

我国部分地区土壤中的苏芸金芽孢杆菌 和球形芽孢杆菌

李荣森 戴顺英 李小刚 罗成 盛竹蓐 孙明

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

从云南、贵州、四川和陕西 4 省的土壤中分离到大量苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 和球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 菌株。血清型分析表明, 苏芸金芽孢杆菌分离株分属于 23 个血清型中的 13 个血清型, 另有近 20% 的自凝型菌株及部分与所有标准菌抗血清无反应的菌株。对该两种昆虫病原细菌的生态分布规律进行了分析。研究了全部苏芸金芽孢杆菌分离株对鳞翅目、鞘翅目及双翅目的 6 种昆虫的毒力特性、伴孢晶体与芽孢的形态, 以及晶体蛋白质成分。观察和测定了球形芽孢杆菌分离株的形态和毒力, 并分析了部分菌株的晶体蛋白质成分。得到 22 株高效苏芸金芽孢杆菌和 2 株高效球形芽孢杆菌。证明苏芸金芽孢杆菌是典型的土壤微生物类群, 我国西南地区土壤中的苏芸金芽孢杆菌资源十分丰富。

关键词 苏芸金芽孢杆菌; 球形芽孢杆菌; 鞭毛血清型

据已有资料, 全世界已报道了苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 23 个鞭毛血清型及无鞭毛的 32 个变种。大多数苏芸金芽孢杆菌对鳞翅目害虫有高毒性, 少数对双翅目害虫^[1]或鞘翅目害虫^[2]有效。长时期内, 除以色列杆菌变种来自水塘污泥^[3]外, 所有变种均自宿主昆虫中分离得到。近几年, 日本和我国研究者从土壤中相继分离到苏芸金芽孢杆菌的新变种^[4-7], 说明土壤可能是该菌的重要栖居环境。球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 是一种在土壤、水体和昆虫中存在的芽孢杆菌, 从世界各地特别是东南亚地区已分离到一些对蚊幼虫有效的菌株, 它们主要属于 H₁、H₂、H_{5a5b}、H₂₅ 及 H₂₆ 等血清型^[8,9], 对防治热带疾病媒介昆虫有重要意义。

为调查我国土壤中苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌种类和分布状况, 并从中获得高效和特异菌株, 发展新型高效微生物杀虫剂, 1987—1989 年我们从云南、贵州、

四川及陕西 4 省 26 县采土样 3160 份, 对该两种细菌进行了分离, 较系统地研究了分离株的主要生物学特性及其生态分布规律。

材料与方 法

(一) 土样

云南、贵州及四川 3 省每省 5—8 个县, 每县 4—6 个乡, 每乡 5 处, 每处土样不少于 8 个。陕西省从 4 个县采样, 每县采土样 50 个。每 200g 土壤为一个样。四省共采 0—10cm 表土层土样 3160 个, 主要为旱地土样, 少部为水田土样。

(二) 菌株分离

以弹土法进行苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌的分离。取风干土壤样品约 5g, 在无菌的 8 × 8cm 纸片上碾细, 将纸片上粘着的土壤细粉轻轻用手指弹入无菌平皿

本文于 1989 年 9 月 11 日收到。

孙春娥同志参加了部分工作。孙明现为华中农业大学硕士研究生。

中,倒入 80℃ 左右的肉汁蛋白胨或酵母汁蛋白胨琼脂培养基,置 30℃ 培养 4 d,挑取菌落,进行光学显微镜检查,确定是否形成伴孢晶体或是否符合球形芽孢杆菌形态特征,然后进行纯化。对形态上不十分肯定的分离株,再进行电镜观察予以确定。同一平板上挑取的菌落一般不超过 3 个。

(三) 土壤 pH 值的测定

按土壤 pH 值速测法^[10]进行,使用由麝香草蓝、甲基红和溴麝香草蓝配成的 pH 检测指示剂。

(四) 毒力试验

在苏芸金芽孢杆菌的毒力初筛、复筛和半致死浓度 (LC₅₀) 的测定中使用小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、斜纹夜蛾 (*Prodenia litura*)、粘虫 (*Leucania separata*)、黄粉甲 (*Tenebrio molitor*)、28 星瓢虫 (*Henosepilachna vigintioctopunctata*) 及致倦库蚊 (*Culex fatigans*) 为试虫。球形芽孢杆菌的毒力测定以致倦库蚊为试虫。

(五) 苏芸金芽孢杆菌鞭毛血清型的初步鉴定

以苏芸金芽孢杆菌各变种标准菌株的鞭毛抗血清与分离株的鞭毛抗原反应,鉴定各分离株的主要 H 抗原,对某些菌株的第二抗原留待下一步鉴定。制备鞭毛抗血清所用标准菌株列于表 1。

(六) 伴孢晶体蛋白质的分析

基本按李荣森等^[11]方法进行全部苏芸金芽孢杆菌和部分球形芽孢杆菌分离株晶体蛋白质的分析,但为了快速检测,采用含 2% 巯基乙醇的样品缓冲液直接从洗涤干净的芽孢和伴孢晶体混合物中溶出晶体蛋白质,而后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。已证明此法结果可靠,芽孢蛋白质干扰很小。

表 1 制备鞭毛抗血清所用的苏芸金芽孢杆菌标准菌株

Table 1 Standard strains of *B. thuringiensis* for preparation of flagellar antiserum

菌株 Strain	鞭毛血清型 H-serotype	变种 Subspecies
HD-2	1	<i>thuringiensis</i>
HD-3	2	<i>finitimus</i>
HD-73	3a3b	<i>kurstaki</i>
HD-930	4a4b	<i>sotto</i>
HD-29	5a5b	<i>galleriae</i>
HD-109	6	<i>subtoxicens</i>
HD-11	7	<i>aizawai</i>
HD-12	8a8b	<i>morrisoni</i>
HD-537	9	<i>tolworthi</i>
HD-146	10	<i>darmstadiensis</i>
HD-201	11a11b	<i>soumanoffii</i>
HD-542	12	<i>thompsoni</i>
HD-395	13	<i>pakistani</i>
HD-567	14	<i>israelensis</i>
HD-932	15	<i>dakota</i>
HD-521	16	<i>indiana</i>
HD-866	17	<i>tohokuensis</i>
HD-867	18	<i>kumamotoensis</i>
HD-868	19	<i>tochigiensis</i>
HD-977	20a20b	<i>yunnanensis</i>
HD-847	21	<i>colmeri</i>
HD-1012	22	<i>shandogiensis</i>
84-F31-31	23	<i>japonensis</i>

结 果

(一) 苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌菌株的分离

从 3160 个土样中共分离得 90 株苏芸金芽孢杆菌和 87 株球形芽孢杆菌,以土样数为基数,两种细菌菌株的分出率分别为 2.9% 和 2.8%,分出率偏低原因前已提及。4 省土样中菌株分离结果见表 2。

(二) 不同土壤条件下两种细菌的分布

1. 不同土壤类型中两种细菌的分布。由表 3 可知,在占总土样近一半的红黄壤中,两种细菌的分出率均为 3% 左右。苏芸金芽孢杆菌在较肥沃的旱地棕壤、砂壤、

表2 四省土样中苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌的分离结果

Table 2 The sum of isolates of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* from soils of four provinces

省 份 Province	土 样 数 Number of soil samples	苏芸金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>		球形芽孢杆菌 <i>B. sphaericus</i>	
		菌株数 Number of isolates	分出率(%) Rate of isolation	菌株数 Number of isolates	分出率(%) Rate of isolation
贵州 Guizhou	740	24	3.2	12	1.6
云南 Yunnan	1290	39	3.0	44	3.4
四川 Sichuan	905	24	2.7	20	2.2
陕西 Shaanxi	225	3	1.3	11	4.9
总计 Total	3160	90	2.9	87	2.8

表3 不同土壤类型中苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌的分布

Table 3 Distribution of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* in different forms of soils

土地类型 Form of land	土 壤 Soil				苏芸金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>		球形芽孢杆菌 <i>B. sphaericus</i>	
	类 型 Sort	pH	土样数 Number of samples	占总土样 比例(%) Rate	分离株数 Number of isolates	分出率(%) Rate	分离株数 Number of isolates	分出率(%) Rate
旱地 Dry land	红黄壤 red and yellow	4.0—7.0	1453	46.0	46	3.1	40	2.8
	紫色土 dark brown	5.0—7.0	455	14.4	11	2.4	7	1.5
	棕 壤 brown	5.0—7.0	280	8.9	9	3.2	9	3.2
	黑 土 black	4.0—7.0	345	10.9	10	2.9	10	2.9
	砂 壤 loamy sand	6.0—6.5	100	3.2	9	9.0	3	3.0
	重砂土 sandy	5.0—7.0	223	7.1	1	0.4	0	0
	黄 土 loess	6.5—7.5	225	7.1	3	1.3	11	4.9
	合 计 total		3082	97.5	89	2.8	80	2.6
水田 Paddy-field	水稻土 rice field	5.0—7.5	79	2.5	1	1.3	7	8.9

黑土及红黄壤中分布较多，而在水稻土和较贫瘠的重砂土及西北黄土中则分布较少。球形芽孢杆菌在水稻土中的分出率明显高于旱地土壤。

2. 不同土壤 pH 环境与两种细菌分布的关系。表 4 结果表明，苏芸金芽孢杆菌的分布与土壤 pH 无明显关系，在 pH 4.0—7.5 的各种土壤中，菌株分出率比较

接近。球形芽孢杆菌似较嗜近中性土壤。

(三) 不同植被类型与苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌分布的关系

植被种类与两种细菌分出率的关系(表 5)分析表明，苏芸金芽孢杆菌在树林、果树、茶树等林木稳定植被条件下的分出率明显高于其他各类植被。球形芽孢杆菌在种植水稻的水田中，分出率达 14.3%，远

表 4 不同土壤 pH 条件下两种细菌的分布
Table 4 Distribution of two species of bacteria in different pH of various sorts of soils

省份 Province	pH4.0—5.5			pH6.0			pH6.5			pH7.0—7.5		
	土样数 Number of soil samples	Bt分出率(%) Bt	Bs分出率(%) Bs	土样数 Number of soil samples	Bt分出率(%) Bt	Bs分出率(%) Bs	土样数 Number of soil samples	Bt分出率(%) Bt	Bs分出率(%) Bs	土样数 Number of soil samples	Bt分出率(%) Bt	Bs分出率(%) Bs
贵州 Guizhou	131	3.1	0	284	1.1	1.4	251	3.6	2.8	74	8.0	1.4
云南 Yunnan	370	3.0	2.7	500	3.4	3.8	265	1.9	5.3	60	8.3	0
四川 Sichuan	130	3.1	0	315	2.9	1.6	370	2.7	3.5	80	0	2.5
陕西 Shaanxi	0			0			25	0	0	200	1.5	5.5
总计* Total	631	3.0	1.6	1099	2.6	2.5	911	3.1	3.7	414	3.4	3.4

* 按分离菌株数占该 pH 范围土样总数的比例计算分出率。
Bt: *B. thuringiensis*; Bs: *B. sphaericus*.

表 5 苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌的分布与植被种类的关系
Table 5 Relation between the distribution of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* and the sort of plant cover

植物类型 Plant group	种类 Species	植被样品数目 Number of plant cover	苏芸金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>		球形芽孢杆菌 <i>B. sphaericus</i>	
			菌株数 Number of isolates	分出率(%) Rate	菌株数 Number of isolates	分出率(%) Rate
旱作粮、油、菸草 Crops, oil plant, tobacco	12	1221	33	2.7	23	1.9
蔬菜 Vegetable	21	445	4	2.8	12	2.7
树林、果、竹、茶 Forestry, fruit tree, bamboo, tea tree	45	680	33	4.9	19	2.8
杂草、荒地、草本花卉 Weed, wastes, herb flower	24	425	14	3.3	22	5.2
无植被 No plant	16	192	5	2.9	4	3.9
水稻 Rice	2	49	1	2.0	7	14.3
总计 Total	120	3012	90	2.9	87	2.8

高于旱地植被。在轮茬频繁的粮、油、菸草及蔬菜等植被下，两种细菌的分出率均较低，杂草、荒地及无植被条件下的菌株分出

率居中。

(四) 苏芸金芽孢杆菌分离株血清型的初步鉴定

表 6 苏芸金芽孢杆菌分离株的血清型及其分布

Table 6 H-Serotype of *B. thuringiensis* and distribution in various province

血清型 H-Serotype	占总分离株 的比例(%) Rate	各省各血清型菌株占总分离株的比例(%) Rate of different H-serotype in various province			
		贵州 Guizhou	云南 Yunnan	四川 Sichuan	陕西 Shaanxi
H ₃	17.8	1.1	10.0	4.4	2.2
H ₅	12.2	6.7	2.2	3.3	0
H ₇	4.4	1.1	0	3.3	0
H ₄	4.4	0	3.3	0	1.1
H ₁₃	4.4	4.4	0	0	0
H ₂₂	3.3	0	1.1	2.2	0
H ₁₀	2.2	0	0	2.2	0
H ₁₅	2.2	0	1.1	1.1	0
H ₂₁	2.2	1.1	0	1.1	0
H ₄	1.1	0	1.1	0	0
H ₁₉	1.1	0	1.1	0	0
H ₂₀	1.1	0	1.1	0	0
H ₂₃	1.1	0	0	1.1	0
自凝菌 Auto-agglutinate	21.1	3.3	13.3	4.4	0
无鞭毛菌 Nonflagellum	6.7	2.2	1.1	3.3	0
无反应菌 No agglutination	14.4	5.5	4.4	4.4	0

在已检出鞭毛血清型的苏芸金芽孢杆菌分离株中,出现频率最高的为 H₃ 与 H₅ 型, 次为 H₄、H₇ 及 H₁₃ 型。鞭毛自凝菌株比例较高, 占总菌株数的 21%。H₁₀、H₁₃、H₁₅、H₁₉、H₂₁ 及 H₂₃ 在我国均属首次分离得到。部分菌株与供试标准菌株的鞭毛抗血清均无反应, 有可能是新血清型, 以上结果见表 6。

(五) 苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌分离株的毒力特性

90 株苏芸金芽孢杆菌中, 对小菜蛾有效的 61 株, 高毒力的 18 株, 对斜纹夜蛾和粘虫有高效的 4—5 株, 对库蚊高效的 2 株, 对黄粉甲和 28 星瓢虫有较高毒力的 3 株。菌株 YG41-02 对小菜蛾和粘虫均有高毒力, 对斜纹夜蛾的毒力也较高, 能产深

褐色色素。高毒力代表菌株的毒力特性列于表 7。

87 株球形芽孢杆菌, 仅 2 株对致倦库蚊有高效, 其毒力与已有高效菌 1593 等相当或稍高。

(六) 伴孢晶体的形态及晶体的蛋白质成分

部分苏芸金芽孢杆菌分离株的伴孢晶体和芽孢形态的电镜观察结果(图 1)表明, 土壤来源的苏芸金芽孢杆菌, 其伴孢晶体多为钝菱形、六角形、颗粒状及方形。其中菌株 SCb11-01 产生菱形和方形晶体, 菱形晶体具有镶嵌型构造。菌株 YG41-02 的六角形晶体, 也可见镶嵌型构造, 其立体形状实际上是四边形的棱柱体。

苏芸金芽孢杆菌 14 个代表菌株的晶

表 7 苏芸金芽孢杆菌对 6 种昆虫的毒力特性

Table 7 Toxicities of principal strains of *B. thuringiensis* against species of insects

试 虫 Insect	虫 龄 Instar	有效菌株数 Number of effective strain	高效菌株数 Number of more effi- cient stra- in	代 表 菌 株 Principal strain		毒力水平 Toxicity	
				菌 号 Code	血清型 H-Serotype	死亡率(%) Mortality	LC ₅₀ (%)
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	3	61	18	SCb11-01	3	100(24h)	1.58
				SPh04-06	7	96(24h)	1.66
				SPy14-01	无鞭毛 nonflagellum	100(24h)	
				SH11-05	3	100(24h)	1.00
				YD41-01	3	100(24h)	
				YD41-03	5	96(24h)	
				YG41-02	3	100(24h)	0.89
				YK42-04	3	96(24h)	
				YL47-03	3	100(24h)	1.41
斜纹夜盗蛾 <i>Prodenia litura</i>	2	15	4	HD-1(CK)	3	88(24h)	2.08
				YG41-02	3	78(48h)	
				YGd22-03	未知 unknown	85(48h)	
				YK49-04	自凝 auto-agglutinate	80(48h)	
				YH-8A(CK)	7	10.25μg/ml(48h)	
				HD-1 (CK)	3	20(48h)	
粘 虫 <i>Leucania separata</i>	2	13	5	IH-A(CK)	7	60(48h)	
				YG42-01	3	97.5(48h)	
				YG41-02	3	97.5(48h)	
				SCb11-01	3	97.5(48h)	
				YD41-01	3	95.0(48h)	
				YD41-03	3	95.0(48h)	
致倦库蚊 <i>Culex fatigans</i>	3	7	2	HD-1(CK)	3	95.0(48h)	
				SPh04-06	7	100(24h)	0.00265
				YK22-01	3	100(24h)	0.00738
				IPS-82(CK)	14	100(24h)	0.00059
黄 粉 甲 <i>Tenebrio molitor</i>	3	4	1	SPH04-04	22	63(72h)	
				FH3-03	未知 unknown	79(72h)	
				HD-1(CK)	3	2(72h)	
				IH-A(CK)	7	0(72h)	
28 星瓢虫 <i>Henosepilachna vigintioctopu- nctata</i>	2	8	2	KK10-01	未知 unknown	80.0(6d)	
				KA32-01	未知 unknown	93.8(6d)	
				KK31-02	未知 unknown	69.2(6d)	
				SPh11-05	未知 unknown	68.0(6d)	
				YM-03	8	46.0(6d)	
				FH3-03	未知 unknown	42.0(6d)	
				HD-1(CK)	3	0 (6d)	

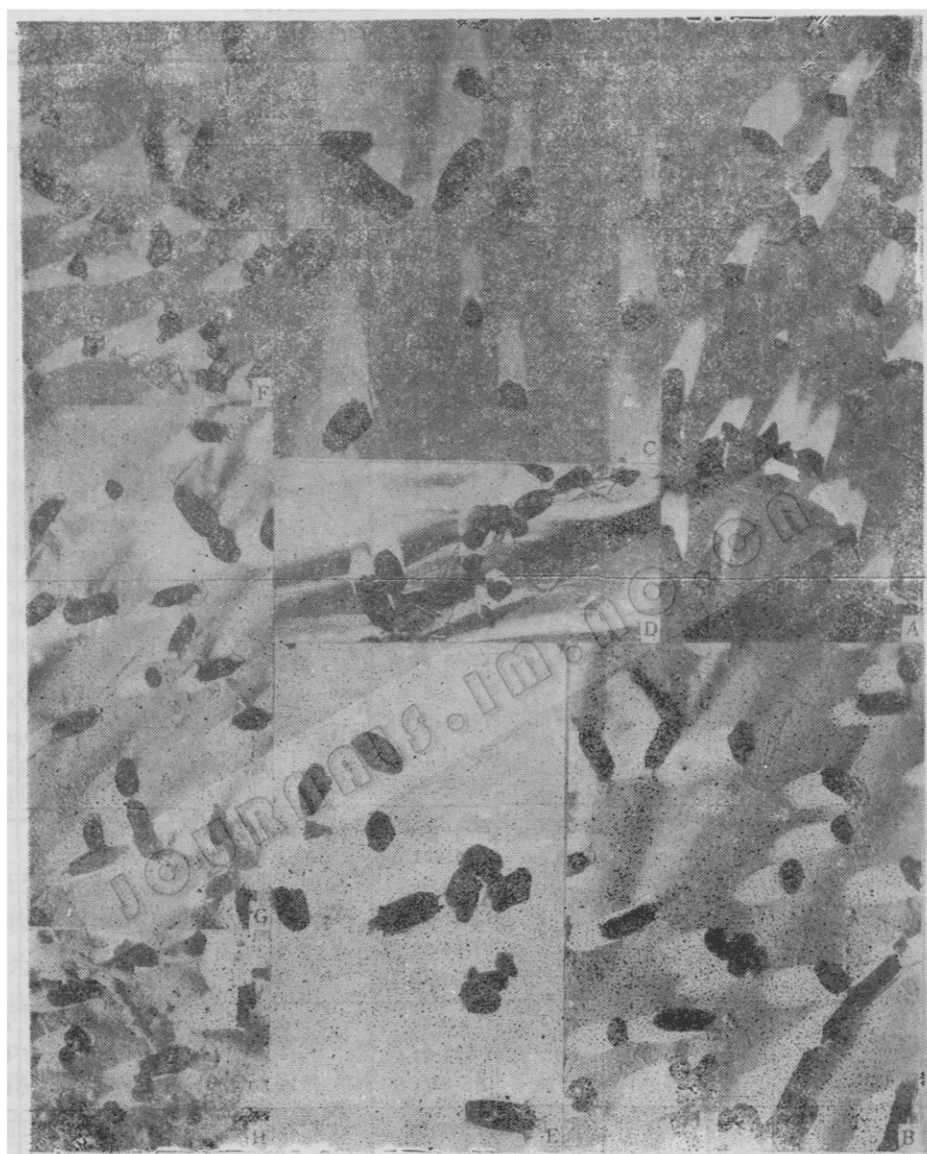


图1 电镜下苏芸金芽孢杆菌伴孢晶体和芽孢的形态 (3300—5300×)

Fig. 1 Morphology of parasporal crystals and spores of *Bacillus thuringiensis* under electro-microscope

(A) SCb11-01; (B) SPh04-06; (C) FH3-03; (D) YD37-01; (E) YG41-02;
(F) YGd22-03; (G) YGd26-03; (H) YK22-01.

体蛋白质的 SDS-PAGE 图型(图2)显示出,大部分菌株的伴孢晶体含有 130—140 kd 的蛋白质,其中 SCb11-01 和 YG41-02 两个 H_1 型菌株还含有 65kd左右的蛋白质;

H_1 型的 SPh04-06 含 135kd 的蛋白质,对鳞翅目和双翅目昆虫均有高效;两种伴孢晶体仅含 50kd 的蛋白质,其中 FH3-03 和另外 2 株(KK10-01 及 KA32-01)对鞘

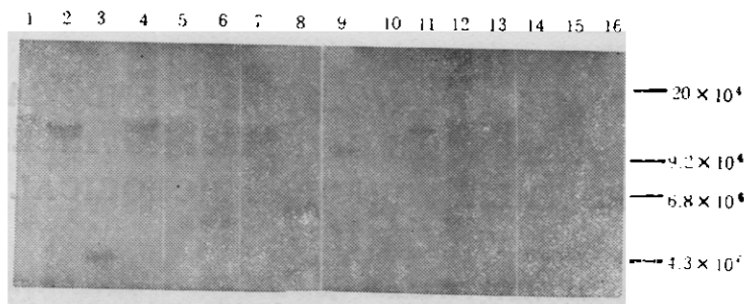


图 2 14 种苏芸金芽孢杆菌伴孢晶体蛋白质的 SDS-PAGE 图型

Fig. 2 Patterns of 14 sorts of parasporal crystals by SDS-PAGE

(1) KA32-02; (2) KK31-01; (3) FH3-03; (4) KZ16-02; (5) SPh04-06; (6) YG41-02; (7) YG48-06; (8)、(16) 蛋白质标准, Protein standards; (9) YGd22-03; (10) YK20-05; (11) SH22-01; (12) SCb11-01; (13) SCb14-01; (14) SPh09-02; (15) SPh15-06 (图侧数字示蛋白质标准的分子量, The numbers beside the figure show the molecular weight of protein standards).

翅目昆虫有较高毒力。球形芽孢杆菌有毒株和无毒株的 SDS-PAGE 分析证明, 有毒株具有 41-44kd 的特征性伴孢晶体蛋白质带(未示出照片)。以上结果说明, 伴孢晶体的蛋白质成分与其毒力相关联, 与我们早先的研究结果^[11-13]一致。

讨 论

从我国西南地区和陕西省的土壤中分离到的苏芸金芽孢杆菌在已有血清型中占据了大部分, 不仅说明我国的苏芸金芽孢杆菌资源十分丰富, 而且证明该菌确属典型的土壤微生物。所获得的苏芸金芽孢杆菌菌株, 产生多种不同性质的 δ -内毒素蛋白质, 表现出各种毒力特性, 这不仅为研制新型高效微生物杀虫剂提供了丰富的菌种资源, 也为抗虫基因工程植物提供了丰富多样的杀虫基因源。

土壤来源的苏芸金芽孢杆菌中有近 20% 的自凝菌, 如何进行鉴定分类, 需进一步研究解决。

在近 90 株球形芽孢杆菌分离株中, 仅

有 2 株对蚊有高效, 所占比例很小。因此, 采用快速检测特定杀蚊晶体蛋白质的方法, 结合毒力测定, 有可能提高球形芽孢杆菌筛选工作的效率。

参 考 文 献

- [1] Herrnstadt, C. et al.: *Bio/Technology*, 4: 305—308, 1986.
- [2] Schnetter, W. et al.: *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*, Wageningen, The Netherlands, p. 555, 1986.
- [3] de Barjac, H.: *C. R. Acad. Sci.*, D286(10): 797—800, 1978.
- [4] Ohba, M. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 38(2): 184—190, 1981.
- [5] Ohba, M. et al.: *ibid.*, 48(1): 129—130, 1986.
- [6] 王 瑛等: *微生物学报*, 26(1): 1—6, 1986.
- [7] 戴莲韵等: *微生物学报*, 28(4): 301—306, 1988.
- [8] Yousten, A. A. et al.: *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)*, 131B: 297—308, 1980.
- [9] Yousten, A. A.: *J. Invertebr. Pathol.*, 43(1): 124—125, 1984.
- [10] 山西省农业科学院土壤肥料科研所编: *土壤肥料分析手册*, 山西人民出版社, 太原, 1961.
- [11] Li, R. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 50(3): 277—284, 1987.
- [12] 李荣森等: *昆虫学报*, 32(2): 149—157, 1989.
- [13] 李荣森等: *微生物学报*, 29(6): 397—404, 1989.

SURVEY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND *BACILLUS SPHAERICUS* FROM SOILS OF FOUR PROVINCES OF CHINA AND THEIR PRINCIPAL BIOLOGICAL PROPERTIES

Li Rongsen Dai Shunying Li Xiaogang

Luo Cheng Sheng Zhumei Sun Ming

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

A number of isolates of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* were obtained from soils of Southwestern Area and Shaanxi Province of China. Among isolates of *B. thuringiensis* were under 13 sorts of serotype in total of 23 sorts of *B. thuringiensis* and about 20% of auto-agglutinate strains. Rules of ecologic distribution of two sorts of bacteria were analysed. Toxicities on six species of insects, morphology and crystal proteins of *B. thuringiensis*, as well as toxicities, morphology and crystal proteins of *B. sphaericus*,

were investigated. 22 strains of more efficient of *B. thuringiensis* and 2 strains of more efficient of *B. sphaericus* were obtained. It was shown that *B. thuringiensis* is actually soil microorganism, and resource of *B. thuringiensis* is much fruitful in Southwestern Area of China.

Key words

Bacillus thuringiensis; *Bacillus sphaericus*; Serotype