

## ウォーターサーバーの細菌学的調査

上原 さとみ<sup>a</sup>, 岸本 泰子<sup>b</sup>, 樋口 容子<sup>a</sup>, 加藤 玲<sup>a</sup>, 千葉 隆司<sup>a</sup>, 平井 昭彦<sup>c</sup>,  
上野 まどか<sup>d</sup>, 唐木田 絃子<sup>d</sup>, 肝付 康人<sup>e,f</sup>, 木村 哲子<sup>e,g</sup>, 仲真 晶子<sup>a</sup>, 甲斐 明美<sup>c</sup>

近年、水を宅配により販売し、専用の機器に設置して冷水あるいは温水として供給するいわゆるウォーターサーバー水が普及してきている。その一方で、保健所に寄せられるペットボトル水及びウォーターサーバー水の苦情件数は増加していることから、ウォーターサーバー水の細菌学的な衛生状況を明らかにすることを目的として、実態調査及び使用試験を行った。

その結果、サーバー使用施設の実態調査において、リターナブル型サーバー未開封ボトル水の7検体中1検体から $10^1$  cfu/mLオーダー、サーバー冷水口の水では27検体すべてから $10^1 \sim 10^4$  cfu/mLオーダーの細菌が検出された。また、ワンウェイ常温型サーバーでは、冷水口の水の2検体から $10^4 \sim 10^5$  cfu/mLオーダーの細菌が検出されたが、ワンウェイ冷蔵型サーバーの冷水口の水の細菌数は7検体すべてが $10^2$  cfu/mL未満であった。

リターナブル型サーバーの使用試験では、冷水口の水から経常的に $10^1 \sim 10^5$  cfu/mLオーダーの細菌が検出された。分離された菌株を16S rDNA塩基配列解析で調べたところ13属に分類され、*Sphingomonas* 属菌、*Caulobacter* 属菌、*Methylobacterium* 属菌が主要な細菌叢であり、腸球菌や緑膿菌は検出されなかった。未開封ボトル水やサーバー本体から検出される細菌と、冷水口の水から検出される細菌叢は共通していたことから、ウォーターサーバー水に混入した細菌は、主に未開封ボトル水やサーバー本体に由来するものと推察された。

**キーワード：**ウォーターサーバー、細菌数、16S rDNA塩基配列解析、PCR、*Sphingomonas* 属、*Caulobacter* 属、*Methylobacterium* 属

### はじめに

近年、大型ボトルに入れた水を宅配により販売し、専用の機器（ウォーターサーバー：以下、サーバー）にセットして冷水あるいは温水として供給するいわゆるウォーターサーバー水（以下、サーバー水）が普及してきている。サーバー水は一般に10～20 L程度のボトル単位で販売され、専用機器にセットし電源を入れると、冷水（5～10℃）あるいは温水（80～90℃）として常時使用可能となる。手軽に冷水や温水を使用できることから、家庭でも普及してきており、2012年における日本の宅配水の市場規模は、5年前の4倍以上に成長している<sup>1)</sup>。

その一方で、都内の消費生活センターに寄せられるサーバーに関する相談件数は、2011年の東日本大震災を境に急増しており<sup>2)</sup>、保健所に寄せられるペットボトル水及びサーバー水の異臭味や浮遊物に関する苦情も近年増加傾向にある。当センター食品細菌研究室においても、平成23年度

から平成24年度の2年間に搬入された苦情検体41検体のうち、サーバー水やミネラルウォーターに関するものは24検体（58.5%）であった。これらの製品のうち清涼飲料水以外の未開封のボトル水には、食品衛生法の清涼飲料水成分規格「大腸菌群陰性」が適用され、非炭酸の無殺菌・無除菌のミネラルウォーターには、さらに「腸球菌陰性」及び「緑膿菌陰性」が適用される。しかしながらサーバーから供給されるサーバー水については、成分規格が適用されず、開封後の水を長期間（1～2週間程度）にわたり使用することから、サーバー水の衛生状態が懸念されてきた。

そこでサーバー水の細菌学的衛生状態を明らかにする目的で、未開封品及び開封し使用状態にあるサーバー水の細菌学的調査を行った。また、2社のサーバーを用いて、サーバー水の細菌学的検査を経時的に行い、その動向を調べた。さらに検出された主要細菌を同定し、その由来を検討した。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科（当時）

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

<sup>d</sup> 東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第一課

<sup>e</sup> 東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第一課（当時）

<sup>f</sup> 現所属：市場衛生検査所

104-0045 東京都中央区築地 5-2-1

<sup>g</sup> 現所属：東京都動物愛護相談センター多摩支所

191-0021 東京都日野市石田 1-192-33

## 実験方法

## 1. 試料

## 1) サーバー水の実態調査 (2010年6月～2011年1月)

東京都内でサーバーを使用している27施設30台（レンタル事業者15社）のサーバーについて調査を行った。使用期間は1ヶ月から10年まで様々であった。サーバーは容器の再利用及び保冷の有無により4つのタイプに分類される。常温で設置した容器を洗浄して繰り返し再利用し、サーバーから冷却した水を供給するタイプ（以下、リターナブル型）が最も多く20施設23台であった（表1）。容器を再利用しないワンウェイタイプでは、容器を冷却した状態で設置し、サーバーから保冷した水を供給するタイプ（以下、ワンウェイ冷蔵型）が6施設6台、容器を常温で設置してサーバーから冷却した水を供給するタイプ（以下、ワンウェイ常温型）は1施設1台であった。

検討した試料は、リターナブル型では、サーバーにセットする前の未開封ボトル水（以下、未開封ボトル水）7検体、サーバーにセットした後に採取したボトルの水（以下、開封済みボトル水）20検体、サーバー冷水口から採取したサーバー水（以下、冷水口）27検体であった。ワンウェイ冷蔵型及びワンウェイ常温型では、冷水口のみ、それぞれ7検体、2検体を試料とした。

## 2) リターナブル型サーバーの使用試験 (2011年6月～2011年12月)

リターナブル型2社（A社及びB社）のサーバーを用いた。サーバーはA社1台（A）、B社2台（B-1、B-2）を事務室（室温21.0～28.3°C）に設置し、通常通りに使用して2週間ごとに未開封ボトルに交換した。サーバーAは新品のため使用履歴がなく、サーバーBは2台とも使用履歴があった。使用条件はAが退庁時から翌登庁時まで電源を切断し、Bは常時通電した。

## (1) ボトル水及びサーバー水

未開封ボトル水39検体、開封済みボトル水39検体、冷水口48検体、及びサーバー温水口（約80～90°Cに設定）から採取した水（以下、温水口）3検体を試料とした。

## (2) ふき取り

使用中のサーバーのウォーターガードのボトル非接触面（図1 D）及びボトル接触面（図1 E）についてふき取りを行った（延べ78検体）。また、使用後のサーバーを分解し、サーバー水と接触する部分及びエアフィルター部分についてもふき取りを行った（延べ49検体）。ふき取り検体は滅菌綿棒で該当箇所を丁寧にふき取った後、滅菌生理食塩水25 mLに懸濁したものを試料とした。

## (3) 落下細菌数

サーバーを設置した室内4か所について落下細菌検査を行った。検査はサーバー設置時とボトル交換時の計15回行い、60検体を試料とした。

## 3) 添加保存試験

サーバー水に由来する細菌の増殖速度を調べることを目

表1. 容器の再利用及び冷却の有無

	容器の再利用	容器の冷却	サーバー内の冷却	施設数 (台数)
リターナブル型	○	×	○	20 (23)
ワンウェイ冷蔵型	×	○	○	6 (6)
ワンウェイ常温型	×	×	○	1 (1)

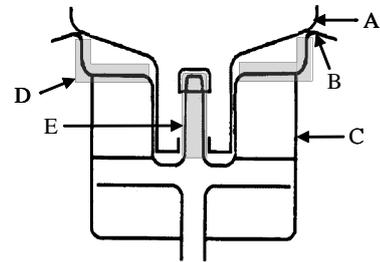
A: ボトル, B: ウォーターガード, C: 冷水タンク  
D: ボトル非接触面, E: ボトル接触面

図1. ウォーターサーバー模式図

的として、A社及びB社の未開封ボトル水、または未開封ボトル水のろ過滅菌水100 mLに、各社の冷水口の水（添加前の細菌数：A社 $3.0 \times 10^3$  cfu/mL、B社 $2.5 \times 10^3$  cfu/mL）を細菌数が約10 cfu/mLとなるように希釈して添加した。添加直後、及び4°Cまたは25°Cで培養した後、24時間ごとに1 mLずつ採取したものを試料とした。

## 2. 検査項目及び方法

実態調査のボトル水及び冷水口については滅菌採水容器に約500mLを採取し、細菌数、従属栄養細菌数、黄色ブドウ球菌及び大腸菌群を、使用試験では、細菌数、従属栄養細菌数、腸球菌及び緑膿菌を調べた。また、温水口及びふき取りは細菌数及び従属栄養細菌数を、添加保存試験では細菌数のみを調べた。

## 1) 細菌数、従属栄養細菌数及び落下細菌数の測定

細菌数は検体原液1 mL及びリン酸緩衝液の10倍段階希釈溶液を用い、標準寒天培地（栄研化学）で混釈し、35°C、48±3時間で培養後、集落数を計測した。従属栄養細菌数については同様にR2A寒天培地（MERCK）で混釈し、20±1°Cで7日間培養後、集落数を計測した。落下細菌数は90 mm φのシャーレに分注した標準寒天培地2枚を測定場所にて20分間暴露後35°Cで24時間培養し、集落数を算定して平均値を落下細菌数とした。

## 2) 黄色ブドウ球菌、大腸菌群、腸球菌及び緑膿菌の検査

黄色ブドウ球菌は7.5%食塩加ブイオン培地12 mLに検体原液1mLを接種して35°C、48時間増菌培養後、卵黄加マンニット食塩寒天培地（栄研化学）に分離し、発育した定型集落をPSラテックス凝集反作用キット（栄研化学）で確認した。大腸菌群、腸球菌及び緑膿菌は清涼飲料水成分規格の試験法<sup>3)</sup>に準拠して検査を行った。

## 3) 検出菌の同定

細菌数、従属栄養細菌数及び落下細菌数測定に用いた標準寒天培地とR2A寒天培地から、コロニーの色調、形態の

なるべく異なる菌株125株を選び、16S rDNA塩基配列解析により同定した。

また、サーバー及びサーバー水から検出された主要な細菌については経時的に出現状況を調査した。

(1) 顕微鏡観察

分離菌株のグラム染色性及び形状については食品衛生検査指針<sup>4)</sup>に準拠して調べた。

(2) DNA塩基配列解析

アルカリ熱抽出法によりDNAを抽出し、大腸菌の16S rDNAの上流側500塩基対を対象として作成されたプライマー9F及び802R<sup>5)</sup>を用いてPCR反応を行った。PCR産物をBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によりシーケンス反応を行った後、BigDye XTerminator 精製キット (Applied Biosystems) により反応産物を精製し、ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列についてBLAST解析を行い、97%以上で最も高い相同性を示したものを属名とした。

(3) PCR法による解析

16S rDNA塩基配列解析は手技が煩雑であり同定までに時間を要するため、サーバー水からの出現頻度の高かった3属 (*Sphingomonas* 属, *Caulobacter* 属, *Methylobacterium* 属) の細菌についてPCR法による属の同定を試みた。16S rDNA塩基配列解析により同じ属と同定された複数菌株の配列から特異性の高い部分を調べ、その部分をターゲットとしてプライマー設計ソフトウェア (Primo Pro 3.4) を用いて4種類のプライマーを設計した (表2)。各プライマーで特異的なバンドが出現した場合にその菌と判定した。

*Caulobacter* 属菌についてはCAU-1/CAU-2プライマー又はCAU-3/CAU-4プライマーで特異的なバンドが出現した場合とした。

アルカリ熱抽出法又はLyse and Go PCR Reagent (Thermo Scientific) によりDNAを抽出し、DNAサーマルサイクラー (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems) を用いてPCR反応を行った。反応条件は95°C, 30秒, 55°C, 30秒, 72°C, 30秒で30サイクルとした。2%アガロースゲルで電気泳動を行い、反応産物の大きさから属名を決定した。

結 果

1. サーバー水の実態調査

リターナブル型において、未開封ボトル水の7検体中1検体 (14%) から10<sup>1</sup> cfu/mLオーダーの細菌が検出された

表2. PCR法に使用したプライマー

プライマー	配列 (5'→3')	属 名	サイズ (bp)
SPH-1	ACTGCCCTTGAGACTGGATTG	<i>Sphingomonas</i> sp.	514
SPH-2	CCAAATGCTGGCAACTAAAGG		
CAU-1	CAGTCTTGAGTACGGAAGAG	<i>Caulobacter</i> sp.	109
CAU-2	GTCAGTAACGGACCATATG		
CAU-3	TCGCCGAAAGCGTGCTAATA		
CAU-4	TAAAGATCGTCGGCTTGGTG		
MET-1	TACTGGGACGCTTGAGTATG	<i>Methylobacterium</i> sp.	367
MET-2	GTAACACGCATGTCAAAAGG		

表3. 実態調査における細菌数の分布

□	リターナブル型			ワンウェイ冷蔵型	ワンウェイ常温型
	検体数	未開封	開封済み	冷水口	冷水口
0	7	20	27	7	2
10 <sup>0</sup> ~10 <sup>1</sup>	6	1		1	
10 <sup>1</sup> ~10 <sup>2</sup>		2		3	
10 <sup>2</sup> ~10 <sup>3</sup>	1	2	4	3	
10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>		7	7		
10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>		1	9		1
10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup>		6	7		
		1			1
平均値	7.4×10 <sup>0</sup>	2.1×10 <sup>4</sup>	7.9×10 <sup>3</sup>	2.7×10 <sup>1</sup>	1.2×10 <sup>5</sup>

(表3)。一方、開封済みボトル水では20検体中19検体 (95%) から10<sup>0</sup>~10<sup>5</sup> cfu/mLオーダーの細菌が、冷水口では27検体すべてから10<sup>1</sup>~10<sup>4</sup> cfu/mLオーダーの細菌が検出された。ワンウェイ冷蔵型の冷水口では、7検体中6検体 (86%) から細菌が検出されたが、すべて10<sup>2</sup> cfu/mL未満であった。ワンウェイ常温型の冷水口は、2検体ともに検出され、細菌数は10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> cfu/mLオーダーであった。また、黄色ブドウ球菌と大腸菌群はすべて陰性であった。

細菌数と従属栄養細菌数をそれぞれ対数変換し、横軸と縦軸にプロットすると、サーバーのタイプに関わらず細菌数と従属栄養細菌数の間に正の相関 (R<sup>2</sup>=0.8082) があった (図2)。この結果から、以後は従属栄養細菌の結果は省略し、細菌数のみを記載する。

2. リターナブル型サーバーの使用試験

1) 細菌数、腸球菌、緑膿菌及び落下細菌数

サーバーの使用試験で測定した細菌数を表4に示す。B社2台 (B-1, B-2) は同様の傾向であったためB-1のみを示す。

Aの未開封ボトル水は14検体中7検体 (50%) から10<sup>0</sup>~10<sup>3</sup> cfu/mLオーダーの細菌が検出された。開封済みボトル水及び冷水口からは経常的に細菌が検出され、細菌数は10<sup>0</sup>~10<sup>5</sup> cfu/mLオーダーで推移した。

B-1の未開封ボトル水は、14検体中1検体 (7%) から3.3×10<sup>1</sup> cfu/mLの細菌が検出された。開封済みボトル水及び冷水口からは、Aと同様に常に10<sup>2</sup>~10<sup>4</sup> cfu/mLオーダーで細菌が検出された。

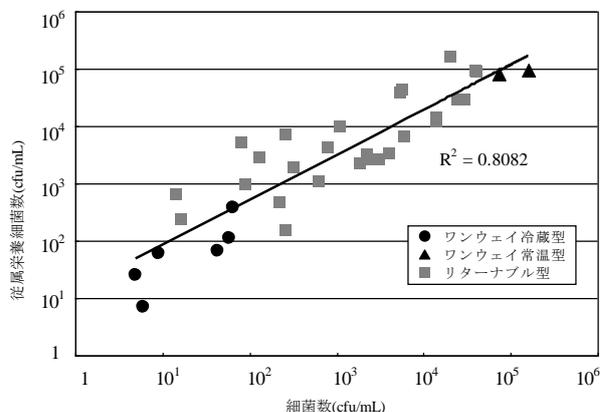


図2. 細菌数と従属栄養細菌数の相関 (冷水口)



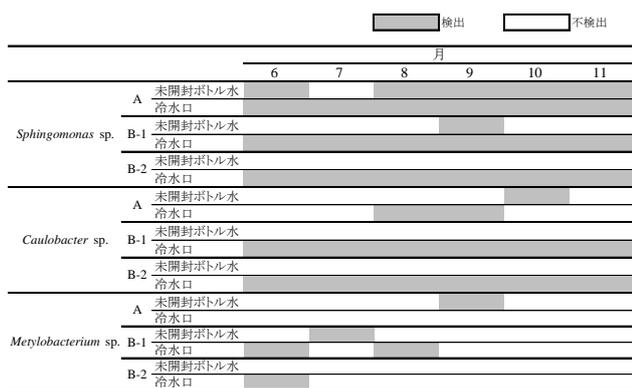


図3. サーバーから細菌が検出された時期

表6. 解体後のサーバーから検出された細菌 (株数)

	A	B-1	B-2
<i>Sphingomonas</i> sp.	37	3	22
<i>Caulobacter</i> sp.	1	13	2
<i>Metylobacterium</i> sp.			
その他の細菌		6	2
死滅		2	
合計	38	24	26

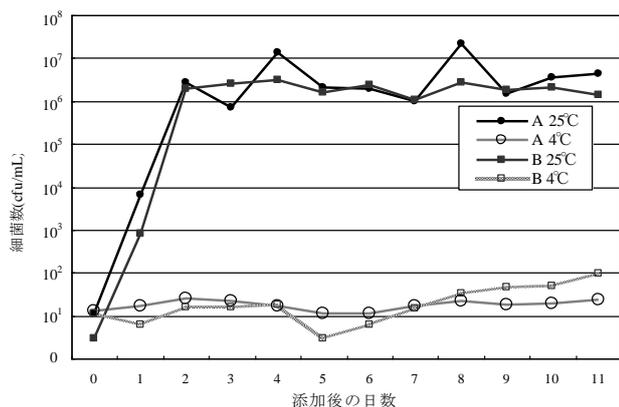


図4. 添加保存試験における細菌数の変化

### 3. 添加保存試験

リターナブル型及びワンウェイ常温型のようにボトルを保冷しないタイプのサーバーを想定し25°Cで保存した場合、10 cfu/mLの細菌を添加した2日後には10<sup>6</sup> cfu/mLオーダーに達し、その後は10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cfu/mLオーダーで推移した(図4)。

ワンウェイ冷蔵型のようにボトルを保冷するタイプのサーバーを想定した保存温度4°Cでは、添加初日から11日目まで10<sup>2</sup> cfu/mL以下で推移した。

### 考 察

サーバー水の実態調査の結果から、冷水口の細菌数は、ワンウェイ冷蔵型(0~10<sup>1</sup> cfu/mLオーダー)がワンウェイ常温型(10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> cfu/mLオーダー)やリターナブル型(10<sup>1</sup>~10<sup>4</sup> cfu/mLオーダー)に比べ低い傾向であった。ワ

ンウェイ冷蔵型はサーバー内部を温水で洗浄するタイプや、冷水が配管やタンクを經由しないタイプもあったことから、これらの理由により細菌数が低く抑えられているものと考えられた。さらに、添加保存試験の結果からも、ボトルの保冷は細菌の増殖抑制に効果があると考えられ、細菌の増殖性を考慮するとワンウェイ冷蔵型が良いことが判明した。

実態調査を行ったサーバーは不特定多数の人が使用するため、手指からの汚染も懸念されたが、黄色ブドウ球菌と大腸菌群はすべて陰性であったことから、ボトル開封後の水であっても、衛生状態に大きな問題はないと考えられた。

サーバーの使用試験では、Aの未開封ボトル水から細菌が検出されなかった場合、10<sup>3</sup> cfu/mLオーダーの細菌が検出された場合のいずれにおいても、2週間後の開封済みボトル水及び冷水口の細菌数は10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup> cfu/mLオーダーで安定していたことから、2週間程度であれば大幅に細菌が増加することはないものと考えられた。この値は、生活文化局消費生活部で平成24年度に実施したレンタルサーバーの使用試験<sup>2)</sup>の一般細菌数(0~10<sup>3</sup> cfu/mLオーダー)と比較すると10<sup>1</sup>~10<sup>2</sup> cfu/mLオーダー程度高くなっていたが、レンタル時のサーバーの汚染状況や細菌の培養時間の違い等の影響によるものと考えられた。

使用試験で検出された主要な3属の細菌の中には、日和見感染を起こす種類も存在している<sup>6,9)</sup>。また、*Streptococcus* 属菌や*Moraxella* 属菌の中には病原性を示す種類もあるが、今回検出された細菌の中に、明らかに病原性を示す種類はなかった。

サーバーの使用試験を行った2社は、ともにリターナブルボトルを使用しているため、未開封ボトル水から検出された細菌が原料の水に由来するものか、洗浄不足のボトルに由来するものかは不明であった。しかし、2社のサーバーに使用されている原料の水はいずれも水道水をRO膜でろ過処理されたものであり、給水栓水からは*Metylobacterium* 属菌や*Sphingomonas* 属菌が検出されることがあることが報告されている<sup>10)</sup>。したがってボトルを十分に洗浄、殺菌した場合でも、原料である水道水のろ過処理に不具合があった場合には、未開封ボトル水にこれらの細菌が存在する可能性がある。

今回の調査では、サーバー、ボトル水及び冷水口から検出された細菌と、室内環境(落下細菌)から検出された細菌のうち*Bacillus* 属菌のみが共通していた。しかし、両者のDNA配列は異なっていたことから、これらは由来が異なるものと考えられ、落下細菌がサーバー水に混入する可能性は低いとみられる。一方、未開封ボトル水やサーバーから検出された細菌と、冷水口から検出された細菌は共通する種類があったことから、冷水口から検出された細菌は、主に未開封ボトル水やサーバー本体に残存していた細菌に由来するものと推察された。

B-1の採水1回目の未開封ボトル水から細菌が検出されなかったにもかかわらず、その直後にサーバーに通水した冷水口から2.1×10<sup>2</sup> cfu/mLの細菌が検出された。B-1のサー

バーは試験開始前に既に使用履歴があったことから、サーバー内部に付着していた細菌が、通水により冷水口から検出されたものと思われる。このことは、サーバー解体後のふき取りにおいて、サーバーから細菌が検出されたことから示唆された。

主要な細菌の出現状況の結果から、今回の使用試験では検出された13属のうち*Sphingomonas* 属菌と*Caulobacter* 属菌がサーバーに残存しやすかったものと推察された。この2属はB-2の1回目通水時の冷水口からも検出されており、いずれも未開封ボトル水からは検出されていないことから、使用開始時に既にサーバーに付着していた可能性が高い。また、未開封ボトル水から細菌が検出されない場合でも、2週間後に採水した開封済みボトル水では $10^3 \sim 10^4$  cfu/mLの細菌が検出されていることから、リース中に内部を洗浄又は消毒しない限り、細菌の混入を防止することは困難であると考えられた。

以上の結果から、人の健康上問題となる細菌は検出されていないが、サーバーやボトルを再利用する場合には、サーバーやボトルの洗浄後に細菌検査を行うなどの十分な衛生管理が必要であることが示唆された。

#### ま と め

1. サーバー水の実態調査において、リターナブル型サーバー及びワンウェイ常温型サーバーの冷水口からは、 $10^1 \sim 10^5$  cfu/mLオーダーの細菌が検出されたが、ワンウェイ冷蔵型サーバーから検出された細菌は $10^2$  cfu/mL未満と少なかった。
2. リターナブル型サーバーの使用試験では、冷水口から経常的に $10^1 \sim 10^5$  cfu/mLオーダーの細菌が検出された。
3. サーバー水から黄色ブドウ球菌、大腸菌群、腸球菌及び緑膿菌は検出されなかった。
4. サーバーの使用試験で分離された細菌を16S rDNA塩基配列解析で調べた結果、13属に分類され、*Sphingomonas* 属菌、*Caulobacter* 属菌、*Methylobacterium* 属菌の3属が主

要な細菌であった。

5. 未開封ボトル水やサーバーから検出された細菌と、冷水口から検出された細菌は共通していたことから、サーバー水に混入した細菌は、主に未開封ボトル水やサーバー本体に由来するものと推察された。

6. サーバーやボトルを再利用する場合には、サーバーやボトルの洗浄後に細菌検査を行うなどの十分な衛生管理が必要であることが示唆された。

#### 文 献

- 1) <http://www.jbwa.org/index.html> (2013年10月2日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 2) <http://www.metro.tokyo.jp/INET/CHOUSA/2013/03/DATA/60n3j200.pdf> (2013年10月2日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 3) 厚生省：告示第370号，食品，添加物等の規格基準（告示），1959.
- 4) 厚生労働省：食品衛生検査指針（微生物編），38-41，2004，社団法人日本食品衛生協会，東京.
- 5) 中川恭好，田村朋彦，川崎浩子：遺伝子解析法，日本放線菌学界編，放線菌の分類と同定，83-140，2001，財団法人日本学会事務センター，東京.
- 6) Nuri Bayram, İlker Devrim, Hurşit Apa, *et al.*: *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, **5(1)**, DOI: 10.4084/MJHID.2013.040, 2013.
- 7) Abraham WR, Strömpl C, Meyer H, *et al.*: *Int J Syst Bacteriol.*, **49(3)**, 1053-1073, 1999.
- 8) Ulrik S. Justesen, Hanne M. Holt, Helle C. Thiesson, *et al.*: *J Clin Microbiol.*, **45(4)**, 1366-1369, 2007.
- 9) Chih-Cheng Lai, Aristine Cheng, Wei-Lun Liu, *et al.*: *J Clin Microbiol.*, **49(9)**, 3329-3331, 2011.
- 10) 岩本智江，田中繁樹，田中真紀子：全国水道研究発表会講演集，**61**, 524-525, 2008.

## Surveys on Bacterial Contamination in Water Servers

Satomi UEHARA<sup>a</sup>, Yasuko KISHIMOTO<sup>b</sup>, Youko HIGUCHI<sup>a</sup>, Rei KATOH<sup>a</sup>, Takashi CHIBA<sup>a</sup>, Akihiko HIRAI<sup>a</sup>, Madoka UENO<sup>a</sup>, Hiroko KARAKIDA<sup>a</sup>, Yasuto KIMOTSUKI<sup>b,c</sup>, Satoko KIMURA<sup>b,d</sup>, Akiko NAKAMA<sup>a</sup> and Akemi KAI<sup>a</sup>

The use of water servers which supply hot or cold water has become more popular. The water bottles for water servers are delivered directly to the place where the servers are set. Due to an increasing number of complaints about water servers, we investigated the bacteriological contamination and sanitary conditions of this equipment and dedicated water.

In a survey of the water servers, bacteria at a standard plate count (SPC) of  $10^1$  cfu/mL were detected from one of 7 samples of the unopened bottled water, and bacteria of  $10^1$ - $10^4$  cfu/mL were from all 27 cold water samples from the returnable-type server. In addition, bacteria of less than  $10^2$  cfu/mL were detected from all 7 cold water samples from the disposable-type cold storage server,  $10^4$ - $10^5$  cfu/mL were from 2 cold water samples from the disposable-type room temperature storage server.

The bacteria of  $10^1$ - $10^5$  cfu/mL had been always detected from opened bottled water and cold water from the returnable-type server. These isolates were classified into 13 genera mainly including *Sphingomonas* sp., *Caulobacter* sp. and *Methylobacterium* sp. by 16S rDNA sequencing and PCR. These bacteria which were commonly detected on the server body, unopened bottled water and cold water from the water server, were presumed to have originated from the server body and unopened bottled water. On the other hand, *Enterococcus* and *Pseudomonas aeruginosa* were not detected from the water server.

**Keywords:** water server, standard plate count, 16S rDNA sequencing, PCR, *Sphingomonas* sp., *Caulobacter* sp., *Methylobacterium* sp.

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out,

<sup>c</sup> Present Address: Tokyo Metropolitan Wholesale Market Sanitation Inspection Station,  
5-2-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

<sup>d</sup> Present Address: Animal Care and Consultation Center Tama Branch  
1-192-33, Ishida, Hino-shi, Tokyo 191-0021, Japan