

在国内初次发现的四个苏芸金杆菌亚种

王 瑛 温 洁 冯喜昌

(中国科学院动物研究所, 北京)

本文报道的五个菌株均是能形成伴孢晶体的芽孢杆菌。从形态与培养性状上看, 具有苏芸金杆菌的典型特征。经生化反应与鞭毛抗原的血清反应, 证明这五个菌株分属于国内未报道过的四个亚种: 菌株 L_1 为加拿大亚种 (*B. thuringiensis* var. *canadensis*), 7902 为杀虫亚种 (*B. thuringiensis* var. *entomocidus*), 8302、8303 为鮎泽亚种 (*B. thuringiensis* var. *aizawai*), 10-4-13 为多窝亚种 (*B. thuringiensis* var. *tolwo-rithi*)。其中菌株 L_1 产晶体和色素并可利用甘露糖, 菌株 10-4-13 不产 β -外毒素, 这与它们各自标准菌株不同。除 L_1 和 7902 外其余三个菌株对粘虫及棉铃虫均有毒性。

材料与方 法

(一) 菌株及来源

1. 标准菌株: $H_{1-9, 8b}$ 及 H_9 引自英国。 $H_{8, 8a}$ 为本组保存。 $H_{11a, 11b, 12, 13}$ 为法国巴斯德研究所 de Barjac 博士提供。 $H_{11a, 11c, 17, 18, 19}$ 为日本 Michio Ohba 博士提供。 H_{14} 为本组从捷克斯洛伐克引进。 H_{16} var. *indiana* 为美国 A. J. Delucca II 提供。 云南变种由云南省动物所王婉瑜提供。

2. 待定菌株: 共 5 株。 L_1 : 山东省林业科学研究所从死松毛虫上分离后提供; 7902: 河北省交河县农业局植保站从死粘虫上分离后提供; 8302、8303: 从印度谷螟死虫上分离; 10-4-13: 从福建省黄岗山采集的土样中分离。

(二) 形态观察、生化反应、血清学试验

通过普通、相差显微镜及电子显微镜扫描观察菌体形态。生化反应及血清学试验按常规进行^[1, 2]。

(三) 土样中苏芸金杆菌的分离方法

用稀释平板法。

(四) β -外毒素产生的试验方法^[3]

用家蝇 *Musca vicina* 三龄幼虫做生测对象, 所用对照 (一) 是用无菌水代替菌液, 对照 (二) 为产 β -外毒素的多窝亚种菌液。

(五) 对鳞翅目、双翅目幼虫的毒性初测

所用虫种为棉铃虫 [*Heliothis armigera*] 及粘虫 [*Leucania separata* (Walker)]。

试 验 结 果

(一) 形态

五个试验菌株革兰氏反应阳性, 接触酶阳性, 具苏芸金杆菌菌群共有的形态特点, 即营养体杆状, 两端钝圆, 大小为 $1.2-1.5 \times 2.5-5 \mu m$, 通常为两个或多个相联。芽孢椭圆形并在游离前孢子囊不膨大, 均产伴孢晶体。在普通细菌琼脂平板上培养 4 天后的菌落呈灰白色, 扁平, 边缘不太整齐, 表面有极小皱褶。菌株 10-4-13 和相应标准菌株 E-013 与其他菌株的菌落不同, 多为同心圆状, 中部凹, 色稍深, 平坦, 外圈稍突起, 灰白色。经镜检发现菌落外圈菌体生长发育快, 整齐, 芽孢、晶体成熟早。菌落中部的菌体芽孢、晶体游离较迟。这现象在其他苏芸金杆菌中未看到。各菌株所产晶体形状和大小见表 1 与图版 I。

从表 1 看出, 除菌株 L_1 产生小的不规则颗粒状晶体与标准菌株 F 不产晶体有区别外; 其他试验菌株与各自标准菌株晶体形态相同。

(二) 生化反应(见表 2)

从表 2 看出, 菌株 L_1 产生淡紫褐色色素, 可利用甘露糖, 这些与标准菌株 F 不同。其他试验菌株仅在一些生化反应的强弱上与标准菌

廖素柏同志采集土样, 特此致谢。

表 1 试验菌株与相应标准菌株的晶体形态

相应变种 项目 菌株	加 拿 大		杀 虫		鮎 泽		多 窝	
	标 准 F	试 验 L ₁	标 准 E-010	试 验 7902	标 准 E-096	试 验 8302 8303	标 准 E-013	试 验 10-4-13
晶体形态	无晶体	小的不规则形	多为较小的菱形		不规则形、菱形、方形		菱 形	

表 2 试验菌株与相应标准菌株的生化反应比较*

项 目 菌 株	V. P. 反应	卵磷酯酶	水杨苷	水解蛋白	色 素	蔗 糖	菌 膜	脲 酶	七叶灵	甘露糖	水解淀粉
L ₁	+	+	+	++	+(-)	+	-	-	+	+(-)	++
7902	-	-	-	++	-	+	-	-	+	+	++(+)
8302、8303	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+(ε)
10-4-13	+	+	+	++(+)	-	+	+	-	+	-	++(+)

* 括号中的结果是相应标准菌株与试验菌株的不同之处。

株有差异。

(三) 鞭毛抗原的血清学试验

1. 凝集反应: 将试验菌株的鞭毛抗原与 19 个标准鞭毛血清型的 24 个抗血清进行凝集反应, 结果表明: L₁ 属于 H₅, 7902 属于 H₆, 8302、8303 属于 H₇, 10-4-13 属于 H₉。

2. 饱和试验: 结果见表 3。

从表 3(1) 可看出菌株 7902、8302、8303 与 10-4-13 的相应标准抗血清被试验菌株的鞭毛抗原饱和完全后, 与相应标准菌株的鞭毛抗原进行凝集反应, 结果无凝集现象产生, 由此说明

上述试验菌株与相应标准菌株具有相同的鞭毛抗原因子。

从表 3(2) 结果看到, 被 L₁ 抗原饱和完全的 H_{5asc} (001) 标准抗血清仍可与 001 抗原产生凝集, 效价为 7,680。说明菌株 L₁ 与菌株 001 仅有一个相同亚因子 5_a。而 L₁ 抗原饱和完全的 H_{5asc}(F) 标准抗血清与 F 抗原产生的凝集效价仅为 100, 该效价很低, 可以不计。由此说明菌株 L₁ 与 F 具有两个相同的亚因子即 H_{5asc}。

上述试验结果证明, 这五个菌株均属苏芸金杆菌群, 其中 7902 在血清型上属于 H₆, 生化

表 3(1) 菌株 7902、8302、8303、10-4-13 的鞭毛抗原与相应标准抗血清的饱和试验

抗血清	吸收抗原	与试验菌凝集效价		抗血清	吸收抗原	与试验菌凝集效价			抗血清	吸收抗原	与试验菌凝集效价	
		E-010	7902			E-096	8302	8303			E-013	10-4-13
杀虫亚种*	—	25,600	12,800	鮎泽亚种	—	12,800	12,800	12,800	多窝亚种	—	25,600	12,800
E-010	7902	—	—	E-096	8302	—	—	—	E-013	10-4-13	—	—

* 菌株 7902 在生化反应上与杀虫亚种相近, 所以未做与亚毒变种的饱和试验

表 3(2) 菌株 L₁ 的鞭毛抗原与相应标准抗血清的饱和试验

抗血清	吸收抗原	与试验菌凝集效价		抗血清	吸收抗原	与试验菌凝集效价	
		001	L ₁			F	L ₁
蜡螟亚种 (H _{5asb})	—	25,600	25,600	加拿大亚种 (H _{5asc})	—	12,800	25,600
001	L ₁	7,680	—	F	L ₁	100	—

反应不产菌膜,所以不同于亚毒变种,定为杀虫变种,8302、8303为鲇泽变种,10-4-13为多窝变种, L_1 虽然生化反应有两项(色素、甘露糖)与加拿大变种不同,但产色素否不是变种的属性(在同一变种中有的菌株产色素有的不产),并该菌的鞭毛抗原血清学结果与 H_{5a5c} 相同,所以仍定为加拿大变种。

(四) β -外毒素的产生

五个试验菌株均不产 β -外毒素。家蝇生活正常如同对照(一)。对照(二)菌株多窝变种E-013产 β -外毒素,引起家蝇幼虫死亡、蛹畸形、不羽化。

(五) 对鳞翅目幼虫的毒性

除菌株 L_1 无毒和菌株7902未做毒力测定外,其他试验菌株对粘虫、棉铃虫均有毒性。

讨 论

我国较早发现的苏芸金杆菌有 H_1 、 H_{4a4b} 、 H_{4a4c} 、 H_{5a7b} 、 $H_{8.8}$ [2,4],其中以 H_{5a5b} 最为常见。以后又发现了无鞭毛的武汉变种 [5]、 H_{3a3b} [6]、 H_2 [7]、 H_{20} [8,10]、 $H_{8.8b}$ [9]。本文报道的五个菌株分属 H_{5a5c} 、 H_6 、 H_1 、 H_9 。这四个血清型的菌株是首次在国内报道。至今我国已有了从1至9的九个血清型的菌株,并有三个新变种(属 $H_{8.8}$ 的玉米螟变种、无鞭毛的武汉变种及属 H_{20} 的云南变种)。

目前按 de Barjac 等的分类法已将苏芸金杆菌分为20个血清型分属27个变种*,我国仅有其中的少部分,而日本至今发现的苏芸金杆菌已有11个血清型,并其中 H_{11a11c} 、 H_{17} 、 H_{18} 、 H_{19} 均为新变种 [11-13],由此看来我们还应做大量工作。特别是从土壤中分离出以色列变种后,提示了发掘昆虫病原菌的新途径。本文报道的10-4

13菌株就是从土壤中分离出的,该菌对鳞翅目、双翅目害虫都有一定毒性,由此更加证明这是行之有效的办法。我国自然条件复杂,必定有大量对人有益的昆虫病原菌存在,有待我们去开发利用。

de Barjac 1978; Padua 等 1980 [14,15] 提出,一些苏芸金杆菌的毒力对昆虫有高度特异性。如以色列变种对鳞翅目幼虫无毒,对蚊幼虫确有极高毒性。因此,除寻找新菌株外,将已有的菌株针对各种害虫进行大量的毒效测定,来寻找高毒效菌株也很必要。

参 考 文 献

- [1] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, 27(3): 439—447, 1964.
- [2] Dulmage, H. T. et al.: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980*, Edited by Burges, H. D. 1981. p. 35—44.
- [3] 冯喜昌等: *昆虫学报*, 18(4): 374—382, 1975.
- [4] 任改新等: *微生物学报*, 15(4): 292—301, 1975.
- [5] 湖北省微生物所虫生菌组: *微生物学报*, 16(1): 12—16, 1976.
- [6] 湖北省天门县微生物研究所等: *微生物学报*, 20(1): 1—5, 1980.
- [7] 吴凤雅等: *微生物学通报*, 8(3): 101—102, 1981.
- [8] 王婉瑜等: *微生物学报*, 19(2): 117—121, 1979.
- [9] 张益等: *微生物学通报*, 10(1): 1—3, 1983.
- [10] 喻子牛等: *微生物学报*, 24(2): 117—121, 1984.
- [11] Ohba, M. and Aizawa, K.: *J. Invert. Path.*, 32(2): 303—309, 1978.
- [12] Ohba, M. et al.: *J. Invert. Path.* 38: 307—309, 1981.
- [13] Ohba, M. et al.: *J. Invert. Path.* 38: 184—190, 1981.
- [14] De Barjac, H.: *C. R. Acad. Sci. Ser. D*, 286: 797—800, 1978.
- [15] Padua, L. E. et al.: *J. Invert. Path.*, 36(2): 180—186, 1980.