

園児が飲用したペットボトルの細菌学的調査

成井浩二¹, 竹ノ内清彦², 野口雅久¹, 笹津備規¹

要旨

園児が飲用したペットボトル中の飲料水の飲用直後から3日間における細菌汚染を調査した。飲用直後において、僅かながら細菌を全てのペットボトルから検出した。30℃、3日保存で大部分のペットボトルにおいて細菌の増殖が認められた。4℃保存においては細菌の増殖は認められなかった。ストローで飲用した場合にも細菌が検出された。細菌の増殖は栄養価の高い茶類が最も速く、次いでミネラルウォーター、酸性飲料であるスポーツドリンクや炭酸飲料は増殖が遅かった。ペットボトルにおける細菌増殖には温度、栄養価、pHが関与していることが示めされた。混入・増殖した主な細菌は土壌から分離される環境細菌や皮膚等の常在菌であった。本研究から、細菌感染予防のためにも口付け飲みしたペットボトル飲料の保存は避けるべきであると考えられた。

緒言

ペットボトルは衝撃に強く、軽量、開閉の自由さなどから様々な用途で用いられている。中でも、清涼飲料の容器としての使用は1997年から2002年の6年間に約2倍に増加し¹⁾、清涼飲料の容器の大部分が缶や瓶からペットボトルに移行している。通常、ペットボトル入りの清涼飲料を飲む場合、口を直接ペットボトルに付けて飲む、いわゆる「口付け飲み」、「ラップ飲み」をすることが多い。そして、口付け飲みをした飲み残しペットボトルを貯蔵したり携帯することがある。そのため、口腔内や皮膚の常在菌が保存・貯蔵中に増殖することで、食あたり等の細菌による腸管感染症疾患を起こすことが危惧される。特に小児や高齢者は体の免疫力が低く、腸内細菌叢も一般の成人よりも弱いため、病原性の低い細菌による腸管感染症を引き起こしやすい。そこで、小児が飲み残したペットボトル入りの清涼飲料中の細菌汚染を調べるために、飲用後のペットボトル入りの清涼飲料を30℃保存（温保存）と4℃保存（冷保存）し、菌数の経日的動向や分離菌種を同定した。

材料・方法

1. 使用飲料

500 mL ペットボトル入りの清涼飲料、ミネラルウォーター（水）、緑茶（緑）、烏龍茶（烏）、紅茶（紅）、麦茶（麦）、スポーツドリンク A（スA）、スポーツドリンク P（スP）、炭酸飲料（炭）を各5本、計40本用いた。昼食時、父兄同伴で約30名の園児によって試飲したペットボトル飲料の飲み残しを検体とした。

2. 生育コロニー数の測定

飲用したペットボトル（検体）を4℃（冷保存）と30℃（温保存）で保存し、保存0日目から3日目の検体1 mL をブレインハートインフュージョン寒天培地（オキソイド）と混積培養し、37℃で24時間後、生育コロニー数を測定した。

3. 分離菌株の菌種同定

生育コロニー数の測定で分離したコロニーを純培養し、生化学的試験により菌種を同定した。

東京薬科大学薬学部病原微生物学教室¹、東京放送²

結果・考察

1. 飲用直後（保存0日目）の細菌数

飲用直後（保存0日目）のペットボトル飲料1mLあたりの検出菌量を図1に示した。

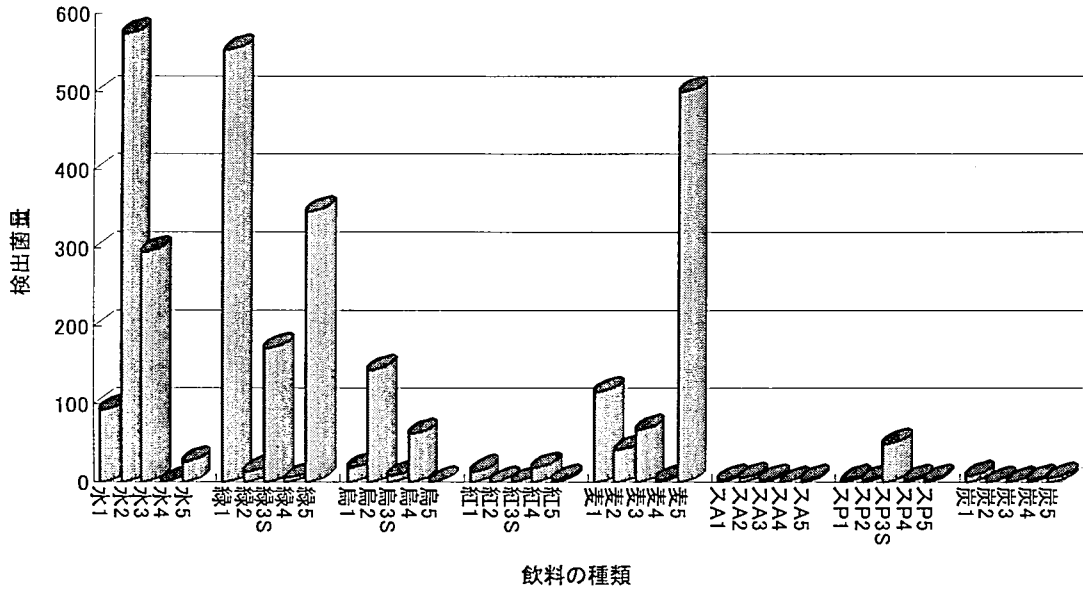


図1. 飲用直後のペットボトル飲料からの検出菌量

ストローで飲用した場合（緑3S, 烏3S, 紅3S, スP3S: 略号は材料と方法参照）も含め、僅かながらも全てのペットボトルから細菌が検出された。ペットボトル飲料は間接的に口を付けた場合でも、口を付けた時点から細菌汚染が始まっていることが明らかになった。

2. 残存細菌数の測定

保存0日目から3日目までの温保存時の生育コロニー数を図2に示した。

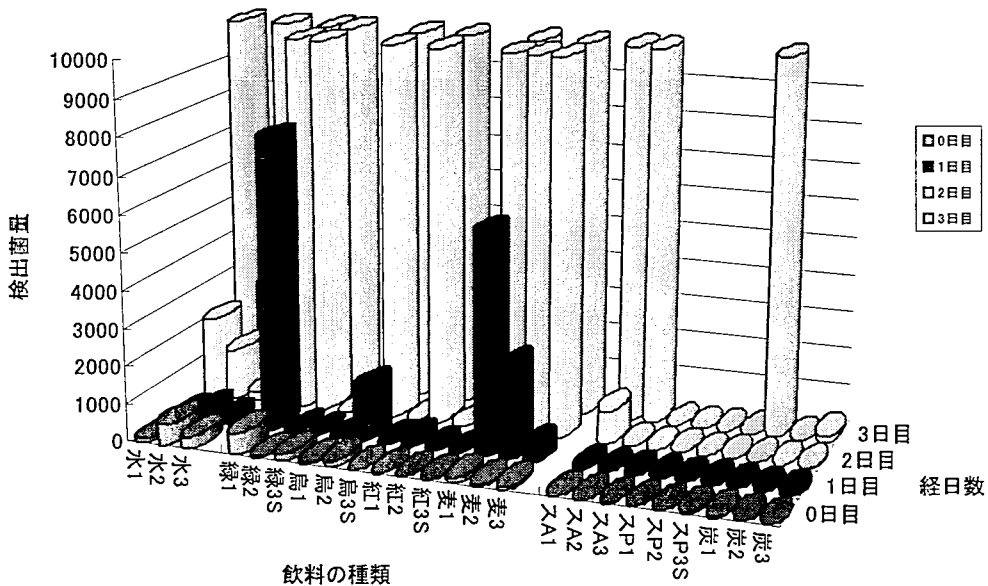


図2. 30°Cにおける経日ごとのペットボトル飲料からの検出菌量

園児が飲用したペットボトルの細菌学的調査

全ての種類の飲料で保存日数の経過に伴い検出菌数が増加した。茶類が最も細菌の増殖が早く、次いでミネラルウォーター、スポーツドリンクや炭酸飲料は増殖が遅かった。

〈ミネラルウォーター〉

栄養分や細菌の生育に必要な無機塩類に乏しいが、飲用により口腔内の食物カスなどが流入し細菌が増殖することが明らかになった。栄養分が乏しいため、他の飲料と比較して細菌の増殖が緩やかだった。

〈茶類〉

カリウムやマグネシウムなどの無機塩類が豊富に含まれているため、細菌の増殖速度が速く、保存2日目に1mLあたり10,000以上の細菌が検出された。

〈スポーツドリンク、炭酸飲料〉

pHが一般細菌の至適pH=6~8付近よりも低い4付近であるため、増殖速度が遅かったと考えられた。スポーツドリンクAとPにおいて検出菌数の差が見られた要因はスポーツドリンクAの方がアミノ酸を豊富に含有することが挙げられた。

保存0日目から3日目までの冷保存時の生育コロニー数を図3に示した。

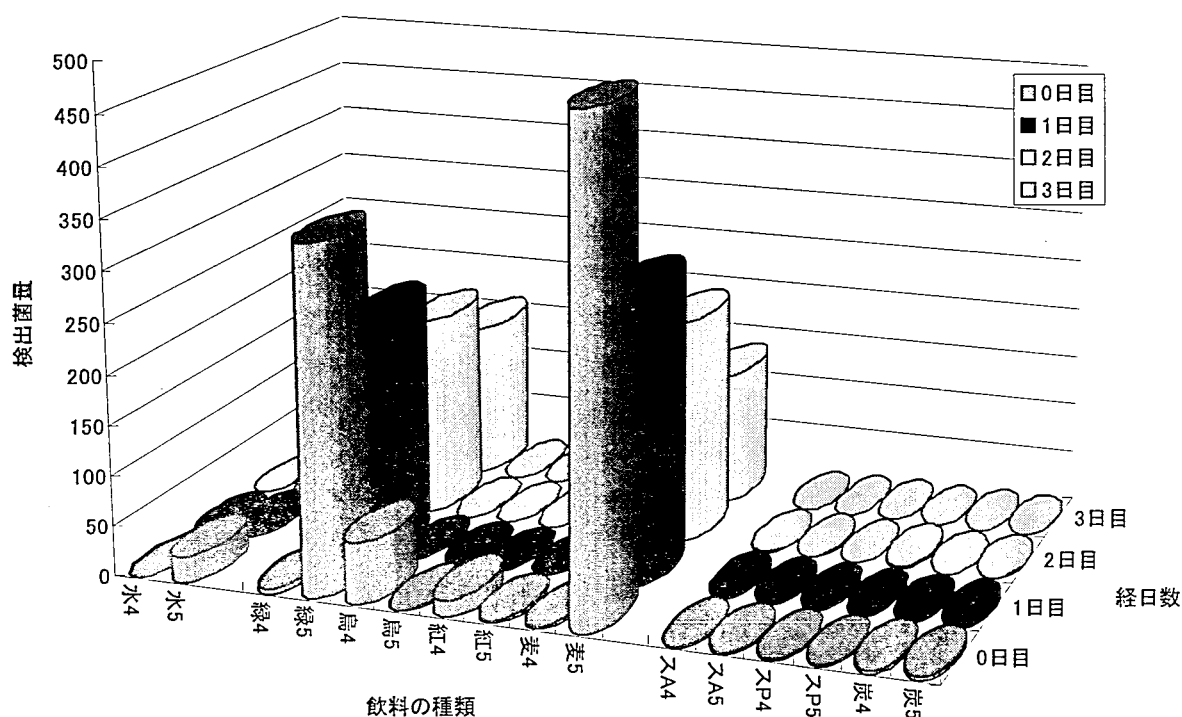


図3. 4°Cにおける経日ごとのペットボトル飲料からの検出菌量

全ての種類の飲料で保存日数が経つにつれ検出菌数が減少した。一般細菌の至適温度は20~40°Cである。温保存群は保存温度が30°Cであり、増殖に適した温度であった。一方、冷保存群は保存温度が4°Cであるため、増殖抑制がみられ、結果的には減少傾向が観察されたと考えられた。

これらの結果から、ペットボトルにおける細菌増殖には温度、栄養価、pHが深く関与していることが明らかになった。

3. 分離菌株の菌種同定

今回、細菌の検出を混積培養で行ったために寒天培地表面と内部にも生育コロニーが観察された。寒天内部に生育したコロニーを分離培養したところ、大部分が好気性下では生育できなかった。そのため、これらは好気性下非増殖性細菌とした。また、寒天培地表面から分離した株と内部から分離し、好気性下で生育した株の菌種の同定結果を表に示した。

表. 分離菌株の菌種と検出されたペットボトルの種類

菌種	検体数	形態*	検出されたボトルの種類 (ボトル数)
好気性下非増殖性細菌	19	-	水 (6)、緑 (3)、烏 (3)、紅 (1)、麦 (4)、スA(1)、スP(1)
酵母様真菌	9	-	緑 (1)、烏 (1)、紅 (1)、炭 (5)
<i>Bacillus</i> spp.	4	GPB	水 (2)、烏 (1)、スA(1)
<i>Micrococcus</i> spp.	2	GPC	紅 (1)、スP(1)
<i>Pantoea</i> spp.	2	GNB	麦 (1)、スA(1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	GPC	スP(1)
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	GPC	スP(1)
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1	GNB	水 (1)
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	GNB	水 (1)

*GPB, グラム陽性桿菌; GPC, グラム陽性球菌; GNB, グラム陰性桿菌.

分離、同定した40株中最も多かったのは、好気性下非増殖性細菌(19株, 47.5%)で、次いで酵母様真菌(9株, 22.5%)であった。嫌気性菌や酵母様真菌がヒトの口腔内、咽頭や消化管などの正常な細菌叢を形成している細菌である。そのため、飲用時に口腔内の飲料がペットボトル内に流入したか、ペットボトルの口に付着した細菌が飲料中へ混入したと考えられた。また、炭酸飲料から分離した細菌は全て酵母様真菌であった。これは真菌類が細菌類よりも生育に酸性条件下を好む性質によると推測された。*Micrococcus* 属、*Pantoea* 属、*Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus hominis* はヒト由来の細菌である。そのため、好気性下非増殖性細菌や酵母様真菌と同様に、飲用した園児の常在菌が混入したと考えられた。しかし、*Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus hominis* は食中毒の原因菌であるため、菌量の増加や保存は健康被害をもたらす危険があることが示された。一方、*Bacillus* 属や植物の根にこぶを形成させる *Agrobacterium radiobacter*、汚泥中から検出される *Brevundimonas vesicularis* は土壌菌であり、通常ヒトには害のない細菌である。これらの細菌は園児の皮膚などに付着して混入したと推測された。

まとめ

本研究では園児が飲用したペットボトル入り清涼飲料中の細菌汚染を調査した。ペットボトル飲料を口付けのみした場合、飲料に細菌が混入することや、飲料の種類や保存温度によって細菌の増殖に違いがあることが明らかになった。菌種の同定から、増殖した細菌の大部分はヒトや環境由来の細菌であった。しかし、これらの細菌でも摂取菌量により胃腸障害を引き起こすことがある。ペットボトル入り飲料はその利便性から細菌汚染は免れられない。夏季あるいは栄養価の高いペットボトル飲料においては汚染微生物が増殖する前に飲み干すなどの個々の衛生面への配慮が必要である。

引用文献

- 1) ペットボトルリサイクル推進協議会, ボトル用 PET 樹脂需要実績推移及び予測,
<http://www.petbottle-rec.gr.jp/top.html>