

K-培地に関する報告 (1)

勝 矢 俊 一, 大 和 平 易

Report of K-media

Shunichi Katsuya, Hirayasu Yamato

第一篇 水中細菌数検査

1 緒 言

細菌の平板固形培地の賦形剤として寒天は世界各国で使用されてきたし、又寒天を用うる事によって細菌学が今日の発達を遂げたと云っても決して過言でない位重要なものである。

然し寒天を用うる場合の一つの大きな欠点とも云うべきは、その使用に際して先づ加熱溶解し、次いでこれを約 45°C に冷却後、シャーレに注入せねばならぬと云う点で、この為には熱源や重湯煎等の器材を要し、従って又野外その他種々な現場で迅速簡易に隨時細菌培養の平板培地を作り得ないと云う不利不便が生じているのである。

細菌検査の多くは、現場に於て直ちに試料を平板に植える事が必要とされ、試料を氷詰めなどにして設備ある検査室へ長時間で送附する様な事は、手数を要するのみならず試料の変質や菌数の変化、時には目標菌の消滅を伴う事すらあって適切な処置でない事は周知されている。

以上の理由から加熱操作を要せずして固形培地を作りうる賦形剤の出現が、昔より痛切に要望されてきたが、常温で直ちにゼリー化し、而もほぼ中性非活性で各種養分を添加し得る様な細菌培地の実現は困難とされ未だ成效をみていなかった。

著者はこの様な固形培地を作りうる基材（主として賦形剤）を得ようと多年に渡って研究を続けてきたが、硅酸アルカリ、硅酸アルカリ中和剤、有機膠質、等を主成分とする、一切加熱を要せず、操作簡易な、且つ貯蔵性の強い、一連の新固形培地組成剤を考案完成したので、これを総称して K-培地と名付けて、その製法、用途、特長等を報告する事とした。

本篇は主として水中細菌数検査に於ける混釈培養に使用する物の組成や、その成績である。

第1 酸として塩酸を用い硅酸ゲルをつくった場合

硅酸ソーダの稀薄溶液 (1~10%)10cc に 2~10%塩酸の適量で凝固せしめ、その状態をしらべた。

種々予備試験を行った結果、凝固に際し離奨して水を分離し、培地として不適當となり易く、特に留意した。

(実験 I) 硅酸ソーダ溶液を10%塩酸の適量で凝固せしめた場合 (ほぼ中和する) は、第 I

(第1-1表) 室温17°C

硅酸ソーダ溶液		10% HCl量	PH	凝固する迄の間	離漿状態
濃度	量				
1%	10c.c.	0.2c.c.	7.2	殆ど凝固せず	
2%	10c.c.	0.42c.c.	7.8	約4時間	水多量滲出
3%	10c.c.	0.61c.c.	7.6	約3時間	水多量滲出
4%	10c.c.	0.8c.c.	7.8	約1時間	水少量滲出
5%	10c.c.	1.1c.c.	7.8	約10分間	水少量滲出
6%	10c.c.	1.4c.c.	6.8	約5分間	水殆ど滲出せず
7%	10c.c.	1.5c.c.	7.8	約1.5分間	水滲出せず

(硅酸ソーダ溶液の%については後述する)

(第1-2表) 室温16°C

硅酸ソーダ溶液		2% HCl量	PH	凝固する迄の時間	離漿状態(24時間後)
濃度	量				
6%	10c.c.	7.6c.c.	7.8	28分間	水多量滲出
7%	10c.c.	8.0c.c.	8.0	27分間	水多量滲出
8%	10c.c.	9.0c.c.	7.9	5分間	水少量滲出
9%	10c.c.	10.5c.c.	7.4	3分間	水殆ど滲出せず
10%	10c.c.	12.0c.c.	6.2	4分間	水多量滲出

又10% HClに比し、中和の操作もやや容易になったが、未だ充分ではなかった。

(実験Ⅲ) 混釈培養

次に実際に養分を加えて混釈培養をした。

即ち、9%の割合に硅酸ソーダを含むブイヨン(肉エキス1%、ペプトン1%) 10ccに、2.2% HCl 9ccを加え、次に検水 1ccを入れて、混釈し、凝固後、37°Cで24時間培養した結果、32例中、離漿し、水が多量滲出したものが15例あった。

尚普通寒天培地に比較して、菌の発育状態も余りよくなかった。

(実験Ⅳ) 他の高分子の添加

離漿による悪影響を防ぐために、種々なる高分子物を添加して、その影響をしらべた。

即ち、寒天、ゼラチン、フノリ、蒟蒻粉、卵白、ポリビニール・アルコール、可溶性澱粉、デキストリン、トラガントゴム、アラビアゴム等を、硅酸ソーダ溶液、或いは HCl 溶液に種々なる割合で、種々なる組合せで加えた。

数多くの実験の結果、HCl液にアラビアゴムを1%の割合に添加するのが良い結果を与えた。

総括

① 硅酸ソーダ溶液を HCl で凝固せしめ(ほぼ中和する)、培地として利用の可否を検討した。

—1表の如くであった。

即ち、7%硅酸ソーダ溶液と10% HClとに依る場合がややよい結果を得た。

併し HCl の濃度が高いので、中和の操作が困難であった。

(実験Ⅱ) 10% HCl では中和の操作が困難であったので、2% HCl を用いて凝固せしめた。

結果は第1-2表の如くである。

即ち、9%硅酸ソーダ溶液と2% HClとに依る場合が、よい結果を得た。

- ② 10% HCl の使用は、中和の操作が困難であったので、2%程度の HCl を用いた。
- ③ 実際に混釈した場合、離漿して水が表面に滲出し、表面の菌の集落が流れる事が多かったが、アラビアゴムを添加する事により、やや良結果を与える様になった。
- ④ HCl 液の使用は PH の補正に困難を感じた。

第2 酸として磷酸を用いた場合

硅酸ソーダ溶液を凝固せしめる酸として、磷酸を用いる事とし、硅酸ソーダと磷酸の緩衝作用を利用して、PH の補正を容易ならしめようと試みた。

実験操作は第1の HCl を用いる方法に準じて行った。

(実験V) 7%硅酸ソーダ溶液を2~10%磷酸適量で凝固せしめた場合(ほぼ中和する)は、第2-1表の如くである。

(第2-1表) 室温21°C

硅酸ソーダ溶液		磷酸液		PH	凝固する迄の時間	離漿状態(24時間後)
濃度	量	濃度	量			
7%	10c.c.	10%	1.45c.c.	6.6	4分間	水滲出量約0.3c.c.
7%	10c.c.	5%	2.5c.c.	6.8	7分間	" 約0.1c.c.
7%	10c.c.	4%	3.0c.c.	7.0	8分間	" 約1滴
7%	10c.c.	3%	4.0c.c.	6.8	7分間	水滲出せず
7%	10c.c.	2%	7.0c.c.	6.8	11分間	水滲出約1滴

磷酸の量による PH の変化は、1cc の増減で僅かに 0.4 程度で、2% HCl を用いた場合に比し、PH の補正は非常に容易であった。

(実験VI) 8%硅酸ソーダ溶液を2~10%磷酸で凝固せしめた場合は、第2-2表の如くである。

(第2-2表) 室温20°C

硅酸ソーダ溶液		磷酸液		PH	凝固迄の時間	離漿状態(24時間後)
濃度	量	濃度	量			
8%	10c.c.	10%	5c.c.	7.0	2分間	水滲出量約1c.c.
8%	10c.c.	5%	3c.c.	7.0	5分間	" 3滴
8%	10c.c.	4%	4c.c.	6.9	8分間	水滲出せず
8%	10c.c.	3%	5c.c.	6.8	9分間	水滲出量約0.3c.c.
8%	10c.c.	2%	7.5c.c.	6.8	10分間	" 約0.6c.c.

(実験VII) 9%硅酸ソーダ溶液を2~10%磷酸で凝固せしめた場合は、第2-3表の如くである。

(第2-3表) 室温22°C

硅酸ソーダ溶液		磷酸液		PH	凝固迄の時間	離漿状態(24時間後)
濃度	量	濃度	量			
9%	10c.c.	10%	1.8c.c.	6.6	2分間	水滲出量約1c.c.
9%	10c.c.	5%	4c.c.	6.5	4分間	" 1滴
9%	10c.c.	4%	4.2c.c.	7.0	5分間	" 0.3c.c.
9%	10c.c.	3%	6.0c.c.	6.5	6分間	" 0.1c.c.
9%	10c.c.	2%	9.0c.c.	6.6	12分間	" 2滴

(実験VII) 10%硅酸ソーダ溶液を2~10%磷酸で凝固せしめた場合は第2-4表の如くである。

(第2-4表) 室温21°C

硅酸ソーダ溶液		磷酸液		pH	凝固迄の時間	離漿状態(24時間後)
濃度	量	濃度	量			
10%	10c.c.	10%	2c.c.	6.8	2分間	水滲出量約0.8c.c.
10%	10c.c.	5%	4c.c.	6.6	2分間	" 0.5c.c.
10%	10c.c.	4%	5c.c.	7.0	5分間	" 0.3c.c.
10%	10c.c.	3%	6c.c.	6.9	8分間	" 0.3c.c.
10%	10c.c.	2%	9c.c.	7.0	10分間	" 2滴

以上第2-1, 第2-2, 第2-3, 第2-4表のうち, 最もよい結果を示したのは, 7%硅酸ソーダ溶液 10cc に対して, 3%磷酸 4cc 及び, 8%硅酸ソーダ溶液 10cc に対して4%磷酸 3.5cc で凝固せしめる方法であった。

(実験IX) 混釈培養

アラビアゴムを添加する事に依って, 或る程度離漿を阻止する事が出来得たので, 次の処方によって, 混釈培養を試みた。

- ① 7%硅酸ソーダ溶液 (肉エキス1%, ペプトン1%含有する) 10cc
- 3%磷酸 (アラビアゴム1%含有) 4cc
- 検水 1cc

但し, 両液混合した時, PHが殆ど7.0になる様, 多少, 磷酸量を加減する。

30例試みるに, 離漿し, 表面が一面菌膜で覆われたものが10例あった。

尚, 常法の寒天培地で混釈培養したものと菌数比較の1例は, 第2-5表の如くであった。

(第2-5表)

検水の種類	K-培地	寒天培地
小使室前水溜の水	菌数 140 表面薄膜	170
校内井戸水	9	30
校庭の水溜の水	2600	3000
小川の水	650	1000
小使室前水溜	表面白膜	130

- ② 8%硅酸ソーダ溶液 (肉エキス1%, ペプトン1%含有) 10cc
- 4%磷酸 (アラビアゴム1%含有) 3.5cc

検水..... 1cc

但し、磷酸量は加減する。

(第2-6表)

22例試みるに、表面菌膜で覆われたものが8例あった。

尚、寒天培地との菌数比較の1例は第2-6表の如くであった。

検水の種類	K-培地	寒天培地
小使室前水溜の水	菌数 200	230
水溜污水(その1)	500, 約 $\frac{1}{5}$ 程度白膜となる	500
" (その2)	230	220
" (その3)	200	320
井戸水	18	18

総括

7~10%硅酸ソーダ溶液を2~10%磷酸で夫々凝固せしめて、その培地としての適否を検討した。

- ① 塩酸を用いる場合に比し、中和操作は容易である。
- ② 実際に混釈培養した結果、概して良好となった。

第3 養分について

菌の発育状態を対照寒天培地のそれと比較すると、菌数は概して低く、培地表面に大きく抜き、或いは白膜を形成して、菌数の集計が困難となる場合が多い。

その原因として離漿による水の分離の他に、養分の組成如何が考えられるので、養分の組成を種々変化せしめて、その影響をしらべた。

(実験X) 食塩による影響

8%硅酸ソーダ溶液(肉汁及びペプトン1%含有)に食塩を0~1%の割合に溶存せしめ、4%磷酸(アラビアゴム1%含有)及び検水を加え凝固せしめ(ほぼ中和する)、混釈培養試験を行った結果は第3-1表の如くて、食塩による影響は余り顕著でなかった。

(第3-1表)

検水の種類	NaCl含有なし	0.5%NaCl含有	1%NaCl含有	寒天培地
水溜の水 (その1)	菌数 370	300	720	500
" (その2)	420	300	330	260
小使室前水溜(その1)	500	650	440	600
" (その2)	340	400	300	620
井戸水	3	4	1	10

(実験XI) 養分濃度を増加せしめた場合の影響

肉エキスとペプトンの量を増加せしめて、混釈培養を行い、菌の発育状態に対する影響をしらべた結果は第3-2表の如くて、養分の増加によって菌の発育(特に菌数)は促進されなかった。

(第3-2表)

検水種類	肉汁 Pepton 1%	肉エキス 1% Pepton 1.5%	肉エキス 0.5% Pepton 2%	肉エキス 1% Pepton 2%	肉エキス 2% Pepton 1%	肉エキス 0.5% Pepton 1%	寒天培地
菌水 1	280	250	260	270	390	270薄膜	300
菌水 2	100	70薄膜	85薄膜	100	100	白膜	180
" 3	190	500	500	180	280	250	340
" 4	25薄膜	50	29	22	18	22	37
" 5	370	360	430	230	250	260	340
" 6	160	170	白膜	280	300	190	180
" 7	44	34	白膜	白膜	30	29	45
" 8	30	45	38	白膜	50薄膜	40薄膜	60
" 9	60	120	170	44	100	35	240
" 10	940	740	910	白膜	760	760	500
" 11	310	450	340	白膜	360	240	270
" 12	160	200	250	140	120	160	300
" 13	500	360	310	650	600	170	800

(実験XII) 養分濃度を減少せしめた場合の影響

これまでの養分を $\frac{1}{5}$, 或いは $\frac{1}{10}$ に減少せしめた場合は第3-3表の如く, 今迄混積培養を行った際, 培地表面が菌の白膜で覆われ, 集計を不能にせしめた障害を, 養分濃度を減少せしめる事により, 防ぐ事が出来た。

(第3-3表)

養分組成%		濃度比	151例中白膜 又は薄膜を形成した例数	百分比
肉エキス	ペプトン			
0.5%	1.0%	1	白膜73例	48.3%
0.1%	0.2%	$\frac{1}{5}$	薄膜14例	9.3%
0.05%	0.1%	$\frac{1}{10}$	薄膜5例	3.3%

尚, 菌の発育状態(特に菌数)を対照寒天培地に於ける場合と比較した結果は第3-4表の如く, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$ 程度の養分の減少では, 何等の悪影響は認められなかった。

(第3-4表)

検水の種類	K培地 1養分	$\frac{1}{5}$ 養分	$\frac{1}{10}$ 養分	寒天培地
小使室前水溜の水	白膜	55	35	21
水溜の水(その1)	20	18	40	12
"(その2)	白膜	13	7	6
白膜形成の菌をとり 菌浮游液をつくる	白膜	190	110	160
同上稀釈液	白膜	40	26	28

総括

混積培養試験の際, 培地表面に菌が大きく拡ったり, 或いは白膜で覆われて, 菌数集計を不能ならしめた欠点は養分濃度を減少せしめる事により, 殆ど完全に防ぐ事が出来, 又菌の発育状態も第3-5表の如く, 数多くの追試の結果良好なる

(第3-5表) (対照寒天培地との菌数比較)

K培地種類	実験件数	対照寒天と同程度 (約2割増減程度)	対照以上	対照以下
$\frac{1}{5}$ 養分K培地	128例中	66例	53例	9例
$\frac{1}{10}$ 養分K培地	140例中	69例	56例	15例
$\frac{1}{20}$ 養分K培地	24例中	12例	3例	9例

結果を得た。

第4 凝固状況と温度並びに PH との関係その他

養分を含む珪酸ソーダ溶液と、アラビアゴムを含む磷酸溶液を混和凝固せしめてK培地をつくる場合、その凝固の状況が必ずしも恒常的でなく、時には不完全で離漿を起し、或いは凝固に要する時間が長く、実用的に不便を感じたりしたので、その原因の追求と対策の樹立が必要となった。

凝固の状況が必ずしも、恒常的でない原因としては、

- ① 温度による影響。
- ② PH による影響。
- ③ 試薬濃度及び組成等による影響。

等が考えられる。

一方、K-培地を混和培養の培地として利用する場合の実用的条件としては、

- ① 凝固に要する時間は、10~30分が望ましい。
- ② PH は7.0~7.2程度が望ましい。
- ③ 離漿等を起さず、細菌の生育に悪影響を及ぼさないこと。

等が考えられる。

使用に際して、PH は大体 7.0 に調節しなければならず、温度は気温等によって、実際的には簡単に統禦出来ないとすれば、試薬の濃度、組成等によって調節する以外に方法はない。

即ち、10~30分の凝固時間を考慮に入れれば、濃度を変化せしめた数種の試薬を用いて、温度によって使い分けるという方法を用いるべきであろう。

以上に述べた立場より、8%珪酸ソーダ溶液と4%磷酸を用いて、各温度において、種々なる PH で、凝固時間を測定し、更に濃度を、やや高めて同様の測定をなし、実用的使用に適する温度範囲を検討することとした。

(実験XIII) 温度による凝固時間の変化

(凝固時間の測定)

珪酸ソーダ溶液と磷酸液を(必要に応じて、検液を加え)混和すると、最初、微かに白濁し、徐々に粘度が上昇するが、或る点で、急にゼリー化を起すので、この点を凝固の始めとした。

凝固開始点は比較的明瞭に観察する事が出来る。

その後、暫時放置すると、凝固は徐々に進行し、遂には容器を伏せても、落ちなくなり、比較的、安全に運搬可能の状態となる。

この状態をもって、安全凝固とみなし、試薬混和より、完全凝固に至る時間を、凝固時間とした。

しかし完全凝固点の観察は可成り不明瞭であるので、実験には、主として凝固開始時間を測定し、完全凝固時間を補足的に測定した。(凝固開始時間と完全凝固時間とは、大体比例して

いるので、凝固開始時間を知ることによって、完全凝固時間を推定する事は、可能である。）

PH 7.0—7.2 に於ける温度による、凝固開始時間の変化は、第4—1、第4—2表の如く、8%珪酸ソーダ溶液と4%磷酸とを混和した場合、完全凝固には猶、数分を要するので、完全凝固時間30分以内と判定してよいのは、12°C 以上と考えられる。

同様に9%珪酸ソーダ溶液と4%磷酸と混和した場合、完全凝固時間30分以内と判定してよいのは、10°C 以上と考えられる。

(第4—1表) (8%珪酸ソーダ+4%磷酸)

温度	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°
凝固開始時間(分)	—	52分	—	40	35	34	28	—	25 28	26 24	22	18	—	—	17 16	—	18 17	14	14 13.5	—

(第4—2表) (9%珪酸ソーダ+4%磷酸)

温度	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°
凝固開始時間	—	—	30分	—	24	—	16	—	19 20 20	—	—	15	19	—	13 14	—	10	—	8 10	—

尚4—1、4—2表に示される様に、温度の上昇と共に、凝固の速度は、著しく早くなった。

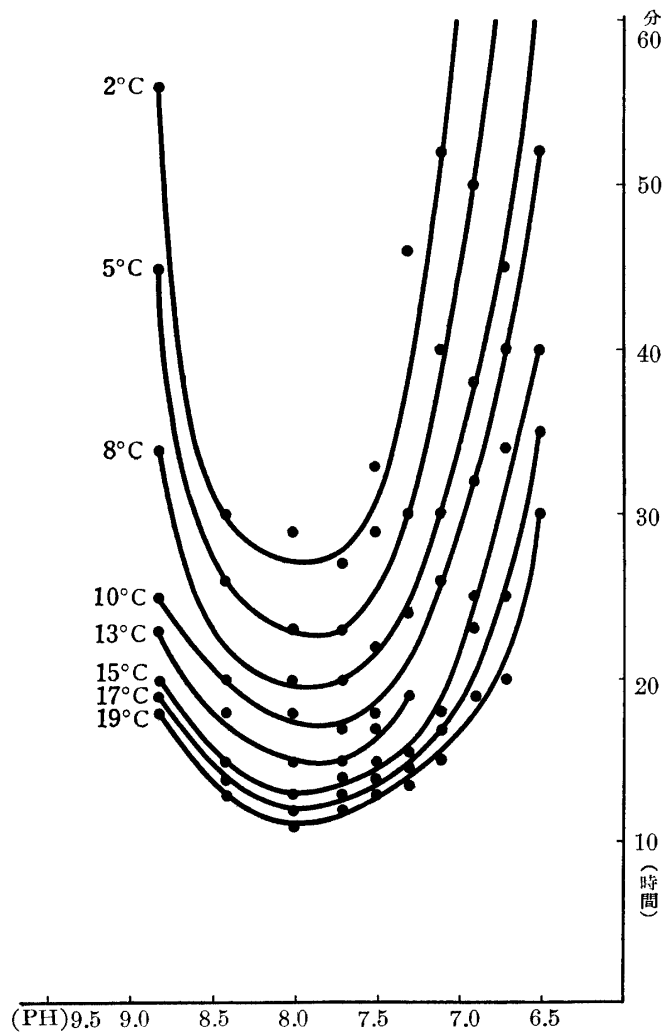
概して云えば、10°C の上昇によって、凝固時間は約 $\frac{1}{2}$ となり、化学反応の一般的傾向と一致している。

(実験XIV) PHによる凝固時間の変化

ゲル濃度を一定にするために、8%珪酸ソーダ溶液 10cc に対して、4%磷酸液を適宜に変化せしめて、培地の容量が全量 15cc になる様、水を加えて比較する事にした。

PH の測定は、SZK 水素イオン濃度比色測定法によった。

温度4~5°C に於ける、PH による凝固開始点、及び、完全凝固時間を測定した実験の一例を示すと、第4—3表の如く、PH 7.7 附近で凝固時間は極小値を示し、それよりPHが大でも、小でも凝固に要する時間は、長く要した。



第1図 各温度に於ける PH と凝固開始時間の関係

他の多くの同種の実験に於ても、一定のPHで極小値を示すと云う現象は、一致している。(PH 7.7より8.0位の範囲)

尚、第1図は2°C, 5°C, 8°C, 10°C, 13°C, 17°C, 19°Cに於ける凝固開始時間を示したもので、この現象は、2°C—30°C範囲の実験では、その温度によっても何等の影響をうけないし又、試薬調製後時間の経過した試薬を使っても、何等変動を来すことはなかった。

(第4—3表) 室温4~5°C

磷酸量	水	PH	指示薬	凝固開始時間	完全凝固時間
2.8c.c.	2.2c.c.	8.8	T.B.	48分	60分
2.9 2.95	2.1 2.05	8.6 8.4	" P.R.	31分 26分	48分 40分
3.0 3.05	2.0 1.95	8.2 7.8	" "	24分 24分	37" 35"
3.1 3.2	1.9 1.8	7.7 7.6	" "	23分 25分	35" 41"
3.3 3.4	1.7 1.6	7.4 7.3	" "	33分 34分	46" 50"
3.5 3.6	1.5 1.4	7.2 7.0	B.T.B. "	35分 45"	51" 60"
3.7 3.8	1.3 1.2	7.0 6.9	" "	45" 48"	61" —
3.9 4.0	1.1 1.0	6.8 6.7	" "	55" 61"	— —
4.25 4.5	0.75 0.5	6.6 6.45	" "	— —	— —