

論 文

高電圧パルス処理による水中および土壌中の線虫不活化

大 嶋 孝 之^{*1}, 渡 辺 卓^{*}, 深 川 毅^{*}, 佐 藤 正 之^{*}

(2006 年 5 月 15 日受付; 2006 年 9 月 23 日受理)

Inactivation of Nematode in Solution and Soil
by High Voltage Pulse TreatmentTakayuki OHSHIMA^{*1}, Suguru WATANABE^{*}, Tsuyosi FUKAGAWA^{*} and Masayuki SATO^{*}

(Received May 15, 2006; Accepted September 23, 2006)

The influence of high-voltage pulse treatment on plant parasitism nematodes was studied. When the 10 sec of high-voltage pulse (5 kVp/cm, 50 Hz) was applied to the suspension of nematode in solution, it became clear that the number of nematode becomes 1/10 or less. We also tried the actual application of high-voltage pulse associated inactivation of nematode in the case of tomato cultivation. When the tomato seeding was cultivated in nematode-contaminating soil, the dry weight of root was 34 g/plant after four weeks cultivation, which was drastically less than that cultivated in nematode free soil (68 g/plant). On the other hand, as 10 sec of high-voltage pulse (5 kVp, 50 Hz) was applied to a needle electrode stabbed near the tomato seeding at two weeks after budding, the prevent of root development due to the nematode was apparently inhibited and the dry weight of root was 60 g/plant after four weeks cultivation.

1. はじめに

近年, 農業構造の変化からハウス等特定の農耕地で特定の作物の連作が行われるようになってきている. このような同一作物の連作は土壌病原虫が定着し, 農作物への被害を拡大する要因となっている. 特に線虫による被害は, 果樹から卉類, 野菜に至るまでの広範な被害をもたらしている. 線虫は農作物から養分を吸収するため, 植物の育成を阻害することから, 収穫量の減少や作物表面にコブや瘰癧を引き起こして商品価値を下げている¹⁾. 線虫によってもたらせられる農作物への被害は全世界で総額 80 億ドルにも達し²⁾, 地球上の作物の 30% 近くを損なっているという統計もある¹⁾.

これらの線虫をはじめとする病害虫の防除は, 現在では農薬を使用した化学的な防除が多いが, この方法では確かに病害虫に対する防除効果は高いが, 農薬残留や土壌生態系破壊, 地下水汚染の問題を引き起こすことが懸念されている²⁾. 線虫の防除はくん蒸剤(D-D, クロルピクリン, 臭化メチルなど)が効果的であるが, これらの薬剤は環境への負担が大きく,

人体への毒性もあるため, しばしば作業者の中毒事故が発生することもある.

これらの薬剤に依存せず安全に植物病原虫の被害を抑えるために, 土壌中線虫など病原虫に対する忌避作用を持った対抗植物(マリーゴールド等)を植えて休耕させる方法が採られているが, この作業は余分な労働力と耕作面積の減少をもたらし, また対抗植物は換金性の低いものが多いため, 経営的側面から困難である. その他に線虫防除に有効とされ実際に試みられている方法としては有機物を肥料として土壌に与えて, 自活性線虫を増やして植物寄生種の線虫の増殖を抑える方法²⁾, オゾンを用いる方法³⁾, 蒸気消毒や 55~80 °C の範囲での熱水土壌消毒^{4,5)}, あるいは土壌の灌水処理を行う方法などがあるが, これらの方法には効果が出るまでに時間が必要で, 大掛かりな設備と莫大なエネルギーが必要になってくる. さらに処理中は栽培ができないなどの問題点がある. したがってより簡便な方法で簡単に導入できる線虫防除法が求められている.

一方, 高電圧パルス状電圧の微生物に与える影響は様々な研究者により報告されており, 高電圧パルス電界(PEF)による微生物の殺菌技術の実用化が試みられている⁶⁻⁸⁾. 報告されている PEF による殺菌メカニズムから推定すると細胞が大きいほうが有効である⁹⁾. そこで細菌(直径数 μm)に比

キーワード: 線虫, 高電圧パルス電圧, トマト

* 群馬大学 (376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

¹ tohshimabce.gunma-u.ac.jp

べて大きな線虫（直径数十～数百 μm ，長さは大きいもので 1 mm 程度）に対する PEF の死滅作用は大きいと考えられ，簡単に死滅されるのではないかと考えた．また線虫が電界および電流に対し感受性を持ち，反応するとの報告¹⁰⁾もあり，殺虫に至らないまでも何らかの忌避作用も期待できるのではないかと考えた．

そこで本研究では PEF による線虫の死滅を確認すると共に，実際の作物栽培への適用を試みた．

2. 実験方法

2.1 線虫の調整法

線虫は群馬県農業技術センターより分与された汚染土より増殖・分離して用いた．プランター栽培した発芽一週間後のトマト（大型福寿；サカタのタネ）の用土（約 10 L）に線虫汚染土（約 10 g）を混入させ，栽培を続けることで線虫の増殖を促した．線虫の抽出は栽培後の培養土 20 g からベルマン法¹¹⁾により行った．線虫頭数の測定はベルマン法抽出液をシャーレに広げ，光学顕微鏡（40～100 倍；OLYMPUS CK-40）下での直接カウントする方法を用いた．図 1 に分離した線虫の光学顕微鏡写真を示す．栽培 1～3 ヶ月の間に得られる線虫頭数はおおよそ 50 頭/g-培養土であった．また，植物体に与える病態からネコブ線虫，ネグサレ線虫が混合していると考えられる．

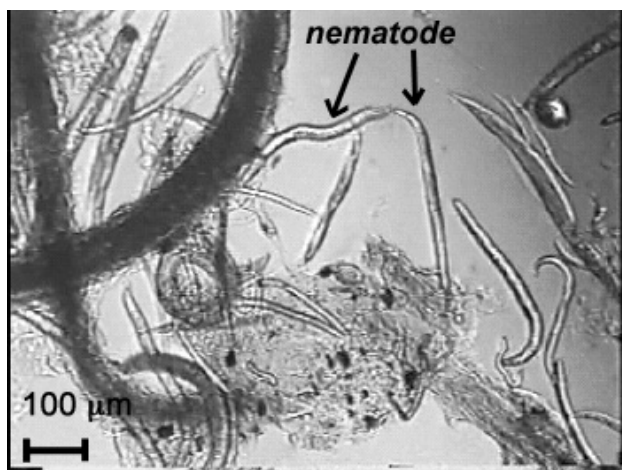


図 1 栽培トマトより分離した線虫の顕微鏡観察．ベルマン法により分離．

Fig.1 Microscopic observations of nematodes isolated from tomato. Isolation of nematode was carried out by Baermann funnel method.

2.2 溶液試料に対する高電圧パルス電界の印加方法

前述の方法で抽出した線虫懸濁液を遠心分離（1,500 rpm, 5 min）した後に上清を捨てて線虫を回収した．この後，水道

水（導電率 0.25 mS/cm）または土壌抽出液（導電率 1.5 mS/cm）に再懸濁し，線虫の溶液試料とした．溶液試料の線虫頭数はおおよそ 50 頭/mL で調整した．土壌抽出液は 20 g の土壌に対し，150 mL の水道水を加えて混合した後，静置した時の上清とした．この溶液試料を図 2 に示す平板対平板電極型の処理槽（処理液量 1.7 mL）に入れ，高電圧パルス電界を印加し，印加前後の生きた線虫頭数変化をベルマン法により観察した．高電圧パルス電源はインダラが使用したスパークギャップを用いた発生装置（周波数 50 Hz）を用いた¹¹⁾．印加電圧はオシロスコープ（Tektronix TDS360）と高電圧プローブ（Tektronix P6015）で測定し，2～10 kVp を印加した．

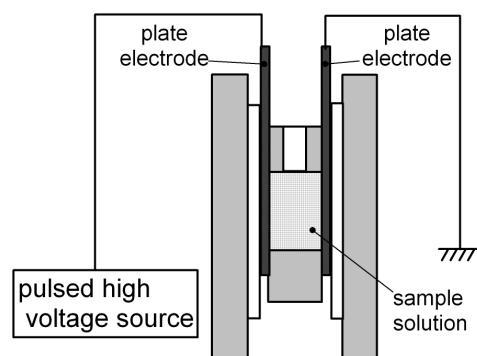


図 2 線虫懸濁液を不活化するための平板対平板電極処理槽

Fig.2 Schematics of plate-to-plate electrode chamber to inactivate nematode suspending in solution.

2.3 トマトの栽培と線虫添加および高電圧パルス印加方法

トマト種子（大型福寿；サカタのタネ）を栽培ポットに入れた滅菌培養土（約 80 g）に接種して栽培を開始した．栽培は南向き窓に接して設置したビニールハウス（25 $^{\circ}\text{C}$ ）で行った．発芽一週間後に滅菌培養土または線虫汚染土各 10 g（線虫頭数 約 500 頭）を混ぜ込み，さらに栽培を行い，トマトの茎丈，根の重量，培養土中の線虫頭数を比較した．茎丈は地上部の茎の長さを測定した．根の重量は地中部位を切断回収後，流水で付着した土を取り除いた後，乾燥器（60 $^{\circ}\text{C}$ ）で一晩乾燥させた後の乾燥重量を測定した．培養土中の線虫頭数の測定は，トマト苗を引き抜いた後の培養土を混合し，この内 20 g を採ってベルマン法により観察し，1 g 培養土当りの頭数で評価した．

トマト栽培への高電圧パルス印加は線虫汚染土を追加した一週間後（発芽二週間後）に印加した．高電圧パルスの印加方法を図 3 に示す．先端 4 cm を除いて被覆したステンレス針金電極を高電圧電極として，トマト苗から 0.5 cm 離れた

位置に、ポット底面まで 2 cm まで挿入した。アース電極は栽培ポットの下に置かれたステンレス金網とした。印加時は培養土に水道水を加え、アース電極と土が染み出した水道水で繋がっている状態とした。高電圧パルス電源は溶液試料で用いた装置と同じものを用い、印加電圧は 3, 5, 8 kVp で、印加時間は 10 秒である。高電圧パルス印加後は電極を取り除き、栽培を続けた。トマト栽培の実験スキームを表 1 にまとめた。線虫の添加の有無、印加条件の違いにより、Ⅰ～Ⅴの 5 種類のサンプルを比較した。

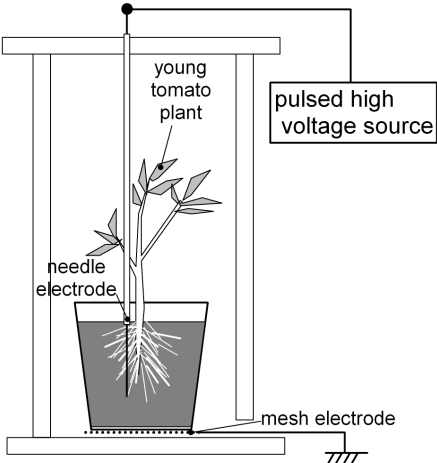


図 3 トマト苗に対するパルス処理装置概略図
Fig.3 Schematics of experimental set up for pulsed high voltage treatment to young tomato plant.

3. 結果および考察

3.1 水溶液中の線虫に与える高電圧パルス電界の影響

線虫を溶液に懸濁した状態で、高電圧パルス電界を印加した時の線虫の死滅率について検討した。図 4 にはこの結果を

示している。ベルマン法を用いて生きた線虫を遠心分離した後、水道水（導電率 0.25 mS/cm）に懸濁したサンプルに 2～10 kVp/cm の電界強度の高電圧パルス電界を 20 秒間印加した場合には、電界強度に伴って線虫の生存率の減少が認められ、10 kVp/cm の時にはおよそ 40 %まで減少した。またベルマン法の過程で生じた土壌抽出液（導電率 1.5 mS/cm）に懸濁したサンプルでは、水道水に懸濁した場合に比べて高い生存率の減少が認められ、5.5 kVp/cm を 20 秒印加した場合にはおよそ 10 %の生存率、10 kVp/cm を印加した場合には残存する線虫は確認できなかった。また土壌抽出液（導電率 1.5 mS/cm）に懸濁した場合で印加時間を 20 秒から 10 秒に短縮した場合の生存率の変化を調べたところ、20 秒の場合とほと

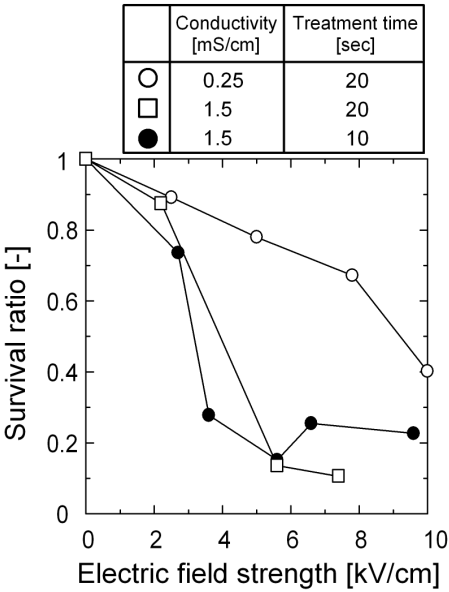


図 4 線虫懸濁液に種々のパルス処理を行ったときの生存率
Fig.4 Survival ratios of nematodes suspending in the solution after various pulsed high voltage treatment.

表 1 トマト栽培実験のスキーム (Ⅰ～Ⅴ)
Table 1 Schemes of tomato cultivation experiment (Ⅰ～Ⅴ)

sample week	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
0	budding of tomato				
	↓	↓	↓	↓	↓
1	add 10 g of nematode-contaminated soil				
	↓	↓	↓	↓	↓
2	3 kV, 10 sec				
	↓	↓	↓	↓	↓
3 or later	measurement of stalk length				
	↓	↓	↓	↓	↓
end of cultivation	measurement of root weight of tomato and nematode number in soil				

んど変わらない生存率の変化が観察された。したがって土壌抽出液の場合には5 kVp/cm程度の電界強度で10秒程度パルス電界を印加することで線虫を死滅させることが可能であることが確認できた。通常、大腸菌や酵母などの細菌（直径数 μm ）を死滅させるには10 kVp/cm程度の電界強度が必要であることが、多くの研究者により確認されている。本研究で使用しているパルス電源においても10 kVp/cm以上の電界強度が必要であった¹¹⁾。しかし線虫の一般的な大きさは直径20 μm 、長さは400 μm 以上であり、細菌よりもパルス電界に対する感受性が高い、すなわち低い電界強度のパルス電界で死滅が起こると考えられる。

3.2 トマト栽培に対する高電圧パルス印加効果

分離した線虫を溶液に懸濁した状態では高電圧パルスにより死滅させることが確認できた。しかし実際に農耕地に应用する場合、線虫は土壌中に存在するため、コントロールされた均一な電界強度の高電圧パルスを印加することは困難である。そこで簡便で実用的な方法として栽培中のトマト苗近傍の培養土に針電極を刺し高電圧パルスを印加することを考えた。培養ポットで栽培したトマト苗を用い、線虫の混入と図3のように高電圧パルスを印加した場合としない場合でトマト苗の生長にどのような変化が見られるかを観察した（表1）。

図5には表1のI～Vの条件で栽培した茎丈の変化を示している。いずれの条件、すなわち線虫の有無、高電圧パルス印加の有無に関わらず茎丈は順調に伸びていることがわかる。また条件により葉の張り方が若干異なっていたが、地上部分に大きな違いを観察することはできなかった。しかしこれらを引き抜き、培養土中に張った根を観察すると大きな違いが認められた。図6は第4週のそれぞれの苗の根重量を比較したものである。何も操作せずに栽培したトマト苗Iの

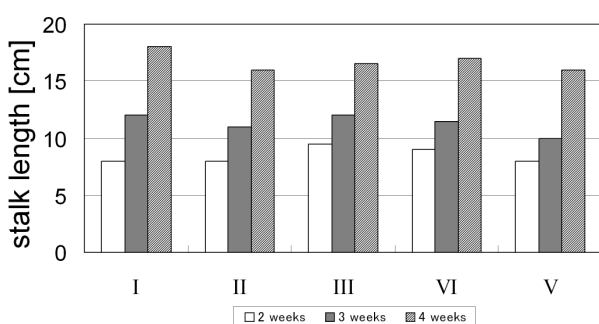


図5 表1に示す方法(I-V)でトマト苗を栽培したときの茎丈変化

Fig.5 Growth of stalk length of tomato in various cultivation condition. Cultivation conditions (I-V) are shown in Table 1.

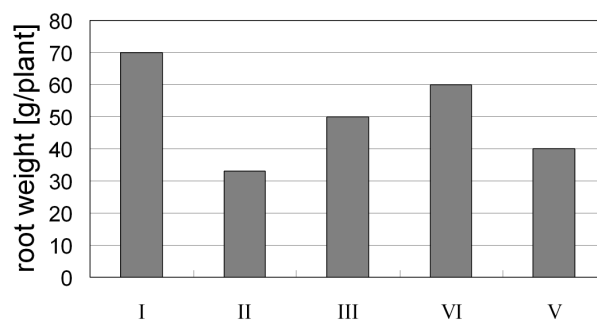


図6 表1に示す方法(I-V)でトマト苗を4週間栽培した後の根重量比較

Fig.6 Root weight of tomato cultivated for four weeks with various cultivation conditions (I-V) shown in Table 1.

根重量は68 gであるのに対し、線虫を混入したトマト苗IIの根重量は34 gと激減しており、線虫による影響を顕著に受けていることが確認された。これに対し、線虫混入後高電圧パルスを印加したトマト苗III～Vの根の重量は、線虫未混入のトマト苗Iには及ばないものの、根重量の増加が認められ、特に5 kVを印加した場合には60 gであった。また培養土中の線虫頭数を測定したところ、高電圧パルスを印加していない場合(II)には42頭/gであったのに対し、印加した高電圧パルス電圧に伴って減少し、3, 5, および8 kVpの場合でそれぞれ34, 31, および29頭/gであった(図7)。最も根重量の回復が認められた5 kVpの線虫頭数はおおよそ27%の減少であった。また8 kVpの高電圧パルス処理(V)では、今回の実験条件の中では最も線虫の減少が認められたが、同時にトマト苗の根重量の回復も小さく、生育に悪影響を与えたと考えられる。

一連の実験で、線虫を混入した一週間後に5 kVp, 10秒の高電圧パルスを印加することで線虫による被害を低減できることが示唆された。そこで別のトマト苗を用いて栽培期

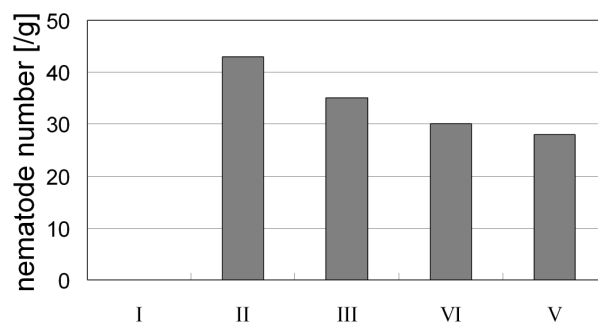


図7 表1に示す方法(I-V)でトマト苗を4週間栽培した後の培養土中線虫濃度比較

Fig.7 Effect of pulsed high voltage treatment on nematode number in the potting soil of tomato cultivated for four weeks.

間を長くして同様の実験を行った。図8は表1のⅡとⅣの条件の第7週後の全体写真, および根の拡大写真を示している。線虫混入後, 高電圧パルスを印加していないトマト苗Ⅱと印加したトマト苗Ⅳの茎丈は同程度であるが, トマト苗Ⅱのほうは弱く, 茎の一部が培養土に接している状態に湾曲していたのに対し, トマト苗Ⅳは太く丈夫にまっすぐに成長していた。また根の状態は明らかに異なっており, トマト苗Ⅱはトマト苗Ⅳに比べて全体的に短いに加え, 根の分岐が明らかに少なく, 特に細かい根の発達が著しく阻害されている様子が観察された。一方, トマト苗Ⅳの根の発達状態は線虫未混入の状態とほとんど差異が認められなかった。この結果, 高電圧パルスをトマト苗近傍の針電極を使って印加することは, 線虫被害を防止することに有効であること, またトマト苗の生育にはほとんど影響を与えないことが確認できた。この時の培養土中の線虫頭数を確認したところ, 無印加の場合(Ⅱ)が41頭/gであったのに対し, 印加の場合(Ⅳ)は30頭/gで, およそ27%の減少であり, 図7の場合と同様であった。

本研究はトマト苗の生長過程で線虫の混入を行い, さらに一度だけ高電圧パルス処理を10秒間施すことにより, 線虫の被害を劇的に低減させられることが実証された。また5kV程度の高電圧パルス処理はトマト苗の生育に悪影響を与えることはなかった。培養土中の線虫頭数の高電圧パルス処理による減少は高々27%程度で, 栽培後の培養土中の線虫が大きく変化しているわけではなく, 高電圧パルス処理を施した系でも投入線虫頭数に比べて8倍程度に増加していた。トマト栽培中の線虫頭数の測定は困難であり, 高電圧パルス処理前後の頭数変化を推定することは困難であるが, 針電極近傍の線虫は高電圧パルス処理により死滅したが, 針電極から離れた線虫が生存し, 増殖したと考えられる。本研究での10秒間の高電圧パルス処理は発芽後2週間後(線虫汚染土混入1週間後)に行ったが, 栽培期間における高電圧パルス処理のタイミングも重要ではないかと考えられる。特に根の発達程度と線虫駆除のための高電圧パルス処理の関係は重要であり, 今後検討が必要と考えられる。

高電圧の作物など植物そのものへの影響については, 雑草の枯死に利用する報告がある¹²⁾。これは地上部に出た葉の部分に高電圧電極を接触させることで根まで枯らすことができる」と述べられている。また植物組織に直接高電圧を印加することで明らかな形態変化が起こっていることも顕微鏡観察により明らかになっている¹³⁾。植物は根から茎, 葉に至る導管, 師管を持っているため, これらに瞬間的な大電流が流れることによって枯死が起こると思われる。しかし本研究で行った高電圧パルス処理では線虫の防除は認められるもの



(a)



(b)



(c)

図8 栽培7週間後のトマト苗Ⅱおよびトマト苗Ⅳの様子 (a)トマト栽培全体写真, (b)上からの様子, (c)根の観察
Fig.8 Photographs of tomato cultivated for seven weeks with (VI) and without (II) pulsed high voltage treatment in nematode contaminated soil. (a) overview of tomato cultivation, (b) up view of tomato plant, and whole view of tomato with roots.

の、5 kV 以下のパルス電圧印加では宿主であるトマト苗の生長に明らかな悪影響を及ぼすことはなかった。印加が一度だけで短い（10 秒間）ためと考えられる。しかし 8 kV を印加した場合にはトマトの根の一部が枯死したと考えられる。したがってトマトについては適当な栽培時期に、生育に影響が出ない程度の高電圧パルス処理を行うことで線虫防除が可能であり、これは他の作物にも応用できるのではないかと考えている。しかし本研究で明らかにした高電圧パルス印加による線虫被害の抑制効果のメカニズムは明らかではなく、今後詳細な検討が必要と考えている。

4. 結言

本研究では線虫に与える高電圧パルスの影響について調べ、次の結果が得られた。

- ・線虫を懸濁した溶液に 5kVp 以上の高電圧パルス電圧を印加すると生虫数が 10 分の 1 以下になった。
- ・トマト苗の栽培において、苗近傍の培養土に針電極を入れて高電圧パルス電圧を印加すると培養土中の線虫密度の減少と共に、線虫被害の低減が認められた。特に 5kVp の場合にはトマトの生育に影響を与えることなく、線虫防除が可能であった。
- ・トマト苗の場合、発芽 2 週間後に 5kVp、10 秒間の高電圧

パルス処理により、苗の生育に影響を与えることなく線虫の防除が可能であることが実証された。

参考文献

- 1) 線虫学実験法編集委員会：「線虫学実験法」，日本線虫学会 (2003)
- 2) 三枝敏郎：「センチュウ おもしろい生態とかしこい防ぎ方」，農山漁村文化協会 (2004)
- 3) M. Takayama, K. Ebihara, H. Stryczewska, T. Ikegami, Y. Gyoutoku, K. Kubo and M. Tachibana: *Thin Solid Films* **506-507** (2006) 396
- 4) M.M.C. Tsang, A.H. Hara and B. Sipes: *Crop Protection* **22** (2003) 589
- 5) N. Kita, K. Nishi and S. Uematsu : *Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions Proceeding from the Conference* (2003)
- 6) M. Sato, K. Tokita, M. Sadakata, T. Sakai and K. Nakanishi : *Int. Chem. Eng.*, **30** (1990) 695
- 7) T. Ohshima, K. Sato, H. Terauchi and M. Sato : *J. Electrostat.*, **42** (1997) 159
- 8) S. Jayaram and G.S.P. Castle : *Biotech. Bioeng.*, **40** (1992) 1412
- 9) U. Zimmermann : *Biochim. Biophys. Acta.*, **694** (1982) 227
- 10) D.R. Viglierchio and P.K. Yu : *Revue Nematol.*, **6** (1983) 171
- 11) ネイデ ミホ イシダ, アント トリ スギアルト, 大嶋孝之, 佐藤正之 : *日本食品工学会誌*, **4** (2003) 47
- 12) 水野 彰 : *プラズマ・核融合学会*, **75** (1999) 666
- 13) M. Fincan and P. Dejmek : *J. Food Eng.*, **5** (2002) 223