

# 白蚁肠道可培养菌群及其功能初探

刘冰, 林景栋, 宋水林, 吴德龙

(江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:** 白蚁是一种危害严重的昆虫, 其以破坏木质而家喻户晓。文献表明, 白蚁对木质强大的消化能力很大程度上取决于其肠道微生物的影响。为了探究白蚁肠道微生物的类群, 本试验以黑翅土白蚁为材料, 分离纯化获得其肠道主要可培养微生物的纯培养 112 种, 其中喜氧菌 35 种, 厌氧菌 77 种; 在分离出的微生物类群中, 通过刚果红法初步筛选出 12 种喜氧菌菌株可能具有纤维素酶活性, 其最大透明圈达到 4.0 cm×4.0 cm; 进一步检测这些菌株的纤维素酶活性发现, 12 株菌均具有羧甲基纤维素钠盐 (CMC-NA) 酶活性和滤纸酶活性, 但是大部分菌株羧甲基纤维素酶活性较弱, 而一些菌株如 NBY14 滤纸酶活较高, 可达到 16.188u/mL。试验结果可为黑翅土白蚁防治提供依据, 亦可为纤维素酶的开发利用奠定基础。

**关键词:** 白蚁; 肠道菌群; 刚果红法; 羧甲基纤维素酶; 滤纸酶

中图分类号: S476.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 02-0172-05

## The Microbes Cultured and Their Function in the Gut of Termites

LIU Bing, LIN Jing-dong, SONG SHui-lin, WU De-long

(College of Agriculture, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Termites, an important pest, were known by everyone because of their damage to the wood. It is suggested that the digestive ability of termites on wood depends mainly on the intestinal microbes in some literatures. In order to know the microbes in the gut of termites, in this experiment, by regarding *Odontotermes formosanus* as materials, 112 species were separated and purified from the gut of termites, and 35 strains are aerophile and 77 strains are anaerobic. In all microorganisms, 12 aerophile species, which may have the activity of cellulose, were screened by Congo red method initially. the largest transparent circle get up to 4.0 cm×4.0 cm. Further, the cellulase activities of 12 strains were checked. The results showed that the sodium carboxy methyl cellulose (CMC-Na) enzyme activity and the filter paper enzyme activity were presented in the ferment liquid of 12 strains, but the sodium carboxy methyl cellulose enzyme activity of numerous strains is lower and the filter paper enzyme activity of some strains, eg. strain NBY14 is higher up to 16.188 u/ml. It is significant that the results not only provide the basis for controlling the termite but also lay the foundation for the development and utilization of cellulose.

**Key words:** Termites; Intestinal microbes; Congo red method; Sodium carboxy methyl cellulose enzyme activity; Filter paper enzyme activity

白蚁是一类重要的的社会性昆虫, 属于昆虫纲 等翅目, 是一类世界性害虫, 自古就有“千里长堤,

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 江西农业大学博士启动基金, 江西农业大学校科技基金, 江西省自然科学基金 (2010GQN0056), 江西省教育厅青年科学基金项目 (GJJ11085)

作者简介: 刘冰, 女, 陕西西安人, 博士, 讲师, 主要从事植物病理学和微生物学方面的教学与科研工作。E-mail: bingbing791202@yahoo.com.cn

毁于蚁穴”之说。白蚁通过筑巢、取食途径为害建筑、堤坝水库和农林作物等<sup>[1]</sup>,对国民经济许多领域造成重大损失。作为一类取食纤维素类物质的昆虫,白蚁的食料主要是木质纤维素类物质,其依靠内源和外源型纤维素酶将木质纤维素降解为可完全吸收利用的营养物质<sup>[2]</sup>。据报道,寄生于白蚁后肠的单细胞原生动、真菌、细菌和白蚁肠道上皮细胞都能分泌纤维素酶<sup>[3]</sup>。通过对其虫体肠道微生物群落及其产纤维素酶的研究有助于阐明白蚁利用纤维素的机理,发现白蚁体内可能存在的可产高活性纤维素酶的菌株,对于探索害虫治理新途径具有新的积极意义<sup>[4]</sup>。

本实验以黑翅土白蚁为材料,采用分离培养法探究高等白蚁肠道的微生物区系,应用刚果红法和分光光度计法相结合检测菌株的纤维素酶活性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验虫源及培养

供试白蚁为江西农大校园周围收集的黑翅土白蚁,在培养皿中滴几滴葡萄糖液和树皮,置于室温条件下培养。

### 1.2 白蚁悬液的制备

在收集的白蚁中选取0.5 g(50头)左右的白蚁,放于0.9%生理盐水中,用解剖刀切去头胸部,表面消毒后,用生理盐水反复漂洗,放入研钵中,加1.8 mL SAB缓冲液冰浴研磨,转移至离心管10 000转/min离心10 min(4℃),取上清液即白蚁肠道微生物悬液,于-20℃冷冻保存备用<sup>[5]</sup>。

### 1.3 培养基及试剂

牛肉膏蛋白胨(琼脂)培养基、PDA培养基、高氏一号培养基按照常规方法配制。

纤维素-刚果红培养基:称取100 mg刚果红于蒸馏水中,配置成100 mL的溶液,搅拌均匀;将配置好的刚果红试剂装入试剂瓶中备用。

二硝基水杨酸(DNS)显色试剂:配制500 mL含有182 g酒石酸钾钠的热水溶液,加入5 g重蒸馏酚和5 g亚硫酸钠,与6.3 g DNS和262 mL 2 mol·L<sup>-1</sup> NaOH进行混合搅拌,然后冷却到室温,最后定容至1 000 mL,贮于带胶塞棕色瓶中<sup>[6]</sup>。

### 1.4 分离与纯培养

1.4.1 白蚁肠道喜氧菌的分离纯化 采用稀释分离法:用一支1 mL无菌吸管吸取1 mL白蚁肠道微生

物悬液加入盛有9 mL无菌水的试管中充分混匀,然后用无菌吸管从此试管中吸取1 mL加入另一支盛有9 mL无菌水的试管中,混合均匀,以此类推按10倍梯度稀释至10<sup>-5</sup>。取10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup>稀释液各0.1 mL,用无菌玻璃涂棒在培养基表面轻轻的涂布均匀,室温下静置5~10 min,使菌液吸附进培养基。于25℃±1℃恒温培养箱中培养。所有的处理均做3次重复。将培养基上的菌落挑取进行纯化。将高氏1号培养基平板倒置于28℃中培养3~5 d,肉膏蛋白胨平板倒置于37℃中培养2~3 d<sup>[7]</sup>。

1.4.2 白蚁肠道厌氧菌的分离培养 采用生物耗氧法:取玻璃板一块或培养皿盖,洗净,干燥后灭菌,铺上一薄层灭菌脱脂棉,将1 g焦性没食子酸放在其上。用肉膏蛋白胨琼脂培养基倒平板,待凝固稍干燥后,在平板上一半划线待测样品。滴加10% NaOH溶液约2 mL于焦性没食子酸上,切勿使溶液溢出棉花,立即将已接种的平板覆盖于玻璃板上或培养皿盖上,必须将脱脂棉全部罩住,而焦性没食子酸反应物不能与培养基表面接触。以溶化的石蜡凡士林液密封皿底与玻板或皿盖的接触处,置30℃培养,定期观察平板上菌种的生长状况并记录<sup>[8]</sup>。

### 1.5 产纤维素酶活性菌株的筛选

将分离到的菌落接种在纤维素-刚果红琼脂培养基上,培养2~5天后观察各平板上出现的细菌菌落。观察菌株是否产生透明圈并记录透明圈的直径(纤维素降解菌的菌落周围会产生一透明圈)<sup>[9]</sup>。

### 1.6 纤维素酶活性测定

将各菌株接入液体培养基中,于摇床(29℃,160 r/min)中培养5 d。发酵液以5 000 r/min离心10 min,上清液即为粗酶液。按照DNS法绘制标准曲线<sup>[10]</sup>,采用DNS法测定还原糖质量浓度。计算酶活力(以每分钟产生1 μmol还原糖所需的酶量为一个酶活力单位, X)

$$X = A \times 1 / 0.5 \times n \times 2$$
(X:酶活力,单位u/mL;A:吸光度在标准曲线上查的或计算得到的还原糖量,单位mg;1/0.5:换算成酶液1 mL;n:酶液的稀释倍数)<sup>[11,12]</sup>

1.6.1 滤纸酶活性(FPA)测定 取0.5 mL待测液加1 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>、pH 5.0的醋酸缓冲液,预热到50℃,加入1条1 cm×6 cm新华滤纸(50±1 mg),50℃保温1 h。取出,沸水浴灭活5 min,冷却至室温,用3 mL DNS试剂显色稀释3倍,测D值(540 nm)。

*D* 值越大, 说明该菌株的酶活力越强。

1.6.2 羧甲基纤维素钠盐(CMC-Na) 酶活性测定 取 0.5 mL 待测液, 加入已预热到 50 °C, 质量分数为 50%的 CMC-Na(溶于 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH4.5 醋酸缓冲液中)2 mL, 50 °C 保温 30 min, 沸水浴灭活 5 min, 冷却至室温, 用 3 mL DNS 试剂显色后稀释 3 倍, 测 *D* 值(540 nm)<sup>[7]</sup>。*D* 值越大, 说明该菌株的酶活力越强。

1.6.3 滤纸崩溃的测定 取 15 mm×150 mm 试管 1 支, 加入醋酸缓冲液 1 mL, 粗酶液 4 mL 及 1 cm×3 cm 新华滤纸 1 条, 摇匀, 使滤纸全部浸入溶液中, 然后将试管放入 40 °C 恒温水浴中保温 2 h, 取出后

观察滤纸崩溃情况, 以“+”的多少来表示滤纸崩溃程度。“+”越多, 说明该菌株的酶活力越强<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 白蚁肠道菌群的分离

2.1.1 喜氧菌的分离 采用稀释分离法从白蚁肠道内获得主要可培养喜氧菌约有 35 种, 每克肠道鲜组织可分离到 71 个单菌落 (cfu/g 鲜重)。在分离出的喜氧菌中, 真菌的主要培养特征为白色, 菌落小, 近圆形; 细菌的主要培养特征是白色, 菌落小, 不规则 (表 1)。在整个分离中, 共得到真菌 14 种, 细菌 21 种。

表 1 白蚁肠道内部分喜氧菌的种类及培养特征

菌株	类群	培养特征 (色泽, 面积, 形状)	菌株	类群	培养特征 (色泽, 面积, 形状)
NBY11	细菌	红色, 小, 规则圆	NBY26	真菌	白色, 小, 十字状
NBY12	细菌	黄色, 小, 规则圆	NBY27	细菌	白色, 小, 不规则
NBY13	细菌	白色, 大, 规则圆	PDY12	真菌	白色, 大, 规则圆
NBY14	真菌	白色, 小, 不规则	GDY11	真菌	浅黄色, 小, 不规则
NBY15	真菌	橙色, 小, 规则圆	GDY12	真菌	白色, 大, 不规则
NBY16	细菌	白色, 大, 不规则	GDY13	真菌	浅黄色, 大, 太阳状
NBY21	真菌	黄色, 小, 规则圆	GDY14	真菌	白色, 小规则圆
NBY22	细菌	浅绿色, 小, 规则圆	GDY15	真菌	红色, 小, 规则圆
NBY23	细菌	白色, 小, 五角状	NDY11	真菌	白色, 大, 规则圆
NBY24	细菌	白色, 小, 规则圆	NDY12	真菌	白色, 小, 规则圆
NBY25	细菌	白色, 小, 不规则	NDY14	真菌	乳白色, 大, 规则圆
NDY13	真菌	白色, 小, 规则一连串圆			

2.1.2 厌氧菌的分离 采用生物耗氧法从白蚁肠道内获得主要厌氧菌约有 77 种, 每克白蚁肠道鲜组织可分离到 149 个单菌落 (cfu/g 鲜重)。

### 2.2 纤维素酶活性菌株的初步筛选

在刚果红-羧甲基纤维素培养基上接种分离到的喜氧菌, 结果表明, 待测菌株中有 12 株菌菌落周围有透明圈出现。其中菌株 GDY14 的透明圈直径最大, 达到 3.42 cm; 菌株 NBY15 的透明圈直径最小, 仅为 1.90 cm (表 2)。

### 2.3 菌株的纤维素酶活性测定

2.3.1 葡萄糖标准曲线的绘制及标准方程 通过 DNS 法绘制标准曲线后, 获得其标准方程为  $y=0.5698x-0.0185$ ,  $R^2=0.9937$ 。

2.3.2 活性菌株的滤纸酶活测定 用分光光度计分别测定 12 株活性菌株发酵液中的滤纸酶活性, 结果见表 3。由表可知所有菌株均能产生滤纸酶。其中

菌株 NBY14 发酵液的酶活力最高, 为 16.188 u/mL; 菌株 NDY2 发酵液的酶活力最低, 仅为 0.652 u/mL。

表 2 不同菌株在刚果红-纤维素培养基上的水解圈直径

菌株	透明圈平均值 (cm)
NBY14	5.73
NBY15	1.90
PDY12	2.31
GDY11	2.51
GDY12	2.83
GDY13	3.12
GDY14	3.42
GDY15	2.10
NDY11	3.35
NDY12	3.05
NDY13	2.14
NDY14	2.31

表3 白蚁肠道内喜氧菌菌株滤纸酶活

菌株	D 值 1	D 值 2	平均 D 值	还原糖含量(mg)	酶活力 (u/mL)
NBY14	2.285	2.285	2.285	4.047	16.188
NBY15	1.022	1.022	1.022	1.822	7.288
PDY12	0.125	0.125	0.125	0.251	1.004
GDY11	0.177	0.177	0.177	0.342	1.368
GDY12	0.258	0.258	0.258	0.485	1.940
GDY13	0.332	0.332	0.332	0.615	2.460
GDY14	1.155	1.155	1.155	2.061	8.244
GDY15	1.642	1.642	1.642	2.917	11.668
NDY11	0.488	0.488	0.488	0.889	3.556
NDY12	0.075	0.075	0.075	0.163	0.652
NDY13	0.127	0.127	0.127	0.254	1.016
NDY14	0.548	0.548	0.548	0.994	3.976

## 2.3.3 羧甲基纤维素钠盐(CMC-Na) 酶活性测定

由表4可知所检测菌株几乎都有羧甲基纤维素酶活性,但是大部分菌株发酵液的酶活力较低。其

中菌株NDY11和GDY15表现出较强的酶活力,分别为2.628 u/g和2.48 u/g。而菌株GDY11酶活力最低,仅为0.28 u/g。

表4 白蚁肠道内喜氧菌菌株羧甲基纤维素钠盐(CMC-Na)酶活性

菌株	D 值 1	D 值 2	平均 D 值	还原糖含量(mg)	酶活力 (u/mL)
NBY14	0.036	0.036	0.036	0.095	0.380
NBY15	0.101	0.101	0.101	0.209	0.836
PDY12	0.055	0.055	0.055	0.128	0.512
GDY11	0.022	0.022	0.022	0.07	0.280
GDY12	0.023	0.023	0.023	0.072	0.288
GDY13	0.042	0.042	0.042	0.105	0.420
GDY14	0.029	0.029	0.029	0.082	0.328
GDY15	0.335	0.335	0.335	0.62	2.480
NDY11	0.356	0.356	0.356	0.657	2.628
NDY12	0.121	0.121	0.121	0.244	0.976
NDY13	0.133	0.133	0.133	0.265	1.060
NDY14	0.056	0.056	0.056	0.13	0.520

## 2.3.4 滤纸崩溃测定

由表5可知,所检测菌株均有不同程度的使滤纸崩溃能力,其中菌株NDY11的崩溃能力最高,导致滤纸表面瓦解为大块的絮状沉淀。

或其他微生物在白蚁肠道消化纤维素过程中可能扮演更重要的角色。

## 3 讨论

通过刚果红-羧甲基纤维素培养基初筛和菌株发酵上清液纤维素酶活性测定发现,所检测的12株菌株几乎都有产纤维素酶活性,其中滤纸酶活性较强的菌株多于CMC-Na酶活较强的菌株,但大部分菌株发酵液的酶活力较低。由此可以推测,厌氧菌

由于厌氧菌的培养不易操作,所以选择合适的方法进行白蚁肠道厌氧菌的检测显得尤为重要。为了定量地测定白蚁肠道中的厌氧菌,本试验采取生物耗氧法(焦性没食子酸和氢氧化钠反应)的方法进行培养。但是以这种方法获得的厌氧菌仅仅只能明确其数量而不能确定其功能,拟在后续试验中采取分子生物学的方法对其进行生物学功能和分类地位方面的深入研究,从而揭示其在白蚁消化纤维素中的作用。

纤维素酶因其广泛的用途备受关注，在自然界中产纤维素酶活性的菌株来源较多，但真正用于工业化生产的却寥寥无几。本试验以白蚁这种特殊的昆虫为材料，初步探索其肠道内菌群产纤维素酶的情况，试验结果不但能从理论上了解菌群在白蚁消化纤维素中的作用，为白蚁防治提供依据，而且可为纤维素酶产生菌的获得开辟一条新途径。另外，本试验中采用刚果红法初筛产纤维素酶菌株发现，菌株菌落透明圈的大小程度受菌落生长情况的影响

很大，而且与纤维素酶活之间没有明确的对应关系，即透明圈的大小不能反映酶活的强弱，这与何强等人的报道不同<sup>[3]</sup>。

此外，有报道表明，产纤维素酶菌株一般对于土传病原菌具有很好的抑制效果，可以作为防治土传病害的生防因子<sup>[14]</sup>。对于本试验中获得具有显著产纤维素酶的菌株，后续工作中将进一步探索它们在植物土传病害防治方面的潜力。

表 5 白蚁肠道内喜氧菌菌株的滤纸崩溃能力

菌株	现象	崩溃程度
ck 对照	溶液清亮，滤纸无崩溃，无色	-
NBY14	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
NBY15	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
GDY11	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
GDY12	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
GDY13	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
GDY14	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
GDY15	溶液稍浑，滤纸稍崩溃，稍黄	+
NDY11	溶液较清亮，有较多大絮状沉淀，稍黄	++++
NDY12	溶液浑浊，有小絮状沉淀，稍黄	+++
NDY13	溶液浑浊，有小絮状沉淀，稍黄	+++
NDY14	溶液浑浊，有小絮状沉淀，稍黄	++
PDY12	溶液较清亮，有较多大絮状沉淀，稍黄	++

注：“+”表示滤纸崩溃程度。

参考文献：

[1] 张大羽, 诸永陈. 黄胸散白蚁和台湾家白蚁不同级虫体内纤维素的活性[J]. 浙江: 浙江大学, 浙江大学学报(农业与生命科学版) 2001, 27(1): 1-4.

[2] 李珺, 张贞华, 李桃生. 低等白蚁肠道内原生动物的分布及其进化学意义[J]. 白蚁科技, 1999(2): 26-29.

[3] 何刚强, 堵国成, 刘立明, 等. 从白蚁中分离筛选纤维素分解菌及其产酶性质[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 352-355.

[4] 胡寅, 莫建初. 白蚁纤维素酶研究的方法学[J]. 城市害虫防治, 2003(03): 77-82.

[5] 杨天赐, 莫建初, 程家安. 中国森林病虫[M]. 西藏人民出版社, 2003, 22(6): 4-7.

[6] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1900, 114-115.

[7] 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: 301-381.

[8] 陈虹, 梅建凤, 闵行. 白蚁肠道微生物[J]. 微生物学杂志, 2005(02): 25-27.

[9] 周津, 阮宏, 孙连奎. 纤维束酶的分离纯化及理化性质研究. 西北大学学报, 2002, 31(1): 113-116.

[10] 宋颖琦, 刘瑞倩, 杨谦. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2002, 34(2): 197-200.

[11] 唐冰. NAG 含量测定中常见的 3 种 DNS 试剂使用效果比较研究[J]. 热带农业科学. 2006, 26(2): 33-35.

[12] 谢占玲, 吴润. 纤维束酶的研究进展[J]. 草业科学, 2007, 21(4): 72-76.

[13] 刘颖, 邵红. 纤维束酶产生菌的鉴定与筛选[J]. 饲料博览, 2003(3): 21-22.

[14] 韩立荣. 一株土传病害生防菌的筛选及其功能开发[D]. 西北农林科技大学. 2010.