① 染色法

染色法は、生菌を適当な染色液を用いて染色し、生菌の物理的・化学的性質、形状及び芽胞の有無を判定する試験法である。

(i) グラム染色法　次の２つの方法のいずれか適当な方法を用いる。

ア　HUCKERの変法

スライドグラス上に塗抹し、固定した試料にフッカーの染色液２滴を加え、30～60秒間放置して染色した後、スライドグラスを軽く振って液をきる。次に、ルゴール液を十分に加え、60秒間放置した後、水洗し、ろ紙で水を吸収する。スライドグラスを軽く動かしながら、脱色液として無水エタノール又はエタノール・アセトン混液（７：３）を用いて洗液がほぼ無色になるまで脱色する。その後、水洗し、ろ紙で水を吸収する。これにサフラニン溶液（１→200）２滴を加え、60秒間放置し、後染色（対比染色）した後、水洗し、乾燥する。

イ　Lillieの変法

スライドグラス上に塗抹し、固定した試料にリリーの染色液２滴を加え、30秒間放置して染色した後、スライドグラスを軽く振って液をきる。次に、ヨウ素・ルゴール試液で数回洗った後、ヨウ素・ルゴール試液３滴を加え、30秒間放置する。ヨウ素・アセトン試液で十分に洗い流した後、ヨウ素・アセトン試液３滴を加え、30秒間放置する。その後、水洗し、ろ紙で水を吸収する。これに弱石炭酸フクシン液２滴を加え、30秒間放置し、後染色（対比染色）した後、水洗し、乾燥する。

(ii) 芽胞染色法　WIRTZの法（SCHAEFFER-FULTONの変法）

スライドグラス上に塗抹し、固定した試料にマラカイトグリーン溶液（１→20）で１～３分間、加温又は加熱して染色した後、約30秒間水洗し、乾燥する。乾燥した塗抹面にサフラニン溶液（１→200）１～３滴を加え15～30秒間染色した後、水洗し、乾燥する。

② 糖分解能力試験法

糖分解能力試験法は、生菌を培養して培養液のpHを測定等することにより、生菌の糖の分解能力の有無を判定する試験法である。

次の２つの方法のいずれか適当な方法を用いる。

(i) 第１法

各条に規定する培地に生じた集落を白金耳でとり、８号培地10mL及び各条に規定する糖の水溶液（３→10）をろ過滅菌した後、ろ液0.3mLを加えた８号培地10mLにそれぞれ接種し、36～38℃で７日間嫌気的に培養し、標準液及び試料溶液とする。

pH測定法により標準液及び試料溶液のpHを測定し、標準液のpHから試料溶液のpHを引いた値が１未満のときを陰性、１以上のときを陽性とする。

(ii) 第２法

各条に規定する培地に生じた集落を白金耳でとり、各条に規定する糖の水溶液（３→10）をろ過滅菌した後、ろ液0.1mLを加えた10号培地３mLに接種し、36～38℃で７日間培養し、試料溶液とする。

別に、陰性対照として10号培地３mLに、陽性対照としてブドウ糖溶液（３→10）をろ過滅菌した後、ろ液0.1mLを加えた10号培地３mLに、それぞれ菌を接種し、同様の操作を行う。

試料溶液が青紫色を呈した場合を陰性と、黄色を呈した場合を陽性とする。同時に、陰性対照が青紫色を、陽性対照が黄色を呈することを確認する。

③ 乳酸生成能力試験法

乳酸生成能力試験法は、生菌を培養して培養液中の乳酸を測定することにより、生菌の乳酸の生成能力の有無を判定する試験法である。

試料溶液及び標準液の調製

別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

各条に規定する試料原液又は培地に生じた集落を白金耳でとり、２号培地10mLに接種し、36～38℃で７日間培養し、試料原液とする。試料原液1.0mLを10mLの共栓付き試験管に入れ、硫酸（１→２）0.25mL及びエーテル２mLを加え、緩やかに20回転倒混和した後、静置し、上層をとり、別の10mLの共栓付き試験管に入れ、同量の水を加え、同様に操作し、下層をとり、これをメンブランフィルター（孔経0.45μm以下）でろ過し、試料溶液とする。

乳酸1.0mLに水を加えて100mLとし、これを標準原液とする。標準原液1.0mLに水を加えて100mLとし、これをメンブランフィルター（孔経0.45μm以下）でろ過し、標準液とする。

使用する水は、液体クロマトグラフ用に精製したものを用いる。

ただし、エンテロコッカス　フェカーリス、エンテロコッカス　フェシウム及びバチルス　コアグランスは好気的に、ラクトバチルス　アシドフィルス及びラクトバチルス　サリバリウスは嫌気的に培養する。

操作法

試料溶液及び標準液各20μLにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行うとき、試料溶液から得たピークの保持時間は、標準液から得たピークの保持時間に一致する。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム：内径4.6mm、長さ150mmのステンレス管に、粒径５μmの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充塡したもの

カラム温度：40℃

移動相：りん酸（１→1,000）

流量：毎分約1.0mL

④ 酪酸生成能力試験法

酪酸生成能力試験法は、生菌を培養して培養液中の酪酸を測定することにより、生菌の酪酸の生成能力の有無を判定する試験法である。

試料溶液及び標準液の調製

各条に規定する試料原液又は培地に生じた集落を白金耳でとり、７号培地10mLに接種し、36～38℃で７日間嫌気的に培養し、試料原液とする。試料原液1.0mLを10mLの共栓付き試験管に入れ、硫酸（１→２）0.25mL及びエーテル２mLを加え、緩やかに20回転倒混和した後、静置し、上層をとり、別の10mLの共栓付き試験管に入れ、同量の水を加え、同様に操作し、下層をとり、これをメンブランフィルター（孔経0.45μm以下）でろ過し、試料溶液とする。

酪酸1.0mLに水を加えて100mLとし、これを標準原液とする。標準原液1.0mLに水を加えて100mLとし、これをメンブランフィルター（孔経0.45μm以下）でろ過し、標準液とする。

使用する水は、液体クロマトグラフ用に精製したものを用いる。

操作法

試料溶液及び標準液各20μLにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行うとき、試料溶液から得たピークの保持時間は、標準液から得たピークの保持時間に一致する。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム：内径4.6mm、長さ150mmのステンレス管に、粒径５μmの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充塡したもの

カラム温度：40℃

移動相：りん酸（１→1,000）

流量：毎分約1.0mL