

## 综述

# 苏云金杆菌以色列变种灭蚊幼 的致病机理与应用

武汉军区军事医学研究所 谭昌炎

苏云金杆菌，革兰氏染色阳性，能产生晶体，具有芽孢，寄生于昆虫体内可引起昆虫发病。目前已知该菌包括24个变种，分居14个血清型。

1901年Ishiwata从死蚕分离出一种杆菌，命名为猝倒杆菌(*Bacillus Sotto*)。1911年，Berlinen从德国苏云金地区一个面粉厂的地中海粉螟罹病幼虫中，因分离出苏云金杆菌而正式命名。自1953年发现其蛋白质伴孢晶体对鳞翅目幼虫有明显毒性后，1958年在国外首次出现商品制剂(美国的Biotrol, 西德的Biospor)。解放后我国引进苏云金杆菌进行防治玉米螟试验，1964年在武汉正式投产。1968年有人从跗班库蚊分离出苏云金杆菌1株，从而开辟利用苏云金杆菌灭蚊幼虫的新途径。

## 苏云金杆菌毒素及其致病机理

苏云金杆菌系经口感染昆虫的，主要是菌体产生的毒素使昆虫短时间内死亡。该菌具有多种杀害虫的毒素，一般分为两类：一类是内毒素(即伴孢晶体)，另一类属外毒素(代谢产物)。

**一、内毒素( $\delta$ -内毒素)：**即伴孢晶体毒素，也是一种蛋白质毒素，能使多种鳞翅目幼虫中毒；1959年Liles, 1960年Kellen报道了伴孢晶体对蚊幼的羽化作用；1971年Reeves试验了埃及伊蚊幼虫对某些苏云金杆菌的易感性；1977年Goldberg分离了1株对蚊幼具有高度毒性(即产生伴孢晶体)的杆菌[1]；1978年经Barjac鉴定属血清型14，由于是从以色列有蚊水塘污泥中分离的，故定名为苏云金杆菌以色列变种(*Bacillus thuringiensis Var, israelensis*)。该菌对属于库蚊、伊蚊、兰带蚊和按蚊的多种蚊幼具有高度敏感性[2,3]。有人试验用家蚕进食晶体毒素后，毒素作用部位在中肠，1分钟内就起反应，10~20分钟内中肠细胞即被破坏；但用晶体毒素注入昆虫体腔则不发病。晶体是一种毒原，只有经过昆虫胃液分解后，方可变为真正的毒素，才能毒杀昆虫。

因受该菌感染的主要是一些鳞翅目的昆虫幼虫，它们的胃液是碱性的，其pH值与该菌生长繁殖的pH相近，故此pH液与晶体的溶解程度有关。

一般认为，不同种类的鳞翅目幼虫对苏云金杆菌染病的反应不同，可分为四种类型：第一类型为家蚕食入毒素后几分钟即可引起中肠麻痹，肠内碱性物漏入体腔，引起血液pH升高，使昆虫全身麻痹死亡；第二类型包括大多数鳞翅目幼虫，虽然同样在几分钟内引起中肠麻痹，但肠内容物不漏入体腔，血液pH基本不变，无全身瘫痪症状，昆虫2~4天方死亡。第三类型必须有芽孢和晶体同时存在才能致死，无全身瘫痪症状，2~4天死亡。第四类型对毒素不敏感，死亡率很低[4]。观察蚊幼对苏云金杆菌以色列变种中毒反应的症状及死亡速度，可能属于第一类型。

## 二、外毒素：可分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 三种。

$\alpha$ -外毒素：曾被称为卵磷脂酶C或磷脂酶C，

$\gamma$ -外毒素：是一种和几种未经鉴定的酶，能澄清蛋黄琼脂，其毒力没有证实；

$\beta$ -外毒素：即热稳定毒素，可溶于水，可透析，表明其不是蛋白质，亦不是脂类[5]。国外研究， $\beta$ -外毒素包含两种核苷酸衍生物，名为苏云金菌素A(*thuringiensis A*)和苏云金杆菌素B(*thuringiensis B*)；两者都具有1个腺嘌呤、1个核糖、1个磷酸、1个葡萄糖和1个未经鉴定的多羟基羧酸残基，羧基在菌素A是游离的，在菌素B则结合成为 $\gamma$ -内酯，分子量在730~850之间。

自1959年Mc Connet首次发现 $\beta$ -外毒素具有杀虫效能以来，做了大量的研究，证明 $\beta$ -外毒素具有广谱杀虫的活性，其杀虫效果与外毒素的纯度和使用剂量有关。由于外毒素在昆虫肠道内大量失活和排出，而口服剂量要比注射剂量高250倍；因条件不统一， $\beta$ -外毒素的杀虫效果有待进一步观察。

## 苏云金杆菌以色列变种制剂的生产方法

苏云金杆菌以色列变种的剂型有菌粉、菌液和漂浮剂等类型。目前菌剂的生产方法各有其优、缺点，尚有待实践中解决。

**一、简易生产法：**苏云金杆菌的简易生产方法很多，主要是液体浅盘和固体浅盘土法生产，虽方法简易，但质量不够稳定，设备不配套，易被杂菌污染和噬菌体裂解而失败，目前已很少使用。

**二、发酵罐工业化生产：**武汉微生物农药厂生产的子子灵粉剂，系由苏云金杆菌以色列变种通过液体深层发酵，经过制备得到的芽孢和伴孢晶体混合物。该制剂所含的伴孢晶体是一种对蚊幼有高度敏感性的特异性蛋白质毒素〔6〕。但工业化生产设备和工艺较繁杂，生产管理费用大，产品价格较贵，不易推广使用。

**三、开放性固体表层发酵法：**由于固体平板培养具有菌落大、生长快等特点，使其对污染杂菌有较大的耐受力。生产出来的孢晶体悬液制剂，具有与工业化生产的菌粉相同的效果；这种生产方法设备投资少，不须要复杂的密闭无菌设备，发酵工艺简便，不须要高压灭菌和无菌操作，既可工业化生产，又能土法生产，从而降低了生产成本，确保了产品的廉价和高效。

最近，我们应用此种生产方法，在提取的浓缩菌液中加0.2%荧光黄钠和0.5%酚，用膨胀珍珠岩吸附剂制成漂浮剂型以延长特效时间，取得一定效果〔7〕。

## 使用方法

**一、施药方法：**苏云金杆菌以色列变种是一种“胃毒剂”，其使用方法与化学杀虫剂相同，可用喷雾或超低容量喷雾、喷粉或撒粉、泼浇和与漂浮物混合施用等。不论哪种方法，力求散布均匀，使蚊幼能吃入该剂而致死。由于苏云金杆菌制剂的效力一般只能保持6~12天，要不断造成感病条件，就应考虑连续喷菌。

1. 喷雾或超低容量喷雾：适用于水面无植被或少植被的水体和水稻生长前期的稻田，将菌剂加水稀释后喷雾或超低容量喷雾。

2. 喷粉或撒粉：由于菌剂含量高，用量小，不容易喷洒均匀。在一些小水池和小水沟应用时，可用两层纱布包着菌粉，于接近水平处用竹杆轻敲纱布包即可；大面积应用时，可加入其它粉末用喷粉机直接喷

洒。

3. 泼浇：用于植被密布的稻田或水沟。喷雾或喷粉中，常把制剂喷在植被上，影响应用效果，故可用稀释液泼浇，使其落入水中。

4. 与漂浮物混合施用：将菌剂与细漂浮物按1:10~20比例混匀洒于水面，即可将菌剂带到水的每个角落。

**二、应用浓度：**苏云金杆菌以色列变种粉剂，含伴孢晶体有效成分的生物效价为1,000子子单位/毫克。一般情况下，毒杀库蚊、伊蚊和按蚊幼虫可稀释到1~3子子单位应用。由于水体浑浊度不同，在同样浓度下，蚊幼在清水中比污水中食入的机会多。因此，应根据水体的浑浊度适当增加浓度，即清水或稍污浊的水应用1~2子子单位，污浊水可用至2~4子子单位。现场试验观察证明，菌剂2ppm或每平方米2克，对清水或污水各孳生场所的库蚊、按蚊，都有很好的效果〔8〕。

## 效果观察与影响因素

各地应用苏云金杆菌以色列变种灭蚊幼实践证明，室内试验对淡色库蚊的LD<sub>50</sub>为0.3~0.5ppm，对淡色库蚊、三带喙库蚊和致乏库蚊稀释至1子子单位，对1~4龄幼虫3~24小时致死率达95%以上。武汉市卫生防疫站在室外积水应用1~3子子单位，中华按蚊幼虫死亡为89~100%〔9〕。我所使用2ppm或每平方米2克以上菌粉，蚊幼死亡率可达80~90%〔10〕。以上结果表明，室内、外应用1~3子子单位，对库蚊、伊蚊和按蚊的幼虫有显著的速杀效果。另据实验室观察，菌粉有一定的持效，第30天死亡率由99.3%降至67.7%；但室外持效时间较短，可能受下列因素影响：

**一、阳光照射的影响：**在强烈阳光下，苏云金杆菌30分钟内死亡50%，1小时死亡80%，在紫外线光下，1分钟死亡12%，2分钟死亡50%，10分钟死亡99.9%。可见阳光和紫外线光对晶体均有破坏作用。1966年Raun报道，紫外线照射24~48小时，菌剂致病性逐渐减低，72小时完全消失。我所在制备菌剂过程中，加入保护剂荧光黄钠，可延长持效3~6天〔7〕。

**二、剂型的影响：**目前常用剂型为菌粉（子子灵），因颗粒较大，溶解于水后，不能形成悬浮状而很快下沉。蚊幼一般生活在水面，下沉的菌剂就不能感染幼虫。

**三、蚊幼密度的影响：**孳生地蚊幼密度可因场所

不同而异。周氏在实验室观察较低浓度(4万/毫升)菌剂的毒效,密度愈高,死亡率愈低,差异非常显著,即低密度死亡率为54%,而高密度仅为12%〔11〕。我们观察了子灵在水浮莲池灭蚊幼的毒效,亦证明了这一点〔8〕。

**四、水浑浊度的影响:** 浑浊度愈大,有机物或杂质愈多,对蚊幼吞食菌剂影响愈大;反之,水质较清,影响较小。

**五、菌剂的质量及使用技术:** 菌剂一定要符合质量指标,使用时应施足够剂量,喷撒均匀,方能达到预期效果。

综上所述,七十年代生物灭蚊有很大的进展;杨氏综合国外生物防制蚊媒的研究现状,认为有希望的微生物防制剂有10余种,苏云金杆菌以色列变种是最有前途的一种〔12〕。该菌在我国已沿用4年之久,生产的菌液与菌粉,其有效成分是对蚊幼有高度毒力的伴孢晶体毒素,是一种灭蚊幼的高效、速效杀虫剂,具有使用安全,对人、畜、鱼、水蚤和青蛙等无毒

害,对农作物无副作用,能保护天敌,不污染环境等优点。但亦存在一些问题,如生产方法、制剂质量、剂型改革、延长持效、菌剂保存和添加增效剂(低剂量化学农药)等,有待今后进一步研究解决。

### 参 考 文 献

1. Goldberg et al: Mosquito News, 37: 355, 1977.
2. Barjac H de: CR Acad Sci(Paris), 286D, 1175, 1978.
3. Barjac H de et al: Bull WHO, 57: 139, 1979.
4. 蒲蛰龙主编: 害虫生物防治的原理和方法,第1版,162页,科学技术出版社,北京,1980.
5. 耿贯一主编: 流行病学(上册),第1版,308页,人卫,1979.
6. 武汉市微生物农药厂: 子灵制剂的生产工艺(微生物制剂),内部资料,1979.
7. 徐启丰等: 延长苏云金杆菌以色列变种杀蚊幼持效的研究内部资料,1981.
8. 谭昌炎等: 人民军医,6: 30,1982.
9. 湖北武汉市卫生防疫站: 生物制剂,内部资料,1979.
10. 徐启丰等: 中华预防医学杂志,14: 193,1980.
11. 周达生等: 流行病学杂志,1: 190,1980.
12. 扬新史: 国外医学寄生虫病分册,1: 15,1979.

## 血凝抑制试验在检测森林脑炎特异抗体方面的应用

第三军医大学微生物学教研室 樊武舫 李光平 朱德钟

本文建立了森脑血凝抑制试验(HIT),并与补结试验(CFT)作了比较。本试验以鱼精蛋白处理感染鼠脑制备森脑病毒血凝抗原;以pH5.8PBS作为鹅红细胞稀释液;以室温作为最适反应温度;反应时间为45分钟。以不同量白陶土处理相同血清(量均为0.1毫升),表明0.1克量以上的白陶土完全可以除去0.1毫升血清中的非特异血凝抑制物。本试验选用0.15克/0.1毫升作为处理血清的白陶土最适用量,共检测了61份正常人血清,结果与CFT完全符合,均为阴性。在相同条件下,血清对照试验系对阳性参考血清、阴性参考血清及森脑病人阳性血清(CFT1:64)进行HIT检测。可见正常血清均无血凝抑制活性。血清交叉试验,用森脑病毒血凝抗原与森脑免疫血清、乙脑

免疫血清及圣路易脑炎免疫血清分别进行HIT试验,结果表明本试验系统与乙脑、圣路易脑炎病毒免疫血清出现较弱的交叉反应( $<1:10$ ),但远较特异反应滴度( $\geq 1:160$ )为低。在不同时间由不同人员操作,对20份病人血清连续进行两次HIT检测。结果表明重复性良好。以两法平行检测109份血清,HIT检出阳性39份,CFT为31份,未发现前者阴性而后者阳性的血清;两法均检出阳性31份,阴性70份,不符合仅8份,总符合率为92.7%;经统计学分析,HIT和CFT的检出结果相关非常显著( $r=0.7819, P<0.001$ ),而HIT的相应检出滴度一般比CFT高2~5倍,表明前者更为敏感。