

- 413 ホールマウント法を用いた硝化細菌の多検体同時迅速定量化手法の
評価および検討
○生田 創、稲森 悠平*、松村 正利** (筑大院・農・応生、*国環研、**筑波大)

排水中の窒素除去を担う硝化細菌の定量化において、通常のELISA法では $1.0 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下の菌体密度の測定は極めて困難となる。一方、抗原抗体法やFISH法を用いた蛍光顕微鏡下での直接計数法では、操作が煩雑となるため誤差が大きく多検体を同時に扱うことが困難となる。そのため本研究では、底面に $0.22 \mu\text{m}$ のポアサイズフィルターを取り付けた96穴プレートを用い、ホールマウントELISA法およびホールマウントハイブリダイゼーション法による、より安価で多検体の測定が可能な硝化細菌の簡易迅速定量化手法の評価および検討を行った。

ホールマウント法による検量線作成の検討を行った。まず、底面に $0.22 \mu\text{m}$ のポアサイズフィルターを取り付けた96穴プレートの各ウェル中に調整したサンプルを $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し洗浄を行った。ELISA法では、Blocking処理を行った後1次抗体を反応させ、洗浄後AP標識2次抗体を添加し室温で1時間反応を行った。最後に基質であるp-NPPを添加し、酵素基質反応による発色をマイクロプレートリーダーを用いて測定し検量線の作成を行った。なお、全ての洗浄は専用のバキュームマニホールドを用いた吸引ろ過により行った。ハイブリダイゼーション法においても同様のプレート上において各反応を行った。サンプルの添加後固定を行い、DIG標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄後ビオチン標識抗DIG抗体を反応させ、次にAP標識ストレプトアビジンを反応させて洗浄し、最後にp-NPPを添加し発色を測定し検量線の作成を行った。その結果、定量下限が約 $1.0 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ の菌体密度の検量線の作成が可能となった。また、本手法は吸引ろ過を用いてサンプルを固着させているため、ろ過量を増やすことでそれ以下の菌体密度においても定量が可能であった。

Evaluation of rapid quantification of nitrifier in many samples by using wholemount method

○Hajime Ikuta, Yuhei Inamori*, Masatoshi Matsumura** (**Tsukuba Univ., *NIES)
wholemount method, nitrifier, monoclonal antibody, hybridization

- 414 *Alcaligenes faecalis* No.4 による従属栄養硝化・脱窒反応
(東工大・資源研) ○和光良平 平井光代 阿野貴司 正田誠

【目的】近年、従属栄養硝化菌が好気条件下で、硝化反応($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)と脱窒反応($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)の両方を行っているという報告がある¹⁾。この菌が利用できれば、好気槽一槽での NH_4^+ から N_2 への変換が可能となる。本研究は、本研究室で単離された*Alcaligenes faecalis* No.4が、好気条件下で硝化反応、脱窒反応を行うことを回分実験により確認し、 NH_4^+ 除去の最適条件を検討することを目的とした。

【方法及び結果】窒素源を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、炭素源をクエン酸ナトリウム塩とした合成培地300 ml、にNo.4株を1%植菌し、回分通気培養(30℃、1.6 vvmで空気を通気)を行い硝化産物、脱窒中間生成物の経時変化を測定した。No.4株の増殖に伴い、 NH_4^+ の減少がみられ、培地中に硝化産物である NH_2OH 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、排気中に脱窒中間生成物 NO 、 N_2O が検出された。このことより、No.4株は好気条件下において、硝化反応、脱窒反応の両方を行っていることが確認された。続いてNo.4株の NH_4^+ 除去能の最適条件を検討するため培地中のC/N比、pHを変化させた。C/N比は10の時、pHは8の時が最適であった。No.4株は、50時間の回分通気培養において90%の NH_4^+ を除去した。また、その時の脱窒の割合はN-balanceから消費 NH_4^+ の46%(2回の平均)であった。

¹⁾E. W. J. van Niel et. al., Antonie van Leeuwenhoek, 62, 231-237, 1992

Heterotrophic nitrification and denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4

○Ryohei Wako, Mitsuyo Hirai, Takashi Ano, Makoto Shoda (Res. Lab. Resour. Util., Tokyo Inst. Technol.)

【Key word】*Alcaligenes faecalis*, heterotrophic nitrification, aerobic denitrification, NH_4^+ removal