

◆ 研究与开发 ◆

一种苏云金杆菌商品制剂菌种的分类鉴定

李景壮, 曾娟, 聂天莹, 肖飞, 段亚玲*

(贵州省分析测试研究院, 贵阳 550002)

摘要:为鉴别苏云金杆菌商品制剂的品质,采用稀释法从苏云金杆菌商品制剂中分离出纯化菌株,命名为菌株D。通过形态特征、生理生化特征和分子鉴定相结合的方法对菌株D进行分类,初步鉴定其为蜡质芽孢杆菌菌株(*Bacillus cereus* strain)。

关键词:苏云金杆菌;微生物杀虫剂;分类;鉴定

中图分类号:TQ 453.5 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2018.06.003

Classification and Identification of the Formulation of *Bacillus thuringiensis*

Li Jing-zhuang, Zeng Juan, Nie Tian-ying, Xiao Fei, Duan Ya-ling*

(Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550002, China)

Abstract: In order to identify the quality of the formulation of *Bacillus thuringiensis*, strain D was isolated from the formulation of *Bacillus thuringiensis* by dilution. Then strain D was classified by investigating morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, molecular identification. The results demonstrated that strain D belonged to *Bacillus cereus* strain.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; microbial insecticide; classification; determination

随着人们对环境保护要求的提高,微生物农药成为今后农药的发展方向之一。苏云金杆菌是包括许多变种的一类产晶体芽孢杆菌,具有专一性、高效和对人畜安全等优点。目前苏云金杆菌商品制剂已达100多种,是世界上应用范围最广、用量最大、研究最多的微生物杀虫剂。

由于苏云金杆菌商品制剂种类繁多、应用广泛,因此,对市场上苏云金杆菌商品制剂产品进行分类鉴别尤为重要。本文建立了苏云金杆菌商品制剂菌株快速分离纯化的前处理方法和鉴定方法,为保证我国微生物农药产品质量,推动微生物农药的快速发展提供了科学依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 分离材料

以市场上购买的苏云金杆菌商品制剂(悬浮

剂)为试验材料,4℃保存以确保制剂中微生物的生物活性。

1.2 培养基

形态特征及生理生化特征试验所用培养基采用细菌培养^[1]。

1.3 主要试剂

75%乙醇水溶液、0.1%氯化汞甲醇溶液、牛肉膏、琼脂条、蛋白胨、NaCl均为分析纯,Tris-HCl缓冲液、核酸染料GoldView、琼脂糖,北京鼎国生物技术有限公司;EX Taq酶、脱氧核糖核苷三磷酸dNTP、10×EX Taq缓冲液,宝日医生物技术(北京)有限公司;引物10p primr1、引物10p primr2、DL 2000 DNA Marker、细菌基因组DNA提取试剂盒,北京新时代生物技术有限责任公司。

1.4 主要试验仪器

PCR仪 杭州朗基科学仪器有限公司;凝胶成像

收稿日期:2018-05-29

基金项目:黔科院J合字[2016]16号 黔科合支撑[2016]2578-2号

作者简介:李景壮(1987—),男,山西省临汾市人,工程师,硕士,主要从事农药生态毒理与环境行为等研究。E-mail:lijingzhuang@gzata.cn

通讯作者:段亚玲(1985—),女,云南省宣威市人,硕士,高级工程师。研究方向:农药安全评价。E-mail:duanyaling2006@163.com

仪、电泳系统,北京君意东方电泳设备有限公司;恒温水浴锅、PRX-250B人工气候培养箱,上海比郎仪器有限公司;医用离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;AL204电子天平,梅特勒-托利多公司;S-3400N扫描电镜,日本HITACHI公司;WP700TL23-K5格兰仕微波炉。

1.5 方法

1.5.1 分离、纯化与保存

制剂商品表面消毒方法按《微生物学实验手册》操作^[2]。用无菌滴管吸取0.5 mL苏云金杆菌悬浮剂,放入盛有100 mL无菌水的烧杯中,制得 10^{-1} 稀释液,然后按10倍的梯度稀释到 10^{-6} 。取不同稀释倍数的菌悬液0.5 mL滴入平板培养基中,于28~30℃培养箱中混菌培养3~4 d。根据菌落的不同形态,在牛肉膏蛋白胨平板上进一步划线纯化、培养,然后将纯化后所得菌落转入装有牛肉膏蛋白胨的试管中,进行编号,4℃保存备用^[3]。

1.5.2 苏云金杆菌的形态特征

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第8版)、《微生物分类学》(1999版)、《常用细菌系统鉴定手册》(2001版)的方法,对苏云金杆菌进行形态学及生理生化特征鉴定。

1.5.3 菌株基因组DNA的提取及PCR反应条件

细菌菌株基因组DNA的提取:采用北京新时代生物技术有限责任公司细菌基因组DNA提取试剂盒提取。

扩增引物:采用扩增细菌16S rDNA的通用引物27F/1492R^[4],由北京新时代生物技术有限责任公司合成,引物具体信息见表1。PCR反应体系总体积为50 mL,其中包括5.0 mL 10×EX Taq缓冲液、4.0 mL dNTP Mix(2.5 mM)、2.0 mL引物10p primr 1、2.0 mL引物10p primr 2、0.5 mL EX Taq酶(5u 2.0 mL模板Template)、36.5 mL无菌超纯水。

表1 引物序列

名称	碱基序列
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

1.5.4 PCR产物电泳检测

称取0.24 g琼脂糖加入至30 mL 0.5×TBE缓冲液,用质量分数0.8%琼脂糖凝胶检测PCR扩增产物。每孔点5 mL样品(3 mL PCR产物+2 mL loading缓

冲液),预留1个孔加入3 mL DL 2000 DNA Marker,在80 V恒压下电泳50 min,电泳结束后将其放在凝胶成像系统下观察并照相。

1.5.5 切胶纯化、测序

将PCR产物纯化后送至北京三博远志生物技术有限责任公司测序。获得的序列去除载体序列后,进行BLAST比对,结合形态学特征,确定菌株的类别。

1.5.6 DNA序列分析及发育树的构建

将测序获得的16S rDNA序列先提交到NCBI中,在GenBank中获得注册号,然后通过BLAST进行序列比对。根据同源性相似度差异,选取同源性较高的模式菌株,用Neighbor-Joining法构建系统发育树,对分离菌株与数据库中登录的近源菌株系统发育关系进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及生理生化特性鉴定

采用稀释法,根据菌落在牛肉膏蛋白胨培养基平板上的形态特征,经过多次划线分离纯化,得到纯化菌株,编号为D。

在显微镜下观察菌株D,其营养体细胞为杆状,较为粗壮,单生或双联体,并以双联体为单位连成短杆状。菌体运动活跃,形成芽孢和伴孢晶体。芽孢呈椭圆形,孢囊不膨大。伴孢晶体呈菱形、近圆形、方形、三角形或不规则形状,晶体大小不均。该菌落在牛肉膏蛋白胨、葡萄糖琼脂平板上扩展较快。菌株D电镜扫描图像如图1所示。

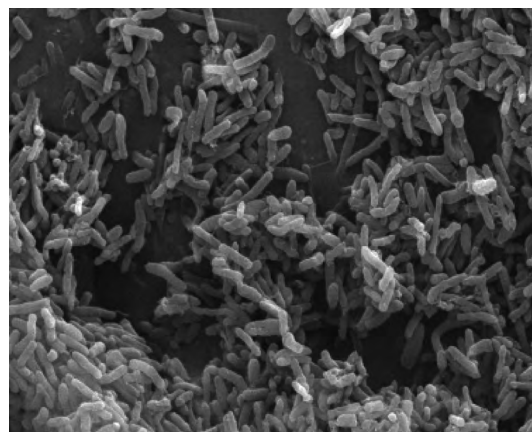


图1 菌株D的电镜扫描照片

菌株D的菌落外观为圆形,呈淡黄色透明状,表面湿润黏稠,边缘不规则,略有隆起。菌株D的菌体呈杆状,革兰氏染色呈阳性,有芽孢、鞭毛。菌株D的生理生化测定结果见表2。

表 2 菌株 D 的生理生化特征

项目	结果	项目	结果
脲酶	+	吲哚试验	-
V.P.	+	氧化酶	+
卵磷脂酶	+	硝酸盐还原试验	+
水杨苷	+/-	产气	-
蔗糖	-/+	柠檬酸盐利用试验	+
纤维二糖	-	色素	-
七叶灵	+	明胶液化试验	+
甘露糖	+	酪蛋白水解	+
淀粉水解	+	木糖	-
蛋白水解	+	精氨酸脱羧酶	+
菌膜	-		

注：“-”表示呈阴性、“+”表示呈阳性。

2.2 基于 16S rDNA 基因序列的系统发育分析和分子鉴定

通过 BLAST 比对后, 与 NCBI 数据库中已收录的同源性较高的菌株进行核苷酸同源性比较。菌株 D 构建发育树所用各个物种 16S rDNA 的 GenBank 序列注册号见表 3, 构建的系统发育进化树见图 2。

表 3 菌株 D 构建发育树所用 16S rDNA 序列的注册号

种名	注册号	相似性/%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain	MH169325	100
<i>Bacillus cereus</i> strain	CP020383	100
<i>Bacillus</i> sp.	MG735379	100
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain	MG780249	100
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain	MH041257	100
<i>Bacillus aryabhattai</i> strain	MF988752	100
<i>Bacillus proteolyticus</i> strain	MG280785	100
<i>Bacillus subtilis</i> strain	KY495216	100
<i>Bacillus cereus</i> strain	MH130053	100
<i>Bacillus cereus</i> strain	MG027647	100
<i>Bacillus cereus</i> strain	CP023245	100
<i>Bacillus cereus</i> strain	CP026678	100

从表 3 中可以看出, 菌株 D 与 *Bacillus thuringiensis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus* sp.、*Bacillus wiedmannii*、*Bacillus aryabhattai*、*Bacillus proteolyticus*、*Bacillus*

subtilis 的相似性均为 100%。从图 2 发育树中可以看出: 菌株 D 的 16S rDNA 序列与芽胞杆菌属 *Bacillus* 中的 *Bacillus cereus* strain (GenBank 登录号为 CP026678) 在同一个分支上, 亲缘关系最近, 序列相似性为 100%。

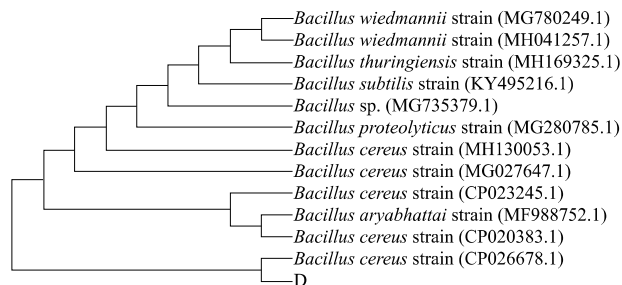


图 2 基于 16S rDNA 序列菌株 D 的系统发育树

3 结论

本文建立了苏云金杆菌悬浮剂样品的前处理及菌种鉴定方法。该方法能够快速、简便、准确地对苏云金杆菌商品制剂的菌种进行鉴别, 满足试验要求。根据菌株形态、生理生化特征及 16S rDNA 分析结果, 该苏云金杆菌悬浮剂中菌株 D 为蜡质芽胞杆菌菌株 (*Bacillus cereus* strain), 而非苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* strain)。

参考文献

- [1] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国轻工出版社, 2006: 165.
- [2] 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 194-197.
- [3] 张传博, 陈荣林, 殷幼平, 等. 金荞麦和苦荞麦抗菌活性内生真菌的筛选及鉴定 [J]. 微生物学通报, 2011, 38 (1): 70-77.
- [4] 李景壮, 胡秀红, 叶胜蓝, 等. 1 株高粱拮抗内生细菌的分类鉴定 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40 (12): 136-138.

(责任编辑: 顾林玲)

灭线磷或将退出欧盟市场

欧盟委员会向世界贸易组织(WTO)提交的关于技术性贸易壁垒的通报中称, 欧盟将不再批准杀虫剂、杀线虫剂灭线磷(ethoprophos)的再评审申请。灭线磷未获得欧盟续展登记的主要原因是登记数据缺失, 包括消费者膳食风险、发育神经毒性、地下水暴露风险评估数据。且其对鸟类和土壤生物有一定风险, 以及潜在的内分泌干扰特性。

灭线磷为具有触杀、熏蒸作用的有机磷类农药, 用于防治线虫和地下害虫。美国 Vanguard 公司向欧盟申请了灭线磷的续展登记, 用于马铃薯。该通报提案需经欧盟成员国投票表决, 预计将于 2019 年第 1 季度完成。由于欧盟登记进程缓慢, 灭线磷在欧盟的登记有效期延长至 2019 年 7 月 31 日。

(陈晨译自《AGROW》)