

黑水虻幼虫肠道和体表产酶细菌的 分离和鉴定^{*}

喻国辉¹ 牛春艳^{1 2} 何国宝^{1 2} 周林^{1 3} 夏婧⁴ 程萍^{1 **}

(1. 珠海市农业科学研究中心 珠海 519075; 2. 中山大学生命科学学院 广州 510275;

3. 华中农业大学生命科学学院 武汉 430070; 4. 遵义医学院珠海校区 珠海 519401)

Isolation and identification of bacteria producing enzymes from gut and skin of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. YU Guo-Hui¹, NIU Chun-Yan^{1 2}, HE Guo-Bao^{1 2}, ZHOU Lin^{1 3}, XIA Qiang⁴, CHENG Ping^{1 **} (1. Zhuhai Agriculture Research Center, Zhuhai 519075, China; 2. Department of Life Science, Sun Yat-sun University, Guangzhou 510275, China; 3. Department of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 4. Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai 519041, China)

Abstract Ten bacterial strains were isolated from the gut, or skin, of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae, collected from the field or when feeding indoors. The strains from the gut were named S14, S15, S16, S19 and S20, and those from skin were named T2, T4, T6, T7 and T8. All strains had both protein and organic phosphate metabolic capability. The 16S rDNA sequences of these strains were cloned; BLAST analytical results identified all strains as *Bacillus* species. The *gyrB* gene, which encodes DNA gyrase B protein, was used to identify the strains to the species level; all strains were identified as *B. subtilis*. A phylogenetic tree based on the *gyrB* gene sequences of the ten strains, *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 and strain BCRC10255, indicates that the ten *B.* strains have phylogenetic relationships and that each is unique.

Key words black soldier fly, companion microbe, protein catabolism, organic phosphate catabolism, *Bacillus subtilis*

摘 要 从野外收集和室内饲养的黑水虻 *Hermetia illucens* L. 幼虫体表和肠道分离出同时具蛋白质和有机磷分解能力的细菌 10 株, 其中编号为 T2、T4、T6、T7 和 T8 的菌株分离自体表, 编号为 S14、S15、S16、S19 和 S20 的菌株分离自肠道。克隆细菌的 16S rDNA 和 DNA 促旋酶 B 亚基编码基因 *gyrB* 对 10 株细菌进行了鉴定。通过 16S rDNA 序列确定 10 株菌为芽孢杆菌属, 根据 *gyrB* 基因以及 BLAST 结果构建系统发育树, 将 10 株细菌鉴定为枯草芽孢杆菌。然后将 10 株菌的 *gyrB* 基因以 *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 和模式菌株 *B. subtilis* subsp. *subtilis* BCRC10255 相应基因序列为参照构建系统发育树, 分析 10 株菌在种的水平上的亲缘关系, 发现 10 株菌存在亲缘关系差异, 没有重复菌株。

关键词 黑水虻, 共生微生物, 蛋白质分解, 有机磷分解, 枯草芽孢杆菌

昆虫肠道系统中寄居的微生物与昆虫的营养生理活动有着密切的关系, 并影响昆虫的生命活动^[1], 肠道正常微生物群含有种类繁多的酶系统, 能参与寄主能量、物质及遗传信息转运等一系列生理过程, 是昆虫机体的生理组成部分, 如低等白蚁肠道内的功能微生物具有多种多样的产酶能力, 对白蚁消化食物和生长发育

具有重要的作用^[2, 3]。近年来国内对家蚕、蜜蜂、黄粉虫、日本龟蜡蚧、天牛、土元等肠道微生物开展了一定的研究^[4-9]。

^{*} 资助项目: 广东省农业攻关项目 (2007B020803001)。

^{**} 通讯作者, E-mail: ygh76411@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-23, 修回日期: 2010-05-27

黑水虻 *Hermetia illucens* L. 作为一种重要的资源昆虫^[10], 在野外以畜禽粪便、腐烂的有机物为食, 可能在畜禽粪便的无害化处理和资源化利用上发挥重要的作用, 但迄今为止, 未见有关黑水虻共生微生物研究的报道。为了获得能够提高黑水虻利用畜禽粪便氮磷的微生物, 本文从野外收集和实验室饲养的黑水虻肠道和体表分离细菌, 并从中筛选出了 10 株同时具有蛋白质分解和有机磷分解能力的细菌, 发现这些产酶微生物能够明显提高黑水虻预蛹的重量, 并提高黑水虻对鸡粪氮磷的利用效率(未发表结果), 因而, 对这些微生物开展了鉴定。首先通过克隆这些菌株的 16S rDNA, 在 NCBI 上通过 BLAST 软件分析, 确定这些菌株是枯草芽孢杆菌近缘种, 然后通过克隆菌株的 *gyrB* (编码 DNA 促旋酶 *gyrase* B 亚基) rDNA 序列^[11], 将菌株鉴定到种, 并单独应用 *gyrB* rDNA 序列, 通过系统进化分析, 了解这些菌株间是否存在重复。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

用于微生物分离筛选的黑水虻幼虫一部分从野外收集, 一部分为实验室人工饲养的无病个体, 体长约 14 mm, 体重约 1 g, 食欲正常, 体表无异常, 肠道充盈度较好。

1.2 供试用培养基

用于黑水虻共生微生物分离和功能鉴定培养基如下:

LB 培养基: 酵母提取物 5 g, 胰化蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0, 121 °C 灭菌 20 min^[12]。

2216E 培养基(蒸馏水或陈海水配置): 细菌学蛋白胨 5 g, $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.6 ~ 7.8, 121 °C 灭菌 20 min^[13]。

有机磷分解菌筛选培养基^[14]: 葡萄糖 10 g, 酵母粉 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂 20 g。酒精棉球擦净鸡蛋外壳, 用 10 mL 注射器(灭菌备用)从鸡蛋中抽取蛋黄置一灭菌的空试管当中, 加入等量的 0.85% 生理盐水(灭菌)充分摇匀, 制成

蛋黄液, 吸取 3 mL 蛋黄液加入已融化的基础培养基中, 充分摇匀后, 倒平板。

酪蛋白分解培养基: Na_2HPO_4 0.107%, KH_2PO_4 0.036%, 酪蛋白 0.4%, 琼脂 1.6%, BaCl_2 0.4% 分开灭菌, 溶解 BaCl_2 后倒平板。

明胶液化培养基: 蛋白胨 0.5%、明胶 10% ~ 15%, pH7.2 ~ 7.4。

纤维素分解培养基^[13]: 羧甲基纤维素钠盐(CMC-Na) 1%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, 蒸馏水 1 000 mL, pH8.0, 琼脂 2%。

1.3 肠道和体表微生物分离纯化

取 1.1 所述 3 头幼虫, 置于无菌培养皿中, 用 5 mL 无菌水清洗其表面, 然后放到另一培养皿中用 75% 乙醇对幼虫表面消毒, 再用无菌水洗涤 3 次, 第 3 次洗涤的无菌水涂布培养作对照, 无菌条件下解剖, 取出肠道, 放到已经灭菌的玻璃匀浆器中, 加入 0.2 mL 无菌水进行研磨, 作为原液, 然后再加入 1.8 mL 无菌水, 为 10 倍稀释的菌悬液。然后再用 1.5 cm × 15 cm 试管分别稀释得不同浓度的稀释液, 取合适的稀释度涂布 LB 或 2216E 平板后置于 28 °C 恒温培养箱中培养 3 d, 每天进行观察和记录结果。

将上述培养的细菌根据菌落颜色、大小、形态等的不同特征挑取并编号, 在 LB 平板上划线培养, 28 °C 恒温培养 1 ~ 3 d, 再挑取单菌落在 LB 平板上划线纯化, 直至平板上长出单一菌株为止, 挑取单菌落在 LB 斜面上培养, 然后放 4 °C 冰箱进行保藏。共分离获得 21 株细菌。

1.4 肠道和体表微生物产酶能力测定

1.4.1 蛋白质分解能力测定 将分离的 21 株供试菌分别接种酪蛋白分解平板(点接种法)和明胶液化测试试管, 每株 3 个重复, 于恒温培养箱中 28 °C 度培养 7 d, 每天观察记录生长情况。在酪蛋白分解平板上的菌落周围有模糊的晕圈者为阳性, 晕圈越清晰, 产蛋白分解酶能力越强, 越模糊, 产蛋白分解酶能力越弱, 无晕圈者为阴性, 不产蛋白酶, 测定晕圈直径, 并记录明胶液化能力作为蛋白质分解能力测定指标。

1.4.2 有机磷分解能力测定 将分离的 21 株

供试菌分别接种有机磷分解平板,每个菌株 3 个重复,于恒温培养箱中 28 ℃ 培养 7 d,每天观察记录生长情况。菌落生长的周围有模糊的晕圈者为阳性,晕圈越清晰,产有机磷分解酶能力越强,越模糊,产有机磷分解酶能力越弱,无晕圈者为阴性,不产有机磷分解酶。

1.4.3 纤维素分解能力测定 将分离的 21 株供试菌分别接种纤维素分解测试平板,每个菌株 3 个重复,于恒温培养箱中 28 ℃ 培养 7 d,每天观察记录生长情况。菌落生长的周围有模糊的晕圈者为阳性,晕圈越清晰,产纤维素分解酶能力越强,越模糊,产纤维素分解酶能力越弱,无晕圈者为阴性,不产纤维素分解酶。

1.5 产酶微生物的分子鉴定

1.5.1 产酶微生物基因组 DNA 提取 基因组 DNA 使用 TaKaRa 公司的 MiNiBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver. 2.0 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。

1.5.2 产酶微生物 16S rDNA 基因的 PCR 扩增 采用细菌通用引物 27F 和 1513R^[15] 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,56 ℃ 2 min,72 ℃ 2 min,30 个循环,72 ℃ 10 min。

用 OMEGA 公司凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 对扩增片段进行回收,将回收产物连接到 pMD19-T 载体上,转化 *E. coli* DH5 α ,挑转化子经菌落 PCR 检验确定有目的基因插入后,摇菌,保甘油种,送 Invitrogen 生物工程技术有限公司广州分公司测定目的基因的碱基序列。

1.5.3 产酶微生物 *gyrB* 基因的扩增 利用简并引物 UP-1S 和 UP-2Sr^[16] 扩增 *gyrB* 基因,95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 1 min,55 ~ 62 ℃ 退火 (优化后) 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,30 个循环,72 ℃ 10 min。

扩增产物的克隆和测序同 1.4。

1.5.4 产酶微生物序列的系统发育进化分析 去掉获得序列中引物片段,将剩余序列登录 NCBI (www. ncbi. nlm. nih. gov) 在线 BLAST 搜索,构建进化树时,选取在 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 杂志上

公开发表的相似度超过 95% 的序列,以 Blast 结果中相似性较低的相近种 *gyrB* 序列作为外群。序列先采用 ClustalX 2.0 进行多重比对,然后用 MEGA4.0 软件包采用 Neighbour-joining (Kimura's 2-parameter 模型,bootstrap 500) 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 黑水虻幼虫肠道和体表共生微生物分离和功能鉴定

随机挑取幼虫,进行了 5 次肠道与体表微生物的分离,用 LB 培养基分离了 4 次,用 2216E 培养基分离了 1 次,用 S + “数字”表示从肠道分离出的菌株编号,用 T + “数字”表示从体表分离出的菌株编号 (表 1)。从 21 株细菌中获得 10 株同时具有蛋白质和有机磷分解能力的细菌, LB 培养基分离出的产酶菌株比 2216E 的要多。同时具有酪蛋白水解能力和明胶液化能力的菌株有 9 株,同时具有酪蛋白分解、明胶液化和有机磷分解能力的微生物有 8 株。所有分离的微生物菌株均没有纤维素降解能力。

2.2 产酶微生物 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列的克隆

利用基因组提取试剂盒获得 10 株产酶微生物的基因组 DNA,电泳检测基因组 DNA 分子量大于 10.0 ku,然后利用提取的基因组 DNA PCR 扩增得到的 16S rDNA 序列 (图 1)。*gyrB* 基因 rDNA 序列如图 2。其中 16S rDNA 序列 1 600 bp 左右,*gyrB* 序列 1 200 bp 左右。测序后获得的 10 株菌的 16S rDNA 序列片段长度 1 513 bp 左右,*gyrB* rDNA 片段长度 1 258 bp 左右。

2.3 基于产酶微生物 16S rDNA 序列的 BLAST 结果

将 10 株产酶微生物的 16S rDNA 序列切去引物序列后,在 NCBI 上 BLAST 的结果显示,这 10 株菌均为芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的种,与枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 和地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 的 16S rDNA Query coverage 值为 100%,Max indent 值为 99%。

表 1 黑水虻幼虫共生微生物分离和功能鉴定

来源	微生物菌株	分离培养基	蛋白质分解能力		有机磷分解 (cm)	纤维素分解
			酪蛋白水解 (cm)	明胶液化		
肠道	S14	LB	1.5	+	1.3	—
	S15	LB	1.5	+	1.4	—
	S16	LB	1.6	+	1.5	—
	S19	2216E ¹	1.2	—	1.2	—
	S20	2216E ¹	0.7	+	1.2	—
体表	T2	LB	—	+	1.6	—
	T4	LB	1.9	+	1.0	—
	T6	LB	1.1	+	1.1	—
	T7	2216E ²	1.5	+	1.1	—
	T8	LB	1.0	+	1.2	—

注:S 代表从肠道分离出来的菌株,T 代表从体表分离出来的菌株。2216E¹ 使用陈海水配置,2216E² 使用蒸馏水配置。+ 表示测定结果阳性,—表示测定结果阴性。

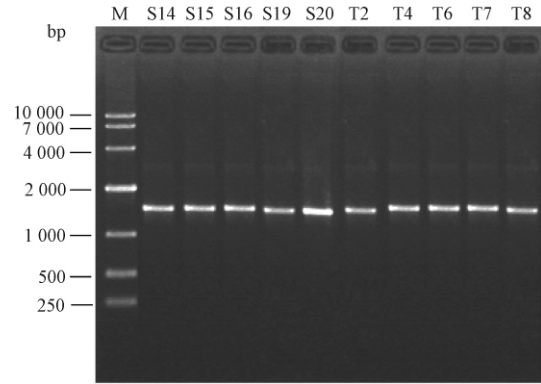


图 1 肠道产酶微生物 16S rDNA 序列扩增结果

2.4 基于产酶微生物 *gyrB* 基因 Blast 结果的系统进化分析

将 10 株产酶芽孢杆菌的 *gyrB* 序列去掉引物后在 NCBI 上开展 Blast 搜索,结果显示这 10 株菌均为枯草芽孢杆菌,但各自间的相似性有一定的差异,基于 Blast 结果构建的系统发育树如图 3,T6、S15、S16 和 S20 在进化上与已知的枯草芽孢杆菌有较高的亲缘关系,而 T2、T4、T7、T8、S14、S19 之间亲缘关系很近,但没有发现与它们更为接近的已发表菌株。

由于这 10 株菌均来自黑水虻的肠道和体表,并且均为枯草芽孢杆菌,为了避免有重复菌株,以枯草芽孢杆菌枯草亚种的 2 个菌株为参考,将 10 株菌的 *gyrB* 基因序列直接构建系统进化树,发现 2 株枯草芽孢杆菌亚种在 0.0005 水平被聚为一类的支持率为 100%,但这 10 株

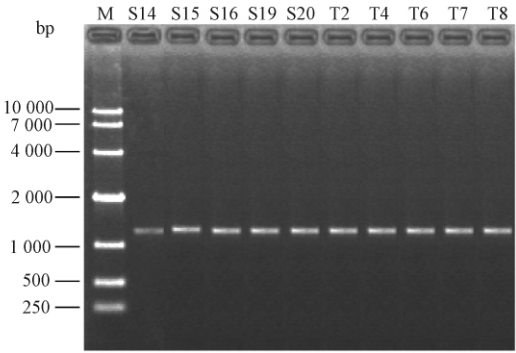


图 2 肠道产酶微生物 *gyrB* rDNA 扩增结果

枯草芽孢杆菌之间没有任何 2 个菌株的支持率超过 80%,显示这 10 株菌的亲缘关系较远,不存在重复(图 4)。

3 讨论

黑水虻幼虫在自然界取食腐烂的有机物,取食的生境中存在各种各样的微生物,黑水虻幼虫通过摄食,将这些微生物摄入肠道,并通过肠道特殊环境的筛选,保留一部分微生物作为共生微生物,这些在肠道中存活的微生物可能对黑水虻消化食物具有重要的作用。本研究从黑水虻幼虫肠道和体表分离出一些同时具有蛋白质水解和有机磷水解能力的微生物菌株,经鉴定均为枯草芽孢杆菌,但通过 *gyrB* 基因序列开展系统进化分析以鉴定菌株时,发现不同菌株的亲缘关系存在差异,其中 T2、T4、T7、T8、S14 和 S19 的亲缘关系较近,而 T6、S15、S16 和

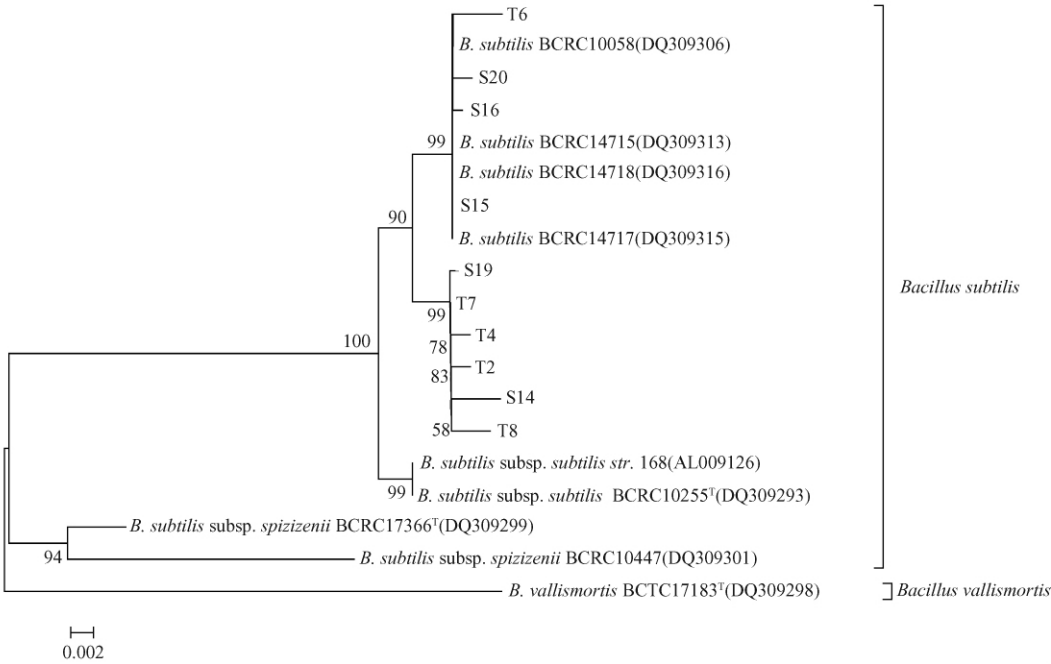


图 3 基于 10 株产酶芽孢杆菌 *gyrB* 基因序列 Blast 结果构建的系统发育树
(图上仅显示 bootstrap 百分率大于 50% 的数据,下同)

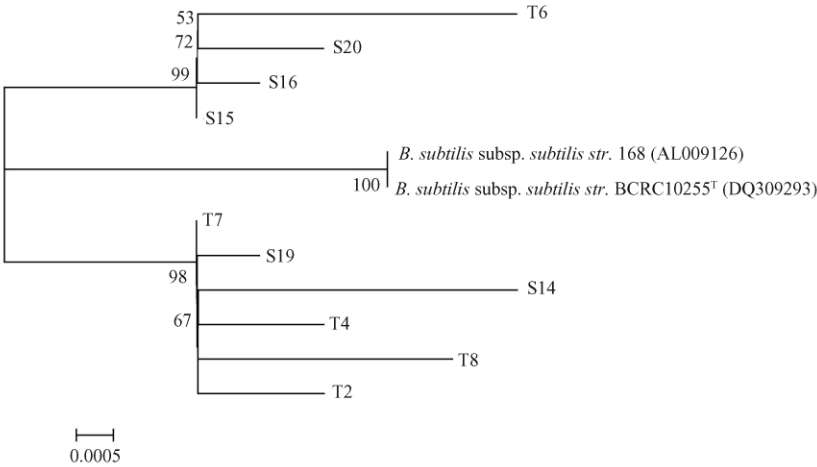


图 4 基于 10 株产酶枯草芽孢杆菌的 *gyrB* 基因 rDNA 系列构建的菌株系统发育树

S20 间亲缘关系则较近,但没有重复的菌株。芽孢杆菌是昆虫肠道常见的微生物并发挥着重要的功能^[17~21],Yoshiyama 和 Kimura^[22]在日本蜜蜂 *Apis cerana japonica* 的肠道中分离获得的许多芽孢杆菌菌株对引起蜜蜂美洲幼虫臭腐病 (American foulbrood) 的病原菌幼虫似芽孢杆菌 (*Paenibacillus*) 具有抑制作用。黑水虻肠道中

的这些芽孢杆菌在黑水虻肠道中起怎样的作用还需要进一步研究。

在其它取食木质素的昆虫如白蚁的肠道中,能够分离获得产纤维素酶的微生物,并且白蚁自身也能分泌纤维素酶^[3],黑水虻在自然界也能够以植物纤维为食,人工饲养过程中也观察到黑水虻取食纸质物品的现象,但本研究没

有从黑水虻肠道和体表分离获得可培养的产纤维素酶微生物。

参 考 文 献

- 相辉, 黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 2008, **45**(5): 687~693.
- 杨红, 彭建新, 刘凯于, 等. 低等白蚁肠道共生微生物的多样性及其功能. 微生物学报, 2006, **46**(3): 496~499.
- 相辉, 周志华. 白蚁及共生微生物木质纤维素水解酶的种类. 昆虫知识, 2009, **46**(2): 32~40.
- 袁志辉, 蓝希钊, 杨廷, 等. 家蚕肠道细菌群体调查与分析. 微生物学报, 2006, **46**(2): 285~291.
- 李蒙英, 许宏庆, 虞晓华, 等. 家蚕肠道菌群的研究. 江苏蚕业, 2000, (2): 5~7.
- 张剑飞, 王林玲, 周泽扬. 家蚕 K_{100} 、 E_{23} 肠道微生物初探. 四川蚕业, 2002, (3): 8~12.
- 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.
- 贝绍国, 刘玉升, 崔俊霞. 日本龟蜡蚧肠道细菌分离及鉴定研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 2005, **36**(2): 209~212.
- 何正波, 殷幼平, 曹月青, 等. 桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的研究. 微生物学报, 2001, **41**(6): 741~744.
- 喻国辉, 陈燕红, 喻子牛, 等. 黑水虻幼虫和预蛹的饲料价值研究进展. 昆虫知识, 2009, **46**(1): 41~45.
- Wang L. T., Lee F. L., Tai C. J., et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, **57**: 1 846~1 850.
- 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 205.
- 吕明生, 吕凤霞, 房耀维, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质初步研究. 食品科学, 2007, **28**(12): 235~239.
- 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996. 91.
- 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- Yamamoto S., Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**: 1 104~1 109.
- Gilliam M., Morton H. L. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D antibiotics (1). *Apidologie*, 1978, **9**(3): 213~222.
- Andrews R. E., Spence K. D. Action of Douglas fir tussock moth larvae and their microflora on dietary terpenes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, **40**(5): 959~963.
- Toth-Prestia C., Hirshfield I. N. Isolation of plasmid-harboring *Serratia plymuthica* from facultative gut microflora of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**(7): 1 855~1 857.
- 卓凤萍, 陈仕江, 殷幼平, 等. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道菌群的分析. 重庆大学学报(自然科学版), 2004, **27**(11): 26~29.
- 杨贵军, 吴涛, 雍惠莉, 等. 沟眶象成虫肠道好氧及兼性厌氧菌群的研究. 宁夏大学学报(自然科学版), 2008, **29**(2): 166~168, 179.
- Yoshiyama M., Kimura K. Bacteria in the gut of Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *J. Invertebr. Pathol.*, 2009, **102**(2): 91~96.