苏云金芽孢杆菌毒性研究

李依韦,尹萌萌,袁琴 (内蒙古民族大学生命科学学院,内蒙古通辽 028000)

摘要 以菜青虫为试验材料,用苏云金芽孢杆菌浸泡过的小白菜饲喂菜青虫,提取菜青虫体内的伴孢晶体,通过生物测定法对苏云金芽孢杆菌的毒性进行研究,并对出发菌株进行紫外诱变筛选高毒性菌株。结果表明,苏云金芽孢杆菌毒性与伴孢晶体含量有关,伴孢晶体含量越多,毒力越高;紫外诱变 16 min 时得到菌株 B16,伴孢晶体含量比出发菌株提高 8.2%,杀虫效率比出发菌株提高 77%。该研究为苏云金芽孢杆菌生产高效率生物农药提供菌种。

关键词 苏云金芽孢杆菌;伴孢晶体;毒力测定;紫外诱变
中图分类号 Q939.96 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2019)20-0159-03
doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.20.042
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Toxicity Study of *Bacillus thuringiensis*

LI Yi-wei, YIN Meng-meng, YUAN Qin (College of Life Science, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000)

Abstract Cabbage caterpillar were used as research materials in the experiment, which was fed cabbage caterpillars with cabbage soaked in *Bacillus thuringiensis*. Parasporal crystals from *Pieris rapae* was extracted, study on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* by bioassay and screening of highly virulent strains by UV mutagenesis of the starting strains were done. The results showed that the toxicity of *Bacillus thuringiensis* was related to the content of spore crystals, the more the content of the accompanying spore crystal, the higher the virulence. The strain B16 obtained by UV mutagenesis at 16 min raised the content of parasporal crystals by 8.2% compared with the original strain, insecticidal efficiency raised by 77% compared to the original strain. The study provides strains for the production of high-efficiency biological pesticides by *Bacillus thuringiensis*.

Key words *Bacillus thuringiensis*; Parasporal crystal; Virulence determination; UV mutagenesis

在农业生产中害虫防治是一项重要任务,随着人们环保意识的不断增强,生物农药正引起广泛关注[1]。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 *Bt*)制剂克服了传统化学农药污染环境、危害人畜、易产生抗性等缺点,具有选择性强、安全、原料简单等优点,是目前用途最广、产量最大的微生物杀虫剂[2]。

利用苏云金芽孢杆菌生产的生物农药在农业生产上应用最广、产量最大[3]。对 100 多种害虫有致病和毒杀作用。针对目前苏云金芽孢杆菌残效期短、杀虫谱窄、见效慢的问题,筛选高毒力菌株以提高苏云金芽孢杆菌生物制剂的杀虫效果成为研究热点[4]。笔者对苏云金芽孢杆菌进行紫外诱变,筛选得到高毒力菌株,为以后生产高毒性生物农药提供菌种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种。苏云金芽孢杆菌(内蒙古民族大学生命科学学院微生物生物技术实验室保存)。

1.1.2 菜青虫。在室外人工种植小白菜,使其自然生长,定期进行观察,会有虫卵出现[5],均采用菜青虫幼虫,其体征表现为青绿色,体圆筒形,中段较肥大,背部有一条不明显的断续黄色纵线,气门线黄色,每节的线上有 2 个黄斑。密布细小黑色毛瘤,各体节有 4~5 条横皱纹。

1.2 试验方法

1.2.1 苏云金芽孢杆菌生长曲线绘制。将纯化的苏云金芽孢杆菌单菌落接种到 LB 液体培养基中,30 ℃、220 r/min 培养 1 h,此时测得细胞浓度为 93.9%。取此培养物接种于 LB 液体培养基中振荡培养。分光光度计在 600 nm 波长处每隔 2 h 测定吸光度,绘制生长曲线。每次测完吸光度的菌液番红染色,显微镜下观察伴孢晶体[6-7]。在伴孢晶体出现期间,每隔 2 h 从菌液中取 8 mL 菌液于离心管中,离心管命名为 E11、E12、E13,用于后续测定伴孢晶体。

1.2.2 伴孢晶体制备。配制溶菌酶溶液 500、250、200、100 μg/mL,各取 200 μL 分别加入含有 1 mL 菌液的离心管中,20 min 后染色镜检观察细胞的完整性。选择 500 μg/mL 的溶菌酶制备孢晶混合液。

在“1.2.1”中每隔 2 h 取培养物加入配好的 500 μg/mL 溶菌酶溶液 1 mL,溶解 20 min 后 -20 ℃冷冻 30 min,取出立即放入 40 ℃水浴中温浴 15 min,反复冻融 3 次,即为孢晶混合液。将孢晶混合液高速低温离心 20 min,弃上清,蒸馏水悬浮沉淀物,振荡使悬浮液产生大量泡沫,弃去泡沫,重复几次,直到产生很少的泡沫为止,重复此操作 2 次后收集沉淀,40 ℃烘干得到淡黄色晶体蛋白粗提物,即为伴孢晶体[8]。

1.2.3 苏云金芽孢杆菌毒力测定。

1.2.3.1 不同培养时间出发菌株毒力测定。通过叶片浸泡饲喂法,在菌液培养到 22~30 h 时,每 2 h 取菌液进行毒力测定,将菌液依次命名为 A22、A24、A26、A28、A30。将新鲜的白菜嫩叶切割成 3~4 cm 见方的小块,并用刀背在叶片上划成纵横交错的刻痕,然后浸入菌悬液中,使叶片各部分比较均匀地接触菌液然后取出,阴干,最后放入养虫瓶。不同时间菌液各放入菜青虫(2~3 龄健康幼虫)9 头,室温下培养,每天观察死亡情况,根据下列公式计算死亡率并进行分析,

作者简介 李依韦(1975—),女,内蒙古赤峰人,副教授,硕士,从事微生物生物技术研究。
收稿日期 2019-06-27

筛选苏云金芽孢杆菌产生毒蛋白的最佳时间[9]。

$$死亡率=\frac{死亡菜青虫数}{供试菜青虫数}\times100\%$$

$$校正死亡率=\frac{处理组死亡率-对照组死亡率}{1-对照组死亡率}\times100\%$$

1.2.3.2 菜青虫肠道内菌群及其毒力检测。为了验证苏云金芽孢杆菌导致菜青虫死亡,把杀死的菜青虫肠液取出接入液体培养基,30 ℃、220 r/min 培养 20 h,显微镜下观察。继续培养至 26 h,以“**1.2.3.1**”中方法和条件测定毒力,其结果与出发菌株毒力相比较[10]。

1.2.3.3 紫外诱变。将培养 26 h 的苏云金芽孢杆菌按照“**1.2.2**”方法制备孢晶混合液进行紫外诱变,诱变时间为 12、14、16、18、20 min,编号 B12、B14、B16、B18、B20,诱变菌液用于菌种筛选。

1.2.3.4 诱变菌液毒力测定。不同诱变时间的菌液按“**1.2.3.1**”中方法进行毒力测定,分别在 12、24、36、48 h 计算菜青虫死亡率。同时对诱变菌液进行培养并按照“**1.2.2**”中方法提取伴孢晶体,每种诱变菌液设置 3 个重复 F21、F22、F23,提取结果与出发菌株比较筛选高毒力菌株。

2 结果与分析

2.1 苏云金芽孢杆菌的生长曲线 由图 1 可知,0~8 h 为迟缓期,显微镜下观察到此期间菌体形态细小且数量较少,8~20 h 为对数生长期,此时菌体增大,数量急剧增长。20~26 h 为稳定期,此时菌体生长迟缓。26 h 后进入衰退期,菌体数量下降。

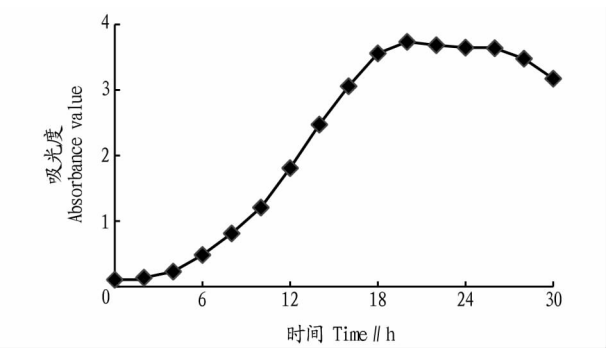

图 1 苏云金芽孢杆菌生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Bacillus licheniformis*

每 2 h 观察菌体形态,在培养 20 h 后芽孢开始出现,后逐渐增多,22 h 有伴孢晶体形成。

2.2 不同培养时间伴孢晶体含量 由表 1 可知,在培养 22~26 h,随培养时间延长,伴孢晶体增多,26 h 时最多,为 0.010 5 g/mL。培养 26~30 h 伴孢晶体数量呈下降趋势。

2.3 不同培养时间出发菌株毒力测定 由表 2 可知,将各菌株浸泡过的小白菜给菜青虫饲喂后,杀虫效率经 SPSS 22.0 软件分析,杀虫率有显著差异($P<0.05$)。

由图 2 可知,培养不同时间苏云金芽孢杆菌杀虫率不同,A26 菌株杀虫率最高,即培养 26 h 的菌液杀虫效果最好,毒性最强。

2.4 肠液菌株检测及毒力测定 由图 3 可知,在同一培养时间下,菜青虫肠液内苏云金芽孢杆菌毒力比出发菌株低,与肠液内的蛋白对菌株毒性有减弱作用有关,这与邵宗泽等[11]的研究结果一致。

表 1 苏云金芽孢杆菌不同时间伴孢晶体含量

Table 1 Parasporal crystall contents of *Bacillus thuringiensis* at different times

g/mL

时间 Time//h	重量 Weight			平均值 Average
	E_{11}	E_{12}	E_{13}	
22	0.011 9	0.008 1	0.008 1	0.009 4
24	0.009 9	0.007 1	0.012 3	0.009 8
26	0.010 9	0.007 8	0.012 8	0.010 5
28	0.010 5	0.008 5	0.011 0	0.010 0
30	0.010 4	0.009 2	0.010 0	0.009 9

表 2 不同培养时间出发菌株毒力测定

Table 2 Virulence determination of strains at different times

菌株 Strain	时间 Time//h			
	24	48	72	96
A_{22}	0.11±0.01 d	0.33±0.01 c	0.56±0.01 b	0.67±0.01 a
A_{24}	0.22±0.01 d	0.44±0.01 c	0.67±0.01 b	0.78±0.01 a
A_{26}	0.44±0.01 c	0.56±0.01 c	0.78±0.01 b	1.00±0.00 a
A_{28}	0.11±0.01 c	0.22±0.01 c	0.44±0.01 b	0.67±0.01 a
A_{30}	0.22±0.01 c	0.33±0.01 c	0.56±0.01 b	0.78±0.01 a

注:同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences at 0.05 level

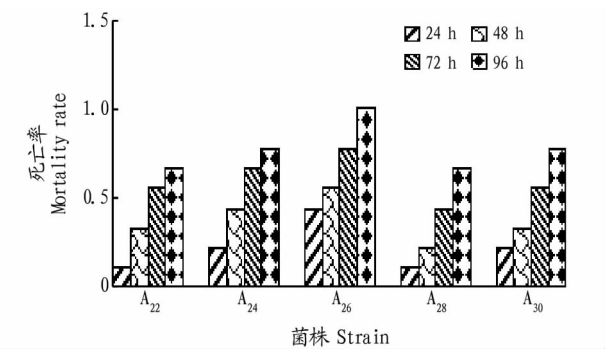

图 2 出发菌株不同时间杀虫率比较

Fig.2 Comparison of insecticidal rates of different strains at different times

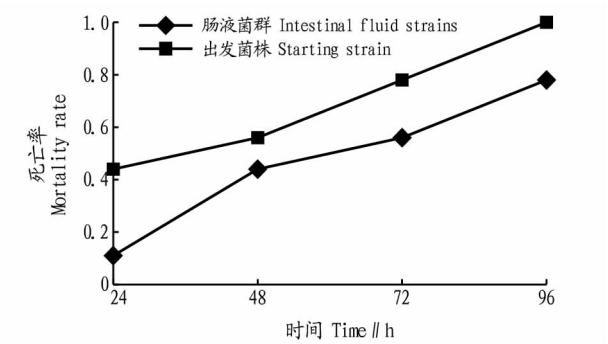

图 3 肠液菌株毒力测定

Fig.3 Toxicity determination of virulence of intestinal fluid strains

2.5 诱变菌株毒力测定 由表 3 可知,用诱变后菌株浸泡过的小白菜饲喂菜青虫,杀虫效率经 SPSS 22.0 软件分析,与出发菌株比较 B16 在不同诱变时间杀虫效果均显著高于其他

菌株($P<0.05$)。

表 3　诱变菌株毒力测定

Table 3　Toxicity determination of mutagenic strain

菌株 Strain	时间 Time//h			
	12	24	36	48
B_{12}	0.11±0.01 b	0.33±0.01 b	0.44±0.01 b	0.56±0.01 c
B_{14}	0.22±0.01 a	0.33±0.01 b	0.44±0.01 b	0.67±0.01 b
B_{16}	0.22±0.01 a	0.44±0.01 a	0.78±0.01 a	1 a
B_{18}	0.11±0.01 b	0.22±0.01 c	0.33±0.01 c	0.56±0.01 c
B_{20}	0.11±0.01 b	0.22±0.01 c	0.44±0.01 b	0.67±0.01 b

注:同列不同小写字母表示不同菌株间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different strains at 0.05 level

由图 4 可知,B_{14}、B_{16}、B_{20}菌株的杀虫率均比出发菌株高,但 B16 菌株杀虫效果最好,与出发菌株相比,杀虫率提高 77%。

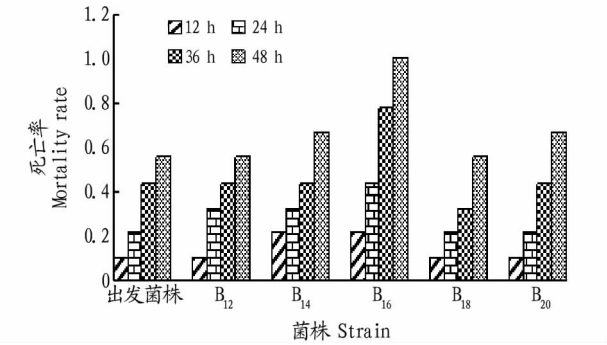

图 4　不同菌株杀虫率比较

Fig.4　Comparison of insecticidal rates of different strains

2.6　诱变菌株伴孢晶体含量　分别提取 B_{12}、B_{14}、B_{16}、B_{18}、B_{20}在培养 26 h 时的伴孢晶体,并提取出发菌株伴孢晶体作对照。由表 4 可知,B_{16}菌株伴孢晶体含量最高,为0.011 36 g/mL,与出发菌株相比提高 8.2%。

3　结论

该研究利用苏云金芽孢杆菌毒杀菜青虫,并测定不同时间菌株的杀虫能力以及伴孢晶体含量,通过紫外诱变技术获得高毒力诱变菌株。结果表明菌株毒力的强弱与伴孢晶体含量有关,伴孢晶体量越多,菌株毒力越强;筛选到一株高毒力菌株 B16,其伴孢晶体含量比出发菌株提高 8.2%,毒力比出发菌株提高 77%,为以后苏云金芽孢杆菌高毒力菌株的选育提供理论依据。

表 4　不同菌株同一时间伴孢晶体含量

Table 4　Content of spore crystals of different strains at the same time

g/mL

菌株 Strain	重量 Weight			平均值 Average
	F_{21}	F_{22}	F_{23}	
出发菌株 Starting strain	0.010 9	0.007 8	0.012 8	0.010 50
B_{12}	0.004 4	0.014 1	0.012 9	0.010 52
B_{14}	0.009 3	0.009 8	0.012 5	0.010 53
B_{16}	0.009 4	0.011 2	0.013 5	0.011 36
B_{18}	0.009 4	0.011 0	0.011 4	0.010 58
B_{20}	0.009 4	0.010 4	0.011 8	0.010 51

参考文献

[1] 刘石泉,单世平,夏立秋.苏云金芽孢杆菌高效价杀虫剂的研究进展[J].微生物学通报,2008,35(7):1091-1095.

[2] 何献君.苏云金芽孢杆菌对菜青虫的防治技术研究[D].成都:四川师范大学,2003.

[3] 赵应,姜培跃.4 种生物农药对高粱蚜虫的田间防控研究[J].植物医生,2019,32(1):20-22.

[4] 周爱萍,罗定荣,余兵.苏云金杆菌 WP 防治水稻稻纵卷叶螟田间药效试验[J].安徽农学通报,2019,25(6):54,75.

[5] 王利平,代林远,李鹏.苏云金芽孢杆菌研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(9):224-227.

[6] 李恩杰.苏云金芽胞杆菌和伊氏杀线真菌对松材线虫致病毒力的研究[D].北京:中国林业科学研究院,2018.

[7] 王子佳,李红梅,弓爱君,等.苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的制备[J].化学与生物工程,2009,26(9):56-58.

[8] 李雪,马玉超,李煦,等.苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(10):5920-5924.

[9] 石美林,江涛.1.1%阿维·苏云金杆菌可湿性粉剂对小菜蛾的田间防效研究[J].现代农业科技,2018(9):146,148.

[10] 刘景坤,高华山,师永东,等.几种杀虫剂防治西兰花小菜蛾的药效评价试验[J].中国农技推广,2019,35(1):77-79.

[11] 邵宗泽,喻子牛.昆虫中肠液性质对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体毒力的影响[J].昆虫学报,2002,45(3):384-390.