



苏芸金杆菌的新陈代谢 和 δ -内毒素的形成

和 致 中*

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明)

当前苏芸金杆菌制剂主要用于防治害虫, 而 δ -内毒素是其主要的杀虫成分。本文着重论述苏芸金杆菌的新陈代谢和 δ -内毒素形成的一些有关问题, 希望对提高制剂的生产水平有些参考作用。

苏芸金杆菌的代谢 型式和代谢途径

苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的代谢型式和蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 有显著不同之处, 在葡萄糖酵母膏无机盐培养基上生长时, 苏芸金杆菌在对数生长期由于利用葡萄糖产生丙酮酸、醋酸, pH 下降到 4.8—5.0, 此时顺乌头酸水化酶活性最高, 醋酸等被进一步异化, 2—3 小时后 pH 开始上升, 芽孢和晶体开始形成^[1]。

Nickerson 和 Bulla^[2] 证明, 包括 12 个血清型的 18 株苏芸金杆菌对葡萄糖的初级异化途径都是通过 EM 途径, 而苏芸金变种 (*B. t. var. thuringiensis*)、库斯塔克变种 (*B. t. var. kurstaki*)、猝倒变种 (*B. t. var. sotto*)、松蠹变种 (*B. t. var. dendrolimus*) 及 B-4047

菌株(血清型 6)等, 除 EM 途径外, 还具有 PP 途径。

Aronson^[3,4] 通过对细胞抽提物的酶分析提出, 苏芸金杆菌具有修正的三羧酸循环(没有 α -酮戊二酸脱氢酶), 能够在芽孢形成期与乙醛酸循环和 γ -氨基丁酸途径相连接起作用(图 1)。他还证明, 苏芸金杆菌具有某些辅助途径, 使谷氨酸和 α -酮戊二酸通过 γ -氨基丁酸途径代谢。

苏芸金杆菌代谢途径的特殊性在于它具有 β -甲基天门冬氨酸途径和 γ -氨基丁酸途径。在芽孢杆菌属细菌中, 很少发现这些途径。 β -甲基天门冬氨酸途径是由 β -甲基天门冬氨酸酶 (EC4, 3, 1, 2) 催化的由 β -甲基反丁烯二酸氨化生成 β -甲基天门冬氨酸的过程。 γ -氨基丁酸途径是由于苏芸金杆菌没有 α -酮戊二酸脱氢酶, 而出现的一条变通途径。此途径包括由谷氨酸脱羧酶 (EC4, 1, 1, 15)、 γ -氨基丁酸转氨酶 (EC2, 6, 1, 19)、琥珀酸半醛脱氢酶 (EC1, 2, 1, 16) 和谷氨酸脱氢酶 (EC1, 4, 1, 2) 催化的反应过程。

对苏芸金杆菌各生长时期各种酶活性的测定表明: γ -氨基丁酸途径中各种酶的活性依赖于铵盐或谷氨酸为氮源; 在转氨酶中, 谷草转氨酶活性最高; 在生长期间各种转氨酶活性受氮源的影响较小, 但到芽孢形成期, 它们的活性因氮源影响而成倍地增加。

苏芸金杆菌的营养需要

Nickerson 和 Bulla^[5,6] 对包括 12 个血清型的 18 株苏芸金杆菌的最低营养需要作过研究。提出了一种可使 18 株菌都能生长, 形成芽孢和伴胞晶体的限定培养基。这种培养基是在基础培养基中加入天门冬氨酸、谷氨酸和柠檬酸。他们发现, 在基础培养基中加入苹果酸、延胡索酸和草酰乙酸时, 所有试验菌都不能生长; 同时, 除亚毒变种 (*B. t. var. subtoxicus*) 外, 其它菌株的生长, 形成芽孢和伴胞晶体都不需要供给维生素; 另外, 在基础培养基中补加胱氨酸、硫代硫酸盐或 EDTA, 则可取代天门冬氨酸、谷氨酸和柠檬酸。

Conner 等试验过氨基酸在限定培养基中对苏芸

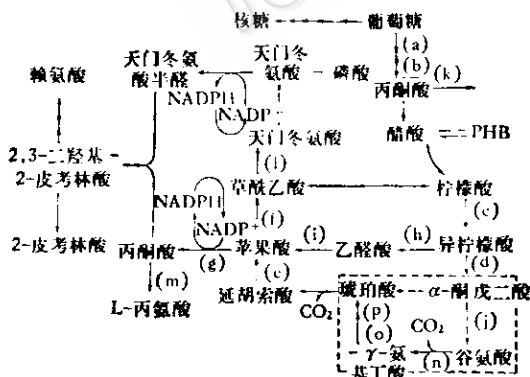


图 1 苏芸金杆菌的代谢途径

1. 二磷酸果糖缩合酶; 2. 磷酸甘油醛脱氢酶; 3. 顺乌头酸水化酶; 4. 异柠檬酸脱氢酶; 5. 延胡索酸水化酶; 6. 苹果酸脱氢酶; 7. 苹果酸脱羧酶; 8. 异柠檬酸裂解酶; 9. 苹果酸合成酶; 10. 谷氨酸脱氢酶; 11. 丙氨酸脱氢酶; 12. 谷草转氨酶; 13. 谷丙转氨酶; 14. 谷氨酸脱羧酶; 15. γ -氨基丁酸转氨酶; 16. 琥珀酸半醛脱氢酶。

* 现在工作单位: 昆明市云南省微生物研究所。

金杆菌的作用。试验表明：缬氨酸和亮氨酸对苏芸金变种、杀虫变种 (*B. t* var. *insectus*) 和猝倒变种的生长有促进作用；异亮氨酸对后两个变种的生长有促进作用，对前一变种的生长有抑制作用^[7]。异亮氨酸对苏芸金变种的抑制作用，可被缬氨酸消除。单用苏氨酸和丝氨酸有抑制作用，单用缬氨酸没有抑制作用^[4]。 $10^{-4}M$ 的组氨酸抑制苏芸金杆菌的生长，而这种抑制作用可被 $5 \times 10^{-4}M$ 的甘氨酸消除；甘氨酸 + 蛋氨酸也可以完全抵销组氨酸的抑制^[9]。

δ -内毒素的形成

δ -内毒素就是苏芸金杆菌伴胞晶体，它是一种糖蛋白。多年来对苏芸金杆菌芽孢形成期蛋白质的转换，伴胞晶体的生源及蛋白质合成的时间等进行了研究^[10-12]。已经用化学、血清学和示踪原子技术等方法证明了：

1. 在苏芸金杆菌的营养体时期和芽孢形成期，培养基中加入的氨基酸均可被用于形成伴胞晶体。
2. 在营养体阶段的菌体细胞抽提物中不存在特异性的晶体抗原，到芽孢形成期才出现特异性晶体抗原。
3. 血清学研究表明，晶体蛋白质是在芽孢形成期合成的，此时蛋白质的转化过程如图 2 所示。图 2 说明了蛋白质转化的估算方法。图中初始蛋白质含量 (a) 由放射活性计算培养基中含有氨基酸时的蛋白质总量，再直接计算；b 为不存在氨基酸时保温后的标记蛋白质含量；c 为存在氨基酸时芽孢形成后的标记蛋白质的含量。

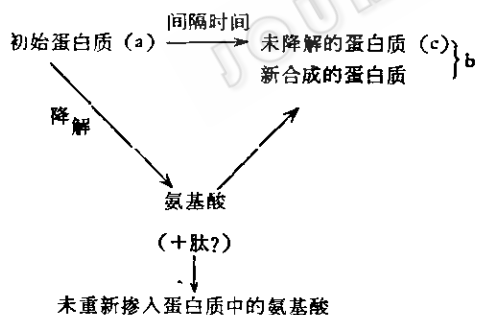


图 2 芽孢形成期蛋白质的转化过程

新合成的蛋白质 = $b - c$ ；降解的蛋白质 = $a - c$ ；

未重新掺入的氨基酸 = $a - b$

Scherrer 等^[13]已证明 δ -内毒素和芽孢外皮蛋白之间的同源性。从芽孢外皮提纯的 F_1 和 F_2 组分，对大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 有毒性，而这种毒性可被 δ -内毒素抗血清消灭。因此，人们认为伴胞晶体几乎与芽孢同步形成的；并认为伴胞晶体是芽孢外皮蛋白质代谢异常而累积的一种次生代谢产物^[14]。伴胞晶体对菌体本身的意义尚不清楚。

自从 Hannay^[15] 和 Angus^[16] 提出并证明伴胞晶体促进昆虫幼虫败血症的发生而且是引起家蚕幼虫麻痹的原因以来，伴胞晶体便是苏芸金杆菌研究的中心问题，同时也是苏芸金杆菌制剂生产中十分重要的问题。在此试论述有关 δ -内毒素形成的几个问题。

1. 细胞外蛋白酶与伴胞晶体的形成

苏芸金杆菌生长由对数期进入稳定期时会形成一种胞外蛋白酶。不能形成这种酶的突变菌株既不能形成芽孢，也不能形成伴胞晶体。这种酶的作用，据认为是参与伴胞晶体形成过程中的蛋白质转换过程^[17]。酶的活性与芽孢形成过程相平行。这种酶的形成或活化，需要在培养基中加有 Ca^{2+} ($7 \times 10^{-3}M$)、 Mn^{2+} ($5 \times 10^{-4}M$) 和 Mg^{2+} ($10^{-3}M$)。最适 pH 为 6.5—7.5，在 pH 6.5 以下活性急剧下降；在 60℃ 处理 10 分钟仍稳定，70℃ 10 分钟仍有 78% 的活性，80℃ 10 分钟后酶活性只有 8%。

2. pH 与伴胞晶体的形成

苏芸金杆菌在葡萄糖酵母膏无机盐培养基上生长时，对数期时培养液 pH 下降到 4.8—5.0，2—3 小时后，pH 回升，进入芽孢形成期，伴胞晶体随之形成，到芽孢和伴胞晶体成熟时，pH 上升至 8.0 左右。Yousten 和 Rogoff 等^[1,17]证明：如果对数期后 pH 不能回升至 6.0 以上，就不能形成芽孢和伴胞晶体； α -皮考啉酸 ($10^{-3}M$) 或氯代醋酸均抑制缬氨酸水化酶的活性而阻碍醋酸的异化，因此抑制芽孢和晶体的形成，但在 pH 回升到 6.0 以上后，这两种抑制剂对芽孢和晶体形成无抑制作用。 α -皮考啉酸的抑制作用可通过加 $CaCO_3$ 或 KOH 控制 pH 而解除。

3. 培养基中糖、氮源和磷源含量及其比例对苏芸金杆菌生长和伴胞晶体形成的影响

作者对蜡螟变种 (*B. t* var. *galleriae*) “17-1”菌株的研究结果表明，对菌体细胞数量的影响大小顺序为氮源，糖，磷源。培养基氮源含量增加，糖含量由 0.1% 增至 0.8%，菌数显著增加，但如糖含量增至 1.5% 时，菌数反而下降，形成芽孢和伴胞晶体的时间显著延长。发酵周期的长短主要决定于培养基中含糖和磷酸盐水平之高低。含糖少 (0.1%) 时，周期短；含糖多 (1.5%)，周期长。若含糖多 (1.5%) 而磷酸盐含量又少 (0.05%)，则 48 小时还不能形成芽孢和伴胞晶体。Scherrer 等^[18]指出，含 0.6—0.8% 葡萄糖的半合成培养基中， δ -内毒素和其它蛋白质形成得多，并且在通气量大时，形成的伴胞晶体较小而毒力高，供氧量减少时形成的伴胞晶体较大而毒力低，因此认为应注意培养基的选择和培养条件对毒素生成的影响。

4. 其它

Smornoff^[19]报道，0.40M 的尿素对苏芸金杆菌形成芽孢和伴胞晶体无影响，但当浓度为 0.45—0.95M 时，则对伴胞晶体的形成抑制 20—100%。但上述浓

度对松蠹变种伴胞晶体的形成无影响。一种荚蒾属植物 (*Viburnum cassinode*) 叶片的水溶性抽提物可抑制柏氏变种 (*B. t* var. *berliner*)、阿莱变种 (*B. t* var. *alesti*)、杀虫变种 (*B. t* var. *entomocidus*)、猝倒变种和松蠹变种等形成伴胞晶体,但不影响芽孢形成。银胶菊 (*Parthenium hysterophorus*) 也有类似抑制伴胞晶体形成的作用。另外,放线菌素 D、氯霉素、叠氮化物和二硝基苯酚等都是芽孢和伴胞晶体形成的抑制剂。

结 束 语

苏芸金杆菌同一变种对不同种昆虫的毒力有很大差异,不同变种对同一种昆虫的毒力也有很大差异,以纯 δ -内毒素而论,由不同变种得到的伴胞晶体对同一种昆虫的毒力也有很大差异。这就说明,苏芸金杆菌对昆虫毒力的高低,不能只从昆虫的生理条件(诸如肠道中的 pH 值,肠道中的酶及氧化还原条件等)的差异方面找原因,还应该从 δ -内毒素本身结构的差异方面找原因。根据 Angus^[14,20] 的已被证实的见解,我们在研究 δ -内毒素与毒力关系的时候,不仅把毒力与昆虫的生理条件联系起来,还要把毒力与 δ -内毒素的结构、以及 δ -内毒素的结构与营养代谢联系起来。否则许多现象将无法解释。如 Grigorova 等^[21]曾观察到两种类型的 δ -内毒素,一种为双锥体,一种为双菱形,认为这两种不同形状的 δ -内毒素的结构差异造成了它们毒力的差异。可惜尚无强有力的实验证据。

尽管已对苏芸金杆菌的生理学和 δ -内毒素进行了大量研究,可是许多问题仍未解决。例如芽孢和 δ -内毒素形成的控制机制如何?一般二者的形成是同步的,但为何某种条件下二者形成又不同步? δ -内毒素与毒力的关系如何?培养条件与菌的代谢对晶体毒素的结构有何影响?可否人工控制?等等。这些问题的解决将可使苏芸金杆菌制剂的生产和应用进入新的阶段。

另外,苏芸金杆菌没有 α -酮戊二酸脱氢酶,能否用它来生产谷氨酸呢?这样,苏芸金杆菌将能一菌二用。

提出这些问题,供同道者考虑,希望共同为解决这些问题努力。

参 考 文 献

[1] Younsten, A. A. and M. H. Rogoff: *J. Bact.*,

100(3): 1229—1236, 1969.

- [2] Nickerson, K. W., G. St. Julian and L. A. Bulla Jr.: *Appl. Microbiol.*, 28: 129—132, 1974.
- [3] Aronson, J. N., D. P. Borris et al.: *ibid*, 30(3): 489—492, 1975.
- [4] Aronson, J. N.: Ammonia Assimilation and Glutamate Catabolism by *Bacillus thuringiensis*, *Microbiology-1976* (ed. by Schlessinger, D.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1976, pp. 444—449.
- [5] Nickerson, K. W. and L. A. Bulla Jr.: *Appl. Microbiol.*, 28: 124—129, 1974.
- [6] Nickerson, K. W. and L. A. Bulla Jr.: *J. Bact.*, 123: 598—603, 1975.
- [7] Conner, R. M. and P. A. Hansen: *J. Invert. Pathol.*, 9(1): 12—18, 1967.
- [8] Singer, S. and M. H. Rogoff: A Study on Amino Acid Imbalance in *Bacillus thuringiensis*, *Bact. Proc.* (ed. by Amer. Soc. Microbiol., the 64th Annual Meeting), Washington, D. C., 1964, p. 8.
- [9] Shieh, T. R. and M. H. Rogoff: Urocante Accumulation under Growth Inhibition by Histidine and Reversal by Glycine in *Bacillus thuringiensis*, *Bact. Proc.* (ed. by Amer. Soc. Microbiol., the 69th Annual Meeting), Miami Beach, Fla. 1969, p. 18.
- [10] Young, I. E. and Fitz-James, P. C.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 483 1959.
- [11] Monro, R. E.: *Biochem. J.*, 81: 225—232, 1961.
- [12] Monro, R. E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 321—331, 1961.
- [13] Scherrer, P. S. and H. J. Somerville: *Eur. J. Biochem.*, 72: 479—490, 1977.
- [14] Bulla, L. A. Jr.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 29: 163—190, 1975.
- [15] Hannay, C. L.: *Nature*, 172: 1004, 1953.
- [16] Angus, T. A.: *ibid*, 173: 545—546, 1954.
- [17] Rogoff, M. H. and A. A. Yousten: *Ann. Rev. Microbiol.*, 23: 357—381, 1969.
- [18] Scherrer, P. et al.: *Appl. Microbiol.*, 25(4): 644—646, 1973.
- [19] Smornoff, W. A.: *J. Insect Pathol.*, 5: 389—392, 1963.
- [20] Angus, T. A.: *Can. J. Microbiol.*, 2: 111, 1956.
- [21] Grigorova, R., E. Kantardgieva and N. Pashov: *J. Intern. Pathol.*, 9: 503, 1967.