

## 2. 土壤還元消毒の作用機構

### 2.1 土壤還元消毒とは

土壤還元消毒は、土壤に有機物炭素を投入し、湛水・被覆を行うだけの簡便な土壤消毒技術です。用いる有機物の種類によって処理の方法は異なります。小麦フスマや米糠のような固体の有機物を用いる場合には、灌水・被覆に先だってロータリー等による土壤への混和が必要になります。これには病原体の拡散を助長する危険性が伴います。また、混和した深さ（20～30 cm）までしか消毒効果は期待できません。一方、エタノールや糖蜜のような液体の有機物を用いる場合には、あらかじめ所定の濃度に希釈した水溶液を散布する方法や液肥混入器を用いて希釈しながら散布する方法があります。この方法では、水溶液が浸透した深さまで消毒効果が期待できます。低濃度のエタノール水溶液を用いた実験では、90 cmの深さまで土壤環境の還元化が確認されています。また、他の有機物のように窒素分を含まないため、処理後の肥培管理が容易であることも利点の一つです。

### 2.2 作用機構

土壤微生物による有機物の分解とそれに伴う酸素の消費、灌水及び被覆による空気の遮断により、土壤環境は強い還元状態となります。この過程で生じる有機酸や金属イオンなどが病原体の密度低減に寄与していることを示唆するデータが得られています。このため、用いる有機物は微生物に分解されやすいものであること及び空気をしっかりと遮断できる灌水・被覆方法を選択することが重要となります。

以下では、主にエタノール水溶液を用いた土壤還元消毒について、これまでの知見から想定される消毒メカニズム、土壤くん蒸剤と比較したときの利点、実施の方法及び実証試験の結果等について紹介します。「低濃度エタノールによる土壤還元消毒マニュアル」と併せて、実際の現場への導入の一助となることを期待しています。

#### 2.2.1 物理化学的要因

低濃度エタノールによる土壤還元消毒法では、土壤中の酸素濃度や酸化還元電位が低下し、酢酸や酪酸等の有機酸が生成してきます（図 2-1、-2）。これらに加え、エタノールなどが作用機作に係わる主な要因として考えられてきましたが、実際の暴露レベルを考慮した単独の評価では、十分にこれを説明することはできませんでした。そこで還元化の過程で土壤溶液中に生成する遊離金属イオン濃度の推移に着目し、これら遊離金属イオンの病原性微生物低減効果への寄与について検討しました。

農環研ハウス圃場内黒ボク土 4 kg をプラスチックコンテナ（内容積 4.45L）に充填し、異なる濃度（0、0.5、1.0、2.0v/v%）のエタノール水溶液 1L を処理しました。比較対象としてフスマ 30g を混和し、水は同量処理しました。これらを 20℃と 30℃の恒温槽中に 2 週間保持し、ポラスカップにより 1 週間後と 2 週間後の土壤溶液を採

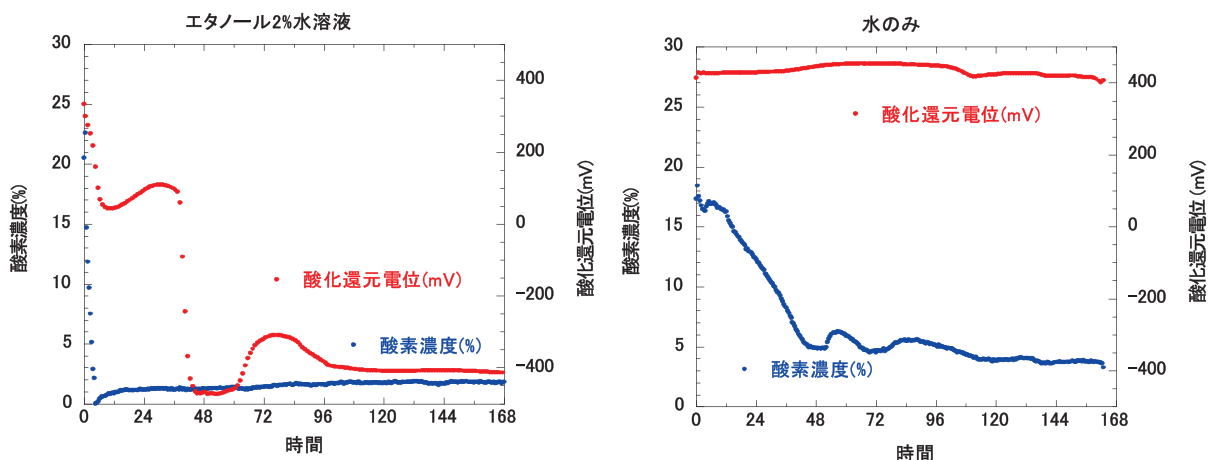


図 2-1 エタノールあるいは水を処理した場合の酸化還元電位と酸素濃度の推移

取しました。土壌溶液中有機酸を HPLC-UV で、遊離金属イオンを ICP-OES で分析しました。また、土壌消毒処理前にパーライトに吸着させたトマト萎凋病菌のバッグを埋設し、1 週間後と 2 週間後に回収し、生残性を評価しました。

その結果、pH と Eh の推移に応じて Mn と Fe の濃度が  $10^3$  倍以上顕著に増加し、溶存卓越化学種の化学形態は  $Mn^{2+}$  と  $Fe^{2+}$  でした (図 2-3)。その他の金属元素は、消毒効果の要因として検討するほどの変動は示しませんでした。Partial Least Squares Regression (PLS 回帰; 偏最小 2 乗回帰) により、得られた環境要因とトマト萎凋病菌の生残性との関係の解析を試みた結果、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、酪酸等の寄与が大きいことが分かりました。

以上で説明したとおり、土壌還元消毒により還元化が促進された土壌水溶液中には、多量の二価マンガンや二価鉄などの金属イオンや、酢酸や *n*-酪酸といった有機酸が高濃度に検出されます。そこで、まずこれらの金属イオンがトマト萎凋病菌の生存におよぼす影響を調査しました。トマト萎凋病菌の Bud cell を  $MnSO_4$  [ $Mn^{2+}$ ] や  $FeSO_4$  [ $Fe^{2+}$ ]、 $Fe_2(SO_4)_3$  [ $Fe^{3+}$ ]、 $MgSO_4$  [ $SO_4^{2-}$ ] を含む水溶液に添加し、 $30^{\circ}C$  で 7 日間静置した後、希釈平板法により生存菌数を測定しました。

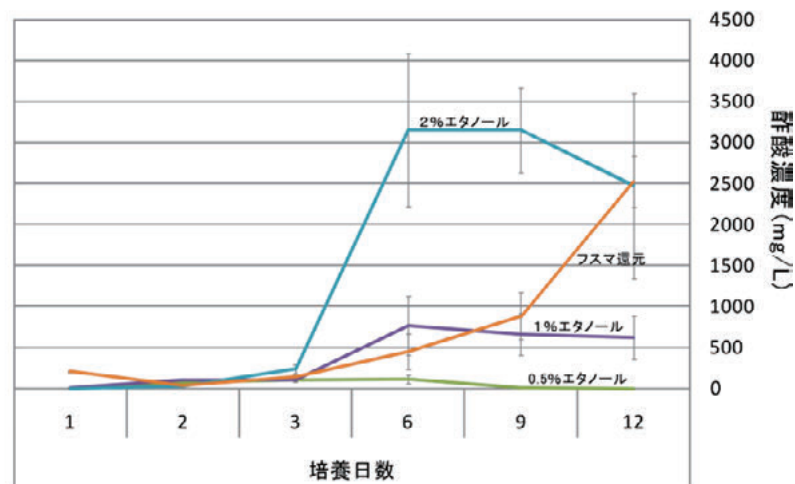


図 2-2 エタノールを処理した場合の酢酸濃度の推移

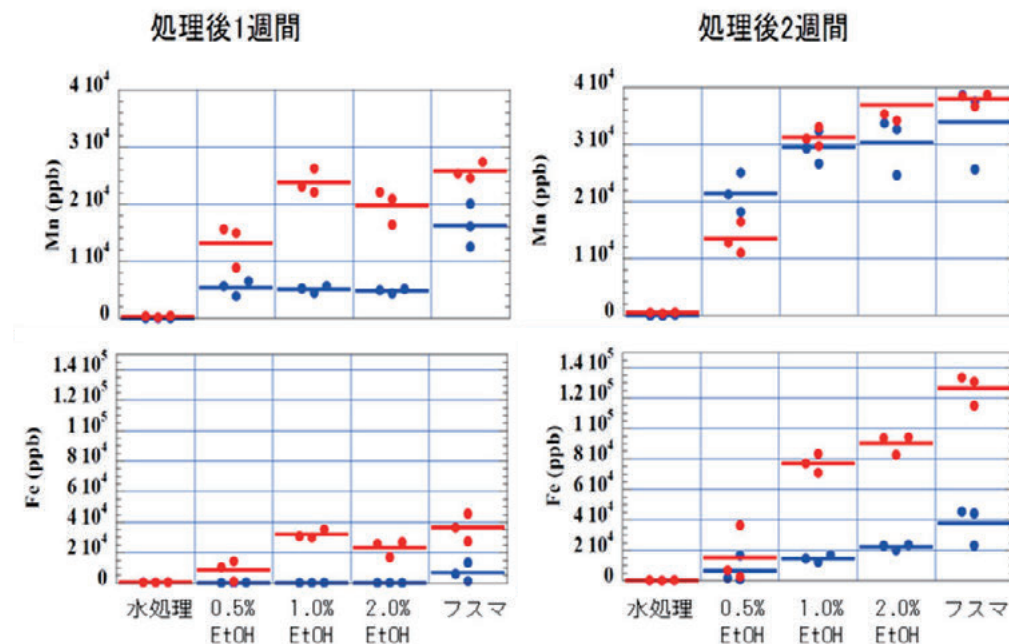


図 2-3 還元処理土壌における金属イオン濃度の推移

その結果、MgSO<sub>4</sub> 処理区では 1% という高濃度で処理した場合にも、病原菌の抑制は全く認められませんでした（表 2-1）。一方、MnSO<sub>4</sub> 及び FeSO<sub>4</sub> では、それぞれ 0.01% と 0.001% の処理区で病原菌の生存が完全に抑制されました。Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> では 0.1% という高濃度で処理した場合に、やはり病原菌の生存が完全に抑制されました。このことは、この試験で観察された病原菌の生存抑制は、Mn<sup>2+</sup> や Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> による影響であることを示しています。鉄イオンは通常の畑状態では Fe<sup>3+</sup> として土壌粒子に吸着しており、還元条件下では Fe<sup>2+</sup> として土壌水中に溶解しています。マンガンについても、還元条件下では Mn<sup>2+</sup> として土壌水中に溶解しています。以上のことから、Mn<sup>2+</sup> や Fe<sup>2+</sup> といった金属イオンが、土壌還元消毒によるトマト萎凋病菌の密度抑制効果に関与していることは十分に考えられることです。

金属イオンや有機酸を単に土壌へ添加することでは土壌還元消毒の効果を再現することはできません。これには、土壌 pH が大きく関与していると考えられます。片瀬・牛尾（2010）は、酢酸の殺線虫効果が水溶液の pH に大きく依存していることを報告しています。金属イオン、とくに Fe<sup>2+</sup> でも、低 pH 条件では酸化による Fe<sup>3+</sup> への変換が抑制される。片瀬・牛尾（2010）は、土壌還元消毒では、土壌 pH がわずかに低下するものの、酢酸が十分な活性を示す値まで低下することはないことを報告していますが、同時に、土壌有機物の近傍ではより多くの有機酸が産生され、土壌 pH も十分に低下している可能性を論じています。病原体も有機物であるので、その近傍ではこのような現象が起きているかもしれません。いずれにしても、土壌 pH と有機酸、金属イオンとの関連についてはまだ多くの検討課題が残されています。

表 2-1 金属イオンがトマト萎凋病菌の生存におよぼす影響

処理区	% (w/w)	病原菌密度 [log CFU/ml (±SE)]		
		1 日目	4 日目	7 日目
蒸留水	—	—	—	4.8 (0.0)
MgSO <sub>4</sub> [SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	1.0	—	—	4.8 (0.0)
	0.1	1.9 (0.1)	0	0
FeSO <sub>4</sub> [Fe <sup>2+</sup> ]	0.01	3.5 (0.0)	0	0
	0.001	4.2 (0.0)	2.1 (0.1)	0
	0.1	3.6 (0.0)	1.6 (0.0)	0
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> [Fe <sup>3+</sup> ]	0.01	4.0 (0.0)	3.8 (0.0)	3.8 (0.0)
	0.001	4.2 (0.0)	4.3 (0.0)	4.3 (0.0)
	0.1	2.5 (0.0)	0	0
MnSO <sub>4</sub> [Mn <sup>2+</sup> ]	0.01	2.6 (0.0)	0	0
	0.001	3.5 (0.0)	2.6 (0.0)	1.9 (0.1)

## 2.2.2 生物学的要因

低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒においても、これまでの小麦フスマ等を用いた土壌還元消毒と同様に、実施時の地温が消毒効果に大きく影響します。そこで、農業環境技術研究所の試験圃場から採取した黒ボク土壌を用い、異なる培養温度条件下でのトマト萎凋病菌に対する消毒効果を検証しました。土壌 4 kg をプラスチック容器に充填し、トマト萎凋病菌の Bud cell 懸濁液を吸着させたパーライト粉末を詰めたナイロンメッシュのバッグを接種源として埋設しました。そこへ、所定の濃度 (%v/v) に調製したエタノール水溶液を加え、蓋を密閉して 20°C、30°C で 2 週間にわたり培養しました。その後、接種源を回収し、西村培地 (Fo-G1 培地) を用いた希釈平板法により生存菌密度を測定しました。

その結果、30°C で培養した土壌では、病原菌の密度が検出限界以下にまで低下していたのに対し、20°C で培養した場合には、このような菌密度の抑制作用は得られませ

んでした（表 2-2）。このことから、低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒では、フザリウムを対象とした場合には、30℃以上の地温が獲得できる時期に実施することで、安定した消毒効果が期待できると考えられます。

千葉県農林総合研究センター北総園芸研究所東総野菜研究室砂地試験地の試験圃場より採取した壤質砂土、鳥取県農林水産部農林総合研究所農業試験場の試験圃場より採取した黒ボク土、岐阜県中山間農業研究所の試験圃場より採取した粗粒灰色低地土を用いた試験でも、概ね 30℃の培養温度で病原菌に対する安定した密度抑制効果が認められています（表 2-3）。これまでの研究において、土壌微生物群の働きが土壌還元消毒の消毒効果には必須であることが論じられてきました（門馬 2005）。このことは、低濃度エタノールによる土壌還元消毒においても同様で、あらかじめオートクレーブ滅菌（121℃、60 min）した土壌に病原菌とエタノールを添加し、30℃で培養しても消毒効果が得られませんでした（Momma 2010）。

表 2-2 低濃度エタノール処理によるトマト萎凋病菌の生存抑制効果

処 理 区	病原菌密度 <sup>1</sup>	
	30℃	20℃
初期菌数	7.97	7.18
無 処 理	7.68 (0.01)	7.25 (0.02)
水 処 理	2.58 (0.06)	6.70 (0.02)
2% エタノール	ND	5.21 (0.02)
1% エタノール	ND	5.65 (0.01)
0.5% エタノール	ND	5.81 (0.04)
小麦フスマ <sup>2</sup>	ND	2.90 (0.07)

<sup>1</sup> log CFU/g dry perlite (±SE)

<sup>2</sup> 土壌 4 kg に対し 30 g の小麦フスマと 1 L の蒸留水を添加した。

表 2-3 国内各地から採取した土質の異なる土壌に対する低濃度エタノール処理の効果

処 理 区	鳥 取		岐 阜		千 葉
	30℃	25℃	30℃	25℃	25℃
初期菌数	6.43		7.32		7.27
無 処 理	—	—	—	—	5.77 (0.03)
水 処 理	3.18 (0.06)	4.54 (0.06)	4.50 (0.03)	6.45 (0.02)	2.31 (0.10)
2%エタノール	ND	2.63 (0.06)	ND	4.34 (0.07)	ND
1%エタノール	ND	2.02 (0.22)	ND	4.06 (0.00)	ND
0.5%エタノール	ND	1.79 (0.20)	ND	5.31 (0.02)	ND
0.25%エタノール	—	—	—	—	ND
糖 蜜	ND	2.83 (0.03)	ND	5.66 (0.01)	—
小麦フスマ	ND	1.95 (0.18)	ND	3.77 (0.13)	ND

単位 : log CFU/g dry perlite (±SE)

表 2-4 低濃度エタノール処理がトマト萎凋病菌の厚膜孢子及び嫌気性細菌の密度に及ぼす影響 (Momma 2010 より抜粋改変)

処 理 区	菌密度 {log CFU/g dry soil (±SE)}				
	3 日 目	6 日 目	9 日 目	12 日 目	15 日 目
<b>トマト萎凋病菌</b>					
無 処 理	-	-	-	-	5.01 (0.06)
水 処 理	3.10 (0.09)	2.57 (0.16)	3.09 (0.10)	3.96 (0.03)	3.67 (0.01)
0.5%エタノール	2.96 (0.07)	3.54 (0.01)	ND	ND	ND
1% エタノール	1.39 (0.16)	ND	ND	ND	ND
2% エタノール	ND	ND	ND	ND	ND
<b>嫌気性細菌</b>					
無 処 理	-	-	-	-	5.67 (0.03)
水 処 理	6.01 (0.05)	6.14 (0.04)	6.19 (0.04)	6.15 (0.02)	5.61 (0.10)
0.5%エタノール	6.72 (0.05)	7.43 (0.03)	6.82 (0.02)	7.14 (0.02)	5.83 (0.01)
1% エタノール	6.36 (0.04)	7.43 (0.02)	6.35 (0.01)	7.49 (0.01)	5.86 (0.11)
2% エタノール	7.32 (0.04)	6.17 (0.06)	6.45 (0.03)	6.39 (0.03)	5.93 (0.07)

そこで、土壤還元処理土壌中におけるトマト萎凋病菌と土着微生物群の密度の経時変化を調査しました。農環研黒ボク土壌 4 kg を充填したプラスチック容器にトマト萎凋病菌の厚膜孢子で調製した接種源（作成法は前項参照のこと）を埋設し、所定の濃度に調製したエタノール水溶液を加え、30℃で 15 日間にわたり培養しました。この間、3 日おきに接種源を取り出し、病原菌の生存数を測定するとともに、接種源近傍の土壌を採取し、土壤希釈平板法により糸状菌、細菌（嫌気性・好気性）密度を測定しました。また、PCR-DGGE 法により細菌群集構造の推移も調査しました。

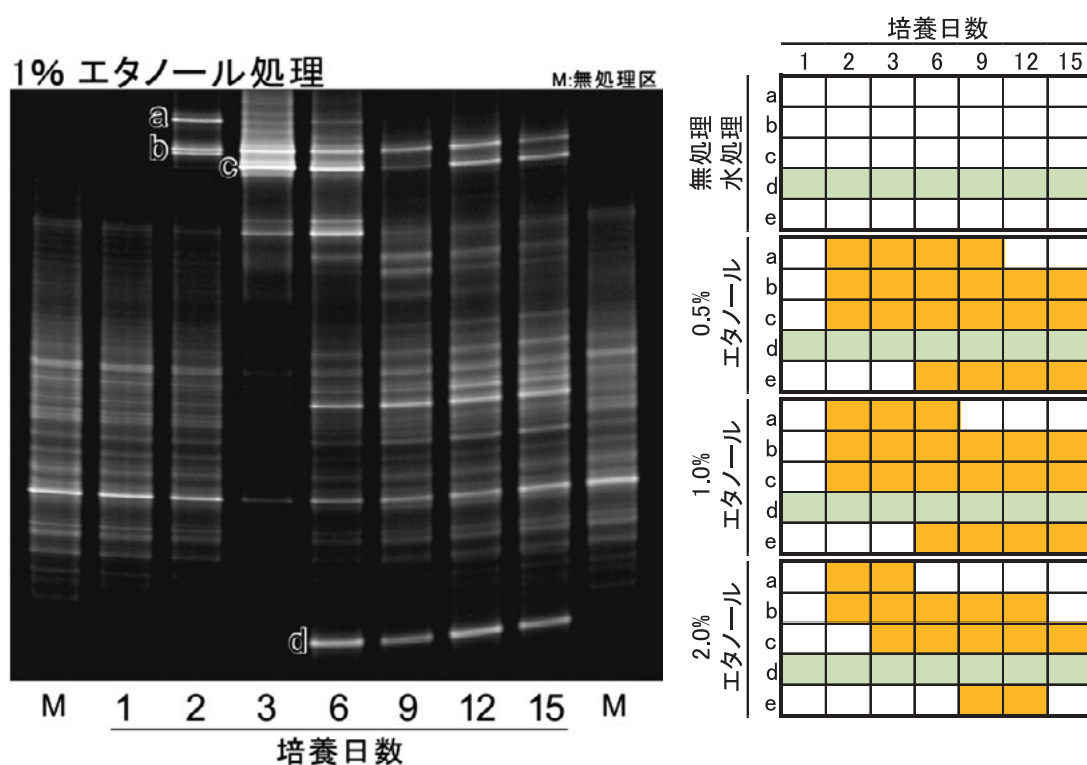


図 2-4 細菌群をターゲットとした PCR-DGGE 解析. 左: 1% エタノール処理区のパンドパターンの推移、右: エタノール処理区に特徴的なバンドの出現時期. a、b、c、d は左図のバンド a、b、c、d に対応.

その結果、低濃度エタノールによる土壌還元消毒はトマト萎凋病菌の厚膜胞子に対しても高い生存抑制作用を示し、用いる濃度が高くなるのに伴い、検出されなくなるまでの日数が2%、1%、0.5%処理区でそれぞれ3、6、9日間と短くなりました（表2-4）。このとき、2%処理区では3日目、1%と0.5%処理区では6日目に嫌気性細菌群の密度が大幅に増加していました。これは土壌中に生息する細菌群が土壌還元消毒の密度抑制効果において、何らかの働きを担っていることを強く示唆する結果です。

そこで、細菌群を対象としたPCR-DGGE解析を実施しました。無処理区や水処理区では15日間にわたり一貫して同様のバンドパターンを示したため、無処理区のサンプルをマーカー代わりとし、エタノール処理区とバンドパターンと比較しました。その結果、エタノール処理区では培養初期にのみ検出されるバンド、培養初期から終了まで検出されるバンド、処理中期から終了まで検出されるバンドなど、無処理区では検出されないバンドが多数認められました（図2-4）。

### 2.3 土壌含水比と土壌還元消毒効果

低濃度エタノール水溶液による土壌還元消毒を行う際、処理前の土壌が乾燥気味だと消毒効果が不安定になることがあります。土壌還元消毒では、土壌環境の還元化とその引き金となる土壌微生物群の働きが消毒効果を左右する要因です。乾燥気味の土壌では、酸素の遮断が不十分となるうえに、土壌微生物群の活性が低いいため、土壌の還元化が緩慢になります。さらに、いわゆる水の通り道ができ、エタノール水溶液が均一に浸透しなくなり、消毒効果にムラが生じることになります。

農業環境技術研究所の黒ボク土壌をあらかじめ風乾しておいたものと、圃場から採取した直後（生土）のものをそれぞれ4kgずつプラスチック容器に充填し、1Lのエタノール水溶液（0.5、1.0%）を加え、密閉し30°Cで2週間保管しました。このとき、線虫密度と埋設しておいたトマト萎凋病菌密度、*F. oxysporum*の密度を測定しました。

その結果、風乾土を用いた場合には、線虫数及びトマト萎凋病菌数ともに、処理前よりも増加していたのに対し、生土を用いた場合には、いずれも処理前と比較して顕著に減少していました（表2-5）。また、風乾土では酸化還元電位もほとんど低下していませんでした。

以上の結果より、低濃度エタノール水溶液による土壌還元消毒を実施する際には、圃場が乾燥気味の場合には、あらかじめ灌水するなどの工夫を講じることが望ましいと考えられました。

表2-5 含水比の異なる土壌における低濃度エタノール処理の効果

処理	含水比	線虫数 (頭/20g 土 壤)	萎凋病菌 <i>F. oxysporum</i> (Log CFU/g dry matter)
風 乾 土	処理前	36	6.1
	0.50%	57	6.3
	0.50%	108	6.7
	1.00%	142	6.7
	1.00%	171	6.8
生 土	処理前	400	6.1
	0.50%	44	4.9
	0.50%	1	<2.3
	1.00%	12	<2.3
	1.00%	11	<2.3

各処理区とも2反復で行った。

含水比=水重量/乾土重

## 2.4 土壌くん蒸剤との違い

### 2.4.1 土壌消毒処理が土壌微生物におよぼす短期的な影響

農業環境技術研究所の試験圃場において、各種の土壌消毒法が土壌微生物におよぼす影響を調査しました。クロルピクリン処理及び低濃度エタノールによる土壌還元消毒処理は、ともにトマト萎凋病菌に対して、菌密度の低減効果が極めて高いことが分かりました（図 2-5）。このとき、土壌くん蒸剤処理区では、無処理区と比較して、一般糸状菌数が検出されなくなったのに対して、低濃度エタノール処理では顕著な菌数の変化は認められませんでした。また、一般細菌についても、処理にかかわらず処理区間で顕著な差は認められませんでした。

### 2.4.2 土壌消毒処理が土壌の発病抑止性と土壌微生物におよぼす長期的な影響

埼玉県の美里町の土壌に対し、1%エタノールによる土壌還元消毒及びクロルピクリンによる土壌くん蒸を施しました。これらの処理土壌と無処理の土壌にトマト萎凋病菌を添加し、土壌消毒後に再汚染が生じたときの状況を再現しました。そこでトマトを5週間に渡り2回育苗し、トマト萎凋病の発生程度を調査しました。また、トマト苗移植直前、各育苗期間終了時点の一般土壌糸状菌数を測定しました。

その結果、クロルピクリン処理区ではトマト萎凋病の発生が助長されたのに対し、1%エタノール処理区では無処理区と同定度に発病が抑制されました（図 2-6）。

このときクロルピクリン処理区では、他の2処理区と比較して糸状菌数が顕著に

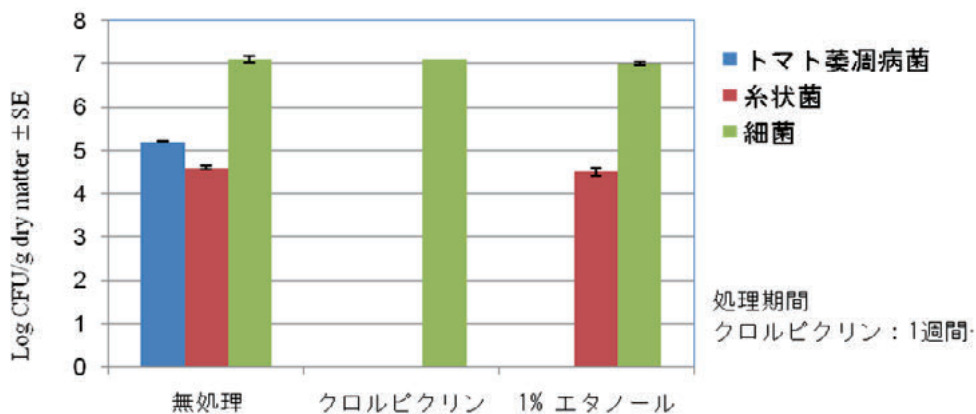


図 2-5 土壌くん蒸と低濃度エタノール処理が土壌微生物群におよぼす影響

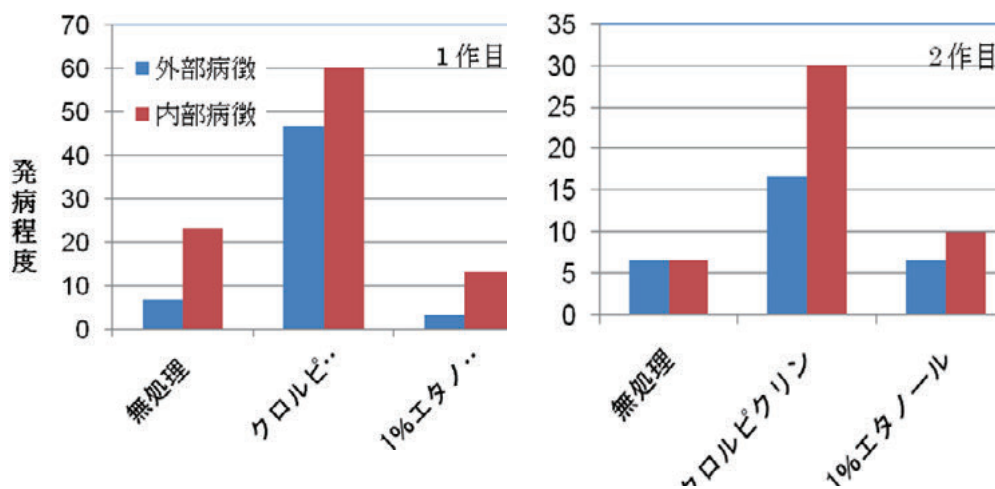


図 2-6 土壌消毒後に再汚染した土壌におけるトマト萎凋病の発生におよぼす影響

発病程度 =  $\sum \{ (\text{階級値} \times \text{当該個体数}) / 3 \times \text{供試個体数} \} \times 100$

外部病徴 0: 健全、1: わずかに黄化、2: 顕著に黄化・萎凋、3: 枯死

内部病徴 0: 健全、1: 導管の一部が褐変、2: 導管の半分が褐変、3: 枯死

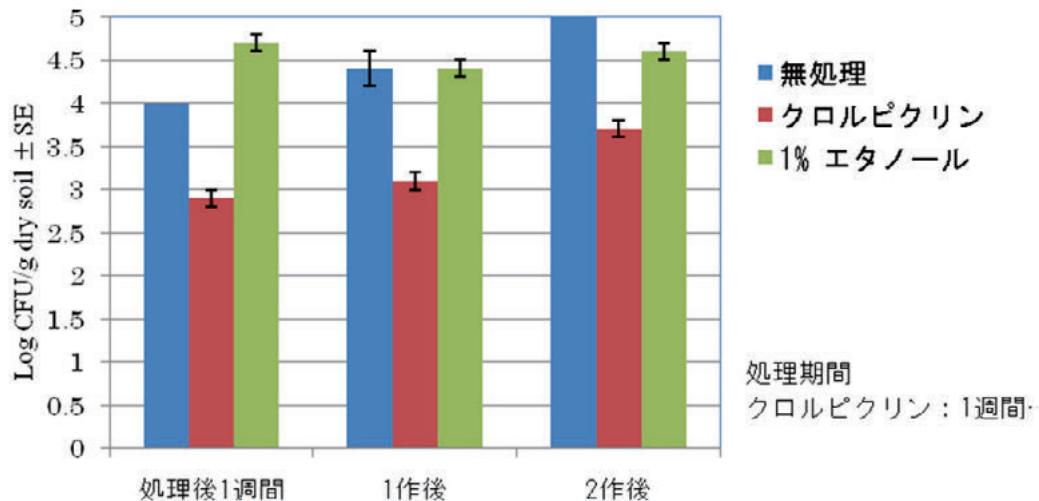


図 2-7 土壌くん蒸と低濃度エタノール処理が土壌糸状菌におよぼす影響  
 少なく、2 作後もその数が十分に回復することはありませんでした（図 2-7）。このことから、クロルピクリン処理では糸状菌の密度が低下することにより、病原菌に対する競合作用が低下し、結果として病害の発生が助長されたものと考えられました（門馬 2011）。一方、低濃度エタノール処理では、このような悪影響は認められませんでした。

## 2.5 まとめ

低濃度エタノール水溶液を利用した土壌還元消毒法は、小麦フスマや米糠といった固形物や糖蜜のような粘性の高い資材を用いた土壌還元消毒と比較して、処理法が簡便なこと、土壌の深い部分まで消毒が可能なこと、処理後の肥培管理が容易であるといった利点があります。また、土壌くん蒸剤による土壌消毒と比較して、土壌微生物群におよぼす影響がマイルドであり、病原菌の再汚染によるリスクが小さいことも特長です。

土壌還元消毒による作物の増収効果は、主に土壌中の病原体や雑草の密度抑制によるものです。低濃度エタノールによる土壌還元消毒法では、エタノールを引き金にして土壌微生物群が活性化され、それに伴い土壌環境が変化（酸化還元電位・pH の低下）し、酢酸や酪酸などの有機酸や  $Fe^{2+}$  や  $Mn^{2+}$  といった金属イオンが生成します。この一連の過程で、病原体の生存が強く抑制されます。このことから、本法の消毒効果の増進には、土壌微生物の活性化を促進するために、十分な温度を確保すること、適切な濃度のエタノールを用いること、さらに、還元化を促進するために、酸素の供給を遮断することが重要になります。

本法で用いるエタノールは、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揃っています。さらに、処理終了後は、殺菌作用に関連する有機酸は速やかに分解消失し、金属イオンも酸化され元の形態に戻ります。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、安全性の高い技術だということがわかります。

（（独）農業環境技術研究所 小原裕三、（財）日本園芸生産研究所 門馬法明）

## 3. 使ってよい作物と土壌還元消毒効果のある病害虫・雑草

これまでに行われた試験結果の概要は下表の通りです。直まきする作物のうち、ハウレンソウのように湿害による発芽阻害を受けやすい作物についてはとくに注意が必要です。また、十分な地温（30°C以上）を十分な期間（2 週間以上）確保することができないような栽培体系では適しません。

土壌の種類ごとに最適な処理液量は異なります。黒ボク土壌と比較すると、水はけの良い



砂地土壌ではより少ない処理液量でも同等の効果が得られることが明らかにされています。また、処理液量が多いほど土中深くまで還元消毒効果が現れるので、作物の根域の深さや病害の種類に応じて液量を調整することが必要です。

低濃度エタノール処理による病害抑制作用は、主因である病原体の密度低減によるものです。ある病原体について低濃度エタノール処理による密度低減効果が確認されている場合には、その病原体が侵す全ての作物に対して病害抑制効果が期待できると考えられます。たとえばこれまでに病原性の *Fusarium oxysporum* による病害に対して抑制効果が確認された事例としては、ハウレンソウ萎凋病、イチゴ萎黄病の2病害のみで、いずれも低濃度エタノール処理により *F. oxysporum* が検出限界以下に低下することが明らかにされています（表3-1）。したがって、低濃度エタノールを利用した土壌還元消毒によって病原性の *F. oxysporum* によって引き起こされるその他の多くの病害についても同様の効果が十分に期待できます。

このことは、ネコブセンチュウやネグサレセンチュウによる病害についても同様です。シストセンチュウについての調査事例はありませんが、土壌還元消毒を施した土壌ではセンチュウがまったく検出されなくなるので、同様の効果が期待できるものと予想されます。

また、多くの1年生畑地雑草の発生も一般的な土壌還元消毒処理と同様のレベルで抑制されま  
す。したがって、湿性雑草や多年生雑草には土壌還元消毒効果は劣ります（図3-1）。しかし、低濃度エタノール処理による土壌還元消毒を繰り返すことで、雑草の発生量は年々減少していくことも明らかにされています。

作物	対象病害等	引用元
ウリ科野菜※1	ホモプシス根腐病	千葉・神奈川県
カーネーション	萎凋細菌病	神奈川県
ハウレンソウ	萎凋病	岐阜県
イチゴ	萎黄病・炭疽病	徳島県
トマト	褐色根腐病	北海道
ブロッコリー	根こぶ病	埼玉県
ルリトウワタ	疫病	高知県
キュウリ	ネコブセンチュウ	千葉・神奈川県

※1：ウリ科野菜：カボチャ、キュウリ、スイカ、メロンなど  
※2：地温が低いほど高濃度が必要。

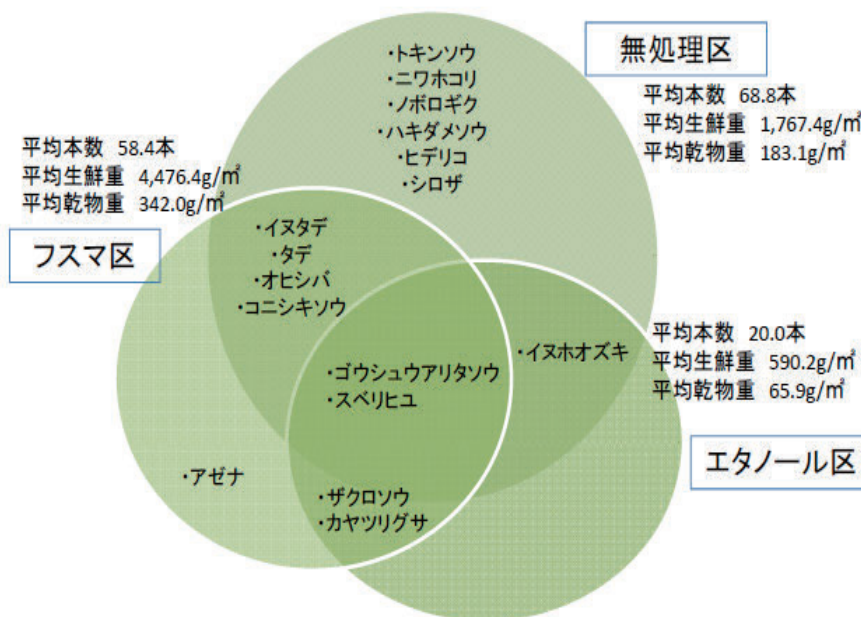


図3-1 消毒終了後2週間で生育した雑草

(H21 埼玉県農林総合研究センター園芸研究所露地野菜担当)

((独) 農業環境技術研究所 小原裕三、(財) 日本園芸生産研究所 門馬法明)