

# 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* Falericius) 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* Falericius) 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<sup>[1、2、4]</sup>方法进行。

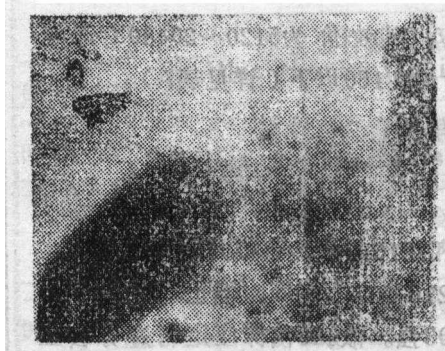
3. 抗原分析, 各菌株鞭毛抗原及其免疫血清的制备基本上按Norris (1964) 等人的方法〔1、2、3、4〕进行。而101、300和140菌株无鞭毛抗原, 其菌体(O)抗原的制备按中科院武汉病毒研究所的方法〔12、13〕进行, 抗原抗体凝集反应按常规方法〔3、6、14〕进行。

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

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<br>(%) |
|---|------|-----|-----|------------|
|   | 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<br><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<br><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<br><i>Papilio cresphontes</i> Cramer        | +    | +   | -   | 88—100     |
| 家蚕<br><i>Bombyx mori</i> (L.)                   | +    | +   | +   | 90—100     |
| 斜纹夜蛾<br><i>Prodenia litura</i> Fabr.            | +    | +   | +   | 35         |
| 芭蕉弄蝶<br><i>Erionota thorax</i> L.               | +    | -   | -   | 100        |
| 黄杨卷叶虫   | +    | +   | -   | 90—100     |
| 米象<br><i>Sitophilus oryzae</i> (L.)             | +    | +   | -   | 不定         |
| 谷蠹<br><i>Rhyzopertha dominica</i> Fabr.         | +    | +   | -   | 不定         |
| 梨小绿叶蝉<br><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<br>(亩) | 试验地点             | 菌剂剂型   | 施药剂量<br>公斤/亩 | 害虫减退率<br>(%) | 施药方法                     | 附注                             |
|----------------------|----------------|-------------|------------------|--------|--------------|--------------|--------------------------|--------------------------------|
| 300号<br>与<br>101号    | 苞菜<br>菜青<br>地虫 | 10          | 桂林市<br>七星大队      | 土法生产固体 | 0.5          | 85—95        | 兑水 100 倍<br>  150 喷<br>雾 | 1978年<br>10月                   |
| 300号<br>与<br>101号    | 白小<br>菜菜<br>地蛾 | 20          | 桂林市郊穿山<br>公社穿山大队 | 同上     | 0.5          | 90           | 同上                       | 1978年<br>9月~10月                |
| 300号                 | 稻田<br>卷叶<br>纵虫 | 0.07        | 广西钟山县            | 同上     | 0.5          | 66.2         | 同上                       | 1979年6月<br>施药后下雨<br>影响试验效<br>果 |
| 101号                 |                | 0.085       |                  |        |              | 60.9         |                          |                                |
| 300号                 |                | 0.76        |                  |        |              | 92.2         |                          |                                |
| 300号                 |                | 0.08        |                  |        |              | 64.5         |                          |                                |
| 300号<br>101号<br>403号 | 稻稻<br>苞<br>田虫  | 40          | 广西一〇三八<br>农场三中队  | 同上     | 0.5          | 80—90        | 同上                       | 1979年<br>6月                    |
| 300号                 | 同<br>上         | 0.47        | 广西一〇三八<br>场大队北山脚 | 同上     | 0.5          | 84           | 同上                       | 1979年<br>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 <sub>1</sub>     | <i>Bacillus thuringiensis</i><br>var. <i>thuringiensis</i> | +      | +   | +  | -    | +   | +   | -  | ++   | +    | ++  | +   | +    | +   | +  | -  | -   |
| 1.897 | H <sub>2</sub>     | <i>Bac. var. finitimus</i>                                 | +      | +++ | +  | -    | +   | -   | -  | ++   | -    | +++ | +++ | +    | +   | +  | -  | +   |
| 1.898 | H <sub>3a</sub>    | <i>Bac. var. alesti</i>                                    | +      | -   | +  | -    | +   | -   | -  | +    | ++   | -   | -   | +    | +   | -  | +  | -   |
| 1.899 | H <sub>4a-4b</sub> | <i>Bac. var. sotto</i>                                     | +      | +++ | +  | -    | +   | -   | -  | ++   | +++  | ±   | +   | +    | -   | -  | +  | -   |
| 1.902 | H <sub>5a-5b</sub> | <i>Bac. var. galleriae</i>                                 | +      | -   | +  | -    | +   | -   | -  | +    | +++  | +++ | ±   | -    | +   | -  | -  | +   |
| 1.903 | H <sub>6</sub>     | <i>Bac. var. entomocidus</i>                               | +      | +   | +  | -    | +   | +   | -  | ±    | ++   | +++ | ±   | -    | -   | -  | -  | +   |
| 1.904 | H <sub>7</sub>     | <i>Bac. var. aizawai</i>                                   | +      | +   | +  | +    | +   | -   | -  | +++  | ++   | +++ | +   | +    | -   | -  | -  | -   |
| 1.905 | H <sub>8</sub>     | <i>Bac. var. morrisoni</i>                                 | +      | +   | +  | -    | +   | ±   | -  | ++   | +    | -   | -   | +    | -   | -  | -  | -   |
| 1.906 | H <sub>9</sub>     | <i>Bac. var. tolworthi</i>                                 | +      | +++ | +  | -    | +   | -   | -  | ++   | +++  | +   | +   | -    | -   | -  | -  | -   |
| 140   | H <sub>5a-5b</sub> |  | +      | -   | +  | -    | +   | -   | -  | +    | +++  | +++ | -   | +    | +   | -  | ±  |     |
| HD-1  | H <sub>3a-3b</sub> |  | +      | -   | +  | -    | +   | -   | -  | +++  | +++  | +++ | -   | +    | +   | +  | -  | +++ |
| 7216  | H <sub>3a-3b</sub> |  | +      | -   | +  | -    | +   | -   | -  | ++   | +++  | +++ | +   | -    | +   | +  | -  | +++ |
| 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 Barjoe 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。