

ペトリフィルム™

*E. coli*および大腸菌群数測定用プレート

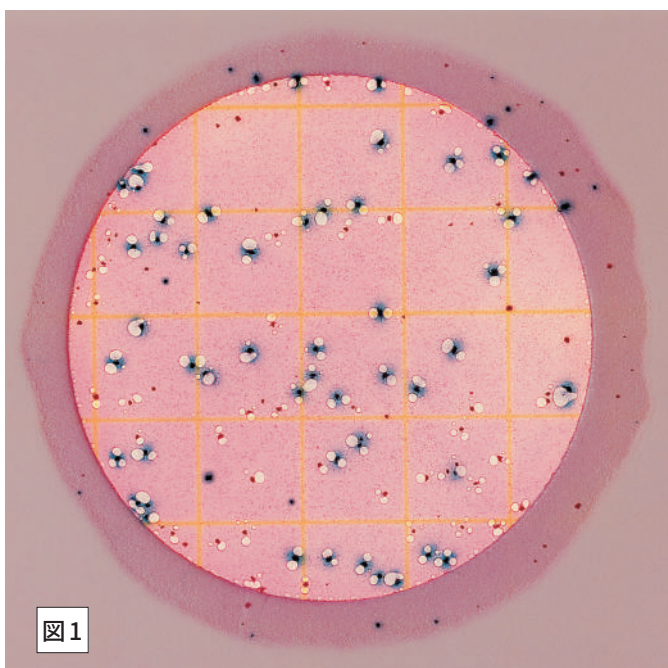
(ECプレート)

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

この解説書はペトリフィルム™ *E. coli*および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、冷水可溶性ゲル化剤、グルクロニダーゼ活性指示薬、およびコロニー数を数えやすくするテトラゾリウム指示薬が含まれています。*E. coli*のほとんど（約97%）はβ-グルクロニダーゼを産生し、コロニーが青色になります。上部フィルムは、*E. coli*および大腸菌群が産生したガスを捕らえます。*E. coli*の約95%はガスを発生しますが、これは本プレート上ではガスを伴う青色から赤味がかかった青色のコロニーとして生育します。（ガスとコロニーの距離は、ほぼコロニー1個分の直径以内です。）

米国FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) 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ていることで、大腸菌群であることが確認されます。



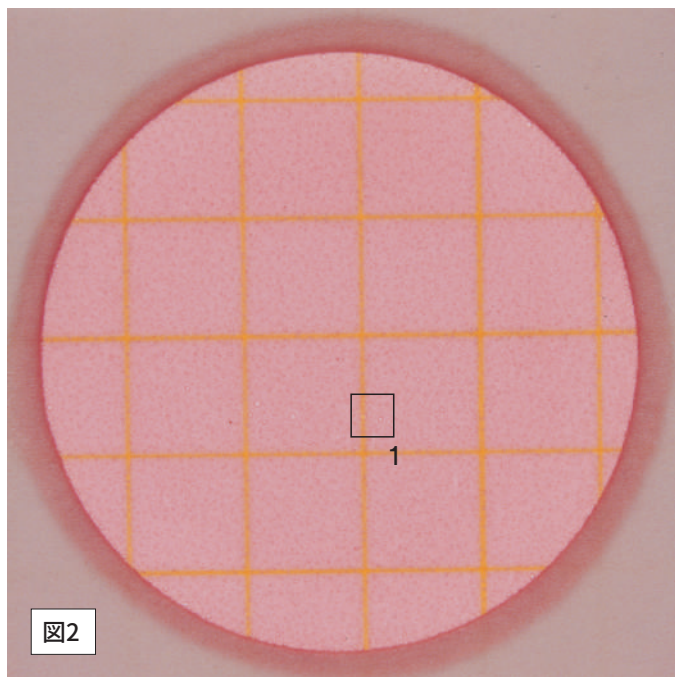
AOAC 法による判定

E. coli = 49 (ガス産生を伴う青いコロニー)

大腸菌群数=87 (ガス産生を伴う青と赤のコロニー)

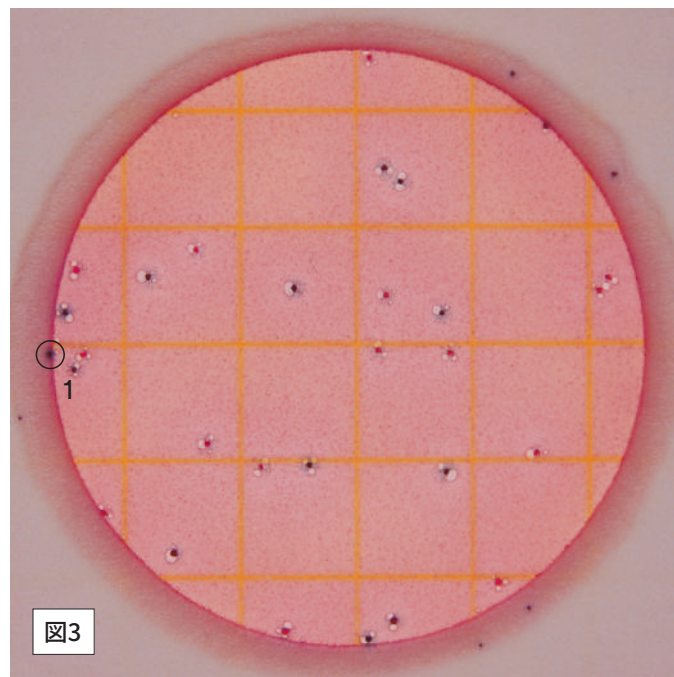
大腸菌群の判定方法は国によって異なる場合があります。国内においては、大腸菌群の定義はAOAC Internationalおよび米国FDA BAMと同じであり、AOAC 法による判定に準じます。（培養時間および温度については「使用上の注意事項」の部参照）

本プレートのみで*E. coli* O157の検出をしません。本プレートは他の多くの*E. coli* / 大腸菌群用の培地と同様に、O157菌株の存在の有無を特異的に示すことはありません。



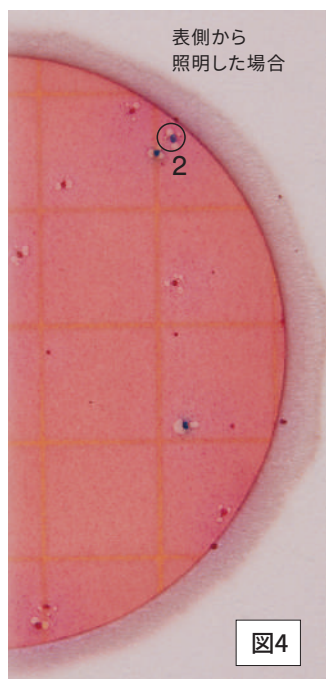
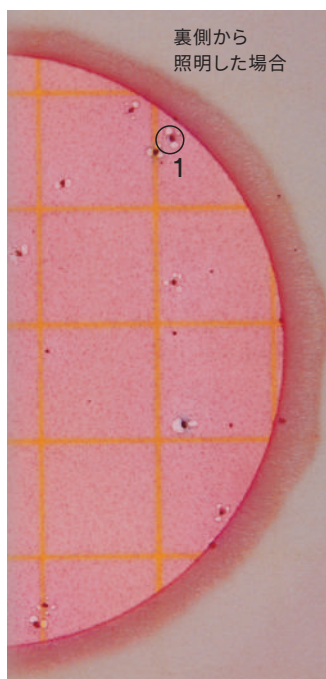
菌の生育なし = 0

図2から図8までのゲルの色調変化に注目してください。*E.coli*または大腸菌群数が多くなるに従って、ゲルの色調は濃赤色または青紫色に変化します。背景に見える小さい気泡はゲルに由来するものであり、*E.coli*または大腸菌群の生育によるものではありません。（□1参照）



*E.coli*数 = 12 大腸菌群数 = 28

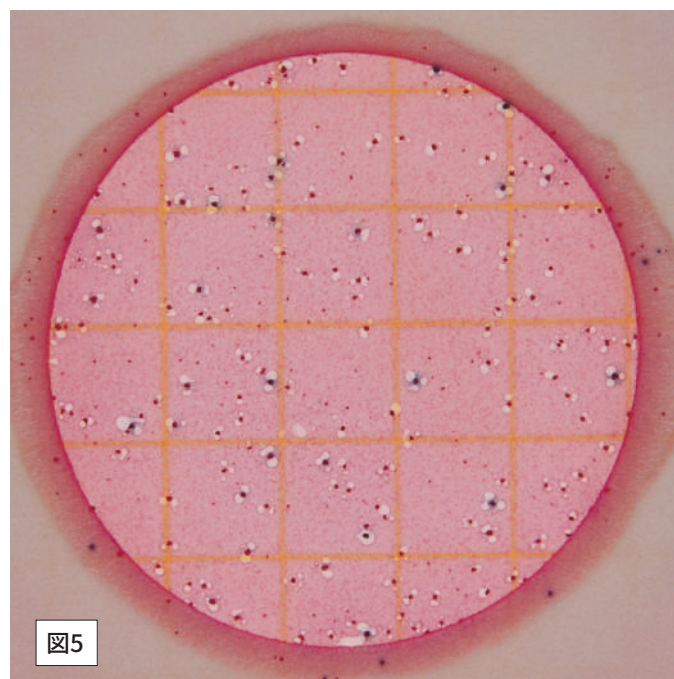
本プレート上のコロニー総数の適正測定範囲は150コロニー以下です。フォームダム上に出現するコロニーは測定しません。フォームダムには培地の選択成分が無いからです。（○1参照）



*E.coli*数 = 3

コロニーが青色（青色から赤味がかった青色まで）であれば*E.coli*の存在を示しています。表側から照明を当てることで、コロニーによって生じた青色の沈着物が見やすくなります。

○1は裏側からの照明により測定される、赤味がかった青色のコロニーを示しています。○2は同じコロニーを表側から照明した場合です。○2の方が青い沈着物がよりはっきり見えます。

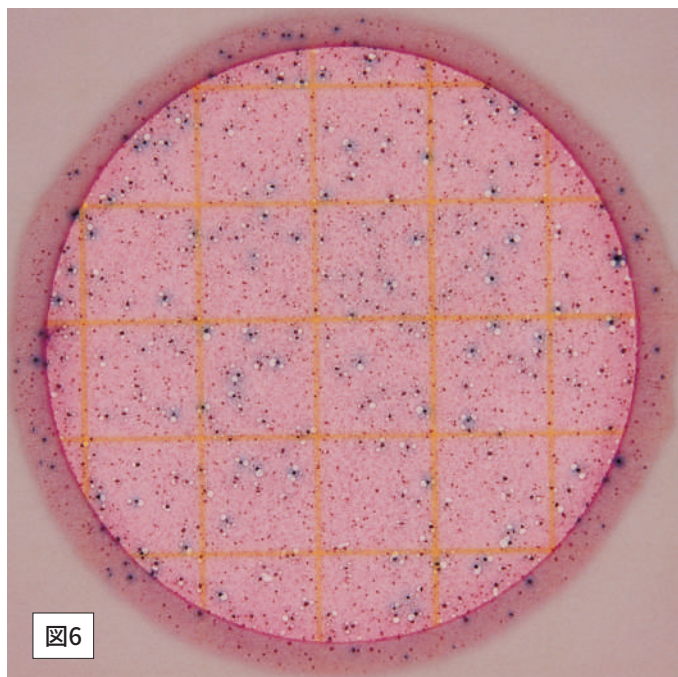


大腸菌群の推定菌数 = 220

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）の平均数を求め、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。

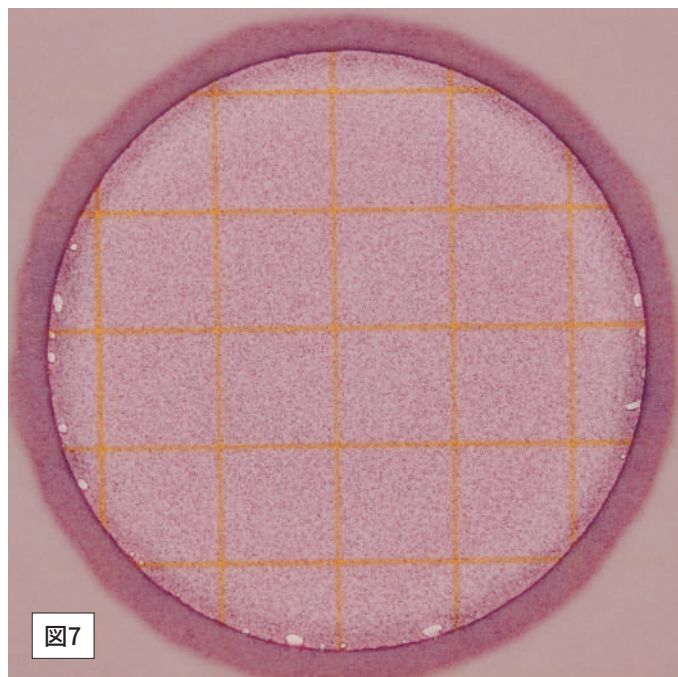
TNTC (Too Numerous to Count : 測定不能多数)

より正確に測定するには、検体をさらに希釈します。



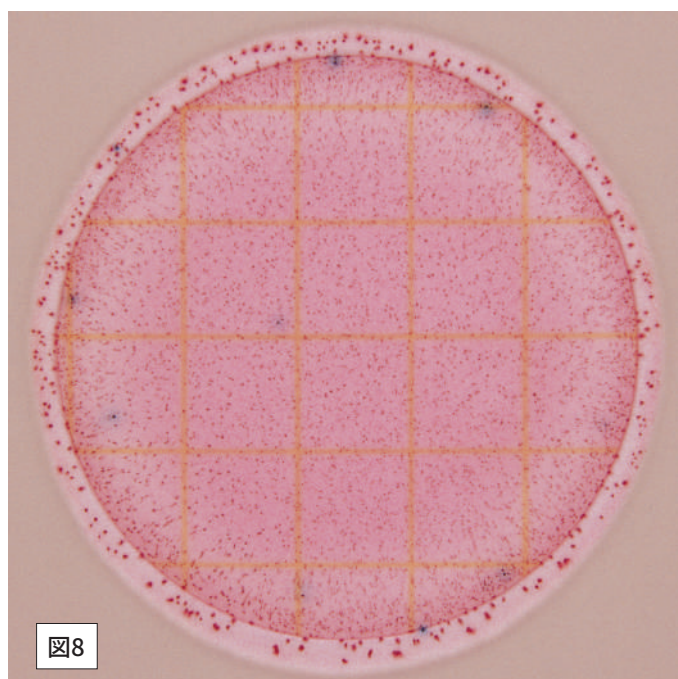
コロニー数 = TNTC (推定コロニー数 = 10^6)

本プレートがTNTC (測定不能多数) となった場合、多くの小型コロニーがある、多くの気泡が見られる、ゲルの色調が赤色から青紫色に変化するというような特徴が1種類以上見られます。



コロニー数 = TNTC (推定コロニー数 = 10^8)

E. coli の菌数が多いと接種部分が青紫色に変わる場合もあります。



E. coli 数の推定菌数 = 約 8 大腸菌群数の推定菌数 = 約 10^8

コロニー数が非常に多い場合 (10^8 を超える)、発生するガスが少なくコロニーの青色がはっきりしない場合もあります。ガスを伴う、伴わないにかかわらず、すべての青色の部分をも *E. coli* の推定菌数として測定します。必要であればガスの伴わない青色のコロニーを釣菌して確認します。



コロニー数 = TNTC (推定コロニー数 = 10^8)

Pseudomonas のような大腸菌群ではない菌が多数本プレート上に生育している場合、ゲルが黄色に変化する場合もあります。

気泡

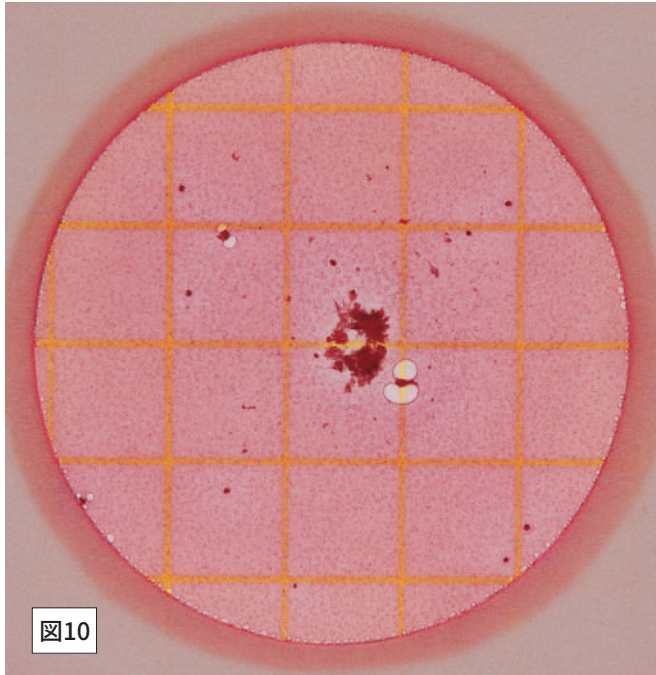


図10

大腸菌群数 = 3

食品残渣は形が不規則で、気泡を伴いません。

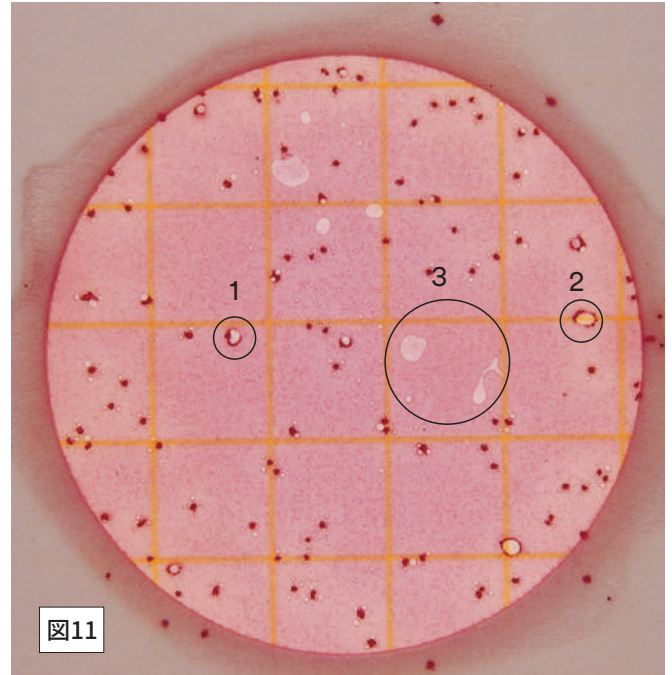


図11

大腸菌群数 = 78

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)

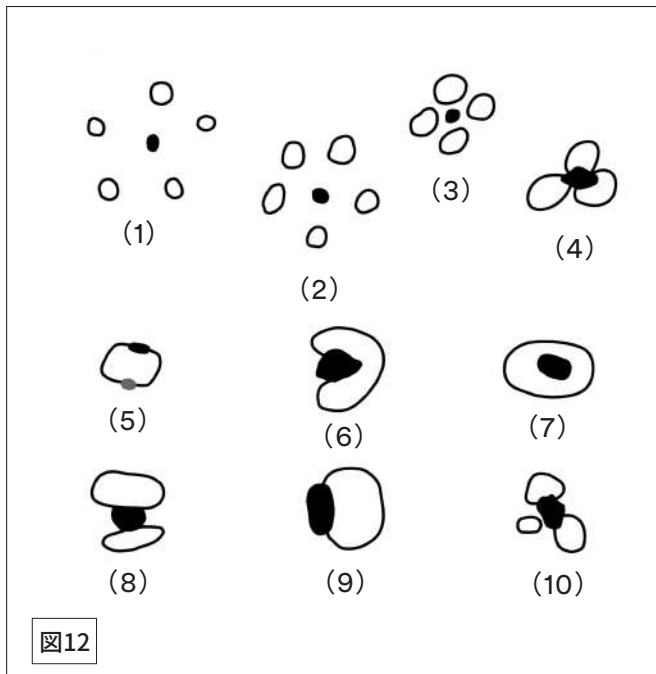
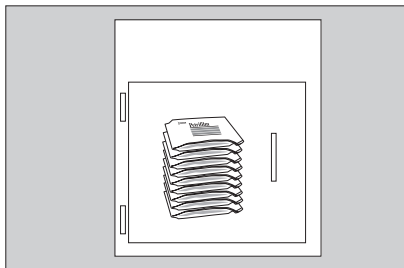


図12

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あるいは*E. coli*として数えます。
 (1)～(3)のように、ガスが放射状に見られる場合には大腸菌群あるいは*E. coli*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があります。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

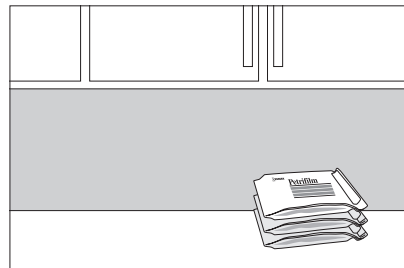
保管



1 未開封のパウチは8°C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戻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。

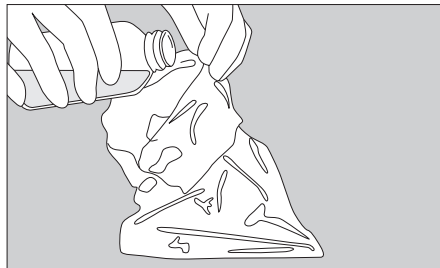


3 開封後に再び密封したパウチは25°C以下、相対湿度50%以下で保管してください。
開封したパウチは冷蔵しないでください。
本プレートは1ヶ月以内にご使用ください。

検体の調製



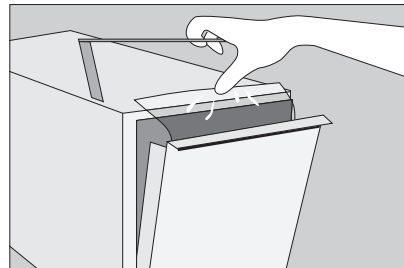
4 検体希釈液を調製します。食品検体を適切な容器、たとえばストマッカーバックや希釈ボトル、またはその他の滅菌済み容器などに秤取またはピペットで採取します。



5 以下に示す滅菌希釈用液のうち1種類を適量加えます。

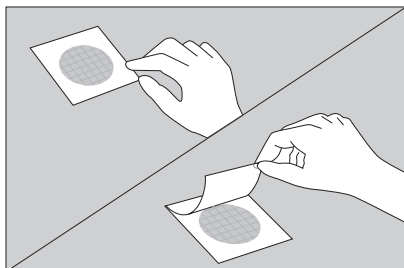
●バターフィールドリン酸緩衝液 (IDFリン酸緩衝液、リン酸二水素カリウムの0.0425g/L溶液をpH7.2に調整) ●0.1% ペプトン水 ●ペプトン加生理食塩水 (ISO6887) ●緩衝ペプトン水 (ISO6579) ●生理食塩水 (0.85-0.90%) ●重硫酸塩無添加リーゼンブロス ●蒸留水

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。

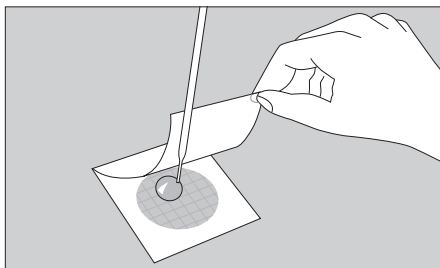


6 検体を攪拌またはホモジナイズします。希釈した検体のpHを6.6から7.2の間に調整します。
●酸性検体には1NのNaOHを使用してください。
●アルカリ性検体には1NのHClを使用してください。

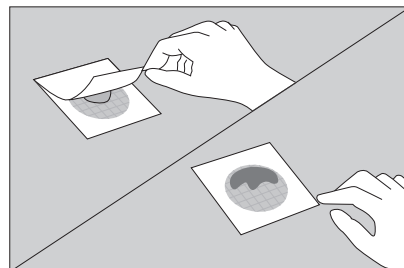
接種



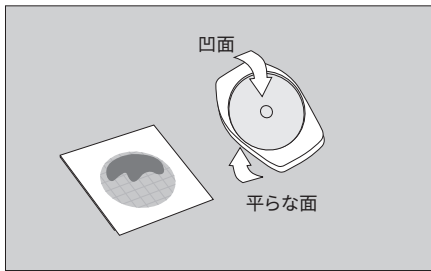
7 本プレートを平らな台に置きます。上部フィルムを持ち上げます。



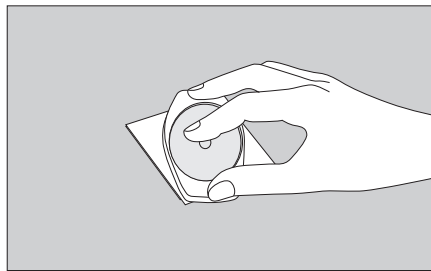
8 本プレートに対し垂直に保って、検体1mLを下部フィルムの中央に接種します。



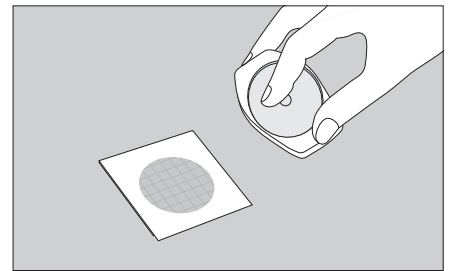
9 気泡が入らないよう注意して上部フィルムを持ったままゆっくりとおろします。



10 スプレッダ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。

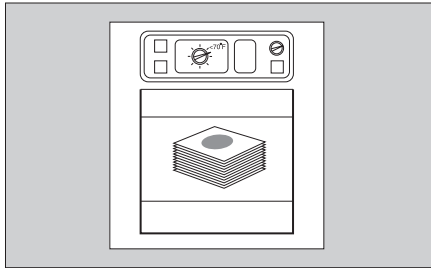


11 ゲル化が始まる前に、スプレッダーを上から軽く押して、接種部分が円形に広がるようにします。スプレッダーはひねったり滑らせたりしないでください。



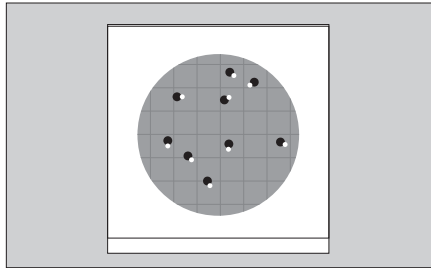
12 スプレッダーを取ります。1分間放置してゲルを固化させます。

培養

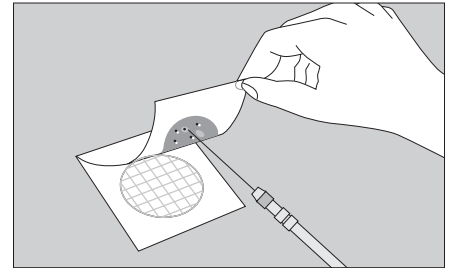


13 上部フィルムを上にして本プレートを重ねて培養します。20枚まで重ねて培養することができます。培養器を加湿して湿度の損失を抑える必要がある場合もあります。

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。もっとも一般的な方法を以下に示します。

AOAC Official Method (OMA)

991.14	大腸菌群の場合	全食品	: 35±1°C、24±2時間
998.08	<i>E.coli</i> の場合	食肉・鶏肉および水産食品	: 35±1°C、24±2時間
991.14	<i>E.coli</i> の場合	その他の食品	: 35±1°C、48±4時間