

大腸菌群の自動測定装置の開発

Development of Automated Coliform Group Counter for River Water Quality Monitor

玉 川 尊*

河川の水質自動監視計の中で、大腸菌群の測定器が未開発である。報告では、従来の比濁法から新たな測定原理を導き、検水の採取から測定までを連続的に行える自動装置の試作器を開発したことについて述べる。

試作器は、変動の著しい河川水にも十分対応でき、実用化も可能であることが検証された。

《大腸菌群；測定法；自動計測；水質監視》

まえがき

河川における水質の常時監視は、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、河川の水質環境項目には健康項目と生活環境項目があって、健康項目による自動測定を行っているものも少なくない。しかし、生活環境項目の測定器は、pH や溶存酸素などいくつかが実用化されているものの、公衆衛生的な見地からきわめて重要な汚染指標である大腸菌群は、いまだ設置されていない。したがって、現行の大腸菌群の測定方法は手分析によるもので、分析にかかわる所要時間も長く、操作も複雑なことから熟練した技術者をもってしても、その精度や再現性が今ひとつ乏しいものとなっている。

そこで、大腸菌群を含む細菌の試験においても機器的な手段が可能ならば、これまでの分析操作の煩雑さを軽減でき、また精度の向上につながるものと考えられる。さらに、こうした機器操作を自動化できれば人為的誤差が避けられ、より再現性が高められる期待も大きい。

従来、細菌における機器的測定には、細菌の増殖過程でもたらされる発熱量をとらえて計測する微熱量測定法¹⁾と、細菌の成長や生化学的な活動より起こる培養液中の電気的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または菌体数を光度計によってはかる比濁法も行われてきた。

しかし、微熱量測定法は室内試験としては適しているが自動化はむずかしく、また電気的インピーダンスによ

る方法も高価な装置を必要とするため、監視計として適用するにはいたっていない。本報告では、比濁法による細菌の機器的計測方法をもとに、その基礎技術の検討を行うとともに、大腸菌群を対象にした自動装置の開発法について述べる。

1. 測定原理

比濁法は、既知細胞数の懸濁液を光度計を用いて、一定の波長でその透過率あるいは吸光度を測定した標準算定曲線をもとにし、未知試料はその曲線式に照らし合わせて菌体数を導きだすものである。しかし、河川や湖沼などの水は通常菌体数が少なく、比濁法で直接測定することは困難なので、その困難を解決するため次の方法を考えた。

細菌を一定の条件下で培養液に接種した場合、その細胞の生育過程は時間を横軸に、菌体数を縦軸にプロットすると生育速度が時間とともに変化し、図-1に示すような、誘導期→対数期→停止期→死滅期といわれる生育曲線²⁾が得られる。この生育過程を光度計で計測すると、図-2に示すように横軸に生育時間、縦軸に吸光度(Optical Density)(O.D)をとると、Lambert-Beerの法則に従って細胞の増殖とともに光が菌液を通過する際、吸収あるいは散乱によって弱められる。特に対数期における吸光度の対数と時間の間に直線関係が見られる。そこで、今、ある既知菌体数の試料をそれぞれ E_1 , E_2 , E_3 (ただし $E_1 > E_2 > E_3$) とし、これを同一条件で培養し、その増殖経過を光度計で測定すると図-3の(A)のように、菌体数の多いほど誘導および対数期の立ちあがり

*応用理化学研究室主任研究員

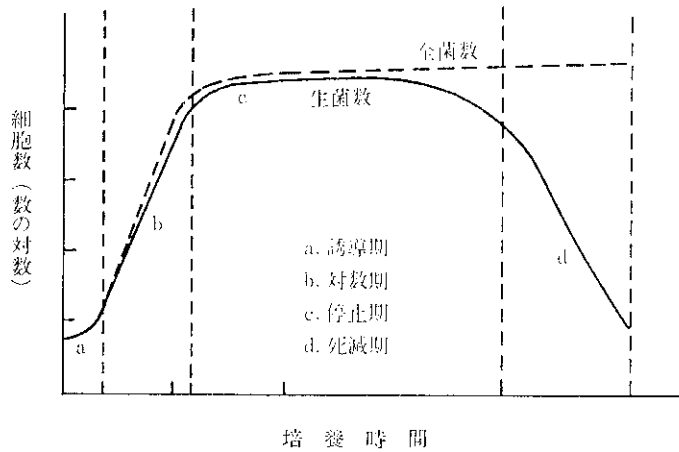


図-1 細菌の生育曲線

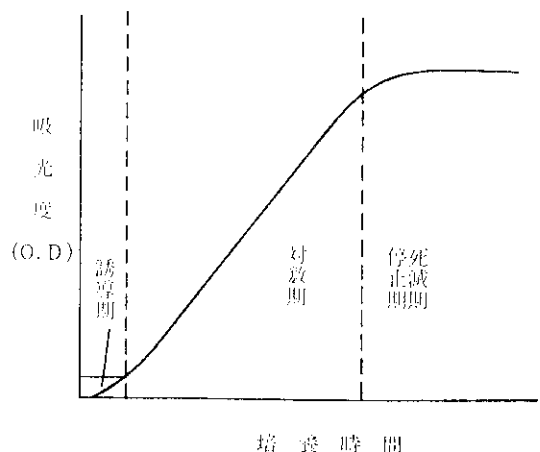


図-2 光度計による細菌増殖変化図

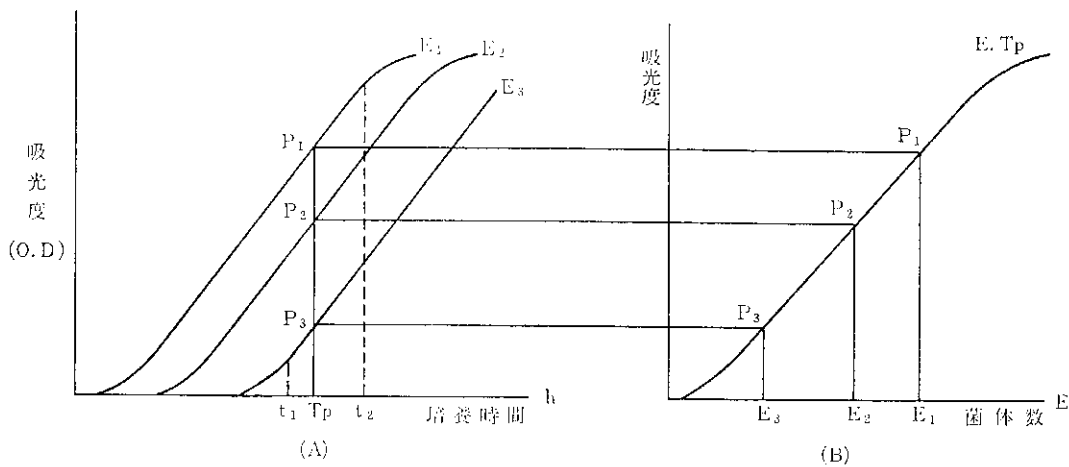


図-3 初期菌体数が異なる場合の増殖曲線

早くなる。そこで、各生育曲線の対数期で共通する区間 ($t_1 \sim t_2$) の任意の増殖時間 T_p を設け、この T_p と交差する各生育曲線の交点をそれぞれ P_1, P_2, P_3 とした。この P_1, P_2, P_3 を図-3の(B)のように横軸に菌体数 (E)、縦軸に吸光度をとると、曲線 $E.T_p$ は培養時間 T_p における各試料の植種時における菌体数と吸光度との関係曲線(標準算定曲線)が得られる。

この関係を利用して、一定の条件で求めておいた標準算定曲線を作成しておく、同一条件で求めた未知菌体数の培養液の吸光度を測定することによって、植種時の正確な菌体数を知ることができる。

2. 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

測定に用いたサンプルは、下水処理排水の混入する河川水を LB-BGLB 培地試験⁵⁾によって得られた大腸菌群陽性管を検体として使用した。また、比濁法による測定器は、光度計の代わりに濁度計を用いた。その理由は、培養液が着色しているので吸光度ではバラツキを生ずる

ためである。

まず、大腸菌群が濁度計で測定しうる範囲 (MAX=500) を求めるため検水を任意の希釈段階に分け、各段階ごとの検液 ($e_1 \sim e_4$) を吸収セルに移し、これに BGLB 培養液を加えて $36 \pm 1^\circ\text{C}$ のふらん器内で培養しながら 30 分ごとの濁度を測定した。濁度計は積分球型を用いた。また、これと平行して平板法(デソオキシコール酸培地)を用いて同一検液の大腸菌群の菌体数を求めておいた。

(2) 濁度と大腸菌群の関係

大腸菌群においては、誘導期から対数期に移行する時間が各検液の菌体数によって異なる。しかし、対数期は BGLB 培地 5 ml + 検液 1 ml の場合、一様に 4 時間程度の培養時間で完了した。このときの生育曲線における濁度値は、図-4 のように約 50~400 まで培養時間と濁度間で直線性が優れ、標準算定曲線を得るには好条件であった。

検液 $e_1 \sim e_4$ における対数期の濁度値を図-5の左図に表わすと、増殖時間による濁度値の増加する割合は、

81.1~84.8 とほぼ等しい傾きを示した。これをもとに、図-3の(B)と同様に、任意時間(6.5時間, 8時間)の濁度と菌体数との関係図(標準算定曲線)および関係式を図-5の右図として得た。

こうして得られた標準算定式を踏まえて未知検水を同一条件で培養液中に植種し、所要の培養時間増殖させた検液の一部を濁度計に送り測定する。測定結果は、図-5の標準算定式より換算されて採取検水の菌体数を算出することができる。

次にこれらの操作の自動化を検討する。

3. 工程の自動化

前述の測定原理をもとにして、大腸菌群の連続自動測定化を具体化するには、下記のような工程の自動化が必要である。

- ① 検水の採取
- ② 検水の菌体数の推定
- ③ 検水の希釈および調整
- ④ 希釈調整後の植種・培養
- ⑤ 植種培養液の測定・記録
- ⑥ 工程各部の殺菌・洗浄
- ⑦ 各部の連続操作による制御

現在、これらの各工程の中で自動的に行うことのできるものは、①の採取、④の植種・培養、⑤の測定・記録、⑥の殺菌・洗浄などである。しかし、②の菌体数の推定は、⑤の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しておかなければならない。したがって、②の検水中の菌体数を推定する工程を設け、さらに②によって推定した検水量を希釈・調整して、その必要量を得るために③の希釈・調整を行う装置が必要とな

ってくる。

そのために、連続希釈調整装置2a⁶⁾を考案した。それは一定量の検水の一部量を残し、他を排出し、新たに排出された容量分の希釈液を加えてもとの量とし、混合するというものである。この操作を反復して繰返すことによって、検水原液のいく倍もの目的の希釈量まで連続して行える。この原理図を図-6に示す。

連続希釈調整装置2aによって希釈操作を自動、かつ連続して行うことによって、検水の培養後の増殖菌体数を測定可能な範囲にまで調整することができる。しかし、目的の希釈量を推定して指示する②の手段が重要である。一般に検水の変動割合によっていくつかの方法が考えられる。そのひとつは、検水の変動がほぼ定常状態の場合は、希釈量の指示方法は任意に指定できる切換ダ

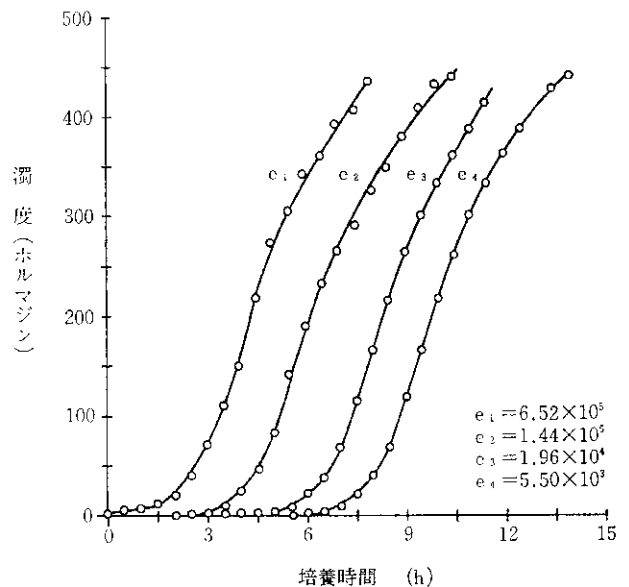


図-4 濁度による細菌の増殖曲線

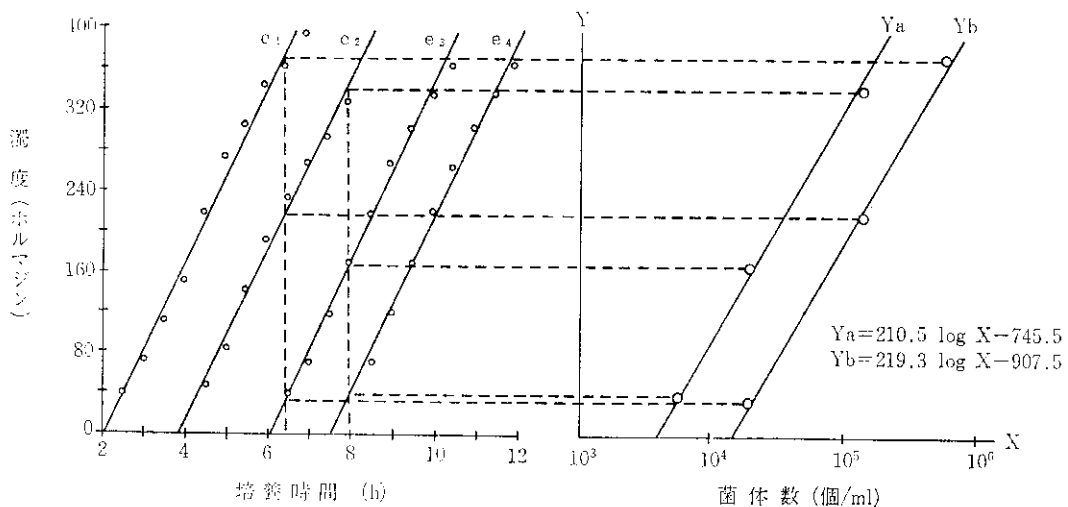


図-5 標準算定曲線

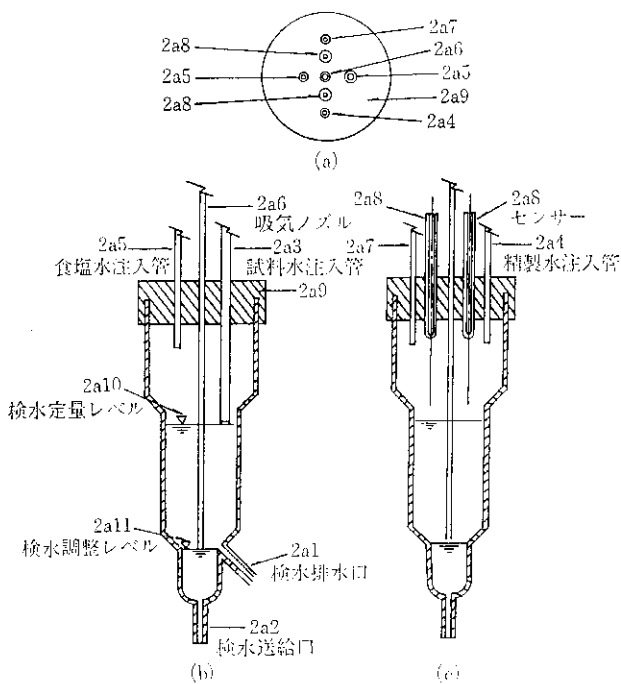


図-6 連続希釈調整装置の原理図

イアルなどを用いる方法をとる。しかし、変動の著しい検水においては、指定された希釈量では必ずしも計測範囲に収まることはむずかしい。したがって、検水の変動に応じた希釈量を推定する必要がある。その方法として、順次実測された測定値を記憶装置を設けて入力し、希釈量の推定指示命令に応じてこの記憶装置より呼びだし、適正な推定値を演算し新たな希釈量として指示しなければならない。これらの問題は、パーソナルコンピュータを用いてデータの記憶機能に加えて制御機能をもたせることで解決した。

4. 大腸菌群の自動測定装置の構成

本装置は図-7に示すように、〔1〕試料採取部、〔2〕検水調整部、〔3〕培養部、〔4〕測定記録部、〔5〕薬液貯蔵部、〔6〕制御部から構成される。

〔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、連続希釈調整装置2aによって、検水の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で培養液の混合によって一定時間培養する装置である。〔4〕測定記録部は、培養後の発酵管内液を濁度計に送水して計測し、その計測値を記録計に出力するものである。〔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、主に培養液、殺菌液、生理食塩水、精製水がある。〔6〕制御部は、各部のパーツを駆動し制御するもので、特に検水の希釈量の推定、実測の濁度値を菌体数に換算する

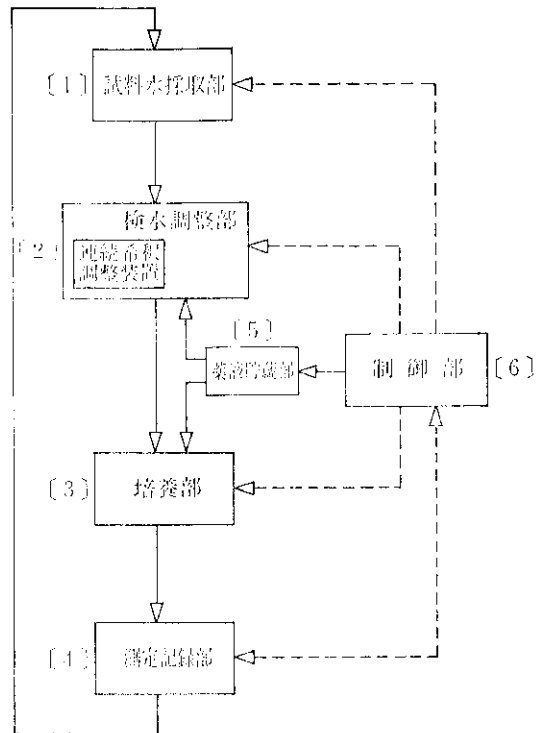


図-7 細菌連続自動測定装置の構成ブロック図

ことや、結果のメモリーなどを行うものである。

5. 装置の機能と工程

次に、本装置の各部における関連性とその動作を図-7および図-8によって説明する。

図-9は、本装置における作動順序を示すタイムチャート図である。

① 初期設定

あらかじめ、〔6〕制御部に培養時間、測定周期(初期値として細菌数換算係数、初期希釈量値、標準希釈基準値、測定値適正範囲を入力する)を設定する。また、発酵管3fに殺菌液5d、連続希釈調整装置2aに精製水5d、を注入しておく。

② 洗 浄

〔6〕制御部のスタートにより、あらかじめ降下しているノズル上下機構3dの吸入管3iから発酵管3fの殺菌液5dをピンチバルブ4fを開き、吸引ポンプ4eの駆動により吸引する。吸引された殺菌液5dは、濁度計4aのフローセル4iを通過して排液処理槽4dに貯留される。連続希釈調整装置2aに注入されている精製水を、ピンチバルブ2fおよび電磁弁2gを開いて、吸入ポンプ2bの吸入圧により注入管3gより発酵管3fに入った洗浄水は、前述の殺菌液5dと同様ピンチバルブ4fを開き、吸入管3iより吸引ポンプ4eの吸引力でフローセル4iを洗浄しながら排液処理槽4dに貯留される。電磁弁2h

を開き、精製水 5h を計量器 5j によって連続希釈調整装置 2a に注入した精製水はかく拌を行うため、電磁弁 2g を開き吸入ポンプ 2b を駆動する。この精製水は、前述の操作で行った工程と同様、発酵管 3f に送給し、管内の洗浄を行った後、濁度計 4a のフローセル 4i を洗浄して排水処理槽 4d に貯留する。この洗浄操作は洗浄

効果を上げるため複数回反復される。

③ 試料採取

港湾操作の終了した連続希釈調整装置 2a に、ピンチバルブ 1d および電磁弁 2i を開き、吸引ポンプ 4e を駆動して検水槽 1b の採水ノズル 1c より検水を吸入する。吸入された検水は、センサー 2d の感知により吸引ポン

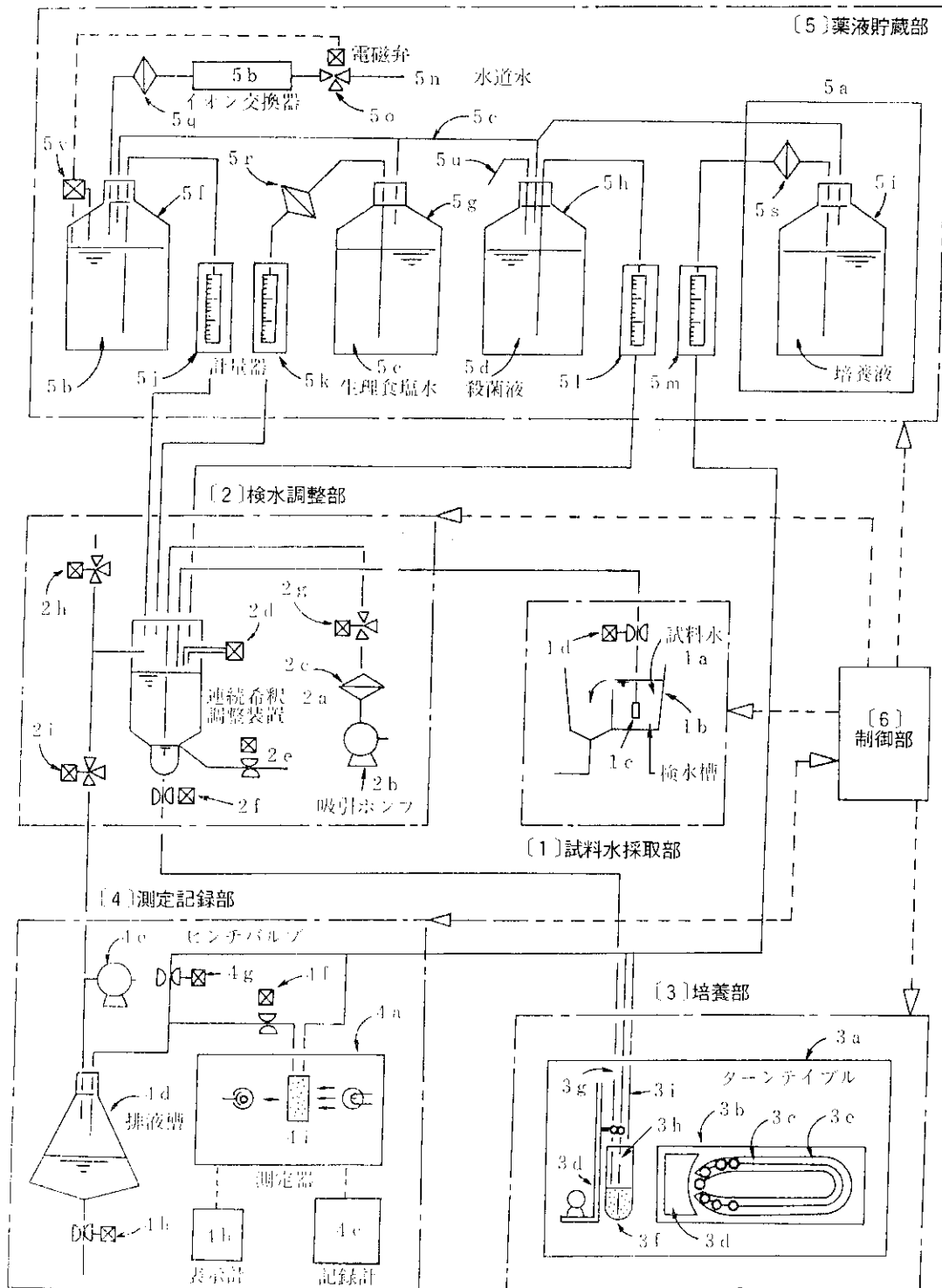


図-8 細菌連続自動測定装置の詳細説明図

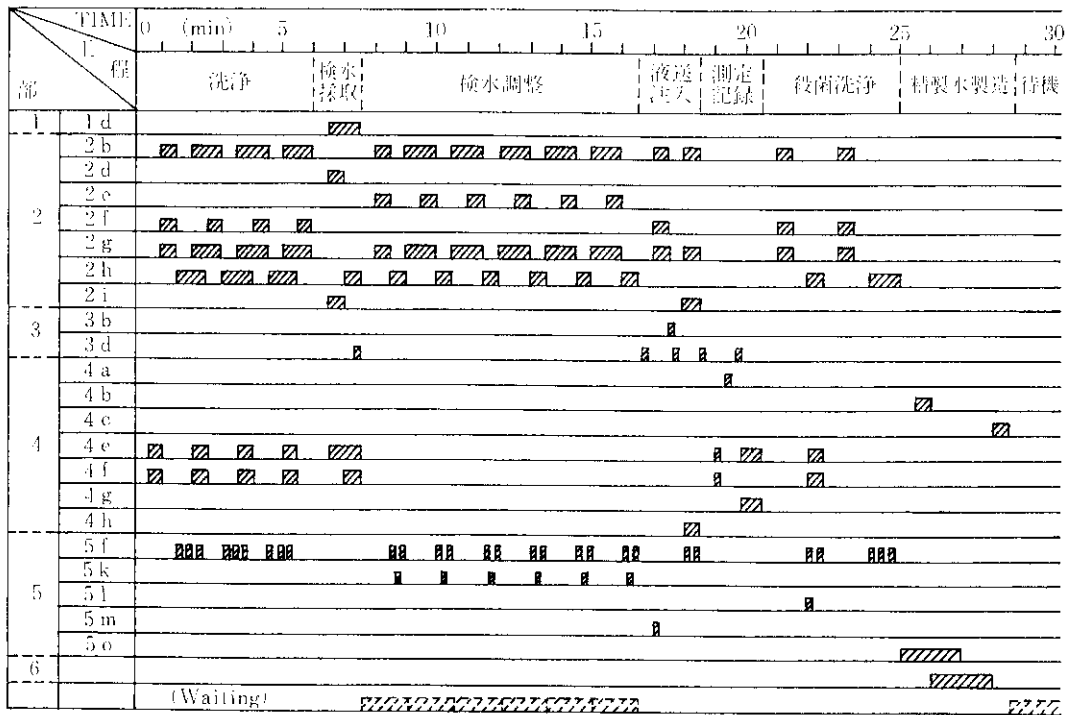


図-9 タイムチャート図

プ4eが停止し、同時に電磁弁2hが開いて検水注入口2a3の先端までサイホン原理により検水槽1bへ逆排出される。この検水注入口2a3までの容量を定量レベル2a10とする。

④ 検水調整

連続希釈調整装置2aに採取された定量の検水は、制御部〔6〕の指示値に指示されている希釈回数値まで希釈操作が行われる。仮に希釈回数値をNとすると、N=0の場合、検水の定量分をピンチバルブ2fおよび電磁弁2gを開き、吸入ポンプ2bを駆動して送給管3gより発酵管3fに注入する。N>0の場合は、検水の一部をピンチバルブ2eおよび電磁弁2gを開いて吸入ポンプ2bを駆動して排出する。このとき、連続希釈調整装置2aに残る検水量は、検水排出口2a1の位置により検水調整レベル2a11が異なり検水を任意に減量しうる。今、仮に検水調整レベル2a11が検水定量レベル2a10の1/10とする。これに希釈水として精製水5bを計量器5jによって加え、さらに食塩液5cを計量器5kによって注入し、その全量が検水定量レベル2a10とする。電磁弁2g、2hを開いて吸入ポンプ2bでかく拌し、混合した検水は10倍に希釈調整された検水となる。したがって、前述の希釈操作を指示された希釈回数値まで繰返すことによって、目的の希釈量に検水を調整することができる。

⑤ 液送・注入

連続希釈調整装置2aで希釈調整された検水は、ピン

チバルブ2fおよび電磁弁2gを開いて、吸入ポンプ2bの吸入圧で送給管3gより発酵管3f中の検水に培養液5eを計量器5mによって培養液注入管3jより注入し、検水の培養が始められる。

⑥ 測定・記録

培養液5eを加えた発酵管3fに降下している送給管3g、吸入管3hをノズル上下機構3dによって上昇させた後、移動装置3bの駆動により回転テーブル3cが移動して新たな発酵管3fが送られてくる。この発酵管3fにノズル上下機構3dの駆動によって吸入管3hを液の中間まで降下してくる。発酵管3f中の液が、所定時間培養された検水でない場合は、あらかじめ注入されている殺菌液5dを吸入して測定がなされるため空測定となる。培養された検水である場合、ピンチバルブ4fを開き吸引ポンプ4eを駆動して吸入管3iより検水培養液の一部を吸入して、一時吸引ポンプ4eを停止させる。フローセル4iに導入された検水培養液は、液の安定時間を経た後、濁度計4aにより測定がなされる。この測定値は、表示計4bに表示されるとともに〔6〕制御部に出力される。

⑦ 殺菌・洗浄

発酵管3fに残留している検水培養液は、培養過程でフロッグなどが起こることもあり、したがってノズル上下機構3dの駆動により、吸入管3iを発酵管3fの底部まで降下して吸引ポンプ4eによって吸引した検水培養

表一 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	1.04×10^5	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	

液を、フローセル 4i に導入して目詰を起こさないようにするために、ピンチバルブ 4g を開いてバイパス管で排液処理槽 4d に貯留する。電磁弁 2h を開き、連続希釈調整装置 2a に濯ぎ水として精製水 5b を注入し、装置の壁面などに付着した検水を洗い落とす。この濯ぎ水は、ピンチバルブ 2f および電磁弁 2g を開いて吸入ポンプ 2b の吸入圧で送給管 3g より発酵管 3f に送給され、発酵管 3f の内壁に残留している検水培養液を濯ぎ落とす。さらに、ピンチバルブ 4f を開き、吸引ポンプ 4e を駆動して吸入管 3g より濯ぎ水を吸引し、フローセル 4i を洗浄して排液処理槽 4d に貯留する。電磁弁 2h を開き、殺菌液 5d を計量器 5i により連続希釈調整装置 2a に注入する。同様に、精製水 5b を計量器 5j により加え、さらに電磁弁 2g を開いて吸入ポンプ 2b を駆動してかく拌し、装置内を殺菌する。この殺菌液 5d は、濯ぎ水と同様にピンチバルブ 2f を開いて送給管 3g より発酵管 3f に送給され、管内を殺菌する。殺菌が行われた連続希釈調整装置 2a に、洗浄水として精製水 5b を計量器 5f により注入する。

⑧ 精製水製造

精製水貯槽 5f の精製水 5b を補給するため、電磁弁 5o を開き市水 5n をイオン交換器 5p を通して精製し貯蔵する。濁度計 4a で測定された測定値は、〔6〕制御部の記憶装置に一時入力される。〔6〕制御部では、入力された測定値は適正に測定されたデータであるかを判断し、判別された適正な測定値は、初期値として設定された菌体数換算係数によって測定検水の菌体数を演算する。この累積された記憶データから、周期変動など種々のパラメータを考慮して、標準希釈基準値を目標に新たな検水の希釈量が推定される。推定された希釈量値は、連続希釈調整装置 2a の希釈回数として〔6〕制御部の指示値に出力されるとともにデータ記憶装置に一時記憶され、前述のように希釈した検水が培養後測定され、全菌体数の

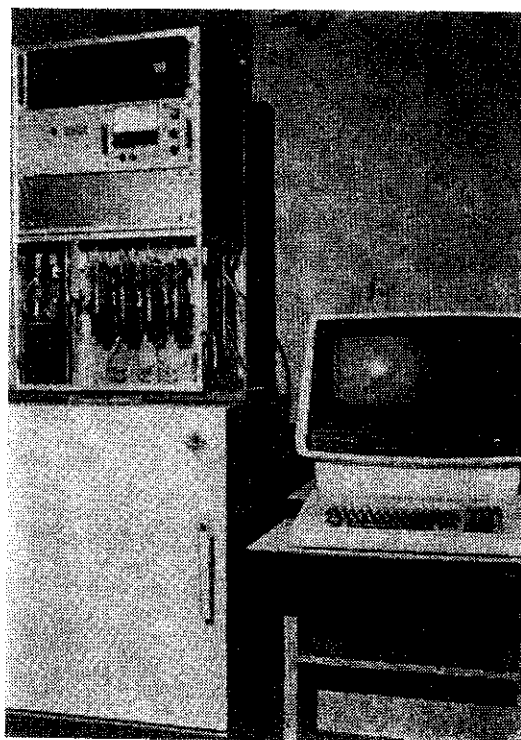
算出を行うため用いられる。

以上の工程を処理した本装置は、1 サイクルによる全工程を終了し次のスタートまで待機する。

6. 自動測定装置と JIS 法の比較

図-5 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 JIS K 0102, 72.3 (デノキシコール酸塩培地法⁷⁾) の方法で比較した。

自動測定と JIS 法を測定したところ、菌体数はオーダーが等しいという結果が得られた。その結果を表-1 に示す。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。一般的にオーダーの等



写真一 試作による大腸菌群の自動測定装置

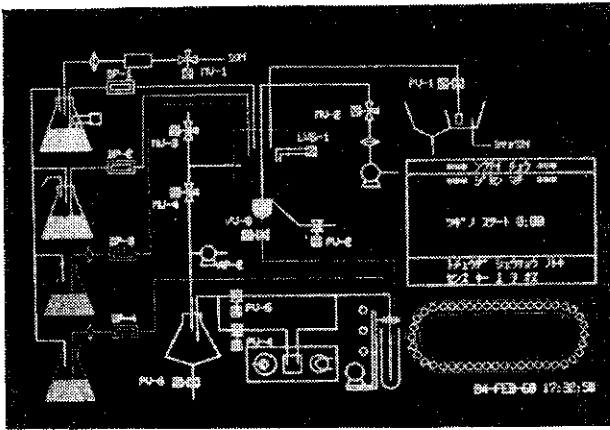


写真-2 分析プロセスのディスプレイ写真

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許容範囲であり、かなりよい結果といえる。

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内にターンテーブルなどが備えられている。また、右には〔6〕制御部としてパーソナルコンピュータを用いて、各部のコントロールおよびデータの記録などを行っている。駆動工程を確認するために、装置全体を模式化してコンピュータディスプレイに表示させたものが写真-2 である。

あとがき

細菌を測定する場合、最も重要なことは培養時間を正確にすることである。その理由は、対数期における細胞分裂が大腸菌群の場合、13~17分の間で対数的に分裂増加するため、計測時刻の誤差が生ずると測定精度に大きな影響を与える。しかし、測定装置の長所は時間的な精度は手動と比べてはるかによいものである。むしろ、今後の課題として考えられることは、電磁弁、ポンプなど従来他の自動装置でも使用されている各パーツの動作トラブルであろう。

本装置は、河川水の監視計とするために研究試作器として開発したものである。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 培養液の使用量が5mlで、濁度の立ちあがりからピークまでが約4時間ほどで完了することがわかった。

培養条件、測定条件が定まれば、薬液内の計量器を定量型できる。

② 試作器は、制御部としてパーソナルコンピュータを用いたが、監視計の専用器としてはシングルボードによる制御方法を取入れ、小型、軽量化が望ましい。

③ 発酵管は順次新しいものとし、繰返し使用を避けることによって汚染の問題が解消されるとともに洗浄、滅菌などの操作が不用となり、同時にこれらに関連する設備が軽減できる。

細菌測定における機器化および自動化は、これまで未開発のものであった。したがって、環境保全の管理上、水質を汚染する産業排水あるいは下水、または河川湖沼海域などの監視には迅速で簡便である必要があり、また測定精度も信頼性の高いものでなければ十分に使用できない。本研究による細菌連続自動測定装置は、以上のように検水の採取から測定までが約2~20時間であり、その全操作の工程は最も短かくて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装置といえる。

終わりに、本装置の開発にあたり技術面や知識の全般にわたって御指導を賜った応用理化学研究室 高島和夫主任研究員に対し、深く感謝する次第である。

参考文献

- 1) Russell, W. J., J. F. Zettler, G. C. Blanchard and E. A. Boling 1975; Bacterial identification by microcalorimetry, In C. G. Heden and T. Illeni (ed.), New approaches to the identification of microorganisms. John Wiley & Sons, New York, 101-121.
- 2) Cady, P. 1975; Rapid automated bacterial identification by impedance measurement, In C. G. Ielden and T. Illeni (ed.), New approaches to the identification of microorganisms. John Wiley & Sons, New York, 73-99.
- 3) 山口辰良; 応用微生物学, 技報堂 (1966) pp. 398.
- 4) 山口辰良; 一般微生物学, 技報堂 (1969) pp. 433.
- 5) 建設省技術管理業務連絡会水質部会; 河川水質試験方法(案), (1984), pp. 9676.
- 6) 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.
- 7) JIS K 0102-1981, pp. 236.