

白腹皮蠹幼虫肠道细菌分离及鉴定

秦 浩, 李志鹏, 李林懋, 刘玉升*, 郑继法

(山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

摘 要: 为了研究白腹皮蠹幼虫肠道环境中的细菌种类, 从中分离、纯化、培养, 获得 6 个细菌菌株, 对其培养性状、染色反应、菌体形态、生理生化反应进行系统研究。鉴定结果表明, 上述 6 个细菌菌株分别属于坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*)、气微菌属 (*Aeromicrobium* Miller, Woese and Brenner, 1978)、浸麻芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* Rosenback, 1884)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)。从白腹皮蠹肠道环境中分离出 6 个菌株, 鉴定出分类地位, 菌株之间的数量存在明显差异, 以巨大芽孢杆菌数量最多 (5.32×10^{19}), 需要进一步研究该 6 个菌株在白腹皮蠹肠道环境中的具体作用, 以期寻求有效防治白腹皮蠹的新途径。

关键词: 白腹皮蠹; 肠道细菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S433.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)03-0482-05

Isolation and identification of intestinal bacterial flora of *Dermestes Maculatus Degeer* larvae

QIN Hao, LI Zhi-peng, LI Lin-mao, LIU Yu-sheng, ZHENG Ji-fa

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: In order to study the bacterial population of the larvae of *Dermestes Maculatus Degeer*, six kinds of bacteria were isolated from the larvae of *Dermestes Maculatus Degeer* after separation and purification. In addition, the bacterial modality, dyeing reaction, cultural character and physiological and biochemical reactions were studied systematically. The identification results showed that the six bacteria belong to *Bacillus firmus*, *Aeromicrobium*, *Bacillus macerans*, *Staphylococcus*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus brevis*, respectively. The significant differences among the counts of the 6 strains isolated from the larvae of *Dermestes Maculatus Degeer* were observed, and *Bacillus megaterium* was the predominant species (5.32×10^{19}). The specific function of each bacterium on the larvae of *Dermestes Maculatus Degeer* need to be further studied for finding an effective method to prevent *Dermestes Maculatus Degeer*.

Key words: *Dermestes Maculatus Degeer*; intestinal bacteria; isolation; identification

白腹皮蠹 (*Dermestes Maculatus Degeer*), 在昆虫分类学中属鞘翅目 (Coleoptera), 皮蠹科 (Dermestidae), 皮蠹属 (*Dermestes*)。白腹皮蠹是一种防除难度较大的仓库害虫, 它对高温、低温、干燥的抵抗力均很强^[1], 环境条件适宜时繁殖很快^[2], 对许多药剂有显著抵抗力^[3]。该虫多危害动物性物品和食品, 如毛皮、干肉、干鱼类、鱼粉、血干, 含油脂较多的皮张, 若及时发现、处理, 则使皮板等遭受破坏, 严重影响其经济价值^[4]。白腹

皮蠹幼虫体毛、体壁、足等处还可以携带粉螨, 随其活动而扩散, 并且虫、螨的排泄物都污染食品, 给人体健康带来不良的影响^[5]。所以, 白腹皮蠹是对内对外检疫和消毒的重要对象。近年来由于人民生活水平的提高和出口需要, 肉制食品和皮毛产品不断增加, 白腹皮蠹严重影响其质量。

在研究昆虫生物学、生态学的影响因素中, 研究温度、湿度、光照、食物等虫体外界影响因素的较多, 但对昆虫肠道微生物的研究与阐述较少^[6]。

收稿日期: 2012-11-02

基金项目: 天津农业环保检测所项目(201103027)资助。

作者简介: 秦 浩, 男, 硕士研究生。E-mail: qinhaosym@126.com

* 通信作者: 刘玉升, 男, 副教授。E-mail: ysl8877@163.com

昆虫肠道系统是伴随昆虫取食、消化、排泄等活动而多变的环境^[7], 近几年对一些重要昆虫的肠道微生态研究日渐活跃^[8-9], 但目前对昆虫肠道的正常微生物群和昆虫的营养生理活动之间的关系研究较少, 尚未涉及通过微生态调节从而影响昆虫的生命活动的方面。有些昆虫不能直接利用食物中的某些营养成分, 必须借助体内共生物的作用来帮助消化食物, 从而促进营养物质的代谢和转化, 而这些共生物主要是肠道微生物^[10]。肠道微生物对宿主具有生物刺激、生物拮抗、营养、免疫等作用, 是昆虫机体的生理组成部分。

到目前为止, 在人体、家畜家禽的微生态方面, 国内外已做了比较系统的研究, 从机制理论的阐明到实践应用均做了大量的工作。而对于作为自然界中最具有代表性的生物类群之一的昆虫, 微生态领域的研究却十分薄弱, 目前只对具有重要经济价值的家蚕有全面的研究, 而对其他几种如天牛、黄粉虫、褐飞虱、龟纹瓢虫、蜜蜂等也只是开展了基础性研究。随着科学技术的迅猛发展, 昆虫微生态领域的研究也将迅速展开。

本实验对白腹皮蠹幼虫的肠道微生物进行了分离、培养及鉴定, 重点研究了肠道细菌, 为研究白腹皮蠹幼虫肠道微生物的种类、作用以及进一步探讨其对白腹皮蠹生命活动的影响奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 虫源及其饲料 试虫为山东农业大学植保学院昆虫繁育试验场繁殖黄粉虫所用木质养殖盒中的

白腹皮蠹, 主要取食新鲜的黄粉虫死虫。

1.1.2 培养基 NA 培养基、NB 培养基、PDA 培养基、金氏培养基 B 等^[11]。

1.2 实验方法

1.2.1 试虫获取 在黄粉虫养殖场中规格为 80 cm × 40 cm × 6 cm 的饲养盒中, 放置 6~8 龄黄粉虫幼虫, 每盒虫量 2~2.5 kg, 每周筛除虫粪、添加饲料, 每 2 d 添加菜料。以该黄粉虫养殖场养殖盒中的白腹皮蠹为供试昆虫。

1.2.2 肠道微生物的分离^[12] 选取白腹皮蠹幼虫 20 只, 杀死后分别放入 75% 的酒精中浸泡 10 s, 在无菌操作下取出虫体并放在 0.1% 升汞液中消毒 2 min, 移入灭菌水中清洗, 然后在蜡盘中进行无菌解剖。分别取出其消化道, 在灭菌研钵中研磨。将研磨液用灭菌水稀释至 10⁻¹~10⁻⁹。取 10⁻⁷、10⁻⁸ 和 10⁻⁹ 3 个稀释度用平板稀释法和涂抹法进行分离, 各稀释度重复 3 次, 分别置于 30 ℃ 的 GXZ 型智能光照培养箱中培养 72 h, 各挑取表征各异的菌落在 NA 平板上划线、纯化、培养。将纯化后菌落再分别移植斜面培养, 并按出现数量多少依次编号。

1.2.3 肠道细菌的鉴定 将白腹皮蠹肠道中分离纯化的各细菌菌株的菌体进行形态染色, 观察其培养性状并进行生理生化测定, 按照有关文献进行鉴定^[13-17]。

2 结果与分析

通过对白腹皮蠹幼虫肠道环境细菌的分离纯化, 获得 6 个细菌菌株。经整理统一编号, 对 6 个菌株进行了鉴定试验。

表 1 白腹皮蠹幼虫肠道细菌形态特征及培养性状

Table 1 Bacterial modality and cultural character of intestinal bacteria in *Dermestes Maculatus Degeer*

菌株编号 Strain code	菌体形状 Thallus shape	革兰染色 Gram-staining	鞭毛 Flagellum	芽孢 Spore	培养形状 Cultural character
1	杆状 Bacillus	G+	有 Have	有 Have	菌落圆形, 表面粗糙, 边缘整齐, 稍凸起, 不透明, 乳白色, 生菌环, 底部沉淀。
2	杆状 Bacillus	G+	无 None	无 None	菌落圆形整齐, 表面粗糙湿润, 有光泽, 不透明, 灰白色, 生菌环, 产生絮状沉淀。
3	杆状 Bacillus	G+	有 Have	有 Have	菌落不规则, 表面粗糙, 边缘波状扩展, 半透明, 乳白色, 生菌膜, 有沉淀。
4	球状 Globular	G+	无 None	无 None	菌落圆形, 表面粗糙, 边缘整齐, 稍凸起, 不透明, 乳白色, 生菌膜, 底部沉淀。
5	杆状 Bacillus	G+	周生 Peripherally	有 Have	菌落表面粗糙, 波纹状, 半透明, 土黄色, 生菌膜, 有沉淀。
6	杆状 Bacillus	G+	周生 Peripherally	有 Have	菌落椭圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 稍凸起, 不透明, 乳白色, 液体混浊有沉淀。

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

Note: “+” represents positive, and “-” presents negative.

表 2 白腹皮蠹幼虫肠道细菌生理性状
Table 2 Physiological characteristics of intestinal bacteria in *Dermestes Maculatus Degeer*

编号 Strain No.	温度/°C Temperature						pH					NaCl/%			
	10	15	30	37	42	55	3	5	7	9	11	2	5	7	10
1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
4	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

注：“+”表示阳性,表明该条件下菌株扩繁;“-”表示阴性,表明该条件下菌株死亡。

Note: “+”represents positive, under this condition, the bacterial strain will propagate rapidly; “-”presents negative, and the bacterial strain will die under this condition.

表 3 白腹皮蠹幼虫肠道细菌生化反应
Table 3 Biochemical reactions of intestinal bacteria in *Dermestes Maculatus Degeer*

项目 Item	菌株编号 Strain No.							CK
	1	2	3	4	5	6		
氧化酶 Oxidase	-	+	+	+	+	+	+	
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	+	+	-	
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	++	--	++	--	++	--	--	
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	++	--	++	--	--	--	--	
精氨酸双水解酶 Arginine double enzymolysis	++	--	++	++	++	++	--	
硝酸盐还原 Nitrate reductase	+	-	+	+	+	+	-	
H ₂ S 产生 H ₂ S producing	+	+	+	+	+	+	-	
吲哚产生 Indole producing	-	-	-	-	-	-	-	
甲基红 (M.R) 试验 Methyl-red test	-	-	-	-	-	-	-	
V.P 试验 V.P test	-	+	-	-	-	-	-	
明胶液化 Gelaune liquefaction	+	+	-	+	-	+	-	
葡萄糖 Glucose	++	++	++	++	++	++	--	
蔗糖 Sugar	++	++	++	--	--	--	--	
麦芽糖 Maltose	++	++	++	++	++	++	--	
乳糖 Lactose	++	++	++	++	++	++	--	
纤维二糖 Cellose	--	++	--	--	++	++	--	
木糖 Xylose	--	--	--	--	--	++	--	
半乳糖 Galactose	++	++	++	++	++	++	--	
棉籽糖 Raffinose	++	++	++	++	++	++	--	
甜醇 Dulcitol	++	++	++	++	++	++	--	
鼠李糖 Rhamnose	+	-	-	-	+	+	-	
海藻糖 Trehalose	++	++	++	++	++	++	--	
阿拉伯糖 Arabinose	++	++	++	++	++	++	--	
肌醇 Inositol	++	++	++	++	++	++	--	
甘露糖 Mannose	++	++	++	++	++	++	--	
甘露醇 Mannitol	++	++	++	++	++	++	--	
山梨醇 Sorbitol	++	++	++	++	++	++	--	
果糖 Fructose	++	++	++	++	++	++	--	
七叶灵水解 Esculin hydrolysis	-	-	+	-	+	+	-	
淀粉水解 Strach hydrolysis	+	+	+	+	+	+	-	
柠檬酸钠 Sodium citrate	-	-	-	-	-	+	-	
丙二酸钠 Sodium malonate	-	-	-	-	-	+	-	

注：“+”表示阳性;“-”表示阴性。Note: “+” represents positive, and “-” presents negative.

表 4 白腹皮蠹成虫肠道细菌鉴定结果及存在的数量
Table 4 Identification results of bacteria in intestinal and their quantities

菌株编号 Strain No.	鉴定结果 Identification result	存在数量 Quantity
1	坚强芽孢杆菌 <i>Bacillus firmus</i>	2.55×10^{17}
2	气微菌属 <i>Aeromicrobium</i>	7.84×10^{17}
3	浸麻芽孢杆菌 <i>Bacillus macerans</i>	6.62×10^{18}
4	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	9.21×10^{17}
5	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	5.32×10^{19}
6	短芽孢杆菌 <i>Bacillus brevis</i>	4.38×10^{16}

2.1 菌体形态和培养性状

供试菌株在 NA 培养基上培养 24 h, 按照革兰染色法和 3% KOH 简易法^[13], 区别 6 个菌株, 6 个菌株均呈革兰阳性反应。经油镜观察和按照磷钨酸负染法电镜观察, 5 个菌株呈杆状 1 个菌株呈球状。将分离纯化的供试菌在 NA 和 NB 培养基上 28℃ 培养 48 h 后观察记载, 9 个菌株在 2 种培养基各呈不同的表现 (见表 1)。

2.2 供试菌株生理性状

供试菌株在不同温度 (°C)、不同氢离子浓度 (pH) 和不同 NaCl 浓度条件下, 接种培养不同时间, 观察检查记载结果 (表 2)。从表 2 可知, 供试菌株在不同温度、不同 pH 和不同 NaCl 浓度下培养, 所有菌株均在 15~42℃, pH 5.0 (±)~11.0 (±), 2%~5% NaCl 条件下生长良好。在 10℃ 低温下只有 6 号菌株能够正常生长; 在 55℃ 高温下, 只有 3 号和 5 号菌株不能正常生长; 在 10% NaCl 条件下只有 2、4、5 号菌株可以正常生长。

2.3 供试菌株生化性状

对供试 6 个菌株生化性状测定, 氧化酶、过氧化氢酶、鸟氨酸脱氢酶等 5 种, 4 种氮素化合物和糖醇苷以及其他碳素化合物 23 种, 其试验结果见下表 3。

由下述实验结果可知, 供试 6 个菌株均分解利用葡萄糖、甜醇、山梨醇、甘露醇、半乳糖、棉籽糖、麦芽糖、乳糖, 但 6 个菌株甲基红 (M.R) 实验均呈阴性, 都不产生吲哚, 其他生化测定项目各异。

2.4 菌株鉴定

根据其培养性状、菌体形态、染色反应、生理生化性状等进行的试验, 上述 6 个细菌菌株分别属于坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*)、气微菌属 (*Aeromicrobium* Miller, Woese and Brenner, 1978)、浸麻芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* Rosenback, 1884)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和短芽孢杆菌 (*Bacillus*

brevis)。由表 4 可知这 6 个细菌菌株在白腹皮蠹肠道环境中的数量差别较大, 以巨大芽孢杆菌数量最大 (5.32×10^{19})。

3 讨论

昆虫纲种类多、食性杂、生存环境多变、进化历史悠久^[18], 昆虫与共生物之间建立了复杂的协同进化关系, 不同类群均有代表性种类并行使不同的功能^[19]。早在 1850 年, 人们就已经发现一些昆虫的内部器官含有共生微生物, 它们一般存在于某些特殊的细胞内, 尤其在消化道和脂肪体内最为常见。沃尔巴克菌 (*Wolbachia*) 最早在库蚊 (*Culex pipiens*) 卵巢中发现, 为细胞内共生菌; 类酵母共生菌 (*Yeastlike symbiotes*, YLS) 是稻飞虱体内脂肪体细胞中的共生菌; 冰核细菌 (*Ice nucleating active bacteria*, INA) 是一类广泛存在于自然界, 能够提高棉铃虫、天牛等越冬昆虫过冷却点的共生菌。通过选择不同生存环境和食性的昆虫种类来加以系统比较的研究, 来分析捕食性昆虫、植食性昆虫、土壤昆虫、水生昆虫以及杂食性昆虫种类的肠道微生物区系的动态变化, 进一步定向分析其主要细菌菌株的功能, 并与食物的营养成分进行关联分析。

通过本实验得知了白腹皮蠹幼虫肠道环境中的细菌种群类型以及每个细菌菌株的数量, 但昆虫中肠道微生物的类群和数量与其所取食的食物存在很密切的关系, 取食不同的白腹皮蠹幼虫肠道环境中的细菌菌株的种类和数量存在差别, 因此可以通过饮食成分的改变来研究其肠道细菌的功能^[20]。本实验的研究对象是以黄粉虫养殖场中死亡黄粉虫为食的白腹皮蠹。期望通过该研究, 进一步得知 6 个菌株在白腹皮蠹肠道环境中的具体作用, 以期寻求有效防治白腹皮蠹的新途径, 减少黄粉虫养殖场的经济损失, 提高经济效益。

对白腹皮蠹肠道菌群的后续研究可以在以下几个方面展开: (1) 对白腹皮蠹不同生长阶段肠道细菌有何异同, 有待进一步研究; (2) 通过分子技术

对共生菌群进一步分离和鉴定,已完全确定白腹皮蠹体内的菌群组成;(3)进一步对较大数量菌株的具体功能和作用进行研究;(4)进一步开展较大数量菌株对宿主昆虫营养贡献机理的分子机制的研究。

参考文献:

- [1] 罗佑珍,李云. 白腹皮蠹的生物学特性及温湿度对其生长的影响[J]. 云南农业大学学报, 1988, 11(2): 209-210.
- [2] 轩静渊,李隆术. 白腹皮蠹的繁殖特性[J]. 四川动物, 1989, 15(3): 12-14.
- [3] 陈浮舟. 环氧乙烷杀灭皮张害虫—白腹皮蠹[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1986, 13(5): 36-37.
- [4] 林冠伦,钱贻隼,丁洪富. 为害肉制食品的拟白腹皮蠹[J]. 植物检疫, 1982, 20(6): 16-17.
- [5] 轩静渊. 白腹皮蠹幼虫的飞翔特点[J]. 西南农业大学学报, 1989, 5(3): 246-247.
- [6] 北京农业大学. 昆虫学通论[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 472-474.
- [7] 刘玉升,叶保华,张丽,等. 黄粉虫不同虫态肠道细菌分离及鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 12 (10): 11-33.
- [8] 郭郢,陈永林,卢宝康. 中国巨蝗生物学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 82-83.
- [9] 唐庆峰,金清,吴振廷,等. 中华真地鳖低龄虫消化道结构及取食习性[J]. 昆虫知识, 2004, 41(6): 575-577.
- [10] Visotto L E, Oliveira M G A, Uedes R N C G, et al. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*[J]. Journal of Insect Physiology, 2009, 55: 185-191.
- [11] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 179-184.
- [12] 王付彬,刘玉升. 小碎斑鱼蛉幼虫肠道细菌分离及鉴定研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010 (5): 15-55.
- [13] 郑继法. 区别格兰氏阴性和阳性菌的简易快速试验[J]. 山东农业大学学报, 1984, Z1: 1-2.
- [14] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 184-289.
- [15] 戈登 R E, 海恩斯 W C, 帕格 C H N. 蔡妙英, 等译. 芽胞杆菌属[M]. 北京: 农业出版社, 1983: 21-90.
- [16] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [17] 布坝南 R E, 吉本斯 N E. 中国科学院微生物研究所译. 伯杰鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [18] 彩万志,庄雄飞,花保祯,等. 普通昆虫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
- [19] 彩万志. 昆虫体内共生物的功能及进化[J]. 昆虫知识, 1990, 27(1): 55-58.
- [20] Hayashi A, Aoyagi H, Yoshimura T. Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect(*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103(4): 358-367.