

土壤還元消毒における有機酸の生成と殺線虫効果

千葉県農林総合研究センター ^{かたせ}片瀬 ^{まさひこ}雅彦・^{うしお}牛尾 ^{しんご}進吾

はじめに

酢酸, n-酪酸等の有機酸が有する殺線虫効果は, 古くから知られていた (STEPHENSON, 1945; JOHNSTON, 1959; BANAGE and VISSER, 1965; NORTON, 1978; CHITWOOD, 2002; BANSAL and BAJAJ, 2003; BROWNING et al., 2004; McELDERRY et al., 2005)。また, 堆肥肥などの有機物を土壌施用すると農作物の線虫害が軽減されることも古くから知られており (LINFORD et al., 1938; JOHNSON et al., 1967; 中園, 1989; SIKORA, 1992), 有機物に含まれる有機酸, または有機物が分解して生じる有機酸が殺線虫要因の一つとして指摘されている (SAYRE et al., 1965; HOLLIS and RODRIGUEZ-KABANA, 1966; ELMILIGY and NORTON, 1973; LYNCH, 1978; BADRA et al., 1979; DJIAN et al., 1991; McBRIDE et al., 2000)。しかし, 多くの場合, 有機物の施用による防除効果は不安定で, 実用技術として確立するまでには至っていない。この中で, HOLLIS and RODRIGUEZ-KABANA (1966) と SOTOMAYOR et al. (1999) は有機物施用, 湛水化, 太陽熱処理等を組合せた効果的な防除方法を報告している。

一方, 新村ら (1999) は施設ネギの萎凋病を対象に, 土壤還元消毒法を開発した。本法は, 小麦フスマまたは米ヌカを 1 t/10 a 施用し, 土壤水分が一時的に圃場容水量になるまで灌水した後, マルチと施設密閉により 30℃以上の地温を 20 日程度保つという, 簡便かつ低コストな土壤消毒法である。これまでに, いくつかの土壤病害および植物寄生性線虫に対して安定した防除効果が認められており, トマト, キュウリ, スイカ, メロン, イチゴ, インゲン, エンドウ, ホウレンソウ等の施設栽培を中心に利用されている (久保ら, 2004; 久保・片瀬, 2007)。また, 「持続性の高い農業生産方式の導入の促進に関する法律」の施行規則が 2007 年に改正され, 「化学的に合成された農薬の使用を減少させる効果が高い技術」の中に土壤還元消毒が取り入れられた。

土壤還元消毒は土壌の還元化によって防除効果が発揮されるため, 当初から作用機構の一つとして有機酸の生

成が考えられていた。本法を最適な条件で実施して, より高くより安定した防除効果を得るためには, 作用機構の解明が不可欠である。そこで, 本法の作用機構について, 有機酸の生成とその殺線虫効果の観点から解明を試みた (KATASE et al., 2009)。なお, この試験の一部は農林水産省の委託プロジェクト研究「生物機能を活用した環境負荷低減技術の開発」(宮井ら, 2009)の一環として実施したものである。

I 土壤還元消毒の現地実証試験

千葉県内のビニルハウスで, 6月2日に 2 t/10 a のフスマを深さ 40 cm まで混和して灌水し, 6月26日まで保温して土壤還元消毒を実施した (久保ら, 2004; KATASE et al., 2009)。対照としてフスマを混和せずに灌水した区を設けた。

処理開始3日目に, 深さ 20 cm の地温は土壤還元消毒の基準とされる 30℃以上になったが, 7日目以降は曇天のため地温が低下した (図-1)。実施時期の日平均気温は 21.8℃, 最低気温は 14.8℃, 最高気温は 30.0℃であった。気温が高くない時期に土壤還元消毒を行う場合, 天候が地温の上昇に大きく影響すると考えられる。処理開始3日目の土壌の酸化還元電位 (Eh6) は, 深さ 20 cm で -207 mV, 深さ 40 cm で -98 mV に低下し, 還元状態になったことが確認された。さらに, 深さ 20 cm の土壌溶液から 5.7 mM の酢酸および 1.5 mM の n-酪酸が検出された。

これに対し, フスマを施用せずに灌水した対照区では, 深さ 20 cm の地温は 30℃に達したが, Eh6 はほとんど低下せず, 有機酸は検出限界以下であった。なお, プロピオン酸, iso-酪酸, n-吉草酸, iso-吉草酸は両区ともに検出限界以下であった。

これらの試験区にミニトマトを 7月18日に定植し, 12月まで栽培した。収穫終了時に調査した結果, 深さ 20 cm および 40 cm のネコブセンチュウ密度とミニトマトの根こぶ指数は, 土壤還元消毒区が対照区よりも著しく低く, 土壤還元消毒の高い防除効果が確認された。

II 土壤還元消毒のモデル試験

1 材料と方法

実験室で土壤還元消毒を再現するモデル試験を行い,

Nematicidal Activity of Volatile Fatty Acids Generated in Reductive Soil Disinfection. By Masahiko KATASE and Shingo USHIO

(キーワード: 線虫防除, 耕種の防除, ネコブセンチュウ, 土壤還元消毒, 有機酸)

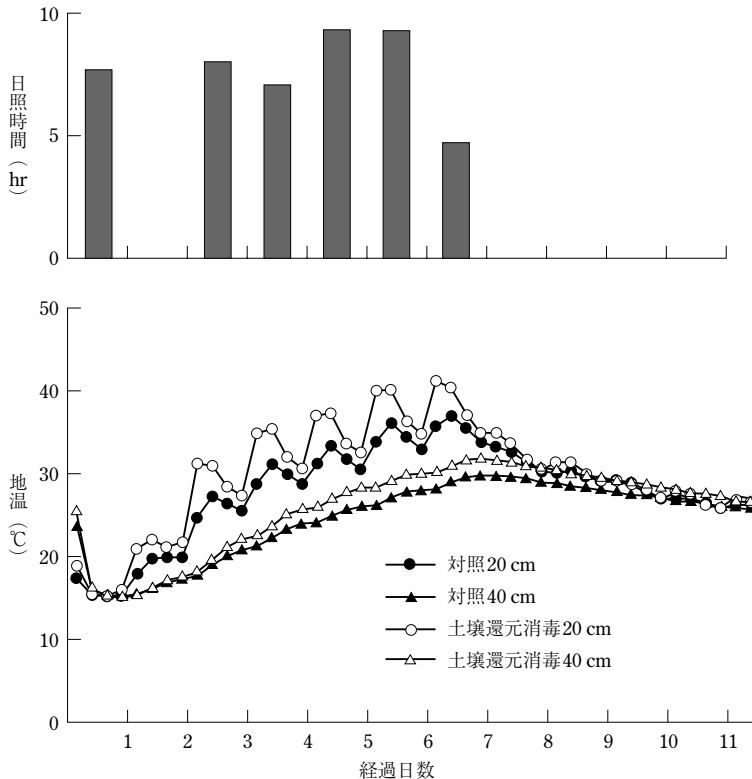


図-1 ビニルハウスでの土壤還元消毒における深さ別地温の経時変化と1日当たり日照時間

土壤の溶存酸素濃度 (DO) と Eh6 を測定した (KATASE et al., 2009)。約 60 頭/g のネコブセンチュウを含む黒ボク土を供試し、この土壤 2.0 g にフスマ 0.02 g を混和してナイロン網に包み、これを土壤試料としてモデル試験に用いた。この土壤とフスマの混合割合は、1 t/10 a のフスマを圃場に深さ 20 cm まで混和した量に相当する。また、対照としてフスマを添加しない土壤試料を用いた。

土壤試料を 7 ml の蒸留水に入れて、これを一定温度でインキュベートしながら、蒸留水の DO をクラーク型酸素電極 (Rank Brothers 社製) で連続的に測定した。

また、7 ml の蒸留水が入った試験管に土壤試料を入れ、この蒸留水中に Eh/pH メータの電極を設置して、試験管全体を密閉した。これを一定温度のウォーターバスでインキュベートしながら、蒸留水の Eh6 を経時的に測定した。これら 2 種類のモデル試験により、土壤試料の DO および Eh6 を周囲の蒸留水から間接的に測定した。

2 溶存酸素濃度 (DO) の変化

温度 30°C でインキュベートした場合、フスマを添加した区の蒸留水の DO はインキュベート開始から急激

に低下し、2 時間後には 0 mM になった。同様に、フスマを添加しない区の蒸留水の DO も急激に低下し、4 時間後に 0 mM になった。この実験を温度 15 ~ 30°C で行ったところ、温度が高いほど DO が 0 mM になる時間は短くなった (図-2)。湛水条件下の土壤の溶存酸素濃度は、フスマを添加するとより早く低下するが、フスマの有無に関係なく急速に低下したことから、土壤は無酸素状態になると推察された。

現地実証試験 (図-1) の場合、灌水を一昼夜行ったため 1 日後まで約 15°C であったが、2 日後には 20°C に達した。このことから、2 日後には無酸素状態になったと推察される。これ以降に、酸素を含む水が追加灌水される場合や、灌水不足で土壤水分が急速に減少して空気が土壤に供給される場合は、無酸素状態になりにくいと考えられる。

3 酸化還元電位 (Eh6) の変化と有機酸の生成

フスマを添加した場合、Eh6 はインキュベート開始から 3 時間後に低下し始め、15 時間後には約 -300 mV にまで低下し、急速に還元状態になった。したがって、土壤の Eh6 も急激に低下して還元状態になったものと推

察された。一方、フスマを添加しない場合、Eh6はわずかに低下したのみであった。

温度を20, 30, 40, 45℃に設定して、Eh6を経時的に測定した(図-3)。温度が20℃から30℃になるとEh6が低下して還元状態になるまでの時間は顕著に短くなったが、30℃と40℃でその差は小さかった。さらに、45℃になるとEh6の低下時間は40℃の場合よりも長くなり、Eh6の最低値は40℃の場合よりも高くなった。すなわち、酸化還元電位の低下にかかわる微生物の最適温度から、土壌還元消毒の最適地温は30~40℃であると考えられる。

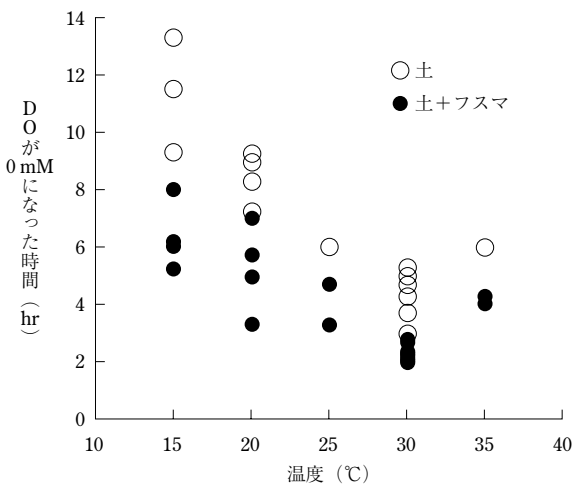


図-2 異なる温度条件下で溶存酸素濃度(DO)が0mMになった時間(モデル試験)

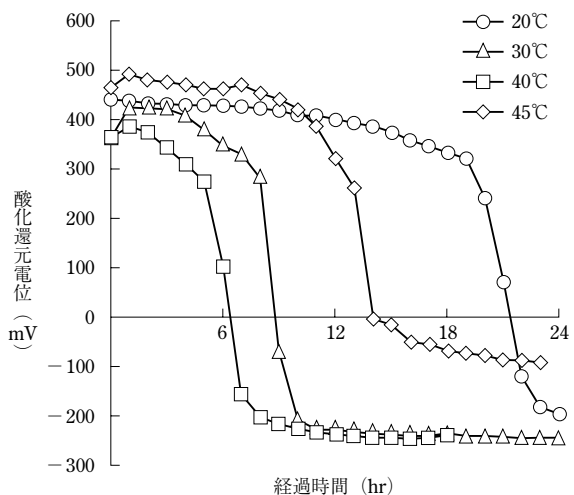


図-3 異なる温度条件における酸化還元電位(Eh6)の経時変化(モデル試験)

温度を30℃と35℃に設定し、それぞれインキュベート時間を変えてモデル試験を繰り返した。インキュベート終了時に、土壌試料を入れた蒸留水のEh6および有機酸濃度、土壌試料中のネコブセンチュウ二期幼虫の生存頭数を計数した(図-4)。その結果、Eh6が低いほどネコブセンチュウの生存頭数は少なくなる傾向が認められた。30℃でEh6がマイナスになるとネコブセンチュウの頭数が顕著に減少したが、35℃の場合はEh6がプラスの場合でも顕著な減少が確認された。また、Eh6が顕著に低下した蒸留水からは酢酸およびn-酪酸が検出された。なお、いずれの区でも、プロピオン酸、iso-酪酸、n-吉草酸、iso-吉草酸は検出限界以下であった。

さらに、別のモデル試験において、黒ボク土(風乾土)53gにフスマ1.0gを混和して湛水状態にし、30℃でインキュベートしながら、土壌から土壌溶液を実際に採取して分析した。Eh6が-33mVに低下した土壌溶液中からは9.8mMの酢酸と10.7mMのn-酪酸が検出された。

4 モデル試験における殺線虫効果の要因

上記のモデル試験において、ネゴセンチュウを含む土壌にフスマを添加して湛水状態にした場合と、フスマを添加しないで湛水状態にした場合を比較すると、DOは両者とも急激に低下して無酸素状態になったが、Eh6は前者で低下したが後者では低下しなかった。また、有機酸は前者で検出されたが後者では検出されず、ネコブセンチュウの生存数は前者で著しく減少した。したがって、土壌還元消毒の作用機構は、無酸素状態になることだけではなく、Eh6の低下に伴う酢酸およびn-酪酸の生成も起因していると考えられた。

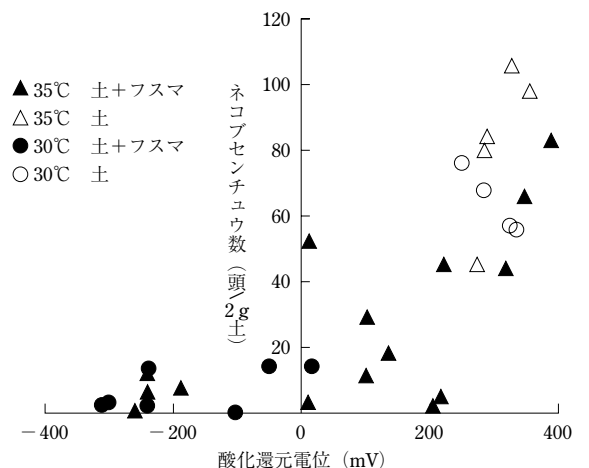


図-4 酸化還元電位(Eh6)とネコブセンチュウ二期幼虫の生存頭数との関係(モデル試験)

また、温度が30℃の場合、殺線虫効果は24時間以内と極めて短期間で得られることが明らかになった。

III 酢酸およびn-酪酸の殺線虫効果

土壌還元消毒の現地実証試験および室内でのモデル試験において、土壤中に10 mM レベルの酢酸およびn-酪酸が検出された。そこで、ネコブセンチュウ二期幼虫に対する酢酸およびn-酪酸の殺線虫活性を、佐野・後藤(1972)の方法で測定した(KATASE et al., 2009)。

pH 4.5 に調整した 2.0 ~ 12 mM の有機酸にネコブセンチュウ二期幼虫を24時間浸漬した結果、5 mM で明

確な殺線虫効果が認められ、有機酸濃度が高くなるほど生存率は低下した(図-5)。

また、酢酸とn-酪酸が共存している場合も、単独の場合と同様に生存率は低下した。酢酸およびn-酪酸の濃度と生存率との関係(図-6)から非線形回帰分析によって効力比を求めたところ、両者の殺線虫効果はほぼ等しく、両者が混在しているときの殺線虫活性には相加効果が認められた。したがって、酢酸とn-酪酸のモル濃度の和は、土壌還元消毒の殺線虫効果を示す指標になると考えられる。

IV 酢酸および酪酸の殺線虫効果に及ぼす pH の影響

1 有機酸の解離と pH

有機酸の殺線虫効果は pH の影響を強く受けることが知られている(SAYRE et al, 1965 ; HOLLIS and RODRIGUEZ-KABANA, 1966 ; DJIAN et al., 1991)。有機酸は弱酸の物質であるため、その分子は非解離状態で存在しやすい。非解離状態の有機酸分子は親油性が高く、細胞に容易に侵入し、細胞内の pH を下げて障害を起こすが、解離してイオンになった分子にはその効果がないと説明されている。なお、これらのことは有機酸の殺菌効果にも当てはまる(松田, 2004)。

酢酸の解離定数(pKa)は4.76であるため、pH 4.76において解離した酢酸と非解離の酢酸が同じ割合で存在し、これよりも pH が高くなると解離した酢酸の割合が高くなる(図-7)。n-酪酸の解離定数は4.82であるため、酢酸とほぼ同様である。圃場の土壌溶液の場合、共

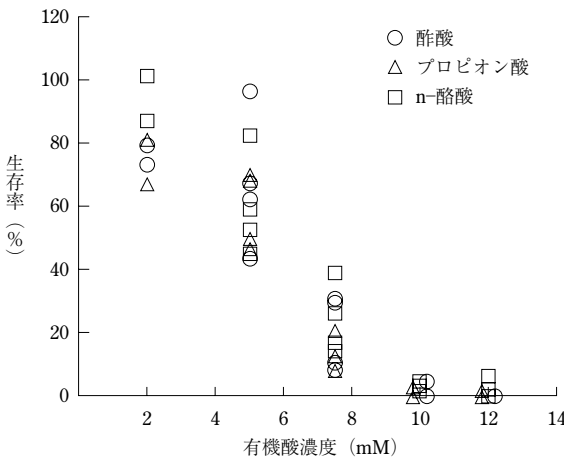


図-5 有機酸 (pH 4.5) の濃度とネコブセンチュウ二期幼虫の生存率 (モデル試験)

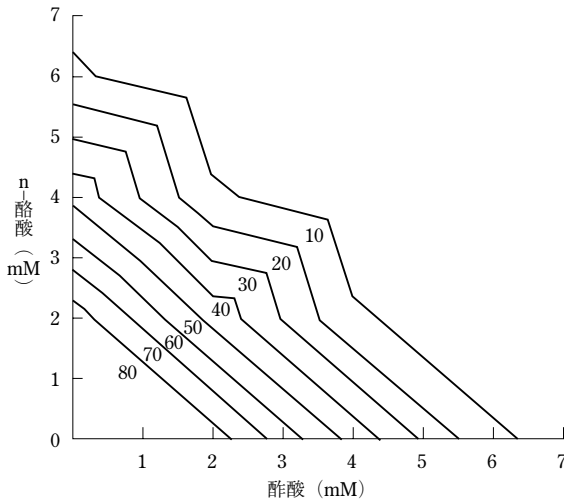


図-6 酢酸およびn-酪酸の混合溶液におけるネコブセンチュウ二期幼虫の生存率 (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%) のイソログラム (モデル試験)

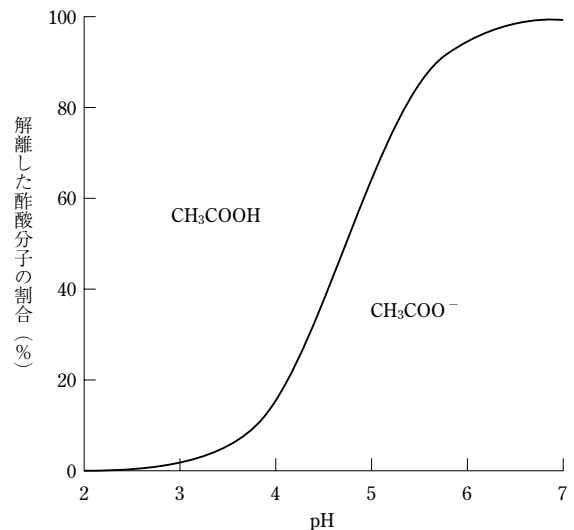


図-7 酢酸溶液における pH と酢酸分子の解離状況

存する電解質の影響があるために単純な系ではないが、大まかな傾向を理解することができる。殺線虫効果は非解離の酢酸およびn-酪酸が有していると考えられるため、pHが解離定数よりも高くなると殺線虫効果が低くなると説明される。

2 酢酸とn-酪酸の殺線虫効果とpH

佐野・後藤(1972)の方法を用い、pH 3.0～6.5の範囲で10 mM酢酸にネコブセンチュウ二期幼虫を24時間浸漬して殺線虫活性を比較した結果、pHが3.0および4.0の場合、ネコブセンチュウの生存率はほぼ0%であったが、pHが4.5よりも高くなると生存率は急激に高くなり、pH 5.5～6.5では生存率が80～90%で、ほとんど殺線虫効果が消失した(KATASE et al., 2009)。一方、対照として用いたpH 3.0～6.5の10 mMクエン酸溶液に殺線虫効果は認められなかった。

すなわち、有機酸の殺線虫効果はpHの影響を強く受け、これらの有機酸が解離してイオンになると殺線虫効果は低くなることが確認された。また、殺線虫効果の要因は、単に酸性になることではなく、有機酸の直接的な効果であると考えられた。

一方、これまでの現地実証試験あるいは室内でのモデル試験において、土壌還元消毒時に測定された土壌pHの最低値は5.0であったが、通常は5.5～6.5であった。この土壌pHの条件下では、土壌還元消毒で生じた有機酸の殺線虫効果は極めて低いことになる。しかし、このpHは土壌に蒸留水を加えて攪拌し、これにpH電極を設置して安定した後に読み取った値である。土壌の構造は極めて複雑であり、微小部位ごとにpHの不均一性があると考えられることから、土壌に混和したフスマの周囲では、生成した有機酸により局所的なpHの低下が起これば、その場に存在するネコブセンチュウには十分な殺線虫効果が及んでいるとも考えられるが、この点については今後の課題である。

V 土壌還元消毒におけるその他の生成物

還元状態で生成する殺線虫物質として、有機酸のほかに亜硝酸(NAGASE et al., 1982; CULBREATH et al., 1986)およびアンモニア(FORGE et al., 2005)を考えねばならない。亜硝酸の生成について検討していないが、アンモニアの生成は確認した(牛尾ら, 2004)。アンモニアはpHを上昇させるため、有機酸の殺線虫効果を低下させる要因になるとも考えられる。土壌還元消毒で生成する物質とその殺線虫効果について、pHなどの土壌環境の変化とともに、さらに検討する必要がある。

IV 土壌還元消毒における温度の殺線虫効果

キタネグサレセンチュウを使ったモデル試験では、無酸素状態でフスマが存在しない土壌の場合、生存率が0%になる時間は、温度30℃では36時間、温度40℃では18時間であった(片瀬ら, 2005)。また、ネコブセンチュウを使ったモデル試験においても、30℃と35℃で同様な効果が確認されており、無酸素状態で温度が高くなると殺線虫効果はより高くなると考えられる。

したがって、土壌還元消毒を行った施設土壌において、太陽熱の殺線虫効果が及ぶ上層では、温度と無酸素状態が大きな殺線虫要因になると考えられる。一方、太陽熱の殺線虫効果が及ばない下層では、土壌還元の効果が発揮されるものと推察される。

おわりに

一般に、土壌の無酸素状態とそれに続く還元状態および有機酸の生成は、土壌微生物の作用によるものであることから、土壌還元消毒は土着の土壌微生物の機能を有効に活用した防除法である。また、土壌病害に対する土壌還元消毒の作用機構として、有機酸の効果、無酸素状態の効果および土壌微生物による拮抗作用が報告されている(久保ら, 2005; 門馬ら, 2005; MOMMA et al., 2006)。

今後、土壌還元消毒に用いる易分解性有機物として、小麦フスマと米ヌカのほかに、糖蜜(新村, 2003)、アルコール(植松ら, 2008)等の利用も試みられており、化学合成農薬を用いない土壌消毒法として、より効果が高くより安定した防除技術に発展することが期待される。

引用文献

- 1) BADRA, T. et al. (1979) : *Revue Nematol.* 2 : 29 ~ 36.
- 2) BANAGE, W. B. and S. A. VISSER (1965) : *Nematologica*. 11 : 255 ~ 262.
- 3) BANSAL, R. K. and A. BAJAJ (2003) : *Nematol. Medit.* 31 : 135 ~ 140.
- 4) BROWNING, M. et al. (2004) : *Appl. Soil Ecol.* 27 : 47 ~ 54.
- 5) CHITWOOD, D. J. (2002) : *Ann. Rev. Phytopathol.* 40 : 221 ~ 249.
- 6) CULBREATH, A. K. et al. (1986) : *Nematologica* 16 : 153 ~ 166.
- 7) DJIAN, C. et al. (1991) : *Nematologica* 37 : 101 ~ 112.
- 8) ELMILIGY, I. A. and D. C. NORTON (1973) : *J. Nematol.* 5 : 50 ~ 54.
- 9) FORGE, T. A. et al. (2005) : *ibid.* 37 : 207 ~ 213.
- 10) HOLLIS, J. P. and R. RODRIGUEZ-KABANA (1966) : *Phytopathology* 56 : 1015 ~ 1019.
- 11) JOHNSON, L. F. et al. (1967) : *Plant Disease Repr.* 51 : 219 ~ 222.
- 12) JOHNSTON, T. M. (1959) : *Nature* 183 : 1392.
- 13) 片瀬雅彦ら (2005) : 千葉農総研研報 4 : 117 ~ 123.
- 14) KATASE, M. et al. (2009) : *Nematol. Res.* 39 : 53 ~ 62.
- 15) 久保周子ら (2004) : 千葉農総研研報 3 : 95 ~ 104.
- 16) ————ら (2005) : 日植病報 71 : 281 ~ 282.
- 17) ————・片瀬雅彦 (2007) : 植物防疫 61 : 68 ~ 72.
- 18) LINFORD, M. B. et al. (1938) : *Soil Sci.* 45 : 127 ~ 141.
- 19) LYNCH, J. M. (1978) : *Soil Biol. Biochem.* 10 : 131 ~ 135.
- 20) 松田敏生 (2004) : 食衛誌 45 : 189 ~ 196.

- 21) McBRIDE, R. G. et al. (2000) : Appl. Soil Ecol. **15** : 243 ~ 251.
 22) McELDERRY, G. F. et al. (2005) : J. Nematol. **37** : 71 ~ 77.
 23) 宮井俊一ら (2009) : 生物機能を活用した病害虫・雑草管理と肥料削減 : 最新技術集, 中央農研センター, つくば, 225 pp.
 24) 門馬法明ら (2005) : 土と微生物 **59** : 27 ~ 33.
 25) MOMMA, N. et al. (2006) : J. Gen. Plant Pathol. **72** : 247 ~ 252.
 26) NAGASE, A. et al. (1982) : Agric. Biol. Chem. **46** : 167 ~ 172.
 27) 中園和年 (1989) : 日線虫誌 **19** : 38 ~ 45.
 28) NORTON, D. C. (1978) : Ecology of Plant-parasitic Nematodes, John Wiley & Sons, Inc., New York, 268 pp.
 29) 佐野善一・後藤 昭 (1972) : 九病虫研究会報 **18** : 1 ~ 6.
 30) SAYRE, R. M. et al. (1965) : Nematologica **11** : 263 ~ 268.
 31) SIKORA, R. A. (1992) : Annu. Rev. Phytopathol. **30** : 245 ~ 270.
 32) 新村昭憲ら (1999) : 日植病報 **65** : 352 ~ 353.
 33) ——— (2003) : 同上 **69** : 78.
 34) SOTOMAYOR, D. et al. (1999) : Nematropica **29** : 153 ~ 170.
 35) STEPHENSON, W. (1945) : Parasitology **36** : 158 ~ 164.
 36) 植松清次ら (2008) : 日植病報 **74** : 46.
 37) 牛尾進吾ら (2004) : 千葉農総研報 **3** : 105 ~ 112.

発売中

「農薬概説 (2010)」

監修 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課, 植物防疫課

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

B5判

321頁

定価 1,890円 (本体 1,800円) 送料 160円

農薬取扱者が知っておかなければならない農薬に関する法令とその解説, 基礎知識についての詳細を掲載。

第1章 作物保護と農薬

- 1 作物保護の目的
- 2 病害虫と雑草による被害
- 3 病害虫・雑草による農作物の経済的損失
- 4 作物保護における農薬の位置づけ

第2章 植物防疫行政

- 1 農薬と植物防疫
- 2 植物防疫行政の組織体制
- 3 病害虫発生予察事業
- 4 防除事業
- 5 農林水産航空事業
- 6 植物検疫

第3章 農薬行政

- 1 農薬行政の歴史
- 2 農薬行政の概況
- 3 農薬の登録
- 4 農薬の果たす役割
- 5 指導者の認定等

第4章 関係法令 解説

- 1 農薬に関わる法体系
- 2 農薬取締法解説
- 3 関係法令と動向
 - (1) 毒薬及び劇物取締法
 - (2) 食品安全基本法
 - (3) 食品衛生法
 - (4) 環境基本法
 - (5) 水質汚濁防止法
 - (6) 水道法
 - (7) 消防法
 - (8) 廃棄物の処理及び清掃に関する法律

第5章 農薬の一般知識

- 1 農薬の種類
- 2 農薬の特性
- 3 農薬の開発
- 4 農薬の生産と流通

第6章 施用技術

- 1 散布技術の基礎
- 2 施用 (散布) 方法

第7章 農薬のリスクと安全性評価

- 1 農薬のリスク
- 2 安全性評価
- 3 農薬リスクの実態

第8章 農薬の安全・適正使用

- 1 農薬使用者の責務
- 2 安全使用の基本事項
- 3 安全使用のための知識
- 4 使用上の諸注意
- 5 農薬散布時の飛散防止対策

第9章 病害虫・雑草とその防除

- 1 病害
- 2 害虫
- 3 雑草
- 4 植物の生育調節

資料

農薬取締法および関連する法令通知等