

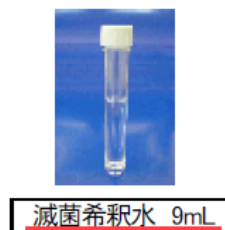
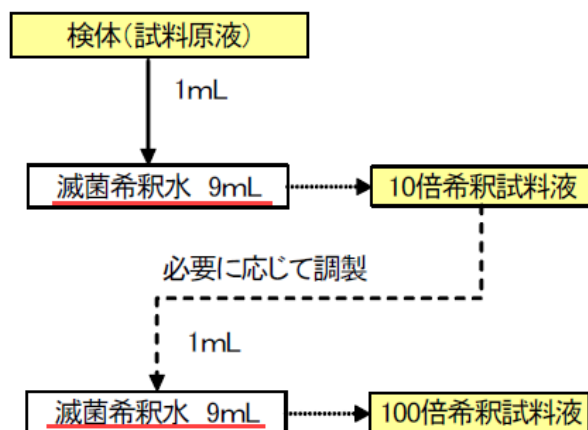
### ----- 一般生菌の微生物検査手順 -----

#### 1-1. 検体の採取

検体以外からの微生物汚染がないように、器具類は全て滅菌したものを使用する。採取した検体は、変質や微生物の増殖が起こらないように 4℃以下の低温に保存し、4 時間以内に検査を行う。

#### 1-2. 試料原液の調製および希釈

検体は通常 10gを計量し、検体の 9 倍量の希釈水を加えて調製する。液状の検体では、採取した試料をそのまま試料原液とする。希釈試料液は必要に応じて希釈水で 10 倍段階希釈して調製する。通常は、ピペットを用い 1mL の試料液を 9mL の希釈水に加えて均一に混合する。試料液の pH は滅菌前に 6~8 に調整しておく。必要に応じて予め希釈水に酸やアルカリを添加しておいてもよい。調製した試料液は 1 時間以内に試験に供し、菌数の増減がないようにする。



## 1-3. 試験操作

### 細菌数(一般生菌数)測定法

#### 1) 培地および希釈水

培地	: <u>湯煎培地</u>	【標準寒天培地】
希釈水	: <u>リン酸緩衝生理食塩水</u>	【滅菌希釈水 9mL】
		【滅菌希釈水 90mL】

#### 2) 培地への接種

##### 《寒天平板混釈法》

検査しようとする原液、10 倍液、100 倍液および 1000 倍液のそれぞれについて、深型シャーレ 2 枚以上にそれぞれの検液を各 1mL ずつ正確に滅菌ピペットで採り、これに加温溶解して 43～45℃に保持した標準寒天培地約 15mL を加え、静かに混和し、冷却凝固させる。検液をシャーレに採ってから培地を加えるまでは 20 分以内に行う。培地が凝固したら倒置し、インキュベーターに入れ培養を行う。

同時に、検液を加えずに希釈用液 1mL と培地を混合した培地が無菌であったことを確認しておくことが望ましい。

##### 《寒天平板表面塗抹法》

固化させ、表面を乾燥させた寒天培地上に、0.05～0.2mL の試料溶液をのせ、コンラージ棒などで均等に塗抹する方法である。シャーレの大きさ、使用する寒天培地の種類と量、培養温度と時間及び生菌数算出法などは、寒天平板混釈法と同様である。

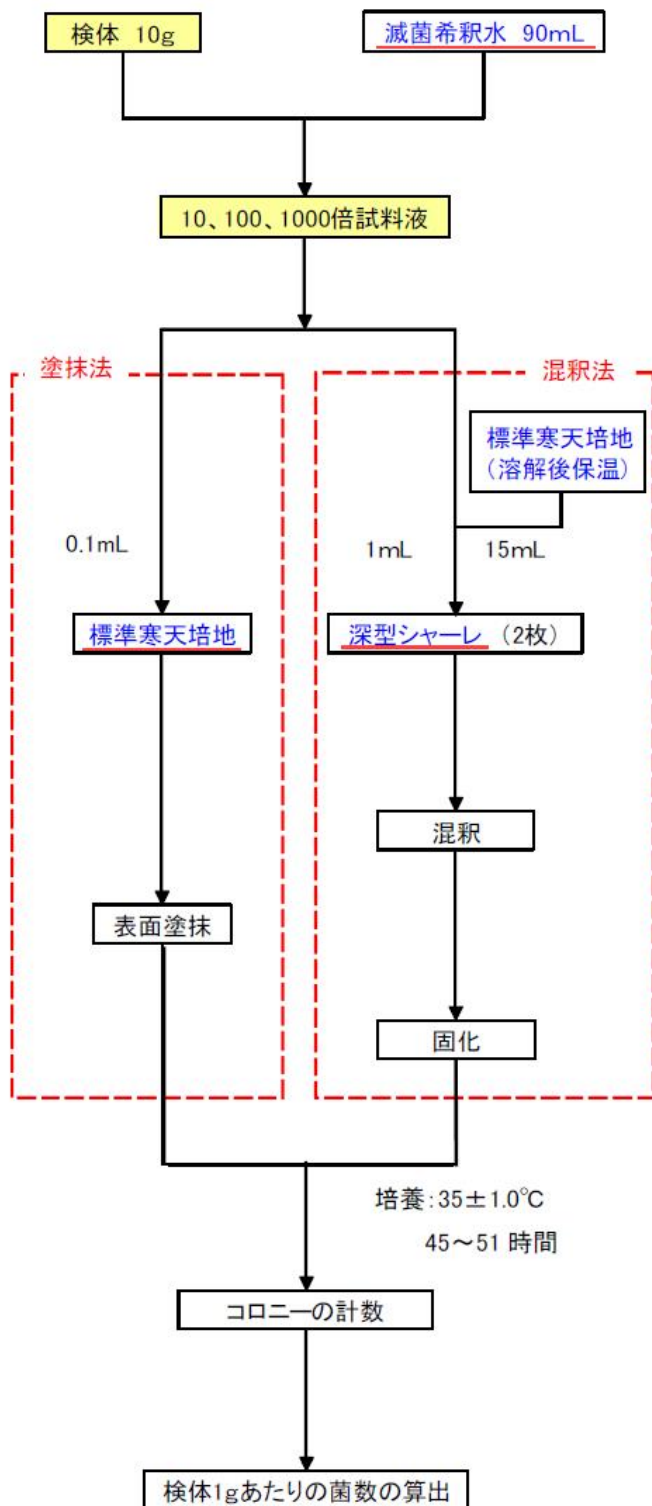
寒天平板混釈法よりも熱に敏感な菌に適している。

#### 3) 培養

温度は 35±1.0℃、時間は 45～51 時間とする。培養が終了した培地は直ちに発生した細菌集落数を算定する。直ちに算定できない場合は 5℃の冷蔵庫に保存し、24 時間以内に算定する。

#### 4) 判定

検出されたすべてのコロニーをコロニーカウンターなどで測定し、検体 1gあたりの菌数を算出する。(4P菌数計算参照)通常、30～300 個のコロニーが得られた平板の測定値を採用し、検体 1gあたりの菌数を算出する。



滅菌希釈水 225mL

## 塗抹法



標準寒天培地



表面塗抹

## 混積法



標準寒天培地(湯せん培地)



希釈試料液の滴下



寒天培地の分注



混積操作



大腸菌 混積培養後

## 菌数計算

寒天培地上に形成されたコロニーを計測して 1 つの希釈倍率毎に 2 枚の平均値を求め、希釈倍率を乗じる。以下に混釈法を用いたときの計算方法を示す。平板塗抹法により、試料の接種量が 0.1mL であった場合は試料の接種量が 1/10 であるため、さらに計数値を 10 倍する。

例) 100 倍希釈液で、コロニー数 179 と 192 を検出した場合

$$(179+192) \div 2 \times 100 = 18550 \doteq 19000 \text{cfu/g(mL)}$$
$$(1.9 \times 10^4)$$

・平均コロニー数がどの希釈倍率でも 30 個以下の場合、最も希釈倍率が低い培地のコロニー数を記入する。10 倍、100 倍の検体希釈液であれば、10 倍希釈の検体を混釈した培地のコロニー数を採用する。その場合、成績表には 300 以下/g(mL)と表記する。

・連続した異なる 2 つの希釈倍率で 30～300 個のコロニーが観察されたときは 2 つの差を求め、次のように計算する。

2 つの希釈倍率のコロニー数の間に **2 倍以上の差がみられる場合は**希釈倍率の低いほうのコロニー数を採用する。

例) 100 倍と 1000 倍で、それぞれ平均のコロニー数が 253 個と 41.5 個の場合は差が 2 倍以上とみなし、菌数は  $2.5 \times 10^4$  cfu/g(mL)となる。

2 つの希釈倍率のコロニー数の差が **2 倍以下の場合**は 2 つの希釈倍率の平均値を求める。

例) 100 倍と 1000 倍でそれぞれ平均のコロニー数が 64.5 個と 38 個の場合は差が 2 倍以下であるので、2 つの希釈倍率全て、つまり 4 枚の培地のコロニー数の平均値を求める。

100 倍希釈で 61 個と 68 個、1000 倍希釈で 40 個と 36 個の結果であった場合

$$(61+68+400+360) \div 4 = 222.25$$

$$222.25 \times 100 = 22225 \quad 2.2 \times 10^4 \text{ cfu/g(mL)}$$

以下の場合には測定不可能または検査結果を無効とする

- ・拡散した集落が平板培地の 1/2 以上を占めている場合
- ・結果を比較するために設けた試験区(ブランク)が汚染されていた場合
- ・菌数が非常に多く、測定不可能な場合