

我国四个自然保护区森林土壤中 苏云金芽孢杆菌的分布*

戴莲韵 王学聘 杨光滢 张万儒

摘要 从我国四个不同立地带——长白山、百花山、鼎湖山、尖峰岭自然保护区,采集到林下0~5 cm土层土壤样品75个,分离到苏云金芽孢杆菌39株。其中芽孢杆菌的总数量和苏云金芽孢杆菌的出土率和分离率有所差异,pH偏中性和含水量稍高的土壤,菌数较高;而与所测的各种土壤养分无明显相关。对39株苏云金芽孢杆菌的鉴定:17株属库尔斯塔亚种,6株属松蠹亚种,16株未定名。毒力测定表明:对杨扇舟蛾和马尾松毛虫幼虫的致死率在50%以上的菌株约占70%;对榆蓝叶甲和黄粉甲幼虫均无明显杀虫活性。

关键词 自然保护区、森林土壤、芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* Berliner)是目前微生物防治害虫的主要手段之一,也是当今唯一能进行大规模工业生产的商业性微生物农药,美、前苏联等国年产量均在万吨以上,在森林害虫防治中占有重要地位^[1]。近年来由于生物技术的发展,苏云金杆菌 δ -内毒素杀虫蛋白基因成功地转移到植物植株细胞,从而获得抗虫转基因植株^[2]。因此开发苏云金杆菌的资源,是发展细菌杀虫剂和抗虫育种研究的重要基础。长期以来,人们从自然感病昆虫以及昆虫饲养的环境和粪便中分离这一类型的昆虫病原,并对其分布和高毒力菌株的筛选进行了广泛的研究,日本Ohba等^[3]对日本部分森林土壤中苏云金杆菌的生态分布及资源进行了研究,发现了对鳞翅目、膜翅目害虫有效的新菌株和新亚种。美国Delucca等^[4]报道了美国土壤中苏云金杆菌的分布。我国李荣森等^[5]对我国部分省份的农田土壤苏云金杆菌的分布进行了调查,提供了大量新资源。上述结果表明,苏云金杆菌是土壤中栖息的微生物之一,有着广泛的分布。我国有着丰富的土壤资源,特别是那些保持原来地貌,不同立地带的森林土壤,对于苏云金芽孢杆菌资源的开发利用及生态分布的研究有着特殊的意义。为此,1990~1993年较系统地研究了13个自然保护区森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布。本文报道了其中长白山、百花山、鼎湖山和尖峰岭四个自然保护区的研究。

1 材料和方法

1.1 四个自然保护区自然概况

详见表1。

1993-06-07收稿。

戴莲韵副研究员,王学聘、杨光滢、张万儒(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)。

*本研究属国家自然科学基金项目“我国森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布的研究”部分内容。顾欣(原北京农业大学生物学院91届毕业实习生)参加部分工作。

表1 四个自然保护区自然概况

立地带	自然保护区	土壤类型	主要生长树种	采集土样	
				海拔高度(m)	数量(个)
中温带	长白山	针阔叶混交林下暗棕壤	长白落叶松(<i>Larix olgensis</i> Henry), 红松(<i>Pinus koraiensis</i> Sieb. et Zucc.), 水曲柳(<i>Fraxinus mandshurica</i> Rupr.)等	600	13
		落叶松林下棕壤	华北落叶松(<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr), 油松(<i>Pinus tabulaeformis</i> Carr.), 栎(<i>Quercus</i> spp.)等		
暖温带	百花山	季风常绿阔叶林下砖红壤性红壤	椎栗(<i>Castanea henryi</i> (Skan) Rehd. et wils.), 厚壳桂(<i>Cryptocarya chinensis</i> (Hance) Hemsl.), 云南银柴(<i>Aporosa yunaneses</i> (Champ.) Merr.)等	200	20
南亚热带	鼎湖山	山地雨林下砖红壤性黄壤	红稠(<i>Lithocarpus fenestratus</i> Rehd.), 子京(<i>Madhuca hainanensis</i> Chun et How), 厚壳桂(<i>Cryptocarya chinensis</i> (Hance) Hemsl.)等	800	20

1.2 土样采集

采用随机踏采的方法, 采自四个自然保护区林下0~5 cm土层的土壤(表1)。

1.3 土壤中芽孢杆菌及苏云金芽孢杆菌的分离

1.3.1 分离培养基 牛肉膏0.5%, 蛋白胨1%, 琼脂粉1.5%, 水1 000 ml, pH7.2~7.5。

1.3.2 分离方法 在无菌室内取土样0.5 g, 放入含有玻璃珠和 50 ml 灭菌蒸馏水的三角瓶中, 机械振荡10 min后, 80℃水浴处理20 min。取悬浮液, 用10倍稀释法平板记数, 按土壤细菌菌落计算方法^[6], 计算每克干土中芽孢杆菌的总数。并从每类土壤样品的平皿中, 随机挑取芽孢杆菌单菌落60~150个, 涂片, 用碱性复红染色, 镜检, 凡产生伴孢晶体的芽孢杆菌再进行分离、纯化、鉴定。

1.4 苏云金芽孢杆菌亚种的鉴定

主要采用11项生理生化特性及营养细胞酯酶型相结合的方法^[7]。

1.5 土壤pH、含水量和养分测定

用S-3型pH酸度计(上海第二分析仪器厂)测定土壤悬浮液的pH值。采用国家标准进行土壤养分分析, 测定土壤全N, 水解性N, 有效P, 速效K, 有机质及含水量(吸水量)^[8]。

1.6 室内生物测定

1.6.1 供试昆虫 杨扇舟蛾 [*Closter anachoreta* (Fabricius)] 2~3龄幼虫; 马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 2龄幼虫; 榆蓝叶甲 (*Pyrrhalta aenescens* Fairmaire) 及黄粉甲 (*Tenebrio molitor* Linnaeus) 幼虫。

1.6.2 测定方法 将分离、纯化、鉴定后的苏云金芽孢杆菌菌株, 移接于分离培养基斜面上, 30±1℃培养3~4 d后, 使之产生芽孢和伴孢晶体, 每个菌斜面加入3~5 ml 0.1% Tween 80无菌蒸馏水, 洗下菌苔, 制成菌悬浮液, 均匀涂布于待试昆虫取食的枝叶上, 晾干, 放入虫试器皿中, 同时以0.1% Tween 80无菌蒸馏水涂叶片为对照, 每个处理放入供试昆虫幼虫20头, 放置光照培养箱或室温, 每天观察死亡情况, 计算其死亡百分率。黄粉甲幼

虫试验是将菌悬浮液均匀拌入灭菌的麦麸中，其余方法同前。

2 结 果

2.1 不同类型森林土壤芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌数量

由表 2 看出，不同类型森林土壤，由于 pH 值、含水量及养分组成不同，其芽孢杆菌的总数及苏云金芽孢杆菌分出的数量有所区别，其中土壤 pH 偏中性和含水量稍高的棕壤、暗棕壤及黄壤，芽孢杆菌的总数均高于红壤，其中：百花山较鼎湖山高出 3 倍左右。苏云金芽孢杆菌的分出数量也表现出上述规律，而所测土壤各种养分与菌数没有明显的正相关。

表2 不同类型森林土壤芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌数量

自然保护区	土壤类型	土壤含水量(%)	pH	水解N (mg/kg)	有效P (mg/kg)	速效K (mg/kg)	全N (%)	有机质 (%)	芽孢杆菌总数(个/千土)	分离苏云金芽孢杆菌数(个)
长白山	暗棕壤	45.20	5.8~7.0	415.4	5.86	163.1	0.305	7.046	1.70×10^6	10
百花山	棕壤	12.75	7.3~7.4	280.4	6.95	200.9	0.225	4.091	3.30×10^6	10
鼎湖山	砖红壤性红壤	3.96	4.3~4.9	435.7	7.37	94.3	0.343	6.707	0.97×10^6	6
尖峰岭	砖红壤性黄壤	27.09	4.9~7.0	347.3	7.47	115.6	0.187	3.724	1.65×10^6	13

2.2 苏云金芽孢杆菌出土率及分离率

表 3 看出了在四个自然保护区中苏云金芽孢杆菌的出土率和占所分离芽孢杆菌的分离率，说明四个自然保护区森林土壤中苏云金芽孢杆菌的分布十分广泛，是土壤芽孢杆菌中常见的种类之一，资源十分丰富。

表3 四个自然保护区森林土壤中苏云金杆菌出土率及分离率

采集地点 (自然保护区)	分离土样数(个)	苏云金杆菌		芽孢杆菌 分离菌落数(个)	其中苏云金杆菌	
		分离出土 样数(个)	出土率 (%)		分离菌落数(个)	分离率(%)
长白山	13	5	38.46	65	10	15.3
百花山	22	5	22.72	132	10	7.5
鼎湖山	20	5	25.00	146	6	4.1
尖峰岭	20	8	40.00	98	13	13.2
合计	75	23	30.66(平均)	441	39	8.8(平均)

2.3 苏云金芽孢杆菌亚种的初步鉴定

四个自然保护区所分离的 39 株苏云金芽孢杆菌亚种初步鉴定结果见表 4、图版 I。

表 4 表明：17 株属于库尔斯塔亚种，6 株属于松蠹亚种。16 株属于与已知的 32 个亚种有所不同的特殊类型，是否属新亚种，有待进一步鉴定。图版 I 表明：由森林土壤分离的苏云金芽孢杆菌，其形态特征，多数伴孢晶体为菱形、镶嵌型菱形、圆形、方形、不规则形、多边形等。

2.4 苏云金芽孢杆菌亚种的分布

表 5 表明苏云金杆菌库尔斯塔亚种和未定名株在四个自然保护区中均有分布，松蠹只在百花山和长白山自然保护区中分布。

表4 39株苏云金杆菌生理生化特性及酶型鉴定

自然保护区	菌号	生理生化特性										酶型	亚种名称 (<i>B. t.</i> subsp.)	
		V.P	卵磷酯酶	水杨甙	解脲作用	色素形成	蔗糖利用	尿酶产生	水解七叶灵	甘露糖利用	水解淀粉			纤维二糖
长白山	Ch ₁	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	Dendrolimus	松属亚种(<i>dendrolimus</i>)
	Ch ₂	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	Ch ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	Ch ₄	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	特殊	待定
	Ch ₅	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	特殊	待定
	Ch ₆	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	特殊	待定
	Ch ₇	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	特殊	待定
	Ch ₈	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	Dendrolimus	松属亚种(<i>dendrolimus</i>)
	Ch ₉	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	Dendrolimus	松属亚种(<i>dendrolimus</i>)
	Ch ₁₀	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	Dendrolimus	松属亚种(<i>dendrolimus</i>)
百花山	B ₁₁	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	Dendrolimus	松属亚种(<i>dendrolimus</i>)
	B ₁₂	+	-	+	+	-	-	-	+	±	+	+	特殊	待定
	B ₁₃	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	Dendrolimus	松属亚种(<i>dendrolimus</i>)
	B ₁₄	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	B ₁₅	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	B ₁₆	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	特殊	待定
	B ₁₇	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	特殊	待定
	B ₁₈	+	+	±	+	-	-	-	+	+	+	+	特殊	待定
	B ₁₉	+	+	±	+	-	-	-	+	+	+	+	特殊	待定
	B ₂₀	-	+	±	+	-	+	-	+	+	+	+	特殊	待定
鼎湖山	D ₁	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	特殊	待定
	D ₂	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	D ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	D ₄	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	D ₅	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	D ₆	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
尖峰岭	J ₁	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₂	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₄	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₅	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₆	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₇	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₈	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	特殊	待定
	J ₉	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	特殊	待定
	J ₁₀	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	特殊	待定
	J ₁₁	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	特殊	待定
	J ₁₂	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Galleriae	库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)
	J ₁₃	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	特殊	待定

2.5 苏云金芽孢杆菌的毒力测定

由表6看出, 39株苏云金芽孢杆菌中对鳞翅目杨扇舟蛾和马尾松毛虫幼虫的致死率在

表5 四个自然保护区中苏云金芽孢杆菌亚种的数量分布

(单位: 个)

亚种名称 (<i>B. t.</i> subsp.)	数量	在四个自然保护区中亚种的分布				占总分离株(39株) 的比例(%)
		长白山	百花山	鼎湖山	尖峰岭	
库尔斯塔亚种(<i>kurstaki</i>)	17	2	2	5	8	43.6
松属亚种(<i>dendrolimus</i>)	6	4	2	0	0	15.4
未定名株	16	4	6	1	5	41.0

表6 39株苏云金芽孢杆菌毒力测定

(单位: %)

自然保护区	菌号	杨扇舟蛾 4 d 死亡率	马尾松毛虫 6 d 死亡率	黄粉甲 9 d 死亡率	榆蓝叶甲 7 d 死亡率
长白山	Ch ₁	80	100	0	0
	Ch ₂	55	100	0	0
	Ch ₃	90	100	0	10
	Ch ₄	0	10	0	20
	Ch ₅	0	30	0	—
	Ch ₆	0	90	0	0
	Ch ₇	5	0	0	0
	Ch ₈	40	90	5	0
	Ch ₉	60	100	10	0
	Ch ₁₀	75	95	0	0
百花山	B ₁₁	100	100	0	0
	B ₁₂	5	0	0	20
	B ₁₃	50	95	0	—
	B ₁₄	60	100	0	—
	B ₁₅	30	100	0	0
	B ₁₆	5	100	0	10
	B ₁₇	70	100	0	—
	B ₁₈	100	0	0	10
	B ₁₉	50	15	5	—
	B ₂₀	20	15	0	0
鼎湖山	D ₁	90	5	0	0
	D ₂	100	100	0	—
	D ₃	100	100	0	10
	D ₄	65	5	0	—
	D ₅	95	100	0	0
	D ₆	100	100	0	—
尖峰岭	J ₁	20	5	0	—
	J ₂	90	100	0	—
	J ₃	80	100	0	—
	J ₄	10	100	0	—
	J ₅	55	100	0	—
	J ₆	100	100	10	0
	J ₇	0	5	0	0
	J ₈	0	35	0	—
	J ₉	5	0	0	0
	J ₁₀	0	5	0	0
	J ₁₁	0	0	0	0
	J ₁₂	0	5	0	0
	J ₁₃	100	100	0	0

50%以上的约占70%，其中有6株(B₁₁, D₂, D₃, D₆, J₆, J₁₃)为100%。对鞘翅目害虫榆蓝叶甲和黄粉甲幼虫均未表现出明显的杀虫活性。

3 讨 论

(1) 土壤微生物分布的研究，其研究结果与研究方法密切相关。本文采用平板稀释法，李荣森等^[5]系采用弹土法，由于方法不同，结果有所不同。但苏云金芽孢杆菌在土壤中分布的规律如土壤pH、类型、优势亚种等方面均表现出一致性的结果。

(2) 在四个自然保护区中苏云金芽孢杆菌松蠹亚种只在百花山和长白山保护区中出现，这一结果是否与油松、落叶松植被及松毛虫寄主有关，有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 周淑芷, 陈昌洁, 戴莲韵, 等. 前苏联森林害虫微生物防治研究概况. 林业科技通讯, 1993, (1): 29~30.
- 2 田颖川, 秦晓峰, 许丙寅, 等. 表达苏云金杆菌 δ -内毒素基因的转基因烟草的抗虫性. 生物工程. 生物工程学报, 1991, 7(1): 1~10.
- 3 Ohba M, Aizawa K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. J. Invert path., 1986, 47(3): 277~282.
- 4 Delucca A J, II Simonson J G, Larson A D. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. Can. J. Microbiol., 1981, 27(9): 865~870.
- 5 李荣森, 戴顺英, 李小刚, 等. 我国部分地区土壤中的苏云金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌. 微生物学报, 1990, 30(5): 380~388.
- 6 许光辉, 郑洪元主编. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986. 92~105.
- 7 戴莲韵, 王学聘. 苏云金芽孢杆菌的一个新亚种. 微生物学报, 1988, 28(4): 301~396.
- 8 国家标准局发布. 中华人民共和国国家标准(GB7848~7858-87). 森林土壤分析方法(第三分册). 森林土壤养分分析. 北京: 中国标准出版社, 1987. 1~24.

Distribution of Bacillus thuringiensis in Forest Soil of Four Nature Reserves in China

Dai Lianyun Wang Xuepin Yang Guangying Zhang Wanru

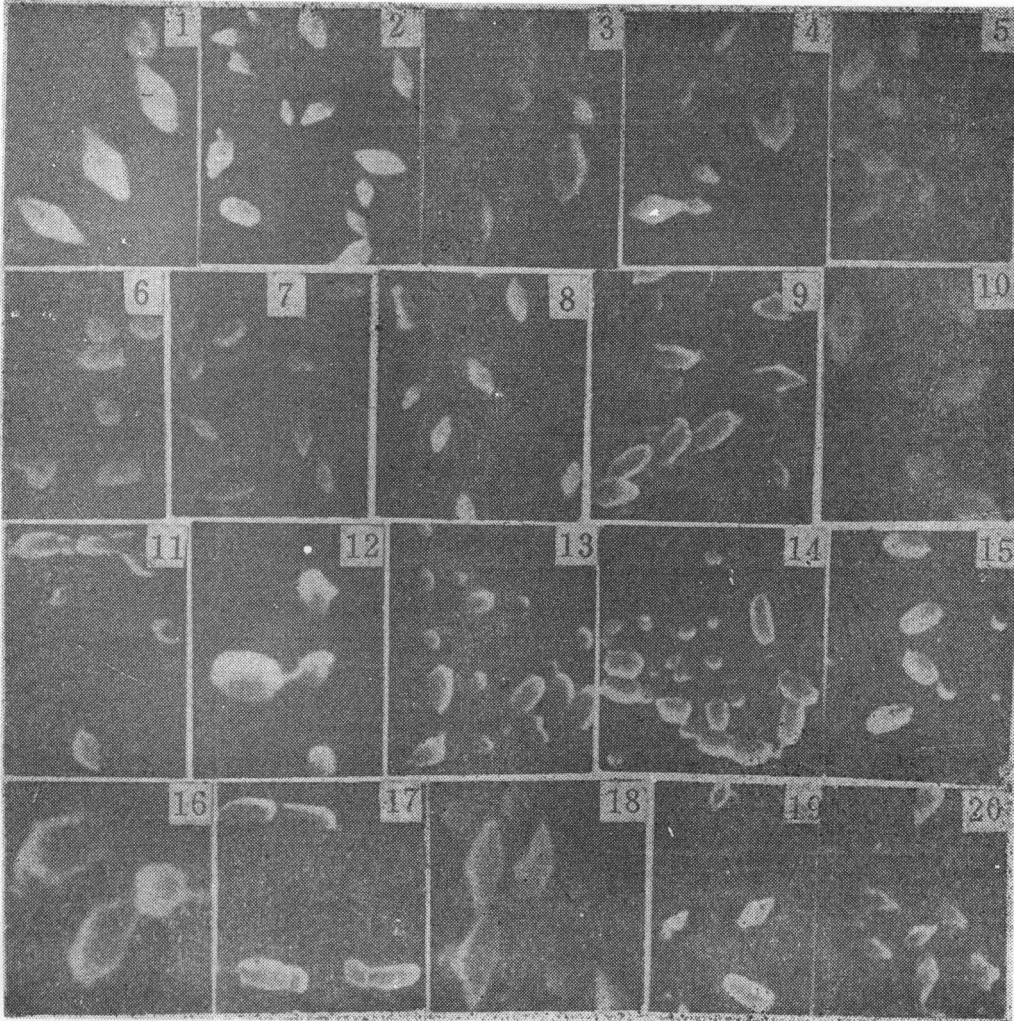
Abstract A total of 75 forest soil samples at 0~5cm depth collected from four nature reserves (Chang Bai Shan, Bai Hua Shan, Deng Hu Shan, Jiang Feng Ling) in China were examined for account of *Bacillus* and *Bacillus thuringiensis*, for description of the distribution of *B. thuringiensis* and calculation of the rate of *B. thuringiensis* to *Bacillus* in these forest soil.

39 isolates of *B. thuringiensis* obtained from the forest soil were identified by means of the characterization of physiology-biochemistry and esterase type. It indicated that among the 39 isolates, 17 belong to *B.t.* subsp. *kurstaki* (H-serotype 3a3b), 6 belong to *B.t.* subsp. *dendrolimus* (H-serotype 4a4b), and 16 were different from known subspecies.

These isolates were toxin-tested to insects. 70% of the 39 isolates were Lepidopteran-toxin; the mortality against *Clostera anachoreta* and *Dendrolimus punctatus* were above 50%. Coleoptero-toxin were not observed.

Key words nature reserve, forest soil, *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis*

Dai Lianyun, Associate Professor, Wang Xuepin, Yang Guangying, Zhang Wanru (The Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091).



苏云金芽孢杆菌伴孢晶体和芽孢扫描电镜形态特征 (2 200~4 400 \times)，1—Ch₁，2—Ch₂，3—Ch₄，4—Ch₅，5—Ch₆，6—Ch₇，7—Ch₈，8—Ch₉，9—B₁₂，10—B₁₂，11—J₁₁，12—B₂₀，13—B₁₉，14—B₁₈，15—J₁₀，16—D₁，17—J₈，18—D₂，19—J₁₃，20—B₁₆。