

一种快速简易的苏芸金杆菌变种鉴别法

——菌落碘色反应法

聂延富 董今才

(山东大学微生物研究所, 济南)

一般认为, 用血清学方法鉴定苏芸金杆菌变种的方法较好, 但也要参考生理生化、酯酶型等方法^[1]。我们用菌落碘色反应法经过几年的反复试验表明, 对苏芸金杆菌变种来说, 该法可做为用其它方法鉴定前的初始鉴别方法。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 菌落碘色反应试剂: 将 Lugol's 原碘液用蒸馏水稀释 2 倍, 再加 1% 的洗液(为助显色剂并能延长呈色时间)。

2. 苏芸金菌血清型标准菌株兼作碘色反应法标准菌株共 19 株, 得自英国、法国、美国 and 捷克。

3. 经中国科学院昆虫研究所鉴定的菌株(血清型等法) 1.950 至 1.988。T3、7589、T40、荆 II 菌得自有关单位, 其他菌株为本校研究所分离、收集, 均未经血清学方法鉴定。

4. 各种生理生化培养基和抗血清制备均按常规方法进行^[1]。

5. Col 菌为山东大学白玉谦先生分离, L₂ 系分离自沂南林厂松毛虫。“新”系分自垃圾中。

二、方法

菌落碘色反应法包括菌落大小、形态结构。但有些菌株菌落大小, 形态结构不尽相同却有相同的碘色反应, 但此二者相同的菌落碘色反应多数相同。该方法主要步骤如下。

1. 活化、纯化菌株和初步鉴定: 先把血清型标准菌株和待鉴菌株在普通培养基平板上划出单个菌落, 30℃ 培养 24 小时, 加碘色反应试

剂于部份菌落上, 如各菌株菌落分别在其平板上呈色一致, 可初步与标准菌株比较与哪一标准菌株相同或最接近。如呈色反应不一致, 要按常规法再次分纯使其一致。

2. 在不同的培养时间内, 进行多次碘色反应观察, 并与血清型标准菌株的菌落形态作比较。由每株纯化的菌落中, 挑取一个第一次未加碘色反应试剂的菌落, 点种于含等量一次配制的普通培养基平板(直径 12 cm 培养皿)上, 每皿点接一株菌, 分 4 行, 每行 3 点, 点距按第 1、2、3、4 行顺序分别为 2、2、3、3 cm, 行距 2、3.3 cm, 加碘色试剂观察时间分别为 12、24、48、72 小时。必要时可多加一行于 96 小时观察, 每行用于一个培养时间加碘液观察。

3. 经上述试验后, 记录每次呈色反应、菌落大小和形态结构都与某标准菌株一致的或最接近的待鉴菌株菌号, 作为用其他方法进一步证明的参考。样品不能及时观察时, 可放冰箱内保存。同一菌落多次加碘液呈色反应基本相同并可延长呈色时间, 便于多次核对比较。

结 果

1. 19 株血清型标准菌株的碘色反应特征见表 1。

从表 1 可见 19 株苏芸金菌变种血清型标准菌株的碘色反应细节各不相同, 特别是培养四天者首次观察时更为明显。在 24、48、72 小时观察, 每次也都能彼此分开, 虽然每次的碘色反应特征略有差异。培养 12、168 小时者仅供

参加试验的还有于忠诚、杨金梅同志。

表1 培养4天及7天19个标准菌株的显色反应

B.t. var. 菌号、变种	菌落大小(天, cm)		基本色调	显色(由菌落边缘→中心色泽变化及色区宽度 cm) 第一行为4天,第二行为7天(培养时间不同有变化)
	4(天)	7(天)	7天	
009, <i>thuringiensis</i> , H ₁	0.7*	2.0*	黄	红0.1→褐0.1→黄 黄0.1→褐红0.1→黄(有轮)或全黄(多次加碘)
021, <i>finitimus</i> , H ₂	0.8	1.5	黄	紫红0.1→灰黄→灰→黄或全黄(多次加碘) 浅黄0.25→深黄红(有灰红轮)
003, <i>alest</i> , H _{3a}	0.8	2.8	黄	紫0.1→深黄→浅黄→黄褐 全黄有轮
HD-1, <i>Kurstaki</i> , H _{3a,3b}	1.5	3.5	黄、褐心 (1.2 cm)	深黄→中心为星状紫褐1.2 cm± 同上
016, <i>sotto</i> , H _{4a,4b}	1.3	3.0	黄	浅黄0.1→灰黄0.1±→浅黄 全黄有辐射纹
306, <i>dendrolimus</i> , H _{4a,4b}	0.8	2.0	黄	紫褐0.1→深黄→暗黄→黄色 全黄
023, <i>Kenya</i> , H _{4a,4c}	1.0	3.0	黄	全深黄 全黄
087, <i>galleriae</i> , H _{5a,5b}	0.6	3.0	黄、紫红心	紫红0.05→深黄0.1→褐紫→深褐紫 黄1.7→紫红1.3车轮状,有轮和辐射线
<i>canadensis</i> H _{5a,5c}	0.8	2.4	黄、紫心	黄0.1→红紫0.1→黄→紫黑色中心 裂页状边缘中心紫→紫环→黄环→褐心中有辐射纹
010, <i>entomocidus</i> H ₆	1.3	2.5	黄	紫红0.1→黄褐 全黄
096, <i>aizawai</i> , H ₇	1.0	1.8	黄	红黄0.1→黄 全黄有浅黄轮
012, <i>marrison</i> , H ₈	1.5	4.0	黄、紫心大	黄0.15→紫褐 黄2.0→紫褐2.0
013, <i>tolworthi</i> , H ₉	0.7	2.5	黄	黄0.05→红0.05→黄0.1→深黄色 全黄
<i>darmstadiensis</i> , H ₁₀	0.7	2.5	黄	黄0.1→红0.1→褐黄0.1→黄绿 全黄
<i>toumaniffi</i> , H ₁₁	0.8	1.8	黄、褐红心	紫红0.05→黄0.15→褐 黄0.05→红0.05→黄→褐红1.0辐射状
<i>thompsoni</i> , H ₁₂	1.0	3.5	黄、紫心	褐黄0.2→紫褐0.1→褐黄0.1→紫褐 黄→紫心2.0呈不规则辐射状
<i>pakistani</i> , H ₁₃	0.8	3.0	同上	红0.1→黄0.1→褐0.1→褐黄→辐射状紫褐心 黄→紫心1.3有多个紫褐相间轮
<i>israelensis</i> , H ₁₄	1.5	3.0	黄	黄→褐→深黄→灰黄 (4、7天相同)
<i>subtoxicens</i> H ₆	0.7	1.7	黄、褐心	红0.1→黄0.1→黄褐心 全为黄褐,有数个暗黄色轮

* 4天和7天二行菌落大小结果均为平均值。

参考。因为12小时菌落较小,菌落中菌体的几个生长发育时期不全,缺少孢囊期和芽孢释放期;培养7天后,菌落基本上不再扩大,几乎全处于孢囊期和芽孢释放期。应该说明的是碘色反应色泽的性质、深浅,很难用标准的名词描

述;呈色区的形状、大小,除呈环状者外,对不同形态的星状色区的描述也难作到确切。因培养观察的时间和温箱温度略有变化,即使在一种培养时间内重复二次的结果也可能有某些差别。并尽可能地同时一次观察完毕,所以表1

的呈色反应仅供参考,不是呈色反应的标准。这和血清型法各人制备的抗血清效价虽略有高低之分,但不影响鉴定结果相似。

2.以 19 株血清型标准菌株用菌落碘色反应法鉴定的标准菌株,对已知血清型的待鉴株进行鉴定的结果比较见表 2。

表 2 待测菌株的鉴定结果

标准株	鉴定结果一致的菌株	碘色反应与标准株最接近者
009	1.953、1.950、 1.952、1.949、 1.954	1.956、1.957、1.951、1.958
087	1.987、1.970、 1.961、1.973、 1.972、1.967、 1.976	1.975、1.977、1.965、1.989、1.960 1.983、1.981、1.979、1.959、1.966 1.968、1.988、1.978、1.985、1.964
306	1.995	1.969 (原为 087 菌,但碘色法与 306 接近)
023	1.992、1.993、 1.990	1.991

表 2 中“最接近者”指在菌落大小、形态与标准株差别较大,在碘色反应方面色泽深浅、色环的宽窄、色区的形状、大小等方面与标准菌株有某些差别,但与其它血清型变种比较差别更大,而与其经血清型等法鉴定的所属血清型变种最接近。从表 2 可见,有 36 株菌用碘色反应法鉴定的结果与血清型等法鉴定的结果一致,占被测菌数的 90%。

3.先用碘色反应法对未经其它方法鉴定的一些菌株进行鉴定,再做血清型和生理生化法鉴定。碘色反应法与标准株一致者共 18 株: 1.309、16-2、10、T40、15、14、12、长苏等菌与 009 菌株相同; 14-1、14-2、9-6、13 等与 087 同;长松、DG6517、D57、6A₂、DG6513 等与 306 菌株同; T₃ 与 H₁₁ 株相同。与标准株最接者有 38 株。此外, L₂ 和“新”两株菌碘色反应、血清型均与 19 个标准菌株不同。L₂ 菌株无伴孢晶体或晶体的产生不稳定且为数极少,杀松毛虫毒力弱。“新”系分离自垃圾中,碘色反应: 任何培养时间均为黄色,菌落扩展快,菌落形态结构与 *B. mycoides* (1.856) 完全相同为逆时针弯曲的卷发状。菌落深入培养基中不易挑起,但与 1.856 不同之处是在含软琼脂的“U”形管中

培养,有运动性而鞭毛染色为负反应并有小而圆的少量伴孢晶体。产生的不稳定晶体对菜青虫无毒力(其他害虫未试)。其分类地位有待深入鉴定。另外“青 82”、7589 是否为 087 及 457 菌是否为 009 还是 087 尚难确定。Col 血清学反应与 016、306 菌同效价达 40960、023 菌为 640,其生化反应亦与 016、306 菌接近。但产色素、不发酵纤维二糖。77 与 087 菌反应效价为 20480,但生化反应有菌膜、脲酶,发酵蔗糖、甘露糖与 087 菌不同,且菌落有辐射状皱折。77 菌与 013 凝集效价很弱,在卵黄培养基上产粉红色色素。T₃ 有水杨苷、菌膜、脲酶、纤维二糖四项与 H_{11a}, 11b 不同。故 Col、77、T₃ 是否为其所属血清型中的新变种以及 L₂ “新”二菌的分类位置如何有待研究。

上述试验说明先用碘色反应法鉴定,再用生理生化、血清型法鉴定,其结果一致的菌有 56 株,难确定和不一致的菌有 6 株。一致的菌占 90% 以上。

4.在培养 1—4 天的苏芸金菌菌落中,菌体各生育期的分布与碘色反应的关系: 由菌落的外缘向中心分别取数点的菌体涂片染色(用石炭酸复红)观察表明,菌落中心的菌体处于芽孢释放期,外缘处于对数期。由中心向边缘依次为孢囊期和芽孢逐渐形成诸期。在此菌落上加碘色反应液后,不同变种菌落边缘的呈色反应特征为其对数期菌体所具有,中心为芽孢释放区所具有,中间系芽孢形成期和孢囊期的特点。但处于对数期的菌体呈色反应也非都是一种颜色,芽孢释放区等也是如此。这对探讨碘色反应的机理是有益的。

讨 论

从同属某一菌体生育期的不同变种的菌落部位,其呈色反应不尽相同,不同期的菌体也有差别,原碘液在光和空气中,可由棕黑色渐变为棕、黄、无色,容易被光解、氧化,再从植物显微化学上看,某些物质与碘液有不同呈色现象(如红淀粉、蓝淀粉),不同成份的物质构成植物某种细胞成份,有时也呈某种颜色^[2]等。碘色反应

的机制有可能是菌落不同部位、菌体各生育期的不同阶段,新陈代谢的物质成份有差异。在生理上可能是氧化还原电位也有差异。试验表明,单孢分离的菌落比点种的菌落的碘色反应性更清楚、稳定,说明由一个芽孢有规律的分裂形成的菌落能更好地反应碘色反应的特点。用碘色反应法检查菌种是否纯化时,经常发现某些菌株除多数菌落具有本身多色的反应外,还有少数全黄色菌落出现,这种菌落不加碘液用肉眼很难识别,其原因不得而知。碘色反应法为什

么多数菌株与血清法鉴定结果基本一致,有待进一步研究。少数菌株与血清法鉴定结果不一致的问题,也有待探讨。

参 考 文 献

- [1] 任改新等:微生物学报,15(4): 292—301, 1975。
- [2] Джапаридзе, Л. И.: Практикум по Микроскопической Химии Растений, Государственное Издательство "Советская Наука". 余名嵩译:《植物显微化学实验指导》,高等教育出版社,北京,1965, 17—39 页。