

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05609

研究課題名（和文）土壌還元消毒法の基盤構築に向けたメカニズム解明

研究課題名（英文）Fundamental analysis of anaerobic soil disinfestation process

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・農業環境研究部門・グループ長補佐

研究者番号：10355729

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：土壌還元消毒過程に関わる土壌微生物種やその役割を明らかにするため、土壌病原菌接種土壌に1%エタノール溶液を加えて密封することで土壌還元消毒試験を行った。処理中の土壌では酸化還元電位が急速に低下し、病原菌が死滅するとともに、二価鉄が土壌に蓄積した。土壌微生物相の変化を経時的に調査した結果、嫌気性細菌（Clostridium属菌、Desulfosporosinus属菌等）の存在比が高くなり、これら細菌種の増殖が、殺菌物質の生成・蓄積および還元消毒効果と密接に関連していることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、人体や環境に対する影響への懸念から、化学合成農薬（土壌くん蒸剤）を代替する技術の開発が要望されている。土壌還元消毒法は環境や人体に負荷をかけない代替技術の一つとして有望視されているが、その土壌消毒メカニズムについては不明な点が多い。その消毒効果に関連する土壌微生物の種類やそれらの役割を明らかにすることで、常に安定した効果を得るための条件や処理方法を確立することができ、同技術の一層の普及・利用につなげられる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the soil microbial species involved in anaerobic soil disinfestation (ASD) process and their roles, ASD tests were conducted by adding 1% ethanol. The redox potential of the soil rapidly decreased during the treatments, the pathogens were killed, and ferrous iron accumulated in the soil. As a result of investigating the changes in the soil microbial flora over time, the abundance ratio of anaerobic bacteria (Clostridium spp., Desulfosporosinus spp., etc.) increased, and it was inferred that the proliferation of these bacterial species is closely related to the production of antibiotic substances and the ASD effect.

研究分野：植物病理学

キーワード：土壌還元消毒 嫌気性細菌 低濃度エタノール

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 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拡がっており、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、必ずしも安定に発揮されないこと。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・改良に資する。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) 還元消毒効果が安定的に得られる条件と安定しない条件での還元消毒試験を行い、土壌病原菌を対象として、土壌中の死滅速度、添加有機物の分解・代謝、土壌特性(酸化還元電位、無機成分等)の変動を経時的に調査する。

(2) 同時に、土壌微生物相の変化(微生物の種類や数量、それらの存在比の変化)を、次世代DNAシーケンサー等を用いて経時的に比較・調査し、消毒過程に関与する土壌微生物種を特定する。

(3) 還元消毒過程に関与すると推定された土壌微生物種について、定量PCR等の手法を用いて還元消毒中の動態を経時的に調査し、同時に殺菌物質の生成・蓄積量等を調査することで、これら土壌微生物種の還元消毒過程における役割を明らかにする。

### 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、これに低濃度エタノール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、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。還元消毒効果が安定的に得られる30℃と、安定しない20℃で処理を行った。

30℃処理区では、4日目以降に酸化還元電位(Eh)が急速に低下するとともに、病原菌が検出されなくなった。一方、20℃処理区では、酸化還元電位が徐々に低下したが、10日目まで病原菌が生存していた(図1a, b)。

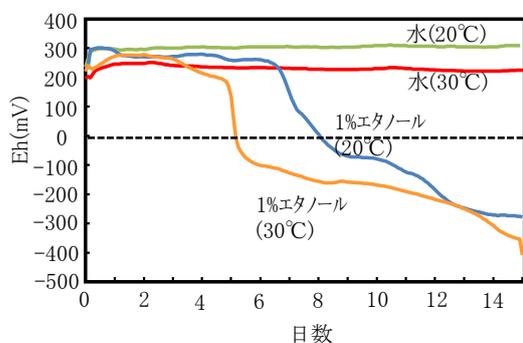


図1a 酸化還元電位の推移

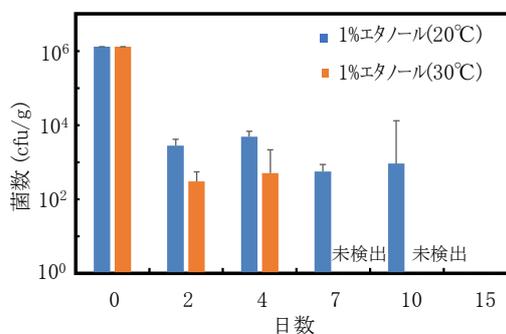


図1b トマト萎凋病菌生残数

30℃処理区では、エタノールは処理4日目以降に代謝・分解され、それにともない酢酸、二価鉄が検出・蓄積していた。一方、20℃処理区では、処理期間中エタノールが残存し、15日目まで土壌溶液中から酢酸、二価鉄は検出されなかった(図2a, b)。以上のことから、20℃処理で

は、エタノールの代謝が遅れ、それにもない、酢酸、二価鉄等の生成が遅れて消毒効果が得られていないことが推測された。

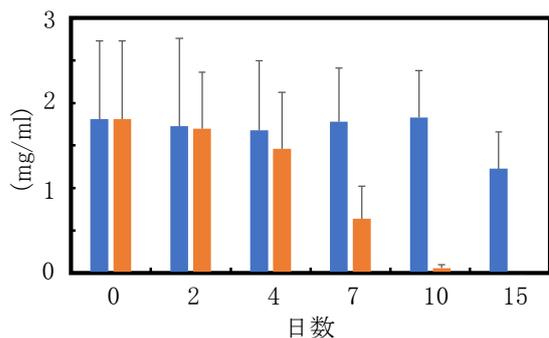


図2a 土壌中のエタノール濃度

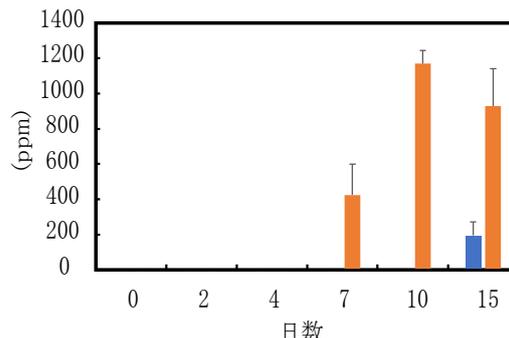


図2b 土壌中の二価鉄蓄積量

(2) 還元消毒中の土壌を経時的に採取し、土壌 DNA を抽出後、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に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。30℃処理区では、7日目以降に Firmicutes 門に属する嫌気性細菌 (*Clostridium* 属、*Desulfohalobium* 属)

他の存在割合が急速に高くなる傾向を示した。一方、20℃処理区では、これら細菌種の割合が高くなるのが遅くなる傾向がみられた (図3)。以上の結果から、これら一部の嫌気性細菌種が土壌還元消毒過程において重要な役割を果たしていることが推測された、特に *Desulfohalobium* 属等は硫酸塩還元菌で、嫌気的条件下で酢酸等の揮発性有機酸を代謝する能力を有することが知られている。

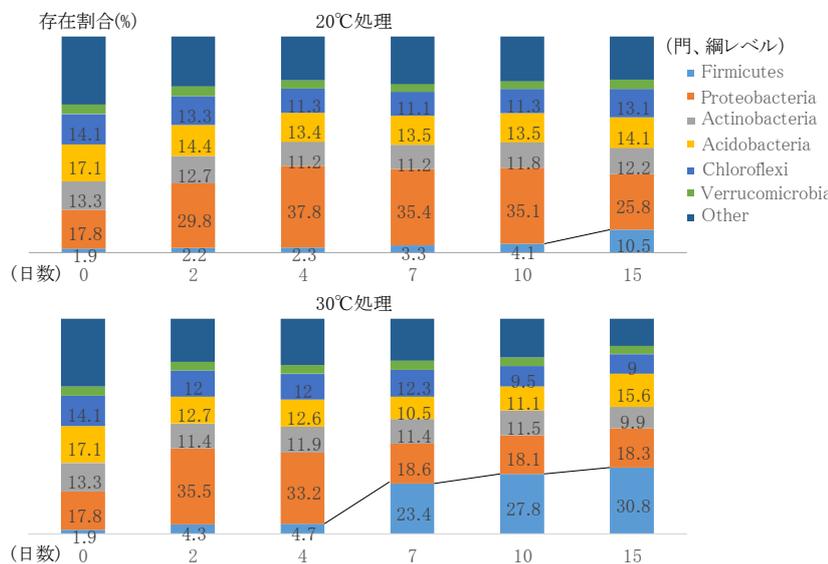


図3 土壌微生物相の変化

(3) これら嫌気性細菌種 (*Clostridium* 属と *Desulfohalobium* 属等の硫酸塩還元菌) の動態をさらに定量 PCR を用いて調査した。*Clostridium* 属菌は、還元状態の形成とともに増殖がみられ、硫酸塩還元菌は、酢酸の生成とともに急速に増加し (図4)、同時期に二価鉄が土壌中に蓄積しているのが確認された。以上の結果から、酢酸、二価鉄の生成および土壌中での蓄積過程にこれら細菌種が密接に関連していることが示唆された。

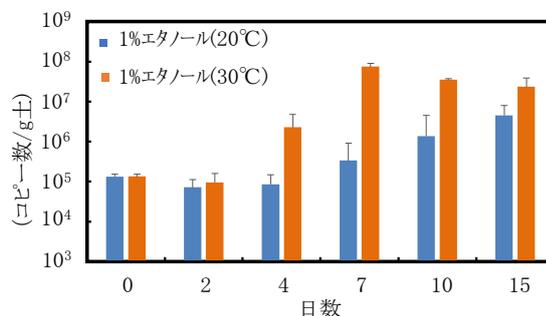


図4 定量PCRによる硫酸塩還元菌の動態解析

以上の解析結果を基に、土壌還元消毒過程について、以下のようなことが推測された (図5)。すなわち、①添加したエタノールなどの有機物を土壌中の微生物 (好気性細菌) が分解・代謝する過程で酸素が消費されて、土壌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、②還元条件下で特定の嫌気性細菌種 (*Clostridium* 属菌等) が急速に増殖し、有機物を代謝して、土壌溶液中に酢酸等の揮発性有機酸を生成すること、③還元条件下で揮発性有機酸を代謝できる硫酸塩還元菌が増殖し、硫酸イオンおよび三価鉄等を還元して硫化鉄 (FeS) を生成・固定化すること、④最終的に、これら蓄積した殺菌性成分および嫌気的な土壌環境等が関わって病

原菌を死滅させていること等が推測された。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。

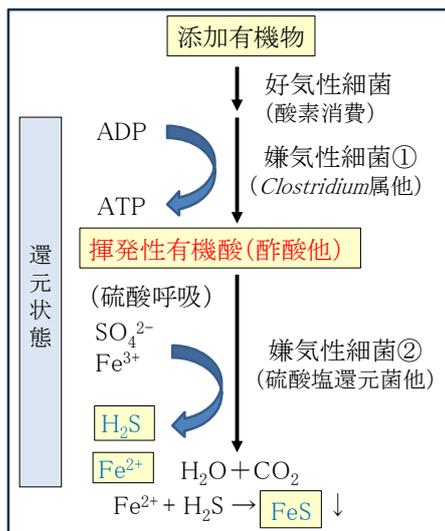


図5 還元消毒処理土壤中での微生物の物質代謝 (仮説)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mitsuo Horita, Yuso Kobara, Kazutaka Yano, Kazusa Hayashi, Tomoka Oki, Yasuaki Morita	4. 巻 32
2. 論文標題 Suppression of ginger bacterial wilt disease by anaerobic soil disinfestation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 2022 MBAO Proceedings	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 堀田 光生	4. 巻 2586
2. 論文標題 圃場・種イモの診断に基づくショウガ青枯病防除技術体系	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 技術の窓	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 堀田光生	4. 巻 76
2. 論文標題 圃場・種イモの診断に基づくショウガ青枯病防除体系	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 68~72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 堀田光生	4. 巻 636
2. 論文標題 土壌還元消毒法を主体としたショウガ青枯病の防除対策	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 グリーンレポート	6. 最初と最後の頁 2~3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horita Mitsuo, Kobara Yuso, Yano Kazutaka, Hayashi Kazusa, Nakamura Yoshihide, Iiyama Kazuhiro, Oki Tomoka	4. 巻 13
2. 論文標題 Comprehensive Control System for Ginger Bacterial Wilt Disease Based on Anaerobic Soil Disinfestation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 1791 ~ 1791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy13071791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horita Mitsuo, Kobara Yuso	4. 巻 33
2. 論文標題 Population Dynamics of Soil Microbial Species during ASD	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 2023MBAO Proceedings	6. 最初と最後の頁 1 ~ 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀田 光生、門馬 法明、小原 裕三
2. 発表標題 土壌還元消毒過程における土壌微生物相の変化および消毒効果に関連する微生物種の推定
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀田 光生
2. 発表標題 土壌還元消毒過程における温度域の違いが消毒効果および土壌微生物相の変化に与える影響
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 堀田 光生
2. 発表標題 低濃度エタノールによる土壌還元消毒
3. 学会等名 第16回有機化学物質研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 農文協（執筆者 堀田 光生 他）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 932
3. 書名 ジャガイモ大事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------