



Title	酸素電極法による一般細菌数の簡易計測
Author(s)	須田, 充; 笠原, 伸介; 石川, 宗孝
Description	第10回衛生工学シンポジウム (平成14年10月31日 (木) -11月1日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 4 環境計測 . 4-4
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 10, 113-116
Issue Date	2002-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7114
Type	departmental bulletin paper
File Information	10-4-4_p113-116.pdf



4-4 酸素電極法による一般細菌数の簡易計測

須田 充 (大阪工業大学大学院)
笠原伸介 石川宗孝 (大阪工業大学工学部)

1. はじめに

細菌計測を簡易かつ迅速に行うことは、公衆衛生を管理するうえで重要である。このような背景の下、食品衛生管理の分野では、酸素電極を用いて細菌数を電気化学的に推定する手法¹⁾(以下、酸素電極法)が開発された。この手法は、細菌を液体培地中で培養し、その増殖に伴う酸素消費速度から菌体濃度を推定するものであり、平板計数法のような煩雑な作業を一切必要としない。

本研究では、この酸素電極法を環境微生物試料の一般細菌計測に応用することを目的とし、まず、計測時における培地の組成と培養温度について検討するとともに、得られた結果の妥当性および酸素電極法の測定精度について検討した。また、同手法を水道水に適用することを想定し、試料のろ過濃縮操作を行うことにより、水道水質基準である 10^2 レベルの一般細菌計測が可能か否かについて検討した。

2. 酸素電極法の概要

酸素電極装置には、**図-1**に示すような剥き出しの電極がセル底部に装着されており、電極周辺における酸化還元反応の結果得られた電流値に基づいて溶液中の溶存酸素が検出される。電極セル内に、試料および液体培地を0.1または1.0 mLずつ注入し、一定条件で培養することにより、増殖・呼吸に伴う溶存酸素の急激な減少点が検出される。培養開始から急激な減少点が検出されるまでの時間(以下、検出時間)とセル注入時の菌体濃度の間には、**図-2**

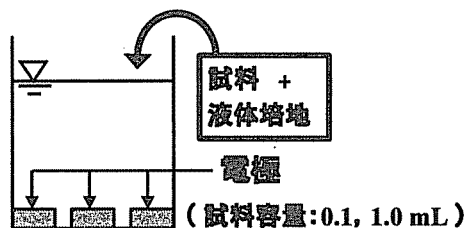


図-1 電極セルの概要

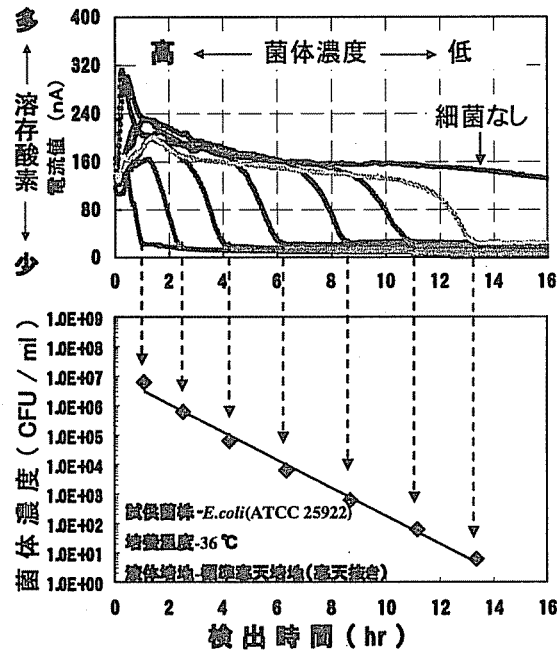


図-2 菌体濃度と検出時間の関係

に示すように、良好な負の相関関係が成立し、試料中の細菌数(以下、換算一般細菌数)を推定することができる。

3. 計測手順と精度評価

3.1 計測手順

純粋培養微生物試料として、*E.coli* (ATCC 25922)を、環境微生物試料として、菅原城北大橋と豊里大橋の中間付近において採取した淀川表流水(以下、河川水)および塩素処理前の農業集落排水処理水(以下、排水)をそれぞれ用い、希釈を要する試料については、滅菌リン酸緩衝希釈水²⁾を用いて適宜希釈した。濃縮を要する試料については、 $0.45 \mu\text{m}$ 混合セルロースエステルろ紙(以下、MCE)または $0.20 \mu\text{m}$ ポリカーボネートろ紙(以下、PC)(いずれもアドバンテック東洋(株))を用いて吸引ろ過することにより、細菌をろ紙上に捕集し、液体培地中にろ紙を浸漬させて計測を行った。

計測時の液体培地として、標準寒天培地、

PGY 培地, または R2A 培地 (いずれも寒天抜き) を用い, 培養温度 36, 30, 25, 20 °C で計測した。

3.2 精度評価

計測の可否については, 標準偏差の 2 倍 (分散範囲: 2σ) と試料の倍加時間 (基準範囲: g) とを比較することで判定した。

標準偏差については, 同一試料を 6~8 検体計測し, 検出時間から統計的に算出した。倍加時間については, 検量線の勾配より比増殖速度 μ を求め, 次式により算出した。

$$N = a \times e^{-\mu t}$$

$$g = 0.693 / \mu^3$$

ここで, N: 換算細菌数 (CFU/mL), a: y 切片 (CFU/mL) t: 検出時間 (hr), g: 倍加時間 (hr), μ : 比増殖速度 (1/hr)

分散範囲 (2σ) が基準範囲 (g) を下回った試料を計測可能と判定した。

4. 実験結果と考察

4.1 測定条件の検討

表-1 に, 各種液体培地, 培養温度で河川水を計測した際の検出時間を示す。まず, 液体培地の種類による検出時間への影響に注目すると, 培養温度が等しい場合, いずれの培地を用いても検出時間に大きな違いが認められず, 培地の組成が細菌の検出効率に及ぼす影響は小さいことが示唆された。一方, 培養温度による検出時間への影響に注目すると, 培養温度が低いほど検出時間が長くなる傾向が認められ, いずれの培地においても, 従属栄養細菌数の最低培養温度として設定されている 20°C を採用した場合, 一般細菌数の培養温度である 36°C を採用するよりも計測に 2 倍以上もの時間を要することがわかった。

これらの結果をふまえ, 以下の計測では, 一般細菌数の測定条件に準じ, 液体培地として標

表-1 河川水の計測結果 (n=4)

培養温度	液体培地の種類		
	標準	PGY	R2A
36°C	6.1	6.0	6.0
30°C	7.0	7.1	7.3
25°C	10.2	10.0	10.3
20°C	14.3	14.2	14.5

* 試料容量: 0.1 mL 単位: hr

準寒天培地 (寒天抜き) を, 培養温度として 36°C をそれぞれ採用することとした。

4.2 妥当性の検討

に, 河川水および排水を適宜希釈し, 得られた一般細菌数と検出時間との関係を示す。これによると, いずれの試料においても両者の間に $R^2=0.84$ 以上と高い相関係数が得られた。ここで, 同じ菌体濃度における検出時間に注目すると, 河川水は排水に比べ約 1 時間短かった。このことは, 試料により細菌相が異なり, 河川水中における菌体数当たりの酸素消費速度が, 排水に比べ高かったためと考えられる。したがって, 実際の適用に際しては, 測定対象とする試料毎に検量線を作成し, この影響を極力少なくすることが必要と考えられる。また, 図-4 に, 図-3 の検量線を用いて算出した換算一般細菌数と平板計数法により計測した一般細菌数との関係を示す。 10^3 程度において若干のずれが見られたものの, 両者の間には概ね良好な正の相関関係が認められた。このことから, 酸素電極法により求められた一般細菌数は妥当であったと考えられる。

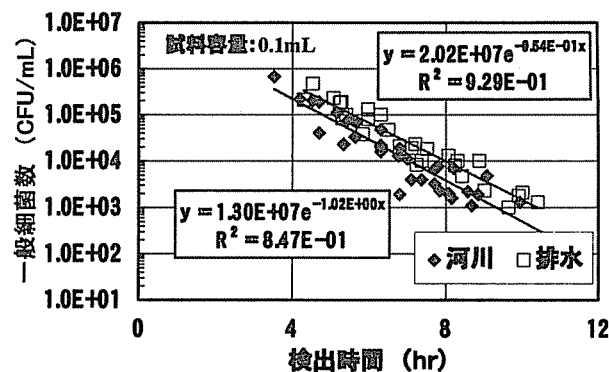


図-3 一般細菌数と検出時間

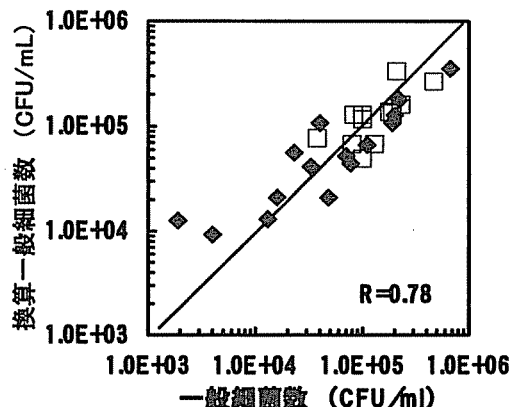


図-4 換算一般細菌数と一般細菌数の関係

4.3 測定精度の検討

図-5 に、*E. coli* および河川水を適宜希釈し、同一試料を多検体同時に計測した際の測定結果を示す。これによると、いずれの試料においても試料中の菌体濃度が低いほど検出時間の分布が大きくなり、測定値の信頼性が低下することが確認された。これは、低濃度試料ほど、溶存酸素が枯渇するまでにより長い対数増殖期間が必要となり、セル内に存在する初期菌体濃度の微小な差についても対数的に増幅されたためと考えられる。また、この傾向は、純粋培養微生物試料である *E. coli* に比べ、環境微生物試料である河川水においてより顕著に現れ、試料容量 0.1 mL の場合、河川水では 10^1 CFU/mL 程度の一般細菌を検出することさえ困難であった（8 検体中 1 検体のみ検出）。このことは、環境微生物試料の場合、増殖速度や呼吸活性の異なる細菌が共存しており、一般細菌

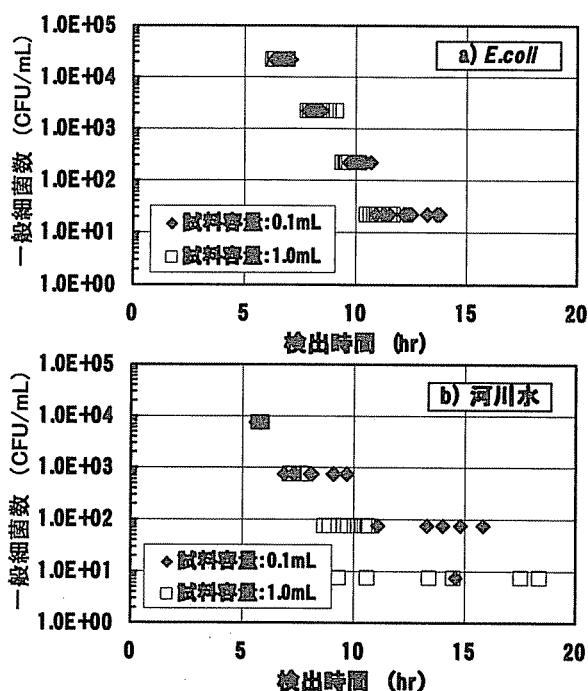


図-5 検出時間の分布 (n=6~8)

菌として検出される細菌の全てが、酸素電極法における検出時間に対して同様に寄与しなかったためと考えられる。

ここで、両試料における計測可能な菌体濃度の下限について検討するため、表-2 に、各菌体濃度における分散範囲と基準範囲を示す。これによると、分散範囲が基準範囲を下回る一般細菌数の下限は、*E. coli* の場合、試料容量 0.1 および 1.0 mL において 2.2×10^3 および 2.2×10^2 CFU/mL、河川水の場合、それぞれ 7.5×10^3 および 7.5×10^2 CFU/mL と、いずれの試料においても、試料容量を 1 mL とすることで、0.1 mL の場合より計測可能な菌体濃度が 1 オーダー低かった。しかし、河川水においては、試料容量を 1 mL としても水道水質基準に定められている 100 CFU/mL を判定し得る精度までは得られておらず、細菌数の存在有無の判定を 10^3 オーダーでしか行い得ないことが明らかとなった。

4.4 濃縮操作の検討

ろ過濃縮操作が測定結果に及ぼす影響について検討するため、希釈操作により菌体濃度が調整された試料（以下、希釈系）と濃縮操作により調整された試料（以下、濃縮系）をそれぞれ 6 検体ずつ計測し、各菌体濃度における平均値と分散範囲 (2σ) を比較した。測定対象は、*E. coli* または河川水とし、希釈系については、試料を 1, 10, 100 倍に希釈することにより、濃縮系については、100 倍希釈された試料を 1, 10, 100 mL ろ過することにより、それぞれ菌体濃度を調整した。

図-6 に、河川水を計測した際の一般細菌数と検出時間の関係を示す。まず、希釈系と濃縮系における分散範囲 (2σ) を比較すると、いずれのろ紙を用いた場合でも、同一の菌体濃度

表-2 各菌体濃度による分散範囲 (2σ) と基準範囲 (g)

一般細菌数 CFU/mL	<i>E. coli</i>				河川水				
	0.1 mL		1.0 mL		一般細菌数 CFU/mL	0.1 mL		1.0 mL	
	g	2σ	g	2σ		g	2σ	g	2σ
$2.2E+06$		> 0.35		> 0.38					
$2.2E+05$		> 0.31		> 0.35					
$2.2E+04$	0.53	> 0.47	0.45	> 0.23					
$2.2E+03$		> 0.46		> 0.44	$7.5E+03$		> 0.17		> 0.13
$2.2E+02$		< 0.67		> 0.37	$7.5E+02$	0.68	< 2.03	0.64	> 0.35
$2.2E+01$		< 1.90		< 0.76	$7.5E+01$		< 3.58		< 1.52

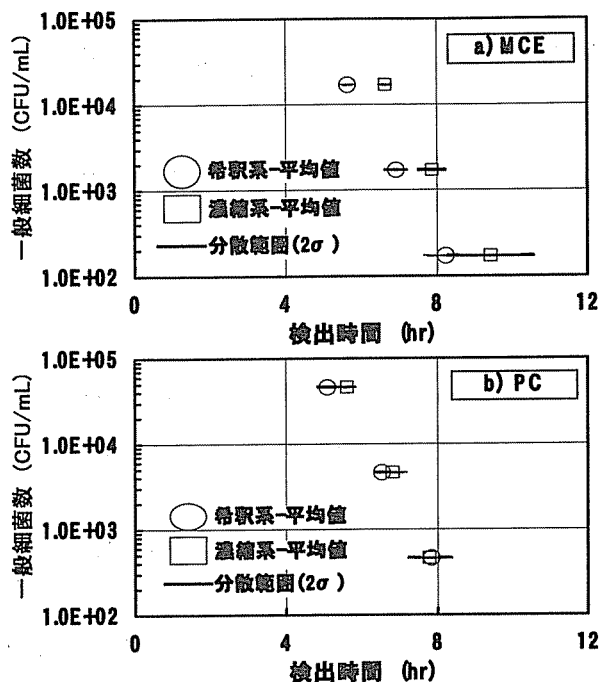


図-6 計測結果に及ぼす濃縮操作の影響

における分散範囲には大きな違いが見られず、ろ過操作より発現する誤差は、菌体濃度の違いにより引き起こされる誤差に比べて僅かであることが示唆された。

次に、希釈系と濃縮系における平均検出時間の違いについて使用したろ紙別に比較すると、MCE では、菌体濃度にかかわらず、濃縮系の方が希釈系よりいずれも 1 時間ほど遅く検出されたのに対し、PC では、系列の違いによる検出時間への影響は認められなかった。このことは、ろ紙表面形状の違いにより、捕集された菌体の液体培地中への分散効率が異なったためと考えられ、PC メンブランフィルタを用いてろ過濃縮された試料については、希釈操作によって作成された検量線を用いて一般細菌数を推定し得ることが示唆された。また、このことは、PC メンブランフィルタを用いてろ過濃縮することで、細菌数と検出時間の関係を保持したまま測定精度の向上と検出時間の短縮を同時に達成し得ることを意味している。以上のことから、同濃縮操作を行うことで、水道水質基準である 10^2 CFU/mL の一般細菌数の有無が、約 6 時間で判定可能であることが明らかになった。

5. おわりに

本研究では、酸素電極法を純粋培養微生物試

料および環境微生物試料に適用し、環境試料の測定条件、測定結果の妥当性、測定精度、およびろ過濃縮操作による測定精度の向上効果について検討した。得られた結果を要約すると、以下のとおりである。

- (1) 測定条件について検討したところ、培養温度は検出時間に大きく影響するが、培地の組成はほとんど影響しないことがわかった。
- (2) 標準寒天培地と同じ組成の液体培地を用いて培養温度 36°C で河川水と排水を計測したところ、酸素電極法によって求められた換算一般細菌数と平板計数法によって求められた一般細菌数との間には、良好な比例関係が成立した。
- (3) 酸素電極法により計測可能な一般細菌数の下限を標準偏差と倍加時間に基づいて判定したところ、河川水の場合、試料容量 0.1 および 1.0 mL においてそれぞれ 7.5×10^3 および 7.5×10^2 CFU/mL となり、水道水質基準に定められている 100 CFU/mL を、直接判定し得る精度は得られなかった。
- (4) しかし、試料をポリカーボネート製メンブランフィルタ (孔径 $0.2 \mu\text{m}$) を用いて、ろ過濃縮することで、細菌数と検出時間の関係を保持したまま測定精度の向上と検出時間の短縮を達成し得ることが示された。このことから、酸素電極法では、 10^2 レベルでの一般細菌数の有無を最短約 6 時間で判定可能であることが示唆された。

【謝辞】最後に、本研究の遂行に多大な協力を頂いた(株)ダイキン環境研究所の関係各位ならび、本学卒業生および本学 4 年生の分林静人君、甲本周司君、山内雅之君、山川勝也君に感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1)厚生省生活衛生局水道環境部 監修:上水試験方法 (1993), (社)日本水道協会, 1995.3
- 2)天野義久・新井潤一郎・山中俊介:日本食品化学工学会誌, Vol.48, No.8, pp.94-98, 2001.2
- 3)堀越弘毅・中村聡・青野力三:ピギナーのための微生物実験ラボガイド, 講談社, 1993.6