

事 務 連 絡

令和6年3月29日

各都道府県下水道担当課長 殿
政令指定都市下水道担当部長 殿

国土交通省水管理・国土保全局
下水道部流域管理官付課長補佐

大腸菌数の検定方法について

「下水の水質の検定方法等に関する省令及び下水の処理開始の公示事項等に関する省令の一部を改正する省令」（令和6年国土交通省令・環境省令第1号）が令和6年3月13日に公布され、放流水の水質における大腸菌数の検定方法が新たに定められ、令和7年4月1日から施行されます。これについて、「下水道法施行令の一部を改正する政令等の施行について」（令和6年3月29日付国水企第108号）により各都道府県知事及び各政令指定都市の長あてに通知されたところです。

今般、別紙のとおり、大腸菌数の検定における詳細な作業方法や使用する培地等についてまとめましたので、事務執行上の参考とされますようお願いいたします。

なお、各都道府県におかれては貴管内の市町村（指定都市を除く。）に対しても、この旨周知方お願いいたします。

大腸菌数の検定方法について

大腸菌数の検定は、下水の水質の検定方法等に関する省令（昭和三十七年厚生省・建設省令第一号）に基づき、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。

1 試薬

(1) 水

日本産業規格K0557に規定する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(※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) 滅菌生理的食塩水

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、滅菌生理的食塩水のいずれかとする

(※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、参考として「令和4年度第3回下水道における水系水質リスク検討会」において回収率、繰り返し精度、室間精度の評価を行い、本例示と同等以上の品質、性能を有することが確認された培地の組成を本紙の最後に例示する。

培地の組成(培地1 Lあたり)

ペプトン	10.0 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	0.2 g
5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド (X-GLUC)	0.1 g
5-ブromo-6-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (MAGENTA-GAL)	0.1 g
寒天	15.0 g

2 器具及び装置 (※2)

(1) 計量器具 (メスピペット、試験管その他の希釈瓶等)

高压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 34°C ~ 37 °C 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

(※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 (※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。

(※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 100mL に対して 20 ~ 30mg 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 (※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 (※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。

(※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。

(※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、高压蒸気滅菌を行う。

(2) 希釈試料の調製

試料は 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 (※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試料 1 mL をメスピペットで採り、十分に振り混ぜる (※7) (※8)。

(※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。

(※7) メスピペットは都度、滅菌済みのものを用いる。

(※8) 希釈した後の試料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希釈試料から 1 ml ずつメスピペット 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 (※9) を無菌的にそれぞれのペトリ皿に加え、直ちに蓋をして、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希釈試料との混合物が広がったら、水平の状態で静置し、放冷して凝固させる。

(※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。培地の量は使用する培地の使用説明書を参照する。

(4) 培養

- (a) ペトリ皿を倒置する。
- (b) 34°C~37 °Cの恒温装置に倒置した状態で 18 時間~24 時間程度培養する (※10)。

(※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) 大腸菌数の計数

- (a) 培養後、拡大鏡を用いて青色のコロニー数を数える。(※11)
- (b) 次の式から試料中の大腸菌数を算出する。(※12) (※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

(※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。

(※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。

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

(6) 空試験

培養に用いた希釈試料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。

(参考)

「令和 4 年度第 3 回下水道における水系水質リスク検討会」において回収率、繰り返し精度、室間精度の評価を行い、1 (※1) で例示した培地と同等以上の品質、性能を有することが確認された培地の組成 (例示培地も再掲)

培地 A	ペプトン 3.0g 塩化ナトリウム 5.0g
------	---------------------------

	リン酸二水素ナトリウム 2.2g リン酸一水素二ナトリウム 2.7g 寒天 10.0 g ソルビトール 1.0g ピルビン酸ナトリウム 1.0 g タージトール 0.15g トリプトファン 1.0g 合成基質混合物 0.4 g
培地 B	ペプトンと酵母エキス 8.0 g 塩化ナトリウム 5.0 g 特殊酵素基質混合物 4.8 g 寒天 15.0 g
培地 C	ペプトン 10.0 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 リン酸二水素ナトリウム 2.2 g リン酸一水素ナトリウム 2.7 g 硝酸カリウム 1.0 g ラウリル硝酸ナトリウム 0.2 g 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド (X-GLUC) 0.1 g 5-ブromo-6-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (MAGENTA-GAL) 0.1 g カンテン 15.0 g
培地 D	ペプトン 10.0 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 リン酸二水素ナトリウム 2.2 g リン酸水素二ナトリウム 2.7 g 硝酸カリウム 1.0 g ラウリル硝酸ナトリウム 0.2 g 発色酵素基質等混合物 0.2 g カンテン 15.0 g
培地 E	ペプトン 10.0 g 酵母エキス 3.0 g 塩化ナトリウム 5.0 g ラウリル硫酸ナトリウム 0.1 g ピルビン酸ナトリウム 1.0 g リン酸塩 0.5 g 合成酵素基質 0.4 g カンテン 15.0 g

上記の培地は回収率、繰り返し精度、室間精度について、以下の目標値を満たすことが確認されている。

目標値：回収率：70～100%、繰り返し精度：30%以内、室間精度：35%以内。

出典) 「令和4年度第3回下水道における水系水質リスク検討会」資料