

刘国红, 林营志, 刘波, 等. 芽胞杆菌种类脂肪酸鉴定与分子鉴定方法的比较 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (2): 173-180.

LIU G-H, LIN Y-Z, LIU B, et al. Comparison of *Bacillus* Species Identification Based on ITS and Fatty Acid Analysis [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (2): 173-180.

芽胞杆菌种类脂肪酸鉴定与分子鉴定方法的比较

刘国红^{1,2}, 林营志², 刘波², 林乃铨¹

(1. 福建农林大学, 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院, 福建 福州 350003)

摘要: 基于 ITS 序列和脂肪酸鉴定方法对从土壤中分离得到的 16 株芽胞杆菌进行分类研究, 与分子鉴定结果相比, 脂肪酸种的鉴定准确率可达到 99% 以上。通过生物软件 SPSS 和 Mega 分别对 16 株菌进行聚类分析, 结果表明, 脂肪酸比 ITS 更适合于芽胞杆菌的分类研究, 根据脂肪酸成分可以将 16 株芽胞杆菌准确聚在一起, 而 ITS 则不能。芽胞杆菌特征性脂肪酸为 15 : 0 ANTEISO 和 15 : 0 ISO, 但不同种芽胞杆菌的此类脂肪酸含量不同。对芽胞杆菌 3 大类菌群主要特征性脂肪酸的含量比例 (15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO) 进行了分析, 其中比较特殊的为蜡状芽胞杆菌类群, 蜡状芽胞杆菌主要脂肪酸为 15 : 0 ISO, 其次为 13 : 0 ISO, 而 15 : 0 ANTEISO 的含量很低, 而且不是主要类型, 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 的比值约为 5.6~7.9。简单芽胞杆菌群主要脂肪酸为 15 : 0 ANTEISO 和 15 : 0 ISO, 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 比值约为 1/6。巨大芽胞杆菌类群主要脂肪酸 15 : 0 ISO 和 15 : 0 ANTEISO 含量相近, 其余脂肪酸远远低于这 2 种主要脂肪酸。巨大芽胞杆菌的 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 的比值约为 4/5~5/4, 菌株 FJAT-4500 为短小芽胞杆菌, 其 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 比值约为 2。短小芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌归为一类是因为其脂肪酸类型相近, 但含量并不同。枯草芽胞杆菌群主要脂肪酸 15 : 0 ISO 的含量小于 15 : 0 ANTEISO, 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 的比值为 1/3~2/3。

关键词: 芽胞杆菌; 脂肪酸类型; ITS 序列; 分类

中图分类号: S 476

文献标识码: A

Comparison of *Bacillus* Species Identification Based on ITS and Fatty Acid Analysis

LIU Guo-hong^{1,2}, LIN Ying-zhi², LIU Bo², LIN Nai-quan¹

(1. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: 16 strains of *Bacillus* species isolated from soil were studied based on ITS sequences and fatty acids analysis. The accuracy rate of FA identification was 99%. Through biological software of SPSS and Mega cluster analysis, fatty acids were found to be better for *Bacillus* identification than ITS sequences. In this paper, we could make all the strains cluster together by FA, but ITS not. The major fatty acid of genus *Bacillus* was 15 : 0 ANTEISO and 15 : 0 ISO. The major FA ratio of three group were analyzed. *Bacillus cereus* group was special, its major FA was 15 : 0 ISO, and 13 : 0 ISO, but 15 : 0 ANTEISO had very lower profile. The ratio of 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO in *Bacillus cereus* group was 5.6—7.9. The ratio of 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO in *Bacillus simplex* group was 1/6. The ratio of 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO in *Bacillus megaterium* was 4/5—5/4, strain FJAT-4500 was *Bacillus pumilus*, the ratio of 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO was 2. *Bacillus pumilus* was owed to *Bacillus megaterium* for similar ratio of 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO, but the couple had different fatty acid profiles. The profile of 15 : 0 ISO was lower than 15 : 0 ANTEISO in *Bacillus subtilis* group, and ratio was 1/3—2/3.

Key words: *Bacillus* species; fatty acid; ITS; classification and identification

收稿日期: 2011-11-17 初稿; 2012-02-07 修改稿

作者简介: 刘国红 (1983-), 男, 博士生, 研究方向: 微生物分类 (E-mail: liuguohong624@sina.com)

通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 主要从事生物技术及农业生物药物研究 (E-mail: liubofaas@163.com);

林乃铨 (1948-), 男, 博士, 教授, 主要从事害虫综合治理、生物防治和寄生蜂分类 (E-mail: green48@163.com)

基金项目: 国家“948”项目子专题 (2011-G25); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2009R10037-1)

芽胞杆菌是一大类表型特征不同的细菌群,如营养需求多样性,生理与代谢多样性,DNA 碱基范围广。芽胞杆菌种类繁多,功能多样,在工业、农业、医学等各个领域都具有重要的作用,因此研究芽胞杆菌分类具有重要的意义。Priest 等^[1]根据芽胞杆菌的表型特征进行数值分类,从而将 368 株菌分为 79 个群。同时,Woese 证明了 RNA 可以作为微生物分类的一把标尺,Ash 等^[2]利用 16S rRNA 将 51 种芽胞杆菌分为 5 群。但是,随着分类技术的发展,发现 16S rRNA 过于保守,很难区分近缘种,而 rDNA 转录间隔区(ITS)弥补了 16S rRNA 的缺陷。Xu 等^[3]利用 ITS 序列解释了芽胞杆菌科 6 个属 40 个种的系统发育关系,准确地将芽胞杆菌近缘属区分开来,但是,对于亲缘关系极相近的一些种,ITS 序列不能准确区分。

脂肪酸是微生物细胞组分中一种稳定而且含量丰富的重要成分,它和细菌的遗传变异、毒力、耐药性等有着极为密切的关系,它的种类和含量是细胞化分类法的重要依据之一。Heyrman 等^[4]用脂肪酸对从壁画分离到的微生物进行分类,脂肪酸成分的分群充分表现了微生物的多样性。Johannes^[5]研究不同温度下简单芽胞杆菌脂肪酸的变化,分析了以

色列进化谷中微生物的进化起源关系。Alexandra 等^[6]利用脂肪酸成分对 *Legionella* 属进行了数值分析,结果表明脂肪酸可以作为该属分类的一个有效标记,能正确地将 *Legionella* 属不同的种以不同的分支代表。王秋红等^[7]利用气相色谱技术检测福建省 40 株青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 菌株细胞内的脂肪酸,分析发现其脂肪酸分布有明显的多态性,脂肪酸有望成为青枯雷尔氏菌小种鉴定的新指标,但构建芽胞杆菌脂肪酸指数公式的研究还未见报道。本文比较了基于脂肪酸和 ITS 的 2 种鉴定方法,以期分析脂肪酸鉴定方法能否可以作为一种简单、准确的芽胞杆菌的鉴定和分类方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株:芽胞杆菌菌株 4382、4388、4395、4396、4399、4404、4428、4481、4469、4470、4476、4495、4500、4521、4591、4540 等 16 株从吉林、新疆、内蒙古、甘肃、西藏、陕西等地采集分离得到(表 1),保存于福建省农业科学院农业生物资源研究所。供试菌株在 TSB 培养基上 28℃ 培养 24 h。

表 1 芽胞杆菌的采样地点和生境类型

Table 1 The sampling locations and habitat types of *Bacillus* species

序号	菌株编号	采样地点	采样生境	采集时间/ (年—月—日)
1	4382	吉林长白山	天池土壤	2007—07—30
2	4388	吉林长白山	大峡谷林地土壤	2007—07—30
3	4395	吉林长白山	大峡谷林地土壤	2007—07—30
4	4396	吉林长白山	大峡谷林地土壤	2007—07—30
5	4399	新疆阜北农场	戈壁杂草根际土	2007—10—08
6	4404	新疆阜北农场	戈壁杂草根际土	2007—10—08
7	4428	新疆阜北农场	戈壁白碱土	2007—10—08
8	4481	内蒙古呼和浩特	大草原根际土	2006—07—31
9	4469	内蒙古响沙湾	沙漠土壤	2006—07—31
10	4470	内蒙古响沙湾	沙漠土壤	2006—07—31
11	4476	内蒙古响沙湾	沙漠土壤	2006—07—31
12	4495	内蒙古呼和浩特	大草原根际土	2006—07—31
13	4500	甘肃兰州	黄河底土	2006—08—04
14	4521	西藏林芝	古柏根际土	2006—07—07
15	4591	陕西省延安市宝塔山区	树林土	2007—05—19
16	4540	西藏林芝措湖	菜地	2006—07—07

1.2 芽胞杆菌 ITS 分子鉴定方法

DNA 的提取:菌纯化培养 24 h 后,划取菌落

2 环左右至装有 500 μ L 无菌水的离心管中,煮沸 10 min,反复冻融 30 min,然后放入-20℃冰箱贮

存备用。PCR 扩增体系为 25 μL ：10 \times Buffer 2.5 μL ，dNTP Mixture (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL ，引物 F 1.0 μL ，引物 R 1.0 μL ，TaqDNA 酶 (2.5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.3 μL ，DNA 1.0 μL ，ddwater 18.7 μL 。ITS 基因序列扩增引物由上海生物工程有限公司合成，引物序列 L516SF：5'-TCGCTA GTAATCGCGGATCAGC-3'；L523SR：5'-GCA TATC GGT GTTA GTCCCGTCC-3'^[3]。PCR 反应条件：95℃预变性 45 s，94℃变性 15 s，58℃复性 30 s，72℃延伸 90 s，30 个循环，72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 芽胞杆菌脂肪酸鉴定方法

气相色谱系统采用的是美国 Agilent 7890N 型，包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器；分析软件应用美国 MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定细菌的软件 Sherlock MIS6.0(microbial identification system)。在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本：二阶程序升高柱温，170℃起始，5℃ $\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 260℃，而后 40℃ $\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 310℃，维持 90 s；汽化室温度 250℃、检测器温

度 300℃；载气为氢气 (2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$)、尾吹气为氮气 (30 mL $\cdot\text{min}^{-1}$)；柱前压 10.00 psi (1 psi=6.895 kPa)；进样量 1 μL ，进样分流比 100：1。芽胞杆菌细胞脂肪酸的提取试剂和方法参照 MIDI 操作手册^[8] (Sherlock Microbial Identification System, Version 6.0)。

1.4 数据处理

脂肪酸数据结果根据 SPSS16.0 进行处理，采用欧氏距离法做聚类分析。序列经 Clustal X^[9] 对齐后，用软件 Mega 4^[10-11] 进行聚类分析(方法为 Neighbour-Joining,Nucleotide;Jukes-Cantor)。

2 结果与分析

2.1 芽胞杆菌脂肪测定结果

16 株芽胞杆菌的脂肪酸检测结果如表 2 所示，根据脂肪酸成分将 16 株菌分为 4 大类群：类群 I 蜡状芽胞杆菌、类群 II 巨大芽胞杆菌、类群 III 简单芽胞杆菌及类群 IV 枯草芽胞杆菌。通过 Sherlock 脂肪酸鉴定系统共检测出 20 种脂肪酸，主要脂肪酸类型为 15：0ISO 和 15：0ANTEISO。其余脂肪酸类型和含量详见表 2。

表 2 16 株芽胞杆菌的脂肪酸类型和百分含量
 Table 2 The fatty acid profiles of 16 strains of *Bacillus* species

脂肪酸类型	类群 I				类群 II			
	4382	4388	4540	4476	4395	4396	4469	4500
ISO 17：1 ω 10C	6.93	6.26	0	2.77	1.84	1.59	0.19	1.09
ISO 17：1 ω 5C	0	1.64	0	4.04	0	0	0	0
12：0 ISO	1.55	1.13	1.10	1.57	0	0	0	0
13：0 ANTEISO	1.88	1.67	1.30	1.57	0	0	0	0
13：0 ISO	11.31	16.62	10.02	15.48	0.50	0.58	0.50	0
17：1 ISO ω 10C	0	0	9.24	0	0	0	0	0
14：0	5.16	4.15	2.94	3.94	1.26	1.99	2.21	0.88
14：0 ISO	6.94	3.80	3.32	5.34	5.91	4.79	7.18	1.18
15：0 ANTEISO	3.87	2.84	3.04	4.34	33.32	34.06	40.66	27.25
15：0 ISO	21.72	22.31	20.48	31.09	41.94	38.34	32.03	52.34
16：0	7.15	10.28	11.18	3.84	2.27	3.31	5.14	3.37
16：0 ISO	6.35	5.42	6.74	5.79	0.77	0.61	1.79	2.01
16：1 ω 11C	1.88	1.75	2.12	0	4.27	4.78	2	0.94
16：1 ω 7C ALCOHOL	1.56	1.32	1.72	0.9	1.63	1.26	0.74	0
17：0 ANTEISO	1.24	1.21	1.57	1.07	2.29	2.4	3.13	4.21
17：0 ISO	5.9	7.68	11.97	6.56	1.38	1.26	1.82	6.74
18：0	0.83	1.01	1.38	0	0.50	1.50	1.07	0
16：1 ISO I/14：0 3OH / 16：1 ISO I / 14：0 3OH	1.29	0.65	0.78	2.26	0	0	0	0
15:0 ISO 2OH/16:1 ω 7C/15:0 ISO 2OH/16:1 ω 7C	5.55	7.47	0	8.71	0	0	0	0
17：1 ISO I/ANTEI B / 17：1 ISO I / ANTEI B	0	0	0	0	1.58	1.51	0.27	0

脂肪酸类型	类群Ⅲ				类群Ⅳ			
	4382	4388	4540	4476	4395	4396	4469	4500
ISO 17 : 1 ω10C	0	0	3.39	3.19	1.27	4.71	2.43	3.15
ISO 17 : 1 ω5C	0	0	0	0	0	0	0	0
12 : 0 ISO	0	0	0	0	0	0	0	0
13 : 0 ANTEISO	0	0	0	0	0	0	0	0
13 : 0 ISO	0	0	0	0	0	0	0	0
17 : 1 ISO ω10C	0.69	0	0	0	0	0	0	0
14 : 0	2.81	1.93	0.48	0.55	0	0.61	0	0
14 : 0 ISO	3.22	3.15	1.18	2.69	1.13	1.73	1.89	1.50
15 : 0 ANTEISO	59.48	61.47	41.94	47.33	48.94	36.59	45.25	41.4
15 : 0 ISO	11.76	9.07	16.85	18.44	15.05	20.86	21.29	23
16 : 0	6.21	6.18	2.76	1.83	2.44	2.09	2.05	2.05
16 : 0 ISO	1.85	2.84	4.46	5.46	4.59	5	5.23	4.76
16 : 1 ω11C	5.57	6.75	1.02	0.85	0	1.29	1.11	1.12
16 : 1ω7C ALCOHOL	1.87	2.11	0.62	1.34	0	0.89	0.93	0.79
17 : 0 ANTEISO	1.98	3.67	14.21	10.34	17.72	11.85	11.30	11.96
17 : 0 ISO	0.98	1.2	8.56	3.88	7.94	9.49	7.01	8.61
18 : 0	0.50	0	0.68	0.62	0	0.68	0	0
16 : 1 ISO I/14 : 0 3OH / 16 : 1 ISO I / 14 : 0 3OH	0	0	0	0	0	0	0	0
15:0 ISO 2OH/16:1ω7C/15:0 ISO 2OH/16:1ω7C	0	0	0	0	0	0	0	0
17 : 1 ISO I/ ANTEI B / 17 : 1 ISO I / ANTEI B	0	1.64	1.96	2.51	0.93	1.97	1.51	1.65

2.2 芽胞杆菌 ITS 测定结果

16 株芽胞杆菌的 ITS 序列测定结果（表 3）表明，采用 ITS 引物 L516 和 L523，通过 PCR 扩增得到 350~500 bp 长度的序列。

表 3 芽胞杆菌 ITS 测定结果
Table 3 ITS test results of *Bacillus* species

菌株编号	NCBI 登录号	测序长度/bp
FJAT-4470	JN836494	392
FJAT-4481	GQ255892	391
FJAT-4428	GQ25589	393
FJAT-4404	GQ255876	438
FJAT-4399	JN836498	436
FJAT-4495	GQ255886	439
FJAT-4521	JN836495	397
FJAT-4591	JN836497	457
FJAT-4395	GQ255875	479
FJAT-4396	JN836493	446
FJAT-4469	GQ255883	482
FJAT-4500	GQ255887	393
FJAT-4382	GQ255870	373
FJAT-4388	GQ255872	355
FJAT-4540	JN836496	356
FJAT-4476	GQ255884	426

2.3 芽胞杆菌不同方法鉴定结果比较

根据脂肪酸成分含量和 ITS 序列鉴定得出 16 株芽胞杆菌的鉴定结果(表 4)。Sherlock MIS 脂肪酸鉴定系统规定,只要是其数据中有的菌种,脂肪酸鉴定结果大于 0.5 以上,第 1 匹配值和第 2 匹配值相差 0.1 以上,鉴定结果可以准确鉴定到种。若鉴定结果匹配值在 0.3~0.5,可准确鉴定到属。

从表 4 中可以看出:脂肪酸鉴定和 ITS 鉴定的结果具有很高的一致性。巨大芽胞杆菌、短小芽胞杆菌和简单芽胞杆菌两者的鉴定结果相同。枯草芽胞杆菌和矮缩芽胞杆菌是亲缘性极高的菌种,很难区分,后者是前者的变种,因此枯草芽胞杆菌的脂肪酸鉴定结果也是基本正确的。蜡状芽胞杆菌类群的菌特征基本相似,难以区分。菌株 FJAT-4540 的脂肪酸鉴定和 ITS 鉴定不一致,是因为 MIDI 数据库中 没有此菌,造成结果鉴定不准确,但是其鉴定的类群还是准确的。通过以上鉴定分析及表 4 中的数据可得出:脂肪酸的鉴定结果非常准确,准确率(FA 鉴定结果/ITS 鉴定结果)达 99%以上。

2.4 芽胞杆菌的 ITS 分子鉴定的聚类分析

根据 16 株芽胞杆菌的 ITS 序列作出的聚类图(图 1) 可以得出: 16 株芽胞杆菌分为 2 大分支。

表 4 16 株菌的脂肪酸和 ITS 鉴定结果
Table 4 Identification results of 16 strains of *Bacillus* species

序号	菌株编号 (FJAT-)	脂肪酸鉴定结果	SI	ITS 鉴定结果	同源性系数/%
1	4470	<i>Bacillus atrophaeus</i>	0.799	<i>Bacillus subtilis</i>	98
2	4481	<i>Bacillus subtilis</i>	0.792	<i>Bacillus subtilis</i>	100
3	4428	<i>Bacillus subtilis</i>	0.707	<i>Bacillus subtilis</i>	99
4	4404	<i>Bacillus atrophaeus</i>	0.674	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100
5	4399	<i>Bacillus atrophaeus</i>	0.828	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99
6	4495	<i>Bacillus atrophaeus</i>	0.848	<i>Bacillus atrophaeus</i>	98
7	4521	<i>Bacillus simplex</i>	0.874	<i>Bacillus simplex</i>	99
8	4591	<i>Bacillus simplex</i>	0.764	<i>Bacillus simplex</i>	99
9	4395	<i>Bacillus megaterium</i>	0.826	<i>Bacillus megaterium</i>	99
10	4396	<i>Bacillus megaterium</i>	0.736	<i>Bacillus megaterium</i>	100
11	4469	<i>Bacillus megaterium</i>	0.741	<i>Bacillus megaterium</i>	99
12	4500	<i>Bacillus pumilus</i>	0.879	<i>Bacillus pumilus</i>	99
13	4382	<i>Bacillus cereus</i>	0.511	<i>Bacillus mycoides</i>	100
14	4388	<i>Bacillus mycoides</i>	0.422	<i>Bacillus mycoides</i>	100
15	4540	<i>Bacillus mycoides</i>	0.678	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	100
16	4476	<i>Bacillus cereus</i>	0.598	<i>Bacillus cereus</i>	99

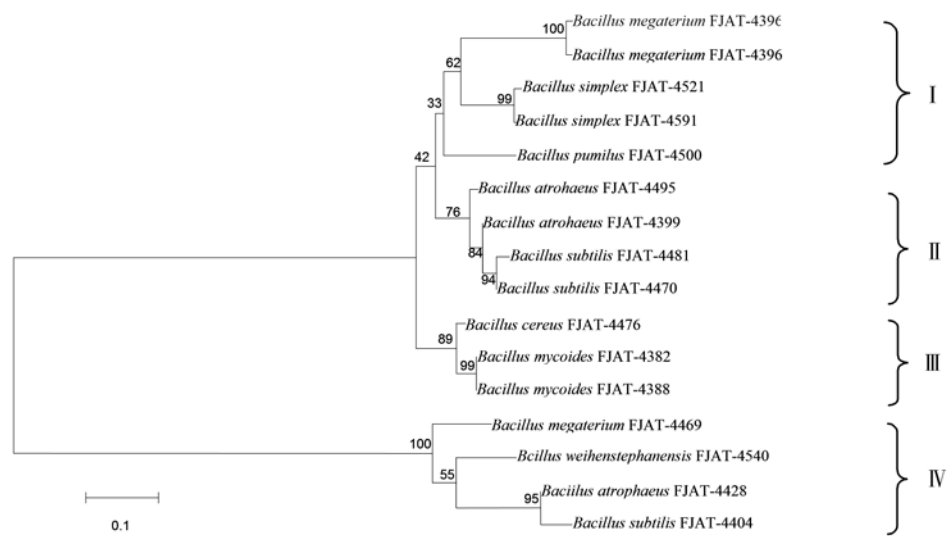


图 1 16 株芽胞杆菌的 ITS 序列聚类图
Fig. 1 ITS dendrogram of 16 strains of *Bacillus* species

分支 1 又可分为 3 个类群。类群 I 为巨大芽胞杆菌 *Bacillus megaterium* 类群，该群又可细分为巨大芽胞杆菌群和简单芽胞杆菌群，由菌株 FJAT-4395、FJAT-4396、FJAT-4521、FJAT-4591、FJAT-4500 组成。类群 II 为枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 类群，包括菌株 FJAT-4481 枯草芽胞杆菌、FJAT-4470 枯草芽胞杆菌、FJAT-4399 矮缩芽胞杆菌、FJAT-4495 矮缩芽胞杆菌。类群 III 为蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 类群，包含菌株 FJAT-4476、FJAT-4382、FJAT-4388。

分支 2：类群 IV 由 4 株菌组成。菌株 FJAT-4469、FJAT-4540、FJAT-4404 和 FJAT-4428。

2.5 芽胞杆菌脂肪酸鉴定的聚类分析

根据 16 株芽胞杆菌根据脂肪酸成分分析得出聚类图（图 2），分析脂肪酸成分与系统发育地位的关系。与分子的聚类分析基本一致，脂肪酸聚类也是分为 2 大分支，具体分为 3 大类群。

当 λ 约为 7 时 16 株芽胞杆菌菌可分为 3 大群：类群 I：枯草芽胞杆菌脂肪酸群，包含了菌株 FJAT-4470、FJAT-4481、FJAT-4399、FJAT-

4495、FJAT-4428、FJAT-4404。菌株 FJAT-4470 和 FJAT-4481 为枯草芽胞杆菌、菌株 4399 和 4495 为黑色芽胞杆菌变种。这 6 株菌均为枯草芽胞杆菌群，矮缩芽胞杆菌曾为枯草芽胞杆菌的亚种——枯草芽胞杆菌黑色变种^[12]。

群 II：巨大芽胞杆菌脂肪酸群，该群又可细分为巨大芽胞杆菌群和简单芽胞杆菌群。包含了菌株 FJAT-4521、FJAT-4591、FJAT-4395、FJAT-4396、FJAT-4469、FJAT-4500。菌株 FJAT-4521、FJAT-

4591 为简单芽胞杆菌 *Bacillus simplex*，菌株 FJAT-4395、FJAT-4396 和 FJAT-4469 为巨大芽胞杆菌 *Bacillus megaterium*，菌株 FJAT-4500 为短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus*。

群 III：蜡状芽胞杆菌脂肪酸群，包含了 FJAT-4388、FJAT-4476、FJAT-4382、FJAT-4540。这 4 株菌均为蜡状芽胞杆菌群，4 株菌的特征比较相似，亲缘关系比较近，较难以区分。

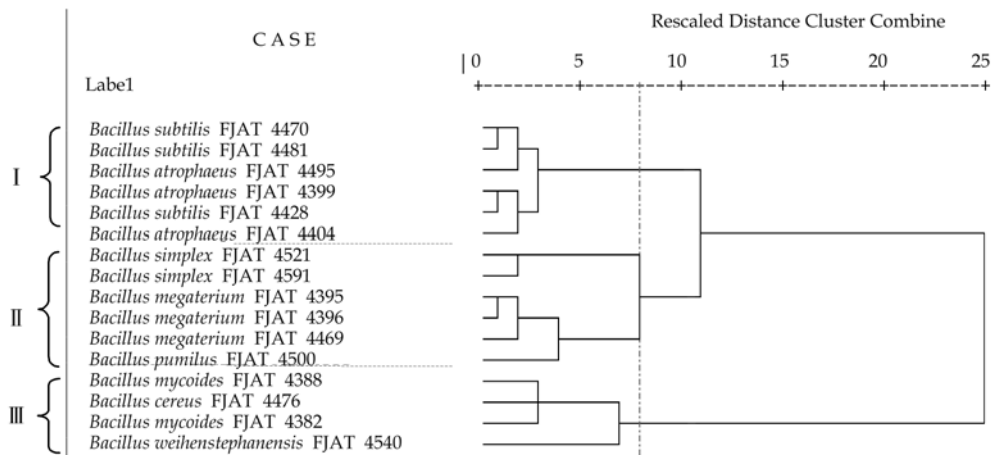


图 2 16 株芽胞杆菌的脂肪酸聚类图

Fig. 2 Fatty acid dendrogram of 16 strains of *Bacillus* species

2.6 芽胞杆菌种类鉴定方法的比较

芽胞杆菌按 ITS 和脂肪酸进行分类都分为 2 大分支 4 大群(表 5)，脂肪酸和 ITS 对 16 株芽胞杆菌的分类基本一致，除了 ITS 分类的第 IV 群和脂肪酸分类差异很大，其他群虽然排列不一致，但结果

基本一致。两者的第 1 群一致，ITS 的第 2 群与脂肪酸的第 4 群一致，ITS 的第 3 群和脂肪酸的第 2、3 群一致。根据脂肪酸分类使亲缘关系和地域相近的菌株聚在一起，由以上分析可知，与分子分类鉴定的结果相比脂肪酸鉴定方法更适合芽胞杆菌分类。

表 5 芽胞杆菌脂肪酸和 ITS 鉴定方法的比较

Table 5 Comparison between fatty acid profiles and ITS of *Bacillus* strains

分支	群	ITS	脂肪酸
分支 1	I	FJAT-4481, FJAT-4470, FJAT-4399, FJAT-4495	FJAT-4470, FJAT-4481, FJAT-4495, FJAT-4399, FJAT-4428, FJAT-4404
	II	FJAT-4476, FJAT-4382, FJAT-4388	FJAT-4521, FJAT-4591
	III	FJAT-4500, FJAT-4395, FJAT-4396, FJAT-4521, FJAT-4591	FJAT-4395, FJAT-4396, FJAT-4469, FJAT-4500
分支 2	IV	FJAT-4469, FJAT-4540, FJAT-4404, FJAT-4428	FJAT-4388, FJAT-4476, FJAT-4382, FJAT-4540

2.7 芽胞杆菌脂肪酸群的成分特征分析

16 株芽胞杆菌测得脂肪酸共有 20 种，不同种芽胞杆菌含有脂肪酸类型和含量不同，15 : 0 ANTEISO 和 15 : 0 ISO 为芽胞杆菌的特征性脂肪酸，但特征性脂肪酸在不同种中的含量不同。

蜡状芽胞杆菌群主要脂肪酸为 15 : 0 ISO，其次为 13 : 0 ISO，而 15 : 0 ANTEISO 的含量很低，且为非主要类型，与其他种芽胞杆菌主要脂肪酸类型含量完全不同。蜡状芽胞杆菌类群主要脂肪酸 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 的比值约为 5.6~7.9。

简单芽胞杆菌群主要脂肪酸为 15 : 0 ANTEISO 和 15 : 0 ISO, 15 : 0 ANTEISO 含量最高, 其次是 15 : 0 ISO, 剩余均低于 15 : 0 ISO。简单芽胞杆菌的主要脂肪酸 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 比值约为 1/6。

巨大芽胞杆菌类群主要脂肪酸 15 : 0 ISO 和 15 : 0 ANTEISO 含量相近, 其余脂肪酸远远低于这 2 种主要脂肪酸。巨大芽胞杆菌的 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 的比值约为 4/5 ~ 5/4, 菌株 4500 为短小芽胞杆菌, 其 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 比值约为 2。短小芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌归为一类是因为其脂肪酸类型相近, 但含量并不同。短小芽胞杆菌归为巨大芽胞杆菌而与简单芽胞杆菌分离开是因为短小芽胞杆菌的脂肪酸类型虽然和两者都相似, 但是主要 2 种脂肪酸的含量比值差异很大。

枯草芽胞杆菌群主要脂肪酸 15 : 0 ISO 的含量小于 15 : 0 ANTEISO, 15 : 0 ISO/15 : 0 ANTEISO 的比值为 1/3 ~ 2/3。与简单芽胞杆菌类群主要脂肪酸类型相似, 但是含量差异较大。因此, 根据以上所述的芽胞杆菌主要脂肪酸含量和类型可以初步判断未知菌株属于哪个类群。

3 讨论

芽胞杆菌的分类一直是研究人员关注的热点, 它的分类地位一直处于变化之中。近几年来, 随着测序技术的普及和测序周期的缩短、成本的降低, 微生物核酸序列数据库的不断充实, 16S rRNA 序列和 16-23S rRNA 间的内源转录间隔区 (Internally transcribed spacer, ITS) 序列测定已成为细菌的快速鉴定方法。但是 16S rRNA 只能鉴定到属, 对很多种芽胞杆菌来说, 很难鉴定到种, 需要借助其他方法才可得到种的鉴定结果。ITS 是居于 16S rRNA 和 23S rRNA 之间的一段高度可变的序列, 它弥补了 16S rRNA 保守性强, 分化程度不够的缺点, 成为对细菌在种和亚种水平上进行分类鉴定的有力工具。Xu 等^[3]利用 ITS 序列解释了芽胞杆菌科 6 个属 40 个种的系统发育关系, 证明 ITS 能更好用于芽胞杆菌种的鉴定。但是郑雪松等^[13]对近年来以 ITS 序列为基础在细菌分类鉴定和种群结构分析等领域取得的研究成果做了全面的总结, 并对这一方法的优点和缺陷进行评价。ITS 虽然变异性强, 分化程度高, 但是由于 RNA 操纵子多拷贝的原因, 使得其应用受到了一定的限制, 且并非所有微生物物种都适合凭借 ITS 作为分类鉴定手段。辛玉华等^[14]通过 PCR 扩增了苏云金芽胞

杆菌 9 个亚种的 16S ~ 23S rRNA 基因转录间隔 (ITS) 片段, 它们的长度均为 144 bp, 序列同源性分析结果表明这 9 个亚种与其他亚种的 ITS 序列高度相似, 说明 16S-23S rRNA 基因的 ITS 序列不适于苏云金芽胞杆菌亚种的分型。

本文对 16 株芽胞杆菌利用 ITS 进行分类鉴定, ITS 序列利用 Mega 软件进行聚类分析, 将 16 株芽胞杆菌分为 2 大分支。由聚类图可以看出, 根据 ITS 序列得出的相同的鉴定结果在构建进化树时却没有聚在一起, 如巨大芽胞杆菌 FJAT-4469 和 FJAT-4395。不同的种也没有区分开, 如枯草芽胞杆菌 FJAT-4470 与 FJAT-4481 和矮缩芽胞杆菌 FJAT-4399。这可能与 RNA 的多拷贝有一定的相关性, ITS 测序得到的序列位置和片段大小不同, 以至于构建进化树没有聚为一群, 也可能是 ITS 不适合亲缘关系相近的芽胞杆菌菌种分类。根据郑雪松等^[13]的研究, ITS 变化频率太高, 稳定性不好, 根据 ITS 得出的结果可靠性不是很高。因此, 这就需要建立一些简单、方便、易于操作的分类鉴定方法对微生物进行分类, 使人们在一定程度上更科学、更精确、更快速地找到分离物的分类地位。

脂肪酸是微生物细胞内的主要成分, 它不会发生遗传变异, 每种菌含有不同的特征脂肪酸种类和含量。脂肪酸和 16S rRNA 的序列分析对微生物分类鉴定有着同等重要地位, 根据特征脂肪酸可以将未知菌快速鉴定到种或属。目前商业上应用的最好的脂肪酸鉴定系统为 Sherlock MIS, 根据此系统的标准操作方法, 只要是此数据中有的菌种, 脂肪酸鉴定结果大于 0.5 以上, 第 1 匹配值和第 2 匹配值相差 0.1 以上, 鉴定结果可以准确鉴定到种。若鉴定结果匹配值在 0.3 ~ 0.5, 可以准确鉴定到属。吴愉萍等^[15]以 10 种已知菌株为例, 对 Sherlock 微生物鉴定系统 (Sherlock MIS) 的细菌鉴定准确性及培养基、活化时间和取样区域等因素对鉴定结果的影响进行了研究, 结果表明脂肪酸鉴定结果是相当准确的。邝玉斌等^[16]通过气相色谱对 10 种芽胞杆菌模式菌株的细胞脂肪酸组分及其含量进行分析, 研究表明控制芽胞杆菌的培养条件及生长状态, 同样有效地使脂肪酸组分成为芽胞杆菌化学分类的重要指征。刘志辉等^[17]应用气相色谱技术分析全细胞脂肪酸进行分枝杆菌菌种鉴定, 和传统鉴定方法结果具有良好的一致性。

本文利用 MIDI 系统鉴定了从土壤中分离的 16 株芽胞杆菌, 对其主要脂肪酸类型和含量进行了分析。芽胞杆菌的主要脂肪酸类型为 15 : 0 ISO 和

15:0 ANTEISO, 但不同种主要脂肪酸含量比例不同, 因此根据 15:0 ISO 和 15:0 ANTEISO 的含量比例可以初步判断目标菌株属于哪一芽胞杆菌类群。不同类群芽胞杆菌脂肪酸类型不同, 如 16:1 ISO I/14:0 3OH 和 15:0 ISO 2OH/16:1 ω7C 仅存蜡状芽胞杆菌类群, 在其他类群中不存在, 简单芽胞杆菌除了主要 2 种脂肪酸以外, 其余含量都很少。根据脂肪酸类型可以快速判定未知菌的分类地位。秦巧玲等^[18]通过气相色谱-质谱法分析志贺菌的脂肪酸, 发现环戊烷十三烷酸只在志贺菌属中, 这为志贺菌的化学分类和快速鉴定提供了重要的参考资料。由于通过对芽胞杆菌主要脂肪酸含量的比例来判断未知菌的研究未见相关报道, 本文的研究对于芽胞杆菌分类具有一定的意义。

本文根据 16 株芽胞杆菌的脂肪酸含量利用 SPSS 软件进行聚类分析, 根据脂肪酸类型能将这 16 株芽胞杆菌成功地分为 4 个类群。与 ITS 聚类结果相比, 相同的芽胞杆菌类群能聚在一起, 能更好地区分芽胞杆菌。脂肪酸分类主要是根据脂肪酸的成分和含量, 脂肪酸的类型与地理区域位置、生境类型等有关。文中 16 株芽胞杆菌的脂肪酸聚类主要是根据菌株的脂肪酸种类和地理位置, 同种菌相同地点分离的聚为一群。而 ITS 分类是根据基因型为标准, 虽然可以作为鉴定手段, 但是由于其变异率太高, 作为分类工具并不适宜。本研究揭示脂肪酸可以作为芽胞杆菌分类的一种手段, 且快速简便。

总结近年来的微生物学分类研究表明, 细菌的细胞结构中普遍含有的脂肪酸成分与细菌的 DNA 具有高度的同源性, 不同种属的细菌脂肪酸的组成和含量表现出不同程度的差异, 并且这种差异是稳定的。根据脂肪酸成分可以将未知菌快速鉴定到种或属, 本文研究结果表明脂肪酸适合于芽胞杆菌的分类研究。

参考文献:

- [1] PRIEST F G, GOODFELLOW M, TODD C. A numerical classification of the genus *Bacillus* [J]. J Gen Microbiol, 1988, 134: 1847—1882.
- [2] ASH C, FARROW A E, WALLBANKS S, et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences [J]. Lett Appl Microbiol, 1991, 13: 202—206.
- [3] XU D, CTE J C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S—23S ITS nucleotide sequences [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53: 695—704.
- [4] HEYRMAN J, MERGAERT J, DENYS R, et al. The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 181 (1): 55—62.
- [5] JOHANNES S, EVELYNE B, REINER M, et al. The temperature-adaptive fatty acid content in *Bacillus simplex* strains from Evolution Canyon, Israel [J]. Microbiology, 2008, 154: 2416—2426.
- [6] ALEXANDRA D, ANTÓNIO V, NOBRE F, et al. Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37 (7): 2248—2254.
- [7] 王秋红, 陈亮, 林营志, 等. 福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40 (8): 1675—1687.
- [8] Sherlock Microbial Identification System, Version 6.0, MIS Operating Manual [M]. Newark, DE: MIDI, Inc., 2002.
- [9] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876—4882.
- [10] TAMURA K, DUKLEY J, NDI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596—1599.
- [11] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 2004, 101: 11030—11035.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌系统学鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 郑雪松, 杨虹, 李道棠, 等. 基因间隔序列 (ITS) 在细菌分类鉴定和种群分析中的应用 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (6): 678—684.
- [14] 辛玉华, 东秀珠, 吴明强. ITS 序列同源性在苏云金芽孢杆菌分型中的应用研究 [J]. 微生物学通报, 2000, 27 (3): 178—181.
- [15] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究 [J]. 土壤学报, 2006, 43 (4): 642—647.
- [16] 邝玉斌, 方呈祥, 张璐珍, 等. 芽胞杆菌模式菌株细胞脂肪酸组分的气相色谱分析 [J]. 分析科学学报, 2000, 16 (4): 270—273.
- [17] 刘志辉, 蔡杏娜, 竺澎波, 等. 应用气相色谱技术分析全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌 [J]. 中国结核和呼吸杂志, 2005, 28 (6): 403—406.
- [18] 秦巧玲, 栗婉媛, 吕均, 等. GC-MS 联用分析测定志贺菌全细胞脂肪酸组成 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (3): 426—428.

(责任编辑: 林海清)