

一株除臭细菌的筛选及鉴定

吴翔^{1,2}, 余洋^{1,2}, 谢丽源^{1,2} (1. 四川省食用菌研究所, 四川成都 610066; 2. 国家农业微生物新都观测实验站, 四川成都 610066)

摘要 [目的] 筛选获得分类地位明确、具有较好除臭效果的微生物菌株。[方法] 通过平板涂布法从鸡粪发酵料中筛选具有除臭效果的菌株, 并检测各菌株对鸡粪中氨气和硫化氢的降解率。通过表型特征、生理生化特征和遗传特征等多相分析来确定目的菌株的分类地位。[结果] 筛选获得一株除臭细菌 3-1, 对氨气和硫化氢的降解率分别达到了 63.08% 和 62.80%。鉴定结果表明, 细菌 3-1 为原磷谷氨酸杆菌 (*Glutamicibacter protophormiae*), 在 GenBank 核酸登录号为 OM816730。[结论] 菌株 3-1 在无害化处理畜禽粪污方面具有一定的应用前景。

关键词 除臭细菌; 筛选; 鉴定

中图分类号 X172 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)06-0058-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.06.016



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening and Identification of a Deodorant Bacterial Strain

WU Xiang^{1,2}, YU Yang^{1,2}, XIE Li-yuan^{1,2} (1. Sichuan Institute of Edible Fungi, Chengdu, Sichuan 610066; 2. National Observing and Experimental Station of Agricultural Microbiology in Xindu, Chengdu, Sichuan 610066)

Abstract [Objective] To screen microbial strains with clear classification status and good deodorization effect. [Method] Strains with deodorization effect were screened from chicken manure fermentation materials by plate coating method, and the degradation rates of ammonia and hydrogen sulfide in chicken manure were tested. The taxonomic status of the target strain was determined by multiphase analysis of phenotypic characteristics, physiological and biochemical characteristics and genetic characteristics. [Result] The strain 3-1 possessing deodorizing functions was isolated, the amount of NH₃ and H₂S removed were 63.08% and 62.80%. The identification results showed that bacteria 3-1 was *Glutamicibacter prototropiae*, and the nucleic acid registration number in GenBank was OM816730. [Conclusion] The isolated strain 3-1 have great potential for the harmless treatment of livestock manure.

Key words Deodorant bacterial; Screening; Identification

随着经济发展, 人民生活水平的提高, 对肉、蛋、奶等产品的需求越来越大, 促进了畜禽养殖业的快速发展。而畜禽养殖业的发展必然增加畜禽粪污产生的量, 给环境带来新的压力。其中畜禽粪便中含有的大量蛋白质、氨基酸等营养物质被分解为 NH₃、H₂S 等恶臭气体^[1], 这些气体会引起周围强烈的刺激性, 损害吸入群体的人身健康。目前对这些恶臭气体主要的处理方法有物理法、化学法和生物法^[2-6], 而生物法主要通过微生物降解、转化恶臭成分, 具有成本低、不易产生二次污染等优点, 因此是解决恶臭气体重要的研究方向。该研究从鸡粪发酵物中筛选降解 NH₃ 和 H₂S 的微生物菌株, 为后续研发除臭剂打下基础。

1 材料与与方法

1.1 培养基 含氮富集液体培养基^[7]: 蔗糖 25 g, NH₄NO₃ 2 g, KH₂PO₄ 2 g, NaCl 2 g, FeSO₄ 0.1 g, CaCl₂ 0.5 g, ZnSO₄ 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蒸馏水 950 mL, 灭菌后的鸡粪浸出液 50 mL, pH 7.5~8.0。LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4。产气检测培养基^[8]: 蔗糖 2 g, NaCl 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸出粉 5 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.5~7.0。

1.2 样品采集及处理 在成都市大邑县、邛崃市采集鸡粪发酵物共计 5 个, 称取样品各 5 g 分别置于富氮液体培养基中进行富集培养, 放入 30 °C、120 r/min 摇床振荡, 3 d 后在转接

到新鲜的培养液中培养, 连续转接 3 次。

1.3 菌株筛选 将富集后的培养液进行梯度稀释, 选取适宜稀释度的稀释液 0.1 mL, 采用平板涂布法涂布于 LB 培养基上, 于 30 °C 的恒温培养箱倒置培养, 待菌长出后将纯化后的单个菌株接种到产气培养基, 利用石蕊试纸和醋酸铅试纸检测各菌株的产气情况, 菌株生长过程中产生 NH₃ 红色石蕊试纸将变为蓝色, 产生 H₂S 气体醋酸铅试纸将变为黑色^[9]。参照李玥等^[8]的方法, 再次检测 2 种气体产气试验都不变色菌株的除氨和除 H₂S 能力, 确定筛选目标菌株。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 显微形态和培养形态特征分析。 将筛选所得的目标菌株于 LB 培养基上划线培养, 于培养箱 30 °C 培养 18 h, 观察菌株形态特征, 并对菌落形态拍照; 挑取单菌落进行革兰氏染色, 并于光学显微镜下观察其显微形态。

1.4.2 生理生化特征分析。 菌株大部分生理生化特征利用 Biolog Gen III 型细菌鉴定仪的微孔板检测, 具体按照 Biolog Gen III MicroPlate™ 使用说明书步骤操作, 其微孔板布局如图 1 所示。其他生理生化试验检测内容参照赵斌等^[10]的《微生物学实验》进行操作。将 LB 培养基 NaCl 含量调节为 1%、4%、8% 和 10% (w/v), pH 分别调节为 5、6、7、8、9、10、11, 检测菌株生长 pH 范围和 NaCl 耐受情况, 检测菌株在 7、15、25、30、40、45 和 50 °C 条件下的生长情况。

1.4.3 菌株 16S rRNA 基因序列的测定及系统发育树构建。 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(杭州博日科技有限公司)的说明书提取细菌基因组 DNA。用细菌通用引物(正向引物 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R

基金项目 成都市重点研发支撑计划项目(2022YF0500956SN); 四川省农业科学院国际科技交流合作提升行动计划项目(2021ZSSFGH05)。

作者简介 吴翔(1981—), 女, 四川理县人, 副研究员, 博士, 从事土壤微生物研究。

收稿日期 2022-05-06

5'-GGTTACCTTGTACTGACTT-3')参照张飞官等^[11]的方法扩增菌株 16S rDNA。PCR 产物在生工生物工程(上海)有限公司进行测序。将测得的 16S rRNA 基因序列提交到 Gen-

Bank, 获得各菌株的登录号。参照张越己等^[12]的方法构建系统发育树。

A1 阴性对照	A2 糊精	A3 D-麦芽糖	A4 D-海藻糖	A5 D-纤维二糖	A6 龙胆二糖	A7 蔗糖	A8 D-松二糖	A9 水苏糖	A10 阳性对照	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 蜜三糖	B2 α -D-乳糖	B3 蜜二糖	B4 β -甲酰-D-葡萄糖苷	B5 D-水杨苷	B6 N-乙酰-D-葡萄糖胺	B7 N-乙酰- β -D-甘露糖胺	B8 N-乙酰-D-半乳糖胺	B9 N-乙酰神经氨酸	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α -D-葡萄糖	C2 D-甘露糖	C3 D-果糖	C4 D-半乳糖	C5 3-甲酰葡萄糖	C6 D-果糖	C7 L-果糖	C8 L-鼠李糖	C9 肌苷	C10 乳酸钠	C11 梭链孢酸	C12 D-丝氨酸
D1 D-山梨醇	D2 D-甘露醇	D3 D-阿拉伯醇	D4 肌醇	D5 甘油	D6 D-葡萄糖-6-磷酸	D7 D-果糖-6-磷酸	D8 D-天冬氨酸	D9 D-丝氨酸	D10 醋竹桃霉素	D11 利福霉素SV	D12 二甲胺四环素
E1 明胶	E2 e-氨基乙酰-L-脯氨酸	E3 L-丙氨酸	E4 L-精氨酸	E5 L-天冬氨酸	E6 L-谷氨酸	E7 L-组胺	E8 L-焦谷氨酸	E9 L-丝氨酸	E10 林肯霉素	E11 盐酸胍	E12 硫酸四癸钠
F1 果胶	F2 D-半乳糖醛酸	F3 L-半乳糖醛酸内酯	F4 D-葡萄糖酸	F5 D-葡萄糖醛酸	F6 葡萄糖酐	F7 粘酸	F8 奎宁酸	F9 糖质酸	F10 万古霉素	F11 四唑紫	F12 四唑蓝
G1 p-羟基-苯乙酸	G2 丙酮酸甲酯	G3 D-乳酸甲酯	G4 L-乳酸	G5 柠檬酸	G6 α -酮-戊二酸	G7 D-苹果酸	G8 L-苹果酸	G9 溴-丁二酸	G10 萘啶酮酸	G11 氯化锂	G12 亚硝酸钾
H1 吐温40	H2 γ -氨基-丁酸	H3 α -羟基-丁酸	H4 β -羟基-D,L-丁酸	H5 α -酮-丁酸	H6 乙酰乙酸	H7 丙酸	H8 乙酸	H9 甲酸	H10 氨曲南	H11 丁酸钠	H12 溴酸钠

图 1 Biolog GEN III MicroPlate 微孔板测试布局

Fig.1 The distribution in microplates of Biolog GEN III MicroPlate

2 结果与分析

2.1 菌株的分离 从 5 个鸡粪发酵物样品中分离获得 52 株菌株,其中细菌 38 株,放线菌 14 株。在利用试纸检测各菌株产生 NH_3 和 H_2S 气体的过程中发现,有 5 株细菌同时不产生 NH_3 和 H_2S ,它们分别是 3-1、3-2、4-3、5-2、5-4,分别检测了这 5 株菌的除氨和除 H_2S 能力,结果如表 1 所示,从表 1 可看出,菌株 3-1 的除氨率和除硫化氢率均为 5 个菌株中最高的,分别达到了 63.08%和 62.98%,因此选该菌为最优的目的菌株确定其分类地位。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态特征。菌株 3-1 是革兰氏阳性的好氧细菌,在 LB 培养基上的菌落呈现出隆起、边缘整齐的形状,菌株表面湿润,无可溶性色素,菌株为乳白色,培养过程中菌株颜色无

变化,无金属光泽,在光学显微镜下观察发现该菌呈现杆状,如图 2 所示。

表 1 菌株除臭结果

Table 1 Deodorization result of strains

处理 Treatment	产生氨量 Amount of NH_3 produced mg/kg	除氨率 Ammonia removal rate//%	产生硫化氢量 Amount of H_2S produced mg/kg	除硫化氢率 除硫化氢率 removal rate//%
CK	749.33±12.36		1.81±0.04	
3-1	276.67±5.79	63.08	0.67±0.04	62.98
3-2	468.67±9.29	37.45	1.23±0.02	32.04
4-3	435.33±13.27	41.90	1.34±0.01	25.97
5-2	523.00±11.52	30.20	1.46±0.03	19.34
5-4	524.67±6.80	29.98	1.37±0.05	24.31

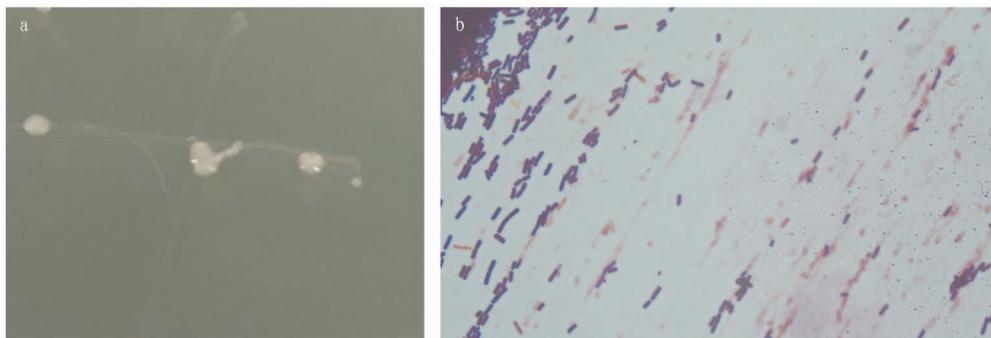


图 2 菌株 3-1 在牛肉膏蛋白胨培养基上的菌落形态 (a) 和光学显微形态 (b)

Fig.2 Colony morphology (a) and optical microscopic morphology (b) of strain 3-1 on beef extract peptone medium

2.2.2 生理生化特征。菌株 3-1 培养 22 h 后在 Biolog 鉴定板上的鉴定结果如图 3 所示。将该菌 Gen III 鉴定板上的鉴定结果在数据库中比对,未发现与有该菌结果具有匹配可能性的菌株,距离最近的菌为 *Bacillus megaterium*,但与该菌的相似度 (SIM) 为 0.212,距离 (DIST) 为 10.253,无匹配可能性。

鉴定结果表明该菌具有一定的耐酸性和耐盐性,可在 pH 低至 5 和含 8%NaCl 的培养液中生长,生长温度是 15~30℃。可利用糊精、D-麦芽糖、D-纤维二糖、蔗糖、D-松二糖、水苏糖、棉子糖、蜜二糖、D-水杨酸、N-乙酰神经氨酸、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露醇、D-阿拉伯醇、甘油、L-丙氨酸、L-天冬氨

酸、L-谷氨酸、L-焦谷氨酸、L-丝氨酸、果胶等生长。

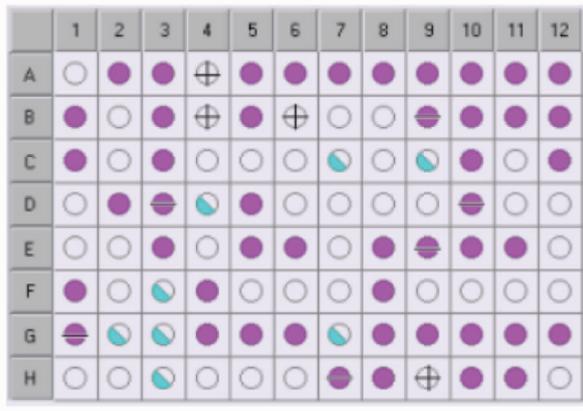


图3 菌株3-1在鉴定板上的反应结果

Fig.3 The reaction result of 3-1 in microplates

2.2.3 菌株16S rRNA基因部分序列分析。菌株3-1的16S rRNA基因部分序列长度为1424 bp,在GenBank核酸登录号为OM816730。根据菌株3-1系统发育分析,菌株3-1属于贝氏谷氨酸杆菌属(*Glutamicibacter*)细菌,与该属菌株原磷谷氨酸杆菌 *Glutamicibacter protophormiae* DSM 20168系统发育关系最近,其16S rRNA基因相似性为99.93%;其次是菌株 *Glutamicibacter soli* SYB2,相似性为99.07%;通过邻接法构建的基于菌株3-1相关菌株16S rRNA基因部分序列的系统发育树如图4所示。结合其形态特征、生理生化特征和16S rRNA基因部分序列分析结果^[13],初步判定菌株3-1属于原磷谷氨酸杆菌(*Glutamicibacter protophormiae*)。

3 讨论

在已有的降解畜禽粪污臭气方面的研究中,发现具有这类功能的微生物主要包括芽孢杆菌^[14]、镰刀菌^[15]、酵母

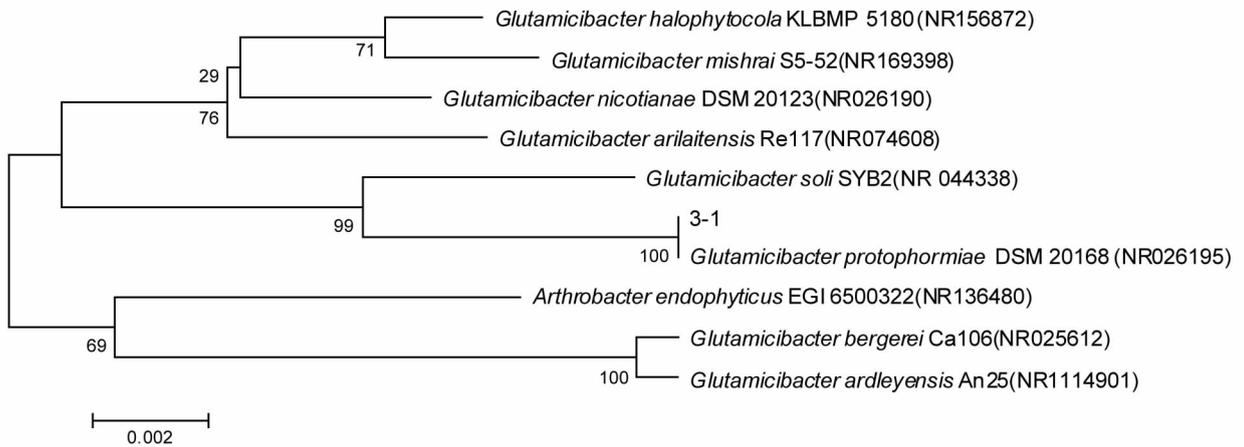


图4 通过邻接法构建的基于菌株3-1及相关菌株16S rDNA序列的系统发育树

Fig.4 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain 3-1 and other related strains, constructed by neighbor-joining method

菌^[16-17]等,该研究所得的降解氨气和硫化氢的菌株为原磷谷氨酸杆菌(*Glutamicibacter protophormiae*),已有的报道中该类菌主要具有产生L-谷氨酸、谷氨酸等功能^[17],鲜有该类菌用于降价畜禽粪污臭气成分的报道。该研究筛选出的菌株3-1对氨气和硫化氢都有较好的去除效果,具有研发为功能菌株生产除臭剂的潜力,为除臭菌剂的研发等后续研究打下了基础。

参考文献

- [1] 王志茹,彭旭阳,任丽梅,高安屯卫生填埋场刚性调节池除臭新工艺的应用[J].环境卫生工程,2012,20(6):27-29.
- [2] 许丽娟,王震,吴迎奔,等.城市生活垃圾除臭微生物菌群的筛选[J].江西农业学报,2016,28(7):87-91.
- [3] 张杰,李杭芬,赵由才,等.垃圾填埋场苍蝇和恶臭污染控制技术进展[J].环境污染与防治,2016,38(1):69-75,110.
- [4] 吴见平,靳紫恒,长英夫,等.污水处理厂生物除臭技术及其应用进展[J].化工进展,2021,40(5):2774-2783.
- [5] 崔玉雪,郭广寨,黄皇,等.用于填埋场恶臭气体控制的微生物除臭剂筛选及其除臭机制研究[J].环境污染与防治,2014,36(1):60-63,83.
- [6] 唐董滢,王士雄,李何君,等.畜禽场园林绿化与臭气减排控制研究现状[J].安徽农业科学,2021,49(18):5-8.
- [7] 曾苏,李南华,盛洪产,等.微生物除臭剂的筛选、复配及其除臭条件的优化[J].环境科学,2015,36(1):259-265.
- [8] 李玥,李成成,李静,等.鸡粪除臭菌的分离筛选及除臭效果分析

- [J].农业环境科学学报,2020,39(5):1103-1110.
- [9] 陈玲,张攀.浅谈臭气控制项目在下坪固体废物填埋场环境保护方面的作用[J].广东化工,2013,40(17):233-234.
- [10] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.
- [11] 张飞官,高雅慧,任慧爽,等.桑疫病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J].微生物学报,2013,53(12):1285-1294.
- [12] 张越己,秦盛,卞光凯,等.具有ACC脱氨酶活性的麻疯树根际促生菌(PGPR)的分离筛选及系统发育分析[J].微生物学通报,2012,39(7):901-911.
- [13] BUSSE H J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov., and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus* [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2016, 66(1):9-37.
- [14] 宋繁永,史亚微,李天元,等.高效养猪废水除臭菌株的筛选及条件优化[J].环境科学与技术,2021,44(S1):45-50.
- [15] 尹红梅,刘标,郭照辉,等.1株畜禽粪便堆肥脱氨除臭菌的筛选及特性[J].江苏农业科学,2020,48(17):261-265.
- [16] 叶芬霞,朱瑞芬,叶央芳.复合微生物吸附除臭剂的制备及其除臭应用[J].农业工程学报,2008,24(8):254-257.
- [17] SHASHKOV A S, TUL' SKAYA E M, DOROFEEVA L V, et al. Two glycosyl 1-phosphate polymers and teichulosonic acid from *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104^T cell wall [J]. Biochemistry, 2020, 85(5):629-635.