

<研究発表>

## フローインジェクション法を用いた迅速大腸菌群計測装置

A Rapid Detection Apparatus of Coliforms in Water by Flow Injection Analysis Method

○守川 彰<sup>1</sup>, 稲富健一<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 三菱電機 先端技術総合研究所 / 〒661-8661 尼崎市塚口本町 8-1-1

AKIRA MORIKAWA<sup>1</sup>, KEN-ICHI INATOMI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Advanced Technology R & D Center Mitsubishi Electric Corporation,  
/8-1-1 Tsukaguchi-Honmachi Amagasaki Hyogo 661-8661 Japan

### Abstract

A rapid detection apparatus of coliforms in water has been developed for the real time control of disinfection process. Concentration of coliforms is measured by the fluorogenic detection of enzymatic hydrolysis using fluorogenic enzyme substrate. This apparatus has a flow injection analysis (FIA) method using the continuous flow in a small bore tube in which water samples and reagents are mixed automatically, and the reactor of enzymatic hydrolysis which maintains moderate temperature, and the accurate sensing of the fluorescence. This rapid detection apparatus made possible continuous detection in less than 1 hour for detection of 200CFU/mL of coliforms of water samples.

**Key Words** : Coliforms, Enzyme, Rapid detection

## 1 はじめに

大腸菌群数の下水処理場における放流水の水質基準は 3000 個/mL 以下と規定されているため、塩素等により最終段で消毒が行われている。その際、注入量は経験的に決定されている場合が多いため、適正な注入制御がされているとは言い難く、最近ランニングコストや環境影響配慮の立場から適正な注入量制御が求められるようになってきている。しかし、下水試験方法で規定されている培養法では測定に 18 時間以上必要であり、注入量の制御が事実上困難であった。今回演者らは、培養を行わず 1 時間以内で大腸菌群数を測定可能な原理を利用し、自動的に測定する手段としてフローインジェクション法を適用した大腸菌群計測装置の開発を行ったので報告する。

## 2 測定原理と実験方法

### 2.1 原理

本研究で検討した計測方法の原理は、大腸菌群が保持している  $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を利用し、特異的に反応する蛍光酵素基質を用いて酵素加水分解反応により生成した蛍光物質を定量するものである。一定時間内の蛍光強度の増加分が酵素活性に比例し、酵素活性が大腸菌群数に比例すると仮定できるので、蛍光強度から大腸菌群数が推定できる。ここでは蛍光酵素基質として 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (以下 4-MUG と略す) を用いた。4-MUG は  $\beta$ -ガラクトシダーゼにより加水分解を受け、蛍光物質である 4-メチルウンベリフェロン (以下 4-MU と略す) を生成する。

### 2.2 実験方法

実験はまず手分析の蛍光酵素法 (以下手分析蛍光法と呼ぶ) において測定条件を最適化した後に、後述する評価装置にその結果を反映させるというステップで進めた。

### 2.2.1 手分析蛍光法

手分析蛍光法の測定手順は以下のとおりである。4-MUG、ラウリル硫酸ナトリウム、リン酸緩衝液 (pH7) とサンプルを混合し、充分混和した後 37°C で反応させた。所定時間ごとにサンプリングし、水酸化ナトリウム水溶液を加えた後、蛍光光度計 (HITACHI:F-2000) で蛍光強度 (励起波長 358nm、蛍光波長 450nm) を測定することにより、4-MUG の加水分解で生じる 4-MU 濃度を経時的に求めた。4-MU 濃度の経時変化は Fig.1 に示すようにほぼ直

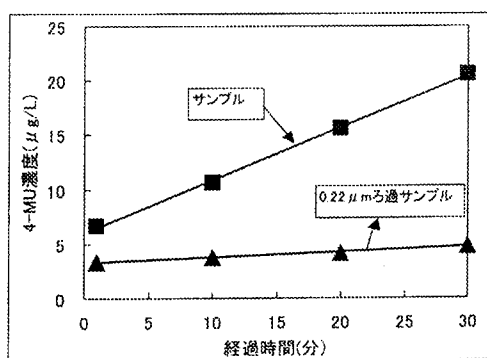


Fig.1 4-MU 濃度の時間変化

線となるため、最小二乗法により直線の傾きを求めて4-MU生成速度とし、別途バックグラウンドとして孔径0.22μmのフィルタでろ過したサンプルから得た4-MU生成速度を差し引いて、大腸菌群のβ-ガラクトシダーゼ活性値 (単位は μg/L/min) とした。

### 2.2.2 デソキシコール酸塩培地法

培地法による大腸菌群数評価は、デソキシコール酸塩培地を用いた混釈培養法にて行い 37°C で 20 時間培養後、形成された紅～淡紅色のコロニー全てをカウントした。

### 2.2.3 サンプルについて

実験に用いたサンプルは全て消毒前の二次処理水を用いた。

## 3 評価装置の装置構成

Fig.2 に評価装置の基本的な装置構成を示す。評価装置はフローインジェクション方式を採用しており、その基本動作は以下のとおりである。一定流量に制御したサンプルにインジェクタで混合試薬を注入し、恒温の反応槽にいったん混合物を滞留させる。反応槽の配管内では酵素加水分解反応が行われる。その後混合物を順次送液すると同時にアルカリ (水酸化ナトリウム水溶液) を注入し、混合溶液を蛍光光度計に送り蛍光強度を測定 (励起波長: 358nm、蛍光波長: 450nm) する。反応部分における反応時間としては 30 分まで行っており、測定終了後の配管洗浄の工程も含め、1 サンプルのトータル計測は 1 時間以内で終了する。以下 Fig.2 の各部分について説明する。

#### (1) インジェクタ、ポンプ

測定感度を上げるためには酵素反応速度をなるべく大きくする必要がある。従って混合試薬とサンプルの混合攪拌を充分に行うために、インジェクタ内部の管内流速と配管部分の流速をなるべく大きくするようなインジェクタを選定し、ポンプ流量を決定した。3 台のポンプは MasterFlex の PA-21A を用いた。

#### (2) 反応部分

Fig.2 中のコイル状の反応部分は恒温状態に保持するため、アルミ製のブロック (105×80×95mm) を製作し、その中でテフロン製の配管を収める構造とした。恒温状態の監視制御はサーミスタ制御装置 (Iuchi: DP-3) により行った。

#### (3) 蛍光光度計

蛍光光度計 (HITACHI:F-1000) をフローセル方式の仕様に変更して用いた。

なお Fig.2 には記載されていないが、蛍光光度計のアナログ出力を AD 変換ボード (RATOC: REX-5054B) を介して、パソコンに信号を入力して演算し、ポンプおよび電磁弁はシーケンサ (三菱電機: FX2N) を用いて制御している。

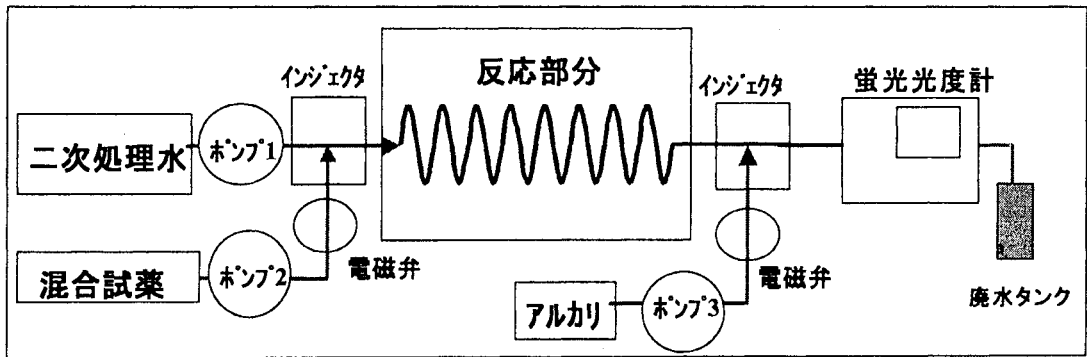


Fig.2 評価装置の構成図

Table.1 試薬の安定性の試験結果 (相対値)

経過時間	室温 (10~22°C)	37°C	新品調製試薬での $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値 (単位は $\mu\text{g/L}/\text{min}$ )
20日	1.01	1.06	2.68
4ヵ月	1.02	0.83	2.32

## 4 実験結果と考察

### 4.1 試薬の保存安定性

一般に 4-MUG を含む酵素基質は高温に対して不安定で分解しやすいものが多く、通常は冷蔵保存が必要である。しかし装置を簡素化したい考えから、アルカリ (水酸化ナトリウム水溶液) 以外の全ての試薬を混合した混合試薬の酵素反応活性の保存条件に対する依存性を実験的に調査した。試験操作は試薬を混合してプラスチック製の密閉容器に入れ 3 段階の温度環境 (室温、5°C、37°C) で保管し、20 日、4ヵ月後の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を調べた。得られた各温度条件の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を、新品調製試薬での  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を 1.00 とする時の相対値として Table.1 に示す。

なお Table.1 には 5°C の結果を記載していないが、これは保存開始の数日後に沈殿が発生したため、測定するのは不適と考えたためである。Table.1 からわかるように、37°C、20 日後の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値がやや上昇しているが、これは測定誤差の範囲内と考えられる。また 37°C、4ヵ月後の 4-MU 濃度の生成直線のベースラインが 20 日後と比較し

て上昇しており (データは記載せず)、相対値は他の条件より低い、これは 4-MUG の一部が分解して、試験前にすでに 4-MU を生成しているためと考えられる。一方、室温条件については 20 日後、4ヵ月後ともにほぼ問題ない値を得ている。これらのことから夏季や寒冷地などでは試薬の保管性に課題が残るが、通常温度条件においては問題が無く、恒温条件で保管する必要はないと考えられる。

### 4.2 評価装置と手分析蛍光法の測定値の相関

評価装置および手分析蛍光法による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値とデソキシコール酸塩培地法との相関を Fig.3、4 にそれぞれ示す。サンプル数は少ないが、評価装置の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値と培地法の大腸菌群数とはほぼ直線的な関係にあると考えられる。一方、Fig.3、4 を比較すると手分析蛍光法の場合は評価装置よりもやや相関が低いことがわかる。これは後述するように手分析蛍光法の試験操作における誤差が含まれているためと考えられる。

Table.2 各測定方法の変動係数 (単位は%)

測定法	サンプル 1(168 個/mL) <sup>※</sup>	サンプル 2(1233 個/mL) <sup>※</sup>	サンプル 3(13000 個/mL) <sup>※</sup>
デソキシコール酸塩培地法	測定せず	22.7	測定せず
手分析蛍光法	測定せず	36.2	測定せず
評価装置	20.6	14.2	4.6

※大腸菌群数はデソキシコール酸塩培地法による

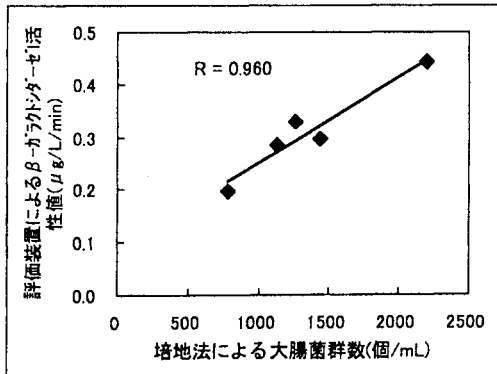


Fig.3 評価装置と培地法の相関

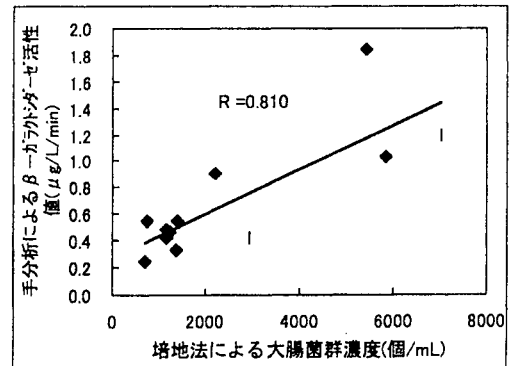


Fig.4 手分析蛍光法と培地法の相関

### 4.3 評価装置の測定再現性

測定の再現性を検証するため、デソキシコール酸塩培地法、手分析蛍光法、評価装置の繰り返し測定をそれぞれ10回行った。手分析蛍光法と評価装置については、各サンプルの0.22μmろ過水の4-MU生成速度を差し引いてβ-ガラクトシダーゼ活性値の変動係数を求めた。また評価装置についてはβ-ガラクトシダーゼ活性値が高いサンプルと低いサンプルの両方について検証した。実験結果をTable.2に示す。

Table.2 から大腸菌群数が同じサンプルで比較すると、手分析蛍光法より評価装置の方の測定精度が高い。このことは手分析蛍光法における攪拌動作などの試験操作の誤差や時間的な誤差が少なくなったためと考えられる。また評価装置については大腸菌群数が高濃度の場合には、高い再現性を持っていると考えられるが、低濃度の場合には精度が低下することが判明した。

### 4.4 測定下限値

蛍光酵素基質法での大腸菌群数の測定下限値を求めするため、サンプル(大腸菌群数707個/mL)を0.85%の滅菌生理食塩水により2、4、10、50倍と順次希釈した各サンプルを用意し、手分析蛍光法とデソキシコール酸塩培地法の相関を調べた結果をFig.5に示す。Fig.5から手分析蛍光法のβ-ガラクトシダー

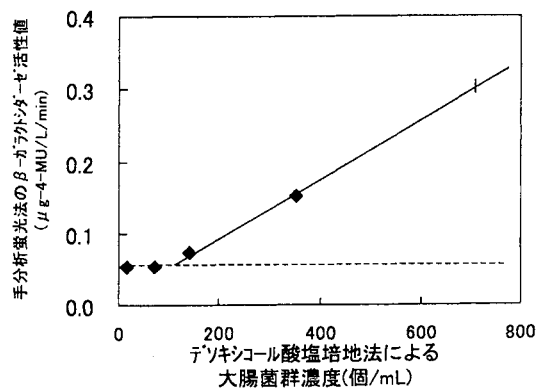


Fig.5 蛍光酵素基質法の測定下限値

ゼ活性値はデソキシコール酸塩培地法による大腸菌群数と約100個/mL以上でほぼ直線関係が得られていることがわかる。またTable.2において評価装置の大腸菌群数168個/mLの場合の変動係数が20.6%であり、有機化合物反応の場合の測定下限値は変動係数20%以下とされているため、この評価装置の測定下限値は200個/mL程度と推定される。

## 5 まとめ

蛍光酵素基質法とフローインジェクション法を利用した大腸菌群計測装置の開発を行った。

- ・測定に用いる混合試薬は室温条件において4ヶ月間保管可能であることが判明した。
- ・自動計測を可能とする評価装置を検証した結果、従来のデソキシコール酸塩培地法の測定値と高い相関であった。

- ・評価装置の測定の再現性について検証し、自動測定により手分析蛍光法と比較して測定精度が向上した。また、大腸菌群数が高いサンプルを測定した場合は高精度に測定可能であることが判明した。
- ・評価装置の測定下限値を検証し変動係数から大腸菌群数200個/mLが測定下限値であると推定された。

## 参考文献

- 1) 平敷ら「蛍光酵素基質を用いた大腸菌群数迅速計測の実下水への適用」、第37回下水道研究発表会講演集
- 2) 下水試験方法(1997年版)、日本下水道協会
- 3) 上水試験方法(1993年版)、日本水道協会