

# 苏芸金杆菌戈尔斯德变种产色素的研究

刘志成 肖喜凤 鲁迎新 马小惠

(湖南省微生物研究所,长沙)

苏芸金杆菌的变种在某些产色素培养基上能形成非水溶性红色色素<sup>[1]</sup>。这个类群的标准菌株是苏芸金杆菌阿莱变种。但该变种均需在某些产色素培养基上才形成色素,着色部位仅是菌落。我们用亚硝基胍(MNNG)处理该变种时,得到一株能在非色素培养基上产生水溶性色素的新品系。我们对这株菌进行了分类地位、生产性能、杀虫活性及伴孢晶体数量的研究,现报道如下。

## 材料与方 法

1. 菌株: 苏芸金杆菌戈尔斯德变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*) 及其棕褐色菌株(简称产色素菌株)

2. 培养基组成(%):

A: 蛋白胨 0.8, 牛肉膏 0.3, 琼脂 2,

B: A 培养基灭菌冷却后加入灭菌卵黄使浓度为 2.5% (V/V);

C: 马铃薯洗净切成斜角块置试管中,

D: 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 0.5,  $K_2HPO_4$  0.5, 琼脂 2;

E: 蛋白胨 0.8, 牛肉膏 0.3, 柠檬酸钠 0.5, 琼脂 2;

F: 蛋白胨 2, 牛肉膏 0.7, 葡萄糖 0.3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03,  $KH_2PO_4$  0.03;

G: 黄豆饼粉 2.5, 米糠饼粉 3,  $KH_2PO_4$  0.05;

H: 黄豆饼粉 3, 淀粉 1, 酵母粉 0.5,  $KH_2PO_4$  0.05,  $CaCO_3$  0.2。

3. 诱变: 用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)按 Adelberg<sup>[2]</sup> 方法进行。

4. 形态和培养特征:

将菌接种在培养基 A 上, 29℃ 培养 24 小时

后观察形态; 在培养基 F 中 29℃ 摇瓶培养 24h 观察生长特征。

苏芸金杆菌的伴孢晶体数量, 是以相差显微镜做随机取样计算 100 个以上孢子囊中的芽孢与晶体数量, 进而计算伴孢晶体与芽孢的比值。

5. 生化试验和血清学反应: 生化试验按常规方法进行。血清学反应参照 Norris<sup>[3]</sup> 制备 H 抗原和免疫血清的方法。鞭毛凝集试验和吸收试验参照上述文献的方法进行。

6. 生产性能考核及杀虫试验: 生产性能考核按苏芸金杆菌生产工艺进行。家蚕生物测定用卵浸法<sup>[4]</sup> (家蚕为湖南蚕桑研究所提供), 并计算校正死亡率, 求出  $LC_{50}$ 、标准误差和 95% 置信限<sup>[5]</sup>、相对毒力指数。

菜青虫试验是以不同浓度的菌剂浸叶, 饲喂 3—4 龄幼虫, 然后在 24、48、72h 统计死亡率, 以 Abbott 公式校正。

## 结 果

### 一、产生色素菌株的形态、培养特征

在蛋白胨、牛肉膏琼脂培养基上培养、菌落表面粗糙、菌苔常有皱褶和隆起, 湿润而粘稠, 菌落边缘不整齐, 成粗布状向外展开。菌苔颜色呈浅灰色, 培养基为棕褐色。而 HD-1 菌株的菌苔为乳白色, 培养基为浅黄色。

在蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖摇瓶培养基中培养时, 菌体为杆状, 长短不等, 呈单、双或链状。液体混浊, 有絮状沉淀。均产生芽孢和伴孢晶体。

HD-1 菌和产色素菌的孢子囊与伴孢晶体大小不等。HD-1 菌的孢子囊比产色素菌稍

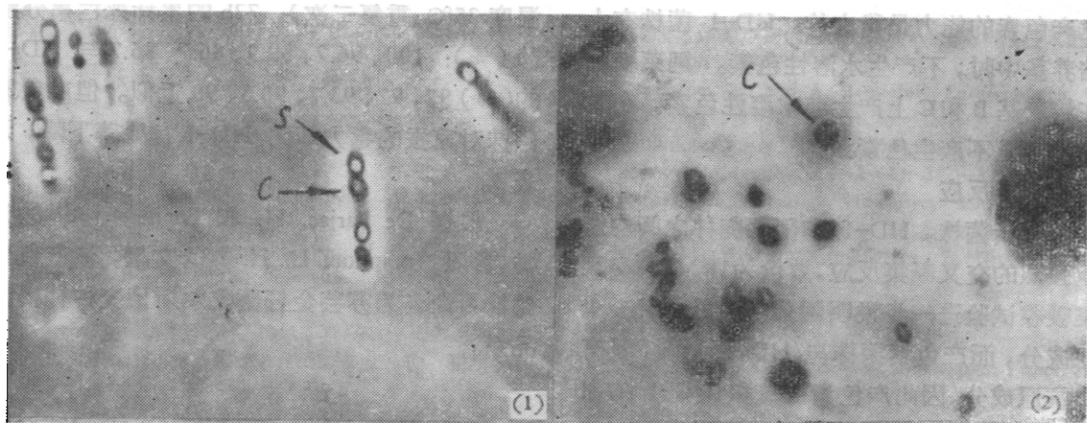


图1 苏芸金杆菌戈尔斯德变种( $\times 4000$ ) 1为孢子囊; 2为伴孢晶体。S为孢子; C为伴孢晶体。



图2 苏芸金杆菌戈尔斯德变种产色素菌株( $\times 4000$ ) 图示同图1。

表1 HD-1 和产色素菌株的菌体、伴孢晶体比较

结 果 项 目	营养细胞 ( $\mu\text{M}$ )	孢子囊 ( $\mu\text{M}$ )	芽 孢 ( $\mu\text{M}$ )	伴孢晶体 ( $\mu\text{M}$ )	晶体与芽孢比例		晶体形状百分率(%)			
					固体培养	液体培养	圆菱形	典型菱形	伸长菱形	小菱形
HD-1	$0.86 \times 1.86$ —4.3	$0.86-1.372$ $\times 2.66-5.85$	$0.86 \times 1.29$ —1.72	$0.946-2.67$ $\times 0.86-2.58$	1.01:1.0	1.03:1.0	58.9	35.6	3.45	2.05
产色素菌株	$0.86 \times 1.72$ —4.3	$0.86-1.55$ $\times 3.27-6.45$	$0.86 \times 1.29$ —1.81	$0.688-2.75$ $\times 0.774-2.58$	1.53:1.0	1.49:1.0	65.1	20.7	3.5	10.7

小,伴孢晶体数量也比产色素菌少,但伴孢晶体则稍大,并且菱形晶体较多,而产色素菌的方形晶体比 HD-1 菌多。见图 1—2 和表 1。

## 二、产色素菌株的生理生化特性

### (一) 生化试验

HD-1 与产色素菌株的生化反应结果一致,与苏芸金杆菌阿莱变种比较,除发酵水杨苷和纤维二糖的结果不同及对七叶灵的发酵略有

差异外,对蔗糖、甘露糖、卵磷脂酶、VP 试验、明胶液化、水解淀粉、菌膜形成、尿酶试验等结果也一致。

### (二) 色素

产色素菌株在 A、B、E、F、G、H 培养基上,菌落呈浅灰色,在培养基中分泌水溶性色素,使培养基颜色由浅黄色逐渐变为桔红色,最后呈棕褐色。经长期保存和多次转接(30 次)证

明它产色素的能力是稳定的。HD-1 菌株在上述培养基中时,不产生水溶性色素。阿莱变种则在培养基 B 和 C 上产生非水溶性色素,在其他培养基上不产生色素。

三、血清学反应

产色素菌株,HD-1 和阿莱变种之间均能发生强烈的交叉凝集反应,效价为10240。交叉凝集吸收试验进一步说明阿莱变种只具有一个抗原成分,而产色素菌株与 HD-1 相同,具有二个抗原成分,因此产色素菌株和 HD-1 的血清型都是 H<sub>3a3b</sub>。结果见表 2。

表 2 HD-1 阿莱变种与产色素菌株交叉凝集吸收试验

抗血清菌株	吸收抗原	试 验 菌		
		阿莱变种	HD-1	产色素菌株
HD-1	—	10240	10240	10240
	阿莱变种	—	320	320
	产色素菌株	—	—	—
产色素菌株	—	10240	10240	10240
	阿莱变种	—	320	320
	HD-1	—	—	—
阿莱变种	—	10240	10240	10240
	HD-1	40	—	—
	产色素菌株	40	—	—

四、产色素菌株的生产特点

该菌株应用于生产时,采用 H 培养基,其 pH 变化、传代时间、发酵周期、含菌数等指标均与 HD-1 菌相似。但产色素菌株具有产水溶性色素的特性。发酵液由浅黄色变成桔红色,最后变成棕褐色。

五、产色素菌株产生的杀虫活性

对菜青虫的毒力保持了出发菌株 HD-1 较高的杀虫活性。菌剂稀释 200、400、800、1600、3200 倍进行杀虫试验时(每个处理试虫 30 条,

温度 25℃,重复二次),72h 的累计死亡率分别为(%) : 100、96.7、89.9、86.7、86.7 与 HD-1 的(%) 97、97、93.7、90.3、90 近似。但产色素菌株对家蚕的毒力却比 HD-1 有显著下降,见表 3。

根据 De Barjac, H. 和 Bonnefoi, A<sup>[6]</sup> 的分类,参照 Троицкая Е. Н.<sup>[7]</sup> 的文献,该产色素菌株可命名为苏芸金杆菌戈尔斯德变种棕褐色品系。

讨 论

所试验的产色素菌株,无论在固体或液体培养基中培养,部分孢子囊中都有二个伴孢晶体。这一结果证实了亚硝基胍处理对提高苏芸金杆菌伴孢晶体数量有一定作用<sup>[8]</sup>。虽然产色素菌株的晶体数量比 HD-1 提高了近 50%,但是产色素菌株对菜青虫的杀虫活性并无提高,而对家蚕毒力还显著下降。说明晶体对昆虫的毒力,不仅与晶体数量有关,还与晶体的质量、大小、形状、昆虫敏感性有关。伴孢晶体形状分圆菱形(芝麻形)、正菱形、长菱形和不定形的四角形、小菱形等四个类型<sup>[9]</sup>。它们对昆虫的毒力关系是一个复杂而重要的问题。抗原特征与生化特征之间有相关性。当出现一个新的抗原或新的抗原成分,就会发现一些新的生化特征<sup>[6,10]</sup>。实验中发现,产色素菌株与 HD-1 的生化特性几乎一致。而 HD-1 菌株与 De Barjac<sup>[6]</sup> 的结果相同。血清学反应也证实它们的抗原结构没有改变。产色素菌株的菌落形态、培养特征和杀虫活性,有利于品系间的鉴定、菌剂生产及蚕桑区的应用。该菌在多种培养基中均能正常地产生水溶性色素,但在 C、D 培养基上不产生水溶性色素,这可能与培养基中缺乏某种前体物

表 3 HD-1 和产色素菌株对家蚕毒力的机率值分析

结 果 菌株名称	项 目	y = a + bx	LC <sub>50</sub> (mg/ml)	95%置信限	毒力指数	备 注
				上限—下限		
HD-1 产色素菌株	y = 3.218 + 2.2x	6.457±0.034	7.586—5.52	1000	处理为七个浓度；每个浓度的试验虫数均大于50。	
	y = 3.22 + 1.1x	41.69±0.061	54.95—31.62	155		

质有关。这个新菌株为开展苏芸金杆菌遗传学基础研究提供了材料。

### 参 考 文 献

- [1] Швецова, О. И. и Э. Р. Зубарова: *Микробиол.*, **35**: 726, 1966.
- [2] Adelberg, E. A., M. Mandel and G. C. C. Chen: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**: 788—795, 1965.
- [3] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, **27**: 439—447, 1964.
- [4] 中山大学生物系昆虫学教研室昆虫微生物组: *昆虫学报*, **20**(1): 5—13, 1977.
- [5] 张宗炳: «杀虫药剂的毒力测定», 上海科学技术出版社, 上海, 1959 年。
- [6] De Barjac, H. and A. Bonnefoi; *Entomophaga*, **18** (1): 5—17, 1973.
- [7] Троицкая, Е. Н., Е. Н. Михайлов и Т. А. Плужников: *Микробиол.*, **42** (2): 312—315, 1973.
- [8] Burges, H. D. and N. W. Hussey: *Microbial Control of Insects and Mites*, 广东农林学院林学系等译: «昆虫和螨类的微生物防治», 科学出版社, 1977 年, 第 443 页, 北京。
- [9] Швецова, О. И.: *Журн. Общей Биол.*, **23** (5): 381—390, 1962.
- [10] Мысловатая, М. П. и А. Н. Майсунян: *Гинетика*, **12** (4): 79—82, 1976.