

一般生菌数迅速計測用シート培地サニ太くんACplusの評価

○寺村 哉、岩崎 美穂子、恩地 裕一、木村 龍三、牛山 正志 (JNC株式会社 横浜研究所)

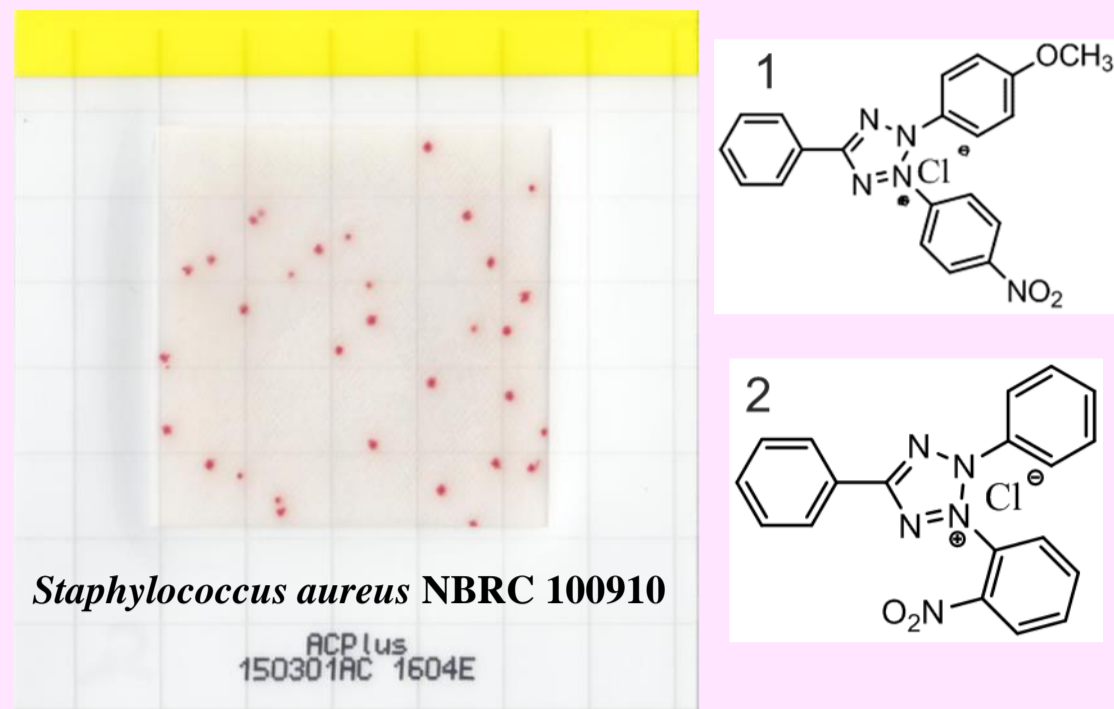
背景

- 一般生菌数は食品の品質、製造プロセスや環境の衛生度合いを測る上で重要な検査項目である。
- 一般的に食品での一般生菌数は標準寒天培地による35℃、48時間の培養により得られる。
- 近年の技術革新により、大腸菌群数や黄色ブドウ球菌数などは24時間で結果が得られ、一般生菌数の検査時間に差が生じる。
- 食品の加工や流通技術が進歩していることから、可能な限り全ての検査結果が同時に得られることに対する要望が高い。

サニ太くんACplus (ACplus)

●従来から広く用いられているTTC (2'3'5'-Triphenyl tetrazolium chloride)に加え、2-(4-Methoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride: 1
2, 5-diphenyl-3-(2-nitrophenyl)-tetrazolium chloride: 2を組み合わせることで、1つのプレートで、24時間培養の迅速計測と、48時間培養の通常の菌数計測が併用可能な乾燥簡易培地ACplusを開発した。

24時間培養: 迅速モード、48時間培養: 通常モードとして使用し、発育した集落は赤色となる(写真)。



評価方法

●標準菌株を用いた評価

供試菌株—グラム陰性細菌44株、グラム陽性細菌39株、酵母2株、計85株を使用した。

各供試菌株はヒツジ血液寒天培地(日水製薬)で35℃、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Butterfield's phosphate buffer (BPB)へ懸濁し供試菌液とした。

供試菌株はBPBで10倍段階希釈し、菌希釈液の1mLをACplus、簡易培地A、および滅菌空シャーレに接種し、滅菌空シャーレには予め滅菌保温した標準寒天培地 (SPC; Difco)にて混釈を行った。

ACplusは35℃、24および48時間培養後、簡易培地AおよびSPCは35℃、48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97検体を使用した。

(精肉類、生鮮魚介類、生野菜・果実類、乳製品、惣菜類、麺類、生地、漬物、穀類、菓子類、乳酸菌飲料、ヨーグルト)

各検体は9倍量の滅菌BPBを加え、90秒間スタマッキング処理を行い試料原液とし、試料原液は滅菌BPB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ACplus、簡易培地A、および滅菌空シャーレに接種滅菌空シャーレには予め滅菌保温したSPCにて混釈した。ACplusは35℃、24および48時間培養後、簡易培地AおよびSPCは35℃、48時間培養後、各培地上での集落数を計測した。

各方法において得られた菌数をそれぞれ対数に変換し、ACplusの菌数の対数値をy軸に、対照とする培地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。

サニ太くんSAの評価結果

●標準菌株を用いた評価では、ACplusは低温性の細菌(*P. stutzeri*, *Y. enterocolitica*)と一部の乳酸菌(*L. plantarum*, *L. citreum*)以外は24時間培養で検出でき、48時間培養では供試した全ての菌株が検出できた。

●市販食品検体を用いた評価では、全食品を対象としたとき(下図)

ACplus 24時間迅速法は簡易培地Aと良好な相関を示し、直線回帰式 $y = 0.94x - 0.25$ 、相関係数(r) 0.94であった。但し、ACplus 24時間迅速法では乳酸菌が発育しないため、標準寒天とは相関が悪いことを認めた。

ACplus 48時間法は標準寒天培地と良好な相関を示し、直線回帰式 $y = 0.98x + 0.13$ 、相関係数(r) 0.97であった。但し、ACplus 48時間法では乳酸菌が発育し、簡易培地Aには乳酸菌が発育しなかったため、簡易培地Aと相関が悪いことを認めた。

乳酸菌飲料、ヨーグルト以外の食品を対象としたとき(表2)

ACplus 24時間迅速法、48時間法ともに、標準寒天培地、簡易培地Aの双方と高い相関を示した。

まとめ

サニ太くんACplusは通常の48時間法である一般生菌数計測と24時間法の迅速計測を併せ持つ簡易培地法であり、いずれの方法においても、従来法と高い相関を有するものであった。

さらに乳酸菌飲料、ヨーグルトなどの乳酸菌が多く存在する食品以外では、24時間培養での迅速法が適応可能であることから、食品製造現場などの通常の一般生菌数計測だけでなく、検査対象により迅速検出による検査時間短縮ができる点で、有用な手段となると考えられた。

Table 1. Growth of microbes tested on various media

Microbes tested	log CFU/ml				Microbes tested	log CFU/ml			
	ACplus24	ACplus48	培地A	PCA		ACplus24	ACplus48	培地A	PCA
Gram negative bacteria									
<i>Aeromonas hydrophila</i> JCM 1027	6.41	7.48	7.56	6.87	<i>Bacillus cereus</i> NBRC 13494	7.59	7.60	7.63	7.49
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	7.26	7.26	7.07	7.00	<i>B. licheniformis</i> NBRC 12200	8.52	8.56	8.57	7.85
<i>Citrobacter amalonaticus</i> IFO 13547	7.79	7.79	7.79	7.75	<i>B. subtilis</i> NBRC3134	6.53	6.56	6.68	5.48
<i>C. freundii</i> IFO 12681	7.16	7.33	7.30	7.17	<i>Corynebacterium xerosis</i> IFO 12684	7.65	7.67	7.64	7.41
<i>C. koseri</i> JCM 1659	7.84	7.83	7.78	7.86	<i>C. ammoniagenes</i> NBRC12612	7.85	7.85	7.90	7.80
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 12868	7.68	7.68	7.64	7.65	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 7783	7.66	7.86	7.87	8.08
<i>Edwardsiella tarda</i> JCM 16656	5.85	5.85	6.11	5.85	<i>E. faecalis</i> JCM 8726	8.51	8.53	8.39	8.49
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	7.97	8.00	7.90	7.91	<i>E. hirae</i> IFO3181	6.11	7.68	5.85	7.77
<i>E. cloacae</i> IID 977	7.39	7.39	7.52	7.49	<i>Lactobacillus lactis</i> IFO 3376	7.93	7.95	7.92	7.93
<i>E. cloacae</i> JCM 1232	7.85	7.88	7.88	7.36	<i>L. helveticus</i> NBRC 15019	9.02	9.02	9.14	9.05
<i>E. gergoviae</i> JCM 1234	7.34	7.34	7.37	7.26	<i>L. plantarum</i> IFO 12519	not grown	6.56	5.48	7.63
<i>Escherichia coli</i> IID 5208	7.97	7.97	8.03	7.79	<i>Leuconostoc citreum</i> JCM 9698	not grown	8.37	8.01	8.34
<i>E. coli</i> NBRC 3972	8.51	8.51	8.52	8.20	<i>L. mesenteroides</i> IFO 3832	7.83	8.03	8.07	8.07
<i>E. coli</i> NBRC 13500	8.57	8.58	8.52	8.48	<i>Listeria ivanovii</i> JCM 7681	8.79	8.93	8.89	8.95
<i>E. coli</i> NBRC 15034	7.67	7.67	7.57	7.48	<i>L. monocytogenes</i> JCM 7680	8.26	8.30	8.30	8.29
<i>E. fergusonii</i> NBRC 102419	8.31	8.31	8.27	7.90	<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 12708	5.48	7.99	5.30	8.02
<i>E. vulniferi</i> NBRC 102420	6.40	6.40	6.46	6.26	<i>Staphylococcus arletae</i> DSM 20672	8.42	8.47	8.57	8.56
<i>Hafnia alvei</i> JCM 1666	6.51	6.73	6.89	6.63	<i>S. aureus</i> NBRC 14462	8.07	8.10	8.13	7.86
<i>Klebsiella oxytoca</i> JCM 1665	7.71	7.73	7.72	7.79	<i>S. aureus</i> NBRC 15035	8.53	8.56	8.47	8.39
<i>K. pneumoniae</i> JCM 1662	7.30	7.30	7.13	6.04	<i>S. aureus</i> NBRC 100910	8.15	8.16	8.08	8.16
<i>Kluyvera ascorbata</i> JCM 1681	6.89	6.90	6.87	6.93	<i>S. auricularis</i> ATCC 33753	7.49	8.65	8.80	8.77
<i>K. intermedia</i> JCM 1238	5.85	5.95	6.08	5.90	<i>S. caprae</i> JCM 2420	5.00	6.97	6.69	6.41
<i>Leclercia adecarboxylata</i> NBRC 102595	7.38	7.38	7.26	7.13	<i>S. caprae</i> JCM 3573	8.42	8.58	8.61	8.03
<i>Moraxella atlantae</i> NBRC 14588	7.54	7.54	7.48	7.68	<i>S. cohnii</i> JCM 2417	7.20	8.54	8.51	8.45
<i>M. lacunata</i> NBRC 102154	7.73	7.74	7.63	7.75	<i>S. delphini</i> DSM20771	6.20	8.00	8.00	8.15
<i>Morganella morganii</i> IFO 3848	7.72	7.75	7.68	7.60	<i>S. epidermidis</i> NBRC 12993	7.79	8.10	8.00	8.09
<i>Proteus mirabilis</i> NBRC 13300	6.99	7.13	7.52	6.56	<i>S. epidermidis</i> NBRC 100911	8.08	8.17	8.05	7.38
<i>P. vulgaris</i> NBRC 3851	7.49	7.60	7.59	7.14	<i>S. gallinarum</i> ATCC 35539	7.94	8.01	8.05	8.02
<i>Providencia alcalifaciens</i> IFO 12931	7.81	7.81	7.94	6.97	<i>S. haemolyticus</i> JCM 2416	7.61	8.00	7.96	7.86
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3446	7.76	8.12	8.29	8.13	<i>S. hominis</i> JCM 2419	6.81	7.60	7.39	7.35
<i>P. aeruginosa</i> NBRC 12689	7.91	8.17	8.24	8.21	<i>S. hyicus</i> JCM 2423	8.38	8.45	8.38	8.20
<i>P. aeruginosa</i> NBRC 13275	8.09	8.12	8.49	8.64	<i>S. intermedius</i> ATCC 29663	7.99	8.01	7.76	7.61
<i>P. fluorescens</i> NBRC 15842	6.18	7.26	7.59	7.34	<i>S. lentus</i> ATCC 20970	8.27	8.39	8.39	8.28
<i>P. stutzeri</i> NBRC 14165	not grown	7.54	7.96	7.83	<i>S. saprophyticus</i> JCM 2427	8.22	8.23	8.12	8.16
<i>Rahnella aquatilis</i> IFO 13544	6.83	6.93	7.20	6.88	<i>S. schleiferi</i> ATCC 43808	8.03	8.29	8.22	8.28
<i>Raoultella planticola</i> IFO 14939	6.82	6.82	6.93	6.83	<i>S. sciuri</i> ATCC 29062	8.46	8.47	8.46	8.45
<i>R. terrigena</i> NBRC 14941	7.81	7.81	7.89	7.81	<i>S. simulans</i> JCM 2424	8.44	8.47	8.43	8.24
<i>Salmonella Choleraesuis</i> NBRC 105684	7.05	7.08	7.09	7.07	<i>S. xylosum</i> JCM 2418	7.49	7.52	7.76	7.88
<i>S. Enteritidis</i> NBRC 3313	8.23	8.25	8.31	8.20	<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 14485	5.30	6.36	6.23	5.30
<i>S. Typhimurium</i> JCM 1652	8.00	8.49	8.08	7.90					
<i>Serratia marcescens</i> JCM 1239	8.12	8.12	8.22	8.08					
<i>S. rubidaea</i> NBRC 12973	7.64	7.65	7.79	7.61					
<i>Yersinia aldovae</i> JCM 5892	7.15	7.15	7.20	6.98					
<i>Y. enterocolitica</i> IID 981	not grown	8.18	8.18	8.04					

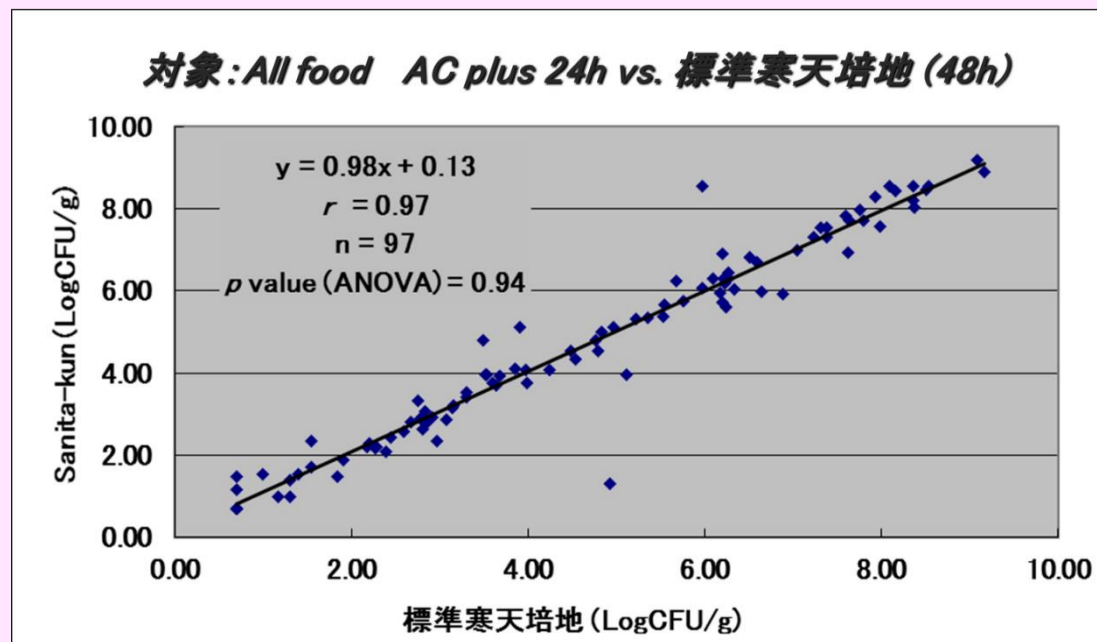
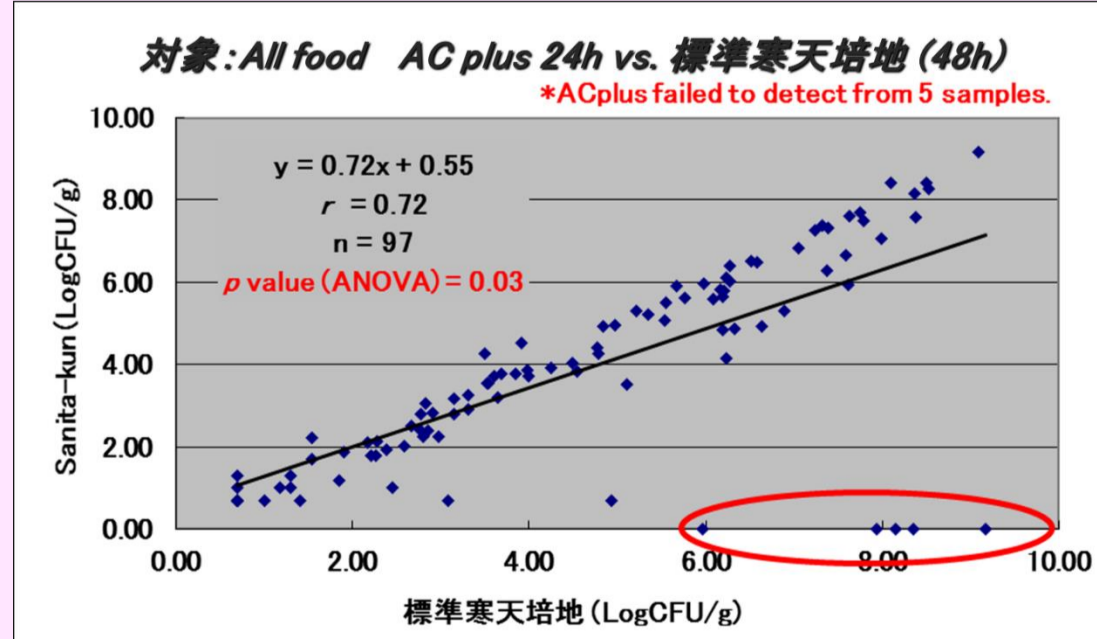
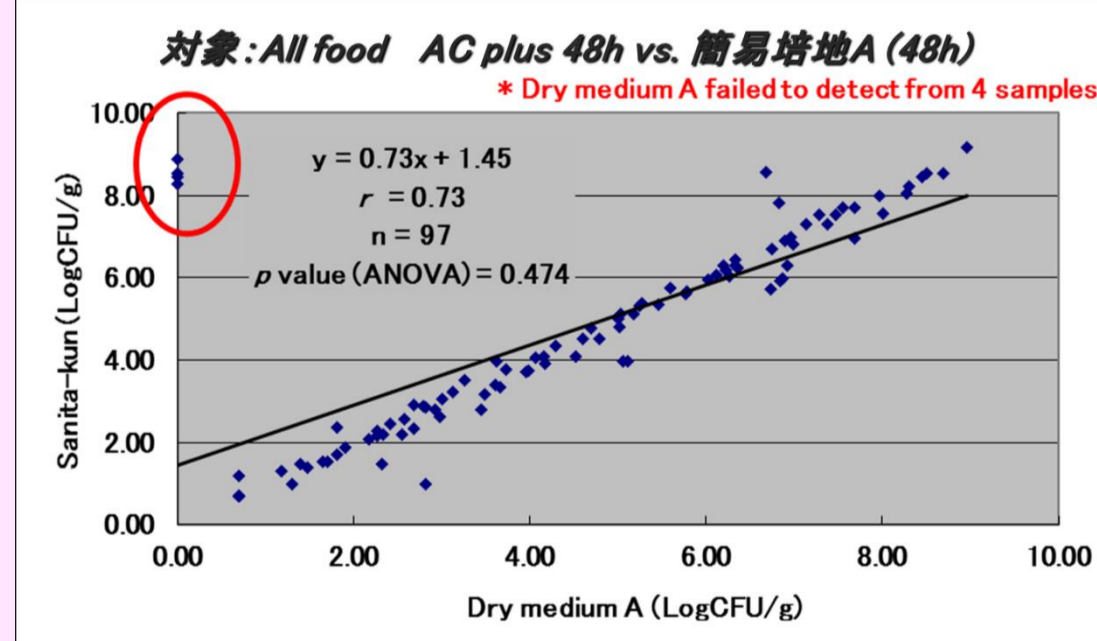
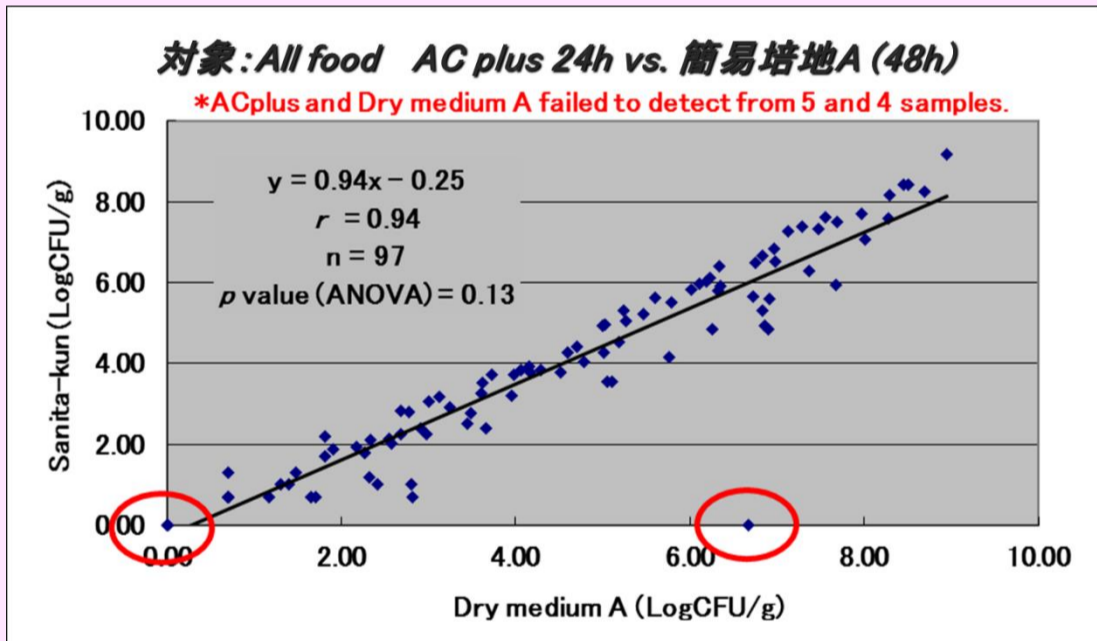


Table 2. Regression lines between ACplus and reference media for the determining population of aerobic count in all food excluding yogurt and lactic beverages.

	n	linear regression line	correlation coefficient (r)	p value (ANOVA)
ACplus 24h vs. Dry medium A (48h)	92	$y = 0.97x - 0.36$	0.97	0.15
ACplus 48h vs. Dry medium A (48h)	92	$y = 0.99x - 0.09$	0.99	0.71
ACplus 24h vs. 標準寒天培地 (48h)	92	$y = 0.94x - 0.11$	0.95	0.29
ACplus 48h vs. 標準寒天培地 (48h)	92	$y = 0.96x + 0.15$	0.97	0.99

Figure. Regression lines between ACplus and reference media for the determining population of aerobic count in all food