

## 大腸菌群数に係る排水基準の見直し（案）

### 1 排水基準の見直し（案）について

今回の排水基準の見直しは、排水基準の指標を「大腸菌群数」から「大腸菌数」に見直すものであり、現行の大腸菌群数の基準値（ $=3,000$  個/cm<sup>3</sup>）に相当する大腸菌数を基準値として設定することを基本とする。

検討の結果、大腸菌群数の基準値（ $=3,000$  個/cm<sup>3</sup>）に相当する大腸菌数は840CFU/ml程度であり、切り下げにより数値を丸め800CFU/mlを基準値とすることが妥当ではないか。

### 2. 検定方法について

排水基準に係る検定方法については、別紙によることが適当ではないか。

### 3. 今後の予定（案）

今後、大腸菌数の排水基準値案については、各業種の排水実態などを踏まえ、引き続き本検討会での検討を行い、中央環境審議会水環境・土壌農薬部会に報告する基準の見直し案を取りまとめるとともに、同部会での審議を経て、令和6年4月頃の施行を目指して環境省において関係政省令等の改正等を行う予定である。

## 大腸菌数の排水基準に係る検定方法案について

## 見直し後の検定方法（案）

## 大腸菌数の検定方法（案）

## 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(1mol/L)

水酸化ナトリウム約40gを水に溶かして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) リン酸二水素カリウム

日本産業規格K9007に定めるもの

## (8) 滅菌りん酸塩緩衝希釈水

りん酸二水素カリウム42.5gを水約500ml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

## (9) 塩化ナトリウム

日本産業規格K8150に定めるもの

## (10) 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

## (11) 希釈水

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。なお、当該培地は、大腸菌及び大腸菌群の検出が可能である。

## 培地の組成（培地 1 L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- $\beta$ -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- $\beta$ -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、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) ペトリ皿

ガラス製で、約 170℃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

### (3) 恒温装置

装置内の温度を 37℃付近に調節できるもの

### (4) 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℃（凍結させない）の暗所に保存し、12 時間以内に試験する。

## 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（注3）。

(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4）。

(c) 寒天が溶解した後、速やかに約 50℃を目安にしながら固まらない程度の温度に保つ。

(注3) 量りとりと分散については使用する培地の使用説明書を参照する。

(注4) 培地の種類によつて培地調製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1 mL とし、ペトリ皿内の大腸菌のコロニー数が200を超えると予想される場合は希釈し、ペトリ皿内の大腸菌のコロニー数を30~200個程度とする(注5)。希釈の操作は次の例による。

(a) 試験管等(注6)に希釈水を9ml入れる。

(b) 10倍希釈の場合は、希釈水9mlが入った試験管等に検水1mlをメスピペットで採り、十分に振り混ぜる(注7)(注8)。

(c) 100倍希釈が必要な場合は(a)(b)に従つて操作し、(b)から1ml採り、希釈水9mlが入った試験管等に入れ、十分に振り混ぜる。

(d) 更に希釈が必要な場合は、同様な操作を行つて希釈を繰り返す。

(注5) ペトリ皿内の大腸菌のコロニー数は30~100個程度が望ましいが、20~200個の範囲であればよい。

(注6) 希釈操作は、希釈瓶等に希釈水90mlを入れ、検水10mlを加えてもよい。

(注7) メスピペットはその都度、滅菌済みのものを用いる。

(注8) 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) 操作

(a) 振り混ぜて均一化した検水又は希釈検水から1 mL ずつをメスピペット1 mL を用いてそれぞれ2個以上のペトリ皿にとる。

(b) (1)で溶解した後に、約50°Cを目安に培地が固まらない程度の温度に保った特定酵素基質寒天培地約15ml(注9)を無菌的にそれぞれのペトリ皿に加え、固まらないうちに、緩やかに回しながら揺り動かしてよく混ぜ合わせる。

(c) ペトリ皿全体に培地と検水との混合物が広がったら、水平の状態で放置し、凝固させる。

(注9) 寒天培地は細菌が死滅しないように固まらない程度の低い温度まで下げた状態で用いる。

## (4) 培養

(a) ペトリ皿を倒置する。

(b) 37°C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)。

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

a 試料1ml中の大腸菌数

m ペトリ皿内の大腸菌コロニー数

V 培養に用いた検水量(ml)

P 希釈倍率

(注 11) 大腸菌が特異的に保有・産生する酵素  $\beta$ -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  $\beta$ -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- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (MAGENTA-GAL) 又は 6-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (Salmon- $\beta$ -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っ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) (a) に示したように2個以上のペトリ皿で試験を行い、得られた全ての結果(希釈試料の場合には、コロニー数が20~200個のもの)を算術平均する。

(注 13) 試験結果の単位はCFU(コロニー形成単位(Colony Forming Unitの略)) / ml とする。

(6) 空試験

培養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。