

# 超微細高密度オゾン水のSalmonella Enteritidisに対する殺菌効果と応用

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	高木, 昌美 岩田, 剛敏 松村, 栄治 萩原, 信子 秋庭, 正人 神尾, 次彦
巻/号	44巻4号
掲載ページ	p. 150-157
発行年月	2009年2月

## 超微細高密度オゾン水の *Salmonella* Enteritidis に 対する殺菌効果と応用

高木昌美<sup>1,2)</sup>・岩田剛敏<sup>2)</sup>・松村栄治<sup>3)</sup>・萩原信子<sup>3)</sup>・秋庭正人<sup>2)</sup>・神尾次彦<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 農林水産消費安全技術センター, 〒330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2-1

<sup>2)</sup> 動物衛生研究所, 〒305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5

<sup>3)</sup> ネイチャーズ株式会社, 〒154-0011 東京都世田谷区上馬 3-18-11-305

### 要 約

超微細高密度オゾン水の *Salmonella* Enteritidis (SE) に対する殺菌効果について、基礎的な検討を行うとともに、有機物存在下（鶏糞、鶏卵、鶏肉）における殺菌効果を検討した。オゾン水は、SE 約  $10^8$  個を含む菌液 1 mL に対し、最少有効濃度 4 ppm で、水量 500 mL（約 500 倍量）で瞬時に殺菌効果を示した。オゾン水生成後の安定性を検討したところ、少なくとも生成後 30 分間は、安定的に殺菌効果を示した。約  $10^8$  個の SE を含む鶏糞混入材料 1 mL に対し、水温 10°C 前後、濃度 10 ppm のオゾン水 3,000 mL で殺菌効果が認められた。SE 菌液を塗抹した鶏卵では、濃度 10 ppm のオゾン水を毎秒 80 mL の水量で、最低 1 分間噴射洗浄することにより、表面の SE を殺菌することが示された。鶏と体表面の汚染（皮付き鶏肉）に対しては、低濃度の汚染（ $10^2$  個/検体）に対しては、濃度 10 ppm のオゾン水を毎秒 80 mL の水量で、最低 1.5 分間噴射洗浄することにより殺菌効果が認められた。本オゾン水は、SE に対し、低濃度で即効的に殺菌効果を示し、かつ鶏糞・鶏卵・鶏肉等を用いた有機物存在下における試験でも、十分な殺菌効果を示したことから、鶏舎、GP センターや食鳥処理場等における消毒・殺菌に有用と思われる。

キーワード : *S. Enteritidis*, 殺菌効果, 消毒, 超微細高密度オゾン水

### 緒 言

人の食中毒事例の原因菌としては、サルモネラやカンピロバクターが毎年上位を占め、「食の安全・安心」を基調とする昨今、生産現場はもとより、食肉処理場・加工場において衛生対策が求められ、様々な努力がなされている。生産現場では、病原菌の侵入防止や消毒薬による鶏舎等の消毒・殺菌<sup>18)</sup>、ワクチン<sup>16)</sup>や抗菌剤<sup>11)</sup>、生菌剤<sup>15)</sup>を用いたサルモネラの予防などの徹底した衛生管理が実施されている。食鳥処理場では、処理工程中における二次汚染防止策として塩素剤が使用されているが、塩素消毒にも限界があることが報告されている<sup>3, 14, 19, 24)</sup>。現場では、効果とともに経済性が要求される一方、消毒薬の大量使用による環境汚染の問題や、作業従事者への影響を考慮する必要がある。加えて、抗菌剤使用による薬剤耐性菌の誘発は、生産現場のみならず、公衆衛生上

も大きな問題となってきている<sup>39)</sup>。抗菌剤等の動物用医薬品の食品への残留に関しても問題となっており<sup>7)</sup>、FAO/WHO 合同食品規格委員会において、食品中に残留する動物用医薬品の国際基準（コーデックス規格）の設定作業が進められており、わが国においても人の健康への影響を考慮し、食品衛生法の改正（平成 15 年 5 月 30 日）によるポジティブリスト制度が導入された（平成 18 年 5 月 29 日より施行）。こうした背景の中で、HACCP に対応した新しい消毒技術の開発、環境や鶏のみならず、作業従事者に対する負荷をも軽減させるような減薬管理対策の構築は、未だになされていない<sup>21)</sup>。

以前より、一般の消毒方法で効果の低い病原微生物に対して、オゾン水の有用性が示唆されている<sup>33)</sup>。近年では、食品<sup>7, 31, 34)</sup>や<sup>6, 25, 33)</sup>、種子<sup>36)</sup>や飼料<sup>27)</sup>、畜舎<sup>23)</sup>やと殺前<sup>2, 9)</sup>の報告があり、*Escherichia coli*<sup>36)</sup>、*Clostridium perfringens*、*Listeria monocytogenes*<sup>31, 34)</sup>、*Staphylococcus aureus*<sup>8)</sup>、*Bacillus cereus*、*B. megaterium*<sup>4)</sup>、*Salmonella* Typhimurium<sup>2)</sup>、*Shigella flexneri*、*Vibrio cholerae*<sup>5)</sup>、*Eimeria tenella*<sup>27)</sup>等に対する有効性が報告さ

2008 年 6 月 23 日受付

鶏病研報 44 巻 4 号, 150~157 (2008)

れている。また、塩素消毒では効果が期待出来ない *Cryptosporidium parvum*<sup>1)</sup>、*Giardia lamblia* および *G. muris*<sup>1,10)</sup> に対するオゾン水の殺菌効果が報告された。

オゾン水 (O<sub>3</sub>) は、水中にオゾンガス気泡が多数分散・浮遊している状態にあり病原体へ接触し、酸化作用により細菌の細胞膜を破壊・分解して、死滅させる<sup>26)</sup>。安全性に関しては、高濃度では人体に影響を及ぼすオゾンガスに比べて、オゾン水の場合、分解が早く、水と酸素に変化することから、オゾン水を散水したあとの環境汚染もなく、作業者にも安全といえる<sup>20,21)</sup>。従来、オゾン水の生成は、水に電解補助剤 (NaCl や KCl) を加え、通電して、化学反応により、オゾン水を生成させる電解法や、オゾン気泡を強制的に水に混合し、生成させる気液混合法が用いられていた。しかし、電解法で生成されたオゾン水は、強酸性水 (pH 2.2~2.7) で、殺菌効果はあるものの、安全性や金属腐食性、残留性に問題があった。また、気液混合法で生成されたオゾン水は、水中のオゾン気泡の粒径が大きく、オゾンガスが水に十分に溶け込まないため、溶存オゾン濃度が低く、すぐに水に復帰してしまい、安定性や効果は低かった<sup>29,38)</sup>。今回、供試したオゾン水は、磁力によりオゾン気泡を出来るだけ微細な気泡に分散し、繰り返し注入する超微細気液濃縮混合法で生成された「超微細高密度オゾン水」である (特許第 3850027 号: 家畜消毒法および家畜消毒装置)。このオゾン水は、中性で、高濃度 (15 ppm) のオゾン水を生成することができ、従来法と比べ、溶存オゾン気泡の粒径が直径 50 nm 以下という性状を有している<sup>28)</sup>。

今回、このオゾン水を用い、*S. Enteritidis* (SE) に対する殺菌効果についての基礎的検討および野外の応用を想定した有機物存在下 (鶏糞・鶏卵・鶏肉) における殺菌効果について検討を行った。

## 材 料 と 方 法

### 1. 供試菌株

リファンピシン (rif) 耐性 SE HY-1 (以下、SE HY-1 (rif)) 株を用いた。

### 2. オゾン水の生成

オゾン水は、「ナノピコ<sup>®</sup> オゾン水生成装置」(ネイチャーズ(株)社製)で生成された超微細高密度オゾン水(ナノピコ<sup>®</sup> オゾン水。以下、「オゾン水」とする。)を用いた。

### 3. 反応水量の検討

試験に使用するオゾン水量を検討した。水温約 10°C、濃度 10 ppm に設定したオゾン水 9, 19, 49, 99, 499 mL に、37°C、一晚培養した SE HY-1 (rif) 株菌液 1 mL (約

10<sup>9</sup> 個) をそれぞれ混合し、室温で 10 分間静置して反応させた後、各反応液を rif 添加 DHL 寒天培地 (rif を 0.1 mg/mL 含む、以下、rifDHL 培地という。) に塗抹し、37°C、24 時間培養後、反応液中の菌数を計測した。対照には、同じ水量の水道水を用い、同様に菌数を計測した。

### 4. 最少有効オゾン濃度の検討

殺菌効果を示すオゾン水の最少有効濃度を検討するため、水温約 10°C 前後で、濃度 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 ppm の各濃度に設定したオゾン水 49.9 mL と、培養菌液 0.1 mL (約 10<sup>8</sup> 個) を混合し (1 : 500)、室温で 10 分間静置した後、各々の反応液を rifDHL 培地に塗抹し、37°C、24 時間培養後、反応液中の菌数を計測した。対照は、水道水 49.9 mL を用いて、同様に菌数を計測した。

### 5. 反応時間の検討

殺菌効果を示す反応時間の検討は、水温約 10°C、濃度 4 ppm に設定したオゾン水 49.9 mL と、培養菌液 0.1 mL (約 10<sup>8</sup> 個) を混合し、反応直後 (0), 30 秒, 1, 2, 5, 10 分間の各反応時間、室温で静置して反応させた後、各々の反応液を rifDHL 培地に塗抹し、37°C、24 時間培養後、反応液中の菌数を計測した。対照は、水道水 49.9 mL を用いて、室温 10 分間反応させた後、同様に菌数を計測した。

### 6. 採水後のオゾン水の安定性

オゾン水の安定性を検討するために、濃度 4 ppm に設定したオゾン水を生成・採水した後、室温で、採水直後および 10 分, 30 分, 1, 2, 18 時間放置したオゾン水 49.9 mL に、培養菌液 0.1 mL (約 10<sup>8</sup> 個) を混合し、室温、10 分間静置して反応させた後、各々の反応液を rifDHL 培地に塗抹し、37°C、24 時間培養後、反応液中の菌数を計測した。対照は、採水後 18 時間の水道水を用い、同様に菌数を計測した。

### 7. 有機物存在下における殺菌効果の検討

#### 1) 鶏糞混入材料

鶏糞 10 g をハート・インヒュージョン (HI) 培地 10 mL に混和し、これに培養菌液 1 mL (約 10<sup>9</sup> 個) を加えたものを、試験材料とした。濃度 10 ppm に設定し、オゾン水 499, 1,000, 2,000, 3,000, および 5,000 mL (水温 16~17°C のみ) の各々に、試験材料 1 mL を加え、室温で 10 分間静置し反応させた後、各反応液を rifDHL 培地に塗抹し、37°C、24 時間培養後、反応液中の菌数を計測した。また、菌数計測とともに、サルモネラ検出法<sup>17)</sup> に準じて菌分離を実施した。陰性だった試験材料は、遅延二次増菌培養を実施した<sup>17)</sup>。水温は、約 10°C および 16°C 前後の 2 段階を設定し、比較を行った。

2) 鶏卵材料

GPセンター等での応用を目的として、鶏卵を用いた殺菌効果の検討を行った。市販鶏卵の卵殻に培養菌液 0.1 mL (約  $10^6$  個) を滴下、室温で 5 分間静置・乾燥させたものを、試験材料とした。洗浄作業における応用を想定し、毎秒 80 mL で噴射されるように調整したオゾン水を用い、水温約 10°C、濃度 4 ppm に設定し、0.5, 1, 1.5 分の各々の時間で試験材料を洗浄した後、試験材料をハーナテトラチオン酸塩基培地 (HTT 培地) 10 mL に、室温、10 分間の浸漬を行い、試験材料を取り出した後の培地を、37°C で 24 時間培養した後、サルモネラ検査法に準じて菌分離を行うとともに、一次培養で陰性だった試験材料は、遅延二次培養法による菌分離を行った。また、水温約 14°C、濃度 10 ppm のオゾン水での同様の試験を実施し、効果を比較した。

3) 鶏肉材料

鶏肉処理場等での応用を目的として、市販鶏肉の鶏皮部分 3cm 四方に印をつけ、その部分に培養菌液 0.1 mL を各々の材料に塗抹した。接種菌量は、0.1 mL 中約  $10^8$  個ならびに  $10^2$  個に希釈調整した 2 種類の菌液を用い、各々の菌濃度での検討を行った。菌を塗抹後、室温で 5 分間静置させたものを試験材料とした。鶏卵の場合と同様に、毎秒 80 mL で噴射されるように調整したオゾン水を用い、水温約 14°C、濃度 10 ppm に設定し、0.5, 1, 1.5 分の各々の時間、試験材料を洗浄した後、試験材料を HTT 培地 10 mL に、室温、10 分間の浸漬を行い、試験材料を取り出した後の培地を、37°C で 24 時間培養し、サルモネラ検査法に準じて菌分離を行い、一次培養で陰性だった試験材料は、遅延二次培養法による菌分離を行った。

成 績

1. オゾン水の SE 殺菌効果に関する基礎的検討

供試したオゾン水の SE 殺菌効果における基本的な性能を検討したところ、殺菌効果は反応水量に影響を受け、検査材料と水量の対比が 1:10 から 1:50 では、対照と差は認められなかったが、1:100 で対照に比べ菌数を 1/100 に減少させ、1 mL あたり約  $10^9$  個のサルモネラを約 500 mL の水量 (1:500) に反応させたところ、菌は分離されず、殺菌効果を示した。オゾン水の殺菌効果は、反応水量に影響を受け、500 倍量の水量が必要であることが示された (図 1)。また、1 mL あたり約  $10^9$  個の SE 殺菌効果における最少有効オゾン濃度を検討したところ、2 ppm で試験材料の菌量を 1/100 減少させる効果を示したが、4 ppm 以上で菌は全く分離されず、完全殺菌効果が認められ、オゾン水の最少有効オゾン濃度は 4 ppm あることが示された (図 2)。この最少有効オゾン濃度 4 ppm の殺菌効果に必要な反応時間を検討したところ、図 3 に示したように、オゾン水と反応させた直後から菌分離は陰性だった。試験を 3 回繰り返したが、全

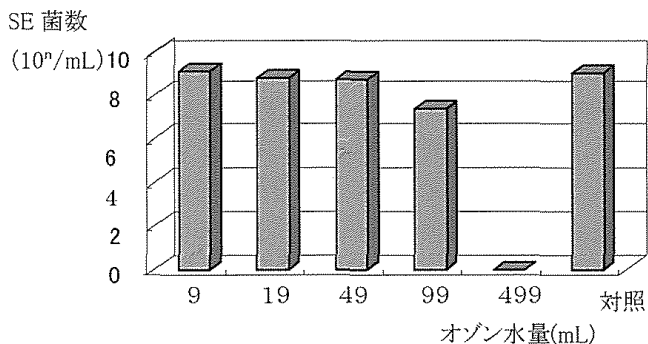


図 1. 菌液 1 mL ( $10^9$  個) に対するオゾン水量の検討

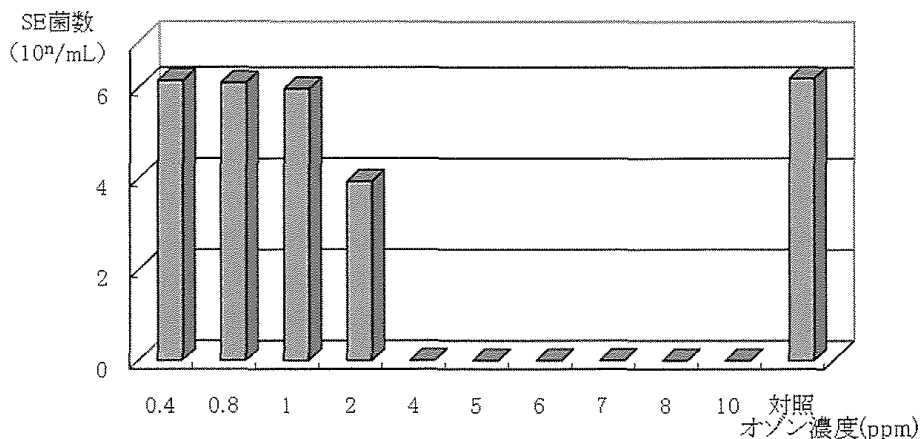


図 2. オゾン最少有効濃度の検討

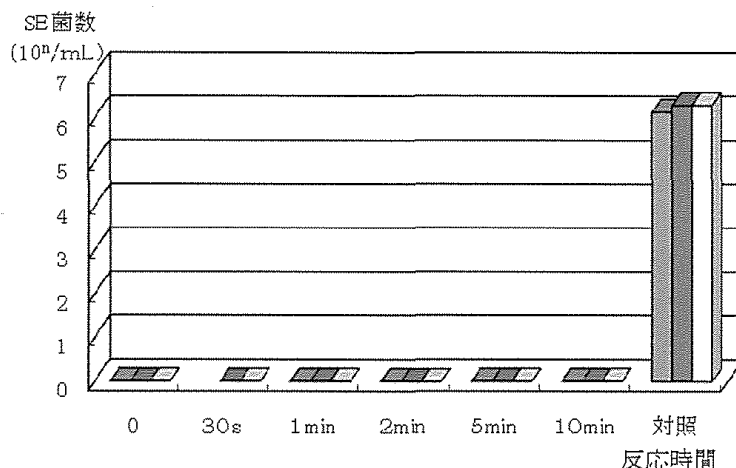


図 3. 反応時間の検討

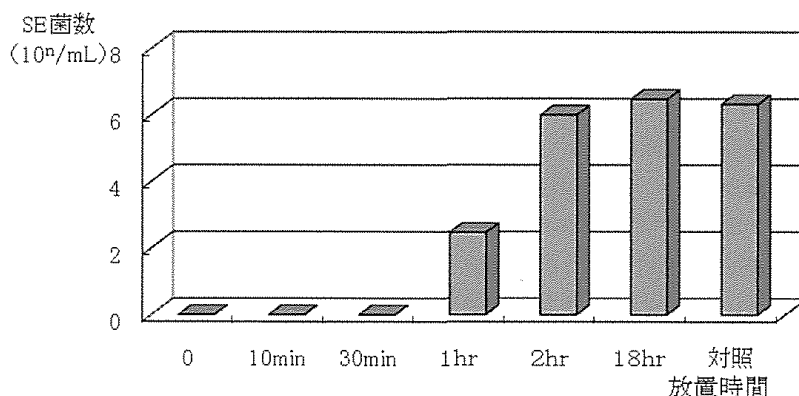


図 4. 採水後の放置時間と殺菌効果

での試験において同様に成績が得られ、オゾン水と菌が反応すると同時に殺菌されることが示された。

供試したオゾン水の生成後の安定性を検討したところ、1 時間経過したオゾン水では、対照と比べて、10,000 分の 1 に SE 菌数を減少させる殺菌効果が認められたが、生成から 2 時間以上を経過したオゾン水では、SE に対する殺菌効果は認められなかった。生成後少なくとも 30 分間は、生成直後と同等な殺菌効果を持続していることが示された (図 4)。

## 2. 有機物存在下における殺菌効果

### 1) 鶏糞混入材料での殺菌効果

濃度 10 ppm のオゾン水を用いて、鶏糞混入材料中の SE に対する殺菌効果を、水温を 2 段階に変えて検討した (図 5)。水温 16°C 前後において、検査材料 1 に対し、オゾン水量 500 の場合、対照の水道水と同等の菌が回収され、殺菌効果は認められなかった。水量比が 1,000 倍の場合、対照に比べ 1/100 に菌数の減少が認められ、水

量が増加するにつれて菌数の減少を示し、殺菌効果は認められたが、完全な殺菌効果は示されなかった。水温 10°C 前後では、水量比 1,000 倍以上から菌数が減少し、水量比 3,000 倍では、菌分離は陰性を示した。これら陰性を示した材料は、遅延二次増菌法による菌分離においても陰性を示しており、水温 10°C 前後、濃度 10 ppm のイオン水は、鶏糞混入材料に対し、3,000 倍以上の水量で完全に殺菌効果を示すことが示された。また、鶏糞混入材料の場合、オゾン水の水温の違いにより、殺菌効果に大きく影響されることが示唆された。

### 2) 鶏卵材料での殺菌効果

鶏卵の卵殻汚染に対するオゾン水の殺菌効果を検討したところ、培養菌液に対する最少有効オゾン濃度 4 ppm では、1.5 分間以内のオゾン水洗浄では、殺菌効果は認められなかった。しかし、濃度 10 ppm で 1 分間以上の洗浄により、鶏卵外殻表面から SE は分離されず、遅延二次増菌法による菌分離成績も陰性であり、完全な殺菌効

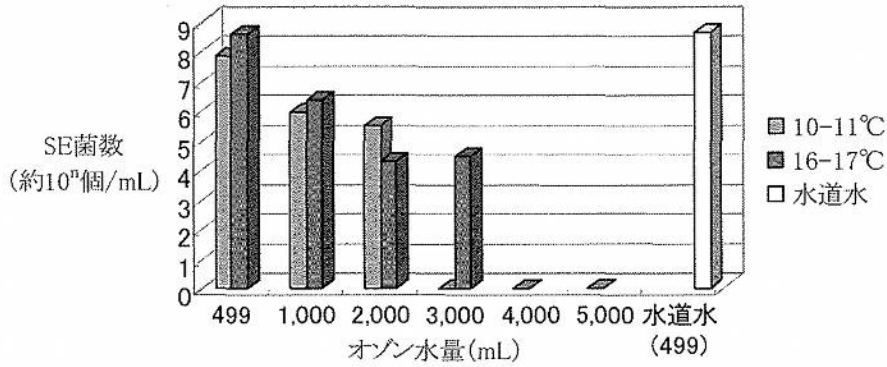


図 5. 鶏糞材料 1 mL (約 10<sup>8</sup> 個) に対する殺菌効果

果が認められた (表 1)。

3) 鶏肉材料での殺菌効果

食肉処理場における鶏と体表面の汚染菌数にはばらつきがあるため、高濃度 (約 10<sup>8</sup> 個/mL) あるいは低濃度 (約 10<sup>2</sup> 個/mL) の SE 培養菌液を、市販の鶏肉の鶏皮部分に塗抹し、殺菌効果を検討した。オゾン水の濃度は 10 ppm を用い、鶏卵洗浄の場合と同様に洗浄による殺菌効果を検討したところ、低濃度汚染の場合、濃度 10 ppm のオゾン水を、流速 80 mL で 1.5 分間洗浄することにより、菌は分離されず、遅延二次増菌培養でも菌分離陰性で、完全な殺菌効果が示された (表 2)。しかし、高濃度汚染させた鶏肉材料は、濃度 10 ppm, 1.5 分間のオゾン水洗浄では、殺菌効果は認められなかった。

考 察

オゾン水は、水中に微細なオゾンガス気泡が溶存した状態のもので、強い酸化作用により、細菌やウイルス、真核細胞の細胞表層成分を損傷・破壊させる<sup>26)</sup>。古くから、その殺菌効果は知られていたが<sup>13,30)</sup>、生成法により、強酸性水 (pH 2.2~2.7) のため、殺菌効果はあっても金属腐食性や残留性の問題があり、オゾン気泡の粒径が大きく、オゾン気泡が十分に溶け込まないため、オゾン濃度が低く、わずかな衝撃で脱気する等、安定性や効果の持続性に問題が生じていた<sup>29,38)</sup>。今回供試した超微細高密度オゾン水は、超微細気液濃縮混合法によるオゾン生成装置 (ネイチャーズ(株), 東京) で生成されたオゾン水で、一般のオゾン水と比べて、溶存しているオゾン気泡の粒径が 50 nm 以下の超微細粒子であり、pH 7.0 前後の中性で、高濃度 15 ppm 以上での大量生成が可能となった<sup>32)</sup>。また、紫外線吸収法によるオゾン濃度測定器 (EL-500 型溶存オゾンモニター; ネイチャーズ(株), 東京) が装着されており、試験中や使用中のオゾン濃度の管理が容易に行える。今回実施した試験の全ては、この

表 1. 鶏卵材料に対する殺菌効果

濃度 (ppm)	噴射時間 (分)	菌分離		
		増菌培養後	遅延二次増菌後	
4	0.5	+	+	
	1	+	+	
	1.5	+	+	
10	0.5	+	+	
	1	-	-	
	1.5	-	-	
対照	水道水	1.5	+	+

表 2. 鶏肉材料に対する殺菌効果

濃度 (ppm)	菌数 (10 <sup>8</sup> 個/材料)	噴射時間 (分)	菌分離		
			増菌培養後	遅延二次増菌後	
10	8	0.5	+	+	
		1	+	+	
		1.5	+	+	
2	2	0.5	+	+	
		1	+	+	
		1.5	-	-	
対照	水道水	8	1.5	+	+
		2	1.5	+	+

測定器を用いて調整した。

高濃度のオゾンガス単体は、人に対する毒性が強い。応用に際しては、作業者の安全性を重視する必要もある。超微細高密度オゾン水と従来法で生成したオゾン水を用いて、12m<sup>3</sup>の密閉した室内で、4ppm濃度の各イ

オン水を 15 L 散水した際に排出されるオゾンガスの濃度を比較したところ、従来法でのオゾン水は、散水後 1 分以内から環境濃度基準のオゾン濃度 0.1 ppm を上回り、時間経過とともに次第に上昇し、4 分後には 2.5 ppm 以上のオゾンガスが測定された。これに対し、超微細高密度オゾン水は、4 分以上経過しても室内オゾンガス濃度は、基準値以下を示していた<sup>24)</sup>。また、豚に直接放水した場合の安全性も確認されており<sup>40)</sup>、安全に使用出来る消毒資材と考えられる。

この超微細高密度オゾン水の効果は、畜舎消毒<sup>23)</sup>における消毒効果や口蹄疫ウイルスや豚水疱病ウイルス等に対する殺ウイルス効果が報告されている<sup>37)</sup>。今回、人の食中毒原因菌としても、鶏のサルモネラ症の原因菌としても関心の高い SE を用いて超微細高密度オゾン水の殺菌効果を検討したが、実験室内試験において、最少有効オゾン濃度 4 ppm という比較的低い濃度で、瞬時に SE に対する殺菌効果が確認された。Restaino ら<sup>32)</sup>は、グラム陽性菌では、効果に若干の違いが生ずるものの、グラム陰性菌では、殺菌効果に大きな違いはなかったと報告していることから、サルモネラ以外のグラム陰性腸内細菌に対しても同様に有効と思われる。

オゾン水の細菌等に対する作用機序は、オゾン水中のオゾン気泡が病原体本体へ直接的に接触し、その酸化作用が発揮されるため、実験室内の反応水量の検討結果が示すように、水量に大きく影響を受けることが示された。このように、対象細菌との接触量の多さに影響されることから、十分な効果を期待するためには、対象により使用する水量の検討が必要となるだろう。また、実際の畜舎消毒等では、様々な有機物が存在し、オゾン水の効果は減弱する事が予想される<sup>22, 23, 37)</sup>。今回実施した有機物存在下での試験では、オゾン濃度を最少有効濃度より高濃度にすること、水量を調整することにより十分な殺菌効果が得られることが確認された。また、鶏糞材料の検討では、水温の違いが殺菌効果に大きく影響することが示唆された。消毒薬では、低温下でその成分の分子運動が著しく低下し、その結果として消毒効果が低下する傾向にある<sup>35)</sup>。オゾン水の場合、一般的に消毒薬とは異なり、低温下でその消毒効果が上昇する傾向にある。こうした作用に関する詳細は、現在のところ不明ではあるが、オゾン水は、水中にオゾン粒子を溶存させていることから、その粒子の活性が低温下でより保存されるのではないかとと思われる。また、こうした特性は、有効な消毒効果を得るために消毒薬の選択を考慮しなければならなかった寒冷地においては、有効な手段であるといえる。今後、野外応用に際して、効果的な消毒効果を得

るためには、温度条件を低く設定する必要があるだろう。

GP センター内での鶏卵洗浄作業は、45~60°C の温水による 30 秒程度のブラシ洗浄で、無洗浄に比べ卵殻上の細菌数を減少する効果があることが示されている<sup>12, 19, 31)</sup>。今回の試験結果からも、オゾン水を用いた洗浄による卵殻の殺菌・消毒効果が期待され、鶏卵の細菌汚染の防止や抑制に大いに役立つものと思われる。現在、GP センターの温水洗浄工程にオゾン水を導入する試みが行われており、生成濃度 10 ppm のオゾン水を、洗浄直前に水温 55°C の温水に混合し、混合接触時の濃度 5 ppm、水温 42°C 前後、水量 8L/分で 5 秒間の洗浄を行ったところ、オゾン洗浄後、一般細菌の検出された鶏卵から細菌が検出されなかった結果も出ている（社内実験成績、未発表）。供試したオゾン水は、安定性に優れており、オゾンの効果は瞬時であることから、濃度を高めたオゾン水と温水を混合直後に、大量の混合水で洗浄することで、水温を上昇させても殺菌効果が得られたものと思われる。

一方、食鳥処理場では、冷却水での細菌の交差汚染防止や、設備・器具の消毒法として 20~50 ppm の塩素消毒が行われ、汚染菌数の軽減傾向は確認されている。しかし、HACCP を完全に実施していても、食肉処理工程で細菌数をゼロにすることは困難であり、抗菌処理が必須という考え方も多く、海外では、食肉の抗菌処理にリン酸三ナトリウム (TSP) や二酸化塩素による超塩素処理、放射線照射による抗菌処理を実施している場合もある<sup>19)</sup>。塩素処理以外の抗菌処理は日本では許可されていないが、食品への残留問題や、環境汚染、作業者の安全性を考慮した場合、最適な方法を見いだすまでには至っていない。食鳥処理場における工程中、と体をチラーに入れる前のスプレー洗浄や、洗浄後の冷却管理は、二次感染の減少や菌の増殖防止等に効果があり、と体の微生物汚染の 90% 以上を減少させるという報告がある<sup>9, 13)</sup>。今回、鶏肉を用いて検討したところ、低濃度汚染 (約  $10^2$  個/検体) では、殺菌効果が示されたことから、洗浄工程への本オゾン水の応用は、鶏卵と同様、菌の減数効果に大いに役立つと思われる。処理場における応用に際しては、処理時間や水量を減少させるために、オゾン濃度を上げて、最適条件の検討が必要だろう。また、高濃度汚染 (約  $10^8$  個/検体) に対する至適条件の検討も必要と思われる。

超微細高密度オゾン水を用いた SE に対する殺菌効果の検討から、殺菌効果を十分に発揮させるためには、オゾン濃度、水量、水温など、効果に影響を及ぼす要因を考慮し、対象や工程に適合した設定方法を検討し、管理

することが必要であることが示唆された。今回供試した超微細高密度オゾン水は、残留性が少なく、消臭性も高いこと、人や家畜に対する安全性、および安定した殺ウイルス作用や殺菌作用から、今後様々な分野における有効な消毒資材として、活用範囲の広がることが期待される。

## 文 献

- 1) Biswas, K. *et. al.* : Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by monochloramine in two natural waters. *Water Res.* 39, 3167-3176 (2005)
- 2) Bosilevac, J.M. *et. al.* : Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative water to decontaminate hides of cattle before slaughter. *J. Food Prot.* 68, 1393-1398 (2005)
- 3) Brackett, R.E. : Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Microbiol.* 50, 999-1003 (1987)
- 4) Broadwater, W.T., Hoehn, R.C. and King, P.H. : Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl. Microbiol.* 26, 391-393 (1973)
- 5) Burleson, G.R., Murray, T.M. and Pollard, M. : Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Microbiol.* 29, 340-344 (1975)
- 6) Driedger, A. *et. al.* : Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation. *Wat. Res.* 35, 2950-2960 (2001)
- 7) Eli Das, Gürekan, C, and Bayindirli, A. : Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella* Enteritidis on cherry tomatoes. *Food Microbiol.* 23, 430-438 (2006)
- 8) Estrela, C. *et. al.* : Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Braz. Dent.* 17, 134-138 (2006)
- 9) Fabrizio, K.A. *et. al.* : Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poult. Sci.* 81, 1598-1605 (2002)
- 10) Finch, G.R. *et. al.* : Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Appl. Microbiol.* 59, 3674-3680 (1993)
- 11) 深田恒夫 : 第 10 章 抗菌剤, オリゴ糖類の鶏サルモネラ症対策への応用. pp 183-191. 鶏病研究会編, 鶏卵・鶏肉サルモネラ全書, 日本畜産振興会, 東京 (1998)
- 12) 今井忠平 : 第 5 章 鶏卵の処理・加工におけるサルモネラ汚染対策. pp 88-114. 鶏病研究会編, 鶏卵・鶏肉のサルモネラ全書, 日本畜産振興会, 東京 (1988)
- 13) Ingram, M. and Haines, R.B. : Inhibition of bacterial growth by pure ozone in the presence of nutrients. *J. Hyg.* 47, 146 (1949)
- 14) Jarroll, E.L., Bingham, A.K. and Meyer, E.A. : Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 483-487 (1981)
- 15) 鶏病研究会 : 競合排除 (CE) 法による鶏のサルモネラ症対策. 鶏病研報 34, 1-10 (1998)
- 16) 鶏病研究会 : 鶏サルモネラワクチンと問題点. 鶏病研報 34, 53-163 (1998)
- 17) 鶏病研究会 : サルモネラ検査法. 鶏病研報 37, 14-30 (2001)
- 18) 鶏病研究会 : 採卵養鶏場大型ウインドレス鶏舎における消毒法. 鶏病研報 37, 77-85 (2001)
- 19) 鶏病研究会 : 生産現場におけるカンピロバクター汚染実態とその対策. 鶏病研報 37, 195-216 (2001)
- 20) Kim, G., Youself, A.E. and Dave, S. : Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods : A review. *J. Food Microbiol.* 62, 1071-1087 (1999)
- 21) Kim, G., Youself, A.E. and Khadre, M.A. : Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv. Food Nutr. Res.* 45, 168-216 (2003)
- 22) King, L.J. : History and future perspectives of the use of disinfectants in animals health. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epz.* 14, 41-46 (1995)
- 23) 小嶋信雄ら : オゾン水の養豚への応用に関する検討. 家畜衛生誌 33, 1-5 (2007)
- 24) Korich, D.G. *et. al.* : Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1423-1428 (1990)
- 25) Larson, M. and Marinas, B. : Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and and monochloramine. *Water Res.* 37, 833-844 (2003)
- 26) Lerner, R. and Eschenmoser, A. : Ozone in biology. *PNAS* 100, 3013-3015 (2003)
- 27) 丸山義人, 森満佐美 : 薬剤に代わる殺菌法としての養鶏へのオゾン利用について (第一報). 静岡県中小家畜試験場研究報告. 4, 39-44 (1991)
- 28) 松村栄治 : “高溶解オゾン水”を用いた衛生対策の試み, ピッグ・ジャーナル 6, 46-48 (2006)
- 29) 松尾昌樹 : 電解水の概要, 電解水の基礎と利用技術. pp 1-8, 技報堂出版, 東京 (2000)
- 30) Meddows-Taylor, J. : Some characteristics of ozone in relation to water treatment. *J. Inst. Water Eng.* 1, 187 (1947)
- 31) Novak, J.S. and Yuan, J.T.C. : Viability of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* surviving mild heat or aqueous ozone treatment on beef followed by heat, alkali, or salt stress. *J. Food Prot.* 66, 382-389 (2003)
- 32) Restanio, L. *et. al.* : Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3471-3475 (1995)
- 33) Rice, R.C. *et. al.* : Use of ozone in drinking water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.* 73, 44-57 (1981)
- 34) Rodgers, S.L. *et. al.* : A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J. Food Microbiol.* 67, 721-731 (2004)
- 35) 迫田義博ら : 鳥インフルエンザウイルスに対する消毒薬の効果. 日獣会誌 60, 519-522 (2007)
- 36) Sharma, R.R. *et. al.* : Inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated wa-



- ter and heat treatment. *J. Food Prot.* 65, 447-451 (2002)
- 37) 白井淳資, 松村栄治, 萩原信子: 超微細高密度オゾン水による殺ウイルス効果試験. *日獣会誌* 61, 233-239 (2008)
- 38) 杉光英俊: オゾン発生装置. *オゾンの基礎と応用*. pp. 109-136, 光琳, 東京 (2004)
- 39) 田村 豊: 動物用抗菌剤の使用状況と耐性菌の現状—ヒトにいたる耐性菌の伝播経路. *動薬研究* 64, 12-17 (2007)
- 40) 山本 譲ら: 超微細高密度オゾン水の豚に対する安全性. *日本家畜衛生学会第 66 回大会 講演集* pp 10-11 (2007)

## Bactericidal Effect of Superfine and High Density Ozone Water on *Salmonella* Enteritidis

Masami Takagi<sup>1,2)</sup>, Taketoshi Iwata<sup>2)</sup>, Masato Akiba<sup>2)</sup>, Eiji Matsumura<sup>3)</sup>,  
Nobuko Hagiwara<sup>3)</sup> and Tsugihiko Kamio<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> National Veterinary Assay Laboratory, 1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511

<sup>2)</sup> National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856

<sup>3)</sup> Nature's Co., 3-18-11-305 Kamiyama, Setagayaku, Tokyo 154-0011

### Summary

The bactericidal effect of superfine and high density ozone water (nano pico ozone water, ozone water) on *Salmonella* Enteritidis was evaluated. More than 8 log unit of SE were killed instantaneously in this ozone water. To achieve clear bactericidal effects, a volume of ozone water (10 ppm) of 500 times that of a sample is needed. The minimum effective concentration for 1mL of SE growth culture sample (about  $10^8$  cfu) was 4 ppm. This ozone water was stable for a comparatively long time and remained effective after it had remained at room temperature for 30 minutes. This ozone water exhibited bactericidal effects in the presence of organic materials (chicken feces, egg, and chicken meat). A volume of this ozone water (10 ppm) of 3,000 times for 1mL of a sample with chicken feces and SE growth culture ( $10^8$  cfu) also exhibited bactericidal effects. The effectiveness of this ozone water depended on its temperature. Jet washing of SE-contaminated egg ( $10^6$ /egg sample) for one minute sterilized the contaminated egg surface. Jet washing for more than 1.5 minutes with ozone water as same condition against the SE contaminating chicken meat ( $10^2$ /meat sample) was able to sterilize the surface of contaminated chicken meat. These results suggest that a low concentration (4 ppm) of this ozone water instantaneously killed bacteria and that ozone water was therefore useful for disinfecting materials in animal houses and slaughter houses and for sterilizing surfaces of chicken eggs or chicken carcasses.

(*J. Jpn. Soc. Poult. Dis.*, 44, 150-157, 2008)

**Key words** : *S. Enteritidis*, superfine and high density ozone water, bactericidal effect, disinfection