

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580466

研究課題名(和文) バイオエタノールを用いた土壌消毒技術に関する研究

研究課題名(英文) Biological soil disinfestation using bioethanol fermentation solution

研究代表者

堀田 光生 (HORITA, MITSUO)

独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員

研究者番号：10355729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：燃料以外のバイオエタノールの用途として、エタノール発酵後、回収中に得られる低濃度エタノール溶液を用いて土壌消毒する技術を開発するとともに、同溶液の病害虫に対する作用機作の解明を行った。バイオエタノールは精製エタノールと同程度以上の消毒効果を示し、発酵液中のエタノール以外の有機成分に消毒効果を促進するものがみられた。消毒過程では、土壌中の特定の細菌種がエタノールの代謝や抗菌物質の生成に関与していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：To utilize bioethanol for other than motor fuel, we have assessed to use bioethanol fermentation solution for biological soil disinfestation of agricultural field. Treatments of the bioethanol solution into the field soil sufficiently suppressed soil borne disease pathogens. Several soluble or organic materials (e.g. organic acids, sugars) other than ethanol in the bioethanol solution induced suppressive effect like as ethanol. In the biological soil disinfestation process, some specific bacterial species living in the soil were closely correlated with metabolism of ethanol and production of antimicrobial substances.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオエタノール 土壌消毒 土壌還元 土壌微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 化石燃料の高騰や枯渇化、地球温暖化などに対する懸念からバイオ燃料に対する関心が高まっており、我々は家畜の飼料としてサイレージを作る過程を応用した新規バイオエタノール生産技術を考案した。

(2) 燃料以外にもエタノールの有する機能性を応用した新たな用途開発が望まれており、我々は回収中に得られる低濃度エタノール溶液の土壤消毒への利用の可能性に着目した。これまで土壤伝染性の病害虫の防除には、臭化メチル等の土壤くん蒸剤が使用されてきたが、環境への負荷が大きく、その代替技術として、低濃度エタノール溶液を用いた新規土壤消毒法が開発されている。

2. 研究の目的

(1) 以上の経過を基に、我々は各種植物バイオマスからエタノール発酵により生産・回収したバイオエタノール発酵産物を用いて土壤消毒試験を行い、土壤病害虫に対する消毒効果を調べる。

(2) 低濃度エタノール土壤消毒法の病害虫に対する作用機作は解明されていないが、オートクレーブ処理した土壤にエタノール処理しても消毒効果が全くみられないことなどから、土壤中の微生物がエタノールを代謝する過程で、病害虫に消毒効果をもたらす物質等が生産されると考えられ、それらの殺菌成分やその生成条件を明らかにすることで、バイオエタノール溶液が土壤消毒効果を引き起こすメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 各種植物バイオマスから生産・回収したバイオエタノール発酵産物を用いて土壤消毒試験を行い、病害虫に対する効果を調べる。

(2) バイオエタノール発酵産物に含まれるエタノール以外の様々な有機成分、およびその組成比を明らかにし、これら成分の違いが土壤消毒効果に及ぼす影響を調べる。

(3) バイオエタノール添加後の土壤特性の変化や土壤中の微生物相を調べ、土壤消毒に最適な条件を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 農耕地土壤には多種の土壤伝染性病害虫が存在するため、これら病害虫に汚染された土壤に、植物バイオマスから得られたバイオエタノール発酵産物を用いて土壤消毒試験を行い、その効果を確認した。材料として、エタノール固体発酵させた飼料イネより、発酵過程で得られる発酵液、回収したエタノールの蒸留液、および飼料作物ソルガムのエタ

ノール発酵液を用い、それぞれ所定のエタノール濃度に希釈後、トマト萎凋病菌およびナス青枯病菌を埋設した土壤(ポット)に灌水し、処理後の病原菌の生残数を測定した。その結果、いずれの材料を用いても精製エタノールと同程度以上の殺菌効果がみられた(表1)。特に飼料イネの固体発酵過程で得られる発酵液は、通常よりも低いエタノール濃度で処理しても、安定した消毒効果がみられた。

表1 各種バイオエタノール発酵産物の土壤消毒効果

処理	バイオエタノール		
	精製エタノール	イネ発酵液	ソルガム発酵液
エタノール (%)			
0.125			
0.25			
0.5			
1.0			

: 効果不安定、 : 効果安定

(2) バイオエタノール発酵産物にはエタノール以外の様々な有機成分(乳酸、酢酸等の有機酸、六炭糖のグルコース、五炭糖のキシロース等の糖類)が多量に含まれており、また、その組成比がエタノール発酵に用いる原材料やエタノール抽出段階(発酵液、蒸留液)において、それぞれ異なっていた(表2)。

表2 バイオエタノール発酵産物中の主要有機成分

	エタノール (%)	有機酸 (%)		糖 (%)	
		乳酸	酢酸	六炭糖	五炭糖
イネ発酵液	9.9	1.6	0.3	0.2	0.3
イネ蒸留液	14.0	-	0.1	-	-
ソルガム発酵液	7.1	0.6	0.1	-	-

これら成分の違いが土壤消毒に及ぼす影響を調べるため、これら乳酸、酢酸、グルコースの溶液をそれぞれ別個に調製し、エタノールと同様に添加して、土壤消毒試験を行った(表3)。

表3 バイオエタノール発酵産物に含まれる

各種有機成分の土壤消毒効果

処理	病原菌密度(CFU/g)	
	1回目	2回目
水	2.4 x 10 <sup>2</sup>	1.2 x 10 <sup>2</sup>
0.5% エタノール	未検出	未検出
0.5% グルコース	未検出	未検出
0.3% 乳酸	未検出	未検出
0.5% 酢酸	未検出	未検出

その結果、いずれもエタノール添加区と同様にトマト萎凋病菌に対する消毒効果がみられた。以上の結果から、バイオエタノール発酵産物を用いた土壌消毒では、発酵産物に含まれるエタノール以外の成分も消毒効果を促進していることが示唆された。

(3) 次に、飼料イネを材料に用いたエタノール発酵液を大量に調製し、圃場レベルでの土壌消毒試験を行った。春（5月）および秋（10-11月）にそれぞれ畑土壌（黒ボク土）に、バイオエタノール発酵液を希釈して湛水後、土壌表面をガスバリア製フィルムで被覆して処理を行った。その結果、バイオエタノール処理区では、精製エタノール処理区と同程度以上の消毒効果がみられた。特に、地温が30以下と低く、消毒効果が安定しないとされてきた時期（10-11月）に処理した場合でも、明確な効果がみられた。

(4) バイオエタノールによる土壌消毒メカニズムを解明するため、バイオエタノール発酵液処理後の土壌特性、エタノール等有機成分の代謝および土壌微生物相の変化について解析した。その結果、処理直後より土壌中の酸化還元電位およびpHが速やかに低下し、その後も還元状態が維持されていた（図1）。

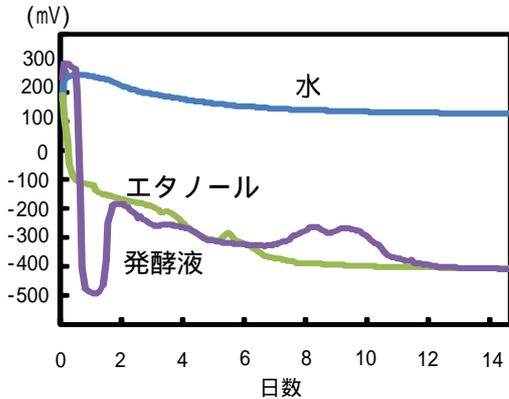


図1 消毒処理中の酸化還元電位の推移

エタノール等の有機成分は短期間に代謝されて、酢酸等の有機酸や金属イオンが急速に蓄積し、その後、有機酸が徐々に分解されていた（図2、3）。

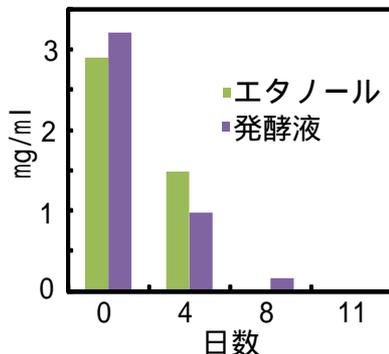


図2 消毒処理中のエタノール濃度の推移

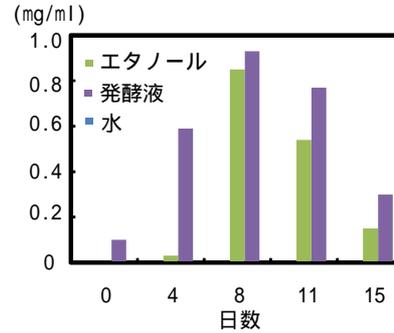


図3 消毒処理中の酢酸濃度の推移

消毒処理後の土壌では、処理前に比べ、糸状菌数や好気性細菌数に大きな変化は見られなかったが、嫌気性細菌数が有意に増加していたことから、特定の細菌群が消毒過程に関与していることが推測された（表4）。

表4 消毒処理後の土壌微生物数の変化

処理	細菌 (CFU/g)		糸状菌 (CFU/g)
	好気性	嫌気性	
処理前	$1.5 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$
水	$2.1 \times 10^6$	$4.9 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$
エタノール	$5.6 \times 10^6$	$15.1 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$
発酵液	$7.7 \times 10^6$	$30.2 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$

(5) 消毒処理過程に関与すると推測される土壌微生物を特定するため、PCR-DGGE法を用いて、消毒処理中の土壌微生物群集構造の変化を経時的に調査した（図4）。その結果、特定の細菌種（*Clostridium*属菌）が急速に増殖していることが確認され、これら微生物種が、エタノール等の有機酸への変換や抗菌物質の生産等、消毒効果の発現と密接に関連していることが推測された。

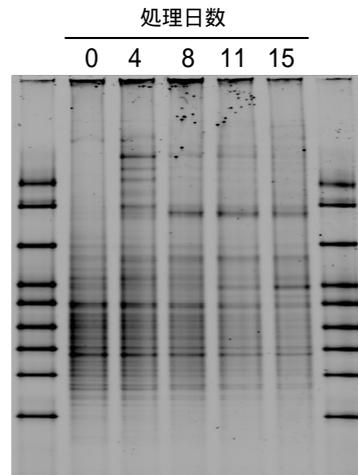


図4 消毒処理中の微生物群集構造の変化

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Kitamoto, H.K., Horita, M., Cai, Y., Shinozaki, Y. and Sakaki, K., Silage produces biofuel for local consumption, *Biotechnology for Biofuels*, 査読有, Vol.4, No.46, 2011, 1-9  
DOI:10.1186/1754-6834-4-46

### 〔学会発表〕(計5件)

堀田 光生、バイオエタノール発酵産物を用いた生物的土壌消毒過程における土壌微生物相の解析、日本植物病理学会 2014 年度大会、2014 年 6 月 2 日、札幌コンベンションセンター

堀田 光生、バイオエタノール発酵産物を用いた生物的土壌消毒および消毒過程における発酵産物の代謝と土壌微生物相の解析、日本植物病理学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 28 日、岐阜大学

堀田 光生、飼料イネロールペールを用いたエタノール固体発酵および簡便なエタノール回収法、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学

堀田 光生、飼料イネロールペールを用いたエタノール発酵およびエタノール回収法の検討、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学

堀田 光生、バイオエタノール発酵産物に含まれる各種成分の生物的土壌消毒に及ぼす影響、日本土壌微生物学会 2011 年度大会、2011 年 11 月 26 日、大崎市鳴子公民館

### 〔図書〕(計1件)

堀田 光生 他、養賢堂、土壌微生物実験法、2013、375

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀田 光生 (HORITA, Mitsuho)  
独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員  
研究者番号：10355729

### (2) 研究分担者

北本 宏子 (KITAMOTO, Hiroko)  
独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・上席研究員  
研究者番号：10370652