



本土蘇力菌素生產菌株之篩選

高穗生^{1*} 石振宏¹ 張妙順¹ 柯俊良²

¹臺中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

²臺中市 私立中山醫學院毒理所

(接受日期：中華民國 89 年 4 月 13 日)

摘 要

高穗生、石振宏、張妙順、柯俊良 2000 本土蘇力菌素生產菌株之篩選 植保會刊 42: 125-134

針對自倉庫中採樣，經分離鑑定後所蒐集的 574 株本土蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中，以 HPLC 篩選蘇力菌素產量高的菌株，發現有 321 株 (55.9%) 的菌株具有產生蘇力菌素 (thuringiensin) 之能力。然而其產能高於 *B. thuringiensis darmstadiensis* HD199 (6.6 mg/ml) 者，有 14 株 (BPD1-BPD14) 產量從 6.79-9.62 mg/ml 不等，其產能倍數為 HD199 的 1.02-1.45 倍之間。可提供做為日後研究開發的菌株候選者。此外亦針對高產能的菌株做血清型的鑑定，發現 BPD1、BPD2 和 BPD3 屬於 *B. thuringiensis kenyae* 的 H-antigen 4a,4c，而 BPD5、BPD6、BPD7 和 BPD8 四株則屬於 *B. thuringiensis tolworthi* 的 H-antigen 9 血清型。與目前確知能分泌蘇力菌素的八種 H-antigen (1、5a, 5b、5a, 5c、7、8a, 8b、9、10 及 11a,11b) 相比較，發現 H-antigen 4a, 4c 為新發現能產生蘇力菌素的 H-antigen。另外以紫外線照射菌株進行誘變試驗，由 HD199 誘變得一產蘇力菌素高之誘變株 UV1-3，其蘇力菌素之產量為原菌株 HD199 之 1.73 倍。檢定經篩選所得產蘇力菌素高之菌株對家蠅 (*Musca domestica*, CMA080192 品系) 的殺蟲效果，其 LC₅₀ 值介於 2.39±0.19 到 7.83±0.17 ppm 不等。此外，蘇力菌素對家蠅之化蛹能力在低濃度 6.7-30 ppm 時影響不大，仍有 85.28% 的化蛹能力。然而當濃度達 53.6 ppm 時其化蛹能力顯著下降至 60.15%，影響家蠅較大的階段是在家蠅從蛹羽化成成蟲之時期。在低濃度 6.7-30 ppm 時便有其明顯的降低，羽化的成蟲百分比僅 23.33%。而蘇力菌素對家蠅之致畸形性亦達 7.84%。

(關鍵詞：蘇力菌、蘇力菌素、篩選、畸形性)

緒 言

蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 為一群能形成孢子之革蘭氏陽性 (Gram positive) 好氣性桿菌, 所產生之殺蟲性毒素已知有八種^(8, 10, 20, 21, 22), 其中蘇力菌素 (thuringiensin) 是蘇力菌的某些血清型菌株在營養生長階段分泌釋出至細胞外的類核 酸二次代謝產物⁽¹⁹⁾, 其結構類似 ATP⁽⁷⁾。由於蘇力菌有許多不同品系, 品系間種類的區分, 主要是依據 1990 年代末期 de Barjac 所建立之血清分類法⁽⁶⁾, 以菌體鞭毛抗原與抗體反應之差異性, 來取代傳統細菌生化反應所需做多種之複雜試驗。目前已知蘇力菌可分成 82 個血清型⁽¹⁴⁾。而目前確知能分泌蘇力菌素的蘇力菌株有血清型 1、5a, 5b、5a, 5c、7、8a, 8b、9、10 及 11a, 11b 等八種^(17, 18)。而蘇力菌素在 121°C 之高壓滅菌處理下仍具有活性, 是一種對熱安定之毒素, 故亦稱熱穩定毒素, 又因家蠅幼蟲對它特別敏感, 又有蠅因子或蠅毒素之稱⁽¹⁰⁾。由於結構與 ATP 相似, 因此會與 ATP 競爭 DNA-dependent RNA-polymerase, 進而抑制 RNA 的生合成^(2, 26)。其作用特點是在昆蟲蛻皮或變態期間起作用, 使昆蟲不能正常生長發育, 導致化蛹不完整、畸形蛹、無法化蛹或形成殘翅的成蠅⁽²²⁾。另外, 蘇力菌素的殺蟲範圍廣泛, 對昆蟲綱中之鱗翅目 (Lepidoptera)、雙翅目 (Diptera)、鞘翅目 (Coleoptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、等翅目 (Isoptera)、直翅目 (Orthoptera)⁽¹⁾、脈翅目 (Neuroptera)⁽¹³⁾、半翅目 (Hemiptera)⁽⁹⁾、異翅目 (Heteroptera)⁽²⁴⁾ 等九目昆蟲, 甚至對線蟲⁽⁴⁾ 和蟎類⁽¹⁶⁾ 皆具有殺蟲活性。而蘇力菌素具有熱穩定性、殺蟲廣效性和化學結構的多樣性, 使它成爲一種具有商業潛力的廣效性生物殺蟲劑。面對未來商品化及專利性問題而言, 開發及尋找本土新菌株勢在必行, 因此本計畫針對本土蘇力菌素生產菌株之篩選、鑑定進行一系列之探討。

材料與方法

菌種採集及培養分離

自全省 100 個鄉鎮農會穀倉, 分別採集粉塵樣品 10 g, 分裝入塑膠袋。取 0.5 g 樣品加入 10 ml 無菌水劇烈振盪懸浮, 依 Kao 等人⁽¹²⁾ 方法熱處理懸浮樣本, 塗於 Nutrient Agar (NA) 平板培養基上, 28°C 培養 5 天, 挑單一菌落, 選取含結晶及孢子之菌株共 574 株, 並加以編號。

篩選本土菌株及誘變菌株之搖瓶培養

自 Luria agar (LA) 培養基上取供試本土菌株單一菌落分別接種至 2 ml Luria Broth (LB) 培養基做前培養, 過夜。取經前培養之菌液 100 μ l 移至 3 ml SMB (Soy molasses broth) 培養基中, 而 SMB 培養基配方是根據 Holmberg 等人⁽¹¹⁾ 之方法以大豆蛋白及糖漿爲基礎培養基進行配製。配方成份爲 KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.5%, MgSO_4 0.005%, MnSO_4 0.003%, FeSO_4 0.001%, CaCl_2 0.005%, $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, soy protein 3% 及 molasses 1.5%。再以 1/20 (v/v) 85% H_3PO_4 調至 pH 7.0。滅菌待用。於 28°C 培養箱中以轉速 200 rpm 振盪培養 72 小時, 進行蘇力菌素分析。

菌種誘變

選取 *B. thuringiensis darmstadiensis* HD199 及本土分離株 BPD1 (A1-09a)、BPD2 (A3-01a)、BPD3 (A3-03a)、BPD5 (E12-24a)、BPD6 (E12-26a)、BPD7 (E12-33a)、BPD8 (E12-34a) 共八株, 進行誘變處理。將經培養之蘇力菌菌液以蒸餾水洗二次, 取 100 ml 放入 60 mm 空白培養皿中, 以 Bio-Rad UV crosslinker 254 nm 波長照射 100 mW, 處理 5 秒鐘, 經連續稀釋 1000 倍後, 吸取 500 ml 塗抹於 Nutrient Broth (NB) 培養基, 培養 16 小時, 將菌體接種至 25 ml SMB 培養基, 於 28°C 培養

箱中以轉速 200 rpm 振盪培養 72 小時，進行蘇力菌素分析。

高效液相層析儀(HPLC)定量蘇力菌素

將培養之菌液以 10000 rpm、4°C 離心 15 分鐘，取上清液以 121°C 高壓滅菌 15 分鐘後，稀釋成適當濃度，即可用於生物活性檢定。另外此經滅菌之上清液以 0.22 μm 碟式過濾器過濾，即可用於 HPLC 分析。其 HPLC 分析條件為 Water C18 Reverse phase μ -bondapak column, 4.6 \times 150 mm (Phenomenex[®] USA)，沖提流速：2 ml/min，偵測波長：260 nm，沖提緩衝液：50 mM KH_2PO_4 ，pH 2.8，需以 0.45mm 硝酸纖維薄膜過濾。而標準曲線之製作，以 Levinson 等人⁽¹⁵⁾的分析方法為基礎，略予修改如下：量取純度 35%之蘇力菌素標準品，以 50 mM KH_2PO_4 之沖提緩衝液配製成 2、4、6、8 mg/ml 等四種待測濃度（以 0.22 μm 碟式過濾器過濾），並以不含蘇力菌的沖提緩衝液為測量時之空白對照液，由結果所得的尖峰積分面積（Peak area）與濃度關係製作標準曲線。

鞭毛血清型之鑑定

根據 Charles⁽³⁾、de Barjac⁽⁵⁾及 Thiery⁽²⁵⁾等人，製備 H-抗原和進行免疫反應。

(一) 將菌株接種至 Craigie tube（內含半固態之 Nutrient Agar）中，18-24 小時，30°C，培養至 vegetative-stage，再將菌移至含有 100 ml Nutrient broth（pH 7.4）之搖瓶中培養 4-6 小時，30°C，150 rpm 振盪，使其 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 介於 0.8-1.0 間，加入 0.5 ml formaldehyde。以便於進行鞭毛凝集反應（flagellar agglutination），此鞭毛懸浮液於 4°C 下可保存數個月。

(二) H-antigen 血清之製備

第一次以皮下注射方式進行，注入鞭毛懸浮液 0.5 ml（ $\text{OD}_{650\text{nm}}:1$ ）於兔

子中，往後每星期兩次以靜脈注射方式分別增加其注射劑量（1 ml，2 ml，4 ml）持續 3 週。於最後一次注射後第 8 天，取 2 ml 之血清測其抗體力價是否達（1/25600）及其專一性（specific）。以心臟採血方式取血，置於室溫下待其凝固，於 2000 rpm 下，離心 5 min，取血清保存於 4°C 或 -20°C。

(三) 血清學之鑑定

於 5 ml 之塑膠管中加入 1.8 ml 的 0.15 M NaCl，再加入 200 μl 之鞭毛抗血清以連續稀釋（1:1）的方式進行，於每一試管中取 100 μl 至含 900 μl 細菌懸浮液的溶血試管中，置於 37°C，2 小時，並觀察 1:100，1:200，1:400 三種稀釋倍數之管，是否有凝集反應產生。若有白色沉澱之凝集，則再繼續稀釋倍數至 25600 倍，並置於 37°C，2 小時，觀察是否有凝集現象。

供試家蠅之飼養及生物檢定

(一) 成蟲飼料：取糖與全脂奶粉以 1:1 比例混合均勻。

(二) 幼蟲飼料：取全脂奶粉 36 g、酵母粉（台糖）186 g 加去離子水 600 ml 置於果汁機中攪打均勻。加入煮沸的洋菜粉水溶液（400 ml 去離子水中含 7 g 洋菜粉），充份攪拌均勻後，分裝至產卵盒（布丁杯）（200 ml/cup）及養蠅盒（350 ml/box）中，待其凝固即可使用，或蓋上錫箔紙置於 4°C 冰箱中備用。

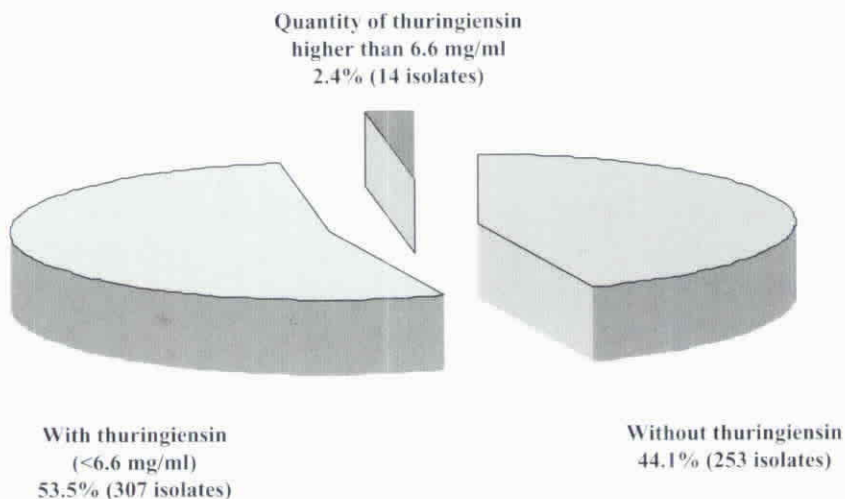
(三) 生物檢定方面：以 3 日齡幼蟲之家蠅（*Musca domestica*，CMA080192 品系）為供試昆蟲，飼養於 30°C 恆溫箱中。秤取 15 g 微溫未凝固之家蠅幼蟲飼料置入試飲杯中為一重複。取稀釋成適當濃度之蘇力菌素溶液各 1 ml，分別加入 15 g 家蠅幼蟲飼料內攪拌均勻，待飼料凝固後，每一重複置入 10 隻 3

日齡家蠅幼蟲，每一處理三重複，以蒸餾水加入幼蟲飼料為對照組，如是重複處理三次，於 30°C 恆溫培養箱中培養，於第 5 天記錄化蛹情形，第 10 天觀察羽化變異情形，並記錄試驗結果，本試驗重複三次，並以對機值 (probit analysis) 分析計算 LC_{50} 值。另外，為瞭解不同處理濃度對家蠅生長之影響，共進行 8 次實驗，每種濃度 3 重覆，每一重覆 10 隻 3 日齡幼蟲，計算其化蛹、羽化及畸形之平均百分比，並以 Duncan's multiple range test (DMRT) 方法分析其差異性。

結果與討論

針對自本省各地倉庫採集而來之 574 株蘇力菌，進行高產能蘇力菌素菌株之篩選，以 HPLC 篩選共有 321 株 (55.9%) 會產生蘇力菌素之菌，然而蘇力菌素菌產能較高者只有 14 株 (2.4%) (圖一)，產量介於 6.79-9.62 mg/ml 間 (HD199 為 6.63 mg/ml)，而產能倍數則介於 1.02-1.45 倍 (以 HD199 為標準倍數 1) (表一) 為提高蘇力菌素產量

以改良菌株，因此本研究亦對本土蘇力菌進行各種誘變試驗，包括各種誘變劑 (MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoquanidine)、4-NQO (4-nitroquinoline oxide)、DES (Diethyl sulfonate)、EMS (ethyl methanesulfonate)、2-AP (2-aminopurine)) 及紫外線之誘變。然而化學藥劑之誘變處理中以 DES、EMS 及 2-AP 在 50 mM 的濃度處理下供試菌液完全死亡外，其餘之藥劑處理並無法增加其蘇力菌素之產量。顯示經由化學藥劑處理之過程須考慮其對菌的毒性、誘變機率成功性及藥劑處理之濃度。七株高產本土菌株 BPD1、BPD2、BPD3、BPD5、BPD6、BPD7、BPD8 及標準菌株 HD199，經紫外線照設射誘變。雖然經由誘變成功的機率不高，然而仍由 HD199 誘變得一產蘇力菌素高之誘變株 UV1-3，其蘇力菌素之產量 12.22 mg/ml 為原菌株 HD199 之 1.73 倍 (表二)。就蘇力菌鞭毛血清型鑑定方面，其中 BPD1、BPD2、BPD3 屬 H-antigen 4a,4c 之 *kenyae* 血清型，另外四株 BPD5、BPD6、BPD7 及 BPD8 為 H-antigen 9 之 *tolworthi* 血清型 (表三)。與目前確知能分泌蘇力菌素的八種



圖一、本土蘇力菌株中蘇力菌素生產菌株百分比。

Fig. 1. Percentage of thuringiensin-producing isolates among the indigenous *Bacillus thuringiensis*.

表一、不同蘇力菌株間之蘇力菌素相對產量(3 ml 培養基)¹⁾Table 1. Relative amount of thuringiensin production among different *Bacillus thuringiensis* isolates (in 3 ml culture medium)¹⁾

Isolate	Thuringiensin (mg/ml)	Relative amount of production
BPD9 (I9-03a)	9.62	1.45
BPD1 (A1-09a)	9.56	1.45
BPD2 (A3-01a)	8.79	1.33
BPD3 (A3-03a)	8.66	1.31
BPD4 (A9-01a)	8.57	1.29
BPD7 (E12-33a)	8.34	1.26
BPD5 (E12-24a)	8.02	1.21
BPD13 (I14-05a)	7.97	1.20
BPD8 (E12-34a)	7.84	1.19
BPD12 (I7-01a)	7.67	1.16
BPD10 (I5-01a)	7.42	1.12
BPD11 (I5-08a)	7.36	1.11
BPD6 (E12-26a)	7.23	1.09
BPD14 (I27-08a)	6.79	1.02
HD199	6.63	1.00

¹⁾ The amount of thuringiensin produced by each isolates was calibrated with 35% purity of thuringiensin as standard.

表二、HD199 與其紫外線誘變菌株 UV1-3 之蘇力菌產量(25 ml 培養基)¹⁾Table 2. Quantity of thuringiensin produced from a mutant (UV1-3) and parental strain (*B. thuringiensis darmstadiensis* HD199) (in 25 ml culture medium)¹⁾

Strain	Thuringiensin (mg/ml)	Relative amount of production
HD199 (Parent)	7.03	1
UV1-3 (Mutant)	12.22	1.73

¹⁾ The amount of thuringiensin produced by each isolates was calibrated with 35% purity of thuringiensin as standard.

H-antigen (1、5a, 5b、5a, 5c、7、8a, 8b、9、10 及 11a, 11b)^(17, 18) 相比較, 發現 H-antigen 4a, 4c 為新發現能產生蘇力菌素的 H-antigen。而利用蘇力菌培養基上清液之蘇力菌素對家蠅進行生物檢定方面, 其半致死濃度(LC₅₀)分別為 BPD1 : 2.39± 0.19 ppm、BPD2 : 3.01± 0.57 ppm、BPD3 : 2.68± 0.51 ppm、BPD5 : 7.83± 0.17 ppm、BPD6 : 5.99± 0.13 ppm、BPD7 : 4.36± 0.11 ppm、BPD8 : 3.66± 0.11 ppm 及 UV1-3 : 3.77± 0.11 ppm

(表四)。檢定此篩選所得產蘇力菌素高之菌株對家蠅的殺蟲效果, 其中以 BPD1、BPD2 及 BPD3 殺蟲效果較佳。推測此生產蘇力菌素之八個菌株對家蠅殺蟲活性有高低差異之原因, 可能為本研究生物檢定試驗是以培養上清液混合飼料餵食家蠅幼蟲, 然蘇力菌菌株除生產蘇力菌素外尚有其它代謝產物產生, 可能這些代謝物質會造成菌株間的殺蟲活性有所差異。此外, 由家蠅對蘇力菌素的感受性發現, 蘇力菌素影響家蠅幼蟲化蛹

表三、七株本土蘇力菌株血清型鑑定結果

Table 3. Serotyping of 7 indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates

Isolate	H-Antigen	Serovar.
BPD1 (A1-09a)	4a,4c	
BPD2 (A3-01a)	4a,4c	<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i>
BPD3 (A3-03a)	4a,4c	
BPD5 (E12-24a)	9	
BPD6 (E12-26a)	9	<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i>
BPD7 (E12-33a)	9	
BPD8 (E12-34a)	9	

表四、八株蘇力菌素高產量之菌株對家蠅之毒效¹⁾Table 4. Toxicity of 8 thuringiensin-producing *Bacillus thuringiensis* isolates against *Musca domestica* (CMA080192)¹⁾

Isolate	LC ₅₀ (ppm) ²⁾
BPD1 (A1-09a)	2.39±0.19
BPD2 (A3-01a)	3.01±0.57
BPD3 (A3-03a)	2.68±0.51
BPD5 (E12-24a)	7.83±0.17
BPD6 (E12-26a)	5.99±0.13
BPD7 (E12-33a)	4.36±0.11
BPD8 (E12-34a)	3.66±0.11
BPD15 (UV1-3)	3.77±0.11

¹⁾ The amount of thuringiensin produced by each isolates was calibrated with 35% purity of thuringiensin as standard.

²⁾ Average of 3 trials, 10 of 3-day-old larvae/replicate, 3 replicates/trial.

表五、蘇力菌素對家蠅羽化之影響¹⁾Table 5. Effect of thuringiensin on the adult emergence of *Musca domestica* (CMA080192)¹⁾

Conc. range(ppm)	Pupation(%)	Emergence (%)	Malformed adult (%)	Failed to emerge(%)
>53.6 (ppm)	60.15 c	0.75 c	—	—
6.7-30 (ppm)	85.28 b	23.33 b	7.84	2.34
CK	95.62 a	92.23 a	—	—

¹⁾ Average of 8 trials, 10 of 3-day-old larvae/replicate, 3 replicates/trial. Data were transformed to $\sin^{-1}\sqrt{x}$ prior to analysis, and means in each column followed by the same letter are not significantly different at 0.01 level by DMRT.

率在 6.7-30 ppm 不明顯 (約 85.28%)，但若將濃度提高至 53.6 ppm 以上時，化蛹率便降至 60.15%。而蘇力菌素真正影響家蠅成長的階段乃在於從蛹變成蠅的羽化階段，在低濃

度 (6.7-30 ppm) 的情況下其羽化率便已明顯降至 23.33%，濃度大於 53.6 ppm 時羽化率僅為 0.75%。此外蘇力菌素造成家蠅之致畸形性達 7.84%，而使其成蟲發育受損甚至

羽化不完全者亦有 2.34%(表五)。由 Sebesta 等人⁽²²⁾利用大腸桿菌研究蘇力菌素對昆蟲抑制的作用機制，發現是以蘇力菌磷酸根的部份與 ATP 三磷酸根部位類似，兩者的酵素作用部位相同，故產生競爭性抑制作用 (competitive inhibition) 因而延遲 RNA 聚合酶合成 mRNA 之步驟，進而影響整個 RNA 的生合成。而根據 Sharma 和 Dash⁽²³⁾指出 rRNA 是第一個被抑制的步驟，但對 tRNA 之抑制作用最小。由以上之實驗結果推論，昆蟲在蛹化的這段期間其生理代謝所需之 RNA 量可能較大，因此一旦 RNA 生合成受阻或延遲，便影響其生長及羽化。因此就酵素動力學機制而言，當競爭者 (蘇力菌素) 量甚大於受質 (ATP) 時，RNA 聚合酶完全被佔據，因此便無法合成出 RNA。故在高濃度蘇力菌素情況下家蠅根本無法羽化，更遑論會有畸形成蠅出現，此與結果相符。而 Sharma 和 Dash⁽²³⁾亦指出蘇力菌素並不會對蛋白質生合成產生影響。因此當其下游產物充裕時，蘇力菌素並不會馬上有抑制的效果產生，待其下游產物消耗待盡時，依正常之細胞調控機制 mRNA 便開始進行轉錄作用 (transcription)，然而若合成蛋白質的 rRNA 亦無法有效發揮作用，其下游之蛋白質合成勢必受影響。而 rRNA 之轉換率 (turn-over rate) 並不像 mRNA 之快。因此這可能是蘇力菌素作用較緩慢的原因之一。而蘇力菌素會引起家蠅高致畸形率與羽化不完全之比率，從分子層次而言，可能是蘇力菌素在 RNA 生合成時，因為與 ATP 競爭 RNA 聚合酶而使合成出的 mRNA 有誤併入 (misoperation) 之現象，因此造成合成出錯誤 mRNA 的比率偏高。故接踵而至的轉譯 (translation) 過程亦將出現錯誤，所以造成畸型甚至羽化不完全的機率便會增加。因此在低濃度蘇力菌素存在下，受質 (ATP) 與競爭者 (蘇力菌素) 之間的比例便是影響其生存，畸形亦或羽化與否之關鍵所在。過去傳統化學農藥使用的泛濫，使得愈來愈多的

昆蟲對化學殺蟲劑產生嚴重的抗藥性，而傳統的化學殺蟲劑常得用到高危險劑量才能勉強奏效，更是嚴重的危及人類健康，以及對地球環境的生態平衡造成嚴重的破壞，且化學殺蟲劑的製造成本亦急劇的在增加⁽²¹⁾，因此在考量人類健康、生態平衡及經濟效益等前題下，減少化學農藥之使用及開發新而安全的藥劑有其必要性。利用生物殺蟲劑防治害蟲是害蟲綜合管理的一個重要部分，生物殺蟲劑既能直接殺死害蟲，又不傷害能控制害蟲族群的天敵，它不污染環境，害蟲也較難產生抗藥性，更能利用遺傳工程的方法改良這些生物殺蟲劑的性狀。本研究針對本土菌株進行篩選，期望能找到生產蘇力菌素多及殺蟲效果高的蘇力菌的本土菌株，以及藉由 UV 照射的方法進行誘變期望能找到更多產蘇力菌素高的誘變菌株，將來大量商品化醱酵生產時可節省醱酵培養成本，亦可避免專利所有權的問題。另外，在生物檢定方面除以家蠅為供試昆蟲外，亦可以小菜蛾、甜菜夜蛾、二點葉 等為供試蟲源，檢定蘇力菌素對其它昆蟲的殺蟲效果，亦或配合其他藥劑 (如：內毒素) 之混合使用或許可增加其效用及殺蟲範圍，以便將來商品化生產時可擴大其利用範圍。

謝 辭

本研究承行政院國科會 NSC87-2622-E-259-002(3)計劃經費補助，又蒙陽明大學翟建富博士協助蘇力菌鞭毛血清型鑑定，本所蔡勇勝及曾經洲博士協助菌種採集及鑑定，及東華大學曾耀銘博士提供蘇力菌素標準品與高效液相層析分析等相關實驗協助，特此一併誌謝。

引用文獻

1. Bond, R. P. M., Boyce, C. B. C., Rogoff, M. H., and Shieh, T. R. 1971. The

- thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: H. D. Burges and N.W. Hussey eds., Microbial control of insects and mites. Academic Press, New York. p. 275-303.
2. Carlberg, G. 1986. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. J. MIRCEN 2: 267-274.
 3. Charles, J-F., Nielsen-Leroux, C. and Delecluse, A. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: Molecular biology and mode of action. Annu. Rev. Entomol. 41: 451-472.
 4. Ciordia, H., and Bizzell, W. E. 1961. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on the development of the free-living stages of some cattle nematodes. J. Parasitol. 47: 41 (Abstract).
 5. de Barjac, H., Larget-Thierry, I., Cosmao Dumanoir, V., and Ripouteau, H. 1985. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity to mosquito larvae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 85-90.
 6. de Barjac, H., and Frachon, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga 35: 233-240.
 7. Farkas, J., Sebesta, K., Horkas, K., Samek, Z., Dolijs, J., and Sorm, F. 1977. Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Coll. Czech. Commun. 42: 909-939.
 8. Faust, R. M. 1982. Bacteria and their toxins to insecticides, pp. 75-110. In: E. Kustak ed., Microbial and Virus Pesticides. Dekker, New York.
 9. Herbert, D. A., and Harper, J. D. 1986. Bioassay of a beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). J. Econ. Entomol. 79: 592-595.
 10. Heimpel, A. M. 1967. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". J. Invertebr. Pathol. 9: 346-375.
 11. Holmberg, A., Sievanen, R., and Carlberg, G. 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. Biotech. Bioengin. 22: 1707-1724.
 12. Kao, S. S., Tzeng, C. C., Tuan, S. J., and Tsai, Y. S. 1996. Isolation, characterization and *cry* gene typing of *Bacillus thuringiensis* isolates from stored product material sample collected around Taiwan. Symposium in "The Second Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Impact to the Environment". p. 132-151. 4-8 Nov. 1996, Chiang Mai, Thailand.
 13. Kiselek, E. V. 1975. The effect of biopreparations on insect enemies. Zashch. Rast. (Mosc.) 12: 23 (in Russian with English summary)
 14. Lecadet, M. M., Frachon, E., and Cosmao Dumanoir, V. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 86: 660-672.
 15. Levinson, B. L., Kasyan, K. J., and Chiu, S. S. 1990. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by HPLC. J. Bacteriol.: 3172-3179.
 16. Marjorie A. H., and Ouyang Y. L. 1987. Toxicity of the β -exotoxin of *Bacillus*

- thuringiensis* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 80: 507-511.
17. Mummigatti, S. G., and Raghunathan, A. N. 1988. Production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by three different methods and its relative toxicity to *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. 51: 115-118.
18. Ohba, M., Tantichodok, A., and Aizawa, K. 1981. Production of heatstable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. J. Invertebr. Pathol. 38: 26-32.
19. Paige, M. R., and Cooper, R. D. 1990. Scale-up of beta-exotoxin production in fed-batch *Bacillus thuringiensis* fermentation. Eue. Congr. Biotechnol. 5 Meet. p. 146-149.
20. Rodriguze-Padilla, C. 1990. *Bacillus thuringiensis neoleonensis* serotype H-24, a new subsp. which produces a triangular crystal. J. Invertebr. Pathol. 56: 280-282.
21. Rowe, G. E., and Margaritis, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Cri. Rev. Biotech. 6: 87-127.
22. Sebesta, K., Farkas, J., and Horska, K. 1981. Thuringiensin, the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, p. 249-281. In: H. D. Burges ed., Microbial Control of Pests and Plants Diseases 1970-1980. Dekker, New York.
23. Sharma, C. B. S. R., and Dash, S. K. 1977. Use of a bacterial exotoxin, thuringiensin-A as pretreating agent in chromosome analysis. Beitr. Biol. Pflanzen. 53: 211-215.
24. Tanigoshi, L. K., Mayer, D. F., and Babcock, J. M. 1990. Efficacy of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Lygus hesperus*. J. Econ. Entomol. 83: 2200-2206.
25. Thiery, I. and de Barjac, H. 1989. Slection of the most potent *Bacillus sphaericus* strains based on activity ratios determined on three mosquito species. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 577-581.
26. Vankova, J. 1978. The heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Folia. Microbiol. 23: 162-174.

ABSTRACT

Kao, S. S.^{1*}, Shih, C. H.¹, Chang, M. S.¹, and Ko, J. L.² 2000. Screening of indigenous thuringiensin-producing *Bacillus thuringiensis* isolates. Plant Prot. Bull. 42: 125 - 134 (¹Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ²Institute of Toxicology, Chung Shan Medical & Dental College, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Specimens of stored-grain materials from different locations around Taiwan were collected. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) isolates were made. Five hundred and seventy-four isolates were selected for thuringiensin screening by HPLC. Results indicated that 321 out of 574 *Bt* isolates produced thuringiensin. The best 14 isolates of this collection were isolates BPD1-BPD14 which produced 6.79 to 9.62 mg/ml thuringiensin. The relative amount of thuringiensin production was 1.02 to 1.45-fold as compared to reference strain *B. thuringiensis darmstadiensis* HD199 (6.6 mg/ml). The high thuringiensin-producing isolates BPD1, BPD2, BPD3, were serologically classified as *B. thuringiensis kenya*e of H-antigen 4a, 4c, while BPD5, BPD6, BPD7 and BPD8 were serologically classified as *B. thuringiensis tolworthi* of H-antigen 9. Isolates of *B. thuringiensis kenya*e were found to be a novel thuringiensin producing serotype. In another screening test of mutation, UV was tested against 8 thuringiensin-producing isolates. The quantity of thuringiensin produced by UV1-3 (UV mutant of *B. thuringiensis darmstadiensis* HD199) was 1.7-fold as compared with the parental strain (HD199). The LC₅₀ values of 8 high thuringiensin-producing isolates against *Musca domestica* (CMA080192) were between 2.39 ± 0.19 and 7.83 ± 0.17 ppm. Pupation rate of *M. domestica* was 85.25% when treated with low concentration of thuringiensin (6.7-30 ppm), however, pupation rate decreased significantly down to 60.15% at higher concentrations (>53.6 ppm). Emergence rate was drastically declined to 23.33% even at the concentrations of 6.7-30 ppm. The percentage of malformed adults reached to as high as 7.84%.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, thuringiensin, screening, malformation)

*Corresponding author. E-mail: sskao@tactri.gov.tw