

食安基発第 1019003 号
平成 17 年 10 月 19 日

内閣府食品安全委員会事務局評価課長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長



食品健康影響評価に係る資料の提出依頼について（回答）

平成 17 年 9 月 22 日府食第 937 号により依頼のありました食品健康影響評価に係る補足資料の提出依頼について、回答いたします。

また、8 月 23 日付けで提出した資料中に一部誤った記載がありましたので、修正したものを再提出いたします。



提出資料一覧

- 「食品健康影響評価に係る資料の提出について」（平成 17 年 9 月 22 日府食第 937 号）に対する回答

→ 第10回会合 参考資料2

- 資料 2 冷凍パン生地に関するリスクプロファイル（修正の上、再提出）

→ 第10回会合 参考資料3

- 資料 3 平成 17 年度 冷凍食品の規格に関する調査 ～総括報告ならびにリスクプロファイル（修正の上、再提出）

→ 第10回会合 参考資料5

- 資料 5 平成 17 年度 食品・添加物等規格基準に関する試験検査等について ～冷凍パン生地およびその原料に関する試験（修正の上、再提出）
- 食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」における E. coli 検査法
- 米国食品医薬品庁（FDA）”Bacteriological Analytical Manual”抜粋

「食品健康影響評価に係る資料の提出について」 (平成 17 年 9 月 22 日府食第 937 号) に対する回答

1. 諮問の対象

(1) 本諮問の対象とする冷凍パン生地様食品の定義について

冷凍パン生地様食品とは、小麦粉を主原料とする加熱後摂取・凍結直前未加熱冷凍食品であり、高温で加熱しなければ食することができない冷凍パン生地のような食品を指し、パン生地（食パン、ハードロール、菓子パン、ドーナツ、デニッシュ、パイ）の他、ピザ生地等を含む。また、これらの中には、ジャムや餡等をフィリングしたパン生地等も含まれる。

(2) 冷凍パン生地様食品に冷凍菓子生地、冷凍パン生地、冷凍サブレ生地等生きたイースト（酵母菌）を含まない製品が含まれる場合、これら冷凍食品に適用されている一般生菌数に係る成分規格（300 万/g 以下）は、諮問結果にかかわらず存続して適用されるものと理解して良いか。

貴見のとおり。

2. 成分規格に対する考え方について

(1) 冷凍パン生地様食品の成分に規格の見直しについて、どのように考えているのか。

食品健康影響評価の結果、*E. coli* 陰性の適用を除外することによりリスクが増大するというのであれば、リスク管理機関として適切な措置を検討する。

(2) 指標菌としての *E. coli* の基準の考え方について、今回の諮問の結果を踏まえ、他の食品についても基準の見直しを予定しているのか。

今回は、現時点で汚染実態や文献等の資料が揃っている冷凍パン生地様食品について食品健康影響評価を依頼したものであるが、今後、他の冷凍食品についても知見の集積に努め、基準を見直す必要があると判断された場合は適切に対応してまいりたい。

- (3) 現行の成分規格において、加熱後摂取冷凍食品のうち、「凍結直前加熱」については「大腸菌群陰性」の規格を適用し、「凍結直前未加熱」については *E. coli* 陰性の規格を適用する理由について。

凍結直前加熱・加熱後摂取冷凍食品は、製造又は加工工程の最終段階で加熱操作が行われたものであることから、凍結直前未加熱の冷凍食品と比較し、より高度の衛生状態が担保されているものとの考えの下に、大腸菌群という、糞便系大腸菌群 (*E. coli*) よりも広範囲の菌群について陰性とした基準を適用している。

- (4) *E. coli* が検出された食品は不衛生な取り扱いがなされた可能性があることから食品としては不適切ではないかとする指摘に対する厚生労働省としての見解について。

E. coli については、飲食物からこれらが検出されるということは、比較的新しい糞便汚染があったことを示すものとして汚染指標菌として設定されたものである。しかしながら、冷凍パン生地様食品については、原材料である小麦粉に *E. coli* が汚染する場合があること及びその加工工程等の特性より、*E. coli* 陰性を汚染指標の基準として採用することが妥当であるか疑義が生じたため、貴委員会に対して食品健康影響評価を依頼したところである。

3. 試験法について

食品衛生法における *E. coli* の検査法は、正確には糞便系大腸菌群を検出するための検査であるが、44.5℃の培養温度で乳糖を分解してガスを発生する菌群を検出していることから、植物フローラを検出している可能性は低いと考えられる。→ **第10回会合 参考資料2**

ちなみに、資料1「冷凍パン生地に関するリスクプロファイル」中に引用した Richter *et al.*(1993)の文献においては、FDA (米国食品医薬品庁) が定めた方法 (Bacteriological Analytical Manual) により小麦粉中の大腸菌(狭義の *E. coli*)を検索している。我が国の食品衛生法における *E. coli* の検査法と FDA が定めた検査法をそれぞれ添付する (*食品衛生法及び FDA の検査法を添付)。

4. 原料小麦粉の汚染実態

日本国内で大規模に小麦粉の汚染実態を調査した文献・データ等が検索できなかったため、海外の文献を参考資料として提出しているが、国内メーカーの予備調査においては数種類の小麦粉から E. coli が検出されており、国内においても小麦粉の E. coli 汚染の実態はあると思われる。

5. 米国の規制の背景等

米国においては、FDA（米国食品医薬品庁）により、冷凍パン生地様食品以外のいくつかの冷凍食品についてガイダンス文書が示されているが、これらの食品について微生物に関する明確な規定は定められていない。

第10回会合
参考資料6

資料 6、127 頁の「(3) 規格・基準まとめ」表中に記載された米国における生地、クッキーについての規格基準は、USDA（米国農務省）が、食品購入者の便宜を図るため、食品の品質保証を行う際の目安を定めたものであるが、その設定根拠までは不明である。

<<http://www.ams.usda.gov/fv/fvqual.htm>>

6. 資料の確認 → 第10回会合 参考資料5

資料 5「平成 17 年度 食品・添加物等規格基準に関する試験検査等について 冷凍パン生地及びその原料に関する試験」について

- ① 分析結果がすべて記号・番号で記載されており、冷凍パン生地と原料との区別が付かない。また、原料の種類についても明確な記載がない。

修正の上、資料 5 を再提出する。

→ 第10回会合 参考資料5

- ② 分析結果を見る限り、E. coli 陽性となっているのは F 工場の a 検体のみであり、特定の工場の特定の製品において微生物汚染が発生していたことを示唆するものとも考えられるが、この結果のみをもって、一般に冷凍パン生地から E. coli が検出されると判断した理由についてご教示いただきたい。

→ 第10回会合 参考資料2)

資料 1 「冷凍パン生地に関するリスクプロファイル」 4. 国内の冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態に記述したとおり、今回、国内 4 メー

カーの調査を実施する前に、他メーカー1社において、予備調査を実施している。この際、食品衛生法に規定するよりも10倍感度の高い（使用検体量を10倍にした）検査法を用いて検査したところ、製品14種類中4種類、粉類15種類中4種類から *E. coli* が検出されている。また、MPN 算出法*に基づいて行われた大腸菌の検査では、D 社（F 工場）の1製品以外に、C 社1製品からも大腸菌が検出されている。これらのことから、*E. coli* の検出は特定の工場の特定の製品における事例とは断じ難いと考ええる。

*MPN（最確数）算出法：10倍階段希釈した3段階の検体を3～5本の発酵管に接種し、それぞれの段階で陽性になった（例：ガスが発生した）試験管の数から、目的とする細菌の数を確率論的に求める方法。

資料2 正誤表

→ 第10回会合 参考資料2

- ・2ページ、26行目、

(誤) 粉類15種類中1種類 ⇒ (正) 粉類15種類中4種類

- ・2ページ、27行目、

(誤) 大腸菌群は全29種類中28種 ⇒ (正) 大腸菌群は全29種類中27種

冷凍パン生地に関するリスクプロファイル

1. 問題となる微生物・食品の組み合わせについて

- 対象微生物：
糞便汚染の指標菌としての *E. coli*
*食品衛生法に基づく試験法に規定されている“*E. coli*”で、EC発酵管で、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養し、ガス発生が認められ、大腸菌群と同様な試験により大腸菌群であることが確認された菌群である。すなわち糞便系大腸菌群のことである。なお、糞便系大腸菌群とされたもののうち、IMViC 試験を実施し、そのパターンが、「++--」である場合を食品衛生検査指針では大腸菌と呼んでいるため、この概念と区別するため、本報告書では *E. coli* と表記することにした。従って、分類学上の *Escherichia coli* や、海外で用いている“大腸菌”とは多少異なる菌群を示すこととなる。
- 対象とする食品または加工食品についての概略：
小麦粉を主原料とする加熱後摂取・凍結直前未加熱の冷凍食品であり、高温で加熱しなければ食することができない冷凍パン生地のような食品
- 過去に報告されている健康被害：
加熱後摂取・凍結直前未加熱の冷凍食品を原因とする健康被害は、これまでわが国において知られていない。

2. 問題となる微生物の特徴について

- 糞便汚染の指標菌としての *E. coli* には、明白な病原性はない。60℃における D 値が 0.26～2.64、64.3℃における D 値が 0.16 分と報告されている。
- 小麦粉あるいは非加熱で製造されたパン生地を汚染しうる病原体としては、サルモネラ、赤痢菌、セレウス菌、黄色ブドウ球菌、そして黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンなどが知られている。これら細菌は、セレウス菌芽胞と黄色ブドウ球菌エンテロトキシンを除き、63～65℃以上の加熱により非常に速やかに死滅することが知られている。セレウス菌芽胞は 100℃での D 値が 4 分以上であるが、121℃では極めて短時間で死滅する。黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの産生は、温度 10～48℃、pH 4.5～9.6、水分活性 0.87 以上で認められ、至適条件での毒素産生は 6～7 時間で起こることが報告されている。黄色ブドウ球菌エンテロトキシンは、120℃の加熱によっても、毒素力価が 10 分の 1 になるまでに 20～40 分を要する。(ICMSF, 1996)

3. 食品製造、加工、流通と摂取

- リスクマネジメントに関与し、影響を与え得る媒介食品の特性
 - 国内で業務用に販売されている冷凍パンは、生地基本的に、食パン、ハードロール、菓子パン、ドーナツ、デニッシュ、パイの 6 種類である。デニッシュとパイは、生地に油脂層を挟みながら折りたたむ。パイ以外には全てイーストが入る。あんやクリーム、カレーの具などをフィリングした後、に冷凍するものもある。
 - 冷凍パン生地の製造工程においては、予め温度管理された原材料を用い、概ね 20～24℃以下に設定された工場内で、基本的には 2 時間半程度、パンの種類により冷却過程を挟んでも 7 時間以内に成形が完了し、急速冷凍が行なわれる。

- 国内での製造状況
 - パンの生産数量は、食パン、菓子パン、その他のパン、学給パンを合計したパン用小麦粉使用量として、平成 16 年には 1,242,951 トンであった。
 - 同年における冷凍生地使用量は、76,879 トンであり、パンの生産数量の約 6%が冷凍生地を使用したものである。
(総合食料局食糧部消費流通課流通加工対策室、2005)
- 輸入実績ならびに違反状況
 - 平成 15 年の加熱後摂取・凍結前未加熱冷凍パン生地の輸入実績は、届出件数 4,064 件、届出重量 15,400 トンであり、うち 277 件の検査結果として、4 件が E. coli 陽性による違反であった。
- 既存のリスクマネジメントについての要約
 - <規格基準>
食品衛生法においては、加熱後摂取冷凍食品（冷凍直前未加熱）の規格基準として、糞便汚染の指標菌としての E. coli 陰性を求めている（昭和 48 年設定）。イーストを使用する冷凍パン生地などのような発酵食品については、一般生菌数の規格は適用されない。

4. 国内の冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態

- 国内メーカー 4 社から提供を受けた冷凍パン生地検体 18 種中、冷凍食品規格に基づいて行なわれた検査では 6 種から大腸菌群が、1 種から E.coli が検出された。MPN 算出法に基づいて行なわれた検査では 18 種全てから大腸菌群が、2 種から大腸菌が検出された。生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 7.1 \times 10^8/\text{g}$ であった。
- 原材料の小麦粉、イースト、パンの製造工程で用いられる手粉、副原料として用いられるクルミ、レーズン、ベーキングパウダー、ライ麦ペーストからは、検体の種類により大腸菌群は検出されたが、大腸菌は検出されなかった。
- 他の 1 社について、食品衛生法に規定される検査法よりも 10 倍感度の高い検査法を用いて検査をしたところ、製品 14 種類中 4 種類、粉類 15 種類中 4 種類から E. coli が検出された。大腸菌群は全 29 種類中 27 種の検体において陽性であった。
- 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンについては、原材料、製品ともに、検査した検体についてはいずれも不検出であった。
- 製粉協会製粉研究所より提供いただいた、製粉メーカー 4 社による小麦粉の自主検査の結果では、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラは、過去に検出されていない

5. 冷凍パン生地および原料の麦類の汚染実態に関する文献情報

- 国内外の文献を調査した結果、生地では大腸菌群が 6 文献において、8 種類の検体中 6 種類からの検出が報告されていた。大腸菌は 3 文献において、3 種類の検体中 2 種類からの検出が報告されている。
- 小麦、ライ麦では、4 文献において、9 種類の検体中 6 種類から大腸菌群の検出が報告されており、2 文献において、9 種類の検体中 1 種類から大腸菌が検出されている。
- 小麦粉では、7 文献において、19 種類の検体中 11 種類から大腸菌群の検出が報告されており、5 文献において、13 種類の検体中 4 種類から大腸菌が検出されている。
- 生地と同様に製造過程で加熱工程を経ない生麺に関しては、大腸菌群が 9 文献において、20 種類の検体中 15 種類から検出が報告され、大腸菌は 4 文献において、6 種類の検体中 4 種類で検出が報告されている。

- この他、米国において総計 3,350 検体の小麦粉を調査した結果、季節や小麦の品種を問わず、平均 12.8%(3.4-89.3%)の汚染率で大腸菌汚染が認められたとの報告がある (Richter *et al.*, 1993)。

6. 海外の冷凍食品の規格基準

- 冷凍食品として規格・基準を有しているのは、アメリカ、中国、韓国である。
 - ・ アメリカでは生地およびクッキー（未焼成、冷蔵あるいは冷凍）として、大腸菌群が<100 MPN、大腸菌が<10 MPN、サルモネラが検出されないこと、総菌数が<50,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が<10 MPN という規格である。
 - ・ 中国では急速冷凍インスタント食品(急速冷凍前未加熱処理)として、大腸菌群が<240 cfu/g、大腸菌が検出されないこと、総菌数が<300,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が 0.01 g 中に検出されないこと、サルモネラが 25 g 中に検出されないこととなっている。
 - ・ 韓国では日本と同様、冷凍食品(冷凍前非加熱製品)として、大腸菌が検出されないこと、総菌数が<3,000,000 cfu/g である。
- 作りたての生地(fresh dough)の規格・基準に関しては、カナダが大腸菌について、m=10、M=100、n=5、c=2 という規格を有しており、キューバが糞便系大腸菌群について n=1 で<10 cfu/g という規格を有している。
- 小麦粉の規格・基準に関しては、スペインが大腸菌<100 cfu/g という規格を有している。
- 焼成後のパン等の規格・基準に関しては、スイス、アイルランド、オランダ、スペインに大腸菌を含む微生物規格が存在するが、スイスでは、焼成前の冷凍パン生地には大腸菌の規格は適用されないとの注意書きがある。

7. 食品安全委員会への諮問の必要性と諮問内容

諮問の必要性

食品に新たな規格基準の適用を図る際には、食品安全基本法により、健康への影響が明白である場合や緊急対応が必要とされる場合などを除き、食品安全委員会における食品健康影響評価が必要とされている。今回、輸入冷凍食品に関し、食品の性質上、現在の成分規格を適用することが困難であると指摘されており、厚生労働省に冷凍食品の規格基準の見直しが要請された。国際貿易上の問題提起であり、厚生労働省は規格基準の見直しについて検討するが、規格基準の見直しによる健康影響については食品安全委員会に諮る必要がある。

諮問内容

小麦粉を主たる原材料とし、摂食前に加熱工程が必要な冷凍パン生地様食品（パン生地の他、ピザ生地等を含む。）については、E. coli 陰性の成分規格を適用しないことによってリスクが増加するか否か。

8. 参考文献

総合食料局食糧部消費流通課流通加工対策室（2005）：生産動態調査
 ICMSF, 1996: Microorganisms in Foods 5, Blackie Academic & Professional
 Richter *et al.* (1993): Microbiological quality of flours. Cereal Foods World 38(5), 367-369.

資料3 正誤表

→ 第10回会合 参考資料3

- ・ 3ページ、18行目、
(誤) 粉類15種類中1種類 ⇒ (正) 粉類15種類中4種類
- ・ 3ページ、19行目、
(誤) 大腸菌群は全29種類中28種 ⇒ (正) 大腸菌群は全29種類中27種
- ・ 10ページ表2の差し替え
- ・ 26ページ、26行目、
(誤) 粉類15種類中1種類 ⇒ (正) 粉類15種類中4種類
- ・ 26ページ、27行目、
(誤) 大腸菌群は全29種類中28種 ⇒ (正) 大腸菌群は全29種類中27種

平成17年度

冷凍食品の規格に関する調査

— 総括報告ならびにリスクプロファイル —

国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部

山本 茂貴

五十君 静信

春日 文子

鈴木 穂高

I 背景

我が国において、食品衛生法上、冷凍食品の規格基準が定まったのが 1973 年であり、表 1 に示すような分類に従い、微生物の規格基準が定められている。その中で、不衛生な取扱いや消化器系感染症起因菌による汚染を示唆する指標菌として大腸菌群や *E. coli* (注) を採用し、これら微生物が最終製品から検出されないことを求めている。以来、食品の輸入時、販売時などの微生物検査などにより、冷凍食品に対する安全性確保対策が行われているところである。しかしながら、近年の冷凍食品の多様化及び輸入冷凍食品の増加に伴い、現在の成分規格の中で用いられている分類（凍結直前加熱・凍結直前未加熱など）及び微生物規格のうち、一部を見直す必要があるのではないかと指摘がある。

具体的には、小麦粉を主たる原材料とする冷凍パン生地製品は、冷凍前に加熱工程がないため、原材料に由来する微生物汚染を除去する手段を講じることができないが、冷凍された製品には、加熱後摂食・凍結直前未加熱冷凍食品に該当し、その成分規格として *E. coli* 陰性が求められており、食品の性質上、現在の成分規格を適用することが困難であると指摘されている。この点について、米国において総計 3,350 検体の小麦粉を調査した結果、季節や小麦の品種を問わず、平均 12.8%(3.4–89.3%)の汚染率で大腸菌汚染が認められた報告がある (Richter *et al.*, 1993) ことから、小麦粉に由来する *E. coli* が冷凍パン生地に持ち込まれる可能性が十分あり、*E. coli* 陰性を担保することは困難であることが示唆されている。

注) 本報告書では、“大腸菌群”、“*E. coli*”、そして“大腸菌”の表記を用いるが、それぞれの意味するところは以下である。

大腸菌群：食品衛生法に基づく大腸菌群で、グラム陰性の無芽胞桿菌で、48 時間以内に乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性菌と定義される菌群で、今回の試験では、EMB 寒天平板培地上で、金属光沢または紫赤色の定型的集落を形成し、乳糖ブイヨン培地で酸の産生とガスの発生を確認した一群の菌である。

E. coli：食品衛生法に基づく試験法に規定されている“*E. coli*”で、EC 発酵管で、 $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養し、ガス発生が認められ、大腸菌群と同様な試験により大腸菌群であることが確認された菌群である。すなわち糞便系大腸菌群のことである。なお、糞便系大腸菌群とされたもののうち、IMViC 試験を実施し、そのパターンが、「++--」である場合を食品衛生検査指針では大腸菌と呼んでいるため、この概念と区別するため、本報告書では *E. coli* と表記することにした。従って、分類学上の *Escherichia coli* や、海外で用いている“大腸菌”とは多少異なる菌群を示すこととなる。

大腸菌：海外の規格基準等に用いられている物を含め、一般的な *E. coli* を表すこととする。

II 目的

上記の背景を踏まえて、冷凍パン生地を中心とした冷凍食品に関し、現行の成分規格の見直しに伴う食品健康影響評価を食品安全委員会に諮問することを前提に、その評価依頼に必要な文献、海外情報及び科学的データ等を収集し、知見を取りまとめることを本調査の目的とする。

具体的には、下記の事項について調査を行い、リスクプロファイル案を作成する。

- ・ 原材料を含めた国内冷凍パン生地の汚染実態調査
- ・ 原材料を含めた国内外の冷凍パン生地の汚染実態に関する文献情報及び海外政府機関情報の収集
- ・ 諸外国の冷凍食品に関する規格基準の調査
- ・ 冷凍パン生地の焼成条件の調査
- ・ E. coli その他細菌の加熱による死滅動態の調査

III 調査の概要

本調査は、平成 17 年 4 月から 7 月に、以下の構成により実施した。

1. 冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態に関する予備調査（国立医薬品食品衛生研究所）
2. 国内の冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態調査（国立医薬品食品衛生研究所、財団法人日本食品分析センター、財団法人日本冷凍食品検査協会）
3. 冷凍パン生地を中心とする冷凍食品および原料の麦類の汚染実態に関する文献情報ならびに海外政府機関情報の検索、および諸外国の冷凍食品の規格基準の調査（国立医薬品食品衛生研究所、株式会社三菱総合研究所）
4. その他の事項に関する検討、調査とりまとめならびにリスクプロファイル作成（国立医薬品食品衛生研究所）

なお、8 月以降も、国立医薬品食品衛生研究所においては追加情報の収集を継続するものとする。

IV 調査の結果

1. 冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態に関する予備調査

冷凍パン生地メーカーE社の協力を得て、

① 冷凍パン生地一製品に関する、同一ロットの工程追跡検査

② 原料・製品検査

を実施した。

検査項目は一般生菌数、大腸菌群(MPN)、E. coli (MPN)とし、大腸菌群と E. coli の測定に当たっては、「食品、添加物等の成分規格(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)の第 1 食品 D 各条〇冷凍食品」の試験法の 10 倍量の検体を検査対象とした。すなわち、菌の検出限界を公定検査法の 10 分の 1 まで下げて、検査感度を上げた条件で検査を行なった。

①の工程追跡調査では、原材料 9 種類(うち小麦粉類 3 種類)、途中生地 4 種類、手粉、最終製品を検体とした。②の原料・製品検査では、小麦粉・ミックス粉計 11 種類、その他材料 3 種類、および製品 13 種類を検体とした。それぞれ、1 種類の検体について 10 回の繰り返し検査を行なった。

その結果、冷凍パン生地製造工程内で、一般生菌数、大腸菌群、E. coli の菌数ならびに汚染率が特に増加することは観察されなかった。

①および②の調査により得られた、製品 14 種類、手粉を含む材料の粉類 15 種類の大腸菌群ならびに E. coli の検査結果を表 2 に示す。製品 14 種類中 4 種類、粉類 15 種類中 4 種類から E. coli が検出された。大腸菌群は全 29 種類中 27 種の検体において陽性であった。

予備調査の結果、食品衛生法に規定される検査法よりも感度の高い検査の結果とはいえ、国内の冷凍パン生地製品およびその原材料に、実際に E. coli 汚染が観察されたことから、より広範なメーカーに対して、汚染実態調査を実施する必要性が認められた。

2. 国内の冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態調査

日本パン工業会の紹介により冷凍パン生地メーカーA～D 4 社に協力いただいた。

各メーカーには、販売量が多く、長期間製造されている商品の中から、惣菜パン等パン生地以外の材料の占める割合の多いものを除外し、4～5 種類の冷凍パン生地製品を選択していただいた。それら製品、製品に使用される小麦粉、イースト、くるみやレーズンなどの副材料、そして手粉について、細菌数(生菌数)、大腸菌群、E. coli を「食品、添加物等の成分規格(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)の第 1 食品 D 各条〇冷凍食品」の試験法により測定した。また、大腸菌群数および大腸菌数を MPN 法により測定した。さらに、各検体について、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンをミニバイタス法により測定した。

微生物検査結果の詳細は、財団法人日本食品分析センターおよび財団法人日本冷凍食品検査協会の報告書を参照されたい。結果を表 3 にまとめる。

- 冷凍パン生地検体 18 種中、冷凍食品規格に基づいて行なわれた検査では 6 種から大腸菌群が、1 種から E.coli が検出された。MPN 算出法に基づいて行なわれた検査では 18 種全てから大腸菌群が、2 種から大腸菌が検出された。生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 7.1 \times 10^4/\text{g}$ であった。
- 原材料の小麦粉においては 23 種の検体中、冷凍食品規格の検査では 5 種から、MPN 算出法の検査では 23 種全てから大腸菌群が検出された。大腸菌は、冷凍食品規格法でも MPN 算出法でも検出されなかった。生菌数は $<100 \sim 3.0 \times 10^7/\text{g}$ であった。
- 同じく原材料のイーストにおいては、13 種の検体中、MPN 算出法に基づく検査により 2 種から大腸菌群が検出されたのみであった。生菌数は $7.3 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^{10}/\text{g}$ であった。
- パンの製造工程で用いられる手粉においては、5 種の検体中、冷凍食品規格法では 3 種から、MPN 算出法では 5 種全てから大腸菌群が検出された。大腸菌は、冷凍食品規格法でも MPN 算出法でも検出されなかった。生菌数は $1.4 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^4/\text{g}$ であった。
- 副原料として用いられるクルミにおいては、2 種の検体中、2 種ともに冷凍食品規格法、MPN 算出法で大腸菌群が検出された。大腸菌は検出されなかった。生菌数は $3.0 \times 10^2 \sim 7.8 \times 10^4/\text{g}$ であった。レーズン、ベーキングパウダー、ライ麦ペーストからは、大腸菌群も大腸菌も検出されなかった。
- 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンについては、原材料、製品ともに、検査した検体についてはいずれも不検出であった。

一方、製粉協会の製粉研究所のご協力により、製粉メーカー4 社から小麦粉に関する過去の自主検査の結果を提供いただいた。E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラは、過去に検出されていない（表4）。

3. 冷凍パン生地を中心とする冷凍食品および原料の麦類の汚染実態に関する文献情報ならびに海外政府機関情報の検索、および諸外国の冷凍食品の規格基準の調査

3-1. 文献調査

詳細は、株式会社三菱総合研究所の報告書の通りである。国内外の文献を調査した結果を表5～7に示す。

- 生地では大腸菌群が 6 文献において、8 種類の検体中 6 種類からの検出が報告されている。大腸菌は 3 文献において、3 種類の検体中 2 種類からの検出が報告されている。
- 小麦、ライ麦では、4 文献において、9 種類の検体中 6 種類から大腸菌群の検出が報告されており、2 文献において、9 種類の検体中 1 種類から大腸菌が検出されている。
- 小麦粉では、7 文献において、19 種類の検体中 11 種類から大腸菌群の検出が報

告されており、5 文献において、13 種類の検体中 4 種類から大腸菌が検出されている。

- 生地と同様に製造過程で加熱工程を経ていない生麺に関しては、大腸菌群が 9 文献において、20 種類の検体中 15 種類から検出が報告され、大腸菌は 4 文献において、6 種類の検体中 4 種類で検出が報告されている。
- 一方、焼成後のパンに関しては大腸菌群が 3 文献において、4 種類の検体中 3 種類で検出されておらず、1 種類に関しても 95 percentile 値が $10^{1.8}$ cfu/g という低い値と報告されている。大腸菌は 1 文献における 1 種類の検体の結果であるが検出されていない。

3-2. 海外政府機関情報ならびに諸外国の規格基準

アメリカ、カナダ、イギリス、ドイツ、スイス、中国、韓国、マレーシア、オーストラリア、フランス、オーストリア、ベルギー、キューバ、フィンランド、ギリシャ、アイスランド、イタリア、アイルランド、イスラエル、オランダ、ノルウェー、ポルトガル、南アフリカ、スウェーデン、スペインの計 25 カ国と EU の食品規格・基準において、冷凍パン生地の規格・基準に該当するものがないか調査を行った。一部、WHO がまとめた情報を含む。

詳細は、株式会社三菱総合研究所の報告書の通りである。表 8 に冷凍パン生地あるいは関係食品に関する規格基準をまとめる。

- 冷凍食品として規格・基準を有していたのは、アメリカ、中国、韓国のみであり、
 - ・ アメリカでは生地およびクッキー（未焼成、冷蔵あるいは冷凍）として、大腸菌群が <100 MPN、大腸菌が <10 MPN、サルモネラが検出されないこと、総菌数が <50,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が <10 MPN という規格になっている。
 - ・ 中国では急速冷凍インスタント食品(急速冷凍前未加熱処理)として、大腸菌群が <240 cfu/g、大腸菌が検出されないこと、総菌数が <300,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が 0.01 g 中に検出されないこと、サルモネラが 25 g 中に検出されないこととなっている。
 - ・ 韓国では日本と同様、冷凍食品(冷凍前非加熱製品)として、大腸菌が検出されないこと、総菌数が <3,000,000 cfu/g となっている。
- 作りたての生地(fresh dough)の規格・基準に関しては、カナダが大腸菌について、 $m=10$ 、 $M=100$ 、 $n=5$ 、 $c=2$ という規格を有しており、キューバが糞便系大腸菌群が $n=1$ で <10 cfu/g という規格を有している。
- 小麦粉の規格・基準に関しては、スペインが大腸菌 <100 cfu/g という規格を有している。
- 焼成後のパン等の規格・基準に関しては、スイス、アイルランド、オランダ、スペインに規格が存在し、
 - ・ スイスは大腸菌が <10 cfu/g、総菌数が <1,000,000 cfu/g、ブドウ球菌が <100

cfu/g という規格を有しているが、焼成前の冷凍パン生地には大腸菌の規格は適用されないとの注意書きがある。

- ・ アイルランドでは大腸菌が<20 cfu/g が望ましいが、20<100 cfu/g が境界とされている。また、大腸菌 O157 及びその他の VTEC(ベロ毒素産生大腸菌)は 25g 中に検出されないこととされ、総菌数は<10,000CFU/g が望ましいとされている。バチルスは<100CFU/g が望ましく 1,000~<10,000CFU/g が境界、カンピロバクターは 25g 中に検出されないこと、ウェルシュ菌は<10CFU/g が望ましく 10~<100CFU/g が境界、リステリア・モノサイトゲネスは 25g 中に検出されないことが望ましく 25g 中<200CFU/g が境界、リステリア・モノサイトゲネス以外のリステリアは 25g 中に検出されないことが望ましく 25g 中<200CFU/g が境界、サルモネラは 25g 中に検出されないこと、黄色ブドウ球菌は<20CFU/g が望ましく 20~<100CFU/g が境界、腸炎ビブリオは 25g 中に検出されないことが望ましく 25g 中<200CFU/g が境界という規格となっている。
- ・ オランダは総菌数が<1,000,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が<500 cfu/g、病原性微生物と微生物毒素は検出されないこと、という規格を有している。スペインは大腸菌が検出されないこと、亜硫酸塩還元性クロストリジウム属が<1,000 cfu/g、カビが<500 cfu/g、サルモネラ、赤痢菌は 30g 中に検出されないこと、黄色ブドウ球菌が 0.1g 中に検出されないこと、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが検出されないこと、酵母が<500 cfu/g という規格を有している。
- ・ イギリス政府の担当者からは、「イギリスには摂食前に加熱処理を行なう冷凍食品についての微生物規格基準は存在しない。サルモネラなどの病原体が未加熱の製品に低いレベルで存在することがあっても、焼く、調理する等の工程の中で破壊されるはずである。」というコメント返ってきた。

4. その他の調査事項

4-1. 大腸菌群および大腸菌の加熱死滅動態

細菌の温度抵抗性は、一定温度における加熱死滅動態として、菌数が 10 分の 1 になるまでの時間 (D 値) として示されることが多い。E. coli の様々な菌株について、液体培地あるいは食品中での D 値を集計した資料 (ICMSF, 1996) によると、60℃ における D 値が 0.26~2.64 分である。脂肪は熱に対する保護作用を有するが、脂肪含量の多い牛ひき肉中の E. coli O157:H7 に関し、64.3℃における D 値が 0.16 分と報告されている。

4-2. 他の細菌の熱抵抗性ならびに細菌毒素の産生条件とその熱抵抗性

冷凍食品あるいはパン生地に関連した食品について、海外での規格の対象となっているのは、大腸菌のほかに、サルモネラ、赤痢、黄色ブドウ球菌、そして黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンである。穀類および穀類製品に関して知られる病原性細菌としては、他にセレウス菌がある (三菱総合研究所報告書、ICMSF, 1998)。

これらの細菌および細菌毒素について、ICMSF (1996)から情報の得られた加熱温度と対応する D 値を表 9 にまとめる。セレウス菌芽胞と黄色ブドウ球菌エンテロトキシンを除き、63～65℃以上の加熱により非常に速やかに死滅することが示される。セレウス菌芽胞は 100℃での D 値が 4 分以上であるが、121℃では極めて短時間で死滅する。黄色ブドウ球菌エンテロトキシンは、120℃の加熱によっても、毒素力価が 10 分の 1 になるまでに 20～40 分を要する。

なお、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの産生は、温度 10～48℃、pH 4.5～9.6、水分活性 0.87 以上で認められる。至適条件での毒素産生は 6～7 時間で起こることが報告されている (ICMSF, 1996)。冷凍パン生地 of 製造工程においては、概ね 20～24℃以下に設定された工場内で、基本的には 2 時間半程度、パンの種類により冷却過程を挟んでも 7 時間以内に成形が完了し、急速冷凍が行なわれる。

4-3. 冷凍パン生地焼成時の内部温度と時間

国内パンメーカーにおけるパンの焼成条件ならびに焼成時のパンの最高中心温度を表 10 にまとめる。中心温度は 85～90℃以上に達する。中心温度をモニターしたデータでは、中心部における 70℃以上の保持時間は 3 分以上であった (図 1)。

V まとめと考察

本調査において、原材料を含めた国内冷凍パン生地の汚染実態調査、原材料を含めた国内外の冷凍パン生地の汚染実態に関する文献情報及び海外政府機関情報の収集、諸外国の冷凍食品に関する規格基準の調査、冷凍パン生地の焼成条件の調査、E. coli その他細菌の加熱による死滅動態の調査を実施した。

その結果、冷凍パン生地の主たる原材料である小麦には、世界各国での実態調査において大腸菌群だけでなく大腸菌による汚染がある程度の頻度で認められることが報告されており、加熱工程のないままに製造される冷凍パン生地には、原材料に由来する大腸菌汚染が避けがたいことが示された。実際、国内の冷凍パン生地製品の検査により、冷凍食品の検査法によっても E. coli が検出された。

一方、海外において、冷凍パン生地が該当する冷凍食品に対して大腸菌非検出を求めているのは韓国だけである。

これらのことから、凍結直前未加熱・加熱後摂取冷凍食品に対する現行の成分規格としての E. coli 陰性を冷凍パン生地に適用することは、実態に合わないものと考ええる。

冷凍パン生地は、喫食前には高温で加熱される。中心温度の推移は、E. coli その他冷凍パン生地を汚染することが文献からも危惧される細菌を死滅させるのに十分なものである。冷凍食品あるいはパン生地に関連した食品について、諸外国の微生物規格の対象となりあるいは汚染が報告されている細菌には、サルモネラ、黄色ブドウ球菌等があるが、パンの加熱条件を考慮すると、冷凍パン生地に対して他の病原菌の規

格を設定することについて、強く支持する理由は認められない。

小麦粉や冷凍パン生地汚染しうるセレウス菌芽胞や黄色ブドウ球菌エンテロトキシンは、通常のパン焼成条件では失活しない耐熱性を有する。したがって、健康被害の原因となる可能性は否定できない。しかし今回の調査で検査した限り、国内の冷凍パン生地製品は、原材料も含め、いずれもエンテロトキシン非検出であった。過去に加熱後摂取冷凍食品を原因とする健康被害も報告されていないことから、現時点で、耐熱性芽胞や細菌毒素についての成分規格を新たに設定する強い理由は認められないと考える。

VI リスクプロファイル (案)

冷凍パン生地の成分規格見直しに関し、食品安全委員会に諮問する際に提出するためのリスクプロファイル (案) を別添のようにまとめた。

謝辞

今回の調査にご協力をいただきました、冷凍パン生地メーカー関係各位、製粉協会製粉研究所、株式会社三菱総合研究所、財団法人日本食品分析センター、財団法人日本冷凍食品検査協会、国際食品微生物規格委員会(ICMSF)メンバー各位、そして国立医薬品食品衛生研究所安全情報部豊福肇主任研究官に、深謝いたします。

参考文献

- ・ Richter *et al.* (1993): Microbiological quality of flours. Cereal Foods World 38(5), 367-369.
- ・ ICMSF (1996): Microorganisms in Foods 5, Blackie Academic & Professional
- ・ ICMSF (1998): Microorganisms in Foods 6, An Aspen Publication

表 1. 冷凍食品の成分規格

冷凍食品の分類	成分規格
無加熱摂取冷凍食品	生菌数 100,000/g 以下、大腸菌群陰性
加熱後摂取冷凍食品	
凍結直前加熱	生菌数 100,000/g 以下、大腸菌群陰性
凍結直前未加熱	生菌数 3,000,000/g 以下、E. coli 陰性
生食用冷凍鮮魚介類	生菌数 100,000/g 以下、大腸菌群陰性、 腸炎ビブリオ最確数 100 以下

表 2. 冷凍パン生地汚染実態予備調査における、冷凍パン生地製品および小麦粉類の大腸菌群ならびに E. coli の検査結果

検体	種類	大腸菌群 (MPN)			E. coli (MPN)		
		陽性/10	最低	最高	陽性/10	最低	最高
製品	1	8	<300	2300	0	<30	<30
	2	9	<300	2300	1	36	36
	3	7	<300	4300	0	<30	<30
	4	10	920	24000	0	<30	<30
	5	6	<300	2300	0	<30	<30
	6	8	<300	2300	0	<30	<30
	7	10	920	9300	3	36	36
	8	9	<300	4300	0	<30	<30
	9	4	<300	360	0	<30	<30
	10	2	<300	360	0	<30	<30
	11	8	<300	2300	1	36	36
	12	6	<300	920	1	36	36
	13	4	<300	360	0	<30	<30
	14	0	<300	<300	0	<30	<30
粉類	1	6	<300	2300	0	<30	<30
	2	10	360	9300	0	<30	<30
	3	8	<300	4300	0	<30	<30
	4	10	300	9300	2	290	930
	5	0	<300	<300	0	<30	<30
	6	10	360	4300	0	<30	<30
	7	10	360	9300	0	<30	<30
	8	3	<300	2100	0	<30	<30
	9	4	<300	2300	0	<30	<30
	10	4	<300	2300	0	<30	<30
	11	8	<300	2300	0	<30	<30
	12	10	2300	2300	1	92	92
	13	10	2300	9300	0	<30	<30
	14	10	2300	9300	1	36	36
	15	4	<300	2300	2	36	36

表3. 国内の冷凍パン生地ならびに原材料の微生物検査結果のまとめ

総計

検体名	冷凍食品規格				MPN算出法						エンテロ トキシン
	細菌数(生菌数) [1/g]	大腸菌群	E. coli	大腸菌群数 [MPN/g]		大腸菌数 [MPN/g]		検出率			
				検出率	最小値～最大値	検出率	最小値～最大値				
冷凍生地	4.3×10 ³ ～7.1×10 ⁸	6/18	1/18	18/18	<3～1100	2/18	<3～240	0/18			
小麦粉	<100～3.0×10 ⁷	5/23	0/23	23/23	<3～>1100	0/23	<3～<3	0/22			
イースト	7.3×10 ⁷ ～1.6×10 ¹⁰	0/13	0/13	2/13	<3～3.6	0/13	<3～<3	0/13			
手粉	1.4×10 ³ ～5.2×10 ⁴	3/5	0/5	5/5	<3～>1100	0/5	<3～<3	0/4			
レーズン	<100～9.0×10 ²	0/2	0/2	0/2	<3～<3	0/2	<3～<3	0/2			
クルミ	3.0×10 ² ～7.8×10 ⁴	2/2	0/2	2/2	3.6～>1100	0/2	<3～<3	0/2			
ベーキングパウダー	<100～<100	0/2	0/2	0/2	<3～<3	0/2	<3～<3	0/2			
ライ麦ペースト	<100～<100	0/1	0/1	0/1	<3～<3	0/1	<3～<3	0/1			

検体種類別集計

検体記号 会社名/検体名	冷凍食品規格				MPN算出法						エンテロトキシン
	細菌数(生菌数) [1/g]	大腸菌群	E. coli	大腸菌群数 [MPN/g]		大腸菌数 [MPN/g]					
	最小値～最大値			検出率	最小値～最大値	検出率	最小値～最大値	検出率			
A社: 冷凍生地a	1.6×10 ⁵ ～3.7×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	15～43	0/10	<3～	<3	検出せず		
A社: 冷凍生地b	1.8×10 ⁶ ～4.8×10 ⁶	0/10	0/10	3/10	<3～3.6	0/10	<3～	<3	検出せず		
A社: 冷凍生地c	4.1×10 ⁸ ～7.1×10 ⁸	0/10	0/10	3/10	<3～3.6	0/10	<3～	<3	検出せず		
A社: 冷凍生地d	1.1×10 ⁸ ～2.0×10 ⁸	0/10	0/10	6/10	<3～23	0/10	<3～	<3	検出せず		
A社: 冷凍生地e	1.6×10 ⁸ ～4.9×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	9.2～75	0/10	<3～	<3	検出せず		
B社: 冷凍生地f	1.9×10 ⁸ ～4.8×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	7.4～93	0/10	<3～	<3	検出せず		
B社: 冷凍生地g	3.6×10 ⁸ ～5.6×10 ⁸	2/10	0/10	10/10	3.6～43	0/10	<3～	<3	検出せず		
B社: 冷凍生地h	2.9×10 ⁸ ～5.4×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	7.4～43	0/10	<3～	<3	検出せず		
B社: 冷凍生地i	4.9×10 ⁷ ～1.2×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	43～460	0/10	<3～	<3	検出せず		
C社: 冷凍生地j	4.2×10 ⁷ ～2.1×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	3.6～75	0/10	<3～	<3	検出せず		
C社: 冷凍生地k	1.2×10 ⁸ ～2.0×10 ⁸	0/10	0/10	10/10	23～1100	0/10	<3～	3.6	検出せず		
C社: 冷凍生地l	1.0×10 ⁸ ～2.2×10 ⁸	1/10	0/10	10/10	3.6～460	0/10	<3～	<3	検出せず		
C社: 冷凍生地m	1.6×10 ⁵ ～5.4×10 ⁵	0/10	0/10	5/10	<3～15	0/10	<3～	<3	検出せず		
C社: 冷凍生地n	5.3×10 ⁵ ～1.4×10 ⁷	0/10	0/10	3/10	<3～3.6	0/10	<3～	<3	検出せず		
D社: 冷凍生地o	4.3×10 ³ ～8.7×10 ³	5/10	0/10	10/10	9～240	0/10	<3～	<3	検出せず		
D社: 冷凍生地p	1.8×10 ⁷ ～1.2×10 ⁸	4/10	0/10	5/10	<3～43	0/10	<3～	<3	検出せず		
D社: 冷凍生地q	6.4×10 ⁷ ～1.8×10 ⁸	10/10	3/10	10/10	93～1100	10/10	9.2～240	240	検出せず		
D社: 冷凍生地r	3.9×10 ⁷ ～8.9×10 ⁷	10/10	0/10	10/10	23～460	0/10	<3～	<3	検出せず		

*E. coli 検出例に網掛け

検体記号 会社名/検体名	冷凍食品規格			MPN算出法						エンテロト キシン
	細菌数(生菌数)[/g]	大腸菌群	E. coli	大腸菌群数[MPN/g]		大腸菌数[MPN/g]		検出率		
				検出率	最小値～最大値	検出率	最小値～最大値			
A社:小麦粉a	1.0×10 ³ ～3.8×10 ³	0/10	0/10	9/10	<3～240	0/10	<3～<3	検出せず		
A社:小麦粉b	6.0×10 ² ～7.3×10 ³	0/10	0/10	8/10	<3～240	0/10	<3～<3	検出せず		
A社:小麦粉c	5.0×10 ² ～8.1×10 ³	0/10	0/10	8/10	<3～15	0/10	<3～<3	検出せず		
A社:小麦粉d	2.0×10 ² ～2.5×10 ³	0/10	0/10	10/10	3.6～150	0/10	<3～<3	検出せず		
A社:小麦粉e	8.0×10 ² ～2.9×10 ³	0/10	0/10	8/10	<3～43	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉f	2.0×10 ² ～1.4×10 ³	0/10	0/10	2/10	<3～3.6	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉g	3.0×10 ² ～2.0×10 ³	0/10	0/10	10/10	9.2～460	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉h	<100～1.4×10 ³	0/10	0/10	6/10	<3～43	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉i	2.1×10 ³ ～1.1×10 ⁴	0/10	0/10	10/10	7.4～>1100	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉j	1.0×10 ² ～1.2×10 ³	0/10	0/10	7/10	<3～93	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉k	1.3×10 ³ ～4.8×10 ³	0/10	0/10	8/10	<3～93	0/10	<3～<3	検出せず		
B社:小麦粉l	3.2×10 ³ ～1.1×10 ⁴	0/10	0/10	10/10	3.6～1100	0/10	<3～<3	検出せず		
C社:小麦粉m	1.6×10 ³ ～5.8×10 ³	0/10	0/10	10/10	23～460	0/10	<3～<3	検出せず		
C社:小麦粉n	5.4×10 ³ ～9.8×10 ³	0/10	0/10	10/10	120～>1100	0/10	<3～<3	検出せず		
C社:小麦粉o	1.4×10 ³ ～6.7×10 ³	0/10	0/10	6/10	<3～43	0/10	<3～<3	検出せず		
C社:小麦粉p	2.3×10 ³ ～1.1×10 ⁴	0/10	0/10	9/10	<3～240	0/10	<3～<3	検出せず		
C社:小麦粉q	2.0×10 ² ～2.1×10 ³	0/10	0/10	8/10	<3～240	0/10	<3～<3	検出せず		
C社:小麦粉r	3.5×10 ³ ～1.3×10 ⁴	0/10	0/10	10/10	43～>1100	0/10	<3～<3	検出せず		
D社:小麦粉s	8.2×10 ³ ～1.6×10 ⁴	10/10	0/10	8/10	<3～23	0/10	<3～<3	検出せず		
D社:小麦粉t	<3.0×10 ³ ～<3.0×10 ³	3/10	0/10	9/10	<3～23	0/10	<3～<3	検出せず		
D社:小麦粉u	<3.0×10 ³ ～6.5×10 ³	4/10	0/10	10/10	9.2～23	0/10	<3～<3	検出せず		
D社:小麦粉v	7.5×10 ³ ～1.4×10 ⁴	1/10	0/10	10/10	23～240	0/10	<3～<3	検出せず		
D社:小麦粉w	<3.0×10 ³ ～3.0×10 ⁷	4/10	0/10	9/10	<3～23	0/10	<3～<3	未検査		

検体記号 会社名/検体名	冷凍食品規格				MPN算出法						エンテロトキシン
	細菌数(生菌数) [7/g]	大腸菌群	E. coli	大腸菌群数 [MPN/g]		大腸菌数 [MPN/g]		検出率	最小値～最大値		
				最小値～最大値	検出率	最小値～最大値	検出率				
A社 イーストa	2.2×10 ⁹ ～ 8.8×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
A社 イーストb	5.7×10 ⁹ ～ 1.4×10 ¹⁰	0/10	0/10	1/10	<3 ～ 3.6	3.6	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
B社 イーストc	8.2×10 ⁹ ～ 1.4×10 ¹⁰	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
B社 イーストd	5.1×10 ⁹ ～ 1.1×10 ¹⁰	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
B社 イーストe	2.3×10 ⁹ ～ 5.7×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
B社 イーストf	7.3×10 ⁷ ～ 9.5×10 ⁷	0/10	0/10	1/10	<3 ～ 3	3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
C社 イーストg	1.1×10 ¹⁰ ～ 1.6×10 ¹⁰	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
C社 イーストh	4.6×10 ⁹ ～ 1.4×10 ¹⁰	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
C社 イーストi	1.7×10 ⁹ ～ 8.7×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
D社 イーストj	2.3×10 ⁹ ～ 9.6×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
D社 イーストk	9.8×10 ⁹ ～ 3.2×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
D社 イーストl	1.7×10 ⁹ ～ 6.3×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	
D社 イーストm	5.6×10 ⁹ ～ 8.3×10 ⁹	0/10	0/10	0/10	<3 ～ <3	<3	0/10	<3 ～ <3	<3	検出せず	

検体記号 会社名/検体名	冷凍食品規格				MPN算出法						エンテロトキシン
	細菌数(生菌数) [/g]	大腸菌群	E. coli	大腸菌群数 [MPN/g]		大腸菌数 [MPN/g]		検出率			
				最小値 ~ 最大値	検出率	最小値 ~ 最大値	検出率				
A社 手粉a	1.4×10 ³ ~ 3.7×10 ³	0/10	0/10	6/10	<3 ~ 75	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
B社 手粉b	3.6×10 ³ ~ 1.1×10 ⁴	1/10	0/10	10/10	240 ~ >1100	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
C社 手粉c	9.1×10 ³ ~ 5.2×10 ⁴	0/10	0/10	10/10	210 ~ >1100	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
D社 手粉d	<3.0×10 ³ ~ 8.0×10 ³	1/10	0/10	9/10	<3 ~ 240	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
D社 手粉e	<3.0×10 ³ ~ <3.0×10 ³	4/10	0/10	8/10	<3 ~ 23	0/10	<3 ~ <3	未検査			
A社 レーズンa	<100 ~ 4.0×10 ²	0/10	0/10	0/10	<3 ~ <3	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
C社 レーズンb	3.0×10 ² ~ 9.0×10 ²	0/10	0/10	0/10	<3 ~ <3	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
A社 クルミa	2.0×10 ³ ~ 7.8×10 ⁴	4/10	0/10	10/10	210 ~ >1100	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
C社 クルミb	3.0×10 ² ~ 2.9×10 ³	2/10	0/10	10/10	3.6 ~ 43	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
ベーキングパウダーa	<100 ~ <100	0/10	0/10	0/10	<3 ~ <3	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
B社 パウダーb	<100 ~ <100	0/10	0/10	0/10	<3 ~ <3	0/10	<3 ~ <3	検出せず			
ライ麦ペーストa	<100 ~ <100	0/10	0/10	0/10	<3 ~ <3	0/10	<3 ~ <3	検出せず			

表 4. 国内製粉メーカー4社の自主検査による小麦粉類の汚染状況

小麦粉中の菌数検査結果

		強力粉				分析法*
		1等粉		2等粉		
		結果	点数	結果	点数	
A社	大腸菌	陰性/2.22g	15	陰性/2.22g	1	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.01g	15	陰性/0.01g	4	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	15	陰性/25g	4	増菌培養法
B社	大腸菌	陰性/2.22g	24	陰性/2.22g	12	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.03g	24	陰性/0.03g	12	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	24	陰性/25g	12	増菌培養法
C社	大腸菌	陰性/2.22g	12	陰性/2.22g	8	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.01g	12	陰性/0.01g	8	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	2	陰性/25g	2	増菌培養法
D社	大腸菌	陰性/3g	48	陰性/3g	24	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.02g	9	陰性/0.02g	2	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/0.1g	9	陰性/0.1g	2	増菌培養法

		中力粉				分析法*
		1等粉		2等粉		
		結果	点数	結果	点数	
A社	大腸菌	陰性/2.22g	16			増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.01g	16			平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	16			増菌培養法
B社	大腸菌	陰性/2.22g	24	陰性/2.22g	12	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.03g	24	陰性/0.03g	12	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	24	陰性/25g	12	増菌培養法
C社	大腸菌	陰性/2.22g	10			増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.01g	10			平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	2			増菌培養法
D社	大腸菌	陰性/3g	24	陰性/3g	12	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.02g	4	陰性/0.02g	1	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/0.1g	4	陰性/0.1g	1	増菌培養法

		薄力粉				分析法*
		1等粉		2等粉		
		結果	点数	結果	点数	
A社	大腸菌	陰性/2.22g	16	陰性/2.22g	1	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.01g	16	陰性/0.01g	1	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	16	陰性/25g	1	増菌培養法
B社	大腸菌	陰性/2.22g	24	陰性/2.22g	12	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.03g	24	陰性/0.03g	12	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	24	陰性/25g	12	増菌培養法
C社	大腸菌	陰性/2.22g	4	陰性/2.22g	1	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.01g	4	陰性/0.01g	1	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/25g	1	陰性/25g	1	増菌培養法
D社	大腸菌	陰性/3g	12	陰性/3g	12	増菌培養法
	黄色ブドウ球菌	陰性/0.02g	2	陰性/0.02g	1	平板塗抹培養法
	サルモネラ	陰性/0.1g	1	陰性/0.1g	1	増菌培養法

* 分析法は全て食品衛生検査指針に準拠

表 5. 生地に関する大腸菌並びに大腸菌群の汚染実態に関する文献調査結果

【1. 生地 (大腸菌並びに大腸菌群)】

文献番号	国名	サンブル (食品、原材料)	菌名	汚染菌数、汚染率	使用培地	培養条件	方法	備考
J-45	スロバキア	Broiche*	coliform bacteria	ND	VRB agar	NS	plate count method	* クロフツサン、生地 30g+ヌガー クリーム 10g
J-45	スロバキア	Croissant*	coliform bacteria	ND	VRB agar	NS	plate count method	* クロフツサン、生地 27g+ヌガー クリーム 13g
J-66	ドイツ	bread(raw)	coliforms	10(3.1) cfu/g(95percentile)	*	*	*	* article 35 LMBG に従った
			<i>E. coli</i>	10(12) cfu/g(95percentile)	*	*	*	
J-132	アメリカ	dough (flour-water)*	coliforms	1.3x10(5) cfu/g	violet red agar	bile 30°C, 48h	plate count method	* 小麦粉と水で作った生地(30°C 48h 保存)
J-132	アメリカ	dough (flour-water- yeast)*	coliforms	1.5x10(1) cfu/g	violet red agar	bile 30°C, 48h	plate count method	* 小麦粉と水とイーストで作った 生地(30°C 48h 保存)
J-166	アルゼンチン	dough	<i>E. coli</i>	ND	*	*	*	* AOAC method 46016 に従った
J-190	エジプト	plain part of pizza*	coliform bacteria	8.4x10(2) cfu/g	MacConkey broth	37°C, 24h	MPN method	* 生地
J-221	日本	生地(A工場)	大腸菌群数	+*2	*1	*1	*1	*2 検出有り
J-222	アメリカ	biscuit dough	coliforms	<3 to 1100/g	*	*	*	* Official Methods of Analysis と Bacteriological Analytical Manual に従った
			<i>E. coli</i>	3 to 240/g	*	*	*	

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

表 6. 麦類, 麦類粉に関する大腸菌及び大腸菌群の汚染実態に関する文献調査結果

【2. 麦類, 麦類粉 (大腸菌並びに大腸菌群)】

文献番号	国名	サンプル (食品、原材料)	菌名	汚染菌数、汚染率	使用培地	培養条件	方法	備考
J-59	イギリス	broken wheat	coliforms	ND	violet red bile agar	37°C, 24h	plate count method	
J-59	イギリス	wheat	coliforms	ND	violet red bile agar	37°C, 24h	plate count method	
J-59	イギリス	self-raising flour*	coliforms	ND to 3.65x10 ³ (3) cfu/g	violet red bile agar	37°C, 24h	plate count method	* ベーキングパウダー入小麦粉
			<i>E. coli</i> O157	ND	modified sorbitol MacConley agar	NS	plate count method	
J-59	イギリス	Chupatty flour*	coliforms	ND	violet red bile agar	37°C, 24h	plate count method	* チャパティー、北インドのパン
			<i>E. coli</i> O157	ND	modified sorbitol MacConley agar	NS	plate count method	
J-72	ドイツ	durum wheat semolina	coliform germs	3 to >1100 cfu/g	brila bouillon	NS	NS	
			<i>E. coli</i>	ND	brila bouillon	NS	NS	
J-72	ドイツ	wheat flour type 405	coliform germs	15 to >1100 cfu/g	brila bouillon	NS	NS	
			<i>E. coli</i>	<3 to 15 cfu/g	brila bouillon	NS	NS	
J-72	ドイツ	wheat flour type 630	coliform germs	4 to >240 cfu/g	brila bouillon	NS	NS	
			<i>E. coli</i>	ND	brila bouillon	NS	NS	
J-72	ドイツ	whole wheat flour	coliform germs	23 to >1100 cfu/g	brila bouillon	NS	NS	
			<i>E. coli</i>	<3 to 14 cfu/g	brila bouillon	NS	NS	

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

【2. 麦類, 麦類粉 (大腸菌並びに大腸菌群) つづき】

文献番号	国名	サンプル (食品、原材料)	菌名	汚染菌数、汚染率	使用培地	培養条件	方法	備考
J-96	ドイツ	wheat(1989年)	<i>E.coli</i>	23%	NS	NS	NS	
J-96	ドイツ	wheat flour type 405/550(1989年)	<i>E.coli</i>	96%	NS	NS	NS	
J-96	ドイツ	wheat/rye*	coliform bacteria	10/g	NS	NS	NS	*Spicher の 1986 年の報告より引用
J-96	ドイツ	wheat/rye*	<i>E.coli</i>	51/g	NS	NS	NS	
J-96	ドイツ	wheat/rye*	coliform bacteria	10/g	NS	NS	NS	*Spicher の 1986 年の報告より引用
J-96	ドイツ	wheat/rye*	<i>E.coli</i>	51/g	NS	NS	NS	
J-112	ニュージーランド	bakers flour	coliform counts	80%	lauryl sulphate tryptose broth	35±0.5°C, 48 ±2h	MPN method	
J-112	ニュージーランド	wholemeal flour*1	coliform counts	71%	lauryl sulphate tryptose broth	35±0.5°C, 48 ±2h	MPN method	*1 全粒小麦粉
J-112	ニュージーランド	bran*1	coliform counts	57%	lauryl sulphate tryptose broth	35±0.5°C, 48 ±2h	MPN method	*1 ふすま
J-112	ニュージーランド	kibbled wheat*1	coliform counts	50%	lauryl sulphate tryptose broth	35±0.5°C, 48 ±2h	MPN method	*1 粗引き小麦
J-112	ニュージーランド	gluten	coliform counts	50%	lauryl sulphate tryptose broth	35±0.5°C, 48 ±2h	MPN method	
J-112	ニュージーランド	yeast	coliform counts	100%	lauryl sulphate tryptose broth	35±0.5°C, 48 ±2h	MPN method	
J-113	オーストラリア	wheat flour	coliform counts	1.4×10(0)MPN/g	*	*	MPN method	* Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	dirty wheat	<i>E.coli</i> /counts	ND	*	*	MPN method	
J-113	オーストラリア	cleaned wheat	coliform counts	1.4×10(0)MPN/g	*	*	MPN method	* Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	cleaned wheat	<i>E.coli</i> /counts	ND	*	*	MPN method	

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

【2. 麦類, 麦類粉 (大腸菌並びに大腸菌群) つづき】

文献番号	国名	サンプル (食品、原材料)	菌名	汚染菌数、汚染率	使用培地	培養条件	方法	備考
J-113	オーストラリア	first scouring*1	coliform counts	1.5x10 ¹ (1)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 1 回目の研磨(洗浄前) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	second scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	second scouring*1	coliform counts	2.1x10 ¹ (1)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 2 回目の研磨(洗浄後) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	conditioned wheat w/ scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	conditioned wheat w/ scouring*1	coliform counts	2.0x10 ³ (3)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 配合(研磨あり) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	conditioned wheat w/ scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	conditioned wheat w/ scouring*1	coliform counts	5.0x10 ² (2)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 配合(研磨なし) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	straight run flour w/ scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	straight run flour w/ scouring*1	coliform counts	1.4x10 ² (2)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 全工程終了後(研磨あり) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	straight run flour w/o scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	straight run flour w/o scouring*1	coliform counts	2.0x10 ² (2)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 全工程終了後(研磨なし) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	bran w/ scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	bran w/ scouring*1	coliform counts	5.0x10 ³ (3)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 ふすま、ぬか(研磨あり) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	bran w/o scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-113	オーストラリア	bran w/o scouring*1	coliform counts	2.0x10 ³ (3)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 ふすま、ぬか(研磨なし) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	bran w/o scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

【2. 麦類, 麦類粉 (大腸菌並びに大腸菌群) つづき】

文献番号	国名	サンプル (食品、原材料)	菌名	汚染菌数、汚染率	使用培地	培養条件	方法	備考
J-113	オーストラリア	pollard w/ scouring*1	coliform counts	2.0x10(3)MPN/g	*2	*2	MPN method	*1 小麦粉を含むふすま(研磨あり) *2 Australian Standard 1766 に従った
J-113	オーストラリア	pollard w/o scouring*1	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-124	日本	小麦粉	<i>E.coli</i> counts	ND	*2	*2	MPN method	
J-124	日本	小麦玄麦	大腸菌群	<300/g	NS	NS	NS	
J-166	アルゼンチン	flour	大腸菌群	<300/g	NS	NS	NS	
J-166	アルゼンチン	semolina*1	<i>E.coli</i>	ND	*1	*1	*1	*1 AOAC method 46016 に従った
			<i>E.coli</i>	ND	*2	*2	*2	*1 セモリナ、小麦から作る粒状で *2 AOAC method 46016 に従った
J-210	日本	小麦粉(A工場)	大腸菌群	ND	NS	NS	NS	
J-210	日本	小麦粉(B工場)	大腸菌群	ND	NS	NS	NS	
J-210	日本	小麦粉(C工場)	大腸菌群	ND	NS	NS	NS	
J-210	日本	小麦粉(D工場)	大腸菌群	ND	NS	NS	NS	
J-221	日本	小麦粉(A工場)	大腸菌群数	ND	*	*	*	* 食品衛生検査指針Iに従った
J-221	日本	小麦粉(B工場)	大腸菌群数	ND	*	*	*	* 食品衛生検査指針Iに従った

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

表 7. 生麺に関する大腸菌及び大腸菌群の汚染実態に関する文献調査結果

【 3. 生麺（大腸菌並びに大腸菌群）】

文献番号	国名	サンプル (食品、原材料)	菌名	汚染菌数、汚染率	使用培地	培養条件	方法	備考
J-23 ア	オーストラリア	fresh white noodle	coliforms	7.2MPN/g	lauryl tryptose broth	37°C, up to 48h	MPN method	
J-23 ア	オーストラリア	fresh yellow alkaline noodle	coliforms	0.3MPN/g	lauryl tryptose broth	37°C, up to 48h	MPN method	
J-23 ア	オーストラリア	fresh yellow alkaline egg noodle	coliforms	19MPN/g	lauryl tryptose broth	37°C, up to 48h	MPN method	
J-23 ア	オーストラリア	udon noodle*	coliforms	>10(3)MPN/g	lauryl tryptose broth	37°C, up to 48h	MPN method	* うどん(10~20分煮て食べる麺)
J-23 ア	オーストラリア	Hokkien noodle*	coliforms	9x10(2)MPN/g	lauryl tryptose broth	37°C, up to 48h	MPN method	* 福建省の麺(1分前後煮て食べる麺)
J-23 ア	オーストラリア	above all samples	<i>E. coli</i>		lauryl tryptose broth	37°C, up to 48h	MPN method	*1 生地 の 2 サンプル で検出 (240MPN/g と >10(3)MPN/g)
J-66	ドイツ	pasta(raw/partially cooked)	coliforms	10(2.8) cfu/g(95percentile)	*	*	*	* article 35 LMBG に従った
			<i>E. coli</i>	ND	*	*	*	
J-124	日本	生うどん	大腸菌群	20%	NS	NS	plate count method	
J-124	日本	生中華麺	大腸菌群	4%	NS	NS	plate count method	
J-124	日本	生そば	大腸菌群	65%	NS	NS	plate count method	
J-148	日本	生うどん	大腸菌群	26.1%	*2	*2	NS	*2 食品衛生検査指針および生めん類の衛生規範に従った
			大腸菌	43.9%	*2	*2	NS	
J-148	日本	生そば	大腸菌群	37.9%	*2	*2	NS	*2 食品衛生検査指針および生めん類の衛生規範に従った
			大腸菌	69.9%	*2	*2	NS	

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

【3. 生麺（大腸菌並びに大腸菌群）つづき】

J-148	日本	生中華麺	大腸菌群	ND	*2	*2	*2	NS	*2 食品衛生検査指針および生めん類の衛生規範に従った
			大腸菌	ND	*2	*2	*2	NS	
J-152	日本	生うどん	大腸菌群	ND	*	*	*	NS	* 生めん類の衛生規範に準じた
J-152	日本	生きしめん	大腸菌群	ND	*	*	*	NS	* 生めん類の衛生規範に準じた
J-152	日本	生そば	大腸菌群	17%	*	*	*	NS	* 生めん類の衛生規範に準じた
J-185	イタリア	fresh "home-made" egg-free pasta	total coliforms	10(6.63±1.40)/g	violet red agar	bile 37°C, 24h			
			fecal coliforms	10(6.54±0.88)/g	violet red agar	bile 42°C, 24h			
J-210	日本	生めん(A工場)	大腸菌群	ND	NS	NS	NS	NS	
J-210	日本	生めん(B工場)	大腸菌群	ND	NS	NS	NS	NS	
D-207	アメリカ	frozen raw egg noodles	coliforms	36 MPN/g	Lauryl Sulfate Tryptose Broth	35°C, 48h		MPN method	
					2% Brilliant Green Lactose Broth	35°C, 48h		for confirmation	
D-176	イタリア	simple fresh pasta*1	coliform	negative to 1.5x10(4) MPN*2					*1 Sardinian gnocchetti *2 positive: 0.3% for fresh pasta, <0.01% for egg pasta, 0.5% for potato gnocchetti *3 positive: 0.2% for potato gnocchetti
			E.coli	negative to 7.0x10 ³ MPN*3					

ND: not detected NS: not specified NT: not tested

表8. 冷凍食品あるいはパン生地関連食品に関する諸外国の微生物規格基準

食品群	国	対象食品詳細	菌種	規格基準
冷凍食品	アメリカ	生地およびクッキー (未焼成、冷蔵ある いは冷凍)	大腸菌群	<100MPN
			大腸菌	<10MPN
			サルモネラ 総菌数 黄色ブドウ球菌	検出されないこと <50,000CFU/g <10MPN
	中国	急速冷凍インスタント食品(急速冷凍前未加熱処理)	大腸菌群 大腸菌 総菌数 黄色ブドウ球菌 サルモネラ	<240CFU/g 検出されないこと <300,000CFU/g 0.01g中に検出されないこと 25g中に検出されないこと
	韓国	冷凍食品(冷凍前非加熱製品)	大腸菌 総菌数	検出されないこと <3,000,000CFU/g
生の生地	カナダ	Fresh Dough	大腸菌	m=10, M=100/ n=5, c=2
	キューバ	Dough Paste (Fresh)	糞便系大腸菌群	<10CFU/g, n=1
小麦粉	スペイン	Flour	大腸菌	<100CFU/g
パン等	スイス	Confectionery, Pastries	大腸菌	<10CFU/g
			総菌数 ブドウ球菌	<1,000,000CFU/g <100 CFU/g
		*焼成前の冷凍パン生地には大腸菌の規格は適用されない。		
	アイルランド	Bakery and Pastry products	大腸菌	<20CFU/gが望ましい 20~<100CFU/gが境界領域
			大腸菌0157及び他のVTEC	25g中に検出されないこと
			総菌数	<10,000CFU/gが望ましい 10,000~<100,000CFU/gが境界領域
			パチルス	<100CFU/gが望ましい 1,000~<10,000CFU/gが境界領域
			カンピロバクター ウェルシュ菌	25g中に検出されないこと <10CFU/gが望ましい
			リステリア・モノ サイトゲネス	10~<100CFU/gが境界領域 25g中に検出されないことが望ましい
			リステリア(リステ リア・モノサイト ゲネス以外)	25g中<200CFU/gが境界領域 25g中に検出されないことが望ましい
			サルモネラ 黄色ブドウ球菌	25g中<200CFU/gが境界領域 25g中に検出されないこと <20CFU/gが望ましい
			腸炎ビブリオ	20~<100CFU/gが境界領域 25g中に検出されないことが望ましい 25g中<200CFU/gが境界領域
			総菌数 黄色ブドウ球菌 病原性微生物 微生物毒素	<1,000,000CFU/g <500CFU/g 検出されないこと 検出されないこと
			大腸菌 亜硫酸塩還元性ク ロストリジウム属 カビ サルモネラ 赤痢菌 黄色ブドウ球菌 黄色ブドウ球菌エ ンテロトキシン 酵母	検出されないこと <1,000 CFU/g <500CFU/g 30g中に検出されないこと 30g中に検出されないこと 0.1g中に検出されないこと 検出されないこと <500CFU/g
	オランダ	Dough Products (Ready for	総菌数 黄色ブドウ球菌 病原性微生物 微生物毒素	<1,000,000CFU/g <500CFU/g 検出されないこと 検出されないこと
	スペイン	Pastry	大腸菌 亜硫酸塩還元性ク ロストリジウム属 カビ サルモネラ 赤痢菌 黄色ブドウ球菌 黄色ブドウ球菌エ ンテロトキシン 酵母	検出されないこと <1,000 CFU/g <500CFU/g 30g中に検出されないこと 30g中に検出されないこと 0.1g中に検出されないこと 検出されないこと <500CFU/g

表 9. 小麦粉あるいはパン生地を汚染するおそれのある大腸菌以外の細菌や細菌毒素の温度抵抗性 (ICMSF (1996): Microorganisms in Foods 5, Blackie Academic & Professional)

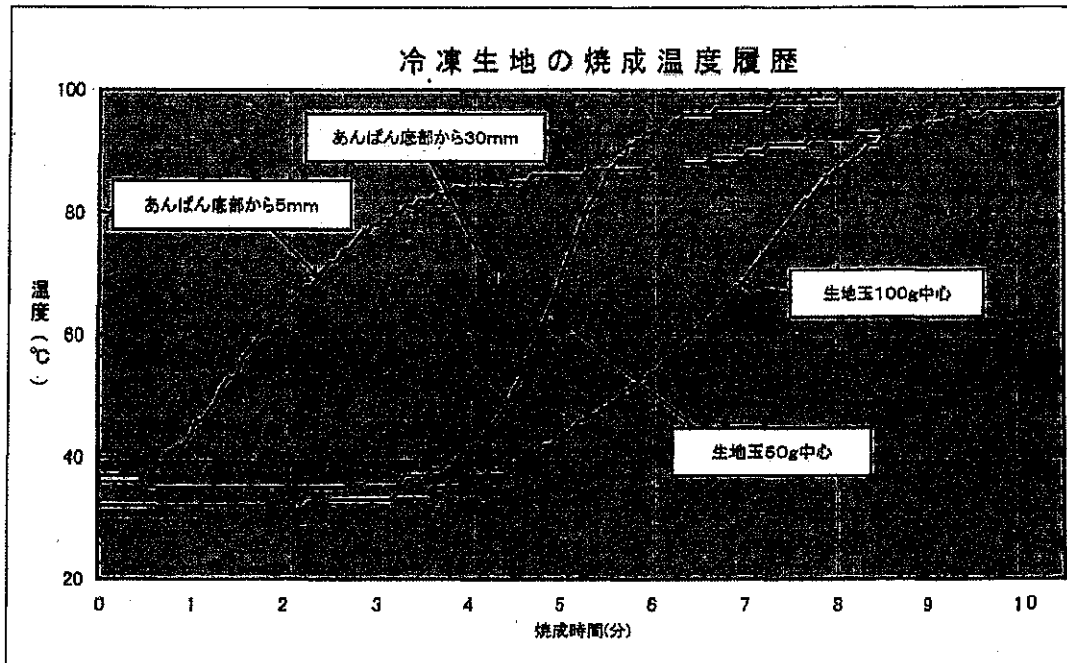
細菌・細菌毒素	温度	D値(分)
サルモネラ	65.5	1.1~4.1
	70	<0.05~1.4
赤痢菌	63	1~6
黄色ブドウ球菌	65	0.2
	75	0.02
黄色ブドウ球菌 エンテロトキシ	80	>160
	100	40~80
	120	20~40
	121	0.03~2.35
セレウス菌芽胞	85	33~106
	100	4.2~6.3
	121	0.03~2.35

表 10. 冷凍パン生地の焼成条件

検体名	焼成温度	時間	最高中心温度
食パン類	210～230℃	30～35 分	98℃
菓子パン類	200～210℃	12～15 分	95℃
デニッシュ類	200～210℃	15～18 分	98℃
ドーナツ類	175～180℃	3～5 分	85～90℃
バターロール			103.6℃
イギリスパン	170℃	50 分	
あんぱん	190℃	8～10 分	
メロンパン	130℃	18 分	
ウインナーロール	200℃	12 分	
クロワッサン	160℃	18～20 分	
アップルパイ	170℃	25 分	
あんドーナツ	180℃	5 分	
食パン	200℃	35 分	98℃
フランスパン	210℃	25 分	
バターロール	200℃	13 分	96℃
シナモンロール	200℃	14 分	
あんパン	200℃	9 分	
メロンパン	190℃	13 分	96℃
あんドーナツ	170℃	4 分	
クロワッサン	200℃	12 分	
アップルパイ	200℃	25 分	
デニッシュ生地	200℃	13 分	

*メーカーにより違いがあるため、各メーカーからのデータには罫線で仕切りを入れてある。

図1. 冷凍パン生地焼成時の中心温度の変化



別添. 冷凍パン生地に関するリスクプロファイル (案)

* 具体的なデータは、報告書本文を参照のこと

1. 問題となる微生物・食品の組み合わせについて

- 対象微生物：
糞便汚染の指標菌としての *E. coli*
* 食品衛生法に基づく試験法に規定されている“*E. coli*”で、EC 発酵管で、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養し、ガス発生が認められ、大腸菌群と同様な試験により大腸菌群であることが確認された菌群である。すなわち糞便系大腸菌群のことである。なお、糞便系大腸菌群とされたもののうち、IMViC 試験を実施し、そのパターンが、「++--」である場合を食品衛生検査指針では大腸菌と呼んでいるため、この概念と区別するため、本報告書では *E. coli* と表記することにした。従って、分類学上の *Escherichia coli* や、海外で用いている“大腸菌”とは多少異なる菌群を示すこととなる。
- 対象とする食品または加工食品についての概略：
小麦粉を主原料とする加熱後摂取・凍結直前未加熱の冷凍食品であり、高温で加熱しなければ食することができない冷凍パン生地のような食品
- 過去に報告されている健康被害：
加熱後摂取・凍結直前未加熱の冷凍食品を原因とする健康被害は、これまでわが国において確認されていない。

2. 問題となる微生物の特徴について

- 糞便汚染の指標菌としての *E. coli* には、明白な病原性はない。60°Cにおける D 値が 0.26~2.64、64.3°Cにおける D 値が 0.16 分と報告されている。
- 小麦粉あるいは非加熱で製造されたパン生地を汚染しうる病原体としては、サルモネラ、赤痢菌、セレウス菌、黄色ブドウ球菌、そして黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンなどが知られている。これら細菌は、セレウス菌芽胞と黄色ブドウ球菌エンテロトキシンを除き、63~65°C以上の加熱により非常に速やかに死滅することが知られている。セレウス菌芽胞は 100°Cでの D 値が 4 分以上であるが、121°Cでは極めて短時間で死滅する。黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの産生は、温度 10~48°C、pH 4.5~9.6、水分活性 0.87 以上で認められ、至適条件での毒素産生は 6~7 時間で起こることが報告されている。黄色ブドウ球菌エンテロトキシンは、120°Cの加熱によっても、毒素力価が 10 分の 1 になるまでに 20~40 分を要する。(ICMSF, 1996)

3. 食品製造、加工、流通と摂取

- リスクマネジメントに関与し、影響を与え得る媒介食品の特性
 - 国内で業務用に販売されている冷凍パンは、生地基本的に、食パン、ハードロール、菓子パン、ドーナツ、デニッシュ、パイの 6 種類である。デニッシュとパイは、生地に油脂層を挟みながら折りたたむ。パイ以外には全てイーストが入る。あんやクリーム、カレーの具などをフィリングした後、に冷凍するものもある。
 - 冷凍パン生地の製造工程においては、予め温度管理された原材料を用い、概ね 20~24°C以下に設定された工場内で、基本的には 2 時間半程度、パンの種類により冷却過程を挟んでも 7 時間以内に成形が完了し、急速冷凍が行なわれる。

- 国内での製造状況
 - パンの生産数量は、食パン、菓子パン、その他のパン、学給パンを合計したパン用小麦粉使用量として、平成 16 年には 1,242,951 トンであった。
 - 同年における冷凍生地使用量は、76,879 トンであり、パンの生産数量の約 6%が冷凍生地を使用したものである。
(総合食料局食糧部消費流通課流通加工対策室、2005)
- 輸入実績ならびに違反状況
 - 平成 15 年の加熱後摂取・凍結前未加熱冷凍パン生地の輸入実績は、届出件数 4,064 件、届出重量 15,400 トンであり、うち 277 件の検査結果として、4 件が E. coli 陽性による違反であった。
- 既存のリスクマネジメントについての要約
 - <規格基準>
食品衛生法においては、加熱後摂取冷凍食品（冷凍直前未加熱）の規格基準として、糞便汚染の指標菌としての E. coli 陰性を求めている（昭和 48 年設定）。イーストを使用する冷凍パン生地などのような発酵食品については、一般生菌数の規格は適用されない。

4. 国内の冷凍パン生地ならびに原材料の汚染実態

- 国内メーカー 4 社から提供を受けた冷凍パン生地検体 18 種中、冷凍食品規格に基づいて行なわれた検査では 6 種から大腸菌群が、1 種から E.coli が検出された。MPN 算出法に基づいて行なわれた検査では 18 種全てから大腸菌群が、2 種から大腸菌が検出された。生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 7.1 \times 10^8/g$ であった。
- 原材料の小麦粉、イースト、パンの製造工程で用いられる手粉、副原料として用いられるクルミ、レーズン、ベーキングパウダー、ライ麦ペーストからは、検体の種類により大腸菌群は検出されたが、大腸菌は検出されなかった。
- 他の 1 社について、食品衛生法に規定される検査法よりも 10 倍感度の高い検査法を用いて検査をしたところ、製品 14 種類中 4 種類、粉類 15 種類中 4 種類から E. coli が検出された。大腸菌群は全 29 種類中 27 種の検体において陽性であった。
- 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンについては、原材料、製品ともに、検査した検体についてはいずれも不検出であった。
- 製粉協会製粉研究所より提供いただいた、製粉メーカー 4 社による小麦粉の自主検査の結果では、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラは、過去に検出されていない

5. 冷凍パン生地および原料の麦類の汚染実態に関する文献情報

- 国内外の文献を調査した結果、生地では大腸菌群が 6 文献において、8 種類の検体中 6 種類からの検出が報告されていた。大腸菌は 3 文献において、3 種類の検体中 2 種類からの検出が報告されている。
- 小麦、ライ麦では、4 文献において、9 種類の検体中 6 種類から大腸菌群の検出が報告されており、2 文献において、9 種類の検体中 1 種類から大腸菌が検出されている。
- 小麦粉では、7 文献において、19 種類の検体中 11 種類から大腸菌群の検出が報告されており、5 文献において、13 種類の検体中 4 種類から大腸菌が検出されている。
- 生地と同様に製造過程で加熱工程を経ない生麺に関しては、大腸菌群が 9 文献において、20 種類の検体中 15 種類から検出が報告され、大腸菌は 4 文献において、6 種類の検体中 4 種類で検出が報告されている。

- この他、米国において総計 3,350 検体の小麦粉を調査した結果、季節や小麦の品種を問わず、平均 12.8%(3.4–89.3%)の汚染率で大腸菌汚染が認められたとの報告がある (Richter *et al.*, 1993)。

6. 海外の冷凍食品の規格基準

- 冷凍食品として規格・基準を有しているのは、アメリカ、中国、韓国である。
 - ・ アメリカでは生地およびクッキー（未焼成、冷蔵あるいは冷凍）として、大腸菌群が<100 MPN、大腸菌が<10 MPN、サルモネラが検出されないこと、総菌数が<50,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が<10 MPN という規格である。
 - ・ 中国では急速冷凍インスタント食品(急速冷凍前未加熱処理)として、大腸菌群が<240 cfu/g、大腸菌が検出されないこと、総菌数が<300,000 cfu/g、黄色ブドウ球菌が 0.01 g 中に検出されないこと、サルモネラが 25 g 中に検出されないこととなっている。
 - ・ 韓国では日本と同様、冷凍食品(冷凍前非加熱製品)として、大腸菌が検出されないこと、総菌数が<3,000,000 cfu/g である。
- 作りたての生地(fresh dough)の規格・基準に関しては、カナダが大腸菌について、 $m=10$ 、 $M=100$ 、 $n=5$ 、 $c=2$ という規格を有しており、キューバが糞便系大腸菌群について $n=1$ で<10 cfu/g という規格を有している。
- 小麦粉の規格・基準に関しては、スペインが大腸菌<100 cfu/g という規格を有している。
- 焼成後のパン等の規格・基準に関しては、スイス、アイルランド、オランダ、スペインに大腸菌を含む微生物規格が存在するが、スイスでは、焼成前の冷凍パン生地には大腸菌の規格は適用されないとの注意書きがある。

7. 食品安全委員会への諮問の必要性と諮問内容案

諮問の必要性

食品に新たな規格基準の適用を図る際には、食品安全基本法により、健康への影響が明白である場合や緊急対応が必要とされる場合などを除き、食品安全委員会における食品健康影響評価が必要とされている。今回、輸入冷凍食品に関し、食品の性質上、現在の成分規格を適用することが困難であると指摘されており、厚生労働省に冷凍食品の規格基準の見直しが要請された。国際貿易上の問題提起であり、厚生労働省は規格基準の見直しについて検討するが、規格基準の見直しによる健康影響については食品安全委員会に諮る必要がある。

諮問内容案

現在の規格基準の中に、「なお、小麦粉を主原料とし、喫食前に加熱工程が必要な冷凍パン生地のような食品については、この限りではない。」と追加することによって、リスクが増加するか否か。

8. 参考文献

総合食料局食糧部消費流通課流通加工対策室 (2005) : 生産動態調査
 ICMSE, 1996: Microorganisms in Foods 5, Blackie Academic & Professional
 Richter *et al.* (1993): Microbiological quality of flours. Cereal Foods World 38(5), 367-369.

平成17年度

食品・添加物等規格基準に
関する試験検査等について

冷凍パン生地およびその原料に関する試験

機 関 名

財団法人日本冷凍食品検査協会

研究責任者名（契約者）

理事長 近藤 和廣（印）

1. 目的

食品衛生法における冷凍食品の規格基準では、不衛生な取扱いや消化器系感染症起因菌による汚染を示唆する指標菌として、大腸菌群や大腸菌 (*E. coli*) を採用し、これら微生物が最終製品から検出されないことを求めている。しかしながら、近年の冷凍食品の多様化及び輸入冷凍食品の増加に伴い、現在の成分規格の中で用いられている分類（凍結直前加熱・凍結直前未加熱等）及び微生物規格を見直す必要があるのではないかと指摘がなされている。

本調査は、このような状況を踏まえて、現行の冷凍食品の成分規格の見直しに伴う食品健康影響評価を食品安全委員会に依頼するために必要な微生物学的データを収集し、知見を取りまとめることを目的とする。

2. 方法

1) 器具・試薬・培地

標準寒天培地、デソキシコレート寒天培地、BGLB 培地、EC 培地、EMB 寒天培地、乳糖バイオン培地、普通寒天培地、クロモカルコリウム寒天培地、滅菌リン酸緩衝液
シャーレ、牛乳ピペット、メスピペット、ねじ口瓶、三角フラスコ、外科ばさみ、薬匙、ストマッカー袋、試験管、ダーラム管、試験管立て、ステリSTOPパー（栓）
マイクロピペット、チップ、精製水、バイダスアッセイキットスタフエンテロトキシンⅡ、PH試験紙

2) 機器

ボルテックスミキサー、ストマッカー、ふ卵器、コロニーカウンター、ダイリューター、ディープフリーザー、恒温水槽、乾熱滅菌器、オートクレーブ
ミニバイダス、遠心分離機

3) 試料溶液の調製および試験方法

<生菌数、大腸菌群、*E. coli*>

試料 25g をストマッカー袋にはかり取り 225mL のリン酸緩衝液を加え、これを試料原液とした。食品・添加物等の規格基準、冷凍食品の成分規格により、生菌数、大腸菌群、*E. coli* の検査および、食品衛生検査指針により、*E. coli* (MPN 法)、大腸菌群 (BGLB MPN 法) の検査を行った。

<黄色ブドウ球菌エンテロトキシン>

試料 25g をストマッカー袋にはかり取り 25mL の抽出緩衝液（バイダスアッセイキットスタフエンテロトキシンⅡの試薬原液 50mL を 1L に希釈する）を加え、均質化試料とした。粉体は等量の精製水を加え 1 時間放置し、同様な操作を行った。

次に均質化試料の遠心分離を行い、上澄み液を分取し、PH試験紙で 7.5 から 8 を確認した。

PH確認を行った検液 500 μ L を、バイダスアッセイキットスタフエンテロトキシン

Ⅱ中のストリップに分注し、ミニバイダスにより黄色ブドウ球菌エンテロトキシン測定を行った。

以上

冷凍パン生地及びその原料に関する基礎調査分析結果

工場名	検体名	製品名・商品名	番号	生菌数	大腸菌群 (デシキョレート)	大腸菌群 (MPN/100g)	E.coli (MPN/100g)	E.coli(3本法) (冷凍食品規格)	エンテロキシン (ミニバイダス法)
T	製品	①	1	5.3×10^{-3}	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	8.6×10^{-3}	陰性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	5.9×10^{-3}	陰性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	4.3×10^{-3}	陽性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	8.7×10^{-3}	陰性	24,000	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	5.4×10^{-3}	陰性	24,000	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	6.9×10^{-3}	陽性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	5.0×10^{-3}	陽性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	6.4×10^{-3}	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	5.8×10^{-3}	陽性	2,100	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
		②	1	8.9×10^{-7}	陽性	15,000	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	7.8×10^{-7}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	3.9×10^{-7}	陽性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	4.5×10^{-7}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	4.7×10^{-7}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	6.1×10^{-7}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	7.5×10^{-7}	陽性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	6.1×10^{-7}	陽性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	5.8×10^{-7}	陽性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	6.7×10^{-7}	陽性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	小麦粉	③	1	1.1×10^{-4}	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	1.4×10^{-4}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	1.3×10^{-4}	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	1.2×10^{-4}	陽性	740	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	1.4×10^{-4}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	1.2×10^{-4}	陽性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	9.2×10^{-3}	陽性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	1.4×10^{-4}	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	1.6×10^{-4}	陽性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	8.2×10^{-3}	陽性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
		④	1	8.4×10^{-3}	陰性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	7.7×10^{-3}	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	1.4×10^{-4}	陰性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	1.2×10^{-4}	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	1.3×10^{-4}	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	9.3×10^{-3}	陰性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	9.9×10^{-3}	陽性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	7.5×10^{-3}	陰性	24,000	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	9.6×10^{-3}	陰性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	1.2×10^{-4}	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	手粉	⑤	1	8.0×10^{-3}	陰性	24,000	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	$<3.0 \times 10^{-3}$	陰性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	4.0×10^{-3}	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	$<3.0 \times 10^{-3}$	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	$<3.0 \times 10^{-3}$	陰性	9,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	5.3×10^{-3}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	$<3.0 \times 10^{-3}$	陰性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	6.9×10^{-3}	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	3.2×10^{-3}	陰性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	3.7×10^{-3}	陰性	24,000	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	イースト	⑥	1	2.9×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	2.9×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	2.0×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	3.8×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	1.7×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	6.3×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	3.2×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	3.8×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	4.2×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	5.3×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
		⑦	1	4.7×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	2.3×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	3.4×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	8.7×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	9.6×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	3.7×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	2.6×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	3.9×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			9	7.1×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	6.6×10^{-9}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
H	製品	⑧	1	5.3×10^{-7}	陰性	4,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	5.4×10^{-7}	陽性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	1.8×10^{-7}	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	6.6×10^{-7}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	5.5×10^{-7}	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	4.7×10^{-7}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	3.8×10^{-7}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	4.0×10^{-7}	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)

冷凍パン生地及びその原料に関する基礎調査分析結果

工場名	検体名	製品名・商品名	番号	生菌数	大腸菌群 (デシキョレート)	大腸菌群 (MPN/100g)	E.coli (MPN/100g)	E.coli(3本法) (冷凍食品規格)	エンテロトキシン (ミニバイダス法)
F	小麦粉	⑨	9	2.1×10^7	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	1.2×10^8	陽性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			1	$<3.0 \times 10^3$	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	$<3.0 \times 10^3$	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	$<3.0 \times 10^3$	陽性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	$<3.0 \times 10^3$	陰性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	$<3.0 \times 10^3$	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	$<3.0 \times 10^3$	陰性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	$<3.0 \times 10^3$	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	$<3.0 \times 10^3$	陰性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	ミックス粉	⑩	9	$<3.0 \times 10^3$	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	$<3.0 \times 10^3$	陰性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			1	4.5×10^3	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	$<3.0 \times 10^3$	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	$<3.0 \times 10^3$	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	$<3.0 \times 10^3$	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	6.5×10^3	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	3.3×10^3	陽性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	$<3.0 \times 10^3$	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	4.8×10^3	陰性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	イースト	⑪	9	$<3.0 \times 10^3$	陰性	920	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	$<3.0 \times 10^3$	陽性	2,300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			1	7.5×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	6.3×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	7.3×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	7.5×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	7.6×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	6.9×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	6.6×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	5.6×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	製品	⑫	9	6.2×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	8.3×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			1	9.3×10^7	陽性	24,000	920	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	1.8×10^8	陽性	9,300	4,300	陽性	検出せず(<1ng/g)
			3	1.3×10^8	陽性	46,000	9,300	陽性	検出せず(<1ng/g)
			4	8.2×10^7	陽性	46,000	4,300	陽性	検出せず(<1ng/g)
			5	8.2×10^7	陽性	110,000	920	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	1.1×10^8	陽性	110,000	24,000	陽性	検出せず(<1ng/g)
			7	7.5×10^7	陽性	9,300	15,000	陽性	検出せず(<1ng/g)
			8	1.1×10^8	陽性	24,000	9,300	陽性	検出せず(<1ng/g)
	小麦粉	⑬	9	1.1×10^8	陽性	24,000	4,300	陽性	検出せず(<1ng/g)
			10	6.4×10^7	陽性	24,000	1,500	陽性	検出せず(<1ng/g)
			1	2.9×10^6	陽性	360	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	$<3.0 \times 10^3$	陽性	920	<300	陰性	—
			3	$<3.0 \times 10^3$	陰性	360	<300	陰性	—
			4	1.2×10^6	陰性	2,300	<300	陰性	—
			5	2.6×10^6	陰性	2,300	<300	陰性	—
			6	3.0×10^7	陰性	920	<300	陰性	—
			7	$<3.0 \times 10^3$	陽性	920	<300	陰性	—
			8	$<3.0 \times 10^3$	陰性	<300	<300	陰性	—
	イースト	⑭	9	5.1×10^3	陽性	2,300	<300	陰性	—
			10	$<3.0 \times 10^3$	陰性	2,300	<300	陰性	—
			1	2.8×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			2	3.2×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			3	2.5×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			4	1.9×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			5	1.5×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			6	2.0×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			7	1.1×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			8	9.8×10^8	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
	手粉	⑮	9	2.5×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			10	1.1×10^9	陰性	<300	<300	陰性	検出せず(<1ng/g)
			1	$<3.0 \times 10^3$	陽性	920	<300	陰性	—
			2	$<3.0 \times 10^3$	陰性	<300	<300	陰性	—
			3	$<3.0 \times 10^3$	陰性	920	<300	陰性	—
			4	$<3.0 \times 10^3$	陽性	360	<300	陰性	—
			5	$<3.0 \times 10^3$	陰性	360	<300	陰性	—
			6	$<3.0 \times 10^3$	陽性	360	<300	陰性	—
			7	$<3.0 \times 10^3$	陰性	360	<300	陰性	—
			8	$<3.0 \times 10^3$	陽性	2,300	<300	陰性	—
			9	$<3.0 \times 10^3$	陰性	360	<300	陰性	—
			10	$<3.0 \times 10^3$	陰性	<300	<300	陰性	—

E. coli 検査法

(「食品、添加物等の規格基準」(昭和34年12月28日厚生省告示第370号)からの抜粋)

○ 冷凍食品

1 冷凍食品(製造し、又は加工した食品(清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品、魚肉ねり製品、ゆでだこ及びゆでがにを除く。以下この項において同じ。)及び切り身又はむき身にした鮮魚介類(生かきを除く。以下この項において同じ。)を凍結させたものであって、容器包装に入れられたものに限る。以下この項において同じ。)の成分規格

(1) 無加熱摂取冷凍食品(冷凍食品のうち製造し、又は加工した食品を凍結させたものであって、飲食に供する際に加熱を要しないとされているものをいう。以下この項において同じ。)は、細菌数(生菌数)が検体1gにつき100,000以下で、かつ、大腸菌群が陰性でなければならない。この場合の細菌数(生菌数)の測定法及び大腸菌群試験法は、次のとおりとする。

1. 検体の採取及び試料の調製

冷凍したまま容器包装の表面をアルコール綿でよくふき、滅菌した器具を用いて開封し、その内容の全体を細切りした後無作為に25gを無菌的に滅菌ホモジナイザーにとり、滅菌リン酸緩衝希釈水225mlを加えて細砕する。その10mlを滅菌ピペットを用いて滅菌試料びんにとり、滅菌リン酸緩衝希釈水90mlを加えてよく混和し、これを試料原液とする。

細菌数(生菌数)の測定に関しては、1平板に30~300の集落がえられるように滅菌リン酸緩衝希釈水で試料原液を段階希釈したものを試料とし、大腸菌群の試験に関しては、試料原液を試料とする。

(略)

(3) 加熱後摂取冷凍食品であって、凍結させる直前に加熱されたもの以外のものは、細菌数(生菌数)が検体1gにつき3,000,000以下で、かつ、E. coli が陰性でなければならない。この場合の細菌数(生菌数)の測定法及びE. coli の試験法は、次のとおりとする。

1. 検体の採取及び試料の調製

(1)の1. に準じて行う。この場合において、E.coli の試験に関しては、試料原液を試料とする。

(略)

3. E.coli の試験法

試料を 1ml ずつ 3 本の E.C. はっ酵管(第 1 食品の部 D 各条の項の○生食用かきの 1 生食用 かきの成分規格の(3)の 3. に規定するものをいう。)に接種し、恒温水槽を用いて 44.5° (上下 0.2° の余裕を認める。)で 24 時間(前後 2 時間の 余裕を認める。以下この目において同じ。)培養する。その際、ガス発生を認めた試料は、推定試験陽性とし、ガス発生を認めないものは、推定試験陰性とする。

推定試験が陽性の場合、当該 E.C. はっ酵管より 1 白金耳を E・M・B・培養基にかく線し、35° (上下 1.0° の余裕を認める。以下この目において同じ。)で 24 時間培養した後、E.coli の定型的集落(定型的集落がない場合は、定型的集落 に類似した集落 2 以上)を釣菌して、乳糖ブイオンはっ酵管及び寒天斜面にそれぞれ移植する(定型的集落に類似した集落を釣菌した場合は、各集落から釣菌し たもの別にそれぞれ移植する。)。

乳糖ブイオンはっ酵管は 35° で 48 時間(前後 3 時間の余裕を認める。)、寒天斜面は 35° で 24 時間培養し、乳糖ブイオンはっ酵管においてガス発生を確認した場合に、これと相対する寒天斜面について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合を E.coli 陽性とする。

U.S. Food & Drug Administration
Center for Food Safety & Applied Nutrition

Bacteriological Analytical Manual Online

September 2002

Chapter 4

Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria

Authors

[Return to Table of Contents](#)

Chapter Contents

- [Conventional Method for Determining Coliforms and *E. coli*](#)
- [LST-MUG Method for Detecting *E. coli* in Chilled or Frozen Foods Exclusive of Bivalve Molluscan Shellfish](#)
- [Bottled Water](#)
- [Examination of Shellfish and Shellfish Meats](#)
- [Analysis for *E. coli* in citrus juices](#)
- [Other Methods for Enumerating Coliforms and *E. coli*](#)
- [References](#)

Escherichia coli, originally known as *Bacterium coli commune*, was identified in 1885 by the German pediatrician, Theodor Escherich (14, 29). *E. coli* is widely distributed in the intestine of humans and warm-blooded animals and is the predominant facultative anaerobe in the bowel and part of the essential intestinal flora that maintains the physiology of the healthy host (9, 29). *E. coli* is a member of the family *Enterobacteriaceae* (15), which includes many genera, including known pathogens such as *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. Although most strains of *E. coli* are not regarded as pathogens, they can be opportunistic pathogens that cause infections in immunocompromised hosts. There are also pathogenic strains of *E. coli* that when ingested, causes gastrointestinal illness in healthy humans (see Chap. 4A).

In 1892, Shardingier proposed the use of *E. coli* as an indicator of fecal contamination. This was based on the premise that *E. coli* is abundant in human and animal feces and not usually found in other niches. Furthermore, since *E. coli* could be easily detected by its ability to ferment glucose (later changed to lactose), it was easier to isolate than known gastrointestinal pathogens. Hence, the presence of *E. coli* in food or water became accepted as indicative of recent fecal contamination and the possible presence of frank pathogens. Although the concept of using *E. coli* as an indirect indicator of health risk was sound, it was complicated in practice, due to the presence of other enteric bacteria like *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Enterobacter* that can also ferment lactose and are similar to *E. coli* in phenotypic characteristics, so that they are not easily distinguished. As a result, the term "coliform" was coined to describe this group of enteric bacteria. Coliform is not a taxonomic classification but rather a working definition used to describe a group of Gram-negative, facultative anaerobic rod-shaped bacteria that ferments

lactose to produce acid and gas within 48 h at 35°C. In 1914, the U.S. Public Health Service adopted the enumeration of coliforms as a more convenient standard of sanitary significance.

Although coliforms were easy to detect, their association with fecal contamination was questionable because some coliforms are found naturally in environmental samples (6). This led to the introduction of the fecal coliforms as an indicator of contamination. Fecal coliform, first defined based on the works of Eijkman (12) is a subset of total coliforms that grows and ferments lactose at elevated incubation temperature, hence also referred to as thermotolerant coliforms. Fecal coliform analyses are done at 45.5°C for food testing, except for water, shellfish and shellfish harvest water analyses, which use 44.5°C (1, 3, 30). The fecal coliform group consists mostly of *E. coli* but some other enterics such as *Klebsiella* can also ferment lactose at these temperatures and therefore, be considered as fecal coliforms. The inclusion of *Klebsiella* spp in the working definition of fecal coliforms diminished the correlation of this group with fecal contamination. As a result, *E. coli* has reemerged as an indicator, partly facilitated by the introduction of newer methods that can rapidly identify *E. coli*.

Currently, all 3 groups are used as indicators but in different applications. Detection of coliforms is used as an indicator of sanitary quality of water or as a general indicator of sanitary condition in the food-processing environment. Fecal coliforms remain the standard indicator of choice for shellfish and shellfish harvest waters; and *E. coli* is used to indicate recent fecal contamination or unsanitary processing. Almost all the methods used to detect *E. coli*, total coliforms or fecal coliforms are enumeration methods that are based on lactose fermentation (4). The Most Probable Number (MPN) method is a statistical, multi-step assay consisting of presumptive, confirmed and completed phases. In the assay, serial dilutions of a sample are inoculated into broth media. Analysts score the number of gas positive (fermentation of lactose) tubes, from which the other 2 phases of the assay are performed and then uses the combinations of positive results to consult a statistical tables (Appendix 2), to estimate the number of organisms present. Typically only the first 2 phases are performed in coliform and fecal coliform analysis, while all 3 phases are done for *E. coli*. The 3-tube MPN test is used for testing most foods. The 5-tube MPN is used for water, shellfish and shellfish harvest water testing and there is also a 10-tube MPN method that is used to test bottled water or samples that are not expected to be highly contaminated (3).

There is also a solid medium plating method for coliforms that uses Violet Red Bile Agar, which contains neutral red pH indicator, so that lactose fermentation results in formation of pink colonies. There are also membrane filtration tests for coliform and fecal coliform that measure aldehyde formation due to fermentation of lactose. This chapter also includes variations of above tests that use fluorogenic substrates to detect *E. coli* (18), special tests for shellfish analysis, a brief consideration of bottled water testing and a method for testing large volumes of citrus juices for presence of *E. coli* in conjunction with the Juice HACCP rule.

I. Conventional Method for coliforms, fecal coliforms and *E. coli*

A. Equipment and materials

1. Covered water bath, with circulating system to maintain temperature of $45.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Water level should be above the medium in immersed tubes.
2. Immersion-type thermometer, $1\text{--}55^\circ\text{C}$, about 55 cm long, with 0.1°C subdivisions, certified by National Institute of Standards and Technology (NIST), or equivalent
3. Incubator, $35 \pm 1.0^\circ\text{C}$
4. Balance with capacity of ≥ 2 kg and sensitivity of 0.1 g

5. Blender and blender jar (**see** Chapter 1)
6. Sterile graduated pipets, 1.0 and 10.0 mL
7. Sterile utensils for sample handling (**see** Chapter 1)
8. Dilution bottles made of borosilicate glass, with polyethylene screw caps equipped with Teflon liners. Commercially prepared dilution bottles containing sterile Butterfield's phosphate buffer can also be used.
9. Quebec colony counter, or equivalent, with magnifying lens
10. Longwave UV light [~365 nm], not to exceed 6 W.
11. pH meter

B. Media and Reagents

Brilliant green lactose bile (BGLB) broth, 2% (M25)

Lauryl tryptose (LST) broth (M76)

EC broth (M49)

Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar (M80)

Tryptone (tryptophane) broth (M164)

MR-VP broth (M104)

Koser's citrate broth (M72)

Plate count agar (PCA) (standard methods) (M124)

Butterfield's phosphate-buffered water (R11) or equivalent diluent (except for shellfish)

Kovacs' reagent (R38)

Voges-Proskauer (VP) reagents (R89)

Gram stain reagents (R32)

Methyl red indicator (R44)

Violet red bile agar (VRBA) (M174)

VRBA-MUG agar (M175)

EC-MUG medium (M50)

Lauryl tryptose MUG (LST-MUG) broth (M77)

Peptone Diluent, 0.1% (R56)

C. MPN - Presumptive test for coliforms, fecal coliforms and *E. coli*

Weigh 50 g food into sterile high-speed blender jar. (see Chapter 1 and current FDA compliance programs for instructions on sample size and compositing) Frozen samples

can be softened by storing it for ≤ 18 h at $2-5^{\circ}\text{C}$, but do not thaw. Add 450 mL of Butterfield's phosphate-buffered water and blend for 2 min. If <50 g of sample are available, weigh portion that is equivalent to half of the sample and add sufficient volume of sterile diluent to make a 1:10 dilution. The total volume in the blender jar should completely cover the blades.

Prepare decimal dilutions with sterile Butterfield's phosphate diluent. Number of dilutions to be prepared depends on anticipated coliform density. Shake all suspensions 25 times in 30 cm arc or vortex mix for 7 s. Do not use pipets to deliver $<10\%$ of their total volume. Transfer 1 mL portions to 3 LST tubes for each dilution for at least 3 consecutive dilutions. Hold pipet at angle so that its lower edge rests against the tube. Let pipet drain 2-3 s. Not more than 15 min should elapse from time the sample is blended until all dilutions are inoculated in appropriate media.

NOTE: Use 5-tube MPN for analysis of shellfish and shellfish harvest waters.

Incubate LST tubes at 35°C . Examine tubes and record reactions at 24 ± 2 h for gas, i.e., displacement of medium in fermentation vial or effervescence when tubes are gently agitated. Re-incubate gas-negative tubes for an additional 24 h and examine and record reactions again at 48 ± 2 h. Perform confirmed test on all presumptive positive (gas) tubes.

D. MPN - Confirmed test for coliforms

From each gassing LST tube, transfer a loopful of suspension to a tube of BGLB broth, avoiding pellicle if present. Incubate BGLB tubes at 35°C and examine for gas production at 48 ± 2 h. Calculate most probable number (MPN) (see Appendix 2) of coliforms based on proportion of **confirmed** gassing LST tubes for 3 consecutive dilutions.

E. MPN - Confirmed test for fecal coliforms and *E. coli*

From each gassing LST tube from the Presumptive test, transfer a loopful of each suspension to a tube of EC broth (a sterile wooden applicator stick may also be used for these transfers). Incubate EC tubes 24 ± 2 h at 45.5°C and examine for gas production. If negative, reincubate and examine again at 48 ± 2 h. Use results of this test to calculate fecal coliform MPN. To continue with *E. coli* analysis, proceed to Section F below. The EC broth MPN method may be used for seawater and shellfish since it conforms to recommended procedures (1). (Caution: see Note below).

NOTE: Fecal coliform analyses are done at $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ for all foods, except for water testing and in shellfish and shellfish harvest water analysis, which uses an incubation temperature of $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

F. MPN - Completed test for *E. coli*.

To perform the Completed test for *E. coli*, gently agitate each gassing EC tube and streak for isolation, a loopful to a L-EMB agar plate and incubate for 18-24 h at 35°C . Examine plates for suspicious *E. coli* colonies, i.e., dark centered and flat, with or without metallic sheen. Transfer up to 5 suspicious colonies from each L-EMB plate to PCA slants incubate for 18-24 h at 35°C and use for further testing.

NOTE: Identification of any 1 of the 5 colonies as *E. coli* is sufficient to regard that EC tube as positive; hence, not all 5 isolates may need to be tested.

Perform Gram stain. All cultures appearing as Gram-negative, short rods should be tested for the IMViC reactions below and also re-inoculated back into LST to confirm gas production.

Indole production. Inoculate tube of tryptone broth and incubate 24 ± 2 h at 35°C . Test for indole by adding 0.2-0.3 mL of Kovacs' reagent. Appearance of distinct red color in upper layer is positive test.

Voges-Proskauer (VP)-reactive compounds. Inoculate tube of MR-VP broth and incubate 48 ± 2 h at 35°C . Transfer 1 mL to 13 x 100 mm tube. Add 0.6 mL α -naphthol solution and 0.2 mL 40% KOH, and shake. Add a few crystals of creatine. Shake and let stand 2 h. Test is positive if eosin pink color develops.

Methyl red-reactive compounds. After VP test, incubate MR-VP tube additional 48 ± 2 h at 35°C . Add 5 drops of methyl red solution to each tube. Distinct red color is positive test. Yellow is negative reaction.

Citrate. Lightly inoculate tube of Koser's citrate broth; avoid detectable turbidity. Incubate for 96 h at 35°C . Development of distinct turbidity is positive reaction.

Gas from lactose. Inoculate a tube of LST and incubate 48 ± 2 h at 35°C . Gas production (displacement of medium from inner vial) or effervescence after gentle agitation is positive reaction.

Interpretation: All cultures that (a) ferment lactose with gas production within 48 h at 35°C , (b) appear as Gram-negative nonsporeforming rods and (c) give IMViC patterns of ++- (biotype 1) or +-- (biotype 2) are considered to be *E. coli*. Calculate MPN (see Appendix 2) of *E. coli* based on proportion of EC tubes in 3 successive dilutions that contain *E. coli*.

NOTE: Alternatively, instead of performing the IMViC test, use API20E or the automated VITEK biochemical assay to identify the organism as *E. coli*. Use growth from the PCA slants and perform these assays as described by the manufacturer.

G. Solid medium method - Coliforms

Prepare and autoclave violet red bile agar (VRBA) according to manufacturer's instructions. Cool to 48°C before use. Prepare, homogenize, and decimally dilute sample as described in section I. C above so that isolated colonies will be obtained when plated. Transfer two 1 mL aliquots of each dilution to petri dishes, and use either of the following two pour plating methods, depending on whether injured or stressed cells are suspected to be present (1).

Pour 10 mL VRBA tempered to 48°C into plates, swirl plates to mix, and let solidify. To prevent surface growth and spreading of colonies, overlay with 5 mL VRBA, and let solidify. If resuscitation is necessary, pour a basal layer of 8-10 mL of tryptic soy agar tempered to 48°C . Swirl plates to mix, and incubate at room temperature for 2 ± 0.5 h. Then overlay with 8-10 mL of melted, cooled VRBA and let solidify.

Invert solidified plates and incubate 18-24 h at 35°C . Incubate dairy products at 32°C (2). Examine plates under magnifying lens and with illumination. Count purple-red colonies that are 0.5 mm or larger in diameter and surrounded by zone of precipitated bile acids. Plates should have 25-250 colonies. To confirm that the colonies are coliforms, pick at least 10 representative colonies and transfer each to a tube of BGLB broth. Incubate tubes at 35°C . Examine at 24 and 48 h for gas production.

NOTE: If gas-positive BGLB tube shows a pellicle, perform Gram stain to ensure that gas production was not due to Gram-positive, lactose-fermenting bacilli.

Determine the number of coliforms per gram by multiplying the number of suspect colonies

by percent confirmed in BGLB by dilution factor.

Alternatively, *E. coli* colonies can be distinguished among the coliform colonies on VRBA by adding 100 µg of 4-methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) per mL in the VRBA overlay. After incubation, observe for bluish fluorescence around colonies under longwave UV light. (see LST-MUG section II for theory and applicability.)

H. Membrane Filtration (MF) Method - coliforms: see Section III. Bottled Water.

NOTE: Food homogenates will easily clog filters, hence MF are most suitable for analysis of water samples; however, MF may be used in the analysis of liquid foods that do not contain high levels of particulate matter.

II. LST-MUG Method for Detecting *E. coli* in Chilled or Frozen Foods Exclusive of Bivalve Molluscan Shellfish

The LST-MUG assay is based on the enzymatic activity of β-glucuronidase (GUD), which cleaves the substrate 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide (MUG), to release 4-methylumbelliferone (MU). When exposed to longwave (365 nm) UV light, MU exhibits a bluish fluorescence that is easily visualized in the medium or around the colonies. Over 95% of *E. coli* produces GUD, including anaerogenic (non-gas-producing) strains. One exception is enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) of serotype O157:H7, which is consistently GUD negative (11, 17). The lack of GUD phenotype in O157:H7 is often used to differentiate this serotype from other *E. coli*, although GUD positive variants of O157:H7 do exist (24, 26). The production of GUD by other members of the family *Enterobacteriaceae* is rare, except for some shigellae (44-58%) and salmonellae (20-29%) (18, 27). However, the inadvertent detection of these pathogens by GUD-based assays is not considered a drawback from a public health perspective. Expression of GUD activity is affected by catabolite repression (8) so on occasion, some *E. coli* are GUD-negative, even though they carry the *uidA* gene (*gusA*) that encodes for the enzyme (19). In most analyses however, about 96% of *E. coli* isolates tested are GUD-positive without the need for enzyme induction (27).

MUG can be incorporated into almost any medium for use in detecting *E. coli*. But some media such as EMB, which contain fluorescent components, are not suitable, as they will mask the fluorescence of MU. When MUG is incorporated into LST medium, coliforms can be enumerated on the basis of gas production from lactose and *E. coli* are presumptively identified by fluorescence in the medium under longwave UV light, thus it is capable of providing a presumptive identification of *E. coli* within 24 h (18, 28). The LST-MUG method described below has been adopted as Official Final Action by the AOAC for testing for *E. coli* in chilled or frozen foods, exclusive of shellfish (28). For information on MUG assay contact Dr. Peter Feng, FDA, CFSAN, College Park, MD, 20740; 301-436-1650; pfeng@cfssan.fda.gov.

CAUTION: To observe for fluorescence, examine inoculated LST-MUG tubes under longwave (365 nm) UV light in the dark. A 6-watt hand-held UV lamp is adequate and safe. When using a more powerful UV source, such as a 15-watt fluorescent lamp, wear protective glasses or goggles. Also, prior to use in MUG assays, examine all glass tubes for auto fluorescence. Cerium oxide, which is sometimes added to glass as a quality control measure, will fluoresce under UV light and interfere with the MUG test (25). The use of positive and negative control strains for MUG reaction is essential.

- 1. Equipment and material:** see section I.A above and in addition,
New, disposable borosilicate glass tubes (100 x 16 mm)
New, disposable borosilicate glass Durham vials (50 x 9 mm) for gas collection.
Longwave UV lamp, 6-watt or equivalent
- 2. Media and reagents:** see section I.B above

3. Presumptive LST-MUG test for *E. coli*.

Prepare food samples and perform the MPN Presumptive test as described in section I.C. above, except use LST-MUG tubes instead of LST. Be sure to inoculate one tube of LST-MUG with a known GUD-positive *E. coli* isolate as positive control (ATCC 25922). In addition, inoculate another tube with a culture of *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) as negative control, to facilitate differentiation of sample tubes that show only growth from those showing both growth and fluorescence. Incubate tubes for 24 to 48 ± 2 h at 35°C. Examine each tube for growth (turbidity, gas) then examine tubes in the dark under longwave UV lamp (365 nm). A bluish fluorescence is a positive presumptive test for *E. coli*. Studies by Moberg et al. (28) show that a 24 h fluorescence reading is an accurate predictor of *E. coli* and can identify 83-95% of the *E. coli*-positive tubes. After 48 h of incubation, 96-100% of *E. coli*-positive tubes can be identified (28). Perform a confirmed test on all presumptive positive tubes by streaking a loopful of suspension from each fluorescing tube to L-EMB agar and incubate 24 ± 2 h at 35°C. Follow protocols outlined in I. F, above, for Completed test for *E. coli*. Calculate MPN of *E. coli* based on combination of confirmed fluorescing tubes in 3 successive dilutions.

III. Examination of Bottled Water

Consumption of bottled water is increasing rapidly worldwide. In the U.S. alone, over 3.6 billion gallons of bottled water were consumed in 1998 (International Bottled Water Association, Alexandria, VA). Unlike potable water, which is regulated by the U.S. EPA, bottled water is legally classified as food in the U.S. and regulated by the FDA (Federal Register. 1995. 21 CFR Part 103 et al. beverages: bottled water; final rule. 60(218) 57076-57130). FDA defines bottled water as "water that is intended for human consumption and that is sealed in bottles or other containers with no added ingredients except that it may contain safe and suitable antimicrobial agents" and, within limitations, some added fluoride. Bottled water may be used as a beverage by itself or as an ingredient in other beverages. These regulations do not apply to soft drinks or similar beverages. In addition to "bottled water" or "drinking water", in 21 CFR Part 103 FDA also defines various types of bottled water that meet certain criteria. These identities include "artesian or artesian well water", "ground water", "mineral water", "purified or demineralized water", "sparkling bottled water", "spring water" and "well water". Additionally "sterile water" is defined as water that meets the requirements under the "Sterility Test" in the United States Pharmacopeia.

Coliform organisms are not necessarily pathogens and are rarely found in bottled water, however, they serve as an indicator of insanitation or possible contamination. Surveys have shown that coliforms are useful indicators of bottled water quality, but some countries also monitor additional microbial populations as indicators of bottle water quality (10, 33). Under the current bottled water quality standard, FDA has established a microbiological quality requirement that is based on coliform detection levels. These levels may be obtained by membrane filtration (MF) or by 10-tube MPN analysis of ten 10-mL analytical units. For information on bottled water methods contact Dr. Peter Feng, FDA, CFSAN, College Park, MD, 20740; 301-436-1650; pfeng@cfsan.fda.gov.

1. Equipment and Materials.

- a. Incubator at 35° ± 0.5°C.
- b. Membrane filtration units (filter base and funnels): glass, plastic, or stainless steel; wrapped in foil or paper and sterilized.
- c. Ultraviolet sterilization chamber for sterilizing filter base and funnels (optional).
- d. Filter manifold or vacuum flask to hold filter funnels.

- e. Vacuum source (line vacuum, electric vacuum pump or water aspirator).
- f. Membrane filters; sterile, white, gridded, 47 mm diameter, 0.45 µm pore size (or equivalent, as specified by the manufacturer) for enumeration of bacteria.
- g. Petri dishes, sterile, plastic, 50 x 12 mm, with tight fitting lids.
- h. Forceps designed to transfer membranes without damage.

2. Culture media.

- a. Lauryl sulfate tryptose (LST) broth (M-76).
- b. Brilliant green lactose bile broth (BGLB) (M-25).
- c. M-Endo medium or LES Endo Agar (for formulation see Standard Method for Examination of Water and Wastewater, 1998, 20th ed, p. 9-58 (3)).

3. Ten tube MPN coliform test - Presumptive and Confirmed procedures.

For routine examination of bottled water, take 100 mL of sample and inoculate 10 tubes of 2X LST (10 mL of medium) with 10 mL of undiluted sample each. Incubate tubes at 35°C. Examine tubes at 24 ± 2 h for growth and gas formation as evidenced by displacement of medium in fermentation vial or effervescence when tubes are gently agitated. If negative at 24 h, reincubate tubes for an additional 24 h and examine again for gas. Perform a confirmed test on all presumptive positive (gassing) tubes as follows: gently agitate each positive LST tube and, using a 3.0 - 3.5 mm sterile loop, transfer one or more loopfuls of suspension to a tube of BGLB broth. Sterile wooden applicator sticks may also be used for transfer by inserting it at least 2.5 cm into the broth culture. Incubate BGLB tubes for 48 ± 2 h at 35°C. Examine for gas production and record. Calculate MPN using 10 tube MPN Table (9221.III), p. 9-52, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (3).

4. Membrane filter method for coliforms.

Filter 100 mL of test sample and transfer the filter to M-Endo medium or LES Endo Agar and incubate at 35 °C for 22-24 h. Count colonies that are pink to dark red with a green metallic surface sheen. The sheen may vary from pinpoint to complete coverage of the colony. Use of a low power, dissecting-type microscope to examine filters is recommended.

Confirmation - If there are 5 to 10 sheen colonies on the filter, confirm all by inoculating growth from each sheen colony into tubes of LST and incubate at 35 °C for 48 h. If the number of sheen colonies exceeds 10, randomly select and confirm 10 colonies that are representative of all sheen colonies. Any gas positive LST tubes should be sub cultured to BGLB and incubated at 35°C for 48 hr. Gas production in BGLB within 48 h is a confirmed coliform test. Report results as number of coliform colonies per 100 mL.

NOTE: Standard Method, 1998, 20th ed, p. 9-60 (3), allows for simultaneous inoculation of LST and BGLB during verification. However, BGLB is somewhat inhibitory so the method described above, where samples are sub cultured from LST into BGLB is regarded as a more sensitive verification assay and therefore, recommended.

IV. Examination of Shellfish and Shellfish Meats

The official FDA procedure for bacteriological analysis of domestic and imported bivalve molluscan shellfish is fully and properly described in the APHA's *Recommended Procedures the Examination of Sea Water and Shellfish*, 4th ed. 1970 (1). The methods, including the

conventional 5-tube MPN for coliform, fecal coliform and standard total plate count for bacteria (see [Chapter 3](#)), are described below for examining shell stock, fresh-shucked meats, fresh-shucked frozen shellfish, and shellfish frozen on the half shell. These procedures do not apply to the examination of crustaceans (crabs, lobsters, and shrimp) or to processed shellfish meats such as breaded, shucked, pre-cooked, and heat-processed products. Also, many methods that are used for testing for environmental water or for shellfish harvest waters will not be covered here. Environmental water analyses are done by the U.S. EPA ([3](#)) and the quality of shellfish harvest waters are mainly the responsibilities of each State's Shellfish Control Authorities ([20](#)).

1. Sample Preparation

Using 10-12 shellfish, obtain 200 g of shellfish liquor and meat. Blend 2 min, with 200 mL sterile phosphate buffered dilution water or 0.5% peptone water to yield a 1:2 dilution of sample. Analysis of the ground sample must begin within 2 min after blending. Make serial dilutions in 0.5% sterile peptone water or sterile phosphate buffered dilution water.

2. MPN - Presumptive and Confirmed Test for Coliform

Use Lactose Broth (M74) or Lauryl Tryptose Broth (M76), at single strength in 10 ml volumes. Inoculate as follows:

- a. To each of 5 tubes, add 2 mL of the blended homogenate (equivalent to 1 g of shellfish).
- b. To each of 5 tubes, add 2 mL of 1:10 dilution of homogenate (0.1 g shellfish).
- c. To each of 5 tubes, add 2 mL of 1:100 dilution of homogenate (0.01 g shellfish).
- d. To each of 5 tubes, add 2 mL of 1:1000 dilution of homogenate (0.001 g shellfish).

Further dilutions may be necessary to avoid indeterminate results. Incubate tubes at 35°C then follow instructions in section 1.C and perform Confirmed test as in 1.D above, under "Conventional Method for Coliforms, fecal coliforms and *E. coli*". Calculate MPN as described in section 1.D above, except that shellfish analysis specifies that the coliform density be expressed as MPN per 100 g of sample rather than per g.

3. MPN - Presumptive and Confirmed Test for Fecal Coliforms in Shellfish

Perform presumptive test as described in section 2 above. To confirm positive tubes, transfer one loopful from gas positive LST tubes to EC broth and incubate in a covered circulating waterbath at 44.5±0.2°C for 24 ± 2 hr. Gas production in EC is a positive confirmed test for fecal coliforms. Calculate the MPN for fecal coliforms as described above for coliform.

4. MPN - EC-MUG Method for Determining *E. coli* in Shellfish Meats

The MUG assay for β -glucuronidase (GUD) described above for detecting *E. coli* in chilled and frozen food can also be used for testing for *E. coli* in shellfish meats; but with slight modifications. This is due to the fact that foods, such as shellfish meats contain natural GUD activity ([32](#)). As a result, oyster homogenate inoculated directly into LST-MUG tubes in the Presumptive phase of the MPN test can cause false positive fluorescence reactions. Hence, in the analysis of *E. coli* in shellfish meats, the MUG reagent is added to the EC medium and used in the confirmatory phase of the assay. The EC-MUG tubes, incubated at 44.5°C, can be used in the confirmatory phase of a conventional 5-tube MPN assay to determine fecal coliform levels in shellfish meats, then by examining tubes for fluorescence

under longwave UV, an *E. coli* MPN can also be readily obtained (32).

See section 1.A and 1.B above for materials and reagents required. Use commercially prepared dehydrated EC-MUG, or prepare medium by adding MUG to EC broth (0.05 g/L) (M50). Several sources of MUG compound are suitable: Marcor Development Corp., Hackensack, NJ; Biosynth International, Skokie, IL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO and Hach Chemical, Loveland, CO. Dispense 5 mL into new disposable borosilicate glass tubes (100 x 16 mm) containing, new disposable borosilicate glass Durham vials (50 x 9 mm) for gas collection. Sterilize EC-MUG broth tubes at 121°C for 15 min; store up to 1 week at room temperature or up to a month under refrigeration.

Perform the 5-tube MPN Presumptive and Confirmed Test for Fecal Coliforms in Shellfish as described above in Section 3, except use EC-MUG tubes instead of EC for the confirmed test. Determination of fluorescence in EC-MUG broth requires the use of 3 control tubes, one inoculated with *E. coli* as positive control; one with *K. pneumoniae* as negative control; and an uninoculated tube as EC-MUG medium batch control. Inoculate the positive and negative controls at the time when Confirmed test is being performed and incubate all tubes at 44.5°C ± 0.2°C for 24 h.

Read fluorescence as described above under LST-MUG assay. Note that some (<10%) *E. coli* are anaerogenic (gas-negative), but should be MUG-positive. Include all fluorescence positive tubes in the *E. coli* MPN calculations. Determine *E. coli* MPN from tables using combination of fluorescence positive tubes at each dilution.

V. Analysis for *E. coli* in citrus juices

Analysis for *E. coli* has been implemented to identify potentially contaminated juices or for verifying the effectiveness of HACCP during processing of unpasteurized juices (21 CFR Part 120, Vol. 66, No. 13, January 19, 2001). The standard method commonly used for testing for *E. coli* is the MPN however, it does not seem adequate for juice testing because of the acidity (pH 3.6 to 4.3) of juices, which can interfere with the test, plus it only allows for testing 3.33 mL of sample. Unlike most *E. coli* methods, which are enumeration assays, the following method is a simple Presence/Absence test that can examine 10-mL volume of juices (34, 35). This assay, designated as modified ColiComplete (CC) Method, is a modification of AOAC Official Method 992.30, which uses MUG for detection of *E. coli* (see Section on LST-MUG Method for details).

1. Equipment and materials

- Covered water bath, with circulating system to maintain temperature of 44.5 ± 0.2°C. Water level should be above the medium in immersed tubes.
- Incubator, 35 ± 0.5°C
- Longwave UV light [~365 nm], not to exceed 6 W.

2. Media and reagents:

Universal Preenrichment Broth (UPEB) (M188) or can be purchased from Difco Laboratories, Detroit, MI

EC medium (M49)

ColiComplete (CC) discs - Biocontrol, Bellevue, WA

3. Sample preparation, enrichment and analysis

Perform assay in duplicate. Aseptically, inoculate 10-mL portion of juice into 90 mL of UPEB and incubate at 35°C for 24 h. After enrichment, mix and transfer 1-mL from each UPEB enrichment broth into 9 mL of EC broth containing a CC disc. Incubate EC/CC broth tubes at 44.5°C in a circulating water bath for 24 h. Include a tube inoculated with a MUG (+) *E. coli* strain as positive control and another with *K. pneumoniae* as negative control. Examine tubes in the dark and under long wave UV light. The presence of blue fluorescence in either tube is indicative that *E. coli* is present in the sample. Note: The CC discs also contain X-gal, which when cleaved by β -galactosidase will yield blue color on or around the disc. This reaction is analogous to measuring acid/gas production from fermentation of lactose hence, the presence of blue color is indicative of coliforms.

VI. Other Methods for Enumerating Coliforms and *E. coli*

For information and reference purposes there is a Table in Appendix I, which contains a partial listing of commercially-available assays, many of which uses fluorogenic reagents like MUG or other chromogenic substrates for presumptive detection and identification of coliform and *E. coli* in foods. Many of these tests, such as the Petrifilm dry rehydratable film, the hydrophobic grid membrane filter/MUG (HGMF/MUG) method (13), ColiComplete disc (16), etc, have been evaluated by collaborative studies and adopted as official first or final action by the AOAC. There are also many modifications of the membrane filtration assays that have been developed for testing for coliform, fecal coliform and *E. coli* and some of these may be useful in testing foods such as milk and beverages, but they are used mostly for water, environmental waters, and shellfish harvest waters analysis (5, 7, 20, 22, 23, 31).

References

1. American Public Health Association. 1970. Recommended Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 4th ed. APHA, Washington, DC.
2. American Public Health Association. 1992. In: Marshall, R.T. (ed). Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed. APHA, Washington, DC.
3. American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. APHA, Washington, DC.
4. American Public Health Association. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. APHA, Washington, DC.
5. Brenner, K. P., C. C. Rankin, M. Sivaganesan, and P.V. Scarpino. 1996. Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by the M1 agar method and the U.S. Environmental protection agency-approved membrane filter method. Appl. Environ. Microbiol. 62:203-208.
6. Caplenas, N.R. and M.S. Kanarek. 1984. Thermotolerant non-fecal source *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal coliform test in recreational waters. Am. J. Public Health. 74:1273-1275
7. Ciebin, B.W., M.H. Brodsky, R. Eddington, G. Horsnell, A. Choney, G. Palmateer, A. Ley, R. Joshi, and G. Shears. 1995. Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water. Appl. Environ. Microbiol. 61:3940-3942.
8. Chang, G.W., J. Brill, and R. Lum. 1989. Proportion of beta-glucuronidase-negative *Escherichia coli* in human fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 55:335-339.

9. Conway, P.L. 1995. Microbial ecology of the human large intestine. In: G.R. Gibson and G.T. Macfarlane, eds. p.1-24. Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology, and pathology. CRC Press, Boca Raton, FL.
10. Dege, N.J. 1998. Categories of bottled water. Chapter 3, In: D.A.G. Senior and P. R. Ashurst (ed). Technology of Bottled Water. CRC Press, Boca Raton, Florida.
11. Doyle, M.P. and J.L. Schoeni. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats and poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53:2394-2396.
12. Eijkman, C. 1904. Die garungsprobe bei 46° als hilfsmittel bei der trinkwasseruntersuchung. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig. 37:742.
13. Entis, P. 1989. Hydrophobic grid membrane filter/MUG method for total coliform and *Escherichia coli* enumeration in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72:936-950.
14. Escherich, T. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. Fortshr. Med. 3:5-15-522, 547-554.
15. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier, New York.
16. Feldsine, P.T., M.T. Falbo-Nelson, and D.L. Hustead. 1994. ColiComplete Substrate-supporting disc method for confirmed detection of total coliforms and *Escherichia coli* in all foods: comparative study. J. AOAC 77:58-63.
17. Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence phenotypic variants. Emerging Infectious Dis. 1:16-21.
18. Feng, P.C.S. and P.A. Hartman. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329.
19. Feng, P., R. Lum, and G. Chang. 1991. Identification of *uidA* gene sequences in beta-D-glucuronidase (-) *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 57:320-323.
20. FDA. 1998. Fish and Fisheries Products Hazards and Control Guide. 2nd ed. Office of Seafood, CFSAN, U.S. FDA, Public Health Service, Dept. Health and Human Services, Washington DC.
21. Frampton, E.W. and L. Restaino. 1993. Methods for *E. coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. J. Appl. Bacteriol. 74:223-233.
22. Geissler, K., M. Manafi, I. Amoros, and J.L. Alonso. 2000. Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. J. Appl. Microbiol. 88:280-285.
23. Grant, M.A. 1997. A new membrane filtration medium for simultaneous detection and enumeration of *Escherichia coli* and total coliforms. Appl. Environ. Microbiol. 63:3526-4530.
24. Gunzer, F., H. Bohm, H. Russmann, M. Bitzan, S. Aleksic, and H. Karch. 1992. Molecular detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 30:1807-10.
25. Hartman, P.A. 1989. The MUG (glucuronidase) test for *Escherichia coli* in food and water, pp. 290-308. In: Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. A. Balows,

R.C. Tilton, and A. Turano (eds). Brixia Academic Press, Brescia, Italy.

26. Hayes, P.S., K. Blom, P. Feng, J. Lewis, N.A. Strockbine, and B. Swaminathan. 1995. Isolation and characterization of a β -D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* O157:H7 in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 33:3347-3348.
27. Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *Int. J. Food Microbiol.* 31:45-58.
28. Moberg, L.J., M.K. Wagner, and L.A. Kellen. 1988. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and frozen foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:589-602.
29. Neill, M. A., P. I. Tarr, D. N. Taylor, and A. F. Trofa. 1994. *Escherichia coli*. In *Foodborne Disease Handbook*, Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murell, and D. O. Cliver, eds. Marcel Decker, Inc. New York. pp. 169-213.
30. Neufeld, N. 1984. Procedures for the bacteriological examination of seawater and shellfish. In: Greenberg, A.E. and D.A. Hunt (eds). 1984. *Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish*, 5th ed. American Public Health Association. Washington, DC.
31. Rippey, S.R., W.N. Adams, and W.D. Watkins. 1987. Enumeration of fecal coliforms and *E. coli* in marine and estuarine waters: an alternative to the APHA-MPN approach. *J. Water Pollut. Control Fed.* 59:795-798.
32. Rippey, S.R., L.A. Chandler, and W.D. Watkins. 1987. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shellfish. *J. Food Prot.* 50:685-690, 710.
33. Warburton, D.W. 2000. Methodology for screening bottled water for the presence of indicator and pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 17:3-12.
34. Weagant, S.D. and P. Feng. 2001. Comparative evaluation of a rapid method for detecting *Escherichia coli* in artificially contaminated orange juice. *FDA Laboratory Information Bulletin* #4239, 17:1-6.
35. Weagant, S.D. and P. Feng. 2002. Comparative Analysis of a Modified Rapid Presence-Absence Test and the standard MPN Method for Detecting *Escherichia coli* in Orange Juice. *Food Microbiol.* 19:111-115.

Hypertext Source: Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4.
*Authors: Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant
Revised: 2002-September.

Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*

[Top](#)

[Foods Home](#) | [FDA Home](#) | [Search/Subject Index](#) | [Disclaimers & Privacy Policy](#) | [Accessibility/Help](#)

Hypertext updated by kwg/cjm/dav/dvd 2003-DEC-30