

## &lt;論文&gt;

## 酵素蛍光法を用いた大腸菌群数計測装置の開発

Development of Monitoring System for Coliforms  
using Enzyme Fluorescence Method

○守川 彰、古川誠司

三菱電機(株) 先端技術総合研究所

Akira Morikawa, Seiji Furukawa

Advanced Technology R &amp; D Center, Mitsubishi Electric Corporation

## Abstract

A monitoring system for coliforms in treated effluent of a wastewater treatment plant has been developed. In order to achieve the rapid monitoring within one hour, enzyme fluorescence method without culturing process was introduced to this system. It detects the increase rate of fluorescence intensity as enzyme activity and converts it into coliforms concentration instead of transforming the value of fluorescence intensity itself. Moreover, it is equipped with the pre-filtering unit to remove the interfering substances in the suspended solids caused deterioration in measurement precision. The good correlation coefficient of 0.9 between the monitoring values of coliforms concentration and the analyzed values by conventional direct counting method was obtained in the continuous test at an existing wastewater treatment plant.

**Key Words:** Coliforms,  $\beta$ -galactosidase, Enzyme fluorescence method, Rapid detection, Effluent sterilization

## 1.はじめに

下水処理場における放流水の水質基準は大腸菌群数 3000 個/mL 以下と規定されているため、塩素等により放流直前に消毒が行われている。大腸菌群数の測定には下水試験方法<sup>(1)</sup>で定められているデソキシコレート寒天培地法(以下「デソ法」)等の培養操作によって菌体を増殖し計数する方法が用いられているが、測定に 18 時間以上必要であり消毒剤の注入量をリアルタイムで制御することはできない。しかし環境影響やランニングコストの面から、今後は過不足のない注入量制御が望ましいと考えられる。

大腸菌群数の 1 時間以内の迅速測定を行うためには、時間がかかる培養操作を省略する必要がある。培養操作を用いずに微生物数を測定する手法としては、抗原抗体法、ATP 法等が存在するが、これらは一般的に複雑な処理操作が必要であった<sup>(1)</sup>。そこで筆者らは、大腸菌群が所持している酵素の活性を利用して測定する酵素蛍光法に着目した<sup>(2)</sup>。酵素蛍光法の操作は、基本的にサンプルと試薬を混合させるのみでシンプルであり、連続測定可能な自動装置を構築する上で有利である。ただし従来の酵素蛍光法では、高感度に測定するために培養操作を予め行うのが一般的であった。本研究では、培養操作を省略しながらも高精度な測定が可能な大腸菌群数計測装置の開発を目指して検討を行った。

本報では、培養操作を省略した酵素蛍光法による迅速大腸菌群数測定の原理実証を行った結果、ならびに実際の二次処理水への適用検討を行った結果について述べる。さらには自動連続運転による測定再現性の検証を行った結

果についても報告する。

## 2. 実験装置の原理と構成・動作

### 2.1 測定原理

酵素蛍光法の原理は、大腸菌群が保持している酵素と特異的に反応する酵素基質から生成した蛍光物質を定量し、大腸菌群数に換算するものである。大腸菌群が保持する酵素として、今回は $\beta$ -galactosidase (以下「 $\beta$ -gal」)に注目した<sup>(2)(3)(4)</sup>。 $\beta$ -gal と特異的に反応する分析用の酵素基質については、発色酵素基質、蛍光酵素基質、発光酵素基質が知られている<sup>(4)</sup>。感度面からは発光酵素基質、蛍光酵素基質、発色酵素基質の順で有利であるが、本研究においては高感度を確保しつつも複雑な検出機構とせず、また試薬の入手や保管が容易であることを条件に比較した結果、蛍光酵素基質 (4-MUG、4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)<sup>(2)</sup>を用いることにした。反応経路を Fig.1 に示す。蛍光性を持たない 4-MUG が $\beta$ -gal により触媒加水分解を受け、蛍光物質として、4-MU (4-methylumbelliferone) を生成する。4-MU は 360nm 付近の光を照射することで 450nm の蛍光を発する。

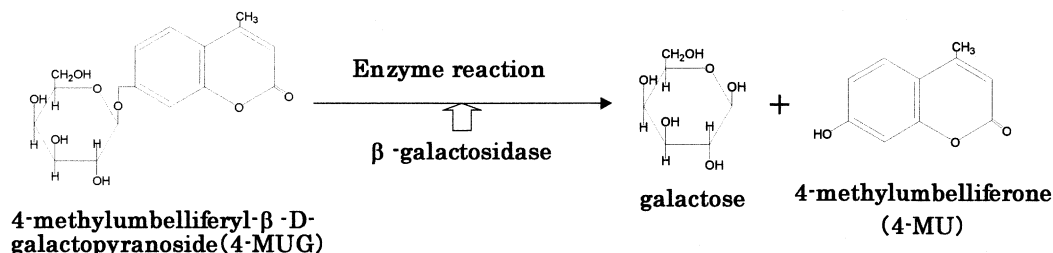


Fig.1 Enzyme reaction of  $\beta$ -galactosidase using 4-MUG

しかし酵素蛍光法は、一般的に予め数時間の培養操作を行うことで大腸菌群を増殖させて計測しているため、時間がかかる欠点がある。そのため本研究では、1 時間以内の測定を実現するために培養操作を省略することとし、大腸菌群の細胞が元々保持している酵素活性から大腸菌群数を推定する方法を採用した<sup>(2)</sup>。ミハエリスーメンテン式によると基質が十分多量に存在する時の酵素反応による生成物質の増加速度は酵素活性に比例し、また酵素活性が大腸菌群数に比例すると仮定した場合は酵素活性から大腸菌群数を求めることができる。すなわち 4-MUG を添加、混合した後のサンプルに 360nm の光を照射したときの蛍光強度の増加速度を大腸菌群の酵素活性とみなし、大腸菌群数に換算する。蛍光強度の絶対値を直接大腸菌群数に換算するものではないため、二次処理水に含まれる蛍光物質の影響を受けにくく、希薄な大腸菌群の濃度を培養操作なしで測定できると期待される。

### 2.2 大腸菌群数計測装置の構成

Fig.2 に装置の基本的な構成を示す。装置構成は、近年、計測装置で主流となっているフローインジェクション (以下「FIA」) 方式を採用した。ただし酵素反応の時間が通常の FIA 方式で用いられる化学反応と比較して長いため、連続通水で試薬を反応させるノーマルフロー方式ではなく、間欠的に送液するストップフロー方式を採用した。

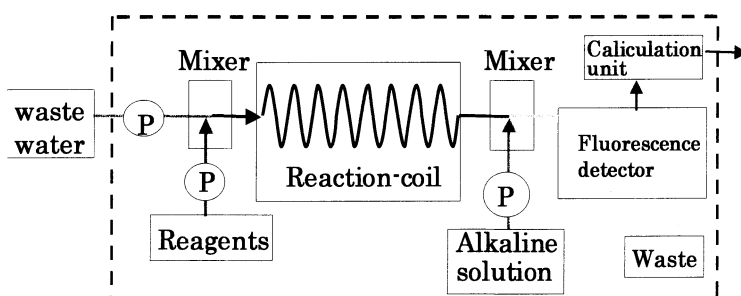


Fig.2 Schematic diagram of the proposed monitoring system for coliforms

Fig.2の配管をコイル状に形成した反応部分は、 $\beta$ -galによる触媒分解反応を行うために37°Cの恒温状態とした。また、励起光源として発光ダイオード、蛍光物質を励起させるための光源、酵素反応後のサンプルを導入する蛍光セル、蛍光を検出するフォトマルチプライヤーで構成した。

### 2.3 装置の動作

サンプルに蛍光酵素基質、細胞膜を軟化させる作用を持つラウリル硫酸ナトリウム、反応時のpHを一定に保つための緩衝液を一定比で混合させ、反応部分に一旦混合溶液を滞留させる。反応部分の配管内では $\beta$ -galによる反応が行われる。その後混合溶液を10分毎に順次送液すると同時にアルカリを注入した後、混合溶液を蛍光検出部に送る。反応時間としては30分まで行っており、蛍光検出部の出力電圧から予め求めた検量線により蛍光物質の生成速度を求めた。別途に孔径0.22 $\mu$ mのフィルタで濾過したサンプルから求めた蛍光物質の生成速度を差し引いて、大腸菌群の $\beta$ -gal活性値(単位は $\mu$ g/L/min)を得た。これは、溶液中にも $\beta$ -galが存在しているので、これをバックグラウンドとして補正する必要があるからである。測定終了後に塩酸および水道水による配管の内部洗浄を10分間行った。そのため1サンプルあたりの計測時間は40分となる。

## 3.実験方法

### 3.1 大腸菌群数計測装置の原理実証

装置の出力電圧から4-MU濃度に換算する検量線を求めるために、4-MU(和光純薬製)を0~90 $\mu$ g/Lの濃度で数種類適宜に調製して装置に供給し、出力電圧を求めた。また装置の応答性を調べるために人工的に調製した大腸菌菌液のサンプルを装置に供給し、大腸菌濃度依存性を求めた。大腸菌菌液のサンプルはTSB培地(without グルコース: Difco社)に $\beta$ -galの誘導剤としてIPTG(isopropyl thiogalactoside)を0.006%添加した液体培地により、大腸菌(*Escherichia coli* K12株)を18~20時間培養後に菌体洗浄、希釈により得た。

また比較対照となる培地法による大腸菌群数の評価は、下水試験方法<sup>(1)</sup>に記載のデソ法により行い37°Cで20時間培養後、形成された紅~淡紅色の直径0.5mm以上のコロニーを目視でカウントした。

### 3.2 二次処理水測定のための検討

下水処理場の消毒前の二次処理水を採水後、4時間以内に以下のいずれかの前処理を行ってから装置に供給した。

- ① 二次処理水を手動でフィルタ濾過した。フィルタはポリカーボネート製で電子線により穿孔したもので、大腸菌群が通過可能な孔径のものを用いた。
- ② セラミックフィルタ(長さ500mm、外径30mm、内径22mmの筒状断面、濾過面積0.03m<sup>2</sup>)を製作し、Fig.3のようにクロスフローで構成した。濾過水は装置内臓のポンプで自動的に装置に供給した。セラミックフィルタに供給されるサンプル流量は装置に通水する濾過流量に比べて十分大きく、後者は20mL/minと一定値を維持した。また水道水による逆洗を定期的に行った。

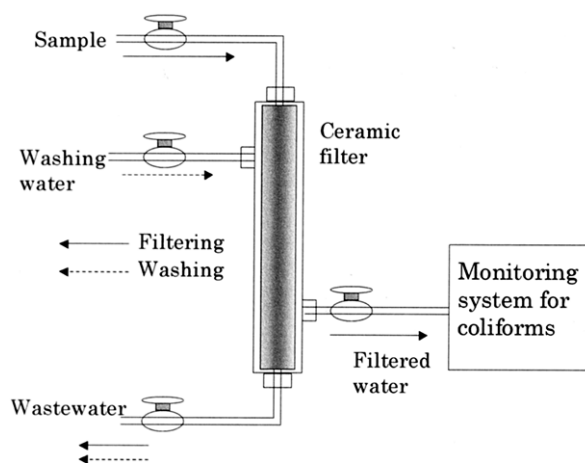


Fig.3 Schematic diagram of pre-filtering unit

一方、3.1と同様にデゾ法による大腸菌群数の測定を同時に行い、装置の測定値と比較した。

### 3.3 大腸菌群数計測装置による連続測定

3.1と同様に調製した大腸菌菌液を装置に供給して、同一サンプルの繰り返し連続試験を実施した。大腸菌菌液は2日以上放置すると酵素活性が顕著に低下するため、最大60回の測定回数を目処にサンプルを交換することとした。また装置を実際の下水処理場に設置し、3.2の②の前処理を含む二次処理水の連続測定を実施した。

## 4. 実験結果および考察

### 4.1 大腸菌群数計測装置の原理実証

Fig.4に示すように出力電圧と4-MU濃度との相関は良好な直線性を示していることが分かった。次にこの検量線を用いて大腸菌濃度633、14667CFU/mLのサンプルの4-MU時間変化を求めた結果をFig.5に示す。低濃度、高濃度いずれの大腸菌濃度においても、良好な時間応答直線が得られた。また直線の傾きすなわち $\beta$ -gal活性値は大腸菌群数に応じて増減する結果であり、培養を用いない酵素蛍光法により30分程度で大腸菌群数を計測可能であることが分かった。

### 4.2 二次処理水測定のための検討

大腸菌群数1553CFU/mLの二次処理水を装置に供給して、3回の繰り返し測定を行った場合の4-MU濃度の時間変化をFig.6に示す。このように二次処理水の場合でも再現性ある直線応答が得られ、30分程度での迅速な大腸菌群数測定が可能であることが分かった。

ここで単位大腸菌群数あたりの $\beta$ -gal活性値を求めたところ $3.0 \sim 3.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/L} \cdot \text{min} \cdot \text{CFU}$ の範囲であった。4.1の大腸菌菌液および大腸菌群数 $9.6 \times 10^4 \text{CFU/mL}$ の流入下水について同様に求めて比較した結果をFig.7に示す。二次処理水は大腸菌の菌液を用いた結果よりも2.7倍大きく、流入下水よりも60%ほど小さい値であった。SSには大腸菌群由来でない $\beta$ -galや、 $\beta$ -gal活性を有するが、デゾ法では増殖しない損傷状態すなわちVBNC (Viable But Non-Culturable) 状態の大腸菌群が吸着していると推定される。大腸菌菌液にはこれらが少なく、逆に流入下水には多量に存在することが、上記の差異の原因と考えられる。このことから、SSに付着した過剰測定分の $\beta$ -galを除去することで、測定精度が改善すると考えた。

二次処理水をサンプルとして用い、ポリカーボネート製のフィルタで濾過前処理を行った場合の装置の $\beta$ -gal活性値とデゾ法による大腸菌群数の測定値をプロットした結果をFig.8に示す。相関係数は0.90と高く、 $\beta$ -gal活性値から換算した大腸菌群数の推定値と、デゾ法に

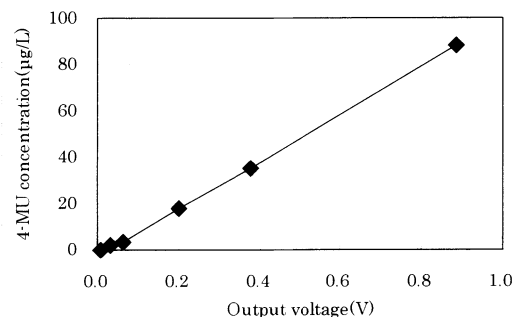


Fig.4 Relationship between 4-MU concentration and output voltage

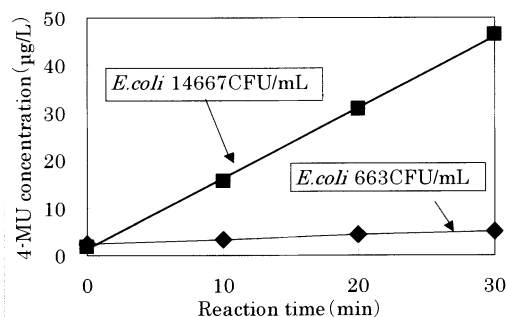


Fig.5 Change in the 4-MU concentration of *E. coli* solution

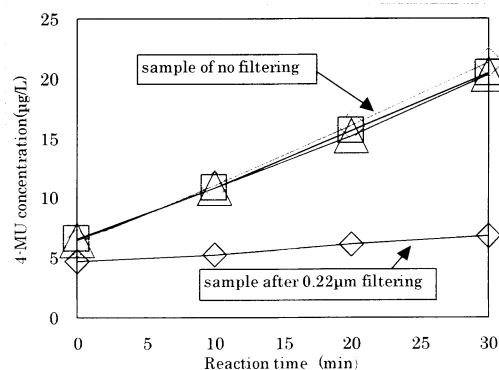


Fig.6 Change in the 4-MU concentration of treated wastewater

よる測定値との差異は、 $-40\sim+16\%$ の範囲内に収まる良好な結果であった。SS付着の過剰分の $\beta$ -gal活性を適正な濾過で除去した上で測定することにより、高い相関を得たものと考えられる。

このように公定法との相関が良好であったことから、本装置による消毒剤の注入量制御により消毒剤の節減効果を十分高く期待できるものと考えられる。

#### 4.3 大腸菌群数計測装置による連続測定

大腸菌菌液を用いた場合の測定結果を Fig.9 に示す。測定開始直後は測定値が不安定であるが、3回目以降は大腸菌濃度に応じて高い再現性が得られた。この結果から、150回の連続測定すなわち40分/1回計測として4日間の連続測定において、 $\beta$ -gal活性値が高い信頼性を持って計測可能であることが分かった。Fig.10 に大腸菌濃度に対する変動係数 CV (coefficient of variation) の変化を示す。大腸菌濃度が低いほど変動係数は大きくなるが、二次処理水中の濃度として一般的な値である大腸菌群数 1000CFU/mL の場合でも良好な繰り返し再現性能の目安となる CV6%以下を達成した。

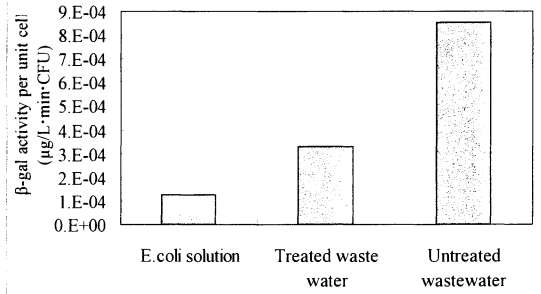


Fig.7 Comparison of  $\beta$ -gal activity per unit cell

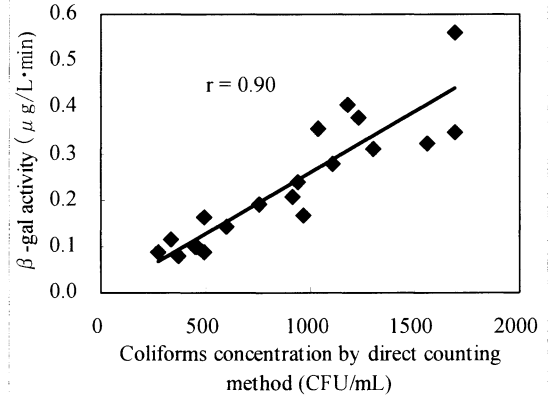


Fig.8 Correlation between coliforms concentration and  $\beta$ -gal activity

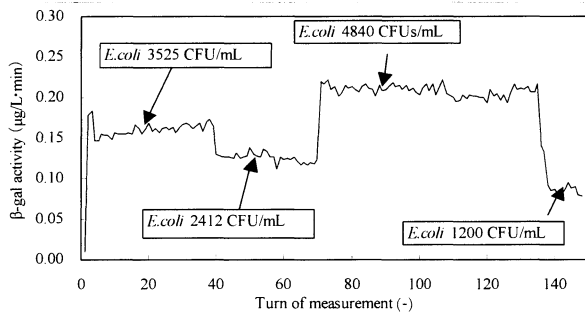


Fig.9 Results of the continuous measurement using *E. coli* solution

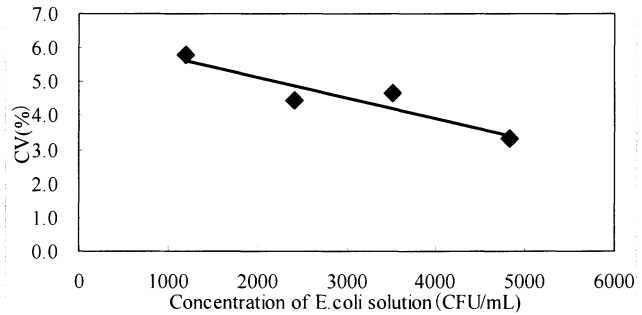


Fig.10 Relationship between the concentration of *E. coli* solution and the coefficient of variation (CV)

二次処理水について3時間及び約3.5日間の繰り返しの連続自動連続運転を行った結果をそれぞれ Fig.11 及び Fig.12 に示す。両図から明らかなように、日中は漸減し夕方から夜間にかけて上昇する時間変動が毎日再現されている。Fig.12 の大腸菌群数および $\beta$ -gal 活性値と、3日後の同時刻のデソ法による分析値と比較したところほぼ同様な測定値であったことから、120回の連続測定ではセラミックフィルタの濾過特性は維持されており、問題なく連続測定が可能であることが示唆された。

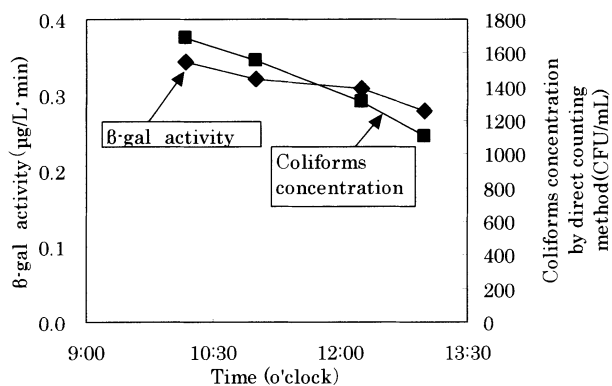


Fig.11 Results of continuous measurement for 3 hours

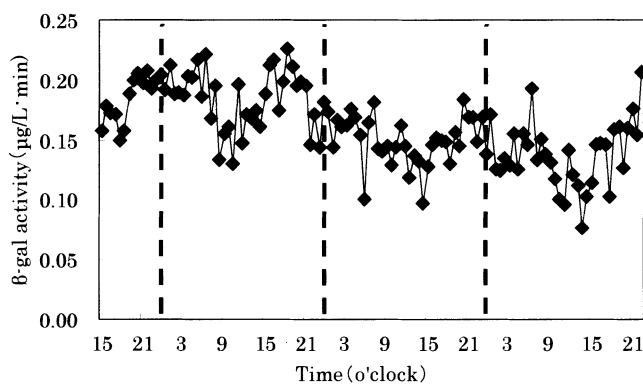


Fig.12 Results of continuous measurement for 3.5 days

## 5.まとめ

酵素蛍光法を利用した大腸菌群数計測装置について検討を行い、以下の結果を得た。

- (1) 培養操作を省略した酵素蛍光法を適用して自動測定装置を構築した結果、30分程度の短時間で二次処理水の大腸菌群数測定が可能であることを確認した。
- (2) SSに付着するβ-gal成分が酵素蛍光法における主な妨害要因であることが示唆され、前処理により予め除去することにより測定精度が向上することが判明した。
- (3) 大腸菌菌液を用いた大腸菌群数計測装置の繰り返し試験を実施した結果、二次処理水中の濃度として一般的な値である大腸菌群数 1000CFU/mL の場合でも良好な繰り返し再現性能の目安となる CV6%以下を達成した。また大腸菌群数計測装置の測定値とデソ法の測定値とは相関係数 0.90 と高い相関であり、両者の差異は -40~+16%の範囲内に収まる良好な結果を得た。

今回の実験により二次処理水の大腸菌群数迅速測定装置としての実用化の目処が得られたと考える。今後はさらに長期の連続試験を実施するとともに、消毒システムの消毒剤節減効果について検証したい。

## [参考文献]

- 1) 日本下水道協会, "下水試験方法", (1997)
- 2) Fiksdal et al., "Monitoring of Fecal Pollution in Coastal Waters by use of Rapid Enzymatic Techniques", Applied and Environmental Microbiology, Vol.60, No.5, pp.1581-1584 (1994)
- 3) Poucke et al., "Limitation of Highly Sensitive Enzymatic Presence-Absence Tests for Detection of Waterborne Coliforms and *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, Vol.63, No.2, pp.771-774 (1997)
- 4) Poucke et al., "Development of a Sensitive Chemiluminometric Assay for the Detection of β-Galactosidase in Permeabilized Coliform Bacteria and Comparison with Fluorometry and Colorimetry", Applied and Environmental Microbiology, Vol.61, No.12, pp.4505-4509 (1995)

(受付 2004 . 4 . 28)

(受理 2004 . 6 . 2)