

Bt 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响*

孙彩霞 陈利军[†] 武志杰

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

摘要 研究表明以不同形式导入土壤中的杀虫晶体蛋白在土壤中的残留特性及其对土壤磷酸酶活性的影响有所不同。以 Bt 菌体向土壤导入杀虫晶体蛋白的试验表明: 随着培养时间的延长, 土壤中杀虫晶体蛋白含量逐渐增加, 到 15 d 时达到一个峰值, 而后下降, 在培养 30 d 时, 杀虫晶体蛋白含量基本与初始含量相同。以不同 Bt 棉组织添加土壤的试验表明: 随着培养时间的延长, 土壤中的杀虫晶体蛋白含量降低, 在培养初期下降的速度较快, 随后下降的速度较慢, 在培养的中后期基本稳定, 在培养 56 d 时, 杀虫晶体蛋白含量为初始值的 44.7% (ZK) 和 56.1% (GK)。不同 Bt 棉的盆栽试验表明: 在整个生育期内, Bt 棉花种植后根际土壤中杀虫晶体蛋白含量均明显比非 Bt 棉高。Bt 菌体和 Bt 棉组织处理的土壤磷酸酶活性均呈现出比对照高的趋势, 而在 Bt 棉种植过程中 Bt 棉根际土壤的磷酸酶活性则呈现出比非 Bt 棉低的趋势。无论以何种方式向土壤导入杀虫晶体蛋白, 土壤磷酸酶活性在不同杀虫晶体蛋白浓度处理间的差异显著。

关键词 Bt (*Bacillus thuringiensis*); 杀虫晶体蛋白; 土壤磷酸酶

中图分类号 S154.32 文献标识码 A

土壤是生态系统中物质循环和能量转化过程的重要场所, 转 Bt 基因作物的外源基因表达产物 Bt 杀虫晶体蛋白 (Bt insecticidal crystal protein, BICP) 可通过根系分泌物或作物残茬进入土壤生态系统^[1-3]。Bt 杀虫晶体蛋白是苏云金芽孢杆菌在芽孢形成过程中产生的, 可分为 α 外毒素、 β 外毒素、 δ 内毒素和虱因子, 而转基因植物产生的主要是 δ 内毒素。在菌体内的杀虫蛋白以一种前体的形式存在, 称为原毒素 (protoxin) 并自发形成伴胞晶体, 在昆虫中肠的碱性和还原性环境下被降解为 60 Kda 左右的活性肽, 并与受体蛋白结合, 嵌合于细胞膜, 引起膜穿孔, 最终导致昆虫瘫痪或死亡^[4-7]。但插入转基因作物体内的修饰基因不是编码合成非毒性的原毒素, 而是编码合成活性的杀虫晶体蛋白。因而活化原毒素的高肠道 pH 和专一蛋白酶将不是其产生毒性的必需因素了, 尤其是导入土壤中的蛋白能被结合到土壤环境中的其他颗粒而不易被微生物降解并仍然保持杀虫晶体蛋白活性, 将导致杀虫晶体蛋白的累积, 从而使土壤的特异生物功能类群以及

土壤生物多样性都有可能因此改变^[8-11]。土壤磷酸酶能酶促有机磷化合物水解, 转化为植物可利用的形态, 后者是土壤磷的重要组分。磷酸酶活性的变化与作物对营养元素的需求有很大关系, 其活性是评价土壤磷素转化方向与强度的指标。转 Bt 基因棉花是通过遗传工程技术能够表达 Bt 基因并产生一定杀虫晶体蛋白的棉花。转 Bt 基因棉花在田间释放后, 杀虫晶体蛋白通过根系分泌物或凋落物分解进入土壤后, 能否对在生态系统磷营养元素循环与周转中发挥重要作用的磷酸酶活性产生影响, 目前还不清楚。本研究试图阐明这一问题, 从而为转基因棉花的生产和生态风险评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理

1.1.1 苏云金芽孢杆菌 (Bt) 菌体杀虫晶体蛋白培养试验 供试土壤为棕壤。土壤有机质含量为 25.2 g kg⁻¹, 全氮 1.22 g kg⁻¹, 全磷 (P₂O₅) 1.12 g

* 国家自然科学基金项目 (40101016)、中国科学院沈阳应用生态研究所创新重大项目 (SCXZD0104 02)

[†] 通讯作者

作者简介: 孙彩霞 (1973~), 博士后, 主要从事植物安全性及逆境生理的研究工作。E-mail: suncaixia@hotmail.com

收稿日期: 2003-05-09; 收到修改稿日期: 2003-11-25

kg^{-1} , 全钾 (K_2O) 24.24 g kg^{-1} , 水解性氮 $106.37 \text{ mg kg}^{-1}$, 有效磷 15.92 mg kg^{-1} , 有效钾 $143.29 \text{ mg kg}^{-1}$, pH 为 5.72。每只试管(具通气塞)装入 1 g 土, 土壤含水量始终保持在 20%。苏云金芽孢杆菌粉剂(孢子和伴胞晶体蛋白混合物)由武汉科诺生物农药有限公司提供。用 Bradford^[12] 检测法测定粉剂中蛋白浓度。将粉剂用蒸馏水按测定蛋白浓度配置成低(L, $0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$), 中(M, $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$), 高(H, $0.08 \mu\text{g mL}^{-1}$) 浓度梯度的悬浊液。用磁力搅拌器混匀后立即向每只试管中加入 $100 \mu\text{L}$ 悬浊液。置于 30°C 恒温培养箱中培养, 分别培养 1、3、5、7、15、30 d 测定各指标。每个处理 3 次重复。

1.1.2 Bt 棉盆栽试验 将国内育成转 Bt 基因棉花国抗 12(GK)、中抗 30(ZK) 及非转 Bt 基因棉花中棉所 30(ZM), 温室盆栽。化肥作底肥一次施用, 尿素 1.25 g pot^{-1} , KH_2PO_4 0.97 g pot^{-1} , 每盆栽土 4 kg 。防治蚜虫、红蜘蛛 2 次。其他栽培管理按照常规进行。分别在苗期(6月27日)、盛蕾期(7月25日)、盛花期(8月27日)、盛铃期(9月23日)、盛絮期(10月21日)采集根际土壤样品进行各指标的测定。每个处理 3 次重复。

1.1.3 Bt 棉组织土壤培养试验 分别在苗期、盛蕾期、盛花期、盛铃期、盛絮期采集 Bt 棉 ZK、GK 和非 Bt 棉 ZM 的整个棉花植株, 自然风干, 粉碎并过 2 mm 筛。先将植物材料加蒸馏水浸湿, 然后按 1:3 比例与土壤混匀装入具塞(可通气)试管, 置于恒温培养箱 26°C 培养, 使土壤含水量稳定在 20%, 分别培养 1、3、7、14、21、28、56 d 取样并进行各指标的测定。每个处理 3 次重复。

1.2 测定方法

1.2.1 杀虫晶体蛋白含量的测定 采用 ELISA 方法测定。试剂盒及所需试剂均购买于美国 Envirologix 公司。具体操作步骤如下: (1) 每个土壤样品取 0.5 g , 加入 0.5 mL 提取液, 摇匀, 4°C 下提取 2 h, 6000 r min^{-1} 离心 10 min, 取上清液, 用于测定。(2) 包被。每孔加入样品上清液 $100 \mu\text{L}$, 混匀, 每个样品重复 2 次。在同一酶标板上分别加入对照(Negative Control)、 0.5 ng g^{-1} 、 2.5 ng g^{-1} 、 5 ng g^{-1} 的 Bt 标准杀虫晶体蛋白用来作标准曲线。将包被好的酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘中, 23°C 下培养 15 min。(3) 将包被好的酶标板取出, 用 8 孔道加样器每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 杀虫晶体蛋白酶抗体, 混匀, 23°C 下湿培养 1 h。(4) 洗板。倒掉培养液, 每孔加满洗涤液, 放置片刻, 甩掉洗涤液, 重复洗涤 4 次, 将

板内残留洗涤液在吸水纸上用力甩干。(5) 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 酶作用底物, 混匀, 放入湿盒, 23°C 下培养 30 min。(6) 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 终止液, 终止反应。(7) 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。根据标准曲线计算各个土壤样品中杀虫晶体蛋白含量。

1.2.2 土壤磷酸酶活性测定 供试土壤为酸性(pH 为 5.72), 故采用对硝基苯磷酸盐法测定酸性磷酸酶活性^[13]。

2 结果与分析

2.1 苏云金芽孢杆菌中的杀虫晶体蛋白在土壤中的残留及其对土壤磷酸酶活性的影响

由图 1 可知, 不同浓度 Bt 菌体处理的土壤中的杀虫晶体蛋白含量的变化趋势基本相同, 即随着培养时间的延长, 蛋白含量逐渐增加, 到 15 d 时达到一个峰值, 而后下降, 在培养 30 d 时, 蛋白含量基本与初始含量相同。在整个培养过程中, 土壤中的杀虫晶体蛋白浓度随菌体浓度的增加而增加。由图 2 可知, 在培养的初期(第 3 和第 5 d)高浓度及中低浓度菌体处理的土壤磷酸酶活性分别有所下降, 而后呈上升趋势, 在培养第 15 d 时酶活性最高, 之后又呈下降趋势。在培养结束时, 不同浓度菌体处理的土壤磷酸酶活性趋于相同, 在此之前的整个培养过程中高浓度菌体处理的土壤磷酸酶活性明显比中低浓度处理的高。相关样本的 M 测验表明不同菌体浓度处理的土壤磷酸酶活性差异显著。

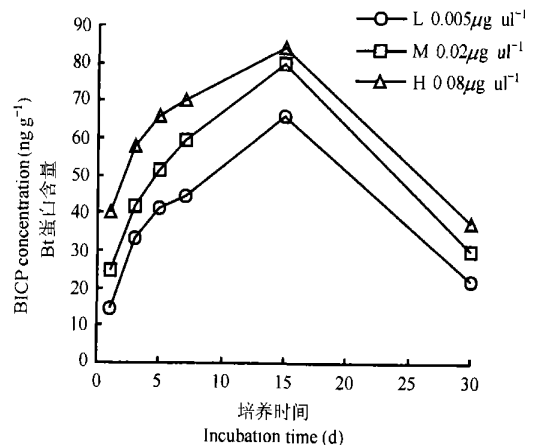


图 1 不同浓度 Bt 菌体杀虫晶体蛋白处理土壤中蛋白含量的变化

Fig. 1 Changes in BtCP concentration in soil treated with Bt different in content

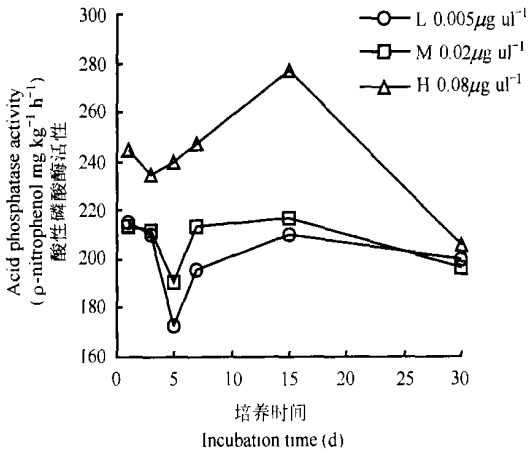


图 2 不同浓度 Bt 菌体杀虫晶体蛋白处理的土壤酸性磷酸酶活性变化

Fig 2 Changes in acid phosphatase activity in soil treated with Bt different in content

2.2 Bt 棉盆栽种植后杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响

由图 3 可知, Bt 棉根际土壤中的杀虫晶体蛋白含量均比非 Bt 棉 ZM 高, 且不同 Bt 棉在不同生育期释放到土壤中的杀虫晶体蛋白含量有所不同。在生育前期(苗期、盛蕾期) Bt 棉 ZK 释放到土壤中的杀虫晶体蛋白含量低于 Bt 棉 GK, 在生育中后期(盛花期、盛铃期、盛絮期) Bt 棉 ZK 释放到土壤中的杀虫晶体蛋白含量则明显高于 Bt 棉 GK。Bt 棉 ZK 释放后, 土壤中的杀虫晶体蛋白浓度分别在苗期和盛铃期达到高值, 而 Bt 棉 GK 释放后, 土壤中的杀虫晶体蛋白浓度只有在盛蕾期最高。在本试验中, 土壤中杀虫晶体蛋白的累积主要是由于 Bt 棉释放后通过根系分泌物导入的, 而上述变化则可能与不同 Bt 棉植株中杀虫晶体蛋白的时间表达特性有关。由图 4 可知, 在棉花的不同生育期, 土壤中磷酸酶活性有

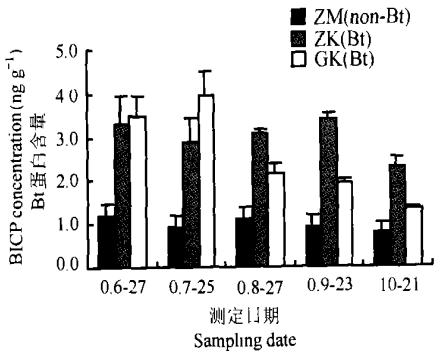


图 3 不同 Bt 棉花盆栽种植后土壤中杀虫晶体蛋白含量的变化

所变化, 其中在盛蕾期, 土壤磷酸酶活性为最高。在整个生育过程中, 种植非 Bt 棉土壤的磷酸酶活性呈现出比 Bt 棉高的趋势, 而 Bt 棉 ZK 释放后土壤中的磷酸酶活性呈现出比 Bt 棉 GK 低的趋势。相关样本的 M 测验表明, 非 Bt 棉 ZM 与 Bt 棉处理的土壤中杀虫晶体蛋白含量差异显著; 非 Bt 棉 ZM 与 Bt 棉 ZK 的土壤磷酸酶活性的差异显著。

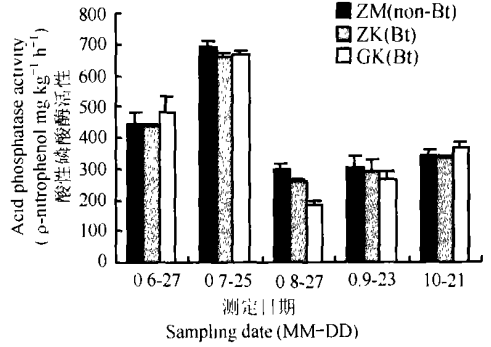


图 4 不同 Bt 棉花盆栽种植后土壤中酸性磷酸酶活性的变化

Fig 4 Changes in acid phosphatase activity in soils planted with different Bt cotton

2.3 Bt 棉组织中杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响

由图 5 可知, 随着培养时间的延长, 两种 Bt 棉花组织处理土壤中的杀虫晶体蛋白含量降低, 在培养初期(7 d 内) 下降的速度较快, 随后下降的速度较慢, 在培养的后期(28 d 后) 基本稳定。在培养结束时 Bt 棉处理的杀虫晶体蛋白含量分别为初始量的 44.7% (ZK)、56.1% (GK)。在整个培养过程中, 转基因棉花 ZK 的杀虫晶体蛋白含量明显高于转基因棉花 GK, 另外由于土壤中存在一定的 Bt 或者受检

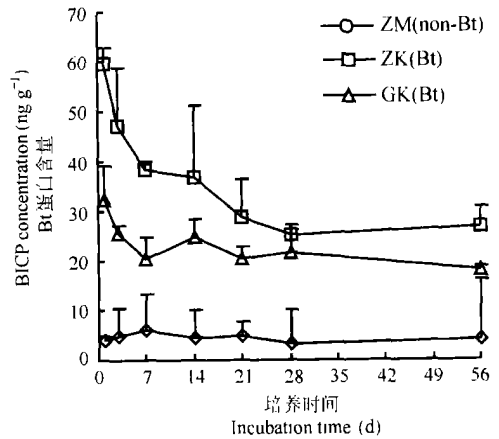


图 5 Bt 棉花组织中杀虫晶体蛋白的土壤残留特性

Fig. 5 Persistence of BtCP from Bt cotton tissues in soil

测精度的影响,非 Bt 棉花 ZM 的土壤处理中也检测到低浓度的蛋白。由图 6 可知,在培养的初期(3 d 内),各处理的磷酸酶活性明显上升并且在第 3 d 达到最大值,而后又呈明显下降的趋势,到培养的后期(28 d 后)酶活性基本稳定。另外,在整个培养过程中两种 Bt 棉处理的酶活性呈现出比非 Bt 棉高的趋势。相关样本的 M 测验结果表明各处理酶活性间的差异达极显著水平。

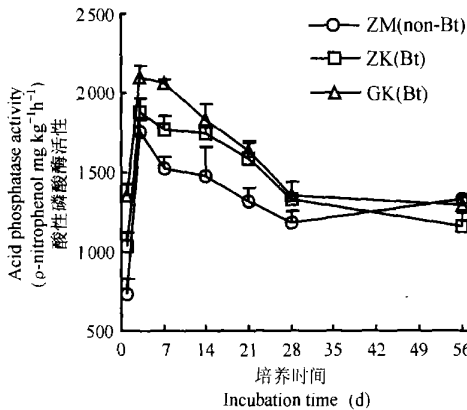


图 6 Bt 棉花组织处理土壤酸性磷酸酶活性的变化

Fig 6 Changes in soil acid phosphatase activity treated with Bt cotton tissues

3 讨论与结论

转 Bt 基因作物释放后导入土壤中杀虫晶体蛋白的生物活性是评价其对非目标物种潜在风险和命运的最重要参数^[1]。因而,为了评价杀虫晶体蛋白对土壤环境的潜在风险,学者们对杀虫晶体蛋白在土壤中的残余量进行了大量的试验并取得了一些结果。在试验室内进行的纯化杀虫晶体蛋白与土壤性质关系的研究结果表明,杀虫晶体蛋白能快速被土壤吸附并紧紧地结合,结合态杀虫晶体蛋白仍保持杀虫活性且比游离态杀虫晶体蛋白更抗降解^[14~17]。另外,转 Bt 基因作物释放后,向土壤中导入杀虫晶体蛋白的主要方式之一是作物残茬,因而可以通过将转 Bt 基因作物组织添加到土壤中的研究以揭示植株体内杀虫晶体蛋白在土壤中的残留特性。Sims 和 Holden 以 Bt 玉米组织为添加材料处理土壤的研究表明,转 Bt 基因玉米组织材料中的杀虫晶体蛋白的生物活性由于暴露在土壤中而快速下降^[18]。Palm 等以 Bt 棉组织为添加材料处理土壤的研究表明,由于生物降解或与土壤颗粒的缓慢结合和吸附, Bt 棉组织加入土壤的 7 天内,土壤中可提

取的杀虫晶体蛋白浓度快速下降,之后下降的速度比较稳定,甚至维持数周不变^[2]。在灭菌土壤中蛋白浓度是稳定的,这一试验结果揭示了生物降解的作用。

本文以不同浓度菌体杀虫晶体蛋白及不同 Bt 棉组织添加处理土壤的研究表明,用菌体和 Bt 棉组织处理土壤后,杀虫晶体蛋白在土壤中的残留特性有所不同。在菌体处理中,土壤中杀虫晶体蛋白含量有一个上升的过程,这可能是由于二者导入土壤中杀虫晶体蛋白的形式不同,因而在土壤中衰变的快慢不同。另外, Bt 组织中杀虫晶体蛋白比菌体中杀虫晶体蛋白在土壤中降解快,这可能是由于植物材料腐烂时释放出降解性酶和化合物(直接来源于植物或者是来源于植物相关微生物);或者由于植物材料的添加增加了土壤微生物的种群。不同 Bt 棉释放后根际土壤中杀虫晶体蛋白的含量的研究结果表明,在生长发育前期(苗期、盛蕾期) Bt 棉 ZK 释放到土壤中的杀虫晶体蛋白含量低于 Bt 棉 GK,在生长发育中后期(盛花期、盛铃期、盛絮期) Bt 棉 ZK 释放到土壤中的杀虫晶体蛋白含量则明显高于 Bt 棉 GK。在该处理中,土壤中的杀虫晶体蛋白累积主要是由于 Bt 棉释放后通过根系分泌物导入的,而上述变化则可能与不同 Bt 棉植株中杀虫晶体蛋白的时间表达特性有关。

土壤酶活性反映了土壤中各种生物化学过程的强度和方向,是土壤重要的生物学特性。现有的研究表明,转 α 淀粉酶和木质素过氧化物酶基因的紫花苜蓿释放后,土壤中的脱氢酶和碱性磷酸酶活性下降^[19];转凝集素和内切几丁质酶基因的马铃薯释放后,土壤中脱氢酶活性上升^[20];Jepson 等提出转 Bt 基因植物的种植可能改变脲酶、脱氢酶、磷酸酶的活性但没有进行试验验证^[21]。目前尚无人开展 Bt 棉组织中杀虫晶体蛋白对土壤磷酸酶影响的系统研究。本文的研究结果表明:在室内试验中 Bt 菌体和 Bt 棉组织处理的土壤磷酸酶活性均呈现出比非 Bt 棉处理高的趋势,而在 Bt 棉盆栽种植过程中 Bt 棉土壤的磷酸酶活性则呈现出比非 Bt 棉低的趋势。但无论以何种方式向土壤中导入杀虫晶体蛋白,土壤磷酸酶活性在不同杀虫晶体蛋白浓度处理间的差异显著。值得注意的是,土壤是复杂的基质,许多因子可以影响土壤中蛋白的降解和磷酸酶的活性,而导入土壤中杀虫晶体蛋白对磷酸酶的影响不仅可能与杀虫晶体蛋白的类型、形式(孢子或晶体)、浓度有关,而且可能与土壤类型、土壤湿度、土

壤微生物的构成、耕作的深度和气候等因子有关。因而目前研究获得的尚为描述性结果, 土壤磷酸酶活性与杀虫晶体蛋白含量的数量化关系仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Morra M J. Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. *Mol. Ecol.*, 1994, 3: 53~ 55
- [2] Palm C J, Schaller D L, Donegan K K, *et al.* Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *karstaki* delta endotoxin. *Can. J. Microbiol.*, 1996, 42(12): 1 258~ 1 262
- [3] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, 402(12): 480
- [4] Cummings C E, Armstrong G, Hodgman T C, *et al.* Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Baillus thuringiensis* δ endotoxin. *Mol. Memb. Biol.*, 1994, 11: 87~ 92
- [5] Ferré J, Escriche B, Bel Y, *et al.* Biochemistry and genetics of insect resistance to *Baillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 132: 1~ 7
- [6] Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Baillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.*, 1989, 53: 241~ 255
- [7] Van R J, McGaughey W H, Johnson D E, *et al.* Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide of *Baillus thuringiensis*. *Sci.*, 1990, 247: 72~ 74
- [8] Heckel D G. The complex genetic basis of resistance to *Baillus thuringiensis* toxin in insects. *Biocontrol Science & Technology*, 1994, 4: 405~ 417
- [9] Koskella J, Stotzky G. Microbial utilization of free and clay bound insecticidal toxins from and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 3 561~ 3 568
- [10] McGaughey W H, Whalon M E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Science*, 1992, 258: 1 451~ 1 455
- [11] Sims S R, Ream J E. Soil inactivation of the insecticidal protein with in transgenic cotton tissue: Laboratory microcosms and field studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 1 502~ 1 505
- [12] 汪家政, 范明主编. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2001. 42~ 46. Wang J Z, Fan M. eds. *Protein Technology Handbook (In Chinese)*. Beijing: Science Press, 2001. 42~ 46
- [13] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 252~ 254. Lu R K. ed. *Analysis Methods in Soil Agrochemistry (In Chinese)*. Beijing: Agricultural Science Press, 1999. 252~ 254
- [14] Venkateswari G, Stotzky G. Banding of the protoxin and toxin proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *karstaki* on clay minerals. *Current Microbiology*, 1992, 25: 1~ 9
- [15] Tapp H, Stotzky G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *karstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 1 786~ 1 790
- [16] Cecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *karstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. and Biochem.*, 1998, 30: 463~ 470
- [17] Cecchio C, Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *karstaki* bound to complexes of montmorillonite humic acids Al hydroxypolymers. *Soil Biol. and Biochem.*, 2001, 33: 573~ 581
- [18] Sims S R, Holden L R. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* var. *karstaki* CryIA (b) protein in com tissues. *Environmental Entomology*, 1996, 25: 659~ 664
- [19] Donegan K K, Seidler R J, Doyle J D, *et al.* A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: Effects on the soil ecosystem. *J. Appl. Ecol.*, 1999, 36: 920~ 936
- [20] Griffiths B S, Geoghegan I E, Robertson W M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non target soil organisms and processes. *J. Appl. Ecol.*, 2000, 37: 159~ 170
- [21] Jepson P C, Croft B A, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release for *Baillus thuringiensis* genes in crop plants. *Mol. Ecol.*, 1994, 3: 81~ 89

PERSISTENCE OF Bt TOXIN IN SOIL AND ITS EFFECTS ON SOIL PHOSPHATASE ACTIVITY

Sun Caixia Chen Lijun[†] Wu Zhijie

(*Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China*)

Abstract Experiments in lab indicated that the persistence of Bt insecticidal crystal protein (BICP) in soil and its effects on soil phosphatase activity were different between forms of BICP introduced into the soil. In the first treatment of the experiments, Bt was applied directly into the soil with results showing that BICP concentration in the soil increased gradually along with the incubation time and reached the peak value on D15 and then decreased. On D30 the concentration of BICP was almost the same as at the initial stage after the application. In the second treatment, Bt cotton tissues were used. The results showed that BICP concentration in soil decreased along with the incubation time. There was a rapid decline at the initial stage of the incubations and the trend leveled off in the middle and late stages. On D56 of the incubation, BICP in soil was at 44.7% (ZK) and 56.1% (GK) of the initial values. In the third treatment, Bt cotton was planted in pots. Analysis of the soil showed that during the whole growth period, the concentration of BICP in the rhizospheric soil of Bt cotton was significantly higher than that of non-Bt cotton. The treatment with Bt and Bt cotton tissues showed a trend of the soil phosphatase activity being higher than that in CK. But the phosphatase activity in the rhizospheric soil of Bt cotton was lower than that of non-Bt cotton. Whatever forms of BICP were introduced into soil, the difference in soil phosphatase activity between treatments different in BICP concentration treatment was significant.

Key words Bt (*Bacillus thuringiensis*); Insecticidal crystal protein; Soil phosphatase