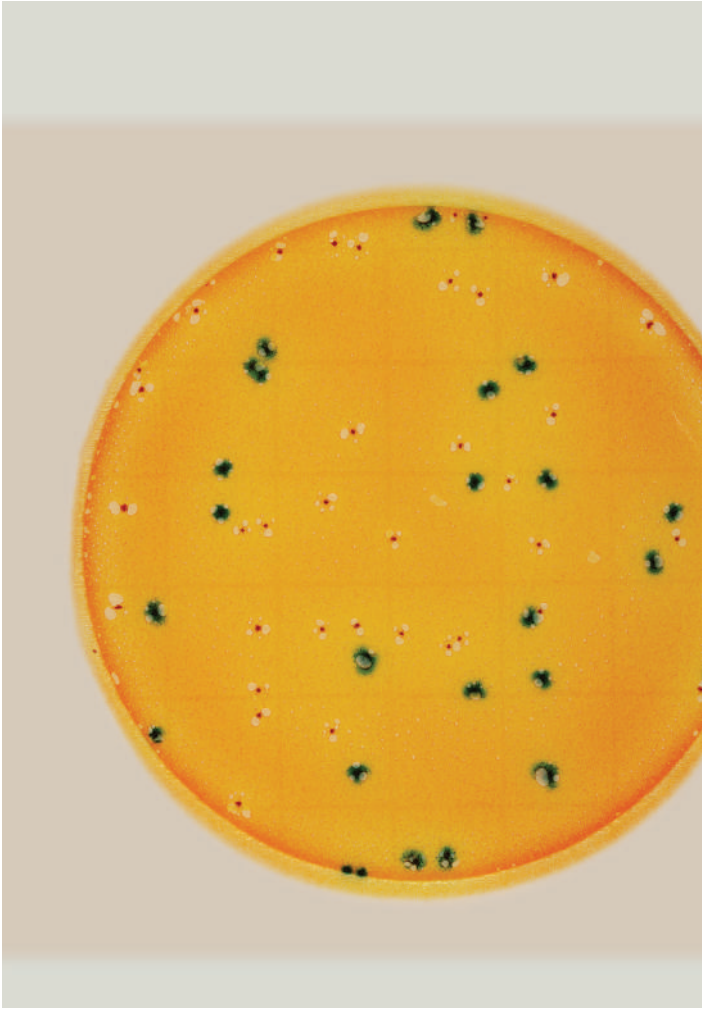
ペトリフィルム™
*E.coli*および大腸菌群数迅速測定用プレート
（RECプレート）

Petrifilm™ Rapid *E.coli* / Coliform Count Plate(REC Plate)

解説書

ペトリフィルム™ *E.coli*および大腸菌群数迅速測定用プレート（以下「本プレート」という）は、選択鑑別用のできあがり培地で、専用の栄養成分、冷水可溶性ゲル化剤、グルクロニダーゼ活性指示薬である5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド（BCIG）、およびコロニーを数えやすくするTTC指示薬を含んでいます。本プレートは、食品・飲料業界で大腸菌（*E.coli*）および大腸菌群の測定に使用されます。



ほとんどの *E.coli*（約 97%）はβ-グルクロニダーゼを産生しますが、このβ-グルクロニダーゼは、本プレート上で青い沈着物を産生し、コロニーを形成します。本プレートの上部フィルムは、乳糖発酵性の大腸菌群および *E.coli* により産生されるガスを捕捉します。乳糖発酵において、ごく一部の *E.coli* はガスを産生せず、それらはガス非産生 *E.coli* と呼ばれています。本プレート上では、（ほぼコロニー 1 個分の直径の範囲内に）捕捉されるガス（気泡）の有無にかかわらず、青～青緑色のコロニーが *E.coli* として測定されます。

ほとんどの *E.coli* O157 株は定型的コロニーを示しません。これらはβ- グルクロニダーゼ陰性であり、コロニーは青色に着色されないため、本プレートでは大腸菌群として検出されます。また、*E.coli* 以外の一部の細菌株（例：*Shigella, Salmonella, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella* 等）の中にはβ- グルクロニダーゼを産生するものもあります。

米国食品医薬品局（FDA）が定める Bacteriological Analytical Manual（BAM）では、大腸菌群は、代謝発酵中に乳糖から酸とガスを産生するグラム陰性桿菌と定義されています。※ 本プレート上で生育する *E.coli* 以外の大腸菌群コロニーは酸とガスを産生し、これによって pH 指示薬がゲルの色を淡黄色に変色させ、ガスが赤色のコロニーの周りに捕捉されます。本解説書では、FDA BAM の定義による大腸菌群の数は、気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニーの総数となります。

※日本における大腸菌群は、FDA BAM と同様、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または通性嫌気性の細菌と食品衛生検査指針微生物編 改訂第 2 版 2018 に定義されています。

ISOでは、大腸菌群を選択培地上での生育能により定義しています。ISO4832では Violet Red Bile Lactose（VRBL）寒天培地上で典型的な大腸菌群コロニーを測定すると共に、非典型的なコロニーを確認します。本プレートでは、大腸菌群は、気泡の有無を問わない赤色のコロニーおよび気泡の有無を問わない青色のコロニーの総数となります。

製品の取扱説明書も併せてご覧ください。

適正測定範囲

*E.coli*の適正測定範囲	：	総コロニー数にかかわらず、気泡の有無を問わない青色から青緑色のコロニー数で 100 個以下
大腸菌群の適正測定範囲	：	気泡の有無を問わない青色のコロニーと気泡の有無を問わない赤色のコロニーの総数で 100 個以下

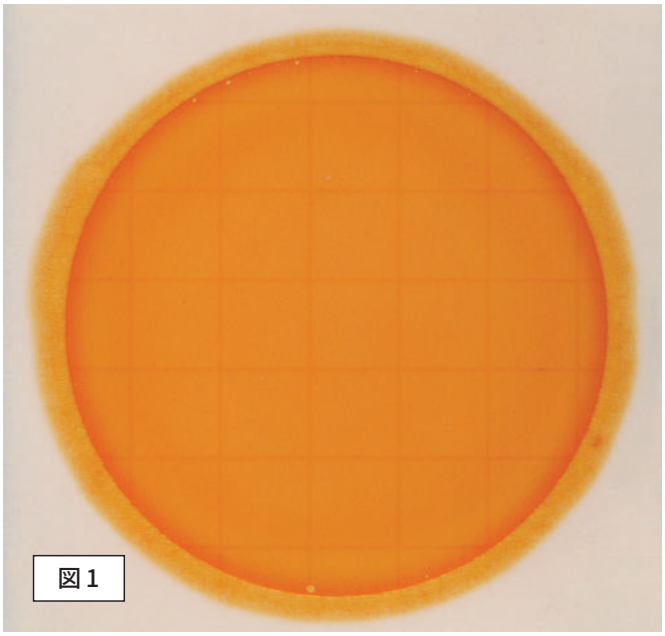


図 1

***E.coli*数 = 0**

大腸菌群数 = 0

菌の生育がない本プレート

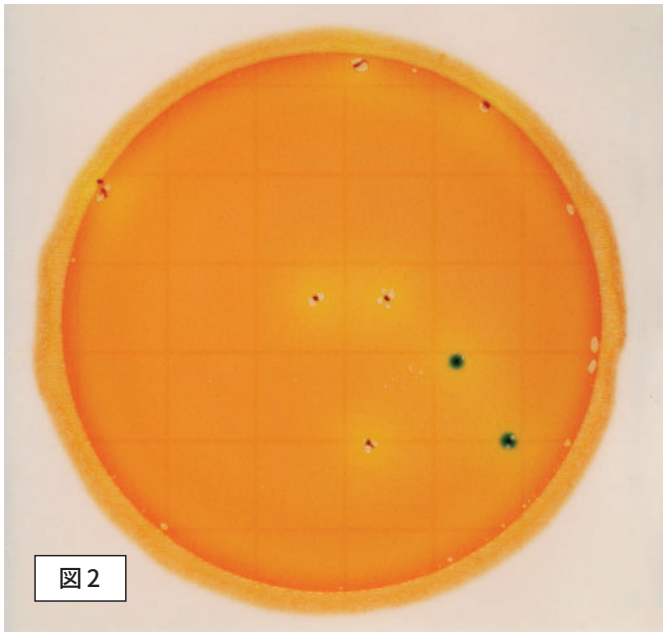


図 2

***E.coli*数 = 2**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：FDA BAMに基づく考え方 = 8

（気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：ISOに基づく考え方 = 8

（気泡の有無を問わない赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

*E.coli*は青色から青緑色のコロニーで、気泡の有無を問いません。大腸菌群の定義は参照する方法によって異なります。

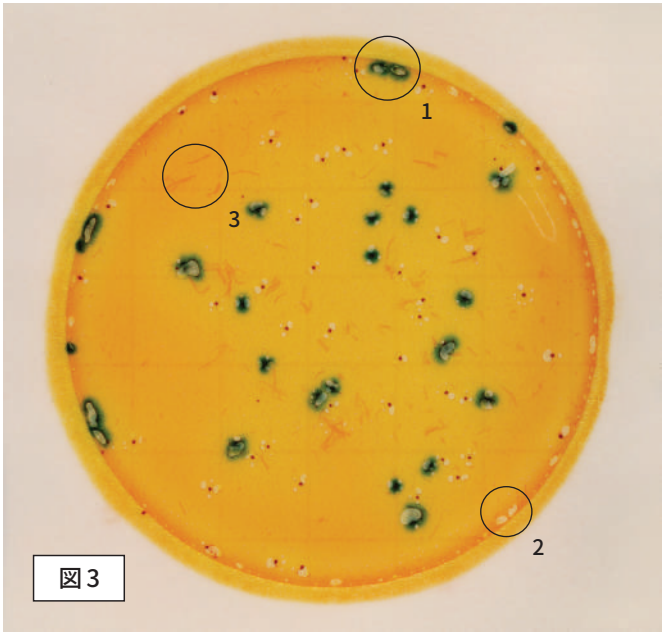


図3

***E.coli*数 = 25**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：FDA BAMに基づく考え方 = 71
（気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：ISOに基づく考え方 = 75
（気泡の有無を問わない赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

○1内は2つのコロニーが隣接しているため1つのコロニーのように見えますが、コロニーとそれに伴う気泡が独立して出現しているため、2個と測定します。

○2の気泡は接種が不適切であったため、あるいは検体内に混入していた空気に起因する可能性があります。そのような気泡の形状は不規則で、コロニーを伴っていません。

食品残渣の形状は不規則で、気泡を伴っていません（○3 参照）。

フォームダム上のコロニーは、培地の選択作用を受けていないため、測定しません。

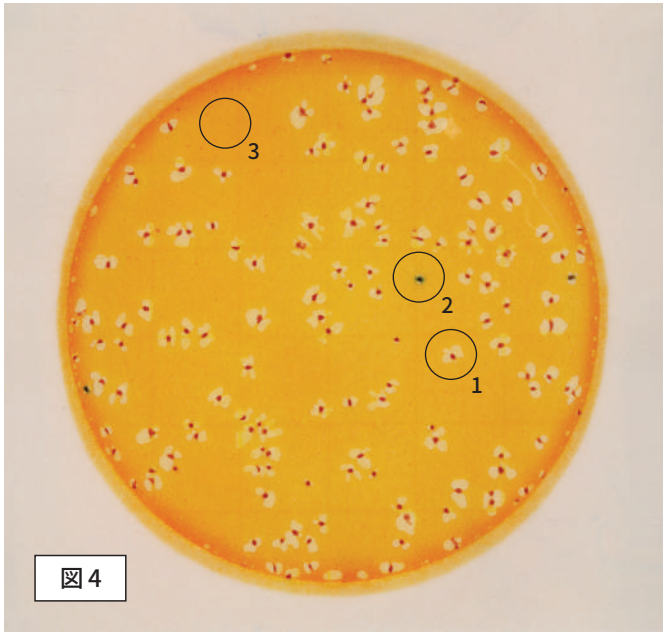


図4

***E.coli*数 = 3**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

推定される全ての大腸菌群数 = 145

本プレートの接種領域は約30cm^{2}です。100個以上のコロニーが存在する本プレートでは、推定個数を算出することができます。代表的な1個または複数個の格子の中にあるコロニー数を数え、格子1個あたりの平均値を決定します。平均値を30倍して推定個数を算出します。

この写真では、次の2つのコロニーが見えます。
○1：気泡を伴う赤色のコロニー
○2：気泡を伴う青色のコロニー

なお、○3のきわめて小さく淡い色のコロニーは非定型菌のため、測定しないでください。

より正確な数が必要な場合、検体をさらに希釈してください。

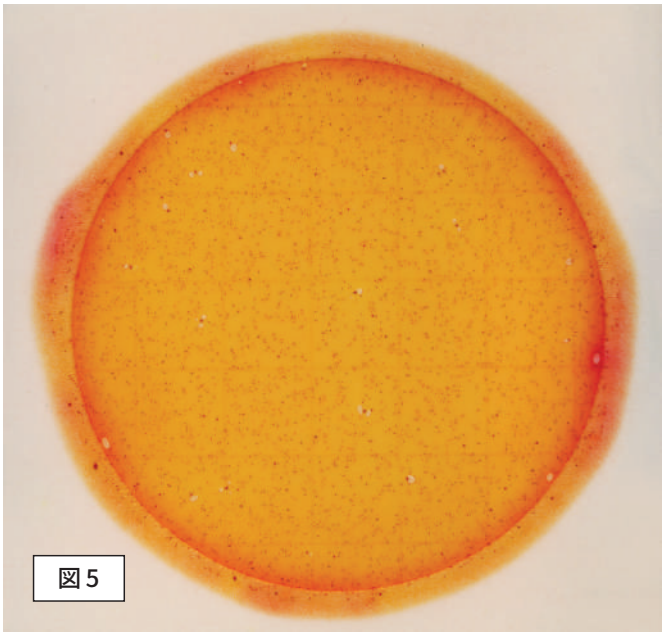


図5

***E.coli*数 = 0**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数 = 測定不能多数

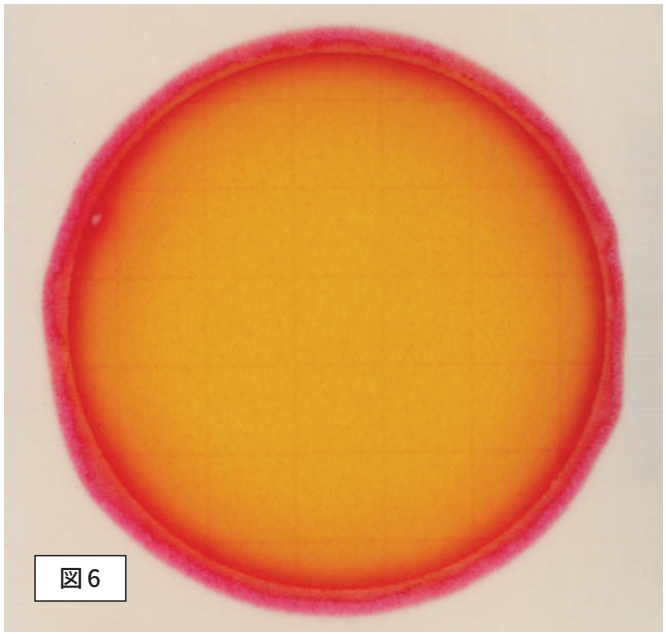
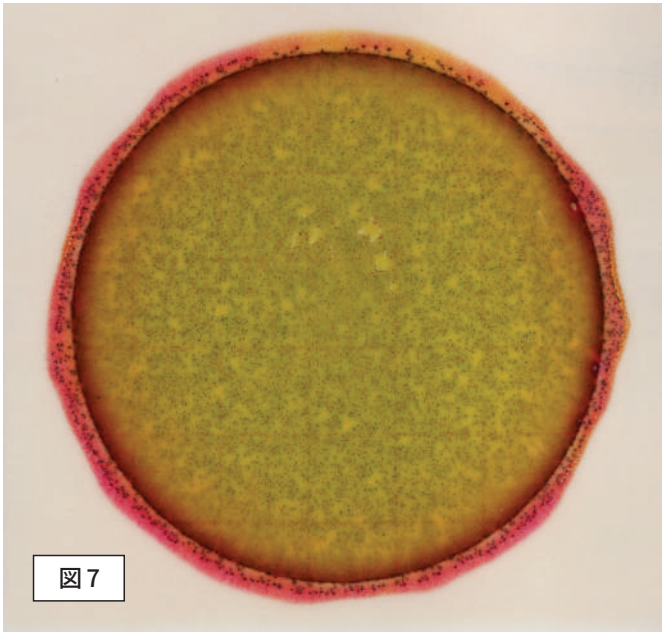


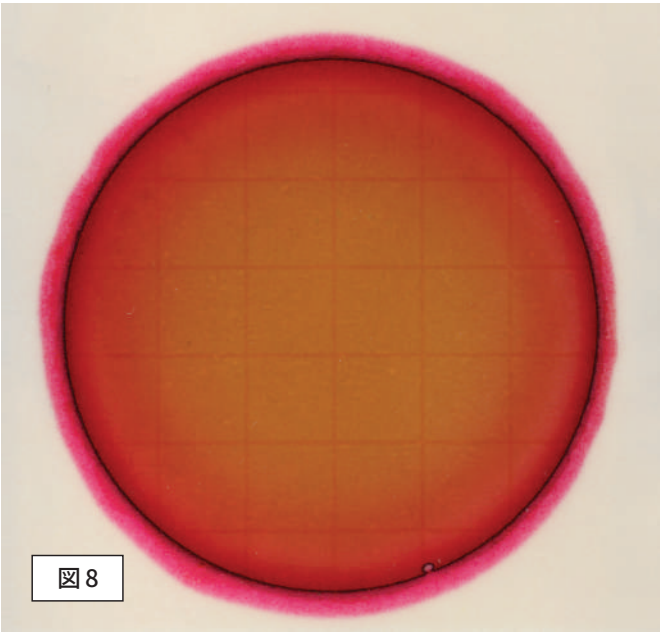
図6

***E.coli*数 = 判定不能**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数 = 測定不能多数

大腸菌群の適正測定範囲は全てのコロニーの合計数が100個以下です。コロニー数が測定不能多数の本プレートでは、以下の特徴が1つ以上見られます：
ゲルの色が明るくなり黄色になる。多数の小さく不明瞭な赤または青のコロニーおよび/または多数の気泡が見られる。*E.coli*または大腸菌群が本プレート1枚あたりに多数存在すると、生育域の外縁がピンクからピンクオレンジになります。より正確な数が必要な場合、検体をさらに希釈してください。



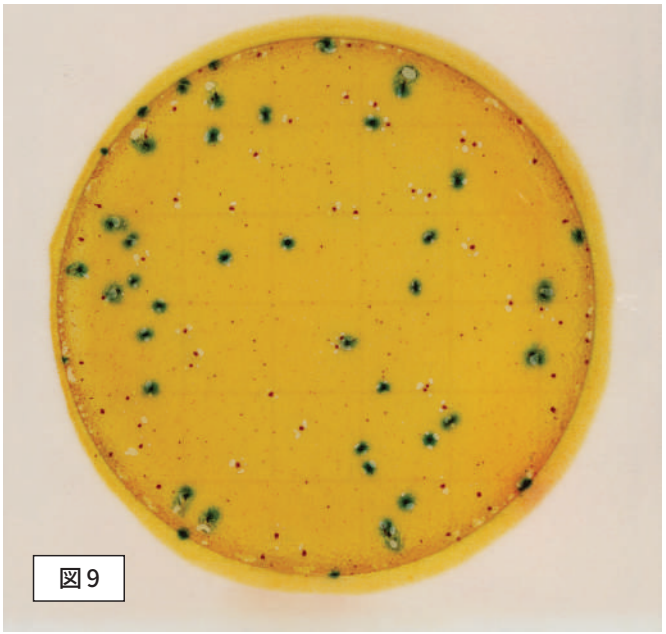


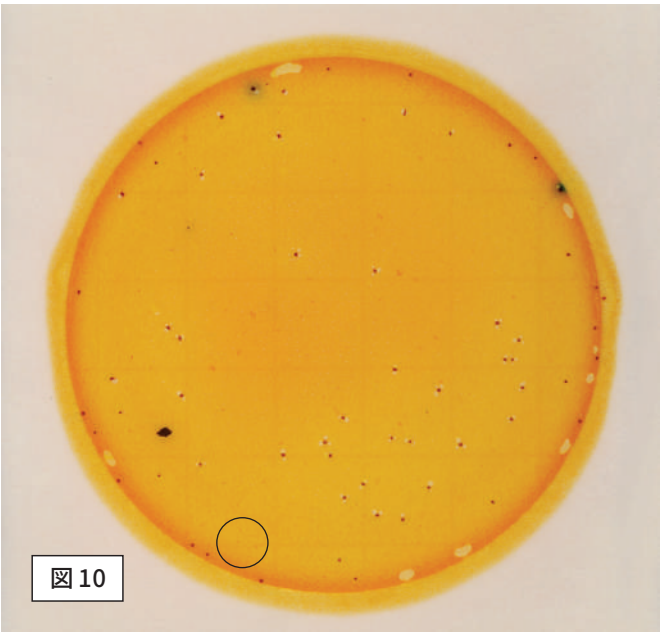
***E.coli*数 = 測定不能多数**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数 = 測定不能多数

本プレートにおける*E.coli*の適正測定範囲は、青色から青緑色のコロニー数が100個以下です。コロニーが測定不能多数のプレートでは、以下の特徴が1つ以上見られます：ゲルの色が明るくなり黄色になる。多数の小さく不明瞭な赤色または青色のコロニーおよび/または多数の気泡が見られる。*E.coli*または大腸菌群が本プレート1枚あたりに多数存在すると、培地面のエッジ部分が濃いピンクから赤になります。

より正確な数が必要な場合、検体をさらに希釈してください。





***E.coli*数 = 41**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：FDA BAMに基づく考え方 = 測定不能多数
（気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：ISOに基づく考え方 = 測定不能多数
（気泡の有無を問わない赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

本プレートにおける*E.coli*の適正測定範囲は、総コロニー数とは無関係に、青色から青緑色のコロニー数が100個以下です。この写真では、大腸菌群の適正測定範囲にするためには、さらに希釈をする必要があります。

***E.coli*数 = 2**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：FDA BAMに基づく考え方 = 39
（気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：ISOに基づく考え方 = 61
（気泡の有無を問わない赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

上図は、図9のプレート中の検体を階段希釈したものです。本プレートにおける全ての大腸菌群の適正測定範囲は、全てのコロニー合計数が100個以下です。きわめて小さく淡い色のコロニーは非定型菌のため、測定しないでください。（〇参照）

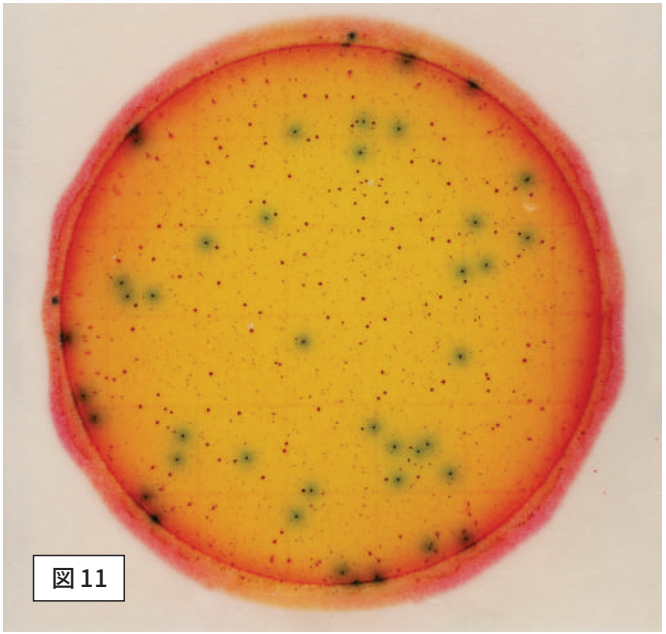


図 11

***E.coli*数 = 42**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：FDA BAMに基づく考え方 = 測定不能多数
（気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：ISOに基づく考え方 = 測定不能多数
（気泡の有無を問わない赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

本プレートにおける*E.coli*の適正測定範囲は、総コロニー数とは無関係に、青色から青緑色のコロニー数が100個以下です。大腸菌群の適正測定範囲にするためには、さらに希釈をしてください。

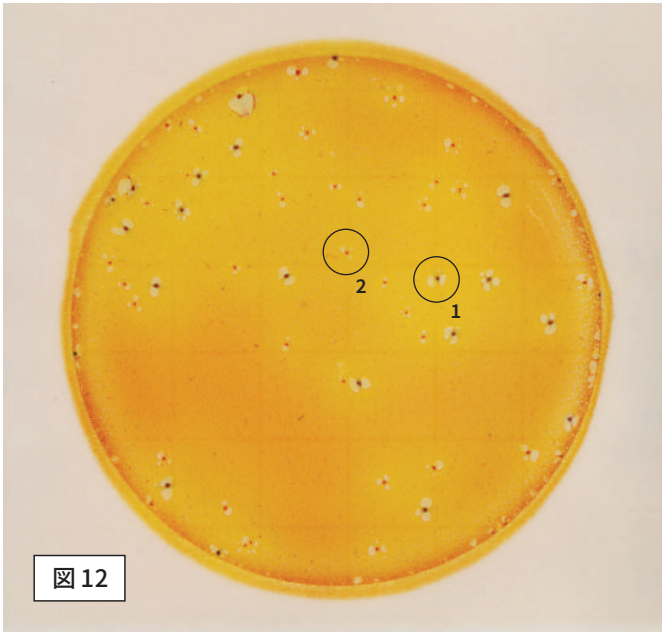


図 12

***E.coli*数 = 21**（気泡の有無を問わない青色のコロニー）

大腸菌群数：FDA BAMに基づく考え方 = 60
（気泡を伴う赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

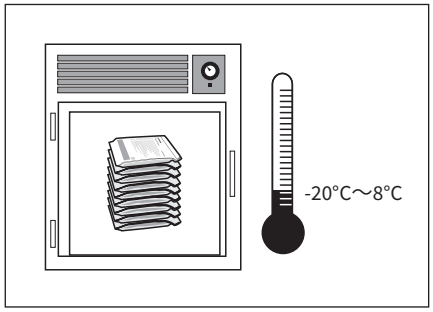
大腸菌群数：ISOに基づく考え方 = 60
（気泡の有無を問わない赤色のコロニーと気泡の有無を問わない青色のコロニー）

ある種の食品検体、例えば果実を含む食品検体の10倍希釈液は、*E.coli*によるβ-グルクロニダーゼ産生に影響を及ぼし、青緑の色を薄める可能性があります。培養時間の延長および/または20倍希釈すると、青緑色が鮮明になります。

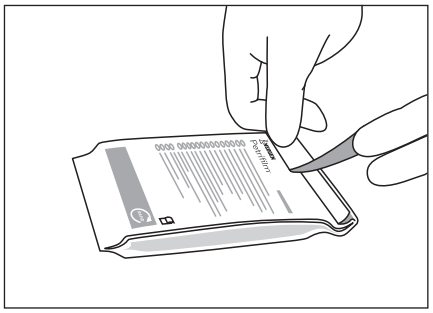
上図では、*E.coli*コロニーは、薄い青緑色で囲まれた暗色のコロニー（○1）として確認できます。このコロニーと、明るい赤色の*E.coli*以外の大腸菌群コロニー（○2）を比べてみてください。

使用上の注意

培養

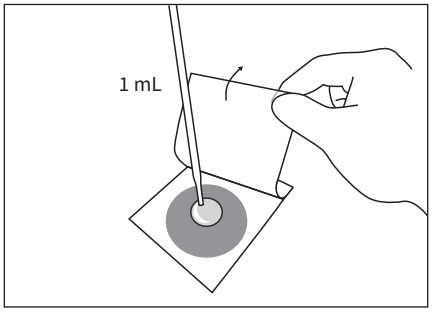


1 未開封の本プレートの包装パウチは、－20°Cから8°Cの温度で冷凍または冷蔵保管してください。パウチに記載されている使用期限内にご使用ください。未開封のパウチは全て、ご使用の直前に室温に戻してから開封してください。

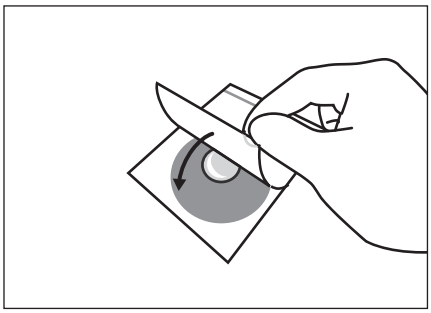


2 開封後は、パウチの開口部を折りたたみ、粘着テープ等で封をしてください。湿気を避ける必要があるため、開封したパウチは冷蔵しないでください。一度開封した後に封をしたパウチは、乾燥した冷所（25°C以下、相対湿度50%未満）で保管し、4週間以内にご使用ください。

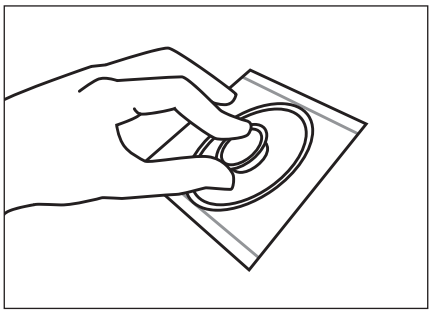
接種



3 本プレートは平らな台に置いてください。上部フィルムを持ち上げ、ピペットを接種プレートに対し垂直に保ち、1mLの検体試料液を下部フィルムの中央に接種します。

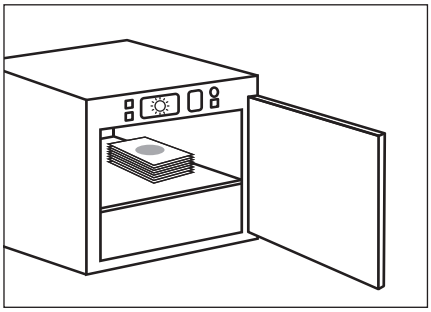


4 気泡が入らないように注意して、上部フィルムを持ったまま検体の上にゆっくりと下ろします。上部フィルムから手を離して自然に落とさないようにしてください。



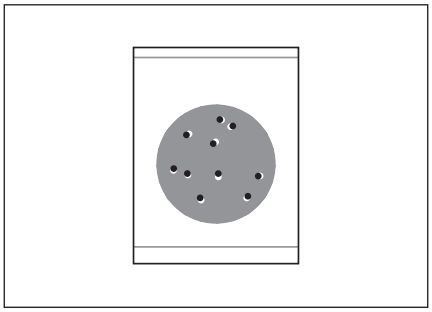
5 本プレートの中央に、ペトリフィルム™ フラットスプレッダー（以下「本スプレッダー」という）を置きます。本スプレッダーの中心を押して検体を均等に広げてください。本スプレッダーはひねったり滑らせたりしないでください。

培養



6 本プレートの上部フィルム（透明フィルム側）を上にして培養します。20枚まで重ねて培養することができます。湿度低下を最小限にするため、培養器の加湿が必要な場合もあります。
培養時間および温度は以下の通りです。

判定



7 本プレートは、標準的なコロニーカウンターまたは拡大鏡でも測定が可能です。詳しく同定する場合は、コロニーを釣菌することができます。上部フィルムを持ち上げ、ゲル部からコロニーを釣菌します。

適切な滅菌希釈液を使用してください。

[使用可能な希釈液]
- バターフィールドリン酸緩衝希釈液
- 0.1%ペプトン水
- ペプトン塩希釈液
（Maximum Recovery Diluent）
- 緩衝ペプトン水
- 0.85～0.90%生理食塩水
- リン酸緩衝生理食塩水（PBS）
- 蒸留水
- 重亜硫酸塩無添加リージンブロス

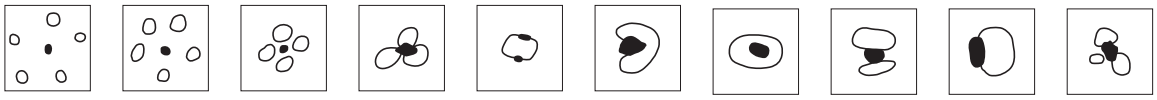
[pH調整について]
酸性検体（<pH5）における菌の生育を確実にするために、検体試料液をpH5以上になるよう1N NaOHを用いて調整してください。

[注意]
クエン酸、重硫酸塩またはチオ硫酸塩を含む希釈液は本プレートに使用しないでください。菌の生育が阻害される可能性があります。

標準手順でクエン酸緩衝液が指定されている場合には、あらかじめ40℃～45℃に加温したバターフィールドリン酸緩衝希釈液に変更して使用してください。

気泡

下図は、ガスを産生するコロニーに伴ってみられる様々な気泡のパターンを示しています。
いずれのパターンも1つのコロニーとして測定してください。



使用者の責任：ペトリフィルム™ 培地の性能は、全ての微生物、培養条件、食品検体について評価されたわけではありません。
試験方法とその結果がお客様の必要条件を満たすかどうかの判断は、お客様ご自身の責任となります。本判定ガイドの複製が必要な場合、お客様の印刷設定が画像や色の質に影響する場合があります。

培養の時間や温度は方法によって異なります。
最も一般的な方法を以下に示します。

AOAC Official Method（OMA）

2018.13 乳製品 ：30±1℃または32±1℃、18～24時間
その他の食品：35±1℃または37±1℃、18～24時間
【*E. coli*のみ判定の場合】
すべての食品：42±1℃、18～24時間

MicroVal

2017LR76 乳製品 ：30±1℃、18～24時間
その他の食品：37±1℃、18～24時間
【*E. coli*のみ判定の場合】
すべての食品：42±1℃、18～24時間

NEOGEN、ペトリフィルム、Petrifilmは、Neogen社の商標です。

ネオジェンジャパン株式会社
https://www.neogen.jp/

NEO-232-B(1124)e.

Please Recycle. Printed in Japan.
© Neogen Corporation. All rights reserved.