酸素電極を用いたクロノアンペロメトリーによる 一般細菌数の簡易推定手法の検討

笠原 伸介* 須田 充** 石川 宗孝*

A Simple Estimation Method for Heterotrophic Plate Count by Chronoamperometry with a Dissolved Oxygen Electrode

Shinsuke KASAHARA*, Takashi SUDA** and Munetaka ISHIKAWA*

* Department of Civil Engineering and Urban Design, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology, Omiya 5-16-1, Asahi-ku, Osaka 535-8585 Japan

** Chugai Ro Co., Ltd., Kyomachibori 2-4-7, Nishi-ku, Osaka 550-0003, Japan

Abstract

Applicability of a new simple method for estimating heterotrophic plate count (HPC) in environmental samples was investigated. In this method, 0.1-1.0 ml of sample is incubated in a cell equipped with a dissolved oxygen (DO) electrode. The HPC in the sample is estimated from the time required until the DO is depleted (detection time). This method was applied to a pure culture sample and environmental samples to evaluate the validity and reliability of this method.

The results indicated that (1) the HPC estimated by this method was in agreement with that determined by the plate count method in environmental samples ($r = 0.85$), (2) 95 % confidence interval of detection time of this method was shorter than the generation time of bacteria in the samples with HPCs higher than $10^2 \sim 10^3$ CFU $\cdot$ ml $^{-1}$, (3) In the case in which the same amounts of heterotrophic bacteria existed in the sample cell, the detection time (mean value and 95 % confidence interval) for bacteria captured on a polycarbonate membrane filter (0.2 μ m) was comparable with that for bacteria suspended in the sample cell.

Thus, it could be concluded that this simple method could more rapidly estimate the HPC in environmental samples than the conventional plate count method with comparable accuracy and could be sufficiently applied to low-HPC samples.

Key words: simple method, dissolved oxygen (DO) electrode, heterotrophic bacteria, heterotrophic plate count (HPC), plate count method

1. はじめに

水中に生息する細菌の現存量をモニタリングすることは、公衆衛生を管理するうえで重要である¹⁾。

通常、水中の細菌現存量は、R2A寒天培地、PGY寒天培地、標準寒天培地等を用いた平板計数法（従属栄養細菌数または一般細菌数）により求められるが、これらの計測には、煩雑な培養操作と、少なくとも24 h以上の培養時間が必要となるため、平板計数法は、細菌の日常的なモニタリングに適しているとはいえない。

これまでに、水中の細菌数を迅速に計測する手法として、acridine orange (AO) または4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) により染色された菌体数を直接計数する全菌数計測法^{2~4)}、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) や5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) などのテトラゾリウム塩を還元

させ、生成されたフォルマザンを直接計数する生菌数計測法^{5~7)}が開発されてきた。しかし、これらも、染色、計数の作業が煩雑であるうえ、基本的に検出の原理・対象が平板計数法とは異なるため、環境試料中の従属栄養細菌数や一般細菌数を計測するための簡易代替指標とはなり難い。

一方、食品衛生管理の分野では、HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point: 危害分析重要管理点) システムの導入を背景に、細菌検査を日常的に行うための様々な簡易手法の導入が進み、現在では、ATP (adenosine triphosphate) 測定法が広く用いられるようになってきた⁸⁾。同手法は、細菌が有する活性を高い感度で検出でき、環境試料においても生菌数を推定するための有効な手段となり得ることが報告されている⁹⁾。しかし、共雑する植物による測定値への影響やATPの抽出・回収に伴って発生する誤差等、その適用に際しては留意すべき検討課題もいくつか指摘されている¹⁰⁾。

* 大阪工業大学工学部都市デザイン工学科 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5-16-1

** 中外炉工業株式会社 〒550-0003 大阪市西区京町堀 2-4-7

このような状況の下、同じく食品中の細菌数を簡便に推定する手法として、酸素電極を用いた新しい簡易手法（以下、DO法）が開発された¹¹⁾。DO法は、試料中の細菌を液体培地中で培養し、細菌の増殖に伴う培地内の状態変化を電気化学的に検出するものであり、直接計数法やATP測定法に比べ、寒天培地上で集落を形成する細菌を合理的に検出し得ると考えられる。

天野ら¹¹⁾は、このDO法を食品中の細菌数計測に応用し、DO法により推定された一般細菌数と平板計数法により計測された一般細菌数の間には相関があることを示した。しかし、食品検査を想定した同検討では、食品に付着した細菌を水中に剥離・分散させる際に、ある程度、検水中の菌体濃度を任意に調整できるため、菌体濃度の低い試料への適用が想定されておらず、DO法自体がどの程度の定量下限を有しているか、また、集菌操作によってどの程度の低濃度試料にまで対応できるかについて、定量的な検討が一切加えられていない。

そこで、本研究では、このDO法を、低濃度の環境試料、とりわけ水道水質基準値 (10^2 CFU・ mL^{-1}) への適合判定に応用することを想定し、その簡易モニタリング手法としての適用の可能性を評価した。DO法を純粋培養試料 (*E. coli*) および環境試料（河川水、下水処理水）に適用し、平板計数法により得られた結果との相関、DO法が有する計測誤差範囲、およびメンブランフィルタを用いた集菌操作の有効性について検討した。

2. DO法の計測原理¹¹⁾

Fig. 1に、計測装置の概要を示す。計測には、剥き出しのAu電極が3電極装着された容量0.3または3.0 mLのプラスチック製サンプルセルを用い、接続されたパソコンにより計測間隔時間などの設定が行われる。

試料および液体培地をサンプルセルに注入し、400 mVの印加電圧を加えると、電極周辺において酸化還元反応が起こり、電流が発生する。この時検出される電流値は、溶液中の溶存酸素濃度の他、酸素と類似の酸化還元電位を持つ共雑物の量、セル内溶液の温度、粘性等にも左右されるが、適切な液体培地の組成と濃度を設定すれば、それらの影響を除外し、ほぼ溶存酸素濃度に比例した電流値を得ることができる。

この状態において、一定温度で培養すると、細菌の増殖に伴って溶存酸素が消費され、Fig. 2（上図）のような電流値の経時変化が計測される。通電直後は、電極周辺の溶存酸素が一挙に還元されるため、一時的に電流値が上昇するが、その後、酸素の分子拡散が律速すると、電流値の推移は安定する。ある任意の経過時間後における溶液中の溶存酸素濃度は、① 細菌の呼吸によって消費された酸素量、② 電極周辺において還元された酸素量、③ 液表面から混入した酸素量により決まるが、①に比べ、②および③が無視できるほど小さければ、実質的に、ほぼ細菌の増殖に伴う溶存酸素濃度の推移のみをモニタリングすることができる。

セル内溶液中の基質濃度が十分に高い条件で培養した場合、溶存酸素は、細菌がある一定値まで対数増殖した段階で急激に減少し、最終的に枯渇する (*E. coli* < ATCC25922 > の場合、 $1.3 \sim 1.4 \times 10^7$ CFU・ mL^{-1} に到達した段階でDOが枯渇することを予備実験により確認)。計測する細菌の比

Fig. 1 Schematic diagram of the measurement system for DO method.

Fig. 2 Relation of initial densities of bacteria in sample with changes in electric currents.

増殖速度が一定であれば、この溶存酸素が枯渇するまでに要する時間は、セル内溶液中に存在する初期菌体濃度の対数に反比例する。

この関係について、本計測装置を用いて電流値の推移としてモニタリングすると、溶存酸素が枯渇するまでに要する時間は、電流値が急激に減少した後一定で推移する屈曲点が出現するまでに要する時間（検出時間）と見なされ、Fig. 2（下図）に示すように、検出時間と初期菌体濃度（対数）との間には、良好な直線関係が成立する。この特性を利用し、あらかじめ既知の試料を用いて両者の関係を把握しておけば、検出時間より未知試料中の細菌数を逆に推定することができる。

3. 実験方法

3.1 実験試料

3.1.1 純粋培養試料

純粋培養試料として、標準寒天培地上で長期保存した *E.coli* (ATCC25922) を用いた。使用前に標準寒天培地と同一組成の液体培地に接種し、対数増殖期にある試料を、リン酸緩衝希釈水²⁾を用いて適宜希釈し、実験に供した。

3.1.2 環境試料

環境試料として、大阪市旭区大阪工業大学工学部北側において採取した淀川表流水（以下、河川水）および兵庫県A町農業集落排水処理施設において採取した塩素処理前の下水処理水（以下、排水）を用いた。いずれの試料も、採取した後低温状態で実験室に持ち帰り、速やかに実験に供した。

3.2 計測条件

先にも述べたように、DO法では、計測時に使用する液体培地の組成および培養温度は、電流値の推移や細菌の増殖特性を大きく左右し、細菌数の推定結果に様々な影響を及ぼす。そこで、上水試験方法²⁾に定められている代表的な三種の非選択性培地と同一組成の液体培地（標準寒天培地＜Media S＞、PGY培地＜Media P＞およびR2A培地＜Media R＞）を用いてDO法を河川水に適用したところ、Fig. 3に示すように、いずれの培地を用いても明瞭な電流値の挙動の得られることが確認された。また、河川水の検出時間に及ぼす液体培地と培養温度（20～36℃）の影響について調べたところ、Table 1に示すように、培養温度が等しい場合、培地にかかわらず検出時間はほぼ一定となり、本手法における細菌の検出効率は、寒天培地法ほど培地の組成による影響を受けないことが示唆された。他方、細菌の増殖速度を左右する培養温度については、検出時間に大きな影響を及ぼすことも同時に確認され、培養温度20℃と36℃では検出時間が2倍以上異なることがわかった。以上の結果をふまえ、以下の実験では、計測時の液体培地として一般細菌数との整合性がとれるMedia S（寒天を除く成分は標準寒天培地と同一）を用い、培養温度として最も迅速に検出し得る36℃を採用することとした。

3.3 計測方法

3.3.1 DO法

容量0.3または3.0 mlのサンプルセルに濃度を2倍高く調整した液体培地を0.1または1.0 ml注入した後、液体培地と同体積の試料を注入し、直ちに計測を開始した。濃縮の必要な試料については、メンブランフィルタを用いて試料を吸引ろ過（有効ろ過面積：1.2 cm²、吸引ポンプ：ULVAC DA-15S SINKU KIKO社製）し、ろ紙上に細菌を捕集した後、容量3.0 mlのサンプルセルに設定濃度の液体培地を2.0 ml注入し、細菌を捕集したろ紙を直接浸漬させて計測を開始した。サンプルセルに試料および液体培地を注入する際、溶存酸素の調整は行わなかった。DO法を適用した全ての試料において、同一試料を4回以上計測し、その相加平均を当該試料の検出時間とした。

3.3.2 平板計数法

上水試験方法²⁾に準拠し、培養時間を24 hとして一般細菌数（標準寒天培地）を計測した。一般細菌数の計測は、同一試料に対していずれも3回行った。

3.4 95%信頼区間および世代時間の算出

DO法の測定精度を評価するため、必要に応じ、検出時間の95%信頼区間を算出するとともに、当該試料中に含まれる細菌の計測時における世代時間を算出した。

Fig. 3 Influence of a liquid media on the behavior of electric current. Liquid media contain identical components with plate count agar (Media S), PGY agar (Media P) and R2A agar (Media R), respectively.

Table 1 Influence of incubation temperature and liquid media on detection time for the river water. The river water included 1.6×10^4 CFU·mL⁻¹ HPC (counted on plate count agar) and 8.4×10^4 CFU·mL⁻¹ HPC (counted on R2A agar). Detection time indicate arithmetic mean of 4 measurements (h).

Temperature	Media S	Media P	Media R
36℃	6.1	6.0	6.0
30℃	7.0	7.1	7.3
25℃	10.2	10.0	10.3
20℃	14.3	14.2	14.5

95%信頼区間については、同一試料を複数回計測した際、計測された検出時間はt分布すると仮定し、計測結果を式(1)に代入することにより求めた。

$$CI = 2 \times t_{0.05} \frac{s}{\sqrt{n-1}} \quad (1)$$

ここで、CI: 95%信頼区間 (h), n: 計測試料の検体数, $t_{0.05}$: t分布表より得られた有意水準5%の係数, s: 標準偏差 (h)。

細菌の計測時における世代時間については、ある任意の試料をリン酸緩衝希釈水により適宜希釈した場合、菌体濃度と検出時間の間には式(2)が成立すると判断し、まず、計測結果を式(2)を用いて近似し、得られた μ を式(3)に代入することにより求めた。

$$N = N_0 e^{-\mu t} \quad (2)$$

$$G = \frac{\log_e 2}{\mu} \quad (3)$$

ここで、N: 試料中の一般細菌数 (CFU·mL⁻¹), t: 検出時間の平均値 (h), N_0 : DOが枯渇した時点における一般細菌数 (= Y切片) (CFU·mL⁻¹), μ : 計測時における細菌の比増殖速度 (h⁻¹), G: 計測時における世代時間 (h)。

Fig. 4 Relation of HPC with detection time for environmental samples (sample volume = 0.1 ml).

Fig. 5 Comparison of HPC estimated by the DO method and HPC determined by the plate count method for environmental samples.

4. 結果および考察

4.1 環境試料への適用

4.1.1 キャリブレーション

環境試料中の一般細菌数をDO法により推定するため、2001年7月～10月にかけて河川水を8回、排水を5回それぞれ採取し、採取した試料をリン酸緩衝希釈水で適宜希釈し、キャリブレーションカーブを作成した (Fig. 4)。これによると、一般細菌数と検出時間の関係は試料ごとに異なり、同じ一般細菌数であっても、河川水の検出時間は排水に比べて約1時間短いことが確認された。このことは、河川水では、排水に比べ菌体数当たりの酸素消費速度が高かったためと考えられ、細菌相が異なると考えられる計測対象試料毎に十分な較正を行うことの重要性が示唆された。しかし、いずれの試料においても検出時間と一般細菌数 (対数) との間には良好な直線関係が成立し、指数関数により回帰分析を行ったところ、両試料とも決定係数の高い回帰式 ($R^2=0.89\sim0.97$) が得られた。

4.1.2 平板計数法との比較

次に、2001年10月～12月にかけて河川水および排水を7

Fig. 6 Dispersion of detection time at the time of measuring same samples ($n = 8\sim9$).

回ずつ採取し、Fig. 4の回帰式を用いて試料中の一般細菌数を推定した。Fig. 5に、DO法により推定した一般細菌数と平板計数法により実測した一般細菌数の関係を示す。この図によると、DO法と平板計数法により求められた一般細菌数の間には良好な正の相関関係が認められ、相関係数を算出したところ0.85と高い値を示した。また、両手法により求められた一般細菌数はほぼ一致することが確認され、DO法により得られた結果は、平板計数法により求めた一般細菌数をほぼ的確に推定していることが示唆された。しかし、平板計数法により得られた一般細菌数が最低となった1点のみ、両手法による測定値のオーダーが一致しなかった。このことは、本計測では、いずれの試料も濃縮せずにDO法を適用した結果、後に示すように、低濃度試料ほどDO法の計測誤差範囲が大きくなったことが要因と考えられる。

4.2 誤差範囲の検討

DO法により計測された検出時間の誤差範囲を評価するため、*E. coli*および河川水を対象として多検体同時計測を行った。まず、*E. coli*および河川水をリン酸緩衝希釈水で10倍ずつ希釈し、菌体濃度が1オーダーずつ異なる試料を作成した。次に、実験に供した両試料の一般細菌数を平板計数法により計測するとともに、希釈された各試料の検出時間をDO法により計測した。DO法により検出時間を計測

Table 2 95 % confidence intervals of detection time.

<i>E. coli</i>			River water		
HPC (CFU·ml ⁻¹)	Sample volume		HPC (CFU·ml ⁻¹)	Sample volume	
	0.1 ml	1.0 ml		0.1 ml	1.0 ml
2.2×10 ⁶	0.28	0.30	-	-	-
2.2×10 ⁵	0.25	0.43	-	-	-
2.2×10 ⁴	0.38	0.39	-	-	-
2.2×10 ³	0.40	0.64	7.5×10 ³	0.15	0.11
2.2×10 ²	0.54	0.30	7.5×10 ²	0.77	0.30
2.2×10 ¹	1.52	0.61	7.5×10 ¹	4.60	1.33

Unit: (h)

Table 3 Generation time of bacteria calculated by formula (2) and (3) for the pure culture of *E. coli* and the river water.

Sample volume	<i>E. coli</i>	River water
0.1 ml	0.46	0.72
1.0 ml	0.46	0.45

Unit: (h)

する際、*E. coli*については同一オーダーの試料を9検体ずつ、河川水については8検体ずつそれぞれ計測した。Fig. 6に、計測された検出時間の分布を、Table 2に、計測結果に基づいて算出した95%信頼区間をそれぞれ示す。これらによると、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、また、菌体濃度が等しくても試料容量が少ないほど、さらにその分布が大きくなることが確認された。このことは、菌体濃度が低いほど、サンプルセルに注入した後溶液内の溶存酸素が枯渇する（一定の菌体濃度に到達する）までにより長い対数増殖期間を必要とするため、試料注入時における初期菌体濃度の誤差も指数関数的により大きく増幅されるためと考えられる。加えて、試料容量が少ない場合、理論的な初期菌体数がサンプルセルに注入される確率が低下することも計測誤差に影響したと考えられる。さらに、この傾向は、純粋微生物系である*E. coli*に比べ、混合微生物系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、河川水中に存在する10⁰ CFU·ml⁻¹オーダーの一般細菌については検出することさえ困難であった（8検体中7検体は、20 h以内に検出不可能）。このことは、環境（混合微生物）試料の場合、*E. coli*とは異なり、増殖速度や呼吸活性の異なる細菌が共存しており、一般細菌として検出される細菌の全てが、DO法における検出時間に対して等しく寄与しなかったことが要因と考えられる。

ここで、Table 3に、式(2)および(3)より算出した各試料中の細菌の計測時における世代時間を示す。先にも述べたように、DO法では、培養開始からある一定の細菌数に到達するまでに要する対数増殖時間が検出時間として計測されており、換言すれば、DOが枯渇した時点で生息している細菌の世代に到達するまでに経過した世代数を計測していることになる。したがって、計測された検出時間の分布（95%信頼区間）が、当該試料中に含まれる細菌の世代時間以内に収まっていれば、検出に関与した細菌は危険率5%で同一世代と見なされ、計測結果はきわめて信頼性が高いと判断することができる。この考えに基づいて

Table 4 Influence of membrane filters on detection time for the river water (HPC = 5.4×10⁴ CFU·ml⁻¹).

Membrane filter	MCE* (0.45)	MCE* (0.2)	CA* (0.2)	PC* (0.2)	D**
Detection time (h)	6.0	6.0	5.9	5.7	5.6

* 1 ml river waters were filtered with mixed cellulose ester filter (MCE), cellulose acetate filter (CA) and polycarbonate filter (PC). Numbers in parentheses indicate the pore size of the filter (μm).

** 1 ml river water was injected into the sample cell directly.

Table 2とTable 3を比較すると、本実験では、概ね、試料中の一般細菌数が10²（試料容量1.0 mlの場合）～10³（試料容量0.1 mlの場合）CFU·ml⁻¹ オーダーを上回ると、95%信頼区間が世代時間以内となることが確認され、DO法により信頼性の高い推定値を得るためのおおよその下限値が示された。

4.3 集菌操作の検討

4.3.1 平均検出時間に及ぼす集菌操作の影響

まず、細菌検査に広く用いられる市販のろ紙4種類を対象とし、集菌操作に使用するろ紙が検出時間にどのような影響を及ぼすかについて検討した。河川水を1 mlろ過したろ紙を液体培地中に浸漬させ、検出時間を計測したところ、Table 4に示すように、同一試料を計測したにもかかわらず、使用するろ紙によって検出時間が異なり、条件次第では、試料を直接計測する場合に比べ、最大で約30分遅延することが確認された。DO法の場合、細菌の増殖量は液体培地中での溶存酸素の減少量として計測されるため、計測対象となる細菌は、液体培地中に均一に分散していることが前提となる。このように、使用するろ紙により検出時間が異なったことは、ろ紙の表面性状により、捕集された細菌の液体培地中への分散効率が異なり、結果として液体培地中での局所的な酸素消費または増殖速度の低下が引き起こされたためと考えられる。

次に、検討したろ紙のうち、直接計測した場合と検出時間が最も異なった0.45 μm混合セルロースエステルろ紙（以下、MCEろ紙）および最も近かった0.2 μmポリカーボネートろ紙（以下、PCろ紙）について、ろ過量と検出時間の関係を調べた。まず、*E. coli*および河川水をリン酸緩衝希釈水により1（無希釈）、10、100倍希釈し、菌体濃度が1オーダーずつ異なる試料を5～6検体ずつ用意した（希釈系）。次に、100倍希釈した試料をメンブランフィルタにより1、10、100 ml 吸引ろ過し、理論上、希釈系と菌体濃度が等しい試料を4～7検体ずつ用意した（ろ過系）。各試料の検出時間をDO法により計測するとともに、両試料の一般細菌数を平板計数法により求めた。Fig. 7に、検出時間に及ぼすろ過の影響を示す。

まず、*E. coli*を対象とした希釈系とろ過系における平均検出時間の違いに注目すると、MCEろ紙を用いた場合には、菌体濃度にかかわらずろ過系の方が希釈系より1.1～1.2時間程度遅かったのに対し、PCろ紙を用いた場合には、両者の検出時間は概ね一致した。このことは、集菌操作を行った場合、一度、ろ紙上に捕集された細菌の剥離・分散にはほぼ一定の時間を要し、その後の液体培地中での増殖速度はほとんど変化しないことを意味しており、PCろ紙を用

Fig. 7 Influence of filtration with $0.45\ \mu\text{m}$ mixed cellulose ester filter (MCE) and $0.2\ \mu\text{m}$ polycarbonate filter (PC) on detection time for the pure culture of *E. coli* and the river water (○: series of dilution, ●: series of filtration, sample volume = $1.0\ \text{mL}$). Error bars represent 95 % confidence intervals.

いと、その剥離・分散に要する時間が短く、集菌操作への適用にきわめて有利であることを示している。

また、この傾向は、両ろ紙を河川水に適用した場合においても確認され、検出時間の遅延は、ほぼろ紙のみに依存することが示唆された。しかし、PCろ紙を用いた場合、ろ紙の違いによる遅延ほどではないものの、ろ過量が多いほど検出時間が遅くなる傾向も同時に確認され、 $10\ \text{mL}$ ろ過時で $0.3\ \text{h}$ 、 $100\ \text{mL}$ ろ過時で $0.6\ \text{h}$ の差が認められた。*E. coli*に適用した場合、この傾向は認められなかったことをふまえると、この遅延は、河川水中に含まれていた懸濁成分によると考えられる。そこで、菌体濃度を $10^2\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ オーダーに調整した*E. coli*にカオリンを加えて濁度の異なる試料を作成し、PCろ紙を用いて $100\ \text{mL}$ ろ過した際の濁度と検出時間の関係を調べたところ、Fig. 8に示すように、試料中のカオリン濃度が $0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上になると検出時間が約 $0.4\ \text{h}$ 以上遅延することが確認された。このことから、懸濁粒子を多く含む試料に対して集菌操作を行う場合、これらの影響に十分配慮する必要があることが示唆された。

4.3.2 測定精度に及ぼす集菌操作の影響

Table 5に、計測結果に基づいて算出した希釈系およびろ過系の95%信頼区間を示す。これによると、菌体濃度が等しくても、ろ過系は希釈系に比べて95%信頼区間が大き

くなる傾向が認められ、集菌操作によって測定精度が低下することが確認された。また、その傾向は、検出時間の遅延が著しかったMCEろ紙において顕著に現れ、ろ過に伴う測定精度の低下を阻止するうえでもPCろ紙の使用は有効であることが示唆された。

さらに、ろ過系において、ろ過量に伴う95%信頼区間の変化に注目すると、いずれの試料においてもろ過量を多くする、すなわち試料中の菌体濃度を高くするほど誤差範囲が小さくなることが明らかとなり、特に、PCろ紙を用いて $10^4\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ オーダーの細菌を捕捉した場合には、95%信頼区間が世代時間の $1/2$ 程度にまで短縮された。このことは、集菌操作を行った際の測定精度には、ろ過に伴う精度の低下より、菌体濃度の上昇に伴う精度の向上の方が大きく影響することを意味しており、希薄溶液中の菌体濃度を計測するうえで、集菌操作は、検出時間を短縮させると同時に測定精度を向上させるきわめて有効な手段であることが示唆された。

以上のことから、試料中の細菌をPCろ紙上に捕集した後液体培地中に浸漬させ、計測された検出時間は、低濃度試料中の細菌数をほぼ的確に代表することが明らかとなった。Fig. 4において、 $10^4\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ の一般細菌数を検出するのに概ね6~8時間を要したことをふまえると、PCろ紙を

Fig. 8 Influence of turbidity (kaolin concentration) on detection time for the pure culture of *E. coli* (2.3×10^2 CFU·mL). Error bars represent the standard deviations of measurements ($n = 4$). Detection time of the sample without kaolin was 6.8 h.

用いて試料100 mL中の細菌を捕集した場合、電流値の推移を6～8時間程度計測すれば、当該試料中における一般細菌の存在有無を 10^2 CFU·mL⁻¹ オーダーで判定することが可能となる。したがって、仮に、水道水質基準の判定にこのDO法を用いた場合、従来の平板計数法に比べて検出時間を1/4～1/3程度に短縮し得ると考えられる。

5. まとめ

本研究では、酸素電極を用いた一般細菌数の新しい簡易推定手法を環境試料に適用し、その妥当性と信頼性について検討した。得られた結果を要約すると、以下のとおりである。

- 1) 一般細菌数と検出時間の関係を試料ごとに較正することで、DO法により推定された一般細菌数と平板計数法により計測された一般細菌数との間には、良好な相関関係 ($r = 0.85$) が成立した。
- 2) 同一試料を多検体計測した際の検出時間の分布は、試料中の菌体濃度が低いほど、試料容量が少ないほど大きくなり、その傾向は、純粋培養微生物試料に比べ、混合微生物試料においてより顕著に現れることがわかった。
- 3) $10^2 \sim 10^3$ CFU·mL⁻¹ オーダー以上の一般細菌数が含まれる試料においては、検出時間の95%信頼区間が試料中の細菌の世代時間を下回り、信頼性の高い測定が可能であることがわかった。
- 4) ポリカーボネート (孔径: $0.2 \mu\text{m}$) ろ紙を用いた集菌操作は、測定精度の向上および検出時間の短縮を図るうえで有効であることが明らかとなり、DO法は、希薄溶液に対しても十分適用し得ることが示された。

謝 辞

実験装置をご提供下さった (株) ダイキン環境研究所の関係各位に対し、心より感謝の意を表します。

また、実験データの採取に、本学学部卒業生の分林静人君、甲本周司君、山内雅之君および山川勝也君の協力を得たことを付記し、感謝致します。

Table 5 Influence of filtration with (a) $0.45 \mu\text{m}$ mixed cellulose ester filter and (b) $0.2 \mu\text{m}$ polycarbonate filter on 95 % confidence intervals of detection time (sample volume = 1.0 mL).

(a) $0.45 \mu\text{m}$ mixed cellulose ester filter

<i>E. coli</i> (G=0.53 h)			River water (G=0.39 h)		
HPC	CI		HPC	CI	
	D	F		D	F
2.6×10^4	0.09	0.56	4.5×10^3	0.15	0.30
2.6×10^3	0.13	1.02	4.5×10^2	0.45	1.00
2.6×10^2	0.21	0.62	4.5×10^1	1.67	3.08

(b) $0.2 \mu\text{m}$ polycarbonate filter

<i>E. coli</i> (G=0.48 h)			River water (G=0.42 h)		
HPC	CI		HPC	CI	
	D	F		D	F
2.1×10^4	0.09	0.24	8.1×10^4	0.17	0.22
2.1×10^3	0.14	0.39	8.1×10^3	0.08	0.44
2.1×10^2	0.17	0.38	8.1×10^2	0.88	0.89

G: Generation time, CI: 95 % confidence interval (h)

D: Series of dilution, F: Series of filtration

(原稿受付 2004 年 3 月 5 日)

(原稿受理 2004 年 9 月 10 日)

参 考 文 献

- 1) 上水試験方法 解説編 (1993) V 微生物試験 5 一般細菌, pp.562-565, 日本水道協会, 東京。
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境部 監修 (1993) 上水試験方法, 日本水道協会, 東京。
- 3) APHA, AWWA and WEF (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, Washington, D.C.
- 4) 中村寿子 (1988) 落射蛍光顕微鏡を用いた水道生物試験—植物ピコプランクトン試験の導入及び全菌数とその他のピコプランクトンとの同時試験方法の検討—, 水道協会雑誌, 57(7), 21-32.
- 5) 岡部聡, 境一澄, 渡辺義公 (1998) テトラゾリウム塩還元法を応用した硝化細菌の検出方法の検討, 水環境学会誌, 21(2), 88-97.
- 6) Schaule G., Flemming H. C. and Ridgway H. F. (1993) Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(11), 3850-3857.
- 7) Rodriguez G. G., Phipps D., Ishiguro K. and Ridgway H. F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(6), 1801-1808.
- 8) 青木正人 他 (2000) 第2編 資料編 第1章 簡易検査法概説, 「有害微生物管理技術 第II巻 製造・流通環境におけるエンジニアリングとHACCP」 (芝崎 勲 監修), pp.327-518, フジ・テクノシステム, 東京。
- 9) 北野雅昭, 大島詔, 新矢将尚, 荻原拓幸, 後藤 薫, 鶴保謙四郎 (2002) 大阪市内河川水のATP濃度と細菌群集の比較, 第35回日本水環境学会年會講演集, 460.
- 10) 犬伏和之 (1997) 第11章 土壌バイオマス測定法 11.3 ATP法, 「土壌微生物実験法」 (土壌微生物研究会 編), pp.186-190, 養賢堂, 東京。
- 11) 天野義久, 新井潤一郎, 山中俊介, 一色賢司 (2001) 酸素電極を用いた一般細菌数検査の簡易迅速化, 日本食品化学工学会誌, 48(8), 94-98.