

东北地区土壤中 4 株 Bt 菌株的研究

徐宜宏¹, 纪明山^{1*}, 于敬沂², 张 弘³, 李胜敏¹,

(1. 沈阳农业大学植物保护学院农药科学实验室, 辽宁 沈阳 110161;

2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001; 3. 沈阳化工研究院, 辽宁 沈阳 110021)

摘要: 对从东北地区土壤中分离出的 4 株编号分别为 HB-4、HB-11、HB-37 和 HB-69 的苏云金芽孢杆菌菌株进行了形态特征、发酵特性、生化反应、鞭毛血清型鉴定及毒力测定的研究。结果表明, 4 株菌株的血清型分别为: H_{3abc}、H₁₄、H_{5ab} 和 H_{3abc}。4 株菌株对小菜蛾均有较高毒力, HB-37 对玉米螟有较高毒力, HB-4 对玉米螟有低毒, HB-11 对尖音库蚊有低毒。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 鞭毛血清型鉴定; 毒力测定

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)01-0054-03

Study on 4 Bt Strains from Soil in Northeast China

XU Yi-hong¹, JI Ming-shan^{1*}, YU Jing-yi², ZHANG Hong³, LI Sheng-min¹

(1. Pesticide Science Lab, Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China;

3. Shenyang Research Institute of Chemical, Shenyang 110021, China)

Abstract: This paper studied the modality characters, ferment characters, biochemical reaction, H-serotype and toxicity of 4 Bt strains numbered HB-4, HB-11, HB-37 and HB-69 respectively from soil in northeast China. The results showed that their serotype belong to H_{3abc}, H₁₄, H_{5ab} and H_{3abc} respectively. All of the 4 strains have highly toxicity to *Plutella xylostella*; HB-37 has highly toxicity to *Ostrinia furnacalis*; HB-4 has low toxicity to *Ostrinia furnacalis*, HB-11 has low toxicity to *Culex pipiens*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; Flagellum serotype identification; Toxicity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种在自然界广泛分布的好气性芽孢杆菌, 因在其芽孢形成过程中能产生对不同昆虫有毒杀作用的伴孢晶体而引起人们的关注。全世界最近分离到 Bt 菌数达 50 000 株, 分为 62 种血清型和亚种^[1]。沈阳农业大学植物保护学院农药科学实验室自东北地区不同植株的根表土中分离到 120 余种苏云金芽孢杆菌及其近似种^[2]。从中优选出 4 株比较典型的苏云金芽孢杆菌菌株, 对它们的生物学特性进行了研究。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

标准菌株有苏云金亚种 (H₁)、幕虫亚种 (H₂)、以色列亚种 (H₁₄)、HD-1 (H_{3ab})、阿莱亚种 (H_{3ac})、鮎泽亚种 (H₇)、库斯塔克亚种 (H_{3abc})、猝倒亚种 (H_{4ab})、蜡螟亚种 (H_{5ab})、杀虫亚种 (H_{6ab})、莫里逊亚种 (H_{8ab})、多窝亚种 (H₉) 和东北亚种 (H₁₇)。均为沈阳农业大学植物保护学院农药科学实验室保存。苏云金芽孢杆菌 HB-4、HB-11、HB-37、HB-69 为

收稿日期: 2005-09-01

基金项目: 辽宁省“十五”科技攻关项目 (2001208001)

作者简介: 徐宜宏 (1980-), 女, 辽宁鞍山人, 在读硕士研究生, 主要从事生物农药的研究。

通讯作者: 纪明山 (1968-), 男, 河北任丘人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物农药学研究。E-mail: jimingshan@163.com

沈阳农业大学植物保护学院农药科学实验室从东北地区植株根表土中分离获得。

1.2 供试昆虫

小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 二龄幼虫、玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 初龄幼虫、尖音库蚊 (*Culex pipiens*) 三龄幼虫, 均为沈阳化工研究院农药生物测定中心的室内饲养敏感品系。

1.3 培养基和试剂

LB 固体培养基: 酵母浸膏 0.5%、蛋白胨 1.0%、琼脂 1.8%、NaCl 1.0%, pH 7.0。

LB 液体培养基: 酵母浸膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 1.0%, pH 7.0。

LB 半固体培养基: 酵母浸膏 0.25%, 蛋白胨 0.5%, NaCl 0.5%, 琼脂 0.2%~0.3%, pH 7.0。

1.4 培养与观察

将冰箱保存的斜面菌种活化后接种到 LB 固体培养基中, 30℃培养 18~24 h, 观察菌落生长情况; 取 25 ml LB 液体培养基于 250 ml 三角瓶中并接种, 置 30℃恒温摇床, 230 r/min 振荡培养 8 h 后涂片镜检。观察菌体的形态、运动性及鞭毛情况。

1.5 摇瓶发酵试验

1.5.1 晶体形成率试验 将活化菌株各取一环接种于 LB 液体培养基中, 200 r/min, 30℃摇床培养 36 h。用血球记数板计数正常孢囊数和菌体总数。

晶体形成率= 正常孢囊数/ 菌体总数。发酵结束时的晶体形成率高于 90% 时反映菌体发酵状态良好。

1.5.2 芽孢耐热性试验 将菌株经灭菌的 LB 培养基摇瓶发酵 48 h 得到的菌悬液 1 000 r/min 低速离心 2~3 min, 每株菌的上清液分装 5 支无菌试管中, 每管 5 ml, 标记后以此为处理样品于恒温水浴锅中分别煮沸 5 min、10 min、15 min、20 min, 稀释平板法计数活菌数, 计算存活率。

1.6 生理生化试验及 H—血清型鉴定

生理生化试验参照喻子牛 (1990) 和中国科学院微生物所 (1978) 的方法^[3, 4] 进行。

1.7 毒力测定

将 LB 液体培养基发酵培养的成熟发酵液配置成不同的梯度浓度进行室内毒力测定。其中小菜蛾的毒力测定采用叶面喷雾法; 玉米螟的生物测定采用感染饲料法; 尖音库蚊的生物测定参照陈在铨等 (2004) 的方法^[5] 进行。每组供试幼虫 30 头, 每个处理 3 次重复。于 25℃饲养 48 h, 调查死亡头数, 计算校正死亡率。

2 结果

2.1 形态与培养特征

对 4 株 Bt 菌株的形态特性进行观察比较, 结果见表 1。

表 1 4 株 Bt 菌株的形态特性

菌株	革兰氏反应	晶体		菌体		鞭毛	菌落特征	运动性
		体积 (μm)	形状	体积 (μm)	形状			
HB—4	G ⁺	1.95×1.10	菱形	2.68×1.10	杆状	周生	圆形, 白色, 边缘不光滑, 不透明。	+
HB—11	G ⁺	1.63×0.93	不规则形	2.89×1.13	杆状, 细长	周生	圆形, 黄白色, 边缘褶皱, 不透明	+
HB—37	G ⁺	1.93×1.22	方形	2.65×1.45	杆状, 短粗	周生	圆形, 白色, 边缘不光滑, 不透明。	+
HB—69	G ⁺	1.60×0.63	菱形	3.18×1.20	杆状, 细长	周生	圆形, 黄白色, 边缘褶皱, 不透明	+

从表 1 可以看出, 4 株菌株均具有苏云金芽孢杆菌的典型特征, 营养细胞杆状, 单生、双联体或以双联体为单位连成短链状, 菌体大小 3.18~2.65 μm×1.10~1.45 μm, 芽孢椭圆形, 孢囊微膨大, 有的近中生, 有的居于菌体一端 (较少), 晶体有菱形、方形和不规则形, 周生鞭毛, 运动活跃。但营养体和晶体的形状、大小及菌落的培养特征方面又存在一定的差异。

2.2 菌株晶体形成率测定结果

各个菌株的晶体形成率见表 2。从表 2 可以看出, 4 株菌在 LB 液体培养基摇瓶发酵中, HB—11 和 HB—69 的晶体形成率均超过 90%, 但 HB—11 产生的总活菌数比较少, 可能和选择的培养基种类

有关。HB—4 的产品率也比较高, 而 HB—37 无论是总活菌数还是晶体形成率都很最低的。

表 2 4 株 Bt 菌株的生长发育情况

项目	HB—4	HB—11	HB—37	HB—69
总活菌数 (×10 ⁸ 个/ml)	5.6	5.8	4.9	8.3
正常孢囊数 (×10 ⁸ 个/ml)	4.9	5.3	3.7	7.7
晶体形成率 (%)	87.5	91.4	75.5	92.8

2.3 菌株芽孢耐热试验结果

分别考察了 4 株菌株的芽孢悬液水浴煮沸 5 min、10 min、15 min、20 min 后的存活情况。结果见

图 1。从图 1 可以看出, 4 株菌株在 100 ℃水浴 5 min 后即表现出明显的耐热性差异, 其中 HB-11 和 HB-69 的芽孢存活率明显高于其他 2 株菌株, 表现出较好的耐热性; 而在水浴 10 min 后, HB-11 的芽孢存活率仍达到 55%; 其余菌株芽孢数量大幅度下降, 而 HB-4 的芽孢已基本死亡。在处理 15 min 后, 所有菌株的芽孢已基本死亡。

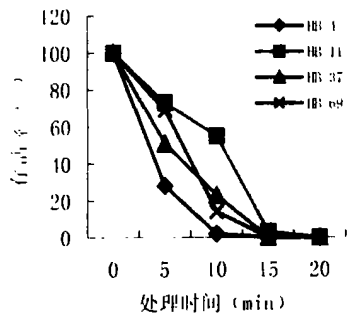


图 1 4 株菌株芽孢热处理后的存活率

2.4 生理生化反应结果

对 4 株菌株共进行了 11 项生理生化反应, 结果见表 3。将测定结果与已公开发表的苏云金芽孢杆菌亚种的生理生化结果相对照, 初步断定 HB-4 和 HB-69 同属于 KUR 生化亚种; HB-11 属于 ISR 生化亚种; HB-37 属于 GAL 生化亚种。

表 3 4 株菌株的生理生化反应结果

试验项目	供试菌株			
	HB-4	HB-11	HB-37	HB-69
蔗糖	—	—	—	—
VP	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+
卵磷脂酶	+	+	—	+
尿酶	+	—	+	±
菌膜	+	+	—	+
七叶灵	+	—	+	+
水杨苷	+	—	+	+
甘露糖	—	—	—	—
色素	—	+	±	—
蛋白水解	+	+	+	+

注: “+”为反应阳性; “—”为反应阴性; “±”为弱反应或结果不定

2.5 血清型鉴定结果

4 株菌株的鞭毛血清型, 经交叉反应和凝集反应鉴定, 结果见表 4。

表 4 4 个供试菌株的鞭毛血清型

菌株	HB-4	HB-11	HB-37	HB-69
鞭毛血清型	H _{3abc}	H ₁₄	H _{5ab}	H _{3abc}

2.6 毒力测定结果

4 株菌株对 3 种昆虫的室内毒力测定结果见表 5。由表 5 可以看出: 4 株菌株对小菜蛾均有较高毒力, HB-37 对玉米螟有较高毒力, HB-4 对玉米螟有低毒。HB-11 对尖音库蚊有低毒。

表 5 4 株 Bt 菌株的室内毒力测定结果

菌株	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	校正死亡率(%)		
		小菜蛾	玉米螟	尖音库蚊
HB-4	10^{-2}	82.4	53.1	0
	10^{-3}	71.6	14.7	0
	10^{-4}	33.8	0	0
HB-11	10^{-2}	80.3	0	62.1
	10^{-3}	58.9	0	19.4
	10^{-4}	21.5	0	0
HB-37	10^{-2}	85.4	81.2	0
	10^{-3}	42.1	53.7	0
	10^{-4}	15.8	17.3	0
HB-69	10^{-2}	83.2	0	0
	10^{-3}	59.4	0	0
	10^{-4}	26.9	0	0

3 讨论

1) 本研究采用 LB 液体培养基研究供试菌株的发酵特性和杀虫活性, 由于菌株的生长发育与培养基的配方有很大的关系, 因此, 该培养基下的发酵液并不能准确地反映供试菌株的发酵特性和杀虫活性, 而应该比实际水平偏低。

2) 在毒力测定中, 由于供试昆虫种类较少, 很难断定这些菌株对其他种类昆虫没有活性。有必要进一步扩大毒力测定的虫种范围。

3) 对于几种供试菌株, 本试验只对其进行了一些基础的生物学特性的研究, 若要明确几种菌株的营养代谢及杀虫活性成分, 还需要在蛋白和分子水平上做深入的研究。

致谢: 特别感谢沈阳化工研究院 张弘 高级工程师对本研究的大力支持和悉心指导

参考文献:

[1] 曾林, 任改新. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白 CRY 基因研究的现状[J]. 微生物学通报, 1998, 25(1): 49—51.
[2] 曲慧东, 孙明, 谷祖敏, 等. 东北地区土壤中苏云金杆菌遗传多样性初步调查[J]. 中国生物防治, 2004, 20(增刊): 101—105.
[3] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 41—46.
[4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 135—177.
[5] 陈在饵, 吴继星, 张志钢. 苏云金杆菌菌株 Bti99-11 的研究[J]. 湖北农业科学, 2004(4): 50—52.