

れるリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を提案し、食品製造工程や保存における増殖性の評価、バイオフィルムの形成防止と本菌の除去を目指した管理法を検討することを目的とした。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、文献調査と web 情報等の収集により、バイオフィルムに関する情報収集を行った。

製造工程におけるバイオフィルム形成の実態調査は、北海道立釧路水産試験場の協力により行った。平成 20 年度調査した施設をフィールドとし、水産加工品の製造工程における一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について調査した。調査施設は北海道釧路にあり、原料は北海道東部沿岸で漁獲されたスケトウダラを用い、塩タラコ製品を製造している。原魚裁割から魚卵の取り出しと原卵漬け込み処理、塩タラコ製品の箱詰めに至る工程で使用される器材、並びに作業環境よりバイオフィルムを採集した。

バイオフィルムは滅菌済みのマイクロスポーテルあるいはスクレイパーを用いて、バイオフィルムを器材および作業環境より剥離し、滅菌済み蓋付き小型試験管（樹脂製）に採集した。各バイオフィルムの採集箇所および細菌検査に供した重量を記録した。採集したバイオフィルムは、直ちに釧路水産試験場の微生物実験室に搬入し、一般生菌数、リステリア (*Listeria monocytogenes*) について、定量的に調べた。

バイオフィルム調整液を接種した標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地については、形成された集落を分離し、菌種の同定を試みた。菌叢構成菌の DNA 分析とリステ

リア属菌の同定は帯広畜産大学で行った。リステリアが検出された木製パレット由来のバイオフィルムのマイクロフローラ解析を行った。分離菌株から鋳型 DNA を抽出・精製した後、常法にしたがって塩基配列を決定した。これを Gene Bank から出されている 16S-rRNA をコードする DNA の塩基配列に対してホモロジー検索を行って、分離株の菌種を推定した。

形成されたバイオフィルムの除去方法の検討については、バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を使用し、洗浄(ブラッシング、洗剤:3%レディクリーン エコラボ)、スチーム(スチームクリーナーSC1402 ケルヒャジャパン)、塩素浸漬(100ppm 次亜塩素酸ナトリウム)または、洗剤浸漬(1%プリンシパル エコラボ)をそれぞれ行った後、水洗し、拭き取りを行い、一般生菌数を測定した。

また、洗浄後にスチーム処理を行い、さらに、各浸漬をする処理区、および洗浄後にスチーム処理を行わず、各浸漬をする処理区を作製し、各工程中の拭き取りを行い、一般生菌数と ATP 発光量を測定し、洗浄効果を比較した。ATP 発光量の測定は、ルミテスターPD20(キッコーマン)を用いた。

なお、スチーム処理はスチーム温度 50~70℃、ノズルから 5~10cm の距離で 30 秒間行い、各浸漬処理の浸漬時間は 18 時間であった。

(倫理面への配慮)

本研究は問題になる研究内容を含まない。

C. 研究結果

(1) バイオフィルムにおける細菌検査結果

採集した各バイオフィルムのリステリア検査における一次増菌培地および二次増菌培地

について、これら培地の黒色化の有無と、クロモアガーリステリア寒天培地 (CHROMagar 社) による水色の定型的集落およびハローの有無について調べた。その結果、二次増菌培養では、8月で剥皮機の上面カバー部、フォークリフトのアクセルペダル部の2箇所、11月ではフォークリフトのアクセルペダル部の1箇所の計2箇所(3検体)から得られたバイオフィルムの培地で、黒色化を観察した。また、黒色化したすべての箇所でリステリア属菌と推定される水色の定型的集落を確認した。しかし、ハローを生じるものはなく、*L. monocytogenes* を含むものであると推定できるバイオフィルムは、確認できなかった。

すべての一次増菌培地について、培地の黒変色とクロモアガーリステリア寒天培地による水色の定型的集落およびハローの有無について検討したところ、剥皮機の上面カバー部、フォークリフトのアクセルペダル部で確認できた。また、二次増殖培養で確認できなかった採集箇所のうち、ヘッドカッターのベルト部、フィレーマシンの出口下部カバー、ザルカゴの持ち手部、原料作業台、井戸水タンクのホース部、たらこ室床面タイルのねじ部、原料処理場の床面、木製パレット、フォークリフトのタイヤホイール部の9カ所で黒色化を確認し、そのうち井戸水タンクのホース部を除く8カ所で水色の定型的集落を確認したが、発色が48時間後と遅く、二次増菌培養で陰性であることよりリステリア属菌とは推定しなかった。

各バイオフィルムの一般生菌数と、クロモアガーリステリア寒天培地によるコロニー観察結果と合わせてみると、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、たらこ室入り口戸の取手部で 10^1 cfu/mg biofilm 以下と低い値であった

が、これを除く検体では $10^2 \sim 10^6$ cfu/mg biofilm に分布しており、このうち8月と11月を合わせた全体の約77%となる20検体で 10^4 cfu/mg biofilm 以上であった。なお、たらこ室入り口戸の取手部の一般生菌数が他と比べて顕著に低い値を示したが、これは採集した試料の大部分が鉄錆等であり、バイオフィルムがほとんど含まれていなかったことによるものと推測した。

クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属菌と推定したバイオフィルムの一般生菌数は、 $10^2 \sim 10^6$ cfu/mg biofilm の範囲に分布し、8月の剥皮機の上面カバー部で 1.3×10^6 cfu/mg biofilm と最も高い値を示し、次いでフォークリフトのアクセルペダル部が8月、11月ともに 10^4 cfu/mg biofilm 台を示した。一方、工場外砂利道の土壌は 10^2 cfu/mg biofilm 台であった。また、8月にリステリア属菌陽性と推定した剥皮機の上面カバー部は11月では陰性で一般生菌数は 10^3 cfu/mg biofilm 台と低い値であった。リステリア属陽性のバイオフィルムでは、一般生菌数が $10^7 \sim 10^9$ cfu/g biofilm に分布し、剥皮機・上面カバー部で 1.3×10^9 cfu / g biofilm と最高値を示した。また、リステリア属菌陽性であったフィレーマシン、原魚処理用作業台、貯水タンク、木製パレットからは検体採取時期によりリステリア属菌は検出されず、フォークリフト・アクセルペダル部のみ3回の調査のいずれでも検出された。このことから、フォークリフト・アクセルペダル部における継続的なリステリア属菌汚染が明らかとなった。

なお、大腸菌は採集したすべてのバイオフィルムにおいて、陰性と推定された。

(2) バイオフィルム構成菌とリステリア属菌

の関連性

一般生菌の菌種推定は、16S-rRNA 遺伝子配列解析により行った。今回調査した全 23 検体のバイオフィルムのうち、最も多く検出された菌種はフラボバクテリウム属 (12 検体)、ロドコッカス属 (11 検体)、クラビバクター属 (10 検体) の 3 種類であった。シュードモナス属 (5 検体)、アシネトバクター属 (5 検体)、カルコバクター属 (4 検体) など比較的多くの箇所で見られた。

これらの一般生菌が、バイオフィルム中のリステリア属菌の有無と関連があるかを調べるために、リステリア属菌陽性バイオフィルム 8 検体とリステリア属菌陰性バイオフィルム 15 検体の計 23 検体における、一般生菌の出現割合を比較するため、リステリア属菌と一般生菌の存在割合を検討した。これらのうち、グラメラ属、パラコッカス属、サイクロバクター属は 25% のリステリア属菌陽性バイオフィルム中に検出されたが、リステリア属菌陰性バイオフィルムには 6.7% しか検出されず、出現割合に約 3.7 倍差があった。推定した一般生菌の菌種を属ごとに分類し、リステリア属菌と一般生菌の有無により 2 x 2 分割表を作成してフィッシャーの直接確率法により確率 p を求め、有意差検定を行った。これらの解析結果より、 $2p$ 値が 0.05 未満となる一般生菌はみられず、有意水準 5% でリステリア属群の有無と一般生菌の出現割合に差がないことがわかった。

(3) バイオフィルムの防除試験結果

バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を洗浄(ブラッシング)、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬をそれぞれ行った時の拭き取りによる一般生菌数の変化の結果から、それぞれ単独処理では、一般生菌数はスチーム

処理が洗浄前の 10^6 cfu/25cm² 台から 10^4 cfu/25cm² 台に減少した以外、他の処理は減少しなかった。

そこで、洗浄(ブラッシング)を行った後、スチーム処理を行い、さらに各浸漬をする処理区、および洗浄後にスチーム処理を行わないで、各浸漬をする処理区の各工程中の拭き取りによる一般生菌数および ATP 発光量の変化の結果から、一般生菌数は洗浄前が 10^7 cfu/25cm² 台であったものが、洗浄後、スチーム処理をすることにより 10^5 cfu/25cm² 台に減少し、さらに塩素浸漬、洗浄浸漬によりそれぞれ 10^3 cfu/25cm²、 10^2 cfu/25cm² に減少した。また、洗浄後、スチーム処理を行わずに塩素浸漬、洗剤浸漬を行ったものはそれぞれ 10^5 cfu/25cm²、 10^2 cfu/25cm² に減少した。また、ATP 発光量では、洗浄前に比べ、スチーム処理での減少が少なかったが、その後の塩素浸漬で減少し、特に、洗剤浸漬で著しく減少した。

(4) Tween 80 添加効果試験結果

原料作業台(上面)及びフィレーマシンの出口部カバー部より各濃度の Tween 80-生理的食塩水(滅菌済み)に浸漬した綿棒で拭き取り、適宜、同濃度の Tween 80-生理的食塩水で希釈した時の一般生菌数を調べた。原料作業台では 0%、0.1% に比べ 0.25%、0.5% でやや高い傾向を示したが、著しい差は認められなかった。また、フィレーマシンの出口部カバー部では、0% と 0.1% では差は認められなかった。

各バイオフィルムに 0% (無添加) および 0.1% Tween 80-生理的食塩水(滅菌済み)を加え、乳剤を調整、希釈し、一般生菌数を比較した。各バイオフィルムとも無添加と 0.1% 添加では著しい差は認められなかった。

D. 考察

乾燥や高濃度の食塩耐性、低温増殖性といった環境抵抗性を示し、バイオフィーム形成が見られるリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を確立し、バイオフィームの形成防止と本菌の生産ラインからの除去を目指した管理法を検討している。

昨年に引き続きバイオフィームに関する文献調査と情報収集を行い、バイオフィームに関する情報を整理し、バイオフィームを構成する菌に関する情報収集と、バイオフィームの除去に関する文献を重点的に集めた。

現場におけるバイオフィームに関する検討としては、北海道立釧路水産試験場の協力により、塩タラコの製造工程における調査を行った。製造工程をとおして、一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について調査した。今回の塩タラコ製造施設において、20箇所26検体（8月：20箇所、11月：6箇所）より採集したバイオフィームのうち、2箇所（3検体）のバイオフィームからリステリア属菌を推定した。昨年度 *L. monocytogenes* を分離した箇所を含め、今年度の検討では *L. monocytogenes* の検出される箇所はなかったが、工場内においてリステリア属菌を検出したことから、原魚裁割工程における原卵への交叉汚染が容易に推測される。

水産加工施設において採取した52検体のバイオフィーム（昨年度分離分も含む）のうち、11検体のバイオフィームからリステリア属菌を推定した。そのうち1検体は *L. monocytogenes* であった（2008年度に分離）。リステリア属菌の検出割合としては、2008年度分離では26検体中8検体（30.7%）、2009年度検体B群では20検体中2検体（10.0%）、検

体C群では6検体中1検体（16.7%）であり、高率でリステリア属菌が検出されている。昨年度に比べ本年度の成績には改善が見られた。また、フォークリフト・アクセルペダル部における継続的なリステリア属菌汚染も明らかとなった。工場内においてリステリア・モノサイトゲネスおよびリステリア属菌を検出したことから、原魚裁割工程における原卵への交叉汚染が容易に推測される。

当該施設で採集したバイオフィームにリステリア属菌が陽性を示した理由の一つとして、当該施設が未舗装の道路に隣接しており、運搬作業や気象条件等により、土壌が施設内に持ち込まれやすい環境にあるためと考えられる。特に、フォークリフト・アクセルペダル部は足で踏んで操作を行うため、特に土壌からの汚染を受けやすいと考えられる。リステリア属菌の検出割合が2008年度に比べて2009年度で減少しているのは、第1回目の調査である2008年度の結果を受けて、水産加工施設が自主的に施設内の整頓・清掃を実施した影響によるものと思われる。

バイオフィームの防除方法の検討として、バイオフィームが付着しているザルカコ（持ち手部）を用いて、洗浄（ブラッシング）、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行った。塩素浸漬、洗剤浸漬では、単独の処理では一般生菌数の減少が認められなかったが、洗浄処理後に各浸漬処理を行うことにより減少した。これは、洗浄処理によりバイオフィームが除去され、このことにより、各浸漬処理の除菌・殺菌が進行したものと考えられる。

洗浄後の処理では、スチーム処理、塩素処理は一般生菌数の減少に一定の効果を示したがATP発光量の減少は少なかった。また、スチー

ム処理により、バイオフィルムの表面が熱変性を生じ、剥離等が困難になる可能性があり、付着箇所の状況を判断して使用する必要がある。これに対して、洗剤浸漬は一般生菌数、ATP発光量とも著しく減少した。これらのことより、スチーム処理、塩素処理は除菌・殺菌効果が認められるが、有機物等の除去・洗浄には効果が認められなかった。一方、洗剤浸漬は、除菌・殺菌に加え、有機物等の除去・洗浄にも効果が認められた。

モニタリングの方法として、一般生菌数等の測定に、バイオフィルムを溶解させ、均一な乳剤を得るために、生理食塩水に0.1%のTween 80を添加している。今回、バイオフィルム生成箇所におけるのふき取り及び各バイオフィルムのTween 80添加の有無による一般生菌数の比較を行った。ふき取りにおいては、0.25%、0.5%の高濃度で比較的高い傾向を示したが、0.1%では無添加に比べ差は認められなかった。また、各バイオフィルムにおいても差は認められなかった。今回使用したバイオフィルムは比較的ウェットなものであり、溶解しやすいものであったと考えられる。今後、難溶のバイオフィルムについても検討する必要がある。

尚、それぞれの研究内容の詳しいデータについては、研究協力者の報告書に詳しく述べられているので、そちらを参考にしていきたい。

E. 結論

塩タラコの製造施設において、製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリア菌の有無について調査を行った。その結果、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、ほとんどが $10^2 \sim 10^6$ cfu/mg biofilmに分布していた。このうち、今年度の

調査で剥皮機の上面カバー部など2箇所(3検体)から採集したバイオフィルムでは、リステリア属陽性であった。しかし、*L. monocytogenes*は検出されなかった。

食品工場から実際に採取したバイオフィルムを用い、リステリア属菌と一般生菌の菌種を推定して、その関連について明らかにしようと試みたが、統計的に有意な差は見られなかった。しかしながら、グラメラ属、パラコッカス属、サイクロバクター属のリステリア属菌陽性バイオフィルム中の出現割合はリステリア属菌陰性バイオフィルムに比べて3.7倍高く、何らかの関連があることも示唆される。

モニタリングの方法の検討として、バイオフィルムを溶解するために生理食塩水へのTween 80の添加効果を検討した。その結果、今回検討したバイオフィルムでは、無添加と0.1%添加において一般生菌数の差は認められなかった。

バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を用いて、洗浄(ブラッシング)、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行い、バイオフィルムの防除方法を検討した。その結果、洗浄後のスチーム処理、塩素処理では除菌・殺菌効果が認められたが、有機物等の除去・洗浄には効果が認められなかった。一方、洗剤浸漬は、除菌・殺菌に加え、有機物等の除去・洗浄にも効果が認められた。また、洗浄によってバイオフィルムを除去することにより、その後の処理での除菌・滅菌に効果が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takeshi K, Kitagawa M, Kadohira M, Igimi S, and Makino SI. (2009) Hazard analysis of *Listeria monocytogenes* contaminations in processing of salted roe from Walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 71(1):87-91.
- ② Hara H, Ohashi Y, Sakurai T, Yagi K, Fujisawa T, and Igimi S. (2009) Effect of Nisin (Nisaplin) on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Karashi-mentaiko (Red-pepper Seasoned Cod Roe). 日本食品衛生学会誌. 50(4):173-177.

2. 学会発表

- ① 井田美樹、金子誠二、仲真晶子、岡田由美子、樋脇弘、江渕寿美、中村寛海、大塚佳代子、竹村壘、長田共未、三山九美、吉田朋高、五十君静信。リステリア検査用酵素基質培地の検討。日本食品微生物学会 (2009. 10) (東京)
- ② 岡田由美子、鈴木穂高、門田修子、五十君静信、山本茂貴、岡田信彦*。シグマ因子 RpoN のリステリアの病原性への関与とその機構。第 83 回日本細菌学会総会。(2010. 3)横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
非加熱製造・非加熱喫食型水産加工食品製造施設におけるリステリアを中心とする
バイオフィルムの採集と、その基礎的性状に関する調査研究

国立大学法人帯広畜産大学獣医学ユニット獣医公衆衛生学分野

西川 絵梨子

武士 甲一（教授）

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

五十君 静信（室長）

岡田 由美子（主任研究官）

北海道立釧路水産試験場 利用部・加工部

担当者 阪本 正博（利用部・主任研究員）

信太 茂春（加工部・保蔵流通科長）

麻生 真悟（利用部・利用技術科長）

蛸谷 幸司（利用部・原料化学科長）

北川 雅彦（利用部長）

研究要旨

バイオフィルム中にマイクロフローラとして存在するリステリアについて、スケトウダラの一次加工を主たる業務とするS水産加工施設をモデルとして、非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程における最適な衛生管理手法を確立することを目的とし、バイオフィルム構成菌に関して検討を行った。

水産加工施設の製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリア属菌の有無について調査を行った。剥皮機の上面カバー部、フォークリフトのアクセルペダル部の2箇所（3検体）から採集したバイオフィルムでは、クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属陽性であるコロニーを検出した。バイオフィルムの検討後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地からの分離株については、DNA分析とリステリア属菌の同定を行った。

A. 研究目的

近年、わが国では水産物のリステリア・モノサイトゲネスによる汚染が注目され、食中毒発生防止の観点から、危害分析と衛生管理構築の試みがなされている。本菌の工場内環境汚染を考察するとき、バイオフィルムの除去は実施すべき重要な一般的衛生管理事項の一つと考えられる。

我々は、バイオフィルム中にマイクロフローラとして存在するリステリア属菌について、スケトウダラの一次加工を主たる業務とするS水産加工施設をモデルとして、非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程における衛生管理のための、最適なモニタリング手法の確立を試みた。

モニタリング方法として、まずS水産加工施設の非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程からバイオフィルム採取効率を向上するため、拭き取り試験および一般生菌数査用のバイオフィルム懸濁液に界面活性剤の Tween 80 を添加し、バイオフィルムの採取効果を検討した。また、採取したバイオフィルムの構成細菌を調べることにより、どのような構成菌がリステリア属菌を含むバイオフィルムを作るかを知るために、バイオフィルム中の一般生菌数と、大腸菌およびリステリア属菌の有無について調査を行った。さらに、一般生菌の遺伝子解析を行うことにより、バイオフィルム中の一般生菌叢を形成する細菌を明らかにし、リステリア属菌との競合あるいは拮抗の関係を考察した。

B. 研究方法

1. 調査施設

調査施設は北海道釧路管内にあり、塩タラコ製品をはじめスケトウダラフィレーなどの水産加工品を製造している。

2. 調査試料

(1) バイオフィルム採取方法の検討

効率的にバイオフィルム採取を行うための

検討として、生理食塩水および Tween 80 添加による、バイオフィルム採取効果を検討した。

原料作業台(上面)より 0%, 0.1%, 0.25%, 0.5%の各濃度の Tween 80・生理的食塩水を浸漬した綿棒を用い、一定面積を拭き取り、10倍量の乳剤を調整後、同濃度の Tween 80・生理的食塩水で希釈して一般生菌数を測定した。

(2) バイオフィルム検体採取

上述の調査施設では、原料は北海道東部沿岸で漁獲されたスケトウダラを用い、水揚げ当日に施設に搬入して裁割を行っている。当該施設において、原魚裁割から製品に至る工程で使用される器材、並びに作業環境よりバイオフィルムを採取した。採材は、採材は、昨年度(2008年)10月(検体A群; 9箇所)、2009年8月(検体B群; 20箇所)、2009年11月(検体C群; 6箇所)に行った。バイオフィルムの採集は、滅菌済みのマイクロスパーテルあるいはスクレイパーを用いて、バイオフィルムを器材および作業環境より剥離し、滅菌済み蓋付き小型試験管(樹脂製)に採集した。各バイオフィルムの採集箇所および細菌検査に供した重量は、別添の釧路水産試験所の事業報告書表 1-3 に示した。

(3) 菌数測定

採集したバイオフィルムの一般生菌数、大腸菌およびリステリア属菌の菌数測定は、以下に示す方法で行った。

一般生菌数: 図 1 に示した重量のバイオフィルムを滅菌チューブに無菌的に精秤し、これに滅菌済みの 0.1% Tween 80・生理的食塩水を 10 ml 加えて激しく攪拌し、10倍乳剤を調製した。この乳剤を適宜希釈し、標準寒天培地(日水製薬株式会社)に植菌し、35℃, 48 時間培養して一般生菌数を推定した。

大腸菌: 一般生菌と同様にバイオフィルムを

精秤し、これに滅菌済みの 0.1% Tween 80-生理的食塩水を 10 ml 加えて激しく攪拌し、10 倍乳剤を調製した。この乳剤を適宜希釈し、クロモアガー-ECC 培地 (CHROMagar 社, 推定培地) による植菌し、35°C, 24 時間培養して大腸菌の有無を推定した。

リステリア属菌: 重量を計測したバイオフィルムを滅菌チューブに無菌的に精秤し、ハーフフレイザー培地 (一次増菌培地; Oxoid 社) 10mL を加えて激しく攪拌した後、30°C で 24 時間培養した (一次増菌培養)。この培養液 1.0mL をフレイザー培地 (二次増菌培地; Oxoid 社) 10mL に接種し、37°C にて 24~48 時間培養した (二次増菌培養)。一次増菌培養および二次増菌培養した試料は、クロモアガーリステリア寒天培地 (CHROMagar 社) を用いて、37°C で 24~48 時間、画線培養を行い、水色定型集落およびハローの有無によりリステリア属菌の有無を推定した。

(4) 細菌株の分離と菌種推定

菌数測定後の一般生菌の標準寒天培地およびリステリア属菌のクロモアガーリステリア寒天培地の分離平板から菌株として分離し同定を試みた。バイオフィルムを構成する一般生菌の菌種推定および、リステリア属菌の菌種推定は以下のように行った。

リステリア属菌: クロモアガーリステリア寒天培地上の水色定形的集落から代表株を選別し、PALCAM リステリア培地上で発育させてリステリア属菌特有のオリーブ緑の集落を確認した。さらに、糖分解性試験、運動性試験、生化学試験等によってリステリア属菌については菌種同定を行った。

一般生菌: 検体 A 群では、リステリア属菌が疑われた 5 箇所と、検出されなかった 4 箇所の計 9 箇所、検体 B 群ではリステリア属菌が疑われた 2 箇所と、検出されなかった 2 箇所の計 4 箇所、検体 C 群ではリステリア属菌が疑わ

れた 1 箇所と、検出されなかった 5 箇所の計 6 箇所において、それぞれ一般生菌の菌種推定を行った。送付された分離平板上を CCD カメラ装着の生物顕微鏡で観察し、集落の形態や色調等によって分別し、各々の集落数を算定するとともに、各集落の代表株を保存した。

(5) 16S-rRNA 遺伝子配列解析およびホモロジー検索

得られたリステリア属菌および一般生菌の代表菌株を用いて、常法にしたがって鋳型 DNA を抽出し、これを精製した後、常法にしたがって塩基配列を決定した。

得られた遺伝子配列を Gene Bank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) に登録された 16S-rRNA をコードする DNA 塩基配列に対してホモロジー検索を行って、分離株の菌種を推定した。

(倫理面への配慮)

当該施設名、従業員名、製品に関する情報を匿名とした。

C. 研究結果

(1) バイオフィルム採取方法の検討

バイオフィルム懸濁液に Tween 80 を添加した場合の一般生菌数を比較した結果、バイオフィルム懸濁液の一般生菌数は 0% および 0.1% で差は認められなかった。

これらの結果より、バイオフィルムの採取には生理食塩水を用いることとした。

(2) バイオフィルム検体採取と菌数測定

一般生菌数および大腸菌:

検体 A 群における一般生菌数は、サイドテーブル側面の 10^{10} cfu/g biofilm が最高値、天井雨漏り部の 10^4 cfu/g biofilm が最低値を示し、その他の箇所では $10^6 \sim 10^{10}$ cfu/g biofilm に分布していた。検体 B 群における一般生菌数

は、 $10^5 \sim 10^9$ cfu / g biofilm に分布していた。たらこ室入り口戸の取手部で 10^3 cfu/g biofilm と低値であったが、これは採集試料の大部分が鉄錆等であったためと推測した。検体 C 群における一般生菌数は、 $10^6 \sim 10^8$ cfu / g biofilm に分布していた。

検体群 A～C において、 10^6 cfu/g biofilm 以上の一般生菌数が見られたのは全 52 検体中 48 箇所 (92%) であった。

また、リステリア属陽性のバイオフィームでは、一般生菌数が $10^7 \sim 10^9$ cfu/g biofilm に分布し、検体 B 群の剥皮機・上面カバー部で 1.3×10^9 cfu / g biofilm と最高値を示した。また、検体 A 群でリステリア属菌陽性であったフィレーマシンの、原魚処理用作業台、貯水タンク、木製パレットからは検体 B 群および検体 C 群では検出されず、フォークリフト・アクセルペダル部のみ 3 群とも検出された。このことから、フォークリフト・アクセルペダル部における継続的なリステリア属菌汚染が明らかとなった。

大腸菌は採集したすべてのバイオフィーム検体において陰性と推定された。

(3) リステリア属菌の分離と菌種推定

リステリア属菌の分離と菌種推定は、まず各バイオフィームの一次増菌培地および二次増菌培地の黒色化の有無とクロモアガーリステリア寒天培地の水色定型的集落の観察による一次スクリーニングによって菌株を分離し、生化学試験および 16S rRNA 遺伝子配列解析により菌種の推定を行った。

検体 A 群のテーブル側面、ポリ容器底面、床タイル、排水ピット・枠受け部、フィレーマシンのキャスター、フィレーマシンの魚体搬送部、スキナーローラー・受け部横、フォークリフト・タイヤ側面、フォークリフト・アクセルペダル、原魚処理用作業台 (木製板)、貯水タンク、木製パレット、プラスチック製まな板、原魚置き場壁の 12 箇所 18 検体で二次増菌培地

が黒色化した。そのうち 8 箇所 13 検体はクロモアガーリステリア寒天培地上に水色定型的集落を形成した。このうち木製パレット 4 ではハロー形成がみられ、*L.monocytogenes* が推定された。

検体 A 群のリステリア属菌の疑われる分離箇所を表 1 に、生化学試験を行った同定結果を表 2 に示した。ハロー形成株は、生化学検査の結果ラムノース分解性、キシロース非分解性、マンノース非分解性で、*L.monocytogenes* の性状を示した。また、他のリステリア属菌は、3 箇所 *L.seeligeri*、2 箇所 *L.innocua*、1 箇所 *L.grayi* が推定された。16S-rRNA 遺伝子配列解析を行ったところ、生化学検査結果とほぼ一致したが、*L.grayi* のみ *L.innocua* となり、同定結果は生化学試験の結果と一致しなかった。

検体 B 群のヘッドカッター・ベルト部、フィレーマシンの出口下部カバー、ザルカゴ・持ち手部 (2 箇所)、原料作業台、井戸水タンク・ホース部、たらこ室床面タイル・ねじ部、原料処理場・床面、木製パレット、剥皮機・上面カバー部、フォークリフト・タイヤホイール部、フォークリフト・アクセルペダル部の 10 箇所 12 検体で一次増菌培地の黒色化を確認できた。そのうち井戸水タンク・ホース部を除く 9 箇所 11 検体でクロモアガーリステリア寒天培地上に 24～48 時間後に水色定型的集落が確認された。しかしながら、剥皮機・上面カバー部、フォークリフト・アクセルペダル部の 2 検体以外は発色が 48 時間後と遅かった。二次増菌培地は、剥皮機・上面カバー部、フォークリフト・アクセルペダル部の 2 箇所 2 検体のみ黒色化し、クロモアガーリステリア寒天培地上で 24 時間後に水色定型的集落を形成した。このため、1 次増菌培地が黒色化したもののクロモアガーリステリア寒天培地で水色定型的集落形成に 48 時間を要した菌株については、疑似陽性と判定し、2 次増菌培地で 24 時間以内に水色

定型的集落を形成した 2 検体をリステリア属菌と推定した。これらの集落にはハロー形成はみらず、*L.monocytogenes* は推定されなかった。検体 B 群のリステリア属菌の生化学試験の結果を表 3 に示した。剥皮機・上面カバー部の代表菌株は、半流動培地で傘状発育を示し、ラムノース非分解性、キシロース分解性、マンノース非分解性、フォークリフト・アクセルペダル部の代表株はラムノース分解性、キシロース非分解性、マンノース非分解性であったことから *L.seeligeri* と *L.innocua* が推定された。示唆された。16S-rRNA 遺伝子配列解析の結果は生化学試験と一致した。

検体 C 群のフィレーマシ、原料作業台、ザルカゴ、フォークリフト・アクセルペダル部の 4 検体で 1 次増菌培地の黒色化がみられ、そのうち 3 検体でクロモアガーリステリア寒天培地上に 24~48 時間後に水色定型的集落が確認された。さらに、2 次増菌培地ではフォークリフト・アクセルペダル部の 1 検体のみ黒色化し、クロモアガーリステリア寒天培地で 24 時間以内に水色定型的集落を形成したため、この 1 検体をリステリア属菌と推定した。集落周辺にハロー形成はみられなかったため、*L.monocytogenes* は推定されなかった。検体 C 群のリステリア属菌の生化学試験の結果を表 4 に示した。フォークリフト・アクセルペダル部の代表菌株は半流動培地内で傘状発育を示し、ラムノース非分解性、キシロース非分解性、マンノース非分解性であったため *L.innocua* と推定した。16S-rRNA 遺伝子配列解析の結果は、生化学試験と一致した。

(4) 一般生菌の分離と菌種推定

一般生菌の菌種推定は、16S-rRNA 遺伝子配列解析により行った。検体 A~C 群における一般生菌の種類と存在比を表 5~7 に示した。

今回調査した全 23 検体のバイオフィルムのうち、最も多く検出された菌種はフラボバクテ

リウム属 (12 検体)、ロドコッカス属 (11 検体)、クラビバクター属 (10 検体) の 3 種類であった。シュードモナス属 (5 検体)、アシネトバクター属 (5 検体)、カルコバクター属 (4 検体) など比較的多くの箇所で見られた。

これらの一般生菌が、バイオフィルム中のリステリア属菌の有無と関連があるかを調べるために、リステリア属菌陽性バイオフィルム 8 検体とリステリア属菌陰性バイオフィルム 15 検体の計 23 検体における、一般生菌の出現割合を比較するため、リステリア属菌と一般生菌の存在割合を表 8 に示した。これらのうち、グラメラ属、パラコッカス属、サイクロバクター属は 25% のリステリア属菌陽性バイオフィルム中に検出されたが、リステリア属菌陰性バイオフィルムには 6.7% しか検出されず、出現割合に約 3.7 倍差があった。推定した一般生菌の菌種を属ごとに分類し、リステリア属菌と一般生菌の有無により 2 x 2 分割表を作成してフィッシャーの直接確率法により確率 p を求め、有意差検定を行った (表 9)。これらの解析結果より、 $2p$ 値が 0.05 未満となる一般生菌はみられず、有意水準 5% でリステリア属群の有無と一般生菌の出現割合に差がないことがわかった。

D. 考 察

L.monocytogenes は比較的乾燥に強く、低温でも増殖することが知られている。近年、水産加工施設の塩タラコ製造過程において、ローラーコンベヤ、パレットおよび魚卵漬け込み容器外壁より当該菌を含むバイオフィルムが検出されており、非加熱で製造・喫食される水産加工品では、衛生管理の最適なモニタリング手法の確立が求められると同時に、その防除方法が大きな課題となっている。

今回、モニタリング方法としてバイオフィルム採取方法の検討を行った。生理食塩水に Tween 80 を添加して拭き取りおよびバイオフ

イルムの懸濁を行い、一般生菌数を比較したところ、Tween 80の有無による差はなかった。しかしながら、今回使用したバイオフィームは湿潤状態を保っており、溶解しやすいものであったと考えられる。今後、難溶のバイオフィームについては検討する必要がある。

水産加工施設において採取した52検体のバイオフィームのうち、11検体のバイオフィームからリステリア属菌を推定した。そのうち1検体は *L.monocytogenes* であった。リステリア属菌の検出割合としては、検体A群では26検体中8検体(30.7%)、検体B群では20検体中2検体(10.0%)、検体C群では6検体中1検体(16.7%)であり、高率でリステリア属菌が検出されている。また、フォークリフト・アクセルペダル部における継続的なリステリア属菌汚染も明らかとなった。工場内においてリステリア・モノサイトゲネスおよびリステリア属菌を検出したことから、原魚裁割工程における原卵への交叉汚染が容易に推測される。

当該施設で採集したバイオフィームにリステリア属菌が陽性を示した理由の一つとして、当該施設が未舗装の道路に隣接しており、運搬作業や気象条件等により、土壌が施設内に持ち込まれやすい環境にあるためと考えられる。特に、フォークリフト・アクセルペダル部は足で踏んで操作を行うため、特に土壌からの汚染を受けやすいと考えられる。リステリア属菌の検出割合が検体A群に比べて検体B群および検体C群でわずかに減少しているのは、第1回目の調査である検体A群の結果を受けて、水産加工施設が自主的に施設内の整頓・清掃を実施した影響によるものと思われる。

バイオフィーム中の一般生菌とリステリア属菌の有無の関連については、食品加工工場常在菌との共存によるリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィーム中の増殖効果に関する報告 (Brigitte Carpentier et.al. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes*

and resident microorganisms from food industry premises International J. of Food Microbiology 97 111-122.(2004)) や、シュードモナス属によるリステリア属菌のコロニー形成能向上に関する報告 (Sasahara,K.C et.al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism inflowing systems. J. Food Prot. 56, 1022-1028.(1993))、フラボバクテリウム属との共存によるリステリア・モノサイトゲネスの表面接着能向上に関する報告 (Bremer, P.J.et.al. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. J. Food Prot. 64,1369-1376.(2001)) などに、リステリア属菌と他属菌がバイオフィーム形成時の相互作用があることが示唆されている。しかしながら、環境中でのバイオフィーム中のリステリア属菌と一般生菌の関連について解析した、疫学的な報告はこれまでなかった。

今回、食品工場から実際に採取したバイオフィームを用い、リステリア属菌と一般生菌の菌種を推定して、その関連について明らかにしようと試みたが、統計的に有意な差は見られなかった。しかしながら、グラメラ属、パラコッカス属、サイクロバクター属のリステリア属菌陽性バイオフィーム中の出現割合はリステリア属菌陰性バイオフィームに比べて3.7倍高く、何らかの関連があることも示唆される。

今後の検討課題として、サンプリングの継続による検体数の向上や、今回得られた一般生菌とリステリア属菌を用いた実験的バイオフィーム作製と評価などが挙げられる。バイオフィーム中でリステリア属菌と相互作用する環境菌が明らかになれば、リステリア汚染の指標や危険度の評価、モニタリングに用いることができる。

今回の検討では、リステリア属菌の有無と有

意に関連をもつ菌種は推定できなかった。そこで、バイオフィルムの効率的な除去方法を検討することにより、リステリア属のバイオフィルムへの定着・増殖を予防するための検討を行った。施設内の清掃管理では、効果の高い消毒薬などを多用することで、耐性菌の選択的増加をもたらす危険性がある。また、薬物の食品内混入の危険性があるため、できるだけ温和で効果の高い条件による洗浄消毒法が求められている。スチーム処理は薬剤を使用しないという利点があり、洗浄後洗剤浸漬処理と組み合わせて行うことが望ましいといえる。

E. 結論

塩タラコの製造施設において、製造環境からバイオフィルム 52 検体を採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリア属菌の有無について調査を行った。その結果、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、最高値がサイドテーブル側面の 10^{10} cfu/g biofilm、最低値がたらい入り口戸・取手部の 10^3 cfu/g biofilm であり、その他は $10^5 \sim 10^9$ cfu/g biofilm に分布していた。このうち、フィレーマシンのフォークリフト、原魚処理作業台、木製パレット、貯水タンク、剥皮機の 6 箇所 11 検体からリステリア属菌が検出された。さらに、木製パレット 1 検体で *L.monocytogenes* が検出された。これらのうち、リステリア属菌の検出されたバイオフィルム 8 検体と検出されなかったバイオフィルム 15 検体において、バイオフィルムを構成する一般生菌の菌種を 16S-rRNA 遺伝子配列解析で推定し、その存在割合比較したところ、バイオフィルム中の一般生菌とリステリア属菌の有無に有意な関連は見られなかった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図1

微生物試験のプロトコール

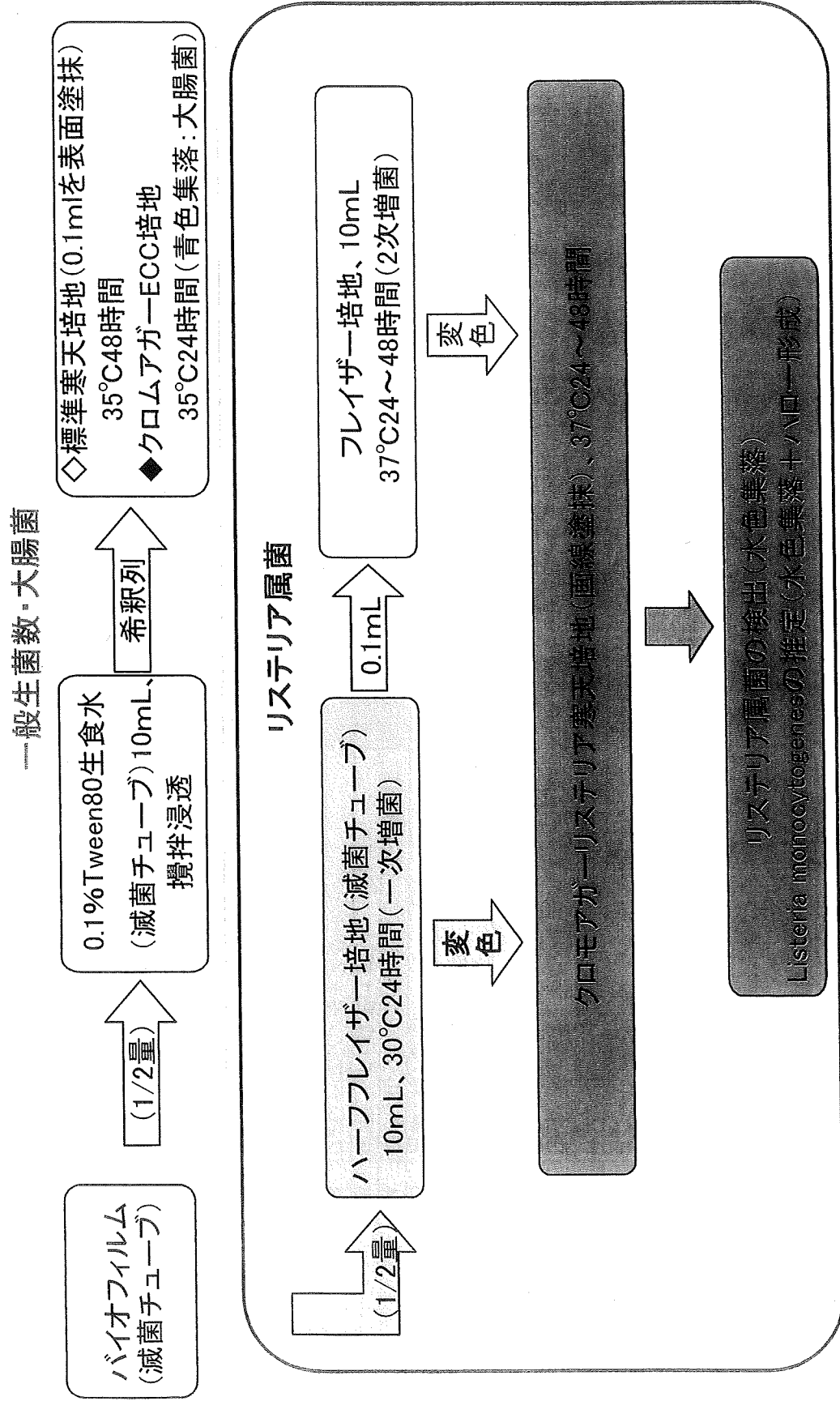


表1. リステリア(2008年10月分離) 検体A群

No.	採集箇所	二次増菌培地		クロモアガー-リステリア寒天培地	
		変色		水色集落	ハ口形成
2	テーブル側面	+		-	-
3	サイドテーブル側面	-			
4	サイドテーブル・キャスターハウジング	-			
5	魚卵処理台(ステン)表面	-			
6	床タイル	-			
7	ポリ容器底面	+		-	-
9	計量器秤量台周囲	-			
10	台車(緑)表面	-			
14	床タイル	+		+	-
16	排水ピット・粹受け部	+			
18	フレアマシンキャスター	+		+	-
19	フレアマシン魚体搬送部	+		+	-
21	スキナー・ローラー受け部横	+			
22	フォークリフト・タイヤ側面	+		+	-
23	フォークリフト・アクセルペダル	+		+	-
24	天井雨漏り部	-			
25	天井ドレイン	-			
28	原魚処理用作業台-1(木製板)	+		+	-
30	貯水タンク	+		+	-
32	木製パレット-1	+			
33	木製パレット-2	+		+	-
34	木製パレット-3	+		+	-
35	原魚処理用作業台-2(木製板)	+		+	-
36	プラスチック製まな板	+		+	-
38	原魚置き場壁	+		+	-
47	木製パレット-4	+		+	-

表2. リステリアの糖分解性試験(2008年10月分離) 検体A群

場所No.	名称			生化学試験							判定
	場所	コロニーNo.	代表菌株名	Halo形成	ラムノース	キシロース	マンニット	キシロース	マンニット		
19	ファイルマシノ魚体搬送部	1	L1	-	-	+	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>	
		2	L2	-	-	+	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>	
		3	L3	-	-	+	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>	
22	フォークリフト・タイヤ側面	1	L4	-	-	+	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>	
		2	L5	-	-	+	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>	
		3	L6	-	-	+	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>	
23	フォークリフト・アクセルペダル	1	L7	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
		2	L8	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
		3	L9	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
28	原魚処理用作業台-1(木製板)	1	L10	-	-	-	-	-	+	<i>L. grayi</i>	
		1	L11	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
		2	L12	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
34	木製パレット-3	3	L13	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
		1	L14	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
		2	L15	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
35	原魚処理用作業台-2(木製板)	3	L16	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
		1	L17	+	+	-	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	
		2	L18	+	+	-	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	
47A	木製パレット-4(A)	1	L19	+	+	-	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	
		2	L20	+	+	-	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	
47B	木製パレット-4(B)	1	L19	+	+	-	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	
		2	L20	+	+	-	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	

表3. リステリアの糖分解性試験(2009年8月分離) 検体B群

場所No.	コロニー名	発芽発育	ラムノース	キシロース	マンノース	判定
1	ヘッドカッター ベルト部(処理前)	-	-	+	+	非リステリア属
						非リステリア属
6	ファイアマシン1 出口下部カバ(処理前)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
7	ファイアマシン1 出口下部カバ(スクラム後)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
12	ザルカゴ2 持ち手部(処理前)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
13	ザルカゴ3 持ち手部(処理前)	-	-	-	+	非リステリア属
						非リステリア属
19	原料作業台 上面(処理前)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
23	床面1 たらこ室(ねじ部)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
27	ザルカゴ4 持ち手部(塩素浸漬後)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
28	ザルカゴ5 持ち手部(洗剤浸漬後)	-	-	-	-	非リステリア属
						非リステリア属
40	木製パレット: 側面部	-	+	+	+	非リステリア属
						<i>L. seeligeri</i>
42H(1次増菌)	剥皮機 上面カバ一部	+	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
						<i>L. seeligeri</i>
42F(2次増菌)	剥皮機 上面カバ一部	+	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
						<i>L. seeligeri</i>
50H(1次増菌)	フォークリフト アクセルペダル部	+	+	-	-	<i>L. innocua</i>
						<i>L. innocua</i>
50F(2次増菌)	フォークリフト アクセルペダル部	+	+	-	-	<i>L. innocua</i>
						<i>L. innocua</i>

表4. リステリアの糖分解性試験(2009年11月分離) 検体C群

場所No	コロニーNo	PALCAM発育	糖分解試験				運動性	判定
			マンニトール	キシロース	ラムノース			
T-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
T-6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
T-9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
T-12	L70	+	-	-	-	傘状発育	<i>L. innocua</i>	
(F10)	L71	+	-	-	-	傘状発育	<i>L. innocua</i>	
T-15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
T-18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
T-21	L72	発育せず (栄養培地には発育)	nd	nd	nd	nd	非リステリア属	
(F19)	L73	発育せず (栄養培地には発育)	nd	nd	nd	nd	非リステリア属	

表5. 一般生菌の菌種と存在比率 検体A群

リステリアの有無	バイオフィーム採取場所	株名	数	%	遺伝子解析
-	木製パレット2	35	65	33.7	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		36	79	40.9	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>
		37	46	23.8	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		38	3	1.6	<i>Gramella forsetii</i>
-	プラスチック製まな板	39	68	56.2	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
		40	12	9.9	<i>Caulobacter crescentus</i>
		41	41	33.9	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>
		43	4	10.8	<i>Pseudomonas putida</i>
-	原魚置場壁	44	30	81.1	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
		45	3	8.1	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
-	スキナーローラー受け部横	52	30	42.3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		53	41	57.7	<i>Rhodococcus</i> sp. RH41
	フレーマシン魚体搬送部	3	35	66.0	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>
		4	15	28.3	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		5	1	1.9	<i>Rhodococcus opacus</i>
		6	2	3.8	<i>Gramella forsetii</i>
		15	17	100.0	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
		17	30	68.2	<i>Paracoccus denitrificans</i>
	原魚処理作業台2(木製板)	19	2	4.5	<i>Minibacterium massiliensis</i>
		20	6	13.6	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		21	1	2.3	<i>Gramella forsetii</i>
		22	5	11.4	<i>Rhodococcus</i> sp. RH41
	原魚処理作業台1(木製板)	28	10	11.9	<i>Aeromonas salmonicida</i>
		29	19	22.6	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		30	21	25.0	<i>Proteus mirabilis</i>
		31	34	40.5	<i>Paracoccus denitrificans</i>
	木製パレット4	46	22	42.3	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
		47	7	13.5	<i>Deinococcus radiodurans</i>
		48	5	9.6	<i>Bordetella avium</i>
		49	10	19.2	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		51	8	15.4	<i>Caulobacter crescentus</i>

表6. 一般生菌の菌種と存在比率 検体B群

リステリアの有無	バイオフィルム採取場所	株名	数	%	遺伝子解析
-	ファイルマシ1 出口下部カバー(処理前)	62	7	43.8	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		63	7	43.8	<i>Enterobacter</i> sp.
		64	2	12.5	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>
		77	47	62.7	<i>Rhodococcus opacus</i>
-	ザルカゴ2 持ち手部 (処理前)	78	4	5.3	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		79	8	10.7	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		80	3	4.0	<i>Gordonia bronchialis</i>
		85	1	1.3	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>
-	ザルカゴ3 持ち手部 (処理前)	81	12	16.0	<i>Rhodococcus jostii</i>
		86	12	19.4	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>
		87	6	9.7	<i>Rhodococcus jostii</i>
		88	4	6.5	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
-	原料作業台 上面 (処理前)	89	6	9.7	<i>Caulobacter crescentus</i>
		90	34	54.8	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		99	12	29.3	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
		100	9	22.0	<i>Acinetobacter baumannii</i>
-	木製パレット 側面部	101	5	12.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		103	9	22.0	<i>Rhodococcus jostii</i>
		102	6	14.6	<i>Paracoccus denitrificans</i>
		128	17	26.2	<i>Serratia proteamaculans</i>
-	フォークリフト タイヤホイール部	129	36	55.4	<i>Psychrobacter</i> sp.
		130	12	18.5	<i>Pedobacter heparinus</i>
		150	24	75	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		151	4	12.5	<i>Rhodococcus jostii</i>
-	剥皮機 上面カバー部	152	4	12.5	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		131	3	21.4	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>
		132	8	57.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		133	3	21.4	<i>Arthrobacter aureescens</i>
-	フォークリフト アクセルペダル部	150	3	14.3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		154	6	28.6	<i>Psychrobacter</i> sp.
		155	4	19.0	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
		156	7	33.3	<i>Micrococcus luteus</i>
		151	1	4.8	<i>Rhodococcus jostii</i>