

白星花金龟幼虫虫粪可培养微生物的分离鉴定及特性研究

张婷¹, 王霄煜², 吴如微², 张莹莹¹, 霍燃华¹, 李海燕¹, 任杰³, 李洁^{2*} (1.承德市农林科学院, 河北承德 067000; 2.河北民族师范学院, 河北承德 067000; 3.承德市农村土地承包经营权流转管理服务中心, 河北承德 067000)

摘要 [目的] 筛选可培养功能微生物, 为农业废弃物的循环利用提供微生物资源。[方法] 以喂食食用菌渣的白星花金龟幼虫虫粪为研究对象, 采用平板涂布法分离虫粪中的可培养微生物, 并对其分解纤维素和蛋白质能力进行初步探究。[结果] 共分离出细菌 5 株、真菌 3 株, 经鉴定, 分别为纤维化纤维微细菌、铅黄肠球菌、原玻璃蝇节杆菌、谷氨酸杆菌、灰色链霉菌、热带假丝酵母、长枝木霉和白地霉。其中纤维化纤维微细菌和灰色链霉菌具有降解蛋白质的能力, 在酪蛋白培养基上透明圈直径与菌落直径的比值(HC)分别为 7.259 ± 0.417 和 1.971 ± 0.584 ; 原玻璃蝇节杆菌、灰色链霉菌、白地霉、长枝木霉具有降解纤维素的能力, 在羧甲基纤维素钠上经刚果红染色后透明圈 HC 分别为 1.166 ± 0.028 , 2.044 ± 0.245 , 1.075 ± 0.029 , 1.288 ± 0.048 。[结论] 纤维化纤维微细菌、原玻璃蝇节杆菌、灰色链霉菌、白地霉和长枝木霉可作为食用菌渣等农业废弃物循环利用的菌种资源。

关键词 白星花金龟; 幼虫虫粪; 可培养微生物; 分离鉴定

中图分类号 S182 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)24-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.24.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation, Identification and Characterization of Culturable Microorganisms from Frass of *Protaetia brevitarsis* Larva

ZHANG Ting¹, WANG Xiao-yu², WU Ru-wei² et al (1. Chengde Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Chengde, Hebei 067000; 2. Hebei Normal University for Nationalities, Chengde, Hebei 067000)

Abstract [Objective] To screen cultivable functional microorganisms, and provide microbial resources for the recycling of agricultural waste. [Method] Taking the frass of *Protaetia brevitarsis* larva with the edible fungi residues as the research object, the plate coating method was used to separate culturable microorganisms from feces, and their ability to decompose cellulose and protein was preliminarily explored. [Result] A total of 5 strains of bacteria, and 3 strains of fungi were isolated. After identification, they were identified as *Cellulosimicrobium cellulans*, *Enterococcus casseliflavus*, *Arthrobacter protophormiae*, *Glutamicibacter halophytocola*, *Streptomyces griseolus*, *Candida tropicalis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Geotrichum candidum*. Among them, *Cellulosimicrobium cellulans* and *Streptomyces griseolus* had the ability to decompose protein, and the ratio of transparent circle diameter to colony diameter (HC) on casein culture medium were 7.259 ± 0.417 and 1.971 ± 0.584 , respectively. *Arthrobacter protophormiae*, *Streptomyces griseolus*, *Geotrichum candidum* and *Trichoderma longibrachiatum* had the ability to degrade cellulose, and after Congo red staining on sodium carboxymethyl cellulose, the HC values of the transparent circle were 1.166 ± 0.028 , 2.044 ± 0.245 , 1.075 ± 0.029 and 1.288 ± 0.048 . [Conclusion] *Cellulosimicrobium cellulans*, *Arthrobacter protophormiae*, *Streptomyces griseolus*, *Geotrichum candidum* and *Trichoderma longibrachiatum* can be used as strain resources for the reuse of agricultural wastes such as edible fungi residues.

Key words *Protaetia brevitarsis*; Frass of larva; Culturable microorganisms; Isolation and identification

白星花金龟(*Protaetia brevitarsis*), 属鞘翅目花金龟科, 是一种宝贵的昆虫资源, 在药用、饲用、生态等方面均具有较高的利用价值。研究表明, 白星花金龟幼虫多在腐殖质丰富的土壤或粪堆中生活, 以腐烂的秸秆、杂草以及禽畜粪便为食^[1], 其幼虫在对秸秆进行转化的同时, 也可以获得虫体和虫粪等副产品, 极具有开发利用价值。白星花金龟幼虫对平菇菌糠、猪粪、牛粪、玉米秸秆等农业有机废弃物消化率较高^[2]。对东亚飞蝗粪沙、玉米秸秆、小麦秸秆和花生壳均有一定的转化作用^[3], 且获得的幼虫干物质中蛋白质、脂肪和氨基酸含量较高^[4], 虫粪沙也富含较多的有机物质^[5]。因此, 在利用白星花金龟幼虫转化利用农业有机废弃物的同时, 不仅治理了环境问题, 还提高了虫体和虫粪沙资源的利用率。

目前有关白星花金龟幼虫在废弃物循环利用方面的研究主要集中在幼虫对农业废弃物的转化利用、农业有机废弃物对幼虫生物学特性影响、幼虫肠道微生物筛选以及幼虫虫粪有机肥等方面, 而对于幼虫虫粪微生物的筛选及多样性研

究鲜见报道。黄婉秋等^[6]从白星花金龟幼虫肠道中分离出 1 株具有较强纤维素降解能力的纤维单胞菌, 其 CMC 酶活性峰值能达 0.19 U/mL , 并确定该菌株具有包括内切葡聚糖酶、 β -葡聚糖苷酶和外切葡聚糖酶等纤维素降解相关基因及代谢通路。赖德强等^[7]将白星花金龟幼虫虫粪按比例添加在辣椒育苗基质中, 结果发现, 辣椒幼苗的生物量、根系发育情况以及壮苗指数均显著高于对照组, 提高了辣椒苗期的耐寒能力。刘福顺等^[8]研究施用不同量白星花金龟幼虫虫粪对樱桃萝卜生长情况的影响, 结果显示, 在一定范围内随着虫粪施用量的增加, 樱桃萝卜地上部、地下部鲜质量均呈现增加的趋势。该研究以饲喂食用菌废菌渣的白星花金龟幼虫为研究对象, 收集其新鲜虫粪后采用平板涂布法分离其中的可培养微生物, 为筛选可高效利用的微生物提供菌种资源和基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 白星花金龟幼虫由河北燕塞生物科技有限公司提供, 主要以食用菌废菌渣为食。

1.2 培养基 LB 培养基: 广东环凯微生物科技有限公司; PDA 培养基: 马铃薯 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; 麦芽汁培养基: 青岛海博生物技术有限公司; 酪蛋白培养基: 酪蛋白 10.00 g, 牛肉浸粉 3.00 g, 氯化钠 5.00 g, 磷

基金项目 河北省重点研发计划项目(21327306D, 20326807D)。

作者简介 张婷(1992—), 女, 河北石家庄人, 助理研究员, 硕士, 从事农业应用微生物研究。* 通信作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事生物资源开发利用研究。

收稿日期 2022-12-16

酸氢二钠 2.00 g,琼脂 15.00 g,溴麝香草酚蓝 0.05 g,pH 7.4±0.1;羧甲基纤维素钠培养基:羧甲基纤维素钠 15.0 g,硝酸铵 1.0 g,酵母膏 1.0 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 1.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然;赫奇逊氏无机盐培养液:KH₂PO₄ 1.00 g,NaCl 0.10 g,MgSO₄·7H₂O 0.30 g,NaNO₃ 2.50 g,FeCl₃ 0.01 g,CaCl₂ 0.10 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2 左右;液体产酶培养基:玉米秸秆粉 20 g,赫奇逊氏无机盐培养液 1 000 mL。

1.3 试验方法

1.3.1 微生物的分离纯化。收集新鲜的幼虫粪沙 0.1 g 于无菌管中,加入 0.9 mL 无菌水充分混匀后,稀释至 10⁻²、10⁻³ 浓度梯度涂布于分离培养基上,于 30 ℃ 恒温培养箱中培养,待长出菌落后,挑取单菌落至相应的培养基上进行划线培养,纯化次数 3 次以上,直至获得稳定生长的单菌落。

1.3.2 形态学鉴定。菌落形态观察:将获得的菌株挑取单菌落进行平板划线培养,观察菌体在培养基上的菌落形态及生长情况。菌体形态观察:染色后置于显微镜下观察菌体形态。

1.3.3 分子生物学鉴定。

1.3.3.1 DNA 提取。分别用 Ezup 柱式细菌、真菌、酵母菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取相应微生物的基因组 DNA。

1.3.3.2 PCR 扩增及测序。采用通用引物进行 PCR 扩增,其中,细菌引物序列 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)、1492R (GCTTACCTTGTTACGACTT);酵母菌引物序列 NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)、NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG);真菌引物序列 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)、ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)。扩增产物送

至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3.4 降解蛋白质和纤维素能力初探。将分离纯化的菌株分别点接种至酪蛋白固体培养基上,培养后观察菌株生长情况及产生透明圈情况,并计算透明圈直径与菌落直径的比值(HC),探究各菌株降解蛋白质的能力。

将分离纯化的菌株分别点接种至羧甲基纤维素钠固体培养基上,培养后观察菌株生长情况,用刚果红染色后观察透明圈情况,计算透明圈 HC 值,探究各菌株降解纤维素的能力。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离鉴定 通过对白星花金龟幼虫粪样品进行分离,总共得到细菌 5 株、真菌 3 株,结合形态学和分子生物学对所分离的菌株进行综合鉴定。

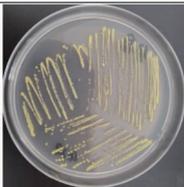
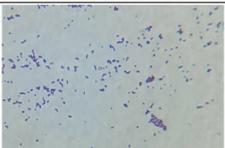
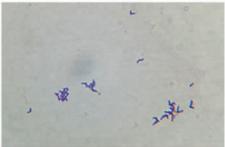
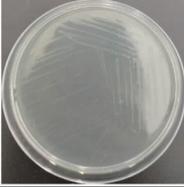
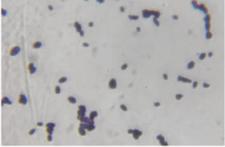
2.1.1 细菌。

2.1.1.1 形态学观察。将分离纯化的细菌培养于 LB 固体培养基上,观察菌落形态,并挑取单菌落进行显微观察。各细菌菌落形态及菌体形态见表 1,其中分离出的 4 株细菌革兰氏染色后均呈阳性。

2.1.1.2 分子鉴定。将细菌 16S rDNA 测序结果提交至 NCBI 进行 Blast 对比,并结合《细菌鉴定手册》确定待测菌株的分类地位。分子鉴定结果显示,xh1 菌株为纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*),dh1 菌株为谷氨酸杆菌 (*Glutamicibacter halophytocola*),hb2 菌株为铅黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*),hd1 菌株为原玻璃蝇节杆菌 (*Arthrobacter protophormiae*),hb1 菌株为灰色链霉菌 (*Streptomyces griseolus*)。

表 1 细菌形态

Table 1 Bacterial morphology

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	菌体形态 Thallus morphology
xh1	菌落呈淡黄色,圆形,脐状突起,表面光滑湿润,边缘整齐 	革兰氏阳性,菌体为短杆状 
dh1	菌落呈淡黄色,圆形凸起,表面光滑 	革兰氏呈阳性,菌体为棒状 
hb2	菌落透明,圆形,表面光滑湿润 	革兰氏阳性,菌体为卵圆形 

接下表

续表 1

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	菌体形态 Thallus morphology
hd1	菌落呈白色,圆形,表明光滑湿润,中间有突起,边缘整齐	革兰氏阳性,菌体呈杆状
hb1	菌落圆形,边缘整齐,基内有菌丝,不易挑起	孢子丝直而略波曲

2.1.2 真菌。

体培养基和 PDA 固体培养基上,观察其菌落形态,并挑取单

2.1.2.1 形态学观察。将分离纯化的菌株培养于麦芽汁固

菌落进行显微观察。各真菌菌落形态及菌体形态见表 2。

表 2 真菌形态

Table 2 Fungal morphology

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	菌体形态 Thallus morphology
bd1	菌落呈白色,圆形,表面粗糙,中间凸起	菌体呈椭圆形,出芽生殖
SX2	菌落呈乳白色,中间有圆形凸起,表面不光滑,质地油不干燥;周围有褶皱,短绒毛状,地毯式向四周铺开	菌体呈砖形,孢子呈长筒状或椭圆形
SM2	菌落开始为白色,致密,圆形向周围扩展;中央产生绿色孢子,有明显的轮纹,周围有白色菌丝的生长带	菌丝分支常单生,孢子为深绿色椭圆形

2.1.2.2 分子鉴定。将测序结果提交至 NCBI 进行 Blast 对比,并结合《酵母菌鉴定手册》《真菌鉴定手册》确定待测菌株的分类地位。分子鉴定结果显示,bd1 菌株为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*),SM2 菌株为长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*),SX2 菌株为白地霉(*Geotrichum candidum*)。

说明其具有一定的纤维素降解能力。陈燕红等^[9]研究表明,纤维化纤维微细菌具有水解蛋白质的特性,这与该研究结果一致。

2.2 降解蛋白质和纤维素能力 酪蛋白培养基上菌株生长结果显示(表 3),纤维化纤维微细菌和灰色链霉菌能够产生明显的透明圈,透明圈 HC 值分别为 7.259 ± 0.417 、 1.971 ± 0.584 ,说明其具有一定的蛋白质降解能力;羧甲基纤维素钠培养后刚果红染色结果显示(表 4),原玻璃蝇节杆菌、灰色链霉菌、白地霉和长枝木霉能够产生透明圈,透明圈 HC 值分别为 1.166 ± 0.028 、 2.044 ± 0.245 、 1.075 ± 0.029 、 1.288 ± 0.048 ,

3 讨论与结论

白星花金龟幼虫能够有效降解秸秆、菌渣等农业废弃物,研究表明其肠道中存在丰富的与纤维素降解有关的微生物^[3,10],而目前对于其幼虫相关的微生物的研究也主要集中在肠道微生物上。黄婉秋等^[6]从白星花金龟幼虫肠道中分离出 1 株具有较强分解纤维素能力的纤维单胞菌。魏盼盼^[11]对白星花金龟幼虫肠道微生物多样性研究发现,具有降解木质纤维素和固氮功能的纤维菌属、纤维杆菌属、纤维素单胞菌属、假单胞菌属、链霉菌属等优势菌属在中肠和后

肠中都有存在。田小燕等^[12]对饲喂玉米秸秆的白星花金龟幼虫肠道微生物细菌多样性研究发现,假单胞菌属和脱硫弧菌属分别为幼虫中肠和后肠中的优势菌属。

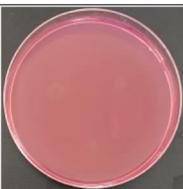
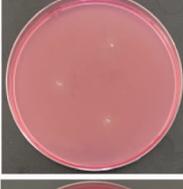
表3 酪蛋白透明圈情况

Table 3 Casein transparent circle

菌种 Strain	酪蛋白培养基透明圈 Casein transparent circle	透明圈 HC 值 The HC values of the transparent circle
纤维化纤维细菌 <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>		7.259±0.417
灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseolus</i>		1.971±0.584

表4 纤维素刚果红透明圈情况

Table 4 Cellulose Congo red transparent circle

菌种 Strain	纤维素刚果红透明圈 Cellulose Congo red transparent circle	透明圈 HC 值 The HC values of the transparent circle
原玻璃蝇节杆菌 <i>Arthrobacter protophormiae</i>		1.166±0.028
灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseolus</i>		2.044±0.245
白地霉 <i>Geotrichum candidum</i>		1.075±0.029
长枝木霉 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>		1.288±0.048

该研究从白星花金龟幼虫新鲜虫粪中共分离出细菌5种、真菌3种,对其进行形态学和分子生物学鉴定,初步确定其分类地位及所属类群,分别为纤维化纤维细菌、铅黄肠球菌、原玻璃蝇节杆菌、谷氨酸杆菌、灰色链霉菌、热带假丝

酵母、长枝木霉和白地霉。通过选择培养基进行初步的功能筛选,确定纤维化纤维细菌和灰色链霉菌具有降解蛋白质的能力,原玻璃蝇节杆菌、灰色链霉菌、白地霉和长枝木霉具有降解纤维素的能力,但其降解能力强弱仍需进一步定量研究。

农业生产活动中产生的废弃物种类多、数量大,但目前对于农业废弃物资源化利用率相对较低。我国每年都能生产出大量的食用菌废菌渣,因其利用过程中存在诸多难点,导致其实际循环利用率相对较低。而利用微生物发酵技术对农业废弃物进行无害化处理,已成为生态农业可持续发展的重要方向。研究表明,纤维化纤维细菌、原玻璃蝇节杆菌、灰色链霉菌等细菌,以及长枝木霉、白地霉等真菌具有降解纤维素和蛋白质的能力^[13-15],且在增加土壤养分、提高土壤酶活^[16]、增强植物抗逆性^[17-18]、吸附金属离子^[19-20]等方面表现出积极作用。因此,从饲喂食用菌废菌渣的白星花金龟幼虫粪中分离可培养微生物,筛选降解纤维素和蛋白质的功能菌,将为食用菌废菌渣的循环利用提供菌种资源。

参考文献

- [1] 郑洪源, 刘建平, 南怀林, 等. 白星花金龟子食性研究[J]. 陕西农业科学, 2005, 51(3): 23-24, 54.
- [2] 杨柳, 张广杰, 徐韬, 等. 白星花金龟幼虫对不同农业有机废弃物的转化力研究[J]. 新疆农业大学学报, 2019, 42(3): 189-193.
- [3] 张广杰, 王倩, 刘玉升, 等. 白星花金龟幼虫对不同孵化周期四种物料的转化力研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2019, 50(5): 764-767, 804.
- [4] 张庆镐, 朴奎善, 李基俊, 等. 蛴螬矿物元素和维生素含量分析[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19(1): 30-31.
- [5] 杨诚, 刘玉升, 徐晓燕, 等. 白星花金龟幼虫资源成分分析及评价[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2014, 45(2): 166-170.
- [6] 黄婉秋, 石冬冬, 蔡红英, 等. 白星花金龟幼虫肠道中纤维素降解菌的筛选及其全基因组分析[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 51-58.
- [7] 赖德强, 王庆雷, 吴娱, 等. 白星花金龟幼虫粪对低温条件下辣椒苗期发育的影响[J]. 北方园艺, 2019(8): 63-66.
- [8] 刘福顺, 冯晓洁, 席国成, 等. 白星花金龟幼虫粪对樱桃萝卜生长情况的影响[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(4): 44-46, 50.
- [9] 陈燕红, 程萍, 杨鹏, 等. 一株纤维化纤维细菌的生物学特性及其对几种苯环类化合物的利用研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1021-1027.
- [10] 杨诚, 刘玉升, 徐晓燕, 等. 白星花金龟幼虫对酵化玉米秸秆取食效果的研究[J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(1): 122-127.
- [11] 魏盼盼. 白星花金龟幼虫处理木耳和香菇菌渣的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [12] 田小燕, 宋福平, 张杰, 等. 饲喂玉米秸秆的白星花金龟幼虫肠道细菌多样性[J]. 昆虫学报, 2017, 60(6): 632-641.
- [13] 王兴吉, 王克芬, 刘文龙, 等. 灰色链霉菌 LD1810 产胰蛋白酶发酵条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(2): 7-9, 51.
- [14] 田小海, 崔洪艳, 王萃. 白地霉发酵产物的应用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2016, 22(9): 31-32.
- [15] 李婉云, 杨静雅, 赵爽, 等. 纤维素降解木霉菌株的筛选及其生物学特性探究[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2021, 41(6): 698-708.
- [16] 李堆淑, 何念武, 冀玉良. 干旱胁迫下灰色链霉菌对桔梗幼苗根际土壤酶活性、养分及微生物的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2017, 35(6): 173-180.
- [17] 刘佳, 张悦, 沈志彦, 等. 长枝木霉 T6 菌株对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用[J]. 西北农业学报, 2020, 29(12): 1891-1897.
- [18] 李瑞, 李惠霞, 谢丙炎, 等. 长枝木霉菌株 TL16 防治南方根结线虫的作用机理[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 384-393.
- [19] 王学松, 胡亚兰, 付晶, 等. 原玻璃蝇节杆菌对锌离子的吸附特征[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2012, 21(4): 57-59.
- [20] 付晶, 王学松, 王亮. 原玻璃蝇节杆菌对铅离子的吸附性能研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(4): 817-820.