

炭酸ファインバブル水の抗植物病原微生物活性に関する研究

戸田武¹, 本田晃大¹, 福島淳², 藤晋一¹, 古屋廣光¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科² 秋田県立大学生物資源科学部応用生物学科

炭酸ファインバブル水（CFB 水）の微生物に対する殺菌あるいは生育阻害効果を調査した。真菌および卵菌類の 7 属 12 種の 13 菌株を使用した結果、CFB 水では *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Pythium arrhenomanes*, *Pythium spinosum*, および *Botrytis* sp. の生育が抑制された（1%または 5%水準）。レフラン水では、上記 5 種に加えて *Phytophthora* sp. および *Rhizoctonia solani* AG-4 の生育が抑制された（5%水準）。細菌類では、大腸菌 *Escherichia coli* および緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* をファインバブル水(pH5.0)に加えて 2 時間の浸漬処理したところ、いずれも生菌が約 1/100 に減少し、一定の殺菌効果が認められた。CFB 水でイネ種子を催芽時に浸漬処理してイネ籾枯細菌病に対する防除効果を検証したところ、薬剤の防除価が 90 前後（発病苗率 9%前後）であったのに対し CFB 水は 55.7 であり、十分な防除効果は得られなかった。

キーワード：炭酸ナノバブル（CFB）水，レフラン水，微生物

はじめに

ファインバブル（Fine-Bubble, 以下 FB）は直径 100 μm 以下の気泡のことを言い（国際標準化機構（ISO）「ファインバブル技術専門委員会」2013 年による定義），これを含む水はファインバブル水と呼ばれている。2000 年頃にカキ養殖に微細な気泡を散気することでカキの生育を促進させたことで微小なバブルを含む水が注目を集めるようになり、すし産業のほか、農業、臨床医療、食品工業、化学工業などにも多様な産業への利用が検討されてきた（ファインバブル学会連合，<http://www.fb-union.org/about.html>）。農業分野では酸素を封入した微細なバブル水を植物に与えると、細根の生育が促進されること（「微細気泡の最新技術」，梨子木久恒，2006），あるいは種子の発芽率や発芽勢が向上することが知られている（大木博士私信）。本研究では炭酸ガスを封入した微細なファインバブル水（CFB 水）の植物病原微生物に対する影響と病害防除の可能性を検討した。

1. CFB 水における菌類の生育

1) 材料と方法

(1) 供試菌.

供試菌株は、真菌類では 5 属 6 種の 7 菌株すなわち *Botrytis* sp. Pg1 株（各種作物の灰色かび病菌，オタネニンジン分離株），*Calonectria ilicicola* AP-11 株（ダイズ黒根腐病菌），*Fusarium oxysporum* AP-F10 株，*F. solani* f. sp. *phaseoli* AP-F1 株（インゲンマメ根腐病罹病菌），*Penicillium* sp. Oni-A および Pot9 株（いずれも腐敗したオーニソグラムから分離された菌株），および *Rhizoctonia solani* AG-4 Rh131（各種作物の苗立枯病菌，テンサイ分離株）とした。また卵菌類では 2 属 6 種の 6 菌株すなわち *Phytophthora* sp. AS3-35 株（アスパラガス疫病菌）および各種作物に主に苗立枯病を起こす *Pythium* spp. すなわち *Py. aphanidermatum* Toc159 株（ニンジン分離株），*Py. arrhenomanes* C7-2 株，*Py. myriotylum* 12C-4 株（以上、イネ苗分離株），*Py. spinosum* Cu-2 株（キュウリ分離株），および *Py. ultimum* AP-P182 株（ダイズ苗

分離株)とした。

(2) 供試菌の前培養.

Botrytis sp. Pgl 株は、直径 90 cm のペトリ皿に分注した 20 ml のグルコース加用ジャガイモ煎汁寒天 (以下, PDA) 平板培地で 3 日間, 25°C の暗所で培養した後, ブラックライトブルー蛍光灯照射下で 5 日間 20 °C で培養した. この間に形成された分生子を回収し, 滅菌水で 1.0×10^5 個/ml に調整した孢子懸濁液を得た. *Penicillium* sp. Oni-A および Pot9 株は, *Botrytis* sp. Pgl 株と同じく PDA 平板培地で 7 日間培養した後, 1.0×10^5 個/ml とした分生子懸濁液を作製した. その他の真菌類 4 菌株は 10ml PDA 平板培地で, また卵菌類 6 菌株は 10 ml のコーンミール寒天 (CMA) 平板培地で 3 日間, 25°C の暗所で培養した後, 直径 5 mm の含菌寒天円盤を得て生育調査の実験に使用した.

(3) 炭酸ファイナブル水における菌糸生育調査の方法.

試験区は次の 3 区すなわち, (i) 滅菌水区, (ii) CFB 水区, (iii) レフラン水区とした. 供試水を 15 ml ずつ試験管にとり, グルコース加用ジャガイモ煎汁をそれぞれ 300 μ l 加えた. これら 3 試験区でそれぞれ 4 反復準備した. CFB 水は超純水 1L を泡次郎 (型番 BY-4A200, (有) ベイクルーズ社製) で 30 分間処理した水である. また, レフラン水は, ホタテ貝粉末, クエン酸, 重曹 (炭酸水素ナトリウム), ニガリ (塩化ナトリウム, 塩化マグネシウム, およびナトリウム, カリウム混合物) を一定の割合で CFB 水と混合した水である ((有) ベイクルーズ社製).

Botrytis sp. Pgl 株, *Penicillium* sp. Oni-A および Pot9 株の 3 菌株は前項で準備した分生子懸濁液を各試験区の試験管に 100 ml ずつ添加した. その他の真菌類 4 菌株および卵菌類 6 菌株は, 前項で準備した含菌寒天を一片ずつ各試験区の試験管に添加した. 供試菌を加えたのちは全ての試験区とも室温 25 °C の暗黒下でおよそ 4 週間培養した.

(4) 菌糸生育量の測定.

各試験区の菌糸量は, 生育した菌体を丁寧に磨砕したのち, 磨砕液の吸光度によって比較した. 試験管内の生育菌糸を含む培養液を 15 mL 遠心チューブに移し, 3,000 rpm (50 分) 遠心分離して沈殿させた

後, 上清をメスピペットで遠心チューブの 1 mL 線まで正確に取り除いて濃縮液とした. レフラン水区では試験管に析出物があったため, 0.1N 塩酸を 15 mL 添加して再び 3,000 rpm (50 分) 遠心分離した後, 上清を 1 mL まで取り除いた. 濃縮液は 2.2 mL チューブに移し, チューブにメタルコーンを入れ 1,500 rpm (5 - 10 分) で破砕 (Bug Crasher, タイテック株式会社) した. これに 2.2 mL まで滅菌水を加え, 良く攪拌した後, OD₆₀₀ で各試験区の吸光度を測定した (NANO DROP 2000, サーモフィッシャーサイエンスフィック株式会社). 試験区間における吸光度の有意差はスチューデントの t 検定による.

2) 結果

CFB 水では *F. oxysporum*, *Penicillium* sp. Pot9 株 (以上 $p < 0.01$), *Py. arrhenomanes*, *Botrytis* sp. Pgl 株, *Penicillium* sp. OniA 株および *Py. spinosum* (以上 $p < 0.05$) の生育は滅菌水区よりも明らかに劣った. また *C. ilicicola* および *R. solani* AG-4 も生育が抑制される傾向がみられた (それぞれ $p < 0.08$). 他の *F. solani* f. sp. phaseoli, *Py. aphanidermatum*, *Py. ultimum*, *Phytophthora* sp. では大きな差は見られなかった (図 1).

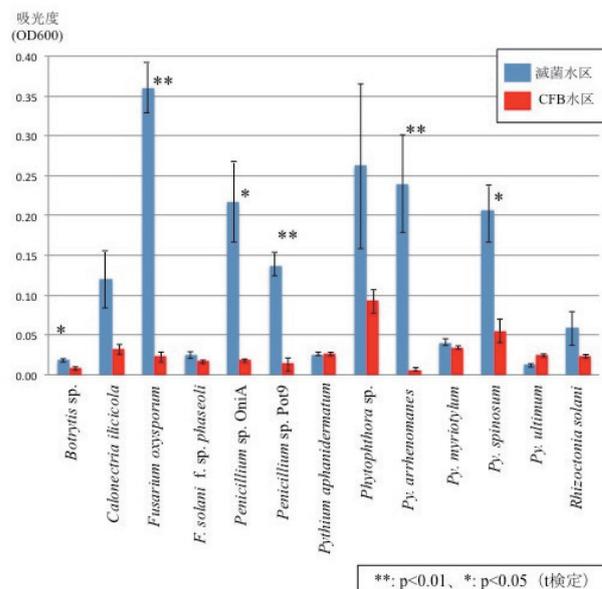


図 1. 真菌類および卵菌類における CFB 水および滅菌水内の生育に対する吸光度

レフラン水区では, *F. oxysporum*, *Py. arrhenomanes* (以上 $p < 0.01$), *Botrytis* sp. Pgl 株, *Phytophthora* sp., *Py. spinosum* および *R. solani* AG-4 (以上 $p < 0.01$) の生育は滅菌水区に比べて明らかに劣った. また, *C.*

ilicicola および, *Py. aphanidermatum* も抑制される傾向が見られた ($p < 0.08$) (図 2).

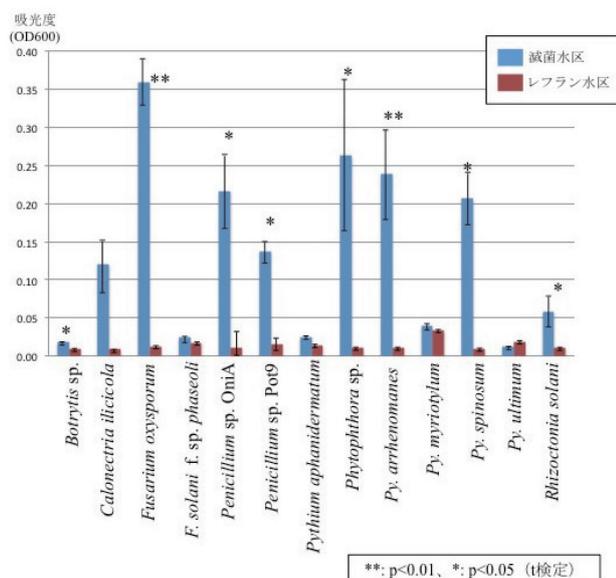


図 2. 真菌類および卵菌類におけるレフラン水および滅菌水内の生育に対する吸光度

2. CFB 水における大腸菌および緑膿菌の生存

1) 材料と方法

(1) 供試菌.

供試菌株は, 大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株, 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* とした.

(2) 試験区および調査の方法.

試験区は次の 5 種類, (i) レフラン水区 (pH 7.0), (ii) CFB 水区 (pH 5.04), (iii) CFB 水 (pH 4.97) 区, (iv) 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 ($C_2H_3NaO_2$) 区 (pH 5.0), (v) 蒸留水区 (pH 8.4) とした. これら 5 試験区の水は無菌性を確認した後に使用した.

供試菌株を Luria-Bertani (LB) 培地で 24 時間培養し, 各試験区の使用水 5 mL に培養液が 1% になるように加え 37°C で 2 時間保温した. その後, 培養液を希釈して各濃度で 2 枚の LB 寒天培地に塗布し, 37°C で一晚培養して生じたコロニーを計数し, 2 枚の平均値を求めた.

2) 結果

大腸菌および緑膿菌は, とともに CFB 水処理によって, 蒸留水区の百分の一以下まで生菌数が減少した. レフラン水処理区は, 大腸菌および緑膿菌ともに蒸留水と菌数に変化は見られなかった. 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 処理区では, 大腸菌の生

菌は百万分の一以下まで減少し, 緑膿菌は CFB 水処理と同程度まで減少した.

表 1. 大腸菌および緑膿菌の各試験区における 2 時間処理後の生菌数 (菌体数 / ml)

試験区	大腸菌	緑膿菌
レフラン水 (pH 7.0)	9.4×10^9	5.1×10^8
CFB水 (pH 5.04)	7.6×10^7	9.0×10^6
CFB水 (pH 4.97)	7.5×10^7	2.0×10^6
$C_2H_3NaO_2$ (pH 5.0)	$1.0 \times 10^3 >$	1.0×10^6
蒸留水 (pH 8.0)	9.1×10^9	2.9×10^8

3. イネもみ枯細菌病に対する CFB 水の影響

1) 材料と方法

(1) 供試植物および試験区.

供試植物はイネ種子 (品種: あきたこまち) の健全種子に開花期にもみ枯細菌病菌を接種した種子を 20% 混合して使用した.

試験区は 4 区, すなわち (i) CFB 水区, (ii) テクリード C フロアブル (クミアイ化学工業社製) 処理区, (iii) エコフィット (クミアイ化学工業社製) 処理区, (iv) 無処理区とし, それぞれ 3 反復ずつ準備した. 各反復で種子は乾粒重 25g となるように調整した. (iv) の無処理区の種子は 15°C で 5 日間の水道水による浸漬処理後に, 30°C で 24 時間の同じく水道水による催芽処理を行い播種した. (i) の CFB 水区の種子は, 15°C で 5 日間の処理後に, CFB 水に浸漬して 30°C 24 時間の催芽処理を行った. (ii) および (iii) の薬剤処理区の種子は, 各薬剤の規定の濃度である 200 倍および 100 倍に希釈後に 15°C で 24 時間の浸漬処理し, 水道水に移して 15°C で 4 日間の浸漬処理, および 30°C で 24 時間の催芽処理を行って播種した.

育苗は 20 x 15 x 4 cm³ のプラスチック製箱型容器を使用し, 各容器に培土 (いなほ粒状培土) 600 ml を詰め (i)-(iv) の処理を行った種子を表面に散播した. これを 200 ml の培土で覆土して 32°C で 48 時間の出芽処理後, 12 日間人工光形グロースキャビネット (小糸工業社製 KG-206SHL-D) で栽培した. グロースキャビネットにおける栽培は, 照度 50,000 Lux (最大), 15 時間明期 (4:00-19:00) で, 24 時間の温度が 9:00-11:00 を 15°C, 11:00-13:00 を 20°C, 13:00-15:00 を 25°C, 15:00-17:00 を 20°C, 17:00-19:00

を 15℃, 19:00-9:00 を 10℃の条件で管理した.

(2) 調査の方法.

播種 14 日後に各処理区における苗の発病度を調査した. 発病度は, 全ての苗について, あらかじめ定めた 4 段階の指数 (0: 健全, 1: 白化, 2: 萎凋または生育不良により草丈が健全の 1/2 以下, 3: 枯死) を求め, 次式により計算した. 各試験区における発病度 ($=\sum(\text{程度別発病苗数} \times \text{指数}) \times 100 / (\text{調査苗数} \times 3)$) を, 発病度から防除価 ($= (100 - \text{発病苗率} / \text{無処理区の発病苗率}) \times 100$) を算出し, 試験区間で効果を比較した.

2) 結果

無処理における苗は萎凋が多く, 発病苗率が 88.8%で発病度が 57.9 であった (表 2). 対照薬剤のテクリードCフロアブル処理区およびエコフィット処理区は発病苗率がいずれも著しく低く, 高い防除価を示した. CFB 処理区は, 発病苗率が約 40%と無処理よりも 50%近く発病を低下させたが, 防除価は薬剤処理区より大きく劣った (表 2).

4. 考察

糸状菌および卵菌類の一部は, CFB 水またはレフラン水によって菌糸の生育が顕著に抑制された. これまで炭酸ファインバブル水によって細菌に対して殺菌効果があることは知られているが, 真菌および卵菌類に対する生育阻害効果の報告は見当たらない. ただし, 抑制されたいずれの菌も FB 水でわずかではあるが生育していることから, 殺菌効果があったとは考え難い. 抑制された菌類はいずれも植物病原菌であることから病気の発生抑制に利用できることも期待されるが, 生育抑制効果は必ずしも強くないことから, 使用方法について慎重に検討す

る必要がある.

CFB 水と pH がほぼ同じ酢酸ナトリウム緩衝液も殺菌効果があったことから, この細菌数の低下は pH が低いことによる可能性が高いと推察される. イネもみ枯細菌病菌の CFB 水による防除の可能性を検討したところ, CFB 水区では無処理区よりも発病苗率が約 50%低下した. イネもみ枯細菌病の病原菌 *Burkholderia glumae* は, pH4.2-5.0 の土壌では pH6.0 の土壌よりも発病が低い (遠藤, 1980). このことから, CFB 水の低い pH がもみ枯細菌病の発病苗率を低下させたと考えられる. しかし, *B. glumae* は pH5.0 でも生育が可能 (植松ら, 1976) であることから, 感染種子に CFB 水を処理しても, 残った生菌が約 40%の苗を発病させたと考えられる. CFB 水の防除値は対照薬剤と比較して著しく低く, この使用方法での実用性は著しく低いかなと考えられる.

5. 引用文献

植松 勉, 吉村大三郎, 西山幸司, 茨木忠雄, 藤井 溥 (1976) 「育苗箱のイネ幼苗に腐敗をおこす細菌について」『日本植物病理学会報』42: 464-471.
遠藤頼嗣 (1980) 「イネもみ枯細菌病による苗腐敗症の発生する育苗条件について」『北日本病害虫研究会報』31: 56-58.

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

表 2. 各処理区におけるイネもみ枯細菌病の発病程度、発病度、発病苗率、および防除価

処理区	調査苗数	健全苗数	枯死苗数	重症苗数	軽症苗数	発病度	発病苗率	防除価
CFB	618.3	398.7	1.0	215.3	3.3	25.5	38.5%	55.7
テクリードCフロアブル	725.3	658.7	0.0	65.0	1.7	6.1	9.2%	89.4
エコフィット	698.0	638.0	0.0	60.0	0.0	5.7	8.6%	90.1
無処理	530.3	74.7	0.0	455.7	0.0	57.9	86.8%	

Growth inhibition and sterilization of plant pathogenic microorganisms through the application of carbonated fine-bubble water

Takeshi Toda¹, Akihiro Honda¹, Jun Fukushima², Shin-ichi Fuji¹, Hiromitsu Furuya¹

¹ Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

² Department of biotechnology, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

Carbonated fine-bubble water (CFB) was applied to sterilize microorganisms and to inhibit their growth. CFB subdued the growth of *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Pythium arrhenomanes*, *Pythium spinosum* and *Botrytis* sp. ($P < 0.05$) in fungi and in oomycetes. Lefran water also repressed the growth of *Phytophthora* sp. and *Rhizoctonia solani* AG-4 ($P < 0.05$) as well as the five species named above. Soaking *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in CFB for 2 hours resulted in the reduction of live cells of the bacteria. CFB was also used for controlling bacterial panicle blight, a disease that infects rice. Soaking the afflicted rice seeds in CFB decreased the rate of panicle blight (38.5%) in comparison with non-treated rice (86.8%). However, the preventive value of CFB was lower (55.7) than two chemical controls (~90).

Keywords: Carbon fine bubble water, lefran, microorganism