

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.03.013

Bt 新菌株资源的采集与鉴定

黄勤清*, 黄晓梅

福建农业职业技术学院, 福建 福州 350119

摘要:【目的】寻找对致倦库蚊高效的苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)杀蚊菌株新资源。【方法】从福建省的武夷山自然保护区、建阳、建瓯、浦城等多个地区采集土壤样品,采用热处理法从土壤中分离 Bt 菌株,并测定其对致倦库蚊活性的效果。【结果】从 125 份土壤样品中分离出 71 株 Bt 菌株,经生物测定得到 4 株对致倦库蚊有效菌株(QQ13、QQ42、QQ66 和 QQ92)。其中,QQ66 和 QQ92 有较高的毒性,均有几丁质酶基因,没有检测到 *cry1*、*cry1 I*、*cry2*、*cry4*、*cry5*、*cry6*、*cry7*、*cry8*、*cry9*、*cry10* 和 *cry11* 基因,在 75~100 ku 处各有一条杀虫晶体蛋白条带。【结论】采集和鉴定到的 Bt 新菌株资源将对致倦库蚊的生物防治起到促进作用。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 采集; 鉴定; 致倦库蚊

Isolation and identification of new strains of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*

HUANG Qinqing*, HUANG Xiaomei

Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350119, China

Abstract: 【Aim】To isolate and identify effective strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt) that can kill the mosquito *Culex quinquefasciatus*. 【Method】Soil samples were collected from several areas in Fujian Province, including Wuyi Mountain, Jianyang, Jian'ou and Pucheng. Bt strains were isolated from the soils by heat treatment and their activities against *C. quinquefasciatus* was determined. 【Result】71 Bt strains were isolated from 125 soil samples and subjected to bioassay. Four strains were active against *C. quinquefasciatus* (QQ13, QQ42, QQ66 and QQ92). Among them, QQ66 and QQ92 had the highest toxicities and harbored chitinase genes. Although *cry1*, *cry1I*, *cry2*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10* and *cry11* were not detected in the two strains, they had an insecticidal crystal protein with a molecular weight of 75–100 ku. 【Conclusion】The identified Bt new strains may promote the biological control of *C. quinquefasciatus*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; isolation; identification; *Culex quinquefasciatus*

在微生物农药中,苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前应用广泛的微生物杀虫剂之一,可以产生杀虫蛋白晶体(insecticidal crystal proteins, ICPs)(黄勤清,2008; Huang *et al.*, 2018)。Bt 对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等多种昆虫有毒杀活性,害虫不易产生抗性,成本低,便于工业化生产,不污染环境(张巧铃等,2015)。

Bt 分布广泛,可分离自昆虫、土壤、植物和水环境等(徐卓吟等,2016)。近年来,对许多国家大量生境进行调查发现,虽然 Bt 最初发现于染病地中海粉蛾 *Ephestia kuehniella* Zeller,但 Bt 的存在和昆虫没有

必然联系,这种细菌依然大量存在于一些没有昆虫的环境中(张灵玲等,2008)。Bt 对蚊虫也有较好的防治效果(Ben-Dov, 2014)。研究学者已经分离出了大量的 Bt 菌株,但新菌株的筛选仍在继续。这是因为虽然害虫对 Bt 高度敏感,但现有 Bt 菌株仍然无法防治其他大量害虫。因此,继续分离新的高效特效 Bt 菌株十分必要(黄勤清等,2006; 魏华等, 2018; Sun & Yu, 2000)。武夷山是国家保护区,有宝贵的微生物菌种资源。因此,本研究从武夷山等福建省多个地区采集土壤样品,从中分离纯化得到 71 株 Bt 新菌株,并研究其对致倦库蚊 *Culex quinquefasci-*

atus Say 的杀虫效果,以期进一步丰富 Bt 菌种资源,为高效杀蚊微生物制剂的研发奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离培养基 培养基 BPA:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,乙酸钠 34 g,加 ddH₂O 至 1000 mL,pH 值 7.2~7.4。培养基 BP:牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,琼脂 18 g,NaCl 5 g,加水至 1000 mL,pH 值 7.0~7.2。1/2 LB 培养基:蛋白胨 5 g,酵母粉 2.5 g,NaCl 5 g,琼脂 15 g,加水至 1000 mL,pH 值 7.0~7.2。

1.1.2 实验药剂 2 g·mol⁻¹ NaAc;100 mg·mL⁻¹ 青霉素钠盐;复红染色剂(100 mL):碱性品红(0.1 g)+95%酒精(10 mL)+3%苯酚水溶液(90 mL)。

1.1.3 土壤样品 从福建省武夷山自然保护区、建阳、建瓯、浦城等地区采集土壤样品分离与纯化 Bt。

1.1.4 供试昆虫 以 4 龄致倦库蚊进行生物测定,试虫由福建农林大学生物农药研究中心提供。

1.1.5 实验主要仪器 DYC-28C 型电泳槽、HH-W21-600 型电热恒温水浴锅、HQ-45A 恒温摇床和 BACKMAN 离心机。

1.2 方法

1.2.1 土壤样品采集 采集地表 5 cm 以下的土壤进行菌株分离,将土样放入干净的自封袋,带回实验室开展菌株分离等工作。

1.2.2 Bt 菌株分离和镜检 称取 0.1 g 土壤放入 BPA 培养基中,并加入 100 mg·mL⁻¹ 青霉素钠盐 80 μL,2 g·mol⁻¹ NaAc 325 μL,置于摇床上(温度 33.2 ℃;转数 130 r·min⁻¹)培养 42 h 后取下,取 200 μL 菌液装入离心管于 75~80 ℃ 水浴中热处理 10~15 min,稍微静置后冰浴 5 min,吸 0.2 mL 于 BP 平板上,均匀涂布,倒置于 30 ℃ 培养箱中培养 24 h。挑选 5 个类似于 Bt 的菌落(干燥、不透明、乳白色、均一或边缘有缺刻)接种到 BP 斜面上,30 ℃ 培养 72 h。用复红染色剂染色进行镜检。

1.2.3 Bt 菌株杀蚊生物测定 用 0.85% 的 NaCl 将培养 2 d 的 Bt 菌株稀释至 D_{600 nm} 为 0.1。取 1 mL 加入 50 mL 蒸馏水中,放入 45 只致倦库蚊 4 龄幼虫,放置于 25 ℃ 恒温箱 48 h 后,记录致倦库蚊 IV 龄幼虫的死亡数。重复 3 次,用无菌水做对照。

1.2.4 高效杀蚊 Bt 菌株部分杀虫基因检测 以高效杀蚊菌株的总 DNA 为模板,利用通用引物分别 PCR 扩增部分 cry 基因和几丁质酶基因等杀虫基

因。其中, cry5、cry6、cry8 和 cry11 基因的引物 cry5F/cry5R、cry6F/cry6R、cry8F/cry8R 和 cry11F/cry11R 参考黄天培(2006)的实验设计; cry1、cry7、cry9 基因的引物 K5un2/K3un2 和 K5un3/K3un3, cry11 基因的引物 S5uni/S3uni, cry2 基因的引物 S5un2/S3un2, cry4、cry10 基因的引物 S5un4/S3un4 参考前人文献(宋福平等,1998; Kuo & Chak,1996; Song *et al.*, 2003); 几丁质酶基因的引物参考 Bt WB7 的序列(GenBank 登录号 AY074882)设计 Chi-F(5'-GGAATTCATGGCTATGAGGTCTC-3') 和 Chi-R (5'-CCCAAGCTT CTAGTTTTCGCTAATG-3') (骆兰,2008)。

1.2.5 高效杀蚊 Bt 菌株杀虫晶体蛋白检测 参考张灵玲等(2008)的方法分离杀虫晶体蛋白,利用 SDS-PAGE 进行检测。

2 结果与分析

2.1 Bt 新菌株资源的采集与鉴定

从武夷山自然保护区等福建省内各地采集的 125 份土壤样品中分离 Bt。Bt 芽孢为椭圆形,杀虫晶体蛋白以菱形为主(图 1)。具有上述特征的菌株初步鉴定为 Bt。共纯化得到 71 株 Bt 新菌株。由此可见,Bt 普遍存在于土壤中,福建省具有丰富的 Bt 菌种资源。

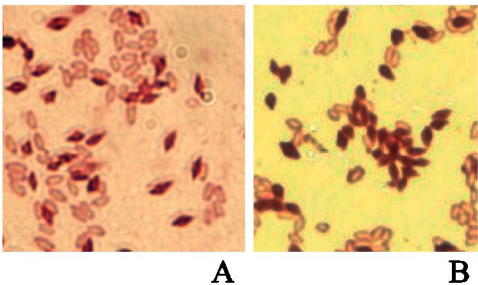


图 1 Bt QQ66(A)和 QQ92 形态(B)
Fig.1 Morphology of Bt QQ66 (A) and QQ92 (B)

2.2 Bt 菌株杀蚊生物测定

生物测定结果表明,共有 4 个 Bt 新菌株对致倦库蚊有效,死亡率均达 50% 以上,其中菌株 QQ66 和 QQ92 杀虫效果最好,校正死亡率均达到 100%,而 QQ13 和 QQ42 的杀虫效果相对较差,分别是 64.4% 和 57.8% (表 1)。

2.3 高效杀蚊 Bt 菌株 QQ66 和 QQ92 部分杀虫基因检测

杀虫基因 PCR 产物电泳检测结果表明,QQ66

和 QQ92 菌株均有约 2 ku 大小的几丁质酶基因(图 2), 没有检测到 *cry1*、*cry1I*、*cry2*、*cry4*、*cry5*、*cry6*、*cry7*、*cry8*、*cry9*、*cry10* 和 *cry11* 基因。

表 1 对致倦库蚊 4 龄幼虫有效 Bt 菌株的生物测定

Table 1 Bioassay of Bt isolates effective against 4th instar larvae of *C. quinquefasciatus* (n=45 in all tests)

分离株 Isolates	校正死亡率 Corrected mortality rate/%
QQ13	64.4
QQ42	57.8
QQ66	100.0
QQ92	100.0
对照 Control	0

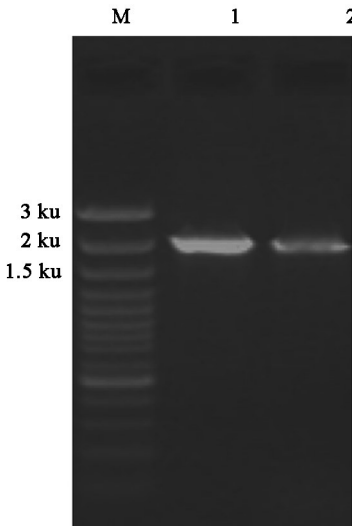


图 2 Bt 菌株 QQ66 和 QQ92 几丁质酶基因 PCR 产物电泳

Fig.2 Electrophoresis of PCR products of chitinase genes from Bt QQ66 and QQ92

泳道 M: DNA 分子质量标准;泳道 1: Bt 菌株 QQ66 几丁质酶基因 PCR 产物;泳道 2: Bt 菌株 QQ92 几丁质酶基因 PCR 产物。
Lane M: DNA Marker; Lane 1: PCR product of chitinase gene from Bt QQ66; Lane 2: PCR product of chitinase gene from Bt QQ92.

2.4 高效杀蚊 Bt 菌株 QQ66 和 QQ92 杀虫晶体蛋白检测

对 QQ66 和 QQ92 菌株进行 SDS-PAGE 检测,发现 QQ66 和 QQ92 菌株在 75~100 ku 处各有一条杀虫晶体蛋白条带(图 3)。

3 讨论

近年来,随着可持续发展观的深入人心,保护环境、提高环境质量成为全人类的共识。在生物农药中,研究最深入、使用最广泛的首推 Bt(姚荣英, 2009; Dai *et al.*, 2016)。

要开发出高效的微生物杀蚊剂,关键是要有自

己的优良生产菌种。寻找高效菌株对我国生物杀虫剂的生产有着十分重要的意义(Huang *et al.*, 2018),研究人员也不断地在寻找从不同材料上分离 Bt 的新方法。本研究以武夷山自然保护区为主要采集区,采集到的 125 份土壤样品中分离出 Bt 71 株。结果表明,Bt 普遍存在于土壤中。

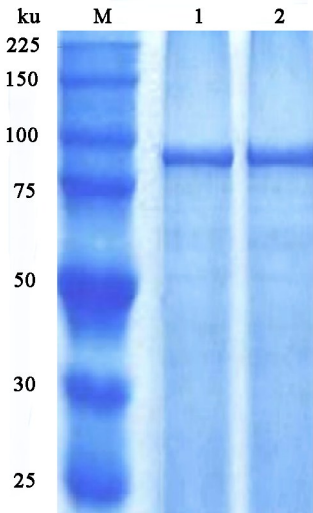


图 3 Bt 菌株 QQ66 和 QQ92 杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of ICPs from Bt QQ66 and QQ92

泳道 M: 蛋白分子质量标准;泳道 1: Bt QQ66 杀虫晶体蛋白;
泳道 2: Bt QQ92 杀虫晶体蛋白。
Lane M: Protein Marker; Lane 1: ICPs of Bt QQ66;
Lane 2: ICPs of Bt QQ92.

由于双翅目的蚊虫传播着各种疾病,使得全世界半数以上的人口受到其传播的疾病的威胁。每年数亿人受蚊媒疾病的折磨,其中有几百万人被夺去生命,因此,它是人类生存和健康的大敌(Zhang *et al.*, 2017)。本研究以致倦库蚊 4 龄幼虫作为双翅目靶标害虫进行生物毒力测定,得到 4 株毒性较高的菌株,其中 QQ66 和 QQ92 菌株均具有较高的杀虫活性。

QQ66 和 QQ92 菌株均有几丁质酶基因,没有检测到 *cry1*、*cry1I*、*cry2*、*cry4*、*cry5*、*cry6*、*cry7*、*cry8*、*cry9*、*cry10* 和 *cry11* 基因,在 75~100 ku 处各有一条杀虫晶体蛋白条带。这说明 QQ66 和 QQ92 菌株可能含有较新的杀蚊 *cry* 基因(黄天培, 2006; 宋福平等, 1998; Kuo & Chak, 1996; Song *et al.*, 2003)。

今后,将对得到的 2 株具有高杀虫毒力的 Bt 菌株进一步研究,如有效基因的克隆、鉴定及表达等,以筛选和构建出具有生态、经济和社会效益的高效工程菌。

参考文献

- 黄勤清, 2008. 苏云金杆菌发酵后处理技术与产量关系研究. 华东昆虫学报, 17(3): 230–235.
- 黄勤清, 黄志鹏, 关春鸿, 黄必旺, 2006. 苏云金芽孢杆菌 WB9 菌株的分离、生化特性及培养基优化. 福建农林大学学报(自然科学版), 35(4): 346–351.
- 黄天培, 2006. 苏云金芽孢杆菌的重要功能基因. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 骆兰, 2008. 苏云金芽孢杆菌 P91 和 B31 菌株的研究. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 宋福平, 张杰, 谢天健, 杨自文, 戴莲韵, 李国勋, 1998. 苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. 中国农业科学, 31(3): 13–18.
- 魏华, 袁生, 张文, 2018. 海洋来源的苏云金芽孢杆菌 h3 菌株和昆虫幼虫来源的 Ly30 对鳞翅目小菜蛾、双翅目家蝇和淡色库蚊、鞘翅目德国小蠊的毒性. 南京师大学报(自然科学版), 41(3): 109–115.
- 徐卓吟, 楼杨, 张俊, 林白容, 李杰, 2016. 苏云金芽孢杆菌菌种资源现状. 江西农业(17): 26–29.
- 姚荣英, 2009. 苏云金杆菌生物农药生产和应用现状. 生物安全学报, 18(2): 156–160.
- 张灵玲, 关怡, 黄勤清, 关雄, 2008. 武夷山土壤中分离的 Bt 杀蚊新菌株. 寄生虫与医学昆虫学报, 15(2): 82–85.
- 张巧铃, 邱淑惠, 张永嵘, 黄天培, 2015. 一株分离自铀矿土壤的苏云金芽孢杆菌的鉴定. 福建农林大学学报(自然科学版), 44(2): 131–134.
- BEN-DOV E, 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, 6(4): 1222–1243.
- DAI R, SU X, JIN X, ZHANG J, GUAN X, CHEN C, SHU C, HUANG T, 2016. Cloning, expression, purification, and insecticidal activity of a novel Cry1Na3 toxin from *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2. *Journal of Economic Entomology*, 109(3): 1064–1070.
- HUANG T, LIN Q, QIAN X, ZHENG Y, YAO J, WU H, LI M, JIN X, PAN X, ZHANG L, GUAN X, 2018. Nematicidal activity of Cry1Ea11 from *Bacillus thuringiensis* BRC-XQ12 against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Phytopathology*, 108(1): 44–51.
- KUO W, CHAK K, 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4): 1369–1377.
- SONG F, ZHANG J, GU A, WU Y, HAN L, HE K, CHEN Z, YAO J, HU Y, LI G, HUANG D, 2003. Identification of *cry1 I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1 I*-type gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9): 5207–5211.
- SUN M, YU Z, 2000. Recent developments in the biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Advances*, 18(2): 143–145.
- ZHANG L, ZHAO G, HU X, LIU J, LI M, BATTOOL K, CHEN M, WANG J, XU J, HUANG T, PAN X, XU L, YU X Q, GUAN X, 2017. Cry11Aa interacts with the ATP-binding protein from *Culex quinquefasciatus* to improve the toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50): 10884–10890.

(责任编辑: 郑姗姗 郭莹)

<http://www.jbscn.org>