

化学杀虫剂对苏云金杆菌芽孢及伴胞晶体的影响

曹伟平¹, 冯书亮^{1*}, 范秀华¹, 王容燕¹, 杨更亮²

(1 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北 保定 071000;

2 河北大学 化学与环境科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 研究了7种常用化学杀虫剂对苏云金杆菌芽孢及伴胞晶体的影响及作用, 结果表明, 常用浓度下, 2.5% 溴氰菊酯乳油、48% 毒死蜱乳油对苏云金杆菌芽孢及伴胞晶体无影响, 可与苏云金杆菌制剂事先做成混剂; 4.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、20% 灭多威和40% 辛硫磷在短时期内对芽孢及伴胞晶体无明显影响, 可与苏云金杆菌制剂现混现用; 80% 敌敌畏乳油(500倍稀释)对苏云金杆菌伴胞晶体有明显损伤作用, 不宜与苏云金杆菌制剂混合使用。

关键词: 苏云金杆菌; 化学杀虫剂; 芽孢; 伴胞晶体

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2003)01-0039-06

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称Bt)制剂作为一种对人畜安全、无环境污染的微生物杀虫剂, 在农、林害虫的防治中发挥了重要作用, 但在实际应用中仍存在一定的局限性。我国农民的施药习惯是“见虫打药”, 而Bt对多数害虫的有效敏感期在初孵至1龄阶段, 2~3龄后药效普遍下降。另一方面, Bt药效期较短, 杀虫速度相对较慢, 对害虫的控制力度不强^[1], 在害虫大发生的情况下, Bt制剂往往难以奏效。因此, 人们常常将Bt制剂与化学杀虫剂混合使用, 以提高Bt制剂的防治效果。Bt制剂与化学杀虫剂正确混用, 既可降低二者的用量, 提高杀虫效果, 又能防治一些对Bt制剂不敏感的虫种, 起到兼治作用^[2]; 同时, 可减少化学杀虫剂对环境的污染; 还可避免长期大量单一使用化学杀虫剂而使害虫产生抗药性。由于二者混用时化学杀虫剂因其本身及制剂中的助剂对Bt制剂有或增效或减效的影响^[3,4], 而非简单的相加作用, 因此, 在实际应用中, 应特别注意Bt制剂与化学杀虫剂种类的搭配及化学杀虫剂的使用浓度。我国现有Bt制剂多为芽孢与伴胞晶体混合物, 为明确常用化学杀虫剂对Bt制剂中芽孢及伴胞晶体的影响, 作者就7种化学杀虫剂对Bt芽孢及伴胞晶体的作用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 本室选育的具有天然标记的产核黄素CH菌株^[5]。

1.1.2 培养基 LB液体培养基(多肽蛋白胨10g/kg, 酵母浸出粉5g/kg, NaCl5g/kg, 葡萄糖1g/kg, pH7.2); 细菌培养基(琼脂20g/kg, 葡萄糖2g/kg, NaCl2g/kg, 牛肉膏10g/kg, 酵母粉10g/kg, pH7.2)。

1.1.3 供试药剂 4.5% 高效氯氟氰菊酯(*beta*-cypemethrin)乳油(天津市华宇化学杀虫剂有限公司); 2.5% 高效氯氟氰菊酯(*lambda*-cyhalothrin)乳油(英国捷利康有限公司); 2.5% 溴氰菊酯(*deltamethrin*)乳油(江苏宜兴益农化工厂); 80% 敌敌畏(*dichlorvos*)乳油(河北新丰化

□ 作者简介: 冯书亮(1957-), 男, 河北威县人, 研究员, 从事杀虫、抗菌等方面的研究

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(30070516); 河北省自然科学基金资助课题(399440)。

学杀虫剂化工股份有限公司); 48% 毒死蜱(chlorpyrifos) 乳油(广东省化州市第一化学杀虫剂厂分装); 40% 辛硫磷(phoxim) 乳油(山东胜邦鲁南化学杀虫剂有限公司); 20% 灭多威(methomyl) 乳油(山东华阳化学杀虫剂化工集团有限公司)。以上 7 种化学杀虫剂依次编号为 1~ 7。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液制备与伴胞晶体的提纯 将 CH 菌株斜面接种到装有细菌培养基的克氏瓶斜面上, 30 ℃ 下培养 4 d, 待胞晶游离后, 用少量无菌水将克氏瓶内的菌苔刮至无菌生理盐水中, 并将浓度调整为每 mL 含 2 亿芽孢, 4 ℃ 保存备用。伴胞晶体的提纯参照文献[6]。

1.2.2 化学杀虫剂对 CH 菌株芽孢的处理方法

短期处理: 设上述 7 种化学杀虫剂的田间使用浓度为中间浓度, 以两倍等比级差另选取高低两个浓度, 将一定剂量的化学杀虫剂分别加入到装有 4 mL 灭菌 LB 培养基的试管中, 配成设定的试验终浓度; 另以未加化学杀虫剂的灭菌 LB 培养基为对照, 振荡摇匀; 以 0.01 mL/mL 的比例接种 CH 菌悬液, 恒温 30 ℃ 下振荡培养, 2 d 后涂片检查芽孢的萌发情况。

长期处理: 在 1 mL 无菌水中加入 0.01 mL CH 菌悬液, 加入一定量的上述 7 种化学杀虫剂, 使杀虫剂的终浓度均为 600 倍稀释液, 振荡摇匀, 30 ℃ 下放置 30 d, 经常振荡以保证杀虫剂对芽孢作用完全。之后将各处理液转移至小离心管内, 用无菌水洗涤离心(10^5 r/min, 10 min) 数次, 除去其中的化学杀虫剂, 加 1 mL 无菌水充分振荡使芽孢悬浮, 移取 0.1 mL 悬浮液至平皿(\varnothing 6 cm) 中, 涂敷均匀, 在细菌培养基中培养, 胞晶游离后在相差显微镜下观察芽孢及伴胞晶体的形成情况。以上各处理均同时设 3 个重复。

1.2.3 化学杀虫剂对 CH 菌株伴胞晶体影响的处理方法 用万分之一电子天平称取一定量伴胞晶体悬浮于 1 mL 无菌水中, 第 1 组所加杀虫剂浓度同 1.2.2 的短期处理试验浓度, 第二组同 1.2.2 长期处理的试验浓度(600 倍稀释), 每个处理同时设 3 个重复。两组均设不加杀虫剂的伴胞晶体对照, 充分振荡后 30 ℃ 下密封放置, 第 1 组放置 2 d, 第 2 组放置 30 d, 期间振荡。规定时间内将处理晶体转移至小离心管内, 用无菌水洗涤离心(10^5 r/min, 10 min) 3 次, 第 1 组进行 SDS-PAGE 分析, 第 2 组用于生物测定。

1.2.4 SDS-PAGE 方法 参照文献[7]样品处理方法。浓缩胶质量分数为 5%, 分离胶质量分数为 8%, 电极缓冲液采用 Tris-甘氨酸系统。浓缩胶部分的电压为 120 V, 样品进入分离胶后电压升高到 150 V。考马斯亮蓝染色, 甲醇-冰乙酸系统脱色。

1.2.5 伴胞晶体蛋白含量的定量分析 采用 GDS-8000 凝胶成像分析系统(UVP 公司生产)分析样品胶, 设未经化学杀虫剂处理的伴胞晶体的各蛋白带质量分数为 100%, 计算各处理的伴胞晶体主要蛋白带的相对质量分数。

1.2.6 生物测定 用磷酸缓冲液(0.2 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 61.0 mL + 0.2 mol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 39.0 mL, pH 7.0) 将 1.2.3 中第 2 组洗涤离心后的晶体移至盛有玻璃珠的三角瓶并稀释, 使伴胞晶体含量约为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 1 龄末棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫为供试昆虫, 采用无毒棉叶片感染饲喂法, 每个处理重复 3 次, 每个重复接虫 30 头, 另设清水对照, 间隔一定时间检查死、活虫数, 计算死亡率, 结果采用 SSR 法进行差异显著性测定。

2 结果与分析

2.1 化学杀虫剂对苏云金杆菌芽孢的作用

苏云金杆菌 CH 菌株芽孢经化学杀虫剂处理 2 d 后的测定结果(见表 1)表明, 不同化学杀

虫剂, 不同浓度对芽孢萌发的抑制程度不同。常用浓度下, 2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、48% 毒死蜱乳油、40% 辛硫磷乳油对 CH 菌株芽孢的抑制作用较强, 但均不能杀死芽孢。涂片相差显微镜下观察, 其他抑制作用较差的杀虫剂样品, 处理后的芽孢及芽孢萌发后的营养体均未发生变形, 生长正常。如将对 CH 菌株芽孢抑制作用较强的杀虫剂添加在 Bt 制剂中, 可在一定程度上防止芽孢的 2 次发酵, 延长持效期。

Table 1 Inhibition of different concentration of seven kinds of chemical insecticides against Bt spores

No.	Insecticides	Diluent fold	Susceptivity*	No.	Insecticides	Diluent fold	Susceptivity*
1	4.5% beta-cypermethrin	1×10^3	+	5	48% chlorpyrifos EC	5×10^2	-
		2×10^3	+			1×10^3	-
		4×10^3	+			2×10^3	+
2	2.5% lambda-cyhalothrin EC	2×10^3	-	6	40% phoxim EC	5×10^2	-
		4×10^3	-			1×10^3	-
		8×10^3	+			2×10^3	-
3	2.5% deltamethrin EC	1×10^3	-	7	20% methomyl EC	1×10^3	+
		2×10^3	+			2×10^3	+
		4×10^3	+			4×10^3	+
4	80% dichlorvos EC	5×10^2	+				
		1×10^3	+				
		2×10^3	+				

* + : spore geminating, - : spore un-geminating

Bt 芽孢经化学杀虫剂处理 30 d 的测定结果表明, 不同化学杀虫剂及其不同浓度对 Bt 制剂的芽孢及晶体的影响不同。各处理液在细菌培养基上培养至不同发育阶段, 相差显微镜下观察表明, 经 2.5% 溴氰菊酯乳油、80% 敌敌畏、48% 毒死蜱乳油处理的菌悬液芽孢和晶体的形态及芽孢和晶体的产生比率基本未发生变化; 经 4.5% 高效氯氟氰菊酯乳油和 40% 辛硫磷乳油处理的菌液, 产生芽孢与晶体的数量相当, 但晶体的形态稍微发生改变; 经 2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油处理的菌液, 产生晶体数量减少; 经 20% 灭多威乳油处理过的菌液, 产生芽孢与晶体的数量相当, 晶体形状未见改变, 但其营养体缩短变粗。说明 4.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、40% 辛硫磷乳油和 20% 灭多威乳油对 Bt 菌株的菌体有一定作用, 在与 Bt 制剂混用时应注意这 4 种化学杀虫剂的使用浓度。

2.2 化学杀虫剂对伴胞晶体的影响

经化学杀虫剂处理的伴胞晶体的 SDS-PAGE 图谱见图 1。由 GDS-8000 凝胶成像系统分析 SDS-PAGE 各处理主要晶体蛋白带(见表 2)可以看出: 与未添加化学杀虫剂的空白对照相比, 4.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、2.5% 高效氯氟氰菊酯乳油、2.5% 溴氰菊酯乳油、80% 敌敌畏乳油、48% 毒死蜱乳油、40% 辛硫磷乳油 3 个处理浓度的伴胞晶体蛋白带中, 均有一浓度使蛋白带相对含量在一定程度上有所增加, 作者认为这 6 种化学杀虫剂与 Bt 混用时可能有一最佳使用浓度。经 80% 敌敌畏乳油 500 倍稀释液处理的伴胞晶体的两条主要蛋白带与对照相比含量明显降低, 说明该化学杀虫剂对伴胞晶体有明显损伤作用。其原因还有待研究。经 20% 灭多威乳油处理的伴胞晶体电泳蛋白带未发生明显变化。以上结果说明, 不同化学杀虫剂及其不同浓度对 Bt 伴胞晶体的作用不同, 该结果可为化学杀虫剂与 Bt 制剂混用浓度提供试验依据。

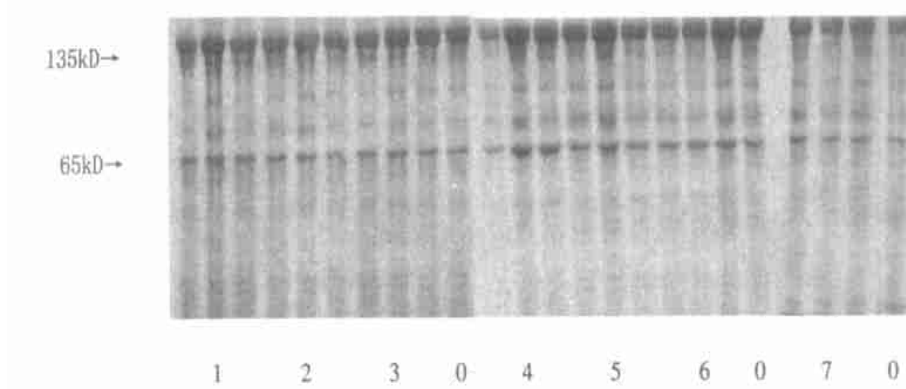


Fig 1 SDS-PAGE for Bt parasporal crystals treated by chemical insecticides for two days

Note: Three electrophoresis strips are one group treated by the same kind of insecticides with different concentrations, 1~ 7 in order. The number and the concentrations are corresponding with table 1. The number zero is untreated by insecticides

Table 2 The content relatively of main protein of parasporal crystal treated by chemical insecticides

Insecticides	Diluent fold	Relative protein content (%)		Insecticides	Diluent fold	Relative protein content (%)	
		135 kD	65 kD			135 kD	65 kD
4 5% <i>beta</i> -	1×10^3	100	100	48%	5×10^2	100	103
cypemethrin EC	2×10^3	115	112	chlorpyrifos EC	1×10^3	109	115
	4×10^3	101	100		2×10^3	101	100
2 5% <i>lanbda</i> -	2×10^3	100	100	40% phoxim EC	5×10^2	100	100
	4×10^3	105	104		1×10^3	100	99
		8×10^3	100		99	2×10^3	111
2 5% deltamethrin EC	1×10^3	100	101	25% methomyl EC	1×10^3	100	105
	2×10^3	105	102		2×10^3	100	100
	4×10^3	100	100		4×10^3	102	100
80%	5×10^2	51	56	CK		100	100
dichlorvos EC	1×10^3	120	118				
	2×10^3	99	108				

应该指出的是,在Bt制剂与化学杀虫剂混用时,在短期内化学杀虫剂对伴胞晶体起到增效作用,但是从长远来看,化学杀虫剂很可能会破坏晶体蛋白的包膜——保护膜,进而缩短Bt制剂的持效期。

2.3 生物测定结果

以1龄末棉铃虫幼虫为供试昆虫,对经以上7种化学杀虫剂长期处理的CH菌株伴胞晶体进行生物测定,结果(见表3)表明,与未用杀虫剂处理的CH伴胞晶体毒效相比较,经2.5%溴氰菊酯乳油、48%毒死蜱乳油、4.5%高效氯氰菊酯乳油、2.5%高效氯氟氰菊酯乳油、20%灭多威乳油和40%辛硫磷乳油处理的CH伴胞晶体毒效均有不同程度的提高,其原因还有待于研究。经80%敌敌畏乳油处理的CH伴胞晶体毒效降低较明显,降低率为46.7%。由此可见,

供试敌敌畏对 CH 伴胞晶体有较强的损伤作用。上述结果与经杀虫剂短期处理的伴胞晶体的电泳图谱相吻合。

Table 3 The effect of seven kinds of chemical insecticides on the bioactivity of CH strain preparation *

Time/d	Item (%)	Insecticides**							Chemical insecticides	
		1	2	3	4	5	6	7	CK+	CK-
2	Mortality	48.9	70.0	86.7	37.8	85.6	86.7	90.0	60.0	5.60
	Adjusted mortality	45.9 ^{cd}	68.2 ^b	85.9 ^a	34.1 ^d	84.7 ^a	85.9 ^a	89.4 ^a	57.6 ^{bc}	
4	Mortality	68.9	87.8	96.7	49.0	88.9	90.0	97.8	78.9	5.60
	Adjusted mortality	67.1 ^d	87.1 ^{be}	96.5 ^a	46.0 ^e	88.2 ^b	89.4 ^a	97.7 ^a	77.6 ^{cd}	

* Means followed by same letters within same rows for treatments are not significantly at 5% level. CK+: The comparison of CH strain preparation untreated by insecticides. CK-: The comparison of water.

** 1. 4.5% beta-cypermethrin EC; 2. 2.5% lambda-cyhalothrin EC; 3. 2.5% deltamethrin EC; 4. 80% dichlorvos EC; 5. 48% chlorpyrifos EC; 6. 40% phoxim EC; 7. 20% methomyl EC.

3 结论与讨论

试验中供试化学杀虫剂均为制剂,不同供试化学杀虫剂可能含有不同种类助剂,本文试验结果只能说明供试制剂对 Bt 芽孢及伴胞晶体的作用,而制剂中的有效成分对 Bt 芽孢及伴胞晶体的作用及影响还有待进一步研究。

常规使用浓度的 48% 毒死蜱乳油对 CH 菌株芽孢萌发的抑制作用较强,2.5% 溴氰菊酯乳油抑制 CH 菌株芽孢萌发的作用稍弱,经这两种杀虫剂长时间处理后的 CH 菌株芽孢均能正常生长;短期内这两种杀虫剂对伴胞晶体无损伤作用,且伴胞晶体经杀虫剂处理 30 d 后,与对照相比,其杀虫活性均有一定程度的提高。作者认为这两种杀虫剂既可在使用时与 Bt 制剂现混现用,也可事先做成混剂。

4.5% 高效氯氟菊酯乳油、2.5% 高效氯氟菊酯乳油、20% 灭多威乳油和 40% 辛硫磷乳油与 Bt 混用时,与未加杀虫剂的 Bt 对照相比,短期内对 Bt 伴胞晶体无损伤作用,且伴胞晶体经杀虫剂处理 30 d 后,杀虫活性亦有一定程度提高,但在长期作用下,Bt 有效成分中芽孢的正常生长受到一定影响,建议与 Bt 现混现用,不宜事先做成混剂。

短期处理后,80% 敌敌畏乳油 500 倍稀释液对 CH 伴胞晶体有明显的损伤作用,因此供试敌敌畏不宜与 Bt 混用,以免降低 Bt 的杀虫效果。

本文仅初步研究了上述 7 种化学杀虫剂对 CH 菌株芽孢及伴胞晶体的影响,苏云金杆菌因菌株不同,芽孢和伴胞晶体的抗逆性有一定的差别,所以上述 7 种化学杀虫剂对其他 Bt 菌株制剂的作用以及是否可与其他 Bt 制剂混用,还应进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 殷向东. 生物源杀虫剂研究应用进展及其在我国的发展思路 [J]. 农药, 1999, 38(11): 45-46
- [2] Heimpel A. M. A Critical review of *Bacillus thuringiensis* Var *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria (Biological Control of Insects) [J]. *Annual Review Entomology*, 1967, 12: 287-322
- [3] 董惠芳, 牛离平. 复方苏云金杆菌商品制剂对捕食螨的影响 [J]. 生物防治通报, 1991, 7(1): 10-12

- [4] 庄占兴, 慕立义, 洪淑梅 苏云金杆菌防治抗药性棉铃虫应用技术研究 [J]. 农药, 1993, 32(6): 6-10
- [5] 冯书亮, 王容燕, 付韵琴, 等 产维生素B₂的苏云金杆菌CH菌株的生物学特性 [J]. 华北农学报, 1997, 12(增刊): 1-7
- [6] 王文军, 钱传范, 申继忠, 等 活性氧对苏云金芽孢杆菌伴胞晶体的损伤作用 [J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 469-474
- [7] 刘丰茂, 钱传范, 江树人 苏云金杆菌制剂蛋白的SDS-PAGE-TLC定量分析 [J]. 植物保护学报, 1998, 25(4): 359-363

Effect of Some Chemical Insecticides on *Bacillus thuringiensis* Spore and Parasporal Crystals

CAO Weiping¹, FENG Shu-liang^{1*}, FAN Xiu-hua¹,
WANG Rong-yan¹, YANG Geng-liang²

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Agricultural & Forestry Science, Baoding 071000, China;

2. College of Chemical & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The effects of seven chemical insecticides on CH strain were reported. The results of the laboratory study showed that 2.5% deltamethrin EC, 48% chlorpyrifos EC had no harmful effects and they can be made as composite preparation with Bt, 4.5% beta-cypermethrin EC, 2.5% lambda-cyhalothrin EC, 20% methomyl EC and 40% phoxin EC had weak harmful effects on Bt spore and they can be tank mixed with Bt for use. 80% dichlorvos was very harmful to parasporal crystals. SDS-PAGE analysis and bioassay also showed the same results.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; chemical insecticides; spore; parasporal crystal

农业图书信息网简介

农业图书信息网(<http://www.agribook.net>), 是全国首家专营农业科技图书经营的站点。本网集出版、零售、提供农业信息为一体, 旨在以最短的时间、最快的速度、最好的服务将最新最好的农业科技图书送到广大农业科技工作者和寻求致富的农友手中。经营范围主要有: 农业类、林业类、生物类、食品类、农业教材类、环保类、化工类等图书、报刊及音像制品。欢迎大家光临本网站, 查询图书、下载目录。

网址: <http://www.agribook.net>

门市部地址: 北京中关村南大街12号 中国农科院幼儿园北门旁

邮购地址: 北京中关村南大街12号 中国农科院 266 信箱 邮编: 100081

联系电话: 010-62116838 传真: 010-62116838