

多重 PCR 技术检测微生物肥料中巨大芽孢杆菌和蜡样群芽孢杆菌的研究与应用

曹凤明^{1,2*} 李俊² 沈德龙¹ 关大伟² 李力²

(1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

(2. 农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心 北京 100081)

摘要: 巨大芽孢杆菌是微生物肥料生产中的常用菌种, 与之形态上相似的蜡样群芽孢杆菌(蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌)则是产品中常见的污染菌, 传统方法区分两者费时费力, 有必要建立检测这两类芽孢杆菌的 PCR 方法。本文利用已登录的 *spoOA* 基因序列分别设计和筛选了上述两个种(群)的特异引物, 并建立了多重 PCR 检测技术。使用该方法对巨大芽孢杆菌、蜡样群芽孢杆菌和其他芽孢菌共 3 属 13 种 24 株标准菌株的基因组 DNA 进行扩增, 以检验其特异性。结果显示, 巨大芽孢杆菌、蜡样群芽孢杆菌基因组 DNA 分别产生大小不同的唯一产物, 其他芽孢杆菌均为阴性。该多重 PCR 检测方法的灵敏度经测定为 10^5 CFU/mL。同时对 10 株待测菌株和 8 个微生物肥料产品进行检测, 其鉴定结果与常规鉴定结果一致。以上结果表明, 本文建立的多重 PCR 方法具有较高的特异性和灵敏度, 可快速、准确鉴定巨大芽孢杆菌和蜡样群芽孢杆菌, 在微生物肥料检测方面有良好的实用前景。

关键词: 巨大芽孢杆菌, 蜡样群芽孢杆菌, 多重 PCR, 种(群)特异引物, 检测

Multiplex-PCR Approach to Identify *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus* Group Applied in Microbial Fertilizers

CAO Feng-Ming^{1,2*} LI Jun² SHEN De-Long¹ GUAN Da-Wei² LI Li²

(1. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(2. Center for Quality Supervision and Test of Microbial Fertilizers and Mushroom Spawn, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: *Bacillus megaterium* strains are commonly used in microbial fertilizer (MF). MF products are often contaminated by other *B. cereus* group members, which have similar phenotype such as *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoide*. For quality control and safety of MF, a rapid and accurate method is needed to distinguish the strains of *Bacillus megaterium* from *B. cereus* group. Based on specific nucleotide sequences of the *spoOA* genes, 2 pairs of species-specific primers were designed and a multiplex-PCR (mPCR) was developed for this purpose. When the optimized mPCR was used to detect the DNAs of 24 reference strains from three genera of *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Brevibacillus*, all *B. megaterium* strains showed single

fragment of 443 bp and *Bacillus cereus* group showed a fragment of 411 bp. However, no any amplified product was from the other bacteria. The sensitivity of mPCR was 10^5 CFU/mL. The mPCR results of 10 isolates of *B. megaterium*/*B. cereus* group and 8 products of MF coincided with the biochemical assay. Taken together, our newly developed mPCR assay was species-specific and effective in application. It can be used to detect and identify the strains of *B. megaterium* and *B. cereus* group from microbial fertilizer products.

Keywords: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* group, Multiplex-PCR, Species-specific primers, Detection

近年来微生物肥料行业发展迅速, 产品数量和产量逐年增加, 作为产品核心内容的功能微生物的种类也日趋丰富。判定产品质量的关键技术是怎样将功能菌与杂菌准确区分。常规的检测方法是根据菌落、菌体特征结合菌种鉴定材料进行判断, 当表型特征不明显时, 须结合生化试验或一些仪器设备对菌种进行辨认。传统的生理生化试验耗时费力; Biolog 鉴定系统等自动化技术虽然能够较快得到结果, 但对有些种只能鉴定到属或群, 不能满足微生物肥料检测的需要^[1]。

巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)是微生物肥料中研究较早、使用很广的一种微生物, 革兰氏阳性, 菌体直径大于 1.0 μm , 在营养肉汤上形成白色或淡黄色、扁平的大菌落, 这些特征与蜡样群芽孢杆菌颇为相似。蜡样群芽孢杆菌由系统发育非常接近的种组成, 主要包括蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)、蕈状芽孢杆菌(*B. mycooides*), 这些种中的很多菌株因具有治病性和溶血反应而在微生物肥料生产中禁止使用^[2,3]。蜡样群芽孢杆菌普遍存在于土壤、水体、空气中, 为微生物肥料中常见的污染源, 将其与功能菌巨大芽孢杆菌准确区分在安全生产和质量控制上具有重要意义。

基于 DNA 序列的特异(引物)PCR 技术是当今快速、准确鉴定菌种的方法之一, 可避免培养方法和生化鉴定方法的繁琐, 在临床诊断、流行病学调查、食品检测、土壤微生物等领域广为应用。为解决微生物肥料产品中巨大芽孢杆菌和蜡样群芽孢杆菌检测时间长、效率低的问题, 本文将在分析具有种属特异序列的基础上设计并建立特异 PCR 技术, 并以各种标准菌株、生产菌株以及微生物肥料产品为实验材料对其进行种群特异性的验证, 考察其准确、快速检测这 2 个种群的能力和前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和微生物肥料产品: 24 株标准菌株编号及来源见表 1; 10 株待测菌株来自微生物肥料产品, 编号分别为 3060~3069; 以巨大芽孢杆菌为有效菌的微生物肥料产品 8 个。试验前所有菌株均采用营养肉汤平板划线分离、纯化与确定。

Species name	Strains
巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	CCTCCAB92075 ^T , CGMCC1.217, CGMCC1.151, ACCC10011, CGMCC1.1870
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	CCTCCAB93038 ^T , CGMCC1.173, CGMCC1.932, CGMCC1.1846
蕈状芽孢杆菌 <i>B. mycooides</i>	CGMCC1.2014, CGMCC1.182
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	ACCC10325 ^T , ACCC10033, ACCC10026, ACCC10018
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	CCTCCAB92068 ^T
解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	ACCC10225 ^T
地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	CCTCCAB92069 ^T
短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	CCTCCAB94044 ^T
胶冻样芽孢杆菌 <i>B. mucilaginosus</i>	VKPMB7519 ^T
土壤芽孢杆菌 <i>B. edaphicus</i>	VKPMB7517 ^T
侧孢短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	CGMCC1.2012 ^T
短短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus brevis</i>	CCTCCAB94025 ^T
固氮类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus azotofixans</i>	CCTCCAB94023 ^T

注: ACCC: 中国农业微生物菌种保藏管理中心; CCTCC: 中国典型培养物保藏中心; CGMCC: 中国普通微生物菌种保藏管理中心; VKPM: 俄罗斯国家工业微生物菌种保藏中心。

Note: ACCC: Agricultural culture collection of China; CCTCC: China center for type culture collection; CGMCC: China general microbiological culture collection center; ATCC: American type culture collection; VKPM: Russian national collection of industrial microorganisms.

1.1.2 主要试剂和仪器:

TENP buffer: 50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.01 g/mL PVP, pH 10.

PBS buffer: 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4.

裂解液组成为: 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris HCl(pH 8.0), 50 mmol/L EDTA, 40 g/L SDS.

PCR 反应体系购自天根生物技术公司(北京), DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 菌株基因组DNA的提取: 挑取培养基上单个菌落, 接种于营养肉汤液体, 30°C快速振摇培养 16 h, 离心取沉淀, 采用硅藻土吸附法快速提取各菌株的基因组DNA^[4], 作为PCR的模板。

1.2.2 微生物肥料产品基因组 DNA 的提取: 样品洗涤: 取 0.2 g 样品放入 30 mL 的无菌离心管中, 加入数粒玻璃珠和 10 mL 的 TENP buffer 涡旋 5 min, 8000 × g 离心 5 min, 去上清。(若离心后的上清液颜色较深, 则反复用 TENP buffer 洗涤样品, 直到上清液较为澄清); 菌体悬浮: 加 10 mL PBS 缓冲液, 涡旋 5 min, 100 g 离心 3 min, 收集上清。再向沉淀物中加入 10 mL PBS 缓冲液, 涡旋 5 min, 100 × g 离心 3 min, 收集上清; 菌体洗涤和收集: 上清液 8000 × g 离心 5 min, 收集沉淀并将沉淀转入 2 mL 离心管中。(若离心后上清液颜色较深, 则再用 TENP buffer 洗涤沉淀, 直至上清液为无色或浅色);

菌体裂解: 向沉淀中加入裂解液 900 μL, 0.1 mm 瓷珠 1 g, 酚氯仿异戊醇抽提液 700 μL, 涡旋使沉淀充分悬浮。将离心管置于细胞破碎仪上均质化(3200 r/min, 2 min), 然后 4°C 10000 × g 离心 15 min, 将上层水相(DNA 溶液)移到一个新离心管内;

DNA 纯化: 采用酚氯仿异戊醇对 DNA 溶液进行纯化;

DNA 溶解和保存: 加入 1×TE 缓冲液 20 μL 溶解 DNA, DNA 样品放在 -20°C 保存备用。

1.2.3 种特异 PCR 引物设计: 比较 GenBank 数据库中具有种特异序列的基因, 使用软件 Primer 5.0 设计引物。将引物于互联网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行比对, 每条引物在本种(群)内的同源性应为 100%, 与其他种同源性则应很低, 保证引物的种(群)内通用、种(群)间特异。通过分析比较筛选了位于调节对数生长期和芽孢形成起始的 *spoOA* 基因上的 2 对种(群)特异引物, 即扩增巨大芽孢杆

菌的引物 BML257/ R700 和蜡样群芽孢杆菌的引物 BCL214/ R625(见表 2)。

表 2 特异 PCR 引物
Table 2 Primers for specific PCR

Target bacteria	Primer sequences(5'→3')	PCR product
<i>B. megaterium</i>	BML257: TGATGATAATCGGGAAC	443 bp
	BMR700: TGAATGATGCTCGTAATG	
	BCL214: CCACATTAGATGG(G,T)TTAG	
<i>B. cereus</i> group	BCR625: TCTGGATAACAATACTTTCG	411 bp

1.2.4 多重 PCR 反应体系及程序: 以标准菌株的基因组 DNA 为模板, 利用设计好的种特异引物进行 PCR 扩增。经过多轮条件优化后, 建立了多重 PCR 反应体系。多重 PCR 反应采用 20 μL 体系: 10×PCR buffer(不含 Mg²⁺) 2.0 μL, MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 各 200 μmol/L, 引物 BML257/R700 和 BCL214/R625 各 3 μmol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 基因组 DNA 50 ng 左右, 加水补足 20 μL。扩增反应: 94°C 3 min; 94°C 40 s, 51°C 40 s, 72°C 25 s, 30 个循环; 72°C 10 min。产物经 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 产物测序

对菌株 *B. megaterium* 92075^T、*B. cereus* 93038^T、*B. mycoides* 1.182、*B. thuringiensis* 10325^T 的 PCR 扩增产物进行测序, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 灵敏度检测

菌株 *B. megaterium* 92075^T 和 *B. cereus* 93038^T 分别在营养肉汤液体中培养至芽孢形态, 采用活菌平板计数法测定菌体数量, 并用无菌水进行系列稀释至菌体浓度为 10⁸ CFU/mL、10⁷ CFU/mL、10⁶ CFU/mL、10⁵ CFU/mL、10⁴ CFU/mL, 各取 1 mL 菌液离心收集菌体, 按 1.2.2 方法提取菌体 DNA, 各取 1 μL 作为模板进行多重 PCR 扩增, PCR 方法同 1.2.4。

1.5 生产菌株的检测

采用常规生化方法对 10 株待测菌株进行鉴定^[5], 然后采用多重 PCR 方法对其扩增, 检验其鉴定结果与常规生化试验鉴定结果是否一致。

1.6 微生物肥料产品的检测

采用平板划线方法分离产品中的菌种, 并按照常规生化方法鉴定。同时采用多重 PCR 方法对产品 DNA 进行扩增, 比对其结果与常规生化试验鉴定结

果是否一致。

2 结果与分析

2.1 PCR 特异性检测

以标准菌株基因组 DNA 为模板分别进行多重 PCR 扩增, 其特异性检验结果显示(图 1), 巨大芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌菌株均出现单一的扩增条带, 产物大小分别为: 巨大芽孢杆菌约 443 bp, 蜡样芽孢杆菌约 411 bp, 均与预期大小一致, 其它标准菌株均无扩增产物。

2.2 PCR 产物序列分析

对标准菌株的特异 PCR 产物进行测序并通过



图1 以标准菌株基因组 DNA 为模板的多重 PCR 扩增结果
Fig. 1 The multiplex PCR amplification of the representative strains using genomic DNA as template

Note: 1: 50 bp ladder marker; 2~6: *B. megaterium* 92075, 1.217, 1.151, 10011, 1.1870; 7~10: *B. cereus* 93038, 1.173, 1.932, 1.1846; 11~14: *B. thuringiensis* 10325, 10033, 10026, 10018; 15~16: *B. mycoides* 1.2014, 1.182; 17~22: *B. amyloliquefaciens* 10226; *B. subtilis* 92068; *B. licheniformis* 92069; *B. pumilus* 94044; *B. mucilaginosus* 7519; *B. edaphicus* 7517; 23: *Paenibacillus azotofixans* 94023; 24: *Brevibacillus laterosporus* 1.2012, 25: *Brevibacillus brevis* 94025.

GenBank 中 Blast 比对, 与数据库中的 *spoOA* 基因的同一段核酸序列同源性均达 98% 以上(见表 3, 互联网中暂无蕈状芽孢杆菌 *spoOA* 基因序列), 结果表明多重 PCR 方法具有很强的忠实性和特异性。

表3 *spoOA* 基因序列比对结果
Table 3 *spoOA* gene sequence alignment results

Strain No.	Specie name (Gene sequence number from GenBank)	Homology
<i>B. megaterium</i> 92075 ^T	<i>B. megaterium</i> (U09974.1)	98%
<i>B. cereus</i> 93038 ^T	<i>B. cereus</i> (AE016877.1)	99%
<i>B. mycoides</i> 1.182	<i>B. cereus</i> (AE016877.1)	98%
<i>B. thuringiensis</i> 10325 ^T	<i>B. thuringiensis</i> (AE017355.1)	100%

2.3 灵敏度检测

多重 PCR 反应在菌体浓度为 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL 范围内均呈现阳性反应, 即巨大芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌的检测灵敏度均为 10^5 CFU/mL。

2.4 生产菌株的检测

采用常规生化试验鉴定 10 株待测芽孢杆菌, 其结果与多重 PCR 技术鉴定的结果完全一致(见表 4), 表明多重 PCR 方法可以用于微生物肥料产品中生产菌株的鉴定。

2.5 微生物肥料的检测

应用多重 PCR 技术检测微生物肥料产品, 从图 2 可以看出, 除 4 号产品外, 8 个产品中有 7 个产品得到了有效扩增。将传统方法对目标菌的检测结果和 PCR 结果相比较, 发现两者完全一致(见表 5), 并且其它微生物的存在并没有影响到 PCR 反应的特异

表4 待测菌株的 PCR 鉴定和部分生化实验结果
Table 4 Results of the strains identification using biochemical and multiplex PCR methods

Strain	Amplifications of multiplex PCR		Lysocleithin activity	Voges-proskauer reaction	Anaerobic growth	Hemolysis activity	Results of biochemical identification
	<i>B. megaterium</i>	<i>B. cereus</i> group					
3060	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
3061	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
3062	+	-	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>
3063	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
3064	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
3065	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
3066	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
3067	+	-	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>
3068	+	-	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>
3069	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i> group
92075	+	-	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>
93038	-	+	+	+	+	+	<i>B. cereus</i>

表 5 微生物肥料样品 DNA 的 PCR 反应结果

Table 5 Detection results of microbial fertilizer samples using traditional and multiplex PCR methods

Sample number	Marked species name in the production	The bacterial content 10 ⁸ CFU/g	Amplification of multiplex PCR		Results of biochemical identification
			<i>B. megaterium</i>	<i>B. cereus</i> group	
1	<i>B. megaterium</i>	0.24	+	-	<i>B. megaterium</i>
	<i>B. mucilaginosus</i>	0.05	/	/	
2	<i>B. megaterium</i>	2.60	-	+	<i>B. cereus</i> group
3	<i>B. megaterium</i>	0.30	+	-	<i>B. megaterium</i>
	<i>B. mucilaginosus</i>	2.60	/	/	
4	<i>B. megaterium</i>	0.0003	-	-	/
	<i>B. mucilaginosus</i>	1.10	/	/	
5	<i>B. megaterium</i>	0.42	+	-	<i>B. megaterium</i>
	<i>B. mucilaginosus</i>	1.20	/	/	
6	<i>B. megaterium</i>	2.97	+	-	<i>B. megaterium</i>
	<i>B. subtilis</i>	3.7	/	/	
7	<i>B. megaterium</i>	2.0	-	+	<i>B. cereus</i> group
8	<i>B. megaterium</i>	20.0	-	+	<i>B. cereus</i> group



图 2 微生物肥料产品的 DNA 稀释液为模板的多重 PCR 扩增结果

Fig. 2 The multiplex PCR results using diluted DNA of MF products as template

Note: 1~3: Sample 1; 4~6: Sample 2; 7~9: Sample 3; 10~12: Sample 4; 13: 50 bp ladder; 14~16: Sample 5; 17~19: Sample 6; 20~22: Sample 7; 23~25: Sample 8, diluted DNA of the samples as 10⁰, 10¹, 10².

性,说明不经过分离纯化微生物,直接利用 PCR 技术也可将产品中的巨大芽孢杆菌和蜡样群芽孢杆菌准确鉴别出来。

4 号产品无扩增产物,产品经过重新提取 DNA 和 PCR 反应后,仍无产物出现。从产品的平板计数结果可以看出,该产品含目标菌低于 PCR 方法的灵敏度,因此产品中的目标微生物无法得到有效扩增。

3 讨论

巨大芽孢杆菌和蜡样群芽孢杆菌易形成芽孢,在微生物肥料产品中也主要以芽孢形式存在。众所周知,芽孢中的 DNA 不易提取,而在以草炭、麸皮、畜禽粪便、城市垃圾等为基质的微生物肥料产品中的 DNA 提取和纯化则更加困难。作者采用菌体悬浮和细胞机械破碎提取产品中的 DNA,为 PCR 扩增提供了较高浓度和纯度的 DNA 模板。文中建立的多重 PCR 技术的灵敏度在 10⁵ CFU/mL 左右,较王津^[6]、

Schrait H^[7]等人的灵敏度低,可能由于基因组 DNA 提取效率低、*spoOA* 基因拷贝数少引起。

16S rDNA 是细菌鉴定时最先考虑的靶基因,已广泛应用,但是用 16S rDNA 鉴定芽孢菌时,有时不尽人意^[8]。现已有很多功能基因用于特异性分析,这些基因进化速率较慢,在系统进化过程中非常保守,但相对于 16S rRNA 基因进化速率快,能够代表种以下水平的进化方向,如 *gyrA*、*cheA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*vrrA*、*spoOA*、 α -amylase 等^[9-16]。*spoOA* 是调节对数生长期和芽孢形成起始的基因,在基因表达和调控方面的研究很多^[17],但在分子鉴定方面应用的很少。蜡样群芽孢杆菌菌株的 *spoOA* 序列相似性为 97~99%,与其它芽孢菌的同源性低于 70%。由此看来, *spoOA* 基因是一个具种群水平代表性的遗传标记,可为菌种鉴定提供可靠的分子依据。

本文在 *spoOA* 基因序列分析基础上,设计了既有种(群)差异又有扩增片段大小差异的种特异引物,经过 Mg²⁺、退火温度和引物浓度等 PCR 反应条件优化,建立了多重 PCR 方法。利用该方法扩增芽孢杆菌、类芽孢杆菌和短芽孢杆菌 3 属 13 种的参考菌株(共 24 株),2 个目标种(群)分别产生了大小不同的唯一的扩增产物,其他标准菌株均无产物。待测菌株和复杂的微生物肥料产品 DNA 扩增发现,PCR 鉴定与常规鉴定结果完全相同,表明该多重 PCR 技术具有良好的准确性和可靠性,能有效区分巨大芽孢杆菌和蜡样群芽孢杆菌以及其他芽孢菌,可用于微生物肥料产品的菌种鉴定。此外,该技术采用直接提取产品 DNA 进行 PCR 扩增,不需要菌种的纯培养过程,因此更加简便快速。

参 考 文 献

- [1] 冯瑞华, 樊 蕙, 李 力, 等. Biolog 细菌自动鉴定系统应用初探. 微生物学杂志, 2000, **20**(2): 36–38.
- [2] Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, *et al.* *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2627–2630.
- [3] 姜 昕, 李 俊, 沈德龙主编. NY 1109-2006. 微生物肥料生物安全通用技术准则. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [4] 陈 强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法. 微生物学通报, 2002, **29**(6): 65–68.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] 王 津, 宋亚军, 郭兆彪, 等. 用复合 PCR 检测炭疽芽孢的研究. 中国人兽共患病杂志, 2002, **18**(6): 52–54, 72.
- [7] Schraft H, Griffiths MW. Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(6): 98–102.
- [8] Ash C, Farrow JA, Wallbanks S, *et al.* Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol*, 1991, **13**: 202–206.
- [9] Blackwood KS, Turenne CY, Harmsen D, *et al.* Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(4): 1626–1630.
- [10] 曹凤明, 沈德龙, 李 俊, 等. 应用多重 PCR 鉴定微生物肥料常用芽孢菌. 微生物学报, 2008, **48**(5): 651–656.
- [11] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(3): 1104–1109.
- [12] Yuan Q, Guy P, Xudong L, *et al.* Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(8): 3720–3727.
- [13] Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, *et al.* Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(1): 179–185.
- [14] 胡 哲, 王振国, 刘金华, 等. 利用 PCR 技术检测鸡肉产品中的空肠弯曲杆菌. 吉林农业大学学报, 2005, **27**(6): 671–674.
- [15] 张继瑜, 金 奇, 侯云德. 福氏志贺菌 *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 序列的测定与同源性分析. 动物医学进展, 2002, **3**: 47–50, 59.
- [16] 侯晓丽, 陈 智. 分类及鉴别细菌的新靶标—*gyrB* 基因. 国外医学—流行病学传染病学分册, 2005, **32**(1): 38–41.
- [17] Strauch M, Webb V, Spiegelman G, *et al.* The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, **87**: 1801–1805.

稿件书写规范

论 文 中 统 计 学 符 号 书 写 规 则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。