

参考にして $10^2 \sim 10^4$, $10^3 \sim 10^5$ というように希釈段階を省略して 3 段階でよい。

各希釈段階について 2 枚のペトリ皿を用いて、それぞれの希釈試料液を 1ml ずつ分注する。次いで、あらかじめ高圧滅菌後 50°C 以下の寒天が固まらない程度のできるだけ低い温度で保温しておいた標準寒天培地約 15ml を無菌的に各ペトリ皿に注ぎ、直ちに試料と培地がよく混ざるように静かに混合（混釈）する。この際、用いた希釈水、培地、ペトリ皿、ピペットなどが無菌であることを確かめるために、混合時に用いた希釈水 1ml をペトリ皿に採り、寒天培地を加えて混合したものを対照として置く。試料液をペトリ皿に分注してから培地と混合するまでの操作は 20 分以内に終了し、ペトリ皿に希釈試料液を分注したまま長時間放置してはならない。

なお、各希釈段階について 2 枚のペトリ皿を用いるのが通常の方法であるが、日常の自主衛生管理を目的とした検査では、各希釈段階について 1 枚のペトリ皿による方法でも検体のひょう量、試料原液の作製、希釈、希釈試料液の分注、混釈培養の各操作を正確に実施すれば、大きな過ちはないと考えられる。

(b) 培養

寒天培地が完全に凝固したらペトリ皿を倒置して、 $35 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養する。なお、乳・乳製品、食肉、魚介類などの低温流通食品では低温細菌の汚染状況の把握も重要であることから、 $30 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ～ 72 時間培養を行い、中温細菌と低温細菌とを同時に測定して、より広範な細菌汚染状況を把握しようとする考え方が国際的に広く支持されている。これに対して、加温式自動販売機で販売されるコーヒー、スープなどの缶入り飲料、温蔵庫や保温ジャーなどで保温される食品では *Bacillus stearothermophilus* や *B. coagulans* などのいわゆる高温細菌による品質劣化が予想され、これらの菌は 35°C では発育できないので、中温細菌と併せて 55°C 培養による高温細菌を検査することも必要となる。

通常、生菌数検査では上記のように混釈培養法が採用されるが、この方法では試料と $45 \sim 50^\circ\text{C}$ に溶解した寒天培地を混合するため、温度感受性の高い低温細菌や水系由来の細菌が死滅することがある。このため、あらかじめ標準寒天培地平板を作製しておき、その平板上に均一に試料を塗抹して培養する寒天平板塗抹法を採用することもある。すなわち、この方法では浅型ペトリ皿に標準寒天培地を 15 ～ 20ml 注ぎ固化後、ふ卵器中で 1 ～ 2 時間寒天表面の水分を乾燥させて、各希釈段階 2 枚の寒天平板に希釈試料液の 0.1ml を滴下し、平板全面にコンラージ棒で水分が認められなくなるまでよく塗抹する。本法は低温細菌などの汚染が心配される食肉、魚介類、野菜などの検査に勧められる方法であり、集落形態の観察や菌の分離も容易である。

(c) 集落数の算定

乳・乳製品、氷雪、氷菓の成分規格検査法においても生菌数の算定法が規定されている。通常は次の要領に従って発生した集落数をコロニーカウンターを用いて測定することにより集落

数を算定する。なお、直ちに集落数を測定できない場合は、5℃の冷蔵庫に培養後の寒天平板を保存し24時間以内に算定する。1日以上経過すると発育菌数に変動が起き正しい成績が得られない。

1) 1平板に30～300個の集落数がある場合

i) 1段階の希釈にのみ30～300個の集落数が得られた場合：2枚の平板の集落数の算術平均を求める。

ii) 連続した2段階の希釈に30～300個の集落数が得られた場合：各希釈ごとに2枚の平板の算術平均を算定し、両者の比を求める。

両者の比が2倍未満のときは連続する2段階の希釈平板の集落数から次の計算式により求める。

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

ΣC ：各平板の集落数の合計

n_1 ：希釈が低いほうの算定対象ペトリ皿数

n_2 ：希釈が高いほうの算定対象ペトリ皿数

d ：希釈が低いほうの希釈倍数

例えば、 10^2 希釈で集落数が188と235、 10^3 希釈で31と40であったとすれば、

$$N = \frac{188 + 235 + 31 + 40}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{494}{0.022} = 22,455$$

両者の比が2倍を超えたときは希釈段階の低いほうの集落数の算術平均を求める。

2) 全平板が300個を超えた集落数である場合

最も希釈倍率の高いものについて、正確に1cm²の区画のある密集集落計算板を用いて計測する。

i) 1cm²の区画に10個以下の集落数の場合：中心を通過する縦に6か所、これに直角に6か所の計12か所の区画中の集落数を数え、1cm²区画の平均集落数を求め、これにペトリ皿の面積を乗じて1平板当たりの集落数を算出する。直径9cmのペトリ皿では、得られた1cm²の平均集落数に65を乗じる。

ii) 1cm²の区画に10個以上の集落数の場合：前記と同様にして4～5か所の区画の集落数から1cm²区画の平均集落数を求め、ペトリ皿の面積を乗じて1平板当たりの集落数を算出する。

3) 全平板が30個未満の場合

最も低い希釈倍数に30を乗じて、例えば固形試料の場合は試料原液の10倍希釈では300

以下、100 倍希釈では 3,000 以下として記載する。

- 4) 拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する。
 - i) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。
 - ii) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。
- 5) 次のような場合は、実験室内事故 (Laboratory Accident ; L.A.) とする。
 - i) 集落の発生が認められない場合。ただし殺菌した製品やそれに相当する加工あるいは加熱処理がなされた食品はこの限りではない。
 - ii) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以上となり、集落数が測定できない場合。なお、アルコール綿などにより寒天平板上をていねいにぬぐって拡散集落を除去し、発生集落数を計測することにより細菌数を推定できる。
 - iii) 対照とした平板に集落が認められ、汚染されたことが明らかな場合。
 - iv) その他不適当と思われる場合。

(d) 菌数の記載

生菌数の記載は、算定対象とした平板の集落数に希釈倍数を乗じ、さらに得られた数字の上位 3 桁目を四捨五入して、上位 2 桁を有効数字として表示し、以下に 0 をつけ、食品 1g (1ml) 当たりの菌数として求める。例えば、22,000 / g (ml)あるいは 22×10^3 / g (ml) または 2.2×10^4 / g (ml) と記載する。なお、最低希釈平板の集落発生数が 30 未満の場合も、必要があれば測定値をそのまま記載しておく。

(e) 簡易・迅速検査法

一般的に、生菌数の測定は法令に規定されているいわゆる公定法といわれる標準平板菌数測定法が広く採用されているが、近年、簡易・迅速を目的としたさまざまな手法が開発され市販されている。主なものを以下に示すが、できるだけ科学的根拠に基づいて評価を済ませたものを用いることが重要である。また、それぞれの仕様書きをよく読み、特徴や使用範囲に限界のあることを正しく認識し、使用目的に合った検査法を採用することにより、日常の自主衛生管理に効果的にフィードバックしていくことができる。

1) スタンプ法

枝肉、まな板や包丁などの器具・器材、食品取扱い環境の表面の生菌数検査に使用され、プラスチック容器などに固化された標準寒天培地面を検査材料表面に圧着することにより、材料表面に存在する汚染細菌を寒天培地に移し取り、材料表面の生菌数を把握しようとする手法である。培地や試料の調製が必要なく、きわめて手軽であるということから現場検査に広く使用されている。日水製薬、栄研器材、日本 BD、Merck、デンカ生研などからいろいろな商品名で市販されている。

2) 乾式培地法

特殊な膜面に培地成分を乾燥状態で含ませてあるため培地の調製が不要であるが、試料調製