

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580407

研究課題名（和文）マイクロバブルオゾンを利用した効率的な水耕培養液の殺菌・浄化

研究課題名（英文）Disinfection using ozone microbubbles to inactivate phytopathogens

研究代表者

玉置 雅彦（TAMAKI MASAHIKO）

明治大学・農学部・教授

研究者番号：20227268

研究成果の概要（和文）：

マイクロバブルオゾン(O₃MB)を培養液の殺菌・浄化法として確立するため、根から侵入する植物病原菌のフザリウム菌および軟腐病菌を用いて検討した。O₃MBはO₃ミリバブルよりも水中に短時間で効率よく溶存して、両植物病原菌に対して高い殺菌効果を示した。また、O₃MB水の殺菌効果およびその持続性は初発DO₃の上昇に伴い高まった。以上の結果から、O₃MBが養液栽培における培養液の新たな殺菌・浄化法と成り得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To establish a method for disinfecting hydroponic culture solutions using ozone microbubbles (O₃MB), we examined the disinfectant activity of O₃MB against phytopathogens in infected plant roots. O₃MB had a higher solubility and remained in the water for a longer period than ozone millibubbles, resulting in extremely high disinfecting activity against both phytopathogens. Furthermore, disinfectant activity and durability of O₃MB-treated water against both phytopathogens increased with an increase in the initial concentration of dissolved ozone. Therefore, these results suggest that O₃MB may be suitable for use as a new disinfectant against phytopathogens in hydroponic culture solutions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：マイクロバブル、オゾン、殺菌、養液栽培、植物病原菌

1. 研究開始当初の背景

水耕栽培の導入や普及を図る上で以下に示すような問題点が存在する。水耕栽培は、肥料を含む培養液によって栽培する方法であるため、

(1) 培養液中に一旦病原菌が侵入すると全施設内に蔓延し、短時間のうちに施設内の全作物に被害が発生するといった大きなリスクがある。培養液を介して根から発生する病害に対して有効な殺菌対策は無く、また培養液

中へ農薬を投与することは農薬取締法で禁じられているために、栽培期間中の培養液殺菌技術の開発が急務である。

(2)現状の掛け流し方式水耕栽培システムでは培養液は常に垂れ流し状態であり、培養液循環型水耕栽培システムでも栽培終了時に培養液を河川等の外部に廃棄しており、これらが環境汚染の一原因となっている。

上記の背景から、培養液殺菌と廃液ゼロを可能とする環境に配慮した半永久的培養液連続循環型水耕栽培システムの開発が必要である。本システムを実現させるためには、培養液の継続的・効率的な同時殺菌・浄化が必要である。しかし、これまで熱や紫外線処理などの物理的方法、オゾンや塩素処理などの化学的方法、さらには緩速ろ過や拮抗微生物を利用した生物的方法などが検討されてきたが、これらの方法はいずれも経済性や効果、植物に及ぼす影響等の面で課題を残している。

2. 研究の目的

作業場での大気中のオゾン濃度は 0.1ppm 以下にしないといけない（厚生労働省）。従来技術のオゾンによる培養液の殺菌・浄化には溶存オゾン濃度が 2.0ppm 程度必要であるが、その為には数千 ppm という極めて高濃度のオゾンを発生させ、廃オゾンは回収する必要があった。人体や植物に及ぼす影響、ランニングコスト等を考えると、発生させるオゾン濃度を極めて低くして、低い溶存オゾン濃度で殺菌・浄化効果を得る必要がある。マイクロバブル発生技術を用いてオゾンをマイクロバブル化することで、オゾンの水中での安定性と殺菌・浄化効率を飛躍的に高めることが可能である。オゾンをマイクロバブル化して用いる場合の、培養液の殺菌・浄化が可能で有効下限溶存オゾン濃度を明らかにすること、さらに、その濃度での植物の生育、培養液の肥料組成への影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)溶存マイクロバブルオゾンの有効下限殺菌・浄化濃度の検証

溶存オゾン濃度およびオゾン暴露時間等のパラメータと植物病原菌（フザリウム菌および軟腐病菌）の殺菌効果および培養液の浄化効果との関係について検証する。

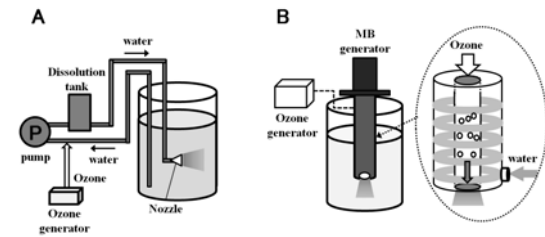
(2)オゾンマイクロバブルの植物病原菌の殺菌メカニズム

O_3MB 水処理した病原菌懸濁液を、SEM を使用し電子顕微鏡観察を行う。

(3)オゾンマイクロバブルの発生方法の違いが培養液中の植物病原菌の殺菌に及ぼす影

響

MB の発生方法には、加圧溶解法と気液旋断法の 2 つの方法がある。異なる 2 つの方法により発生させた O_3MB が、培養液中の植物病原菌に対する殺菌効果について検証する。



A; 加圧溶解法、B; 気液旋断

(4)マイクロバブルオゾンが植物の生育に及ぼす影響

コンテナ内でレタスを水耕栽培し、特に1.のマイクロバブルオゾンの有効下限殺菌・浄化濃度において生育に及ぼす影響について把握する。

(5)マイクロバブルオゾンによる培養液の肥料組成の変化

これまでの実験から、溶存マイクロバブルオゾン濃度が高いと (2.0ppm)、培養液が酸化されて Mn と Fe が難溶性となり沈殿し肥料組成が変化することを検証したが、低濃度の場合については未検討である。そこで、特に1.のマイクロバブルオゾンの有効下限殺菌・浄化濃度と培養液の肥料組成との関係について検証する。

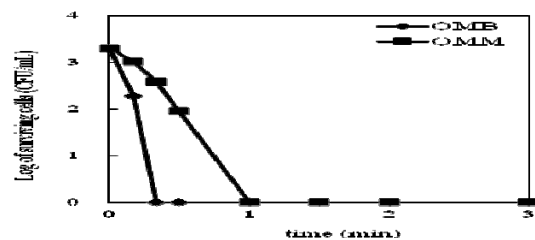
(6)オゾンマイクロバブル発生後のキレート剤添加が培養液の肥料組成に及ぼす影響

O_3MB 発生直後に培養液にエチレンジアミン 4-酢酸を主成分とするキレート剤 EDTA およびジエチレントリアミン 5-酢酸を主成分とするキレート剤 DTPA を、培養液当たり重量比でそれぞれ 0.1%、0.01%、0.001% になるようにそれぞれ添加する。

4. 研究成果

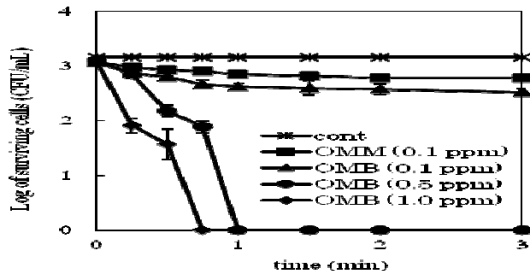
(1)溶存マイクロバブルオゾンの有効下限殺菌・浄化濃度の検証

O_3MB およびマイクロバブルオゾン (O_3MM) のフザリウム菌に対する殺菌効果を下記に示す。気液旋断法による O_3MB 処理した生菌数は O_3MM 処理よりも速やかに減少し、 O_3MB 処理の高い殺菌効果が認められた。



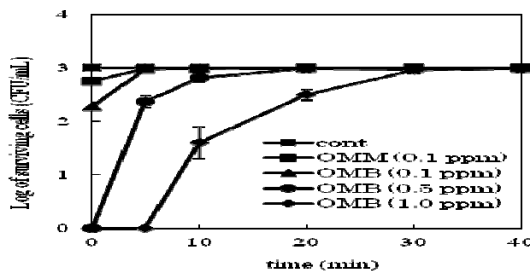
O_3 MB 水および O_3 MM 水のフザリウム菌に対する殺菌効果を下記に示す。 O_3 MB 水の殺菌効果は dO_3 の初期濃度の上昇に伴い高まった。一方、 O_3 MM 水処理は、同 dO_3 の O_3 MB 水処理よりも殺菌効果は低かった。

O_3 MB 水および O_3 MM 水のフザリウム菌に対



する殺菌効果の持続性を下記に示す。 O_3 MB 水の殺菌効果の保持時間は dO_3 の初期濃度の上昇に伴い長くなった。一方、 O_3 MM 水の殺菌効果の保持時間は同 dO_3 の OMB 水と同等であった。しかしながら、 O_3 MB 水の殺菌効果は O_3 MM 水よりも高まった。

以上の結果から、 O_3 MBは O_3 MMよりも殺菌・浄



化効果は高く、有効下限濃度は0.5ppm以下であることが明らかとなった。

(2) オゾンマイクロバブルの植物病原菌の殺菌メカニズム

加圧溶解法による O_3 MB が、フザリウム菌および軟腐病菌に及ぼす影響を SEM 観察した。対照区には認められない O_3 MB 区の形態学的な差異として、フザリウム菌は小型分生子の隔壁に大きな陥没が複数箇所観察される微細変化が観察された。軟腐病菌は、 O_3 MB 区で細胞壁の破壊や、細胞質が流出している様子が観察された。これらの成果は、世界で初めての観察結果である。

(3) オゾンマイクロバブルの発生方法の違いが培養液中の植物病原菌の殺菌に及ぼす影響

加圧溶解法により発生させた O_3 MB による殺菌効果は、気液旋断法により発生させた O_3 MB よりも高いことが明らかとなった。前者の高い殺菌効果は O_3 が有する酸化力に加えて、 O_3 MB から発生する OH ラジカルとの相乗効果によるものであることが示唆された。し

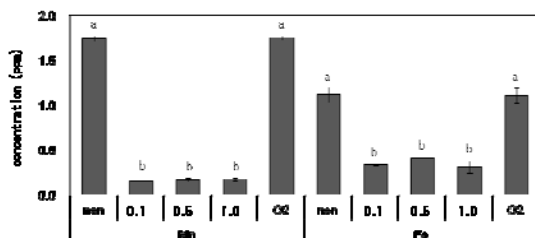
たがって、水耕栽培における植物病原菌の殺菌には、加圧溶解法により発生させた O_3 MB の使用が有効であることが明らかとなった。

(4) マイクロバブルオゾンが植物の生育に及ぼす影響

実験 (1) の結果等に基づき、週 2 回、0.5ppm の dO_3 になるように設定してレタスを水耕栽培した。フザリウム菌を混入した区では発病率が 48.4% と約半分の植物体が発病し植物の生育も有意に劣ったが、フザリウム菌を混入し O_3 MB 処理した区では発病率は 4.7% と極めて少なくなった。また、 O_3 MB 区は対照区と比較して植物の生育に影響を及ぼさなかった。したがって、0.5ppm 程度の低濃度の dO_3 でも、植物の生育に影響を及ぼすことなく病原菌の殺菌が可能であることが明らかとなった。

(5) マイクロバブルオゾンによる培養液の肥料組成の変化

マイクロバブルオゾンによる培養液の肥料組成の変化を下記に示す。 dO_3 が 1.0ppm では、 O_3 MB 発生前後の培養液中の NH_4 、K、Mg、Ca、 NO_2 、 NO_3 および PO_4 濃度は有意に変化しなかった。しかし、Fe および Mn 濃度は O_3 MB 発生後に有意に減少した。 O_3 MB 処理前の培養液中の Fe 濃度は 1.1ppm、Mn 濃度は 1.7ppm であったが、1.0ppm での O_3 MB 処理後は Fe 濃度は 0.3ppm、Mn 濃度は 0.2ppm まで減少した。また、 dO_3 が 0.5ppm および 0.1ppm でも同様に、Fe および Mn 濃度は有意に減少したことから、 dO_3 に関係なく O_3 MB 処理することで培養液組成は変化することが示された。これらの O_3 MB 処理後の培養液中には赤色の沈殿物が観察された。しかし、 O_2 MB 処理では処理前後で Fe および Mn 濃度には変化がなく、他の肥料組成も変化しなかった。培養液を O_3 MB 処理することで生じた赤褐色の沈殿は、 O_3 および O_3 MB 圧壊に伴い発生するヒドロキシラジカルが有する酸化力により、Fe および Mn が酸化されて難溶性となり沈殿したことが示唆された。

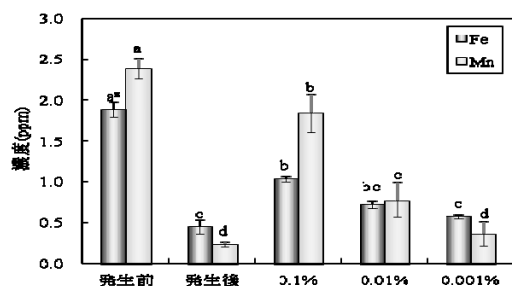


(6) オゾンマイクロバブル発生後のキレート剤添加が培養液の肥料組成に及ぼす影響

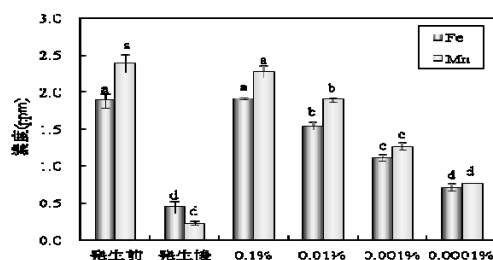
培養液の殺菌を目的とした O_3 MB の発生後のキレート剤添加が、培養液の肥料組成に及ぼす影響を検討した。 O_3 MB を培養液中に発生

させると沈殿が生じ、Fe と Mn 濃度の減少が認められた。そこで、EDTA または DTPA キレート剤を添加した結果、添加濃度が高いほど Fe と Mn の培養液中に再溶解する濃度は高まった。また、キレート剤の種類による効果の違いは認められなかった。O₃MB の発生にともない沈殿した培養液中の Fe と Mn は、キレート剤の添加により再溶解が可能であることから、キレート剤を使用した O₃MB による培養液殺菌が水耕栽培での新しい殺菌技術として利用可能であると考えられる。

(A) EDTA



(B) DTPA



今後の展望

O₃MB は培養液中の植物病原菌に対して O₃MM よりも高い殺菌効果を示すことが認められた。しかし、O₃MB 処理により培養液中の Mn および Fe 濃度が減少することが確認された。本実験のレタス栽培では、植物に肥料欠乏等の生育障害は認められなかったが、栽培する植物によっては Mn および Fe を適宜加える等の対策が必要であった。そこで、キレート剤を添加したところ、沈殿防止が可能であることを見いだした。

しかし、キレート剤の種類、濃度や栽培期間中の添加回数と野菜の生育との関係、溶存オゾン濃度と野菜の生育との関係、については未解決であるので、今後はこれらの点を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ①Fumiyuki Kobayashi, Hiromi Ikeura, Shuichi Ohsato, Tomohiro Goto and Masahiko Tamaki. Disinfection using

ozone microbubbles to inactivate *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. Crop Protection. 査読有, 30, 1514-1518. 2011.

<http://www.journals.elsevier.com/crop-protection/>

- ②Fumiyuki Kobayashi, Hiromi Ikeura, Shuichi Ohsato and Masahiko Tamaki. Microbicidal effect of ozone microbubbles generated by different methods on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. Japanese Society of Agricultural Technology Management. 査読有, 18(3), 129-134. 2011.

http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA11646210_ja.html

- ③Fumiyuki Kobayashi, Hiromi Ikeura, Shuichi Ohsato and Masahiko Tamaki. Microbicidal effect of microbubbles with ozone, oxygen, and carbon dioxide against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. Japanese Society of Agricultural Technology Management. 査読有, 18(3), 123-128. 2011.

http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA11646210_ja.html

[学会発表] (計 8 件)

- ①後藤知大・佐藤道夫・森崎亜友生・玉置雅彦. 走査型電子顕微鏡観察によるオゾンマイクロバブルの殺菌メカニズム. 園芸学会. 2012年3月28日. 大阪府立大学
- ②玉置雅彦. マイクロバブルの農業分野への応用. 日本混相流学会. 2011年10月26日. 慶応義塾大学
- ③後藤知大・高橋秀彰・山田将史・玉置雅彦. オゾンマイクロバブルの水耕栽培利用～キレート剤を添加した培養液の殺菌およびレタスの生育に及ぼす影響～. 園芸学会. 2011年9月24日. 岡山大学
- ④後藤知大・斧実穂・玉置雅彦. オゾンマイクロバブルにより沈殿した培養液中の微量元素に対するキレート剤の効果. 園芸学会. 2011年3月20日. 宇都宮大学
- ⑤後藤知大・斧実穂・玉置雅彦. オゾンマイクロバブルの発生方法の違いが殺菌に及ぼす影響. 園芸学会. 2010年9月19日. 大分大学
- ⑥後藤知大・小島敬久・塚田桂太・榎真由美・玉置雅彦. オゾンマイクロバブルを用いた水耕栽培での応用. 園芸学会. 2010年3月22日. 日本大学
- ⑦後藤知大・小島敬久・塚田桂太・榎真由美・玉置雅彦. オゾンマイクロバブルを用い

た水耕栽培の培養液殺菌. 第9回マイナスイオン応用学会. 2009年10月7日. 東京大学

- ⑧後藤知大・小島敬久・塚田桂太・榎真由美・玉置雅彦. 水耕栽培でのオゾンマイクロバブルを用いたフザイウム菌、軟腐病菌の殺菌の検討. 園芸学会. 2009年9月27日. 秋田大学

[図書] (計1件)

- ①玉置雅彦, 他、シーエムシー出版、マイクロバブル・ナノバブルの最新技術Ⅱ、2010、175-180

[産業財産権]

- 出願状況 (計1件)

名称：水耕栽培方法および水耕栽培装置

発明者：玉置雅彦

権利者：学校法人明治大学

種類：特許

番号：特願 2011-056948

出願年月日：23年3月15日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~mtamaki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 雅彦 (TAMAKI MASAHIKO)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：20227268