素の量の測定値により有機物分解量を正確に評価することはできない。しかし、アセチレンの添加によって二酸化炭素発生量が少なくなる傾向は認められた。これは、アセチレンが存在すると脱窒が亜酸化窒素までしか進行しないので、亜酸化窒素を電子受容体とする分の二酸化炭素発生量が少なくなるためと考えられた。

E. coli の場合、各種生化学反応に及ぼすアセチレンの影響は、培地の量によらずまったくみられなかった。

以上の実験結果に基づいて、以後の実験においては培地の量は 5ml とすることにした。

(2) その他の微生物株について：前項で用いた 2 株のほか、数種の菌についてもアセチレンの影響を検討した。脱窒能のある *Pseudomonas aeruginosa*、硝酸を亜硝酸にまで還元する *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (根菜類等に広く寄生する植物病原菌) を用いた。

実験結果を第 8 図に示した。前者の場合アセチレン添加区では二酸化炭素発生量が少なくなること、後者の場



第 8 図 微生物に及ぼすアセチレンの影響

第 4 表 供試菌株の硝酸代謝

菌 株	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ →N ₂ O	N ₂ O→N ₂
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+
<i>E. carotovora</i>	+	-	-

合ほとんど影響がないことは前項の実験と同様であった。

上述の結果は本実験法が個々の微生物の硝酸代謝を迅速・正確に評価できることを示している。第 8 図の分析結果から、これら 2 菌株の硝酸代謝は第 4 表に示したとおりであることが確認される。

5. 摘 要

著者らの考案した培養方法にアセチレンブロック法を組み合わせて、脱窒を迅速・正確に測定する際の問題点を検討した。

1) 土壤に硝酸塩を加えて 24 時間保温静置した場合、沖積土・黒ボク土ともに、アセチレンは亜酸化窒素還元を阻害する以外には他の生化学反応にほとんど影響を与

えないことが確かめられた。しかし 7 日間培養すると、アセチレンはさまざまな生化学反応に影響を及ぼした。なお、土壤を保温静置する際の水分含量を最大容水量の 7 倍にしても、アセチレンの効果は十分に認められた。

2) 汚水の脱窒も本実験法で評価できた。

3) 個々の微生物の硝酸還元能、亜硝酸還元能、亜酸化窒素還元能を容易に評価することも可能になった。

謝 辞 ガス分析等に関してご指導をいただいた名古屋大学農学部助教木村真人博士、菌株を分譲していただいた東京大学応用微生物研究所有用菌株保存施設の方々、活性汚泥を採取させていただいた相模川流域下水道四之宮管理センターの方々、その際ご便宜いただいた神奈川県肥飼料研究所所長松崎敏英氏に感謝します。

文 献

- 久馬一剛・庄子貞雄・鍛塚昭三・服部 勉・和田光史・加藤芳朗・和田秀徳・大羽 裕・岡島秀夫・高井康雄：新土壤学，p.63~64，朝倉書店，東京（1984）
- YOSHINARI, T., HYNES, R. and KNOWLES, R.: Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 177~183 (1977)
- SMITH, M.S., FIRESTONE, M.K. and TIEDJE, J.M.: The acetylene inhibition method for short-term measurement of soil denitrification and its evaluation using nitrogen-13. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **42**, 611~615 (1978)
- 福土定雄・陽 捷行：土壤の脱窒の測定法の修正，土肥誌，**54**，9~14 (1983)
- 佐藤立夫・和田秀徳：二重ゴム栓によるガス代謝測定系の密閉法，同上，**59**，306~307 (1988)
- PAGE, A. L., MILLER, R. H. and KEENEY, D. R.: Method of soil analysis, part 2, Chemical and microbiological properties, 2nd ed., p.1021, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (1982)

Development of Simple and Reliable Methods to Measure Denitrification

Ritsuo SATO, Yasuhiko SEKINE and Hidenori WADA

(Fac. Agric., Univ. Tokyo)

In a previous paper, we proposed simple and effective methods of incubating samples (soil, sewage, and microorganisms) in vessels for measuring gas metabolism. In this paper, these methods were combined with the acetylene block technique to easily measure denitrification along with other biochemical reactions in various samples. Several factors (amount of water, incubation period, effects of acetylene on various biochemical reactions, effects of amendments) which might affect denitrification in the new combined systems were examined. On the basis of experimental results, simple and reliable methods of measuring denitrification in various samples were proposed.

Key words acetylene block technique, denitrifiers, measurement of denitrification, sewage

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., **59**, 557-562, 1988)