

凸形假单胞菌对钉螺的杀灭作用

陈祥麟(整理)

(湖南省寄生虫病防治研究所,岳阳)

日本血吸虫病是流行在我国南方一些省(市)的一种严重疾病。从1966年开始,我们开展利用微生物杀灭日本血吸虫的中间宿主钉螺的研究。1967年从活田螺体内分离出一株Thp1菌株,1971年又从自然死亡率高达48%的病态钉螺中分离出一株Lb1菌株,两菌株均有较高的杀螺能力。Thp1与Lb1均为假单胞菌属的凸形假单胞菌(*Pseudomonas conrea* Chester)。现将研究情况报告如下。

一、Thp1和Lb1菌株的生物学特性

菌体呈短杆状,大小为 $0.6-0.7 \times 2-3 \mu\text{m}$,圆端;单个或成对,革兰氏染色阴性,丛生极毛。鞭毛1-4根,长于菌体2-3倍,基部呈囊状。细胞质呈颗粒状,细胞壁半透明(见图1)。

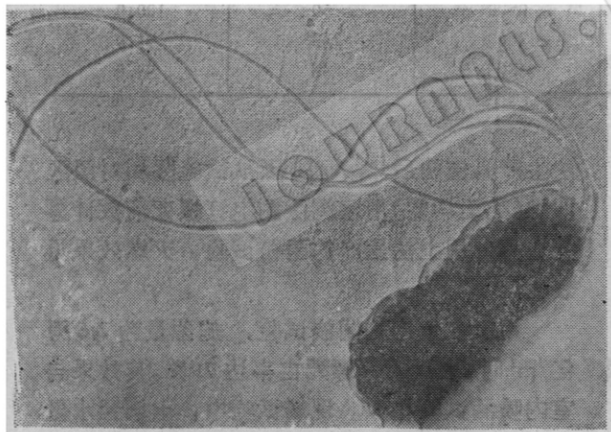


图1 凸形假单胞菌(Thp1)菌体形态($\times 12903$)

在普通营养琼脂固体培养基上,经 28°C 、48小时,菌落圆形、全缘,间有扇形缺刻或乳头状突起;凸脐状,表面光滑,质地不粘;菌苔乳白色,半透明,有淡绿色荧光色素,但无可见的水溶性色素。在马铃薯块培养基上,菌苔丰厚,闪光,中灰驼色,不扩散。

半固体穿刺培养, 28°C 、48小时生长旺盛,穿刺线呈绒毛状;有动力,作悬滴观察,细菌作螺旋状运动。

最适生长温度 $25-28^{\circ}\text{C}$, 37°C 不生长。最适pH6.8-7.2。在蛋白胨水中经 28°C 、48小时后培养液混浊。静置培养24小时进入对数期,振荡培养20小时左右进入对数期。培养后期pH呈碱性(7.8-8.4),并发生自溶。

能氧化葡萄糖,产酸不产气,氧化酶试验阳性,接触酶试验阳性,为兼性嫌气菌。还原硝酸盐,嫌气硝酸盐生长,不产气。石蕊牛奶试验产碱,不凝固。淀粉水解试验阴性。不液化明胶,不产生吡嗪。V.P反应阴性。甲基红反应阴性。

在青霉素,氯霉素含量为50u/ml时,对凸形假单胞菌无抑制作用,四环素、链霉素、金霉素则有不等的抑制作用。

二、凸形假单胞菌(Thp1)灭螺试验

(一)室内试验

用浸泡法和喷洒法感染钉螺。

1.取 28°C 48小时的培养物(一支斜面或5、10ml摇瓶发酵液)用水稀释成50ml菌悬液。浸泡法是将活螺50或100只投入菌悬液中,浸泡4小时后倾去菌液,置有湿纱布的平皿内饲养;喷洒法是将钉螺放于盛有湖泥的平皿中,喷洒菌悬液并在皿内饲养。感染2、4、7、15天后用水测法测定钉螺死活数。按同法设清水或不菌培养液作对照。1967、1971、1974、1976四年内共108次浸泡和喷洒灭螺。试验结果与对

本文承中国科学院微生物研究所王大帮、战立克、凌代文等同志指导菌种鉴定;湖南省微生物所和湖南师范学院生物系参加协作;中山大学电镜室协助拍照。在此一并致谢。

表1 室内灭螺试验效果

年 度	试验次数	试 验 组			对 照 组		
		钉螺总数(只)	死螺总数(只)	死亡率(%)	钉螺总数(只)	死螺总数(只)	死亡率(%)
1967	8	1106	1055	95.4	389	46	11.8
1971	19	992	950	95.8	568	23	4.1
1974	75	6581	5979	90.9	4030	127	3.2
1976	6	600	578	96.3	300	11	3.7
合 计	108	9279	8562	92.3	5287	207	3.9

照的比较见表1。

表1结果说明,无论使用浸泡法还是喷洒法,凸形假单胞菌杀灭钉螺的效果均非常显著,钉螺死亡率均达90%以上。被感染的钉螺一般在2—4天内大部分死亡。

2. 菌悬液含菌量与灭螺效果:浸泡法,每毫升菌液含菌数达千万级(千万/ml)时,显示灭螺效果,达亿级(亿/ml)时,效果可达100%;喷洒法,每平方米含菌数达万亿级(万亿/m²)时,灭螺效果稳定(见表2)。

表2 含菌量与灭螺效果的关系

含菌量 (亿/ml)	浸 泡 法		含菌量 (亿/m ²)	喷 洒 法	
	死螺数(只)	校正死亡率(%)		死螺数(只)	校正死亡率(%)
0.11	25	50.0	825	15	30.0
0.18	46	91.0	1511	42	84.0
0.22	39	78.0	2800	39	77.0
0.31	25	43.0	4800	30	56.0
0.62	40	77.0	7310	44	87.0
0.86	49	97.0	9500	50	100.0
0.90	50	100.0	13600	47	91.0
1.57	50	100.0	16600	48	94.0

注:试验用活钉螺每组50只。

3. 其他影响因素:喷洒试验时,土壤含水量低于45%,灭螺效果下降,含水量达50—65%时,灭螺效果达91.2—98.0%;浸泡试验时,菌液的稀释度对灭螺效果有影响,当每毫升含菌量低于1千万时灭螺效果下降。

(二) 现场试验

从1968—1976年共试验40次,面积5—667m²不等,剂型为菌液或菌粉(工业生产或土

法生产),施菌后2、7、12天从试验区和对照区取螺(死活均要)用水测法测定钉螺死活数计算死亡率。用土法生产的菌粉试验,灭螺效果见表3。

用工业生产的菌液试验,施菌量为2.6万亿/m²时,次日的钉螺死亡率达79%,其效果与室内喷洒试验相似。现场试验中,土壤含水量为40%的组灭螺效果为68%,含水量为25%

表3 土法生产的菌粉灭螺效果

试验日期	试 验 组			对 照 组		
	检查螺数(只)	死亡数(只)	死亡率(%)	检查螺数(只)	死亡数(只)	死亡率(%)
1970年4月30日	74	70	94.6	73	4	5.5
1971年4月24日	183	182	99.5	120	9	7.5

注:施菌量:土法生产的菌粉0.5斤/m²。

的组灭螺效果在 30% 以下(1973 年)。高温、干燥、寒潮降温均影响效果。现场试验中未发现对人、畜、植物、水生生物产生毒害。

三、凸形假单胞菌杀灭钉螺的毒理探讨

(一) 灭活试验

将菌悬液置 40、43、45、50、56℃ 中水浴 30 分钟或煮沸 30 分钟,测其毒力变化。经 40℃ 及 43℃ 处理,钉螺死亡率达 84—100%,经 45℃ 处理,毒力下降,死亡率达 38%,经 50℃ 以上处理,均丧失毒力,钉螺死亡率与对照相同(0—18%)。表明灭活后致死因子丧失毒力。

(二) 过滤试验

将凸形假单胞菌的肉汤蛋白胨培养液用蔡氏滤器抽滤,滤渣感染钉螺死亡率为 64—100%,滤液感染钉螺死亡率为 0—16%,与对照组同(0—18%)。增菌培养,滤渣显示阳性,滤液显示阴性。表明致死因子不能透过蔡氏滤器的滤板,而且与菌体存在与否密切相关。

(三) 破壁试验

将培养的菌苔刮下置 -40℃ 或 -50℃ 低温中反复冻融,破坏细胞壁,其毒力下降,钉螺死亡率为 18—46%,未经冰冻的阳性对照组毒力为 80—98%。上述培养物用玻璃砂研磨(置冰浴中) 2 小时后,毒力降至 20% 以下,计数检查仅存极少活菌,而未经研磨的阳性对照组毒力为 98—100%。表明菌体一经破坏即失去毒性。

(四) 重分离试验

取感染后 4、12、24、48 小时的钉螺,将外壳消毒,取其肝、肠、胃、体液进行分离,然后用血清凝集试验及毒力测定进行鉴别。从 68 只感染的钉螺中有 54 只分离出凸形假单胞菌,占 79.4%。从 121 个阳性代表株中,经毒力测定,钉螺死亡率高于 80% 以上的有 98 株,占 81%。表明细菌入侵钉螺体内是钉螺致死的原因。

综合上述试验,凸形假单胞菌入侵钉螺体内是引起钉螺死亡的主要原因,入侵后亦可能产生一些使钉螺致死并能被高温灭活的生物活性物质,对此物质的性质、结构等均有待研究。

四、讨论

1. 我们在 1967 年、1971 年分别从活田螺和病态钉螺中分离出凸形假单胞菌,经多次试验,毒力稳定,杀螺效果达 80—100%。浸泡法含菌量为千万/ml 和泥皿中喷洒法含菌量为万亿/m² 时,杀螺效果均较好。经 40 次现场试验证明,在适宜条件下,灭螺效果可达 90% 以上,但要注意季节、温度、土壤含水量等因素的影响。

2. 工业或土法生产的菌液或菌粉及时使用不影响毒力,而且原料来源广,成本低,操作简单易行。试验时对人、畜、植物、水生生物无毒害。但从使用要求来看,该菌对不良环境如高温、曝晒等的抗性还有待提高。产品的干燥保存还需进一步解决。对灭螺的有效成份分析可为合成新型灭螺药剂和方法提供启示。