

# 球形芽孢杆菌 LP1-G 的发酵特性及杀蚊活性 \*

袁志明<sup>1,2</sup> 蔡全信<sup>1</sup> 张用梅<sup>1</sup> 裴国风<sup>1</sup>

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)<sup>1</sup>

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)<sup>2</sup>

**摘要:** 球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) LP1-G 菌株在 MBS 培养基上能正常生长、发育, 产生位于芽孢外膜外的伴孢晶体。其产生的 41.9 和 51.2kD 二元毒素蛋白合成于芽孢形成期, 另一分子量约为 49kD 蛋白和二元毒素同期合成, 并随着芽孢的释放而被降解。生物测定结果表明该菌株在营养体生长阶段对

---

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.39770170)

Project Granted by Chinese National Natureal Sciene Fund (No. 39770170)

收稿日期: 1999-01-11, 修回日期: 1999-08-09

致倦库蚊幼虫无毒,孢子囊初期毒力较高,并在整个芽孢形成期都维持较高的毒力水平。其全发酵液对敏感和抗性库蚊幼虫都具有中等的毒杀作用,对 3~4 龄幼虫 48h 的  $LC_{50}$  值分别为 0.113 和 0.137mg/mL。该菌株对敏感和抗性致倦库蚊幼虫的毒杀作用可能同其产生 49kD 蛋白相关。

**关键词:** 球形芽孢杆菌,发酵,毒力,SDS-PAGE,抗性

**中图分类号:** Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0170-04

## CHARACTERIZATION OF *BACILLUS SPHAERICUS* LP1-G AND ITS TOXICITY AGAINST SUSCEPTIBLE AND RESISTANT MOSQUITO LARVAE

YUAN Zhi-Ming<sup>1,2</sup> CAI Quan-Xin<sup>1</sup> ZHANG Yong-Mei<sup>1</sup> PEI Guo-Feng<sup>1</sup>

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)<sup>1</sup>

(The Key Laboratory of Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275)<sup>2</sup>

**Abstract:** *Bacillus sphaericus* LP1-G, belonging to serotype H3, can grow and develop well in MBS media and synthesize 41.9 and 51.2kD proteins, which resemble in a parasporal form during sporulation. SDS-PAGE analysis showed that this strain can also synthesized another 49kD peptide during sporulation. The sporangium and spore/crystal cultures of LP1-G had medium toxicity against 3~4 instar *Culex quinquefasciatus*, in comparison, the vegetative culture had no toxicity against the target larvae. It has also been found that the final whole culture had same activity to both susceptible and resistant *C. quinquefasciatus* and the  $LC_{50}$  values at 48h were 0.113 and 0.117mg/mL respectively. It is suggested that the presence of P49 protein in LP1-G could be responsible for its toxicity against both susceptible and resistant mosquito larvae.

**Key words:** *Bacillus sphaericus*, Fermentation, SDS-PAGE, Toxicity, Resistance

长期以来人们一直认为杀蚊球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus* 简称 *B.s*) 不会导致蚊虫产生抗性,这是生物杀虫剂优于化学杀虫剂的主要特点之一<sup>[1]</sup>。但近年的研究表明,在实验室连续的强选择性压力下,致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 会对 *B.s* 杀蚊二元毒素产生抗性,其抗性水平同选择压力和选择处理时间相关<sup>[2]</sup>。同时在法国、巴西、印度和中国等地出现了野外抗性蚊虫的报道<sup>[3~5]</sup>,因此抗性蚊虫的生物防治是一急待解决的问题。

LP1-G 是从加纳分离出的高毒力 *B.s* 菌株,属血清型 H3 型<sup>[6]</sup>。实验室的生物测定表明该菌株对敏感和抗性致倦库蚊幼虫都具有一定的毒杀作用。该菌株在生长发育过程中除产生位于芽孢外膜内,由 41.9kD 和 51.2kD 蛋白

组成的伴孢晶体外,可能还产生另一类杀蚊毒素,该毒素对敏感和抗性致倦库蚊幼虫都具有毒杀作用<sup>[7]</sup>,因此将会在抗性蚊虫的控制中发挥重要的作用。

本文研究了 LP1-G 菌株的发酵特性、毒素蛋白的生物合成及全发酵液对敏感和抗性致倦库蚊幼虫的杀蚊活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和样品:** 球形芽孢杆菌 (*B. sphaericus*) C3-41 菌株由本室分离保存。LP1-G 菌株由英国 Watt-Heirot 大学的 Priest 教授馈赠。C3-41 和 IAB-59 丙酮粉剂样品由法国巴斯得研究所提供,效价分别为 1720IU/mg 和 254

IU/mg.

1.1.2 培养基: MBS 培养基: 每升含量  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.8g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20mg;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  20mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20mg 蛋白胨 10g; 酵母膏 2.0g; pH7.0.

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养: 斜面菌种活化一代后, 接种在 25mL MBS 培养基中, 在 30℃, 摇床培养 (200r/min) 至芽孢脱落, 再按 2.5% 量转接到新鲜的 MBS 培养基中, 在同样的条件下培养, 并在不同时间取样观察菌体生长发育状态, 发酵液 pH 值, 抗热芽孢数含量, SDS-PAGE 分析及不同发育阶段的发酵液对敏感致倦库蚊的毒力. 发酵液细菌总数和抗热芽孢数的测定按常

规的平板菌落计数法.

1.2.2 SDS-PAGE 分析: 参照 Thiery 等方法<sup>[6]</sup> 进行不同发育时期的菌株发酵液的毒素蛋白分析.

1.2.3 生物测定: 不同时期的发酵液离心除去上清, 沉淀用无菌水洗涤 3 次后, 再用无菌水恢复到原发酵液体积后用于生物测定. 生物测定昆虫为 3~4 龄的敏感和抗性致倦库蚊 (*C. quinquefasciatus*) 幼虫, 敏感蚊虫来源于湖北省医学科学院长期饲养的敏感品系, 抗性蚊虫是在实验室条件下筛选的对 C3-41 菌株产生抗性的抗性蚊虫品系 (RSCq1). 生物测定方法参照 WHO<sup>[8]</sup>. 记录 48h 死亡的蚊幼虫数, 利用 Log-Probit 计算不同发酵液的  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{LC}_{90}$ , 相关系数

表1 不同发酵液对3~4龄致倦库蚊幼虫的毒力\*

样品号	培养时间 (h)	$\text{LC}_{50}$ (mg/mL)	$\text{LC}_{90}$ (mg/mL)	相关系数 (R)	回归方程 $Y=bx+a$
1	4	>200	>200		
2	8	>200	>200		
3	12	>200	>200		
4	16	0.935(0.792~1.103)	2.761(2.185~3.822)	0.995	2.726x+5.022
5	20	0.113(0.0961~0.132)	0.308(0.247~0.415)	0.998	2.940x+5.219
6	24	0.0712(0.0588~0.0844)	0.2175(0.173~0.301)	0.983	2.641x+5.217
7	28	0.0771(0.0627~0.0911)	0.244(0.185~0.352)	0.997	2.549x-5.133
8	30	0.0804(0.0639~0.0988)	0.352(0.261~0.551)	0.987	1.998x+5.210
9	32	0.113(0.0956~0.133)	0.341(0.269~0.479)	0.990	2.679x+5.034

\* 48h 的结果

和及标准误 (SE).

2 结果

2.1 发酵特性

LP1-G 菌株在 MBS 培养基上生长发育良好, 可以形成芽孢和位于芽孢内的伴孢晶体. 平均发酵周期 31.5h, 最终发酵液中芽孢同步率为 90% 以上. 图 1 示 LP1-G 菌株在 MBS 培养基中发酵过程的 pH, OD 值和发酵液抗热芽孢数的变化曲线. 其中 0~3h: 芽孢萌发期; 3~16h: 营养体对数生长期; 16~28h: 孢子囊和芽孢形成期; 28~30h: 芽孢脱落期. 最终发酵液 pH 为 9.07, 抗热芽孢数为 13.3 亿/mL.

2.2 SDS-PAGE

不同时期发酵液的 SDS-PAGE 蛋白分析表明, LP1-G 菌株在 MBS 培养基中, 从芽孢子囊形成期开始合成 41.9kD 和 51.2kD 的二元

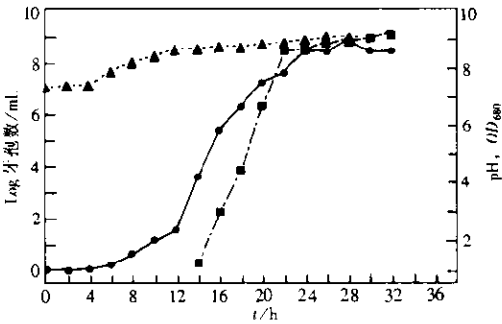


图1 LP1-G菌株在MBS培养基中的生长

—●—  $\text{OD}_{680}$ , —▲— pH, —■— Spores

毒素蛋白,直至到芽孢脱落期达到最大,并且随着芽孢的脱落而有所下降。同时该菌株在整个孢子囊和芽孢形成期还能产生一种约 49kD 的蛋白多肽,结果如图 2。

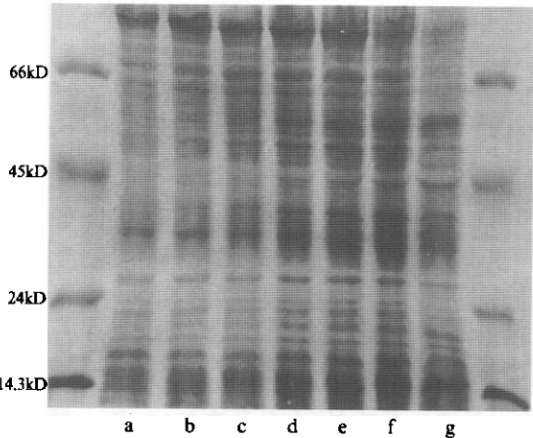


图2 LPI-G菌株不同时间发酵液的SDS-PAGE分析  
a b c d e f g:培养6 10 14 18 22 26 30h的发酵液样品

2.3 不同时期发酵液的毒力

生物测定结果表明该菌株在营养体生长期阶段对蚊幼虫无毒,其发酵液对 3~4 龄致倦库蚊幼虫的  $LC_{50}$  大于 200mg/mL; 进入孢子囊形成期,发酵液的杀虫活性很快提高,在整个孢子囊形成期都维持在较高水平,并在孢子囊末期达到最高,其  $LC_{50}$  值为 0.0712mg/mL。随后随着芽孢的释放,全发酵液的杀虫活性略有下降。

2.4 全发酵液对抗性蚊虫的毒力

RLCq1是实验室筛选的对球形芽孢杆菌 C3-41 和 IAB59 菌株产生抗性的抗性蚊虫品系。我们进行了 LPI-G 的全发酵液及 C3-41 和 IAB59 粉剂对敏感和抗性蚊致倦库蚊幼虫的毒力比较。从表 2 结果可以看出,RLCq1对 C3-41 的抗性水平为 1184.3 倍,对 IAB59 的抗性水平为 19.39 倍。LPI-G 菌株发酵液对敏感和抗性蚊幼虫都具有中等的杀虫活性,对 3~4 龄敏

表2 几种球形芽孢杆菌菌株对敏感和抗性致倦库蚊的毒力\*

菌株	敏感致倦库蚊		抗性致倦库蚊		抗性水平** (95%CI)
	$LC_{50}$ ** (mg/L)	$LC_{90}$ (mg/L)	$LC_{50}$ (mg/L)	$LC_{90}$ (mg/L)	
C3-41	0.00497 (0.00397~0.00620)	0.01977 (0.0141~0.0330)	5.886 (4.547~7.462)	56.23 (31.34~71.01)	1184.3
IAB-59	0.04544 (0.03216~0.06676)	0.61047 (0.2980~2.207)	0.881 (0.707~1.166)	7.559 (4.459~16.91)	19.388
LPI-G	113.3 (95.6~133.8)	340.8 (269.0~473.7)	117.3 (98.3~139.8)	315.2 (248.4~443.2)	1.0353

\* 两次结果的平均值, \*\* 抗性水平=抗性蚊虫的 $LC_{50}$ /敏感蚊虫的 $LC_{50}$

感和抗性致倦库蚊的  $LC_{50}$  值为 0.113 和 0.117 mg/mL。

3 讨论

LPI-G 菌株在 MBS 培养基上能正常生长发育产生芽孢和伴孢晶体。SDS-PAGE 和形态观察表明该菌株二元毒素合成于芽孢孢子囊形成期,到孢子囊末期达到最大。另一类分子量约为 49kD 蛋白同二元毒素同时期合成。我们在前期的研究工作中已完成 LPI-G 菌株二元毒素基因的克隆和表达,结果表明,同 C3-41 菌株产生的二元毒素比较,该菌株产生的二元毒素蛋白在几个氨基酸位点上发生了改变导致其

失去对敏感蚊幼虫的杀虫活性(Yuan *et al.*待发表)。而生物测定的结果却显示出该菌株对敏感和抗性致倦库蚊都具有相同的杀虫活性,这说明在该菌株中存在另一类不同于二元毒素上的杀蚊毒素。从 SDS-PAGE 蛋白质分析及与其相对的生物测定结果分析看,49kD 蛋白可能同其对蚊幼虫的性相关。对 49kD 蛋白的分离、纯化和 N-末端的氨基酸序列比较分析表明该蛋白同二元毒素和苏云金杆菌亚种的杀蚊毒素蛋白无同源性,可能是一种新的杀蚊毒素蛋白。有关该蛋白的研究另文发表。

由于该菌株的全发酵液对敏感和抗性蚊幼虫都具有毒杀作用,因此在弄清其发酵特性基

基础上,可以筛选出适合该菌株生长发育的培养基和培养条件,提高发酵液的抗热芽孢数和毒力,在抗性蚊幼虫的生物防治中有一定的应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Thiery I, Back C, Barbazan P *et al.* Ann Instit Pasteur, 1996, 72:247~260.
- [2] Rodcharoen J, Mulla M S. J Econ Entomol, 1994, 87:1130~1140.
- [3] Silva-Filha M H, Regis L, Nielsen-Leroux C *et al.* J Econ Entomol, 1995, 88:525~530.
- [4] Rao D R, Mani T R, Rajendran R *et al.* J Am Mosq Contr Assoc, 1995, 11:1~5.
- [5] Sinegre G, Babinot M, Qquermel J M *et al.* Abstracts Eur. Meet. Soc. Vector Ecol. 8th, Barcelona. 1994, 17.
- [6] Thiery I, Ofori J, Consmao D V *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37:718~722.
- [7] 袁志明, Nielsen-LeRoux C, Pasteur N 等. 昆虫学报, 1998, 41(4):337~342.
- [8] WHO. TDR/BCV/SPHAERICUS. 85.3 1985, 1~24.