

苏芸金芽孢杆菌的一个新亚种

戴莲韵 王学聘

(中国林业科学研究院林业研究所, 北京)

由北京近郊温泉地区油松林间土壤中, 分离到一株产生伴孢内含物的芽孢杆菌 TW 20。该菌株具有苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的典型特征, 但无鞭毛抗原 (H), 伴孢内含物与孢子常常不分开, 位于孢子囊一端由数个不同形状的晶体组成。其生化反应特性及酯酶型与已知 23 个血清型 30 个亚种的标准菌株均不相同。对油松毛虫 (*Dendrolimus tabulaeformis*)、午毒蛾 (*Lymantria dispar*)、黄褐天幕毛虫 (*Malacosoma neustria testacea*)、光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*) 幼虫没有明显的致病性。根据上述特性, 菌株 TW20 属于一个新的酯酶型亚种, 定名为苏芸金芽孢杆菌温泉亚种——*Bacillus thuringiensis* subsp. *wenquanensis*。

关键词 苏芸金芽孢杆菌温泉亚种

目前, 苏芸金芽孢杆菌的分类和鉴定方法主要根据鞭毛抗原 (H) 与生化反应特性, 并参照其酯酶型^[1]。到 1986 年止, 已知苏芸金杆菌被分为 23 个血清型, 30 个亚种^[2-5]。我们根据生化反应特性和酯酶型分析相结合的方法, 将苏芸金杆菌的 30 个亚种区分为 27 个酯酶型^[6-8], 进行了鉴定。

1985 年我们由北京近郊温泉油松林间土壤中, 分离到一株产生伴孢内含物的芽孢杆菌 TW 20。现将该菌株的形态特征、生化反应特性、酯酶分析的鉴定结果及室内杀虫活性报道如下。

材料和方法

(一) 菌种及来源

1. 标准菌株: 血清型 H₁—H₁₀, 由法国巴斯德研究院 de Barjac 博士提供; H_{11abc}, H_{11abcd}, H₁₁—H₁₆, 及 H₁₇, 由南开大学任改新提供; H₁₈, H₁₉, H₂₀, 由中国科学院动物研究所沙棧云、王瑛提供。

2. TW20 菌株: 从北京近郊温泉油松林间土壤中分离获得。

(二) 分离方法

采用常规的稀释平板法, 并参照 Ohba (1981)^[9]的方法。培养基为牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, pH 7.2—7.5。

(三) 形态观察与生化特性测定

采用普通光学显微镜、扫描电镜 (SEM505) 及超薄切片的电子显微镜观察其表形和内部结构。生理生化反应采用《一般细菌常用鉴定方法》一书的方法^[10]。

(四) 酯酶型分析

参照 Norris (1964)^[4]及《聚丙烯酰胺凝胶电泳》一书^[11]的方法和参考文献[6]和[7]。

(五) 室内杀虫活性测定

1. 供试昆虫: 油松毛虫、午毒蛾、黄褐天幕毛虫、光肩星天牛的幼虫。

2. 测定方法:

(1) 油松毛虫和午毒蛾幼虫毒效试验: 在牛肉膏、蛋白胨斜面培养基上, 30 ± 1℃ 培养 4 天以上的 TW20 菌株斜面二支, 用 20ml 无菌蒸馏

本文于 1987 年 6 月 15 日收到。

本文经蔡妙英先生审阅; de Barjac 博士、任改新、沙棧云、王瑛先生提供标准菌株; 我院电镜组协助完成电镜照片; 严静君先生、高瑞桐等提供试虫; 贾凤友采集土样, 在此一并致谢。

水洗下菌苔,振荡均匀的菌悬液(约每毫升 20 亿活芽孢)及稀释 10 倍的菌悬液,用上述两种浓度的悬液分别浸杨树和油松枝叶 2 分钟,以叶片全部湿润为准。取出枝叶晾干,插入盛有水的小玻璃瓶中,然后放入玻璃缸中(10×15cm),每个浓度分别放入 2 龄午毒蛾幼虫和 3—4 龄油松毛虫幼虫 30 头,盖好纱布盖,以蒸馏水浸枝叶为对照,放在 20℃ 室温下,48 小时,3 天—5 天观察结果。

(2) 天幕毛虫幼虫的毒效试验: 取培养 4 天以上菌斜面一支,加 9ml 无菌蒸馏水洗下菌苔摇匀的菌悬液(约每毫升 20 亿活芽孢)及稀释 10 倍的菌悬液。用上述两种浓度的菌悬液分别浸杏树枝叶 2 分钟后,晾干。按上述方法,每个玻璃缸中放入 5—6 龄天幕毛虫幼虫 20 头,在 20℃ 室温下,48 小时,3 天—5 天观察结果。

(3) 光肩星天牛幼虫毒效试验: 用直径为 2.5cm,长 4cm 的杨树枝条浸在 20 亿/ml 的 TW 20 菌悬液中 1 分钟,取出枝条放于 3×11 cm 的指形管中,每管内放入一条天牛幼虫,每个处理为 15 条幼虫,对照为清水浸枝条。塞上棉塞放入 25±1℃ 温箱中,2、4、6—15 天观察结果。

结 果

(一) 形态特征及生化特性

TW 20 菌株革兰氏反应阳性;胞内具类脂颗粒(聚 β -羟基丁酸)染色阳性;营养细胞杆状,两端钝圆,大小为 1.2—1.5×4.0—5.5 μm ,通常成链。经多次活化营养细胞在 U 型管内不运动,无鞭毛。扫描电镜观察营养细胞表面有一层薄膜(见图 1),孢子囊不膨大,芽孢为椭圆形,大小为 1.0×2.0 μm 。芽孢和伴孢内含物常常不分开(见图 2)。超薄切片电镜观察表明,伴孢内含物位于孢子囊一端由数个菱形或不规则形晶体组成(见图 3)。在牛肉膏、蛋白胨琼脂培养基上生长,其最高温度为 40—45℃,最适温度为 30℃,最低温度 10℃。菌苔薄,表面光滑,乳白色,菌落圆形,扁平,边缘不整齐。

生化反应特性: 接触酶、厌氧生长、对



图 1 营养细胞的扫描电镜照片

Fig. 1 Scanning electron micrograph of the vegetative cell



图 2 孢子囊的扫描电镜照片

Fig. 2 Scanning electron micrograph of sporangium

0.001% 溶菌酶的抗性、7% 氯化钠生长、葡萄糖产酸、蔗糖产酸、硝酸盐还原、L-酪氨酸生长、卵磷脂酶产生、水解淀粉、解脲作用均为阳性反应。V.P 反应产酸(pH 5.5 以下)。V.P 反应、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、甘露醇、水杨甙、纤维二糖产酸、水解七叶灵、脲酶产生、柠檬酸盐利用均为阴性反应。上述结果表明: TW20 菌株具有苏芸金芽孢杆菌的一般特性^[12,13],但与苏芸金



图3 孢子囊的超薄切片电镜照片

Fig. 3 Electron micrograph of athion section of sporangium

S. 芽孢 Spores; C. 晶体 Crystal

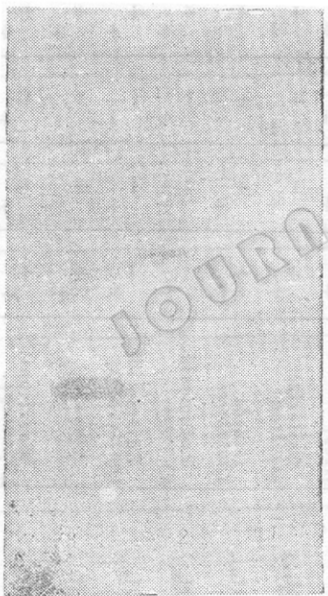


图4 TW20 菌株与苏芸金芽孢杆菌幕虫亚种、云南亚种的酯酶型

Fig. 4 Esterase type of *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*, *yunnanensis* and strain TW20

1. *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*
2. Strain TW20
3. *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis*

芽孢杆菌 30 个亚种的标准菌株及无鞭毛抗原 (H) 的苏芸金杆菌 140 菌株比较, 其

形态特征和生化反应特性均有明显差异 (见表 1)。

(二) 酯酶型分析

TW20 菌株酯酶型为一条独特的酯酶带与已知的 30 个亚种及苏芸金杆菌 140 菌株的酯酶型均不相同, 与苏芸金芽孢杆菌幕虫亚种及云南亚种的比较图谱见图 4。其余标准菌株及 140 菌株的图谱及酯酶型见表 1 和参考文献 [6, 7]。

(三) 杀虫活性测定结果

对上述四种试虫均无明显的毒杀作用。

讨 论

1. 根据形态观察和芽孢杆菌属种间生化特性比较, TW20 菌株属于苏芸金芽孢杆菌群。由于与已知的苏芸金芽孢杆菌 23 个血清型 30 个亚种的标准菌株和 140 菌株的生化特性以及酯酶型均不相同; 不具有运动性, 无鞭毛抗原 (H), 因此定名为苏芸金芽孢杆菌一个新的酯酶型亚种——苏芸金芽孢杆菌温泉亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *wenquanensis*)。

2. 关于苏芸金芽孢杆菌伴孢晶体的形状和数量的电镜观察曾有过报道^[14]。而像 TW20 菌株超薄切片电镜观察, 在一个孢子囊中产生三个以上菱形或不规则形状的伴孢晶体的这一特殊现象, 我们在苏芸金芽孢杆菌孢子囊超薄切片的研究一文中, 进行了详细的比较^[15]。上述现象, 与已知 30 个亚种的标准菌株晶体的组成有着明显差异。这些不同形状晶体的组成成份尚待进一步研究, 至于伴孢内含物对鳞翅目幼虫无明显毒性这一特性, 在苏芸金芽孢杆菌 H_{5.5c}, H₁₄, H₁₅, H₂₁ 等也存在。这一现象表明, 晶体的形状和结构与对昆虫的毒力有一定的关系。菌株 TW 20 对其它昆虫是否表现毒性, 有待进一步试验。

表1 苏芸金芽孢杆菌酯酶型及生化反应一览表

Table 1 The esterase type and biochemical reaction of *Bacillus thuringiensis*

编号 No	亚种名称 <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> subsp.	血清型 Serotype	酯酶型 Esterase type	生化反应 Biochemical reaction								水解七 叶灵 Esculin Mannose	甘露 糖利用 Mannose	水解淀粉 Starch	纤维二糖 Cellobi- ose
				V. P	卵磷脂酶 Lecit- hinase	水杨甙 Salicin	解脲作用 Prote- olysis	色素形成 Pigment	蔗糖利用 Sucrose	尿酶产生 Urease	水解七 叶灵 Esculin Mannose				
1	苏芸金亚种 <i>thuringiensis</i>	H ₄	Berliner	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
2	幕虫亚种 <i>finitimus</i>	H ₂	Finitimus	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
3	阿来亚种 <i>alesti</i>	H _{3a}	Alesti	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
4	库尔斯塔克亚种 <i>kurstaki</i>	H _{3ab}	Galleriae	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
5	猪倒亚种 <i>totto</i>	H _{4ab}	Sotto	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
6	松蠹亚种 <i>dendrolimus</i>	H _{4ab}	Dendrolimus	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
7	肯尼亚亚种 <i>kenyae</i>	H _{4ac}	Kenyae	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
8	蜡螟亚种 <i>galleriae</i>	H _{5ab}	Galleriae	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
9	加拿大亚种 <i>canadensis</i>	H _{5ac}	Canada	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
10	杀虫亚种 <i>entomocidus</i>	H ₆	Entomocidus	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
11	亚毒亚种 <i>subtoxius</i>	H ₆	Entomocidus	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
12	占泽亚种 <i>aizawai</i>	H ₇	Aizawai	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
13	英国逊亚种 <i>morrisoni</i>	H _{8ab}	Morrisoni	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
14	玉米螟亚种 <i>ostriniae</i>	H _{8ac}	Ostriniae	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-

15	多刺亚种 <i>tolworthii</i>	H ₉	Tolworthi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	达姆斯特亚种 <i>darmstadtensis</i>	H ₁₀	Darmstadtien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	托马诺夫亚种 <i>toumanoffii</i>	H _{11a+b}	Toumanoffii	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	九州亚种 <i>kyushuensis</i>	H _{11a+c}	Kyushue	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	汤姆逊亚种 <i>thompsoni</i>	H ₁₁	Thompson	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	巴基斯坦亚种 <i>pakistani</i>	H ₁₂	Pakistan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	以色列亚种 <i>israelensis</i>	H ₁₄	Israel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	达可达亚种 <i>dakota</i>	H ₁₅	Dakota	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	印第安亚种 <i>indiana</i>	H ₁₆	Indiana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	东北亚种 <i>tohokuensis</i>	H ₁₇	Tohokue	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	熊本亚种 <i>kumamotoensis</i>	H ₁₈	Kumamotoil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	栃木亚种 <i>tochigiensis</i>	H ₁₉	Tochigie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	云南亚种 <i>yunnanensis</i>	H ₂₀	Yunnane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	可玛利亚种 <i>colmeri</i>	H ₂₁	Colmeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	山东亚种 <i>shandongensis</i>	H ₂₂	Shandongie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	日本亚种 <i>japonensis</i>	H ₂₃	Galleriae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	140	—	Galleriae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	TW20	—	TW20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3. 最近, Ohba 等^[16] 从日本土壤中分离出大量含有伴孢内含物而不具有运动性的细菌。我们从我国森林土壤中也获得了上述同样的结果, 其中 TW 20 就是一株。这株细菌采用鞭毛抗原(H)的血清学方法则无法进行血清型分类, 而采用形态特征、生理生化特性及营养细胞的酯酶型相结合的方法进行该细菌的分类、鉴定是可行的。

参 考 文 献

- [1] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, **27**(3):439—447, 1964.
- [2] de Barjac, H.: *Microbial control at 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] 王瑛等: *微生物学报*, **26**(1): 1—6, 1986.
- [5] Ohba, M. et al.: *J. Invert. Path.*, **48**:129—130, 1986.
- [6] 李兆麟等: 中国科学院林业土壤研究所集刊, 第六集, 科学出版社, 北京, 169—178 页, 1983.
- [7] 戴莲颖等: *微生物学通报*, **14**(3): 100, 1987.
- [8] 戴莲颖等: *林业科学*, **23**(1): 91—93, 1987.
- [9] Ohba, M. et al.: *J. Invert. Path.*, **38**:184—190, 1981.
- [10] 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, 科学出版社, 北京, 1978.
- [11] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 北京, 1975.
- [12] Gordon, R. E. et al. (蔡妙英译): 芽孢杆菌属, 农业出版社, 北京, 1983.
- [13] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, p. 536, 1974.
- [14] 陈 涛等: *电子显微学报*, **5**(4): 20—30, 1986.
- [15] 戴莲颖等: *林业科学研究*, **1**(3): 285—288, 1988.
- [16] Ohba, M. et al.: *J. Invert. Path.*, **47**:277—282, 1986.

A NEW SUBSPECIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Dai Lianyun Wang Xuepin

(Forest Research Chinese Academy of Forestry, Beijing)

The strain TW20 was isolated from a soil sample collected in Beijing. Morphological observation showed that the vegetative cell was not motile. Gram-positive. Rod with dimensions of 1.2—1.5×4.0—5.0 μm. Paraspore inclusion is irregular in shape. Electron micrograph of a thin section of TW20 at sporangium stage showed a few paraspore inclusion is irregular in shape.

The biochemical character and esterase type of strain TW20 are different from all reference standard strains.

Bioassays on larval have shown that the

new strain TW20 has no pathogenicity against *Dendrolimus tabulaeformis*, *Lymantria dispar*, *Malacosoma neustria testacea* and *Anoplophora glabripennis*.

On the basis of the aforementioned characteristics, we propose the name of *Bacillus thuringiensis* subsp. *wenguanensis* for the type strain TW20.

Key word

Bacillus thuringiensis subsp. *wenguanensis*