

平成29年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「化学農薬の代替となるバチルス属菌株の選抜及び
複合化技術を用いたネギ属野菜向け微生物防除剤の開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月
(事業実施期間：平成27年度～平成29年度)

担当局 九州経済産業局

補助事業者 公益財団法人 福岡県産業・科学技術振興財団

目 次

第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2	研究体制	4
1-2-1	実施体制	
1-2-2	研究者等氏名	
1-2-3	協力者及び指導者・協力事項 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	
1-3	成果概要	5
1-4	当該研究開発の連絡窓口	6
第2章	本論	
2-1	主要7病害に防除活性を有する菌株の選抜および複合化(テーマ1)	7
2-2	微生物防除剤の信頼性向上および防除メカニズムの解明(テーマ2)	10
2-3	微生物防除剤の低コスト製造技術の開発(テーマ3)	15
2-4	各種散布法に対応可能な粒剤化技術の開発(テーマ4)	18
最終章	全体総括	
3-1	複数年の研究開発成果	22
3-2	研究開発後の課題	22
3-3	事業化展開	22

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

国内出荷額が第1位のネギ属野菜は、日本農業にとって主要な野菜であり我々にとって非常になじみ深い作物である。一般的にネギ属野菜は病害等に強く、家庭菜園等においては、比較的放置していても容易に栽培できるイメージがあるが、実際の生産現場においては、僅かな傷みが商品価値を著しく落とし、収益に打撃を与えるため、ネギ属野菜の栽培時に、白色疫病等の主要病害防除のため、年間約106億円もの化学農薬が多用されている現状がある。

その他にも化学農薬においては、農薬に対する病害菌の抵抗性が増大していく傾向が認められ、新しい化学構造・作用を有する化学農薬の創製が課題となっている。しかしながらその開発は、人体や環境に対する安全性確保のハードルが年々高くなっており思うように進んでいない。また、農薬等の使用を抑制する環境保全型農業に関する施策の推進、化学農薬の負の遺産とも言える内分泌かく乱物質等の問題もあり、化学農薬を取り巻く環境は厳しいものとなっている。さらに、化学農薬の使用は、ヒト、家畜、環境等への悪影響に加え、栽培土壌中の有用微生物を死滅させることで、野菜の収穫量や品質低下をきたすことが懸念されている。

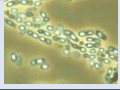
このため、農業資材取扱業者やエンドユーザー（農家等）では、化学農薬に替わる安心・安全な微生物防除剤開発に関するニーズが極めて大きい。しかし、化学農薬に比べ、微生物製剤は、薬効の範囲が極めて狭く限定され、多くの病害を防除するには多くの微生物製剤を必要とすることや、極めて正確な病害の診断を要求されるなど使い辛い。また、化学農薬に比べ微生物防除剤は高価なこと等から普及していない。

本事業では、川下企業やエンドユーザーのニーズに応えた画期的な製品を開発するために、ネギ属主要7病害¹⁾を一製剤で防除し、化学農薬以下の低価格で提供でき、既存の各種散布装置で散布できる安心安全なものを目指した。(表1-1)。テーマは4つに分け、年度ごとの技術目標値を設定し研究開発を行った(図1-1、表1-2)。

1) ネギ属野菜の主要7病害

ネギ属野菜の葉面に発生する4病害（白色疫病、疫病、黒斑病、菌糸性腐敗病）と土壌に発生する3病害（苗立枯病、乾腐病、黒腐菌核病）を指す。いずれも蔓延するとネギ属野菜を損傷し、収益に重大な影響を与える。

表1-1 既存製品と新規開発品の比較

ネギ属野菜向け 防除剤の比較	既存製品		新規開発品
	化学農薬	既存の微生物防除剤	開発する新規微生物防除剤
防除剤の 主要成分 ニーズ 対応の 課題	マンゼブ クロルピクリン	コニチリウムミニタンス属、 シュドモナス属等の細菌	安全性が高く、抗菌物質 も産生するパチルス属 菌から目標菌を選抜 
主要7病害に 1製剤で対応 (テーマ1で対応)	△ マンゼブとクロルピクリンの 2剤必要	× 7病害対応防除剤はない	◎ 1剤で7病害に対応可能
信頼性 (安全・安心) (テーマ2で対応)	× 使用時の健康被害防止に 細心の注意必要	◎ 安全性確認済み	◎ 確認(既選抜株は安全)
低価格 (テーマ3で対応)	△ 約1,700円/kg	× 約15,000円/kg	◎ 1,500円/kg以下で提供可能
各種散布装置 で使用可能 (テーマ4で対応)	× 対応できる散布装置が限定	× 対応できる散布装置が限定	◎ 既存の散布装置に対応可能
有機農業 での使用	× 使用不可	◎ 使用可	◎ 使用可

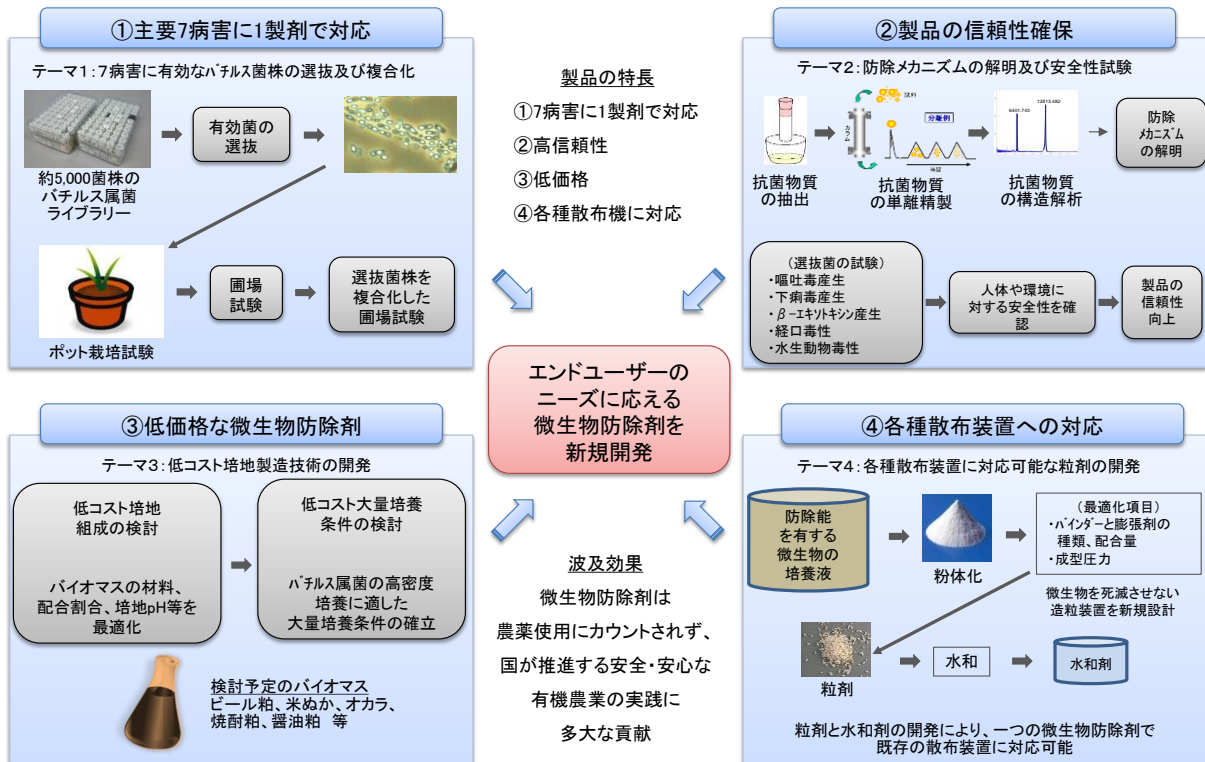


図1-1 研究開発の概要

表1-2 サブテーマと技術目標値

サブテーマ名	平成27年度	平成28年度	平成29年度
1. 主要7病害に防除活性を有する菌株の選抜および複合化	○プレート選抜試験により、土壌3病害菌の生育を抑制する菌を50株以上選抜	○ポット栽培試験により、土壌3病害について、防除性能基準：B以上を10株以上選抜	○圃場栽培試験により、土壌3病害について、防除性能基準：B以上を5株以上選抜 ○菌の複合化試験により、防除効果上位7株の選抜
2. 微生物防除剤の信頼性向上および防除メカニズムの解明	○抗菌物質の分離精製 ○葉面4病害用に選抜した6菌株の安全性（嘔吐毒産生試験）を確認	○抗菌物質の分離精製および生産関連遺伝子の特定 ○選抜バチルス属菌の安全性を確認（1種類：β-エキソトキシン産生試験）	○抗菌物質の構造ならびに抗菌メカニズムの解明 ○ヒトおよび環境への安全性の確認（4種類：溶血毒産生試験、嘔吐毒産生試験、経口毒性試験、水生動物の毒性試験）
3. 微生物防除剤の低コスト製造技術の開発	○20円/ℓ以下で菌濃度 10^8 cfu/ml培養可能なバイオマス混合培地組成を最低1種類以上考案（平成28年度に達成）	○20円/ℓ以下で菌濃度 10^8 cfu/ml培養可能なバイオマス混合培地組成を最低1種類以上考案 ○1バッチ200L、開放系での大量培養方法の確立（平成29年度に達成）	○1バッチ200L、開放系での大量培養方法の確立 ○菌数 10^8 cfu/ml以上が確保可能な低コスト培地の製造技術確立 ○防除剤の製造原価：750円/kg以下
4. 各種散布法に対応可能な粒剤化技術の開発	○微生物を死滅させず、比重0.5付近の材料を造粒できる装置を設計	○粒剤タイプを試作（圧壊強度の平均が1kgf以上、粒径：2~3mmの歩留まりが50%以上）	○粒剤の粒径：2~3mm ○水和崩壊速度（0.01g/s）で水和剤化可能な粒剤

○ 高度化指針

（十一）バイオに係る技術に関する事項

1. バイオに係る技術において達成すべき高度化目標

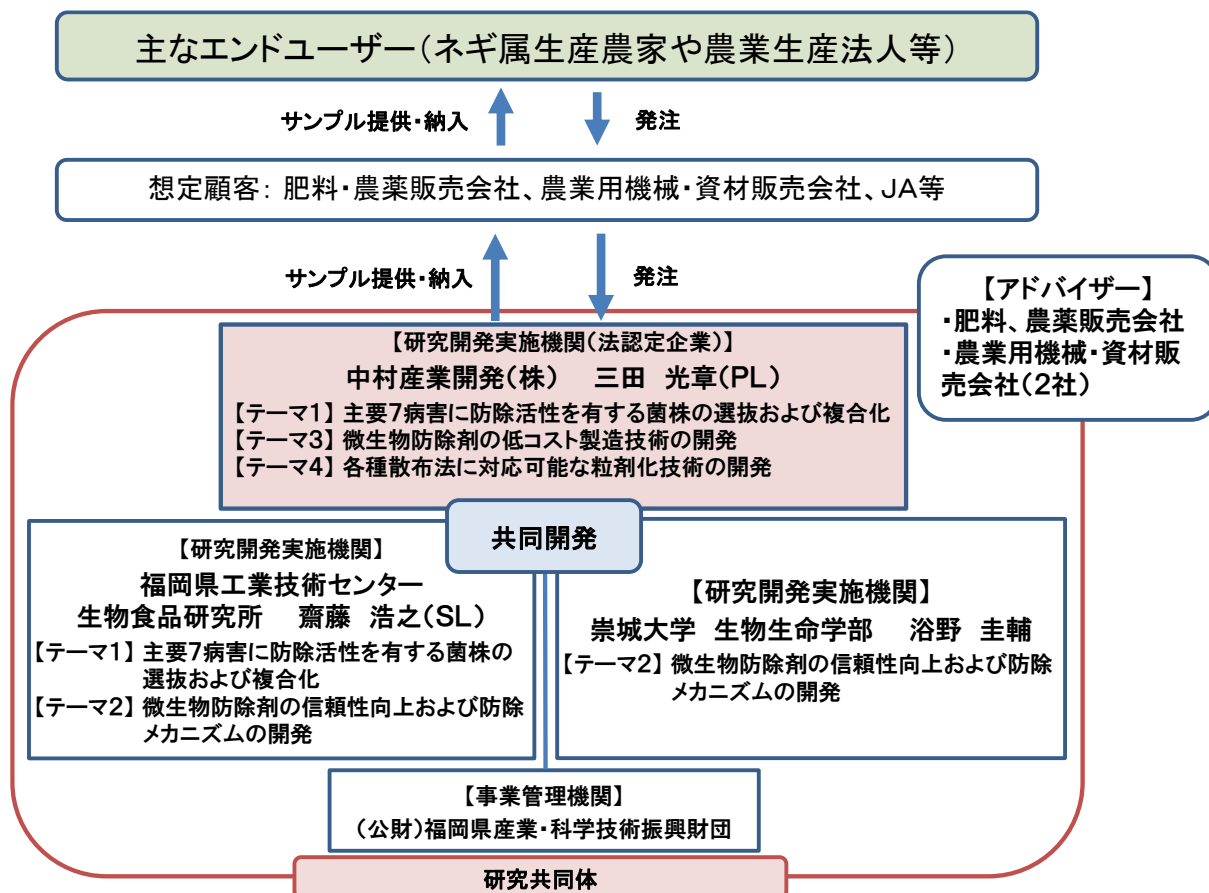
（4）川下分野特有の事項

3) その他の川下分野に関する事項 b. 食品製造業分野に関する事項

- ① 川下製造業者等の特有の課題及びニーズ ア. 有用な生物資源の探索及び利用
- ② 高度化目標 ア. 有用な生物資源及び利用方法の多様化

1-2 研究体制

(研究組織・管理体制・研究者氏名・協力者)



1-3 成果概要

テーマ1：主要7病害に防除活性を有する菌株の選抜および複合化

バチルス属菌ライブラリーより段階的な選抜を行った結果、ネギ属野菜の白色疫病等の主要7病害それぞれに有効な菌株を最終的に複数株選抜することに成功した。また、選抜した菌株の複合物を用いてポット試験・圃場試験を行った結果、一部の病害菌について複合物の有効性を確認した。

テーマ2：微生物防除剤の信頼性向上および防除メカニズムの解明

・性状解明と安全性試験

選抜した菌株について、光学顕微鏡を用いた菌体の観察や 16S rDNA 等の遺伝子レベルでの解析を行った結果、安全性が高い菌種であることが確認された。また、行った安全性試験ではどれも毒性は認められず、安全性は基本的に担保された。

・抗菌メカニズムの解明

選抜した 6 菌株全ての全遺伝子配列の解析及び非抗菌性の変異株の解析の結果、B 菌株においては Zwittermicin、その他 5 菌株においても数種の抗菌物質の関与が示唆された。抗菌メカニズムに関しては、いずれも細胞膜に作用することで病原菌を死滅させていることが明らかとなった。

テーマ3：微生物防除剤の低コスト製造技術の開発

選抜したバチルス属菌を、目標濃度（ 10^8 cfu/ml）で培養可能な、安価なバイオマス培地を2種類（廃棄バイオマスⅠ及びⅡ）開発した。このうち廃棄バイオマスⅡを用いて、200L スケールにおける目標濃度かつ低コスト（6.6 円/L）な培養方法を確立した。

製造原価としてはテーマ4の造粒コストがかさみ、目標である750 円/kg 以下には達しておらず、今後の検討が必要である。

テーマ4：各種散布法に対応可能な粒剤化技術の開発

解砕方式等の造粒装置に関する条件及びバインダー、崩壊剤等の原料に関する条件を検討した結果、2~3mm の歩留まりが50%以上となる解砕方法を確立し、比重0.5付近、圧壊強度の平均1kgf以上、水和崩壊速度0.01g/sで水和剤化可能な粒剤を開発した。これにより、各種散布機械で簡単に散布することが期待される。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

中村産業開発株式会社

バイオ事業部

課長 三田 光章

Tel : 0947-44-1818 (代) Fax : 0947-44-5707

E-mail : m-mita@nk52.com

住所 : 〒826-0041 福岡県田川市大字弓削田 80 番地

第2章 本論

2-1 主要7病害に防除活性を有する菌株の選抜および複合化（テーマ1）

<研究目的及び目標>

葉面4病害、土壌3病害を一製剤で防除するために、福岡県工業技術センターが保有する約 5,000 菌株のバチルス属菌ライブラリーより選抜を行う。葉面4病害に防除効果のある菌株はポット試験まで終了し、選抜済み（菌株 A、B）であるため、本事業では土壌3病害に防除効果のある菌株をプレート試験、ポット試験により選抜を行う。その後選抜した菌株を複合化し、ポット試験及び圃場試験により最終的な菌株を選抜する。

<実施内容>

2-1-1 プレート試験

土壌3病害菌それぞれとバチルス属菌株を同じ培地上に接種し、病害菌に対し大きな阻止円を生じたバチルス菌株を強い抗菌活性を有する菌株とした。その結果、土壌3病害菌に強い抗菌活性を有する菌株を12株（菌株C~N）選抜した。

2-1-2 ポット試験

2-1-2-1 プレート試験選抜菌のポット試験

36穴セルトレイに土壌を充填し、土壌病害菌培養液と選抜した12菌株の培養液に浸漬したタマネギ種子を播種して試験を行った。

植物インキュベーターを用い、病害の発病及びタマネギ栽培に適した条件に設定し、2週間後、タマネギ苗を掘り出し、苗全長を測定して発病度及び防除価を算出した。

発病度の算出は、滅菌水試験区の苗全長をコントロールとし、0：苗全体の長さがコントロールの3/4以上又は病徴なし、1：同3/4~1/2、2：同1/2~1/4、3：同1/4以下、4：枯死・発芽なしの0~4の発病指数を求め、以下の式により行なった。

$$\text{発病度} = \sum (\text{発病程度別株数} \times \text{指数}(0 \sim 4)) \times 100 / (4 \times \text{調査株数})$$

この各試験区での発病度を基に防除価を計算して、ネギ属野菜病害用農薬の規定濃度散布区と同等又は高い値を示す菌株を有効菌株として選抜した。防除価は次の計算式により求めた。

$$\text{防除価} = (\text{発病区の発病度} - \text{試験区の発病度}) \times 100 / \text{発病区の発病度}$$

試験の結果、乾腐病菌で12菌株中10菌株、苗立枯病菌で5菌株、黒腐菌核病菌で5

菌株が農薬散布区と同等又はそれ以上の防除価を示した（表2-1）。この中で、土壌3病害全てに有効であった4菌株（C、D、E、I）を以降の実験に使用することにした。

表2-1 プレート選抜菌のポット試験結果

菌株	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
乾腐病菌	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	×
苗立枯病菌	○	○	○	×	×	○	○	×	×	×	×	×
黒腐菌核病菌	○	○	○	×	×	×	○	×	○	×	×	×

※○は、農薬散布区と同等又はそれ以上の防除価、×は劣る防除価を示す。

2-1-2-2 土壌3病害に対する菌複合物のポット試験

2-1-2-1で選抜した菌株同士を同じプレート培地上に接触するように接種することにより、お互いに生育を阻害することがないか（拮抗性）の確認を行った。この結果を基に、拮抗性の低い菌株同士を組み合わせ、更に葉面4病害菌に高い防除活性を持つ選抜菌株 A、B を加えた2種類の菌複合物①、②（表2-2）を用いて、再度、土壌3病害菌のポット試験を行い、防除効果を検討した。

表2-2 菌複合物①、②の構成

	菌複合物①	菌複合物②
菌株	A、B、C、D、E	A、B、E、I

ポット試験は、タマネギ苗を用いて4週間行なった。病害菌区に加え、対照区として滅菌水区および農薬区を設けた。病害菌の菌濃度は、乾腐病菌では 10^3 、 10^4 cfu/ml、苗立枯病菌と黒腐菌核病菌では 10^2 、 10^3 cfu/mlの2種類ずつとし、菌複合物の接種は1回行った。

発病度の算出方法は病徴面積から、発病指数 0：病徴なし、同 1：病徴が葉身の5%未満、同 2：5%～25%未満、同 3：25%～50%未満、同 4：50%以上又は枯死として行なった。その他の計算は2-1-2-1の方法に準じた。

その結果、菌複合物①は、ネギ属土壌3病害菌全てにおいて農薬区と同等又はそれ以上の防除価を示した。一方、菌複合物②は、菌複合物①と比べ防除価が全体的に低かった（図2-1）。これらの結果より、菌複合物①を次の圃場試験に供することとした。

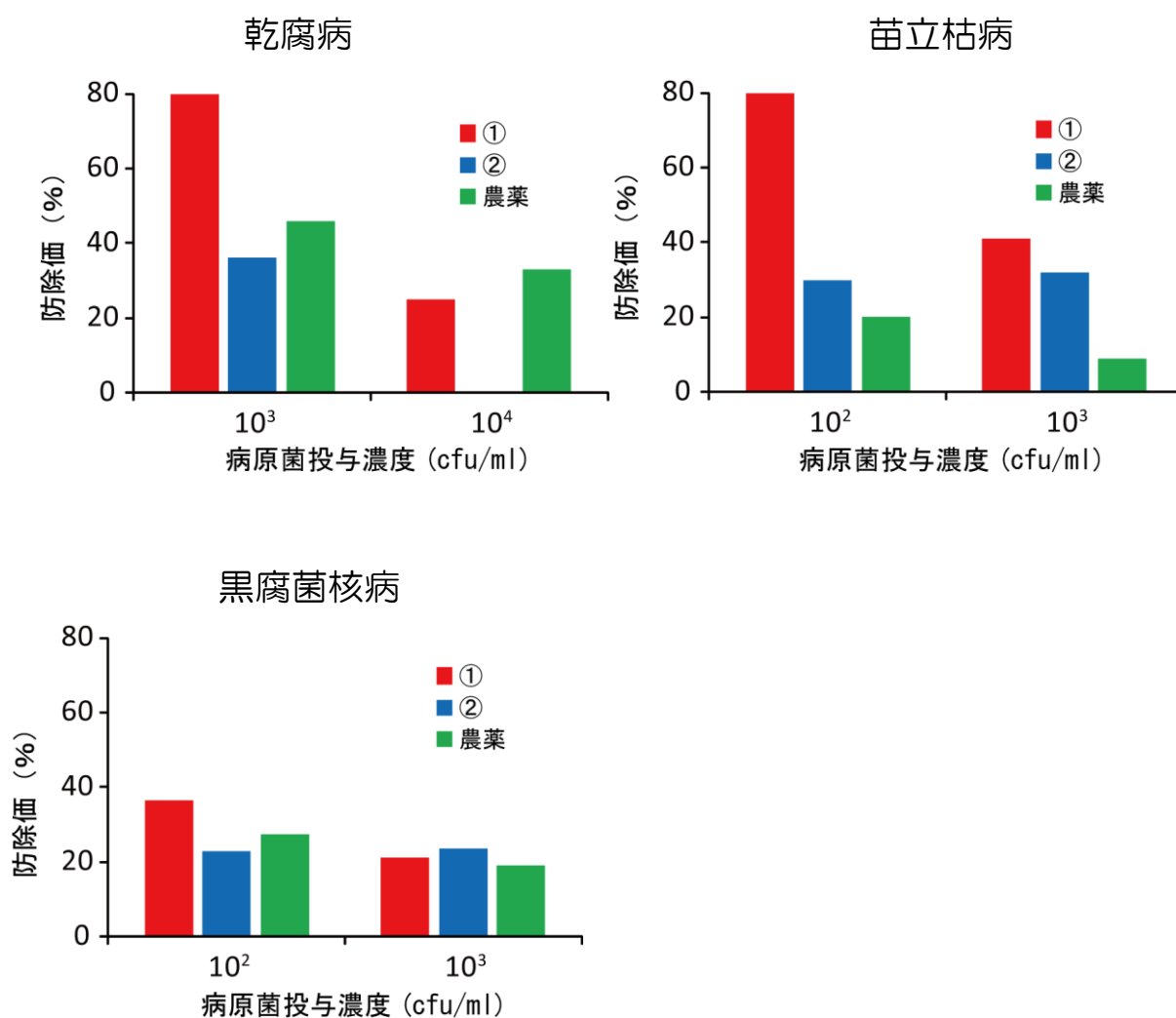


図2-1 土壌3病害に対する菌複合物のポット試験

2-1-3 圃場試験

ポット試験により選抜された菌複合物①を用い、葉面4病害であるタマネギ白色疫病と葉ネギ黒斑病について、日本植物防疫協会に外注し圃場試験を実施した。タマネギ白色疫病に対しては、菌複合物①試験区は、農薬区とほぼ同等の防除価であった。また、葉ネギ黒斑病に対しては、菌複合物①試験区が、僅かに農薬区に劣る防除価となったが、実用性はあると認められた(表2-3)。

表2-3 日本植物防疫協会による圃場試験

試験区	防除価	
	白色疫病	黒斑病
	タマネギ	葉ネギ
①	96.2	61.8
農薬	100	76.3

2-2 微生物防除剤の信頼性向上および防除メカニズムの解明（テーマ2）

<研究目的及び目標>

バチルス属菌は納豆菌に代表されるように、安全性が高いことで知られている。既に選抜した葉面4病害に防除効果のある菌株や、本事業で新たに選抜する土壌3病害に防除効果がある菌株に関して、性状を明らかにすると共に、毒素産生能試験、環境毒性試験等の安全性試験を実施し、製品化した際の信頼性を向上させる。

また、本研究における有効菌株の選抜時に、寒天培地上での抗菌活性が確認されていることから、抗菌物質を生産することで病原菌の生育を阻害していることが示唆される。そのため、生産される抗菌物質を推定することで抗菌メカニズムを明らかにすることを目標とする。これにより、新製品の信頼性を獲得することができるとともに、より効果的・効率的な使用方法や製造法の検討が可能になると期待できる。

<実施内容>

2-2-1 性状解明と安全性試験

2-2-1-1 光学顕微鏡による形態観察（土壌3病害用）

培地上に菌株を白金耳で画線し、28℃で3日間培養後、位相差顕微鏡による形態観察を行った。葉面4病害用の菌株については本事業開始前に実施し、菌体内に芽胞と *B. thuringiensis* に特徴的なクリスタル（タンパク質の塊）を確認した。土壌病害用に選抜した菌株の菌体の大きさは *B. subtilis* と同程度で、菌体の中央に芽胞を形成していた。また、芽胞の横にはクリスタルは認められなかった（図2-2）。

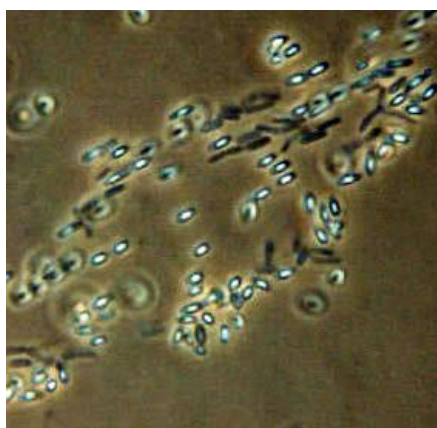


図2-2 土壌3病害用選抜菌株の形態観察

2-2-1-2 選抜菌株の同定

選抜した菌株の同定を遺伝子レベルで行った。まず、選抜した菌株の 16S rDNA の一部を PCR で増幅後、その配列を DNA シーケンサーにより決定し、データベース上にある各種菌株の 16S rDNA 配列と比較した。その結果、事業開始前に実施した葉面4病害用の菌株については、*B. thuringiensis* であると同定した。土壌3病害用の菌株については、*B. subtilis* のグループに属することがわかった。そこで更に詳細に同定するために、選抜菌株の全ゲノム配列を決定し、この中から *rpoB* の配列を取り出し、データベース上にある各種細菌の *rpoB* の配列と比較した。その結果、*B. velezensis* という種である可能性が高いことがわかった(図2-3)。*B. velezensis* は *B. subtilis* グループの *B. amyloliquefaciens* から2017年に細分化され確立した菌種であり、安全性が高い菌種として知られている。

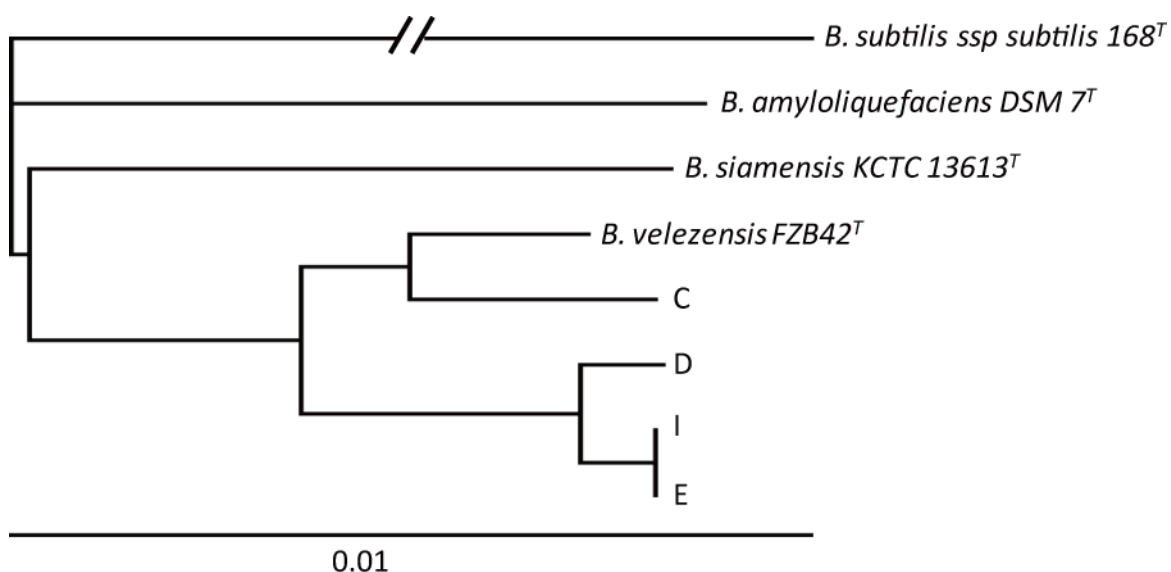


図2-3 土壌3病害用選抜菌株の *rpoB* 配列の比較

2-2-1-3 嘔吐毒遺伝子有無の検討

選抜菌株の嘔吐毒遺伝子の有無について、リアルタイム PCR 用の嘔吐毒遺伝子検出キットを用いて検討した。その結果、選抜菌株はいずれも嘔吐毒の遺伝子を有していないことがわかった。

2-2-1-4 β -エキソトキシン産生有無の検討

β -エキソトキシン産生の有無について、イエバエ最終齢幼虫に選抜菌株を経皮投与し、その蛹化率及び羽化率を測定することにより検討した。その結果、無処理区と同様の蛹の形状、羽化率となり、 β -エキソトキシンを産生していないことがわかった。

2-2-1-5 菌複合物①の経口毒有無の検討

経口毒有無については雌雄それぞれ 5 匹のマウスに単回経口投与することにより検討した。観察期間は 14 日間とし、投与日は頻回、翌日から 1 日 1 回観察するとともに、投与後 14 日後に体重測定を行った。その結果、観察期間中試験群は対照群と比較して雌雄とも体重差、異常及び死亡例は認められなかった（図 2-4）。以上のことから、検体の LD50 値は雌雄とも 2,000mg/kg を超え、経口毒はないと評価された。

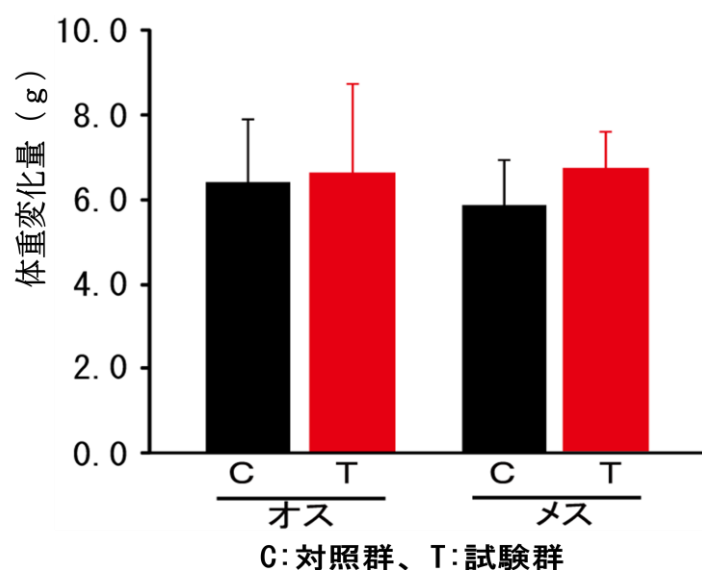


図 2-4 14 日後の体重変化量

2-2-2 抗菌メカニズムの解明

本研究では、葉面 4 病害用の 2 菌株 (A、B) および土壌 3 病害用の 4 菌株 (C、D、E、I) についてその抗菌メカニズムの解析を行った。

2-2-2-1 抗菌物質の精製

培養液中への抗菌物質を生産させるため、培地組成の異なる数種類の培地を用い、培養日数を検討した。その結果、各培養上清に抗菌活性を確認できたが、培地組成や培養日数による活性の大きな違いは確認できなかった。次に、様々な原理のクロマトグラフィーを用いて抗菌物質の精製を試みた。しかし、培養液中への生産量が少ないこと、抗菌活性の測定において判定に時間がかかることから、精製から物質を特定することは困難であると考えられた。そこで、抗菌物質の生産関連遺伝子を解析することによって、抗菌物質を推定することを試みた。

2-2-2-2 抗菌活性を失った変異株の取得

葉面 4 病害および土壌 3 病害用選抜菌株に紫外線を照射し、病害菌に対して抗菌活性を失った変異菌株を選抜した。その結果、葉面 4 病害用の A および B 菌株それぞれにおいて 1 株ずつの非抗菌性変異株を取得することに成功した。これら非抗菌性変異株を解析した結果、A および B 両菌株の変異株ともにプラスミドが脱落することにより抗菌活性を失っていることが明らかとなった。一方、土壌 3 病害用の 4 菌株においては変異株の取得には至らなかった。

2-2-2-3 抗菌物質生産関連遺伝子の解析

抗菌物質の生産に関与する遺伝子を特定するため、まず、選抜菌株の次世代シーケンズ解析を行った。その結果、葉面 4 病害用の A 菌株は染色体の他に 12 個のプラスミドを、B 菌株は 8 個のプラスミドを保持していた。一方、土壌 3 病害用の 4 菌株すべての菌株においてプラスミドは存在していないことが明らかとなった。

次に、二次代謝産物合成遺伝子群の推定を antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) システムを用いて行った。その結果、A 菌株は染色体上に 8 種類、12 個のプラスミドのうち 1 つのプラスミド上に 3 種類、3 つのプラスミド上にそれぞれ 1 種類ずつの合計 14 種類の遺伝子群の存在が確認された。また、B 菌株は染色体上に 9 種類、8 個のプラスミドのうち 1 つのプラスミド上に 2 種類、合計 11 種類の遺伝子群

の存在が確認された。この結果及び2-2-2-2の変異株の結果より、A および B 両菌株においては、脱落したプラスミド上に存在する遺伝子群によって生産される抗菌ペプチドが本抗菌活性に関与することが明らかとなった。A 菌株においては、未知の抗菌ペプチド3種の全てあるいはいずれかが、B 菌株においては Zwittermicin が関与していることが示唆された。

一方、土壌3病害用の4菌株には染色体上にそれぞれ12から13種類の二次代謝産物生合成遺伝子群の存在が確認された。抗真菌活性を示す4種類の抗菌ペプチド（Surfactin、Fengycin、Bacillomycin、Rhizocticin）生産関連遺伝子群が含まれることから、これらが抗菌活性に関与することが示唆された。

2-2-2-4 抗菌作用機構の解析

病害菌に対する抗菌作用メカニズムを解析する目的で、各選抜菌株の培養上清を病害菌に添加し、顕微鏡下においてその形態変化を観察した。A 菌株においては病害菌の形態変化は観察できなかった。しかしながら、B 菌株の培養上清を添加した黒斑病菌は菌糸が膨潤し、その生育が阻害されていることが明らかとなった（図2-5）。また、C、D、E、Iの4菌株の培養液を添加した乾腐病菌も同様に菌糸の膨潤が確認された。さらに細胞膜が損傷した場合に細胞を染色するエバンスブルーを用いた染色により、膨潤した細胞が特異的に青く染色されていた（図2-6）。また生細胞および死細胞を特異的に検出する蛍光プローブを用いた蛍光観察においても、同様の形態変化が観察された。これらの観察結果より、選抜菌株が生産する抗菌物質は細胞膜を損傷することで植物病原菌を死滅させていることが明らかとなった。

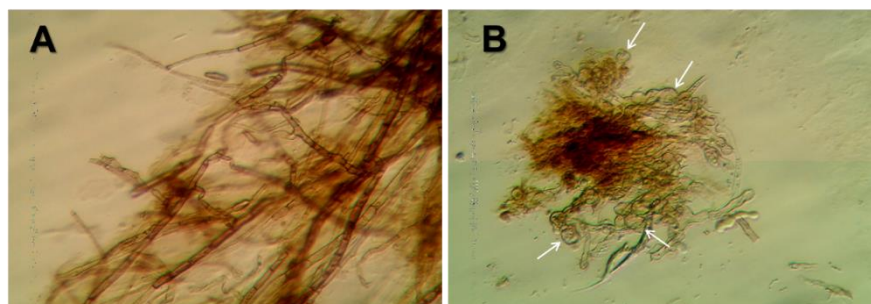


図2-5 B菌株の培養液添加による黒斑病菌の形態に及ぼす影響
黒斑病菌（培養液無添加）の菌糸形態（A）、B菌株培養液上清添加後、5日間反応した後の黒斑病菌の菌糸形態（B）。矢印は菌糸が膨潤した形態の変化を示した。

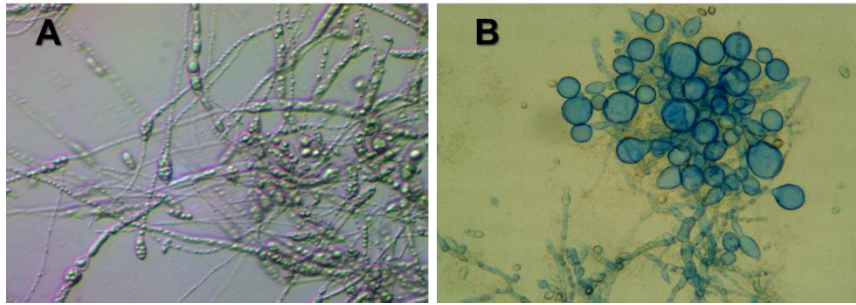


図2-6 C菌株の培養液添加による乾腐病菌の形態に及ぼす影響
乾腐病菌の形態観察の際、エバンスブルーを添加して顕微鏡観察を行った。乾腐病菌（培養液無添加）の菌糸形態（A）、C菌株培養液上清添加後、5日間反応した後の乾腐病菌の菌糸形態（B）。膨潤した形態がエバンスブルーによって青く染色されている。

2-3 微生物防除剤の低コスト製造技術の開発（テーマ3）

<研究目的及び目標>

微生物製剤において微生物培養にかかるコストのウエイトは非常に大きく、安価かつ高密度に菌株を増殖させることは製剤の低コスト化への重要な課題である。

現状では、微生物製剤用培地として、魚肉エキスやペプトン等を使用するため、培養原液の製造コストは約 290 円/L と高額である。そこで本事業では、安価・入手容易で、窒素源・炭素源等が含有される廃棄バイオマスを中心に、処理条件、濃度等を検討することで、培地コストを約 1/15 の 20 円/L 以下にする。また、菌株の防除活性を確保するため、菌数 10^8 cfu/ml 以上の高密度培養達成を目指す。

<実施内容>

2-3-1 廃棄バイオマスの選抜

入手した様々な廃棄バイオマスからそれぞれ培地を作製した。小型振とう培養器を用いて、濁度（OD650nm）を測定しながら、選抜菌株をそれらの作製された培地中で培養した。その結果、基準となる普通ブイオン培地と同等かそれ以上の濁度を示す廃棄バイオマスⅠ、Ⅱが選抜された（図2-7）。また、濁度測定後の培養物の生菌数を平板法により測定して 10^8 cfu/ml 以上であることを確認した。

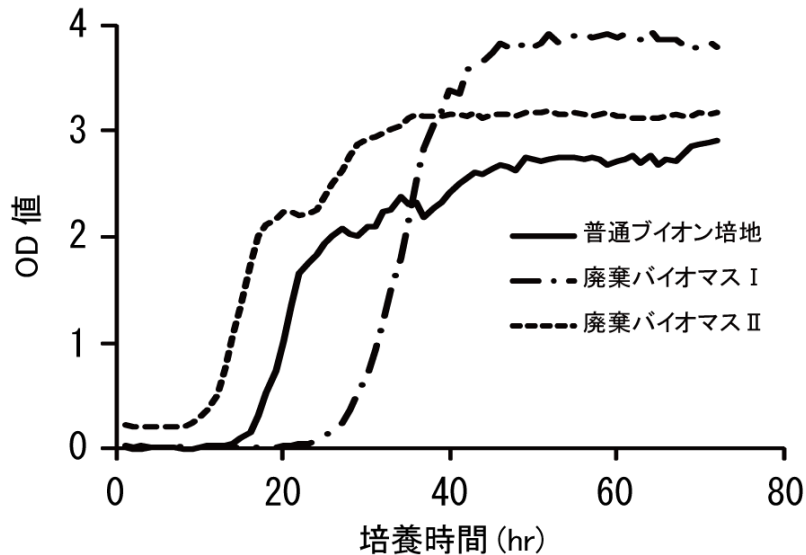


図2-7 廃棄バイオマスによる培養

2-3-2. 廃棄バイオマス抽出条件の検討

選抜した廃棄バイオマス I、II を用いた培地を作製するために、成分の抽出条件の検討を行なった。

2-3-2-1 抽出濃度の検討

水に対して5、10、20、30%濃度となるように廃棄バイオマス I、II を加え、121℃、10 分間オートクレーブ（以下熱水抽出）した後の上清を抽出物とした培地（合計8種類）について検討した。その結果、最も濁度が高かった培地は、10%濃度の廃棄バイオマス II 抽出物であった。

2-3-2-2 廃棄バイオマスの粉碎有無の検討

廃棄バイオマスを粉碎することによる菌の培養の影響を、廃棄バイオマス I、II の濃度が各 10%となるよう水を加え、粉碎機（ホモジナイザー）を用い、約 5,000~6,000rpm で 3 分間粉碎後、熱水抽出した培地と、粉碎せずに熱水抽出した培地（合計4種類）について検討した。その結果、最も濁度が高かった培地は廃棄バイオマス II を粉碎抽出したものであった。

2-3-3 5L スケール培養試験

2-3-2の結果より、以降のスケールアップの検討では、粉碎した廃棄バイオマス II の 10%熱水抽出物（II 培地）を用いた。ジャーファーマンターを用い、適当と想定される条

件下で 72 時間培養した。その結果、 1×10^8 cfu/ml 以上の菌濃度が得られたため、5L スケールでの廃棄バイオマスによる高密度培養が可能であることがわかった。

2-3-4 100L スケール培養試験

200L の容器に加温装置、通気装置、攪拌装置等を設置した培養装置を用いて 100L スケールでの培養を行なった。II 培地を用い、適切な条件下で選抜菌株を 7 日間培養した。開始 13 時間、24 時間、それ以降は 1 日毎にサンプルを採取し、菌数を測定した結果、培養開始 24 時間後に 6×10^8 cfu/ml の菌濃度が得られた (図 2-8)。

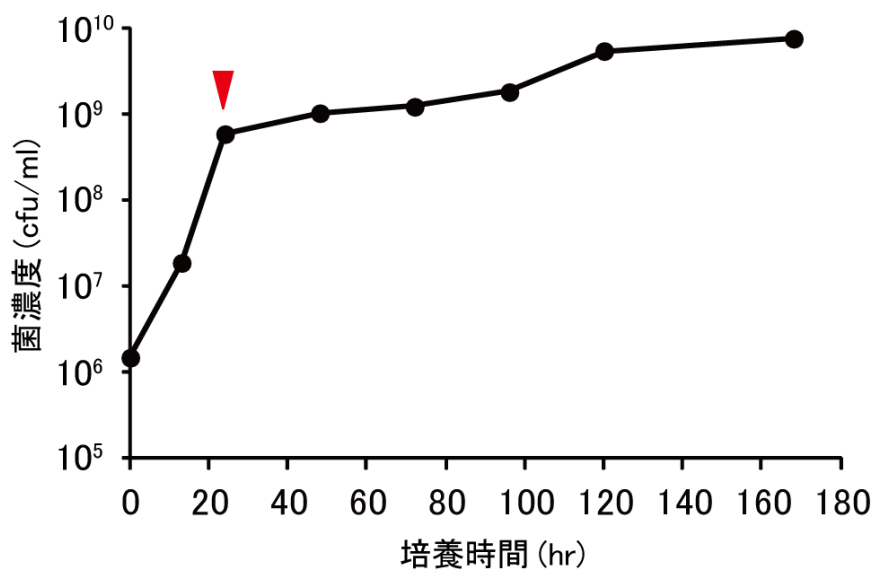


図 2-8 100L スケールにおける培養

2-3-5 200L スケール培養試験

200L スケール培養では 2-1 で選抜された菌複合物①構成する A~E の 5 菌株それぞれについて 3 日間培養した。培養開始から 15 時間、24 時間、それ以降は 1 日毎にサンプルを採取し、菌数を測定した結果、48 時間培養後 A~E のいずれの菌株でも 1×10^8 cfu/ml 以上の菌濃度が得られた。A 菌株の培養結果を図 2-9 に示す。

200L スケール培養試験における培養コストは、目標額より非常に安価なものとなった。しかし、製品 1 kg 当たりの製造原価としては、製品粒状化に係る外注費用が想定以上だったことが原因で目標金額より高額となった。

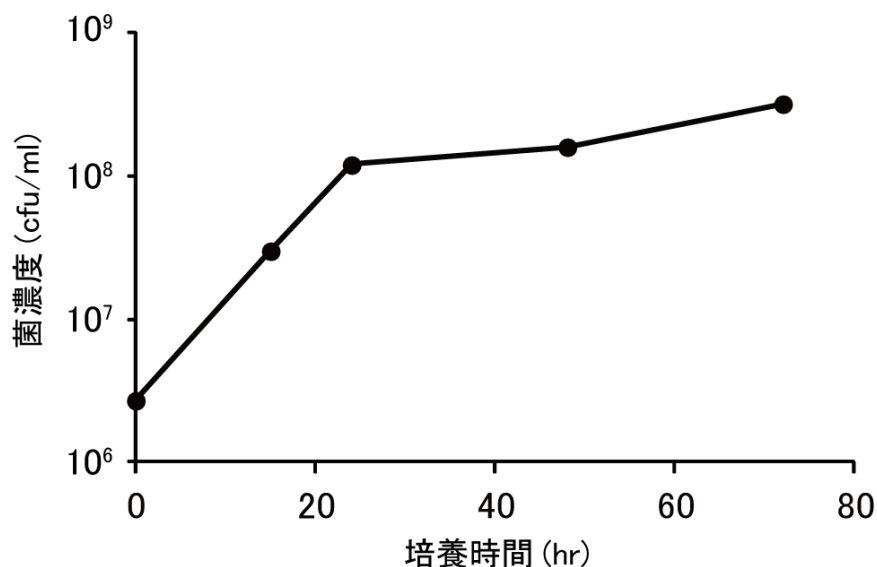


図2-9 200L スケールにおける A 菌株の培養

2-4 各種散布法に対応可能な粒剤化技術の開発（テーマ4）

<研究目的及び目標>

農業生産の現場において既存の散布法としては、粒状散布式やスプレー式が主流であり、様々な散布機が存在する。しかし、現在の化学農薬や微生物防除剤は、限られた散布機械にしか対応していない。そこで、本研究では、造粒テスト装置を用いて各種条件を検討し、一つの微生物製剤で複数の散布方式に対応可能（複数種の散布機械に適合可能）な剤型の開発を目指す。

<実施内容>

2-4-1 タブレット試験

まず予備試験として、微生物の付着原料の主成分となる各粒度（ブレン値：3.0~3.5 cm²/g、4.0~4.5 cm²/g、10.0 cm²/g）の炭酸カルシウム担体の造粒性を確認するために、0.5 t、1 t、1.5 t、2 tの圧力を加えてタブレット成型の有無を検討した。その結果、検討した炭酸カルシウム各粒度の材料全てにおいて、実施した成型圧力の範囲で成型できたが、10.0 ブレン（比重 0.5 付近）の材料については若干成型性に劣ると推測された。

2-4-2 造粒テスト装置を用いた試験

本試験では、図2-10の構造をした造粒装置を用いた。ロール形状、ロール支持圧力、解砕方式等の装置に関する検討、バインダー、崩壊剤等の粒剤の原料に関する検討および微

生物への影響に関する検討を行った。

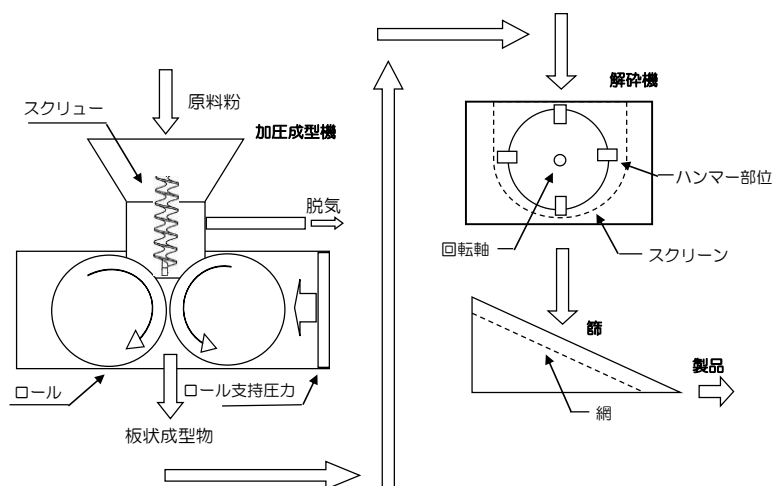


図2-10 造粒テスト装置の構造

2-4-2-1 ロール形状の検討

2～3mmの造粒物を効率的に製造するため、ロールの表面形状を検討した。検討したロールの種類はスムーズ、溝付きスムーズ、プロファイル、 $\phi 3.11\text{mm}$ で行った。プロフィール型では、中心部に掛かる圧力が弱くなると推定され、 $\phi 3.11\text{mm}$ のポケット構造のものでは、目詰まりを起こし、成型不能であった。そこで、スムーズ構造の中でも、滑り現象の少ない、溝付きスムーズ型を採用した。

2-4-2-2 ロール支持圧力等の検討

2-4-1の結果を基に、炭酸カルシウムの各粒度についてロール加圧による成型性を検討した。その際、原料に含まれる空気による成型時の粉化を防ぐために予め原料の脱気を行った。結果としては、どの粒度でも板状に成型されたが、脱気処理をしても結着力が弱く粉化が目立った。

次に、その板状成型物を打砕式解砕機により解砕し、粒径1mm～5mmの粒剤の歩留りを検討した。その結果、どの粒径についても、解砕の際に粉化が起り、炭酸カルシウムだけでは、成型物の強度が不足していることがわかった。

2-4-2-3 バインダーの検討

成型物の強度を補うために無機物系と有機物系の数十種類よりバインダーの検討を行った。まず、無機物系の中から選抜を行った。圧壊強度が1kgf以上あるものが4種(a～d)ほ

どあったが、他の3種に比べ a は圧壊強度については若干劣るものの、安価で、水和時にある程度の崩壊が認められた。そこで、a をバインダーとして用いて成型および解砕をして粒剤を試作し、実際の散布機械を用いて散布を行った。しかし、散布の際、粒剤が容易に砕かれて大量の粉塵が発生したことから、更なる粒剤の強度の向上が必要と考えられた。

次に、無機物 a の使用を前提に有機物系の中から選抜を行った。その結果、4 種類に絞ることができた。この有機物 4 種は無機物 a と共にバインダーとして用いると、目標値以上の圧壊強度を持つ粒剤となった。実際の散布機械を用いて散布を行っても、粒剤が砕かれ大量の粉塵が発生することがなくなった。

2-4-2-4 崩壊剤の検討

散布後や水和後の粒剤を適度に分散させるために、粒剤の崩壊速度を 0.01g/s 以上に行うことができる崩壊剤の検討を行った。崩壊剤としては吸水・膨張により崩壊を促進するものや水溶性物質を検討した。その結果、1 種類の水溶性物質のみが目標の崩壊速度以上に達した。

2-4-2-5 解砕方式の検討

生産性の向上及び低コスト化を行うため、幅広い用途がある粒径 2~3mm の粒剤の歩留まりが 50%以上になるように、2 種類の解砕方式（剪断方式と打砕方式）について検討した。

その結果、剪断方式においては、3mm間の解砕刃による試験で、初回解砕の歩留りで3mm以上のものが少ないため、多段階解砕しても、粒径 2~3mmの粒剤の歩留まりは目標の50%には達しなかった。

一方、打砕方式においては、粒径 2mm以上の粒剤を、 $\square 11\text{mm}$ スクリーンにて解砕後、残った 3mm以上の粒剤を $\square 11\text{mm}$ スクリーンにて再度解砕した。そして、まだ残っている3mm以上の粒剤を順に $\square 7\text{mm}$ スクリーンと $\square 5\text{mm}$ スクリーンを用いて合計4段階の解砕を行うことにより、粒径 2~3mm程度の粒剤の歩留りを 60%以上にすることが可能となった。また、打砕方式では剪断方式に比べ粒剤の角が取れており、袋詰め、積荷及び運搬の際、角が削れて粉化する可能性は低いと推定された。これらの結果により、打砕方式の方が優れていることがわかった（図 2-11）。

【剪断方式】



角が鋭い

【打砕方式】



若干角が削れている

図2-11 解砕方式の違いによる解砕物の形状

2-4-2-6 微生物への影響

2-4-2-2において造粒テスト機による加圧造粒に対する微生物への影響を検討するために、造粒前後および造粒後長期保存した試料中の生菌数を測定した。その結果、造粒前後および1年保存では菌数に変化はなく、2年保存でも1/10程度の減少にとどまり、造粒による影響はないと考えられた（表2-4）。

また、2-4-2-3と2-4-2-4で選抜されたバインダーおよび崩壊剤の影響も検討した。その結果、それらを含む試料の造粒前後の菌数の変化はなく、影響はないと考えられた。

表2-4 造粒による微生物への影響

試料	造粒前	造粒後	造粒後1年経過	造粒後2年経過
生菌数(cfu/g)	4.1×10^6	4.1×10^6	3.3×10^6	1.3×10^5

2-4-3 散布試験

粉塵化率が高い散布機械（ブロードキャスター：積載量 250kg）を用いて、2-4-2で試作した粒剤を200kgスケールで圃場散布試験を行った。その結果、粒剤の片面飛距離が5m（両面10m）を超え、また、散布の際の粉塵化も大幅に抑制されて、快適に散布できた。そして散布後、降雨時の崩壊性も速やかであった。

最終章 全体総括

3-1 複数年の研究開発成果

本事業により、以下の成果が得られた。

- ① バチルス属ライブラリーより選抜を行った結果、ネギ属野菜主要 7 病害それぞれに有効な菌株を最終的に複数得ることに成功した。
- ② 選抜した菌株の安全性は基本的に担保された。
- ③ 選抜した菌株の抗菌メカニズムにおいては抗菌物質の関与が示唆され、いずれも細胞膜に作用することがわかった。
- ④ 目標濃度（ 10^8 cfu/ml）で培養可能な、安価なバイオマス培地を開発した。
- ⑤ 各種散布機械で散布可能な粒剤を開発した。

3-2 研究開発後の課題

本研究開発により、有効菌の選抜、安全性、有効菌の培養方法等、製品化の目途が立ちつつあるが、圃場試験での効果の検証やユーザーからの意見や要望の調査、使用環境による影響や事例の調査等、情報量がまだ不十分である。今後、信頼性が高く、使い易い、ユーザーが買いたくなる、販売店が売りたい商品体系を構築するため、配布した試作品の感想等をユーザーや販売店から調査、収集し、それらを参考に製品の改良を行っていく必要がある。

3-3 事業化展開

生物的防除剤として開発を進めているが、農薬登録を行った場合、①作物や病害により用途が限定され、販売範囲も狭くなること、②登録には膨大な時間とコストがかかるため販売時期が大幅に遅れてしまうこと等、事業化の機会損失が懸念されるという指摘をアドバイザーから受けた。そこで、農薬登録の検討を行いつつ、早期の事業化に向け、植物活性剤や肥料等の分野において先行しての事業化を検討する。

現在実施中の日本植物防疫協会等の公的試験、試験協力先における圃場試験での評価を受け、改良等を検討した試作品（粉剤）を無料で希望者へ配布するとともに、販売店等の協力を得ながら試作品提供対象農家を増やし、製品の信頼性および評価等を蓄積していく。

粉剤製品については、圃場試験で一定の評価が得られた後、購入を希望された農家から販売店と協議し、順次有料化していく予定である。また、粒剤製品については無料サンプル出荷後、量産設備の導入検討等、コスト面の課題解決を図りながら製品化を目指す。