

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 无鞭毛变种 “140” 菌的研究

湖北省微生物研究所虫生菌组*

(武汉)

从棉花小造桥虫 (*Anomic flava* Fatature) 中分离出一株能形成伴孢晶体的芽孢杆菌“140”。该菌无鞭毛、不运动, 无H抗原, 明显地区别于目前所报道的苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 各变种, 认为是苏云金杆菌的新变种, 定名为武汉杆菌 (*Bacillus thuringiensis* var. *wuhanensis*)。

140 菌发酵性能较好。孢晶混合物对 3 龄菜青虫幼虫 (*Pieris rapae* L.) 的 LD_{50} 为 0.129 微克/头幼虫。其制剂对农、林、果、蔬的多种害虫进行了 15 万余亩的防治试验, 效果良好。

近十余年来, 苏云金杆菌制剂已在国内外大量生产和应用。对农、林、蔬、果、茶、烟、牧草等上的数十种害虫进行防治有良好效果^[1,2,3]。

在毛主席关于“独立自主、自力更生”方针的指引下, 为了有效地防治粮食和经济作物的虫害, 我们开展了细菌杀虫剂的研究。1969 年自棉花小造桥虫 (*Anomic flava* Fatature) 感病死亡幼虫中分离出一株产伴孢晶体的芽孢杆菌 140 菌株。

140 菌对鳞翅目昆虫具有良好毒杀效果。对昆虫纲的 3 个目及蛛形纲的 1 个目共 17 科 39 种害虫进行试验, 证明能毒杀其中属于鳞翅目的 32 种害虫。对稻苞虫、稻螟蛉、玉米螟、高粱条螟、菜青虫、小菜蛾、舟型毛虫、梨刺蛾、木燎尺蠖、松毛虫等毒杀作用较强。如以 0.06 亿孢子/毫升和 0.1 亿孢子/毫升喷雾, 防治稻苞虫效果分别为 76.2% 和 87.5%; 以 0.2 亿孢子/克毒砂撒喇叭口, 防治玉米螟和高粱条螟的效果分别为 91.4% 和 96.4%; 将工业制剂稀释 1000—2000 倍喷雾, 防治舟型毛虫和梨刺蛾效果可达 82—100% 等。此外,

还对稻纵卷叶螟、棉铃虫、红铃虫、二化螟、三化螟、避债蛾、棉花小造桥虫、尺蠖、菜螟、茶毛虫等均有一定毒杀效果。

从 1971 年以来, 在本省及外省有关单位的协助与支持下, 先后有 4 省约 30 个县开展了 140 菌的生产和大田防治试验。据 1975 年统计, 仅湖北省开展 140 菌剂生产的基层单位达 70 个, 防治害虫面积达 15 万亩以上。

140 菌的生物学特性

(一) 形态及培养特征

牛肉膏蛋白胨 30℃ 平皿培养 40 小时, 菌落为乳白色、扁平、表面粗糙、边缘不整齐 (图版 I-1), 牛肉汁液体培养形成一层薄菌膜, 液体混浊。在马铃薯斜面上, 生长丰满, 边缘呈假根状。

牛肉膏蛋白胨液体摇瓶培养 6—8 小

本文于 1975 年 2 月 4 日收到。

* 本所病毒研究室拍摄照片并参加酯酶分析工作, 宜昌农药厂协助中间生产试验; 进行生产和大田防治试验的还有: 安陆县微生物站、大悟县微生物站、钟祥县微生物站、沙洋农场农科所、河北石家庄微生物农药厂等 30 多个单位, 特此一并致谢。

时,营养细胞杆状,两端钝圆,常呈长链状,4—8个多至16个以上。革兰氏染色为阳性。细胞大小为 $0.82 \times 2.0-4.05$ 微米;培养17—18小时出现芽孢;20—22小时大部分形成芽孢囊。芽孢囊体不膨大,芽孢着生于细胞的近端,另一端形成伴孢晶体。成熟的芽孢椭圆形,其大小为 0.55×1.38 微米。伴孢晶体近似菱形,大小为 0.66×1.32 微米(图版I-2,3)。

(二) 鞭毛和运动性

用半固体斜面培养转接活化5代。取4—12小时之间的培养体制成悬液,活体观察不运动。用Casaresgil's鞭毛染色及电子显微镜观察结果是无鞭毛(图版I-4);以同样方法观察,*B. thuringiensis* var. *galleriae*运动活跃,具周鞭毛(图版I-5)。

此外,电镜观察发现,140菌培养12小时的菌体,具有比鞭毛更细、短而直的纤毛^[14,15]。

(三) 生化反应

各种生化试验按常规方法进行。营养细胞的酯酶分析参照Norris的方法^[4]。试验结果表明140菌的各种生化反应和营养细胞酯酶图型与*B. thuringiensis* var. *galleriae*相同。

(四) 血清学反应

抗血清是从兔耳静脉注射5次抗原液获得的。参照Norris的方法^[4],用福尔马林制备H抗原,用石炭酸酒精制备O抗原。试验对照菌有如下苏云金杆菌变种:苏云金变种(*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*)、幕虫变种(*B. thuringiensis* var. *finitimus*)、阿莱变种(*B. thuringiensis* var. *alesti*)、松蠹变种(*B. thuringiensis* var. *dendrolimus*)、蜡螟变种(*B. thuringiensis* var. *galleriae*)、杀虫菌变种(*B. thuringiensis* var. *entomocidus*)、多窝变种(*B. thuringiensis* var. *tolworthi*)和莫里逊变种(*B. thuringiensis*

var. *morrison*)。除蜡螟变种和松蠹变种为本所保藏菌种外,其它均系武汉大学生物系从英国引进。

实验结果表明,140菌未经吸收的抗血清,对所有的对照菌H抗原均不发生凝集反应。对照菌苏云金变种、蜡螟变种的抗血清,用各自的O抗原吸收后,再与其H抗原凝集的效价均为5120,而未经吸收的抗血清与同源H抗原凝集效价亦为5120。说明各菌O抗原吸收试验不影响其H抗原凝集效价;140菌的抗血清与其“H”抗原和O抗原进行凝集反应时,其效价均为2560,而用该菌O抗原吸收后的抗血清,不再与其“H”抗原发生凝集反应(效价为零)。这和用100℃加热1小时处理菌悬液制备的O抗原吸收后的抗血清,不再与未加热的抗原凝集的结果一致^[5]。

上述实验证明140菌无H抗原,其抗血清纯为O抗血清。

(五) β -外毒素测定

采用Megna等配方^[6,7],并加入0.05%缬氨酸,分别作几个菌的24、48小时的摇瓶培养,终止时调pH至4.5,离心,将上清液经无菌细菌过滤器抽滤,滤液冰冻浓缩后,以118℃灭菌15分钟制得样品。

将上述样品用杯碟法测定其对黄色八叠球菌(*Sarcina flava*)的抑制能力,以此检定是否产生 β -外毒素^[8]。结果浓缩至原体积1/7、1/10的苏云金变种和蜡螟变种的滤液,对*S. flava*有抑制作用;但浓缩至原体积1/2时,蜡螟变种则不产生抑制作用,而苏云金变种抑制圈仍很明显;140菌和不产生 β -外毒素的阿莱变种,在这三种浓度下均未产生抑制圈。

将稀释70倍的上述样品10毫升,加到5克的饲料中,用10头家蝇(*Musca vicina*)3龄幼虫(2次重复)进行活性测定。结果表明家蝇幼虫对 β -外毒素很敏感,其

化蛹、羽化均受到不同程度影响。对照组和阿莱变种组的成蛹期、羽化期基本一致,全部正常;140菌和蜡螟变种组部分蛹的羽化期稍延后2天,外形未见异常;而产生β-外毒素的苏云金变种组死亡率(包括半化蛹和畸蛹)100%。

综合上述两方面试验结果,证明140菌不产生β-外毒素。

芽孢和晶体混合物的收集及其毒性

参考 Dulmage^[9] 的方法收集芽孢和晶体混合物。140 菌在 28—30℃、转速 200 转/分的摇床上液体培养 8—11 天,收获发酵液 1400 毫升,以 2,000 转/分离心 30 分钟,用 5% 乳糖悬浮,最后收集干的孢晶混合物为 4 克。该制剂含活孢子数为 1,800 亿/克。

生物测定采用头一天捕捉的 3 龄菜青

虫 (*Pieris rapae*) 幼虫,参考 Galowalia^[10] 微量点滴饲喂法进行。在 26±1℃、相对湿度 65—75% 下,室温 (5—35℃) 保存半年的孢晶混合物,饲喂菜青虫 48 小时,半数致死剂量 (LD₅₀) 为 0.129 微克/头幼虫。

发 酵

(一) 培养基的选择

用 9 种培养基进行了摇瓶发酵试验。通过生长周期、菌数、pH 值变化情况的观察比较,证明 140 菌在培养基 A (下表) 上生长发育良好。后经生产试验,证明培养基 B 和 C 分别用于液体深层发酵和固体培养,也可获得毒力强的菌剂。

(二) 发酵结果

1. 液体深层发酵工艺流程:

砂土管菌种→斜面活化→扁瓶斜面培养→50 升种子罐培养→4.5 吨发酵罐发酵→贮罐→压滤→真空烘干

培 养 基 及 其 组 分

培 养 基 A			培 养 基 B			培 养 基 C	
成 份	含 量(%)		成 份	含 量(%)		成 份	含量(%)
	种 子	发 酵		种 子	发 酵		
豆 饼 粉	1	2	花 生 饼	0.5	2	豆 饼 粉	15—20
蛋 白 胨	0.2	0.25	鱼 粉	0.5	0.5	麸 皮	70
糊 精	0.4	0.4	玉 米 浆	0.5	1.8	谷 壳	9—14
碳 酸 钙	0.1	0.1	葡 萄 糖	0.3		碳 酸 钙	1
硫 酸 铵	0.03	0.03	硫 酸 钙		0.5	硫 酸 镁	0.1
硫 酸 镁	0.03	0.03	硫 酸 镁		0.0075	磷酸氢二钾	0.15
磷酸氢二钾	0.2	0.2	糊 精		0.5	氢氧化钠	1
豆 油	0.4	0.3	磷酸氢二钾		0.04	(另加,调 pH 用)	
			豆 油	0.25	0.3		

→半成品检验→球磨粉碎→配制
→包装。

培养基见上表。

用培养基 B 进行试验,接种 4 小时后,芽孢萌发并开始裂殖,营养体单个至 4 连;培养 7 小时的种子液,平均菌数为 1.95

亿/毫升,此种子液移入发酵罐培养,4—8 小时繁殖迅速,多为 2—4 连,菌体粗壮,着色均匀;培养 10 小时,原生质开始浓缩,着色不甚均匀;到 12 小时,原生质明显浓缩,着色不均;14 小时约有 50% 形成孢子囊;17—20 小时为孢子囊成熟阶段。当

有少量芽孢、晶体游离时,即行放罐。

据9罐统计,放罐液活孢子数平均为24.4亿/毫升。用真空干燥箱干燥(60℃ 14小时),成品活孢子数为121—178亿/克,平均为154.9亿/克;同样滤饼用电烘箱60℃迅速烘干(1—2小时),其活孢子数达140—250亿/克,平均为180.7亿/克。前者收获率为47%,后者则为57%。

按这个工艺生产,140菌生长整齐,同步率高。因而放罐时间较一致,一般为17—20小时,平均为18小时40分钟。同时,后处理压滤较快(1—3小时),生产周期较短。

发酵中发酵液pH变化如下:种子罐消前pH 7.5,消后为6.5,培养6小时pH下降至5.8,到移种时pH开始上升至6.0。发酵4小时pH达最低值是6.2,从6小时开始逐渐上升,8小时为6.72,12小时为7.27,放罐时(18小时)pH上升至7.92。

2. 固体培养工艺流程是:

砂土管菌种 → 斜面活化 → 液体种子

芽孢母剂 → 固体培养基发酵 → 烘干 → 粉碎 → 检验 → 包装。

用固体培养方法生产,成品菌数一般可达50—100亿/克。

以140工业制剂作母剂,直接接种于固体料发酵,培养10—24小时,菌体生长整齐,杂菌很少,培养40小时,芽孢和晶体大部分脱落,两天即可出料。

讨 论

以产生伴孢晶体为特征的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*),被认为是一个独立的种而与蜡质芽孢杆菌(*B. Cereus*)相区别。对于苏云金杆菌的分类,Heimpel^[11]、de Barjac 和 Bonnefoi^[12]分别提出了检索表,其分类标准主要依据生理生化特性和

H抗原血清型。从苏云金杆菌各变种的分类特征比较指出:①生理生化特性的区别同血清型的区别基本一致,但不完全符合;②生理生化特性相同,血清学反应不同定为不同的变种。因此,生理生化特性同血清型是苏云金杆菌分类的基础。血清学反应能进一步分出生理生化特性未能区分的变种。此外,Norris^[4]发现酯酶型同血清型之间有密切的关系,每个血清型表现有相应的酯酶型。但血清7型和血清5型则相同。目前酯酶及其他一些酶反应的特性,是作为分类鉴定的参考指标。

140菌鉴定表明,虽然生理生化特性、酯酶型与*B. thuringiensis* var. *galleriae*相同,但它是一株不运动,无鞭毛的产晶芽孢杆菌,在形态学上区别于苏云金杆菌各变种;血清学试验证明无H抗原,这一特性同De Barjac 和 Bonnefoi (1973)^[12]提出的分类检索表所包括的17个变种(有血清型类)相比较有明显的区别。Heimpel^[11]、Krieg^[13]描述的一个变种,即*Bacillus finitimus* var. *fowleri*也无H抗原血清型。但同140菌比较,不仅生理生化特性不同,重要的是*B. finitimus* var. *fowleri*的伴孢晶体在芽孢囊成熟后不游离出来,而同芽孢紧紧的连结在一起,并对昆虫无毒性。综上所述,我们认为140菌不是苏云金杆菌群的蜡螟变种(*B. thuringiensis* var. *galleriae*)^[5],而是一个新变种,定名为武汉杆菌(*Bacillus thuringiensis* var. *wuhanensis*)。

140菌对多种农林及经济作物害虫有良好的杀虫效果,营养条件要求不严格,生产周期较短,适宜于工业发酵及固体发酵生产。

参 考 资 料

- [1] 站沢启夫等: 醱酵工学誌, 51(5): 351—357, 1973。

- [2] 广东省微生物研究所: 微生物学通报, 2(2): 5—7, 1975.
- [3] 江苏省南通农业局: 昆虫知识, 12(3): 31, 1975.
- [4] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, 27: 439—447, 1964.
- [5] 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等: 微生物学报, 15(1): 5—14, 1975.
- [6] Kim, Y. T., Huang, H. T.: *J. Insect. Path.*, 15 (1): 100—108, 1970.
- [7] Contwell, G. E., et al.: *J. Insect. Path.*, 6: 466—480, 1964.
- [8] Rosenberg, G., Cerlberg, G.: *J. Appl. Bact.*, 34: 419—423, 1971.
- [9] Dulmage, H. T.: *J. Invert. Path.*, 15: 15—20, 1970.
- [10] Galowalia, M. M. S. et al.: *J. Invert. Path.*, 21: 301—308, 1973.
- [11] Heimpel, A. M.: *Ann. Rev. Ent.*, 12: 287, 1967.
- [12] de Barjac, H. and Bonnofoi, A.: *Entomophaga*, 18 (1): 5—17, 1973.
- [13] Krieg, A.: *J. Invert. Pathol.*, 15 (3): 313—320, 1970.
- [14] Salton, M. R. J.: *The Bacterial cell wall*. Elsevier, London, New York, p. 3—5, 1964.
- [15] Davis, B. D. et al.: "Microbiology," Hoeber medical division, Harper Row, publishers, New York, Evanston, and London, p. 22—28, 1967.

BACILLUS THURINGIENSIS "140", A NEW VARIETY WITHOUT FLAGELLUM

ENTOMOGENOUS ORGANISM RESEARCH GROUP,

HUBEI INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

(Wuhan)

A parasporal crystal forming *Bacillus thuringiensis* strain "140" was isolated from a dead insect (*Anomic flava* Fatature) body found in a cotton field. Unlike the other varieties of this species, the organism in question is non-motile and possesses no flagellum, and, therefore no H-antigen. The author suggests the name *Bacillus thuringiensis* var. *wuhanensis* for this newly found variety.

Bacillus thuringiensis var. *wuhanensis* is readily cultured to produce parasporal crystals used as insecticide. A mixture of its spores and parasporal crystals used orally to the third instar of *Pieris rapae* L. has a LD₅₀ 0.129 μ g/larva. Field experiments on more than ten thousand hectares of different crops, forests, orchards and vegetables showed excellent insecticidal effect.