

## 对蚊的高毒效菌株 187 的研究

张用梅 库竹 陈宗胜

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

徐博钊 袁方玉 陈国英 钟涛 明桂珍

(湖北省医学科学院疟疾室, 武汉)

对湖北省医学科学院疟疾室筛选的对蚊具有高毒效的菌株 187 的生物学特性和毒性进行了研究。此菌株的血清型、酯酶型和主要生化反应与参考菌株苏芸金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 1897 菌株相同, 但在菌体大小、鞭毛、微毛、运动性、菌落特征、晶体形态和生化特性等方面又有差异。因此认为此菌株属于苏芸金杆菌  $H_{14}$  型的一个新品系。其菌液对白纹伊蚊、致乏库蚊和中华按蚊的毒力分别是 1897 菌株的 3.32、2.82 和 2.48 倍, 晶体的毒力则分别为 1897 菌株的 4.04、7.03 和 1.28 倍。

**关键词** 苏芸金杆菌以色列变种

由于蚊对化学农药产生了抗性, 世界卫生组织从 1966 年开始组织利用微生物防治蚊的研究。自从 1977 年分离到苏芸金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 1897 菌株以来<sup>[1]</sup>, 这方面的研究取得了很大的进展<sup>[2-8]</sup>。

为了寻找我国蚊的病原菌, 推动微生物灭蚊工作, 我们对 187 菌株的生物学特性和杀蚊毒性进行了研究。现将结果报道如下。

### 材料和方法

#### (一) 试验菌株

187 菌株 (即 79-W-187 菌株) 系 1979 年从湖南岳阳市岳阳楼对面湖滩死钉螺上分离得到的一株芽孢杆菌<sup>[9]</sup>。

参考菌 1897 菌株为苏芸金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 1897), 由中国科学院动物研究所沙槎云提供。

#### (二) 菌体和晶体形态观察

1. 培养基及培养条件: 菌株接种在蛋白胨牛肉膏斜面上, 于 30℃ 分别培养 24 和 48 小时, 用

电镜和光学显微镜观察孢子囊、芽孢和晶体形态; 采用上述半固体斜面, 在相同温度下培养 7 小时后观察菌体的鞭毛和微毛; 营养体形态及其运动性, 系采用肉汤培养基在 30℃ 以 150rpm 振荡培养 8 小时的培养液进行观察; 菌落形态系用蛋白胨牛肉膏平板划线后于 32℃ 培养 48 小时观察。

#### 2. 电镜观察:

样品收集和洗涤: 每支斜面菌苔加入 3—4 ml 无菌蒸馏水, 小心刮取菌苔, 转入小离心管中, 盖上洗净的橡皮塞, 剧烈振荡使菌苔分散, 离心去上清液, 后经 5% 丙酮和蒸馏水反复离心洗涤 5—6 次, 取沉淀备用<sup>[10]</sup>。

投影: 上述沉淀物加入无菌蒸馏水后制成一定浓度的菌悬液, 然后点样; 观察鞭毛和微毛时, 1 支培养 7 小时的半固体斜面菌苔, 加入 6—8 ml 无菌蒸馏水, 置室温下静止 10—15 分钟, 取含有游出的菌体悬液点样。样品用钨铌或铂投影。

固定、切片和染色: 取上述洗涤过的菌体, 用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定, 水洗, 系列脱水, 在苯二甲酸二丙酯中渗透后, 置 DPA 包埋剂

本文于 1983 年 6 月 13 日收到。

中国科学院武汉病毒研究所电镜组协助拍摄和洗印照片, 特此致谢。

中包埋聚合, 用 LKB III 切片机进行超薄切片。再用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色 2 次, 在日本 JEM-100 型电镜下进行观察。

### (三) 生化特性、血清型和酯酶型分析

生理生化试验按常规方法进行。血清型和酯酶型分析分别采用文献[11]和[12,13]的方法。

### (四) 生物测定

1. 菌液: 将活化的营养体接 1 环于盛有 100 ml 肉汤的 500ml 三角瓶中, 于 30℃、280rpm 振荡培养 56 小时, 这种大部分形成芽孢并有少量晶体的培养液供生物测定使用。

芽孢和晶体的制备采用双相法<sup>[1]</sup> (晶体纯度达 99% 以上)。将所获得的晶体和芽孢冻干备用。

2. 毒力试验: 菌液、芽孢和晶体的毒力测定是按世界卫生组织 1980 年规定的程序进行。同时, 按活菌计数法计算出菌液浓度。供试蚊为室内驯化饲养的 3 龄幼虫, 每个处理虫数为 25 头。参考菌 1897 菌株以相同的方法进行试验并设空白对照。试验温度为 26℃, 每个处理设 3 个重复。处理 24 小时后, 检查死活虫数, 以最小自乘法求出  $LC_{50}$  值。

## 结 果

### (一) 形态特征

菌体形态: 187 菌株的营养体呈杆状, 两端钝圆, 大小为  $2.906 \times 1.313 \mu m$  (平均值), 通常 4—8 个营养体相连。菌体有稀少的周生鞭毛, 但未见到明显的繖毛(图版 I-1), 营养体运动性差。营养体阶段的肉汤培养液易于沉淀。孢子囊不膨大, 芽孢偏端生, 一般呈长椭圆形, 大小为  $2.052 \times 0.972 \mu m$  (平均值)。晶体呈较规则的卵圆形, 大小为  $1.116 \times 0.813 \mu m$  (平均值) (图 I-1), 在晶体的整体照片中, 常可见到晶体被一膜状物包裹着(图 I-2)。

群体特征: 在固体平板上培养 48 小时的单菌落直径为 1.7cm, 呈乳白色, 边缘不整齐, 表面粗糙, 菌落中央有不整齐的突起。

187 菌株与 1897 菌株的形态差异: 前者营养体比后者小, 后者有更发达的鞭毛和繖毛(图版 I-2), 前者的运动性不及后者强。在光学显微镜下观察时, 前者的芽孢呈长椭圆形, 后者呈椭圆形; 前者的晶体呈卵圆形并常有一包膜(图 I), 后者则为不规则形、无包膜(图 2); 前者菌落有不整齐的突起, 后者相应部位则具有微突起的放射条纹。

超薄切片的电镜观察表明, 187 菌株和 1897 菌株的晶体均由电子密度大(图版 I-3、4 和图 3 中箭头所示部位)、具有隆起的条纹和电子密度小、不具条纹的相互嵌合的多部分结构组成。

### (二) 生理生化特性

187 菌株 VP 和 MR 反应为阳性, 具有卵磷脂酶, 能水解明胶、七叶灵和淀粉, 形成菌膜和产生色素, 发酵葡萄糖、甘露糖、纤维二糖并产酸, 可还原硝酸盐成亚硝酸盐, 能利用柠檬酸盐。但无脲酶, 也不利用蔗糖、乳糖、木糖、鼠李糖和水杨苷。

187 菌株与 1897 菌株的生理生化特性差异: 187 菌株的 V. P 反应、葡萄糖产酸和七叶灵水解比 1897 菌株弱, 而明胶液化和纤维二糖利用比 1897 强。

### (三) 酯酶型

两菌株的酯酶区带均为 5 条, 而且强弱带的 Ef 值也极为相近, 因此两菌株具有相同的酯酶型。

### (四) 血清学特性

H-抗原血清型是苏芸金杆菌分类的重要指标。表 1 结果表明, 187 菌株 H-抗原与 187 菌株的抗血清的交叉凝集反应效价为 1,600—3,200; 1897 菌株的 H-抗原与 187 菌株的抗血清具有 12,800—25,600 高效价的交叉凝集反应。然而用异源 H-抗原饱和后的 187 菌株和 1897 菌株的抗血清均不与其同源 H-抗原发生凝

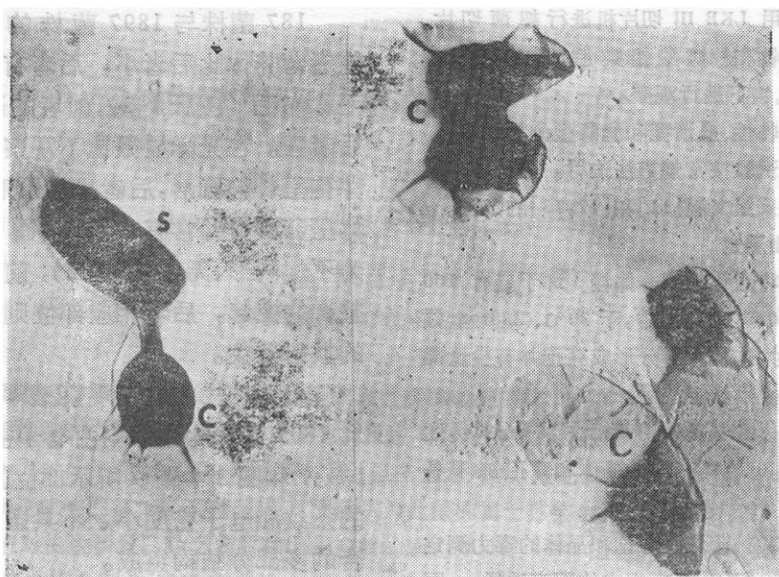


图 1 187 菌株的芽孢(S)和晶体(C) ( $\times 10,800$ )

Fig. 1 Spores (S) and crystals (C) of strain 187



图 2 1897 菌株的芽孢(S)和晶体(C) ( $\times 20,000$ )

Fig. 2 Spores (S) and crystals (C) of strain 1897

集反应。证明两菌的 H-抗原结构完全相同。因此, 187 菌株的鞭毛抗原血清型为 *Bacillus thuringiensis* H<sub>14</sub> 型。并证明 187 菌株的菌体抗原与 1897 菌株相同(表 2)。

### (五) 对蚊幼虫的毒力

1. 菌液: 187 菌株 56 小时的培养液对白纹伊蚊、致乏库蚊和中华按蚊幼虫的毒力, 其  $LC_{50}$  分别为  $0.076 \times 10^3$  细胞/ml、



图 3 1897 菌株晶体的超微结构 ( $\times 81,000$ )

Fig. 3 The ultra-structure of the crystal from strain 1897

$0.097 \times 10^3$  细胞/ml 和  $1.326 \times 10^3$  细胞/ml。但 1897 菌株的菌液对上述 3 种蚊幼虫的  $LC_{50}$  则分别为  $0.252 \times 10^3$  细胞/ml、 $0.274 \times 10^3$  细胞/ml 和  $3.289 \times 10^3$  细胞/ml。187 菌株对白纹伊蚊、致乏库蚊和中华按蚊的毒力分别是 1897 菌株的 3.32、

表 1 187 菌株的鞭毛抗原分析

Table 1 Determination of the H-antigen of Strain 187

H- 抗 血 清 H-antiserum		与试验抗原 (H) 的凝集效价 Titre tested against H-antigen	
		187 菌株 Strain 187	1897 菌株 Strain 1897
187 菌株 Strain 187	用 1897 菌株 H-抗原吸收 Saturated by H-antigen of strain 1897	0	0
	未吸收 Not Saturated	25,600	12,800—25,600
1897 菌株 Strain 1897	用 187 菌株 H-抗原吸收 Saturated by H-antigen of strain 187	0	0
	未吸收 Not Saturated	1,600—3,200	10,240—20,480

表 2 187 菌株的菌体抗原(O)分析

Table 2 Determination of the O-antigen of Strain 187

O- 抗 血 清 O-antiserum		与试验抗原 (O) 的凝集效价 Titre tested against O-antigen	
		187 菌株 Strain 187	1897 菌株 Strain 1897
187 菌株 Strain 187	用 1897 菌株 O-抗原吸收 Saturated by O-antigen of strain 1897	0	0
	未吸收 Not saturated	160—320	160—320
1897 菌株 Strain 1897	用 187 菌株 O-抗原吸收 Saturated by O-antigen of strain 187	0	0
	未吸收 Not saturated	80	80

2.82 和 2.48 倍。

2. 晶体: 187 菌株和 1897 菌株的晶体对白纹伊蚊的  $LC_{50}$  分别为  $0.0021\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $0.0085\mu\text{g}/\text{ml}$ , 对致乏库蚊的  $LC_{50}$  分别为  $0.0037\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $0.026\mu\text{g}/\text{ml}$ , 对中华按蚊的  $LC_{50}$  分别为  $0.187\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $0.240\mu\text{g}/\text{ml}$ 。187 菌株对这 3 种蚊幼虫的毒力分别是 1897 菌株的 4.04、7.03 和 1.28 倍。但将 187 菌株的晶体和芽孢以 1:1 混合, 对白纹伊蚊和致乏库蚊的  $LC_{50}$  分别为  $0.0015\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $0.008\mu\text{g}/\text{ml}$ , 表明芽孢和晶体混合使用, 毒力并未提高。

3. 芽孢: 187 菌株的芽孢对白纹伊蚊、致乏库蚊和中华按蚊幼虫的  $LC_{50}$  分别为

$3.88\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3.99\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $24.22\mu\text{g}/\text{ml}$ 。但 1897 菌株的芽孢在相同浓度下对上述 3 种蚊幼虫无毒性, 当浓度增至  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 致乏库蚊幼虫的死亡率仅分别为 4%、8% 和 12%。

## 结 论 和 讨 论

1. 187 菌株虽然在血清型、酯酶型和主要生理生化特性等方面与参考菌 1897 菌株相同, 但在菌体大小、运动性、鞭毛、菌落特征、芽孢、晶体形态和生理生化特性等方面又与 1897 菌株有明显的区别。鉴定结果表明, 187 菌株是分布于我国, 属于苏芸金杆菌  $H_{14}$  型的一个新品系, 命名为苏

芸金杆菌以色列变种中国品系 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 79-W-187 (Chinese strain)。

2. 187 菌株的菌液、晶体和芽孢对常见的伊蚊、库蚊和按蚊 3 属幼虫均有很高的毒性,并且其毒力明显地高于世界卫生组织重点组织试验的 1897 菌株<sup>[8-13]</sup>。这一结果不仅再次证明苏芸金杆菌同一血清型中的不同品系和菌株的毒力有显著差异,而且说明此菌株在蚊的微生物防治中具有实际应用价值。

3. 187 菌株的晶体对白纹伊蚊和中华按蚊的毒力分别是芽孢的 540,000 和 7,600 倍,表明此菌对蚊幼虫的致毒因子是晶体蛋白。

### 参 考 文 献

[1] de Barjac, H.: C. R. Acad. Sc. Paris. Ser.

D., 286: 797—800, 1978.

- [2] 王瑛等: 微生物学报, 20(3): 285—288, 1980.
- [3] 喻子牛、戴大生: 微生物学通报, 7(5): 198—199, 1981.
- [4] 徐启丰等: 微生物学通报, 7(5): 199—201, 1981.
- [5] Garcia, R.: California Agriculture, 34: 18—19, 1980.
- [6] Merdan, A. I.: Basic Biology of Microbial Larvicides of Vectors of Human Diseases, Chapter 2, 1982.
- [7] Stark, P. M.: Mosquito News, 43: 59—62, 1983.
- [8] Annie, E. S. et al.: Mosquito News, 43: 306—310, 1983.
- [9] 张用梅等: 自然杂志, 7(5): 394—395, 1984.
- [10] 张用梅等: 电子显微学报, 2(3): 48—51, 1983.
- [11] 湖北省微生物研究所虫菌组: 微生物学报, 16(1): 12—16, 1976.
- [12] 张用梅、陈宗胜: 微生物学报, 21(2): 197—203, 1981.
- [13] 张用梅等: 华中农学院学报, 2(4): 42—47, 1983.

## A NEW ISOLATE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* POSSESSING HIGH TOXICITY AGAINST THE MOSQUITOES

Zhang Yongmei Ku Zhu Chen Zongsheng  
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Xu Bozhao Yuan Fangyu Chen Guoying  
Zhong Tao Ming Guizhen  
(Hubei Academy of Medical Science, Wuhan)

The biological characteristics and toxicities of a *Bacillus thuringiensis* isolate, 79-W-187, which is highly toxic to 3 species of larvae of the mosquitoes were studied. Its flagellar antigen, esterase pattern and main biochemical reactions are similar to reference strain. *B. thuringiensis* var. *israelensis* 1897. But the size, flagella, fimbriae, motility of the vegetative cells, form of the colony and shapes of the spores and crystals of this isolate are different from those of the strain *B. thuringiensis* var. *israelensis* 1897. There are also some differences between the two cultures in biochemical properties. We suggest that this isolate belongs to a new

strain which is named *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 79-W-187 (Chinese strain).

Bioassay indicated that the toxicities of its culture fluid are 3.32, 2.82 and 2.48 times as toxic as *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 1897 to larvae of the mosquitoes, *Aedes albopictus*, *Culex fatigans* and *Anopheles sinensis* respectively, and that of the crystals are 4.04, 7.03 and 1.28 times.

### Key word

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*  
79-W-187 (Chinese strain).