

塩素系薬剤によるリステリア損傷菌の Thin agar layer 法と Flow cytometry 法による検出比較

井上 あやの¹、阿野 貴司²、山脇 伸行³、白木 琢磨¹、泉 秀実¹

要旨

損傷菌の菌数測定には培養法が用いられることが多いが、細胞計測法の Flow cytometry (FCM) では、生菌、死菌、および損傷菌の迅速評価が可能である。本研究では、*Listeria monocytogenes* の代替株である *L. innocua* (毒素陰性株) の薬剤損傷菌数測定について、培養法の Thin agar layer (TAL) 法と FCM 法の比較を行った。有効塩素濃度 0 ~ 6 ppm の強酸性電解水で処理したとき、TAL 法では 1 ppm および 2 ppm の強酸性電解水処理において、選択培地よりも TAL 培地で 0.6 log 菌数が多く検出され、それぞれ 59% および 67% の損傷菌が生残したことが示唆された。一方 FCM 法では、生菌を染色する膜透過型 DNA 染色剤 (thiazole orange: TO) と、死菌を染色する膜非透過型 DNA 染色剤 (propidium iodide: PI) での二重染色の結果、TO と PI の両方に染色された損傷菌の割合は、有効塩素濃度 1 ~ 3 ppm でそれぞれ 59% ~ 78% となった。薬剤損傷 *L. innocua* の回復においては、TAL 法では 2 時間後には損傷菌が未検出となったが、FCM 法では 4 時間後まで損傷菌が生残していた。この結果より回復期の薬剤損傷菌の検出においては、二つの方法で違いがあることが示された。

キーワード：強酸性電解水、薬剤損傷菌、リステリア、Thin agar layer 法、Flow cytometry 法

1. 緒論

Listeria monocytogenes は、これまでリステリア症 (Listeriosis) と呼ばれる多くの流行性の食中毒を引き起こした原因菌で、食品衛生上注目すべき菌の一つである。この菌は、土壌、農業用水、排水、ヒトや動物の糞便から検出されるグラム陽性のリステリア属の一種で、これまで様々な環境、たとえば高熱や高塩濃度、低 pH、凍結、乾燥などに対しても他の細菌と比較して強い耐性をもち、増殖可能であることが示されてきた⁽¹⁾。食品では、加工肉や冷凍肉、乳製品などから多く検出されるが、近年ではキャベツやニンジン、レタス、キュウリなどの青果物やサラダなどからも *L. monocytogenes* が検出されている^(2,3)。実際アメリカでは、青果物やサラダを原因とするリステリア症が報告されており^(4,5)、その安全性を守るためには、青果物における *L. monocytogenes* の制御法について更なる研究が必要とされている。

カット野菜やサラダなどの一次加工食品工場では、原料の生産、収穫および流通時において混入した病原微生物や腐敗原因菌の除去を目的として、様々な化学薬剤による殺菌処理が行われている。日本で広く使用されている酸性電解水もその一つで、低濃度の食塩水または希塩酸を電気分解して得られる次亜塩素酸 (有効塩素) を含有する酸性の水として、日本では強酸性電解水 (pH 2.2 ~ 2.7、有効塩素 20 ~ 60 ppm)、弱酸性電解水 (pH 2.7 ~ 5.0、有効塩素 10 ~ 60 ppm) および微酸性電解水 (pH 5.0 ~ 6.5、有効塩素 10 ~ 80 ppm) が食品添加物に指定されている。

原稿受付 2017 年 11 月 24 日

キーワード：強酸性電解水、薬剤損傷菌、リステリア、Thin agar layer 法、Flow cytometry 法

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.15-I-3, 2016 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部食品安全工学科、〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部生物工学科、〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 近畿大学生物理工学部医用工学科、〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

ところが、このような化学薬剤の使用は薬剤損傷菌を生じさせる。塩素系殺菌剤や過酢酸、グリシン、エタノールなど様々な化学薬剤により損傷菌が生じることが、これまでに報告されてきた⁽⁶⁻⁹⁾。薬剤処理後の菌液や食品の中には、処理前と同様に増殖できる「健常菌（生菌）」と死滅した「死菌」以外に、好適な条件下では増殖能を回復する「損傷菌」が存在する。著者ら⁽¹⁰⁾は、強酸性電解水を混合した*Enterobacter cloacae*、*E. coli* O157:H7の各菌液と農業用水中の大腸菌群では、一部で損傷化が起こり、それらが培養中に回復してコロニーを形成することを報告した。*L. monocytogenes*においても塩素系殺菌剤による損傷化が報告されており^(11, 12)、化学薬剤によって損傷化した薬剤損傷菌は、主に細胞壁や細胞膜の透過障壁にダメージを受け、多くの薬剤に感受性になるため、選択培地を使用した菌数測定法ではコロニーを形成せず、死菌として扱われる可能性がある。損傷化した*L. monocytogenes*は、回復後には病原性を再び示すこと⁽¹³⁾から、損傷菌の見落としは、食品の微生物学的品質と安全性の過大評価につながる危険がある。

食品の安全衛生に関する多くの研究者たちが、これまでに損傷菌の測定法について様々な検討を行ってきた。Kang と Fung⁽¹⁴⁾は、Thin Agar Layer 法（TAL 法）として選択培地に非選択培地を重ねた TAL 培地を使用した 1 ステップで行う損傷菌測定法を開発した。この方法で、熱処理^(15, 16)、貧栄養⁽¹⁵⁾、高圧力⁽¹⁷⁾およびエタノールや塩素系殺菌剤のような化学薬剤^(6, 15, 18)によって生じた損傷菌の測定が報告されている。選択剤に感受性となった損傷菌は選択培地上ではコロニーを形成しないが、TAL 培地では、上層の非選択培地上に菌液を塗抹して培養することにより、損傷菌は選択培地の選択剤が浸透するまでの間に回復し、損傷菌を含む生残菌全てがコロニーを形成する。このため損傷菌数は、選択培地上のコロニー数と TAL 培地上のコロニー数の差として算出される。

一方、個々の菌の状態を蛍光染色によって解析可能な Flow cytometry（FCM）法は、菌の培養を経ずに菌の性状を測定できる。核酸と特異的に反応する蛍光試薬の中には、細胞膜を透過する特性をもち、生菌、死菌ともに染色可能な acridium iodide (AO)、SYTO 9、thiazol orange (TO)などと、生菌の細胞膜は透過できず、死菌にのみ透過して染色する propidium iodide (PI)や ethidium bromide (EB)などがある。この生・死菌を染色する試薬と死菌のみを染色する試薬で二重染色し細胞膜の透過性を指標とすることで生菌と死菌の判別を行うことができる⁽¹⁹⁾。損傷菌の測定においては、高圧力処理⁽²⁰⁾および殺菌剤処理⁽²¹⁾後の菌についてどちらの蛍光試薬にも染色可能な損傷菌が存在していることが示され、これを培養法、蛍光顕微鏡での観察と同等に評価可能であることが示された。

これまで、食性病原菌を対象に強酸性電解水処理により生じる損傷菌数測定において、これら二つの方法を比較した報告はない。そこで本研究では、*L. monocytogenes* と発育性状がよく似ており、食品の殺菌処理などの代替モデルとして一般的に使用される非病原性の *L. innocua* を使用し、強酸性電解水処理後および回復期のリステリア菌の損傷化率について TAL 法と FCM 法で比較した。

2. 材料および方法

2.1 *L. innocua* の培養

L. innocua ATCC33090 は、American Type Culture Collection（ATCC, Manassas, Va., U.S.A.）より購入し、実験に使用するまで 20% スキムミルクに懸濁して -80℃ で保存した。菌株は BBL™ Brain Heart Infusion Agar (Becton Dickinson and Company, USA) にて 37℃ で約 10 日間ごとに継代培養を行い、使用前日に BBL™ Brain Heart Infusion Broth（Becton Dickinson and Company）で 30℃ にて 24 時間振盪培養を行い前培養液とした。

2.2 電解水処理

予備実験で濁度 $OD_{600}=0.6\pm0.05$ のときの *L. innocua* の菌数が約 10^8 cfu/ml となったことから、前培養した菌体を滅菌生理食塩水（0.85%塩化ナトリウム）で洗浄後、濁度調整により菌液濃度を 10^9 cfu/ml に調整した。この菌液 1 ml を 9 ml の各有効塩素濃度（0、0.5、1、2、3、4、5 および 6 ppm）の強酸性電解水と混合後（最終菌液濃度 10^8 cfu/ml）、室温で 10 分間静置し処理を行った。なお、強酸性電解水は電解水生成装置（ROX-20TA-u、ホシザキ電機株式会社）で試験当日に生成し、使用した。実験は各処理 3 反復行った。

2.3 損傷菌数測定（TAL 法）

TAL 法は、PALCAM Listeria-Selective agar (Base) (Merck, Germany) に PALCAM Listeria Selective Supplement (Merck) を添加し固化した培地を選択培地とし、選択培地上に非選択培地として損傷菌の回復を促進するピルビン酸ナトリウム⁽²²⁾を 0.03 % 加えた標準寒天培地（日水製薬株式会社）7 ml を 2 回重層し固化させた培地を TAL 培地として使用した。各菌液を生理食塩水で適宜段階希釈後、選択培地および TAL 培地上に 100 μ l ずつ塗抹し 37℃で 24 時間倒置培養を行った。培養後、各培地上に 10~100 個のコロニーが得られた選択培地および TAL 培地上のコロニー数を計測し、菌液 1 ml あたりの菌数を対数値で示した。菌液原液を塗抹後に、すべての培地でコロニー数が 0 個のときは未検出、10 個未満のときには検出限界値以下として対数表示し、 $<2.0 \log$ CFU/ml とした。損傷菌数は、SAS system, release 6.12 (SAS Inst., Cary, NC)を用いた *t* 検定 5 % 有意水準 ($P\leq0.05$) において、TAL 培地の菌数が選択培地の菌数より有意に多かった場合に、TAL 培地上のコロニー数（生菌+損傷菌）と選択培地上のコロニー数（生菌）の差として算出した。損傷菌率は、次の式で表示した。

$$[(\text{TAL 培地上のコロニー数} - \text{選択培地上のコロニー数}) \div (\text{TAL 培地上のコロニー数}) \times 100 (\%)]$$

2.4 損傷菌数測定（FCM 法）

各処理後の菌液 1 ml を遠心（3,000 x g、室温、10 分間）し、Phosphate Buffered Saline (PBS)で 1 回洗浄した。上澄みを除去し 500 μ l の PBS に懸濁した菌液に、TO および PI (BD Cell viability kit; Becton Dickinson, Japan) をそれぞれ最終濃度 210 nM、4.3 μ M となるよう加え、混和後に室温で 5 分間静置し染色を行った。PBS で 2 倍に希釈後に FACS Calibur (Becton Dickinson, Japan)で 1 サンプルにつき 20,000 個のフローサイトメトリーを行った。また各データの解析は FlowJo (FlowJo for Mackintosh) ソフトウェアで行った。

2.5 損傷菌の回復

標準液体培地（SMB：酵母エキス 0.25 %、ペプトン 0.5 %、ブドウ糖 0.1 %）に 10^6 cfu/ml となるように、菌体を懸濁し、損傷菌を回復させるため 37 °C でインキュベートした。回復開始 0、1、2、3、4 時間後に TAL 法および FCM 法で菌数測定を行った。

3. 結果

3.1 TAL 法を用いた強酸性電解水処理による *L. innocua* 損傷菌の検出

L. innocua を異なる有効塩素濃度の強酸性電解水で処理し、TAL 法で損傷化率について検討した。液体培地による前培養後の未処理の *L. innocua* の菌液では、TAL 培地と選択培地上での菌数はともに約 8.6 log

cfu/ml で、菌数に差は見られず損傷菌が存在しないことを確認した (図 1 A)。この菌液に対して有効塩素濃度 0.5 ppm から 6 ppm の強酸性電解水処理を行うと、有効塩素濃度 1 ppm で TAL 培地の菌数が選択培地の菌数よりも多くなった。この傾向は 2 ppm まで見られ、それぞれ選択培地、TAL 培地の菌数の差から算出した損傷菌の割合は、1 ppm で 59 %、2 ppm で 67 % と最も高くなった (図 1 B)。3 ppm になると、TAL 培地の菌数は選択培地の菌数と同等に減少し、その差が見られなくなった。強酸性電解水の有効塩素濃度の上昇に伴い菌数は減少し、5 ppm で TAL 培地と選択培地上の菌数は検出限界値を示し、6 ppm では選択培地で未検出となった。

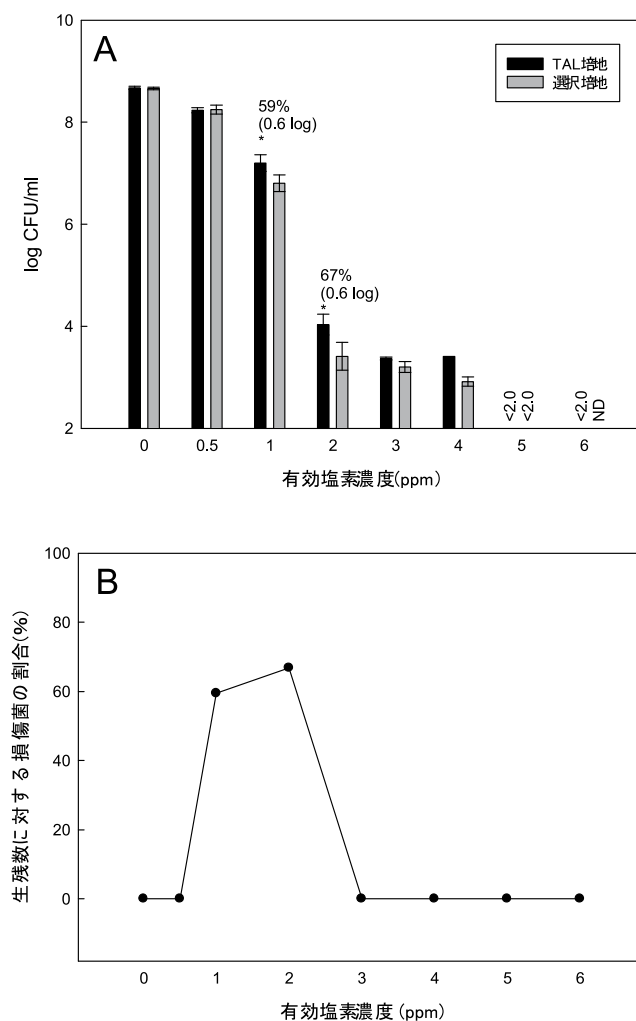


図 1. 強酸性電解水 (有効塩素濃度 0 ~ 6 ppm) 処理した *L. innocua* の TAL 培地および選択培地の菌数 (A) と生残数に対する損傷菌の割合 (B)

<2.0 : 検出限界値以下、ND : 未検出

*は各処理区における選択培地と TAL 培地上の菌数の 5 %水準における有意差を示す。

3.2 FCM 法を用いた強酸性電解水処理による *L. innocua* 損傷菌の検出

各濃度の強酸性電解水で処理した *L. innocua* を、細胞膜を透過し生菌を染色できる TO、生細胞の細胞膜を透過できない PI で二重染色し、FCM 法で解析を行った。forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) のプロットによりゲーティングを行い小さなごみや菌の破片を除いた集団について、TO、PI の 2 カラードット

プロットにより解析した (図 2)。未処理の菌液 (0 ppm) では TO のみに染色された集団 (TO+/PI-) が得られ、これを生菌とした。また 3 ppm 以上になるとほとんどの細胞が TO 陰性 PI 陽性 (TO-/PI+) となった。前述の TAL 法において致死性的であった有効塩素濃度 6 ppm の強酸性電解水で処理した菌は、すべて TO 陰性 PI 陽性 (TO-/PI+) の細胞集団となることが確認され、これを死菌とした。一方、TAL 法において生菌・死菌・損傷菌の存在が確認された有効塩素濃度 0.5 ppm、1 ppm、2 ppm では TO と PI のどちらにも染色された集団 (TO+/PI+) が得られた。これは、生菌としての性質をもちつつ、細胞膜が異常をきたしている損傷菌であるとみられた。

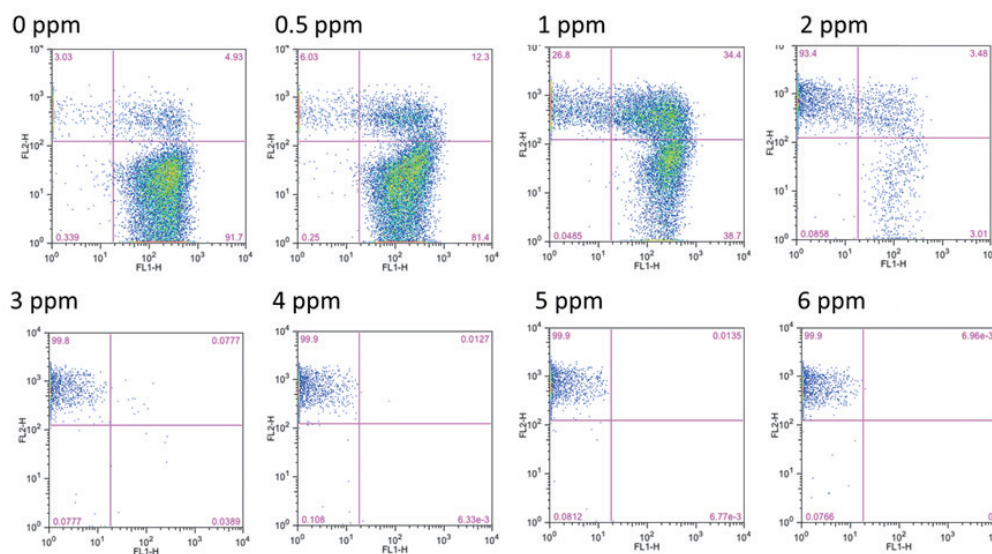


図 2. 強酸性電解水 (有効塩素濃度 0 ~ 6 ppm) 処理した *L. innocua* の FCM ドットプロット
各有効塩素濃度の強酸性電解水処理した *L. innocua* を thiazole orange (TO: FL1) と propidium iodide (PI: FL2) 染色した。示された結果は、3 反復の 2 回の実験において示された結果の典型例。

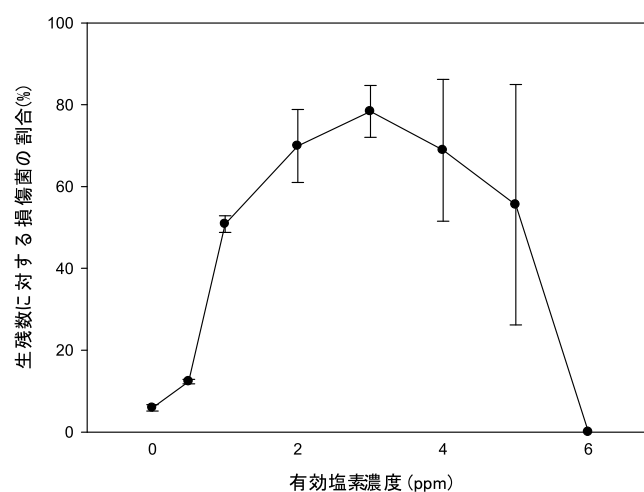


図 3. FCM 法により検出された強酸性電解水 (有効塩素濃度 0 ~ 6 ppm) 処理における *L. innocua* 生残数に対する損傷菌の割合
各プロットは、3 反復の平均値 ± 標準誤差 (エラーバー) を示す。

各細胞集団 (TO+/PI-, TO+/PI+, TO-/PI+) をゲートにかけ、生残数 (生菌と損傷菌を合算した数) における損傷菌の割合を計算すると図 3 のようになった。0 ppm の 5 % から強酸性電解水濃度が高くなるに従い PI 陽性細胞の割合が高くなり、1 ppm で 50 %、2 ppm で 70 %、3 ppm で 78 % と最も高い値を示した。その後 4、5 ppm と割合は減少し、6 ppm になると損傷菌は未検出となった。

3. 3 強酸性電解水処理により損傷化後に回復した *L. innocua* の解析

次に、有効塩素濃度 1 ppm の強酸性電解水により損傷化した *L. innocua* を標準液体培地 (SMB) 中で回復させたときの損傷菌率について比較を行った。1 ppm の強酸性電解水処理により、TAL 法では 18 % の *L. innocua* の損傷化が確認された (図 4 A)。次に遠心分離により電解水を除去し、SMB に懸濁後、37 °C で静置して損傷菌を回復させた。損傷菌の割合は、0 時間の 18 % から 0.5 時間で 18 %、1 時間で 11 % であったが、2 時間後には TAL 培地と選択培地上のコロニー数に差はなく、損傷菌は検出されなかった。一方、同じ菌液を FCM で解析したところ、有効塩素濃度 1 ppm の強酸性電解水処理直後には損傷菌率が 22 % となっていたが、SMB に懸濁して 37 °C で回復させた結果、1 時間後には損傷菌率が 37 % まで増加し、その後回復時間を延長しても損傷菌率は大きな変化はせず、回復 4 時間目まで約 35 % を維持した (図 4 B)。

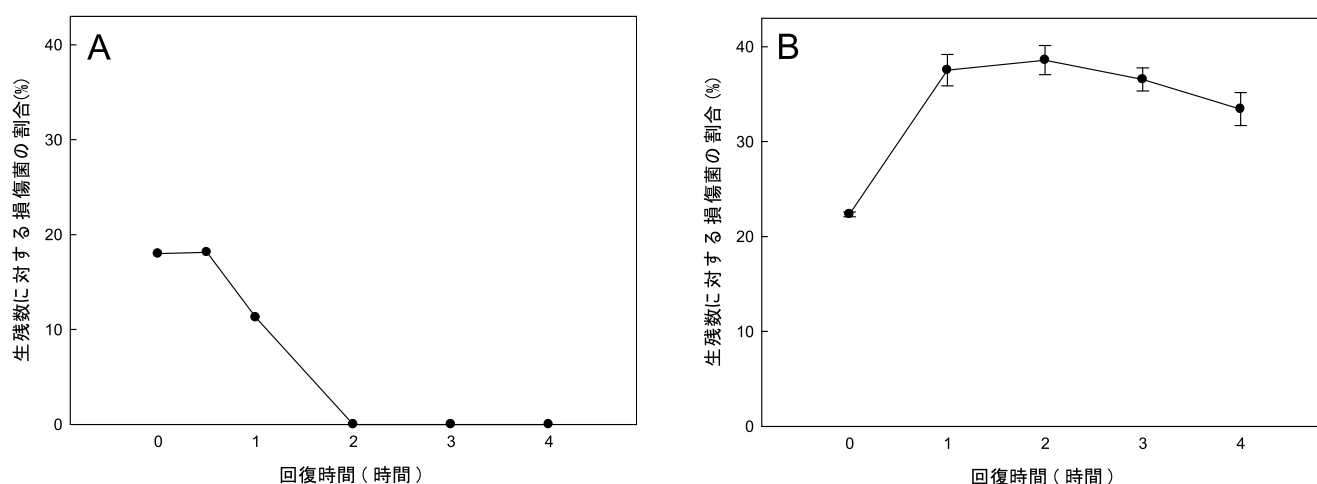


図 4. 強酸性電解水 (有効塩素濃度 1 ppm) で損傷化させた *L. innocua* の回復時の TAL 法 (A) および FCM 法 (B) による生残数 (0、0.5、1、2、3、4 時間後にそれぞれ 7.8 ± 0.0 、 6.8 ± 0.0 、 6.3 ± 0.0 、 6.6 ± 0.2 、 7.0 ± 0.0 、 7.4 ± 0.1 log CFU/ml) に対する損傷菌の割合
各プロットは、3 反復の平均値 \pm 標準誤差 (エラーバー) を示す。

4. 考察

損傷菌の検出には、大きく分けて従来のコロニー数の計測を基本とする培養法と培養を必要としない非培養法の二つの方法がある。本研究では、食性病原菌の *L. monocytogenes* の代替菌種である *L. innocua* を用いて、強酸性電解水処理により出現する損傷菌の検出について、培養法の TAL 法と非培養法の FCM 法で比較した。有効塩素 0.5 ppm から 2 ppm の低濃度の強酸性電解水処理による損傷菌生残性の評価においては、TAL 法において TAL 培地と選択培地上の菌数の差を損傷菌とした場合と FCM 法で TO+/PI+ を損傷菌とした場合に、ほぼ一致した結果が得られた。FCM 法では、*E. coli*、*Enterococcus faecalis*、*Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus* を塩素系の次亜塩素酸ナトリウムや過酸化水素系、フェノール系、4級アンモニウム系の6種類の殺菌剤で処理した Massicotte ら⁽²¹⁾の報告がある。彼らは低濃度の殺菌剤処理後の菌液中に生菌、死菌と異なる染色像を示す集団があると述べているが、今回の電解水処理においても生菌、死菌のどちらの性質ももつ損傷菌の集団が検出された。TO は、一般に細胞膜を透過し死・生菌ともに染色するといわれているが⁽¹⁹⁾、今回の実験では死菌で TO の染色性が減弱した。この点は *E. coli*, *Bacillus globigii*, *Salmonella choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* の殺菌剤処理後の死菌で、TO の蛍光強度が弱まるとする報告⁽²²⁾と一致した。PI による染色は、TO の細胞内への透過よりも速く、膜損傷の程度によって多量に DNA に結合した PI が TO の染色を阻害するのかもしれない。強酸性電解水の有効塩素濃度が 3 ppm 以上になった場合には、損傷菌は TAL 法では確認されず、FCM 法でしか損傷菌の生残が確認されなかった。しかし、FCM 法において有効塩素濃度が高くなるにつれて、サンプル間の損傷菌率で誤差が大きくなる傾向が見られた。これは、母集団の数 20,000 個という設定で解析を行ったため、死菌が大部分になったサンプルでは、生菌数が激減した結果であると考えられる。損傷菌率の測定のみを目的とする場合には、時間をかけて多数の菌をさらに解析する必要がある。

本研究の中で最も両方法の違いが現れたのは、回復期間 2 時間以降の損傷菌率であった。FCM 法においてはこの間で損傷菌の割合は 35 %前後で減少しなかったが、TAL 法では損傷菌の割合が回復開始の 18 %から減少し、2 時間後からは損傷菌が全く検出されなかった。一般に、塩素系殺菌剤処理により生じた損傷菌では、カタラーゼなどによる活性酸素除去能が低下することが示唆されている^(23, 24)。糖質代謝やストレス応答は、細胞内に過酸化水素などの活性酸素を生じるが、通常は細胞内のカタラーゼにより除去される。これが損傷菌においては酵素活性の低下により除去が十分にできずに細胞内の活性酸素が蓄積することによって、二次損傷を引き起こす。損傷回復期の 37℃標準液体培地 (SMB) 中では、核酸染色剤を用いて膜透過性の解析を元にした FCM 法では、損傷菌の割合が 22 %から 1 時間後には 37 %に増加したことから、PI 染色で検出した損傷菌の回復よりも強酸性電解水によるストレスが引き起こした *L. innocua* の細胞膜の二次損傷の方が勝ったと考えられる。これに対して TAL 法では、TAL 培地中のピルビン酸ナトリウムが二次損傷で生じた活性酸素を十分に除去できなかったか⁽²⁴⁾、あるいはリステリア選択培地に含まれる選択剤に対する耐性を回復したために、結果として選択培地と TAL 培地上の菌数の差が見られず、損傷菌が検出されなかったと考えられる。リステリア選択培地では、選択剤として塩化リチウム、セフトジジン、ポリミキシム B、アクリフラビンが含まれている⁽²⁵⁾が、損傷菌の検出では、セフトジジン以外の選択剤が関係していると考えられている⁽²⁶⁾。セフトジジン以外の選択剤に対するリステリアの耐性は、菌体細胞膜表面上の多剤排出ポンプにより選択剤が排出されやすいため⁽²⁷⁻²⁹⁾で、これが損傷菌では機能異常を起し、選択剤に対して感受性となることが考えられる。

殺菌処理過程で生じる薬剤損傷菌の性質やその回復について理解することは、食品の微生物学的品質と安全性を守るために重要である。食品製造現場で、青果物など様々な菌と組織が混在したサンプルにおいて損傷菌の程度を確認する際には、選択剤を用いた TAL 法などの培養法が安易に利用でき、出現したコロニーの同定が可能であるという利点がある^(10, 18)。一方、損傷菌の迅速な測定が必要なときは、解析に約 24 時間かかった培養法に比べて、数分で解析できる FCM 法が有効となる。さらに、様々な状態にある細胞の解析が可能な FCM 法は、様々な分子をターゲットとして抗体や蛍光試薬を利用でき、今後損傷菌の性質や状態を調べる上で有効な手段であると考えられる。これら二つの方法を組み合わせた解析により、今後、損傷菌の詳細な解析が行われ、損傷菌制御に向けた新たな技術が開発されることを期待する。

参考文献

- (1) Anonymous, 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition/FDA and Food Safety and Inspection Service/USDA. Washington, DC.
- (2) Ponniah, J., Robin, T., Paie, M. S., Radu, S., Ghazali, F. M., Kqueen, C. Y., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., Malakar, P. K. (2010) *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malayaia. Food Control 21, 774-778.
- (3) Althus, D., Hofer, E., Corti, S., Julmi, A., and Stephan, R. (2012) Bacteriological survey of ready-to eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. J. Food Prot. 75, 1338-1341.
- (4) CDC. Multistate outbreak of listeriosis linked to packaged salads produced at Springfield, Ohio Dole processing facility (final update). Availilable online : <https://www.cdc.gov / listeria / outbreaks / bagged-salads-01-16 / index.html> (accessed on 15 November 2017)
- (5) Gaul, L.K., Farag, N.H., Shim, T., Kingsley, M.A., Silk, B.J., Hyytia-Trees, E. (2013) Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery-Texas, 2010. Clin. Infect. Dis. 56, 20-26.
- (6) Moosekian, S. R., Jeong, S., Ryser, E. T. (2014) Inactivation of sanitizer-injured *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach using X-ray irradiation. Food Control 36, 243-247.
- (7) Scheusner, D.L., Busta, F. F., and Speck, M. L. (1971) Injury of bacteria by sanitizers. Appl. Microbiol. 21, 41-45.
- (8) Wesche, A. M, Gurtler, J. B, Marks, B. P, Ryser, E. T. (2009) Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. J. Food Prot. 72, 1121-1138.
- (9) Hu, J., Miyaguchi, Y., Kurusu, Y., Tsutsumi, M. (2002) Recovery of *Escherichia coli* IFO3301 injured by glycine and ethanol. Food Sci. Technol. Res. 8, 333-336.
- (10) Izumi, H., Nakata, Y., and Inoue, A. (2016) Enumeration and identification of coliform bacteria injured by chlorine or fungicide mixed with agricultural water. J. Food Prot. 79, 1789-1793.
- (11) Bundoki, M. M-C., Flanders, K. J., Donnelly, C. W. (1995) Metabolic and structural sites of damage in heat- and sanitizer-injured populations of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 58, 410-415.
- (12) Lee, S-Y., Yun, K-Y., Fellman, J., Kang, D-H. (2002) Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in mung bean sprouts by chemical treatment. J. Food Prot. 65, 1088-1092.
- (13) Bunduki, M. M.-C., Zavizion, B. A., Politis, I., and Donnelly, C.W. (1996) Virulence of culture filtrate from heat-injured and repaired *Listeria* strains: Assay on bovine mammary epithelial (MAC-T) cells. J. Food Prot. 59, 932-937.
- (14) Kang, D. H., Fung, D. Y. (1999) Thin agar layer method for recovery of heat injured *Listeria*

-
- monocytogenes*. J. Food Prot. 62, 1346-1349.
- (15) Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shaker, R. R., Al-Holy, M. M., Al-Haddaq, M. S., Olaimat, A. N., Ayyash, M. M., Al Ta'ani, M. K., Forsythe S. J. (2010) Efficacy of the thin agar layer method for the recovery of stressed *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). J. Food Prot. 73, 1913-1918.
 - (16) Wu, V.C., Fung, D. Y. (2001) Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. J. Food Sci. 66, 580-583.
 - (17) Yuste, J., Capellas, M., Fung, D. Y., Mor-Mur, M. (2004) Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. Food Res. Int. 37, 861-866.
 - (18) Inoue, A., Nakata, Y., and Izumi, H. (2017) Enumeration and identification of ethanol-injured coliform bacteria found on harvest equipment and its cross-contamination with cabbage. J. Food Nutr. Disor. 6, 1-5.
 - (19) Davey, H. M., Kell, D. B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. Microbiol. Rev. 60, 641-96.
 - (20) De Lamo-Castellvi, S., Toledo, R., and Frank, J. F. (2013) Observation of injured *E. coli* population resulting from the application of high-pressure throttling treatments. J. Food Sci. 78, M582-M586.
 - (21) Massicotte, R., Mafu, A. A., Ahmad, D., Deshaies, F., Pichette, G., Belhumeur, P. (2017) Comparison between flow cytometry and traditional culture methods for efficacy assessment of six disinfectant agents against nosocomial bacterial species. Front. Microbiol. 8 (112), 1-14.
 - (22) Alsharif, R., Godfrey, W. (2002) Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry. Microbial Cytometry Application Note. San Jose, CA, BD Biosciences, Immunocytometry Systems.
 - (23) Calabrese, J. P., Bissonnette, G. K. (1990) Improved membrane filtration method incorporation catalase and sodium pyruvate for detection of chlorine-stressed coliform bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3558-3568.
 - (24) Tandon, P., Chhiber, S., Reed R. H. (2007) The enumeration of chlorine-injured *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* is enhanced under conditions where reactive oxygen species are neutralized. Lett. Appl. Microbiol. 44, 73-78.
 - (25) Van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G., D., Mossel, D. A. (1989) Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Microbiol. 8, 299-316.
 - (26) Vicente, M. F., Perez-daz, J. C., Baquero, F., Angel de Pedro, M., Berengur, J. (1990) Penicillin-binding protein 3 of *Listeria monocytogenes* as the primary lethal target for β -lactams. Antimicrob. Agent Chemothar. 34, 539-542.
 - (27) Yu, Z., Qin, W., Fang, S., Qiu, J. (2015) Antibacterial mechanisms of polymixin and bacterial resistance. BioMed Res. Int. 2015, 1-11.

- (28) Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., Audurier, A. (2000) Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5083-5086.
- (29) Piddock, L. J., Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. (2006) Nat. Rev. Microbiol. 4, 629-636.

抄録

Comparison of thin agar layer method and flow cytometry methods for enumeration of chlorine-injured *Listeria innocua*Ayano Inoue¹, Takashi Ano², Nobuyuki Yamawaki³, Takuma Shiraki¹, Hidemi Izumi¹

Culture-based methods are often used for the enumeration of sublethally injured bacteria, while flow cytometry (FCM) can provide rapid quantitation of live, dead, and injured bacteria. In this study, the culture-based thin agar layer (TAL) method was compared with a FCM assay to enumerate chlorine-injured *Listeria innocua*, a surrogate for *L. monocytogenes*. Bacteria were injured by mixing them with diluted electrolyzed water containing 0 to 6 ppm available chlorine. In the TAL method, counts of *L. innocua* exposed to 1 to 2 ppm available chlorine were 0.6 log higher on the TAL medium than on the selective medium, indicating that 59 to 67% of the viable cells were injured by a chlorine level of 1 to 2 ppm. In comparison, the available chlorine level of 1 to 3 ppm caused sublethal injury ranging from 59 to 78% as determined by the FCM assay based on the quantitation of stained cells with both permeant DNA dye (thiazole orange: TO) and impermeant DNA dye (propidium iodide: PI), relative to live and dead cells that were stained only with TO and PI, respectively. With regard to recovery of chlorine-injured *L. innocua* after treatment with electrolyzed water, injured cells were inactivated after two hours when enumerated with the TAL method, whereas injured cells remained injured for four hours after the treatment as determined by the FCM assay. This result indicated a difference in the detection of chlorine-injured *L. innocua* between the two methods during the recovery period of injured cells.

Key words: Acidic electrolyzed water, Sanitizer-injured bacteria, *Listeria*, Thin agar layer method, Flow cytometry

1. Faculty of Science and Technology on Food Safety, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Faculty of Biotechnological Science, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Faculty of Biomedical Engineering, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

