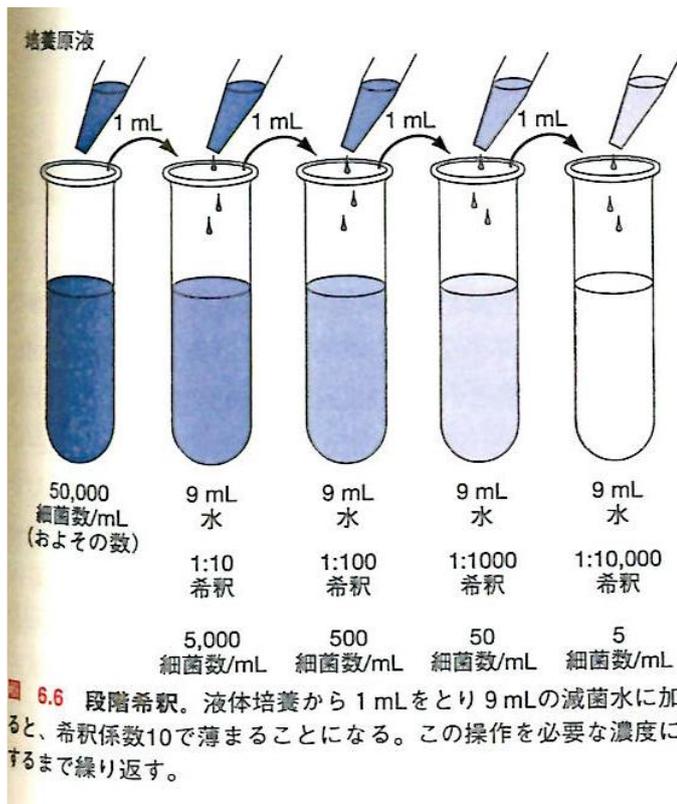


## 細菌の増殖の測定

細菌の増殖は、増殖期に2分裂で増えていく菌数を算定することにより測定することができます。このような測定法では細胞の数は培地1 mL中に含まれる生菌数として表れられます。細菌の増殖を測定する方法としてはいくつかのものが知られています。

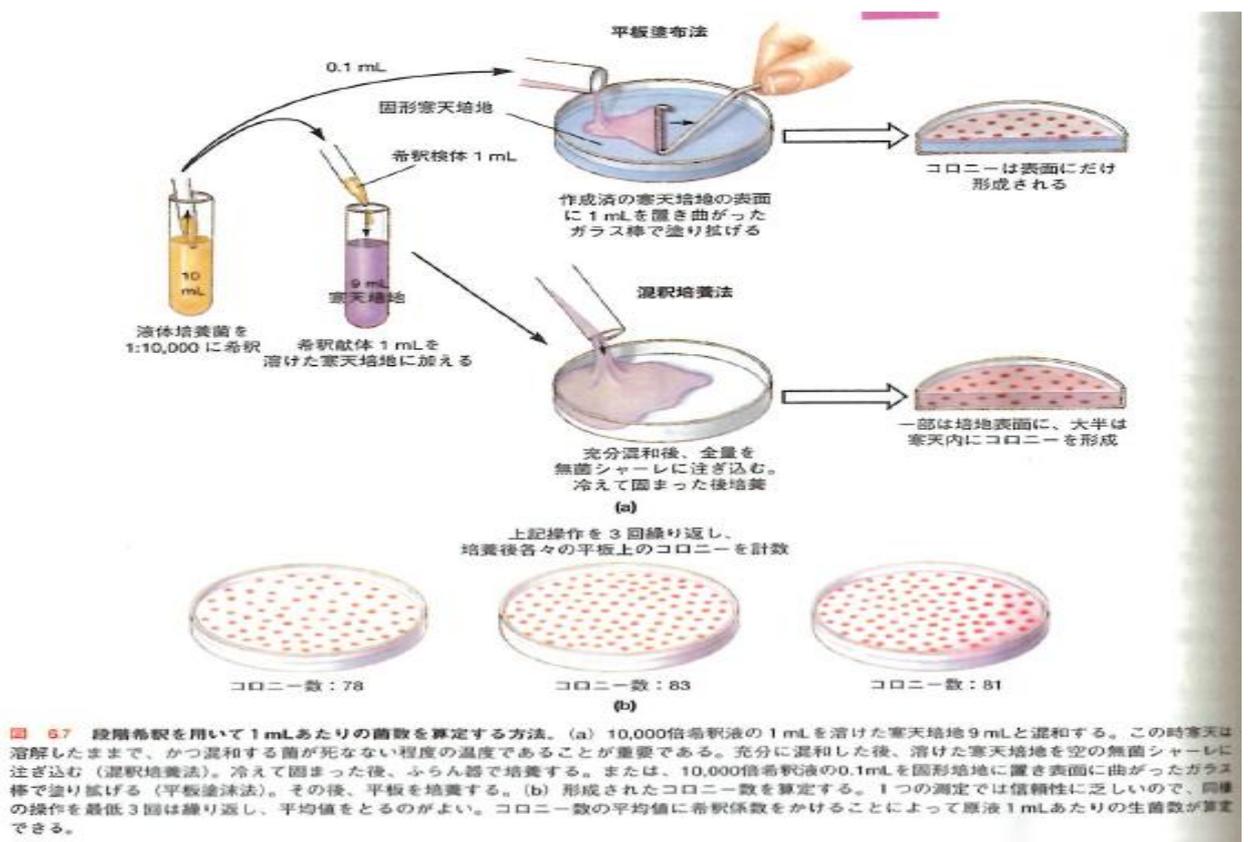
### 段階希釈および標準平板法

細菌の増殖を測定する1つの方法は**標準平板算定法 standard plate count**です。この方法の根拠は、適切な条件においては生きた細菌だけが分裂し寒天培地上で眼に見えるコロニーをつくることにあります。**寒天培地 agar plate**とは、**寒天 agar**で固形化した栄養分の培地を入れたシャーレであり、寒天というのはある種の海藻から抽出された多糖類の複合体です。1つの寒天平板培地上にあるコロニーは300個以上を算定するのは困難なので、一般には固形培地に一定量を接種する前に細菌の培養原液を希釈する必要があり、そのために行うのが段階希釈です。



段階希釈 serial dilution (上図)には液体培養の菌を用います。この培地1 mLを9 mLの滅菌水を混ぜることにより10倍希釈できます。その10倍希釈液の1 mLをさらに9 mLの滅菌水に加えることにより100倍の希釈液ができます。このように連続して希釈していくことが可能です。希釈ごとに1 mL当たりの菌は10分の9ずつ減少することになります。従って希釈を続けていくと1:1,000、1:10,000、1:100,000、1:1,000,000というように希釈され、もし最初の培養液が極端に多数の細菌を含んでいる場合には1:10,000,000と高い希釈をする必要があります。

普通は 100 倍の希釈液から始めるが、それぞれの希釈液から 0.1mL を寒天培地に接種します（10 倍希釈液の 0.1mL を接種した場合、通常は算定できないほどたくさんのコロニーをつくるものです）。接種法には混釈法と塗抹法の 2 つがあります。



混釈法 pour plate では、まず希釈した培養液の 1 mL を溶かした寒天培地 9mL に加える。培養液が充分混和された後、何も入っていない空のシャーレに注ぐ。寒天培地が冷えて固まった後、これをふ卵器

で培養すると、コロニーが培地のなか、またはその表面の両方に形成される。準備段階で溶かした寒天に懸濁された菌が熱により障害されているとコロニーはできない。寒天内部で増殖された細菌は、寒天の表面で増殖する菌よりも小さなコロニーをつくる。一方、寒天に塗り拡げる塗沫法 spread plate method ではそのような問題は起きない。なぜなら、すべての細菌細胞は固形培地の表面に留まるからである。希釈した検体を、まず冷えた固形寒天培地の中心に接種し、続いて滅菌された曲がったガラス棒を用いて培地の表面全体に均一に塗り拡げる。ふ卵器で培養すると寒天培地の表面にコロニーが形成される。

培地のどの部位であれ、単一の生きた細菌が植え付けられたところでは、菌は分裂しコロニーを形成する。それぞれの細菌はコロニーフォーミングユニット colony-forming unit(CFU)で表される。少なくとも1枚以上の寒天平板培地上には、明確に判別が可能で数えられるちょうどよい数のコロニーが存在することが必要である。もしも希釈系列が正しく調整されていれば、**算定可能なコロニー数 countable number**を示す培地が得られるはずである(培地当たり 30 ~ 300 個)。

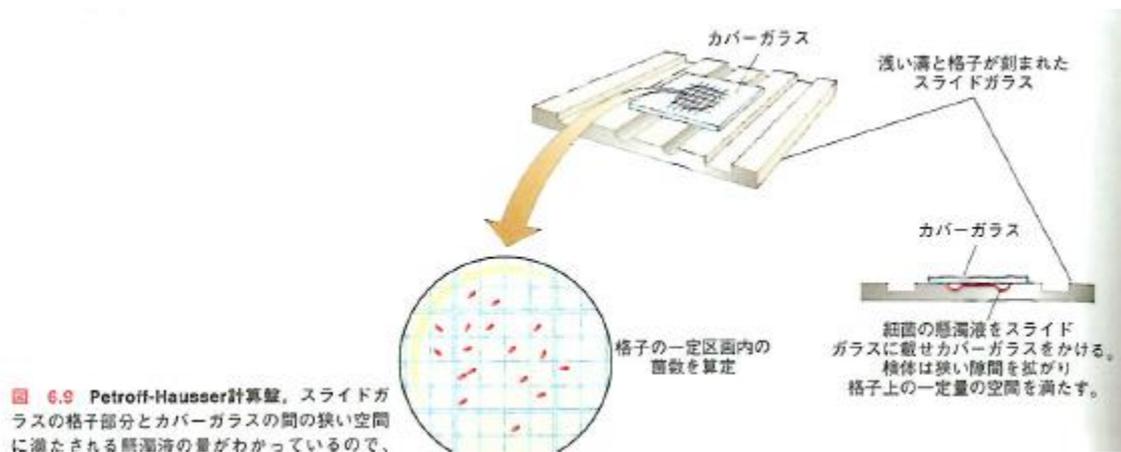
存在するコロニーの実数を数えるために、平板培地を拡大鏡の下、またはコロニーカウンターに置き、培地全体に存在するすべてのコロニーを算定する。原液の中に存在する CFU 数を算定するためには、ある平板培地で数えられたコロニーの数に希釈係数 dilution factor を掛ければよい。1,000 という希釈係数は 1:1,000 または 1/1,000 と表すことができ、10,000 という希釈係数は 1:10,000 と表すことができる。1/100,000 に希釈した検体を接種した培地で平均 81 個のコロニーが観察されたとすれば、次のように計算される。

$$81 \times 100,000 = 8,100,000 \quad \text{または} \quad 8.1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$$

希釈係数や平板算定法が正確であるためには、それぞれの希釈系列において細菌の分布が非常に均一であることが必要です。誤差を少なくするためには、検体を十分に攪拌したり、1つの希釈について複数の平板培地を用意することが必要です。数えられたコロニーは生菌の数を示しているため、平板培地に接種した時点ですでに死んでいた細菌は算定されず、また特殊な培地でしか増殖できないような細菌も算定できません。このような問題に対処するため、対数増殖期にある比較的若い培養を用いることをお勧めします。

## 直接顕微鏡下算定法

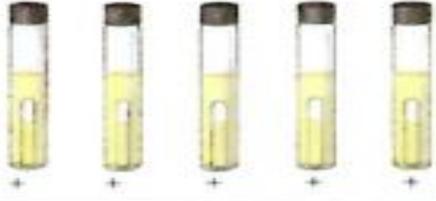
直接顕微鏡下算定法 direct microscopic counts で細菌の増殖を調べることができます。この方法では Petroff-Hausser 計算盤という罫線入りの検定済みスライドグラスに培養の一定量を置きます。目盛付きピペットで細菌の懸濁液を計算盤に滴下し、菌が沈んで動きがおさまるまで培養液の流れが止まったところで、一定の決まった区画のなかの菌数を数えます。公式を用いて細菌の懸濁液原液一定量あたりの細菌数を計算します。この方法では、1mL の培養液中の細菌数をかなり正確に算定することができます。直接顕微鏡下算定法で正確を期するためには、培養液 1mL あたりに 1,000 万個以上の細菌が存在しなければなりません。なぜならば、この計算盤は極めて多数の細菌が存在する時にだけ正確に算定できるようにつくられているからです。また正確な算定を行うためには、細菌が均一に浮遊されていることが必要です。この手法の一般的欠点として、生菌と死菌を区別できないことが挙げられます。

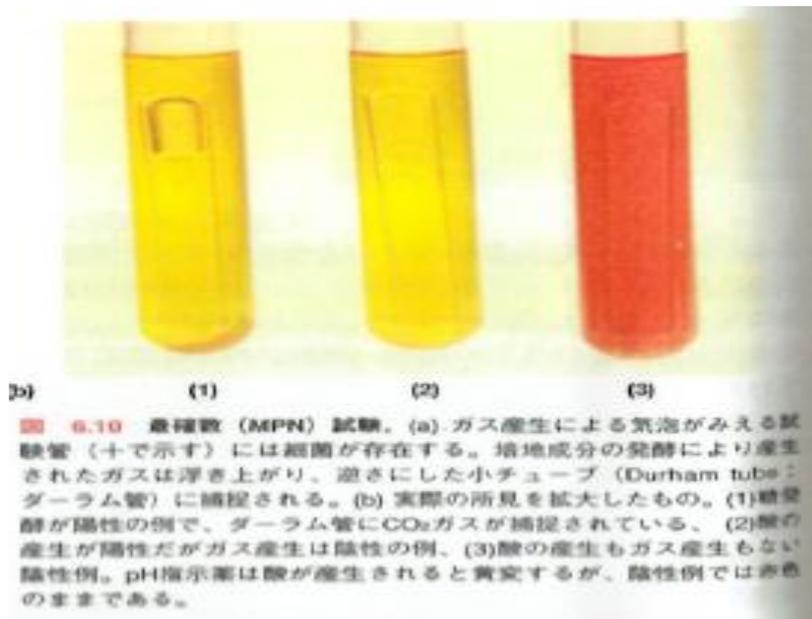


## 最確数

食品や水の汚染検索など、検体に含まれる菌数が極めて少なく標準的な寒天平板による培養法で算定が困難な場合や、寒天培地の上では目的とする微生物が増殖しにくい場合には、最確数 most probable number(MPN)を算定する方法が用いられる。この方法では、検査者はまず検体を観察して存在する細菌数を予想し、次に徐々に希釈を進める。希釈係数が増加すると、どこかでその試験管には1個の細菌しか含まれずそれ以上の希釈には細菌が存在しないところを得られることになる。典型的な MPN テストでは、3つの希釈(10,1,0.1 mL)についてそれぞれ5本の試験管を用意する(下図)。細菌を含む試験管では培養により細菌が増殖し、その結果ガス産生

による気泡が生じたり、増殖による濁りが生じます。原液中の細菌数は MPN 表に従って算定することができます。表に記載された数値は統計的な確率に基づいており、それによって 95%の確率で、ある幅の菌数があると知ることができます。完全な MPN 表を下表に示しました。細菌が増殖を示す試験管数が多く、特に高い希釈で多い場合には、検体のなかにはより多くの細菌が存在していることを意味しています。

添加する希釈検体の量	培養結果	陽性を示す試験管の数
10 mL		5
1 mL		2
0.1 mL		0



最確数表を使用して菌数を出すには、各希釈検体についての陽性の本数を表の該当する欄にあてはめます。図に示した例では、5本、2本、0本なので、これに相当する最確数をみると、推定菌体数は50/100mLとなります。

最もよく用いられる最確数の応用としては、水の清浄度の検査です。

表 6.1

最確数表 (1) 各希釈につき5本ずつ (10mL, 1mL, 0.1mL接種のそれぞれにつき5本) 検査した場合の陽性、陰性の組合せから得られる推定菌体数

陽性を示す試験管の本数

最確数				最確数			
10 ml.	1 ml.	0.1 ml.	推定菌体数 / 100 ml.	10 ml.	1 ml.	0.1 ml.	推定菌体数 / 100 ml.
0	0	0	<2	4	3	1	33
0	0	1	2	4	4	0	34
0	1	0	2	5	0	0	23
0	2	0	4	5	0	1	30
1	0	0	2	5	0	2	40
1	0	1	4	5	1	0	30
1	1	0	4	5	1	1	50
1	1	1	6	5	1	2	60
1	2	0	6	5	2	0	50
2	0	0	4	5	2	1	70
2	0	1	7	5	2	2	90
2	1	0	7	5	3	0	80
2	1	1	9	5	3	1	110
2	2	0	9	5	3	2	140
2	3	0	12	5	3	3	170
3	0	0	8	5	4	0	130
3	0	1	11	5	4	1	170
3	1	0	11	5	4	2	220
3	1	1	14	5	4	3	280
3	2	0	14	5	4	4	350
3	2	1	17	5	5	0	240
4	0	0	13	5	5	1	300
4	0	1	17	5	5	2	500
4	1	0	17	5	5	3	900
4	1	1	21	5	5	4	1,600
4	1	2	26	5	5	5	≥1,600
4	2	0	22				
4	2	1	26				
4	3	0	27				

出典 : A. E. Greenberg, L. S. Clesceri, and A. D. Eaton, Eds. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1992.

引用文献：ブラック 微生物学 林 英生・岩本愛吉・神谷 茂・高橋秀実 監  
訳 丸善株式会社