

桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的研究*

何正波 殷幼平** 曹月青 董亚敏 张 伟

(西南农业大学植物保护系 重庆 400716)

关键词: 桑粒肩天牛, 肠道菌群, 纤维单胞菌属

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 06-0741-04

昆虫肠道中存在着大量的正常微生物, 一般认为这些微生物(或叫正常菌群)是宿主昆虫正常生长发育所不可缺少的, 它们不仅在维生素的合成、脂肪和碳水化合物的吸收与利用中起着重要作用, 而且在抵御外来菌的侵入与定植, 以及在促进免疫系统的功能中也起着重要作用^[1]。天牛蛀食树木及木材, 能消化利用食物中的纤维素成分。关于天牛肠道的微生物已有一些报道, 但其中大多是围绕纤维素降解菌展开研究的^[2-5]。为研究天牛的消化生理, 本研究以桑粒肩天牛 *Apriona germari* (Hope) 幼虫为材料, 定性定量地研究其肠道的正常菌群, 以更好地了解天牛消化纤维素的机制和天牛肠道微生态系统, 为探索新的防治途径提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

桑粒肩天牛 *A. germari* (Hope) 幼虫, 采于西南农业大学校园内, 寄主植物为构树, 采样时间为 1999 年 10 月至 2000 年 10 月, 每两月采一次样, 每次 8 头。试验前使其饥饿一天, 排空体内食物残渣。

1.2 培养基

普通细菌、真菌和酵母培养基、各种选择性培养基、生化实验用培养基均按周德庆和陈天寿介绍的方法配制^[6,7]。纤维素-刚果红选择培养基, 以羧甲基纤维素钠、微晶纤维素为碳源, 按 Hendricks 原方法配制^[8]。

1.3 天牛的解剖

用细线将桑粒肩天牛幼虫头尾分别系紧, 75% 酒精浸泡 3min 消毒体表; 无菌条件下解剖天牛, 取其肠道, 称重后加入 1mL 无菌水匀浆, 将匀浆液迅速 10 倍梯度稀释至 10^{-6} 。分离纤维素降解菌则用细线将肠道分前中肠、后中肠、后肠系紧, 分段后装于 1mL 无菌水中匀浆, 稀释同上。

1.4 接种和培养

采用平板涂布法接种, 每个稀释度接种三个平板。在 37℃ 恒温培养箱中培养 24 ~ 72h 后观察菌落生长情况。在纤维素-刚果红琼脂培养基上, 纤维素降解菌的菌落周围会产生一透明圈。

1.5 菌落鉴定和计数

根据细菌在培养基上的生长特性、菌体染色特性和菌体形态, 判断菌落性质。并按照可数性原则, 计数每个平板上的典型目标菌落, 根据稀释倍数和肠道的质量计算每克肠道所含菌数, 求得其平均值, 并转换成自然对数值。

* 国家自然科学基金资助项目(39770621)

** 通讯联系人

作者简介: 何正波(1977-), 男, 四川巴中人, 西南农业大学植物保护系, 硕士, 主要从事昆虫生理研究。

收稿日期: 2000-12-19, 修回日期: 2001-04-02

1.6 形态染色及生化实验

参照周德庆、Hendricks 等^[7,8]方法进行。

1.7 鉴定程序

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版^[9]及《一般细菌常用鉴定方法》进行^[10]。

2 结果和讨论

2.1 桑粒肩天牛幼虫肠道的菌群

从 47 头桑粒肩天牛幼虫肠道中共分离出 21 种不同的细菌,经鉴定其属于 13 个菌属,它们分别是葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、明串球菌属 (*Leuconotoc*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*) 和沙雷氏菌属 (*Serratia*)。其中优势菌为葡萄球菌属,检出率为 100%,数量为 7.63 ± 0.21 。其它细菌的检出率较低,依次是肠杆菌属、链球菌属、埃希氏菌属、纤维单胞菌属、微球菌属、芽孢杆菌属、志贺氏菌属、克雷伯氏菌属、明串球菌属、沙雷氏菌属、变形杆菌属和乳杆菌属。肠液中也培养出了酵母菌,但未见其它真菌。有关结果参见表 1。

表 1 桑粒肩天牛肠道菌群检测结果

菌 群	数 量	分离率/%
<i>Staphylococcus</i>	7.63 ± 0.21	100
<i>Enterobacter</i>	7.48 ± 0.51	34.04
<i>Streptococcus</i>	6.90 ± 0.81	27.64
<i>Escherichia</i>	7.42 ± 0.24	25.53
<i>Cellulomonas</i>	3.48 ± 0.54	23.40
<i>Micrococcus</i>	6.87 ± 1.16	19.15
<i>Bacillus</i>	5.41 ± 0.34	17.02
<i>Shigella</i>	6.69 ± 0.63	17.02
<i>Klebsiella</i>	30 ± 0.98	14.89
<i>Leuconotoc</i>	7.37 ± 0.44	12.77
<i>Serratia</i>	7.49 ± 0.45	12.77
<i>Proteus</i>	5.78 ± 0.67	10.64
<i>Lactobacillus</i>	6.77 ± 0.12	8.51
Yeast	6.53 ± 1.02	38.30

从分离结果看,桑粒肩天牛幼虫肠道中葡萄球菌属的数量较大,分离频率高,因此,它们应是桑粒肩天牛肠道的常住菌群。而其余菌群的分离频率较低,具有很大的偶然性,可能是桑粒肩天牛消化道的过路菌。

许多天牛和食木白蚁均以木材为食,Eutick 等^[11]研究了 9 种澳大利亚白蚁的肠道细菌,发现高等白蚁的优势菌群为葡萄球菌属,低等白蚁的优势菌群为链球菌属。而主要取食叶片或茎秆的沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*) 的优势菌群为肠杆菌属和链球菌属^[12],杂食性的美洲大蠊 (*Periplaneta americana*) 主要为肠杆菌属和克雷伯氏菌属及严格厌氧的梭菌属 (*Clostridium*)^[13]。殷幼平等的研究证明桑粒肩天牛和高等白蚁一样主要依靠其内源性纤维素酶消化食物中的纤维素成分^[14],二者的肠道优势菌群同为葡萄球菌属,表明桑粒肩天牛和高等白蚁肠道微生态结构较为相似,由此可以看出肠道正常菌群与昆虫的营养及消化生理可能有极密切的关系。

2.2 桑粒肩天牛肠道中的纤维素降解菌

采用纤维素-刚果红琼脂培养基,从桑粒肩天牛前中肠分离到一株能分解纤维素的菌株,经鉴定此菌株属于棒状菌群的纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)。此菌株仅存在于部分桑粒肩天牛幼虫肠道,在羧甲基纤维素培养上生长 1.5d 即可出现可见的透明圈和菌落,菌落为白色圆形,透明圈直径可达 10mm—20mm,该菌株也可分解微晶纤维素(Avicel),但产生的透明圈不太明显(图 1)。

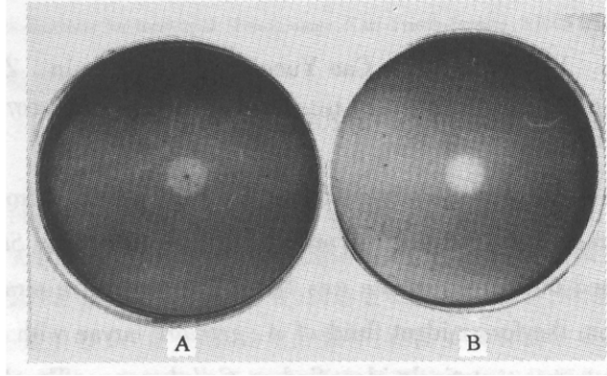


图 1 分离菌株在纤维素-刚果红琼脂培养基上的菌落
A. 微晶纤维素; B. 羧甲基纤维素钠。

天牛消化纤维素的机制至今仍是一个具有争议的问题。有些学者认为天牛是依靠随食物摄入的微生物消化纤维素^[15],另一些学者认为是依靠自身分泌的纤维素酶,微生物只给宿主提供微量元素或维生素,并不能分解纤维素^[3]。本研究从桑粒肩天牛前中肠分离到的这株纤维降解菌株,其分解纤维素的能力较强,但数量较少(约 3.84 ± 0.54),且检出率较低(约 26.32%)。由于桑粒肩天牛主要靠内源性纤维素酶消化纤维素,因此,来自前各肠的这株菌对天牛消化纤维素究竟能起到什么样的作用,还有待于进一步研究,不排除桑粒肩天牛随食物偶然摄入该菌的可能性。

桑粒肩天牛消化道其它菌群对桑粒肩天牛生理的影响及其与纤维单胞菌属的相互关系,目前仍不清楚,有待深入研究。特别是进一步研究桑粒肩天牛消化道中的严格厌氧菌,对于全面了解桑粒肩天牛消化道的微生态结构及其消化生理有极其重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 康白. 微生物学. 大连:大连出版社,1988. 64~81.
- [2] 蒋书楠,殷幼平,王中康. 林业科学,1996,32(5):441~446.
- [3] Grinbergs J. *Arch Mikrobiol*,1962,41:51~78.
- [4] Mansour K, Mansour-Bek J J. *Camb Philos Soc Biol Rev*,1934,9:363~392.
- [5] Riba G, Chararas C. *Bull Soc Zool*,1976,101:597~602.
- [6] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京:中国农业出版社,1995. 301~381.
- [7] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海:上海科学出版社,1982. 97~137.
- [8] Hendricks C W, Doyle J D. *Appl Environ Microbiol*,1995,61(5):2016~2019.
- [9] R. E. 布坦南, N. E. 吉本斯(中国科学院微生物研究所译). 伯杰氏鉴定手册. 第 8 版. 北京:科学出版社,1984.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京:科学出版社,1978.
- [11] Eutick M L, O'Brien R W, Slaytor M. *Appl Environ Microbiol*,1978,35(5):823~828.
- [12] Hunt J, Charney A K. *J Invertebr Pathol*,1981,38:378~385.
- [13] Cruden D L, Markovetz A J. *Ann Rev Microbiol*,1987,41:617~643.
- [14] 殷幼平,曹月青,何正波,等. 林业科学,2000,36(6):82~85.
- [15] Wood T G, Thomas R J. The mutualistic association between Macrotermitinae and Termitomyces. In: Wildiny N, Collins N M,

Hammond P M, et al. In *Insect, Fungus Interactions*. New York: Academic press, 1989. 69 ~ 92.

STUDY ON THE *APRIONA GERMARI* (HOPE) LARVAE'S INTESTINAL BACTERIAL FLORA*

He Zhengbo Yin Youping** Cao Yueqing Dong Yamin Zhang Wei

(Department of Plant Protection, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Intestinal flora of 47 *Apriona germari* (Hope) larvae, collected from fields, had been isolated and identified. The results showed that the predominant bacteria were *Staphylococcus*. Its viable count was 7.63 ± 0.21 , and the detection rate was 100%. Meanwhile, a strain of cellulose-utilizing bacterium was isolated from the fore-midgut fluid of *A. germari* larvae with the cellulose-congo red agar medium. The bacterium was tentatively identified as *Cellulomonas*. The detection rate of the cellulolytic bacterium was 23.40%, and the count was 3.84 ± 0.54 approximately. Its contribution to the borer's cellulose digestion needs further investigations.

Key words: *Apriona germari* (Hope), Intestinal flora, *Cellulomonas*

* Project supported by the National Science Foundation of China(No:39770621)

** Corresponding author