

桑粒肩天牛肠道纤维素分解细菌的分离和鉴定*

曹月青 殷幼平 董亚敏 何正波

(西南农业大学生物技术中心 重庆 400716)

摘要:为研究天牛消化利用纤维素的机理,利用纤维素-刚果红琼脂培养基,从桑粒肩天牛(*A. germari*)幼虫中肠分离到一种兼性厌氧纤维素分解菌。菌落为白色圆形,边缘比较规则,周围溶纤维素透明圈直径一般可达10mm~20mm,细菌大小为 $0.5\sim 0.8\mu\text{m}\times 1\sim 3\mu\text{m}$,革兰氏染色阳性,杆状,极生鞭毛,无芽孢。结合生化实验结果,初步鉴定该菌株为纤维单孢菌属(*Cellulomonas*)。

关键词:桑粒肩天牛,纤维素分解菌,纤维单孢菌属

中图分类号:Q939.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-09-04

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE CELLULOSE-UTILIZING BACTERIA FROM THE GUT OF *APRIONA GERMATI* (HOPE)

CAO Yue-Qing YIN You-Ping DONG Ya-Min HE Zheng-Bo

(Center of Biotechnology, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

Abstract: In order to clarify the cellulose-utilizing mechanism of the Cerambycidae, the microorganism in the *Apriona germari* (Hope) larvae's gut was cultured and identified. A strain of facultative anaerobic cellulose-utilizing bacteria was isolated from the midgut fluid of *A. germari* larvae with the cellulose-congo red agar medium. The colonies of the bacteria were white and round with regular margin. Clear zones of cellulolysis surrounding the colonies might reach 10mm~20mm. The size of the bacteria was $0.5\mu\text{m}\sim 0.8\mu\text{m}\times 1\sim 3\mu\text{m}$ approximately. The cell was gram-positive rod with polar flagella. It hadn't spores. With the results of biochemical tests, the bacteria were tentatively identified as *Cellulomonas*.

Key words: *Apriona germari* (Hope), Cellulose-utilizing bacteria, *Cellulomonas*

早在二十世纪初,天牛分解利用纤维素的研究便已开始。最初,人们把天牛消化纤维素这一能力归结于肠道微生物^[1]。Muller(1934)从天牛幼虫肠道中分离出一些微生物,发现并无纤维素分解活性^[2],于是一些学者认为这些微生物只为寄主提供微量元素,如固醇、维生素,降解尿酸,维持氮元素的平衡^[3]。

为研究天牛的消化生理,我们进行了桑粒肩天牛幼虫肠道微生物培养,用纤维素-刚果红琼脂培养基^[4],从其肠液中分离出一种分解纤维素的细菌,并对这种细菌进行了初步鉴定。本文首次报道天牛肠道纤维素分解菌的分离和鉴定,通过对这种细菌更深一步的研究,可以更好地了解天牛消化纤维素的机制,对天牛的生物防治提供理论基础。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770621)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770621)

收稿日期:1999-12-17,修回日期:2000-04-15

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验昆虫:桑粒肩天牛幼虫 [*Apriona germari* (Hope)], 采于西南农业大学校园内构树, 使其饥饿一天, 排除体内食物残渣。

1.1.2 培养基:普通细菌培养基、生化实验用培养基均按周德庆介绍的方法配制^[4]。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 的方法配制^[5]。

1.2 方法

1.2.1 天牛的解剖:用75%酒精棉球擦拭桑粒肩天牛幼虫体表, 再用细线将头尾分别系紧, 75%酒精浸泡3min消毒体表; 无菌条件下解剖天牛, 取其肠道, 用细线将肠道分前中肠、后中肠、后肠系紧, 将这3部分剪开, 分别放于装有1mL 无菌水的离心管中, 剪开肠道使肠液与水混匀。

1.2.2 细菌的好氧培养:将前中、后中、后肠肠液分别稀释1000、1000、100倍涂布于纤维素-刚果红培养基上28℃培养, 能分解纤维素的细菌菌落周围产生一透明圈, 将此菌在普通培养基上进行增菌纯化。

1.2.3 厌氧培养:将涂有菌的平板倒置于有进出气接管的真空干燥器中, 进气管深入容器底部, 出气管在容器顶部, 出气管口伸入溴甲酚紫水溶液(作指示剂, 变色范围pH5.2~6.8, pH6.8以上为紫色, pH5.2以下为黄色), 从进气管通入CO₂直至指示剂变黄, 继续通气几分钟后, 封闭进气管。将此真空干燥器放于28℃培养箱中, 3d后观察微生物生长状况。

1.2.4 形态染色及生化实验:鞭毛染色、革兰氏染色、V P、M R、接触酶、吲哚、氧化酶、明胶液化、葡萄糖和乳糖利用实验参照周德庆及刘德容等方法进行^[4-6]。

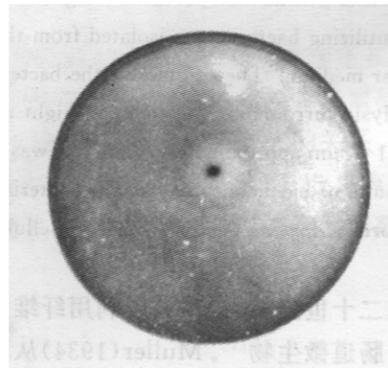
1.2.5 鉴定程序:根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版及《一般细菌常用鉴定方法》进行^[7,8]。

2 结果与讨论

2.1 结果

采用纤维素-刚果红琼脂培养基, 从桑天牛前中肠分离到一株能分解纤维素的菌株。在好氧及厌氧条件下, 该菌株在普通细菌培养基及纤维素-刚果红琼脂培养基上都能生长, 两种情况下生长没有明显差异。

2.1.1 菌落形态:有氧或无氧时, 此菌株在羧甲基纤维素培养基上生长1.5d都可出现透明圈和菌落。菌落为白色圆形, 透明圈直径可达10~



20mm(如图1), 该菌株也可分解微晶纤维素(Avicel), 但透明圈不太明显。

2.1.2 分离菌株的形态及生化特征:该菌为杆状, 极生鞭毛最多4根, 菌体大小0.5μm~0.8μm×1μm~3μm, (如图2)。

由以上特征, 根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版所描述, 此菌株属于棒状菌群的纤维单孢菌属(*Cellulomonas*)细菌。

表1 分离菌株的生化特征

实验	表形
细胞形态	直杆
革兰氏染色	+
鞭毛	极生
芽孢	-
接触酶	+
甲基红	+
乙酰甲基甲醇	-
氧化酶	+
吲哚	-
明胶液化	-
葡萄糖利用	+
乳糖利用	+

+ 代表阳性反应, - 代表阴性反应

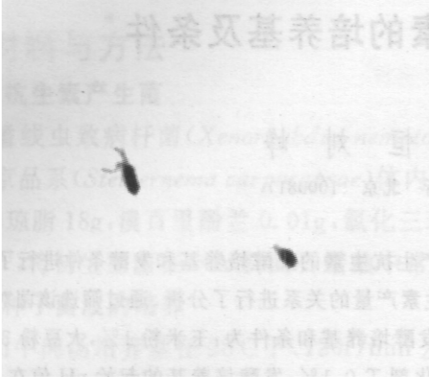


图2 分离菌株的形态特征

2.2 讨论

天牛的纤维素消化机制至今仍是一个悬而未决的问题。有些学者认为天牛是依靠随摄食摄入的微生物消化纤维素^[9],另一些学者认为是依靠其自身分泌的纤维素酶,微生物只给寄主提供微量元素或维生素类,并不能分解纤维素^[3]。我们的研究也发现中肠是天牛消化纤维素的主要场所,桑粒肩天牛中肠能分泌内源性纤维素酶分解食物中的纤维素成分(文章待发表)。而此菌株正是分离自桑天牛前中肠肠液,其分解纤维素的能力较强,但数量较少,(约每条虫体含 3×10^3 个)。由于该菌仅在部分桑天牛中肠检测到,来自中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。估计其对桑粒肩天牛消化纤维素的贡献有两种可能,第一,有可能参与纤维素的消化,但并不起主要作用;第二,并不参与纤维素消化,而是直接利用天牛消化纤维素产生的葡萄糖。这一推测可以从此菌株能利用葡萄糖、乳糖而得出,也不排除天牛从寄主植物中偶然摄入该菌的可能性。

昆虫肠道内能分解纤维素的细菌并不多见,这株纤维素分解菌分离自桑粒肩天牛的肠道,说明它能够适应天牛肠道内的环境。把这类菌应用到家蚕的饲养上,有可能提高桑叶的利用率。

纤维素-刚果红琼脂平板是一种有效的检测纤维素分解菌的方法。刚果红能与含有 β -1,4-D-葡萄糖苷键的多糖紧密结合,使多糖染成红色,但不与单糖结合。在纤维素-刚果红琼脂平板上,细菌将纤维素分解成为单糖,则红色消失,形成一透明圈。与红色背景相映衬,透明圈很明显,而且酶活性很低时也能检测到,在微生物种类庞杂的天牛肠道中,用这种方法能快速而准确的进行纤维消化细菌的检测。

参 考 文 献

- [1] Cleveland L R. Biol Bull, 1924, 46:217~227.
- [2] Muller W H. Arch Mikrobiol, 1963, 5:84~147.
- [3] Jurzitza G. Insect-fungus symbiosis. Allanheld & Osmun, Montclair, 1979, 65~76.
- [4] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海:上海科技出版社,1982.
- [5] Hendricks C W, Doyle J D. Appl. Environ. Microbiol, 1995, 61(5):2016~2019.
- [6] 刘德容,李晓红. 微生物学通报,1998,25(2):119~121.
- [7] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版. 北京:科学出版社,1984.