

3. 天敵微生物実用化試験

(1) 不織布に培養した*Beauveria bassiana*の活性度試験

中村健一・陳野好之¹⁾・串田 保¹⁾

〔目的〕

これまで実施してきた*Beauveria bassiana* (以下、*B. bassiana*) を培養した不織布によるマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope)防除試験によって、この防除方法に一定の効果があることが認められた。しかし、*B. bassiana*は糸状菌の一種で、その活性は温度や湿度等の環境条件の変化に大きな影響を受ける。今後、この防除方法を事業化(大量施用)するためには、その活性を保持した状態で現地に輸送したり保存しなければならない。

そこで、これらの方法を確立し、*B. bassiana*を培養した不織布による防除の事業化を目指す。ここでは、*B. bassiana*の培養法および不織布の輸送法や保存法による活性度(孢子形成数、発芽率)の推移を調査した。

なお、この試験は大島支庁産業課大室秀実氏にご協力いただいた。

〔方法〕

まず、試験管培養した*B. bassiana*を1%酵母エキス加用Sabourandしよ糖液体培地(SSY培地)で振とう培養した。そして、この培地(接種源)を1%酵母エキス加用ブドウ糖寒天培地(SDY寒天培地)の寒天を溶かした中に20%混合し、よく攪拌して、43×5cmの不織布に含浸させた。この不織布を恒温恒湿槽内(25℃、80%)に設置したステンレス製の棚に、両面培養は吊るし、片面培養は塩化ビニール製の板の上に置き、7日間培養した(写真-1)。また、棚の中を保湿するため、棚をビニールシートで覆った。培養開始日は1998年9月25日で、終了日は10月2日である。

①培養中の活性度調査

両面ならびに片面培養における、培養中の*B. bassiana*の活性変化を見るため、培養開始3, 6, 7日目に孢子形成数とその発芽率を調査した。また、培養期間が7日を超えた場合の活性変化を見るため、さらに3日間培養期間を延長して調査した。

②輸送、保存および施用後の活性度調査

輸送、保存および現地における施用後の活性変化を見るため、培養後ビニールパック(家庭用真空パック)に封入する方法およびプラカップ(ふた付きプラスチック製カップ、φ110mm×50mm)に丸めて入れる方法(写真-2)により被害地(東京都大島町)に冷蔵(約5℃)で輸送した(10月2日)。現地到着(10月5日)後5℃で10日間保存し、被害地の状況に類似している薄暗い林内に配置した。そして、施用時および施用12, 20, 29, 40, 60日後に孢子形成数とその発芽率を調査した。調査は両面培養、片面培養両方について行い、片面培養は孢子未形成面を布テープで被覆したものと被覆しないものの2種類行った。

孢子形成数は、不織布の表面1.0×1.0cmから白金ループにより孢子を採集し、Tween80を加えた滅菌水1mlが入った管ビンに入れ、よく攪拌してから血球計算盤により数えた。

1) (財)林業科学技術振興所多摩事務所

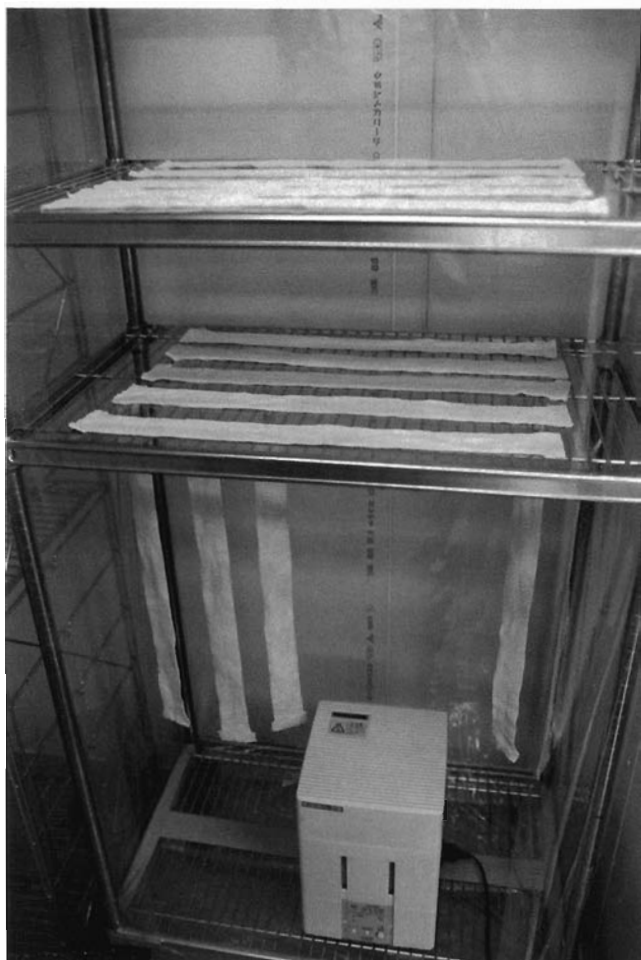


写真-1 不織布に培養中の *Beauveria bassiana* (上：片面培養、下：両面培養)



写真-2 輸送前の不織布 { 上：プラカップ、右：ビニールパック
左：両面培養、中央：片面培養（被覆有）、右：片面培養（被覆無） }

胞子の発芽率は、白金耳で不織布上の胞子をかきとり、シャーレ内のSDY寒天培地に擦りつけ、コンラージ棒で拡散させた。そして、25℃で約20時間培養した後、発芽胞子及び不発芽胞子を数え発芽率を求めた。

〔結果〕

①培養中の活性調査

培養中における胞子の形成数ならびに発芽率を表-1に示す。

培養開始3日目において不織布の全面に菌糸が繁殖し、片面培養では胞子の形成が見られた。片面培養のほうが両面培養に比べ胞子形成が早かった。培養開始7日目には両方ともほぼ全面に胞子が形成されたが、形成数は片面培養が両面培養を上回った。その後、両面培養した不織布は乾燥しはじめ、胞子の形成数、発芽率ともに低下した（培養開始10日目）。不織布の乾燥と胞子の発芽率との関係は不明だが、これらの結果からは、片面培養のほうが両面培養より取り扱いも容易であることも含めて、実用性が高いと考えられる。

②輸送、保存および施用後の活性度調査

輸送、保存および施用後における胞子の形成数ならびに発芽率を表-2に示す。

輸送、保存において、培養終了後、ビニールパック、プラカップに入れて輸送し、約2週間保存された不織布は、施用時においても培養終了時とほぼ同等の発芽率が保持されており、5℃でのビニールパック、プラカップにおける冷蔵による輸送および保存（10日間）にはとくに問題はないといえる。ただし、ビニールパックでは、開封時に不織布上の胞子が若干ビニールに付着してしまうので、その点の注意が必要である。

つぎに、施用後における胞子形成数は、施用12日後にはすべての区において急速に低下し、その後漸減する傾向が認められた。この原因として、施用直後にまとまった降雨があり、これにより胞子が分散した可能性が考えられる。また施用後、不織布上に新たな胞子が形成されるかどうかは明らかにされていないが、この結果から推測すると新たな胞子の形成はほとんどなかったと考えられる。

また胞子の発芽率は、不織布の表面では施用12日後から発芽率の低下が見られたが、不織布の裏面では施用後60日後においても80%以上の活性を示した。しかし、不織布の表面、裏面とも、発芽率の低下後再び上昇することがあった。この原因についてはいろいろ考えられるが、野外では不織布上に他の糸状菌や細菌類による汚染も確認されており、今後その調査方法について検討することも必要である。

表-1 培養中における活性度（孢子形成数、発芽率）

| 培養方法 | 培養3日目 | | 培養6日目 | | 培養7日目 | | 培養10日目 | |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % |
| 両面 | 0 | — | 176 | 95.2 | 408 | 98.1 | 68 | 81.2 |
| 片面 | 104 | 93.0 | 1,064 | 97.2 | 932 | 99.1 | 2,914 | 97.8 |

注) 形成数 $\times 10^4$ 個

表-2 輸送、保存及び施用後における活性度（孢子形成数、発芽率）

| 輸送、保存方法 | 培養、施用方法 | 培養時 (10/2) | | 施用時 (10/15) | | 施用12日目 | | 施用20日目 | | |
|---------|---------|------------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 試料面 | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % |
| ビニールパック | 両面 | 表面 | — | — | — | — | 22 | 74.8 | 34 | 0 |
| | | 裏面 | 538 | 99.3 | 230 | 96.8 | 20 | 92.4 | 28 | 10.4 |
| | 片面(被覆無) | 表面 | — | — | — | — | 16 | 19.6 | 14 | 0 |
| | | 裏面 | 1,268 | 99.1 | 1,218 | 93.8 | 68 | 68.5 | 32 | 57.5 |
| | 片面(被覆有) | 裏面 | — | — | — | — | 60 | 92.4 | 98 | 24.8 |
| プラカップ | 両面 | 表面 | — | — | — | — | 8 | 8.9 | 8 | 0 |
| | | 裏面 | 538 | 99.3 | 994 | 97.0 | 32 | 55.3 | 20 | 50.3 |
| | 片面(被覆無) | 表面 | — | — | — | — | 10 | 11.4 | 24 | 0 |
| | | 裏面 | 1,268 | 99.1 | 156 | 91.5 | 16 | 82.3 | 40 | 86.0 |
| | 片面(被覆有) | 裏面 | — | — | — | — | 46 | 97.6 | 34 | 60.2 |

| 輸送、保存方法 | 培養、施用方法 | 施用29日目 | | 施用40日目 | | 施用60日目 | | |
|---------|---------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 試料面 | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % | 形成数 個 | 発芽率 % |
| ビニールパック | 両面 | 表面 | 20 | 75.4 | 14 | 1.1 | 4 | 4.9 |
| | | 裏面 | 32 | 70.3 | 26 | 35.2 | 10 | 96.4 |
| | 片面(被覆無) | 表面 | 26 | 0 | 18 | 0 | 6 | 81.9 |
| | | 裏面 | 46 | 68.1 | 44 | 67.7 | 22 | 89.5 |
| | 片面(被覆有) | 裏面 | 42 | 63.7 | 50 | 37.9 | 16 | 90.3 |
| プラカップ | 両面 | 表面 | 18 | 3.9 | 18 | 0 | 6 | 25.0 |
| | | 裏面 | 50 | 47.1 | 22 | 48.2 | 8 | 96.2 |
| | 片面(被覆無) | 表面 | 14 | 0 | 16 | 0 | 6 | 0.7 |
| | | 裏面 | 40 | 53.4 | 6 | 53.0 | 12 | 83.9 |
| | 片面(被覆有) | 裏面 | 42 | 66.7 | 18 | 39.2 | 10 | 87.6 |

注) 形成数 $\times 10^4$ 個