



検査技術研修会での質問から

伊藤 ゆかり

(公益財団法人日本乳業技術協会 〒102-0073 東京都千代田区九段北 1-14-19)

受講者の皆様からよく寄せられる質問事項を質疑応答形式でご紹介いたします。日々の試験検査のご参考になれば幸いです。

ペーパーディスク法について

Q：検査を行う際、どのような点に気を付ければよいでしょうか。

A：生乳検査マニュアルに定められたペーパーディスク法では、陽性コントロール（乳におけるベンジルペニシリンの残留基準値：0.004 ppm と同濃度に調製した標準液）が形成する阻止円と試料が形成する阻止円の直径を比較して、試料のペニシリン濃度が基準値以下であるかを判定します。

そのため、コントロールを検査の都度正確に調製することと同時に、コントロールの阻止円が理想的な大きさ（直径10～11 mm）に形成されるよう検査用培地のコンディションを一定にすることに十分気を付ける必要があります。

コントロールの阻止円の大きさは、①液体培地に接種する菌量、②菌液の培養時間、③寒天平板の厚みなどによって変動します。理想的な大きさの阻止円を形成させるためには、①芽胞懸濁液を室温に戻し、よく攪拌して正確にとる、②液体培地に接種してから16時間、③寒天平板中心部の厚みが0.8～1.0 mm、の一定の条件で検査用培地を準備することが必要です。

Q：コントロールの阻止円が小さくなってしまう原因は何でしょうか。

A：原因はいくつかありますが、まず検査に用いた菌株の薬剤感受性が低下していることが考えられます。菌株の継代培養を繰り返すと細菌が薬剤耐性を獲得し阻止円が小さくなる場合があります。

また、寒天平板を作成する際に液体培地で増菌させた菌量が一定数を超えると阻止円は小さくなります。接種菌量と培養時間を正確に守ることが重要です。さらに、寒天平板の厚みが1.0 mm を超えた場合も阻止円は小さくなります。培地の厚みは0.8～1.0 mm にする必要があります。

培養法について

Q：標準寒天培地にはどのような細菌が生育しますか。また、生育した細菌がどのような菌であるか知る方法がありますか。

A：標準寒天培地には広範囲の種類の細菌が生育します。例えば大腸菌群などのグラム陰性菌、黄色ブドウ球菌や乳酸菌などのグラム陽性菌、細菌以外ではカビなどの真菌も生育します。

標準寒天培地上に発育した細菌の集落は、その形態のみから種類(属や種)を特定することはできませんが、集落の特徴からある程度推測することができます。

集落の特徴としては、形、大きさ、隆起の有無、色、透明度、表面の光沢の有無、集落の辺がラフ(ギザギザ)かスムーズなどが観察できます。

さらに白金線を使用して粘調性の有無や集落の硬度が確認できます。より詳しく調べるには、グラム染色を行います。染色強度や色調を観察することによりグラム陰性か陽性かを識別でき、形や構造もわかりやすくなります。ただし、どのような菌であるか特定するには各種性状試験を行う必要があります。

Q：大腸菌群の検査においてデスオキシコレート寒天培地を重層する意味を教えてください。

A：デスオキシコレート寒天培地は、デスオキシコール酸ナトリウムがグラム陽性菌の発育を抑制し、大腸菌群の発育により培地中の乳糖が分解されて酸を生成、この酸がデスオキシコール酸ナトリウムから不溶性のデスオキシコール酸を析出させ、デスオキシコール酸が酸性で赤変したニュートラルレッドと結合することにより大腸菌群の集落を赤く発色させるものです。

この培地では、培地と試料を混積し、固化後さらに同じ培地で表面を覆う、いわゆる重層を行う必要があります。

これは、培地表面で先に生育する集落の遊走を防ぐことにより、遅れて発育する菌に対する生育阻害を防ぐことが目的です。また、大腸菌群の中に培地表面のような酸素の多い状況下でアルカリ化をおこす菌があり、アルカリ側に傾いた培地では大腸菌群の集落の特徴である赤色が薄くなり、偽陰性と判断してしまう可能性があります。そのため、重層によって培地表面で過剰に菌が発育するのを抑える必要があります。