

2

食品の微生物学的検査

われわれの生活環境には無数ともいわれるさまざまな微生物が生息している。このような微生物の中には増殖に際し、食品中の栄養素を強く利用し、食品を腐敗させる。また、食中毒や感染症を引き起こす病原菌もある。このような食品の劣化ならびに微生物による危害を防止することが食品衛生上の大きな目的の1つといえるが、このために食品の汚染微生物の実態を把握し、同時に食中毒などの疾病をもたらす病原菌についても検索する必要がある。

2-1 微生物検査上の基本的な注意

微生物はわれわれの生活環境のいたる所に存在している。検査にあたってはこれらを排除し、試料中の微生物のみを検索する、いわゆる無菌操作に十分注意しなくてはならない。また、微生物の取扱いが不十分であれば、実験室全体の汚染をもたらすのみならず、病原微生物による実験室内感染の危険性があることも、常に心得ておく必要がある。

次に微生物取扱い上の注意点を列挙する。

- ① 実験にあたっては専用の実験着を着用し、専用の履物に履き替える。調理着などとは区別する。
- ② 正しい検査手技を身に付けるようにし、未熟な自己流に固執しないこと。
- ③ 効果的な手洗いと万が一の二次汚染防止のため、手指の爪は常に短く切っておくこと。
- ④ 使用する培地および器具は原則として滅菌したものを使用すること。
- ⑤ 微生物の取扱い時は窓を閉め、空気の流動を少なくするためにできるだけ静かに行動すること。
- ⑥ 実験室内は清潔にし、飲食物は持ち込まないこと。
- ⑦ 白金耳、白金線、試験管やフラスコの使用前後は必ず滅菌すること。
- ⑧ 培地類は使用后、滅菌して棄てること。寒天は腐らないので排水管をつまらせないために寒天培地は固まった状態で流しに流さないこと。

2-2 微生物検査に必要な器具

微生物検査に必要な器具は、試験管、ビーカーなどの一般的な実験器具、ダーラム管、シリコ栓など微生物検査に特有な器具・器材を必要とする。

1) ガラス器具類

① 試験管：大試験管 (28×200 mm)，中試験管 (18×180 mm)，小試験管 (13×135 mm)，ビグール管 (5×18 mm)

② ペトリ皿 (シャーレ)

滅菌済みのプラスチック製のものが繁用され、深型 (90×20 mm) は混釈培養として、浅型 (90×13 mm) は塗抹用として利用すると良い。

③ ルー型培養びん

びんの片側が平坦になっており、芽胞菌を培養し、芽胞を調製するのに便利である。

④ メスピペット (牛乳用：11.1 mL 用，2.2 mL 用など)

試料採取にあたっては先口が広がっているものが便利である。牛乳検査にあたっては牛乳検査用のものを用いるとよい。

⑤ コンラージ棒

直径 2 mm のガラス棒を L または三角に折り曲げたもので、寒天平板培地に試料液や菌液を塗抹する際に利用する。

⑥ 白金耳，白金線，白金鉤

培地上の菌の移植時に使用するものである。繰り返し火炎滅菌を行うので、酸化されにくい白金が使用されるが、高価なので一般には電熱用ニクロム線が用いられる。特に鉄分の含まれていない 1 または 2 等級のものがよい。

⑦ ダーラム管 (長さ 20 mm，幅 5 mm)

糖分解によるガス産生の有無を判定する。

⑧ 誘導板・塗抹針

牛乳等の総菌数の算定時に用いられる。

2) 微生物用機器

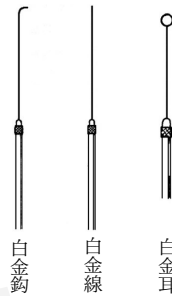
電子天秤，培地および器具の滅菌用として乾熱滅菌器，高圧滅菌器 (オートクレーブ) や，培養に用いる孵卵器，試料調製時に使用するダイリューター，その他クリーンベンチ，ストマッカーなどが利用される。



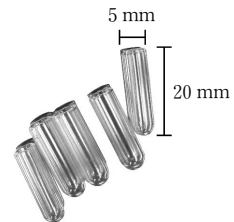
ルー型培養びん



メスピペット



ストマッカー



ダーラム管



ダイリューター

2-3 滅菌法および消毒法

微生物検査を正確に行うためには、器具、培地などは事前に滅菌されたものを使用しなければならない。滅菌はすべての微生物を死滅、除去させることにあり、消毒は対象とするものからの感染性をなくすことで、一般的には非病原微生物の残存は許容するが、病原微生物は完全に殺滅除去することをいう。

代表的な滅菌法

(1) 物理的滅菌法

1) 加熱滅菌法

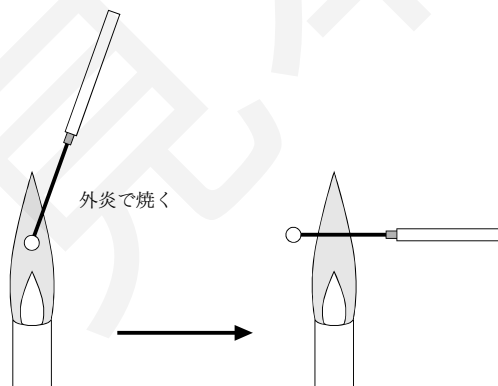
① 火炎滅菌法：白金耳、白金線、試験管の口、フラスコの口をブンゼンバーナーの炎の中に数秒間かざして滅菌する方法で、無菌操作で欠かすことのできないものである。特に白金耳などは、操作前は酸化炎（外炎）で全体をあぶって滅菌するが、菌を扱ったあとは還元炎（内炎）で先端を焼いたあと酸化炎で全体を焼くようにするとよく（白金耳の火炎滅菌法）。

② 乾熱滅菌法

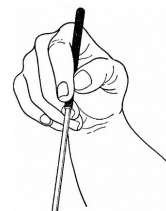
乾熱滅菌器で160～180℃、30～40分間保って滅菌する方法である。



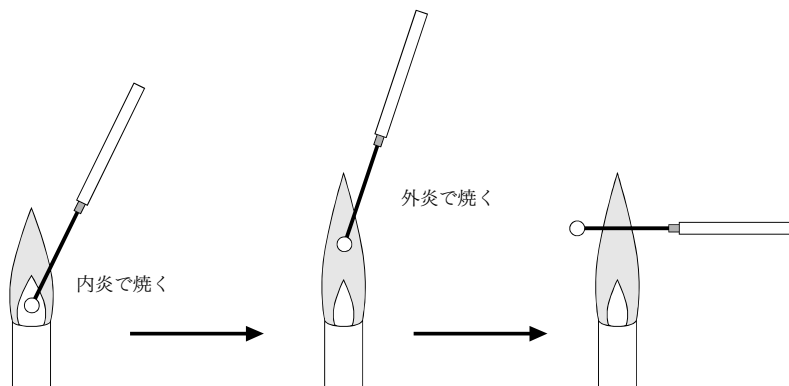
乾熱滅菌器



釣菌前の白金耳の焼き方



ペンを持つ要領で柄の部分を持つ



釣菌後の白金耳の焼き方

2-8 一般衛生微生物検査

食品の衛生管理や食品由来感染症（食中毒を含む）など食品の安全性や品質保持を考える上で微生物学的評価は重要な意味を持つ。微生物学的評価には、定量的評価と定性的評価があげられる。定量的評価は、食品中に存在する微生物数を測定する生菌数検査、総菌数検査、大腸菌・大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数や乳酸菌数、真菌数検査などで、定性的評価には特定細菌、すなわち大腸菌・大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌、腸球菌、腸炎ビブリオ、カンピロバクターなどの有無を確認する検査が行われる。これらの検査法については食品衛生法に基づいた成分規格・基準として施行規則が示されている。

実験1 生菌数の検査

生菌数検査とは、好気条件下において増殖しうる中温性の細菌を測定する検査であり、食品衛生検査における通常生菌数測定では、標準寒天培地を用いて35°Cで24～48時間培養を行い、発育した集落数を計測して食品1g（または1mL）あたりの細菌数として表示する。食品の原材料や製品中の生菌数は、原材料や製造環境における微生物汚染の程度、衛生的な取扱いなど食品の製造、加工、輸送、貯蔵など食品の安全性や保存性に関する総合的な評価の指標として扱われ、食品のカテゴリによって生菌数基準が定められている。測定には、標準寒天培地を用いた平板培養法（寒天平板混積法、寒天平板塗抹法）が公定法として用いられているが、その他にメンブランフィルター法、スパイラルプレートの法、ペトリフィルム法、スタンプ法などがある。また、生菌数測定の迅速化を目的としてDEFT（Direct Epifluorescent Filter Technique、直接落射蛍光フィルター法）、バクトスキャン法やバイオルミネッセンス法などを用いた菌数測定法も開発されている。

* 標準寒天培地（生菌数用培地）

組成

酵母エキス2.5g
ペプトン5g
ブドウ糖1g
寒天15g
蒸留水1000mL
pH 7.0±0.2	

普通寒天培地

組成

肉エキス5g
ペプトン10g
塩化ナトリウム5g
寒天15g
蒸留水1000mL
pH 7.0±0.1	

培地・試薬

- ① 標準寒天培地*
- ② 希釈液（表2-3に規定されたものを利用）

器具・装置

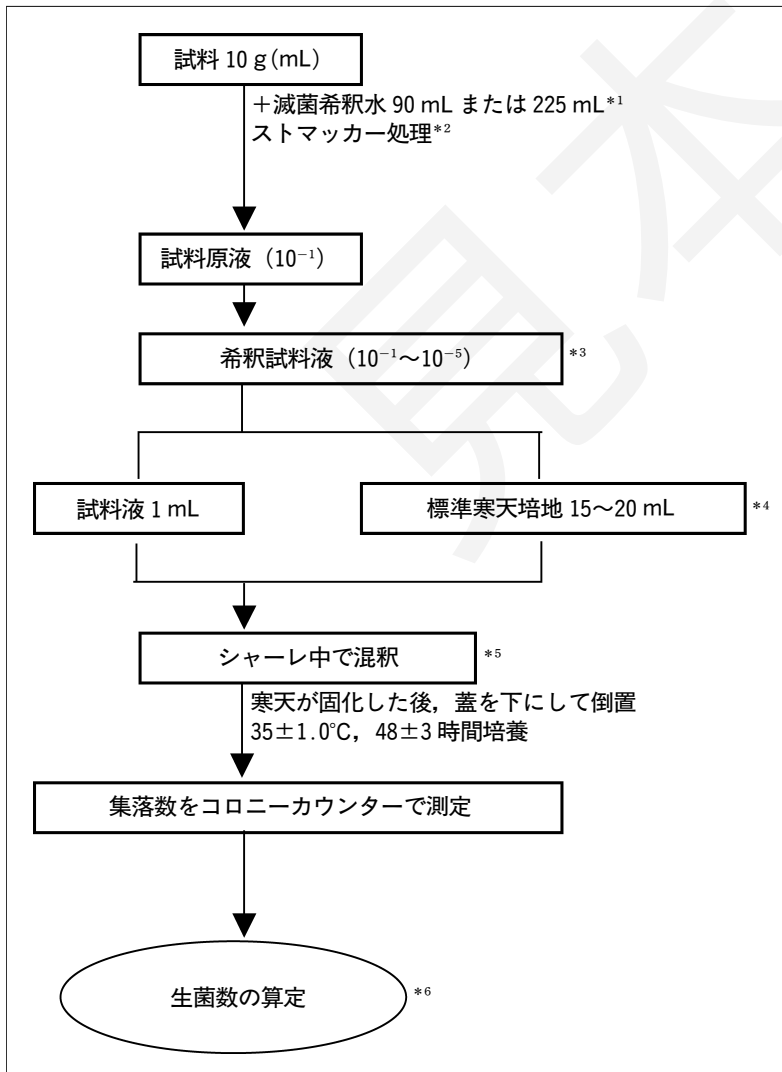
インキュベーター（35±1°C）、恒温槽（45～50°C）、電子天秤、ストマッカー（またはブレンダー）、滅菌ストマッカー用袋、滅菌ピンセット、滅菌スパーテル、滅菌ハサミ、滅菌シャーレ、滅菌メスピペット（または滅菌マイクロピペット）、希釈びん、コロニーカウンター、マジックなど

表 2-3 法的に規定された生菌数測定のための希釈水の種類とその液量，培養温度と時間

食品名	試料量	希釈水		培養温度	培養時間
		種類	量		
乳・乳製品	原液, 10 g	滅菌生理食塩水	全量100mL	32~35°C	48±3 時間
アイスクリーム類	10 g	滅菌生理食塩水	90 mL	32~35°C	48±3 時間
粉末清涼飲料	10 g	滅菌リン酸緩衝希釈水	全量100mL	35±1.0°C	24±2 時間
ミネラルウォーター類の原水	100 mL		希釈なし	35±1.0°C	24±2 時間
氷雪	融解水	規定なし		35±1.0°C	24±2 時間
氷菓	10 mL	滅菌生理食塩水	90 mL	35±1.0°C	48±3 時間
冷凍ゆでだこ，冷凍ゆでがに	25 g	滅菌リン酸緩衝希釈水	225 mL	35±1.0°C	24±2 時間
生食用冷凍鮮魚介類	25 g	滅菌リン酸緩衝希釈水	225 mL	35±1.0°C	24±2 時間
冷凍食品	25 g	滅菌リン酸緩衝希釈水	225 mL	35±1.0°C	24±2 時間
生食用力キ	200 g 以上	滅菌リン酸緩衝希釈水	試料と同量	35±1.0°C	24±2 時間
未殺菌液卵	原液	規定なし		35±1.0°C	24±2 時間

(注) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針（微生物編），p 117（2004）改変

操作手順



* 1 滅菌希釈水を加え，試料の10倍希釈液を調製する。

* 2 ストマッカーの処理時間は試料の種類によって適切な処理時間を設定する。

* 3 1平板に30~300個の集落が得られるような測定溶液の希釈液を調製する。

* 4 培地は50°C以下（寒天が固まらない温度）に保温しておく。

* 5 1希釈2枚のシャーレを用意し，シャーレの蓋に希釈倍数をマジックで記載しておく。培地を蓋につけないよう混ぜあわせる。

* 6 測定に用いたシャーレに添加した測定液の希釈倍数を考慮して，試料1g（または1mL）あたりの生菌数を算出する。

生菌数の算定

1) 1平板に 30～300 個の集落数がある場合

① 1つの希釈段階に 30～300 個の集落数が得られた場合：2枚を算術平均する。

		希釈倍率		
		$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$
a)				392
b)				418

		×10 ⁴	
		35	$\frac{35+41}{2} \times 10^4 = 380,000$
		41	

$\therefore 3.8 \times 10^5 \text{ cfu}^*/\text{g}$

* 7 colony forming units (cfu)

② 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：各希釈毎の2枚の平板を算術平均し、両者の比を求める。

・希釈倍率から換算した数値の比が2倍以内であったときは、2つの希釈の集落数の平均を求める。

		希釈倍率			
		$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$
a)				250	31
b)				228	30

$$\frac{(250+228) + (31 \times 10 + 30 \times 10)}{4} \times 10^3 = 272,000$$

$\therefore 2.7 \times 10^5 \text{ cfu/g}$

・換算数値の比が2倍以上であった場合は、希釈倍率が低い値をもって計算する。

		希釈倍率			
		$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$
a)				150	55
b)				102	60

$$\frac{150+102}{2} \times 10^3 = 126,000$$

$\therefore 1.3 \times 10^5 \text{ cfu/g}$

③ 全平板に 300 以上の集落数がある場合

・一番希釈倍率の高い平板を用いて算出する。

〈密集集落平板測定法〉

肉眼的に測定しにくい場合は 1 cm^2 の区画のある計算板を用いて測定し、平均値を求めてシャーレ面積を乗じて算出する。

1 cm^2 の区画が 10 個以下…中心を通過する縦・横、各 6 箇所、計 12 箇所の平均値より、算定する。

1 cm^2 の区画が 10 個以上…中心を通過する縦・横、4～5 箇所の区画の平均集落数を求めて算出する。

④ 全平板が30個未満の場合

最も低い希釈倍率に30を乗じて算定する。必要があれば測定値そのままを記載しておく。

⑤ 拡散集落のある場合は、次の条件の物に限りそれ相当の部分を計測する。

- ・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
- ・拡散集落の部分が平板の1/2以下の場合。
- ・次の様な場合は、実験室内事故（Laboratory Accident：L.A.）とする。

無菌であるべきはずの検査を除いて、集落発生の認められなかった場合。

拡散集落の部分が平板の1/2以上の場合。

汚染されたことが明らかな場合。

その他、状況で不適当と思われる場合。

実験2 大腸菌群の検査

大腸菌群 (coliforms)*¹はグラム陰性の無芽胞桿菌で、乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性もしくは通性嫌気性菌として定義される菌群をいい、食品衛生細菌学領域で使用される名称である。分類学的には、*Escherichia coli* や *Citrobacter* 属菌、*Klebsiella* 属菌、*Enterobacter* 属菌など腸内細菌科に属する多くの菌種が含まれる。

大腸菌群の検査法は、表2-4の食品衛生法施行規則の規格基準に示す培地が使用されるが、最近では特異性が高く、発色や発光により判定が容易な合成酵素基質（大腸菌群β-ガラクトシダーゼや大腸菌β-グルクロニダーゼに対する合成酵素基質）を用いた培地も開発され、水質基準の大腸菌検査や食品の自主検査などで採用されている。以下に乳・乳製品や魚肉練り製品、冷凍食品などを対象とした大腸菌群検査の操作手順を示す。

培地・試薬

BGLB培地、乳糖ブイオン、デソキシコレート寒天培地、EMB寒天培地、普通寒天培地

グラム染色液、希釈液（生理食塩液またはリン酸緩衝希釈水）

器具・装置

インキュベーター（35±1℃）、電子天秤、ストマッカー（またはブレンダー）、光学顕微鏡、滅菌ストマッカー用袋、滅菌ピンセット、滅菌ス

*1 大腸菌群は、製造環境や安全な食品の生産を確保するための環境衛生管理における指標菌としての扱いが考えられている。そのうち *E. coli* は糞便系大腸菌群としてヒトや動物の糞便の直接的・間接的汚染に由来するため、不衛生な環境下での食品の取扱いを疑う指標菌として位置付けられている。また、大腸菌群は、腸管系病原菌 (*Sigella*, *Salmonella* など) と起源を同じくするため、食品からこれらの菌が検出された場合には、腸管系病原菌の汚染リスクも視野に入れて考えなければならない。

大腸菌群検査用培地

1) 乳糖ブイオン

① 組成

肉エキス	……………3g
ペプトン	……………10g
乳糖	……………5g
ブロームチモールブルー	
(BTB)	……………0.024g
蒸留水	……………1000mL
	pH 7.0±0.1

2) BGLB培地

① 組成

ペプトン	……………10g
牛胆汁末	……………20g
乳糖	……………10g
ブリリアントグリーン	
	……………0.0133g
蒸留水	……………1000mL
	pH 7.0±0.1