

平成18年度農林水産省  
食品製造工程管理  
情報高度化促進事業

平成18年度  
病原微生物データ分析実験作業  
成果報告書

「食中毒細菌バイオフィルムの加熱殺菌に関する実験」

平成19年2月  
国立大学法人 北海道大学  
森川 正章 教授

## 1. 背景および目的

2000年6月から7月にかけて各地で猛暑が連日続く中、過去最大規模となる有症者数14,780名の集団食中毒事件が発生した。原因は、低脂肪乳であったが、その原料となる脱脂粉乳を生産していた工場の生産設備で停電が発生し、黄色ブドウ球菌が増殖して製品に毒素（エンテロトキシン A）が混入したことが直接の原因と推定されている [1]。調査委員会の最終報告書には「生乳の加温からクリーム分離、冷却の過程で、通常は数分間で冷却工程に送られるべきものが、20～50℃に加温された状態で約4時間にわたって滞留し、最初の停電復旧後、廃棄されずに停電前後の脱脂乳とともに貯乳タンクに貯乳され、そのまま脱脂粉乳の製造に使用された可能性があることが立ち入り検査の再現作業において示唆された。」と記載されている。ここで注意したいのは「さらに汚染源については、調査の過程においては、明らかとなっていないが、ライン乳タンク冷却器のプレートの組み違いにより生じたデッドスペースにおいて、停電当日の早朝にライン乳が操作ミス等で冷却器内に数時間滞留していたとの情報もあり、当該ラインの開放部分から汚染されたデッドスペース内容物の汚染を受けたおそれもある。しかし、130℃、4秒以上の殺菌が通常どおりが行われていれば黄色ブドウ球菌の汚染源と考えるのは難しく、黄色ブドウ球菌の汚染源と考えるのは問題もある。」という記述の部分である。すなわちデッドスペースではライン乳が滞留しやすいため自浄作用が少なく細菌バイオフィームが形成され易く、浮遊細胞では完全に死滅するはずの殺菌条件処理後においてもバイオフィーム内の細胞の一部が死滅せずに生存していた可能性がある。

このような惨事を引き起こす要因となったと予想される病原性細菌バイオフィームは、臨床医学分野においても数々の問題が指摘されている。例えば、血管や尿道などに挿入されたカテーテル内壁で形成されたバイオフィームが原因となって様々な疾病を引き起こすことが知られている。また、臓器移植や白血病などの治療で免疫抑制剤を使用している患者では、日和見細菌感染症（緑膿菌など）に罹患するリスクが高くなる。緑膿菌は気管支などに強固なバイオフィームを形成し、抗生物質や化学療法剤に対する抵抗性が飛躍的に増すためにその殺菌を困難にしている [2]。つまりヒトの体内を含む自然環境において細菌は本来、なんらかの固体表面に付着してバイオフィームを形成することによって傷害から身を守り生きながらえようとする傾向

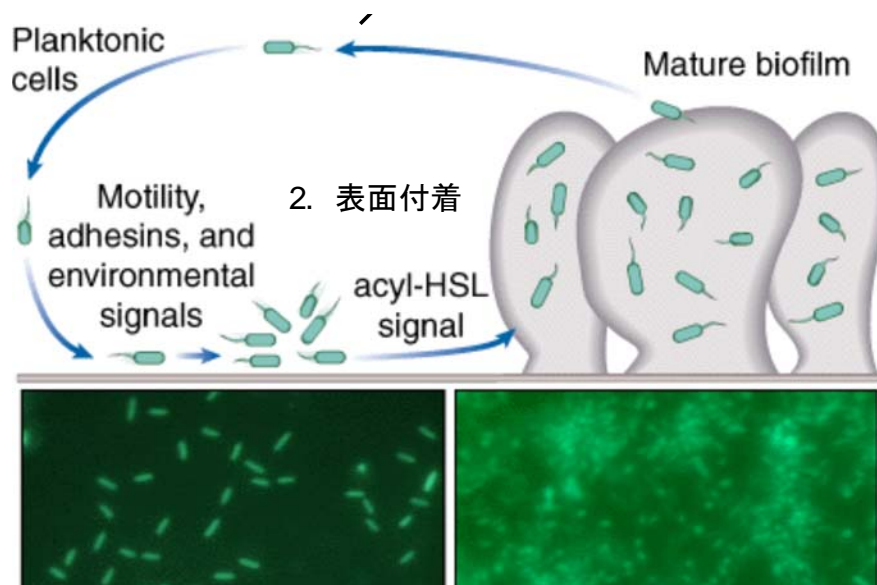
にあると言っても過言ではない [3]。

薬剤を用いたバイオフィルムの殺菌効果についていくつかの知見が得られている。たとえば、「カチオン性化合物」に比べて適度な疎水性を有する「非イオン性化合物」がバイオフィルムへの浸透性に優れる傾向にある。イソプロピルメチルフェノールの菌周病菌浮遊細胞に対する殺菌力は塩化セチルピリジニウムやトリクロサンに比べて10分の1程度であるのに、バイオフィルム細胞に対してはるかに高い殺菌作用（同濃度で比較した場合の残存生菌数が100から1000分の1）を示すことが知られている [4]。

一方、食品製造工程においては薬剤殺菌に比べてより安価で残存性の問題のない加熱殺菌が多用される。これまでに加熱殺菌条件の検討は主に食中毒細菌の浮遊細胞について行われてきた。しかしながら上で述べたとおり、同じ細菌であっても浮遊細胞に比べてバイオフィルムを形成した細胞では殺菌剤をはじめとするさまざまなストレスに対する抵抗性を向上させているので加熱に対する抵抗性もその例外ではないことが予想される。

そこで本実験では、食中毒細菌（黄色ブドウ球菌、セレウス、サルモネラ、リステリア、腸炎ビブリオ）および日和見感染症菌（緑膿菌）の浮遊細胞とバイオフィルム細胞の加熱殺菌耐性について比較検討を行い、食品製造工程における適切な殺菌処理条件の策定に資するデータベース構築を目的とした。

バイオフィルムの形成過程（上段）と細胞の顕微鏡観察（下段）左は浮遊細胞、右はバイオフィルム細胞



固体表面に付着した浮遊細胞（planktonic cells）は細胞間でシグナル分子を交換しながら細胞密度を感知する。密度がある閾値を越えると一連の遺伝子群が発現を開始し、多糖類などを主成分とするマトリクスに覆われた強固な、バイオフィルム構造体となる。バイオフィルムは平坦ではなく水路を確保したキノコ状の三次元構造体となる。

#### 参考文献

[1] 「低脂肪乳等による黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA型食中毒の原因について」  
平成12年12月20日付 雪印食中毒事件厚生省大阪市原因究明合同専門家会議最終報告  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/0012/tp1220-1.html>

[2] Holby N, Frederiksen b, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. J. Cyst. Fibros. (2005) Suppl 2: 49-54

[3] 伊藤 武、森地敏樹編「食品のストレス環境と微生物」（サイエンスフォーラム, 2004）

[4] ライオン株式会社 会社案内 発表資料2004年7月15日

<http://www.lion.co.jp/press/2004052.htm>

## 2. 方法

### 2-1. 供試菌株および培養条件

本実験で使用したセレウス (*Bacillus cereus* M-1)、リステリア (*Listeria monocytogenes* 4b)、サルモネラ (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* A type)、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6) は、大阪大学微生物病研究所 感染症国際研究センターより購入した。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、独立行政法人 理化学研究所 バイオリソースセンターより購入した (表 1)。バイオフィルムの形成条件検討には大腸菌の培養に汎用される LB 培地 (富栄養培地)、MM 培地 (貧栄養合成培地)、Y 培地 (栄養培地) を用いた (表 2)。バイオフィルム形成条件検討の結果、腸炎ビブリオを除く他の 4 種の細菌は Y 培地、腸炎ビブリオは 3% NaCl を含む Y 培地で培養した。培養温度はいずれも 30°Cにて行った。また、バイオフィルム形成条件の検討などいくつかの予備試験は研究室所有の土壌細菌 *Pseudomonas stutzeri* T102 を用いて行った。

表 1. 使用菌株リスト

<i>Bacillus cereus</i> M-1 (Enterotoxin +) RIMD020623
<i>Listeria monocytogenes</i> type 4b RIMD1205021
<i>Salmonella enterica</i> (serovar <i>Typhimurium</i> ) invA+ O4:Hi RIMD1985007
<i>Staphylococcus aureus</i> (Enterotoxin A+) RIMD3112001
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 (TDH+) RIMD2210633 [genome sequenced strain]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (type strain) JCM5962

## 表 2. 使用培地

### ・Y 培地 (pH 7.0)

0.2%	Bacto tryptone
0.1%	NaCl
0.2%	Yeast extract
0.025%	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.025%	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
0.01%	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$
0.01%	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$

### ・LB 培地 (pH 7.2)

1%	Bacto tryptone
1%	NaCl
0.5%	Yeast extract

### ・MM 培地 (pH 7.2)

0.1%	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1%	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
1%	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.02%	$\text{MgCl}_2$
0.01%	Casamino acids vitamins & trace elements

### 2-2. バイオフィルムの形成

30°Cで一晩前振とう培養をおこなった培養液を新たな Y 培地に加え (0.1% v/v)、さらに 6 から 12 時間振とう培養した。600 nm の濁度 ( $\text{OD}_{600}$ ) が 0.3~0.7 に達した培養液 0.5 ml を 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブ (ポリプロピレン製) に分注し、30°C 24 時間静置培養を行うことによりチューブ内壁にバイオフィルムを作成した。バイオフィルム量の測定はクリスタルバイオレット染色法により行った。バイオフィルムを形成したエッペンドルフチューブに 0.1% (w/v) クリスタルバイオレット水溶液を 1 ml 加え、40 分間染色した。その後、クリスタルバイオレット水溶液を除去し 95% エタノールを 1 ml 加え色素を可溶化した。分光光度計により  $A_{590}$  を測定し色素を定量し、これをバイオフィルム形成能とした (結果は図 2 に示す)。

### 2-3. 浮遊細胞の調製

バイオフィルム形成のために培養した  $\text{OD}_{600}$  が 0.3~0.7 に達した培養液をフラスコ内でさらに 30°C 24 時間静置培養をおこなった。0.1 ml の培養液をエッペンドルフチューブに

移し遠心分離（13,000rpm, 5 min）により浮遊細胞をペレットとして回収した。培地成分を除去するために蒸留水あるいは腸炎ビブリオの場合は 3% NaCl で遠心洗浄後、再び細胞をペレットとして調製し、上清を除去したものを以下の加熱処理に供した。このようにしてバイオフィームと同様に高い細胞密度状態で評価した。

#### 2-4. 加熱処理

腸炎ビブリオを除く他の5種の細菌バイオフィームは、滅菌蒸留水でゆるやかにピペッティングにより洗浄した。腸炎ビブリオは、3% NaCl 溶液で洗浄を行った。洗浄後、上清を除去したものを検体として以下の通り加熱処理を行った。比較対照試料として前項で調製した浮遊細胞を用いた。いずれもチューブの蓋は閉じて加熱処理を行った。また、バイオフィームの加熱処理温度はグラム陽性細菌（黄色ブドウ球菌およびリステリア）では、非加熱、50, 60, 70, 80, 90, 100°C、グラム陰性細菌（サルモネラ、腸炎ビブリオおよび緑膿菌）では、非加熱、40, 50, 60, 70, 80°Cで行った。処理時間はそれぞれ 10 分間で行った。

#### 2-5. 生菌数(CFU) の計測

加熱処理をおこなったバイオフィームに蒸留水あるいは 3% NaCl を 1 ml 加え、先端の尖った滅菌綿棒でバイオフィームを擦取および肉眼で均一になるまでよく懸濁し、分光光度計により OD<sub>600</sub> を測定した。その懸濁液 100 μl を 適当に希釈した後、Y 寒天培地(含、1.5% agar) に塗抹し 30°Cで一晩培養し、形成したコロニー数と希釈率から CFU を算出した。浮遊細胞についてはバイオフィーム形成時間と同時間培養した浮遊細胞を加熱処理した後、1 ml の蒸留水あるいは 3% NaCl 溶液に懸濁した。これを適宜希釈した後、Y 寒天培地に塗抹し、上記と同様に培養を行い CFU を算出した。

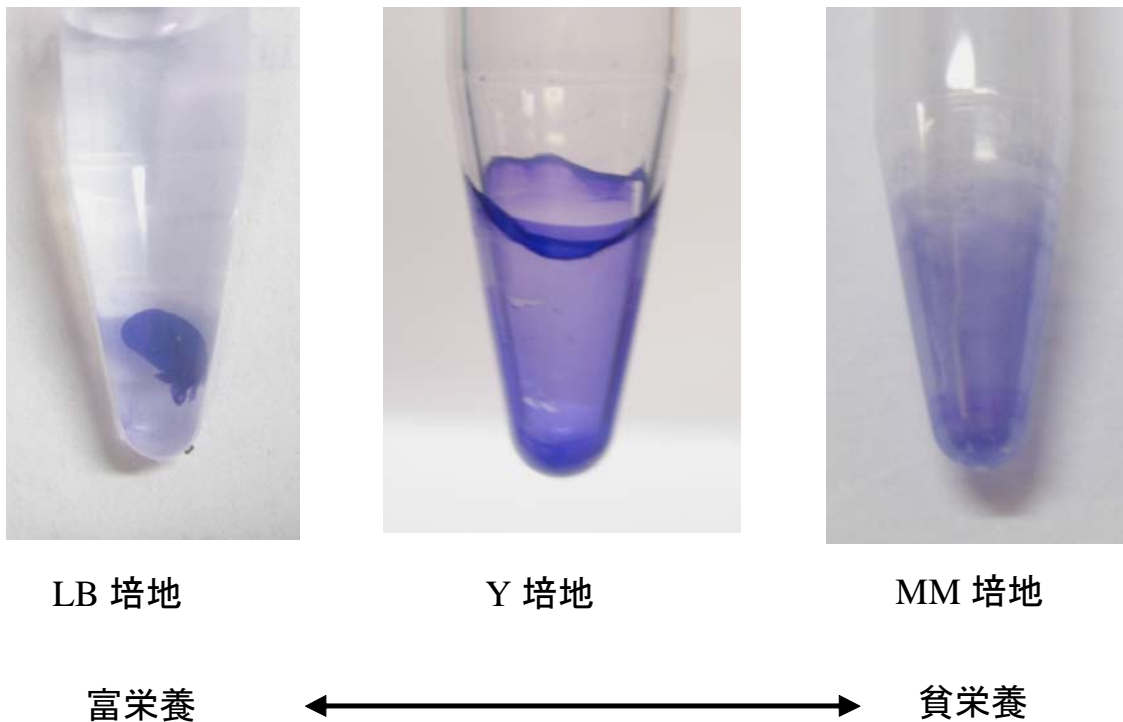
### 3. 結果

#### 3-1. バイオフィルム形成条件の検討

*Pseudomonas stutzeri* T102 を用いてバイオフィルム形成に適した培地条件を予備検討した（図1）。その結果、栄養培地である Y 培地で最も厚いバイオフィルムを形成した。そこで以後の実験は Y 培地で行うことにした。また、24h で既にバイオフィルムの形成が確認できたので、以降の実験は 30°C 24h で行った。

図 1. 培地条件とバイオフィルム形成の関係

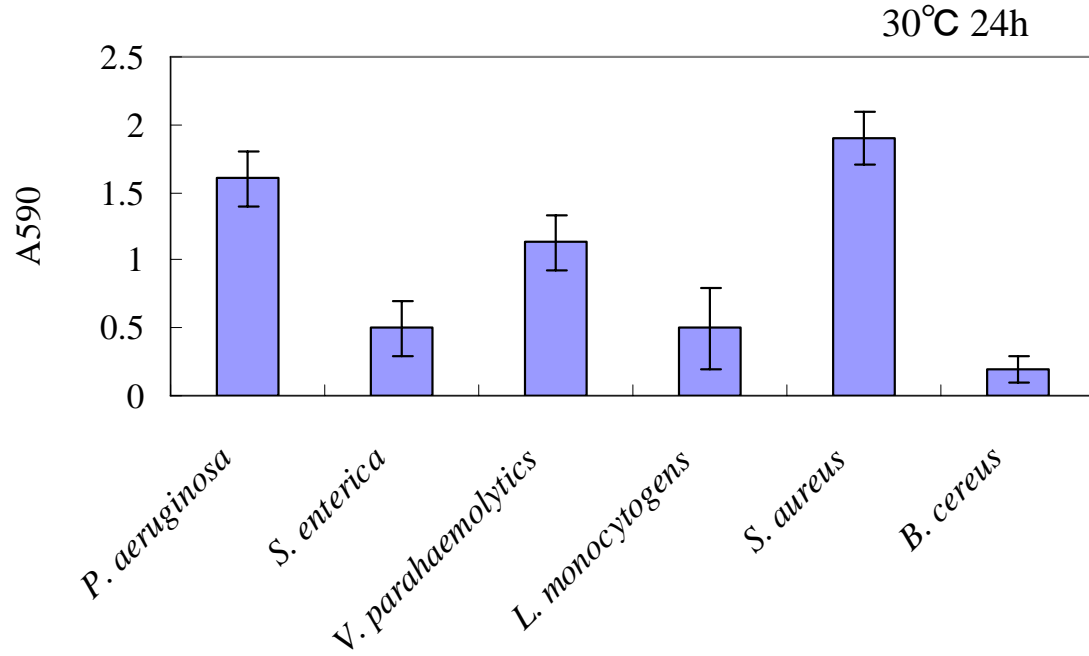
*Pseudomonas stutzeri* T102 72h at 30°C





次に Y 培地で食中毒細菌のバイオフィルム形成能を比較した (図 2)。

図 2. 食中毒細菌のバイオフィルム形成能

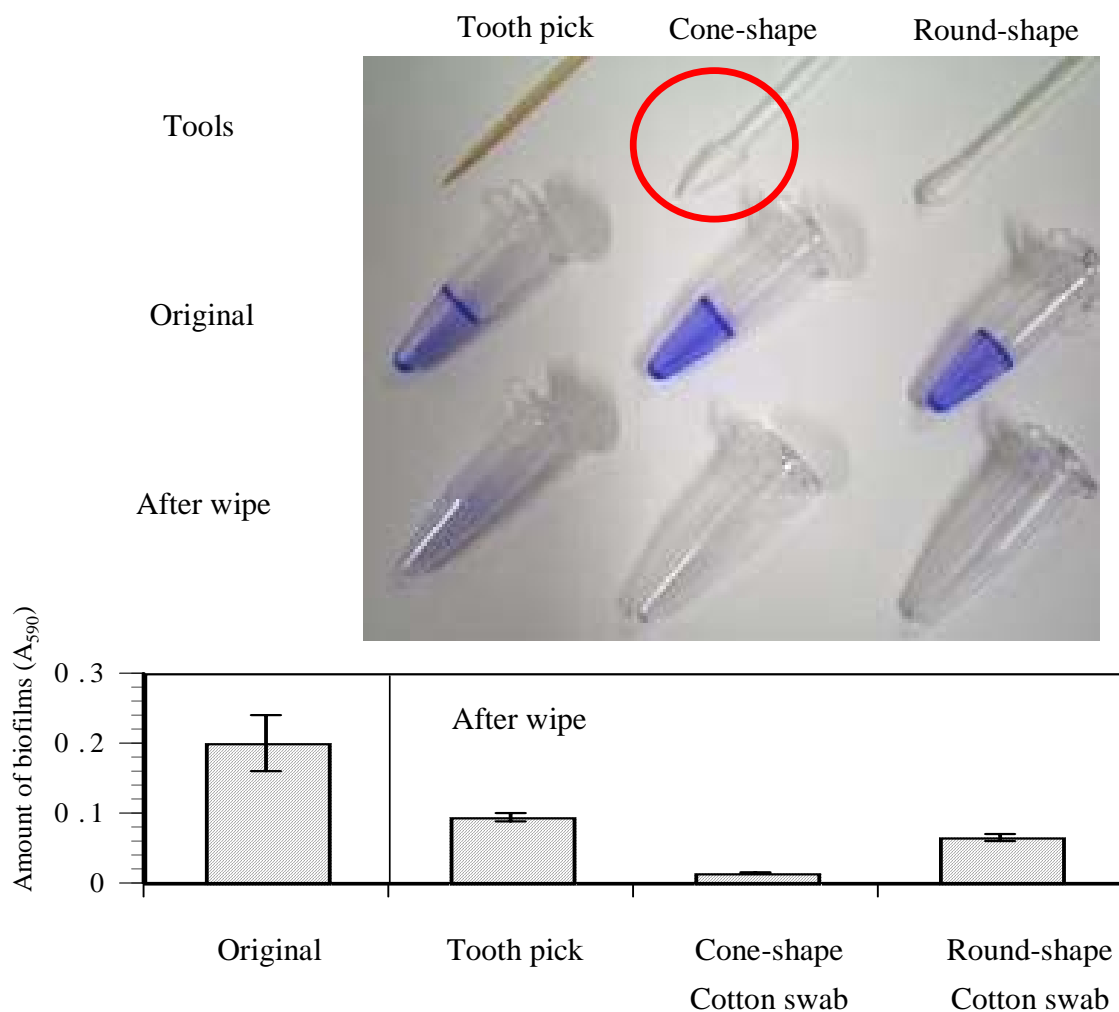


その結果、緑膿菌と黄色ブドウ球菌および腸炎ビブリオが特にバイオフィルムを良く形成することが判明した。

### 3-2. バイオフィルム細胞回収法の検討

次にバイオフィルム中の生菌数計測に不可欠となる細胞の回収法について検討した。バイオフィルムは強固な構造体のため、通常のボルテックミキサー等の攪拌では剥離しない。そこで、つまようじ、先端の尖った綿棒、先端の丸い綿棒を用いてバイオフィルムの回収効率を擦取前後の残存バイオフィルム量で比較した（図3）。その結果、先端の尖った綿棒を用いた場合の回収率が最も高いことが分かった。そこで、以後の実験においてはこれを用いて行うことにした。

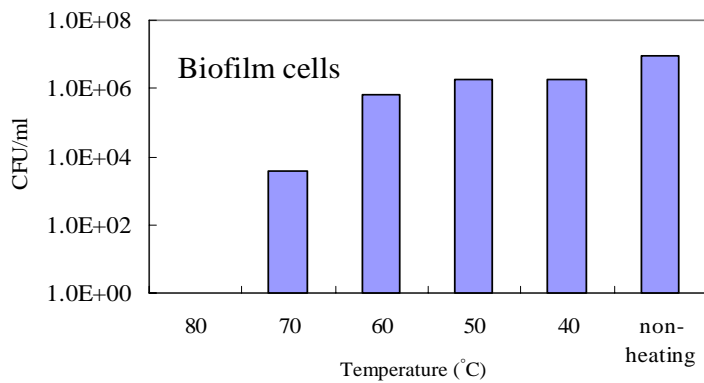
図 3. バイオフィルム細胞回収法の検討



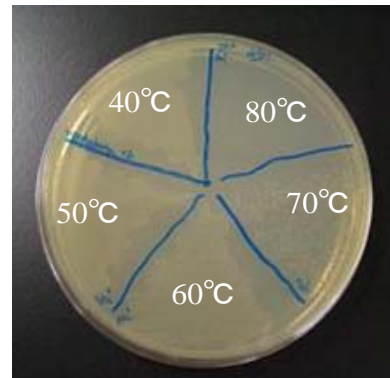
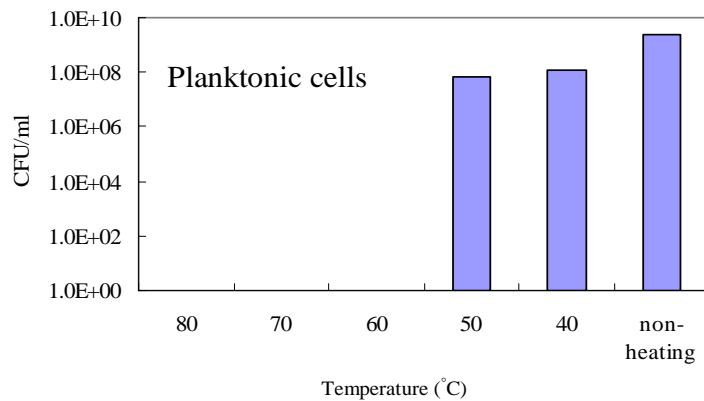
### 3-3. 浮遊細胞とバイオフィーム細胞の加熱処理耐性の比較

まず、*P. stutzeri* T102（土壌細菌）の加熱処理耐性を浮遊細胞とバイオフィーム細胞で比較した（図4）。その結果、浮遊細胞では60℃において完全に死滅したが、バイオフィーム細胞では70℃まで生菌が観察された。すなわち、浮遊細胞に比べてバイオフィーム細胞の方が約20℃高い耐性を有することが判明した。

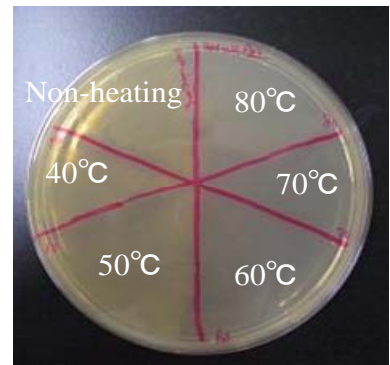
図4. 土壌細菌の加熱処理耐性試験



各温度で10分間処理した後の残存生菌数



*Pseudomonas stutzeri* T102  
Y寒天培地でのコロニー形成



続いて、セレウスについて同様の比較を行った。

図5-1. *Bacillus cereus* バイオフィルム細胞

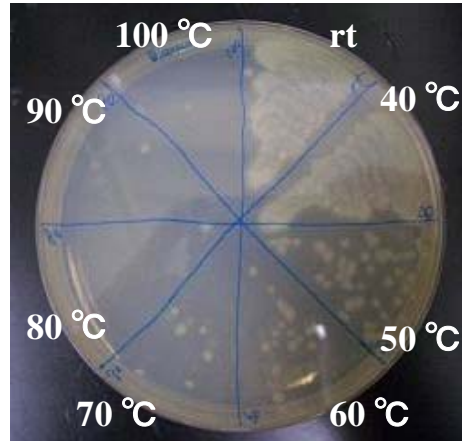
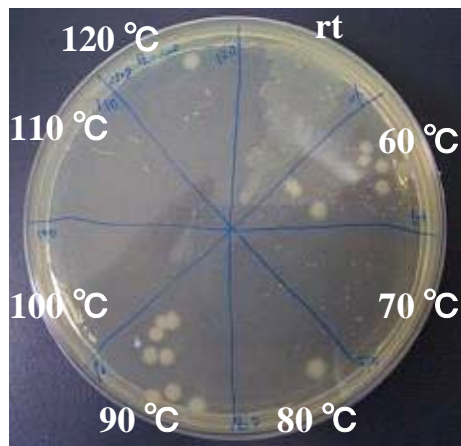


図5-2. *Bacillus cereus* 浮遊細胞



rt: 非加熱処理

セレウスの場合、浮遊細胞においても 100°C加熱処理後に生菌が確認された。これは芽胞形成によるものと思われる。栄養細胞に比べて芽胞は熱、薬剤、乾燥などのストレスに対して極めて高い耐性を示すことが知られている。従って、セレウスではバイオフィルム細胞と浮遊細胞の加熱処理耐性の差を見出すことが困難と予想された。そこで本菌について加熱処理実験はこれ以上行わないことにした。

次ページ以降、緑膿菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、リステリアおよび黄色ブドウ球菌に関する加熱処理耐性の比較結果を示す。

### 3-3-1. 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

表3-1. CFU of *Pseudomonas aeruginosa*

[ Biofilm cells ]		CFU/ 100 $\mu$ l (Av $\pm$ SD)						
Dilution ratio	Heating temperature ( $^{\circ}$ C)							
	Non-heating	50	60	70	75	80	90	
10(2)	-	-	-	-	-	4 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	
10(3)	-	-	-	873 $\pm$ 337	106 $\pm$ 9	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
10(4)	-	1993 $\pm$ 713	1259 $\pm$ 87	100 $\pm$ 18	12 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
10(5)	810 $\pm$ 74	381 $\pm$ 210	145 $\pm$ 18	13 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	-	-	
10(6)	69 $\pm$ 5	62 $\pm$ 27	23 $\pm$ 11	2 $\pm$ 1.7	0 $\pm$ 0	-	-	
10(7)	6 $\pm$ 1	16 $\pm$ 12	4 $\pm$ 2	-	-	-	-	

[ Planktonic cells ]		CFU/ 100 $\mu$ l (Av $\pm$ SD)						
Dilution ratio	Heating temperature ( $^{\circ}$ C)							
	Non-heating	40	50	55	60	65	70	
10(2)	-	-	-	-	-	16 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0	
10(3)	-	-	-	118 $\pm$ 25	27 $\pm$ 9	2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	
10(4)	-	CL	162 $\pm$ 7	11 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
10(5)	991 $\pm$ 70	1933 $\pm$ 776	30 $\pm$ 15	3 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	-	-	
10(6)	260 $\pm$ 23	223 $\pm$ 76	5 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	-	-	
10(7)	63 $\pm$ 11	54 $\pm$ 48	2 $\pm$ 1	-	-	-	-	

CL・・・Countless

図6-1. 緑膿菌バイオフィルム細胞の加熱処理耐性

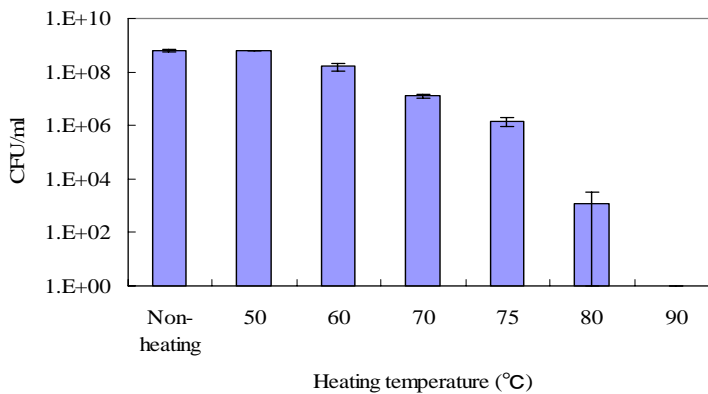
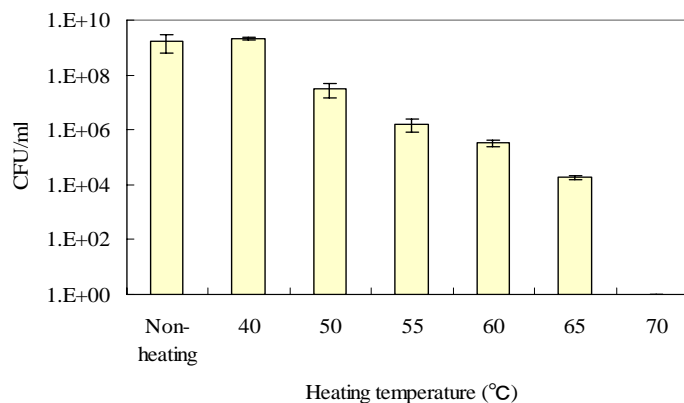


図6-2. 緑膿菌浮遊細胞の加熱処理耐性



### 3-3-2. サルモネラ (*Salmonella enterica*)

表3-2. CFU of *Salmonella enterica*

[ Biofilm cells ]		Heating temperature (°C)							CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	50	60	70	75	80	90		
10(2)	-	-	-	-	-	2±1.7	0.3±0		
10(3)	-	-	-	20±13	5±4	0±0	0±0		
10(4)	-	433±103	9±2	2±1.7	2±1.7	0±0	0±0		
10(5)	423±50	50±13	1±1	0±0	0±0	-	-		
10(6)	46±0	11±1	0±0	0±0	0±0	-	-		
10(7)	8±2	1±0	0±0	-	-	-	-		

[ Planktonic cells ]		Heating temperature (°C)						CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	40	50	55	60	65	70	
10(2)	-	-	-	-	-	526±21	2±0	
10(3)	-	-	-	1314±12	122±10	59±7	0±0	
10(4)	-	1052±63	357±77	330±18	25±2	1±0	0±0	
10(5)	262±18	139±55	68±11	58±8	3±1.7	-	-	
10(6)	66±28	68±10	19±8	8±1	0±0	-	-	
10(7)	5±3	8±0	8±0	-	-	-	-	

図7-1. サルモネラバイオフィルム細胞の加熱処理耐性

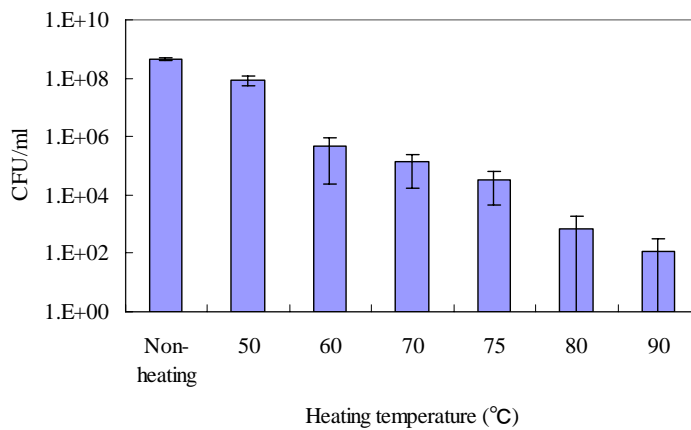
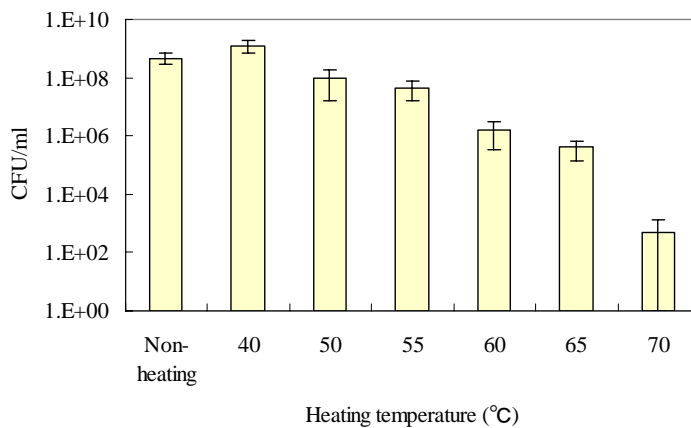


図7-2. サルモネラ浮遊細胞の加熱処理耐性



### 3-3-3. 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*)

表3-3. CFU of *Vibrio parahaemolyticus*

[ Biofilm cells ]		Heating temperature (°C)							CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	50	60	70	75	80	90		
10(2)	-	-	-	-	-	0±0	0±0		
10(3)	-	-	-	0±0	0±0	0±0	0±0		
10(4)	-	-	-	0±0	0±0	0±0	0±0		
10(5)	154±12	101±1	3±0.6	0±0	0±0	-	-		
10(6)	13±2	17±6	0±0	0±0	0±0	-	-		
10(7)	1±1	0±0	0±0	-	-	-	-		

[ Planktonic cells ]		Heating temperature (°C)						CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	40	50	55	60	65	70	
10(2)	-	-	-	-	-	0±0	0±0	
10(3)	-	-	-	0±0	0±0	0±0	0±0	
10(4)	-	375±130	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	
10(5)	991±71	146±45	0±0	0±0	0±0	-	-	
10(6)	260±226	39±22	0±0	0±0	0±0	-	-	
10(7)	63±11	6±3	0±0	-	-	-	-	

図8-1. 腸炎ビブリオバイオフィルム細胞の加熱処理耐性

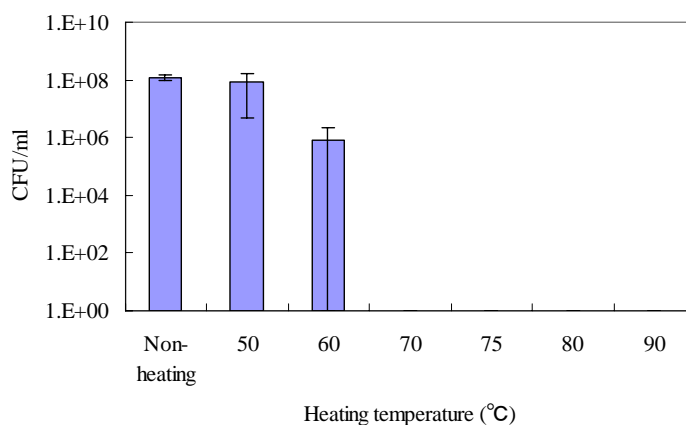
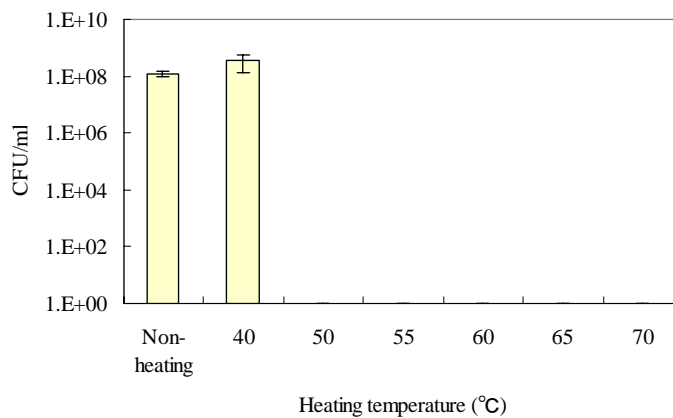


図8-2. 腸炎ビブリオ浮遊細胞の加熱処理耐性



### 3-3-4. リステリア (*Listeria monocytogenes*)

表3-4. CFU of *Listeria monocytogenes*

[ Biofilm cells ]		Heating temperature (°C)							CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	50	60	70	80	90	100		
10(2)	-	-	-	-	97±77	1±1	0±0		
10(3)	-	-	1951±582	499±236	14±18	0±0	0±0		
10(4)	-	1793±323	194±93	57±55	0±0	0±0	-		
10(5)	1056±12	224±7	32±7	5±4	0±0	-	-		
10(6)	110±12	52±19	3±2	1±1	-	-	-		
10(7)	12±2	5±4	-	-	-	-	-		

[ Planktonic cells ]		Heating temperature (°C)						CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	50	60	65	70	75	80	
10(2)	-	-	-	2737±1339	1128±125	108±6	1±1	
10(3)	-	-	1616±248	606±9	223±110	30±9	0±0	
10(4)	-	1013±2	339±105	87±2	41±7	1±1	-	
10(5)	1148±188	195±15	27±6	3±1	-	-	-	
10(6)	316±140	50±15	5±1	-	-	-	-	
10(7)	67±35	-	-	-	-	-	-	

図9-1. リステリアバイオフィルム細胞の加熱処理耐性

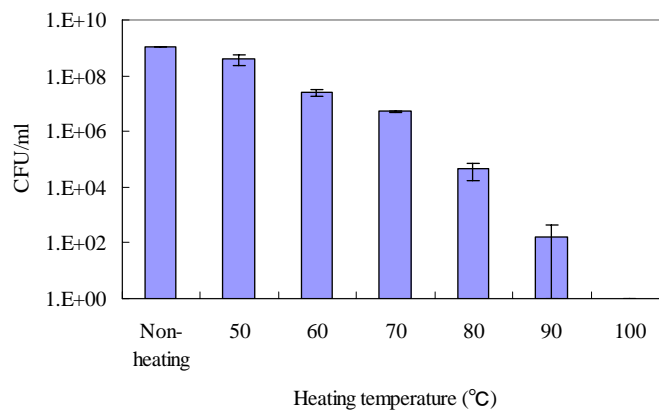
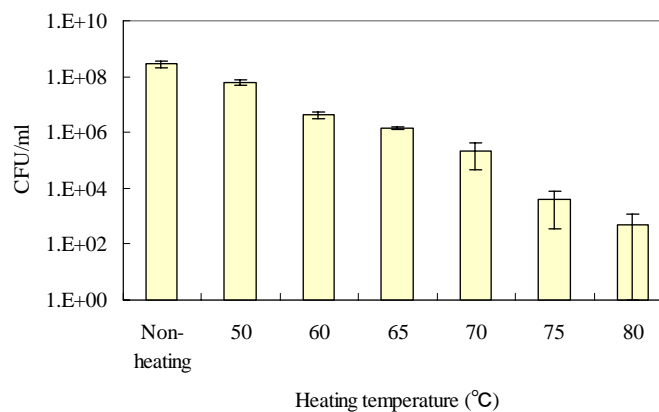


図9-2. リステリア浮遊細胞の加熱処理耐性





### 3-3-5. 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)

表3-5. CFU of *Staphylococcus aureus*

[ Biofilm cells ]		Heating temperature (°C)							CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	50	60	70	80	90	100		
10(2)	-	-	-	-	18±0	25±9	1±1		
10(3)	-	-	76±19	64±19	2±1	4±3	0±0		
10(4)	-	260±107	8±2	11±1	1±0	0±0	-		
10(5)	169±25	51±19	3±1.7	2±1	0±0	-	-		
10(6)	17±8	10±4	1±1	0±0	-	-	-		
10(7)	1±0	1±1	-	-	-	-	-		

[ Planktonic cells ]		Heating temperature (°C)						CFU/ 100µl (Av±SD)
Dilution ratio	Non-heating	50	60	65	70	75	80	
10(2)	-	-	-	2737±1339	1128±125	108±6	1±1	
10(3)	-	-	1616±248	606±9	223±110	30±9	0±0	
10(4)	-	1013±2	339±105	87±2	41±7	1±1	-	
10(5)	1148±188	195±15	27±6	3±1.7	-	-	-	
10(6)	316±140	50±15	5±1	-	-	-	-	
10(7)	67±35	-	-	-	-	-	-	

図10-1. 黄色ブドウ球菌バイオフィーム細胞の加熱処理耐性

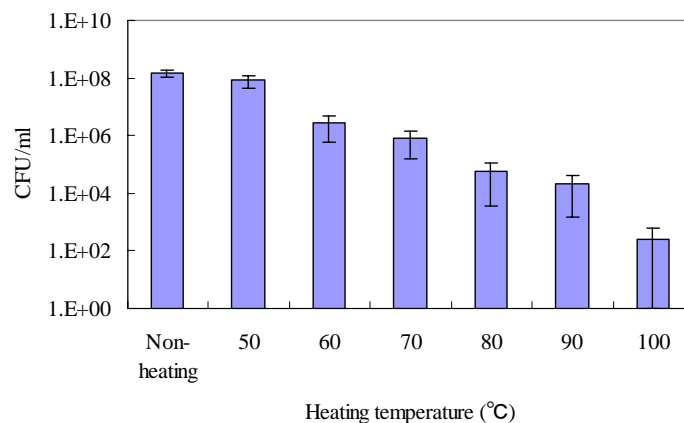
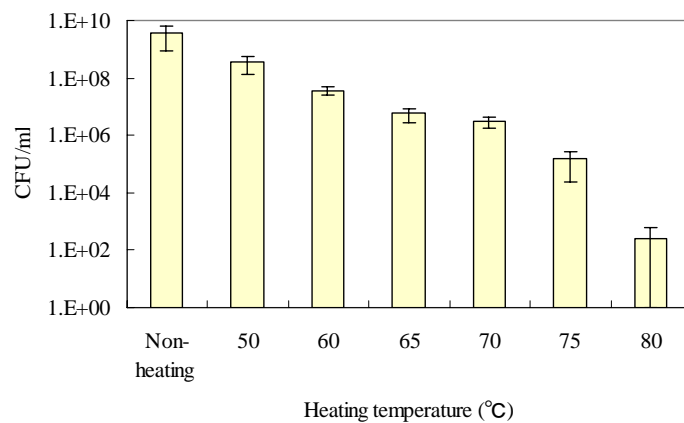


図10-2. 黄色ブドウ球菌浮遊細胞の加熱処理耐性



## 4. 結論

本実験では、主要な食中毒原因細菌：セレウス (*Bacillus cereus* M-1)、リステリア (*Listeria monocytogenes* 4b)、サルモネラ (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* A type)、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* 03:K6) および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) について、加熱処理に対する耐性を調べた。

その結果、セレウスを除いていずれの細菌（栄養細胞）も加熱処理に対する耐性が浮遊細胞に比べてバイオフィルム細胞において明らかに高いことが示された。この傾向は食中毒細菌だけではなく一般細菌（緑膿菌）や土壌細菌においても観察されたことから、これは食中毒細菌など細菌の属種によらない普遍的な傾向と思われる。またこの原因は高い細胞密度に由来する保護効果だけの影響ではなく、バイオフィルム特有の細胞増殖ステージあるいは遺伝的な変異によるものと思われる。

セレウスは芽胞を形成するためにその加熱耐性が飛躍的に高く（図5）、浮遊細胞とバイオフィルム細胞の違いが観察できないと予想されたため、今回は実験対象からは除外した。

また、グラム陰性細菌群（サルモネラ、腸炎ビブリオ、緑膿菌）に比べてグラム陽性細菌群（リステリア、黄色ブドウ球菌）の加熱殺菌耐性は高い傾向にあった。特に、黄色ブドウ球菌はバイオフィルム細胞において 100℃ 10 min の加熱処理後も生菌が観察された。今回、残存生菌の計測はY寒天培地での CFU すなわち、損傷回復能およびコロニー形成能を有する細胞数としたが、実際にはこの条件でコロニー形成能力がなくても、生物活性を有している可能性がありバイオフィルム状態を形成した食中毒細菌の加熱殺菌はさらに厳しい条件が必要かも知れない。

以上、本実験によりバイオフィルム形成が想定される現場においては、浮遊細胞を対象とした食中毒細菌の加熱殺菌条件検討だけでは不十分であることが示された。

以上