

E. coli/大腸菌群数計測用シート培地MC-Media Pad ECの評価

○寺村 哉、小椋 彩、藤原 翠、曾田 浩二郎、岩崎 美穂子(JNC株式会社 横浜研究所)

背景

- 食品の衛生管理や品質管理において、手軽にE.coli/大腸菌群数を計測できるシート状培地として「サニ太くんE.coli/大腸菌群用」が開発されている。
- 「サニ太くんE.coli/大腸菌群用」では一部の腸菌群が明瞭な集落を形成しにくい、チーズ等の酵素を含む食品では培地面が着色し計測出来なくなることがあった。
- 酵素による培地着色を低減できるように全面的に改良し、「MC-Media Pad EC」として開発を行った。
- MC-Media Pad EC(MCEC)について、純培養菌株および市販食品検体ならびに人工的にE.coliで汚染させた食品検体を用いた評価を行った

MC-Media Pad EC

- 発色酵素基質と特徴的な形状の乾燥シート培地「サニ太くん」の構造を見直し、食品中の酵素の影響による培地着色を低減(Figure 1)。大腸菌群は青緑～青色、E.coliは赤紫色～藍色の集落を形成する(Figure 2)。

評価方法

●標準菌株を用いた評価

供試菌株—大腸菌群30株、大腸菌群以外のグラム陰性細菌12株、グラム陽性細菌33株、酵母2株、計77株を使用した。各供試菌株はヒツジ血液寒天培地(BD)で35°C、24時間培養後、マクファーランド#1(3×10⁸ cfu/mL)相当になるように滅菌リン酸緩衝液(PBS)へ懸濁し供試菌液とした。

供試菌株はPBSで10倍段階希釈し、菌希釈液の1mLをMCECに供試した。

対照にはペトリフィルムEC(PEC; 3M)、デソキシコレート寒天培地(Deso; Difco)、VRBA寒天培地(VRBA; Difco)、クロモカルトコリフォーム寒天培地(CCA; Merck)および標準寒天培地(Difco)を使用した。

35°C、24時間培養後、各培地上での発育および集落性状の観察を行った。

●市販食品検体を用いた評価

市販食品検体—横浜市内で購入した市販食品100検体(精肉類40検体、生鮮魚介類30検体、生野菜・果実類30検体)を使用した。各検体は9倍量の滅菌PBSを加え、90秒間ストマッキング処理を行い試料原液とし、試料原液は滅菌PBSで10倍段階希釈を繰り返し、各検体希釈液の1mLを各2枚のMCEC、PEC、Deso、VRBA、CCAに供試した。

35°C、48時間培養後、各培地上での集落数を計測した。同時にAOAC 966.24法に従ったMPN3本法による菌数計測も実施した。

各方法において得られた菌数をそれぞれ対数に変換し、MCEC菌数の対数値をy軸に、対照法での菌数の対数値をx軸にそれぞれプロット後、相関係数を算出し、また一元配置分散分析(ANOVA)により有意差の有無を確認した。

MCECの評価結果

●標準菌株を用いた評価では、MCECは大腸菌群、E.coliを含めた全ての供試菌株について

対照法と同等以上の発育・発色・選択性を認めた。(Table 1)

●市販食品検体を用いた大腸菌群数計測の評価では、

MCECと各参照法間での直線回帰式は、いずれもいずれも傾きが1に近く、切片が0に近いことを認め、

MEECとPEC、Deso、VRBA、CCA、MPN間での相関係数は、それぞれ0.996、0.992、0.989、0.994、0.953であり、高い相関を認めた。

また、ANOVAによる有意差検定においてMCECと各参照法間で有意差は認めなかった。(Table 2)

●市販食品検体を用いたE.coli数計測の評価では、

MCECと各参照法間での直線回帰式は、いずれもいずれも傾きが1に近く、切片が0に近いことを認め、

MEECとPEC、CCA、MPN間での相関係数は、それぞれ0.974、0.978、0.954であり、高い相関を認めた。

また、ANOVAによる有意差検定においてMCECと各参照法間で有意差は認めなかった。(Table 3)

まとめ

MC-Media Pad ECは従来法と高い相関を有するシート状培地であることを認めた。

また、食品中の酵素による培地着色を低減し明瞭な発色集落によりE.coliおよび大腸菌群数の計測が可能であることから、より広範囲な食品に対応可能であると考えられ、自主衛生検査等においてより有用な手段の一つとなると考えられた。

Table 1. Growth of microbes on various media

Strains tested (No. of strain)	colony appearance / mean of grown number											
	MCEC	PEC	Deso	VRBA	CCA	SPC	MCEC	PEC	Deso	VRBA	CCA	SPC
Coliforms												
<i>Cedecea</i> (1)	blue	8.64	red	8.74	red	8.60	violet	8.71	mauve	8.62	8.70	
<i>Citrobacter</i> (3)	blue	9.03	red	8.96	red	8.86	violet	8.45	mauve	8.40	8.99	
<i>Cronobacter</i> (2)	blue	8.94	red/gas	8.88	red	8.85	violet	8.72	mauve	9.05	8.99	
<i>Enterobacter</i> (4)	blue	8.99	red/gas	8.88	red	8.61	violet	8.67	mauve	8.82	8.85	
<i>Escherichia coli</i> (4)	purple/navy	8.95	blue/gas	8.88	red	8.42	violet	8.73	blue	8.95	8.93	
<i>Escherichia coli</i> O157 (2)	blue	9.09	red/gas	9.00	red	9.02	violet	8.79	mauve	9.04	8.91	
<i>Escherichia</i> excluding <i>E. coli</i> (3)	blue	9.10	red	8.95	red	9.04	violet	8.93	mauve	8.88	9.01	
<i>Hafnia alvei</i> (1)	blue	8.79	red/gas	8.60	red	8.56	violet	8.54	mauve	7.96	8.66	
<i>Klebsiella</i> (2)	blue	9.04	red/gas	9.03	red	8.94	violet	8.89	mauve	9.02	9.04	
<i>Kluyvera</i> (2)	blue	9.06	red/gas	8.86	red	8.96	violet	8.81	mauve	8.89	8.73	
<i>Leclercia</i> (1)	blue	9.05	red/gas	8.94	red	8.95	violet	8.86	mauve	9.02	8.98	
<i>Rahnella</i> (1)	blue	9.01	red	8.86	red	8.81	violet	8.53	mauve	8.88	8.76	
<i>Raoultella</i> (2)	blue	8.97	red	8.88	red	8.72	violet	8.95	mauve	9.07	8.88	
<i>Serratia</i> (2)	blue	9.19	red	9.16	red	9.19	violet	9.18	mauve	9.24	9.10	
non-coliform gram-negative bacteria												
<i>Aeromonas</i> (1)	white	6.30	red	8.58	red	8.72	violet	6.60	mauve	7.41	8.11	
<i>Edwardsiella</i> (1)	not grown		red	7.74	colorless	9.16	colorless	7.88	colorless	9.06	9.02	
<i>Morganella</i> (1)	white	8.72	red	9.34	colorless	9.37	colorless	9.33	colorless	9.38	9.38	
<i>Proteus</i> (2)	white	8.02	red	8.90	colorless	9.09	colorless	8.94	brown	9.10	9.00	
<i>Providencia</i> (1)	white	8.57	red	9.04	colorless	9.15	colorless	8.69	colorless	8.99	8.30	
<i>Pseudomonas</i> (4)	white	6.60	red*	8.73	colorless	8.60	colorless	8.66	colorless	8.05	8.61	
<i>Salmonella</i> (2)	white	8.68	red	9.09	colorless	8.87	colorless	8.86	colorless	8.50	9.05	
Gram-positive bacteria												
<i>Bacillus</i> (3)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.26	
<i>Corynebacterium</i> (1)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.93	
<i>Enterococcus</i> (3)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.38	
<i>Lactobacillus</i> (2)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.52	
<i>Leuconostoc</i> (2)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		7.62	
<i>Listeria</i> (2)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.82	
<i>Micrococcus</i> (1)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.24	
<i>Staphylococcus</i> (18)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		8.53	
<i>Streptococcus</i> (1)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		7.59	
Yeast												
<i>Candida</i> (2)	not grown		not grown		not grown		not grown		not grown		7.48	

Table 2. Statistical relationship between MCEC and reference media for enumerating coliform

Comparison	n	Linear regression line	Correlation coefficient (r)	p value (ANOVA)
MCEC vs. PEC	100	y = 1.01x + 0.01	0.996	0.83
MCEC vs. VRBA	100	y = 1.03x - 0.01	0.992	0.64
MCEC vs. Deso	100	y = 1.00x + 0.17	0.989	0.38
MCEC vs. CCA	100	y = 1.03x - 0.12	0.994	0.95
MCEC vs. MPN	100	y = 1.00x + 0.42	0.953	0.05

Table 3. Statistical relationship between MCEC and reference media for enumerating E.coli

Comparison	n	Linear regression line	Correlation coefficient (r)	p value (ANOVA)
MCEC vs. PEC	100	y = 0.96x + 0.21	0.974	0.39
MCEC vs. CCA	100	y = 0.95x + 0.13	0.978	0.96
MCEC vs. MPN	100	y = 0.94x + 0.19	0.954	0.91

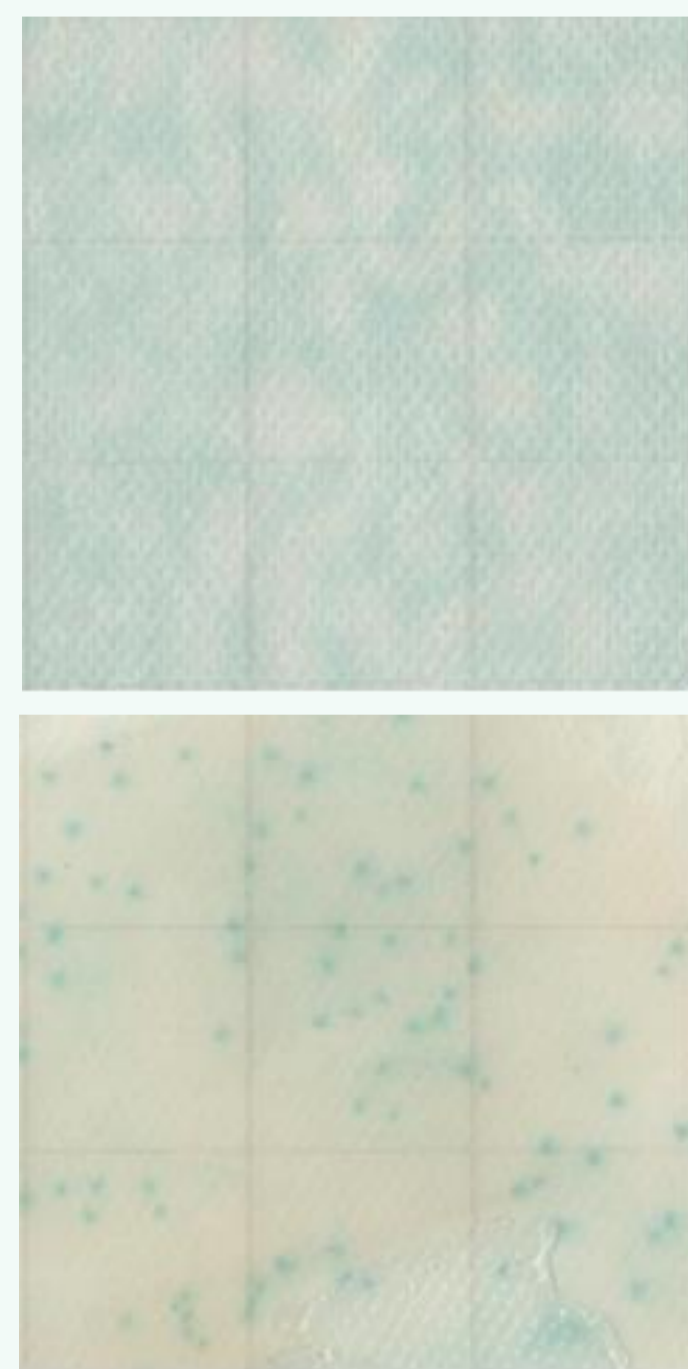


Figure 1 大腸菌群を接種したチェダーチーズでの培養例
上段; 旧「サニ太くん」E.coli/大腸菌群用
下段; 新「MC-Media Pad EC」

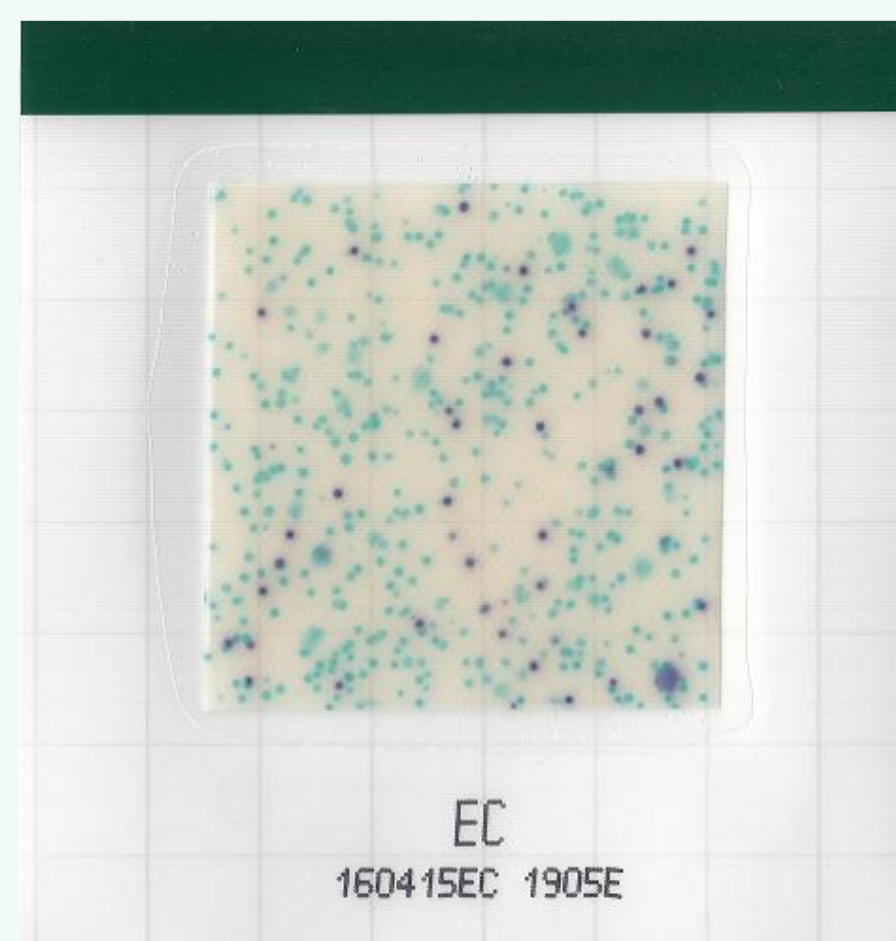


Figure 2 MC-Media Pad EC培養例
Enterobacter aerogenes と E.coli の混合培養