

(15) ブロモデオキシウリジン修飾 DNA 量に基づいた浄水中の従属栄養細菌数迅速推定法の開発

浅田 安廣^{1*}・大河内 由美子²・伊藤 禎彦²

¹ 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂)

² 京都大学大学院地球環境学堂地球益学廊 (〒615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂)

* E-mail: asada@urban.env.kyoto-u.ac.jp

水道水中の微生物汚染の指標である従属栄養細菌に着目して、微生物の DNA 合成時に 5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) により DNA を標識し、定量することでそれらの迅速測定を試みた。まずモデル微生物を用いて BrdU ラベル化反応条件を検討し、BrdU 濃度を $1 \mu\text{M}$ と設定した。この条件により得られた標識 DNA を細胞固定化法、DNA 固定化法の 2 種類の方法で固定化して定量したところ、両手法ともに $10^1 \sim 10^3 \text{ CFU/mL}$ の範囲で定量性が確認され、測定時間は約 2 日間に短縮された。最後に水道水中の従属栄養細菌数測定に適用したところ、測定値の変動がより少ないこと、また感度の点から DNA 固定化法の方が有用性が高いことを示した。

Key Words : drinking water, BrdU labeling, heterotrophic bacteria, immobilization method, distribution system

1. はじめに

日本の水道水は塩素消毒剤を注入・残留させることで病原微生物の再増殖能を抑制し、感染リスクを低下させている。その一方で、塩素消毒によりカルキ臭が発生し快適性が低下することから、需要者の水道水離れが進んでいる¹⁾。またカルキ臭のみならず、トリハロメタン等といった消毒副生成物の生成による健康影響も問題視されている。そのため、現在では残留塩素濃度の低減が提案されている。しかし残留塩素低減を実行する場合、塩素によりこれまで抑制されていた微生物再増殖やバイオフィーム形成などの問題が引き起こされる可能性がある。そのため、残留塩素濃度と微生物再増殖との関係が重要となり、各処理過程並びに給配水過程での微生物の挙動が重要視されるようになった。

従属栄養細菌数は、浄水処理過程や消毒過程での微生物の挙動評価、塩素消失や滞留の結果としての微生物再増殖に代表される給配水過程での微生物汚染の評価に適している²⁾として、2007 年の水道水質基準の改正により水質管理目標設定項目として追加され、データの蓄積が進められている。しかし、その測定には 7 日間の培養期間を要することから、給配水時間が 1~2 日間程度と短い我が国の水道システムにおいて、従属栄養細菌数測定結果のフィードバックによる水質管理

は難しいと考えられる。上水試験法には培養によらない検出法としてアクリジンオレンジ染色法や DAPI 染色法、ATP 法などが記載されている³⁾。DAPI 染色などによる測定法は生きているが培養できない状態になった細菌や死滅した細菌も区別なく検出するという問題点がある。また ATP 法に関しては、死滅した微生物から遊離した ATP も存在する³⁾ことから、消毒後の浄水中の ATP 量で微生物数の定量を正確に行うのは困難であると予想される。そこで、現行の培養法に代わる迅速測定法が必要である。

こうした背景を踏まえて、本研究では微生物再増殖の指標として従属栄養細菌を取り上げ、5-プロモ-2'-デオキシウリジン (以下、BrdU と記載) を用いた核酸標識法 (以下、BrdU ラベル化法と記載) により従属栄養細菌数の迅速測定を試みた。この方法は、微生物増殖に伴う DNA 合成時にチミジンの類似体である BrdU を用いて標識を行い、BrdU 標識 DNA 量の定量を行う手法であり、培養細胞の増殖アッセイによく使用される。そのため水道水中の従属栄養細菌についても、BrdU を添加した培地上で短時間培養を行うことにより、DNA 合成活性を有する微生物のみを検出することが可能となると考えられる。しかし、微生物検出を目的とした検討では、海洋微生物の生産速度測定^{4), 5)}への適用が報告されているのみである。そこで微生物数

の測定法として適用するために、DNA の BrdU ラベル化反応条件ならびに検出条件を検討する必要がある。

そこで本研究では、まずモデル微生物を使用し、BrdU ラベル化反応条件として微生物数を定量的に測定可能な BrdU 濃度を検討した。そして BrdU 標識 DNA の固定化法として、BrdU を取り込ませた微生物細胞をマイクロプレートに固定化して定量的測定を行う手法（以下、細胞固定化法と記載）と、抽出した BrdU 標識 DNA を直接マイクロプレートに固定化して抗原抗体反応を行う手法（以下、DNA 固定化法と記載）を検討した。最後に、実際の浄水中の従属栄養細菌を対象として本手法を適用し、BrdU ラベル化法の従属栄養細菌数迅速測定法としての適用性について検討した。

2. 実験方法

(1) モデル微生物懸濁液の調製

モデル微生物として *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642; P17 株) および *Aquaspirillum* sp. NOX (ATCC 49643; NOX 株) を選定した。これらは元々水道水から単離された菌株であり、一般的に存在する微生物と考えられている。それぞれの微生物は使用する直前に R2A 液体培地 10 mL に植菌し、 20 ± 1 °C で約 2 日間の前培養を行った。その後、分光光度計 (MultiSpec-1200, 島津製作所) を用いて培養液の光学密度を波長 660 nm で測定し、あらかじめ算出した光学密度と平板培養によるコロニー数の関係式を用いておおよその微生物濃度を把握し、微生物濃度が $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲になるように、R2A 液体培地を用いて段階希釈を行い、BrdU ラベル化反応に供した。

(2) BrdU ラベル化反応条件の検討

BrdU ラベル化法は、Hamasaki らによる方法⁴⁾を参考にし、多検体同時処理が可能となるよう 96 穴マイクロプレートに細胞増殖時に標識された BrdU 標識 DNA を固定化し、酵素抗体法を用いて BrdU 標識 DNA 量を吸光度として測定した。主な試薬については、BrdU Labeling & Detection Kit III (ロシュ・ダイアグノスティクス) に同梱された試薬を用いた。それと同時に、リン酸緩衝液で 10 倍ごとに希釈した微生物懸濁液を用いて、R2A 寒天培地 (日本製薬) による平板法により、培養液中の微生物濃度を算出した。そして BrdU 標識 DNA 量と微生物濃度の関係を調べた。BrdU ラベル化反応および各インキュベーションは遮光状態で行った。

a) ラベル化反応における BrdU 濃度が BrdU 標識 DNA 量に及ぼす影響

BrdU 濃度が高濃度であると DNA 合成期におけ

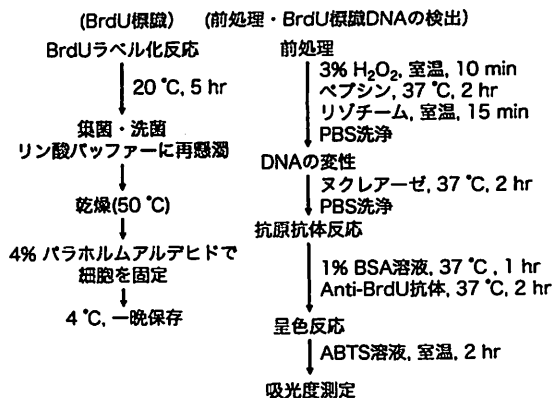


図-1 細胞固定化法の操作フロー

る BrdU の DNA への取り込み率があがると考えられる。一方で高濃度の場合には、BrdU の遺伝毒性により DNA 合成反応が妨げられる可能性もあると報告されている⁴⁾。そこで、BrdU 濃度を 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM と変化させ、最適な BrdU 濃度を検討した。

b) 細胞固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量方法

細胞固定化法の操作フローを図-1に示す。段階的に希釈した微生物懸濁液を用いて BrdU ラベル化反応 (20 °C, 5 時間) を行った後に 96 穴マイクロプレートへ 50 μ L ずつ分注し、等量の 99.5% エタノールを加え 50 °C で乾燥した。次に 99.5% エタノールを 100 μ L 加えて再度 50 °C で乾燥し、4% パラホルムアルデヒド緩衝液を 100 μ L 加えて 4 °C で一晩微生物細胞を固定した。固定液を除去した後に、3% H₂O₂ 溶液 100 μ L による内因性ペルオキシダーゼの不活化と 2 mg/mL ペプシン溶液 100 μ L と 3 mg/mL リゾチーム溶液 100 μ L による細胞壁の消化処理を順に行った。その後キットに同梱されたヌクレアーゼ溶液 100 μ L により DNA 変性を行い、1% ウシ血清アルブミン溶液 250 μ L を用いてブロッキングを行った。そしてペルオキシダーゼ標識 anti-BrdU 抗体 100 μ L を添加し、最後に ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) を基質として室温で呈色反応を行い、マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad) により吸光度 (測定波長 405 nm, 対照波長 490 nm) を測定した。得られた吸光度 (すなわち、BrdU 標識 DNA 量) と平板法で求めた微生物濃度との関係を調べた。

(3) BrdU 標識 DNA 固定化法の比較

2. (2) で決定したラベル化条件を用いて、全体的な作業時間の短縮、抗原抗体反応の向上を目的として細胞固定化法と、DNA 固定化法を比較した。なお測定値を安定させるため、両手法ともに R2A 液体培地に BrdU を添加した試料をブランクとして設定した。

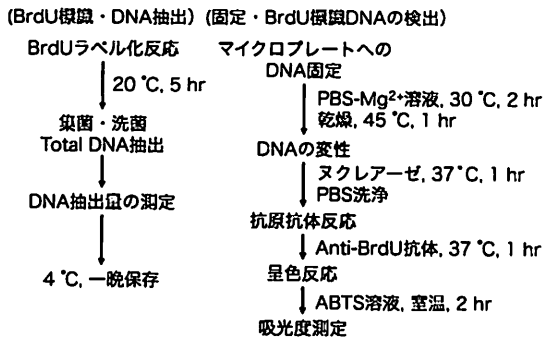


図-2 DNA 固定化法の操作フロー

a) 細胞固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量

BrdU 標識 DNA 量の定量は、2. (2) b) と同様に行った。

b) DNA 固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量

DNA 固定化法の操作フローを図-2 に示す。まず微生物数が $10^1 \sim 10^6$ cells/mL の範囲になるように、R2A 液体培地を用いて 10 倍ごとの段階希釈を行った。そして R2A 液体培地 49.5 mL を入れた 2 本の 50 mL 遠心チューブに、段階希釈した溶液を 0.5 mL ずつ分注し、BrdU ラベル化反応 (20 °C, 5 時間) を行った。そして遠心分離により集菌・洗菌を行った後に、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA を抽出した。抽出した DNA 濃度は Spectrophotometer (ND-1000, Thermo Scientific) により決定した。そして翌日マイクロプレートウェルへの DNA 固定化操作を行うため、DNA 抽出を確認できた試料は、遮光状態で 4 °C, 一晚保存した。続いて、抽出した DNA 溶液 200 μ L に対して 0.2 M PBS-Mg²⁺ 溶液を等量加え、96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、30 °C, 2 時間で DNA の固定を行った。その後ウェル内の溶液を取り除き、45 °C で乾燥を行った後、ヌクレアーゼ溶液を 100 μ L ずつ加えた。以降の anti-BrdU 抗体の添加、ABTS 基質溶液の添加、吸光度測定については、2. (2) b) と同様に行った。

(4) 浄水中の従属栄養細菌数測定への BrdU ラベル化法の適用

高度浄水処理水の給水区域として大阪市給水区域、急速ろ過処理水給水区域として京都市給水区域を選定し、2008 年、2009 年の冬期にそれぞれ 6 地点で給水栓水 100 mL のサンプリングを行った。チオ硫酸ナトリウム溶液を最終濃度が 0.003% となるよう添加しよく混合した後、遮光状態で 20 ± 1 °C で 6 日間培養した。なお塩素中和直後の試料を 0 日目とし、0, 2, 3, 4, 6 日目に試料を採取して従属栄養細菌数の測定を行った。それと同時に細胞固定化法・DNA 固定化法により

BrdU 標識 DNA 量を定量した。浄水中の従属栄養細菌数は非常に小さいことが予想されるため、R2A 寒天培地による平板法のみでは検出できない可能性がある。そこで、0, 2 日目の試料は、通常法に加えてメンブレンフィルター法により測定を行った。この方法は、吸引ろ過によりメンブレンフィルター (C020G047A, ADVANTEC) 上に微生物を捕集し、メンブレンフィルターを R2A 液体培地を吸収させたパッドの上に乗せ、 20 ± 1 °C で 7 日間培養した後、1 mL 中の微生物濃度を計算する方法である。なお微生物濃度は、平板法で検出限界を下回った際にのみメンブレンフィルター法で得られた値を採用した。得られた従属栄養細菌数の経時変化を用いて、各試料中の微生物群の比増殖速度、倍加時間を算出した。

(5) 統計解析方法

微生物濃度と吸光度の関係から得られた回帰式の有意性に関しては、Microsoft Excel 2004 の回帰分析ツールを用いて p 値を算出した。また Mac 多変量解析 Ver.1.0 (エスミ) を用いて、得られた回帰式の 95% 信頼区間を求めた。なお、0.05 よりも小さい p 値が得られた回帰式について有意性があると判断した。

3. 実験結果と考察

(1) BrdU ラベル化反応条件の検討

BrdU 濃度が吸光度に与える影響を、図-3 に示す。なおエラーバーは、測定値の標準偏差である。培養細胞を用いた実験結果から、BrdU を取込んだ DNA 濃度の対数値に対して吸光度はジグモイド型の応答を示し、良好な応答が見られる領域では、DNA 濃度の対数値と吸光度の間に一次線形関係を示したことが報告されている⁶⁾。その情報に基づいて、R2A 寒天培地で求めた微生物細胞数 (以下、HPC と記載) と吸光度の関係を調べたところ、HPC が 0.5 CFU/mL 以上の範囲では、吸光度と HPC の対数値に対して一次線形の関係が得られた。また HPC 濃度が高い領域では、およそ 10^3 CFU/mL を境に吸光度の減少が確認された。 10^3 CFU/mL 以下の濃度範囲では、P17 株、NOX 株ともに BrdU 濃度 1 μ M で最も大きな吸光度の変化が得られた。これと比較して BrdU 濃度 10 μ M では、P17 株では吸光度の変化量があまり変化が見られなかったのに対して、NOX 株では吸光度の変化量が大幅に減少した。この結果は、BrdU 添加濃度が高すぎると、BrdU の遺伝毒性により DNA 合成が抑制される可能性を示すと考えられる。BrdU は通常アデノシンと結合するが、臭素原子置換基の電気陰性度が高いためにピリミジン環の

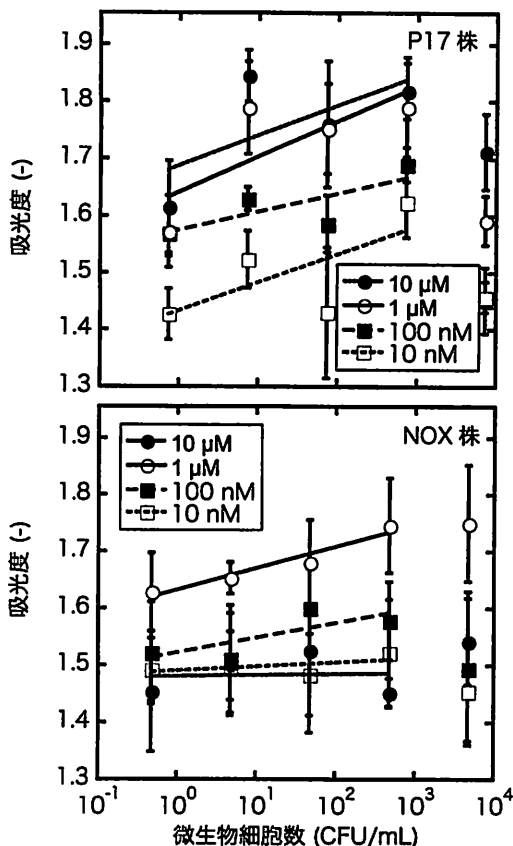


図-3 BrdU 濃度が BrdU 標識 DNA 量に与える影響 (n=3)

化学構造がケト型からエノール型に変化し、グアノシンと結合する場合がある。そして DNA に対してこれらの変異が導入された結果、DNA 合成が停止すると考えられている⁴⁾。以上から BrdU 濃度の条件を 1 μM と設定した。

(2) BrdU 標識 DNA 固定化法の比較

a) 細胞固定化法

決定した BrdU 添加濃度で、定量実験を 3 回繰り返し行った。そして、同一条件で得られた測定値を比較し吸光度変化量の変動幅について確認した。結果を図-4 に、回帰式を以下に示す。なおエラーバーは、測定値の標準偏差である。

(P17 株)

$$y = 0.023 \log(x) + 0.026 \quad (R^2 = 0.942) \quad (1a)$$

$$y = 0.029 \log(x) + 0.040 \quad (R^2 = 0.732) \quad (1b)$$

$$y = 0.029 \log(x) + 0.028 \quad (R^2 = 0.895) \quad (1c)$$

(NOX 株)

$$y = 0.041 \log(x) + 0.022 \quad (R^2 = 0.888) \quad (2a)$$

$$y = 0.033 \log(x) + 0.031 \quad (R^2 = 0.823) \quad (2b)$$

$$y = 0.033 \log(x) + 0.047 \quad (R^2 = 0.802) \quad (2c)$$

$10^1 \sim 10^3$ CFU/mL の範囲で直線性が得られ、P17 株の細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量は 0.023 ~ 0.029、NOX 株は 0.033 ~ 0.041 と比較的安定した結果となった。また得られた回帰式に対して回帰分析を行ったところ、全ての回帰式に関して傾きが有意であると判断できた ($p < 0.05$)。HPC 濃度が高い領域では、各細胞で BrdU の取込みが均一に行われなかった、あるいはマイクロプレートのウェル内で確実に細胞が固定化されなかったなどの理由により、吸光度の低下が生じていると考えられる。そのため、HPC 定量可能範囲は、 $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL であると判断した。この範囲は、水道システムにおける初期の微生物再増殖の挙動把握に対して有効であると考えられる。また本研究で採用した抗

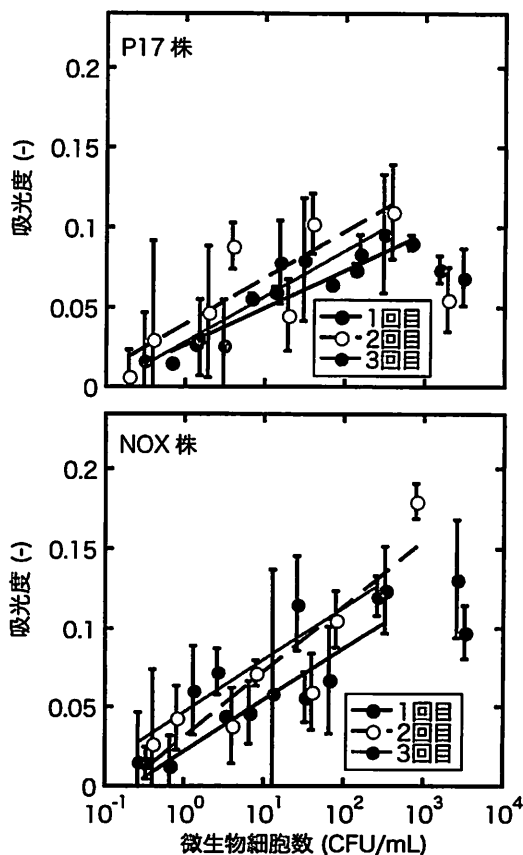


図-4 細胞固定化法による微生物細胞数と BrdU 標識 DNA 量の関係 (n=4)

原抗体反応は、ABTS を基質とした酵素酸化反応に基づいているが、内因性ペルオキシダーゼを不活化しているにも関わらず、酵素活性とは無関係な吸光度上昇が度々確認された。対象試料あるいは測定環境にその要因があると考えられるが、原因特定はできなかったため、ブランク値を用いた補正を試みた。直線性を示す範囲の下限微生物濃度 10^{-1} CFU/mL の吸光度の変動は、BrdU 濃度の検討では 1.383 ~ 1.636 であったのに対して、ブランク値で補正を行った本実験の結果では -0.011 ~ 0.013 と測定回ごとの変動幅が小さくなった。そのため、ブランク値補正により吸光度変動要因を除去することができ、BrdU による発色量のみを測定することが可能になったと考えられる。しかし部分的に測定値が大きく変動しており、さらに P17 株と NOX 株では細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量が若干ながら差が生じている。この原因として微生物細胞への BrdU の取込み率が均一でないことや、細胞壁処理効果の違いが考えられる。細胞壁処理では、ペプシンとリゾチームを用いて微生物細胞壁を消化し、表面に DNA を露出させて抗原抗体反応を行っている。そのため、部分的に消化さ

れなかった細胞壁が残存すると、分子量の大きい抗体が通過することができず、抗原抗体反応効率が低下する可能性がある。またその他にも、微生物種間の増殖速度の違い、DNA の GC 含量や微生物細胞当たりの核酸量といった要因が吸光度変化量に影響を及ぼす可能性も考えられる。約 3.0×10^8 cell から DNA を抽出・精製した場合の微生物細胞当たりの核酸量は、P17 株で 7.87 fg/cell、NOX 株で 7.70 fg/cell となりほぼ同じ値を示したため、微生物細胞当たりの核酸量が吸光度変化量に影響を与える可能性は小さいと考えられる。また一般的に GC 含量は微生物種により異なることが知られており^{7),9)}、BrdU は DNA2 本鎖の構成成分であるチミジンの代わりに取込まれることから、DNA2 本鎖中の GC 含量により、吸光度変化量が変動する可能性がある。そのため、実際の浄水中の従属栄養細菌数測定に対して本手法を適用し、複合微生物系が測定値に及ぼす影響を確認する必要がある。一方、本手法により HPC 測定に要する時間は、約 2 日間に短縮された。

b) DNA 固定化法

同一条件で 3 回測定を行い、得られた測定値の比較を行った。結果を図-5 に、回帰式を以下に示す。なおエラーバーは、測定値の標準偏差である。

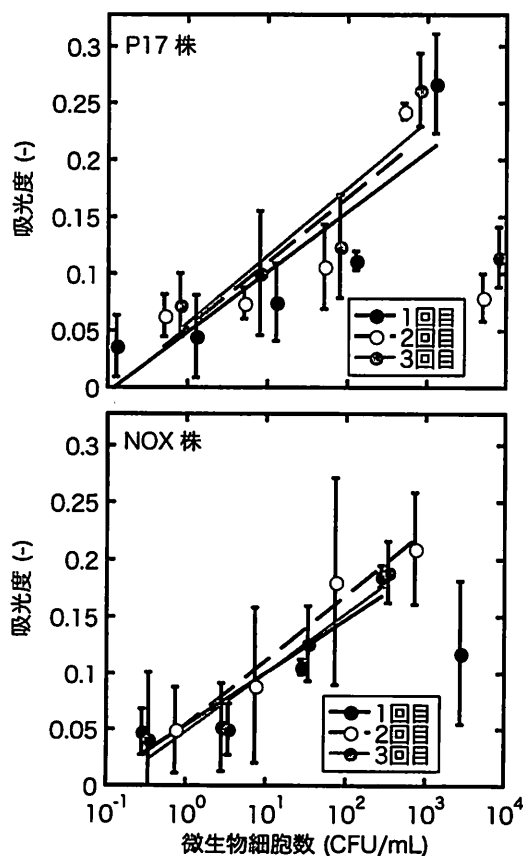


図-5 DNA 固定化法による微生物細胞数と BrdU 標識 DNA 量の関係 (n=3)

(P17 株)

$$y = 0.053 \log(x) + 0.049 \quad (R^2 = 0.785) \quad (3a)$$

$$y = 0.057 \log(x) + 0.053 \quad (R^2 = 0.792) \quad (3b)$$

$$y = 0.059 \log(x) + 0.057 \quad (R^2 = 0.825) \quad (3c)$$

(NOX 株)

$$y = 0.047 \log(x) + 0.054 \quad (R^2 = 0.883) \quad (4a)$$

$$y = 0.057 \log(x) + 0.054 \quad (R^2 = 0.960) \quad (4b)$$

$$y = 0.052 \log(x) + 0.048 \quad (R^2 = 0.930) \quad (4c)$$

細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量は P17 株で 0.053 ~ 0.059、NOX 株で 0.047 ~ 0.057 と多少変動があるものの、両株とも類似かつ比較的安定した値を示した。そしてこれらの吸光度変化量は、細胞固定化法を用いた場合に得られた値よりも増大した。この理由としては、細胞壁処理方法の違いが強く影響していると考えられる。細胞固定化法の場合、細胞をマイクロプレートに固定してから細胞壁処理を行っているため、消化しきれなかった細胞壁が残存するなどの理由により、抗原抗体反応効率が低下した可能性がある。一方 DNA 固定化法は、微生物濃度が小さいため DNA 抽出効率を

100%と考えると、抽出段階で細胞壁を完全に除去しているため、抗原抗体反応への妨害がなく、より大きな吸光度変化量が得られたと考えられる。また、P17株とNOX株それぞれの吸光度変化量はほとんど同じであったことから、DNAに取込まれたBrdU量はP17株、NOX株でほぼ同程度と考えられる。また得られた回帰式に対して回帰分析を行ったところ、全ての回帰式の傾きに関して有意性があると判断できた($p < 0.05$)。一方、細胞数が多い場合については、やはり吸光度の低下が確認されており、この原因としてマイクロプレートへのDNA固定が不完全である、あるいはDNAが重層された状態で固定化されたことにより、DNA変性をはじめとした抗原抗体反応の効率が低下した可能性が考えられる。細胞固定化法と同様、直線性が得られる範囲は $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLと判断した。また、細胞固定化法が両日ともに1日当たり約12時間の作業時間を要するのに対して、DNA固定化法では1日目が約10時間、2日目が約8時間と更なる時間短縮が可能となった。

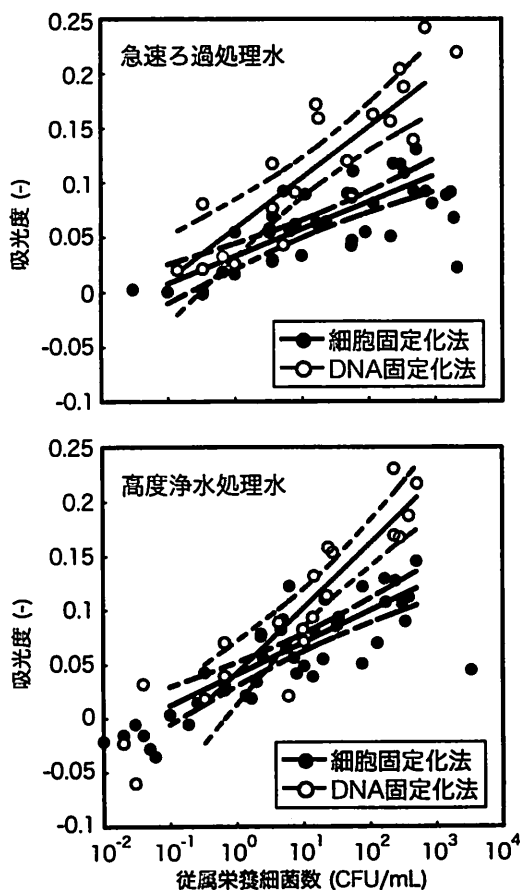


図-6 給水栓試料で再増殖した従属栄養細菌数とBrdU標識DNA量の関係

(3) 浄水中の従属栄養細菌数測定へのBrdUラベル化法の適用

残留塩素中和後、全ての給水栓試料で再増殖が確認された。そこで、0～6日目まで測定された従属栄養細菌数データを用いて、各試料の最大比増殖速度(μ)および倍加時間(t_b)を算出した。水道水中微生物の倍加時間は、DNA合成時間とも密接に関係すると考えられるため、水道水試料を対象としたBrdUラベル化反応時間決定の際の有用な情報となる。2008年冬の測定結果では、最も小さい比増殖速度は通常処理水の場合で 0.056 hr^{-1} 、高度浄水処理水の場合には 0.049 hr^{-1} であり、これらは倍加時間で考えると12.4時間、14.2時間にそれぞれ相当した。また2009年冬の測定結果では、最も小さい比増殖速度は通常処理水で 0.075 hr^{-1} 、高度浄水処理水で 0.045 hr^{-1} であり、これらを倍加時間に換算すると、9.8時間、15.3時間となった。Hamasakiらは、微生物の倍加時間が25時間以内であれば、5時間のBrdUラベル化反応時間で検出可能と報告している⁴⁾。今回得られた倍加時間を考えると、採用したラベル化反応時間5時間は妥当であると判断でき、水道水試料中の従属栄養細菌の核酸がBrdUにより十分に標識されたと考えられる。

続いて、水道水中で再増殖した従属栄養細菌に3.(2)で検討した2種類の固定化法を用いてBrdU標識DNA量を測定し、細菌数との関係を調べた。なお細胞固定化法は2回、DNA固定化法は1回、一連の測定を行った。細胞固定化法、DNA固定化法で得られた結果をそれぞれ図-6に示す。ここでプロットについては、従属栄養細菌数が測定可能であったもののみ記載した。 10^{-1} CFU/mL以下の領域では両手法ともにブランクにより補正した吸光度がほぼ0あるいは負の値を示し、正確な測定ができていないと考えられる。さらに 10^3 CFU/mL以上の領域では、吸光度が低下する傾向が確認された。そこで、 $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLの領域で回帰式を算出し、95%信頼区間と合わせて図-6に示した。得られた回帰式を以下に示す。

(急速ろ過処理水)

〈細胞固定化法〉

$$y = 0.025 \log(x) + 0.032 \quad (R^2 = 0.632) \quad (5a)$$

〈DNA固定化法〉

$$y = 0.048 \log(x) + 0.056 \quad (R^2 = 0.711) \quad (5b)$$

(高度浄水処理水)

〈細胞固定化法〉

$$y = 0.030 \log(x) + 0.040 \quad (R^2 = 0.643) \quad (6a)$$

〈DNA固定化法〉

$$y = 0.059 \log(x) + 0.047 \quad (R^2 = 0.806) \quad (6b)$$

その結果、従属栄養細菌数の対数値と吸光度の間に一次線形の関係が得られた。急速ろ過処理水を対象とした場合の決定係数は細胞固定化法で $R^2 = 0.632$, DNA 固定化法で $R^2 = 0.711$ であった。また高度浄水処理水では、細胞固定化法で決定係数が $R^2 = 0.643$, DNA 固定化法で $R^2 = 0.806$ であり、ともに正の相関が確認された。そのため、細胞固定化法、DNA 固定化法ともに $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL の範囲で定量性があると判断した。回帰式の傾きから細胞数 1 log あたりの吸光度変化量は 2 つの固定化法ともに高度浄水処理水の方が大きいことが確認された。この原因として、従属栄養細菌数の測定誤差が考えられる。培養法による従属栄養細菌数測定は、上水試験法³⁾に従って 7 日間で形成される集落を確認している。急速ろ過処理水と高度浄水処理水で再増殖した細菌のコロニーを比較すると、高度浄水処理水の方には視認が困難な非常に小さいコロニーが数多く確認された。そのため、培養法による高度浄水処理水の従属栄養細菌数測定結果は、実際に存在する従属栄養細菌数よりも若干低い値を示している可能性があり、その影響で細胞数あたりの吸光度変化量が大きくなったと考えられる。また、今回の水道水試料で得られた細胞数 1 log あたりの吸光度変化量は、モデル微生物で検討した際のそれと同程度の値となった。

3. (2) で検討した 2 種類の固定化法が BrdU 標識 DNA 量に及ぼす影響を比較すると、細胞数 1 log あたりの吸光度変化量は細胞固定化法で 0.025 程度、DNA 固定化法では 0.050 程度と約 2 倍の値を示した。これもモデル微生物で得られた結果と同様の傾向を示しており、DNA 抽出により細胞壁処理の影響を排除することでより大きな吸光度変化量が得られることを示している。3. (2) で述べたように、モデル微生物を用いた場合においても、同一試料の測定値の変動が抑制できなかったことを考慮すると、細胞数 1 log あたりの吸光度変化量が大きいほど微生物数推定値の誤差を低減可能であると言えるため、水道水中の従属栄養細菌数測定には DNA 固定化法を採用することが望ましい。また、細胞固定化法では 95% 信頼区間をはずれる吸光度値が半数程度存在する。これと比較すると、DNA 固定化法で得られた吸光度値の方が変動幅が抑制できていると考えられる。そのため、DNA 固定化法の方がより信頼度が高い手法であると言える。さらに前述の通り、DNA 固定化法では 1 日あたりの作業時間がより短縮されている。以上から、浄水中の従属栄養細菌数推定法として、DNA 固定化法がより有用性が高い推定法であると判断できる。

しかし、DNA 固定化法を用いた場合でも、式 (5b), (6b) からわかるように細胞数 1 log の変化に伴う吸光度

の変化量は 0.05 前後と非常に小さく、従属栄養細菌数の推定精度を向上させるためには、より鋭敏かつ特異的な BrdU 標識 DNA の検出方法を模索していく必要があると考えられる。具体的には、anti-BrdU 抗体濃度を上げて BrdU に対して結合可能な抗体量を増やす、あるいは酵素反応の特異性及び反応性を高めるために、吸光度測定を行う場合は ABTS 以外の基質として TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) を使用する、さらに蛍光強度測定を行うなどの方策が挙げられる。

4. 結論

本研究では水道システムにおける微生物再増殖指標として従属栄養細菌をとりあげ、BrdU ラベル化法によるその迅速推定手法を提案した。まずモデル微生物を用いて、BrdU ラベル化反応条件について検討し、BrdU 濃度を $1 \mu\text{M}$ と決定した。そしてこの条件を用いて合成された BrdU 標識 DNA を対象として、細胞固定化法と DNA 固定化法を比較検討した。その結果、細胞固定化法、DNA 固定化法ともに $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL の範囲で細菌数の対数値との間で直線性が確認できた。最後に実際の水道水中の従属栄養細菌数を対象として、BrdU 標識 DNA 量に基づいた従属栄養細菌数測定を適用した。両手法ともに $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL の範囲で定量性が確認された。測定に要する時間も 2 日間に短縮でき、両手法の有用性が示された。2 種類の固定化法を比較した結果、細胞数 1 log あたりの吸光度変化量が大きいこと、1 日の作業時間がより短いことから、DNA 固定化法を用いた BrdU ラベル化法が浄水中の従属栄養細菌数の迅速推定法としてより有用性が高いと結論づけた。

謝辞: 本研究の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業, H20-健危-一般-006, 代表者 島崎大)によるものである。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 伊藤禎彦, 越後信哉: 水の消毒副生成物, 技報堂出版, 2008.
- 2) 厚生科学審議会: 水質基準の見直し等について(答申), 2003.
- 3) (社)日本水道協会: 上水試験方法, 日本水道協会, 2001.
- 4) Hamasaki, K., Long, R. A. and Azam, F.: Individual cell growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine incorporation, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 35, No. 3, pp. 217-227, 2004.

- 5) Steward, G. F. and Azam, F.: Bromodeoxyuridine as an alternative to ^3H -thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 19, pp. 57-66, 1999.
- 6) Muir, D., Varon, S. and Manthorpe, M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures, *Anal. Biochem.*, Vol. 185, pp. 377-382, 1990.
- 7) Belozersky, A. N. and Spirin, A. S.: A correlation between the compositions of deoxyribonucleic and ribonucleic acids, *Nature*, Vol. 182, pp. 111-112, 1958.
- 8) Lobry, J. R.: Influence of genomic G + C content on average amino-acid composition of proteins from 59 bacterial species, *Gene*, Vol. 205, pp. 309-316, 1997.

(2010.05. 21 受付)

Development of a prompt estimation method for heterotrophic bacteria in drinking water based on the amount of DNA labeled with bromodeoxyuridine

Yasuhiro ASADA¹, Yumiko OHKOUCHI² and Sadahiko ITOH²

¹Dept. of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²Dept. of Global Ecology, Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

Advanced monitoring of regrown bacteria is highly required to minimize microbiological risk in water supply systems with lower chlorine residual. In this study, DNA labeling method with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) during short time incubation was applied to estimate promptly heterotrophic bacterial counts in distributed water. The DNA amounts labeled with BrdU were increased linearly with the logarithmic values of cell counts in the range of $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL. The cell counts could be estimated within 2 days. BrdU concentration for labeling reaction was determined as 1 μM using two kinds of model bacterial strains. Then, two different immobilization methods of DNA labeled with BrdU, cell-immobilization and DNA-immobilization, were compared using both model bacterial strains and heterotrophic bacteria in water samples. It was suggested that DNA immobilization method had a better sensitivity and a smaller variation for an estimation of heterotrophic bacteria in drinking water than cell immobilization method.