

VII-3

FISH法による土壤中の硝化細菌の定量

東北大学 学生員○藤井雄一郎
東北大学 学生員 小甲 孝史
東北大学 正会員 大村 達夫

1.はじめに

硝酸性窒素による地下水汚染は、乳幼児のメトヘモグロビン血症の原因となり、また、硝酸性窒素は発ガン性物質を生成すると言われていることから、その早急な対策が望まれている。そこで、地下水からの硝酸性窒素の除去方法として、土壤中の微生物の硝化・脱窒作用を制御することで、硝酸性窒素に汚染された地下水を、原位置で浄化する研究が進められている¹⁾が、この研究の中では、硝化および脱窒細菌の土壤中の分布を知ることは、硝化・脱窒作用の制御の効率化を進めるうえで重要であると考えられる。

ところで、これまで硝化細菌の計数方法として、主にMPN法などが用いられてきた。しかし、硝化細菌は増殖速度が遅いため、培養に非常に時間がかかり、計数も過小評価になる傾向があるため、正確に硝化細菌数を把握することが困難であると考えられる。

DNAプローブを用いたFISH (Fluorescent in situ hybridization) 法は、培養を伴わずに微生物そのものの検出が可能ことから、種々の微生物に対して特異的に結合するプローブの開発が進められており、硝化細菌についても多くのプローブが開発されている。そこで本研究では、土壤中の硝化細菌数の把握を目的として、16s rRNAを標的とするDNAプローブを用いて、硝化細菌のうちのアンモニア酸化細菌の定量を試みた。

2.実験方法

2.1試料の採取 本研究は、土壤中の硝化細菌の定量を目的としているが、実験では、実際の土壌を再現した土壌カラムから土壌試料を採取した。土壌試料を採取した実験装置¹⁾の概略を図1に示す。硝化細菌を測定する土壌試料は、コントロール系上段カラムの土壌表層よりそれぞれ1.3, 5, 15cmの計4か所から、乱さないよう慎重に採取した。

次に、土粒子から微生物を剥がす目的で、肥田野らの方法²⁾に従って土壌試料に超音波処理を施し、得られた試料を固定液（4%パラホルムアルデヒド/PBS, pH7.2, 4℃）で3時間固定した。固定液を除去したのち、50%エタノール/PBSで再懸濁し、微生物試料として-20℃で保管した。微生物試料は、0.01%ピロリン酸ナトリウム水溶液で50倍に希釈後超音波分散して、ゼラチンコーティングしたスライドガラスにスポットし、エタノールで脱水し、FISHに適用した。

2.2プローブ 実験の対象となる細菌は、硝化細菌のうちのアンモニア酸化細菌である。よって、アンモニア酸化細菌に特異的な、16s rRNA 標的DNAプローブで

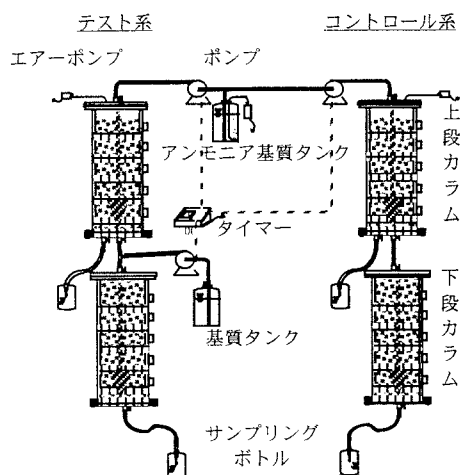


図1 実験装置の概略

あるNso190(5'CGATCCCCTGCTTTTCTCC3')³⁾を用いた。Nso190には、Cy3が蛍光標識として5'末端に付加してある。

2.3FISH法の適用 FISHはAmannの方法⁴⁾に従った。Nso190のハイブリダイゼーションに対する厳密度を高めるために、ハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミド濃度は55%とした。また、非特異的なプローブの結合を防ぐために、プローブの洗浄に用いる洗浄液のNaClの濃度は20mMとした。FISHに続いて、全菌に対するアンモニア酸化細菌の割合を測定するために、DAPI染色をおこなった。各スポットにDAPI染色液（1.0μg/ml DAPI, 0.01M Tris/HCl）を10μlずつ滴下し、5分間染色したのち滅菌蒸留水で洗い流した。また、全菌数を測定するために、微生物試料を100倍に希釈して孔径0.2μmのポリカーボネート製フィルター上に集菌し、DAPI染色をおこなった⁵⁾。

DNAプローブおよびDAPIで染色した微生物は、蛍光顕微鏡（Zeiss Axioplan2）で観察した。DNAプローブおよびDAPIのそれぞれの励起波長で、写真撮影し、蛍光を発している細菌を計数した。

3.結果及び考察

3.1カラム内土壌の硝化能 表1に、定常状態におけるコントロール系上段カラム流出水中の窒素成分濃度の平均値を示す。カラム流入基質中のアンモニア性窒素濃度は約100mg/lであるが、表1に示されるように、流出水中からはほとんどアンモニア性窒素は検出され

表1 定常状態におけるコントロール系上段カラム
流出水中の窒素成分濃度の平均

窒素成分	濃度 (mg/l)
硝酸性窒素	70.0
亜硝酸性窒素	0.01
アンモニア性窒素	0.13

なかった。また、亜硝酸性窒素も検出されないことから、この実験装置内の土壌は、良好な硝化能を保持しているといえる。

3.2FISH法による硝化細菌の計数とその評価 表2に、FISH法により求めた土壌カラムのそれぞれの深さにおける全菌数、アンモニア酸化細菌数およびその存在率を示す。アンモニア酸化細菌の存在率の計算式は以下の通りである。

$$\text{存在率 (\%)} = \frac{\text{Nso190で蛍光を発する細菌数}}{\text{DAPIで染色した細菌数}} \times 100$$

また、図2はDAPI染色した全菌の蛍光顕微鏡画像、およびNso190が結合したアンモニア酸化細菌の蛍光顕微鏡画像である。Nso190に付加したCy3は赤色の蛍光を発するが、土粒子や土壌中の有機物も同色の自家蛍光を発するため、図2(b)の画像のみではアンモニア酸化細菌を計数することは困難であった。しかし、DAPI染色したすべての細菌は、青白い蛍光を発しており容易に判別できたので、それぞれの画像を重ね合わせることによって、アンモニア酸化細菌の特異的検出および計数が可能であった。アンモニア酸化細菌のうちに観察された細胞の形態は、球菌や桿菌がほとんどであったが、葉状で不規則な形態である*Nitrosolobus*も一部、観察された。アンモニア酸化細菌数は、土壌カラム表層から3～5cmが最も多く、深さ15cmでは1/10程度にまで減少しているため、全菌に対する存在率はあまり変化しないまま、全細菌数と同様に、深さ方向に徐々に減少すると考えられる。

表2 土壌カラムのそれぞれの深さにおける全菌数、
アンモニア酸化細菌数 (cells/g dry soil [10⁸])
およびアンモニア酸化細菌の存在率 (%)

土壌カラム 表層からの 距離(cm)	全菌数	アンモニア 酸化細菌数	存在率
1	7.70	0.72	9.3
3	15.2	1.06	7.0
5	8.23	1.09	13.3
15	1.98	0.17	8.8

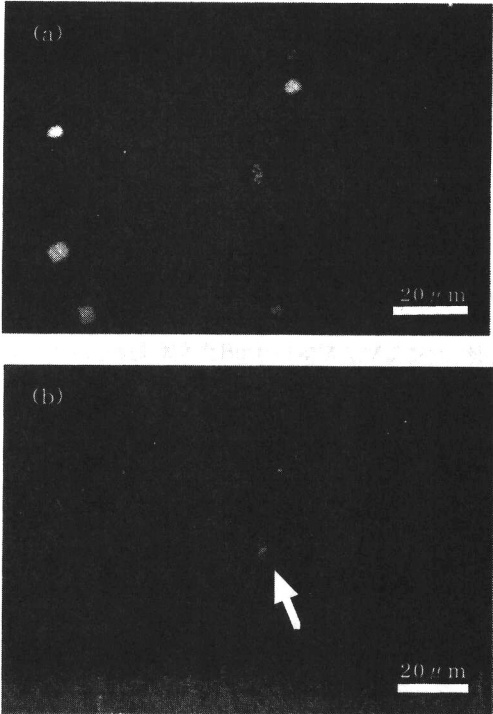


図2 (a) DAPI染色した全菌の蛍光顕微鏡画像
(b) Nso190が結合したアンモニア酸化細菌の
蛍光顕微鏡画像 (倍率：1000倍)

4.おわりに

本研究では、FISH 法を用いて土壌中の硝化細菌の定量を試みたが、実験によって硝化細菌の定量が行え、硝化細菌は絶対好気性細菌であるため、土壌中では主に表層付近に多く存在することが予測されたが、その予測を裏付けることができた。

参考文献

1) 小甲孝史：地下水を汚染する窒素除去の効率化を目指した硝化・脱窒菌相の制御，東北大学修士論文，1999。
2) 肥田野他：FISHによる土壌内微生物の同定および定量，土木学会第53回年次学術講演会概要集，pp60-61，1998。
3) Mobarry,B *et al*, (1996) Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.*62：2156-2162。
4) Amann,R.I (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*,3.3.6.1-15,Kluwer Academic Publishers。
5) 土壌微生物研究会編：土壌微生物実験法，養賢堂，1992。