微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

AUG 20, 2010, 37(8): 1159–1163
© 2010 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

# 一株芽孢杆菌的分离和鉴定

张国庆　董晓芳　佟建明*　王志红　张琪

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室　北京　100193)

**摘　要:** 从中国农业科学院北京畜牧兽医研究所鸡舍附近土壤中分离到一株芽孢杆菌 P-25, 并进行了分子鉴定。通过形态鉴定、革兰氏染色、生理生化测定、16S rRNA 序列分析和系统发育树构建, 确定该菌株为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 其 16S rRNA GenBank 登录号为 GU271135。

**关键词:** 芽孢杆菌, 16S rRNA, 鉴定

# Isolation and Identification of a *Bacillus* sp. Starin

ZHANG Guo-Qing　DONG Xiao-Fang　TONG Jian-Ming*　WANG Zhi-Hong
ZHANG Qi

(*State Key Laboratory of Animal Nutrition*, *Institute of Animal Sciences*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*)

**Abstract:** A *Bacillus* sp. strain P-25 was isolated from soil nearby the henhouse of Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences. This bacterium was identified as *Bacillus cereus* by analyses of its morphological and biochemical properties and 16S rRNA sequence.

**Keywords:** *Bacillus* sp., 16S rRNA, Identification

自 20 世纪 50 年代以来, 抗生素开始广泛应用于畜禽养殖业, 虽然在保证动物健康、促进生长、节约饲料成本、提高经济效益等方面做出了巨大的贡献, 但是随着抗生素的长期使用, 引发了诸如病原菌产生耐药性、动物免疫力和抗病力下降、动物产品中抗生素残留危害人类健康等一系列问题[1−2]。2006年, 欧盟已经全面禁止了饲料中抗生素的使用, 美国和日本等国家也对其做出了严格的限制, 其他动物食品中抗生素残留标准也越来越高。由于抗生素的滥用, 人类正面临着“超级菌”的威胁。2008 年, 世界卫生组织提出警告, 耐药菌日益增加, 可能会将我们的世界推回到前抗生素时代。抗生素作为饲料添加剂已面临了严峻的困境[3]。

益生菌(Probiotics)又称为益生素、微生态调节剂、活菌制剂等, 最早是由俄国科学家 Elie Metchnikoff 提出。他在研究高加索地区居民长寿原因的时候, 发现这与当地居民长期食用发酵乳品有关, 认为乳制品中产酸细菌可能是使得当地人长寿的原因[4]。目前, 益生菌被定义为一类“能够促进肠内菌群生态平衡, 对宿主起有益作用”的活微生物制剂[5−6]。近年来的研究表明, 益生菌在调节畜禽肠道微生物群落、增强动物免疫力、提高饲料利用率和畜禽生长率等方面具有良好的促进作用, 是无毒、无残留、无抗药性的新型饲料添加剂, 为国内外科研工作者和饲料业者所广泛关注, 极具开发前景[7]。饲用益生菌在饲料工业中已有广泛的应用, 但

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2006BAD12B05); 动物营养学国家重点实验室自主研究课题(No. 2004DA125184G0811)
*通讯作者: Tel: 86-10-62816061; ✉: tjm606caas@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-12-16; 接受日期: 2010-05-21
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

作为活菌制剂, 其开发和利用还受到许多条件的制约, 如在饲料加工、运输途中容易失活; 在动物肠道难以存活、定殖并成为优势菌群而发挥益生功效等[8–9]。目前, 芽孢杆菌以其抗逆性强、营养需求低、复活率高、致病性低等特点, 被视为最理想的益生菌类之一[10]。

本研究从中国农科院北京畜牧兽医研究所鸡舍附近土壤中, 分离得到一株产淀粉酶和蛋白酶的芽孢杆菌菌株, 编号为 P-25。利用微生物常规生理生化检测和分子生物学手段, 鉴定 P-25 为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 其 16S rRNA GenBank 登录号为 GU271135。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

菌株来源: 采集于中国农科院北京畜牧兽医研究所鸡舍附近土壤。

牛肉膏蛋白胨液体培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 值 7.0–7.2。$1 \times 10^5$ Pa 灭菌 20 min。

牛肉膏蛋白胨固体培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂粉 20.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 值 7.0–7.2。$1 \times 10^5$ Pa 灭菌 20 min。

### 1.2 菌株分离与纯培养

土壤样品 1 g 置于 100 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基内, 37°C、150 r/min 培养 24 h。培养液在 90°C 水浴中孵育 10 min, 取 0.1 mL 以无菌水稀释成 $10^{-6}$、$10^{-7}$ 和 $10^{-8}$ 3 个浓度梯度, 涂布牛肉膏蛋白胨平板, 37°C 培养 24 h。挑选菌落进行芽孢染色, 挑选具有芽孢的菌落, 利用牛肉膏蛋白胨平板划线培养, 获得单菌落。

### 1.3 革兰氏染色与镜检

获得的纯培养菌株接种于牛肉膏蛋白胨平板上, 37°C 培养 24 h。取新鲜菌体进行革兰氏染色并镜检, 染色方法参照《农业微生物学》[11]。取新鲜菌体送中国农业大学电镜室, 制备扫描电镜切片并镜检、拍照。

### 1.4 细菌总 DNA 提取

细菌总DNA的提取利用异硫氰酸胍(GUTC)法[12]。

### 1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增

以 10 ng 纯化的细菌总 DNA 作为模板, 扩增 16S rDNA。所用引物为大肠杆菌(*Escherichia coli*)通用引物 P1 (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3′)和 P6 (5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3′), 由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增体系采用 25 μL 体系, 包括 0.25 μL *Taq* 酶(0.5 U/mL)、2.5 μL 10 × Buffer、2.0 μL dNTPs Mixture、1.0 μL 模板 DNA、1.0 μL 正向引物 P1 (10 μmol/L)、1.0 μL 反向引物 P6 (10 μmol/L)和 17.25 μL $ddH_2O$, 以灭菌的 $ddH_2O$ 代替模板 DNA 作为阴性对照。扩增条件: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 5 min, 4°C 终止反应。PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司测序, 其余部分–20°C 保存。

### 1.6 系统发育树的构建

根据 16S rRNA 测序结果, 结合 GenBank 中芽孢杆菌属(*Bacillus*)中 24 个种 16S rRNA 序列, 利用 MEGA 3.0 软件, 绘制系统发育树。

### 1.7 生理生化鉴定

生理生化实验方法参照《常见细菌系统鉴定手册》[13]。测定其糖醇利用、产酸产气、生长温度、pH 范围、耐盐试验、溶菌酶抗性、V-P 测定、接触酶反应、卵黄反应、吲哚反应、明胶穿刺、淀粉水解、硝酸盐还原、厌氧生长、柠檬酸盐利用、苯丙氨酸脱氨酶活性、酪素水解和酪氨酸水解。

## 2 结果

### 2.1 细菌形态及菌落特征

P-25 菌株在牛肉膏蛋白胨平板上 37°C 培养 24 h, 菌落扁平、略粗糙, 成圆形或近圆形, 稍带光泽, 乳白色(近似蜡烛颜色), 不产色素。菌体杆状, 末端钝圆, (0.8–1.2) μm × (2.0–4.0) μm, 成短链或长链。革兰氏阳性, 产芽孢, 芽孢椭圆形, 中生或近中生, (0.7–1.2) μm × (1.0–1.5) μm。菌株扫描电镜照片如图 1 所示。

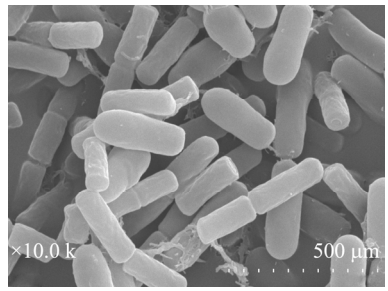


**图 1 P-25 菌株扫描电镜照片**

**Fig. 1 Scanning electron micrograph of cells of strain P-25**

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

### 2.2 16S rRNA 测定与系统发育树构建

P-25 菌株 16S rRNA 测序后, 登录 GenBank, 登录号为 GU271135。利用 MEGA 3.0 软件, 与芽孢杆菌属内 24 个种的 16S rRNA 序列(菌株号见发育树)进行同源性比对, 绘制系统发育树, 结果见图 2。P-25 菌株与蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)和蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)亲缘关系最近, 同源性分别为 99.85%、99.70%和 99.55%。

### 2.3 生理生化特性

P-25 菌株的生理生化特征见表 1, 根据《常见细菌系统鉴定手册》[13]和《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)[14]芽孢杆菌属特征, 结果显示 P-25 菌株生理生化特性与蜡状芽孢杆菌一致。

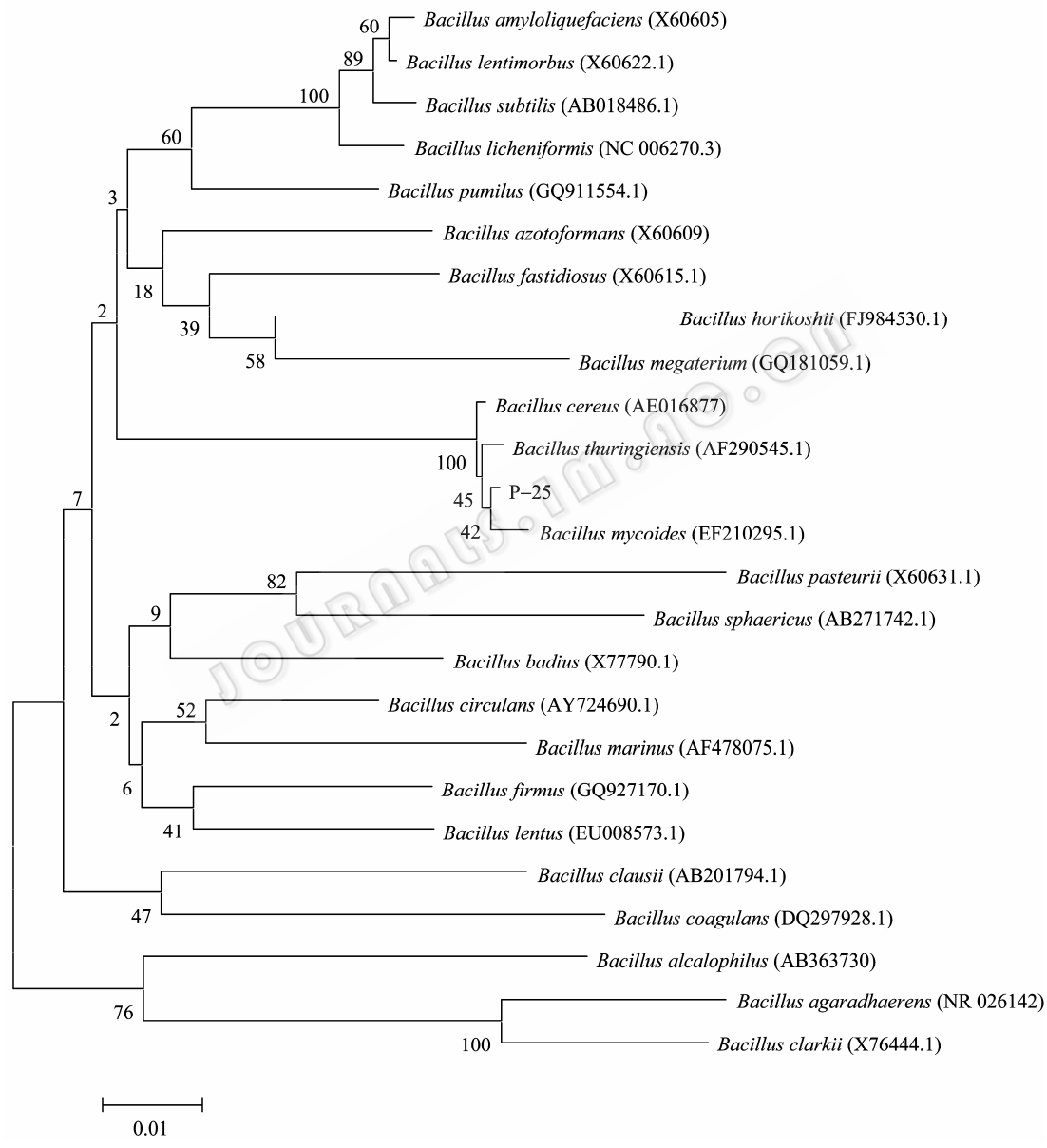


**图 2 依据 16S rRNA 序列构建的菌株 P-25 和同属相关种的系统发育树**

**Fig. 2 Phylogenetic tree of P-25 and related *Bacillus* sp. based on 16S rRNA sequences with MEGA 3.0 software**

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

表 1 P-25 菌株形态和生理生化特征
Table 1 Morphological and biochemical characteristics of P-25 strain

| 特征 Characteristic | | 活性 Activity | 特征 Characteristic | | 活性 Activity |
|---|---|---|---|---|---|
| 产酸 Acid production | D-葡萄糖 D-Glucose | + | 生长温度 Growth temperature | 5°C | + |
| | L-阿拉伯糖 L-Arabinose | – | | 20°C | + |
| | D-木糖 D-Xylose | – | | 30°C | + |
| | D-甘露醇 D-Mannitol | – | | 40°C | + |
| 葡萄糖产气 Gas production using glucose | | + | | 45°C | + |
| 生长 NaCl Growth with NaCl | 2% | + | | 50°C | – |
| | 5% | + | 0.001%溶菌酶抗性实验 0.001% lysozyme resistance | | + |
| | 7% | + | V-P 实验 V-P test | | + |
| | 10% | + | 接触酶反应 Catalase reaction | | + |
| 生长 pH 值 Growth pH | 5.0 | + | 卵黄反应 Lecithin hydrolysis | | + |
| | 6.0 | + | 吲哚反应 Indole reaction | | + |
| | 7.0 | + | 明胶穿刺 Gelatin experiment | | + |
| | 8.0 | + | 淀粉水解 Amylum hydrolysis | | + |
| 厌氧生长 Anaerobic growth | | + | 硝酸盐还原 Nitrate deoxidization | | + |
| 柠檬酸盐利用 Citrate utilization | | + | 苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase | | – |
| 酪素水解 Casein hydrolysis | | + | 酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis | | + |

注: +: 阳性反应; –: 阴性反应.
Note: +: Positive; –: Negative.

## 3 讨论

芽孢杆菌广泛存在于自然界中, 其营养简单、繁殖迅速; 适应能力强, 能够形成抗逆性很强的芽孢结构, 当环境条件适宜时重新萌发形成营养体细胞; 具有抑制病原菌生长、产生物酶等特点, 除个别种(如炭疽芽孢杆菌)外, 对人畜无害, 是目前应用较广的理想益生菌类型。本试验研究发现, P-25 菌株在温度范围为 5°C–45°C、盐度范围为 2%–10%、pH 值 5.0–8.0 时均能生长。16S rRNA 序列同源性比对显示, P-25 菌株与蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌亲缘关系最近, 但均高于 99%。

一般认为, 16S rRNA 序列同源性大于 99%, 可以认为属于同一种; 同源性为 95%–98%可以认为是同属不同种; 同源性在 95%以下可以认为属于不同属[15–16]。苏云金芽孢杆菌具有特有的伴孢晶体(Parasporal crystals)结构, 而 P-25 菌株未发现此类结构, 故而不属于苏云金芽孢杆菌。蕈状芽孢杆菌与蜡状芽孢杆菌同源关系极近, 其最初分类地位是蜡状芽孢杆菌的一个变种, 即蜡状芽孢杆菌蕈状变种[*Bacillus cereus* var. *mycoides* (Flugge) Smith, Gorden & Clark], 拥有其特有的性质, 包括菌落根状、少数菌株 37°C 生长等[14]。本研究中 P-25 菌株菌落扁平、略粗糙, 成圆形或近圆形, 稍带光泽, 乳白色, 与典型蕈状芽孢杆菌菌落形态不符。同时, P-25 菌株 16S rRNA 序列与蜡状芽孢杆菌相似性最高, 因而最终确定其为蜡状芽孢杆菌。

## 参考文献

[1] 吕桂霞, 李春蕾, 曹雁行, 等. 国内饲用抗生素替代品的研究简况. 兽药与饲料添加剂, 2008, **13**(4): 12–14.
[2] 杨菲菲, 楼月琴. 对抗生素替代品的研究. 四川畜牧兽医, 2005(1): 31–32.
[3] 程学慧, 彭健, 詹志春. 抗生素在畜牧生产中面临的挑战和出路. 中国畜牧兽医, 2004, **31**(2): 13–15.
[4] 秦楠. 益生菌及其在食品中应用进展. 中国酿造,

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2006(7): 1–3.
[5] Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2003, **17**(5): 711–724.
[6] Golden BR. Health benefits of probiotic. *British Journal of Nutrition*, 1998, **80**(2): 203–207.
[7] 姜文侠, 史连生, 李韬, 等. 饲用微生态制剂——益生素. 动物科学与动物医学, 2000, **17**(2): 57–59.
[8] 闵钟嫚, 牛天贵, 岳喜庆. 益生菌的研究和发展趋势. 杂粮作物, 2007, **27**(1): 55–57.
[9] 张璐, 张敏红. 饲用益生菌产品评价研究进展. 中国畜牧兽医, 2008, **35**(3): 21–24.
[10] 张保全, 朱年华. 芽孢杆菌在畜牧业中应用的研究进展. 江西畜牧兽医杂志, 2007(1): 2–3.
[11] 袁红莉, 王贺祥. 农业微生物学及实验教程. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 441–443.
[12] Terefework K, Kaijalainen S, Lindström K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*, 2001, **91**(2/3): 169–180.
[13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 62–65, 364–398.
[14] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729–758.
[15] Devereux R, He SH, Doyle CL, *et al*. Diversity and origin of desulfovibrio species-phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(7): 3609–3619.
[16] Fry NK, Warwick S, Saunders NA, *et al*. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family legionellaceae. *Journal of General Microbiology*, 199l, **137**(5): 1215–1222.

编辑部公告

## 关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部邮箱: tongbao@im.ac.cn, 并请在邮件主题中注明“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: 邮箱 tongbao@im.ac.cn 或电话 010-64807511。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn