

异小杆线虫发光共生细菌两种型的生物学研究

唐 依 霖 戴 冠 群

(广州师范学院) (华南农业大学)

摘要 异小杆线虫发光共生细菌两种型(初生型和次生型)的形态和绝大多数生理生化及血清学反应均相同。它们的主要差异表现在培养特征、稳定性及对线虫繁殖的作用性上。如初生型菌能使线虫在人工培养基上大量繁殖,次生型菌却不能;初生型菌不稳定,易转化为较稳定的次生型。但不同的初生型菌株其稳定性又有差别;在 NBTA、EMB 及麦康凯培养基上,两种型的菌落区别明显。此外,所有初生型菌都具有抗菌作用,次生型菌只有部分菌株具有此性质,而且前者的抗菌谱较后者广。不同菌株的初生型,其抗菌能力有差别。

关键词 异小杆线虫;共生细菌;初生型;次生型

异小杆线虫肠道内含有发光共生细菌。1980年 Akhurst^[1]发现,从线虫肠道中分离出来的发光共生细菌在人工培养基上培养一段时间后,出现有两种不同特征的菌落,他称其为两种型——初生型和次生型。初生型菌存在于线虫肠道中,当初生型菌在普通细菌培养基上生长时,会转变为次生型。目前认为,共生细菌的两种型问题在异小杆线虫作为害虫天敌的研究中是相当重要的。它不仅具有明显的生物学意义,而且在大量生产线虫用以防治害虫方面也有着重要的实践意义^[1,2]。

对共生细菌两种型的性质问题国内尚未有较详细报道。因此,作者对采自国内及国外的几株异小杆线虫发光的共生细菌两种型的形态、培养特征、生理生化反应、血清学、抗菌作用、稳定性(抵抗型变的能力)以及对线虫繁殖的影响做了观察和测试。

材料和方法

1. 测试菌株: 国外菌株有 *Xenorhabdus luminecens* C1、T327 及 Hb-1 三株菌,分别由中国农业科学院生防室和广东省昆虫研究所提供。国内菌株有 *Xenorhabdus luminecens* 8204 及泰山 1 号,是作者按戴冠群^[3]的方法分离获得。

2. 培养基: NA、SS、EMB 和麦康凯均为卫生部上海生物制品研究所生产的干粉培养基。

NBTA: NA 培养基 1000ml,溴百里酚蓝 0.025g, pH 6.9 ± 0.1。高压灭菌后加入 40mg TTC。

NB 肉汤: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 5g, 蒸馏水 1000ml。

3. 测定共生细菌两种型的形态、培养特征、生理生化反应、血清学、抗菌作用及对线虫繁殖的影响均按文献^[3]的方法进行。

4. 两种型的稳定性测定: 把 C1、泰山 1 号及 Hb-1 菌株的初生型和次生型(以下简称 C1 初, C1 次。其余类推)分别接种于 NB 肉汤中,置于 28℃ 的恒温箱中培养,每隔一定时间

取出,于麦康凯或 EMB 平板上检查初生型与次生型的比例。

结果与讨论

(一) 形态特征

初生型与次生型菌体均为棒状。前者长 2.1—2.4 μm, 宽 0.6—0.8 μm; 后者长 2.5—3.7 μm, 宽 0.6—0.7 μm。两种型菌均为革兰氏阴性,运动,周身鞭毛,不产生芽孢。

(二) 培养特征、生理生化特性

1. 培养特征: 两种型菌落均为圆形。初生型菌落直径较小,粘性大,不透明,凸起;次生型菌落直径较大,粘性小,透明,较偏平。两种型菌落颜色有差别,尤其反映在 NBTA、麦康凯及 EMB 培养基上。在 NBTA 上,初生型菌落中心深绿,外圈绿色;次生型菌落中心红色,外圈透明。在麦康凯培养基上,初生型菌落红色;次生型菌落橙黄色。在 EMB 培养基上,初生型菌落为黑色-黑紫色;次生型为浅紫棕色。具体菌落特征见表 1。由此可见,两种型菌的培养特征有较大差异。

表 1 共生细菌两种型的培养特征

菌型 培养基	初生型	次生型
NA	24 小时, 菌落圆形, 直径 1mm, 凸, 黄色, 粘, 不透明。	24 小时, 菌落圆形, 微凸, 直径 1—2 mm, 黄白色, 无粘性, 半透明。
NBTA	48 小时, 菌落圆形, 直径 1mm 左右, 凸, 中心深绿, 外圈绿色, 粘, 不透明。	48 小时, 菌落圆形, 直径 1—3mm, 微凸, 中心红色, 外圈透明, 无粘性。
麦康凯	48—72 小时, 菌落圆形, 直径 1—2mm, 凸, 红色, 粘, 不透明。	48—72 小时, 菌落圆形, 直径 2—4mm, 微凸, 橙黄色, 微粘, 半透明。
EMB	48 小时, 菌落圆形, 直径 1mm 左右, 凸, 黑色-紫黑色, 粘, 不透明。	48 小时, 菌落圆形, 直径 2mm 左右, 微凸, 浅紫棕色, 不粘, 半透明。
SS	72 小时, 菌落圆形, 直径 1mm 左右, 橙黄色。	菌落橙黄色或橙红色, 其余同左。

2. 生理生化特性: 供试菌株两种型的生理生化特性,除了脂酯 Tween 80、Simmon 琼

表 2 各测试菌株共同的生理生化特征

项目	结果	项目	结果	项目	结果
过氧化氢酶	+	淀粉水解	-	琥珀酸钠	+
脱氧核糖核酸酶	-	明胶水解	+	酒石酸钠	-
卵磷脂酶	-	酪蛋白水解	+	葡萄糖酸钠	-
氧化酶与细胞色素氧化酶	-	Hugh & Leifson 氧化发酵:	+	KCN 耐性	+
酪氨酸酶	-	开管	+	糖发酵:	-
脲酶	+	闭管	+	七叶苷	-
精氨酸双水解酶	-	石蕊牛奶:	+	水杨苷	-
脱羧酶:	-	陈化	+	葡萄糖	+
鸟氨酸	-	产酸	+	木糖	-
谷氨酸	-	有机酸利用:	+	山梨糖	-
赖氨酸	-	乙酸钠	+	乳糖	-
糖还原	-	苯甲酸钠	+, -	阿拉伯糖	-
三糖铁琼脂 (产 H ₂ S)	-	柠檬酸钠	+	肌醇	-
V-P	-	甲酸钠	+	麦芽糖	+, -
M.R	-	延胡索酸钠	+	鼠李糖	-
硝酸盐还原	-	乳酸钠	-	蔗糖	-
		苹果酸钠	+	侧金盏花醇	-
		草酸钠	-	纤维二糖	-

脂、七叶苷水解、吲哚产生及马铃薯斜面(产色素)等少数项目外,绝大多数无差异。结果见表 2—3。

(三) 血清学

表 3 所有测试菌株不同的生理生化特征

测试项目	菌型	初生型	次生型
脂酶 Tween 80		3+*	2+, 3-
Simmon 琼脂		1+, 2-	2+, 3-
七叶苷水解(5 天)		3+	4+, 1-
吲哚产生		1+, 2-	3+, 2-
马铃薯斜面(产色素)		黄色, 朱红色	浅黄色

* 表中数字示菌株数数字上角的+, -号示阳、阴性反应(如 3+示 3 株初生型菌为阳性)

各菌的初生型菌株抗血清效价均为 1024, 与其同源次生型起凝集反应, 反应效价亦为 1024。说明共生细菌具有抗原性, 同一菌株其初生型与次生型的抗原是非常接近或相同的。

(四) 抗菌作用

所有的初生型均具有抗菌作用。次生型菌则一部分有抗菌作用, 一部分没有(如 C1 次、T327 次)。不同的共生细菌初生型与次生型, 其抗菌谱及抗菌能力均有差异(表 4)。尽管抑菌圈受琼脂厚度、共生细菌最初浓度及测试细菌等的影响^[4], 但不难看出, 初生型菌中抗菌能力的大小依次为泰山 1 号初 > Hb-1 初 > C1 初。具有抗菌作用的次生型菌中抗菌能力是泰

表 4 共生细菌两种型的抑菌试验*

测试菌	共生细菌	大肠杆菌	微球菌	变形杆菌	金黄色葡萄球菌	苏云金杆菌
C1 初		10.5	17.0	-	10.8	14.0
Hb-1 初		10.8	18.3	-	11.0	14.0
泰山 1 号初		10.5	18.5	-	10.5	15.0
C1 次		-	-	-	-	-
Hb-1 次		-	19.0	-	-	13.0
泰山 1 号次		-	20.7	-	-	12.0
T327 次		-	-	-	-	-
8204 次		-	13.5	-	-	-

* 表中数字为抑菌圈大小(mm), “-”表示无抑菌作用

山 1 号次和 Hb-1 次 > 8204 次。至于抗菌谱, 大多数是初生型较次生型广。

(五) 稳定性

各测试菌次生型较稳, 无任何变化, 只是随着时间的延长, 菌的生长减弱; 初生型菌不稳定, 可随着时间的延长而不断地转变为次生型, 但

未发现有次生型转为初生型。不同菌株的初生型转化为次生型的快慢有差异(图 1)。显然, 从图 1 中看出几株共生细菌初生型的稳定性顺序为泰山 1 号初 > C1 初 > Hb-1 初。

(六) 对线虫繁殖的影响

在人工培养基(鸡内脏 70%, 猪油 20%, 水

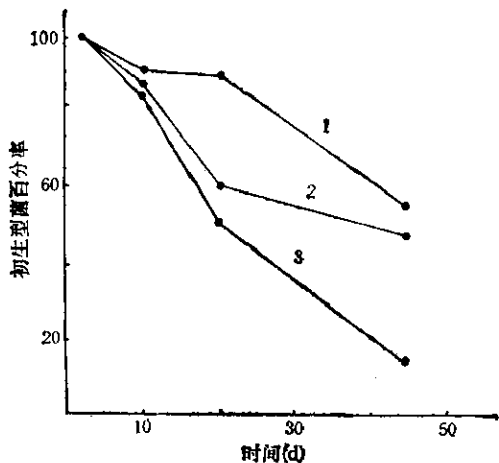


图1 共生细菌初生型于NB肉汤上28℃培养的稳定性的稳定性

1.泰山1号初, 2. C1初, 3. Hb-1初

10%)接种初生型共生细菌,均能使其宿主线虫大量繁殖,而接种次生型共生细菌或单滴NB肉汤的对照均未见有线虫繁殖。人工培养基繁殖出来的线虫,其感染力未见减退。

讨 论

从上述结果看,异小杆线虫共生细菌的初生型与次生型菌在生理生化反应方面,除了少数几项不同外(表3),绝大多数生理生化反应及血清学反应均无差异。在形态上大同小异。然而在培养特征方面(如在NBTA、EMB及麦

康凯上)却有明显差异,这与Akhurst^[2]及戴冠群等^[3]报道的结果相符。因此,尽管国外还报道某些异小杆线虫共生细菌两种型可溶性蛋白电泳图谱不一样^[6],但是,依培养特征来区分初生型与次生型仍是一种较简易的方法。

根据异小杆线虫共生细菌的初生型具有抗菌作用、对线虫繁殖有促进作用、不稳定、易转化为次生型菌等特性,在筛选一种用于防治害虫的异小杆线虫时,不仅要考虑线虫本身的特点,更重要的是对该线虫初生型菌的性质应高度重视。因为初生型菌稳定性越强,就越不易变为次生型,对线虫繁殖就越有利;抗菌谱愈广,抗菌能力越强,对杂菌的抑制能力也就愈强。所以,注意对初生型菌株的筛选是关键。

初生型菌转变为次生型菌的原因,目前尚不清楚,有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Akhurst, R. J.: *J. Gen. Microbiol.* 121: 303—310, 1980.
- [2] Bedding, R. A. et al.: *Nematologica*, 27(1): 109—114, 1981.
- [3] 戴冠群,唐依霖: *华南农业大学学报*, 4: 31—37, 1988.
- [4] Akhurst, R. J.: *J. Gen. Microbiol.* 128: 3061—3065, 1982.
- [5] Akhurst, R. J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33(1): 38—45, 1983.
- [6] Hotchkiss, P. O. et al.: *J. Gen. Microbiol.* 130: 2725—2731, 1984.