海洋微生物による無機窒素代謝

(東大農化) 丸山芳治

1. 目的 無機窒素は緑色植物等基礎生産生物の重要な栄養素であるが海洋においては生物生産の制限因子のひとつと考えられている。しかし近年一部の沿岸海域ではその負荷が増大し、赤潮の頻発等富栄養化が問題となってきた。また地球上の窒素循環を考える上でも海洋における無機窒素代謝は重要であるがこの方面の研究は陸上に比し著るしく遅れている。今回は種々の海域から分離した海洋微生物による窒素固定と硝酸還元や脱窒に関する我々の研究を中心に海洋における無機窒素代謝を紹介する。

2. 方法 本実験に使用した菌株は東大海洋研白鳳丸、淡青丸の研究航海の際種々の海域から採取された海水試料、海底土試料、プランクトン試料等から無窒素培地、脱窒菌分離培地等を用いて純粋分離されたものである。これらの菌株につき硝酸窒化試験を行ない、窒素固定活性、脱窒活性、硝酸還元活性を調べた。窒素固定はケルダール法およびアセチレン還元法で、脱窒活性はガスクロマトグラフを用いて測定した。

3. 結果と解説 海洋における無機態窒素存在量は海域、深度、季節等により大きく異なるが一般に硝酸態窒素(NO_3^--N)とアンモニア態窒素(NH_4^+-N)が主なものであり亜硝酸態窒素(NO_2^--N)も少量ではあるが特異な分布を示している。外洋の例として中部太平洋(KH-69-4)と東支那海(KH-71-2)における白鳳丸航海調査結果をあげると NO_3^--N は表層から中底層に在るに従い増加し(0~50 $\mu\text{g}/\text{l}$)、 NO_2^--N は検出限界以下の所が多かったが透光層下部に極大層が見られた(0~1 $\mu\text{g}/\text{l}$)。 NH_4^+-N は10¹ $\mu\text{g}/\text{l}$ のオーダーで前者に比し変動は少ないが測定限界値なので正確ではない。沿岸海域の例として東京湾における調査結果(一都三県公害防止協議会)を引用すると夏期表層で NH_4^+-N が最も多く(100~300 $\mu\text{g}/\text{l}$)、 NO_3^--N が30~90 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、 NO_2^--N は20~30 $\mu\text{g}/\text{l}$ と外洋に比し著るしく高い値を示し、その濃度は1963年から直線的に増加している。東京湾は常時赤潮が見られる過栄養状態にある。赤潮の頻発を防ぐ無機窒素濃度の決定は困難であるが日本水産資源協会による水産環境基準は化学的酸素要求量1 ppm, 無機態窒素0.1 ppm (100 $\mu\text{g N}/\text{l}$)、燐酸態燐0.015 ppm以下とされている。

海洋に加わる窒素化合物は降水、河川水と海洋微生物の窒素固定によるものが主なものであるが、東京湾では河川からの流入負荷が最も大きいと思われる。これらの窒素化合物は代謝され結局脱窒や海底堆積物として失われる。海洋における無機窒素代謝は陸上におけるものとほぼ同様に行われていると考えられるが窒素固定に関しては藍藻トリコデスミウムによるものが知られているだけで生物的窒素固定は陸上に比し重要でないと考えられている。しかし我々の研究では窒素固定菌は海洋にも広く分布し殊に沿岸海域ではこれらの菌による固定量は高く、窒素循環への寄与は無視できないものと思われる。

窒素固定は分子状窒素をアンモニアにする反応であるが、アンモニアは好氣的に硝酸化成細菌により亜硝酸、硝酸に酸化される。近年海洋性アンモニア酸化細菌 *Nitrosocystis oceanus*

シンポジウム (廃液処理)

が分離され、その後種々の硝化細菌についての報告が出されたがその生態、生理、分類については未知の点が多い。硝酸塩は植物プランクトンや微生物に直接吸収されアンモニヤ還元同化される他、ある種の微生物により亜硝酸、さらに酸化窒素、分子状窒素に還元され大気中に失われる。海洋から分離された従属栄養細菌の大部分は硝酸還元能を有しその $\frac{1}{100}$ 程度が脱窒作用を示すようである。脱窒反応は呼吸型硝酸還元であるため嫌氣的条件下でのみ反応が進行し、海洋のような溶存酸素の高い環境では不適と考えられる。しかし中南米沖の東部熱帯太平洋に大規模な低酸素水塊がありここで大量の脱窒がみられ海洋における窒素の収支を支える重要な海域であることがわかった。海洋から分離された脱窒菌として *Pseudomonas* 等が報告されているが脱窒の微生物学的研究は少ない。

我々は種々の海域、試料より無窒素培地、脱窒菌培地を用いて純粋分離した菌株につき硝酸還元能を調べた。263株中206株が硝酸還元能を有していたがこの中には①亜硝酸②亜硝酸とアンモニヤ③アンモニヤを蓄積するものや④何も蓄積しない脱窒菌と思われるもの等種々の性質の菌が認められた。そのうち5株につき窒素固定活性を調べたが酸素の存在下でのみ活性を示したもの、逆に嫌氣的条件下で高い活性を示したもの等がみられた。また7株につき脱窒活性を反応生成物の N_2 と NO 量により測定したが、酸素存在下でも高い活性を示すものが多く、また比較的少量の NO が生成された。一株につき反応の時間的経過を調べると NO は好氣的条件下で、 N_2 は嫌氣的条件下で生成される傾向を示した。このうちの3株に窒素固定と脱窒の両能力が認められたことが特に注目される。これらの菌の生育至適pHは7~9であり、その大部分は Na^+ を要求し3~5% $NaCl$ が最もよく生育した。

無窒素培地を用いて分離した際、比較的多くの酵母状菌が認められたがその海洋性酵母菌についても同様な実験を行なった。50株中28株は硝酸還元能を有し、その3株につき硝酸還元酵素活性を調べるといずれも酸素存在下でのみ適応的に活性を示した。脱窒活性は2株について検討したが嫌氣条件下でのみ活性が認められた。窒素固定能はケルダール法とアセチレン還元法で測定したが数株につき有意義な活性がみられた。これは現在真核生物の窒素固定能の有無が問題になっているため特に興味深い結果である。また1株は脱窒能と窒素固定能を有していた。

まだ予備的な実験であるが海洋には窒素代謝に関して種々興味ある性質を持った微生物が広く分布し、一般の海洋環境条件下で各々その機能を発揮し窒素サイクルに関与していると考えられる。

海洋微生物による脱窒

菌株	脱窒活性 ($\mu\text{mole}/100\text{mg cell/day}$)				
	N_2		NO		
	O_2	$-O_2$	O_2	$-O_2$	$-O_2$
2348	13	9.1	38		38
2189	0.49	0.29	75		33
2167	17	15	38		41
2054	0.00	0.14	66		25
2120	32	57	240		87
2105	2.2	5.2	320		23
11-8	0.40	0.12	150		31