

氏名(本籍)	いくたはじめ 生田創(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2804号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	モノクローナル抗体を用いた排水処理における硝化細菌定量手法の実証評価
主査	筑波大学教授 工学博士 松村正利
副査	筑波大学教授 工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授 農学博士 佐藤誠吾
副査	筑波大学教授 農学博士 前川孝昭

論文の内容の要旨

排水処理施設における窒素除去法は、一般に生物学的な硝化反応と脱窒反応の組合わせからなる。この一連の反応において、硝化反応に携わるアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌といった硝化細菌の増殖が律速因子となることから、水量、水質の急激な負荷変動等に伴う硝化細菌の活性低下、個体数減少を迅速に評価する手法の開発は極めて重要である。そうした手法は処理施設の管理や設計のみならず、土壌や湖沼等の生態系における窒素循環経路を知る上でも有効である。

本研究では、代表的なアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌である、*Nitrosomonas europaea* および *Nitrobacter winogradskyi* に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を用いた硝化細菌の簡便かつ迅速な検出および定量手法の開発を行った。

最初に、硝化細菌に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの開発を行った。その結果、*N. europaea* に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマはIgG産生のもが1種、IgM産生のもが5種、*N. winogradskyi* に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマはIgG産生のもが7種、IgM産生のもが3種それぞれ獲得された。なお、得られた抗体には、他の細菌に対する顕著な交差反応性は見られなかった。

ついで、硝化細菌の簡便かつ迅速な検出・定量手法として、「競合ELISA法」、「2抗体サンドイッチELISA法」、「multi-well filtration ELISA法」および「蛍光抗体法を用いた直接計数法」のモノクローナル抗体を用いた4つの手法による評価、検討を行った。その結果、4つの手法ともに、硝化細菌濃度に対し、一定の定量性を示した。中でも multi-well filtration ELISA 法は定量域が広く、迅速かつ簡便な手法であり、実際の排水処理施設においても使用が可能なものであった。また、蛍光抗体法を用いた直接計数法は、定量下限が低く、菌体濃度が低い湖沼等の環境においての適応が可能なものであった。

さらに、従来の硝化細菌の定量手法であるMPN法と新規の手法であるmulti-well filtration ELISA法およびDCC-FISH法の原理が全く異なる3つの手法を用いて活性汚泥中のアンモニア酸化細菌の定量を経時的に行い、その定量特性を把握し、今後の排水処理における運転管理や装置設計に役立てることを目的として、実験を行った。その結果、活性汚泥中の硝化活性が高いときにおける multi-well filtration ELISA 法によるアンモニア酸化細菌数はMPN法よりもわずかに低い値を示すものの、その定量特性は、DCC-FISH法と対照的に極めてMPN法に近いことが明らかとなった。

最後に、モノクローナル抗体を用いて、*in situ* 蛍光抗体法による PEG 包括固定化担体および付着型 PEG 担体における硝化細菌の経日的な挙動解析を行った結果、両担体共に運転開始後に何らかの要因で硝化細菌が減少していることが観察された。これは包括固定時のショックや供試排水の変化によるストレス、更に高密度に存在している細菌に対して、基質の供給が足りない等の要因が考えられた。今後、種特異性の高い抗体と組み合わせて解析を行うことにより、異なる環境条件・処理状況における優占種の変遷および種間の分布特性についても把握することができるものと考えられた。

以上の結果から、硝化細菌の定量は、本研究で得られたモノクローナル抗体を用いることにより、迅速かつ簡便に行えることが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

排水処理施設における窒素除去法は、一般に生物学的な硝化反応と脱窒反応の組合わせからなる。この一連の反応において、硝化反応に携わるアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌といった硝化細菌の増殖が律速因子となることから、負荷変動等に伴う硝化細菌の活性低下、個体数減少を迅速に評価する手法の開発は極めて重要である。

本研究では以上のことを鑑み、代表的なアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌である、*N.europaea* および *N.winogradskyi* に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を用いた硝化細菌の簡便かつ迅速な検出および定量化手法の開発を行った。

その結果、2抗体サンドイッチ ELISA 法は、 $1.0 \times 10^6 \text{N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上の菌体濃度の迅速かつ簡便な測定が可能な手法であることを明らかにすると共に、「蛍光抗体法を用いた直接計数法」を応用することにより、実際の排水処理装置内における生物膜内および包括固定化担体内の *in situ* における硝化細菌の分布特性の解析が可能であることも明らかとなった。

以上の結果から、本研究で得られたモノクローナル抗体は、混合微生物系においても、特異的に *N.europaea* および *N.winogradskyi* と結合しており、硝化細菌の簡便かつ迅速な検出および定量化手法が確立され、その成果は極めて大きい。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。