

一株分离自猪粪堆肥细菌的生物学特性研究

邱鹏滢, 黄曼曼, 云佳锐, 芦光新*

青海大学, 青海 西宁

收稿日期: 2022年5月5日; 录用日期: 2022年6月9日; 发布日期: 2022年6月21日

摘要

目的: 从高寒地区猪粪堆肥中筛选得到一株编号为DF200620的细菌, 对其进行生物学特性的研究。方法: 通过细菌培养, 革兰氏染色和比浊法等方法对菌株DF200620的形态, 培养特征, 遗传型特征, 运动性与需氧性, 以及与环境因子(温度, pH, 盐度, 水分)的关系进行了研究。结果: 结果表明, 菌株DF200620为革兰氏阳性的杆状细菌, 菌落为圆形, 不透明, 表面光滑, 淡黄色, 分子鉴定结果确定菌株DF200620为赖氨酸芽孢杆菌。菌株生长曲线在0~2 h为调整期, 2~8 h内为对数期, 8~16 h为稳定期, 16 h以后为衰亡期。菌株生长的最适温度为35°C, 最适pH为7, 在NaCl浓度范围为0%~7% (W/V), 聚乙二醇浓度范围为5~25 g/100mL内能正常生长。结论: 此研究结果可为赖氨酸芽孢杆菌的开发利用奠定基础, 同时为丰富堆肥中有益微生物的菌株资源、以及为当地农业废弃物的高效利用提供依据。

关键词

赖氨酸芽孢杆菌, 生物学特性, 环境因子

Study on the Biological Characteristics of a Bacterial Strain Isolated from Pig Manure Compost

Pengying Qiu, Manman Huang, Jiarui Yun, Guangxin Lu*

Qinghai University, Xining Qinghai

Received: May 5th, 2022; accepted: Jun. 9th, 2022; published: Jun. 21st, 2022

Abstract

Objective: To study the biological characteristics of a bacterial strain named DF200620, screened

*通讯作者。

文章引用: 邱鹏滢, 黄曼曼, 云佳锐, 芦光新. 一株分离自猪粪堆肥细菌的生物学特性研究[J]. 微生物前沿, 2022, 11(2): 75-84. DOI: 10.12677/amb.2022.112009

from pig manure compost in alpine region. **Methods:** In this study, the morphology, culture characteristics, genotypic characteristics, motility and aerobic of strain DF200620, as well as the relationships with environmental factors including temperature, pH, salinity and moisture were studied by bacterial culture, gram staining and turbidimetry. **Results:** The results showed that strain DF200620 is gram-positive and rod shaped. Colonies are round, opaque, smooth and pale yellow. The growth curve of the strain was adjusted from 0 to 2 h; the logarithmic phase occurred within 2~8 h; 8~16 h is stable period; after 16 h, the decline stage was observed. The optimum temperature was 35°C, the optimum pH was 7, and the strain could grow normally in the range of NaCl concentration 0%~7% (W/V) and polyethylene glycol concentration 5~25 g/100mL. **Conclusion:** Based on these results, it can provide experimental basis and theoretical reference for the development and utilization of *Lysinibacillus fusiformis*.

Keywords

Lysinibacillus fusiformis, Biological Characteristics, Environmental Factors

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

合理利用农业废弃物资源以减少对环境的污染是当前绿色发展的途径，堆肥发酵是畜禽粪便资源化利用最有效可行的方式之一[1]。堆肥过程本质上是由群落结构复杂多样的微生物相互作用而形成的一种复杂、动态的生化过程，其中微生物对基质的转化和分解发挥着重要作用[2]。堆肥过程中细菌是分解有机物和产热的主要微生物种群，也是整个堆肥过程中最普遍、数量最多的微生物[3]。堆肥是一个微生物功能丰富的资源库，但对高寒地区堆肥发酵过程中可培养功能细菌的研究鲜少报道。鉴于此，本研究以高寒地区的油菜秸秆和猪粪为主要原料，进行了功能菌株的筛选，为丰富堆肥中有益微生物的菌株资源以及功能利用奠定基础，同时为当地农作物秸秆的高效利用提供依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

2.1.1. 供试菌株

课题组前期在自然堆肥中分离获得，编号为 DF200620，保存于 4°C 冰箱备用。

2.1.2. 培养基的制备

参照文献[4]进行如下改进：NB 固体培养基：蛋白胨 10 g/L，牛肉膏 3 g/L，氯化钠 5 g/L，琼脂 15 g/L，121°C 灭菌 20 min；NB 液体培养基：蛋白胨 10 g/L，牛肉膏 3 g/L，氯化钠 5 g/L，121°C 灭菌 20 min。

2.2. 试验方法

2.2.1. 菌株活化与复壮

将保存的菌株 DF200620 采用平板划线法接种于 NB 固体培养基中，置于 37°C 培养箱中培养 24 h。

2.2.2. 菌体形态学观察

将菌株在 NB 固体培养基上 37°C 下培养 48 h 后，观察菌落大小、形状、颜色和表面特征，并通过革

兰氏染色用光学显微镜观察菌株的细胞形态。

2.2.3. 生物学特性研究

生长曲线的测定 参照王安妮等人的方法进行如下改进[5]: 菌种的培养: 将赖氨酸芽孢杆菌以无菌操作的方法接入 NB 液体培养基, 37°C 置于恒温培养箱培养 12 h 左右, 此菌液作为测定时的种子液。取菌株种子液, 按 5% 接种量转接至已标记好培养时间的试管中, 硅胶塞封口, 每个时间点设置 3 次重复。将已接种的试管置摇床 37°C, 120 r/min 振荡培养, 每隔两小时测定一次, 共测定 24 h, 按标记的培养时间取出试管, 立即测定 OD 值, 记录数据。对未接入菌种液的试管选用 600 nm 波长测定, 在分光光度计上调节零点, 以作为测定时的对照组。最后以 OD_{600nm} 值为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘制生长曲线。

运动性观察 采用针穿刺接种的方法将菌株接种至 NB 半固体培养基的试管中(1000 mL 培养基 - 5 g 琼脂), 在 37°C 恒温培养箱中培养 24 h 后观察生长状况。若菌株只生长在穿刺线上, 边缘十分清晰, 表示该菌不具有运动特性; 若菌株沿着穿刺线向四周呈明显的云雾状扩散带, 则表示该菌具有运动特性。

需氧性观察 参照张亚楠的方法进行如下改进[6]: 将菌株采用针穿刺接种的方法接种至 NB 半固体培养基的试管中(1000 mL 培养基 - 5 g 琼脂), 在 37°C 恒温培养箱中培养 24 h 后观察生长状况。若菌株生长在穿刺线底部, 则表示该菌是厌氧性细菌; 若菌株生长在整个穿刺线上, 则表示该菌是兼性厌氧菌; 若菌株生长在穿刺线上部, 则表示该菌是微好氧菌; 若菌株生长在培养基表面, 则表示该菌是好氧菌。

温度试验 将 5% 的细菌培养物接种在 NB 液体培养基上, 分别在 5°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C 下培养, 每个温度梯度下分别做 3 个平行重复, 观察其生长状况, 并采用分光光度法在波长为 600 nm 条件下测定相应 OD 值。

pH 试验 将 5% 的细菌培养物接种到 pH 值分别调至 5、6、7、8、9、10、11 的 NB 液体培养基中, 每个梯度下分别做 3 个平行重复, 37°C 培养 24 h 后, 采用分光光度法在波长为 600 nm 条件下测定相应 OD 值。

盐度试验 将 5% 的细菌培养物接种在含 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7% NaCl (W/V) 的 NB 液体培养基中, 每一浓度的液体培养基做 3 个平行重复, 37°C 培养 24 h 后, 采用分光光度法在波长为 600 nm 条件下测定相应 OD 值。

耐旱性试验 参照文献[7], 用 PEG6000 (聚乙二醇) 形成模拟干旱环境, 将 5% 的细菌培养物接种到 PEG6000 质量浓度为 5、10、15、20、25、30、35 g/100mL 的 NB 液体培养基中, 每一浓度的液体培养基做 3 个平行重复, 37°C 培养 24 h 后, 采用分光光度法在波长为 600 nm 条件下测定相应 OD 值。

2.2.4. 16S rDNA 分子生物学鉴定

菌株基因组 DNA 提取 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA, 具体步骤按照操作说明进行。

16Sr DNA 基因 PCR 扩增 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 对基因组 DNA 进行扩增。

PCR 反应体系的配制 在薄壁 PCR 管内配制 50 μL 反应体系, 按下表准确加入各反应物(表 1)。

PCR 反应条件的设置 在 PCR 热循环仪上设置程序, 按程序设置的条件进行扩增: 1) 94°C 预变性 5 min; 2) 94°C 变性 1 min; 3) 57°C 退火 1 min; 4) 72°C 延伸 90 s; 5) 重复步骤 2)~4) 30 次; 6) 72°C 延伸 15 min; 7) 6°C for ever。关闭 PCR 仪, 取出 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 确认 PCR 扩增片段。

序列测定 将 DNA 样品送到上海生物工程有限公司进行测序, 参照文献[8]分别采用 Neighbor-Joining 法和 Maximum Likelihood 法构建系统进化树。

Table 1. PCR reaction system
表 1. PCR 反应体系

反应物	体积/ μL
引物混合液	4
2xSanTaq PCR Mix (含蓝染液)	25
模板 DNA	1
加 ddH ₂ O 至 50 μL	20

2.3. 数据处理

每次试验的数据均为 3 次独立试验平均值,采用 Microsoft Excel 2010 对原始试验数据进行整理分析。

3. 研究结果

3.1. 菌株形态学观察

如图 1 所示,菌株 DF200620 菌落形成表面光滑平坦并伴有光泽的边缘整齐的淡黄色,不透明,直径为 2~4 mm 的圆形菌落。穿刺试验结果表明菌株沿着穿刺线向四周呈明显的云雾状扩散带,表示该菌是具有运动特性的细菌,且菌株大量生长在培养基表面,少量生长在穿刺线中上部,表明该菌是好氧菌。在光学显微镜下观察菌株的细胞形态为杆状,革兰氏染色结果为紫色,说明该菌株是革兰氏阳性细菌。

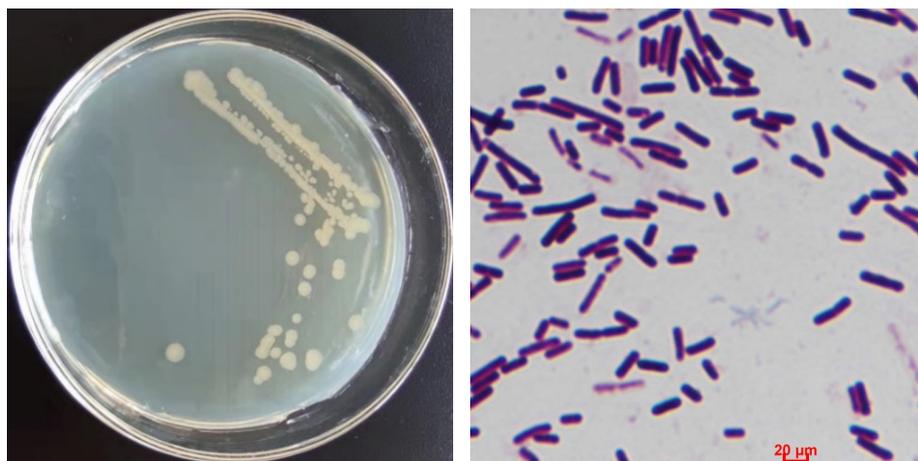


Figure 1. Colonies and cells morphology
图 1. 菌落及细胞形态

3.2. 生物学特性研究

3.2.1. 生长曲线的测定

如图 2 所示,OD 值随着时间的延长,前期呈现“S”型曲线,8 h 后逐渐趋于平稳,16 h 达到最高峰后逐渐下降。菌株 DF200620 在 0~2 h 内生长曲线较为平坦稳定,为调整期;2~8 h 内曲线以几何级数快速增长,为对数期;8~16 h 内曲线总体处于较为平坦的阶段,为稳定期;16 h 以后曲线呈缓慢下降趋势,此时期为衰亡期。在调整期和对数期时,OD 值差异显著($P < 0.05$);稳定期时,12~16 h 的 OD 值差异显著($P < 0.05$);衰亡期时,18~20 h,22~24 h 的 OD 值差异显著($P < 0.05$)。

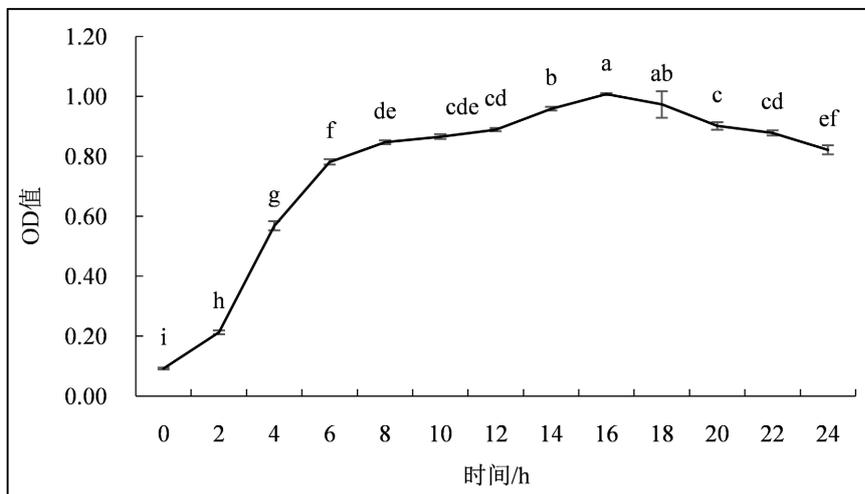


Figure 2. The growth curve

图 2. 生长曲线

3.2.2. 温度试验

如图 3 所示, 菌株 DF200620 在 NB 液体培养基中的 OD 值随着温度的增加呈现先升高后降低的变化趋势: 在 5℃~35℃时, 随着温度的升高, OD 值不断升高; 35℃~40℃时, OD 值下降。在 5℃~40℃的各个温度阶段, OD 值差异显著($P < 0.05$)。结果表明菌株 DF200620 在 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃和 40℃下均能够生长, 且最适生长温度为 35℃。

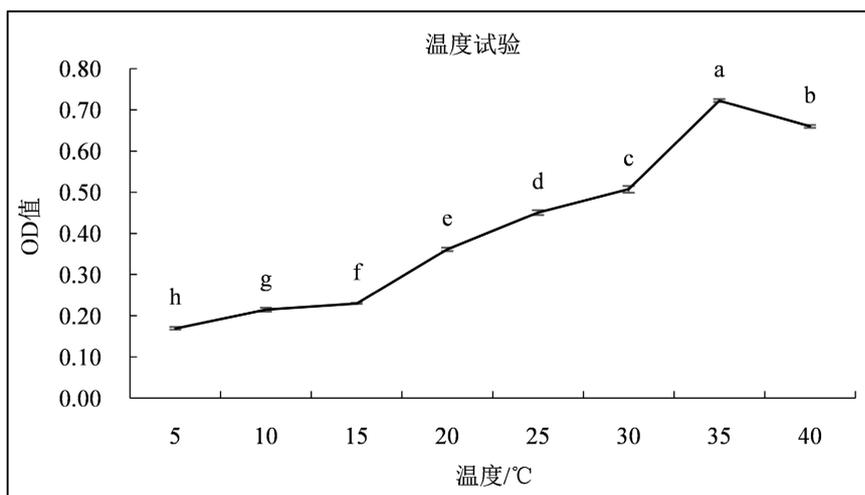


Figure 3. The growth of strains at different temperatures

图 3. 不同温度下菌株的生长情况

3.2.3. pH 试验

如图 4 所示, 菌株 DF200620 在 NB 液体培养基中的 OD 值随着 pH 的增加呈现先升高后降低的趋势, 当 pH 在 5~7 范围内时, OD 值升高; pH 在 7~10 范围内时, OD 值急剧下降; pH 在 10~11 范围内时, OD 值下降缓慢。当 pH 在 5~6, 8~10 范围内时, OD 值差异显著($P < 0.05$)。结果表明菌株 DF200620 在 NB 液体培养基的 pH 分别为 6、7、8 和 9 时均能够正常生长, 最适生长 pH 为 7, 说明菌株 DF200620 具有一定的耐碱性。

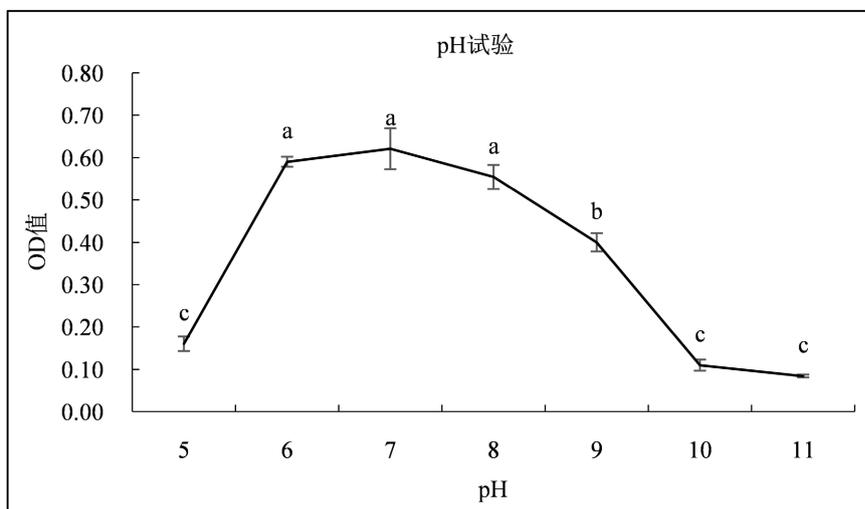


Figure 4. The growth of strain at different pH
图 4. 不同 pH 下菌株的生长情况

3.2.4. 盐度试验

如图 5 所示, 菌株 DF200620 在 NB 液体培养基中的 OD 值随着 NaCl 浓度的增加呈现逐渐下降的变化趋势, 当 NaCl 浓度在 0%~1%, 2%~3%, 5%~6% 范围内时, OD 值差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明菌株 DF200620 在含有 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6% 和 7% 的 NaCl 的液体培养基上均能够生长, 说明菌株 DF200620 具有一定的耐盐性。

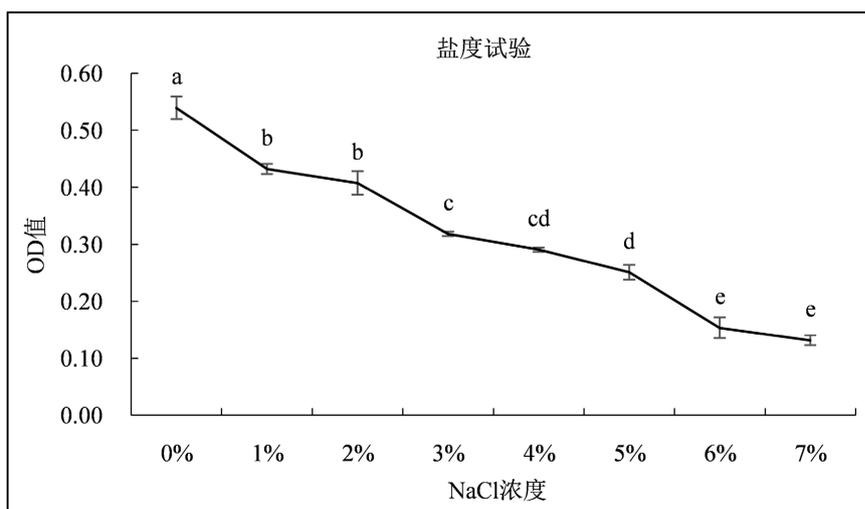


Figure 5. The growth of strain at different NaCl concentrations
图 5. 不同 NaCl 浓度下菌株的生长情况

3.2.5. 耐旱性试验

如图 6 所示, 菌株 DF200620 在 NB 液体培养基中的 OD 值随着 PEG6000 质量浓度的增加呈现逐渐下降的变化趋势, 当 PEG6000 质量浓度在 0~10 g/100mL, 20~25 g/100mL 范围内时, OD 值差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明菌株 DF200620 在 PEG6000 质量浓度为 5、10、15、20、25 g/100mL 的 NB 液体培养基中均能生长, 说明菌株 DF200620 具有一定的耐旱性。

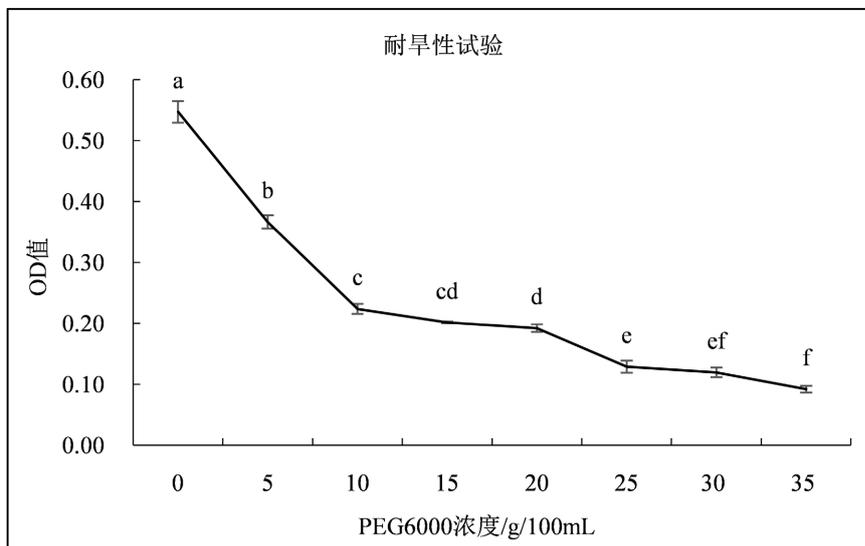


Figure 6. The growth of strain at different PEG6000 mass concentrations

图 6. 不同 PEG6000 质量浓度下菌株的生长情况

3.3. 菌株的 16S rDNA 分子生物学鉴定

将菌株 DF200620 的 DNA 样品(DNA 及 PCR 产物电泳检测结果如图 7 所示)送到上海生物工程有限公司进行 16S rDNA 完整长度测序, 获得长度为 1410 bp 的序列。将菌株 DF200620 的 16S rDNA 序列在 Blast 网站进行比对后得到相似性较高的 16S rDNA 序列, 最后利用 MAGA7.0.26 软件对所获得的菌株序列以及与其相似性较高的 16S rDNA 基因序列进行排列, 鉴定结果如图 8、图 9 所示, 两种方法的结果均表明菌株 DF200620 与 *MK574994.1 Lysinibacillus* sp. strain PF66X 和 *JQ956508.1 Lysinibacillus* sp. enrichment culture clone MJJ-12 系统发育关系最为密切, 同属于一个分支, 并具有 100% 的同源性。

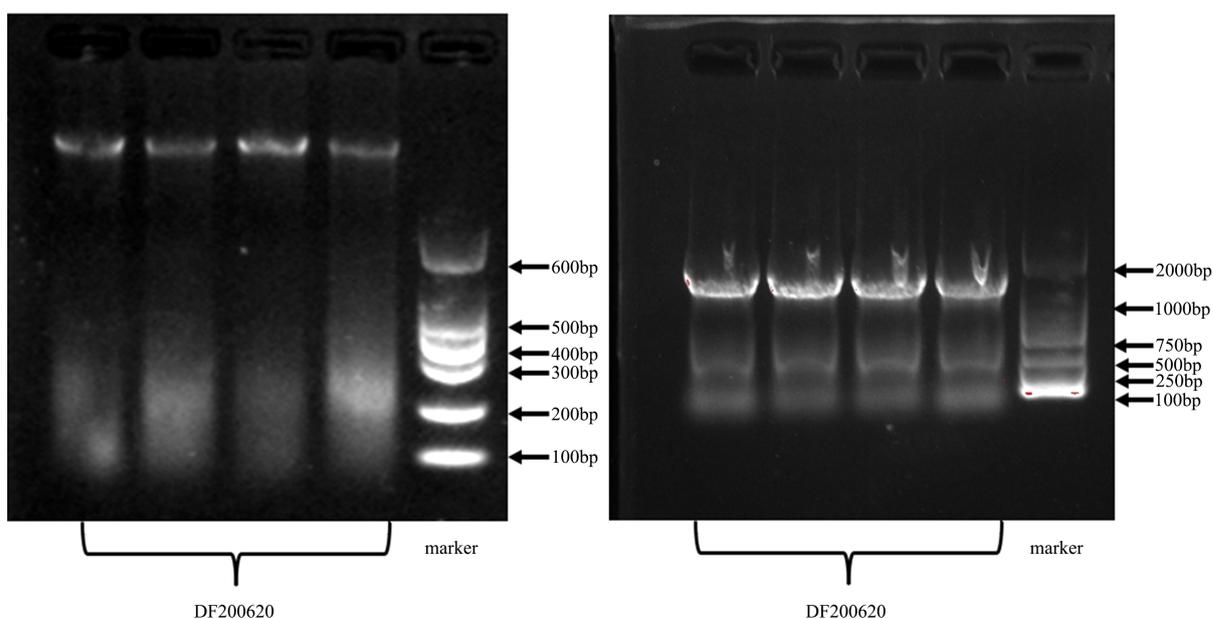


Figure 7. DNA figure and PCR run plastic figure

图 7. DNA 和 PCR 产物电泳检测

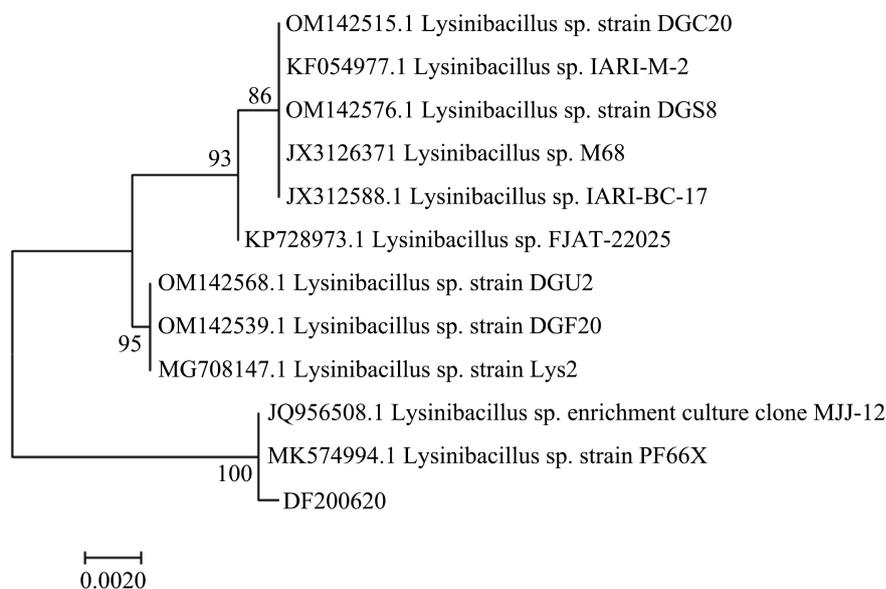


Figure 8. Phylogenetic tree constructed by Maximum Likelihood
图 8. Maximum Likelihood 法构建系统发育树

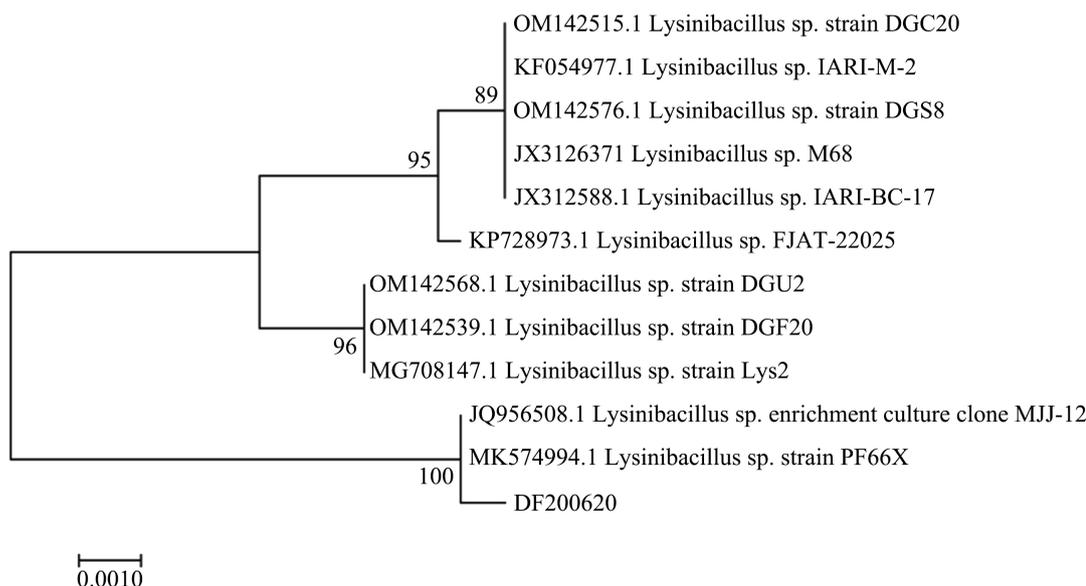


Figure 9. Phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining
图 9. Neighbor-Joining 法构建系统发育树

4. 讨论

本研究以课题组前期从猪粪和油菜秸秆自然堆肥条件下筛选获得的 1 株编号为 DF200620 的细菌为材料，对其生物学特性进行研究。结果表明，菌株 DF200620 有着与赖氨酸芽孢杆菌属的成员一致的表型特征，如菌落为表面光滑的圆形，呈杆状，为革兰氏阳性菌。Neighbor-Joining 法和 Maximum Likelihood 法的结果均表明菌株 DF200620 与 JQ956508.1 *Lysinibacillus* sp. enrichment culture clone MJJ-12 和 MK574994.1 *Lysinibacillus* sp. strain PF66X 在同一分支上，亲缘关系最近，支持率高达 100%，说明菌株 DF200620 的 16S rDNA 基因高度保守未发生异化。分子鉴定结果确定菌株 DF200620 为赖氨酸芽孢杆菌。

生长曲线结果表明菌株 DF200620 的生长曲线在 0~2 h 为调整期, 2~8 h 内为对数期, 8~16 h 为稳定期, 16 h 以后为衰亡期。菌株在 10℃~40℃ 内均可生长, 最适温度为 35℃; pH 为 6~9 范围内均可生长, 最适 pH 为 7; 在 0%~7% (W/V) NaCl 浓度范围均可生长; 在聚乙二醇浓度为 5~25 g/mL 范围内均可生长。综上所述, 说明菌株 DF200620 具有一定的耐旱耐盐碱特性。

目前为止, 国内外的研究发现赖氨酸芽孢杆菌在多个领域具有极大的应用价值, 主要集中在以下几个方面: 1) 生物降解方面, *Lysinibacillus* 属一些菌株具有一定的降解甲酚、硫化钠等污染物的作用[9], 可以降解食物和农产品的黄曲霉毒素 B1 [10]; 2) 抑制病原生物方面, 赖氨酸芽孢杆菌 B-CM18 对植物病原真菌的生长有抑制作用[11]; AHMAD 等[12] [13]从果蔬中分离得到的赖氨酸芽孢杆菌(JX416855、JX416856)具有抗食源性细菌的潜力; 3) 在畜牧生产方面, 邢月腾等从猪肠道食糜中分离并筛选出高产赖氨酸的芽孢杆菌, 可以减少赖氨酸添加剂在饲料中的使用量及替代部分抗生素[14]; 4) 在植物促生性和抗逆性方面, 努斯热提古丽·安外尔等[9]从胡杨茎秆液分离得到 1 株赖氨酸芽孢杆菌 ML-64, 具有一定的耐旱、耐盐、耐高温特性; 福建农林大学[15]研究发现两株具有较好溶磷效果的球形赖氨酸芽孢杆菌(YP17 和 P19)在促进巨桉幼苗生长方面具有较高潜力。总体来说, 目前国内外对赖氨酸芽孢杆菌的研究报道较少, 本课题组将持续致力于对该菌株的多方面深入研究与探索, 为拓宽其利用价值提供一定的实验基础和理论参考, 为丰富堆肥中有益微生物的菌株资源以及功能利用奠定基础, 同时为当地农作物秸秆的高效利用提供依据。

基金项目

1) 青海省科技厅科技成果转化专项项目, 禾/豆混播的微生物调控及菌肥研发(2022-SF-147)。2) 青海大学农牧学院大学生科研训练项目, 1 株赖氨酸芽孢杆菌的生物学特性及促生功能研究(NKX202112)。

参考文献

- [1] 李莉, 杨昕润, 何家俊, 贾鼎铤, 吴浩, 解祥学. 我国畜禽粪便资源化利用的现状与展望[J]. 中国奶牛, 2020(11): 55-60.
- [2] Karadag, D., Özkaya, B., Ölmez, E., Nissilä, M.E., Çakmakçı, M., Yıldız, Ş., et al. (2013) Profiling of Bacterial Community in a Full-Scale Aerobic Composting Plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **77**, 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.10.011>
- [3] 王秀红, 李欣欣, 史向远, 周静, 王保平, 杜慧平, 等. 玉米秸秆不同发酵时期理化性状和细菌群落多样性[J]. 华北农学报, 2018, 33(3): 144-152.
- [4] 郑雯, 杨兴变, 康冀川, 李洪庆. 赖氨酸芽孢杆菌 He14 发酵产物抗真菌活性的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 22-26.
- [5] 王安妮, 周花艳, 魏若瑶, 姜勇, 刘林, 徐建生. 鼻气管鸟杆菌生长曲线的测定[J]. 中国家禽, 2019(8): 53-55.
- [6] 张亚楠. 高盐环境中根际溶磷菌的分离及其对玉米促生功能研究[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津大学, 2018.
- [7] 芦光新, 刘雯, 卞静, 傅美涛, 陈秀蓉. 一株来自东祁连山高寒草地土壤纤维素分解真菌培养特性的研究[J]. 草原与草坪, 2011(3): 50-55.
- [8] 芦光新. 高寒草地真菌纤维素降解酶系及其对油菜秸秆降解活性的研究[D]: [博士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [9] 努斯热提古丽·安外尔, 热孜亚·艾肯, 吾尔麦提汗·麦麦提明, 布阿依夏姆·阿木提, 努丽曼姑·司马义, 木合喀尔·阿布都克里. 一株分离自胡杨的赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus*) ML-64 的微生物学特性[J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1160-1170.
- [10] Ayodeji Adebo, O., Berka Njobeh, P. and Mavumengwana, V. (2016) Degradation and Detoxification of AFB₁ by *Staphylococcus warneri*, *Sporosarcina* sp. and *Lysinibacillus fusiformis*. *Food Control*, **68**, 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.021>
- [11] Singh, R.K., Kumar, D.P., Solanki, M.K., Singh, P., Srivastva, A.K., Kumar, S., et al. (2013) Optimization of Media Components for Chitinase Production by Chickpea Rhizosphere Associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. *Journal*

- of Basic Microbiology*, **53**, 451-460. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100590>
- [12] Ahmad, V. and Khan, M.S. (2015) Therapeutic Intervention and Molecular Characterizations of Bacteriocin Producing *Lysinibacillus* sp. nov. Isolated from Food Sample. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **28**, 1337-1344.
- [13] Ahmad, V, Muhammad Zafar Iqbal, A.N., Haseeb, M. and Khan, M.S. (2014) Antimicrobial Potential of Bacteriocin Producing *Lysinibacillus jx416856* against Foodborne Bacterial and Fungal Pathogens, Isolated from Fruits and Vegetable Waste. *Anaerobe*, **27**, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.001>
- [14] 邢月腾. 产赖氨酸芽孢杆菌的筛选、鉴定及对临武鸭饲用效果的研究[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [15] 黄伟, 俞新玲, 林勇明, 吴承祯, 李键, 陈灿, 范海兰, 洪伟. 两株球形赖氨酸芽孢杆菌对巨桉幼苗生长及光合特性的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(5): 839-844.