

# 野菜洗浄を目的としたオゾン水と中性電解水との比較検討

Comparative study of ozonated water and neutral electrolyzed water for washing vegetables

○内藤 博敬

静岡県立農林環境専門職大学

## 論文要旨

オゾン水および中性電解水の野菜の洗浄・消毒効果を比較検証し、これら機能水の個人利用の有用性を検討した。洗浄前後で付着する細菌種を分子遺伝学的に同定した。また、洗浄後のキュウリを SCD 液体培地に浸漬して、時間経過とともに増加する細菌数を確認した、その結果、オゾン水および中性電解水のいずれも洗浄によって付着菌量を減らすことが明らかとなり、オゾン水中のオゾン濃度が高いほど効果が高いことが明らかとなった。

The cleaning and disinfection effects of ozonated water and neutral electrolyzed water were compared and verified. The usefulness of personal use of functional water was also examined. Bacteria that remain on cucumbers after washing and increase with time were pursued. The results showed that both ozonated water and neutral electrolyzed water reduced the amount of bacteria adhering to cucumbers by washing, and that the higher the ozone concentration in the ozonated water, the more effective it was.

キーワード：オゾン水、中性電解水、野菜洗浄

## 1. はじめに

我が国の食中毒事情は、発生件数の減少や季節性の低下など、大きな変化をみせている。日本の食中毒事件発生報告件数は、2000 年では 2,247 件あったものの 2010 年には 1,254 件と半減し、2013 年以降は寄生虫による食中毒も食品衛生法で報告に加えられたものの 2020 年には 887 件まで減少している。2021 年の食中毒報告患者数は 11,080 人であり、病因別に解析すると 9 割以上が微生物を原因とした食中毒であり、細菌性食中毒が半数以上を占めている。また、食中毒による死亡事例は、ウイルス性や寄生虫症と比べて細菌性食中毒による場合が多く、企業ではもちろんのこと家庭においても食品中の微生物対策が重要である。

近年の食中毒減少の要因として、冷蔵・冷凍食品の台頭と流通の発達、コンビニエンスストアの増加、大量調理マニュアルに従った調理加工時洗浄消毒の徹底、食品添加物の適正利用など、我々の生活様式や消費形態の変化が考えられる。しかし、消費者の意識として食品添加物は安全なものとして捉えられていない現状があり、生産から消費までのプロセスのなかで微生物汚染を低減させ、鮮度保持および食中毒予防が可能となる画期的な科学的アプローチとして、オゾン水や中性電解水など機能水が期待されおり、家庭でも利用できるパーソナル機器も見かけるようになってきた。

食中毒原因細菌の中でも近年の日本において大きな問題となっているのが腸管出血性大腸菌であり、2012 年の食中毒死亡者数 11 名中 8 名が、2016 年の食中毒死亡者数 14 名のうち 10 名が腸管出血性大腸菌を原因としている。腸管出血性大腸菌は少ない菌量で感染が成立することがわかっており、日本でも感染者は毎年数千名程度報告され、集団感染事例も多い。静岡県でも 2014 年 7 月末に、花火大会で屋台販売された冷やしキュウリを原因食とした腸管出血性大腸菌 O157 の集団感染事件が発生している。大腸菌はその名の通り動物の大腸に常在する細菌であり、食肉を原因として食中毒を起こす印象が強いが、カイワレダイコン(1996

年・岡山、大阪)、生野菜(1998年・山口)、カブ浅漬(2000年・埼玉)、キュウリ浅漬(2002年・福岡)、白菜浅漬(2012年・北海道)と、野菜を原因食材としたO157集団食中毒事例もこれまでも多く報告されている。そこで本研究では、2014年に静岡市で起きたO157食中毒事例をモデルとして、オゾン水および中性電解水を使ったキュウリの洗浄・消毒について考察した。

## 2. 実験方法

### 2.1 オゾン水生成と濃度測定

本研究で用いた4 mg/L オゾン水は、OPENICS-220(日科ミクロン)を用い、超純水(メルクミリポア)を原水として生成した。オゾン水中のオゾン濃度は、あらかじめインジゴ法でOPENICS-220の生成するオゾン水濃度が4 mg/Lであることを確認し、実験中は適宜パックテスト(共立理化学研究所)および簡易型濃度計(アイ電子工業製)で濃度を確認した。

### 2.2 中性電解水生成と有効塩素濃度

本研究で用いた中性電解水は、陽極に貴金属被覆チタン、陰極にステンレスを用いた無隔膜電解装置(株式会社MTG)を用い、水道水を原水として生成した。電解前後で、pH、電気伝導率、水温に大きな変化は見られなかった。有効塩素濃度はヨウ化カリウム法で測定し、電解前0.2 mg/Lから電荷後には3.5~4.0 mg/Lに上昇したことを確認した。

### 2.3 材料と洗浄

キュウリは静岡市内のスーパーマーケットで箱売りされていた福島県産キュウリを用いた。キュウリの洗浄は、大量調理施設衛生管理マニュアル(厚生労働省、衛食第85号別添・日食安第1号)に従い、衛生害虫、異物混入、腐敗・異臭等がないか点検した後に、水道水、オゾン水(0.5, 1, 2, 4 mg/L)、中性電解水それぞれを、キュウリ1本につき250 mL タッパーに調整し、3回浸漬洗浄した。

### 2.4 キュウリに付着している細菌の分子遺伝学的同定

キュウリに付着する細菌の単離および生菌数測定には、一般細菌数測定用のトリプトソーヤ(SCD)液体培地(1.7 g/L casein peptone, 0.3 g/L soy peptone, 5.0 g/L NaCl, 2.5 g/L dextrose, 2.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)および寒天培地(SCD液体培地, 15 g/L agar)を用いた。これらの培地はpH7.3に調製し、オートクレーブで滅菌して用いた。

キュウリに付着する細菌は、キュウリ1本をチャック付ビニール袋内でSCD液体培地100 mLに浸し、震盪した後に100 μLをSCD寒天培地へ塗布して37°Cで24~48時間静置培養することで単離した。単離したコロニーを液体培地で培養し、1 mLから遠心回収した細菌からQIAamp DNA mini kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出した。DNA 30 ngをテンプレートとして、16S rRNA領域をターゲットとした519 f / 1492 rプライマーペアを用いてPCR増幅した。電気泳動により増幅を確認後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up(Takara)を用いて増幅産物を精製した。精製したDNAはDNAシーケンサーで塩基配列を解読し、DNA解析ソフトMEGA11で解析後、NCBIデータベース上でBLAST検索して細菌属種を同定した。

### 2.5 洗浄後キュウリに残存付着している細菌の増殖試験

水道水で洗浄したキュウリを対照として、オゾン水および中性電解水で洗浄したキュウリを、濃度毎にそれぞれ3本ずつ行った。洗浄後のキュウリは、チャック付ビニール袋に入れたSCD液体培地100 mLに浸し、30°Cで静置した。1時間毎にSCD液体培地約0.5 mLを採取し、3枚の平板に100 μLずつコン

ラージ棒で塗布し、37°Cの孵卵器で一晩静置培養して生菌数を計数した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 キュウリから単離した細菌の分子遺伝学的解析

洗浄したキュウリに生残する細菌属種を同定するため、未洗浄、水道水、オゾン水および中性電解水洗浄したキュウリから、それぞれ付着細菌を単離した。コロニーの形状、大きさおよび色によって分別し、58個の細菌を単離した。それぞれについて分子遺伝学的に同定を行い、重複した菌を除いた15属35種を表1に示す。これら35種の細菌は、全て土壌、動物、ヒトなど、環境由来の細菌であった。

表1 キュウリから洗浄前後で単離した細菌の分子遺伝学的同定結果

属	種	洗浄			
		無	水道水	オゾン水	中性電解水
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i> , <i>calcoaceticus</i> , <i>lwoffii</i> , <i>oleivorans</i> , <i>soli</i>	○			
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> , <i>taiwanensis</i>		○	○	○
<i>Buttiauxella</i>	<i>izardii</i>	○			
<i>Chryseobacterium</i>	<i>hagamense</i> , <i>indologenes</i>	○	○		
<i>Citrobacter</i>	<i>gillenii</i>	○			
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i> , <i>asburiae</i> , <i>cancerogenus</i> , <i>cloacae</i>	○	○		○
<i>Escherichia</i>	<i>hermannii</i>	○			
<i>Exiguobacterium</i>	<i>acetylicum</i>				○
<i>Kosakonia</i>	<i>cowanii</i>	○			
<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	○			
<i>Microbacterium</i>	<i>arborescens</i>	○			
<i>Pantoea</i>	<i>ananatis</i> , <i>eucalypti</i>			○	○
<i>Pseudomonas</i>	<i>fulva</i> , <i>indoloxydans</i> , <i>monteilii</i> , <i>mosselii</i> , <i>oryzihabitans</i> , <i>plecoglossicida</i> , <i>putida</i>	○	○		○
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	○			
<i>Sphingobacterium</i>	<i>multivorum</i>	○			○
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> , <i>sciuri</i> , <i>succinus</i>	○			
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	○	○		○

キュウリ表面に付着する細菌数は、 $10^2 \sim 10^9$ 個/cm<sup>2</sup>程度とされており、本研究では $10^8 \sim 10^9$ 個/cm<sup>2</sup>と比較的多数であった。洗浄直後のキュウリに生残する細菌数は、SCD培地1mL当たり水道水洗浄では $10^4$ 個オーダーであったが、オゾン水および中性電解水洗浄では $10^2$ 個オーダーまで減少していた。表1の生残菌種は、中性電解水洗浄と比較してオゾン水洗浄で少ないように見えるが、SCD培地のみの使用で優先生育した菌を釣菌していることもあり、偶発的に同定菌種が少なかった可能性がある。

キュウリから同定された細菌中、*Bacillus*属菌は未洗浄キュウリからは単離されておらず、水道水、オゾン水、中性電解水洗浄後に単離同定された。洗浄前のキュウリにも*Bacillus*属菌は付着していたと考えられるが、芽胞を形成する細菌であり、他の栄養型細菌が多い中では培養時に競り負け、洗浄後に菌数が減少したことで培養されたものと考えられる。オゾン水洗浄後に単離された細菌は、*Bacillus*属菌以外には*Pantoea*属菌のみであった。*Pantoea*属菌は、先行研究で野菜に付着するポピュラーな細菌の一つであることがわかっており、大量に付着していることで浸漬洗浄では除去しきれなかった可能性が考えられる。また、中性電解水洗浄後にも検出されているものの水道水洗浄後には検出されていないことから、付着菌数を減じたことで優先生育する細菌が減り、*Pantoea*属菌の存在が確認できるようになったと考えられる。中性電解水洗浄後のキュウリからのみ、先行研究でカタラーゼを大量に産生して塩素

に抵抗性を有している *Exiguobacterium* 属菌が同定された。中性電解水の除菌成分は塩素であり、塩素に感受性を有する細菌属が影響を受ける中で、僅かに付着していた *Exiguobacterium* 属菌が単離されたものと考えられた。

本研究では浸漬洗浄であったことから、洗浄 1~3 回目の洗浄後水についても SCD 寒天培地に塗布して培養したところ、0.5 mg/L オゾン水洗浄では 3 回目の洗浄後水でも生菌が確認されたのに対し、中性電解水および 2, 4 mg/L オゾン水洗浄では、1 回目の洗浄後水からも増殖する細菌は確認されなかった。

### 3. 2 洗浄後キュウリに残存付着している細菌の増殖試験結果

オゾン水各濃度または中性電解水で洗浄したキュウリを SCD 液体培地に浸漬し、30°Cで静置することで増殖を早め、その挙動を観察した結果を図 1 に示す。中性電解水または 0.5 mg/L オゾン水で洗浄したキュウリでは、SCD 培地浸漬 1 時間後から細菌数の明らかな増殖が確認され、2 時間後には対数増殖期に入ったものと考えられた。1.0 mg/L オゾン水で洗浄したキュウリでは、洗浄後 3 時間から 4 時間で対数増殖期に入るものと推察された。2.0 mg/L および 4.0 mg/L オゾン水で洗浄した場合には、4 時間経過時点でも増殖カーブの立ち上がりが緩く、菌の対数増殖は確認されなかった。細菌培養において、細菌の種類、世代時間が近い菌であれば、培養初期から対数増殖期に至る誘導期は菌量が少ないほど長くなるため、この違いは 0 時間（洗浄直後）の残存付着菌量の違いによるものと考えられた。

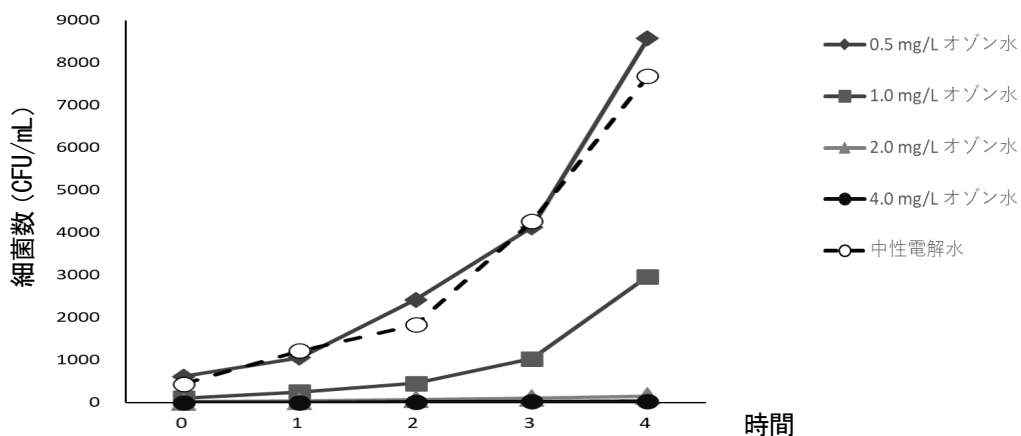


図 1 洗浄後キュウリに残存付着している細菌の増殖試験結果

## 4. まとめ

食中毒を引き起こす菌量は菌種によって異なるが、予防の観点からすると食材に付着する菌量をできるだけ減らし、食品中で増殖させないことが大切である。今回の結果から、0.5 mg/L 以上のオゾン水および中性電解水でキュウリを洗浄することで、水道水と比べて表面に付着している細菌の量を減少させることが明らかとなり、これによって洗浄調理後の増殖が水道水洗浄と比べて遅くなることを示した。キュウリなどの生野菜は調理前の洗浄が重要であり、低濃度オゾン水であっても消毒殺菌効果が得られることが示唆され、家電としてのオゾン機器普及の一助となることを願う。今後、流水での洗浄試験法を検討し、家庭における水回りでオゾン水の有用性を示す。

### 参考文献

- 1) 内藤博敬, 西山晃平: 無隔膜一室型電解水を用いたキュウリ付着細菌の除菌効果, アグリフォーレレポート (静岡農林専門職大紀要) Vol.2, 2-8 (2022)
- 2) 野木菜々子, 内藤博敬, 谷 幸則: 野菜の保存におけるオゾン水洗浄とオゾンガス保存の相乗効果, 医療・環境オゾン研究, Vol.25(4), 132-141 (2018)