



# 苏芸金杆菌毒力研究\*

赵荣杰

邹德华

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京) (河南省农林科学院植物保护研究所, 郑州)

刘仲昇 常保才 刘玉凡

(河南省新郑县孟庄微生物农药厂)

对于苏芸金杆菌制剂来说, 用检查活孢子数的方法不能充分反映产品的质量。因为不同变种对不同害虫的毒力会有很大差异<sup>[1,2]</sup>, 甚至相同菌种在不同生产条件下的产品, 尽管孢子数相近, 毒力却有显著差异。通过生物测定可以直接了解产品毒力。但生物测定的方法及采用何种昆虫进行测定尚处研究试验阶段。此外, 苏芸金杆菌的混合血清型制剂, 在对昆虫的感染过程中发挥什么作用, 也有必要加以阐明。然而至今未见报道。为此, 我们选用国内外有代表性的十一种苏芸金杆菌制剂和五种有代表性的昆虫进行生物测定, 并用血清反应和卵磷酸酯酶反应的方法, 检查不同血清型菌株在昆虫体内外的相互关系。

## 材料和方法

### 一、供试昆虫

家蚕 (*Bombyx mori*) 为东 34 × 苏 12, 江苏省武进县蚕场提供。粘虫 (*Leucania sepalata*)、玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 均为一龄, 枣尺蠖 (*Apocheima* sp.) 为二龄幼虫。菜青虫 (*Pieris rapae*) 为 3—4 龄幼虫。

### 二、苏芸金杆菌制剂

试验用苏芸金杆菌制剂除 Dipel 产品外, 其余均系湖南省微生物所 1979 年生产产品 (表 1)。其中 NO3 菌株为河南省农林科学院植物保护研究所于 1972 年自纹纹夜蛾虫尸分离得到;

表 1 苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 制剂

制剂名称	变种名称	血清型 (H)	含菌数 (亿孢子/克)
苏芸金杆菌	<i>B. t. var. thuringiensis</i>	1	130
HD-1	<i>B. t. var. kurstaki</i>	3a3b	170
Dipel	<i>B. t. var. kurstaki</i>	3a3b	240
7216(F <sub>2</sub> )	<i>B. t. var. tenminsis</i>	3a3b	150
NO3	<i>B. t. var. kurstaki</i>	3a3b	180
松油菌	<i>B. t. var. dendrolimus</i>	4a4b	210
青虫菌	<i>B. t. var. galleriae</i>	5a5b	160
杀螟杆菌	<i>B. t. var. galleriae</i>	5a5b	220
H <sub>10-2</sub>	<i>B. t. var. pacificus</i>	7	170
012	<i>B. t. var. morrisoni</i>	8a8b	180
013	<i>B. t. var. tolworthi</i>	9	210

H<sub>70-2</sub> 选自 096 菌株 (武汉大学引自英国)。

### 三、毒力测定方法

1. 将苏芸金杆菌制剂均配制 7 种浓度, 每种浓度试虫 40 头, 在 24—30℃ 饲养。

2. 十种苏芸金杆菌制剂对五种昆虫的毒力测定, 均采用等剂量法; 对家蚕测定使用浓度为 0.1 亿孢子/毫升, 粘虫为 0.25 亿孢子/毫升, 玉米螟为 0.125 亿孢子/毫升, 菜青虫为 0.1 亿孢子/毫升, 枣尺蠖为 0.25 亿孢子/毫升, 对照为 0.1% 洗衣粉浸蘸饲料。每种制剂每次试虫 60—90 头, 24—30℃ 室温下饲养。

3. HD-1 对粘虫不同龄期幼虫毒力测定, 含菌量为 2 亿孢子/毫升。

\* 承湖南省微生物研究所提供苏芸金杆菌制剂; 新郑县生防站、蚕种场提供蚕卵。

四、苏芸金杆菌制剂不同血清型菌株等剂量混合的感染效应和等量混合培养效应

1. 血清反应：鞭毛抗原及抗血清制备、试管凝集、玻片凝集和凝集素吸收反应，参照 Norris<sup>[3]</sup> 和石黑丈雄<sup>[4]</sup> 的方法。

2. 卵磷脂酶反应，参照《一般细菌常用鉴定方法》一书<sup>[5]</sup>。

3. 将各种苏芸金杆菌制剂配制为含菌量 2 亿孢子/毫升的悬液，然后等量混合，浸蘸饲料后，在 24—30℃ 下饲虫。死虫以常规方法平板划线分离，用上述方法鉴别菌落。

4. 不同血清型菌株混合培养：用 500 毫升三角瓶内装 100 毫升肉汁培养基，不同血清型菌株两个一组，各接三环，每组三瓶，28—32℃ 下震荡培养。

五、检查方法及数理分析

试虫饲养 40 小时开始检查，死亡率用 Abbott 公式校正。相对毒力指数计算方法：

某制剂毒力指数 = HD-1  $LC_{50}$  × 1000 / 某制剂  $LC_{50}$ 。

结果 和 分 析

一、苏芸金杆菌对供试昆虫的毒力

1. 测定结果表明：苏芸金杆菌 *kurstaki* 变种对家蚕的毒力最强，其次是 *galleriae*、*pacificus*、*morrisoni* 等变种，*dendrolimus* 变种的制剂

毒力最弱(表 2, 3)。Dipel、013、青虫菌、HD-1 等制剂对粘虫的毒力很强，而松油菌制剂毒力最弱；玉米螟幼虫对十种苏芸金杆菌制剂都很敏感，其中包括对家蚕、粘虫毒力都很弱的松油菌；HD-1、青虫菌、NO3 对菜青虫的毒力较强；HD-1、Dipel、013 对枣尺蠖的毒力较强(图 3)。

表 2 苏芸金杆菌制剂对家蚕毒力的机率值分析

菌 种	LC <sub>50</sub> (亿孢子/ 毫升)	95% 置 信 限		相对毒力 指 数
		上 限	下 限	
苏芸金杆菌变种	0.2399	0.2818	0.2042	120
HD-1	0.0288	0.0316	0.0263	1,000
7216	0.0098	0.0110	0.0087	2,939
松油菌	0.3548	0.4266	0.2951	81
青虫菌	0.0288	0.0372	0.0224	1,000
H <sub>70-1</sub>	0.0219	0.0251	0.0195	1,315
NO3	0.1202	0.1514	0.1259	240

2. 五种昆虫对十种苏芸金杆菌制剂敏感性的相关分析：通过相关分析，一般看来呈正相关。家蚕与粘虫对十种制剂的敏感性呈高度相关，与枣尺蠖的敏感性呈中度相关，与菜青虫、玉米螟呈弱相关。枣尺蠖的敏感性与其他几种昆虫呈中度相关。玉米螟与其他几种昆虫的敏感性呈弱相关。

3. HD-1 制剂对粘虫不同龄期幼虫的毒力

表 3 十种苏芸金杆菌制剂对五种昆虫的毒力比较\*

平均死亡率 (%) 试 虫 制剂名称	家 蚕	粘 虫	玉 米 螟	菜 青 虫	枣 尺 蠖
HD-1	79.85	85.30	96.08	74.44	80.32
Dipel	97.50	91.88	95.13	—	79.06
7216	75.79	80.12	86.33	52.68	52.69
NO3	61.37	69.79	83.40	70.62	56.34
松油菌	2.68	32.26	95.00	55.99	47.86
青虫菌	64.89	88.95	87.47	76.43	49.84
杀螟杆菌	74.16	72.46	93.39	53.56	32.30
H <sub>70-1</sub>	60.07	84.02	87.11	64.69	47.54
012	69.28	69.77	90.73	64.09	44.86
013	39.87	90.44	84.80	59.06	68.32
对 照	0.57	1.25	9.56	12.01	12.41

\* 重复试验 5—7 次。

变化: 粘虫幼虫在 1—3 龄阶段,随龄期增长对 HD-1 抗性逐渐增强,到 4 龄又突然显著下降(表 4)。013 制剂对粘虫不同龄期幼虫的毒力变化也出现同样现象。

表 4 HD-1 对不同龄期粘虫幼虫的毒力测定\*

粘虫龄期	处 理	试虫数	平均死亡率 (%)
1 龄	HD-1	225	99.11
	对 照	223	1.35
2 龄	HD-1	224	88.43
	对 照	221	2.72
3 龄	HD-1	184	56.60
	对 照	180	0
4 龄	HD-1	180	90.46
	对 照	162	11.92

\* 试验重复 3 次。

二、利用血清反应、卵磷酯酶反应检查苏芸金杆菌不同血清型菌混合感染效应

1. HD-1、松油菌、青虫菌、013 抗血清凝集

表 5 HD-1 等菌抗血清凝集反应及交叉凝集反应

抗 血 清	抗 原 凝 集 反 应	HD-1		松 油 菌		青 虫 菌		013	
		凝集反应效价	玻片凝集反应	凝集反应效价	玻片凝集反应	凝集反应效价	玻片凝集反应	凝集反应效价	玻片凝集反应
HD-1		20480	+	—	—	160	+	—	—
松油菌		—	—	5120	+	—	—	—	—
青虫菌		160	+	—	—	10240	+	1280	+
013		—	—	—	—	1280	+	20480	+

表 6 不同血清型菌株等剂量混合对粘虫、家蚕的感染效应

混合感染的菌株组合		试验昆虫	分离菌落总数 (个)	与菌株 I 抗血清玻片凝集反应+ 与菌株 II 抗血清玻片凝集反应- 菌 株 I				与菌株 I 抗血清玻片凝集反应- 与菌株 II 抗血清玻片凝集反应+ 菌 株 II			
菌株 I	菌株 II			菌落数 (个)	比 率 (%)	95% 置 信 限		菌落数 (个)	比 率 (%)	95% 置 信 限	
						上 限	下 限			上 限	下 限
HD-1	松油菌	粘 虫	217	61	28.11	31.16	25.06	156	71.89	74.97	68.84
		家 蚕	132	46	34.85	38.97	30.73	86	65.15	69.27	61.03
松油菌	青虫菌	粘 虫	204	16	7.84	9.84	5.84	188	92.16	94.16	90.16
		家 蚕	173	31	17.92	20.92	14.92	142	82.08	85.08	79.08
松油菌	013 菌	粘 虫	202	79	39.11	42.57	35.65	123	60.89	64.35	57.43
		家 蚕	208	75	36.06	39.38	32.74	133	63.94	67.26	60.62

反应及交叉凝集反应: 此四种抗血清均能以很高的效价凝集同源抗原。青虫菌和 HD-1, 青虫菌与 013 菌均发生交叉凝集反应, 其余则均呈阴性反应(表 5)。

2. HD-1、青虫菌交叉凝集吸收反应: HD-1 抗血清经过青虫菌抗原吸收后, 青虫菌抗血清经过 HD-1 抗原吸收后, 都仍能以很高的效价与同源抗原起凝集反应, 而且玻片交叉凝集反应都表现高度特异性。

3. 不同血清型菌株对昆虫的混合感染效应: HD-1 和松油菌等剂量混合后感染粘虫时, 粘虫体内松油菌的增殖占优势; 在松油菌和青虫菌的组合中, 青虫菌占优势; 在松油菌和 013 菌的组合中, 013 略占优势。对家蚕的试验结果, 趋势完全相同(表 6)。

卵磷酯酶反应测定: HD-1 为阳性反应, 青虫菌呈阴性反应, 这与 H. deBarjac 等人报道一致<sup>[6]</sup>。利用卵磷酯酶反应, 检查 HD-1 和青虫菌等剂量混合对粘虫等感染效应, 发现青虫菌

表 7 青虫菌、HD-1 等剂量混合对粘虫等的感染效应

混合感染的菌株组合		试验昆虫	分离菌落总数 (个)	卵磷脂酶反应 与 HD-1 抗血清玻片凝集反应 与青虫菌抗血清玻片凝集反应 HD-1				卵磷脂酶反应 与 HD-1 抗血清玻片凝集反应 与青虫菌抗血清玻片凝集反应 青 虫 菌			
菌株 I	菌株 II			菌落数 (个)	比 率 (%)	95% 置 信 限		菌落数 (个)	比 率 (%)	95% 置 信 限	
						上 限	下 限			上 限	下 限
HD-1	青虫菌	粘 虫	208	14	6.73	8.47	4.99	194	93.27	95.01	91.53
		家 蚕	214	32	14.95	17.40	12.50	182	85.05	87.50	82.60
		菜青虫	132	30	22.39	26.0	18.78	104	77.61	81.22	74.00

表 8 不同血清型菌株等量混合培养效应

混合培养的菌株组合		分离菌落总数 (个)	与菌株 I 抗血清玻片凝集反应+ 与菌株 II 抗血清玻片凝集反应- 菌 株 I		与菌株 I 抗血清玻片凝集反应- 与菌株 II 抗血清玻片凝集反应+ 菌 株 II	
菌株 I	菌株 II		菌 落 数 (个)	比 率 (%)	菌 落 数 (个)	比 率 (%)
HD-1	松油菌	100	0	0	100	100
HD-1	青虫菌	129	129	100	0	0
松油菌	青虫菌	100	100	100	0	0
松油菌	013	100	100	100	0	0

在三种昆虫体内的增殖均占压倒优势(表 7)。卵磷脂酶反应结果与血清反应结果完全一致。

4. 不同血清型菌株等量混合培养效应: 在松油菌与 HD-1、松油菌与青虫菌、松油菌与 013 菌三个组合中, 松油菌生长都占绝对优势; HD-1 和青虫菌组合中, HD-1 占绝对优势(表 8)。

讨 论

1. 在一般情况下, 家蚕对苏芸金杆菌的毒力反应有一定代表性, 并有虫源易得、操作简便等优点, 因此, 国内外建议用家蚕作测定昆虫的不乏其人<sup>[7,8]</sup>。但家蚕对苏芸金杆菌毒力反应也有其局限性, 如对某些变种的反应不敏感<sup>[8,9]</sup>。本试验也证明了这一点。此外, 我们发现 013 菌株对家蚕的毒力虽低, 但对粘虫和枣尺蠖的毒力却很强。作为产品标准化的测定昆虫应尽量选用害虫, 尤其是主要防治对象。而把家蚕作为毒力测定昆虫似乎不大适宜。

2. 微生物种内的关系错综复杂, 从稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 小种间在寄主体上的生存竞争, 导致一些小种的更迭, 引起我们分析苏

芸金杆菌不同变种混合制剂对昆虫感染效应的兴趣。试验表明, 等剂量混合感染昆虫, 并没有导致各菌株细胞的均衡增殖。四个不同血清型菌株组合, 在三种昆虫体内寄生状态下的竞争结果, 与摇瓶液体混合培养, 亦即腐生条件下的竞争结果迥然不同, 但都表现相互抑制。这使我们感到, 用苏芸金杆菌不同血清型菌株混合感染昆虫, 能否起增效作用是值得进一步研究的。

3. 苏芸金杆菌制剂对昆虫不同龄期幼虫毒力变化值得深入探讨。粘虫 4 龄幼虫对 HD-1 的抗性突然下降, 与粘虫对化学农药的抗性随龄期增长而上升的普遍规律截然不同。这个问题在粘虫的防治上是有意义的。

参 考 文 献

[1] 鮎泽啓夫: 今月の农药, 7: 12—17, 1976。  
[2] Burgerjon, A. and H. Dulmage: *Entomophaga*, 22(2): 121—129, 1977。  
[3] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.* 27 (3): 439—447, 1964。  
[4] 石黒丈雄: 防虫科学, 42(2): 75—81, 1977。  
[5] 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 年, 第 174 页。

(下转 208 页)

(上接第 196 页)

- [6] DeBarjac, H. and Bonnefoi: *Entomophaga*, **18** (1): 5—17, 1973.
- [7] 中山大学昆虫学教研室: 昆虫学报, **20**(1): 5—13, 1977.
- [8] 鮎泽啓夫、藤吉宣男: 醱酵工学雜誌, **51**(5): 351—357, 1973。
- [9] Heimpei, A. M.: *J. Invert. Pathol.*, **9**: 264—375, 1967.