



白背飞虱致病细菌 *Acinetobacter soli* 的分离 鉴定及其杀虫活性测定

李咏祺¹, 丁文兵^{1,3}, 贺华良¹, 高 俏¹, 高宏帅¹,
李有志^{1,2,3}, 邱 林^{1,2*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; 2. 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 长沙 410128; 3. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要: 白背飞虱 *Sogatella furcifera* 是重要的水稻害虫, 通过取食和传播病毒病对水稻造成严重的危害。因此, 开发和利用病原微生物防治白背飞虱具有重要现实意义。本研究从白背飞虱体内分离出 1 株细菌, 命名为 HUNAN-1。通过形态学及分子生物学手段对该菌株进行了鉴定, 并采用喷雾法测定了该菌株菌液对白背飞虱的室内杀虫活性, 同时评估了培养时间和培养基 pH 值对发酵上清液杀虫活性的影响。结果表明, 菌株 HUNAN-1 为不动杆菌属, 单不动杆菌 *Acinetobacter soli*。菌株 HUNAN-1 对白背飞虱表现出显著的杀虫活性。当浓度为 10^9 CFU/mL 时, 菌液对白背飞虱的校正死亡率达到 100%, 其 LT_{50} 为 31.523 h, LC_{50} 值为 2.71×10^6 CFU/mL。菌株 HUNAN-1 的发酵上清液同样对白背飞虱有较高的致死率, 处理 72 h 后, 白背飞虱的死亡率超过 80%, 并且不同发酵时间和培养基 pH 值对发酵上清液的杀虫活性无显著影响。综上, 菌株 HUNAN-1 对白背飞虱具有良好的防治潜力, 应用前景广阔。

关键词: 白背飞虱; 病原微生物; 单不动杆菌; 杀虫活性

中图分类号: Q968.1; Q965.9 文献标识码: A

Isolation and identification of a pathogenic bacterium *Acinetobacter soli* from *Sogatella furcifera*, and determination of its insecticidal activity

LI Yong-Qi¹, DING Wen-Bing^{1,3}, HE Hua-Liang¹, GAO Qiao¹, GAO Hong-Shuai¹, LI You-Zhi^{1,2,3}, QIU Lin^{1,2*} (1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Key Laboratory of Biology and Control of Plant Pests and Diseases, Changsha 410128, China; 3. National Engineering Research Center for Utilization of Plant Functional Components, Changsha 410128, China)

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1401100); 湖南省青年科技人才项目 (2022RC1025)

作者简介: 李咏祺, 女, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: yongqili1023@outlook.com

*通讯作者 Author for correspondence: 邱林, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: qiulin@hunau.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-10-18; 修回日期 Revision received: 2024-12-18; 接受日期 Accepted: 2024-12-19

Abstract: The white-backed planthopper (*Sogatella furcifera*) is a significant pest of rice, inflicting severe damage to crops through feeding and transmitting of viral diseases. Therefore, developing and utilizing pathogenic microorganisms for the management of *S. furcifera* holds substantial practical importance. In this study, a bacterial strain, designated as HUNAN-1, was isolated from *S. furcifera*. The strain was identified using morphological and molecular biological approaches, and its insecticidal activity, as well as the influence of fermentation time and pH value on the insecticidal activity of the fermentation supernatant, were assessed through a spray method. The results revealed that strain HUNAN-1 has the genus name *Acinetobacter* and species name *Acinetobacter soli*. This strain exhibited notable insecticidal effects against *S. furcifera*, achieving a cumulative corrected mortality rate of 100% at a concentration of 10^9 CFU/mL, with an LT_{50} value of 31.523 hours. Additionally, the LC_{50} value was determined to be 2.71×10^6 CFU/mL. The fermentation supernatant of strain HUNAN-1 demonstrated high lethality against *S. furcifera*, with mortality rates exceeding 80% after 72 hours of treatment. Notably, variations in fermentation duration and medium pH had no significant impact on the insecticidal activity of fermentation supernatant. In conclusion, strain HUNAN-1 shows considerable control potential of *S. furcifera*, with broad application prospects.

Key words: *Sogatella furcifera*; pathogenic microbes; *Acinetobacter soli*; insecticidal activity

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváth) 属于半翅目 Hemiptera 飞虱科 Delphacidae, 是水稻的主要害虫之一, 在水稻产区常年大面积发生, 严重影响水稻安全生产, 造成了重大的经济损失。白背飞虱通过吸食水稻韧皮部汁液, 导致水稻变黄、枯萎, 进而影响正常生长 (Ramesh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017)。目前, 化学农药仍是防治白背飞虱的主要手段, 而农药的频繁使用, 加剧了害虫抗药性的产生。研究表明, 白背飞虱对吡虫啉、噻虫嗪表现出中等抗性, 对毒死蜱和噻嗪酮产生高等抗性 (Zhang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021)。因此, 探索白背飞虱的绿色防治方法已经变得尤为紧迫。

利用具有致病性的微生物防治害虫是一种绿色高效的防治策略, 在害虫防治中受到广泛关注, 目前多项研究报道了病原微生物防治害虫的成功案例。例如, 球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是一类具有致病性且寄主范围广泛的昆虫病原真菌, 成功应用于农林害虫的防治 (Zhang *et al.*, 2011)。球孢白僵菌对茶黄螨 *Polyphagotarsonemus latus* 的侵染力在第 3 天达到 60% 以上, 并且影响种群的繁殖力 (张燕南等, 2023)。筛选出的球孢白僵菌 BbFZ51、Bb3752 等优良菌株用于防治松墨天牛 *Monochamus alternatus* 幼虫, 并且这些菌株与天敌昆虫也表现出良好的相容性 (邓竣丹等, 2021; 林文清, 2024)。菌株 BbANU1、Bn237 等是红火蚁 *Solenopsis invicta* 的有效生物防治品系 (蔡霓等, 2022; Park *et al.*, 2022)。苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 因其毒力强且杀虫范围广泛, 被应用于草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、二化螟 *Chilo suppressalis* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等鳞翅目害虫的防治 (Knaak *et al.*, 2010; Li and Bouwer, 2012; Jiao *et al.*, 2016)。苏云金芽孢杆菌对双翅目害虫同样具有杀虫效果, 刘婷婷等 (2023) 发现该菌对白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 的致死率

达到 80%，并且防治效果不受温度限制。此外，粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 的致死率达到 88%，此后发现该菌对二化螟、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫等均具有杀虫活性（Jeong *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2022; 袁梓涵等, 2024）。因此，开发昆虫病原微生物，对于实现害虫可持续防控具有重要意义。

目前，关于病原微生物防治稻飞虱的研究已有相关报道，其中病原真菌金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*、爪哇棒束孢 *Isaria javanica* 以及病原细菌铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 等均对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 表现出较高致病性，可作为褐飞虱的生物防治菌株（Jin *et al.*, 2011; 牛洪涛等, 2015; Zhao *et al.*, 2021）。万玉莹（2021）从灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内筛选出 3 株致病菌，包括铜绿假单胞菌、粘质沙雷氏菌以及皱纹假单胞菌 *Pseudomonas corrugata*。进一步研究发现，与单独使用螺虫乙酯、噻虫嗪和吡虫啉等杀虫剂相比，粘质沙雷氏菌与上述杀虫剂的联用能显著提高灰飞虱的死亡率（牛洪涛等, 2018）。关于病原真菌防治白背飞虱的报道，以金龟子绿僵菌为主，其对白背飞虱的防效达 80%，并且对天敌无杀伤作用（车正明等, 2018）。此后，研究发现降低金龟子绿僵菌与吡蚜酮的使用量并联合应用，能显著提升对白背飞虱的防效（姚经武, 2022）。相比之下，病原细菌防治白背飞虱的研究较少。因此，开展病原细菌防治白背飞虱的研究具有重要意义。

不动杆菌属 *Acinetobacter* 为革兰氏阴性球杆菌，可引起血液感染、肺炎、尿路感染和胃肠炎等多种人类疾病（Antunes *et al.*, 2014; Harding *et al.*, 2018）。同时，不动杆菌对线虫具有致死作用（田士靖, 2017）。单不动杆菌 *Acinetobacter soli* 最初从土壤中分离得到，后在医院中发现该菌会导致新生儿的血液感染，并且易在患者间传播（Kim *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2014）。近年来的研究表明，单不动杆菌也是草地贪夜蛾、飞虱等昆虫体内的一种共生细菌（徐天梅等, 2021; 李永萍等, 2022; 孙红波等, 2022）。然而，有关单不动杆菌对昆虫的研究仍然较少，本研究从白背飞虱体内分离到 1 株对白背飞虱若虫有杀虫活性的菌株 HUNAN-1，通过形态特征以及 16S rRNA 序列测定分析，确定该菌株 HUNAN-1 为单不动杆菌。随后，测定了菌株 HUNAN-1 对白背飞虱若虫的毒力，并研究了不同发酵时间和培养基 pH 值对发酵上清液的杀虫活性的影响，为该菌株在生物防治中的应用及杀虫微生物的开发奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 供试虫体

白背飞虱是在温度 $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $80\% \pm 5\%$ ，光周期 L : D=16 h : 8 h 条件下，以“黄花占”水稻培养 30 代以上的室内种群。

1.2 菌株的分离纯化

取 20 头白背飞虱若虫，用 75%乙醇（无水乙醇 7.5 mL，灭菌去离子水 2.5 mL）浸泡 3 min，再用灭菌去离子水冲洗 5 次。将白背飞虱置于离心管中，加入 1 mL 灭菌去离子水后匀浆，将匀浆后的样品 5 000 r/min 离心 5 min。离心后的上清液加入装有 100 mL 无机盐培

培养基（七水硫酸镁 0.2 g，硫酸铵 0.5 g，磷酸二氢钾 0.5 g，氯化钠 1.0 g，磷酸氢二钾 1.5 g，超纯水 1 000 mL）的三角瓶中，加入呋虫胺作为唯一碳源，制备成 50 mg/mL 的呋虫胺无机盐培养基。在 200 rpm/min，37°C 下培养 2 d。将培养的菌液以 5% 的接种量接种到浓度为 50 mg/mL 的呋虫胺无机盐培养基中，重复纯化 3 次。将纯化后的菌液接种于 LB 固体培养基（蛋白胨 10 g，氯化钠 10 g，酵母提取物 5 g，琼脂粉 15 g，超纯水 1 000 mL）试管斜面，4°C 保存。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态鉴定及生理生化

使用接种环挑取单菌落，划线法将菌株接种于无机盐培养基，倒置于 37°C 恒温培养箱中，培养至 24 h 出现生长良好的菌落。在光学显微镜下，观察菌落的形态特征、大小、颜色、透明度、表面纹理、边缘状况等。使用 LB 液体培养基富集菌株，将菌液 10 000 r/min，离心 10 min，弃掉上清，细菌沉淀用 1×磷酸盐缓冲盐水（PBS）清洗两遍后置于电镜固定液中保存。经脱水、干燥、喷金等步骤，进行扫描电镜（HITACHI Regulus 8100）表征。

革兰氏染色：使用接种环沾取菌液，将其涂布在滴有少量无菌水的载玻片上。使涂片在自然情况下干燥，并用火焰进行固定。在已固定的涂片上，滴加结晶紫染液进行染色，染色 1 min 后水洗；然后滴加革兰氏碘液于涂片上，作用 3 min 后水洗；滴加 95% 酒精，并频频摇动玻片，至无紫色脱出为止后水洗；进行复染，加沙黄染液，复染 0.5 min 后水洗，用吸水纸印干后，油镜检查。

根据《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化鉴定（东秀珠和蔡妙英，2001）。

过氧化氢酶反应：吸取 300 μ L 的 5% 过氧化氢溶液，滴在菌落的菌苔上。如果有气泡产生，即为阳性反应。如果没有反应，则为阴性反应。

V.P 试验：将菌株接种于装有 5 mL 葡萄糖蛋白胨水培养基（蛋白胨 5 g，磷酸氢二钾 2 g，葡萄糖 5 g，蒸馏水 1 000 mL）的试管中，置于 30°C 培养箱中培养 48 h 后，加入 500 μ L 的 V.P 试剂（硫酸铜 1 g，蒸馏水 10 mL，浓氨水 40 mL，10% 氢氧化钾 950 mL）和 1 mg 肌酐，充分震荡混匀。若出现红色，即为阳性反应。没有变化，则为阴性反应。

淀粉水解：用划线法将细菌接种在淀粉琼脂培养基（可溶性淀粉 2 g，牛肉膏 3 g，蛋白胨 5 g，NaCl 5.0 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1 000 mL）上，置于 30°C 培养箱中培养 48 h，加入碘液后观察现象。若菌落周围出现透明圈，而其他地方为蓝色，则为阳性。若培养基全部为蓝色，则为阴性。

吲哚反应：将菌株接种于装有 5 mL 肉汁胨培养基（蛋白胨 20 g，磷酸氢二钠 2 g，葡萄糖 10 g，蒸馏水 1 000 mL）的试管中，置于 35°C 培养箱中培养 3 d，加入 2 mL 吲哚试剂（对二甲氨基苯甲醛 5 g，戊醇 75 mL，浓盐酸 25 mL），充分震荡混匀。若培养基呈现红色，即为阳性。若培养基没有变化，即为阴性。

1.3.2 分子鉴定

将分离纯化的菌株接种于 LB 培养基，置于摇床 37°C，200 r/min 培养。菌液作为 PCR 模板，采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增，反应体系：菌液 1 μ L、27F 0.5 μ L、1492R 0.5 μ L、2 \times phanta Max Master Mix 5.0 μ L、dd H₂O 3 μ L；反应条件：95°C 3 min，95°C 15 s，52.1°C 20 s，72°C 1.5 min，32 个循环，72°C 5 min。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测并进行纯化，达到测序浓度和纯度后送北京擎科生物科技股份有限公司进行测序鉴定。

1.4 菌株杀虫活性测定

1.4.1 供试菌株

供试菌株为 1.1 分离的菌株。该供试菌种保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC M 20241953。

1.4.2 菌液杀虫活性测定

将菌株接种于 LB 液体培养基，摇床 37°C，200 r/min 培养。采用平板计数法，将菌悬液的浓度调整到 10⁹、10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ CFU/mL。采用喷雾法，对白背飞虱进行毒力测定。选取生长状况良好并且大小一致的水稻苗，用脱脂棉将水稻苗根部包住并浸湿，保持根部湿润。将水稻苗放入塑料杯中，每个塑料杯中放入 20 头生长状况良好的白背飞虱 3 龄若虫，塑料杯中喷雾 2 mL 菌悬液，并用纱网封口，每个处理重复 4 次。对照为没有接种菌株的 LB 液体培养基。并采用浓度为 10⁹ CFU/mL 的大肠杆菌 *Escherichia coli* 作为杀虫活性测定的对照菌株。喷雾时注意用纱网盖住杯口，防止若虫跳出。将处理好的若虫置于培养箱 27°C \pm 1°C、相对湿度 80% \pm 5%、光周期 L : D=16 h : 8 h 的条件下培养，每隔 12 h 检查若虫死亡情况，累积统计 120 h 校正死亡率。

1.4.3 菌株菌体和发酵上清液的杀虫活性

将 10⁹ CFU/mL 的菌悬液，10 000 r/min，离心 10 min，取上清液过 0.22 μ m 滤膜，得到细菌发酵上清液。向沉淀中加入 PBS 缓冲液 (pH7.4)，用移液枪轻轻吹打混匀，使沉淀悬浮于 PBS 缓冲液，超声破碎后过 0.22 μ m 滤膜，得到细菌破碎液。采用喷雾法对白背飞虱 3 龄若虫进行杀虫活性测定，其对照分别为未接种细菌的 LB 培养基和 PBS 缓冲液。每个处理重复 4 次，每隔 24 h 检查若虫死亡情况，累积统计 72 h 校正死亡率。

1.4.4 发酵时间对发酵上清液杀虫活性的影响

按照 5%接种量，将菌株接种到 LB 培养基后，摇床 37°C，200 r/min 培养至 10、12、18、24、36 h 后，分别取细菌发酵上清液对白背飞虱 3 龄若虫进行杀虫活性测定。每个处理重复 4 次，每隔 24 h 检查若虫死亡情况，累积统计 72 h 校正死亡率。

1.4.5 培养基 pH 值对发酵上清液杀虫活性的影响

LB 培养基灭菌之前，用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节培养基的 pH 至 5、6、7、8、9。培养基灭菌后，接种菌株摇床培养，取细菌发酵上清液对白背飞虱 3 龄若虫进行杀虫活性测定。每个处理重复 4 次，每隔 24 h 检查若虫死亡情况，累积统计 72 h 校正死亡率。

1.5 数据统计与分析

1.5.1 系统发育分析

将测序获得的基因序列与 GenBank 数据库中的基因序列进行 BLAST 同源序列比对，得到与目的菌株源性高的基因序列。下载与目的菌株源性较高的基因序列，利用 MEGA11.0 软件，采用邻接法 (Neighbour-Joining) 进行稳定性检测，并重复取样 1 000 次，进行聚类分析，构建系统发育树。

1.5.2 数据分析

使用 Excel 整理计算累积死亡率和累积校正死亡率，使用 SPSS 26.0 软件单因素方差分析的 Duncan 进行多重比较分析、Probit 法构建毒力回归方程，并估算致死中浓度 (LC₅₀) 和致死中时间 (LT₅₀)。显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。生存曲线采用 Kaplan-Meier estimator 进行存活分析，并用 log-rank test 进行显著性分析 ($P < 0.05$)，利用 GraphPad Prism 8.0 进行曲线作图。菌株 HUNAN-1 发酵液杀虫活性采用独立样本 t 检验进行分析 ($P < 0.05$)。累积死亡率和累积校正死亡率公式如下：

$$\text{累积死亡率 (\%)} = \text{累积死虫数} / \text{试虫数} \times 100$$

$$\text{累积校正死亡率 (\%)} = (\text{处理组累积死亡率} - \text{对照组累积死亡率}) / (1 - \text{对照组累积死亡率}) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 形态观察及生理生化反应

将分离纯化得到的菌株 HUNAN-1 通过平板划线法接种到无机盐固体培养基培养，观察其外观形态特征。菌株 HUNAN-1 在无机盐培养基上生长良好，菌落呈现白色、圆形、表面光滑且边缘整齐 (图 1-A)；油镜下观察革兰氏染色为阴性 (图 1-B)；在扫描电镜下菌体呈短棒状，无芽孢，无鞭毛 (图 1-C)。生理生化反应结果显示，菌株 HUNAN-1 无氧化反应，V.P 试验、淀粉水解、吲哚反应均为阴性。

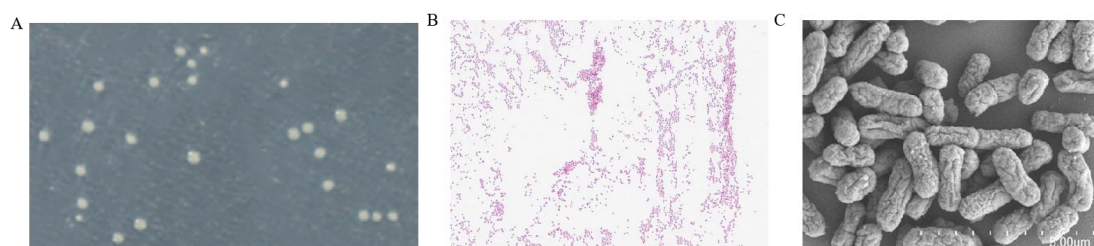


图 1 HUNAN-1 的菌落形态、革兰氏染色及扫描电镜图

Fig. 1 The colonial morphology, gram-stained cells and sem photograph of strain HUNAN-1

2.1.2 分子生物学鉴定

以菌株 HUNAN-1 菌液为模板, 采用 16S rRNA 通用引物进行扩增, 产物上机测序, 测得该菌的 16S rDNA 序列由 1 462 个碱基组成。用 BLAST 程序对菌株 HUNAN-1 的 16S rDNA 序列和 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较, 利用 MEGA11.0 软件构建系统发育树。结果与已报道的单不动杆菌(登录号: HQ407279.1)的序列同源性达 99.86%, 并在系统进化树上聚为一簇(图 2)。结合形态特征和生理生化特性, 确定菌株 HUNAN-1 为不动杆菌属的 *Acinetobacter soli*。

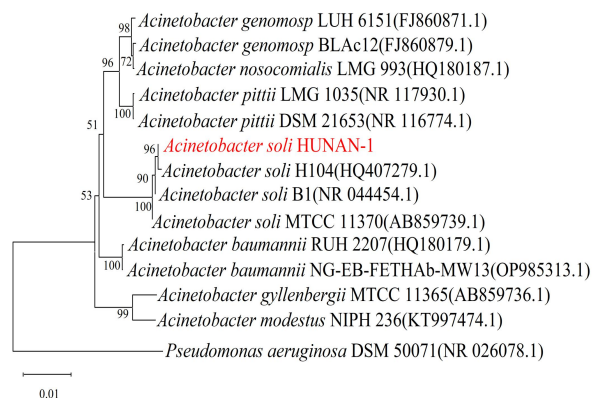


图 2 菌株 HUNAN-1 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain HUNAN-1 based on 16S rDNA sequences

2.2 菌液杀虫活性测定

喷雾法测定菌株 HUNAN-1 菌液对白背飞虱若虫的杀虫活性, 结果显示, 白背飞虱死亡率随菌液浓度的增加而升高(图 3)。其中当菌液浓度为 10^9 CFU/mL 时, 若虫校正死亡率为 100%, 此时致死中时间为 31.523 h, 并且与各个浓度之间均存在显著差异。浓度为 10^5 CFU/mL 时, 处理若虫校正死亡率为 16.67% (表 1)。测定菌株 HUNAN-1 的亚致死浓度 LC_{10} 、 LC_{25} 、 LC_{50} 分别为 2.85×10^5 CFU/mL、 2.71×10^6 CFU/mL、 2.71×10^6 CFU/mL (表 2)。

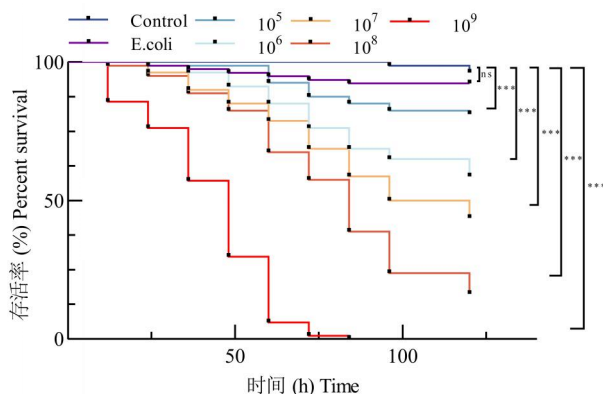


图 3 菌株 HUNAN-1 菌悬液侵染白背飞虱 3 龄若虫的生存曲线图

Fig. 3 Survival curve of the third-instar nymph of *Sogatella furcifera* infected by strain HUNAN-1 suspension
注: 图中“***”表示处理间差异显著 $P < 0.001$ 。Note: “***” in the figure indicated that the difference between treatments was significant ($P < 0.001$).

表 1 菌株 HUNAN-1 对白背飞虱 3 龄若虫的致病力

Table 1 Pathogenicity of strains HUNAN-1 to the third-instar nymph of *Sogatella furcifera*

浓度 CFU/mL Concentration	120 h 校正死亡率 (%) Corrected mortality at 72 h	回归方程 Regression equation	LT ₅₀ (95%置信区间) (h) 95% confidence interval	相关系数 Correlation coefficient
10 ⁵	16.67 ± 6.45 e	y = 2.485x - 5.916	>120	0.9547
10 ⁶	39.74 ± 6.45 d	y = 3.032x - 6.417	>120	0.9799
10 ⁷	55.13 ± 2.56 c	y = 2.987x - 6.01	102.715 (92.797 ~ 117.239)	0.9629
10 ⁸	83.33 ± 10.57 b	y = 3.967x - 7.382	72.612 (63.857 ~ 83.938)	0.9723
10 ⁹	100 ± 0 a	y = 4.346x - 6.513	31.523 (22.652 ~ 39.877)	0.9175

注: 表中校正死亡率为平均值 ± 标准误; 同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Note: The corrected mortality rate in the table was the mean ± SE; Different letters in the same column indicated that the level of $P < 0.05$ was significantly different.

表 2 菌株 HUNAN-1 处理白背飞虱 3 龄若虫 72 h 的毒力

Table 2 Toxicity of strain HUNAN-1 to the third-instar nymph of *Sogatella furcifera* for 72 hours

菌株 Strain	回归方程 Regression equation	LC ₁₀ (CFU/mL) 95% confidence interval	LC ₂₅ (CFU/mL) 95% confidence interval	LC ₅₀ (CFU/mL) 95% confidence interval	χ^2 (df)	相关系数 Correlation coefficient
HUNAN-1	y = 4.346x - 6.513	3.74 × 10 ⁴ (5.94 × 10 ² ~ 2.28 × 10 ⁵)	2.85 × 10 ⁵ (1.87 × 10 ⁴ ~ 1.12 × 10 ⁶)	3.71 × 10 ⁶ (5.94 × 10 ⁵ ~ 9.59 × 10 ⁶)	7.2 (3)	0.8669

2.3 菌株菌体和发酵上清液的杀虫活性

与 LB 培养基相比, 菌株 HUNAN-1 发酵上清液对白背飞虱若虫有显著的杀虫效果 (图 4-A)。发酵上清液处理白背飞虱若虫 48 h 时, 其死亡率为 44.94%, 处理 72 h 后, 死亡率达到 85.96%。而细菌菌体破碎液对白背飞虱若虫没有明显的杀虫效果 (图 4-B), 说明该菌株在发酵过程中可能产生了某种杀虫物质, 且该物质存在于胞外。

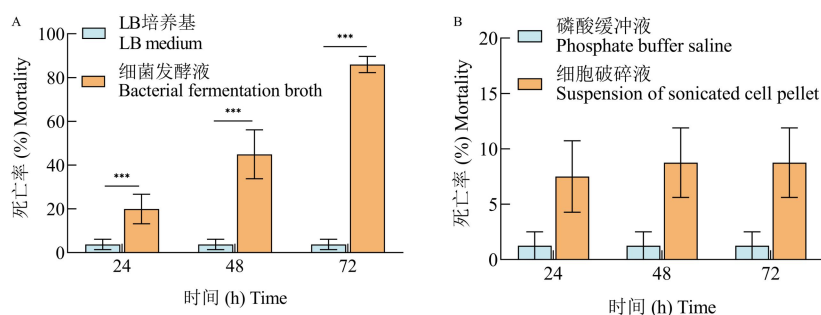


图 4 菌株 HUNAN-1 的发酵液 (A) 和细胞破碎液 (B) 处理白背飞虱 3 龄若虫 72 h 的杀虫活性

Fig. 4 Insecticidal activities of supernatant of fermentation broth (A) and suspension of sonicated cell pellet (B) of Strain HUNAN-1 against third-instar nymphs of *Sogatella furcifera* for 72 hours

注: 图中“***”表示处理间差异显著 $P < 0.001$ 。Note: “***” in the figure indicated that the difference between treatments was significant ($P < 0.001$).

2.4 发酵时间对发酵上清液杀虫活性的影响

不同发酵时间的菌株 HUNAN-1 上清液处理白背飞虱若虫, 24 h 后若虫出现死亡现象, 此时死亡率均低于 20%; 处理 48 h 若虫死亡率显著升高, 均达到 60% 以上; 处理 72 h 后, 各个时间段若虫死亡率达到最高值 (图 5)。不同发酵时间的上清液对白背飞虱若虫的致死率没有显著差异, 证明该菌株杀虫活性物质具有性质稳定性。

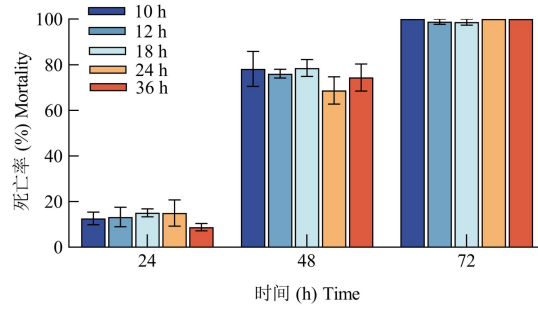


图5 发酵时间对菌株 HUNAN-1 上清液杀虫活性的影响

Fig. 5 Effect of fermentation time on insecticidal activity of the supernatant of strain HUNAN-1

2.5 培养基 pH 值对发酵上清液杀虫活性的影响

不同 pH 培养条件下，菌株 HUNAN-1 的上清液仍具有良好的杀虫活性（图 6）。pH 为最小值 5 时，处理 24 h、48 h 和 72 h 后的死亡率分别为 19.32%、47.23%、90.26%；当 pH 为最大值 9 时，死亡率分别为 20.01%、39.25%、90.92%。不同 pH 值处理间白背飞虱的死亡率差异不显著，表明 pH 值的改变不会影响上清液中杀虫活性物质的杀虫效果，该菌产生的杀虫活性物质具有良好的耐酸碱性能。

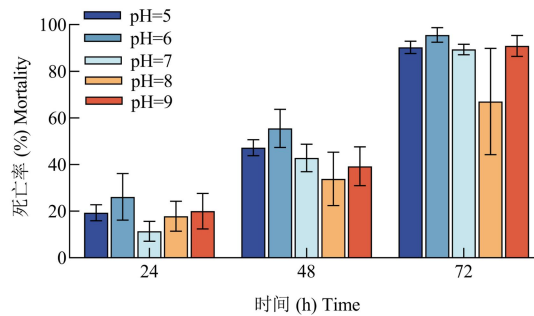


图6 pH 值对菌株 HUNAN-1 上清液 72 h 杀虫活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on the 72 hours insecticidal activity of the supernatant of strain HUNAN-1

3 结论与讨论

白背飞虱是一种对水稻安全生产构成威胁的重要迁飞性害虫。近年来，由于绿色防治的需求不断增加，微生物农药防治成为新的研究热点。目前，用于防治白背飞虱的生物农药相对较少。因此，开发用于防治白背飞虱的微生物杀虫剂显得尤为重要，筛选并利用昆虫体内细菌防治害虫的研究已有相关报道。程世昌（2023）从稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 肠道中分离得到 1 株高致死率的病原细菌粘质沙雷氏菌，作为开发微生物农药的原始菌株；另有研究从小菜蛾体内分离得到 *Enterococcus mundtii* 和粘质沙雷氏菌 2 株同样具有高致病力的细菌（Devi *et al.*, 2022）。本研究从白背飞虱体内分离得到 1 株革兰氏染色为阴性，无氧化反应并且 V.P 试验、淀粉水解、吡啶反应均为阴性的菌株 HUNAN-1。根据生理生化特征及分子生物学鉴定结果显示，该菌株与已报道的单不动杆菌结果一致（Nguyen *et al.*,

2018)。并且研究发现菌株 HUNAN-1 对白背飞虱若虫有致死作用，展现了应用于白背飞虱防治的潜力。

昆虫病原微生物的致病力是衡量其作为潜在防治菌株的重要指标之一，通常通过死亡率、致死中时间、致死中浓度等参数进行评价。本研究致病力测定结果显示，随浓度增加，菌株 HUNAN-1 对白背飞虱死亡率也随之增强，显著高于单不动杆菌对甜菜夜蛾的致死率(Eski *et al.*, 2018)。当菌株 HUNAN-1 浓度达到 10^9 CFU/mL 时，白背飞虱的校正死亡率达到 100%，在甜菜夜蛾中的致死率为 26.66%。这种差异可能与两种菌株分泌的毒素种类不同有关，菌株 HUNAN-1 可能依赖其他更高效的致死因子。此外，甜菜夜蛾和白背飞虱在生理特性上存在显著差异，如免疫防御机制、消化系统及体表结构的不同，这也可能导致两种害虫对病原菌的敏感性存在差异。综合来看，HUNAN-1 菌株对白背飞虱具有的高效性及快速致死能力，为进一步开发基于该菌株的微生物杀虫剂提供了重要依据。

病原微生物不仅可以直接侵染导致害虫死亡，其代谢物也可以起到杀虫作用。本研究中发现菌株的发酵上清液对白背飞虱若虫有较高的致死率。已有研究表明细菌发酵上清液具有杀虫活性，例如铜绿假单胞菌发酵上清液对褐飞虱若虫的致死率为 80%（牛洪涛等，2015），Kim 等（2011）也从铜绿假单胞菌发酵上清液中分离出对桃蚜具有较高致病力的代谢物鼠李糖脂；发光光杆状菌 *Photobacterium luminescens* 上清液中也观察到类似的杀虫效应（Wu *et al.*, 2020）。先前研究表明，单不动杆菌在发酵过程中会产生能够溶解磷、硫的活性物质，结合本研究中发酵上清液对白背飞虱具有致死作用的结果来看，表明该菌株在发酵过程中产生了多种代谢产物，而是哪种活性物质仍需进一步研究（张美珍等，2022）。

本研究对不同发酵时间及培养基 pH 值培养下菌株的杀虫活性进行测定，结果表明不同发酵时间下，菌株均有较好的杀虫活性且各组之间没有显著差异。李根（2020）对芽孢杆菌 *Bacillus sp.* 发酵上清液研究中得到相似的结论，表明发酵上清液中的杀虫物质性质稳定。田鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium hotanense* 在碱性条件下致死率明显高于酸性条件下，推测该杀虫物质偏碱性（王建宇，2021）。但我们发现在酸、碱性条件处理下，菌株 HUNAN-1 发酵上清液对白背飞虱仍保持良好的致死率，表明该杀虫活性物质具有良好的耐酸碱能力。这些研究对菌株发酵液活性物质的分离纯化以及微生物农药的开发都具有重要的意义。

综上所述，本研究分离并鉴定出 1 株对白背飞虱若虫具有较强致死作用的菌株。进一步研究发现该菌株的杀虫活性物质可能位于发酵上清液中，并且该物质的杀虫活性不受培养时间和培养基 pH 的影响。这为后续深入研究该菌株的杀虫活性物质奠定了理论基础。然而该菌株在田间的杀虫效果、对稻田天敌的影响以及与农药联用的防治效果，仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen [J]. *Pathogens and Disease*, 2014, 71 (3): 292-301.
- Cai N, Long XZ, Liu R, *et al.* Virulence and regulating immune-associated enzyme activity and gene expression of a *Beauveria bassiana* strain against red fire ants [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (6): 1517-1527. [蔡霓, 龙秀珍, 刘蓉, 等. 一株白僵菌对红火蚁的毒力及对免疫酶活性与基因表达的影响 [J]. *环境昆虫学报*, 2022, 44 (6): 1517-1527]

- Che ZM, Zhu CB, Li ZX, *et al.* Effect of *Metarhizium anisopliae* on controlling white backed rice plant hopper [J]. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, 2018, 6: 42-43. [车正明, 朱楚波, 李正祥, 等. 金龟子绿僵菌 CQMa 421 防治水稻白背飞虱试验 [J]. 云南农业科技, 2018, 6: 42-43]
- Cheng SC. Identification of Beacteria in Gut and Screening of Pathogens in the *Cnaphalocrocis medinalis* [D]. Yangzhou: Yangzhou University 2023. [程世昌. 稻纵卷叶螟肠道中细菌的鉴定及致病菌筛选 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023]
- Deng JD, Zhuang WX, Liu YJ, *et al.* Journal of plant protection pathogenicity of white muscardine fungus *Beauveria bassiana* against Japanese pine sawyer beetle *Monochamus alternatus* and its compatibility with ectoparasitic beetle *Dastarcus helophoroides* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48 (3): 602-609. [邓竣丹, 庄文欣, 刘玉军, 等. 球孢白僵菌对松墨天牛的致病力及其与花绒寄甲的相容性 [J]. 植物保护学报, 2021, 48 (3): 602-609]
- Devi S, Saini HS, Kaur S. Assessing the pathogenicity of gut bacteria associated with tobacco caterpillar *Spodoptera litura* (Fab.) [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12 (1): 8257.
- Dong XZ, Cai MY. Manual for the Identification of Common Bacterial Systems [M]. Beijing: Science Press, 2001: 64-398. [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398]
- Endo S, Yano H, Kanamori H, *et al.* High frequency of *Acinetobacter soli* among *Acinetobacter* isolates causing bacteremia at a tertiary hospital in Japan [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 52 (3): 911-915.
- Eski A, Demir İ, Güllü M, *et al.* Biodiversity and pathogenicity of bacteria associated with the gut microbiota of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 121: 350-358.
- Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16 (2): 91-102.
- Jeong HU, Mun HY, Oh HK, *et al.* Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia* sp. EML-SE1 against diamondback moth [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 48 (4): 541-545.
- Jiao Y, Yang Y, Meissle M, *et al.* Comparison of susceptibility of *Chilo suppressalis* and *Bombyx mori* to five *Bacillus thuringiensis* proteins [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 136: 95-99.
- Jin SF, Feng MG, Ying SH, *et al.* Evaluation of alternative rice planthopper control by the combined action of oil-formulated *Metarhizium anisopliae* and low-rate buprofezin [J]. *Pest Management Science*, 2011, 67 (1): 36-43.
- Kim D, Baik KS, Kim MS, *et al.* *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 46 (4): 396-401.
- Kim SK, Kim YC, Lee S, *et al.* Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (3): 934-938.
- Knaak N, Franz AR, Santos GF, *et al.* Histopathology and the lethal effect of cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae) [J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2010, 70 (3): 677-684.
- Li G. Study on the Active Substance of *Bacillus* sp. AMCC100018 Against *Meloidogyne incognita* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020. [李根. 芽孢杆菌 AMCC100018 杀南方根结线虫活性物质的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020]
- Li H, Bouwer G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 109 (1): 110-116.
- Li YP, Du GZ, Di T, *et al.* Diversity analysis of cultivable intestinal bacteria in different geographic populations of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53 (4): 1066-1077. [李永萍, 杜广祖, 狄藤, 等. 云南不同地理种群草地贪夜蛾肠道可培养细菌多样性分析 [J]. 南方农业学报, 2022, 53 (4): 1066-1077]
- Li Z, Qin Y, Jin R, *et al.* Insecticide resistance monitoring in field populations of the whitebacked planthopper *Sogatella furcifera* (Horvath) in China, 2019-2020 [J]. *Insects*, 2021, 12 (12): 1078.
- Lin WQ. Analysis of pathogenicity of *Beauveria bassiana* BbFZ51 strain to larvae of *Monochamus alternatus* [J]. *Fujian Forestry*, 2023, 39 (4): 34-37. [林文清. 球孢白僵菌 BbFZ51 菌株对松墨天牛幼虫致病力分析 [J]. 福建林业, 2024, 39 (4): 34-37]
- Liu TT, Wang Y, Zheng D, *et al.* Killing efficacy of *Bacillus thuringiensis* Israelensis on *Aedes albopictus* at different temperatures [J]. *China Tropical Medicine*, 2023, 23 (12): 1260-1265. [刘婷婷, 王英, 郑丹, 等. 不同温度下苏云金杆菌对白纹伊蚊的杀虫效果研究 [J]. 中国热带医学, 2023, 23 (12): 1260-1265]
- Nguyen NT. *Acinetobacter soli* SP2 capable of high-efficiency degradation of food emulsifier polysorbate 80 [J]. *Current Microbiology*, 2018, 75 (7): 896-900.
- Niu HT, Guo HF, Li YT, *et al.* Isolation and identification of an entomopathogenic bacterium from aphids and preliminary study of its efficacy against *Nilaparvata lugens* [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2015, 17 (5): 538-543. [牛洪涛, 郭慧芳, 李永腾, 等. 蚜虫病原细菌的分离鉴定及其对褐飞虱的杀虫活性初探 [J]. 农药学报, 2015, 17 (5): 538-543]
- Niu HT, Xiao LJJ, Wang N, *et al.* Combined effects of *Serratia marcescens* S-JS1 with five insecticides against *Laodelphax striatellus* and the effect of S-JS1 on activities of relative enzymes in *L. striatellus* [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2018, 20 (2):

- 185-191. [牛洪涛, 肖李俊杰, 王娜, 等. 粘质沙雷氏菌 S-JS1 与 5 种杀虫剂对灰飞虱的联合作用及该菌对灰飞虱相关酶活性的影响 [J]. 农药学报, 2018, 20 (2): 185-191]
- Park Y, Vatanparast M, Minoo Sajjadian S. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* ANU1 to the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* workers in Korea [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2022, 25 (2): 101913.
- Pellegrino FL, Vieira VV, Baio PV, et al. *Acinetobacter soli* as a cause of bloodstream infection in a neonatal intensive care unit [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49 (6): 2283-2285.
- Ramesh K, Padmavathi BG, Ram B, et al. Whitebacked planthopper *Sogatella furcifera* (Horváth) (Homoptera: Delphacidae) resistance in rice variety Sinna Sivappu [J]. *Euphytica*, 2014, 200: 139-148.
- Sun HB, Jiang J, Chen LY, et al. Identification of the core symbiotic bacteria of *Laodelphax striatellus* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62 (1): 160-175. [孙红波, 姜军, 陈丽莹, 等. 灰飞虱核心共生菌的鉴定 [J]. 微生物学报, 2022, 62 (1): 160-175]
- Tao A, Wang T, Pang F, et al. Characterization of a novel chitinolytic *Serratia marcescens* strain TC-1 with broad insecticidal spectrum [J]. *AMB Express*, 2022, 12 (1): 100.
- Tian SJ. The Complete Genome Sequence Analysis of *Acinetobacter johnsonii* MB44 with Nematicidal Activity [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017. [田士靖. 具有杀线虫活性的约氏不动杆菌 MB44 全基因组分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017]
- Wan YY. Pathogenicity and Location of Culturable Symbionts in *Laodelphax striatellus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021. [万玉莹. 灰飞虱中可培养共生细菌的致病性及其定位研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2021]
- Wang JY, Yu FY, Lu Y, et al. Isolation and identification of *Sphingobacterium hotanense* AMCC 100218, and characterization of its nematicidal properties [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48 (3): 689-696. [王建宇, 于丰源, 卢毅, 等. 和田鞘氨醇杆菌 AMCC 100218 菌株的筛选、鉴定及杀线虫特性 [J]. 植物保护学报, 2021, 48 (3): 689-696]
- Wang L, Tang N, Gao X, et al. Genome sequence of a rice pest, the white-backed planthopper (*Sogatella furcifera*) [J]. *GigaScience*, 2017, 6 (1): 1-9.
- Wu LH, Wang YT, Hsieh FC, et al. Insecticidal activity of *Photorhabdus luminescens* 0805-P2R against *Plutella xylostella* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191 (1): 191-200.
- Xu TM, Huang Y, Xiao GL, et al. Composition and differential analysis of culturable bacteria community in the gut of male and female *Sogatella furcifera* (Horvath) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 158-169. [徐天梅, 黄钰, 肖关丽, 等. 白背飞虱雌雄成虫肠道可培养细菌种类组成及差异分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 158-169]
- Yao JW, Wang BB, Li F, et al. *Metarhizium anisopliae* combined with pymetrozine reduction for control of rice white-backed planthopper [J]. *South-Central Agricultural Science and Technology*, 2022, 43 (5): 10-13. [姚经武, 王蓓蓓, 李飞, 等. 金龟子绿僵菌与吡蚜酮减量联用防控水稻白背飞虱 [J]. 中南农业科技, 2022, 43 (5): 10-13]
- Yuan ZH, Wang XW, Ding XH, et al. Isolation, identification and evaluation of insecticidal activity of an entomopathogenic bacteria strain infecting post-overwintering *Ostrinia furnacalis* larvae [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2024, 40 (2): 310-318. [袁梓涵, 王小武, 丁新华, 等. 亚洲玉米螟越冬后幼虫致病细菌——黏质沙雷氏菌的分离鉴定及杀虫活性评价 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40 (2): 310-318]
- Zhang K, Zhang W, Zhang S, et al. Susceptibility of *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) to six insecticides in China [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2014, 107 (5): 1916-1922.
- Zhang MZ, Wang LN, Liu Q, et al. Screening and identification of saline-alkali-tolerant phosphorus-solubilizing bacteria and functional verification in the growth of soybean [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2022, 51 (5): 34-44. [张美珍, 王丽娜, 刘权, 等. 耐盐碱溶磷菌的筛选鉴定及其在大豆生长中的功能验证 [J]. 河南农业科学, 2022, 51 (5): 34-44]
- Zhang SZ, Xia YX, Kim B, et al. Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the fungus, *Beauveria bassiana* [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80 (3): 811-826.
- Zhang YN, Bi SJ, Li Y, et al. Effects of the *Beauveria bassiana* GZGY strain on the pathogenicity and reproduction of *Polyphagotarsonemus latus* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2023, 60 (6): 835-1840. [张燕南, 毕司进, 李悦, 等. 球孢白僵菌菌株 GZGY 对茶黄螨致病力及生长发育的影响 [J]. 应用昆虫学报, 2023, 60 (6): 1835-1840]
- Zhao Q, Ye L, Wang Z, et al. Sustainable control of the rice pest, *Nilaparvata lugens*, using the entomopathogenic fungus *Isaria javanica* [J]. *Pest Management Science*, 2021, 77 (3): 1452-1464.