テトラゾリウム塩還元法を応用した硝化細菌の検出方法の検討

岡 部 聡* 境 一 澄** 渡 辺 義 公*

A Rapid Detection Method of Nitrifying Bacteria Using an INT Dehydrogenase Assay

Satoshi OKABE*, Kazumi SAKAI** and Yoshimasa WATANABE*

* Department of Urban and Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University, North 13, West 8, Kita-ku, Sapporo 060-0813 Japan

** FUJI Electronic Co., Ltd., Public System Division, No. 1, Fuji-machi, Hino, Tokyo 191-0064 Japan

Abstract

A new enumeration method for nitrifying bacteria was developed using the 2-(*p*-indophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) dehydrogenase assay with specific inhibitors for ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. This technique was firstly applied to artificial mixed cultures of *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi* and *Pseudomonas fluorescens* and then to environmental mixed culture samples to evaluate the validity and sensitivity of this method. Detection efficiency of nitrifying bacteria by this method was more than 1 order of magnitude and 1~2 orders of magnitude higher than that of the most probable number (MPN) method for the pure culture samples and environmental mixed culture samples, respectively. Since the INT dehydrogenase assay counts only metabolically active bacteria, the numbers of NH_4^- and NO_2^- -oxidizing bacteria determined by this method were directly proportional to ammonia and nitrite oxidation rates. Furthermore, this INT dehydrogenase method was applied to biofilm samples for *in situ* identification of nitrifying bacteria. Fractions of nitrifying bacteria in the biofilm were more than 1-3 orders of magnitude higher than those determined by the MPN method, whereas the fractions were comparable with those determined by the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Therefore, it could be summarized that this newly developed INT dehydrogenase method was more rapid, sensitive and reliable over the conventional MPN method for environmental samples and could be applied for *in situ* identification of nitrifying bacteria in biofilms.

Key words: INT dehydrogenase assay, nitrifying biofilm, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes

1. はじめに

硝化細菌によるアンモニア性窒素の硝化は廃水処理において重要なプロセスである。しかし、硝化細菌はほとんどが独立栄養性細菌であり、増殖速度がきわめて遅く、pH、水温、有機物負荷等の影響を受け易い。また、廃水処理に用いられる生物膜は多種多様の微生物から構成されており、硝化細菌はしばしば溶存酸素と生物膜内の空間をめぐる微生物間の競合に敗れ、十分な菌体密度を生物膜内で保持出来ない¹⁾。特に生物膜表層では、増殖速度の速い他栄養性細菌等が優占的に増殖し、生物膜底層に位置する硝化細菌に対し、アンモニアおよび溶存酸素の輸送抵抗として働き、その結果、硝化効率は低下す

る¹⁾。このことは、生物膜内の硝化細菌の菌体密度、活性およびそれらの空間的分布が、硝化効率を決定する重要な要因であることを示唆している。故に、反応槽内および生物膜内の硝化細菌のポピュレーションダイナミクスを迅速に測定することは、処理効率の向上および安定化のために必要不可欠である。また土壌や湖沼等の環境生態系における自然浄化機能としての硝化反応を評価する上でも、その重要性は高いと思われる。

現在、硝化細菌の計数には、主に最確値法(MPN法)²⁾や平板計数法(plate count法)³⁾が用いられているが、操作が煩雑でありしかも硝化細菌の増殖速度がきわめて遅いため、長期間の培養日数(4~8週間程度)を必要とする。更に、培地の選択性や培養条件および菌体の分散

* 北海道大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 〒060-0813 札幌市北区北13条西8丁目

** 富士電機株式会社公共システム事業部 〒191-0064 東京都日野市富士町1番地

効率に大きく影響を受けるため、一般的に計数効率は低い⁴⁾。更に培養を基本とする最確値法等では、生物膜内における *in situ* での硝化細菌の検出は不可能である。これらの問題を回避する方法として蛍光抗原-抗体法^{5,6)}や蛍光遺伝子プローブ法⁷⁻¹¹⁾が開発され、生物膜や活性汚泥内の生態学的構造が徐々に解明されつつある。しかしながら、蛍光抗体法では硝化細菌の血清の多様性や細胞外ポリマー等への非特異的結合など、蛍光遺伝子プローブ法では細菌の増殖速度(代謝活性)とリボゾーム RNA (rRNA) 含有率との関係、プローブの標的位置への到達率の向上、試料の自家蛍光など、解決されなければならない問題も多く残されている。これらの方法は非常に有効な硝化細菌の検出方法であるが、高度な技術と熟練を要し、現段階では適用の範囲が限られている。

そこで、本研究では生菌(代謝活性を有する細菌)を識別する方法として用いられている2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT)還元法¹²⁾を応用した、簡便で迅速なアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の計数方法を提案する。また、硝化細菌の16S rRNA 標的蛍光遺伝子プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を行い、生物膜内における硝化細菌の存在位置および存在比率を測定し、本法の結果と比較することにより、その妥当性について検討した。

2. 理論的背景

2-(*p*-indophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) は分子状酸素に代わる人工電子受容体として作用し、電子伝達系で生成された還元力によって、生菌(代謝活性を有する菌体)体内で、INT-フォルマザン (INTF) に還元され蓄積される¹³⁾。INTF は赤紫色で不溶性であるため光学顕微鏡下で容易に識別可能である。同時に試料をアクリジンオレンジ (AO) 等で二重染色し、光学および蛍光顕微鏡で観察することにより、活性菌数および全細菌数の同時計測が可能となる¹²⁾。また、菌体内に蓄積した INTF をメタノールにより抽出し、波長480nm における吸光度 (A480) を測定することにより複雑な直接計数を簡略化し、試料全体の INTF 生成量を定量することができる^{14,15)}。直接計数では小さな細菌内の INTF 結晶を見逃す可能性があるが、抽出法ではこれらの欠点をカバーできる。

ここで、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の活性を特異的に阻害した試料に INT 還元法を併用すると、INTF 生成量の差から活性を有するアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の存在比が測定できる。本研究ではアンモニア酸化細菌の特異的阻害剤としてアリルチオ尿素(ATU)¹⁶⁾、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の特異的阻害剤として塩素酸ナトリウム (NaClO₃)¹⁷⁾を用いた。両硝化細菌の全細菌中の存在比率は、無添加系の INTF 生成量に対する各阻害剤添加系の INTF 生成量の比に、直接検鏡法で求めた全活性細菌数 (INT 還元細菌) を乗じれば求めることができる。

3. 実験方法

3.1 実験試料

3.1.1 純粋培養系微生物

本法の妥当性を検討するために三種の純粋培養株 *Nitrosomonas europaea* (IFO14928) と *Nitrobacter winogradskyi* (IFO14927) および *Pseudomonas fluorescens* を用いた。*N. europaea*, *N. winogradskyi* はそれぞれ液体培地239, 240¹⁹⁾を用い28°C, 暗所で振盪培養したものを実験に供した。*P. fluorescens* は1.8% (w/v) R2A 培地 (DIFCO 社) を用いて植え継ぎ、YG 液体培地²⁰⁾に移植し28°C, 暗所で振盪培養したものを実験に供した。試料は全て対数増殖期 (平均菌体密度 = $2 \sim 5 \times 10^7$ 個・ ml^{-1}) にあるものを用いた。この三種の純粋株を、所定の菌体濃度となるように混合し (以下、人工混合系試料という)、本法により各細菌数の定量を行った。

3.1.2 混合培養系試料

純粋培養系試料 (人工混合系試料を含めて) を用いて INT 還元法の妥当性を評価した後、混合培養系の試料についてもその妥当性を検討した。混合培養系試料として活性汚泥混合液 (浮遊系試料) と都市下水および人工下水を基質とし、ベンチスケールの回転円板装置で培養した生物膜を試料として用いた。活性汚泥混合液および生物膜の試料は採取後、直ちにその場で INT 試験に供した。硝化阻害剤の影響を評価するための回分実験では、活性汚泥混合液を研究室に持ち帰り実験を行った。

3.2 テトラゾリウム塩 (INT) 還元法

3.2.1 浮遊系試料

滅菌した50ml 三角フラスコに7.4 ml の試料 (試料中の菌体数が $10^6 \sim 10^8$ 個・ ml^{-1} となるようにあらかじめ調整した) を入れ、次にナリジキシン酸溶液 (20mg/10ml) を0.1 ml、電子供与体として酵母エキス溶液 (30g/l)、NH₄Cl 溶液 (2000mg-N/L) および NaNO₂ 溶液 (2000 mg-N/L) をそれぞれ0.1 ml、0.2%INT 溶液 (20mg/10ml) を1.0ml、リン酸緩衝液 (pH=7.6) を0.2 ml 同時に添加し、28°C, 暗所で24時間振盪培養した^{12,18,25,26)}。活性汚泥を2倍 (Sample A) および6倍 (Sample B) に希釈した試料を用いて、培養時間の INTF 生成量に及ぼす影響を調べたところ、Fig. 1 に示す様に INTF の菌体内での蓄積は培養時間の経過と共に増加するが、培養5時間を過ぎると INTF の蓄積は一定となり、24時間後においても変化は見られなかった。また24時間の培養期間中、全菌体数の変化に有意な差は生じなかった。故に、以下の全ての実験では、培養時間を24時間とした。培養後、37%ホルムアルデヒド溶液を1 ml 添加してサンプルを固定した。硝化阻害剤を添加する系では、INT 等を添加する30分前に阻害剤を添加した。ATU および NaClO₃ の添加量 (硝化活性を完全に阻害し、有機物酸化活性等には影響を与えない最小濃度) はそれぞれ最終濃度として15 mg・ l^{-1} 、1.6 g・ l^{-1} (NaClO₃ として) と決定した¹⁸⁾。全ての実験は、Positive Control (ATU および NaClO₃ 無添加) と Negative Control (あらかじめ37%ホルムアルデヒド溶液を1 ml 添加したもの) を用いて検討した。INTF の抽出は、任意量の試料をホモジナイズし、0.1 μm 酢酸セルロース製メンブレンフィルター (直径25mm, アドバンテック東洋株) で汙過後、フィルター上に集積した細菌内の INTF を3.5ml のメタノールで20分間抽出し、吸光度 (A480) を Negative Control を対象として測定した。試料の INTF 濃度により抽出する試料の量およびメタノールの量を適宜調節した。

Fig. 1 Influence of incubation time on INTF formation in activated sludges. The activated sludges were obtained Souseigawa domestic wastewater plant, Sapporo. The activated sludges were diluted 2 times (Sample A) and 6 times (Sample B).

3.2.2 INTF 蓄積 (INT 還元) 菌数および全菌数

ホルムアルデヒドで固定したサンプルをホモジナイズし、任意量をブラックポリカーボネイトフィルター (ポアサイズ $0.2\mu\text{m}$, 25mm, アドバンテック東洋^(株)) を用いて濾過し、固定した。風乾した後、イマージョンオイルでスライドガラスに固定し、光学顕微鏡で INTF 蓄積細菌 (INT 還元細菌) を直接計測した。全菌数は試料と同量の 0.02% の AO 溶液で、30 分間暗所で染色した後、ポリカーボネイトフィルターで集菌し、蛍光顕微鏡 (Nikon, X2F-EFD2, B-2 A filter BP450-490, 対物レンズ CF Fluor 100x) で観察した。同時測定の場合は、明視野と蛍光を併用して観察した。各試料につき 10 視野で菌数の計測を行い、その平均を全細菌数および INT 還元菌数とした。本法による全菌数および INT 還元菌数の測定精度 (標準偏差/平均値) は、それぞれ平均で $\pm 20\%$ と $\pm 24\%$ 程度であった。

3.2.3 生物膜内における *In situ* での硝化細菌の検出

生物膜の構造を崩さないように注意深く生物膜を回転円板からスライド式の支持体ごと抜き取り、反応槽内の処理水 (7 ml) が満たされた試験管内に静かに挿入した。ATU, NaClO_3 無添加および、ATU, NaClO_3 をそれぞれ添加した後、浮遊系試料の場合と同様に、ナリジキシン酸溶液 (20mg/10ml), 電子供与体として酵母エキス溶液 (30g/l), NH_4Cl 溶液 (2000mg-N/L) および NaNO_2 溶液 (2000mg-N/L) をそれぞれ 0.1ml 加え、

0.2%INT 溶液を 1.0ml 添加後、 28°C , 暗所で 24 時間試験管内で INT を還元させた。その後、試料を OCT-compound (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, IN) で包埋後、 -20°C で凍結し、支持体に対して水平方向にクライオミクロトーム (Reichert-Jung Cryocut 1800, Leica) で $20\mu\text{m}$ 毎にセクションを行った。その断片をスライドガラスに張付け、風乾させた後、光学顕微鏡で観察した。対物レンズは $\times 20$ を用いた。CCD カメラで画像を取り込み、代謝生成物である INTF の存在するバイオマス (INTF(+)), 存在しないバイオマス (INTF(-)) を画像解析装置 (Q500 MC, Leica) を用いて検出した。最初に硝化阻害剤無添加系 (Positive control) (Fig. 9A) の INTF(-) バイオマスの位置および存在比率 (INTF(-) バイオマスの面積/全バイオマスの面積) を求めた。さらに硝化阻害剤添加系 (Figs. 9B and 9C を参照) についても同様に画像解析を行った。1 つの試料につき画像解析を 10 回以上行い、各系における INTF(-) バイオマスの存在比の差から、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の膜深さ方向の 1 次元的な存在比率分布を求めた。

3.3 蛍光 *In Situ* ハイブリダイゼーション (FISH)

採取した生物膜は直ちに 4% のパラホルムアルデヒド溶液で固定 (4°C で 12–24 時間), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄 (3 分間 $\times 2$ 回), OCT compound で包埋後、急速に凍結した。凍結した試料をクライオミクロトームを用いて $20\mu\text{m}$ 毎の切片とし、ゼラチンで皮膜したスライドガラス²⁴⁾に張付け、風乾した。エタノール脱水 (50%, 80%, 96% シリーズで各 3 分間), 風乾後, *in situ* ハイブリダイゼーションに供した。*in situ* ハイブリダイゼーションに用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブと標的微生物, およびハイブリダイゼーションバッファーに添加したホルムアミドの濃度を Table 1 に示す。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は, 0.9 M NaCl, 20mM Tris HCl (pH=7.2), 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS), 40%ホルムアミドである。ハイブリダイゼーションは 46°C で 3 時間行い, その後, 48°C で 20 分間洗浄を行った。洗浄液のハイブリダイゼーションの安定性は NaCl 濃度を調整することによって決定した⁷⁾。NEU プローブと NIT3 プローブの標的 16S rRNA 領域内の塩基配列は, 近縁微生物種の塩基配列と類似している (非相補的塩基 (ミスマッチ) がただ 1 個存在する) ため, 非修飾のコンペティタープローブ (CNIT3 と CTE) を NEU と NIT3 と等モル添加することによりプローブの特異性を高めた^{7,9,11)}。*In situ* ハイブリダイゼーションの手順は Schramm *et al.*¹¹⁾ や Amann²⁴⁾ の方法に準拠した。ハイブリダイゼーションした生物膜試料は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Zeiss LSM410, 488 (Ar ion レーザー) and 543nm (HeNe レーザー) 装備) を用い

Table 1 Probe specificity and concentrations of formamide in the hybridization buffer

Probe	Probe specificity	Fluorophore	Formamide (%)	Reference
(1)NIT3	<i>Nitrobacter</i> species	FITC	40	(9)
(2)CNIT3	used as unlabelled competitor for NIT3			(9)
(3)NEU	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i>	TRITC	40	(7)
(4)CTE	used as unlabelled competitor for NEU			(10)

て観察した。得られた蛍光投影画像より硝化細菌のクラスター面積を、微分干渉画像からバイオマス全体の面積を画像解析装置を用いて検出し、その面積比を硝化細菌の存在比として求めた。

3.4 回分実験

3.4.1 硝化活性試験

INT還元菌数の検出効率を *N. europaea* および *N. winogradskyi* の比硝化速度から評価するために、*N. europaea* と *N. winogradskyi* を用いて回分式硝化活性試験を行った。回分実験は、初期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ および $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度がそれぞれ $20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となるように調整した液体培地239, 240¹⁹⁾を1.0l ビーカーに用意し、所定量の対数増殖期に達した *N. europaea* と *N. winogradskyi* を遠心分離 (15000rpm, 20min) によって集菌した後、菌体密度が $1\times 10^6\sim 5\times 10^7\text{個}\cdot\text{mL}^{-1}$ 程度となるように添加した。マグネテックスターラーで攪拌し、エアバブルを用いて曝気を行い、水温28°Cで培養した際の三態窒素の経時変化を測定することにより、アンモニア酸化および亜硝酸酸化速度を求めた。

3.4.2 硝化阻害剤の影響評価試験

対数増殖期に達した *N. europaea*, *N. winogradskyi* および *P. fluorescens* を、それぞれ4個の50mlの滅菌済み三角フラスコに7.4mlずつ採取し、negative control, positive control (無添加系), ATU添加系、および NaClO_3 添加系として、上述した様にINT還元試験を行った。培養後、それぞれの試料に対してA480とINT還元菌数を測定した。また、混合培養系試料 (活性汚泥混合液) において、ATU ($15\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) 添加が特異的にアンモニア酸化のみを阻害し、 NaClO_3 ($1.6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) 添加がアンモニア酸化および亜硝酸酸化のみを阻害するのかわ確認実験を行った。活性汚泥混合液を1.0l採取し、ブドウ糖を30mg-C/L, NH_4Cl および NaNO_2 をそれぞれ20mg-N/Lになるように添加した。マグネテックスターラーで攪拌し、エアバブルを用いて曝気を行い、水温28°Cで培養した際のDOC, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ および $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度の経時変化を測定した。阻害剤は反応が50%程度進行した時点で添加した。

3.5 平板計数法と最確値法

本法の妥当性を評価するために、*P. fluorescens* と他栄養性細菌はR2A (1.8% (w/v)) 培地を用いて平板計数法で、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌は最確値法²⁰⁾を用いて定量し、本法で求めた結果と比較した。

3.6 水質分析

試料を0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した後、DOC濃度 (Dissolved Organic Carbon, 溶解性有機物) はTOCアナライザー (Shimadzu TOC-5000) を用いて測定し、 NH_4^+ はイオンクロマトグラフ (DIONEX DX-100, カラム: IonPac CS3) で、 NO_2^- と NO_3^- はイオンクロマトグラフ (DIONEX DX-100, カラム: HPIC AS4A) を用いて測定した。

4. 実験結果と考察

4.1 INT還元法の純粋培養系試料への適用

4.1.1 検出効率の検討

Fig. 2に示す様に、純粋培養系の *N. europaea*, *N. winogradskyi*, *P. fluorescens* を用いた時のINT還元菌

数と最確値法および平板計数法により定量した各々の細菌数を比較し、直接検鏡によるINT還元法の検出効率を検討した。この図から明らかなように純粋培養系の場合、各々の菌種において、全体的にINT還元菌数の方が1オーダー程度高く検出された。特に低濃度領域 ($10^4\sim 10^6\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) では、両者の値の差が大きくなる傾向を示した。検出効率の違いは認められるものの、菌数が $1\times 10^5\sim 1\times 10^8$ の範囲において、INT還元菌数と平板計数法および最確値法により求められた細菌数は正の相関関係を示した。

INT還元菌数 (全菌数を含む) を直接検鏡により測定する場合、試料中の細菌密度が $1\times 10^5\sim 1\times 10^8$ の範囲であることが望ましいが、 $10^8\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ より高い時は、あらかじめ希釈する必要がある。また細菌密度が $10^5\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下の時は、直接ポリカーボネイトフィルターである一定量の試料を透過し濃縮する必要がある。フィルターによる濃縮は、試料中に含まれている溶解性還元剤による化学的なINT還元を排除するためにも有効であると考えられる。

Fig. 2 Correlation of INT-reducing cell numbers with the cell numbers enumerated by the MPN method for *P. fluorescens* (A) and *N. europaea* and *N. winogradskyi* (B).

4.1.2 INT 還元菌数と硝化活性の関係

INT 還元菌数の検出効率を *N. europaea* および *N. winogradskyi* の比硝化速度から評価するために、*N. europaea* と *N. winogradskyi* を用いて回分式硝化活性試験を行った。Fig. 3 には、アンモニア酸化および亜硝酸酸化速度と *N. europaea* と *N. winogradskyi* の INT 還元菌数（実験開始時）の関係を示す。両者の間に、明らかな正の相関関係 ($r^2 \geq 0.9$) が得られた。これらの直線の傾きから比硝化速度（1 菌体あたりの硝化速度）を算出すると、*N. europaea* の場合、 $0.014 \text{ pmol NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ 、*N. winogradskyi* の場合、 $0.007 \text{ pmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ となった。Belser *et al.*,²¹⁾ は、アンモニア酸化細菌の最大比硝化速度は $0.023 \text{ pmol NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であると報告している。また、Yoshioka *et al.*,²²⁾ らの報告によると、蛍光抗原-抗体法によって計数したアンモニア酸化および亜硝酸酸化細菌数を用いて算出した最大比硝化速度は、それぞれ $0.003 \text{ pmol NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ 、 $0.012 \text{ pmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ である。本実験で得られた比硝化速度が、文献値と類似することから、本研究で得られた INT 還元菌数は妥当であり、INT 還元法の検出効率は非常に高いことが示唆された。

AO 染色による全菌数をベースに比硝化速度を求めると相関係数は低下し、両者の値は約55%程度小さくなり、比硝化活性を過少評価することになった。故に、比硝化速度を求める時は、INT 還元菌数をベースに計算する必要がある。文献等に報告されている値は、何をベースに計算されているか十分検討する必要がある。

4.1.3 INTF 抽出法の検討

本法の迅速性および精度を向上させるために、菌体内で生成した INTF を抽出し、抽出液の吸光度 (A480) を測定し定量した。予備実験として INTF（フナコシ社）をメタノールに溶解し、INTF 濃度と A480 の関係を検討した。その結果、A480 が 1.5 近傍まで両者の間には非常

に高い相関関係 ($r^2 \geq 0.95$) が得られた。

4.1.4 INT 還元菌数と INTF 生成量の関係

Fig. 4 には、三種の純粋株を用いた場合の直接検鏡による INT 還元菌数と INTF 生成量 (A480 で示す) の相関関係を示す。データに若干のばらつきが認められるものの、INT 還元菌数と INTF 生成量の間には明らかな正の相関関係が示された。直接検鏡の結果、細胞外における INTF の蓄積は確認されなかったため、生成した INTF は全て細菌の呼吸活性によるものと判断した。細菌の種類の違いによる細菌当たりの INT 還元量には有為な差は見られなかった。この結果より、各々の硝化阻害剤を併用し、INTF 生成量の差から硝化細菌数を算出できることが示唆された。

データにばらつきが見られる理由として、Fig. 5 に示

Fig. 4 Correlation of INT-reducing cell numbers with INTF formation determined as A480 for *P. fluorescens*, *N. europaea* and *N. winogradskyi*.

Fig. 3 Correlation of INT-reducing cell numbers with ammonia- and nitrite oxidation rates determined by the batch experiments with *N. europaea* and *N. winogradskyi*. Error bars represent the standard deviations of measurements.

Fig. 5 Dependence of INT-reducing activity on growth phases for a *P. fluorescens* pure culture. Error bars represent the standard deviations of measurements.

すように同種の細菌であっても、対数増殖期、定常期、および死滅期によって呼吸活性、つまり INTF 生成量は異なることが考えられる。植種から培養 3 日目までは対数増殖期にあり、全菌数の増加に比例して INT 還元菌数も増加し、INT 還元菌数は全菌数の90%以上を占めていた。しかしながら、培養 4 日目から全菌数は殆ど変化しないが、INT 還元細菌数は徐々に減少し、培養 6 日目には INT 還元細菌の占める割合は約50%程度に減少した。この結果は、試料採取から INT 試験に至る迄の時間およびその間の基質の枯渇等により、INTF 生成量は大きく影響される^{14,23)}ことを示唆している。また、INT 還元菌数の測定誤差にも起因する。

4.1.5 硝化阻害剤の影響

硝化阻害剤 (ATU と NaClO_3) の *N. europaea*, *N. winogradskyi* および *P. fluorescens* の INT 還元反応に及ぼす影響を検討した (Fig. 6)。 *P. fluorescens* においては、ATU, NaClO_3 をそれぞれ $15\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1.6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と

Fig. 6 Influence of nitrification inhibitors (ATU and NaClO_3) on INT-reducing cell numbers and INTF formation determined as A480 for the cultures of *P. fluorescens*, *N. europaea* and *N. winogradskyi*, respectively. Error bars represent the standard deviations of measurements for INT-reducing cell numbers.

なるように添加しても直接検鏡による INT 還元菌数および INTF 生成量 (A480) には変化は見られなかった。 *N. europaea* では ATU および NaClO_3 添加系において INT 還元菌数および A480は全く検出されなかった。一方, *N. winogradskyi* の場合では, NaClO_3 添加系のみにおいて両者の値が 0 となった。故に, ATU はアンモニア酸化反応のみを阻害し, NaClO_3 はアンモニア酸化および亜硝酸酸化の両反応を阻害するが, 有機物酸化には全く影響を及ぼさないことが明らかとなった。また, アンモニア酸化および亜硝酸酸化反応が阻害剤を添加した直後に阻害されることより, アンモニア酸化および亜硝酸酸化反応と INT 還元反応は連動していることが確認された。

4.2 INT 還元法の人工混合試料への適用

4.2.1 検出効率の検討

三種の純粋株, *N. europaea*, *N. winogradskyi*, *P. fluorescens* を培養し, INT 還元菌数がそれぞれ 2.1×10^7 , 2.7×10^7 , $4.1 \times 10^7 \text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ であることを確認した後, これらを 1 : 1 : 1 の体積割合で混合した試料 (人工混合試料) を作成した。この人工混合試料を用いて, 硝化阻害剤 (ATU と NaClO_3) を併用した INT 還元法で, 実際にアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の定量を試みた。同時に硝化阻害剤無添加系 (positive control), ATU 添加系, NaClO_3 添加系の A480を測定し, *N. europaea*, *N. winogradskyi*, および *P. fluorescens* の菌体数を以下のように定量した。

$$N. europaea \text{ (cells}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = [(A480^{\text{Posi}} - A480^{\text{ATU}}) / A480^{\text{Posi}}] \times \text{全 INT 還元菌数}$$

$$\text{(positive control) (cells}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)}$$

$$N. winogradskyi \text{ (cells}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = [(A480^{\text{ATU}} - A480^{\text{ClO}_3}) / A480^{\text{Posi}}] \times \text{全 INT 還元菌数}$$

$$\text{(positive control) (cells}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)}$$

$$P. fluorescens \text{ (cells}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = [A480^{\text{ClO}_3} / A480^{\text{Posi}}] \times \text{全 INT 還元菌数}$$

$$\text{(positive control) (cells}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)}$$

ここで, $A480^{\text{Posi}}$ = Positive control の A480, $A480^{\text{ATU}}$ = ATU 添加系の A480, $A480^{\text{ClO}_3}$ = NaClO_3 添加系の A480 である。その結果を Table 2 に示す。本法により定量された各々の細菌数は, 初期 INT 還元菌数 $\times 1/3$ と非常によく一致した。細菌の混合比を変えて行った実験においても同様の結果が得られたことより, 本法の再現性が実証された。

Table 2 Comparison of INT reducing cell numbers by the direct microscopic count and the INTF extraction method.

	Positive control*	+ATU	+ NaClO_3
A480	0.148	0.109	0.071
	original INT reducing cell density $\times 1/3$ (cells/mL)	Calculated INT reducing cell density (cells/mL)	
<i>P. fluorescens</i>	1.4×10^7	1.5×10^7	
<i>N. europaea</i>	6.9×10^6	8.4×10^6	
<i>N. winogradskyi</i>	9.1×10^6	8.2×10^6	

* Total INT reducing cell number in positive control = $3.2 \times 10^7 \text{ cells/mL}$.

4.3 INT還元法の混合培養系試料への適用

4.3.1 硝化阻害剤の影響

INT還元法が活性汚泥や生物膜に代表される混合培養系試料に適用できるか検討した。まず最初に、混合培養系試料(活性汚泥混合液)において、ATU ($15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) 添加が特異的にアンモニア酸化のみを阻害し、 NaClO_3 ($1.6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) 添加がアンモニア酸化および亜硝酸酸化の

Fig. 7 Influence of nitrification inhibitors (ATU and NaClO_3) on DOC (A), NH_4^+ (B) and NO_2^- (C) oxidations in mixed cultures (i. e., activated sludge).

みを阻害するのか確認実験を行った。Fig. 7A に示すように ATU と NaClO_3 は有機物酸化には全く影響を与えなかった。アンモニア酸化は ATU および NaClO_3 によって阻害され (Fig. 7B), 亜硝酸酸化は NaClO_3 によってのみ阻害されることが確認された (Fig. 7C)。

4.3.2 検出効率の検討

実際に硝化阻害剤を併用した INT還元法を活性汚泥および生物膜試料に適用し、その結果を平板計数法および最確値法と比較したものを Fig. 8 に示す。他栄養性細菌の場合 (Fig. 8A), 今回測定した 10^6 – $10^9 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ の範囲内では平板計数法と INT還元法の結果は概ね一致した。しかしながら、硝化細菌に関しては、INT還元法と最確値法の間には正の相関関係が認められるものの、INT還元法の値が最確値法の値よりも常に1~2オーダー程度高い値を示した (Fig. 8B)。この理由として、①特に活性汚泥や生物膜中では硝化細菌は密なクラスターを形成して存在しているため (FISH法の結果を参

Fig. 8 Correlation of INT-reducing cell numbers with the cell numbers enumerated by the plate count for heterotrophs and by the MPN method for nitrifying bacteria in the environmental mixed culture samples (i. e., biofilms and activated sludges).

照 (Fig. 10A)), 菌体の分散効率が悪い, ②最確値法で用いた培地では培養不可能な硝化細菌が存在する, 等が考えられる。比硝化速度をINT還元菌数およびMPN法で得られた菌数を用いて算出し, 上記の文献値および純粋培養系の値と比較すると, INT還元細菌数ベースの値が文献値等の値とオーダー的に一致した。故に, INT還元法は, 混合培養系試料においても, 最確値法よりも検出効率が高いといえる。

Fig. 9 Microscopic images of horizontal sections of cryosectioned biofilms stained with INT. The shaded areas indicate the biomass where INTF is accumulated. The black areas indicate the biomass where no INTF is accumulated. (A) No treatment (positive control); (B) treatment with $15\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of ATU; (C) treatment with $1.6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of NaClO_3 . The scale bars correspond to $100\mu\text{m}$.

4.4 生物膜内における *In situ* での硝化細菌の検出

生物膜内における *in situ* での硝化細菌の検出を目的とした場合の, 本法の可能性について以下に検討を加えた。生物膜を支持体ごとに取り取り, ATU, NaClO_3 をそれぞれ添加した試験管内でINTを還元させた後, 支持体に水平方向に $20\mu\text{m}$ の厚さにクライオセクションし, 光学顕微鏡で観察した。これを画像処理してバイオマス全体およびINTFを蓄積したバイオマス (INTF (+))を検出した (Fig. 9A-C)。ATUおよび NaClO_3 添加系においてINTFを蓄積しなかったバイオマス (INTF (-))はそれぞれアンモニア酸化細菌, アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌のクラスターと見なすことができる。実験に供した生物膜は都市下水で馴養した生物膜であり, 間隙率が40~90%程度で, 非常に不均一で多孔質のバイオマスが網の目状に蓄積していた。ATU添加系においてアンモニア酸化細菌のクラスターを示す (INTF (-))部は, 直径5~ $20\mu\text{m}$ 程度を有し, 網の目状のバイオマスと間隙の境界付近でより多く観察できた (Fig. 9B)。 NaClO_3 添加系ではATU添加系よりも (INTF (-))部の面積比は増大し, バイオマス内部でも観察された (Fig. 9C)。

4.5 蛍光 *In Situ* ハイブリダイゼーション

INT還元法を用いた生物膜内での硝化細菌の検出法の妥当性を評価するために, 蛍光遺伝子プローブを用いた *In Situ* ハイブリダイゼーションを行い, 本法との比較を行った。Fig. 10には生物膜 (膜厚約 $300\mu\text{m}$)の底層部 (膜表面から $280\mu\text{m}$ の位置)の硝化細菌の存在形態を示す。この試料はFITC (フルオレセインイソチオシアネート)で修飾したNIT3プローブとTRITC (イソチオシアン酸テトラメチルローダミン)で修飾したNEUプローブにより同時に二重染色したものである。*Nitrosomonas* sp. に代表されるアンモニア酸化細菌は直径5~ $15\mu\text{m}$ 程度の非常に密な球状のクラスター (オレンジ色の部分)を形成し, 生物膜全体に点在していた。アンモニア酸化細菌のクラスターは, バイオマスと間隙の境界付近に多く存在する傾向にあった。この事実は, INT還元法で得られた知見と一致する。膜表層では, 同様の存在傾向が見られたものの, クラスター数は減少し, 膜深さ方向のアンモニア酸化細菌分布が存在することが確認できた。一方, ほとんどの試料において亜硝酸酸化細菌に特異的なNIT3プローブの蛍光は微弱であり, 明確な *Nitrobacter* sp. の存在を明らかにすることができなかった。この理由として, *Nitrobacter* sp. 以外の *Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* 等が実際には優占種であり亜硝酸酸化を担っていると考えられる。

4.6 INT還元法, FISH法, および最確値法の比較

INT還元法, FISH法および最確値法により, アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の生物膜深さ方向の1次元的存在比率分布を求め, その結果の一例をTable 3に示す。INT還元法による測定では, 底層および中層におけるアンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌の存在比は高く約5~9%であり, 膜表層に向かって緩やかに減少する傾向を示した。これらの存在比をFISH法で得られた各硝化細菌の存在比 (硝化細菌のクラスター面積/全バイオマス面積 (同視野の微分干渉像)と比較すると, INT還元法と同様に深部で高く (10%以上)

Fig. 10 *In situ* hybridization of a horizontal biofilm section; **A**: CSLM projection image of z sequences obtained from 10 optical sections acquired at 2 μ m intervals, **B**: DIC image. Staining was carried out with TRITC-labelled NEU probe and FITC-labelled NIT3 probe. Signals are displayed as rgb images. (AO, ammonia oxidizing bacterial clusters (orange color); P, pores; scale bar, 100 μ m).

Table 3 Comparison of fractions of NH_4^+ -oxidizers and NO_2^- -oxidizers in biofilms determined by the INT reduction method with an image analysis, the FISH with specific gene probe followed by an image analysis and by the conventional MPN method (mean $\pm$ SD)

Distance from substratum (μ m)	Fraction of NH_4^+ -oxidizers (%)			Fraction of NO_2^- -oxidizers (%)		
	INT reduction method	FISH method	MPN method	INT reduction method	FISH method	MPN method
0 - 80	5.1 $\pm$ 2.5	11.0 $\pm$ 2.1	0.4	5.2 $\pm$ 1.2	ND*	0.8
80 - 160	8.7 $\pm$ 1.6	14.6 $\pm$ 3.8	0.4	7.7 $\pm$ 5.1	ND	0.6
160 - 240	5.1 $\pm$ 2.0	8.4 $\pm$ 3.2	0.6	6.3 $\pm$ 0.8	ND	0.5
240 - 320	2.2 $\pm$ 1.5	2.5 $\pm$ 1.3	0.2	1.8 $\pm$ 1.4	ND	0.4
320 - 400	0.1 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 1.1	0.4	1.9 $\pm$ 1.7	ND	0.3

* ND: not determined due to very low fluorescence intensity derived from NIT3 probe.

Standard deviations for the values of the MPN method were not given because of the single determination.

表層に向かって減少した。しかしながら、FISH 法では、深層部で1.7倍程度 INT 還元法よりも高い存在比を示した。この理由として、① FISH 法では、共焦点レーザー顕微鏡で画像を獲得したため、非焦点部（試料深部）に存在するアンモニア酸化細菌も正確に検出されるが、通常の光学顕微鏡では焦点面のみの画像情報しか得られず、試料深部に存在する INTF(-)のバイオマスが検出され難い、② INT 還元法は活性を有する硝化細菌のみを検出するのに対して、FISH 法は Wagner *et al.*⁷⁾が指摘するように、標的の RNA が存在すれば活性とは無関係にハイブリダイズする、ことなどが考えられる。また、INTF の蓄積が少ない場所では、INTF(-)部との識別が画像解析時の検出色相値（スレッショールド値）の設定に大きく影響されるため、今回使用した検出色相値の妥当性の評価は今後の課題である。最確値法で求めたアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の存在比は、全

菌数の 1 % にも満たず、INT 還元法で得られた値と比較すると 1～2 オーダー以上、FISH 法と比較すると、1～3 オーダー低い。この差は Fig. 8 B で示したように、混合培養系試料では最確値法による硝化細菌の検出効率が高いことに起因すると考えられる。INTF に類似した無機成分やコロイド成分が含まれている生物膜試料では、INTF との識別が困難となり、INTF(+)のバイオマスを過大評価する恐れがある。本実験では、positive control を対象としてその存在比を検討しているので無機成分やコロイド成分の影響は少ないものと考えられる。しかしながら、小さな細菌や INT 還元速度の遅い細菌は検出されない危険性がある。

INT 還元法と FISH 法を比較し、各硝化細菌の存在比に多少の違いは存在するが、存在形態および膜深さ方向分布が同様の傾向を示したことより、INT 還元法と画像解析を併用することにより、生物膜内の硝化細菌分布を、

ある程度 *in situ* で観察できることが示唆された。

5. 結 論

本研究では、テトラゾリウム塩還元法を応用した硝化細菌の検出方法を開発し、純粋培養系試料を用いて本法の妥当性を確認した後、混合培養系試料（活性汚泥および生物膜試料）に適用した。その結果、本法の検出効率は従来の最確値法と比較して、純粋培養系試料に対しては1オーダー程度、混合培養系試料に対しては1～2オーダー以上高かった。また、INT還元法で定量された硝化細菌数は硝化活性と非常に高い正の相関関係を示した。画像解析を併用することで、生物膜内での硝化細菌の存在位置および存在比率を半定量的ではあるが *in situ* で検出することができた。以上のことより、INT還元法を応用した本法は、最確値法に比べ、迅速かつ検出効率の高い硝化細菌の検出方法であり、生物膜内の硝化細菌のポピュレーションダイナミクスを解析する有効な手段であると考えられる。しかしながら、INT還元法を応用した本法は、間接的に硝化細菌を検出するものであり、同一試料に対して、同時にATUおよびNaClO₂を添加することはできないため、各硝化細菌の存在位置を限定できない技術的な欠点がある。また、硝化細菌の存在比率が極端に低い試料に関しては、硝化阻害剤によるINTF生成量の差が検出できない等の解決すべき問題点を含んでいる。そこで、今後の課題として、本法と硝化細菌に特異的に結合する蛍光遺伝子プローブを用いたFISH法を併用することで、特異性と感度を向上させ、生物膜内の *in situ* での各硝化細菌の生態学的構造とその活性度分布を、同時に検出する予定である。

謝 辞

共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡の使用にあたり、多大なる御協力、御助言を賜った本学農学部森林科学科、船田 良助教授に対し、心より感謝の意を表します。また、実験データの採取に、本学大学院工学工学研究科、乗松直生子君の協力を得たことを付記し、感謝致します。

(原稿受付 1997年7月9日)

(原稿受理 1997年11月4日)

参 考 文 献

- Okabe, S., Hirata, K. and Watanabe, Y. (1996) Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed population biofilms: Experimental results and model simulation. *Wat. Sci. Technol.* **32**, (8) 67-74.
- Matulevich, V. A., Strom, P. F. and Finstein, M. S. (1975) Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl. Microbiol.* **29**, 265-268.
- Ford, D. L., Curchwell, R. L. and Kachtick, J. W. (1980) Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control. Fed.* **52**, 2726-2745.
- Belser, L. W. (1979) Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 309-333.
- Ward, B. B. and Carlucci, A. F. (1985) Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescence in culture and in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 194-201.
- Abeliovich, A. (1987) Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 754-760.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. -P. and Schleifer, K. -H. (1995) *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **18**, 251-264.
- Mobarry, B., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2156-2162.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H. -P., Flood, J. and Amann, R. (1996) *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Technol.*, **34**(1/2), 237-244.
- Schleifer, K. -H., Amann, R., Ludwig, W., Rothmund, C., Springer, N. and Dorn, S. (1992) Nucleic acid probes for the identification and *in situ* detection of pseudomonads. In: *Pseudomonas 91*, E. Galli, S. Silver, B. Witholt (Eds.). Washington, American Society for Microbiology, 127-134.
- Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R., and Schleifer, K. -H. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrode. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4641-4647.
- Zimmermann, R., Iturriaga, R., and Becker-brick, J. (1978) Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number of thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 926-935.
- Seidler, E. (1992) The Tetrazolium-formazan system: design and histochemistry. *Prog. Histochem. Cytochem.*, **24**, 78.
- Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H. F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1801-1808.
- Kim, C. W., Koopman, B., Bitton, G. (1994) INT-dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Wat. Res.*, **28**, 1117-1121.
- Hooper, A. B. and Terry, K. R. (1973) Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.*, **115**, 480-485.
- Belser, L. W. and Mays, E. L. (1980) Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 505-510.
- 境一澄, 岡部聡, 渡辺義公, (1996) テトラゾリウム塩還元法を用いた硝化細菌の計測方法, 土木学会第50回年次学術講演会講演概要集第2部(B), 1142-1143.
- List of cultures, 10th edition, *Microorganisms*, (1996) pp.504. IFO(財団法人微生物研究所編).
- 土壤微生物実験法 (1992) 第13章 硝化作用の測定と硝化菌の計数, 分離, 207-214. 土壤微生物研究会編.
- Belser, L. W. and Schmidt, E. L. (1980) Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizers, *FEMS Microbiol. Lett.*, **7**, 213-216.
- Yoshioka, T., Terai, H. and Saijo, Y. (1982) Growth kinetic studies of nitrifying bacteria by the immunofluorescent counting method, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **28**, 169-180.
- Griebe, T., Schaule, G., Wuertz, S. and Flemming, H. -C. (1995) Determination of activity in activated sludge, *Proc. of Int. Conf. Workshop on Biofilm Structure, Growth, and Dynamics*, Noordwijkerhout, The Netherlands, 249-254.
- Amann, R. I. (1995) *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial. Ecology Manual*, **3.3.6**, 1-15.
- Rittmann, B. E., Trinet, F., Amar, D., and Chang, H. T. (1992) Measurement of the activity of a biofilm, effects of surface loading and detachment on a three-phase, liquid-fluidized-bed reactor, *Wat. Sci. Technol.*, **26**, 585-594.
- Zhang, T. and Bishop, P. (1993) Structure, activity and composition of biofilms, *Proc. First Int. Specialized Conf. on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*, Paris, France, 303-312.