

## 研究报告

## 大豆根瘤菌蛭弧菌的发现\*

徐 恒

(四川大学生物工程系, 成都 610064)

岑 英 华

王 子 芳

(广东省微生物所, 广州 510070)

(中国科学院武汉病毒所, 武汉 430071)

**摘要** 从我国的一些大豆产区土壤中分离出四种大豆根瘤菌的噬菌蛭弧菌, 对它们的培养特征、宿主范围以及其它生物学特性进行了初步研究, 发现: 大豆根瘤菌蛭弧菌具有典型的蛭弧菌特征, 有极广泛的寄主范围和很强的裂解大豆根瘤菌的能力。它是影响结瘤效果和降低大豆产量的主要生物因子之一。

**关键词** 大豆根瘤菌; 噬菌蛭弧菌; 噬斑

噬菌蛭弧菌是一类专性捕食细菌的寄生性细菌, 体积小, 能通过细菌滤器, 有似噬菌体作用, 具明显的“寄生”和“裂解”特性。国外是 60 年代初发现蛭弧菌的<sup>[1,2]</sup>; 我国于 1982 年首次报道了蛭弧菌的存在<sup>[3]</sup>。到目前为止, 国内外大豆根瘤菌蛭弧菌研究尚未见报道。我们在广泛收集的种植大豆的土样中首次分离出了四种大豆根瘤菌蛭弧菌, 并对其一般生物学性状进行了初步研究, 现将研究结果报道如下。

## 材料与方 法

## (一) 菌株 (表 1)

## (二) 培养基与缓冲液

1. 快生型大豆根瘤菌培养基 Ym(g/L):  $K_2HPO_4$  1,  $KH_2PO_4$  0.5,  $MgSO_4$  0.2, NaCl 0.1,  $CaCl_2$  0.1, 酵母粉 0.4, 甘露醇 3.0, 微量元素母液(0.5% 硼酸, 0.5% 钼酸钠) 4ml, pH7.5。

2. 慢生型大豆根瘤菌培养基 Sm(g/L):  $NaH_2PO_4$  0.4,  $CaCl_2$  0.1,  $MgSO_4$  0.2, 谷氨酸钠 0.3, 酵母粉 0.4, 蛋白胨 1.0, 葡萄糖酸钠 2.5, 甘油 2.5ml, 微量元素母液(同 Ym) 4ml, pH 6.2—6.4。双层平板法上层和下层培养基各加 5g 和 16g 琼脂。

3. 缓冲液 PDB: 每升含 pH8.0 的 1mol/L Tris · Cl 30ml, NaCl 5.8g,  $MgCl_2$  2.3g。此

表 1 实验用菌株

菌 株	来 源
大豆根瘤菌 ( <i>R. japonicum</i> )	
USDA 1914 (快生型)	中科院武汉病毒所王子芳
USDA 191 (同上)	同 上
USDA 205 (同上)	同 上
MD <sub>1</sub> (同上)	同 上
2750 (同上)	黑龙江农科院赠
USDA110 (慢生型)	中科院武汉病毒所王子芳
USDA113-2 (同上)	同 上
USDA1822 (同上)	同 上
USDA005 (同上)	同 上
22-10 (同上)	黑龙江农科院赠
61A76 (同上)	同 上
三叶草根瘤菌 ( <i>R. trifolii</i> )	
S-32-1	南京土壤所赠
62	中国农科院土肥所
苜蓿根瘤菌 ( <i>R. meliloti</i> )	
ATCC 9930	中国农科院土肥所赠

缓冲液用于蛭弧菌的浸取、稀释和保存。

## (三) 土样

土样采自湖北、河南、四川、黑龙江等省区多年种植大豆的田地。

## (四) 蛭弧菌的分离与纯化

取一定量(约 8—10g)土样进行富集培养液过滤除菌后按常规双层平板法分离; 单斑

\* 中科院武汉病毒所钟卫洲同志参加部份工作, 特此致谢。

纯化3—5次,最后于PDB 4℃保存。

### (五) 蛭弧菌培养特征观察

双层平板于28—30℃培养72小时后,观察噬斑。液体培养物(于对数期宿主菌悬浊液中加入定量蛭弧菌液)于28—30℃振荡72小时后,观察澄清度。

### (六) 蛭弧菌宿主范围测定

测试菌与蛭弧菌制双层平板,28—30℃,72小时有噬斑形成则为敏感寄主。

### (七) 温度对蛭弧菌生长的影响

不同温度下以最适寄主菌为对象,观察蛭弧菌的出斑时间和出斑数量。

### (八) pH值对蛭弧菌生长的影响

不同pH条件下,观察蛭弧菌对最适寄主的出斑数量、出斑时间。

### (九) 氯仿对蛭弧菌活性的影响

于1ml蛭弧菌悬液中加入0.05ml氯仿,混合振荡10分钟,测定蛭弧菌pfu/ml。

### (十) 蛭弧菌繁殖特点的测定

于对数期宿主菌悬液中加入定量蛭弧菌,定时取样测其繁殖量。

## 结 果

### (一) 蛭弧菌的分离

我们以USDA 191-4为快生型大豆根瘤菌代表菌从湖北土样中分出了F<sub>1</sub>蛭弧菌,从河南土样中分离出了F<sub>2</sub>蛭弧菌;以USDA 110为慢生大豆根瘤菌代表菌,从湖北土样中分离出了S<sub>1</sub>蛭弧菌,从河南土样中分离出了S<sub>2</sub>蛭弧菌。

### (二) 蛭弧菌培养特征

四株蛭弧菌于30℃培养72小时,在含有宿主菌的平板上形成的噬斑形态相似,均呈圆形、透明、清晰、光滑、边缘整齐。噬斑直径F<sub>1</sub>和F<sub>2</sub>为0.2—1.0mm(30℃,72小时),S<sub>1</sub>与S<sub>2</sub>相对较大为1.0—2.0mm(30℃,72小时)。四株蛭弧菌的噬斑在适宜温度下可随培养时间延长而扩大。

在指示宿主菌(USDA191-4和USDA110)的培养液中加入定量蛭弧菌(50ml对数期

USDA 191-4中加1ml  $1 \times 10^6$  pfu F<sub>1</sub>或F<sub>2</sub>, 50ml对数期USDA110中加1ml  $1 \times 10^6$  pfu S<sub>1</sub>或S<sub>2</sub>),30℃培养三天,结果混浊培养液完全裂解澄清。

### (三) 蛭弧菌的宿主范围

蛭弧菌与噬菌体不同,它们一般都有较广的宿主范围<sup>[4,5]</sup>,这四株蛭弧菌也是这样。F<sub>1</sub>和F<sub>2</sub>可感染快生大豆根瘤菌ANU240、USDA191、USDA205、2750MD<sub>3</sub>以及它们的各种变种(营养缺陷、质粒缺失Tn<sub>1</sub>、诱变株等),也可感染慢生大豆根瘤菌USDA110、USDA113-2、USDA1822、USDA005、22-10、61A76以及它们的各种变种,但不感染大肠杆菌和假单胞菌。S<sub>1</sub>与S<sub>2</sub>可感染慢生大豆根瘤菌USDA110、USDA1822、USDA113-2、USDA005、22-10、61A76以及它们的变种,但不感染快生型大豆根瘤菌、大肠杆菌和假单胞菌。随后又发现四株蛭弧菌又能分别感染苜蓿根瘤菌、三叶草根瘤菌的某些种(表2)。

同期,我们分出了大豆根瘤菌噬菌体,它们的宿主范围就很窄,仅感染1或2种根瘤菌。

### (四) pH和温度对蛭弧菌活性的影响

四株蛭弧菌最适生长温度为30℃,这时出斑最快。将蛭弧菌的双层平板置4℃、80—90小时仍可出斑。于40℃下处理1小时,可使F<sub>1</sub>和F<sub>2</sub>失活而S<sub>1</sub>与S<sub>2</sub>则于50℃下处理1小时才完全失活(表2)。

四株蛭弧菌的最适pH为7—8,适应范围5.5—9.0低于或高于此pH范围对蛭弧菌活性均有明显影响。

### (五) 氯仿对四株蛭弧菌活性的影响

氯仿对四株蛭弧菌活性有明显的灭活作用,F<sub>1</sub>与F<sub>2</sub>被氯仿处理10分钟后存活率为10%,S<sub>1</sub>与S<sub>2</sub>同样处理后存活率为零。四株蛭弧菌对氯仿的敏感性符合细菌的特点,表明它们不同于噬菌体,噬菌体对氯仿不敏感(表2)。

### (六) 四株蛭弧菌的繁殖特点

四株蛭弧菌的繁殖周期类似于噬菌体的一步生长曲线,但蛭弧菌增殖期比噬菌体增殖期长得多,而且每个宿主细胞释放蛭弧菌的量比

表 2 四株蛭弧菌的生物学特性

蛭弧菌 测试项目	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
噬斑大小 (φmm)	0.2—1.0	0.2—1.0	1.0—2.0	1.0—2.0
pH 范围	5.5—9.0	5.5—9.0	5.5—9.0	5.5—9.0
温度范围	4—40℃	4—40℃	4—50℃	4—50℃
氯仿敏感性	敏 感	敏 感	敏 感	敏 感
宿主范围	能感染表 1 中所 列的全部菌株	同 F <sub>1</sub>	能感染表 1 中所 有慢生大豆根瘤菌	同 S <sub>1</sub>

相应释放噬菌体少得多。

四株蛭弧菌对停止生长和生长缓慢的宿主菌苔具更强裂解能力。

讨 论

为了更多了解大豆根瘤菌蛭弧菌的自然分布状况,我们又先后从四川、黑龙江等省区采样分离到了许多大豆根瘤菌的蛭弧菌。分离工作中我们发现:从大豆长势较差的田地中分出蛭弧菌的机率明显高于大豆长势良好的田地;在同一田地里,长势差的植株根部土壤中蛭弧菌存在的可能性远远大于长势好的植株。根据蛭弧菌“溶菌”范围广,裂解能力强等特点,我们推

测大豆根瘤菌蛭弧菌在自然环境下可能极大妨碍大豆根瘤的形成,毁灭根瘤菌的结瘤效果。因此,进一步加强对大豆根瘤菌蛭弧菌的研究将对共生生物固氮体系的应用起到积极的作用。

参 考 文 献

1. Stolp H et al.: *Physopathol* 2 45:364, 1962.  
2. Stolp H et al.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, 29:217, 1963.  
3. 司榭东等: *中华微生物学和免疫学杂志*, 2(1): 12, 1982。  
4. 秦生巨: *微生物学通报*, 14(4): 184, 1987。  
5. 王家驹: *微生物生命科学*, 1(1): 21, 1988。  
(1991-11-18 收稿)

FINDING OF BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS INFECTING RHIZOBIUM JAPONICUM

Xu Heng

(Department of Biotechnology of Sichuan University, Chengdu 610064)

Cen Yinghua

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Wang Zifang

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Four bdellovibrio bacteriovorus of *Rhizobium japonicum* were isolated in our country from field soils cropped to soybeans. The culture character, morphology, host range and the other biological properties of these bdellovibrio bacteriovorus of *R. japonicum* had a wide host range and a strong ability that lyse *R. japonicum* in field soils, and were one of main biological factors that lower the yield of soybeans.

**Key words:** *Rhizobium*; Bdellovibrio bacteriovorus; Plaque