

3種殺菌剤によるカンキツ果実表面のカンキツかいよう病菌殺菌効果試験

原 紀香¹⁾・藤田 聖一・佐竹 優生子・鳴尾 高純・須之内 恒久

神戸植物防疫所

A comparative experiment on the three kinds of disinfectant used surface treatment against *Xanthomonas citri* pv. *citri* on citrus fruits. Norika Hara¹⁾, Shoichi Fujita, Yuko Satake, Takasumi Naruo, Tsunehisa Sunouchi (Kobe Plant Protection Station, 1-1, Hatoba-Cho, Kobe-Shi, Chuo-Ku, Hyogo-Ken, 650-0042, Japan. ¹⁾ Research Division, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **56**: 9-12 (2020)

Abstract: *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *X. citri* pv. *aurantifolii*, pathogens that cause citrus canker, are listed as quarantine pests in the EU. To prevent the introduction of these pathogen, the EU requires third countries where these pathogen are located to conduct the surface treatment of citrus fruits being exported to EU countries. At the time of this study, only sodium hypochlorite (SH) could be used in Japan. The purpose of this study is to research the possibility of using peracetic acid (PAA) and/or strongly-acidic electrolyzed water (EW) as an alternative disinfectant to SH against *X. citri* pv. *citri*. Therefore, the disinfection effectiveness and degree of damage caused by the treatments were estimated.

The test results showed that no *X. citri* pv. *citri* was detected on fruits treated with 85 ppm PPA (1 minute), which is the same as the 200 ppm SH (2 minutes) treatment. On the other hand, *X. citri* pv. *citri* was recovered from citrus fruits treated with EW (2 minutes). Also, no damage was observed on PAA-treated fruits. From the result of this study, PAA treatment was considered to be an effective citrus fruit surface treatment against *X. citri* pv. *citri* for export to EU countries.

Key Words: Citrus canker, Fruit surface treatment, Peracetic acid, Strongly-acidic electrolyzed water

欧州連合（European Union; EU）は、カンキツかいよう病の病原菌である *Xanthomonas citri* pv. *citri* 及び *X. citri* pv. *aurantifolii* を検疫有害植物に指定しており、これらの侵入を防ぐため、EU は発生国に対し、EU 向けに輸出するカンキツ果実の表面殺菌を要求している。本研究実施時では、次亜塩素酸ナトリウムによる処理のみが日本で認められている。本研究の目的は、過酢酸及び強酸性電解水が *X. citri* pv. *citri* に対する次亜塩素酸ナトリウムの代替となるかを調査することであり、殺菌効果及び殺菌処理が果実に与える障害の有無について確認した。試験の結果、次亜塩素酸ナトリウム（200 ppm、2 分間）による処理と同等に過酢酸（85 ppm、1 分間）の処理を行った果実からは当該病菌は確認されなかった。一方で、2 分間の強酸性電解水処理を行った果実からは当該病菌の生菌が検出された。また、過酢酸処理を行った果実に障害は見られなかった。本試験から過酢酸による処理は、EU 加盟国向けカンキツの *X. citri* pv. *citri* の表面殺菌剤として有効と考えられた。

緒 言

カンキツかいよう病（Citrus Canker）は、カンキツの葉、緑枝および果実に中心部がコルク化した円形の病斑を形成する。病斑により果実の商品価値を低下させ、激しく発病すると落葉や枝枯れを引き起こし、樹勢を著しく低下させることがある（塩谷, 2010）。欧州食品安全機関（European Food Safety Authority; EFSA）によると、カンキツかいよう病の病原細菌となる *Xanthomonas citri* pv. *citri* 及び *X. citri* pv. *aurantifolii* は、EU 加盟国内に発生しておらず、EU 加盟国内に侵入・まん延した場合、カンキツ産業に大なりリスクを与えるとしている（EFSA, 2014）。発生国からのカンキツ類果実を介したカンキツかいよう病菌の EU 域内への侵入を防ぐため、植物検疫に関する欧州理事会指令（Directive 2000/29/EC^{*}、以下、EU 理事会指令という。）において、*X. citri* pv. *citri* 又は / 及び *X. citri* pv. *aurantifolii* が分布している国（地域）に対して、カンキツ類果実の輸出に際し満たすべき植物検疫条件が記載されている。

¹⁾ 横浜植物防疫所調査研究部

主な植物検疫条件として、カンキツかいよう病の症状を呈していない果実であること、当該病菌に有効な表面殺菌を行うことの要求が規定されている。日本では、*X. citri* pv. *aurantifolii* の発生は確認されていないが、*X. citri* pv. *citri* は広く分布している（日本植物病理学会編, 2020）ことから、EU 加盟国にカンキツ類生果実を輸出しようとする場合は、EU の要求を満たす必要がある。これまで、日本で有効と認められている表面殺菌処理は、有効塩素濃度 200 ppm 以上の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 2 分間以上浸漬する方法に限定されていた。他方、2018 年 1 月、EU 理事会指令が改正され、輸出国植物検疫機関がカンキツかいよう病菌に効果があると認めるものであって、事前に EU 委員会に処理方法を通知することを条件に表面殺菌処理方法を追加できることとなった。新たな表面殺菌剤・方法による表面殺菌が追加となることで、日本の多種多様なカンキツ栽培形態、輸出入者のニーズに合わせた表面殺菌処理の適用が見込まれ、輸出促進の一助になることが考えられる。

輸出果実に使用する殺菌剤は、カンキツかいよう病菌に対して十分な殺菌能力を有しているのみならず、日本で殺菌処理が行えるよう国内の入手が容易で、使用に係る規制等の制限の有無も考慮する必要がある。このことを踏まえ、既存の次亜塩素酸ナトリウム水溶液以外に国内で食品添加物として登録されておりカンキツ果実への使用が認められている過酢酸製剤及び塩素系殺菌剤の強酸性電解水の 2 剤が次亜塩素酸ナトリウムの代替となる新たな殺菌剤になる可能性があると考えた。なお、米国においては、85 ppm の過酢酸に 1 分間カンキツ果実を浸すことが、カンキツかいよう病菌に対する殺菌処理の一つとして認められており（Parra, 2007; USDA, 2016）、果実の州間移動や EU への輸出前の表面殺菌に用いられているが（USDA, 2018）、日本で分離されたカンキツかいよう病菌及び日本産の果実を用いた試験は実施されていない。

このため、本研究では、過酢酸製剤又は強酸性電解水による処理が既存の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用した殺菌処理方法と比較し、同等以上の殺菌効果を有するかを検証すること、及び、表面殺菌が果実に与える障害の有無を検証することを目的として試験を行った。

※本試験実施時における EU の植物検疫規則。2019 年 12 月 14 日以降、Directive 2000/29/EC は Regulation 2016/2031 に置き換えられ、EU 域内に輸入されるカンキツを含めた植物に適用される条件は、EU implementing regulation 2019/2072 に移行された。

材料と方法

1. カンキツかいよう病菌接種果実の作成

農業生物資源ジーンバンクから分譲を受けたカンキツかいよう病菌株（*Xanthomonas campestris* pv. *citri*（=*X. citri* pv. *citri*））（MAFF 番号:673036、分離元:温州みかん）を NA 培地（Nutrient Broth 8 g/l、寒天 15 g/l、pH 6.8）上で培養後、滅菌水中に懸濁し、吸光度 0.1（660 nm）（細菌密度 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml）に調整した。

日本産の温州みかん（*Citrus unshiu*）及びゆず（*Citrus junos*）の果実にカーボランダムを散布し軽くこすり、果実表面に全体的にまんべんなく微小な傷をつけた後、細菌懸濁液 0.5 ml を果実全体にまんべんなく塗布し、15 分間静置した果実をカンキツかいよう病菌接種果実とした。

2. 殺菌効果試験

(1) 使用殺菌剤

試験で使用した次亜塩素酸ナトリウム水溶液は、有効塩素濃度が 200 ppm となるよう調整し、過酢酸は過酢酸製剤（パーサン MP2-J、関東化学）を希釈し、過酢酸濃度が 85 ppm となるよう調整した。強酸性電解水は、保存条件によっては有効塩素濃度が低下することが知られていることから（小西ら, 2000）、強酸性電解水生成器（アルトロン・ネオ AL-740、第一産業）で生成した電解水（pH 2.4 以下、有効塩素濃度 20~40 ppm）を速やかに供試した。

(2) カンキツかいよう病菌接種果実の殺菌試験

温州みかん及びゆず果実に 1. の処理を施した後、温州みかん果実については各殺菌剤 50 ml 中に、ゆず果実については各殺菌剤 200 ml 中に浸漬処理を行った。過酢酸の殺菌条件については、米国で行われている処理基準（85 ppm、1 分間）（USDA, 2018）を参考とし、強酸性電解水の殺菌条件については、次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同様に塩素系の殺菌剤であることから、日本で行われている現行の処理基準を参考として 2 分間の処理とした。また対照区として各接種果実を滅菌水 50 ml 又は 200 ml 中に同様に浸漬した。なお、各処理区及び対照区において、3 果実ずつ供試した。

(3) 殺菌効果確認

(2) までの処理を行った各果実を各処理液から取り出し、プラスチックバッグに入れ、その中に 100 ml のリン酸緩衝液（0.075 M、pH 7.0）を添加し、超音波洗浄を 5 分間行った。各洗浄液を回収後、15℃、13,000 g で 10 分間遠心分離し、上清を除去し 5 ml に調整した。その後、ボルテックスで攪拌し、段階希釈を行った攪拌液 0.1 ml を供試菌株の半選択培地である KCB 培地（Nutrient Broth 8 g/l、寒天 15 g/l、カスガマイシン 16 mg/l、セファレキシム 16 mg/l、クロロタロニル 12 mg/l（Graham and Gottwald, 1990））に塗布した。KCB 培地上で 25℃、5~8 日間インキュベーター内で培養後、カンキツかいよう病菌由来の黄色コロニーの数を計数した。また、黄色コロニーが確認できたものは、1 果あたりの CFU（Colony Forming Unit）値から、対数値（log10 CFU/ 果）を算出した。処理区にあつてはこの値を殺菌後果実の生菌数値とした。また、対照区の果実の生菌数値から殺菌後果実の生菌数値を引いた値（Log Reduction Value（対数減少値））を算出し、殺菌効果の指標とした。

3. 果実障害試験

過酢酸を用いたゆず果実の果実障害試験を行った。試験は、ゆず果実を過酢酸に 1 分間浸漬した処理区と無処理区を設け、それぞれ 5 果ずつ供試し、室温で 14 日間静置し、数日毎に 4

名の評価者により果実評価を行った。果実の評価方法は外観上から処理区、無処理区を判別できないようにし、各評価者が外観、香り、果実の硬さに異常がないかを3段階の基準により評価した。

結 果

1. 殺菌効果確認試験

各殺菌試験の結果、KCB培地上に確認された生菌数値及び対数減少値は、それぞれ表1、2のとおりであった。各対照区で黄色コロニーが確認され、次亜塩素酸ナトリウム水溶液及び過酢酸の両処理区では黄色コロニーが確認されなかった。強酸性電解水処理区では、対照区と比較して少ないものの黄色コロニーが確認された。対数減少値は微生物の殺菌程度の指標として用いられており（USDA, 2017）、処理前後の対数を比較し、対数値が1低下する毎に細菌数が10分の1に低減することを示す。強酸性電解水処理区の対数減少値から、温州みかん果実では対照区と比較して88%から98%程度、ゆず果実では99%から99.99%程度の殺菌効果があった。また、両果実の処理で

対数減少値が次亜塩素酸ナトリウム水溶液処理区よりも低い値であったため、殺菌効果は次亜塩素酸ナトリウム水溶液よりも低かったと考えられた。過酢酸処理区では、対照区と比較して温州みかん及びゆず果実の殺菌処理でいずれも黄色コロニーが検出されず、4.84以上の対数減少があり、99.99%以上の殺菌効果があると考えられた。また、過酢酸処理区では両果実の処理で次亜塩素酸ナトリウム水溶液処理区と同等以上の対数減少値が出ていたため殺菌効果も同等以上であると考えられた。

2. 果実障害試験

ゆず果実について、外観、香り及び硬さについてそれぞれ3段階の基準を定め、各評価者毎に評価を実施した。この結果、表3のとおり処理区の評価の平均は、無処理区と等しいか、上回っていたことから、過酢酸処理による果実への障害は認められなかった。

考 察

1. の試験結果から、過酢酸においてはカンキツかいよう病菌

Table 1. Surviving population value on *Citrus unshiu* and Log reduction value.

Treatment method	Surviving population value (log10 CFU/fruit) ¹⁾		Log Reduction Value (=B-A)	Sterilization rate (%) ³⁾
	A. Treated fruit	B. Control fruit		
Sodium Hypochlorite (200 ppm, 2 min)	ND ²⁾	3.81 ± 0.17	3.64	99.9
Peracetic acid (85 ppm, 1 min)	ND	5.46 ± 0.30	5.16	99.999
Strongly acidic electrolyzed water (2 min)	2.52 ± 0.20	3.81 ± 0.17	0.92 - 1.66	88 - 98

1) The means of three measurements±standard deviation.

2) Indicates no detectable survivors via direct plating procedure.

3) Sterilization rate (%) = $((10^B - 10^A) / 10^B) \times 100$

Table 2. Surviving population value on *Citrus junos* and Log reduction value.

Treatment method	Surviving population value (log10 CFU/fruit) ¹⁾		Log Reduction Value (=B-A)	Sterilization rate (%) ³⁾
	A. Treated fruit	B. Control fruit		
Sodium Hypochlorite (200 ppm, 2 min)	ND ²⁾	4.96 ± 0.12	4.84	99.99
Peracetic acid (85 ppm, 1 min)	ND	4.96 ± 0.12	4.84	99.99
Strongly acidic electrolyzed water (2 min)	2.61 ± 0.39	5.94 ± 0.85	2.09 - 4.57	99 - 99.99

1) The means of three measurements±standard deviation.

2) Indicates no detectable survivors via direct plating procedure.

3) Sterilization rate (%) = $((10^B - 10^A) / 10^B) \times 100$

Table 3. Mean characteristics of *Citrus junos* between treated and control fruit.

Evaluation date	Surface Color ¹⁾		Flavor ²⁾		Hardness ³⁾	
	Peracetic acid (85 ppm, 1 min)	Control	Peracetic acid (85 ppm, 1 min)	Control	Peracetic acid (85 ppm, 1 min)	Control
First Day	0	0	0.1	0.25	0	0
Third Day	0	0	0	0.1	0	0
Seventh Day	0	0	0.05	0.05	0	0
Tenth Day	0	0	0.05	0.05	0	0
Fourteenth Day	0	0	0	0	0	0

1) Change in surface color was graded in three levels. 0=no change, 1=change, 2=remarkable change

2) Change in flavor was graded in three levels. 0=no change, 1=slightly smell, 2=smell

3) Change in hardness was graded in three levels. 0=no change, 1=slightly soft, 2=soft

に対し次亜塩素酸ナトリウム水溶液による処理との差は見られず同等程度の殺菌効果があることが確認できた。過酢酸は米国と同様の処理条件 (USDA, 2018) で、日本産の果実及び日本産果実由来のカンキツかいよう病菌を用いても十分な殺菌効果が確認できたことから、日本においても同様の処理条件で表面殺菌を実施することが可能であると考えられた。なお、Narciso (2005) は、カンキツ果実に真菌類等を接種し、Mathew ら (2018) は、マンゴー果実にサルモネラ菌を接種し、過酢酸と次亜塩素酸ナトリウム水溶液による殺菌効果を比較しており、本研究と同様に過酢酸が次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同等以上の殺菌効果を有していることを報告している。一方、強酸性電解水においては、カンキツかいよう病菌に対して一定の殺菌効果は有するものの、既存の次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同等の安定した殺菌効果を有していることは確認できなかった。

また、本試験で過酢酸を用いた表面殺菌による果実の外観、香り、硬さへの影響は確認できなかったことから、過酢酸をカンキツ生果実の表面殺菌に用いた場合に果実に与える負荷は低いと考えられた。次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含む塩素溶液は、有機物と接触することで分解されるため、有効塩素濃度を維持するためには頻繁に薬液を更新する必要がある (小畑ら, 1969)。一方、過酢酸は、有機物接触による失活が少ないこと (大越, 2016) から塩素溶液よりも長い時間殺菌効果があるとされている (Narciso, 2005)。また、過酢酸は、人体に無害な物質に分解され有害な副産物を生じないことから塩素溶液よりも食品を介した人へのリスクが少ないことが知られている (Banach *et al.*, 2015; Taverner *et al.*, 2018)。以上のことから、過酢酸による浸漬処理は、EU に輸出する果実に用いる有効な表面殺菌方法の一つとして適用が可能であると考えられた。

引用文献

- Banach J.L., I. Samper, S. Van Haute and H. J. Van der Fels-Klerx (2015) Effect of Disinfectants on Preventing the Cross-Contamination of Pathogens in Fresh Produce Washing Water. *Int J Environ Res Public Health*. **12**(8): 8658–8677
- EFSA(European Food Safety Authority) (2014) Scientific Opinion on the risk to plant health of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* for the EU territory. *EFSA Journal* 2014. **12**(2).
- Graham, J. H. and T. R. Gottwald (1990) Variation in Aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. *Phytopathology*. **80**: 190-196.
- 小西成樹、伊藤和彦 (2000) 短期間および長期間の保存における電解水の特性値変化. 日本食品科学工学会誌 : **47**(5)
- 日本植物病理学会編 (2020) 日本植物病名目録、日本植物防疫協会 : 1362pp.
- Mathew, E. N., M. S. Muhammed, C. Bedell and M. A. Amalaradjou (2018) Efficacy of Chlorine, Chlorine Dioxide, and Peroxyacetic Acid in Reducing *Salmonella* Contamination in Wash Water and on Mangoes Under Simulated Mango Packinghouse Washing Operations. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. **2**. Article 18
- Narciso, J. A. (2005) An Assessment of Methods to Clean Citrus Fruit Surfaces. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **118**: 437-440
- Obata, T., T. Tsuboi, S. Wakimoto (1969) Studies on the Detection of *Xanthomonas citri* by Phage Technique and the Surface Sterilization of Unshu Orange for Export to the United States. *Res. Bull. Pl. Prot. Jap* **7**: 26-37
- 大越俊行 (2016) 新規殺菌剤としての過酢酸製剤. 食品と開発 **51**(2) : 34-37.
- Parra, G. (2007) Information regarding Peroxyacetic Acid and its efficacy to treat Citrus Canker bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (online) , available from <https://irrec.ifas.ufl.edu/postharvest/pdfs/Peroxyacetic_Acid_Efficacy.pdf>, (accessed 2020-01-29).
- 塩谷浩 (2010) カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 微生物遺伝資源利用マニュアル **29** : 1-11.
- Taverner, P., A. Leo and N. Cunningham (2018) Efficacy of peracetic acid in ambient and warm water to control conidia of *Penicillium digitatum*. *NEW ZEALAND JOURNAL OF CROP AND HORTICULTURAL SCIENCE*. 46(3): 264-268
- USDA (United States of Department of Agriculture) (2016) Treatment Manual.(online), available from <https://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/ports/downloads/treatment.pdf>, (accessed 2020-01-29).
- USDA (United States of Department of Agriculture) (2017) Salmonella Compliance Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products and Revised Appendix A June 2017, available from <<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bf3f01a1-a0b7-4902-a2df-a87c73d1b633/Salmonella-Compliance-Guideline-SVSP-RTE-Appendix-A.pdf?MOD=AJPERES>>, (accessed 2020-04-15).
- USDA (United States of Department of Agriculture) (2018) Florida Fresh Citrus Fruit Shipment Procedures version 5.3. (online), available from <https://irrec.ifas.ufl.edu/postharvest/presentations/2018_Packinghouse_Day/Fresh%20Fruit%20Shipment%20Procedures%20Ver%205.3.pdf>, (accessed 2020-01-29).