

几种细菌杀虫剂的菌种鉴定*

70 级工农兵学员杀虫菌鉴定小组 武汉染料厂青虫菌车间

(武汉大学生物系微生物专业, 武汉)

(武汉)

以鉴定为目的,对国内广泛使用的几种昆虫病原性产伴孢晶体芽孢杆菌: 青虫菌, 杀螟杆菌及 140 杀虫菌, 荆菌 II 号进行了形态、培养特性、生化反应、外毒素产生、抗原分析及酯酶分析等研究。上述各菌的生化反应、鞭毛抗原分析(140 菌无鞭毛抗原)、菌体抗原分析、酯酶电泳图型等特性,均与苏云金杆菌蜡螟变种(*Bacillus thuringensis* var. *galleriae*)相同。以微生物学方法测定上述各菌均能产生 β -外毒素。故青虫菌、杀螟杆菌、荆菌 II 号均鉴定为 *Bacillus thuringensis* var. *galleriae* 血清型 H₁, 酯酶型 5 *galleriae*; 140 菌鉴定为 *Bacillus thuringensis* var. *galleriae* (无鞭毛菌株)酯酶型 5 *galleriae*。对生化反应、抗原分析及酯酶分析的特点进行了比较和讨论,认为抗原分析具有特异性高及快速的优点。并认为菌体抗原同样具有变种特异性,也能用于该菌群的鉴定工作。

细菌杀虫剂对农、林、蔬菜和经济作物的某些虫害的防治效果是显著的。在毛主席革命路线指引下,在伟大的无产阶级文化大革命运动的推动下,群众性的生物防治工作已经广泛地开展起来。我国一些基层虫害防治人员及专业研究人员,分离出一批昆虫病原细菌。对这些细菌防治效果做了大量的实验。因此,菌种的分类鉴定就成为非常必要了。姜书勤、徐婉学^[1],湖北微生物研究所,中国科学院动物研究所昆虫病理组^[2],都曾对他们所收集分离的昆虫病原细菌,进行了生物学特性及分类鉴定的研究。

近年来,国外对苏云金杆菌各变种的分类鉴定工作有一些进展。除根据形态、培养特性及生化反应的鉴定外,还应用了抗原分析法和酯酶分析法。

de Barjac 和 Bonnefoi** 研究了苏云金杆菌各变种的鞭毛抗原,认为可分为

8 种血清型。Norris^[3] 证明了另一血清型。Krieg^[4,5] 报道了第 10, 第 11 血清型。

Norris^[3,6] 用淀粉凝胶电泳,研究苏云金杆菌各变种营养细胞的酯酶,证明不同变种的酯酶电泳,具有特定的图型。酯酶分析的结果,除血清型 H₁ 与 H₂ 具有相同的酯酶图型之外,与抗原分析结果在分类鉴定上都是一致的。

Heimpel^[7] 综合形态、培养特性、生化反应、 β -外毒素、血清学分型及酯酶分型等,提出了新的蜡螟杆菌(*Bacillus cereus*)菌群检索表。本实验按照该检索表以 H₁₋₉ 9 种血清型代表菌为对照菌株,对青虫菌、杀螟杆菌、140 杀虫菌和荆菌 II 号进行了比较和鉴定。

* J. R. Norris 教授赠送菌种,致以谢意。湖北微生物研究所多方帮助,表示感谢。

** 见参考资料 [3]。

本文 1974 年 4 月 1 日收到。

我们坚决贯彻执行毛主席的无产阶级教育方针,坚持走与工农兵相结合的道路,实行开门办学,厂校挂钩,联系生产实践,在批林批孔运动推动下,提出解决杀虫菌菌种鉴定问题,与武汉染料厂青虫菌车间工人、技术人员紧密结合,在教师指导下进行了毕业实践课题。在毕业实践中提高了分析问题和解决问题的能力,充分显示出毛主席无产阶级教育路线的强大威力,也是对那些诬蔑工农兵学员学习质量“今不

如昔”谬论的有力回击。

材料和方法

一、菌种

待鉴定菌种: CF 青虫菌原始菌种,武汉染料厂保存; 39 青虫菌抗噬菌体菌株,武汉染料厂保存; 140 杀虫菌 湖北微生物研究所 1969 年从湖北江陵棉花小造桥虫分离; 荆菌 II 号 湖北荆州农科所 1962 年分离自棉花金钢钻死亡幼虫; AS 1.189 (杀螟杆菌) 中国科学院微生物研究所保存。对照用菌种(见下表)。

菌号	菌名	血清型(H)
009	苏云金杆菌苏云金变种 [<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> Berliner (Mattes)]	1
021	苏云金杆菌幕虫变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>)	2
Alesti	苏云金杆菌阿莱变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>)	3
016	苏云金杆菌猝倒变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>)	4A
023	坚夷 (Kenya)	4B
087	苏云金杆菌蜡螟变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>)	5
010	苏云金杆菌杀虫菌变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>)	6
096	苏云金杆菌太平洋变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>pacificus</i>)	7
012	苏云金杆菌莫里逊变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>morrison</i>)	8
013	苏云金杆菌多窝变种 (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tolworth</i>)	9

以上菌种为 J. R. Norris 教授赠送。

二、生化反应

糖发酵试验按常规方法进行。葡萄糖、蔗糖、果糖 1%、海藻糖、纤维二糖、阿拉伯糖、水杨苷、木糖 0.5%, 以酸性复红为指示剂,制成糖发酵管。

七叶灵水解试验按 Sneath^[13]方法进行。七叶灵 0.3%, FeCl₃ 0.05%, 培养后萤光消失并出现棕色沉淀者为阳性反应, 无上述改变者为阴性反应。

上述糖及糖苷试验在培养 48、72 小时观察结果。某些菌种对某些糖的反应按检索表要求的时间观察结果。

V. P. 试验按常规进行。

磷酸酯酶试验按 McGaughey 和 Chu^[14]方法进行。以无菌手续吸取卵黄,按 2.5% (体积/体积) 加入溶化并冷至 45℃ 的营养琼脂中, 摇匀倒入平皿。同时按上述比例加卵黄于营养肉汤中, 分装试管。

将各试验菌分别接种卵黄平皿及卵黄肉汤

管, 30℃ 培养 24 小时。卵黄平皿菌落四周有混浊圈, 卵黄肉汤管上层出现乳白色混浊絮状物者为阳性反应。缺乏者为阴性反应。

三、β-外毒素

1. 培养基 按 Cantwell, Heimpel 和 Thompson^[10]方法配制, 并加入 0.05% 缬氨酸以刺激 β-外毒素的产生。

2. β-外毒素的制备 按 Rosenberg, Carlberg 和 Gyllenberg^[11]的方法制备。培养 24、48、72 小时后, 将培养液调至 pH 4.5, 离心, 取上清液减压浓缩至原体积 1/10, 118℃ 高压灭菌 15 分钟, 备用。

3. 微生物学试验 根据 Rosenberg, Carlberg 和 Gyllenberg^[11]报道, β-外毒素可以抑制黄色八叠球菌 (*Sarcina flava*) 和某些细菌的生长。其对黄色八叠球菌的抑菌能力, 与在 260nm 处吸收和以家蝇幼虫作生物试验所测定的量相符合。因而可用黄色八叠球菌作 β-外毒素的定量试验。

将黄色八叠球菌接种于营养琼脂斜面, 37℃ 培养 48 小时后, 细胞悬浮于 5 毫升无菌水中, 吸取 0.1 毫升菌液于 5 毫升琼脂中, 摇匀, 倒入已制备好的下层琼脂上。以杯碟法测定 β -外毒素对该菌的抑制能力。

四、鞭毛及运动性

1. 运动性试验 用半固体琼脂柱和半固体平皿观察运动性能。

2. 鞭毛染色试验 将 087、140 菌分别接种斜面, 置 30℃ 温箱中培养 7—9 小时后, 先用悬滴法观察运动能力。然后分别加入 5 毫升 1% 甲醛盐水, 将菌苔洗下, 各盛于小试管中供染色使用。以 Leifson 鞭毛染色法染色镜检。

3. 电镜观察* 按上述方法制备的 087、140 菌液, 滴加于电镜标本铜网火棉胶膜上, 以铬喷镀投影, 在电镜下观察有无鞭毛。

4. 140 菌无鞭毛抗原的证明 将 140 菌悬液加热 100℃ 1 小时作抗原, 吸收 140 抗血清中的抗体, 直到全部除去能凝集此加热抗原的抗体。然后以未加热的 140 菌液与吸收后的抗血清作凝集试验, 有凝集现象时证明有 H 抗原, 无凝集现象者没有 H 抗原。

五、抗原分析

1. H 抗原制备 参照 Norris^[2] 方法制备。活化用 0.3—0.5% 半固体琼脂。活化后细菌接种于 Oxoid 肉汤, 28℃ 振荡培养 8—10 小时。离心, 收集细菌, 悬浮于 0.25% 甲醛盐水中, 制成 1000—1500 亿/毫升菌液, 和相当于 Brown's 浊度管第 8 管浓度的抗原母液, 置冰箱保存。

2. O 抗原制备 细菌接种于 Oxoid 肉汤中, 振荡培养 28℃ 10 小时, 离心, 收集细菌。用盐水重新悬浮制成浓抗原, 水浴中煮沸 1 小时, 置冰箱保存。

3. 抗血清制备 抗原母液静注家兔, 第 1 次 0.5 毫升, 以后间日 1 次, 共 5 次, 每次 1 毫升, 最后 1 次注射后的第 5 天, 心脏采血, 分离血清, 保存于冰箱(不加保存剂)。

4. 凝集试验 按常规试管凝集试验进行。抗血清用倍比稀释法。抗原浓度为 Brown's 浊度管第 5 管, 各成分混匀后置 37℃, 4 小时后观察结果, 24 小时结果不变。

5. 凝集素吸收试验 抗血清浓度为 1:10,

抗原浓度为 1200 亿/毫升, 2 毫升 1:10 稀释抗血清加 0.2 毫升抗原, 置 37℃ 水浴中, 经常振摇, 保温 2 小时, 离心, 取上清液, 与吸收抗原作凝集试验, 以测定其是否吸收完全。如未吸收完全, 则重复吸收, 直至全部移去对该抗原的凝集素为止。以此吸收血清与同源抗原及有关抗原作凝集反应, 以测定其是否存在未被吸收的抗体。

六、酯酶分析

1. 缓冲液及染色液的制备 淀粉凝胶缓冲液和电泳槽缓冲液采用 Poulik^[12] 的不连续缓冲系统。淀粉凝胶缓冲液离子强度降低至原强度的 30%。

检出酶带所用染色液, 按 Norris 和 Burges^[6] 的方法制备。现配现用。

2. 酶液制备

(1) 研磨法: 细菌在 Oxoid 肉汤琼脂培养基上 30℃ 培养 16 小时, 以无菌蒸馏水洗下菌苔, 离心, 收集细胞, 加入相当于细胞体积 1—2 倍的 SiO₂, 置钵中, 在冰浴上研磨 30 分钟, 镜检无完整菌体后, 加入少量 tris-柠檬酸缓冲液以浸出其酯酶, 再置布氏漏斗中抽滤获得滤液, 3000 转/分离心 20 分钟, 上清液直接用于分析。

(2) 超声波法: 按上述方法培养和收集细胞, 用 CFS-80X 超声波发生器加聚能器裂解, 直到显微镜下观察 90% 以上细胞已裂解为止(通常 15—20 分钟), 裂解液离心沉淀, 上清液直接用于分析。

上述两种方法所制备的酶液所得结果相同。酶液置 4℃ 冰箱保存, 活力保持约 10 天。

3. 凝胶制备 试剂级马铃薯淀粉(中国医药公司上海药用辅料厂出品), 按 Smithies^[13] 方法制备凝胶。热淀粉凝胶一次倒入长 17 厘米, 宽 2.5 厘米, 高 0.6 厘米的有机玻璃槽中, 在室温下冷却凝固后当天使用。

4. 样品加入 在凝胶槽的负极大约 3 厘米处, 垂直于电场方向挖一长约 2 厘米、宽 0.3 厘米、深至底的小槽, 小槽中加入凝胶及酶液的混合物, 待凝固后, 胶板置电泳槽中, 以四层滤纸为桥联接凝胶板及电泳槽缓冲液, 盖上玻板, 以防失水。

5. 电泳 电位梯度 8—10 伏特/厘米, 电

* 由武汉大学生物系电镜室进行。

泳时有一棕色带以 2.0—2.5 厘米/小时的速度从阴极向阳极移动,当其移动到距样品槽 10 厘米时,停止电泳。一般 4—5 小时电泳即可完成。

6. 酯酶带的检出 电泳完成后,自凝胶槽内剥下凝胶板,水平方向平行切成 3—4 片(每片厚约 1—1.5 毫米),置染色液中染色。酶带在室温下(20℃左右)2 小时后染成紫红色带。按 Norris^[3] 所描述的方法记录酯酶带的 Ef 值。染色后的凝胶板用甲醇:冰醋酸:水=5:1:5 的固定液固定。在反射光下照相。

实验结果

一、生化反应

生化反应结果见表 1。

表 1 生化反应测定结果

菌种	结果	糖 发 酵							V. 磷酸脂酶 C	
		葡 萄 糖	蔗 糖	果 糖	阿 拉 伯 糖	海 藻 糖	水 杨 苷	木 糖		纤 维 二 糖
009	+	+	+	-	+	+	±	-	+	+
021	+	+	+	-	+	+	±	-	+	+
Alesti	+	-	+	-	+	±	-	-	+	+
016	+	+	+	-	+	±	-	-	+	+
023	+	+	+	-	+	±	-	-	+	+
087	+	-	+	-	+	±	-	-	+	-
010	+	+	+	-	+	±	-	-	-	-
096	+	+	+	-	+	±	-	±	+	+
012	+	+	+	-	+	±	-	±	+	-
013	+	+	+	-	+	±	-	-	+	+
CF	+	-	+	-	+	±	-	-	+	-
39	+	-	+	-	+	±	-	-	+	-
140	+	-	+	-	+	±	-	-	+	-
荆 II 号	+	-	+	-	+	±	-	-	+	-
1.189	+	-	+	-	+	±	-	-	+	-

+: 发酵; ±: 弱发酵或结果不定; -: 不发酵。

各变种对照菌株的生化反应结果除个别反应外,与 Heimpel^[7,14] 所述相符。按 Heimpel^[7] 的检索表,所有鉴定菌的生化反应均与 087 菌完全相同,初步证明各鉴定菌与 087 菌为同一变种。

但生化反应并不是经常可以区别开各

个变种的,甚至在严格的实验条件下各实验室的结果也不完全相符。例如 Heimpel^[14] 认为阿莱培养 6 天后可以发酵蔗糖产酸,而 Norris^[3], Barjac 与 Bonnefoi^[15] 和我们的结果均未发现产酸; Norris^[3] 认为 013 菌不能发酵蔗糖产酸,而 de Barjac 和 Bonnefoi^[15] 的检索表则认为能发酵蔗糖产酸,我们的结果与后者是一致的。

我们采用 McGaughey 和 Chu^[9] 的方法进行磷酸脂酶试验,方法简便,反应明显易辨。结果如图 1、图 2。

在肉汤中除 009 菌形成菌膜外,其余各菌均不形成菌膜。

二、β-外毒素试验结果

不同培养时间对 β-外毒素抑菌能力的影响结果见表 2。009, 012 和 013 三株

表 2 培养不同时间对 β-外毒素抑菌能力的影响

菌号	抑 菌 能 力 时 间		
	24 小时	48 小时	72 小时
009	+	+	-
012	+	+	-
013	+	+	-
CF	-	-	-
39	++	+	-
1.189	+	+	-
140	-	-	-
荆 II 号	++	++	-
021	-	-	-
Alesti	-	-	-

注: ++: 中等抑菌反应; +: 弱抑菌反应; -: 无抑菌反应。

菌为可以产生 β-外毒素的变种,有弱抑菌反应;不产生 β-外毒素的变种为 021 和 Alesti,不具有抑菌能力;39 和荆 II 号有较强的抑菌能力,39 号菌 24 小时培养物制备的 β-外毒素较 48 小时的为强;CF 和 140 无抑菌能力;1.189 仅有弱抑菌能力;所有各株的 72 小时培养物的清液,均无抑

菌能力。

Conner 和 Hansen^[16] 报道缬氨酸可以刺激 β -外毒素的产生。从表 3 可以看出,

表 3 缬氨酸对 β -外毒素产生的影响

菌号	抑菌能力	
	24 小时	48 小时
009	+	+
012	+	+
013	+	+
CF	+++	++
39	+++	++
1.189	+++	++
140	+++	++
荆 II 号	+++	++
021	-	-
Alesti	-	-

注: +++: 强抑菌反应; ++: 中等抑菌反应;
+: 弱抑菌反应; -: 无抑菌反应。

140, CF 加缬氨酸以后, 产生明显的抑菌能力; 39、1.189 和荆 II 号的抑菌能力有所提高; 但标准的不产生 β -外毒素的变种如 0.21、Alesti 仍不产生 β -外毒素。试验菌 24 小时培养物制备的 β -外毒素抑菌能力, 较 48 小时者为强。

我们同时也试验了金色小球菌 (*Micrococcus aureus*) 对 β -外毒素的敏感性, 结果与黄色八叠球菌完全相同。

β -外毒素对黄色八叠球菌的抑菌作用如图 3。

三、鞭毛及运动性

半固体琼脂柱穿刺接种, 半固体平皿点种。除 140 菌外, 其余各菌株均能在半固体琼脂柱及半固体平皿中扩散生长。特别是在半固体平皿中扩散极快, 培养 16 小时左右即可布满整个平皿。

鞭毛染色结果, 证明 087 菌具有周身鞭毛, 140 菌则无鞭毛。电镜观察结果完

全相同。

血清学方法也证明 140 菌是没有鞭毛抗原的。100℃ 1 小时处理的 140 抗原, 可以吸收全部 140 抗体。结果如表 4。

表 4 140 “O” 抗原吸收试验

抗血清	吸收抗原	抗 原	
		加热 140	未加热 140
140	加热 140	0	0
140	—	1280	2560

注: 表中数字为凝集效价。

上述结果证明, 140 菌是没有鞭毛的。

140 菌虽与幕虫杆菌弗雷变种 (*Bacillus finitimus* var. *fowleri*) 一样没有鞭毛, 但湖北微生物所的工作证明, 它对鳞翅目昆虫的幼虫有毒力, 伴孢晶体在培养 24 小时后即与芽孢分离, 故仍应属于苏云金杆菌的变种。

四、抗原分析

1. H 抗原分析 各血清型对照抗血清, 抗原及各鉴定菌 (除 140 菌外) 的抗血清, 抗原之间的交叉凝集反应结果如表 5。

各抗血清与其同源抗原均有很高的凝集效价。除 096 抗血清与 009 抗原有很弱交叉反应外, 其余各对照血清型抗原、抗体, 反应均为特异性的。

表 5 结果表明, 087 抗血清及 087 抗原, 与各鉴定菌均有强烈交叉反应。为证明各鉴定菌是否与 087 为同一血清型, 设计了下列交叉吸收试验, 结果如表 6。

各鉴定菌抗原可以全部吸收 087 抗血清中的 087 凝集素, 同时 087 抗原也可以全部吸收各鉴定菌的抗血清中的凝集素。足见各鉴定菌均与 087 菌属于同一血清型。

2. O 抗原分析 通过运动性、鞭毛染色、电镜观察及血清学分析, 结果均证明 140 菌缺乏鞭毛, 故不可能作 H 血清型鉴

表 5 交叉凝集试验结果

抗 体 \ 效 价 抗 原	009	021	Alesti	016	023	087	010	096	012	013	CF	39	1.189	荆 II
009	20480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
021	0	20480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alesti	0	0	20480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
016	0	0	0	20480	640	0	0	0	0	0	0	0	0	0
023	0	0	0	640	20480	0	0	0	0	0	0	0	0	0
087	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	20480	20480	20480	20480
010	0	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	0	0	0
096	160	0	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	0	0
012	0	0	0	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	0
013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0
CF	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	20480	10240	10240	20480
39	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	5120	20480	20480	5120
1.189	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	20480	20480	20480	20480
荆 II	0	0	0	0	0	20480	0	0	0	0	20480	20480	20480	20480

表 6 交叉吸收试验结果

抗 血 清	吸 收 菌	试 验 菌	凝 集 效 价
087	1.189	1.189	0
		087	0
	CF	CF	0
		087	0
	39	39	0
		087	0
	荆 II	荆 II	0
		087	0
1.189	087	087	0
1.189		0	
CF	087	087	0
		CF	0
		087	0
39	087	087	0
		39	0
荆 II	087	087	0
		荆 II	0

表 7 是各对照血清型细菌的抗血清及鉴定菌的抗血清,与 140 菌的 O 凝集试验。各同源抗原均加热 100℃ 1 小时,以破坏其 H 抗原。

表 7 说明 140 抗原与各鉴定菌的抗血清,均有较高的凝集效价,与各对照血清型

表 7 140 抗原与各血清 O 凝集试验

抗 体 \ 效 价 抗 原	抗 原	
	140	同源抗原
009	0	640
021	0	320
Alesti	0	1280
016	0	2560
023	0	2560
087	2560	2560
010	0	2560
096	0	1280
012	0	1280
013	0	1280
140	2560	2560
CF	2560	2560
39	1280	2560
1.189	2560	2560
荆 II	2560	5120

定,但考虑到 140 菌的 O 抗原可能与某些菌有共同的抗原性,因此进行 O 抗原分析。

细菌的抗血清, 除 087 抗血清外, 均无反应。证明 140 抗原与各鉴定菌及 087 菌, 有共同抗原性。

为了探讨 140 抗原与有交叉反应各菌的亲缘关系, 以有关各菌分别吸收 140 抗血清后, 以 140 抗原测定其凝集效价, 并以 140 抗原分别吸收有关各菌抗血清后, 以同源抗原测定其凝集效价, 结果如表 8。

表 8 O 交叉吸收试验

抗血清	吸收菌	试验菌	效价	
140	087	087	0	
		140	0	
	CF	CF	0	
		140	0	
	39	39	0	
		140	160	
	1.189	1.189	0	
		140	0	
	荆 II	荆 II	0	
		140	0	
	087	140	140	0
			087	0
CF	140	140	0	
		CF	0	
39	140	140	0	
		39	320	
1.189	140	140	0	
		1.189	0	
荆 II	140	140	0	
		荆 II	0	

140 抗血清可以被 087、CF、1.189 和荆 II 号全部吸收其对 140 菌的抗体。同时上述各菌的抗体也可以被 140 抗原所全部吸收, 故证明 140 菌与 087、CF、1.189 和荆 II 号的抗原完全相同。因此 140 菌应当

是 087 的无鞭毛菌株。

39 菌抗原不能全部吸收 140 抗体, 140 抗原也不能全部吸收 39 抗体, 故设计抗原分析, 以确定 39、140 菌的抗原成分。结果见表 9。

表 9 O 抗原分析

抗血清	吸收菌	试验菌		抗原成分
		140	39	
140	不吸收	2560	320	A. B.
	39	80	0	
39	不吸收	320	2560	A. C.
	140	0	160	

O 抗原分析结果指出, 140 菌和 39 菌有共同抗原 A, 140 菌有 39 菌所不具有的抗原 B, 39 菌具有 140 菌所不具有的抗原 C。由于 140 菌与 CF、荆 II 号、087、1.189 具有完全相同的 O 抗原, 因此, 39 菌的 O 抗原成分与 087、140、荆 II 号、CF、1.189 各菌均有相同的关系, 即 087、140、荆 II 号、CF 各菌的抗原式为 AB, 而 39 菌的抗原式为 AC。

五、酯酶分析

各鉴定菌的酯酶图型均与 087 的酯酶图型相同, 如图 4。Ef 值为 38, 56, 71, 84, 87。必须指出酶活力较低的 Ef 值 38 的带, 并不是经常明显的。

综合上述实验结果, 对各菌鉴定如下:

青虫菌(CF、39)、杀螟杆菌(AS1.189)、荆菌 II 号定名为: *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* 血清型 H₅、酯酶型 5 *galleriae*。

140 杀虫菌定名为:

Bacillus thuringiensis var. *galleriae* (non-flagellum strain)、酯酶型 5 *galleriae*。

讨 论

测定微生物的生化反应, 一般来说, 具

有简便易行的优点。但在亲缘关系较近的种及变种之间,由于生化反应仅有极小的差别,因此个别生化反应的误差即足以导致错误的鉴定。

血清学反应具有高度的特异性。本报告的实验结果进一步说明血清学反应,作为分类鉴定的手段具有极高的鉴别能力。在亲缘关系极近的变种之间,抗原性仍然是特异的。除 096 抗血清与 009 抗原有极微弱的交叉反应外,其余各血清型均有极高的特异性。

在鉴定的 5 株菌中,140 菌无鞭毛,形态上与其它各菌有极大的差别,但 O 抗原分析,它与苏云金杆菌蜡螟变种的 O 抗原完全一样,证明它应当是苏云金杆菌蜡螟变种的无鞭毛菌株。O 抗原分析结果说明,有可能与 H 抗原分析一样,应用于该菌群的分类鉴定。

39 菌的抗原分析更证明了血清学反应的特异性和灵敏性。39 菌的生化反应及酯酶图型与苏云金杆菌蜡螟变种一样, H 抗原也相同,但由于它是苏云金杆菌蜡螟变种的抗噬菌体菌株,细胞表面噬菌体吸附的接受器有所改变。因此,在 O 抗原分析时,表现在它与 H₂ 血清型有共同的抗原,也有不同的抗原。这个不同的抗原成分,可能是反映了消失的噬菌体接受器和改变了的细胞表面结构。

酯酶分析提供了苏云金杆菌菌群不同结构酯酶的知识。不同菌种虽都具有酯酶,由于该酶的结构不同而具有分类鉴定的价值。它比一般生化反应具有较高的特异性。但对实验条件要求较严格。我们的实验结果与 Norris^[3] 的结果比较, Ef 值有微小差别。可能是由于实验条件不完全相同所致。

只有在特定的条件下 Ef 值的再现性才是稳定的。因此,酯酶的凝胶电泳分析应在对照酯酶型菌种对照下进行为宜。

必须指出在有对照血清的情况下,在收到细菌纯培养后,只需数分钟就可以用玻片凝集试验做出初步鉴定,试管凝集反应也只需四小时就可以得到结果。在速度方面血清学反应也大大超过生化试验及酯酶分析。

参 考 文 献

- [1] 姜书勤,徐婉学:微生物学报, 11:298—310, 1965.
- [2] 中国科学院动物研究所昆虫病理组:昆虫学报, 16:1, 91—93, 1973.
- [3] Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.* 27:439—447, 1964.
- [4] Krieg, A., de Barjac, H., Bonnefoi, A.: *J. Insect. Path.* 10:428—429, 1968.
- [5] Krieg, A.: *J. Insect. Path.* 14:279—281, 1969.
- [6] Norris, J. R., Burges, H. D.: *J. Insect. Path.* 5:460—472, 1963.
- [7] Heimpel, A. M.: *J. Insect. Path.* 9:364—375, 1967.
- [8] Sneath, P. H. A.: *J. Gen. Microbiol.* 15:70—98, 1965.
- [9] McGaughy, C. A., Chu, P. H.: *J. Gen. Microbiol.* 2:334—340, 1948.
- [10] Cantwell, G. E., Heimpel, A. M., Thompson, M. J.: *J. Insect. Path.* 6:466—480, 1964.
- [11] Rosenberg, G., Carlberg, G., Gyllenberg, H. G.: *J. Appl. Bact.* 34:419—423, 1971.
- [12] Poulík, M. D.: *Nature*, 180:1477—1479, 1967.
- [13] Smithies, O.: *Biochem. J.* 61:629—641, 1955.
- [14] Heimpel, A. M., Angus, T. A.: *Canad. J. Microbiol.* 4:531—541, 1958.
- [15] de Barjac, H., Bonnefoi, A.: *J. Insect. Path.* 11:335—347, 1968.
- [16] Conner, R. M., Hansen, P. A.: *J. Insect. Path.* 9:114—125, 1967.

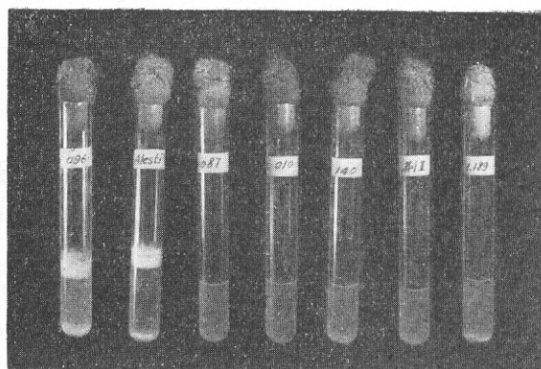
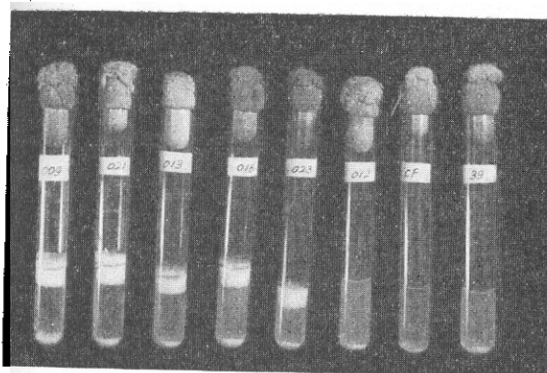


图1 卵黄肉汤管磷酸脂酶反应

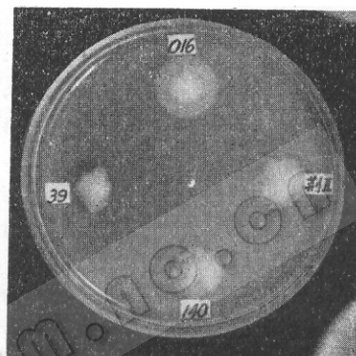
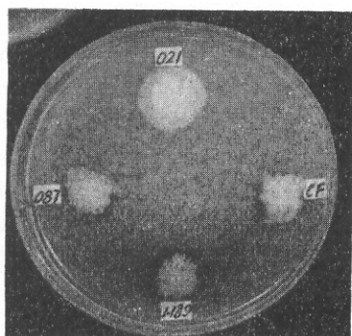


图2 卵黄平皿磷酸脂酶反应

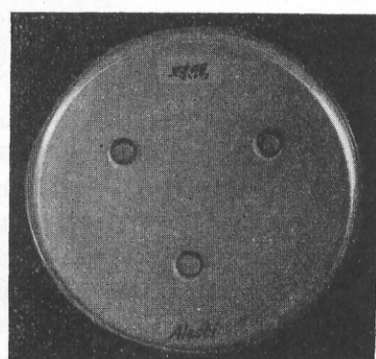
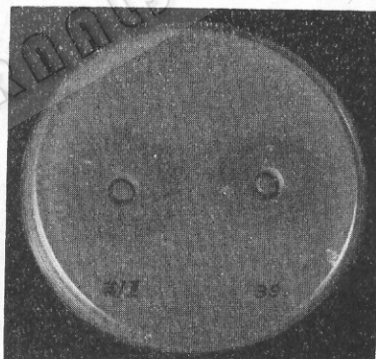
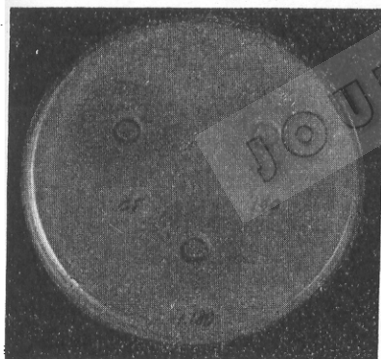


图3 β -外毒素对黄色八叠球菌的抑菌作用

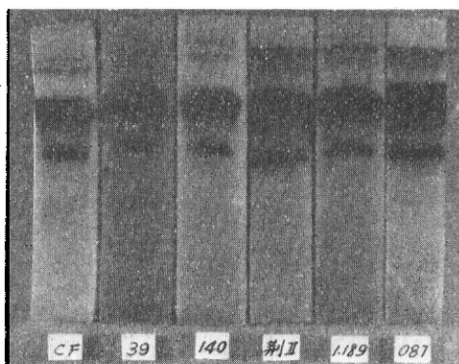


图4 各鉴定菌及087菌的酯酶电泳图型

IDENTIFICATION OF SOME STRAINS OF CRYSTAL-FORMING BACTERIA PATHOGENIC TO INSECTS

WORKER-PEASANT-SOLDIER STUDENTS

(Microbiological Laboratory, Department of Biology, Wuhan University, Wuhan)

WUHAN DYE FACTORY

(Wuhan)

Five isolates of Protein crystal-forming bacteria pathogenic to insects were identified on the basis biochemical reaction, flagellar antigens, somatic antigens, and esterase patterns which were obtained when cell extracts were analysed by electrophoresis in starch gel.

All of the five isolates had the same biochemical reactions and esterase pattern as those of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, and had the same flagellar antigens as those of "galleriae", but isolates No. 140, which had no flagellum, was an exception.

The isolates studied had the somatic antigens except isolate No. 39 which is resistant to phage, attacking strain CF. AB and AC denote the antigenic formula of strain CF and isolate No. 39 respectively. The analysis of somatic antigens of these bacteria therefore can be also applied to taxonomic purposes.

The significance of biochemical reac-

tions, antigenic analysis and esterase patterns was discussed. According to our experimental results the specificity of antigenic analysis is more discriminative than biochemical reactions and esterase patterns in identification, notably in subspecies identification.

All the five isolates had the ability to produce β -exotoxin detectable with microbiological method (Rosenberg et al. 1971) and this agrees with the result of Cantwell et al. (1964).

The five isolates were identified as follows:

(1) Isolates CF, 39, *Galleriacidus bacillus* (AS 1.189) and Jim 2 bacillus were identified as *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, serotype H_s, esterase pattern 5 *galleriae*.

(2) Isolate No. 140 were identified as *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* (non-flagellum strain), esterase pattern 5 *galleriae*.