

(3) アンモニア酸化細菌に対する FISH 法の実用性評価

Feasibility Study about FISH method for Ammonia-oxidizing Bacteria

小沼 晋*、佐藤弘泰**、味埜 俊**、松尾友矩*

Susumu KONUMA*, Hiroyasu SATO**, Takashi MINO** and Tomonori MATSUO*

ABSTRACT; To assess the feasibility of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method for ammonia-oxidizing bacteria, three experiments were done as follows; 1) re-optimization of experimental conditions for an oligonucleotide probe Nso190 specific for most of ammonia-oxidizing bacteria, 2) enumeration of ammonia-oxidizing bacteria in lab-scale nitrification reactors, municipal wastewater treatment plants and river water by FISH and other available methods, and 3) to evaluate a correlation between ammonia-oxidizing activity and FISH observation. The results indicated that 1) optimal concentration of formamide for Nso190 probe was 25%, 2) as for the nitrification reactors, where high number of ammonia-oxidizing bacteria seem to exist, FISH, antibody bound latex coagulation and dot blot hybridization methods gave consistent results of ammonia oxidizer enumeration, whereas the MPN method showed 1-2 order lower values than other methods, 3) ammonia-oxidizing bacteria can not be quantitatively detected by FISH method in the municipal wastewater treatment plants (WWTPs) and river water where the ammonia loading is rather low, 4) in some cases, ammonia-oxidizing bacteria can not be detected by FISH whereas ammonia oxidizing activity is observed. Improvement of the FISH methods, such as pretreatment of sample and/or techniques of boosting the fluorescence from the target is needed.

KEY WORDS; ammonia-oxidizing bacteria, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), most probable number, antibody, dot blot hybridization, nitrification

1. はじめに

近年の分子生物学の発展は、環境工学の分野において rRNA (リボソーム RNA) を標的とした FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) 法を広く普及させるに至った¹⁾。標的 RNA 配列に対し相補的な蛍光標識 DNA プローブをハイブリダイズさせるこの手法を用いると、特定の微生物種・微生物群を、そしてその空間的配置までもを特異的に検出することが可能になる。特にアンモニア酸化細菌に関しては、サンプル中で特徴的なクラスターを形成する場合が多いこともあいまって、生物膜・固定化微生物系・高濃度基質系などでの応用例と興味深い解析結果が数多く報告されている²⁾³⁾⁴⁾。しかしながら、基質 (アンモニア) 濃度が比較的低い都市下水処理場やその放流水、また河川水などに対しては、FISH 法の適用例は未だ十分に報告されていない。

また、アンモニア酸化細菌の多くを検出するとされ、実用性が高いと考えられる DNA プローブ Nso190⁵⁾に

* 東京大学大学院工学系研究科 都市工学専攻
(Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

** 東京大学大学院新領域創成科学研究科 環境学専攻
(Department of Environmental Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

関しては、文献通りの条件ではシグナルが極めて暗く、ターゲットの検出が難しいことが知られている³⁾⁶⁾。

そこで本研究では、まず、アンモニア酸化細菌以外の細菌の中から Nso190 プローブにハイブリダイズしやすい純菌株を 1 種類ピックアップして、Nso190 プローブの最適実験条件を再検討した。そして、FISH 法での測定が困難な場合に対応して、MPN 法⁷⁾、抗体ラテックス凝集法⁸⁾（以下、本論文では「抗体法」と呼ぶ）、Dot Blot Hybridization 法⁵⁾⁹⁾を併用しつつ、実際の下水処理場や河川などの系での FISH 法の現状での実用性を検証した。さらに、FISH 法でのアンモニア酸化細菌の観察結果と実測したアンモニア酸化速度の相関関係、そしてその結果を踏まえたアンモニア酸化細菌に対する FISH 法の適用範囲に関する考察を行った。

2. 実験方法

2.1 測定に用いたサンプル

(1) 純菌

アンモニア酸化細菌の純菌として、*Nitrosomonas europaea* (IFO14298) を試験管内で純菌培養した。培養液としては IFO240¹⁰⁾を用い、28℃で振盪培養を行った。

また、Nso190 プローブの再最適化のために、*Variovorax paradoxus* (IAM12373) を試験管内で純菌培養した。培養液としては IAM B-1¹¹⁾を用い、23℃で振盪培養を行った。この細菌はアンモニア酸化細菌ではないが、RDPII (Ribosomal Database Project II (<http://www.cme.msu.edu/RDP/>)) から得られるデータによれば、その rRNA 上の塩基配列の中には、Nso190 プローブが標的とする塩基配列と 19 塩基中 17 塩基まで一致している部分がある（つまり、2 ミスマッチである）。さらに、同じく RDPII のデータによれば、Nso190 プローブの標的配列と同じ、あるいは 1 ミスマッチの塩基配列を持つ細菌は、現在知られている範囲では全てアンモニア酸化細菌である。したがって *Variovorax paradoxus* は、アンモニア酸化細菌以外で Nso190 プローブにもっともハイブリダイズしやすい純菌株の 1 つだと言える。

(2) 実験室内のリアクター（都市下水処理場の模擬系・集積培養系）汚泥混合液

リアクター A は、都市下水処理場での排水組成を模した基質組成で運転しており¹²⁾、生物学的リン除去の研究用に使われていたものであったが、アンモニア酸化能も有していた。

リアクター B・C は早稲田大学理工学部平田・常田研から分譲を受けた汚泥を種汚泥として、高濃度アンモニア基質で連続運転している集積培養系であり、共に槽容積=5L、HRT=15 日、推定 SRT=150 日で運転を行った。リアクター B には無機基質のみ¹³⁾、リアクター C には有機基質を流入させた。それぞれの流入基質組成を Table 1 に示す。

これら 3 系統のリアクターの運転は、20℃恒温室内で行われた。

(3) 都市下水処理場の曝気槽汚泥混合液・放流水

都市下水処理場 X・Y より、汚泥混合液を曝気槽終端から約 0.5L、放流水（消毒前約 2L・消毒後約 2L）を採取した。サンプルは直ちに持ち帰り、速やかに必要な前処理・測定を行った。

(4) 河川水

多摩川の河川水（羽村堰・関戸橋・是政橋・丸子橋付近）を岸辺から約 2L 採取した。サンプルは直ちに持ち帰り、速やかに前処理・測定を行った。

Table 1. Substrate composition of Reactor B, C

Reactor B	
NH ₄ HCO ₃	12.3g /L
K ₂ HPO ₄	3.6g /L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.4g /L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.7g /L
Reactor C	
Dextrin	0.9g /L
Meat Extract	2.3g /L
Yeast Extract	2.0g /L
Peptone	2.0g /L
NaCl	0.2g /L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3g /L
KH ₂ PO ₄	0.6g /L
KCl	0.3g /L
NH ₄ Cl	5.8g /L
NaHCO ₃	5.8g /L
Autoclave (121℃, 60min.)	

2.2 前処理

下水処理場の放流水（消毒前・消毒後ともに）・河川水は、MPN 法に対しては濃縮せず、その他の測定手法用には遠心分離（約 3000g、30 分、4℃）で 300 倍濃縮して分析に供した。

2.3 FISH 法

基本的には Amann ら¹⁴⁾、Wagner ら¹⁵⁾、Mobarry ら⁵⁾によって報告されたプロトコルに従った。すなわち、4℃にて 3%パラホルムアルデヒド溶液にサンプルを 2 時間以上漬けて置いて固定した後、定量が必要なサンプルについては超音波分散し、直径 5mm のウェルの付いた（ウェル以外の部分には疎水コートがなされている）ゼラチンコート済みスライドガラス上にサンプルを 3μL 滴下、風乾後エタノール系列（50%、80%、98%）に 3 分ずつ漬けて脱水、ホルムアミドの配合されたハイブリダイゼーションバッファー（0.9M NaCl、20mM Tris/HCl、0.01% SDS、pH 7.2）に溶解した XRITC（X-Rhodamine Isothiocyanate）標識 Nso190 プローブ（5'-CGA TCC CCT GCT TTT CTC C-3'；βサブクラスアンモニア酸化細菌全体を検出（日清紡））、あるいは XRITC 標識 DNA プローブ NEU¹⁵⁾（5'-CCC CTC TGC TGC ACT CTA-3'；*Nitrosomonas* 数種を検出（宝酒造製））をハイブリダイズ（46℃、2 時間）させ、洗浄後（48℃、20 分）、共焦点レーザー顕微鏡（Leica TCS-NT）で撮影した。撮影には PL APO×63 レンズを使用した。得られた画像（正方形）の 1 辺は 158.7μm であった。画像 1 枚の面積は 1 ウェルの約 779 分の 1 である。画像 1 枚の中に検出されたアンモニア酸化細菌数にこの倍率を掛け、滴下した液量で割ると、サンプル中のアンモニア酸化細菌濃度が推定できる。

既知のアンモニア酸化細菌群は、塩基配列のマッチングから見て Nso190 プローブでおおむね十分に検出できる（Fig.1）。しかし、Nso190 プローブで得られる蛍光は暗い場合が多く、検出・定量に困難を来す場合が多かった。そこで、Nso190 プローブよりも明るい蛍光が得られる NEU プローブもあわせて実験を行い、Nso190 プローブを用いた FISH 法での検出がうまくいかない事態に備えることにした。ただし、NEU プローブのカバー範囲は Nso190 よりも狭いため、NEU プローブで検出できるのはアンモニア酸化細菌全体ではなく、その中の一群ということになる。

ホルムアミド濃度に関しては、NEU プローブに関しては文献通り 40%¹⁵⁾を、Nso190 プローブに関しては、文献では 55%⁵⁾のところ、25%を用いた。この最適化に関しては後述する。

本実験で使用したサンプルには、プローブと夾雑物との非特異結合を起こすものが多かったため、上記の基本的なプロトコルに加え、ハイブリダイゼーションバッファーにブロッキング剤（ブロックエース（大日本製薬））を 20%配合した¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、非特異結合・自家蛍光の判別を容易にし、またハイブリダイゼーションが確実に起こっていることを確認するために、設計上ほとんどの真正細菌にハイブリダイズする DNA プローブ EUB338¹⁸⁾（5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'（宝酒造））、設計上どのような細菌にもハイブリダイズしない DNA プローブ NON¹⁹⁾（5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'（宝酒造））を組み合わせて多重ハイブリダイゼーションを行った。EUB338 プローブには FITC（Fluorescein Isothiocyanate）を、NON プローブには Cy5（シアニン系蛍光色素（Amersham Pharmacia Biotech））を標識することで、同一視野に対し、ターゲットプローブ（XRITC 標識された Nso190 プローブあるいは NEU プローブ）の影響を受けない、それぞれのプローブに由来する画像を得ることができた。そして、ターゲットプローブと EUB338 プローブの画像の両方に蛍光が見いだされる部分を抽出することで、ターゲットの判定を確実なものにし、そこから NON プローブ分の画像情報を差し引くことで、NON プローブでシグナルとして検出される非特異結合と、多波長にまたがって存在する

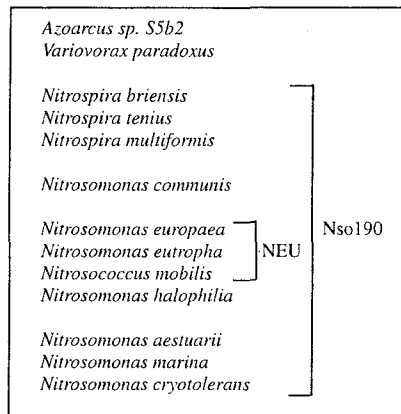


Fig.1. Target organisms and NEU, Nso190

自家蛍光を排除することができた。つまり、ターゲットに由来する真のシグナルは、「(ターゲットプローブ/EUB338 プローブ) -NON プローブ」の画像処理で抽出されることになる (Fig.5)。この処理は Scion Image for Windows (Release Beta 3、Scion Corporation) で行った。

ターゲットの個数カウントにあたっては、1 サンプルあたり無作為に 10 枚の視野を選択・撮影し、画像処理の後に目視でカウントを行った。

2.4 MPN 法

下水試験方法⁷⁾に従い、5 連法で行った。すなわち、サンプルをあらかじめ希釈して 10 倍希釈列とし、所定の培地に植種後 28℃で 30 日間培養し、GR 試薬により亜硝酸の生成を判定して MPN 表により推定した。

2.5 抗体法

硝化細菌測定キット「イムノラテックス “検出くん”」(ヤクルト本社)⁸⁾により推定を行った。利用法はキット添付のプロトコルに従った。この方法は、ラテックス粒子の結合した抗 *Nitrosomonas europaea* 抗体を、あらかじめ希釈列としたサンプルに 96 穴マイクロタイタープレート上で反応させるものであり、*Nitrosomonas europaea* とそれに類縁の血清型を持つアンモニア酸化細菌がサンプル中に存在すると、これらはラテックスの凝集として検出される。*Nitrosomonas europaea* 以外のアンモニア酸化細菌に対する反応性に関してはほとんど知られていない。抗体に対して与えられている力価と希釈倍率を掛け合わせることで、アンモニア酸化細菌の濃度が推定される。

2.6 Dot Blot Hybridization 法

TRIZOL (Life Technologies) 溶液²⁰⁾を用いた AGPC (Acid Guanidium Phenol Chloroform) 法²¹⁾で RNA を抽出⁵⁾後、希釈列とし、ナイロンメンブレン上にスポットして、DIG 標識 Nso190 プローブ⁵⁾をハイブリダイズ、NBT/BCIP 系 (Boehringer Mannheim) で発色反応を行い、目視によって判定を行った。RNA 抽出に関しては TRIZOL のプロトコル²⁰⁾に、ハイブリダイズ・発色反応に関しては DIG システムのプロトコル²²⁾²³⁾に従った。その検出の一例を Fig.2 に示す。

サンプル中のアンモニア酸化細菌濃度は、計数済み純菌の希釈列をレファレンスとして推定を行った。レファレンスとして用いる純菌の計測には、YOYO-1 を用いる全菌染色²⁴⁾、Nso190 プローブを用いる FISH 法の 2 つの菌数計測法が考えられるが、このそれぞれのレファレンスを用いたときのサンプル中のターゲット濃度をあわせて推定した。全菌ベースで計算した場合は、活性のあるなしにかかわらない全てのアンモニア酸化細菌濃度を、Nso190 ベースで計算した場合は、Nso190 プローブで検出できる程度の活性を持っているアンモニア酸化細菌濃度を推定できることになる。

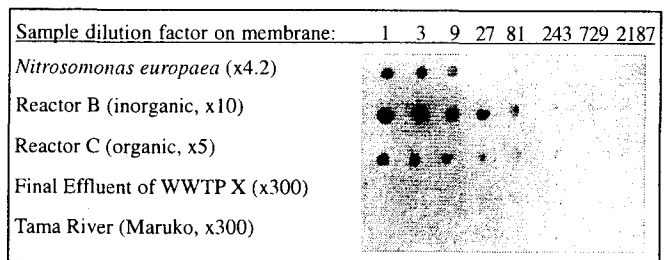


Fig.2. One example of Dot Blot Hybridization

*括弧内はサンプルの濃縮倍率を示す

2.7 アンモニア酸化速度測定実験

リアクターBから採取した汚泥を、基質の供給を絶って密閉、あるいは空曝気しつつ1か月～2か月放置し、時折サンプリングを行ってアンモニア酸化速度と FISH 法での観察結果との相関を見た。アンモニア酸化速度の測定に際しては、基質として *Nitrosomonas europaea* 純菌 (IFO14298) 用標準基質 (IFO240) を準備し、基質 100mL に対して検液 10mL を加え 20℃恒温室内でスターラーを用いて攪拌しながら曝気し、窒素計 (セントラ

ル科学HC-707N)でアンモニア性窒素の減少を計測した。リアクターBには有機物はほとんど含まれておらず、純菌用基質にも有機物は含まれていないため、実験系に有機性窒素は存在しないとみなすことができる。従って、アンモニア性窒素の減少だけでアンモニア酸化活性を計測することが可能である。

3. 実験結果と考察

3.1 *Variovorax paradoxus* (IAM12373) を用いた Nso190 プローブの実験条件の再最適化

Nso190 プローブはアンモニア酸化細菌全体を特異的に検出することを意図して設計されており、ミスマッチなし、1 ミスマッチ内にほとんどのアンモニア酸化細菌が含まれている。アンモニア酸化細菌以外の細菌は 2 ミスマッチから出現し、その一つが *Variovorax paradoxus* (IAM12373) である。

このプローブの開発を行った Mobarry ら⁵⁾は、ターゲットと非ターゲット細菌を混合したサンプルで FISH 法の実験条件の最適

化を行い、その結果、ホルムアミド濃度を 55%と設定している。しかし、この設定で得られる蛍光は極めて暗いため、実際にはホルムアミド濃度を 20%³⁶⁾に低下させ、蛍光を増加させる適用例が知られている。この場合、検出感度は向上しているが、その反面、プローブの持つ特異性が失われている恐れがある。

Nso190 プローブを取り巻くこの曖昧な状況を解消すべく、ターゲット細菌としてリアクターCから採取した汚泥混合液サンプル、非ターゲット細菌として Nso190 と 2 ミスマッチである *Variovorax paradoxus* を用いて、実験条件の再最適化を行った (Fig.3)。その結果、1) *Variovorax paradoxus* はホルムアミド濃度 30%でほとんど蛍光を持たず、25%で弱い蛍光を持ち、20%では強い蛍光を放つこと、2) リアクターCに観察されるアンモニア酸化細菌クラスターはホルムアミド濃度 30%で弱い蛍光を持ち、25%で十分な蛍光を、20%で強い蛍光を放つことが分かった。つまり、ホルムアミド濃度 20%だとターゲット・非ターゲット共に蛍光を持ってしまい不適切、30%だと非ターゲットの蛍光は消失するものの、リアクターCのアンモニア酸化細菌クラスターも見えなくなってしまいこれも不適切であった。アンモニア酸化細菌クラスターが十分な蛍光を持ち、なおかつ非ターゲット細菌の蛍光が最低限に抑えられるのは、ホルムアミド濃度が 25%の時であることが分かった。

この実験では *Nitrosomonas europaea* のようなアンモニア酸化細菌の純菌を用いていないために、ターゲット細菌であるアンモニア酸化細菌に対して厳密な評価を行うことができていない。FISH 法を適用した際に強い蛍光を発するアンモニア酸化細菌の純菌を取得することが難しかったからである。ここで行った最適化は実際に FISH 法で観察されるべきサンプルを使用している点で実用的であると考えられるが、この結果をより確実なものにするためには、純菌を用いた最適化実験を行う必要があるだろう。

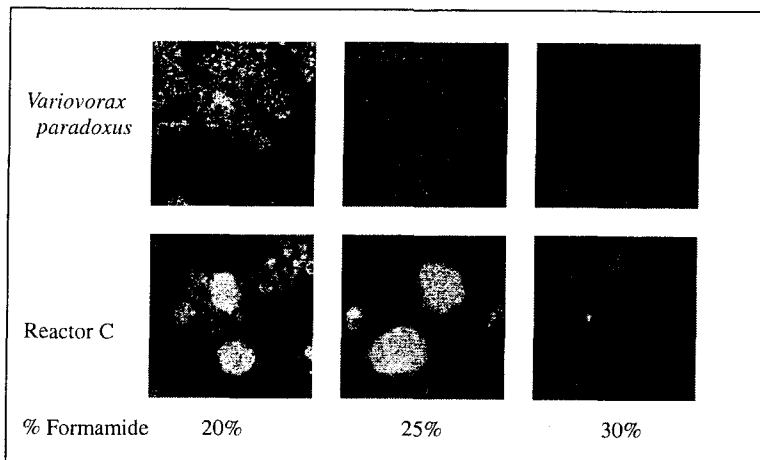


Fig.3. Re-optimization for Nso190 probe using reactor sample and 2mismatch

3.2 FISH 法、その他諸方法での測定結果

様々なサンプルに対する FISH 法の実用性を評価するために、*Nitrosomonas europaea* (IFO14298) 純菌 (表中 “N.e. sample”)、実験室内での模擬排水処理系 (リアクターA)・硝化細菌集積培養系 (リアクターB：無機基

質・リアクターC：有機基質）リアクター汚泥混合液（表中“Reactor”）、都市下水処理場X・都市下水処理場Yでの曝気槽汚泥混合液（表中“WWTP reactor”）・消毒前処理水（表中“WWTP before Cl”）・消毒後放流水（表中“WWTP effluent”）、多摩川4地点の河川水（表中“Tama Riv.”）に対し、FISH法を適用してアンモニア酸化細菌の定量を試みた。さらに、FISH法で得られる結果の妥当性の検証を目的として、MPN法、抗体法、Dot Blot Hybridization法による定量もあわせて実施した。これらの測定結果をTable 2に示す。

Table 2. Results of FISH and other methods for various samples

	N.e. sample1	N.e. sample2	Reactor A	Reactor B	Reactor C	WWTP X reactor	WWTP X before Cl [†]	WWTP X effluent
FISH (Nso190)	2.1×10^7	(1.8×10^7)	(2.1×10^8)	2.6×10^8	6.7×10^7	(2.2×10^7)	(1.6×10^4)	(1.5×10^5)
FISH (NEU)	3.8×10^7	(1.2×10^7)	2.1×10^8	5.4×10^7	2.3×10^7	(3.7×10^7)	(8.4×10^4)	(8.3×10^4)
Direct Cell Count (DCC)	7.8×10^7	3.1×10^7	—	—	—	—	—	—
MPN	—	—	—	2.2×10^6	NC ($<4.0 \times 10^5$)	2.8×10^5	9.2×10^3	2.8×10^3
Antibody	3×10^7	2×10^7	6×10^6	3×10^7	6×10^7	4×10^7	1.3×10^4	2.7×10^4
DotBlot (DCC base)	— [†]	— [†]	8×10^6	1×10^8	8×10^7	1.5×10^7	5×10^3	5×10^3
DotBlot (Nso190 base)	— [†]	— [†]	2×10^6	8×10^7	5×10^7	8×10^6	3×10^3	3×10^3

	WWTP Y reactor	WWTP Y before Cl [†]	WWTP Y effluent	Hamura (Tama Riv.)	Sekido (Tama Riv.)	Koremasa (Tama Riv.)	Maruko (Tama Riv.)
FISH (Nso190)	(7.5×10^7)	(2×10^5)	NC	NC	NC	NC	NC
FISH (NEU)	(3.3×10^7)	(1×10^5)	NC	NC	NC	NC	NC
Direct Cell Count (DCC)	—	—	—	—	—	—	—
MPN	NC ($>2.2 \times 10^7$)	4.4×10^2	8.1×10^1	2.0×10^0	2.3×10^1	2.2×10^2	4.9×10^1
Antibody	2×10^7	2×10^5	ND ($<1 \times 10^4$)	3×10^4	1×10^4	ND ($<1 \times 10^4$)	3×10^4
DotBlot (DCC base)	5×10^7	2×10^5	ND ($<5 \times 10^3$)	ND ($<5 \times 10^3$)	ND ($<5 \times 10^3$)	ND ($<5 \times 10^3$)	ND ($<5 \times 10^3$)
DotBlot (Nso190 base)	3×10^7	8×10^4	ND ($<1 \times 10^3$)	ND ($<3 \times 10^3$)	ND ($<3 \times 10^3$)	ND ($<3 \times 10^3$)	ND ($<1 \times 10^3$)

* 単位:個/mL、—:未測定、ND:定量下限以下、NC:計測不能（FISH法ではターゲットの判別が極めて困難で、計数不能であった場合。MPN法では不適切な希釈倍率設定によって測定値が決定できなかった場合）。

* N.e.: *Nitrosomonas europaea* (IFO14298) 純菌。サンプル1,2は培養日数が異なる。WWTP: 都市下水処理場。

* FISH法での括弧の有無はデータの信頼性を定性的に示している。計測に困難を伴ったデータを括弧付きとした。

* 300倍濃縮時の各手法の現状での定量下限は以下の通り。MPN法: 7×10^4 、抗体法: 1×10^4 、FISH法: 9×10^3 、Dot Blot Hybridization法: 1×10^3 （単位:個/mL）。MPN法、抗体法、FISH法ではこの濃縮倍率で起こり得る定量下限を計算的に推定した。Dot Blot Hybridization法では実際の実験で得られた検出感度を元に推定を行った。

† 他のサンプルのDot Blot Hybridization法による推定のためのリファレンスとして利用されている。

(1) 硝化細菌集積培養系の場合

硝化細菌を集積することを目的としているリアクターB・Cでは、FISH法で得られる蛍光は非常に明るく、計数は容易であった（Fig.4）。これらの系でのFISH法での測定結果は十分に信頼できる。

FISH法と抗体法・Dot Blot Hybridization法との比較においても、オーダーで見てもおおむね一致している。FISH法とMPN法とを比較すると、MPN法が1~2オーダー低い測定結果となっている。これらのリアクターの中

では、ほとんどのアンモニア酸化細菌がクラスター状の構造をとっており (FISH 法での確認による (例えば Fig.3)), MPN 法での測定時にクラスターを菌体単位に十分に分散できないことによる影響が強く出ていると考えられる。

(2) 都市下水処理場の曝気槽・放流水サンプル、河川水サンプルの場合

都市下水処理場 X・Y の曝気槽・放流水、都市下水処理場を模した実験室内排水処理系であるリアクター A、また河川水では、FISH 法での判定・計数はかなり困難であった (Fig.5)。計測に困難を伴ったデータを表中では括弧付きで、また、計測を行ってみたがデータの信頼性があまりに疑わしい物を表中では NC として示した。

この場合、1) ターゲットの蛍光そのものが暗いこと、2) サンプルそのものが持つ自家蛍光、3) さらにプローブがターゲット以外の夾雑物に結合してしまう非特異結合、の 3 つの事柄が問題となった。この影響を受けて、他の測定手法との測定結果の一貫性が失われ、リアクター A、都市下水処理場 X の放流水に見るように抗体法・Dot Blot Hybridization 法に比べて FISH 法の結果が高めに出る傾向が現れている。河川水に対して計測を試みた結果 (表中では NC となっている) では、この傾向はさらに顕著であった。都市下水処理場 X・Y の曝気槽でのデータに関しては、FISH 法と抗体法・Dot Blot Hybridization 法の結果はオーダーで見てもおおむね一致しているように見えるが、それでも上記のような理由で、FISH 法自体のデータの信頼性は高くないものと考えられる。

対策として、1) 共焦点レーザー顕微鏡の検出器感度の引き上げ、それに伴うノイズを削減するための画像の複数回取り込み→平均化、2) 自家蛍光とターゲットを判別するための多波長画像重ね合わせ・差し引き、3) 非特異結合を削減するためのブロッキング剤、またこれを判別するための NON プローブの併用などを行っているが、それでもターゲットを確実に判定できるとは言い難い。Nso190 でなく NEU プローブを使用すると、得られる蛍光強度は幾分増加する現象が見られ、判定が多少容易になったものの、全体的な状況に変化はなかった。

放流水や河川水サンプルの場合、Dot Blot Hybridization 法や MPN 法での測定結果を見ると、これらのサンプル中のアンモニア酸化細菌濃度は FISH 法での定量下限以下であった (具体的には、顕微鏡で撮影された画像の中にほとんど入っていなかった) 可能性がある。しかし、たとえ濃縮倍率を上げてターゲットが画像の中にある一定数入ってきたとしても、上記で触れた 3 つの問題のために、定量は容易にならず、むしろ非特異結合や自家蛍光が強まって、定量がより困難になるだろうと思われる。

(3) Nso190 プローブと NEU プローブの比較

Nso190 プローブの測定値と NEU プローブの測定値はおおむね一致した。このことから、本研究で取り扱ったサンプル中のアンモニア酸化細菌は、多くが NEU で検出できる *Nitrosomonas* 種に属していたと考えられる。

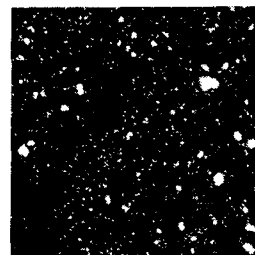


Fig.4. Probe signal from reactor B

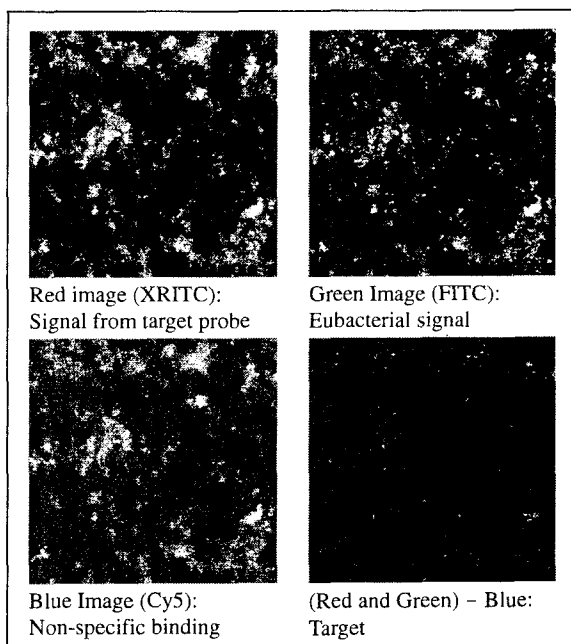


Fig.5. Signals from WWTP X reactor

数値を少し詳しく見ていくと、Nso190 はアンモニア酸化細菌のおおむね全体を、NEU はその中の *Nitrosomonas* 他数種を捉えるものであるから (Fig.1)、論理的には Nso190 の測定値の方が NEU を上回るはずである。しかし、確実にこの傾向が判断できるのは、蛍光が非常に明るいリアクター B・C だけである。FISH 法による定量が精度良く行えるのは得られる蛍光が明るい場合であり、蛍光が暗い場合は、自家蛍光・非特異結合などの妨害要因や、それぞれのプローブの持つ検出感度 (ミスマッチ株を検出しないように最適化した状態で FISH 法を行った際に、ハイブリダイズしたプローブから発せられる蛍光の明るさ) などの要素が大きく効いてくる、ということをこの結果は示唆している。

(4) 本研究で行っているアンモニア酸化細菌に対する FISH 法の実用面から見た適用限界

この結果を FISH 法の実用性という観点から見ると、一般的な都市下水処理場の曝気槽汚泥はアンモニア酸化細菌に対する FISH 法の実用下限に位置していると考えられる。得られる結果には一応の一貫性があるように見えるが、実際の計数は困難な場合が多く、結果の信頼性は低いと思われるからである。そして、これ以上のアンモニア負荷がかかっている系 (リアクター B・C) の場合、本研究で行っている FISH 法は十分実用に耐え得るし、これ以下のアンモニア負荷である放流水・河川水の場合、サンプルの前処理や蛍光を増幅するテクニックなど FISH 法に関わる技術的な改良が必要である、と考えることができるであろう。

3.3 アンモニア酸化速度と FISH 法での観察結果との相関

都市下水処理場の曝気槽汚泥混合液サンプルで見たように、他の手法での測定結果を見る限りは視野内にある程度以上の菌体数があるにもかかわらず、FISH 法ではターゲットの蛍光が暗く、判別や定量が困難であるという問題にしばしば直面する。しかしながら、どの程度の活性を系が持っていれば FISH 法で検出可能なのか、実証的に把握した研究はあまりないのが現状である。そこでこの実験では、アンモニア酸化速度と FISH 法での観察結果の相関を取ることで、ターゲットの持つ蛍光と系の活性との関連づけを試みた。

具体的にはまず、リアクター B から採取した汚泥をそのまま密閉して静置、あるいは空曝気して 1~2 か月間放置し、アンモニア酸化活性を次第に失わせた。その過程で不定期にサンプリングを行い、FISH 法によってカウントされるアンモニア酸化細菌由来の画素数とアンモニア酸化速度の変化の両面から経日変化を追跡した。FISH 法では Nso190 プローブを用いて、一つのスライドガラス上の個別のウェルに全てのサンプルを等量 (3 μ L) スポットし、同時に実験・計測を行った。計測は、ある蛍光強度の閾値を設定し、それ以上の蛍光強度を持つ視野内の画素数を Scion Image を用いて計数することで行った。経日変化を Fig.6、Fig.7 に、その結果をまとめたものを Fig.8 に示す。

ばらつきは大きいものの、FISH 法で計測可能な画素数とアンモニア酸化活性には相関関係があることが見て取れる。この実験結果において、両者の関係を示す回帰直線を仮に設定するとこれが正の y 切片を持

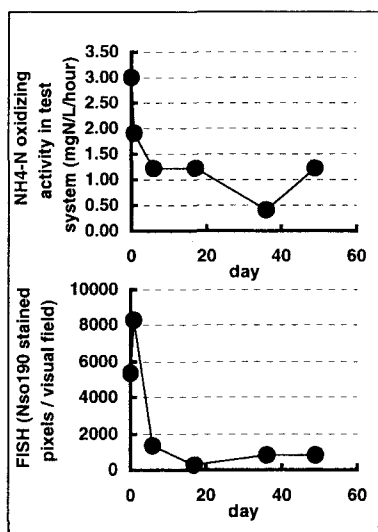


Fig.6. Change of activity and FISH observation: closed system

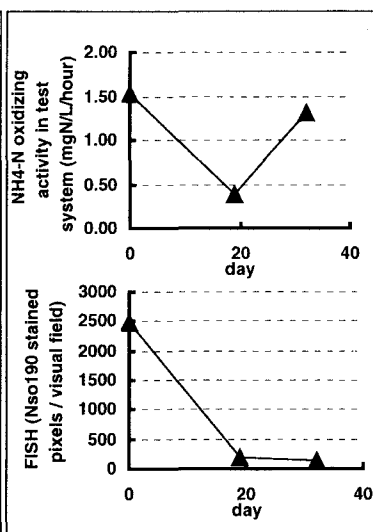


Fig.7. Change of activity and FISH observation: aerated system

つことから、系のアンモニア酸化活性は存在するものの、FISH 法ではターゲットが見えないケースがあることが明らかになった。これらのデータの元となる FISH 法での測定では全てターゲットを視野内に確認できたことから、これは FISH 法での定量下限のために起こることではなく、基本的には得られる蛍光が暗くなったことから引き起こされると考えられる。

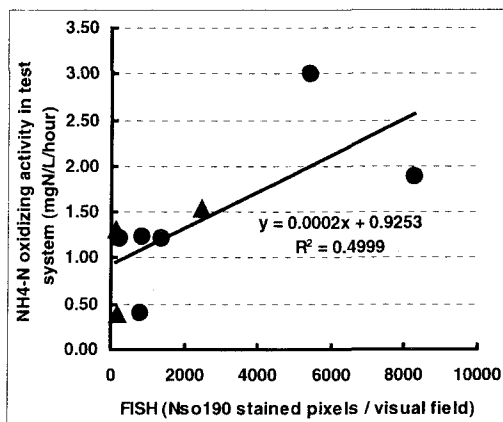


Fig.8. Activity-FISH correlation

この現象は、a) 細胞の活性が低く、細胞に含まれるリボソーム数が、つまり rRNA 量が減少するため、プローブの 1 細胞あたりのハイブリダイズ量が減少する¹⁾、b) 細胞膜が厚くなりプローブの浸透性が悪くなる¹⁾、c) rRNA は二次構造を持っており、標的部位が rRNA 構造体の中でハイブリダイズしにくい位置にある¹⁾、といったことでしばしば説明される。静置または空曝気中にアンモニア酸化細菌が大きく変化していないとすれば、その理由は主に a) であろうと考えられるが、b) の可能性も排除できない。この実験だけでその正確な理由を推定することはできない。

しかしここでは、実用的な「FISH 法での観察」ということに着目してこの実験結果を捉えることにする。この視点で見たときに、「アンモニア酸化活性はあるが FISH 法では蛍光が暗いために検出できないケースが存在する」というこの結論は、アンモニア酸化細菌に対して Nso190 プローブを用いた FISH 法を行う場合に留意すべきことと考えられる。

4. おわりに

アンモニア酸化細菌に対する FISH 法の実用性を評価すべく、1) Nso190 プローブを用いた際の実験条件の再最適化、2) 集積培養系、都市下水処理場（模擬系・実際の系）曝気槽・放流水、河川水を対象にした、FISH 法・その他諸方法によるアンモニア酸化細菌の計測、3) アンモニア消費活性と FISH 法での観察結果の相関を見る実験を行い、次のような結果を得た。

1) Nso190 プローブを FISH 法に用いた際の最適ホルムアミド濃度は 25%であった。ただしこれは、アンモニア酸化細菌の純菌を用いない、実用性を優先した最適化であり、厳密性が要求される場合には、アンモニア酸化細菌の純菌を用いた最適化を行う必要がある。2) FISH 法での測定結果の信頼性が高いと思われる硝化細菌集積培養系では、FISH 法と抗体法・Dot Blot Hybridization 法ではオーダーでおおむね同じ計測値が得られるものの、MPN 法での測定値はそれより 1~2 オーダー下回った。3) 都市下水処理場や河川系といった比較的アンモニア負荷が低い系になると、FISH 法でのアンモニア酸化細菌の検出は難しくなった。4) 系のアンモニア酸化活性はあるものの、FISH 法ではそこから得られる蛍光が暗いために、アンモニア酸化細菌が検出できない状況が確かに存在した。

以上のように、FISH 法が力を発揮する系とそうでない系があることが明らかになった。FISH 法がうまく適用可能な系に対しては、より積極的に FISH 法を活用していくことが可能であるが、そうでない系に対しては、サンプルの前処理、蛍光を増加させるテクニックなど、FISH 法の更なる技術的な改良が必要であると思われる。

参考文献

- 1) Amann,R.I., Ludwig,W., and Schleifer,K.H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation, *Microbiological Reviews*, **59**, 1, 143-169.
- 2) 荒木信夫, 大橋晶良, 原田秀樹, Machdar,I. (1999) FISH 法を適用した生物膜内硝化細菌の菌数計測と空間分布の観察, 水環境学会誌, **22**, 2, 152-159.
- 3) 岡部 聡, 内藤初夏, 渡辺義公 (1999) FISH 法を用いた都市下水生物膜内におけるアンモニア酸化細菌の空間分布の解析, 水環境学会誌, **22**, 3, 191-198.
- 4) 佐藤 久, 岡部 聡, 渡辺義公 (1999) 微小電極および FISH 法を用いた都市下水生物膜内のアンモニア酸化機構の検討, 水環境学会誌, **22**, 3, 206-214.
- 5) Mobarry,B.K., Wagner,M., Urbain,V., Rittmann,B.E., and Stahl,D.A. (1996) Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 6, 2156-2162.
- 6) 伊藤 司, 乗松直生子, 佐藤 久, 岡部 聡, 渡辺義公, 境 一澄 (1997) 硝化菌生物膜の生態学的構造解析, 第 34 回環境工学研究フォーラム講演集, 自由投稿発表セッション, 91-93.
- 7) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部監修 (1997) 下水試験方法上巻 1997 年版, 608-611, (社) 日本下水道協会.
- 8) 安田 勉, 柳下正美 (1996) 抗体法を用いた硝化細菌の測定手法の開発, 下水道協会誌, **33**, 400, 44-51.
- 9) Hovanec,T.A. and DeLong,E.D. (1996) Comparative Analysis of Nitrifying Bacteria Associated with Freshwater and Marine Aquaria, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 8, 2888-2896.
- 10) (財) 発酵研究所 (IFO) 編 (1996) List of Cultures, Microorganisms, Tenth Edition, 504.
- 11) 東京大学応用微生物研究所微生物微細藻類総合センターIAM 微生物・微細藻株カタログ編集委員会編 (1993) IAM 微生物・微細藻株カタログ初版, 164.
- 12) 太田智久, 佐藤弘泰, 味埜 俊, 松尾友矩 (1999) 第 36 回環境工学研究フォーラム自由投稿発表セッション (投稿準備中)
- 13) Zheng,H., Hanaki,K., and Matsuo,T. (1994) Production of Nitrous Oxide Gas during Nitrification of Wastewater, *Water Science and Technology*, **30**, 6, 133-141.
- 14) Amann,R.I. (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6: 1-15, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 15) Wagner,M., Rath,G., Amann,R., Koops,H.P., and Schleifer,K.H. (1995) *In situ* Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, **18**, 251-264.
- 16) 小沼 晋, 佐藤弘泰, 味埜 俊, 松尾友矩 (1999) 硝化細菌定量法の比較検討, 第 33 回日本水環境学会年会講演集, 533.
- 17) 荒木信夫, 田中 力, 戸田岳史, 大橋晶良, 原田秀樹 (1996) 16SrRNA 標的 DNA プローブの In-situ Hybridization 手法の検討, 土木学会第 51 回年次学術講演会講演概要集第 7 部, 150-151.
- 18) Amann,R.I., Krumholz,L., and Stahl,D.A. (1990) Fluorescent Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic and Environmental Studies in Microbiology, *Journal of Bacteriology*, **172**, 762-770.
- 19) Wallner,G., Amann,R., and Beisker,W. (1993) Optimizing Fluorescent in situ Hybridization with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms, *Cytometry*, **14**, 136-143.
- 20) Life Technologies, Inc. (1997) TRIzol Reagent (Instruction Manual), Form #3796.
- 21) Chomczynski,P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, *BioTechniques*, **15**, 532-537.
- 22) ベーリンガー・マンハイム株式会社, DIG 標識核酸検出キット (取扱説明書).
- 23) ベーリンガー・マンハイム株式会社 (1997) DIG システムを用いてハイブリダイゼーションを行なうためのユーザガイド.
- 24) 肥田野哲樹, 原田秀樹, 大橋晶良, 珠坪一晃 (1998) 蛍光染色による環境微生物の検出方法, 第 32 回日本水環境学会講演集, 378.