

仕様書 別紙 7

ふん便性大腸菌群数の測定方法

第1 メンブランフィルター法 (M-F C法)

1. 器具

(1) 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、オートクレーブで滅菌する。

ただし、滅菌効果をあらかじめ確認した条件下でUV照射による滅菌を行ってもよい。

(2) メンブランフィルター

直径47mmの円形、孔径0.45μmのもので、滅菌済みのものを使用する。

(3) ペトリ皿

ふたと身が密着できて滅菌済みのものを使用すること。

(4) 恒温装置 (恒温水槽)

44.5℃±0.2℃に調節できるもの。

(5) 拡大鏡

2倍程度の拡大倍率をもつもの。

備考：恒温装置は(4)と同程度の温度調節が可能であれば、恒温水槽でなくてもよい。

2. 培地等

(1) M-F C寒天培地

ア. 組成

| | |
|---------------------|----------|
| 特殊混合ペプトン (注1) | 10.0 g |
| 獣肉-パパイシン消化ペプトン (注2) | 5.0 g |
| 酵母エキス | 3.0 g |
| 塩化ナトリウム | 5.0 g |
| 乳糖 | 12.5 g |
| 胆汁酸塩 (注3) | 1.5 g |
| アニリンブルー | 0.1 g |
| 寒天 | 15 g |
| 蒸留水 | 1,000 mL |

(注1) トリプトース又はビオセートに相当する混合ペプトン

(注2) プロテオーゼペプトン No. 3 又はそれに相当するペプトン

(注3) 特異的に阻止能力を有するように調整され規格化されたもの
(胆汁酸塩 No. 3 又は胆汁酸塩混合物)

イ. 調製

(ア) 培地は加熱して寒天を完全に溶解した後、直ちに60℃前後に冷却する。

(30分以上の加熱及びオートクレーブによる滅菌は避ける。)

(イ) 最終のpHは7.3~7.5であること。

(ウ) 培地の保存は2~10℃で行うが、調製後96時間以上経過したものは用いないこと。

備考：培地は、乾燥培地又は寒天を含まない市販培地に寒天を加えたものを用いてもよい。

(2) 平板調製

M-F C寒天培地を厚さが約5mmになるようにペトリ皿中に分注して寒天を凝固させる。

(3) 滅菌ペプトン液

- ア. カゼイン製ペプトン 1 g を水 1,000 mL に加えて溶かす。(注 4、注 5)
- イ. オートクレーブ (約 120℃, 20 分間) で滅菌する。
 - (注 4) 沈澱物が生じている場合はろ紙を用いてろ過しておく。
 - (注 5) 最終的に pH が中性付近になるように調整する。

3. 試験操作

(1) ろ過

- ア. フィルターホルダーを吸引びんに取り付けたのち、滅菌済みピンセットを用いて (注 6) 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。
- イ. 試料の適量 (注 7) を滅菌試験管 50 mL にとり、滅菌ペプトン液を加えて約 50 mL (注 8) としたのちファンネル内に注いで吸引ろ過する。(注 9)
- ウ. ろ過したのち滅菌ペプトン液 (1 回に約 30 mL) を用いてファンネルの内壁を 2 ～ 3 回洗浄、吸引ろ過する。(注 10)
 - (注 6) ピンセットで強くはさむとフィルターが破れることがある。
 - (注 7) 培養後に適当なコロニー数の平板が得られるよう試料を数段階希釈でとる。
 - (注 8) 試料を 50 mL とした場合は希釈する必要はない。
 - (注 9) 試料が濁っている場合は、プレフィルターでろ過しておく。
 - (注 10) ろ過洗浄後のフィルター上に洗浄水が残ると培地上に流れて失敗することがある。

(2) 培養

- ア. 試料をろ過したメンブランフィルターを M-F C 寒天平板上に気泡ができないように密着させる。(注 11)
- イ. ペトリ皿はふたを閉め、さらに二重の密封用の袋に入れて密封する。(注 12)
- ウ. 44.5℃±0.2℃に調節した恒温水槽にペトリ皿を倒置した状態で沈め、24±1 時間培養する。
 - (注 11) フィルターを培地に密着させる際、気泡が生じてフィルターと培地が完全に密着しないことがある。
 - (注 12) 恒温水槽中でペトリ皿が浮上することがないように密封用の袋の空気をできるだけ追い出してから密封すること。

4. 菌数の計算

培養後、拡大鏡を用いてメンブランフィルター上に発生した青色で光沢をもったコロニーを数え (注 13)、次式から菌数を算出する。

$$a = \frac{m}{V} \times 100$$

a : 試料 100 mL 中のふん便性大腸菌群数

m : フィルター上のコロニー数

V : ろ過に用いた試料の量 (mL)

なお、フィルター上のコロニー数は 10 ～ 30 個になるよう希釈調整することが最も望ましい。フィルター上のコロニー数が、多すぎると計数が困難であるばかりでなく、コロニー色調が不明確となりやすい。

(注 13) コロニーの色調は太陽光と電球光で異なることがあるので一定条件下で観察すること。