

## 分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための  
微生物同定方法の確立

協力研究報告書

最確数法による果実汚染真菌の定量方法

工藤 由起子

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・安全確保推進研究事業)

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

研究代表者 工藤 由起子(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

### 分担研究報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

研究分担者 工藤 由起子(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

### 協力研究報告書

最確数法による果実汚染真菌の定量方法

#### 研究要旨

食品中の真菌数の定量方法について、圃場で汚染が起こりやすく腐敗の原因として真菌があげられる果実を用いて検討を行った。方法には、従来から用いられている塗抹培養法に加え、細菌数の定量方法として使用されている最確数(most probable number; MPN)法を従来通りの試験管での液体培養による MPN 法および寒天平板培地に塗抹する平板 MPN 法を用いた。市販の国産果実 9 種 27 検体を供試し、果実の表皮部分を検体として用いた。その結果、MPN 法では真菌の発育が遅く、ほとんどの検体において定量値が塗抹培養法および平板 MPN 法に比べて低かった。塗抹培養法および平板 MPN 法では、4 日間培養で 10 日間培養とほぼ同等の定量値を得られ、両方法の定量値に大きな差はなかった。平板 MPN 法は、真菌の生育した平板培地枚数から定量値を算出するものであるため、塗抹培養法でコロニー数を計測するよりも正確な数値が統計学的な手法によって得られ、また定量操作として簡便であることから、優れた迅速な真菌定量方法であることが明らかになった。

#### 研究協力者

堤 史行、小沼博隆（東海大学海洋学部）

渡辺 麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）

#### A. 研究目的

真菌の食品汚染は、食品の保存性を損なわせる大きな要因のひとつであり、青果物<sup>1)</sup>や穀物<sup>2)</sup>など多くの食品の腐敗や変敗に関係している。真菌の発生を理由に莫大な量の食品やその原料が廃棄されており食料損失や経済的損失となっている<sup>3)</sup>。真菌数は品質の良さの目安となり、真菌の生育に適した保存条件では真菌の汚染量が多いほど真菌の発生性が高くまた保存期間が短くなることが考えられる。汚染真菌量をできるだけ迅

速に正確に測定する方法や、汚染真菌数の低い食品の製造の評価に用いる真菌数のより正確な測定方法が必要である。真菌数の測定には、通常は食品検体乳剤の希釀列を作製し、それを真菌選択性寒天平板培地に塗抹し 5~10 日間培養してコロニー数を測定する方法が用いられる。判定までに数日を要することから、迅速な測定が必要な場合には適していない。

真菌数の測定法については、顕微鏡下観察する直接顕微鏡法や ATP 法などもある<sup>4)</sup>

が、培養法では塗抹培養法が主であり、細菌で使われている最確数 (most probable number; MPN) 法<sup>5)</sup>や疎水性格子膜メンブランフィルター (HGMF) 法<sup>6)</sup>の応用<sup>7-9)</sup>についても少數の報告がある。MPN 法では通常使われる液体培地に代えて寒天平板培地を用いる平板 MPN 法が、培地の使用量が少なくて済み、液体培地を用いる通常の MPN 法での測定値とよく一致することが報告されている<sup>10)</sup>。しかし、細菌に比べ真菌の定量方法の検討は多くはない。

本研究では、果実の腐敗や変敗に真菌の発生が関与することが多いことから、果実を汚染する真菌を対象にし、塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法を用いて真菌の定量方法の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試検体

2008 年 7 から 11 月に東京都および神奈川県内の小売店で購入した国内産果実 9 種類(表1)の各 3 検体計 27 検体を供試した。検体ごとにビニール袋に保存し、二次汚染が生じないようにして研究所へ輸送した。

### 2. 検体乳剤および希釀列の作製

真菌の汚染が果実表面であることから各果実の表皮を検体とした。リンゴ、レモン、ミカン、メロン、ナシおよびモモでは、1 個から表皮、ヘタなど様々な部位を滅菌したメスで切り取った。ブドウおよびイチゴでは、複数個の表皮を滅菌したメスで切り取った。果実表皮 5 g をストマッカー袋に入れ、Chloramphenicol (50 mg/ml) 添加 Potato dextrose broth (PDB、ベクトン・ディッキンソン、米国) 45 ml を加えて検体をストマッカーにて破碎し、検体乳剤を作製した。この検体

乳剤 1 ml を PDB 9 ml に加え、さらにその 1 ml を PDB 9 ml に加えた。この操作を繰り返し行い、10<sup>-6</sup>まで希釀検体を作製した。

### 3. 真菌の定量方法

塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法の 3 種の方法にて真菌数の測定を行った(図1)。

塗抹培養法では、検体乳剤および各段階の希釀検体を各 5 枚の Chloramphenicol (50 mg/ml) 添加 potato dextrose agar (PDA、栄研化学株式会社) 培地に 0.1 ml ずつ塗抹し、25°C で 10 日間培養を行った。

平板 MPN 法では、検体乳剤および各段階の希釀検体を各 3 枚の PDA に 1 ml ずつ塗抹し浸透を確認した後に 25°C で 10 日間培養を行った。

MPN 法では、滅菌試験管 3 本に検体乳剤 10 ml、PDB 9 ml が入った試験管 3 本に検体乳剤 1 ml を加えた。次に、PDB 9 ml が入った試験管 3 本に 10<sup>-1</sup> 希釀検体 1 ml を加えた。この操作を 10<sup>-6</sup> 希釀検体まで行った後に 25°C で 10 日間培養を行った。

培養 2、4、7 および 10 日目に真菌の生育を確認した。塗抹培養法では 5 枚の培地上に形成を確認できたコロニー数を計測した。MPN 法ではカビの菌体の浮遊や培地の濁りを確認できたものを、平板 MPN 法ではコロニーの形成を確認できたものを陽性とし、MPN 表を用いて MPN 値を算出した。

### 4. 統計処理

果物ごとの方法間の真菌数定量値および方法ごとの果実間の真菌数定量値を一元配置分散分析にて解析し、その結果、有意差の認められた組み合わせについては Bonferroni-Dunn 検定にて解析した。

### C. 研究結果

果実 24 検体の全検体より真菌を検出した。塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法における培養 10 日目での真菌数定量値を比較したところ、イチゴ以外の全検体で MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が低かった(表 2)。このうちメロンでは MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも有意に低い定量値であった(MPN 法 vs 塗抹培養法では  $p < 0.01$ 、MPN 法 vs 平板 MPN 法では  $p < 0.05$ )。しかし、イチゴでは MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が高かった。

各果実での各測定方法による経時的な測定値を図2~9に示す。

リンゴ(図2)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 4.80 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 5.46 log MPN/g、塗抹培養法が 5.54 log cfu/g であった。また、リンゴの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は培養 2~9 日目に菌数が急激に増加したのに対し、MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法では菌数の増加は少量であった。

ブドウ(図3)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 4.44 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 4.48 log MPN/g、塗抹培養法が 4.60 log cfu/g であった。また、ブドウの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法が培養 2~4 日目に菌数が急激に増加した。7 日目以降は MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法と同様に菌数の増加は少量であった。

レモン(図4)では、3 法とも菌数が非常に低かった。各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 2.33 log MPN/g、MPN

寒天平板培養法が 2.78 log MPN/g、塗抹培養法が 2.43 log cfu/g であった。また、レモンの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は培養 2~9 日目、MPN 寒天平板培養法が、10 日目まで増加傾向であったのに対し、塗抹培養法では 7 日目以降の菌数の増加は少量であった。

メロン(図5)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 5.19 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 6.69 log MPN/g、塗抹培養法が 6.57 log cfu/g であった。また、メロンの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は培養 2~7 日目に菌数が急激に増加したのに対し、MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法では菌数の増加は少量であった。

ナシ(図6)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 4.77 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 4.88 log MPN/g、塗抹培養法が 5.36 log cfu/g であった。また、ナシの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法と比較すると、培養 2~10 日目に菌数が急激に増加した。

モモ(図7)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 4.38 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 4.84 log MPN/g、塗抹培養法が 4.50 log cfu/g であった。また、モモの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は培養 2~7 日目に菌数が急激に増加したのに対し、MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法では菌数の増加は少量であった。

イチゴ(図8)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 5.24 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 4.91 log

MPN/g、塗抹培養法が 4.72 log cfu/g であった。また、イチゴの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は培養 2~9 日目に菌数が急激に増加したのに対し、MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法では 2 日目以降の菌数の増加は少量であった。

ミカン(図9)では、各検査法の 3 検体の平均値は、MPN 試験管培養法が 3.88 log MPN/g、MPN 寒天平板培養法が 4.74 log MPN/g、塗抹培養法が 4.41 log cfu/g であった。また、ミカンの生菌真菌数の推移を見ると、MPN 試験管培養法は培養 2~9 日目に菌数が急激に増加したのに対し、MPN 寒天平板培養法、塗抹培養法では 4 日目以降の菌数の増加は少量であった。

#### D. 考察

塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法における培養 10 日目での真菌数定量値では、イチゴ以外の全検体で MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が低かった(表 2)。イチゴでは MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が高かつた。これは、PDB 中で増殖した菌種中に寒天培地上よりも液体培地中で増殖に優れる菌が存在し、それらが発育したことが原因として考えられた。Koburger & Norden<sup>7</sup>らは、MPN 法、塗抹培養法および混釀培養法を比較し、MPN 法のみで菌数が測定された食品があつたことから、寒天培地よりも液体培地での増殖に適している真菌もあることを報告している。本研究においても、イチゴを汚染していた真菌が寒天培地よりも液体培地での増殖に適していたことが考えられた。また、全検体において塗抹培養法と平板 MPN 法の定量値に大きな差はなかった。

各果実での各測定方法による測定値を経時的に比較すると、MPN 法では、ブドウでは 4 日間、モモでは 7 日間の培養で定量値が 10 日目とほぼ同じであったが、リンゴ、レモン、ミカン、メロンおよびナシでは 10 日目まで測定数が上昇し菌数の決定には 10 日間の培養が必要であった。塗抹培養法および平板 MPN 法では、レモン以外の全果実で 2 または 4 日目の測定値が 10 日目とほぼ同じであり、菌数の決定に 2 または 4 日間の培養で終えられることが判明した。レモンではいずれの方法でも測定値 3 log 未満と低く 10 日目まで測定値の上昇がみられ 10 日の培養が必要であった。果実検体の全体の傾向として、MPN 法では培養日数が増えるとともに菌数が増加したが、塗抹培養法および平板 MPN 法では多くの真菌が 4 日目でコロニーとして現れ、10 日目までの菌数の増加は少なかつた。液体培地を用いる MPN 法よりも寒天平板培地を用いる塗抹培養法および平板 MPN 法のほうが定量値が高い傾向が示された。また、いずれの培養日数でも塗抹培養法および平板 MPN 法の定量値は、ほぼ同じ程度であった。

平板 MPN 法では、寒天平板培地上の真菌の発育が確認された培地数から MPN 表を用いて定量値を算出する。このため MPN 法という統計学的な手法によってより科学的な定量値が得られた。塗抹培養法では寒天平板培地上のコロニー数の測定に時間要するが、平板 MPN 法では寒天平板培地を観察する時間が短く、定量操作として簡便であった。また、塗抹培養法および平板 MPN 法では、生育が確認されたコロニーは小さいため菌種の推察や決定は難しかったが、真菌の測定が行えた後も引き続き培養することで菌

種の同定が行えると考えられた。また、カビ毒産生菌など菌数定量の対象が限られる場合には寒天平板培地の種類を工夫することによってある程度は特定の菌種の定量ができる可能性もあると考えられる。

本研究では、全検体から真菌を検出し、このうちメロンでは塗抹培養法および平板 MPN 法で 6log MPN または CFU/g を超える高い真菌数が測定された(表2) ( $p < 0.05$  または 0.01)。メロンは表面構造の複雑であることなど菌が付着しやすいことが菌数の高くなっていることの要因のひとつとして考えられた。また、メロンの pH は 6.2–6.5<sup>11)</sup>と中性であり pH が低いものよりは細菌や真菌が増殖しやすいことが言われている<sup>12)</sup>。一方、レモンではいずれの測定方法でも 3log MPN または CFU/g 未満であり他の果実での菌数に比べて極端に少なかった(表 2) ( $p < 0.05$  または 0.01)。これはレモンの pH が 2.2–2.6 と低い<sup>12)</sup>ことが付着真菌の生残に影響することが考えられた。その他の果実は概ね pH 4.5–3.2 であり、それら果実での検出菌数も有意な差はなかった(表2)。

本研究の結果から、平板 MPN 法は 4 日間の培養によって統計学的な数値として高い定量値が得られ、また定量操作が簡便であることから、優れた迅速な真菌定量方法であることが明らかになった。

## E. 結論

果実を用いて食品中の真菌数の定量方法について検討を行った。方法には、従来から用いられている塗抹培養法に加え、細菌数の定量方法として使用されている MPN 法を従来通りの試験管での液体培養による MPN 法および寒天平板培地に塗抹する平

板 MPN 法を用いた。その結果、MPN 法ではほとんどの検体において定量値が塗抹培養法および平板 MPN 法に比べて低かった。塗抹培養法および平板 MPN 法では、両方法の定量値に大きな差はなかった。しかし、平板 MPN 法は、真菌の生育した平板培地枚数から定量値を算出するものであるため、塗抹培養法よりも正確な数値が統計学的な手法によって得られ、また定量操作として簡便であることから、優れた迅速な真菌定量方法であることが明らかになった。

## F. 参考文献

- 1) Pitt, J. I. and Hocking, A. D. Fresh and perishable foods. In : Fungi and food spoilage. Springer. NY, USA. 2009.
- 2) Pitt, J. I. and Hocking, A. D. Spoilage of stored, processed and preserved foods. In : Fungi and food spoilage. Springer. NY, USA. 2009.
- 3) Pitt, J. I. and Hocking, A. D. Introduction. In : Fungi and food spoilage. Springer. NY, USA. 2009.
- 4) Jarvis, B., et al. Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. J. Appl. Bacteriol. 55: 325–336, 1983.
- 5) Oblinger, J. L. and Koburger, J. A. Understanding and teaching the most probable number technique. J. Milk Food Technol. 38: 540–545, 1975.
- 6) Sharpe, A. N. Machine for printing hydrophobic grids on membrane filters. Appl. Microbiol. 30: 110–112, 1975.
- 7) Koburger, J. A. and Norden, A. R. Fungi in Food VII. A comparison of the surface,

- pour plate, and most probable number methods for enumeration of yeast and molds . J . Milk Food Technol. 12 : 745–746, 1975.
- 8) Brodsky, M. H., et al. Determination of aerobic plate and yeast and mold counts in foods using an automated hydrophobic grid-membrane filter technique. J. Food Prot. 45: 301–304, 1982.
- 9) Entis, P. Two-day hydrophobic grid membrane filter method for yeast and mold enumeration in foods using YM-11 agar: collaborative study. J. AOAC Int. 79: 1069–1082, 1996.
- 10) Tan, S. T., et al. Colony-forming unit enumeration by a plate-MPN method. J. Food. Prot. 46: 836–841, 1983.
- 11) Carlin, F. “Fruits and vegetables”. Food microbiology, 2<sup>nd</sup> ed. Doyle, M. P., Beuchat, L. R., ed. Washington D. C., USA, ASM press: 157–170, 2007.
- 12) Anon. “Fruits and fruit products”. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities, 2<sup>nd</sup> ed. ICMSF, New York, USA, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 326–359, 2005.
- Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. and Kumagai, S. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. J. Food Prot. 印刷中.
- Ui, J., Kondo, K., Sawada, T. and Hara-Kudo, Y. Survival of foodborne pathogens in grain products and effect of catechins. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 50:126–130, 2009.
- Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikeda, M., Konuma, H. and Hara-Kudo, Y. Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the Loop-mediated isothermal amplification. J. Food Prot. 72: 748–754, 2009.
- 野田裕之、千須和美母衣、金子通治、尾上洋一、高島浩介、工藤由起子. ブラックターゲートエビに接種した *Salmonella* Weltevreden 及び *S. Senftenberg* の生残性. 食品衛生学雑誌. 50: 86–90, 2009.
- Toyota-Hanatani, Y., Ekawa, T., Ohta, H., Igimi, S., Hara-Kudo, Y., Sasai, K. and Baba, E. An assessment on inactivated-Salmonella enteritidis vaccine treatment in the layer flocks with regard to public health. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1005–1010, 2009.
- Hidaka, A., Hokyo, T., Arikawa, K., Fujiwara, S., Ogasawara, J., Hase, A., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 106: 410–420, 2009.
- Hara-Kudo, Y. and Takatori, K. Microbial

## G. 研究発表

### 論文発表

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. and Konuma, H. Enumeration methods for fungal contaminants in fruits by the most probable number method. 投稿中.

quality of liquid egg and *Salmonella* infection status in Japan. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 50: 34-40, 2009.

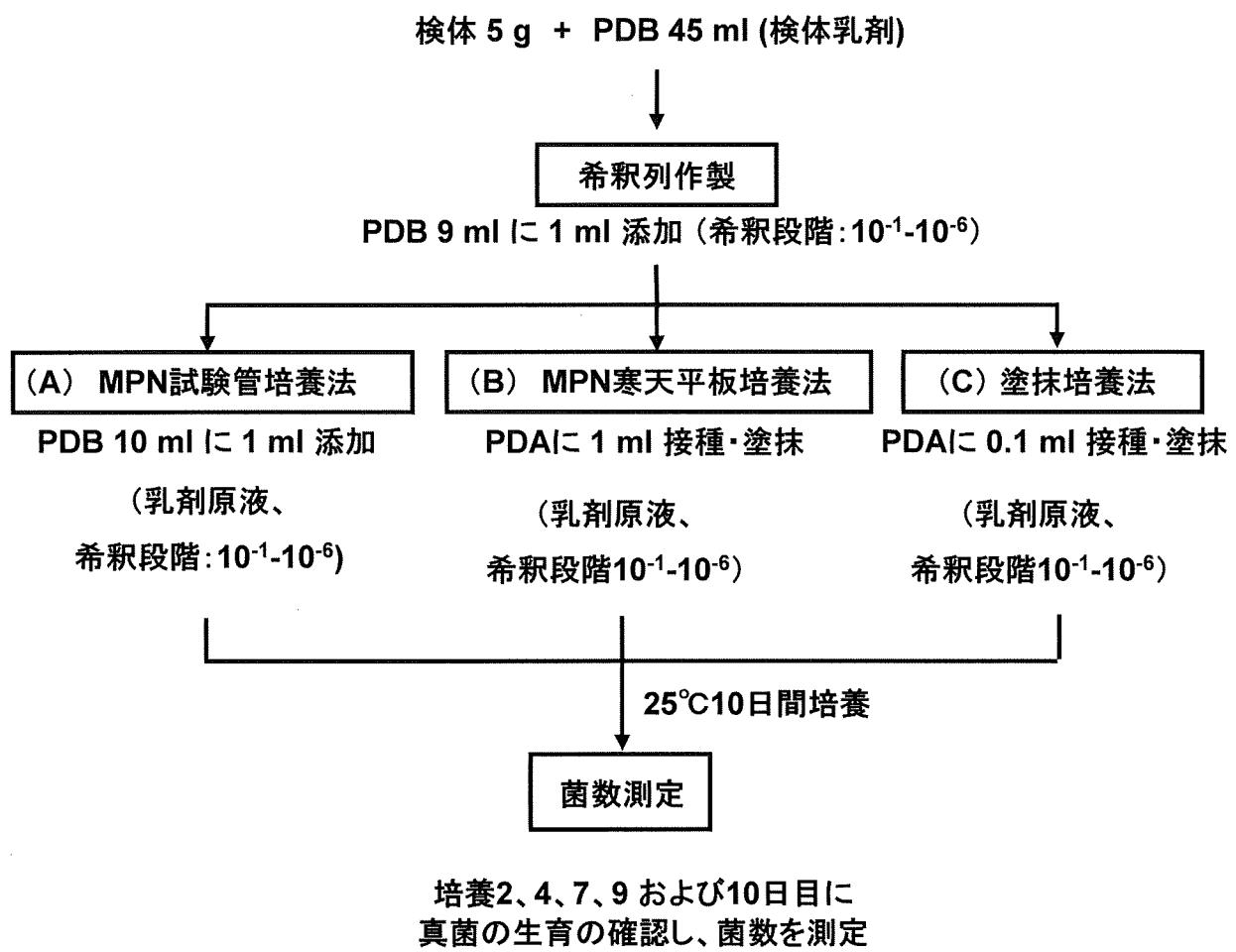


図1 実験方法の全体の流れ

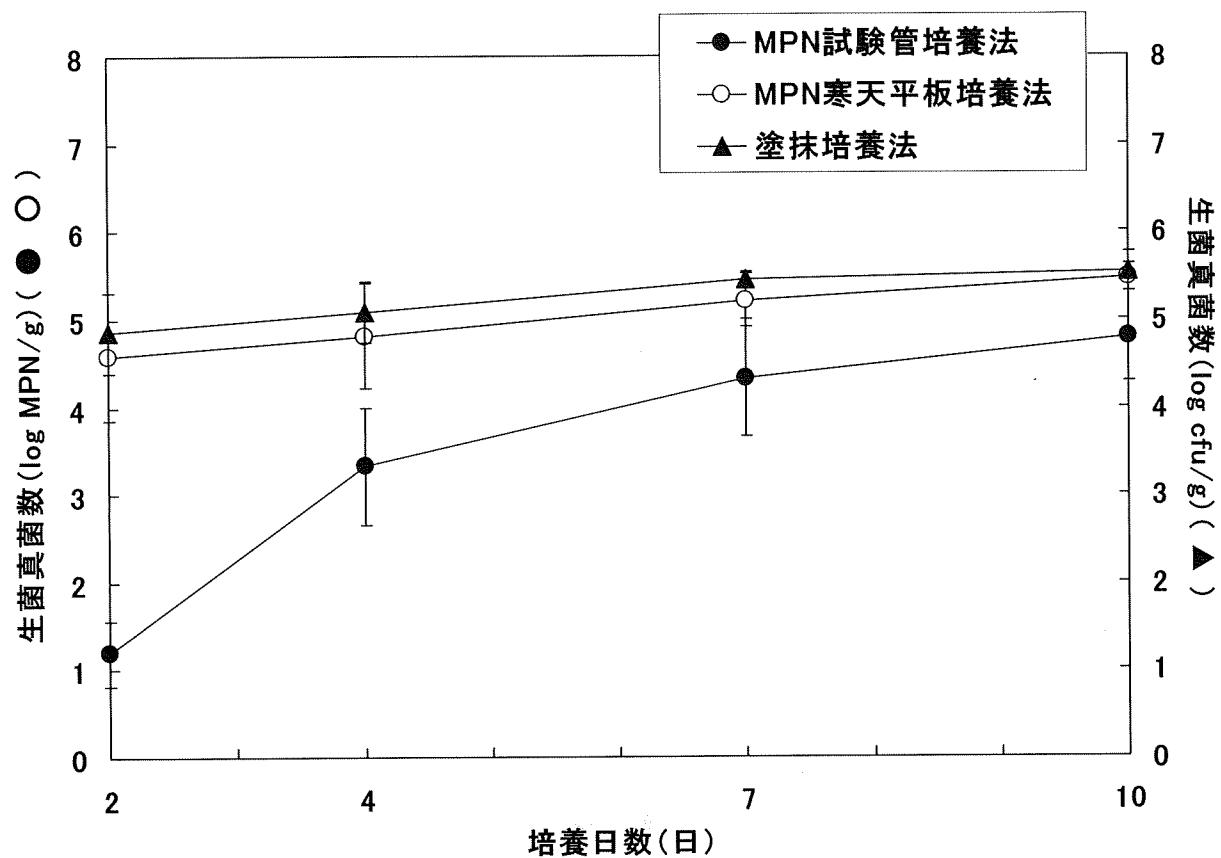
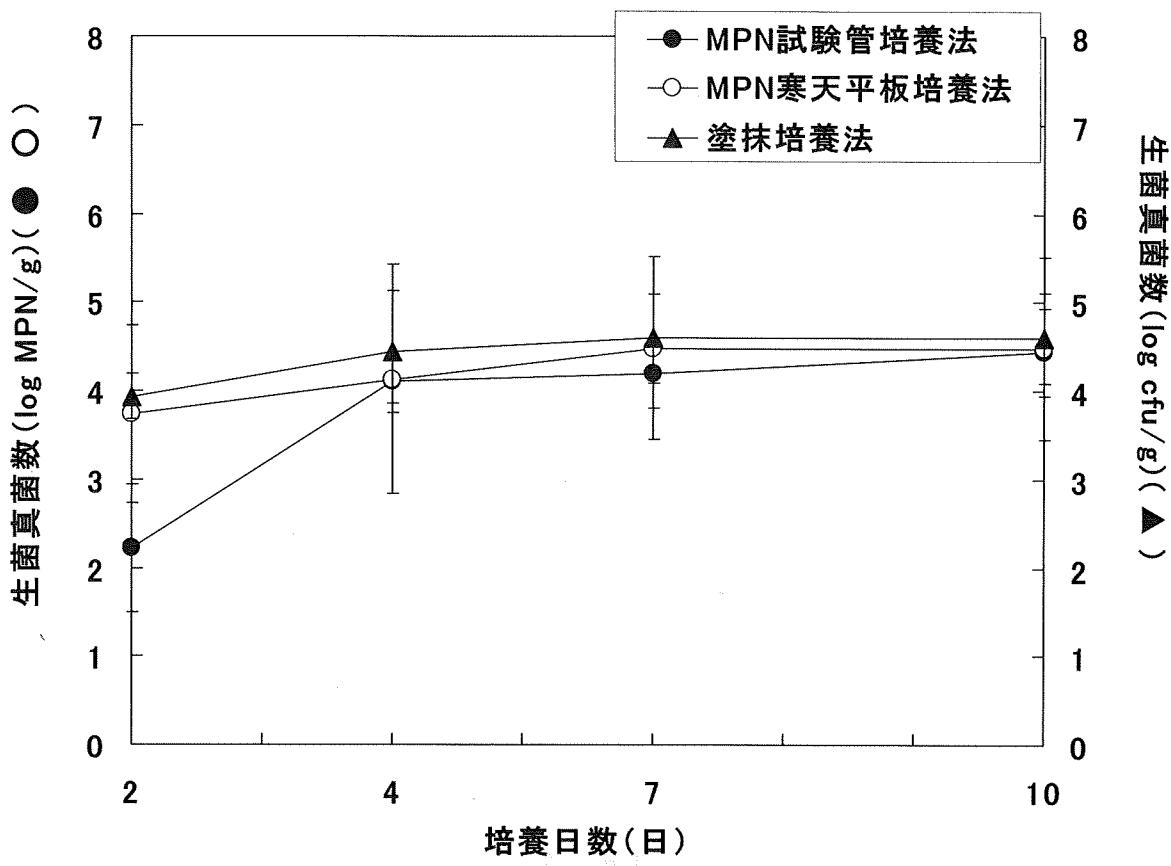


図2 リンゴにおける各検査法の真菌数の推移



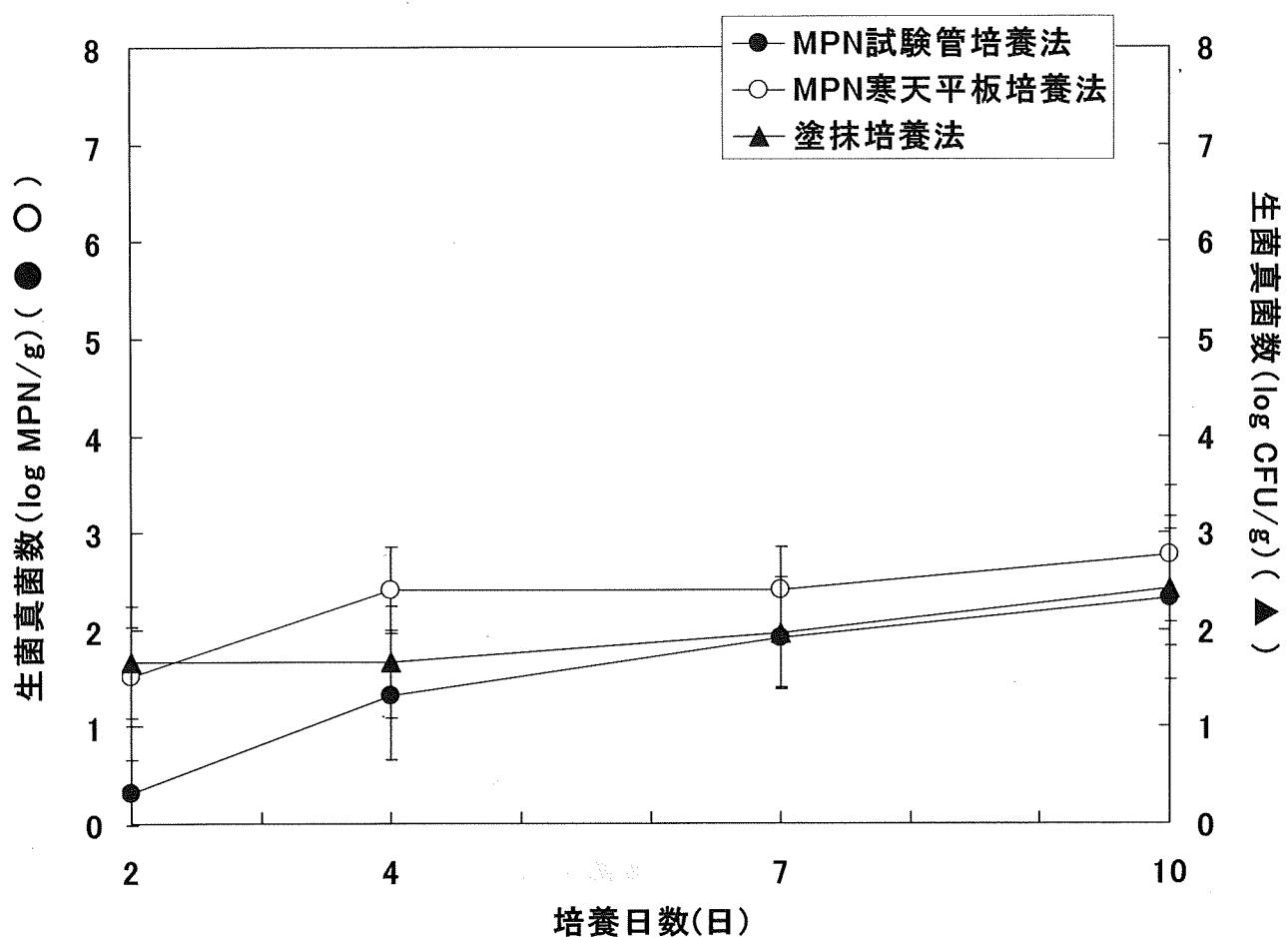


図4 レモンにおける各検査法の真菌数の推移

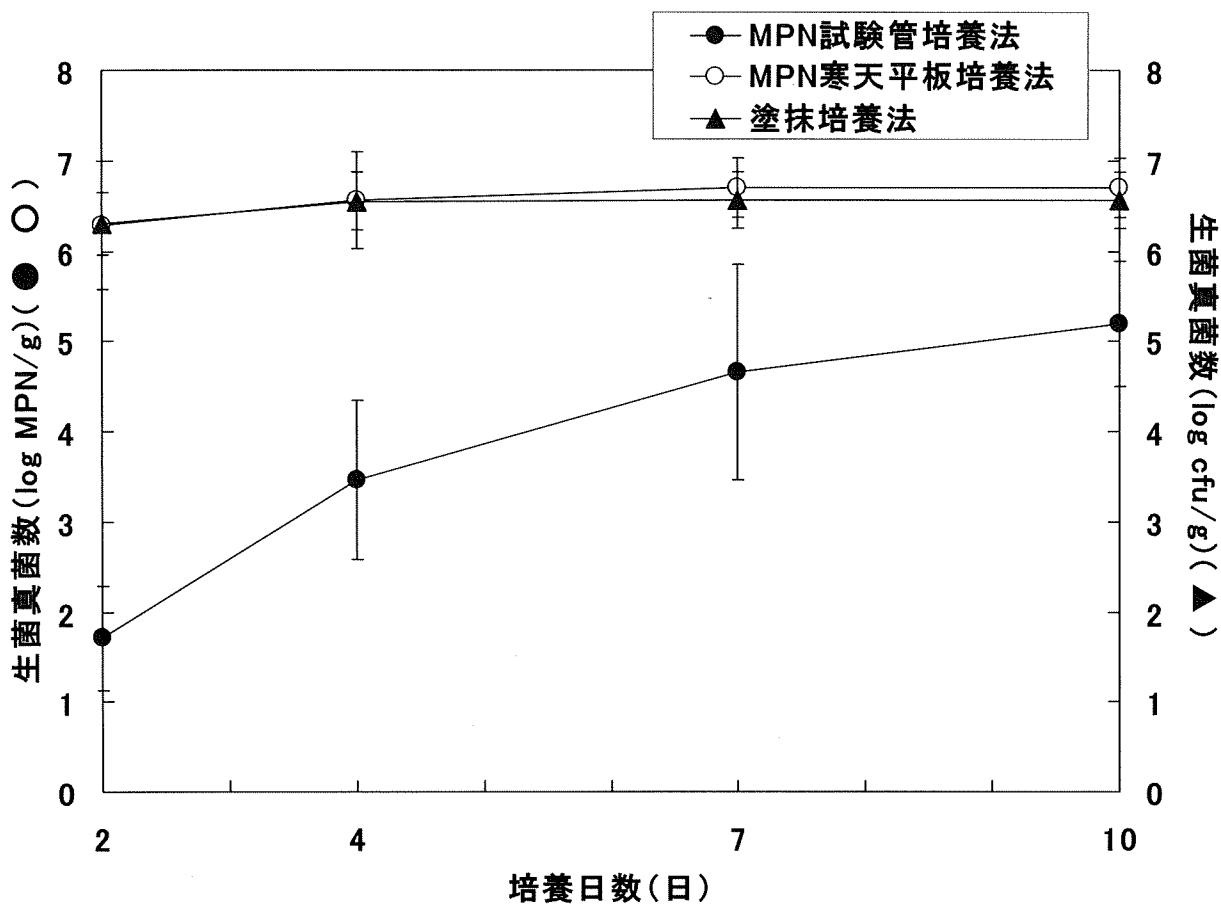


図5 メロンにおける各検査法の真菌数の推移

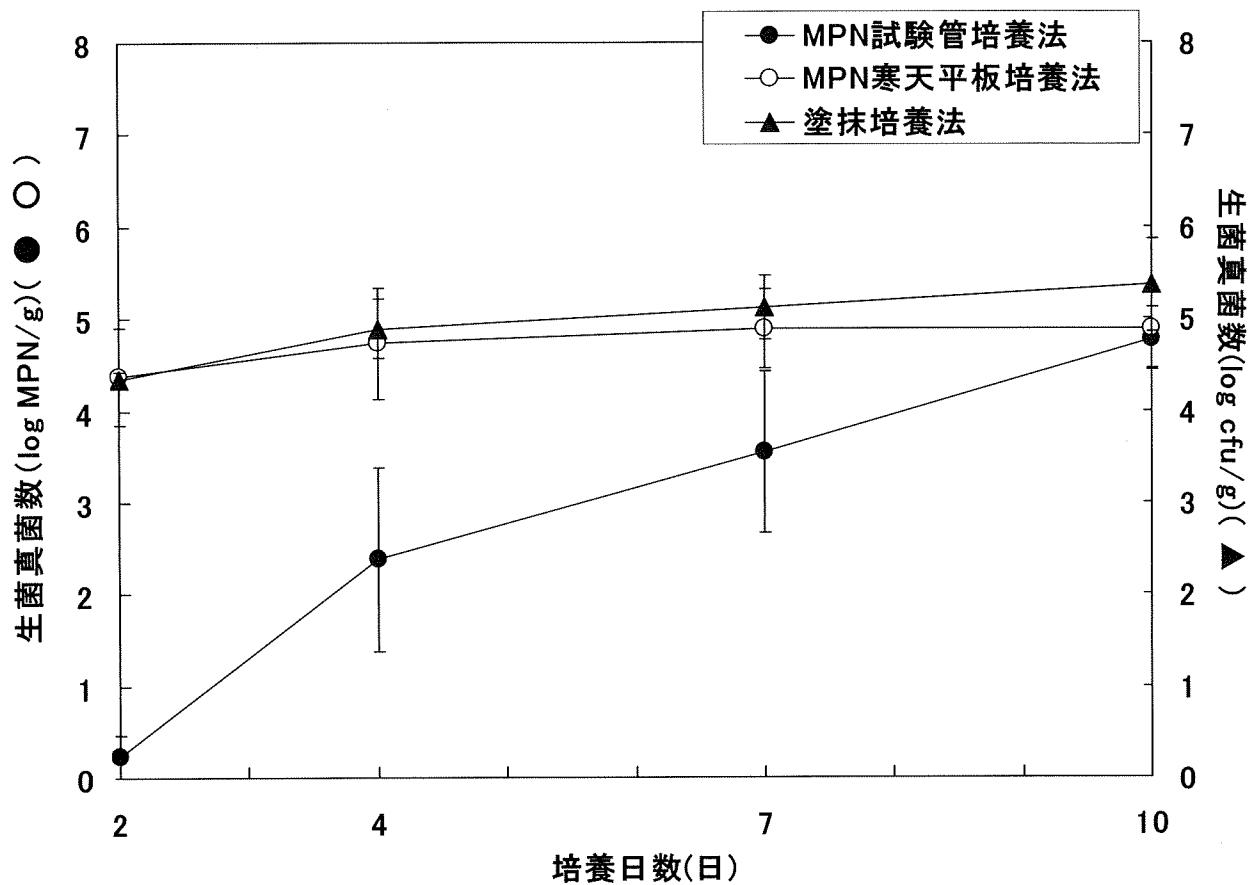


図6 ナシにおける各検査法の真菌数の推移

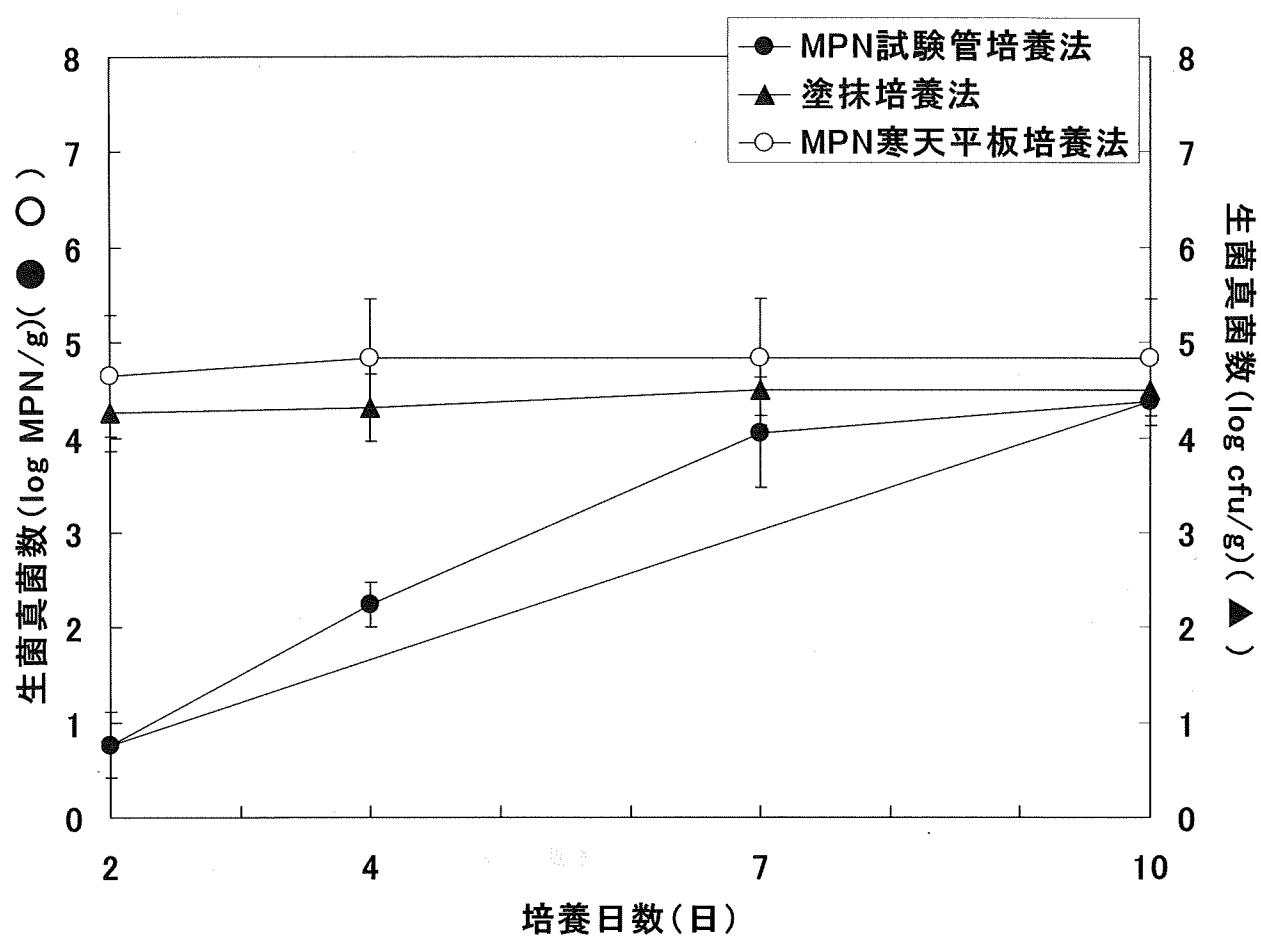


図7 モモにおける各検査法の真菌数の推移

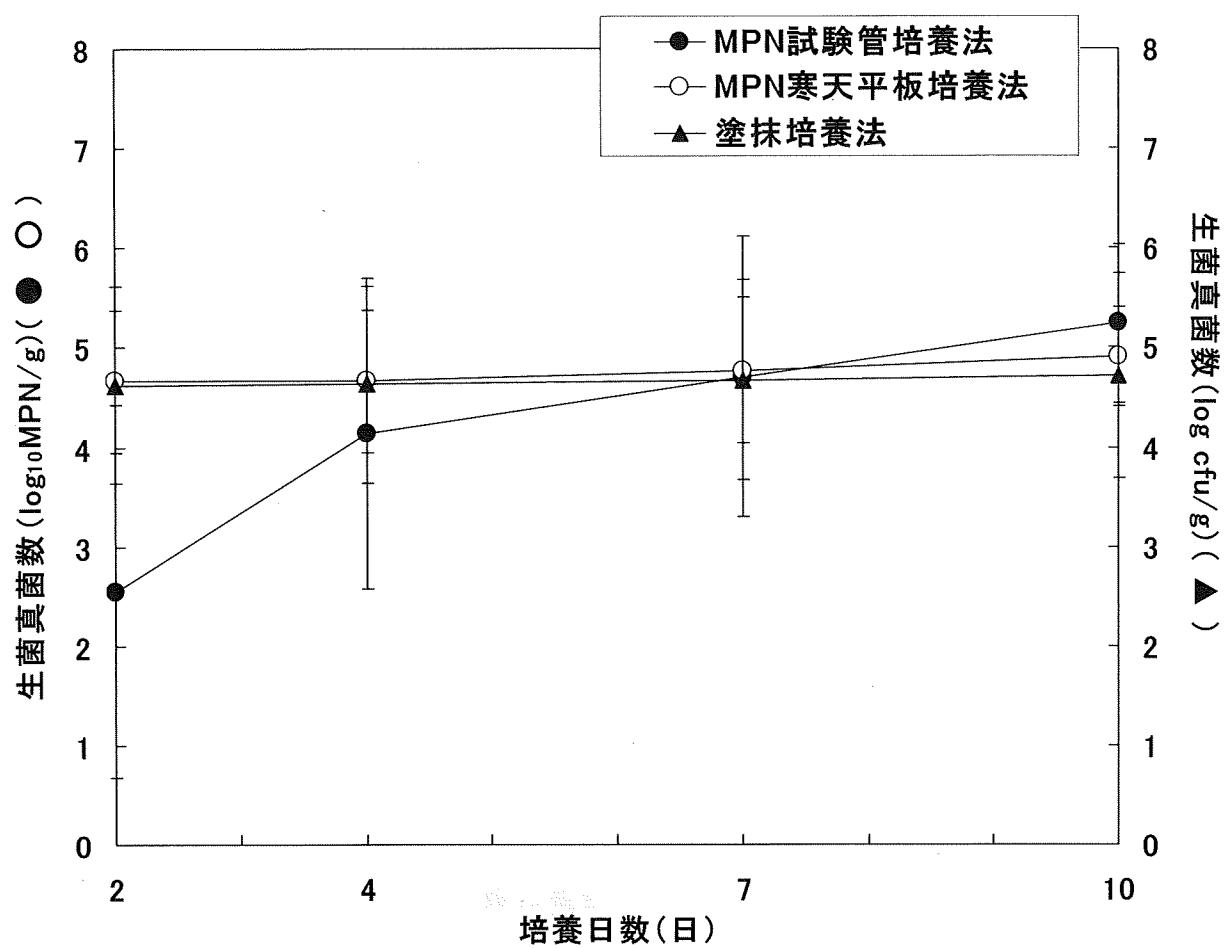


図8 イチゴにおける各検査法の真菌数の推移

生菌真菌数( $\log$  cfu/g)(▲)

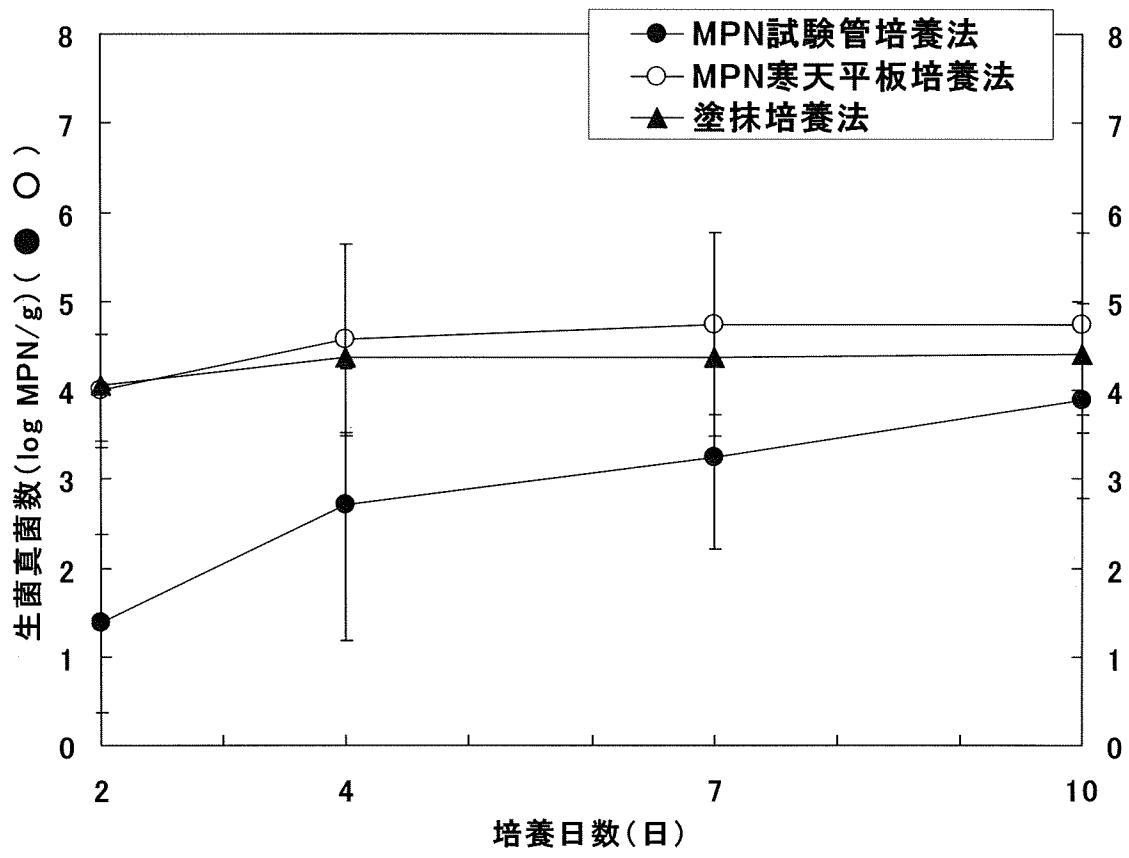


図9 ミカンにおける各検査法の真菌数の推移

表1 供試検体

検体名	検体番号	旧検体番号	入手日	購入場所	産地
リンゴ	A-1	A-29	2008.10.14	小売店A(世田谷区内)	山形
	A-2	A-30	2008.10.21	小売店C(世田谷区内)	青森
	A-3	A-33	2008.10.27	小売店B(世田谷区内)	青森
ブドウ	G-1	A-23	2008.9.22	小売店B(世田谷区内)	長野
	G-2	A-24	2008.9.29	小売店C(世田谷区内)	福島
	G-3	A-26	2008.10.6	小売店A(世田谷区内)	長野
レモン	L-1	A-9	2008.6.26	小売店A(世田谷区内)	愛媛
	L-2	A-20	2008.9.16	小売店E(世田谷区内)	熊本
	L-3	A-22	2008.9.22	小売店A(世田谷区内)	愛媛
	L-4	A-37	2008.11.11	小売店A(世田谷区内)	愛媛
メロン	M-1	A-25	2008.9.29	小売店C(世田谷区内)	茨城
	M-2	A-27	2008.10.6	小売店F(世田谷区内)	静岡
	M-3	A-28	2008.10.14	小売店G(世田谷区内)	茨城
ナシ	N-1	A-18	2008.8.27	小売店B(世田谷区内)	栃木
	N-2	A-19	2008.9.16	小売店A(世田谷区内)	秋田
	N-3	A-21	2008.9.22	小売店B(世田谷区内)	茨城
モモ	P-1	A-14	2008.7.23	小売店A(世田谷区内)	山梨
	P-2	A-16	2008.8.11	小売店D(川崎市内)	福島
	P-3	A-17	2008.8.27	小売店B(世田谷区内)	福島
イチゴ	S-1	A-34	2008.11.5	小売店H(世田谷区内)	茨城
	S-2	A-36	2008.11.11	小売店A(世田谷区内)	静岡
	S-3	A-38	2008.11.17	小売店C(世田谷区内)	茨城
ミカン	U-1	A-31	2008.10.21	小売店C(世田谷区内)	福岡
	U-2	A-32	2008.10.27	小売店B(世田谷区内)	熊本
	U-3	A-35	2008.11.5	小売店I(世田谷区内)	和歌山

表2 各検査法における培養終了時の菌数

検体名	検体番号	MPN試験管培養法 (log MPN/g)	MPN寒天平板培養法 (log MPN/g)	塗抹培養法 (log cfu/g)
リンゴ	A-1	4.38	5.38	5.36
	A-2	5.38	5.38	5.46
	A-3	4.63	5.63	5.79
	平均±SD	4.80±0.52	5.46±0.14	5.54±0.23
ブドウ	G-1	3.97	3.63	4.41
	G-2	4.38	4.18	4.21
	G-3	4.97	5.63	5.18
	平均±SD	4.44±0.50	4.48±1.03	4.60±0.51
レモン	L-1	2.97	3.18	3.08
	L-2	1.38	1.97	2.30
	L-3	2.63	3.18	1.90
	平均±SD	2.33±0.84	2.78±0.70	2.43±0.60
メロン	M-1	5.97	6.66	6.63
	M-2	4.63	6.38	6.24
	M-3	4.97	7.04	6.84
	平均±SD	5.19±0.70	6.69±0.33	6.57±0.30
ナシ	N-1	4.97	4.63	4.94
	N-2	4.38	4.63	5.23
	N-3	4.97	5.38	5.92
	平均±SD	4.77±0.34	4.88±0.43	5.36±0.50
モモ	P-1	4.38	4.18	4.08
	P-2	4.38	4.97	4.70
	P-3	4.38	5.38	4.72
	平均±SD	4.38±0.00	4.84±0.61	4.50±0.36
イチゴ	S-1	4.38	4.38	3.54
	S-2	5.38	4.97	5.11
	S-3	5.97	5.38	5.50
	平均±SD	5.24±0.80	4.91±0.50	4.72±1.04
ミカン	U-1	2.63	3.63	3.42
	U-2	4.38	4.97	4.70
	U-3	4.63	5.63	5.11
	平均±SD	3.88±1.09	4.74±1.02	4.41±0.88

# 分 担 研 究 報 告 書

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

後藤 慶一