



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner による家蚕疾病の病原機作 : 第1報 B.thuringiensis の芽胞分離
Author(s)	滝沢, 義郎; TAKIZAWA, Yoshiro; 松本, 継男 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(4), 482-485
Issue Date	1970-12-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11811
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(4)_p482-485.pdf



Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis* BERLINER

による家蚕疾病の病原機作

第1報 *B. thuringiensis* の芽胞分離

滝沢義郎・松本継男

(北海道大学農学部蚕学教室)

Infection mechanism of the disease of the silkworm, *Bombyx mori* L., caused by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER

I. Separation of the spores of *B. thuringiensis*

Yoshiro TAKIZAWA and Tsuguo MATSUMOTO

(Laboratory of Sericulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received June 30, 1970

緒 言

B. thuringiensis は *B. cereus* に極めて類似した性状をもつ昆虫疾病病原細菌である⁵⁾。*B. thuringiensis* およびその類縁菌の侵害をうけた昆虫(主として鱗翅目昆虫)は、一般に腸管の麻痺による摂食停止をおこし死亡する。家蚕においても顕著なる感受性を示し、挙動不活発、皮膚の弛緩をきたし、下痢・吐液等の病勢の進行に伴い黒変、死後軟腐して悪臭を放つ¹⁾。この疾病は軟化病と呼ばれ、ウイルスや生理障害などによっても発現するが、家蚕における被害が甚大でその感染発病機構の究明が急がれている。

筆者らは *B. thuringiensis* に起因する家蚕軟化病の病原機構を究明するために、まず完熟芽胞を家蚕に投与して家蚕体内での *B. thuringiensis* の動向を検討することを考慮したが、芽胞のうりに結晶体を抱有する *B. thuringiensis* は、従来の遠心洗浄の操返しによる芽胞採取法では、結晶体が混入し完熟芽胞のみを得ることは困難でありまだ行なわれていない。

本報は取量の多い完熟芽胞を得る芽胞分離法を検討し、併せて *in vitro* での芽胞の発育様相の観察結果を報告する。

本研究にあたり終始有益なる助言を賜った北海道大学

農学部植物ウイルス・菌学教室の小島誠氏に厚く謝意を表する。

実験材料および方法

1. 供試菌株 北海道大学農学部蚕学教室保存の *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner (農林省蚕糸試験場分与) を使用した。

2. 培養 普通寒天斜面培地(肉エキス0.3%, ペプトン0.5%, 寒天1.5%, 調整pH7.2)に、1カ月30°Cで好氣的に培養する。

3. 芽胞分離 培養菌体を鈎菌し冷却滅菌水で洗浄を操返し、軽くホモジナイザーして乳状に均等分散後、しょ糖密度勾配遠心法で分画する。出現した帯分離部を有機溶媒(トリフロロトリクロロエタン:シクロヘキサン, 2:1)中に再浮遊させ、芽胞の分離採取を行なった。

4. 分離芽胞の検討 位相差顕微鏡下で芽胞の分離状態を観察するとともに、正常なる発育様相を検討することで操作の成否を確かめた。そのため普通液体培地(肉エキス0.3%, ペプトン0.5%, pH7.2)に一定量の芽胞液を接種し、30°Cに保護後経時的に次の各試験を行なうと同時に、普通寒天培地にも接種して培養形態を観察した。

i) 生長度の計測 比濁法にて菌量を測定した。盲検

は普通液体培地で調製し 630 m μ (島津製スペクトロニック 20) で行なった。又菌数はトーマーの血球計算盤で測定し、乾燥剤を入れたデシケーター内で減圧乾燥させた。菌体重量も秤量した。

ii) pH の測定は pH メーター (日立-堀場 F-5) で行なった。

iii) 糖の消費 0.01% グルコース添加の前記液体培地に芽胞液を接種し、発育に伴う糖の消費量を SOMOGYI-NELSON^{6,9)} 法で定量した。

実験結果

B. thuringiensis の芽胞の分離過程を Fig. 1 に示した。粥状の菌体を重層した一回のしよ糖密度勾配遠心で、出現した水面下 1.8 cm のバンド部 (0.4 cm) は、顕微鏡下で多くの芽胞が認められたが、わずかの細胞片や結晶体等も含んでいたのをさらにそのバンド部のみを同一操作を実施し、完熟芽胞のみを得た (Fig. 2)。分離芽胞は有機溶媒抽出、浸漬処理を行なって安定した休止芽胞にした。収量はトーマーの血球計算盤で 1,600/ μ l の芽胞数であった。

分離された芽胞の普通液体培地における発育様相を Fig. 2 に示した。これにより明らかなように、吸光度、細菌数、乾菌重量は経時的に増加し、培養後 24 時間以降もそれらの増加率は漸減した。pH は糖の減少に伴い下がるが糖の消失で再び上昇した。Fig. 3 の吸光度に基づく発芽率⁴⁾を算定した結果を、Fig. 4 に示した。

一方、普通寒天斜面培地に同様に芽胞を接種し、培

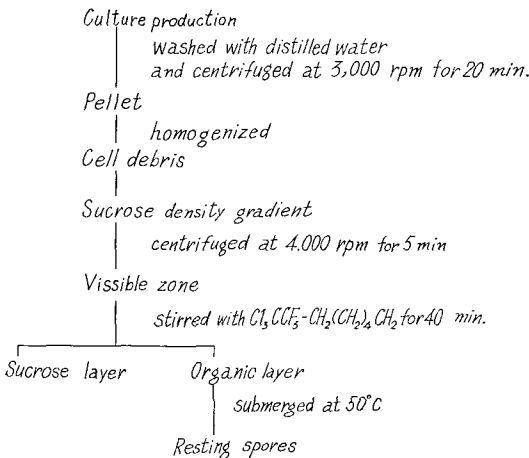


Fig. 1 Separation of spores of *B. thuringiensis* Preparation of the spores of *B. thuringiensis* by centrifugation and organic solvents absorption.

養後経時的に *B. thuringiensis* の塗沫標本を作成し SMIRNOFF の染色法⁸⁾により、芽胞の形態を顕微鏡下で観察した。その結果接種後 4 時間の培養物に多くの発芽

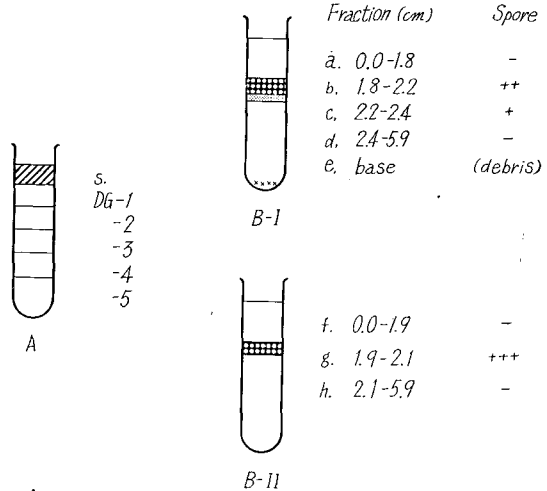


Fig. 2 Fractionation of the spores of *B. thuringiensis* by density gradient centrifuging at 4,000 rpm for 5 min.

A; density gradient tube before centrifuging S: sample (culture product) DG-1~5: each 2 ml of sucrose solution (10~50%) A tube was stored at 0°C overnight B-I; first centrifuging B-II; second centrifuging

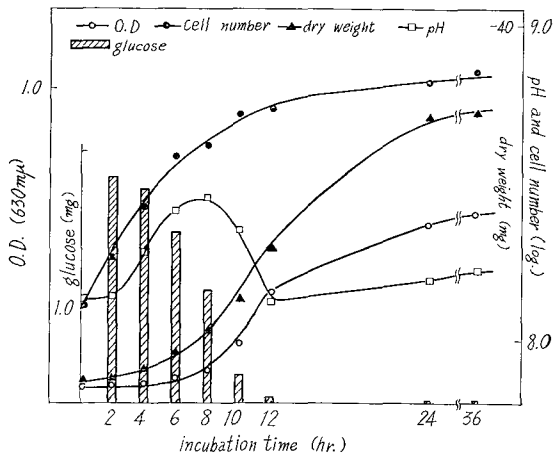


Fig. 3 Growth curve of the spores of *B. thuringiensis*

Nutrient broth were inoculated to give an initial concentration of approximately 5×10^7 spore/ml. and aerated at 30°C. Sample were removed at regular intervals.

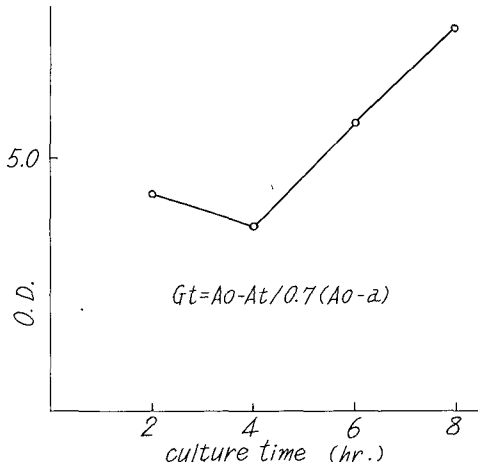


Fig. 4 Germination percent of the spores of *B. thuringiensis*

Gt: germination percent

Ao: O.D. of just after seeding's broth

At: O.D. of inoculated broth

a: O.D. of non-seeded broth

(by HACHISUKA et al. (1955)⁴⁾ formula)

細胞を、12時間培養に完全な新生細胞、24時間で芽胞・結晶体をもつ栄養型細胞、36時間で遊離した芽胞や結晶体等がそれぞれ観察された。

考察および論議

芽胞形成細菌の芽胞は適当な栄養分や温度を与えると、ただちに発芽する。従って完全なる休止芽胞を得るのは容易でなく、多くの研究者は遠沈洗浄の繰返しやカタラーゼ作用の消失まで洗浄する方法等で芽胞を得ている。しかし芽胞のうちに結晶体を形成する *B. thuringiensis* は、従来の洗浄法のみで芽胞を分離採取するのは極めて困難である。

ANGUS²⁾, BATESON³⁾は有機溶媒を使って、*B. thuringiensis* var. *sotto* ISHIWATA の結晶体の単離を試みたが、芽胞の混在を来し生産の低下をまねいている。渡辺ら¹⁰⁾は老培養物からしょ糖密度勾配法で、結晶体の純化を行ない結晶体を得ている。PENDLETON, NORRIS⁷⁾は界面活性剤を利用し、口紙による口過法で芽胞を得ているが、回収率が約60%と低い。

本方法では老培養物からほとんどの芽胞が採取出来、且つ収量の多い安定した芽胞が得られた。

芽胞の発育様相および顕微鏡観察結果より考察するに、*B. thuringiensis* 芽胞は普通液体培地で接種後4時

間で発芽し、接種前に置かれていた退行的変化から次第に回復し、12時間迄に細胞成分を活発に合成して栄養型細胞へ進み、24時間で安定した新細胞に達するものと思われる。又結晶体は36時間までに培地中に遊離するものと考えられる。

一般に休止性の強い細菌芽胞が発芽し栄養型細胞へ移行する過程や芽胞化などは、生物の分化機構の究明に興味ある問題を示しているが、この芽胞形成細菌が昆虫病原細菌で sporogenesis が宿主体内で営まれると推定すると、昆虫の病理や生理面からも考察する素材となろう。

摘 要

昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER の芽胞分離を試み、その分離芽胞の増殖様相を観察した。その結果は次のように要約される。

1) 1ヵ月好気培養された *B. thuringiensis* 菌体を、しょ糖密度勾配遠心法、有機溶媒処理により収量の多い安定した休止芽胞を採取した。

2) 分離芽胞は普通液体培地接種後、4時間で発芽し12時間で新生細胞、24時間で芽胞や結晶体を抱有した栄養型細胞になる。結晶体の遊離は培養後24時間より36時間までと思われる。

引用文献

- 1) ANGUS, T. A. 1956: Can. J. Microbiol. 2: 111.
- 2) ——— 1959: J. insect Pathol. 1: 97.
- 3) BATESON, J. B. 1955: Nature 205: 622.
- 4) HASHIMOTO, Y., ASANO, K., KATO, N., OKAJIMA, M. and KITANO, T. 1955: J. Bact. 69: 399.
- 5) HEIMPFL, A. M. 1967: J. invertebrate Pathol. 9: 364.
- 6) NELSON, N. 1944: J. Biol. Chem. 153: 375.
- 7) PENDLETON, I. R. and R. B. MORRIS 1966: Nature 212: 729.
- 8) SMIRNOFF, W. A. 1962: J. insect Pathol. 4: 384.
- 9) SOMOGYI, M. 1945: J. Biol. Chem. 160: 61.
- 10) 渡辺忠雄・筒井亮毅・岩花秀典 1966. 日本蚕糸学雑誌 35: 418.

Summary

The present paper reports on the separation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER which causes the disease of insects (mainly lepidopterous larvae) and on the growth of the sep-

arated spores in nutrient broth. The results are summarized as follows:

1) Spores of *B. thuringiensis* were separated by sucrose density gradient centrifugation and absorption in organic solvents (trifluorotrchloroethane: cyclohexane, 2:1) from the cultures on the nutrient slant agar for 30 days. The method described here

gives a much higher yield of spores. It was given a yield of approximately 1,600 spores/ml.

2) The spore germinated at hours after seeding in the medium and developed new cell for 12 hours and removed a vegetative cell which containing spore and crystal for 24 hours. The crystal was released till 36 hours.