昆虫寄生菌 *Metarhizium anisopliae* ESC 1 の防蟻効果 第3報 — 処理土壌における効果の持続性 —

飯島倫明^{*1}, 江口博美^{*1*2}, 檜垣宮都^{*1}

Termiticidal Performance of the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae* ESC 1 (Ⅲ)
— Durability of Termiticidal Performance on its conidia-treated soil —

Tomoaki IJIMA^{*1}, Hiromi EGUCHI^{*1*2}, and Miyato HIGAKI^{*1}

The conidia of *Metarhizium anisopliae* ESC 1 treated on a sterilized soil showed termiticidal performance against workers of *Coptotermes formosanus*, which was found to last as long as one year by keeping the moisture content of the soil to be 25% at 28°C, although it did not show soil boring-prevention or repellent effect. When the conidia-treated soil was dried up to less than 5% moisture content, the conidia in the soil perished and the termiticidal performance declined rapidly. The termiticidal performance of conidia treated on unsterilized soil lasted for 4 weeks. These results in some laboratory tests suggested that practical use of the *M. anisopliae* ESC 1 conidia-treated soil as a biological termite control was expected.

滅菌土壌に処理した *Metarhizium anisopliae* ESC 1 分生胞子は、穿孔阻止効果と忌避効果は無いが、処理土壌の含水率を25%に維持できれば、28°Cで1年間保存してもその殺蟻効果は持続した。処理土壌が含水率5%以下に乾燥すると、分生胞子が死滅しその殺蟻効果も急激に低下した。非滅菌土壌に処理した *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子も、その殺蟻効果が4週間持続した。室内試験による結果から、昆虫寄生菌 *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子は実用性が期待できる微生物防蟻剤であることが示唆された。

1. 緒 言

EcoScience 社がシロアリ防除用に *Metarhizium anisopliae* ESC 1 株の分生胞子を製剤化した「バイオブラスト」に注目し、その防蟻効果を解明し、実用性を評価することを目的とした。

土壌に処理された本菌株の分生胞子は、イエシロアリに対しても、ヤマトシロアリ職蟻に対しても、強い殺蟻効果を示し、25°Cから30°Cで良くその効果を発現することから、駆除剤として注目されると報告した¹⁾。

前報²⁾では、イエシロアリ職蟻に対する *M. an-*

* 1 東京農業大学地域環境科学部 Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture

* 2 現在 シントーファイン株式会社 SHINTO FINE CO., LTD.

isopliae ESC 1 の感染力と殺蟻効果の発現を検討し、本菌株の分生胞子を培地上で発芽生育させた菌糸体上に再形成した分生胞子も殺蟻効果を示し、死亡していない感染したシロアリの体表から分生胞子が他の個体に伝播し感染させることもあるが、感染死亡したシロアリの体表面に再形成された分生胞子が伝播し死亡させる方が主であると報告した。

本報では、滅菌土壤に処理した *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子の殺蟻効果の持続性および穿孔阻止効果と忌避効果について検討し、バイオブラストの実用性を評価した。

2. 実 験

2.1 供試菌株および分生胞子懸濁液の調製

EcoScience 社が *M. anisopliae* ESC 1 の分生胞子を製剤化した「バイオブラスト」³⁾ を供試した。前報^{1, 2)} に従い、バイオブラスト 1 g を滅菌蒸留水 100 ml に懸濁したものを分生胞子懸濁液原液とし、これを滅菌蒸留水でさらに 20 倍に希釈し使用した。

20 倍に調製希釈した分生胞子懸濁液は生存分生胞子 4.3×10^6 個/ml を含有していた。

2.2 供試シロアリ

東京農業大学林産化学研究室で飼育しているイエシロアリ *Coptotermes formosanus* SHIRAKI 職蟻を供試シロアリとした。

2.3 分生胞子処理土壤の保存と殺蟻効果の測定

2.3.1 分生胞子処理土壤の調製と保存

前報²⁾ に従い、鹿児島県曾於郡大崎町の東京農業大学大崎町シロアリ試験地内で採取した砂壤土を滅菌して得た乾燥滅菌土壤に、20 倍希釈した分生胞子懸濁液を処理し分生胞子処理土壤とした。調製した分生胞子処理土壤は、生存分生胞子 1.2×10^6 個/土壤 g を含有していた。

また、採取した砂壤土中の微生物と pH を常法により測定した。細菌用培地は YG 培地を、糸状菌用にはローズベンガル培地を使用した。この非滅菌土壤に処理した分生胞子についても、殺蟻効果の持続性を検討した。

この処理土壤に滅菌蒸留水を加え、土壤含水率を調節後、マヨネーズ瓶内に取り、密栓して 28℃ で保存した。保存中はその質量を測定し、含水率

が変動しないように注意した。土壤含水率を 10%, 15%, 20%, 25% および 30% として、保存期間は最大 90 日間とした。長期間の保存は、土壤含水率を 15%, 25% とし、最大 1 年間保存した。各含水率について、3 瓶を保存した。

2.3.2 処理土壤の乾燥状態での保存

含水率を 25% に調節した処理土壤を、28℃ の恒温器内で含水率 5% 以下に乾燥した。この含水率で、最大 6 週間 28℃ で保存した。

2.3.3 殺蟻効果の測定方法

所定期間保存後、直径 90 mm シャーレに、土壤含水率を 25% に再調節した分生胞子処理土壤 20 g を取り、イエシロアリ職蟻 10 頭を投入し、28℃ で飼育してシロアリの健康状態を観察した。土壤含水率 30% で保存した処理土壤はその土壤含水率で殺蟻効果を測定し、殺蟻効果の測定は 5 回の繰り返しとした。

2.4 処理土壤中の生存分生胞子数の測定

滅菌蒸留水 1 リットルにクロラムフェニコール 0.3 g を溶解後、ろ過滅菌した液を希釈液とした。希釈液 90 ml を 300 ml 容三角フラスコ分注し、測定する土壤 10 g を加え、良く攪拌抽出した。この液を 1 次懸濁液とし、さらに希釈液で 10 倍に希釈し 2 次懸濁液とした。3 次懸濁液あるいは 4 次懸濁液まで希釈した懸濁液 0.5 ml をマイコロジカルアーカー培地に接種し 28℃ で培養後、生育したコロニー数を測定し生存分生胞子数とし、測定回数は 5 回とした。

2.5 穿孔防止試験⁴⁾

社団法人木材保存協会規格第 13 号土壤処理用防蟻剤の防蟻効力試験方法及び性能基準 (I) 3.1 室内試験に従った。ガラス管に耐候操作をしていない調製直後の分生胞子処理土壤をつめ、試験に供試した。試験期間は 21 日間、試験温度は 28℃ とし、実験の反復回数は 3 回とした。

2.6 忌避性試験⁵⁾

直径 90 mm シャーレの半面に、調製直後の分生胞子処理土壤を敷き処理区とした。残りの半面に無処理土壤を敷き無処理区とした。無処理区側からイエシロアリ職蟻を投入し、シロアリの移動状況を 1 時間毎に 12 時間観察し、忌避率を求めた。忌避率は下記式により計算した。なお、対象として、両半面に無処理土壤を敷き詰めたものを用い、

測定の反復回数は5回とした。

$$\text{忌避率(\%)} = \frac{\text{無処理区の虫数} - \text{処理区の虫数}}{\text{供試虫数}} \times 100$$

3. 結果および考察

3.1 処理土壌の含水率と効果

分生孢子懸濁液で処理した土壌の含水率を10%から30%に調節し、28℃で、最長90日間保存した。この間に滅菌水を加え設定含水率を維持した。保存10日目、30日目、60日目および90日目に保存した処理土壌をシャーレに取り、その殺蟻効果を測定した。結果は図1に示したように、土壌含水率10%、15%、20%、25%、30%では、保存期間10日間、30日間、60日間、90日間において、何れもシロアリに接触開始後8日目以内に死虫率は

100%に達した。また、各土壌含水率、各保存期間においても、処理土壌中から、本菌の生存分生孢子が土壌g当たり約 1.1×10^6 個が確認され、確認された数にはほとんど変化がなかった。

この試験結果から、滅菌土壌に処理した本菌株の分生孢子は、28℃で保存した場合、土壌含水率10%から30%では、90日間は、処理土壌中で生存し、その殺蟻効果が持続した。

3.2 処理土壌における殺蟻効果の持続性

滅菌した土壌を分生孢子懸濁液で処理し、土壌含水率を25%に維持して、28℃で最大1年間保存した場合に、その殺蟻効果が持続するか検討した結果を図2に示した。

3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月と保存期間が長期間となると死虫率が100%に達する日数が6

図1 イエシロアリ職蟻に対する *M. anisopliae* ESC1 分生孢子処理土壌の殺蟻効果に及ぼす保存期間中の土壌含水率の影響

Fig. 1 Effect of soil moisture contents during storage periods on the termiticidal performance of the *M. anisopliae* ESC1 conidia-treated soil against workers of *C. formosanus*

図2 イエシロアリ職蟻に対する *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子処理土壌の殺蟻効果に及ぼす土壌含水率25%での保存期間の影響

Fig. 2 Effect of storage periods at moisture content of 25% on the termiticidal performance of the *M. anisopliae* ESC 1 conidia-treated soil against workers of *C. formosanus*

日目、10日目、11日目、15日目と徐々に遅れてくるが、処理土壌中で本菌株の分生胞子はその殺蟻効果を持続した。また、徐々に減少しているが12ヶ月間保存した処理土壌中からも生存分生胞子が確認できた。さらに、この結果は土壌含水率15%の場合も同様であった。

処理土壌の土壌含水率を15%と25%に維持し、28℃で保存した結果、本菌株の分生胞子の殺蟻効果は1年間は持続した。

3.3 乾燥土壌における効果

実際のシロアリ防除を想定すると土壌含水率が15%や25%に維持されることは少なく、多くの場合は、乾燥状態である。そこで、調製した処理土壌を28℃で乾燥し、土壌含水率5%以下で保存した。この乾燥状態での保存期間を最長6週間として、各乾燥期間後に土壌含水率を25%に再調節して、その殺蟻効果を検討した。

乾燥期間4週間と6週間の処理土壌における殺蟻効果を図3に示した。乾燥期間4週間の処理土壌は接触開始後11日目に死虫率は100%に達したが、6週間乾燥状態で保存した処理土壌は14日目でも死虫率は30%と弱い殺蟻効果しか示さなかった。

処理土壌が含水率5%以下の乾燥状態となると、28℃2週間目から生存分生胞子数が減少し、6週間目では生存分生胞子は確認できなかった。

図3 イエシロアリ職蟻に対する *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子処理土壌の殺蟻効果に及ぼす処理土壌の乾燥の影響

Fig. 3 Effect of drying of treated soil at 28℃ on the termiticidal performance of the *M. anisopliae* ESC 1 conidia-treated soil against workers of *C. formosanus*

3.4 無滅菌土壌における効果

本報告では、滅菌土壌を供試土壌として使用してきたが、床下土壌中には多くの微生物が生息しており、これらの土壌微生物と本菌株が拮抗すると考えられる。そこで、東京農業大学大崎町シロアリ試験地内で採取した、土壌1g当たり、糸状菌が 5.6×10^5 個、細菌が 1.0×10^7 個含有するpH7.1の砂壤土をそのまま滅菌することなしに、分生胞子懸濁液で処理後、土壌含水率を25%に維持して、28℃で最長4週間保存後その殺蟻効果を測定した。

図4に示したように、保存期間に従い徐々にその殺蟻効果は弱くなり、4週間保存した処理土壌では、試験開始後13日目で、死虫率100%に達し、この土壌からも生存分生胞子が確認された。

以上の結果から、供試した砂壤土では、分生胞子懸濁液で処理後、含水率を25%に維持でき

図4 非滅菌土壌における *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子処理土壌のイエシロアリ職蟻に対する殺蟻効果

Fig. 4 Termiticidal performance of the *M. anisopliae* ESC 1 conidia-treated on unsterilized soil against workers of *C. formosanus*

ば、28℃で4週間保存しても、本菌株の分生胞子は他の土壌微生物と拮抗しながらも、その殺蟻効果を持続した。

3.5 穿孔阻止効果

化学薬剤では処理土壌の土壌穿孔阻止効果が社団法人日本木材保存協会規格第13号⁴⁾により測定される。そこで、本製剤品の分生胞子懸濁液で処理した土壌を同試験方法により穿孔防止効果を検討した。

結果を表1に示した。飼育期間21日間で、穿孔長は50mm以上となり、処理土壌を貫通したが、死虫率は試験開始後17日目に100%に達した。この結果は、滅菌土壌に処理した本菌株の分生胞子は穿孔阻止効果はないが、処理土壌に接触したシロア

表1 イエシロアリ職蟻に対する *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子処理土壌の穿孔防止効果

Table 1 Prevent effect of soil boring in the *M. anisopliae* ESC 1 conidia-treated soil against workers of *C. formosanus*

	穿孔長 Boring length	死虫率(%) Mortality
処理土壌 Treated soil	>50mm	100
	>50mm	100
	>50mm	100
無処理土壌 Untreated soil	>50mm	8
	>50mm	12
	>50mm	18

・試験期間：3週間

・Testing period：3 weeks

表2 イエシロアリ職蟻に対する *M. anisopliae* ESC 1 分生胞子処理土壌の忌避効果

Table 2 Repellent effect of the *M. anisopliae* ESC 1 conidia-treated soil against workers of *C. formosanus*

	忌避率(%) Repellency rate
処理土壌 Treated soil	35±65
無処理土壌 Untreated soil	—13±21

(平均値±標準偏差値)

(Mean±SD)

・試験期間：12時間

・Testing period：12 hrs

りは死亡したことを示している。

3.6 忌避効果

分生胞子処理土壌の忌避性を検討した結果を表2に示した。忌避率は35%を示したが標準偏差値は65と大きな値を示した。高い忌避性を示す化合物 TPIC1000ppm 処理した土壌はこの試験方法で測定した忌避率が95%⁵⁾を示すことと比較して、生存分生胞子を 1.1×10^6 個/土壌g含む処理土壌は忌避性が無いと判断された。

4. 結 論

本菌株の分生胞子懸濁液で処理した土壌を28℃で保存し、その殺蟻効果の持続性を検討した結果、土壌含水率10%から30%に維持した場合は、本菌株の分生胞子は一年間は処理土壌中で生存し、殺蟻効果を持続した。しかし、処理土壌が乾燥状態になるとその処理土壌中の生存分生胞子は急激に減少した。この減少にともない殺蟻効果も急激に低下した。

滅菌土壌に処理した「バイオブラスト」は、忌避効果と穿孔阻止効果が認められなかった。

本研究では、滅菌した土壌を供試土壌として使用してきたが、床下土壌には多くの微生物が生息しており、これらの土壌微生物と本菌が拮抗すると考えられる。そこで非滅菌の土壌を「バイオブラスト」で処理後28℃で最長4週間保存して、その殺蟻効果を測定した結果、その殺蟻効果は保存期間に従い徐々に弱くなったが、本菌株は他の土壌微生物と拮抗しながらも、4週間殺蟻効果を持続した。

これらの室内試験による結果から、昆虫寄生菌 *M. anisopliae* ESC 1 の分生胞子を製剤化した「バイオブラスト」は実用性が十分にある微生物防蟻剤である。今後、実際に施工したサービステストの結果が期待される。

謝 辞

本研究に対して、「バイオブラスト」を御提供戴き、御助言と励ましを賜りました丸和バイオケミカル株式会社とシントーファイン株式会社に謝意を表します。また、実験に御協力戴いた山口千恵君に感謝いたします。

文 献

- 1) 飯島倫明, 江口博美, 檜垣宮都: 木材保存, **27**, 67-73, (2001)
- 2) 飯島倫明, 江口博美, 檜垣宮都: 木材保存, **27**, 109-113, (2001)
- 3) バイオブラスト普及会: “生物シロアリ駆除剤「バイオブラスト」”, 1998, p. 2
- 4) 社団法人日本木材保存協会: “木材保存学入門 改訂版”, (1998) p. 387-395
- 5) 市橋昌子: 東京農業大学修士論文, 東京農業大学, (1997), p. 13-14, p. 51-55.
(2000.10.23受理)