

北海道松前郡, 厚田郡, 野付郡の森林土壌における *Bacillus thuringiensis* の検索

菊田 治典*・村野 紀雄**・飯塚 俊彦***
伴 戸 久 徳****

Isolate of *Bacillus thuringiensis* in the matumae_gun, athuta_gun, nothuke_gun
Hokkaido forest soil

Harunori KIKUTA, Norio MURANO, Tosihiko IZUKA,
Hisanori BANTO
(October 2005)

緒 言

Bacillus thuringiensis (以下 BT) は石渡 (1901) によってカイコの卒倒病の原因となる細菌として単離された病原微生物で, 殺虫性結晶タンパク質 (以下: ICP) を産生する。ICP は鱗翅目, 双翅目, および鞘翅目等の幼虫をそれぞれ特異的に殺す。更に, ICP は自然環境の中で速やかに分解され, 環境に対する付加が少ないことから優れた生物農薬として注目されている。

本試験は自然環境における BT の消長を明らかにして, 生物農薬開発の基礎資料を得る目的で行なった。

材料および方法

調査は森林土壌を対象とした。即ち, 調査地は酪農学園大学所有の北海道野付郡別海町奥行林地 (以下: 奥行), 厚田郡厚田村大字望来林地 (以下: 望来), 松前郡福島町字千軒林地 (以下: 千軒) とし, 表土を採集し BT の分離に供した。調査地環境は奥行および望来では沢地でヤチハンノキ, ヤチダモ, ハルニレなどの樹木が目立ち, 落ち葉の堆積は見られるが, 比較的若い林地とした。千軒では杉林周辺の雑木地とした。

採取された土壌サンプルは, 菊田ら (1989)¹⁾ およ

び菊田・浜田 (2001)⁵⁾ の方法で BT の分離に供した。即ち, 培養後得られたコロニーは, マンニトール非分解性試験およびレシチナーゼ反応試験によって *Bacillus cereus* (以下 BC) を選抜した。選抜された BC は 2% マラカイトグリーン溶液および 0.3% サフラニン溶液で, 芽胞および結晶タンパク質の識別染色を行い, 結晶タンパク質の確認されたものを BT とした。

結果および考察

本試験におけるマンニトール非分解性株の分離状況は奥行では 5 調査ポイントの土壌から菌株の分離を行い, A 区: 98%, B 区: 96%, C 区: 70%, D 区: 78%, E 区: 94%, 平均 87.2% の分離率となった。望来では 5 調査ポイントの土壌から菌株の分離を行い, A 区: 78%, B 区: 77%, C 区: 93%, D 区: 92%, E 区: 91%, 平均 86.2% の分離率となった。千軒では 4 調査ポイントの土壌から菌株の分離を行い, マンニトール非分解性株は A 区: 90%, B 区: 100%, C 区: 88%, D 区: 90%, 平均 92.0% の分離率となり, 千軒においてやや高い分離率になった。

それらの中でレシチナーゼ反応が得られたのは, 奥行では A 区: 79.6%, B 区: 50.0%, C 区: 80.0%, D 区: 33.3%, E 区: 83.0% となり, 平均

* 酪農学園大学酪農学部・酪農学園大学短期大学部酪農学科微生物利用学研究室

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

** 酪農学園大学環境システム学部地域環境学科地域環境保全学研究室

Department of Regional Environmental studies, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

*** (株)北海道グリーンバイオ研究所

Reserch Institute of Hokkaido Greenbio, East5, North15, Naganuma, 069-1301, Japan

**** 北海道大学大学院

Hokkaido University Graduate School, North9, West9, Kita-ku, Sapporo, 060-8589, Japan

***** 本研究は 2000 年度酪農学園大学・酪農学園短期大学部共同研究の助成 (採択 No.1) を受けたものである。

65.2%で286株が得られた。望来ではA区：52.2%，B区：44.7%，C区：35.8%，D区：77.6%，E区：75.6%となり，平均57.2%で248株が得られた。千軒ではA区：77.8%，B区：84.0%，C区：86.4%，D区：91.1%となり，平均84.8%で333株が得られた。

奥行，望来，千軒から得られた867株をマラカイトグリーンおよびサフラニン染色を行い光学顕微鏡でICPの有無を観察したところ，ICPの観察された株は得られなかった。

菊田ら(1990)²⁾は北海道江別市野幌森林公園においてBTの分離を行い，数多く分離される地点とまったく分離されない地点があることを報告している。また，菊田ら(1999)³⁾は屋久島においてBTの分離を行い，林道などにおいて分離率が高いことを示唆している。また，酪農学園大学野外礼拝堂200地点および野幌森林公園200地点の土壌からBTを分離して，BT分離率はBCとして分離された菌株の1%から2%で，土壌中に局在分布していることを報告し，土壌中で増殖している可能性は低いことを示唆している⁴⁾。

本試験の結果はこれらの報告を裏付けるものと考えられた。即ち，いずれの調査地も沢地で若い樹木が多い林であり，葉に昆虫の食害痕はあまり観られなかったことから，BTは土壌中においてBCと近似した菌株として分離されるものの，BCとは生活環を異にし，BTは樹冠において増殖し，その一部が落下して土壌に生息している可能性を示唆したものと考えられた。

摘 要

本試験で分離選抜されたBC 867株の中からBTは分離されなかった。BTはBCと近似した菌株として分離されるものの，BTはBCとは生活環を異にし，樹冠において増殖し，その一部が落下して土壌に生息している可能性を示唆した。

引用文献

- 1) 菊田治典・浅野真一郎・飯塚敏彦，1989. 北海道の土壌から分離された *Bacillus thuringiensis*. — 喜茂別町，蘭越町，ニセコ町からの分離株 —. 北大農邦文紀要，16(4) 383-389.
- 2) 菊田治典，橋本明，坂本与市，飯塚敏彦，1990. 北海道における土壌から分離された *Bacillus thuringiensis*. 野幌森林公園からの分離株. 酪農学園大学紀要，14(2)：189-197.
- 3) 菊田治典・黒岩 学・高木隆一郎・飯塚俊彦，1999. 屋久島土壌から分離された *Bacillus thuringiensis* I. H-serotype のフローラ. 日蚕雑 68(3)：217-223
- 4) 菊田治典・五十嵐倫子・立林千夏・荻野幸子・村田顕治，2001. 北海道の森林土壌における *Bacillus thuringiensis*. 日本蚕糸学雑誌 70(1)，1-9
- 5) 菊田治典・浜田知佐子，2001. 微生物農薬有用細菌 *Bacillus thuringiensis* の簡易分離法の検討. 酪農大紀要 25(2) 277-280.

Summary

Bacillus cereus 867 was isolated in this experiment. *B. thuringiensis* was not generated from the *B. cereus* 867 stock. It was isolated as the bacteria that resembled *B. cereus*. *B. thuringiensis* usually multiplies on trees. The bacteria that migrated from the trees suggest the possibility that *B. thuringiensis* inhabited the soil.