

一株高毒力致病杆菌 CB6 的鉴定

庞在堂 杨怀文 杨秀芬* 简 恒 刘 峥

(中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

摘 要 :从北京郊区果园采集的小卷蛾斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae*) 肠道内分离到一株具有较强杀虫和抑菌活性的致病杆菌菌株 CB6。形态特征及生理生化特征测定结果表明 ,CB6 菌株与致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 中的嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) 种的特征基本一致。测定了该菌株的 16S rRNA 序列并根据 16S rRNA 序列构建了系统发育树 ,在系统发育树中 ,CB6 菌株与嗜线虫致病杆菌其他 4 个菌株形成一个类群 ,序列同源性大于 99%。但 CB6 菌株的酪氨酸酶、脂酶(蛋黄) 的产生、核糖产酸等生化特征与嗜线虫致病杆菌种内的其他菌株存在一定的差异 ,且具有更强的杀虫和抑菌活性。因此认为 CB6 菌株是嗜线虫致病杆菌的一个变种 ,命名为嗜线虫致病杆菌北京变种 (*X. nematophila* var. *pekingensis*)。

关键词 :嗜线虫致病杆菌 ,16S rRNA ,系统发育树 ,鉴定

中图分类号 :Q939 **文献标识码** :A **文章编号** :1001-6209 (2004) 02-0131-05

致病杆菌属 (*Xenorhabdus* Thomas & Poinar , 1979)^[1] 细菌是一类与昆虫病原线虫斯氏线虫属 (*Steinernema*) 互惠共生的细菌 ,属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)。在自然界 ,此类细菌存在于侵染期线虫肠道内 ,随线虫侵入寄主昆虫而进入昆虫血腔 ,导致昆虫患败血症而死亡。在此侵染过程中 ,共生菌产生具有广谱抑菌作用的活性物质 ,为线虫的生长提供良好的环境^[2]。

近年来 ,随着对昆虫病原线虫共生菌研究的不断深入 ,共生细菌的多种生物学功能亦不断被发现。共生菌产生的多种抗生素 ,对多种植物及人类病原菌有广泛的抑菌活性^[3-6] ;产生的杀虫毒素对许多害虫有较强的致死作用 ,尤其是蛋白毒素的发现 ,为生物农药的开发和抗虫基因工程提供了新的微生物杀虫资源和杀虫基因^[7,8]。由于共生菌具有广阔的开发利用前景 ,世界各国对共生菌菌株的资源以及分类研究亦日趋重视。菌株 CB6 是从北京郊区果园采集的小卷蛾斯氏线虫肠道内分离的新菌株 ,其代谢产物具有很高的杀虫、抑菌以及抑制癌细胞生长等活性^[9,10]。本文采用形态和生理生化特征以及 16S rRNA 序列分析等方法 ,对该菌株进行分类鉴定。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

菌株 CB6 由本室从被小卷蛾斯氏线虫 CB6 品

系感染致死的大蜡螟血淋巴中分离获得。在鉴别培养基 NBTA[营养琼脂(NA) + 0.0025% 溴麝香草百里酚兰(BTB) + 0.004% 氯化三苯基四氮唑(TTC)]^[11] 平板上表现蓝色菌落者为 I 型 ,记为 CB6- I ;红色菌落者为 II 型 ,记为 CB6- II。

1.2 形态特征的观察

将菌株 CB6 接种在 NA、NBTA 和麦康凯(MacConkey) 营养培养基上 ,在 28℃ 下培养 24h 后开始观察其菌落形态及色素吸收。利用光学显微镜和电镜观察在 NA 培养基上生长 36h 的菌体形状、革兰氏染色和鞭毛。

菌体在 TSB 培养液(每升含胰蛋白胍 15g ,大豆蛋白胍 5g ,氯化钠 5g ,pH7.2) 中振荡培养 20h ,收集菌体细胞 ,测量 50 个细胞的大小。

1.3 生理生化特征的测定

各项生理生化指标的测定均参照参考文献 [12 ,13] 以及《常见细菌系统鉴定手册》^[14] 的方法。

1.4 对大蜡螟幼虫的注射致病力

分别将 I、II 型细胞悬浮液 10 μ L 注射到老龄健康大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 幼虫体内 ,每处理 20 头 ,重复 3 次 ,以无菌水做对照 ,注射后的幼虫置于 25 \pm 1℃ 人工温室内 48h 后统计死亡率并计算致死中浓度 LD₅₀ ,实验重复 3 次。

1.5 抑菌活性

单菌落接种到 20mL TSB 培养液中 ,180r/min ,

基金项目 :国家自然科学基金(30070519) ,国家“ 863 计划”(新型生物农药的研发)(2001AA246)

* 通讯作者。Tel : 86-10-68919562 ; E-mail : xiufeny@mailserver.cjac.org.cn

作者简介 :庞在堂(1976 -) ,男 ,山东临沂人 ,主要从事昆虫病原线虫共生菌的研究。Tel : 86-10-64002234 ; E-mail : pz99@sohu.com

收稿日期 :2003-06-26 ,修回日期 :2003-11-14

28℃培养 72h。采用牛津杯法测定其发酵上清液对细菌的抑菌活性,毒板法测定对植物病原真菌抑菌效果。

1.6 (G+C)mol% 含量的测定

采用熔点测定法^[14],以 *Escherichia coli* AS1.365 为参比对照菌株。

1.7 16S rRNA 的扩增和测序

16S rRNA 的扩增参照文献[15]描述的方法,PCR 产物连接到 pGEM T easy vectors(Progema)上,序列测定由上海生工(Sangon)生物技术有限公司完成。

1.8 系统发育树的构建

将菌株 CB6 的 16S rRNA 序列与从 GenBank 等核酸序列数据库中获取的 13 株致病杆菌属和光杆状菌属 *Photorhabdus* 的 16S rRNA 全序列进行比较,采用 DNAMAN 4.0 软件的 Multiple Sequence Alignment 进行多序列同源性分析,并构建系统发育树(Bootstrap 值 = 1000)。

2 结果

2.1 形态特征

菌株 CB6 革兰氏染色为阴性,兼性厌氧,长杆状,不产生芽孢,周生鞭毛(图 1-A);在细胞内可观察到着色较深的颗粒(图 1-B)。细胞大小变化较大,液体培养 20h,I 型菌的菌体大小为(0.5~1.0) $\mu\text{m} \times (2.1 \sim 7.3) \mu\text{m}$,平均长度为 3.96 μm ;II 型菌的菌体大小为(0.5~1.0) $\mu\text{m} \times (1.1 \sim 4.2) \mu\text{m}$,平均长度为 2.58 μm 。在两型菌中均可观察到 20 μm 的细丝状细胞。

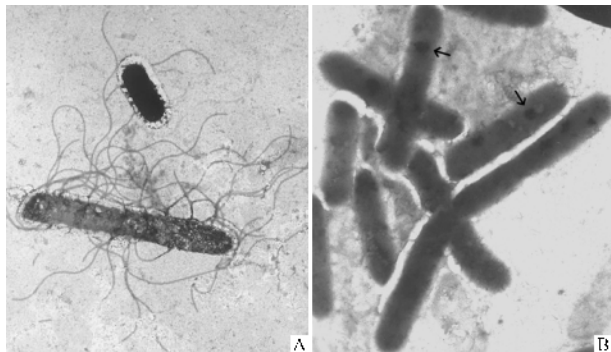


图 1 菌株 CB6 的电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of strain CB6

A. Peritrichous flagella of CB6- I (8000 \times);

B. Birefringent bodies(10000 \times).

在 NA 上培养 48h 后,CB6- I 可以形成直径为 1~2mm 菌落,菌落圆形、凸起、灰白色或浅黄色,有

光泽,边缘稍不整齐。CB6- II 菌落直径为 2~3mm,扁平、灰白色。在 NBTA 平板上,CB6- I 培养 24h 见透明的浅灰色菌落,72h 形成边缘为蓝色、中间为暗蓝色的菌落,菌落周围的培养基为浅蓝色。CB6- II 不吸收 BTB,可还原 TTC,形成红色菌落。CB6- I 在 MacConkey 培养基上吸收中性红,形成褐色菌落;CB6- II 不能吸收中性红,形成透明无色菌落。

2.2 生理生化特征

CB6 菌株的 I、II 型均不能还原硝酸盐,不产生生物荧光。MR 和 VP 反应为阴性,不能产生 H_2S 和吲哚,七叶灵水解阴性,精氨酸双水解酶阴性,不能产生磷酸酶、 H_2O_2 酶和脲酶,不水解淀粉,不产生苯丙氨酸脱氨酶和色氨酸脱氨酶。明胶水解阳性,可水解三丁酸甘油酯。可利用葡萄糖、麦芽糖、甘露糖和纤维二糖产酸,不能利用果糖、肝糖、甘油、水杨苷和七叶苷产酸。利用甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐和乳酸盐为惟一碳源生长,不能利用丙二酸盐、柠檬酸盐和葡萄糖酸盐。CB6- I 产生卵磷脂酶;CB6- II 不产生卵磷脂酶。CB6 菌株的主要生理生化特征与嗜线虫致病杆菌的比较见表 1。

表 1 CB6 菌株 I、II 型的主要生理生化特征

Table 1 Biochemical characteristics of the strain CB6(phase I , II)

Characteristics	Results		<i>X. nematophila</i>
	CB6- I	CB6- II	
Growth at 34℃	+	+	+
37℃	-	w	-
BTB absorption	+	-	+
MacConkey	+	-	+
Tyrosinase	w	-	-
Lecithinase	+	-	+
Phosphatase	-	-	-
Protease : skim milk agar	+	w	+
Utilization (OY medium) of :			
Propionate	+	+	+
Citrate	-	-	+
Gluconate	-	-	±
Lipase : egg yolk agar	-	+	+
Tween 60	+	+	+
Tween 80	-	w	-
Tributytin	+	+	±
Acid from :			
Cellobiose	+	+	±
Maltose	+	+	w
Inositol	w	+	±
Dextrin	+	+	w
D-ribose	-	-	w
Inosose	-	+	-
HCl- α -glucosamine	-	+	-

+ . Positive ; - . Negative ; w . Weak reaction ; ± . Positive or negative , varied with different strains .

2.3 (G + C)mol%

菌株 CB6 的 T_m 值为 70.8°C ,对照菌株 *E. coli* AS1.365 的 T_m 值为 74°C ,根据公式 $(G + C) \text{mol} \% = 50.4 + 2.08(T_m - T_{E. coli})$ 计算其 $(G + C) \text{mol} \%$ 含量为 43.7% 。

2.4 构建系统发育树

测得菌株 CB6- I 的 16S rRNA 序列有 1496 个碱

基 ,在 GenBank 中的登记注册号为 AF522294。

根据 16S rRNA 序列同源性构建系统发育树(图 2)。以与共生菌同源性最高的 *Proteus vulgaris* 作为外群种(Outgroup),其中 CB6 和嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila*)的 4 个菌株亲缘关系最近 ,序列同源性大于 99% ,形成一个簇群。

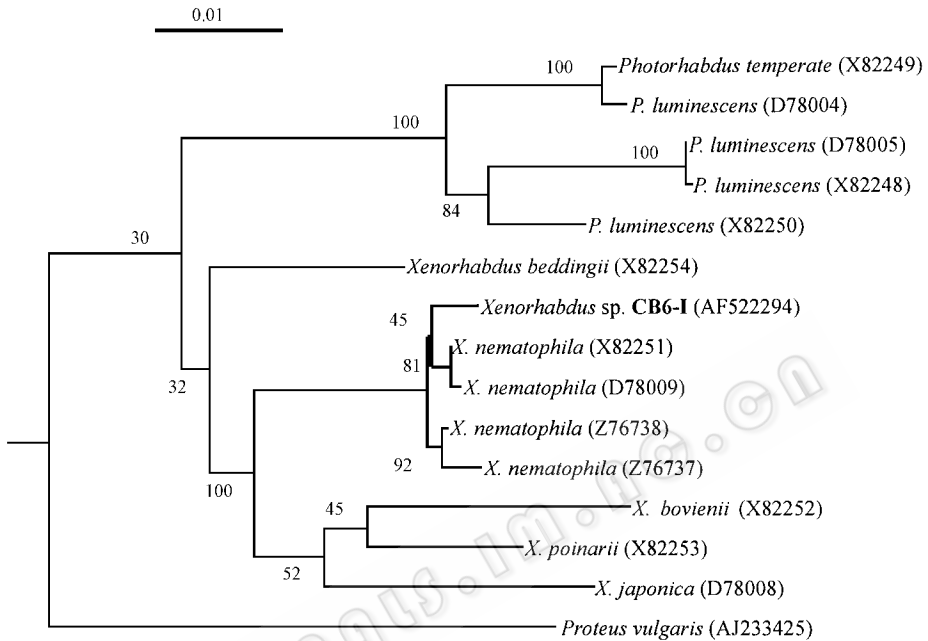


图 2 根据 16S rRNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences homology
Evolutionary distances were calculated by Multiple Sequence Alignment of DNAMAN 4.0 , bootstrap = 1000.
Bar ,0.01 substitution per nucleotide.

表 2 菌株 CB6- I 的抑菌活性

Table 2 The antibiotic activity of strain CB6- I

Bacteria	Antibacterial activity*	Pathogenic fungi	Antifungi activity†
<i>Staphylococcus aureus</i>	++++	<i>Alternaria solani</i>	+++
<i>B. thuringiensis</i> HD-1	+++	<i>Physalospora piricola</i>	—
<i>B. megaterium</i>	+++	<i>Vaisa mali</i>	—
<i>B. subtilis</i>	++++	<i>Botryosphaeria ribis</i>	++
<i>Corynebacterium pekinense</i>	+++	<i>Fusarium graminearum</i>	—
<i>Micrococcus luteus</i>	++	<i>Helminthosporium sativum</i>	+++
<i>B. cereus</i>	++	<i>Alternaria citri</i>	—
<i>Erwinia carotovora</i>	++++	<i>Phytophthora melonis</i>	++++
<i>Xanthomonas oryzae</i>	+++	<i>P. boehmeriae</i>	++++

* : + + + + , diameter of the circle by antibiotic activity > 25mm ; + + + 25mm ≥ diameter of the circle by antibiotic activity > 20mm ; + + 20mm ≥ diameter of the circle by antibiotic activity > 15mm.
† : + + + + , 1/4 colony contrasted with control ; + + + , 1/3 colony contrasted with control ; + + , 1/2 colony contrasted with control ; + , weak anti-fungi activity ; — , no antifungi activity.

2.5 致病性

菌株 CB6 的 I、II 型对大蜡螟老龄幼虫均具有较强的注射毒性,48h 时 CB6-I 的致死中浓度 (LD_{50}) 为 3~10 个菌体细胞, CB6-II 的致死中浓度 (LD_{50}) 为 15~60 个菌体细胞。

2.6 抑菌活性

CB6-I 对病原真菌和细菌的抑菌活性见表 2。CB6 菌株对所测定的细菌均有较强的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最高,对植物病原真菌中的黄瓜疫霉和棉花疫霉的抑制作用最强。

3 讨论

昆虫病原线虫共生菌是研究较晚的一类特殊细菌,20 世纪 60 年代才开始其分类研究,并将其归到肠杆菌科。随着研究的深入和分类技术的应用,目前共生菌已分为两个属: *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus*^[16]。

共生菌传统的分类主要是依靠生理生化等特征,但作为一个比较独特的表型群体,共生菌菌株之间存在非常相似的表型特征,同时在培养过程中产生的型态变异亦会导致某些生理生化特征的改变,因此仅依靠表型特征来区分不同菌株存在较大的困难。早期的分类研究只注重 I 型菌各项指标的测定,致使对同一种共生菌的特征描述存在一定的分歧。本研究同时测定了 I、II 型菌株的形态、生理生化及生物学特性,系统比较了 CB6 菌株与已知种的各项分类指标,提高了该菌株鉴定的准确性。

基于 16S rRNA 序列分析的系统发育学和表型特征存在较好的相关性^[17,18],系统发育学分析在共生菌的分类中越来越得到广泛的应用。在构建的系统发育树(图 2)中,菌株 CB6 与嗜线虫致病杆菌种内的其他 4 个菌株形成一个簇群,序列同源性均在 99% 以上。因此,从系统发育树和 16S rRNA 序列同源性进行分析,菌株 CB6 应当属于嗜线虫致病杆菌种内的菌株。但 CB6 也与嗜线虫致病杆菌种内的其他菌株存在一定的差异,如酪氨酸酶、脂酶(蛋黄)的产生、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐的利用、核糖产酸等,可能是由于该菌株的生态差异造成的。尤其是该菌株有较强的杀虫和抑菌活性,次生代谢产物对多种病原真菌具有较高的抑制作用^[3,4],目前文献描述的该种内其他菌株还未见相似的菌株报道。综合形态、生理生化以及 16S rRNA 序列分析等实验结果,我们将 CB6 菌株命名为:嗜线虫致病杆菌北京变种 (*Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*)。

我国有丰富的共生菌资源,目前已发现许多具有开发应用价值的新菌株,但对其还尚未进行系统地分类鉴定,不利于其进一步的开发研究。本文将表型特征和分子分类方法应用到共生菌的分类中,对菌株 CB6 进行了系统的分类鉴定,确定了其分类学地位,为以后其他共生菌的分类鉴定提供技术资料。

致谢 本实验得到中国科学院微生物研究所东秀珠研究员的热心帮助,在此特表感谢。

参 考 文 献

- [1] Thomas G M, Poinar G O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol*, 1979, **29**(4): 352–360.
- [2] Akhurst R J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp.: bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabdidae and Steinernematidae. *J Gen Microbiol*, 1982, **128**(12): 3061–3065.
- [3] 杨怀文, 张志铭, 杨秀芬, 等. 嗜线虫杆菌代谢物对马铃薯晚疫病的抑制作用. *中国生物防治*, 2000, **16**(3): 111–113.
- [4] 杨秀芬, 杨怀文, 简 恒. 嗜线虫致病杆菌代谢物拮抗大豆疫霉. *大豆科学*, 2002, **21**(1): 52–55.
- [5] Yang X F, Zhang Z M, Yang H W, et al. Inhibition of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora infestans*. *J Agri Univ Hebei*, 2001, **24**(2): 65–68.
- [6] Li J X, Chen G H, Webster J M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canada J Microbiol*, 1997, **43**: 770–773.
- [7] Morgan J A W, Sergeant M, Ellis D, et al. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **5**: 2062–2069.
- [8] Waterfield N, Dowling A, Sharma S. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **11**: 2579–2601.
- [9] 刘 峥, 简 恒, 杨秀芬, 等. 致病杆菌和光杆状菌发酵液对几种害虫的生物活性. *植物保护学报*, 2003, **30**(1): 19–23.
- [10] Pan Y H, Jian H, Yang X F. An intracellular protein (Xin) with remarkable inhibition on growth of *Helicoverpa armigera* was isolated from *Xenorhabdus nematophilus* strain BJ. *Progress in Natural Science*, 2002, **12**(4): 310–312.
- [11] Akhurst R J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabdidae*. *J Gen Microbiol*, 1980, **121**: 303–309.
- [12] Boemare N E, Akhurst R J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 751–761.

- [13] Akhurst R J. Taxonomic study of *Xenorhabdus* , a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *Int J Syst Bacteriol* , 1983 , **33** : 38 – 45 .
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001 .
- [15] Brunel B , Givaudan A , Lanois A , *et al* . Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** : 574 – 580 .
- [16] 庞在堂, 杨怀文. 昆虫病原线虫共生菌的分类. 微生物学报, 2003 , **43** (4) : 527 – 533 .
- [17] Fischer-Le Saux M , Arteaga-Hernandez E , Viallard V E , *et al* . Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa : *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov. , *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov. , *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov. , *P. temperata* sp. nov. , *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. , and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* , 1999 , **49** : 1645 – 1656 .
- [18] Liu J , Berry R E , Blouin M S. Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rRNA sequence. *J Invertebr Pathol* , 2001 , **77** : 87 – 91 .

Identification of A Strain *Xenorhabdus* sp. with High Antibiotic and Insecticidal Activity

PANG Zai-Tang YANG Huai-Wen YANG Xiu-Fen* JIAN Heng LIU Zheng

(Institute of Biological Control , Chinese Academic of Agriculture Science , Beijing 100081 , China)

Abstract : Strain of *Xenorhabdus* sp. CB6 with high antibiotic and insecticidal activity was isolated from the intestine of *Steinernema carpocapsae* collected from orchard of Beijing , China. The morphology , physiological and biochemical characteristics were studied. The results indicated that its characteristics were most consistent with *X. nematophila* . The sequence of 16S rRNA fragments were analyzed. The homology between strain CB6 and other strains of *X. nematophila* is above 99% . Strain CB6 was clustered together with other four strains of *X. nematophila* in phylogenetic tree. But there are some differences in biochemical characteristics (e. g. tyrosinase , lipase , acid from ribose) with other strains of *X. nematophila* , especially CB6 has high insecticidal and antibiotic activity. We suggested that strain CB6 was a variation of *X. nematophila* and named *X. nematophila* var. *pekingensis* .

Key words : *Xenorhabdus nematophila* , 16S rRNA , Phylogenetic tree , Identification

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (Research and Development of Bio-pesticide) (2001AA246)

* Corresponding author. Tel : 86-10-68919562 ; E-mail : xiufeny@mailserver.cjac.org.cn

Received date : 06-26-2003

《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 : 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果, 包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等, 本刊均欢迎投稿。
 2. 应首次发表 : 所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。
 3. 介绍信 : 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误, 请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文, 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。
 4. 作者联系方式 : 请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。
 5. 审稿费 : 投稿时请随寄 100 元审稿费, 可通过邮局汇来 (务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者, 我们将开具正式发票)。
 6. 投稿方式 : 本刊中英文稿件均收。采用邮寄投稿, 要求五号宋体、A4 纸单面打印稿 2 份, 提供电子版 (附软盘或 E-mail 传来)。
 7. 投稿及汇款地址 (100080) 北京中关村中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部
- 欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 : [Http //www. im. ac. cn/journals](http://www.im.ac.cn/journals)