

FISH 法により測定した硝化細菌量と硝化活性との関係に関する基礎的研究

日本大学大学院理工学研究科土木工学専攻

学生会員 加賀美雅彦, 杉浦将平

日本大学理工学部土木工学科

正会員 小沼 晋, 齋藤利晃

1. 研究背景

排水処理において生物学的窒素除去プロセスの第一段階は硝化であるが、硝化を行う硝化細菌の増殖速度は遅く、水質・pH・水温等の変動に敏感であることから、実際の処理施設において安定した硝化反応を維持することは困難な場合が多い。硝化効率を安定化させるためには、反応を担う微生物の生態を知ることが重要である。近年、16SrRNA を標的とする FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法は、蛍光物質で標識した DNA プローブを、組織や細胞内において標的とする RNA と特異的に結合させ(hybridization)、蛍光顕微鏡で観察することで、標的細菌の分布や個数を検出することが可能になった。実際に硝化反応を担っている硝化細菌群の多様性、また廃水の組織や処理方式の違いによりこれらの優先種はことなるのか、などの排水処理プロセスにおける硝化細菌相に関する情報は少ない。

2. 目的

アンモニア酸化細菌(AOB)と亜硝酸酸化細菌(NO₂)が種によりどの程度のアンモニア酸化活性・亜硝酸酸化活性を持っているのか、いくつかの研究で計測されているが、実排水処理プロセスで機能している汚泥中の AOB や NO₂ の存在量や、また、1 細胞あたりの活性の大きさなどについては詳細は不明である。そこで本研究では、FISH 法により AOB や NO₂ の細胞数を定量し、別途行ったアンモニア酸化活性試験および亜硝酸酸化活性試験の結果とあわせて検討することで、1 細胞当りの活性が細胞数とどのような関係があるのか、また、それぞれの活性がどの種の存在量に依存しているのかを明らかにすることができると考えられる。

3. 実験方法

実下水を処理する運転方式の異なる 2 つの反応槽から採取した汚泥を使用した。2012 年 6 月 5 日から 7 月 12 日の間、2 週間おきに 7 回のサンプリングを実施した。ゼラチンコートされたスライドガラスに 1 mL の活性汚泥サンプルを固定し、スライドガラス上でハイブリダイゼーションを行った。次いで、サンプルにプローブをそれぞれハイブリダイゼーションさせた。

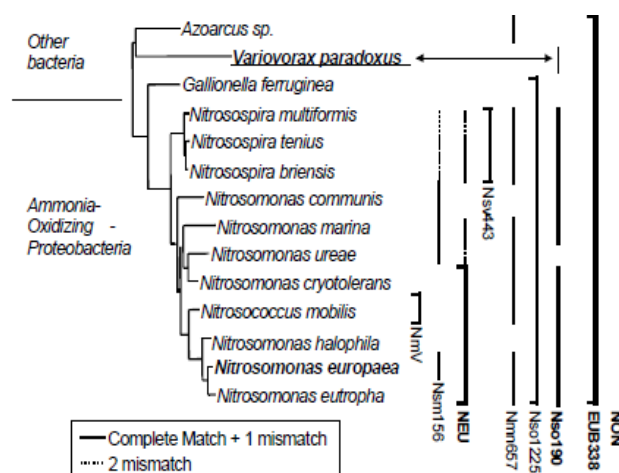


図 1 AOB プローブの染色範囲

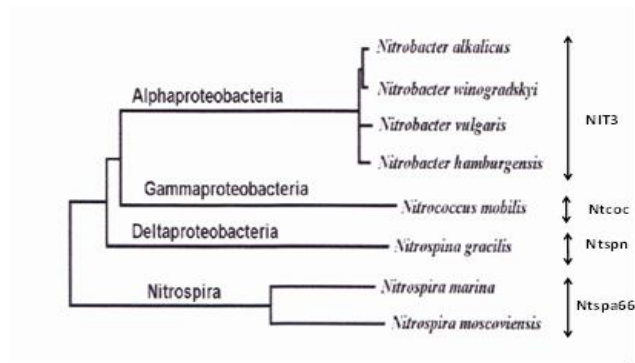


図 2 NOB プローブの染色範囲

今回の実験では、AOB プローブを 2 種類(Nso190, NEU), NOB プローブを 4 種類(NIT3, Ntspa662, Ntspn, Ntccoc)使用した。

キーワード：アンモニア酸化細菌 亜硝酸酸化細菌 N₂O 活性 FISH

連絡先：〒101-8308 東京都千代田区神田 1-8-14 日本大学大学院理工学研究科 TEL：03-3259-0688

表 1 FISH に用いたプローブ

	Probe name	Sequence	Target group
NOB probe	NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	Nitrobacter
	Ntspa662	GGAATTCCGCGCTCCTCT	Nitrospira genus
	Ntspn693	TTCCCAATATCAACGCATT	Nitrospina
	Nitcoc84	TCGCCAGCCACCTTTCCG	Nitrococcus
AOB Probe	Nso190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Almost all AOB
	NEU	CCCCTGCTGCACTCTA	Halophilic and halotolerant members of the genus Nitrosomonas

固定液を作成し、サンプルの固定を行った。サンプルを超音波分散に 10 分かけ、スライドガラスへ定着させる。プローブとサンプルの hybridization を 2 時間行った後、洗浄を 20 分し DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡 (Nikon Eclipse 80i) で観察、高感度冷却 CCD カメラ (Nikon DS-Qi1MC) で撮影をした。一つのサンプルに対しランダムに 10 枚撮影し AOB・NOB のカウントを行った。

4. 結果

図 3 に示されるように Nso190 で検出される AOB 細胞数は測定日より大きく変化したが、gVSS 当たりのアンモニア酸化活性は全期間を通して変化は小さかった。そのため、1 細胞当たりアンモニア酸化活性 (図 4) は細菌数変化の影響を受けて、菌数が多い日に 1 細胞当たりの活性が低く、菌数が少ない日はその逆になる結果が得られた。NEU は全体に菌数が少なく、その変動とアンモニア酸化活性との関係は不明である。

一方、NOB は図 5 に示される通り全期間を通して種類毎に増減はあるものの、合計の細胞数自体は最大でも 2 倍の違いに留まり、変化は小さかった。また、gVSS 当たりの亜硝酸酸化活性も全期間を通して大きな変化はなく、結果として、図 6 に示される通り 1 細胞当たりの亜硝酸酸化活性も大きな変化は見られなかった。

5. 結果

FISH 法によりアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の細胞数を測定しそれぞれの活性の変化と比較したところ、AOB 全細胞数 (Nso190 による検出数) は NOB の全細胞数に比べて変化が大きく、また 1 細胞当たりの活性も NOB と比較して AOB の変化が大きい結果が得られた。しかし、NOB の 4 種の細胞数はそれぞれ大きく変化していることから、環境変化に対し系全体の亜硝酸酸化能力を保つ機能が存在していることが推察された。

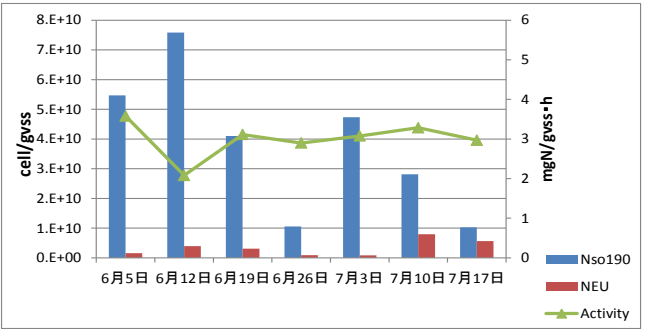


図 3 種別 AOB とアンモニア酸化活性

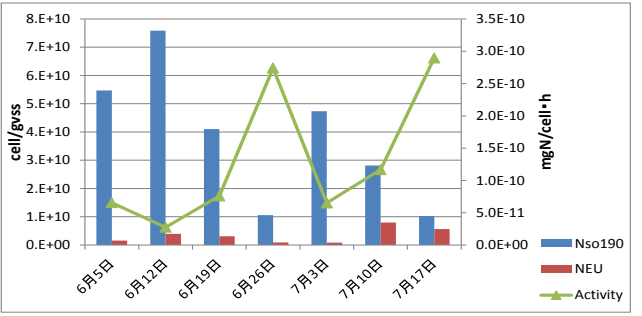


図 4 種別 AOB と 1 細胞当たりアンモニア酸化活性

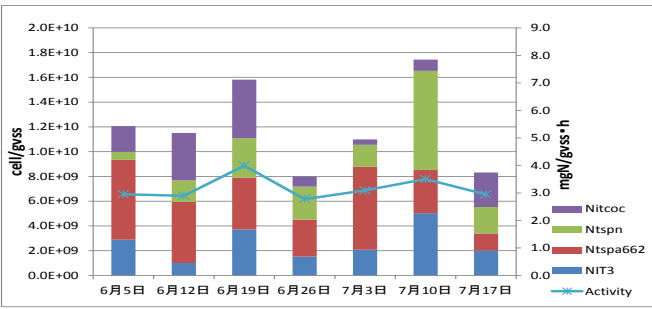


図 5 NOB 種別積上げと亜硝酸酸化活性

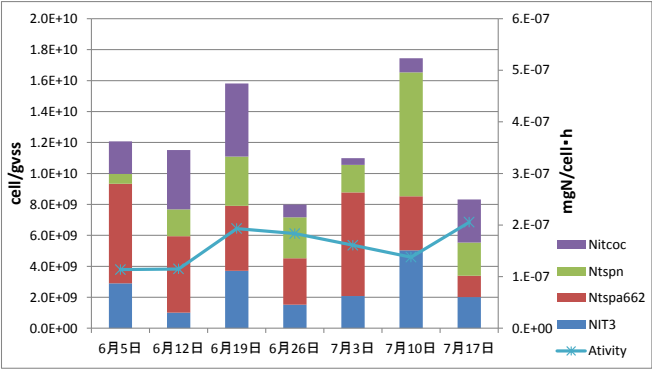


図 6 NOB 種別積上げと 1 細胞当たり亜硝酸酸化活性

(参考文献)

岡部ら (2000) 16sRNA アプローチによる硝化菌生物膜の生態学的構造解析。

小沼晋 (1999) 分子生物学的手法を中心とした AOB 定量手法の実用性評価、東京大学大学院工学系研究科博士課程論文。

高崎由紀 (2005) 亜硝酸蓄積型硝化脱窒処理プロセスに置ける硝化細菌の挙動解析、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻社会文化環境コース修士論文。