

溶藻细菌——M-4*

李勤生 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

1980年, 我们从不同地区分离到5株具有明显溶藻能力的细菌。其中4株的生物学特性观察结果表明它们属于同种类群, 但与已报道的某些溶藻菌株有不同程度的差别^[1,4,5,6,7], 在分类上还有待进一步研究。本文报道了代表株M-4的溶藻特点和生物学特性, 并与已报道的某些溶藻菌进行了比较。其结果如下。

材料与方 法

一、菌株来源及培养

从湖北省圻春县、浠水县及本所出现病态

的藻种培养池中采样, 在0.05%胰蛋白胍琼脂培养基^[1]上划线分离纯化, 然后在0.5%胰蛋白胍琼脂培养基^[1]中培养。得到溶藻菌株M-1、M-2、M-3、M-4、M-5。M-4为代表株。

二、试验藻种及培养

固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* 即水生686)和鱼腥藻15(*Anabaena* sp. 15)。采用水生111

* 本文承王大稻、阮继生先生审阅; 林万明、郭兆彪同志协助测定DNA GC比; 武汉病毒研究所电镜组协助拍摄电镜照片。本所朱芝运同志参加部分工作; 何楚华、陶为民同志拍洗照片。一并致谢。

藻培养基培养试验藻。其成份：10% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.25ml, 2% $CaCO_3$ 5ml, 1% 柠檬酸铁 0.5ml, 土壤浸出液 (1:1) 10ml, 10% K_2HPO_4 0.75ml, 1% 钼酸 0.25ml, 1% 柠檬酸 0.5ml, 蒸馏水 1000ml, pH7.0。固体培养基则加入 1% 琼脂。

三、溶藻试验

在水生 111 琼脂培养基中生长良好的藻苔 (algallawn), 或在三角瓶中生长成片的藻体上接种培养 24 小时的菌苔或细菌悬液。间歇光照 (10 小时光照/14 小时黑暗), 光照强度为 1500 Lux, 温度 28—33℃。逐日观察溶藻斑 (圈) 的形成。

四、生物学特性观察

1. 分解几丁质、沉积铁等试验按“细菌属的鉴定指导”进行^[3]。

2. 铵盐及柠檬酸盐的利用：采用 Koser 和 Simmons 培养基。

3. 明胶液化：12% 明胶小管穿刺法。

4. 酪素水解：0.5% 胰蛋白胍琼脂中加入新鲜脱脂牛奶，最终浓度为 2%。

5. 耐盐性及生长 pH 范围的测定均用 0.5% 胰蛋白胍液体培养基为基础，用 72 型分光光度计测定各试验组培养物光密度 (波长 430nm)，以比较生长丰度。

6. 子实体 (fruiting bodies) 或小孢囊 (microcysts) 的形成或诱导：(1) 在固氮蓝藻藻苔上观察子实体的形成；(2) 在灭菌的兔粪球上接种试验菌诱导子实体；(3) 将试验菌洗涤离心后加入含有 0.5M 甘油的培养液 (0.05% 胰蛋白胍、0.08M $MgSO_4$ 、0.02% $NaAC$ 、0.05% 酵母浸膏、0.02% 牛肉浸膏、0.5M 甘油) 诱导小孢囊形成。

7. 对放线菌素 D 的敏感性：浓度为 5 μg /ml, 纸片法。

8. 色素提取：64℃ 热甲醇提取色素。用 SPECORD. UV. VIS. 分光光度计测定光谱吸收峰。

9. DNA 碱基比的测定：采用热变性温度法。

10. 其它项目均按“一般细菌常用鉴定方法”^[2]进行。

结 果

一、溶解固氮蓝藻的能力和特点

1. 在藻苔上点种试验菌后，4 小时内即见接种点向周围扩大，12 小时后，出现明显溶藻圈，72 小时出现同心环状溶藻圈。显微镜下观察透明区内仅残存异形胞，营养细胞溶解殆尽；在呈现蓝绿色的细环处尚存部分短的散乱藻丝。连续观察发现溶藻圈逐日扩展，环数逐日增加，一周后直径可达 2.8cm 左右 (图 1, 2)。除试验菌株 M-6 外，其余 5 个菌株特点均同。

2. 将试验菌悬液涂布藻苔，在稀释适度的平皿上约 5 天左右出现可见的圆形或梭形溶藻斑 (图 3)。

3. 将试验菌悬液接种在液体培养的藻体上，5—7 日观察到点状黄色病斑并逐渐向周围扩展，藻体逐渐变薄，褪色，直至完全衰败。

二、M-4 菌株培养特性及形态特征

1. 培养特性：

在 30—32℃ 条件下，在 0.05% 胰蛋白胍琼脂培养基上形成薄的伸展状菌落，边缘有许多不规则突起 (见照片 4) 或浮雕状花纹；在 0.5% 胰蛋白胍培养基上菌落比较丰厚，中央隆起，浅黄色，无水溶性色素；在肉汁胍斜面上菌苔色较深，粘性亦增加。5—10℃ 未见生长，但 45℃ 高温条件下可以生长。

在适宜培养液中，随菌龄增长，部分菌体相互粘着下沉，形成黄色透明粘液。陈旧培养物中菌体多自溶。

最适 pH6.5，在 pH6—8 范围内均可生长。在无 NaCl 的液体培养中生长最佳，NaCl 浓度在 1% 以下可以生长；在 3%、5% 不能生长。

2. 形态特征：

菌体细长杆状 (0.4 × 3—5 μm)，两端钝圆

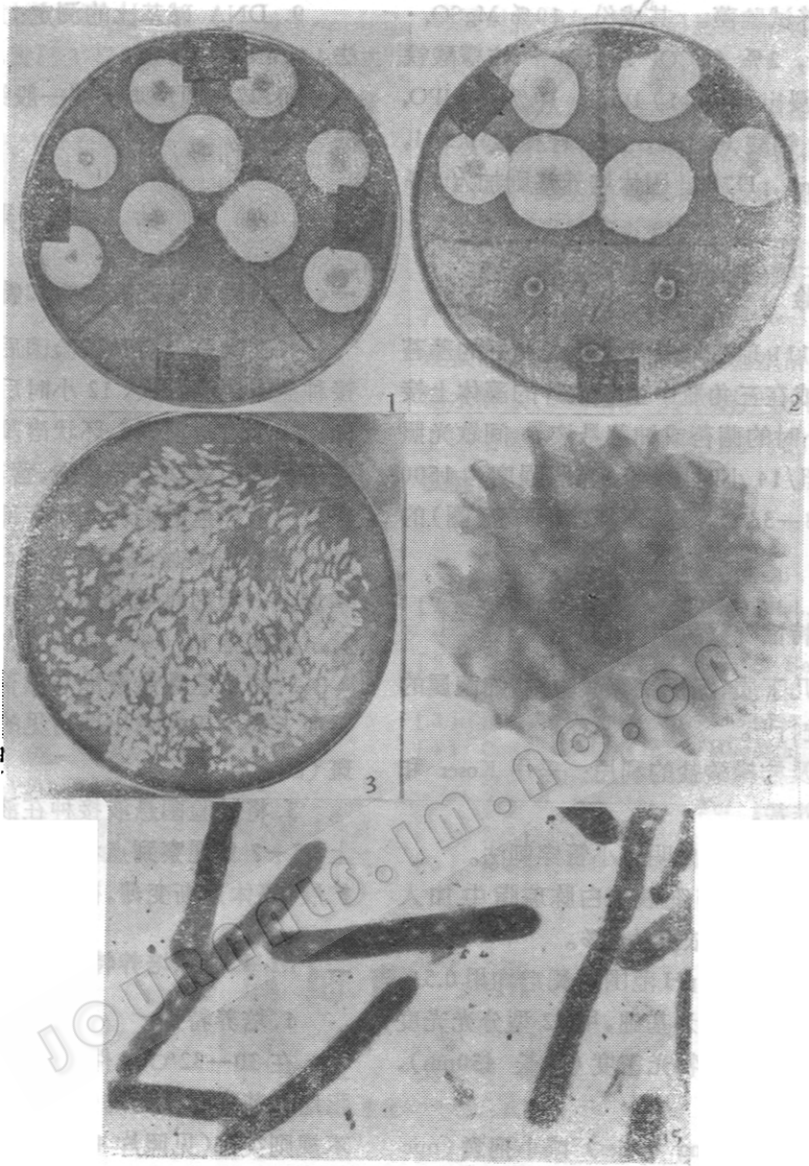


图 1-5 溶藻细菌——M-4

1、2. 示溶藻圈呈同心环状 3. 示菌苔形成的圆形或菱形溶藻斑
4. 示菌落边缘突起 5. 示 M-4 杆状菌(7950×)

或略尖细(图 5)。随菌龄增长,有的菌体可达 10—16 μm 。折光较弱,无鞭毛,可屈挠,滑行运动。革兰氏染色阴性,有异染粒。菌体有时可聚集成束成片,但在藻苔和兔粪球上未见形成子实体,0.5M 甘油培养液诱导,亦未见有小孢囊形成。

三、生理生化特性(见表 1)

溶藻菌株 M-4 对 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的放线菌素

D 不敏感。

甲醇提取 M-4 菌株色素光谱测定结果表明最高吸收峰值为 420、450、468nm。

M-4 菌株的 DNA GC 比为 70.3 克分子% (Tm 值)。

四、溶藻菌株 M-4 与已报道的溶藻细菌的比较(见表 2)

比较结果 M-4 与已报道的溶藻细菌有不

同程度的差别。

表 1 溶藻菌株 M-4 的生理生化特性

测定项目	结果*	测定项目	结果
淀粉水解	+	铵盐、柠檬酸盐的利用	-
水解七叶灵	+	还原硝酸盐	-
水解酪素	+	吲哚试验	-
分解几丁质	+	产生硫化氢	+
分解纤维素	-	液化明胶	+
利用葡萄糖	⊕	由胰蛋白酶产氨	+
乳糖	+	脲酶	-
半乳糖	+	氧化酶	+
阿拉伯糖	+	接触酶	+
木糖	+	果胶酶	-
纤维二糖	⊕	沉积铁	-
石蕊牛奶酪化	⊕	Ashby 无氮培养基上生长	-

* ⊕“阳性反应并产酸”+“阳性反应”-“阴性反应”

讨 论

1. 本试验中所分离到的 5 株细菌经室内人工感染试验证明有溶解固氮蓝藻营养细胞的能力, 在水生 111 琼脂培养的藻苔上形成具有特色的同心环状溶藻圈。观察到其中 4 株溶藻细菌的生物学特性均同, 表明它们属于同种类群。虽然它们的形态特征、滑行运动方式和高的 DNA 碱基比与已报道的溶藻粘细菌相似, 但在本实验条件下, 未发现子实体或小孢囊形成。对这类细菌在分类上的归宿有两种不同的意见: 一种将它们划在粘细菌中; 而 Christensen, P. 和 Cook, F. D. (1978)^[5]的意见则是将它们另

表 2 M-4 与近似溶藻菌株的比较

菌株	M-4	C798 ^[1]	Lysobacter antibioticus ^[7]	Lysobacter brunescens ^[7]	Lysobacter enzymogenes ^[8]	Cytophaga N-5[4]	Fp-1 ^[3]	Cp-1 ^[4]
菌苔颜色	淡黄色	淡黄、微绿	粉红—淡褐红	黄—巧克力色	奶油—奶褐色	黄色	橙红色	黄—淡红色
水溶性色素	-	灰褐色	褐色	褐色	暗褐色	灰褐色	-	-
分解纤维素 (CMC)	-	-	+	-	+	+	-	-
分解几丁质	+	+	+	+	+	-	-	-
液化明胶	+	+	+	+	+	-	-	-
还原硝酸盐	-	+	部分菌株+	-	-	-	-	-
沉积铁	-	+	-	-	-	-	-	-
水解果胶	-	-	-	+	+	+	-	-
水解淀粉	+	+	-	+	-	-	+	-
柠檬酸盐作唯一碳源	-	-	+	-	+	+	-	-
产生 H ₂ S	+	+	-	+	-	-	-	-
对放线菌素 D 的敏感性	-	-	-	+	不敏感或中等敏感	-	+	-
DNAG + C 克分子%	70.3	69.1	66.2—69.2	66.8—67.9	69—70.1	-	70.0	68.0
溶解范围	蓝藻	蓝藻、革兰氏阴性、阳性细菌	绿藻、革兰氏阴性、阳性细菌、真菌	藻、革兰氏阴性阳性细菌、真菌	绿藻、革兰氏阳性菌、真菌	蓝藻、绿藻、革兰氏阳性、阴性细菌	蓝藻、革兰氏阳性细菌	蓝藻、革兰氏阳性、阴性细菌

立一新属——溶解细菌属 (*Lysobacter*), 隶属于新的溶解细菌科 (*Lysobacteraceae*)、溶解细菌目 (*Lysobacterales*)。后者的意见似乎有一定道理, 因为具有高的 DNA 碱基比的滑行细菌不一定只限于粘细菌; 但在对诱导子实体或小孢囊形成的条件尚未充分了解时, 未见形成子实体或小孢囊的细菌是否肯定不具备这种能力? 因此, 我们认为对这类细菌 (包括 M-4 菌株) 的分类位置有待进一步研究。

2. M-4 菌株生长的 pH(6—8)、温度范围与固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica*, 即水生 686) 及鱼腥藻 15 (*Anabaena* sp.15) 是一致的。

3. 由试验菌株对固氮蓝藻明显的溶藻能力和在溶解藻体中分离的机率较高看来, 它很可能是影响藻的生长丰度的重要生物因子 (agents) 之一。但值得注意的是在实验室培养条件下, 它们的溶解能力逐渐减弱。考虑作为生物调控藻类密度的手段, 还必须进一步研究

其溶藻机制及在自然环境中，影响藻—菌关系的生态因子。

参 考 文 献

- [1] 李勤生、黎尚豪：溶解固氮蓝藻的细菌，水生生物学集刊，7(3)：377—384，1981年，科学出版社，北京。
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组：一般细菌常用鉴定方法，科学出版社，1978年，北京。
- [3] Skerman, V. B. D.: A Guide to the Identifica-

tion of the Genera of Bacteria. 2nd ed. 1967.
蔡妙英、凌代文、战立克等译：《细菌属的鉴定指导》，科学出版社，1978，北京。

- [4] Stewart, J. R. & R. M. Brown: *Science* 164: 1523—1524. 1969.
- [5] Shilo, M.: *J. Bacteriol.* 104: 453—461. 1970.
- [6] Daft, M. J. & W. D. P. Stewart: *New Phytol.* 70: 819—829. 1971.
- [7] Christensen, P. & F. D. Cook: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 367—393. 1978.