

试验研究

应用超声波破碎苏云金芽孢杆菌试验

魏万勇¹ 苏智先²

(1. 四川省蚕丝学校, 四川南充 637090 2. 西华师范大学, 四川南充 637000)

摘要: 用超声波对一定浓度的苏云金芽孢杆菌的营养细胞和芽孢进行破碎试验, 结果表明: 在试验条件下, 超声波破碎达到 95% 以上的破碎率所需时间为 30 ~ 50min, 尤其是菌液浓度为每毫升 50 亿, 用 10 变幅杆破碎, 40min 破碎率可达 99.9%。而细菌的芽孢, 无论是采用幅杆 6 或 10, 其破碎效果不明显。

Abstract: Ultrasonic wave was used to break *Bacillus thuringiensis*. The results show: it took 30 ~ 50 minutes to break somatic cell in fluid containing 5 ~ 10 billion germs/ml by ultrasonic wave instrument with variable amplitude lever 6 and when fluid germ concentration was 5 billion/ml it took 40min to be broken up to 99.9% with 10 instrument for germs. While the same method using in spore the efficiency was not apparent, no matter with variable amplitude lever 6 or 10.

关键词: 苏云金芽孢杆菌 营养细胞 芽孢 超声波破碎

Key words: *Bacillus thuringiensis* Somatic cell spore Ultrasonic wave breaking

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是农业上研究最多, 应用最广的一类微生物, 随着生物技术的发展, 对苏云金芽孢杆菌的研究越来越深入。在一些研究中, 需要有效地破碎苏云金芽孢杆菌细胞。目前, 应用于细胞破碎的方法有物理和化学的两类, 在物理破碎方法中主要有玻璃匀浆器破

碎、高压细胞破碎、液氮破碎、高速组织捣碎机破碎、超声波破碎等, 本试验应用了常用的超声波破碎法, 分别对苏云金芽孢杆菌的营养细胞和芽孢进行了破碎试验, 以期对研究有所帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

收入少, 可采取二次分配和风险基金的办法;

3.2 分析生产弹性、合理调控蚕茧的生产供应量。不管是采取价格鼓动、宣传鼓动还是行政推动都要适度, 避免出现一哄而上搞蚕茧大战, 到最后两败俱伤。

蚕业生产由传统生产型向产业化生产转

变是茧丝绸行业发展的必然趋势, 也是推进产业化进程的标志和目标。我们只有以体制创新为突破, 依托“公司+农户”的蚕业化经营模式, 增强农民在产业中的主体地位, 使农民真正成为生产经营的市场主体和整个产业的受益主体, 从而使广大蚕农脱贫致富奔小康, 为建设社会主义新农村奠定基础。

苏云金芽孢杆菌为四川省蚕丝学校微生物实验室保存。

饲养家蚕为 781 × 7532，做菌种复壮用。

超声波破碎机由宁波新芝生物科技股份有限公司生产。

电热恒温培养箱、冰箱、高压灭菌锅、平皿、克氏瓶、吸管、试管等。

牛肉膏蛋白胨液体培养基和固体培养基(营养琼脂)。

1.2 菌种复壮

将冷冻菌种接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基培养 18~20h，给 2、3 龄起蚕添食，待蚕儿发病死亡后，进行细菌分离和鉴定，确认为家蚕猝倒病病原—苏云金芽孢杆菌猝倒亚种。

试验用菌液的制备：复壮菌种一定量接种于营养琼脂克氏瓶中，恒温 37 分别培养 14h 和 24h，用适量生理盐水洗下菌苔，配制成试验所需浓度，4 冰箱保存。

1.3 破碎方法

1.3.1 培养 14h 细胞液的破碎 取培养 14h 的试验用菌液 200ml 选择 6，10 的变幅杆，应用工作 5s 休息 5s 的运行模式，对不同浓度的菌液实际破碎 10、20、30、40、50min 后，进行活菌计数。

1.3.2 培养 24h 细胞液的破碎 取培养 24 小时的试验用菌液的 200ml 选择 6，10 的变幅杆，运用工作 5s 休息 5s 的运行模式，对不同浓度的菌液实际破碎 10、20、30、40、50、60min 后，进行活菌计数。

1.4 活菌计数

参照《微生物实验手册》中介绍的方法进行活菌计数，无论是培养 14h 还是 24h 的菌液都是在 6h 内结束超声波破碎试验，不考虑细菌的自然死亡。

2 结果与分析

2.1 培养 14h 的苏云金芽孢杆菌菌液破碎结果

表 1 培养 14h 菌液的破碎结果

变幅杆 (mm)	菌液浓度 (亿/ml)	工作时间 (min)	平均活菌率 (亿/ml)	平均破 碎率(%)	
6	50	20	6.5	87	
		30	4.5	91	
		40	3.0	94	
		50	1.0	98	
	100	20	21.0	79	
		30	13.0	87	
		40	7.75	92.25	
		50	3.5	96.5	
	10	50	10	5.0	88.5
			20	3.5	92
			30	1.0	95
			40	0.05	99.9
100		10	9.5	90.5	
		20	5.5	94.5	
		30	2.5	97.5	
		40	0.5	99.5	

*随着工作时间的增加，肉眼观察可见菌液浊度降低而透明度增加。

不同的细菌浓度，用同样的变幅杆（6 或 10），在相同的工作时间内，50 亿/ml 的破碎率比 100 亿/ml 的高 1.75~8 个百分点；相同的细菌浓度（50 亿/ml 或 100 亿/ml），用不同的变幅杆（6 和 10）达到相同的破碎率时间基本在 10min 左右，但无论用 6 或 10 的变幅杆，还是 50 亿/ml 或 100 亿/ml 的细菌浓度，达到 95% 以上破碎率所需时间在 50min 内。

2.2 培养 24h 的苏云金芽孢杆菌菌液破碎结果

无论是 50 亿/ml 还是 100 亿/ml 细菌浓度，也无论用 6 或 10 的变幅杆，在 30~60min 的工作时间内，菌液的破碎率在 6.5~12% 之间，如考虑到培养 24h 苏云金芽孢杆菌菌液内的少部分（约 10% 左右）营养细胞和计算误差外，完全可以认为超声波对培养 24h 苏云金芽孢杆菌芽孢的破碎无明显效果。

表2 培养24h菌液的破碎结果

变幅杆 (mm)	菌液浓度 (亿/ml)	工作时间 (min)	平均活菌率 (亿/ml)	平均破 碎率(%)
6	50	30	45	10
		40	44.5	11
		50	44	12
		60	44.5	11
6	100	30	92.5	7.5
		40	93	7
		50	92	8
		60	92.5	7.5
10	50	30	44	12
		40	44.5	11
		50	44	12
		60	44	12
10	100	30	93.5	6.5
		40	93	7
		50	92	8
		60	92.5	7.5

*随着工作时间的增加,肉眼观察可见菌液浊度无明显变化。

3 讨论

随着生物工程技术的发展,苏云金芽孢杆菌的应用正变得越来越广,而找到其有效的破碎方法,具有非常重要的理论和实践意义。在实验和研究工作中我们常用超声波来破碎细胞以分离细胞成分或用于免疫化学研究。本次试验表明,虽然能否形成芽孢是菌种的遗传特性,但是同时也与环境条件如培养时间、营养条件等有关。对于培养14h还没有产生芽孢的苏云金芽孢杆菌菌液来说,超声波破碎法在试验条件下,无论选用6变幅杆还是直径相对较大的10变幅杆,也无论菌体浓度是50亿/ml,还是100亿/ml,达到95%以上的破碎率所需时间为30~50min,破碎效果较为理想;然而对于培养24h已经产生芽孢的苏云金芽孢杆菌菌液来讲,菌液中既有芽孢,还有部分营养细胞,

从表2可以看出,破碎率均较低,超声波破碎法的效果是极不显著的。

超声波是振动频率超过2万Hz的声波。它能够通过强烈的振动使细胞破裂,细胞内物质外泄而死亡。超声波的破碎效果与处理功率、频率、次数、时间、微生物类型及其生理状态等因素有关。芽孢的抗逆性强,几乎不受超声波处理的影响,故芽孢的破碎宜用其它方法。本次实验表明:应用超声波处理苏云金芽孢杆菌应特别注意该菌培养时间、培养条件和生物状态。

本次实验采用非灭活细胞破碎,对环境的要求较为严格,但通过细菌计数,可以比较明确地掌握各个时间段的细胞(包括休眠细胞-芽孢)破碎情况,至于灭活的苏云金芽孢杆菌菌体及其芽孢最佳的破碎方法和破碎情况,尚有待进一步研究。

参考文献

- 周德庆. 微生物实验手册【M】上海:上海科学技术出版社,1986.
- 戴莲韵,王学聘等.我国森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布的研究1993
- 金伟.家蚕病理学【M】北京:中国农业出版社,2001
- 张文成,任改新.苏云金芽孢杆菌与蜡状芽孢杆菌【J】.微生物学通报,1999,26(4):293-296
- 薛俊龙,王采先等.两种物理方法破碎大肠杆菌比较试验【J】.山西农业科学,2005,33(4):77-79
- 冯冬菊,赵福令等.超声波加工工具对复合变幅杆谐振性能影响【J】.大连理工大学学报,2004,44(5):685-686
- 林仲茂.超声波变幅杆的原理和设计【M】.北京:科学出版社1987
- 陈天寿等.微生物培养基的制造与应用【M】.北京:中国农业出版社1995
- 匡群,孙梅,施大林.乳酸梭状芽孢杆菌培养条件的研究【J】.2005