

付表 10

大腸菌数の測定方法

1 試薬

(1) 水

日本産業規格 K0557 に規定するA1、A2、A3又はA4のもの

(2) 特定酵素基質寒天培地

酵素基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド(X-GLUC)を含む特定酵素基質寒天培地(注1)

(3) 水酸化ナトリウム

日本産業規格 K8576 に定めるもの

(4) 水酸化ナトリウム溶液(0.1mol/L)

水酸化ナトリウム約 40gを水に溶かして全量を 1,000ml としたもの

(5) 塩酸

日本産業規格K8180 に定めるもの

(6) 塩酸(1mol/L)

塩酸約 85ml を水に溶かして 1,000ml としたもの

(7) ペプトン

微生物試験用のもの

(8) 滅菌ペプトン水

ペプトン 1.0gを水約 950ml に溶かした溶液を、水酸化ナトリウム溶液(1mol/L)又は塩酸(1mol/L)で高圧蒸気滅菌(121℃で 15 分間行う高圧蒸気滅菌をいう。以下同じ。)後の pH が 6.9~7.1 になるよう調整した後、水を加えて全量を 1,000ml とし、高圧蒸気滅菌したもの

(9) リン酸二水素カリウム

日本産業規格K9007 に定めるもの

(10) 滅菌りん酸塩緩衝希釈水

りん酸二水素カリウム 42.5gに溶かした溶液を、水酸化ナトリウム溶液(1mol/L)で pH を 7.2 に調整し、水を加えて全量を 1,000ml とした後、この溶液の 1ml を水に溶かして 1,000ml とし、高圧蒸気滅菌したもの

(11) 塩化ナトリウム

日本産業規格K8150 に定めるもの

(12) 滅菌生理食塩水

塩化ナトリウム 8.5gを水に溶かして 1,000ml とし、高圧蒸気滅菌したもの。

(13) 希釈水

滅菌ペプトン水、滅菌りん酸塩緩衝希釈水、滅菌生理食塩水のいずれかとする。

(注1) 大腸菌数試験用の特定酵素基質寒天培地として以下の組成の培地が市販されている。

ここで示す培地の組成は、この測定試験法使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、この組成の培地を推奨するものではなく、これと同等以上の品質、性能を有すると確認された培地を用いてもよい。

培地の組成(培地1Lあたり)

ペプトン	10 g
ピルビン酸ナトリウム	1.0 g
L-トリプトファン	1.0 g
D-ソルビトール	1.0 g

塩化ナトリウム	5.0 g
りん酸二水素ナトリウム	2.2 g
りん酸一水素ナトリウム	2.7 g
硝酸カリウム	1.0 g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.20 g
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド (X-GLUC)	0.10 g
5-ブロモ-6-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラ ノシド (MAGENTA-GAL)	0.10 g
寒天	15 g

2 器具及び装置(注2)

- (1) 計量器具(メスピペット、有栓シリンダー、希釈瓶等)
高圧蒸気滅菌したもの又は同等の性能で滅菌したもの
 - (2) メンブランフィルターろ過装置
ファンネル及びフィルターホルダーは高圧蒸気滅菌したもの又は同等の性能で滅菌したもの
 - (3) メンブランフィルター
直径 47mm、孔径 0.45 μm の円形のメンブランフィルターで高圧蒸気滅菌したもの
 - (4) ペトリ皿
ガラス製で、約 170°C で約 1 時間乾熱滅菌したもの又は日本産業規格 K0950 に定めるプラスチック製滅菌シャーレ
 - (5) 恒温装置
装置内の温度を 37°C 付近に調節できるもの
 - (6) 拡大鏡
2 倍程度の拡大倍率をもつもの
- (注 2) 市販の滅菌済みの器具及び装置を用いてもよい。

3 試料の採取及び保存

試料は、滅菌した密封できる容器に採取し、速やかに試験する。試料採取後直ちに試験ができないときは、0~5°C (凍結させない) の暗所に保存し、9 時間以内に試験することが望ましく、12 時間以内に試験する。

なお、希釈に用いる検水の量を考慮し、十分な採水量を確保するように努める。

4 試験操作

(1) 培地の調製

- (a) 培地の粉末を三角フラスコ等に量りとり、かき混ぜながらゆつくり水を加え分散させる。
- (b) 沸騰水中で寒天が完全に溶けるまで加熱を繰り返す(注3)。
- (c) 寒天が溶解した後で速やかに 50°C 程度に冷却し、培地の厚さが 5mm 程度になるようにペトリ皿に分注し、寒天を凝固させる。

(注3) 培地の種類によつて培地調整時に滅菌操作が必要となる場合は、高圧蒸気滅菌を行う。

(2) 検水の調製

検水量は 100ml とし、メンブランフィルター上のコロニー数が 100 を超えると予想される場合は希釈し、メンブランフィルター上のコロニー数を 20～100 個程度とする(注4)。希釈の操作は次の例による。

- (a) 希釈瓶(注5)に希釈水を 90ml 入れる。
 - (b) 10 倍希釈の場合は、希釈水 90ml が入った希釈瓶に検水 10ml をメスピペットで採り、十分に振り混ぜる(注6)(注7)。
 - (c) 100 倍希釈する場合は(a)(b)に従って操作し、(b)から 10ml 採り、希釈水 90ml が入った希釈瓶に入れ、十分に振り混ぜる。
 - (d) さらに希釈する場合は、同様な操作を行って希釈を繰り返す。
- (注4) 10 倍や 100 倍など 10 倍ごとの数段階の検水を調製する。
(注5) 使用する元の検水量が少ない場合は試験管を用い、9ml の希釈水に 1ml の検水を加えてもよい。
(注6) メスピペットはその都度、滅菌済みのものを用いる。
(注7) 希釈した後の検水は微生物が増殖や死滅を起こすことがあるため、調製後は速やかに操作を行う。

(3) ろ過

- (a) 滅菌済みのフィルターホルダーを吸引瓶に取り付け、ピンセットを用いてメンブランフィルターをフィルターホルダー上に置き、ファンネルをつけて固定する。
 - (b) ろ過する検水を振り混ぜて均一化し、適量(注8)を有栓シリンダー等(注9)に採り、ファンネル内に注いで吸引ろ過する。
 - (c) ろ過した後に希釈水を用いて有栓シリンダー及びファンネルの内壁を 2～3 回洗浄し、吸引ろ過する。
- (注8) 1 枚のメンブランフィルターで吸引ろ過する検水量は 40ml 以上を基本とするが、土粒子による濁りに起因するコロニーの滲みにより、計数が困難となることが予想される場合は、1 枚で吸引ろ過する検水量を 40ml 未満とし、複数のメンブランフィルターを用いて吸引ろ過の回数を増やすこととする。
(注9) 検水量に応じて適切な器具を使用する。

(4) 培養

- (a) 検水をろ過したメンブランフィルターを、ろ過面を上にして培地上に気泡ができないように密着させる。
 - (b) ペトリ皿に上皿を被せて、倒置する。
 - (c) 37℃付近の恒温装置に倒置した状態で 24 時間程度培養する(注 10)。
- (注 10) 培養温度と時間は使用する培地の使用説明書を参照する。

(5) 菌数の計数

- (a) 培養後、拡大鏡を用いてフィルター上の青色のコロニーを数える(注 11)。
- (b) 次の式から試料中の大腸菌数を算出する(注 12)(注 13)(注 14)。

$$a = (m/V) \times P \times 100$$

a 試料 100ml 中の大腸菌数

m フィルター上の大腸菌コロニー数

V ろ過に用いた検水量(ml)

P 希釈倍率

- (注 11) 大腸菌が特異的に保有・産生する酵素 β -グルクロニダーゼと、培地の成分である酵素基質 X-GLUC とが反応して青色を呈するため、大腸菌は青みを帯びた色のコロニーとなる。一方、大腸菌群が保有・産生する酵素 β -D-ガラクトシダー

ゼと反応して赤色を呈する酵素基質5-ブロモ-6-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (MAGENTA-GAL)もしくは6-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (Salmon-β-D-GAL)が含まれている培地については、大腸菌群は赤みを帯びた色のコロニーとなつて両者の識別が可能となる。培地の組成によりコロニーの色調が異なることがあるため、コロニーの色調や識別に際しては使用する培地の使用説明書を参照する。

(注 12) 1つの試料につき(3)から(5)の操作を2回以上繰り返し試験として行い、得られた全ての結果(希釈試料の場合には、原則としてコロニー数が20~100個のもの)を算術平均する。ただし、粒子や大きなコロニーが重なり合うなど計数しにくいときは、状況に応じてより計数しやすいフィルターを適宜選択する。

(注 13) 数値の丸め方は日本産業規格Z8401のとおりとする。

(注 14) 試験結果の単位はCFU(コロニー形成単位(Colony Forming Unitの略))/100mlとする。

(6) 空試験

ろ過に用いた検水量と同量の希釈水を用い、(3)~(5)の操作を1回行い、結果を整理しておくことが望ましい。