

nisms of pathogenesis is still partial and fragmentary. Many questions remain unanswered. From a food microbiologist's point of view, a particularly interesting point is why only certain serovars of *L. monocytogenes* are associated with listeriosis and certain clones of serovar 4b are associated with epidemic episodes of this invasive disease? Answering these questions is very important in order to prevent the unnecessary recall and destruction of valuable food products. Further, as discussed in a previous section of this review, despite the significant consumption of raw fish and ready-to-eat fish products in Japan, why have these products as yet never been implicated in clinical listeriosis in humans? There is probably an important difference between the *L. monocytogenes* populations affecting humans and those found in fish products consumed in Japan. In the coming years of the new era of *Listeria* research, we will certainly witness spectacular progress in these areas and no doubt find answers to these and many other questions.

## References

- Borucki, M.K., S.H. Kim, D.R. Call, S.C. Smole and F. Pagotto. 2004. Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5270–5276.
- Brett, M.S.Y., P. Short and J. McLaughlin. 1998. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* **43**: 223–229.
- Cai, S., D.Y. Kabuki, A.Y. Kuaye, T.G. Cargioli, M.S. Chung, R. Nielsen and M. Wiedmann. 2002. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3319–3325.
- Centers for Disease Control and Prevention (2000) CDC Surveillance Summaries. *MMWR*. **49**, No. SS-1.
- Cole, M.B., M.V. Jones and C. Holyoak. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 63–72.
- Cotter, P.D., C.G.M. Gahan and C. Hill. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol. Microbiol.* **40**: 465–475.
- Davis, M.J., P.J. Coote and C.P. O'Byrne. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* **142**: 2975–2982.
- De Cesare, A., J.L. Bruce, T.R. Dambaugh, M.E. Guerzoni and M. Wiedmann. 2001. Automated ribotyping using different enzymes to improve discrimination of *Listeria monocytogenes* isolates, with a particular focus on serotype 4b strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3002–3005.
- Doumith, M., C. Cazalet, N. Simoes, L. Frangeul, C. Jacquet, F. Kunst, P. Martin, P. Cossart, P. Glaser and C. Buchrieser. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* **72**: 1072–1083.
- Drevets, D.A., P.J. Leenen and R.A. Greenfield. 2004. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 323–347.
- Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda and P. Cossart. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 587–610.
- Ericsson, H., A. Eklöv, M.-L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L.-O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad and W. Tham. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2904–2907.
- Farber, J.M. and P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476–511.
- Farber, J.M., F. Coates and E. Daley. 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letts. Appl. Microbiol.* **15**: 103–105.
- Farber, J.M., S.L. Wang, Y. Cai and S. Zhang. 1998. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. *J. Food Prot.* **61**: 192–195.
- Ferreira, A., C.P. O'Byrne and K.J. Boor. 2001. Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol, acid and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4454–4457.
- Ferreira, A., D. Sue, C.P. O'Byrne and K.J. Boor. 2003. Role of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2692–2698.
- Fraser, K.R., D. Sue, M. Wiedmann and K.J. Boor. 2003. The role of  $\sigma^B$  in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is  $\sigma^B$  dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2015–2022.
- Gahanand, C.G.M. and C. Hill. 2005. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1345–1353.
- Gasnov, U., D. Hughes and P.M. Hansbro. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 851–875.
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K.D. Entian, H. Fsihi, F.G. Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitourmam, J.M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Rimmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland and P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849–852.
- Graves, L.M. and B. Swaminathan. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **65**: 55–62.
- Handa, S., B. Kimura, H. Takahashi, T. Koda, K. Hisa and T. Fujii. 2005. Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw seafood products in Japanese retail stores. *J. Food. Prot.* **68**: 411–415.
- Hara, Y., M. Izumisawa and K. Ishii. 2003. Contamination of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Seafoods in Japan. *Jpn. J. Food Microbiol.* **20**: 63–67. (In Japanese)

- 25) Herd, M. and C. Kocks. 2001. Gene fragments distinguishing an epidemic-associated strain from a virulent prototype strain of *Listeria monocytogenes* belong to a distinct functional subset of genes and partially cross-hybridize with other *Listeria* species. *Infect. Immun.* **69**: 3972–3979.
- 26) Igimi, S. 2005. Current topics and risk management of *Listeria monocytogenes* in food. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* **46**: 237–239.
- 27) Jacquet, C., M. Doumith, J.I. Gordon, P.M.V. Martin, P. Cossart and M. Lecuit. 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.* **189**: 2094–2100.
- 28) Jeffers, G.T., J.L. Bruce, P.L. McDonough, J. Scarlett, K.J. Boor and M. Wiedmann. 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology.* **147**: 1095–1104.
- 29) Kazmierczak, M.J., S.C. Mithoe, K.J. Boor and M. Wiedmann. 2003. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* **185**: 5722–5734.
- 30) Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon and P. Cossart. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521–531.
- 31) Kokubo, Y. 1992. *Listeria monocytogenes*. *Jpn. J. Food Microbiol.* **9**: 13–22. (In Japanese)
- 32) Lecuit, M. 2005. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 430–436.
- 33) Liu, S.Q., J.E. Graham, L. Bigelow, P.D. Morse and B.J. Wilkinson. 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1697–1705.
- 34) Maiden, M.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman and B.G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3140–3145.
- 35) Makino, S.-I., K. Kawamoto, K. Takeshi, Y. Okada, M. Yamasaki, S. Yamamoto and S. Igimi. 2005. An outbreak of foodborne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 189–196.
- 36) Marquis, H., H. Goldfine and D.A. Portnoy. 1997. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **137**: 1381–1392.
- 37) McLauchlin, J., R.T. Mitchell, W.J. Smerdon and K. Jewell. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol.* **92**: 15–33.
- 38) Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin and R.V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 607–625.
- 39) Meinersmann, R.J., R.W. Phillips, M. Wiedmann and M.E. Berrang. 2004. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2193–2203.
- 40) Miller, A. 1992. Combined water activity and solute effects on the growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. *Food Prot.* **55**: 414–418.
- 41) Nadon, C.A., D.L. Woodward, C. Young, F.G. Rodgers and M. Wiedmann. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2704–2707.
- 42) Nightingale, K.K., K. Windham, K.E. Martin, M. Yeung and M. Wiedmann. 2005. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8764–8772.
- 43) Nightingale, K.K., Y.H. Schukken, C.R. Nightingale, E.D. Fortes, A.J. Ho, Z. Her, Y.T. Grohn, P.L. McDonough and M. Wiedmann. 2004. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4458–4467.
- 44) Okutani, A., Y. Okada, S. Yamamoto and S. Igimi. 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **93**: 131–140.
- 45) Okutani, A., Y. Okada, S. Yamamoto and S. Igimi. 2004. Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiol. Infect.* **132**: 769–772.
- 46) Palumbo, J.D., A. Kaneko, K.D. Nguyen and L. Gorski. 2005. Identification of genes induced in *Listeria monocytogenes* during growth and attachment to cut cabbage, using differential display. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5236–5243.
- 47) Pamer, E.G. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 812–823.
- 48) Paul, D., Cotter, P.D., S. Ryan, C.G.M. Gahan and C. Hill. 2005. Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2832–2839.
- 49) Prazak, A.M., E.A. Murano, I. Mercado and G.R. Acuff. 2002. Prevalence of *Listeria monocytogenes* during production and postharvest processing of cabbage. *J. Food Prot.* **65**: 1728–1734.
- 50) Richard, H.T. and J.W. Foster. 2003. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**: 167–186.
- 51) Robbins, J.R., A.I. Barth, H. Marquis, E.L. de Hostos, W.J. Nelson and J.A. Theriot. 1999. *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* **146**: 1333–1350.
- 52) Roche, S.M., P. Gracieux, E. Milohanic, I. Albert, I. Virlogeux-Payant, S. Témoïn, O. Grépinet, A. Kerouanton, C. Jacquet, P. Cossart and P. Velge. 2005. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6039–6048.
- 53) Rousseaux, S., M. Olier, J.P. Lamaitre, P. Piveteau and J. Guzzo. 2004. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2180–2185.
- 54) Schuchat, A., B. Swaminathan and C. Broome. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 169–183.
- 55) Schuchat, A., K. Robinson, J.D. Wenger, L.H. Harrison, M. Farley, A.L. Reingold, L. Lefkowitz, B.A. Perkins and the Active Surveillance Team. 1997. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N. Engl. J. Med.* **337**: 970–976.
- 56) Siegman-Igra, Y., R. Levin, M. Weinberger, Y. Golan, D. Schwartz, Z. Samra, H. Konigsberger, A. Yinnon, G. Rahav, N.

- Keller, N. Bisharat, J. Karpuch, R. Finkelstein, M. Alkan, Z. Landau, J. Novikov, D. Hassin, C. Rudnicki, R. Kitzes, S. Ovidia, Z. Shimoni, R. Lang and T. Shohat. 2002. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 305–310.
- 57) Sleator, R.D., C.G.M. Gahan and C. Hill. 2003. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1–9.
- 58) Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food Prot.* **65**: 709–725.
- 59) Vázquez-Boland, J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 584–640.
- 60) Walker, S.J., P. Archer and J.G. Banks. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 157–162.
- 61) Ward, T.J., L. Gorski, M.K. Borucki, R.E. Mandrell, J. Hutchins and K. Papedis. 2004. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **186**: 4994–5002.
- 62) Wernars, K., P. Boerlin, A. Audurier, E.G. Russell, G.D. Curtis, L. Herman and N. van der Mee-Marquet. 1996. The WHO multi-center study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Int. J. Food Microbiol.* **32**: 325–341.
- 63) Wiedmann, M., J.L. Bruce, C. Keating, A.F. Johnson, P.L. McDonough and C.A. Batt. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* **65**: 2707–2716.
- 64) Wing, E.J. and S.H. Gregory. 2000. An updated model of cell-mediated immunity—listeriosis: clinical and research aspects. *Allergy Asthma Proc.* **21**, pp. 209–214.
- 65) Yamazaki, K., T. Tateyama, Y. Kawai and N. Inoue. 2000. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in retail fish and processed seafood products in Japan. *Fish. Sci.* **66**: 1191–1193.
- 66) Zheng, W. and S. Kathariou. 1995. Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4°C). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4310–4314.

## ノート

## ドライアイスを用いた食卓用保冷器による魚介類の腸炎 ビブリオ増殖抑制

(平成 17 年 1 月 27 日受理)

丸山 弓美\*<sup>1</sup> 木村 凡\*<sup>1,†</sup> 藤井 建夫\*<sup>1</sup>  
徳永 宜則\*<sup>2</sup> 松林 潤\*<sup>2</sup> 相川 保史\*<sup>2</sup>

### Growth Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood by Tabletop Dry Ice Cooler

Yumi MARUYAMA\*<sup>1</sup>, Bon KIMURA\*<sup>1,†</sup>, Tateo FUJII\*<sup>1</sup>, Yoshinori TOKUNAGA\*<sup>2</sup>,  
Megumi MATSUBAYASHI\*<sup>2</sup> and Yasushi AIKAWA\*<sup>2</sup>

(\*<sup>1</sup>Tokyo University of Marine Science and Technology: 4-5-7, Konan, Minato-ku,  
Tokyo 108-8477, Japan; \*<sup>2</sup>Niitaka: 1-8-10, Niitaka, Yodogawa-ku, Osaka 532-8560,  
Japan; † Corresponding author)

Tabletop dry ice coolers (three types; dome model, cap model and tripod model), which are used in kitchens and hotel banquet halls to refrigerate fresh seafood, were investigated to determine whether growth of *Vibrio parahaemolyticus* was inhibited by their use. On TSA plates containing 1.8% NaCl and fresh seafood (fillets of squid, pink shrimp and yellowtail), *V. parahaemolyticus* (O3:K6, TDH-) inoculated at 4 to 5 log CFU/sample and left at ambient temperature (25°C) grew by 1.0 to 2.8 orders in 4 hours. In contrast, with tabletop coolers no significant increase in viable count occurred in 3 to 4 hours, confirming that tabletop coolers inhibited the growth of *V. parahaemolyticus*. The temperature in each tabletop cooler was kept below 10°C for 80 to 135 min, though the CO<sub>2</sub> gas concentration in them remained high for only a short time (0 to 75 min). It was presumed that the refrigeration function mainly contributed to growth inhibition. Our results indicate that tabletop dry ice coolers are helpful for prevention of food-borne disease due to *V. parahaemolyticus* in food-service locations, such as kitchens and banquet halls.

(Received January 27, 2005)

**Key words:** 生鮮魚介類 fresh seafood; 腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus*; 食卓用ドライアイス  
保冷器 tabletop dry ice cooler; 保冷器 tabletop cooler; ドライアイス dry ice; 冷却 refrigeration;  
二酸化炭素ガス CO<sub>2</sub> gas

#### 緒 言

旅館やホテルなどの外食産業において、魚介類を介した腸炎ビブリオ食中毒の発生事例が多くみられている<sup>1)</sup>。腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は中温性で、10°C 以下の環境下ではほとんど増殖しないが、37°C の至適温度条件下での発育世代時間が約 8 分と、短時間で活発に増殖する<sup>2)</sup>。そのため、原料汚染とともに温度管理の不備が食中毒発生要因として指摘されている。腸炎ビブリオ食中毒を防止するため、寿司および刺身などの魚介類調理品について冷蔵保存下を出てから可能な限り速やか (最大 2 時間以内) に消費するよう提言されている<sup>3)</sup>。しかし、旅館やホテルでは調理から消費されるまでに要する時間が長く、室温放置されてしまうことがある。

本研究では、生鮮魚介類の衛生管理をより徹底する手段として食卓用ドライアイス装置 (保冷器) の *V. parahaemolyticus* の増殖抑制効果について検討した。保冷器は、皿に盛られた生鮮魚介類をドライアイスを利用して冷やし、食感を保持する装置として、一部の旅館の調理場において大型冷蔵機器の代わりに、また宴会場においても喫食が遅れた場合に備えて使われている。本装置は、生鮮魚介類の保冷によって本菌の増殖を制御することが期待された。また、ガス置換包装による食品中の微生物制御に関する研究分野において、低温貯蔵に CO<sub>2</sub> 置換包装を併用すると、多くの細菌に対して増殖抑制効果が高まることが認められていることから<sup>4)~6)</sup>、本装置のドライアイスから発生する CO<sub>2</sub> ガスが本菌に対して何らかの影響を与えている可能性も考えられた。そこで本研究では、食卓用ドライアイス装置の使用によって、生鮮魚介類に付着した *V. parahaemolyticus* の増殖抑制が可能であるか調査し、さ

#### † 連絡先

\*<sup>1</sup> 東京海洋大学: 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

\*<sup>2</sup> (株)ニイタカ: 〒532-8560 大阪市淀川区新高 1-8-10

らにそのメカニズムを解明するため、冷却機能とCO<sub>2</sub>ガス保持機能について調査した。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

東京都立衛生研究所（現、東京都健康安全研究センター）から分与された食中毒患者由来である *V. parahaemolyticus* V02-36 (O3:K6, TDH 陽性株) を使用した。

### 2. 魚介類試料

生食用のイカ（アカイカ）、アマエビおよびハマチを東京都内の量販店で購入し、無菌的に約10gのフィレー状に切り、滅菌シャーレに入れて-20℃で凍結保存した。実験に供する際は、5℃下に約2時間貯蔵し、さらに室温25℃下に約20分間放置して解凍した。これらの試料は、TCBS 寒天培地（栄研）にて緑色のコロニーを形成する *Vibrio* 属菌が検出されないことを確認した上で使用した。

### 3. 菌液の調整

NaCl 3.0%を含む Trypticase Soy Broth (TSBN) 培地 (BBL) にて30℃、一晚培養した供試菌の前培養液（約9 log CFU/mL）を新しいTSBN培地を用いて段階希釈し、さらに30℃、2時間培養して得られた対数増殖期の培養液（5~6 log CFU/mL）を実験に供した。

### 4. 保冷器内の温度とCO<sub>2</sub>ガス濃度の測定

室温25℃下において、3種類の保冷器〔ドーム型、帽子型および三脚型保冷器（ニイタカ；Fig. 1）〕を発泡スチロール製の板上に静置した後、ドライアイス充てん用容器にペレットドライアイス（ドーム型および帽子型では53±1g、三脚型では30±1g充てんし、各保冷器の上部に設置した。

その直後から経時的に保冷器内の中心（底部から約3cm）の温度（5分ごと）およびCO<sub>2</sub>ガス濃度（15分ごと）を調べた。温度については、TM-150型食品用デジタル温度計（アズワン）を用い、測定部位に温度センサーを固定して測定した。またCO<sub>2</sub>ガス濃度については、1.0 mL容シリンジにより測定部位から捕集したガスに対して、G-5000A型ガスクロマトグラフ（日立）およびD-2500型クロマトデータ処理装置（日立）を用いて測定した。

### 5. TSAN 平板培地における *V. parahaemolyticus* の挙動

保冷器内での本菌の挙動を調べるために、魚介類試料のモデル系として、NaCl 1.8%を含む Trypticase Soy Agar (TSAN) 平板培地 (BBL) を用いた。TSAN 平板培地に対数増殖期の供試菌液（5~6 log CFU/mL）を100 μL接種し、塗抹した。4.と同様に室温25℃で各保冷器にド

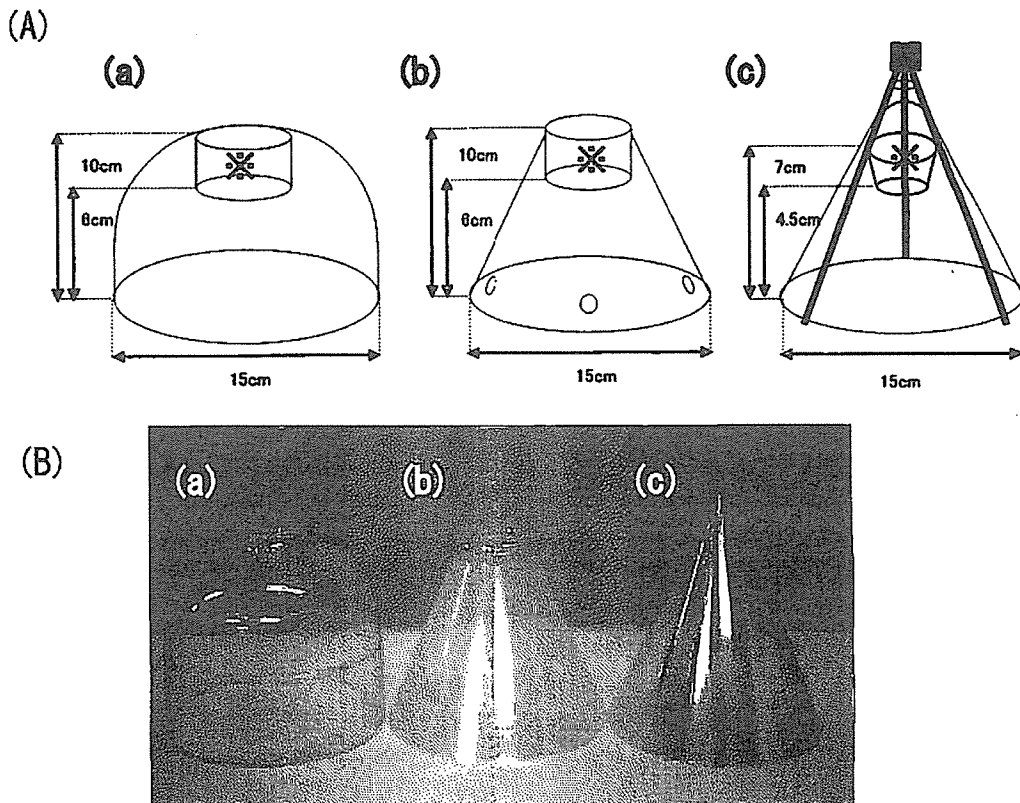


Fig. 1. Illustrations (A) and photographs (B) of tabletop dry ice coolers  
(a), dome model; (b), cap model; (c), tripod model  
The marks \* indicate the places where dry ice is placed.

ライアスを充てん後、保冷器内の中心に TSAN 平板培地をシャーレのふたを開けた状態で一定時間 (0, 2, 3, 4 時間) 放置した。また接種後の TSAN 平板培地を室温 25°C 下に保冷器を用いずに同時間放置したものを対照区とした。処理後は TSAN 培地を回収し、5 倍量の希釈水を加えホモジナイズした後、段階希釈し TCBS 寒天平板に塗抹して、25°C で 18~24 時間培養後、生菌数を計測した。以上の実験を 3 回行い、生菌数の平均値を表した。

#### 6. 生鮮魚介類における *V. parahaemolyticus* の挙動

TSAN 培地平板と同様に、魚介類試料に対し本菌を接種し、各保冷器内に一定時間 (0, 2, 3, 4 時間) 放置後、TCBS 寒天平板を用いて生菌数を計測した。予備実験では、ハマチフィレーに接種した本菌が 25°C 保存下、4 時間後に約 0.5 オーダーのみの増加にとどまったため (Fig. 3(D)), ハマチを試料として用いた場合については、増殖が促進された 4~8 時間後の間において保冷器の効果を調査した。菌液接種後、25°C に 4 時間放置したハマチに対して、各保冷器内に一定時間 (0, 2, 3, 4 時間) 放置して、TCBS 寒天平板を用いて生菌数を計測した。以上の実験を 3 回行い、生菌数の平均値を表した。

### 結果および考察

#### 1. 保冷器内の温度と CO<sub>2</sub> ガス濃度の測定

本装置の冷却機能と CO<sub>2</sub> ガス保持機能を調べるために、保冷器内部の中心温度および CO<sub>2</sub> ガス濃度を経時的に測定した。その結果、ドーム型および帽子型保冷器では、三脚型保冷器と比較して、ドライアイスの昇華が緩慢であり、10°C 以下および 40% 以上の高 CO<sub>2</sub> ガス濃度の保持時間が長かった。すなわちドーム型および帽子型保冷器内において、使用開始から 115~135 分間、10°C 以下に保持され、160~175 分後にすべてのドライアイスが昇華し、その後 30 分以内に室温 25°C に戻った。一方、三脚型保冷器内において、10°C 以下の保持時間は約 80 分間にとど

まり、約 90 分後にすべて昇華し、その後 30 分以内に室温に戻った (Fig. 2(A))。また CO<sub>2</sub> ガス濃度についても、ドーム型および帽子型保冷器では 60~75 分間ほど 40% 以上に保持されたが、三脚型保冷器では使用開始後に約 33% にいったん上昇した後、速やかに室内と同じ濃度に戻った (Fig. 2(B))。このように、低温や CO<sub>2</sub> ガスの保持しやすさに差がみられたのは、ドーム型および帽子型では、ドライアイス充てん量が 53 ± 1 g であり、装置の構造上密閉性が比較的高く、また三脚型では充てん量 30 ± 1 g であり、密閉性が低かったことが要因として考えられた。

使用開始後 0°C 以下の低温に保持された時間については、ドーム型および帽子型では 25 分間であったが、三脚型では使用開始後 -22°C 以下の大幅な温度低下が起きたため、60 分間と比較的長かった。しかし、三脚型では、CO<sub>2</sub> ガス濃度が他の保冷器よりも常に低かった。これは装置下部が、他の保冷器よりも大きく開いており、装置内での対流が起こりにくいため、CO<sub>2</sub> ガスが装置外に排出され、ドライアイスから発生した新しい冷気が常に供給されていることが考えられた。このような理由から、温度の低下と CO<sub>2</sub> ガス濃度の上昇は一致しないと考えられた。

また保冷器使用による生鮮魚介類 (ハマチフィレー) の内部温度を測定したところ、0°C 以下に達することはなく、生鮮魚介類が凍結することはなかった (非提示)。

#### 2. TSAN 平板培地における *V. parahaemolyticus* の挙動

魚介類試料のモデルとして用いた TSAN 平板培地に対して、対数増殖期の *V. parahaemolyticus* V02-36 を 4~5 log CFU/平板接種後、室温 25°C 下に放置した場合、本菌は活発に増殖し、4 時間後に約 2.8 オーダー増加した。しかし、ドーム型および帽子型保冷器を使用した場合は、本菌は 3 時間後に約 1.4, 0.5 オーダーそれぞれ減少し、4 時間後まで著しい菌数変化はみられなかった。また

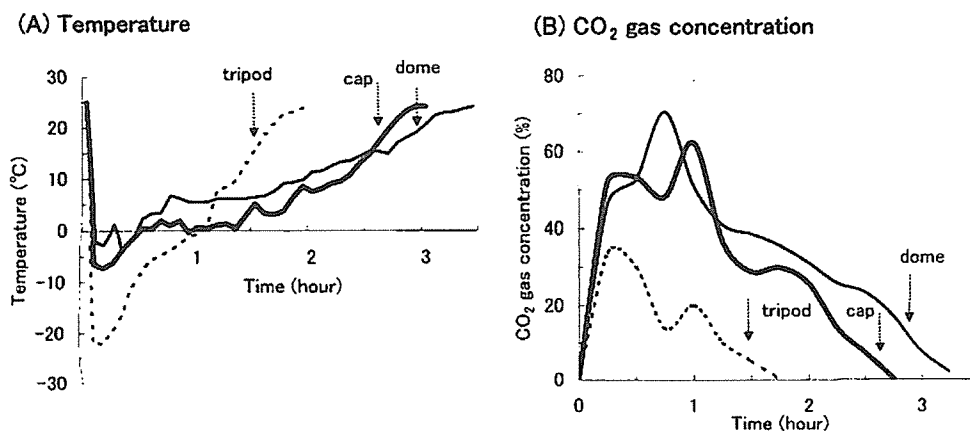


Fig. 2. Temperature (A) and CO<sub>2</sub> gas concentration (B) in tabletop dry ice coolers in locations at room temperature (25°C). Thin line, dome model tabletop cooler; thick line, cap model tabletop cooler; thin dotted line, tripod model tabletop cooler

Arrows indicate the time when all the dry ice had completely sublimated.

三脚型保冷器では、2時間後にいったん約1.0オーダー減少し、4時間後に約0.3オーダー増加したが、初期の菌数と差がみられなかった (Fig. 3(A))。これより、いずれの保冷器においても、4時間の増殖抑制効果が確認された。

### 3. 生鮮魚介類における *V. parahaemolyticus* の挙動

TSAN 平板培地において本菌の増殖抑制効果が確認されたため、TSAN 平板培地を用いた実験と同様に、実際に魚介類試料 (生食用のイカ、アマエビおよびハマチの各フィレ) に本菌を接種し、保冷器による増殖抑制効果を調べた。イカフィレに接種して、室温 25°C 下に放置した場合、本菌は4時間後に約1.0オーダー増加したが、3種類の保冷器を用いた場合、著しい菌数増加はみられず、4時間の増殖抑制効果が確認された (Fig. 3(B))。

アマエビフィレにおいて、開放下の場合、本菌は4時間後に約2.1オーダー増加した。ドーム型、帽子型および三脚型保冷器を使用した場合、3時間後まで著しい菌数増加はみられなかったが、4時間後にそれぞれ約0.4, 0.4, 0.9オーダー増加したことから、3時間までの増殖抑制効果が確認された (Fig. 3(C))。予備実験では、ハマチフィレに接種した本菌の増殖が25°C保存下で4時間後まで緩慢であり、4~8時間後の間において促進されたことか

ら、本試験では接種後4時間放置したものに対して保冷器の効果を調査した。その結果ハマチフィレにおいて室温 25°C下の場合、接種4時間後と比較して、6~8時間後に0.8~1.0オーダー増加したが、3種類の保冷器を使用した場合、6~8時間後に-0.8~0.3オーダーと著しい菌数増加がみられなかったことから、保冷器未使用の25°C, 4時間保存下を含めて、8時間の増殖抑制効果が確認された (Fig. 3(D))。

魚介類試料のうち、本菌の増殖が25°C下で活発であったアマエビフィレにおいては、保冷器の増殖抑制効果が3時間と比較的短かった。このように本菌が増殖しやすい魚介類では、保冷器内のドライアイスの昇華後、速やかに菌数増加するので注意が必要である。

本研究において、保冷器内における本菌の減少がTSAN培地上およびハマチフィレ上でみられたが、イカおよびアマエビフィレ上では増殖抑制にとどまった (Fig. 3)。これはTSAN培地平板では本菌が平板表面上に残り、本装置の低温の影響を受けやすかったことに対して、魚介類試料では表面構造が複雑で、組織が脆弱であることから、本菌がその組織内に入り込み、低温にさらされにくかったことが推測された。またハマチフィレの pH

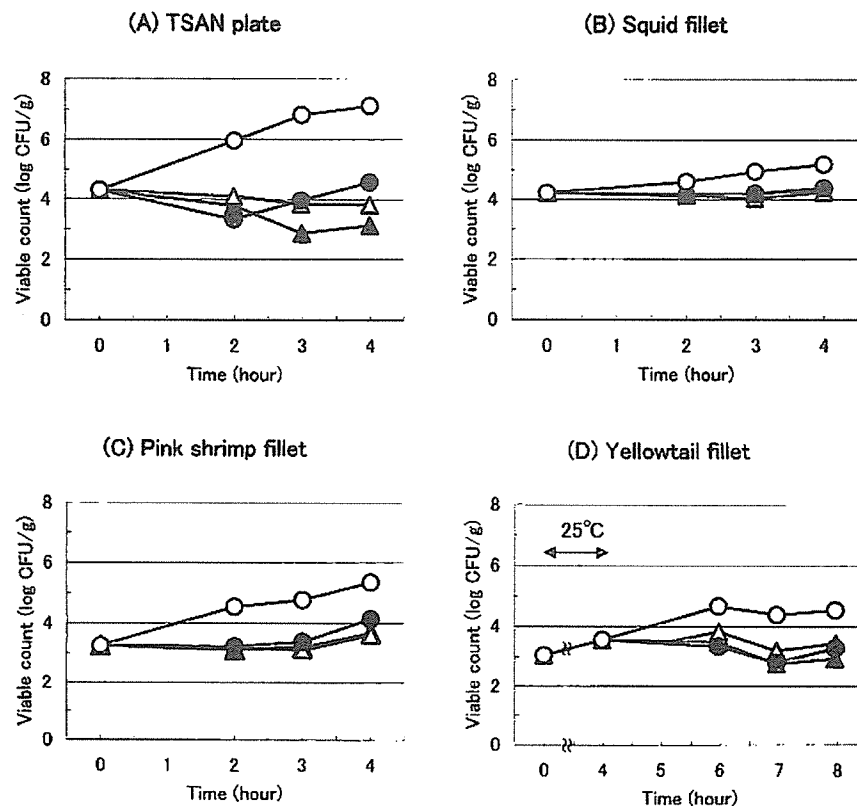


Fig. 3. Inhibition of growth of *V. parahaemolyticus* V02-36 inoculated on TSAN plate (A), squid fillet (B), pink shrimp fillet (C) and yellowtail fillet (D) in tabletop dry ice coolers in locations at room temperature (25°C)

▲, dome model tabletop cooler; △, cap model tabletop cooler; ●, tripod model tabletop cooler; ○, opened (25°C)  
The arrow in (D) indicates a period at room temperature (25°C) when the dry ice coolers were not used.  
These data are presented as mean of three experiments.

は pH 6 付近と低く、本菌の増殖環境として不適であり<sup>7)</sup>、その条件下で本装置の低温の影響を受けたため死滅したと推測された。

3 種類の保冷器の増殖抑制効果の強さにはわずかに差が見られるものの、効果の持続時間はほぼ同じであった。最初低温および CO<sub>2</sub> ガスが増殖抑制作用を示すと期待されたが、保冷器内における 40% 以上の高 CO<sub>2</sub> 濃度の保持時間は 0~75 分間と短かった。これより、本菌に対する保冷器内の CO<sub>2</sub> ガスの影響はごく小さく、保冷器の増殖抑制効果は主に低温によるものと示唆された。

#### ま と め

ドライアイスを用いた保冷器を使用することにより、魚介類に付着した *V. parahaemolyticus* に対して室温 (25℃) 下でも 3~4 時間の増殖抑制効果があることが示された。各保冷器内の温度は 10℃ 以下に 80~135 分間保持されていたが、高 CO<sub>2</sub> 濃度の保持時間が短かったことから (0~75 分間)、増殖抑制効果は主に冷却機能によるものであったと思われる。旅館、ホテルや飲食店などの調理場や宴会場において、刺身やたたきなどの生鮮魚介類の調理から消費までの時間、長時間の室温放置を防止する手段として利用することは、食品の品質保持のみならず、腸炎ヒブリオ食中毒防止に役立つであろう。

#### 謝 辞

本研究に用いた *V. parahaemolyticus* V02-36 を分与してくださった、東京都健康安全研究センターの諸角 聖、甲斐明美、尾畑浩魁先生に深く感謝いたします。また、本研究を行うに当たり協力していただいた東京海洋大学食品

微生物学研究室の畝尾規子氏、海野真由子氏に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Inspection and Safety Division Department of Food Sanitation Ministry of Health, Labour and Welfare. The epidemiological data of food poisoning in Japan 2001. Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research), 52(9), 118-203 (2002).
- 2) Katoh, H., Studies on the growth rate of various food bacteria. 1. On the generation time of *Vibrio parahaemolyticus* Fujino. Nihon Saikingaku Zasshi (Jpn. J. Bacteriol.), 20, 94-100 (1965).
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について”平成 13 年 6 月 7 日、食発第 170 号 (2001).
- 4) Farber, J. M., Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology—A review. J. Food Prot., 54, 58-70 (1991).
- 5) Kimura, B., Prevention of food spoilage and poisoning by modified atmosphere packaging. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.), 61, 91-92 (1995).
- 6) Kimura, B., Fujii, T., Effect of CO<sub>2</sub> on microbial growth. Nihon Shokuhin Biseibutsu Gakkai Zasshi (Jpn. J. Food Microbiol.), 13, 1-8 (1996).
- 7) Horie, S., Okuzumi, M., Kato, N., Saito, K., Growth of *Vibrio parahaemolyticus* on flesh of various kinds of fish and shellfish. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.), 32, 517-521 (1966).



## 調査・資料

## 各種温度条件下における微生物増殖予測プログラムの開発

(平成 18 年 3 月 22 日受理)

藤川 浩\*<sup>1,†</sup> 矢野一好\*<sup>1</sup> 諸角 聖\*<sup>1</sup>  
木村 凡\*<sup>2</sup> 藤井建夫\*<sup>2</sup>

## Development of a Predictive Program for Microbial Growth under Various Temperature Conditions

Hiroshi FUJIKAWA\*<sup>1</sup>, Kazuyoshi YANO\*<sup>1</sup>, Satoshi MOROZUMI\*<sup>1</sup>,  
Bon KIMURA\*<sup>2</sup> and Tateo FUJII\*<sup>2</sup>

(\*<sup>1</sup>Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Jpan;

\*<sup>2</sup>Tokyo University of Marine Science and Technology:  
4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Jpan;

<sup>†</sup>Corresponding author)

A predictive program for microbial growth under various temperature conditions was developed with a mathematical model. The model was a new logistic model recently developed by us. The program predicts *Escherichia coli* growth in broth, *Staphylococcus aureus* growth and its enterotoxin production in milk, and *Vibrio parahaemolyticus* growth in broth at various temperature patterns. The program, which was built with Microsoft Excel (Visual Basic Application), is user-friendly; users can easily input the temperature history of a test food and obtain the prediction instantly on the computer screen. The predicted growth and toxin production can be important indices to determine whether a food is microbiologically safe or not. This program should be a useful tool to confirm the microbial safety of commercial foods.

(Received March 22, 2006)

**Key words:** コンピュータプログラム computer program; 予測微生物学 predictive microbiology; 増殖モデル growth model; ロジスティックモデル logistic model; 変動温度 varying temperature

## 緒 言

微生物による食中毒事件および食品腐敗の発生を抑制するための手段は数多くあり、その代表的なものとしては温度、酸素濃度、水素イオン濃度、水分活性およびそれに关与する塩分・糖濃度、保存料濃度などがある。しかし、その大部分の要因はその食品自体に固有な値であり、製造・包装後の変動は少ないと考えられる。製造後変動が可能であり、しかも最も微生物増殖に大きな影響を与える環境要因として温度が挙げられる。しかも、食品への各種添加物の使用が安全性の面から控えられている現在、微生物制御を行う最も有効な手段の1つは温度管理である。したがって、食品をいかに適切な温度で製造し、流通させるかは食品の安全性を確保する上で非常に重要である。

一方、製造および流通過程で対象食品が受けた温度履歴

から、それを汚染する有害微生物の増殖を予測できれば、その予測結果から対象食品の微生物学的安全性に対する客観的な判断ができる。これまで国際的にいくつかの増殖モデルが発表され、なかでもゴンベルツモデルとバラニーモデルはよく知られている<sup>1,2)</sup>。特にバラニーモデルは最近多くの研究者によって使われているが、変動温度下での増殖にはうまく対応できない場合がある<sup>3,4)</sup>。一方、ゴンベルツモデルは数学的に変動温度には適用が困難である。

国際的にはコンピュータ上の微生物増殖プログラムとして、アメリカ農務省の Pathogen Modeling Program (<http://ars.usda.gov/service/docs.htm?docid=6786>) がよく知られ、入力したデータに対して瞬時に増殖予測結果を得ることができ、しかし、このプログラムはゴンベルツモデルなどを増殖モデルとして使っているため、変動温度には適用できない。

最近、私たちはロジスティックモデルを基本にしたモデルを新たに開発し、このモデルを新ロジスティックモデルと名づけた<sup>5)</sup>。本モデルは大腸菌、サルモネラ、黄色ブドウ

<sup>†</sup> 連絡先

\*<sup>1</sup> 東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\*<sup>2</sup> 東京海洋大学: 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

ウ球菌など各種の微生物の増殖挙動を高い精度で表すことができた<sup>4)~6)</sup>。しかも、本モデルは変動温度下の増殖を高い精度で予測することが示された<sup>4), 6), 8)</sup>。

今回、この新ロジスティックモデルを用いて、これまで発表された微生物増殖データを基に、各種の温度条件下での微生物増殖を予測するコンピュータプログラムの開発を行った。このプログラムは食品の生産・加工・流通および食品衛生行政の関係者、研究者あるいは一般消費者を対象として作られている。そのため、ユーザーに対してできる限り易しく、使いやすいように設計を心がけた。すなわち、増殖モデルに関する知識を必要とせずに簡単に必要なデータを入力でき、瞬時に対象微生物の増殖予測がコンピュータ画面上に表示されるようにした。

## 2. 開発方法

### 2.1 増殖予測モデル

増殖予測プログラムに用いる増殖モデルは私たちが最近開発したモデルを用いた。このモデルは生物個体数あるいは人口を表すためにこれまでよく用いられてきたロジスティックモデルを基本にし、それを拡張したものであるため、新ロジスティックモデルと呼ぶ<sup>4)~8)</sup>。その式を下に示す。

$$\frac{dN}{dt} = rN \left\{ 1 - \left( \frac{N}{N_{\max}} \right)^m \right\} \left\{ 1 - \left( \frac{N_{\min}}{N} \right)^n \right\}$$

ここで  $N$ : 菌数,  $t$ : 時間,  $r$ : 速度定数,  $N_{\max}$ : 最大値 (定常期菌数),  $N_{\min}$ : 最小値 (接種菌数),  $m, n$ : 調節パラメータである。

### 2.2 増殖データ

微生物増殖データはこれまでに報告された液体培地中の大腸菌増殖<sup>9)</sup>、牛乳中の黄色ブドウ球菌増殖とエンテロトキシン生成量<sup>8)</sup>、液体培地中の腸炎ビブリオ増殖<sup>4)</sup>を用いた。

### 2.3 プログラム開発方法

上記の新ロジスティックモデルは数値解法 (ルンゲクッタ法) を用いて解いた<sup>4)~8)</sup>。速度定数  $r$  は各時間での温度からアレニウスモデルあるいは平方根モデルを用いて求めた<sup>4)~8)</sup>。ブドウ球菌エンテロトキシン生成量は牛乳の受けた温度履歴データから予測した<sup>8)</sup>。

予測プログラムは表計算ソフトウェア Microsoft Excel を用いて作られた<sup>4)~8)</sup>。また、ユーザーに使いやすくなるため、Excel 中の Visual Basic Application および操作ボタンを使って自動化した。

## 3. 増殖予測プログラムの開発結果: 内容と使用手順

### 3.1 概要

本プログラムは新ロジスティックモデルを使った一般ユーザー向けの初めての増殖予測プログラムである。ユーザーは対象とする菌種および初期菌数、温度履歴を入力す

ると、その条件下での増殖予測を瞬時に行う。なお、牛乳中の黄色ブドウ球菌についてはエンテロトキシン生成量も予測できる。

温度履歴は2つの入力方法がある。1つは手動でキーボードから温度が変化するステップごとにその温度と時間を入力する方法である。もう1つはデジタル温度記録計で得られた時間-温度データを貼り付ける方法である。

### 3.2 使用手順

本プログラムの使い方を実際のコンピュータ画面で表示しながら解説する。ここでは温度履歴を手動入力する方法での操作手順を示す。

①対象とする菌種をリストボックス中の「大腸菌・黄色ブドウ球菌・腸炎ビブリオ」から選択し、次にその初期菌数を入力する (Fig. 1)。この例では、黄色ブドウ球菌 (牛乳中) を選択し、その初期菌数を 1,000 CFU/mL とした。

②温度履歴を入力する (Fig. 2)。最初に開始温度を入力し、次に各温度ステップでの時間と温度を入力する。一定温度のステップではその時間と温度を入力し、経時的な温度勾配のある場合はその温度と経過時間を入れ、「勾配を付ける」というボックスにチェックを入れる。ただし、予測適用温度の範囲は 15°C から 35°C とした。

③入力した温度履歴を確認する (Fig. 2)。「温度履歴確認」ボタンを押し、入力した温度履歴が正しいかをグラフで確認する。温度履歴曲線は赤線で示される。もし、間違っていたら②に戻って数値を入れ直し、再度「温度履歴確認」ボタンを押して確認する。

④「増殖予測」ボタンを押し、温度履歴に対応した増殖予測曲線を得る (Fig. 3)。増殖予測曲線は青い線で示される。黄色ブドウ球菌の場合はエンテロトキシンの産生予測量を得ることもできる。予測毒素量は紫色の線で示される。

⑤指定した時間での予測菌数を知る (Fig. 3)。指定した時間を入力し、「表示」ボタンを押すとその時刻における予測菌数が得られる。黄色ブドウ球菌の場合はその時刻におけるエンテロトキシンの予測産生量を知ることができる。この図では 20 時間後の値を求めた。

⑥出力した増殖予測曲線を印刷する。「グラフ印刷」ボタンを押した後、Excel の通常の操作指示に従って印刷することができる。

デジタル温度記録計などによる連続した温度データも同様に使うことができる (Fig. 4)。対象菌種とその初期菌数を入力した後、時間-温度データは右側の表に貼り付け、「増殖予測」ボタンを押す。Fig. 4 では前述した手動による場合と同じ温度データを入力した場合の予測結果を示す。

## 4. 増殖予測プログラムの活用

対象食品の微生物学的安全性は最終的には実際に微生物

\*1 関根囃子, 木村 凡, 丸山弓美, 藤井建夫: 投稿中

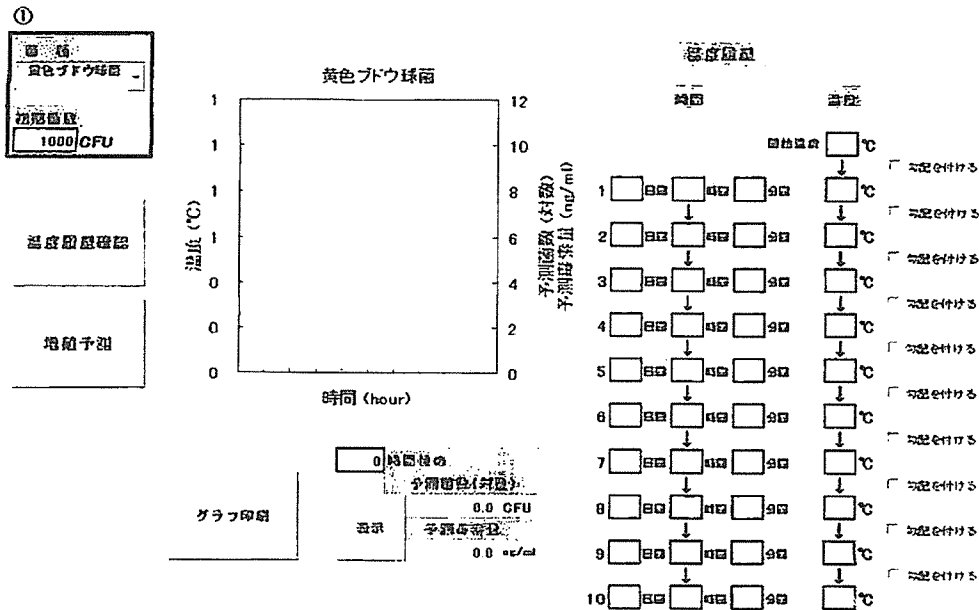


Fig. 1. Procedure-1: Input of microbial species and initial cell count  
Circled number corresponds to the number of the procedure.

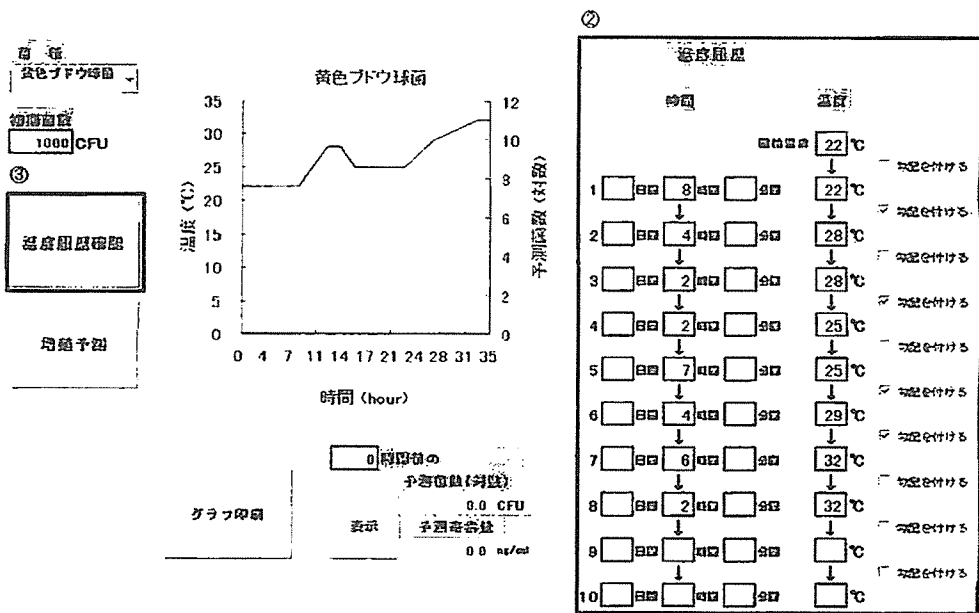


Fig. 2. Procedures-2 and 3: Input of the temperature history and its confirmation  
Circled number correspond to the numbers of the procedures.

検査をしなければ知ることはできないが、それには相当の時間と費用が必要となる。それに対して、本プログラムは微生物学的安全性を瞬時に推測する手段となりうる。それで得られた予測結果が微生物学的な許容限度を超えたかどうかでその食品あるいは工程が微生物学的に安全であったか判断できるであろう。

この許容限度は食品の変敗を対象とした一般細菌数と食中毒を起こす病原菌数とは当然その値が異なる。惣菜な

ど一般的な市販食品の細菌数は、食品の種類にもよるが概ね  $10^4 \sim 10^6$  CFU/g の範囲に入り、微生物による変敗は一般に細菌数が  $10^{7 \sim 8}$  CFU/g 以上で認められる<sup>9)~11)</sup>。実際の食品行政上の指導基準は細菌数に関して  $10^5$  あるいは  $10^6$  CFU/g としている自治体が多い<sup>12)</sup>。したがって、対象食品の細菌数に関する許容限度を、例えば  $10^6$  CFU/g とし、本プログラムによる最終予測菌数がこの値以下であれば、その工程には温度管理上の問題がなく、食品の微

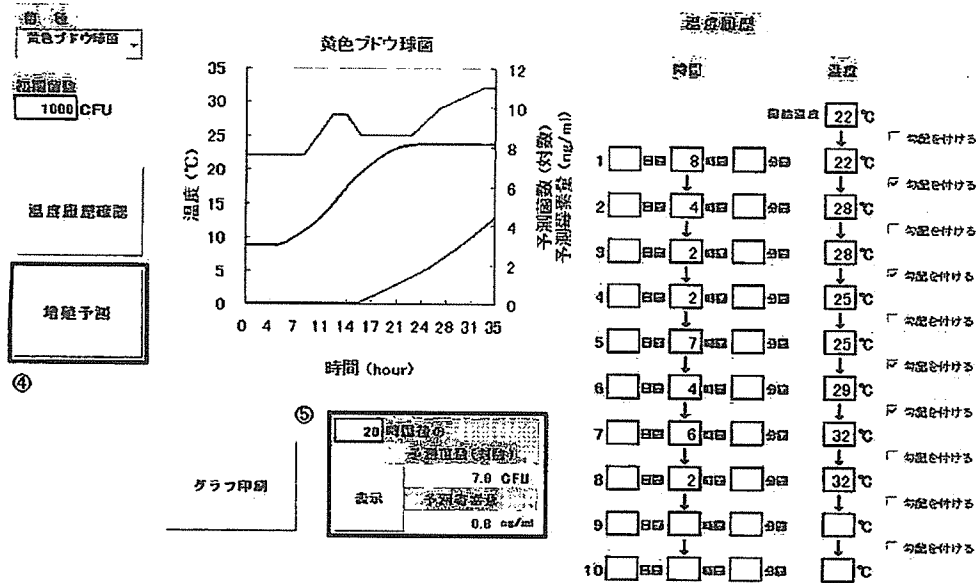


Fig. 3. Procedures-4 and 5: Implementation of growth prediction  
Circled number correspond to the numbers of the procedures.

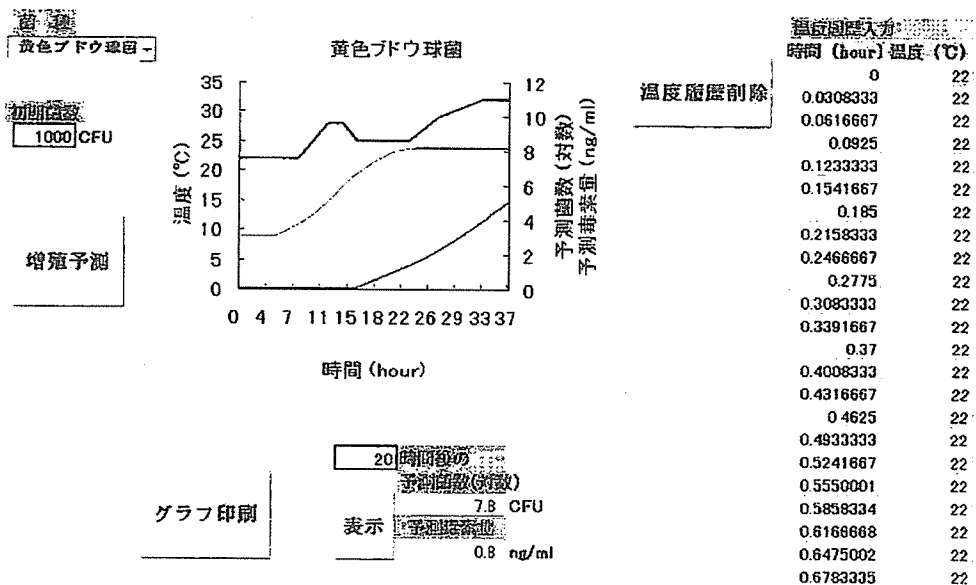


Fig. 4. Growth prediction using continuous temperature data

生物学的安全性および品質も確保されていると考えてよいだろう。

食中毒起因細菌に関しては、対象食品の初期汚染量は一般にゼロあるいは非常に低く、同時に正確な値が得られないことが多い。そのため、対象食品に関して増殖予測する際に病原微生物の初期汚染量を設定することは難しい。初期汚染量が不明であれば、その工程の温度履歴が得られても、当然最終増殖予測はできない。このような場合、筆者らの考えでは病原菌についての予測結果に明らかな増殖が認められなければ、その工程における食品の微生物学的安

全性はほぼ確保されているとしてよいだろう。例えば、ある病原菌の初期汚染量を 10 CFU/g であったと仮定し、その工程での最終増殖予測結果が 100 CFU/g 以下、すなわち 1 桁以内の増殖であればその工程の安全性は一応確保されていると考えてよいかもしれない。しかし、もっと厳しい基準であれば、増殖予測結果も 10 CFU/g であること、すなわち増殖を認めないことを要求される場合もある。この判断基準は対象微生物によっても異なるであろう。

以上のような予測結果に基づいて、その製品をそのまま

次の工程に送るか、あるいは破棄・再加工などを行うか判断できる。このようにして、本増殖予測プログラムは食品の微生物学的安全性確保のための道具として活用できると考えられる。

### 5. 今後の課題

本プログラムは前述したように一般ユーザー向けに初めて開発したものである。まだ対象菌種も3種類であり、用いた基質（食品）も液体プロセスおよび牛乳である。ただし、この3菌種はそれぞれ黄色ブドウ球菌が乳肉原材料由来の食中毒起因細菌、腸炎ビブリオが海産物由来の食中毒起因細菌、大腸菌が一般的な通性嫌気性細菌に対応している。また、著者らの大腸菌を用いた最近の実験では、栄養が十分ある環境において液体、固体表面、固体内部（あるいは包装容器内）での増殖挙動はほぼ等しかった<sup>4), 6)</sup>。したがって、今回示した増殖予測は一般の食品の各部位でほぼ当てはまるのではないかと考えられる。ただし、今後さらに多くの菌種および食品におけるデータは必要である。

また、微生物は同じ温度でも食品固有のpH、水分活性、保存料濃度などの要因によって増殖は変化する。これらの要因のとりうる範囲の値をすべて使って増殖実測をすることは不可能に近い。しかも食品のpHまたは水分活性が同一であっても、含まれる酸、塩あるいは糖の種類によって微生物の挙動は異なる。そのため、対象とする食品についてできる限り精度の高い増殖予測をするためには、実際にその食品を使った定常温度での増殖実測値が必要となる。しかし、これらの要因の濃度はその食品群ごとにそれほど変わらないことが多いので、実測データを一度得ておけば、そのデータは多方面で活用できると考えられる。

今回用いた増殖モデルはその予測可能な温度条件、すなわち温度帯、温度変化速度などについてさらに確認しておく必要がある。今回はモデル構築時に行った実験条件から10~35度の範囲を予測可能温度帯とした。一方、コンピュータプログラムは今後さらに使いやすくし、新機能を加えるなどユーザーの要望に沿った改良を行いたい。

なお、本プログラムは(財)食品産業センター (<http://www.shokusan.or.jp/haccp/>) から公開されている。

本研究は(財)食品産業センター「平成17年度食品製造工程管理情報高度化促進事業」による助成を受けた。

### 文 献

- 1) Gibson, A. M., Bratchell, N., Roberts, T. A., The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 479-490 (1987).
- 2) Baranyi, J., Roberts, T. A., McClure, P., A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.*, 10, 43-59 (1993).
- 3) Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., Mackey, B. M., Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 27, 61-75 (1995).
- 4) Fujikawa, H., Morozumi, S., Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 7920-7926 (2005).
- 5) Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi, S., A new logistic model for bacterial growth. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 44, 155-160 (2003).
- 6) Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi, S., A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiol.*, 21, 501-509 (2004).
- 7) Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi, S., Improvement of new logistic model for bacterial growth. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 45, 250-254 (2004).
- 8) Fujikawa, H., Morozumi, S., Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiol.*, 23, 260-267 (2006).
- 9) Kawabata, T., Haruta, M. eds., "Souzai No Seizou Kanri To HACCP", Tokyo. Chuo Hoki Shuppan, 1997. (ISBN 4-8058-1638-4)
- 10) Okuda, S., "Yugai Biseibutsu Kanri Gijutsu" volume 1, Shibasaki, I. ed., Tokyo. Fuji Tekuno Sisutemu, 2000. p. 80-86. (ISBN4-9385-5578-6)
- 11) Kaneko, S., "Shokuhin heno Yosoku Biseibutsugaku no Tekiyoku" Yano, N. et al. eds., p. 253-260. Tokyo. Science Forum, 1997.

# Rapid Separation and Counting of Viable Microbial Cells in Food by Nonculture Method with Bioplorer, a Focusing-Free Microscopic Apparatus with a Novel Cell Separation Unit

TOMONORI SHIMAKITA,<sup>1</sup> YOSHIKAZU TASHIRO,<sup>1</sup> AKIRA KATSUYA,<sup>1</sup> MIKAKO SAITO,<sup>2,3</sup>  
 AND HIDEAKI MATSUOKA<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Biosensing Business Project, Matsushita Ecology Systems Co., Ltd., 4017 Shimonakata, Takaki-Cho, Kasugai, Aichi 486-8522, Japan; <sup>2</sup>Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan; and <sup>3</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Honcho 4-1-8, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

MS 05-118: Received 16 March 2005/Accepted 1 August 2005

## ABSTRACT

A nonculture method utilizing a novel apparatus, the bioplorer, was developed. The bioplorer is composed of an efficient cell separation unit, a focusing-free microscopic device, and an image analysis program. A meat or vegetable suspension is poured into the cell separation funnel, and insoluble matter in the sample suspension is trapped by prefilters. Microbial cells passing through the two prefilters are then trapped by the membrane filter (pore size, 0.4  $\mu\text{m}$ ). Trapped cells are double-stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole and propidium iodide, and the membrane filter is removed and set on the focusing-free microscope. A fluorescent image is then recorded. Total numbers of viable and dead cells on the membrane filter can thus be determined automatically. One assay can be performed within 10 min, which is much faster than the culture method. The results obtained with both the nonculture method and the culture method for meat and vegetable samples were highly correlated ( $r = 0.953$  to  $0.998$ ). This method is feasible for the practical purpose of food safety control.

To protect food from contamination, it is important to detect viable microbial cells as rapidly as possible. A rapid method implies the direct counting of cells without culture, either in liquid or on solid media, and may be referred to as a nonculture method (NCM) as opposed to a conventional culture method (CM) based on counting colonies on an agar plate. The NCM is based on various indicators of living cells such as cell membrane permeability (5, 8, 11), intracellular esterase activity (4), microscopic changes in cell shape (9), respiratory activity (5, 9), and nutrient uptake (1, 7, 15). Dyes that allow visualization of these indicators are now commercially available.

This study was focused on the permeability of the cell membrane to ionic dyes, which is not equivalent to cell viability but can be used as a practical indicator of it. Propidium iodide (PI) is an ionic dye used for this purpose because this dye can permeate the damaged cell membrane and combine with DNA to form a fluorescent compound. Therefore, PI can detect only dead cells. 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) is a nonionic dye used to stain DNA. Because DAPI can permeate intact and damaged cell membranes, it can make both viable and dead cells fluorescent. Therefore, the combined use of PI and DAPI enables the enumeration of both viable and dead cells.

When dealing with clean samples containing only microbial cells, an NCM based on fluorescent staining is useful and reliable; successful applications already have been

reported (6, 13). However, a NCM cannot be regarded as reliable for food samples because these samples contain various unidentified compounds that may cause pseudopositive or pseudonegative signals.

Another problem to consider when using a NCM is the need for a fluorescent microscope. Microscopic observation requires careful focusing and image scanning, and such time-consuming and labor-intensive operations are unsuitable for frequent use. Therefore, more rapid and less labor-intensive techniques are essential for practical applications.

To overcome these problems, we devised a smart apparatus, the bioplorer, which is composed of an efficient cell separation unit (CSU), a focusing-free microscopic device (FFM), and image analysis software. Here, we describe the specifications of this novel apparatus and its successful application for the rapid counting of viable cells in food samples.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** The feasibility of the bioplorer NCM was evaluated in two stages. First, we determined whether the bioplorer NCM could produce the same cell count as the conventional agar plate CM independent of species. For this purpose, we selected typical examples of gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts from among those often encountered in food safety screenings. Species tested were *Escherichia coli* NBRC 3301, *Staphylococcus aureus* NBRC 12732, *Enterobacter intermedius* ATCC 33110, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Klebsiella pneumoniae* NBRC 14940, *Bacillus subtilis* NBRC 3023, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275, *Salmonella* Enteritidis IFO 3315, *Candida*

\* Author for correspondence. Tel: +81-42-388-7029; Fax: +81-42-387-1503; E-mail: bio-func@cc.tuat.ac.jp.

TABLE 1. Applicability of the bioplorer NCM to analysis of various food samples

Sample	SC <sup>a</sup>	FP <sup>b</sup>	RFC <sup>c</sup>	BNCM <sup>d</sup>	SR <sup>e</sup>
<b>Refreshing drinks</b>					
Water, mineral water	L	○	○	○	GF
Cola, soda	L	○	○	○	GF
Carbonated drinks	L	×	×	×	GF
Juice	L	×	×	×	
Tea	L	△	×	×	
Coffee	L	×	×	×	
<b>Milk-based drinks</b>					
Milk	L	×	×	×	
Lactic acid drink	L	○	○	○	
<b>Alcoholic drinks</b>					
Japanese sake	L	○	○	×	GF
Beer	L	△	○	△	GF
<b>Meats</b>					
Beef	S	○	○	○	
Pork	S	○	○	○	
Chicken	S	○	○	○	
Gyoza	S	○	○	○	
<b>Vegetables</b>					
Cabbage	S	○	○	○	
Lettuce	S	○	○	○	
Cut vegetables	S	○	○	○	
Flour	S	○	○	○	
Mushrooms	S	○	○	○	
Radish sprouts	S	○	○	○	
Bean sprouts	S	○	○	○	
<b>Seafoods</b>					
Fish	S	○	○	○	
Oysters	S	×	×	×	
<b>Dairy products</b>					
Butter	S	×	○	×	
Margarine	S	○	×	×	
Yogurt	L	○	○	○	
<b>Grains</b>					
Rice	S	○	○	○	
Boiled rice	S	×	○	×	
Noodles	S	○	○	○	
Buckwheat noodles	S	○	○	○	
<b>Seasonings</b>					
Salt	S	○	○	○	
Powdered soy sauce	S	○	×	×	
Syrup	L	○	○	○	

<sup>a</sup> Sample condition: L, liquid; S, solid.

<sup>b</sup> Filtration possibility: ○, possible; ×, impossible; △, depending upon sample conditions.

<sup>c</sup> Removal of fluorescent contamination: ○, can be removed; ×, cannot be removed.

<sup>d</sup> Bioplorer NCM: ○, possible; ×, impossible; △, depends upon sample conditions.

<sup>e</sup> Special requirement: GF, germ-free condition is required.

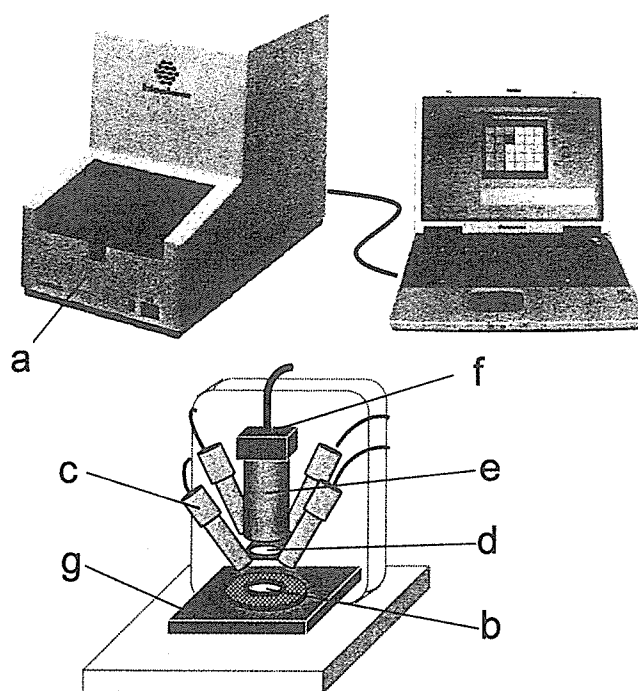


FIGURE 1. Schematic diagram of the bioplorer. (a) Appearance; (b) cell trap membrane filter; (c) UV and green light-emitting diodes; (d) absorption filter; (e) objective lens; (f) charge-coupled device; and (g) XY-automatic stage.

*albicans* NBRC 1594, and *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0555. Standard method agar (Nissui Seiyaku, Tokyo, Japan) was used for the colony count CM. In this first stage, water samples spiked with one of the above species were used.

The second stage focused on whether the bioplorer NCM is applicable to naturally occurring bacteria in actual food samples. Among the materials that were applicable to the bioplorer NCM without pretreatment for cell separation (Table 1), we selected meats (beef, pork, chicken, and fish), vegetables (cabbage, lettuce, and radish sprouts), and grain (rice) for further quantitative comparison with the agar plate CM. At this stage, no spike test was performed. Meats, vegetables, and rice were purchased fresh from the market and were not cooked or processed. Based on preliminary experiments, we determined the proper dilution conditions such that the range of cell concentration was  $10^2$  to  $10^5$  cells per ml.

DAPI and PI were obtained from Wako Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan). Other reagents were of commercially available analytical grade.

**Spike test.** Each species was cultured on standard agar medium at  $36^\circ\text{C}$  for 24 h, and a single colony was selected and suspended in physiological saline. Cells were then diluted in distilled water to give the prescribed concentrations. Spiking tests were performed only with these water samples.

**Optical system.** A schematic diagram of the bioplorer is given in Figure 1. The optical system is composed of two sets of light-emitting diodes and filters. One set is for DAPI and comprises four UV light-emitting diodes, a 375-nm excitation filter, and a 435- to 580-nm absorption filter. The other set is for PI and comprises four green light-emitting diodes, a 525-nm excitation filter, and a 580- to 650-nm absorption filter. The excitation light source is illuminated for 6 s through the excitation filter on the cell trap membrane filter of the CSU. The fluorescent light emitted

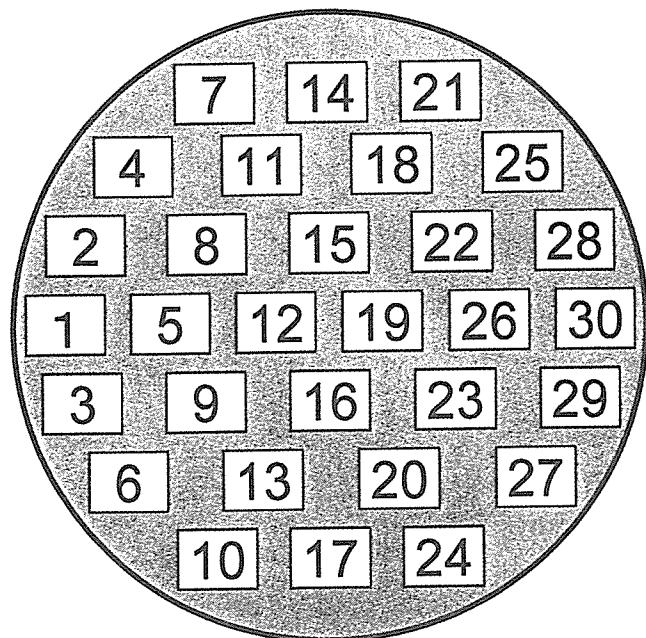


FIGURE 2. Cell counting area of a cell trap membrane filter.

from 1 of 30 sections (Fig. 2) of the cell trap membrane filter passes through an objective lens and an absorption filter and is projected onto a charge-coupled device. Under these conditions, one pixel of the charge-coupled device corresponds to 1.8 by 1.6  $\mu\text{m}^2$  on the cell trap membrane filter. All 30 sections were scanned automatically, and fluorescent spots in each section were counted.

**CSU.** The CSU is composed of three parts (Fig. 3). The top part is a funnel with two prefilters (unwoven nylon cloth and cellulose membrane). The unwoven nylon cloth is 9 mm in diameter, and the cellulose membrane is 9 mm in diameter and has an 8- $\mu\text{m}$  mesh size. These prefilters are vital for the efficient trapping of fluorescent contaminants and other large particles. The middle part is a cell trap membrane filter 9 mm in diameter with a 0.45- $\mu\text{m}$  pore size. This membrane is coated with gold by ion sputtering to ensure a clean surface, free from fluorescent background. The prefilters facilitate uniform cell distribution for the cell trap membrane filter. The bottom part is a needle that allows for convenient one-touch thrust into the rubber plate of a suction unit.

**Image analysis program.** The image analysis program was developed by Matsushita Ecology Systems Co., Ltd. The cell counting area is 30 sections (Fig. 2). Total area is 50% of the whole membrane area. Each fluorescent spot is registered as a microbial cell when its intensity exceeds the lowest intensity limit and its size is smaller than the largest spot size limit. The lowest light intensity limit was adjusted to ensure that the bioplorer NCM results agreed with those of direct microscopic observation. For this adjustment, we used water samples spiked with each of the test strains at various concentrations. The size limit of the largest spot was determined based on a database produced from comparative CM studies of various practical samples. Spots larger than 30 pixels were excluded from the cell count.

The number of DAPI-fluorescent microbial cells ( $N_{\text{DAPI}}$ ) corresponds to the total number of living and dead cells, whereas the number of PI-fluorescent microbial cells ( $N_{\text{PI}}$ ) corresponds to the number of dead cells. Therefore, the number of living cells is given by  $N_{\text{DAPI}} - N_{\text{PI}}$ .  $N_{\text{DAPI}}$  and  $N_{\text{PI}}$  were determined for all 30 sections per membrane. Therefore, the total numbers of viable and

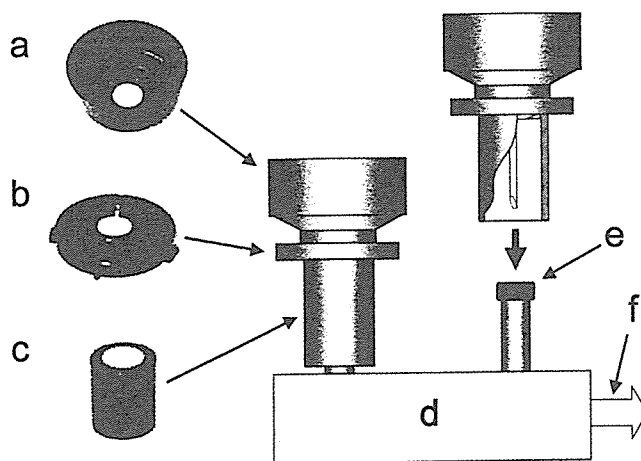


FIGURE 3. Cell separation unit (CSU). (a) Funnel with prefilters; (b) cell trap membrane filter; (c) base with a needle; (d) suction unit; (e) silicon rubber cap; and (f) to a suction line.

dead cells per membrane are respectively given by the following formulas:

$$2 \times \sum_{i=1}^{30} (N_{\text{DAPI}} - N_{\text{PI}})_i \quad \text{and}$$

$$2 \times \sum_{i=1}^{30} (N_{\text{PI}})_i.$$

Numbers of both viable and dead cells on the respective membranes are displayed and saved for later use.

**Preparation of test cell suspensions.** Raw meat or raw vegetable (10 g of solid matter) was suspended in 90 ml of physiological saline and transferred into a stomacher bag (a plastic bag with a mesh filter at the nozzle). The bag was agitated at 8 strokes per s for 30 s. The contents of the bag were then poured out through the mesh filter. The resultant suspension was diluted with physiological saline from 100 to 100,000 times to prepare test cell suspensions. These test cell suspensions were assayed by both the bioplorer NCM and the standard agar colony count CM.

For the bioplorer NCM assay, the cell suspension (1 ml) was directly transferred into the CSU funnel. For the CM, the cell suspension (0.1 ml) was spread onto a standard agar plate and incubated at 36°C for 24 or 48 h.

**Cell trapping and staining.** The CSU was placed on a suction unit such that the needle of the CSU pierced the rubber plate (Fig. 3). One hundred microliters of Tween 80 (0.1%, vol/vol) was added onto the prefilter to improve filterability. One milliliter of cell suspension was added to the CSU and filtrated by suction, and the prefilter was then washed with 3 ml of physiological saline. The funnel was removed, and 100  $\mu\text{l}$  of solution containing DAPI (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and PI (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was placed on the membrane filter. After incubation for 2 min, the dye solution was removed by suction from below. Another 100  $\mu\text{l}$  of DAPI (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added onto the membrane filter to compensate for the relatively weak staining of DAPI compared with PI. The DAPI solution was removed immediately by suction from below. Finally cells were rinsed with 0.1 ml of saline.

## RESULTS

**Applicability of the bioplorer NCM for various foods.** When a sample can be filtered and fluorescent contamination can efficiently be removed, the sample can be



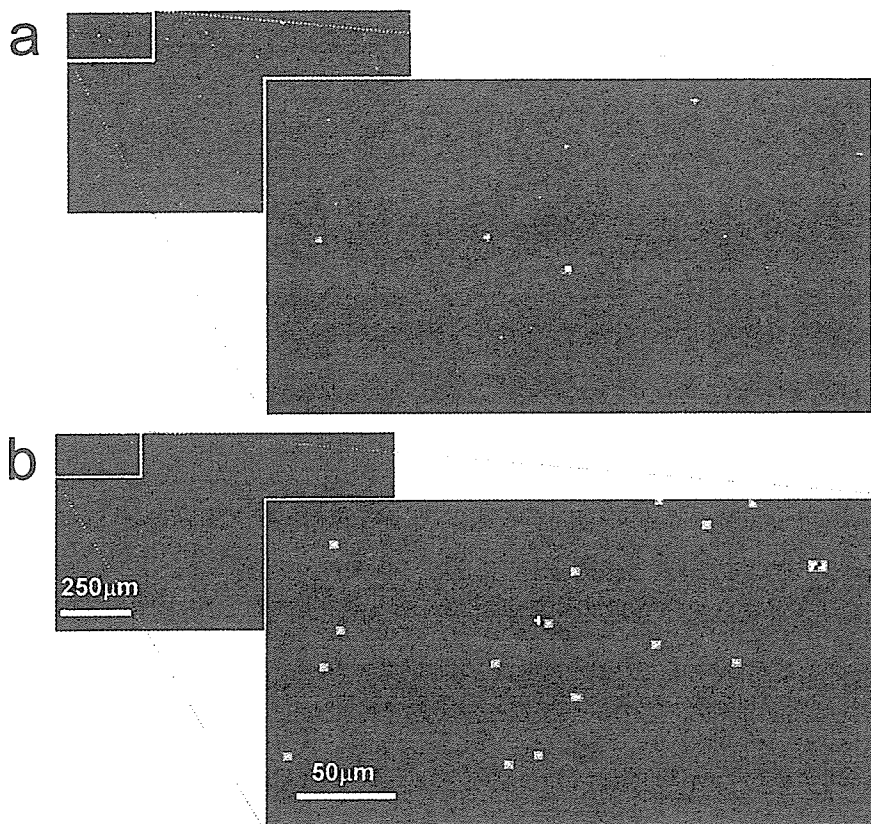


FIGURE 4. Fluorescent images of DAPI-stained *E. coli* cells from a water sample spiked with *E. coli*. When a fluorescent spot satisfies the criteria of light intensity limit and spot size, the spot is intensified by the image processing program. (a) Before image processing; (b) after image processing.

assayed by the bioplorer NCM. Table 1 summarizes the results for 33 types of food and drink. For each type, we tested 5 to 50 brands, and raw samples were used throughout. A total of 21 types of food and drink were applicable to the bioplorer NCM, including meats and vegetables. For

some items, some brands could be assayed with the bioplorer NCM but others could not, e.g., beer. In such cases, evaluation depended on sample conditions.

**Fluorescent image of microbial cells.** Spiked water samples cause no particular problems with fluorescent background, but food samples often contain many fluorescent contaminants that cannot completely be removed by CSU. This problem was solved with the image analysis program.

An aliquot of meat sample was applied to the bioplorer, and the fluorescent image of the trapped cells was displayed on a monitor. Figure 4a shows an image of bacteria before image processing; many fluorescent spots with irregular shapes are visible. After image processing, only the spots that satisfy the criteria of light intensity and spot size are designated as discrete spots (Fig. 4b).

Figure 5 shows a pair of DAPI-stained (Fig. 5a) and PI-stained (Fig. 5b) images of the same meat sample. Those cells that emitted fluorescence in both images (indicated by arrows) were considered dead cells, whereas those that emitted fluorescence only in Figure 5a were regarded as viable cells. These results indicate that the numbers of viable and dead cells can be determined simultaneously.

**Number of viable microbial cells in water spiked with test species.** The bioplorer NCM was applied to test sample suspensions containing only one species. Aliquots of distilled water were spiked with the prescribed number of test species. The number of viable cells determined by the bioplorer NCM was plotted against the number of colonies determined by CM (Fig. 6a). The results of these two methods were highly correlated. In the same manner, sam-

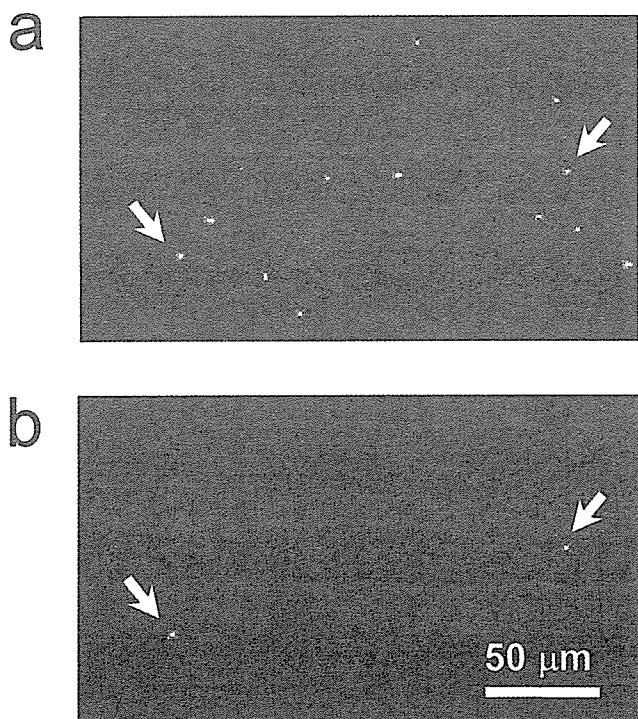
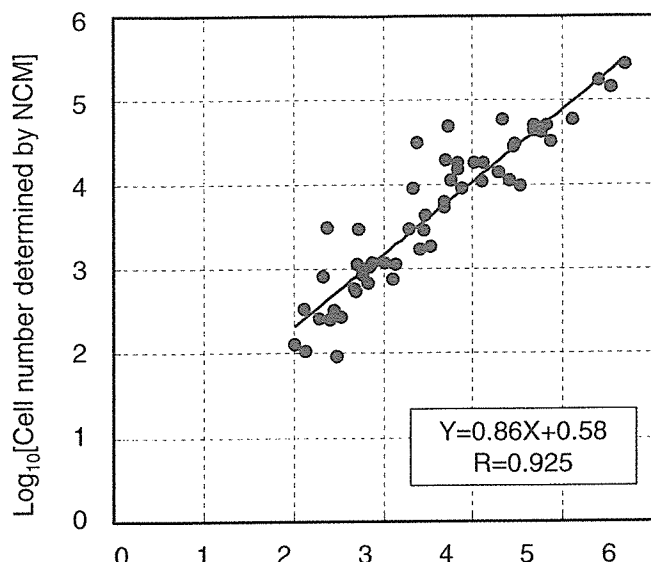
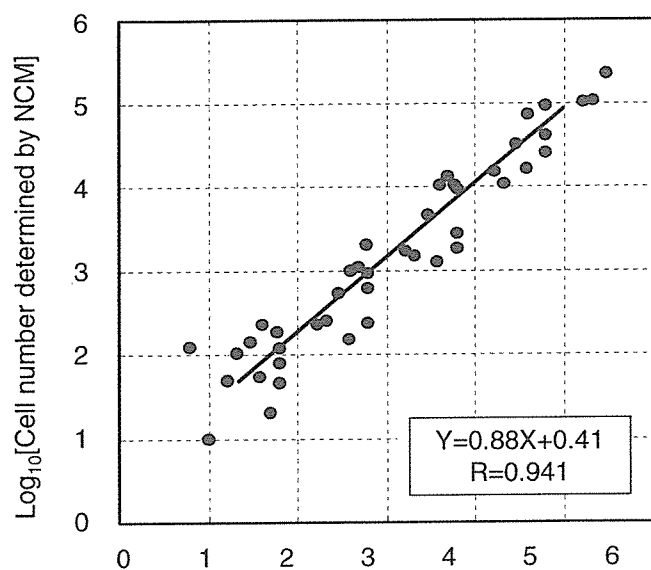
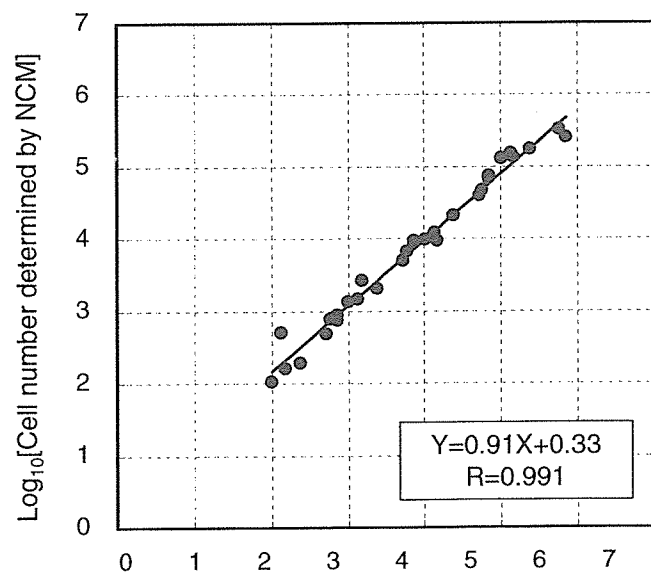


FIGURE 5. Fluorescent images of DAPI-stained (a) and PI-stained (b) cells separated from beef. Arrows indicate dead cells, which were stained with both dyes.

a  $\text{Log}_{10}[\text{Cell number determined by CM (cfu/ml)}]$ b  $\text{Log}_{10}[\text{Cell number determined by CM (cfu/ml)}]$ c  $\text{Log}_{10}[\text{Cell number determined by CM (cfu/ml)}]$ TABLE 2. Correlations of numbers of microbial cells as determined with the bioplorer NCM (direct count) and CM (plate count) for water samples spiked with various microbial strains<sup>a</sup>

Strains	Correlation coefficients	
Gram-negative species		
<i>Escherichia coli</i>	$Y = 0.86X + 0.58$	$r = 0.925$
<i>Salmonella</i> Enteritidis	$Y = 0.88X + 0.39$	$r = 0.941$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$Y = 0.97X + 0.25$	$r = 0.999$
<i>Enterobacter intermedius</i>	$Y = 0.85X + 0.15$	$r = 0.994$
<i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 0.96X + 0.35$	$r = 0.989$
<i>Proteus vulgaris</i>	$Y = 0.89X + 0.06$	$r = 0.998$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$Y = 1.14X - 0.34$	$r = 0.967$
Gram-positive species		
<i>Bifidobacterium</i> species	$Y = 1.07X + 0.10$	$r = 0.996$
<i>Lactobacillus</i> species	$Y = 0.89X + 0.54$	$r = 0.993$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 0.91X + 0.33$	$r = 0.991$
<i>Bacillus subtilis</i>	$Y = 0.98X$	$r = 0.994$
Yeasts		
<i>Candida albicans</i>	$Y = 0.40X$	$r = 0.995$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$Y = 1.60X$	$r = 0.950$

<sup>a</sup> For all strains, number of cells per membrane ranged from  $10^2$  to  $10^5$ .

ples containing other species were assayed using both methods (Fig. 6b and 6c and Table 2), and the results were highly correlated.

Therefore, the bioplorer NCM and agar plate colony count CM were designated as giving equivalent results with clean samples containing only microbial cells.

**Number of viable microbial cells collected from meats and vegetables.** The performance of the bioplorer NCM was investigated with food samples that contained unidentified contaminants. The numbers of living cells determined with the bioplorer NCM and the CM were closely correlated (Fig. 7a). Similar results were obtained with lettuce samples (Fig. 7b).

The number of viable cells determined with the bioplorer NCM was correlated with the results for the CM, which indicates that insoluble contaminants were removed effectively by the CSU prefilters and that potential fluorescent contaminants had no effect on counts for the bioplorer NCM. Linear relationships and high correlation coefficients were also obtained for several other meat and vegetable samples (Table 3).

## DISCUSSION

The use of a membrane filter and prefilter for rapid collection of microbial cells from food samples has been described previously (3, 10, 14). Pettipher and Rodrigues

←

FIGURE 6. Correlations of microbial cell numbers determined with the bioplorer NCM (direct count) and the CM (plate count). Water samples were spiked with *E. coli* (a), *Salmonella* Enteritidis (b), and *S. aureus* (c). For the CM, cultures were incubated for 24 h at 36°C.

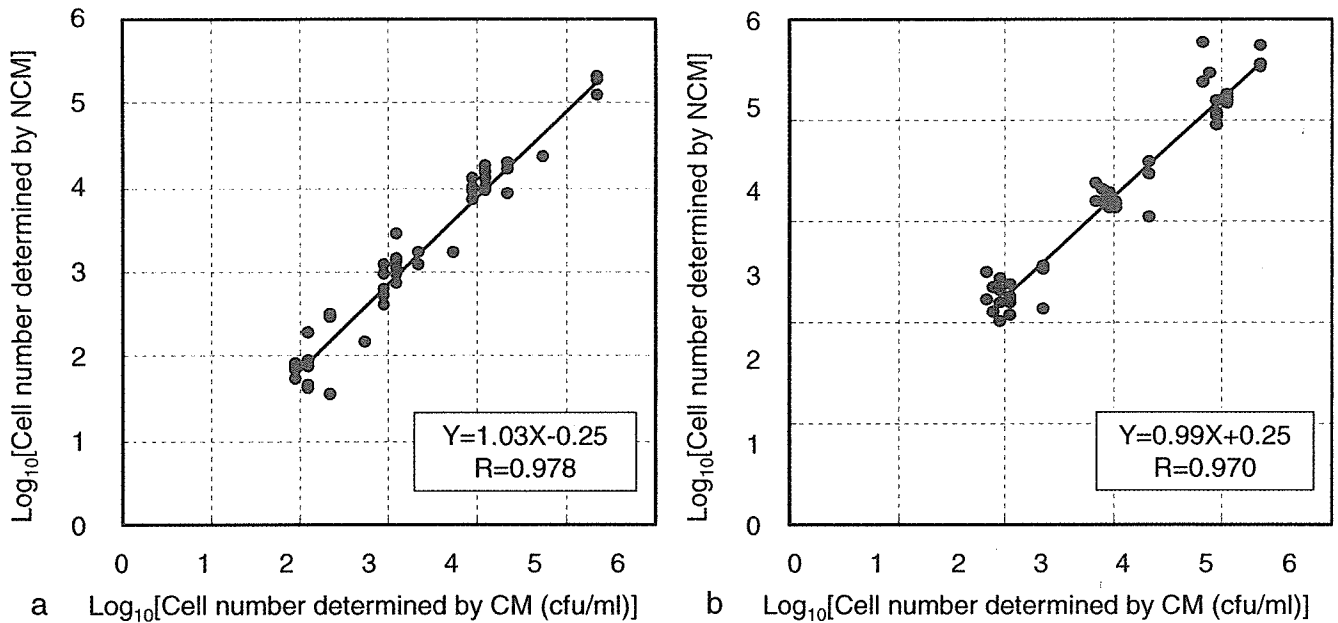


FIGURE 7. Correlations of microbial cell numbers determined with the bioplorer NCM (direct count) and the CM (plate count). Food samples contained naturally occurring microbial cells. (a) Beef; (b) lettuce. For the CM, cultures were incubated for 48 h at 36°C.

(10) reported the rapid count of microorganisms in foods by the NCM based on fluorescent dye staining and microscopic observation. Another pretreatment method was the use of alkaline protease in a meat sample to facilitate membrane permeation (14). As a result, a close correlation was obtained between the NCM and the CM with certain food samples. Despite these pioneering studies, a more convenient method or device that can be applied to various other food and drink samples was required. Nonspecific fluorescent background has been a particularly difficult problem to overcome. However, the apparatus developed in the present study has solved this problem and satisfies the requirement of wide applicability.

A comparison of the bioplorer NCM and CM results for meat revealed that the number of cells determined by the bioplorer NCM tended to be higher than that determined by the CM. One of the reasons for this difference might be the influence of viable but nonculturable cells (VNC) (2, 4,

TABLE 3. Correlations of numbers of microbial cells as determined with the bioplorer NCM (direct count) and CM (plate count) for naturally contaminated meats and vegetables<sup>a</sup>

Samples <sup>b</sup>	Correlation coefficients
Beef	$Y = 1.03X - 0.25, r = 0.978$
Pork	$Y = 1.15X - 0.28, r = 0.995$
Chicken	$Y = 1.18X + 0.60, r = 0.998$
Cabbage	$Y = 0.89X + 0.10, r = 0.982$
Lettuce	$Y = 0.99X + 0.25, r = 0.970$
Radish sprouts	$Y = 0.97X - 1.33, r = 0.997$
Rice	$Y = 0.81X + 0.56, r = 0.954$
Fish	$Y = 1.21X + 0.01, r = 0.902$

<sup>a</sup> For all sample types, the number of microbial cells per membrane ranged from  $10^2$  to  $10^5$ .

<sup>b</sup> Stomacher-treated filtrates were diluted 100-fold and then assayed.

8). VNC may be counted as viable cells by the NCM because the cell membrane properties of VNC more closely resemble those of viable cells than of dead cells. In contrast, VNC do not form colonies under typical culture conditions and thus are not counted as viable cells by the CM. (6)

Considering the principle of the NCM, it is not surprising that differences were seen in the number of cells determined with the two methods. Different NCM techniques will not necessarily coincide because the indicators used for different NCM techniques reflect different aspects of the live state, i.e., a highly vital state or a seriously wounded state.

For practical application of the NCM, conditions under which the NCM results are highly correlated with those of CM were identified. Very close correlation between results for both methods was observed for counts of microbial cells from meats and vegetables. Insoluble matter inevitably contaminates homogenates of food samples, but such contaminants were efficiently eliminated by the CSU. The number of VNC in these samples is likely to be small. Therefore, the bioplorer is useful for the rapid detection of microbial contamination in meat and vegetable samples.

#### ACKNOWLEDGMENTS

H. Matsuoka acknowledges support from a Grant-in-Aid for Scientific Research, Scientific Research of Priority Areas 736: Single-Cell Molecular Technology, MEXT. This work was partially supported by the knowledge developed in the research project "High Throughput Creation of Disease Model Cells and the Analysis of Their Function," which was funded by CREST of the Japan Science and Technology Agency.

#### REFERENCES

1. Achilles, J., S. Muller, T. Bley, and W. Babel. 2004. Affinity of single *S. cerevisiae* cells to 2-NBD glucose under changing substrate concentrations. *Cytometry* 61A:88–98.
2. Bunthof, C. J., and T. Abee. 2002. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2934–2942.

3. Entis, P., M. H. Brodsky, A. N. Sharpe, and G. A. Jarvis. 1982. Rapid detection of *Salmonella* spp. in food by use of the ISO-GRID hydrophobic grid membrane filter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:261–268.
4. Kawai, M., N. Yamaguchi, and M. Nasu. 1999. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.* 86:496–504.
5. Laflamme, C., S. Lavigne, J. Ho, and C. Duchaine. 2004. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *J. Appl. Microbiol.* 96:684–692.
6. Lepeuple, A.-S., S. Giloupe, E. Pierlot, and M.-R. de Roubin. 2004. Rapid and automated detection of fluorescent total bacteria in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* 92:327–332.
7. Matsuoka, H., K. Oishi, M. Watanabe, I. Kozone, M. Saito, and S. Igimi. 2003. Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2459–2462.
8. Oda, M., M. Morita, H. Unno, and Y. Tanji. 2004. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:527–534.
9. Ogawa, M., K. Tani, N. Yamaguchi, and M. Nasu. 2003. Development of multicolour digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. *J. Appl. Microbiol.* 95:120–128.
10. Pettipher, G. L., and U. M. Rodrigues. 1982. Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:809–813.
11. Queric, N. V., T. Soltwedel, and W. E. Arntz. 2004. Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria. *J. Microbiol. Methods* 57:351–367.
12. Raymond, L., J. R. Keoner, and J. R. Pratt. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.* 58:603–615.
13. Sunamura, M., A. Maruyama, T. Tsuji, and R. Kurane. 2003. Spectral imaging detection and counting of microbial cells in marine sediment. *J. Microbiol. Methods* 53:57–65.
14. Walls, I., J. J., Sheridan, R. W. Welch, and D. A. McDowell. 1990. Separation of micro-organisms from meat and their rapid enumeration using a membrane filtration–epifluorescent microscopy technique. *Lett. Appl. Microbiol.* 10:23–26.
15. Yoshioka, K., H. Takahashi, T. Homma, M. Saito, K.-B. Oh, Y. Nemoto, and H. Matsuoka. 1996. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1289:5–9.