

苏芸金芽孢杆菌与蜡状芽孢杆菌

张文成 任改新

(南开大学生物系 天津 300071)

关键词 苏芸金芽孢杆菌, 蜡状芽孢杆菌

分类号 R378 文献标识码 C 文章编号 0253-2654(1999)-04-0293-04

苏芸金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 *B.t.*)与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* 简称 *B.c.*)这一对高度近缘细菌既有重要的经济意义又与人类的健康密切相关。*B.t.*在其芽孢形成期可产生杀虫晶体蛋白,已成为全球性应用最广泛的细菌杀虫剂^[1];*B.c.*能产生多种有害毒素,诸如肠毒素、呕吐毒素、溶血素等,可引起人类非肠道感染及食物中毒,是人类的条件致病菌^[2]。尽管*B.t.*杀虫剂有较好的完全性记录,但新近的文献表明,昆虫病原菌*B.t.*与人类的条件致病菌*B.c.*的基因型及表现型非常相似,*B.t.*菌株也可产生对非靶标生物及人畜有毒的肠毒素、溶血素等。人们当前最关注的问题是*B.t.*的大规模的使用会不会对人畜构成威胁,本文拟对*B.t.*与*B.c.*的研究现状作一概述。

1 蜡状芽孢杆菌

蜡状芽孢杆菌(*B.c.*)是一种杆状、产内生芽孢的革兰氏阳性细菌,土壤、尘埃、各类食物中皆可分离到*B.c.*。通常认为*B.c.*是一种条件致病菌,临床上有可致脓肿、脑膜炎、骨髓炎、心内膜炎等报道,但以引起食物中毒

最为重要,有关*B.c.*引起非肠道感染及食物中毒的报道屡见不鲜^[3]。

人类对*B.c.*致病性的认识过程进展缓慢,有以下两个原因,其一,有相当长的一段时期内,研究人员关注的焦点是如何区分*B.c.*与其近缘种炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)。其二,与芽孢杆菌属分类学上的混乱状态有关,直到1952年,Smith才使该属的分类趋于有序^[4]。尽管在1952年之前,*B.c.*被冠以各种不同的种名,但是,大量证据表明,从1898年起,就有*B.c.*造成泌尿系感染及肠胃炎的记载,有些感染的病例甚至很严重,以致造成死亡,*B.c.*也可引起牛的口蹄炎^[5]。

在微生物发展的早期,好氧芽孢杆菌就被怀疑可造成食物中毒,Lubenu1906年描述了发生在一家医院的严重的食物中毒事件,300名医务人员及病人用餐后出现急性肠胃炎,对剩余的食物进行检测,发现含有大量的好氧芽孢杆菌,尽管从原文中的描述分析,该污

1998-06-23收稿,1998-11-28修回

染菌应为 *B.c.*, 但原作者将其定名为 *B. peptonificans*. Seitz 1913 年从一例患肠炎与腹泻的病人分离出 *B.c.* 样芽孢杆菌。Brekenfeld 分别于 1926 年及 1929 年报道了两起 *B.c.* 造成的食物中毒事件。1936 年至 1942 年, 瑞典卫生部对 367 例食物中毒事件综合分析, 证实 117 例是由 *B.c.* 样芽孢杆菌引起, 且认识到 *B.c.* 污染的食物, 储藏温度不当时, 可能会造成食物中毒。按照当今的流行病学标准来衡量, 有关芽孢杆菌引起食物中毒的早期报道很粗略。很少人对食物等病检标本的污染菌作过计数, 对污染菌的鉴定、命名也不确切, 从而造成不少混乱现象。Smith、Gorden 及其同事在芽孢杆菌分类学上的出色工作, 为进一步研究这一大类群细菌奠定坚实基础, 也正是由于分类学的进展, Hauge 经过对 4 起食物中毒事件的认真调查, 于 1955 年首次确认 *B.c.* 是一种引起食物中毒的致病菌^[6]。

近 40 年来, *B.c.* 作为引起食物中毒的致病菌受到研究人员的普遍关注。起初, 研究的重点是 *B.c.* 引起的腹泄综合症, 其潜伏期较长, 食入污染的食物 8~16h 后, 出现腹部痉挛及腹泻症状, 引起此类的食物中毒的食物种类很多, 如蔬菜、肉类、蛋糕、果浆、牛奶等。后来的研究表明, *B.c.* 也可引起呕吐型的食物中毒症, 其潜伏期较短, 为 5~6h。 *B.c.* 引起的呕吐型食物中毒症状与金黄色葡萄球菌的致病症状十分相似, 因此, 曾经一度将 *B.c.* 引起的食物中毒误认为由金黄色葡萄球菌所造成。大量实验证实, *B.c.* 产生的呕吐毒素是一种由十二个氨基酸组成的环状肽, 为一种热稳定毒素 (1×10^5 Pa, 1.5h), 通过 5-羟色胺受体刺激迷走神经传入通路而引起呕吐反应。不同国家由 *B.c.* 造成食物中毒的主要类型也不相同, 在日本呕吐型食物中毒的发生率是腹泄型的 10 倍^[7], 而在欧洲及北美洲以呕吐型食物中毒为主。有关 *B.c.* 食物中毒的流行病学资料如下: 1993~1998 年期间挪威 33.3% 的食物中毒由 *B.c.* 引起; 冰岛 (1985~1992) 为 47%; 荷兰 (1991) 为 8.5%; 丹麦 (1990~1992) 为 5%。

B.c. 所造成的腹泄型食物中毒的致病因子是肠毒素, 肠毒素能够引起家兔肠段的液体积聚, 可以改变豚鼠皮肤血管的通透性, 具有对 vero 细胞的溶细胞毒性^[8]。对具有肠毒素活性的蛋白已进行过纯化, Turnbull 1979 年报道过一个单亚基热不稳定肠毒素, 其分子量 50kD, 等电点为 4.9, Thompson 1984 年研

究证实 *B.c.* 含有一种多亚基组成的肠毒素, 他从 *B.c.* B-4ac 菌株中通过层析法分离到三个蛋白亚基, 三者的分子量分别为 38、39.5 及 43kD, 实验表明只有三个亚基同时存在才具有肠毒素的活性。Beecher 1991 年从 *B.c.* 菌株中分离提纯了一种具溶血活性的三亚基肠毒素, 并命名为溶血素 BL (hemolysin BL), 该肠毒素亚基大小及等电点与 Thompson 1984 年报道的结果相似^[9]。Shinagawa 提纯了一种单亚基的肠毒素蛋白, 其分子量为 45kD, 等电点为 5.5。Lund 1996 年的研究结果显示, *B.c.* 菌株含有一种不具溶血活性的三亚基肠毒素, 其三个亚基的分子量分别是 39、45 及 105kD^[10]。综上所述, 由于世界各国不同实验室使用的菌株及技术路线各有差异所以报道的结果也不相同。尽管对 *B.c.* 能产生多少种肠毒素尚未定论, 但至少有两种肠毒素的结构已经阐明, 即溶血素 BL 及肠毒素 T (entetotoxin T)^[3,11]。

为了从分子水平阐明 *B.c.* 肠毒素基因的结构和功能, 有人对编码的肠毒素基因进行了克隆和测序。日本学者 Agata 从 *B.c.* B-4ac 菌株中对编码肠毒素 T 的 *bceT* 基因实施克隆并测序^[11], Pyan 等对编码溶血素 BL 三个亚基的基因 *hblA*, *hblC*, *hblD* 完成克隆和测序^[12]。

2 *B.t.* 与 *B.c.* 的相似性研究

苏芸金芽孢杆菌作为一个独立的种在《伯杰氏细菌手册》第七版到第九版中得到正式确认。然而, 对于 *B.t.* 是否独立于人类病原菌 *B.c.* 种群这一问题至今仍有争议。在 *B.c.* 近缘种的形态、菌落及生理生化特征中, *B.t.* 除能产生伴孢晶体而不同于 *B.c.* 外, 其它性状几乎没有区别。不同的芽孢杆菌所含的不饱和脂肪酸的种类、比例以及链的长度范围是不相同的, 然而, *B.t.* 与 *B.c.* 二者的脂肪酸非常相似。DNA 同源性、G+C% 以及 16S rRNA 序列测定都证实了 *B.t.* 与 *B.c.* 的相似性。Carlson 1993 年利用脉冲场变电泳 (PFGE) 及多位点酶电泳技术 (MEE) 对 *B.t.* 与 *B.c.* 染色体 DNA 物理图谱及多位点酶进行了对比研究, 结果表明, 二者无实质性差异, 并主张将 *B.t.* 与 *B.c.* 鉴定为同一个种^[13]。鉴于上述 *B.t.* 与 *B.c.* 极为相似的情况, 细菌分类学家一直坚持把二者合并为一个种, 把 *B.t.* 鉴定为 *B.c.* 的一个亚种, 亚种下进一步区分为不同的血清型。但是, 这一主张并没有被《伯杰氏细菌手册》所采纳, 而是从经济与实践需要出发, 继续保留了 *B.t.* 作为独立种的分类地位。

尽管 *B.t.* 与 *B.c.* 已被界定为不同的种,但二者基因型及表现型的相似性不容否认。近几年来,对 *B.t.* 所分泌的各类对哺乳动物及人类有害毒素的研究开始受到重视。Carlson 1993 年利用 *B.c.* 肠毒素免疫试剂盒对 12 个 *B.t.* 菌株进行了检测,发现其中有 9 个 *B.t.* 菌株含有肠毒素^[13],日本学者 Takeshi, M. 1995 年对从土壤、食物、蔬菜分离的 90 个 *B.t.* 野生株进行研究,发现其中有 47 株 *B.t.* 可以产生肠毒素。1994 年,瑞典学者 Abdel-Hameed 从土壤中也分离到 23 株产肠毒素的 *B.t.* 野生株,Perani(1998)的研究工作表明:83% 的新分离株可产生肠毒素。1995 年,Tashio, M 利用杂交瘤技术,获得了 *B.t.* 溶血素的单克隆抗体,该单克隆抗体可以和 *B.t.* 及 *B.c.* 所产生的溶血素发生相同的免疫学反应,进一步证实了 *B.t.* 及 *B.c.* 溶血素发生的免疫学同源性。苏芸金芽孢杆菌可产生对脊椎动物特别是哺乳动物有细胞遗传毒性的热稳定 β -外毒素,Ohba 等的研究表明,在 270 个 *B.c.* 菌株中,有 3 株也可产生 β -外毒素。

文献资料表明,杀虫晶体蛋白的 *cry* 基因一般都定位于质粒上,因而产生晶体这一表型特征可随质粒的丢失而丧失,而丢失晶体的 *B.t.* 与 *B.c.* 无法区分。更重要得是 *cry* 晶体编码质粒可以在 *B.t.* 与 *B.c.* 菌株中发生转移,形成能产生晶体的 *B.c.*^[14]。*B.t.* 与 *B.c.* 如此相似,尽管 *B.c.* 被视为对人类健康有害的条件致病菌,但 *B.t.* 却由于其有杀虫活性,而被认为是有益微生物。虽然到目前为止 *B.t.* 仅引起一例人类的疾病—角膜炎,但近几年来发现 *B.t.* 也可产生类似 *B.c.* 的肠毒素以后,人们开始关注 *B.t.* 是否也可以造成食物中毒。为了认识 *B.t.* 对人类及高等动物的潜在的致病性,最直接的办法就是比较 *B.t.* 与 *B.c.* 产生的肠毒素及编码基因。1997 年日本学者 Asano, S.I. 从一个 *B.c.* 菌株中 (*B.c.* FMI) 及两个 *B.t.* 标准株中 (*B.t.i.*; *B.t.sotto*) 克隆到同一个肠毒素基因^[15]。对 *B.c.* FMI 中克隆到的肠毒素 *ent* FM 基因测序表明,该开读框架所编码的蛋白由 422 个氨基酸组成,分子量为 45kD。在开读框架的邻近区域,有一个核糖体结合位点。该开读框架的 5' 端,有一个与 *B.t.cry* 基因启动子相似的序列。对 *ent* FM 基因所编码的氨基酸序列分析表明,其 N-端有一个由 19 个氨基酸组成的疏水性信号肽序列,此结构与肠毒素向胞外分泌相适应。Southern 杂交实验证实, *ent* FM 基因定位于染色体上。

Assano, S.I. 为了对 *B.t.i.* 及 *B.t.sotto* 中可能存在的肠毒素基因进行克隆,按照 *ent* FM1 基因序列设计一对引物,然后以上述两个 *B.t.* 标准株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得的片段与 *ent* FM1 基因大小一致。经过克隆及测序,将由 *B.t.i.* 及 *B.t.sotto* 中获得的肠毒素基因命名为 *entI*, *ent S*。分析 *entS* 的序列得知:是一个连续的开读框架,其编码的蛋白分子量为 45kD,由 430 个氨基酸组成。比较 *ent S*, *entI* 及 *ent FM* 基因编码的氨基酸序列得知, *Ent S* 与 *EntI* 的相似性为 99%, *Ent S* 与 *Ent FM* 二者的同源率为 97%^[15]。

为了检测 *ent S* 肠毒素基因是否在 *B.t.* 中普遍存在,利用 PCR 技术对 10 个不同 *B.t.* 亚种进行检测,除 *B.t.morrisoni* HD12 及 *B.t.tolworthi* HD125 两个菌株不含有 *entS* 基因外,其余八个标准菌株 (*B.t.azawai* HD125; *kenyae* HD136; *kurstaki* HD1; *aizawai* HD12 等) 皆含有该基因^[15]。1996 年本文作者曾对肠毒素基因 *hblA* 与 *bceT* 在 *B.t.* 种群的分布,通过 PCR 技术作过系统调查,发现除少数菌株外,大多数菌株含有 *hblA* 与 *bceT* 基因,通过非连续性溶血平板法的实验表明,有些 *B.t.* 与 *B.c.* 菌株可以产生溶血素 BL,说明肠毒素基因在 *B.t.* 与 *B.c.* 菌株皆有分布^[16]。

Asano 曾提出一种观点: *B.t.* 是获得 *cry* 质粒的 *B.c.*。从这一观点分析, *B.t.* HD12 及 *B.t.* HD125 或许在进化过程中更高等, *B.c.* 作为进化史上较为原始的类群,很可能获得 *cry* 基因后演变为含有肠毒素基因的 *ent*⁺ *B.t.* 菌株。另外一种推论是 *ent*⁻ *B.t.* 菌株与 *ent*⁺ *B.t.* 菌株起源于不同的祖先。

由 *B.t.* 菌株生产的各种商品化杀虫剂已经大规模地应用于农林及卫生害虫的防治数十年,与 *B.c.* 不同的是 *B.t.* 危及人类健康的报道很少,有如下两种可能的解释: (1) *B.t.* 与 *B.c.* 肠毒素蛋白中氨基酸序列的细微差异,可以降低 *B.t.* 菌株的致病性。(2) *B.t.* 菌株不能在人类肠道中繁殖。

3 结束语

纵观新近文献, *B.c.* 除了引起呕吐及腹泻型的食物中毒之外,还可导致败血症及非肠道感染, *B.c.* 的污染也可影响牛奶工业。鉴于 *B.t.* 与 *B.c.* 的基因型及表现型十分相似,为了避免 *B.t.* 菌株造成生态污染并对人类健康构成威胁,建议在遴选 *B.t.* 高毒生产菌株及生物工程改良菌株的出发株时,选用不含肠毒素基因、或含有肠

毒素基因而不表达或表达水平不高 *B.t.* 菌株。

参 考 文 献

- [1] 曾林, 任改新. 微生物学通报. 1998, 25(1): 49~51.
- [2] 夏克栋. 微生物学通报. 1989, 16(1): 35~36.
- [3] Granum P E, Naestvold A, Gundersby K N. Norsk Veterinaidisk, 1995, 107: 945~948.
- [4] Smith N R, Gordon R E, Clark E F. United States Department of Agriculture Monograph No. 16, 1952, PP: 56~64.
- [5] Jone T O, Turnbull P C B. Vet Rev, 1981, 108: 272~274
- [6] Hauge S J. Appl Bacteriol, 1955, 18: 591~595.
- [7] Kramer J M, Gibert R J. In: Doyle M D ed Foodborne Bacteriol Pathogens New York: Marcel Dekker, 1989, 21~71.
- [8] Shinagawa K, Sagiya J, Terada J. FEMS Microbiol lett, 1990, 80: 4~6.
- [9] Beecher D J, Macmillam J D. Infect Immun, 1991, 43: 887~894.
- [10] Lund T, Granum P E. FEMS Microbiol Lett, 1996, 141: 151~156.
- [11] Agata N, Ohba M, Araakwa Y. Microbiology, 1995, 141: 983~988.
- [12] Pyan P A, Macmillam J D, Zilinskas A. J Bacteriol, 1997, 179: 2551~2556.
- [13] Carlson C R, Kolsto A B. J Bacteriol, 1993, 175: 1053~1060.
- [14] Ganzales J M, Brown B J, Carlton B C. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 6951~6955.
- [15] Asano S I, Nukumizu Y, Bando H. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(3): 1054~1057.
- [16] Zhang W C, Ren G X. Society for Invertebrate Pathology In: 30th Annual Meeting: Program and Abstract, 1997, 70~71.