

タイムラプス画像解析法による寒天培地の性能評価

○小川廣幸¹、松岡英明²、斉藤美佳子²
¹マイクロバイオ(株)、²東京農工大・生命工

目的

寒天培地の性能は、対象となる微生物細胞が成長してコロニーを形成する状態から判断される。したがって、性能を定量的に評価するためには、培地に蒔いた試験菌の各細胞の成長過程を計測することが基本となる。その方法論の一つとして、多数の細胞をランダムに蒔いて、個々の成長過程を合算して統計的に評価する方法である。プレート内の培地を一つの均質な媒体と考える方法で、培地成分評価、あるいは逆に複数の試験菌が共存する場合に、それを識別する場合などに適した方法である。個々の細胞の成長過程を同時計測する装置が必要となる。

本研究は、そのために開発したタイムラプス画像解析法に基づく自動装置(図1)を利用して、寒天培地成分を検計できることを示すことを目的としている。

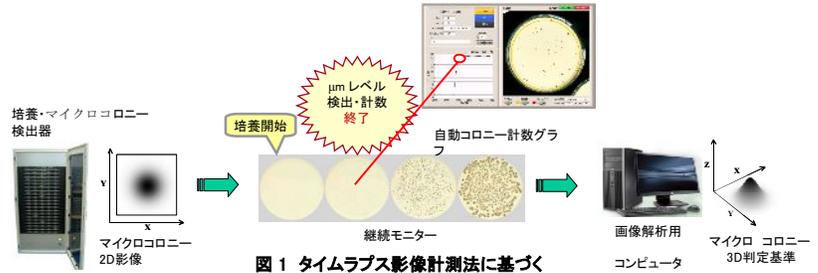


図1 タイムラプス画像計測法に基づく全自動微生物検査装置

方法

試験菌として、*Candida albicans* (NBRC1594)と*Escherichia coli* (NBRC3972)、培地として、同一メーカーのポテトデキストロース寒天培地(PDA)、デソキシコレイト寒天培地(DA)、標準寒天培地(SPC)を用いた。ポテトデキストロース寒天培地は成分調整しないで購入品を直接評価対象とし、*C. albicans*の懸濁希釈液を試料として1 ml混釈して35°Cで48時間培養した。デソキシコレイト寒天培地は塩分濃度を0.75、1、1.5%に増加したのもも調製して評価対象とした。試験菌として、*E. coli*の懸濁希釈液1 mlを混釈して35°Cで24 h培養した。これに対する対照として、成分調整しない標準寒天培地を用い、これに同じ*E. coli* 試料液1 mlを混釈して35°Cで24 h培養した。

結果

PDAに *C. albicans* を蒔いたところ、多くの細胞は同程度の速度で増殖し、コロニーカウントグラフは階段状となった。この結果から、培養状況が良好であると判断された。また、コロニー形成時間のヒストグラムは単一のピークを示し、24時間以内にほぼ100%のコロニーが形成されたことが分った。一方、デソキシコレイト寒天培地の塩分濃度を0.75、1、1.5%と増加していくと *E. coli* の増殖が悪くなっていき、菌の回収が76から59、14、0個になるとともに、初菌の検出時間が7.5、9、13.5時間目に遅れるとともに、グラフ形状も崩れていった。

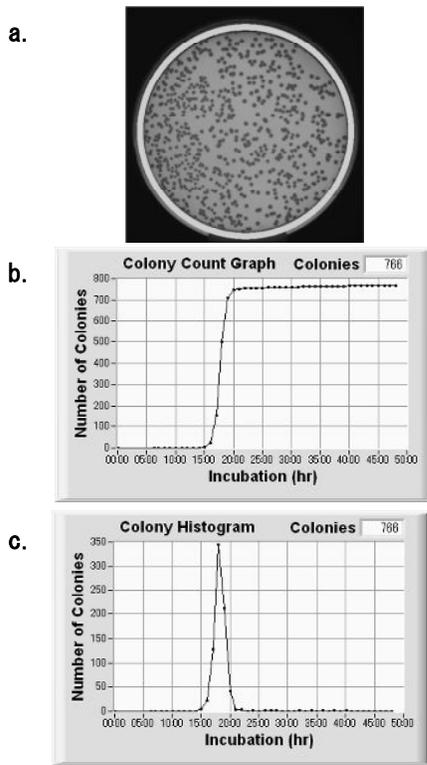


図2. ポテトデキストロース寒天培地(PDA)の性能評価
C. albicans (NBRC1594)
 a. 48h後のシャード画像
 b. コロニーカウントグラフ
 c. コロニーヒストグラム

考察

ポテトデキストロース(PDA)寒天培地はカビ、酵母検出用でこれらの微生物には抑制の無い培地である。図2は、*C. albicans* を用いて、至適培養温度によりPDAで培養して、その性能をコロニーカウントグラフとヒストグラムで表示したものである。グラフは横軸が時間軸であることから、タイムラプス計測の画像取得時に逐次検出されたコロニーにより形成されるグラフ形状は、菌の増殖状況を表している。形成されたグラフ形状は性能確認に有用である。形状を確実に把握するには菌株試料の濃度は、1 mlの試料について1000個程度のコロニーを形成するものが好ましい。これは、菌数が少ないときの結果は、菌数の多いときのグラフ形状に含まれているからである。

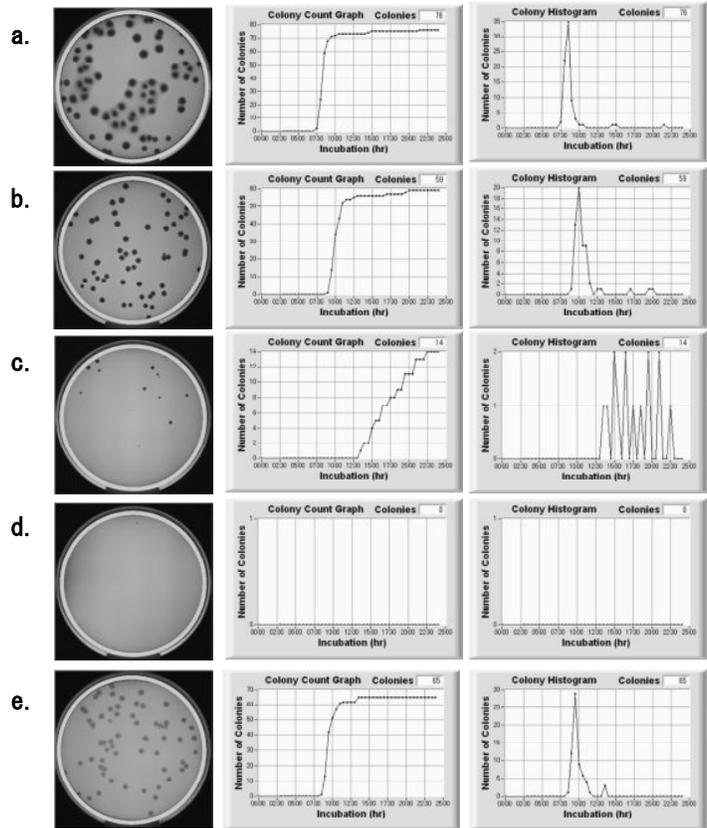


図3. デソキシコレイト寒天培地(DA)の性能評価
E. coli (NBRC3972)

- a. DA 通常組成 (24h画像、コロニーカウントグラフ、ヒストグラム)
- b. DA 塩分0.75%増加 (24h画像、コロニーカウントグラフ、ヒストグラム)
- c. DA 塩分1.0%増加 (24h画像、コロニーカウントグラフ、ヒストグラム)
- d. DA 塩分1.5%増加 (24h画像、コロニーカウントグラフ、ヒストグラム)
- e. 標準寒天培地による対照 (24h画像、コロニーカウントグラフ、ヒストグラム)

図3は、デソキシコレイト寒天培地の性能が塩分濃度を増加させるとどのように変化していくかがグラフを利用するとよく分かる。特に増殖が極端に悪い場合は、グラフ形状が極度に崩れるので、このような寒天培地は対象微生物の検出には不適切であることが分かる。24時間培養した結果のコロニーを観察するだけでは得られない増殖情報がタイムラプス計測で得られ、時間軸を持つグラフの形状にこれが反映されているので、培地の性能評価や成分検討には有用である。