

一株羽毛降解菌的分离与鉴定

顾振红^{1,2} 谢小林^{1,2} 刘晓迪¹ 冯广达² 朱红惠² 姚青^{1*}

(1. 华南农业大学 园艺学院 广州 广东 510642)

(2. 广东省微生物研究所 广州 广东 510070)

摘要: 【目的】从土壤中分离并鉴定羽毛降解菌,测定其生长最适温度及起始 pH,并观察酶活动态。【方法】采用系列稀释法和选择培养基法筛选目的菌株,基于 16S rRNA 基因序列及 Biolog 方法鉴定其分类地位,利用全自动生长曲线分析仪监测菌株的最适生长条件,并通过测定蛋白水解活性观察其酶活动态。【结果】从混合羽毛的土壤样品中筛选到一株羽毛降解菌,命名为菌株 GIMN1.015,初步判定该菌株属于芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina*)。最适生长 pH 为 9.0,温度为 30 °C。蛋白水解活性最高值出现在培养后 96 h。【结论】菌株 GIMN1.015 在利用羽毛角蛋白资源中具有潜在的应用价值。这是芽孢八叠球菌在羽毛降解方面的首次报道。

关键词: 羽毛降解菌, 分离, 鉴定, 芽孢八叠球菌

Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium

GU Zhen-Hong^{1,2} XIE Xiao-Lin^{1,2} LIU Xiao-Di¹ FENG Guang-Da²
ZHU Hong-Hui² YAO Qing^{1*}

(1. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangdong, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong, Guangzhou 510070, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to isolate and characterize feather-degrading bacte-

基金项目: 广东省科技攻关项目(No. 2008B021000047); 广东省-中科院产学研项目(No. 2010B090300067); 广东省省部产学研结合项目(No. 2011B090400613); 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAD14B16)

*通讯作者: Tel: 86-20-85286902; 邮箱: yaoqscau@scau.edu.cn

收稿日期: 2012-06-30; 接受日期: 2012-12-17

ria from soil, and to determine the optimal temperature and initial pH for growth and further to observe the dynamic of enzyme activity. **[Methods]** Serial dilution on agar plate and selective medium culture techniques were used for screening bacteria. Strain identification was based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence and Biolog analysis. Optimal growth conditions were measured by automated microbiology growth curve analyzer. The proteolytic activity assay was carried out to observe the dynamic of enzyme activity. **[Results]** A feather-degrading bacterial strain, designated as GIMN1.015, was isolated and screened from the soil mixed with feathers. The strain was preliminarily identified as a strain of the genus *Sporosarcina*. The optimal pH and temperature for growth were 9.0 and 30 °C, respectively. The peak value of proteolytic activity appeared at 96 h of incubation time. **[Conclusion]** Strain GIMN1.015 has the potential for the application of feather keratin sources. This is the first report on the feather degrading by *Sporosarcina*.

Keywords: Feather-degrading bacteria, Isolation, Characterization, *Sporosarcina*

羽毛是自然界中最为丰富的角蛋白来源。尤其在现代农业中,大规模的家禽养殖产生了大量的羽毛,位居各类角蛋白类废弃物的榜首^[1]。全球范围内,每年家禽加工厂产生的羽毛约为 85 亿 t^[2]。据统计,我国家畜年出栏量:2009 年 106.1 亿只^[3],2010 年 110.1 亿只^[4],逐年呈上升趋势,按每只可产羽毛 0.1 kg 计算,年产羽毛约为 1 100 万 t。羽毛的积累最终会导致环境污染,随意弃置后会蚊蝇滋生,产生细菌、病毒和难闻甚至有毒害气体,对人类和生态环境极为有害^[5-6]。但是据测定,羽毛角蛋白的粗蛋白含量约在 91% 左右,含有丰富的赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、甘氨酸、胱氨酸等 10 多种动物所必需的氨基酸,还含有常量元素、微量元素、维生素以及一些未知生长因子^[7]。因此羽毛角蛋白废弃物经过适当的处理具有十分广泛的应用前景^[8-11]。

目前已有 30 余种可降解角蛋白的微生物,主要包括真菌、放线菌和细菌 3 类^[12]。其中,真菌大多属于皮肤寄生菌,具致病性,而没有太多的经济价值。而降解角蛋白的细菌具有生长快、产

酶活性较高、相对安全的优势,近年来备受关注。本研究旨在从环境中分离筛选高效的角蛋白降解细菌,并进一步利用高效菌株降解羽毛,生产氨基酸叶面肥,为园艺植物的有机栽培提供技术保障。本文报道了从土壤中分离的一株新的羽毛角蛋白降解细菌,并进行了分类鉴定和系统发育分析,观察酶活动态,为其进一步利用提供了技术参数。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂和培养基

除特殊说明外均为市售分析纯。基础培养基为营养肉汤培养基(Nutrient broth, NB),购于广东环凯微生物科技有限公司,配方如下(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉浸出粉 3.0,氯化钠 5.0,最终 pH 7.4±0.2,琼脂(Agar) 15-20(斜面或平板,NA)。胰蛋白胨大豆琼脂培养基(Tryptic soy agar, TSA)购于广东环凯微生物科技有限公司,配方如下(g/L):胰蛋白胨(酪蛋白胰酶消化物) 15,大豆蛋白胨(大豆粉木瓜蛋白酶消化物) 5,氯化钠 5,琼脂 15,最终 pH 7.3±0.2。羽毛取自家禽屠宰市场,

经彻底清洗, 蒸馏水煮沸 2 次, 烘干备用。添加 0.1% 的天然羽毛至 NB 为羽毛补给性培养基。以上培养基均 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。细菌通用引物为上海英骏生物技术有限公司合成。偶氮酪蛋白 (Azocasein) 购于德国 Sigma-Aldrich 公司。本文所用的 Biolog 测试专用培养基 BUGM 和接种液的详细配方及制备参考《Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程》(以下简称《操作规程》)^[13]。

1.2 羽毛降解菌的分离

土样取自广东省广州市华南农业大学校内 (东经 $113^{\circ}35'$, 北纬 $23^{\circ}9'$), 混入羽毛 (未经处理), 待羽毛分解后收集土样, 自然阴干, 4°C 保存备用。

取 10 g 上述土样, 利用稀释涂布平板法在 NA 培养基分离土壤细菌。对每个菌落形态不同的菌株做 2 个平行纯化平板。挑取初筛单菌落于羽毛补给性培养基中, 置于 30°C 摇床, 120 r/min 培养, 以未接种的培养基作对照, 期间不断观察羽毛降解情况, 将明显出现羽毛降解现象的菌株做进一步筛选。将候选菌株多次纯化后, 保存为 NA 斜面及 15% 甘油种。其中一株具有较强的降解活性, 编号为 GIMN1.015, 做进一步鉴定分析。

1.3 Biolog 鉴定

首先按照表型常规鉴定方法^[22]对获得的菌株进行革兰氏染色、氧化酶指标等实验, 确定菌株类型。然后基本按《操作规程》, 选择与菌株类型相对应的鉴定板以及培养条件^[13], 再利用 MicroLog 4.2 系统进行读数, 分析结果。

1.4 菌株形态观察与生理生化特征鉴定

菌株 GIMN1.015 接种于 NA 平板上, 30°C 恒温培养 48 h。革兰氏染色后, 在光学显微镜下观察形态特征。参照《常见细菌鉴定手册》^[14]中的有关方法进行生理生化特性的测定。

1.5 测序和系统发育分析

将菌株 GIMN1.015 划线接种在 NA 平板上, 30°C 培养过夜。取单一菌落悬浮于 10 μL 无菌蒸馏水中, 于沸水中加热 5 min, 离心, 取上清作为 PCR 模板 DNA, 对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。引物为 F27: 5'-AGAGTTTGTATCTGCTCAG-3', 反向引物为 1492R: 5'-GGTTACCTGTGTTACGACTT-3'^[15]。PCR 反应体系 (总体积 50 μL): 10 倍缓冲液 5 μL , dNTPs (2 mmol/L) 4 μL , F27 (10 pmol/L) 1 μL , 1492R (10 pmol/L) 1 μL , *Taq* 酶 (2 U/L) 0.4 μL , DNA 模板 1 μL , 灭菌 ddH₂O 37.4 μL 。PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 2 min, 共 30 个循环; 72°C 7 min。

PCR 产物纯化 (PCR 产物回收试剂盒, 上海生工) 后, 送上海英骏生物技术有限公司测序。利用 BLASTn 软件与 GenBank 基因库中已知的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 从数据库获得相关种属的序列, 并结合 EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/index.jsp>) 进行有效种的搜索, 利用软件 ClustalX 1.83 和 MEGA 4.0^[16] 进行多重比较后通过邻接法 (Neighbor-Joining method, NJ) 构建系统发育树。

1.6 菌株的生长测定

取菌株 GIMN1.015 接种于 NB 中, 30°C 、120 r/min 振荡培养 18 h 作为种子液使用。将灭菌后的 NB, 用经灭菌的 2 mol/L NaOH, 1 mol/L HCl 微调至 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、11.0、12.0, 分别取种子液接种, 接种量为 5%, 不接种为对照。每个 pH 接种 350 μL 至 Honeycomb 10 \times 10 微孔板上, 每个重复 3 次, 在全自动生长曲线分析仪 (BioSreen C MBR, 芬兰) 上分别设定 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C 、 45°C 、 50°C , 测定 600 nm 的吸光值, 每个温度自动检测 48 h, 步长为 1 h。

1.7 蛋白酶活性和细菌数量测定

取 1.6 中的种子液接种至羽毛补给性培养基

中, 接种量为 5%, 30 °C、120 r/min 振荡培养。培养 7 d, 接种后 2、4、8、16、32 h 及每 24 h 测定蛋白酶活性。同时利用平板法(NA 培养基)测定细菌数量。

蛋白酶水解活性方法的测定参照文献[17]的方法, 稍加修改。上述培养液经 4 °C、9 000×g 离心 10 min, 即得到粗酶液。取 120 μL 酶液加入 480 μL 含 1% (W/V) 偶氮酪蛋白(Azocasein)于 50 mmol/L 缓冲液(最适 pH)中。混合液 30 °C 温育 30 min, 加入 600 μL 10% 三氯乙酸(TCA)终止反应后, 冰浴 30 min, 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 800 μL 上清液加入 200 μL 1.8 mol/L 的 NaOH, 在 420 nm 处测定 OD 值。计算 ΔOD_{420} 。酶活力单位定义: 实验条件下, 420 nm 处吸收值升高 0.01 所需的酶量为一个活力单位(U)。最适 pH 的测定使用不同的缓冲液体系, 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液为 5.5–7.5, Tris-HCl 缓冲液为 7.0–9.5, Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液为 9.0–11.0, 间隔 0.5。

2 结果与分析

2.1 Biolog 鉴定结果

Biolog 系统规定: 对于革兰氏阳性菌, 鉴定

板培养 4–6 h 可以进行一次读数, 过夜培养(16–24 h)可再进行一次读数。其中 SIM 值表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度。

由表 1 可以看出, 菌株 GIMN1.015 两次读板的鉴定结果的 SIM 值均小于 0.5, 而 MicroLog 4.2 系统给出的结果是“NO ID”, 因而无法依靠 Biolog 鉴定系统确定菌株 GIMN1.015 的具体分类, 推测可能是一种新的菌。但鉴定系统每次仍然给出 10 个参考结果, 见表 1: *Bacillus* (芽孢杆菌)。因此应与其他鉴定手段相结合进行微生物鉴定方面的工作。

2.2 菌株的形态和生理生化特性

菌株 GIMN1.015 菌落呈淡黄色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑, 革兰氏阳性菌, 芽孢端生(图 1)。菌株 GIMN1.015 的生理生化特性如表 2 所示。

2.3 菌株的系统发育分析

通过对菌株 GIMN1.015 的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 得了 1 421 bp 大小的片段, 其在 GenBank 上的登录号为 JF731343。通过 BLASTn 在线比对, 与基因库中已知菌株的 16S rRNA 基因序列进行了同源性比较, 结果表明菌株 GIMN1.015 与芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)菌

表 1 Biolog 鉴定结果
Table 1 The identification result with Biolog system

| 序号 Number | 菌种名 Strain name (4–6 h) | SIM 值 SIM value | 序号 Number | 菌种名 Strain name (16–24 h) | SIM 值 SIM value |
|--------------|---|--------------------|--------------|--|--------------------|
| 1 | <i>Bacillus spahaericus</i> | 0.040 | 1 | <i>Bacillus subtilis</i> B | 0.008 |
| 2 | <i>Bacillus badius</i> | 0.006 | 2 | <i>Bacillus megaterium</i> A | 0.004 |
| 3 | <i>Bacillus mycoides</i> | 0.004 | 3 | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> C | 0.003 |
| 4 | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> C | 0.003 | 4 | <i>Bacillus mycoides</i> | 0.003 |
| 5 | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> A | 0.002 | 5 | <i>Bacillus licheniformis</i> | 0.003 |
| 6 | <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> | 0.001 | 6 | <i>Bacillus maroccanus</i> | 0.003 |
| 7 | <i>Bacillus maroccanus</i> | 0.001 | 7 | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> A | 0.003 |
| 8 | <i>Bacillus megaterium</i> A | 0.001 | 8 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B | 0.002 |
| 9 | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> | 0.001 | 9 | <i>Bacillus megaterium</i> B | 0.002 |
| 10 | <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> (55C) | 0.001 | 10 | <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> | 0.002 |

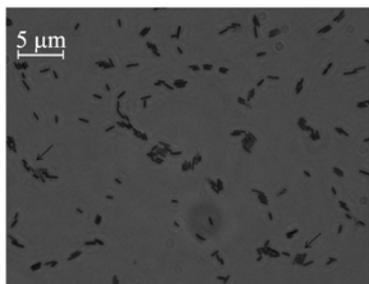


图 1 菌株 GIMN1.015 的光学显微镜图

Fig. 1 Optical micrograph of strain GIMN1.015

注: 标尺为 5 μm; 箭头: 芽孢.

Note: Scale bar is 5 μm; Arrows: Spores.

| 表 2 菌株 GIMN1.015 与生理生化特性 | |
|---|--------------|
| Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain GIMN1.015 | |
| 实验项目 Tested items | 结果 Result |
| 氧化酶 Oxidase | + |
| 脲酶 Urease | - |
| 水解性 Hydrolysis of | + |
| 酪蛋白 Casein | - |
| 明胶 Gelation | - |
| 淀粉 Starch | - |
| 吐温 80 Tween 80 | - |
| 酪氨酸 Tyrosine | - |
| 硝酸还原性 Nitrate reduction | + |
| 苯丙氨酸测定 Determination of phenylalanine | - |
| 产酸性 Acid production form | - |
| D-葡萄糖 D-glucose | - |
| D-甘露醇 D-mannitol | - |
| D-木糖 D-xylose | - |

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果.

Note: +: Positive result; -: Negative result.

株的 16S rRNA 基因序列有 95%–99% 的同源性。通过邻接法构建系统发育进化树, 从结果(图 2)进一步可以看出, 菌株 GIMN1.015 与芽孢八叠球菌模式菌株 *Sporosarcina koreensis* DSM 16921^T (GenBank 登录号: DQ073393) 亲缘关系最近, Ez-Taxon server 2.1 比对的同源性为 99.6%。结合传统的生理生化鉴定以及 16S rRNA 基因序列系统

发育分析的结果, 初步判定菌株 GIMN1.015 为芽孢八叠球菌。

2.4 起始 pH 及温度对菌株生长的影响

通过全自动生长曲线分析仪对菌株 GIMN1.015 的生长状况的监测, 不同温度及起始 pH 对其生长的影响见图 3 和图 4。如图 3 所示, 在起始 pH 7.0–9.0 范围内, 菌株 GIMN1.015 的生长速率较快, 最适生长起始 pH 为 9.0。如图 4 所示, 30 °C–40 °C 范围内, 菌株 GIMN1.015 的生长速率较快, 最适生长温度为 30 °C。在接种量为 5% 的前提下, 菌株 GIMN1.015 在接种后时数 (Incubation hours, IH) 为 18 IH 时, 进入稳定生长期, 且不易受到生长 pH 及温度的影响。

2.5 培养上清液的蛋白酶活性

蛋白酶在 pH 8.0–10.0 之间活性较高, 最适 pH 为 9.0, 见图 5。经过不同时间的培养, 发现菌株 GIMN1.015 在 48–96 IH 范围内, 蛋白酶活性增幅最大, 在 96 IH 时达到最大, 羽毛开始大量降解, 此时细菌生长处于对数生长期后期。96 IH 后, 蛋白酶活性趋于下降, 但是幅度较小, 这时培养基中的羽毛逐渐分解为羽毛碎屑。

3 讨论

本文报道了一株分离自混合羽毛的土壤细菌 GIMN1.015 具有降解羽毛的能力。利用 Biolog 鉴定方法和系统发育分析表明这株菌是一种新的细菌, 初步鉴定结果为芽孢八叠球菌。两次 Biolog 鉴定结果, 都为“NO ID”, 因而无法依靠 Biolog 鉴定系统确定菌株 GIMN1.015 的具体分类, 需要与其他鉴定手段相结合进行菌种鉴定。尽管如此, 从图 1 的进化树中可以发现, 菌株 GIMN1.015 与芽孢八叠球菌模式菌株 *Sporosarcina koreensis* DSM 16921^T 亲缘关系最近, 同源性为 99.6%。尽管 Kluver 和 van Niel

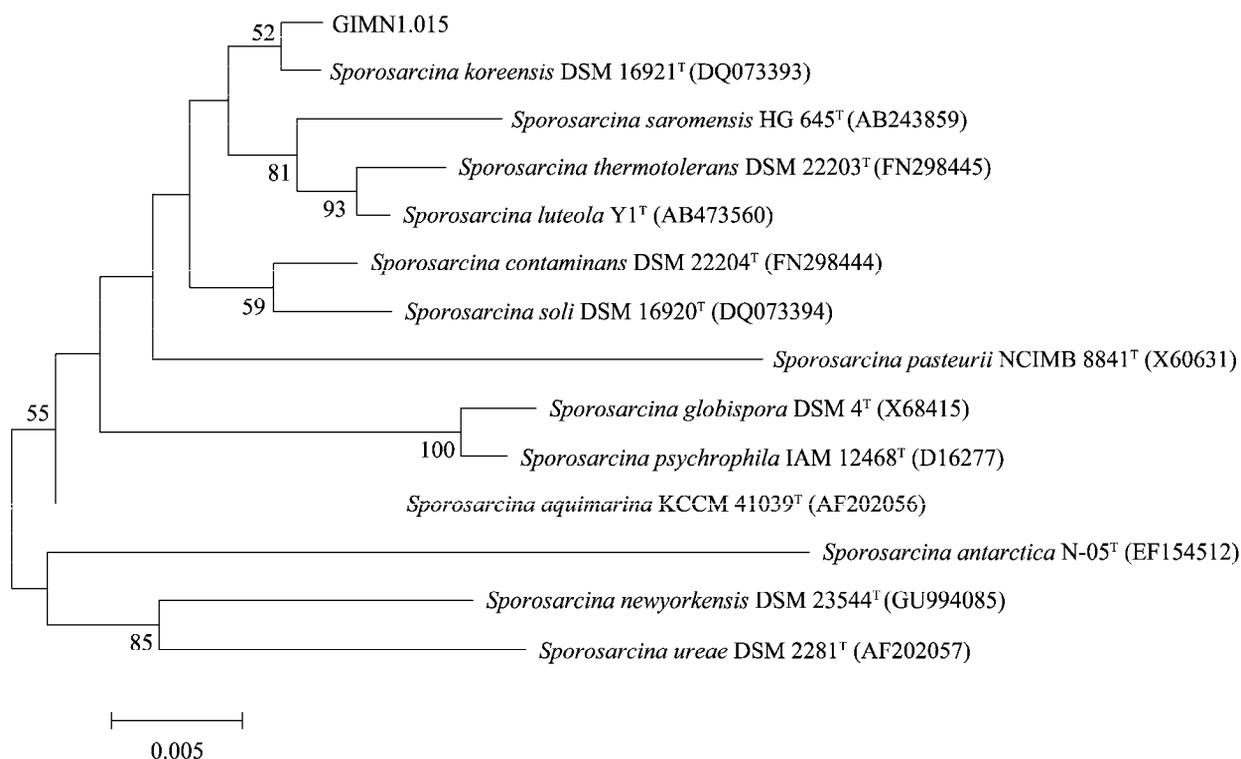


图 2 利用 16S rRNA 基因序列构建的菌株 GIMN1.015 的 N-J 系统发育进化树

Fig. 2 N-J phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain GIMN1.015

注: 图中分支上数字表示树形>50 的解靴值; 括号内为 GenBank 登录号; 黑体字表明试验菌株; 比例尺表示每个位点的核苷酸置换率 0.005.

Note: The figures on the branches indicate the bootstrap values above 50. GenBank accession numbers are in the parenthesis. Word in boldface indicates the tested strain. The scale bar represents 0.005 substitutions per nucleotide position.

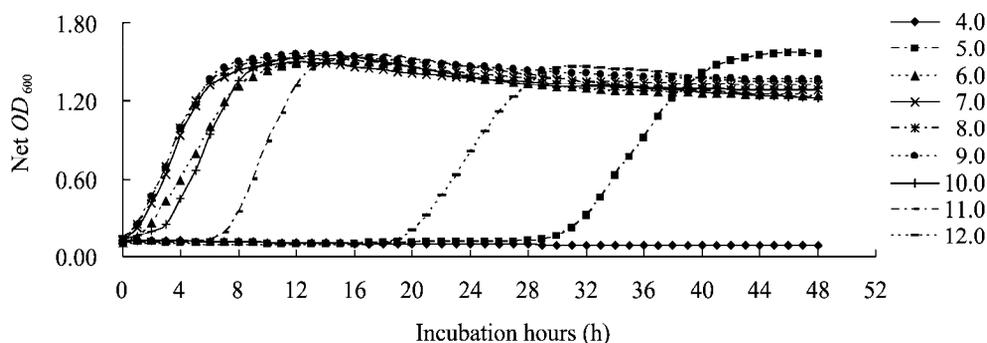


图 3 菌株 GIMN1.015 在不同起始 pH 条件下的生长曲线图(30 °C)

Fig. 3 Growth curve of strain GIMN1.015 under different initial pH (30 °C)

于 1936 年首次发现 *Sporosarcina* 属^[18], 但是该属的其他菌株均是在 2001 年后才逐渐被报道(J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in

Nomenclature-Genus *Sporosarcina*, <http://www.bacterio.cict.fr/s/sporosarcina.html>)或重新命名^[19], 除此以外, Biolog 系统数据库的建立和改进均在

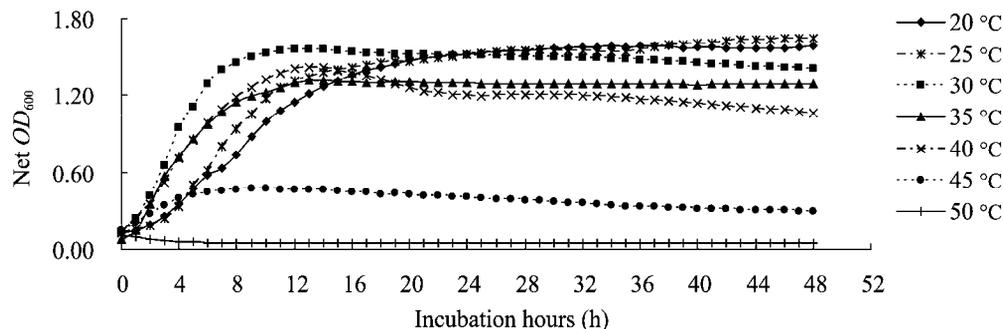


图4 菌株 GIMN1.015 在不同温度条件下的生长曲线图(pH 7.4±0.2)

Fig. 4 Growth curve of strain GIMN1.015 under different temperature (pH 7.4±0.2)

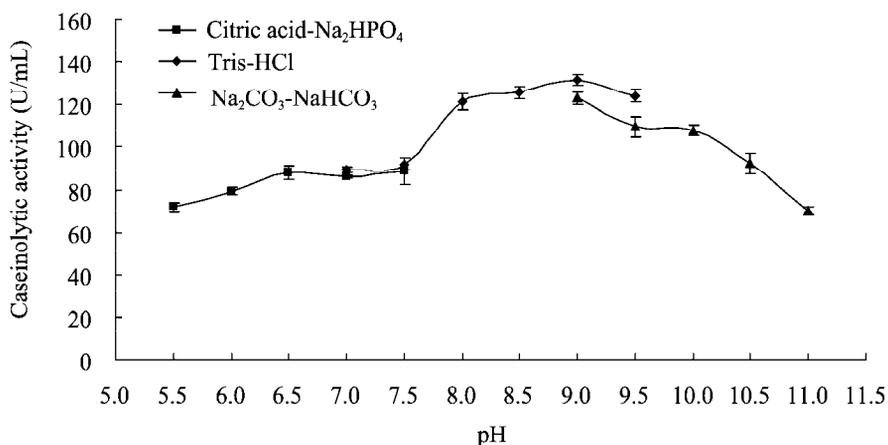


图5 菌株 GIMN1.015 蛋白酶活的最适 pH

Fig. 5 The optimal pH of caseinolytic activity for strain GIMN1.015

2000 年前完成, 数据库涵盖范围有限, 因此 *Sporosarcina* 属内绝大多数菌种的代谢特征都未包含在 Biolog 鉴定系统数据库范围内, 所以无法根据菌株 GIMN1.015 对鉴定板上碳源的利用情况确定其分类。但有趣的是, 多株 *Sporosarcina* 属的模式菌株在重新命名之前的分类地位都归于 *Bacillus* 属^[19], 这与 Biolog 给出的参考结果是相符的(表 1)。结合 Biolog 鉴定以及 16S rRNA 基因序列系统发育分析的结果, 初步判定菌株 GIMN1.015 为芽孢八叠球菌 (*Sporosarcina*)。

通过全自动生长曲线分析仪 BioScreen

C MBR, 可以准确地对菌株 GIMN1.015 的生长状况进行实时监测, 最适生长起始 pH 为 9.0, 最适生长温度为 30 °C (图 3、图 4)。有研究实验利用 BioScreen C 可快速准确地对菌株的发酵条件进行优化^[20], 监测分析代谢物质的变化^[21], 都表现出优异的性能。本研究中的代谢底物为天然羽毛, 因而无法结合 BioScreen C MBR 进行酶活动态研究。

本文实验结果表明, 在 48–96 IH 范围内, 蛋白酶活性增幅最大, 在 96 IH 时达到最大, 同时伴随大量羽毛的开始降解, 96 IH 后, 蛋白酶活性趋于下降, 但是幅度较小, 这时培养基中的羽毛

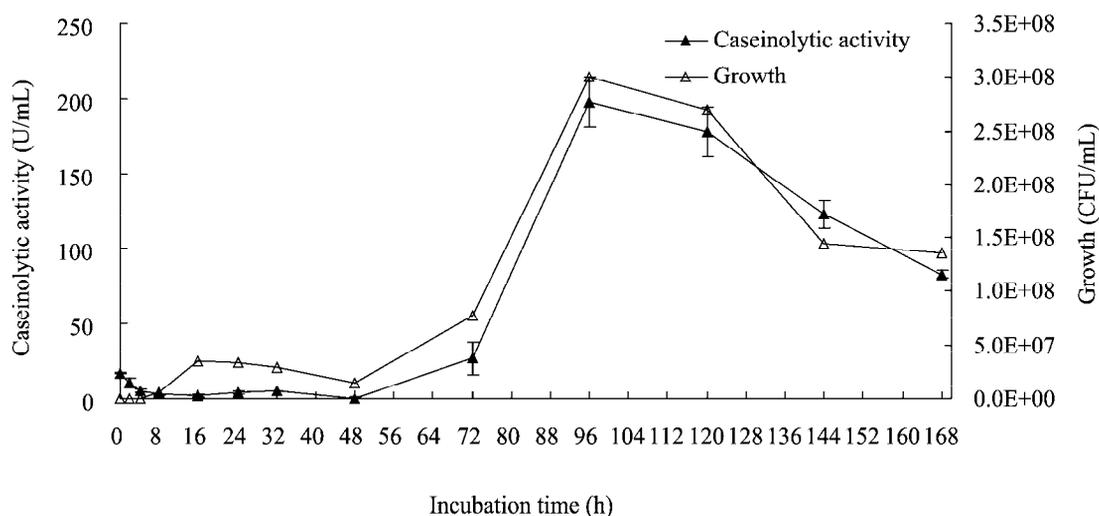


图 6 菌株 GIMN1.015 蛋白水解活性-时间曲线图
Fig. 6 Caseinolytic activity-time curve of strain GIMN1.015

逐渐分解为羽毛碎屑(图 6)。细菌数量的测定结果显示, 菌株 GIMN1.015 在 48 IH 时进入对数生长期, 同时蛋白酶活性呈线性增长。Park 等^[22]报道的巨大芽孢杆菌 F7-1 经过 30 °C 培养 4 d 后多数羽毛发生降解, 且观测到的最大酶活出现在对数生长期后期。Sahoo 等^[23]分离到的一株角蛋白降解芽孢杆菌 PKD 5, 经过培养 10 d, 发现在第 7 天菌体处于对数生长阶段, 而此时酶活达到最大。而汤兴俊与何国庆^[24]在研究 *B. subtilis* ZJF-1A5 的 β -葡聚糖酶时也发现, 该酶的产生与菌体生长部分相关, 在细胞进入对数生长后期至稳定期, 酶活性显著增加。夏静等^[25]分离筛选到的一株产异淀粉酶的栖热菌 (*Thermus*)。该菌在 8-19 h 为对数生长期, 20 h 后进入稳定期, 进入稳定期后产酶迅速提高, 39 h 产酶量达最高。根据这些研究结果, 我们推测菌体的生长、酶活峰值的出现和羽毛降解三者 在时间上出现顺序可能因菌株的不同而有所差异。

本研究中菌株的最适生长 pH 和最适生长温度都是采用 NB 培养基, 发现在 pH 9.0 和 30 °C

时生长最好(图 3、图 4), 在 8 IH 达到高峰, 进入稳定期。值得注意的是, 在添加羽毛的 NB 培养基中研究菌株的生长和酶活时, 菌株生长在 16 IH 出现一个小的峰值(3.5×10^7 CFU/mL), 然后在 96 IH 出现生长高峰(3.0×10^8 CFU/mL), 这个生长高峰与试验中观察到的羽毛大量降解的出现时间一致(图 6)。这表明, 添加羽毛对 GIMN1.015 的生长模式产生影响, 这也为利用该菌株进行羽毛发酵提供参考。

本文中的菌株 GIMN1.015 分离自混合羽毛的土壤中, 经 Biolog 鉴定与系统发育进化分析, 判定其属于芽孢八叠球菌属, 推测极有可能是一种新的菌株。酶活分析结果表明菌株的最适生长起始 pH 为 9.0, 最适生长温度为 30 °C, 在 96 IH 时酶活达到最大。这是芽孢八叠球菌在羽毛降解方面的首次报道, 本文的研究结果拓宽了人们对羽毛角蛋白降解微生物类群的新认识。

参 考 文 献

- [1] 孟建宇, 李贵春. 羽毛角蛋白: 一种新的蛋白资

- 源[J]. 内蒙古科技与经济, 2003(2): 103-104.
- [2] Agrahari S, Wadhwa N. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant[J]. International Journal of Poultry Science, 2010, 9: 482-489.
- [3] 2009年中国主要畜禽年末存栏量、年内出栏量及当年产品量[J]. 养猪, 2011(3): 8.
- [4] 2010年中国主要畜禽年末存栏量、年内出栏量及当年产品量[J]. 养猪, 2012(4): 9.
- [5] 李闻欣. 废弃羊毛、禽毛角蛋白的降解及资源化利用研究[D]. 西安: 陕西师范大学博士学位论文, 2008.
- [6] Tompkin RB, Mcnamara AM, Acuff GR. Meat and poultry products[M]. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Downes, Ito K, Washington, DC: American Public Health Association, 2001: 4, 676.
- [7] Tseng FCJ. Biofibre production from chicken feather[D]. Waikato: University of Waikato master, 2011.
- [8] Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1735-1750.
- [9] Kornilowicz-Kowalska T, Bohacz J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects[J]. Waste Management, 2011: 1689-1701.
- [10] Karthikeyan R, Balaji S, Sehgal PK. Industrial applications of keratins-A review[J]. Journal of Scientific and Industrial Research, 2007, 66(9): 710-715.
- [11] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(1): 21-33.
- [12] 王晶. 一株新的羽毛角蛋白降解菌的鉴定, 研究与应用[D]. 上海: 东华大学硕士学位论文, 2006.
- [13] 程池, 杨梅, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54.
- [14] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 科学出版社, 2001: 419.
- [15] Heuer H, Krsek M, Baker P, et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3233-3241.
- [16] Sohal VK, Dey A, Singh A. MEGA biocentric software for sequence and phylogenetic analysis: a review[J]. International Journal Bioinformatics Research and Applications, 2010, 6(3): 230-240.
- [17] Radha S, Gunasekaran P. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(4): 1301-1310.
- [18] Kluyver AJ, van Niel CB. Prospects for a natural system of classification of bacteria[J]. Zentralbl Bakteriologie Abt II, 1936, 94: 369-403.
- [19] Yoon JH, Lee KC, Weiss N, et al. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(3): 1079-1086.
- [20] Okubo T, Suzuki T, Fujita K, et al. Postantibiotic effects (PAE's) of macrolide antibiotics evaluated using Bioscreen C

