

土壤来源的五个苏云金芽孢杆菌新亚种的鉴定

李荣森 高梅影 戴顺英 李小刚

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

提 要 从中国土壤中分离的大量苏云金芽孢杆菌菌株中鉴定出 H42、H43、H56、H60 及 H62 等 5 种新 H 血清型,并进行了形态、培养特征、生化反应、晶体蛋白质成分及毒力特性等项检测鉴定,鉴定了 5 个苏云金芽孢杆菌新亚种:*Bacillus thuringiensis* subsp. *jinghongiensis* (H42), *B. thuringiensis* subsp. *guiyangiensis* (H43), *B. thuringiensis* subsp. *rongseni* (H56), *B. thuringiensis* subsp. *pingluonsis* (H60) 及 *B. thuringiensis* subsp. *zhaodongensis* (H62)。毒力生物测定证明 5 个新亚种的代表菌株对棉铃虫(*Heliothis armigera*)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)、柳蓝叶甲(*Plagioderma versicolora*) 幼虫均无毒力。H42、H43、H56、H60 对埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、斑须按蚊(*Anopheles stephensi*) 及尖音库蚊(*Culex pipiens*) 亦均无毒;H62 对埃及伊蚊无毒,但对尖音库蚊与斑须按蚊有低毒。

关键词 苏云金芽孢杆菌 新亚种 鉴定

分类号 Q93-331 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0154-59

1987 年至 1993 年间,本实验室自我国 18 省(自治区)的土壤和水体中分离到大量苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,以下简称 Bt)、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*) 及其它种芽孢杆菌的菌株^[1,2],从苏云金芽孢杆菌分离株中鉴定了 5 个新血清型即 5 个新亚种,现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供鉴定的 Bt 菌株:YGd22-03,分离自云南省景洪县打洛镇旱地黄壤;KK31-01,分离自贵州贵阳市花溪镇黑色土;SCg04-02,分离自四川省重庆市歌乐山紫色土;NXP15-04,分离自宁夏回族自治区平罗县姚伏乡沙壤土;HZ39-04,分离自黑龙江省肇东县黑土。

1.1.2 标准 Bt 菌株:血清型 H1-H41、H44-H55、H57-H59 及 H61 标准菌株由法国巴斯德研究院 Dr. Lecadet M. M. 提供,其余皆由本实验室保存。

1.1.3 生物测定用昆虫:小菜蛾、棉铃虫、柳蓝叶甲由本实验室饲养并用于生物测定,三种蚊幼虫由 Dr. Lecadet 提供并进行毒力生物测定。

1.2 方法

1.2.1 H-抗血清制备及 H-血清型鉴定:按常规方法制备供试 Bt 菌株的 H 抗原注射家兔,采血制备抗血清和测定效价,然后进行凝集试验和交叉吸收凝集试验。

1.2.2 形态及培养特征试验:按常规方法^[3]进行,于电镜下观察伴孢晶体形成及形态。

1.2.3 生化试验:H42、H43 菌株按经典方法^[4]及 API 系统^[5,6]进行,而 H56、H60 及 H62

则只按 API 系统的方法进行测定。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 :先以快速 SDS-PAGE 方法^[1]初步分析供试 Bt 菌株的晶体蛋白质图形后 ,以常规方法^[7]鉴定各菌株提纯伴孢晶体的蛋白质成分。

1.2.5 毒力生物测定 :在供试昆虫中 ,小菜蛾为 3 龄幼虫 棉铃虫为初孵幼虫 柳蓝叶甲为 2 龄幼虫 3 种蚊虫为 3 龄或 4 龄幼虫。在毒力生物测定中 棉铃虫使用人工半合成饲料 蚊幼虫于水中加酵母粉饲喂 ,其它昆虫以一定稀释度的摇瓶菌液浸叶饲虫。

2 结果

2.1 H 血清型

供试菌株 H 抗血清的效价及 H 血清型的鉴定结果见表 1。

以标准菌株 HD-73(H3abc) HD-8(5ab)和 HD-11(H7)为参照菌株 ,其 H 抗血清效价皆为 25 600。

2.2 形态与培养特征

结果见图 1 及表 2。

表 1 B_t 新菌株的 H 血清型
Table 1 H-erotypes of new B_t strains

菌 株 Stain	H 血清型 H-serotgpe	H 抗血清的效价 H-antiserum
YGd22-03	42	25600
KK31-01	43	25600
SCg04-02	56	12800
Nxp15-04	60	25600
HZ39-04	62	25600

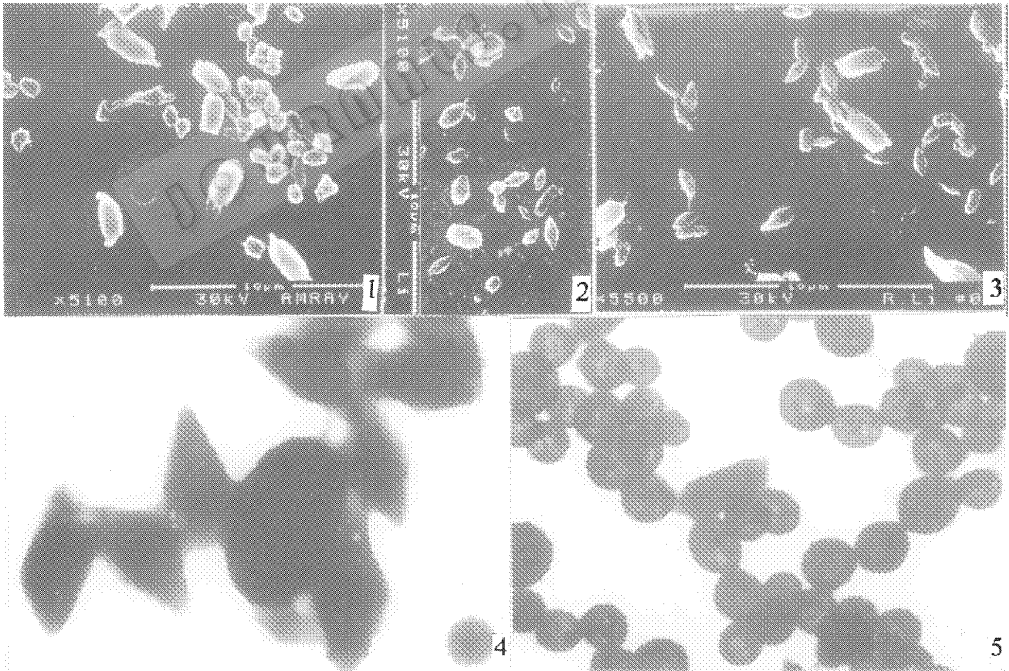


图 1 电镜下五个新 H 血清型菌株伴孢晶体的形态
Fig.1 Morphology of parosporal crystals from 5 new Bt H-serotypes
Scanning :1. YGd22-03(H42) 2. KK31-01(H43) 3. SCg04-02(H56) ;
Transmission :4. NXP15-04(H60) ,X15000 5. HZ39-04(H62) ,X7000.

表 2 新 B_t 菌株的形态与培养特征

Table 2 Characters of morphology and culture in new Bt strains

菌株 Strain	形态 Morphology				培养 Culture			
	芽孢 Spore	伴孢晶体 Crystal	营养琼脂上的菌落 Colonies	运动 Motility	革兰氏反应 Gram stain	pH6 营养琼脂上生长 Grow in N. A. pH6	厌气生长 Anaerobic grow	硝酸盐产气 Gas from nitrate
YGd22-23	卵圆,芽孢囊不膨大	+ ,双菱台	粗糙,直径>2mm	+	+	+	+	+
KK31-01	卵圆,芽孢囊不膨大	+ ,双锥体	粗糙,直径>2mm	+	+	+	+	+
SCg04-02	卵圆,芽孢囊不膨大	+ ,双锥体及长椭圆	粗糙,直径>2mm	+	Varied	+	+	±
NXP15-04	卵圆,芽孢囊不膨大	+ ,很小,双锥体	粗糙,直径>2mm	+	+	+	+	±
HZ39-04	卵圆,芽孢囊不膨大	+ ,很小,不规则,大小不等	粗糙,直径>2mm	+	+	+	+	±

表 3 血清型 H42 与 H43 菌株按传统方法测定的生化反应特性

Table 3 Biochemical characters of H42 and H43 strains by classical method

生化反应 Biochemical reaction		菌 株 Strain	
		YGd22-03(H42)	KK31-01(H43)
V-P 反应	V-P reaction	Weak	+
卵黄磷脂酶	Egg yolk lecithinase	+	+
脲酶 (Fergusson)	Urease (Fergusson)	+ 24h	—
脲酶 (Christensen)	Urease (Christensen)	+ 24h	—
精氨酸二氢化酶	Arginine dihydrolase	+	—
硝酸盐还原	Nitrate reduction	—	+
V-P 肉汤中 pH<6	pH in V-P broth<6	+	+
β-半乳糖苷酶	β-galactosidase	—	—
吲哚产生	Indole production	—	—
Hugh-Leifson		Fermentation	Fermentation
淀粉水解	Starch hydrolysis	+	+
明胶水解	Gelatin hydrolysis	+++	+++
七叶苷水解	Hydrolysis of Esculin	+	+
自铵盐加下列糖类中产酸：			
Ammonium salt sugars acid from：			
D-Xylose		—	—
D-Glucose		+	+
D-Mannitol		—	—
Starch		+	+
D-Raffinose		—	—
D-Lactose		—	—
D-Salicin		—	+
D-Sucrose		—	—

2.3 生化反应

菌株 YGd22-03(H42)与 KK31-01(H43)按传统方法测定的结果列于表 3。5 个供试菌株按 API 系统测定的结果列于表 4。

三个参照菌株的生化反应结果皆与原始发表结果相同。供试菌株的结果除脲酶一项与表 4 中的 API 系统结果微有差异外,余皆相同。由于 API 测定系统精确性、可靠性皆比传统方法高,且已成为巴斯德研究院的常规方法^[6],故只用传统方法测定了 H42 和 H43 两个菌株。

表 4 5 个新血清型菌株按 API 系统测定的生化反应特性
Table 4 Biochemical characters of 5 new serotypes by API system

API 项目	API item	YGd22-03 (H42)	KK31-01 (H43)	SCg04-02 (H56)	NXP15-04 (H60)	HZ39-04 (H62)
鸟氨酸磷酸甘油脱氢酶	ONPG	—	—	—	—	—
精氨酸脱氢酶	ADH	±	+	+	—	+
赖氨酸脱羧酶	LDC	—	—	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶	ODC	—	—	—	—	—
柠檬酸利用	CIT	±	±	+	—	—
硫化氢	H ₂ S	—	—	—	—	—
尿酶存在	URE	±	—	—	—	—
色氨酸脱酰胺酶	TDA	—	—	—	—	—
由色氨酸产生吲哚	IND	—	—	—	—	—
乙酰-甲基-甲	VP	+	+	+	+	+
明胶水解	GEL	+	+	+	+	+
由葡萄糖产酸	GLU	±	+	+	+	+
因硝酸盐还原酶产亚硝酸	NO ₂	+	+	+	+	+
超出亚硝酸根的还原	N ₂					
甘油	Glycerol	±	+	—	—	—
赤藓糖醇	Erythritol	—	—	—	—	—
D-阿拉伯糖	D-arabinose	—	—	—	—	—
L-阿拉伯糖	L-arabinose	—	—	—	—	—
核糖	Ribose	+	+	+	±	+
葡萄糖	Glucose	+	+	+	+	+
果糖	Fructose	+	+	+	+	+
甘露糖	Mannose	±	+	—	—	—
N-乙酰葡萄糖胺	N-Acetyl-glucosamine	+	+	±	+	+
苦杏仁苷	Amygdalin	±	—	—	—	—
熊果苷	Arbutin	+	+	+	—	+
七叶苷	Esculin	+	+	+	+	+
水杨苷	Salicin	+	+	+	—	±
纤维二糖	Cellobiose	±	+	±	—	±
麦芽糖	Maltose	±	+	+	+	+
蔗糖	Sucrose	+	+	+	—	—
海藻糖	Trehalose	+	+	+	+	+
淀粉	Starch	+	+	+	+	+
糖原	Glycogen	+	+	+	+	+
葡糖酸酯	Gluconate	±	—	—	—	—

Note D-xylose, L-xylose, adonitol, β-methyl-xyloside, galactose, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, methyl-mannoside, methyl-glucoside, lactose, melibiose, inulin, melezitose, raffinose, xylital, gentiobiose, turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, 2keto-gluconate and 5keto-gluconate all are negtive in five Bt strains.

按 API 系统方法所获得的生化试验结果表明, H42 与 H43 基本相同, H56、H60 与

H62 之间差异很少,但与 H42 及 H43 有较明显差异,H60 的差异最为明显,只有 ADH、CIT、熊果苷、纤维二糖及蔗糖等 5 项反应与其它 4 个血清型不同。

2.4 晶体蛋白质

晶体蛋白质的 SDS-PAGE 分析结果列于表 5。

表 5 5 个新 Bt 血清型的晶体蛋白质成分
Table 5 Component of crystal protein from 5 new serotypes

菌株 Strain	H-血清型 H-serotype	晶体蛋白质 Crystal protein/kD	
		主要成分 Major	次要成分 Minor
YGd22-03	42	110 ,36	120
KK31-01	43	140 ,95	65
SCg04-02	56	135	
NXP15-04	60	140 ,110 ,95	
HZ39-04	62	105	

在 10μg 蛋白质加样量下,菌株 YGd22-03、KK31-01、NXP15-04 及 HZ39-04 的晶体蛋白质带均较微弱。

2.5 杀虫特性

6 种昆虫的毒力生物测定表明,供试 H42、H43、H56、H60 菌株对小菜蛾(*Plutella xylostella*) 棉铃虫(*Heliothis armigera*) 柳蓝叶甲(*Plagioder a versicolora*) 埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) 斑须按蚊(*Anopheles stephensis*)及尖音库蚊(*Culex pipiens*)均无毒。H62 对 3 种鳞翅目昆虫及伊蚊无毒,但对尖音库蚊和斑须按蚊有低毒,结果见表 6。

表 6 5 个 Bt 新血清型的杀虫特性

Table 6 Insecticidal property of 5 new H-serotypes of Bt

菌株 Strain	H-血清型 H-serotype	培养液 稀释度 Dilution	供试昆虫死亡率 Mortality of tested insects/%					
			小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i> (3rdin ,48h)	棉铃虫 <i>Heliothis armigera</i> (1st ,72h)	柳蓝叶甲 <i>Plagioder a versicolora</i> (2ndin ,72h)	伊蚊 <i>Aedes aegypti</i> (3rdin ,24h)	按蚊 <i>Anopheles stephensis</i> (3rdin ,24h)	库蚊 <i>Culex pipiens</i> (3rdin ,24h)
YGd22-03	H42	10 ⁻²	0	0	0	0	0	0
		10 ⁻³				0	0	0
		10 ⁻⁴				0	0	0
KK31-01	H43	10 ⁻²	0	0	?	0	0	0
		10 ⁻³				0	0	0
		10 ⁻⁴				0	0	0
SCg04-02	H56	10 ⁻²	25.0	0	0	0	0	0
		10 ⁻³				0	0	0
		10 ⁻⁴				0	0	0
NXP15-04	H60	10 ⁻²	23.8	0	0	0	0	0
		10 ⁻³				0	0	0
		10 ⁻⁴				0	0	0
HZ39-04	H62	10 ⁻²	23.8	0	0	0	32	48
		10 ⁻³				0	28	28

2.6 新亚种的鉴定与定名

根据上述鉴定结果,按国际公认的 Barjac Bt 菌鉴定分类系统^[4],5 个新 H 血清型的 Bt 菌株鉴定为 5 个新 Bt 亚种,分别命名如下:(1) *Bacillus thuringiensis* subsp. *jinghongensis* ,H42,标准菌株为 YGd22-03,其它菌株有 YGd22-01, YGd22-02, YGd22-05。(2) *Bacillus thuringiensis* subsp. *guiyangensis* ,H43,标准菌株为 KK31-01,其它菌株有 KK31-02, LNB25-02。(3) *B. thuringiensis* subsp. *rongseni* ,H56,标准菌株为 SCg04-

02。(4) *B. thuringiensis* subsp. *pingluonsis* ,H60 ,标准菌株为 NXP15-04。(5) *B. thuringiensis* subsp. *zhaodongensis* ,H62 ,标准菌株为 HZ39-04。

3 讨论

Barjac 于 1964 年提出的以 H 抗原特性为主结合生化反应及其它项目的 Bt 分类鉴定系统已为国际所公认 ,其科学基础是凡出现一个新的 H 血清型 ,其生理生化反应必有一些差异。因此 ,在形成伴孢晶体的 Bt 菌中 ,H 血清型在新亚种的鉴定中具有决定性意义。生化反应的项目及其在分类鉴定中重要性的排位次序 ,自 1964 年以来已有较大改变和发展 ,已建立并应用了新的生化测定系统 ,即 API 系统 ,提高了 Bt 亚种鉴定的准确性与科学性。本研究也证明了这点。

本研究从我国土壤来源的 Bt 菌中鉴定出 5 个新亚种 ,表明了我国 Bt 资源的丰富和多样性特点。在毒力生物测定中 ,5 个新亚种显示对供试 5 种昆虫无毒或低毒 ,这与近年来国内外从土壤中鉴定出的新亚种的情况类似 ,但由于供试虫种很少 ,难以断言其对昆虫无毒 ,故有必要进一步扩大生物测定的虫种范围。

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] 戴顺英 ,高梅影 ,李小刚等.微生物学报 ,1996 ,36(4) :295~302.
- [3] Barjac H , Bonnefoi A. *Entomophaga* ,1973 ,18(1) :5~17.
- [4] Barjac H , Frachon E. *Entomophaga* ,1990 ,35(2) :233~240.
- [5] Sneath S H A. Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci. In :Sraley J T , Bryant M P , Pfenning N *et al.* ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* , Volume 2. 1st ed. Baltimore : Williams & Wilkins , 1990 ,1140~1135.
- [6] Thierry I & Frechon E. Identification , isolation , culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In : Lacey L A ed. *Manual Of Techniques In Insect Pathology*. 1st ed. San Diego :Academic Press Limited. 1997 ,55~77.
- [7] 李荣森 ,罗 成.微生物学报 ,1989 ,29(6) :397~404.

THE IDENTIFICATION OF 5 NEW SEROTYPES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* FROM SOIL IN CHINA

Li Rongsen Gao Meiyong Dai Shunying Li Xiaogang

(Wuhan Institute of Virology , Chinese Academy of Sciences. Wuhan 430071)

Abstract Five new strains of *Bacillus thuringiensis*(Bt) from soil in China were classified. 5 new H-serotypes :H42 ,H43 ,H56 ,H60 and H62 were identified. There were some distinction in the morphology , biochemical reaction and toxicity against species of insect. Five new Bt subspecies were identified as follows : Strain YGd22-03 *Bacillus thuringiensis* subsp. *jinghongiensis* ,H42 ;Strain KK31-01 *Bacillus thuringiensis* subsp. *guiyangiensis* ,H43 ;Strain SCg04-02 *B. thuringiensis* subsp. *rongseni* ,H56 ;Strain NXP15-04 *B. thuringiensis* subsp. *pingluonsis* ,H60 ;Strain HZ39-04 *B. thuringiensis* subsp. *zhaodongensis* ,H62.

Key words *Bacillus thuringiensis* , New subspecies , Identification