

枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展

曹凤明^{1,2} 杨小红² 马鸣超¹ 陈慧君¹ 沈德龙¹ 李俊^{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. 农业部微生物产品质量安全风险评估实验室 北京 100081)

摘要: 枯草芽孢杆菌近缘种群(简称枯草群)是一群表型相似的革兰氏阳性、产芽孢的杆菌, 目前该群已包括 10 个有效发表种。该群细菌广泛应用于生物技术、工业和农业等领域, 因此实现菌株的快速准确鉴别与鉴定, 确保其使用的安全性和有效性是首要条件。本文在本研究室进行的枯草群鉴定研究基础上, 总结提出了基于形态和生化特性测定的传统经典方法和以分子生物学技术为基础的基因序列分析技术、特异 PCR 技术, 并在实践上进行了大量的验证, 对指导该种群的准确鉴定与快速鉴别具有重要应用价值。

关键词: 枯草群, 鉴定, 生化特性, 序列分析, 种特异 PCR

Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species

CAO Feng-Ming^{1,2} YANG Xiao-Hong² MA Ming-Chao¹ CHEN Hui-Jun¹
SHEN De-Long¹ LI Jun^{2*}

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

(2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Microbial Products, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* and closely related species, as members of the “subtilis-group”, are composed of rod-shaped, endospore-forming bacteria with high degree of phenotypic and biochemical similarity. The “subtilis-group” includes *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. siamensis*. Strains of the group have been exploited for biotechnological, industrial and agricultural applications; therefore, their rapid and accurate identification is important in practice. Here we reviewed traditional and molecular methods to identify these species. The combination of the physiological and biochemical characteristics, sequencing analysis and species-specific PCR would allow us to rapidly and accurately differentiate the strains of the group.

基金项目: 中央级公益性科研院所专项资金资助项目(No. IARRP-2014-19); 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31200388)

*通讯作者: Tel: 86-10-82106208; Fax: 86-10-82108702; ✉: jli@caas.ac.cn

收稿日期: 2013-06-27; 接受日期: 2013-08-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

Keywords: *B. subtilis* group, Identification, Biochemical characteristics, Sequence analysis, Species-specific PCR

枯草芽孢杆菌自从 1835 年正式命名以来,其研究已有 178 年的历史,在工业发酵、农业生产、医药卫生、食品保健、水产养殖等领域应用广泛。随着研究技术的进步,人们发现枯草芽孢杆菌实际上是一个表型相似的群体,即枯草芽孢杆菌近缘种群(简称枯草群)^[1]。除了较早命名的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、解淀粉芽孢杆菌^[2](*B. amyloliquefaciens*)、深褐(萎缩)芽孢杆菌^[3](*B. atrophaeus*) 5 个种外,枯草群还包括莫哈韦(莫杰夫)芽孢杆菌^[4](*B. mojavensis*)、死谷芽孢杆菌^[5](*B. vallismortis*)、索诺拉沙漠芽孢杆菌^[6](*B. sonorensis*)、特基拉芽孢杆菌^[7](*B. tequilensis*)、暹罗芽孢杆菌^[8](*B. siamensis*);而且枯草芽孢杆菌这个分类种也进一步被分为 *B. subtilis* subsp. *subtilis*、*B. subtilis* subsp. *spizizenii*^[9]和 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*^[10]三个亚种,解淀粉芽孢杆菌也被分为 *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* 和 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 两个亚种^[11]。至此,枯草芽孢杆菌的近缘种已包括 10 个有效发表种。

由于枯草群菌株与人类生产、生活密切相关,所以对这类微生物的准确鉴定和鉴别非常重要,然而枯草群分类的复杂性给其鉴定带来了巨大的困难。传统的生化试验法进行菌株鉴定耗时费力,结果易受环境条件和人员经验的影响;现在广泛应用的 Biolog 快速鉴定系统、API 系统、脂肪酸分析系统等技术操作简便、速度快、效率高,但对于亲缘关系密切的枯草群菌株只能鉴定到群,很难鉴定到种。基于基因序列分析的鉴定技术以其高分辨率、稳定性和重现性的优势逐渐成为鉴定菌株的重要工具,而在序列分析基础上建立的特异 PCR 技术使鉴定工作更快速,针对性更强。为促进新技术与新方法的使用,提高鉴定的速度和效率,本文综述了传统生化法、基因序列分析和特异 PCR 技术

在枯草及其近缘种群鉴定的研究进展,并对其应用前景进行了展望。

1 枯草群的典型生化特征对比分析

枯草芽孢杆菌近缘种群的形态特征和生理生化特征,是早期进行各种群分类与鉴定的基础。传统的枯草群分类主要依据这些表型特征,如用色素区分深褐芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌^[3];通过菊粉、乳糖发酵产酸试验、菌体成链排列和芽孢中生等特性区分解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌^[2];地衣芽孢杆菌则通过鼠李糖、半乳糖、丙酸盐利用、产生脲酶以及厌氧生长等试验与枯草芽孢杆菌区分^[12];而对氯化钠 14%的强耐受性则成为区分暹罗芽孢杆菌与其他枯草群菌株的重要特征^[8]。除了这些特征外,其他特征包括生长温度范围、厌氧反应、碳氮源利用、盐类利用、抗生素敏感性、氯化钠耐受性、氧化酶、接触酶、糖醇类发酵、淀粉水解、硝酸盐还原等也是枯草群内各种的重要鉴别特征。尽管 Biolog 和 API 等快速鉴定系统可以提供大量信息,但是表 1 中分析总结出的枯草近缘种群的典型生化特征,仍然是该群鉴定时不可或缺的^[1-12],是快速鉴别的重要特征。

2 具有鉴别作用的基因序列分析

16S rRNA 基因以其含有丰富的信息量,能够反映种属的亲缘关系,已成为细菌系统发育和分类鉴定的金标准。但经比较分析发现(图 1),枯草群中除短小芽孢杆菌和索诺拉沙漠芽孢杆菌以外,其余 8 个种的 16S rRNA 基因序列相似性均在 99.5% 以上,因此根据 16S rRNA 基因序列不能准确区分枯草群内的各个种。细菌的基因组中有很多功能基因,这些基因在系统进化过程中非常保守,但相对于 16S rRNA 基因变异速率快,能够代表种以下分类单元的进化方向,如 *gyrB*、*gyrA*、*rpoB*、*rpoD*、*recA*、*purH*、*polC*、*groEL*、*sodAint*、*toxR*、*rcfB* 等^[10,13-16]。

表 1 枯草芽孢杆菌近缘种群的典型生化特征										
Table 1 Biochemical characteristics that distinguish <i>Bacillus subtilis</i> and other related <i>Bacillus</i> species										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
厌氧生长	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Anearobic growth	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
溶血反应	-	+	+	+	+	ND	-	-	ND	+
Haemolytic activity	-	+	+	+	+	ND	-	-	ND	+
吲哚产生	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	-
Production of indole	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	-
淀粉水解	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
氧化酶	+	+	-	+	+	-	+	+	ND	+
Oxidase activity	+	+	-	+	+	-	+	+	ND	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
丙酸盐利用	-	-	-	-	-	ND	ND	+	+	-
Utilization of propionate	-	-	-	-	-	ND	ND	+	+	-
柠檬酸盐利用	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
乳糖发酵产酸	-	-	-	-	+	+	+	+	ND	ND
Acid produced from lactose	-	-	-	-	+	+	+	+	ND	ND
最高生长温度	50	50	50	50	50	55	50	55	55	50
Maximum temperature for growth (°C)	50	50	50	50	50	55	50	55	55	50
最低生长温度	10	10	10	10	10	4	ND	15	15	10
Minimum temperature for growth (°C)	10	10	10	10	10	4	ND	15	15	10
7% NaCl 生长	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
Growth in the presence of 7% NaCl	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
12% NaCl 生长	+	+	ND	-	-	+	ND	-	-	ND
Growth in the presence of 12% NaCl	+	+	ND	-	-	+	ND	-	-	ND
DNA G+C 含量	43	43	42	43	45	41	ND	46	46	ND
DNA G+C content (mol %)	43	43	42	43	45	41	ND	46	46	ND
pH 5.6 琼脂色素分析	Cream white	Cream white	Darkbrown	Cream	Cream white	Cream white	Yellow	Cream	Bright yellow	ND
Pigmentation assays of pH 5.6 agar	Cream white	Cream white	Darkbrown	Cream	Cream white	Cream white	Yellow	Cream	Bright yellow	ND

Note: 1: *B. subtilis* subsp. *subtilis* CECT39^T; 2: *B. mojavensis* NRRL B-14698^T; 3: *B. atrophaeus* NRRL NRS213^T; 4: *B. vallismortis* NRRL B-14890^T; 5: *B. amyloliquefaciens* NRRL B-14393^T; 6: *B. siamensis* PD-A10^T; 7: *B. tequilensis* 10b^T; 8: *B. licheniformis* NRRL NRS-1264^T; 9: *B. sonorensis* NRRL B-23154^T; 10: *B. pumilus* CCTCCAB94044^T; ND: Not detected.

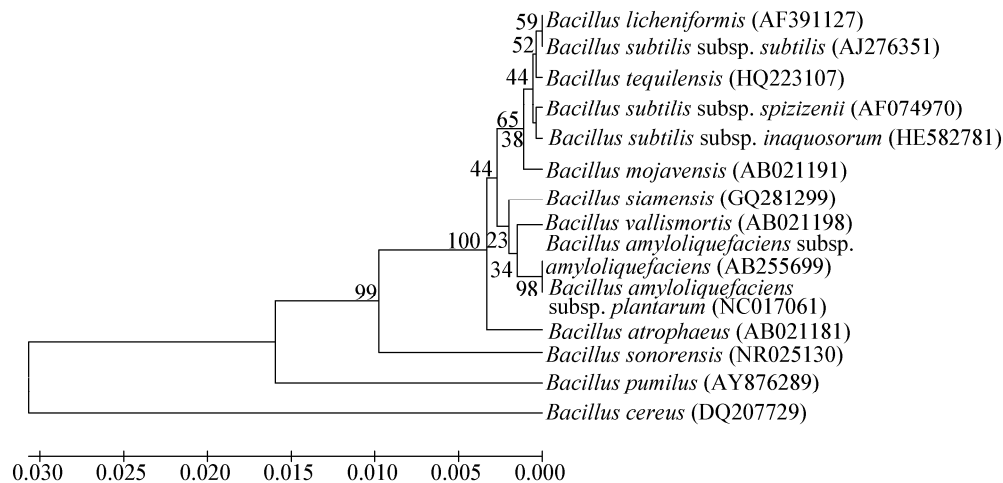


图 1 枯草芽孢杆菌及近缘种代表菌株 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic relationships of some species of the genus *Bacillus* and related taxa based on 16S rRNA gene sequence analysis

Note: The branching pattern was generated by the UPGMA method. Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications). Bar 0.005 substitutions per nucleotide position.

近几年解旋酶基因在菌种分类和鉴定上的意义日显突出。Wang 等比较了 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列,发现枯草群各种、亚种的 *gyrB* 基因相似性在 75%–95% 之间,比 16S rRNA 有更好的区分效果,认为 *gyrB* 基因是非常好的替代靶基因^[17]; 2008 年他还利用 *gyrB* 基因序列和全基因组 DNA 杂交、生化试验确认了贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) 是解淀粉芽孢杆菌的同物异名种^[18]。与 *gyrB* 基因一样,枯草群 *gyrA* 基因的碱基序列也存在明显差异,最相似的两个种深褐芽孢杆菌和莫哈韦芽孢杆菌的 *gyrA* 基因序列相似性也仅为 95.8%,因此 *gyrA* 基因也有望成为枯草群的快速鉴定工具之一^[19]。

rpoB 基因是分类研究中广泛应用的基因,目前已用于炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*)、嗜盐芽孢杆菌 (*Halobacillus*) 等菌属鉴别和系统发育分析^[20-21]。但是 *rpoB* 基因序列较短,根据其序列制作的相似性

树与 16S rRNA 的相似,不足以反映细菌中相似种群的细微差异^[22-23]。笔者曾测定枯草芽孢杆菌 12 号的 *rpoB* 基因的部分序列,发现其与死谷芽孢杆菌和莫哈韦芽孢杆菌的相似性为 99%,深褐芽孢杆菌 97%,解淀粉芽孢杆菌 96%,地衣芽孢杆菌 91%,而非枯草群菌株均在 81% 以下。因此 *rpoB* 基因序列只能用于区分枯草群中差异相对较大的种。

2009 年,Rooney 等利用 *gyrA*、*rpoB*、*purH*、*polC* 和 *groEL* 基因序列构建了系统发育树,不仅将枯草群中的不同种准确区分开,还将枯草芽孢杆菌的 3 个亚种分成不同组群^[10]。由此看来,虽然各个基因序列在属、种、亚种以及分型中的作用各不相同,但利用多基因序列进行综合分析则更能真实反应枯草群各个分类单元的差异。目前 NCBI 核酸数据库中,16S rRNA、*gyrB*、*gyrA*、*rpoB*、*purH* 等基因已涵盖了枯草群的各个种,可利用这些基因序列(表 2)进行相关菌株的鉴定和鉴别^[24-26]。

表 2 测序基因、PCR 引物及扩增条件
Table 2 Genes and primers and amplification parameters used for PCR and sequencing

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增条件 Amplification parameters	PCR 产物 PCR products (kb)
16S rRNA	27f: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492r: GGTTACCTTGTTACGACTT	50 μL 反应体系: 1×PCR buffer, 2.0 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 4.0 μL 的 25 mmol/L MgCl ₂ , 2.0 μL 每条引物 (10 pmol/L), 2.5 U <i>Taq</i> DNA 聚合酶, 50–100 ng 模板 DNA, 加灭菌双蒸水至 50 μL 扩增反应: 95 °C 5 min; 93 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min 10 s, 25 个循环; 72 °C 10 min	1.5
<i>gyrB</i>	UP1: GAAGTCATCATGACCGTTCTGC AYGCNGGNGGNAARTTYGA UP2r: AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRT CNACRTCNGCRTCNGTCAT 测序引物 UP1S: GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA UP2rS: AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC	50 μL 反应体系: 1×PCR buffer (含 Mg ²⁺), 2.0 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2.0 μL 每条引物 (10 pmol/L), 2.5 U <i>Taq</i> DNA 聚合酶, 50–100 ng 模板 DNA, 加灭菌双蒸水至 50 μL 扩增反应: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min 10 s, 35 个循环; 72 °C 10 min	1.2
<i>gyrA</i>	42f: CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT 1066r: CAAGGTAATGCTCCAGGCATGCT	反应体系同 <i>gyrB</i> 基因 扩增反应: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 51 °C 45 s, 68 °C 1 min, 40 个循环; 68 °C 10 min	1.0
<i>rpoB</i>	2292f: AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC 3354r: AAGAACCGTAACCGCAACTT	反应体系同 <i>gyrB</i> 基因 扩增反应: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 51 °C 45 s, 68 °C 50 s, 40 个循环; 68 °C 90 s	0.6
<i>purH</i>	70f: ACAGAGCTTGGCGTTGAAGT 1013r: GCTTCTGGCTGAATGAAGG	反应体系同 <i>gyrB</i> 基因 扩增反应: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 45–55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min (尽可能选用较高的退火温度)	0.9

3 枯草群的特异 PCR 技术

多基因序列分析是菌株鉴定最有效的方法,但仍存在费用高时间长的问题。特异 PCR 技术利用具有种特异性的引物和优化的反应条件,通过 PCR 扩增、产物检测在几个小时内即可完成菌株的鉴定,其简便、经济、快速、直观的优势很快被应用于临床诊断、流行病学调查、食品检测等领域。Idriss 和 Oleg 分别利用 α -淀粉酶基因、*yyaR*、*yyaO*、*tetB*、*tetL* 基因设计引物,通过特异 PCR 完成了枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌的区分^[26-27]。刘勇等则利用 β -甘露聚糖酶基因建立的特异 PCR 技术实现了枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌 3 个种的快速鉴别^[28]。

为了解决微生物肥料中枯草群菌株出现频率高、检测要求时间短的问题,曹凤明等利用 *gyrA*、*rpoA*、16S rRNA 基因差异序列建立了多重 PCR 技术,通过一个 PCR 反应即可完成枯草群中枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌的准确区分^[29]。近三年本实验室使用该技术(表 3)检测了微生物肥料中 450 株枯草群菌株,仅一株因无扩增产物无法鉴定到种(经序列分析发现该

菌株为莫哈韦芽孢杆菌),其余菌株均为 4 个种之一,其结果与传统生化法和基因分析结果一致。

虽然特异 PCR 技术在枯草群准确鉴定与快速鉴别上作用明显,但也会出现特异性不足的问题。由于新建 PCR 技术时不可能对所有相关菌株进行特异性验证,在应用时极易出现假阳性或假阴性。Idriss 因在设计 and 验证方法之初选取的参比菌株太少,未包含枯草芽孢杆菌的斯氏亚种,结果是特异 PCR 在枯草芽孢杆菌种内的通用性不够,无法用于斯氏亚种菌株的鉴定^[27]。为此,为了提高 PCR 的分辨能力和适用范围,应尽量多地使用参比菌株、尤其是近缘种、亚种的菌株进行特异性验证。

另外,一项新 PCR 技术的建立需要进行引物设计、条件优化、特异性验证等复杂过程,耗时费力,所以只能在一些有经济或研究价值的微生物种群中进行。目前枯草群特异 PCR 技术主要针对生产常用种,而应用较少如深褐芽孢杆菌、莫哈韦芽孢杆菌等则无人问津。随着生物产业的发展,必将有枯草群的其他种应用到生产中,这在带来更多的经济效益的同时也存在一定的安全隐患,因此需要投入更多力量于快速鉴定方法的研究当中。

表 3 特异 PCR 的引物和扩增条件

Table 3 Genes and primers and amplification parameters used for specific PCR

种名 Specie names	基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增条件 Amplification parameters	PCR 产物 PCR products (bp)
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	<i>rpoA</i>	BSL72: CGTAGAGCCACTTGAGCG BSR328: CTGCCGTTACAGTTCCTT	20 μ L 反应体系: 1 \times PCR buffer, 0.8 μ L MgCl ₂ (25 mmol/L)溶液, 0.8 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 0.3 μ L 每条引物(10 pmol/L), 1.0 U <i>Taq</i> DNA 聚合酶, 10-50 ng 模板 DNA	256
解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>gyrA</i>	L100: AAATCTGCCCGTATCGTCG R836: GCGTCACGGCGRATCTCAA	扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 61.7 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 25 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min	736
地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	<i>gyrA</i>	L168: TGGGATGACAAGTGATAAGC R514: CTCCGTTGACAAGCAAGTTCCG		346
短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	16S rRNA	L354: AGGGAAGAACAAGTGCRAGAG R674: GCTCCTCAGCGTCAGTTACA		321

4 结语

近年来微生物分类更新周期快,不仅新种数量增加迅速,而且有的种也被重新确立分类地位。枯草群即是分类变化快速的典型代表,对该群菌株准确鉴定的难度越来越大。无论形态学与生化结合的传统方法还是基于序列分析的分子生物学鉴定方法均存在着一定的缺陷,如,传统鉴定方法耗时长、再现性差;而分子生物学方法会因为实验条件不好控制,极易造成扩增失败或非特异性扩增,甚至由于公开核酸数据库中核酸数据鱼龙混杂,稍有不慎鉴定结果会大相径庭。因此,任何单一的鉴定技术不能完全胜任枯草群菌株的鉴定,只有将传统方法与先进的分子生物学方法相结合,互为补充和验证才能得到快速、科学、准确的鉴定结果。

参考文献

- [1] Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences[J]. Letters in Applied Microbiology, 1991, 13: 202-206.
- [2] Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987, 37(1): 69-71.
- [3] Nakamura LK. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1989, 39(3): 295-300.
- [4] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(2): 256-264.
- [5] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM, et al. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(2): 470-475.
- [6] Palmisano MM, Nakamura LK, Duncan KE, et al. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51: 1671-1679.
- [7] Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, et al. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1475-1484.
- [8] Sumpavapol P, Tongyong L, Tanasupawat S, et al. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (*poo-khem*) in Thailand[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60: 2364-2370.
- [9] Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(3): 1211-1215.
- [10] Rooney AP, Price NPJ, Ehrhardt C, et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 2429-2436.
- [11] Borriss R, Chen XH, Rueckert C, et al. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7^T and FZB42^T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 1786-1801.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 侯晓丽, 陈智. 分类及鉴别细菌的新靶标——*gyrB* 基因[J]. 国外医学-流行病学传染病学分册, 2005, 32(1): 38-41.
- [14] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.
- [15] Weng FY, Chiou CS, Lin PHP, et al. Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107: 452-464.
- [16] Pascual J, Macián MC, Arahal DR, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60: 154-165.
- [17] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, et al. Reclassification of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-García et al. 2005 and *Bacillus malacitensis* Ruiz-García et al. 2005 as later heterotypic synonyms of *Bacillus mojavensis* Roberts et al. 1994[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 1663-1667.
- [18] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, et al. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 671-675.
- [19] Chun J, Bae KS. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(2): 123-127.
- [20] Qi Y, Patra G, Liang XD, et al. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 3720-3727.

- [21] Liu WY, Zeng J, Wang L, et al. *Halobacillus dabanensis* sp. nov. and *Halobacillus aidingensis* sp. nov., isolated from salt lakes in Xinjiang, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1991-1996.
- [22] Adderson EE, Boudreaux JW, Cummings JR, et al. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes[J]. Journal Clinical Microbiology, 2008, 46(3): 921-927.
- [23] Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 278-288.
- [24] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 1104-1109.
- [25] Clerck DE, Vanhoutte T, Hebb T, et al. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 3664-3672.
- [26] Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect[J]. Microbiology, 2002, 148: 2097-2109.
- [27] Oleg NR, Christina D, Johan M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48: 249-259.
- [28] 刘勇, 李辉, 李金霞, 等. 特异 PCR 方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分[J]. 饲料工业, 2010, 31(4): 52-54.
- [29] 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杆菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 651-656.

科技信息摘录

抗生素作为链霉菌种间信号的研究获进展

微生物能够产生多种结构各异的抗生素,然而,对微生物产生抗生素的真正生物学意义的认识至今尚不明晰。目前,研究表明天然抗生素除了对非产生菌的抑杀作用外,还可能在微生物种间起信号作用;但是,迄今为止尚没有在分子层面上,对抗生素作为种间信号介导特定的生理行为及其机理有深入的阐释。

中国科学院微生物研究所杨克迁课题组经过潜心研究,发现天蓝色链霉菌能够感应来源于委内瑞拉链霉菌产生的抗生素——杰多霉素(Jadomycin B, JdB)信号,引起气生菌丝提前分化和十一烷基灵菌红素产生等一系列生理行为;并证明对种间 JdB 信号的感应和传导是通过受体 ScbR2 介导的一个复杂的调控网络实现的;该调控网络包含了一个由 ScbR2-AdpA-RedD 构成的前馈调控回路(Feed-forward loop),该调控回路可以感应 JdB 浓度变化,对不同浓度做出不同的生理响应。该研究还进一步证明其它链霉菌产生的角蕈环化合物在天蓝色链霉菌也都能通过这一信号转导网络诱导相似的生理响应行为,说明角蕈环化合物作为种间信号具有普遍性。这一研究首次报道了角蕈环抗生素的种间信号作用及其分子机制,揭示了抗生素在调节微生物种群相互作用中的生态及进化意义。

相关文章发表在 Proceedings of the National Academy of Sciences ,文章发表后立即被 Faculty of 1000 推荐。

——摘自《中国生物技术信息网》2014/4/24
<http://www.biotech.org.cn/information/119022>