

## 9 8 1 3 海洋性硝化及び脱窒細菌の電気化学的計数法の開発

助成研究者：高山 勝己 (福井工業高等専門学校 物質工学科)  
 共同研究者：小泉 貞之 (福井工業高等専門学校 物質工学科)

## 1 緒言

海洋性の脱窒および硝化細菌は、海水中の窒素成分の循環において極めて重要な役割を果たしている。このような理由で、海洋生態調査の一項目として、脱窒および硝化細菌の分布調査が行われている。一般に、これら両細菌の分布(計数)調査を行う場合、希釈法(MPN法)が用いられることが多い。しかしながら、この方法は操作の過程において、菌体培養行程を含む為に、結果を得るまでに数日を必要とする。我々は、これまで、微生物をバイオカタリストとして用いるメディエーター型の酵素機能電極の作製及び応答特性解析の検討を行ってきた。菌体内の酸化還元酵素-電極間の電子移動をメディエーターを介して行うものであり、菌体濃度と電極応答電流値とは一定の範囲で比例関係にあることも解っている。

## 1) 脱窒菌を対象としたときの測定原理

脱窒菌は硝酸イオンを窒素まで還元する一連の酸化還元酵素系を有している。十分な硝酸イオンと適当なメディエーターが存在する条件下において、電極電位をメディエーターの還元電位に設定しておけば、脱窒菌体濃度に比例した応答電流が得られる。

## 2) 硝化菌を対象としたときの測定原理

硝化菌は亜硝酸イオンを硝酸イオンへ酸化する酸化還元酵素系を有している。十分な亜硝酸イオンと適当なメディエーターが存在する条件下において、電極電位をメディエーターの酸化電位に設定しておけば、硝化菌体濃度に比例した応答電流が得られる。

## 2. 実験

基礎検討を行うための典型的細菌として *Pseudomonas denitrificans* 及び *Nitrobacter winogradskyi* 菌体を選定した。既知濃度のそれぞれの菌体懸濁液をニトロセルロース膜(47 mm i. d., 0.45  $\mu$ m ポアサイズ)上に吸引濾過した。膜の中央部を5 mm i. d. にポンチでくり貫き、それをグラッシーカーボン電極の表面にのせ、さらに透析膜をかぶせ、全体をナイロンネットで固定した。リン酸緩衝液(pH 8)を入れた自作測定セル(容量1 cc)に、菌体固定電極をセットし、窒素ガス通気により除酸素した。メディエーターを添加し、電極を任意の電位に設定した後で、各基質イオンを添加した時の電流応答値をモニターした。

## 3. 結果と考察

脱窒細菌に対しては、メディエーターとしてデュロヒドロキノンが有効であることが解った。メディエーターは測定溶液中に0.5 mM程度溶解させればよく、pH 8、温度30℃において最大応答が得られた。検出限界は膜中にトラップされる菌体数で $10^6$ 個であった。

硝化菌に対しては、メディエーターとしてヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを選択し、脱窒菌と同様の手法により検討したが、十分な応答を得ることができなかった。



## 9 8 1 3 海洋性硝化及び脱窒細菌の電気化学的計数法の開発

助成研究者：高山 勝己（福井工業高等専門学校 物質工学科）

共同研究者：小泉 貞之（福井工業高等専門学校 物質工学科）

## 1. 研究目的

海水中に生息する脱窒細菌並びに硝化細菌は海洋の窒素循環において重要な役割を果たしている。このような理由で、海洋生態調査の一項目として、両細菌の分布調査が行われており、これらの細菌の計数法としては、一般に希釈法（MPN法）が用いられている<sup>1)</sup><sup>2)</sup>。しかしながら、この方法は培養操作を含むので、煩雑でしかも結果を得るのに数日を要する。我々は、これまで、微生物をバイオカタリストとして用いるメディエーター型の酵素機能電極の研究に取り組んできた。この電極は、微生物の種類に依存して任意の基質に応答するものであり、バイオセンサとしての応用が可能である<sup>3-5)</sup>。一方、電極面に固定する菌体量にも応答が比例するので、菌体濃度を測定するためにも用いることができる<sup>6)</sup>。

1) 脱窒菌はその呼吸鎖上に硝酸レダクターゼを有している。十分な硝酸イオンと適当なメディエーターが存在する条件下において、電極電位をメディエーターの還元電位に設定しておけば、脱窒菌体濃度に比例した応答が得られる。この考えに基づいて、脱窒細菌の菌体計数を電気化学的に行うための基礎検討を行った。

2) 硝化細菌は亜硝酸イオンを硝酸イオンへ酸化する酸化還元酵素系を有している。十分な亜硝酸イオンと適当なメディエーターが存在する条件下において、電極電位をメディエーターの酸化電位に設定しておけば、硝化菌体濃度に比例した応答が得られる。この考えに基づいて、硝化細菌の菌体計数を電気化学的に行うための基礎検討を行った。

## 2. 研究方法

研究対象とする菌体に、*Pseudomonas denitrificans* 及び *Nitrobacter winogradskyi* を選定した。濃度既知の菌体懸濁液を、市販の47 mm i. d. 0.45 μmポアサイズのエポキシ膜（アドバンテック製）に吸引濾過した。膜の中央部を5 mm i. d. にポンチでくり貫き、それを6.0 x 3.0 mm グラッシーカーボン電極（BAS製）上にのせ、さらに透析膜をかぶせ、全体をナイロンネットで固定した。リン酸緩衝液（pH 8）をいれた自作セル（内容積1 cc）に、作製した菌体固定電極をセットし、窒素ガス通気により除酸素

した。恒温槽を任意温度に設定し、電極の電位を設定後、メディエーター、基質（硝酸イオンあるいは亜硝酸イオン）の順に添加し、電極応答をモニターし菌体濃度との相関をみた。菌体固定電極および測定装置の概略を図1に示す。

### 3. 研究結果および考察

#### 3-1 脱窒細菌の電気化学的計数法の検討について

脱窒細菌の電気化学的計数法の機構を図2に示す。図の円中は脱窒細菌の呼吸鎖の一部である。メディエーターにデュロヒドロキノン（ $DQH_2$ ）を用いて、菌体呼吸鎖上のユビキノン（ $UQ$ ）に電子を供与させることを考えた。図に示すように、電極- $DQH_2$ -菌体呼吸鎖-硝酸イオンの順に電子移動が起こる。 $DQH_2$ が $UQ$ に電子を与えることで生じるデュロキノン（ $DQ$ ）を電極で還元し、基の $DQH_2$ を再生する。電極の電位は $DQ$ の還元電位以下に設定しておく。図2の推定機構が実際に起こることを、サイクリックボルタメトリーの手法を用いて実証した。図3にその結果を示す。（a）は、 $0.1\text{ mM}$ の $DQH_2$ 存在下での菌体固定電極のサイクリックボルタモグラムである。 $DQH_2$ の酸化還元波が記録されている。（b）はさらに、硝酸イオンを $80\ \mu\text{M}$ 存在させた場合のサイクリックボルタモグラムである。還元波の増大及び酸化波の減少が見られ、これより図2に示した機構で電子移動反応が起こっていることが実証できた。メディエーターとして $DQH_2$ を用いれば、電極から脱窒細菌呼吸鎖に電子を供与できることが解ったので、 $DQH_2$ の最適濃度の検討を行ったところ、 $0.5\text{ mM}$ 以上で十分な応答が得られることが解った（データは示さない）。 $DQH_2$ をはじめとするキノン系化合物は細菌に毒性を示すことも予想されたので、以後実験では必要充分濃度である $0.5\text{ mM}$ を選択することにした。図4はpHの効果を見たものであり、pH8において最大応答が得られることが解った。これは、海水のpHが8付近にあることから理解できる。土壌中の脱窒細菌に対する検討では、最適値はpH7であることがすでにわかっている<sup>5)</sup>。図5は温度に対する検討を行ったものである。 $40^\circ\text{C}$ においても活性を維持しているが、 $40^\circ\text{C}$ で測定を行った後、再度同温度にて測定を行うと初めの活性を失ってしまうことが解った。これは、菌体の一部死滅によるものと考えられる。よって活性の減少が起こらない最適値は $30^\circ\text{C}$ 付近であるといえる。測定対象が海水中に生息する脱窒細菌であるので、塩濃度（食塩）の効果を検討した。海水と同濃度の塩を含む場合と、含まない場合で比較検討したところ、両者に有意の差はみられなかった（データは示さない）。図は最適測定条件下（pH8リン酸緩衝液、 $0.5\text{ mM}$  $DQH_2$ 、 $30^\circ\text{C}$ ）で作成した検量線である。 $10^6$ から $10^9$ 個の範囲で直線性が得られた。横軸の菌体数は、濾過に用いた菌体懸濁液中に含まれていた菌対数を、バクテリア計数盤を用いて計数した値である。なお、 $660\text{ nm}$ における吸光度が1である菌体懸濁液中に含まれる菌対数を、顕微鏡による直接計数法、MPN法、CFU法（コロニー計数法）のそ

れぞれの方法により見積もったところ、それぞれ $3.8 \times 10^9$ 、 $7.9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ の関係が得られた。

### 3-2 硝化細菌の電気化学的計数法の検討について

硝化細菌の電気化学的計数の機構を図7に示す。図の円中は硝化細菌の呼吸鎖の概略を示している。メディエーターにヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを用いて、菌体呼吸鎖上のヘムcレベルで電子を授受させることを考えた。図に示すように、亜硝酸イオン-菌体呼吸鎖-ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム-電極の順に電子移動が起こる。ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムが、呼吸鎖から電子を受け取ることで生じるヘキサシアノ鉄(II)酸カリウムが電極で酸化され、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを再生する。電極の電位はヘキサシアノ鉄(II)酸カリウムの酸化電位以上に設定する。図7の推定機構が実際に起こることを、サイクリックボルタンメトリーの手法を用いて検討したが、明瞭な酸化及び還元波の変化を確認することができなかった。

## 4. 今後の課題

### 4-1 脱窒細菌の電気化学的計数法の検討について

土壌中に比べて、海水中に存在する脱窒菌の数は極めて少ない。比較的多数存在する沿岸域においても1ccあたり100個程度(MPN法による)である。現時点において、本法の実分析への適用を考えた場合、1000cc以上の海水を濾過する必要がある。海水を連続的に濾過することを考えればよいが、より実用化の為には、さらに1ないし2オーダーの電極の感度向上が望まれる。

### 4-2 硝化細菌の電気化学的計数法の検討について

硝化細菌の検討については、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムにかわる最適なメディエーターの候補が見つかっていない状況である。各種メディエーターのもつ特性(溶解度、酸化還元電位等)と硝化菌の各呼吸鎖成分の特性間の関係を再検討する必要がある。

## 文献

- 1) 木俣正夫、河合章、吉田陽一：日水誌、27、593-597 (1961)
- 2) 木俣正夫、吉田陽一、谷口道子：日水誌、34、1114-1117 (1968)
- 3) Takayama, K., Kurosaki, T. and Ikeda, T.: J. Electro. Anal. Chem., 356, 295-301 (1993)
- 4) Takayama, K., Ikeda, T and Nagasawa, T.: Electroanalysis, 8, 765-768 (1996)
- 5) Takayama, K.: Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 45, 67-72 (1998)
- 6) Nishikawa, S., Sasaki, S., Karube, I., Ma-tsunaga, T. and Suzuki, S.: Appl. Environ. Microbiol., 43, 814-818 (1982)

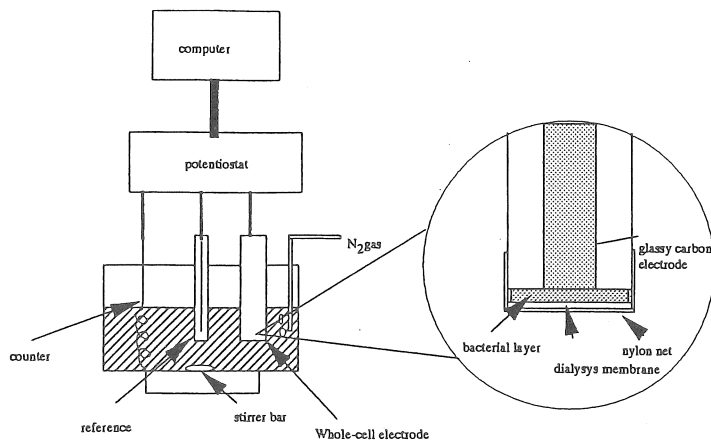


Figure 1 Whole-cell electrode system.

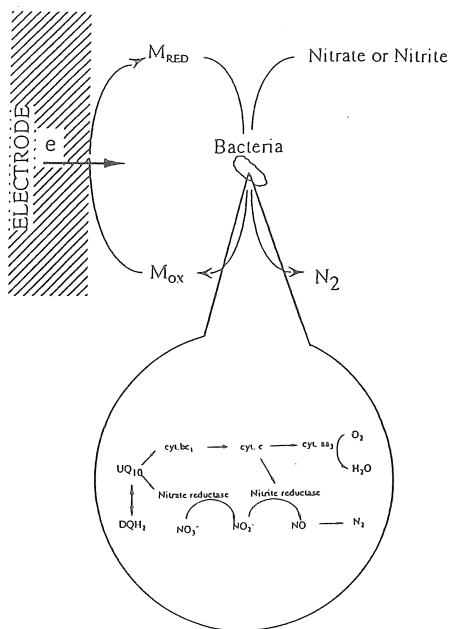


Figure 2 Schematic illustration of the electrocatalytic reduction process at the film-coated *P.denitrificans* modified glassy carbon electrode.

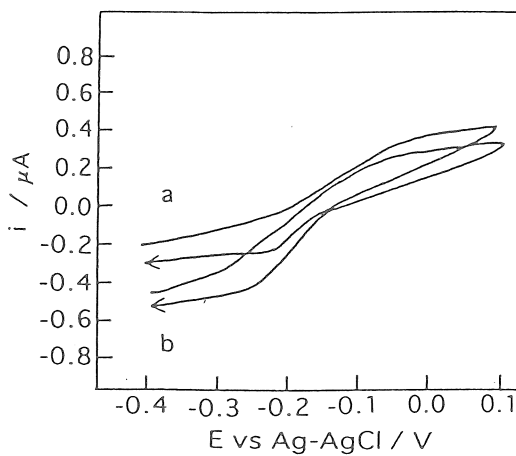


Figure 3 Cyclic voltammograms of 0.1mM DQH<sub>2</sub> in (a) pH7.3 phosphate buffer and (b) the buffer containing 80μM KNO<sub>3</sub>. Scan rate: 1mVs<sup>-1</sup>.

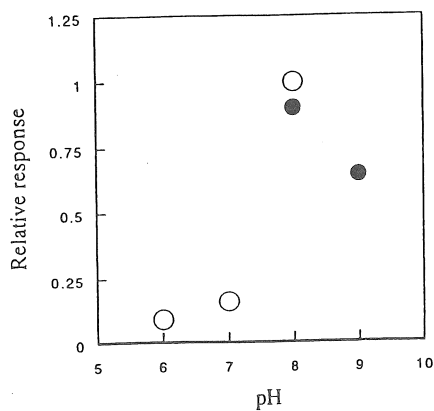


Figure 4 Effect of pH on current response.

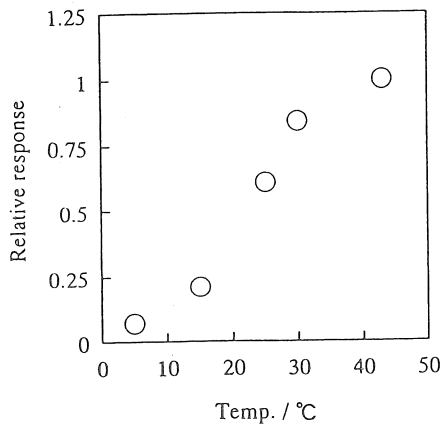


Figure 5 Effect of temperature on current response.

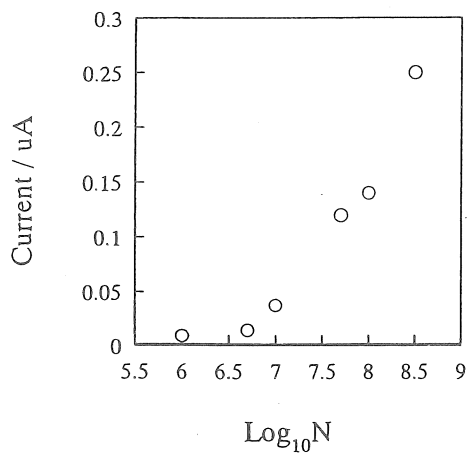


Figure 6 Calibration curve of a *P.denitrificans*

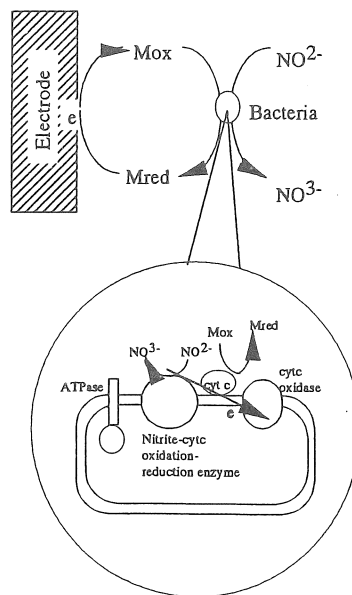


Figure 7 Schematic illustration of the electrocatalytic oxidation process at the film-coated *N. winogradskyi* immmodified glassy carbon electrode.



## Electrochemical counting method of the Marine Nitrifying and Denitrifying Bacteria

Katsumi Takayama and Sadayuki Koizumi

(Department of Chemistry & Biology Engineering Fukui National College of  
Technology, Geshi, Sabaе, Fukui, 916-8507, Japan)

### Summary

The counting method of marine denitrifying bacteria was developed on the basis of the whole-cell enzyme modified electrode. Measurement were carried out by using ordinary three electrode electrochemistry system. The bacteria were trapped on the nitrocellulose membrane, then a part of the membrane was putted onto the surface of the graphite electrode. The electrode surface was covered with a dialysis membrane and a nylon net to give it physical strength. The geometrical surface area of the whole-cell electrode was  $0.09\text{cm}^2$ . For example, the principle of denitrifying bacteria number determination is based on sensing a redox dye oxidized by the microorganisms in the presence of a final electron acceptor such as nitrate and nitrite ion. Durohydroquinone was selected as a redox dye, mediator, for denitrifying bacteria counting system. The electrode potential was set at  $-0.4\text{V}(\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl})$ . The steady-state current was obtained within 60 to 120s, and the current magnitude was proportional to the cell populations above  $10^6$  cells/ml. For marine nitrifying bacteria, hexacyanoferrite (III),  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , was used as a mediator. In this case, the electrode potential was set at  $+0.5\text{V}(\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl})$ . Unfortunately, the current response of the electrode was not enough. Therefore, additional study have to be done to develop a practical nitrifying bacteria counting system.