中华通草蛉越冬成虫肠道可培养好氧细菌多样性分析*

刘 宁[1**] 刘玉升[1***] 付卫东[2] 张国良[2]

(1. 山东农业大学 环境生物与昆虫资源研究所 泰安 271018;
2. 中国农业科学院 农业环境与可持续发展研究所 北京 100081)

摘 要 本研究以昆虫微生态学原理为指导探究中华通草蛉 *Chrysoperla sinica* (Tjeder)的肠道菌群构成,为中华通草蛉的营养生理研究及人工繁殖利用提供理论依据和技术基础。采用无菌解剖及纯培养分离检测技术,从雌、雄成虫肠道环境中分离、纯化、培养,获得 10 个细菌菌株,对菌体形态、染色反应、培养形状、生理生化反应进行系统研究。结果表明,上述 10 个菌株分别属于摩根氏菌属(*Morganella*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、地杆菌属(*Terrabacter*)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、热黄杆菌(*Flavobacterium thoupophilum*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、棍状杆菌属(*Clavibacter*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、预研菌属(*Yokenella*);越冬期雌、雄成虫肠道细菌的种类和数量存在较大差异,可能与雌、雄成虫不同的营养和生理需求有关,两者关系还需进一步研究。

关键词 中华通草蛉,肠道好氧细菌,分离,鉴定

Diversity of intestinal aerobic bacteria in overwintering adults of *Chrysoperla sinica*

LIU Ning[1**] LIU Yu-Sheng[1***] FU Wei-Dong[2] ZHANG Guo-Liang[2]

(1. Institute of Enviromental Biology and Insect Resources, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Institute of Enviroment and Sustainable Development in Agriculture, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract An important natural enemy of many pests, *Chrysoperla sinica* (Tjeder) has a wide distribution and strong predatory capacity. The primary objective of this study was to explore the microbial ecology of the intestinal bacteria of *C. sinica* and provide theoretical and technological references for research on its nutritional physiology and husbandry. Ten bacterial strains were obtained from different genders of *C. sinica* by means of pure cultivation. These were identified on the basis of morphology, staining, cultivation characteristics, physiological and biochemical reactions as, *Morganella*、*Bacillus pumilus*、*Terrabacter*、*Edwardsiella*、*Chromobacterium*、*Flavobacterium thoupophilum*、*Actinobacillus*、*Clavibacter*、*Plesiomonas* and *Yokenella*. Both the type and quantity of intestinal bacteria differed between adult *C. sinica*. This may be related to differences in the nutrition and physiology of different genders but further research is required to confirm this.

Key words *Chrysoperla sinica*, intestinal aerobic bacteria, isolation, identification

中华通草蛉 *Chrysoperla sinica* (Tjeder)最初发现于我国甘肃宕昌,1963 年由瑞典分类学家 Tjeder 命名为 *Chrysopa sinica*,属脉翅目(Neuroptera)、草蛉科(Chrysopidae)、通草蛉属(*Chrysoperla*)(许永玉等,1999)。成虫体长 9 ~ 10 mm,黄绿色;胸和腹部背面有黄色纵带;颊和唇两侧各有一条黑斑,黑斑多上下连接或不明显;翅透明,翅脉大部分绿色,少部分黑色(段海军等,

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201003079)。

** E-mail:ln0830@126.com

*** 通讯作者:E-mail:ysl@sdau.edu.cn

收稿日期:2011-03-24,接受日期:2011-09-15

2005)。

中华通草蛉是粮食和经济作物上许多害虫的重要天敌。成虫主要取食花粉和花蜜,幼虫肉食性,以 3 龄幼虫捕食能力最强(Huang and Enkegaard,2010)。在 20 世纪 80—90 年代,陕西、河南、江苏等省先后应用于棉田害虫防治,在保护棉田自然虫源的基础上,人工繁殖释放,取得了较好的效果(李淑梅,2000)。中华通草蛉在自然界以成虫兼性滞育越冬,尽管越冬种群数量较大,但在第 2 年春季种群数量却较小,从而限制了其对春季作物上蚜、螨等害虫的控制作用(许永玉等,2004)。周伟儒和陈红印(1985)研究认为中华通草蛉成虫越冬期间的死亡率与越冬前和越冬过程中的营养有密切关系,但其肠道微生态与越冬营养生理之间的关系尚无研究报道。

昆虫肠道是一个伴随着昆虫取食、消化、排泄而多变的环境,其中寄居的微生物与昆虫的营养生理具有密切关系(吕飞等,2009)。随着技术手段的进步和微生态理论实践范围的扩大,近年来昆虫肠道微生物的研究逐步活跃。刘玉升等研究了东亚飞蝗、白星花金龟、B 型烟粉虱、菜青虫等的肠道细菌(刘玉升等,2007;姬小雪等,2009;王菲菲等,2009;刘玉升等,2010)。本研究对中华通草蛉越冬期雌、雄成虫的肠道好氧细菌进行了分离、培养和鉴定,为明确中华通草蛉越冬成虫的营养生理状况以及进一步探讨肠道细菌对其生命活动的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 虫源 试虫从山东农业大学校本部及南校区试验田采集。

1.1.2 培养基 NA 培养基、NB 培养基、PDA 培养基、金氏培养基 B 和各种生理生化培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 肠道的解剖与保存 选取中华通草蛉雌、雄成虫各 20 头分别放入 75% 酒精溶液中浸泡 10 s 杀死,在无菌操作下取出并放在 0.1% 升汞液中消毒 2 min,移入灭菌水中清洗,然后在蜡盘中进行解剖,取出肠道,称重,加 10 mL 无菌水制成研磨液。

1.2.2 肠道细菌的分离 移液枪吸取 1 mL 肠道研磨液,雌虫稀释至 10^{-1} ~ 10^{-9},选 1×10^{-7}、1×10^{-8}、1×10^{-9} 3 个稀释度;雄虫稀释至 10^{-1} ~ 10^{-16},选 1×10^{-14}、1×10^{-15}、1×10^{-16} 3 个稀释度。用涂抹法进行分离,每个稀释度重复 3 次,分别置于 30℃ 的 GXZ 型智能光照培养箱中培养 72 h,挑取表征各异的菌落,并在 NA 平板上划线,纯化,培养。将纯化后菌落分别移植斜面培养并编号。

1.2.3 肠道细菌的鉴定 中华通草蛉雌、雄成虫肠道稀释液经分离、纯化得 10 株细菌。对 10 株菌株进行菌体形态、染色反应、培养性状和生理生化测定(中国科学院微生物研究所细菌分类组,1978;布坝南和吉本斯,1984;郑继法,1984;陈天寿,1995;东秀珠和蔡妙英,2001)。

1.2.4 肠道细菌数量的测定与计算 将中华通草蛉雌、雄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 72 h,选取适当稀释度计算菌落数,求出 3 个重复的平均值。每 mg(mL)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 结果与分析

通过对中华通草蛉越冬期雌、雄成虫肠道细菌的分离、纯化,雌虫获得 9 个菌株,雄虫获得 6 个菌株,合并相同菌株、整理编号,共得 10 个细菌菌株。其中 5 个菌株为雌、雄共有,4 个菌株为雌虫特有,1 个菌株为雄虫特有。

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,区别 10 个细菌菌株,有 3 个菌株呈革兰氏阳性反应,7 个菌株呈革兰氏阴性反应。经油镜观察和按照磷钨酸负染法电镜观察,10 个菌株均为杆状;4 个菌株具周生鞭毛,2 个菌株具极生鞭毛,3 个菌株无鞭毛;1 个菌株具有芽孢,9 个菌株无芽孢。将分离纯化的供试菌在 NA 和 NB 培养基上,30℃培养 48 h 后观察记载,10 个细菌菌株在 2 种培养基各呈不同的表现(表 1)。

2.2 供试菌株生理性状

供试细菌菌株在不同温度(℃)、不同氢离子浓度(pH)和不同 NaC1 浓度条件下,接种培养不同时间,观察记载结果(表 2)。

表 1　中华通草蛉肠道细菌形态特征及培养性状

Table 1　Morphology and culture character of intestinal bacteria in *Chrysoperla sinica*

菌株编号 Strain No.	菌体形状 Modality	革兰氏染色 Gram's dyeing	鞭毛 Flagellum	芽孢 Spore	培养性状 Culture character
1	杆状	G^-	周生	无	菌落大,不规则,白色,无光泽,不透明,边缘不整齐;沉淀,浑浊,有菌膜
2	杆状	G^+	周生	有	菌落大,不规则,灰白色,无光泽,不透明,边缘不整齐;沉淀,浑浊,有菌膜
3	杆状	G^+	无	无	菌落大,近圆形,白色,有光泽,不透明,中央隆起,边缘不整齐;沉淀,浑浊
4	杆状	G^-	周生	无	菌落小,近圆形,乳白色,有光泽,不透明,中央隆起,边缘整齐;沉淀,浑浊
5	杆状	G^-	极生	无	菌落小,近圆形,黄色,有光泽,不透明,中央隆起,边缘整齐;沉淀,浑浊,有菌膜
6	杆状	G^-	极生	无	菌落小,圆形,浅黄色,有光泽,透明,边缘整齐;沉淀,浑浊
7	杆状	G^-	无	无	菌落小,圆形,乳白色,无光泽,不透明,中央隆起,边缘整齐;沉淀,浑浊,有菌膜
8	杆状	G^+	无	无	菌落小,不规则,乳白色,有光泽,不透明,边缘不整齐;沉淀,浑浊,有菌膜
9	杆状	G^-	极生	无	菌落较小,圆形,白色,有光泽,半透明,边缘整齐;沉淀,浑浊,有菌膜
10	杆状	G^-	周生	无	菌落小,近圆形,乳白色,有光泽,不透明,中央隆起,边缘整齐

注:+表示阳性;-表示阴性。

+ indicates positive; - indicates negative.

表 2　中华通草蛉肠道细菌生理性状测定结果

Table 2　Physiological characteristics of intestinal bacteria in *Chrysoperla sinica*

菌株号 Strain No.	温度(℃) Temperature(℃)							pH 值 pH value						耐盐性(%) Salt tolerance(%)				
	10	15	30	37	42	55	CK	2	5	7	9	11	CK	2	5	7	10	CK
1	-	+	+	++	-	-	-	-	+	+++	+	-	-	++	++	+	-	-
2	-	+	+	++	+	-	-	-	+	+++	+	-	-	+	++	+	-	-
3	-	+	+	+	+	-	-	-	+	++	+	-	-	++	++	+	-	-
4	-	+	+	+	-	-	-	-	++	+++	+	-	-	++	++	+	-	-
5	-	+	+	++	++	-	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-
6	-	+	+	++	+	-	-	-	+	++	+	-	-	+	++	+	-	-
7	-	+	+	++	+	-	-	-	++	+++	++	-	-	+	++	+	-	-
8	-	+	+	+	-	-	-	-	+	++	+	-	-	+	+	+	-	-
9	-	+	+	+	+	-	-	-	++	+++	++	-	-	++	++	+	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-	-	++	+++	++	-	-	++	++	+	-	-

注:+表示生长;++表示生长中等;+++表示生长强;-表示不生长。

+ indicates growth moderate; ++ indicates growth well; +++ indicates growth best; - indicates no growth.

从表 2 可知，供试菌株在不同温度(℃)、不同氢离子浓度(pH 值)和不同 NaCl 浓度下培养，所有菌株在低于 10℃不能生长，在 30 ~ 37℃条件下均能生长，其中在 37℃条件下生长良好；所有菌株适宜的 pH 值为 5.0 ~ 9.0；对耐盐度适应范围广，在 2% ~ 7% 的范围内均可生长。

2.3 供试菌株生化性状

对 10 个供试菌株的生化性状包括 4 种酶、6 种氮素化合物和 20 种碳素化合物进行测定，试验结果见表 3。从表 3 可以看出，10 个供试菌株均能产生过氧化氢酶和明胶酶；除 10 号菌株外，均能产生 H_2S；其它生化测定项目各异。

表 3 中华通草蛉肠道细菌生化性状测定结果

Table 3 The biochemical reactions of intestinal bacteria in *Chrysoperla sinica*

项目 Items	菌株 Strains										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CK
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 dihydrolase	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	−	+	+	+	+	−	−	+	+	−
H_2S 产生 Production of H_2S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
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 Galetin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
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	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−
果糖 Levulose	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
半乳糖 Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
海藻糖 Trehalose	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+	−
棉籽糖 Raffinose	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−
山梨醇 Sorbitol	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
甜醇 Dulcitol	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−
肌醇 Inositol	−	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−
七叶灵水解 Scculin hydrolyzation	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−
淀粉水解 Starch hydrolyzation	+	−	+	−	−	−	−	+	−	+	−
丙二酸钠 Sodium malanate	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−
柠檬酸钠 Citric acid	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−

注：+ 表示阳性；− 表示阴性。

\+ indicates positive; − indicates negative.

2.4 菌株鉴定及细菌数量存在情况

通过对菌体形态、染色反应、培养性状、生理生化反应等各项指标鉴定，并测试雌、雄成虫肠道细菌数量，结果见表 4。上述 10 个细菌菌株依次

属于摩根氏菌属(*Morganella*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、地杆菌属(*Terrabacter*)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、热黄杆菌(*Flavobacterium thoupophilum*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、棍状杆菌属(*Clavibacter*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、预研菌属(*Yokenella*)。

表 4　中华通草蛉肠道细菌鉴定结果及数量

Table 4　Identification and counting of the intestinal bacteria in *Chrysoperla sinica*

菌株编号 Strain No.	鉴定结果 Identification result	雌虫(♀) Female	雄虫(♂) Male
1	摩根氏菌属 *Morganella*	4.0×10^{5}	1.4×10^{15}
2	短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*	5.2×10^{6}	6.8×10^{14}
3	地杆菌属 *Terrbacter*	1.4×10^{6}	1.7×10^{15}
4	爱德华氏菌属 *Edwardsiella*	1.3×10^{9}	4.0×10^{15}
5	色杆菌属 *Chromobacterium*		4.0×10^{13}
6	热黄杆菌 *Flavobacterium thoupophilum*	1.6×10^{8}	2.4×10^{14}
7	放线杆菌属 *Actinobacillus*	8.0×10^{7}	
8	棍状杆菌属 *Clavibacter*	2.0×10^{7}	
9	邻单胞菌属 *Plesiomonas*	1.6×10^{8}	
10	预研菌属 *Yokenella*	2.0×10^{5}	

3　讨论

昆虫肠道中存在数量庞大的微生物,它们生活于昆虫肠道环境,同时帮助昆虫完成多种生理生化功能。昆虫肠道的微生物群系是动态的群系,以功能的多样性和较大的适应性应对外界环境的改变(高权新等,2010)。已有研究表明,某些昆虫肠道内的酵母菌共生体可以为昆虫提供一些食物中缺乏的必需氨基酸(Woolfolk and Inglis, 2004)。

中华通草蛉是一类重要的天敌昆虫。国内研究表明,在加强田间虫源保护的基础上,通过田间释放中华通草蛉可使棉铃虫卵和幼虫减退 80% 以上(李淑梅,2000)。随着人们对可持续发展和生物防治认识程度的提高,中华通草蛉在害虫综合防治中的应用必将得到广泛重视,具有广阔的发展前景。本研究对中华通草蛉越冬期雌、雄成虫的肠道好氧细菌进行了分离和鉴定,结果表明:中华通草蛉越冬期雌、雄成虫肠道好氧细菌种类和数量均存在较大差异,其中摩根氏菌属(*Morganella*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、地杆菌属(*Terrbacter*)、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)和热黄杆菌(*Flavobacterium thoupophilum*)同时存在于雌、雄成虫肠道,放线杆菌属(*Actinobacillus*)、棍状杆菌属(*Clavibacter*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、预研菌属(*Yokenella*)仅存在于雌虫肠道,而色杆菌属仅存在于雄虫肠道。另外,爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)在雌、雄成虫肠道中数量均较大。这可能与越冬期雌、雄成虫特殊的营养生理需求有关。

今后还应进一步开展的研究内容有:(1)系统分离鉴定不同虫态(卵、幼虫、蛹)的肠道细菌;(2)对所得优势肠道细菌进行 16S DNA 分析。(3)开展中华通草蛉肠道功能菌株(如分解纤维素、淀粉、脂类等)的研究。

参考文献(References)

Huang NX, Enkegaard A, 2010. Predation capacity and prey preference of *Chrysoperla carnea* on *Pieris brassicae*. *BioControl*, 55:379—385.

Woolfolk SW, Inglis DG, 2004. Microorganisms associated with field-collected *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults with emphasis on yeast symbionts. *Biol. Control*, 29:155—168.

布坝南 RE,吉本斯 NE,中国科学院微生物研究所译,1984. 伯杰氏细菌学鉴定手册第 8 版. 北京:科学出版社. 855—865.

陈天寿,1995. 微生物培养基的制造与利用. 北京:中国农业出版社. 179—467.

东秀珠，蔡妙英，2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京：科学出版社. 46—267.

段海军，王秀锁，赵一凡，2005. 草蛉常见种类的识别. 内蒙古林业，(3)：16.

高权新，吴天星，王进波，2010. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展. 动物营养学报，22(3)：519—526.

姬小雪，刘玉升，周真，郑继法，2009. 菜青虫幼虫肠道细菌的分离及鉴定. 中国微生态学杂志，21(9)：841—843.

李淑梅，2000. 人工饲养中华草蛉防治棉田害虫的操作技术. 农业与技术，20(2)：41—42.

刘玉升，李明立，刘俊展，郑继法，2007. 东亚飞蝗肠道细菌的研究. 中国微生态学杂志，19(1)：34—39.

刘玉升，张爱君，陈倩，郑继法，2010. B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius 成虫肠道细菌的初步研究. 中国微生态学杂志，22(8)：693—696.

吕飞，刘玉升，王振鹏，李斐斐，张建巍，2009. 豆天蛾幼虫肠道细菌的初步研究. 中国微生态学杂志，21(1)：36—39.

王菲菲，刘玉升，姬小雪，郑继法，2009. 白星花金龟成虫肠道细菌的分离鉴定. 中国微生态学杂志，21(9)：798—800.

许永玉，牟吉元，胡萃，1999. 中华通草蛉的研究与应用. 昆虫知识，36(5)：313—315.

许永玉，牟吉元，胡萃，王洪刚，2004. 温湿度对中华通草蛉越冬成虫存活的影响. 生态学报，24(11)：2569—2572.

郑继法，1984. 区别格兰氏阴性和阳性菌的简易快速试验. 山东农业大学学报，(1/2)：121—122.

中国科学院微生物研究所细菌分类组，1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京：科学出版社. 31—96.

周伟儒，陈红印，1985. 中华草蛉成虫越冬前取食对死亡率的影响. 生物防治通报，1(2)：11—14.