

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07819

研究課題名(和文) 土壌還元消毒法による病害虫防除メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of disinfestation mechanism by anaerobic soil disinfestation method

研究代表者

堀田 光生 (Horita, Mitsuo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・物質循環研究領域・ユニット長

研究者番号：10355729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エタノール等各種有機物を用いた土壌還元消毒法による土壌病害虫防除メカニズムを解明するため、還元消毒処理中の土壌特性および土壌微生物相の変化について解析した結果、土壌中の微生物が添加有機物を分解・代謝する過程で還元状態が形成され、特定の嫌気性微生物種が急速に増殖するとともに、これら微生物種が関わって抗菌性物質が土壌中に生成・蓄積されることで、土壌病害虫を死滅させていることが推測された。

研究成果の概要(英文)：To analyze disinfestation mechanism against soil living pests by anaerobic soil disinfestation (ASD) method using various organic substances such as ethanol, we have continuously assessed various soil characters such as oxidation-reduction potential, pH, metabolism of additive carbon sources, concentration of metal ions and population dynamics of soil microorganisms during the anaerobic soil disinfestation treatment. Therefore, anaerobic condition was quickly induced by soil microorganisms during their oxidative metabolism of additive carbon sources. Thereafter antibiotic materials such as acetic acid and metal ions which can kill or decrease numbers of the soil living pests were produced and accumulated in soil along with rapid multiplication of several kinds of anaerobic soil bacteria. It suggests that soil microorganisms such as anaerobic bacteria would play important role for ASD.

研究分野：植物病理学

キーワード：土壌還元消毒 土壌微生物 土壌病害虫 エタノール

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、土壌くん蒸剤などの化学農薬の使用による人体や環境への影響に対する懸念が広がっており、その代替技術の開発が求められている。わが国では低濃度エタノールなどを材料に用いた簡便かつ環境低負荷型な土壌還元消毒法が開発された。

(2) 上記法を既存農薬と比較した場合、漏洩リスクがなく、再汚染も起きにくい一方、消毒効果が対象病害虫の種類により異なり、必ずしも安定に持続しないこと。また処理可能な時期が地温の高い期間に限定され、資材コストが高いなどの課題も挙げられている。

2. 研究の目的

(1) 以上の課題を解決するため、土壌還元消毒法により土壌病害虫が死滅するメカニズムを解明し、同技術の開発に資する。具体的には、エタノールなどの有機物を処理した後の土壌特性・微生物相の変化、有機成分の代謝など各種要因と、病害虫に対する消毒効果との関連性を明らかにする。

(2) 次に土壌消毒過程に関与すると推定された土壌微生物を分離・同定し、消毒効果と関連する特性を明らかにする。以上の解析結果を基に、安定した土壌消毒効果を得るための各種条件（生物的、化学的、物理的）を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エタノールなどの各種有機物を処理した後の土壌特性の変化、有機成分の代謝と、土壌中の病原菌の死滅との関連性を調査し、消毒効果と密接に関連する各種要因を特定する。

(2) 消毒処理中の土壌微生物相の変化を微生物種類別に調査するとともに、消毒効果との関連がみられた微生物種を土壌から分離・培養・同定し、それらの生物的性状や殺菌物質生産能等を調べる。

(3) 消毒効果に関与すると推定された微生物種ごとに、還元消毒過程での土壌中の動態を詳細に調査し、土壌特性の変化や抗菌物質の蓄積、病原菌の死滅およびその他土壌微生物との関連などを調査することで、その消毒メカニズムを解明・推定する。

4. 研究成果

(1) 土壌伝染性病原菌（トマト萎凋病菌）に汚染した土壌を人工的に作成し、これに精製エタノール、バイオエタノール発酵液、フスマなど各種有機物を資材に用いて還元消毒試

験を行い、土壌中の病原菌の死滅に要する時間、土壌特性（酸化還元電位、土壌 pH、各種無機・有機成分など）の変動、エタノールなどの添加有機物の分解、代謝を経時的に調査し、土壌消毒効果に関連する要因を推定した。

病原菌は有機物の種類にかかわらず処理 4～8 日目までに検出されなくなり、早い段階で死滅していた。土壌中では処理直後～2 日目以内に酸化還元電位が急速に低下して還元状態（無酸素状態）となり、試験終了時まで還元状態が維持されていた。土壌 pH も処理直後から低下がみられたが、試験終了時には開始時と同程度に回復していた。

エタノールなどの添加有機物は、種類により代謝速度が異なり、フスマやエタノール発酵液などに含まれるグルコースなどの糖類および乳酸などの有機酸は速やかに代謝・分解され、処理 4 日後には検出されなくなったが、エタノールは 8 日目前後まで残存していた。処理 4～8 日目には、土壌溶液中から酢酸、二価鉄などが高濃度で検出されるようになり、その後、これらの濃度が徐々に低下していた（図 1）。

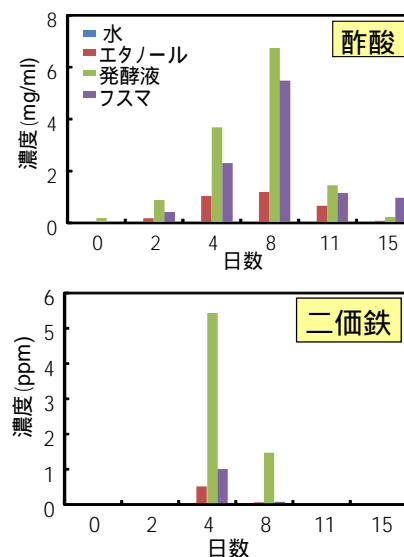


図 1 還元消毒処理中の土壌溶液中の酢酸と二価鉄濃度の変化

以上のことから、処理直後から添加した有機物の代謝が始まり、その後、酢酸や二価鉄が生成され、これら成分が消毒効果に関与していることが推測された。

(2) エタノールなど各種有機物を用いて還元消毒処理した土壌を経時的に採取し、土壌微生物相の変化を、リボソーム RNA 遺伝子の特定領域を標的に PCR で増幅後、DGGE 法を用いて比較調査した結果、有機物の種類が違っていても、共通かつ複数の微生物種が特異的に増殖してくることが確認された（図 2）。そこで、これら DNA バンドをクローニングしてシーケンス解析を行い、種の同定を行った結果、いずれも共通のグループ（*Clostridium* 属）に

属する偏性嫌気性（酸素の無い状態でのみ生育可能）の細菌種であることが推定された。

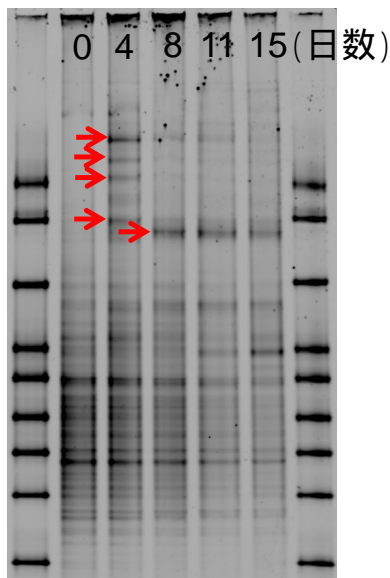


図2 PCR-DGGE法による還元消毒中の微生物群集構造の変化（一般細菌相）

PCR-DGGE法では、多数のバンドが重複して特定できない微生物種も多数みられたため、次に次世代シーケンサーを用いて、リボソームRNA遺伝子の可変領域を標的としたアンプリコン解析により、土壌細菌相を詳細に調査した。有機物として精製エタノールを添加したもの、および比較対照として蒸留水を加えたものについて、それぞれ経時的に調査した結果、エタノールを添加した場合、Firmicutes綱に属する細菌の割合が増え、試験終了時まで、その割合を維持していることが確認された。細菌種について更に詳細に調査した結果、既確認の*Clostridium*属菌に加え、偏性嫌気性細菌*Desulfosporosius*属、*Desulfomaculum*属、*Ammoniphilus*属、および好気性細菌で、*Oxalobacteriaceae*科、*Pseudomonas*属にそれぞれ属する細菌種が、*Clostridium*属菌と同様に、土壌中で増加していることが確認された（図3）。

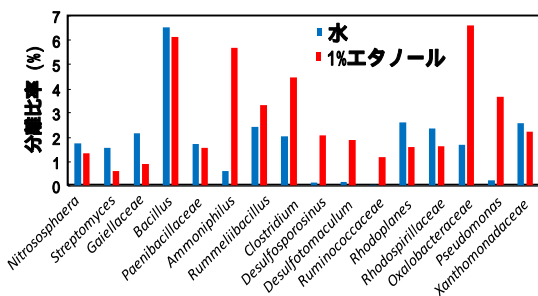


図3 低濃度エタノール土壌還元消毒による土壌微生物相の変化（処理4日目）

一方、*Bacillus*属菌など一部の細菌種の割合は低下していた。これら細菌種の還元消毒への関与を調査するため、選択培地などを用い

て、還元消毒過程の土壌から、菌の分離を試みた。嫌気性の*Clostridium*属、*Desulfosporosius*属、*Desulfomaculum*属などの細菌については、還元状態での還元物質の生産能を指標とすることで、選択培地上での分離が可能であった。しかし、これら以外の嫌気性細菌を選択的に分離・培養することは困難であった。

(3) これら細菌種の動態を定量PCRや選択培地を用いて調査するとともに、抗菌性物質（酢酸、二価鉄など）の生成と接種した病原菌（トマト萎凋病菌）の土壌中の生存との関連性を調査した。ポットに詰めた土壌に低濃度エタノール水（1%）を処理して密閉すると、土壌内でエタノールが分解・代謝されて土壌溶液中の酢酸濃度が上昇するとともに、遊離した二価鉄が検出された。定量PCR法による調査では、同時期に嫌気性細菌の*Clostridium*属菌量が、水処理に比べ有意に増加していることが確認された（図4）。

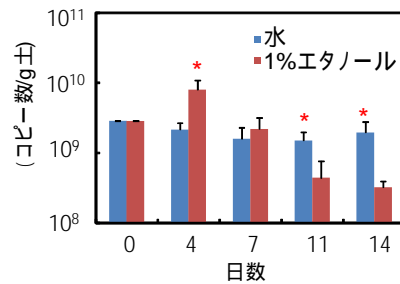


図4 定量PCR法による土壌還元消毒中の土壌中の*Clostridium*属菌量の変化

その後、土壌溶液中の酢酸、二価鉄濃度は低下し、*Clostridium*属菌量も減少したが、土壌全体に含まれる二価鉄量は急速に増加し、一定量以上蓄積した土壌中からは病原菌が全く検出されなくなった。以上の結果から、二価鉄の生成・遊離および土壌中での蓄積過程が、還元消毒効果と密接に関連していることが示唆された。

以上の解析結果を基に、土壌還元消毒メカニズムについて、以下のようなことが推定された（図5）。

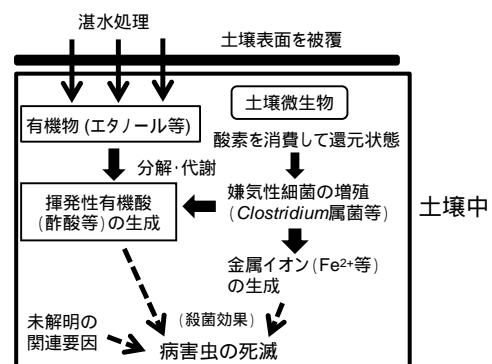


図5 土壌還元消毒メカニズム（推定）

すなわち、添加したエタノールなどの有機物が直接病害虫に作用し、死滅させるのではないこと、土壤中の微生物が添加された有機物を分解・代謝する過程で酸素が消費されて、土壤中の環境が酸化状態から還元（無酸素）状態に急速に変化すること、同環境条件下で特定の嫌気性細菌種が急速に増殖し、有機物を代謝して、土壤溶液中に酢酸などの揮発性有機酸および二価鉄などの金属イオンを遊離・蓄積させること、最終的に、これら蓄積した殺菌性成分および嫌気的な土壤環境などが関わって病原菌を死滅させていること、および有機物の分解や殺菌物質の生成には、複数の微生物種が関わっていること、などが推定された。今後、これらの要因について、更に調査を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

堀田光生、セルロース系バイオマスから固体発酵でバイオエタノール生産、ケミカルエンジニアリング、査読無、62巻、2017、634-638

堀田光生、北本宏子、飼料稲からエタノールと優良サイレージを農地で作る、バイオサイエンスとインダストリー、査読無、74巻、2016、234-235

堀田光生、ショウガ科植物青枯病菌の遺伝的多様性、農研機構遺伝資源センター微生物遺伝資源探索収集調査報告書、査読有、25巻、2016、89-96

Horita, M. and Kitamoto, H.K., Biological soil disinfestation using bioethanol fermentation products: role of residual organic substances, Journal of General Plant Pathology, 査読有, Vol. 81, 2015, 304-314
DOI: 10.1007/s10327-015-0595-x

〔学会発表〕(計5件)

堀田光生、土壤還元消毒過程に関わる抗菌性物質の生成と土壤微生物の動態調査、平成29年度日本植物病理学会大会、2017年4月26日、いわて県民情報交流センター

堀田光生、各種有機物資材を用いた土壤還元消毒過程における土壤微生物群集構造の解析、日本土壤微生物学会2016年度大会、2016年6月11~12日、岐阜大学

堀田光生、稲発酵飼料(稲WCS)を用いたバイオエタノールと家畜飼料の同時生産、平成27年度農研機構シンポジウム「自給飼料低コスト生産と新機能活用に向けた新展開」(招待講演)2015年12月8日、発明会館

堀田光生、飼料稲ロールペールを用いたバイオエタノール生産と発酵液の健全な作物が育つ土作りへの利用、第189回酵母細胞研究会(招待講演)2015年11月27日、東京海洋大学

堀田光生、飼料稲からバイオエタノールを作り、健康な作物が育つ土作りに役立つ、農業環境技術研究所公開セミナー「農地にすむ生物の能力を利用した環境にやさしい農業生産に向けて」(招待講演)2015年11月26日、秋葉原コンベンションホール

〔その他〕

アウトリーチ活動(講演)(計4件)

堀田光生、低濃度エタノール土壤還元消毒によるショウガの土壤病害対策について、平成29年度ショウガ生産者交流会(高知県庁主催)、2018年2月8日、白鳳会館

堀田光生、国内で発生する青枯病の現状と病原菌の特性、平成29年度九州沖縄農業試験研究推進会議 野菜・花き推進部会遺伝子研究連絡会、2017年10月19日、九州沖縄農業研究センター

堀田光生、セルロース系バイオマスから固体発酵でバイオエタノール生産、「知」の集積と活用の特許説明会、2017年3月10日、AP秋葉原

堀田光生、セルロース系バイオマスから固体発酵でバイオエタノール生産、JST新技術説明会、2017年2月28日、JST東京本部別館

ホームページ等、

<https://researchmap.jp/0506>

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀田 光生 (HORITA, Mitsuo)
農研機構農業環境変動研究センター・物質循環研究領域・ユニット長
研究者番号: 10355729

(3)連携研究者

北本 宏子 (KITAMOTO, Hiroko)
農研機構農業環境変動研究センター・物質循環研究領域・ユニット長
研究者番号: 10370692