

化学助剂对苏云金芽孢杆菌的影响及新型悬乳剂的研制

李荣森 戴顺英 李小刚 罗成

(中国科学院武汉病毒研究所,武汉)

摘要 研究了由乳化剂、湿润剂、防腐剂和少量氯氰菊酯配制的几种乳剂组合对苏云金芽孢杆菌芽孢和伴孢晶体的影响及所形成的悬乳剂的稳定性。分析了不同化学助剂组合与孢晶混合物在不同贮存期的毒力变化、晶体蛋白质的降解及芽孢存活率。从供试的助剂组合中获得了一种最佳组合,可发展为一种新型的苏云金杆菌悬乳剂。

关键词 苏云金芽孢杆菌;晶体蛋白质;化学助剂

在有关化学助剂对苏云金杆菌 δ 内毒素的毒力和晶体蛋白质的影响研究结果^[1]的基础上,进一步用几种化学助剂的不同组合与苏云金杆菌 HD-1 菌株的芽孢、晶体混合物配成悬乳剂,贮存于 5—36℃ 的室温下,于不同贮存期检测各悬乳剂的毒力变化、晶体蛋白质的降解、芽孢存活率及悬乳剂的稳定性,以选择出合适的助剂组合,改善我国苏云金杆菌杀虫剂的性能,研制出性能优良的苏云金杆菌悬乳剂。

材料与方 法

(一) 试验材料

1. 芽孢和伴孢晶体混合物的制备: 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) HD-1 菌株经摇瓶液体培养至充分成熟,孢晶全部游离,5000 r/min 离心收集芽孢和晶体,冰箱保存备用。

2. 化学助剂组合: 以乳化剂、湿润剂、防腐剂及少量氯氰菊酯(10% 乳剂)配制成三种组合(表 1)。

3. 毒力测定: 用 3 龄(7 日龄)家蚕幼虫,自湖北省蚕种场引种。

4. 苏云金芽孢杆菌 H1 标准制剂: 可湿性粉剂,由日本东京农业大学 T. Misato 教授赠

表1 三种化学助剂组合的组成

成份 组合	氯氰菊酯 (按有效成分计)	3号乳化剂	9号湿润剂	防腐剂BP
A	0.01%	0.1%	0.5%	3%
B	0.05%	0.3%	2%	9%
C	0.25%	0.1%	0.5%	3%

送,毒力效价为1000家蚕单位(B.U.)/mg。

(二) 菌悬乳剂的配制和处理

将孢晶混合物分别与上述三种助剂组合混合,制成悬乳剂,以蒸馏水孢晶悬液为对照,皆存放于室温下。另以存放于10℃冰箱中的孢晶蒸馏水悬液为恒温保存对照。所有处理中,活芽孢的含量皆为 1.42×10^8 /ml。

(三) 测定和分析

1. 毒力效价测定:在不同保存时期,从各处理中取样,按二倍稀释作成5个稀释度。取0.5毫升悬液均匀涂布于直径14厘米平皿中的一片桑叶的正反面。桑叶大小与平皿同,晾干,每皿放入7日龄家蚕30头,26±1℃下饲喂。另以H1标准制剂同时进行毒力测定。取48小时死亡结果,求出 LC_{50} ,换算出各处理的毒力效价。

2. 活芽孢数测定:在毒力测定的同时,以稀释平板法测定各处理的存活芽孢数。

3. 晶体蛋白质的凝胶电泳分析:以SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析各处理中伴孢晶体的蛋白质在贮存过程中的变化。

4. 各组合乳剂稳定性的分析:定期观察记录各助剂组合乳剂的分层及其他变化情况。

结果与讨论

(一) 各助剂组合对HD-1孢晶混合物毒力的影响

于处理当天、室温存放5个月及1年,取样进行毒力效价测定。结果(表2)表明,室温下5个月,A组合悬乳剂的毒力基本不下降,B、C二组合毒力明显下降。室温下存放1年,A组合悬乳剂毒力下降25%,B、C二组合悬乳剂则分别下降61.9%和58.3%,蒸馏水中的孢晶混合物,存放5个月及1年,毒力皆约下降

32%。B、C二组合悬乳剂毒力大幅度下降的主要原因可能是其中氯氰菊酯含量过高。早先的研究结果^[1]已证明过高的氯氰菊酯浓度对 δ 内毒素的毒力及晶体蛋白质的稳定性皆有不利影响。根据表2结果按三角座标法^[2]进行增效作用分析,表明A、B、C三种助剂组合与孢晶混合后的毒力实验值均位于三角座标之内,即均显示有一定增效作用。

(二) 芽孢存活情况

由表3可知,室温存放6个月,A、B二悬乳剂中,芽孢存活率80%以上。现放1年,A悬乳剂中存活率88%,B中为63%。C悬乳剂存放6个月及1年,芽孢存活率分别下降至0.04%和0.02%。蒸馏水中的芽孢存活率,无论10℃或室温保存均明显下降。说明A助剂组合对芽孢有良好的保护作用。

据已有研究结果^[3,4],苏云金杆菌的芽孢在昆虫的致病作用中占有重要地位,芽孢和晶体1:1的混合物总是表现出最高的毒力。对于某些昆虫的毒杀效果,芽孢更是不可缺少的。

(三) 孢晶混合物中晶体蛋白质的分析结果

晶体蛋白质的SDS-PAGE分析结果(图1)表明,室温存放2个月及6个月,各组合悬乳剂中伴孢晶体的P1蛋白质^[5]的降解程度轻微,与蒸馏水中的情况相近。存放1年,三种悬乳剂中晶体蛋白质的降解程度比蒸馏水中的要轻,说明三种助剂组合对晶体蛋白质稳定性的保持皆有一定效果。

(四) 助剂组合乳剂的稳定性

4种化学助剂配制成的3种乳剂,室温下存放不同时间后,其分层情况见表4。结果表明,就乳剂的稳定性而言,A组合最优,B组合次之,C组合最差。

根据上述4项指标进行评价,A助剂组合是较佳配方,可发展为一种新的性能较优良的苏云金杆菌悬乳剂。本研究还证明,苏云金杆菌悬乳剂中如添加氯氰菊酯乳剂,其有效成分含量不宜超过0.01%。悬乳剂在室温下的贮存时间一般不宜超过半年,最长不应超过一年。

表 4 各助剂组合样品对被蛋的毒力*

毒力 处理	LC ₅₀ (%)										毒力效价 (B.U. × 10 ⁵ /ml)				
	CK-S	CK-M	CK-A	CK-B	CK-C	A	B	C	CK-M	CK-A	CK-B	CK-C	A	B	C
当天	0.0607	1.1997	1.8954	0.1954	0.0134	1.0231	0.0781	0.0098	50.6	32.0	310.6	4520.4	59.3	777.2	6193.9
5个月	0.0688	2.0239	—	0.2097	—	1.1413	0.1514	0.0152	33.5	—	294.7	—	54.1	408.2	4065.3
1年	0.0696	2.0385	2.8293	0.2998	0.0539	1.5711	0.2355	0.0269	34.5	24.6	232.1	1290.4	44.3	295.5	2580.7
1年的毒效下降率(%)									31.8	23.1	25.3	71.4	25.3	61.9	58.3

* 处理代号说明: (CK-S) H1 标准制剂, (CK-M) 胞晶蒸馏水悬液, (CK-A) 助剂组合 A, (CK-B) 助剂组合 B, (CK-C) 助剂组合 C, (A) A 组合加胞晶混合物, (B) B 组合加胞晶混合物, (C) C 组合加胞晶混合物。

表 3 各助剂组合中的活芽孢测定结果

处理	说明	活芽孢含量 (×10 ⁸ /ml)						芽孢存活率(%)	
		初始	1个月	2个月	4个月	6个月	1年	6个月	1年
CK-I	10°C, 蒸馏水	1.42	1.22	1.25	1.17	0.66	0.50	46.5	35.2
CK-M	室温, 蒸馏水	1.42	0.86	0.87	0.85	0.47	0.42	33.1	29.6
A	室温, A 悬剂	1.42	1.38	1.25	1.32	1.25	1.26	88.0	88.7
B	室温, B 悬剂	1.42	1.24	1.03	1.19	1.17	0.90	82.4	63.4
C	室温, C 悬剂	1.42	7 × 10 ⁻³	5.7 × 10 ⁻³	5.5 × 10 ⁻³	5.9 × 10 ⁻³	3.1 × 10 ⁻³	0.04	0.02

表 4 各助剂组合乳剂的稳定性

组合	存放时间	8小时	10天	2个月	4个月	6个月	1年
A (pH5.5)	初始	均匀乳液	均匀乳液	均匀乳液	均匀乳液	均匀乳液	均匀乳液
B (pH6.0)	均匀乳液	均匀乳液	均匀乳液	分层, 上部为清亮层, 下部为乳液层	分层, 同 2 个月	分层, 下部更浓重	分层, 上部清亮层扩大, 下部乳液层更浓重
C (pH5.5)	均匀乳液	均匀乳液	分层, 下部比 8 小时更薄	分层, 下部比第 10 天更薄	分层, 同 2 个月	分层, 同 2 个月	分层, 上部浮一薄层乳油层, 下部为清亮层

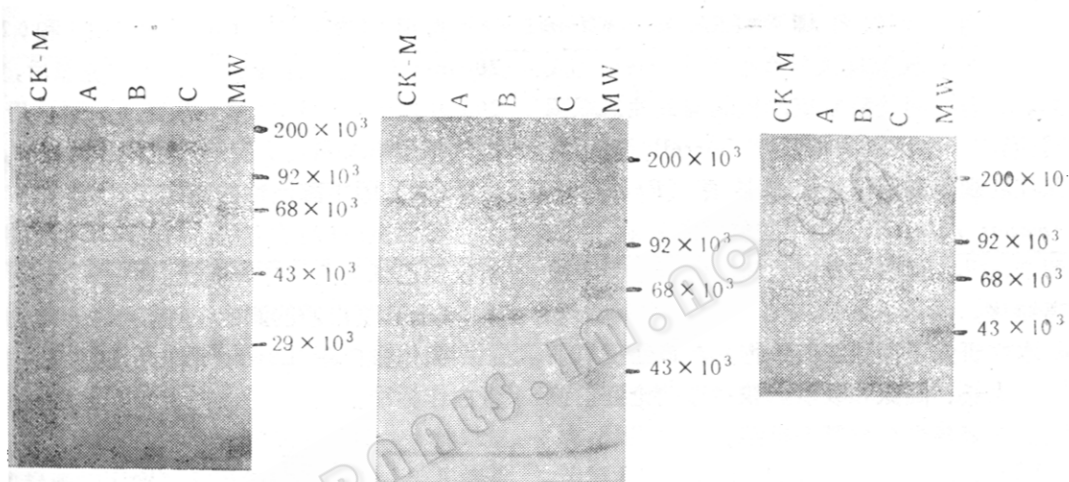


图1 不同贮存期各悬乳剂中 HD-1 晶体蛋白质的 SDS-PAGE 图型

(a) 贮存 2 个月, (b) 贮存 6 个月, (c) 贮存 1 年; (CK-M) 蒸馏水中, (A) A 悬乳剂中, (B) B 悬乳剂中, (C) C 悬乳剂中, (MW) 蛋白质标准, 图侧数字示分子量。

参 考 文 献

1. 李荣森等: 微生物学通报, 17(1): ,1991。
2. 唐振华等编著: 农业害虫抗药性, p. 133—142, 农业出版社, 北京, 1982。
3. Burges HD et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 27(1): 87—94, 1976.
4. 李荣森等: 昆虫学报, 32(2): 149—157, 1989。
5. Iizuka T et al.: *FEMS Microbiol. Letter*, 19:187—192, 1983.