

ミニ特集：低濃度エタノールによる土壤還元消毒

# 土壤還元消毒法によるトマト萎凋病菌の 密度低減効果のメカニズム解析

公益財団法人 園芸植物育種研究所 もん ま のり あき  
門 馬 法 明

## はじめに

臭化メチル剤による土壤くん蒸は、安価で最も効果的な土壤病害対策法とされてきた。しかし、平成24年12月31日をもって、特例措置も含めその使用が全廃された。クロルピクリンやD-D剤等、いくつかの代替薬剤についても、当分の間はこれまで通りの使用が可能であると考えられるものの、今日の環境や健康リスクに対する意識の高まりから、今後様々なレベルでの規制が設けられる可能性も否定できない。住農混在地域では、住民からの苦情も絶えず、土壤くん蒸剤に限らず、化学合成農薬全般が使用しにくいのが現状である。米国では、バッファゾーンを定める法律によって、土壤くん蒸剤の使用は厳しく規制されている。このため、土壤くん蒸に替わる土壤消毒技術や土壤病害管理技術が、ますます注目を集めるようになってきている。

このような背景のもと、新村(2000)によって土壤還元消毒法が開発され、様々な改良を伴いながら、全国的に普及・定着してきている。土壤還元消毒は、露地圃場、施設圃場のいずれにも適用可能である(図-1)。カリフォルニア州やフロリダ州では、日本と比較して遙かに広大な面積での実証試験が行われている(図-2)。地床での一般的な処理の手順は、用いる炭素源(有機物)のタイプによって大きく二つに大別される。小麦フスマや米糠等では、圃場への混和作業の後、灌水、被覆の順に処理を行う。低濃度エタノールや糖蜜の場合には、圃場への混和作業を必要としないため、水溶液を処理してから被覆を行う。いずれの方法においても、灌水後の被覆資材の展開は大きな労力であるため、被覆資材の下に灌水チューブをあらかじめ敷設しておき、灌水するという方法もある。

また、エタノールを用いた還元消毒は、高設栽培などで用いられている既存の灌水設備(多くの場合、自動の

液肥混入器が取り付けられている)を利用して処理することができるという利点がある(図-3)。

土壤還元消毒では、炭素源を投入した土壤を一時的に湛水状態とする(空隙を水分で満たす)ことで土壤中の空気が追い出され、さらに微生物による有機物の分解により残留している酸素が消費される。これにより、土壤の還元化が促進され、これに伴う様々な環境変化によって、病原体の生存が抑制される(新村, 2000; MOMMA et al. 2010)。小麦フスマ、米糠、糖蜜、稲ワラ、低濃度のエタノール等が炭素源として用いられるほか、緑肥や地域特有の有機廃棄物についても土壤還元消毒の効果が認められている(BUTLER et al., 2012)。青刈り作物を利



図-1 低濃度エタノールを用いた土壤還元消毒  
(上：施設圃場，下：露地圃場)

Mechanisms for Suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by Anaerobic-mediated Biological Soil Disinfestation (ABSD). By Noriaki MOMMA

(キーワード：土壤還元消毒，トマト萎凋病菌，金属イオン，有機酸)



図-2 米国カリフォルニア州の土壌還元消毒の実証試験圃場



図-3 イチゴ栽培用高設ベッドでの還元消毒の様子 (上：実施の様子，下：灌水装置)

用する方法は、Blok et al. (2000) の方法に着想を得たものと考えられる。間作に被覆作物を栽培することは、土壌微生物の多様化を促し、土壌の発病抑止性を改善する効果も期待できるかもしれない(小長井ら, 2005)。

土壌の被覆は、太陽熱による地温の上昇を図る(微生物の活性に影響)こと、大気中からの酸素の流入を遮断すること、さらに土壌の乾燥を防ぐことを目的として行われるものである。そのため、ただ土壌の表面に展開しておけばよいと言うわけではなく、土壌還元消毒の効果を増進・安定させるためには、フィルムの端を埋設するなどしてきちんと固定することが望ましい。

土壌還元消毒は英語で Biological Soil Disinfestation や Anaerobic/Reductive Soil Disinfestation などと呼ばれている。前者は土壌微生物群の働きが必須であることを、後者は嫌氣的/還元的条件下で消毒効果が促進されることを強調しており、ともに土壌還元消毒の一面を良く捉えた表現である。ここで筆者は、両方の要素を含んだ呼称、すなわち Anaerobicity-mediated Biological Soil Disinfestation (ABSD) を提案する。日本語では、土壌還元消毒法が定着して久しいので、ここでは土壌還元消毒法と表記することとし、そのメカニズムについて、これまでに明らかにされてきていることを概説する。本稿の内容の一部には、「新たな農林水産技術を推進する実用技術開発事業(農林水産省)」の助成を受け、日本園芸生産研究所(現園芸植物育種研究所)で取り組んだ試験の内容を含む。

## I 消毒のメカニズム

### 1 土壌微生物の関与

小麦フスマを混和した土壌をあらかじめ蒸気消毒しておき、そこへトマト萎凋病菌を埋設、灌水および被覆を

施してから真夏の温室内に保持し、還元消毒の効果を判定する試験を行った(門馬ら, 2005)。このとき、蒸気消毒を施していない処理区も設けた。2週間後、蒸気消毒を施していない処理区では、予想通り病原菌が完全に抑制されていたものの、蒸気消毒を施しておいた処理区では、病原菌が高密度に生存していた。このとき、両処理区間で地温の差は認められなかった。このことは、①土壌還元消毒の消毒効果が発揮されるためには、土壌中の微生物の働きが必須であること、②地温が消毒効果を決定する第一義的な要因ではないことを示している。低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒では、2%、1%、0.5%のエタノールを用いたとき、トマト萎凋病菌の厚壁胞子の数がそれぞれ3、6、9日間で検出限界以下にまで低減した(Momma et al., 2010)。また、この抑制作用も、病原菌を埋め込む前に土壌をあらかじめオートクレーブ

処理 (121°C, 60 分間) しておくことで全く発揮されなかった。

小麦フスマ, 低濃度エタノールのいずれを用いた土壤還元消毒においても, 土壤細菌群集構造が大きく変化することが PCR-DGGE 法によって明らかにされている (門馬ら, 2005; MOMMA et al., 2010)。アブラナ科植物や小麦フスマを利用した土壤還元消毒では, *Clostridium* 属細菌が増加することが報告されている (門馬ら, 2007; MOWLICK et al., 2012)。*Clostridium* 属細菌には, 嫌気条件下での有機物の分解により, 酪酸や酢酸等の有機酸を産生する種が多く含まれていることから, 土壤還元消毒のメカニズムに深く関与していることが考えられる。しかし, これらの解析は土壤還元消毒の培養期間終了時の土壤を用いていることから, 環境条件が変化した結果, *Clostridium* 属細菌が顕在化したとも考えられる。今後は処理期間中の有機酸の蓄積と *Clostridium* 属細菌の増減を関連づけるような研究が望まれる。

## 2 嫌気・還元条件と温度

土壤還元消毒による病原菌の抑制には, 土壤環境の還元化が伴うことが報告されている (BLOK et al., 2000; 門馬ら, 2005; MOMMA et al., 2010)。このことから, 嫌気条件や還元条件がトマト萎凋病菌をはじめとする病原菌の密度低減に関与していることが考えられた。筆者らは, トマト萎凋病菌を移植した寒土培地を, アネロキープ (三菱ガス化学株式会社) を用いて作り出した嫌気環境下に保持する試験を行った。その結果, 嫌気条件下ではこの病原菌の菌糸生育が完全に停止するものの, 好気条件に戻してやることで菌糸の生育が再開されることが明らかとなった。トマト萎凋病菌の胞子を蒸留水に懸濁し, 水素ガスバブリングを行いながら 30°C で 15 日間培養した試験では, 水素ガスバブリング区では, 処理期間中の酸化還元電位は平均 -230 mV を維持していたものの, 無処理区と比較して, 病原菌の生存菌数には差が認められなかった。以上のことから, 嫌氣的/還元条件下での短期間の培養によっては, トマト萎凋病菌の生存は影響を受けないことが示された。

千葉県と北海道の水田土壤における *Verticillium dahliae* の菌密度の推移を経時的に調査した事例では, 千葉県では北海道と比較して速やかに菌密度が減少すること, この現象には土壤の温度が関与していることが報告されている (EBIHARA et al., 2010)。このことに注目し, 海老原らは, 異なる温度条件下での嫌気培養により, 各種土壤病原菌の生存がどのように影響を受けるかを調査した。その結果, *Fusarium oxysporum* を含むいくつかの病原性糸状菌において, 培養温度が上昇するにつれ, 嫌気条

件下における生存可能期間が短縮, つまり早く死滅することを明らかにしている (EBIHARA et al., 2013 (投稿中))。

## 3 有機酸

土壤還元消毒を施した土壤中では, 有機物の分解に伴い酢酸や酪酸といった有機酸が生成・蓄積することが知られている (MOMMA et al., 2006; MOMMA et al., 2011)。小麦フスマを用いた場合の土壤中からは, 2,000 mg/l 程度の酢酸および酪酸が検出される。このことから, 土壤還元消毒による植物寄生性線虫や土壤伝染性病原菌等の抑制には, 有機酸の関与が示唆されている (MOMMA et al., 2006; KATASE et al., 2009)。湛水状態にしたグルコース添加土壤においても酢酸や酪酸が蓄積し, 病原菌の抑制に働いていることが示唆されている (OKAZAKI and NOSE, 1986)。

トマト萎凋病菌の厚壁胞子は, 800 mg/l の酢酸溶液中に 48 時間保持することで完全に殺菌される一方で, 酪酸では 2,000 mg/l の高濃度でもわずかに生き残ることができる (MOMMA et al., 2006)。トマト青枯病菌の場合には, 200 mg/l の酢酸, 酪酸水溶液中で完全に殺菌される。しかし, これらの有機酸を土壤中から検出される量を直接添加しても, トマト萎凋病菌に対する土壤還元消毒の抑制効果を再現することはできなかった。

酢酸や酪酸の殺線虫活性は, pH3.0 ~ 4.0 付近で高く, pH5.5 ~ 6.5 付近でほとんど消失してしまう (KATASE et al., 2009)。土壤還元消毒では, 消毒期間中に土壤 pH の低下が観察されるが, 小麦フスマを使った土壤還元消毒では, 最低でも pH5.5 程度までしか下がらなかった (門馬ら, 2005)。KATASE et al. (2009) の報告によると, このような土壤 pH では酢酸や酪酸の寄与の程度は極めて低レベルであると考えられる。しかし, 投入した小麦フスマや土壤有機物, 病原菌や線虫の極近傍は炭素源が豊富であり, これを嫌気性微生物が分解することで高濃度の有機酸が生じ, 局所的な pH の低下が起こっていることも想像される。

## 4 金属イオン

嫌気/還元状態の土壤中では, 土壤溶液中に  $Mn^{2+}$  や  $Fe^{2+}$  等の金属イオンが溶出してくることが知られている。水田で観察される還元層の青灰色は  $Fe^{2+}$  に由来するものである。このような還元層の発達は土壤還元消毒を施した土壤においても観察される (MOMMA et al., 2010; 2011)。小麦フスマを使った土壤還元消毒は, 小麦フスマが混和された深さまでしか土壤の還元化は誘導されない。一方で, 低濃度エタノールを用いた場合には, 70 ~ 90 cm の深さまで還元化することが露地圃場で行った試験で確認されている。土壤の還元化と消毒効果には

関連があるようで、低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒では、深さ 50 cm まで（それより深い地点は測定していない）の線虫が検出されなくなる一方で、小麦フスマを用いた場合には、還元層の直下（20 cm 程度）で線虫の生残が確認される。

筆者らは、還元処理土壌から採取した土壌抽出液中では、トマト萎凋病菌が強く抑制されること、またその作用が土壌の還元化の程度（抽出液にフェナントロリンを添加する方法で評価した）と相関があることに注目し、 $\text{FeSO}_4$  および  $\text{MnSO}_4$  溶液中でトマト萎凋病菌を培養する実験を行った。その結果、0.001% の  $\text{FeSO}_4$  ( $\text{Fe}^{2+}$  濃度 =  $0.036 \mu\text{mole/ml}$ )、0.01% の  $\text{MnSO}_4$  ( $\text{Mn}^{2+}$  濃度 =  $0.36 \mu\text{mole/ml}$ ) 水溶液中において、 $30^\circ\text{C}$  で 7 日間培養すると病原菌の胞子が死滅することを明らかにした。このとき、1.0% の  $\text{MgSO}_4$  溶液 ( $\text{SO}_4^{2-}$  を含む) 中では、病原菌の生存は全く影響を受けなかった。このことから、 $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{Mn}^{2+}$  がトマト萎凋病菌の抑制に関与していることが示された。今後の研究では、実際の処理土壌の条件 (pH, 温度, 酸素, 有機酸, 金属イオン濃度) を再現して、それらの組合せによる病原菌の抑制効果を調査することが必要である。

## II 土壌還元消毒の選択性

*F. oxysporum* や *Phomopsis sclerotioides*, *Phytophthora capsici*, *Monosporascus cannonballus* 等の、様々な植物病原性糸状菌が、土壌還元消毒によって抑制されることが報告されている。またその一方で、土壌糸状菌群の数はそれほど顕著に減少しないか、ほとんど影響しないことも知られている。これはなぜだろうか？

筆者らは、*F. oxysporum*, *P. sclerotioides*, *P. capsici*, *M. cannonballus* を対象に有機酸や金属イオンに対する各種病原菌の感受性を調査した。10% PDA (potato dextrose broth 2.4 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l) で前培養した菌叢ディスクを 0.1% の  $\text{FeSO}_4$  溶液に浸漬し、 $30^\circ\text{C}$  で 8 日間培養し、菌叢ディスクを新しい PDA に移植し、菌糸生育の有無によりその生存を確認した。

その結果、*P. capsici* を除く 3 種の病原菌は 0.1% の  $\text{Fe}^{2+}$  溶液中で完全に抑制された。*P. capsici* のような水生菌は、底質などのような還元化しやすい環境にさらされる機会が多いため、 $\text{Fe}^{2+}$  に対して基本的に耐性を持っているのではないかと推測される。現在筆者らの行っている試験では、エタノールを用いた土壌還元処理土壌または水処理土壌から分離した土壌糸状菌群を対象に

同様の実験を行っており、還元処理土壌では  $\text{Fe}^{2+}$  に耐性を示す菌群が多いことが明らかとなりつつある。酢酸や酪酸では、いずれの病原菌も同様に抑制されること、土壌糸状菌群に対しては  $\text{Fe}^{2+}$  の場合と類似した結果が得られている。以上のことは、 $\text{Fe}^{2+}$  や有機酸が土壌糸状菌の群集構造に大いに影響を与えていることを示唆すると同時に、これらが土壌還元消毒のメカニズムにも関与しているという説を支持するものであると筆者らは考えている。

## おわりに

本稿では、これまでにわかってきている土壌還元消毒のメカニズムについて概説した。還元資材としてよく用いられる、小麦フスマや糖蜜、低濃度のエタノールは、それら自体が殺菌効果の主体となるものではないし、土壌中で速やかに分解消失する。その分解に伴って、土壌の還元化が促進され、酢酸や酪酸等の有機酸や  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  などの金属イオンが遊離してくる。土壌還元消毒の糸状菌群に対する選択性がこれらの要因によって説明できることも明らかになりつつある。このことは、有機酸や金属イオンが土壌還元消毒のメカニズムに関与しているという説を支持するものである。今後は、これらの要因を組合せた場合の病原菌に対する抑制効果を調査する必要がある。より詳細な消毒メカニズムが明らかになることで、消毒技術の最適化や普及がより促進されることが期待される。

最後に、本稿を執筆するにあたりご助言いただいた植松清次氏 (千葉県農林総合研究センター)、北 宣裕氏、折原紀子氏 (神奈川県農業技術センター)、小原裕三氏 (独立行政法人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) BLOK, W. J. et al. (2000): *Phytopathol.* **90**: 253 ~ 259.
- 2) BUTLER, D. et al. (2012): *Plant and Soil* **355**: 149 ~ 165.
- 3) EBIHARA, Y. et al. (2010): *J. Gen. Plant Pathol.* **76**: 7 ~ 20.
- 4) ——— et al. (2013): *ibid.* (投稿中).
- 5) KATASE, M. et al. (2009): *Nematol. Res.* **39**: 53 ~ 62.
- 6) 小長井 健ら (2005): *日植病報* **71**: 101 ~ 110.
- 7) 門馬法明ら (2005): *土と微生物* **59**: 27 ~ 33.
- 8) MOMMA, N. et al. (2006): *J. Gen. Plant Pathol.* **72**: 247 ~ 252.
- 9) 門馬法明ら (2007): *土と微生物* **61**: 3 ~ 9.
- 10) MOMMA, N. et al. (2010): *J. Gen. Plant Pathol.* **76**: 336 ~ 344.
- 11) ——— et al. (2011): *ibid.* **77**: 331 ~ 335.
- 12) MOWLICK, S. et al. (2012): *Appl. Microbiol. Biotechol.* DOI: 10.1007/s00253-012-4532-z.
- 13) OKAZAKI, H. and K. NOSE (1986): *日植病報* **52**: 384 ~ 393.
- 14) 新村昭憲 (2000): *土壌伝染病談話会レポート* **20**: 133 ~ 143.