

# 我国海南省杀蚊球形芽孢杆菌的分离和分布

袁志明 陈宗胜 刘娥英 蔡全信 张用梅

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

**摘要** 在我国海南省共采集 158 个各种类型的泥土样品,采用选择性培养基(PBMYS)进行样品分离,并结合形态学观察、血清学鉴定和生物测定,获得对致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)幼虫有毒性的球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)73株,有毒株的分离率占样品总数的 34.2%。血清学试验表明,新分离菌株有 71 株属 H<sub>5a5b</sub>型,两株属在我国首次分离出 H<sub>6</sub>型菌株。许多球形芽孢杆菌新菌株对致倦库蚊幼虫具有很强的毒杀作用。其中 228-2 和 117-1 菌株的丙酮粉剂效价分别为 2721ITU/mg 和 2331ITU/mg, 高于相同条件下制备的参考菌株 2362 丙酮粉剂的效价(2218ITU/mg)。

**关键词** 球形芽孢杆菌,致倦库蚊,效价,血清型

球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus* 简称 *B.s*)是一种在自然界分布广泛,形成亚末端膨大孢子囊和球形芽孢的好氧菌。目前,在已发现的 49 个鞭毛血清型中有 9 个血清型(H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>5</sub>、H<sub>6</sub>、H<sub>9</sub>、H<sub>25</sub>、H<sub>26</sub> 和 H<sub>45</sub>)的菌株对蚊幼虫有一定的毒杀作用<sup>[1,2]</sup>,其中大部分高毒力菌株属血清型 H<sub>5</sub>、H<sub>6</sub> 和 H<sub>25</sub>型。

自 80 年代以来,我国亦开展了 *B.s* 的研究,并先后分离出高毒力菌株 TS-1、BS-10 和 C3-41<sup>[3-5]</sup>,并将后两者研制成杀蚊制剂用于蚊幼孳生地的大面积控制,取得了良好的防治效果。我国在资源调查和发掘方面只开展了一些零星的分离、筛选工作,至今在我国只发现血清型 H<sub>5a5b</sub> 的有毒菌株。为丰富杀蚊菌资源,本研究在具有独特地理环境的海南省,较系统地调查 *B.s* 在海南的分布。

## 1 材料方法

### 1.1 样品的采集

1992 年至 1993 年,我们在海南全岛 14 个县(市)的 17 个采样点共采集各种生态环境条件下的土壤、污泥样品 158 个。

### 1.2 有毒株的筛选

1.2.1 菌株的分离:见文献 [6]。

1.2.2 供试蚊种:2~3 龄致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)幼虫由本所养虫室提供。

取一环在 PBMYS 上培养 3~4d 的培养物,悬浮于 10ml 无菌水中,投放 20 只蚊幼虫,26 ± 1℃,将 48h 能致死 50% 以上的分离物定为有毒菌株。将初筛的有毒株进行摇瓶培养,100ml PBMYS / 500ml 三角瓶,200r / min,30℃ 培养 48h,镜检大部分菌体已发育形成孢子囊和部分芽孢释放。10<sup>-6</sup> 发酵稀释液 48h 能导致幼虫死亡率在 50% 以上为高毒力菌株。

### 1.3 丙酮粉剂的制备和效价测定

参照 Dulmage<sup>[7]</sup>方法将复筛中确认为高毒力菌株及参考菌株 2362 在相同条件下制成丙酮粉剂,并按 WHO<sup>[8]</sup>提供的标准生物测定方法,以 SPH88(1700ITU / mg)为标准品,计算丙酮粉剂的效价,每个样品在不同的时间重复三次,最后计算出样品的平均效价。

### 1.4 标准抗血清的制备及血清学实验

血清型 H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>6</sub>、H<sub>9</sub>、H<sub>25</sub>、H<sub>26</sub> 和 H<sub>45</sub> 型的标准菌株由法国巴斯德研究所 Lecadet 博士提供。标准抗血清的制备及血清学实验参照文献 [9]。

## 2 结果

### 2.1 杀蚊球形芽孢杆菌在海南的分布

国家自然科学基金项目,并得到中国科学院微生物所微生物资源前期开发实验室资助

1996-08-07收稿

从158个样品的分离菌落中,共挑取具有*B.s*特征的菌落601个,从中筛选出对致倦库蚊幼虫有毒的分离菌株73株,占菌落总数的12.4%。含有毒菌株的样品数54个,占样品总数的34.2%。除乐东外,其余13个县(市)的样品中均分离到*B.s*有毒菌株。在海南西部的海口、琼海、万宁和陵水最为丰富,有毒菌株的检出率达40%~50%,而在中部和东部的分出率略低(18.7%~37.5%),如表1。

表1 不同采样点所分离的球形芽孢杆菌有毒菌株

采样点 (县、市)	菌株数/ 样品数	分出率 (%)	有毒菌落数 /总菌落数	有毒菌落 分出率(%)
海口	2/5	40.0	2/30	6.67
琼海	4/10	40.0	4/45	8.89
万宁	5/12	41.6	6/50	12.0
陵水	9/18	50.0	14/69	20.29
三亚	7/20	35.0	8/81	9.88
通什	10/28	35.7	13/42	31.0
琼中	2/11	18.7	2/41	4.4
屯昌	3/9	33.3	5/36	13.9
澄江	3/8	37.5	4/35	11.4
乐东	0/5	/	0/31	/
昌江	2/8	25.0	3/36	8.33
儋州	3/9	33.3	5/35	14.2
临高	2/7	28.6	3/41	7.3
东方	3/8	37.5	4/29	13.8
总计	54/158	34.18	73/601	12.15

血清学鉴定证明,海南自然存在的有毒菌株绝大多数为H<sub>5a5b</sub>型,仅在陵水和澄迈的样品中分别获得的47-6和124-3菌株属血清型H<sub>6</sub>型。

2.2 不同类型样品中的*B.s*分布

表2的数据表明,对蚊幼虫有致病性的*B.s*在不同类型的样品中均有分布,其中以污水沟、水塘底泥样品的分出率最高(42.7%),而一些临时性积水坑、稻田泥土样品中的分出率最低(27.3%~28.6%),不同耕作旱地土样的分出率均在30%以上。两株H<sub>5a5b</sub>型的高毒力菌株(228-2和117-1)都是从蚊幼虫害孳生地底层

泥样中分离获得。

表2 不同类型样品中球形芽孢杆菌的分离

样品类型	样品数	含有毒菌 株样品数	分离率 (%)
稻田泥土	26	6	28.6
污水沟、塘泥	51	21	42.7
杂草、荒地泥土	33	10	36.4
菜园泥土	10	3	33.3
耕作旱地	6	2	33.3
林地泥土	20	7	35.0
临时性积水坑	6	2	33.3
其它	11	3	27.3
总计	158	54	34.2

2.3 *B.s*新分离菌株的毒力

部分*B.s*分离菌株摇瓶发酵液对2~3龄致倦库蚊幼虫毒力测定结果表明,不同分离菌株间的毒力差异较大。在所考察的23株有毒菌株中,高毒力菌株11株,中等毒力菌株10株,两株为低毒力菌株。全部高毒力菌株均属血清型H<sub>5a5b</sub>型。两株H<sub>6</sub>型菌株的毒力同样存在着差异,证明*B.s*菌株的血清型同菌株的杀蚊毒力高低没有直接关系。

表3 球形芽孢杆菌新分离菌株丙酮粉剂的毒力比较

菌株	发酵周期 (h)	形成芽孢 同步率(%)	对致倦库蚊的毒效 (48h)		效价 (ITU/ mg)
			LC <sub>50</sub> (×10 <sup>-4</sup> ng/ ml)	LC <sub>90</sub> (×10 <sup>-3</sup> ng/ ml)	
SPH-88			5.86~7.18	0.119~1.87	1700
228-2	53	90.8	3.37~3.65	0.912~10.4	2721
117-1	48	91.0	1.24~4.86	1.02~1.34	2331
113-3	44	93.0	6.77~8.96	1.23~1.99	1375
90-2	48	57.2	1.17~1.84	3.89~6.21	568
65-1	48	72.1	7.21~8.53	1.37~2.13	1485
44-4	48	63.9	13.4~2.31	3.18~6.25	718
35-2	53	79.5	13.6~2.21	2.90~6.34	782
23-4	55	94.5	7.71~8.43	1.64~2.18	1401
2362	48	83.5	3.49~5.97	1.14~1.38	2218

表3是几株 *B.s* 有毒菌株丙酮粉剂的效价测定结果。其中228-2和117-1菌株的丙酮粉剂的效价分别为2721和2331ITU/mg, 比参考菌株2362丙酮粉剂的效价高22.7%和5.1%。

### 3 讨论

(1) 球形芽孢杆菌在海南省有着广泛的地理分布, 但不同采样点存在分出率的差异, 这可能同该菌的残存和再循环条件有关<sup>[10]</sup>。

(2) 血清学鉴定表明, 海南自然界存在的 *B.s* 有毒菌株绝大多数属  $H_{5a5b}$  型, 唯一发现的两株  $H_6$  型有毒株, 属我国首次报道。

(3) 毒力测定结果表明, 自然界存在着对蚊幼虫高毒力的 *B.s* 菌株。在本研究所获得的73个分离菌株中, 高毒力菌株约占30%左右, 其中228-2和117-1菌株丙酮粉剂的效价高于WHO推荐的2362菌株, 因此本研究对丰富我国杀蚊菌资源和发展我国生物杀虫剂的研究和

应用具有实际意义。

### 参 考 文 献

- [1] Thierry I, de Barjac H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31: 577~581.
- [2] de. Barjac H. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1988, 139: 363~377.
- [3] 任改新, 孙桂华, 许容满等. 昆虫学报, 1982, 25: 249~250.
- [4] 刘娥英, 张用梅, 蔡昌建等. 中华流行病学杂志, 1989, 10(7): 79.
- [5] 张用梅, 刘娥英, 戴顺英等. 杀虫微生物, 1989, 1: 98~101.
- [6] Dulmage H T. *Microbial Control of Insects and Mites* (H D. Burges and N W. Hussey, eds). Academic Press, New York, 1970, 507~540.
- [7] 袁志明, 陈宗胜, 刘娥英等. 微生物学通报, 1995, 22: 92~94.
- [8] WHO, TDR / BCV / SPHAERICUS / 85.3, 1985.
- [9] 张用梅. 球形芽孢杆菌杀蚊原理和应用, 北京: 科学出版社, 1995, 58~60.
- [10] Brownbridge M, Margalit J. *J Invertebr Pathol*, 1987, 50: 106~112.

## ISOLATION OF MOSQUITO-LARVICIDAL *BACILLUS SPHAERICUS* FROM THE SOIL SAMPLES COLLECTED IN HAINAN, CHINA

Yuan Zhiming    Chen Zongsheng    Liu E-ying    Cai Quanxing  
Zhang Yongmei

(Wuhan Institute Of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

**Abstract** During 1992~1993, one hundred and fifty eight of various soil samples collected in fourteen counties or cities in Hainan Province. With a selected medium (PBMYS), totally seventy-three strains of *Bacillus sphaericus*, possessing larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*, were isolated. The rate of active strains isolated is 34.2% in the total of samples. The serological study showed that most of newly isolates were belonging to serotype  $H_{5a5b}$  except that two strains, 47-6b and 124-3, were belonging to  $H_6$ .

The acetone powders prepared from several newly isolates of  $H_{5a5b}$ , were highly toxic to the larvae of *C. quinquefasciatus*. Two of them, 228-2 and 117-1, had a calculated potency of 2721 and 2331ITU/mg respectively. In contrast with the potent strain 2362, it had a potency value of 2218ITU/mg.

**Key words** *Bacillus sphaericus*, *Culex quinquefasciatus*, Potency, Serotype