

Ⅱ-571

テトラゾリウム塩還元法を用いた硝化細菌の計測方法

北海道大学工学部 正○岡部 聡 渡辺 義公
北海道大学工学部 学 境 一澄

1. はじめに

硝化細菌によるアンモニア性窒素の硝化は好気性水処理において重要プロセスであり、硝化細菌の動態の調査は処理性能の把握にとって必要不可欠である。現在、硝化細菌の計数には主にMPN法が用いられている。しかしながら、硝化細菌はそのほとんどが独立栄養細菌であり増殖速度がきわめて遅く、長期間の培養日数（4-8週間程度）を必要とする上、培地や菌体数に大きく影響される¹⁾。そこで、本研究ではこれらの問題を回避する方法として、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT)還元法を応用した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について検討した結果について報告する。

2. 実験方法

テトラゾリウム塩還元法²⁾では、生菌（代謝活性を有する細菌）はINTを代謝生成物である赤紫色のテトラゾリウムフォルムザン(INTF)を菌体内に蓄積する。INTFを蓄積下生菌は直接光学顕微鏡で計測された。また培養液(1~3mL)からメタノールによりINTFを抽出し、波長480nmにおける吸光度(A)を測定した。同時に試料をアクリジンオレンジ(AO)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細菌数と全細菌数の同時計測を行った。本研究では、札幌市創成川下水処理場から採取した活性汚泥を試験検体として用いた。十分にホモジナイズした活性汚泥(6.7mL)に0.2%のINT溶液(1.0mL)、電子供与体として酵母エキス(最終濃度300mg/L)、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (10mg/L)、および $\text{NO}_2\text{-N}$ (10mg/L)となるように添加し、全試料容量を10mLにリン酸緩衝液で調整した後、28℃、暗所で12-24時間培養した。アリルチオ尿酸(ATU)はアンモニア酸化細菌の活性を、塩素酸ナトリウム(NaClO_3)はアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化菌の両方の活性を阻害する³⁾ことに着目し、これら2つの阻害剤を添加した場合の A_{480} を同時に測定した。両硝化細菌の存在比は各阻害剤添加および無添加時の A_{480} の差から求めることができる。直接検鏡法で求められた全活性細菌数にこれらの存在比を乗じればアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化菌を定量できる。

全ての実験は、Positive Control (ATUおよび NaClO_3 無添加)とNegative Control (あらかじめ37%ホルムアルデヒド(1mL)を添加したもの)を用いて検討した。アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌は従来のMPN法により、他栄養性細菌は平板希釈法(R2A)により定量し本法との比較検討を行った。

3. 実験結果と考察

最初に、ATUと NaClO_3 のアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化菌に及ぼす阻害効果を確認するために、図-1と2はATUおよび NaClO_3 をそれぞれ15mg/L、1.6g/L添加した時の硝化反応に与える影響を示す。ATUを添加した場合、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の酸化は阻害されるが、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の酸化には変化が見られなかった。一方、 NaClO_3 を添加した場合、 $\text{NH}_4\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ の酸化をブロックした。これらの結果より、ATUはアンモニア酸化細菌の活性を、 NaClO_3 はアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の両方の活性を阻害することが確認された。図-3には、ATUおよび NaClO_3 の最適添加濃度を決定するために、ATUおよび NaClO_3 濃度の A_{480} に与える影響を検討した。硝化細菌濃度が比較的高い試料BとCにおいては、硝化細菌の活性を完全に阻害するために、より

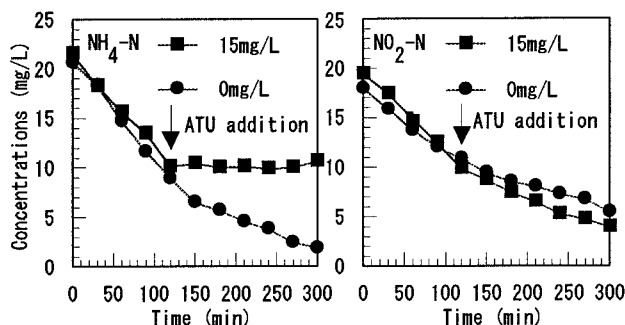


図-1 硝化反応に与えるATUの影響

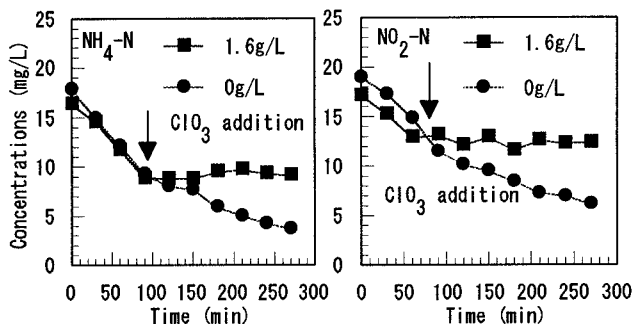


図-2 硝化反応に与える NaClO_3 の影響

高いATUおよび NaClO_3 濃度を必要とした。しかしながら、全試料において、ATU濃度および NaClO_3 濃度がそれぞれ約15mg/L、1.6g/L以上で A_{480} は一定の値を示した。以上の結果より、ATUおよび NaClO_3 の最適添加濃度はそれぞれ15mg/L、1.6g/Lと決定した。これらの濃度以上添加しても吸光度に影響を及ぼさなかった。また平板希釈法による他栄養性細菌の計数結果より、ATUおよび NaClO_3 の添加は他栄養性細菌の活性には影響を及ぼさことが確認された。次に、図-4にはINTFの生成量(A_{480})と代謝活性を有する細菌数（光学顕微鏡による直接検鏡法による）の関係を示す。両者には比較的高い相関が見られ、菌体外におけるINT還元は無視できることが確認された。また顕微鏡観察でも、細胞外でのINTFの蓄積は確認されなかった。図-5には実際に本法を異なる条件で馴養した活性汚泥に適応した場合の例を示す。アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌および他栄養性細菌の存在比はそれぞれ、 $(A_{480}^{\text{P}} - A_{480}^{\text{ATU}})/A_{480}^{\text{P}}$ 、 $(A_{480}^{\text{P}} - A_{480}^{\text{ClO}_3})/A_{480}^{\text{P}}$ 、 $A_{480}^{\text{ClO}_3}/A_{480}^{\text{P}}$ として求めた。これら各種細菌の存在比に代謝活性を有する細菌数を乗じれば各種細菌の菌体数が求まる。表-1には、このようにして求められた各種細菌の菌体数とMPN法および平板希釈法で求められた値との比較を示す。表-1よりINT還元法で求められた硝化細菌数は従来MPN法に比べての約10倍高い値を得た。この理由としてINT還元法は、1) 菌体の分散度合および細菌濃度に影響を受けない、2) 人工培地では培養不可能な菌をも検出できる等が考えられ、本法の優位性が示唆されたと思われる。

4. 結論

INT還元法を用いた硝化細菌の計測方法は、直接検鏡法と培養法の中間の手法であり迅速かつ簡便であると考えられる。従来のMPN法と比較すると約10倍高い値を得ることができた。本研究では比較的高い活性汚泥の活性汚泥について検討したので、今後の課題として、特に低密度領域におけるINTF生成量(A_{480})と硝化細菌数の相関を明らかにし、本法の河川水等への適用の妥当性を確認する必要がある。

表-1 INT還元法とMPN法および平板希釈法による細菌数の比較

	Sample A (活性汚泥)		Sample B (生物膜)	
	従来方法	INT還元法	従来方法	INT還元法
$\text{NH}_4\text{oxidizers}$	5.4×10^5	3.9×10^6	4.4×10^6	5.4×10^7
$\text{NO}_2\text{oxidizers}$	2.2×10^5	1.4×10^6	1.1×10^7	9.4×10^7
Heterotrophs	1.1×10^7	3.6×10^7	1.1×10^8	6.3×10^8

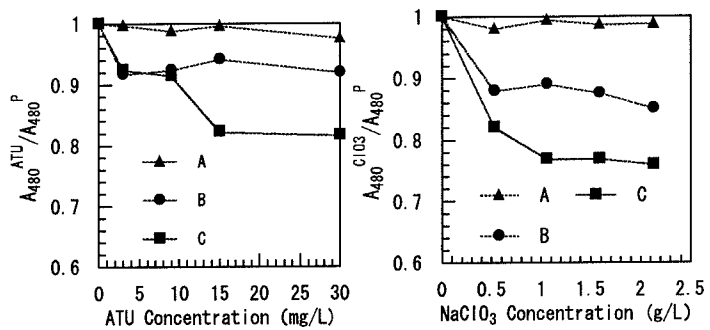


図-3 ATU および NaClO_3 濃度の A_{480}^{ATU} 、 $A_{480}^{\text{ClO}_3}$ に及ぼす影響

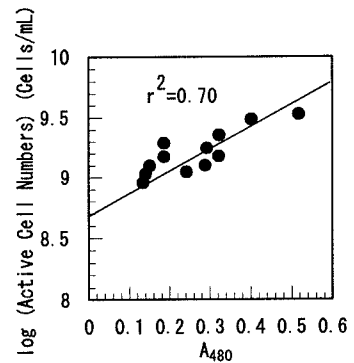


図-4 活生菌と A_{480} の相関関係

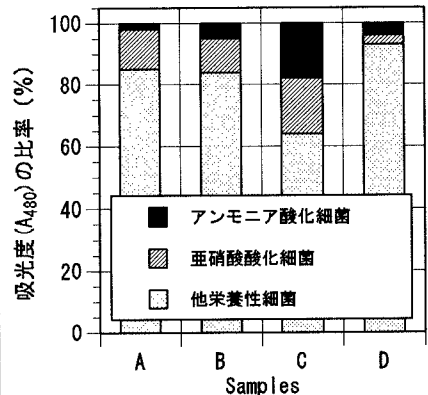


図-5 A_{480} による各種細菌存在比率

【参考文献】 1) Zimmermann R. *et al.*, (1978) Simultaneous determination of total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 926-935. 2) 海老江 邦雄 他, 生物活性炭の硝化細菌計数法における培地の検討, (1994) 第2回衛生工学シンポジウム講演集, 270-274. 3) Kuenen, J.G. and Robertson L.A., (1987) Ecology of nitrification and denitrification. *In The nitrogen and sulphur cycles*, Society for General Microbiology Symposium 42, 161-218.