

苏云金杆菌 (Bt)研究 论文集

吴继星 陈在佖 等编著

)(Bt)(Bt)

中国农业科学技术出版社

苏云金杆菌 (Bt) 研究论文集

吴继星 陈在佺 等编著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

苏云金杆菌 (Bt) 研究论文集/吴继星, 陈在佺等编著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2006. 10
ISBN 7-80233-102-1

I. 苏… II. ①吴…②陈… III. 苏云金杆菌 - 文集
IV. Q939.124 - 53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 115797 号

责任编辑 徐平丽
责任校对 贾晓红
出版发行 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 68919704 (发行部) (010) 62189014 (编辑室)
(010) 68919703 (读者服务部)
传 真 (010) 68975144
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 新华书店北京发行所
印 刷 者 北京科信印刷厂
开 本 787 mm × 1092 mm 1/16
印 张 11
字 数 270 千字
版 次 2006 年 10 月第 1 版 2006 年 10 月第 1 次印刷
印 数 1 ~ 600 册
定 价 35.00 元

❖ 版权所有 · 侵权必究 ❖



吴继星和武汉大学孟小林教授、河北农科院冯书亮教授在一起



吴继星照



吴继星在菲律宾



吴继星在国际水稻研究所(菲律宾)



吴继星工作照



吴继星工作照



吴继星在非洲肯尼亚



吴继星在非洲肯尼亚



吴继星和 Bt 中心办公室韦文红、林艳在一起



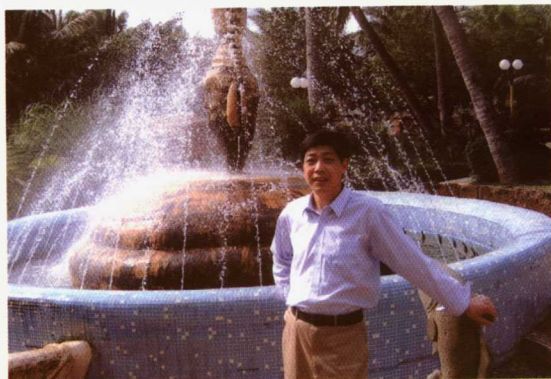
吴继星和 Bt 中心办公室韦文红同志在一起



吴继星在实验室



吴继星、陈在珥和 Bt 中心张碧海同志在一起



吴继星照



吴继星在查资料



吴继星工作照



吴继星、陈在佺夫妻在一起



陈在佺照



陈在佺工作照



陈在佺工作照



吴继星工作照



吴继星父子在一起(儿子吴超在德国)



吴继星照



陈在佴照



陈在佴照



陈在佴照



陈在佴照



陈在佴照

编著人员名单

石鹏皋	研究员	湖北省林科院（原院长）
孟小林	教授	武汉大学生科院
张友清	研究员	中国科学院武汉病毒研究所
陈在佺	副研究员	湖北省农科院 Bt 研究开发中心
吴继星	研究员	湖北省农科院 Bt 研究开发中心
彭辉银	研究员	中国科学院武汉病毒研究所

作者简介

吴继星,男,研究员,1946年6月出生,汉族,湖北天门人,中共党员,毕业于华中农学院。曾任湖北省农科院 Bt 研究开发中心和湖北省生物农药工程研究中心副主任,湖北康欣农药业有限公司副总经理、总工程师,国务院特殊津贴享受者。主持国家“八五”、“九五”重点攻关课题“苏云金杆菌杀虫剂的研制与应用”。主要成果:“苏云金杆菌天门变种(7216)的分离研究与应用”获1978年全国科学大会奖和湖北省科学大会奖;“苏云金杆菌效价测定标准化技术”和“苏云金杆菌杀虫剂的生产与应用新技术”分别获1990年、1991年农业部科技进步二等奖;“中国苏云金杆菌杀虫剂的商品生产、质量标准及应用”获1995年国家科技进步二等奖;“苏云金杆菌 MP-342 的研究”获1999年度湖北省科技进步二等奖;“八五”攻关成果得到国家计委、国家科委和财政部的表彰;研究、开发的 Bt 粉剂是唯一被国家科委列入“国家重点科技成果推广计划”的 Bt 杀虫剂;筛选获得优秀 Bt 菌株和优良发酵培养基配方,攻克了噬菌体污染难关,使 Bt 发酵水平和噬菌体防治水平达到国家领先水平,产品质量达到国际水平,产品大量出口欧美及东南亚各国,该成果获2001年度湖北省科技进步一等奖。“八五”、“九五”期间,利用该成果创纯利1 000多万元,防治农作物害虫面积1亿多万亩,新增工农业产值10亿多元。2001年以来,又获多项国家专利,新成果“马尾松毛虫专用 Bt 新剂型及应用技术研究”再获湖北省科技进步一等奖。发表论文和译文120多篇,发表科普文章800多篇,其中多篇论文被联合国粮农组织《Agrindex》及《Review of Agricultural Entomology》、《Review of Applied Entomology》等摘录。获湖北省有突出贡献的中青年专家,1999年荣获湖北省推进农业产业化经营先进个人称号,2001年湖北省人民政府授予“农业科技先进工作者”称号,湖北省劳动模范,事迹入选《中华人物辞海》、《中国专家大辞典》、《21世纪人才库》等。

前言

《苏云金杆菌 (Bt) 研究论文集》汇集了编著者从 1970 ~ 2006 年从事苏云金杆菌研究工作的主要内容。内容涉及苏云金杆菌菌种分离筛选技术, 菌株分类鉴定和保藏, 发酵培养基的优选, 发酵工艺的优化, 噬菌体的防治以及应用技术的研究。

苏云金杆菌之所以独立于蜡状芽孢杆菌成为一类, 其主要原因是该菌能产生含有蛋白质晶体毒素等多种杀虫活性物质。如何获得毒效高、发酵性能好、抗噬菌体能力强的优良菌株, 先进的分离方法显得特别重要。为此, 我们研究了一种从土壤中分离苏云金杆菌的新方法——NaCl 分离法。该法与 AC 分离法和无菌水稀释法相比, 分离率分别提高 1.4 倍和 21.7 倍。我国微生物 (包括苏云金杆菌) 资源十分丰富, 许多研究单位陆续分离获得一些高效苏云金杆菌新菌株, 正拟开发用于工业化发酵生产中。

苏云金杆菌新菌株的不断发现为 Bt 的研究开辟了更加广阔的前景。我们除了从土壤、仓库粉尘、水体中分离 Bt 菌株外, 还特别从死亡昆虫尸体中分离 Bt 菌株。例如, 首次从一自然死亡的舍蝇幼虫中分离到一株对棉铃虫高毒的 Bt 菌株—79007, 从棉花卷叶螟幼虫中分离到 Bt - 94001 菌株, 还分离到对蚊子幼虫高毒的 Bti99 - 11 菌株。这些菌株均已用于发酵生产。

由于欧洲国家不提倡使用工程菌生产 Bt 制剂, 所以我们通常使用自然菌株进行发酵生产。为了稳定和提高自然菌株的毒力及其发酵性能, 我们仍然采用物理化学诱变和虫体复壮等常规技术, 先后选育获得对棉铃虫、甜菜夜蛾、蚊幼高毒力的优良菌株。实践证明, 这些传统方法仍然是 Bt 优良菌株选育的有效手段。

苏云金杆菌 (Bt) 发酵培养基配方直接影响到发酵水平、制剂的质量和田间应用效果。为了获得高水平的发酵培养基配方, 许多研究人员相继采用正交设计、快速登高法、优选法和二次旋转组合设计等方法, 取得了一定的成效。在此基础上, 我们设计了一套新的 Bt 发酵培养基配方的优选模型: 正交试验—浓度加倍—生物测定 (晶体蛋白质测定)。这个模型可以采用低浓度配方, 根据一定的碳氮比原理, 进行浓度加倍, 在高浓度培养基上实现高产优质, 具有试验容易、快速获得优良培养基配方的特点。该方法可在微生物发酵培养基优选研究中获得广泛的应用。针对欧美等发达国家在 Bt 杀虫剂的发酵生产中采用的原料价格贵、成本高, 我们则大量采用棉饼粉、豆饼粉、玉米浆等廉价的农副产品和工业下脚料, 大大降低了成本, 提高了我国 Bt 制剂在国际上的竞争力。

众所周知, 在苏云金杆菌 (Bt) 液体深层工业化发酵中, 为害最大的是噬菌体。早在 20 世纪 70 年代, 国内曾有 30 多个厂家, 大多因为噬菌体倒罐而被迫关闭, 其倒罐率均在 10% 以上, 有时高达 50%。我们从生产车间环境中分离获得了为害发酵生产的 4 类噬菌体, 对其特性进行了研究。在此基础上, 选育出耐温菌株并摸索出一套既适合该菌株正常生长繁殖, 又能避开噬菌体敏感侵染期的发酵工艺, 经对本单位发酵工厂 1986 ~ 1994 年噬菌体发生量的测定, 进行了 Bt 发酵中环境温湿度与噬菌体流行关系的研究, 总结出一套综合防治措施, 即严格把好菌种关、原料关、消毒关、空气关、罐温控制和季节关 5 关, 攻克了噬菌体的为害。从 1999 ~ 2006 年 8 年中, 创造了 2000 批无噬菌体污染的

新纪录。

本论文集是编著者 1979 ~ 2006 年发表的论文, 共 39 篇, 按发表时间顺序编排。编著者之一吴继星毕业于原华中农学院, 在陈华癸院士、周启教授、喻子牛教授以及天津南开大学任改新教授等众多德高望重恩师的教导和影响下, 从事微生物学, 特别是苏云金杆菌的研究、生产和应用达 30 多年。为此, 特向导师们深表敬意。陈在佺同志从 1982 年以来, 在 Bt 菌株选育、发酵培养基筛选以及发酵工艺的优化方面作出了许多创造性的工作。本书在編集过程中, 得到了湖北省农科院生物农药工程研究中心杨自文、舒金树、张碧海、施天柱、曹昭斌、黄兴华、王开梅、程贤亮、王海宁、徐德宝、曹春霞、胡洪涛、陈伟、江爱兵、周荣华、林艳、万忠义、廖先清等同志的大力支持, 特别是刘翠君、韦文红两位女士做了大量的前期工作, 在此一并致谢。

论文集难免会有错误和遗漏, 恳请同行专家指教为感。

编著者

2006 年 8 月

目 录

苏云金杆菌天门变种——“7216”菌的研究	(1)
在不同昆虫体内连续传代对苏云金杆菌晶体形成的影响	(5)
苏云金杆菌天门变种 (7216) 抗噬菌体菌株的选育	(9)
苏云金杆菌抗噬菌体血清的制备及应用	(14)
苏云金杆菌一些菌株保藏方法的研究	(17)
苏云金杆菌制剂的生产和应用	(21)
苏云金杆菌——“75002”菌的研究	(26)
7216 杀虫菌制剂的应用效果	(29)
苏云金杆菌 (7216) 的诱变选育	(34)
用红铃虫进行虫体复壮对苏云金杆菌毒力的影响	(38)
苏云金杆菌 85-10-6 (S) 发酵培养基的筛选	(41)
苏云金杆菌耐温菌株的选育及其应用	(45)
苏云金杆菌 (H_{3a3b}) 发酵中常见噬菌体的研究	(49)
以棉饼粉为主的 Bt 发酵培养基的筛选	(54)
湖北省苏云金杆菌资源调查初报	(58)
细菌生物防治蚊子研究进展	(62)
苏云金杆菌的生物技术研究新进展	(65)
苏云金杆菌无芽孢突变菌株的选育	(68)
苏云金杆菌高效培养基优选模型的研究	(72)
一株对棉铃虫高效的苏云金杆菌	(77)
苏云金杆菌研究进展	(81)
一种从土壤中分离苏云金杆菌的新方法	(84)
对棉铃虫高毒的苏云金杆菌“79007”菌研究	(88)
苏云金杆菌 79007 发酵上清液对棉铃虫的毒力作用	(93)
苏云金杆菌发酵中环境温湿度对噬菌体污染影响的研究	(96)
苏云金杆菌菌种保藏	(101)
Commercialization of <i>Bacillus thuringiensis</i> Insecticides in China	(105)
我国苏云金杆菌液体深层发酵研究十年进展 (1990~2000)	(113)
苏云金杆菌不同菌株混合发酵对发酵效价和蛋白含量的影响	(117)
蜡质芽孢杆菌 12-14 菌株对苏云金杆菌增效作用的研究	(121)
苏云金杆菌菌株 Bti99-11 的研究	(125)
对甜菜夜蛾高毒苏云金芽孢杆菌菌株的选育	(130)

对甜菜夜蛾高毒苏云金芽孢杆菌菌株 CZE99985 的研究	(136)
对蚊幼高毒苏云金芽孢杆菌菌株的选育	(141)
苏云金杆菌 WG-001 工程菌发酵培养基的筛选	(145)
噬菌体在苏云金芽孢杆菌发酵中的感染因素	(150)
苏云金杆菌 99-11 菌株培养条件的研究	(155)
苏云金芽孢杆菌 “94001” 菌株发酵工艺的优化	(160)
苏云金杆菌 “79007” 菌株发酵工艺的研究	(164)

苏云金杆菌天门变种——“7216”菌的研究*

1972 年从棉花铃虫 (*Pectinophora gossypiella* Saunders) 中分离出一株能形成伴孢晶体的芽孢杆菌“7216”。该菌具有苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的典型特征^[1]。血清型属 H_{3a3b}, 但培养特征、生化特性有别于 H₃ 中的阿莱变种和戈尔斯德变种, 认为是苏云金杆菌的一个新变种, 定名为苏云金杆菌天门变种 *Bacillus thuringiensis* var. *tianmensis* (7216)。

我们从自然死亡的越冬红铃虫幼虫的尸体中分离到一株产晶体毒素的芽孢杆菌, 代号为“7216”。该菌具有苏云金芽孢杆菌群的典型特征。毒性试验表明, 对试验动物无致敏反应, 未见病理变化, 是一种比较安全的杀虫菌。本文介绍“7216”菌的生物学特性及其分类地位。

材料和方法

一、菌株来源

“7216”菌系从自然死亡的越冬红铃虫的尸体中分离得到。对照菌株来源见表 1。

表 1 对照菌株及其来源

菌 号	菌 名	血清型	来 源
009	苏云金杆菌苏云金变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>)	H ₁	
021	苏云金杆菌幕虫变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>)	H ₂	引自武汉大学
E ₋₃	苏云金杆菌阿莱变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>)	H _{3a}	
Kurstaki	苏云金杆菌戈尔斯德变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>)	H _{3a3b}	引自中国科学院动物研究所
016	苏云金杆菌猝倒变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>)	H _{4a4b}	
023	苏云金杆菌肯尼亚变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kenyae</i>)	H _{4a4c}	引自武汉大学
087	苏云金杆菌蜡螟变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>)	H _{5a5b}	引自湖北省农业科学院
010	苏云金杆菌杀虫变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>)	H ₆	
096	苏云金杆菌鲇泽变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>)	H ₇	引自武汉大学
012	苏云金杆菌莫里逊变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i>)	H ₈	
013	苏云金杆菌多窝变种 (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>)	H ₉	

二、形态及培养特征

在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上接种, 30℃ 培养 24h 后观察。

在牛肉膏蛋白胨摇瓶中培养 6~8h 涂片镜检。

鞭毛及运动性的观察采用半固体平板培养, 转接活化 3~5 代, 取 8h 左右的培养物制成悬液, 活体观察, 并进行了电镜观察。

* 原载微生物学报, 1980, 20 (1)

三、生化反应

各种生化反应均按常规方法进行^[2-5]。

四、血清学试验

1. H 抗原的制备：将各菌株分别接种于半固体平板上进行鞭毛活化培养，连续 5 次，然后选取活动性最强的群体接种摇瓶，置 30℃ 振荡培养 8 ~ 10h。离心，收集菌体，悬浮于 0.4% 甲醛盐水中，制成浓的 H 抗原悬液，再于 30℃ 24h 灭活后，置 4℃ 冰箱中保存备用。

2. 抗血清的制备：将制备的抗原经耳缘静脉注射家兔，获得抗血清。第 1 ~ 2 次注射 0.5ml，第 3 ~ 4 次注射 1ml，第 5 次注射 1.5ml。除第 4 ~ 5 次间隔 2d 外，其余每次间隔 1d。最后一次注射后的第 5d，心脏采血，分离抗血清，置冰箱保存。

3. 凝集试验、凝集吸收试验：按常规血清试验方法进行^[2-6]。

结 果

一、形态及培养特征

接种牛肉膏蛋白胨摇瓶培养 6 ~ 8h 后观察，“7216”菌具苏云金杆菌的典型特征：革兰氏染色阳性，营养细胞杆状，两端钝圆，具周身鞭毛，能运动，通常 2 ~ 4 联，多为两联，大小为 $1.0\mu\text{m} \times 2.4 \sim 4.4\mu\text{m}$ ，呈粗短杆状，孢子囊不膨胀，芽孢卵圆形，伴孢晶体多呈短菱形，大小为 $0.8 \sim 1.4\mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.6\mu\text{m}$ 。菌落圆形，表面粗糙，边缘不整齐。

“7216”菌在牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基上，菌落扩展快，30℃ 培养 24h，菌落直径可达 6 ~ 8mm，且表面常无皱纹。对照菌苏云金变种、戈尔斯德变种等通常具有明显的皱纹。

二、生化特性

对照菌株基本能重复其原始性状。血清型 H₃ 中 3 株菌的生化反应结果见表 2。

表 2 H₃ 型中 3 株菌的生化反应结果

菌种	葡萄糖	水解蛋白	蔗糖	纤维二糖	色素	水杨苷	七叶灵	甘露糖	水解淀粉	脲酶	V. P. 试验	菌膜	卵磷脂酶
E ₋₃	+	++	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
HD -1	+	+	-	+	±	+	++	-	+	++	+	-	+
“7216”	+	++	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-

注：+ 发酵；- 不发酵；± 弱发酵或结果不定。

表 2 结果表明，“7216”菌 V. P. 反应阳性，卵磷脂酶反应阴性（对照菌阿莱变种、戈尔斯德变种 HD -1 为阳性），能利用水杨苷，在卵黄培养基上不产生色素（对照菌阿莱

变种能产生色素), 脲酶和七叶灵呈弱阳性反应 (对照菌戈尔斯德变种呈强阳性反应), 水解淀粉和蛋白能力强, 能利用纤维二糖, 不能利用蔗糖和甘露糖。

三、血清反应

经鉴定, “7216”菌属苏云金杆菌血清型 H₃。交叉凝集试验结果见表 3。

表 3 交叉凝集试验结果

效 价 抗 体	抗 原	009	021	E ₋₃	016	023	087	010	096	012	013	“7216”
009		20 480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
021		0	20 480	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E ₋₃		0	0	20 480	0	0	0	0	0	0	0	10 240
016		0	0	0	20 480	320	0	0	0	0	0	0
023		0	0	0	5 120	20 480	0	0	0	0	0	0
087		0	0	0	0	0	20 480	0	0	0	0	0
010		0	0	0	0	0	0	20 480	0	0	0	0
096		0	0	0	0	0	0	0	20 480	0	0	0
012		0	0	0	0	0	0	0	0	20 480	0	0
013		0	0	0	0	0	0	0	0	0	20 480	0
“7216”		0	0	10 240	0	0	0	0	0	0	0	20 480

为了证明“7216”菌与阿莱变种、戈尔斯德变种的抗原成分是否完全相同, 我们进行了交叉凝集吸收试验, 结果见表 4。

表 4 交叉凝集吸收试验结果

抗血清	吸收抗原	试 验 菌		
		阿莱变种	戈尔斯德变种	“7216”
阿莱变种	—	10 240	10 240	10 240
	戈尔斯德变种	80	—	—
	“7216”	40 ~ 80	—	—
戈尔斯德变种	—	10 240	10 240	10 240
	阿莱变种	—	160 ~ 320	160 ~ 320
	“7216”	—	—	—
“7216”	—	10 240	10 240	10 240
	阿莱变种	—	160 ~ 320	160 ~ 320
	戈尔斯德变种	—	—	—

表 4 表明, 苏云金杆菌阿莱变种、戈尔斯德变种和“7216”菌之间均能发生强烈的交叉凝集反应, 说明它们都具有一个共同的抗原成分 a; 阿莱变种的抗血清被戈尔斯德变

种的抗原吸收后, 仍能以较低的效价与本抗原相凝集; 阿莱变种的抗血清被“7216”菌的抗原吸收后, 也能以较低的效价与本抗原相凝集; 戈尔斯德变种的抗血清被阿莱变种的抗原吸收后, 仍能以较高的效价与本抗原和“7216”菌的抗原相凝集; “7216”菌的抗血清被阿莱变种的抗原吸收后, 也能以较高的效价与本抗原和戈尔斯德变种的抗原相凝集。由此说明, 戈尔斯德变种与“7216”菌均有一个第二抗原成分 b, 这是阿莱变种所缺少的。因此, 阿莱变种的血清型应为 H_{3a} , “7216”菌与戈尔斯德变种为同一血清型, 即 H_{3a3b} 。

综上所述, “7216”菌的生化反应、血清抗原成分与阿莱变种不同。“7216”菌的血清抗原成分虽与戈尔斯德变种相同, 但生化特性却不同, 其毒性也有差别, 故认为“7216”与戈尔斯德变种是两个不同的生物型。

参考 de Barjac 和 Bonnefoi 关于苏云金杆菌分类的论述和检索表, 将“7216”菌定为新变种——苏云金杆菌天门变种 *Bacillus thuringiensis* var. *tianmensis* (7216)。

参考文献

- [1] 刘崇乐等. 苏云金杆菌研究的五十年. 北京: 科学出版社, 1962
- [2] 中国科学院动物研究所昆虫病理组. 昆虫病原细菌“010”的鉴定. 昆虫学报, 1973, 16 (1): 91~93
- [3] 任改新等. 昆虫病原菌苏云金芽孢杆菌群 (*Bacillus thuringiensis* group) 的分类. 微生物学报, 1975, 15 (4): 292~301
- [4] 武汉大学生物系微生物专业 70 级工农兵学员杀虫菌鉴定小组等. 几种细菌杀虫剂的菌种鉴定. 微生物学报, 1975, 15 (1): 5~14
- [5] 湖北省微生物研究所虫生菌组. 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 无鞭毛变种“140”菌的研究. 微生物学报, 1976, 16 (1): 12~16
- [6] 齐良才等. 细菌血清学检验手册. 北京: 人民卫生出版社, 1962

A NEW VARIETY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER

A parasporal crystal forming bacillus “7216” was isolated from dead *Pectinophora gossypiella* Saunders in 1972. This bacillus has the typical characteristics of *Bacillus thuringiensis*. Its serotype belongs to H_3 , but it is distinguished from variety *alesti* and variety *kurstaki* in cultural characteristics and biochemical reactions. This bacillus is therefore, considered to be a new variety and the trinomial *Bacillus thuringiensis* var. *tianmensis* (7216) is proposed.

Bacillus thuringiensis var. *tianmensis* (7216) is easy to cultivate by industrial fermentation and to be used as an insecticide. It is more effective in the control of *Pectinophora gossypiella* than any other microbial insecticides commonly used in this country.

Type culture of this new variety is deposited in Tianmen Institute of Microbiology, Hubei, China.