



Title	びん装乳の大腸菌群による汚染
Author(s)	三河, 勝彦; 谷口, 信幸; 嶋崎, 敏彦; 安井, 勉
Citation	北海道大学農学部附属農場報告, 19, 76-92
Issue Date	1974-03-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/13333
Type	bulletin (article)
File Information	19_p76-92.pdf



[Instructions for use](#)

びん装乳の大腸菌群による汚染

三河勝彦・谷口信幸

嶋崎敏彦・安井勉

緒言

牛乳は数多くの食品のうちでも最も微生物が繁殖し易いもののひとつであり、その品質規格としては厚生省の「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）」¹²⁾に「牛乳」（直接飲用に供する目的で販売する牛の乳をいう）の細菌数は標準平板培養法で1cc当り50,000以下、大腸菌群は陰性であることが要求されている。

大腸菌群のうちのいくらかは加熱殺菌に対して抵抗性を持つといわれているが^{7,24,25)}、ふつうの場合、殺菌乳から大腸菌群が検出されるのは2次汚染によるものと考えられる。田中らは乳処理工場におけるびん装乳の大腸菌群汚染に関する一連の研究^{1,22,23)}において、大腸菌群がびん装乳に混入する大きな要因として処理場の空気があげられることを明らかにしている。処理場の空気が市乳の汚染原因であることは、低温菌に関する村田ら¹⁴⁾や小川ら¹⁷⁾、それに浜本と金内の研究⁶⁾によっても明らかにされ、特に牛乳充てん機のエアパイプノズルから吸入する空気が主因であるとされている。同様な研究はCANNONとREDDYによりカルトン詰め牛乳の場合について行なわれ、フィルターボウル内の牛乳が泡抜き用真空ポンプを作動させることによって、大腸菌群を含む空気中のバクテリアで汚染されることが示された⁴⁾。こうした乳製品工場における空気中の細菌の重要性に関しては、HEDRICKとHELDMANがまとめており、そのバクテリアの主な供給源は近くに人間や、工場近くにある舗装されていない道路であると指摘しており⁹⁾、同様なことがHELDMANら¹⁰⁾や小川ら¹⁷⁾によっても報告されている。

殺菌した牛乳中の大腸菌群を検査するにはわが

国の場合、「乳等省令」に記載されている方法により、1ml, 0.1ml, および0.01mlの試料を2本づつBGLB発酵管に植えて32~35°Cで48時間培養の結果、ガス発生が認められなければ大腸菌群は陰性と判定される¹²⁾。これに対し国際酪農連盟(IDF)の標準法¹⁵⁾（殺菌乳の大腸菌群の菌数測定の日常検査法：IDF Standard 40）を用いる場合にはもう1桁多い試料すなわち10mlから始め、1ml, 0.1mlの3段階について検査するために、「乳等省令」の方法に比べてよりわずかの汚染も検出できることになる。

北大附属農場乳製品工場において製造されているびん装乳は、85°Cまでプレートで加熱した後、15分間保持する方法で殺菌されている。その製品は従来「乳等省令」による方法で大腸菌群を検査してきたが、IDFの方法でこれを調べるべく1971年8月に検査を行なった。その結果かなりの大腸菌群が検出され、かつ「乳等省令」の方法によっても陽性を示す程度に汚染されていることが判明したので、直ちにびん装乳製造を中止して原因を追究したところ、工場内の空気が隣接する牧草地に液肥として散布する乳牛のし尿によって汚染され、これが牛乳充てん機のエアパイプノズルから吸入されることが推測された。このため、工場の開放されている窓をふさぎ、空気を濾過して取入れるためのフィルター取付け工事を行なった結果、大腸菌群が検出されなくなった。本報ではこの経過および分離した大腸菌群の2, 3の性質、さらに市販牛乳の検査結果をも併せて報告する。

実験方法

1. 試料

牛乳試料はびん装のまま、あるいは滅菌試料び

んに入れ、原則として水中に保って実験室に運搬して4時間以内に検査を行なった。

2. 培地

BGLB (栄研) は10mlの試料を接種するものについては培地濃度を50%増とし、20mlずつ分注した¹⁵⁾。VRB(DifcoまたはOxoid)およびEMB (栄研) は使用する毎に調製した。乳糖ブイオンはポリペプトン (大五栄養化学) 0.5%, 肉エキス (極東) 0.3%, 乳糖 (関東化学特級) 0.5%, pH 7.0; SPC 培地²⁾ はトリプトン (Difco) 0.5%, 酵母エキス (Oxoid) 0.25%, ブドウ糖 (関東特級) 0.1%, 寒天 (半井化学 EP または栄研細菌用) 1.5%, pH 7.0; 普通寒天培地は肉エキス (極東) 1%, ポリペプトン (大五) 1%, 塩化ナトリウム (関東特級) 0.1%, 寒天 (半井 EP または栄研細菌用) 1.5%, pH 7.0の組成で調製した。希釈液には希リン酸緩衝液を用いた²⁾。

3. 培養条件

各培地は次に示す温度と時間により培養を行なった。

BGLB	31°C	3日
VRB	31	1
EMB	37	1
SPC	{ 31 6	{ 3 7
乳糖ブイオン	{ 31 37	{ 5 1~3
普通寒天	37	1~2

培養温度に主として31°Cを用いたのはIDF法¹⁵⁾によるBGLBの培養温度が30°Cであるのに対し、一般細菌を測定するSPC培地の培養温度とBGLBの培養温度がAPHAの標準法²⁾では32°Cになっているので、この中間の温度である31°Cを採用した。なお、大腸菌群を分離する実験および完全試験^{11,12)}を行なう場合には、予備実験の結果、31°Cでは培地の撰択性を示す特徴が充分現われず、撰択が困難となるおそれが生じたので、37°Cで培養を行なった。また6°C7日間の培養は低温菌検出の目的で採用した。

4. 菌数の算出

BGLB 培地を使用して大腸菌群を検出する際に

は、特にことわらない限り3本法によった。生乳では1mlから始め、0.1, 0.01, および0.001mlの4段階、殺菌乳については10ml, 1ml, および0.1mlの3段階の試料を各3本のBGLBに接種し、ガス発酵した試験管数からMC CRADYのMPN表により100ml当りの最確数を算出した^{2,15,16)}。一般細菌および低温菌はAPHAの標準法²⁾によった。

結 果

1. びん装乳の第1次大腸菌群検査

BGLBを用いた大腸菌群検査はびん装乳についてまず1971年8~9月に行なわれた。その結果はTable 1に示すとうり、汚染率はかなり高いものである。このIDF法は10mlから3段階の濃度の試料を接種するため、検出感度は「乳等省令」の方法よりも1桁高いわけであるが、本実験の結果は後者の方法によっても陽性結果を示す程の高い汚染度であった。特に汚染のひどい前半に比べて9月6日以降は大腸菌群が少なくなり、検出されない検体も見られた。しかし8~9月全体で見ると検出率は75%にもものぼっている。このためびん装乳の払下げを8月下旬に一旦中止し、9月10日からは全面的に停止して原因を究明することとした。なお、サージタンクから無菌的に滅菌ひしゃく(100mlビーカーに直径2mmの針金で柄を付けたもの)で牛乳を採取して、大腸菌群を調べた結果(8月28日および9月6日の2回)はいずれも陰性であった。

2. 汚染原因の追究

殺菌済の牛乳がびん装される段階までに汚染される可能性はいろいろ考えられるが、これを系統的に調べるため、田中らの製造工程大腸菌群汚染特性要因図²³⁾を参考にしながら次に示す諸点について大腸菌群を検査した。

A. 洗びん工程

洗びん機内のタンクから使用中の希アルカリ洗剤をとり、その1mlをBGLB3本に植えた。また洗びん機で洗浄直後のびんに0.5%ハイポを含む希釈液10mlを加え、よく振りまぜてからその3mlづつをとり、VRB培地で3枚の平板を作成した。び

Table 1. Determination of Coliform Bacteria in Bottled Milk. — Experiment 1.*¹

Sampling date	No. of bottle	No. of positive bottle	MPN/100ml	Remarks* ²	Weather* ³		
					Direction	m/s	°C
'71/8/20	1	1	4,300	stored for 7 d. at 4~5°C	SSE	5.6	16.1
24	1	1	93		NNW	2.0	20.5
28	1	1	93		NNW	3.0	18.9
30	5	5	>24,000	1	SSE	3.8	18.3
			>24,000	100			
			14	1000			
			150	middle			
			23	final			
9/2	3	3	39	1	SE	2.6	15.7
			150	200			
			9.1	1000			
3	3	3	23	1	SSE	4.7	16.0
			23	100			
			23	1000			
4	1	1	23	stored for 24h. at 4~5°C	SE	3.4	17.6
6	3	1	0	1	NNW	2.2	16.6
			3.6	100			
			0	1000			
9	3	1	0	initial } stored	SE	3.1	17.8
			3.6	" } for 24h.			
			0	final } at 4~5°C			
10	7	7	9.1	initial	SSE	4.3	16.3
			3.6	"			
			23	middle			
			9.1	"			
			23	"			
			3.6	"			
			7.2	"			
25	8	3	0	initial	NW	2.2	14.1
			9.1	"			
			0	"			
			3.6	"			
			0	final			
			0	"			
			3.6	"			
			0	"			
Total	36	27					

*1 Bottled milk manufactured in dairy plant of Hokkaido University.

*2 Numbers along with bottling order.

*3 Cited from Monthly Weather Report of Experiment Farm of Hokkaido University.

Direction: Most frequent direction of winds, m/s: Velocity of winds,

°C: Average temperature.

んは1回の実験で10本について行ない、同じ実験をもう1度くり返した。これらの結果はいずれも大腸菌群が陰性であった。

B. ボトルコンペアー系統

ボトルコンペアーは充てん機まで全長約11mあり (Fig. 1), プラスチックカバーがかかっているものの、カバーの下部は開放されており、空中からの汚染が考えられたので次の実験を行なった。

希釈液15mlづつを分注した滅菌牛乳びん10本を洗びん機出口でボトルコンペアーに乗せ、充てん機までコンペアーを運転した後、あらかじめ乾熱滅菌した紙キャップで機械を用いず無菌的に栓をした。直ちにびんをよく振って内部を洗い落した後、その洗液10mlを1.5倍濃度の乳糖ブイオン20mlに接種して31°Cで5日間培養し、ガス発生を観察した。その結果、大腸菌群は全く検出されなかった。

C. 紙キャップ

パッケージから紙キャップを無菌的に5枚取りだして、それぞれを20mlの乳糖ブイオン中に切り刻み、31°Cで5日間培養してガス発生を観察した結果、ガスはいずれも認められなかった。5試料中4試料では細菌の発育を示す濁りが生じたが、このそれぞれ1白金耳量をBGLBに接種しても培地の混濁やガス発生は起らず、大腸菌群陰性であることが確認された。

D. 洗浄用水

洗浄水の汚染の有無を確かめるため、10ml、

1ml、および0.1mlの各3本をBGLBで検査した。その結果はいずれも陰性で、同時に行なった一般細菌および低温菌数もゼロであった。

E. 充てん機関係各部

以上の実験から次第に汚染源が空気にあることが予想されてきたので、牛乳充てん機のうち真空関係について次のような検査を行なった。フィルタータンクと真空ポンプとの中間につけてあるトラップとフィルタータンクからの排気用固定パイプとの結合部、トラップ蓋のパッキング、同内部に溜った水、および同底部を白金耳で掻きとった試料について、いずれもVRB培地で画線培養を行なった結果、パッキングおよびトラップ内溜り水の大腸菌群が陽性と判定された。また、サージタンクと充てん機間を連結しているサニタリーパイプのガスケット3ヶ所、およびサージタンクのコックに使用しているOリングからはVRB培地で大腸菌群が検出されなかった。

F. ふきとり検査と落下細菌

大腸菌群が空気中から入るとすれば、空中から

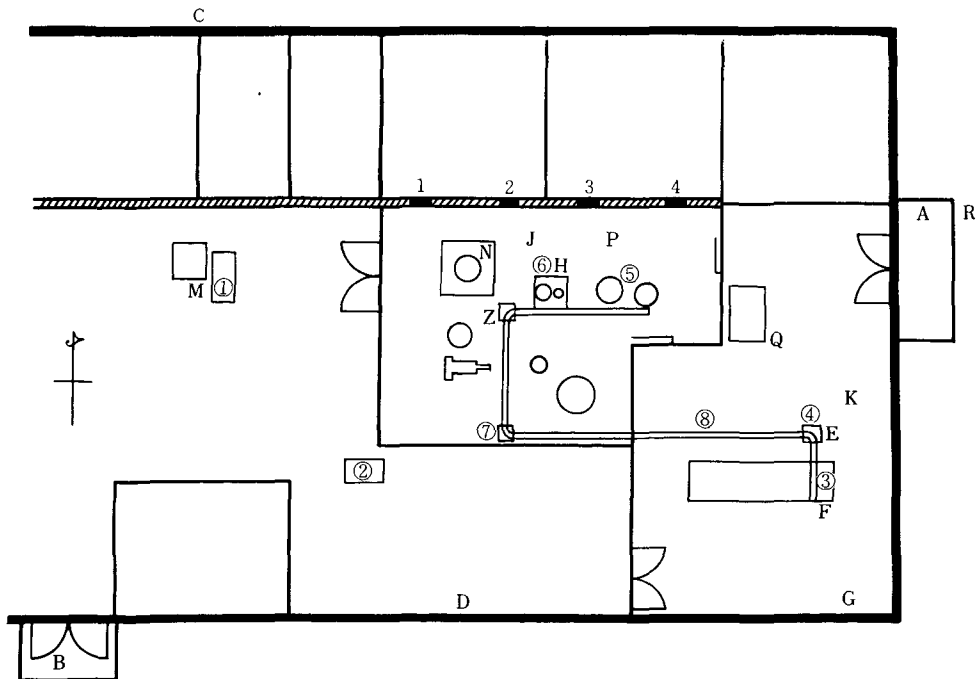


Fig. 1. Sampling Spots in Dairy Plant of Experiment Farm of Hokkaido University.

1, 2, 3, and 4: Filtered air duct, A, B, C, D, E, F, G, H, M, N, and Z: Fall-out bacteria, J, K, P, Q, and R: Airborne bacteria, ①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦, and ⑧: Coliforms by swab method.

落下した菌が機械類の上に落ちていることが考えられるので、ふきとり検査と落下細菌の測定を行なった。Fig. 1に示した各部すなわち①ステンレス台約200cm²、②廃棄処分した旧式充てん機約200cm²、③洗びん機コンペアー約270cm²、④コンペアーコーナー約400cm²、⑤冠帽機下面約180cm²、⑥充てん機フィルタータンク約200cm²、⑦コーナートーブルカバーおよびテーブル本体約250cm²、および⑧コンペアーカバー約220cm²のそれぞれについて、ふきとり法¹¹⁾により滅菌ガーゼで表面をふきとり、10ml希釈液に浮遊させたくちから2.5mlずつ2枚のVRB平板を作成して検査した結果、総てについて大腸菌群が陰性であった。また、落下細菌については充てん機直前のコンペアーコーナー(Fig. 1のZ点)上で20分間、および充てん機真空ポンプの排気管開口部直下の床上で同ポンプを運転しながら15分間、いずれもVRB培地を入れた90mmシャーレで大腸菌群を測定した結果、排気管直下のシャーレに1個の大腸菌群コロニーが検出された。

3. 真空式牛乳充てん機の汚染経路

真空式充てん機は、充てん速度を高めるためにびん内の空気を充てん時に真空ポンプで吸引するような構造になっている。しかし、牛乳が充てんされていない時にも周囲の空気をどんどん吸い込んでいる。さらに機械が回転してノズルが牛乳の満たされたびん口から離れ、新しい空びんに再び牛乳が充てんされ始めるまでの間に、パイプ内に残った牛乳と一緒に空気を吸い込み、その牛乳は再びフィルタータンク内に戻る仕組みになっている。そこでこの戻った牛乳(還流乳)の汚染を調べるため、田中ら²³⁾および浜本と金内⁶⁾が用いたものと同様なフィルタータンク内の還流乳を捕集する500ml容のトラップを充てん機内部にとりつけて充てん作業を行ない、還流乳を集めた。牛乳の還流量は1本(180ml)充てんする毎に3.0~3.6mlであった。これを直ちに試料びんにとり、4時間以内にBGLB(5本法²⁾)とSPC培地で大腸菌群および一般細菌、低温菌を測定した。

また、牛乳の殺菌が完全か否かを確かめるため、

充てん作業開始直前にサージタンクから無菌的に牛乳を採取して、上述のように大腸菌群、一般細菌、および低温菌を測定した。なお、この実験と平行してびん装乳の第2次検査を行なった。検体は充てん開始時、開始後100本目附近、同200本目附近の3時点で1本ずつ抜きとり、他の試料と同様、大腸菌群、一般細菌、それに低温菌を測定した。これらの結果はTable 2に示した。

大腸菌群による汚染は第1次検査に比べて全体としてかなり減少しているが、還流乳が平均6.6/100mlを含み、サージタンクからも2回検出されている。汚染は12月2日に最も高率に生じ、この日はサージタンク乳、還流乳、および3本のびん装乳の総てから大腸菌群が見出された。一般細菌はいずれも「乳等省令」の規格1cc当り50,000以下に合格する値であるが、検査日によって差があるほか、びん毎のばらつきが大きい。このため、対数平均をとってみると、びん装乳の方が還流乳よりも菌数が多い結果となった。一般細菌の場合には、前述の紙キャップの実験結果からも分るように、還流乳以外からの汚染が当然あり得よう。低温菌はいずれも30以下/mlと問題はなく、空気からの汚染もこの方法では認められなかった。

4. 落下細菌および浮遊細菌

本乳製品工場はFig. 1の斜線で示した位置に北側に向って蒸気抜きの開放窓があり、吹抜けの格子が取付けられている。工場北側は10数mを隔てて直接乳牛の放牧地および採草地となっており、肥料として年間数回にわたってし尿が散布される実情であった。これまでに示したような種々の実験によって、びん装乳の大腸菌群は空気からの2次汚染であることが充分推測され、その原因が北側の開放窓にあることがほぼ確定したので、その実態を調査するために空中細菌を測定した。落下細菌についてはSPC培地で一般細菌を測り、大腸菌群にはVRB培地を用いた。検査はFig. 1に示したA~Hの8ヶ所について各15分ずつ90mmのシャーレで行なった。一方、浮遊細菌の測定は直径47mmのミリポアフィルターHAWP(孔径0.45nm)を蒸気滅菌して、同じく滅菌したホルダー

Table 2. Determination of Coliforms, SPC, and Psychrotrophic Bacteria (PTC) in Surge Tank Milk, Flow-Backed Milk, and Bottled Milk. — Experiment 2.

Milks	'71/11/1			11/8			11/17			12/2			12/8			Coliforms Average	SPC Log Average
	C* ¹	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P		
Surge tank	2	<30	<30	0	LA* ²	<30	0	89	<30	7	34	<30	0	<30	<30	1.8	40.6
Flow-backed	0	<30	<30	2	43	<30	23	1100	<30	8	32	<30	0	<30	<30	6.6	67.1
Bottled																2.9	74.5
1	0	<30	<30	0	35	<30	0	260	<30	27	2500	<30	0	43	<30		
2	0	<30	<30	0	32	<30	0	340	<30	7	47	<30	2	<30	<30		
3	0	<30	<30	0	37	<30	2	1500	<30	5	180	<30	0	<30	<30		

*1 C: Coliforms MPN/100ml by 5-tubes method, S: SPC/ml, P: PTC/ml.

*2 Laboratory Accident.

に取付け、ロータリーポンプを用いて約200ℓの空気を10分間で吸引した後、このフィルターをVRBに貼りつけて培養した。測定位置は充てん機および洗びん機の附近で床面から約50cmの高さである (Fig. 1のJおよびK点)。浮遊菌の測定は12月24日1回のみであるが、当日の気象条件は晴れており、北大農場気象月報によると、最多風向はWNW、平均風速は3.0m/sec、平均気温は-2.8°Cであった。

この結果は落下細菌のうち一般細菌について

Table 3に示した。屋内と屋外とでは1桁の差があり、北西風が他の日よりやや強い11月29日の場合、屋外では地表が凍結していたにも拘らず、15分間で600にまで達した。北側から直接風が吹き込んでくる工場内でもこの日は他の検査日より菌数が多く、しかも充てん機附近の増加が顕著であった。積雪によって落下細菌の測定値は明らかに減少し、12月の3回は同じような傾向を示した。このように落下細菌は地表の状態 (乾湿、凍結、積雪の有無など) と風向および風速に強く影響され

Table 3. Fall-Out Bacteria at Some Spots Inside and Outside of the Plant.*¹

		'71/10/19	10/25	11/29	12/6	12/13	12/20
Weather* ²	Direction	WNW	WNW	NW	NW	WNW	SSE
	m/s	1.0	2.1	3.1	1.8	2.5	1.3
	°C	6.8	7.5	-6.4	0.2	-4.1	-5.3
Spots* ⁴	A	—	—	601	20	—* ³	31
	B	93	>300	512	44	53	52
	C	—	—	494	20	—* ³	24
	D	11	6	86	11	0	1
	E	8	7	30	0	1	3
	F	3	4	22	0	0	3
	G	34	10	55	6	8	3
	H	13	3	77	0	0	4

*1 SPC agar plates were exposed for 15 min.

*2 Cited from Monthly Weather Report of Experiment Farm of Hokkaido University. See foot note of Table 1.

*3 Colony was not detected, presumably due to freezing of medium during exposure.

*4 A: Out-door(East), B: Out-door(South), C: Out-door(North), D: Milk-can yard, E: Bottle conveyer, F: Bottle-washing machine, G: Unwashed-bottle yard, and H: Bottle filler. See also Fig. 1.

ていることがうかがわれる。なお、この測定は作業休止時に行なったものであり、屋内では空気がほぼ静止に近い状態であったことから、実際の操業時には更に菌数が増加するものと思われる。

VRBによる大腸菌はいずれの日にも検出されず、これまでの種々の検査結果を考え合わせると、空中細菌測定には不適當であることが予想される。ミリポアフィルターによる浮遊大腸菌群の測定結果も陰性を示したが、このことは一般細菌の場合と同様、積雪の影響と培地の不適合との両原因が考えられる。

5. 改修工事後の第3次大腸菌群検査

外部より侵入する大腸菌群を防止するため、工場北側の開放窓を塞いで天井を張り、取り入れた

空気を濾過して温度を調節する空調設備工事は、本学農業工学科の堂腰助教授の基本設計のもとに1972年10月から12月にかけて行なわれた。この空気濾過装置設置後の効果を調査するため、1973年1月末から第3次の大腸菌群検査を実施した。試料には生乳も含め、サージタンク乳、還流乳のほか、びん装乳の場合は充てん開始時、同中間点、および最終時点の3種とした。

大腸菌群の測定結果はTable 4に示したようにばらつきが大きく、全体の平均で見た限りではいずれも100ml当りサージタンク乳が6.7、還流乳が14.3、それにびん装乳では11.4と空気濾過装置を取りつける前の数字 (Table 2) よりも多くなっている。しかしこれを1~2月と5月以降に分け

Table 4. Determination of Coliforms After Setting of Air Filter. — Experiment 3.

Sampling date	MPN/100ml of milk from					
	Raw sample $\times 10^{-3}$	Surge tank	Flow backed sample	Bottled samples		
				Initial	Middle	Final
'73/1/30	0.43	23	43*	23	43*	43*
2/1	1.5	0	—	0	3.6	3.6
2	1.5	39	23	23	43*	9.1
13	0.93	15*	—	9.1	9.1	15*
14	4.3	9.1	23	9.1	23	9.1
15	1.5	3.6	3.6	3.6	0	3.6
19	46	0	3.6	3.6	9.1	3.6
20	110	3*	23	23	9.1	0
21	>240	0	7.3*	9.1	3.6	9.1
22	9.3	20*	75*	93*	23	23
23	>240	0	7.3*	0	43*	9.1
24	>240	0	3.6	9.1	15*	9.1
Average	—	9.4	21.2	15.7		
5/16	110	0	9.1	3.6	0	3.6
17	9.3	0	0	9.1	3.6	0
23	24	0	0	9.1	0	0
24	46	3.6	3.6	3.6	3.6	0
25	24	3.6	0	3.6	9.1	0
9/21	>240	0	3.6	0	0	0
Average	—	1.0	2.7	2.7		
Total average	—	6.7	14.3	11.4		

* Not permitted sample by Japanese legal limitation.

て見ると、後者については100ml当りサージタンク乳1.0、還流乳2.7、それにびん装乳では同じ2.7という値になり、Table 2の値よりいずれも低い。屋外の条件が1～2月は積雪があり、5月以降は塵埃の舞いあがる季節であることを考えると、このデータから空気濾過装置の効果が現われてきたと見ることができよう。1973年9月に行なわれた検査においてはこの効果が顕著になり、還流乳試料10mlを接種した3本のBGLBのうち、わずかに1本が陽性(MPN=3.6/100ml)であるに過ぎなかった。原料乳の大腸菌群は検査日による変動が非常に大きく、少ない日の430/100mlに対して多い日には24,000以上/100mlもの値を示したが、殺菌された牛乳中の大腸菌群との関連は見られなかった。サージタンク乳からもBGLBで陽性の菌が検出されたことは注目に値しよう。しかし、このことは直ちに殺菌が不十分であることには結びつかない。なぜなら、もし殺菌で生き残るのであれば、殺菌乳中(この場合、サージタンク乳、還流乳、びん装乳全部を含む)に存在する大腸菌群の数は原料乳のそれに比例しなければならず、実

際のデータはこれと矛盾するからである。

「乳等省令」で指定している牛乳大腸菌群の測定方法¹²⁾は試料1mlから始めることになっている。この方法で測定した場合に大腸菌群陽性(但しBGLB段階のみ)と推定される可能性のある試料はTable 4中に星印(※)で示した。1～2月のデータ中にはこれがかかなり見られるが、全体として菌数が少なくなってきた5月以降には認められない。

大腸菌群の菌数が検査日によって試料全部に多い日と少ない日があることは、びん装乳3本についての平均値と還流乳を比較したFig. 2からも明らかである。当然のことながら、還流乳に大腸菌群が多い日にはびん装乳中の菌数も多い傾向を示している。この図からはまた、全体として1～2月の大腸菌群の変動が大きく、菌数が多いのに比べて、5月以降の菌数が少なく変動も少ないことが明らかである。

一般細菌および低温菌の測定結果はTable 5に示した。前者の菌数は対数平均値で見ると、空気濾過装置取付け以前の冬のデータ(Table 2)よ

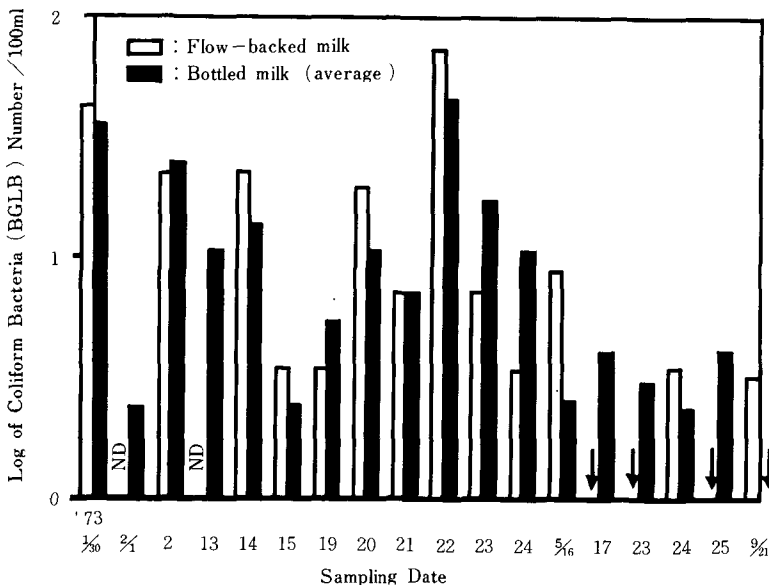


Fig. 2. Comparison with Flow-Backed Milk and Bottled Milk. Arrows indicate zero and ND means "not determined"

Table 5. SPC and Psychrotrophic Bacteria(PTC) After Setting of Air Filter.

Sampling date	SPC/ml of milk from						PTC/ml of milk from		Survival ratio*1 (%)
	Raw sample ×10 ⁻³ ⑥	Surge tank ①	Flow-backed sample ②	Bottled samples			Raw sample ×10 ⁻³	Others	
				Initial ③	Middle ④	Final ⑤			
'73/1/30	14	1400	1000	860	910	1000	<3	<30	7.39
2/1	13	91	560	130	98	110	<3	<30	1.52
2	20	64	93	81	73	55	<3	<30	0.52
13	14	91	LA*2	240	120	140	5	<30	1.06
14	22	45	75	67	61	63	17	<30	0.28
15	14	<30	77	37	41	<30	3.2	<30	<0.31
19	180	39	67	41	45	41	120	<30	0.03
20	990	<30	35	59	30	<30	710	<30	<0.004
21	1400	<30	78	<30	<30	<30	990	<30	<0.003
22	22	<30	100	<30	<30	53	<3	<30	<0.22
23	240	<30	46	<30	<30	<30	190	<30	<0.11
24	440	<30	45	<30	<30	<30	330	<30	<0.008
5/16	170	990	390	550	620	590	36	<30	0.37
17	14	56	33	30	33	43	2.4	<30	0.28
23	93	33	<30	30	<30	30	5.6	<30	<0.31
24	21	<30	<30	<30	<30	<30	7.5	<30	<0.08
25	70	<30	<30	<30	<30	<30	17	<30	<0.02
9/21	370	4300	4200	4600	3900	3700	19	<30	1.12
Log Average	68.5	75.7	103	76.9			19.3	<30	-

$$*1 \frac{(\text{①}+\text{②}+\text{③}+\text{④}+\text{⑤})/5}{\text{⑥}} \times 100$$

*2 Laboratory Accident.

りもサージタンク乳と還流乳で約6割も多くなっているが、びん装乳では殆んど変らない。改修後の菌数が改修前に比べて多いことの理由は、1つには一般細菌の場合、芽胞形成菌を含む耐熱菌は85°C15分の殺菌では生き残り、従って殺菌乳中に存在する菌数は生乳の菌数や菌の種類に左右されることが考えられる。もう1つは特に改修後間もない1~2月に全体として菌数が多い傾向を見ると、この時期の場合、風速約6mで4ヶ所のダクトから吹き出してくる無菌濾過された空気によって、それ以前から留っていた菌が舞い上がり、こ

のために菌数が多くなったと考えることができよう。この後者の考え方は上述の大腸菌群のデータについても妥当な説明であろう。しかし、一般細菌の場合に特徴的なのは、連続して実験を行なった最初の日にいずれも菌数が多い現象である。この日にはサージタンク乳にも菌数が多いことから、空気による還流乳汚染とは関係ないことが想像される。毎日連続して操業すると殺菌効果が日毎に上昇する結果が、生乳の菌数に対する殺菌乳の菌数(平均値)の比から得られた(Table 5)。1~2の例外も認められるがこの傾向ははっきりして

おり、今後の検討を要する問題として残されている。

低温菌の場合は改修以前と同様、いずれも1ml当り30個以下であって、このことから低温菌に関しては還流乳による大きな2次汚染はないものと考えられる。

空気濾過装置設置後の室内環境が外部の条件と全く独立しているかどうか、言い換えれば改修の効果が確実に現われたか否かを調査するために空中落下菌の測定を行なった結果がTable 6である。一般細菌について見た場合、屋外の3点 (Fig. 1のA, B, およびC点) の落下菌数は1~2月の冬期と5月以降とを比べるとほぼ1桁の差が認められた。5月23日の屋外菌数が2桁であるのは前日

に雨が降り、地表が濡れていたためであろう。

これに対し屋内 (Fig. 1のD, E, M, およびN点) の菌数は冬も春以降も大きな差はない。更に冬の場合は屋外も屋内も殆んど同じレベルの菌数であることが分る。屋内のうち、スクリーンで仕切っており、除菌空気が直接吹き込まれている場所であるN点 (サージタンク横) では全期間を通して1桁 (0~8) の落下細菌しか検出されず、平均値は15分当り4.1個であった。このN点を改修前のH点 (充てん機, Fig. 1およびTable 3参照) と比較してみると、改修前に見られた検査日による変動が改修後には認められないのが特徴である。前者では操業を行っていない時、後者では作業中のデータであることを考慮すれば、空気濾過の

Table 6. Fall-Out Bacteria After Setting of Air Filter.*1

Sampling date	SPC/ plate							VRB Count/plate Spots A to N shown on the left	
	Spots*2	A	B	C	D	E	M		N
'73/1/30		4	0	0	1	11	0	2	0
2/1		15	153	17	5	5	5	6	0
2		4	5	3	3	4	0	7	0
13		13	9	6	6	8	7	2	0
14		5	4	4	3	5	3	0	0
15		2	2	3	1	11	2	3	0
19		9	7	4	5	4	4	3	0
20		21	13	9	7	261	8	3	0
21		47	36	24	5	19	5	6	0*3
22		0	9	15	0	2	4	7	0
23		18	9	7	6	9	3	4	0
24		28	87	15	4	30	5	5	0
5/16		129	173	122	3	44	7	8	0
17		600	798	450	26	11	26	5	0
23		54	50	86	9	12	11	8	0
24		169	146	135	3	7	5	6	0
25		>300	>300	>217	25	28	32	4	0
9/20		140	171	131	5	7	20	0	0
/21		177	310	113	10	14	8	1	0*4

*1 Plates were exposed for 15 min.

*2 A: Out-door (East), B: Out-door (South), C: Out-door (North), D: Milk-can yard, E: Bottle conveyer, M: Ice-cream freezer, and N: Surge tank. See also Fig.1.

*3 Except spot C with 12 colonies and spot E with 14 colonies.

*4 Except spot A with one colony.

効果は現われていると推察できよう。

VRB 培地による空中落下大腸菌群の測定結果は殆んど総てが陰性で、わずかに2月21日のC（屋外北側）およびE（洗びん機横のコンベアー）点で12個および14個、9月21日のA（屋外東側）点で1個検出されたのみであった。

同様な傾向は空中浮遊大腸菌群の測定結果についても見られる。1～2月にかけて12回、Fig. 1のP（充てん機附近）、Q（原料乳受入タンク横）、およびR（屋外東側）の3点について各200ℓの空気をミリポアフィルターを通して吸引し、これをVRB平板上で培養した結果は、2月23日のR点で1個のコロニーが認められたにすぎない。また、濾過空気吹出し口（びん装乳処理室の北側、床上3.1mの高さに4ヶ所設けられている；Fig. 1の1、2、3、および4の点）から秒速約6mで吹出してくる空気中の大腸菌群を測定するため、開口部のグリル面から5～10cmの距離で気流に対し直角にVRB平板を5分間さらして大腸菌群を測定した結果も、16回（2月9回、5月5回、および9月2回）の総てが陰性であった。この場合は除菌空気であり、大腸菌群が検出されなくとも当然ではあるが、これまでの実験から、改修直後（1～2

月）には壁や機械器具に附着していた大腸菌群がダクト中に残存している菌も含めて、少量ずつ濾過空気の気流によって流されてくることが予想されたにも拘わらず、総てが陰性であったことは前にも述べたように、検査方法に問題があると推察された。

このため、STERSKYとHEDRICK²¹⁾が推奨している方法で吹出し口での菌数を測定した結果がTable 7である。この方法はSPC培地で捕えた菌の上から、培養前にEMBを重層するのであるが、実験結果を見ると大腸菌は検出されず、同時に行なったSPC培地単独のものに5分当り0～5個の一般細菌が検出された。このことから1973年9月現在においては、吹出し口から出てくる濾過空気中に大腸菌群は含まれていないと判定できよう。

6. 完全試験と分離大腸菌群の2、3の性質

これまでに行なった大腸菌群のBGLBによる検出は推定試験であり、スクリーニングの意味をもつものである。衛生管理の面からは通常この推定試験のみが行なわれることが多く¹⁵⁾、本実験でも主としてBGLBでこれまで検査を行なったが、厳密には衛生検査指針¹¹⁾や「乳等省令」¹²⁾にも記載されているように、完全試験を行なって大腸菌群であ

Table 7. Airborne Bacteria Determined by Three Kinds of Agar Plate.*1

Air duct number*2	Media	Sampling date	
		'73/9/20	9/21
1	VRB	0	0
	EMB/SPC*3	0	0
	SPC	0	2
2	VRB	0	0
	EMB/SPC	0	0
	SPC	5	0
3	VRB	0	0
	EMB/SPC	0	0
	SPC	0	2
4	VRB	0	0
	EMB/SPC	0	0
	SPC	1	1

*1 Plates were exposed for 5 min. at distance 5~10cm from the grill of the filtered air duct.

*2 See Fig. 1.

*3 EMB overlaid on SPC plate after sampling.

ることを確かめる必要がある。そこで、これまでにBGLBでガスを発生した試験管からEMB、乳糖ブイヨン発酵管の順に菌を移植して反応を調べ、更に鏡検してグラム陰性、無芽胞の桿菌をもって大腸菌群と判定した^{11,12)}。培養は「実験方法」で述べたように31°Cの代りに37°Cで行ない、菌の性質を調べる目的のためには必要に応じてEMB、乳糖ブイヨン、BGLBによる分離をくり返し行なった。

実験はTable 1に示した第1次検査のうち、8月24日および9月4日のびん装乳と第2次検査(Table 2)のBGLB陽性全試料、および空気濾過装置を設置した後の検査のうち、最初の3回を除く2月13日以後のBGLB陽性全試料(Table 4)について行なわれた。その結果、Table 1の試料では両方共、Table 2に関しては11月8日および11月17日の還流乳、Table 4の試料の場合は2月14日の還流乳、2月17日の還流乳と最終びん装乳、2月22日は全試料、2月23日は中間点びん装乳の

それぞれについて大腸菌群が陽性であった。このように汚染が発見されて改修がまだ行われていない時期、および改修して間もない時期には空気を汚し、環境中に残存していたと見られる大腸菌群が牛乳を汚染していることが、完全試験の結果から確認された。しかし5月以降についてはBGLB陽性管数が絶対値として減少すると同時に、大腸菌群は完全試験によれば陰性であることがはっきり示された。すなわち、1973年5月以降に見られたBGLB陽性の菌は大腸菌群とは異なることが明らかになったわけである。

次に、完全試験で検出された大腸菌群のうちの一部についてIMViCシステムによる同定とECテストおよび耐熱性を調べた。

IMViC (インドール反応、メチルレッド試験、Voges-Proskauer 反応、およびクエン酸ソーダ試験)の諸検査は主としてManual of Microbiological Methods²⁰⁾およびSKERMANの著書¹⁹⁾により行なった。ECテストはEC培地(栄研)を用い、普

Table 8. Some Characteristics of Isolated Coliform Bacteria.

Strain number	Source	Gram	Indole	MR	VP	Citrate	EC test	Heat resistance ^{*1}		Identification ^{*2}
								Gas	Turbidity	
1	Bottled milk (7/18/24)	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>C. freundii</i> I
2	"	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>C. freundii</i> II
3	"	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>K. aerogenes</i> II
4	"	-	+	-	+	+	-	-	-	"
5	"	-	+	-	+	+	-	-	-	"
6	"	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K. aerogenes</i> I ^{*3}
7	"	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>K. aerogenes</i> II
8	Bottled milk (9/4)	-	+	-	+	+	-	-	-	"
11	Flow-backed milk(11/7)	-	+	-	+	+	-	-	-	"
12	"	-	+	-	+	+	-	-	-	"
13	"	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> III
14	"	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>K. aerogenes</i> I ^{*3}

*1 63.5°C for 30 min.

*2 Coli-aerogenes subcommittee (1956).

*3 *K. aerogenes* I or *Ent. cloacae* or *Erw. carotovorum*.

通寒天に2回、乳糖ブイオンに1回移植を行なって活性化した菌の1白金耳量をこの培地に植え、44.5°C (恒温水槽) で48時間の培養を行なって培地の混濁とガス発生の有無を観察した。耐熱性は上と同じ乳糖ブイオンから1白金耳量を新たな乳糖ブイオンに植え、63.5°Cの恒温水槽で同温度に達してから30分間保持の後、氷水中で培養温度(37°C)まで冷却し、その温度で5日間まで培養して培地の混濁とガス発生の有無を確認した。これらの結果はTable 8に示した。数少ない試料中から、Coli-Aerogenes 小委員会の分類¹⁸⁾による *Citrobacter freundii*のIおよびII型、*Klebsiella aerogenes*のI(または *Enterobacter cloacae* または *Erwinia carotovorum*) およびII型、それに *Escherichia coli* III型が検出されており、それらのECテ

ストの結果はいずれも陰性であった。耐熱性は *K. aerogenes* I型の1株と *E. coli* III型に見られたが、後者では菌の発育のみで、乳糖からのガスの産生は認められなかった。

7. 市販びん装乳の検査

大腸菌群を含む空気中の細菌によってびん装乳の汚染が生じることはこれまでの実験で明らかになった。そこで比較のために市販びん装乳を店頭で購入して調べた。すなわち、1973年5月から10月にかけて5回、6社の「乳等省令」でいう「牛乳」(但し一部は「加工乳」を含む)を検体として大腸菌群と一般細菌を検査した。このうち1社のみは対照のため、紙容器(テトラパック:180ml)の牛乳を購入した。製造日付は最大4日前のものが1件見られたが、平均すると1.3日前となった。

Table 9. Coliforms and SPC in Market Bottled Milk.

Dairy plant	A	B	C	D	E	F*1
Heat processing	120°C 2sec.	130°C 2sec.	130°C 2sec.	130°C 2sec.	75°C 15min.	120°C 2sec.
73/5/29	Bottled date	5/27	5/28	5/28	5/28	5/28
	Coliforms**2	0	0	0	0	>2,400
	(Completed test)	(0)	(0)	(0)	(0)	(16)
	SPC/ml	34	<30	<30	<30	95,000
7/18	Bottled date	7/16**3	7/17**3	7/17	7/17**3	7/18
	Coliforms	0	0	0	15	>2,400
	(Completed test)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1100)
	SPC/ml	<30	<30	<30	<30	42,000
7/24	Bottled date	7/23	7/22	7/20	7/23	7/24
	Coliforms	9.1	0	0	43	>2,400
	(Completed test)	(0)	(0)	(0)	(7.3)	(150)
	SPC/ml	<30	<30	410	<30	51,000
9/27	Bottled date	9/25	9/26	9/26	9/26	9/27
	Coliforms	0	0	0	93	>2,400
	(Completed test)	(0)	(0)	(0)	(43)	(36)
	SPC/ml	<30	<30	<30	38	33,000
10/3	Bottled date	10/1	10/1	10/1	10/2	10/3
	Coliforms	0	0	0	3.6	>2,400
	(Completed test)	(0)	(0)	(0)	(0)	(36)
	SPC/ml	50	<30	<30	<30	9,800

*1 Paper container (Tetra Pak, 180ml).

*2 Coliform number indicated MPN/100ml on BGLB (and on "completed test").

*3 "Kakonyu" in Japanese legal term.

結果は Table 9 に示したように、BGLB による推定試験では全 30 試料中の約 37% にあたる 11 試料が陽性であった。更に完全試験を行なったところ、11 試料中 4 試料が陰性となり、結局 7 試料のみが大腸菌群陽性となった。この 7 試料は D および E の 2 社に集中し、特に後者の場合、5 回の検査のすべてに大腸菌群が検出され、完全試験の結果でも最確数が最高 1100/100ml を示した。SPC 培地による一般細菌は E 社以外は殆んどが 10^1 のオーダーであり、 <30 と表示した場合でも実際のコロニー数は 1 ml 当り 0 ~ 2 のケースが多かった。製造後 4 日経過した試料で、やっと 10^2 のオーダーである。これに対し、大腸菌群が常に検出された E 社試料の一般細菌は、製造日付が殆んど購入当日であるにも拘わらず、最低でも 9,800/ml、最高では 95,000/ml と厚生省規格の 50,000/ml を越えている試料があり、衛生管理の不充分さがうかがわれた。

考 察

大腸菌群が牛乳（および食品一般）の衛生検査において汚染指標菌としてチェックされるのは、食品衛生法でいう「病原微生物によって汚染され、またはその疑いがあり、人の健康を害うおそれ」のある食品を排除するのが目的である。ところが實際上これらの病原菌をすべての場合に食品から検出することは不可能なので、消化器系伝染病原菌と起源を同じくしているという見地から、食品が人畜の糞便で汚染されている場合には危険であるという意味で、汚染判定の 1 つの指標として一般に検索の容易な大腸菌群を検出するのである¹¹⁾。

このような考え方に対し、大腸菌群の諸性質を考慮した上で「より良い環境下で、より安全性の高い良質の食品を生産、確保するのに必要な衛生管理上の尺度」とする考え方がある⁸⁾、近年は一般にこの考え方に傾きつつある。この意味からすれば単に BGLB による推定試験のみ¹⁵⁾であっても、食品衛生管理上から大腸菌群を検査することの重要性が強調されるわけである。

空気中の細菌によって殺菌乳が汚染される現象は、これまでの報告^{1,4,6,14,22,23)}と同様、本実験の

場合にも明らかになった。こうした汚染は工場環境によって強く影響され⁹⁾、特に窓が開放されていた本工場のような場合には天候に大きく左右される結果となる。このことは落下菌の測定によって確かめられた (Table 3 および 6)。

殺菌乳が殆んど外気に触れることなく一時的に貯留されるサージタンクから無菌的に採取した試料について、第 2 次以後の検査結果 (Table 2 および 4) に見られるように BGLB で陽性を示す菌が発見されたことが、直ちに真の大腸菌群の汚染を意味するとは限らない。このことは完全試験の結果からも証明されたが、衛生管理面からは考慮すべき点があるものと推測され、今後の検討を要する問題であろう。

BGLB と同様、推定試験に用いられる VRB 培地で行なった諸検査において多くの結果が陰性を示したことは、この培地自体が一般に大腸菌群用として不適當であるという訳ではなく、大腸菌群の方に問題があったものと思われる。MAXCY¹³⁾ は大腸菌が熱、凍結—融解、塩素、それに食塩などによって損傷を受けると、撰択培地で低い菌数しか得られないことを示した。春田⁷⁾ も同様の実験を行なっている。FRAZIER と GNEISER⁵⁾ はメンブランフィルターを使う菌数測定の場合、凍結やブランチングなどの処理を受けた試料については、培養時間を延長すべきことを示唆している。また、STERSKY と HEDRICK²¹⁾ は空気に浮遊させた大腸菌群が撰択培地に生育しにくくなることを示し、特にデソキシコレート培地で悪く、VRB もあまり良くない結果であることを示した。これを防ぐには SPC 培地上に菌を集めてから、その上に EMB 培地を重ねると良い結果が得られるという。本研究において、空中落下細菌、メンブランフィルターによる空中浮遊菌、および濾過空気吹出口からの空中菌の検査を VRB 培地で行なった結果、いずれの場合も殆んど大腸菌群が検出されなかったのは、特に前 2 者では菌の乾燥や凍結による損傷が原因になっていると考えることができよう。事実、空中落下菌検出の際に一部の VRB 培地で培養時間を延長したところ、陽性を示すコロニーが

認められるケースがあったことからこのことが推察される。しかし培養時間の延長をすることは培地の撰択性を低下させる結果となるので、注意が必要となる。なお、本実験ではメンブランフィルターを単にVRB培地上に貼りつけたのみで、その上から同培地を重層する方法を採らなかったため、このことも一因かも知れない。EMB/SPC重層法を採用して行なった本実験の結果 (Table 7) が陰性であったことは、2回のみ検査ではあるが、上に述べたような理由から、1973年9月現在ダクトから吹き出す空気中には大腸菌群が含まれないことを証明している。

空気からの低温菌による市乳の汚染はこれまでもいくつかの報告があり^{3,4,6,14,17)}、空気は重要な汚染源のひとつと考えられている。本実験で検出された低温菌は原料乳を除くと、すべての試料について30以下/mlの値を示した。実際のコロニー数でもTable 2の場合は0~14/mlであるのに対し、Table 5の特に5月以降では殆んどが0/ml(5月25日のみ1~3/ml)である。従って空気中からの低温菌による汚染は、今回の検査方法で行なった限りでは殆んどないということができよう。しかし、本実験では試料1mlを用いて平板を作成しているため、浜本と金内⁶⁾のようにもっと大量の試料によりMPN方式で検出を行なえば、厳密な低温菌汚染の有無が判明することと思われる。

大腸菌群の耐熱性についてはいくつかの報告^{7,24,25)}があるが、分離した大腸菌群に対し耐熱性の試験を行なった結果、2株に耐熱性が認められた。そのうち1株 (*E. coil* III型) では発育が認められたのみで乳糖からのガス産生能は見られなかった (Table 8)。もう1株は *K. aerogenes* I型 (ゼラチン試験を行っていないので本菌は *Enterobacter cloacae* あるいは *Erv. carotovorum* であるかも知れない) で、こちらは発育もガスの産生も認められ、明らかに63.5°Cで30分の処理に対しては耐熱性のあることが確認された。本工場の殺菌方法は85°Cで15分間保持する方式であるため、上の実験結果は直ちに生乳由来大腸菌がびん装乳に残存してこれが汚染原因となるという推測とは結びつ

かないであろうと考えられる。このことは空気中からの大腸菌群の汚染が殆んど見られなくなった1973年5月以降のデータ (Table 4) において、生乳中の大腸菌群と殺菌乳中の大腸菌群 (この数字はBGLBによるものであり真の大腸菌群はすべてゼロである; 結果の6節参照) とを比較して見れば明らかである。

要 約

1971年8~9月にBGLBを用いる国際酪農連盟の標準法 (IDF Standard 40) によって、北大附属農場乳製品工場で生産したびん装乳を検査したところ、検体の75%からかなりの大腸菌群が検出され、完全試験によってもこれが確かめられた。この原因を究明するために洗浄びん、コンペアーシステム、牛乳紙キャップ、洗浄用水、充てん機各部、サージタンクとの結合パッキング類、および工場各所の機械類表面について大腸菌群を測定した結果、空気からの汚染が推測された。これを確かめるため、真空式牛乳充てん機から還流乳を集めてサージタンク乳やびん装乳と大腸菌群、一般細菌、および低温菌を比較し、更に工場内外の落下細菌と浮遊大腸菌群を測定した。その結果、びん装乳の汚染は空気中の大腸菌群が充てん機ノズルから吸引されて生じることがほぼ確認された。

こうした汚染を防止するため、1972年10月から12月にかけて、それまで開放されていた建物北側の窓を塞ぎ、天井を張って空気濾過のフィルターを取付ける工事が行なわれた。改修工事後、再びサージタンク乳、還流乳、びん装乳、および生乳のそれぞれについて大腸菌群、一般細菌、および低温菌が測定された。また同時に落下細菌、浮遊大腸菌群、および吹出しダクトからの濾過空気中の一般細菌と大腸菌群も検査された。これらの結果、改修直後には汚染が少々見出されたが、1973年5月以降にはBGLB陽性の試料がいくつか存在したものの、完全試験を行なって見ると大腸菌群は全く認められなくなった。

低温菌の汚染は本実験では確認することができなかった。改修後の落下細菌は充てん機近くのサ

ージタンク横で1枚のシャーレ当り15分間に0～8個であった。一般細菌数は製造日によりかなり変動が認められた。

最初の検査対象となった試料から純粹分離した大腸菌群12株について、その分類、ECテスト、それに耐熱性試験を行なった結果、63.5°C、30分に耐熱性を示す菌が2株存在した。

比較のために市販びん装乳を5社から、紙容器入り牛乳を1社から購入して大腸菌群と一般細菌を検査した結果、6社のうち2社の製品から大腸菌群が検出され、中でも特定の1社の牛乳は一般細菌および大腸菌群による大きな汚染が常に認められた。

本稿を終るにあたり、実験に協力下さった長橋隆雄、板谷一、及川昭夫、加藤秀雄の諸技官、および吉村滋君、ならびに工場改修の基本設計を担当された農業工学科の堂腰純助教授に深甚の謝意を表します。

引用文献

- 1) 秋山 陽：食品衛生研究, 20, 374-377, 1970.
- 2) APHA: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 12th Ed., APHA, 1967.
- 3) CANNON, R. Y.: J. Milk Food Technol., 33, 19-21, 1970.
- 4) CANNON, R. Y. and K. K. REDDY: *ibid.*, 33, 197-201, 1970.
- 5) FRAZIER, W. C. and D. F. GNEISER: *ibid.*, 31, 177-179, 1968.
- 6) 浜本典男, 金内稔郎: 食衛誌, 10, 414-419, 1969.
- 7) 春田三佐夫: 栄養と食糧, 11, 281-295, 1959.
- 8) 春田三佐夫: モダンメディア, 16, 259-267, 1970.
- 9) HEDRICK, T. I. and D. R. HELDMAN: J. Milk Food Technol., 32, 265-269, 1969.
- 10) HELDMAN, D. R., T. I. HEDRICK and C. W. HALL: *ibid.*, 27, 245-251, 1964.
- 11) 厚生省: 食品衛生検査指針 (I), 協同医書出版, 1960.
- 12) 厚生省: 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令 (昭和26年12月27日厚生省令第52号, 昭和48年3月31日同第13号=第11次改正)
- 13) MAXCY, R. B.: J. Milk Food Technol., 33, 445-448, 1970.
- 14) 村田 章, 斎藤幸雄, 末木賢二, 鈴木雄三: 食品衛生研究, 18, 146-157, 1968.
- 15) 日本国際酪農連盟: 資料第17号 (IDF Standard), 日本国際酪農連盟, 1969.
- 16) 日本薬学会: 衛生試験法注解, 金原出版, 1965.
- 17) 小川益男, 武村和男, 北原康弘, 菅原通夫, 高橋利弘, 近藤 貢, 久井伸次, 中野竜雄, 山田俊雄: 日獣会誌, 21, 248-252, 1968.
- 18) 坂崎利一: モダンメディア, 16, 308-312, 1970.
- 19) SKERMAN, V. B. D.: A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd Ed., Williams & Wilkins, 1967.
- 20) Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Methods, McGraw-Hill, 1957.
- 21) STERSKY, A. K. and T. I. HEDRICK: J. Milk Food Technol., 35, 156-162, 1972.
- 22) 田中錠太郎, 海沼 勝, 秋山 陽, 大竹 昇, 前田明: 食品衛生研究, 20, 298-302, 1970.
- 23) 田中錠太郎, 海沼 勝, 小山 実, 飯島義章, 山田満, 秋山 陽, 大竹 昇: *ibid.*, 19, 705-722, 1969.
- 24) WILSON, G. S.: The Bacteriological Grading of Milk, H. M. Stationary Office (London), 1935.
- 25) YANG, H. Y. and G. A. JONES: J. Milk Food Technol., 32, 102-109, 1969.

Contamination of Bottled Milk with Coliform Bacteria

Katsuhiko MIKAWA, Nobuyuki TANIGUCHI, Toshihiko SHIMAZAKI
and Tsutomu YASUI

(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Summary

Bottled milk from dairy plant of experiment farm, Hokkaido University, was inspected by a BGLB method of IDF Standard 40 in August and September, 1971, and 75 per cent of the sample was positive on the test. In order to survey the source of this contamination, coliform determination of washed bottles, bottle conveyer line, paper caps, supplied water, various parts of bottle filler, gasketts of sanitary pipe between bottle filler and surge tank, and surface of various equipments were performed. The results suggested airborne contamination. In order to ascertain the source of contamination, flow-backed milk from bottle filler nozzle was collected and the coliform number (MPN/100ml), standard plate count (SPC), and psychrotrophic bacteria were compared with that of surge tank milk and of bottled milk. Furthermore, fall-out bacteria at some spots inside and outside of the plant and airborne coliforms were determined. These results confirmed that the bottled milk contamination resulted from airborne coliforms which were introduced through the bottle filler nozzle.

After the setting of air filter and some constructions to prevent the inside of the plant from coliform contamination, surge tank milk, flow-backed milk, bottled milk, and raw milk were examined for coliforms, SPC, and psychrotrophic bacteria. Fall-out bacteria, airborne coliforms and SPC of filtered air from the duct were also determined. Although some extent of contamination were found in one or two month(s) after the setting of air filter, there were no coliforms with "completed test" in the samples after May, 1973, while BGLB positive samples in limited numbers were detected.

Psychrotrophic bacterial contamination was not recognized throughout the period of experiment under the conditions studied. The fall-out bacteria number on surge tank near bottle filler examined after the setting of air filter was 0 to 8 on exposure of petri plates for 15 minutes. Standard plate count varied considerably from one experiment to another.

Identification, EC test, and heat resistance test were undertaken on 12 strains of coliform bacteria isolated from tubes which exhibited positive on BGLB at the primary inspection of bottled milk. It was found that two strains were survived at 63.5°C for 30 minutes.

Coliforms and SPC were examined, for comparison, on bottled milk from five dairy plants and paper container (Tetra Pak) milk from a dairy plant. Bottled milk from two dairy plants contained coliforms, and particularly considerable amount of coliforms and high SPC were found constantly in bottled milk which was produced in a certain dairy plant.