九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

栽培段階におけるホウレンソウのサルモネラ汚染とその生残性

三島，朋子
九州大学大学院生物資源環境科学府生命機能科学専攻食料化学工学教育コース食品衛生化学研究室

島本，美紗子
九州大学大学院生物資源環境科学府生命機能科学専攻食料化学工学教育コース食品衛生化学研究室

城戸，希望
九州大学大学院生物資源環境科学府生命機能科学専攻食料化学工学教育コース食品衛生化学研究室

本城，賢一
九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室

他

https://doi.org/10.15017/1687703

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 71 (2), pp.37-45, 2016-09-01. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第 71 巻　第 2 号　37-45　（2016）

栽培段階におけるホウレンソウのサルモネラ汚染とその生残性

三　島　朋　子[1]・島　本　美紗子[1]・城　戸　希　望[1]
本　城　賢　一・宮　本　敬　久*
九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室
（2016年4月22日受付，2016年5月10日受理）

Contamination and survival of *Salmonella* on leaf vegetable during cultivation

Tomoko MISHIMA[1], Misako SHIMAMOTO[1], Nozomi KIDO[1],
Ken-ichi HONJOH and Takahisa MIYAMOTO*
Laboratory of Food Hygienic Chemistry, Division of Food Science and Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒　　言

近年，食の欧米化や食の外部化が進んだことから，我が国の一人当たりの野菜消費量は減少傾向にある．野菜の1人当たり年間消費量について食料需給表でみると1987年には111kgであったが，2007年には93.9kgと20年間に約15％減少している（独立行政法人農畜産業振興機構，2011）．しかし，経済性や利便性の高いカット野菜やパッケージサラダといった生食用野菜加工品の消費は増加傾向にあり，日本における生食サラダ用野菜類の総販売額は，1996年には約1000億円，1999年には約1300億円（泉秀実，2001）となっている．同様にカット野菜販売の市場規模も年々増加し，2012年の推計では約1900億円（独立行政法人農畜産業振興機構，2013）とされている．このような生食用野菜の消費量増加に伴い，野菜に起因する食中毒事故発生の増加が懸念される．実際にアメリカでは2007年に発生した食中毒事故のうち約20％が野菜に起因するとされ，これは1991年の8％から大幅に増加している（農林水産省 農林水産技術会議事務局技術政策課，2007）．日本では生野菜に起因する大規模な食中毒事故はまだ発生していないものの，加熱殺菌されていない野菜加工品である浅漬けによる集団食中毒事件の発生は後を絶たない．2012年8月に発生した白菜の浅漬けを原因食品とした大腸菌O157食中毒事件では患者数169名，8名の死者を出している（札幌市, 2013）．白菜の浅漬け以外にもキュウリの浅漬け，和風キムチなどを原因とした大腸菌O157による食中毒事件が報告されている．

これらの生食用野菜を原因とする食中毒は下痢原性大腸菌，サルモネラ，リステリア，赤痢菌等の病原菌やウイルスにより引き起こされており，野菜は家畜由来の病原菌などで汚染された農業用水や未完熟な堆肥の使用，作業者により栽培段階で食中毒細菌に汚染されると考えられている（Beuchat，1996）．このため青果物の汚染は，栽培土壌中の病原菌の濃度や，土壌と青果物可食部の距離に影響されると考えられている（Jacobsen and Bech，2012）．さらに汚染土壌の青果物への付着以外に汚染土壌に存在する虫や微生物が媒体となり青果物が汚染される可能性がある．一度サルモネラで汚染されるとサルモネラは土壌中で長ければ数ヶ月生残しうる（Holley *et al*, 2006; Islam *et al*., 2004）ため，汚染土壌中で青果物を栽培することによる青果物可食部の汚染が懸念される．しかし，その詳

[1] 九州大学大学院生物資源環境科学府生命機能科学専攻食料化学工学教育コース食品衛生化学研究室
[1] Laboratory of Food Hygienic Chemistry, Division of Food Science and Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan
* Corresponding author（E-mail:tmiyamot@agr.kyushu-u.ac.jp）

細な汚染経路などについては不明な点が多い．また，生食用野菜類では加熱殺菌が困難であるため，安全性確保のためには，科学的根拠に基づいた栽培段階における衛生管理が重要である．

本研究では，主要な食中毒細菌のひとつである *Salmonella* Enteritidisに緑色蛍光タンパク質（GFP）発現プラスミドを導入した*S.* Enteritidis-GFPを種々の濃度で接種した初期汚染土壌でホウレンソウを栽培し，土壌中における*S.* Enteritidis-GFPの生残性，食中毒細菌の可食部への移行と土壌汚染濃度との関連を調べた．次に，ホウレンソウに*S.* Enteritidis-GFP汚染水を頭上噴霧し，*S.* Enteritidis-GFP汚染潅水からの汚染と葉上での生残性について調べたので報告する．

本研究は，農林水産省「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」事業において「生食用野菜における病原微生物汚染の防止・低減技術の開発」の課題番号FV4103「野菜の栽培過程におけるサルモネラ汚染低減化技術の開発」として実施したものであり，関係各位に深謝いたします．

材 料 と 方 法

1．GFP発現*Salmonella* Enteritidisの作製と培養

S. Enteritidis IFO3313は大阪発酵研究所より購入した．エレクトロポレーションにより*p*GFP Vector（緑色蛍光タンパク質（GFP）発現プラスミド，BDバイオサイエンス，USA）を導入した*S.* Enteritidis-GFP株を作製した（Mishima *et al*., 2012）．

S. Enteritidis-GFPを100 mL の0.5 mg/mL アンピシリン添加トリプトソイブロス（Becton, Dickinson and Company）に1白金耳接種し，37℃で一晩振とう培養して定常期の菌体を得た．この培養液から遠心分離（8000×*g*，25℃，10分間）により集菌した．菌体を滅菌水に懸濁し，遠心分離（8000×*g*，25℃，10分間）により，集菌して洗浄した．これを滅菌水10 mLにOD_{660}=1.2となるように懸濁し，約 9 logCFU/mLの濃度の*S.* Enteritidis-GFP菌液を得た．これを滅菌水で希釈して0～8 logCFU/mLの菌液を調製した．

2．土壌の調製

オートクレーブ処理した土壌（石灰を混ぜて pH6.2～6.5に調整した培養土pot mix，株式会社大石物産）100 gに対して種々の濃度の*S.* Enteritidis-GFP菌液50 mLを添加し，十分に混合して調製した2 log～8 logCFU/gの*S.* Enteritidis-GFP汚染土壌45 gを黒ポット（直径7.5 cm）に移した．

3．ホウレンソウの栽培

約45 gの土壌を入れた黒ポット（直径7.5 cm）にホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）の種子（品種：サラダアカリ，タキイ種苗，京都市）を播種し，バイオフォトチャンバー LX-3000（TAITEC）内で栽培した．バイオフォトチャンバー内は明期16時間，暗期8時間，20℃に設定した．毎日、滅菌した水道水20 mLを土壌に潅水した．また液体肥料（ハイポネックス原液，ハイポネックスジャパン，大阪市）を500倍に希釈したもの30 mLを週に1回土壌に潅水した．

4．*S.* Enteritidis-GFP懸濁液の頭上潅水

オートクレーブ処理した市販土壌で35日間前後栽培したホウレンソウの頭上10 cm の高さから，種々の濃度の*S.* Enteritidis-GFP懸濁液をスプレーボトル（アズワン株式会社）に入れて4回噴霧した．この操作により，ホウレンソウ1株当たり約2 mLの菌液が噴霧された．この後は土壌潅水により栽培し，7日後に収穫した．

5．表面殺菌法

収穫したホウレンソウは，500mLの70％エタノールに1分間浸漬後，500mLの10％次亜塩素酸ナトリウム水溶液に1分間浸漬した．その後，500mLの脱イオン水で1分間の洗浄を3回繰り返して洗浄した．

6．土壌の生菌数測定

栽培開始を0日目とし，7，14，21，28，35日目に1ポットの土壌全体を3つに分けて採取し，それぞれを別のストッマカー袋に入れ，緩衝ペプトン水（Buffered Peptone Water，BPWと略す，日水製薬（株））で希釈した．30秒間のストマッカー処理後，10倍希釈系列を作製した．各希釈液100μLをTryptic Soy Agar（TSAと略す，Becton, Dickinson and Company），Desoxycholate-Hydrogen sulfide-Lactose agar（DHLと略す，日水製薬（株））寒天平板に塗抹し，37℃，48時間培養後に生じたコロニー数を計測し，生菌数を算出した．TSA による生菌数を一般生菌数，DHLによる生菌数をサルモネラ生菌数とした．

7．ホウレンソウの生菌数測定

ホウレンソウを土壌表面から約1 cm上のところで茎

を滅菌済みのメスで切断して収穫した．ストマッカー袋に入れ，滅菌水中で30秒間ストマッカー処理後，滅菌水で10倍希釈系列を作製した．各希釈液100μLをTSAおよびDHL寒天平板に塗抹し，37℃，48時間培養後に生じたコロニー数を計測し，それぞれ一般生菌数及びサルモネラ生菌数を算出した．

8. サルモネラ定性試験法

サルモネラ定性試験では，試料をBPW中でストマッカー処理後に37℃で24時間培養した．増菌培養後の培養液をRappaport-Vassiliadis Soya peptone Broth（MERCK社）に接種して選択増菌培養を行なった後，培養液をDHL寒天平板に塗末して培養し，サルモネラと推定される中心部位が黒色のコロニーを分離した．このコロニーから調製したDNAを鋳型としてサルモネラ特異的なinvA遺伝子増幅用プライマーセットを用いてPCRを行い，サルモネラを確認した（Mishima *et al*., 2012）．PCR反応液は全量が10 μLで，終濃度が0.2mM dNTPs（TOYOBO），0.4 μM forward primer（5'- gtgaaattatcgccacgttcgggcaa -3'），0.4 μM reverse primer（5'- tcatcgcaccgtcaaaggaacc -3'），0.05 unit/μL Taq polymerase（SIGMA）となるようにPCR Buffer（SIGMA）で調製した．TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600（タカラバイオ株式会社）を用いて，95℃で3分間加熱後，熱変性：95℃で30秒，アニーリング：55℃で30秒，伸長反応：72℃で30秒を1サイクルとして35サイクルの反応を行った．PCR終了後，PCR反応液を1.5％アガロースゲル電気泳動後，アガロースゲルを暗所で1 μg/mLエチジウムブロマイド溶液に20分間浸漬してDNAを染色した．紫外線照射装置 MBP-UV312（株式会社美舘イメージング）により紫外線を照射して増幅産物を検出した．目的サイズ（285bp）の増幅産物のバンドが確認できた試料をサルモネラ陽性とした．

結果および考察

1．ホウレンソウ栽培土壌中のサルモネラ生菌数の変化

ホウレンソウの栽培開始から収穫の35日目までの栽培期間中の土壌中の一般生菌数および接種した*S*. Enteritidis-GFP生菌数を経時的に測定した．

約2，4，6，8 logCFU/gとなるように*S*. Enteritidis-GFPで初期汚染した土壌を調製して調べた結果，**Fig. 1**に示すように2，4，6 logCFU/gの初期汚染土壌中の*S*. Enteritidis-GFP生菌数はそれぞれ初めの28，14，7日間は増加し，この後ホウレンソウ収穫時の35日目までに徐々に減少した（**Fig. 1**）．これに対して8 logCFU/gの初期汚染では，*S*. Enteritidis-GFP生菌数は35日目まで徐々に減少した（**Fig. 1**）．全ての汚染土壌において収穫時の35日目には初期汚染濃度に依存して4～7 logCFU/gの*S*. Enteritidis-GFPが生残した．

Mishimaらは25℃におけるトマト栽培土壌におけるサルモネラの消長を調べた結果，低濃度のサルモネラ汚染土壌中では一旦生菌数が増加し，徐々に低下した

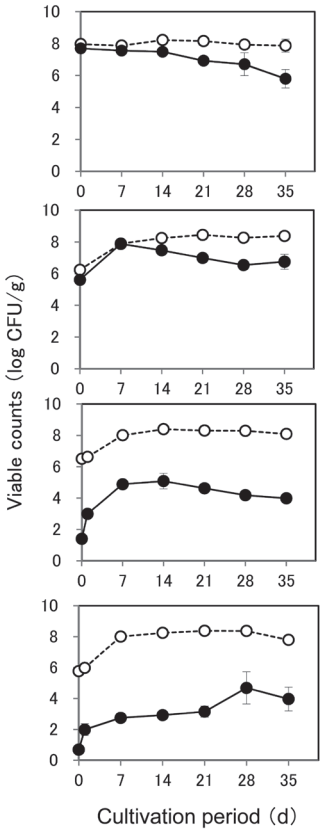

Fig. 1. Changes of viable and *Salmonella* counts of soil contaminated with *S*. Enteritidis-GFP at various initial concentration.
Total viable counts（○）and *Salmonella* counts（●）were measured by the conventional plating method using TSA and DHL agar, respectively. *S*. Enteritidis-GFP was also determined by the 3-tube MPN method. Values were means ± SD (n=3).

と報告している（Mishima *et al*., 2012）．また，土壌のサルモネラ初期濃度が7 logCFU/gの土壌中では，接種後1～3日間でサルモネラの濃度は約4倍に増加し，徐々に減少傾向が見られた報告（You *et al*., 2006）や，初期汚染濃度に依存して土壌中で28日間以上サルモネラが生残した報告（Anthurson *et al*., 2011）もある．本研究の結果でも同様に，低濃度のサルモネラ汚染土壌中では一旦サルモネラ生菌数が増加し，その後，徐々に低下したことから土壌中や植物肥料中の成分がサルモネラの生育を支持する事が示された．本研究ではホウレンソウを栽培したポット中の土壌について異なる部位ごとに比較は行わなかったが，文献によると，サルモネラを接種した農場規模の土壌では採取した土壌の深さにより汚染濃度に違いがあることや，根の周辺の土壌中でサルモネラの生菌数が増えることも報告されている（Semenov *et al*., 2009）．さらに土壌中のサルモネラの生残期間についての報告は数日間から332日間と様々である（Holly *et al*., 2006; Islam *et al*., 2004 ; Anthurson *et al*., 2011）．これはサルモネラの土壌中における生残性が土壌の温度，湿度，土壌の種類，常在菌および植物の有無，光の照射など様々な因子に影響されるためと考えられている（Jacobsen and Bech, 2012）．本研究で得られた結果は，実験室内のポット栽培におけるサルモネラの生残性を20℃で，明期16時間，暗期8時間の光照射下で調べたものであるが，前述の圃場栽培と同様の結果が得られたことから，圃場栽培における温度変化や明暗期間の不均一性の影響は加味する必要があると思われるが，圃場栽培環境における土壌中のサルモネラの消長を示すものと考えられた．

2．土壌のサルモネラ初期汚染濃度とホウレンソウ可食部汚染の関連

Fig. 2に頭上潅水後，35日間栽培後（収穫前）および収穫後のホウレンソウの写真を示す．初期汚染濃度として1.8，3.8，6.0，7.7 logCFU/gの*S*. Enteritidis-GFPを含む汚染土壌中で35日間栽培後に収穫したホウレンソウ可食部の*S*. Enteritidis-GFP汚染を調べた結果を**Table 1**に示す．写真には示していないが，サルモネラ汚染土壌で栽培しても非汚染土壌と同様にホウレンソウは生育した．この結果，6.0および7.7 logCFU/gの*S*. Enteritidis-GFP初期汚染土壌で栽培したホウレンソウは，それぞれ3検体全て定性試験により*S*. Enteritidis-GFP陽性であった．一方，1.8および3.8 logCFU/gの汚染土壌中で栽培したホウレンソウは，すべて定性試験で*S*. Enteritidis-GFP陰性であった．

次に7.8 logCFU/gの*S*. Enteritidis-GFP汚染土壌で栽培して収穫したホウレンソウの可食部汚染について調べた結果を**Table 2**に示す．収穫時の土壌の*S*.

Fig. 2. Spinach after overhead irrigation, at harvest time and harvested spinach
Spinach（Saradaakari）was cultivated in a soil contaminated with or without *S*. Enteritidis-GFP at 20° C with a photoperiod consisting of 16-h light and 8-h dark in the growth chamber. The plants were overhead irrigated with sterile water or water with *S*. Enteritidis-GFP at various concentrations. After cultivation for 35d, leaves were harvested for determination of viable and *Salmonella* counts.

Table 1. Viable and *Salmonella* counts of spinach leaves cultivated for 35 d in soil contaminated with *S.* Enteritidis-GFP at various initial concentrations

Initial *Salmonella* counts in soil (log CFU/g)	Sample No.	Viable counts (log CFU/g)		*Salmonella* Qualitative test
		Total	*Salmonella*	
1.8	1	3.9	<2.0	-
	2	2.0	<2.0	-
	3	4.2	<2.0	-
3.8	4	3.8	<2.0	-
	5	4.9	<2.0	-
	6	5.6	<2.0	-
6.0	7	4.5	<2.0	+
	8	5.90	<2.0	+
	9	6.3	<2.0	+
7.7	10	4.7	3.0	+
	11	3.6	<2.0	+
	12	4.3	<2.0	+

＋：*Salmonella* positive, －：*Salmonella* negative

Table 2. Effect of surface sterilization on viable and *Salmonella* counts of spinach leaves cultivated for 35 d in soil initially contaminated with *S.* Enteritidis-GFP at 7.8 log CFU/g.

	Sample No.	Viable counts (log CFU/g)		*Salmonella* Qualitative test
		Total	*Salmonella*	
Before sterilization	1	5.7	<2.0	+
	2	3.0	<2.0	-
	3	3.0	<2.0	+
	4	2.9	<2.0	-
	5	4.8	<2.0	-
	6	7.3	<2.0	+
	7	4.9	<2.0	-
	8	3.3	<2.0	-
	9	4.1	<2.0	-
After sterilization	1	<2.0	<2.0	-
	2	<2.0	<2.0	-
	3	<2.0	<2.0	-
	4	<2.0	<2.0	-
	5	<2.0	<2.0	-
	6	<2.0	<2.0	-
	7	<2.0	<2.0	-
	8	<2.0	<2.0	-
	9	<2.0	<2.0	-

＋：*Salmonella* positive, －：*Salmonella* negative
After cultivation for 35 d, *Salmonella* counts in soil ranged from 4.4 to 6.2 log CFU/g.

Enteritidis-GFP生菌数は4.4～6.2 logCFU/gであった．この土壌で栽培したホウレンソウでは9検体中3検体から定性試験により*S.* Enteritidis-GFPが検出された．しかし，エタノールと次亜塩素酸ナトリウムにより葉の表面殺菌を行って検査を行った結果，9検体すべて*S.* Enteritidis-GFP陰性であった．

サルモネラ汚染土壌で栽培したホウレンソウ可食部の汚染として，ホウレンソウ可食部への汚染土壌の付着による表面汚染と，土壌中のサルモネラがホウレンソウの根から侵入して可食部へ移行する内部汚染が考

えられる．これまでに*E. coli* O157: H7がレタスの根から導管を通り植物の細胞内小器官に移行することでレタス可食部が汚染された報告がある（Solomon *et al*., 2002a）．しかし，今回の結果では，ホウレンソウの葉の表面殺菌を行った9検体すべてでサルモネラ陰性であった．さらに検体数を増やして試験する必要があるが，ホウレンソウでは土壌栽培において根からの侵入による内部汚染の可能性は低く，汚染土壌で栽培したホウレンソウ可食部の汚染は，汚染土壌との接触による表面的な汚染であると推定された．今回の栽培試験結果より，土壌のサルモネラの初期汚染濃度が6 logCFU/g以上である場合や，栽培段階で土壌のサルモネラの濃度が6 logCFU/g以上であれば，35日間程度の短期間の栽培後に収穫されるサラダ用のホウレンソウ可食部はサルモネラ汚染されている可能性が高いと推定される．本研究の他にも5 logCFU/gのサルモネラ汚染土壌で栽培したレタスの葉からは63日目まで，パセリからは231日目までサルモネラが検出された例（Islam *et al*., 2004）もあり，食中毒発生のリスク低減のためには，生産段階を通して土壌の病原微生物管理が必であると考えられる．

3. 潅水のサルモネラ汚染濃度と可食部汚染の関連

サルモネラはレタスやホウレンソウの気孔を通じて内在化することが報告されている（Mitra *et al*., 2009; Erickson *et al*., 2010; Kroupitski *et al*., 2009）．これまでに，汚染水の頭上噴霧では他の潅水法と比較して青果物における大腸菌O157汚染率が高いという報告もある（Solomon *et al*., 2002b）．このように食中毒細菌汚染水を青果物栽培の灌水に使用することで青果物可食部が汚染されるため，洗浄・殺菌が不十分であれば食中毒の原因となる．そこで，サルモネラ懸濁液を頭上噴霧により潅水して栽培したホウレンソウ可食部におけるサルモネラの生残性を検討した．潅水から7日後に可食部の*S*. Enteritidis-GFP汚染を調べた結果を**Table 3**に示す．3.6 logCFU/mLの*S*. Enteritidis-GFP汚染水を頭上噴霧した結果，潅水から0および7日目ともにMPN-3本法および定性試験で*S*. Enteritidis-GFPが検出された．3.1 logCFU/mL以下と低濃度の*S*. Enteritidis-GFP懸濁液を頭上噴霧した場合には潅水から7日目においては，18検体すべてにおいて定性試験で*S*. Enteritidis-GFP陰性であった．さらに試験数を増やす必要があるが，ホウレンソウのベビーリーフ栽培において，3 logCFU/mL 以下のサルモネラ汚染水を頭上潅水しても潅水から7日後には可食部にはサルモネラは生残しないと考えられた．2006年にアメリカで発生したホウレンソウやレタスを原因食品とした大規模な食中毒事件では栽培段階での汚染潅水の使用が可食部汚染の原因であると推定されている（Mitra *et al*., 2009; Aruscavage *et al*., 2006）．アメリカではスプリンクラーによる潅水法が一般的であるが，これまでにレタスの大腸菌O157汚染率を汚染水の潅漑法毎に比較した結果では，点滴潅水（drip irrigation）や畦間潅水（furrow irrigation）より，頭上噴霧による潅水でレタス可食部の汚染率が最も高いことが報告されている（Kroupitski *et al*., 2009; Solomon *et al*., 2002b）．さらに大腸菌O157汚染水の頭上潅水により，レタスおよびホウレンソウ可食部で汚染が確認された例も数多報告されている（Song *et al*., 2006; Aruscavage *et al*., 2006）．アメリカの“Commodity Specific Food Safety Guidelines for the Production and Harvest of Lettuce and Leafy Greens”によると，葉菜類に使用可能な潅水用水の大腸菌数基準は126 CFU/100 mL以下と決められている（Ingram *et al*., 2011）．今回のサラダ用ホウレンソウにおけるサルモネラ汚染試験の結果では，この大腸菌基準値の1000倍の濃度でも1週間後にはサルモネラの生残が検出されなかった．サラダ用ホウレンソウとして収穫時にサルモネラが検出されないための生産条件を確立するには、更に検体数を増やして，頭上潅水のサルモネラ汚染濃度と生残期間の関係を明らかにする必要がある．

要　　約

Salmonella Enteritidisに緑色蛍光タンパク質（GFP）発現プラスミドを導入した*S*. Enteritidis-GFPを約2, 4, 6, 8 logCFU/gとなるように接種した初期汚染土壌でサラダ用ホウレンソウを栽培して調べた結果，播種から35日目の収穫時には初期汚染濃度に比例して4～7 logCFU/gの*S*. Enteritidis-GFPが土壌中に生残した．この*S*. Enteritidis-GFP初期汚染土壌で栽培・収穫したホウレンソウ可食部の汚染を調べた結果，3.8 logCFU/g以下の汚染土壌で栽培したホウレンソウは，すべて定性試験で*S*. Enteritidis-GFP陰性であったが，6.0 logCFU/g以上の初期汚染土壌では全て*S*. Enteritidis-GFP陽性であった．しかし，収穫後に可食部分を表面殺菌して調べた結果、全て陰性となった．*S*. Enteritidis-GFP汚染水を頭上潅水した結果、3.1 logCFU/mL以下の*S*. Enteritidis-GFP汚染水では潅水から7日後には試験した18検体すべて*S*. Enteritidis-GFP陰性であった．

Table 3. Viable and *Salmonella* counts of spinach leaves overhead-irrigated with *Salmonella*-contaminated water

Salmonella counts in irrigation water (log CFU/ mL)	after irrigation (d)	Sample No.	Viable counts (log CFU/g)		*Salmonella* Qualitative test
			Total	*Salmonella*	
0.3 (2.0)*	0	1	5.4	<2.0	-
		2	3.9	<2.0	-
		3	5.0	<2.0	-
	7	4	ND	ND	-
		5	ND	ND	-
		6	ND	ND	-
1.6 (36)*	0	7	<2.0	<2.0	+
		8	3.9	<2.0	-
		9	4.4	<2.0	-
	7	10	ND	ND	-
		11	ND	ND	-
		12	ND	ND	-
2.3 (200)*	0	13	4.6	<2.0	+
		14	5.7	<2.0	+
		15	5.3	<2.0	+
	7	16	ND	ND	-
		17	ND	ND	-
		18	ND	ND	-
2.5 (325)*	0	19	4.7	<2.0	+
		20	4.9	<2.0	+
		21	4.6	<2.0	+
	7	22	ND	ND	-
		23	ND	ND	-
		24	ND	ND	-
2.6 (360)*	0	25	5.1	<2.0	+
		26	6.0	<2.0	+
		27	2.93	<2.0	+
	7	28	ND	ND	-
		29	ND	ND	-
		30	ND	ND	-
3.1 (1200)*	0	31	4.3	<2.0	-
		32	3.5	<2.0	+
		33	4.2	<2.0	+
	7	34	ND	ND	-
		35	ND	ND	-
		36	ND	ND	-
3.6 (4015)*	0	37	<2.0	<2.0	+
		38	<2.0	<2.0	+
		39	3.8	<2.0	+
	7	40	ND	ND	+
		41	ND	ND	+
		42	ND	ND	+
3.7 (5445)*	0	43	3.6	3.1	+
		44	3.0	<2.0	+
		45	3.5	<2.0	+
	7	46	ND	ND	-
		47	ND	ND	-
		48	ND	ND	+

* , Values in the parentheses are *Salmonella* counts in CFU/mL
＋：*Salmonella* positive, －：*Salmonella* negative
ND：not determined

キーワード

汚染土壌、汚染灌水、サルモネラ、ホウレンソウ

文　　献

Anthurson, V., Sessitsch, A., and L. Jäderlund 2011 Persistence and spread of *Salmonella* enteric serovar Weltevreden in soil and on spinach plants. *FEMS Microbiol. Lett.*, **314**(**1**)：67-74

Beuchat, L. R. 1996 Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, **59**：204-216

独立行政法人農畜産業振興機構 2011 資料3－野菜の価格と消費との関係について－. www.alic.go.jp/content/000074970.pdf

独立行政法人農畜産業振興機構 2013 平成24年度カット野菜需要構造実態調査事業報告概要. www.alic.go.jp/content/000091984.pdf

Erickson, C., Webb, C., Diaz-Perez, C., Phatak, C., Silvoy, J., Davey, L., Payton, S., Liao, J., Ma, L., and P. Doyle 2010 Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *J. Food Prot.*, **73**(**6**)：1023-1029

Holley, R., Arrus, K., Ominski, K., Tenuta, M., and G. Blank 2006 *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *J. Environ. Quality*, **35**：1170-1180

Ingram, D., Patel, J., and M. Sharma 2011 Effect of Repeated Irrigation with Water Containing Varying Levels of Total Organic Carbon on the Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on Baby Spinach. *J. Food Prot.*, **74**：709-717

Islam, M., Morgan, J., Doyle,M., Phatak, S., Millner, P., and X. Jiang 2004 Persistence of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathog. Dis.*, **1**(**1**)：27-35

泉秀実 2001 カット野菜の微生物汚染度とその制御. 防菌防黴, 29(2)：107-114

Jacobsen, C., and T. Bech 2012 Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Res. International*, **45**：557-566

Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., and S. Sela 2009 Internalization of *Salmonella* enterica in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**：6076-6086

Mishima, T., Kido, N., Nakashima, S., Yamakawa, M., Miyaji, N., Soli, K.W., Honjoh, K., Md. Bari, L. and T. Miyamoto 2012 Investigation of possible situation of internalization of *Salmonella* Enteritidis in tomato fruits and bacterial survival during tomato plant cultivation, *Food Sci. Technol. Res.*, **18**(**6**)：869-877

Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, A., Talley, J., Gilliland, S., and J. Fletcher 2009 Effects of Route of Introduction and host Cultivar on the Colonization, Internalization, and Movement of the Human Pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in Spinach. *J. Food Prot.*, **72**：1521-1530

農林水産省 農林水産技術会議事務局 技術政策課 2007 米国における生食用野菜食品に起因する微生物学的危害の発生防止技術に関する研究動向調査. www.s.affrc.go.jp/docs/kankoubutu/foreign/pdf/no50.pdf

札幌市 2013 白菜浅漬による腸管出血性大腸菌O157食中毒事例について－, 病原微生物検出情報（IASR）, **34**(**5**)：126

Semenov, A., Overbeek, L., and A. Bruggen 2009 Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enteric serovar Typhymurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**：3206-3215

Solomon, E., Yaron, S., and K. Matthews 2002a Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. *Appl. Environ. Microbiol.*. **68**：397-400

Solomon, B., Potenski, J., and R. Matthews 2002b Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J. Food Prot.*, **65**(**4**)：673-676

Song, I., Stine, S., Choi, C., and C. Gerba 2006 Comparison of crop contamination by microorganisms during subsurface drip and furrow irrigation. *J. Environ. Eng.*, **132**(**10**)：1243-1248

You, Y., Rankin, S., Aceto, H., Benson, C., Toth, J., and Z. Dou 2006 Survival of *Salmonella* enteric serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(**9**)：5777-5783

Summary

Salmonella contamination of spinach leaf during cultivation was investigated. *Salmonella* Enteritidis expressing green fluorescent protein (*S*. Enteritidis-GFP) was used in this study. *S*. Enteritidis-GFP was detected from soil, which had been initially inoculated with the bacterium at more than 2 logCFU/g after 35-d cultivation. The viable *S*. Enteritidis-GFP counts in soil ranged from 4 to 7 logCFU/g in proportion to the initial inoculum from 2 to 8 logCFU/g after 35-d cultivation. All the 6 spinach plants were negative for *S*. Enteritidis-GFP by the qualitative test, when spinach had been cultivated in a soil initially contaminated with the bacterium at less than 3.8 logCFU/g. In contrast, all the 6 plants were positive for the bacterium when cultivated in a soil contaminated with more than 6.0 logCFU/g. However, the leaves of all 9 plants were negative for *S*. Enteritidis-GFP after surface sterilization, suggesting the surface contamination. At 7d after overhead irrigation of water contaminated with *S*. Enteritidis-GFP at less than 3.1 logCFU/mL, all the spinach plants were negative for the bacterium in 18 separately cultivated spinach plants.

Key words: contaminated soil, contaminated water, *Salmonella*, Spinach