

Microbiology

Nalgene分析用フィルターウェアに使用される メンブレンフィルターの評価

キーワード

ろ過、水質試験、環境検査、品質試験、フィルターロート、ニトロセルロース、メンブレンフィルターISO 7704:1985、微生物、回収、計数

概要

フィルターロートとメンブレンフィルターは、水質試験や食品・飲料製品の品質試験において微生物の回収と計数に日常的に使用されます。メンブレンがアセンブリされた滅菌済みのフィルターロートは、フィルターロートの滅菌やメンブレンのセットなど時間のかかる作業を省くことができ、作業効率化を図るために有用なツールです。

本稿では、Thermo Scientific™ Nalgene™分析テストフィルターロート (CN) およびThermo Scientific™ Nalgene™水質試験メンブレン (CN) に使われているメンブレンフィルターの流量の測定結果とISO 7704:1985に記載されている方法に従って評価した微生物回収率、そしてその評価に用いられたプロトコルを報告します。

はじめに

ろ過は、水質試験や食品・飲料製品の品質試験において一般的な作業です。ろ過のプロトコルを確立する際に考慮すべき重要な点のひとつが、検査対象となる液体の流量と微生物の回収率です。

メンブレンフィルターを液体が通過するときの流量は、メンブレンフィルターの孔径と液体の粘度によって決まります。流量を調べるには、一定の量の液体をメンブレンフィルターがセットされたフィルターロートに入れてろ過します。そして、ろ過に要した時間と液量から流量を算出します。



Nalgene分析テストフィルターロート (CN) (製品番号147-2045)

メンブレンフィルターと寒天培地を使用して液体に含まれる微生物の回収と計数を行い、その結果から微生物の回収率を算出します。微生物の回収・計数を行うには、まず試験対象となる液体をろ過して微生物をメンブレンフィルターに回収します。そしてメンブレンフィルターを取り出して寒天培地の上にのせて培養後、コロニーを数えます。

基本的に1個の微生物が1個のコロニーを形成するとみなし、培養後にコロニーを目視で数えます。この考えで測定した微生物の数はコロニー形成単位 (Colony Forming Unit：CFU) で表します。ろ過した液量とコロニー数 (CFU) がわかれば、対象となる液体中の微生物濃度を推定できます。

試験を行う前には、メンブレンフィルターの性能を評価する必要があります。微生物の回収と計数に使われるメンブレンフィルターの性能評価のガイドラインとしてISO 7704：1985規格が使用できます。本試験では、このガイドラインに従って評価用プロトコルを作成しました。具体的なISO 7704:1985の要件を以下に示します。

- メンブレンフィルターの各ロットのテストには5つ (以上) の別々のサンプルが必要
- 各プレートのコロニー数は25～100個とし、統計比較には200個以上のコロニーが必要
- コントロールプレートの80%以上のコロニー数が得られるメンブレンを合格とする

方法

1) 流量測定

孔径が0.45 μmまたは0.2 μmのニトロセルロース製メンブレンフィルターがセットされた3種類のNalgene分析テストフィルターロート (CN) 250 mLを用いて、コーン油、ビール、ぶどうジュース、トリプシン大豆ブロス、Tween™入りリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、PBS、脱イオン水の流量を測定しました。試験液は250 mLずつ、それぞれ5個用意しました。

試験液をフィルターロートに注ぎ、27 inHg以上の真空をかけ、全ての液体がメンブレンを通過するのに要した時間 (秒) を測定しました。試験液の量をろ過に要した時間 (秒) で割り、流量を算出しました。

表1. メンブレンフィルターの平均流量 (mL/秒) (n=5／ユニット)

Nalgene分析テストフィルターロート (CN)			
製品番号	147-2045	145-2045	145-2020
メンブレン直径 (mm)	47	47	47
メンブレン孔径 (μm)	0.45	0.45	0.2
試験液	平均流量 (mL/秒)		
コーン油	0.23 ± 0.003	0.23 ± 0.004	0.08 ± 0.001
ビール	2.3 ± 0.8	3.2 ± 0.1	0.5 ± 0.4
ぶどうジュース	3.7 ± 0.6	4.3 ± 0.9	1.4 ± 0.4
トリプシン大豆ブロス	6.1 ± 1.1	6.3 ± 1.5	1.3 ± 0.7
Tween入りPBS	8.2 ± 0.2	8.7 ± 0.2	3.1 ± 0.1
PBS	8.8 ± 0.5	9.5 ± 0.3	3.6 ± 0.1
脱イオン水	10.3 ± 0.7	8.4 ± 0.2	3.6 ± 0.2

2) メンブレンフィルターの微生物回収率の評価

Nalgene分析テストフィルターロート (CN) とNalgene水質試験メンブレン (CN) のISO 7704:1985規格への適合性を評価するために、メンブレンフィルター法を用いてメンブレンフィルターの微生物回収率を算出しました。

微生物は*Escherichia coli* (ATCC #11775)、*Enterococcus faecalis* (ATCC #19433)、*Saccharomyces cerevisiae* (ATCC #7754) を用いました。

既知の濃度の微生物懸濁液をフィルターロート (n=10) に注ぎ、全量をろ過しました。そして、微生物を回収したメンブレンフィルターを寒天培地の上にのせて培養後、発育した全てのコロニーを数え (CFU)、回収率を算出しました (表2)。

Nalgene分析テストフィルターロート (CN) の評価用プロトコルは、以下のとおりです。

1. 製造元の指示に従って寒天培地を準備します。蒸気滅菌後、溶かした寒天培地を滅菌済みのペトリディッシュ (Thermo Scientific™ Nunc™ ペトリディッシュ、製品番号 263991) に深さが3 mm以上になるように注ぎます。培地が固まったらペトリディッシュを、試験実施まで4 °Cで保存します。*Escherichia coli*はThermo Scientific™ Oxoidプレートカウント寒天培地 (乾燥) (製品番号CM0325B)、*Enterococcus faecalis*はThermo Scientific™ Oxoidトリプトンソーヤ寒天培地 (乾燥) (製品番号CM0131B)、*Saccharomyces cerevisiae*はThermo Scientific™ Remel Sabouraud's Dextrose Agar (製品番号R454462) を使用しました。
2. 適切な培地で培養した微生物を準備します。一晚培養後、培養液中の微生物の濃度を測定し、サンプルあたり25~100 CFUになるように50 mLの滅菌した脱イオン水で希釈します。ろ過用と標準ポアプレート用にひとつずつサンプルを準備します。
3. ポアプレートを準備します。手順2で準備したサンプル50 mLを滅菌済みのペトリディッシュに注ぎ、そのサンプルを適切な培地で覆います。培地が固まったら、培地が上になるように逆さまにして適切な温度で培養します。
4. 真空マニホールド (Thermo Scientific™ Nalgene™真空マニホールド、製品番号DS0345-0001) にNalgene分析テストフィルターロート (CN) をセットし、真空をかけます。手順2で準備したサンプル50 mLをフィルターロートに注ぎ、ろ過します。

5. 20~30 mLの滅菌した脱イオン水でフィルターロートの内側に残っているサンプルを洗い流し、その洗浄液もろ過します。
6. ろ過が終了したら、滅菌したピンセットでメンブレンフィルターを取り外し、準備した寒天培地の表面にのせます。メンブレンフィルターと寒天培地の間に気泡が入らないように注意します。
7. 適切な培養後、メンブレンフィルターとポアプレートのコロニーを数えます。そして、以下の式を使用して、回収率 (R) を算出します。

$$R = m_m / m_c \times 100$$

ここでは、 m_m はメンブレンフィルター上の計数、 m_c はポアプレート上の計数の平均を表します。

結果と考察

1) 流量測定

Nalgene分析テストフィルターロート (CN) 3種の各試験液の平均流量値を表1に示します。

2) 微生物回収率

Nalgene分析テストフィルターロート (CN) とNalgene水質試験メンブレン (CN) の微生物回収率を図1に示します。

*Saccharomyces cerevisiae*の回収率は全てのメンブレンフィルターで100%でした。*Escherichia coli*は89~100%、*Enterococcus faecalis*は81~100%であり、使用したメンブレンにより回収率が異なりました。ISO 7704:1985規格ではコントロールプレートと比べて80%以上のコロニー数が得られるメンブレンフィルターを合格としていることより、これらのNalgene分析テストフィルターロート (CN) とNalgene水質試験メンブレン (CN) のメンブレンフィルターはISO 7704:1985規格に適合していることが確認できました。

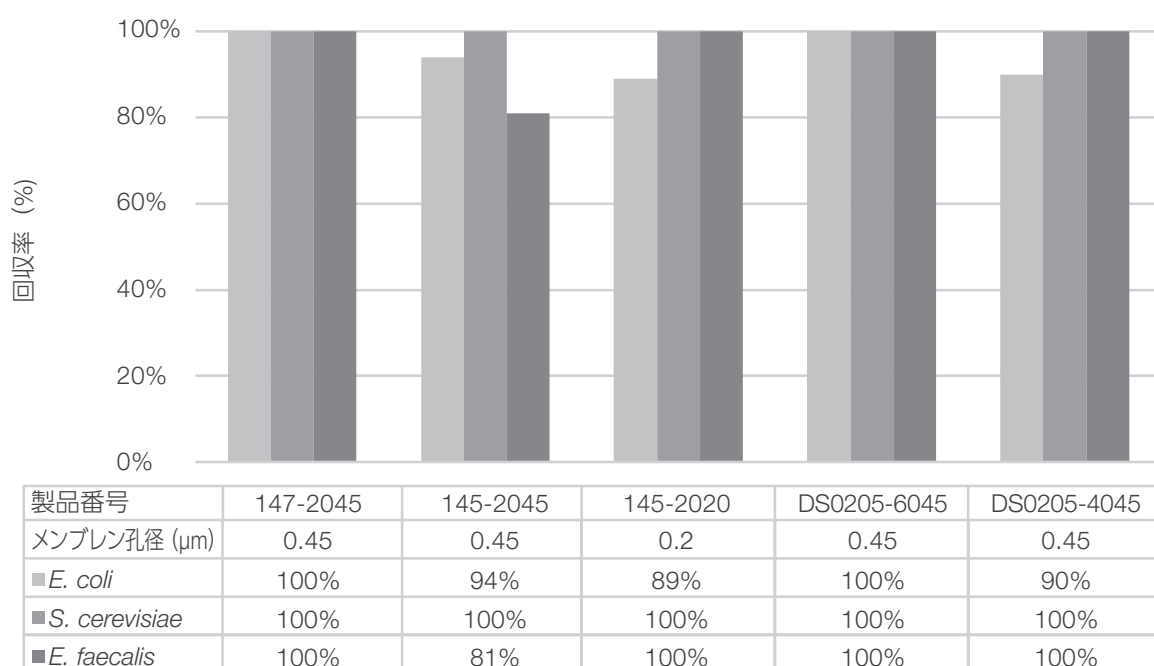


図1. Nalgene分析テストフィルターロート (CN) とNalgene水質試験メンブレン (CN) の微生物回収率

まとめ

本試験で示されたNalgene分析テストフィルターロートの流量は、ろ過中にそれぞれの液体がどのように機能するかを判断する目安になります。

ISO 7704:1985に定められた方法に従ってNalgene分析テストフィルターロート (CN) のメンブレンフィルターとNalgene水質試験メンブレン (CN) の微生物回収率の評価を行いました。全ての製品でポアプレートと比べて80%以上のコロニー数 (CFU) が得られたことより、これらのメンブレンフィルターはISO 7704:1985の要件に適合することが示されました。また、評

価用に作成したプロトコルは、メンブレンフィルターで微生物を回収・計数するときのプロトコルとして使用できます。

なお、ここに示したデータは、試験実施時の製品性能を忠実に見積もったものです。このデータは、特定の目的への適合性を保証するものでも承認するものでもありません。お客様の個別のアプリケーションについては、お客様自身で製品の有効性を検証することを推奨いたします。

Ordering information

製品名	入数	製品番号
Nalgene分析テストフィルターロート (CN) 0.45 µm/47 mm/250 mL グレー 滅菌	50	147-2045
Nalgene分析テストフィルターロート (CN) 0.45 µm/47 mm/250 mL 白 滅菌	50	145-2045
Nalgene分析テストフィルターロート (CN) 0.20 µm/47 mm/250 mL 白 滅菌	50	145-2020
Nalgene水質試験メンブレン (CN) 0.45 µm/47 mm グレー 滅菌	100	DS0205-6045
Nalgene水質試験メンブレン (CN) 0.45 µm/47 mm 白 滅菌	100	DS0205-4045
Nalgene真空マニホールド 3本立て	1	DS0345-0001

 詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/analyticalfiltration

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。
 © 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
 Tween is a trademark of Merck.
 実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
 価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
 標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc **LSP082-A23060B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL : 03-6832-9260 FAX : 03-6832-9261

営業部 TEL : 03-6832-9270 FAX : 03-6832-9271

 facebook.com/ThermoFisherJapan

 [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

thermo scientific