

II-439

大腸菌群数モニターの開発

北海道開発局土木試験所 正員 玉川 尊

1、はじめに

河川における水質調査は、流水の正常な機能を保持する上で必要不可欠なものである。とりわけ、河川の常時監視は自動測定機によって、人の健康や生活に係わる種々の指標が、水質自動監視装置として測定されている。しかし、生活環境項目の中で、公衆衛生的な見地から極めて重要な汚染指標である大腸菌群数は、測定されていない。その理由は、現行の公定法の操作が複雑であり分析所要時間も長く煩雑なため自動化が困難であった。しかし河川における大腸菌群数の環境改善が今だ未達成な地点が多いため、その挙動を知る上で連続的な測定資料が期待されている。

従来、細菌を機器的に測定されているものとしては、細菌の増殖過程で発生する熱量を捉えた微熱量測定法や、細菌の生化学的な活動によっておこる培養液中の電気インピーダンスの変化から、液中の細菌密度を推定する方法がある。また、細菌の増殖による培養液中の細胞量を光学的に捉えた比濁法も行われていた。しかし、微熱量測定法や電気インピーダンスによる方法も高価な装置を必要とし、自動化はむずかしい。そこで本報告は、比濁法による細菌の機器的計測方法をもとに、大腸菌群数を対象にした自動測定装置の開発について述べる。

2、測定原理

比濁法は、既知細胞数の異なる試料を光度計を用いて測定した標準算定曲線をもとにし、未知試料をその曲線式に照らし合せて菌体数を導きだす。しかし、通常の河川水では比濁法で直接測定する程の菌体数を有していないため、その解決の手法として次の方法を考えた。

細菌の生育課程は、時間の経過とともに、誘導期→対数期→停止期→死滅期といわれる生育曲線が得られる。これを光度計にかけると、Lambert-Beerの法則に従い、特に対数期では、図-1のような直線関係を示す。そこで菌対数の異なる数試料を増殖培養すると、菌対数の多い程、誘導期および対数期の吸光度の立ちあがりが早くなる。この関係を応用して、標準算定曲線を作成し、未知試料を同一条件で培養して、その吸光度を測定することによって、接種時の正確な菌体数を導きだすことができる。

3、大腸菌群の推定のための標準算定曲線の作成

(1) 測定条件の設定

測定には、下水混入河川水をLB-BGLB培地試験で得られた陽性管を任意の希釈段階に分けた。この検液(c1~e4)を1ml吸収セルに移し、BGLB培養液を5ml加えて条件温度で培養しながら30分毎の濁度(積分球型)を測定した。これと平行して、同一検液をデソ培地の平板法試験で菌体数を求めておいた。

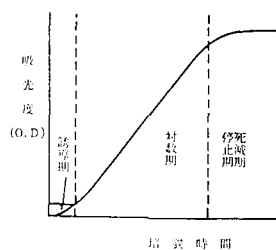


図-1 細菌増殖変化図

本条件で対数期の培養時間は、一様に4時間程度で完了し、その濁度値は約50~400であった。この結果から、任意時間(6.5h, 8h)の濁度と菌体数との関係図(標準算定曲線)と関係式を図-2の右図として得た。

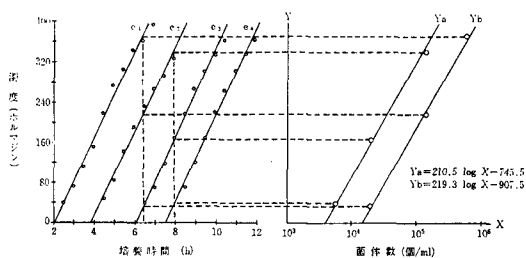


図-2 標準算定曲線

4、大腸菌群の自動測定装置の構成

本装置は図-3に示す6部より構成する。

〔1〕試料採取部は、河川水を導入する検水槽が設けられ、検水はこの槽より採取される。〔2〕検水調整部は、任意の希釈量が可能な連続希釈調整装置を有し、検水の適正希釈操作が行われる。〔3〕培養部は、〔2〕で調整された検液を発酵管に移し、培養液を加えて一定時間増殖する装置である。〔4〕測定記録部は、増殖後の培養液を濁度計セルに送水し、その計測値を記録計に出力する。〔5〕薬液貯蔵部は、本装置で使用される試薬液などの貯留である。〔6〕制御部は、各部のパーツを駆動し制御する。特に、本装置内の連続希釈調整装置は、植種後の増殖菌体数が濁度計の計測範囲が限られているため、その範囲の増殖数として検水をあらかじめ調整するために考案した。その原理図を図-4に示す。

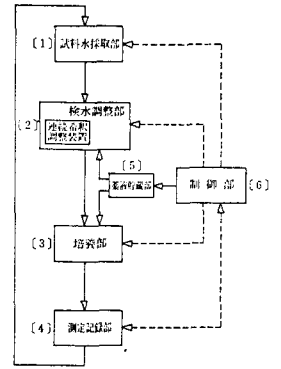


図-3 本装置の構成ブロック図

5. 自動測定装置とJIS法の比較

図-2で求められた標準算定曲線をもとに、本装置で自動測定（一部手動操作）を行った結果と、同一検水の菌体数をJISK0102、72.3（デソオキシコール酸塩培地法）の方法で比較した。その結果を表-1に示す。

自動測定とJIS法では、菌体数はオーダが等しいという結果が得られた。また、JIS法を1とすれば自動測定法で得られた値は、0.70～1.33の間に含まれている。一般的にオーダの等しいことは、測定値のバラツキやJIS法との比較からみても、これら細菌の測定精度においては十分な許容範囲であり、かなりよい結果と言える。

写真-1は、試作した大腸菌群の自動測定装置である。本装置は〔1〕試料採取部を除き、左に〔2〕検水調整部、〔4〕測定記録部、〔5〕薬液貯蔵部および〔3〕培養部としてフラン器がある。また右に〔6〕制御部としてパソコンを用い各部の駆動とデータの記録などを行っている。

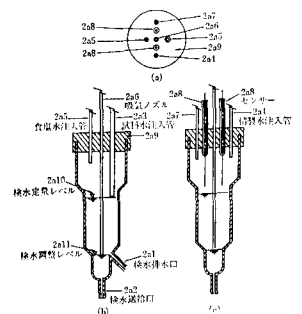


図-6 連続希釈調整装置の原理図

表-1 自動測定とJIS法との比較

	測定値 (濁度)				JIS法 (個/ml)	自動測定装置 (個/ml)	測定条件
	No. 1	No. 2	No. 3	平均			
SP. 1	158.4	160.7	158.4	159.2	1.04*10 ⁶	7.33*10 ⁴	6時間30分培養
SP. 2	127.9	120.2	126.7	124.7	5.20*10 ⁴	5.10*10 ⁴	
SP. 3	68.0	64.5	66.5	66.3	2.60*10 ⁴	2.76*10 ⁴	
SP. 4	183.6	163.0	173.0	173.2	2.60*10 ⁴	2.31*10 ⁴	8時間培養
SP. 5	174.2	167.2	176.0	172.5	1.72*10 ⁴	2.30*10 ⁴	
SP. 6	77.4	69.2	71.0	72.5	8.60*10 ³	7.69*10 ³	

あとがき

本装置は、研究試作器として開発した。したがって、実用器として簡素化する点や改良すべき点を次に示す。

- ① 培養液等の諸条件が定まれば、計量器等が定量型にできる。
- ② 制御部にパソコンを用いたが、実用器ではシングルボードによる制御方法を取り入れ、計量化できる。
- ③ 発酵管を使い捨てとすることで汚染、洗浄、滅菌等の操作が不用となり、設備も軽減できる。

本研究による細菌連続自動測定装置は、検水の採取から測定まで約2～20時間であり、その全操作の行程は、30分ごとで行うことができる。したがって、水質の変動の著しい試料水についても十分実用性を有するものと考えられる。

〔参考文献〕

玉川 尊、細菌連続自動測定装置、公開特許公報（1983、3、4）、昭58-37559。

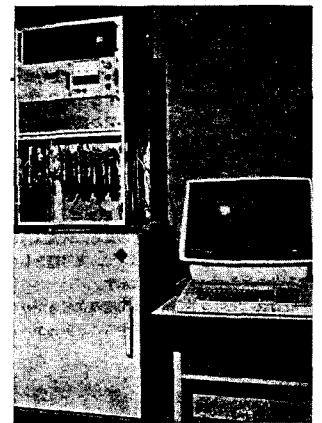


写真-1 試作による大腸菌群の自動測定装置