

苏云金芽孢杆菌 研究进展

戴莲韵 王学聘 编著

科学出版社

苏云金芽孢杆菌研究进展

戴莲韵 王学聘 编著

科学出版社

1997

内 容 简 介

本书介绍作者 20 多年来从事苏云金芽孢杆菌研究的成果,全书共分六编,主要叙述苏云金芽孢杆菌鉴定及分类学研究;苏云金芽孢杆菌在我国森林土壤中的生态分布;苏云金芽孢杆菌的毒性测定;发酵工程研究;*B. t.* σ -内毒素蛋白基因在林木育种中的应用;菌种资源及保藏技术研究等。

本书可供从事该领域研究工作的人员及大专院校有关师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

苏云金芽孢杆菌研究进展/戴莲韵,王学聘编著. —北京:科学出版社, 1997

ISBN 7-03-006115-2

I. 苏… II. ①戴… ②王… III. 苏云金芽孢杆菌-研究-进展 IV. Q939.124

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 12420 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1997 年 12 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1997 年 12 月第一次印刷 印张:8 3/4 插页:8

印数:1—1 200 字数:200 000

定价:26.50 元

前 言

《苏云金芽孢杆菌研究进展》一书总结了作者 20 多年研究成果。本书较系统地介绍了苏云金芽孢杆菌鉴定及分类学研究、在我国森林土壤中的生态分布、毒性测定、发酵工程研究、 σ -内毒素蛋白基因在林木育种中的应用、菌种资源及保藏技术等主要内容。

《苏云金芽孢杆菌研究进展》一书是作者研究成果,分为六编二十三章。其中有些章节的研究内容与同事们共同完成(详见每章后的署名),大部分为作者完成。本书书名和一级标题均采用苏云金芽孢杆菌全称,其他内容有的以缩写名称苏云金杆菌称之,文中变种与亚种为同一分类等级。

本书的出版希望能对我国苏云金芽孢杆菌的研究和应用及今后科学发展起到一定的推动作用,因作者水平有限,错误之处在所难免,请读者指正。

戴莲韵

1997.9.

AAX35/01

目 录

前言

概述.....	(1)
---------	-----

第一编 苏云金芽孢杆菌的鉴定及分类学研究

第一章 苏云金芽孢杆菌的分离、纯化及生理生化特性测定	(5)
一、苏云金芽孢杆菌的分离	(5)
二、菌种的纯化	(6)
三、苏云金芽孢杆菌的培养特征和形态特性	(7)
四、生理生化特性的测定	(8)
第二章 苏云金芽孢杆菌的 H-血清型鉴定	(11)
一、H-血清学方法	(11)
二、苏云金芽孢杆菌的血清型分类	(13)
第三章 苏云金芽孢杆菌的酯酶型分析	(15)
一、圆盘电泳在苏云金芽孢杆菌变种鉴定上的应用	(15)
二、板状电泳在苏云金芽孢杆菌亚种鉴定上的应用	(20)
第四章 IBM PC/XT 微型计算机在苏云金芽孢杆菌亚种鉴定上的应用	(24)
第五章 热解气相色谱法鉴定苏云金芽孢杆菌亚种	(27)
第六章 苏云金芽孢杆菌 7 个亚种的 DNA 的 G+C 摩尔百分数的测定	(34)
第七章 苏云金芽孢杆菌孢子囊超微结构的研究	(38)
第八章 苏云金芽孢杆菌的一个新亚种	(41)

第二编 苏云金芽孢杆菌的生态分布

第九章 我国四个自然保护区森林土壤中苏云金芽孢杆菌的分布	(45)
第十章 中国八个自然保护区森林土壤中苏云金芽孢杆菌的分布	(52)
第十一章 我国森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布的研究	(59)

第三编 苏云金芽孢杆菌的毒性及生物测定

第十二章 三株不同形状伴孢晶体的苏云金杆菌对几种害虫的毒力测定	(69)
第十三章 高毒力苏云金杆菌的筛选	(73)
第十四章 苏云金杆菌 83016 菌株的研究	(77)
第十五章 用马尾松毛虫幼虫测定苏云金芽孢杆菌制剂毒力效价	(82)

第四编 苏云金芽孢杆菌发酵工程的研究

第十六章 苏云金芽孢杆菌发酵条件的研究	(85)
---------------------------	------

一、发酵条件与昆虫毒性之间的相关性	(85)
二、83002 菌株在 14L 发酵罐发酵条件与制剂生产	(90)
第十七章 用黄酒滤渣生产苏云金杆菌的研究	(95)
第十八章 苏云金芽孢杆菌制剂与化学药剂混合使用的初步研究	(99)

第五编 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素蛋白基因在林木育种上的应用

第十九章 表达苏云金杆菌 δ -内毒素蛋白基因大肠杆菌对四种林业害虫作用的生物测定	(101)
第二十章 欧美杨转基因植株的 PCR 检测	(105)
第二十一章 抗虫转基因欧美杨的培育	(107)

第六编 苏云金芽孢杆菌资源及保藏技术

第二十二章 苏云金芽孢杆菌菌种保藏目录	(113)
第二十三章 苏云金芽孢杆菌菌种保藏	(124)
参考文献	(129)
图版	(133)

Contents

Preface

An Introduction to <i>Bacillus thuringiensis</i>	(1)
--	-----

PART 1 STUDY ON IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Chapter 1 The isolation purification and biochemical character determination of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(5)
I . The isolation of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(5)
II . The purification of strains	(6)
III . The characterization of culture and mophology of <i>Bacillus thuringiensis</i> ...	(7)
IV . Biochemical character determination	(8)
Chapter 2 The H-serotype of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(11)
I . The method of H-serotype	(11)
II . The H-serotype of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(13)
Chapter 3 The esterase type analysis of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(15)
I . Identification of <i>Bacillus thuringiensis</i> varieties by means of disc electrophoresis	(15)
II . Identification of <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies by means of slab electrophoresis	(20)
Chapter 4 Identification of <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies by means of IBM PC/XT microcomputer	(24)
Chapter 5 A priliminary report on the identification of <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies by pyrolysis gas-liquid chromatography	(27)
Chapter 6 Determination of mole percent of G+C in DNA of <i>Bacillus thuringiensis</i> seven subspecies	(34)
Chapter 7 Studies on the ultramicro structure of <i>Bacillus thuringiensis</i> sporangium	(38)
Chapter 8 A new subspecies of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(41)

PART 2 THE ECOLOGICAL DISTRIBUTION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Chapter 9 Distribution of <i>Bacillus thuringiensis</i> in forest soil of 4 nature reserves in China	(45)
---	------

Chapter 10	Distribution of <i>Bacillus thuringiensis</i> in forest soil of 8 nature reserves in China	(52)
Chapter 11	Studies on the ecological distribution of <i>Bacillus thuringiensis</i> in forest soils of China	(59)

PART 3 TOXICITY AND BIOASSAY OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Chapter 12	The toxicity of three strains of <i>Bacillus thuringiensis</i> with different forms of parasporal crystal	(69)
Chapter 13	Screening of <i>Bacillus thuringiensis</i> with high toxicity	(73)
Chapter 14	Studies on strain 83016 of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(77)
Chapter 15	Determining toxicity of <i>Bacillus thuringiensis</i> preparation by dendrolimus punctatus larva	(82)

PART 4 STUDIES ON THE FERMENTATION ENGINEERING OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Chapter 16	Studies on the fermentation condition of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(85)
	I . Relationship between the fermentation condition and toxicity	(85)
	II . Fermentation condition of 14L fermentor and preparation production ...	(90)
Chapter 17	Studies on producing <i>Bacillus thuringiensis</i> with yellow rice wine residue	(95)
Chapter 18	Studies on mixing application of the <i>Bacillus thuringiensis</i> preparation with chemical insecticide	(99)

PART 5 APPLICATION IN TREE BREEDING OF *BACILLUS THURINGIENSIS* σ -ENDOTOXIN GENE

Chapter 19	Bioassay of <i>Escherichia coli</i> of expressing <i>Bacillus thuringiensis</i> σ -endotoxin gene against forest pests	(101)
Chapter 20	PCR analysis of transgenic(<i>P. euramericana</i>) plants	(105)
Chapter 21	Studies on insect-resistant transgenic(<i>P. euramericana</i>) plants	(107)

PART 6 THE RESOURCE AND CONSERVATION TECHNOLOGY OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Chapter 22	Catalogue for resource and conservation of <i>Bacillus thuringiensis</i>	(113)
Chapter 23	Conservation of <i>Bacillus thuringiensis</i> culture	(124)

概 述

苏云金芽孢杆菌的名称来源于 *thuringiensis* 的译音, 是 Berliner 1909 年从德国苏云金省 (Thuringien) 的一个面粉厂寄出的一批染病地中海粉螟中分离出的一种杆菌。1915 年 4 月他详细描述了该菌的形态和培养特征, 并定名为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 *B.t.*)。后来他分离的菌株不幸失传, Matter 1927 年再次从地中海粉螟中分离出类似的杆菌, 并沿用了苏云金芽孢杆菌的名称, 从而建立了苏云金芽孢杆菌亚种的模式种 (*Bacillus thuringiensis* Mattes or Berliner)。

苏云金芽孢杆菌的分类问题是细菌分类学家一直争论不休的问题之一, 直至 1957 年在《伯杰细菌鉴定手册》(第七版) 正式列为一个独立的种。1974 年《伯杰细菌鉴定手册》(第八版) 中苏云金芽孢杆菌属于第十五部分, 产生内孢子的杆菌和球菌部分的芽孢杆菌科, 芽孢杆菌属, 1 类群 22 个种中的一个独立种, 种以下又区分为不同的亚种, 并被公认。苏云金芽孢杆菌的分类主要根据鞭毛抗原的血清型和生理生化特性的不同进行亚种的划分, 由于无鞭毛亚种的出现, 人们又采取了营养细胞的酯酶型, 作为补助分类方法。目前人们正在探讨采用 DNA 杂交的方法进行亚种间的系统分类。到目前全世界已发表和定名的苏云金芽孢杆菌为 48 个亚种。

苏云金芽孢杆菌的形态特征, 在其生长发育的整个周期中可分为营养体、孢子囊、孢子和伴孢晶体。营养体为杆状, 两端钝圆, 大小为 $1.2 \sim 1.3 \mu\text{m} \times 3.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$, 周生鞭毛 (或无鞭毛), 微动或不动, 单个存在或 2~4 个成短链状, 革兰氏染色阳性反应。孢子囊杆状比营养体稍膨大或不膨大, 在孢子囊内除芽孢外, 另一侧均有钻石形 (菱形、正方形、圆形、不规则形、镶嵌形等) 结晶体伴生, 称为伴孢晶体。研究表明, 伴孢晶体是使昆虫致死的主要因素之一, 它的形状和大小不同, 对昆虫毒性大小也不同, 其中菱形和镶嵌形菱形晶体对鳞翅目昆虫的幼虫毒性最强。孢子囊培养到一定时间破裂, 释放出游离的伴孢晶体和孢子。孢子为卵圆形, 有光泽, 大小为 $0.8 \sim 0.9 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$, 用来继续繁殖。整个生长和代谢过程从芽孢萌发, 营养体生长, 孢子囊破裂释放出芽孢和伴孢晶体完成其整个的生命循环过程。在苏云金芽孢杆菌生长和芽孢形成过程中需要氮、碳和矿物质营养及生长素等。研究表明, 该菌有着广泛的营养源, 一般农副产品和其下脚料均可作为营养源。我国生产苏云金杆菌制剂的主要氮、碳源有豆饼粉、棉子饼粉、鱼粉、淀粉、玉米粉、酵母粉、麦麸等, 矿物营养为硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰、磷酸二氢钾、碳酸钙等。此外在其生长、发育过程中环境因素如温度、pH 值、氧气、光和射线、植物叶汁以及抗生素和一些化学农药都影响它的生长和毒性的强弱, 因此营养条件和环境因素是苏云金杆菌生长发育, 提高毒性的关键之一。

毒素是苏云金杆菌杀虫的核心, Heimpel (1987a) 将它们分为 4 类: ①伴孢晶体即 σ -内毒素, 它是一种蛋白质, 是昆虫致死的主要毒素之一, 它的形状、结构和大小均与其毒力有着密切关系。目前人们热衷于研究伴孢晶体毒蛋白基因的序列、分类、活性, 为进一步重组高效、广谱、新型高毒力菌株和人工合成新杀虫剂以及利用基因工程手段, 培育抗虫工程

植物提供条件。伴孢晶体杀虫作用的机制,通过昆虫病理学家的研究表明,在昆虫体外,毒素与特定的原生质膜类脂物相互作用,使类脂物重新排列,导致完整膜类脂物和细胞最终溶解。在活体内,在昆虫肠液碱性条件和酶的作用下,伴孢晶体降解成毒性多肽,使昆虫中肠上皮细胞的酶功能、蛋白质代谢和运输过程受干扰,或是作为酶的抑制剂和细胞自溶的起动剂造成内质网空泡,线粒体瓦解,最终细胞自溶使昆虫致死。②苏云金素,亦称 β -外毒素,热稳定外毒素,是部分苏云金杆菌分泌到体外的具有热稳定性和广谱杀虫作用的一类核苷类物质。对蝇类幼虫,夜蛾科和鞘翅目害虫有很好的毒杀作用。③芽孢:既是病原,又是毒素,当中肠受伴孢晶体损伤后,活芽孢便萌发成营养体,穿透肠壁进入血液,并在那里大量繁殖,使害虫患败血症死亡。④其它几种毒素由于不稳定,研究和应用的较少。

苏云金杆菌制剂生产,从1938年商品制剂问世到现在,已经实现了工业化生产。其中毒力高和发酵性能稳定的菌种是提高产品质量和降低生产成本的重要环节。自1970年美国Dulmage从患病红铃虫中分离到比当时商品制剂菌种毒力高20倍以上的HD-1菌种用于生产后,对苏云金杆菌制剂的生产和发展起了巨大的推动作用。

目前苏云金杆菌的制剂生产主要采用液体深层发酵。生产程序为菌种培养、发酵、浓缩(离心或板框过滤)、干燥、剂型化、产品检验六个程序。苏云金杆菌制剂剂型有:粉剂、可湿性粉剂、乳剂、颗粒剂、气雾剂和油乳剂等种类。我国主要产品为粉剂和液剂,其出厂标准以含孢子数100亿/(g·ml)。目前也建立了以目的昆虫为指标的制剂标准。在剂型化的过程中加入适当的助剂(稀释剂、防腐剂、粘着剂、保护剂)可更好的发挥在不同生态环境中的应用效果,以延长持效期。

自1915年Berliner发现鳞翅目昆虫病原苏云金芽孢杆菌以来,这一类型的细菌杀虫剂的研究已成为目前微生物防治害虫的重要手段之一。近30年来,苏云金杆菌杀虫剂在农、林、卫生害虫防治中起了很大的作用,具有化学杀虫剂不可比拟的优点,它既能直接杀死害虫,又不伤害能控制害虫群落的天敌,对人畜无害,不污染环境等优点。其应用范围和防治对象从25年前的4目32属121种扩大到10个目522种害虫。在美国用于防治危害20多种农作物的23种害虫,在前苏联Битоксибациллин用于防治夜蛾科和鞘翅目类害虫。据1982年统计,在2700万公顷的生物防治面积中,生物制剂应用的面积超过700万公顷。目前在美国和前苏联该类杀虫剂均已发展成吨位商品农药投放市场,用于大规模的害虫防治,取得了明显的经济效益和生态效益。据报道目前世界上近40个国家开展了这方面的应用和研究工作。我国研究和应用苏云金杆菌起于1959年,从前苏联和捷克分别引进了蜡螟亚种,于1965年在长沙和武汉进行了工业化生产,到70年代工业产品每年1000吨左右,最早用于进行大面积防治的是林业上的松毛虫。1974年在湖北宜昌地区,飞机防治松毛虫的面积达82.5万亩,取得了满意的效果,除此之外在尺蠖、毒蛾、天社蛾等19科56种害虫防治上也得到了应用。在农业上由于化学农药对环境的污染日趋严重,苏云金杆菌在蔬菜、棉花、果树、茶、麻、薯类、玉米、大豆、水稻等主要作物的害虫防治上均得到了广泛应用,年用药量约在6000吨以上。

苏云金芽孢杆菌目前研究的重点为新资源的收集和开发,60年代初,人们开始注意到它的生态分布问题。70年代在美国和菲律宾的土壤中,日本的蚕场以及南斯拉夫的水磨坊和昆虫饲养室中的分布进行了比较系统的研究,发现了 H_{13} 、 H_{14} 、 H_{15} 、 H_{16} 、 H_{17} 、 H_{18} 、 H_{19} 等新亚种。尤其对双翅目蚊子幼虫有特异敏感的以色列亚种的发现,以及对几种鞘翅

目幼虫有毒性的新菌株——拟步行甲亚种和圣地亚哥亚种分别在德国和美国分离出后,打破了长期以来认为苏云金芽孢杆菌只对鳞翅目昆虫有效的固有观念,大大开拓了它的应用前景。我国近年来也对苏云金芽孢杆菌的分布及资源的开发进行了广泛的研究,发现了山东、云南和温泉新亚种等。据统计,至今我国发现的新亚种还有 H_{8a8c}、H_{1a} 和无鞭毛亚种 140、7805,新记录有 H₁、H₂、H_{3a3b}、H_{4a4b}、H_{4a4c}、H_{5a5b}、H_{5a5c}、H₇、H₈、H₉、H₁₀、H₁₃、H₂₁ 共 20 个亚种。研究表明苏云金芽孢杆菌在自然界广泛存在,但尚有待进一步开发。

生物技术在苏云金芽孢杆菌领域的研究得到突飞猛进的发展,除在基础理论上的意义外,为遗传育种展现了美好的应用前景。80 年代初编码苏云金芽孢杆菌晶体毒蛋白基因已被克隆到大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,并得到表达。Kline 构建了对鳞翅目和双翅目昆虫有活性的苏云金芽孢杆菌工程菌株。Mycogen 公司将苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白基因转入假单胞菌属,获得抗不良环境的高杀虫活性工程菌株等。尤其值得一提的是,Mark. Vaeck 已成功地把毒蛋白基因转入到烟草获得抗虫植株,建立工程菌株。我国转基因抗虫育种也取得了可喜的突破性进展,中国农业科学院与中国科学院微生物所、遗传所合作成功获得了一批转 *B. t.* 杀虫蛋白基因及 CPT1 基因棉花和烟草,中国林科院等转 *B. t.* 杀虫蛋白基因欧美杨和美洲黑杨抗虫树种及大田试验获得成功,杀虫死亡率可达 50%~70%,上述成果为今后扩大到蔬菜、棉花、水稻及树木中,建立工程植物,为抗虫育种开辟了新途径。科学家预言今后将是苏云金芽孢杆菌杀虫剂产量迅速增长,研究领域更加开拓的年代。

(戴莲韵 王学聘)

第一編 苏云金芽孢杆菌的 鉴定及分类学研究

第一章 苏云金芽孢杆菌的分离、 纯化及生理生化特性测定

微生物学研究的关键问题之一,就是对研究的有机体给予正确的鉴定。没有一个鉴定用的可靠分类系统,会造成在应用上的混乱。近些年来在害虫的生物防治工作中,苏云金芽孢杆菌在生产和使用上日益扩大,各地所使用的菌株越来越多,而且人们不断地从野外病虫体上分离这类产生伴孢晶体的芽孢杆菌,因此,对于这类杆菌急需弄清楚使用的菌株是什么?鉴定其属于那个亚种(变种),给它以正确的分类,以便为生产、使用中发现新亚种(变种),选育优良菌株,以及研究苏云金芽孢杆菌在自然界中的生态分布,对更迅速地发掘和利用我国昆虫病原资源有着十分重要的意义。

我们对苏云金芽孢杆菌这类菌的鉴定,主要参考 Barjac (1973 年)的检索表,根据我们实验室的条件,进行该菌的鉴定研究工作。

一、苏云金芽孢杆菌的分离

1. 患病昆虫的采集

因病死亡的昆虫,可发现于植物的枝叶上、茎内、花苞里、果实中和网苞内或其它栖息地。它们可被病原体或昆虫的体液、粪便固着于枝叶上或倒挂于枝叶下。死亡的昆虫样本多数很脆弱,在剥离基物时很易损坏而失去主要症状。因此,采集死虫应以单个样本连同基物一部分或全部置于小瓶中。瓶塞应用棉花或泡沫塑料等透气物质,以避免瓶内湿度过大。青霉素瓶或玻璃指型管常作样本的盛器,但必须先洗涤和消毒,以免受污染。对采集的样本可按年号、虫种或寄主植物为字头进行顺次编号,并作如下记载:①昆虫名称(学名或俗名);②寄主植物或动物;③采集日期、地点;④采集人;⑤简单描述样本体的病症、疾病在寄主种群中发生的范围、植物生育期及其它有关情况。对采集的样本最好迅速处理,尽快进行分离,如不能当时进行分离,可冷藏,以阻止样本进一步腐解。

2. 感染苏云金杆菌昆虫的一般特征

昆虫被感染后常见活动力减弱,食欲减退,口腔与肛门常有吐泻排泄物的现象,多数

幼虫因败血症而死,死虫躺卧在植物或其它物体表面,或在植物各种器管里或倒挂于枝叶下。体色由褐色逐渐加深呈黑色,内部组织崩溃时流出发臭的粘液。

3. 常用分离细菌的培养基配方

牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1.0%,琼脂 2%,水 100ml,pH7.2~7.5,以上培养基配好后,装入 500ml 三角瓶中,高压蒸气灭菌,一个气压(121℃)灭菌 20~30 分钟,即可使用。

4. 分离方法

苏云金芽孢杆菌一般采用稀释分离法,因它在侵染物的组织中,数量大,稀释培养可以使它与杂菌分开,形成分散的菌落,容易分离得到纯培养。

(1)由病虫体上分离:用 75%的酒精或 0.1%的昇汞进行虫体的表面消毒 3~5 分钟,然后用无菌水冲洗 2~3 次即可达到表面消毒的目的。剖开腹腔,用接种环取死虫肠道粘液,放入无菌水中(约 3~5ml),然后取此菌悬液 0.1ml 于灭菌的培养皿中,加入已溶化的上述细菌培养基(培养基温度冷却到 45℃时),直径 9cm 培养皿加 15ml 左右,摇匀,待冷凝后,倒置,放入 28~30℃温箱中培养 1~2 天后,挑取其单菌落。或者用上述菌悬液在培养基表面划线,获得单菌落。

(2)由土壤或虫粪中分离:取 1g 土壤或虫粪,悬浮在 100ml 无菌蒸馏水中,用力振荡 10 分钟,然后放置 5 分钟,将上清液成 10 倍稀释数次,取悬浮液 0.1ml 于细菌培养基平板上,用玻璃刮刀涂匀,倒置,放入 28~30℃温箱中 1~2 天后取出,挑取单菌落。

以上两种分离方法所得到的单菌落,涂片后,用石碳酸复红染色,在油镜下镜检,凡产生伴孢晶体的芽孢杆菌,均用接种环移入细菌培养基的斜面上。

二、菌种的纯化

鉴定细菌首要的条件是所鉴定的菌是纯菌。道理是显而易见的,一般从事鉴定工作的人都知道这一点,但还是要强调在开始鉴定和鉴定的过程中都要保持菌种是纯菌。什么是纯菌?一般说来是指菌落形态一致和菌体形态一致的菌株而言。菌落形态一致的菌株,菌体形态也应一致。但在观察这两个一致性时,应考虑到细菌的光滑型和粗糙型的变化,考虑到某些菌株在生长发育过程中形态的变化,以及生物本身个体差异幅度的有关情况。

细菌鉴定工作中主要有两种纯化方法:

1. 单细胞分离法

单细胞分离法是在显微镜下,利用特殊器械(例如单细胞分离器),在直接观察下,取一个单纯的细菌细胞培养。用这个方法所得到的纯株是比较可靠的,但单细胞分离技术较难掌握,并需要特殊器械,故除非特殊要求,一般不采用单细胞分离纯化细菌。

2. 平板划线单菌落分离法

用接种环在平板表面逐渐稀释分散,以致达到单个细胞在平板表面形成一个个的单

独菌落,具体操作如下:

(1)取一环细菌悬液或一点菌苔,在表面无冷凝水的平板一侧边缘处,反复涂抹约1cm 大小的面积上。

(2)烧灼接种环,冷却后,从上述涂菌处沿平板边缘划3~5条直线。前2~3条直线从涂菌处划出,后2~3条直线也可不通过涂散处。划线时接种环与平板表面成 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 角,轻轻接触不使接种环划破表面到琼脂里面去。

(3)烧灼接种环,冷却后,将环通过原划线处划2~3条直线,并连续划3~4条不通过原划线的直线上。

(4)按上法反复几次划满整个平板。

(5)倒置平板于适温培养,直到形成明显的菌落为止,一般生长较快的细菌要1~2天,生长慢的细菌要3~5天。

三、苏云金芽孢杆菌的培养特征和形态特性

1. 培养特征的观察

(1)平板菌落形态:在牛肉膏、蛋白胨、琼脂培养基上, 30°C 培养24小时后,形成大头针大小的乳白色或淡黄色小点,有平滑边缘或不平滑边缘,72小时后圆盘状菌落的直径为1cm,边缘整齐或不整齐。菌落特征因培养基不同亦有所区别。

(2)斜面菌苔形态:斜面是日常接触最多的培养物,认识斜面菌苔形态,对掌握菌种是否污染有一定帮助,苏云金杆菌斜面上的菌苔形态为乳白色、光滑或有皱,产生可溶性色素或不产生可溶性色素等。

2. 形态特性

细菌的形态主要指菌体的形态和大小以及是否产生荚膜、芽孢和鞭毛,鞭毛的数目和分布等。细菌的形态观察,大都要经过涂片、固定和染色。其方法是用接种针从固体培养基表面挑取少量细菌于无菌蒸馏水中。将配成的稀悬浮液1滴涂匀在洁净的载玻片上,干燥后,固定,染色,在显微镜下进行观察,用测微尺量出其长、宽,通常用微米(μm)表示。苏云金芽孢杆菌在生长和发育过程中,菌体形态的变化一般经过以下几个阶段:

(1)营养体(vegetative rods):是一种相当肥状直形,生芽孢的小杆状菌,菌端圆角,菌体有坚实的膜,大小为 $1.2\sim 1.8\mu\text{m}\times 3.0\sim 5.0\mu\text{m}$,周生鞭毛(或无鞭毛),微动或不动,单个存在或2~4个在一起成短链状,革兰氏染色呈阳性反应。

(2)孢子囊(sporangium):杆状比营养体稍膨胀,在孢子囊内除芽孢外,另一侧均有钻石形(菱形或正方形)结晶体(crystal)伴生,称为伴孢晶体(parasporal crystal),经研究试验对多种鳞翅目幼虫有毒。孢子囊到一定时间破裂,放出游离的伴孢晶体和孢子,晶体的大小为 $0.6\mu\text{m}\times 2.0\mu\text{m}$,大小不一,孢子用来继续繁殖。

(3)孢子(芽孢)(spore):卵圆形,有光泽, $0.8\sim 0.9\mu\text{m}\times 2.0\mu\text{m}$,在菌偏端处出现,一般可在24~48小时形成($30\sim 32^{\circ}\text{C}$),孢子歪斜地长在孢子囊中。孢子囊破裂时,释放出孢子。

四、生理生化特性的测定

(1) V. P. 反应(乙酰甲基甲醇试验): 某些细菌在糖代谢过程中, 分解葡萄糖产酸, 进一步转化为中性化合物, 如乙酰甲基甲醇。乙酰甲基甲醇在碱性环境下被空气中的氧气氧化成二乙酰, 后者与蛋白胨中精氨酸所含的胍基起作用, 生成红色化合物为 V. P. 反应阳性(+), 反之为阴性(-)(若培养基中胍基太少时, 加少量肌酸或肌酸酐可促进反应进行)。

1) 培养基配方: 蛋白胨 5g, 葡萄糖 5g, K_2HPO_4 (或 NaCl) 5g, 蒸馏水 1000ml, pH7.0~7.2(自然)。

按以上配方配制后, 分装试管, 每管 5ml, $0.6kg/cm^2$ 灭菌 30 分钟, 备用。

2) 试剂: 肌酸 0.3%(或不配溶液, 直接使用), NaOH 40%。

3) 接种: 接种试验菌种于培养基中, 每次三个重复, 置适温培养, 分别于 2、4、6 天取样测定。

4) 操作与结果观察: 取少许培养液于小试管中与 40% 氢氧化钠等量混合, 加少许肌酸(即一刀尖约 0.5~1.0mg)。加入后猛烈振荡, 2~10 分钟内如培养液出现红色, 即为 V. P. 试验阳性反应, 有时需要放置更长时间才出现红色反应。反之为阴性反应。

(2) 卵磷脂酶测定: 菌体如存在有卵磷脂酶, 能使卵磷脂分解生成脂肪和水溶性的磷酸胆碱。将细菌培养在含有卵黄的肉汤琼脂平板上, 若该菌产生卵磷脂酶, 卵黄被分解, 在菌苔周围出现不透明圈环, 即为不溶性的脂肪。

1) 培养基的制备: 无菌条件下取卵黄一个加等量的生理盐水, 摇匀后, 取 10ml 上述悬浮液加入到融化的约 50~55℃ 的 200ml 肉膏琼脂培养基中, 混合均匀后倒入培养皿中, 制成卵黄平板, 30℃ 下过夜后如无杂菌污染, 即可使用。

2) 接种与观察: 取 18~24 小时的斜面或培养液中的菌体, 点种在上述平板上。点的直径约为 2~3mm。每个平板可分散点种 5~7 株菌, 以不影响观察结果为宜, 每株重复三个平板, 适温培养 18~24 小时观察。在菌落四周和下面有不透明的区出现, 表示卵磷脂分解生成脂肪, 即为阳性反应(+), 反之为阴性反应(-)。

(3) 糖、醇、苷类发酵试验: 某些细菌能发酵糖、醇、苷类产酸, 产气或产酸不产气, 苏云金杆菌的不同变种对糖、醇、苷的发酵能力不同, 因此该项测定可作为该菌分类鉴定的依据。

1) 培养基配方: $(NH_4)_2HPO_4$ 1g, KCl 0.2g, $MgSO_4$ 0.2g, 酵母膏 0.2g, 琼脂 5~6g (水洗琼脂), 蒸馏水 1000ml, 溴甲酚紫 0.04%, pH 调至 7.0~7.2。

在以上基础培养基内分别按 1% 的糖、醇、苷的量加入, 其中蔗糖可直接加入, 甘露糖、纤维二糖、水杨苷用细菌过滤器过滤灭菌后加入, 防止糖类因高压蒸气灭菌而被破坏。基础培养基经 $0.6kg/cm^2$ 蒸气灭菌 30 分钟, 并用无菌操作加入各种糖后, 分装试管, 每管约 4~5ml, 凝固后, 进行穿刺接种。培养在 28~30℃ 温箱中。

2) 结果观察: 凡是分解糖、醇、苷产酸的苏云金芽孢杆菌的变种, 使培养基 pH 下降, 溴甲酚紫则由紫红色变为黄色, 即为阳性反应(+), 反之为阴性反应(-), 观察日期为 1、2、4、7、14 天。

(4)脲酶测定：有些细菌能产生脲酶，分解尿素形成大量氨，氨使培养基的 pH 值升高，则酚红指示剂呈现红色，即为阳性反应(+)，反之为阴性反应(-)。

1) 培养基的配制：蛋白胨 1g, NaCl 5g, 葡萄糖 1g, KH_2PO_4 2g, 琼脂 20g, 酚红 0.02g (1:500 的酚红溶液)。蒸馏水 1000ml, pH7.0~7.2(自然)。

分装试管, 0.6kg 蒸气灭菌, 灭菌后 pH 大约为 6.8~6.9, 培养基呈桔红色, 20% 的尿素水溶液用细菌滤器过滤灭菌后, 待基础培养基冷却到 50~55℃ 时将尿素加入, 使尿素的最终浓度为 2%, 然后将试管培养基摆成较大的斜面, 备用。

2) 观察结果：接种后适温培养, 2 小时就可开始观察, 4 小时一次, 过夜。阴性结果观察 4 天。培养基呈红色者为阳性, 培养基颜色不变者为阴性。

(5)水解淀粉：这项测定是检查细菌是否产生淀粉酶。细菌产生的淀粉酶, 能使遇碘呈蓝紫色的淀粉, 水解成为遇碘不显色的无色糊精等小分子。

1) 培养基配制：牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 琼脂 2%, 可溶淀粉 0.2%, 蒸馏水 100ml, pH7.5。

1kg/cm² 20 分钟灭菌, 倒平板, 凝固后, 备用。

2) 接种和观察：每个平板点种待测菌株 1~5 株, 每株菌重复三个平板, 适温培养, 2~5 天后, 用卢哥氏碘液在形成明显菌落的平板上滴加碘液, 整个平板和菌落下琼脂如为蓝紫色, 移开菌落后再加碘液, 菌落下琼脂仍为蓝紫色, 表示该菌不产生淀粉酶, 为阴性反应(-), 如在菌落周围出现无色透明区则为阳性反应。

(6)七叶灵试验：七叶灵水解后形成七叶亭和葡萄糖。七叶亭遇铁盐形成黑褐色色素。

1) 培养基配制：在水解淀粉的培养基中, 去掉淀粉, 加入 0.1% 七叶灵, 0.05% 柠檬酸铁, 分装试管, 1kg/cm² 20 分钟蒸气灭菌, 摆斜面, 备用。

2) 接种和观察结果：取新鲜菌种接种后, 适温培养 3、7、14 天观察。产黑褐色色素者为阳性, 不产黑褐色色素者为阴性。

(7)解脲作用(明胶水解)：明胶是一种蛋白质, 明胶水解是由于细菌所产生的蛋白分解酶的作用。明胶分解后, 其分子变小, 虽在低于 20℃ 的温度下, 亦不再凝固。明胶培养基本身具有低于 20℃ 凝固为固体, 高于 24℃, 则自行液化的特性, 所以必须注意培养和观察的温度, 如高于 24℃ 时, 则需低温处理。

1) 培养基：蛋白胨 5g, 明胶 100~150g, 水 1000ml。

pH7.2~7.4, 分装试管, 培养基高度约 4~5cm, 间歇灭菌或 0.73kg 蒸气灭菌 20 分钟。

2) 取 18~24 小时的斜面培养物作穿刺接种, 并有两支未接种的空白对照。

3) 观察：于 20℃ 温箱中培养 2、7、10、14 和 30 天, 在 20℃ 以下的室温观察菌的生长情况和明胶是否液化。如菌已生长, 明胶表面无凹陷且为稳定的凝块, 则为明胶水解阴性。如明胶凝块部分或全部在 20℃ 以下变为可流动的液体, 则为明胶水解阳性。如菌已生长, 明胶未液化, 但明胶表面菌苔下出现凹陷小窝(须与未接种的对照比较, 因培养过久的明胶因水分失散也会凹陷)也是轻度水解, 按阳性记录。若细菌未生长, 则或是不在明胶培养基上生长, 或者基础培养基不适宜。

(8)菌膜形成：在肉汤培养基中, 菌膜的有无及形成的状况也可作为苏云金杆菌变种间区分的标志之一。