ペトリフィルム™
大腸菌群数迅速測定用プレート

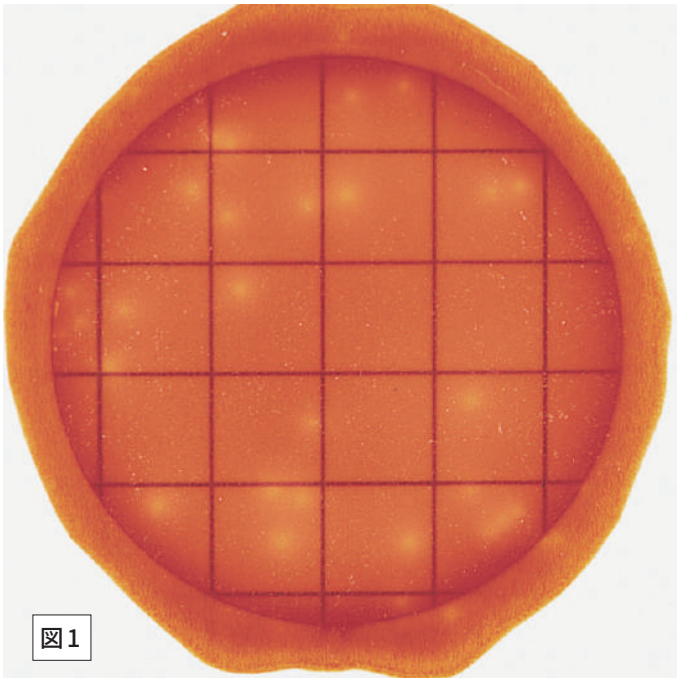
（RCCプレート）

Petrifilm™ Rapid Coliform Count Plate (RCC Plate)

この解説書はペトリフィルム™ 大腸菌群数迅速測定用プレート（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。

AOAC International、FDA BAMでは、大腸菌群をグラム陰性菌で、乳糖を分解して酸とガスを産生する菌としています。大腸菌群は本プレートでコロニーを形成して酸を産生し、本プレートに含まれているpH指示薬により、黄色域を示します。コロニーの周りに気泡があるものは、確定大腸菌群です。

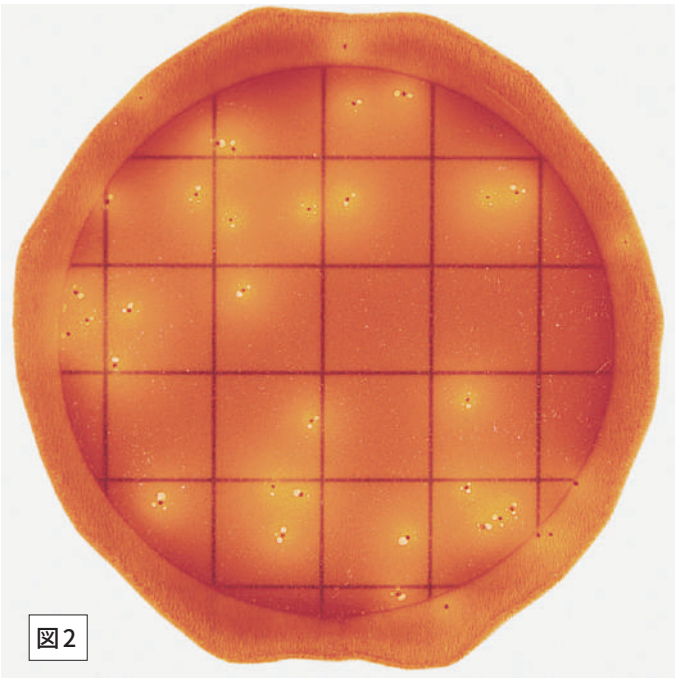
ISOでは、選択培地を用いて生育する菌を大腸菌群としています。大腸菌群数の測定方法として、ISO4832法では、乳糖添加VRB培地（VRBL）を用い、コロニーの大きさ、酸の産生により確認します。本プレート上では、酸の産生により、黄色域を示し、気泡を伴う、あるいは気泡を伴わない赤色コロニーとして見られます。ISO4831法では、大腸菌群はMPN法で測定され、選択培地で乳糖を分解してガスを発生するとしています。本プレート上で大腸菌群は、気泡を伴う赤色コロニーとして見られます。AFNORでは、ISO4831法とISO4832法と比較して、精度を確認しています。



6時間培養 酸産生領域（黄色域）による
大腸菌群測定（6－14時間）

6時間ほどで黄色域が現れます。大腸菌群が増殖すると、黄色域が現れます。

- **AOAC ／ FDA BAM法と比較したときの解釈**
  中心部の赤い点の有無に関わらず、黄色域を数え、推定大腸菌群とします。
- **ISO4832（VRBL）と比較したときの解釈**
  中心部の赤い点の有無に関わらず、黄色域を数え、大腸菌群とします。
  AFNORでは、14時間培養後、最終判定とします。



14時間培養 大腸菌群コロニー測定（8－24時間）

8時間以上培養すると、気泡を伴う赤色コロニー、気泡を伴わない赤色コロニーが見られます。

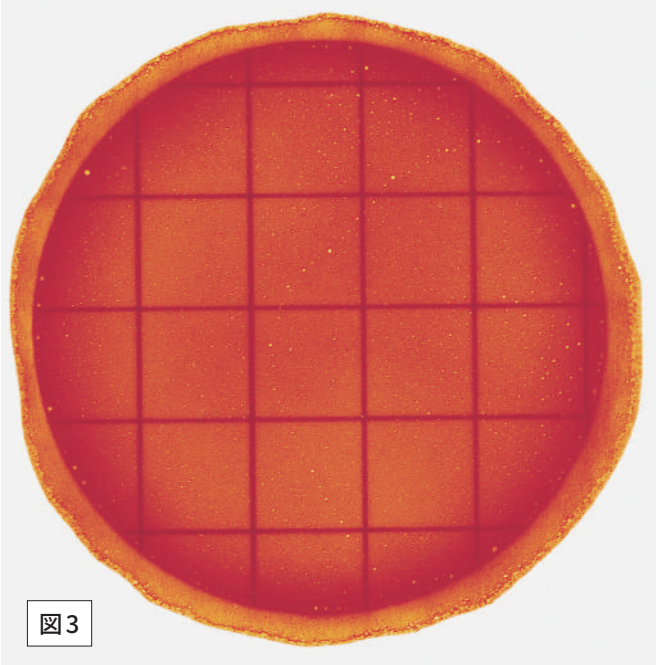
- **AOAC ／ FDA BAM法と比較したときの解釈**
  気泡を伴う赤色コロニーを測定し、確定大腸菌とします。
- **ISO4831（MPN）と比較したときの解釈**
  気泡を伴う赤色コロニーを測定し、大腸菌群とします。
  豚加工品以外はAFNOR精度管理では、最終結果は24±2時間培養します。
- **ISO4832（VRBL）と比較したときの解釈**
  気泡の有無にかかわらず赤色コロニーを測定し、大腸菌群とします。
  AFNORでは、24±2時間培養後、最終測定します。

適正測定範囲：～150コロニー（コロニー総数）
～50コロニー（黄色域）

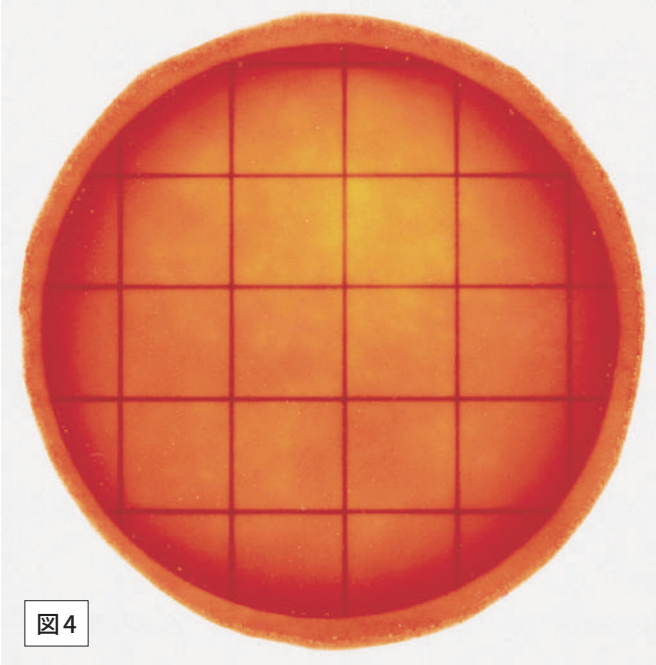
酸産生領域（黄色域）（6－14時間）

図3から図10までのゲルの変化に注目してください。大腸菌群が酸を産生するために、ゲルの色が、赤橙色から橙黄色に変化します。
菌数の多い大腸菌群（10^3個以上/プレート）では4時間の培養で全体的に黄変します。（図4参照）この場合には、更に希釈してください。
大腸菌群の中には、大量の酸を産生するものもあります。この様な場合、コロニー数が本プレート当り20を超えなくても、黄色域の融合が起きる事があります。また目立たない黄色域50ヶ所以上を含む本プレートで推測することもできます。

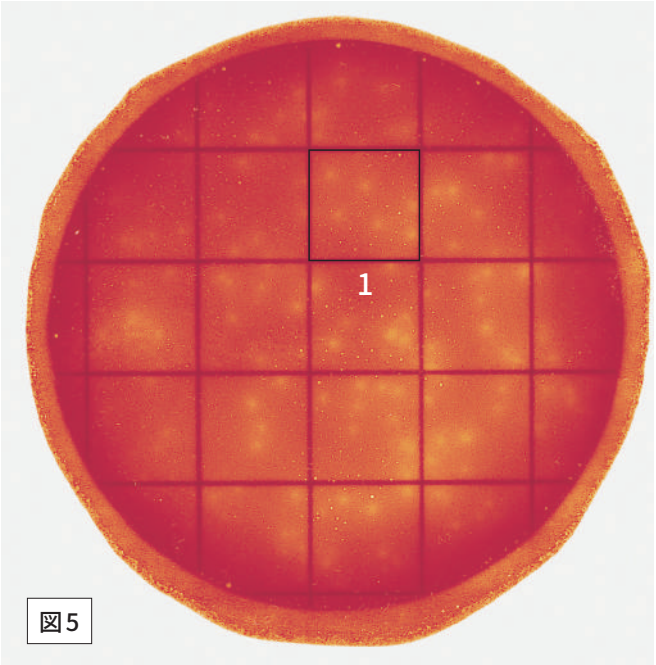
本プレート上の接種エリアの面積は20cm²です。1つの格子（1cm²）以上の中の黄色域の平均数を求め、20倍することにより本プレート1枚あたりの推定菌数を求めることができます。図5で囲った□1の中には、6つの推定大腸菌群（黄色域）が認められます。
大腸菌群が生育するに従って、赤色コロニーが黄色域の中に現れ始めます。（図6参照）



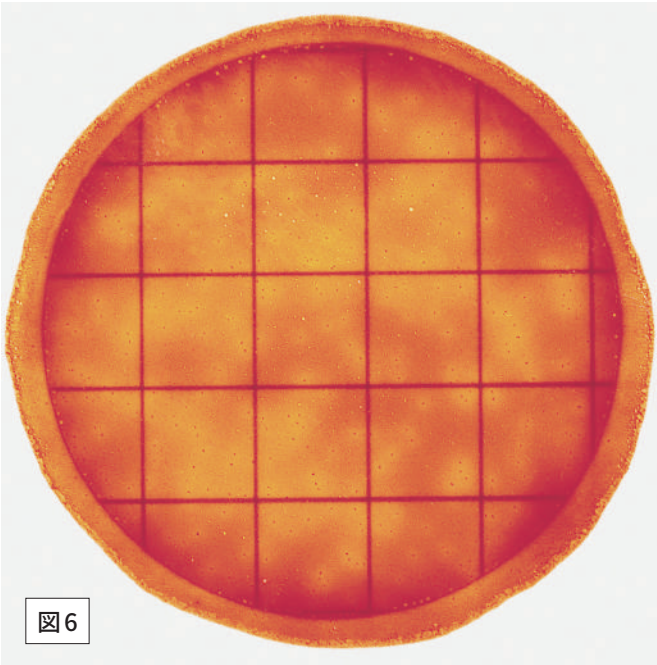
大腸菌群数 = 0



推定大腸菌群数 = 測定不能多数（10^5以上）



推定大腸菌群数 = 120



推定大腸菌群数 = 280

コロニーと気泡の測定（8－24時間）

図7および図8はそれぞれ異なる細菌をそれぞれの濃度で接種し、同じ時間培養した本プレートの例です。この時点で黄色域を伴う明瞭な赤色コロニーが両プレートに現れています。図8の細菌は図7の細菌と比較してより旺盛に乳糖を発酵し、ガスを産生することができると考えられます。基準に従って、気泡を伴うコロニーあるいは伴わないコロニーを測定してください。（図7の○1・2を参照）図9は、気泡を伴うまたは気泡の伴わないコロニーが同じプレートに生育している場合の測定の例を示しています。測定は、次の規定にしたがって行ってください。

- AOAC/FDA BAM法による気泡を伴う赤色コロニー（確定大腸菌群数）= 72
- ISO4831法による気泡を伴う赤色コロニー（大腸菌群数）= 72
- ISO4832法による気泡の有無にかかわらない赤色コロニー（大腸菌群数）= 128

本プレートあたりのコロニー数が150を超える場合には推定菌数を測定することができます。フォームダム上にあるコロニーは培地の選択成分の影響を受けていないので測定しないでください。（図7－図10参照）

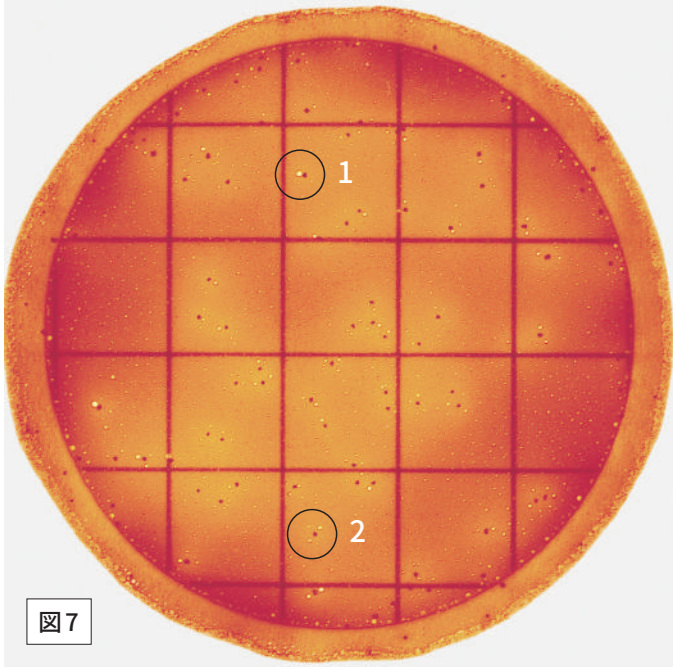


図7

大腸菌群数 = 64

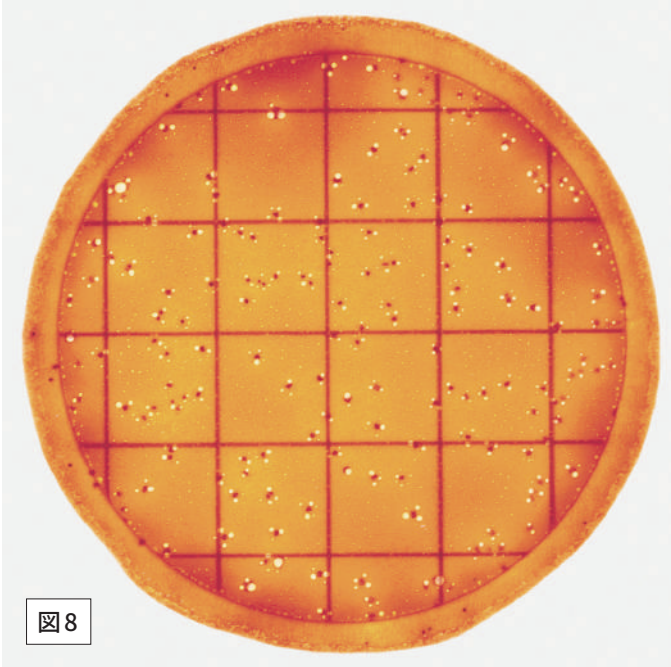


図8

大腸菌群数 = 164

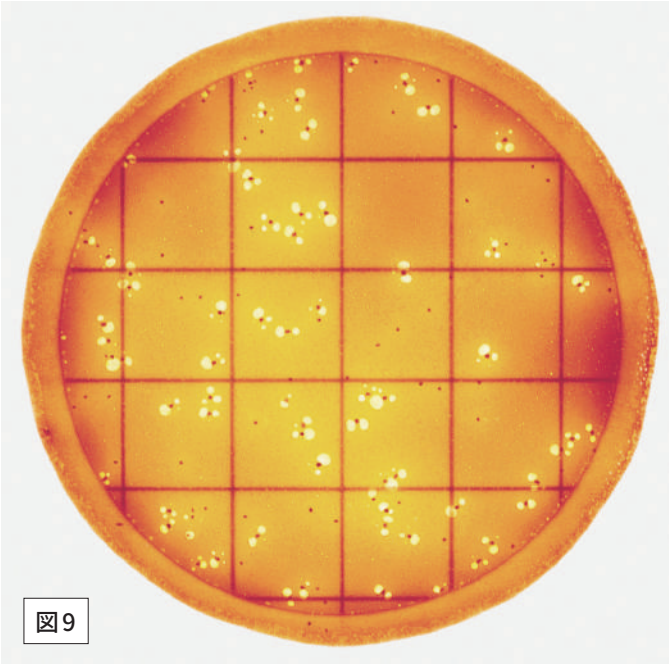


図9

大腸菌群測定解釈参照

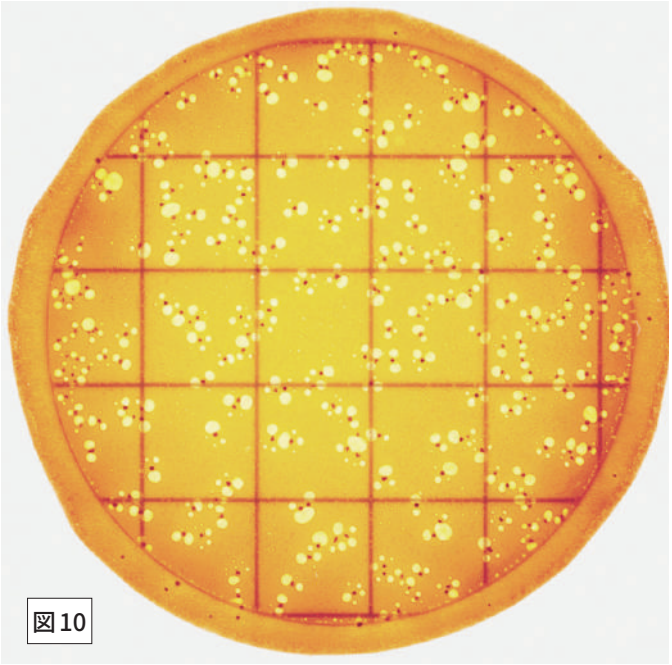


図10

推定大腸菌群数 = 240

TNTC（Too Numerous to Count：測定不能多数）

より正確に測定するには、検体をさらに希釈する必要があります。

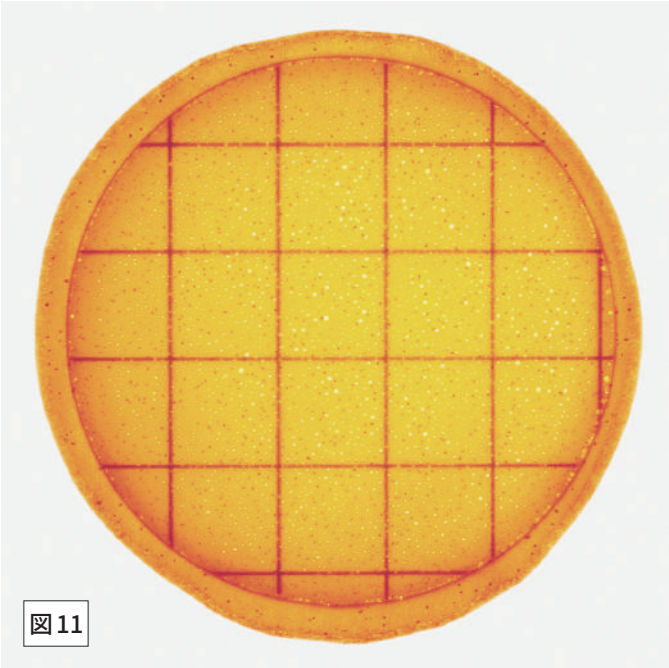


図11

大腸菌群数 = TNTC（実数＞10^4）

測定不能なほど多数（TNTC）のコロニーが現れた本プレートは以下のうち1つ以上の特徴があります。

1）赤褐色から黄褐色へゲルの色の変化
2）多数の小型コロニー
3）多数の気泡

（図11参照）

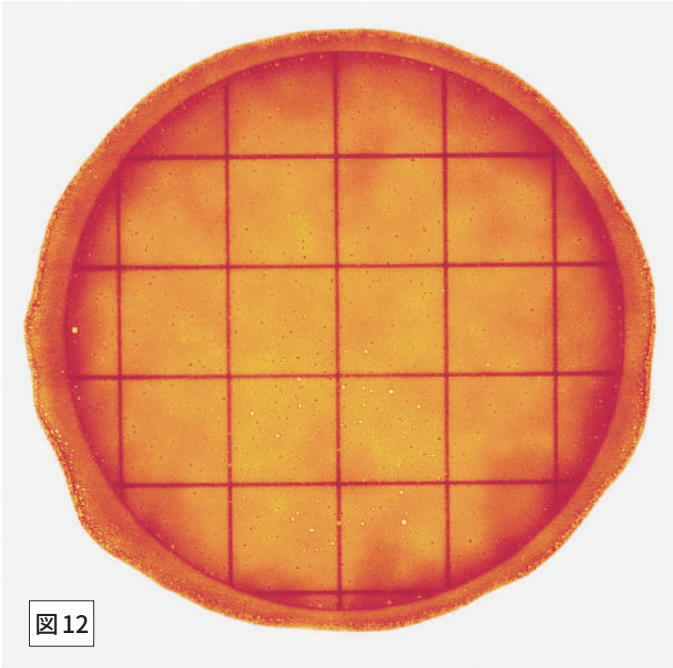


図12

大腸菌群数 = TNTC（実数＞10^3）

本プレートにはTNTCであることを示す2つの特徴があります。

1）ゲルの色調変化
2）多数の小型コロニー

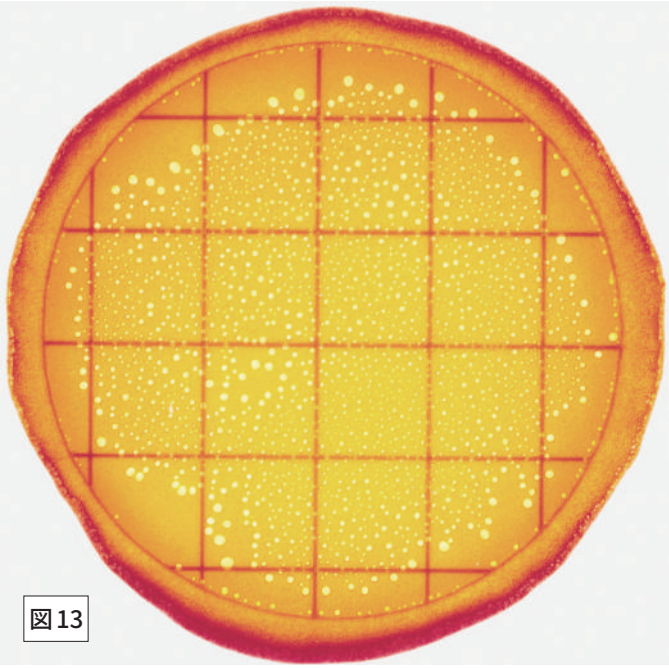


図13

大腸菌群数 = TNTC（実数＞10^4）

コロニーが見えないほど数が多くなっており、目視ではコロニーの測定が困難です。ゲルの色調が黄色に変化している、また多くの気泡が存在することからTNTCと判定します。

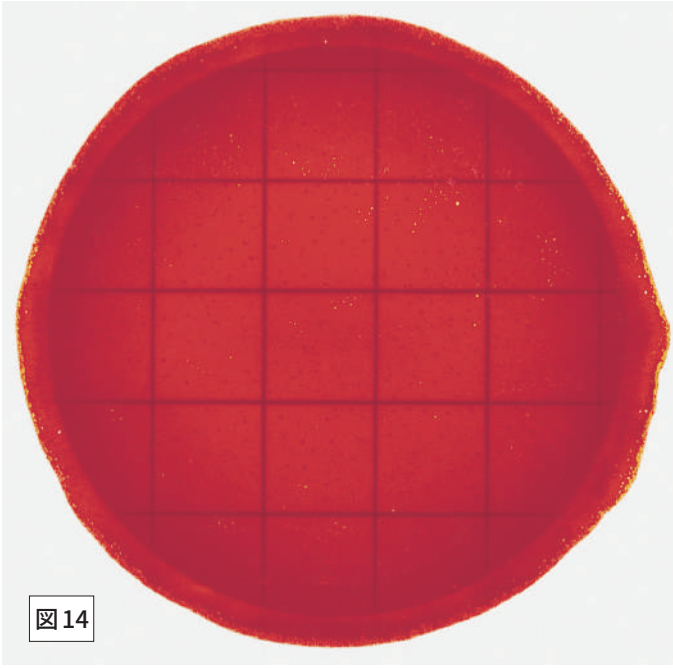


図14

大腸菌群数 = 0

グラム陰性菌の非大腸菌群のコロニーが多数生育した本プレートを示しています。乳糖を発酵しない細菌が多数現れた場合にはゲルの色調が暗赤色になります。

pH

殆どの細菌の生育至適pHは、pH7.0付近で至適成長します。pHの低い検体を希釈してプレートに接種する場合には、pH6.5-7.5に調整してください。

図15および図16はpH調整後に接種したフレッシュヨーグルトの例です。培地中の阻害剤によりグラム陽性菌であるヨーグルトのスターターカルチャーは生育が阻害されますがスターターカルチャーにより産生された酸によりゲルのバックグランドの色調が赤橙色から橙黄色へと変化し、TNTCの結果の早期の状態に似ることがあります。培養中に更にTNTCの大腸菌群類の生育の兆候が現れるかどうかフレッシュヨーグルトを含む本プレートを経過観察します。

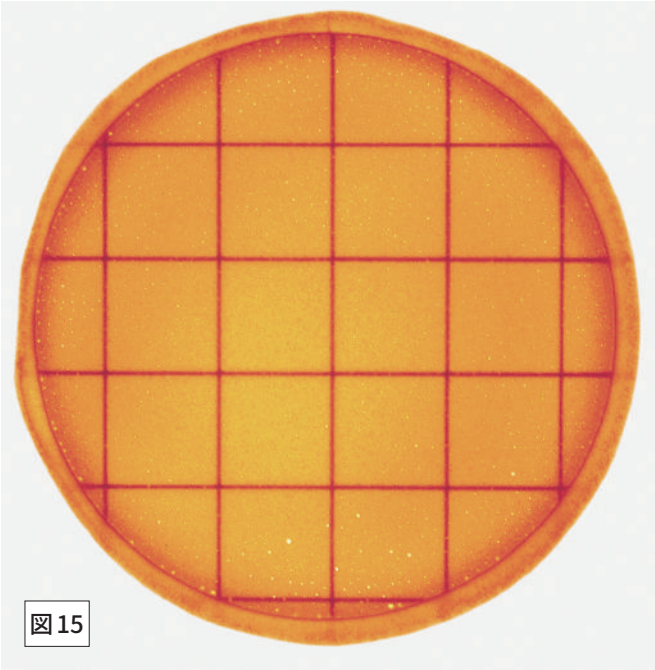


図15

大腸菌群数 = 0

上の陰性本プレートと前のページのTNTCの本プレートを比較してください。TNTCの結果を示すコロニーや気泡が存在しないことに注目してください。

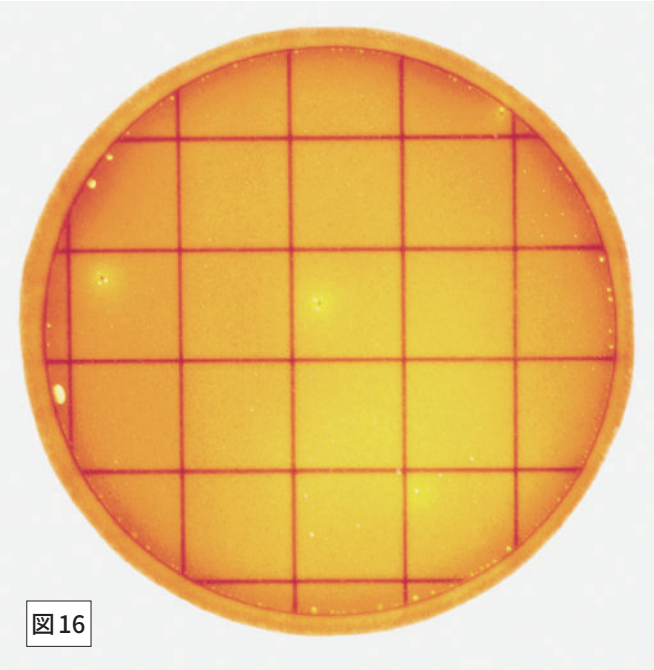


図16

大腸菌群数 = 4

ゲルの色調変化にもかかわらず、大腸菌群が発生した酸は容易に確認することができます。

食品残渣

食品残渣は不規則な形をしており、気泡を伴いません。

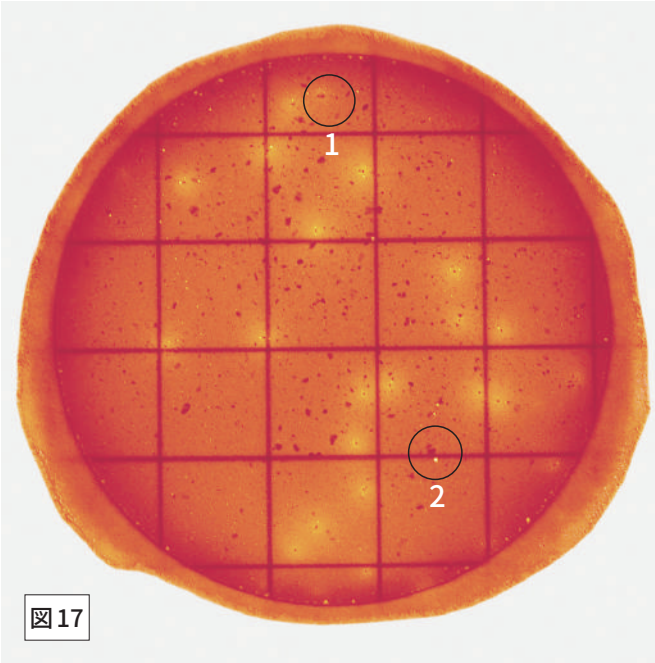


図17

大腸菌群数 = 11

パプリカの希釈液を接種した本プレートの早期読み取り例です。◯1は赤色の食品残渣周囲の酸性領域を示しています。食品の中にはpH指示薬と反応する酸性の細片を含むものがあります。◯2は赤色残渣の近くの気泡を示していますが、黄色域がありません。両方ともコロニーとして数えないでください。

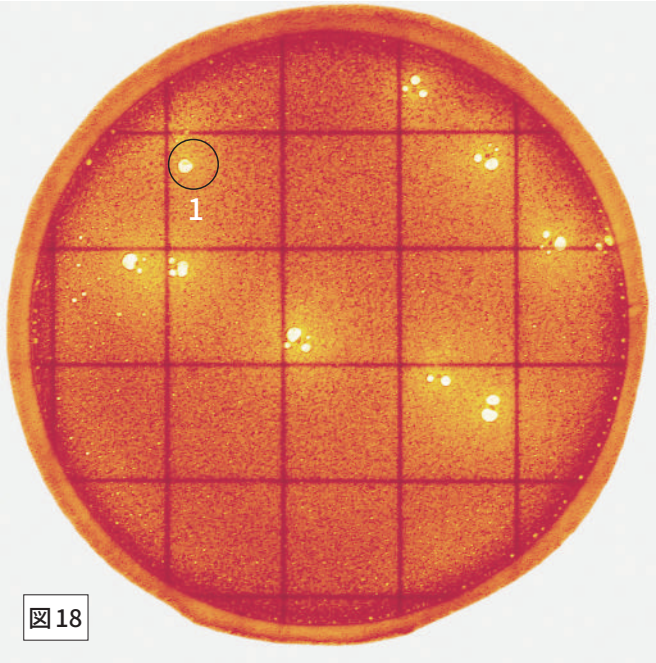


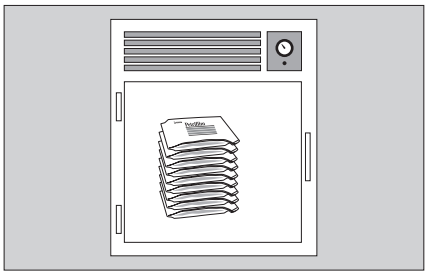
図18

大腸菌群数 = 10

チョコレートを希釈した場合を示しています。◯1で示したように気泡がコロニーに割り込み、コロニーが気泡の縁取りをするようになることがあります。気泡周囲の酸の産生による黄色域により、大腸菌群のコロニーであることが分かります。

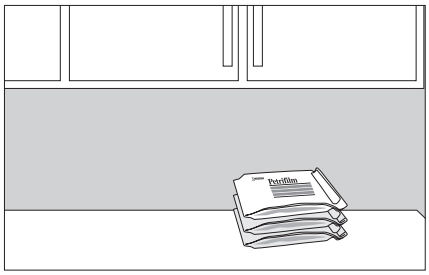
使用上の注意事項

保管



1 開封前は、冷蔵庫（8℃以下）で保管してください。有効期限内に使用してください。

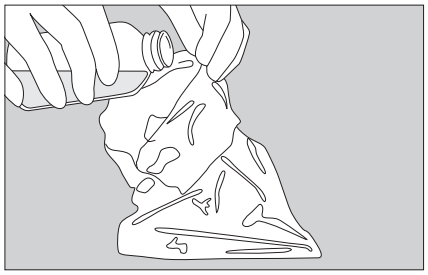
2 開封後は、開口部を折り、粘着テープでシールしてください。



3 開封後は室温（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。開封後は1ヶ月以内に使用してください。

使用手順

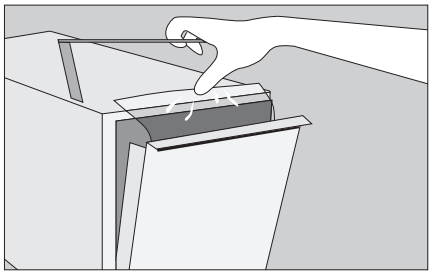
4 高脂肪、低脂肪乳は直接接種できます。その他の食品、乳製品については、少なくとも10倍希釈してください。ストマッカーバッグ、希釈瓶などに秤量または採取します。



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●ペプトン塩希釈液（ISO法6887）●緩衝ペプトン水（ISO法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

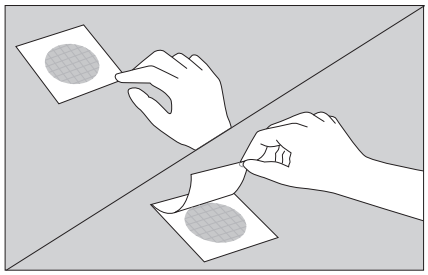
クエン酸、重亜硫酸塩、チオ硫酸塩を含む緩衝液は使用しないでください。菌の生育を阻害することがあります。



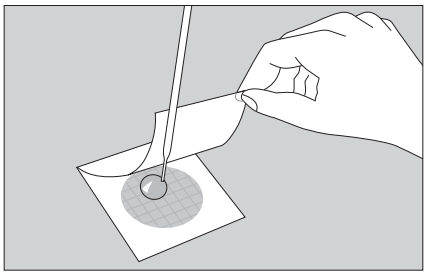
6 検体を攪拌またはホモジナイズします。希釈した検体のpHを6.5から7.5の間に調整します。

- 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。

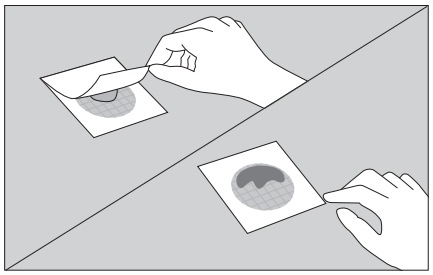
接種



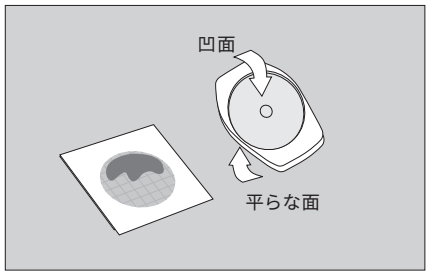
7 平らな台の上に本プレートを置きます。上部フィルムを持ち上げます。



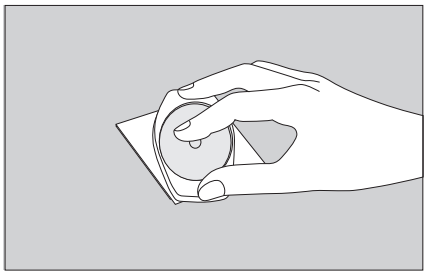
8 本プレートに対して垂直にピペットを持ち、下部フィルムの中心に1mLの試料液を接種します。



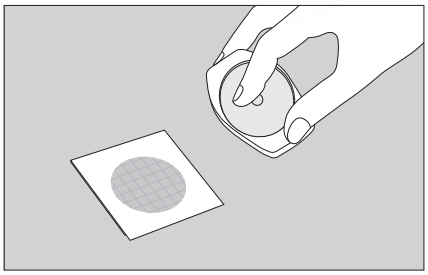
9 気泡が入らないように上部フィルムを持ったままゆっくり下ろします。



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

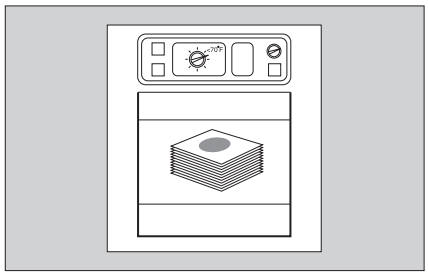


11 ゲル化が始まる前にスプレッダーを上から軽く押し、試料を均一に広げます。スプレッダーをひねったり、滑らせたりしないでください。



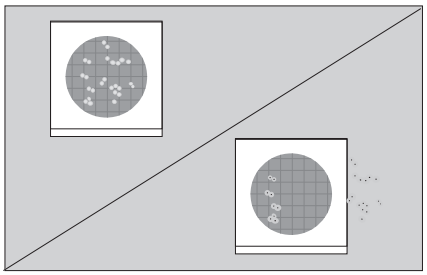
12 スプレッダーを取り、1分間放置してゲルを固化させます。

培養

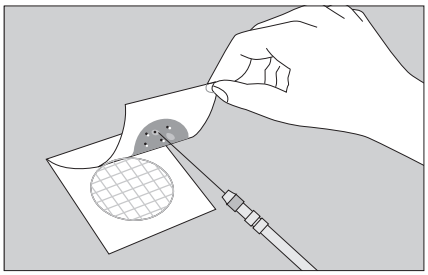


13 上部フィルムを上にして水平に置き、35°C±1°Cで6〜24±2時間培養します。20枚まで重ねて培養できます。

読み取り



14 本プレートの測定については、下から直接光を当てずに測定してください。本プレートは、コロニーカウンターまたは拡大鏡にて測定することができます。結果の確認は解説書を参照してください。



15 コロニーは釣菌することが出来ます。上部フィルムを持ち上げ、コロニーをゲルから釣菌します。

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）

2000.15　全食品：35±1°C、24±2時間

AFNOR Validated Methods

3M 01/5-03/97A	豚肉加工製品および魚介類	：30±1°C、14時間 ±30分	VRBL30°Cとの比較
	その他の食品	：35±1°C、14時間 ±30分	
3M 01/5-03/97B	豚肉加工製品および魚介類	：30±1°C、24±2時間	VRBL30°Cとの比較
	その他の食品	：35±1°C、24±2時間	
3M 01/5-03/97C	魚介類	：30±1°C、24±2時間	MPN法との比較
	その他の食品	：35±1°C、24±2時間	

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、食品マトリクス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。

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-037-B(1124)

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