河川水中の細菌数測定のための、 スパイラル・プレーティング法の最適条件の統計学的検討

和田 正道

信州大学医学部衛生学教室

Statistical Study of the Optimal Conditions of the Spiral Plating Method for Counting Bacterial Numbers in River Water

Masamichi Wada

Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto

The application of the spiral plating method, a rapid and labor-saving technique for enumerating bacteria in food, to evaluate bacteria in river water, was examined. Standard plate counts and the numbers of heterotrophic bacteria, coliforms and *Flavobacterium* spp. in the water were tested by the spiral plating method, the results were compared with those of the conventional method and the optimal conditions for using the spiral plating method were considered and selected to fit the conventional methods.

The optimal conditions selected were as follows: by laser colony counter after incubation at 35 °C for 38h. for standard plate counts; by laser colony counter after incubation at 25 °C for 48h. for the numbers of heterotrophic bacteria and *Flavobacterium* spp.; by colony viewer counting reddish colonies ≥ 0.25 mm in diameter after incubation at 35 °C for 22h. for the number of coliforms.

The numbers of bacteria, except for coliforms, determined by this spiral plating method were found to be closely related to those from conventional methods ($r \geq 0.91$), and the replicating variances of both methods were not significant.

The counts of bacteria by laser colony counter gave results similar to those by colony viewer counting by visual inspection.

This spiral plating method saved time, money and labor in the evaluation of bacteria in river water as comparable to that in food.

These results indicate that the spiral plating method can be used in place of conventional methods in evaluating the number of bacteria in river water.

Key words : Spiral plating method, Rapid and labor-saving technique, Laser colony counter, River water, Optimal conditions, Standard plate counts, Number of heterotrophic bacteria, Number of coliforms
スパイラル・プレーティング法, 迅速および省力技術, レザーコロニカウ
ンタ, 河川水, 最適条件, 一般生菌数, 従属栄養細菌数, 大腸菌群数

緒 言

近年, 細菌数の測定について, 検査の迅速化, 省力化および検査器具, 器材などの節約を目的とした新しい測定法の開発が盛んに行われている。米国のFood and Drug

Administration (FDA)で開発されたSpiral plating 法(以下SPL法と略す)¹⁾もその一つである。この方法は従来の混釈法や表面塗抹法による細菌数測定法の機械化および自動化をめざして, 開発されたもので, わが国²⁾および各国においても食品微生物検査の公定法の一つとし

て、活用されている。本法を食品中の細菌数測定に使用した場合、統計的にみて従来法と同一測定値が得られ^{3,4)}、また、精度も従来法に劣らないことが認められている。

したがって、この方法を応用すれば、衛生学および生態学的見地から環境中の細菌の実態を定量的に把握することが容易になると考えられる。しかし、本法を環境中の細菌数の測定に応用した報告は極めて少なく⁵⁾、河川水についての報告は皆無である。そこで著者はSPL法と従来法を用いて、河川水中の一般生菌数、従属栄養細菌数および大腸菌群数の測定を行い、両法の測定値の一致性、精度および培養時間等について比較検討した。

これらの実験結果に基づいて、河川水中の細菌数を省力的かつ迅速に、高精度で測定できる、SPL法の最適な測定条件を設定した。

実験方法

1. 実験機器とその使用方法

SPL法に必要な機器は、寒天平板の表面に被検水を塗布するスパイラル・プレータ、被検水を塗布された寒天平板を培養するためのふらん器、培養した寒天平板から肉眼でコロニを計数するためのコロニビューアおよびレーザー光を用いて自動測定するためのレーザーコロニカウンタ等である。

スパイラル・プレータによる被検水の塗布は、寒天平板の中心部から周辺部に向かって、らせん状に、液量を少しずつ減らしながら行われる。今回、使用したスパイラル・プレータ・モデルC型(Spiral systems Instruments, Inc., USA)は、直径10cmの寒天平板を用いた場合、総塗布量を0.037mlまたは0.092mlに調整できる。また、1時間当たり、60～70枚の寒天平板に塗布することが可能である。塗布された寒天平板を従来法と同様にふらん器で培養すると、中心部が密で、周辺にいくにつれ、疎に分布するコロニが現れる。この寒天平板から肉眼で菌数を読み取るにはコロニカウンティング・グリッド付のコロニビューア(Spiral systems Instruments, Inc., USA)を用いて次のように行う。同心円と線分でいくつかの扇形状に区分されたガラス板であるコロニカウンティング・グリッド上の中心に培養した寒天平板を置き、計数するのに適当なコロニ密度の部分を選び、対称部位にある扇形状の2区画内のコロニを計数する。この2区画に塗布された液量は、あらかじめ設定されているので、菌数は計数されたコロニ数を設定された塗布量で除すことにより算出される。また、レーザーコロニカウンタ(Spiral systems Instruments, Inc., USA)を用いて、寒天平板上のコロ

ニ数の自動測定が可能である。このレーザーコロニカウンタはレーザー透過方式で、レーザー光を寒天平板の周辺部から中心に向かって、らせん状に走査させて、コロニを計数するとともに、そのコロニを計数するまでに要したレーザー光の走行距離(以下AREAと略す)を同時に記録する。また、ビームサイズ(以下SPOT SIZEと略す)を1～10まで0.5刻みで変更することにより、測定可能な最小コロニサイズを0.1mm～1.0mmまで0.05mm刻みで19段階に設定できる。

2. 培地と寒天平板の調製法

一般生菌数の測定に使用する標準寒天培地、大腸菌群数の測定に使用するデオキシコレイト寒天培地およびBGLB培地の調製には市販の粉末培地(栄研化学製)を用いた。従属栄養細菌数の測定に使用する桜井寒天培地⁶⁾は各成分を秤量して自製した。

SPL法に使用する寒天平板の調製はつぎのように行った。標準寒天培地および桜井寒天培地は自動滅菌機(千代田製作所)で121℃、15分間滅菌後、また、デオキシコレイト寒天培地は加熱溶解後、各培地とも、自動分注機(Pool bioanalysis italiana)を用いて24mlずつを滅菌したプラスチックシャーレに分注した。分注後、水平台上で固化させ、クリーンベンチ(Hitachi, Ltd.)内で寒天表面を十分に乾燥後、使用時まで冷蔵保存した。

混釈法に用いる場合、標準寒天培地および桜井寒天培地は121℃、15分間滅菌後、また、デオキシコレイト寒天培地は加熱溶解後、使用時まで水浴中で50～55℃に保温した。BGLB培地は、発酵管を入れた中試験管に10mlずつ分注して、121℃、15分間滅菌後、使用時まで冷蔵保存した。

3. 供試した河川水

1983年11月～1988年10月まで、長野県内の千曲川水系の8河川、犀川水系の7河川および天竜川水系の17河川の計32河川において、任意の採水定点から、任意の時期に、必要に応じて、表層流水を無菌的に採水して被検水とした。なお、採水方法は環境測定分析法注解⁷⁾に準じた。

4. SPL法および従来法による細菌数の測定方法

SPL法と従来法による測定は、同一の被検水について、並行して行った。測定項目は、一般生菌数、従属栄養細菌数および大腸菌群数とし、各被検水ごとに任意の項目数が検査された。また、裾花川の河川水から分離した河川の汚濁指標菌の一つである*Flavobacterium* spp. 菌の懸濁液について従属栄養細菌数に準じて実験を行った。従来法として、一般生菌数および従属栄養細菌数につい

ては、混釈法(Pour plate method)⁸⁾を、大腸菌群数については、最確数法(Most probable number, Multiple-tube tests)⁹⁾を用いた。いずれの場合にも、細菌数が測定可能な範囲に入るよう、磷酸緩衝液を用いて被検水を10倍段階希釈して調製した試料を用いた。なお、被検水中に浮遊物等があり、検査に支障がある場合には、滅菌可能な金網でできたざる状のステンレスメッシュを通して除去後、検査を継続した。

SPL法の場合、スパイラル・プレートによる塗布量は1寒天平板あたり0.092mlとした。今回の実験では、レーザーコロニカウンタによる測定の誤差を小さくするため、スパイラル・プレートを調整して通常的位置より2mm内径で塗布を終了させた。培養後、出現したコロニをコロニビュアを用いて、肉眼で計数した。なお、計数は観察する部分が重ならないように、寒天平板を回転させてずらし、3回ずつ行った。また、標準寒天平板および桜井寒天平板については、レーザーコロニカウンタを用いて自動測定を行い、測定値を解析して最適な測定条件を定めた。測定値は、寒天平板の周辺部から中心部にむかって、コロニを100個数えるのに要したAREAを表示盤から読み取ることにより求めた。測定条件は、SPOT SIZEを2～5まで0.5刻みで7段階に変えて、各段階ごとに行った。

混釈法の場合は、同一希釈段階の被検水1mlずつを3枚の滅菌シャーレに滴加し、これに、寒天培地を10～15mlずつ注ぎ混釈した。固化後、同培地5mlずつを重層した。培養後、出現したコロニ数が、30～300の寒天平板を選び、コロニを計数した。各検査項目ごとの実験手順を次に示す。

4.1 一般生菌数

88被検水について検査を行った。SPL法の場合は、6枚の標準寒天平板のそれぞれに、同一希釈段階の河川水を同様に塗布した。塗布した平板は表面が乾いてから35℃で培養し、24および38時間経過後に3平板ずつ取り出して計数した。計数は、コロニビュアとレーザーコロニカウンタを用いて行った。混釈法による場合は、混釈した寒天平板を35℃で48時間培養後、コロニを計数した。

4.2 従属栄養細菌数

87被検水について検査を行った。SPL法の場合は、9枚の桜井寒天平板のそれぞれに、同一希釈段階の河川水を同様に塗布した。塗布した平板は表面が乾いてから25℃で培養し、24、48および72時間経過後に3平板ずつ取り出して計数した。計数は、コロニビュアとレーザーコロニカウンタを用いて行った。混釈法による場合は、混釈

した寒天平板を25℃で72時間培養後、コロニを計数した。

4.3 大腸菌群数

検査に先立ち、デオキシコレイト寒天平板上の赤～暗赤色コロニの直径と大腸菌群との関連について以下のような検討を行い、計数の際の大腸菌群の判定基準を定めた。

スパイラル・プレートで、被検水を塗布後、重層したデオキシコレイト寒天平板を35℃で22時間培養し、出現した116コロニについて、その直径を計測後、釣菌して大腸菌群の定義に基づいて次の確認を行った。すなわち、グラム染色して顕鏡することによりグラム陰性の無芽胞桿菌であること、糖分解試験用PYP培地により乳糖を酸化あるいは発酵により分解すること、大腸菌群検索用LB培地において乳糖を分解してガスを産生すること、およびオキシダーゼペーパーによりチトクロームオキシダーゼテスト陰性であること。これらの結果に基づいて大腸菌群として計数すべきコロニの直径等の条件を決めた。コロニの直径計測用には、各種直径の黒円を記した透明板を作成して使用した。

検査は185被検水について行った。SPL法の場合は、1枚のデオキシコレイト寒天平板に、河川水を希釈せずに塗布した。塗布した平板は表面が乾いてから同培地5mlを重層した。35℃で22時間培養後、コロニビュアを用いて、平板に発育した赤～暗赤色のコロニについて、前述の条件に適合するものを選択して計数した。最確数法は、あらかじめ調製した発酵管入りBGLB培地を同一希釈段階あたり3本ずつ用いて行った。

4.4 *Flavobacterium* spp. 菌液を用いた菌数測定

寒天を加えない桜井液体培地で25℃、24時間静置培養した*Flavobacterium* spp. 菌液を任意の濃度に希釈して調製した36被検水を用いて、従属栄養細菌数と同じ方法で測定を行った。

5. *Flavobacterium* spp. 菌液を用いたSPL法と混釈法の精度比較実験方法

前述の4.4項と同様に培養した*Flavobacterium* spp. 菌液を計数に適したコロニ数が得られるよう磷酸緩衝液で10倍段階希釈して、SPL法および混釈法用の被検水とした。この際、SPL法のコロニビュアによる計数を、測定精度が最も低いと考えられる寒天平板の周辺部で行えるように菌液の濃度を微調整した。SPL法の場合は、被検水を、0.092mlずつ108枚の桜井寒天平板にスパイラル・プレートをを用いて塗布した。塗布した寒天平板を、25℃で培養し、培養後形成されたコロニを、コロニビュアを用いて計数した後、レーザーコロニカウンタを用いて

自動測定した。培養時間およびレーザーコロニカウンタの測定条件は、前述の4.4項の実験結果から得られた *Flavobacterium* spp. の最適測定条件に準じた。混釈法の場合は、被検水の1 mlずつを、チップ交換式マイクロピペットを用いて、同一希釈段階当り110枚の減菌シャーレにそれぞれ滴加し、4.2項に準じて混釈培養後、コロニを計数した。

6. 被検水としての河川水の保存実験

犀川、裾花川および長野市内を流れる小河川の3河川水を4℃および25℃で暗所に保存し、24, 48, 72, 120および168時間経過後にサンプルを採取し、SPL法を用いて、一般生菌数、従属栄養細菌数を、SPL法およびBGLB培地を1希釈段階あたり5本ずつ用いた最確数法を用いて大腸菌群数の測定を行った。

実験結果

1. 算出されたSPL法の最適な測定条件

最適な測定条件の算出に際して、菌数はすべて常用対数に変換した。コロニビュアで計数されたコロニ数から菌数を算出するための塗布量として、SPL法のマニュアル^{10, 11)}には、(1)従来法との関連に基づいて統計的に求めた数値、(2)理論的に計算された数値、(3)スパイラル・プレートによる塗布を通常の終了位置より2 mm内径で終了させる条件で、理論的に計算された数値、の3種類が記載されている。したがって、コロニビュアによる計数値を1 ml当りの菌数に換算するため、以下に記載するように、各菌数測定法ごとに最適な塗布量の検討を行った。また、一般生菌数、従属栄養細菌数および *Flavobacterium* spp. 菌数については、レーザーコロニカウンタの最適測定条件についても検討した。

1.1 一般生菌数

解析は4段階に分けて行われたが、第1～3段階までは、24および38時間の培養時間別に行われた。解析の第1段階では、培養したSPL法の寒天平板をコロニビュアを用いて計数し、得られたコロニ数から3種類の塗布量による菌数をそれぞれ算出した。第2段階では、第1段階で算出された各塗布量ごとの菌数を目的変数とし、レーザーコロニカウンタによるAREAを従属変数とする連立多項式による最適な回帰式¹²⁾を、自由度修正済みの重相関係数を指標として、最小自乗法により算出した。回帰式は7段階の各SPOT SIZEごとに、それぞれ作成した。これらの回帰式に基づき、各塗布量ごとに、レーザーコロニカウンタによる7通りの推定菌数を算出した。第3段階では、混釈法による菌数を以下のように算出した。コ

ロニ密度が計数に適した希釈段階の3寒天平板上のコロニ数を計数して算術平均値を求め、これに希釈倍数を乗じた。第4段階では、培養時間ごとのコロニビュアによる3種類の塗布量ごとの菌数、レーザーコロニカウンタによる各塗布量ごとの7通りの菌数および混釈法による菌数の21通りの組合せに、2通りの培養時間の組合せを乗じた計42通りの測定条件のそれぞれについて、二元配置分散分析法¹³⁾による解析を行い、コロニビュアによるSPL法、レーザーコロニカウンタによるSPL法および混釈法の3方法間および88被検水間のF-ratioを求めてFig. 1に示した。方法間のF-ratioが小さいほど方法間に差がなく、すなわちSPL法と混釈法の一致性が高くなる。また、被検水間のF-ratioが大きく被検水間相互の差が大きいほど、測定値の明確な比較ができ測定条件として良好である。Fig. 1から、測定条件1～7は他と比較して高い一致性を示し、かつ被検水間にも十分な差が認められ、良好な測定条件と考えられた。実際にレーザーコロニカウンタを使用する場合に、SPOT SIZEがあまり小さいと、シャーレの傷、汚れ、寒天中の気泡および被検水中のごみ等を間違えて計数する可能性が高くなる。また、大きすぎると、直径の小さいコロニが計数されなくなる。以上を考慮した結果、測定条件1が最も適合すると判断した。すなわち、最適な条件は次のように求められた。被検水を塗布した寒天平板を35℃で38時間培養する。培養後、コロニビュアによる計数値から菌数への換算に用いる塗布量として、塗布を2 mm内径で終了させた条件で理論的に計算された数値を用いること。レーザーコロニカウンタで自動測定する場合は、SPOT SIZEを2.5に設定する。この場合、AREA (X)から被検水1 ml中の細菌数(Y)を推定する回帰式は、

$$\log Y = \{0.24 \times (\log X)^3 - 1.56 \times (\log X)^2 + 3.51 \times \log X - 2.47\}^{-1} \text{ (重相関係数} = 0.963) \text{ となる。}$$

Fig. 2に、AREAをX軸に、コロニビュアによる被検水1 ml中の細菌数をY軸にとり、対応するサンプルの位置とサンプル数および算出された重回帰式と重回帰曲線を示した。この重回帰式に、レーザーコロニカウンタから読み取られたAREAを代入することによって、被検水1 ml中の細菌数に換算することが可能である。

1.2 従属栄養細菌数

3種類の培養時間、7種類のコロニの直径および3種類の塗布量から成る63組合せから、1.1 一般生菌数と同じ方法によって求めた最適な条件は次のとおりである。すなわち、被検水を塗布した寒天平板を25℃で48時間培養する。培養後、コロニビュアによる計数値から菌数へ

Fig. 1 Evaluation of the optimal conditions of the spiral plating method for determining standard plate counts by analysis of variance.

- a) A: Value relating to colony count by conventional methods
B: Theoretically derived value
C: Theoretically derived value (spreading on agar plate until 2mm inside)
- b) Laser beam size of the laser colony counter
- c) Spiral plating method using a colony viewer, spiral plating method using a laser colony counter and the pour plate method

Fig. 2 Calibration curve for determining standard plate counts from the value of "AREA" counted with a laser colony counter at a spot size of 2.5.

- a) Scanning distance of the laser beam for counting one hundred colonies

Fig. 3 Calibration curve for determining the number of heterotrophic bacteria from the value of "AREA" counted with a laser colony counter at a spot size of 3.5.

- a) Scanning distance of the laser beam for counting one hundred colonies

の換算に用いる塗布量として、従来法との関連に基づいて統計的に求めた数値を用いる。レーザーコロニカウンタで自動測定する場合は、SPOT SIZEを3.5に設定する。この場合、AREA (X)から被検水 1 ml 中の細菌数(Y)を推定する回帰式は、 $\log Y = -0.46 \times (\log X)^2 + 0.32 \times \log X + 5.81$ (重相関係数=0.985)となる。Fig. 3に、AREAをX軸に、コロニビュアによる被検水 1 ml 中の細菌数をY軸にとり、対応するサンプルの位置とサンプル数および算出された重回帰式と重回帰曲線を示した。この重回帰式に、レーザーコロニカウンタから読み取られたAREAを代入することによって、被検水 1 ml 中の細菌数に換算することが可能である。

1.3 大腸菌群数

デオキシコレイト寒天平板上に形成される赤色～暗赤色コロニの直径と大腸菌群との関係をTable 1に示した。コロニの直径が0.25mm未満では、大腸菌群である比率は8.3%であったが、0.25mm以上では、0.75～1.00mmの90.5%を最高に69.8%以上の比率を示した。したがって、直径0.25mm以上のコロニを選択して計数すれば、その76.0%を大腸菌群とみなしうることがわかった。

最適な測定条件を設定するため、最確数法による菌数と3種類の塗布量に基づき算出されたコロニビュアの各菌数間の3通りの組合せについて解析した。解析方法は、両方法の測定値の分散について、F検定を行い、有意差が認められなければ、対応のあるt検定を、認められれば、Aspin-Welchの方法で検定を行い、両方法による測定値の相違が最も小さいと考えられる組合せの塗布量をもって最適条件とした。

解析結果から、塗布を2mm内径で終了させて理論的に計算された数値が最適と判断された。以上の成績から、大腸菌群数の最適測定条件は次のように定められた。被検水を塗布後、重層したデオキシコレイト寒天平板を35℃で22時間培養後、直径0.25mm以上の赤色～暗赤色コロニを選択して計数する。コロニビュアによる計数値か

らの菌数の換算には、塗布を2mm内径で終了させて理論的に計算された数値を用いる。

1.4 *Flavobacterium* spp. 数

3種類の培養時間、7種類のコロニの直径および3種類の塗布量から成る63組合せから、最適な測定条件は1.1一般生菌数と同じ方法によって、次のように求められた。すなわち、被検水を塗布した寒天平板を25℃で48時間培養し、培養後、コロニビュアによる計数値から菌数への換算に用いる塗布量として、従来法との関連に基づいて統計的に求めた数値を用いる。レーザーコロニカウンタで自動測定する場合は、SPOT SIZEを3.5に設定する。この場合、AREA (X)から被検水 1 ml 中の細菌数(Y)を推定する回帰式は、 $\log Y = (-2.63X^2 + 2.20X + 0.20)^{-1}$ (重相関係数=0.994)となる。Fig. 4に、AREAをX軸

Fig. 4 Calibration curve for determining the number of *Flavobacterium* spp. from the value of "AREA" counted with a laser colony counter at a spot size of 3.5.

a) Scanning distance of the laser beam for counting one hundred colonies

Table 1 The relation between the diameter of reddish colonies and coliforms on a desoxycholate agar plate.

Colony diameter (mm)	The number of examined colonies	The number of coliform colonies	Positive percent
<0.25	12	1	8.33
0.25≤<0.50	43	30	69.77
0.50≤<0.75	32	23	71.88
0.75≤<1.00	21	19	90.48
1.00≤<1.50	8	7	87.50
Total	116	80	68.97

に、コロニビュアによる被検水 1 ml 中の細菌数を Y 軸にとり、対応するサンプルの位置とサンプル数および算出された重回帰式と重回帰曲線を示した。この重回帰式に、レーザーコロニカウンタから読み取られた AREA を代入することによって、被検水 1 ml 中の細菌数に換算することが可能である。

2. SPL法と従来法との比較

前項で求められた最適条件における SPL 法および従来法により求められた、一般生菌数、従属栄養細菌数、*Flavobacterium* spp. 数および大腸菌群数について、解析された両方法の関連のうち、培養時間、相関係数、回帰式および 95% 信頼区間を Table 2 に示した。なお、解析に際して、細菌数はすべて常用対数に変換した。相関係数については、大腸菌群数 ($r=0.788$) 以外は、 $r=0.91$ 以上の高い相関を認め、回帰式については、すべての菌数測定法において、 $Y=X$ に近似しており、また、95% 信頼区間は、すべての菌数測定法において、 ± 1 以内であった。即ち、従来法のデータとの高い一致性を示した。なかでも、*Flavobacterium* spp. 数の測定は、算出された各統計量の比較から、特に高い一致性を示した。また、すべての菌数測定法において、SPL 法のコロニビュアとレーザーコロニカウンタの測定値はきわめて高い一致性を示した。算出された測定結果から、一般生菌数の測定における、SPL 法のコロニビュアによる測定値と混釈法との関係を Fig. 5 に、大腸菌群数の測定における、SPL 法と最確数法との関係を Fig. 6 に示した。両図には、回帰式、相関係数、95% 信頼区間、回帰直線およびサンプル数等を示した。

各菌数測定法ごとの、SPL 法および混釈法または最確

数法の分散値を Table 3 に示した。一般生菌数、従属栄養細菌数および *Flavobacterium* spp. 数については、Bartlett の方法により SPL 法と従来法の分散値間に有意差は認められず、両方法間の精度は同じと考えられた。大腸菌群数については、F-検定により、最確数法の分散値が SPL 法に比較して、有意に大きく、SPL 法は最確数法に比較して精度が高いと結論された。

以上、3 枚の寒天平板の算術平均値を用いた SPL 法と混釈法との関係を示したが、一般生菌数、従属栄養細菌数および *Flavobacterium* spp. 菌数については、迅速化、省力化および省資材化を考慮して、次に述べる方法によって、混釈法との関連が再び解析された。3 寒天平板の算術平均値を用いることは、河川水を SPL 法を用いて、3 回検査した結果について、混釈法との関連を求めることを意味している。しかし、実際に日常業務として SPL 法を用いる場合は、1 枚の寒天平板を用いた検査が行われると考えられるので、これを想定して混釈法との関連を求めた。すなわち、3 寒天平板の測定値から、コンピュータを用いて、無作為に 1 測定値を選択して、被検水の細菌数とした。得られた細菌数について平均を用いた方法と同様の解析を行い、混釈法との関連を解析した。混釈法による細菌数は、平均値を用いる方法と同様、同一希釈段階の 3 混釈平板のコロニ数を算術平均して算出した。しかし、この方法は無作為に測定値を選択するため、算出される解析結果にばらつきを生じる。このばらつきの程度を測るため、コンピュータで同じ操作を 1000 回繰り返し、各解析値の平均値、回帰式および 95% 信頼区間値を算出し、比較検討した。

1000 回算出された、相関係数、SPL 法から混釈法の測

Table 2 Comparison of the spiral plating method with conventional methods.

	Methods (A/B) compared	The number of samples	Incubation time (h) A method/ B method	Correlation coefficient (r)	Regression line from A method on B method	95% confidence interval (Log)
Standard plate counts	Pour/SPCV	88	48/38	0.949	$Y=1.05X-0.12$	± 0.564
	Pour/SPLC	88	48/38	0.944	$Y=1.07X-0.23$	± 0.592
	SPLC/SPCV	88	38/38	0.990	$Y=0.96X+0.17$	± 0.219
The number of heterotrophic bacteria	Pour/SPCV	87	72/48	0.910	$Y=0.92X+0.44$	± 0.655
	Pour/SPLC	87	72/48	0.918	$Y=0.93X+0.38$	± 0.627
	SPLC/SPCV	87	48/48	0.997	$Y=0.99X+0.04$	± 0.125
The number of coliforms	MPN/SPCV	185	48/22	0.788	$Y=1.01X-0.07$	± 0.951
The number of <i>Flavobacterium</i> spp.	Pour/SPCV	36	72/48	0.996	$Y=1.00X-0.13$	± 0.376
	Pour/SPLC	36	72/48	0.996	$Y=1.00X-0.13$	± 0.377
	SPLC/SPCV	36	48/48	1.000	$Y=1.00X-0.00$	± 0.073

Pour: Pour plate method MPN: Multiple-tube tests

SPCV: Spiral plating method using a colony viewer

SPLC: Spiral plating method using a laser colony counter

Fig. 5 Regression of data from the pour plate method on the spiral plating method with a colony viewer for determining the standard plate count.

Fig. 6 Regression of data from multiple tube (MPN) tests on the spiral plating method with a colony viewer for determining the number of coliforms.

Table 3 Comparison of the variance of the spiral plating method with the conventional methods.

	Spiral plating method using a colony viewer	Spiral plating method using a laser colony counter	Conventional methods
In determining standard plate counts	0.6842	0.6460	0.8347
In determining the number of heterotrophic bacteria	0.5378	0.5331	0.5444
In determining the number of coliforms	0.4280*	—	0.7090*
In determining the number of <i>Flavobacterium</i> spp.	5.0792	5.0736	5.1406

*: Significance at the 5% level

定値を推定する回帰式、95%信頼区間およびSPL法の分散値の各解析値の平均値と95%信頼区間値を3種類の菌数測定法別に、Table 4,5および6に示した。いずれの菌数測定法についても、Table 2および3に示した3寒天平板の平均値を用いたSPL法に比較して、1寒天平板を用いた各算出値には大きな相違は認められなかった。

3. *Flavobacterium* spp. 菌液を用いたSPL法と混釈法との精度比較

SPL法による108枚の各寒天平板について、コロニビュアを用いて、1枚につき、3回ずつ測定部分を変えて計数し、3回の計数値を算術平均して、1 ml当りの細菌数を算出し、各寒天平板の3回計数値とした。また、各寒天平板の3回の計数値から、コンピュータを用いて1回および2回の計数値を無作為に選択し、同様に1 ml当りの細菌数を算出し、1回計数値および2回計数値と

した。レーザーコロニカウンタによる自動測定値については、1 ml当りの細菌数に換算し、レーザーコロニカウンタ値とした。混釈法による110枚の寒天平板の測定値は、1 ml当りの細菌数に換算され、混釈法値とされた。以上5種類の計数方法の分散間について、Bartlettの方法を用いて、分散の等質性の検定を行い、有意差が認められた場合は、混釈法とSPL法の各計数方法の分散間で、それぞれF-検定を行い、相違を比較した。これらの解析には、無作為に測定値を選択する操作が入るため、結果にばらつきを生じる。このばらつきの程度を測るため、以上の解析をコンピュータを用いて1000回繰り返した結果について比較検討した。

1000回繰り返したBartlettの検定総てに有意差が認められたため、SPL法のコロニビュアによる1回、2回、3回計数値およびレーザーコロニカウンタ値の分散と混釈

Table 4 Relation between the spiral plating method using one agar plate and the pour plate method in determining standard plate counts.

		Mean	95% confidence interval	
Colony viewer	Correlation coefficient (r)	0.9458	0.9457~	0.9460
	Regression line of pour plate method (a)	1.0418	1.0411~	1.0426
	on spiral plating method (aX+b) (b)	-0.0899	-0.0934~	-0.0864
	95% confidence interval of Y value	±0.5998	±0.5990~	±0.6007
Laser colony counter	Variance of spiral plating method	0.6884	0.6874~	0.6893
	Correlation coefficient (r)	0.9386	0.9384~	0.9388
	Regression line of pour plate method (a)	1.0603	1.0593~	1.0613
	on spiral plating method (aX+b) (b)	-0.1724	-0.1770~	-0.1677
	95% confidence interval of Y value	±0.6372	±0.6361~	±0.6383
	Variance of spiral plating method	0.6548	0.6536~	0.6560

One plate was selected at random from three spiral plates, and the number of colonies was counted. The work was repeated one thousand times for each sample, and the results were compared with those of the pour plate method.

Table 5 Relation between the spiral plating method using one agar plate and the pour plate method in determining the number of heterotrophic bacteria.

		Mean	95% confidence interval	
Colony viewer	Correlation coefficient (r)	0.9083	0.9082~	0.9084
	Regression line of pour plate method (a)	0.9124	0.9122~	0.9127
	on spiral plating method (aX+b) (b)	0.4529	0.4516~	0.4542
	95% confidence interval of Y value	±0.6246	±0.6243~	±0.6250
Laser colony counter	Variance of spiral plating method	0.5395	0.5392~	0.5398
	Correlation coefficient (r)	0.9157	0.9156~	0.9158
	Regression line of pour plate method (a)	0.9234	0.9231~	0.9237
	on spiral plating method (aX+b) (b)	0.3984	0.3967~	0.4001
	95% confidence interval of Y value	±0.5999	±0.5995~	±0.6004
	Variance of spiral plating method	0.5355	0.5351~	0.5358

One plate was selected at random from three spiral plates, and the number of colonies was counted. The work was repeated one thousand times for each sample, and the results were compared with those of the pour plate method.

Table 6 Relation between the spiral plating method using one agar plate and the pour plate method in determining the number of *Flavobacterium* spp..

		Mean	95% confidence interval	
Colony viewer	Correlation coefficient (r)	0.9958	0.9957~	0.9958
	Regression line of pour plate method (a)	1.0016	1.0014~	1.0019
	on spiral plating method (aX+b) (b)	-0.1296	-0.1309~	-0.1282
	95% confidence interval of Y value	±0.4410	±0.4403~	±0.4417
Laser colony counter	Variance of spiral plating method	5.0810	5.0787~	5.0833
	Correlation coefficient (r)	0.9958	0.9957~	0.9958
	Regression line of pour plate method (a)	1.0022	1.0020~	1.0024
	on spiral plating method (aX+b) (b)	-0.1292	-0.1305~	-0.1279
	95% confidence interval of Y value	±0.4413	±0.4405~	±0.4420
	Variance of spiral plating method	5.0750	5.0727~	5.0774

One plate was selected at random from three spiral plates, and the number of colonies was counted. The work was repeated one thousand times for each sample, and the results were compared with those of the pour plate method.

法値の分散間で、F-検定を行った結果をTable 7に示した。混釈法とSPL法のコロニビュア 1 回計数値および 2 回計数値との間には有意差が認められたが、コロニビュア 3 回計数値およびレザーコロニカウンタ値との間には有意差が認められず、混釈法は、コロニビュア 3 回計数値およびレザーカウンタ値と同じ精度と考えられた。したがって、SPL法の寒天平板をコロニビュアで測定する場合は、平板を 3 回計数し平均を求める必要がある。

4. 被検水としての河川水の保存実験

算出された各細菌数は、保存温度および各菌数測定法別に分けられ、各保存時間経過後と実験開始時の菌数が比較検討された。解析に際して、各細菌数は常用対数値に変換された。解析方法は、両測定値の分散について、F 検定を行い、有意差が認められなければ、対応のある t 検定で、認められれば、Aspin-Welch の方法で検定を行った。以上の解析結果をTable 8に示した。

一般生菌数については、4℃で保存した場合は168時間経過後も、菌数に変動が認められなかったが、25℃で

保存した場合には、24時間経過後に変動が認められた。従属栄養細菌数については、4℃で保存した場合は、48時間経過後に、25℃で保存した場合は24時間経過後に変動が認められた。デオキシコレイト寒天平板を用いたSPL法による大腸菌群数については、4℃で保存した場合は、48時間経過後に、25℃で保存した場合は24時間経過後に変動が認められた。最確数法による大腸菌群数については、4℃で保存した場合は168時間経過後も、菌数に変動が認められなかったが、25℃で保存した場合には、72時間経過後に変動が認められた。すなわち、SPL法を用いて、一般生菌数、大腸菌群数および従属栄養細菌数の測定を並行して行う場合は、4℃(冷蔵庫内)に保存し、24時間以内に検査すべきである。

考 察

食品中の細菌数測定法として開発されたSPL法を河川水中の細菌数測定に応用するため、従来法と比較検討した結果、測定値の一致性および精度に関しては以下のと

Table 7 Comparison of the variance of the spiral plating method with the pour plate method by experiments using bacterial suspension of *Flavobacterium* spp..

Counting procedures		Variance
Spiral plating method	Using colony viewer	0.0098*(1000) ^{a)}
	Using colony viewer	0.0060*(768) ^{b)}
	Using colony viewer	0.0048 ^{c)}
	Using laser colony counter	0.0034
Pour plate method		0.0033

*: Significantly different from data of the pour plate method by F test ($p < 0.01$).

a) The datum represents the variance of one selected datum from three counting data on each spiral plate at random.

b) The datum represents the variance of the average of two selected data from three counting data on each spiral plate at random.

c) The datum represents the variance of the average of three counted data on each spiral plate.

The figures in parentheses show the number of significant times out of one thousand trials.

Table 8 Results of experimental preservation of river water at 4℃ and 25℃.

	preservation temperature	Log ₁₀ number of bacteria (the average of 3 sample data)					
		Starting point	after 24h.	after 48h.	after 72h.	after 120h.	after 168h.
Standard plate counts using the spiral plating method (/ml)	4℃	4.5858	4.5890	4.4295	4.4368	4.6649	4.5951
	25℃	4.5858	5.5241*	4.8786*	5.1148*	4.8440	4.8617*
The number of heterotrophic bacteria using the spiral plating method (/ml)	4℃	4.8947	4.8805	5.1454*	5.2608*	5.3103*	5.6194*
	25℃	4.8947	5.7231*	5.2876	5.0364	4.8191	4.7251
The number of coliforms using the spiral plating method (/ml)	4℃	2.9958	2.5604	2.4465*	2.4829*	2.4773	2.6346*
	25℃	2.9958	3.9843*	2.7707	2.8748	2.3314*	2.0785*
The number of coliforms using the MPN method (/100ml)	4℃	4.5863	4.5709	4.1770	4.1785	4.0919	4.2560
	25℃	4.5863	4.8860	4.1305	3.8504*	3.1831*	3.3251*

MPN: Multiple-tube tests

*: Significantly different from data at the starting point ($p < 0.05$) by paired-sample or Aspin-Welch t-test.

おりであった。

一般生菌数、従属栄養細菌数および *Flavobacterium* spp. の菌数の測定において、3枚の寒天平板を用いてSPL法を行った場合と混釈法との相関は、高く、さらに、回帰式は $Y=X$ に近接している。このことから、SPL法と混釈法によって得られる測定値は、統計的にみて同一とみなしうることが明らかになった。また、SPL法と混釈法との分散間には有意差が認められないことから、両法の精度には差がないと考えられる。また、3寒天平板の測定値から、無作為に1測定値を選択して同様に解析した結果、SPL法を寒天平板1枚で行っても、3枚の寒天平板の場合と比較して、各解析値に大きな変動は認められなかった。したがって、SPL法を1枚の寒天平板で行った場合でも、混釈法と同一とみなせる測定値が、同一の精度で得られることになる。特に、*Flavobacterium* spp. 菌液を用いた場合に、SPL法と混釈法の測定値が高い一貫性を示すことは、両法により、本質的に、同一の結果が得られることを示すものと考えられる。

また、測定条件の最適化を行った結果、コロニビュアを用いた肉眼による計数値とレーザーコロニカウンタの自動計数値とは、いずれの菌数測定の場合にも高い相関関係が認められ、食品の場合¹⁴⁾に優る、レーザーコロニカウンタの信頼性と有用性を証明することができた。*Flavobacterium* spp. 菌液を使用した精度比較実験の結果から、1枚の寒天平板を用いてSPL法を行った場合、培養した寒天平板を、コロニビュアを用いて肉眼で3回計数し、算術平均値を求めれば、同一希釈段階あたり3枚のシャーレを用いた混釈法と同一の精度で測定が可能ながわかった。また、レーザーコロニカウンタで自動測定を行っても、混釈法と同一の精度が得られた。今回の精度実験では、SPL法によるコロニ数の測定部位は、最も精度が低くなると考えられる寒天平板の周辺部位であったにもかかわらず、上記の結果が得られたことは、SPL法の精度の高さを示すものと考えられる。

大腸菌群数の測定については、SPL法から最確数法を推定する回帰式は $Y=X$ に近接しており、統計的にみて、両方法の測定値は同一と考えられる。しかし、分散に有意差が認められることから、回帰式に基づいて、一方の測定値から、他方を推定するような場合は注意が必要と思われる。また、デオキシコレイト寒天平板上の直径0.25mm以上のコロニを選択して計数した場合、大腸菌群数を過大に計数する傾向が認められたが、これは、デオキシコレイト寒天培地の特性によると思われる。0.25mm以上のコロニの選別用に、著者は、各種直径の黒円を記

した透明板を作成して使用したが、目を慣らすトレーニング用として有効であった。

SPL法の迅速性、省力性および省資材性に関しては、本実験において、同一希釈段階あたり3枚のシャーレを用い、3段階希釈まで行い、計9枚のシャーレを必要とした混釈法および同一希釈段階あたり3本のBGLB培地を用い、4段階希釈まで行い、計12本のBGLB培地を必要とした最確数法と比較し、わずか1枚の寒天平板を使用するSPL法は、迅速性、省力性および省資材性において、はるかに優れると考えられた。著者が行った本実験に関しては、従来法と比較して、実働時間は約1/2、経費は約30%で済むと試算された。この数値は食品の場合と同じであった^{15, 16)}。SPL法の培養時間については、これまで検討された例が無いが、本実験において測定条件の最適化を行った結果、一般生菌数の場合は、48時間から38時間へ、従属栄養細菌数の場合は、72時間から48時間へ、大腸菌群数の場合は、48時間から22時間へと、いずれの場合にも、従来法と比較して大幅に短縮することができた。

一般生菌数の測定条件を食品と比較すると、培養後のコロニの直径は、大小のばらつきが大きいことが観察されたが、これは河川の菌相が変化に富み、各菌の増殖速度に大きな相違があるためと考えられた。したがって、レーザーコロニカウンタの測定条件は同一ではなかった³⁾。培養時間は、著者らが報告した市販食品¹⁷⁾に比較して、長時間を必要とした。

SPL法用の被検水としての河川水の条件に関しては、多くの場合、採水した河川水を、そのまま、寒天平板に塗布することが可能であったが、浮遊物等があり、塗布できない場合は、滅菌可能な金網でできたざる状のステンレスメッシュを通すことにより塗布することが可能となった。採水した河川水は、保存実験の結果から、4℃で保存すれば、大腸菌群数および従属栄養細菌数は24時間保存後まで、一般生菌数は少なくとも168時間保存後まで菌数に変動が認められず、3種類の菌数測定を並行して行う場合は、少なくとも24時間保存後まで被検水として使用することが可能であった。希釈倍数については、本実験の場合、大腸菌群数は無希釈、一般生菌数は10倍希釈、従属栄養細菌数は100倍希釈で塗布することにより、いずれの場合にも測定に適正なコロニ密度を得た。

以上を総合すると、機器の操作および器材の使用について、技術的に問題とすべき点は認められず、食品の場合と同等の迅速性、省力性および省資材性を得ることが可能であった。したがって、環境衛生学および生態学

的な見地から、SPL法を河川水の細菌数の測定に応用することは、十分に可能であり、かつ意義あるものと考えられた。

地球規模での環境汚染が問題となって久しいが、我々、人類が作り出した環境汚染物質および排出した有機物を分解し、浄化および無毒化するのは、環境中の微生物、そのなかでも、特に代謝活性の強い細菌によると考えられる¹⁸⁾。この環境浄化の担い手である細菌を研究することは、今後の環境問題を考える上で、きわめて重要であると考えている。しかし、この数十年間、環境中の細菌を迅速に、省力的に計数する技術については、ほとんど進歩がなく、広範囲な環境に基づく研究を進める上で大きな障害となっていた。本実験によって、食品の迅速検査法であるSPL法を環境中の細菌数の測定に応用することができた。今後、この技術は環境衛生および環境保全等の分野において重要な役割を果たしていくものと考えられる。

結 論

食品中の細菌数の迅速検査法として開発されたSPL法を河川水中の細菌数測定に応用するため、従来法との測定値の一致性および精度について比較検討した。これらの実験結果に基づいて、SPL法を利用した、河川水中の細菌数測定のための最適条件を設定することができた。

- 1) 一般生菌数、従属栄養細菌数および大腸菌群数をSPL法で測定するための最適条件を設定した。なお、河川由来菌である*Flavobacterium* spp. 菌数についても、実験に用いるため最適条件を設定した。
- 2) 新たに設定したSPL法による最適な菌数測定条件を示す。

一般生菌数の場合は、被検水の0.092mlを1枚の標準寒天平板に塗布し、35℃で38時間培養後、寒天平板をレーザーコロニカウンタ (SPOT SIZE=2.5) で測定し、算出された回帰式に基づいて菌数を算出する。

従属栄養細菌数の場合は、被検水の0.092mlを1枚の桜井寒天平板に塗布し、25℃で48時間培養後、寒天平板をレーザーコロニカウンタ (SPOT SIZE=3.5) で測定し、算出された回帰式に基づいて菌数を算出する。

大腸菌群数の場合は、被検水の0.092mlを1枚のデオキシコレイト寒天平板に塗布し、同培地を重層してから、35℃で22時間培養後、同培地上に出現した直径0.25mm以上の赤～暗赤色のコロニを肉眼で選択した計数値を、塗布量で除して菌数を算出する。

- 3) 最適条件で測定されたSPL法による一般生菌数、従

属栄養細菌数および*Flavobacterium* spp. 菌数と従来法との一致性は高く、また、精度も同等と認められた。大腸菌群数については、精度はSPL法が従来法に比較して有意に高い結果を得た。

- 4) SPL法と混釈法の一致性および精度については、1枚の寒天平板を用いてSPL法を行い、培養した寒天平板を測定部位を変えて3回以上、肉眼で計数して平均を求めるか、レーザーコロニカウンタによる測定を行えば、同希釈段階あたり3枚のシャーレを用いた混釈法と同等の成績が得られた。
- 5) SPL法の迅速性、省力性および省資材性に関しては、従来法と比較して、食品の場合と同等の性能を得ることが可能であった。また、培養時間についても、従来法に比較して大幅に短縮することが可能となった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただいた信州大学医学部・村山忍三教授、信州大学繊維学部・桜井善雄教授、長野県衛生公害研究所・小関勇一所長および採水に御協力いただいた同所水質部の諸兄に深く感謝致します。

なお、本研究の一部は、第22回水質汚濁学会(1988)にて口頭発表された。

文 献

- 1) Gilchrist, J.E., Campbell, J.E., Donnelly, C.B., Peeler, J.T. and Delaney, J.M.: Spiral plate method for bacterial determination, *Appl. Microbiol.*, **25**, 244-252 (1973).
- 2) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 微生物編, p.47, 日本食品衛生協会, 東京(1990).
- 3) 和田正道, 村松紘一, 小林正人, 笹井貞雄：スパイラルシステムによる食品中の細菌数の測定, *食品と微生物*, **2**, 137-142 (1984).
- 4) 和田正道, 斉藤文一, 武政二郎, 真野寛, 水谷宏, 五十嵐英夫, 小沼博隆：食品の細菌数測定法としてのスパイラル・プレーティング法の評価, *食衛誌*, **28**, 311-316 (1987).
- 5) Callieri, C.: Spiral plate and spread plate: A note on the evaluation of fresh water bacteria, *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, **37**, 209-212 (1979).
- 6) 日本水道協会：上水試験方法, p.596, 日本水道協会, 東京(1985).
- 7) 日本環境測定分析協会：環境測定分析法注解 第3

- 巻, p. 24, 丸善, 東京(1985).
- 8) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p. 102-109, 金原出版, 東京(1983).
- 9) 日本水道協会: 上水試験方法, p. 610-611, 日本水道協会, 東京(1985).
- 10) Spiral System, Inc.: User Manual Spiral Plater Model C, p. 36, Spiral System, Inc., USA (1981).
- 11) Spiral System, Inc.: Model 500A Laser Bacteria Colony Counter User Manual, Spiral System, Inc., USA (1981).
- 12) 小林龍一: 相関・回帰分析法入門, p. 47-64, 日科技連, 東京(1982).
- 13) 篠原弘章: 実験計画法, ナカニシヤ出版, 京都(1984).
- 14) Kramer, J.M., Kendall, M. and Gilbert, R.J.: Evaluation of the spiral plate and laser colony counting techniques for the enumeration of bacteria in foods, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 289-299 (1979).
- 15) Jarvis, B., Lach, V.H. and Wood, J.M.: Evaluation of the spiral plate maker for the enumeration of micro-organisms in foods, *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 149-157 (1977).
- 16) Konuma, H., Suzuki, A. and Kurata, H.: Improved Stomcher 400 bag applicable to the spiral plate system for counting bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 765-769 (1982).
- 17) 和田正道, 村松紘一, 宮坂たつ子, 笹井貞雄: スパイラル・プレーティング法を用いた一般生菌数の測定における培養時間の検討, 日本食品衛生学会第53回学術講演会講演要旨集, 26 (1987).
- 18) 柳田友道: 微生物科学 1, p. 26-29, 学会出版センター, 東京(1980).

(受付 1991年8月14日 受理 1992年6月1日)