

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

令和6年度 分担研究報告書

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者： 泉山信司 国立感染症研究所

薬湯の循環ろ過器をオゾンで逆洗浄する試み

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター

研究協力者： 井上 浩章 アクアス株式会社

研究協力者： 木村 哲也 株式会社ヤマト

研究協力者： 小森 正人 株式会社ヤマト

研究協力者： 小田 康雅 シスマックス株式会社

研究協力者： 下田 貴宗 株式会社シモダアメニティサービス

研究協力者： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

オゾンは遊離塩素消毒より強い殺菌効果があるが、気相のオゾンは毒性があつて管理が容易ではないのでこれを避けて、気相にオゾンが漏れにくい、水の電気分解による電解オゾン水をろ過器消毒に応用することを試みた。浴槽水からはレジオネラ属菌が検出されないが、ろ過器排水からは検出される潜在的な汚染のある循環式浴槽のろ過器に対して、逆洗浄時に電解オゾン水を注入した。このろ過器は、薬湯を遊離塩素消毒する循環式浴槽に付随するもので、日常のろ過器の逆洗浄や定期的な化学的洗浄が徹底されてはいたが、レジオネラ属菌問題が生じやすい状況にあった。当初はろ過器に電解オゾン水を注入しても、逆洗浄水から微量ながらレジオネラ属菌の消長が繰り返された。ろ過器内水の排水後に電解オゾン水を注入しても、改善されなかった。消毒の開始から8か月経過後にろ材交換したところ、廃ろ材からレジオネラ属菌とその遺伝子は何も検出されず、電解オゾン水の効果があったと考えられた。しかしながら、電解オゾン水供給後も微量のレジオネラ属菌が検出されていたため、精査したところ、その原因は越流水の排水溝上蓋の高度のレジオネラ属菌汚染であった（詳細は令和5年度総括分担報告書に記載）。今回、汚染源を排除した前後で各種指標を比較したところ、ATP量、フローサイトメトリーによる細菌数および従属栄養細菌数の平均値に差はなかったが、レジオネラ属菌の培養検査（平板培養法とレジオラート）、レジオネラ属菌生菌遺伝子、レジオネラ属菌全遺伝子（以上 $P<0.01$ ）および残留塩素濃度に差が認められた（ $P<0.05$ ）。対処後の清浄な状態はその後に約1年間継続しており、雑菌の汚染が若干あっても、レジオネラ属菌は抑制できていた。ろ材の清浄化とその維持は電解オゾン水によるものと考えられた。

A. 研究目的

入浴施設の衛生上の問題の一つに、レジオネラ属菌があり、これを保護して消毒等から回避させる生物膜への対策が重要となる¹⁾。生物膜の発生が強く懸念される循環式浴槽の

ろ過器では、汚れや生物膜の除去に、通常のろ過とは逆方向に水を送る、逆洗浄作業が行われる²⁾。これまで逆洗浄時に、強い酸化力が期待できる電解オゾン水を注入することで、生物膜を剥離し強く消毒する方法の有効性を報

告してきた³⁾。本研究ではさらなる事例の追加になる試験を実施した。

適用した循環系統は、過去のフローサイトメトリー法による調査で継続的に高い細菌数が確認されており、薬湯系統の回収槽水や逆洗水の消毒効果が十分でないと見られた⁴⁾。よって、当該系統には塩素より強い殺菌力が期待できる電解オゾン水を適用して消毒を強化することとした。

今回はレジオネラ属菌対策に苦慮している薬湯への、約2年間にわたる長期の試験を実施したので報告する。調査に非培養の検査法を活用し⁴⁾、レジオネラ属菌の増減を追うだけでなく生物膜と密に関係すると思われる細菌数やATPといった汚染指標と並行して比較検証することで電解オゾン水の抗レジオネラ属菌作用をこれまでと異なる視点で考察した。

B. 材料と方法

1. 施設の衛生管理の状況と調査の推移

1日の入浴者数が千人規模の営業施設の協力を得て試験を実施した。施設では、温泉（塩化物泉）と井水を利用しておらず、次亜塩素酸ナトリウムにより消毒されていた。温泉には除鉄・除マンガン処理もなされていた。それぞれの循環系統に回収槽があり、週1回の清掃・消毒が行われていた。生物膜対策として、週1回の頻度で20 mg/L×1時間の高濃度塩素による洗浄と、年3回の配管の化学的洗浄が行われていた。なお、当該浴槽水は毎日換水されている。

今回、電解オゾン水発生装置を設置したのは薬湯で、井水に入浴剤や生薬などを入れていた。そのろ過器は単独の循環系統でその大きさは約100L、浴槽水の水量は約3m³であった。試験前の消毒は、次亜塩素酸ナトリウムにより残留塩素濃度1.0～2.0 mg/Lと高めに管理されていたが、回収槽の存在や薬湯の影響により、ろ過器内の強い汚染が懸念された。

また、電解オゾン水は反応性が高い分だけ不安定で水温の高い浴槽水では長時間には維

持されないこと、浴槽水中の電解オゾン水濃度を維持するには水の電気分解では不足で空気中の放電が必要になること、気相のオゾンガスは毒性が高く安全の確保が困難であること、気相のオゾンガスを水に溶解させる効率が低く廃オゾン処理が必要になり複雑さが相当に増すこと、電解オゾン水と塩素消毒は打ち消し合って共存できないこと、等があり、本研究ではろ過器の消毒に限って電解オゾン水を使用した。

ろ過器を電解オゾン水で逆洗浄する処理の概要は、以下の通りである。まず、電気分解によりオゾンを発生させる装置を使用した³⁾。簡単に記載すると、毎日のろ過器逆洗前に、ろ過槽の有効容量分（ろ材充填量）以上の電解オゾン水を自動注入する単純なシステムである。オゾン生成電極外観、電気分解時の状況およびオゾン生成電極は既報のとおりである⁴⁾。

本報告では、機器を設置する1ヶ月前の2022年9月24日から、2024年9月29日の2年間に実施した結果を記載する。10月に装置を施設に設置し、11月8日から電解オゾン水注入（流量10 L/min、電解オゾン水約1.2～1.8 ppm、注入時間20分（200 L））を開始した。月～土曜日の営業終了後、ろ過器の逆洗浄時に、毎日電解オゾン水注入を実施し、毎週日曜日に高濃度塩素洗浄を行い、電解オゾン水処理をしないため、採水は、土曜日夜の逆洗浄時に行なった。浴槽水は逆洗浄後に毎日換水されており、採水時は営業終了後の有機物等が最も蓄積した状態と推定されるため電解オゾン水の効果が最も期待される。

電解オゾン水処理の開始後3ヶ月経過すると、排水からレジオネラ属菌が検出されて効果が認められにくくなつた。そこで電解オゾン水の消毒効果がより強く発揮されることを期待して、ろ過槽内水を一旦排水した後から電解オゾン水を注入する方式に変更した（以降排水オゾン処理という）。排水オゾン処理は2023年2月17日以降、日曜日以外毎日行なうようにした。なお、電解オゾン水注入開始から

オゾン効果が十分に期待できる排水オゾン処理までの期間を試運転期間とした。

その後も微量のレジオネラ属菌が検出される傾向は変わらなかったために、電解オゾン水処理開始後 8か月後（2023年6月22日）にろ材を交換した。それでもレジオネラ属菌が検出され、レジオネラ属菌汚染源を究明して改善に至った経緯は既に報告したとおりである⁵⁾。即ち、電解オゾン水開始から約10ヶ月後（2023年8月5日）にレジオネラ汚染源が循環排水溝上蓋にあることを発見し、当該部の消毒洗浄処理を開始し、2024年9月29日まで続けた。

逆洗浄水の採水は、調査全般にわたって月1～2回の頻度で実施したが、浴槽水の安全性を確認するために、2023年11月～2024年5月の間は逆洗浄水と同時に浴槽水を調査した。

詳細な採水の操作は、次のとおり実施した。即ち、逆洗浄前に予め検水の遊離塩素濃度を測定し、ろ過器内水を排水した。電解オゾン水発生装置を稼働させたら、半自動的に逆洗浄を開始して、逆洗浄中の電解オゾン水濃度を測定した。20分間の電解オゾン水処理後に、逆洗浄水を採水した。浴槽水を詳細に検査する場合、当日19:00の遊離塩素濃度測定と同時に検水を採取した。採水した検水は冷蔵で実験室に運び入れ、非培養検査（ATP法、FCM法と生菌遺伝子検査）と培養検査（平板培養法とレジオラート）を実施した。これらの検査は48時間以内に行なったが、レジオネラ全遺伝子の検査については検水の100倍濃縮物を冷凍保管しておき、概ね1か月以内に纏めて実施した。調査の途上で交換したろ材を用いてレジオネラ属菌の検査を実施した。300gのろ材に300mLの滅菌蒸留水を加えてよく混釀した上清を100倍濃縮して各種検査に供試した。

2. 調査で用いた検査法

2.1. 遊離塩素濃度と電解オゾン水濃度の測定

検水の遊離塩素濃度はDPD（N,N-diethyl-p-phenylenediamine, Hach）法を用いて測定し

た。オゾン濃度はデジタル比色計（O3-3F, 笠原理化工業）により計測した。

2.2. ATP法

ルミテスターPD-30（キッコーマンバイオケミファ）とATPふき取り検査システム（ルシパックA3 Water（液体測定用），キッコーマンバイオケミファ）を用いて、添付の取扱説明書⁶⁾に従って処理した。

2.3. FCM法

フローサイトメーター（RF-500、Sysmex社製）を使用し、田栗らの方法⁷⁾に準拠して設定した測定領域（Gate）を用いて、各種浴用水に含まれる雑菌の量を測定した。Gate内の菌数が暫定的な基準値（200 cells/mL, 以降基準値という）未満であった場合は「消毒効果有り」と判定し、基準値以上の場合は「消毒効果不十分」と判定した。

2.4. レジオネラ属菌遺伝子検査法

レジオネラ属菌遺伝子検査は磯部ら⁸⁾の方法に準拠した。逆洗浄水を対象とし、浴槽水からの濃縮およびDNA抽出法と同様に処理した。レジオネラ属菌全遺伝子を定量するqPCR法は、Lysis Buffer for Legionella（タカラバイオ）およびCycleave PCR Legionella（16S rRNA）Detection Kit（タカラバイオ）を用いた⁹⁾。レジオネラ属菌生菌遺伝子を検出するEMA-qPCR法は、DNA抽出の前に、Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）およびLED Crosslinker 12（タカラバイオ）を用いて、EMA処理を実施した。得られた遺伝子コピー数をCFU相当に換算した。EMA-qPCRとqPCRのCFU換算値をそれぞれ生菌遺伝子量（CFU-equivalent unit: CFU-eU/100mL）と全遺伝子量（CFU-eU/100mL）とした。本検査法の検出限界は1CFU-eU/100mLである。

2.5. レジオネラ属菌の培養法

レジオネラ属菌の培養検査は森本らの方法¹⁰⁾でろ過濃縮法により行った。培地はGVPCα培地（ビオメリュー）を使用し、100倍濃縮

した検水を、酸処理か熱処理の後、塗抹して36°Cで3~7日間培養した。システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。レジオラート(アイデックス)は淀谷らの報告¹¹⁾に準拠して、10mLの検水に適量の前処理剤(アイデックス)を加えて10分間反応、水酸化カリウムにより反応停止後に、37°Cで7日間培養した。

2.6. 従属栄養細菌数

2023年2月以降、従属栄養細菌数の検査を追加した。これは電解オゾン水による消毒が認められるようになってから細菌汚染とレジオネラ汚染の相関が認められなくなったため、細菌汚染検証の必要が生じた。方法はR2A寒天培地(塗抹法)を用いて30°Cで7日間培養した。

2.7. 統計処理

ろ過器外のレジオネラ属菌の汚染源の発見前後で集計した2つのグループを比較するために、スチューデントのt検定を使用した。差は、有意水準0.05および0.01の両側検定で確保した。値は、汚染源発見前が31回、発見後が16回の独立した調査の平均±SDで示した。各検査法において不検出の場合は値を0として統計処理に供した。

C. 結果および考察

電気分解式の電解オゾン水生成装置(ヤマト)を、入浴施設の薬湯に適用した。装置設置前を含む、約2年間、薬湯の逆洗浄水を採水して、各種試験を実施した。

逆洗浄水への電解オゾン水注入後1ヶ月間のレジオネラ属菌は、処理前と比べて抑制される傾向を示したが、2ヶ月ほどたつと効きづらくなった(図1)。

2023年2月17日以降排水オゾン処理により電解オゾン水処理を強化したところ、一定の抑制は認められたが、低濃度とは言え散発的にレジオネラ属菌の生菌が検出され、一過性に高い濃度のレジオネラ属菌遺伝子が検出された。その後も、微量とはいえ逆洗浄水か

ら、レジオネラ属菌の検出が続いた。ろ過器のろ材は長期に使用して交換されていなかったことから、2023年6月にろ材を交換し、廃ろ材を検体としてレジオネラ属菌を検査したところ、廃ろ材からはレジオネラ属菌の生菌も遺伝子も全く検出されなかつたため、ろ材がレジオネラ属菌の汚染源であると考えにくかった。これら循環ろ過系統以外のレジオネラ属菌汚染源の発見と対応の詳細については既報のとおり、レジオネラ属菌汚染源が循環排水溝上蓋にあることを発見し、当該部の消毒洗浄処理を開始してからはレジオネラ属菌は検出されなくなった⁵⁾。

レジオネラ汚染源発見前の5か月間と発見後の1年2ヶ月間にについて、各種測定値の平均値を比較した(表1)。このとき、レジオネラ属菌の培養検査で不検出の値は欠損値とせずに0として計算した。ATP法、FCM法による細菌数はあまり変化が認められなかつた。細菌数が高かつたために検査を追加した従属栄養細菌数でも倍半分以上の差にはならなかつた。

レジオネラ属菌の平板培養法では、電解オゾン水供給前の7.50±10.35CFU/100mLから、電解オゾン水供給後に10.50±12.12CFU/100mLと少し上昇し、排水オゾン処理を始めると5.00±5.77CFU/100mLと減少したが、レジオネラ属菌汚染源の改善後は不検出となつた。レジオラートも類似の傾向を示した。レジオネラ属菌遺伝子検査の生菌遺伝子も、汚染源を発見後に減少した。レジオネラ属菌全遺伝子も類似の傾向を示して、汚染の発見後に減少した。

なお、採水時の遊離塩素濃度と、電解オゾン水濃度は、レジオネラ属菌汚染源の発見前後で大きな変動はなかつた。強いて、遊離塩素濃度は減少しているが、レジオネラ属菌の汚染が解消して強い消毒の必要がなくなったことが理由と考えられた。

なお、2023年11月～2024年5月の間に検査した浴槽水からは、レジオネラ属菌の培養

検査(平板培養法とレジオラート)と遺伝子検査(レジオネラ属菌生菌遺伝子および全遺伝子)において、逆洗浄水と同様に培養検査では何も検出されず、遺伝子検査でもほとんど検出されなかった(生菌遺伝子: 1.51 ± 1.08 CFU-eU/100mL, 全遺伝子: 3.19 ± 2.85 CFU-eU/100mL, N=16)。

以上のように、電解オゾン水供給の有無や排水オゾン処理による若干の変動は認められたものの、すべての指標で大きな差は認められなかつた。レジオネラ属菌汚染源の改善前と改善後の平均値を比較すると、ATP量、細菌数および従属栄養細菌数では差が認められなかつたが、レジオネラ属菌の培養検査(平板培養法とレジオラート)、レジオネラ属菌の生菌遺伝子、同全遺伝子および残留塩素濃度で差が認められた(両側t検定、SPSS ver.25.0)。

レジオネラ属菌汚染源の問題が解消後は、レジオネラ属菌の検出がほとんどなく、この状況は約1年間継続することができた。細菌汚染は持続しているにもかかわらず、レジオネラ属菌を抑制できていることになり、これはろ過器を対策できていることが背景にあると考えられた(図1)。排水オゾン処理中にはろ材を交換したが、その時に検査した使用済ろ材からはレジオネラ生菌および遺伝子は検出されなかつた。電解オゾン水のろ過器逆洗浄による清浄化作用はこれまでの報告³⁾でも認められており、電解オゾン水の消毒効果は期待通りに得られていたと考えられた。一方で、電解オゾン水供給後も微量のレジオネラ属菌汚染が続いたのは、ろ過器とは別の汚染源が理由であり、ろ過器の外にあった汚染源に電解オゾン水が通用しなかつたのは当然であった。

過去の電解オゾン水逆洗浄処理では、ATP量、一般細菌数およびFCMによる細菌数が減少していた^{3,4)}。しかしながら、今回はほとんど変化が認められなかつた(表1)。施設衛生管理者によると、レジオネラ属菌汚染源であった排水溝上蓋のATP量は、改善後の8月5

日以降もゼロになることはなく、時に $10^3\sim10^4$ RLUを示したこと(データ不掲載)。すなわち、逆洗浄水から検出された細菌は、排除しきれない生物膜由来と考えられた。浴場にとって生物膜の生成は避けられず、常時の消毒と定期的な洗浄が重要であることはまちがいない。今回の調査により、衛生管理者には設備の監視と洗浄消毒を継続して行うことの必要性を理解してもらうことができた。

このような細菌数の高さから生物膜再発が懸念されたが、ろ過器の逆洗浄水からレジオネラ属菌は検出されず、電解オゾン水消毒は機能していたと考えられた(図1)。なお、レジオネラ属菌汚染源改善前の、2023年11月～2024年5月の浴槽水からもレジオネラ属菌の生菌は検出されず、遊離塩素消毒の効果もあつたと考えられた。

D. まとめ

薬湯の循環ろ過器にオゾン逆洗浄を行った。当初、レジオネラ属菌の検出がわずかに続いたが、それはろ過器の問題ではなく、排水溝にレジオネラ属菌の汚染源によるものだった。汚染源の対策により、その後はレジオネラ不検出の状態を長期に維持できた。ろ過器内部のろ材が清浄化されて、オゾン逆洗浄の消毒効果が確認できた。一方で、回収経路の見落として少量とはいえ長期にレジオネラ検出が続き、回収経路の管理は容易ではないと考えられた。回収経路を含め、浴槽全体の生物膜管理の重要性を改めて認識した。

E. 参考文献

- 厚生労働省:循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル, p5, 2019年12月,
<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/01401965.pdf>
- 厚生労働省:公衆浴場における衛生等管理要領等について, p13, 2024年12月,
<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/01375914.pdf>

3. 泉山信司ら, オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和3年度総括研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 33-51, 2021.
4. 田栗利紹ら, フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和4年度総括研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 77-89, 2022.
5. 田栗利紹ら, フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和5年度総括研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 102-115, 2023.
6. キッコーマンバイオケミファ, ルシパック A3 Water (液体測定用) 取扱説明書, <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/download/?id=11410>.
7. Taguri, T, et.al., Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. In the 10th International Conference on *Legionella* 2022, P-53, 2022.
8. 磯部順子ら, レジオネラ属菌迅速検査法の評価, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成30年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 13-22, 2018.
9. タカラバイオ, Cycleave PCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit 取扱説明書, https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/cy240_cy240s_j.pdf
10. 森本 洋ら, レジオネラ属菌検査法の安定化

に向けた取り組み:-厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成24年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉文明, 93-130, 2012.

11. 淀谷雄亮ら, 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の有効性の検討:-厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和3年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 87-92, 2021.

F. 研究発表

紙上発表
なし

学会発表

小森正人、金井博哉、齋藤利明、泉山信司、田栗利紹、電解オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒試験、日本オゾン協会第33回年次研究講演会、2024年6月、京都府京都市

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

オゾン供給前

オゾン不足(試運転)

ろ過器内排水後オゾン水供給

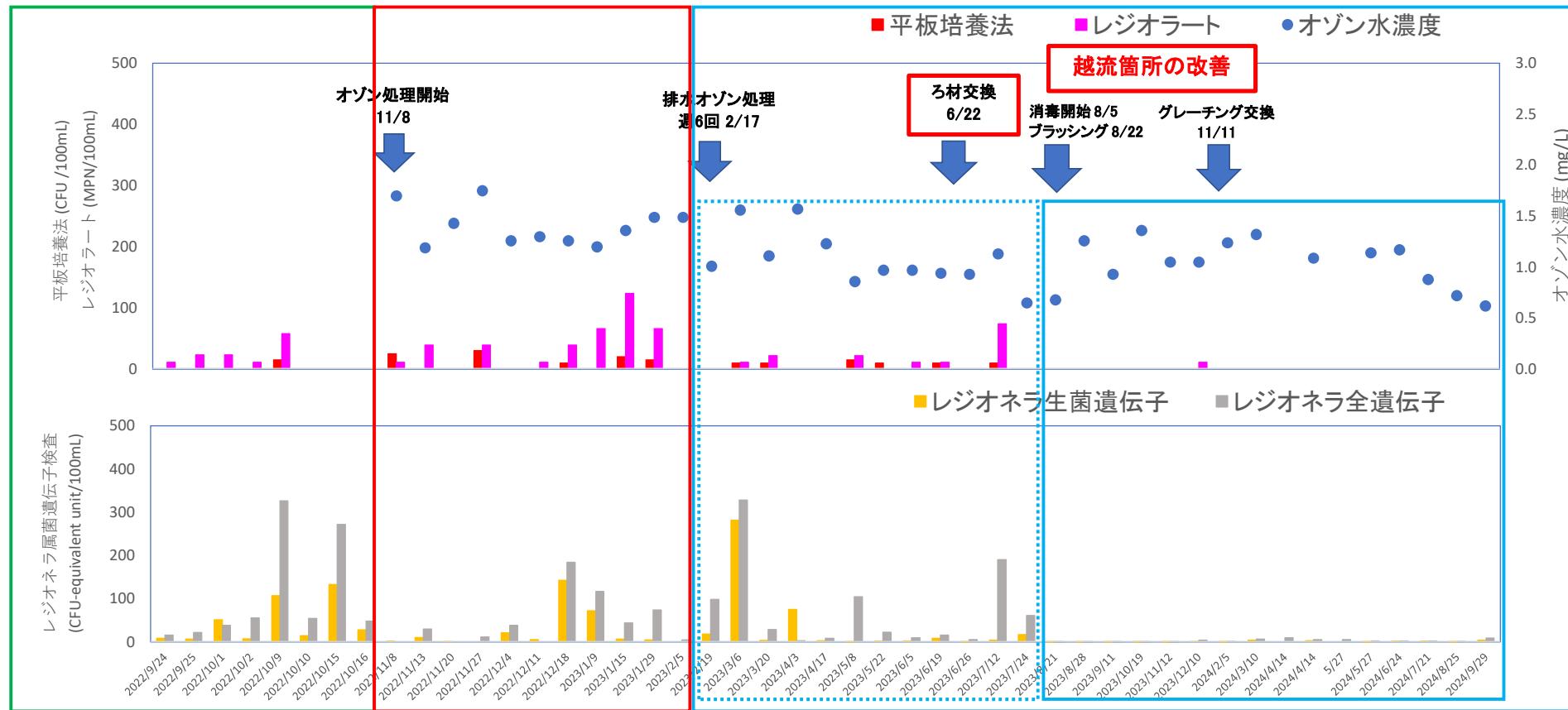


図1 ろ過器のオゾン処理によるレジオネラ属菌解析結果

緑枠：オゾン供給前 2022年9月24日～10月16日、赤枠：オゾン不足 2022年11月8日～2023年2月5日

青枠：ろ過器内排水後のオゾン供給 2023年2月17日～2024年9月29日(レジオネラ汚染源の特定 2023年8月5日)

青枠内部は、レジオネラ汚染源発見する前(破線)と発見後対応して以降(実線)、電解オゾン水処理によっても微量ながらレジオネラ汚染を認めたためろ材交換、循環系排水溝からの越流箇所の改善(消毒、ブラッシング、グレーチング交換)を行った。

検出限界：平板培養法 (10 CFU/100mL), レジオラート(10 MPN/100mL), レジオネラ属菌遺伝子検査 (1 CFU-equivalent unit/100 mL)

表1 オゾン運転状況による逆洗浄水内の各種検査指標の比較

採水時の運転状況	ATP (RLU ¹⁾)	Flow cytometry ¹ (cells/mL)	レジオネラ属菌検査		レジオネラ属菌遺伝子検査		従属栄養細菌数 (R2A法) (CFU/mL)	遊離塩素濃度 (mg/L)	
			平板培養法 (CFU ²⁾ /100mL)	レジオラート (MPN ³⁾ /100mL)	EMA-qPCR (CFU-eU ⁴⁾ /100 mL)	qPCR (CFU-eU/100 mL)			
ろ過器外の汚染発見前 (n=31)	オゾン供給前 (n=8)	58.19±51.06	55,640±98,944	7.50±10.35	15.75±19.56	41.89±51.44	104.02±122.07	NT ⁵⁾	1.51±0.66
	オゾン供給初期 (n=10)	63.10±26.74	67,409±103,704	10.50±12.12	39.50±38.43	26.46±46.10	50.21±59.96	NT	1.93±0.16
	ろ過器内排水後 オゾン供給(n=13)	48.08±28.27	22,574±38,972	5.00±5.77	11.62±20.52	31.88±77.77	67.7±95.97	3,386±6,070	1.83±0.30
小計		55.53±34.46	45,570±80,829	7.67±9.39*	22.40±29.32*	34.46±60.58*	73.65±93.16*	3,386±6,070	1.79±0.42#
ろ過器外の汚染発見後 (n=16)		88.89±61.86	33,252±46,422	0 ^{6)*}	0.69±2.75*	1.51±1.08*	3.19±2.85*	6,449±14,250	1.10±0.76#

¹⁾Relative Lights Unit, ²⁾Colony Forming Unit, ³⁾Most Provable Number, ⁴⁾CFU-equivalent Unit, ⁵⁾Not Tested, ⁶⁾All samples were below the detection limit. I: The RF-500 Flow Cytometer (Sysmex.co.) was used in this study. t-test: *; P<0.01, #; P<0.05, The values below the detection limit were calculated as 0 in the t-test.