



土壤分离苏云金芽胞杆菌的方法比较

鞠守勇

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430070)

摘要:苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是世界上应用最广的微生物农药,通过比较三种经典的从土壤样品中分离 Bt 的方法,发现 NaAC—抗生素法的分离效果最好,最高分离率 5.06%,平均达到 2.82%,为大规模从土样中分离 Bt 奠定了基础。

关键词:苏云金芽胞杆菌;筛选方法

中图分类号: S154

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2014) 03-0088-03

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是土壤中广泛存在的革兰氏阳性细菌, 在芽胞期能产生一个或者多个伴胞晶体蛋白, 即杀虫晶体蛋白(ICPs, Insecticidal Crystal Protein), 不同的杀虫晶体蛋白 ICPs 对不同昆虫, 以及线虫、螨类和原生动动物等都具有特异性的杀虫活性; 因此 Bt 已经成为世界上应用全最为广泛的微生物杀虫剂, 占整个生物农药产业 90% 以上的市场^[1]。从土壤中筛选出对农业害虫有活性的 Bt 菌株从而取代化学农药, 是“绿色农业”和“有机农业”发展的重要方向之一, 具有十分广阔的开发价值前景。

从土壤中不断分离新的 Bt 资源及时更换当前使用的菌株, 为生产高效的苏云金芽胞杆菌制剂和生产菌株的轮换提供后备资源菌株, 是实现 Bt 产业化发展的重要途径^[1]。随着苏云金芽胞杆菌制剂应用量的增大, 在国内外已经发现多种害虫对苏云金芽胞杆菌的伴胞晶体蛋白产生了不同程度的抗性, 因此土壤中快速筛选新型 Bt 也是防止害虫抗性的最重要的手段之一^[2]。

目前土壤中分离 Bt 的方法主要有 NaCl 法^[2]、

NaAC 法^[3]、NaAC—抗生素法^[3]。本文比较评价了这三种土壤筛选 Bt 的方法, 从中得到了一种比较快速筛选 Bt 的方法。

一、材料与方法

(一)材料

1.菌株

Bt YBT -1520, Bt HD -1, Bt YBT -1765, Bt YBT-1518, Bt CT-43, Bt BMB171 均来自华中农业大学农业微生物学实验室。

2.培养基

LB (Luria-Bertani) 液态培养基: 蛋白胨 10g, 酵母浸出液 5g, NaCl 10g, 定容至 1000mL, pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 30min; ICPM 液态培养基: 蛋白胨 6g, 葡萄糖 5g, CaCO₃ 1g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 0.5g, 定容至 1000mL, pH7.0, 121℃ 灭菌 30min, 固态培养基: 液态培养基中添加 15% (w/v) 琼脂, 121℃ 灭菌 30min。

(二)方法

1. Bt 分离方法

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目优秀中青年人才项目(项目编号: Q20116001)。

作者简介: 鞠守勇(1981-), 男, 山东泰安人, 武汉职业技术学院讲师, 华中农业大学在读博士, 研究方向: 微生物农药。

称取 1.0g 土壤土样放入分别放入 100mL, 含有 4% NaCl (NaCl 法), 0.25mol/L NaAC (NaAC 法), 0.25mol/L NaAC, 400ug/mL 青霉素和硫酸庆大霉素 LB 等液体培养基中 (NaAC—抗生素法) 中, 加入一定数量的灭菌玻璃珠充分混匀, 200r/min 培养 1~8h, 75℃水浴 10min, 静置 30min, 离心, 取 1mL 上清液梯度稀释, 选取 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 三个稀释度, 涂布 ICPM 固体培养基上, 28℃培养 36h, 石炭酸复红染色, 100 倍油镜镜检观察, 有伴胞晶体的菌株为苏云金芽胞杆菌^[2]。

2. Bt 芽胞萌发实验

在测量芽胞萌发率时, 首先将制备的芽胞离心收集, 并用灭菌水将芽胞悬浮至 OD600nm ≈ 1.0, 用灭菌水离心洗涤芽胞 3 次, 备用。取等量的芽胞分别加入 4% NaCl, 0.25mol/L NaAC, 0.25mol/L NaAC—抗生素 LB 培养液中, 培养不同的时间; 检测培养条件下芽胞悬浮液在 600nm 的光密度, 检测前将试管摇动至少 30s, 使芽胞均匀分布。随后再用相差显微镜观察芽胞萌发情况, 评价其萌发效果^[7]。

二、结果与分析

(一) 三种培养条件不同处理时间对 Bt 芽胞萌发率的影响

土壤中分离 Bt 的原理在 30℃下抑制 Bt 芽胞的萌发, 随后用 75℃水浴 10min 处理将处于营养期的其他细菌杀死, 从而达到富集 Bt 的目的。为了比较三种不同方法的分离效果, 本文探讨了 Bt 在 4% NaCl, 0.25mol/L NaAC, 0.25mol/L NaAC—抗生素中三种培养条件下不同时间 Bt 的萌发情况 (表 1)。研究结果表明 Bt 在三种培养液中 4 个小时均未萌发, 在 0.25mol/L NaAC—抗生素中的萌发时间最长一直到 6 个小时才能萌发, 实验表明三种培养液中

表 1 不同处理时间对 Bt 芽胞萌发率的影响

方法	时间(H)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
4% NaCl	-	-	-	-	±	+	+	+
0.25mol/L NaAC	-	-	-	-	±	+	+	+
NaAC—抗生素法	-	-	-	-	-	+	+	+

注: + 表示 Bt 芽胞萌发, - 表示 Bt 芽胞不萌发; 结果不定或极少数萌发。

表 2 三种不同培养基中不同 Bt 芽胞萌发情况

菌株	生长情况		
	4% NaCl 培养液	0.25mol/L NaAC 培养液	0.25mol/L NaAC—抗生素培养液
Bt YBT-1520	±	-	-
Bt HD-1	-	+	-
Bt YBT-1765	-	±	-
Bt YBT-1518	+	-	-
Bt CT-43	-	-	-
Bt BMB171	-	-	-

注: + 表示生长, - 表示不生长; 极少生长或生长。

0.25mol/L NaAC—抗生素抑制 Bt 萌发的效果最好, 6 小时后 Bt 才开始萌发。

(二) 三种不同培养基中不同 Bt 的萌发情况

6 种不同 Bt 分别含有 NaCl, NaAC, NaAC—抗生素培养液中培养 4 小时后, 观察芽胞萌发情况, 表 2 实验结果表明在 4% NaCl, 0.25mol/L NaAC, 0.25mol/L NaAC—抗生素中三种培养条件下培养 4 个小时大部分 Bt 的均未萌发, 其中 4% NaCl, 0.25mol/L NaAC 培养液能抑制大部分 Bt 的萌发, 而 0.25mol/L NaAC—抗生素培养液中所以 Bt 均未萌发, 其对不同 Bt 的萌发抑制效果最明显。

表 3 三种不同培养基对不同来源土样 Bt 分离效果的比较

土样	采集地	生长情况								
		4% NaCl			0.25mol/L NaAC			0.25mol/L NaAC—抗生素		
		总菌落	Bt 菌落	分离率	总菌落	Bt 菌落	分离率	总菌落	Bt 菌落	分离率
A4	湖北武汉	63	0	0.00%	43	1	2.33%	36	1	2.78%
A9	湖北宜昌	97	0	0.00%	48	1	2.08%	43	1	2.33%
A13	湖北武穴	37	1	2.70%	63	2	3.17%	49	1	2.04%
A37	湖北神农架	132	1	0.76%	113	3	2.65%	79	4	5.06%
B6	河南郑州	54	0	0.00%	63	1	1.59%	58	1	1.72%
B9	河南驻马店	69	1	1.45%	96	1	1.04%	62	1	1.61%
B23	河南郑州	52	0	0.00%	85	1	1.18%	63	2	3.17%
C5	广东深圳	85	2	2.35%	55	1	1.82%	74	2	2.70%
D17	山东泰安	59	1	1.69%	76	1	1.32%	59	1	1.69%
E9	云南丽江	61	2	3.28%	45	1	2.22%	79	3	3.80%
总计		709	8	1.13%	687	13	1.89%	602	17	2.82%

鞠守勇: 土壤分离苏云金芽胞杆菌的方法比较

(三)三种不同培养基对不同来源土样 Bt 分离效果的比较^[1,5,6]

不同来源的 10 份土壤样品使用 3 种不同的分离比较 Bt 的分离效率方法,结果见表 3。结果表明 NaCl 分离方法在 10 份土样中得到菌落总数为 709 个,其中分离到 8 株 Bt,总分离率为 1.13%;NaAC 分离法分离得到菌落总数为 687 个,其中分离到 13 株 Bt,总分离率为 1.89%;NaAC—抗生素分离法分离得到菌落总数为 602 个,其中分离到 17 株 Bt,总分离率为 2.82%;从数据上显示 NaCl 分离方法与 NaAC 分离法分离效果相当,NaAC—抗生素分离法分离 Bt 效果优于其他两种方法。

三、小结与讨论

农业害虫对农作物的危害很大,长期的化学防治导致有害甲虫对常用的农药产生了抗性,甚至有些地区农业害虫对几乎所有化学杀虫剂产生了高水平的抗性。因此急需一种可以替代化学农药的生物农药^[5]。

本研究比较了三种经典的土壤中分离 Bt 的方法,发现其中 NaAC—抗生素分离法分离 Bt 效果优于 NaCl 和 NaAC 分离方法其他两种方法,但是由于 NaAC—抗生素分离法加入了青霉素和硫酸庆大霉素,因此也提高了相应的分离成本。本文为探索了从土壤中快速分离 Bt 的方法,为从土壤中大规模分离

有活性的 Bt 菌株,开发具有我国自主知识产权的微生物农药,提供了方法学上的基础。

参考文献:

- [1] 喻子牛.苏云金杆菌[M].北京:科学出版社,1990.
- [2] 陈在俚.一种从土壤中分离苏云金杆菌的新方法[J].中国生物防治,1996,12(2):75-77.
- [3] 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):5.
- [4] 竺莉红,施跃峰.苏云金芽胞杆菌 Ba9808 对鞘翅目害虫的生物活性[J].浙江农业学报,2002,14(6):331-333.
- [5] 宋萍,王勤英,吴会贤,等.苏云金芽胞杆菌 WZ-9 菌株对马铃薯瓢虫的毒力及其杀虫基因的研究[J].农业生物技术学报,2008,16(3):515-520.
- [6] 蔡启良,刘子铎,喻子牛.苏云金芽胞杆菌生物活性成分研究进展 [J]. 应用与环境生物学报,2003,9(2):207-212.
- [7] 吴艳艳,孙长坡,高继国,等.苏云金芽胞杆菌 HD-73 菌株芽孢萌发条件的优化及质粒 pHT73 对芽孢萌发的影响[J].中国农业科技导报,2007(3):103-108.
- [8] Travers RS, Martin PA, Reichelderfer CF. Selective Process for Efficient Isolation of Soil Bacillus spp [J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(6):1263-1266.

[责任编辑:孔康伟]

The Comparison of Methods Isolated Bacillus Thuringiensis from soil

JU Shou-yong

(School of Bioengineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: Bacillus thuringiensis (Bt) is the most widely used microbial pesticides in the world. This paper compared three classic Bt isolated methods and found that the best one was NaAC-antibiotic methods, the maximum isolation rate was 5.06 %, the average was 2.82 %. It established the foundation for the further research on the large-scale Bt isolated from soil.

Key words: bacillus thuringiensis; screening methods