

## 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定研究

刘玉升, 陈艳霞, 吕飞, 何华

(山东农业大学植物保护学院环境生物研究所, 山东泰安 271018)

**摘要:** 斑衣蜡蝉是自然发生于臭椿树和苦楝树的一种重要害虫, 也是一种重要的药用昆虫资源, 分布于山东省、江苏省等地。本研究从自然种群的斑衣蜡蝉成虫肠道环境中分离、纯化、培养, 获得细菌 4 个菌株, 分别对其菌体形态、染色反应、培养性状、生理生化反应进行了系统研究。鉴定结果表明: 4 个细菌菌株均为兼性厌氧芽孢杆菌, 1 号菌株为多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*), 2 号菌株为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 3 号菌株为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 4 号菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。在斑衣蜡蝉成虫肠道环境中存在的不同细菌之间的数量具有明显差异。

**关键词:** 斑衣蜡蝉; 肠道细菌; 鉴定

中图分类号: S436 文献标识码: A 文章编号: 1000-2324(2006)04-0495-04

### STUDY ON THE PRIMARY IDENTIFICATION OF INTESTINAL BACTERIA

#### *N Lycoma delicatula* (White)

LU Yu-sheng CHEN Yan-xia Lü Fei HE Hua

(Institute of Environmental Biology, College of Plant Protection Shandong Agricultural University, Taian 271018)

**Abstract** *Lycoma delicatula* (White) is a kind of pest insect on tree of heaven and plant of Meliaceae. It is also a kind of important resource insect for medicine. Four bacteria strains were isolated from the intestinal of the adults. The modality, bacteria dyeing reaction, culture character and physiological and biochemical reactions were studied systematically. The result of identification was that No. 1 is *Bacillus polymyxa*, No. 2 is *Bacillus licheniformis*, No. 3 is *Bacillus megaterium*, No. 4 is *Bacillus subtilis*. And the quantity of different bacteria strains were significantly different in intestinal environment of the adult *Lycoma delicatula*.

**Key Words** *Lycoma delicatula*, Intestinal bacteria, Identification

蜡蝉科是同翅目的一个大科, 全世界已知 700 多种, 我国已知 20 多种, 斑衣蜡蝉 *Lycoma delicatula* (White) 是其中常见的代表种<sup>[1]</sup>, 刺吸危害, 寄主有臭椿树、苦楝树等。

昆虫的生命活动受到虫体内外各种不同环境因素的影响, 对于温度、湿度、光照、食物等虫体外界影响因素的研究较多, 但对昆虫肠道微生物的研究与阐述较少。昆虫体内共生物与消化和营养之间存在密切的关系, 昆虫肠道系统是伴随取食、消化、排泄等活动而多变的环境, 其中寄居的正常微生物群与昆虫的营养生理活动发生着密切的关系<sup>[2]</sup>, 通过微生态调节而影响到昆虫的生命活动。国内外研究的种类有家蚕<sup>[3-7]</sup>、桑粒肩天牛<sup>[8]</sup>、日本龟蜡蚧<sup>[9]</sup>、黄粉虫与黑粉虫<sup>[10]</sup>、东亚飞蝗<sup>[11]</sup>等。

在自然环境中, 斑衣蜡蝉是一种危害臭椿树的重要害虫; 另一方面, 又是一种重要的药用昆虫资源, 体内所含斑蝥素是治疗肿瘤类病变的有效物质<sup>[12]</sup>。为了深入研究斑衣蜡蝉的营养生理状况, 特对斑衣蜡蝉成虫的肠道细菌进行了研究。

收稿日期: 2005-08-18

基金项目: 科技部《环境微生物菌种资源整理、整合》项目 (编号 2005DKA21201-1-1)

作者简介: 刘玉升 (1964-), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫学和环境生物学。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 虫源 试虫为山东农业大学校园和泰山自然生长的多年龄臭椿树上发生的斑衣蜡蝉成虫。

1.1.2 培养基 NA 培养基、NB 培养基、K'B 培养基等<sup>[12]</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试虫保存饲养 在温室外露地环境中移栽多年龄臭椿树桩 5 株, 周围密集栽培实生臭椿树苗, 将自校园及泰山采集的自然虫源放养其上, 任其自由生活, 由于对寄主臭椿的依赖而不远离, 实验时采集即可。

1.2.2 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的分离与纯化 选取健康的斑衣蜡蝉成虫活体 6 只, 分别放入 75% 酒精溶液中浸泡 2min 杀死, 在无菌操作下取出虫体并放在 0.1% 升汞液中消毒 2min 移入灭菌水中清洗, 然后在蜡盘中进行无菌解剖, 去掉翅和足, 解剖出肠道, 称取 0.5g 研磨, 加无菌水 10ml 制成研磨液, 稀释至  $10^{-8}$ , 备用。取  $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  3 个稀释度、各吸取 0.2ml 用涂抹法进行分离, 各稀释度重复 3 次, 分别置于 30℃ 的 GXZ 型智能光照培养箱和 YQX 型厌氧培养箱中培养 72h 挑取表征各异的菌落在 NA 平板上划线、纯化。

1.2.3 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定 对纯化后已编号的各菌株进行革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色、生理生化测定等试验。按有关文献进行鉴定。

1.2.4 肠道细菌的数量测定与计算 将斑衣蜡蝉成虫肠道细菌悬浮液定量稀释后, 取一定量不同稀释度的细菌悬浮液, 分别在琼脂平板上培养 72h 选取菌落生长稀疏、适当稀释度计算菌落数, 求出三个重复的平均值。计算出 g/ml 肠道中的细菌数。每克 (毫升) 肠道中的细菌数 (菌落形成单位) = 平板上菌落数 × 稀释倍数 / 平板上加菌液的量 (ml)。

## 2 试验结果

### 2.1 菌体形态和培养性状

供试菌株在 NA 培养基上培养 24h 按照格兰氏染色法和 3% KOH 简易法, 4 个细菌菌株, 均呈格兰氏阳性反应。经油镜观察和按照磷钨酸钠负染法电镜观察, 4 个菌株均为杆状菌, 并均具周生鞭毛。将分离纯化的供试菌株在 NA 和 NB 培养基上, 28℃ 培养 48h 后观察记载, 4 个菌株在两种培养基上各呈不同的表现 (见表 1)。

表 1 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌形态特征及培养性状

Table 1 Modality and culture shape of bacteria in intestinal of *Lycoma delicatula*

菌株 编号 Strain No	菌体 形状 Modality	格兰氏 染色 Gram's dyeing	鞭毛 Flagellum	芽 孢 spore	需氧情况 Aerobic situation	培养性状 Culture shape
1	杆状	G+	周生	有	兼性厌氧	菌落圆形, 较大, 稍突起, 边缘不整齐, 表面光滑或呈细颗粒, 乳白色, 不透明。培养液上层绿色或有菌膜产生。
2	杆状	G+	周生	有	兼性厌氧	菌落不规则形状, 扩展, 边缘裂叶状。表面光滑, 乳白色, 不透明。培养液上层绿色, 浑浊。
3	杆状	G+	周生	有	厌氧	菌落规则放射叶状, 皱纹状突起, 边缘裂叶状。表面粗糙, 颗粒状, 乳白至淡黄色, 不透明, 培养液上层有菌膜, 不浑浊。
4	杆状	G+	周生	有	兼性厌氧	菌落圆形, 边缘整齐。表面粗糙, 淡褐色, 不透明, 培养液上层有菌膜, 浑浊。

由表 1 可知, 从斑衣蜡蝉肠道分离出的 4 个菌株, 均为芽孢杆状菌, 偏兼性厌氧。

### 2.2 供试细菌菌株生理性状

供试细菌菌株在不同温度 (℃)、不同氢离子浓度 (pH 值) 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 值和不同 NaCl 浓度下培养, 1、3、4 号菌株在 30℃ 条件下, 2 号在 30℃ ~ 37℃ 条件下生长良好。4 个菌株最佳适应 pH 值为 6~7。NaCl 含量为 2% 的条件最适应。

表 2 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌生理性状  
Table 2 Physiological modality of bacteria in intestinal of

菌株编号 Strain No	温度℃ Temperature℃				pH 值 pH Value NaCl							含量% NaCl Content%			
	15	30	37	42	55	2	4	6	7	9	11	2	5	7	10
1	+	++	+	+	-	-	+	+++	+++	+	-	++	+	-	-
2	+	++	++	+	+	-	+	+++	++	+	-	++	+	+	-
3	+	++	+	+	-	-	-	+	+	+	-	++	+	+	-
4	+	++	+	+	-	-	+	+	++	+	-	++	+	+	-

2.3 供试菌株生化性状

对供试 4 个菌株生化性状测定, 氧化酶等 6 种, 6 种氮素化合物和糖醇以及其他碳素化合物 19 种, 其试验结果如表 3。从表 3 结果可知, 供试 4 个菌株不产生苯丙氨酸脱氨酶、氧化酶、鸟氨酸脱羧酶和吲哚, 不能利用甜醇和丙二酸钠, 都产生过氧化氢酶。其他生化测定项目各异。

表 3 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌生化测定结果  
Table 3 Results of biochemical reactions of bacteria in Tenebrionolitor intestinal

项目 Items	1	2	3	4	CK
过氧化氢酶 Cathase	+	+	+	+	-
脲酶 Urease	-	-	-	-	-
氧化酶 Oxidase+	-	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 phenylalanine	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S 产生 Production of H <sub>2</sub> S	-	+	-	-	-
吲哚产生 production of Indole	-	-	-	-	-
甲基红 (M, R) 试验 Test M, R	+	-	-	-	-
V, P 试验 Test V, P	+	+	-	+	-
明胶液化 Gelatin liquification	+	+	+	+	-
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	-
乳糖 Lactose	+	+	+	+	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	-
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+	+	-
木糖 D-Xylose	+	+	+	+	-
鼠李糖 Tartrate	+	+	+	+	-
海藻糖 Trehalose	+	+	+	+	-
棉籽糖 Raffinose	+	+	+	+	-
半乳糖 Mannose	+	+	+	+	-
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	-
山梨醇 Sorbitol	+	+	+	+	-
甜醇 Dulcitol	-	+	+	-	-
肌醇 Inositol	+	-	+	+	-
七叶灵水解 Sculin hydrolyzation	+	+	+	+	-
淀粉水解 Starch hydrolyzation	+	+	+	+	-
丙二酸钠 Sodium malanate	+	+	-	-	-
柠檬酸钠 Citric acid	-	+	+	+	-

2.4 细菌菌株鉴定及其存在数量状况

经对应检查菌体形态、染色反应、培养性状、生理生化反应等各项指标鉴定, 结果见表 4 可知上述 4

个细菌菌株分别为多粘芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌。表 4 可见,斑衣蜡蝉成虫肠道细菌各菌株存在的数量差别很大。

表 4 斑衣蜡蝉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 quantity

	鉴定结果 Identification result	存在数量 quantity
1	多粘芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	$24 \times 10^9$
2	地衣芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	$9 \times 10^9$
3	巨大芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus megaterium</i> )	$15 \times 10^9$
4	枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	$3 \times 10^8$

#### 4 结论与讨论

昆虫同其他动物一样,其消化系统为各种微生物提供适宜的生活环境,反过来,肠道微生物对宿主动物产生两方面的作用:一是助消化,为动物提供各种营养物质;二是起到益生菌的作用,调控肠道微生物区系本身之间的平衡,保证动物的健康。斑衣蜡蝉是刺吸式口器昆虫,其消化道内的菌群应由寄主植物内部、表面及空气中以及长期进化积累而来,即存在水平传递和垂直传递两种方式。本实验分离鉴定了斑衣蜡蝉消化道内 4 种细菌,均为兼性厌氧芽孢杆菌,分别为多粘芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,这明显与斑衣蜡蝉生物学特性特别是消化道对食物消化利用的特性有关。斑衣蜡蝉消化道内以芽孢杆菌居多,与芽孢杆菌对较为恶劣的环境条件适应有关。芽孢杆菌在恶劣环境条件下能产生芽孢度过不良环境,从而进行菌体的增殖再生长。斑衣蜡蝉的刺吸式口器决定了它没法如咀嚼式口器一般自由取食,它只能以刺吸臭椿树干的汁液过活,一旦外界环境条件改变,食物不充足,它便要受到饥饿的威胁,这时的芽孢杆菌便在很大程度上有抵抗外界恶劣条件的作用。

昆虫肠道微生物的研究,不但有利于昆虫资源的开发利用,而且有利于从昆虫肠道这一特殊环境中获得特殊功能的细菌资源。同时,可以通过检测肠道微生物区系的变化测定一些特殊影响因素的作用<sup>[9]</sup>,并在重要经济昆虫的生产中研制、应用微生态制剂。

#### 参考文献

- [1] 彩万志等. 普通昆虫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 312
- [2] 北京农业大学主编. 昆虫学通论 [M]. 北京: 农业出版社, 1983: 472-474
- [3] 李蒙英, 许云庄, 虞晓华等. 家蚕肠道菌群的研究 [J]. 江苏蚕业, 2000 (2): 5-7
- [4] 易发平等. 蚕肠道好氧微生物菌群的研究 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 117-119
- [5] 张剑飞, 王林玲. 家蚕  $K_{10}$ 、 $E_{12}$  肠道微生物初探 [J]. 四川蚕业, 2002 (3): 8-12
- [6] 潼泽义郎. 家蚕胃肠内好气性细菌的检索: (I) 分离培养基与活菌数量的关系 [J]. 日本蚕丝学杂志, 1968, 37(2): 295-392
- [7] 饭冢敏彦. 家蚕胃肠内好气性细菌的检索: (II) 人工饲养下的细菌检索 [J]. 日本蚕丝学杂志, 1969, 38(2): 102
- [8] 何正波, 殷幼平等. 桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的研究 [J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 741-744
- [9] 贝绍国等. 日本龟蜡蚧肠道细菌分离及鉴定研究 [J]. 山东农业大学学报, 2005, 36(2): 209-212
- [10] 张丽, 刘玉升, 刘大伟等. 黑粉虫与黄粉虫幼虫肠道细菌的比较. 华东昆虫学报, 2006, 15(1): 17-21
- [11] 刘玉升, 李明立, 刘俊展等. 东亚飞蝗肠道细菌的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(1): 51-54
- [12] 刘玉升, 叶保华. 精细养殖经济昆虫 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 71
- [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: 1-2
- [14] 陈世雄等. 文山松毛虫肠道微生物区系及感染 CPV 后的变化 [J]. 中国生物防治, 2005, 36(2): 209-212