

# 亮斑扁角水虻卵携带细菌的分离鉴定 及其对成虫产卵行为影响

杨 森, 李 严, 麦艳娜, 阮润田, 宋安东, 王凤芹, 陈红歌\*

(河南农业大学生命科学学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 郑州 450002)

**摘要:**【目的】分离鉴定对亮斑扁角水虻 *Hermetia illucens* 产卵具有诱导作用卵携带细菌, 探索提高亮斑扁角水虻人工繁育过程中卵收集效率途径。【方法】使用脑心浸出液肉汤(BHI)培养基对亮斑扁角水虻卵携带细菌分离纯培养; 以灭菌 BHI 液体培养基为对照, 使用筛选到的单菌株摇瓶发酵液对亮斑扁角水虻成虫进行产卵诱导试验。【结果】筛选纯培养到 15 株细菌, 编号分别为 EEAM-1, EEAM-2, EEAM-3, EEAM-5, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-8, EEAM-9, EEAM-10A, EEAM-10B, EEAM-11, EEAM-12, EAM-13, EEAM-14 和 EEAM-15。经发酵液产卵诱导试验, 发现有 5 株能显著提高亮斑扁角水虻成虫产卵量的菌株, 分别为 EEAM-3, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-10A 和 EEAM-10B。经菌落培养特征、菌体形态比较、16S rDNA 序列测定和发育树比对分析鉴定这 5 株细菌分别为: 特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis*、粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*、短杆菌属 *Brevibacterium* sp. 和甲基营养芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus*。其中, EEAM-7 粪肠球菌 *E. faecalis* 发酵液诱导的亮斑扁角水虻成虫产卵量最高, 是对照组的 7.400 倍; 其次为 EEAM-10B 甲基营养芽孢杆菌 *B. methylotrophicus*, 诱导的产卵量是对照组的 6.531 倍; 再次是 EEAM-6 粘质沙雷氏菌 *S. marcescens*、EEAM-10A 短杆菌 *Brevibacterium* sp. 和 EEAM-3 特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis*, 诱导的产卵量分别是是对照组的 5.100, 4.187 和 2.636 倍。【结论】亮斑扁角水虻卵携带细菌能显著影响繁殖期成虫产卵量, 为建立稳定水虻人工养殖体系提供理论依据。**关键词:** 亮斑扁角水虻; 细菌; 发酵液; 产卵; 16S rDNA

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)02-0163-10

## Isolation and identification of egg-associated bacteria of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) and their effects on its adult oviposition behavior

YANG Sen, LI Yan, MAI Yan-Na, RUAN Run-Tian, SONG An-Dong, WANG Feng-Qin, CHEN Hong-Ge\* (Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** 【Aim】To screen and identify bacterial strains isolated from *Hermetia illucens* eggs inducing the oviposition of *Hermetia illucens* adults and to discover the way of improving the egg collection efficiency in the process of artificial breeding of this insect. 【Methods】Separation and pure culture of egg-associated bacteria were fulfilled by using brain heart infusion broth (BHI) medium, and the screened solo bacteria strain was fermented in shaking flask to verify the effects of these fermentation broths on adult oviposition behavior of *H. illucens* with the sterilized BHI medium as the negative control. 【Results】Fifteen strains were obtained and numbered as EEAM-1, EEAM-2, EEAM-3, EEAM-5, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-8, EEAM-9, EEAM-10A, EEAM-10B, EEAM-11, EEAM-12, EEAM-13,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400433); 河南省重点科技攻关项目(152102210060); 郑州市农委科技创新项目

作者简介: 杨森, 男, 1982 年生, 河南南阳人, 博士, 副教授, 主要从事农业废弃物资源化利用和酶工程技术研究, E-mail: yangsen7676@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: honggeyz@163.com

收稿日期 Received: 2016-09-12; 接受日期 Accepted: 2017-01-03

EEAM-14 and EEAM-15, respectively. It was found that five strains including EEAM-3, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-10A and EEAM-10B significantly improved the fecundity of *H. illucens* adults, and they were identified as *Bacillus tequilensis*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Brevibacterium* sp. and *Bacillus methylotrophicus*, respectively, through the morphology comparison, characteristics of colonies, 16S rDNA sequence analyses and phylogenetic tree construction. Especially, the fermentation broth of *Enterococcus faecalis* (EEAM-7) had the highest inducing effect on adult oviposition, 7.400-fold as high as that of the control group. The oviposition amounts in the treatment groups of the fermentation broths of *B. methylotrophicus* (EEAM-10B), *S. marcescens* (EEAM-6), *Brevibacterium* sp. (EEAM-10A) and *B. tequilensis* (EEAM-3) were 6.531-, 5.100-, 4.187- and 2.636-fold as high as that of the control group, respectively. 【Conclusion】 The results indicate that the egg-associated functional bacteria of *H. illucens* affect the fecundity of *H. illucens* adults. This study will provide a theoretical basis for establishing the stable feeding system of *H. illucens*.

**Key words:** *Hermetia illucens*; bacteria; fermentation broth; oviposition; 16S rDNA

亮斑扁角水虻 *Hermetia illucens* 是一种大型双翅目水虻科扁角水虻属昆虫,起源于南美洲热带草原,呈世界性分布,是重要的环保资源昆虫(杨森, 2010)。所产虫卵初期呈淡黄色,后期逐渐加深,30℃条件下孵化需 3.5 d (Sheppard *et al.*, 2002),在我国海南地区全年都可生长发育与繁殖,孵化周期在 2~6 d (李志刚等, 2011)。孵化后幼虫以猪粪、牛粪、鸡粪、餐厨垃圾等有机固体废弃物为食,生长 14 d 左右可进入蛹期 (Diclaro and Kaufman, 2009; 平磊, 2010; 李武等, 2014)。亮斑扁角水虻成虫只采食少量清水,繁殖力强,但寿命较短,一般不会滋扰人类生活。幼虫具有较高营养价值,含有丰富脂肪和蛋白质,是一种比较理想的替代性动物蛋白饲料来源之一 (Cullere *et al.*, 2016)。

亮斑扁角水虻规模化人工繁育一直是研究热点,但普遍存在交配率低,产卵不稳定,虫卵收集效率低等问题 (Tomberlin and Sheppard, 2001; 靳任任和刘杰, 2016)。成虫产卵地点或基质种类的选择是影响卵产量和收集效率的重要因素。成虫产卵行为属于昆虫寄主选择行为,对于完全变态发育昆虫来说,成虫只有正确选择适合的产卵地点或基质,幼虫才能正常生长发育传代。双翅目食腐性昆虫如蝇类和亮斑扁角水虻等,产卵一般具有聚集特点,产卵地点或基质的选择行为主要由其嗅觉或味觉决定。目前研究较多的是对成虫产卵具有正趋向性影响化学信号物质,即引诱剂 (attractant), 这些引诱剂既可以来源于产卵基质、寄主本身或幼虫等,也可以来源于成虫自身所产的新鲜卵块。比如,大头金蝇 *Chrysomya megacephala* 更趋向于在含有鱼粉的基质上产卵,而家蝇 *Musca domestica* 更趋向于以麸皮为主的基质上产卵,大头金蝇雌性成虫还更喜欢将卵

产在含有同类新鲜卵块的基质上 (王争艳和莫建初, 2010; Lima and Zuben, 2016); 从家蝇卵分离的产酸克雷伯菌 *Klebsiella oxytoca* 能产生二硫化物来调节家蝇产卵行为 (Lam *et al.*, 2007); 从亮斑扁角水虻虫卵携带的细菌中筛选到了一个由 4 种菌 (戈登氏菌属 *Gordonia* sp., 纤维单胞菌属 *Cellulomonas* sp., 微杆菌属 *Microbacterium* sp. 和微球菌属 *Micrococcus* sp.) 组成的复合体,对成虫产卵有明显的诱导作用 (Zheng *et al.*, 2013)。进一步研究发现,低浓度 0.1% 的乳酸对亮斑扁角水虻有显著的引诱作用,浓度升高则引诱效果明显下降,但无显著差异,不同浓度的碳酸氢铵虽然对成虫具有明显引诱作用,但所产虫卵孵化率显著下降 (徐柳等, 2015)。

本研究通过对亮斑扁角水虻卵携带微生物进行筛选分离、纯培养,选出对亮斑扁角水虻成虫产卵可能有诱导作用的微生物菌株,通过对有诱导作用的微生物进行鉴定,确定有诱导效果微生物的种类和培养特征。期待筛选出既对亮斑扁角水虻幼虫生长具有促进作用,又可以作为成虫产卵引诱剂的生产原材料,为下一步亮斑扁角水虻专用的幼虫微生态制剂和成虫产卵生物引诱剂的规模化生产提供原始菌种,更为进一步实现亮斑扁角水虻成虫的集中定向产卵,减轻人力与物力的负担,提高收集效率和种虫繁育质量,有助于亮斑扁角水虻的大范围推广应用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 亮斑扁角水虻饲养

亮斑扁角水虻种虫卵购自广州无两生物科技有限公司,27℃条件下孵化 3 d,使用含水量为 75% 的

人工饲料(麸皮 70%, 鱼粉 30%) 在塑料周转箱内饲养幼虫。幼虫变黑进入前蛹期后, 用 2 mm × 2 mm 的钢网筛筛掉虫粪, 30℃ 条件下自然化蛹; 进而将 1 万头蛹放入 1 m × 1 m × 5 m 的蚊帐中羽化产卵, 蚊帐放在 8 m × 15 m × 2.5 m 的河南农业大学试验田温室大棚中, 温度控制在 30 ± 3℃, 空气相对湿度 75% ± 10%, 自然光照。使用 3 层 5 cm × 8 cm 的包装箱瓦楞纸制作收卵板, 瓦楞纸上提供产卵的每孔大小为 2 mm × 2 mm × 3 mm, 进行人工饲养传代。具体方法参考文献 Sheppard 等(2002)。

### 1.2 主要设备和培养基

仪器: 恒温培养箱、电热鼓风干燥箱、恒温摇床、天平、离心机和 PCR 仪等。

试剂: 脑心浸出液肉汤(BHI, 青岛海博生物) 配方(g/L): 蛋白胨 10, 脱水小牛脑浸粉 12.5, 脱水牛心浸粉 5, 氯化钠 5, 葡萄糖 2, 磷酸氢二钠 2.5, pH 值调节为 7.4 ± 0.2。溶菌酶(Amresco, 美国)、蛋白酶 K(Merk, 美国)、无水乙醇(国药, 分析纯)、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs(上海金穗生物) 等。

### 1.3 亮斑扁角水虻卵携带微生物分离纯培养

将收集到的约 0.5 g 新鲜虫卵(生产时间 < 8 h) 置于无菌研钵中, 加入 2 mL 无菌水, 研磨均匀。取 5 支无菌试管(18 mm × 180 mm), 分别加入 9 mL 无菌水, 用移液枪取研磨液 1 mL, 进行 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> 和 10<sup>5</sup> 倍梯度稀释, 分别用 200 μL 移液枪取不同浓度梯度菌液 100 μL, 均匀涂布在 BHI 固体培养基平板上, 每个梯度 3 个重复, 同时涂布 100 μL 无菌水作为空白对照。使用封口膜封好, 放置于 28℃ 恒温培养箱中倒置培养 48 h。在无菌条件下, 挑选培养基上具有代表性的单一菌落, 用平板划线法在 BHI 固体培养基上反复划线, 倒置放入 28℃ 恒温培养箱中培养, 每天查看菌落生长情况, 观察记录菌落特征。挑选单菌落, 进行革兰氏染色并记录结果。将得到的每一种单一菌株分别进行斜面保藏和甘油管冷藏, 标明编号。

### 1.4 亮斑扁角水虻卵携带细菌发酵液对亮斑扁角水虻产卵诱导效果测定和分析

将 800 mL 的 BHI 液体培养基分装在 16 个 100 mL 的三角瓶中, 121℃ 灭菌 20 min 备用。分别将 1.3 节中筛选到的 15 株细菌接种到三角瓶液体 BHI 培养基中, 留一瓶培养基不接任何微生物作为对照组, 标记好后放入恒温摇床培养箱 28℃ 150 r/min, 培养 72 h 后 4℃ 冷藏备用。选取洁净的瓦楞纸包装箱板, 剪成整齐的 5 cm × 8 cm 的 3 块纸板, 并使用

透明胶带粘在一起, 中间位置挖空 2 mm × 24 mm, 并用填充相应大小, 之前清洗干净、烘干的海绵块制作成收卵纸盒。同样的收卵纸盒制作 161 个, 使用一周。为提高试验准确性, 试验分 8 组进行, 分别设置 8 个虫笼(1 m × 1 m × 5 m), 每个笼子中约有 1 万头成虫(雌雄比约为 56:44), 每个笼子中各放置一个收卵盆(40 cm × 15 cm × 10 cm)。使用含水量为 75% 的人工饲料(麸皮 70%, 鱼粉 30%) 自然发酵 1 d 制成收卵料, 在收卵盆中平铺约 3 cm。收卵盆上方覆盖一层纱网。其中 7 个笼子中, 每个收卵盆纱网上等距离放置 3 个收卵纸盒, 收卵纸盒中分别加入两株细菌发酵液和空白对照, 剩余 1 个笼子, 收卵盆纱网上放置 2 个收卵纸盒, 分别加入一株细菌发酵液和空白对照。将 15 株细菌发酵液分为 8 组, 两两为一组, 最后剩余一株细菌单独为一组, 分别加入对应的 8 个笼子中收卵盆上的收卵纸盒里。每天 8:00 时使用移液器和无菌枪头分别将 15 株菌发酵液和对照的 BHI 液体培养基各取 0.5 mL, 加入收卵纸盒上海绵内, 17:00 时收集称重虫卵量。试验具体设置如下: 1 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-1 和 EEAM-2 发酵液; 2 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-3 和 EEAM-5 发酵液; 3 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-6 和 EEAM-7 发酵液; 4 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-8 和 EEAM-9 发酵液; 5 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-10A 和 EEAM-10B 发酵液; 6 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-11 和 EEAM-12 发酵液; 7 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-13 和 EEAM-14 发酵液; 8 号虫笼, BHI 培养基, EEAM-15 发酵液。

放置时间为成虫羽化后的第 3 天, 收卵时间持续 1 周, 期间对照组和试验组每天各换一次收卵纸盒, 将换下的收卵纸盒中得到的新虫卵解剖出来, 在电子天平上称重。记录各个笼子对照组和试验组每天的卵重, 最后计算收卵期间平均每天的卵重, 采用方差分析(ANOVA) 和独立样本 *t* 检验分析, 所有数据分析和作图使用 GraphPad Prism 软件完成。

### 1.5 16S rDNA 基因扩增与细菌系统发育分析

根据 1.4 节中收卵数据分析结果, 选择出对亮斑扁角水虻成虫产卵具有明显促进作用的 5 株细菌 EEAM-3, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-10A 和 EEAM-10B, 进行基因组 DNA 提取和 16S rDNA 扩增。将上述各菌株, 在 28℃ 150 r/min 条件下培养 3 d, 分别取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 室温 5 000 × g 条件下离心 10 min, 弃上清液, 加入 120 μL 1.25 × 溶菌酶 Buffer 和 30 μL 溶菌酶(150 mg/mL), 充分悬浮

沉淀后,37℃水浴 30 min。加入 5  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 和 300  $\mu\text{L}$  缓冲液剧烈震荡,70℃水浴 10 min,12 000  $\times g$  离心 2 min,转移上清液,加入 230  $\mu\text{L}$  无水乙醇,进而转移至 DNA 吸附柱中,12 000  $\times g$  离心 1 min,加入 500  $\mu\text{L}$  洗涤 Buffer,12 000  $\times g$  离心 1 min,重复洗涤 3 次,最后向硅胶膜中央加 50  $\mu\text{L}$  的去离子水 ( $\text{pH} \geq 7.0$ ),室温静置 2 min,12 000  $\times g$  离心 1 min,获得基因组总 DNA。

以提取总 DNA 为模板,16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') (夏晓峰等,2013),扩增 EEAM-3, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-10A 和 EEAM-10B 5 株细菌的 16S rDNA。PCR 反应体系 15  $\mu\text{L}$ :去离子水 10.35  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  缓冲液 1.5  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ ,引物 (10 mmol/L) 各 0.5  $\mu\text{L}$ ,dNTPs 1.0  $\mu\text{L}$ ,Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.15  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 延伸 10 min, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,将 PCR 扩增产物委托上海生工测序公司进行测序。

将测序得到的 16S rDNA 序列与 NCBI GenBank 数据库进行 BLAST 序列比对,选取每个菌株近亲序

列。使用 Clustal W 进行序列比对,利用 MEGA5.05 软件 (Tamura and Nei, 1993),采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 算法构建系统发育树 (Tamura *et al.*, 2011)。

## 2 结果

### 2.1 亮斑扁角水虻卵携带微生物的分离培养

通过亮斑扁角水虻卵携带微生物的分离纯化试验,一共分离出了 15 株微生物,分别编号为 EEAM-1, EEAM-2, EEAM-3, EEAM-5, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-8, EEAM-9, EEAM-10A, EEAM-10B, EEAM-11, EEAM-12, EEAM-13, EEAM-14 和 EEAM-15。这 15 种菌的发酵液对亮斑扁角水虻的产卵诱导试验结果如表 1 所示。

由表 1 可知,一共有 5 株细菌对亮斑扁角水虻虫卵的收集效率有明显的提高,从高到低分别是 EEAM-7, EEAM-10B, EEAM-6, EEAM-10A 和 EEAM-3 发酵液。其中,EEAM-7 在相同条件下平均每天收卵量是对照组无菌 BHI 培养基的 7.400 倍,增加量十分明显。诱导效果如图 1 所示,说明本试验方法是行之有效的。



图 1 亮斑扁角水虻卵携带细菌对亮斑扁角水虻成虫产卵行为影响

Fig. 1 Effects of bacterial strains isolated from *Hermetia illucens* eggs on oviposition behavior of adults

### 2.2 亮斑扁角水虻卵分离细菌对成虫产卵的诱导效果

为进一步比较 EEAM-7, EEAM-10B, EEAM-6, EEAM-10A 和 EEAM-3 这 5 种菌株发酵液对亮斑扁角水虻产卵诱导的效率差异,我们对亮斑扁角水虻产卵高峰期平均每天的产卵量 (成虫羽化后的第 3 天开始以后的 3 d 时间) 进行了方差分析 (ANOVA)

和独立样本  $t$  检验分析 (图 2), 在亮斑扁角水虻产卵高峰期, 这 5 株细菌发酵液处理组与对照组相比差异显著。其中, EEAM-3 菌株 ( $P = 0.0132$ )、EEAM-6 菌株 ( $P = 0.0288$ ) 和 EEAM-10A 菌株 ( $P = 0.0414$ ) 发酵液处理组与对照组相比, 差异显著; 而 EEAM-10B 菌株 ( $P = 0.0043$ ) 和 EEAM-7 菌株 ( $P = 0.0093$ ) 发酵液处理组与对照组相比, 差异极显著,

表 1 亮斑扁角水虻卵分离细菌对成虫产卵的诱导效果

Table 1 Inducing effects of the bacterial strains isolated from *Hermetia illucens* eggs on its adult oviposition

虫笼编号 Cage no.	菌株编号 Strain no.	平均每天卵收集量(g) Daily egg collection mass	与对照组差异(g) Difference between the control group and the treatment group	与对照组差异(倍数) Difference between the control group and the treatment group (fold)
1	BHI 培养基 BHI medium	0.720		
	EEAM-1 发酵液 Fermentation broth of EEAM-1	0.915	0.195	1.271
	EEAM-2 发酵液 Fermentation broth of EEAM-2	1.325	0.605	1.840
2	BHI 培养基 BHI medium	0.385		
	EEAM-3 发酵液* Fermentation broth of EEAM-3	1.015	0.630	2.636
	EEAM-5 发酵液 Fermentation broth of EEAM-5	0.680	0.295	1.766
3	BHI 培养基 BHI medium	0.100		
	EEAM-6 发酵液* Fermentation broth of EEAM-6	0.510	0.410	5.100
	EEAM-7 发酵液* Fermentation broth of EEAM-7	0.740	0.640	7.400
4	BHI 培养基 BHI medium	0.380		
	EEAM-8 发酵液 Fermentation broth of EEAM-8	0.880	0.500	2.316
	EEAM-9 发酵液 Fermentation broth of EEAM-9	0.570	0.190	1.500
5	BHI 培养基 BHI medium	0.160		
	EEAM-10A 发酵液* Fermentation broth of EEAM-10A	0.670	0.510	4.187
	EEAM-10B 发酵液* Fermentation broth of EEAM-10B	1.045	0.885	6.531
6	BHI 培养基 BHI medium	1.020		
	EEAM-11 发酵液 Fermentation broth of EEAM-11	0.590	-0.430	-0.578
	EEAM-12 发酵液 Fermentation broth of EEAM-12	0.470	-0.550	-0.461
7	BHI 培养基 BHI medium	0.520		
	EEAM-13 发酵液 Fermentation broth of EEAM-13	0.290	-0.230	-0.558
	EEAM-14 发酵液 Fermentation broth of EEAM-14	0.260	-0.260	-0.500
8	BHI 培养基 BHI medium	0.385		
	EEAM-15 发酵液 Fermentation broth of EEAM-15	0.750	0.365	1.940

\* 经 16S rDNA 测序鉴定的菌株 Bacterial strains identified by 16S rDNA.

具有潜在应用价值,值得进一步深入研究,这一结果也与表 2 的收卵趋势相符合。

值得注意的是,还有一部分卵携带微生物菌株对收卵效率具有负面的效应,比如:EEAM-11, EEAM-12, EEAM-13 和 EEAM-14 这 4 株细菌发酵液处理组与对照组相比明显降低,特别是 EEAM-12 菌株发酵液,收卵量只有对照组的 0.461 倍。

### 2.3 具有诱导作用的卵携带菌株的形态观察

将筛选到的 5 种菌株在 BHI 平板上进行培养和革

兰氏染色,菌落特征和革兰氏染色结果如图 3 所示,除 EEAM-6 革兰氏染色呈阴性外,EEAM-7, EEAM-10B, EEAM-10A 和 EEAM-3 均为阳性;从形态上看,只有 EEAM-7 为球状,其余均为杆状。结合表 2 进一步比较表明,菌株 EEAM-10B 菌落较大,挑起时有发粘现象,并且在 BHI 固体培养基培养 2 d 后能够产生淡黄色色素,而其余菌株基本不产生色素;菌株 EEAM-7 菌落最小,且边缘整齐,表面光滑;其余 3 株细菌菌落基本呈白色。菌落培养特征比较典型,易于辨别。



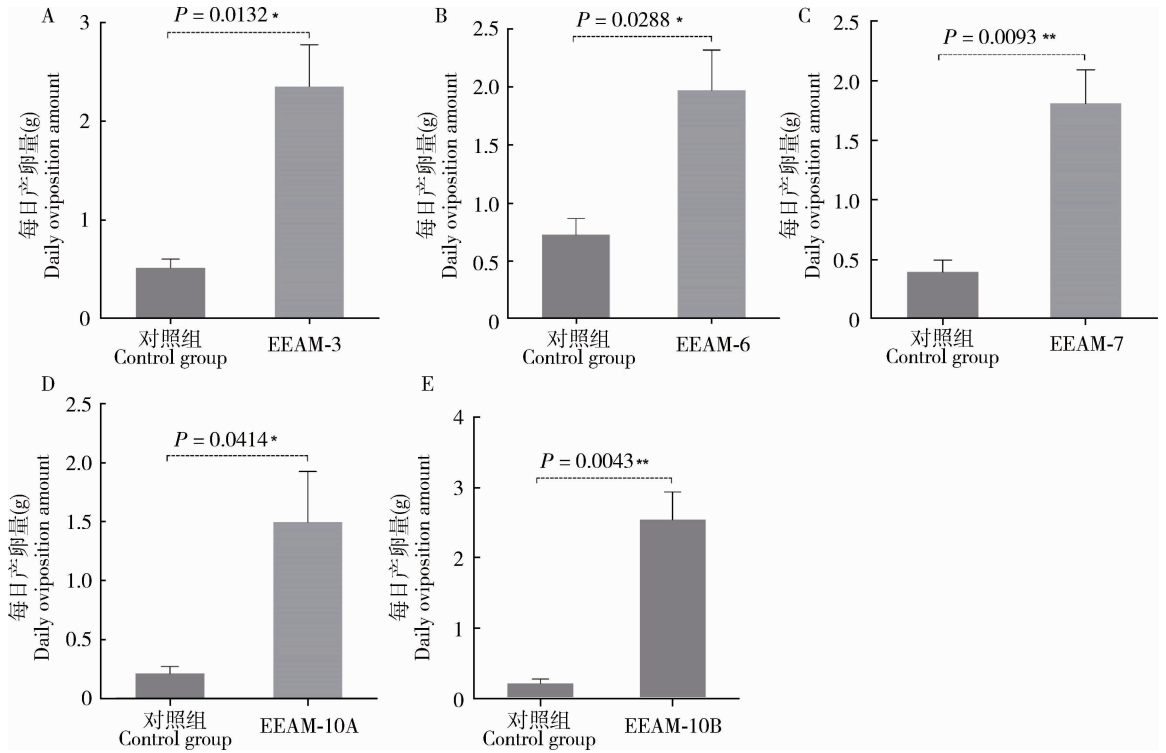


图2 卵携带细菌 BHI 发酵液对亮斑扁角水虻成虫产卵高峰期产卵量影响

Fig. 2 Effects of BHI fermentation broth of bacterial strains isolated from *Hermetia illucens* eggs on oviposition of adults during oviposition peak

\* 处理组与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $T$ -检验) Significant difference between a treatment and the control at the 0.05 level ( $T$ -test); \*\* 处理组与对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ ,  $T$ -检验) Extremely significant difference between a treatment and the control at the 0.01 level ( $T$ -test).

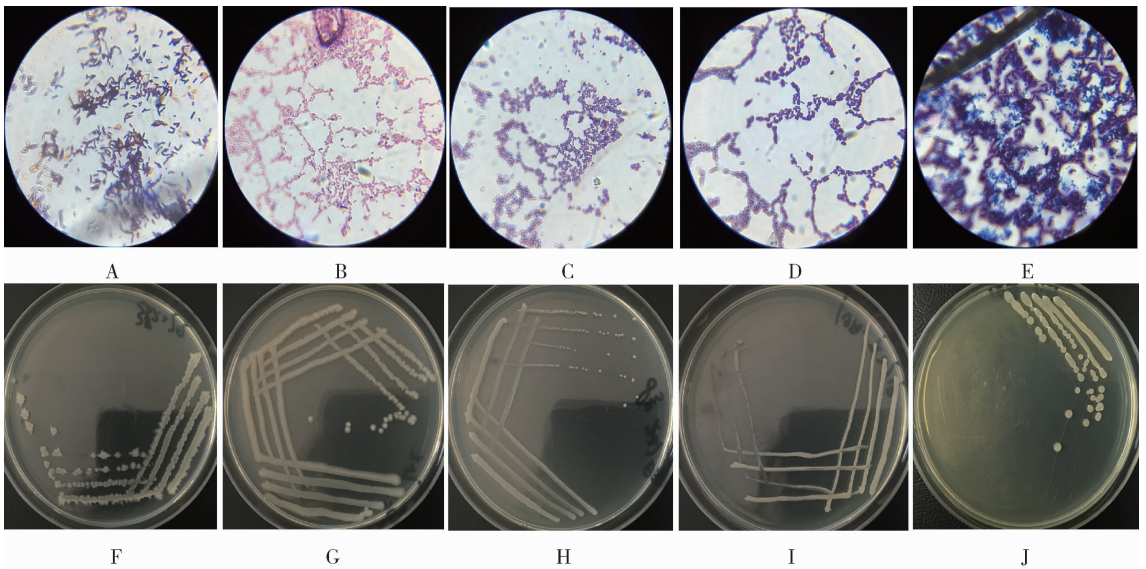


图3 从亮斑扁角水虻成虫卵分离的对其成虫产卵行为有诱导作用的菌株菌落形态和革兰氏染色结果

Fig. 3 Colonial morphology of bacterial strains isolated from *Hermetia illucens* eggs with inducing effects on its adult oviposition behavior and their Gram's dyeing results

A - E: 革兰氏染色结果 Gram's dyeing results; F - J: 菌落形态 Colonial morphology.

表 2 亮斑扁角水虻卵分离细菌的菌落形态及培养形状

Table 2 Colonial morphology and cultural characteristics of bacteria isolated from *Hermetia illucens* eggs

菌株编号 Strain no.	革兰氏染色 Gram's dyeing	菌体形状 Bacterial shape	培养性状 Cultural characteristics
EEAM-3	G +	短杆状 Rhabditiform	菌落呈乳白色, 边缘不整齐锯齿状, 表面湿润光滑 Milkiness in color, ragged edge and serrated, humid and smooth surface
EEAM-6	G -	短杆状 Rhabditiform	菌落呈米白色, 圆形, 边缘整齐, 低凸, 湿润光滑 Rice white in color, round, regular edge, low convex, humid and smooth
EEAM-7	G +	球状 Sphere shaped	菌落呈圆形, 奶白色, 不透明, 表面光滑, 边缘整齐 Round colony, milkiness in color, opaque, smooth surface, regular edge
EEAM-10A	G +	短杆状 Rhabditiform	菌落较小, 黄色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑 Small colony, yellow in color, round, regular edge, smooth surface
EEAM-10B	G +	短杆状 Rhabditiform	菌落呈米白色, 圆形, 凸起, 表面蜡质光滑, 边缘整齐 Rice white in color, round, convex, waxy and smooth surface, regular edge

G + : 革兰氏染色阳性 Gram-positive; G - : 革兰氏染色阴性 Gram-negative.

## 2.4 细菌系统发育分析

根据 16S rDNA 测序结果并在 NCBI 网站进行 BLAST 比对(表 3), 分析对成虫产卵具有明显诱导效果的 EEAM-7, EEAM-10B, EEAM-6, EEAM-10A 和 EEAM-3 这 5 株菌, EEAM-3 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* 参考序列 KX673636 具有很高的-一致性; EEAM-6 与

GenBank 中粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 的参考序列 GU124498.1 和 GU826157.1 具有 99% 序列-一致性; 而 EEAM-7 属粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*; EEAM-10A 和 EEAM-10B 分别与短杆菌属 *Brevibacterium* sp. 序列 KU221065 和甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus* 序列 KM659227 具有 99% 和 100% 的序列-一致性。

表 3 亮斑扁角水虻卵中筛选到的菌株 16S rDNA 鉴定结果

Table 3 Identification of the bacteria from *Hermetia illucens* eggs by 16S rDNA analysis

菌株编号 Strain no.	Blast 结果中-一致性最高序列来源菌株 Origin strain of blasted sequences with the highest identity	-一致性(%) Identity	Query cover (%)	E 值 E-value	GenBank 登录号 GenBank accession no.
EEAM-3	特基拉芽孢杆菌 <i>Bacillus tequilensis</i>	100	100	0.0	KX673636
EEAM-6	粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	99	99	0.0	GU826157.1
EEAM-7	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	100	100	0.0	NR_115765
EEAM-10A	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i> sp.	99	100	0.0	KU221065
EEAM-10B	甲基营养型芽孢杆菌 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	100	100	0.0	KM659227

为进一步确认菌株的亲缘关系, 我们从 NCBI 数据库中选取了 13 条现有菌株的 16S rDNA 参考序列, 与 5 株菌(EEAM-3, EEAM-6, EEAM-7, EEAM-10A 和 EEAM-10B)一起构建系统发育树, 结果如图 4 所示。与 EEAM-10B 亲缘关系最近的是甲基营养型芽孢杆菌 *B. methylotrophicus*, 其次为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (GenBank 登录号: JQ579620) 和解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (GenBank 登录号: KJ009435), 与 EEAM-10B 亲缘关系较近的是 EEAM-3, 但这两株菌并不属于同一进化分支, EEAM-3 与特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis* (GenBank 登录号: KX673636) 具有更近的亲缘关系; EEAM-7

明显与粪肠球菌 *E. faecalis* (GenBank 登录号: NR\_115765) 共同属于一个进化分支; EEAM-10A 与序列短杆菌属 *Brevibacterium* sp. (GenBank 登录号: KU221065) 具有很近亲缘关系, 然而与同属的 *Bacillus senegalense* (GenBank 登录号: NR\_118221) 和 *Bacillus yomogidense* (GenBank 登录号: NR\_113310) 亲缘关系相对较远; EEAM-6 明显和粘质沙雷氏菌 *S. marcescens* (GenBank 登录号: KR133281.1) 具有较近亲缘关系, 综合图 3 的革兰氏染色结果和菌落培养特征的结果, 基本可以支持 EEAM-6 属于粘质沙雷氏菌的这一结果, 但具体还有待于进一步细菌生理生化实验分析。

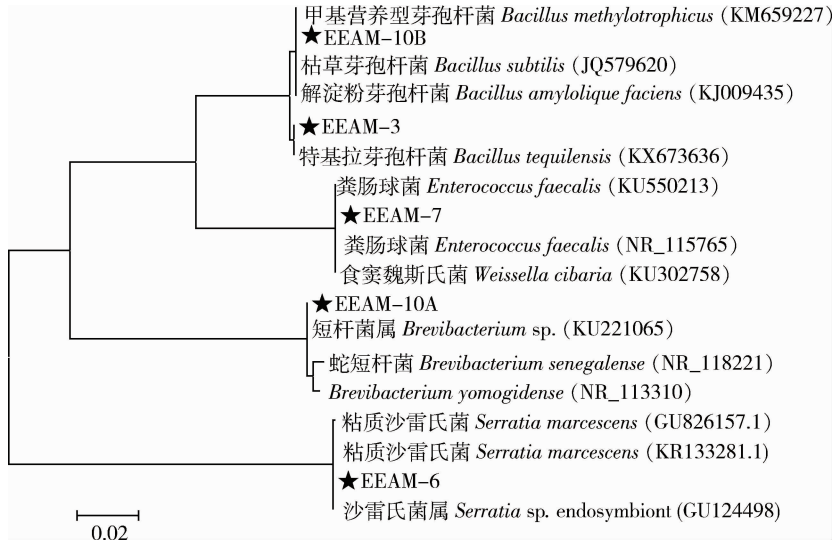


图 4 最大似然法分析菌株 16S rDNA 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strains based on 16S rDNA constructed by maximum likelihood method  
标尺表示遗传距离。Scale bar indicates the genetic distance.

### 3 讨论

对于双翅目中很多种昆虫,蚊、家蝇、大头金蝇或亮斑扁角水虻,卵携带或共生微生物对于抵抗外界致病性真菌感染、促进幼虫肠道微生物区系形成、成虫产卵行为和幼虫生长发育周期等都具有重要影响(Lam *et al.*, 2007, 2009; 郑龙玉, 2012; Arbaoui and Chua, 2014)。郑龙玉(2012)在早期研究中指出,亮斑扁角水虻卵携带微生物不仅对其成虫产卵具有定点诱导作用,也有一部分微生物对其幼虫的发育具有重要作用。所以,亮斑扁角水虻卵携带微生物的深入研究不仅有助于研究成虫产卵地点选择行为,也有助于维持人工种群稳定,提高亮斑扁角水虻饲料利用率等重要的应用价值。

然而,到底是哪种细菌,或者是哪几种细菌的协同作用在亮斑扁角水虻的产卵地点选择行为和幼虫生长发育中其主要作用? 这些微生物种类和数量是否稳定? 在本研究中所筛选出的亮斑扁角水虻卵携带细菌对成虫产卵既有明显的诱导作用,又有一部分菌株(表 2),如 EEAM-11 和 EEAM-12 发酵液对亮斑扁角水虻水虻的产卵具有明显的排斥作用,这与郑龙玉(2012)报道的结果相一致。但是,本研究筛选得到的具有促进亮斑扁角水虻成虫产卵菌株的种类和数量与先前研究也有一定差别。比如,从本实验得到数据上看,EEAM-7 甲基营养型芽孢杆菌 *B. methylotrophicus* 对成虫产卵具有一定的诱导效

果,而之前文献中所报道的戈登氏菌属 *Gordonia* sp., 纤维单胞菌属 *Cellulomonas* sp., 微杆菌属 *Microbacterium* sp. 和微球菌属 *Micrococcus* sp. 这 4 种菌株所组成的复合体在本实验中并未筛选到。而之前也没有报道类似菌株对亮斑扁角水虻具有诱导效果。已有研究表明,水虻第一代卵和次代卵携带的细菌类群会有 15% 的相同,说明卵携带近 85% 的微生物种类和数量有可能受到饲养环境、饲料配方等条件改变而改变(郑龙玉, 2012),本实验发现也是对上述研究重要补充。

甲基营养型芽孢杆菌 *B. methylotrophicus* 在自然环境中广泛存在,从软体动物、灵长类动物和鱼类的肠道中都有分离鉴定的报道(郝乐等, 2013; 田良和陈政强, 2014; 李莲等, 2016)。它又称为甲基利用菌,是一类能够利用非 C-C 键低碳化合物(如甲烷、甲醇、甲醛、甲酸、甲基胺类等)的微生物,具有一些特殊的代谢途径,在发酵工业具有重要的商业用途,可以进行单细胞蛋白、氨基酸、胞外多糖等产品的发酵研究,具有比较成熟的发酵工艺,具备规模化生产的潜力(向军等, 2012),部分甲基营养型芽孢杆菌据报道还有拮抗真菌的能力(刘利强等, 2014),这与亮斑扁角水虻虫卵孵化期内抗真菌能力是否有关值得进一步深入验证。另一株具有明显诱导效果的菌株 EEAM-7 粪肠球菌 *E. faecalis*,与之前所报道(郑龙玉, 2012)分离的卵表面分离微生物的一种 FE03 菌株相同,但之前的研究并没有明确指出这一株细菌对亮斑扁角水虻产卵地点选择行为



的具体影响。

粪肠球菌 *E. faecalis* 是肠球菌属代表种。它分布广泛,常在人类和其他动物的肠道内存在,在人体粪便中的数量仅次于大肠菌群。由于该菌鲁棒性优良,对外界环境抵抗力强,生长营养要求低,而且能够耐受多种抗生素,因此在自然界中存活较为持久。部分粪肠球菌可以产乳酸,并作为动物饲料添加剂使用(吴艳艳等,2010;龚阿琼等,2012)。很多昆虫卵携带微生物经证实可以分解所处环境的底物从而产生多样的挥发性化合物,来充当化学信息素调控分子(Kai *et al.*, 2009)。人们还对乳酸、碳酸氢铵、顺-9-二十三碳烯3种化学物质影响亮斑扁角水虻产卵行为进行了研究,结果表明,乳酸和碳酸氢铵对亮斑扁角水虻产卵地点的选择具有显著的引诱作用(徐柳等,2015)。是否是由甲基营养型芽孢杆菌或粪肠球菌在培养基中产生了类似于碳酸氢铵或乳酸具有诱导效果的物质还有待于更多的实验去验证。但是,值得注意的是,无论是甲基营养型芽孢杆菌或粪肠球菌都具有鲁棒性强、易于规模化发酵的特点,这对于开发生产出具有促进收卵效率的亮斑扁角水虻微生物生态制剂具有十分重要的意义,在后续的研究中,更应该验证上述细菌对亮斑扁角水虻幼虫发育历期的影响,有助于亮斑扁角水虻人工繁育技术关键性问题的解决。

## 参考文献 (References)

- Arbaoui AA, Chua TH, 2014. Bacteria as a source of oviposition attractant for *Aedes aegypti* mosquitoes. *Trop. Biomed.*, 31(1): 134-142.
- Diclaro JWII, Kaufman PE, 2009. Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). UF/IFAS Extension, University of Florida. EENY 461; 1-3. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN83000.pdf>.
- Cullere M, Tasoniero G, Giaccone V, Miotti-Scapin R, Claeys E, De Smet S, Dalle Zotte A, 2016. Black soldier fly as dietary protein source for broiler quails; apparent digestibility, excreta microbial load, feed choice, performance, carcass and meat traits. *Animal*, 10(12): 1923-1930.
- Gong AQ, Wang XD, Zhou XH, Tan B, 2012. Preliminary study on enteric microcapsule preparation of *Enterococcus faecalis*. *Animal Science Abroad: Pigs and Poultry*, 32(10): 72-74. [龚阿琼, 王学东, 周小辉, 谭斌, 2012. 肠溶性粪肠球菌微胶囊制备的初步研究. 国外畜牧学: 猪与禽, 32(10): 72-74]
- Hao L, Feng GQ, Ma YP, Liu ZX, Ke H, 2013. Isolation and preliminary identification of the intestinal colony of tilapia. The Symposium of China Fisheries Society of Fish Diseases Professional Committee, November 5-8, 2013, Haikou, Hainan. [郝乐, 冯国清, 马艳平, 刘振兴, 柯浩, 2013. 罗非鱼肠道菌群的分离与初步鉴定. 中国水产学会鱼病专业委员会学术研讨会, 2013年11月5-8日, 海南海口]
- Jin RR, Liu J, 2016. The causes of low mating rate of black soldier fly adults. *Agricultural Knowledge: Scientific Culture*, (3): 41-42. [靳任任, 刘杰, 2016. 黑水虻成虫交配率低的根本原因. 农业知识: 科学养殖, (3): 41-42]
- Kai M, Hausteim M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B, 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(6): 1001-1012.
- Lam K, Babor D, Duthie B, Babor EM, Moore M, Gries G, 2007. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. *Anim. Behav.*, 74(1): 81-92.
- Lam K, Thu K, Tsang M, Moore B, Gries G, 2009. Bacteria on housefly eggs, *Musca domestica*, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. *Naturwissenschaften*, 96(9): 1127-1132.
- Li L, Ma GQ, Liu L, Liu AR, Shi J, Zhou JL, Wang XY, 2016. Research and analysis of cultivate bacteria in captive gibbons faeces in the Kunming Zoo. *Journal of Southwest Forestry University*, 36(2): 121-126. [李莲, 马国强, 刘丽, 刘安荣, 师婧, 周杰珑, 王秀艳, 2016. 昆明动物园圈养长臂猿粪便可培养细菌分析. 西南林业大学学报, 36(2): 121-126]
- Li W, Zheng LY, Li Q, Liu XL, Li MS, Zhang YL, Zhang JB, Yu ZN, 2014. Conversion process and resource utilization of restaurant waste by black soldier fly. *Chemistry & Bioengineering*, 31(11): 12-17. [李武, 郑龙玉, 李庆, 刘学林, 李明顺, 张衍林, 张吉斌, 喻子牛, 2014. 亮斑扁角水虻转化餐厨剩余物工艺及资源化利用. 化学与生物工程, 31(11): 12-17]
- Li ZG, Yang S, Lai JX, Long YZ, Wang G, 2011. Artificial breeding technology for black soldier fly in Xinglong Region of Hainan. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 31(6): 28-30. [李志刚, 杨森, 赖剑雄, 龙宇宙, 王干, 2011. 海南兴隆地区黑水虻的人工繁育技术研究初报. 热带农业科学, 31(6): 28-30]
- Lima T, Zuben CJV, 2016. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) oviposition behavior in previous oviposition situation. *Neotrop. Entomol.*, 45(5): 612-617.
- Liu LQ, Yang SL, Chen Q, Ma L, 2014. Field efficacy trials of 3 billion/g bacillus methylotrophicus wettable powder control cucumber gray mold. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, (9): 130. [刘利强, 杨士玲, 陈强, 马丽, 2014. 30亿个/g甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病田间药效试验. 现代农业科技, (9): 130]
- Ping L, 2010. Optimization and Application of Livestock and Poultry Manure Conversion Using Black Soldier Fly. MSc Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [平磊, 2010. 利用亮斑扁角水虻转化畜禽粪便工艺条件的优化及应用. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文]
- Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner SM, 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *J. Med. Entomol.*, 39(4): 695-698.
- Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide

- substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10(3): 512–526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Tian L, Chen ZQ, 2014. Screening and identification of digestive enzymes in the digestive tract of sea cucumber. Annual Symposium of the China Society of Fisheries. [田良, 陈政强, 2014. 海参消化道产消化酶菌株的筛选和鉴定. 中国水产学会学术年会]
- Tomberlin JK, Sheppard DC, 2001. Lekking behavior of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Florida Entomologist*, 84(4): 729–730.
- Wang ZY, Mo JC, 2010. Spawning substrate choice of *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala*. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 21(4): 309–311. [王争艳, 莫建初, 2010. 家蝇和大头金蝇的产卵基质选择行为. 中国媒介生物学及控制杂志, 21(4): 309–311]
- Wu YY, Zhou T, Wang Q, Dai PL, Luo QH, Song HL, 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* in honeybee larvae. *Microbiology China*, 37(10): 1486–1490. [吴艳艳, 周婷, 王强, 代平礼, 罗其花, 宋怀磊, 2010. 蜜蜂幼虫粪肠球菌的分离与鉴定. 微生物学通报, 37(10): 1486–1490]
- Xia XF, Zheng DD, Lin HL, You MS, 2013. Isolation and identification of bacteria from the larval midgut of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 770–776. [夏晓峰, 郑丹丹, 林海兰, 尤民生, 2013. 小菜蛾幼虫中肠细菌的分离鉴定. 应用昆虫学报, 50(3): 770–776]
- Xiang J, Zhang JH, Cai HY, Chen WB, Cui TB, 2012. Fermentation optimization for aminopeptidase production of *Bacillus methylotrophilus*. *China Brewing*, 31(5): 45–50. [向军, 张金虎, 柴海云, 陈伟滨, 崔堂兵, 2012. 甲基营养型芽孢杆菌产氨肽酶的发酵优化. 中国酿造, 31(5): 45–50]
- Xu L, Zheng LY, Hu RQ, Cao ZP, Yu ZN, Zhang JB, 2015. Effect of chemical substances on oviposition behavior of black soldier fly. *Chemistry & Bioengineering*, (9): 46–49. [徐柳, 郑龙玉, 胡芮绮, 曹志平, 喻子牛, 张吉斌, 2015. 影响亮斑扁角水虻产卵行为的化学物质研究. 化学与生物工程, (9): 46–49]
- Yang S, 2010. Continuous Culture of *Hermetia illucens* L. and Study on Swine Manure Bioconversion Tropical Region. MSc Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [杨森, 2010. 热带地区连续培养亮斑扁角水虻 (*Hermetia illucens* L.) 和生物转化猪粪研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文]
- Zheng L, Crippen TL, Holmes L, Singh B, Pimsler ML, Benbow ME, Tarone AM, Dowd S, Yu ZN, Vanlaerhoven SL, Wood TK, Tomberlin JK, 2013. Bacteria mediate oviposition by the black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae). *Sci. Rep.*, 3(9): 2563–2563.
- Zheng LY, 2012. Effects of Egg Associated Bacteria on the Oviposition Aggregation and Development of Black Soldier Fly. PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [郑龙玉, 2012. 卵携带的微生物对亮斑扁角水虻产卵行为和生长发育的影响. 武汉: 华中农业大学博士学位论文]

(责任编辑: 马丽萍)