

## 野菜の実生幼苗における大腸菌の消長

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Escherichia coli O157 : H7, seed, seedling, population dynamics, growth, vegetable 作成者: 白川, 隆, 我孫子, 和雄 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00001539">https://doi.org/10.24514/00001539</a>

# 野菜の実生幼苗における大腸菌の消長

白川 隆・我孫子和雄\*

(平成 16 年 12 月 6 日受理)

## Population Dynamics of *Escherichia coli* on Vegetable Seedlings

Takashi SHIRAKAWA and Kazuo ABIKO

### Synopsis

Population dynamics of *Escherichia coli* O157 on the seedling surface or in the seedling tissue of vegetables was studied. If the irrigation water or vegetable seeds were contaminated with *E. coli* O157, *E. coli* grew in the dipping water during germination. In the examination using spray inoculation with *E. coli* on vegetable seedlings, *E. coli* O157 grew on the leaf surface of all vegetable seedlings tested under high humidity conditions. *E. coli* also grew in the hypocotyls tissues of all vegetable seedlings tested when *E. coli* was inoculated to the hypocotyls by injury inoculation with a single needle. Based on the results mentioned above, it was suggested that *E. coli* generally could grow on the seedling surface and in the seedling tissue of vegetables.

**Key Words:** *Escherichia coli* O157: H7, seed, seedling, population dynamics, growth, vegetable

## I 緒 言

細菌性食中毒は、食中毒菌に汚染された様々な食材を摂取することによって発生する。生鮮野菜が食中毒の原因となることも少なくなく、アメリカ合衆国では食中毒菌に汚染されたレタス、トマト、アルファルファもやし等による発症事例が報告されている (CSPI, 2002)。市場に流通する生鮮野菜の食中毒菌による汚染状況についても調査されており、一部の野菜から大腸菌 (*Escherichia coli*)、*Salmonella* 属菌などが検出されている (BEUCHAT, 1996; 小西, 2000; 上田ら, 1998)。しかし、これまで生産、流通、加工のどの段階で食中毒菌に汚染されたのかについてはほとんど明らかにされていない。

1996 年に大阪府堺市で集団発生した腸管出血性大腸菌 O157: H7 による食中毒事件は、大きな社会問題となった。この食中毒の原因食材としてカイワレダイコン

が疑われるに至り (HARA-KUDOら, 1997; MICHINOら, 1999)、日本国内でも大腸菌などの食中毒菌による生鮮野菜の汚染に関心が寄せられるようになってきている。また、アメリカ合衆国等の国々では、アルファルファもやしをはじめとした発芽野菜による度重なる細菌性食中毒が発生したため (MOHLE-BOETANIら, 2001; TAORMINAら, 1999)、発芽野菜における食中毒菌の動態が調査されており、食中毒菌に汚染した種子の発芽過程で食中毒菌が増殖することが報告されている (FUら, 2001; STEWARTら, 2001a; STEWARTら, 2001b; TAORMINAら, 1999)。しかし、他の果菜類、葉根菜類種子の発芽および育苗過程における食中毒菌の動態については明らかにされていない。

野菜苗の生産における食中毒菌の動態に関する知見を得ることは、安全な生鮮野菜を供給する上で重要であると考えられる。そこで、筆者らは、野菜の発芽時および実生における大腸菌の動態を解析したので報告する。

## II 材料と方法

### 1 供試細菌

大腸菌として非病原性大腸菌 O157 である CE273 (O157: H37, ST1<sup>-</sup>, ST2<sup>-</sup>), CE273 にリファンピシンおよびナリジキシン酸の両抗生物質に対して耐性をもつ CE273-DRM (白川ら, 2001a) および国立感染症研究所から分与された腸管出血性大腸菌である 980002 (O157: H7, ST1<sup>+</sup>, ST2<sup>+</sup>) を供試した。これらの菌株はスキムミルク液 (10%スキムミルク, 1%グルタミン酸ナトリウム) に懸濁して-80°Cで凍結保存し, 使用時に純粋培養であることを確認した後, LB 培地を用いて 36°Cで 24 時間, 振盪培養した。培養後, 菌体を遠心洗浄した後に 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて細菌懸濁液を作成し, 所定の濃度に調製した。

### 2 発芽時における種子浸漬液中の大腸菌の消長

直径 9cm のペトリ皿に各種の野菜種子 0.5g と蒸留水 10ml を入れ, これに最終濃度が約 10<sup>6</sup>CFU/ml となるように大腸菌を接種して 25°Cで培養した。培養 3 日後に種子浸漬液を採取して供試液とし, 大腸菌密度を測定した。大腸菌菌株として CE273-DRM を使用した。

一部の野菜種子では, 種子伝染性の糸状菌病の防除を目的として, チウラム, ベノミル, キャプタン等の化学農薬が粉衣, コーティングなどの方法によって処理されている。そこで, 種子浸漬液中での大腸菌の増殖が認められた野菜種子のうち, 化学農薬処理されているキュウリ, キャベツ, ダイコン, ニンジン, ホウレンソウにおいて大腸菌の増殖に及ぼす処理薬剤の影響を調査した。供試した野菜種子と処理されている薬剤を Table 1 に示した。薬剤処理種子における処理薬剤が大腸菌の消長に与える影響は, 以下のようにして調査した。3g の種子を蒸留水で希釈した 5,000 倍の Tween20 液中で 1 時間, 連続攪拌して種子表面の処理薬剤を除去した。その後, 流水中で 1 時間洗浄して上述の試験に供試した。

### 3 子葉表面における大腸菌の消長

子葉が完全に展開した野菜苗に約 1×10<sup>6</sup>CFU/ml の大腸菌液を子葉表面が濡れる程度になるように蓄圧式スプレーを用いて噴霧接種した。その後, 多湿条件区は植物培養容器のふたをして湿度を保ち, 乾燥区はふたをせずに人工気象室 (昼間 25°Cで 12 時間, 夜間 20°Cで 12 時間, RH80%) 内で栽培した。経時的に実生苗を採取

Table 1. Fungicide treated seeds with used in this experiment<sup>a)</sup>.

Crop	cultivar	Fungicide
Cucumber	Hokushin	thiram, benomyl
Cabbage	YR Aoba	thiram
Radish	Taibyousoubutori	captan
Carrot	Sin-kurodagosun	thiram, benomyl
Spinach	Atlas	captan, thiram

a) All the seeds used in this experiment were purchased until 2000.

し, 子葉 5g を 100ml 容三角フラスコ中の 10ml の 0.01M リン酸緩衝液 (以下 PB, pH7.4) 中に入れて 160rpm で 30 分間振盪した。振盪後に得られた上清を大腸菌の検出・定量に供試した。大腸菌菌株として CE273-DRM を使用した。これとは別に子葉が展開したキュウリ実生苗に上述の方法で大腸菌を接種して湿度を保って 20, 25, 30, 36°Cの暗黒条件下に置き, 経時的に子葉上の大腸菌数を計測した。大腸菌の計測方法は, 上述の通りとした。

### 4 胚軸組織における大腸菌の消長

300ml 容のプラスチック製植物培養容器内の園芸用培土 (呉羽化学) に各種の野菜種子を播種し, 得られた子葉展開期の実生苗を供試した。10<sup>6</sup> CFU/ml の大腸菌液を実生苗の胚軸に注射針 (27G) を用いて単針負傷接種し, プラスチック容器内で湿室に保って 28°Cで管理した。接種 0, 24, 48 時間後に接種部位を含む胚軸を採取し, 70%エタノールと 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて常法によって表面殺菌した後, 5ml 中の PB と共にガラス製ホモジナイザーを用いて摩砕した。得られた摩砕液を供試液として大腸菌を検出定量した。大腸菌菌株として 980002 を使用した。

トマト, スイカ, キャベツを供試して胚軸組織における大腸菌の移動の調査を行った。播種後約 1 ヶ月後の実生苗の胚軸に上述の方法で大腸菌を接種した。24 時間後に実生苗を地際部で切り取って子葉と本葉を除去し, 上述の方法で表面殺菌した後, 無菌的に 1cm 間隔あるいは 0.5cm 間隔で切断して, 上述の方法で大腸菌を検出定量した。

### 5 大腸菌の検出・定量

上述した方法で得られた試料液から, 980002 の検出・定量には大腸菌用選択培地・NIVOT-EC (白川ら, 2001b) を使用し, 希釈平板法によって測定した。CE 273-DRM の測定には, NIVOT-EC にそれぞれ 50ppm

のリファンピシンとナリジキシン酸を添加した培地を使用した。細菌の培養は37°Cで行い、培養24時間後に平板上に出現した青色集落を大腸菌集落として測定した。

### III 結 果

#### 1 種子浸漬液中における大腸菌の増殖

8科13種の野菜種子を供試し、発芽時における大腸菌の消長を調査した。培養開始時の種子浸漬液中の大腸菌密度を $10^2$  CFU/mlに設定し、28°Cで3日間静置培養した。その結果、トマト、ナス、ハクサイ、カブ、ダイコン、レタス、シュンギク、タマネギ、ソバ、アルファルファでは種子浸漬液中で大腸菌が増殖する傾向が認められ、培養開始時に $10^2$  CFU/mlであった大腸菌数は、 $10^3$ ~ $10^7$  CFU/ml台となった (Fig. 1)。一方、スイカでは培養開始時とほぼ同等の菌数を維持し、ミツバでは大腸菌数が減少した。

種子伝染性糸状菌病の防除を目的とした化学農薬の処理が大腸菌に与える影響を調査した結果、処理薬剤の除去の有無に関わらず、供試した全ての野菜種子で大腸菌

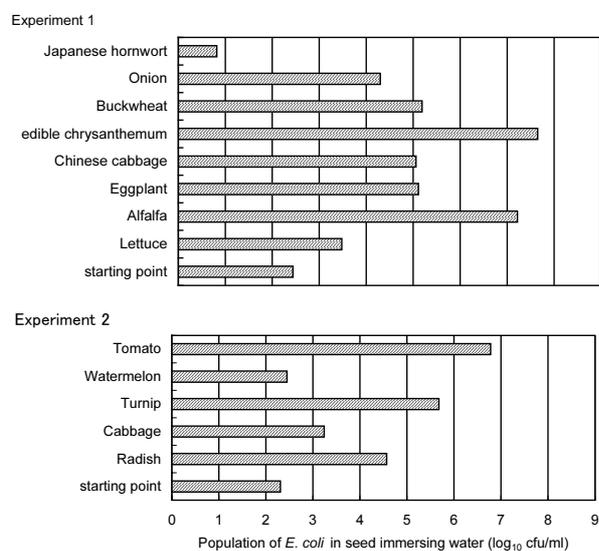


Fig. 1 Growth of *Escherichia coli* in dipping water during germination of vegetable seeds.

The seeds were sown in Petri dishes with distilled water. *E. coli* was inoculated to reach a level of  $10^2$  CFU/ml in the dipping water. Petri dishes with seeds were incubated at 25°C. Population of *E. coli* in dipping water was calculated 3 days after sowing by dilution plate technique with selective medium NIVOT-EC.

の増殖が認められた。この内、キュウリ、キャベツ、ダイコン、ホウレンソウでは処理薬剤の除去によって大腸菌の増殖量が増加したが、ニンジンでは減少した (Fig. 2)。

#### 2 子葉表面における大腸菌の増殖

4科8種の野菜種子を供試して子葉表面における大腸菌の消長を調査した。その結果、大腸菌を噴霧接種した後に密閉状態として多湿条件で栽培した場合、それぞれの野菜実生苗で接種時に $10^3$  CFU/g fresh weight 台であった大腸菌数は、24時間後には $10^4$ ~ $10^6$  CFU/g fresh weight, 48時間後には $10^5$ ~ $10^6$  CFU/g fresh weight となった (Table 2)。一方、接種後に解放状態として低湿度条件 (約RH 80%) で栽培した場合、大腸菌数は減少して接種時に $10^3$  CFU/g fresh weight 台であった大腸菌数は減少し、ダイコンで約 $10^2$  CFU/g fresh weight, キャベツで $10^0$ ~ $10^1$  CFU/g fresh weight 台となった。トマト、レタス、ハクサイ、スイカ、キュウリでは24時間後に検出限界以下となった。温度による子葉表面における大腸菌の増殖量の違いをキュウリ実生苗を用いて調査した結果、いずれの温度においても大腸菌の増殖が確認されたが、大腸菌の増殖に適する36°Cまで温度が高くなるにつれて増殖量が大きくなる傾向が認められた (Fig. 3)。

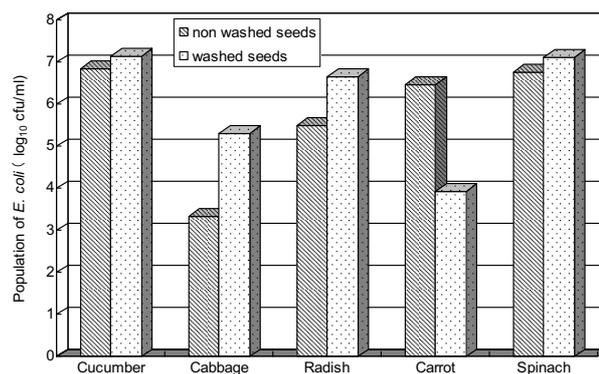


Fig. 2 Growth of *Escherichia coli* O157 in seed dipping water at germination of vegetable seeds. (comparison with chemical treated seeds)

Pesticide treated seeds were washed with 1/5000 Tween 20 solution with agitation for 1 hour and rinsed for 1 hour in running water. Washed seeds and non washed seeds were tested with the method mentioned at Figure 1.

Table 2. Growth of *Escherichia coli* O157 on the surface of vegetable seedlings.

Crops	Time after inoculation				
	0 hr	High humidity conditions		Dry conditions	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Tomato 'Momotarou'	3.94	5.54	6.11	<*	<
Cucumber 'Hokushin'	3.51	4.93	5.54	1.05	1.91
Watermelon 'Shimaoh MK'	3.44	4.29	4.93	<	<
Radish 'Taibyousubutori'	3.55	5.76	6.12	1.89	2.12
Chinese cabbage 'Musou'	3.87	4.29	5.01	<	<
Turnip 'Taibyouhikari'	3.24	5.43	5.47	-**	-
Cabbage 'YR Aoba'	3.43	6.37	6.47	0.43	0.90
Lettuce 'Success'	3.64	4.27	5.41	<	<

Numerical values in the table show the bacterial number ( $\log_{10}$  CFU/point) of *E. coli* at one inoculation point with a single needle. The bacterial number of *E. coli* is shown as the average of 3 repetitions. \*: *E. coli* were not detected. \*\*: not tested.

The seedlings were inoculated by spraying a bacterial suspension (about  $1 \times 10^8$  CFU/ml), and incubated at 25°C maintaining high humidity in the plastic boxes. 24 hr and 48 hr after inoculation, seedlings were harvested and shaken with 0.01M phosphate buffer in a flask for 30 min. to suspend the bacteria from the surface of the seedlings. *E. coli* was calculated from the resulted fluid by dilution plate technique with selective medium for *E. coli* (NIVOT-EC). The results were obtained from the experiments under both high humidity conditions at 28°C and dry conditions. Detection limit of this experiment was about 2 to 10 cfu/g of fresh leaf.

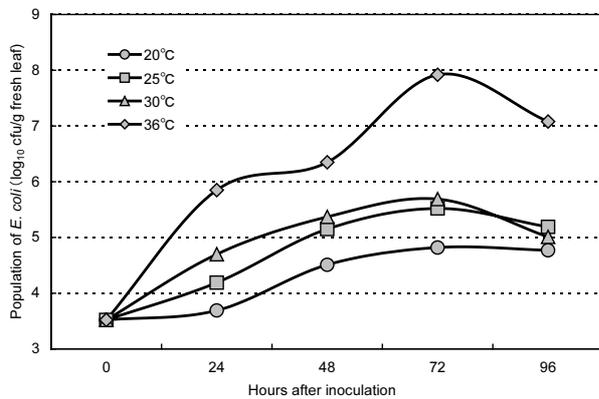


Fig. 3 Growth of *Escherichia coli* on leaf surface of cucumber at various temperature conditions.

The seedlings were inoculated by spraying of *E. coli* suspension (about  $1 \times 10^8$  CFU/ml), and incubated at 25°C keeping high humidity in the plastic boxes. Seedlings were sampled and shaken in 0.01M phosphate buffer for 30 min. to suspend the bacteria on the surface of seedlings. *E. coli* was calculated from resulted fluid using selective medium for *E. coli* (NIVOT/EC). The results were obtained from the experiments under high humidity condition at 28°C.

### 3 胚軸組織内における大腸菌の増殖

発芽実生の胚軸に単針負傷により大腸菌を接種して、胚軸組織における大腸菌の消長を調査した。その結果、供試した6科15種全ての野菜の胚軸組織で大腸菌が増殖して1接種部位当たりの大腸菌数が24時間後には接種時の100~1,000倍となった。しかし48時間後でも1接種部位当たりの大腸菌数が $10^6$  CFU以上となる野菜はなかった (Table 3)。

胚軸に接種した大腸菌の茎内移動を調査した結果、接種24時間後にトマトでは接種部位から6~8cm、スイカでは5~10cm、キャベツでは2~3.5cmのそれぞれ上位組織から大腸菌を検出した (Fig. 4)。

## IV 考 察

これまで、大腸菌、*Salmonella* 菌、*Shigalla* 菌などの人畜に病原性を有する食中毒菌と野菜との関係については詳細な調査がなされてこなかった。しかし、*Salmonella* 菌や腸管出血性大腸菌 O157:H7 に汚染したアルファルファ等のマメ科植物のもやし等が原因であると考えられる食中毒が発生するに至り (BREUERら, 2001; CDC, 1997; VAN DUYNHOVENら, 2002; MOHLE-BOETANIら, 2001), これら発芽野菜の生産過程における食中毒菌の動態が明らかにされつつある。アルファルファでは、発芽過程において種子浸漬液中で食中毒菌が

Table 3. Growth of *Escherichia coli* O157 in hypocotyl tissue of vegetable seedlings.

Crops	980002 (O157: H7)			CE273-DRM (O157: H37)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Tomato 'Momotarou'	2.42	5.22	5.01	3.39	4.94	4.65
Eggplant 'Senryou No.2'	0.86	3.25	4.56	1.14	4.72	5.13
Sweet pepper 'Kyoumidori'	1.25	3.81	4.56	0.13	0.90	5.02
Cucumber 'Hokushin'	2.42	5.27	5.19	2.44	5.44	5.36
Watermelon 'Shimaoh MK'	3.96	5.60	5.13	—*	—	—
Melon 'Andesu'	3.30	4.25	5.17	3.86	5.54	5.45
Radish 'Taibyousoubutori'	1.43	4.50	4.59	0.70	3.38	3.61
Chinese cabbage 'Musou'	2.49	4.51	4.43	3.21	5.01	4.93
Cabbage 'YR Aoba'	2.74	4.82	4.40	3.68	4.16	4.76
Turnip 'Taibyohikari'	2.87	3.79	5.14	2.26	4.43	5.19
Lettuce 'Success'	0.42	3.17	3.48	0.81	4.44	4.10
Garland chrysanthemum 'Chuba'	1.45	3.44	3.44	1.50	3.92	4.31
Carrot 'Sin-kurodagosun'	0.82	2.91	1.92	0.51	3.85	4.07
Japanese hornwort 'Shiroguki'	0.16	3.52	3.48	0.27	3.26	3.81
Buckwheat 'Shinshu'	1.24	3.64	3.83	0.77	3.29	3.59

Numerical values in the table show the bacterial number ( $\log_{10}$  CFU/point) of *E. coli* at one inoculation point with a single needle. The bacterial number of *E. coli* is shown as the average of 3 repetitions. \*: not tested.

Hypocotyls of vegetable seedlings were inoculated by wound inoculation of bacterial suspension (about  $1 \times 10^6$  CFU/ml) with a single needle and incubated at 28°C under high humidity conditions in a plastic box. After 24 or 48 hr incubation, hypocotyls were collected and macerated with 0.01 M phosphate buffer in a glass homogenizer after surface stabilization. *E. coli* was calculated from the homogenate by dilution plate technique with selective agar medium (NIVOT-EC).

増殖すると共に、発芽後に植物体表面で増殖することが報告されている (CHARKOWSKIら, 2002)。このことを利用して、食中毒菌の検査においてアルファルファもやしの洗浄液から目的とする細菌を検出する方法が開発されている (KRAMERら, 2004)。また、カイワレダイコンにおいて腸管出血性大腸菌 O157: H7 が子葉表面で増殖すること、導管を中心とした維管束組織に存在していることが、顕微鏡観察によって明らかにされている (ITOら, 1998)。そのため、本研究ではアルファルファもやしやカイワレダイコンで報告されている現象が、他の野菜の実生においても普遍的に認められるのか否かを明らかにしようとした。

その結果、供試したほとんどの野菜において種子の発芽時に、浸漬液中で大腸菌が増殖することが確認された。このことは、アルファルファ種子の発芽時に *S. enterica* や大腸菌 O157: H7 が浸漬液中で増殖するとする報告 (CHARKOWSKIら, 2002) と一致する。東ら (1997) は、カイワレダイコン種子から高精度で大腸菌を検出することを目的として、発芽後に種子浸漬液から培養法によって検出している。これは、カイワレダイコン種子の発芽時に大腸菌が増殖することを利用したものである。通常、野菜種子の表面には大腸菌等の細菌が利用可能な栄養素

が付着していると共に、発芽時には糖類などの炭水化物が種子から放出され、大腸菌はこれらを利用して増殖するものと考えられる。このため、大腸菌はほとんどの野菜種で野菜種子の発芽時に普遍的に浸漬液中で増殖することが可能であると考えられる。一方、市販種子の一部は、播種後に発生する苗立枯病等の病害を予防する目的でベノミル、キャプタン等の抗糸状菌剤が処理されている。今回、種子に対する抗糸状菌剤処理は大腸菌の増殖に大きく影響しないことを明らかにした。そのため、大腸菌の防除を目的とする場合、他の化学薬剤処理、物理的処理など他の種子消毒を目的とした処理が必要であると考えられる。

これまで、アルファルファもやし、カイワレダイコン、レタスおよびキャベツの子葉や根などの植物体表面で腸管出血性大腸菌 O157: H7 等の大腸菌が増殖することが報告されている (CHARKOWSKIら, 2002; SEOら, 1999; ITOら, 1998, WACHTELら, 2002)。また、アルファルファもやし、レタスの葉面上、トマト果実表面で *Salmonella* 属菌が増殖することが明らかにされている (CHARKOWSKIら, 2002; HARA-KUDOら, 1997; ZHUANGら, 1995; TAKEUCHIら, 2001; SOLOMONら, 2002)。これらの報告と同様に今回、恒湿条件で育苗し

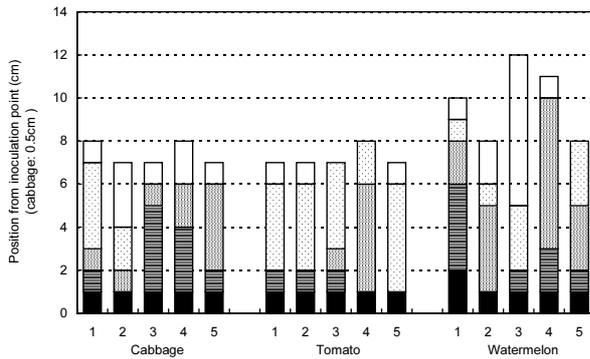


Fig. 4 Diffusion of *Escherichia coli* O157 in the stem tissue of vegetable seedlings from inoculation point.

The hypocotyl of vegetable seedlings with roots were inoculated with *E. coli* suspension (about  $1 \times 10^8$  CFU/ml) with a single needle, and incubated at 25°C under high humidity conditions. Five days after inoculation, stems of seedlings that included hypocotyl were sampled and cut into sections (0.5 or 1.0 cm length). Sections were surface sterilized and macerated in 0.01 M phosphate buffer pH 7.4. Population of *E. coli* was calculated by dilution plate technique with selective agar medium NIVOT-EC. Detectable limit of this experiment was  $1 \times 10^2$  CFU/section.

Symbols: ■ :  $10^5$  CFU/section,  
 ▨ :  $10^4 \sim 10^5$  CFU/section,  
 ▩ :  $10^3 \sim 10^4$  CFU/section,  
 ▪ :  $10^2 \sim 10^3$  CFU/section,  
 □ :  $< 10^2$  CFU/section

た場合、供試した全野菜種の苗表面で大腸菌が増殖することが示された。しかし、低湿度条件で育苗すると接種した大腸菌が急速に死滅した。植物の茎葉に斑点を形成する細菌を中心とした植物病原細菌は、一定の細菌密度まで増殖してから、気孔などの自然開口部や傷口から侵入、感染して病徴を発現することが明らかにされている (BEATTIEら, 1995)。この時、一部の植物病原細菌において葉面上にバイオフィルムを形成して乾燥、紫外線、農薬等の刺激から細菌細胞を保護していることが明らかにされている (MORRISら, 2003)。これは、葉面上には腐生的に生息する細菌が利用できる栄養が存在し、細菌はこれを利用して増殖するためであると考えられている。このような植物病原細菌の増殖は湿度の低下によって停止し、一部の細菌種では細菌密度が漸減する。筆者

ら (白川ら, 2003) は、スイカ果実汚斑細菌病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) は、RH80%の条件下、葉面上で増殖しうることを報告している。以上のことから、本来、植物に対する病原性を持たず、通常は植物体表面で生息しないと考えられる大腸菌は、植物病原細菌ほど盛んではないが、湿度条件などの環境条件が整えば、植物体上で普遍的に増殖するものと考えられる。大腸菌非汚染野菜の供給を目的とした場合、それぞれの野菜種について実際の生産圃場において大腸菌が植物体表面、特に可食部表面で増殖するか否かを今後、検討する必要がある。

アルファルファもやしやカイワレダイコンでは、大腸菌がそれぞれの植物組織内で増殖することが報告されている (DONGら, 2003; ITOら, 1998)。今回、供試した6科15種の野菜苗の胚軸組織内で大腸菌が増殖することを示した。また、供試したトマト、キャベツ、スイカ苗では、胚軸に接種した大腸菌が上部の主茎に移行することが培養法によって確認された。このことは、アルファルファもやしやカイワレダイコンで得られた結果と一致し、大腸菌が普遍的に野菜実生組織で増殖しうること示している。また、トマト、スイカ、キャベツを供試した実験では、主茎に沿って大腸菌が上部に移行することが示された。カイワレダイコンでは大腸菌 O157 が導管組織を伝って可食部に移動すること (ITOら, 1998)、レタス組織で大腸菌が増殖しうること (TAKEUCHIら, 2000) が報告されている。また、COOLEYら (2003) は *Arabidopsis thaliana* において根圏環境で増殖した *S. enterica* や大腸菌 O157: H7 が植物体全体に拡散して花器に到達し、得られた種子はこれらの食中毒菌で汚染されていたことを報告している。そのため、他の野菜種においても大腸菌の組織内での増殖と移動について詳細な検討が必要である。また、安全な野菜を供給する上で、実際の生産環境での大腸菌の組織内増殖を検討する必要がある。通常、植物組織は、その植物に病原性を有する病原体以外の微生物などが組織内に侵入した場合にそれを排除しようとする過敏感反応に代表される動的な抵抗性機構を備えている。本来、大腸菌は、植物に対して病原性を有していない。そのため、如何なる機構によって大腸菌が植物組織内で増殖しうることのかについて興味を持たれる。

以上、述べたように大腸菌の増殖に好適な環境下では、野菜種子の発芽時の種子浸漬液、実生苗の子葉表面および胚軸内部において大腸菌が普遍的に増殖しうる可能性が示された。このことから、野菜種子が汚染していた場

合、播種時に大腸菌が付着した手で操作するなどの人為的要因で汚染した場合、大腸菌を含む土壌を育苗培土として使用した場合、汚染した灌漑水を使用した場合には生産された苗が大腸菌に汚染している可能性があると考えられる。その多くは植物体表面のみに大腸菌が存在すると考えられるが、育苗操作や食害等による傷口や気孔、水孔などの自然開口部から組織内に侵入して増殖することが考えられる。組織内に侵入した大腸菌が可食部に移行するか否かは今後の解明が必要である。また、上述のように *Salmonella* 属菌等、他の食中毒菌による野菜の汚染と食中毒の発生が多数、報告されており、大腸菌以外の食中毒菌の野菜栽培における動態解析と栽培環境での汚染実態の解明が必要であると考えられる。

## V 摘 要

野菜苗または野菜種子に接種した大腸菌の動態を解析した。その結果、ほぼ全ての野菜種子でその発芽時に大腸菌が、種子浸漬液中で増殖した。また、4科8種の実生幼苗を供試して子葉表面での大腸菌の増殖を検討した結果、高湿度条件下で全ての子葉上における増殖を確認した。さらに、6科15種の実生苗の胚軸における大腸菌の増殖を検討した結果、全実生苗の胚軸組織で大腸菌の増殖を認めた。以上のことから、湿度条件などの環境条件が増殖に好適であれば、大腸菌は、ほぼ普遍的に実生幼苗の植物体表面及び組織内で増殖するものと考えられた。

## 引用文献

- 1) 東 敬子・東尾久雄・白川隆・伊藤秀和・野口正樹 (1997) : 乾熱処理によるカイワレダイコン種子付着大腸菌の殺菌. 園学雑, 66 別 2, 400-401.
- 2) BEATTIE, G. A. and S. E. LINDOW (1995): The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 145-172.
- 3) BEUCHAT, M. R. (1996): Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, 59, 204-216.
- 4) BREUER, T., D. H. BENKEL, R. L. SHAPIRO, W. N. HALL, M. M. WINNET, M. J. LINN, J. NEIMANN, T. J. BARRETT, S. DIETRICH, F. P. DOWNES, D. M. TONEY, J. L. PEARSON, H. ROLKA, L. SLUTSKER and P. M. GRIFFIN (2001): A mutistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 977-982.
- 5) Center for Disease Control (CDC) (1997): Outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Verginia, June-July 1997. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, 46, 741-744.
- 6) Center for Science in the Public Internet (CSPI) (2002) : Outbreak alert-closing the gaps in our federal food-safety net. [http://www.cspinet.org/reports/outbreak\\_report.pdf](http://www.cspinet.org/reports/outbreak_report.pdf).
- 7) CHARKOWSKI, A. O., J. D. BARAK, C. Z. SARREAL, and R. E. MANDRELL (2002): Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3114-3120.
- 8) COOLEY, M. B., W. G. MILLER, and R. E. MANDRELL (2003): Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4915-4926.
- 9) DONG, Y., A. L. INIGUEZ, B. M. M. AHMER, and E. W. TRIPLETT (2003): Kinetics and strain specificity of enteric bacateria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1783-1790.
- 10) VAN DUYNHOVEN, Y. T. H. P., M. A. WIDDOWSON, C. M. DE JAGER, T. FERNANDES, S. NEPELENBROEK, W. VAN DEN BRANDHOF, W. J. B. WANNET, J. A. van KOOJI, H. J. M. RIETVELD and W. van PELT (2002): *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* phage 4b outbreak associated with bean sprouts. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 440-443.
- 11) FU, T., D. STEWART, K. REINEKE, J. ULASZEK, J. SCHLESSER and M. TORTORELLO (2001): Use of spent irrigation water for microbiological analysis of alfalfa sprouts. *J. Food Prot.*, 64, 802-806.
- 12) HARA-KUDO, Y., H. KONUMA, M. IWAKI, F. KASUGA, Y. SUGITA-KONISHI, T. ITO, and S. KUMAGAI (1997): Potential hazard of radish sprouts as a vehicle of *Escherichia coli* O157: H7. *J. Food Prot.*, 60, 1125-1127.
- 13) ITO, T., Y. SUGITA-KONISHI, F. KASUGA, M. IWAKI, Y. HARA-KUDO, N. SAITO, Y. NOGUCHI, H. KONUMA and S. KUMAGAI (1998): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1532-1535.
- 14) 小西博隆 (2000) : 野菜における微生物汚染状況とその対策. 日本食品微生物学会雑誌, 17, 37-41.
- 15) KRAMER, M. F. (2004): A rapid and automated fiber optic-based biosensor assay for the detection of *Salmonella* in spent irrigation water used in the sprouting of sprout seeds. *J. Food Prot.*, 67, 46-52.
- 16) MICHINO, H., K. ARAKI, S. ONO and H. YANAGAWA (1999): Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.*, 150, 787-796.
- 17) MOHLE-BOETANI, J. C., J. A. FARRAR, S. B. WERNER, D. MINASSIAN, R. BRYANT, S. ABBOTT, L. SLUTSKER and D. J. VUGIA (2001): *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Ann. Intern. Med.*, 135, 9-247.
- 18) MORRIS, C. E. and J.-M. MONIER (2003): The Ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41, 429-453.
- 19) SEO, K. H. and J. F. FRANK (1999): Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser

- microscopy. *J. Food Prot.*, 62, 3–9.
- 20) 白川隆・我孫子和雄 (2001a): 水耕栽培における大腸菌の消長と制御技術の開発. 野菜茶試研報, 16, 135–146.
  - 21) 白川隆・我孫子和雄 (2001b): 農業生態系からの大腸菌の分離・検出を目的とした選択培地の開発とその性能評価. 野菜茶試研報, 16, 235–244.
  - 22) 白川隆・小宮友紀子・我孫子和雄 (2003): 汚染種子及び汚染種子由来スイカ苗における *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* の動態. 日植病報, 69, 102–106.
  - 23) SOLOMON, E. B., C. J. POTENSKI, and K. R. MATTHEWS (2002): Effect of irrigation method on transmission to persistence of *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce. *J. Food Prot.*, 65, 673–676.
  - 24) STEWART, D. S., K. F. REINEKE, J. M. ULASZEK and M. L. TORTORELLO (2001a): Growth of *Salmonella* during sprouting of alfalfa seeds associated with salmonellosis outbreaks. *J. Food Prot.*, 64, 618–622.
  - 25) STEWART, D., K. REINEKE, J. ULASZEK, F. FU, and M. TORTORELLO (2001b): Growth of *Escherichia coli* O157: H7 during sprouting of alfalfa seeds. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 95–99.
  - 26) TAKEUCHI, K. and J. F. FRANK (2000): Penetration of *Escherichia coli* O157: H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food. Prot.*, 63, 434–440.
  - 27) TAORMINA, P. J. and L. R. BEUCHAT (1999): Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatment with various chemicals. *J. Food Prot.*, 62, 850–856.
  - 28) 上田成子・桑原祥治 (1998): 生食野菜の細菌学的研究. 防菌防黴, 26, 673–678.
  - 29) WACHTEL, M. R., L. C. WHITEHAND, and R. E. MANDRELL (2002): Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewage wastewater. *J. Food Prot.*, 65, 471–475.
  - 30) WEI, C. I., T. S. HUANG, J. M. KIM, W. F. LIN, M. L. TAMPLIN, and J. A. BARTZ (1995): Growth and survival of *Salmonella montevideo* on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *J. Food Prot.*, 58, 829–836.
  - 31) ZHUANG, R.-Y., L. R. BEUCHAT, and F. J. ANGULO (1995): Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2127–2131.

---

## Population Dynamics of *Escherichia coli* on Vegetable Seedlings

Takashi SHIRAKAWA and Kazuo ABIKO

### Summary

Population dynamics of *Escherichia coli* O157 on the seedling surface or in the seedling tissue of vegetables was studied. When seed dipping water for germination was inoculated with *E. coli* O157 at  $10^2$  CFU/ml, *E. coli* O157 grew in the dipping water during germination and increased to  $10^3 \sim 10^7$  CFU/ml. However, *E. coli* O157 did not grow, when Japanese hornwort and watermelon seeds were tested. The fungicide treated to seeds (captan, thiram, benomyl) did not affect the multiplication of *E. coli* O157. In the examination with spray inoculation with *E. coli* to vegetable seedlings, *E. coli* O157 grew from  $10^3$  CFU/g fresh weight to  $10^5 \sim 10^6$  CFU/g fresh weight on the leaf surface of all vegetable seedlings tested under high humidity conditions. *E. coli* O157 also grew in the hypocotyls tissues of all vegetable seedlings tested and the population of *E. coli* O157 reached  $10^3 \sim 10^5$  CFU/point, when *E. coli* O157 was inoculated to the hypocotyls by injury inoculation with a single needle. In seedlings of tomato, cabbage and watermelon tested, *E. coli* O157 spread along the hypocotyls. Based on the results mentioned above, it was suggested that *E. coli* O157 generally could grow on the seedling surface and in the seedling tissue of vegetables.

---

Received: November 6, 2004

Department of Leaf and Root Vegetables  
3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaragi, 305-8666 Japan