

表 3-2 接種試験のまとめ(酵母)

供試清涼飲料水	接種菌株および保存温度(°C)					
	<i>Candida albicans</i>		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	25	35	25	35	25	35
1. 茶系飲料	○	○	○	○	×	△
2. 果汁飲料	○	○	○	△	○	○
3. 野菜ジュース	○	○	○	○	○	○
4. 炭酸飲料	×	×	×	×	×	×
5. スポーツドリンク	○	○	○	○	×	△
6. ミルク入りコーヒー飲料	×	×	×	×	×	×
7. ニアウォーター	×	×	×	×	×	×
8. ミネラルウォーター	×	×	×	×	×	×

生育の目安: ×, $0 \sim 10^1$ /ml ; △, $10^2 \sim 10^4$ /ml ; ○, $>10^4$ /ml

表 3-3 接種試験のまとめ(毒素産生性細菌)

		接種菌株および保存条件															
		<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Bacillus cereus</i>				<i>Salmonella Typhimurium</i>				<i>Escherichia coli</i> O157:H7			
		静置		振盪		静置		振盪		静置		振盪		静置		振盪	
		25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
供試清涼飲料水																	
1.	茶系飲料	x	x	x	x	x	x	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3.	野菜ジュース	x	x	x	x	x	x	△	○	△	○	△	○	x	x	x	x
6.	ミルク入りコーヒー飲料	x	○	x	x	x	x	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x

生育の目安: x, 0~10¹/ml ; △, 10²~10⁴/ml ; ○, >10⁴/ml

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

小沼 博隆

平成 22 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

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

分担研究者 小沼 博隆(東海大学海洋学部 水産学科)

研究要旨

清涼飲料水飲用時に起こるカビによる腐敗を解析するために清涼飲料水への接種試験を行った。使用した飲料は茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、果汁入り炭酸飲料、スポーツドリンク、コーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーターの 8 種類を使用した。これらの飲料に昨年度実施した清涼飲料水の口のみ試験から分離された *Aspergillus sydowii*、*Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium cladosporioides*、*Exophiala xenobiotica*、*Penicillium expansum* の 5 菌種を 10 もしくは 100 cfu/ボトルに接種し、28 日間の菌の発育を観察した。飲料種と菌種の組み合わせにより菌の発育に差は見られたが、全体的に茶系飲料、果汁飲料、野菜飲料、スポーツドリンクで菌の発育が特に良好であった。菌種では *A. pullulans*、*C. cladosporioides*、*P. olsonii* が顕著な発育を示した。25℃の発育環境では培養 2 日後に菌の発育が多く認められた。10℃の発育環境でも 4 日目には菌の発育が認められる例があった。多くの菌では 10℃で培養すると、25℃で培養した場合と比較して発育速度は低下したが、発育そのものを阻止することはできなかった。以上の結果から、開封・飲用後の室温放置は避けること、また 10℃でも短期間のうちに多くのカビの発育が認められたことから、冷蔵庫を過信せず開封・飲用後の飲料は速やかに消費するように消費者に啓蒙していく必要性を確認できた。

研究協力者

荒木 恵美子(東海大学海洋学部)

杉山 寛治、神田 隆(静岡県環境衛生化学研究所)

富田 敦子(静岡市環境保健研究所)

小澤 一弘(株式会社 中部衛生検査センター)

後藤 慶一(三井農林株式会社 食品総合研究所)

大西 貴弘、渡辺 麻衣子(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

現在、多種多様な形態および種類の清涼飲料水が製造販売されている。それに伴い製品の製造、流通、保管、消費方法も複雑になってきている。特にPETボトルや紙パック入りの飲料が普及したため開封後の飲料の持ち運び、保存が非常に容易になった。その結果、飲料に微生物が混入し発育する事例が多発し、消費者からの苦情が企業や地方自治体に届くようになってきている。平成 21 年度に本研究班では地方自治体や企業に対してアンケート調査を行い、消費者から寄せられた清涼飲料水の微生物汚染に関する苦情を収集し解析した[1]。その結果、消費者の苦情の中で大きく占めたのが、飲料中に異物が浮遊しているという苦情であった。その後の調査の結果、それらの異物の多くはカビであることが明らかになっている。カビは発育に伴い菌塊を形成する 경우가多く、またカビの菌体自体に様々な色がついているため、飲料中でも比較的目立ちやすいと考えられる。こういった理由から、カビの発育に伴う菌塊形成を消費者からは異物としてとらえられ、多くの苦情につながるものと思われる。そこで本研究ではこのカビの飲料中での発育に着目し、清涼飲料水にカビの接種を行い、カビの発育を観察した。

B. 研究方法

詳しい研究方法は参考資料 1 に示し、ここではその概略について述べる。

1. 飲料種

茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、炭酸飲料(果汁入りサイダー)、スポーツドリンク(果汁入り)、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラル

ウォーターの 8 種類を用いた。飲料はすべて PET ボトル入りの物を使用した(各飲料の詳細は研究分担者:小沼博隆の分担報告に記載されている)。

2. 接種菌株

ヒトの口腔内や環境中には多くの微生物が存在していると考えられる。そのため、実際に消費者が清涼飲料水を口飲みし、容器にそそぐ場合にどのような微生物が混入し発育するかは不明な点が多い。また、飲料中で発育することのできる菌株は、例えば酸性環境に順応しているなど、特殊な性質を持っている場合があることが指摘されている。そこで本研究班では昨年度に口飲み・開封試験を行い、実際にボランティアに飲料を口飲みや開封を行ってもらい、飲料中でどのような微生物が発育するか分離・同定を行った[2]。合計 672 の飲料サンプルから多くの微生物が分離されたが、今回はその中から分離頻度などを考慮して、*Aspergillus sydowii*、*Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium cladosporioides*、*Exophiala xenobiotica*、*Penicillium expansum* の 5 菌種を使用した。

3. 接種試験方法

飲料の PET ボトルを開封し、中身を半分捨てた。PDA 寒天培地で 10 日間前培養したコロニーから孢子懸濁液を作成し、100 cfu に相当する菌液を飲料に接種した。特に発育の良い菌種に関しては 10 cfu に接種菌数を落した実験もあわせて行った。1 飲料につき 3 サンプル試験を行った。接種したペットボトルは消費者が冷蔵庫に飲料を保存する場合を想定した 10℃、もしくは室温保存を想定した 25℃で 28 日間培養した。カビは菌塊を形成するため菌数計算ができない場合が多いので肉眼

的に観察し、カビの発育を確認できた場合を陽性とし、飲料 3 サンプル中の陽性サンプル数を計数し、結果を試験結果記録表に記録した(参考資料 2)。

C. 試験結果

1. 菌種ごとの傾向

1-1 *Aspergillus sydowii*

*A. sydowii*は他菌種に比べて弱い発育を示した(表 1)。しかし、100 cfu 接種、25°C培養では野菜ジュースにおいて培養 3 日目に発育が見られ、4 日目では茶系飲料が、7 日目にはミネラルウォーターで発育が見られた(表 1)。他のカビと比較して、ミネラルウォーター中で比較的早く発育した。しかし、10°Cではすべての飲料中で *A. sydowii*の発育を確認できなかった(表 1)。

1-2 *Aureobasidium pullulans*

*A. pullulans*は非常に発育が強く、100 cfu 接種、25°C培養では茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンクで培養 2 日目から発育を確認できた(表 2)。培養 7 日目でニアウォーターに、14 日目にはミルク入りコーヒー飲料で発育が認められた(表 2)。100 cfu 接種、10°C培養では 25°Cに比べて発育速度は遅くなるが、25°Cと同じ飲料種で発育が認められた(表 2)。

100 cfu、25°C培養では強い発育が見られたので、接種菌数を 10 cfu に落として 25°Cで培養を行ったが、野菜ジュースでの発育速度が 2 日から 4 日に低下した以外、100 cfu 接種とほとんど変わらない発育を示した(表 3)。

1-3 *Cladosporium cladosporioides*

*C. cladosporioides*は非常に発育が強く、100

cfu 接種、25°C培養では茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンク、ニアウォーターで培養 2 日目から 3 日目の間に発育が見られた(表 4)。28 日目にはミネラルウォーターで発育が認められた。10°C培養でも発育が強く、茶系飲料で培養 4 日目、果汁飲料、野菜ジュースで 7 日目に発育が認められた(表 4)。スポーツドリンクでは培養 14 日目、ミネラルウォーターで 21 日目に発育が認められた(表 4)。

10 cfu、25°C培養でも強い発育が見られ、茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースで培養 4 日目に発育が認められた(表 5)。スポーツドリンクで 7 日目、ニアウォーターで 10 日目、ミネラルウォーターで 28 日目に発育が認められた(表 5)。

1-4 *Penicillium olsonii*

*P. olsonii*の発育は比較的強く、100 cfu 接種、25°C培養では茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースで培養 2 日目に、スポーツドリンクは 3 日目に発育が見られた(表 6)。ミルク入りコーヒー飲料は 14 日目に発育が見られた。100 cfu 接種、10°C培養でも全体的に発育速度は低下するが 25°C培養と同じ飲料で発育が認められた(表 6)。茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースでは、10°C培養でも 7 日後には菌の発育が認められた(表 6)。

10 cfu、25°C培養でも茶系飲料、果汁飲料では培養 2 日目に菌の発育が認められた(表 7)。野菜ジュースやスポーツドリンクでは 7 日目、ニアウォーターでは 21 日目に発育が認められた(表 7)。

1-5 *Exophiala xenobiotica*

*E. xenobiotica*の発育は他の菌種に比べて若干弱い、100 cfu 接種、25°C培養で茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースにおいて 7 日目に発育が

認められた(表 8)。ミネラルウォーターで 10 日目、スポーツドリンクが 14 日目、ニアウォーターでは 28 日目に発育が認められた(表 8)。他のカビと異なり、ミネラルウォーター中でも発育速度は比較的早かった(表 8)。

2. 飲料種ごとの傾向

2-1 全体的な傾向

25℃培養で最もカビの発育が強い飲料種は茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンク、ニアウォーターであった(表 9)。これらの飲料中では培養 2 日からカビの発育が認められた。ミネラルウォーターは培養 7 日目からカビの発育が見られた。ミルク入りコーヒー飲料は 14 日目から発育が見られた。一方、10℃培養では 20℃培養に比べて全体的に発育速度が遅くなるが、培養 4 日目に茶系飲料で発育が認められ、7 日目から果汁飲料や野菜ジュース中での発育が見られるようになった(表 9)。スポーツドリンク、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーター中ではやや遅れて、培養 10 から 14 日目にかけて発育が見られるようになった。これらの飲料の中で、茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンクは培養温度に係らず強い発育が認められた(表 9)。

2-2 茶系飲料

非常に発育が強く、25℃培養では培養 2 日後には発育が認められ、7 日目までにはすべてのサンプルでカビの発育が認められた(表 9)。10℃培養では発育速度は低下するものの培養 4 日にはカビの発育が認められた(表 9)。菌種、培養温度ごとの発育では *A. sydowii* と *A. pullulans*、*E. xenobiotica* の 10℃培養を除いたすべての菌種、培養温度で強い発育が認められた(表 1-8)。

2-3 果汁飲料

発育が非常に強く、25℃培養では培養 2 日後には発育が認められ 4 日後には 15 サンプル中 12 サンプルにカビの発育が認められ 28 日後まで続いた(表 9)。10℃培養でも 15 サンプル中 9 サンプルが培養 7 日後にカビの発育が認められた(表 9)。菌種、培養温度ごとの発育では *A. sydowii* と *E. xenobiotica* の 10℃培養を除くすべての菌種で強い発育が認められた。特に *C. cladosporioides* と *P. olsonii* の 25℃培養では培養 2 日後には発育が認められた(表 4、6)。

2-4 野菜ジュース

野菜ジュースにおいてもカビは非常に強く発育し、25℃培養では培養 2 日後には発育が認められ、7 日後にはすべてのサンプルで発育が認められた(表 9)。10℃培養でも培養 7 日後には 15 サンプル中 5 サンプルにカビの発育が認められた(表 9)。菌種、培養温度ごとの発育を見てみると、*A. pullulans*、*C. cladosporioides*、*P. olsonii*、*E. xenobiotica* の 25℃培養の発育が良好であった(表 2、4、6、8)。

2-5 炭酸飲料

すべてのサンプルにおいて、カビの発育が認められなかった。飲料中に含まれる炭酸ガスの影響によるものと考えられた。

2-6 スポーツドリンク

カビはスポーツドリンクにおいて強い発育を示した。25℃培養では 2 日後には発育が認められ、14 日後には 15 サンプル中 12 サンプルの発育が認められた(表 9)。10℃培養では他の飲料に比べて発育速度は若干遅くなったが、培養 10 日後には 3 サンプルにおいて発育が認められ、7 日後には 15

サンプル中7サンプルにおいてカビの発育が認められた(表 9)。菌種、培養温度ごとの発育では、*A. sydowii* はスポーツドリンク中では全く発育することができなかった(表 1)。それ以外の菌種では非常に発育がよく、特に *A. pullulans* は培養 2 日後ですべてのサンプルにおいて発育が認められた(表 2)。

2-7 ミルク入りコーヒー飲料

ミルク入りコーヒー飲料におけるカビの発育は弱く(表 9)、25℃培養の培養 14 日後もしくは 10℃培養の 28 日後に *A. pullulans* の発育が認められただけである(表 2)。他の菌種の発育は認められなかった。ミルク入りコーヒー飲料は透明度が全くないため、実際にカビが発育できなかっただけでなく、カビの発育を検出できなかった可能性もあると思われる。

2-8 ニアウォーター

25℃培養では *C. cladosporioides* の発育が強く、培養 2 日後に発育が認められ、3 日後にはすべてのサンプルが陽性となった(表 4)。*A. pullulans* の 25℃培養では、培養 7 日後から発育が見られ、10 日後にはすべてのサンプルが陽性となった(表 2)。これら以外の菌種の発育は認められなかった。10℃培養では上記の菌種に加えて *P. olsonii* の発育が認められた(表 6)。しかしこれらの発育は弱く、培養 14 日後になるまで発育が認められなかった(表 9)。

2-9 ミネラルウォーター

カビの発育は悪く、25℃培養でも *A. sydowii* と *E. xenobiotica* の発育がそれぞれ培養 7 日後、10 日後に認められただけである(表 1, 8)。10℃培養では *P. olsonii* が培養 28 日後に 1 サンプル陽性と

なった(表 7)。

D. 考察

昨年度の本研究事業では、消費者が清涼飲料水を消費するときに、どのような微生物が飲料中に混入し、発育するかを調べるためにボランティアに協力してもらい、口飲み・開封試験を行った[2]。今年度は口飲み・開封試験で得られた菌株を実際に飲料中に接種し、微生物がどのように飲料中で発育するか詳細に検討を行った。特に本研究では、発育すると菌塊を形成するため消費者から苦情の対象になりやすいカビの発育に焦点を絞って研究を行った。

今回はカビの菌数計算を行わず、飲料中での菌塊や菌膜の形成などを肉眼的に確認できた場合を陽性とした。このような菌塊や菌膜の形成には相当量の菌数が必要であると考えられることから、肉眼では観察できないが培養 1 日目からかなりの菌量に増殖していることが予想された。それに加え、10 cfu で接種した場合でも 100 cfu 接種した時と発育速度が変化しない例が多く、10 cfu よりさらに少量の菌量でカビが飲料中で発育できることが示唆された。このことは、環境中のカビが飲料の開封時に偶然混入した場合でも、十分飲料中で発育できることを表している。さらに、飲料に透明度がなく肉眼的に観察の難しい野菜ジュースやミルク入りコーヒー飲料を除くほとんどの飲料では、1 飲料 3 サンプルすべてが同じ培養日数で同時に陽性になっている。このことは、たとえ少量のカビでも一度飲料中に混入してしまうと、確実に発育できることを示唆している。

今回試験を行った菌種の中で発育がよかった

のは *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *P. olsonii* の 3 菌種であった。これらのカビは 25℃で培養 2 日から 3 日の間に様々な飲料中で発育できただけでなく、10℃で培養を行っても多くの場合、培養 7 日目には発育が見られた。このことは、10℃で培養を行っても発育速度を低下させることはできても、発育自体は阻止できないことを表している。本研究班では平成 20 年度に地方自治体や企業に対して清涼飲料水における微生物を原因とする苦情に関するアンケートを行った[1]。その結果から消費者が冷蔵庫の効果を過信し、開封後の飲料を冷蔵庫中で 1 週間以上保管し、結果としてカビが発育し、苦情につながる例が非常に多く示されている。今回の我々の研究結果からは、このような苦情事例を実験的に再確認することができた。室温の場合は言うまでもなく、冷蔵庫で保存する場合でも、冷蔵庫の効果を過信することなく、開封後の飲料は速やかに消費するよう、消費者を啓蒙する必要が認められた。また、本研究結果はそのような消費者への啓蒙活動に対する科学的根拠として非常に役立つものと思われる。

今回の研究では清涼飲料水の代表として、茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、炭酸飲料、スポーツドリンク、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーターを用いた。飲料種別のカビの発育状況を見てみると、茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンクで発育が強く見られた。ミルク入りコーヒー飲料での発育は他の飲料と比べて遅れる傾向にあったが、これは飲料に透明性がないためカビの発育が肉眼で観察しにくいことがひとつの原因と考えられた。これに対して、野菜ジュースも飲料自体に透明性がないが、

カビが非常に強く発育するため、肉眼的に発育を検出するのは容易であった。*A. sydowii* や *E. xenobiotica* は他のカビに比べて全体的に飲料中での発育は強くはなかったが、この 2 菌種はミネラルウォーター中では他のカビより強く発育した。このように菌種によって発育に適した飲料は異なるが、炭酸飲料を除くすべての飲料に対して発育に適したカビが存在することが明らかになった。以上のことから、開封後の清涼飲料水の保管においてカビの存在は大きな脅威となることが確認された。

E. 結論

本研究から明らかになったのは次のとおりである。

- 10 cfu という少量のカビでも清涼飲料水中で強く発育することができた。
- 室温では培養 2 日後でカビが肉眼的に観察される例が多く見られた。
- 冷蔵庫で保存しても、カビの発育を遅らせることはできても、カビの発育自体を阻止することはできないことが明らかになった。
- カビは様々な種類の飲料に対応でき、その中で発育できることが明らかになった。

以上のことから、開封後の清涼飲料水を保管する上でカビは大きな脅威となることを再認識できた。今後これらの結果をもとに消費者や企業に対して注意喚起を行う必要があると思われる。

F. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業『清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究』平成 20 年度 総括・分担

報告書

- 2)厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業『清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究』平成 21 年度 総括・分担報告書

G. 研究発表

1. 学会発表

- 神田 隆, 金澤 裕司, 小澤 一弘, 後藤 慶一, 小沼 博隆, 杉山 寛治, 工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口のみでの汚染物質の挙動解析. 第 100 回日本食品衛生学会. 平成 22 年 9 月
- 大西 貴弘, 後藤 慶一, 金澤 裕司, 小澤 一弘, 神田 隆, 杉山 寛治, 渡辺 麻衣子, 小沼 博隆, 工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口のみによって生じる微生物汚染での原因菌の解析. 第 31 回日本食品微生物学会. 平成 22 年 11 月

(参考資料1)

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)

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

平成 22 年度 接種試験方法

【研究体制】

研究代表者 工藤 由起子(国立医薬品食品衛生研究所、総括協力)
研究分担者 小沼 博隆(東海大学、接種試験担当)
後藤 慶一(三井農林株式会社、殺菌方法についての情報収集担当)
大西 貴弘(国立医薬品食品衛生研究所、接種試験担当)
研究協力者 杉山 寛治(静岡県環境衛生科学研究所、接種試験担当)
神田 隆(静岡県環境衛生科学研究所、接種試験担当)
富田 敦子(静岡市環境保健研究所、接種試験担当)
小澤 一弘(株式会社 中部衛生検査センター、接種試験担当)
荒木 恵美子(東海大学、接種試験担当)

【目的】

現在、多様な形態かつ種類の清涼飲料水が製造販売されており、それらの消費や製造、流通、保管方法もさまざまである。この為、安全な製品が消費者に提供され、安全に消費されるために要点を検討し、情報を提示することを目的とする。平成 21 年度は清涼飲料水の口飲み・開封試験を行い、清涼飲料水飲用時に起こる微生物腐敗についての概要を把握した。平成 22 年度は平成 21 年度の試験で得られた菌株を用いて接種試験を行い、飲料中の微生物の動態を詳細に検討するとともに、得られた情報から消費者の啓発、企業への働きかけに利用可能な情報を提供する。

【実施期間】

2010 年 8 月開始 2010 年 12 月終了予定(5ヶ月間)

(参考資料1)

【清涼飲料水】

分類
茶系飲料
果汁飲料
野菜ジュース
炭酸飲料
スポーツドリンク
コーヒー飲料
ニアウォーター
ミネラルウォーター

*静岡県環境衛生科学研究所は茶系飲料、野菜ジュース、コーヒー飲料のみ試験を行う。

【菌株】

担当機関	微生物種	菌名
東海大学	細菌	<i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
静岡県環境衛生科学研究所	食中毒細菌	<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxin A) <i>Bacillus cereus</i> (enterotoxin 陽性株) <i>Salmonella</i> Typhimurium EHEC O157:H7
静岡市環境保健研究所	細菌・酵母	<i>Candida albicans</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>
中部衛生検査センター	細菌・酵母	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
国立医薬品食品衛生研究所	カビ	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Aspergillus sydowii</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Exophiala xenobiotica</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>

(参考資料1)

【検体等の配付】

1. 菌株

- カジトン培地に接種した菌株を国立医薬品食品衛生研究所より送付する。適宜、各研究所で-80℃に保存する。
- 静岡県環境科学研究所で使用する食中毒細菌は同研究所で保有しているものを使用する。

2. 清涼飲料水

- 東海大学から全清涼飲料水をまとめて送付する。

3. 培地

- 国立医薬品食品衛生研究所から各月使用分を送付する。試験スケジュールを大西に連絡する。

【試験方法】

1. 細菌・酵母の接種試験

- A) ペットボトルを開封し、500mlの飲料は250ml、300mlの飲料は150ml捨てる。このときビーカー・メスシリンダーで計量しながら行うか、あらかじめ計量して中身を捨てたペットボトルを用意し、それを参考にマジックでペットボトルに線をひくなどして行う。誤差は±5mlに抑える。
- B) 試験菌を TSB 培地で前培養する。前培養の条件はあらかじめ各機関で検討しておく。*(Lactobacillus fermentum* はより良い液体培地を至急決めます)
- C) 前培養菌液から 100 cfu に相当する菌液を飲料に接種する。1 飲料につきペットボトル 3 本に接種する。前培養菌液の菌数を測定し、実際の接種菌数を計算する(培養 0 時間の菌数に相当)。
- D) 25℃もしくは35℃で培養する。さらに食中毒細菌は振とう培養あり、なしの2種類の条件で行う。
- E) 6, 24, 48 時間ごとに以下のように菌数を計測する。希釈液は PBS を使用する。細菌 (*Lactobacillus fermentum* 以外)は標準寒天培地、酵母はクロラムフェニコール加 PDA 培地、*Lactobacillus fermentum*は MRS 寒天培地を用いる。標準寒天培地は 35℃、クロラムフェニコール加 PDA 培地は 25℃で 20±2 時間培養する。*Streptococcus salivarius*、*Micrococcus luteus*、*Lactobacillus fermentum*は 35℃、2 日培養する。
- 6 時間後
 - ① 原液を 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種し、すべての平板のコロニー数を合計し、1 ml あたりの菌数とする。

(参考資料1)

- 24 時間後
 - ① 25℃ および 35℃ともに、濁っていれば 10^{-5} 、 10^{-6} 希釈した菌液を 0.1 ml ずつ 2 枚の平板に接種し各希釈段階での平均を出す。濁っていなければ原液を 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種する。念のために 10^{-2} 希釈した菌液を 0.1 ml ずつ 2 枚の平板に接種し平均を出す。
 - ② 濁りが判定できない飲料種(野菜飲料、コーヒー飲料、他?)では、原液を 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種する。 10^{-2} 、 10^{-4} 希釈した菌液を 0.1 ml ずつ 2 枚の平板に接種し平均を出す。
 - 48 時間後
 - ① 25℃ および 35℃ともに、濁っていれば 10^{-5} 、 10^{-6} 希釈した菌液を 0.1 ml ずつ 2 枚の平板に接種し各希釈段階での平均を出す。濁っていなければ原液を 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種する。念のために 10^{-2} 希釈した菌液を 0.1 ml ずつ 2 枚の平板に接種し平均を出す。
 - ② 濁りが判定できない飲料種(野菜飲料、他?)では、原液を 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種する。 10^{-2} 、 10^{-4} 希釈した菌液を 0.1 ml ずつ 2 枚の平板に接種し平均を出す。
- F) *Salmonella* を除く食中毒細菌は毒素産生性を逆受け身ラテックス凝集反応(VTEC-RPLA、SET-RPLA、CRET-RPLA; デンカ)で確認する。各時間に 200 μ l をマイクロチューブ等に採取し-80℃で保存する。時間のあるときに解凍し各毒素を試験する。ただし、菌の増殖のみられた培養液について試験する。

2. カビ

- A) 細菌・酵母と同様にペットボトルを開封し、中身を半分捨てる。
- B) PDA で 10 日間培養したコロニーから孢子懸濁液を作成し、血球計算版で菌数を計測し、100 cfu に相当する菌液を飲料に接種する。1 飲料につきペットボトル 3 本に接種する。孢子懸濁液の菌数を測定し、実際の接種菌数を計算する(培養 0 時間の菌数に相当)。
- C) 10℃もしくは 25℃で培養する。
- D) 1 ヶ月間培養し、菌数計算は行わず経時的に肉眼で観察し陽性、陰性で判定する。ただし、カビの生育が観察しにくい飲料種については判定基準をあらかじめ決める。

表 1 *Aspergillus sydowii* (100 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数												
		1	2	3	4	7	10	14	21	28				
10°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	野菜ジュース	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ニアウオーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
野菜ジュース		0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
炭酸飲料		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
スポーツドリンク		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ミルク入りコーヒー飲料		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ニアウオーター		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ミネラルウォーター		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 2 *Aureobasidium pullulans* (100 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数											
		1	2	3	4	7	10	14	21	28			
10°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	野菜ジュース	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
野菜ジュース	0	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	
ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 3 *Cladosporium cladospripoides* (100 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数											
		1	2	3	4	7	10	14	21	28			
25°C	茶系飲料	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	果汁飲料	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	野菜ジュース	0	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	3
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スポーツドリンク	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ニアウオーター	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 4 *Cladosporium cladosporioides* (100 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数											
		1	2	3	4	7	10	14	21	28			
10°C	茶系飲料	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	果汁飲料	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3
	野菜ジュース	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	茶系飲料	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	果汁飲料	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
25°C	野菜ジュース	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スポーツドリンク	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ニアウォーター	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1 飲料3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 5 *Cladosporium cladosporioides* (10 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数												
		1	2	3	4	7	10	14	21	28				
25°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	野菜ジュース	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ミルク入りコーヒードリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数