

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658033

研究課題名(和文) 青果物への農業用水・農薬溶液を介した水系由来の微生物汚染の機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for microbial contamination of produce by agricultural water and pesticide solutions

研究代表者

泉 秀実 (IZUMI, Hidemi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：50168275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：青果物の栽培中の潜在的汚染源として、農業用水に加えて、農業用水に希釈・溶解した農薬溶液も重要であり、それらから青果物への微生物汚染の機構解明が望まれる。農業用水あるいは農薬溶液から青果物に移行する細菌および糸状菌はそれぞれ10菌種以上存在し、それらの青果物汚染微生物に加えて、Escherichia coli O157:H7(毒素陰性株)も、数種農薬溶液中で増殖することが明らかとなった。増殖を示したこれらの微生物は、ペクチン分解性を有する植物病原菌のように、細胞壁分解酵素を産生しなかったため、農業用水および農薬溶液から移行しても、青果物内部には侵入せずに表面に付着の状態であると推定された。

研究成果の概要(英文)：Pesticide solutions diluted with agricultural water are potential sources of preharvest microbial contamination for produce as well as agricultural water itself. The invasion of microorganisms from both agricultural water and pesticide solutions were investigated. Several spoilage pathogens that were transferred from the agricultural water and pesticide solutions to produce and Escherichia coli O157:H7, representing a human pathogen, proliferated when inoculated with pesticide products. Because these microorganisms did not produce cell wall degrading enzymes unlike pectinolytic bacteria and fungi, the cross-contaminating microbes including E. coli O157:H7 from agricultural water and pesticide solutions were assumed to persist on the surface of the produce and not infect inside the produce.

研究分野：食品保全学

キーワード：微生物汚染 ヒト病原菌 植物病原菌 農業用水 農薬溶液 青果物 細胞壁分解酵素

### 1. 研究開始当初の背景

食品衛生法において、青果物に対する微生物の規格基準はなく、現在のところ、自主衛生管理に委ねられている。栽培環境接触物から青果物への微生物汚染を最小限にする衛生管理法の確立が望まれるが、日本では、科学的データに乏しく、科学的根拠を基にした衛生管理の実施は行われていない。これまでに研究代表者は、農業用水（河川水、山水、雨水）の微生物数よりも希釈・溶解された農薬溶液の微生物数の方が、最大で 1000 倍も高くなる場合があること<sup>1)、2)</sup>、また、カキ園地では、農業用水（河川水）に含まれていたサルモネラが、農薬溶液中および農薬散布後の土壌中にも存在することを報告した<sup>1)</sup>。

そこで、農薬溶液を微生物的危険として認識し、その微生物制御の技術を確立するためには、水系由来微生物の青果物への付着経路と感染機構を明確にしたうえで、種々の青果物に対する微生物汚染の防御を科学的に検討することが必要である。

### 2. 研究の目的

青果物の微生物汚染防止は、栽培から収穫にかけての微生物汚染源と青果物との接触を最小限にし、微生物危害を未然に防ぐ栽培法を実践することで行う。潜在的汚染源として知られる農業用水に加えて、農業用水に希釈・溶解した農薬溶液も微生物汚染源として重要であり、それらからの微生物汚染の機構解明を明確にしない限り、青果物の高度な衛生管理法の確立は実現できない。

本研究では、農業用水、農薬溶液および青果物の各微生物叢を解析し、青果物に付着・侵入する微生物と農業用水および農薬成分との相互関係を明らかにする。さらに、対象となる水系由来の微生物が青果物に侵入する際に産生する細胞壁分解酵素と青果物内の基質を特定し、農業用水および農薬から青果物への微生物の感染機構を明確にする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 農業用水、農薬溶液および青果物の微生物叢

和歌山県内の果実（カキ、ウンシュウミカン、ウメ）圃場と野菜（キュウリ、レタス、ブロッコリー）圃場を対象に、農業用水、農業用水によって希釈・溶解された農薬溶液（殺菌剤 7 種、殺虫剤 5 種）および各青果物の微生物叢を解析し、これらの環境接触物から青果物への微生物汚染の影響について検討した。農業用水、農薬溶液および青果物中の微生物数（細菌および真菌）の測定は寒天平板法<sup>3)</sup>で、微生物種（細菌および真菌）の同定は MicroSeq 法<sup>4)</sup>で行った。また、これらの全サンプルの微生物学的安全性については、サルモネラ、腸管出血性大腸菌およびリステリアの存在について、DNA 検出法である LAMP 法<sup>1)</sup>で確認した。

#### (2) 農業用水および農薬溶液から青果物への移行微生物の農薬溶液中での挙動

初年度の研究結果を基に、農業用水・農薬溶液から青果物への移行菌が多かったカキ果実およびレタスから同定された移行細菌 6 菌種と移行糸状菌 6 菌種に、ヒト病原菌として *Escherichia coli* 0157:H7（毒素陰性株）、*Listeria monocytogenes* の代替株 *L. innocua*（毒素陰性株）を加えた 14 菌株について、これらの微生物の増殖と農薬成分との相互関係を解明する実験を実施した。すなわち、対象微生物を生理食塩水に  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml となるように懸濁し、蒸留水あるいは農業用水に溶解した 6 種類の農薬溶液および各農薬有効成分溶液に 1/100 量加えた後に、30°C で細菌は 3 日間、糸状菌は 7 日間静置培養して、微生物数（寒天平板法）を測定した。

#### (3) 農業用水および農薬溶液から青果物への移行微生物が培養液中に産生する細胞壁分解酵素の活性

農業用水あるいは農薬溶液から青果物に移行した微生物のうち、農薬溶液中で増殖が確認された細菌と糸状菌を対象に、これらの微生物が産生する細胞壁分解酵素の存在とその基質について調査した。*E. coli* 0157:H7 を含めた対象微生物とその対照菌株としてペクトリチック細菌である *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* を液体培地中で振盪培養した培養液を粗酵素液とした。培地に炭素源としてグルコース、スクロースあるいは青果物（カキ果実、レタスおよびニンジン）のアルカリ抽出物を添加した区を設け、11 種の *p*-nitrophenol (PNP) 基質を用いて、遊離した PNP 量 ( $1 \mu\text{mol}/\text{min} = 1 \text{ unit}$ ) から酵素活性を算出した<sup>5)</sup>。さらに、もし高い活性を示す微生物が存在した場合は、その微生物が産生する細胞壁分解酵素について、タンパク質量の推定および精製を行い、酵素特性を調査する実験計画とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 数種青果物の微生物叢に及ぼす農業用水および農薬溶液の影響

##### ① 果実（カキ、ウンシュウミカン、ウメ）圃場

農業用水の微生物数は、河川水 (2.8~3.4 log CFU/ml) のウメ圃場の方が、山水 (1.6~2.4 log CFU/ml) のカキおよびウンシュウミカン圃場よりも高かった。農業用水に農薬（殺菌剤または殺虫剤）を溶解すると、微生物数は、カキおよびウメ圃場の農薬溶液で一般生菌数、大腸菌群数、真菌数ともに増加し、ウンシュウミカン圃場ではいずれも減少した。検出された微生物種数は、すべての農薬溶液で、農業用水よりも少なくなった。

果実の微生物数は、カキ果皮の真菌 (3.2 log CFU/g) とウメ果皮の真菌 (4.7 log CFU/g) を除き、いずれの果皮・果肉とも、一般生菌数、大腸菌群数、真菌数は検出限界値以

下または未検出を示した。いずれの果実も、果肉からの検出菌はわずかに 2 菌種以下で、果皮からは細菌 (2~8 菌種) よりも糸状菌 (8~14 菌種) が多く同定された。

農薬散布後に収穫された果実には、農業用水および農薬溶液から果実に移行したと推定される微生物が確認され、カキ果実で微生物叢の 33%、ウンシュウミカン果実で 20%、ウメ果実で 5%と推定された。これらの移行微生物として、細菌では *Enterobacter*、*Pseudomonas* などの植物病原細菌、*Bacillus*、*Curtobacterium* などの土壌細菌、また真菌でも *Coniothyrium*、*Fusarium* などの植物病原糸状菌、*Aureobaculum*、*Cladosporium* などの植物-土壌由来糸状菌が確認された。すべてのサンプルで、遺伝子検出法によるヒト病原菌 (サルモネラ、腸管出血性大腸菌およびリステリア) は陰性を示した。

## ②野菜 (キュウリ、レタス、ブロッコリー) 圃場

井戸水を水源とするブロッコリーおよびキュウリ圃場の農業用水の微生物数は、検出限界値以下であるのに対して、レタス圃場の農業用水は河川水のため、一般生菌数 (3.2 log CFU/ml) と真菌数 (2.2 log CFU/ml) は、検出限界値を上回り、検出される微生物種数 (細菌 18 菌種、糸状菌 9 菌種) も最も多かった。農業用水に農薬 (殺菌剤または殺虫剤) を溶解すると、キュウリ圃場の井戸水では一般生菌数 (4.4 log CFU/ml) と真菌数 (4.7 log CFU/ml) が約 3 logs (1000 倍) 増加し、一方他の農薬溶液では検出限界値以下を示し、検出される微生物種数も低下した。

野菜の微生物数は、キュウリの果皮 (一般生菌数: 6.2 log CFU/g、大腸菌群数: 3.7 log CFU/g、真菌数: 6.0 log CFU/g) で最も高く、続いてレタスの外葉 (一般生菌数: 4.1 log CFU/g、大腸菌群数: 2.8 log CFU/g、真菌数: 4.6 log CFU/g)、ブロッコリーの花蕾 (一般生菌数: 3.1 log CFU/g、大腸菌群数: 2.8 log CFU/g、真菌数: 3.2 log CFU/g) の順となった。検出された微生物種数は、ブロッコリー花蕾 (細菌 17 菌種、糸状菌 8 菌種)、レタス外葉 (細菌 11 菌種、糸状菌 10 菌種)、キュウリ果皮 (細菌 6 菌種、糸状菌 1 菌種) の順に多く、いずれの野菜も、植物病原菌および土壌由来菌が微生物叢の主体であった。

野菜の微生物数および検出される細菌種数は、果実よりも顕著に多いにもかかわらず、農薬散布後に、農業用水および農薬溶液から移行した微生物数は、レタス (微生物叢の 29%) を除き、極めて少ない結果となった。農業用水あるいは農薬溶液からレタスに移行した微生物は、土壌細菌の *Bacillus* と *Paenibacillus*、植物由来糸状菌の *Ascochyta*、*Aureobaculum*、*Coniothyrium* と推定された。移行菌が確認されなかったキュウリ果実および細菌 1 種のみが移行したと推定されたブロッコリーでは、土壌からの移行菌が主体を占めた。果実圃場と同様に、すべてのサン

プルで、ヒト病原菌 (サルモネラ、腸管出血性大腸菌およびリステリア) は検出されなかった。

## (2) 青果物汚染微生物の農薬溶液中での挙動

### ①細菌の挙動

農業用水および農薬溶液からの移行菌が多かったカキ果実とレタスを対象に、カキ果実への移行細菌 3 菌種 (*Chryseobacterium indologenes*、*Enterobacter cloacae*、*Pseudomonas oryzihabitans*)、レタスへの移行細菌 3 菌種 (*Bacillus amyloliquefaciens*、*B. licheniformis*、*B. megaterium*) およびヒト病原菌として *E. coli* O157:H7 (毒素陰性株) の菌液に、それぞれの圃場で使用した農薬 3 種とその有効成分 3 種 (蒸留水溶解) を混合した際の各微生物の挙動を調査した。カキ果実の汚染細菌 3 菌種と *E. coli* O157:H7 をアグロスリン水和剤に接種すると、*Ch. indologenes* は 24 時間後に死滅し (未検出)、*En. cloacae* は生存し続けたのに対して、*P. oryzihabitans* と *E. coli* O157:H7 は、48~60 時間後には約 4 logs (10000 倍) 増殖した (図 1A)。しかし、アグロスリン水和剤の農薬有効成分であるシペルメトリンに接種すると、24 時間後までに *P. oryzihabitans* は検出限界値以下に、*E. coli* O157:H7 は未検出になった (図 1B)。

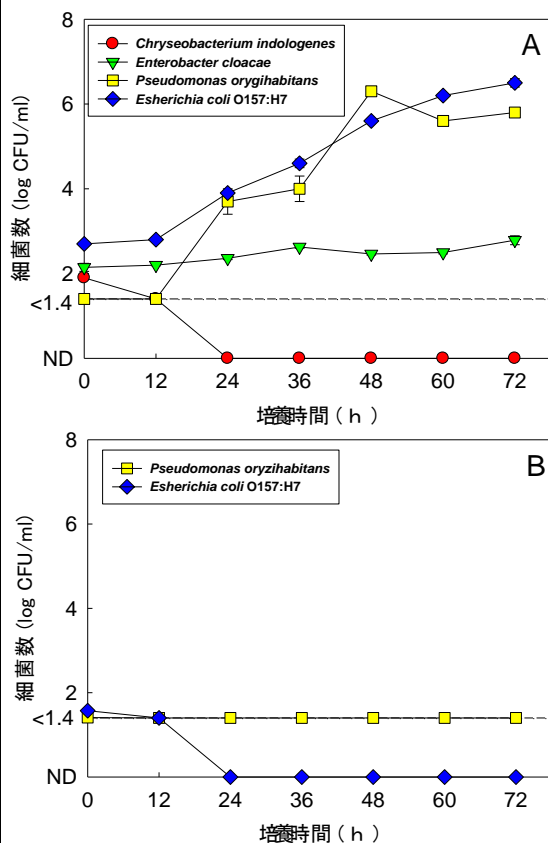


図 1 蒸留水に溶解した農薬 (アグロスリン水和剤) 溶液 (A) および有効成分 (シペルメトリン) 溶液 (B) 中のカキ果実由来細菌および *Escherichia coli* O157:H7 の挙動  
<math>< 1.4</math>: 検出限界値以下、ND: 未検出

このような農薬溶液中での *E. coli* O157:H7 の急激な増殖は、他の農薬（トップジン M 水和剤、ダントツ水溶剤、スミレックス水和剤およびモスピラン水溶剤）でも確認され、さらにこれらの農薬の有効成分（チオファネートメチル、クロチアニジン、プロシミドンおよびアセタミプリド）中では、いずれも未検出となり、死滅することが明らかとなった。農薬中の有効成分の含有割合は、農薬の種類によって 6%~70% と幅があり、それ以外の乳化剤、界面活性剤、展着剤などの対象外物質（詳細な物質名は未発表）が、微生物の増殖のための栄養成分として機能していることが示唆された。

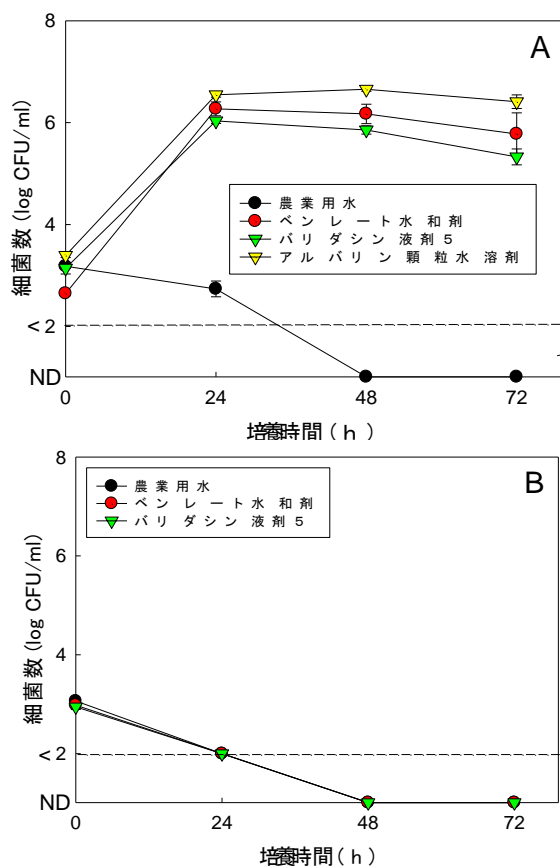


図2 農業用水で希釈・溶解した農薬溶液中の *Escherichia coli* O157:H7 (A) および *Listeria innocua* (B) の挙動  
 <2: 検出限界値以下、ND: 未検出

以上のように、農薬が微生物の増殖に影響することが、単一菌株の培養液において認められたが、圃場で農薬の希釈・溶解に使用する農業用水には、多くの微生物種が存在する。そこで、より圃場レベルでの農薬の希釈・溶解を想定して、*E. coli* O157:H7 あるいは *L. innocua* を河川水（一般生菌数: 5.1 log CFU/ml、大腸菌群数: 4.1 log CFU/ml、真菌数: 3.4 log CFU/ml）に希釈・溶解した農薬溶液（ペンレート水和剤、バリダシン液剤 5、アルパリン顆粒水和剤）に接種し、その後の病原菌の挙動を調べた。最初に、農業用水に農薬を溶解することで、農業用水中の一般生菌数も大腸

菌群数も 3~4 logs (1000~10000 倍) 増加することを確認したが、*E. coli* O157:H7 は、これらと同様に 24 時間以内に約 3 logs (1000 倍) 増殖し (図 2A)、一方 *L. innocua* は徐々に減少して、48 時間後には未検出となった (図 2B)。*E. coli* O157:H7 と *L. innocua* は、農業用水に希釈・溶解した農薬溶液中では対照的な結果を示したが、農業用水だけではなく、農薬溶液も微生物汚染源として重要で、特に *E. coli* O157:H7 のようなヒト病原菌が存在していた場合には、重篤な危害が生じる可能性が示された。

## ②糸状菌の挙動

細菌の挙動実験と同様に、カキ果実への移行糸状菌 3 菌種 (*Arthrrium phaeospermum*、*Cladosporium cladosporioides*、*Fusarium chlamydosporum*) とレタスへの移行糸状菌 3 菌種 (*Ascochyta chartarum*、*Aureobasidium pullulans*、*Coniothyrium fuckelii*) の菌液に、それぞれの圃場で使用した農薬 3 種とその有効成分 3 種（蒸留水溶解）を混合し、各微生物の挙動を調査した。カキ果実への移行糸状菌においては、いずれの農薬中でも *Ar. phaeospermum* および *F. chlamydosporum* は培養 1~2 日目には検出限界値以下または未検出となり、*Cl. cladosporioides* は培養 7 日間を通して生存し続けた。これに対して、各農薬の有効成分中では、いずれの糸状菌も培養期間中に未検出となった。レタスへの移行糸状菌では、いずれの農薬溶液でも *Co. fuckelii* は検出限界以下に低下、*As. chartarum* は生存し続け、また *Au. pullulans* は培養 2 日までに 3 logs (1000 倍) 程度増殖した。*Au. pullulans* は、各農薬の有効成分中에서도 1 log (10 倍) 程度増殖したが、増殖量は農薬溶液中ほど高くはなかった。以上のことから、数種糸状菌も細菌と同様に、農薬成分中の対象外物質がその生存と増殖に関与していることが示唆された。

## (3) 青果物汚染微生物が産生する細胞壁分解酵素の活性

### ①青果物への移行細菌と糸状菌

農薬溶液中での挙動が明確となったカキ果実への移行細菌 3 菌種 (*Ch. indologenes*、*En. cloacae*、*P. oryzihabitans*) と移行糸状菌 3 菌種 (*Ar. phaeospermum*、*Cl. cladosporioides*、*F. chlamydosporum*) およびレタスへの移行細菌 3 菌種 (*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis*、*B. megaterium*) と移行糸状菌 3 菌種 (*As. chartarum*、*Au. pullulans*、*Co. fuckelii*) が、培養液中で産生する細胞壁分解酵素の活性を測定した。細菌 6 菌種は、いずれの PNP 基質に対しても酵素活性が確認されないか、あるいは 0.5 unit 以下の低い活性を示したのに対して、糸状菌では、*Ar. Phaeospermum*、*F. chlamydosporum* および *Au. Pullulans* が、複数の基質 ( $\beta$ -D-glucopyranoside、 $\alpha$ -D-galactopyranoside、 $\beta$ -D-Cellobioside など)

に対して、1 unit 以上の活性を示した。糸状菌の中で、特に植物病原糸状菌である *F. chlamydosporum* および *Co. fuckelii* は、それぞれカキアルカリ抽出物およびレタスアルカリ抽出物添加培地でのみ、 $\beta$ -D-glucopyranosidase と  $\beta$ -D-Cellobiosidase 活性が確認された。これらの酵素は、糸状菌がカキ果実あるいはレタスのアルカリ抽出物の特定の物質を認識して、特異的に産生されたことを示唆している。

② *E. coli* 0157:H7 および *Pe. carotovorum* 農薬溶液中で顕著な増殖を示した *E. coli* 0157:H7 が、植物病原菌のように細胞壁分解酵素の産生を介して青果物内に侵入する機構を有しているのかどうかについて、ペクトリチック細菌である *Pe. carotovorum* を対照に、レタスアルカリ抽出物およびニンジンアルカリ抽出物を含む培地を用いて確認した。*Pe. carotovorum* は、炭素源としてグルコースやスクロースを含む培地よりも、レタスアルカリ抽出物を含む培地で、 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase、 $\beta$ -D-galactopyranosidase および  $\alpha$ -D-galactopyranosidase の高い活性 (0.5~1.5 unit) を示し、レタス中の特定の物質を認識して、これらの酵素を特異的に産生していることが示された。これに対して、*E. coli* 0157:H7 は、レタスおよびニンジンのアルカリ抽出物に対して特定の炭素源を認識せず、細胞壁分解酵素を産生しなかった。以上のことから、*E. coli* 0157:H7 が農薬溶液中で増殖し、青果物へ付着しても、組織表面で生存はするものの、ペクチン分解性を有する植物病原菌のように、組織内部への侵入は容易に起こらないと推察した。

#### <引用文献>

- 1) Izumi, H., Y. Tsukuda, J. Poubol. and K. Hisa, On-farm sources of microbial contamination of persimmon fruit in Japan, *J. Food Prot.*, vol. 71, 2008, 52-59
- 2) Izumi, H., J. Poubol, K. Hisa, and K. Sera, Potential sources of microbial contamination of Satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed, *J. Food Prot.*, vol. 71, 2008, 530-538
- 3) Izumi, H., Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables, *J. Food Sci.*, vol. 64, 1999, 536-539
- 4) Poubol, J. and H. Izumi, Shelf life and microbial quality of fresh-cut mango cubes stored in high CO<sub>2</sub> atmosphere, *J. Food Sci.*, vol. 70, 2005, M69-M74
- 5) Pressey, R.,  $\beta$ -galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* vol. 71, 1983, 132-135.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Hidemi Izumi, Safety and Quality Assurance of Fresh and Fresh-cut Produce:

Current Technologies Developed in Japan. Proceedings of International Symposium on Quality Management of Fruits and Vegetables for Human Health, 査読有, 2015, 63~68

- ② 北田康祐、河本敬子、阿野貴司、泉 秀実、数種果実の微生物汚染源としての農業用水と農薬溶液の影響、近畿大学生物理工学部紀要、査読有、34号、2014、27~34

[学会発表] (計8件)

- ① 泉 秀実、カット野菜の原料から製品までの衛生管理と微生物制御、日本食品・機械研究会セミナー/カット野菜の原料から製品までの高品質と安全性の確保 (招待講演)、2014年11月12日、機械振興会館 (東京都港区)

- ② 北田康祐、泉 秀実、青果物汚染細菌の農薬溶液中での挙動、日本防菌防黴学会第41回年次大会、2014年9月24日、きゅりあん (東京都品川区)

- ③ Hidemi Izumi, Kosuke Kitada, and Izumi Iwasaki, Survival of Microorganisms Isolated from Fresh Produce and Production Fields and Inoculated into Pesticide Solutions, 110th Annual Conference of American Society for Horticultural Science, 28 July 2014, Orland, Florida (USA)

- ④ 泉 秀実、青果物/カット青果物の安全性と品質、第18回日本フードファクター学会学術集会 (招待講演)、2013年11月10日 東京農業大学 (東京都世田谷区)

- ⑤ 北田康祐、真賀里美咲、村上ゆかり、泉 秀実、数種野菜の栽培環境における微生物汚染と農業用水・農薬との関係、日本防菌防黴学会第40回年次大会、2013年9月11日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

[その他]

報道関連

掲載紙：朝日新聞、掲載日：2015年4月26日、掲載記事：ひらけ進・新・針路、農業の最先端技術、3時間目、品質を守る技 (教育17面)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 秀実 (IZUMI, Hidemi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：50168275