

三株杀虫菌的分离和鉴定

吴风雅 尤其傲

(广西科学院生物研究室)

摘 要

分别从粘虫 (*Leucanic sepsata* Walker)、斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* Falericus) 和马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Fualker) 自然死亡的幼虫尸体分离出的101、300和403三个产晶体的芽孢杆菌, 经室内毒力测定和大田防治试验, 它们对多种农林害虫具有较强的致病力。经鉴定, 101和300菌株定名为苏芸金杆菌武汉变种 (101 & 300) [*Bacillus thurigiensis* var. *Wuhanensis* (101 & 300)]。403菌株定名为苏芸金杆菌天门变种 (403) [*Bacillus thurigiensis* var. *Tinmensis* (403)]

近几年, 我们从广西一些地区采集到自然死亡的粘虫 (*Leucania separata* Walker) 斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* Falericus) 和马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 等20多种幼虫尸体上分离出50多株细菌。其中从粘虫分离出的101菌株, 从斜纹夜蛾分离出的300菌株和从松毛虫分离出的403菌株, 经室内毒力测定表明, 对多种农林害虫有较强致病力 (详见表2); 在桂林、柳州和梧州等地区大田防治试验中, 亦具有较好的防治效果 (详见表3)。因此, 这三个菌作为细菌杀虫剂生产菌具有实用价值。本文报道对这三株菌的鉴定结果。

一、试验材料与方法

(一) 材料: 试验菌株为本室分离筛选的101、300和403菌株。对比菌株为苏芸金芽孢杆菌1—9血清型与7216、HD—1和140菌株 (引自武汉大学生物系)。

(二) 方法:

1. 形态和培养特征 观察系用10—60小时的营养琼脂平皿培养、斜面培养、半固体培养、肉汤培养和马铃薯块培养, 并进行了电镜观察和拍照。
2. 生化试验, 各项生化试验按文献^[1、2、4]方法进行。

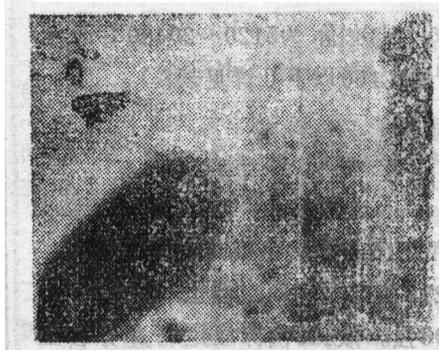
3. 抗原分析, 各菌株鞭毛抗原及其免疫血清的制备基本上按Norris (1964) 等人的方法〔1、2、3、4〕进行。而101、300和140菌株无鞭毛抗原, 其菌体(O)抗原的制备按中科院武汉病毒研究所的方法〔12、13〕进行, 抗原抗体凝集反应按常规方法〔3、6、14〕进行。

二、结 果

(一) 形态和培养特性

101、300和403三菌株在营养琼脂平皿上均生长良好; 菌落扁平、灰白色、无光泽, 边缘不整齐; 在24小时内菌落大小为0.3—0.5厘米, 在48小时内为0.7—1.0厘米; 在20小时内的培养, 绝大多数为营养细胞——杆状, 两端钝圆, 大小为 $1.0\sim 1.2\times 2.5\sim 4.0$ 微米; 营养细胞常2~数个连成链状, 革蓝氏染色反应为阳性。在培养20—30小时内大部分营养细胞形成芽胞囊——它们不膨大, 大小为 $1.0\sim 1.4\times 3.0\sim 4.5$ 微米; 在培养40—48小时内, 大部分芽胞囊成熟、裂解并释放出游离的芽胞和伴孢晶体。芽胞椭圆形, 大小为 $1.0\sim 1.8\times 1.3\sim 1.5$ 微米; 伴孢晶体菱形, 大小为 $1.0\sim 1.8\times 1.8\sim 2.5$ 微米。

根据电镜观察和照片表明, 101和300菌株无鞭毛(见版图Ⅱ、Ⅲ), 403菌株具有周生鞭毛(见版图Ⅰ)。悬滴培养活菌观察和半固体营养琼脂培养表明, 101和300菌株无运动性能, 而403菌株具有运动性能。



版图Ⅰ 403菌株营养细胞电镜照片
($\times 17000$ 倍)
菌表面的丝状物为鞭毛



版图Ⅱ 300菌株营养细胞电镜照片
($\times 21000$ 倍)
菌体表面无鞭毛

在马铃薯上培养, 101、300和403三菌株均生长良好, 但不产生色素。在肉汤中培养48小时左右, 403和300菌株形成表面菌膜, 而101菌株则不形成菌膜。

101、300和403三菌株生长繁殖的适应温度范围为 $15\sim 45^{\circ}\text{C}$, 最适温度为 $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。适应的PH范围为 $5\sim 9$, 最适为 $\text{PH}7.0\pm 0.2$ 。

(二) 生化反应

101、300和403三菌株均能同化葡萄糖、果糖、海藻糖、淀粉、七叶灵和水杨苷; 不能同化蔗糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖; 尿酶和V.p.反应均为阳性。403菌株能同化纤维二糖,

而101和300菌株则不同化纤维二糖。卵磷脂酶反应均为阴性(详见表4)。



版图Ⅱ 101菌株电镜照片

左图为营养细胞,无鞭毛($\times 17000$ 倍)

右图为芽孢和伴孢晶体($\times 25200$ 倍)

(三) 抗原分析

101、300和140三菌株的菌体(O)抗原与抗血清的交叉反应,其效价多数为1280,个别为2560(详见表5)。交叉吸收后的抗血清再与同源抗原的凝集反应,其效价均在80以下(详见表6)。

403、7216和HD-1的鞭毛抗原及其抗血清的交叉反应,其效价为5120~20480(详见表5),而相互吸收后的抗血清再与同源抗原反应,其效价均在160以下(详见表7)。

三、结论与讨论

(一) 上述试验结果表明,403菌株与1.898、HD-1和7216菌株具有相同的鞭毛抗原,而在生化反应方面则它们之间有或多或少的不同;403与7216基本上相同,但也 有所差异,如对七叶灵的同化,403比7216强,而尿酶反应则7216比403强。故403菌株应定名为苏芸金杆菌〔第三血清型(3a3b)〕天门变种(403)〔*Bacillus thuringiensis* var. *Tinmensis*(403)〕(12、13)。

(二) 101和300与140和1902菌株的菌体(O)抗原相同,但1902菌株具有鞭毛,而140与101和300菌株无鞭毛,故101和300与140菌株应属基本上相同的变种,但它们之间的生化反应和某种培养特征却有差异,如尿酶反应140为不定,300为弱阳性反应,101为中强阳性反应,在试管肉汤培养中140与300形成菌膜,而101则不形成菌膜。此外,在淀粉水解反应中101和300比140反应强,相反的,对水杨苷反应则140比101和300强些。根据上述试验,101和300菌株应定名为苏芸金杆菌武汉变种(101 & 300)〔*Bacillus thuringiensis* var. *Wuhanensis*(101 & 300)〕。

101、300和403菌均分离自无任何使用过细菌农药历史的地方自然死亡的幼虫尸体,可

见广西一些地区亦有近似7216、HD—1和140的苏芸金杆菌变种的分布，这在昆虫病原菌的生态地理分布方面提供了新的记录，亦为各地害虫的微生物防治提供了有效的菌种资源。

表1 对比菌株一览表

名称	原菌号	菌号	血清型
苏芸金杆菌苏芸金变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	009	1.896	H ₁
苏芸金杆菌幕虫变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	0.21	1.897	H ₂
苏芸金杆菌阿来变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>	E—3	1.898	H _{3a}
苏芸金杆菌猝倒变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>	0.16	1.899	H _{4a-4b}
苏芸金杆菌蜡螟变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	087	1.902	H _{5a-5b}
苏芸金杆菌杀虫变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>	010	1.903	H ₆
苏芸金杆菌杆鮎泽变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	096	1.904	H ₇
苏芸金杆菌莫里逊变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i>	012	1.905	H ₈
苏芸金杆菌多窝变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	013	1.906	H ₉
苏芸金杆菌武汉变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>wuhancensis</i>		140	
苏芸金杆菌戈尔斯德变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>		HD—1	H _{3a-3b}
苏芸金杆菌天门变种 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tienmensis</i>		7216	H _{3a-3b}

表2

室内毒力试验结果简表

参试昆虫名称	参试菌号			死亡率 (%)
	101	300	403	
菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i> (L.)	+	+	-	80—100
小菜蛾 <i>Plutella xylostalla</i> (L.)	+	+	-	90—100
臭椿皮蛾 <i>Eligma narcissus</i> (Cramer)	+	+	+	90—100
泡桐臭椿	+	-	-	100
竹卷叶虫	+	+	-	60—90
马兰卷叶虫	+	-	-	100
稻纵卷叶螟 <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> Guenée	+	+	+	60
银边卫矛卷叶虫	+	-	-	100
厚壳树害虫	+	-	-	77
叶蜂	+	+	+	70
桂凤蝶 <i>Papilio cresphontes</i> Cramer	+	+	-	88—100
家蚕 <i>Bombyx mori</i> (L.)	+	+	+	90—100
斜纹夜蛾 <i>Prodenia litura</i> Fabr.	+	+	+	35
芭蕉弄蝶 <i>Erionota thorax</i> L.	+	-	-	100
黄杨卷叶虫	+	+	-	90—100
米象 <i>Sitophilus oryzae</i> (L.)	+	+	-	不定
谷蠹 <i>Rhyzopertha dominica</i> Fabr.	+	+	-	不定
梨小绿叶蝉 <i>Empoasca flavescens</i> Fabr.	+	+	+	不定

“+”表示参试。“-”表示不参试。“不定”表示或许实验方法有问题，效果不显著。

表3

试点大田防治效果记录简表

菌号	防治对象	防治面积 (亩)	试验地点	菌剂剂型	施药剂量 公斤/亩	害虫减退率 (%)	施药方法	附注
300号 与 101号	苞菜 菜青 地虫	10	桂林市 七星大队	土法生产固体	0.5	85—95	兑水 100 倍 150 喷 雾	1978年 10月
300号 与 101号	白小 菜菜 地蛾	20	桂林市郊穿山 公社穿山大队	同上	0.5	90	同上	1978年 9月~10月
300号	稻田 卷叶 纵虫	0.07	广西钟山县	同上	0.5	66.2	同上	1979年6月 施药后下雨 影响试验效 果
101号		0.085				60.9		
300号		0.76				92.2		
300号		0.08				64.5		
300号 101号 403号	稻稻 苞 田虫	40	广西一〇三八 农场三中队	同上	0.5	80—90	同上	1979年 6月
300号	同 上	0.47	广西一〇三八 场大队北山脚	同上	0.5	84	同上	1979年 8月
101号		0.47				87		
300号		2.0				86		

表4

对照和未知菌株生化反应结果表

菌种编号	血清型	菌种名称	生化反应类别															
			葡萄糖	蔗糖	果糖	阿拉伯糖	海藻糖	甘露糖	木糖	纤维二糖	淀粉水平	七叶灵	水杨苷	卵磷脂酶	V.P	菌膜	色素	尿酶
1.896	H ₁	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	++	+	++	+	+	+	+	-	-
1.897	H ₂	<i>Bac. var. finitimus</i>	+	+++	+	-	+	-	-	++	-	+++	+++	+	+	-	+	
1.898	H _{3a}	<i>Bac. var. alesti</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	++	-	-	+	+	-	+	-
1.899	H _{4a-4b}	<i>Bac. var. sotto</i>	+	+++	+	-	+	-	-	++	+++	±	+	+	-	-	+	
1.902	H _{5a-5b}	<i>Bac. var. galleriae</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	+++	+++	±	-	+	-	-	+
1.903	H ₆	<i>Bac. var. entomocidus</i>	+	+	+	-	+	+	-	±	++	+++	±	-	-	-	-	+
1.904	H ₇	<i>Bac. var. aizawai</i>	+	+	+	+	+	-	-	+++	++	+++	+	+	-	-	-	-
1.905	H ₈	<i>Bac. var. morrisoni</i>	+	+	+	-	+	±	-	++	+	-	-	+	-	-	-	-
1.906	H ₉	<i>Bac. var. tolworthi</i>	+	+++	+	-	+	-	-	++	+++	+	+	-	-	-	-	-
140	H _{5a-5b}		+	-	+	-	+	-	-	+	+++	+++	-	+	+	-	±	
HD-1	H _{3a-3b}		+	-	+	-	+	-	-	+++	+++	+++	-	+	+	+	-	+++
7216	H _{3a-3b}		+	-	+	-	+	-	-	++	+++	+++	+	-	+	+	-	+++
403	未知		+	-	+	-	+	-	-	++	+++	+++	+	-	+	+	-	++
300	未知		+	-	+	-	+	-	-	+++	+++	+++	-	+	+	-	+	
101	未知		+	-	+	-	+	-	-	+++	+++	+++	-	+	-	-	++	

“+”表示弱阳性反应。“++”表示中强阳性反应。“+++”表示强阳性反应。“-”表示阴性反应。

HD-1的部分生化反应摘自湖北天门县微生物所资料。

表5 对比菌株与试验菌株的同源与交叉凝集反应

抗原	抗血清													
	1896	1897	1898	1899	1902	1903	1904	1905	1906	300	101	403	140	7216
1896 (H)	20480													
1897 (H)	20480													
1898 (H)	20480													
1899 (H)		20480												
1902 (H)				81920										
1903 (H)					20480									
1904 (H)						5120								
1905 (H)							20480							
1906 (H)								10240						
300 (O)					1280					1280	2560		1280	
101 (O)					1280					1280	1280		1280	
403 (H)			20480									10240		
140 (O)					1280					1280	1280		1280	
1902 (O)					1280					1280	1280		1280	
7216			10240											10240

(H) 代表鞭毛抗原。 (O) 代表菌体抗原。

表6 101、300与140、1902抗原吸收试验

抗血清	吸收抗原	试 验 菌			
		101	300	140	1902
101	300	40	40	80	80
101	140	80	40	—	40
101	1902	40	80	80	—
300	102	—	40	80	40
300	140	80	40	—	40
300	1902	40	40	80	—
140	101	—	40	80	40
140	300	80	—	40	80
140	1902	40	80	40	—
1902	101	—	40	80	40
1902	300	80	—	40	80
1902	140	80	40	—	40

表7 403与1898, HD-1, 7216交叉吸收试验

抗血清	吸收抗原	试 验 菌			
		1898	HD-1	7216	403
1898	—	20480	10240	10240	20480
	HD-1	40	—	—	—
	7216	40	40	80	80
	403	0	40	40	—
	—	—	—	—	—

(续上表)

HD-1	—	10240	10240	10240	10240
	1898	—	160	160	160
	7216	—	40	40	40
	403	40	80	40	—
7216	—	10240	10240	10240	10240
	1898	160	160	160	160
	HD-1	—	40	80	40
	403	40	40	40	40
403	—	10240	10240	10240	10240
	1898	320	40	40	40
	HD-1	—	40	40	40
	7216	—	80	80	40

*1.参加本研究工作的有唐改富、计鸿贤、莫玉纯等同志。

2.本文的电镜照片为武汉大学病毒系电镜室拍摄。

参 考 文 献

- 1.中国科学院微生物研究所细菌分类组：一般细菌常用鉴定方法，科学出版社，1978。
- 2.斯克尔曼 V. b. D, 蔡妙英等译：细菌属的鉴定指导（附方法及属的特征提要），科学出版社，北京，1978。
- 3.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，微生物学报，1975，（1）：5—14。
- 4.任改新等，微生物学报，1975，（4）：292—301。
- 5.湖北省微生物研究所虫生菌组，微生物学报，1976，（1）：12—16。
- 6.齐长才等：细菌血清学检验手册，人民出版社，1965。
- 7.伯吉斯，H. D.，N. W. 赫西主编：昆虫和螨类的微生物防治，科学出版社，北京，1977。
8. De Barjau H, Bonnofoi, A. J. Insect Path 11: 335—347, 1968.
9. Heimpel A. M. , T. A. Angus: Canad. J. Microbiol. 4: 531—541, 1958.
10. Norris, J. R.: J. Appl. Bact. 27: 439—447, 1964.
11. Heimpel, A. M.: Ann. Ent. 12: 287—322, 1967.
12. 湖北省天门县微生物研究所：“7216”杀虫菌（资料选编）。
13. 李荣森：微生物学通报，6（5）：1—7，1979。
14. 湖北微生物研究所菌虫组：微生物学报，16（1）：12—19，1976。