

# 异小杆线虫的一株不发光共生细菌

戴冠群 唐依霖\*

(植保系)

## 提 要

异小杆线虫是一种昆虫病原线虫, 多年以来一直认为它的共生细菌都具有荧光的特性。我们从广东阳江海陵岛上所采集的异小杆线虫86H<sub>1</sub>的标本中, 分离出一株不发光的共生小杆菌。它与发光共生小杆菌一样, 亦具备抗生性, 其初生型亦有利于宿主线虫的大量繁殖。用 EMB 琼脂可区别该菌的初生型和次生型。根据其形态及培养特征、生理生化 and 血清学反应的特点, 该菌在分类上可属于发光共生小杆菌 *Xenorhabdus luminescens*。

**关键词:** 发光共生小杆菌 (*Xenorhabdus luminescens*), 异小杆线虫 (*Heterorhabditis* sp.), 共生细菌。

## 引 言

异小杆线虫 (*Heterorhabditis* sp.) 是昆虫病原线虫中的一个独特类群。近年来的研究表明它是一类很有希望的害虫生物防治因子<sup>[1,4]</sup>。目前已知所有的异小杆线虫均与发光共生小杆菌共生<sup>[9][18]</sup>。这种共生细菌能抑制其它微生物的生长, 为线虫的发育繁殖提供适宜的环境条件<sup>[10]</sup>, 因而在异小杆线虫的人工大量繁殖中起着重要的作用<sup>[7][13]</sup>。所以, 了解共生细菌的特性, 无疑对线虫的繁殖及应用研究有相当的价值。国外对共生细菌的研究已有较为系统的报道<sup>[7][8][13][16][19]</sup>, 最近还发现了不发光的异小杆线虫共生细菌<sup>[18]</sup>。国内这方面的工作亦已开展<sup>[6]</sup>, 但对不发光的共生细菌尚未见有报道。因此, 本文就采自我国的一株不发光的共生细菌(暂定为86H<sub>1</sub>)生物学特性做了初步研究, 并与发光共生小杆菌Hb—<sub>1</sub>品系进行了对比观察。

## 材 料 和 方 法

### (一) 共生细菌的来源

发光共生小杆菌 Hb—<sub>1</sub>品系由广东省昆虫所提供。不发光共生细菌86 H<sub>1</sub>则从异小杆线虫*Heterorhabditis* sp.86 H<sub>1</sub>中分离得到(线虫由王国汉、李高峰同志从广东阳江

\*本校研究生, 现在广州师范学院生物系  
1987年9月7日收稿

海陵岛土壤中分离获得), 具体方法如下:

把感染期线虫置于0.1%硫柳汞中表面消毒2小时左右或于0.3%新洁尔灭中消毒20分钟, 然后吸去消毒液, 用无菌水冲洗三次, 随后把线虫吸到灭菌的研磨器内, 反复研磨, 把研磨液适当稀释后, 取少量于NBTA平板上涂布, 置28℃恒温箱中培养48~72小时后, 挑取可能的共生细菌菌落反复培养纯化, 然后进行柯赫氏定律验证, 从而证实所获得可能的共生细菌是该线虫真正的共生细菌。由此分离的共生细菌为初生型菌。次生型菌则是从初生型菌的老培养物中观察并分离得到, 其亦经柯赫氏定律验证。

## (二) 共生细菌的形态、培养特征、生理生化特性及血清学反应

所有试验除特别说明外, 方法的均按《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[1]</sup>在27~29℃进行。

1. 形态特征: 取在NA培养基上培养了24小时的共生细菌, 水浸片法观察其运动性, 进行革兰染色、鞭毛染色及简单染色, 并以此测定菌体的大小和形态观察。此外, 挑取共生细菌的老培养物进行芽孢染色, 观察芽孢产生与否。

2. 培养特征: 观察共生细菌在NA、SS、NBTA、EMB及麦康凯培养基上的菌落形态, 并于暗室中观察其发光性。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的配方为: 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。

3. 生理生化特性: 进行过氧化氢酶、苯丙氨酸脱氨酶、脱氧核糖核酸酶<sup>[4]</sup>、卵磷脂酶、氧化酶与细胞色素氧化酶、脂酶Tween 80 (把Tween 80减少到0.4%)<sup>[8]</sup>、酪氨酸酶<sup>[2]</sup>、尿酶、精氨酸双水解酶、KCN耐性、三糖铁琼脂<sup>[17]</sup>、V.P.、M.R、硝酸盐还原、马铃薯斜面上生长与色素、淀粉水解、明胶水解、七叶苷水解、酪蛋白水解、H&L氧化发酵、石蕊牛奶、糖还原及有机酸利用<sup>[9]</sup>、Simmons琼脂和糖发酵等项目的测定。

4. 血清学反应: 制备共生细菌86 H<sub>1</sub>初生型及Hb-1品系初生型的抗血清, 然后进行效价测定及交叉凝集反应<sup>[3]</sup>。

## (三) 初生型与次生型菌对线虫繁殖的影响

把共生细菌初生型和次生型菌液分别接种到装有人工培养基<sup>[18]</sup>的大试管内, 培养2~3天, 然后每管接入1000条表面消毒的感染期线虫, 置于25℃的培养箱中培养, 12~14天后, 观察记录线虫繁殖情况和产量, 并检查线虫的感染力。

## (四) 共生细菌的抗菌作用

倾注含86 H<sub>1</sub>初生型与次生型菌量和琼脂厚度基本一致的NA平板, 培养24小时后, 用口径为9.5 mm的打孔器在平板上打孔, 取出含菌琼脂圈分别放于含有藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 及苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的NA平板上, 培养48小时, 观察并测量共生细菌初生型与

次生型抑菌圈大小。

## 试验结果

### (一) 共生细菌的形态、培养特征、生理生化特性及血清学反应

1. 形态特征: 86 H<sub>1</sub> 初生型和次生型菌体均为杆状, 革兰氏阴性, 运动, 周身鞭毛, 无芽孢, 大小分别为  $2.4 \times 0.6 \mu$  和  $2.5 \times 0.6 \mu$ 。Hb—1 初生型和次生型菌体大小分别为  $2.0 \times 0.7 \mu$  和  $2.1 \times 0.6 \mu$ , 其余形态特征与 86 H<sub>1</sub> 菌株相同。

2. 培养特征: 86 H<sub>1</sub> 共生细菌在所测试的五种培养基上均未见到荧光, 而发光共生小杆菌有明显荧光。两株细菌的培养特征见表 1。

3. 生理生化特性: 所有的试验结果见表 2。

4. 血清学反应: 抗 86 H<sub>1</sub> 初生型血清和抗发光共生小杆菌 Hb—1 初生型血清凝集效价分别为 2048 和 1024。两者次生型的凝集效价与其初生型菌一样。此外, 发光共生小杆菌 Hb—1 与抗 86 H<sub>1</sub> 初生型血清进行交叉凝集反应的效价为 256~512。

表 1 两株细菌的培养特征比较

| 菌株<br>落<br>培养基<br>特征 | 86 H <sub>1</sub>                            |                             | Hb—1                                       |                                                   |
|----------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                      | 初生型                                          | 次生型                         | 初虫型                                        | 初生型                                               |
| NA                   | 圆, 直径1mm左右, 凸, 浅黄色, 粘, 半透明。                  | 直径大于1mm, 微凸, 粘性小。其余同左。      | 乳黄色, 其余同86H <sub>1</sub> 初生型               | 直径约3mm, 边缘不规则扁平, 粘性小。其余同86H <sub>1</sub> 初生型。     |
| EMB                  | 圆, 直径约1mm, 紫黑色或具一紫黑色中心, 不透明。                 | 圆, 直径2~3mm, 浅紫棕色, 半透明。      | 同86H <sub>1</sub> 初生型                      | 同86H <sub>1</sub> 次生型                             |
| 麦康凯                  | 圆, 直径1~2mm, 微凸, 棕红色, 粘, 半透明。                 | 直径1~3mm, 扁平, 橙黄色, 粘性小。其余同左。 | 凸, 红色, 不透明。其余同86H <sub>1</sub> 初生型。        | 棕黄色, 其余同86H <sub>1</sub> 次生型。                     |
| NBTA                 | 圆, 直径1mm左右, 凸, 有一蓝绿色中心, 外圈浅蓝色, 透明, 粘, 平板变蓝色。 | 菌落稍大, 其余同左。                 | 有一红棕色中心, 外圈绿色, 不透明。其余同86H <sub>1</sub> 初生型 | 直径1~5mm, 扁平, 有一红色中心, 无粘性。其余同86H <sub>1</sub> 初生型。 |
| SS                   | 圆, 直径1mm左右, 橙黄色,                             | 圆, 直径1~2mm, 浅橙红色            | 同86H <sub>1</sub> 初生型                      | 同86H <sub>1</sub> 次生型                             |

\*除在NA培养基上培养24小时外, 其余均培养48~72小时。

### (二) 初生型与次生型菌对线虫繁殖的影响

初生型菌能使线虫大量繁殖, 次生型菌不能。用 86 H<sub>1</sub> 初生型菌繁殖线虫 86 H<sub>1</sub>, 线

虫产量达599900条/管。而其次生型菌却不能使线虫繁殖起来。另外,用 Hb—1 初生型菌亦能培养线虫86H<sub>1</sub>, 线虫产量达642320条/管, 且子代线虫带上了发光共生小杆菌 Hb—1, 但反过来则不行。繁殖出来的线虫感染力未见减退。

### (三) 共生细菌的抗菌作用

86 H<sub>1</sub> 初生型菌只对藤黄微球菌有抑制作用, 抑菌圈为15.5 mm。但其次生型菌则除藤黄微球菌外, 还能抑制苏云金杆菌, 抑菌圈分别为16.0 mm和13.5 mm。

表2 两株共生细菌的生理生化特征比较\*

| 菌 株                              | 86H <sub>1</sub> |   | Hb—1 |   | 菌 株         | 86H <sub>1</sub> |      | Hb—1 |     |
|----------------------------------|------------------|---|------|---|-------------|------------------|------|------|-----|
|                                  | 初                | 次 | 初    | 次 |             | 初                | 次    | 初    | 次   |
| 过氧化氢酶                            | +                | + | +    | + | 淀粉水解        | —                | —    | —    | —   |
| 苯丙氨酸脱氨酶                          | —                | — | —    | — | 明胶水解        | +                | +    | +    | +   |
| 脱氧核糖核酸酶                          | —                | — | —    | — | 七叶苷水解       | +, -             | —    | +    | +   |
| 卵磷脂酶                             | —                | — | —    | — | 酪蛋白水解       | +                | +    | +    | +   |
| 氧化酶与细胞色素氧化酶                      | —                | — | —    | — | H & L 氧化发酵: |                  |      |      |     |
| 脂酶 (Tween 80)                    | +                | — | +    | + | 开管          | +                | +    | +    | +   |
| 酪氨酸酶                             | —                | — | —    | — | 闭管          | +                | +    | +    | +   |
| 尿酶                               | +                | + | +    | + | 石蕊牛奶:       |                  |      |      |     |
| 精氨酸双水解酶                          | —                | — | —    | — | 产酸          | +                | +    | +    | +   |
| 糖还原                              | —                | — | —    | — | 胨化          | +                | +    | +    | +   |
| 三糖铁琼脂 (产H <sub>2</sub> S)        | —                | — | —    | — | 吲哚产生        | +                | +, - | —    | —   |
| KCN耐性                            | +                | + | +    | + | 有机酸利用       |                  |      |      |     |
| V.P.                             | —                | — | —    | — | 乙酸钠         | +                | +    | +    | +   |
| M.R.                             | —                | — | —    | — | 苯甲酸钠        | +                | +    | —    | +   |
| NO <sub>3</sub> →NO <sub>2</sub> | —                | — | —    | — | 柠檬酸钠        | +                | +    | +    | +   |
| 糖发酵                              |                  |   |      |   | 甲酸钠         | +                | +    | +    | +   |
| 水杨苷                              | —                | — | —    | — | 延胡索酸钠       | +                | +    | +    | +   |
| 七叶苷                              | —                | — | —    | — | 乳酸钠         | —                | —    | —    | —   |
| 葡萄糖                              | +                | + | +    | + | 苹果酸钠        | +                | +    | +    | +   |
| 木糖                               | —                | — | —    | — | 草酸钠         | —                | —    | —    | —   |
| 山梨糖                              | —                | — | —    | — | 琥珀酸钠        | +                | +    | +    | +   |
| 乳糖                               | —                | — | —    | — | 酒石酸钠        | —                | —    | —    | —   |
| 阿拉伯糖                             | —                | — | —    | — | 葡萄糖酸钠       | +                | +    | +    | +   |
| 肌醇                               | —                | — | —    | — | (Simmons)   |                  |      |      |     |
| 麦芽糖                              | —                | — | —    | — | 马铃薯斜面色素     | 浅棕红色             | 泥黄色  | 浅朱红色 | 黄白色 |
| 鼠李糖                              | —                | — | —    | — |             |                  |      |      |     |
| 蔗糖                               | —                | — | —    | — |             |                  |      |      |     |

+ " - 弱阳性; 初一初生型菌; 次一次生型菌。

## 讨 论

从本研究的结果看, 不发光共生细菌86H<sub>1</sub>与发光共生细菌Hb—1在形态、培养特征以及生理生化特性方面绝大多数都是相同的, 且两株细菌均具有抗原性, 它们之间能发生血清学(交叉凝集)反应。因此, 可以确定不发光共生细菌86H<sub>1</sub>亦为发光共生小杆菌这个种。然而它们仍存在着差异(表3)。这此差异是属于不同品系间还是属于不同亚种间的还有待进一步探讨。

表 8                      两株共生细菌性质差异

| 项 目 \ 菌 株    |         | 86 H <sub>1</sub> | Hb—1 |
|--------------|---------|-------------------|------|
| 麦康凯          | 初生型菌落   | 棕红色               | 红色   |
| NBTA         | 初生型菌落中心 | 蓝绿色               | 红棕色  |
|              | 次生型菌落中心 | 同上                | 红色   |
| 脂酶(Tween 80) | 次生型菌    | -                 | +    |
| 马铃薯斜面上生长色素   | 初生型菌    | 浅棕红色              | 浅朱红色 |
|              | 次生型菌    | 泥黄色               | 黄白色  |
| 七叶苷水解        | 初生型菌    | +, -              | +    |
|              | 次生型菌    | -                 | +    |
| 吲哚产生         | 初生型菌    | +                 | -    |
|              | 次生型菌    | +, -              | -    |

+ = 微弱反应

对于异小杆线虫亦有携带不发光共生细菌的, Akhurst(1986)<sup>[12]</sup>已做了报道。他把分离到的一株不发光的异小杆线虫共生细菌鉴定为 *Xenorhabdus luminescens*, 可以说我们的研究结果支持了 Akhurst 的试验结论。同时进一步表明, 此种现象既在 Akhurst 那里有发现, 在广东亦有发现, 显然在其它地方也会是普遍存在的。

初生型共生细菌对线虫繁殖有促进作用, 次生型对线虫繁殖不利<sup>[7]</sup>。本研究的结果亦说明这一点。因此, 在人工大量繁殖线虫时, 应力求应用纯的初生型共生细菌。很显然, 如果应用的初生型菌中杂有一些次生型, 那么线虫产量会下降<sup>[7]</sup>。另外, 尤为严重的是此种情况下, 有些线虫可能带上次生型共生细菌。这样的线虫感染力就低, 不能在昆虫体内繁殖, 因而不能在自然界中建立起自己的种群<sup>[15]</sup>。故用这样的线虫来防治害虫是很难或不会取得成功的。所以, 进行线虫繁殖试验时, 辨别挑选初生型菌是很关键的。国外的研究和本文的结果均说明, 初生型与次生型菌在形态、生理生化特性及血清学反应方面几乎相同。其差异主要表现在培养特征上。一般地, 发光共生细菌的初生

型与次生型的菌落较易区别,特别是在鉴别培养基 NBTA 平板上。然而本研究分离的不发光的异小杆线虫共生细菌初生型与次生型菌落特征在多种培养基(如 NA、NBTA)上区别均不太明显。唯一区别较明显的是在 EMB 平板上。该培养基也适合发光异小杆线虫共生细菌型的区别。此外,由于 EMB 培养基国内已有干粉商品出售,使用较方便。因此,作者认为,EMB 培养基可代替 NBTA 来区分异小杆线虫共生细菌(发光的和不发光的)的初生型与次生型。

共生细菌的专化性,在新线虫属 (*Neoplectana*) 线虫中已有报道<sup>[10]</sup>;大部分新线虫属线虫可带上同种其它品系线虫的共生细菌,少数可带上同属其它种线虫的共生细菌。但异小杆线虫属线虫是否也有同样情况?在这之前还未见有正式报道。本研究表明,异小杆线虫属线虫亦存在类似的情况。从实验结果看出,用不发光的共生细菌 86H<sub>1</sub> 初生型及发光共生小杆菌 Hb-1 初生型菌来培养异小杆线虫 86 H<sub>1</sub>, 其产量相差无几。这就为异小杆线虫与共生细菌之间的重新组合培养提供了基础和依据。即我们有可能通过优良性状的线虫和共生细菌的适当组合,从而选育出性状更合需要的线虫。因此这方面的工作有必要进一步探讨。

对于异小杆线虫共生细菌的抗菌作用,一般认为,初生型菌能抑制许多微生物的生长,次生型却不能<sup>[8]</sup>。然而本研究结果表明,次生型亦具有抗菌作用。这种情形与格氏,线虫共生细菌有点相似<sup>[11]</sup>。因此,光凭抗菌作用的有无来判定初生型与次生型是不太可靠的。此外,这种次生型亦有抗菌作用的特性,是否有一定的积极意义倒是值得研究的问题。

#### 引用文献

- [1] 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.北京:科学出版社,1978;
- [2] 中国科学院微生物研究所.菌种保藏手册.北京:科学出版社,1980;
- [3] 方中达.植病研究方法.北京:农业出版社,1979;
- [4] 欧阳谅.微生物学实验法.南昌:江西人民出版社,1980;
- [5] 徐洁莲.昆虫天敌.1986; 8 (3): 168~174
- [6] 斯克爾曼(中译本).细菌属的鉴定指导.附方法及属的特征提要.北京:科学出版社,1978
- [7] Akhurst, R. J., J. Gen. Microbiol. 1980 121 (2), 303-9
- [8] Akhurst, R. J., J. Gen. Microbiol. 1982 128: 3061-6
- [9] Akhurst, R. J., Inter. J. Syst. Bacteriol. 1983 33 (1), 38-45
- [10] Akhurst, R. J., Experimental Parasitology 1983 55: 258-83
- [11] Akhurst, R. J., *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*, Its interaction with insect pathogenic nematodes, in "System. Appl. microbiology." 1985
- [12] Akhurst, R. J. and N. E. Boemare, 86 Gen. Microbiol. 1986 132(7): 1917-22
- [13] Bedding, R. A., Ann. Appl. Biol. 1984 104: 117-30
- [14] Bedding, R. A. and L. A. Miller, Ann. Appl. Biol. 1981 99: 221-6
- [15] Nickle, W. R., Plant and insect nematodes. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. 1984

- [16] Poinar, G. O. Jr. et al.; Parasitology 1966 56; 385—90
- [17] Poinar, G. O. Jr. and G.M. Thomas, Diagnostic manual for the identification of insect pathogens. Plenum, New York 1978
- [18] Thomas, G. M. and G. O. Poinar, Jr., Inter. J. Syst. Bacteriol. 1979 29 (4), 858—60
- [19] Thomas, G. M. et al., Inter. J. Syst. Bacteriol. 1983 33 (4), 878—9

A NONBIOLUMINESCENT BACTERIUM SYMBIOTICALLY ASSOCIATED  
WITH THE INSECT—PATHOGENIC NEMATODE

*HETERORHABDITIS* SP.

Dai Guan-qun      Tang Yiling

(Department of Plant Protection)

ABSTRACT

A nonbioluminescent bacterium symbiotically associated with the insect-pathogenic nematode *Heterorhabditis* spp. 86H<sub>1</sub> was isolated in China. Both of two forms exhibited antibiotic activity, but only primary form enhanced nematode production. Using the EMB agar, the two forms were easily distinguished. According to its morphological, cultural, physiological, biochemical and serological characters, it was identified as *Xenorhabdus luminescens*. So the characterization of the species may need to be amended to allow for bioluminescence or not.

Key words, *Xenorhabdus luminescens*; *Heterorhabditis* spp.; symbiotic bacterium