

向玉勇,徐中秋,柴新义.金银花尺蠖幼虫肠道细菌分离与鉴定[J].江苏农业科学,2017,45(2):106-108.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.029

# 金银花尺蠖幼虫肠道细菌分离与鉴定

向玉勇,徐中秋,柴新义

(滁州学院生物与食品工程学院,安徽滁州 239000)

**摘要:**金银花尺蠖是近年来新发现的金银花主要食叶害虫之一,在河南、山东、安徽等地均有分布。为了解金银花尺蠖幼虫肠道环境中的细菌种类,对金银花尺蠖幼虫肠道中的细菌进行分离、纯化和培养,获得 3 个细菌菌株,对菌株的培养性状、染色反应、菌体形态、生理生化反应进行系统研究。结果表明,它们分别属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。这 3 种菌株在金银花尺蠖幼虫肠道中存在的数量差别很大,其中葡萄球菌属的数量最大,为  $6.59 \times 10^{11}$  个/mL。

**关键词:**金银花尺蠖;肠道细菌;分离;鉴定

**中图分类号:** S433.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2017)02-0106-02

动物的肠道系统内寄居着数量巨大的微生物群,动物的生长发育除受温度、湿度、光照等环境因素影响外,还受其肠道系统内的微生物群影响<sup>[1-2]</sup>。这些微生物群是在与宿主动物协同进化过程中形成的,含有多种酶系统,能参与寄主动物能量和物质代谢,以及遗传信息运转等一系列生理过程<sup>[3]</sup>,因此,对寄主动物的健康生长是有益的。昆虫是动物界中数量最大的类群,在昆虫肠道系统中寄居的正常微生物群,是昆虫机体的生理组成部分,与昆虫营养生理活动有着密切关系<sup>[4]</sup>。如有些昆虫不能直接利用食物中的某些营养成分,必须依靠肠道内微生物的作用才能消化食物,从而促进营养物质的代谢和转化。肠道微环境发生改变,可引起微生物群发生变化,从而影响昆虫的生命活动。因此,对昆虫肠道微生物群进行研究,可以通过人为调控打破其肠道微生态平衡,影响昆虫的营养生理活动,使其不能正常发育,从而控制害虫的发生危害,对害虫防治具有十分重要的理论和实践意义。目前,国内对昆虫肠道微生物的研究只涉及少数昆虫<sup>[4-7]</sup>,昆虫是动物界中种类最大的类群,不同种类昆虫甚至同种昆虫不同虫态肠道微生物的种类会存在差异。因此,还必须选择更多的昆虫种类加以系统研究,以明确不同种类昆虫肠道微生物的类群。

金银花尺蠖(*Heterolocha jinyinhuaephaga*)属鳞翅目尺蛾科昆虫,别称拱腰虫,是近年新发现的金银花主要食叶害虫之一,在河南、山东、安徽等地已有报道<sup>[8-11]</sup>。该虫常将金银花叶片咬成缺刻或孔洞,甚至将叶片全部吃光,造成金银花大面积减产,给金银花生产带来严重损失。目前,国内对金银花尺蠖的研究主要是关于其生物学特性及防治方面<sup>[8-12]</sup>,而对其肠道微生物的研究尚未见报道。本试验对金银花尺蠖幼虫的肠道细菌进行分离及鉴定,以了解其幼虫肠道细菌的种类,为进一步探讨肠道细菌对其生命活动的影响奠定基础,从而为

更好地利用微生态调控技术防治该虫提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源与培养基

金银花尺蠖幼虫采集于安徽省明光市三界镇,在室内人工气候箱[光—暗周期为 14 h—10 h、温度为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为  $(70 \pm 7)\%$ ]中用新鲜的金银花叶片饲养,选取大小一致的健康老熟幼虫作为试验材料。培养基:NA 培养基、NB 培养基、金氏 B 培养基、PDA 培养基等<sup>[13]</sup>。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 肠道细菌的分离与纯化** 取 10 头金银花尺蠖 5 龄老熟幼虫,浸泡在 75% 的乙醇中将其杀死,15 s 后取出虫体放在 0.1% 氯化汞液中消毒 2 min,再用灭菌水清洗,然后在无菌条件下取出消化道称其质量后用灭菌研钵研磨成匀浆,研磨液用灭菌水稀释至  $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 。取  $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  等 3 个稀释度用平板稀释法和涂布法进行分离,各稀释度重复 3 次,分别置于生化培养箱中,在  $30^\circ\text{C}$  下培养 72 h。挑取表征各异菌落在 NA 培养基平板上划线、纯化,然后分别移植斜面培养,并按出现数量依次编号。

**1.2.2 肠道细菌的鉴定** 将分离纯化得到的各细菌菌株进行形态染色,观察其培养性状,并进行生理生化测定,根据文献[14-15]进行鉴定。

**1.2.3 肠道细菌的数量测定** 将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,在琼脂平板上培养 72 h,选取菌落生长稀疏、适当稀释度计算菌落数,求出 3 个重复的平均值。按照以下公式计算出肠道中的细菌数<sup>[4]</sup>:肠道中的细菌数(个/mL) = 平板上菌落数(个) × 稀释倍数/平板上加菌液的量(mL)。

## 2 结果与分析

通过对金银花尺蠖幼虫肠道细菌进行分离纯化,获得 3 个细菌菌株,对 3 个菌株进行鉴定试验。

### 2.1 菌体形态和培养性状

在 NA 培养基上将供试菌株培养 24 h,经革兰氏染色法

收稿日期:2015-11-21

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012B123);

安徽省高等学校优秀青年人才基金(编号:2009SQZR147);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201310377018)。

作者简介:向玉勇(1974—),男,湖南麻阳人,博士,副教授,主要从事资源昆虫学及害虫防治研究。E-mail:xyy10657@sohu.com。

和 3% KOH 简易法鉴别,均呈阳性。油镜下观察发现,1 个菌株呈球状,2 个菌株呈杆状。用 NA、NB 培养基将分离纯化的供试菌株经 28 ℃ 培养 48 h 后观察,3 个菌株在 2 种培养基各呈不同的表现(表 1)。

表 1 金银花尺蠖幼虫肠道细菌形态特征及培养性状

菌株	菌体形状	革兰染色	鞭毛	芽孢	需氧情况	培养形状
1	球状	G+	无	无	需氧	菌落圆形,边缘整齐,表面光滑,稍凸起,湿润,不透明,乳白色,底部沉淀
2	杆状	G+	周生	有	兼性厌氧	菌落表面粗糙,波纹状,透明,土黄色,生菌膜,有沉淀
3	杆状	G+	周生	有	兼性厌氧	菌落圆形,边缘整齐,表面粗糙,不透明,奶油色,生菌膜,浑浊

2.2 供试菌株生理性状

从表 2 可知,经不同温度、pH 值、NaCl 浓度下培养,所有供试菌株均在 15~42 ℃、pH 值 5~9、NaCl 浓度 2%~7% 条件下生长良好。在 10 ℃ 低温下只有 3 号菌株能够正常生长;在 55 ℃ 高温下,只有 1 号菌株能够正常生长;pH 值=11 条件下只有 1、2 号菌能正常生长;在 10% NaCl 浓度条件下只有 1 号菌株可以正常生长。

表 2 金银花尺蠖幼虫肠道细菌生理性状

菌株	不同温度下菌株生理性状						不同 pH 值下菌株生理性状					不同 NaCl 浓度下菌株生理性状			
	10 ℃	15 ℃	30 ℃	37 ℃	42 ℃	55 ℃	3	5	7	9	11	2%	5%	7%	10%
1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-

注:“+”表示该条件下菌株扩张;“-”表示该条件下菌株死亡。

2.3 供试菌株生化性状

3 种菌株均产生氧化酶和过氧化氢酶,能进行淀粉水解和硝酸盐还原,均能分解利用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、阿拉伯糖、海藻糖、果糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇、肌醇,甲基红试验均呈阴性,都不产生吡啶,其他生化项目各异(表 3)。

表 3 金银花尺蠖幼虫肠道细菌生化反应

项目	生化反应结果			
	菌株 1	菌株 2	菌株 3	CK
氧化酶	+	+	+	-
过氧化氢酶	+	+	+	-
鸟氨酸脱羧酶	-	+	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	-	-
葡萄糖	+	+	+	-
蔗糖	-	-	+	-
麦芽糖	+	+	+	-
乳糖	+	+	+	-
纤维二糖	-	+	+	-
半乳糖	+	+	+	-
木糖	-	-	+	-
阿拉伯糖	+	+	+	-
海藻糖	+	+	+	-
甜醇	+	+	-	-
鼠李糖	-	+	+	-
果糖	+	+	+	-
甘露糖	+	+	+	-
甘露醇	+	+	+	-
山梨醇	+	+	+	-
七叶灵水解	-	+	+	-
淀粉水解	+	+	+	-
柠檬酸钠	-	-	+	-
丙二酸钠	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S 产生	+	+	-	-
吡啶产生	-	-	-	-
甲基红试验	-	-	-	-
V-P 试验	-	-	+	-
明胶液化	+	-	+	-
肌醇	+	+	+	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

2.4 菌株鉴定

通过对 3 个细菌菌株的培养性状、菌体形态、染色反应、生理生化性状等进行试验,结果表明它们分别属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。由表 4 可见,金银花尺蠖幼虫肠道中各菌株存在的数量差别很大,其中葡萄球菌属的数量最大,为 6.59×10<sup>11</sup> 个/mL。

表 4 金银花尺蠖幼虫肠道细菌鉴定结果及存在数量

菌株编号	鉴定结果	存在数量 (个/mL)
1	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	6.59×10 <sup>11</sup>
2	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	7.32×10 <sup>10</sup>
3	枯草芽孢杆菌属 <i>Bacillus subtilis</i>	3.47×10 <sup>9</sup>

3 讨论

与其他动物一样,昆虫与共生的肠道微生物之间建立了复杂的协同进化关系,其肠道系统为各种微生物提供适宜的生活环境,肠道微生物一方面帮助宿主昆虫消化食物,为昆虫提供各种营养物质,另一方面可以起着益生菌的作用,调控肠道微生物区系本身之间的平衡,保证昆虫健康。肠道微生物的类群和数量与昆虫所取食的食物性质存在密切的关系,不同食性昆虫肠道环境中的微生物菌株的种类和数量存在差别。如刺吸植物汁液的斑衣蜡蝉(*Lycorma delicatula*)成虫消化道内存在有多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)4 种细菌,其中多黏芽孢杆菌数量最多<sup>[4]</sup>;取食动物性物品和食品的小腹皮蠹(*Dermestes maculatus*)成虫消化道内分布有坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、浸麻芽孢杆菌(*Bacillus macerans*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、巨大芽孢杆菌和短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)6 种细菌,以巨大芽孢杆菌数量最多<sup>[7]</sup>;取食植物叶片或茎秆的沙漠蝗肠道中优势菌群为肠杆

潘宝贵,张玉明. 江苏省长灯笼形辣椒品种区域试验结果分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(2):108-110.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.030

# 江苏省长灯笼形辣椒品种区域试验结果分析

潘宝贵<sup>1</sup>, 张玉明<sup>2</sup>

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 10014;

2. 江苏省种子管理站, 江苏南京 10036)

**摘要:**2006—2015年,通过对29个(次)长灯笼形辣椒品种的区域试验调查,结果表明,江苏省每年有3~4个(次)品种参加辣椒品种区域试验;与对照品种苏椒5号相比,参试品种始花节位高0.5节,单果质量平均增加11.1g,果长平均增加1.4cm,肉厚相当,前期产量、总产量分别增产6.9%、6.5%。

**关键词:**辣椒;品种;长灯笼形;区域试验

**中图分类号:** S641.303.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0108-03

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是江苏省重要的蔬菜作物,每年栽培面积近9.3万hm<sup>2</sup>,其中设施栽培面积比例为73%<sup>[1]</sup>。2001—2014年,江苏省将辣椒列为主要农作物,并组织辣椒新品种进行中间试验(区域试验、生产试验),以鉴定参试品种的区域适应性、熟性、果实商品性、丰产性、抗病性

和抗逆性等。以苏椒5号为代表的长灯笼形辣椒,具有熟性早、耐低温弱光、膨果速度快、皮薄质脆、品质优良、前期产量高等特点<sup>[2-3]</sup>,在江苏省辣椒栽培中占有重要的地位,具有较高的市场占有率<sup>[1,4]</sup>,江苏省及周边许多科研院所、企业广泛开展同类型新品种的选育,并参加江苏省辣椒新品种的中间试验。本研究根据江苏省2006—2015年长灯笼形辣椒品种区域试验鉴定结果,分析参试品种的始花节位、单果质量、果长、果宽、肉厚、前期产量、总产量等主要农艺性状指标的变化,为长灯笼形辣椒新品种的选育和应用推广提供参考。

收稿日期:2015-12-05

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)1004]。

作者简介:潘宝贵(1974—),男,江苏盐城人,硕士,副研究员,主要从事辣椒遗传育种与栽培技术研究。E-mail: pantix@163.com。

通信作者:张玉明,硕士,高级农艺师,主要从事品种管理和推广。

E-mail: seedzym@jsagri.gov.cn。

菌属和链球菌属<sup>[16]</sup>。本试验从金银花尺蠖幼虫肠道中分离鉴定出3种细菌,分别为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其中葡萄球菌属的数量最大。金银花尺蠖的食性单一,只取食危害金银花等少数忍冬科植物,消化道对食物消化也比较单一,可能导致肠道中的细菌种类比较少。另外,金银花是中药材,含有抑菌作用的活性成分,其活性成分对金银花尺蠖肠道细菌的影响还有待进一步研究。

为适应中药材无公害生产的要求,今后还需进一步分析金银花尺蠖幼虫肠道主要细菌菌株的功能,并与食物的营养成分进行关联分析,探讨细菌菌群与金银花尺蠖幼虫的共生机制,从而通过人工方法改善和调节肠道微生物的微生物生态条件,调控金银花尺蠖的生长发育,实现该虫的生态控制。

## 参考文献:

- [1] 何明清. 动物微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1994.
- [2] 施曼玲,邱清波,计翔. 两种有磷类爬行动物消化道微生物的研究[J]. 动物学杂志,2000,35(6):12-15.
- [3] 陈群,鲍大鹏. 人及动物胃肠道正常微生物群的研究[J]. 安徽农业技术师范学院学报,1999,13(4):39-42.
- [4] 刘玉升,陈艳霞,吕飞,等. 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(4):495-498.
- [5] 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

- [J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2005,36(2):209-212.
- [6] 孟祥杰,刘玉升,崔俊,等. 六斑异瓢虫成虫肠道细菌分离及鉴定研究[J]. 中国微生态学杂志,2008,20(2):120-121,125.
- [7] 秦浩,李志鹏,李林懋,等. 白腹皮蠹幼虫肠道细菌分离及鉴定[J]. 安徽农业学报,2013,40(3):482-486.
- [8] 张文冉,高殿滑,刘爱华. 金银花尺蠖的发生与气象条件的关系[J]. 气象与环境科学,2007,30(4):60-62.
- [9] 王广军,张国彦,王江蓉. 金银花尺蠖的发生规律与防治技术[J]. 中国植保导刊,2005,25(3):22-23.
- [10] 姜敏,邵明果,赵伯林. 金银花尺蠖的生物学特性及防治技术[J]. 山东林业科技,2005(1):62-63.
- [11] 向玉勇,刘克忠,殷培峰,等. 安徽金银花尺蠖的生物学特性[J]. 滁州学院学报,2010,12(5):35-37.
- [12] 倪云霞,刘新涛,刘玉霞,等. 金银花尺蠖的药剂防治[J]. 河南农业科学,2006,35(12):78-79.
- [13] 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,1995:179-671.
- [14] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 2版. 北京:科学出版社,2001.
- [15] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所,译. 8版. 北京:科学出版社,1984.
- [16] Hunt J, Charnly A K. Abundance and distribution of the gut flora of the desert locust, *Schistocerca gregaria* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1981, 38(3): 378-385.