
* 简 报 *

苏云金杆菌 79007 发酵上清液对棉铃虫的毒力作用

吴继星 陈在佺 李 青

(湖北省农业科学院 Bt 研究开发中心 武汉 430064)

摘要 79007 菌是一株对棉铃虫高效的苏云金杆菌。该菌与已知的 7216、HD-1 菌的发酵晶体毒素含量基本一致,但其上清液具有一种明显的增效作用。

关键词 苏云金杆菌(79007), 上清液, 棉铃虫, 毒力

高效菌株是影响苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)发酵水平的首要因素^[1,2]。长期以来,许多学者都致力于杀虫晶体蛋白质(简称 ICPs)的研究,却忽视了 Bt 发酵液中除晶体外的增效物质。作者在 Bt-79007 菌的研究中^[3]发现,发酵离心的上清液对棉铃虫(*Heliothis armigera*)具有极强的杀虫增效作用,简报如下。

1 材料和方法

1.1 菌株

B. thuringiensis 79007 系作者于 1979 年从自然死亡的舍蝇幼虫尸体中分离获得。

对照菌株 HD-1-580、7216-F₂ 为本中心保藏的菌株。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 斜面培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 琼脂 2.0, NaCl 0.5。

1.2.2 发酵培养基(%): 酵母粉 5.0, 玉米淀粉 3.75, 葡萄糖 0.5, CaCO₃ 0.1。

1.2.3 培养及晶体、芽孢回收: 500ml 三角瓶装 20ml 培养液,接种后置于 30℃、230r/min 摇床振荡培养 28h,待 20% 芽孢晶体脱落时终止培养;再采用 15000r/min 离心分离回收晶体芽孢,离心上清液和菌体分别贮存于 4℃

冰箱备用。

1.2.4 生物测定: 首先将离心的晶体和芽孢混合采用不同浓度的离心上清液进行稀释,再将自制的并以美国标准品 HD-1-S-1980 (16000IV/mg) 标定的样品按 5 个稀释度进行稀释,均匀混于人工配制的饲料中。供试昆虫为初孵棉铃虫幼虫。操作时小心地挑取孵化后不超过 10h 且未取食的健康活泼初孵幼虫,轻轻放入盛有毒饵的塑料盒中,上盖,叠放于 30℃ 恒温室中饲养。72h 后调查死虫数,活虫数,计算死亡率和毒力回归式,求出 LC₅₀ 值、斜率、相关系数(r)。最后按下式求出发酵液各稀释度的生物效价。

$$\text{样品效价 (IU/ml)} = \frac{\text{标准品 LC}_{50}}{\text{样品 LC}_{50}}$$

× 标准品效价

1.2.5 伴孢晶体毒素测定: 将各稀释度样品采用超声波处理 30s 后加入适当体积的碱解液,使其中的伴孢晶体蛋白质完全溶解。加入缓冲液,沸水浴后,以 10000r/min 离心 3min。取上清液进行电泳。SDS-聚丙烯酰胺凝胶的制备参照 Laemmli 的方法进行^[4],浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 10%,电泳电压为 150V;

电泳完成后对凝胶进行考马斯亮蓝染色及脱色。根据凝胶上每条蛋白质的量与其吸收峰面积成正比的关系,通过计算机扫描,计算出样品中有效晶体蛋白质的含量。

2 结果和讨论

2.1 生物测定结果

不同上清液稀释度对棉铃虫的生物测定结果(表1)表明:全部离心除去上清液后,三菌

表1 不同上清液稀释度对棉铃虫的生物效价($\times 10^3$ IU/ml)

菌株	上 清 液 浓 度 (%)											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	120
79007	1307	2003	2100	2301	2390	2600	2680	2690	3056	3309	3450	3500
7216-F ₂	1459	1339	1350	1267	1372	1759			1600		1703	1691
HD-1-580	1530	1600	1672	1680	1500	1800			1938		1859	1983

株对棉铃虫的毒力基本相当;加入10%的上清液后毒效差异显著。79007菌对棉铃虫的效价大幅度提高到 2003×10^3 IU/ml,为该菌株除去上清液后效价的1.53倍。随着79007上清液浓度的增加,对棉铃虫的毒效也大幅度提高。当上清液浓度达到120%时,效价最高为 3500×10^3 IU/ml,为除去上清液效价的2.66倍。7216-F₂和HD-1-580采用自身上清液稀释后,其对棉铃虫的毒效略有增加,当达到50%浓

2.2 79007菌上清液对7216-F₂, HD-1-580菌的增效作用

79007菌上清液分别加入7216-F₂, HD-1-580菌的晶体和芽孢离心沉淀物中,考察了该菌上清液对两菌株的增效作用。表2结果显示,79007菌上清液对7216-F₂, HD-1-580均具有明显的增效作用,增加30%上清液后,7216-F₂和HD-1-580的效价分别提高46%和58%,增加到50%浓度时提高幅度更大,分别提高1倍以上。

表2 79007菌上清液对7216-F₂, HD-1-580菌的增效作用($\times 10^3$ IU/ml)

菌株	上 清 液 浓 度 (%)						
	0	30	50	70	80	100	120
7216-F ₂	1436	2103	2890	2900	2988	3008	3100
HD-1-580	1550	2445	3196	2890	2920	2986	3046

2.3 晶体蛋白质测定结果

为证明晶体蛋白质不是毒效提高的因素,测定了不同上清液浓度的晶体蛋白质含量。表3结果表明,三菌株在该培养基上的晶体蛋白

质含量无显著变化。

表3 不同上清液浓度晶体蛋白质含量(mg/ml)

菌株	上 清 液 浓 度 (%)							平均
	0	30	50	60	70	80	100	
79007	4.3	4.6	4.0	4.7	4.8	4.2	4.4	4.4
7216-F ₂	4.1	3.9	3.9	4.0	4.1	3.8	4.2	4.0
HD-1-580	4.0	4.2	4.0	4.4	4.0	3.8	3.7	4.0

综上所述,79007菌与7216-F₂, HD-1-580菌在同一培养基上所产生的晶体含量相当,但其毒效分别为7216-F₂, HD-1-580菌的2倍和1.86倍,证实79007菌除了晶体毒素外,上清液中富含重要的增效物质。这一结果表明,采用传统的离心分离和板框压滤等后处理工艺均是不可取的。它会导致上清液中的增效物质大量流失还会污染环境。因此,筛选产生增效物质的高毒菌株和有效回收这种增效物质,研究其理化性状、生物活性、代谢控制和测定方法,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛, 苏云金杆菌, 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 吴继星, 陈在佺, 微生物学通报, 1984, 11(5): 273 ~ 276.
- [3] 吴继星, 陈在佺, 谢天健等, 微生物学通报, 1995, 22(4): 195 ~ 197.
- [4] 莽克强, 徐乃正, 方荣祥, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 北京: 科学出版社, 1975.