

植物病原菌に対する低濃度オゾン水の効果

高原 浩之・林 蒼唯・夏目 英哉・中島 昌太・大橋 勇敢・
南 知花・大西 克利*

Hiroyuki TAKAHARA, Aoi HAYASHI, Hideya NATSUME, Shota NAKAJIMA,
Yuka OHASHI, Chika MINAMI and Katsutoshi ONISHI* :

Efficacy of a low concentration of ozonated water against plant pathogens.

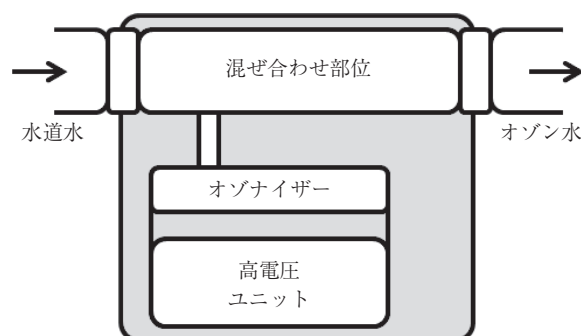
Ozonated water is a strong oxidant, and has been used in many industrial applications. In this study, we evaluated the antimicrobial effect of a low concentration of ozonated water against plant pathogens. A large number of bacterial cells were killed by an ozonated water treatment. The extent of the lethal effect differed among filamentous fungi *in vitro*. However, an ozonated water treatment did not inhibit plant disease development in a field experiment. Here, we discuss the use of a low concentration of ozonated water to control plant disease.

Key words : 低濃度オゾン水, 植物病原菌, 殺菌, 防除技術

オゾンは酸素原子3個が結びついた酸素の同位体で、自然界には上空に高濃度でオゾン層として、またヒトの生活空間にも低濃度で存在している。オゾンには高い殺菌効果があることから、高温加熱に代わる食品の冷殺菌技術^{6,7)}や、汚水処理プラントへの利用³⁾など、様々な分野への応用が期待されている。農業分野においては、資材等の殺菌洗浄に加え、植物毒素(マイコトキシン)の解毒・分解¹⁾、収穫後の農産物へのオゾンガスの噴霧やパッキング時の封入による貯蔵・流通への利用⁴⁾などが考えられている。高濃度オゾンガスに直接触れると人体にも健康被害を及ぼすことから、栽培現場で利用する場合、オゾンを水に溶解したオゾン水が安全の面からも扱い易いと考えられており、農薬を使用しない病害防除法としてオゾン水の活用も期待される。しかしながら、病害防除への利用に関しては研究データが乏しいことから、農林水産省ではオゾン水の取り扱いについては整理中であり、現時点では「特定防除資材に該当しないとされる資材」として区分している。そこで本研究では、将来のオゾン水の病害防除分野への利用を見据えた課題を整理することを目的に、低濃度オゾン水による植物病原菌に

対する殺菌効果を実験室内で検証し、さらに絶対寄生菌による一部病害については圃場における発病抑制効果の検討を行った。

オゾン水生成装置は、アール・ビー・コントロールズ株式会社で開発中の試作機を用いた。生成装置は、縦15cm×横20cm×高さ10cmの小型ボックス内に、高圧電極、オゾンを発生させるオゾナイザー、発生させたオゾンと水を混ぜ合わせる部分で構成されている(第1図)。電極に電流を流すとオゾンが発生し、装置内に送り込んだ



第1図 オゾン水生成装置(試作機)の概略図

水道水と混ぜ合わせることで、オゾン水を生成できる。供試したオゾン水の溶存オゾン濃度は、インライン型オゾン水モニタ（EL-600：荏原実業株式会社）で計測し、水温24℃で安定して0.14~0.15ppmを示した。

病原細菌類として、イネ苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*) とイネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) (ともに石川県農林総合研究センターで分離された株) を用いた。両細菌をそれぞれLB寒天培地で2日間静置培養し、それを滅菌水に懸濁した。そこから100 μ Lをオゾン水10mLに添加し、10分後に試料を10倍ずつの希釈平板法によって生菌数 (CFU/mL) を計測した。処理時間は予備試験を経て決定した。対照区には滅菌水を用い、実験1回につき3反復でカウントし、3回の独立した実験を行った。その結果、低濃度オゾン水の処理により、両細菌の生菌数が大幅に低下することが明らかとなった (第2図)。

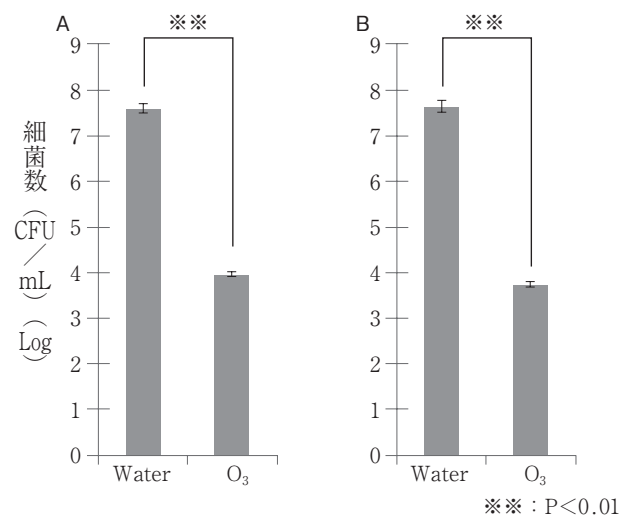
次に病原糸状菌類について実験を行った。ウリ科炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) (104-T株)、アブラナ科炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) (IMI349063株) およびイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) (24-22-1-1株) は、それぞれPDA (ポテトデキストロース寒天培地) もしくはOSA (シュークロース添加オートミール寒天培地) 上で分生孢子を形成させた。孢子懸濁液100 μ Lをオゾン水10mLに添加し、30分後に試料を10倍ずつの希釈平板法によって生菌数 (コロニー数) を計測した。処理時間は予備試験を経て決定した。対照区には滅菌水を用い、実験1回につき3反復でカウントし、3回の独立した実験を行った。その結果、使用した糸状菌種ごとに殺菌効果は異なっていた (第3図)。ウリ科炭疽病菌に対しては、低濃度オゾン水処理後において生菌は検出できなかった。アブラナ科炭疽病菌に対しては、対照区と比較して生菌数が約100分の1以下にまで低下した (第3図A, B)。その一方で、イネいもち病菌に対しては、対照区と比較して有意差はあるものの、供試した3菌の中で最も殺菌効果が低かった (第3図C)。以上のことから、植物病原糸状菌間でオゾンに対する感受性が異なることが示唆された。

さらに石川県立大学のガラス温室で自然発生するトマトうどんこ病およびキュウリうどんこ病に対する発病抑制効果を2016年と2017年に調査した。無処理区、水処理区に加え、オゾン水の週1回散布区および週3回散布区を設定し、2か年ともトマト (桃太郎：タキイ種苗) に対しては圃場に定植後約3か月間、またキュウリ (プロ

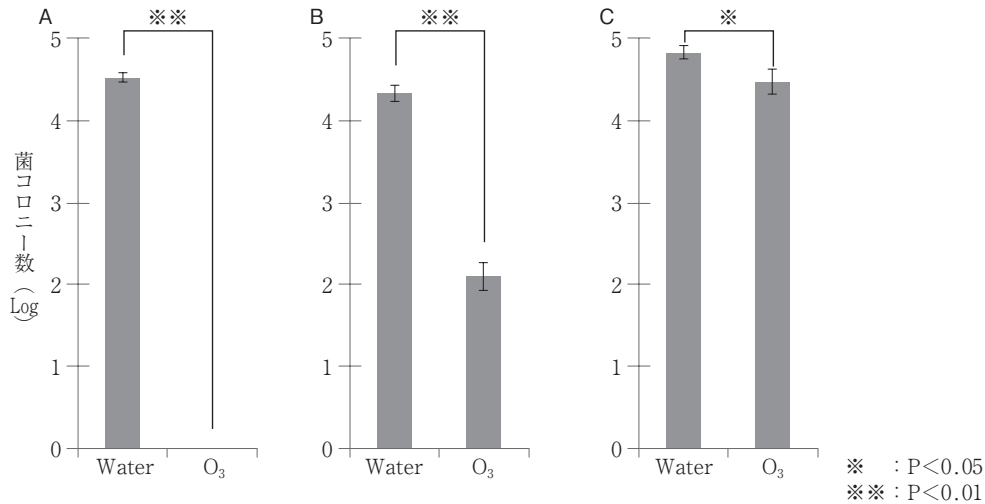
ジェクトX：ときわ研究場) に対しては子葉が展開してから4週間に渡り地上部の葉面にまんべんなく散布した。トマトの生育期間およびキュウリの育苗期間を通じ各処理区間でうどんこ病の発生の程度を比較したが、これらの処理条件では低濃度オゾン水による両病害に対する発病抑制効果は認められなかった (データは示していない)。

オゾン水による微生物の不活化は、強い酸化力による細胞壁や細胞膜、さらに細胞内オルガネラや核などの物理的な損傷によるものとされている⁸⁾。すなわち、オゾン水が殺菌効果を発揮するためには、オゾン水に溶解しているオゾンが直接微生物に接触する必要がある。うどんこ病菌は主に植物体表面で繁殖することから、植物体に侵入して内部に進展する病原菌類と比べて、より直接的な殺菌効果が見込まれると予測していた。しかしながら、本実験では低濃度オゾン水の散布がうどんこ病に対する発病抑制効果を示さなかった。今のところ、うどんこ病菌における適切なオゾン濃度の決定はできていない。オゾン感受性および圃場での発病程度を評価する試験方法を確立することが今後の課題である。

病害防除試験に向けて適切なオゾン濃度を決定することは大変重要である。グラム陰性菌に分類されるイネ苗立枯細菌病菌とイネもみ枯細菌病菌は、本実験で供試したオゾン濃度において生菌数が顕著に低下していた。一



第2図 イネの病原細菌類に対するオゾン水の殺菌効果
オゾン水処理5分後の病原細菌の生菌数を滅菌水処理と比較した。縦軸は、細菌数 (Colony forming unit, CFU/mL) を対数で示した。グラフは独立した3回の接種試験の平均値。エラーバーは標準誤差。
A: イネ苗立枯細菌病菌
B: イネもみ枯細菌病菌



第3図 植物病原糸状菌に対するオゾン水の殺菌効果

オゾン水処理30分後の病原糸状菌の生菌数を滅菌水処理と比較した。縦軸は菌コロニー数を対数で示した。グラフは独立した3回の接種試験の平均値。エラーバーは標準誤差。

A：ウリ科炭疽病菌（104-T株）

B：アブラナ科炭疽病菌（IMI349063株）

C：イネいもち病菌（24-22-1-1株）

般に、細菌に対するオゾンの感受性は、細胞壁のペプチドグリカン層の厚さが薄いグラム陰性菌のほうがグラム陽性菌より高いとされている⁸⁾。植物病原細菌にはグラム陰性菌に分類されるものが非常に多く、今後、さらに複数の病原細菌で殺菌効果を検証することが望まれる。その一方で、病原糸状菌間ではオゾンに対する感受性が異なっていた。その理由については今回の研究では不明だが、使用した病原糸状菌間で細胞壁などの構造の差異が関与することも予測される。また、菌体表層における有機物等の付着、およびオープンな環境下に存在する対象菌以外の微生物や物質の混入により、オゾンが消費されることも知られている⁸⁾。よって、病原菌に対して確実な殺菌効果を得るためには、オゾン濃度を高めることが必要になる。しかしながら、オゾン濃度を必要以上に高くすることで、植物に障害を引き起こすことが知られている²⁾。オゾン水を植物病害の発生抑制に利用する場合は、対象とする病原菌に加えて、対象植物種のオゾン感受性、さらに栽培環境で消費されるオゾン量を考慮し、オゾン濃度、処理量と回数、時間などを決定することが求められる。

本実験では、低濃度オゾン水の圃場での利用を試みたが、機械化・自動化されていないため栽培規模や処理回数に応じて作業時間は慣行防除体系と比べむしろ長くなり、作業内容も煩雑であった。よって、現在の仕様の場

合、小スペースでの種子消毒や育苗期の病害発生予防のための施用などに適用できると考えられる。オゾン水の実用化に向けては検討すべき点が多いものの、本実験で示した殺菌効果に加えて、植物の病害抵抗性誘導効果^{5,10,11)}や、植物の生育促進効果⁹⁾などが報告されており、複数の長所を有す農業資材として有用であると考えられる。今後は、対象となる微生物および植物に対するオゾン感受性の的確な評価手法の開発、実用規模での防除効果試験の実施、さらに対象植物や環境への安全性評価等を加味した評価を進めることが必要である。

引用文献

- 1) Freitas-Silva, O. and Venâncio, A. (2010) Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. *Drug Metab. Rev.* 42 : 612~620.
- 2) Heath, R. L. and Taylor, G. E. (1997) Physiological processes and plant responses to ozone exposure. *Ecol. Stud.* 127 : 317~368.
- 3) 本多敏一, 廣辻淳二 (1999) オゾンによる水処理. *電気学会誌*119 : 281~284.
- 4) Horvitz, S. and Cantalejo, M.J. (2014) Application of ozone for the postharvest treatment of fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54 :

- 312~339.
- 5) Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. and Karjalainen, R. (1994) Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ.* 17 : 783 ~ 794.
- 6) 永島俊夫・高野克己・松本信二・鴨居郁三 (1989) オゾンによる食品の品質保持に関する研究. *日食低温誌*15 : 132~136.
- 7) 永島俊夫・高野克己・松本信二・鴨居郁三 (1990) オゾンの殺菌作用に対する食品成分の影響と食肉加工工程への適用. *日食低温誌*16 : 158~162.
- 8) 内藤茂三 (1995) オゾン・紫外線による微生物制御. *日食微誌*12 : 105~113.
- 9) Onoue, M., Tatsuzawa, F., Kanayama, Y. and Kato, K. (2018) Promotion of plant growth under low temperature by ozonated water at low concentration in komatsuna (*Brassica rapa* L. *perviridis* Group). *Ozone Sci. Eng.* 40 : 415~419.
- 10) Sharma, Y. K. and Davis, K. R. (1997) The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radic. Biol. Med.* 23 : 480~488.
- 11) Sharma, Y. K., Léon, J., Raskin, I. and Davis, K. R. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*14 : 5099~5104.
- (2018年10月15日受理)
-