

东方蝼蛄肠道菌分离鉴定及产纤维素酶菌株的筛选与酶活力测定

陈广青¹, 陈芳敏^{*1,2}, 王琪¹, 付晶晶², 夏琬婷^{1,2}, 王金星¹

1 沈阳大学 生命科学与工程学院 辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

2 沈阳大学 区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

陈广青, 陈芳敏, 王琪, 付晶晶, 夏琬婷, 王金星. 东方蝼蛄肠道菌分离鉴定及产纤维素酶菌株的筛选与酶活力测定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4257-4269.

CHEN Guangqing, CHEN Fangmin, WANG Qi, FU Jingjing, XIA Wanting, WANG Jinxing. Screening and enzyme activity determination of cellulase-producing strains from the gut bacteria of *Grylotalpa orientalis*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4257-4269.

摘要:【背景】蝼蛄(*Grylotalpa* spp.)是我国分布广泛的农业地下害虫,其肠道菌的组成及功能菌资源的挖掘都有待研究。【目的】获得蝼蛄肠道可培养菌株,对其进行鉴定和产纤维素酶功能菌株的筛选,并检测其酶活性,对活性较高菌株的产酶条件进行探究。【方法】采用传统的微生物分离培养方法,结合分子生物学技术对东方蝼蛄肠道菌进行分离和鉴定,采用羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)水解圈法筛选产纤维素酶菌株,并用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定纤维素酶活力。【结果】从东方蝼蛄肠道共分离出23个菌株,可归为7属10种:其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)4种,肠球菌属(*Enterococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和乳球菌属(*Lactococcus*)各1种。结果显示,除菌株N18外的其余22个菌株均具有产纤维素酶能力,其中菌株N3和N14产酶能力最强,其次是N15和N21。培养基的pH、培养时间、菌液接种量对菌株的产酶能力影响各异。在实验设定的梯度范围内,所测各单因素影响下,均为菌株N3和N14产酶能力最强。【结论】蝼蛄肠道可培养菌资源丰富,获得菌株中高达95%具有产纤维素酶的功能,其中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)N3和N14产酶能力最强,最具开发潜力。

关键词: 蝼蛄; 肠道菌; 产纤维素酶功能菌株; 纤维素酶活性

资助项目: 国家自然科学基金(42177406); 辽宁省自然科学基金(2023-MS-319)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42177406) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2023-MS-319).

*Corresponding author. E-mail: fangminchen@syu.edu.cn

Received: 2024-02-01; Accepted: 2024-03-31; Published online: 2024-05-08

Screening and enzyme activity determination of cellulase-producing strains from the gut bacteria of *Gryllotalpa orientalis*

CHEN Guangqing¹, CHEN Fangmin^{*1,2}, WANG Qi¹, FU Jingjing², XIA Wanting^{1,2}, WANG Jinxing¹

1 Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

2 Key Laboratory of Eco-restoration of Regional Contaminated Environment of Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: [Background] Mole crickets (*Gryllotalpa* spp.) are widely distributed agricultural underground pests in China, and the composition of their gut bacteria and the functional bacterial resources remain to be studied. [Objective] To obtain the culturable bacteria from the gut of *G. orientalis*, screen out the strains capable of producing cellulase, measure the cellulase activities of the strains, and explore the culture conditions of the strains with high cellulase activities. [Methods] The gut bacteria of *G. orientalis* were isolated by the culture method and identified by methods of molecular biology. The cellulose-producing strains were screened by the carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na) hydrolysis assay, and the cellulase activity was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. [Results] A total of 23 strains were isolated from the gut of *G. orientalis*, belonging to 10 species of 7 genera (4 species of *Bacillus* and 1 species of *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Enterobacter*, and *Lactococcus*, respectively). The results showed that all the 22 strains except strain N18 had cellulase-producing capacity, among which strains N3 and N14 had the strongest cellulase-producing capacity, followed by N15 and N21. The medium pH, culture time, and inoculum amount had different effects on the cellulase production. Within the ranges set in this study, strains N3 and N14 always had the highest cellulase production under the influences of different single factors. [Conclusion] The gut of *G. orientalis* harbors rich culturable bacterial resources, and 95% of the isolates of gut bacteria have the function of producing cellulase. Among the isolates, *Bacillus subtilis* N3 and N14 with the highest cellulase production demonstrate the most potential for development.

Keywords: *Gryllotalpa* spp.; gut bacteria; cellulose-producing bacterial strains; cellulase activity

肠道菌资源的开发和利用具有重要的研究意义和应用价值。昆虫肠道微生物能够参与代谢、影响宿主发育和进化、提供营养物质、辅助消化、抵御病原微生物、激起免疫反应、调控生殖等,在维持昆虫正常生命活动方面发挥着不可或缺的作用,昆虫肠道菌研究近年来颇

受关注^[1-4]。研究昆虫肠道菌将能够获取一些可应用于农业和工业的微生物资源^[5-7]。胡亚楠等^[8]从大蜡螟和黄粉虫肠道中发现了能降解聚乙烯的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),对治理农业地膜造成的“白色污染”具有应用价值。王宁等^[9]从美洲大蠊肠道中发现了一株能分泌热

稳定碱性蛋白酶的嗜碱性芽孢杆菌。夏琬婷等^[10]和何雨薇等^[11]分别从杜比亚蟑螂和马蜂肠道中发现了能够产消化酶的功能菌株,可帮助宿主降解大分子营养物质。昆虫肠道菌群与宿主互利共生,在宿主的生命活动中发挥了重要作用^[12-13]。

蝼蛄(*Gryllotalpa* spp.)是我国分布广泛的农林作物地下害虫^[14],其中华北蝼蛄(*Gryllotalpa unispina*)和东方蝼蛄(*Gryllotalpa orientalis*)分布较为普遍,危害较重。华北蝼蛄又称单刺蝼蛄,主要分布在北纬32°以北各地;东方蝼蛄全国各地均有分布,其中南方危害较重^[15-16]。自然界中存在很多能够分泌多种纤维素酶降解纤维素的真菌和细菌^[17]。蝼蛄主要以取食植物幼根为生,其肠道菌群结构及纤维素降解菌株资源有待研究。本研究从东方蝼蛄肠道分离可培养菌株并鉴定,筛选产纤维素酶功能菌株并进行产酶活力测定,探究发酵培养基pH、培养时间及接种量等因素对其产酶活性的影响,为功能菌株的应用提供参考依据和研究材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

从河北省沧州市沧县采集蝼蛄,经鉴定为东方蝼蛄(*Gryllotalpa orientalis*),属昆虫纲(*Insecta*)有翅亚纲(*Pterygota*)直翅目(*Orthoptera*)螽亚目(*Ensifera*)蝼蛄科(*Gryllotalpidae*)。

1.1.2 培养基和主要试剂、仪器

乳酸细菌(MRS)培养基和胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;1/3胰蛋白胨大豆琼脂(1/3 TSA)培养基(g/L):TSB 10.0,琼脂 15.0;羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)培养基参照文献^[18]配制;发酵培养基参照文献^[19]

配制。细菌基因组DNA提取试剂盒和2×*Taq* Plus Master Mix,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;梯度PCR仪,Agilent Technologies公司;凝胶成像仪,Bio-Rad公司;体视显微摄像系统,Leica公司;酶标仪,Tecan公司。

1.2 蝼蛄肠道菌的分离纯化及形态学鉴定

将蝼蛄置于通气良好的昆虫箱中,饥饿处理24 h后取出观察,选取存活状态的蝼蛄于-80 °C冷冻保存。取34只蝼蛄于烧杯中,倒入75%酒精浸没蝼蛄,3 000 r/min涡旋5 min,重复4次。然后无菌水浸泡并中速涡旋3 min,重复7次。取200 μL最后一次漂洗液至TSA培养基涂布均匀,3个重复,于37 °C恒温培养箱中培养24 h观察,无菌落出现说明表面消毒彻底。参考李慧等^[20]的蝼蛄肠道模式图,无菌操作解剖出表面消毒好的蝼蛄样品的肠道。将解剖出的肠道放入盛有3 mL预冷无菌生理盐水的匀浆棒中充分研磨,获得肠道匀浆液并分装到1.5 mL离心管中备用。

将样品分成2份:1份未加热处理;另1份85 °C加热15 min处理,用于分离耐热菌。将2组样品分别进行10倍倍比梯度稀释,分别将未加热和加热样品取各梯度(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})的稀释液0.2 mL均匀涂布于MRS培养基和1/3 TSA培养基上,各3个重复。将涂布好的平板静置5-10 min,待样品被培养基完全吸收后,于37 °C恒温箱中倒置培养24 h后开始观察记录。挑取分离平板上表征各异的菌落并编号和纯化。采用3/4划线法连续纯化3代,挑取最后一代的单菌落进行革兰氏染色镜检^[21]。将纯化好的菌株接种至TSB培养基,37 °C、160 r/min富集培养至对数生长期($OD_{600} \approx 0.5$),-80 °C保存备用^[22]。参考文献^[23]并结合菌落形态特征和革兰氏染色镜检结果,对获得的菌株进行初步鉴定。

1.3 分离菌株的分子生物学鉴定

基于 16S rRNA 基因具有“种”间多态区^[24], 对从蜈蚣肠道中分离出的菌株进行 16S rRNA 基因测序。经 BLAST 比对, 确定菌株的同源性及其种属关系。将从蜈蚣肠道分离出的供试菌株划线于 TSA 培养基上, 于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜, 挑取单菌落接种到 TSB 培养基中, 37 °C、160 r/min 振荡培养, 待菌液 OD_{600} 值为 0.5 时取出, 用于菌株 DNA 的提取。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。利用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGACTT-3')^[25] 对供试菌株的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Taq Plus Master Mix 25 μ L, 正、反向引物 (100 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 3 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 呈阳性条带的样品送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果提交到 NCBI 数据库, 使用 BLAST 在 GenBank 数据库中进行 16S rRNA 基因序列的同源性比对分析, 相似度 >95% 则鉴定为同一个属, 相似度 >99%, 则鉴定为同一个种^[26]。采用软件 MEGA v11.0 的邻接法构建系统发育树, 重复取样 1 000 次计算自展值 (bootstrap)。

1.4 产纤维素酶菌株的筛选

将供试菌株点接到 CMC-Na 培养基上, 于 37 °C 生化培养箱中倒置培养 24 h 后用 0.3 g/L 刚果红溶液染色 1 h, 用 5% 的 NaCl 溶液洗脱, 进行纤维素降解功能菌株的筛选。利用已知不能分解纤维素的大肠杆菌作阴性对照。通过观察有无透明圈产生来判断菌株是否具有纤维素降解功能。

1.5 纤维素酶活力的测定

1.5.1 葡萄糖标准曲线的绘制

将葡萄糖置于 110 °C 的烘箱中烘 2 h 至恒重, 称取 0.1 g 葡萄糖溶解于蒸馏水并定容到 100 mL, 得到 1 mg/mL 葡萄糖标准液 100 mL。取 8 只试管, 分别编号为 0-7, 配制浓度不同的葡萄糖溶液, 充分摇匀后分别加入 0.5 mL DNS 溶液, 沸水浴 5 min, 取出用流水冷却后用蒸馏水定容到 6.25 mL, 充分混匀。以 0 号试管溶液为空白对照, 测定其他各管溶液对波长为 520 nm 光波的吸收值(A)并记录结果, 以葡萄糖含量(mg)为纵坐标, 以对应的 A 值为横坐标, 绘制出葡萄糖标准曲线。

1.5.2 蜈蚣肠道可培养菌株产纤维素酶活力测定

挑取供试菌株 N1-N23 单菌落于 TSB 培养基中, 37 °C、170 r/min 振荡培养 24 h, 以 1% 的接种量接到发酵培养基中 (pH 5.0) 于 37 °C、180 r/min 振荡培养 48 h。然后将菌液于 6 000 r/min 离心 10 min, 取 150 μ L 上清液作为粗酶液。采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法, 即 150 μ L 粗酶液与 150 μ L 羧甲基纤维素钠溶液混合后 45 °C 水浴 10 min, 加入 300 μ L DNS 试剂, 沸水浴 10 min。用移液枪吸 200 μ L 待测液于 96 孔板中, 每个菌株重复 3 次, 用酶标仪测定待测液在波长为 520 nm 处的 OD 值 (OD_{520})^[26]。酶活力计算: 每分钟从降解羧甲基纤维素钠的溶液中释放出 1 μ mol 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U), 还原糖以葡萄糖等量值计算。

1.6 产纤维素酶的单因素试验

分别设定发酵培养基的起始 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 (培养 48 h, 接种量为 1%), 培养时间为 4、8、16、24、36 和 48 h (发酵培养基起始 pH 值为 5.0, 接种量为 1%) 和接种量为 1%、2%、4%、8%、12% (发酵培养基起始 pH

值为 5.0, 培养 48 h), 测定代表菌株酶活性的变化。酶活测定方法同 1.5.2, 酶标仪测定待测液 OD_{520} 值。

1.7 数据分析

用 Excel 记录并计算实验结果, 采用 GraphPad Prime 9.0 软件的 One-way ANOVA 方差分析不同单因素条件下功能菌产纤维素酶活力的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态学鉴定结果

从分离平板上共挑出 23 个形态各异的菌落, 纯培养菌株分别编号为 N1-N23。其中 3 株菌从 MRS 培养基上分离获得, 其他 20 株皆来源于加热后的样品于 1/3 TSA 培养基中分离获得。加热的样品在 1/3 TSA 培养基上分离的效果最好, 未加热样品在 1/3 TSA 和 MRS 培养基上分离到的菌株较少。图 1 为代表性分离平板(A)和纯化平板(B)。

从蜈蚣肠道中分离获得的 23 个纯培养菌株中, 4 株为革兰氏阴性菌(G^-), 分别为 N3、N14、N18 和 N20, 其余 19 株为革兰氏阳性菌(G^+)。

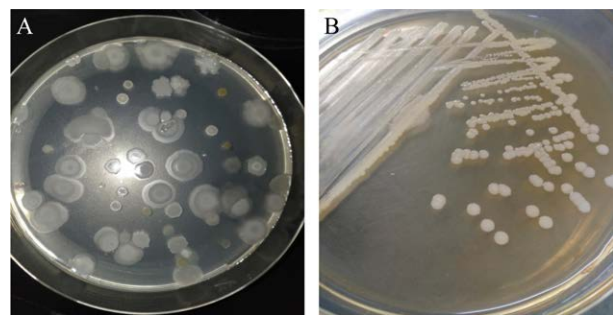


图 1 东方蜈蚣肠道可培养菌的分离平板(A)和纯化平板(B)

Figure 1 Isolation plate (A) and purified plate (B) of culturable bacteria from the gut of *Gryllotalpa orientalis*.

革兰氏染色镜检细胞形态, 结果显示主要为球菌和杆菌。代表菌株的菌落形态观察和革兰氏染色镜检结果详见表 1。

2.2 分离菌株的分子生物学鉴定结果

将菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 的核苷酸数据库, GenBank 登录号为 MW548669-MW548688。基于菌株形态学特征和革兰氏染色镜检的初步鉴定结果, 并通过 BLAST 与 GenBank 中已知 16S rRNA 基因序列相似性比对分析, 对菌株进行鉴定。结果显示, 蜈蚣肠道分离的可培养细菌均可鉴定到种。由表 2 可见, 从蜈蚣肠道分离获得的 23 个菌株可归为 7 属 10 种。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 4 种 14 株, 占比 61%, 其次是肠球菌属(*Enterococcus*) 1 种, 4 株(占 17%)。剩下的 5 个菌属[葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和乳球菌属(*Lactococcus*)]各有 1 个种, 并且都只有 1 株。结合菌株形态学鉴定结果, 如图 2 所示, 选取 10 个代表菌株的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中相似性最高的模式菌株序列进行比对并构建系统发育树。系统发育分析显示鉴定结果可信度高, 发育树分支可信度多为 100%, 并且都大于 80%。

2.3 产纤维素酶菌株的筛选结果

对从蜈蚣肠道获得的菌株进行了产纤维素酶功能的筛选, 以大肠杆菌作为阴性对照。图 3 为筛选实验结果为阳性的代表菌株功能筛选平板图, 透明圈代表该菌株具有产纤维素酶的能力。结果显示, 除了卡氏变形杆菌(*Proteus cibarius*) N18 菌落周围未出现透明圈, 其他 22 株均产生明显的透明圈, 即均具有产纤维素酶的能力。

表 1 东方蝼蛄肠道代表菌株的菌落形态特征和革兰氏染色镜检结果

Table 1 The colony morphology and gram staining results of representative strains from the gut of *Grylotalpa orientalis*

菌株编号 Strain code	菌落形态 Colony morphology	革兰氏染色结果 Gram staining result
N1	黄色不透明, 圆形扁平, 边缘规整 Yellow opaque, round and flat, regular edges	G ⁺ , 细胞为杆状, 菌体接近直链状, 有芽孢, (1.0–1.2) μm×(3.0–5.0) μm G ⁺ , the cells are rod-shaped, the thallus is nearly straight chain-shaped, with spores, (1.0–1.2) μm×(3.0–5.0) μm
N4	白色不透明, 圆形隆起, 边缘规整 White opaque, round bulge, regular edges	G ⁺ , 细胞为球状, 直径 0.5–1.5 μm G ⁺ , the cells are globular, the diameter is 0.5–1.5 μm
N10	白色不透明, 圆形扁平, 边缘规整 White opaque, round and flat, regular edges	G ⁺ , 细胞为圆形, 直径 0.3–0.7 μm G ⁺ , the cells are round, the diameter is 0.3–0.7 μm
N12	白色透明, 不规则扁平, 边缘波浪状 White and transparent, irregular and flat, wavy edges	G ⁺ , 细胞为杆状, (1.2–1.5) μm×(2.0–4.0) μm G ⁺ , the cells are rod-shaped, (1.2–1.5) μm×(2.0–4.0) μm
N14	白色半透明, 不规则扁平, 边缘毛糙 White translucent, irregular and flat, rough edges	G ⁻ , 细胞为直或弯的杆状, 无鞘或突起物, (0.7–0.8) μm×(2.0–3.0) μm G ⁻ , the cells are straight or curved rod-shaped, without sheaths or protrusions, (0.7–0.8) μm×(2.0–3.0) μm
N15	白色不透明, 圆形扁平, 边缘规整 White opaque, round and flat, regular edges	G ⁺ , 细胞为杆状, (0.5–1.5) μm×(3.0–8.0) μm G ⁺ , the cells are rod-shaped, (0.5–1.5)×(3.0–8.0) μm
N18	白色透明, 圆形规整, 边缘规整 White and transparent, round and regular, regular edges	G ⁻ , 细胞为短杆状到卵形, 不产生内生芽孢, (0.4–0.6) μm×(1.0–3.0) μm G ⁻ , the cells are short rod-shaped to ovate, without endophytic spores, (0.4–0.6) μm×(1.0–3.0) μm
N19	白色半透明, 圆形扁平, 边缘规整 White translucent, round and flat, regular edges	G ⁺ , 细胞为球状, 不形成芽孢, 直径 1.0–1.2 μm G ⁺ , the cells are globular, without spores, the diameter is 1.0–1.2 μm
N20	黄色不透明, 圆形隆起, 边缘规整 Yellow opaque, round bulge, regular edges	G ⁻ , 细胞为球形或近球形, 单个, 成对或成堆, 直径 0.5–1.1 μm G ⁻ , the cells are spherical or nearly spherical, single, paired or heaped, the diameter is 0.5–1.1 μm
N21	白色不透明, 圆形扁平, 边缘规整 White opaque, round and flat, regular edges	G ⁺ , 细胞为圆形或卵圆形, 直径小于 2 μm G ⁺ , the cells are round or oval, the diameter is less than 2 μm

表 2 东方蝼蛄肠道菌分子生物学鉴定结果

Table 2 Molecular biology identification results of bacteria from the gut of *Grylotalpa orientalis*

属 Genera	种 Species	菌株编号 Strain code
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	N1、N5、N6、N7、N8、N9、N11、N13、N16、N17
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	N3、N14
	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	N12
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	高地芽孢杆菌 <i>Bacillus altitudinis</i>	N15
	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	N2、N10、N22、N23
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	N4
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	醋酸钙不动杆菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	N19
	变形杆菌属 <i>Proteus</i>	卡氏变形杆菌 <i>Proteus cibarius</i>
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	布甘多肠杆菌 <i>Enterobacter bugandensis</i>	N20
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	应变格氏乳球菌 <i>Lactococcus garvieae</i>	N21

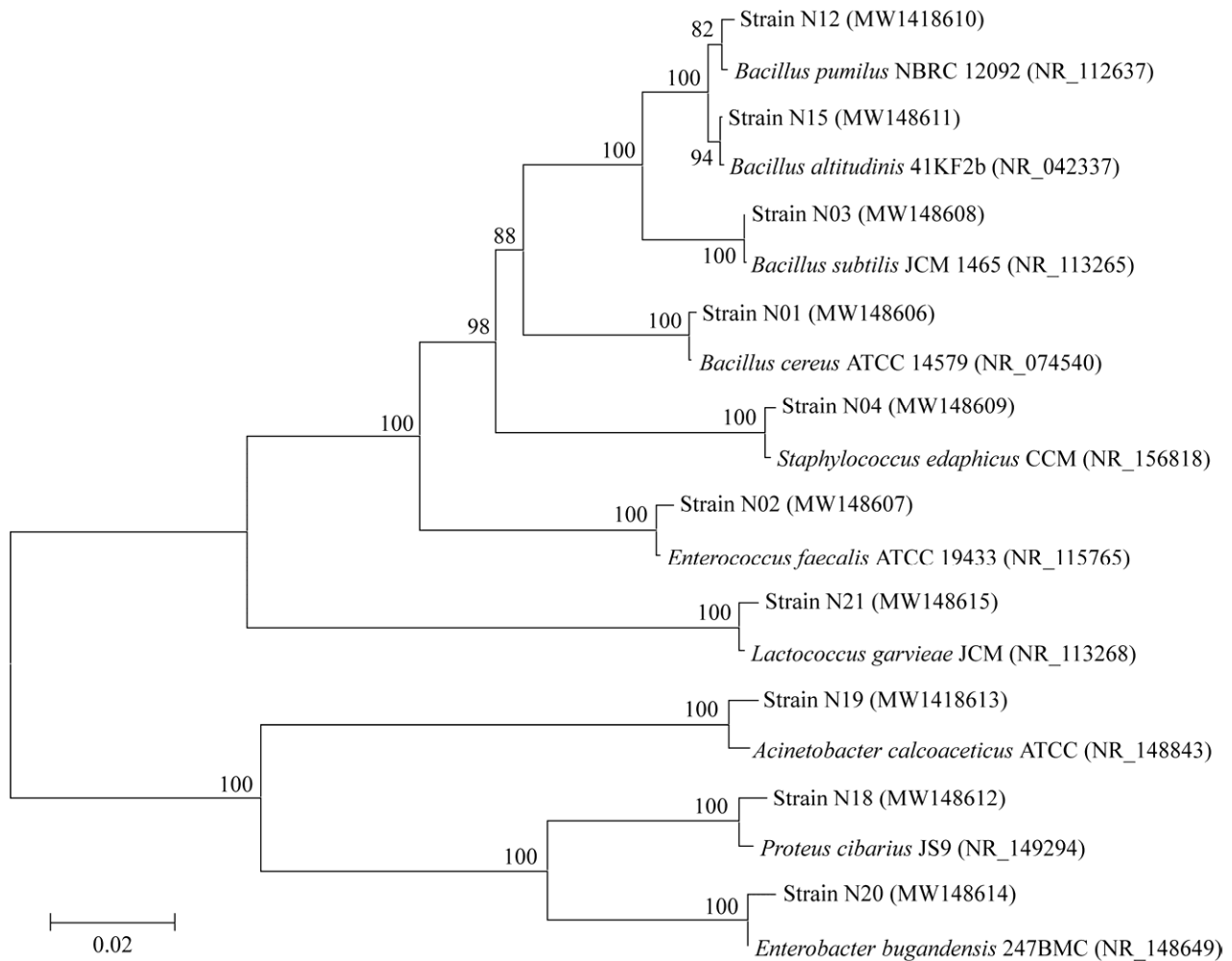


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的蝼蛄肠道菌系统发育树 括号内的序号为相应序列在 GenBank 的登录号；分支点上的数字是自展值，代表进化树分支可信度的百分比；标尺 0.02 表示 2% 的序列分歧

Figure 2 Phylogenetic tree of gut bacteria of *Gryllotalpa orientalis* based on the 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the accession number of the corresponding sequence in GenBank; he numbers at the branch points are the self-spread values representing the percentage of the evolutionary tree branch confidence; The scale 0.02 indicates 2% of sequence divergence.

2.4 功能菌株产纤维素酶活性的定量分析

基于水解圈法对蝼蛄肠道菌产纤维素酶功能筛选的结果,使用 DNS 法对 22 株产酶菌株进行产纤维素酶活性的定量分析。DNS 法实验中,葡萄糖的标准曲线方程为 $y=2.4786x-0.0786$, 相关系数 $R^2=0.9974$ 。实验结果如图 4 所示, 22 个菌株酶活平均值均 >5 U/mL, 其中有 4 个

菌株的产酶活性较强, 平均值均 >8 U/mL, 分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) N3、N14、高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*) N15, 以及应变格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) N21。其酶活力平均值依次为 23.69、22.47、13.81 和 8.48 U/mL。选取这 4 株菌为后续单因素对酶活力影响的供试菌株。

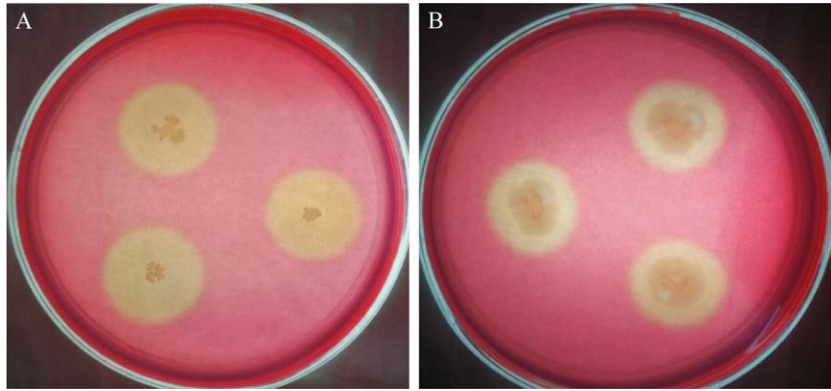


图3 蟋蟀肠道菌 N3 (A)和 N14 (B)纤维素降解功能鉴定结果

Figure 3 Identification results of cellulose degradation function of gut bacteria N3 (A) and N14 (B) from *Gryllotalpa orientalis*.

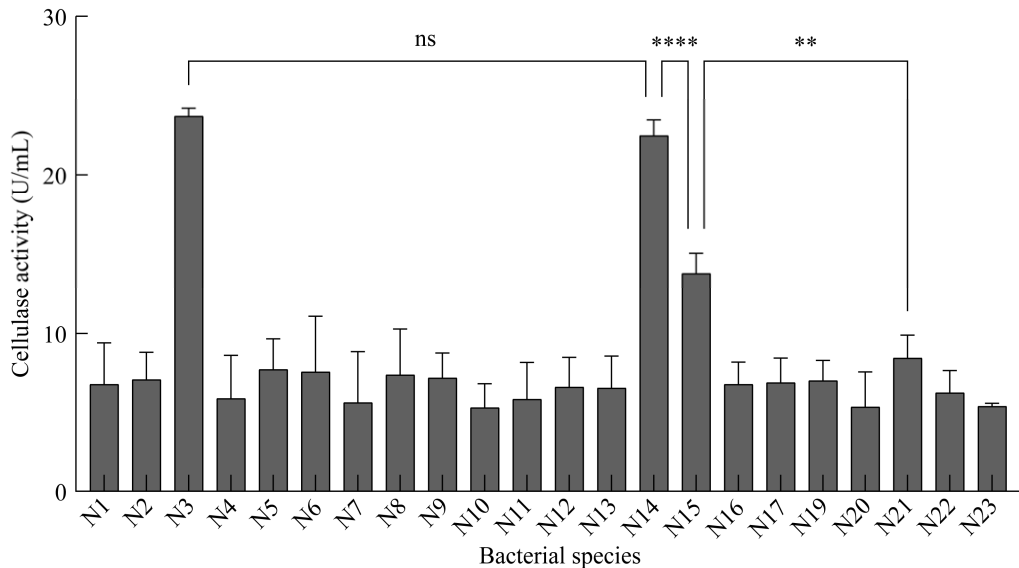


图4 蟋蟀肠道菌的产纤维素酶活力 横坐标为菌株编号. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$; ns: 无显著性差异

Figure 4 The enzyme activity of cellulase-producing strains from the gut bacteria of *Gryllotalpa orientalis*. The horizontal axis represents the strain code. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant.

2.5 不同单因素对产纤维素酶活力的影响

培养基的 pH、培养时间、菌液接种量的改变均影响菌株的生长,从而间接影响菌株的产酶能力。通过对不同条件下产纤维素酶活力的测定,分别探索各检测因素对菌株 N3、N14、N15 和 N21 产酶活力的影响,结果如图 5 所示。

在培养时间为 48 h,接种量为 1%保持不变

的条件下, pH 对菌株产酶能力的影响如图 5A 所示。菌株 N3、N14、N15 和 N21 的产酶活力在 pH 5.0 时达到最大,酶活力分别为 21.47、20.85、13.73 和 8.61 U/mL。酶活力随 pH 增大呈下降趋势,菌株 N3、N14 和 N15 在 pH 9.0 时,酶活力有所回升。菌株 N3 在 pH 5.0–9.0 的所有梯度中,酶活力都最大,其次是菌株 N14。实验

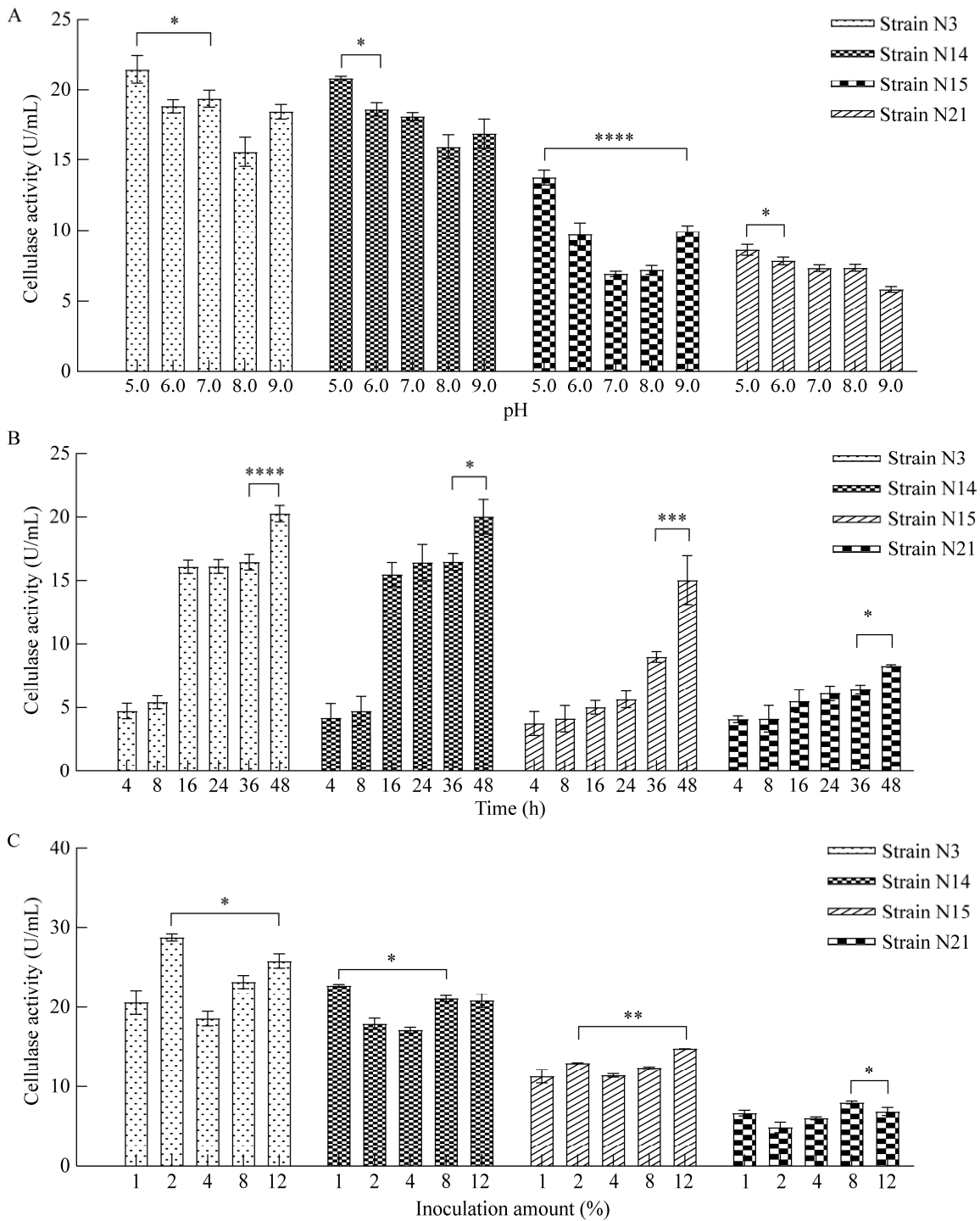


图 5 不同单因素对菌株 N3、N14、N15 和 N21 产纤维素酶活力的影响 A-C 分别为 4 株菌在不同 pH、培养时间和接种量条件下产纤维素酶的活力

Figure 5 The effects of different single factors on the cellulase activity produced by strains N3, N14, N15 and N21, respectively. A-C shows the cellulase producing viability of four strains at different pH, culture time and inoculation amount conditions, respectively. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

结果显示, 发酵培养基 pH 5.0 时供试菌株产纤维素酶活力最强; 并且在任意 pH 值, 菌株 N3 和 N14 的产酶能力都具有优势。

在发酵培养基起始 pH 值为 5.0, 接种量为 1% 保持不变的条件下, 培养时间对菌株产酶能力的影响如图 5B 所示。菌株 N3 和 N14 的产酶能力更加接近, 并且都远高于菌株 N15 和 N21, 检测菌株都在 48 h 时酶活力达到最大值, 分别为 20.26、20.01、15.02 和 8.28 U/mL。因此, 供试菌株在培养时间为 48 h 时产酶能力最强。

在发酵培养基起始 pH 值为 5.0, 培养时间为 48 h 保持不变的条件下, 接种量对菌株产酶能力的影响如图 5C 所示。菌株 N3 和 N14 在接种量分别为 2% 和 1% 时产酶活力最强, 酶活力分别为 28.76 U/mL 和 22.74 U/mL; 菌株 N15 和 N21 在接种量分别为 12% 和 8% 时产酶活力最强, 酶活力分别为 14.82 U/mL 和 7.98 U/mL。可见, 接种量对 4 个菌株产酶活力影响各不相同。

综上所述, 发酵培养基的初始 pH、发酵时间和菌液接种量都是影响菌株产纤维素酶能力的重要因素。在实验设定的梯度范围内, 从蜈蚣肠道分离菌中筛选出的产纤维素酶功能菌株 N3、N14、N15 和 N21 在发酵培养基起始 pH 5.0 的条件下, 或培养时间为 48 h 时产酶能力最强。其他培养条件相同时, 菌株 N3 在接种量为 2%, N14、N15 和 N21 接种量分别为 1%、12% 和 8% 时产酶能力最强。检测菌株中 N3 和 N14 的产酶能力较强, 二者皆为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 其次为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*) N15 和应变格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) N21。筛选出的功能菌株产纤维素酶的关键影响因素和最佳产酶条件还有待继续探究。

3 讨论与结论

在 21 世纪, 全球范围内工业酶的评估价值

在 2020 年约为 59 亿美元, 预计到 2026 年将增长至 87 亿美元^[27]。因此, 开发具有良好产酶潜力的微生物资源将成为现代工业生物技术的关键方向。昆虫肠道菌分泌大部分特异性消化酶^[28], 因其含有消化酶的功能基因, 成为了微生物酶活性分子的潜在来源。2017 年, Banerjee 等^[29]从非洲蜈蚣肠道分离出了一株嗜碱性产蛋白酶菌株, 首次报道了蜈蚣肠道共生菌的功能。蜈蚣作为一种生物资源, 其肠道共生菌资源丰富。本研究对蜈蚣肠道菌的多样性和产纤维素酶功能菌株进行了初步研究。从蜈蚣肠道分离获得 23 株菌, 有 22 株具有纤维素降解功能, 这可能与蜈蚣取食菊科、藜科和十字花科等多个科的植物密切相关, 蜈蚣肠道菌可能辅助宿主消化, 充分利用食物中的纤维素, 供给宿主生长代谢所需。从蜈蚣肠道筛选出的 22 株产纤维素酶菌株中, 14 株为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 占比高达 61%。江学斌等^[30]从 14 株细菌中筛选出的 7 株产纤维素酶菌株均为芽孢杆菌, 与本研究结果类似。

芽孢杆菌的高抗逆性和高产纤维素酶量使其成为纤维素降解菌研究中的重要菌种^[31]。产纤维素酶的芽孢杆菌在畜牧业中受到关注, 芽孢杆菌菌株具有嗜温、好氧等生理特征; 具有抗逆性强、发酵周期短、分泌胞外酶等优势^[32]。从蜈蚣肠道筛选出的芽孢杆菌可进一步开发用于添加到饲料中的益生菌, 在帮助动物拮抗病原菌、调节胃肠道微生态平衡、提供多种酶类和营养物质等方面具有潜在的应用价值。此外, 随着农作物种植面积不断增加, 秸秆处理问题变得严峻。在堆肥处理时, 耐高温菌能够很好地发挥菌株降解纤维素的能力^[33]。从蜈蚣肠道分离出的菌株大多数为耐热菌, 具有开发优势, 其最佳产酶条件的优化与菌株应用有待进一步深入探究。

REFERENCES

- [1] HAMMER TJ, BOWERS MD. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants[J]. *Oecologia*, 2015, 179(1): 1-14.
- [2] 王争艳, 雍哈紫, 胡海生. 共生菌与昆虫的免疫[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2893-2904.
- WANG ZY, YONG HZ, HU HS. Symbiotic bacteria and insect immunity[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2893-2904 (in Chinese).
- [3] 张娜, 赵曼, 王关红. 昆虫共生微生物在病虫害防治的研究进展[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(1): 220-230.
- ZHANG N, ZHAO M, WANG GH. Research progress on microbial symbionts against pest and disease[J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(1): 220-230 (in Chinese).
- [4] 陈勃生, 鲁兴萌, 邵勇奇. 鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性及其与宿主的相互作用[J]. *昆虫学报*, 2017, 60(6): 710-722.
- CHEN BS, LU XM, SHAO YQ. Diversity of the gut microbiota in lepidopteran insects and their interaction with hosts[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(6): 710-722 (in Chinese).
- [5] 魏舸, 白亮, 曲爽, 王四宝. 昆虫共生微生物在病虫害和疾病控制上的应用前景[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1090-1102.
- WEI G, BAI L, QU S, WANG SB. Insect microbiome and their potential application in the insect pest and vector-borne disease control[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1090-1102 (in Chinese).
- [6] 张伟, 孟洁, 宁静, 秦培君, 周娇, 邹振, 王燕红, 江红, FAHEEM Ahmad, 赵莉茜, 孙江华. 松墨天牛对共生真菌和病原真菌的差异化免疫响应[J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(9): 988-996.
- ZHANG W, MENG J, NING J, QIN PJ, ZHOU J, ZOU Z, WANG YH, JIANG H, FAHEEM A, ZHAO LL, SUN JH. Differential immune response of *Monochamus alternatus* to symbiotic fungi and pathogenic fungi[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2017, 47(9): 988-996 (in Chinese).
- [7] 刘最, 何丽芳, 陈晓华, 滕涛, 李玉中. 纤维素降解菌的筛选、酶活及对稻草秸秆的降解研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2018, 26(2): 46-52.
- LIU Z, HE LF, CHEN XH, TENG T, LI YZ. Study on screening cellulose-degrading fungi and its enzyme activity and the effect on the degradation of rice straw[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2018, 26(2): 46-52 (in Chinese).
- [8] 胡亚楠, 贺旭, 亚森·沙力, 罗明, 张宇宏, 张帅. 大蜡螟和黄粉虫肠道菌中聚乙烯地膜降解细菌的筛选及其降解性能[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4029-4041.
- HU YN, HE X, YASENShali, LUO M, ZHANG YH, ZHANG S. Screening of polyethylene film-degrading bacteria from gut microbiota of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4029-4041 (in Chinese).
- [9] 王宁, 李小波, 刘文彬, 唐彬, 汪洁, 朱家勇, 金小宝. 美洲大蠊肠道耐热碱性蛋白酶产生菌筛选及其酶特性[J]. *环境昆虫学报*, 2022, 44(1): 212-220.
- WANG N, LI XB, LIU WB, TANG B, WANG J, ZHU JY, JIN XB. Screening and identification of thermostable alkaline protease-producing bacteria from the gut of *Periplaneta americana* and its enzyme characteristics[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44(1): 212-220 (in Chinese).
- [10] 夏琬婷, 陈芳敏, 何雨薇, 袁霞, 刘洛源. 杜比亚蟑螂肠道菌的分离鉴定及产消化酶功能菌株的筛选[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(12): 4999-5008.
- XIA WT, CHEN FM, HE YW, YUAN X, LIU MY. Isolation and identification of gut bacteria from *Blattella germanica* and screening of digestive enzyme-producing strains[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(12): 4999-5008 (in Chinese).
- [11] 何雨薇, 陈芳敏, 夏琬婷, 刘娟, 黄晨晨. 马蜂肠道菌的分离鉴定及产消化酶功能菌株的筛选[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(6): 2624-2634.
- HE YW, CHEN FM, XIA WT, LIU X, HUANG CC. Isolation and identification of gut bacteria from *Vespa mandarinia* Smith and screening of digestive enzyme-producing strains[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(6): 2624-2634 (in Chinese).
- [12] 梅承, 范硕, 杨红. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 985-994.
- MEI C, FAN S, YANG H. The strategies of isolation of insect gut microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 985-994 (in Chinese).
- [13] 吕文祥, 刘丽娟, 公茂庆. 昆虫肠道菌群的功能及检测方法研究进展[J]. *热带病与寄生虫学*, 2021, 19(5): 284-287, 296.
- LÜ WX, LIU LJ, GONG MQ. Advances in functions and detection methods of insect intestinal microflora[J]. *Journal of Tropical Diseases and Parasitology*, 2021, 19(5): 284-287, 296 (in Chinese).
- [14] 夏先全, 魏会廷, 肖万婷, 敬华英, 张伟, 邢艳, 叶慧丽. 小麦地下害虫及土传病害虫病一体预防技术[J]. *四川农业科技*, 2022(7): 34-36.

- XIA XQ, WEI HT, XIAO WT, JING HY, ZHANG W, XING Y, YE HL. Integrated prevention technology of underground pests and soil-borne diseases in wheat[J]. Sichuan Agricultural Science and Technology, 2022(7): 34-36 (in Chinese).
- [15] 陈长青, 薛建国, 李慧. 秋季地下害虫蛴螋、金针虫、蝼蛄等的发生防治[J]. 农家参谋, 2022(3): 72-74.
CHEN CQ, XUE JG, LI H. Occurrence and control of underground pests such as grubs, needle worms and mole crickets in autumn[J]. The Farmers Consultant, 2022(3): 72-74 (in Chinese).
- [16] 李大鹏. 林木地下害虫防治技术[J]. 现代农村科技, 2023(7): 43-44.
LI DP. Control technology of underground pests in forest trees[J]. Modern Rural Science and Technology, 2023(7): 43-44 (in Chinese).
- [17] 王君, 郝丽平, 白静, 王敏, 张树林, 高鹏岩, 宋立立, 张连水. 枯草芽孢杆菌产纤维素酶活力条件的研究[J]. 饲料研究, 2021, 44(16): 85-88.
WANG J, HAO LP, BAI J, WANG M, ZHANG SL, GAO PY, SONG LL, ZHANG LS. Study on cellulase producing conditions of *Bacillus subtilis*[J]. Feed Research, 2021, 44(16): 85-88 (in Chinese).
- [18] 李乐, 李明星, 汤国雄, 薛冰, 李星, 刘洋, 邱忠平. 一株纤维素酶产生菌的筛选与产酶特性研究[J]. 环境科技, 2019, 32(1): 24-29.
LI L, LI MX, TANG GX, XUE B, LI X, LIU Y, QIU ZP. Optimization of enzyme production conditions for a cellulase-producing strain[J]. Environmental Science and Technology, 2019, 32(1): 24-29 (in Chinese).
- [19] 温冬灼, 张智, 魏罡, 张晓彤. 纤维素降解芽孢杆菌筛选及产酶条件优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2022, 42(2): 169-180.
WEN DZ, ZHANG Z, WEI G, ZHANG XT. Screening of cellulose-degrading bacillus and optimization of enzyme production conditions[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2022, 42(2): 169-180 (in Chinese).
- [20] 李慧, 常景玲. 非洲蝼蛄消化道组织结构的观察[J]. 四川动物, 2006, 25(3): 552-553.
LI H, CHANG JL. Observation on tissue structure of digestive tract of *G. africana* palisot de beauvois[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2006, 25(3): 552-553 (in Chinese).
- [21] 邓振山, 赵瑞华, 贺晓龙, 刘月芹. 提高大学生科学探究实践的案例设计与分析: 《以革兰氏染色方法及机理》为例[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2019, 38(3): 77-79, 85.
DENG ZS, ZHAO RH, HE XL, LIU YQ. Case design and analysis of improving college students' scientific inquiry practice: a case study of Gram staining method and mechanism[J]. Journal of Yan'an University (Natural Science Edition), 2019, 38(3): 77-79, 85 (in Chinese).
- [22] 张爱梅, 郭大城, 王建丽, 张保华, 陈豪敏. 国内菌种保藏材料及保藏方法研究现状[J]. 河南预防医学杂志, 2011, 22(6): 405-407, 412.
ZHANG AM, GUO DC, WANG JL, ZHANG BH, CHEN HM. The recent research of our country in the material and methods of the virus preservation[J]. Henan Journal of Preventive Medicine, 2011, 22(6): 405-407, 412 (in Chinese).
- [23] 李文均, 陈瑛, 田新朋, 焦建宇. 《伯杰氏鉴定细菌学手册》和“伯杰氏国际系统微生物学学会”历史回顾、发展现状及未来展望[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 1714-1723.
LI WJ, CHEN Y, TIAN XP, JIAO JY. Historical review, development status and future prospect of Berger's Handbook of Bacteriological Identification and Berger's International Society for Systems Microbiology[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(5): 1714-1723 (in Chinese).
- [24] THORNE JL, KISHINO H, PAINTER IS. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution[J]. Molecular Biology and Evolution, 1998, 15(12): 1647-1657.
- [25] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [26] 单体江, 段志豪, 吴春银, 李志强, 王松, 毛子翎. 杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物及其生物活性[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(1): 170-179.
SHAN TJ, DUAN ZH, WU CY, LI ZQ, WANG S, MAO ZL. Secondary metabolites of symbiotic fungi isolated from *Blattella germanica* and their biological activities[J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(1): 170-179 (in Chinese).
- [27] Industrial enzymes market by type (carbohydrases, proteases, non-starch polysaccharides & others), application (food & beverage, cleaning agents, animal feed & others), brands by region global trends and forecasts to 2026[EB/OL]. <http://www.marketsandmarkets.com/MarketReports/industrial-enzymesmarket-237327836>.
- [28] JING TZ, QI FH, WANG ZY. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential

- nutrient provision?[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 38.
- [29] BANERJEE S, MAITI TK, ROY RN. Protease production by thermo-alkaliphilic novel gut isolate *Kitasatospora cheerisanensis* GAP 12.4 from *Gryllotalpa africana*[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2017, 35(3): 168-176.
- [30] 江学斌, 成雪鸿, 马苗鹏, 邓仲晴, 李嘉慧. 产纤维素酶芽孢杆菌的鉴定与酶活力比较[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(4): 116-122.
- JIANG XB, CHENG XH, MA MP, DENG ZQ, LI JH. Identification and enzyme activity comparison of cellulase-producing *Bacillus*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(4): 116-122 (in Chinese).
- [31] 韦海婷, 刘晗璐, 李光玉, 司华哲, 刘晓颖. 梅花鹿瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及其酶活力测定[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(4): 888-897.
- WEI HT, LIU HL, LI GY, SI HZ, LIU XY. Isolation, identification and determinations of cellulose-degrading bacteria from sika deer (*Cervus nippon*) rumen[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(4): 888-897 (in Chinese).
- [32] 张元昊, 李豪, 张敏琪, 徐雪明, 赵莹, 张然, 张振东, 桂仲争. 一株蚕沙纤维素降解菌的鉴定及产酶优化和生物强化效果[J]. *蚕业科学*, 2023, 49(6): 551-559.
- ZHANG YH, LI H, ZHANG MQ, XU XM, ZHAO Y, ZHANG R, ZHANG ZD, GUI ZZ. Identification of a cellulose-degrading bacteria from silkworm excrement and optimization of enzyme production and its bioaugmentation effect[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2023, 49(6): 551-559 (in Chinese).
- [33] 王永伦, 余克非, 郑展望. 1 株耐高温纤维素降解菌发酵条件优化与秸秆降解应用[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(19): 229-236, 244.
- WANG YL, YU KF, ZHENG ZW. Optimization of fermentation conditions of a cellulose degrading strain with high temperature resistance and its application in straw degradation[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(19): 229-236, 244 (in Chinese).