

Tyrophagus similis VOLGIN 死亡虫体から分離した微生物とその殺ダニ活性

菊田 治典¹⁾・高木 龍一郎²⁾

Isolation and Acaricidal Activity of Microorganisms from Dead *Tyrophagus similis* VOLGIN.

Harunori KIKUTA¹⁾ and Ryuichiro TAKAGI²⁾
(August 2000)

緒 論

コナダニ類は無気門類コナダニ上科に属し、腐食性、食穀性、食菌性、植物寄生性、昆虫や小型脊椎動物の巢内寄生性、線虫捕食性および屋内塵性のものなどを含み、きわめて多様な環境に見いだされる。コナダニ (*Tyrophagus* 属) の作物加害については、ベルギーの温室ハウレンソウ¹⁾、イタリアのメロン²⁾、アメリカオハイオ州の温室キュウリ³⁾などの報告がある。このようにケナガコナダニおよびこの近縁類は、ウリ類、ハウレンソウなど各種の野菜類に寄生し著しい被害を与え、我が国においても近年農業害虫として問題となることが多く、温室・ハウス栽培のキュウリ^{2),6)}、ナス、ハクサイおよびトマトの育苗³⁾などでケナガコナダニによる被害が報告されている。北海道においてもハウレンソウケナガコナダニ、オオケナガコナダニ、オンシツケナガコナダニおよびニセケナガコナダニの農作物被害が報告されている⁸⁾。

この中でもハウレンソウケナガコナダニ (*Tyrophagus similis* VOLGIN) の被害は全道に拡大しつつあり、全道 19 市町村で確認され、加害作物は 11 種類におよんでいる⁸⁾。これらはハウス栽培ハウレンソウへの加害が著しく、被害は新芽および新葉部に集中しておこり、外側の展開葉は瘤状の小突起を生じ、葉全体が光沢をおび縮葉し奇形となり、中心葉は加害により小孔があきその周囲は褐変する。

ハウレンソウケナガコナダニ発生拡大の原因としては、農薬効果の低下および土壌への未分解有機物投入量の増加によることが示唆されている^{3),6)}。ハウレンソウケナガコナダニの被害は年を増すごとに拡

大する傾向にあると考えられ、有効な防除法の確立は急務である。

本試験ではハウレンソウケナガコナダニが高密度に発生した際に、死亡個体が発見されることに注目し、寄生性微生物の分離、および分離微生物の防除利用の可能性について検討した。

材料および方法

1 試験地および供試材料および寄生性微生物の分離

試験地は北海道中央南西部に当たる胆振支庁の東端で東西北の三方を日高山系外縁部に囲まれ、耕地面積は少なく 1994 年からハウス農家が増加傾向にある。本試験地は穂別中島および穂別仁和のハウレンソウ無農薬栽培ハウス内に発生したハウレンソウケナガコナダニの死亡個体を供試ダニとした。死亡個体確認は物理的刺激を与えても動かないものを死亡個体とした。

細菌の分離は、死亡ハウレンソウケナガコナダニ 10 頭を滅菌蒸留水 0.5 ml の入った滅菌遠心チューブ内で磨砕し、懸濁液を作成し、懸濁液は NA 9 cm ペトリシャーレ培地 (0.3%肉エキス, 0.3%ポリペプトン, 1.5%寒天) で 25℃, 7 日間培養した。得られたコロニーは NA 斜面培地に移植して試験に供した。

糸状菌の分離は、死亡ハウレンソウケナガコナダニ 10 頭を滅菌蒸留水 0.5 ml の入った滅菌遠心チューブ内で磨砕し懸濁液を作成し、懸濁液は SDY 9 cm ペトリシャーレ寒天培地 (1%ポリペプトン, 1%酵母エキス, 4%グルコース, 1.5%寒天) で 25℃, 3 日間培養し、出現した糸状菌を SDY 斜面培

¹⁾ 酪農学園大学酪農学科, 微生物利用学

Department of Dairy Science Utilization of Microorganisms, Rakuno Gakuen University, Ebetsu 069-8501, Japan

²⁾ 穂別町ヘルシーフード農業センター

Hobetsu Town Health Food Agricultural Center, Hobetsu 054-0211, Japan

地に移植して試験に供した。

2 分離細菌の鑑別

1) グラム染色

供試細菌は NA 斜面培地で 25℃, 2 日間培養し, 定法によってグラム染色を行った。作成されたプレパラートは風乾した後, 光学顕微鏡で観察した。

2) 芽胞染色

芽胞菌の染色は 2% マラカイトグリーン液・0.3% サフラニン液染色法を用いた。即ち, スライドガラス上に供試細菌を塗抹し, 風乾後, 火炎固定してプレパラートとした。プレパラートに濾紙を乗せ沸騰水上で 2% マラカイトグリーン液を点滴し, 蒸留水を滴下し, 乾燥を防ぎながら 4 分間染色した。染色が終了したプレパラートは, 水洗後, 更に 0.3% サフラニン液で 40 秒間染色した。作成されたプレパラートは光学顕微鏡を用いて芽胞の有無および栄養細胞を観察した。

3) 運動性試験

運動性試験は NA 半流動培地 (0.3% 肉エキス, 0.3% ポリペプトン, 0.7% 寒天) 法とした。即ち, NA 半流動培地に供試菌を穿刺し 37℃, 7 日間培養し, 培地全体が混濁したものを, 有運動性株とした。

4) 好気性・嫌気性生育試験

酸素に対する生育については溶解した 1% ブドウ糖 NA 培地を 45℃ まで冷やし, 供試菌液を混和した後, 高層に固め, 上層に滅菌流動パラフィン を 2 mm 重層して 25℃, 7 日間培養した。判定は生育が表面に近い場合は好気性菌, 全般に生育している場合は通性好気性菌, 表面からはなれて生育する場合は微好気性菌, 最下層で生育する場合は嫌気性菌とした。

5) カタラーゼ反応試験

カタラーゼ反応は, スライドガラスに 3% 過酸化水素水 1 滴をのせ, NA 培地で 25℃, 7 日間培養した供試菌を一白金耳塗布した。判定は気泡が認められたものを陽性, その他を陰性とした。

6) オキシダーゼ反応試験

1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine HCl sol. を短冊形に切った濾紙に塗布して試験紙とした。試験は NA 培地で 25℃, 7 日間培養した供試菌を試験紙に一白金耳塗布し, 青色反応を示したものを陽性, 無変化を陰性とした。

7) OF 試験

OF 試験に用いた基礎培地は Difco の基礎培地を用い, 定法に従って高層に固め作成した。供試菌を 2 本ずつ穿刺し, 一本は好氣的に, 一本は滅菌流動

パラフィン を 2 mm 重層して嫌氣的に, 各々 25℃, 7 日間培養した。酸化的糖分解は好気培養で黄色, 嫌気培養で緑色を呈したものとした。発酵的分解は培地内に気泡や亀裂を生じ培地の一部を持ち上げ, さらに好気培養では黄色, 嫌気培養では緑色を呈したものとした。

8) 糖から酸の生成

ブドウ糖を添加した OF 培地 (0.2% ペプトン, 0.5% NaCl, 0.03% K₂HPO₄, 0.2% 寒天, 0.008% BTB, 1% ブドウ糖, pH 7.1) を各々高層に固め作成した。供試菌を 2 本ずつ穿刺し, 一本はそのまま好氣的に, 一本は滅菌流動パラフィン を 2 mm に重層し, 嫌氣的に各々 25℃, 7 日間培養し, 好気培養では青色, 嫌気培養では緑色を呈したものを陰性, 無反応を陽性とした。

3 殺ダニ活性

1) 供試細菌および供試糸状菌液の調整

供試細菌は NA 斜面培地を用いて 25℃, 7 日間培養し, 供試糸状菌は SDY 斜面培地を用いて 25℃, 14 日間培養した。培養した菌を各々 1 ml 滅菌蒸留水に一白金耳懸濁して供試菌液とした。

2) 供試ハウレンソウケナガコナダニ

供試ハウレンソウケナガコナダニは, 北海道勇払郡穂別町のハウレンソウ無農薬栽培ハウス内の発生個体を採取した。採取から 4 日間, 同圃場ハウレンソウの新芽を給餌し, 運動の活発な個体を供試した。

3) 殺ダニ活性試験

殺ダニ活性試験方法は濾紙接触法とした。即ち, 9 cm ペトリシャーレに供試菌液 1.5 ml をしみ込ませた濾紙を敷き, 芯に寄生しているハウレンソウケナガコナダニを払い落として濾紙上に放飼し, 1 日毎に 5 日間死亡ハウレンソウケナガコナダニ数を計数した。この処理を 2 反復した。

結果および考察

1. 穂別町の地域別ハウレンソウケナガコナダニ発生状況と死亡個体数

ハウレンソウ無農薬栽培ハウス 4 地点の各 10 株のハウレンソウにおいて, ハウレンソウケナガコナダニの発生状況調査を行った結果, 一株平均中島 1; 54.2 頭, 中島 2; 15.5 頭, 仁和 1; 11.0 頭および仁和 2; 10.0 頭の個体数を得, 中島においては著しく高い結果となった (表 1)。小林・深沢⁶⁾ および Kasuga & Amano⁹⁾ はハウレンソウケナガコナダニの増殖は多湿部位におう盛であるとしている。本試験では, 加害部位は新芽の部分に多く分布してい

表1 ホウレンソウ栽培ハウス内の *Tyrophagus similis* 発生状況および死亡個体数

調査地点	ホウレンソウ株											
	A			B			C			D		
	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)
中島1	93	15	16.1	101	25	24.8	68	7	10.3	72	18	25.0
中島2	34	0	0.0	36	11	30.6	25	0	0.0	13	0	0.0
仁和1	26	5	19.2	16	2	12.5	13	0	0.0	9	0	0.0
仁和2	16	0	0.0	16	0	0.0	13	0	0.0	16	4	25.0
	E			F			G			H		
	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)
	中島1	49	6	12.2	60	18	30.0	41	11	26.8	32	9
中島2	13	1	7.7	11	1	9.1	7	0	0.0	10	4	40.0
仁和1	11	3	27.3	9	1	11.1	10	4	40.0	6	0	0.0
仁和2	13	5	38.5	9	2	22.2	7	2	28.6	5	1	20.0
	I			J			一株当たり平均					
	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)	発生数	死亡数	割合(%)
	中島1	15	3	20.0	11	0	0.0	54.2	11.2	19.3		
中島2	6	1	16.7	0	0	0.0	15.5	1.8	10.4			
仁和1	5	1	20.0	5	1	20.0	11.0	1.7	15.0			
仁和2	3	1	33.3	2	0	0.0	10.0	1.5	16.8			

るものの、比較的乾燥している展開葉においても生息が確認された。しかし、展開葉ではくぼみや縮葉部に集中分布していることが観察された。このことからホウレンソウケナガコナダニは、乾燥部位においても多湿部位を選択して生息していると考えられた。

Johnston & Bruce⁵⁾ および小林・深沢⁶⁾ は、ホウレンソウケナガコナダニの作物選択の基準は嗜好性以外に、葉の形および栽植密度等の耕種的要因に由来するものであるとしている。本試験では、中島1で著しく発生数が高い結果となり、同一作物でありながら、他の調査地点に比較して発生数に差異が生じたことは、嗜好性だけでなく地域による隔離およびハウスによる隔離、連作による種の温存などの耕種的要因が局所的発生の主要な要因であると考えられた。

得られたホウレンソウケナガコナダニの中で死亡

ダニ数の一株平均は、中島1；11.2頭、中島2；1.8頭、仁和1；1.7頭および仁和2；1.5頭となった。ホウレンソウケナガコナダニ発生数に対する死亡個体の割合は、発生数が極度に多かった中島1で一株平均19.3%となった。他は中島2；10.4%、仁和1；15.0%および仁和2；16.8%となり、発生数に対する死亡個体割合に特異な差異は見られなかった。

2. 寄生性微生物の分離

ホウレンソウ無農薬栽培ハウスから採集した死亡ホウレンソウケナガコナダニから分離された寄生性微生物は表2に示した。即ち、細菌は中島1；7菌株、中島2；1菌株、仁和1；2菌株および仁和2；2菌株であった。糸状菌は、中島1；3菌株、中島2；1菌株、仁和1；0菌株および仁和2；2菌株であった。この結果において供試虫数はいずれの分

表2 ホウレンソウ栽培ハウス内 *Tyrophagus similis* から分離された微生物

調査地点	分離株	合計	
細菌	中島1	BDH 1-1, BDH 1-2, BDH 1-3, BDH 1-4, BDH 1-5 BDH 1-6, BDH 1-7	7
	中島2	BDH 1-8	1
	仁和1	BDH 2-1, BDH 2-2	2
	仁和2	BDH 2-3, BDH 2-4	2
糸状菌	中島1	FDH 1-1, FDH 1-6, FDH 1-8	3
	中島2	FDH 1-9	1
	仁和1		0
	仁和2	FDH 2-1, FDH 2-5	2

離地点においても、各々10頭から分離を行ったにも関わらず、中島1では高い分離菌株数が得られた。糸状菌においては分離菌株数が著しく少ないことから明瞭な差異は認められなかった。

3. 分離細菌の鑑別

分離された細菌12菌株を長谷川の方法⁴⁾に従い8種類の生化学試験を表3に示した。即ち、グラム陽性菌株が11菌株、グラム陰性菌株が1菌株、形状

は桿菌が10菌株、球菌が2菌株、抗酸性を示したのは2菌株。芽胞菌は3菌株、運動性を有した菌株は4菌株、好気及び嫌気での発育は12菌株であった。カタラーゼ陽性は9菌株、オキシダーゼ陽性反応は1菌株、ブドウ糖から酸の産生は8菌株、OFテストでは発酵を呈したのは3菌株、酸化を呈したのは5菌株、陰性を呈したのは4菌株であった。以上の結果から、BDH 1-5, BDH 2-2, BDH 2-3の3菌株は *Bacillus* 属, BDH 1-3, BDH 2-4の2菌株は *Nocar-*

表3 ホウレンソウ栽培ハウスから分離された細菌の生化学試験

分離株	生化学試験											属
	グラム染色	形	抗酸性	芽胞	運動性	好気発育	嫌気発育	カタラーゼ	オキシダーゼ	ブドウ糖(酸)	OF	
BDH 1-1	+	R	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Erysipelothrix, Lactobacillus, Arachnia</i>
BDH 1-2	+	S	-	-	-	+	+	+	-	+	O	<i>Micrococcus</i>
BDH 1-3	+	R	+	-	-	+	+	+	-	+	O	<i>Nocardia</i>
BDH 1-4	+	R	-	-	+	+	+	+	-	+	F	<i>Corynebacterium</i>
BDH 1-5	+	R	-	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>
BDH 1-6	+	R	-	-	-	+	+	-	-	+	O	<i>Erysipelothrix, Lactobacillus, Arachnia</i>
BDH 1-7	+	S	-	-	-	+	+	+	-	+	F	<i>Staphylococcus</i>
BDH 1-8	+	R	-	-	+	+	+	+	-	+	F	<i>Corynebacterium</i>
BDH 2-1	-	R	-	-	+	+	+	-	+	-	O	<i>untypable</i>
BDH 2-2	+	R	-	+	-	+	+	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>
BDH 2-3	+	R	-	+	-	+	+	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>
BDH 2-4	+	R	+	-	-	+	+	+	-	+	O	<i>Nocardia</i>

R：桿菌，S：球菌，F：発酵，O：酸化

表4 ホウレンソウ栽培ハウスから分離された細菌および糸状菌による殺ダニ活性

調査地点	分離株	死亡頭数					死亡率 (%)
		経過日数					
		1	2	3	4	5	(日)
中島1	BDH 1-1	1	0	0	0	0	12.5
	BDH 1-2	0	0	0	0	0	0.0
	BDH 1-3	3	2	0	0	0	62.5
	BDH 1-4	0	0	0	0	0	0.0
	BDH 1-5	2	0	0	0	0	25.0
	BDH 1-6	3	1	0	0	0	50.0
	BDH 1-7	0	0	0	0	0	0.0
中島2	BDH 1-8	0	0	0	0	0	0.0
仁和1	BDH 2-1	1	0	0	1	0	25.0
	BDH 2-2	3	0	1	0	0	50.0
仁和2	BDH 2-3	3	0	0	0	0	37.5
	BDH 2-4	3	0	0	0	0	37.5
	control	0	0	0	0	0	0.0
中島1	FDH 1-1	1	0	0	0	0	12.5
	FDH 1-6	3	0	0	0	0	37.5
	FDH 1-8	0	1	0	0	0	12.5
仁和1	FDH 1-9	3	1	0	0	0	50.0
仁和2	FDH 2-1	3	0	0	0	0	37.5
	FDH 2-5	3	0	0	0	0	37.5
	control	0	0	0	0	0	0.0

※試験にはそれぞれ8頭の若ダニを用いた。

dia 属, BDH 1-4, BDH 1-8 の 2 菌株は *Corynebacterium* 属。BDH 1-1, BDH 1-6 の 2 菌株は *Erysipelothrix* 属, *Lactobacillus* 属, *Arachnia* 属のいずれかに属した。BDH 1-2 は *Micrococcus* 属。BDH 1-7 は *Staphylococcus* 属に属した。BDH 2-1 は未同定となった。この結果から, 分離地点において分離細菌に特異な差は認められず, ホウレンソウケナガコナダニすべてから微生物が分離された。

4. 殺ダニ活性

分離細菌による殺ダニ活性試験結果を表 4 に示した。12 株中 8 株の 77.8% に殺ダニ活性が認められた。死亡が認められた菌株の死亡率は BDH 1-3 は 62.5%, BDH 1-6, BDH 2-2 は 50%, BDH 2-3, BDH 2-4 は 37.5%, BDH 1-5, BDH 2-1 は 25.0%, BDH 1-1 は 12.5% となり, BDH 1-2, BDH 1-4, BDH 1-7, BDH 1-8 には死亡は認められなかった。仁和では分離菌数 2 株の内 2 株が殺ダニ活性を有したのに対し, 中島では 50% の殺ダニ活性となった。

分離糸状菌による殺ダニ試験結果は, 6 株全てに殺ダニ活性が認められた。死亡率は FDH 1-9 は 50.0%, FDH 1-6, FDH 2-1, FDH 2-5 は 37.5% および FDH 1-1, FDH 1-8 は 12.5% であった。これらを使用によってホウレンソウケナガコナダニの防除に高い効果が得られるものと考えられた。

要 約

北海道勇払郡穂別町において, ホウレンソウ無農薬栽培ハウスに発生したホウレンソウケナガコナダニ (*Tyrophagus similis* VOLGIN) を調査し, 死亡個体から細菌および糸状菌の分離を行い, 分離された微生物によるホウレンソウケナガコナダニの防除の可能性について検討した。その結果以下のことを明らかにした。

- 1) ホウレンソウケナガコナダニの発生状況は, 中島 1 で著しく高い発生となった。これはハウスによる隔離, 地域による隔離および連作による種の温存などの耕種的要因が局所的発生の主要原因であることが示唆された。
- 2) ホウレンソウケナガコナダニは新芽および展開葉を加害し, 展開葉のくぼみや縮葉部の多湿部位に分布していた。
- 3) ホウレンソウケナガコナダニ発生数に対して死亡ダニは増加するものの, 死亡ダニ割合には特異な差異は認められなかった。
- 4) 分離された細菌は *Bacillus* 属, *Nocardia* 属, *Corynebacterium* 属, *Erysipelothrix* 属,

Lactobacillus 属, *Arachnia* 属, *Micrococcus* 属, *Staphylococcus* 属となり, 分離地点による差異が認められないことから穂別町におけるホウレンソウケナガコナダニの普遍的な微生物と考えられた。

- 5) 分離細菌の 77.8% に殺ダニ活性が認められ, 糸状菌は分離菌株全てに殺ダニ活性が認められた。これらを使用によってホウレンソウケナガコナダニの防除に高い効果が得られるものと考えられる。

文 献

- 1) Bruel, W.E. Van Den, 1940. UN ravageur de l'épinard d'hiver: *Tyrophagus dimidiatus* HERM. (longior GERV.). Bull. Inst. Agron. Gembloux., 9: 81-99.
- 2) 江原昭三・真梶徳純, 1975. 農業ダニ学, pp.328, 全国農村教育協会, 東京.
- 3) 藤本 清・足立年一, 1977. ナス育苗床でのケナガコナダニの発生と防除, 応動昆虫中国支部会報; 19: 1-7.
- 4) 長谷川武治編著, 1985. 微生物の分類と同定<下>, pp.99-161, 学会出版センター, 東京.
- 5) Johnston, D.E. and W.A. Bruce, 1965. *Tyrophagus neiswanderi*, a new acarid mite of agricultural importance (Acari-Acaridae). Res. Bull. Ohio Agr. Expt. Stn., 977: 1-17.
- 6) 小林義明・深沢永光, 1983. コナダニによる農作物害とその防除, 並びに同時発生するホコリダニとの関連, 静岡農試研報; 28: 33-42.
- 7) Laffi, F., 1980. Un acaro dannoso ai simenzai di melone: *Tyrophagus similis* VOLGIN. Informatore filopatol., No.7/8: 17-21.
- 8) 中尾弘志・黒佐和義, 1988. 日本初記録のコナダニ類 4 種, ならびにそれらによる農作物の被害について, 日本応用動物昆虫学会誌; 32: 135-142.
- 9) Shikoh Kasuga and Hiroshi Amano, 2000. Influence of temperature on the life history parameters of *Tyrophagus similis* Volgin (Acari: Acaridae). Appl. Entomol. Zool., 35(2): 237-244.

Summary

In the greenhouses of Hobetsu Town, spinach was examined for the mite *Tyrophagus similis* VOLGIN. Bacteria and fungi were isolated from dead mites found on the spinach, and the microorganisms were applied as a possible countermeasure for controlling the mites.

- 1) The mites were most prevalent on the spinach in Nakajima-1. Plausible factors behind the infestation are that spinach was being cultivated repeatedly in the greenhouse and that this greenhouse was remote from other greenhouses, thus preserving the mites.
- 2) The mites damaged the sprouts and developing leaves of the spinach, and were distributed in the hollow and shrunken moist parts of the leaves.
- 3) The greater the mite population, the greater the number of dead mites were found. However, the rate of dead mites was comparable in all the greenhouses we visited.
- 4) Bacteria isolated from the dead mites were from eight genera: *Bacillus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Arachnia*, *Micrococcus*, and *Staphylococcus*. Approximately the same distribution was found in all the greenhouse.
- 5) Acaricidal action was confirmed in 77.8% of the bacteria isolates and in 100% of the fungi isolates. Bacteria and fungi isolated from *Tyrophagus similis* VOLGIN is deemed effective in the biological pest control of mites that infest greenhouse spinach.