

令和4年3月31日

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進
委託事業のうち短期課題解決型研究
研究成果報告書

課題番号：20330845

野菜の生産環境における微生物の消長を考慮した水や堆肥の管理対策の確立

研究期間：令和2年度～令和3年度（2年間）

研究総括者名：木嶋 伸行

試験研究機関名：野菜生産環境コンソーシアム

- ・ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
- ・ 国立大学法人九州大学
- ・ 新潟県農業総合研究所

<別紙様式3>最終年度報告書

1 研究目的

生食用野菜の有害微生物による汚染リスクを低減するため、収穫前の農業用水の使用時期や堆肥の生産環境への投入時期を、野菜上や土壌における大腸菌の生残特性に基づいて推定する。

本研究では、下記の2点の検討を行う。

1. 葉物野菜における大腸菌の生残特性の検討
2. 土壌環境における大腸菌の生残特性の検討

1では、人為的に葉物野菜に大腸菌を接種し、その生残特性を調べ、灌水や農薬等の各種水溶性資材の散布により野菜可食部に付着した大腸菌が、時間の経過とともに、どのように減少し、どの程度生き残るのかを明らかにする。この結果から、通常の灌水や薬剤散布などの水の使用において、収穫時の生食用野菜の微生物汚染を最小限にとどめる、水の使用から野菜の収穫までの期間確保による水の管理方法を提案する。

2では、土壌に大腸菌を接種し、その生残特性を調べ、堆肥施用により土壌環境に混入した大腸菌が、時間の経過に伴い、どのように減少し、どの程度生き残るかを明らかにする。この結果から、未熟な堆肥の使用において、収穫時の生食用野菜の微生物汚染を最小限にとどめる。施肥から野菜の収穫までの期間確保による堆肥の管理方法を確立する。

これらの水や堆肥の管理を、農林水産省の策定した「栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針」に反映することで、現場での衛生管理の取組を推進し、国産の生食用野菜の安全性向上に繋がることを期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) レタス葉上における大腸菌の生残特性の検討（九州大学）

各種農作業に伴う農業用水との接触や大雨等に伴う非日常的な水系との接触に伴う、レタス可食部の大腸菌汚染を想定し、レタス葉上に大腸菌を接種し、接種した大腸菌が葉上で検出限界以下になる期間やその減少の速度を調べ、収穫前の野菜に対し、水質を十分に確保できない場合の水の使用時期の設定に繋げる。

ファイトトロン内で一定期間栽培したレタスに調製した大腸菌液を頭上灌水により接種し、レタス葉上における大腸菌の消長を経時的に調べる。レタス栽培は低温栽培条件（20-25℃）および常温栽培条件（25-30℃）で行い、大腸菌株には食品や環境分野における実験で広く用いられているFDA（米国食品医薬品局）標準株（ATCC25922）および非病原性大腸菌0157:H7（ATCC43888）の2菌種を用いる。

2) 土壌環境における大腸菌の生残特性の検討（新潟農総研、農研機構）

生産環境への未熟な堆肥投入に伴う大腸菌の混入を想定し、土壌に混入した大腸菌が検出限界以下になる期間を調べ、生産物への大腸菌付着リスクの低減に繋がる堆肥施用時期の設定に繋げる。

国内の生産地に広く分布する黒ボク土を対象に、調製した大腸菌液と堆肥を接種し、その消長を経時的に調べる。大腸菌株はFDA（米国食品医薬品局）標準株（ATCC25922）を用いる。また、大腸菌を接種した土壌は、水分量を高・低の二通りに設定し、それぞれ低温期（冬期）を想定した10℃および常温期（夏期）を想定した25℃で培養する。さらに、供試土壌中には様々な微生物が存在するため、これらの大腸菌の消長への影響も考慮し、オートクレーブ処理をした土壌と処理をしない土壌を用いて検討を行う。

(2) 達成目標及び進捗目標

レタス葉上および土壌試料に人為的に大腸菌を接種し、それぞれの実験条件下において、接種した大腸菌がどの程度生残し、検出限界以下になるのにどの程度の日数を要するのかを明らかにする。また、レタス葉上の検討では得られた結果からレタス葉上における大腸菌の減少速度を算出する。これらの結果を基に、大腸菌の消長を踏まえた、収穫前野菜可食部に対して使用する水や、生食用野菜の栽培に使用する堆肥の管理方法を確立する。

(3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

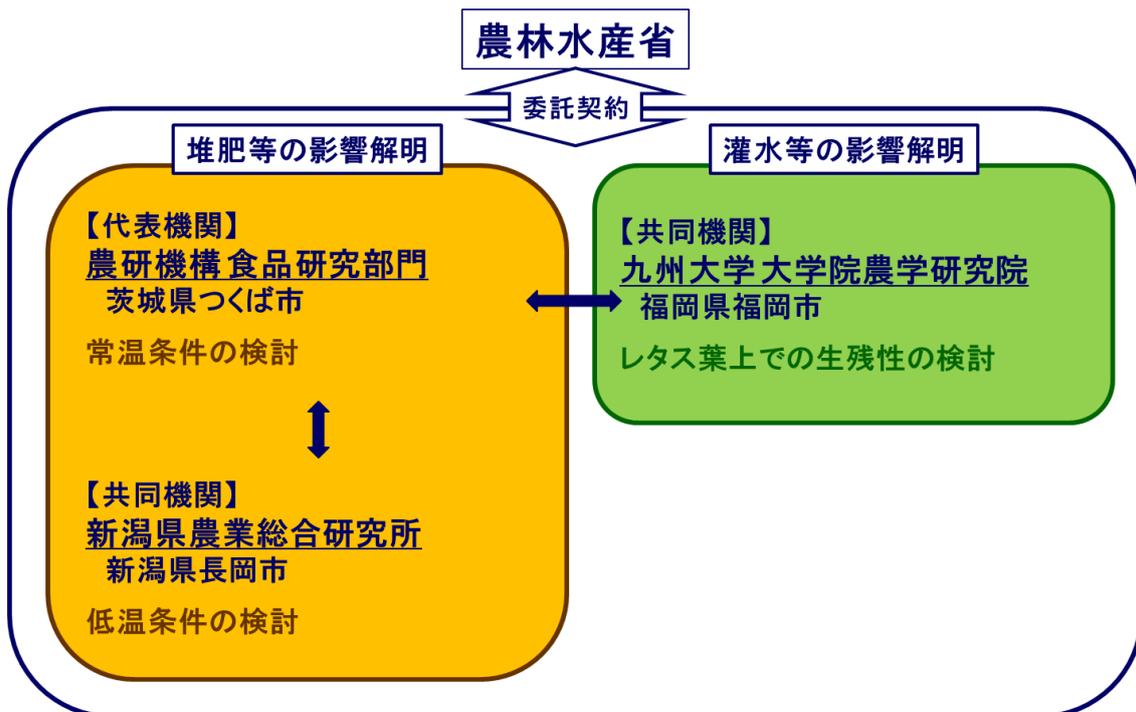
厚労省の食中毒統計では国内で発生する細菌性食中毒は年間おおよそ500件で、その数はここ10年間ほぼ横ばい状態である。原因菌別の件数ではカンピロバクターが最も多いが、何れも死に至る症例はない。一方、腸管出血性大腸菌による発症件数は少ないものの、特に野菜加工品が原因と考えられる例が散発的に発生し、その中には、多くの死亡例を伴う事例がある。そのため、国内では、フードチェーンを通じて、野菜の衛生管理を一層推進していく必要があると考えられる。

上述の2小課題の実施により得られる知見が、農林水産省の「栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針」における、水や堆肥の管理に、現場で実施可能で、かつ、効果的な対策として反映されることで、生産段階における生食用野菜の安全性を向上することに大きく貢献すると考えられる。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度	
	R2	R3
1. レタス葉上における大腸菌の生残特性の検討 (1) FDA株の検討 (2) 大腸菌O157の検討	← FDA株の検討 →	← 大腸菌O157の検討 →
2. 土壌環境における大腸菌の生残特性の検討 (1) 低温条件の検討 (1-1)滅菌土壌の検討 (1-2)未滅菌土壌の検討 (2) 常温条件の検討 (1-1)滅菌土壌の検討 (1-2)未滅菌土壌の検討	← → ← → ← →	← → ← → ← →

(5) 研究体制



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	農研機構・野菜花き研究部門/食品研究部門	野菜生産システム研究領域/食品流通・安全研究領域	◎ 木嶋 伸行	20
1. レタス葉上における大腸菌の生残特性の検討 (1) FDA株の検討 (2) 大腸菌0157の検討	九州大学	食品衛生化学	○ 本城 賢一	20
2. 土壌環境における大腸菌の生残特性に検討 (1) 低温条件の検討 (1-1) 滅菌土壌の検討 (1-2) 未滅菌土壌の検討 (2) 常温条件の検討 (1-1) 滅菌土壌の検討 (1-2) 未滅菌土壌の検討	新潟農総研	基盤研究部	○ 前田 征之	20
	農研機構・野菜花き研究部門/食品研究部門	野菜生産システム研究領域/食品流通・安全研究領域	木嶋 伸行	前出

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(注2) 代表機関及び共同研究機関並びに研究総括者の変更を行う必要が生じた場合はその理由を明記した書面を添付すること。

(7) 各年度の研究費

令和2年度 1,000,000 円

令和3年度 850,000 円

(以下同じ)

3 研究推進会議の開催状況

別添のとおり。

4 研究成果の概要

(1) 主な成果

1) 成果の内容

灌水等による野菜可食部への大腸菌の付着を想定して、2種類の大腸菌（臨床分離株、ATCC25922および非病原性大腸菌0157:H7、ATCC43888）を別々にレタス葉上に接種し、高温条件（30℃-25℃）および低温条件（25℃-20℃）における生残特性を調べた。供試した2株は何れも高温条件に比べ低温条件で高い生残性を示した。生残特性から算出したdie-off rate（大腸菌接種から14日間の減少率）は高温条件では2株ともに0.5 log CFU/g day⁻¹を上回ったが、低温条件の大腸菌0157:H7株では0.5 log CFU/g day⁻¹を下回った。

未熟な堆肥施用による土壤環境への大腸菌の混入を想定して、国内の作物栽培地域に広く分布する黒ボク土に臨床分離株（ATCC25922）を接種し、異なる温度条件（25℃、10℃）および異なる水分条件（乾燥土壌：含水比 26 %、湿潤土壌：含水比43 %）における生残特性を調べた。

未滅菌の黒ボク土に接種した大腸菌は低温条件の乾燥土壌では2週目に検出限界以下となり、湿潤土壌では5週目に検出限界以下となった。常温環境では乾燥土壌、湿潤土壌ともに2週目以降は検出限界以下となった。

2) 成果の活用

国内の栽培条件を想定したレタス葉上における大腸菌の生残性確認実験の結果から特定の菌株（大腸菌0157:H7）では低いdie-off rate（高い生残性）が確認でき、指針等の策定に当たっては留意する必要がある。

また、黒ボク土に接種した大腸菌は低温期では5週間程度、常温期では2週間程度で検出限界以下となったことから、完熟か未確認の堆肥の施用直後の作付けは避け、施用後、一定期間（該当期間以上）を経過してから播種や苗の定植を行う点について、指針等の策定に当たっては留意する必要がある。

(2) 各研究課題の成果

1) 小課題名：レタス葉上における大腸菌の生残特性の検討

(ア) 研究目標

レタス葉上に人為的に大腸菌を接種し、それぞれの実験条件下において、接種した大腸菌がどの程度生残し、検出限界以下になるのにどの程度の日数を要するのかを特定する。この結果を基に収穫時のレタス可食部汚染リスクが最小限となる灌水等の作業時期を特定する。

(イ) 研究内容

各種農作業に伴う農業用水との接触や大雨等に伴う非日常的な水系との接触に伴う、レタス可食部の大腸菌汚染を想定し、レタス葉上に大腸菌を接種し、接種した大腸菌が葉上で検出限界以下になる期間を調べ、収穫前の灌水等の時期の設定に繋げる。

バイオフィットチャンバー内（25℃（明期）、25℃（暗期））で育苗したレタス（晩抽レッドファイヤー（タキイ種苗）、培養土（花と野菜がグングン育つ培養土 25L、NAFCO））苗をプランターに定植し、ファイトトンネル内で高温条件（30℃（明期）、25℃（暗期）、湿度70%）または低温条件（25℃（明期）20℃（暗期）、湿度70%）で1.5ヶ月間栽培した。栽培期間通じ、明期は16時間、暗期は8時間とした。

FDA（米国食品医薬品局）標準株（ATCC25922）および大腸菌0157:H7（ATCC43888）の2菌種を供試菌株として用い、定植1月後のレタスに調製した菌液（8 Log CFU/ml）を2ml噴霧し、上述の温度条件で栽培を続け、経時的に植物体から接種した大腸菌の検出を行った。

採取したレタスを9倍量のPBSとともにストマッカー処理（3分間）した後、寒天培地（TSA：トリプチケースソイ寒天培地、CA：クロモカルトコリフォームアガー）に塗布し、37℃で一晩培養した。TSA上に出現したコロニーを全細菌数、CA上に出現した紫のコロニーを大腸菌数とした。

(ウ) 研究結果

レタス葉上に接種した大腸菌0157:H7株は、何れの温度条件下でも接種後14日目に検出限界には達しなかった。また、高温(30°C-25°C)条件(図1)に比べ低温(25°C-20°C)条件(図2)で菌数の減少が緩やかであった。

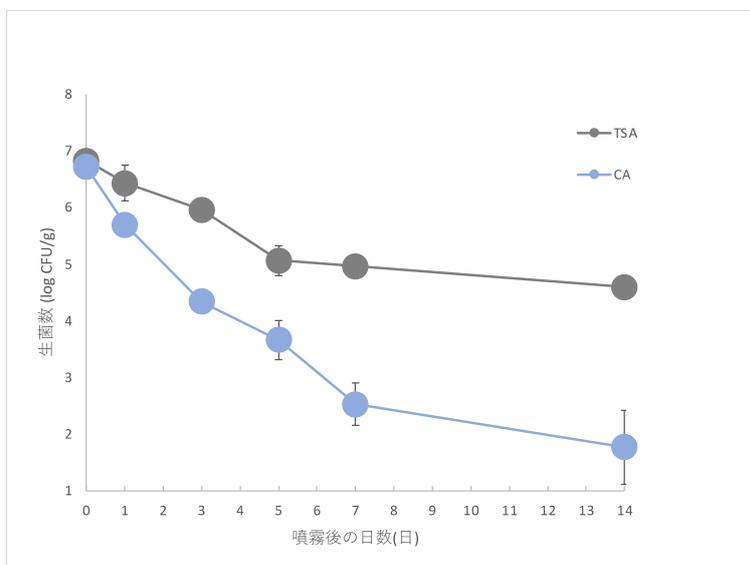


図 1 大腸菌0157:H7 (ATCC43888) のレタス葉上における生残特性 高温条件(30°C-25°C)
TSA : トリプチケースソイ寒天培地、CA : クロモカルトコリフォームアガー

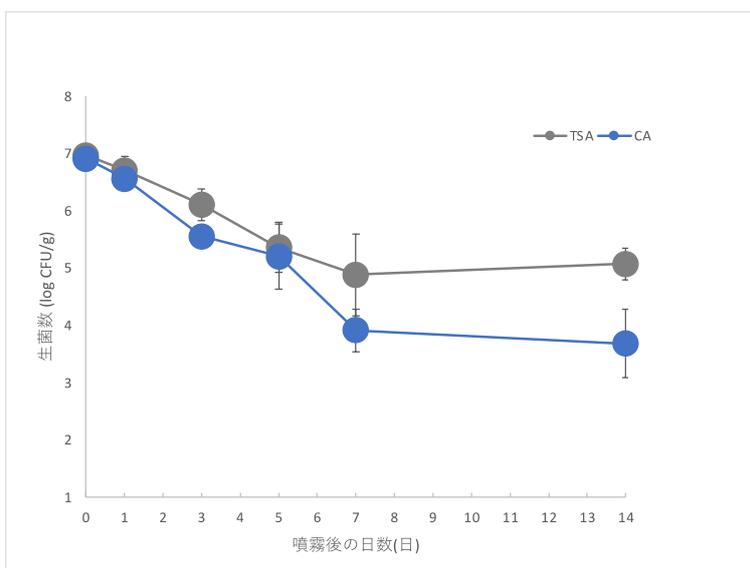


図 2 大腸菌0157:H7 (ATCC43888) のレタス葉上における生残特性 低温条件(25°C-20°C)
TSA : トリプチケースソイ寒天培地、CA : クロモカルトコリフォームアガー

FDA株では、高温条件(図3)と低温条件(図4)で生残特性に顕著な違いは認められなかった。また、0157:H7株に比べ速やかに減少し、14日間で検出限界に達した。

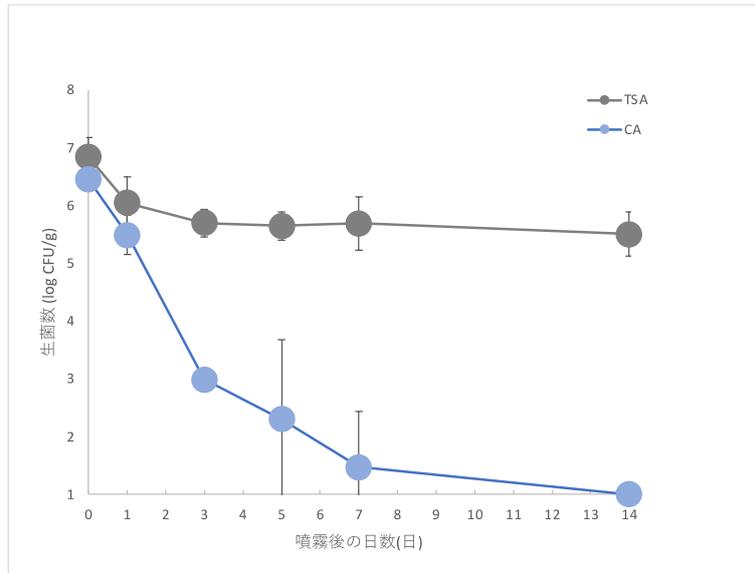


図 3 大腸菌FDA株 (ATCC25922) のレタス葉上における生残特性 高温条件(30°C-25°C)
TSA : トリプチケースソイ寒天培地、CA : クロモカルトコリフォームアガー

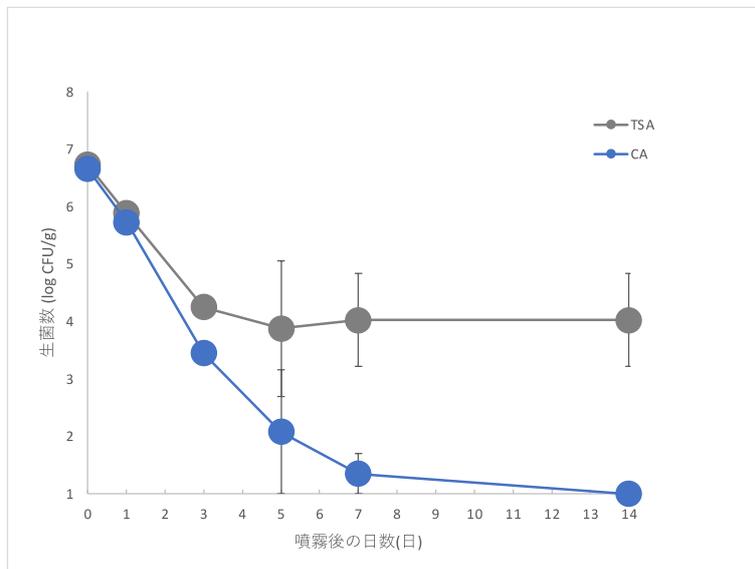


図 4 大腸菌FDA株 (ATCC25922) のレタス葉上における生残特性 低温条件(25°C-20°C)
TSA : トリプチケースソイ寒天培地、CA : クロモカルトコリフォームアガー

実験により得られた生残特性からdie-off rateを算出した結果、高温条件下の7日、14日の平均から大腸菌0157:H7株は、それぞれ0.65、0.54 log CFU/g day⁻¹ で、FDA株は、0.73、0.61 log CFU/g day⁻¹ であった。FSMA PSR (Food Safety Modernization Act, Produce Safety Rule) の目安とする 0.5 log CFU/g day⁻¹ を下回ることはなかった。一方、低温条件の場合、0157:H7株のdie-off rateは、7日、14日の平均がそれぞれ0.54、0.44 log CFU/g day⁻¹ 、FDA株がそれぞれ0.78、0.70 log CFU/g day⁻¹ となり0157:H7株の値はFDA株に比べ低かった。特に0157:H7の14日の平均値はFSMA PSRで目安とする値よりも低かった。

(エ) 研究成果の活用における留意点

国内の栽培条件を想定したレタス葉上における大腸菌の生残性確認実験の結果、大腸菌FDA株に比べ大腸菌O157:H7株は高い生残性を示し、算出したdie-off rate (大腸菌接種から14日間の減少率)は $0.44 \log \text{CFU/g day}^{-1}$ であった。また、得られた結果は特定の菌株によるもので、他の菌株の情報を確認した上で活用する必要がある。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

なし

<引用文献>

2) 小課題名：土壤環境における大腸菌の生残特性の検討

(ア) 研究目標

土壤試料に人為的に大腸菌を接種し、温度及び水分条件が異なる実験条件下において、接種した大腸菌がどの程度生残し、検出限界以下になるのにどの程度の日数を要するかを特定する。この結果を基に、完熟か未確認の堆肥について、播種や苗の定植時期からはじまり栽培期間通じ、生産環境の大腸菌レベルが十分に低下して植物体の汚染リスクが最小限にとどまる施肥時期を特定する。

(イ) 研究内容

生産環境への堆肥投入に伴う大腸菌の混入を想定し、土壤に混入した大腸菌が検出限界以下になる期間を調べ、苗の定植や播種後の幼植物汚染リスクを最小限にとどめる堆肥投入時期や収穫時の汚染リスクを最小限にとどめる堆肥投入時期の設定に繋げる。

国内の生産地に広く分布する黒ボク土を対象に、調製した大腸菌液を接種し、その消長を経時的に調べた。

新潟県農業総合研究所の実験ほ場内の黒ボク土（供試土壤の化学性は表1参照）を採取し、市販牛ふん堆肥（発酵牛糞堆肥、JA越後ながおか）を0.1%混和し、風乾したものを供試土壤とし、乾土100gを500 ml容のボトルに入れて用いた。土壤中には様々な生物が存在するため、生物的要因を排除し、土壤が持つ化学成分が大腸菌の生残性に及ぼす影響を評価する目的でボトル詰めした後にオートクレーブ処理（121℃、20分）をした土壤（オートクレーブ土壤）と、生物的要因が大腸菌の生残性に及ぼす影響を評価するために滅菌処理をせずにボトル詰めした土壤（未滅菌土壤）を用いた。ボトル詰めした土壤は予め、風乾により水分量を絞っており、滅菌水を適量加え2種類の水分条件の土壤として乾燥土壤（含水比 26%）および湿潤土壤（含水比 43%）を調整した。尚、供試土壤のオートクレーブ処理は芽胞形成菌を排除する目的で2回行った。

供試菌株として、FDA（米国食品医薬品局）標準株（ATCC25922）を用いた。大腸菌を接種した土壤は低温期を想定した10℃および常温期を想定した25℃で培養した。接種した大腸菌の検出は一定期間培養した土壤を入れたボトルに一定量の水を加え、室温にて20分間往復振とうしたのち希釈系列を作成し、寒天培地（CA：クロモカルトコリブフォームアガー、MC：マッコンキアガー、TSA：トリプチケースソイ寒天培地）に塗布し、35℃で24時間培養した後に、CA上に出現した紫コロニーおよびMC上に出現した赤いコロニーを大腸菌とし、両者の差を損傷菌数とした。また、未滅菌土壤における生残性の検討についてはTSA上に出現した全コロニーを全細菌数とした。

表 1 供試土壌の化学性

pH	EC	T-C	T-N	C/N	有効態P ₂ O ₅	CEC	交換性塩基			塩基飽和度
							CaO	MgO	K ₂ O	
(H ₂ O)	(ds/m)	(%)	(%)		(mg)	(me)	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	(%)
6.0	0.08	3.67	0.24	15.3	34.5	27.2	119	32	41	33

(ウ) 研究結果

オートクレーブ土壌における大腸菌の生残性は低温環境の乾燥土壌では4週目以降に検出限界以下となり、湿潤土壌では26週（6ヶ月）間生残した（図 5）。常温環境では乾燥土壌で10週目以降は検出限界以下となったが、湿潤土壌では低温環境と同様に26週（6か月）間生残した（図 6）。実験期間を通じ、土壌中の水分条件にかかわらず、一定の損傷菌が存在した。オートクレーブ処理により他の微生物の影響を排除すると長期間にわたり生残が可能で、水分条件が生育を制限する要因になると考えられる。

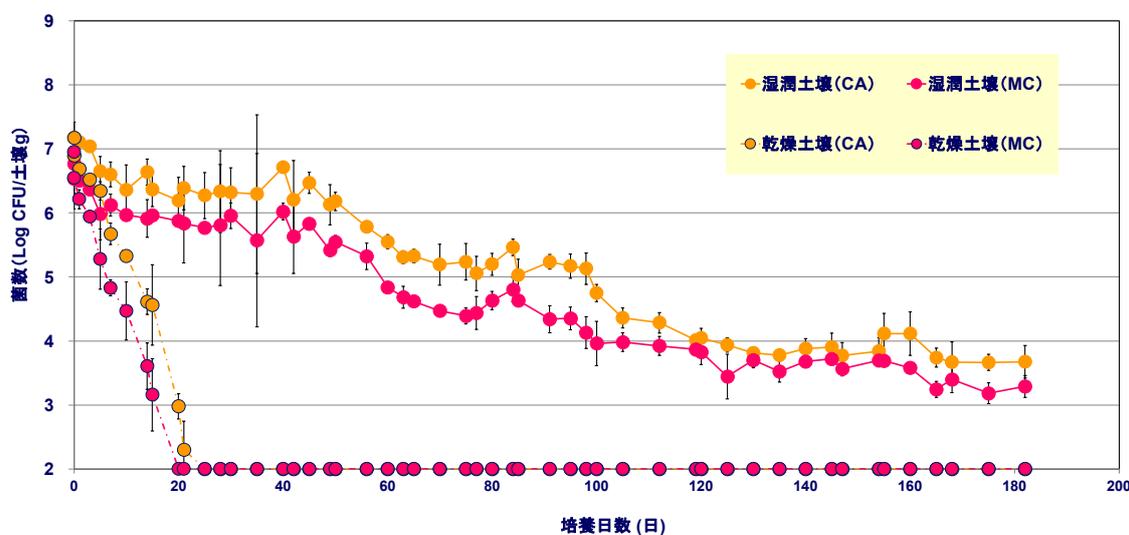


図 5 オートクレーブ土壌における大腸菌FDA株 (ATCC25922) の生残特性 低温環境 (10°C)
 (CA) : クロモカルトコリフォームアガー、 (MC) : マッコンキーアガー

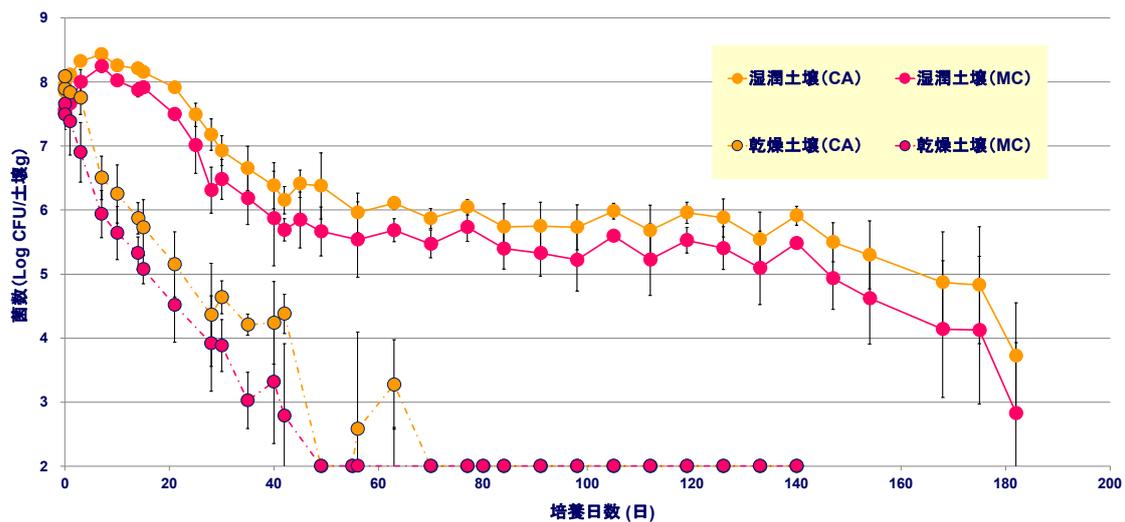


図 6 オートクレーブ土壌における大腸菌FDA株 (ATCC25922) の生残特性 常温環境 (25°C)
 (CA) : クロモカルトコリフォームアガー、(MC) : マッコンキアアガー

未滅菌土壌における大腸菌の生残性は低温環境の乾燥土壌では2週目には検出限界以下となり、湿潤土壌では5週目に検出限界以下となった(図 7)。常温環境では乾燥土壌、湿潤土壌ともに2週目以降は検出限界以下となった(図 8)。また、実験期間を通じ、土壌中の温度条件や水分条件にかかわらず、一定の損傷菌が存在した。両温度条件、両水分条件下でTSA培地上の細菌数は、終始一定の菌数 (7 log CFU/g) で推移した。

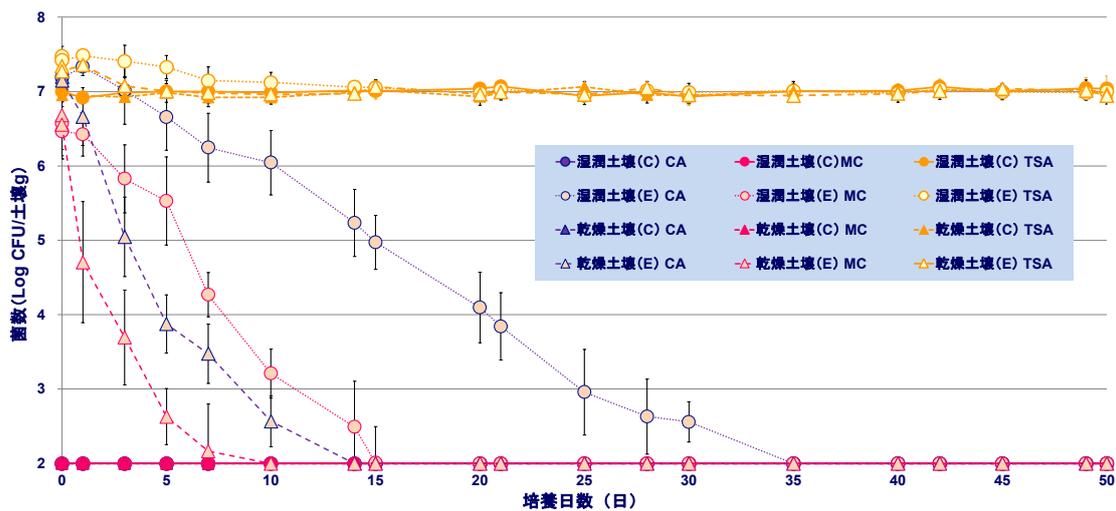


図 7 未滅菌土壌における大腸菌FDA株 (ATCC25922) の生残特性 低温条件 (10°C)
 (C) : 大腸菌無接種、(E) : 大腸菌接種
 CA : クロモカルトコリフォームアガー、MC : マッコンキアアガー、TSA : トリプ
 チケースソイ寒天培地

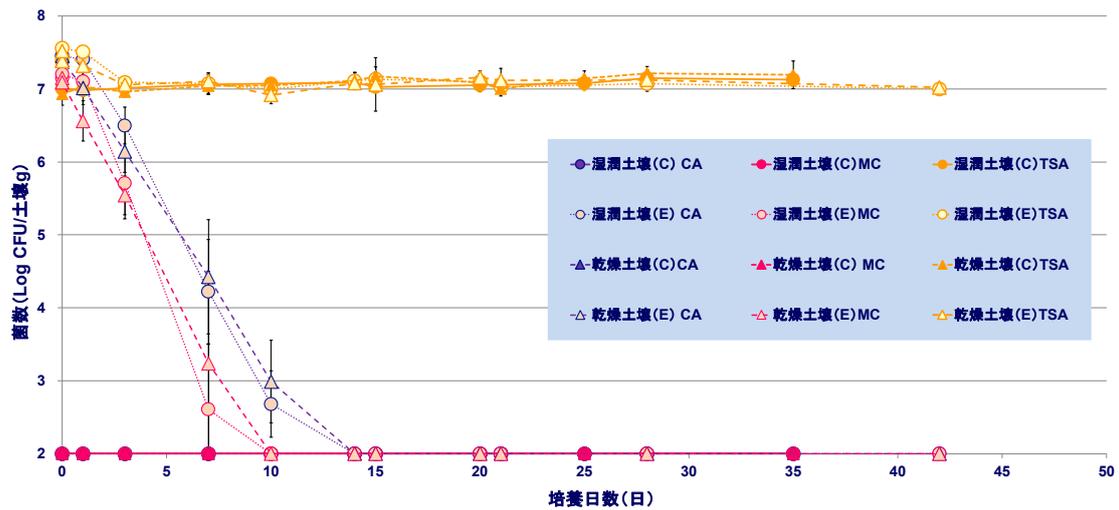


図 8 未滅菌土壌における大腸菌FDA株 (ATCC25922) の生残特性 常温条件 (25°C)

(C) : 大腸菌無接種、(E) : 大腸菌接種

CA : クロモカルトコリフォームアガー、MC : マッコンキーアガー、TSA : トリプ
チケースソイ寒天培地

土壌に接種した大腸菌の生残性は、低温条件では土壌水分が制限要因になると考えられる。一方、常温条件では水分含量と生残特性との関係は認められないが、乾燥土壌では水分が少ないことにより、湿潤土壌では共存する微生物の活性に伴い、大腸菌が速やかに減少したと考えられる。

(エ) 研究成果の活用における留意点

黒ボク土に接種した大腸菌は低温期では5週間程度、常温期では2週間程度で検出限界以下となった。完熟か未確認の堆肥施用後の播種や苗の定植は直後の作付けでは可食部への有害微生物の付着リスクを考慮する必要がある、一定期間（該当期間以上）を経過してから播種や苗の定植を行うことで有害微生物への汚染リスクを低減できると考えられる。得られた結果は特定の菌株によるもので、他の菌株の情報を確認した上で活用する必要がある。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

なし

<引用文献>

5 研究成果の発表

別添のとおり。

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

<研究総括者の自己評価>

項目		評価結果
試験研究全体		A
研究 小 課 題	レタス葉上における大腸菌の生残特性の検討	A
	土壌環境における大腸菌の生残特性に検討	A
		A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
		A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
		A : 順調 B : 概ね順調 C : やや遅れている D : 遅れている
自己評価コメント		

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

課題番号	(1) 研究推進会議等開催回数	(2) 行政が活用しうる成果の有無	(3) 学術論文数		(4) 口頭発表回数		(5) 出版図書数	(6) 国内特許権等数		(7) 国際特許権等数		(8) 報道件数	(9) 物品購入の有無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
20330845	3	有											有

(1) 研究推進会議等の開催実績

区分: ①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者数	消費・安全局担当官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	R2検討会	R3年2月28日	オンライン	10	有	令和2年度の成果検討および令和3年度の駅アック検討
①	中間検討会	R3年8月20日	オンライン	17	有	令和2年度の成果および令和3年度の進捗状況の確認
①	R3検討会	R4年2月18日	オンライン	17	有	令和2年度および令和3年度の成果検討

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8) 報道件数

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9) 購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		
インキュベータ	EYELA FLI-2010A	1	1,244,650	1,244,650	土壌培養実験	
インキュベータ	EYELA FLI-2020A	1	1,311,200	1,311,200	土壌培養実験	
分光光度計	Eppendorf BioSpectrometer No. 6137000014	1	970,200	970,200	菌体調製	