

3) 凍結処理した試料液の大腸菌数測定における前培養の有効性

前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあり、 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2日間及び $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2日間の凍結処理条件では、大腸菌2種類の繰り返し3回測定すべてにおいて、前培養「あり」のほうが高い値であった。また、各測定値を常用対数に変換した後、対応のある2群の平均の差のt検定を行った結果、得られた t_0 値は4.66であり、有意水準1%で「有意差あり」と判定された。ただし、資料8に示したとおり、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は1.9以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

4. ストレス処理(凍結処理)を行った試料の大腸菌数測定における前培養の有効性

ストレス処理を行った試料の大腸菌数測定結果を資料9に示した。

なお、大腸菌数を測定したTBX寒天培地の一例を写真-1~4に示した。また、前培養「あり」の大腸菌数(対数)から前培養「なし」の大腸菌数(対数)を引いた値を図-1に示した。前培養「なし」と前培養「あり」の大腸菌数においては、11試料中8試料で前培養「なし」の大腸菌数が高い値であったが、資料9に示したとおり、その比は2.0以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。また、各測定値を対数に変換した後、対応のある2群の平均の差のt検定を行った結果、得られた t_0 値は0.26であり、有意水準1%で「有意差なし」と判定された。

5. 培養時間が24時間を超えた場合の大腸菌数測定結果への影響

試料の大腸菌数測定結果を資料10に示した。

なお、大腸菌数を測定したTBX寒天培地の一例を写真-5~8に示した。

培養18~24時間及び培養42~48時間におい

て大腸菌集落数の差はまったく認められず、培養42~48時間後でも大腸菌集落の判定に支障はなかった。しかし、培養42~48時間後では大腸菌(青色)以外の集落が大きくなることや新たな大腸菌以外の集落が出現した試料も認められた。

D. 結論

- ・一般生菌数におけるISO法と食品衛生検査指針法では算定方法による結果に大きな違いは認められなかった。

- ・ISO 16649-2:2001 逐語和訳版を作製した。わが国の標準法として導入可能であると判断された。

- ・2種類の大腸菌に対して、加熱処理、酸処理及び凍結処理の3通りのストレス処理を行い、損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討した結果、いずれのストレス処理条件においても、前培養の有無によって極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

- ・ストレス処理(凍結処理)を行ったいくつかの食品種について、損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討した結果、損傷菌(凍結処理)に対する前培養の有効性は認められなかった。

- ・本研究で使用した食品では、培養時間が24時間を超えた場合の大腸菌数は18~24時間培養後の大腸菌数と差は認められなかったが、大腸菌以外の集落が増加した試料が認められたことから、夾雑菌の種類によっては24時間を超える培養で典型集落の判別に影響が出る可能性もあると考えられた。

- ・以上の結果から、前培養の有効性は大腸菌が受けたストレスや食品群によって異なると考えられ、ISO 16649-2:2001を大腸菌数の試験方法として採用する場合は、食品群ごとに前培養の有効性を比較・評価し、前培養を行う必要があるのかどうかを検討することが重要である。

- ・大腸菌集落の誤判定を避けるためにも、規定された培養時間を守る必要があると考えられ

た。

・本研究で用いた食品のように TBX 寒天培地 (44±1 °C, 18~24 時間培養) に生育する大腸菌以外の菌が多数共存する試料では, ISO 16649-2 : 2001 に規定された計数・計算方法どおりには大腸菌数の算出ができない可能性があるため, このような場合の計数・計算方法についても検討する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資料 1 : 一般生菌数測定のための ISO 試験法

食肉製品	魚加工品	乳製品
ISO4833 : 2003 食品及び動物飼料の微生物学 -微生物の計数のための一般試験法-30℃における集落計数法		
ISO6887-1 : 1999 食品及び動物飼料の微生物学 -微生物試験のための試料, 初期懸濁液及び 10 進希釈液の調製- 第 1 部 : 初期懸濁液及び 10 進希釈液の調製		
ISO6887-2 : 2003 食肉製品の試料調製	ISO6887-3 : 2003 鮮魚及び魚加工品の試料 調製	ISO6887-5 : 2010 乳製品の試料調製
ISO7218 : 2007 食品及び動物飼料の微生物学 -微生物試験の一般要求事項及び手引き-		

資料 2 : 国内における従来試験法

食肉製品	魚加工品	乳製品
食品衛生検査指針 微生物編 2004	食品衛生検査指針 微生物編 2004	乳および乳製品の成分規格

資料 3 : 食品群別試料量, 希釈水, 培地, 培養温度, 培養時間一覧表

①食肉製品および魚加工品

	試料量	希釈水	培地	培養温度	培養時間
ISO 試験法	25 g	0.1%ペプトン加	標準寒天	30±1℃	72±3 時間
従来試験法		生理食塩水	標準寒天	35±1℃	48±3 時間

②乳製品

	試料量	希釈水	培地	培養温度	培養時間
ISO 試験法	原液	0.1%ペプトン加 生理食塩水	標準寒天	30±1℃	72±3 時間
従来試験法		滅菌生理食塩水	標準寒天	32~35℃	48±3 時間

資料 4 :

食品ごとの一般生菌数測定結果

① 食肉製品 (鶏唐揚げ)

(1) 添加試験

	添加濃度 (cfu/g)	添加濃度 (対数 cfu/g)
高濃度添加区	1.4×10^5	5.15
低濃度添加区	1.4×10^3	3.15

A : ISO 試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^5	78	5.04	98
②	9.5×10^4	68	4.98	97
③	1.1×10^5	76	5.03	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^3	78	3.04	97
②	1.1×10^3	76	3.03	96
③	9.6×10^2	69	2.98	95

B : 従来試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.2×10^5	87	5.09	99
②	1.1×10^5	80	5.05	98
③	1.1×10^5	80	5.05	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^3	80	3.05	97
②	1.2×10^3	87	3.09	98
③	1.2×10^3	82	3.06	97

(2) 自然汚染食品 (ミンチ肉)

	従来試験法		ISO 試験法	
	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)
①	2.2×10^7	7.34	3.1×10^7	7.48
②	2.2×10^7	7.33	2.4×10^7	7.39
③	2.4×10^7	7.37	3.5×10^7	7.54

② 魚加工品 (サバ缶)

(1) 添加試験

	添加濃度 (cfu/g)	添加濃度 (対数 cfu/g)
高濃度添加区	1.5×10^5	5.18
低濃度添加区	1.5×10^3	3.18

A : ISO 試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^5	73	5.05	97
②	1.2×10^5	81	5.09	98
③	1.2×10^5	79	5.08	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.3×10^3	86	3.12	98
②	1.5×10^3	100	3.18	100
③	1.1×10^3	73	3.05	96

B : 従来試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.2×10^5	79	5.08	98
②	1.1×10^5	71	5.04	97
③	1.2×10^5	81	5.09	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.3×10^3	82	3.10	97
②	1.4×10^3	91	3.14	99
③	1.0×10^3	67	3.01	94

(2) 自然汚染食品

シシヤモー夜干し

	従来試験法		ISO 試験法	
	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)
①	1.3×10^2	2.11	2.6×10^3	3.41
②	1.1×10^2	2.02	5.9×10^3	3.77
③	3.2×10^2	2.50	1.6×10^3	3.20

生タラフィレ

	従来試験法		ISO 試験法	
	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)
①	8.8×10^5	5.94	1.7×10^7	7.24
②	4.2×10^5	5.62	2.7×10^6	6.44
③	4.7×10^5	5.67	8.3×10^6	6.92

③ 乳製品 (牛乳)

(1) 添加試験

	添加濃度 (cfu/g)	添加濃度 (対数 cfu/g)
高濃度添加区	1.1×10^5	5.02
低濃度添加区	1.1×10^3	3.04

A : ISO 試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^5	101	5.03	100
②	1.2×10^5	111	5.07	101
③	1.2×10^5	112	5.07	101

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.4×10^3	129	3.15	104
②	1.4×10^3	131	3.16	104
③	1.4×10^3	125	3.14	103

B : 従来試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	9.9×10^4	94	5.00	99
②	1.1×10^5	104	5.04	100
③	1.0×10^5	95	5.00	100

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.2×10^3	111	3.09	102
②	1.3×10^3	116	3.10	102
③	1.2×10^3	111	3.08	101

資料5： β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法（和訳）

国際規格 ISO 16649-2 食品及び動物飼料の微生物学- β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法-第2部, 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロニドを用いた44°Cにおける集落計数法

まえがき

ISO（国際標準化機構）は、各国の標準化機関（ISO 加盟団体）の国際的な連合体である。通常、国際規格の策定作業はISO 専門委員会を通じて行われる。専門委員会が設置されている特定の課題に関心のある各加盟団体は、その委員会に代表を派遣する権利を有する。国際機関も、政府機関であれ非政府機関であれ、ISO と連携して作業に参加することができる。ISO は、電気技術の標準化に関するあらゆる問題について、国際電気標準会議（IEC）と密接に協力する。国際規格の原案は、ISO/IEC 指令パート3に規定された規則に従って作成される。専門委員会が採択した国際規格案は、投票のため各加盟団体に配布される。

国際規格として公布されるには、投票する加盟団体の少なくとも75 %による承認を要する。本規格の一部の要素は特許権の対象となる可能性があるという点に注意すること。ISO は、そのような特許権の一部又はすべてを特定する義務を負わない。

国際規格ISO 16649-2 は、専門委員会ISO/TC 34「食品」、分科委員会SC 9「微生物」により策定されたものである。

ISO 16649 は、食品及び動物飼料の微生物学- β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般

試験法 という標題のもと、以下の部分から構成される。

- 第1部：メンブレンフィルター及び5-ブロモ4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロニドを用いた

44°Cにおける集落計数法

- 第2部：5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロニドを用いた44°Cにおける集落計数法

- 第3部：最確数法

序文

食品及び飼料製品は実に多種多様であるため、特定の製品については、この一般試験法があらゆる詳細な点で適切というわけではない可能性もある。そのような場合、正当な技術的理由により不可欠であれば、当該製品に特異的な、異なる方法を用いることもできる。それでも、可能な限りこの一般試験法を適用するよう最大限の努力を払うべきである。

本規格が次に見直しされる際には、この一般試験法がどの程度順守されてきたかに関する、また特定製品に関しては本法から逸脱した理由に関する、その時点で利用できるあらゆる情報が考慮に入れられる。

試験方法の調和は即時に達成できるわけではない。また、特定の製品グループについては、この一般試験法に適合しない国際規格及び／又は国家規格がすでに存在している可能性もある。そのような基準が再検討される際に本規格に適合するよう変更され、最終的にこの一般試験法から逸脱した基準として残るのは、十分に確立された技術的理由のゆえに必要とされ

るものだけとなることが期待される。

本国際規格は、 β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための2つの一般試験法（ISO 16649-1及びISO 16649-2）について説明している。使用者は、ISO 16649-1かISO 16649-2のいずれかを選ぶことができる。両規格とも一般的な事例に適用することができるが、大きなストレスを受けた大腸菌細胞を含む食品には、ISO 16649-1を使用すべきである。

食品及び動物飼料の微生物学— β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法—
第2部：

5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロニドを用いた44°Cにおける集落計数法

1 適用範囲

本規格は、ヒトによる摂取及び動物への給餌を目的とした製品における β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法を定めるものである。この方法では、 β -グルクロニダーゼ酵素検出用の発色成分を含有する固形培地を用いた44°Cにおける集落計数法を採用している。警告—44°Cで発育しない大腸菌の菌株、特に大腸菌0157など β -グルクロニダーゼ陰性の菌株は検出されない。

2 引用規格

以下に示す規格文書には、本文中で引用されており、本規格の一部を構成する規定が含まれている。日付が付された参考文献については、その後に行われた修正又はそれらの文献の改訂版は適用されない。しかしながら、本規格に基づき合意した関係者には、以下に示す規格文書の最新版を適用する可能性について検討するよう勧められている。日付が付されていない参考文献については、参照されている規格文書の最新版が適用される。ISO及びIECの加盟国は、現在有効な国際規格の登録リストを維持する。

ISO 6887-1, 食品及び動物飼料の微生物学—微生物試験のための試料, 試料原液及び10倍段階希釈液の調製—第1部：試料原液及び10倍段階希釈液の調製に関する一般規則

ISO 7218, 食品及び動物飼料の微生物学—微生物試験に関する一般規則

3 用語及び定義

本規格の目的においては、以下の用語と定義を適用する。

3.1

β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌

本規格に定める条件下で、44°Cにおいてトリプトン胆汁酸Xグルクロニド培地（TBX）上に典型的な

青色の集落を形成する細菌

3.2

β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数

本規格に従って試験及び計算を実施した場合の、試料1 mlあたり又は1 gあたりの β -グルクロニ

ダーゼ陽性大腸菌の集落数（CFU）の測定

4 原理

4.1 トリプトン胆汁酸X グルクロニド培地 (TBX) の2枚の平板に、所定量の試料又は試料原液を接種する。同じ条件下で、試料又は試料原液の10倍段階希釈液を用いて、各希釈液を2枚の平板に接種する。平板を44℃±1℃で18～24時間培養した後、β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の特徴的な集落の有無を調べる。

4.2 試料1 g あたり又は1 ml あたりのβ-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の集落数 (CFU) を算出する (第10項参照)。

5 希釈水及び培地

最新の試験所規範については、ISO 7218を参照のこと。

5.1 希釈水

ISO 6887-1, 又は試験する製品を対象とした特定の国際規格を参照のこと。

5.2 培地：トリプトン胆汁酸Xグルクロニド培地 (TBX)

5.2.1 組成

カゼイン酵素消化物 20.0 g

胆汁酸塩 No.3 1.5 g

5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロン酸 (BCIG) 144 μmol a

ジメチルスルホキシド (DMSO) b 3 ml

寒天 9 g～18 g c

精製水 1000 ml

a 例えば、シクロヘキシルアンモニウム塩 0.075 g

b ジメチルスルホキシドは吸入及び接触により有害である。

c 寒天のゲル強度に依存する。

5.2.2 調製

BCIG を、ジメチルスルホキシド又はメーカーが推奨する希釈液に溶解する。すべての成分を溶かし、加熱して沸騰させる。

必要であれば、25℃における滅菌後のpH が7.2±0.2となるように調整する。

121℃に設定したオートクレーブ内で15分間滅菌する。ただちに培地を44℃～47℃の恒温水槽 (6.3) に入れて冷ます。

6 装置及びガラス器具

通常の微生物試験用装置 (ISO 7218参照)、特に以下のものを使用する。

6.1 乾熱滅菌 (オーブン) 又は湿熱滅菌 (オートクレーブ) 用の装置

6.2 恒温器：44℃±1℃で稼働できるもの。

6.3 恒温水槽：44℃～47℃の間に維持できるもの。

6.4 試験管、フラスコ又は瓶：適切な容量のもの。

6.5 先端目盛 (吹き出し) ピペット又はマイクロピペット：開口部が広く、公称容量が1 ml 及び10 ml で、それぞれ0.1 ml と0.5 ml 区切りの目盛りが付いたもの。

6.6 ペトリ皿：直径約90 mmのもの。

6.7 pHメーター：精度が0.1 pH単位のもの。

pHメーターの最小測定単位は0.01 pHとする。pHメーターは、手動又は自動の温度補正機能を備えていること。

7 検体の採取

試験室は、輸送又は保存中に損傷又は変化していない、真に製品を代表する検体を受け取ることが重要である。

検体の採取は、本規格に定める方法には含まれていない。当該製品の検体採取を扱った特定の国際規格がない場合は、この問題について関係当事者間で合意を得ることが推奨される。

8 検体の調製

当該製品に適切な特定の国際規格に従って検体を調製すること。特定の国際規格がない場合は、この問題について関係当事者間で合意を得ることが推奨される。

9 手順

9.1 試験，試料原液及び希釈液

ISO 6887-1、及び当該製品に適切な他の特定の国際規格を参照のこと。

9.2 接種及び培養

9.2.1 滅菌したピペット又はマイクロピペット（6.5）を用いて、滅菌ペトリ皿（6.6）に検体（液体の場合）1 mlを、その他の製品の場合は試料原液（10⁻¹）1 mlを分注する。

各希釈液を2枚の平板に接種する。

必要であれば、10倍段階希釈液を調製し、希釈液ごとに新しい滅菌ピペットを用いてこの手順を繰り返す。

9.2.2 各ペトリ皿に、あらかじめ恒温水槽（6.3）内で44℃～47℃に冷ましたTBX培地（5.2）約15 mlを注ぎ入れる。

試料液を培地と注意深く混ぜ合わせた後、ペトリ皿を冷えた水平面に静置して培地を凝固させる。

試料液をペトリ皿に分注してから培地を注ぎ入れるまでの経過時間は、15分を超えてはならない。

9.2.3 接種したペトリ皿（9.2.2）を倒置し、44℃に設定した恒温器（6.2）で18～24時間培養する。

培養時間は24時間を超えてはならない。

警告—ストレスを受けた大腸菌細胞の存在が疑われる場合、まず37℃で4時間、次いで培養温度を44℃に上げて18～24時間培養する。培養温度は45℃を超えてはならない。

9.3 集落の計数

指定時間培養（9.2.3）した後、典型的集落数が150個未満かつ総（典型的及び非典型的）集落数が300個未満の各ペトリ皿における、β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の典型的集落を計数する。それらが該当するペトリ皿の一部である場合、第10項に記載の種々の計算方法において、典型的集落数が0個のペトリ皿を考慮に入れるべきである。

10 結果の表示

10.1 一般規定

10.2 の計算は、GLP に従って試験を実施する際に最も頻繁に遭遇する事例を考慮に入れたものである。何らかの特別な、ほとんど起こりそうもない事例が生じる可能性もある（例：同じ希釈液から調製した2枚のペトリ皿で集落数が大きく異なる、あるいは2つの連続した希釈液における希釈係数の比率と集落数の比率が大きく異なる）。その場合、計数結果を調べ、検討する必要があるが、権限を有する微生物学者により却下される可能性もある。

10.2 計算

結果が有効であるためには、青色の集落を最低15個含む少なくとも1枚のペトリ皿で生菌数を計数する必要があると一般に見なされている。

検体中に存在する1 ml あたり又は1 g あたりの β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の生菌数 (N) を、2つの連続した希釈液の加重平均として、次の方程式を用いて計算する。

(1)

ここで

Σa 2つの連続した希釈液に該当する、すべてのペトリ皿（そのうち少なくとも1枚が最低15個の青色集落を含む）で計数した集落の総数

n_1 最初の希釈液に該当するペトリ皿の枚数

V 各ペトリ皿に接種した試料液の容量 (ml)

n_2 2段階目の希釈液に該当するペトリ皿の枚数

d 該当する最初の希釈液に対応する希釈係数 [直接接種された検体が該当する場合 (液体製品) は $d = 1$]

結果を有効数字2桁に四捨五入する (ISO 7218参照)。

計算結果として、1 ml あたり (液体製品) 又は1 g あたり (その他の製品) の β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌数を取り、有効数字2桁 (100個未満の場合) の整数、又は1.0~9.9に適切な10の累乗を掛けた数で表す。

10.3 低菌数の推定

10.3.1 2枚のペトリ皿が [検体の (液体製品) , 又は試料原液の (その他の製品) , あるいは最初に接種された又は該当する希釈液のレベルで] 15個未満の青色集落を含んでいる場合、検体中に存在する β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の生菌数 (N_E) を、2枚の平板の算術平均として、次の方程式を用いて計算する。

(2)

ここで

Σc 2枚のペトリ皿で計数した青色集落数

V 各ペトリ皿に接種した試料液の容量 (ml)

n 該当するペトリ皿の枚数 (この場合は $n = 2$)

d 試料原液の、あるいは最初に接種された又は該当する希釈液の希釈係数 [直接接種された検体が該当する場合 (液体製品) は $d = 1$]

計算結果を有効数字2桁に四捨五入する (ISO 7218参照)。

結果を次のように表示する。

- 1 mlあたり (液体製品) 又は1 gあたり (その他の製品) の β -グルクロニダーゼ陽性大腸

菌の推定菌数： $N_e = Y$

10.3.2 2枚のペトリ皿に、検体（液体製品）の、あるいは最初に接種された試料原液（その他の製品）の、又は該当する希釈液のレベルで青色集落が含まれていない場合、結果を次のように表示する。

-β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 mlあたり（液体製品）又は1 gあたり（その他の製品） $1/d$ 未満ここで、 d は試料原液の、あるいは最初に接種された又は該当する希釈液の希釈係数である [直接接種された検体が該当する場合（液体製品）は $d = 1$]。

10.3.3 最初の希釈液 d_1 を接種した2枚のペトリ皿では、目に見える青色集落を伴う青色及び非典型的集落の総数が300個を超え、かつ次の希釈液 d_2 を接種した2枚のペトリ皿では、総数が300個未満ではあるが計数できる青色集落がない場合、結果を次のように表示する。

-β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 mlあたり（液体製品）又は1 gあたり（その他の製品） $1/d_2$ 未満かつ $1/d_1$ を超える

ここで、 d_1 と d_2 は希釈液 d_1 と d_2 に対応する希釈係数である。

10.3.4 最初の希釈液 d_1 を接種した2枚のペトリ皿では、目に見える青色集落を伴わずに典型的及び非典型的集落の総数が300個を超え、かつ次の希釈液 d_2 を接種した2枚の皿では、総数が300個未満であるが計数できる青色集落がない場合、結果を次のように表示する。

-β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 ml（液体製品）あたり又は1 gあたり（その他の製品） $1/d_2$ 個未満

ここで、 d_2 は希釈液 d_2 に対応する希釈係数である。

10.4 計算方法：特別な事例

10.4.1 最初の希釈液 d_1 を接種した2枚のペトリ皿で青色集落数が150個を超え、かつ次の希釈液 d_2 を接種した2枚のペトリ皿では青色集落数が15個未満の場合は、

- 希釈液 d_1 を接種した2枚のペトリ皿のそれぞれで青色集落数が150～167個（150個に相当する加重平均の上部の信頼区間）の範囲内であれば、一般的事例の計算方法（10.2）を使用し、
- 希釈液 d_1 を接種した2枚のペトリ皿のそれぞれで青色集落数が167個（150個に相当する加重平均の信頼区間の上限）を超えるのであれば、希釈液 d_2 の計数結果のみを考慮し、低菌数計数（10.3）を実施する。

10.4.2 青色集落の計数が、どの希釈液を接種されたペトリ皿でも150個を超える数値を示す場合、結果を次のように表示する。

-β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 ml（液体製品）あたり又は1 gあたり（その他の製品） $150/d$ 以上ここで、 d は最後に接種された希釈液の希釈係数である。

10.4.3 希釈倍率が最低の（濃度が最高の）希釈液を接種した2枚のペトリ皿のみが典型的集落150個未満を含む場合、検体中に存在するβ-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の生菌数（ N' ）を、2枚のペトリ皿で計数した集落の算術平均として、次の方程式を用いて計算する。

(3)

ここで

Σc 2枚のペトリ皿（そのうち少なくとも1枚は15個の典型的集落を含む）で計数した青色集落の総数

V 各ペトリ皿に接種した試料液の容量（ml）

n 該当するペトリ皿の枚数（この場合は $n = 2$ ）

d 該当する希釈液に対応する希釈係数
計算結果を有効数字2桁に四捨五入する（ISO 7218参照）。

10.5 信頼限界

ISO 7218を参照。

11 試験報告書

試験報告書には以下の点を明記すること。

- 検体の識別に必要とされるあらゆる情報
- 使用した検体採取方法（分かっている場合）
- 使用した試験方法（本規格を参照する）
- 本規格に明記されていない、又は任意と見なされている操作上の詳細、及び試験結果に影響を及ぼした可能性がある出来事に関する詳細
- 得られた結果（使用した表示方法を明記する）
- 併行精度を確認した場合、得られた最終結果

資料6: 加熱処理後の試料液中の大腸菌数測定結果

加熱処理条件	試験菌*1	試料液1 ml当たり的大腸菌数*2		B/A
		前培養「なし」(A)*3	前培養「あり」(B)*4	
55 °C, 5分間	①	1.5×10 ⁴	1.7×10 ⁴	1.13
		3.4×10 ³	3.5×10 ³	1.03
		3.2×10 ³	3.0×10 ³	0.94
	②	1.0×10 ⁵	1.2×10 ⁵	1.20
		1.5×10 ⁵	1.5×10 ⁵	1.00
		1.5×10 ⁵	1.9×10 ⁵	1.27
55 °C, 10分間	①	5.5×10 ³	5.4×10 ³	0.98
		7.6×10 ³	8.0×10 ³	1.05
		1.5×10 ³	1.1×10 ³	0.73
	②	1.1×10 ⁵	1.2×10 ⁵	1.09
		9.7×10 ⁴	1.2×10 ⁵	1.24
		1.5×10 ⁵	1.9×10 ⁵	1.27
55 °C, 15分間	①	4.3×10 ³	4.8×10 ³	1.12
		3.0×10 ³	3.7×10 ³	1.23
		2.7×10 ³	3.6×10 ³	1.33
	②	6.5×10 ⁴	8.6×10 ⁴	1.32
		5.4×10 ⁴	7.6×10 ⁴	1.41
		1.0×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.10

*1 試験菌①: *Escherichia coli* NBRC 15034, 試験菌②: *Escherichia coli* NBRC 3972

*2 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*3 44±1 °C, 18~24時間

*4 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18~24時間

資料 7: 酸処理後の試料液中の大腸菌数測定結果

酸処理条件	試験菌*1	試料液1 ml当たり的大腸菌数*2		B/A
		前培養「なし」(A)*3	前培養「あり」(B)*4	
pH2.0, 15 分間	①	5.5×10 ⁴	5.4×10 ⁴	0.98
		5.9×10 ⁴	7.0×10 ⁴	1.19
		2.6×10 ⁴	3.8×10 ⁴	1.46
	②	3.3×10 ⁴	4.4×10 ⁴	1.33
		2.0×10 ⁴	2.0×10 ⁴	1.00
		6.5×10 ³	1.1×10 ⁴	1.69
pH2.0, 30 分間	①	2.6×10 ⁴	3.3×10 ⁴	1.27
		3.1×10 ⁴	2.8×10 ⁴	0.90
		1.1×10 ⁴	1.2×10 ⁴	1.09
	②	2.2×10 ⁴	2.3×10 ⁴	1.05
		1.7×10 ⁴	1.5×10 ⁴	0.88
		1.1×10 ⁴	1.4×10 ⁴	1.27
pH2.0, 60 分間	①	1.4×10 ⁴	1.3×10 ⁴	0.93
		1.8×10 ⁴	1.8×10 ⁴	1.00
		7.2×10 ³	7.6×10 ³	1.06
	②	1.9×10 ⁴	2.0×10 ⁴	1.05
		2.5×10 ⁴	2.9×10 ⁴	1.16
		2.6×10 ⁴	2.4×10 ⁴	0.92

*1 試験菌① : *Escherichia coli* NBRC 15034, 試験菌② : *Escherichia coli* NBRC 3972

*2 TBX寒天培地を用いた混積平板培養法

*3 44±1 °C, 18~24時間

*4 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18~24時間

資料8：凍結処理後の試料液中の大腸菌数測定結果

凍結処理条件	試験菌*1	試料液1 ml当たり的大腸菌数*2		B/A
		前培養「なし」(A)*3	前培養「あり」(B)*4	
-10 °C, 2日間	①	4.2×10 ⁵	5.7×10 ⁵	1.36
		3.7×10 ⁵	4.2×10 ⁵	1.14
		4.9×10 ⁵	5.0×10 ⁵	1.02
	②	2.4×10 ⁴	2.6×10 ⁴	1.08
		2.0×10 ⁴	2.6×10 ⁴	1.30
		2.0×10 ⁴	2.6×10 ⁴	1.30
-20 °C, 2日間	①	3.1×10 ⁴	2.9×10 ⁴	0.94
		2.8×10 ⁴	3.6×10 ⁴	1.29
		3.0×10 ⁴	3.5×10 ⁴	1.17
	②	4	5	1.25
		7	13	1.86
		12	11	0.92
-30 °C, 2日間	①	1.0×10 ⁵	1.2×10 ⁵	1.20
		9.4×10 ⁴	1.1×10 ⁵	1.17
		1.1×10 ⁵	1.2×10 ⁵	1.09
	②	1.2×10 ³	2.2×10 ³	1.83
		1.8×10 ³	2.9×10 ³	1.61
		1.9×10 ³	2.4×10 ³	1.26

*1 試験菌①： *Escherichia coli* NBRC 15034, 試験菌②： *Escherichia coli* NBRC 3972

*2 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*3 44±1 °C, 18～24時間

*4 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18～24時間

資料9: 試料の大腸菌数測定結果

食品	試料1 g当たり的大腸菌数 ^{*1}		B/A
	ストレス処理あり		
	前培養「なし」(A) ^{*2}	前培養「あり」(B) ^{*3}	
牛小間肉	1.6×10^2	1.5×10^2	0.94
豚ひき肉	8.3×10^3 ^{*4}	6.8×10^3 ^{*5}	0.82
鶏むねひき肉	2.4×10^2	2.3×10^2	0.96
鶏ももひき肉	1.4×10^5	1.2×10^5	0.86
鶏つみれ	2.2×10^2	1.9×10^2	0.86
鶏レバー	1.0×10^5	1.1×10^5	1.10
鶏きも	5.6×10^5	4.8×10^5	0.86

いとより	1.2×10^2 ^{*6}	1.1×10^2 ^{*7}	0.92

鶏味付きつみれ	30	60	2.00
メンチカツ	1.5×10^2	1.6×10^2	1.07
コロッケ	1.0×10^2	80	0.80

*1 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*2 44±1 °C, 18~24時間

*3 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18~24時間

*4 写真-1

*5 写真-2

*6 写真-3

*7 写真-4

資料10: 試料の大腸菌数測定結果

食品	試料1 g当たり的大腸菌数 ^{*1, *2}	
	培養18~24時間 ^{*3}	培養42~48時間 ^{*4}
牛小間肉	2.7×10 ³ (約10 ⁴ ~10 ⁵)	2.7×10 ³ (約10 ⁴ ~10 ⁵)
豚ひき肉	1.5×10 ⁴ ^{*5} (約10 ⁴ ~10 ⁵)	1.5×10 ⁴ ^{*6} (約10 ⁵)
鶏むねひき肉	4.1×10 ² (約10 ⁵)	4.1×10 ² (約10 ⁵)
鶏ももひき肉	1.1×10 ⁵ (約10 ⁵ ~10 ⁶)	1.1×10 ⁵ (約10 ⁵ ~10 ⁶)
鶏つみれ	2.1×10 ² (10未満)	2.1×10 ² (50)
鶏レバー	4.6×10 ⁵ (約10 ⁴ ~10 ⁵)	4.6×10 ⁵ (約10 ⁵)
鶏きも	4.1×10 ⁵ (約10 ⁵)	4.1×10 ⁵ (約10 ⁵)
いとより	1.5×10 ² ^{*7} (約10 ²)	1.5×10 ² ^{*8} (約10 ²)
鶏味付きつみれ	40 (約10 ⁵)	40 (約10 ⁵)
メンチカツ	60 (約10 ⁵)	60 (約10 ⁵)
コロッケ	5.8×10 ² (約10 ³)	5.8×10 ² (約10 ⁴)

*1 TBX寒天培地を用いた混積平板培養法

*2 括弧内に試料1 g当たり的大腸菌以外の菌の概数を示した。

*3 44±1 °C, 18~24時間

*4 44±1 °C, 42~48時間

*5 写真-5

*6 写真-6

*7 写真-7

*8 写真-8

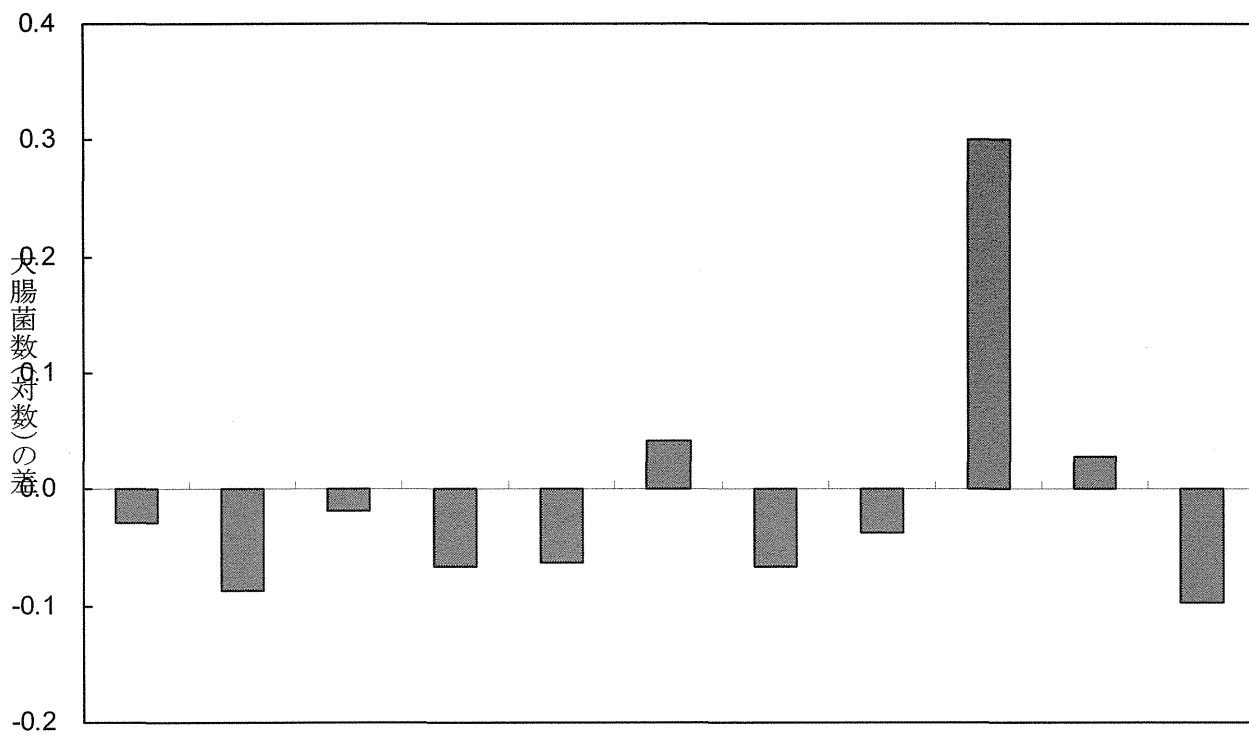


図-1 前培養「なし」(A)及び「あり」(B)で培養した大腸菌数(対数)の差(B-A)



写真-1 豚ひき肉 ストレス処理あり 前培養「なし」
18～24時間培養 [100倍希釈液]

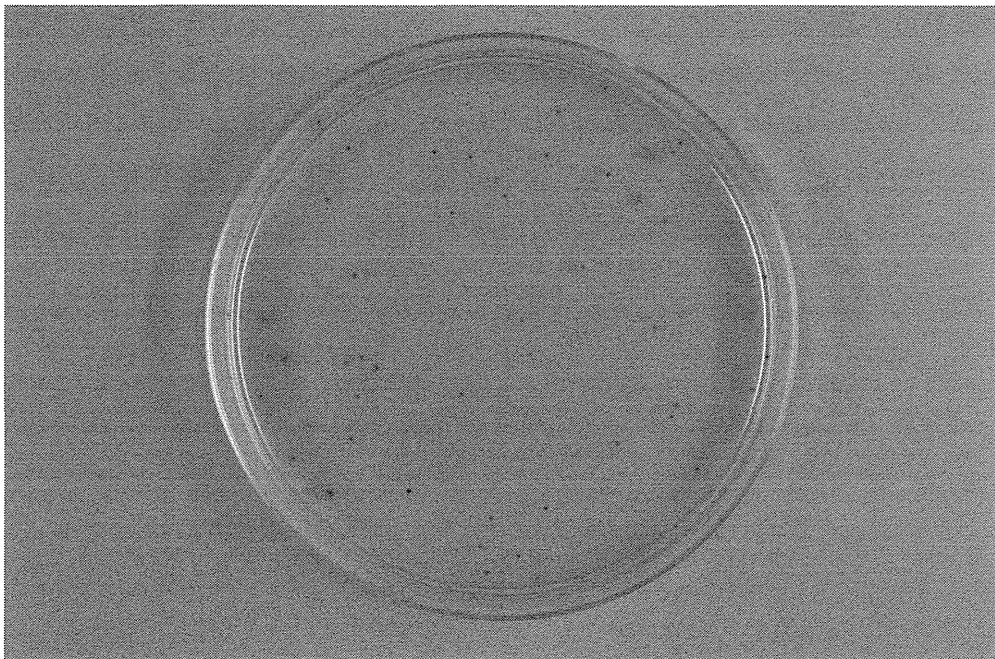


写真-2 豚ひき肉 ストレス処理あり 前培養「あり」
18～24時間培養 [100倍希釈液]