

低濃度エタノールによる新規土壤消毒法の開発

財団法人日本園芸生産研究所 ^{もん}門 ^ま馬 ^{のり}法 ^{あき}明

はじめに

KOBARA et al. (2007) によって開発された低濃度エタノールを用いた土壤消毒法は、希釈したエタノールを土壤が一時的な湛水状態となるように処理し、農業用ポリエチレンフィルムなどで土壤表面を被覆するだけという低コストで簡便な技術である。この方法は、臭化メチルによるくん蒸の代替技術の一つとして実用化が期待されている。平成21年度より「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の助成を受け、農業環境技術研究所を中核とした研究グループが技術の開発・普及を目指し、鋭意試験研究に取り組んでいる。このグループでは、トマト萎凋病、キュウリ根こぶ線虫病、カーネーション萎凋細菌病、ウリ科ホモプシス根腐病、ハウレンソウ萎凋病、イチゴ萎黄病、トマト褐色根腐病、その他雑草等について試験研究に取り組んでおり、良好な結果が得られている。この事業に参画していない都府県においても、多くの防除試験が実施されており、本技術に対する期待の高さが伺える。

それぞれの地域や土壤、対象とする作物、病害虫ごとに適切なエタノールの濃度や量は異なる。0.5～1.0 v/v %程度のエタノールを1 m² 当たり 50～100 l 施用することで、ネコブセンチュウや土壤伝染性病原菌、雑草に対して防除効果が認められている。この数値をおおよその目安として、個々の条件に最適な施用量を検討することで、余剰な資材施用を減らすことも可能である。現在、作成が進められている実施マニュアルには、多くの試験事例が紹介される予定である。用いるアルコールの種類として、原料アルコールや副生アルコールが考えられており、2006年の通関統計実績に基づいた試算では、10 a 当たり 30,000～60,000 円程度の経費で実行可能であるとされている (小原, 2008)。アルコール資材の入手先などの情報も実施マニュアルに盛り込まれることになっている。

低濃度エタノールプロジェクトにおいて日本園芸生産研究所では主として、土壤微生物に与える低濃度エタノール

ール処理の影響評価と、殺菌メカニズムの解明に取り組んでいる。本稿では、現在得られている知見について概説する。

I 低濃度エタノール処理が土壤微生物に及ぼす影響

筆者らは、トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) を用いた小規模実験において、4 kg の土壤に 0.5 v/v % のエタノールを 1 l 処理して 30℃ 条件下に 9 日間置くことで、病原菌の厚膜孢子が死滅することを報告している (MOMMA et al., 2010)。この殺菌作用は、エタノール処理に先立って滅菌処理を施しておいた土壤では誘導されない。このことは、低濃度エタノール処理には、土壤中の微生物の働きが必須であることを示している。

また、土壤に処理するエタノールの濃度よりも、処理前の土壤の含水比が殺菌作用に大きく影響するという結果も得られている。含水比 0.20 および 0.29 の土壤 6.5 kg に 0.25～2.0 v/v % のエタノール 850 ml を添加して 25℃ で 2 週間培養した。その結果、含水比が高い条件では 0.25 v/v % のエタノール処理でもトマト萎凋病菌が死滅していたのに対し、含水比が低い条件では 2.0 v/v % のエタノール処理区においてもトマト萎凋病菌の生存が確認された (表-1)。この結果は、用水が十分に利用できる環境であれば、処理水量を多くすることで、より少量のエタノールでも安定した消毒効果が得られることを現している。また、土壤が乾燥している場合には撥水性が高くなり、水の通り道が生じることでエタノール水溶液が偏って浸透してしまうことがある。こう

表-1 砂壤土における低濃度エタノール処理の効果

処理区	トマト萎凋病菌生存菌数	
	含水比: 0.29	含水比: 0.20
水処理	2.31 (0.10)	5.26 (0.03)
2%エタノール	ND	2.52 (0.03)
1%エタノール	ND	5.09 (0.05)
0.5%エタノール	ND	5.07 (0.05)
0.25%エタノール	ND	—

単位: Log CFU/g dry perlite (± S.E.).

生菌数は MOMMA et al. (2010) の方法で測定した。

New Soil Disinfestation Technique with Low Concentration Ethanol. By Noriaki MOMMA

(キーワード: トマト萎凋病菌, 土壤還元消毒, エタノール, 生物的土壤消毒法)

いった場合には、エタノールを処理する前のある程度の土壌水分となるように均一に灌水しておくことも有効である。

2010年に埼玉県露地圃場で行った試験では、1v/v%のエタノールを1m²当たり100l処理して被覆

を3週間行った。この試験では用いるエタノール資材(65w/w%)の全量を農業用ポリタンクに移し、ベンチュリー管と動力噴霧機を接続した装置により所定の濃度(1v/v%)となるようにエタノールと農業用水を混合し、あらかじめ被覆下に敷設しておいた灌水チューブを通じて圃場に処理した(図-1)。100m²の試験圃場に対し、灌水にはおよそ2時間を要した。

被覆を除去してから1週間風乾した土壌とクロルピクリン処理土壌(床土消毒法に準拠)を希釈平板法に供試し、土壌微生物数を比較した。その結果、*F. oxysporum* 数については、低濃度エタノール処理およびクロルピクリン処理区ともに検出限界以下まで低下していた(表-2)。また、細菌数はすべての処理区で大きな差はなかったものの、糸状菌数についてはクロルピクリン処理区で最も少なくなっていた。

これらの処理土壌にトマト萎凋病菌を土壌1g当たり10⁵孢子となるように添加し、トマトを5週間栽培したときの発病程度を比較した。その結果、クロルピクリン消毒区では、萎凋病が甚発生したにもかかわらず、低濃度エタノール処理区での発病は非常に軽微であった(図-2)。栽培終了時の土壌について微生物数を培養法、糸状菌菌集構造をPCR-DGGE法によりそれぞれ比較したところ、クロルピクリン処理区ではほかの2処理区と比較して糸状菌数が少なく、多様性も低いことが示された(表-2, 図-3)。



A



B



C

図-1 露地圃場における低濃度エタノール処理の様子

A: 試験圃場の全体像。

B~C: エタノール資材原液を農業ポリタンクに移し、ベンチュリー管を応用して用水に混合希釈する。

表-2 土壌消毒後およびトマト栽培後の土壌微生物数

処理区	Log CFU/g 乾燥土 (± S.E.)	
	消毒後1週間	栽培終了時*
糸状菌		
無処理	3.98 (0.02)	4.35 (0.21)
クロルピクリン	2.90 (0.06)	3.12 (0.08)
エタノール	4.74 (0.08)	4.43 (0.06)
細菌		
無処理	6.22 (0.04)	6.58 (0.04)
クロルピクリン	6.81 (0.05)	6.94 (0.02)
エタノール	6.96 (0.03)	6.60 (0.02)
<i>F. oxysporum</i>		
無処理	2.63 (0.07)	2.49 (0.03)
クロルピクリン	ND	ND
エタノール	ND	ND

*病原菌 (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) 無接種土壌を土壌希釈平板法に供試した(栽培期間5週間)。

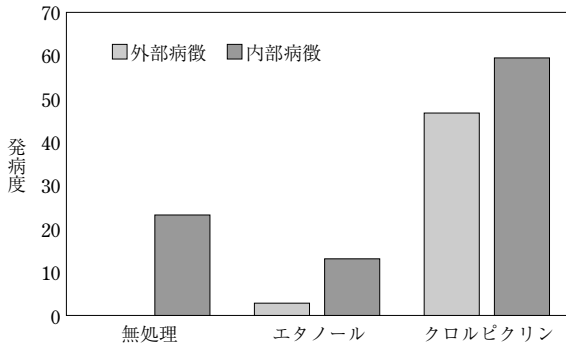


図-2 各土壌消毒処理後の再汚染によるトマト萎凋病の発病

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{発病指数} \times \text{当該株数})}{3 \times \text{全株数}} \times 100$$

発病指数

外部病徴 0:健全, 1:1/3程度の葉が黄化または萎凋, 2:2/3程度の葉が黄化または萎凋, 3:株全体が萎凋または枯死。

内部病徴 0:健全, 1:導管の一部が褐変, 2:導管の1/2が褐変, 3:導管全体が褐変または枯死。

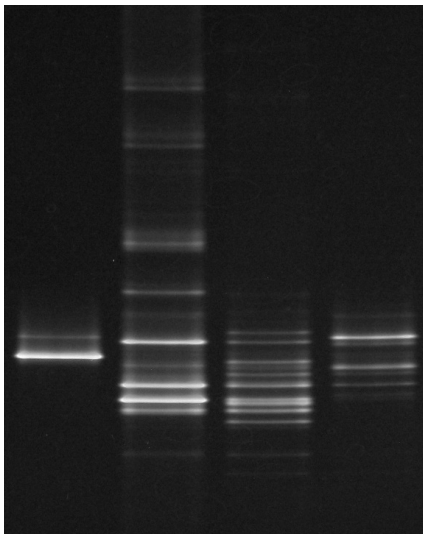


図-3 糸状菌群をターゲットとしたPCR-DGGE解析
左から, *F. oxysporum* 菌株, 無処理区, エタノール区, クロロピクリン区。

※ PCR-DGGE法は, DNAレベルでの種の多様性を比較する方法である。土壌から抽出したDNAから糸状菌群のDNAを特異的に増幅し, 特殊なゲルで電気泳動を行う。これにより得られたバンドの数はそこに優占する種の数と一致する。

II 低濃度エタノール処理の殺菌メカニズム

1 有機酸の作用

低濃度エタノール処理で用いられるエタノールは, 最大でも2 v/v %程度である。この濃度のエタノール溶液中ではトマト萎凋病菌の胞子, 菌糸のいずれも殺菌されなかった。滅菌処理を施した土壌では, エタノールを添加しても病原菌は殺菌されない (MOMMA et al., 2010) ことから, エタノールは直接的な殺菌作用には関与していないことが明らかである。また, 土壌還元消毒法 (新村ら, 1999) と同様に, 低濃度エタノール処理においても土壌の還元化が促進されることから, 本法も土壌還元消毒の変法の一つであるといえる。ただし, 単なる還元化された環境条件が殺菌効果に関与しているわけではない。このことは, 蒸留水に水素ガスをバブリングすることで還元状態を維持した蒸留水中 (酸価還元電位の平均値 - 234 mV) においても, トマト萎凋病菌の胞子, 菌糸のいずれも殺菌されないという実験結果からも明らかである (門馬・小原, 2011)。

土壌還元消毒法では, 土壌の還元化に伴い酪酸や酢酸等の有機酸が生成・蓄積してくることが知られている。また, 低濃度エタノール処理でも, 十分な消毒効果が得られる処理条件では, 土壌溶液中に1,000 ~ 3,000 mg/l程度の酢酸が検出される。トマト萎凋病菌の胞子は0.05 v/v %程度の酢酸溶液中でも容易に殺菌されてしまうが, 土壌懸濁液に酢酸を添加するだけではトマト萎凋病菌に対する殺菌作用を完全には再現できていない (MOMMA et al., 2006)。一方, ナス科の青枯病菌 (*Ralsotonia solanacearum*) では, 土壌懸濁液への酢酸と酪酸の添加により比較的容易に殺菌されてしまう。片瀬・牛尾 (2010) は10 mMの酢酸溶液中における線虫生存率がpH3.0, および4.0のときにはほぼ0%となる一方で, pH5.5 ~ 6.5では80 ~ 90%となり, 殺線虫効果がほぼ消失したことを報告している。我々の実験でも, pHが高くなることにより, 酢酸のトマト萎凋病菌に対する殺菌効果が著しく低下することを認めている。低濃度エタノール処理を施した土壌では, 土壌pHがわずかに低下することはあるものの, 測定値は最低でも5.2程度である。各病原体の有機酸に対する感受性と土壌pHの関係等, 有機酸の関与を説明するためにはまだ多くの検討課題が残されている。

2 金属イオンの作用

酢酸を土壌へ添加することにより, 土壌中のトマト萎凋病菌は完全ではないもののある程度は殺菌される。ところが, あらかじめ滅菌していた土壌では, 同じ量の酢

酸を添加しても殺菌作用が認められず、むしろ無添加土壌と比較して病原菌が増加する現象が確認されている(門馬・小原, 2011)。このとき、殺菌作用の認められた非滅菌の土壌では、土壌の還元化が起こっていた。

土壌還元消毒法や低濃度エタノール処理では、多くの場合、土壌の還元化の強弱と処理の成否が一致する。有機物の添加と湛水処理の組合せや、田畑転換による土壌伝染性病原菌の抑制作用は古くから知られている(OKAZAKI and Nose, 1986)。これらの事例においても、土壌の還元化が重要な要因となっていることが予想される。土壌の還元化の過程では、二価マンガン (Mn^{2+}) や二価鉄 (Fe^{2+}) といった金属イオンが遊離してくる。筆者らは、水溶液中に保持したトマト萎凋病菌が Fe^{2+} や Mn^{2+} によって殺菌されることを確認している。今後は土壌中での消毒効果への関与を検証していく必要がある。これまでに、 Mn^{2+} や Fe^{2+} が土壌伝染性病原菌におよぼす影響を調査した事例は見当たらない。これまでよく知られていたが故に、あまり注目されてこなかった事象が、実は殺菌作用と密接に関連していたのかもしれない。

III 土壌還元化の簡易調査法

土壌の還元化は、酸化還元電位計を用いる方法のほか

に、2,2'-ビピリジルや 1,10-フェナントロリン溶液を用いて還元状態で生成する Fe^{2+} を検出して還元化の程度を評価する比色法等がある。我々の試験では、多孔質素焼管(商品名:ミズツール, 大起理化学工業株式会社)を用いて採取した土壌水 0.9 ml に 0.1 ml のフェナントロリン溶液を加えたときの発色の程度を比較する方法や、 Fe^{2+} 試験紙(商品名:アイアンチェック, アドバンテック株式会社)を用いる方法で還元化の程度を判定している(図-4)。これらの方法は、あらかじめ多孔質素焼管を土壌中に設置しておくことで、農ポリなどの被覆フィルムを撤除することなく手軽に還元化の確認ができる。土壌に指示薬をスプレーする方法では、土壌の色によっては発色の確認が困難である場合があるが、本法はそのような影響を受けず視覚的にも判断が容易である。本法は安価に実施でき簡便なので、低濃度エタノール処理や土壌還元消毒法の普及の一助となると考える。

おわりに

本稿では、具体的な試験結果については一切触れなかった。これは、前章で述べたとおり、最適な処理量や濃度は対象とする病害、実施する圃場条件によって異なるためである。先に示したトマト萎凋病菌の例では、土壌

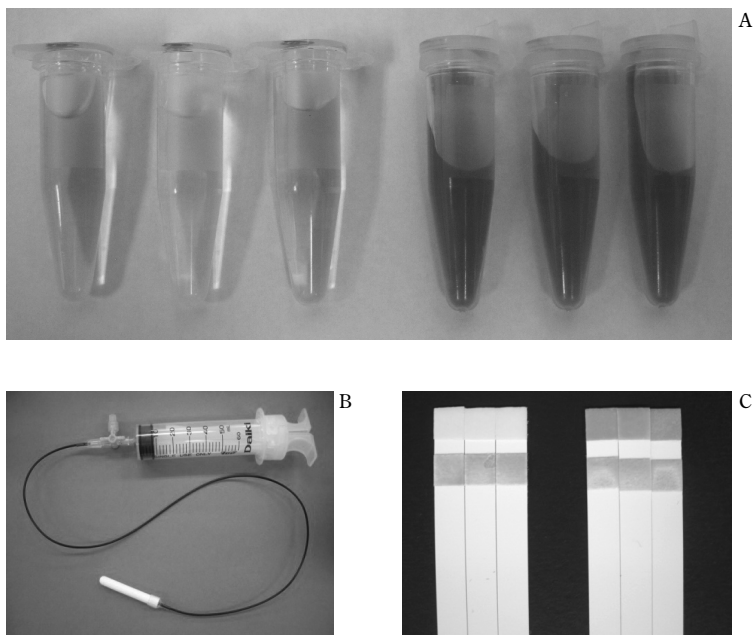


図-4 土壌水を用いた還元化の確認

A: フェナントロリン法(還元状態の進行によって濃く着色)。

B: 多孔質素焼管と吸引捕集のためのシリンジ。

C: Fe^{2+} 試験紙(還元状態で赤く着色, 左:酸化状態, 右:還元状態)。

表-3 低濃度エタノール処理に関する学会発表

作物	対象病原 (害)	発表者
トマト	萎凋病菌	門馬・小原, 日本園芸生産研究所・農業環境技術研究所, 日本植物病理学会 (2011.03)
イチゴ	萎黄病	米本ら, 徳島県立農林水産総合技術支援センター, 日本植物病理学会 (2011.03)
カーネーション	萎凋細菌病	折原ら, 神奈川県農業技術センター, 日本植物病理学会 (2011.03)
キュウリ	ネコブセンチュウ	北ら, 神奈川県農業技術センター, 日本植物病理学会 (2011.03)
ダイコン	ネグサレセンチュウ	植草ら, 神奈川県農業技術センター, 関東東山病害虫研究会 (2011.02)
キュウリ	ネコブセンチュウ	中村ら, 千葉県農林総合研究センター, 園芸学研究 9 (別2): 192
キュウリ	ホモブシス根腐病	牛尾ら, 千葉県農林総合研究センター, 土壤肥料学会 (2010.09)
ハウレンソウ	萎凋病	渡辺・浅野, 岐阜県農業技術センター・岐阜県中間農業研究所, 日本植物病理学会 (2010.09)

含水比が高い条件下であれば、0.25%と2.0%のエタノール処理で同等の効果が確認された。この場合、エタノールの資材費だけでも8倍の開きが出てくる。ただし、エタノールの処理量や濃度を決定する際は、実施コストの削減を意識しながらも、十分な消毒効果が期待できるようにある程度の余裕を持たせたことも重要である。本技術の導入のための予備試験の際には、各都道府県の試験報告や学会発表(表-3)、現在作成中の低濃度エタノールを用いた土壌消毒処理の実施マニュアルを参照いただきたい。

低濃度エタノール処理は、現在一般的に使用されている土壌消毒用農薬に比較して、土壌本来が持つ発病抑止力を損なう可能性が低いと考えられる。本法で用いるエタノールに関しても、土壌中ですぐに分解消失するうえに、ヒトに対する毒性データも十分に得られている。さらに、殺菌作用に関連する有機酸は分解消失し、金属イオンは酸化され元の形態に戻る。これらのことから、低濃度エタノール処理は、環境への負荷が小さく、安全性

の高い技術であるといえる。本法で用いられる低濃度のエタノール水溶液は、それ自体が殺菌効果の主体となっている訳ではないことから、よりスムーズな普及を目指し、農薬としてではなく土壌還元資材として取り扱うこととし、製品化が進められているところである。

最後に、執筆にあたりご助言いただいた北 宜裕氏(神奈川県農業技術センター)および與語靖洋研究コーディネータ、小原裕三主任研究員(農業環境技術研究所)に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 片瀬雅彦・牛尾進吾 (2010): 植物防疫 64: 569 ~ 574.
- 2) 小原裕三 (2008): 同上 62: 427 ~ 432.
- 3) KOBARA, Y. et al. (2007): Proceeding of 2007 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions: 74.1 ~ 74.2.
- 4) MOMMA, N. et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. 72: 247 ~ 252.
- 5) ——— et al. (2010): ibid. 76: 336 ~ 344.
- 6) 門馬法明・小原裕三 (2011): 平成23年度日本植物病理学会大会講演要旨集.
- 7) OKAZAKI, H. and K. NOSE (1986): Ann. Phytopathol. Soc. Japan 52: 384 ~ 393.
- 8) 新村昭憲ら (1999): 日本植物病理学会報 65: 352 ~ 353.