

化学物质和保存条件对苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素的影响

李荣森 罗 成 戴顺英

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

摘要 研究了几种化学物质及保存温度与时间对几种苏云金杆菌 δ -内毒素的毒力和晶体蛋白质的影响。结果表明, 在所用浓度范围内, 农乳 600、二甲苯及氯氰菊酯对 δ -内毒素的毒力有不同程度的影响。三种化学物质分别与伴孢晶体的混合物, 室温下存放 5 个月或 1 年, 其毒力有较明显到大幅度的下降。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明, 室温下存放 6 个月, 各化学物质处理的晶体蛋白质被轻微、明显或完全降解。蒸馏水中的伴孢晶体, 室温或 -20°C 下存放, 毒力下降较缓慢, 晶体蛋白质的降解程度亦较低。不同变种的 δ -内毒素蛋白质的稳定性有差别。讨论了上述化学物质与伴孢晶体混合后的增效作用。

关键词 苏云金芽孢杆菌; δ -内毒素; 增效作用

苏云金杆菌商品杀虫剂中加有多种助剂^[1], 并且产品从出产到使用需经一段储存时间。研究这些化学物质及保存条件对苏云金杆菌杀虫剂的主要有效成分 δ -内毒素, 即伴孢晶体的影响, 从而获得合适的配方和保存条件, 以保证菌剂的质量和和使用效果, 是十分重要的。针对我国生产的苏云金杆菌杀虫剂液剂和乳剂, 我们研究了农乳 600 号、二甲苯、氯氰菊酯杀虫剂及保存温度与时间对 δ -内毒素的毒力和晶体蛋白质的稳定性的影响。

材 料 和 方 法

(一) 苏云金杆菌的伴孢晶体及标准制剂

以苏云金杆菌 HD-1 (H_{3a3b}) 和 81-6 (H_{5a5b}) 两个菌株为主, 按液体双相法^[2]分离提纯伴孢晶体, 同时从菌株 140 (无鞭毛变种) 及 L-14 等获得提纯的伴孢晶体, 晶体制剂的纯度为 99.0—99.9%。二甲苯处理试验中, 使用日本见里朝正教授赠送的苏云金杆菌 (H_1) 标准制剂, 毒力效价为 1000 B. U./mg (1000 家蚕毒力单位/mg)。

(二) 毒力测定用昆虫

家蚕 (*Bombyx mori*) 品种为朝霞 $\times$ 黄鹤, 引种自湖北省蚕种场。

(三) 化学物质处理及保存条件

提纯的伴孢晶体配成含一定晶体蛋白质的悬液, 加入不同浓度的农乳和氯氰菊酯乳剂, 使 HD-1 晶体悬液和 81-6 晶体悬液的蛋白质终浓度分别为 $722.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $445.0 \mu\text{g/ml}$, 以蒸馏水晶体悬液为对照, 密封存放于室温 ($5-37^{\circ}\text{C}$) 下。另将一份蒸馏水晶体悬液置 -20°C 冰箱中, 以与室温保存比较。在二甲苯处理试验中, HD-1 晶体各处理悬液中, 晶体蛋白质终浓度为 $355 \mu\text{g/ml}$ 。

(四) 毒力测定

各处理的伴孢晶体悬液于存放一定时间后, 取样对家蚕进行毒力测定。除二甲苯处理试验以日本 H_1 标准制剂为标准外, 其他试验皆以 -20°C 保存的晶体为标准。每处理用 5—6 个浓度, 每个浓度置 3 龄 (7 至 8 日龄) 家蚕幼虫 30 头, $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 饲养 48 小时, 对死亡结果进行统计分析, 求得 LC_{50} 。低温保存的晶体悬液使用前用匀浆器充分打散。

(五) 晶体蛋白质的电泳分析

于不同保存时间从各处理中取样 $100 \mu\text{l}$ 悬液, 按 Li Rongsen 等方法^[3]进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

结 果

(一) 保存温度与时间对 δ -内毒素毒力的影响

蒸馏水中的 4 种伴孢晶体在 5—37℃ 室温

和 -20℃ 下存放不同时间后,毒力测定结果见表 1。由表 1 可知,室温下存放 5 个月,HD-1 晶体的毒力保持不变,81-6 和 L-14 晶体的毒力皆约下降 18%。-20℃ 存放 5 个月,HD-1 晶体毒力保持不变,140 和 L-14 晶体的毒力

表 1 4 种伴孢晶体在不同温度下存放不同时间对家蚕的毒力 (LC₅₀ 以蛋白质 $\mu\text{g/ml}$ 计)

晶体	温度	毒力		处理当时		1 个月		5 个月		1 年	
		LC ₅₀	毒力指数	LC ₅₀	毒力指数	LC ₅₀	毒力指数	LC ₅₀	毒力指数	LC ₅₀	毒力指数
HD-1	室温	8.77	100	8.78	99.9	8.07	108.7	11.89	73.8		
	-20℃	6.78	100	—	—	6.28	107.9	7.48	90.6		
81-6	室温	6.83	100	—	—	8.43	81.0	12.28	55.6		
	-20℃	12.10	100	—	—	—	—	14.73	82.2		
140	-20℃	6.74	100	8.77	76.9	12.77	52.9	13.89	48.5		
L-14	室温	62.43	100	—	—	76.12	82.0	—	—		
	-20℃	48.06	100	—	—	54.87	87.6	—	—		

表 2 农乳 600 对 HD-1 伴孢晶体毒力的影响

贮存时间	LC ₅₀								总毒力指数				
	晶体(蛋白质 $\mu\text{g/ml}$)				农乳 (ppm)								
	CK-cr	A	B	C	CK-Em	A	B	C	CK-cr	CK-Em	A	B	C
当天	8.77	1.98	1.41	2.75	20395.01	2.73	5.87	38.04	100	100	100	100	100
1 个月	8.78	2.11	2.18	4.16	20866.02	3.21	9.06	57.62	99.9	97.7	85.2	64.8	66.0
5 个月	8.07	1.98	2.17	4.26	27825.59	2.74	9.01	58.09	108.8	73.3	99.6	65.2	65.5
1 年	11.89	8.05	6.79	10.81	16000 无死亡	9.03	15.83	151.75	73.8	—	64.8	37.1	25.1

“CK-cr”: 晶体蒸馏水悬液; “CK-Em”: 农乳 600; “A”: 0.1% 农乳加晶体; “B”: 0.3% 农乳加晶体; “C”: 1% 农乳加晶体

表 3 二甲苯对 HD-1 伴孢晶体毒力的影响

贮存时间	毒力效价 (B.U. $\times 10^3/\text{ml}$)					总毒力指数				
	CK-cr	CK-X	X-A	X-B	X-C	CK-cr	CK-X	X-A	X-B	X-C
当天	45.49	2.0	66.98	60.36	62.92	100	100	100	100	100
5 个月	47.29	1.5	50.49	53.95	52.85	103.9	75.0	75.4	89.4	84.0
1 年	25.29	1.3	26.29	28.89	27.89	55.6	65.0	39.3	47.9	44.3

“CK-cr”: 同表 2; “CK-X”: 二甲苯; “X-A”: 1% 二甲苯加晶体; “X-B”: 3% 二甲苯加晶体; “X-C”: 9% 二甲苯加晶体; “B.U.”: 家蚕毒力单位, 系以日本 H₁ 标准制剂的毒力效价 1000 B.U./mg, 通过试验得到的 LC₅₀, 按公式计算得出。

表 4 氯氰菊酯对 HD-1 伴孢晶体毒力的影响

贮存时间	LC ₅₀								总毒力指数				
	晶体(蛋白质 μg/ml)				氯氰菊酯 (ppm)								
	CK-cr	A	B	C	CK-CI	A	B	C	CK-cr	CK-CI	A	B	C
当天	8.77	0.15	0.026	0.0054	0.19	0.21	0.18	0.19	100	100	100	100	100
1个月	8.78	0.13	0.030	0.0053	0.22	0.17	0.21	0.18	99.9	86.4	123.5	85.5	105.6
5个月	8.07	0.94	0.047	0.0177	0.26	1.09	0.62	0.61	108.8	73.1	19.3	29.0	31.2

“CK-cr”: 同表 2; “CK-CI”: 氯氰菊酯乳剂; “A”: 0.1% 菊酯加晶体; “B”: 0.5% 菊酯加晶体; “C”: 2.5% 菊酯加晶体

分别下降 47% 和 12%。室温下保存一年, HD-1 和 81-6 晶体的毒力分别下降 26% 和 44%, 但 -20℃ 保存一年, 两种晶体的毒力仅下降 10—18%。此结果说明: (1) 由于存在于伴孢晶体内和粘附在晶体表面的蛋白水解酶^[4]在贮存期间的作用, 使晶体蛋白质不断降解为多肽, 此种活性多肽较易失活, 温度越高, 时间越长, 失活作用越明显; (2) 不同种类的 δ-内毒素的稳定性有差异, HD-1 δ-内毒素比 81-6 与 140 δ-内毒素的稳定性高。

(二) 农乳 600 对 δ-内毒素毒力的影响 (表 2)

表 2 结果表明, 农乳 600 对家蚕有微弱的毒力。0.1, 0.3 和 1% 的农乳与伴孢晶体混合有增效作用, 但增效作用随存放时间延长而逐渐降低。与初始毒力比较, 室温存放 5 个月, 0.1% 农乳处理的毒力基本不变, 而 0.3% 及 1% 农乳处理的毒力约下降 35%; 存放一年, 各浓度农乳处理的毒力均明显下降。

(三) 二甲苯对 HD-1 δ-内毒素毒力的影响

1, 3 和 9% 的二甲苯与晶体混合, 室温下贮存 5 个月, 混合物的毒力下降 11—25%; 贮存 1 年, 毒力明显下降(下降 52—61%)。各浓度二甲苯对 δ-内毒素毒力的影响并无明显差别(表 3)。

(四) 氯氰菊酯乳剂对 δ-内毒素毒力的影响(表 4)

由表 4 可知, 0.1—2.5% 的氯氰菊酯有效成分和晶体混合后, 室温下存放 1 个月, 混合物对家蚕的毒力基本不变, 但存放 5 个月后, 各菊酯浓度处理的混合物, 其毒力皆大幅度下降。氯氰菊酯乳剂在存放过程中, 毒力亦明显下降, 只是下降比率低于菊酯与晶体混合物。供试菊酯浓度与晶体混合未显示增效作用。

(五) 保存温度与时间及 3 种化学物质对 δ-内毒素蛋白质稳定性的影响

δ-内毒素蛋白质的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果表明, 蒸馏水中的 HD-1 伴孢晶体, 无论室温或 -20℃ 存放 2 个月, 其蛋白质无明显变化。室温下 2 个月, 0.1% 农乳中的晶体蛋白质无变化, 0.3% 和 1% 农乳处理的有轻度降解; 0.1% 和 0.5% 菊酯中的晶体蛋白质有轻度降解, 2.5% 菊酯中的晶体蛋白质被全部降解(图版 I-1)。存放 5 个月, 蒸馏水及各浓度农乳中的晶体蛋白质仅有轻度降解, 0.1% 菊酯中的晶体蛋白质被深度降解, 而 0.5 和 2.5% 菊酯中的晶体蛋白质均被完全降解(图版 I-2)。二甲苯处理试验中, 室温下存放 2 个月及 6 个月, 1—9% 二甲苯中的 HD-1 晶体蛋白质的降解程度与蒸馏水中的相近(图版 I-3); 存放 1 年, 3% 和 9% 二甲苯中的晶体蛋白质, 其降解程度比蒸馏水中的稍轻。81-6 晶体蛋白质被降解的情况类似于 HD-1 晶体, 但降解过程进行得更快。

讨 论

在本研究所用浓度范围内, 农乳 600 和二甲苯与苏云金杆菌的伴孢晶体混合, 室温下存放 5 个月, 其毒力有不同程度降低; 存放 1 年, 毒力均有明显下降。0.1—2.5% 的氯氰菊酯与晶体混合, 室温下 5 个月, 混合物的毒力即有大幅度下降。氯氰菊酯与晶体混合不显示增效作用, 其原因可能是所用菊酯浓度过高, 从而遮蔽了可能有的增效作用。应进一步考查在低浓度菊酯与晶体混合情况下的增效作用。晶体蛋白质的电泳分析表明, 上述毒力下降与晶体蛋白质的降解有关。在 0.1—2.5% 菊酯处理中, 混合系统中的 pH 分别为 5.5、4.5 及 3.0。已有报道^[9], 低 pH 环境对伴孢晶体和晶体蛋白质的稳定性的保持是不利的。低温保存显然对 δ -内毒

素毒力和晶体蛋白质稳定性的保持是有利的。二甲苯除了起乳化剂作用外, 还有一定防腐作用, 但考虑到可能对环境造成污染, 以其作为助剂是有缺点的。从保持 δ -内毒素的毒效考虑, 苏云金杆菌杀虫剂的液剂或乳剂在室温下的贮存期一般不宜超过 6 个月。

参 考 文 献

1. 安格斯, T A 和 P 鲁瑟 (1971): 昆虫和糖类的微生物防治, [英] H D 伯吉斯, N W 赫西主编, 广东农林学院和辽宁林土所合译, 科学出版社, 第 404—415 页, 1977。
2. Pendleton, I R and R B Morrison: *Nature*, **212** (5063): 728—729, 1966.
3. Li, R et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, **50** (3): 277—284, 1987.
4. Chestukhina, G G et al.: *Biochem. J.*, **187** (2): 457—465, 1980.
5. Nishiitsutsuji-Uwo, J et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, **29** (2): 162—169, 1977.

图 版 说 明

图 1 室温存放 2 个月, 农乳和菊酯中 HD-1 晶体蛋白质的 SDS-PAGE 图型

1、2 为 -20℃ 和室温蒸馏水中的晶体 3、4、5 为 0.1, 0.3 及 1% 农乳 600 中的晶体 6、7、8 为 0.1, 0.5 及 2.5% 氯氰菊酯中的晶体 MW 为蛋白质标准, 图右侧数字示分子量

图 2 室温存放 6 个月, 农乳和菊酯中 HD-1 晶体蛋白质的 SDS-PAGE 图型

1、2 为 -20℃ 和室温下蒸馏水中的晶体 3、4、5 为 0.1, 0.3 及 1% 农乳 600 中的晶体 6、7、8 为 0.1, 0.5 及 2.5% 氯氰菊酯中的晶体 MW 为蛋白质标准, 图右侧数字示分子量

图 3 室温存放 6 个月, 不同浓度二甲苯中 HD-1 晶体蛋白质的 SDS-PAGE 图型

1、2 为 -20℃ 和室温下蒸馏水中的晶体 3、4、5 为 1, 3 及 9% 二甲苯中的晶体 MW 为蛋白质标准, 图左侧数字示分子量