

Ⅶ-148

テトラゾリウム塩還元法を用いた硝化細菌の検出方法の検討

北海道大学工学部 正 岡部 聡 渡辺 義公
富士電機 正〇境 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生物学的な水処理プロセスにおいて重要であり、硝化細菌のポピュレーションダイナミクスの解析は処理性能を把握及び強化する上で必要不可欠である。硝化細菌の計測には主に MPN 法が用いられているが、硝化細菌はその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、検出まで長い培養期間（4-8 週間）を必要とする上、人工培地による選択性が高く検出効率が低い等の問題点が挙げられる。そこで著者らはこれまで、迅速で簡便なアンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌の新たな計測方法として、活性菌（代謝活性を有する細菌）を識別する方法として用いられる 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) 還元法を応用した方法を開発してきた¹⁾。本研究では、純粋培養株 (*Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradsky*, 及び *Pseudomonas fluorescens*) の人工混合試料、混合系試料（活性汚泥や生物膜）に本法を適用し硝化細菌の定量を試みた。MPN 法と比較することにより本法の妥当性及び検出効率を検討した。

2. 実験方法

テトラゾリウム塩還元法では、活性菌（代謝活性を有する細菌）は INT を還元し、代謝生成物である赤紫色のテトラゾリウムフォルマザン (INTF) を菌体内に蓄積する。細菌の計測は、アクリジンオレンジ (AO) で二重染色し、光学及び蛍光顕微鏡で観察することにより活性細菌数 (INTF を蓄積した細菌) と全細菌数の同時計測を行った。また培養液（1~3mL）からメタノールにより生成した INTF を抽出し、波長 480nm における吸光度 (A480) を測定し INTF を定量した。本研究では、*Nitrosomonas europaea* (IFO14928), *Nitrobacter winogradsky* (IFO14927) 及び他 *Pseudomonas fluorescens* の純粋培養種、札幌市創成川下水処理場から採取した活性汚泥、生物膜を試験検体として用いた。3 種の純粋培養種を混合比が 1:1:1 (容積比) となるように調整した人工混合試料 (defined mixed culture) を用いて本法の検出効率を評価した。試料をよくホモジナイズ後、0.2% の INT 溶液 (1.0mL)、電子供与体として酵母エキス、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、及び $\text{NO}_2\text{-N}$ を 20mg/L となるように添加し、全試料容量をリン酸緩衝液で 10mL に調整した後、30℃、暗所で 24 時間培養した。また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) を、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の両方の特異的阻害剤として塩素酸ナトリウム (NaClO_3) を併用し、これら 2 つの阻害剤を添加した系（阻害剤添加系）の INTF の生成量 (A480) を同時に測定した。両硝化細菌の存在比は各阻害剤添加系及び無添加系の A480 の差から求めることができる。全ての実験は Positive Control (阻害剤無添加系) と Negative Control (あらかじめ 37%ホルムアルデヒド (1mL) を添加した系) を用いて検討した。さらにアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌は、同時に MPN 法により定量され本法との比較検討を行った。

3. 実験結果と考察

最初に、人工混合試料を用いて硝化阻害剤 (ATU と NaClO_3) がアンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌の呼吸活性 (INT 還元活性) に及ぼす影響を図 1 に示した。試料に添加した ATU 及び NaClO_3 の最終濃度はそれぞれ 15mg/L、1.6g/L とした¹⁾。*N. europaea* の場合、アンモニア酸化が ATU と NaClO_3 の両方によって阻害されるため、直接検鏡及び A480 において INTF 生成は認められなかった。一方、*N. winogradsky* では、 NaClO_3 添加系のみにおいて INTF 生成が阻害された。INTF 生成及びアンモニア、亜硝酸酸化は ATU 及び NaClO_3 添加後直ちにその活性は阻害された。また、ATU 及び NaClO_3 の添加は、他栄養性細菌 (*P. fluorescens*) の INT 還元活性には全く影響を及ぼさない事を確認した。混合系微生物群についても硝化阻害剤の影響を確認済みである¹⁾。次に図 2 に、各種細菌の INTF 生成量 (A480) と INT 還元菌数 (光学顕微鏡での直接検鏡による計測) の関係を示す。データに若干のばらつきが見られるものの、INTF 生成量 (A480) と INT 還元菌数の間

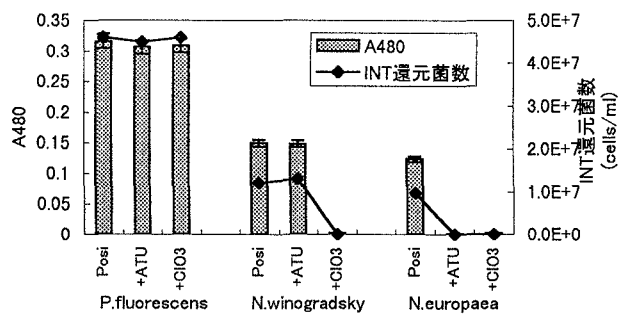


図1 硝化阻害剤によるINT還元への影響

キーワード：硝化細菌、生物膜、INT 還元法、ATU、 NaClO_3

連絡先：060 札幌市北区北 13 条西 8 北海道大学大学院工学研究科、tel&fax：011-706-6267

には正の相関関係が得られた。試料が対数増殖期、安定期、死滅期等の状態により、INT 還元量が異なるためデータにばらつきが生じたが、3種の細菌の菌体当たりの INT 還元量が若干異なる事が明らかとなった。直接検鏡において、細胞外での INTF の蓄積は確認されなかった。

本法の検出効率の妥当性を評価するために、本法を Defined Mixed Culture に適用した場合の例を表3に示す。まず最初に Defined Mixed Culture の Positive Control の全 INT 還元菌数を計測した。次に各系における INTF 生成量を測定した。INT 還元量は各細菌で一定であると仮定して、*N.europaea* を $(A480^P - A480^{ATU}) / A480^P \times \text{全活性菌数}$ 、*N.winogradsky* を $(A480^{ATU} - A480^{ClO_3}) / A480^P \times \text{全活性菌数}$ として計算した（表3-(1)）。しかし実際には各細菌によって INT 還元量は異なるので、図-2で得られた相関係数を用いて同様に $(A480^P - A480^{ATU}) \times (1.69 \times 10^9)$ 、 $(A480^{ATU} - A480^{ClO_3}) \times (1.27 \times 10^9)$ として計算した（表3-(2)）。この結果より、A480比を活性のある硝化細菌の存在比として算出した値が、直接検鏡による硝化細菌数と一致することから A480 比から硝化細菌を定量できる事が示唆された。

更に図4に純粋培養系における INT 還元法と MPN 法による検出効率の関係を示す。菌体密度 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ (cells/mL) の範囲内において、INT 還元菌数と MPN 法による菌数は比較的良好な相関を示した。同様に、混合系微生物試料についても INT 還元法と MPN 法の検出効率の比較を行った（図5）。INT 還元法と MPN 法の間には正の相関関係が認められるものの、INT 還元法による計測値は MPN 法よりも $10 \sim 20$ 倍程検出効率が高い。この理由としては、1) 菌体の分散効率の違い、2) MPN 法では培養不可能な菌が多く存在する、3) INT 還元法の感度が高く、わずかでも活性のある菌を検出するため等と考えられる。これらの結果より、混合系微生物試料については、INT 還元法が MPN 法より迅速かつ検出効率が高いと考えられる。

4. 結論

純粋培養株の人工混合試料に適用することにより、本法の妥当性を確認できた。MPN 法と比較すると Defined Mixed Culture ではほぼ同程度の値を、混合系試料（活性汚泥及び生物膜）の場合では約 $10 \sim 20$ 倍高い検出効率を得ることができた。INT 還元法を用いた硝化細菌の計測方法は、直接検鏡と培養法の間的手法であり、迅速かつ簡便な手法であると考えられる。

5. 参考文献

1) 岡部 他、テトラゾリウム塩還元法を用いた硝化細菌の計数方法、土木学会第 50 回年次学術講演会講演集、第2部 Pp. 1142～1143。

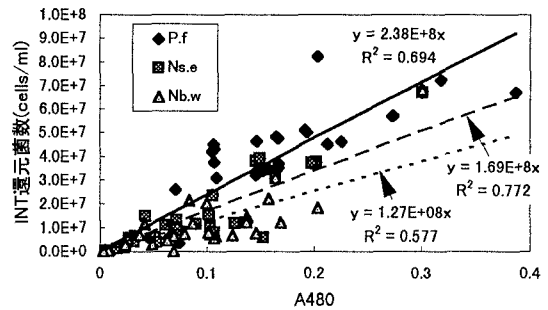


図2 A480とINT還元菌数の関係

表3 A480 を利用した硝化細菌の定量計算結果

	Positive Control	ATU添加系	NaClO ₃ 添加系
A480	0.148	0.109	0.071
	<i>P.fluorescens</i>	<i>Neuropaea</i>	<i>N.winogradsky</i>
直接検鏡によるINT還元菌数	1.36×10^7	7.01×10^6	9.13×10^6
A480比より求めた菌数(1)	1.5×10^7	8.4×10^6	8.2×10^6
図-2より求めた菌数(2)	1.7×10^7	6.6×10^6	4.8×10^6
単位(cells/mL)			

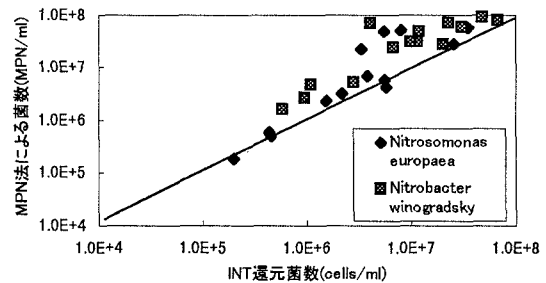


図4 INT還元菌数とMPN法による定量菌数の関係（純粋培養系）

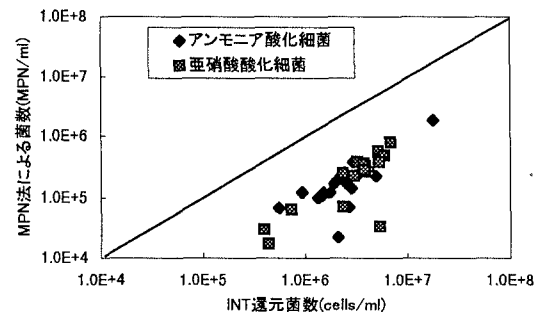


図5 INT還元菌数とMPN法による定量菌数の関係（混合系微生物群）