

牦牛源地衣芽孢杆菌的分离鉴定

王冬经

(西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所/省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室,西藏 拉萨 850000)

摘要:为分离西藏牦牛源地衣芽孢杆菌并研究其生物学特性,为今后开发相关益生菌及其制剂奠定基础,采集西藏牦牛粪便,从粪便中分离培养、纯化病原菌,通过染色镜检、生化试验、16S rRNA PCR扩增、同源性分析、进化树构建等对分离株进行鉴定且对分离株进行耐药性试验。结果从样品中分离到3株地衣芽孢杆菌,革兰氏阳性杆菌,分别命名为XZ-1,XZ-2,XZ-3。3株分离株生化检测结果一致:可分解甘露醇、淀粉、阿拉伯糖,可还原硝酸盐,V-P试验呈阳性,不能水解明胶,不能产生红色吲哚。分离株16S rRNA PCR扩增产物电泳结果与预期结果一致,长度为1 500 bp左右。3株分离株之间同源性为96.0%~99.9%,与地衣芽孢杆菌分离株的同源性为98.3%~100%;3株分离株与地衣芽孢杆菌处于同一支,而与链球菌其他种属芽孢杆菌处于不同分支。分离株XZ-1对青霉素、氨苄西林耐药,对林可霉素中度敏感,对头孢曲松、四环素、红霉素、恩诺沙星、氯霉素、环丙沙星、阿莫西林敏感;分离株XZ-2对青霉素、氨苄西林、四环素、林可霉素耐药,对氯霉素中度敏感,对头孢曲松、红霉素、恩诺沙星、环丙沙星、阿莫西林敏感;分离株XZ-3对青霉素耐药,对氨苄西林、对林可霉素中度敏感,对头孢曲松、四环素、红霉素、恩诺沙星、氯霉素、环丙沙星、阿莫西林敏感。

关键词:牦牛;地衣芽孢杆菌;分离鉴定

中图分类号:Q93

文献标志码:A

Isolation and identification of *Bacillus licheniformis* from yak

WANG Dongjing

(Institute of Animal husbandry and veterinary, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Science /State Key Laboratory of Highland Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Tibet Lhasa 850000, China)

Abstract: In order to isolate *Bacillus licheniformis* from Tibetan yaks and study its biological characteristics, lay a foundation for the development of relevant probiotics and their preparations in the future, Tibetan yak feces were collected, and pathogenic bacteria were isolated, cultured and purified from diseased materials. The isolated strains were identify through staining microscopy, biochemical tests, 16S rRNA PCR amplification, homology analysis, and evolutionary tree construction. Drug resistance test was performed on the isolated strains. Three strains of *Bacillus licheniformis* and Gram-positive bacilli were isolated from the samples, which were named XZ-1, XZ-2 and XZ-3 respectively. The biochemical test results of the three isolated strains are consistent, which can decompose mannitol, starch, arabinose, reduce nitrate, and V-P test is positive. They cannot hydrolyze gelatin and produce red indole. The electrophoresis result of 16S rRNA PCR amplification product of the isolate strains was consistent with the expected result, and the length was about 1 500 bp. The homology between the three isolated strains was 96.0%~99.9%, and that with *Bacillus licheniformis* was 98.3%~100%; The three isolates are in the same branch with *Bacillus licheniformis*, but in different branches with other species of *Bacillus streptococcus*. The isolated strain XZ-1 is resistant to penicillin and ampicillin, moderately sensitive to lincomycin, and sensitive to ceftriaxone, tetracycline, erythromycin, enrofloxacin, chloramphenicol, ciprofloxacin and amoxicillin; The isolated strain XZ-2 is resistant to penicillin, ampicillin, tetracycline and lincomycin, moderately sensitive to chloramphenicol, and sensitive to ceftriaxone, erythromycin, enrofloxacin, ciprofloxacin and amoxicillin; The isolated strain XZ-3 is resistant to penicillin, moderately sensitive to ampicillin and lincomycin, and sensitive to other drug bacteria.

Key Words: Yak; *Bacillus licheniformis*; Isolation and identification

芽孢杆菌属(*Bacillus*)是一类需氧或兼性厌氧异养细菌,革兰氏染色呈阳性,菌体呈直杆状,长度

约1.2~10 μm ,宽度约0.5~2.5 μm ,成对或链状排列,周生鞭毛^[1],芽孢杆菌在自然界中分布广泛,比如土壤、水源、下水道中均有分布,不良生长环境下可产生芽孢,故名芽孢杆菌^[2-4]。芽孢杆菌种类复杂多样,主要包括地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌

收稿日期:2023-02-25

基金项目:西藏自治区科技重大专项(XZ202101ZD002N-05-01);西藏自治区重点研发及转化项目(XZ202201ZY0007N-01)。

作者简介:王冬经(1992-),女,研究实习生,主要从事高原动物传染病学研究,E-mail:920535395@qq.com。

(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)以及致病性的肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)、破伤风芽孢杆菌(*Clostridium tetani*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)等^[5]。其中,地衣芽孢杆菌在农业、医药行业及食品工业等领域都被广泛地应用^[6]。地衣芽孢杆菌在恶劣条件下可形成芽孢的特性,能够抵御极端环境,具有极强的生存能力,在制剂、存储和运输过程中不易死亡^[7],从而成为工业生产菌株较理想的选择,具有广阔的应用前景。

牦牛主要栖息在青藏高原及周围地区,是青藏高原的优势畜种,也是当地牧民重要的生产生活资料^[8]。由于青藏高原独特的地理环境,牧草产量和营养水平远不能满足牦牛正常的营养需要,冬季最为严重,导致牦牛出栏周期长、养殖效益低等问题^[9]。瘤胃是牦牛消化饲粮的重要场所,其中含有大量的细菌、真菌、原生虫和古生菌等^[10],瘤胃发酵及菌群结构组成对其生产性能具有重要影响和意义。研究表明,不同海拔环境放牧牦牛的肠道菌群组成具有明显的差异,并且肠道菌群对于牦牛适应高海拔生境具有重要功能^[11]。本研究拟从牦牛粪便中分离地衣芽孢杆菌,并进行生化特性、分子生物学鉴定,为今后开发研制针对我区牦牛促生长、抗菌、促消化、调节肠道菌群等方面的益生菌和微生态制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

隔水式电热恒温培养箱、摇床、显微镜、PCR仪、电泳仪、立式压力蒸汽灭菌锅、凝胶成像、隔水式电热恒温培养箱、离心机、生物安全柜、电热鼓风干燥箱、低温保存箱、电子天平、净水器等均来自省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室。

1.2 主要试剂

培养基胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)来自于青岛海博生物技术有限公司;革兰氏染色试剂来自于珠海贝索生物技术有限公司;Trans2K Plus DNA Ladder来自于天根生化科技有限公司;药敏纸片来自于杭州微生物试剂有限公司;微量生化反应管来自于青岛海博生物技

术有限公司;2XTaq PCR MasterMix来自于上海生工。

试验所用细菌16S rRNA通用引物干粉来自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 试验材料

2022年12月,从西藏各地采集牦牛粪便17份,运送回实验室后低温保存,待用。

1.4 分离培养与染色镜检

用灭菌枪头挑取适量牦牛粪便接种于TSB培养基,37℃培养18h,划线接种到固体培养基,得到单克隆菌落后,再次接种至液体培养基增菌,保存。同时取少量菌液进行革兰氏染色和镜检观察,拍照记录。

1.5 生化鉴定

严格按照微量生化鉴定管说明书进行操作。

1.6 分子生物学鉴定

挑取单个菌落,提取细菌基因组,利用细菌16S rRNA通用引物,进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物片段大小。将扩增产物送至公司测序、对比分析,通过DNA Star软件构建系统进化树,其中参考菌株信息如表1所示。

表1 16S rRNA 参考菌株

物种	菌株	登录号	宿主	国家
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ATCC14579	AF290547.1	土壤	美国
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	AD6	OL757865.1	矿山	亚美尼亚
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	CICC 10334	GQ375243.1	土壤	中国
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	HNNYDD3	JN999851.1	土壤	中国
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	IM1	MZ389219.1	土壤	中国
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	ISA9	HQ189753.1	水/土混合样	伊朗
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	WJB74	KU877646.1	土壤	中国
短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	Y24	JQ798393.1	池塘沉积物	中国
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	HSY21	MT513998.1	土壤	中国
解淀粉酶芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>	IMB16-090	MG190655.1	海洋沉积物	中国

1.7 药物敏感性试验

试验采用纸片扩散法(Kirby-Baue法),选取青霉素、氨苄西林、林可霉素、头孢曲松、四环素、红霉素、恩诺沙星、氯霉素、环丙沙星、阿莫西林10种抗

菌药进行药物敏感性试验,严格按照药敏片说明书进行试验操作及结果判定。

2 结果

2.1 分离纯化与形态观察

从17份粪便中,得到了3株细菌,对分离株进行革兰氏染色,镜检为革兰氏阳性杆菌,呈杆状,蓝紫色、有芽孢。初步判定分离株为芽孢杆菌,并命名为XZ-1,XZ-2,XZ-3。

2.2 生化鉴定

生化鉴定结果如表2所示,3株分离株生化检测结果一致:可分解甘露醇、淀粉、阿拉伯糖,可还原硝酸盐,V-P试验呈阳性,不能水解明胶,不能产生红色吡啶。

表2 分离株生化鉴定结果				
项目	分离株			
	XZ-1	XZ-2	XZ-3	
甘露醇	+	+	+	
淀粉	+	+	+	
明胶	-	-	-	
V-P试验	+	+	+	
吡啶	-	-	-	
阿拉伯糖	+	+	+	
硝酸盐还原	+	+	+	

+,阳性;-,-,阴性

2.3 16S rRNA PCR 鉴定结果

分离株16S rRNA PCR扩增产物电泳结果与预期结果一致,长度为1 500 bp左右(图1)。

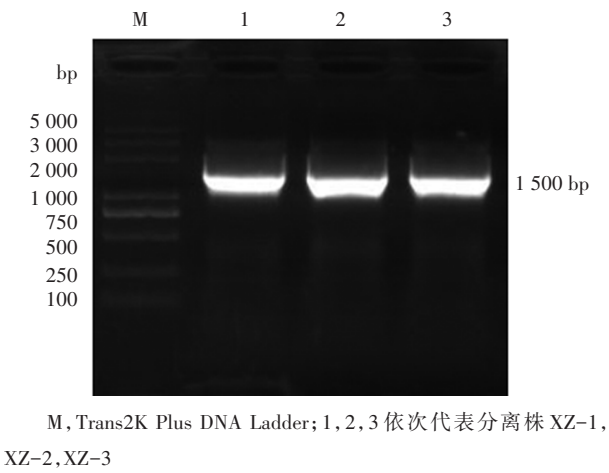


图1 分离菌株16S rRNA 基因PCR 扩增结果

2.4 序列分析

由表3可知,3株分离株之间的同源性为96.0%~99.9%,与地衣芽孢杆菌分离株的同源性为98.3%~100.0%;其中分离株XZ-1与地衣芽孢杆菌分离株的同源性为100.0%,与蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus*分离株ATCC14579的同源性为93.6%,与短小芽孢杆菌*Bacillus pumilus*分离株Y24的同源性为95.9%,与枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*分离株HSY21的同源性为98.0%,与解淀粉酶芽孢杆菌*Bacillus velezensis*分离株IMB16-090的同源性为97.9%;分离株XZ-2与地衣芽孢杆菌分离株的同源性为99.9%,与蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus*分离株ATCC14579的同源性为93.7%,与短小芽孢杆菌*Bacillus pumilus*分离株Y24的同源性为96.0%,与枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*分离株HSY21的同源性为98.2%,与解淀粉酶芽孢杆菌*Bacillus velezensis*分离株IMB16-090的同源性为98.0%;分离株XZ-

表3 同源性表

		PercentIdentity														
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
	1		99.9	98.3	93.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.9	98.0	97.9	1	XZ-1
	2	0.1		96.0	93.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	96.0	98.2	98.0	2	XZ-2
	3	0.0	0.0		94.8	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	96.6	98.4	97.6	3	XZ-3
	4	6.7	6.6	6.2		93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	92.5	91.6	93.7	4	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579
	5	0.0	0.1	0.0	6.7		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.9	98.0	97.9	5	<i>Bacillus licheniformis</i> AD6
	6	0.0	0.1	0.0	6.7	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	95.9	98.0	97.9	6	<i>Bacillus licheniformis</i> CICC 10334
	7	0.0	0.1	0.0	6.7	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	95.9	98.0	97.9	7	<i>Bacillus licheniformis</i> HNNYDD3
	8	0.0	0.1	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	95.9	98.0	97.9	8	<i>Bacillus licheniformis</i> IM1
	9	0.0	0.1	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	95.9	98.0	97.9	9	<i>Bacillus licheniformis</i> ISA9
	10	0.0	0.1	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		95.9	98.0	97.9	10	<i>Bacillus licheniformis</i> WJB74
	11	4.1	4.0	3.3	7.9	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1		95.2	96.7	11	<i>Bacillus pumilus</i> Y24
	12	1.9	1.8	1.7	8.2	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	4.7		99.5	12	<i>Bacillus subtilis</i> HSY21
	13	1.9	1.8	1.3	6.7	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	3.2	0.4		13	<i>Bacillus velezensis</i> IMB16-090
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			

3与地衣芽孢杆菌分离株的同源性为98.3%,与蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus*分离株ATCC14579的同源性为94.8%,与短小芽孢杆菌*Bacillus pumilus*分离株Y24的同源性为96.6%,与枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*分离株HSY21的同源性为98.4%,与解

淀粉酶芽孢杆菌*Bacillus velezensis*分离株IMB16-090的同源性为97.6%。

由16S rRNA核酸序列进化树如图2所示,3株分离株与地衣芽孢杆菌处于同一支,而与链球菌其他种属芽孢杆菌处于不同分支。

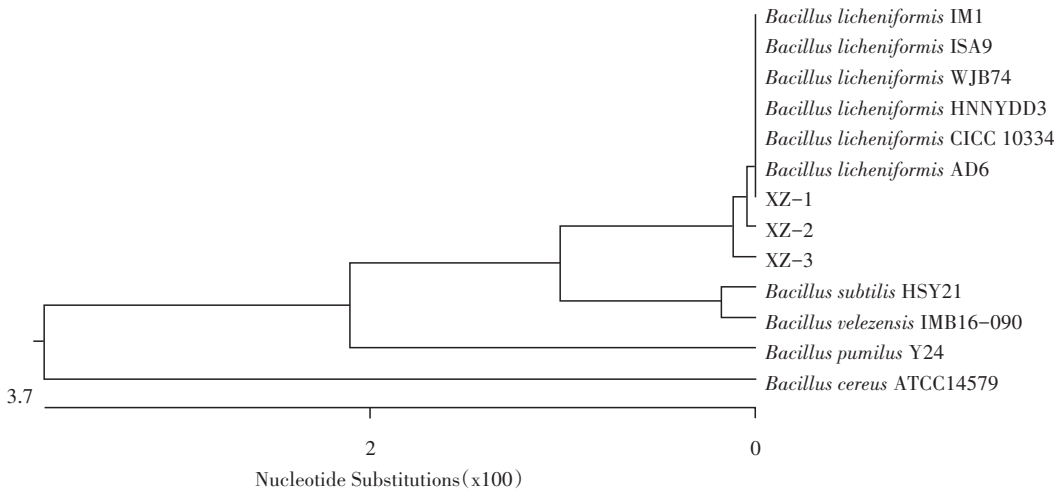


图2 基因进化树

2.5 药物敏感性试验

药物敏感性试验结果如表4所示,分离株XZ-1对青霉素、氨苄西林耐药,对林可霉素中度敏感,对头孢曲松、四环素、红霉素、恩诺沙星、氯霉素、环丙沙星、阿莫西林敏感;分离株XZ-2对青霉素、氨苄西林、四环素、林可霉素耐药,对氯霉素中度敏感,对头孢曲松、红霉素、恩诺沙星、环丙沙星、阿莫西林敏感;分离株XZ-3对青霉素耐药,对氨苄西林、对林可霉素中度敏感,对头孢曲松、四环素、红霉素、恩诺沙星、氯霉素、环丙沙星、阿莫西林敏感。

表4 药物敏感性试验结果

药物名称	分离株		
	XZ-1	XZ-2	XZ-3
青霉素	R	R	R
头孢曲松	S	S	S
氨苄西林	R	R	I
四环素	S	R	S
红霉素	S	S	S
恩诺沙星	S	S	S
氯霉素	S	I	S
林可霉素	I	R	I
环丙沙星	S	S	S
阿莫西林	S	S	S

S,敏感;I,中介;R,耐药;1,2,3依次代表分离株XZ-1,XZ-2,XZ-3

3 讨论

地衣芽孢杆菌是一种常见的革兰氏阳性细菌,在土壤和鸟类羽毛中分布最多,目前主要用于在农业和工业领域的生产和研究^[12-13]。地衣芽孢杆菌具有高分泌碱性丝氨酸蛋白酶的特性,是工业酶生产中最重要细菌之一^[14]。地衣芽孢杆菌还可以生产多肽抗生素,如杆菌肽,可代替抗生素添加在动物饲料中^[15]。在农业领域,利用地衣芽孢杆菌的抗真菌活性,能够有效地抑制植物的烟草黑胫病等真菌性病害^[16]。此外,地衣芽孢杆菌可以降解羽毛,从而生产营养丰富的羽毛饲料,饲喂家畜^[13]。Yu等^[17]的研究表明,地衣芽孢杆菌在预防肉鸡球虫病方面有一定作用,且可以提高肉鸡在柔嫩艾美耳球虫(*E.tenella*)感染下的存活率。地衣芽孢杆菌是一种具有良好拮抗作用的益生菌,已被证实有良好的益生作用,是公认的“安全益生菌”,已被广泛应用于多种动物的养殖中,如对肉鸡的健康有良好的促进作用^[18-20]。研究表明,在水中增加地衣芽孢杆菌可以提高鸡的吸收消化能力^[21],提高鸡的生长性能^[22],并可以减轻坏死性肠炎对鸡生长性能的影响并降低死亡率^[23]。孙铮^[24]的研究表明,地衣芽孢杆菌具有良好的耐受性,能增加小鼠肠道菌群多样性和肠道乳杆菌的丰度,这些特征使其具有益生菌开发的潜力。

地衣芽孢杆菌作为芽孢杆菌属中具有较强应用潜力的菌种之一,受到国内外各方面的关注日益增多^[5]。促生长类药物饲料添加剂的禁用促使益生菌产业快速发展,而我国商品化的益生菌种类还很少,地衣芽孢杆菌可以产生芽孢,芽孢对热、酸碱度及其他环境因素的抗性,因此具有巨大的应用潜力^[24]。本研究从西藏牦牛粪便中成功分离得到3株地衣芽孢杆菌,并进行生化鉴定、分子生物学鉴定,研究其耐药性,为今后开展针对我区牦牛疫病防控、益生菌开发、饲料添加剂研制等相关研究提供参考。

参考文献:

- [1] 施悦,李永峰,李 宁.活性污泥生物相显微观察[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2014.
- [2] 邢芳芳,高明夫,胡兆平,等.芽孢杆菌NY3的鉴定及其对鸡毛菜的促生效果[J].湖北农业科学,2017,56(12):2239-2242.
- [3] SETLOW P. Spore Resistance Properties [J]. Microbiology Spectrum, 2014, 2(5): 2-11.
- [4] MCKILLIP J L. Prevalence and Expression of Enterotoxins in *Bacillus Cereus* and other *Bacillus* SPP, a Literature Review [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 77(4): 393-399.
- [5] 许 慧.地衣芽孢杆菌BF-002高产芽孢的氮源流加工工艺研究[D].无锡:江南大学,2022.
- [6] ELSHAGHABEE F M F, ROKANA N, GULHANE R D, et al. *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1490.
- [7] ELISASHVILI V, KACHLISHVILI E, CHIKINDAS M L. Recent Advances in the Physiology of Spore Formation for *Bacillus* Probiotic Production[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(3): 731-747.
- [8] LONG R J, DING L M, SHANG Z H, et al. The Yak Grazing System on the Qinghai-Tibetan Plateau and Its Status [J]. The Range-land Journal, 2008, 30(2): 241.
- [9] REN Q M, SI H Z, YAN X T, et al. Bacterial Communities in the Solid, Liquid, Dorsal, and Ventral Epithelium Fractions of Yak (*Bos Grunniens*) Rumen [J]. Microbiology Open, 2020, 9(2): 963.
- [10] QIU Q H, GAO C Y, AZIZ UR RAHMAN M, et al. Digestive Ability, Physiological Characteristics and Rumen Bacterial Community of Holstein Finishing Steers in Response to Three Nutrient Density Diets as Fattening Phases Advanced [J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 335.
- [11] 马 艳,向 信,樊嘉凯,等.海拔高度对青藏高原放牧牦牛肠道菌群多样性的影响[J].微生物学通报,2022,49(2):620-634.
- [12] 舒成城.地衣芽孢杆菌DW2的基因组分析和转录组表达研究[D].武汉:华中农业大学,2018.
- [13] POTTER M, OPPERMAN-SANIO F B, STEINBUCHER A. Cultivation of Bacteria Producing Polyamino Acids with Liquid Manure as Carbon and Nitrogen Source [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 617-622.
- [14] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD O P. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(1): 1-17.
- [15] HAAVIK H I, FROYSHOV Ø. Function of Peptide Antibiotics in Producer Organisms [J]. Nature, 1975, 254(5495): 79-82.
- [16] 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.
- [17] YU Y H, WU C M, CHEN W J, et al. Effectiveness of *Bacillus Licheniformis*-Fermented Products and Their Derived Antimicrobial Lipopeptides in Controlling Coccidiosis in Broilers [J]. Animals, 2021, 11(12): 3576.
- [18] 刘秀花.芽孢杆菌的应用研究及进展[J].商丘师范学院学报,2005,21(5):135-137.
- [19] BARBOSA T M, SERRA C R, LA RAGIONE R M, et al. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 968-978.
- [20] 徐 帅.地衣芽孢杆菌H2对坏死性肠炎肉鸡回肠菌群结构的影响[D].雅安:四川农业大学,2018.
- [21] ROZS M, MANCZINGER L, VÁGVÖLGYI C, et al. Secretion of a Trypsin-Like Thiol Protease by a New Keratinolytic Strain of *Bacillus Licheniformis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(2): 221-224.
- [22] LIU X L, YAN H, LV L, et al. Growth Performance and Meat Quality of Broiler Chickens Supplemented with *Bacillus Licheniformis* in Drinking Water [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2012, 25(5): 682-689.
- [23] KNAP I, LUND B, KEHLET A B, et al. *Bacillus Licheniformis* Prevents Necrotic Enteritis in Broiler Chickens [J]. Avian Diseases, 2010, 54(2): 931-935.
- [24] 孙 铮.地衣芽孢杆菌SXAU08的耐受性及其对小鼠肠道菌群影响的研究[D].太谷:山西农业大学,2021.