

我国南北方土壤中苏云金芽孢杆菌的 分布及杀虫特性*

戴顺英 高梅影 李小刚 李荣森

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要 从我国南部和北部地区 12 省的 1491 份土样中分离出苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 以下简称为 Bt) 221 株。经鉴定, 属于已有血清型 ($H_1 \sim H_{45}$) 中的 24 个血清型。此外尚有部分自凝型和未知血清型菌。东北和内蒙古地区的出菌土样率为 12.6%, 出菌率为 17.2%, 优势血清型为 H_4 、 H_{10} 、 H_3 、 H_{13} 、 H_5 及 H_{29} , 其中以黑龙江省土壤 Bt 菌最丰富, 出菌土样率和出菌率分别达 21.4% 和 29.4%, 还分离出 H_{45} 型菌 2 株; 西北地区的出菌土样率和出菌率分别为 6.6% 和 7.1%, 远低于东北、内蒙古地区, 优势血清型为 H_4 、 H_5 、 H_{19} 、 H_{10} 及 H_3 ; 南部 4 省土壤中的优势血清型为 H_3 及 H_5 , Bt 菌的平均分出率高, 但地区分布极不均衡, 湖南、江苏的出菌土样及出菌率均在 4.8%~4.9%, 广东珠江三角洲土壤中分别高达 77.8% 和 129.6%, 湖北长江沿岸冲积土中则未分离出 Bt 菌。毒力初测结果表明: 北部地区的 Bt 分离株中仅有 1.6% 对棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 高效, 1.1% 对柳蓝叶甲 (*Plagiodera versicolora*) 高效, 98.0% 以上的菌株对两种昆虫无效或低效。出自南部地区土壤的 Bt 菌株, 5.3% 对棉铃虫高效, 未发现对柳蓝叶甲有效的菌株。菌株 H27-05 自黑龙江省土壤中分离, 对棉铃虫毒力极高, 对柳蓝叶甲有中等毒效。

关键词 苏云金芽孢杆菌, 鞭毛血清型, 杀虫特性

在对我国西南等地区土壤 Bt 资源进行调查研究^[1~2]之后, 作者于 1992~1994 年又开展了对我国东北、内蒙古、西北、华南及江苏等 12 省土壤 Bt 资源的调查鉴定及分布规律的研究。在本研究中, 对所有获得的 Bt 菌株也进行了杀虫特性的测定, 为我国 Bt 资源利用潜力的评估和杀虫菌多样性研究提供了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 土样采集

自西北地区的陕西、甘肃、宁夏及青海, 东北与华北地区的辽宁、吉林、黑龙江及内蒙古, 南部地区的广东、湖南、湖北及江苏等共 12 省、自治区 37 县(市)的代表性土壤中采集了 1491 份土样, 经了解采样点未使用过 Bt, 土样均采自 0~10cm 深的表土层。

1.2 标准菌株

* 范钦、高海春、范国昌同志参加了采土样工作。

本文于 1995 年 5 月 22 日收到。

使用了 $H_1 \sim H_{29}$ 和 $H_{31} \sim H_{43}$ 的 Bt 标准菌株(表 1), 其中 H_{3ad} 、 H_{3ade} 及 H_{23} 标准菌株来自日本 Aiziwa K 教授, H_{24ac} 、 H_{42} 及 H_{43} 标准菌株为实验室鉴定保藏, 其余均由法国巴斯德研究院 Dr. de Barjac 和 Dr. M. M. Lecadet 惠赠。

表 1 用于 Bt 菌 H-血清型鉴定的标准菌株

Table 1 Standard strains of *B. thuringiensis* for characterization of H-serotype of Bt isolates

菌株	H-血清型	亚种	菌株	H-血清型	亚种
Strain	H-serotype	Subspecies	Strain	H-serotype	Subspecies
HD-2	1	<i>thuringiensis</i>	HD-867	18	<i>Kumamotoensis</i>
HD-3	2	<i>finitimus</i>	HD-868	19	<i>tochigiensis</i>
HD-4	3ac	<i>alesti</i>	HD-977	20ab	<i>yunnanensis</i>
HD-73	3abc	<i>kurstaki</i>	HD-1011	20ac	<i>pondcheriensis</i>
84-F-51-46	3ad	<i>sumiyoshiensis</i>	HD-847	21	<i>colmeri</i>
84-F-26-3	3ade	<i>fukuokaensis</i>	HD-1012	22	<i>shandogiensis</i>
HD-930	4ab	<i>sotto</i>	84-F-31-31	23	<i>japonensis</i>
HD-5	4ac	<i>Kenya</i>	T24001	24ab	<i>neoleonensis</i>
HD-29	5ab	<i>galleriae</i>	KK10-01	24ac	<i>novosibirsk</i>
HD-554	5ac	<i>canadensis</i>	T25001	25	<i>coreanensis</i>
HD-9	6ab	<i>entomocidus</i>	T26001	26	<i>silo</i>
114-72	6ac	<i>oyamensis</i>	T27001	27	<i>mexicanensis</i>
HD-11	7	<i>aizawai</i>	T28001	28	<i>monterrey</i>
HD-12	8ab	<i>morrisoni</i>	T29001	29	<i>amagiensis</i>
HD-501	8ac	<i>ostrinae</i>	T31001	31	<i>toguchini</i>
HD-974	8ad	<i>nigeriensis</i>	T32001	32	<i>cameroun</i>
HD-537	9	<i>tolworthi</i>	T33001	33	<i>leesis</i>
HD-146	10ab	<i>darmstadiensis</i>	T34001	34	<i>konkukian</i>
T10001c	10ac	<i>londrina</i>	T35001	35	<i>seoulensis</i>
HD-201	11ab	<i>toumanoffii</i>	T36001	36	<i>malaysiensis</i>
HD-541	11ac	<i>kyushuensis</i>	T37001	37	<i>andalousiensis</i>
HD-542	12	<i>thompsoni</i>	T38001	38	<i>oswaldocruzi</i>
HD-395	13	<i>pakistani</i>	T39001	39	<i>brasiliensis</i>
HD-567	14	<i>israelensis</i>	T40001	40	<i>huazhongensis</i>
HD-932	15	<i>dakota</i>	T41001	41	<i>sooncheon</i>
HD-521	16	<i>indiana</i>	YGd22-03	42	<i>jinghongiensis</i>
HD-866	17	<i>tohokuensis</i>	KK31-01	43	<i>guiyangiensis</i>

1.3 菌株分离

以弹土法进行分离^[1], 光学和电子显微镜检查确定 Bt 分离株的伴孢晶体形成。

1.4 毒效测定

表 2 不同地区土壤中苏云金芽孢杆菌的分布

Table 2 Distribution of Bt from soils of different area in China

地 区 Area	省 份 Province	土 样 数 Number of soil samples	出菌土样数 Number of Bt harbouring samples	出菌土样率(%) Rate of Bt harbouring samples	出菌数量 Number of Bt isolates	出菌率(%) Rate of Bt isolates	采样县(市)数 Number of counties taken sample
东北及内蒙古 Northeast & Neimeng	辽宁 Liaoning	210	20	9.5	26	12.4	6
	吉林 Jilin	190	18	9.5	25	13.2	4
	黑龙江 Heilongjiang	248	53	21.4	73	29.4	6
	内蒙古 Neimeng	200	16	8.0	22	11.0	3
	合计 Total	848	107	12.6	146	17.2	19
西 北 Northwest	陕西 Shanxi	103	14	13.6	16	15.5	4
	甘肃 Gansu	46	3	6.5	3	6.5	1
	宁夏 Ningxia	244	7	2.9	8	3.3	3
	青海 Qinghai	126	10	7.9	10	7.9	3
	合计 Total	519	34	6.6	37	7.1	11
南 部 South	湖南 Hunan	41	2	4.9	2	4.9	2
	湖北 Hubei	40	0	0	0	0	1
	江苏 Jiangsu	21	1	4.8	1	4.8	1
	广东 Guangdong	27	21	77.8	35	129.6	3
	合计 Total	129	24	18.6	38	29.5	7

供试昆虫为初孵棉铃虫和 2 龄柳蓝叶甲。棉铃虫毒力测定中,以琼脂平板上点接后长成的一个菌落作成 10ml 的菌悬液,加入人工饲料中感染初孵棉铃虫,32℃ 48h 检查死亡率。柳蓝叶甲毒力测定按实验室方法^[1,2]进行,以上述菌悬液涂叶饲虫。80%~100% 死亡率记为高效,20%~79% 记为低效,20% 以下记为无效。高效菌株 H27-05 发酵液的毒力效价测定按标准化方法进行,使用了国外标准品 HD-1S-1980(16000IU/mg)和国产标准品 CS3ab(15000IU/mg)。

1.5 H-血清型的鉴定

按常规方法^[1]进行,首先鉴定全部 Bt 分离株的主要 H 抗原,对少数菌株进行全部 H 抗原因子的鉴定。

1.6 土壤 pH 测定

按以前研究中所用速测法进行^[1]。

2 结果

2.1 不同地区土壤中 Bt 菌的分布

按东北与内蒙古、西北及南部三个区域统计的结果(表 2)显示,东北及内蒙古地区土壤中 Bt 的分布频率高且均衡,出菌土样率为 12.6%,出菌率为 17.2%。西北地区出菌土样率为 6.6%,出菌率为 7.1%。南部 4 省土壤中 Bt 分布极不均衡,广东珠江三角洲地区的出菌土样率和出菌率分别高达 77.8% 和 129.6%。湖南、江苏二省的出菌土样率和出菌率均近 5%,湖北的长江沿岸冲积土中则未分离出 Bt 菌。

2.2 不同血清型 Bt 菌的地理分布

由表 3 可知,南部地区土壤 Bt 菌中近 74% 为 H₃ 与 H₅ 血清型。东北地区土壤优势血清型为 H₄、H₁₀,其次为 H₃、H₁₃、H₅ 及 H₂₉。西北地区主要为 H₄、H₅、H₁₉、H₃ 及 H₁₀。

2.3 自然生态因子对 Bt 分布的影响

2.3.1 土壤类型:在 20 种不同类型的土壤中,东北与内蒙古地区的黑土、棕壤与暗棕壤,华南地区的红壤、红黄壤、黄褐色土、水稻土,西北地区的黄土、林下土中 Bt 菌含量较丰富,出菌率在 10% 或 10% 以上;草甸土、红土、沙土及草原土次之,出菌率为 5.0%~7.5%;在灰钙土、白盐土、盐浸土、灌淤土、黄沙土、冲积土及海滩沙地中均未分离出 Bt 菌,说明高度盐碱化土壤和极贫瘠土壤类型中 Bt 菌含量极少。在大连渤海沿岸海水、青海湖湖水及甘肃仙人湖(淡水)中也未分离出 Bt 菌。

2.3.2 土壤 pH 值:Bt 的出菌土样率及出菌率在 pH4.0~5.5 的土壤中分别为 12.7% 和 16.9%;在 pH6.0~7.0 的土壤中分别为 8.2% 和 8.4%;在 pH7.5~8.5 的土壤中分别为 9.8% 和 12.0%,表明苏云金芽孢杆菌的分布与土壤 pH 值并无明显依赖关系,与我们早先的研究结果^[1]基本一致。

2.3.3 植被种类:将采样处的植被分成 10 个类型。各类植被下的 Bt 出菌土壤率和出菌率以玉米、大豆、树林、蔬菜、向日葵及杂草与花卉地较高,其出菌土壤率分别为 19.2%、15.4%、16.5%、15.2%、20.0% 及 15.2%,出菌率分别为 26.4%、23.0%、22.6%、20.3%、20.0% 及 20.3%;土豆与蕃薯地次之,其出菌土壤率和出菌率分别为 9.4% 和 12.5%;无植被、小麦及草原(草甸)地最低,其出菌土壤率分别为 5.5%、5.3% 及 3.0%,出菌率分别为

6.9%、5.3%及 3.0%。植被类型与 Bt 分布之间并未显示特异相关性。

表 3 中国土壤 Bt 菌各血清型的地理分布

Table 3 Distribution of different H-setotypes of Bt from soils in China

H-血清型 H-serotype	东 北 及 内 蒙 古 Northeast & Neimeng		西 北 Northwest		南 部 South	
	菌株数 Number of isolates	百分比 (%)	菌株数 Number of isolates	百分比 (%)	菌株数 Number of isolates	百分比 (%)
H ₁	1	0.7	0	0	0	0
H ₂	0	0	1	2.7	0	0
H ₃	9	6.2	2	5.4	20	52.6
H ₄	44	30.1	3	8.1	0	0
H ₅	6	4.1	3	8.1	8	21.1
H ₆	0	0	1	2.7	1	2.6
H ₇	3	2.1	0	0	0	0
H ₈	2	1.4	0	0	0	0
H ₉	1	0.7	0	0	0	0
H ₁₀	18	12.3	2	5.4	0	0
H ₁₃	7	4.8	0	0	0	0
H ₁₅	2	1.4	1	2.7	0	0
H ₁₆	4	2.7	0	0	0	0
H ₁₇	0	0	1	2.7	0	0
H ₁₈	2	1.4	1	2.7	0	0
H ₁₉	1	0.7	3	8.1	0	0
H ₂₀	0	0	1	2.7	1	2.6
H ₂₁	1	0.7	1	2.7	1	2.6
H ₂₂	1	0.7	0	0	0	0
H ₂₄	0	0	1	2.7	0	0
H ₂₇	0	0	1	2.7	1	2.6
H ₂₈	0	0	0	0	1	2.6
H ₂₉	6	4.1	1	2.7	0	0
H ₄₃	2	1.4	0	0	0	0
自 凝 Auto-agglutinate	14	9.6	5	13.5	0	0
未 知 Unknown	22	15.1	9	24.3	5	13.2

2.4 土壤来源 Bt 菌株对昆虫的毒力特性

全部 Bt 分离株对初孵棉铃虫和 2 龄柳蓝叶甲的毒力初测结果表明,95.0%以上的菌株对 2 种供试昆虫无效或低效,但北部地区和南部地区 Bt 菌株的毒力特性有明显差异,对棉铃虫高效的菌株比率:北部地区为 1.4%~2.7%,南部地区较高为 5.3%;对柳蓝叶甲的毒力情况与此相反,高效与低效菌株的百分率,北部地区分别为 0%~1.4%及 8.1%~14.3%,而南部地区为零。说明地理、气候、土壤和人为因素对 Bt 菌的类型及杀虫活性有极其重要的影响。

2.5 菌株 H27-05 的生物学特性与毒力

初步鉴定结果表明,菌株 H27-05 属 H_3 型而不同于 H_{3abc} 型,伴孢晶体为镶嵌型双锥体,由 130000 和 70000 的蛋白质构成,发酵性能良好,对棉铃虫和小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 有较高毒力,对柳蓝叶甲有中等毒力。3 次摇瓶发酵比较试验的发酵液毒力测定结果(表 4)证明,对棉铃虫的毒效,菌株 H27-05 比菌株 HD-1 高 62.8%,对小菜蛾的毒效高 29.7%。

表 4 菌株 H27-05 与 HD-1 发酵液的毒力比较

Table 4 Toxicity of fermentation liquid of strain H27-05 and HD-1

供试昆虫 Insect	H27-05		HD-1
	培养基 M3	培养基 M'3	培养基 M3
	Medium M3	Medium M'3	Medium M3
棉 铃 虫 <i>H.armigera</i>	1943	1761	1194
小 菜 蛾 <i>P.xylostella</i>	1803	1403	1397

* 表中所列毒力效价单位为: IU / μ l.
Toxic efficiency was showed in IU / μ l.

3 讨论

本研究结果表明,我国土壤中 Bt 菌含量丰富,类型多样,结合我们过去对西南地区 Bt 资源研究结果,其地理分布表现出一定的规律性。这种规律性表现在:①我国土壤中 Bt 菌的丰度有由南向北逐渐增加的趋势,尤以最北端的黑龙江省含量最丰富;②Bt 各血清型的分布表现出地理区域特点。南部(包括西南地区)土壤中以 H_3 、 H_5 及 H_7 为主。东北及内蒙古地区土壤中的优势血清型为 H_4 、 H_{10} 、 H_3 、 H_5 及 H_{29} 。西北地区土壤中的主要血清型为 H_4 、 H_5 、 H_{19} 、 H_3 及 H_{10} ,显示了明显的过渡性特征。 H_3 和 H_5 显然是我国土壤中广泛分布的 Bt 血清型。土壤中 Bt 分布的地域性特点国内外也有报道^[3~9]。日本、美国、菲律宾及我国的学者均发现 Bt 分离株的 H 血清型存在着一定的地域性,而且地理和生态环境的不同会影响 Bt 亚种的分布。

广东省珠江三角洲地区土壤中 Bt 菌的分出率非常高,且主要是 H_{3abc} 的 HD-1 品系。其原因可能是自 1986 年以来,大量 H_{3abc} 型的 Bt 杀虫剂进入该地区并在蔬菜上较

普遍地使用,通过空气、水流而造成横向传播。Delucca^[4]在美国 Browsville 地区的棉田中发现了很高比例的 H_{3abc} 的 Bt 菌,认为与田块中使用过 Bt 制剂有关。因此,对我国的 Bt 资源及其自然分布状况的调查研究应尽早完成,以免因 Bt 杀虫剂的广泛应用而受到干扰。

本研究结果表明,植被类型与 Bt 分布之间并未显示特异相关性。但综合过去的研究结果^[1]可看出,树林下的土壤中 Bt 含量丰富,而无植被的裸地含量明显要少,其原因可能是,森林或树林中生态条件稳定,直射阳光少或无,昆虫将 Bt 带入土壤的机会也多,而裸地无此条件。

据资料介绍,全世界已发现 Bt 菌的 45 个血清型 59 个亚种,作者先后从我国土壤中发现了其中的 32 个血清型,此外还有一些未知血清型、无鞭毛及自凝型 Bt 菌株,足以说明我国是全世界 Bt 资源最丰富的地区或至少是最丰富地区之一。这些菌株可产生多种多样的晶体蛋白质^[2,14],包括了对鳞翅目、鞘翅目及双翅目昆虫高效的晶体蛋白质,及不同成分和结构的对供试昆虫无毒性的晶体蛋白质。这种杀虫晶体蛋白质及其基因的多样性可以丰富杀虫蛋白质基因的分类^[10,11],新型 Bt 菌株及杀虫晶体蛋白质类型正在不断被发现和鉴定出来^[12~14],杀虫蛋白质基因结构、功能及分类研究已成为 Bt 研究中极活跃的领域,应将先进的分子生物学新技术引入杀虫菌资源的研究工作中。

参 考 文 献

- [1] 李荣森,戴顺英,李小刚,等.微生物学报,1990,30(5):380~388.
- [2] 李荣森,戴顺英,李小刚,等.微生物学报,1992,32(6):387~393.
- [3] Ohba M, Aizawa K, Furusawa T et al. *Japan Appl Entom Zool*, 1979b, 14(3): 340~345.
- [4] Delucca A J, Simonson J G, Larson A D et al. *Can J Microbiol*, 1981, 27(9): 865~870.
- [5] Ohba M, Aizawa K, Shimizu S. *J Invertebr Pathol*, 1981, 38(2): 307~309.
- [6] Padua L E, Cabriel B P, Aizawa K et al. *Philipp Entom*, 1982, 5(2): 199~208.
- [7] Ohba M, Aizawa K. *J Invertebr Pathol*, 1986, 47(3): 277~282.
- [8] 王 瑛,温 洁,王玉珍.微生物学报,1990,30(2):158~160.
- [9] 戴经元,王 波,罗曦霞,等.华中农业大学学报,1994,13(2):144~152.
- [10] Hoft H, Whiteley H R. *Microbiol Rev*, 1989, 52(2): 242~255.
- [11] Feitelson J S, Payne J, Kim I. *Bio / Technology*, 1992, 10(3): 271~275.
- [12] Whitlock V H, Lo M C, Kuo M H et al. *J Invertebr Pathol*, 1991, 58(1): 33~39.
- [13] Orduz S, Rojas W, Correa M M et al. *J Invertebr Pathol*, 1992, 59(1): 99~103.
- [14] Li X, Li R. *Chinese J Biotechnology*, 1994, 10(2): 75~82.

DISTRIBUTION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IN SOILS OF NORTH AND SOUTH OF CHINA

Dai Shunying Gao Meiyong Li Xiaogang Li Rongsen

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract 221 isolates of *Bacillus thuringiensis* were isolated in 1491 soil samples from North and South of China. H-serotypes and larvicidal characters of all Bt isolates have been identified. The rate of Bt-harboursing soil sample and the rate of Bt isolates in Northeast and Neimeng were in 12.6% and 17.2% respectively. Predominant serotypes were H₄, H₁₀, H₃, H₁₃, H₅ and H₂₉. The most fertile Bt-harboursing area was the Heilongjiang Province with rate of Bt-harboursing sample of 21.4% and rate of Bt isolate of 29.4%. Rate of Bt-harboursing sample and rate of Bt isolate in Northwest area were 6.6% and 7.1% respectively. Main serotypes were H₄, H₅, H₁₉, H₁₀ and H₃. In four provinces of Southern China, both rates above were 18.6% and 29.5%, but frequency of Bt distribution was varied seriously in different distinct. Predominant serotypes in soils from Southern China were H₃ and H₅. Results of bioassay showed that the percentage of strains high active to *Heliothis armigera* and *Plogioidera versicolora* were 1.6% and 1.1% in soils from North of China. In contrast to North of China, Bt strains active to *H. armigera* were 5.3% and none of Bt was effective to *P. versicolora* in South of China. A strain H27-05 was high toxic to *H. armigera* and showed temperate toxicity to *P. versicolora*.

Key words *Bacillus thuringiensis*, H-serotype, Larvicidal character