

方光远,茅慧华,郭宇飞,等. 分解鸽羽毛地衣芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):387-390.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.120

分解鸽羽毛地衣芽孢杆菌的分离与鉴定

方光远,茅慧华,郭宇飞,宋丁全,胡志华,蒋加进,孙静静,陈俊红,戴鼎震
(金陵科技学院动物科学与技术学院,江苏南京 210038)

摘要:在江苏省南京地区土壤内分离到 1 株细菌 NJ-01,对该菌株进行一系列的细菌形态大小、菌落形态、生化反应、16S rDNA 鉴定试验,结果表明分离和鉴定该菌株为地衣芽孢杆菌。该菌株能够很好地分解鸽羽毛,37 ℃ 培养 5 d 鸽羽毛开始分解,37 ℃ 培养 15 d 时鸽羽毛小羽枝、羽毛梗全部分解为碎片,对鸽羽毛粉消化分解率为 85%。

关键词:地衣芽孢杆菌;分离;鉴定;鸽羽毛;分解率

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0387-04

随着肉鸽养殖业的迅速发展,肉鸽养殖场产生的大量鸽羽毛废弃物对环境造成了严重污染,为了寻找处理鸽羽毛废弃物的方法,笔者所在项目组成员寻找能够分解鸽羽毛的细菌,对鸽羽毛进行分解处理,从江苏省南京地区土壤分离到 1 株细菌,对该细菌进行多次分离培养获得纯培养菌株,该菌株能够分解鸽羽毛。通过对该菌株进行一系列细菌形态大小、菌落培养特性、生化反应、16S rDNA 鉴定,结果表明,该菌株为地衣芽孢杆菌。现将试验过程及有关内容报道如下。

收稿日期:2015-08-09

基金项目:江苏省南京市科技发展计划(编号:201201026);江苏省教育厅高校自然科学研究项目(编号:12KJD23001);江苏省自然科学基金(编号:BK2011090)。

作者简介:方光远(1965—),男,江苏宿迁人,硕士,副教授,从事兽医微生物学、兽医生物制品学教学及研究工作。E-mail:fanggy126@126.com。

通信作者:戴鼎震,博士,教授,硕士生导师,从事兽医微生物学、中药学教学及研究工作。E-mail:daimingrui@jit.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分解鸽羽毛细菌 从南京地区土壤分离获得 1 株细菌,由本校兽医微生物实验室保存。

1.1.2 培养基 普通营养琼脂平板(营养琼脂 38 g,蒸馏水 1 000 mL,初始 pH 值为 7.5);营养肉汤(牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,K₂HPO₄ 1 g,蒸馏水 1 000 mL,初始 pH 值为 7.5);分解羽毛基础培养基(K₂HPO₄ 0.04%,NaCl 0.05%,初始 pH 值为 7.5);羽毛粉发酵培养基(鸽羽毛粉 2%,K₂HPO₄ 0.04%,NaCl 0.05%,初始 pH 值为 7.5)。

1.1.3 染色液 革兰氏染色液 1 套。

1.1.4 微量生化发酵管 微量生化发酵管购自杭州天和微生物试剂有限公司,共计 16 种:尿素、苯丙氨酸、硫化氢、葡氨酸、靛基质、葡磷胨水、枸橼酸盐、半固体、赖氨酸、鸟氨酸、葡萄糖、蔗糖、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖、氨基酸对照。

[9]孙 艳,钞亚鹏,钱世钧. 嗜吡啉红球菌 R04 的联苯降解途径的研究[J]. 微生物学报,2003,43(5):653-658.

[10]Vasilyeva G K,Strijakova E R. Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls[J]. Microbiology, 2007,76(6):639-653.

[11]Jung I G,Park C H. Characteristics of rhodococcus pyridinovorans PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, *m*-xylene (BTX), and their mixtures[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2004,97(6):429-431.

[12]Ohmori T,Morita H,Tanaka M,et al. Development of a strain for efficient degradation of polychlorinated biphenyls by patchwork assembly of degradation pathways[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2011,111(4):437-442.

[13]Egorova D O,Demakov V A,Plotnikova E G. Destruction of mixture of tri- to hexa-chlorinated biphenyls by *Rhodococcus* genus strains[J]. Applied Biochemistry and Microbiology,2011,47(6):599-606.

[14]Petrić I,Hršak D,Fingler S,et al. Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil under bioremediation[J]. Journal of Soils and Sediments,2011,11(2):290-

300.

[15]杨秀清,郑 媛,李鹏丽,等. 红球菌-R04 生物降解多卤代联苯的影响因素研究[J]. 中国环境科学,2010,30(5):694-698.

[16]Janbandhu A,Fulekar M H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment[J]. Journal of Hazardous Materials,2011,187(1/2/3):333-340.

[17]Romine F,Stillwell C,Saffer D,et al. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199[J]. Journal of Bacteriology,1999,181(5):1585-1602.

[18]Fang H,Dong B,Yan H,et al. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil[J]. Journal of Hazardous Materials,2010,184(1/2/3):281-289.

[19]Demanèche S,Meyer C,Micoud J,et al. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Applied and Environmental Microbiology,2004,70(11):6714-6725.

1.1.5 16S rDNA PCR 扩增引物及试剂 16S rDNA 基因片段扩增引物,上游 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游 1495R:5'-CTACGGCTACCTGTTACGA-3',预计扩增 1 468 bp 基因片段,由宝生物工程(大连)有限公司合成。试剂:2×Taq PCR mix、DL 2000 DNA Marker、Goldview、琼脂糖、超纯水、TBE 缓冲液均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.6 主要试验仪器 CX41 奥林巴斯生物显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社),YXQ-LS-75S II 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),HPX-9052MBE 电热恒温培养箱(上海博讯实业有限公司),ZHTY-70 振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司),PCR 基因扩增仪(德国 Eppendorf 有限公司),Gelx 1650 凝胶成像系统(上海欧翔科学仪器有限公司),WP700 型 LG 微波炉(天津乐金电子电器有限公司),DYY-2C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),DYCP-31 DN 型电泳槽(北京市六一仪器厂),0.5~10 μL 可调移液器(德国 Eppendorf 有限公司),10~100 μL 可调移液器(德国 Eppendorf 有限公司),BHC-1300 II A/B3 型生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司),BS110S 电子天平(德国赛多利斯股份公司),TG500 手提式多功能粉碎机(上海广沙工贸有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养 直接用灭菌接种环将采集的土壤划线接种于普通琼脂平板上,37℃培养 24 h,观察长出的单个菌落形态,取直径 2 mm 左右、边缘不整齐、呈淡棕色、粗糙型菌落进行进一步分离培养,获得单个菌落后进行纯培养。

1.2.2 细菌菌落形态观察 取分离到的细菌在普通琼脂平板上的单个菌落,直接用肉眼观察,同时采用 40 倍低倍显微镜进行观察。

1.2.3 细菌形态大小观察 取分离培养出的单个细菌菌落在载玻片上涂片进行革兰氏染色,置于光学显微镜油镜头下进行观察。

1.2.4 细菌的生化反应 挑取菌落接种于微量生化鉴定管,37℃培养 24 h 后观察结果。按常规方法接种三糖铁琼脂斜面,进行吲哚试验、MR 试验、V.P 试验、柠檬酸盐利用试验、半固体营养琼脂穿刺试验并观察。

1.2.5 细菌分解鸽羽毛试验

1.2.5.1 细菌对鸽羽毛直接分解观察 在玻璃试管中加入 5 mL 分解羽毛基础培养基及 1 片洁净鸽羽毛,高压灭菌 15 磅 121℃15 min,待冷后接种适量分离培养的细菌,置于 37℃培养箱中培养 5~15 d 后观察结果。

1.2.5.2 细菌对鸽羽毛分解残留量测定 取 250 mL 规格三角烧瓶 18 个,各加入鸽羽毛粉 1 g 及发酵培养基 50 mL,高压灭菌 15 磅 121℃15 min,待冷后备用,分成 2 组,第一组 9 个,每个各接种适量分离培养出的细菌(1 mL 不少于 10⁹ CFU),另一组 9 个作为空白对照,置于 37℃振荡培养箱中 150 r/min 培养,第 5 天、第 10 天及第 15 天分别从第一组及对照组各取样 3 份,干燥,称质量,观察结果。

1.2.6 细菌 16S rDNA 基因片段序列测定 取分离培养细菌接种营养肉汤,37℃振荡培养箱中 150 r/min 培养 10 h,用灭菌生理盐水 10 000 r/min 洗涤 2 次,再用生理盐水稀释为原菌液体积,作为细菌 DNA 模板。PCR 扩增体系为:在总量为

50 μL 的反应体系中加入 2×Taq PCR mix 25 μL、上下游引物各 2 μL,细菌 DNA 模板 0.5 μL,加灭菌超纯水至 50 μL。PCR 扩增条件为:94℃8 min;94℃45 s,56℃45 s,72℃1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。以不加 DNA 模板的反应体系溶液作为空白对照。100 mL 1.2% 琼脂糖(TaKa-Ra 公司)微波炉完全融化后加入 goldview 5 μL 混匀,待冷至 80℃时倒板,待凝胶完全凝固后拔出梳子,每孔加样 PCR 扩增产物 3 μL 进行凝胶电泳,电泳条件为电压 100~110 V,电流 80~90 mA,电泳时间 45 min,电泳完毕后立即放入凝胶成像系统进行观察和捕获图象,若图像清晰,取 PCR 扩增产物 30 μL 送宝生物工程(大连)有限公司测定分离细菌 16S rDNA 1 468 bp 核苷酸片段序列。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养结果

通过细菌分离培养,获得 1 株纯培养细菌,命名为 NJ-01。

2.2 菌落形态观察结果

分离到的细菌在普通琼脂平板上的单个菌落直径 2 mm 左右,菌落表面呈淡棕色,表面粗糙扁平,菌落边缘不整齐,在 40 倍低倍显微镜下呈花瓣状(图 1、图 2)。

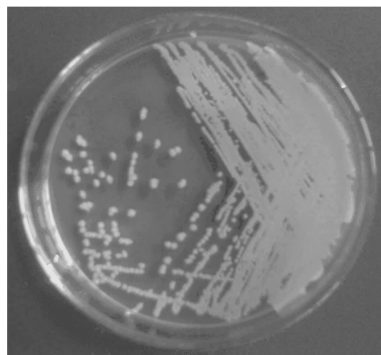


图1 NJ-01菌落形态

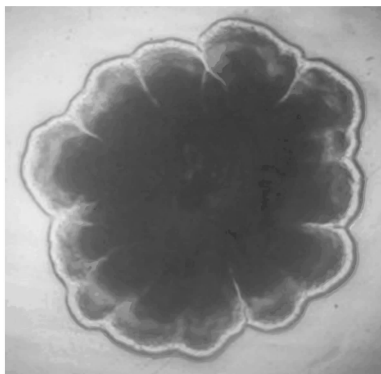


图2 NJ-01 显微镜放大 400 倍菌落形态

2.3 细菌形态大小观察结果

细菌经革兰氏染色后置于显微镜油镜下观察,结果为有芽孢的 G⁺ 中等大小杆菌,多数单在,少数呈 3~5 个短链状,繁殖体细菌大小(0.6~0.8) μm × (1.5~3.0) μm,细菌芽孢为椭圆形,中生,大小为(0.6~0.9) μm × (1.0~1.5) μm (图 3、图 4)。

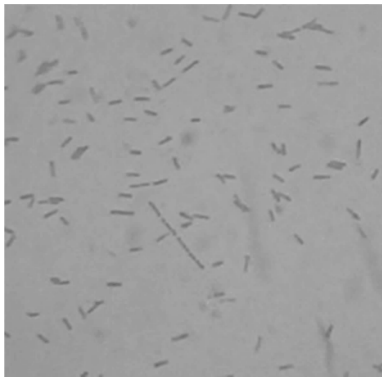


图3 NJ-01繁殖菌体形态

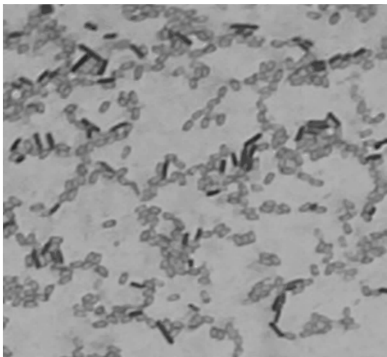


图4 NJ-01芽孢菌体形态

2.4 分离细菌生化试验结果

细菌生化反应试验结果见表 1。从表 1 可以看出,该菌株尿素、苯丙氨酸、硫化氢、葡酸盐、靛基质试验均为阴性,V. P 试验、枸橼酸盐、半固体、赖氨酸、鸟氨酸、葡萄糖试验均为阳性。蔗糖、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖试验均为阴性。对照伯杰细菌鉴定手册第八版,该分离的菌株在生化鉴定上属于地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

表 1 NJ-01 菌株生化反应试验结果

生化试验项目	试验结果
尿素	-
苯丙氨酸	-
硫化氢	-
葡酸盐	-
靛基质	-
V. P 试验	+
枸橼酸盐	+
半固体	+
赖氨酸	+
鸟氨酸	+
葡萄糖	+
蔗糖	-
棉子糖	-
山梨醇	-
侧金盏花醇	-
木胶糖	-

注:“+”表示分离菌生化反应呈阳性;“-”表示分离菌生化反应呈阴性。

2.5 细菌分解鸽羽毛试验结果

2.5.1 细菌对鸽羽毛直接分解观察结果 细菌 NJ-01 能对

不加任何营养成分的鸽羽毛进行分解,37 ℃ 分别培养 5、10、15 d 分解结果如图 5、图 6、图 7 所示,图 8 为对照原始羽毛片。

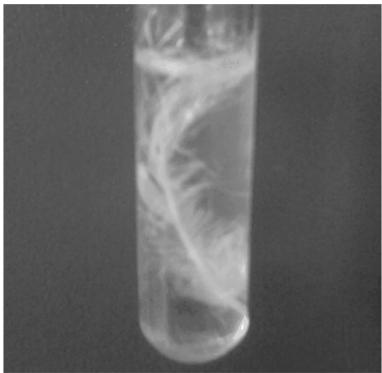


图5 培养 5 d 鸽羽毛片

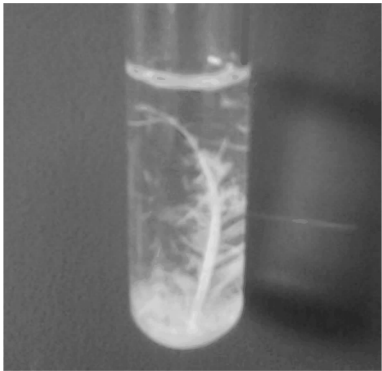


图6 培养 10 d 鸽羽毛片

培养 5 d 羽毛片:羽干仍然完整,羽枝松软,羽小枝解体,羽枝钩溶解,羽毛网状结构消失,附羽部分消失。培养 10 d 羽毛片:羽干松软,羽枝消失,羽小枝脱落、部分溶解消失,附羽全部消失。培养 15 d 羽毛片:羽干大部分消失,仅留羽根硬角质部分,羽枝、羽小枝溶解,呈絮状,摇动分散后消失。至此羽毛片基本溶解。对照原始羽毛片:可见完整的羽干,分出众多的纤细羽枝,每根羽枝上又伸出若干更细的羽小枝,相连的羽小枝上面的小钩子相互钩连,羽毛片呈网状结构。

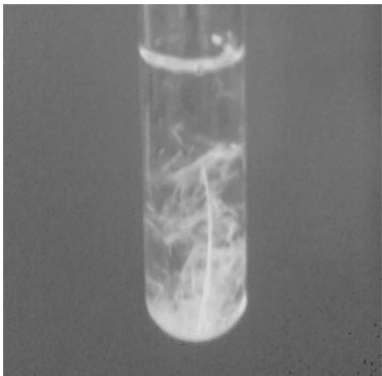


图7 培养 15 d 鸽羽毛片

2.5.2 细菌对鸽羽毛分解残留量测定 将分离培养出的细菌接种鸽羽毛粉发酵培养基置于 37 ℃ 振荡培养箱中 150 r/min 培养 15 d,羽毛残留量见表 2。由表 2 可见,第 5 天试验组羽毛片分解率可达 35%,第 10 天分解率可达 65%。



图8 对照鸽羽毛片

表 2 地衣芽孢杆菌 NJ01 菌株分解鸽羽毛残留量测定

组别	羽毛粉平均残存量(g)			羽毛分解百分率(%)		
	第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天
试验组	0.65	0.35	0.15	35	65	85
对照组	1	1	1	0	0	0

2.6 细菌 16S rDNA 基因片段序列测定

2.6.1 分离细菌 16S rDNA 核苷酸片段 PCR 产物电泳结果

5′ -TGCTACTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGTTACTCACCAGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCA TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAACAGATTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGT TCTGCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGCGAGTCACCTTAGAGTGCCCACTGAATGC TGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGAAGCCCTATC TCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACCATGTCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTG CGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTATCGTTTACGCGGTGGACTACCGGGTATCTAATCCT GTTCGCTCCCCACGCTTTCGCGCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGAATTCACCTCT CCTCTCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCGGGAC AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTTACCGGTGGCTTTCGCGGTAGGTACCGTCAAGGTGCGGCCTATTGCAACGGTACTGTCTCCTACACAGAG TTTTACGATCCGAAACCTTCATCACTCAACGCGGCGTGTCTCCGTCAGAACTTTCGT-3′ (1 098 bp)

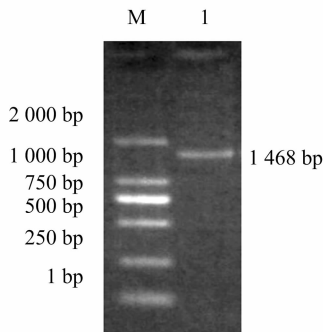
图10 PCR 产物测序结果

2.6.2.2 NJ-01 菌株 16S rDNA 1 098 bp 在 NCBI 网 Blast 结果 将 NJ-01 菌株 16S rDNA 1 098 bp 核苷酸片段上述测序结果在 NCBI 网进行 Blast,结果表明,NJ-01 菌株 1 098 bp 核苷酸片段与 GenBank 中已知地衣芽孢杆菌对应核苷酸片段(登录号: JQ388689、HE590856、GQ375243、KF535146、KF054979、KF052986、KC519411、KC485000、JX847115) 同源性均高达 99% 以上,与地衣芽孢杆菌(登录号: JX025165) 同源性高达 100%。

3 结论与讨论

地衣芽孢杆菌是芽孢杆菌中较具应用潜力的菌种之一。近年来,国内外对于地衣芽孢杆菌应用报道日益增多。地衣芽孢杆菌在医药、饲料加工、农药等行业均取得了较好的应用成果^[1-2]。随着养禽业的集约化发展,在提供肉、禽、蛋的同时,每天都会产生粪、羽毛、骨粉、血渣等大量的废弃物,尤其是羽毛,因其具有难以降解的特点,比其他废弃物更难以回收利用。由于缺乏实用的降解羽毛技术,致使大量羽毛污染环境。尽管高压、酸解等处理方法能够降解羽毛,但成本高、不实用^[3]。生物发酵方法处理农业废弃物成为首选方法,筛选最合适的微生物发酵降解菌株尤为重要^[4]。笔者通过土壤分离鉴定获得了 1 株地衣芽孢杆菌 NJ-1,对鸽羽毛的消化分解试验取得了较好的试验效果,结果表明,该菌株对鸽羽毛

分离细菌经过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳,获得 1 468 bp 核苷酸基因片段,经凝胶成像系统观察、捕获图象,结果见图 9。



M—DL 2000 DNA Marker; 1—NJ-01 16S rDNA 1 468 bp 基因片段 PCR 产物

图9 分离细菌 NJ-01 16S rDNA 核苷酸基因片段 PCR 产物电泳结果

2.6.2 分离细菌 16S rDNA 基因片段 PCR 产物测序与 Blast 结果

2.6.2.1 测定序列 分离细菌 16S rDNA 1 468 bp 核苷酸基因片段 PCR 产物送宝生物工程(大连)有限公司测序,获得 1 098 bp 序列,结果见图 10。

具有很好的分解能力,37℃ 培养 5 d 对鸽羽毛开始分解,37℃ 培养 15 d 时鸽羽毛小羽枝、羽毛梗全部分解为碎片,对鸽羽毛粉消化分解率为 85%。弗氏链霉菌^[5]、地衣芽孢杆菌能够降解鸡羽毛,少数菌可以降解鸭、鹅羽毛,对鸽子的羽毛尚未见有较好的降解菌分离鉴定。傅伟研究认为,采用地衣芽孢杆菌 CGMCC1397 菌株可以较好地降解鸡羽毛,此菌能以鸡羽毛为唯一氮源生长,对鸡羽毛粉的降解率为 83.4%^[6]。

参考文献:

[1] 季金殿,岳寿松,黄亦钧,等. 一株羽毛角蛋白降解菌的鉴定与系统发育分析[J]. 西南农业学报,2009,22(3):838-841.
[2] 唐 娟,张 毅,李雷雷,等. 地衣芽孢杆菌应用研究进展[J]. 湖北农业科学,2008,47(3):351-354.
[3] 徐传涛,周启升. 禽类羽毛角蛋白降解的研究[J]. 中国畜牧业,2013(11):64-65.
[4] 石 笛,江洁芳,钟 瑜,等. 一株产蛋白酶地衣芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学,2012,40(29):14195-14196,14202.
[5] 涂国全,于 静. 一株分解羽毛角蛋白的弗氏链霉菌变种的初步鉴定[J]. 江西农业大学学报,1994,16(4):399-403.
[6] 傅 伟,阮 晖,刘 婧,等. 羽毛的生物降解及其酶学性质的研究[J]. 科技通报,2008,24(3):320-324.