

ペトリフィルム™ 大腸菌群数測定用プレート

(CCプレート)

Petrifilm™ Coliform Count Plate (CC Plate)

この解説書はペトリフィルム™ 大腸菌群数測定用プレート（以下「本プレート」という）に現れた結果を良く理解していただく為のものです。

本プレートには、改良型 Violet Red Bile (VRB) 培地の栄養成分や冷水可溶性ゲル化剤、およびコロニー数を数えやすくする指示薬が含まれています。上部フィルムが大腸菌群の発生したガスを捕らえます。

AOAC Internationalおよび米国FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) では、大腸菌群とは乳糖から酸およびガスを産生するグラム陰性桿菌である、と定義しています。本プレート上で生育した大腸菌群のコロニーは酸を産生し、pH 指示薬がゲルの色調を濃くします。赤色のコロニーの周囲にガスが捕らえられます。FDA BAM における判定では、ガスを伴う赤色のコロニーを大腸菌群として測定します。

ISO では鑑別培地で生育する菌を大腸菌群として定義しています。ISO 4832：2006 では乳糖添加 VRB 寒天培地 (VRBL) における大腸菌群の定形コロニーおよび確認試験で陽性となった非定形コロニーを測定します。

本プレートではこれらの大腸菌群はガスの有無によらず生育した赤色コロニーとして生育します。ISO 4831 は MPN により大腸菌群を測定する方法であり、ISO 4831 に記載された鑑別培地で生育してガスを産生する菌を大腸菌群として定義しています。

本プレートでは、これらの大腸菌群はガスを伴う赤色コロニーとして生育します。

本プレートでは、耐熱性の大腸菌群も測定できます。耐熱性大腸菌群は培養温度をあげるにより選択的に検出することができ、このような耐熱性大腸菌群の測定法については NF V80 060 に記載されています。

本プレートでは 44°C ± 1°C、24 時間 ± 2 時間培養後の赤色コロニーをガスの有無によらず測定することで NF V80 060 の測定結果と同様の結果が得られます。

ガスを伴うコロニー数 = 69、全コロニー数 = 94

大腸菌群の判定方法は国によって異なる場合があります。国内においては、大腸菌群の定義は AOAC International および米国 FDA BAM と同じであり、AOAC 法による判定に準じます。(培養時間および温度については「使用上の注意事項」の部参照)

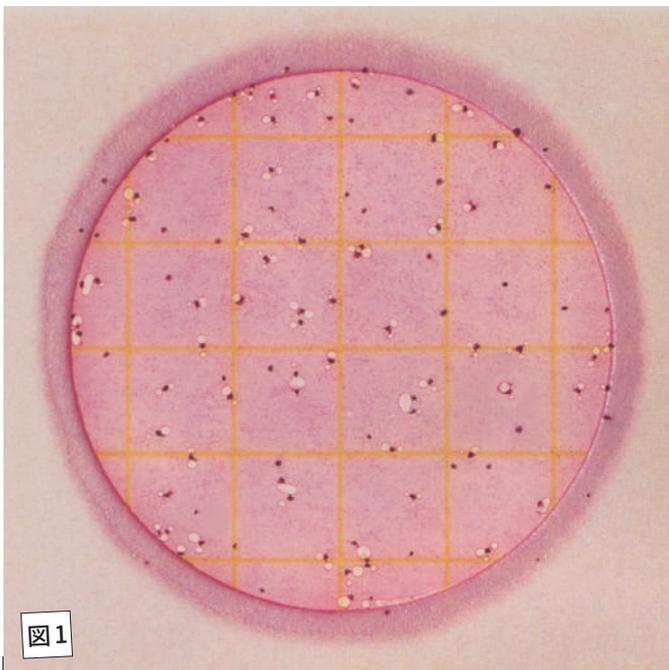


図1

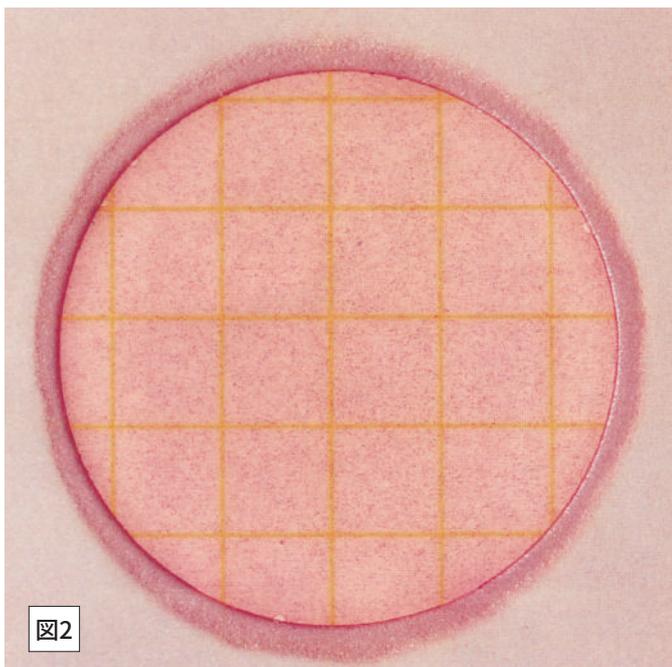


図2

菌の生育なし = 0

図2から図5までのゲルの色調変化に注目してください。大腸菌群数が多くなるに従って、ゲルの色調が濃くなっています。

背景に見える小さな気泡はゲルに由来するものであり、大腸菌群の生育によるものではありません。

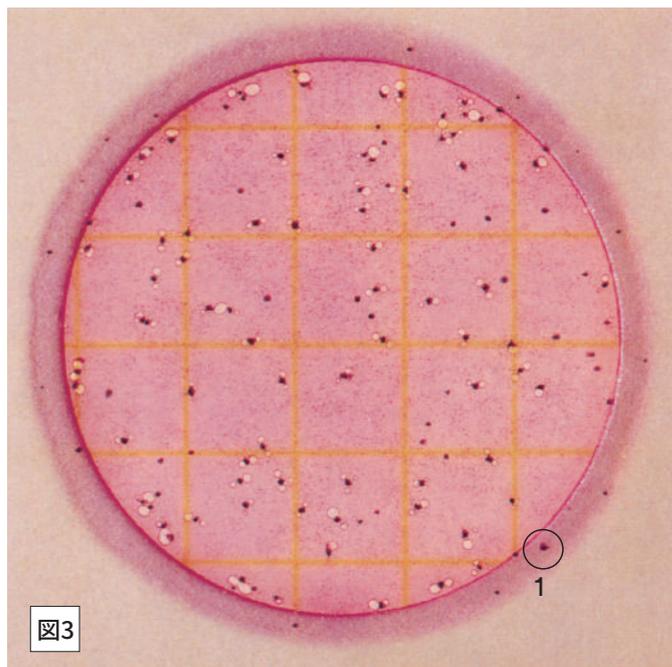


図3

**大腸菌群数 = 79
(AOAC、FDA BAM の定義に基づきガスを伴うコロニーを測定)
全コロニー数 = 109**

本プレート上のコロニー総数の適正測定範囲は150コロニー以下です。フォームダム上に出現するコロニーは測定しません。フォームダムには培地の選択成分が無いためです。(○1参照)

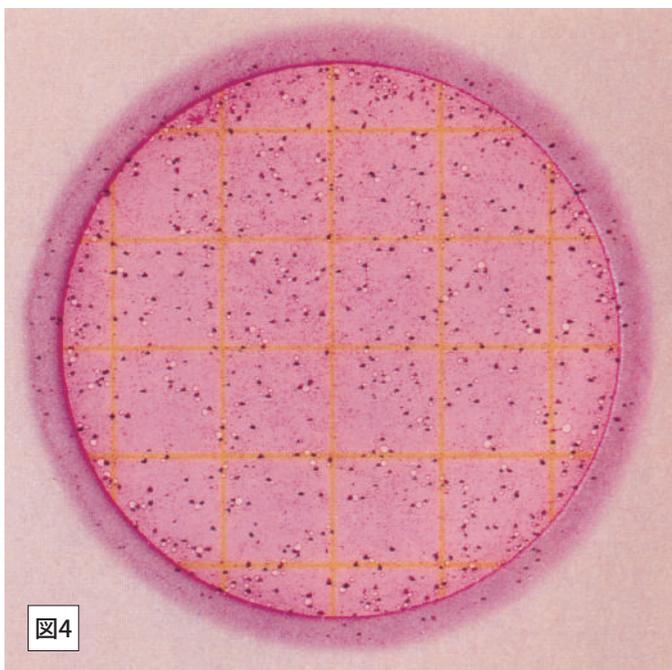


図4

**大腸菌群数の推定数 = 220
(AOAC、FDA BAM の定義に基づきガスを伴うコロニーを測定)**

円形の生育部分の面積は約20cm²です。コロニー数が150を超えるような本プレートでは、代表的な格子角を1つ以上数えて格子(1cm²)の推定菌数を求め、この平均数を20倍して本プレート1枚あたりの推定菌数を求めます。

正確に測定するには検体をさらに希釈することを推奨します。

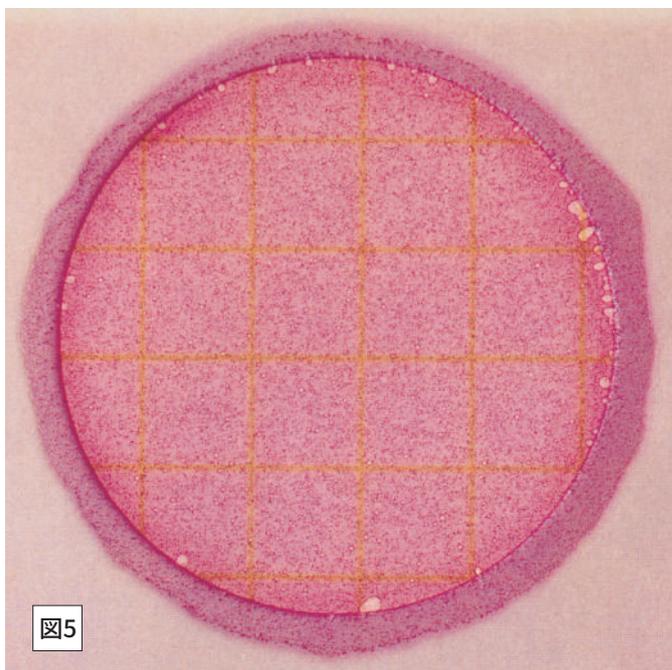


図5

TNTC (Too Numerous to Count : 測定不能多数)

本プレートがTNTC (測定不能多数) となった場合、次の特徴があります。

- 1) 多くのコロニーがあること。
- 2) 多くの気泡があること。
- 3) ゲルの色調が濃くなっていること。

TNTC (Too Numerous to Count : 測定不能多数)

より正確に測定するには、検体をさらに希釈します。

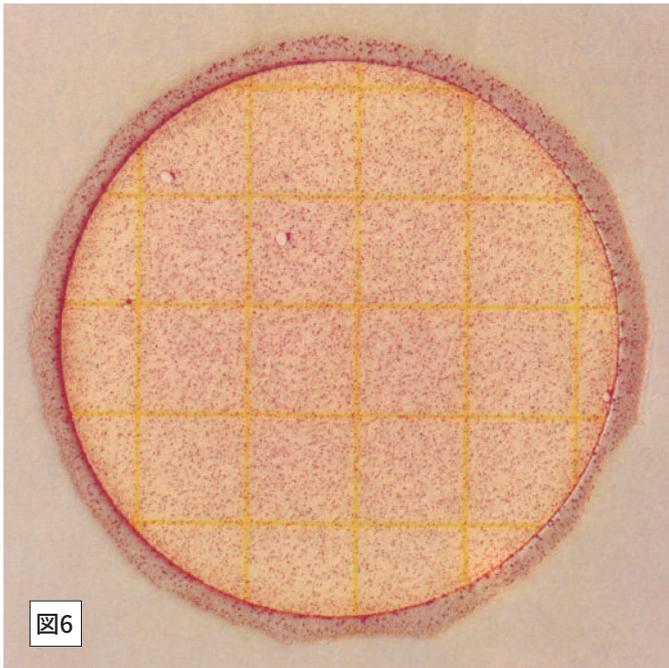


図6

大腸菌群数 = 4
(AOAC、FDA BAM の定義に基づきガスを伴うコロニーを測定)

Pseudomonas のような大腸菌群でない菌が多数本プレートに生育している場合、ゲルが黄色に変化することもあります。正確に判定するためには検体をさらに希釈することを推奨します。

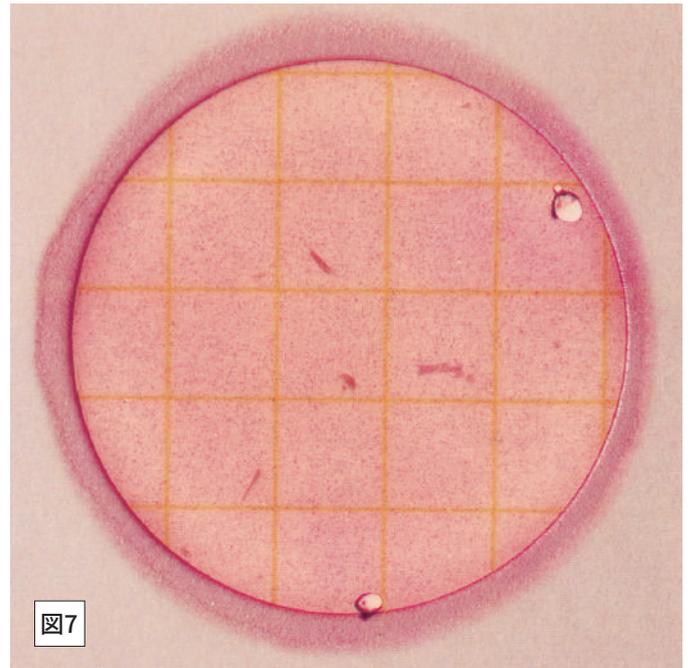


図7

大腸菌群数 = 2
(AOAC、FDA BAM の定義に基づきガスを伴うコロニーを測定)
全コロニー数 = 2

食品残渣は形が不規則で、気泡を伴いません。

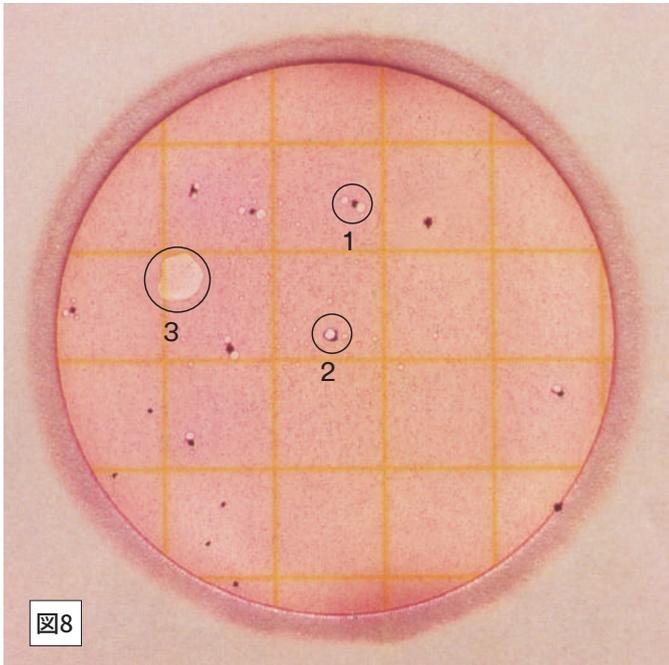


図8

大腸菌群数 = 8
(AOAC、FDA BAM の定義に基づきガスを伴うコロニーを測定)
全コロニー数 = 15

様々な気泡のパターンがあります。ガスがコロニーを分断してコロニーが気泡の周りを「囲む」こともあります。(○1・○2参照)
接種が適切でなかったり、または検体中に空気が入ってしまった為に人為的な気泡が生じる場合もあります。この場合、気泡は不規則な形となりコロニーを伴っていません。(○3参照)

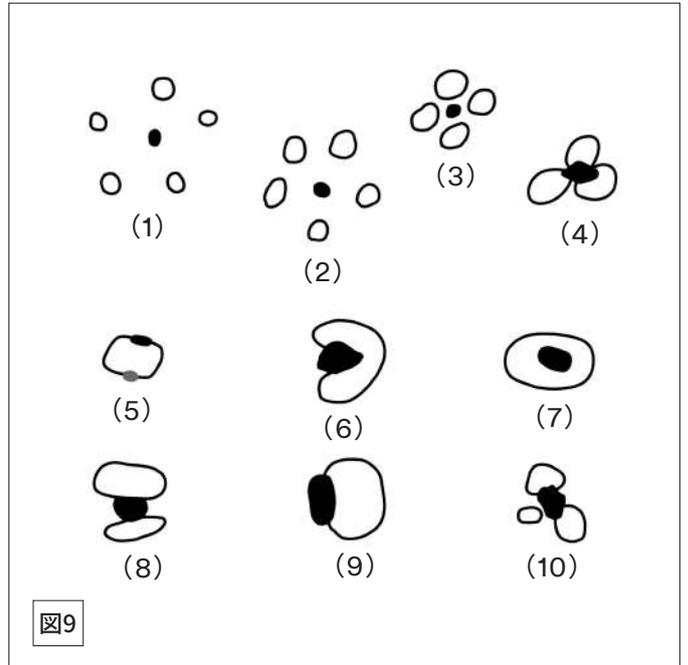


図9

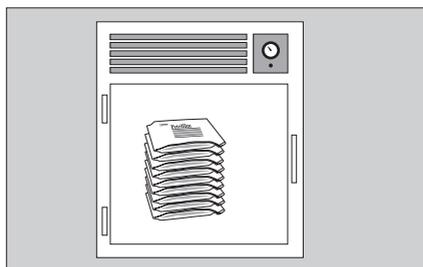
例(1)～例(10)までは、ガスを伴うコロニーの様々なパターンを示しています。いずれの例も大腸菌群として数える必要があります。

(1)～(3)のように、ガスが放射状に見られる場合にはガスを伴うコロニーと判定します。

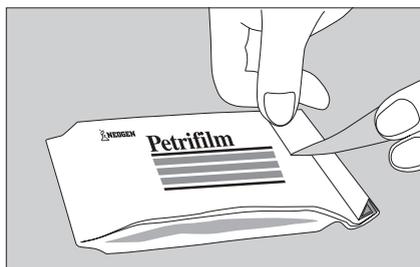
(5)のようにガスがコロニーを分離する場合もあります。この場合においては、1つのコロニーとして測定します。

使用上の注意事項

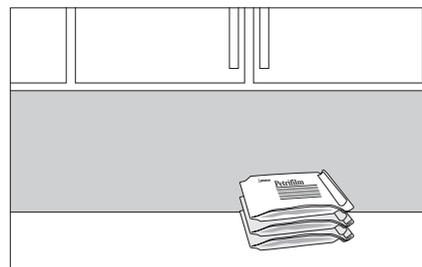
保管



- 1 未開封のパウチは8℃以下で保管してください。パウチに記載されている有効期限内にご使用ください。結露が問題となるような湿度の高い場所では、パウチを室温に放置して室温にしてから開封してください。

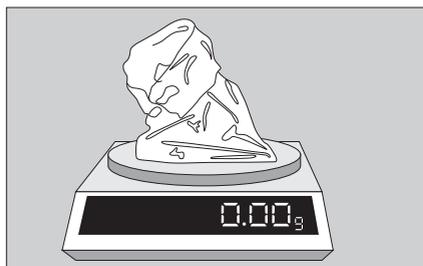


- 2 開封したパウチを閉じる時は、開口部を折り曲げ、テープ等でしっかりと止めます。

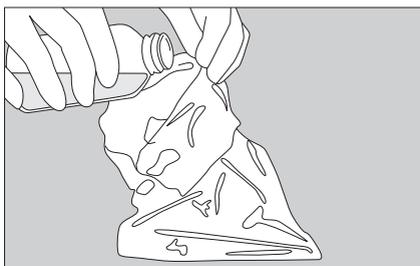


- 3 開封後に再び密封したパウチは25℃以下相対湿度50%以下で保管してください。**開封したパウチは冷蔵しないでください。**開封した本プレートは開封後1ヶ月以内にご使用ください。

検体の調製



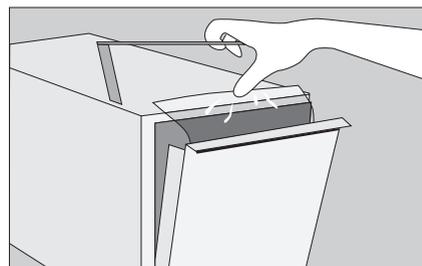
- 4 検体希釈液を調製します。食品検体を適切な容器、たとえばストマッカーバックや希釈ボトル、またはその他の滅菌済み容器などに秤取またはピペットで採取します。



- 5 以下に示す滅菌希釈液のうち1種類を適量加えます。

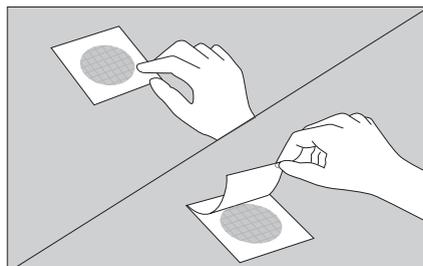
●バターフィールドリン酸緩衝液 (IDFリン酸緩衝液、リン酸二水素カリウムの0.0425g/L溶液をpH7.2に調整) ●0.1%ペプトン水 ●ペプトン塩希釈液 (ISO 6887) ●緩衝ペプトン水 (ISO 6579) ●生理食塩水 (0.85-0.90%) ●重硫酸塩無添加リージンブロス ●蒸留水

クエン酸、重亜硫酸塩、チオ硫酸塩を含む緩衝液は使用しないでください。菌の生育を阻害する恐れがあります。

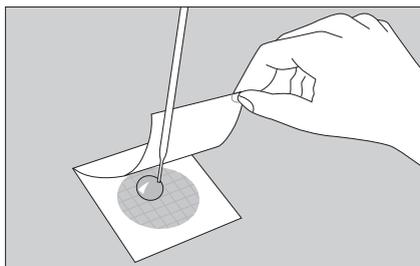


- 6 検体を攪拌またはホモジナイズします。希釈した検体のpHを6.6から7.2の間に調整します。
●酸性検体には1NのNaOHを使用してください。
●アルカリ性検体には1NのHClを使用してください。

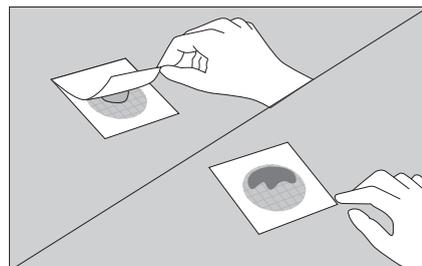
接種



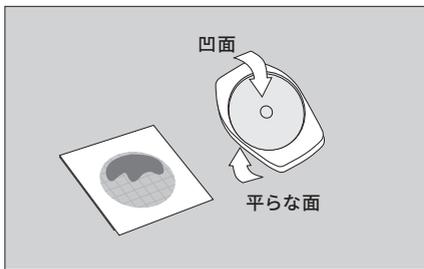
- 7 本プレートを平らな台に置きます。上部フィルムを持ち上げます。



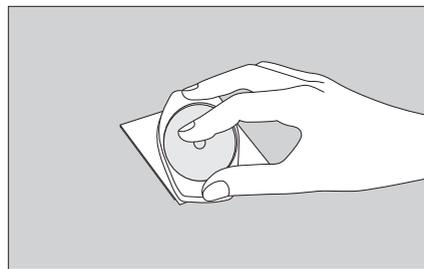
- 8 ピペットを本プレートに対し垂直に保って、検体1mLを下部フィルムの中央に接種します。



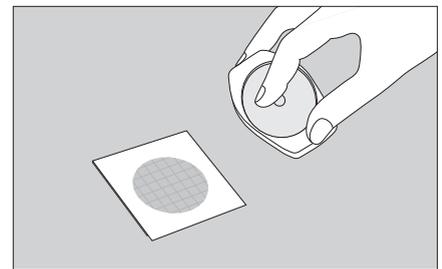
- 9 気泡が入らないよう注意して上部フィルムを持ったままゆっくりとおろします。



10 スプレッターの平らな面を下側にして、接種部分の上部フィルムの上に置きます。

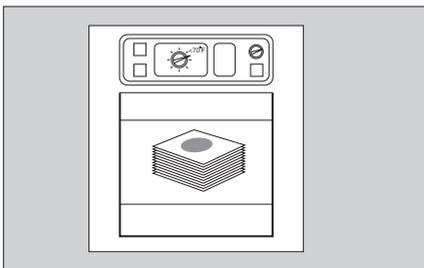


11 ゲル化が始まる前に、スプレッターを上から軽く押して、接種部分が円形に広がるようにします。スプレッターはひねったり滑らせたりしないでください。



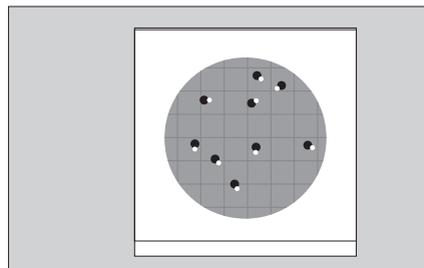
12 スプレッターを取り除きます。1分以上放置してゲルを固化させます。

培養

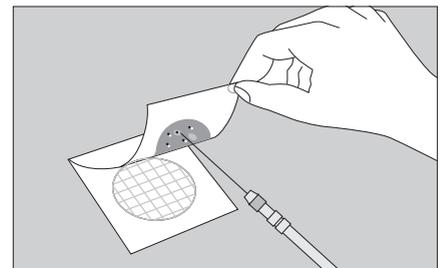


13 本プレートを重ねて培養します。20枚まで重ねて培養することができます。

判定



14 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。



15 上部フィルムを持ち上げてゲルからコロニーを釣菌して、菌を同定することも可能です。

**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)

- 986.33 生乳、低温殺菌乳 : 32±1°C、24±2時間
- 989.10 全乳製品 : 32±1°C、24±2時間
- 991.14 全食品 : 32±1°C、24±2時間

AFNOR Validated Methods

- 3M 01/2-09/89A and B 貝類以外の全食品 : 30±1°Cまたは37±1°C、24±2時間
- 3M 01/2-09/89C 全食品 : 44±1°C、24±2時間

高温で培養する場合には培養器の加湿が必要です。

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

ネोजェンジャパン株式会社

<https://www.neogen.jp/>

NEO-121-A(0524)e.

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