

飲料水細菌検査において試料保存条件、着手時間等が 結果に及ぼす影響について

財団法人福島県保健衛生協会
○ 佐藤 政浩 安達 則子

はじめに

細菌検査は正しい結果を得るために速やかに行う必要がある。水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成 15 年厚生労働省告示第 261 号）及び上水試験方法（2001 年版）において、採取後は速やかに検査する、できない場合は冷暗所に保存し 12 時間以内に検査すると規定されている。

また培地の特性などから培養温度や培養時間についても厳格に規定されている。

当協会では、これらの条件を遵守しながら日常業務として細菌検査を実施しているが、次のような課題も抱えている。

- ・ 試料の保存・搬送中の温度、検査着手までの時間がどの程度結果に影響を及ぼすかについて具体的なデータを持っていない。
- ・ 培養後の判定日時が休日や夜間等になる場合は検査員の負担が大きくなっている。

そこで今回は、業務管理等の資料とするため、飲料水細菌検査において試料保存条件、着手時間等が結果に及ぼす影響を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

水源の種類や塩素消毒の有無などから 8 種類の飲料水を選んだ（表 1）。

2. 検査項目と検査方法

細菌検査の項目は、水道水質基準とされている一般細菌数と大腸菌、そして糞便性指標として重要な大腸菌群とした。

検査方法は、一般細菌数と大腸菌については水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成 15 年厚生労働省告示第 261 号）、大腸菌群については、上水試験方法（2001 年版）により行った。使用培地や培養温度、培養時間は表 2 のとおり。

表 1 試料

No.	名称	試料の概要	塩素消毒
1	沢水-K	山の沢水	無
2	湧水-T	山の裾にあり湧き出してくる水、飲用に用いられている水	無
3	地下水-W	数件の住宅で使用している地下水	無
4	地下水-K	個人住宅で使用している地下水	無
5	ダム水-S	F市などの住民に供給されている水道水	有
6	湧水-I	湧水、簡易水道の水	有
7	湧水-D	湧水、N市の住民に供給している水	有
8	湧水-H	数十件の住宅で使用している水	有(不検出)

表 2 使用培地や培養温度、培養時間

項目	使用培地	培養温度	培養時間
一般細菌数	標準寒天培地 (栄研化学)	36±1℃	24 時間
大腸菌	I P T G 添加 O N P G - M U G 培地 (栄研化学)	36±1℃	24 時間
大腸菌群	同上	36±1℃	24 時間

3. 検討事項

(1) 試料保存条件

クーラーボックスと冷凍して繰返し使用できる保冷剤を用いて検体を保存、搬送する場合を想定し、保冷剤の量や配置を変えて検体の温度を測定することで、最適な保存条件を検討した。

1) 検体量に対する保冷剤量の割合と検体温度

検体量に対する保冷剤量の割合を 0.6~1.5 まで変化させて、20℃の検体がどの程度まで冷却されるか温度を測定した。保冷剤の配置は検体の上部または下部とした。

2) 保冷剤の配置と検体温度

クーラーボックス内の保冷剤の配置を 4 通り (図 1~4) に変えて、20℃の検体がどの程度まで冷却されるか温度を測定した。なお、検体量に対する保冷剤量の割合は 1 とした。



図 1 (配置 A)
下のみ



図 2 (配置 B)
上と下



図 3 (配置 C)
下と中間



図 4 (配置 D)
上と中間

(2) 検査着手時間

検体の保存温度を 3 種類 (4℃、10℃、25℃) 設定し、それぞれ採水から着手までの時間を 6、9、12、24 時間として検査した場合の結果を、採水直後に検査した結果と比較した。

(3) 判定時間

規定の培養時間 (24 時間) を経過したのち、速やかに冷蔵保存 (4℃) し一定時間 (24、48、72 時間) 後に判定した結果を、規定の培養時間を経過し直ちに判定した結果と比較した。

結果

1. 試料保存条件

(1) 検体量に対する保冷剤量の割合と検体温度

検体量に対する保冷剤量の割合が 1.25 では 5℃まで、1.5 では 3℃まで低下した。一方、割合が 1 以下では 9~13℃までしか低下しなかった (図 5)。

(2) 保冷剤の配置と検体温度

配置 A、B では 8 時間経過しても検体温度が 9~11℃までしか低下しなかった。一方、検体容器側面に保冷剤が接触するようにした配置 C、D ではどちらも 3 時間あまりで検体温度が 3℃まで低下した (表 3)。

2. 検査着手時間

保存温度 4℃では、24 時間までの検査着手で、一般細菌数、大腸菌、大腸菌群のいずれの項目でも、採水直後の検査結果と同じ結果が得られた。

一方、保存温度 10℃では 12 時間でも、大腸菌群について採水直後の検査結果とは異なる結果になる検体があった。

保存温度 25℃では、12 時間で大腸菌群について異なる結果が得られ、また 24 時間後に着手した結果で一般細菌数が採水直後の 3 倍ほど増加した検体があった (表 4)。

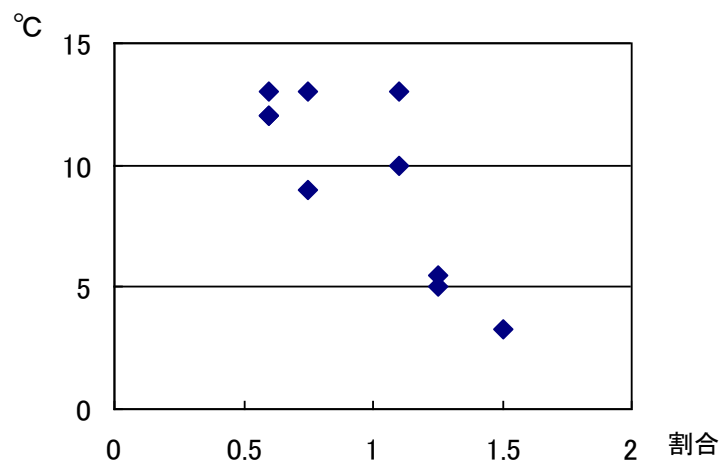


図 5 検体量に対する保冷剤量の割合と検体温度

表 3 保冷剤の配置と検体温度

	配置A	配置B	配置C	配置D
検体温度	11℃	9℃	3℃	3℃

表 4 保存温度及び着手時間と細菌検査結果の変化した検体数の割合

保存温度	着手までの時間	一般細菌数	大腸菌	大腸菌群
4℃	6 時間	0/8	0/8	0/8
	9 時間	0/8	0/8	0/8
	12 時間	0/8	0/8	0/8
	24 時間	0/8	0/8	0/8
10℃	6 時間	0/8	0/8	0/8
	9 時間	0/8	0/8	0/8
	12 時間	0/8	0/8	1/8
	24 時間	0/8	1/8	1/8
25℃	6 時間	0/8	1/8	0/8
	9 時間	0/8	0/8	0/8
	12 時間	0/8	0/8	1/8
	24 時間	1/8	0/8	0/8

3. 判定時間

一般細菌数 規定の判定時間で 0cfu/ml であった検体の一般細菌数は、保存 48 時間まで変化が認められなかった。保存 72 時間以降では 50 検体中 9 検体 (18%) で菌数が増加した。一方、規定の判定時間で 0cfu/ml 以外であった検体の一般細菌数は保存 48 時間でも 70 検体中 15 検体 (21%) で菌数増加が認められ、保存 72 時間では 70 検体中 33 検体 (47%) に増えた。一般細菌数は多いもので 2 割程度増加していた。

表 5 判定時間と細菌検査結果の変化

項目	培養後、判定までの時間	一般細菌数 0cfu/ml、大腸菌(群)陰性の検体			一般細菌数 0cfu/ml 以外、大腸菌(群)陽性の検体		
		検体数	変化無	変化有	検体数	変化無	変化有
一般細菌数	24 時間	50	50	0	70	70	0
	48 時間		50	0		55	15
	72 時間		41	9		37	33
大腸菌	24 時間	92	92	0	28	28	0
	48 時間		92	0		28	0
	72 時間		92	0		28	0
大腸菌群	24 時間	71	69	0	49	28	0
	48 時間		65	6		28	0
	72 時間		58	13		28	0

大腸菌 規定の判定時間での結果（陽性／陰性）に関わらず、保存 72 時間でも検査結果に変化は認められなかった。

大腸菌群 規定の判定時間で大腸菌群が陽性であった検体は、保存 72 時間でも陽性のままであった。しかし、規定の判定時間で陰性であった検体は、保存 24 時間で陽性に変化する検体があり、保存時間が長くなるにしたがい陰性から陽性に変化した検体数が増加した（表 5）。

まとめ

- ・ 保冷剤を用いて検体の保存、搬送をする場合、検体量に対する保冷剤量の割合はおおよそ 1.25 以上必要であることがわかった。ただし、検体容器の側面に保冷剤が接触するような配置をすることで、検体量に対する保冷剤量の割合が 1 程度でも十分に温度を下げられる。
- ・ 細菌検査は 12 時間以内に着手しなければならないが、それまでの保存温度が結果に及ぼす影響が大きいので、確実に冷蔵（4℃程度）する必要のあることが確かめられた。
- ・ 規定時間培養後に冷蔵保存し後日判定する方法について、今回調べた範囲では、一般細菌数と大腸菌で 24 時間までは結果に変化が認められなかった。対象試料について十分なデータを採取した上でこの方法を運用することで検査員の負担を軽減できる可能性がある。しかし、大腸菌群では 24 時間以内でも陰性から陽性に変化する検体があり、冷蔵保存後の判定は適用できないことがわかった。

参考文献等

- 1) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号）
- 2) 上水試験方法(2001 年版) 日本水道協会
- 3) 沢村孝子ほか、特定酵素基質培地法による 飲料水の大腸菌群試験法の検討について、札幌市衛研年報 23,64-70(1996)