

手動カウント vs. ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストによる全自動化

概要

プレート上のコロニー数を肉眼で数えるのは非常に時間がかかるため、微生物検査室ではプレートカウンターによる自動コロニーカウントが重要視されています。ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストは11種類のペトリフィルム™ 培地だけでなく、黄色ブドウ球菌測定用ディスクにも対応しており、微生物検査室における作業効率化を図ることができます。

ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストによる自動コロニーカウントと目視によるコロニーカウントの精度の比較検討試験を実施しました。評価対象のペトリフィルム™ 培地は、以下のとおりです。

- ペトリフィルム™ 生菌数測定用プレート (ACプレート)
- ペトリフィルム™ 生菌数迅速測定用プレート (RACプレート)
- ペトリフィルム™ 大腸菌群数測定用プレート (CCプレート)
- 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)
- 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)
- ペトリフィルム™ 大腸菌選択用プレート (SECプレート)
- ペトリフィルム™ 腸内細菌科菌群数測定用プレート (EBプレート)
- ペトリフィルム™ カビ・酵母迅速測定用プレート (RYMプレート)
- ペトリフィルム™ 黄色ブドウ球菌測定用プレート (STXプレート)
- ペトリフィルム™ 黄色ブドウ球菌測定用ディスク (STXディスク)

手法 - 希釈試験

供試菌株は購入した標準菌株および凍結保存菌株を使用しました。各菌株は非選択液体培地にて18-24時間純培養し、これを取扱説明書に記載されている希釈水にて適宜希釈し、試験に供しました。ペトリフィルム™ 培地の適正測定範囲において低・中・高の水準で測定できるよう表1に記載されている菌株を調製しました。（例：適正測定範囲が0～300のペトリフィルム™ 培地の場合、0～75（低）、75～175（中）、175～300（高））。表1に示したように、各種対応する菌液を各ペトリフィルム™ 培地に1 mL接種し、取扱説明書に従い培養しました。培養後、ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストで測定しました。続いて試験員による目視での検査によって得られた結果と比較しました。

表1. 各ペトリフィルム™ 培地に使用した菌種

菌種	ペトリフィルム™ 培地
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC9642	RYM

<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	STX, STX-D, RAC
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	AC, RAC
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	RYM
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	RYM
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 13803	REC, SEC
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 16022	RYM
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	EC/CC, REC, CC, EB, RAC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	REC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506	EB, RYM
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 51816	EC/CC, REC, CC, EB
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 51818	EC/CC, REC, CC, EB
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	EC/CC, SEC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EC/CC, CC, SEC, STX, STX-D, EB, AC, RAC, RYM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 51813	EC/CC, CC, SEC, AC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	REC, CC, SEC, EB, AC, RAC
<i>Escherichia coli</i> Neogen-FR8	SEC
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13216	REC, SEC
<i>Escherichia coli</i> REC1	REC, SEC
<i>Flavobacterium species</i> ATCC 51823	AC
<i>Geotrichum candidum</i> ATCC 34614	RYM
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 51815	EC/CC, CC
<i>Hansenula anomala</i> Y28	RYM
<i>Korcuria varians</i> ATCC 51820	AC
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 51817	EC/CC, REC, CC
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> 19257	AC, RAC
<i>Microbacterium testaceum</i> ATCC 15829	AC
<i>Micrococcus species</i> ATCC 51819	AC
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10106	RYM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	EC/CC, CC, RAC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35554	EB
<i>Pseudomonas species</i> ATCC 51821	AC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 12469	RAC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	RYM
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 51812	EC/CC, REC, CC, EB
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	EB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	STC, STX-D, AC, RAC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 49476	STC, STX-D
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	STC, STX-D, AC, RAC
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	STC, STX-D

<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	STC, STX-D
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27965	AC

手法 – 食品スパイク試験

全ての食品は事前にスクリーニング試験を実施しました。低・中・高それぞれの測定域を網羅する自然汚染が認められた場合には標準菌を添加せず、自然汚染が網羅していない食品にのみ菌株を添加しました。添加菌株は購入した標準菌株、および凍結保存菌株を使用しました。各菌株は非選択液体培地にて18-24時間順培養し、これを適宜希釈し試験に供しました。表2に示す食品を10倍、100倍、1000倍希釈し、各ペトリフィルム™ 培地の適正測定範囲において低・中・高の水準で測定できるように、表3に記載されている菌株を添加しました。表2、3に基づき、各種対応する菌液をプレートに1 mL接種し、取扱説明書に従い培養しました。培養後、ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストで測定しました。続いて試験員による目視での検査によって得られた結果と比較しました。

表2. ペトリフィルム™ 培地で試験を実施した食品

マトリックス	ペトリフィルム™ 培地
Raw Ground Beef	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
Raw milk	EC/CC, REC, CC, SEC, STX, STX-D, AC, RAC
Coconut	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
Raw chicken	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
Ice Cream	EC/CC, REC, CC, SEC
Red Pepper Hummus	EC/CC, REC, CC, SEC
Alfalfa Sprouts	EC/CC, REC, CC
Offal	SEC
Raw Sausage	STX, STX-D
Liquid Egg	STX, STX-D
Chocolate Cake with Cream Filling	STX, STX-D, EB
Potato Salada	STX, STX-D
Frozen Vegetable Dumplings	STX, STX-D
Chicken Nuggets	EB
Chocolate Milk	EB
Frozen Supreme Pizza	EB
Heavy Cream	AC, RAC
Yellow Din Tuna	AC, RAC
Whey Powder	AC, RAC
Pasteurized Cheese	AC, RAC
Frozen Spaghetti Meal	AC, RAC
Frozen Spinach	AC, RAC
Processed Ham Spread	AC, RAC

Ground Turkey	RAC
Tomato Wash	RAC
Chocolate Sandwich Cookie	RAC
Yogurt	RYM
Ranch Dressing	RYM
Pepperoni	RYM
Kombucha	RYM
Blue Cheese	RYM
Muffins	RYM
Q Labs Sample	RYM
Fresh Cut Fluit Mix	RYM

表3. ペトリフィルム™ 培地での食品のスパイクに使用した菌種

菌種	ペトリフィルム™ 培地
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC9642	RYM
<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	STX, STX-D
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	RYM
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 51818	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EC/CC, REC, CC, SEC, AC, RAC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 51813	EC/CC, REC, CC, SEC
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 51815	EB
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 51817	REC, SEC
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	RAC
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10106	RYM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	AC, RAC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35554	EB
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	RYM
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 51812	EC/CC, REC, CC, SEC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	STC, STX-D, AC, RAC
<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC 35662	STC, STX-D
<i>Shigella sonnei</i> U8	EC/CC, REC, CC, SEC, EB

希釈試験および食品スパイク試験は、適正測定範囲内のペトリフィルム™ 培地において、以下の3点に沿って、取扱説明書に従い判定分析しました。これらの基準を満たしたペトリフィルム™ 培地の精度を、表4、5にそれぞれ示します。

1. 1プレートに11コロニー以上発育しているものとし、プレートリーダーによる測定と人による測定の違いが対数値において±10%以内であること。
2. 偽陽性および偽陰性の合計数は人による測定の10%を超えないこと。
3. 1プレートにコロニーが0～10個の場合、人による測定とプレートリーダーによる測定が偽陽

性および偽陰性を含み2コロニー以内であること。

結果 - 希釈試験

9種のペトリフィルム™ 培地及びSTXディスクにおいて11区分、合計1,901枚について検討しました。先述の基準を満たしたプレートの割合を表4に示します。

表4. ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストの測定が基準を満たした割合

プレート	カウントしたコロニータイプ	得られた結果	プレート数	リーダー1の精度 (%)	リーダー2の精度 (%)
EC/CC	気泡を伴う赤色及び青色のコロニー	大腸菌群数	156	96	97
	気泡を伴う青色のコロニー	大腸菌数		99	99
	気泡を伴う青色と伴わない青色のコロニー	該当なし		100	99
REC	気泡を伴う赤色のコロニー、青色のコロニーすべて	大腸菌群数 (FDA-BAM)	165	100	99
	気泡の有無にかかわらず、すべての赤色および青色のコロニー	大腸菌群数		100	100
	青色のコロニーすべて	大腸菌数		100	100
CC	気泡を伴う赤色コロニー	大腸菌群数 (FDA-BAM)	165	98	100
	気泡の有無にかかわらず、すべての赤色のコロニー	大腸菌群数		98	100
SEC	青緑色のコロニーすべて	大腸菌数	186	99	98
STX	赤紫色のコロニーすべて	黄色ブドウ球菌数	104	100	100
STX-D	ピンクゾーンのあるコロニーすべて	黄色ブドウ球菌数	101	97	100
EB	酸やガスを発生させている赤色のコロニーすべて	腸内細菌科菌群数	181	100	99
AC	コロニーすべて	生菌数	272	97	96
RAC	コロニーすべて	生菌数	210	94	97
RYM	コロニーすべて	カビ・酵母数	196	96	94

結果 - 食品スパイク試験

9種のペトリフィルム™ 培地及びSTXディスクにおいて34種の食品、合計1,636枚について検討しました。先述の基準を満たしたプレートの割合を表5に示します。

表5. ペトリフィルム™ プレートリーダー アドバンストの測定が基準を満たした割合

プレート	カウントしたコロニータイプ	得られた結果	プレート数	リーダー1の精度 (%)	リーダー2の精度 (%)
EC/CC	気泡を伴う赤色及び青色のコロニー	大腸菌群数	195	98	98
	気泡を伴う青色のコロニー	大腸菌数		96	96
	気泡を伴う青色と伴わない青色のコロニー	該当なし		97	95
REC	気泡を伴う赤色のコロニー、青色のコロニーすべて	大腸菌群数 (FDA-BAM)	123	98	99
	気泡の有無にかかわらず、すべての赤色および青色のコロニー	大腸菌群数		96	96
	青色のコロニーすべて	大腸菌数		98	99
CC	気泡を伴う赤色コロニー	大腸菌群数 (FDA-BAM)	126	98	99
	気泡の有無にかかわらず、すべての赤色のコロニー	大腸菌群数		98	98
SEC	青緑色のコロニーすべて	大腸菌数	151	97	93
STX	赤紫色のコロニーすべて	黄色ブドウ球菌数	149	97	95
STX-D	ピンクゾーンのあるコロニーすべて	黄色ブドウ球菌数	154	97	95
EB	酸やガスを発生させている赤色のコロニーすべて	腸内細菌科菌群数	140	96	93
AC	コロニーすべて	生菌数	204	95	93
RAC	コロニーすべて	生菌数	261	95	96
RYM	コロニーすべて	カビ・酵母数	133	91	90

結論

希釈試験において7～13種の異なる分離株を接種したペトリフィルム™ 培地の全てにおいて、プレートリーダー1及びプレートリーダー2は94%以上の精度を示しました。同様に、6～8種の代表的な食品におけるスパイク試験では、プレートリーダー1では91%以上の精度、プレートリーダー2では90%以上の精度を示しました。

参考文献

1. Standard Method for the Examination of Dairy Products, 17th Edition. American public Health Association.2004.

NEOGEN、ペトリフィルムはNeogen社の商標です。

ネオジェンジャパン株式会社

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