

几株 Bt 菌株对紫外线的抗性研究

许会才¹, 王卫国^{2*}, 赵永亮² (1. 焦作师范高等专科学校, 河南焦作 454000; 2. 河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001)

摘要 [目的] 寻求高抗紫外线的 Bt 菌株。[方法] 采用不同照射时间的紫外线(UV)对 1 株野生型 Bt 菌株及 3 株 Bt 菌株 Bt001、Bt200、Bt087 进行照射处理后再置于 32℃ 培养箱中培养 16 h。[结果] Bt 野生菌株在 UV 处理 3 min 后已基本全部失活, 而 Bt001、Bt200、Bt087 在 UV 处理 8 min 后仍有活性。菌株 Bt001、Bt200、Bt087 对 UV 的抗性均强于野生 Bt 菌株, 其中, Bt200 相对弱些, UV 处理 9 min 后已无菌落; Bt087 最弱, UV 处理 8 min 后已无菌落; 而菌株 Bt001 对 UV 的抗性最强, UV 处理 13 min 后仍有菌落出现, 说明不同的 Bt 菌株, 其遗传背景是不同的。另外, Bt001 经紫外线照射 9 min 培养 16 h 后发现有 9 个菌落发生明显的变异, 菌落呈棕黄色, 菌落明显比原始菌落小, 油镜下观察涂片, 其菌体比原始菌体小, 说明 Bt001 为明显发生突变的菌株。[结论] 菌株 Bt001 对 UV 的抗性最强。

关键词 苏云金芽孢杆菌; 抗紫外线性; 分离

中图分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)08-03086-02

Discussion on the Resistances of Several Bt Strains to UV Radiation

XU Hui-cai et al (Jiaozuo Normal College, Jiaozuo, Henan 454000)

Abstract [Objective] The purpose was to seek for Bt strains with high resistance to UV radiation. [Method] A wild Bt strain and 3 Bt strains of Bt001, Bt200, Bt087 were radiated by UV radiation for different time, and then cultured in incubator at 32℃ for 16 h. [Result] Almost all the wild Bt strains lost their activities after they were treated by UV radiation for 3 min, but Bt001, Bt200 and Bt087 also had activities after they were treated by UV radiation for 8 min. The resistances of strains Bt001, Bt200 and Bt087 to UV radiation were stronger than that of the wild Bt strain, among which, Bt200 was relatively weaker, there was no colony after it was treated by UV radiation for 9 min; Bt087 was weakest, there was no colony after it was treated by UV radiation for 8 min; the resistance of the strain Bt001 to UV radiation was strongest, there was also colony appeared after it was treated by UV radiation for 13 min, indicating that the genetic backgrounds of different Bt strains were different. Besides, after Bt001 was treated by UV radiation for 9 min and then cultured for 16 h, there were 9 colonies of Bt001 found to have significant variations and they were brown yellow and significantly smaller than their initial colonies. It was found that their cells were smaller than their initial cells through observing their smears under oil microscope, indicating that Bt001 was the strain with significant variation. [Conclusion] The resistance of the strain Bt001 to UV radiation was strongest.

Key words *Bacillus thuringiensis*; Resistance to ultraviolet radiation; Separation

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)作为杀虫剂, 因为具有使用安全, 对人畜无害, 连续使用害虫不易产生抗药性, 无残毒, 不污染环境, 不杀伤天敌, 成本低, 使用范围广和药效持久等优点而被广泛用于农林害虫和卫生害虫的微生物防治^[1-5], 但苏云金芽孢杆菌的商品寿命较短, 在田间不易移交, 气候与作物本身等因素都会影响苏云金芽孢杆菌毒素蛋白的持效性, 干湿气流交替、阳光强弱、紫外线(UV)的照射等均会导致 Bt 的死亡和苏云金芽孢杆菌毒素蛋白的降解。紫外线对苏云金芽孢杆菌芽孢和晶体都有损伤作用, 是苏云金芽孢杆菌杀虫剂在田间条件下药效迅速降低的主要原因之一^[6-7]。为保护 Bt 及 Bt 毒素蛋白少受外界影响, 增强制剂的生物活性, 运用多种生化手段提高 Bt 制剂的杀虫效果已报道较多。但从 Bt 菌株本身对紫外光照射的抗性来探讨寻求高效 Bt 菌种的研究较少, 不同 Bt 菌株对紫外光照射的抗性试验目前还未见详细报道。运用多种生化手段虽能提高 Bt 制剂的杀虫效果, 但增幅不是很大。若能采用 UV 辐照技术获得直接对紫外线具抵抗能力的苏云金芽孢杆菌突变株, 则可以减少许多生产及应用上的麻烦, 减小阳光强弱对苏云金芽孢杆菌在田间移交及其持效性的影响。笔者就此进行了研究, 现将有关结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株。Bt001、Bt200、Bt087 为河南工业大学生物

工程学院生化微生物实验室所保存的生产菌种, Bt 野生菌株为从河南省南阳市郊土壤中分离出的菌株。

1.1.2 培养基。

(1) 平板斜面培养基。牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 葡萄糖 0.1%, 氯化钠 0.2%, 琼脂(石狮牌)2%, pH 值 7.0~7.2, 121℃ (1.2×10⁵ Pa) 灭菌 30 min。

(2) 分离液态培养基。牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 醋酸钠 3.4%, 青霉素钠盐 400 μg/ml, 庆大霉素 400 μg/ml, pH 值 7.0~7.2, 1.2×10⁵ Pa(121℃) 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 野生 Bt 菌株的分离。采用醋酸钠-抗生素振荡培养分离法^[8]并加以改进。具体操作方法为: 取土样 5 g, 过 20 目筛, 倒入装有 45 ml 液体分离培养基的摇瓶中, 装入适量玻璃珠, 摇床振荡(200 r/min, 30 min) 培养 8 h。培养结束后, 在无菌条件下, 取菌悬液 10 ml, 于 65℃ 水浴 15 min; 同样, 在无菌条件下, 取热处理后的混浊液 0.1 ml 涂平板, 将平板置于 32℃ 培养箱中培养 48 h。然后从平板上挑取类似苏云金芽孢杆菌的边缘不整齐, 表面粗糙的暗白色菌落涂片, 用四溴苯酚磺酞生物染色剂(MBB)及番红复染液区别染色, 显微镜(油镜)下观察。依其菌落形态、颜色、营养体、芽孢、晶体形态进行取舍, 凡形成伴孢晶体的确定为苏云金芽孢杆菌。无菌条件下挑取单菌落于试管斜面, 30~32℃ 培养箱中培养 48 h, 置于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 苏云金芽孢杆菌芽孢和晶体的区别染色。按常规方法进行。把需要镜检的材料涂成薄片, 待其自然干燥后于涂片中央滴加一小滴 MBB 液, 试剂即向四周扩散。须臾干燥并有白色结晶析出。5~6 min 后即用蒸馏水(或清水)轻轻洗

基金项目 河南省教育厅自然科学基金资助项目(No.9711268)部分内容。
作者简介 许会才(1965-), 男, 河南焦作人, 讲师, 从事微生物学研究。* 通讯作者, 硕士, 教授。

收稿日期 2007-12-21

去多余的染色剂;再滴加番红复染液,约 30 s;水洗,待干后用显微镜检视。

1.2.3 紫外线对苏云金芽孢杆菌的处理。

1.2.3.1 菌悬液的制备。取培养 48 h 的苏云金芽孢杆菌各菌株的斜面两支。分别加入 5 ml 无菌生理盐水将菌苔洗下,并倒入盛有玻璃珠的灭过菌的小三角瓶中,振荡 30 min,以打碎菌块。在无菌室内用显微镜直接计数法计数,调整细胞浓度为 10^8 个/ml。

1.2.3.2 紫外线处理操作步骤。

(1)UV 照射。打开红光的灯泡,取直径 9 cm 的培养皿 9 套,分别放入上述菌悬液 5 ml,并放无菌磁子于平皿中。将盛有菌悬液的平皿置于磁力搅拌器上,在距离为 30 cm,功率为 15 W 的紫外灯下分别搅拌照射 0、1、3、5、8、9、11、13、15 min。

(2)稀释。在红灯下,将上述经诱变处理的菌悬液以 10 倍稀释法稀释成 10^{-6} ~ 10^{-1} (具体可按存活率进行稀释)。

(3)涂平板。取 10^{-5} 和 10^{-6} 两个稀释度的菌液,每个稀释度涂平板 2 只,每只加稀释液 0.1 ml。用无菌玻璃刮棒涂匀。以同样操作,取未经紫外线处理的菌体稀释液涂平板作对照。

(4)培养。将上述涂匀的平板,用黑布(或黑纸)包好,置

于 32 °C 培养箱中培养 16 h。

(5)计数。将培养 16 h 后的平板取出进行计数。根据对照平板上菌落数,计算出每毫升菌液中的活菌数。同样操作,计算出 UV 处理 3、5、8、9、11、13、15 min 后的存活细胞数及致死率。

(6)转接。挑取紫外光处理过的有特征的 Bt 菌落转接入试管斜面,30~32 °C 培养箱培养 48 h,取出,4 °C 冰箱保存备用。同样方法转接第 3 代。

2 结果与分析

2.1 苏云金芽孢杆菌芽孢和晶体的区别染色结果 MBB 液染色镜检的结果表明,苏云金芽孢杆菌的晶体呈天蓝色,芽孢呈无色,菌体细胞呈复染的红色。晶体由于含有蛋白质,故具有 MBB 液所特有的颜色反应。晶体蛋白中的自由基 -NH₂ 与溴酚蓝结合,可获得清晰的细胞学形象。由于染色剂 MBB 液中含有 HgCl₂,所以不需要再加热固定。固定和染色可一次完成。

2.2 不同 Bt 菌株对紫外光的抗性 表 1 表明,Bt 野生菌株在紫外线处理 3 min 后已基本全部失活,而 Bt001、Bt200、Bt087 在紫外线处理 8 min 后仍有活性。从 UV 处理时间的长短及平板上出现菌落数的多少可知,尽管菌株 Bt001、Bt200、Bt087 对 UV 的抗性都比野生 Bt 菌株强得多,但并不

表 1 不同 Bt 菌株被紫外光照射不同时间再培养 16 h 后的菌落数
Table 1 Colony number of Bt strain recultured 16 h after UV irradiation with different time

照射时间 Irradiation time min	Bt001				Bt200				Bt087				野生 Bt Wild Bt			
	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁵ 倍 Diluted 10 ⁻⁵ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times	稀释 10 ⁻⁶ 倍 Diluted 10 ⁻⁶ times
	0	>100	>100	21	18	>100	>100	12	10	>100	>100	19	11	>100	>100	24
1	95	>100	7	6	>100	>100	13	9	>100	>100	8	5	65	61	8	9
3	45	59	5	4	64	67	2	2	81	52	2	2	5	4	3	1
5	48	60	5	1	54	21	2	1	15	7	1	0	0	1	0	0
8	45	21	1	1	12	9	1	1	5	6	1	1	1	0	0	0
9	12	5	2	0	5	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
11	3	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

相等,其中,Bt200 相对弱些,UV 处理 9 min 后已无菌落;Bt087 最弱,UV 处理 8 min 后已无菌落;而菌株 Bt001 对 UV 的抗性最强,UV 处理 13 min 后仍有菌落出现。这说明不同的 Bt 菌株,其遗传背景即基因组成是不同的,野生型 Bt 菌株的遗传背景是最不稳定的。进行诱变育种时的诱变效果与出发菌株的选择和菌种本身的遗传背景有直接关系。

3 讨论

(1)试验中,Bt001 经紫外线照射 9 min,培养 16 h 后发现 9 个菌落发生明显的变异,菌落呈棕黄色,菌落明显比原始菌落小。涂片,显微镜(油镜)下观察其菌体要比原始菌体小,此为明显发生突变的菌株。至于该菌株是否为正突变株,是否具有明显的高产性和抗 UV 特性,尚待进一步探讨。

(2)抗紫外线能力检测试验结果表明,用紫外线诱变选育出适合工业生产用的抗紫外线突变株是可能的,有望解决阳光强弱影响苏云金芽孢杆菌在田间移交和导致苏云金毒素蛋白降解等问题。

参考文献

- [1] HOFIACK L, WILCKS A, ANDRUP L, et al. Functional insights into pGI2, a cryptic rolling-circle replicating plasmid from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1519-1530.
- [2] SIMON M A. Research on biological pest control moves ahead [J]. *Science*, 1991, 251: 211-212.
- [3] WILLIAM H. Managing insect resistance to toxins [J]. *Science*, 1998, 258(27): 1451.
- [4] 王卫国, 阚远钧, 孙富林. 3 株苏云金杆菌噬菌体的核酸性质 [J]. *中国生物防治*, 2000, 16(2): 69-73.
- [5] 冯书亮, 付韵琴, 范秀华, 等. 几株高效 Bt 菌株对玉米螟、棉铃虫、粘虫和黄地老虎的毒力测定 [J]. *中国生物防治*, 1995, 11(1): 22-25.
- [6] HERVE G. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein [J]. *J of Biotech*, 1995, 177 (21): 6027-6032.
- [7] KNOWLES B H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins [J]. *Adv Insect Physio*, 1994, 24: 275-308.
- [8] 杨自文, 吴宏文, 王开梅, 等. 从土壤中高效分离苏云金杆菌的方法 [J]. *中国生物防治*, 2000, 16(1): 26-30.