

長岡高専 正 荒木信夫*、飛島建設 中村明靖
長岡技科大 正 大橋晶良、正 原田秀樹

1. はじめに

細胞染色技術の進展にともなう、自然界には寒天培地上でコロニーを形成できない微生物が多く存在していることが報告されている。また、近年開発された遺伝子プローブの In-situ Hybridization 法は微生物の培養を伴わずにある特定の微生物の検出が可能とされている。本研究は、既知面積顕微鏡視野で染色細胞数をカウントして細胞数を計測する Direct Cell Counts 法と遺伝子プローブ法を組み合わせることにより、増殖速度の小さい硝化細菌を特異的に検出し、顕微鏡観察によって直接菌数計測を行う手法を開発することである。本法を実際の処理装置から採取した試料の硝化細菌の菌数計測に適用し、従来用いられてきた MPN 法で得られた数値と比較した。また、Direct Cell Counts 法の計測値に大きく影響を与える試料の分散条件についても検討を加えた。

2. 実験方法 2.1 微生物試料

硝化細菌数を計測する微生物試料は、都市下水を嫌気処理する UASB 反応器の流出水をポリリッシュアップする懸垂型スポンジリアクター(HSC reactor: 1.5cm ウレタンキューブを2mの長さに懸垂し、上部より排水を滴下)から採取した。まず、反応器上部3個、中部17個、下部29個のキューブから汚泥を搾り出し、500mLの懸濁液を作成し硝化細菌計測の原試料とした。

2.2 分散条件の検討

500mL懸濁液試料の一部を分散補助剤と混合して超音波分散を行い、補助剤の種類と分散時間が Direct Cell Counts の値に及ぼす影響を検討した。汚泥試料はトリポリリン酸(最終濃度200ppm)及び Tween 80(最終濃度0、10、50ppm)に懸濁し、超音波分散(Branson Sonifier 250, Output Control 1)を所定時間行った。分散試料はフィルター(Millipore, マイボアメンブレン, 0.2 μ m, 13mm ϕ)に集菌し、DAPI(6.25mg-DAPI/L, 1M NaCl, 0.1M Tris pH7.2)で5分間染色後に落射蛍光顕微鏡(Olympus BX60-FLA)でU肋起観察して蛍光細胞のカウントを行った。

2.3 プローブと In-situ Hybridization

実験には *Nitrosomonas*(5' TGGAATTCCACTCCCCTCTG 3'=Nmn657)、*Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrososivibrio*(5' AACCCAGGGGGCTGCC 3'=Nitm725)と *Nitrobacter*(5' TTGCTTCCCATTGTCACC 3'=Ntb1169)を Genus レベルで検出する 16S rRNA を標的とした3種の合成オリゴヌクレオチド DNA プローブを用いた。Nmn657とNtb1169の5'末端にはTRITCを、Nitm725にはCy5を蛍光標識として付加した。微生物試料はまずパラホルムアルデヒド溶液(4%PHA, 390mM PBS Buffer, 30mM NaCl, NaPO₄ Buffer, 4℃, 24hrs)で固定した。次に超音波で4分間分散をし、希釈後、フィルター(前述)に集菌し、エタノールで脱水した。試料の希釈倍率はアンモニア酸化細菌では100倍、亜硝酸酸化細菌では10倍、全菌では1000倍に設定した。In-situ Hybridization はフィルターに Hybridization Buffer 300 μ L (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.2, 0.1% SDS, ホルムアミド(Nmn657=10%, Nitm725=15%, Ntb1169=0%))をスポットし、さらに2 μ L(100ngのプローブを含む)のプローブ溶液を加えてハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション温度は Nmn657, Nitm725=42℃, Ntb1169=40℃とし、未付着プローブの洗浄は Hybridization Buffer を用いて20分間行った(ハイブリダイゼーション温度+2℃)。

2.4 硝化細菌の計測

硝化細菌の計測は MPN 法では水道試験法に準じてアンモニア酸化細菌(2週間培養)と亜硝酸酸化細菌(4週間培養)に分けて液体培地の3本法を用いて行った。プローブで特異的に染色した硝化細菌は落射蛍光顕微鏡のG肋起視野で既知面積内の蛍光細胞数をカウントし、計測視野のフィルター面積との比と試料の希釈倍率を乗じて算出した。

3. 結果と考察

図-1にトリポリリン酸と Tween 80 を分散補助剤とした超音波分散時間と Direct Cell Counts の関係を示す。超音波の照射時間が短いと汚泥フロックが残存し、細胞が重なって観察されることから小さな計測菌数を示した。過剰の超音波分散も細胞を破壊することから計測菌数を小さくする傾向にあった。本実験では4~8分の照射時間が計

Fluorescent in-situ Hybridization, Nitrification, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, 16S rRNA, Direct Cell Counts

*〒940 長岡市西片貝町888 Tel:0258-34-9281 Fax:0258-34-9284 E-mail:anaki@nagaoka-ct.ac.jp

測菌数を最も大きくする条件であった。分散補助剤としてTween 80を用いた場合、僅かに計測菌数は上昇するが、補助剤の濃度の違いは計測値に有為な差を示さなかった。また、トリポリリン酸では8分が最も良好な分散効果を示した。硝化細菌の計測には200ppmのトリポリリン酸を補助剤として超音波照射を4分に設定して分散を行った。

図-2はリアクターの中部から採取したスポンジ搾汁を100倍希釈した試料をプローブNmn657とDAPIで2重染色し、蛍光顕微鏡のU励起とG励起で同一視野を観察したものである。DAPIが蛍光を発するU励起では全ての菌が青白く発光しているが、プローブに付したローダミンを励起するG励起では*Nitrosomonas*だけが蛍光を発し、僅かに存在していることが観察できた。プローブNitm725で染色されるアンモニア酸化細菌はNmn657で染色される*Nitrosomonas*の計測菌数の約1/5であった。また、Nitm725で検出された菌は主に螺旋状を呈していたことから*Nitrospira*と考えられる。

表-1はプローブのIn-situ Hybridization法とMPN法を用いて計測したスポンジリアクター上部、中部、下部のスポンジ搾汁1mL中の全菌、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の計測菌数である。DAPI染色細胞のDirect Cell Countsでは各試料中には 10^9 レベルの細胞が計測されたが、FISH法による硝化細菌はアンモニア酸化細菌では 10^7 cell/mL、亜硝酸酸化細菌では 10^6 cell/mLであった。DAPI染色細胞に占めるアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌の割合は、2.0～1.5%、0.19～0.16%であった。本法を用いることにより、検出を目的とする細菌の存在率に合わせて希釈率を設定すると全菌数に対して僅かにしか存在しない硝化細菌の菌数計測を行うことが可能であった。アンモニア酸化細菌に比較すると亜硝酸酸化細菌の菌数が少ないが、本実験で用いたプローブセットでは亜硝酸酸化細菌である*Nitrospira*、*Nitrospina*属が検出できないため、これらの細菌が存在していた可能性がある。硝化細菌のMPN値はいずれも 10^3 cell/mLであった。FISH法に比較するとアンモニア酸化細菌で 10^4 、亜硝酸酸化細菌で 10^3 の違いが認められた。

Table-1 Cell Counts and MPN of Nitrifier of Resuspended Mixed Samples Taken From HSC Reactor

		Upper	Middle	Lower
DAPI	Total Cells	$1.9 \pm 0.2 \times 10^9$ (N=14)	$2.1 \pm 0.4 \times 10^9$ (N=15)	$1.7 \pm 0.1 \times 10^9$ (N=14)
FISH	Ammonia Oxidizer	$3.7 \pm 1.9 \times 10^7$ (N=10)	$3.2 \pm 1.2 \times 10^7$ (N=10)	$3.0 \pm 1.5 \times 10^7$ (N=10)
	Nitrite Oxidizer	$3.6 \pm 1.6 \times 10^6$ (N=11)	$3.3 \pm 0.9 \times 10^6$ (N=10)	$3.0 \pm 1.5 \times 10^6$ (N=9)
MPN	Ammonia Oxidizer	7.5×10^3	2.9×10^3	1.1×10^3
	Nitrite Oxidizer	4.3×10^3	7.5×10^3	1.1×10^3

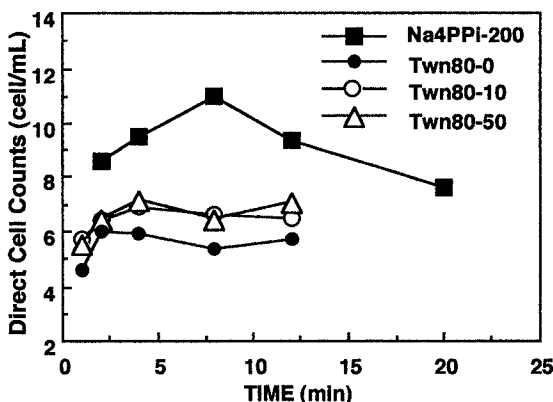


Fig.1 Relationship between Direct Cell Counts and sonification time.

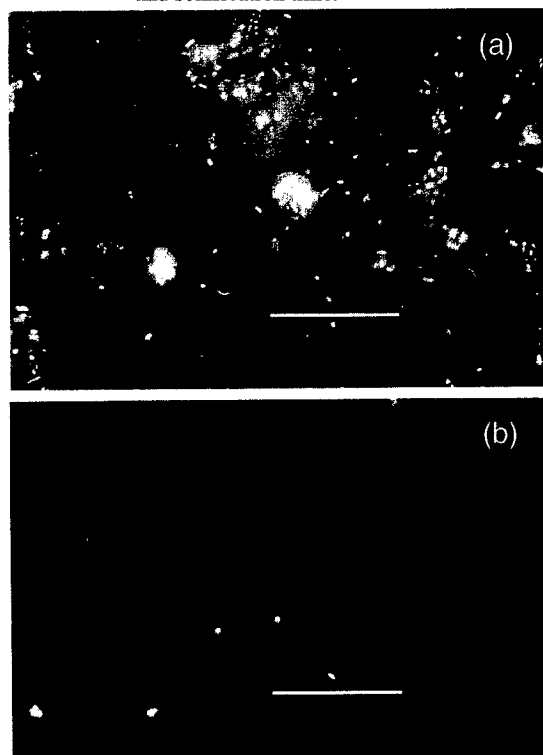


Fig.2 Fluorescent micrographs of suspended cells taken from HSC reactor, stained with DAPI (a) and hybridized with probe Nmn657(b), as the same optical field. Dilution; x100, Bar; 15μm.