

热解气相色谱法鉴定苏芸金芽孢杆菌亚种初报

李兆麟* 胡连生 戴莲韵* 齐玉臣

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

用热解气相色谱法鉴定苏芸金芽孢杆菌已知亚种的 19 个菌株, 这些亚种的大多数都能得到有明显差异的“指纹图”。说明用这一方法鉴定这类细菌是可能的。文中还对用于鉴定这类细菌的热解温度, 色谱柱条件等进行了探讨。

用热解气相色谱法鉴定微生物, 是六十年代后出现的一项微生物分类鉴定的技术^[1]。1961 年, V. I. Oyama 首先提出了这一概念。随后, Eugene Reiner 等许多人在用热解气相色谱法鉴定微生物方面做了大量工作。^[1-3, 5, 6, 8-16]

也有人, 如 Fontanges 等 (1967)^[4], 对此方法持怀疑和否定态度, 认为从分类鉴定的角度来看这一方法的分辨能力是不够的。

本文报道的是作者在整理和普查我国苏芸金芽孢杆菌资源时, 就我们现有的仪器条件探讨用热解气相色谱法鉴定苏芸金芽孢杆菌亚种的初步结果。从目前国内外仪器发展的水平看, 进一步提高和完善这一结果还是有可能的。

材料和方法

(一) 菌株和仪器设备

试验中所用的菌株共 27 株, 其中 19 株在本试验中做为标准菌株, 包括 H. de Barjac 博士鉴定的苏芸金芽孢杆菌的 18 个亚种和 1 株引自中国科学院动物研究所的我国分离到的苏芸金芽孢杆菌玉米螟亚种(表 1)。其它 8 株为待定菌株, 分别为本组分离得到和引自其它兄弟单位(表 2)。

将活化好的上述菌株接种于无菌的克氏瓶中的固体培养基上。固体培养基为: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 琼脂 2%, pH 7.5。于 28—30℃ 温箱中培养 16 小时后, 用 0.5% 福尔马林固定, 然

后用无菌水将细菌营养细胞洗下, 离心 (4000 转/分) 20 分钟, 如此洗涤三次。将洗好的菌体分别放入安瓿管中, 立即用液氮冷冻, 待真空干燥后封口, 放于冰箱中备用。试验用的气相色谱仪为日本岛津产 GC-5A 型及附件 PYR-2A 型管炉式热解器。

(二) 方法

取上述样品 1 毫克放入热解器的样品舟中。使样品松散地在舟中均匀分布。热解炉温度预先稳定在 660℃。进样后, 样品舟先在热解炉进口处停留 1 分钟(待载气将热解管内空气吹走)。热解时间为 10 秒, 随即降温至 175℃, 进样口温度 225℃。色谱柱为不锈钢柱, 长 2.5 米, 内径 3 毫米, 填充涂有 15% 聚乙二醇 (分子量为二万) 的 80—100 目的 Anakrom ABS。程序升温: 110℃ 以下为 6℃/分, 110—210℃ 为 8℃/分, 起始温度尽量保持一致。载气, 氮 60 毫升/分, 氢 50 毫升/分, 空气 900 毫升/分。用氢火焰离子化鉴定器检测。记录仪满量程 1 mv, S = 10, R = 16, 纸速 0.5 厘米/分。

结果和讨论

在前述条件下, 苏芸金芽孢杆菌的指纹图中(图 1) 第 12; 第 26、28 和 29; 第 36 和 37 这三组峰的峰高, 彼此间的比例因亚种而不同, 不仅在连续试验中经十几

本文于 1980 年 4 月 21 日收到。

本文承方肇伦先生审阅, 样品制备得到谢锡锡同志大力协助, 特此致谢。参加具体操作的还有杨建秋同志。

* 现调中国林业科学院林业研究所工作。

表1 试验用对照菌株 (*Bacillus thuringiensis*) 一览

菌 种	血清型	菌 种	血清型
1. 苏芸金芽孢杆菌苏芸金亚种 <i>B. t. subsp. thuringiensis</i>	H ₁	11. 苏芸金芽孢杆菌亚毒亚种 <i>B. t. subsp. subtoxicus</i>	H ₆
2. 苏芸金芽孢杆菌幕虫亚种 <i>B. t. subsp. finitimus</i>	H ₂	12. 苏芸金芽孢杆菌帖泽亚种 <i>B. t. subsp. aizawai</i>	H ₇
3. 苏芸金芽孢杆菌阿莱亚种 <i>B. t. subsp. alesti</i>	H _{3a}	13. 苏芸金芽孢杆菌莫氏亚种 <i>B. t. subsp. morrisoni</i>	H ₈
4. 苏芸金芽孢杆菌库尔斯塔亚种 <i>B. t. subsp. kurstaki</i>	H _{3ab}	14. 苏芸金芽孢杆菌多窝亚种 <i>B. t. subsp. tolworthi</i>	H ₉
5. 苏芸金芽孢杆菌碎倒亚种 <i>B. t. subsp. sotto</i>	H _{4ab}	15. 苏芸金芽孢杆菌晒肠亚种 <i>B. t. subsp. darmstandiensis</i>	H ₁₀
6. 苏芸金芽孢杆菌松蠹亚种 <i>B. t. subsp. dendrolimus</i>	H _{4ab}	16. 苏芸金芽孢杆菌托氏亚种 <i>B. t. subsp. toumanoffi</i>	H ₁₁
7. 苏芸金芽孢杆菌肯尼亚亚种 <i>B. t. subsp. kenya</i>	H _{4ac}	17. 苏芸金芽孢杆菌汤氏亚种 <i>B. t. subsp. thompsoni</i>	H ₁₂
8. 苏芸金芽孢杆菌蜡螟亚种 <i>B. t. subsp. galleriae</i>	H _{5ab}	18. 苏芸金芽孢杆菌以色列亚种 <i>B. t. subsp. israelensis</i>	H ₁₄
9. 苏芸金芽孢杆菌加拿大亚种 <i>B. t. subsp. canadensis</i>	H _{5ac}	19. 苏芸金芽孢杆菌玉米螟亚种 <i>B. t. subsp. ostriniae</i>	H _{1a}
10. 苏芸金芽孢杆菌杀虫亚种 <i>B. t. subsp. entomocidus</i>	H ₆		

表2 待定菌株一览表

菌 株	寄 主	来 源
虫菌3号	银纹夜蛾幼虫 <i>Plusia criosoma</i>	河南省农业科学院植保所
林 001	油松毛虫幼虫 <i>Dendrolimus tabulaeformis</i>	本组 1973 年采自辽宁周家店林场
林 002	舞毒蛾幼虫 <i>Lymantria dispar</i>	本组 1973 年采自沈阳东陵
林 007	油松毛虫幼虫	本组 1973 年采自沈阳马刚林场
林 010	粘虫幼虫 <i>Leucania separata</i>	大连师范学院
林 011	玉米螟幼虫 <i>Ostrinia nubilalis</i>	大连师范学院
48-25		广东省微生物研究所
140	棉花小造桥虫 <i>Anomis flava</i>	中国科学院武汉病毒所

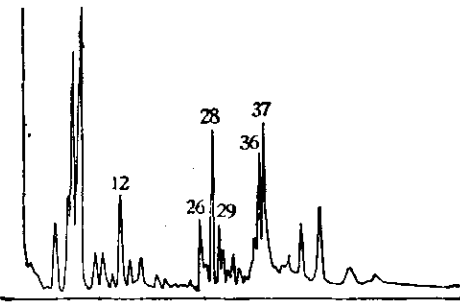


图1 苏芸金芽孢杆菌玉米螟亚种 (*B. t. subsp. ostriniae*) 指纹图

次重复试验,菌株的指纹图是稳定的,可重复的,在间隔一年多时间后重复前述条件,谱图仍然稳定。根据上述三组特征峰,试验中的 19 个苏芸金芽孢杆菌亚种,按照第 12 峰的突出与否,以及第 36 与 37 峰的比例,可以明显地将苏芸金芽孢杆菌亚种的指纹图归为三类,其中除幕虫、阿莱等几个亚种外,大多数亚种均有明显的差异,他们彼此间的区别如下:

- I. 第 12 峰突出,其峰高大于附近峰的 2 倍(图 1, 图 2-1-4)
 - 1. 第 12 峰高出附近峰 3.5 倍以上 莫氏亚种(图 2-1)
 - 2. 第 12 峰高出附近峰 2 倍以上,但不超过 3 倍
 - A. 第 37 峰高于 36 峰
 - a. 第 26 峰峰高不及第 28 峰的 1/3, 低于第 29 峰..... 汤氏亚种 (图 2-2)
 - b. 第 26 峰峰高达第 28 峰的一半, 高于第 29 峰..... 玉米螟亚种 (图 1)
 - B. 第 36 峰高于第 37 峰
 - a. 第 26 峰低于第 28 峰的 1/4. 第 37 峰低于第 36 峰的 1/2 以色列亚种 (图 2-3)
 - b. 第 26 峰峰高在第 28 峰的 1/3 以上, 第 37 峰峰高大于第 36 峰的 1/2 托氏亚种 (图 2-4)
- II. 第 12 峰峰高与附近峰基本一致
 - 1. 第 36 峰高于第 37 峰(图 2-5-6, 图 3)
 - A. 第 37 峰呈突起状, 峰高不及第 36 峰的 1/10
 - a. 第 26 峰高于第 28 峰的 1/4 蜡螟亚种 (图 2-5)
 - b. 第 26 峰低于第 28 峰的 1/5. 第 37 峰后

- 有一稳定的小突起 杀虫亚种 (图 3-7)
- 亚毒亚种 (图 3-8)
- B. 第 37 峰呈尖峰, 但峰高低于第 36 峰的 1/3 肯尼亚亚种 (图 3-9)
- C. 第 37 峰峰高大于第 36 峰的 1/2
 - a. 第 26 峰峰高可达第 28 峰的一半 苏芸金亚种 (图 3-10)
 - 姑泽亚种 (图 3-11)
 - b. 第 26 峰低于第 28 峰的 1/4, 并显著低于第 29 峰 猝倒亚种 (图 3-12)
- 2. 第 37 峰高于第 36 峰 (图 4)
 - A. 第 28 峰突出, 峰高大于第 37 峰 多窝亚种 (图 4-13)
 - B. 第 28 峰正常, 不高于第 37 峰
 - a. 第 26 峰峰高达第 28 峰的一半, 并高于第 29 峰 加拿大亚种 (图 4-14)
 - b. 第 26 峰峰高小于第 28 峰的 1/3, 并低于第 29 峰 (图 4-15-19) 幕虫亚种; 阿莱亚种; 库尔斯塔亚种; 松蠹亚种; 栖肠亚种

8 个待定菌株用热解气相色谱法鉴定的结果, 其中的 7 株与蜡螟亚种的指纹图一致(图 2-6), 经多次重复, 谱图稳定。这些结果与用常规方法和用酯酶型法对这些菌株鉴定的结果相符(李兆麟等: 圆盘电泳在苏芸金芽孢杆菌变种鉴定上的应用, 1980, 林土集刊, 印刷中)。但从河北植保所引进的虫菌 3 号菌株谱图与上述 7 株有明显差异, 用其它方法鉴定这一菌株也应属于蜡螟亚种, 其原因需进一步分析研究。

在试验过程中, 我们还对热解温度, 色谱柱条件等进行了探讨。

在我们现有的仪器条件下, 热解温度从 950℃ 开始试验。在这一温度范围内指纹图中找不到稳定的特征峰, 谱图的重复性也不好。考虑到样品在炉中二次热解等因素的影响, 我们逐渐降低了热解温度, 最后找出了 660℃ 这一对苏芸金芽孢杆菌比较合适的热解温度。并通过实验证明当温度高于 700℃ 或低于 500℃ 时, 前述三组特征峰均显现不出, 亚种谱图间的差异也在消失。在试验中, 有一段时间突然发现同

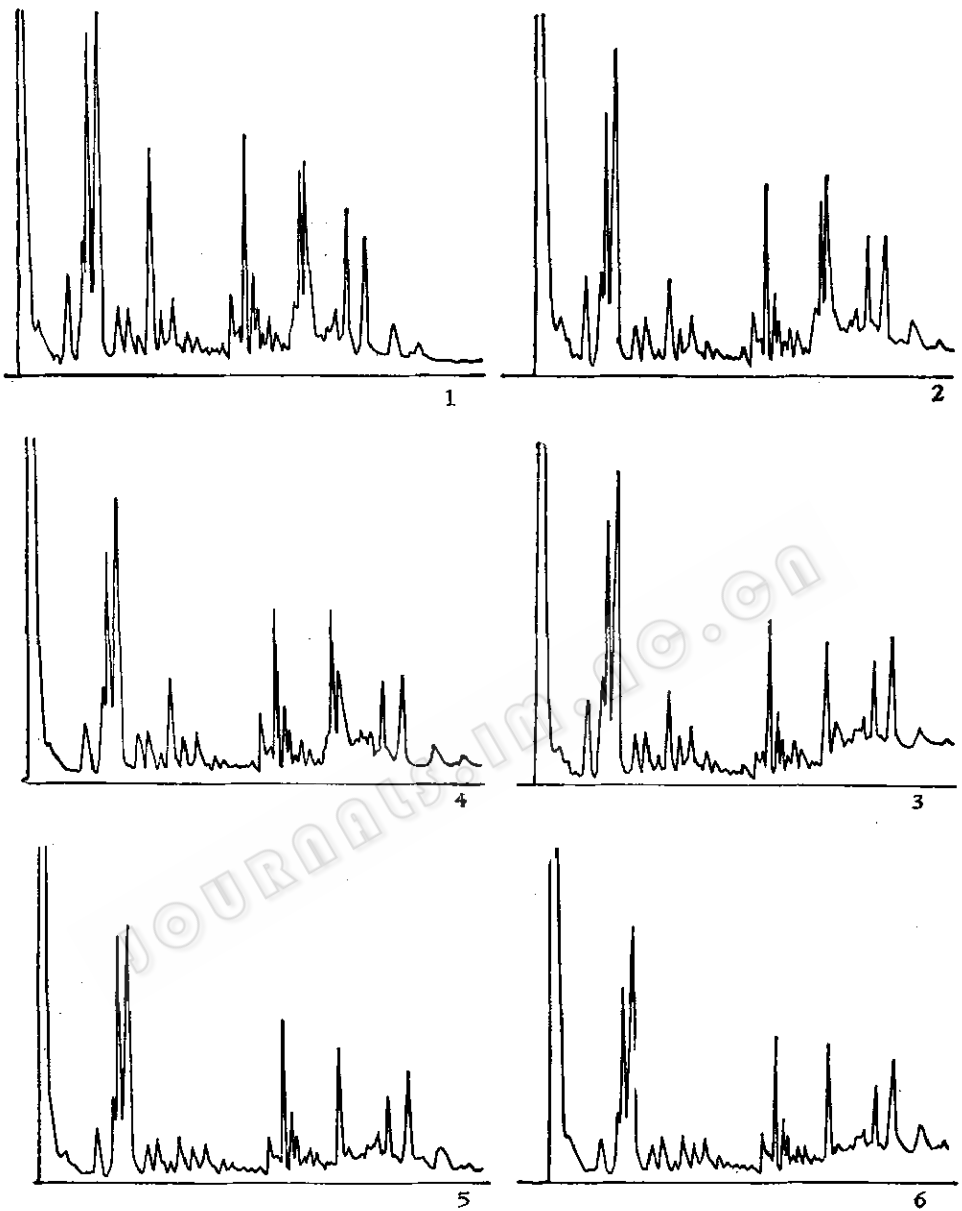


图2 苏芸金芽孢杆菌部分亚种指纹图

1. *B. s. subsp. morrisoni*; 2. *B. s. subsp. thompsoni*; 3. *B. s. subsp. israelensis*; 4. *B. s. subsp. toumanoffi*; 5. *B. s. subsp. galleriae*; 6. *B. s. subsp. galleriae*.

一菌株得不到稳定的指纹图，我们对试验的各个环节逐项进行了分析，最终发现炉温控制部份出现故障。热解温度的波动可达 30℃，当更换了原件，炉温不再波动后，谱图又回复了稳定。这一插曲从反面证明

了热解温度稳定的重要性。

关于色谱柱，现用的为内径 3 毫米，长 2.5 米的不锈钢柱，加长一倍，分辨力无明显的提高，除分析时间拖长外，谱图与柱子不加长的基本一致。固定液在用分子量为

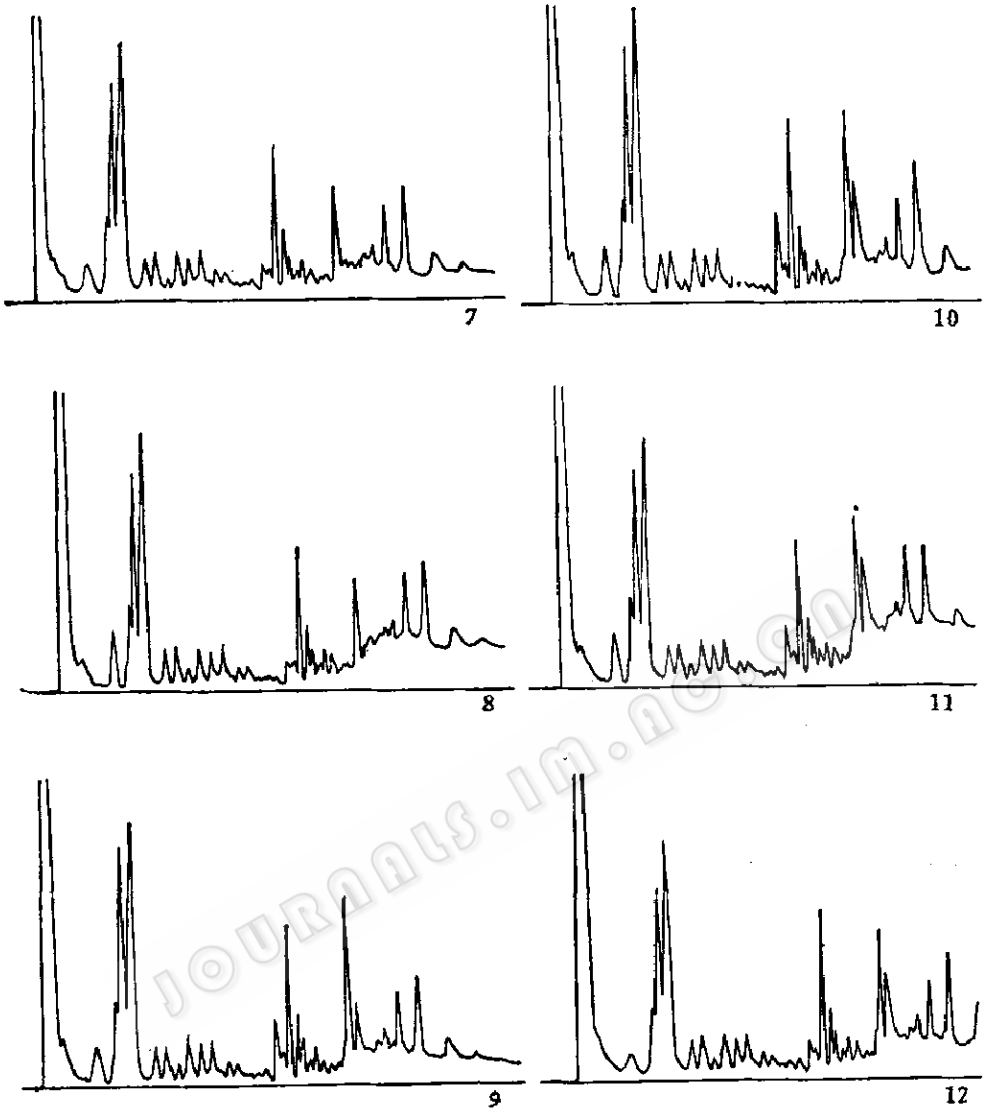


图3 苏芸金芽孢杆菌部分亚种指纹图

7. *B. t.* subsp. *entomocidus*; 8. *B. t.* subsp. *subtoxicus*; 9. *B. t.* subsp. *kenyae*; 10. *B. t.* subsp. *thuringiensis*; 11. *B. t.* subsp. *aizawai*; 12. *B. t.* subsp. *sotto*.

二万的聚乙二醇时，浓度以 15% 的为最好。在试验中，不同时间装过三支柱子，编号 4、11 和 16，其中 4 号和 16 号柱，谱图虽略有差异，但主要特征峰均可重复。说明用热解气相色谱法鉴定微生物对色谱柱的要求并不太苛刻。16 号柱使用了一年多，谱图仍然稳定，重复性良好。当然色谱柱的分辨力如能提高，更多地确定特征峰

对鉴定更为有利。

柱温，在高温区（100℃ 以上）程序升温的起始温度对谱图无明显影响，但在低温区（80℃ 以下）起始温度对峰形，峰数和峰位都有很大影响。如起始温度低于 35℃ 或高于 65℃，则不仅限于低温区，对整个谱图都有明显影响。由于我们现用的仪器程序升温部件没有低温控制装置，在试验

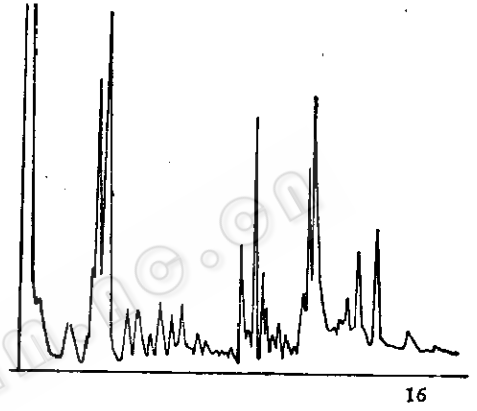
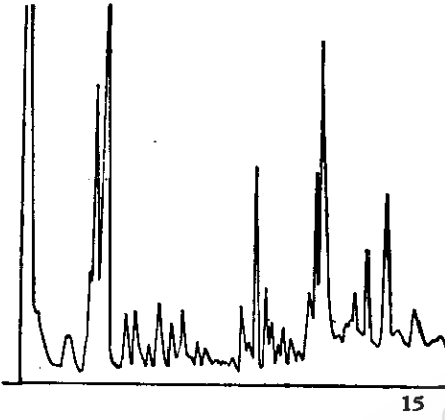
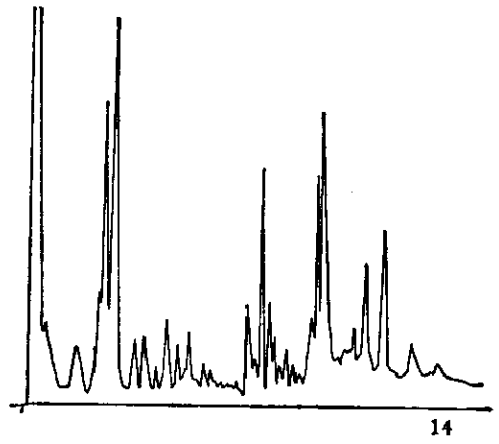
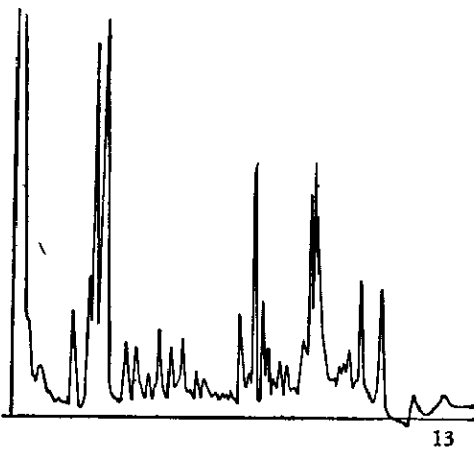


图4 苏芸金芽孢杆菌部分亚种指纹图

13. *B. t.* subsp. *tolworthi*; 14. *B. z.* subsp. *kurstaki*; 15. *B. t.* subsp. *finitimus*;
16. *B. t.* subsp. *canadensis*.

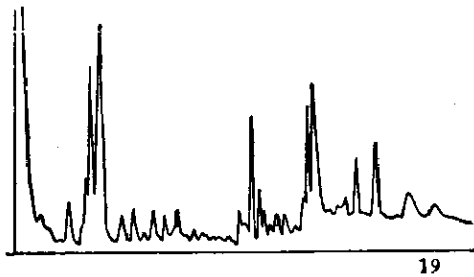
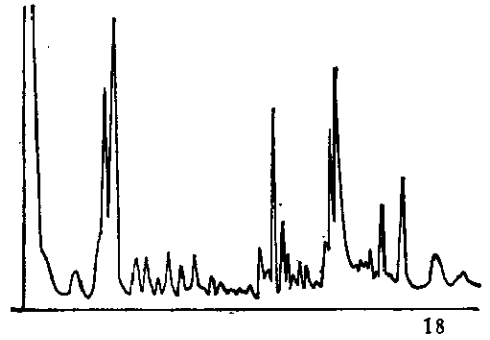
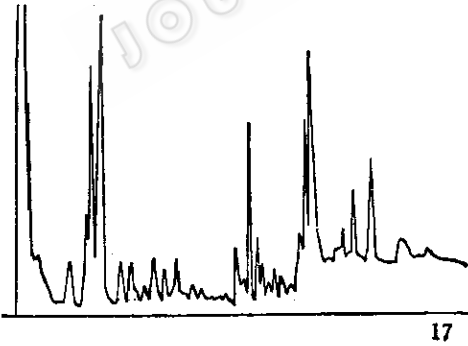


图5 苏芸金芽孢杆菌部分亚种指纹图

17. *B. t.* subsp. *alesti*; 18. *B. z.* subsp. *dendrolimus*; 19. *B. t.* subsp. *darmstandiensis*.

中虽对起始温度力求一致,但由于环境的影响,很难做到恒定。因此,我们在分析指纹图时 80°C 以前出现的谱图未予考虑。在前述条件下,19 个苏芸金芽孢杆菌亚种中还有几个亚种的指纹图在它们之间尚未找到明显的差异。如能在程序升温上加以改进,使得起始温度得以恒定,整个指纹图得以全面分析,可以设想,即使在现有条件下,区分所有的苏芸金芽孢杆菌的亚种也是有可能的。

总之,上述结果说明在现有条件下,用热解气相色谱法鉴定苏芸金芽孢杆菌的亚种并不完善,但显示出这一方法在这类细菌鉴定上应用的可能性。这一方法不仅省时、快速,还为这类细菌过渡到使用现代技术进行自动化的鉴定展现了前景。

参 考 文 献

[1] Burns, D. T. et al.: *J. Chromatography*, 116: 107, 1976.

- [2] Carmichael, J. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 19: 403, 1973.
- [3] Cone, R. D. and R. V. Lechowich: *Appl. Microbiol.*, 19: 138, 1970.
- [4] Fontanges, R. et al.: *Ann. Inst. Pasteur*, 112: 10, 1967.
- [5] Haddadin, J. M. et al.: *Appl. Microbiol.*, 25: 40, 1973.
- [6] Huisin't W. et al.: *Appl. Microbiol.*, 26: 92, 1973.
- [7] Maugh, II, T. H.: *Science*, 191(4272): 1403—47, 1976.
- [8] Menge, F. M. et al.: *Anal. Chem.*, 44: 423, 1971.
- [9] Oyama, V. I. and G. C. Carle: *J. Gas Chromatography*, 5: 151, 1967.
- [10] Reiner, E.: *Nature*, 206: 1272—4, 1965.
- [11] Reiner, E.: *J. Gas Chromatography*, 5: 65—7, 1967.
- [12] Reiner, E. and W. H. Ewing: *Nature*, 217: 191, 1968.
- [13] Reiner, E. et al.: *Anal. Chem.*, 44: 1058, 1972.
- [14] Simmonds, P. G.: *Appl. Microbiol.*, 20: 567, 1970.
- [15] Stretton, R. J. et al.: *J. Chromatography*, 129: 321—8, 1976.
- [16] Vincent, P. G. and M. M. Kulic: *Appl. Microbiol.*, 20: 957, 1970.

A PRILIMINARY REPORT ON THE IDENTIFICATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSPECIES BY PYROLYSIS GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

Li Chaolin Hu Liansheng Dai Lianyun Qi Yuchen
(*Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica, Shenyang*)

Using pyrolysis gas-liquid chromatography (PGLC) it was possible to identify the subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Under the following experimental conditions, most of the fingerprintings by PGLC of 19 subspecies of *Bacillus thuringiensis* were distinguished from one another.

The analyses were performed on a Shimadzu GC-5A gas chromatograph fitted with a PYR-2A pyrolysis module. Pyrolysis temperature 660°C, time 10 sec.

Dual column operation was used, with stainless steel tubing 3 mm inside diameter, 2.5 M long, packed with 15% "Carbowax 20 M" coated on 80 mesh "Anakrom ABS", and hydrogen flame ionization detector. The carrier gas was nitrogen, 60 ml/min. Programmed temperature ranges were from initial 50°C to maximal 210°C at a rate of 50—110°C: 6°C/min, 110—210°C: 8°C/min.

In this paper, pyrolysis temperature, column conditions were also discussed.