

図3 H型エンテロトキシン検出ELISAの検出感度

Capture抗体(0.5 μ g/well)溶液をマイクロプレートの各ウェルに添加し、洗浄後ブロッキングした。抗原溶液(0.1-10 ng/ml, 0.1ml)を添加し、室温で1時間インキュベーションした。洗浄後100 μ lのビオチン標識抗体溶液を添加し室温で2時間インキュベーションした。洗浄後ビオチン-アビジン-ペルオキシダーゼ複合体を形成させ、基質を添加し発色させマイクロプレートリーダーで405 nmの吸光度を測定した。

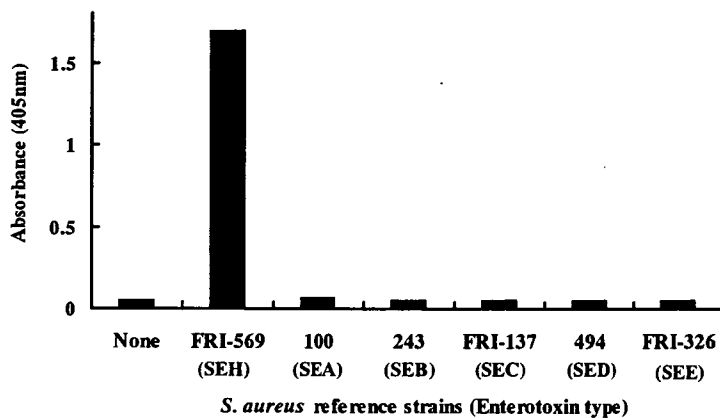


図4 H型エンテロトキシン検出ELISAの特異性

Capture抗体(0.5 μ g/well)溶液をマイクロプレートの各ウェルに添加し、洗浄後ブロッキングした。各型エンテロトキシン産生株培養上清を添加し、室温で1時間インキュベーションした。洗浄後100 μ lのビオチン標識抗体溶液を添加し室温で2時間インキュベーションした。洗浄後ビオチン-アビジン-ペルオキシダーゼ複合体を形成させ、基質を添加し発色させマイクロプレートリーダーで405 nmの吸光度を測定した。

表1 エンテロトキシン産生型とコアグララーゼ型の関係

Enterotoxin production	Number of isolates	Coagulase type					Not typable
		II	III	IV	VI	VII	
A/H	35					35	
A/B/H	23					23	
H	15					15	
B/H	13					13	
A	17	3	9	4	1		
A/D	9		7		2		
B	6	2				3	1
D	6	5				1	
A/B	4					4	
A/C	2				2		
B/D	1	1					
Not detected	13	1	5	1		5	1
Total	144	12	21	5	5	99	2

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食の安心安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

生菌数および汚染指標細菌等の簡易迅速試験法の検討

分担研究者 浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者 河合高生 大阪府立公衆衛生研究所

久米田裕子 大阪府立公衆衛生研究所

小笠原 準 大阪市立環境科学研究所

木村 凡 東京海洋大学

研究要旨

食品中の汚染指標菌の簡易迅速試験法の有用性を検討するために、バイオシータ社の DOX とピオメリュウ社の TEMPO を選択した。DOX は、酸素電極法により細菌の発育にともなう酸素消費量から生菌数を自動計測する試験システムである。TEMPO は 3 段階希釈の 16 本法（計 48 本）の MPN 法をカード化した自動菌数測定装置で、AFNOR と AOAC の認証を得た試験システムである。迅速試験法と従来法（平板培養法）の同等性を評価する方法として、理想的には汚染菌数の異なる各種の自然汚染食品を大量に用意する必要がある。これは、現実的には不可能であるので、自然汚染食品の代替となる食品が必要となる。

より自然汚染に近い指標菌汚染食品を作製する方法として、動物・環境由来菌液を無菌食品に添加することを考えた。今年度は、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、土壌から菌を抽出し、それぞれの菌液中の一般生菌、大腸菌群、大腸菌、*Enterobacteriaceae*（仮約：腸内細菌科菌群）数を、DOX および TEMPO と従来法とで比較検討した。大量の食品に菌液を接種して菌数測定するためには、菌液の保存性が重要な要素となる。今回作製した菌液は、冷蔵保存下で最低 7 日間は菌数に大きな変化がなかった。DOX および TEMPO で得られた菌数と、平板培養法で測定した菌数との間には高い相関関係があった。

わが国の汚染指標菌等の簡易迅速試験法を検討するための基礎資料として、食品細菌規格基準およびその試験法（成分規格）を整理し、一覧表を作成した。

A. 研究目的

近年、細菌試験法の技術は長足の進歩を遂げており、新しい原理や考えに基づく斬新な培地や細菌数測定機器も開発され、一部では実際の食品検査現場で利用されている。食品の衛生管理体制を維持するために、製造ラインでの中間製品と出荷前の製品の安全性や品質の良否をモニタリングできる迅速・簡便な汚染指標菌試験法を開発し評価することは、食品の製造コストや流通コスト削減にも寄与することが期待される。

本年度は市販され、食品検査現場で使用されているバイオシータ社の食品細菌検査装置 DOX-30F とピオメリュー社の自動生菌数測定装置 TEMPO を選択し、従来から実施されている寒天平板培養法による汚染指標菌の試験法と比較検討した。

B. 研究方法

1. 使用機器

ピオメリュー社の自動生菌数測定装置 TEMPO とバイオシータ社の食品細菌検査装置 DOX-30F は各販売会社のご厚意により借用した。

2. TEMPO の基本操作

1) 試料 10 g をストマッカー袋（フィルター付き）に入れ、希釈液 90 ml を加えてストマッキングする。試料に含まれる菌数に応じて、凍結乾燥された培地の入ったバイアルに滅菌精製水を 3 ml（最終希釈倍率 40 倍）あるいは 3.9 ml（最終希釈倍率 400 倍）を分注する。

2) 試料 1 ml あるいは 0.1 ml を上記の培地バイアルに入れボルテックスで混合する。

3) 専用パソコンで培地培地のバーコードを読み取らせ、検体名を入力する。続いて TEMPO カードのバーコードを読み取らせる。

4) 試料を加えた培地バイアルおよび TEMPO カードを充填ラックに入れ、これを TEMPO フィーラーにセットする。培地がカードに充填されると、カードのトランスファーチューブが自動的に切断・シールされる。

5) TEMPO カードを読み取りラックに移し替え、速やかに所定の温度に設定された培養器に入れる。

6) パソコンに表示された、所定の培養時間内にある TEMPO カードを選択し、TEMPO リーダーにセットして読み取らせる。

7) あらかじめ入力した検体名に対応した菌数（MPN 値）がパソコンに保存される。

3. DOX-30F の基本操作

1) 試料 10 g をストマッカー袋（フィルター付き）に入れ、希釈液 90 ml を加えてストマッキングする。

2) 装置専用培地（生菌数測定用液体培地、大腸菌群定量・大腸菌定性用培地）と試料を等量混合して、電極付きのセルへ分注する。

3) 電極付きセルを DOX 本体へセットし、所定の温度で培養する。

4) 波形を読み、一般生菌数では 3 分間連続で閾値（300 nA）を下回る時間を判定基準とする。大腸菌群では、3 分間連続で閾値（1,500 nA）を上回る時間を判定基準とする。この場合、電流値が一旦低下した後に上昇するのが特徴である。このステップは実際の使用に際しては自動測定される。

5) 菌数はあらかじめ設定した標準曲線から自動的に計算される。

4. 菌液作製用糞便・土壌の採取

ウシ、ブタ糞便は屠畜場で解体されたウシとブタの腸内から直接採取し、一夜冷蔵保存したものを翌日に実験に供した。ウマ糞便は自然排便のものを採取した。ニワト

り糞便は養鶏場のニワトリが排便したものを採取した。土壌は、鳥類以外の動物が侵入しにくいように囲った場所から採取した。

5. 各種動物糞便および土壌からの抽出菌液の作製法

出菌液の作製法

- 1) 試料 10 g を無菌プラスチック容器に秤量した。
- 2) 4 倍量の滅菌ペプトン加生理食塩水を加えて手で激しく混合した。
- 3) 混合液をフィルター付きストマッカー袋に移し、ろ過液をピペットで 50 ml の滅菌遠心管に採取した。
- 4) ろ過液を 3000 回転、20 分間、4℃で遠心した。
- 5) 上清を捨て、沈殿物をペプトン加生理食塩水 (約 30 ml) に懸濁、ボルテックスで混合した。
- 6) 3000 回転、20 分間、4℃で遠心し、上清を捨て、5) と 6) の操作を二回繰り返した。
- 6) 約 10 ml のペプトン加生理食塩水に懸濁して 4℃で保存した。

6. 使用培地

生菌数測定用には標準寒天培地 (日水製薬) を使用した。大腸菌群数測定用にはデソキシコレート寒天培地 (日水製薬)、XM-G 培地 (酵素基質培地: 日水製薬)、VRBL 培地 (Difco) を、大腸菌数測定用には XM-G 培地を、腸内細菌科菌群数測定用には VRBG 培地 (Difco) を使用した。それぞれの培地は各メーカーの仕様に従い加温溶解するか、あるいはオートクレーブで滅菌した。平板培地は、培地 20 ml をプラスチックシャーレに分注後、室温で固化させた。培地表面の余分な水分を取り除くため、35℃の培養器の中で約 1 時間乾燥させた。

7. 希釈液 (ペプトン加生理食塩水)

ペプトン (BACTO Peptone, Difco) 1.0 g

及び塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 ml に溶解後に、121℃で 15 分間オートクレーブした (pH は 7.0 ± 0.1)。

8. 寒天培地での培養

約 50℃の恒温水槽で保存した 15 ml の培地により混釈し、室温で固化させた後に 5 ml の同培地を重層後に固化させた。

平板塗抹培養は、希釈液 (0.1% ペプトン加生理食塩水) で 10 倍階段希釈した試料 0.1 ml を各平板培地にコンラージ棒で塗抹した。混釈培養および平板塗抹培養はいずれも $35 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で所定の時間実施した。

C. 研究結果

1. 動物糞便および土壌から抽出した

菌液中の汚染指標菌の菌数測定

ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリ糞便および土壌から抽出した菌液中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数を従来の培養法で測定した。平板培養法は塗抹法および混釈法の 2 通りの方法で実施した (表 1)。動物糞便 1 g 中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数はそれぞれ $10^8 \sim 10^9$ 、 $10^5 \sim 10^7$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^5 \sim 10^7$ のオーダーであった。

土壌 1 g 中の生菌数、大腸菌群数および腸内細菌科菌群数はそれぞれ 10^6 、 $10^3 \sim 10^5$ 、 $10^3 \sim 10^5$ のオーダーであった。なお大腸菌は平板法では検出されなかったので $10^3/\text{g}$ 未満とした。大腸菌群数は使用した培地の種類により菌数が若干異なり、特にデソキシコレート寒天培地で測定した菌数が VRBA 培地や XM-G 培地で測定した菌数よりも低くなる傾向を示した。

塗抹法と混釈法により計測された菌数の差異を調べた。動物糞便では、塗抹法で測定した菌数は混釈法で測定した菌数よりも

若干高くなる傾向にあったが、各菌数の差は 1.0 log を超えることはなかった。土壌中の生菌数は塗抹法と混釈法との間でほとんど差異は認められなかった。しかし、大腸菌群数と腸内細菌科菌群数では、塗抹法に比べて混釈法の菌数が低く計測される傾向にあった。この傾向は、デソキシコレート寒天培地で測定した大腸菌群および、VRBG 培地で測定した腸内細菌科菌群で顕著であり、混釈法で測定した菌数は塗抹法よりもそれぞれ 1.8 log と 1.1 log 低かった。

2. 動物糞便および土壌から抽出した菌液の保存試験

動物糞便から抽出した菌液の冷蔵保存中の菌数の推移を調べるため、作製当日、保存 7 日目、33 日目あるいは 45 日目の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数を測定した (図 1 A-E)。いずれの動物糞便抽出菌液でも、保存 7 日目の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数と、作製当日の汚染指標菌数の差は 1.0 log 以内であった。ニワトリおよびウマの糞便抽出菌液では、いずれの汚染指標菌についても 45 日保存後と作製当日の菌数の差は 1.0 log 以内であった。ブタ糞便抽出菌液では 45 日保存後の大腸菌群数、大腸菌数、腸内細菌科菌群数と作製当日のそれぞれの菌数の差は 1.0 log 以内であったが、生菌数の菌数の差は 1.2 log であった。ウシ糞便抽出菌液では、いずれの汚染指標菌についても 45 日保存後の菌数と作製当日の菌数の菌数の差は 1.0 log 以上となり、45 日保存後の VRBA 培地で測定した大腸菌群数、デソキシコレート寒天培地で測定した大腸菌群数、腸内細菌科菌群数は作製当日の菌数と比較してそれぞれ 1.8 log、2.0 log、1.8 log 低かった。

土壌抽出菌の保存 7 日目の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数と、作製当日の各菌数の差は 1.0 log 以内であったが、45 日保存後には菌数はいずれの場合でも大きく増加した。

3. 動物糞便抽出菌液を用いた TEMPO による菌数測定法の評価

TEMPO による菌数測定法を培養法と比較するために、 10^7 倍まで 10 倍階段希釈したウシおよびブタ糞便抽出菌液の 4 段階希釈液を用いて、TEMPO で生菌数 (TVC)、大腸菌群数 (TC)、大腸菌数 (EC) および腸内細菌科菌群数 (EB) を測定した。X 軸に培養法で測定した糞便抽出菌液の菌数から算出した各希釈液の菌数の対数値を、Y 軸に TEMPO で測定した各希釈液の菌数 (対数値) をプロットし、回帰直線と R (相関係数) の 2 乗値を求めた (図 2 A-F、図 3 A-F)。いずれの汚染指標菌についても、TEMPO で測定したウシおよびブタ糞便希釈液の菌数と、培養法の結果から算出した各糞便希釈液の菌数の R^2 値は 0.964-0.986 の範囲であった。また、いずれの回帰直線の傾きも 0.986-1.19 の範囲であった。

4. DOX による菌数測定法の検討

1) 試料液と液体培地の混合方法の検討

DOX は、菌の増殖に起因する酸素消費を電流値として経時的に検出し、電流値が測定対象となる生菌数や大腸菌群ごとに設定された閾値を超える時間から試料液中の初期菌数を推定する装置である。予備試験的に、動物糞便抽出菌液を用いて DOX で電流値の変化を測定した。測定に使用する電極付きセルの電極部分に気泡が付着すると電流値の測定に支障があるとのことから、メーカーは、電極付きセルに試料液と液体培

地を注入した後混合せずに電極付きセルを測定装置に挿入することを推奨している。そこで、ウシ糞便抽出菌液の 10^4 あるいは 10^3 希釈液を用いてメーカー推奨の方法で電流値を測定し、電流値の経時変化をグラフ化した。このグラフは、測定対象となる生菌数や大腸菌群ごとに特有のパターンを示すことが知られている。しかし、生菌数および大腸菌群用の培地を使用した場合ともに、電流値の経時変化は、測定対象に特有のパターンを示さず、再現性も悪かった (図 4A、4B、5A、5B)。希釈液と液体培地を混合しないことが電流値の経時変化に影響したと推測し、①2.0 ml チューブ内で試料液と液体培地をピペティングで混合した後に電極付きセルに注入する方法、②横置き電極付きセルに試料液と液体培地を注入してセルを前後左右に緩やかに攪拌する方法を行い、電流値の経時変化を調べた。試料液にはウシ糞便抽出菌液の 10^4 あるいは 10^3 希釈液を使用した。両者の方法では、電流値の経時変化は生菌数、大腸菌群用の培地の区別に関係なく測定対象に特有のパターンを示した (図 4C-4F、5C-5F)。②の方法よりも操作が簡易である①の方法で、試料液をブタ糞便抽出菌液に代えて②の方法の有効性を検討した。ブタ糞便抽出菌液の 10^3 ~ 10^5 希釈液と生菌数測定用の培地をそれぞれ混合した場合、ブタ糞便抽出菌液の 10^2 ~ 10^5 希釈液と大腸菌群用の培地をそれぞれ混合した場合でも、電流値の経時変化は測定対象に特有のパターンを示した (図 6)。以上の結果から、電極付きセルへの試料液と液体培地を分注する方法として、②横置き電極付きセルに試料液と液体培地を注入してセルを前後左右に緩やかに攪拌する方法が最適であることがわかった。

2) ウシおよびブタ糞便抽出菌液を用いた DOX による測定法の検討

DOX ではその測定原理から、試料液の初期菌数を推定するためにはあらかじめ測定対象となる菌を用いて、DOX による検出時間から菌数を推定するための検量線を作成する必要がある。そこで、動物糞便抽出菌液を使用したときに検量線が作成できるかどうかについて検討した。ウシおよびブタ糞便抽出菌液を 10^6 倍まで 10 倍階段希釈し、そのうちの 4 段階希釈液を用いた。各希釈液と一般生菌および大腸菌群用の培地をそれぞれ電極付きセル内で混合し、DOX で電流値の経時変化を調べた。X 軸に培養法で測定した糞便抽出菌液の菌数から算出した希釈液の菌数 (対数值) を、Y 軸に DOX による生菌数あるいは大腸菌群数の検出時間をプロットし、回帰直線と R^2 値を求めた (図 7)。DOX での検出時間と一般生菌あるいは大腸菌群の菌数とは高い相関性を示し、ウシおよびブタ糞便抽出菌液の平板培地で測定した生菌数と DOX による生菌数の検出時間の R^2 値はともに 0.97 であった。ウシおよびブタ糞便抽出菌液の大腸菌群数と DOX による大腸菌群検出時間の R^2 値はそれぞれ 0.96 と 0.97 と、生菌数での R^2 値とほぼ同一の値を示した。

ウシ糞便抽出菌液の生菌数を DOX で検出するのに要する時間は、6.9 cfu/ml の場合には 651-677 分であったが、6,900 cfu/ml では 362-372 分と短くなった。ブタ糞便抽出菌液 6.8 cfu/ml の生菌数を検出するには 615-669 分を要したが、6,800 cfu/ml では 322-340 分と短くなった。

ウシ糞便抽出菌液の大腸菌群を DOX で検出するのに要する時間は、39 cfu/ml の場合には 523-560 分であったが、39,000 cfu/ml

では373-376分と短くなった。ブタ糞便抽出菌液の8.3 cfu/mlの大腸菌群を検出するのに要する時間は583-600分であったが、83 cfu/mlでは502-518分、8,300 cfu/mlでは400-417分というように、菌数の増加に従い検出時間は短くなった。

D. 考察

各種動物糞便抽出菌液を4℃で7日間保存した際の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数は、作製当日のそれぞれの菌数と1.0 log以上異なることはなかったが、33日-45日保存後では、動物種によっては菌数が2.0 log程度異なることもあった。これは、各動物の腸内細菌の菌叢の違いが反映されていると推察される。

土壌抽出菌液を、4℃で7日間保存しても生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数は、作製当日のそれぞれの菌数と1.0 log以上異なることはなかった。しかし、45日間保存すると、動物糞便抽出菌液とは異なり、菌数が明らかに増加した。土壌に存在する低温性菌の増殖を反映しているものと考えられた。したがって、動物糞便抽出菌液と土壌抽出菌液を接種試験に使用する場合、菌液作製後7日以内に実施するのが適切であると考えられた。

TEMPOによる菌数測定法と培養法による菌数測定法をウシおよびブタ糞便抽出菌液を用いて比較した。生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数のいずれの場合でも、 R^2 値は0.964-0.986の範囲を示し、TEMPOと寒天平板培養法で測定した菌数には高い相関性があることがわかった。

DOXによるウシおよびブタ糞便抽出菌液中の生菌数と大腸菌群数の検出可能な時間は、いずれの菌群でも、10-100 cfu/mlで

は10時間前後であったが、菌数が 10^3 cfu/ml オーダーとなる6-8時間で測定可能であった。また菌数と電流値が閾値に達するまでの時間(測定時間)との間には高い相関性が認められた。

以上の結果から、TEMPOおよびDOXともに、種々の汚染指標菌などが混在する各種動物糞便や土壌抽出液でも、従来法と高い相関性をもって確実に対象とする汚染指標菌数を測定できることが明らかになった。これに加えて、両法ともに試料の10倍階段希釈、寒天培地による混釈や重層、発生集落のカウントと計算というステップがないので、単に測定時間の短縮のみならず、検査員の技能差などにかかわる人為的な測定誤差の解消も期待できる。さらに、検査結果は自動的にデータベースに保存され、添付ソフトにより報告書を自動作成できるので、試験・検査全体のトレーサビリティも確保でき、検査の結果を報告書に転記する必要もない。このため、二重三重のチェックによっても、避けることができない成績の転記ミスの原因とするトラブルを防止することができる利点もある。

迅速・簡便試験法という観点から、培地や希釈液の作製・保存というような試験の準備作業の軽減化や、大量の培地類とプラスチック製品などの廃棄物量の削減という環境保護やコスト面においても大きな利点があると考えられる。

E. 結論

1. 動物糞便および土壌抽出菌液中の汚染指標菌の菌数は4℃で保存した場合、7日以内であれば、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数ともに各菌数の差は1.0 log以内であった。来年度実施予

定の食品への添加試験に使用可能であるという結果を得た。

2. TEMPO による生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数の菌数測定の結果、従来の寒天培地培養法と高い相関関係が認められた。DOX で測定した生菌数と大腸菌群数電流値が閾値に達するまでの時間（測定時間）と、従来の寒天培地培養法との間には高い相関関係が認められた。
3. デソキシコレート寒天で測定した大腸菌群数は、VRBA や XM-G 寒天で測定した菌数よりも低くなる傾向を示した。
4. 動物糞便抽出菌液では、塗抹法で測定した菌数は混釈法で測定した菌数よりも若干高くなる傾向にあったが、各汚染指標菌の菌数の差は 1.0 log を超えることはなかった。
5. 土壌抽出菌液中の生菌数は塗抹法と混釈法との間で菌数に差は認められなかった。しかし、大腸菌群数と腸内細菌科菌群数では、塗抹法に比べて混釈法の菌数が低く計測される傾向にあった。この傾向は、デソキシコレート寒天で測定した大腸菌群および、VRBG 培地で測定した腸内細菌科菌群で顕著であり、混釈法で測定した菌数は塗抹法よりもそれぞれ 1.8 log、1.1 log 低かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

- 1) 厚生労働省生活衛生局（2006）食品衛生小六法、平成 18 年度版、新日本法規、東京
- 2) 厚生労働省監修（2004）食品衛生検査指針微生物編、日本食品衛協会、東京

H. 研究発表

論文発表

- 1) 浅尾 努（2007）食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法（2）大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌、日本防菌防黴学会誌、35：401-410.
- 2) 浅尾 努、河合高生、久米田裕子、寺本忠司、石黒 厚、梅迫誠一、小笠原 準、高須一重、美野朋隆、日野亮一、齋藤利江、小崎俊司、山本茂貴（2007）食品の細菌学的試験法の現状と問題点（日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告）日本食品微生物学雑誌、24：134-143.

表 1. 動物糞便および土

	ウシ		ブタ		ニワトリ		ウマ		土壌	
	塗抹法	混釈法	塗抹法	混釈法	塗抹法	混釈法	塗抹法	混釈法	塗抹法	混釈法
生菌数	3.5x10 ⁶	5.1x10 ⁶	8.8x10 ⁷	1.2x10 ⁸	4.2x10 ⁶	7.0x10 ⁶	9.6x10 ⁶	2.2x10 ⁹	6.0x10 ⁶	5.5x10 ⁶
大腸菌群(デソキシコレート寒天)	3.9x10 ⁷	1.4x10 ⁷	7.1x10 ⁶	3.6x10 ⁶	8.5x10 ⁵	4.8x10 ⁵	7.3x10 ⁶	5.3x10 ⁶	6.4x10 ⁴	1.0x10 ³
大腸菌群(VRBA)	6.7x10 ⁷	1.9x10 ⁷	9.9x10 ⁶	4.8x10 ⁶	1.3x10 ⁶	5.8x10 ⁵	1.2x10 ⁷	8.8x10 ⁶	7.9x10 ⁴	1.4x10 ⁴
大腸菌群(XM-G寒天)	6.1x10 ⁷	8.4x10 ⁷	8.8x10 ⁶	7.2x10 ⁶	1.3x10 ⁶	1.5x10 ⁶	1.0x10 ⁷	1.1x10 ⁷	1.2x10 ⁵	1.2x10 ⁴
腸内細菌科菌群(VRBG)	6.3x10 ⁷	2.0x10 ⁷	9.5x10 ⁶	4.9x10 ⁶	8.5x10 ⁵	6.1x10 ⁵	1.1x10 ⁷	6.7x10 ⁶	1.1x10 ⁵	8.0x10 ³
大腸菌(XM-G寒天)	6.1x10 ⁷	8.4x10 ⁷	8.6x10 ⁶	7.2x10 ⁶	1.3x10 ⁶	1.5x10 ⁶	9.0x10 ⁶	9.8x10 ⁶	<10 ³	<10 ³

壤の汚染指標菌の菌数(cfu/g)

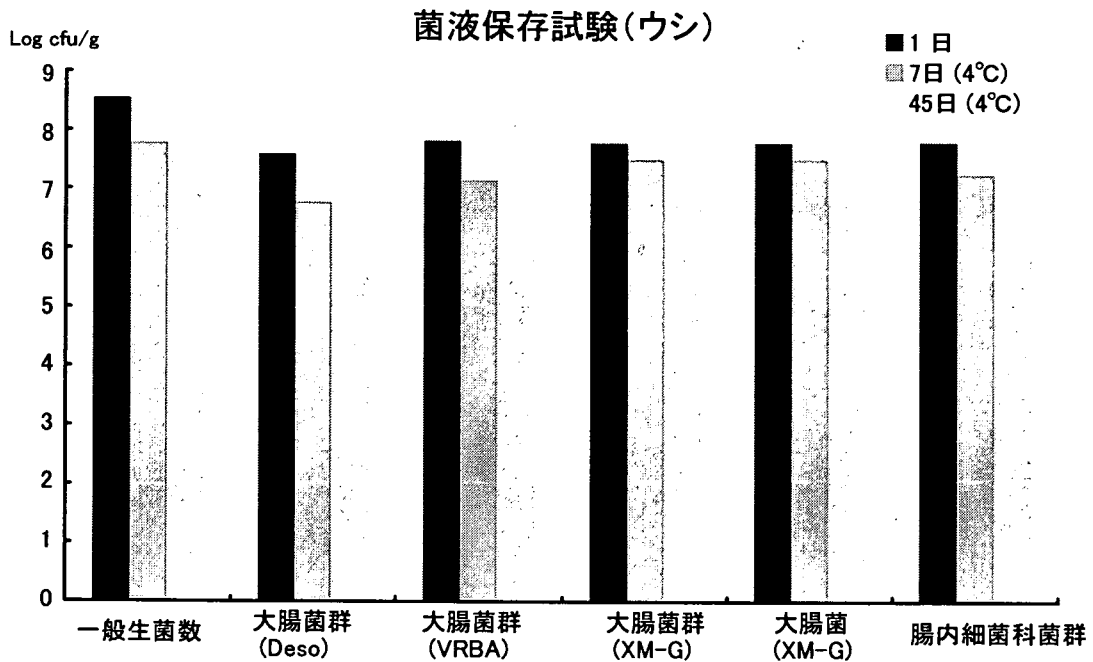


図 1A 4°Cで保存したウシ糞便抽出菌の菌数の推移

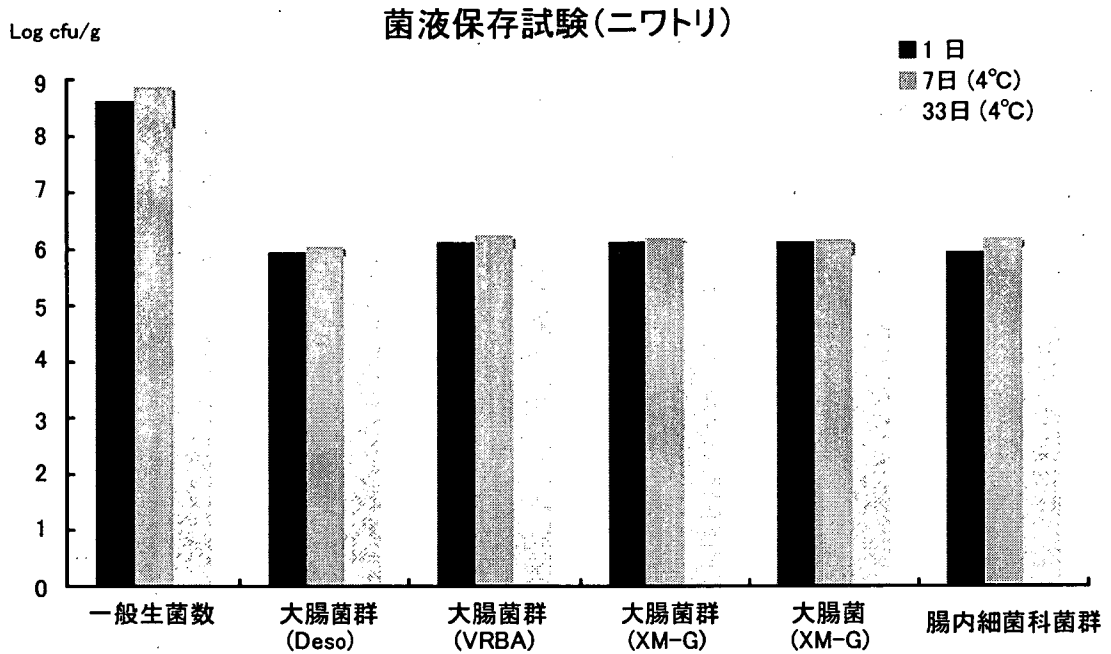


図 1B 4°Cで保存したニワトリ糞便抽出菌の菌数の推移

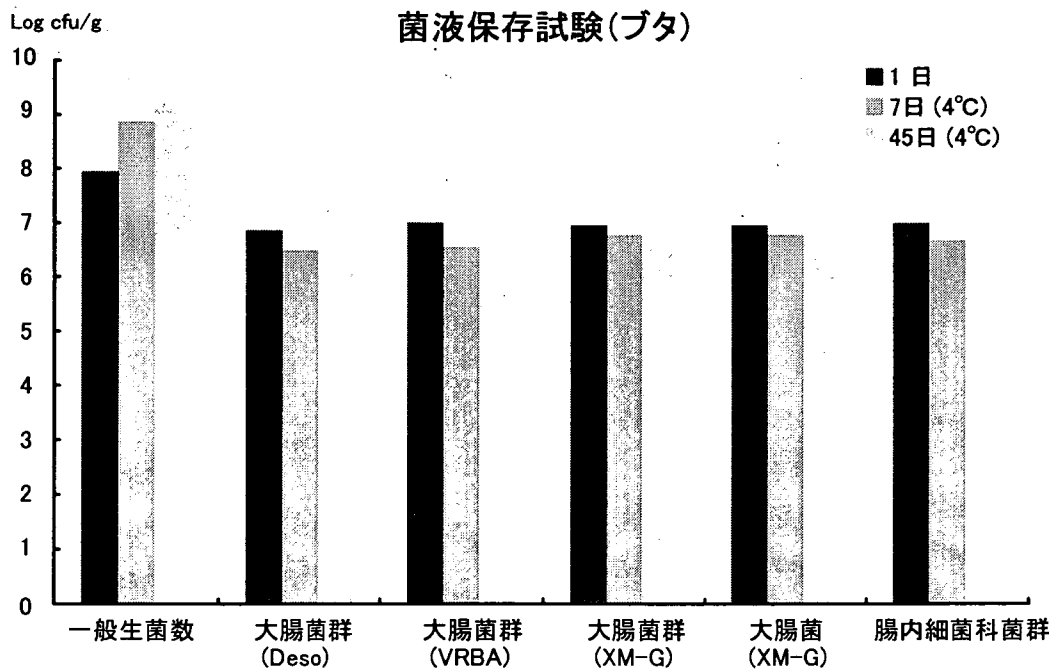


図 1C 4°Cで保存したブタ糞便抽出菌の菌数の推移

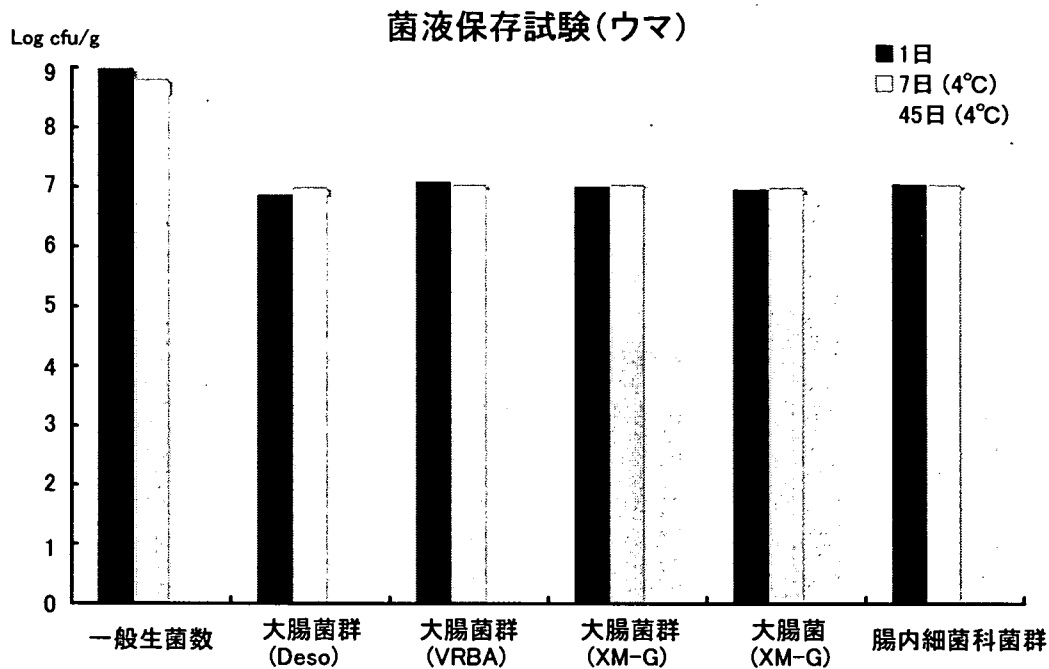


図 1D 4°Cで保存したウマ糞便抽出菌の菌数の推移

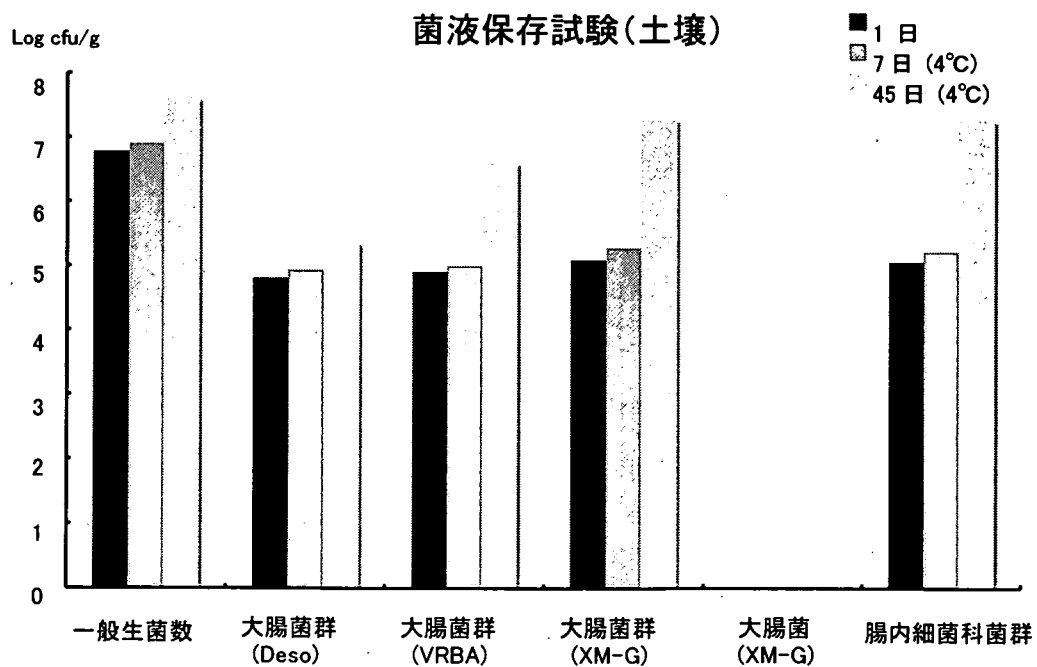


図 1E 4°Cで保存した土壌抽出菌の菌数の推移

生菌数(ウシ糞便菌液)

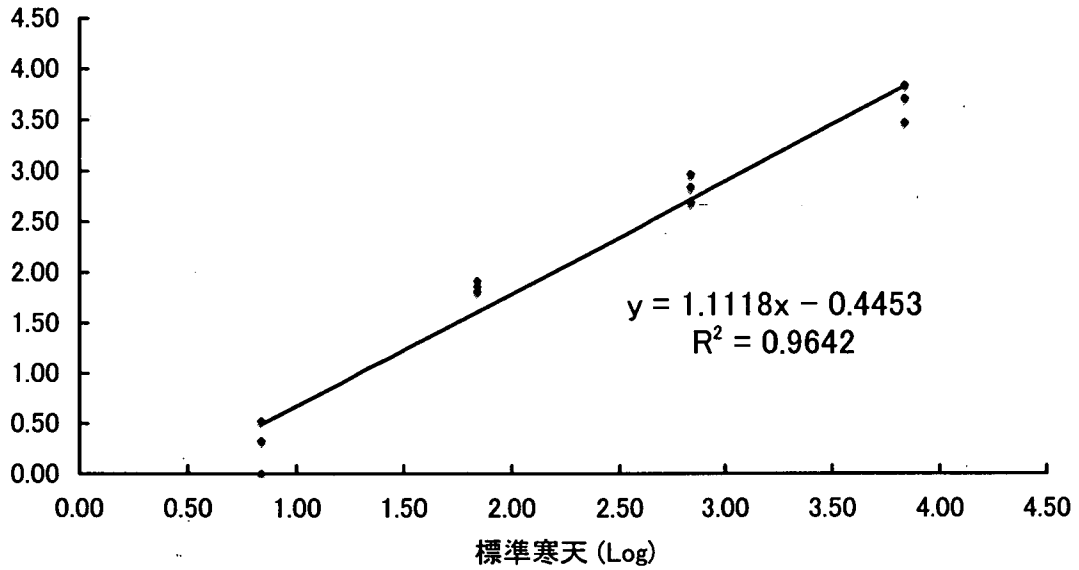


図 2A ウシ糞便中の一般生菌を TEMPO と寒天培養法で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ウシ糞便菌液)

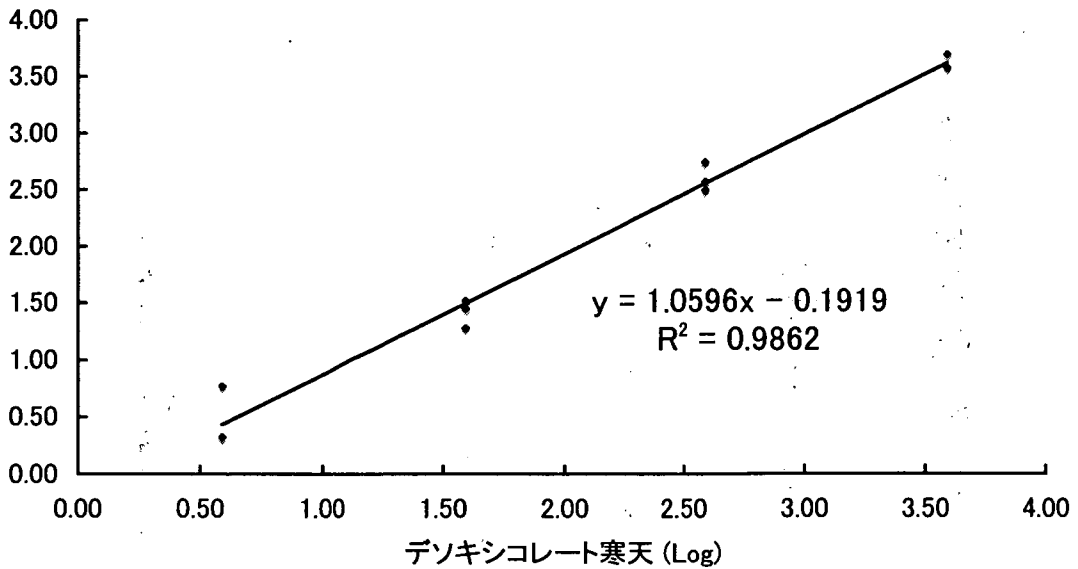


図 2B ウシ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法(デソキシコレート)で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ウシ糞便菌液)

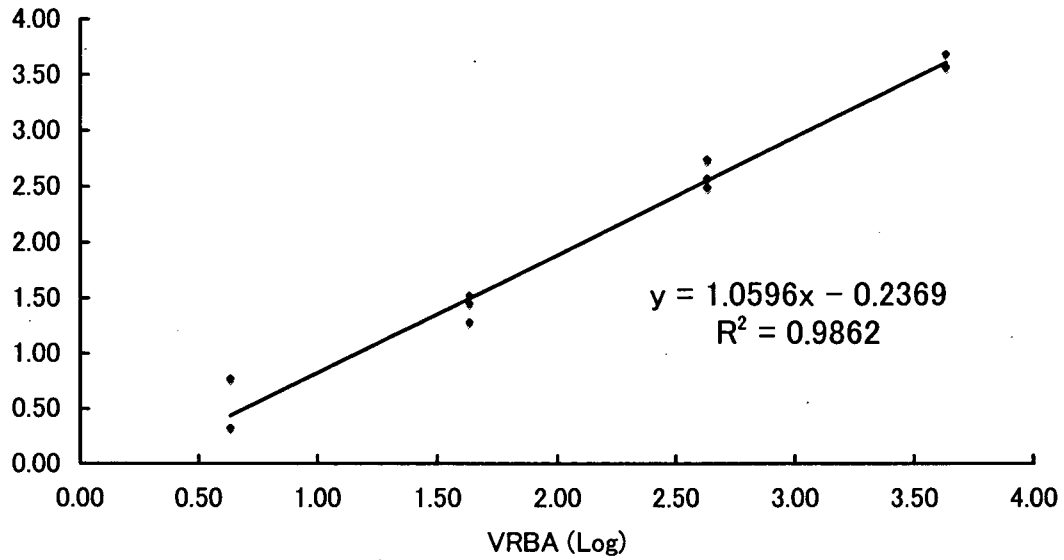


図 2C ウシ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法(VRBA)で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ウシ糞便菌液)

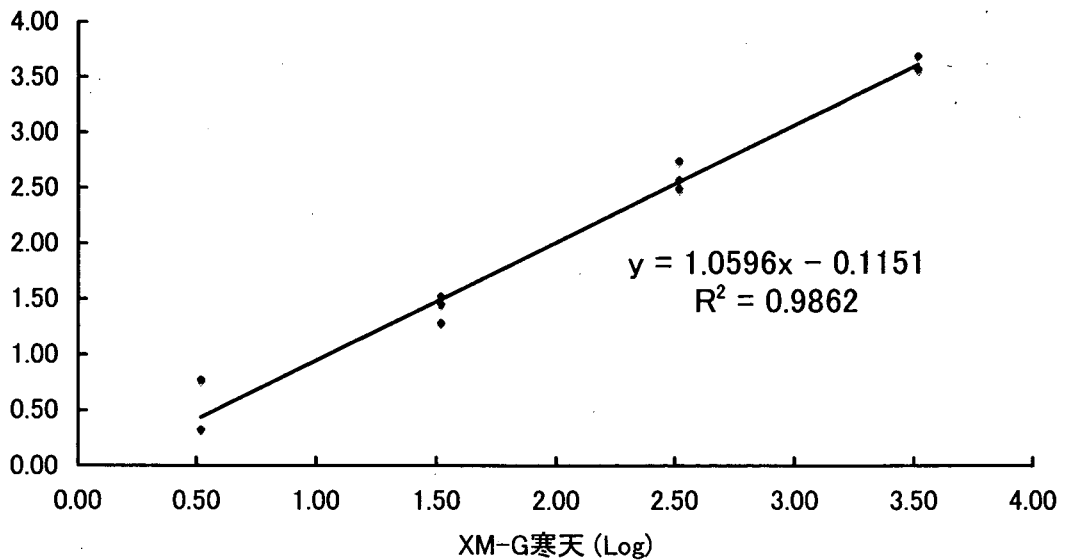


図 2D ウシ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法 (XM-G) で測定した菌数の相関性

大腸菌数(ウシ糞便菌液)

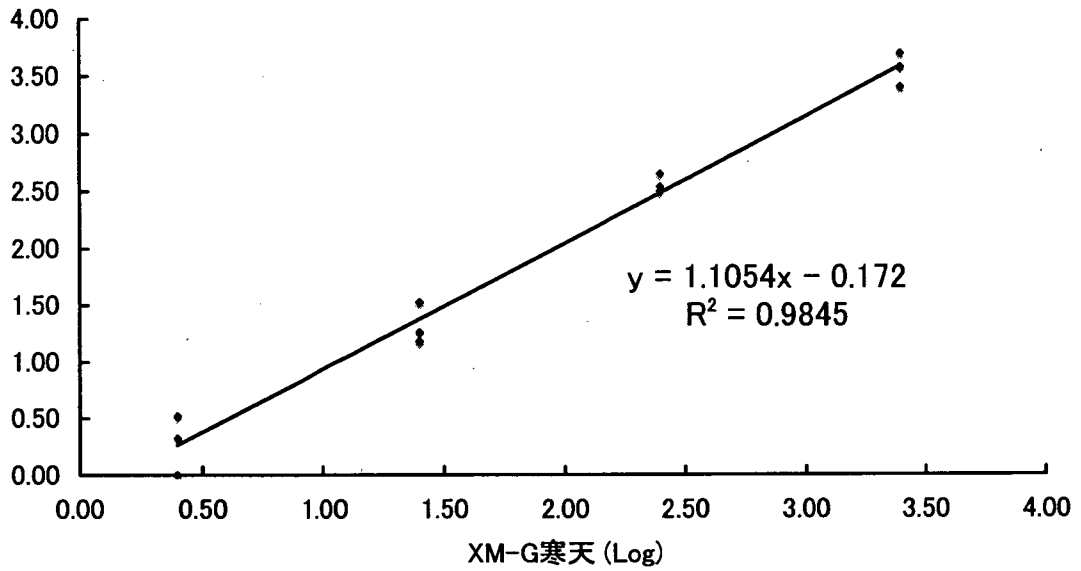


図 2E ウシ糞便中の大腸菌を TEMPO と寒天培養法 (XM-G) で測定した菌数の相関性

腸内細菌科菌群数(ウシ糞便菌液)

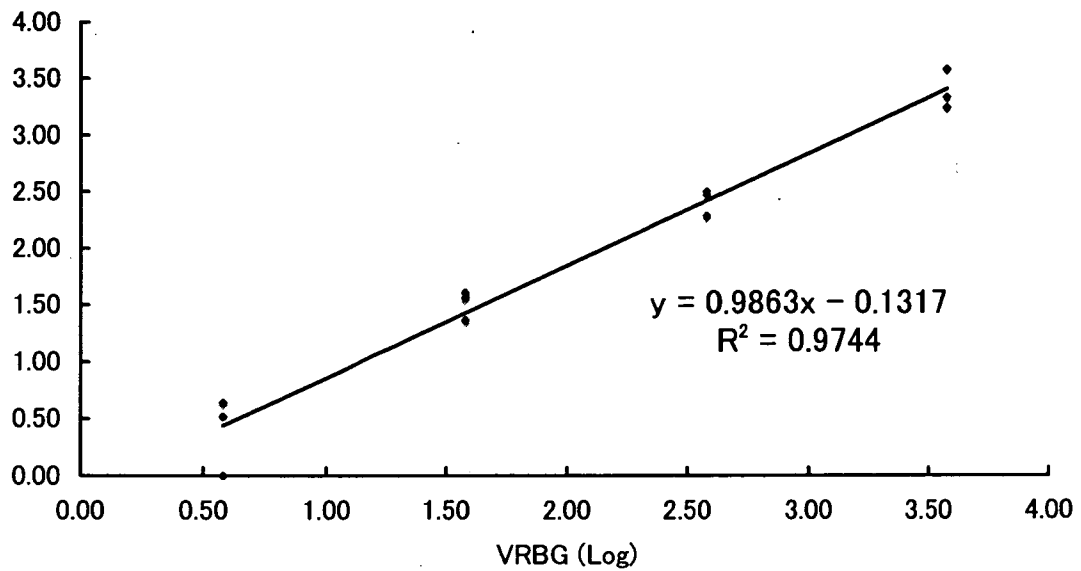


図 2F ウシ糞便中の腸内細菌科菌群を TEMPO と寒天培養法で測定した菌数の相関性

生菌数(ブタ糞便菌液)

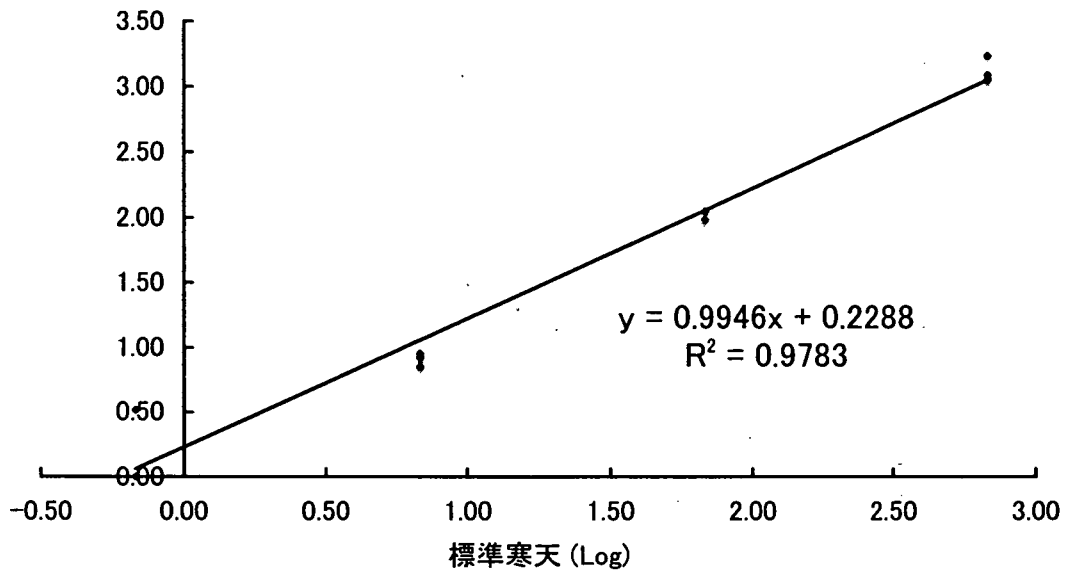


図 3A ブタ糞便中の一般生菌を TEMPO と寒天培養法で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ブタ糞便菌液)

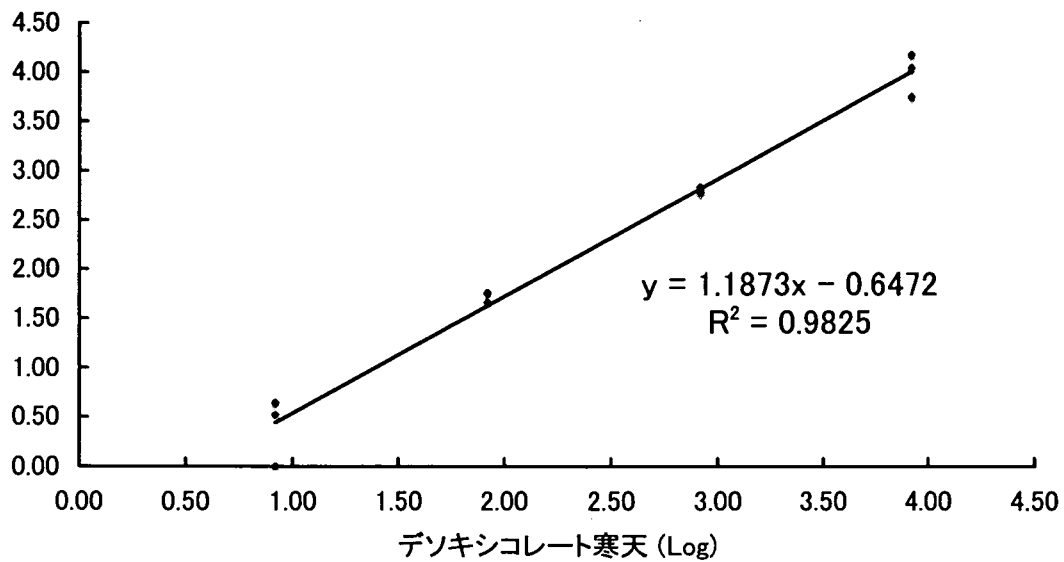


図 3B ブタ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法 (デソキシコレート) で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ブタ糞便菌液)

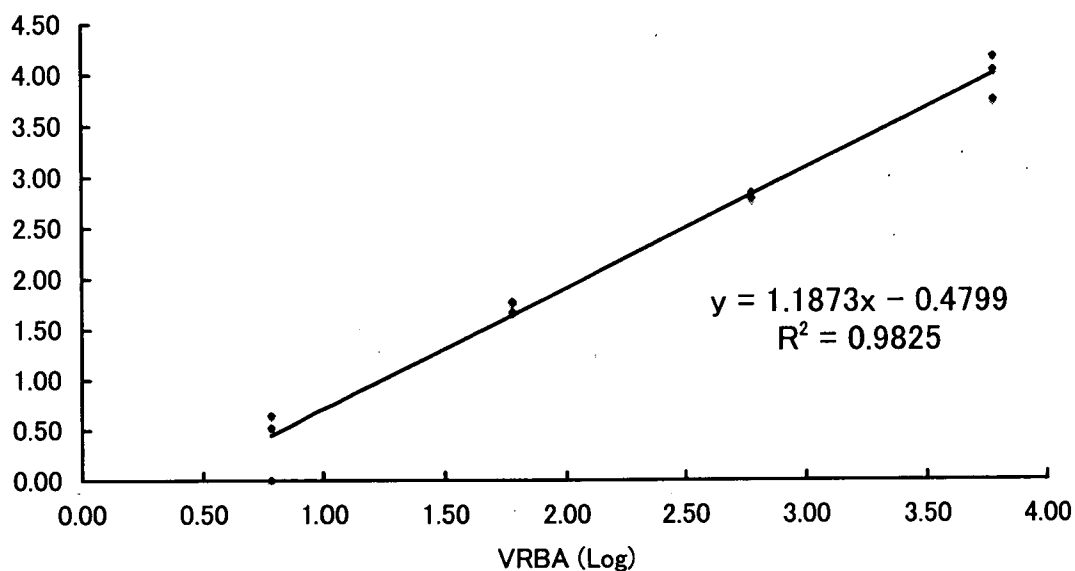


図 3C ブタ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

大腸菌数(ブタ糞便菌液)

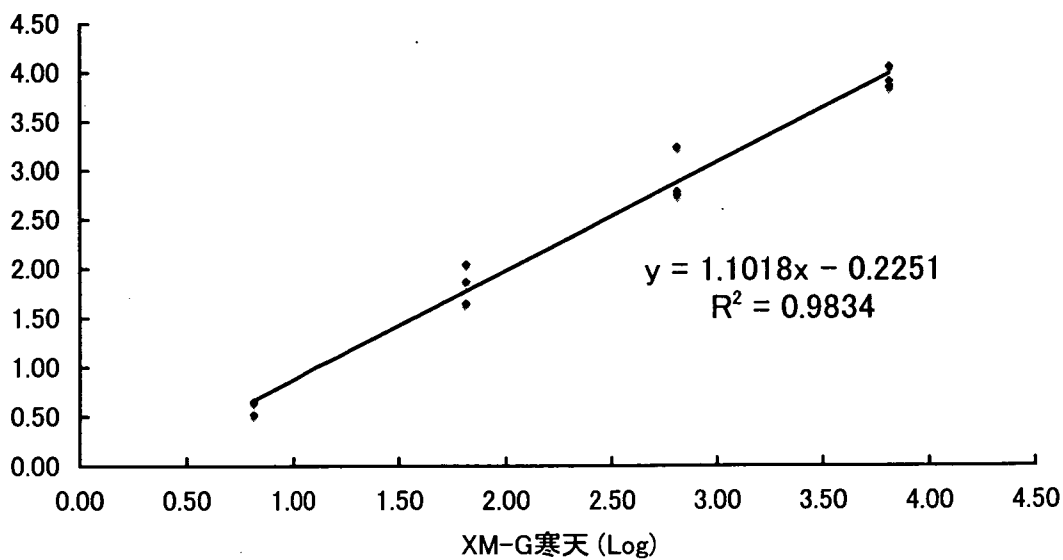


図 3D ブタ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法 (XM-G) で測定した菌数の相関性

大腸菌群数(ブタ糞便菌液)

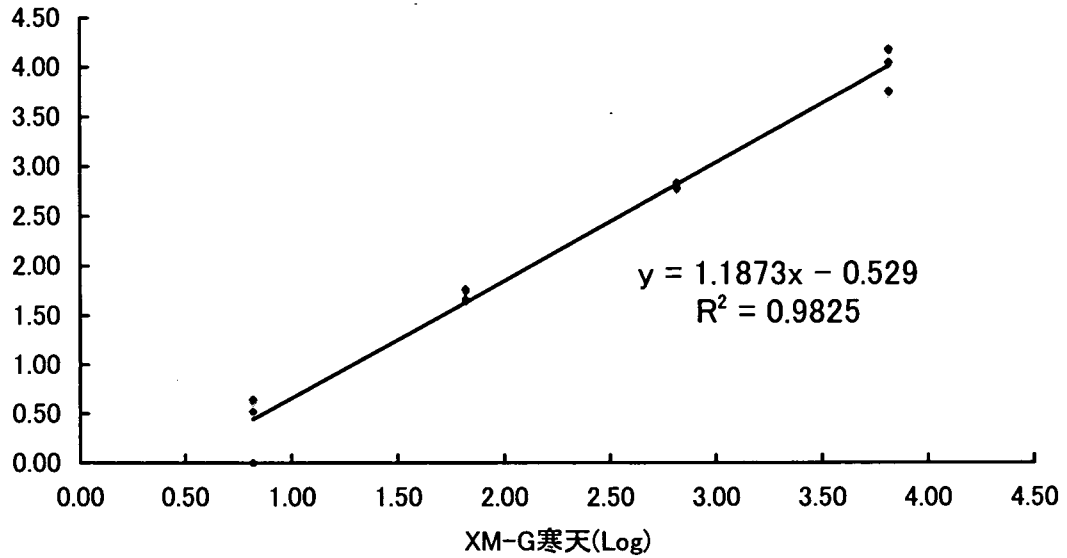


図 3E ブタ糞便中の大腸菌群を TEMPO と寒天培養法 (XM-G) で測定した菌数の相関性

腸内細菌科菌群数(ブタ糞便菌液)

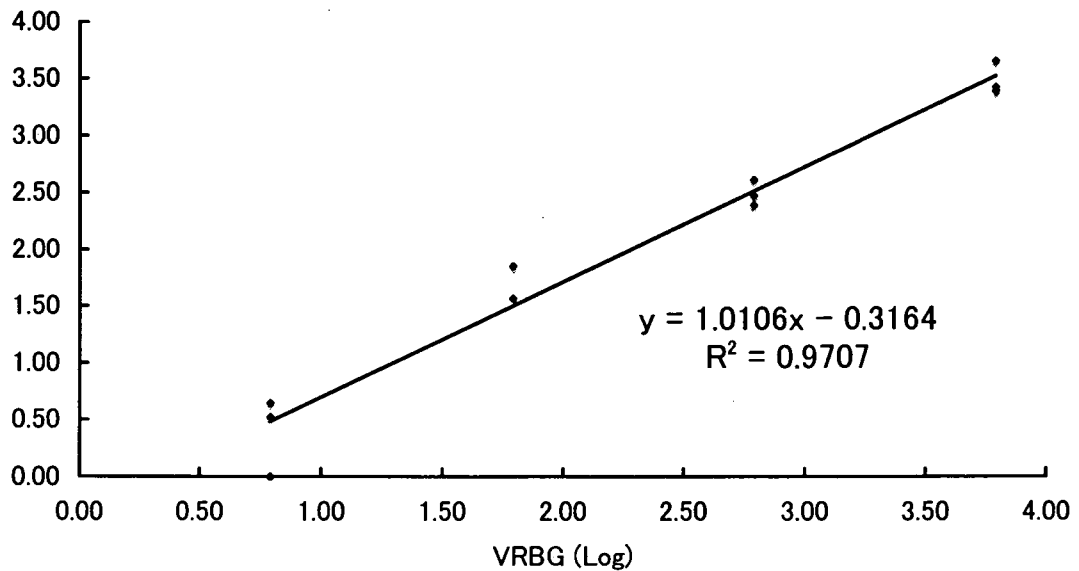
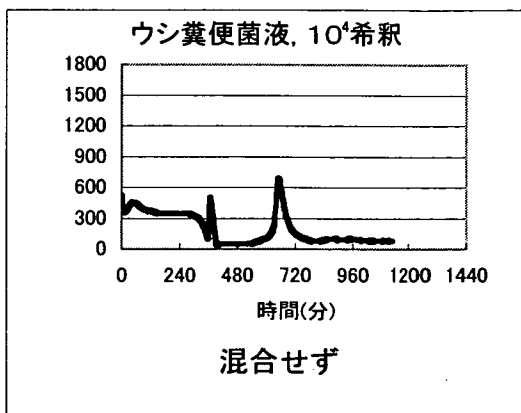
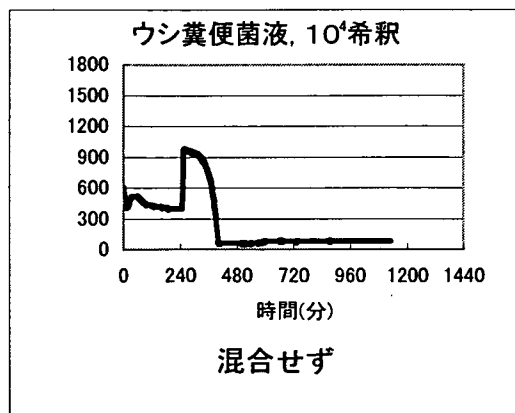


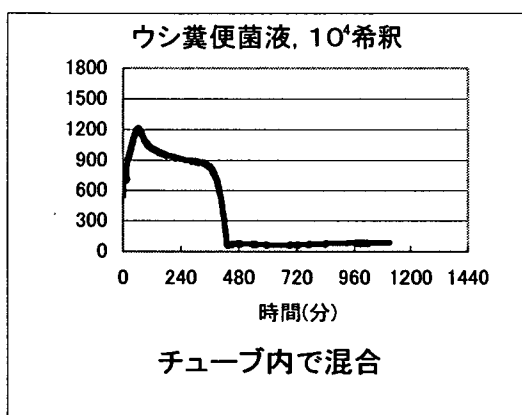
図 3F ブタ糞便中の腸内細菌科菌群を TEMPO と寒天培養法 (VRBG) で測定した菌数の相関性



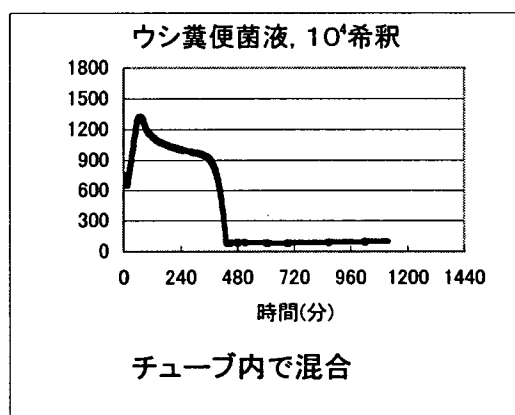
A



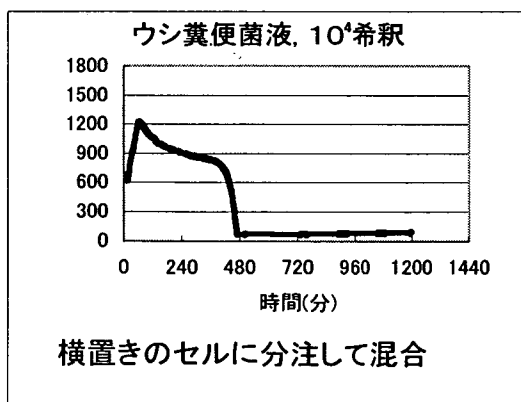
B



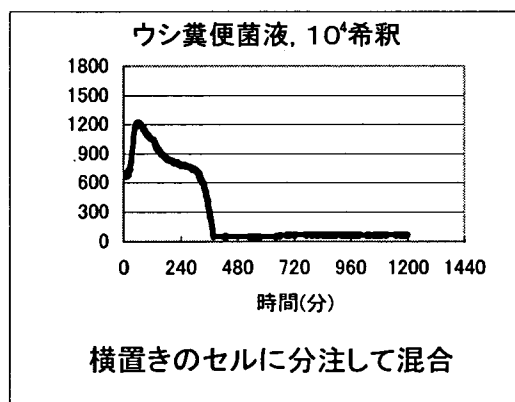
C



D

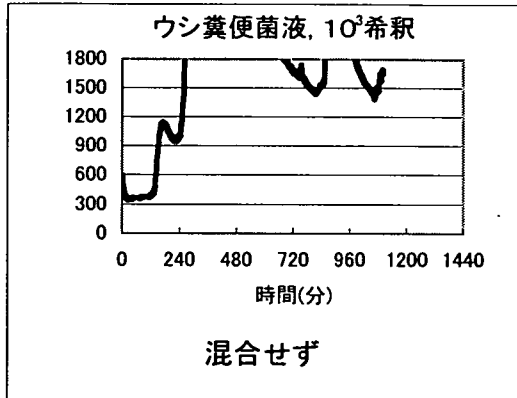


E

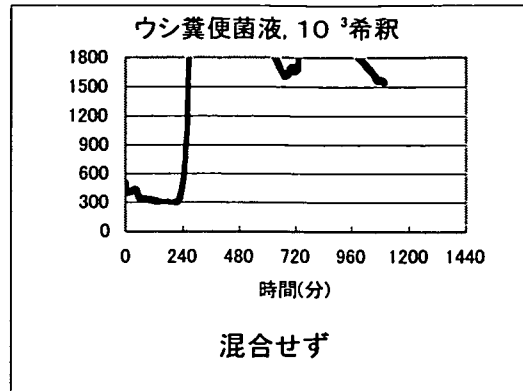


F

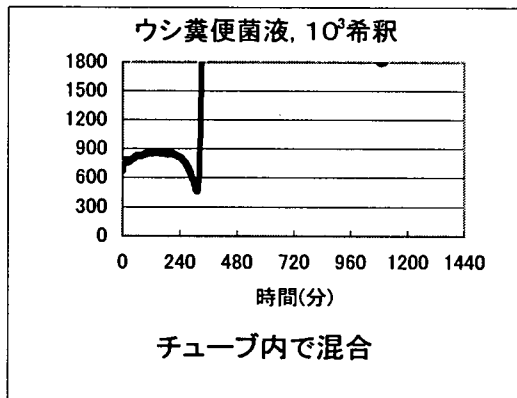
図4 ウシ糞便抽出菌液中の生菌数をDOXで測定する際の培地と試料の混合条件の違いによる電流値の波形



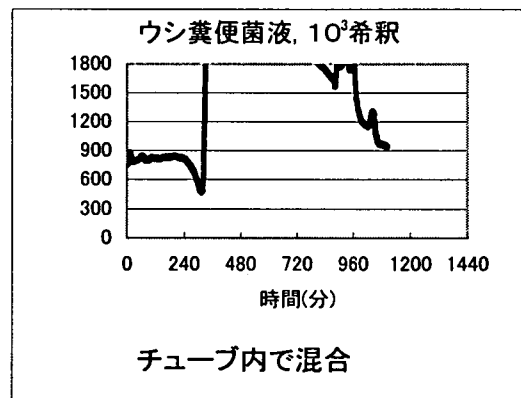
A



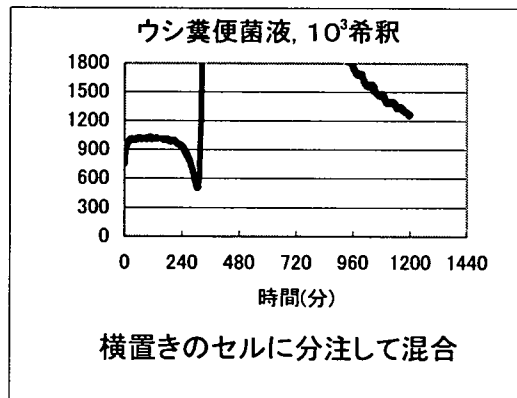
B



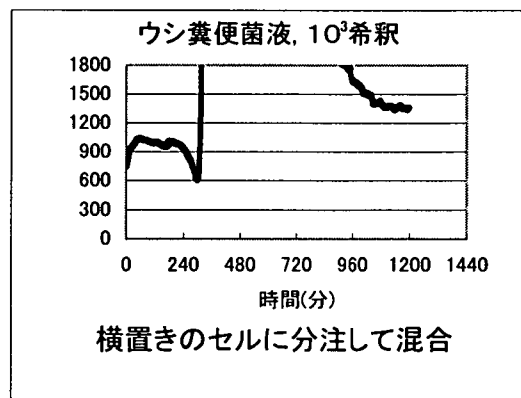
C



D



E



F

図5 ウシ糞便抽出菌液中の大腸菌群数を DOX で測定する際の培地と試料の混合条件の違いによる電流値の波形