

まえがき

この規格は、工業標準化法第 12 条第 1 項の規定に基づき、社団法人日本工業用水協会 (JIWA) / 財団法人日本規格協会 (JSA) から、工業標準原案を具して日本工業規格を制定すべきとの申出があり、日本工業標準調査会の審議を経て、経済産業大臣が制定した日本工業規格である。

JIS K 0350 には、次に示す部編成がある。

JIS K 0350-10-10 用水・排水中の一般細菌試験方法

JIS K 0350-20-10 用水・排水中の大腸菌群試験方法

JIS K 0350-30-10 用水・排水中の従属栄養細菌試験方法

JIS K 0350-40-10 用水・排水中の全細菌試験方法

用水・排水中の一般細菌試験方法

Testing methods for standard plate counts of heterotrophic bacteria in industrial water and wastewater

1. **適用範囲** この規格は、工業用水及び工場排水中の一般細菌の試験方法について規定する。
2. **引用規格** 付表 1 に示す規格は、この規格に引用されることによって、この規格の規定の一部を構成する。これらの引用規格は、その最新版（追補を含む。）を適用する。
3. **定義** この規格で用いられる主な用語の定義は、JIS K 0101, JIS K 0102, JIS K 0550 及び JIS K 0211 によるほか、次による。
 - 3.1 **一般細菌** 標準寒天培地を用いて $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養したとき、培地に集落を形成するすべての細菌をいう。
4. **共通事項** 共通事項は、次による。
 - 4.1 **通則** 化学分析に共通する一般事項は、JIS K 0050 による。
 - 4.2 **水** この規格で用いる水は、JIS K 0557 に規定する A2 又は A3⁽¹⁾の水。
注(1) 金属製の蒸留装置は用いない。
- 4.3 **試薬**
 - a) 試薬は、JIS に規定されているものを用いる。JIS に規定されていないものは、試験に支障のないものを用いる。
 - b) 試薬類の溶液の濃度は、一般に、質量濃度は g/L 又は mg/L、モル濃度は mol/L 又は mmol/L で示す。
なお、化合物については、無水物としての質量を用いる。
 - c) 試薬類の溶液名称の後に括弧で示されている濃度は、標準液以外は概略の濃度であることを意味する。
例えば、水酸化ナトリウム溶液 (1mol/L) は約 1mol/L の水酸化ナトリウム溶液であることを示す。
 - d) 液体試薬の濃度は、水（又は別の液体試薬）との混合比 [試薬 (a+b)] で表す。この表し方は、試薬 aml と水（又は別の液体試薬）bml とを混合したことを示す。
なお、JIS K 0050 の表 3 の液体試薬（例えば、塩酸など）を薄めないで用いる場合は、その試薬名だけで示す。
 - e) 試薬類の調製に用いる水は、4.2 の水による。
 - f) 試薬類の名称は、国際純正及び応用化学連合 (IUPAC) の無機化学命名法及び有機化学命名法を基にして、社団法人日本化学会が定めた化合物命名法及び JIS 試薬の名称とできるだけ整合を図った。
 - g) 試薬類及び廃液などの取扱いについては、関係法令などに従い十分に注意する。

4.4 器具などの滅菌操作 器具などの滅菌操作は、次による。

- a) **乾熱滅菌** ガラス製及び金属製器具類の滅菌に用いる。約 170℃で約 1 時間滅菌する。
- b) **高圧蒸気滅菌** 培地、希釈水、試料容器、使用済み培地などの滅菌に用いる。121℃で 15～20 分間滅菌する。
- e) **火炎滅菌** 試験管及びフラスコの口部などの滅菌に用いる。試験管及びフラスコは、培養操作の前後に斜めに持って回しながら口部を火炎の中にしばらく入れて滅菌する。

4.5 消毒操作 消毒操作は、次による。

- a) 試験操作の前後には、手指及び実験台を消毒する。手指の消毒にはクレゾール石けん液 (10g/L)、陽性石けん液 (1～10g/L)、消毒用エタノール (日本薬局方に規定するもの) 又はエタノール (80vol%) [JIS K 8102 に規定するエタノール (95) を用いて調製する。] を用いる。
実験台は、陽性石けん液 (10g/L)、消毒用エタノール又はエタノール (80vol%) などを噴霧するか、これらを含ませた布でぬぐって消毒する。
- b) 使用済みのピペット、試料容器、採水器などの器具は、クレゾール石けん液 (30～50g/L) などの消毒液中に 1 日間浸した後 (又は高圧蒸気滅菌した後)、消毒液が完全に除去されるまで、水でよくすすぐ。
- c) 培養試験後の試験管、ペトリ皿類^(?)は、培地ごと 4.4b) の高圧蒸気滅菌を行った後、培地を捨ててからよく水洗する。

注^(?) 合成樹脂製のものは、適切な滅菌をした後、廃棄する。

4.6 ガラス器具類 ガラス器具類は、一般に JIS R 3503 及び JIS R 3505 に規定するものを使用する。ただし、特殊な器具を必要とする場合には、それぞれの項目に、その一例を図示又は説明する。また、加熱操作を伴う場合には、JIS R 3503 に規定するほうけい酸ガラス-1 を用いる。

5. 試料

5.1 試料の採取 試料は、採水器又は試料容器を用いて採取する。

5.1.1 器具 器具は、次による。

- a) **採水器** ハイロート採水器^(?)。採水器は、携帯箱に収めて 4.4a) の乾熱滅菌を行う。図 1 に一例を示す。

注^(?) ハイロート採水器による採取が困難な深度からの採取には、バンドーン採水器を用いてもよい。

この場合は、b) の試料容器に移しかえる。

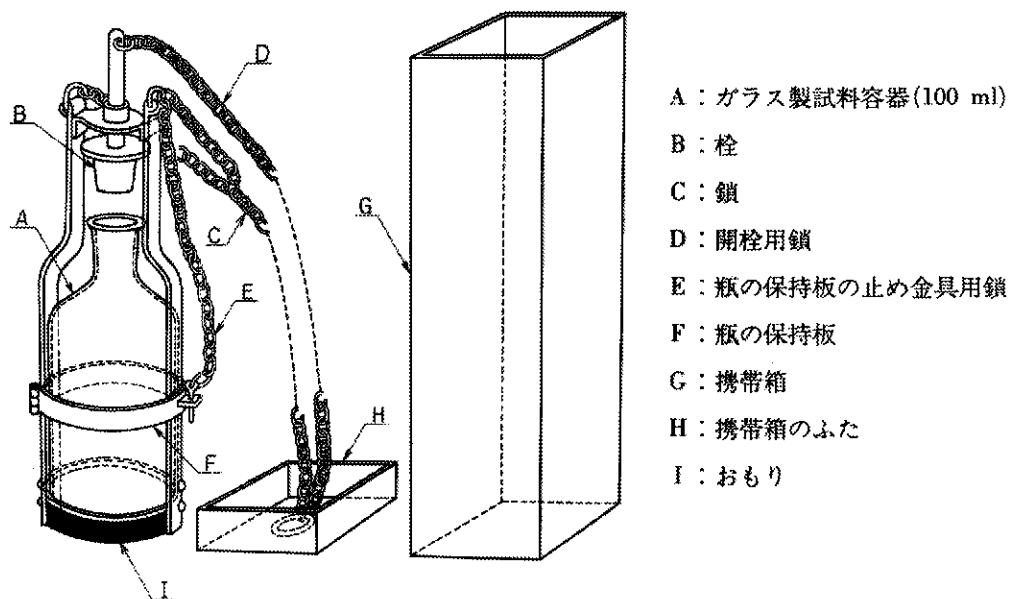


図1 ハイロート採水器の一例

- b) **試料容器** 共栓ガラス瓶 100ml。試料容器(*)は、栓部と首部をアルミニウムはく（又は硫酸紙）などで覆って 4.4a)の乾熱滅菌又は 4.4b)の高圧蒸気滅菌を行う。又は滅菌済みの細菌試験用のポリエチレン瓶を用いてもよい。試料採取時まで汚染を受けないように注意する。

注(*) 残留塩素などの酸化性物質を含む試料を採取する場合には、試料容器に JIS K 8637に規定するチオ硫酸ナトリウム五水和物（粉末にしたもの。）20～30mg を入れ、4.4b)の高圧蒸気滅菌又はオキシラン（エチレンオキシド）滅菌をしておく。

市販の滅菌済みの細菌試験用ポリエチレン瓶であらかじめチオ硫酸ナトリウムの入っているものを用いてもよい。

5.1.2 操作 試料の採取は、次による。

- a) **表層水の採取** 湖沼、河川、水路、排水口及び貯水槽などの表層水で直接採取できる場合は、試料容器で試料を採取する。この際、手指に触れた水が採取されないように注意する。直接採取できない場合は、採水器を用いて採取する(*)。
- b) **各深度の水の採取** 一定の深さの水は、採水器を用いて採取する(*)。
- c) **給水栓からの採取** 給水栓の材質が火炎滅菌に耐えるものである場合、あらかじめ、4.4c)の火炎滅菌に準じて給水栓口を滅菌し、栓を開き、配管中の水を十分に放出した後、試料容器に採取する。

火炎滅菌ができない場合は、あらかじめ、給水栓口の周辺及び内部の汚れを除去し、エタノール（80vol%）などで消毒しておく。栓を開き、配管中の水を十分に放出した後、試料容器に採取する。

- d) **配管、装置からの採取** c)と同様に操作して採取する。

5.2 **試料の取扱い** 試験は試料採取後、直ちに行う。直ちに試験ができない場合には、0～5℃（凍結させない。）の暗所に保存し、9時間以内に試験する。

6. **試験方法** 一般細菌の試験は、一定量の試料又は希釈試料を、標準寒天培地を用いて 36±1℃で 24±2時間培養し、培地上及び培地内に出現した集落数を計数する。

6.1 **試薬及び培地** 試薬及び培地は、次による。

6.1.1 水 4.2 による。

6.1.2 希釈水 希釈水は、生理食塩水又はりん酸塩希釈液 (pH7.2) を用いる。

a) 生理食塩水 JIS K 8150 に規定する塩化ナトリウム 8.5g を水に溶かして 1L とする。これを 6.2.2 のガラス瓶又は三角フラスコに適量（容器容量の約 $\frac{1}{2}$ ）を移し入れ、栓をした後 4.4b) の高圧蒸気滅菌を約 15 分間行う。

b) りん酸塩希釈液 (pH7.2) JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 34g を水約 500ml に溶かし、これに水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) (JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウムを用いて調製する。) を滴加して pH を 7.2 に調節し、JIS K 0557 に規定する炭酸を含まない水を加えて全量を 1L とする。この溶液 1.25ml をとり、水を加えて 1L とする。これを a) と同じ滅菌操作を行う。

6.1.3 標準寒天培地 ペプトン（カゼインのパンクレアチン水解物を用いる。）5g, 酵母エキス（粉末）2.5g, JIS K 8824 に規定する D (+) - グルコース 1g 及び JIS K 8263 に規定する寒天（粉末）15g を水 1L に加え、加熱して溶かす。滅菌後の pH が 7.0 ± 0.1 になるように、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) 又は塩酸 (1 mol/L) (JIS K 8180 に規定する塩酸を用いて調製する。) を用いて調節する^(f)。

大試験管 (30×200mm) 又は三角フラスコ^(f)に適量ずつ移し入れ、これに金属製、合成樹脂製又はシリコーンスポンジ製で高圧蒸気滅菌に耐える栓をして、4.4b) の高圧蒸気滅菌を約 15 分間行い、滅菌後、約 50℃に保って試験に使用する。保存する場合は、水分の蒸発を防いで冷暗所におく。長期間経過したものは用いない。

注^(f) 市販の粉末培地を用いて調製してもよい。

^(f) 使用する量に応じて、適切な容量のものを選ぶ。

6.2 器具及び装置 器具及び装置は、次による。

6.2.1 メスピペット 1～10ml。ピペット滅菌箱に先端を先にして入れるか、アルミニウムはく又は硫酸紙に包んで、4.4a) の乾熱滅菌をしておく。

6.2.2 希釈瓶 ガラス瓶又は三角フラスコ^(f)で、金属製又は合成樹脂製のねじぶた^(f)付きのもの。使用前に 4.4a) の乾熱滅菌又は 4.4b) の高圧蒸気滅菌をしておく。

注^(f) 容量は、希釈水の約2倍のものを用いるとよい。

^(f) ふたは、4.4b) の高圧蒸気滅菌に耐えるもの。又はシリコーンスポンジ製のものを用いてもよい。

6.2.3 ペトリ皿 ガラス製の直径約 90mm, 高さ約 15mm のもの。ペトリ皿滅菌箱に入れるか、アルミニウムはく又は硫酸紙に包んで 4.4a) の乾熱滅菌をしておく。又は JIS K 0950 に規定するプラスチック製滅菌シャーレ 90B。

6.2.4 集落計数器 1.5～2 倍の拡大鏡を備えたもの。

6.2.5 培養器 JIS T 1702 に規定するふ卵器 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節できるもの。

6.2.6 乾熱滅菌器 160～200℃に調節できるもの。

6.2.7 高圧蒸気滅菌器 JIS T 7322 又は JIS T 7324 に規定するもので、 121°C 以上に加熱でき、器内圧力 198kPa で使用できるもの。

6.3 器具などの滅菌操作 器具などの滅菌操作は、4.4 による。

6.4 消毒操作 消毒操作は、4.5 による。

6.5 試料の希釈 試料の希釈は、次による。

a) 試料 1ml 中の一般細菌数が、300 個以上あると予想される場合には、試料を十分に振り混ぜて均一にした後、その 1ml をメスピペット 1ml でとり、希釈水 9ml を入れた希釈瓶に加えてよく振り混ぜる^(f)。

b) この 1ml を別のメスピペット 1ml でとり、希釈水 9ml を入れた別の希釈瓶に加えてよく振り混ぜる^(f)。

- c) b)の操作を繰り返して、数段階の希釈を行い、希釈試料 1ml 中に 30～300 個の一般細菌集落が得られるように試料を調製する。

注⁽⁹⁾ 多数のペトリ皿に試料をとる場合は、希釈瓶に希釈水90mlを入れ、これに試料10mlをメスピペットで加え、よく振り混ぜる。

6.6 操作 操作は、次による。

- a) 5.によって採取した試料又は 6.5 によって調製した希釈試料⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾のそれぞれ 1ml を、メスピペットを用いて、複数のペトリ皿にそれぞれとる。
- b) 約 50℃に保った⁽¹²⁾標準寒天培地約 15ml を a)のそれぞれのペトリ皿に無菌的に加える⁽¹³⁾。直ちに、ふたに培地が付着しないように、円を描くように揺り動かして、試料又は希釈試料と標準寒天培地とをよく混合し、ペトリ皿の全面に広げる。
- c) ペトリ皿を水平の状態で静置し、培地が完全に固まるのを待つ。
- d) 培地が固まったら、ペトリ皿の上下を逆さにした状態で培養器に入れ、36±1℃で 24±2 時間培養する。
- e) 24±2 時間後に、集落計数器を用いて、培地上及び培地内に出現した集落を数え、平均値を求める。希釈試料を用いた場合は、集落数が 30～300 個の範囲にある希釈段階のペトリ皿を選び、その希釈段階の集落数の平均値を求める。
- f) この平均値に希釈倍数を乗じて、試料 1ml 当たり一般細菌の個数（個／ml）を求める。

注⁽¹⁰⁾ 試料1ml中の一般細菌数が300個以下と予想されるときは、5.によって採取した試料及び6.5a)の操作によった希釈試料を用いた、2段階の希釈段階について試験する。

⁽¹¹⁾ 6.5a)～c)の操作によって、数段階の希釈を行った場合は、希釈試料 1ml 中の一般細菌数が 30～300 個と予想される希釈段階を挟んだ 3 段階（例えば、100 倍希釈した希釈試料 1ml 中の一般細菌数が 30～300 個と予想される場合は、10 倍、100 倍及び 1 000 倍の 3 段階）の希釈試料をそれぞれ用いて、試験を行う。

⁽¹²⁾ 保存してある場合は、使用時に水浴中で加熱して溶かす。

⁽¹³⁾ 試料又は希釈試料をペトリ皿にとるとき及び培地をペトリ皿に注ぐときは、ペトリ皿のふたをわずかに開け、注ぎ終わったら直ちにふたをする。

備考 培養後の使用済み培地は、必ずペトリ皿のまま、4.4b)の高圧蒸気滅菌をしてから廃棄する。

7. 結果の表示 6.6f)で得られた一般細菌の個数（個／ml）は、有効数字 2 けたに数値を丸める。

結果には、試料の採取場所、採取日時、試験日時を付記する。

付表 1 引用規格

JIS K 0050	化学分析方法通則
JIS K 0101	工業用水試験方法
JIS K 0102	工場排水試験方法
JIS K 0211	分析化学用語（基礎部門）
JIS K 0550	超純水中の細菌数試験方法
JIS K 0557	用水・排水の試験に用いる水
JIS K 0950	プラスチック製滅菌シャーレ
JIS K 8102	エタノール (95)（試薬）
JIS K 8150	塩化ナトリウム（試薬）

JIS K 8180 塩酸（試薬）
JIS K 8263 寒天（試薬）
JIS K 8576 水酸化ナトリウム（試薬）
JIS K 8637 チオ硫酸ナトリウム五水和物（試薬）
JIS K 8824 D (+) - グルコース（試薬）
JIS K 9007 リン酸二水素カリウム（試薬）
JIS R 3503 化学分析用ガラス器具
JIS R 3505 ガラス製体積計
JIS T 1702 ふ（孵）卵器
JIS T 7322 医療用高圧蒸気滅菌装置
JIS T 7324 医療用小形高圧蒸気滅菌器

日本工業標準調査会標準部会 環境・資源循環専門委員会 構成表

	氏名	所属
(委員長)	二 瓶 好 正	東京理科大学理工学部
(委員)	間 邦 彦	日本製紙連合会
	稲 葉 敦	独立行政法人産業技術総合研究所
	指 宿 堯 嗣	独立行政法人産業技術総合研究所
	今 城 高 之	社団法人日本自動車工業会
	大 谷 郁 二	社団法人プラスチック処理促進協会
	川 合 正 剛	社団法人日本化学工業協会
	久 米 猛	財団法人化学物質評価研究機構
	小 林 珠 江	株式会社西友
	酒 井 伸 一	独立行政法人国立環境研究所
	佐 野 真理子	主婦連合会
	竹 居 照 芳	日本経済新聞社
	辰 巳 菊 子	社団法人日本消費生活アドバイザー・コンサルタント協会
	永 田 勝 也	早稲田大学理工学部
	中 山 哲 男	社団法人産業環境管理協会
	服 部 重 彦	社団法人日本分析機器工業会
	福 田 輝 夫	社団法人日本電機工業会
	松 田 美夜子	生活環境評論家リサイクル研究家（富士常葉大学環境防災学部）
	山 岸 千 丈	社団法人日本建材産業協会
	山 田 範 保	環境省大臣官房