

# 苏芸金杆菌的一个新血清型

王瑛 温浩 冯喜昌

(中国科学院动物研究所, 北京)

从土壤中分离出一株产生伴孢晶体的芽孢杆菌。该菌株具有苏芸金杆菌的典型特征, 产生不规则型晶体, 鞭毛抗原及生化反应与已知的苏芸金杆菌 21 个血清型不同, 不产生  $\beta$ -外毒素。对棉铃虫、粘虫、大蜡螟及尖音库蚊幼虫均无毒性, 是一个新血清型 ( $H_{22}$ ), 定名为苏芸金杆菌山东变种 (*Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis*,  $H_{22}$ )。

**关键词** 苏芸金杆菌山东变种

目前应用最广的苏芸金杆菌分类方法是根据菌的鞭毛抗原(H)与生化反应特征进行的<sup>[1,2]</sup>。已知苏芸金杆菌被分成 21 个血清型<sup>[3]</sup>, 一些血清型由于鞭毛抗原亚因子的存在( $H_3$ 、 $H_4$ 、 $H_5$ 、 $H_8$ 、 $H_{11}$ )或生化特性的不同( $H_6$ )、酯酶型的不同( $H_{4a,b}$ ), 可被进一步区分, 所以至今共有 28 个变种。现将该菌株的形态、H-血清型鉴定、生化反应及毒力测定结果等报道如下。

## 材料和方法

### (一) 菌种及来源

1. 标准菌株:  $H_1$ — $H_{2a,b}$  及  $H_1$  引自英国。  $H_{8a,b,c}$  为本组保存。  $H_{10}$ 、 $H_{11a,b}$ 、 $H_{12}$ 、 $H_{13}$  为法国巴斯德研究所 de Barjac 博士提供。  $H_{11a,b}$ 、 $H_{17}$ 、 $H_{18}$ 、 $H_1$  为日本 Michio Ohba 博士提供。  $H_{14}$  为本组从捷克斯洛伐克引进。  $H_{15}$ 、 $H_{16}$  为美国 A. J. DeLuca 博士提供。  $H_{20}$  由云南省动物研究所王婉瑜提供。  $H_{21}$  为美国 Gail Donaldson 博士提供。

2.  $T_2$  菌株: 从山东省泰安地区麦田土壤中分离获得。

### (二) 土样分离方法

用稀释平板法。

### (三) 形态观察、生化反应及血清学试验

通过光学、相差显微镜及扫描电子显微镜观

察菌体形态。生化反应及血清学试验按常规方法进行<sup>[1,2]</sup>。

### (四) $\beta$ -外毒素产生试验

将  $T_2$  菌株及对照菌株 E-013 从斜面转接入装有肉汤培养基的三角瓶中, 在 30℃ 摇床振荡培养 24 小时, 将培养液高压灭菌 (15 磅/时<sup>2</sup>, 30 分钟) 后, 对家蝇 (*Musca domestica*) 三龄幼虫进行生物测定, 对照设两组, 对照(一)为蒸馏水, 对照(二)为产生  $\beta$ -外毒素菌株 E-013 的灭菌培养液, 具体方法参考文献<sup>[4,5]</sup>。

### (五) 杀虫活性测定

共用四种昆虫。

粘虫 (*Leucania separata* Walker): 取三环菌苔加到含 0.1% Triton X-100 的蒸馏水 (5ml) 中, 配成均匀菌悬液即为最高浓度, 将此液稀释 5 倍为中浓度, 稀释 25 倍为低浓度。把玉米叶剪成 3 × 6cm 大小, 分别浸泡在上述定量菌液中, 使其完全湿润, 晾干, 置于口径为 9cm, 高为 6cm 的玻璃缸中, 每缸放 10 片, 接入三龄幼虫 30 头。对照为加 0.1% Triton X-100 的蒸馏水代替菌液, 25℃, 保湿, 48、72 小时记录结果。

棉铃虫 (*Heliothis armigera* Hubner): 取三环菌苔加到 2ml 蒸馏水中, 混匀成菌悬液, 分别取该液 0.1ml 加到预先放好人工饲料块 (1 × 1 × 0.5cm) 的指形管中, 用玻棒将饲料与菌液混匀,

本文于 1985 年 2 月 8 日收到。

本所马勇同志采集土样, 特此致谢。

表 1 参考标准菌株与 T<sub>2</sub> 菌

Table 1 The results of across-agglutination response

H-抗原 效价	H-抗血清											
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3a</sub>	H <sub>3ab</sub>	H <sub>4ab</sub>	H <sub>4ac</sub>	H <sub>5ab</sub>	H <sub>5ac</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>8ab</sub>	H <sub>8ac</sub>
H <sub>1</sub>	25,600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub>	0	6,400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>3a</sub>	0	0	25,600	—	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>3ab</sub>	0	0	—	6,400	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>4ab</sub>	0	0	0	0	25,600	—	0	0	0	0	0	0
H <sub>4ac</sub>	0	0	0	0	—	25,600	0	0	0	0	0	0
H <sub>5ab</sub>	0	0	0	0	0	0	12,800	—	0	0	0	0
H <sub>5ac</sub>	0	0	0	0	0	0	—	25,600	0	0	0	0
H <sub>6</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	25,600	0	0	0
H <sub>7</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25,600	0	0
H <sub>8ab</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25,600	—
H <sub>8ac</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6,400
H <sub>9</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>10</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>11a11b</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>11a11c</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>12</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>13</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>14</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>15</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>16</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>17</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>18</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>19</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>20</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>21</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T <sub>2</sub> 菌株	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



每管接入 1 头二龄幼虫,共 10 管。对照用蒸馏水代替菌液。第 48、72、96 小时记录结果。

大蜡螟 (*Galleria mellonella*): 菌液制备法与棉铃虫相同,取该液 0.1 ml 加到装有定量人工合成饲料的小称量瓶中。用玻棒将菌液与饲料混匀,放入二龄幼虫 5 头,共 4 瓶。对照用蒸馏水代替菌液,第 4—7 天查结果。

尖音库蚊淡色亚种 (*Culex pipiens* var. *pallens*): 具体方法参考文献<sup>[4]</sup>。

## 结 果

### (一) 形态观察和生化反应

革兰氏反应阳性,接触酶阳性。具有苏芸金杆菌菌群共有的形态特征: 即营养体杆状,两端钝圆,大小为  $1-1.2 \times 2.5-4.5 \mu\text{m}$ 。通常单个或两个相联。在游离前孢囊不膨大,伴孢晶体为不规则形。在扫描电镜下观察,晶体中间呈凹状(见图 1-b),芽孢椭圆形。在普通细菌琼脂平板上的菌落近似圆形,扁平,灰白色,边缘不十分整齐,表面有皱褶。斜面菌苔产生皱纹。

生化反应结果: V. P. 反应、水解淀粉、水解蛋白、卵磷脂酶、菌膜、水杨苷、七叶灵均为阳性反应。色素、脲酶、蔗糖、甘露糖均为阴性反应。上述结果与所有标准菌株均不相同。

### (二) H-血清型鉴定

标准菌株本身 H-抗原与 H-抗血清凝集效价均在 6,400—25,600 或更高。 $T_2$  菌株的 H-抗原和 H-抗血清与所有标准菌株的 H-抗血清和 H-抗原均不产生交叉凝集反应,说明它们之间没有共同的抗原成份。该菌株同源凝集效价为 6,400,说明  $T_2$  菌株具有已知苏芸金杆菌所不具备的独特 H-抗原成份(表 1)。

### (三) 杀虫活性测定结果

$T_2$  菌株不产  $\beta$ -外毒素。家蝇生活正常如同对照(一)。对照(二)菌株 E-013 产  $\beta$ -外毒素,引起家蝇幼虫死亡、蛹畸形、不羽化。 $T_2$  菌株对棉铃虫、粘虫、大蜡螟及尖音库蚊淡色亚种均无毒杀作用。

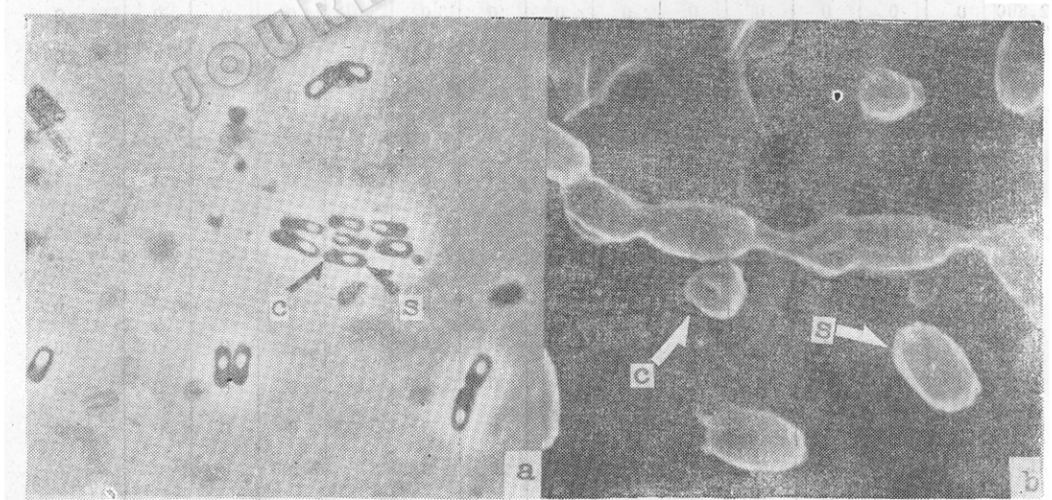


图 1 苏芸金杆菌山东变种

a. 孢囊的相差显微镜照片 ( $\times 2,079$ )。S: 芽孢; C: 晶体, b. 晶体和芽孢的扫描电镜照片 ( $\times 10,000$ )

Fig. 1 *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis*

a. Phase contrast photomicrograph of sporangia S: spore; C: crystal  
b. Scanning electron micrograph of crystals and spores

## 讨 论

根据形态观察证明, T<sub>2</sub> 菌株属于苏芸金杆菌群。由于它的生化特性与所有标准菌株均不同, 又具备独特 H-抗原成份, 因此是苏芸金杆菌中的一个新血清型。世界各地许多实验室都在进行这一分类工作, 为了避免苏芸金杆菌新血清型编号的混乱, Burges 等建议<sup>[7]</sup>, 新血清型的确定应征得法国巴斯德研究所 H. de Barjac 博士的同意。经与 Barjac 联系该菌株定为 H<sub>22</sub>, 并定为新变种——山东变种 (*Bacillus thuringiensis* serovar **shandongiensis**, H<sub>22</sub>) 代表株为 T<sub>2</sub>。

该菌株不产生菱形晶体, 这与 H<sub>3a5c</sub>、H<sub>6a8c</sub>、H<sub>11a11c</sub>、H<sub>14</sub>、H<sub>15</sub> 等类似。这些菌株晶体均是不规则形, 仅大小不同, 并且它们对鳞翅目幼虫均无毒。从晶体蛋白 SDS 凝胶电泳得到的电泳图谱<sup>[8]</sup>也可看出, 菱形晶体蛋白主要由一种大分子亚单位组成, 而 H<sub>11a11c</sub> 及 H<sub>14</sub> 晶体蛋白的亚单位成份与上述不同。由此说明晶体结构与其对昆虫毒力有一定关系。至今发现对鳞翅目幼虫毒性高的菌株大多数都是产菱形晶体的菌株。

从扫描电镜照片上可看出, 该菌晶体不仅为不规则形, 而且中间呈凹状。在其它苏芸金杆菌菌株中还从未见到有这种很独特形状的晶体。至于该菌晶体的成份尚待进一步分析。

目前已共有 22 个血清型, 其中 9 个 (H<sub>7</sub>、H<sub>11a11c</sub>、H<sub>14</sub>、H<sub>15</sub>、H<sub>16</sub>、H<sub>17</sub>、H<sub>18</sub>、H<sub>19</sub>、H<sub>22</sub>) 也就是将近半数是从土壤或养蚕架上的杂物中分离出的, 说明在自然界, 特别是这两种生态环境里存在大量苏芸金杆菌, 有待人类去开发利用。

## 参 考 文 献

- [1] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, 27(3): 439—447, 1964.
- [2] de Barjac, H.: In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980" (ed. by H. D. Burges), Academic Press, London, pp. 35—43, 1981.
- [3] Delucca, A. J. et al.: *J. Invert. Path.*, 43: 437—438, 1984.
- [4] 冯喜昌等: 昆虫学报, 18(4): 374—382, 1975.
- [5] 王 瑛等: 微生物学通报, 11(6): 244—246, 1984.
- [6] 王 瑛等: 昆虫学报, 24(1): 42—47, 1981.
- [7] Burges, H. D. et al.: *J. Invert. Path.*, 40: 415, 1982.
- [8] 王 瑛等: 微生物学通报, 9(5): 201—203, 1982.

## A NEW SEROVAR OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Wang Ying Wen Jie Feng Xiehang

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

The strain T<sub>2</sub> was isolated from a soil sample collected in Shandong. Morphological observations showed that the vegetative cell was a motile Gram-positive rod with dimensions of 1—1.2 × 2.5—4.5 μm. Parasporal inclusion is irregular in shape with a sunken center and forms in unswollen sporangium. β-Exotoxin production was not detected in the strain. The biochemical characteristics of strain T<sub>2</sub> are different from all reference standard strains.

The serological analysis showed that strain T<sub>2</sub> bears an H antigen which was different from other *Bacillus thuringiensis* H-antigen serovars described to date while anti-T serum reacted with its homo-

logous suspension with a titer of 6,400.

Bioassays on larvae have shown that the new strain has no pathogenicity against *Leucania separata*, *Heliothis armigera*, *Galleria mellonella* and *Culex pipiens*.

Based on the aforementioned characteristics, strain T<sub>2</sub> represents a new serovar which can be individualized by its antigen "H-22". The name of *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* is proposed for the type strain T<sub>2</sub>.

### Key word

*Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis*