

大腸菌数の検定方法について（参考）

大腸菌数の検定は、排水基準を定める省令（昭和 46 年総理府令第 35 号）の規定に基づき環境大臣が定める排水基準に係る検定方法において、下水の水質の検定方法等に関する省令（昭和 37 年厚生省・建設省令第 1 号）に規定する特定酵素基質寒天培地を用いた平板培養法（混積平板法）により行うこととしている。

特定酵素基質寒天培地を用いた平板培養法（混積平板法）の詳細な作業方法等について、参考として以下に示す。

1 試薬

(1) 水

日本産業規格 K0557 に規定する A 2、A 3 又は A 4 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（1 mol/L）

水酸化ナトリウム約 40 g を水に溶かして 1,000 ml としたもの

(5) リン酸二水素カリウム

日本産業規格 K9007 に定めるもの

(6) 滅菌りん酸塩緩衝希釈水

りん酸二水素カリウム 42.5 g を水約 500 ml に溶かした溶液を、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）で pH を 7.2 に調整し、水を加えて全量を 1,000 ml とした後、この溶液の 1 ml を水に溶かして 1,000 ml とし、高圧蒸気滅菌したもの

(7) 塩化ナトリウム

日本産業規格 K8150 に定めるもの

(8) 滅菌生理食塩水

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

(9) 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。

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-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、試験管その他の希釈瓶等)
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 °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
 - (3) 恒温装置
装置内の温度を 37 °C 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 (注3)、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、12 時間以内に試験する。

(注3) 残留塩素を含む試料では、日本産業規格 K8637 に定めるチオ硫酸ナトリウム五水和物の粉末を試料 100 mL に対して 20～30 mg となるよう入れて滅菌した容器を用いる。市販の同等の容器を用いてもよい。

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、かき混ぜながらゆっくり水を加え分散させる (注4)。
 - (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5)。
 - (c) 寒天が溶解した後、速やかに約 50 °C を目安にしながら固まらない程度の温度に保つ。
(注4) 「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5) 培地の種類によっ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を 30～200 個程度とする (注6)。希釈の操作は次の例による。
 - (a) 試験管その他の希釈瓶等に希釈水を 9 mL 入れる。

(b) 希釈水 9 ml が入った試験管その他の希釈瓶等に検水 1 ml をメスピペットで採り、十分に振り混ぜる（注 7）（注 8）。

（注 6） ペトリ皿内の大腸菌のコロニー数は正確な計数を行う観点から、30～100 個程度であることが望ましいが、20～200 個の範囲内であればよい。

（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 15 ml（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、水平の状態に放置し、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数を数える（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）。

$$A = a \times P$$

A 試料 1 ml 中の大腸菌数 (CFU/ml)

a ペトリ皿内の大腸菌コロニー数の平均値 (CFU)

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。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） CFU：コロニー形成単位 (Colony Forming Unit の略)

(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。