

# 一株杀蛆细菌的分离与鉴定<sup>\*</sup>

蔡信之

(盐城师范学院生物系 盐城 224002)

关键词 类产碱假单胞菌, 分离, 鉴定, 蝇蛆

中图分类号 Q939.1 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)05-0559-02

蝇属昆虫纲, 双翅目, 能传播霍乱、伤寒、结核及痢疾等多种疾病的病原菌, 种类较多, 生长很快, 分布广泛, 危害严重。化学药剂灭蝇, 不仅杀虫效果差, 而且环境污染严重。生物防治蝇蛆, 不仅能避免污染, 而且可在蝇蛆中间不断传染, 药效较长。但是, 目前在国内外尚未见到有这方面的研究报告, 仅见到刘世贵等利用类产碱假单胞菌防治草地蝗虫的报道。

1996 年夏天, 从盐城市农村粪池中采集的自然病死蝇蛆体内分离到一株具有显著杀蛆作用的细菌, 经回复感染原宿主, 能引起原宿主致病死亡, 又从死虫体内分离到同样的病原菌。经生物测定, 对 2~3 龄丽蝇幼虫具有显著的感染作用, 5d 校正死亡率达 75.3%, 且未死的蝇蛹羽化率下降 52.4%。对其他种类的苍蝇幼虫也有一定的感染能力。对畜、禽安全。经鉴定, 初步确定该病原菌为类产碱假单胞菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 从盐城市农村粪池中自然病死蝇蛆体内分离得到。

1.1.2 标准菌株 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由江苏省卫生防疫站提供。

1.1.3 参照菌株 类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) AS1.1806 由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.1.4 供试昆虫 丽蝇等 2~3 龄健康幼虫, 本室孵化、饲养。

1.1.5 培养基 分离和生物测定均用牛肉膏蛋白胨培养基 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, pH7.4, 定容至 1L。121℃ 灭菌 20min。生理生化试验用培养基 参照文献 [1~3]。

### 1.2 方法

1.2.1 病原菌分离 将刚死亡不久的病蛆尸体浸入 75% 乙醇中, 5min 后转移到无菌生理盐水中漂洗 3 次。用消毒剪刀剪去后部三分之一, 用接种环挑取外溢体液划线和稀释涂布分离, 30℃ 培养 24h 出现单菌落<sup>[4]</sup>。

1.2.2 菌种纯化 挑取单菌落, 制成菌悬液, 充分分散, 用划线法分离, 连续两次纯化菌种。菌落形态一致, 镜检菌体形态、大小及革兰氏染色均一致。

1.2.3 生物测定 纯化的菌株经摇瓶培养, 将含菌  $10^7$ /mL 的菌悬液 0.5mL 加入无菌罐头瓶中, 每瓶加无菌生理盐水 10mL, 无菌碎鸡肠 5g, 2~3 龄丽蝇幼虫 30 只。设空白 (只是不加菌液) 作对照。加盖 (其

<sup>\*</sup> 盐城市 1995 年重点科研项目

作者简介 蔡信之 (1945—), 男, 江苏盐城人, 盐城师范学院生物系副教授, 武汉大学生命科学院访问学者, 主要从事杀虫微生物研究

收稿日期 1999-09-27, 修回日期 2000-05-25 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

上有细孔),室温培养,每日观察、计数、补料。收集死虫,并用上述方法进行病原菌分离。蝇蛹的保藏及孵育参考文献[5]。

1.2.4 形态观察 将纯化的菌株分别接种于肉汤蛋白胨液体培养基试管中和肉汤蛋白胨培养基平板上,30℃培养 48h,观察其生长情况及菌落特征。测量大小、革兰氏染色、鞭毛染色等均按常规方法进行。电镜标本的制备参考文献[6]的方法。

1.2.5 生理生化试验 参照文献[1~3]的方法进行。

1.2.6 DNA 中 G+C mol% 的测定 参照文献[7,8]的方法进行。

1.2.7 DNA 分子杂交 参照文献[7~10]的方法进行。

1.2.8 安全性试验:

洛氏鸡 3 只,重 1.5kg 左右,分笼饲养,每只每天在其饲料中拌入 10<sup>7</sup>/mL 菌液 1mL,连服 3d,给药后连续观察一周,无死亡,无异常。

家兔两只,分笼饲养,每只每天在其饲料中拌入 10<sup>7</sup>/mL 菌液 1.5mL,连服 3d,给药后连续观察一周,均无异常反应。

2 结果

2.1 生物测定

用该菌株感染 2~3 龄丽蝇幼虫,24h 后开始死亡,72h 后进入死亡高峰,5d 校正死亡率达 75.3%。未死的蝇蛆化蛹后,其羽化率比对照下降 52.4%。未羽化的蝇蛹个很小,呈畸形。在 20℃~35℃ 范围内,其毒杀作用随温度上升而增强。在相同条件下,对虫龄较小的蝇蛆毒杀作用较显著。对舍蝇等其他种类的蝇蛆也有一定的毒杀作用。病死虫的特征与原宿主病死虫基本一致。幼虫感染后行动迟缓,反应迟钝,不活跃,基本停食。死亡 24h 后虫尸呈微红色,后变为棕褐色,再逐渐变成黑色。挤出的体液呈褐色,有臭味。

2.2 细菌形态及培养特征

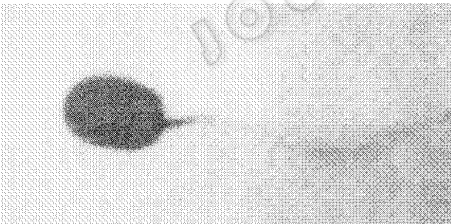


图 1 分离株的电镜观察

透射电镜 示培养 24h 菌体鞭毛(11000×)

该菌株细胞短杆状,直形,两端钝圆,菌体宽 0.5~0.7μm,长 1.3~1.8μm,单个排列为主,极生单鞭毛,运动活跃,革兰氏染色阴性,未见芽孢和类脂颗粒(图 1)。

在肉汤蛋白胨平板培养基上,30℃培养 48h,菌落近似圆形,边缘较整齐,界限较明显,直径 1~2mm,表面较光滑、湿润,稍隆起,黄白色,半透明,较粘稠,略有臭味。在肉汤蛋白胨液体培养基中,30℃培养 48h,呈均一混浊,稍有臭味。

2.3 生理生化特性

该菌株氧化酶和过氧化氢酶反应均为阳性;葡萄糖氧化发酵试验不产酸,10d 后产少量气泡;精氨酸双水解酶阴性;氨基酸脱羧酶测定,L-赖氨酸阴性,L-精氨酸阳性,鸟氨酸未测定;果聚糖形成试验阴性;硝酸盐还原试验、淀粉水解试验及明胶液化试验均为阴性;未见荧光色素产生,有类胡萝卜素;靛青素检出试验阴性;41℃ 生长,42℃ 及 4℃ 均未见生长;碳源利用试验,分离株可以利用 D-果糖、β-苯丙氨酸、DL-精氨酸、柠檬酸盐等,利用甘露醇、山梨醇的能力较差,不能利用酒石酸钾钠、肌酸。

2.4 DNA 中的 G+C mol% 含量

用热变性温度法测得该菌株 DNA 的 T<sub>m</sub> 值为 79.5℃ (0.1SSC 溶液),G+C mol 含量为 62.46%。

2.5 DNA 分子杂交

用液相复性速率法测得该菌株与类产气荚膜梭菌 AS 41806 DNA 的杂交率为 81.2%。

3 讨论

该菌株经多次生物测定,结果比较稳定,虫龄越小,温度越高,杀蛆效果越好。

安全性试验,先后在三处进行,其结果一致,对畜禽安全可以肯定。

该菌株细胞短杆状,0.5~0.7 $\mu\text{m}$ ×1.3~1.8 $\mu\text{m}$ ,革兰氏反应阴性,无芽孢,化能异养,细胞单生,极生单鞭毛运动,呼吸代谢,氧化酶和过氧化氢酶均为阳性,不需要有机生长因素,能利用多种有机化合物作为碳源,完全符合假单胞菌属的主要特征(表 1),因此它应归于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

该菌株细胞不能积累聚  $\beta$ - 羟基丁酸盐作为碳源贮藏物,它应归于假单胞菌属的 RNA 组 I。该菌株不产生荧光色素和脓青素,不能利用葡萄糖、甘油和淀粉,不能从蔗糖形成果聚糖,41℃ 可以生长,所以它的特征与类产碱假单胞菌和产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)很相似(表 1)。

表 1 分离株与几种假单胞菌的特征比较\*

| 特征                  | 铜绿假单胞菌 | 分离株   | 产碱假单胞菌 | 类产碱假单胞菌 |
|---------------------|--------|-------|--------|---------|
| 鞭毛数                 | 1      | 1     | 1      | 1       |
| 荧光色素                | d      | —     | —      | —       |
| 脓青素                 | d      | —     | —      | —       |
| 类胡萝卜素               | —      | +     | d      | —       |
| 在 41℃ 生长            | +      | +     | +      | +       |
| 从蔗糖形成果聚糖            | —      | —     | —      | —       |
| 精氨酸双水解酶             | +      | —     | +      | d       |
| 氧化酶反应               | +      | +     | +      | +       |
| 硝酸盐还原               | +      | —     | +      | d       |
| 明胶水解                | +      | —     | d      | d       |
| 淀粉水解                | —      | —     | —      | —       |
| 聚 $\beta$ - 羟基丁酸盐积累 | —      | —     | —      | d       |
| 碳源利用                |        |       |        |         |
| 葡萄糖                 | +      | —     | —      | —       |
| 甘油                  | +      | —     | —      | d       |
| D- 果糖               | +      | +     | —      | +       |
| $\beta$ - 苯丙氨酸      | +      | +     | —      | d       |
| 柠檬酸盐                | +      | +     | d      | d       |
| DL- 精氨酸             | +      | +     | +      | +       |
| 肌酸                  | —      | —     | —      | d       |
| 山梨醇                 | —      | +     | —      | d       |
| 甘露醇                 | +      | +     | —      | —       |
| DNA 中 G + C mol%    | 67     | 62.46 | 64~68  | 62~64   |

\*“+”为 90% 以上阳性;“—”为 90% 以上阴性;“d”为阳性在 10~90% 之间;“+”为阳性较弱。

类产碱假单胞菌的特征与产碱假单胞菌很相近,它们的主要区别在 DNA 中 G + C mol 百分含量和营养特性方面。该菌株精氨酸双水解酶阴性,能利用果糖、 $\beta$ - 苯丙氨酸、山梨醇等,其 DNA 中 G + C 的 mol 含量为 62.46%,它与参照菌株类产碱假单胞菌 AS1.1806DNA 分子的杂交率为 81.2%,表明它的特征与类产碱假单胞菌更相似。虽然该菌株可以产生类胡萝卜素,且可利用甘露醇,在这些方面与类产碱假单胞菌有区别,但我们仍初步将它确定为类产碱假单胞菌。它是否是类产碱假单胞菌的一个新的亚种,尚需进一步研究<sup>[11,12]</sup>。

用类产碱假单胞菌感染苍蝇幼虫的试验结果表明,该菌株对丽蝇幼虫有较强感染作用,对其他种类的苍蝇幼虫也有一定的感染能力,因此该菌株有可能成为防治蝇蛆的生物农药。据武汉大学图书馆联机检索查新表明,从蝇蛆体内分离到类产碱假单胞菌,利用假单胞菌属的细菌防治蝇蛆,在国内外尚无报道。

致谢 于延球副教授曾参加过前期部分工作 武汉大学生命科学学院沈萍教授等诸同志给予许多指导和帮助,一并致谢。

## 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. 北京 科学出版社, 1978. 46~48, 111~189.
- [2] 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海 上海科技出版社, 1986. 122~132, 137~163.
- [3] Krieg N R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1984. 141~174.
- [4] 李荣森, 罗绍彬, 张用梅, 等. 微生物防治害虫. 北京 科学出版社, 1985. 197~207.
- [5] Judd G J R, Maw H E L. Proceedings of the Entomological Society of Ontario, 1996, 127: 89~97.
- [6] 朱丽霞, 程乃乾, 高信曾. 生物学中的电子显微镜技术. 北京 北京大学出版社, 1983. 73~79.
- [7] 林万明. 细菌 DNA 中 G + C 含量测定和核酸分子杂交技术及其在细菌分类鉴定中的应用. 见 程光胜, 朱厚础, 周 方主编. 分析微生物学专辑. 北京 科学出版社, 1988. 88~98.
- [8] 林万明主编. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海 上海科学技术出版社, 1990. 84~184.
- [9] De Ley J. Eur J Biochem, 1970, 12: 133.
- [10] Bradley S G. J Bacteriol, 1973, 113: 645.
- [11] 刘世贵, 朱 文, 杨志荣, 等. 微生物学报, 1995, 35(2): 86~90.
- [12] 姚 江, 李士玉, 隋新吴, 等. 武汉大学学报(自然科学版), 1998 年, 44(增): 137~141.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A KILLING MAGGOTS BACTERIUM

Cai Xinzhi

(Biology Department of Yancheng Normal College, Yancheng 224002)

**Abstract:** A notably killing maggots bacterium was isolated from natural dead maggots in the manure pits in the countryside of Yancheng. Its pathogenicity was confirmed by the law of KOCK. The results of preliminary bioassay show that the pathogen can infect the larvae of greenbottle flies and other larvae of flies in a certain extent, but can't infect animals and fowls. The G + C content of its DNA is 62.46%. The hybridization ratio of its DNA and the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (AS1. 1806) is 81.2%. According to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Ninth edition, the strain of the bacterium was primarily identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.

**Key words:** *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Isolation, Identification, Maggots

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>