

*Bacillus subtilis*を有効成分とした新規微生物殺菌剤“アグロケア水和剤”について

前田 光紀

Mitsunori Maeda

はじめに

わが国の微生物農薬は1954年のトリコデルマ生菌の登録に始まり、1980年代にはBT剤が登録され始めた。その後、環境保全型農業が重要視され始めた1990年頃から新規剤の開発が盛んになり、環境保全型農業を担う中核的資材として期待されてきている。

微生物農薬は、効力が不安定で保存性が劣り、使用方法が難しく気象条件に影響を受け易いなど多くの欠点が挙げられ、農家が積極的に使用するに躊躇する面がある。しかし、ポジティブリスト規制対象外となる他に農薬使用回数にカウントされず、減農薬に結びつき、化学農薬耐性菌や抵抗性害虫にも有効であり、耐性菌率を低下させたという報告もある（川根、2000）¹⁾など多くの利点も併せ持っている。

アグロケア水和剤については、本年度5月29日に北海道大学で開催された日本農薬学会第35回大会にて“新規微生物農薬殺菌剤アグロケア水和剤の開発”と題して発表した。本報ではその内容について改めて紹介する。

アグロケア水和剤の開発経緯

アグロケア水和剤の有効成分である*Bacillus subtilis* HAI-0404株は、弊社研究所がある静岡県牧之原市の茶葉から分離・採取された。2009年2月に新規農薬登録を申請し、同年11月18日付で農薬登録（農林水産省登録：第22516号）を取得し、翌年2月より販売を開始した。

アグロケア水和剤の登録内容

性状

登録番号：農林水産省登録 第22516号

有効成分：バチルス ズブチリス

HAI-0404株の生芽胞 5×10^9 cfu/g

性状：類白色水和性粉末

剤型：水和剤

有効年数：4年（常温）

適用病害虫名および使用方法：表1に示す

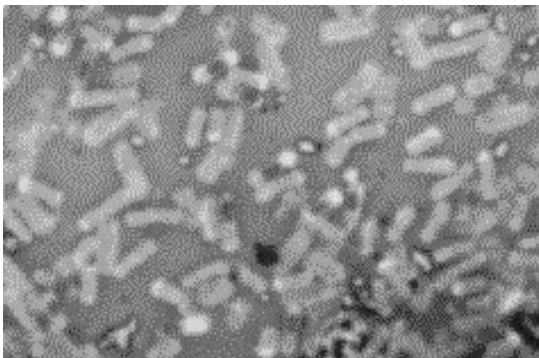


図1 HAI-0404株

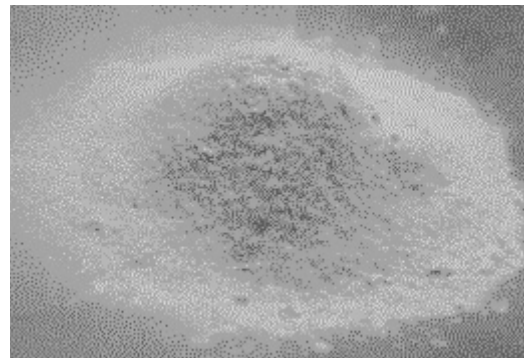


図2 アグロケア水和剤

表1 アグロケア水和剤の適用作物、病害および使用方法

作物名	適用病害虫名	希釈倍数	使用液量	使用時期	本剤の使用回数	使用方法	バチルス　ズブチリスを含む農薬の総使用回数
野菜類 (トマト、ミニトマト、食用ゆりを除く)	灰色かび病 うどんこ病	1,000～2,000倍	100～300 L/10a	収穫前日まで	－	散布	－
トマト ミニトマト		1,000倍					
食用ゆり	灰色かび病 うどんこ病	1,000～2,000倍					
	葉枯病	1,000倍					
ガーベラ	うどんこ病						
ペチュニア							
かんきつ	灰色かび病	1,000～2,000倍	200～700 L/10a				
なし	黒星病						

2010年5月26日現在

室内選抜試験

弊社研究所内の試験圃場茶園の茶葉から微生物を分離し、灰色かび病を対象に病害防除活性を有する菌株を選抜した。その中で、HAI-0404株が先行剤に優る

灰色かび病防除活性を有しており、開発候補菌株として選抜した。

表2 室内選抜試験結果（インゲン灰色かび病）

供試菌株	供試微生物数 (cfu/ml)	病斑直径(mm)	防除価
HAI-0404株	1.0×10^8	0.0	100.0
	1.0×10^7	0.0	100.0
バチルスA剤	1.0×10^8	0.0	100.0
	1.0×10^7	1.0	86.0
無処理	－	21.5	

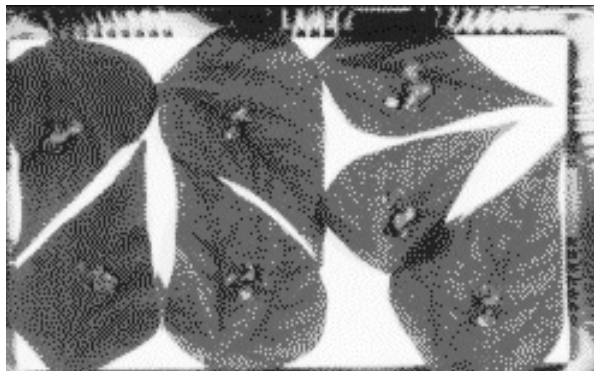


図3 HAI-0404株のインゲン灰色かび病防除試験結果



図4 無処理

HAI-0404株の同定

16SrDNA解析結果を元に系統樹を作成した(図5)。その結果、HAI-0404株は、*B. subtilis*や*B. licheniformis*等の種に系統的に近いことがあきらかとなった。次に種の特定のため、API50CH等を用いて種々の生化学的性状検討を実施した。HAI-0404株は、グラム陽性の桿菌でカタラーゼ反応は陽性、酸化的に酸を生成し、バチルス型の内生孢子を形成することが明らかとなった。また、API50CHの結果を元にAPIWebのデータベースで相同性検索した結果、HAI-0404株は*B. subtilis*

もしくは*B. licheniformis*に相同性が高いことが明らかとなった。そこで、両菌種間の異なる性質 (Peterら)²⁾ (プロピオン酸の利用の有無、55℃での生育の可否、嫌気条件での生育の可否) について検討した結果、HAI-0404株は全てネガティブで*B. subtilis*と同じであることが明らかとなった。これらの結果を総合し、HAI-0404株はバイオセーフティーレベル1である*B. subtilis*と判断し、H17年2月に産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに国際寄託した。

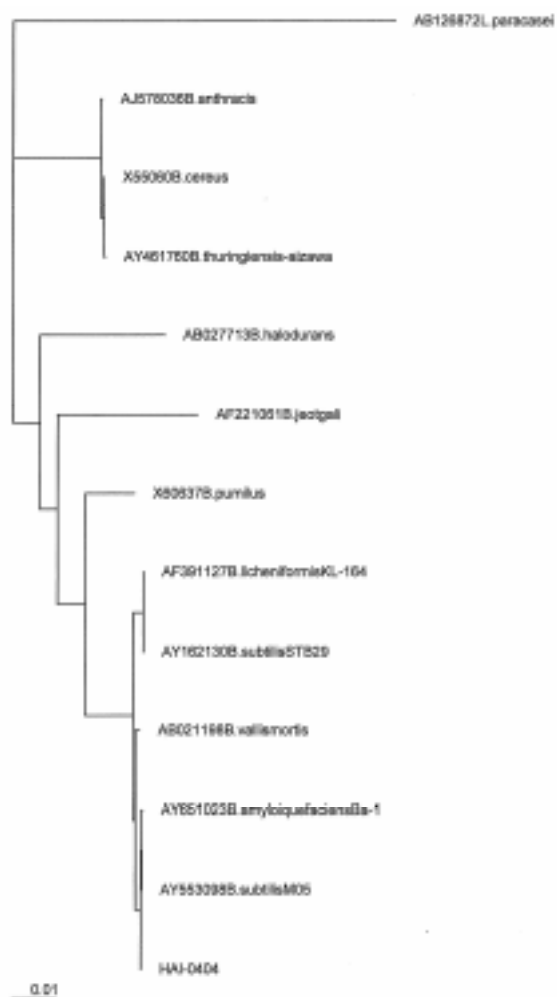


図5 HAI-0404株の系統樹

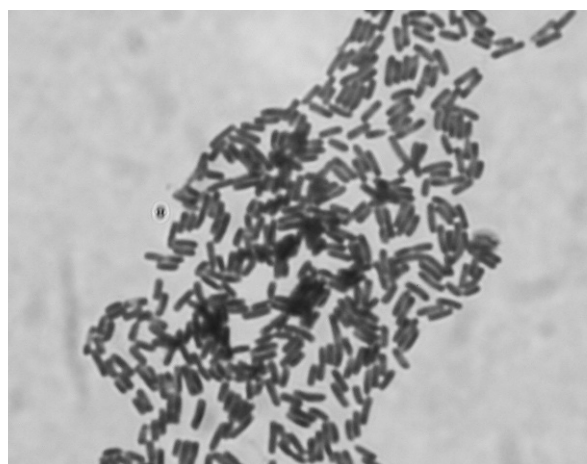


図6 HAI-0404株のグラム染色結果

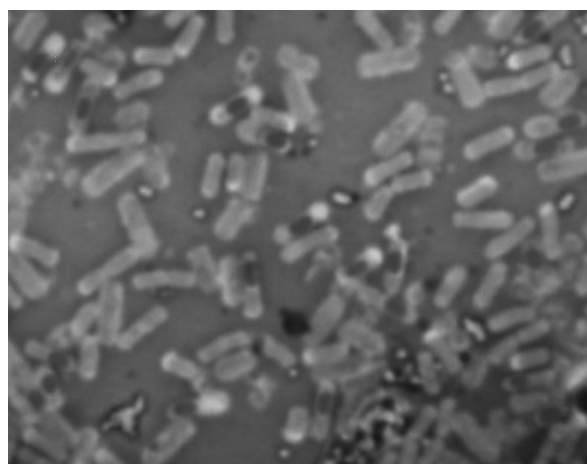


図7 HAI-0404株の孢子染色結果

表3 HAI-0404株の生化学的性状試験結果

試験項目	試験結果
グラム染色	陽性（図6）
カタラーゼ反応	陽性
O-Fテスト	oxidation
孢子形成	バチルス型内生孢子形成（図7）
Glycerol	+
Erythritol	-
D arabinose	-
L arabinose	+
Ribose	+
D xylose	+
L xylose	-
Adonitol	-
β methyl-D xyloside	-
Galactose	-
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
α -methyl-D mannoside	-
α -methyl-D glucoseide	+
N-acetylglucosamine	-

試験項目	試験結果
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	+
Sucrose	+
Trehalose	+
Inulin	-
Melezitose	-
Raffinose	+
Starch	+
Glycogen	+
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D turanose	-
D lyxose	-
D tagatose	-
D fucose	-
L fucose	-
D arabitrol	-
L arabitrol	-
Gluconate	-
2-keto-gluconate	-
5-keto-gluconate	-

+：資化性あり -：資化性なし

安全性試験

HAI-0404株は人畜および環境生物に対して、毒性や病原性等の影響は認められなかった。製剤で軽度の刺激性や感作性が認められたが、何れも毒性や病原性

は認められず、通常の使用において所定の注意事項を守れば、人の健康に影響を及ぼすことはないと判断された。

表 4 安全性試験結果

	試験の種類	供試生物	検体	結 果
人畜毒性	単回経口投与	ラット	原体	感作性，病原性，体内生残性，毒性なし
	単回経皮投与	ウサギ	水和剤	軽度の刺激性あり。経皮毒性なし
	単回経気道投与	ラット	原体	感染性，病原性，体内生残性，毒性なし
	単回静脈内投与	ラット	原体	感染性，病原性，体内生残性，毒性なし
	眼一次刺激性	ウサギ	水和剤	中程度～強度の刺激性あり（但し洗浄効果あり）
	皮膚感作性	モルモット	水和剤	皮膚感作性あり
環境毒性	淡水魚	コイ	原体	影響なし
	淡水無脊椎動物	オオミジンコ	原体	影響なし
	鳥類	ウズラ	原体	影響なし
	植物	標的外10種	原体	影響なし
	昆虫	標的外5種	原体	影響なし
	土壌微生物	真菌，細菌，放線菌	原体	影響なし

実施機関：三菱化学安全科学研究所

アグロケア水和剤の特徴

1) 菌株の特徴

菌株の性質検討の一環として、培養温度と生育量について検討した。HAI-0404株は他の先行微生物剤の菌株と比較して、低温域での生育に優れるということがわかった（図8）。

この特徴が病害防除効果に対して有効に働くか検討したところ、インゲン花器を用いた灰色かび病防除試験の結果、低温でも高い防除価を示すことが明らかとなった（図5、6）。

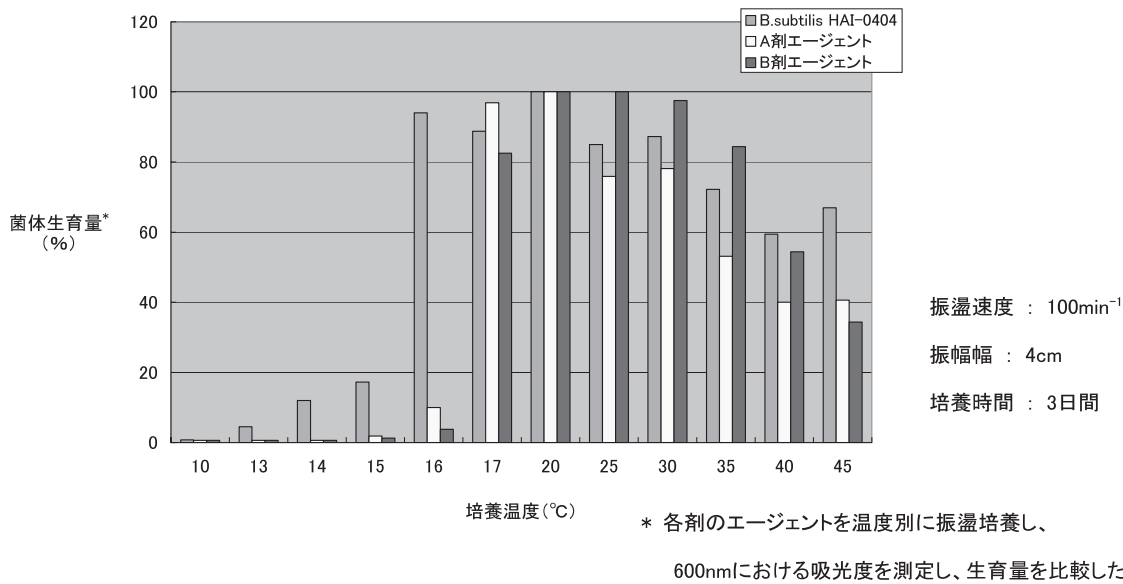


図 8 培養温度と菌体生育量

表5 20℃でのインゲン灰色かび病防除試験結果

供試薬剤名	試験温度	希釈倍数	病斑径(mm)	防除価
アグロケア水和剤	20℃	1,000倍	0.1	99.7
バチルスA剤		1,000倍	0.4	98.8
バチルスB剤		500倍	0.2	99.4
無処理		—	34.4	

表6 16℃でのインゲン灰色かび病防除試験結果

供試薬剤名	試験温度	希釈倍数	病斑径(mm)	防除価
アグロケア水和剤	16℃	1,000倍	8	79.6
バチルスA剤		1,000倍	23.2	41
バチルスB剤		500倍	15.7	60.1
無処理		—	39.3	

次に、夜間低温時期の施設内イチゴ圃場での灰色かび病防除試験を実施した。図9に示したように最低気温は5℃前後と非常に低い条件である。このような条件下でアグロケア水和剤は対照剤に優る防除効果を示し

た(図10)。

アグロケア水和剤は先行剤に比較し、低温時にも高い病害防除効果を発揮することが明らかとなった。

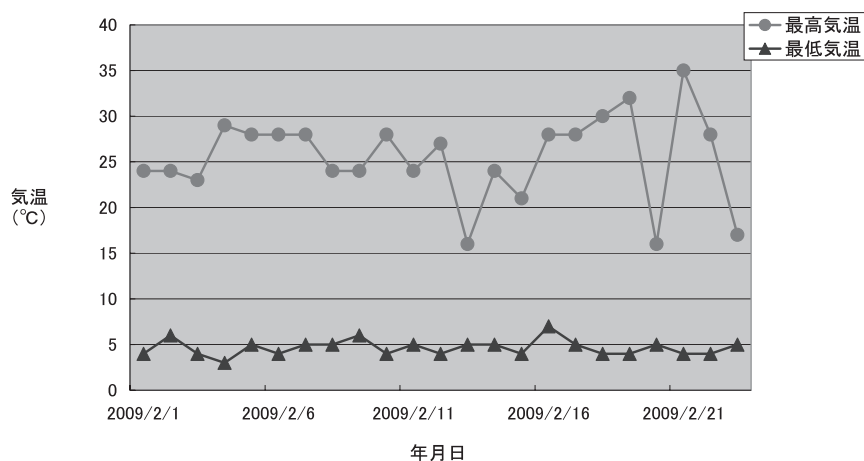


図9 試験期間中の気温変化

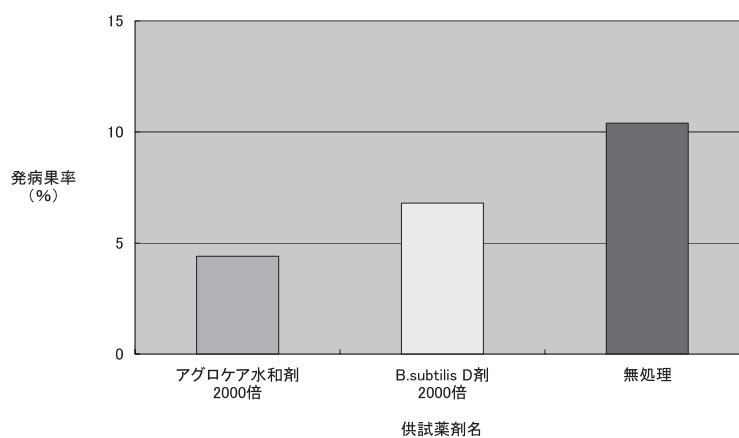


図10 イチゴ灰色かび病防除試験結果

岐阜県植物防疫協会

散布日 : 2009/2/1, 8, 15

調査日 : 2/8, 11, 15, 17

2) 剤の特徴

本剤は収穫前日まで使用可能という登録要件を最大限生かそうと、薬液散布後の作物に対する汚れが少ない製剤の開発を目指してきた。

先行剤A, B, C, D剤の薬液散布後のナス果実は程度の差はあるが薬斑による汚れがはっきりと確認され

た。しかし、アグロケア水和剤散布後のナス果実には、殆ど汚れは確認されなかった。トマトに対しても同様であり、アグロケア水和剤は、散布後の作物に対する汚れは極めて少ないことが確認された。

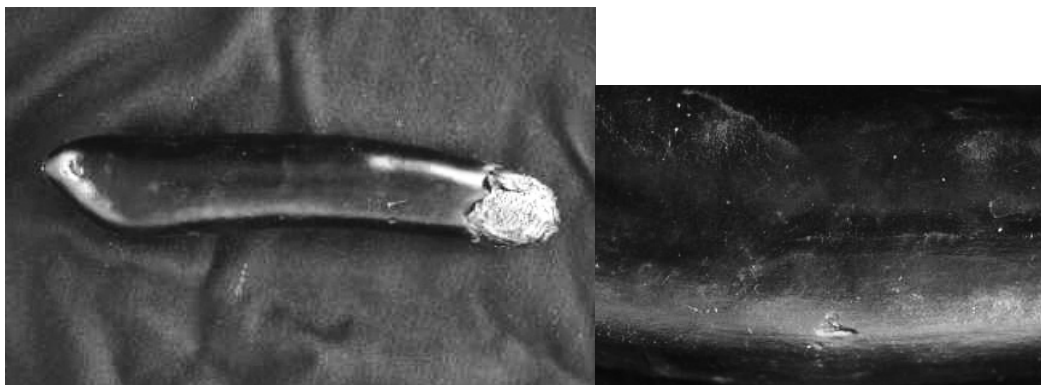


図11 アグロケア水和剤 1000倍

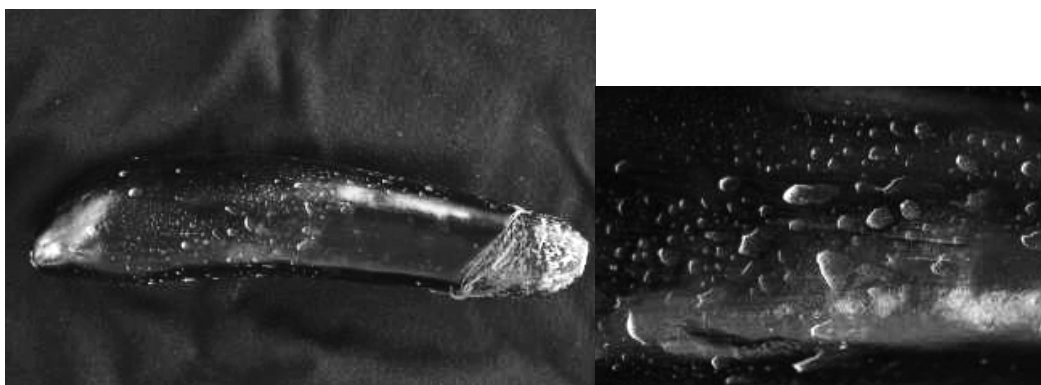


図12 バチルスA剤 1000倍

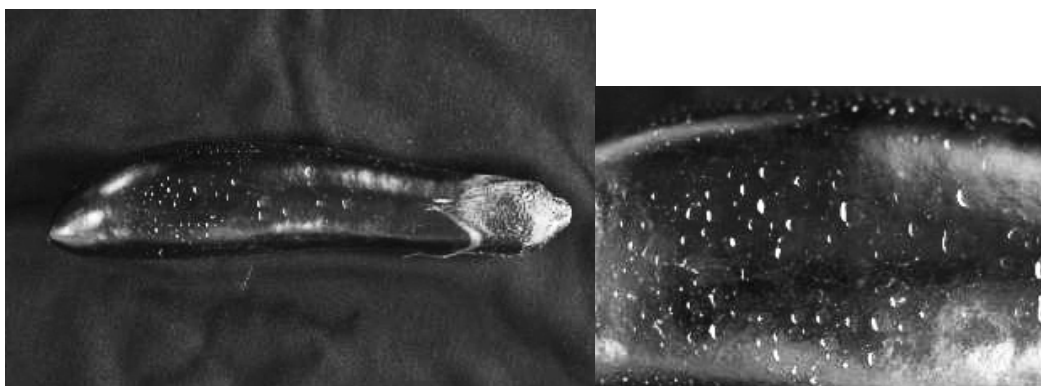


図13 バチルスB剤 500倍

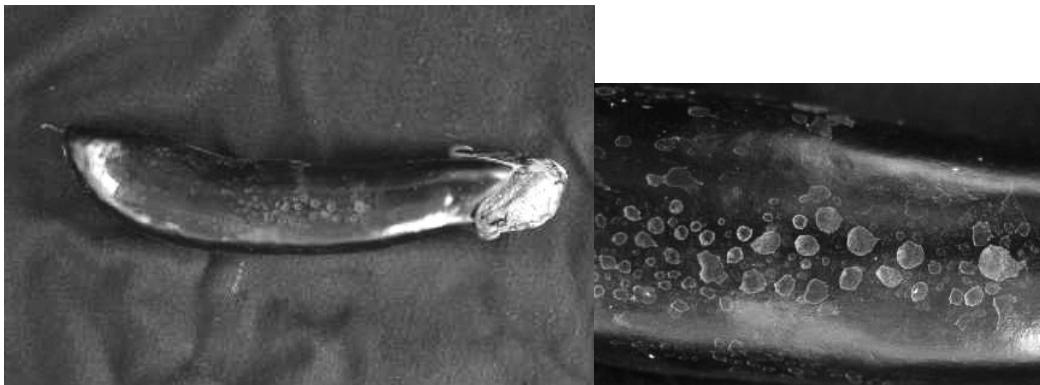


図14 バチルスC剤 1000倍

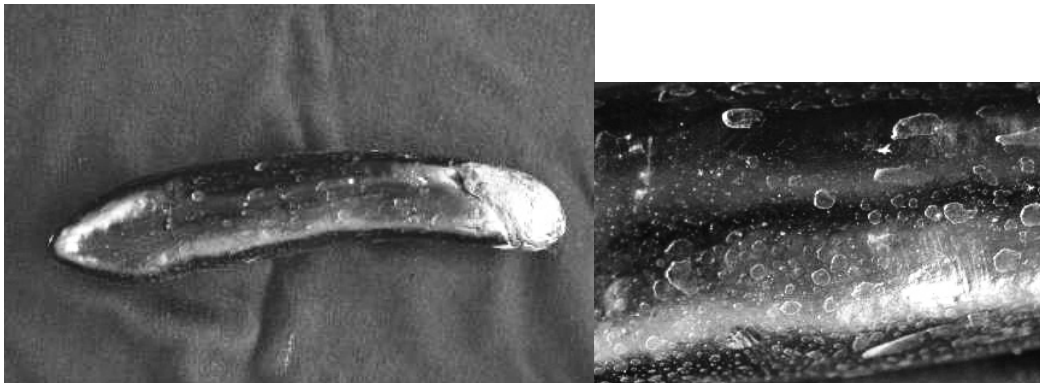


図15 バチルスD剤 2000倍



図16 アグロケア水和剤 1000倍



図17 バチルスA剤 1000倍

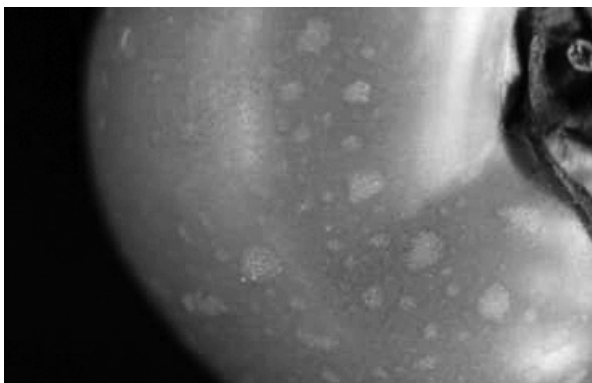


図18 バチルスB剤500倍



図19 バチルスC剤 1000倍

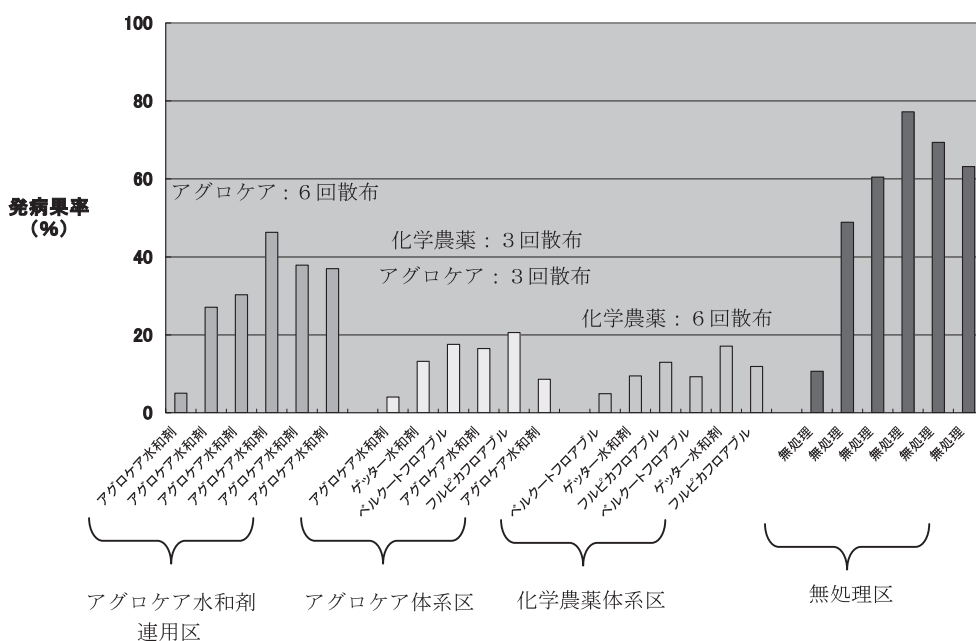


図20 バチルスD剤 2000倍

化学農薬との体系防除

微生物農薬は散布回数に制限がなく、散布回数もカウントされない。化学農薬の耐性菌や抵抗性害虫にも効果を示すなど幾つかの利点があるが、その反面、効果が不安定で低いことや適用適期幅が狭いことなど多くの欠点も持ち合わせている。そこで、アグロケア水和剤の有効な使用方法の1例として、ナス灰色かび病に対する化学農薬との体系防除試験を実施した。

アグロケア水和剤の連続散布区は、化学農薬の体系防除区と比較し、灰色かび病防除効果は低くなる傾向にあったが、アグロケア水和剤と化学農薬との体系防除区は、化学農薬の体系防除区とほぼ同等の灰色かび病防除効果を示した。このように、アグロケア水和剤と化学農薬を体系防除することにより、アグロケア水和剤のみの連続散布より病害防除効果を高め、化学農薬の体系防除と殆ど遜色のない病害防除効果が得られることが明らかとなった。



試験場所：日本曹達(株) 榛原FRC

散布日：2008/11/17, 11/25, 12/1, 12/8, 12/15, 12/21

試験期間：2008/11/17～12/29

図21 ナス灰色かび病に対するアグロケア水和剤と化学農薬体系防除試験

おわりに

本報では、アグロケア水和剤の登録内容や特徴、有効な使用方法例について紹介した。登録作物および病害に対しては、今後、登録農薬の少ない作物の病害にも適用を広げていく予定である。作用機構に関しては、本報ではふれなかったが、本剤を散布すると有効成分である*B. subtilis* HAI-0404株が作物の表面を覆って病原菌と競合し、その栄養と生息場所を奪うことにより病害を予防すると考えている。

このような特徴をご理解頂き、環境保全や多様な防除手段を持つことによる化学農薬の耐性菌発現遅延に貢献できればと願っている。今後も微生物の多様な能力を利用した微生物農薬の製品群の充実に貢献していきたいと考える。

B. subtilis HAI-0404株の同定にあたって、農業環境技術研究所の對馬博士および東京農業大学の篠原博士にご尽力頂いた。末筆ながらこの場をお借りしてお礼申し上げる。

(日本曹達㈱ 研究開発本部

小田原研究所 圃場評価研究部)

参考文献

- 1) 川根 太 (2000). 微生物殺菌剤「ボトキラー水和剤」の開発. 微生物農薬 (山田昌雄編). pp.136-146, 全農協, 東京.
- 2) Peter H. A. Sneath Section 13 Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 1104-1139



新発売!
汚れが少ない微生物農薬!

微生物農薬 殺菌剤
アグロケア 水和剤

●灰色かび病、うどんこ病の防除に!
●従来の微生物農薬と比べ
汚れがとでも少ない!

トマト アグロケア散布 ミニトマト アグロケア散布 ナス アグロケア散布

●無加温ハウスや高冷地でも使いやすい!
低温でも効果を発揮。

有効成分の温度別生育率

温度 (°C)	アグロケア水和剤	日本曹達水和剤
13	0.0	0.0
14	0.0	0.0
15	0.0	0.0
16	0.0	0.0
17	0.0	0.0

⑧ 日本曹達(株)の登録商標