

## 球形芽孢杆菌与苏芸金杆菌对淡色库蚊毒性的比较

任改新\* 孙桂华\*\* 崔荣惠\*\* 朱呈智\*

用 12 株好氧芽孢杆菌对尖音库蚊淡色变种进行了毒性比较,对其中的球形芽孢杆菌 1593 及苏芸金杆菌以色列变种 1897 进行了毒力、生长周期、培养条件、高温处理以及不同龄期敏感性的实验。讨论了此类菌毒杀蚊虫本质上的相似性以及开发这类菌的重要意义。

利用微生物灭蚊已成为综合防治蚊虫的一个重要课题<sup>[1,2]</sup>。Ignoffo 通过比较进一步肯定了苏芸金杆菌以色列变种 1897 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 应用灭蚊的可能性<sup>[3,4]</sup>。我国通过引入试验认为,利用 1897 防治蚊虫是很有希望的。但对另一大类群——灭蚊球形芽孢杆菌的开发,我国尚属空白。本文报道 1897 和 1593 等 12 株具有特异性的菌株感染淡色库蚊幼虫的比较试验结果。

### 材料与方法

#### (一) 菌株

球形芽孢杆菌 1593 (*Bacillus sphaericus*) 为美国 P. Myer 博士赠。

苏芸金杆菌苏芸金亚种 BA-068 (*B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*) 为美国 I. M. Hall 教授赠。*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, subsp. *israelensis* and subsp. *gellerthiae* Auct. 为法国巴斯德研究所 H. de Barjac 教授提供。*B. thuringiensis* subsp. *moritai* 为日本九州大学站泽启夫教授提供。其余五株菌,79201、7404、7501、1-7601、113 和 006,均为南开大学生物系保存的含有不同伴孢晶体类型的苏芸金不同株系<sup>[5,6]</sup>,共计 12 株。

#### (二) 培养条件

毒力比较用液体培养基:

1. 蛋白胨 0.3g、酵母浸出汁 0.1g 葡萄糖 0.1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.34g、混合盐类 1ml、蒸馏水 100ml。

2. 酵母浸出汁 1.5g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3g、葡萄糖 0.2g、蒸馏水 100ml, pH7.4。

3. 牛肉膏 0.5g、蛋白胨 1g、酵母浸出汁 0.05g、 $\text{MgCl}_2 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 $\text{CaCl}_2 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $\text{MnCl}_2 \times 10^{-3}\text{M}$ 、蒸馏水 100ml, pH 7.4<sup>[7]</sup>。

4. 牛肉膏 0.5g、蛋白胨 1g、酵母浸出汁 0.3g、 $\text{NaCl}$  0.5g、蒸馏水 100ml, pH7.4 (简称 NY)。

#### (三) 生物测定

供试虫种为 26—27℃ 室内饲养的尖音库蚊淡色变种 (*Culex pipiens* var. *pallens*) 2—3 龄幼虫,将供试菌的培养液以去氯自来水稀释成 20、200 倍母液,按求 LC<sub>50</sub> 所需浓度梯度配制成 5—6 个菌液浓度,每容器 200ml 稀释液放 50 头 2—3 龄幼虫,每个处理重复三次,每个浓度两个重复。另设对照组。置于 26℃ 室内,定时记录死亡数,隔日给幼虫补充食料粉。毒力指标以百分死亡率作为基数进行毒力分析统计。

菌剂热处理是恒温水浴定时处理后立即置 4℃ 下备用。用血球计数器和 65℃ 30 分钟热处理分别进行菌数计数。

### 结 果

#### (一) 菌株对二龄幼虫敏感性测定

试验结果表明:苏芸金杆菌 9 个变种中以以色列变种 1897 毒力最高。与 1897 相

本文于 1981 年 10 月 18 日收到。

\* 南开大学生物系。

\*\* 天津市卫生防疫站。

本工作承陆宝麟教授和程振衡教授支持、关怀;赵炳成同志参加部分工作,表示感谢。

似,也含有方、圆、不规则形伴孢晶体的菌株,如 7501、HD-1、7404、BA-068 也具有一定的毒力(蚊幼虫死亡率为40—70%),能形成色素的 1-7601 以及具有特异晶体

类型的 79201 菌株,则无毒力。含有不规则形晶体的 006 株毒力很弱。其它三株菌中仅 1593 菌株毒力最高,与 1897 的毒力相近(表 1)。

表 1 1897 与 1593 对二龄蚊幼虫的毒力比较

Table 1 Comparison of toxicity of 1897 and 1593 on 2nd instar mosquito larvae

菌株 Strain	培养时间 Cultivation time (h)	LC <sub>50</sub> *		毒力回归式 Regression lines (Y)
		稀释度 Dilution	菌数(个/ml) Bacteria/ml	
1593	24	1.6×10 <sup>-6</sup>	1.51×10 <sup>3</sup>	1.98 + 0.75X
	48	3.49×10 <sup>-6</sup>	1.17×10 <sup>3</sup>	2.41 + 0.82X
1897	24	2.46×10 <sup>-5</sup>	3.46×10 <sup>3</sup>	0.78 + 0.87X
	48	2.51×10 <sup>-5</sup>	2.93×10 <sup>3</sup>	0.72 + 0.91X

\* 以培养液稀释度为比较基数,1.6×10<sup>-6</sup>表示稀释 1600,000 倍的倒数,即每毫升含菌数为 1.51×10<sup>3</sup>。  
Dilution of the finale whole culture that kill 50% of test larvac. (1.6×10<sup>-6</sup> = 1:1600000, 1.51×10<sup>3</sup> indicate total viable count/ml)

从表 1 可看出,1593 对二龄幼蚊的 LC<sub>50</sub> 值,无论是 24 小时或 48 小时培养液都低于 1897,因此,1593 对淡色库蚊的致死性比 1897 具有更大的潜力。

(二) 1897 与 1593 不同发育阶段的毒力比较

通过对 1897 和 1593 摇瓶培养液定时取样观察,发现两菌芽孢形成的过程极为相近,发酵周期也很接近。30℃,250 rpm

摇床培养 4—8 小时为原生质着色均匀的营养体,10—14 小时原生质分化出折光小体,14—18 小时为孢子囊形成期,1593 菌体一端膨大形成芽孢,1897 则不膨大,原生质明显分化出两个明显的折光体,20—32 小时孢子囊成熟,1593 的孢子囊一端形成折光很强的球状芽孢,1897 则形成了芽孢和伴孢晶体,34—48 小时为孢子囊自溶期。以培养 18、24、32、48 小时发酵液每

表 2 1897 和 1593 不同生长阶段对蚊幼虫毒性比较

Table 2 Effects of different stages of growth of 1897 and 1593 on toxicity to mosquito larvae

时间 (h) Time		18	24	32	48
菌株 Strain	A*	8.83:1	2.58:1	2.92:1	2.04:1
	B	2.02×10 <sup>9</sup>	2.41×10 <sup>9</sup>	3.19×10 <sup>9</sup>	4.02×10 <sup>9</sup>
	C	8×10 <sup>-5</sup>	1.6×10 <sup>-6</sup>	5.2×10 <sup>-6</sup>	3.4×10 <sup>-6</sup>
1897	A	sp	sp	sp	s, c
	B	—	8.5×10 <sup>8</sup>	7.55×10 <sup>8</sup>	6.0×10 <sup>8</sup>
	C	2.4×10 <sup>-5</sup>	2.46×10 <sup>-5</sup>	2.29×10 <sup>-5</sup>	2.51×10 <sup>-5</sup>

- \* A. 营养体与孢子囊之比, sp: 孢子囊, s: 孢子, c: 晶体。  
B. 每毫升培养液含菌数。  
C. LC<sub>50</sub> 为稀释度的倒数。  
A. Vegetable cells; sporangia (sp: sporangia, s: spore, c: crystal)  
B. Total viable count of ml whole culture  
C. LC<sub>50</sub>

毫升含菌数和毒力比较列于表 2。

从表 2 可看出: 1. 1593 培养 18 小时就有明显的杀虫活力, 32 小时达最高峰。2. 1897 与 1593 以同等条件处理蚊子幼虫, 1897 致死时间比 1593 快 8—12 小时, 但 1593 后期效果较明显。用 1897 处理后 35 分钟幼虫开始大量死亡, 3—12 小时全部死亡; 而 1593 的各处理 8 小时仅有少量死亡, 12 小时后才开始大量死亡, 故 1593 死

亡高峰比 1897 晚 8—12 小时, 这是我们在毒力测定中发现 1593 菌有别于 1897 菌的唯一特点。

### (三) 不同培养基对 1593 及 1897 毒力的影响

我们参考 Myer 等、de H. Barjac 等、Dulmage 等的有关芽孢杆菌优良培养基, 结合本实验室条件设计的 NY 配方进行四种培养基的对比试验, 结果见表 3。

表 3 不同培养基对 1593 和 1897 产毒的影响

Table 3 Comparison of insecticidal activity of 1897 and 1593 grown in various media

菌 株 Strain*	时 间 (h) Time	死亡率 Death rate (%)						CK		
		1		2		3			4(NY)	
		A	B	A	B	A	B		A	B
1897	24	87	59	—	87	85	100	87	98	0
	48	87	69	—	87	85	100	87	100	
1593	24	28	33	81	38	70	26	61	74	5
	48	67	47	98	51	100	41	85	99	

\* A: 1897 稀释 180,000 倍, 1593 稀释 800,000 倍。

B: 1897 稀释 360,000 倍, 1593 稀释 1600,000 倍。

A: 1897 diluted 1: 180,000, 1593 diluted 1:800,000.

B: 1897 diluted 1:360,000, 1593 diluted 1:1,600,000.

从表 3 中可看出 1897 以 3、NY 培养基效果最好, 1593 则以 2 和 NY 培养基为好。发酵液含菌数基本上与发酵液毒力相吻合。

### (四) 影响毒力的其它因子

由于 1593 对蚊幼虫的中毒症状与 1897 相似, 为了进一步研究、制备粉剂, 进行了高温及室温放置对毒力的影响试验 (表 4)。

从表 4 可看出, 80℃ 以下热处理半小

表 4 高温处理对 1593 和 1897 毒力的影响

Table 4 Effects of insecticidal activity of 1897 and 1593 treated with heat to mosquito larvae

时间 Time (h)		24				48			
菌种 Strain	处理 Dilution Treatment	CK	65℃	65℃	80℃	CK	65℃	65℃	80℃
			30min	2h	12min		30min	2h	12min
1593	$2.0 \times 10^{-2}$	100	100	100	100	—	—	—	—
	$4.0 \times 10^{-4}$	—	—	—	—	100	—	—	100
	$2.0 \times 10^{-5}$	40	42	6	0	80	67	35	0
	$8.0 \times 10^{-5}$	37	34	0	0	42	50	0	0
	$1.6 \times 10^{-6}$	—	—	—	—	44	—	—	3
1897	$2.0 \times 10^{-2}$	100	100	100	100	—	—	—	—
	$6.0 \times 10^{-4}$	89	90	100	0	99	100	100	0
	$1.8 \times 10^{-5}$	16	62	59	0	45	69	66	0

时到 2 小时, 对稀释 200 倍的浓菌液毒力影响不大, 但稀释 80 万倍时, 80℃ 处理 12 分钟则毒力消失。两菌株的毒力对温度的敏感性差别不显著。

此外, 培养 48 小时的菌液在 4℃ 冰箱存放 31 天, 26℃ 室温放置 3—7 天对活性无影响。

### (五) 不同龄期蚊幼虫对 1897 和 1593 的敏感性

从试验得知, 1897 和 1593 对蚊幼虫的毒力表现为: 虫龄越小, 毒性越大, 杀死速度越快。18 小时, 一龄幼虫全部杀死, 2—3 龄幼虫大部死亡, 而 4 龄幼虫仅分别死亡 26% 和 1% (表 5)。

表 5 不同龄期蚊幼虫对 1897 和 1593 的敏感性测定

Table 5 Insecticidal activity of 1897 and 1593 to various instars of mosquito larvae

菌株 Strain	稀释度 Dilution	时间 (h) Time	死亡率 Death rate (%)				
			龄 期 Instars				
			1	2	3	4	CK
1897	$6.0 \times 10^{-4}$	18	100	99	95	26	0
		24	—	100	97	29	0
1593	$2.0 \times 10^{-3}$	18	100	75	40	1	0
		24	—	99	88	43	0

## 讨 论

从供试的 12 个菌株对淡色库蚊幼虫的毒力比较看, 球形芽孢杆菌 1593 和苏芸金杆菌以色列变种 1897 的毒力远远高于其他 10 个菌株, 1897 具有化学杀虫剂那样的速效作用, 这可能与 1897 糖蛋白性质的伴孢晶体<sup>[8]</sup>在菌剂中游离存在有关。游离的晶体为寄主肠道的蛋白酶水解为毒蛋白; 而 1593 的毒源则主要在球形芽孢杆菌细胞壁和孢衣 (Coats) 上, 而且孢子活性大约 10 倍于细胞壁的活性<sup>[9]</sup>, 毒源呈复合体可能不易被肠道酶活化之故。7501、HD-1、7404、BA-068 等品系虽也有一定的毒力, 但 500 倍稀释液菌数含量为每毫升  $10^{6-7}$  个, 死亡率仅为 40%—70% 左右。这与 Hall<sup>[10]</sup>(1977) 与 Panhargred (1979)<sup>[11]</sup>有关 HD-1 和 BA-068 对埃及伊蚊、尖音库蚊结果类似。但与 1593、1897 相比实际应用价值不大。但值得注意的是在供试的几株苏云金杆菌中不仅具有不规则圆形晶

体的 1897 对蚊幼虫有毒性, 而具有多型晶体类型菌如 7501、HD-1、7404, 甚至于没有伴孢晶体的球形芽孢杆菌 1593 也具有毒效, 而且幼虫中毒症状和对热处理的反应均与 1897 相似, 是否它们致毒物质都是芽孢形成过程中所产生的毒蛋白呢? 因此进一步调查开发此类芽孢杆菌并研究它们在形成芽孢过程中有毒活性物质是有广泛的生物学意义的。

Myer, Vankova 先后提出 1593 和 1897 的杀虫活性比较稳定, 而且经 80℃ 12 分钟处理后不丧失活性。但从我们多次重复中证明: 80℃ 12 分处理影响了 1897 及 1593 活性, 因为 2—3 龄蚊幼虫对 1593 只要每毫升液体含有  $10^{2-3}$  个菌, 1897 含  $10^3$  个菌细胞即可有 50% 的毒效。菌液处理后浓度偏高则看不出影响, 但当 1593 稀释到 80 万倍, 1897 稀释到 18 万倍其活性几乎全部丧失, 而未处理的 1593 80 万倍致死幼虫达 37%, 1897 未处理菌液 18 万倍死亡率达 45%。因而在扩大培养和制备菌剂时

(65℃ 2 小时影响不大), 要注意烘干室温度不能超过 80℃。

此外, 斯里兰卡 R.S.B. Wickremesinghe 和 C.L. Mendis(1980)<sup>[11]</sup> 报道从存放椰子壳的水坑中分离到一株球形芽孢杆菌 MR-4, 对 *Culex quinquefasciatus* 幼虫具有较高的毒力, 该株不同于已报道的株型, 它也像苏芸金杆菌类群一样, 在形成芽孢的一侧形成一个伴孢晶体。这个发现提示我们, 在研究球形芽孢杆菌杀虫本质时, 与以色列变种杀虫物质——伴孢晶体的比较也是具有重要的生物学意义的。我们实验室也已分离到具有伴孢晶体的球形芽孢杆菌 TS-1<sup>[12]</sup> 正在与 1593、MR-4 等株进行比较研究。

## 参 考 文 献

- [1] 陆宝麟: 昆虫学报, 21(2): 217—231, 1978.
- [2] Singer, S.: *Biotech. Bioengin.*, 32: 1335, 1980.
- [3] Ignoffo, C. M. et al.: *Mosquito News*, 40: 290—291, 1980.
- [4] Ignoffo C. M. et al.: *Mosquito News*, 41: 85—93, 1981.
- [5] 任改新等: 微生物学报, 15(4): 292, 1975.
- [6] 任改新等: 微生物学报, 23(1): 57—62, 1983.
- [7] Myers, P. et al.: *Canad. J. Microbiol.*, 25: 1227—1321, 1979.
- [8] Tyrell, D. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 656—658, 1979.
- [9] Myers, P. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 1205—1211, 1980.
- [10] Hall, I. M. et al.: *Mosquito News*, 37: 246—250, 1973.
- [11] Wickremesinghe, R. S. B. et al.: *Mosquito News*, 40: 387—389, 1980.
- [12] 任改新等: 昆虫学报, 25(3): 349—350, 1982.

## COMPARISON OF THE TOXICITY OF *BACILLUS SPHAERICUS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS* AGAINST *CULEX PIPIENS* VAR. *PALLENS*

Ren Gaixin Sun Guihua Cui Ronghui Zhu Chengzhi\*

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

This paper is a report on the comparative studies of 12 strains of *Bacillus* against larvae of *Culex pipiens* var. *palliens*. The results demonstrate that both *Bacillus sphaericus* 1593 and *Bacillus thuringiensis israelensis* 1897 are highly toxic to *Culex pipiens*

var. *pallens* larvae with  $LC_{50}$  of  $1.17 \times 10^3$  and  $2.93 \times 10^3$ /ml, respectively. 1593 and 1897 strains difference was examined by (1) growth cycle experiments (2) bioassays of the toxicity (3) medium tests (4) temperature tests etc.