

# 杀鞘翅目苏云金芽孢杆菌新菌株及其杀虫剂的研究\*

高梅影<sup>1</sup> 李荣森<sup>1</sup> 戴顺英<sup>1</sup> 李小刚<sup>1</sup> 傅建红<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)(<sup>2</sup> 新疆维吾尔自治区农业科学院 乌鲁木齐 830000)

**提 要** 从中国土壤中分离出 2 株杀鞘翅目昆虫的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) YM-03 及 SHQ11-10。YM-03 的血清型为 H8a8b, SHQ11-10 的 H 血清型未知。二菌株皆产近菱形的薄扁伴孢晶体, 分别含 68~70kD 和 65kD 的晶体蛋白质。毒力生物测定证明对柳蓝叶甲(*Plagioder a versicolora*)及马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)有高毒效。发酵性能良好。YM-03 粉剂田间防治马铃薯甲虫有高效。稀释 400 倍喷雾, 防治效果达 94.6%。

**关键词** 苏云金芽孢杆菌 鞘翅目 伴孢晶体

**分类号** Q939.11 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0515-20

从早先分离出的大量苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*)菌株中<sup>[1,2]</sup>, 以柳蓝叶甲为试虫, 通过毒力初筛, 筛选出二株高效菌株 YM-03 与 SHQ11-10。本文报道了二菌株的分类鉴定、晶体蛋白质分析、毒力特性、发酵生产及防治效果等研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** H 血清型鉴定用 H1-H41 型 *Bt* 标准菌株由法国巴斯德研究院 Dr. Barjac 和 Dr. Lecadet 提供, H42、H43 型标准菌株为本实验室鉴定保存。供试菌株为 YM-03 及 SHQ11-10, 分别分离自云南和陕西土壤。菌株 DSM2803 苏云金芽孢杆菌粉虫变种(*Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*)为 German Collection of Microorganisms and Cell Culture 提供, 对鞘翅目有效。

**1.1.2 试剂** 菌株晶体蛋白质成分分析及质粒检测所用药品与试剂参见李荣森等早先研究<sup>[3,4]</sup>。

**1.1.3 昆虫** 菌株初筛昆虫为柳蓝叶甲, 毒力生物测定用鞘翅目昆虫六种: 柳蓝叶甲(*Plagioder a versicolora*)、二十八星瓢虫(*Henosepilachna vigintioctopunctata*)、黄粉甲(*Tenebrio molitor*)、黄守瓜(*Aulacophora femoralis*)、绿豆象(*Bruchus chinensis*)及马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)。

**1.1.4 田间防治对象** 田间防治试验的对象昆虫为马铃薯甲虫, 作物为马铃薯。

### 1.2 方法

**1.2.1 H-血清型鉴定及生化试验** 按常规<sup>[5]</sup>进行。

\* 国家“八五”及“九五”攻关计划项目的内容  
孙春娥同志参加了采样并完成了部分生物测定  
收稿日期: 1998-02-16, 修回日期: 1998-05-29

1.2.2 伴孢晶体形态 :于 JM-100C 透射电镜和 KYKY Amray 1000B 扫描电镜下观察。

1.2.3 晶体蛋白质分析 :按常规以 SDS-PAGE 方法<sup>[3]</sup>进行。

1.2.4 毒力生物测定 :供试二菌株摇瓶培养至成熟 ,以稀释 10 倍的菌悬液进行毒力初筛试验 ,在进一步的生物测定中则将菌液作二倍梯级稀释进行。柳蓝叶甲、二十八星瓢虫及马铃薯甲虫以菌液浸叶饲虫 ,黄粉虫以麦麸饲喂 ,黄守瓜以南瓜切片饲喂 ,绿豆象以绿豆粉饲喂。每浓度皆放虫 40 头 ,感染时间依虫种不同而不同 ,饲养温度 28℃ ~ 30℃。计算其死亡率或 LC50 值。

1.2.5 中试发酵与 *Bt* 制剂生产 :于 2.4t 和 5t 容积发酵罐中进行中试发酵 ,以简易浓缩法和离心浓缩法(16,000r/min)浓缩后制备乳悬剂 ,以喷雾干燥法制备可湿性粉剂。采用含固量 6.4% ~ 6.9%(以 6.4% 为主 ,鱼粉过 40 目筛)的 M3-1 培养基 ,发酵温度 12h 前 32℃ ± 1℃ ,12h 后 31℃ ± 1℃。

1.2.6 田间试验 :田间防治试验于新疆霍城县进行 ,防治对象为马铃薯甲虫 ,以 YM-03 的粉剂和乳悬剂进行喷雾。

## 2 试验结果

### 2.1 毒力特性

供试 *Bt* 菌株培养液和提纯伴孢晶体对几种鞘翅目昆虫的毒力试验结果分别见表 1 及表 2。

表 1 *Bt* 新菌株培养液对几种鞘翅目昆虫的毒力初筛结果

Table 1 Bioassay of new *Bt* strains against several species of coleoptera

菌株 Strains	H-血清型 H-serogtype	菌液浓度 Density	死亡率 Mortality/%					
			柳蓝叶甲 <i>P. versicolora</i> (2in. 48h)	马铃薯甲虫 <i>L. decemlineata</i> (3in. 48h)	二十八星瓢虫 <i>H. vigintioct -punctata</i> (2in 6d)	黄粉虫 <i>T. molitor</i> (3in. 72h)	黄守瓜 <i>A. femoralis</i> (2in. 72h)	绿豆象 <i>B. chinensis</i> (2in. 48h)
H3-03	3ade	10 <sup>-1</sup>	-	NT	-	28.6	-	45.6
Sph16-01	3ade	10 <sup>-1</sup>	-	NT	-	22.6	-	35.6
SH11-05	3abc	10 <sup>-1</sup>	-	NT	-	-	-	-
Sph11-05	5ab	10 <sup>-1</sup>	50.2	NT	-	-	-	-
YH-8A	7	10 <sup>-1</sup>	-	NT	-	-	-	-
YM-03	8ab	10 <sup>-1</sup>	100	100	-	-	71.5	-
YK14-01	14	10 <sup>-1</sup>	54.0	NT	-	-	-	-
KA32-01	21	10 <sup>-1</sup>	-	NT	68.2	-	-	-
Sph04-04	22	10 <sup>-1</sup>	72.4	NT	-	40.0	-	70.0
SHQ11-10	Unknown	10 <sup>-1</sup>	97.9	NT	NT	NT	NT	NT
KK10-01	24ac	10 <sup>-1</sup>	-	NT	-	-	-	-
DSM2803	8ab	10 <sup>-1</sup>	100	NT	NT	NT	NT	NT
HD-1(CK)	3abc	10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	25.0	-

注 Note (-) 无毒效 No toxicity (NT) 未试 Not tested

由表 1 及表 2 可知, YM-03 与 SHQ11-10 二菌株对鞘翅目叶甲科昆虫有高效, 毒力水平与粉虫变种菌株 DSM2803 相当。SPH04-04 对柳兰叶甲、黄粉虫及绿豆象幼虫有一定毒力, KA32-01 对二十八星瓢虫有低毒效。

## 2.2 H 血清型鉴定

以供试菌株的鞭毛抗原(H 抗原)、抗血清同 H1-H43 的 *Bt* 标准菌株进行交叉凝集反应及交叉吸收凝集反应试验, 结果见表 1。其中菌株 YM-03 的 H 血清型为 H8ab。在血清型鉴定的同时, 还按 Barjac 的经典方法<sup>[5]</sup>进行 23 项生理生化试验(结果未列出), 结果基本与 H8ab 标准菌株相同。故本菌株应属于苏云金芽孢杆菌莫氏亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*)。

## 2.3 杀鞘翅目 *Bt* 菌株的伴孢晶体、晶体蛋白质及质粒

2.3.1 伴孢晶体形态: 电镜下菌株 YM-03 与 SHQ11-10 的伴孢晶体皆为薄扁的菱形(图 1), 与国外已报道的杀鞘翅目晶体形态<sup>[6,7]</sup>类似。

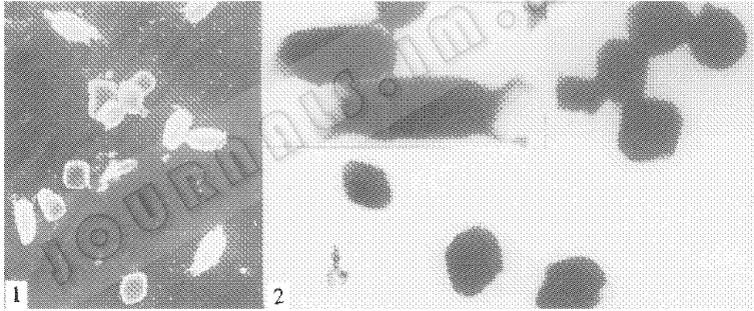


图 1 电镜下杀鞘翅目 *Bt* 菌株伴孢晶体的形态

1. YM-03 伴孢晶体(扫描电镜);
2. SHQ11-10 伴孢晶体(透射电镜), 7500X.

Fig. 1 Morphology of crystals from coleopterancidal *Bt* strains under electron microscope

1. YM-03(Scanning electron microscope);
2. SHQ11-10(Transmission electron microscope).

2.3.2 晶体蛋白质成分: SDS-PAGE 分析表明, 菌株 YM-03 与 SHQ11-10 分别产生 68~70kD 和 65kD 的晶体蛋白质, SPh04-04 产生 35kD 的晶体蛋白质(图 2)。

2.3.3 质粒: 前已报道<sup>[8]</sup>菌株 YM-03 含 64、45 及 9.0MD 三种质粒。

## 2.4 发酵中试

2.4.1 发酵: 菌株为 YM-03 及 SHQ11-10, 发酵培养基为含固料 6.4%~6.9%(以 6.4% 为主)的 M3-1 培养基配方, 消前 pH8.0, 消后 7.0 左右。搅拌 300r/min, 通气量前 8h 为 1.0:0.8, 8h 后为 1:1, 罐压 0.4Pa。发酵结束后发酵液立即酸化至 pH5.5, 然后输往贮罐。发酵试验结果列于表 3。

表 2 新 *Bt* 菌株提纯伴孢晶体对柳兰叶甲的毒力(2 龄幼虫)

Table 2 Toxicity of new *Bt* strains in *Plagioder a versicolor*

菌株 Strain	LC50(μL/mL)	
	菌培养液 Liquid culture	提纯晶体 Pure crystal
YM-03	4.67	96.2
SHQ11-10	5.23	未测 Not tested
YH-8A	>50	未测 Not tested
HH27-05	>50	未测 Not tested
SPh04-04	>25	448.5

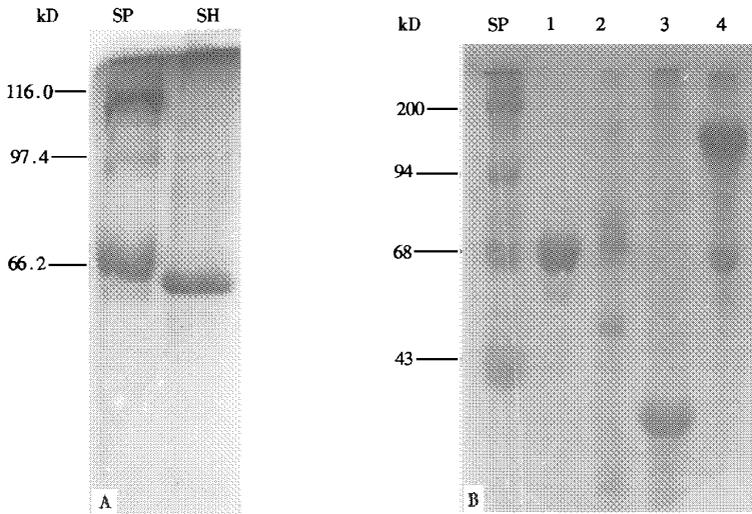


图 2 2种杀鞘翅目晶体蛋白质的 SDS-PAGE 图型

Fig. 2 Patterns of crystal proteins of coleopterancidal *Bt* by SDS-PAGE

A. (SH) SHQ11-10 (SP) 蛋白质标准 Molecular weight of protein ;

B. 1. YM-03 2. YK14-01 3. SPH04-04 4. SH11-05 ;

(SP) 蛋白质标准 Molecular weight of protein.

表 3 菌株 YM-03 与 SHQ11-10 中试发酵结果

Table 3 Result of fermentation of strains YM-03 and SHQ11-10

菌株 Strains	罐次 No. of fermentation	菌体发育情况 Growth and development of bacterial cells					发酵周期 Feimentation period/h
		12h	24h	32h	38h	42h	
YM-03	1	杆菌	50% 芽孢囊	大部芽孢囊	56% 孢晶脱落		38
	2	杆菌	前芽孢	少量芽孢囊	大部芽孢囊	80% 脱落	44
	3	杆菌	全部芽孢囊	50% 孢晶脱落	80% 脱落		36
SHQ11-10	1	杆菌	全部芽孢囊	60% 孢晶脱落	80% 以上脱落		34
	2	杆菌	全部芽孢囊	80% 以上脱落			34
	3	杆菌	全部芽孢囊	很少量脱落	30% 脱落	85% 脱落	42

2.4.2 后处理 (1)YM-03 发酵液经简易沉淀浓缩处理 48h 后制得乳悬剂约 1.4t。以 GF-105(B) 高速离心机 (15,000r/min, 有效容积 53L) 2 次循环离心深浓缩, 由 250kg 初浓缩液中制得高浓缩液剂 54kg (含固量约 6%)。高浓缩菌液以高速离心喷雾干燥, 制得粉剂 3.083kg。干燥机型号 QZR-25, 要求加工液中含固量 1% 左右, 400L/h 流量为好, 喷头转速 22,000r/min, 进口温度 180℃~187℃, 出口温度 68℃~76℃, 功率为 12.5kg/h 蒸发量。(2)SHQ11-10 发酵液经简易沉淀浓缩处理 96h, 制得初浓缩乳悬剂 1.5t。初浓缩悬液 (含固量约 3.8%~4.0%) 100kg 于同型干燥机中直接喷雾干燥, 进口温度 180±2℃, 出口温度

表 4 YM-03 粉剂对马铃薯甲虫的毒力

Table 4 Toxicity of YM-03 powder against

*L. decemlineata*

粉剂浓度 Concentration	死亡率 Mortality/%		
	24h	48h	72h
1:200	78.8	90.9	100
1:400	80.8	100	100
1:800	50.0	89.3	92.2
1:1600	25.9	37.0	44.4
空白对照 (CK)	0	0	3.8

68℃~81℃ 8h 喷完。(3)YM-03 粉剂的毒力,以马铃薯甲虫 3 龄幼虫为试虫进行测定,每处理 40 头虫,空白对照 80 头,室温 20℃~30℃,菌液浸马铃薯叶饲虫。结果(表 4)表明,YM-03 粉剂有高毒效。(4)杀鞘翅目 *Bt* 标准制剂,考虑到国外和国内尚未建立杀鞘翅目 *Bt* 产品的标准化技术系统,本研究中生产的高含量 YM-03 粉剂,以柳蓝叶甲和马铃薯甲虫进行生物测定后,定其毒力效价为 20000CI/mg(杀鞘翅目毒力单位/毫克),充分混匀分装于小安瓿中,密封,置 -20℃ 下贮存,供作杀鞘翅目 *Bt* 制剂毒力测定的暂定标准制剂。

## 2.5 防治马铃薯甲虫的效果

用 YM-03 粉剂防治一代马铃薯甲虫 2~4 龄幼虫,每试验小区面积 0.1 亩,田间试验于新疆霍城县进行,结果见表 5。

表 5 YM-03 粉剂防治马铃薯甲虫的效果

Table 5 Efficiency of YM-03 powder in control of *Leptinotarsa decemlineata*

处理 Treatment	浓度稀释倍数 Density dilution	药前虫口基数/10 株 Basic population/10 plant			虫口下降率 Reduction/%				防治效果 Effectiveness of control/%
		幼虫 Larva	卵 Egg	成虫 Adult	2d 3d 4d 5d				
YM-03 粉剂 Powder	1:200	222	7	0	97.8	99.1	100	100	100
	1:400	225	0	0	80.4	87.1	95.6	96.5	94.6
	1:800	120	0	0	68.4	90.0	84.7	88.3	81.4
	1:200	86	79	0	80.2	89.5	90.7		85.6
	1:400	174	23	1	63.2	81.0	87.4		80.5
	1:800	118	363	1	49.2	40.7	71.1		55.2
敌杀死 2.5% 乳剂 Decis 2.5EC	1:1500	286	0	0	98.9	99.6	100	100	100
	1:1500	186	0	0	99.4	100	99.4		99.1
空白对 照 CK		217	0	0	16.6	17.4	19.8	35.5	-
		123	0	0	33.8	44.6	47.3		-

表 5 结果表明,YM-03 粉剂防治马铃薯甲虫效果极为良好。田间观察证明对 1 龄至 4 龄幼虫皆有高毒效,对 1 龄和 2 龄幼虫毒效尤高。

## 3 讨论

YM-03 与 SHQ11-10 是首次从中国土壤中分离的杀鞘翅目高效 *Bt* 菌株,对柳蓝叶甲和马铃薯甲虫有高毒效,发酵性能良好,喷雾干燥法制得的粉剂防治马铃薯甲虫效果极佳,具有很高应用价值。迄今,国际上报道的杀鞘翅目 *Bt* 菌株皆自虫体分离<sup>[6,7,9]</sup>。本研究所发现的 2 个杀鞘翅目 *Bt* 菌株则分别来自我国云南和陕西土壤。在另一研究中我们已查明此 2 菌株皆具有杀鞘翅目蛋白质基因 *cry3A*<sup>[10]</sup>。

中试发酵结果表明,简易沉淀浓缩法制备 *Bt* 乳悬剂简便可行,但高速离心浓缩技术并不成功。喷雾干燥工艺能达到满意效果。若进一步提高发酵效价,以发酵液直接喷雾,可期望获得更高效价的粉剂。

## 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 ] 李荣森,罗成. 微生物学报, 1989, **29**(6): 397~404.
- [ 4 ] 李荣森. 微生物学报, 1986, **26**(2): 143~150.
- [ 5 ] de Barjac H, Frachon E. *Entomophaga*, 1990, **35**(2): 233~240.
- [ 6 ] krieg V A, Huger A M, Langenbruch G A *et al.* *Z Angew Entomol*, 1983, **96**: 500~508.
- [ 7 ] Herrnstadt C, Soares G C, Wilcox E I *et al.* *Bio/Technology*, 1986, **4**: 305~308.
- [ 8 ] Li Xiaogang, Li Rongsen. *Chinese Journal Biotechnology*, 1994, **10**(2): 75~82.
- [ 9 ] Hori H, Suzuki K, Ogiwara K *et al.* In Programm and Abstracts, SIP 25th Annual Meeting, Heidelberg, Germany, 1992, 209.
- [ 10 ] 高梅影,李荣森,冯平辉等. 特异性引物 PCR 法鉴定苏云金芽孢杆菌的杀虫蛋白质基因, 全国杀虫微生物学术大会论文集(待发表).

## NEW COLEOPTERANCIDAI STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND PRODUCTION OF COLEOPTERANCIDE

Gao Meiyang<sup>1</sup> Li Rongsen<sup>1</sup> Dai Shuying<sup>1</sup> Li Xiaogang<sup>1</sup> Fu Jianhong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

(<sup>2</sup> Xinjiang Academy of Agriculture, Wulumuqi 830000)

**Abstract** Two coleopterancidal strains of *Bacillus thuringiensis*, YM-03 and SHQ11-10, were isolated from soil in China. H-Serotype of YM-03 was H8a8b, and H-Serotype of SHQ11-10 has not been identified. Both of them produced flat bipyramid-like crystals which consisted of 68~70kD and 65kD protien respectively. Bioassay indicated that these two Bt strains were very active on the larva of *Leptinotarsa decemlineata* and *Plagioder aversicolora*. They grew prosperously in fermentation. Powder of YM-03 product was high effect against colorado potato beetle in the field experiment.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*, *Coleoptera*, Parasporal crystal