

# 噬菌体定量检测青枯假单胞杆菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 方法的研究

## II 噬菌体ZP-2对土壤含菌量测定的研究

莫寅元 任欣正 方中达

(南京农业大学植保组, 南京)

### 提 要

采用噬菌体技术对人工接种土壤的青枯假单胞杆菌姜瘟菌株进行测定, 结果表明, 在每克土含 $10^3$ 菌落形成单位(CFU)的情况下, 回收率为57.4%, 检测的敏感性较高, 在每克土含 $10^2$ (CFU)的条件下也能测到活菌数。因此, 这种方法是一种快速、简便、有前途的方法。

在利用噬菌体检测植物病原细菌方面, 已有不少研究者在不同的植物病原细菌——噬菌体系统中作了研究和尝试, 这些研究都是以植物组织或种子为研究对象的<sup>[3-6]</sup>。本研究在完成噬菌体ZP-2生物学特性<sup>[1]</sup>和用ZP-2对纯菌定量测定方法<sup>[2]</sup>的基础上, 探讨用ZP-2对土壤含菌量的测定方法。

### 材 料 与 方 法

**1. 测定程序** 测定土壤中的细菌含量, 在测定待测土样的同时, 必须设立两个对照。

(1) 灭菌土对照: 其作用是在加入土壤因子后, 游离噬菌体是否全部被中和。灭菌土20克加20ml 1% 胨水, 振荡(100r/m) 30分钟, 然后离心若干分钟, 取上清液1ml, 加1ml噬菌体ZP-2( $10^9$ PFU/ml), 在30℃水浴中吸附30分钟, 加2ml抗血清(抗血清稀释倍数依其效价而定), 在相同温度下中和5分钟, 取样0.1ml/皿, 共3皿, 28℃下培养过夜, 噬菌斑计数, 计算平均噬菌斑数。

(2) 灭菌土加纯菌对照: 测定回收率, 用灭菌土20克, 加纯菌菌液( $10^4$ CFU/ml) 2ml, 再加18ml 1% 胨水, 以下步骤同(1)。

(3) 待测土样: 样本土20克, 加20ml 1% 胨水, 以下步骤同(1)。

土壤测定比纯菌测定复杂, 关键就是怎样把存在于土壤中的细菌尽可能多地提取出来, 而使土粒的影响降低到最低程度。因此, 首先要确定适当的离心时间和速度。

本稿于1986年6月30日收到

**2. 离心时间的确定:** 根据预备试验的结果选择离心速度为2000r/m。

(1) 以定量纯菌 ( $10^8$ CFU/ml) 经5、10、15分钟离心, 取样0.1ml/皿于TZC平板, 每处理3皿, 重复三次。

(2) 灭菌土 (沙壤土和粘土) 土壤悬浮液经5、10、15、20分钟离心, 分别取上清液1ml, 各加1ml噬菌体 ZP-2 ( $10^9$ PFU/ml), 30℃水浴中处理10分钟, 再各加2ml抗血清, 30℃下中和5分钟, 取样0.1ml/皿, 各3皿, 对照以1%豚水代替上清液, 重复3次。所得噬菌斑数越少, 表明中和程度越高, 即土粒干扰作用排除越完全。

**3. 土粒对噬菌体吸附的测定:** (1) 土壤悬浮液处理: 取灭菌土20克, 加20ml噬菌体, 浓度有 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ PFU/ml 振荡30分钟, 离心 (2000r/m) 10分钟, 直接取样于上清液或稀释后取样0.1ml/皿, 各3皿, 重复3次。

(2) 上清液处理: 取经10分钟离心 (2000r/m) 灭菌土上清液0.9ml, 加0.1ml噬菌体 ( $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ PFU/ml) 相混, 30℃水浴中处理10分钟, 直接取样或稀释后取样0.1ml/皿, 各3皿, 重复3次。

**4. 测定土壤对抗血清的影响:** 取灭菌土2克, 加2ml抗血清 (稀释10倍), 静置30分钟, 上清液作倍比稀释以测定其效价, 对照以1%豚水为介质。另用灭菌土上清液 (2000r/m、10分钟) 为介质稀释抗血清, 测定其效价, 并与对照比较, 各重复3次。

**5. 土壤对细菌吸附的测定** 取灭菌土20克, 加20ml细菌悬浮液 ( $10^2$ 、 $10^3$ CFU/ml), 振荡30分钟, 离心 (2000r/m) 10分钟, 取上清液0.1ml/皿于TZC平板, 各3皿, 对照为不受处理的纯菌, 重复3次。另用灭菌土土壤上清液 (2000r/m、10分钟) 处理纯菌 ( $10^2$ 、 $10^3$ CFU/ml), 作相同的测定。

**6. 土壤含菌量回收率和含菌量计算** 所谓土壤含菌量回收率是指一定量细菌加入土壤后, 用噬菌体技术测得的噬菌斑数与实际菌量 (平板菌落数) 之比的百分数, 计算方法如下:

$$R_2 = \frac{(A_2 - A_3) \times 40}{n_2} \times 100\%$$

$R_2$  为土壤含菌量回收率,  $A_2$  为灭菌土加纯菌项平均噬菌斑数,  $A_3$  为灭菌土项平均噬菌斑数,  $n_2$  为加入土壤的实际菌量, 40为稀释倍数 (整个测定过程稀释40倍)。

待测土样含菌量计算方法为: 土样项平均噬菌斑数 ( $A_4$ ) 减去灭菌土项平均噬菌斑数 ( $A_3$ ), 乘稀释倍数40, 除以回收率 ( $R_2$ ), 即:

$$\text{土壤含菌量} = (A_4 - A_3) \times 40 \div R_2$$

**7. 取样方式** 种植寄主植物前大田病土按5点取样, 取土样200g左右, 充分混匀后, 再取20克用于测定。

## 结 果

1. 离心时间的确定:

(1) 定量纯菌经不同时间离心后 (2000r/m), 平板菌落数变化结果见表1。

表1说明, 经10'离心, 有5%细菌下沉, 但经15分钟离心, 则有40%细菌下沉。因

表1 纯菌经不同时间离心后的平板菌落数(%)

Tab.1. Colony numbers of pure bacteria after centrifugation(2000r/m)

离心时间(分) Centrifugation time(min)	5'	10'	15'	原有细菌数 Original numbers of bacteria
平板菌落数(%) Colony numbers of plate(%)	100	95	60	100

此, 必须把离心时间控制在10分钟内。

(2) 土壤悬浮液经不同时间离心2000r/m后所到上清液作为介质, 抗血清对存在于此介质中的游离噬菌体中和程度结果见表2。

表2 不同离心时间对抗血清中和噬菌体的影响

Tab.2. The effect of different centrifugation time on neutralization of antisera

离心时间(分) Centrifugation time (min)	5'	10'	15'	20'	对照 Control
噬菌斑数 Plaque numbers	粘土 146	5.2	2.5	0	0
	沙壤土 4	1	0	0	0

对于沙壤土, 只要10分钟离心即可排除土壤对抗血清和噬菌体的作用。而对于粘土则要20分钟离心才能排除土粒的影响。但由于纯菌经15分钟离心, 菌体下沉已很明显(表1), 故对于粘土仍选用10分钟离心。

因此, 最后确定离心时间为10分钟(2000r/m)。

2. 土粒对噬菌体吸附的影响: 不同质地的土壤悬浮液和上清液对噬菌体吸附的结果列于表3。

表3 土壤对噬菌体吸附的影响\*

Tab.3 The influence of soil on phage adsorption

原有噬菌体浓度(PFU/ml) Original concentration of phage		$8.7 \times 10^1$	$8.7 \times 10^2$	$8.7 \times 10^3$	$8.7 \times 10^4$	$8.7 \times 10^5$	$8.7 \times 10^6$	$8.7 \times 10^7$
粘土	悬浮液 Suspension	0	$3.65 \times 10^2$	$4.65 \times 10^3$	$5.15 \times 10^4$	$5.7 \times 10^5$	$6.7 \times 10^6$	$7.3 \times 10^7$
	上清液 Supernatant	5.4	$5.5 \times 10^2$	$5.8 \times 10^3$	$6.0 \times 10^4$	$6.9 \times 10^5$	$8.7 \times 10^6$	$8.7 \times 10^7$
沙壤土	悬浮液 Suspension	0	$4.8 \times 10^2$	$5.2 \times 10^3$	$7.2 \times 10^4$	$7.8 \times 10^5$	$8.7 \times 10^6$	$8.7 \times 10^7$
	上清液 Supernatant	5	$6.9 \times 10^2$	$7.8 \times 10^3$	$8.4 \times 10^4$	$8.4 \times 10^5$	$8.7 \times 10^6$	$8.7 \times 10^7$

\*表中数据为噬菌斑数

\*The data in table express the numbers of plaques

从表3可知,粘土对噬菌体的吸附比沙壤土要强,粘土对噬菌体吸附的最大容量为 $1.4 \times 10^7$ PFU/ml;沙壤土对噬菌体吸附的最大容量为 $9 \times 10^4$ PFU/ml。土壤悬浮液对噬菌体的吸附比上清液强。土壤对噬菌体的吸附还依加入土壤的噬菌体浓度而异,在较低浓度情况下,土壤对噬菌体的相对吸附大,在较高浓度下,则相对吸附小。

3.土壤对抗血清的影响:土壤悬浮液及上清液对抗血清效价的影响见表4。

表4 土壤对抗血清效价的影响

Tab.4 The influence of soil on antiserum titers

土壤类型 Types of soils	原有抗血清效价 Original titers of antisera	处理后抗血清效价 Antiserum titers after treatment
粘土	悬浮液 Suspension	200
	上清液 Supernatant	160
沙壤土	悬浮液 Suspension	200
	上清液 Supernatant	200

粘土对抗血清效价影响比沙壤土要强,粘土上清液稍有影响,沙壤土上清液对抗血清没有影响。

4.土壤对细菌吸附的影响:用土壤上清液处理菌液的结果与对照的相一致,即上清液对细菌不产生吸附。

不同质地土壤悬浮液对细菌吸附影响结果见表5。

表5 土壤对细菌吸附的影响

Tab.5 The influence of soil on adsorption of bacteria

土壤类型 Types of soils	处理前菌量 Bact. concentration before treatment	处理后菌量 Bact. concentration after treatment	吸附率(%) Adsorption rate (%)	处理前细菌量 Bact. concentration before treatment	处理后细菌量 Bact. concentration after treatment	吸附率(%) Adsorption rate (%)
粘土	273	174	41	1350	964	29
沙壤土	273	205	25	1350	1210	10

从表5可知,粘土对细菌的吸附比沙壤土大,在细菌浓度为273CFU/ml时,粘土对细菌的吸附率为41%;沙壤土对细菌的吸附率为25%。较低浓度细菌比较高浓度细菌表现更大的吸附程度。就粘土而言,在细菌浓度为273CFU/ml时,吸附率为41%;而在细菌浓度1350CFU/ml时,吸附率则为29%,在土壤质地已经确定的条件下,如要减少土壤对细菌的吸附,只有提高加入土壤中的细菌浓度。

5.土壤含菌量回收率测定结果:根据10个试验结果的统计,平均土壤含菌量回收率为57.4%(在 $10^3$ CFU/克土的情况下)。

6. 自然病土含菌量测定应用: 根据上一年发病情况, 在山东枣庄冬季病田中, 有目的地选择几个类型的土样进行测定, 其结果列于表6。

表6 田间自然发病土的含菌量测定  
Tab.6 Concentration of bacteria in natural infested soils

土样编号 No. of samples	1	2	3	4	5
来源 Sources	枣庄农科所	枣庄农科所	枣庄农科所	枣庄黄泉大队	枣庄祝郭大队
上年发病情况 Disease incidence in last year	中等发病田 Serious field	轻病田 low incidence field	无病害症状田 No symptom field	重病田 Very serious field	重病田 Very serious field
测定结果(CFU/克土) Test results (CFU/g)	$3.5 \times 10^3$	$6.7 \times 10^3$	$3.2 \times 10^2$	$8.5 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$

测定时间在1984年5月, 2次重复。测定结果与上一年发病情况基本相符, 除2号样本外, 凡是发病重的土壤病菌含量高。对于上年不发病的3号样本也测到320CFU/克土, 说明不表现症状并不能完全肯定这块田就一定无病菌。

## 讨 论

土壤含菌量回收率比纯菌回收率低, 这是必然的。因为土壤本身对细菌的吸附, 离心过程中细菌的下沉等, 都会使一部分细菌损失掉。在离心速度不变的情况下, 离心时间既影响细菌, 又影响土粒下沉, 由土粒再影响到细菌、噬菌体及抗血清, 这是一个比较复杂的相互联系。适宜的离心时间只有在做一系列试验的前提下才能确定。本研究通过纯菌和灭菌土不同时间离心, 最后确定10分钟(2000r/m)为适宜离心时间, 这是比较恰当的, 因为在这样的条件下, 纯菌的损失较小, 而对土粒的干扰已基本排除。土壤上清液对噬菌体, 抗血清的影响很小, 这就保证了利用此法的可能性。土壤对细菌的吸附依不同的土壤质地和加入土壤的细菌浓度而异。粘土对细菌的吸附比沙壤土强, 土壤对细菌的吸附与加入土壤的细菌浓度成反比。如何减少土壤对细菌的吸附, 这是一个有待研究的问题。

大田病土的测定工作做得较少, 但就这少量的测定, 大致可以看出测定结果与上年的发病情况基本相符。通过大田病土的测定, 可以说明噬菌体技术应用于病原细菌的土壤生态学研究是可行的。至于怎样能够在田间应用, 还要做进一步的工作。

## 参 考 文 献

- [1] 任欣正、莫寅元、方中达, 青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)噬菌体ZP-2和ZP-3生物学性状的研究(待发表)。
- [2] 任欣正等, 噬菌体定量检测青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)方法的研究. I、噬菌体ZP-2对寄主细菌定量测定的方法, (待发表)。
- [3] 方中达等, 1982, 植物保护学报9: 103—108。
- [4] Bladwin C.H. and R.N. Goodman, 1963, *Phytopathology* 53: 1299—1303。
- [5] Erskine, J.M., 1973, *Can. J. Microbiol.* 19: 837—845
- [6] Katznelson, H. and D.M. Sutton, 1951 *J. Bacteriol.* 61: 689—701
- [7] Katznelson, H. et al., 1954, *Can. J. Microbiol.* 1: 22—29
- [8] Okabe, N. and M. Goto, 1963, *Ann. phytopathology* 1: 397—418
- [9] Wakimoto, S., 1957, *Ann. phytopathol. soc. Japan* 22: 59—63

## STUDIES ON A METHOD FOR QUANTITATIVE DETECTING OF THE POPULATION OF PSEUDOMONAS SOLANACEARUM BY PHAGE TECHNIQUE

### II. Quantitative Detecting Method of *Pseudomonas solanacearum* Bacteria in Soil by Phage Zp-2

Mo Yin-yuan Ren Xin-zheng Fang zhong-da

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing)

The present paper deals with the phage technique to quantitative determine the survival of causing bacteria of ginger wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in soil. Results show that the bacteria in inoculated soil could recover to 57.4% at  $10^3$  CFU/g soil. The living bacterial cells, even at  $10^2$  CFU/g soil, could be detected. The phage technique is a sensitive, rapid and simple method.