

## 清涼飲料水における微生物基準に係る試験法又は測定法の整理について

今回の改正に伴い、清涼飲料水における微生物基準に係る検体採取及び試料調製並びに試験法又は測定法について、規定内容の整合を図るため、以下のとおり所要の整理を行う（下線部は改正部分を示す）。

改正後の食品分類	規格基準分類	規格基準	現 行		改正後	
			検体採取・試料調製	試験法／測定法	検体採取・試料調製	試験法／測定法
清涼飲料水一般 (ミネラルウォーター類を含む)	成分規格	大腸菌群 陰性	規定あり	規定あり	現行どおり	現行どおり
ミネラルウォーター類 (殺菌・除菌無)	成分規格 (容器包装内の二酸化炭素圧力が 20℃で 98kPa 未満のもの)	腸球菌 陰性	規定あり	規定あり	現行どおり	現行どおり
		緑膿菌 陰性		規定あり		現行どおり
	製造基準 (原水)	芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌 陰性	規定あり	規定あり	<u>現行の清涼飲料水一般の成分規格及びミネラルウォーター類(殺菌・除菌無)の製造基準(原水)の規定を引用(※1)</u>	現行どおり
		腸球菌 陰性		規定あり		現行どおり
		緑膿菌 陰性		規定あり		現行どおり
		一般細菌 5 cfu/ml		規定あり		現行どおり
	大腸菌群 陰性	規定なし	試験法名のみ規定	<u>清涼飲料水一般の成分規格の規定を引用(※2)</u>		
製造基準 (容器包装詰め直後)	一般細菌 20 cfu/ml	規定あり	規定あり	現行どおり	現行どおり	
ミネラルウォーター類 (殺菌・除菌有)	製造基準 (原水)	一般細菌 100 cfu/ml	規定なし	試験法名のみ規定	<u>現行の清涼飲料水一般の成分規格及びミネラルウォーター類(殺菌・除菌無)の製造基準(原水)の規定を引用(※3)</u>	<u>ミネラルウォーター類(殺菌・除菌無)の製造基準(原水)の規定を引用(※3)</u>
		大腸菌群 陰性	規定なし	試験法名のみ規定	<u>現行の清涼飲料水一般の成分規格及びミネラルウォーター類(殺菌・除菌無)の製造基準(原水)の規定を引用(※1)</u>	<u>清涼飲料水一般の成分規格の規定を引用(※2)</u>

## <検体採取・試料調製法>

### ※1 芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌、腸球菌、緑膿菌及び大腸菌群試験並びに細菌数測定に係る検体採取・試料調製法（改正後のミネラルウォーター一類（殺菌・除菌無）の製造基準（原水））

滅菌採取器具を用いてそれぞれの試験及び測定ごとに原水を無菌的に滅菌容器に採取し、これを検体とする。大腸菌群以外の試験又は測定法にあつては、メンブランフィルターろ過装置のファンネル内に検体（芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌の試験にあつては、70℃で20分間加熱処理したもの）を250ml（細菌数の測定にあつては、100ml）注いで吸引ろ過した後、滅菌精製水20～30mlで2～3回ファンネル内を洗浄し、吸引ろ過する。ろ過終了後、滅菌ピンセットを用いてフィルターホルダーからメンブランフィルターをはがし、これを試料とする。大腸菌群の試験にあつては、原水の10ml及び1ml並びに10倍液1mlをを採り、これを試料とする。

メンブランフィルターろ過装置 ファンネル及びフィルターホルダーは121℃で15分間滅菌したものを使用し、メンブランフィルターは孔径が0.45μm（芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌の試験にあつては、0.22μm）であつて、かつ、あらかじめ滅菌し、滅菌精製水で予洗したものを使用する。

## <試験法／測定法>

### ※2 大腸菌群試験法（清涼飲料水一般の成分規格）

1. 推定試験 原液の10mlおよび1ml、ならびに10倍液、100倍液および1,000倍液の各1mlを試料とし、それぞれ発酵管に入れる。発酵管はダーラム管またはスミス管で、これに加えるブイオンはB・T・B・加乳糖ブイオンとし、これは少なくとも試料量の2倍となるような濃度に調製する。

発酵管を35℃（上下1.0℃の余裕を認める。）で24時間（前後2時間の余裕を認める。）培養した後ガス発生をみないときは、さらに培養を続けて48時間（前後3時間の余裕を認める。）まで観察する。

この場合ガスの発生をみないものは推定試験陰性で、ガスの発生をみたものは推定試験陽性（大腸菌群疑陽性）である。

2. 確定試験 推定試験陽性の場合に、これを行う。

遠藤培養基、E・M・B・培養基またはB・G・L・B・発酵管を用いる。

推定試験でガスを発生した発酵管をとり、これが多数ある場合は、そのうちの最大希釈倍数のものをとり、この1白金耳を遠藤培養基またはE・M・B・培養基に画線培養して、独立した集落を発生せしめるか、またはB・G・L・B・発酵管に移植し、培養する。24時間後遠藤培養基またはE・M・B・培養基において定型的集落発生があれば確定試験陽性（大腸菌群陽性）とし、非定型的集落の発生した場合は完全試験を行う。

B・G・L・B・発酵管で48時間以内にガス発生があれば、確定試験陽性（大腸菌群陽性）とする。ただし、培地の色調がかつ色になったときは完全試験を行う。

3. 完全試験 確定試験にB・G・L・B・発酵管を使用したものは、さらに遠藤培養基またはE・M・B・培養基に移してからつぎの操作を行う。
- 遠藤培養基またはE・M・B・培養基から、定型的大腸菌群集落または2以上の非定型的集落を釣菌し、それぞれ乳糖ブイオン発酵管および寒天斜面に移植する。培養時間は48時間(前後3時間の余裕を認める。)とし、ガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培養のものについてグラム染色を行い、鏡検する。乳糖ブイオン発酵管でガスを発生し、寒天斜面の集落の菌がグラム陰性無芽胞の桿菌であれば、完全試験陽性(大腸菌群陽性)とする。
- a 乳糖ブイオン発酵管 普通ブイオン(肉エキス5g、ペプトン10g、水1,000ml、pH6.4~7.0)に乳糖を0.5%の割合で加え、発酵管に分注し、高圧滅菌し、すみやかに冷却する。間けつ滅菌法を採用してもよい。
- b 遠藤培養基 3%の普通寒天(pH7.4~7.8)を加温溶解し、この1,000mlにあらかじめ少量の蒸留水に溶かした乳糖15gを加えてよく混和する。これにフクシンのエタノール飽和溶液(エタノール100mlにフクシン約11gを溶かしたもの)10mlを加え、冷却して約50℃になったとき、新たに作製した10%亜硫酸ナトリウム溶液を少量ずつ加え、フクシンの色が淡桃色になったとき滴加を止める。
- これを大形試験管に40~100mlずつ分注し、100℃で30分間滅菌し、用時加温溶解して、約15mlずつ平板とする。
- c E・M・B・培養基 ペプトン10g、リン酸二カリウム2g、寒天25~30gを蒸留水1,000mlに加熱溶解し、沸騰後蒸発水量を補正する。これに乳糖10g、2%エオシン水溶液20mlおよび0.5%メチレンブルー水溶液13mlを加えて混和し、分注後間けつ滅菌する。用時約15mlずつ平板とする。
- d B・G・L・B・発酵管 ペプトン10gおよび乳糖10gを蒸留水500mlに溶解し、これに新鮮牛胆汁200ml(または乾燥牛胆末20gを水200mlに溶解したもので、pH7.0~7.5のもの)を加え、さらに蒸留水を加えて約975mlとし、pH7.4に補正し、これに0.1%ブリリアントグリーン水溶液13.3mlを加え、全量を1,000mlとし、綿ろ過し、発酵管に分注し、間けつ滅菌する。このpHは7.1~7.4とする。

### ※3 細菌数(生菌数)測定法(ミネラルウォーター類(殺菌・除菌無)の製造基準)

試料を標準寒天培地上に空気が残らないように密着させ、35.0±1.0℃で24±2時間培養し、発生した集落の数を100で除して1ml当たりの細菌数とする。