昆虫知识 *Chinese Bulletin of Entomology* 2010,47(6):1123 ~ 1127

肠道共生细菌预发酵鸡粪对黑水虻生长发育的影响*

喻国辉[1] 杨紫红[1] 夏 嫱[2] 陈远凤[1] 程 萍[1**]

(1. 珠海市农业科学研究中心 珠海 519075;2. 遵义医学院珠海校区 珠海 519041)

Effect of chicken manure treated by gut symbiotic bacteria on the growth and development of black solder fly *Hermetia illucens*.

YU Guo-Hui[1], YANG Zi-Hong[1], XIA Qiang[2], CHEN Yuan-Feng[1], CHENG Ping[1**] (1. *Zhuhai Agricultural Research Center*, Zhuhai 519075, China; 2. *Zuyi Medical College Zhuhai Campus*, Zhuhai 519041, China)

Abstract The effects of fermenting chicken manure for 4 days with *Bacillus subtilis* strains S15, S16 and S19 isolated from the gut of black soldier fly larvae and *B. natto* strain D1, on the growth and development of black soldier fly larvae was evaluated by feeding larvae with the fermented manure. The results show that prepupal and pupal weight increased significantly, pupation rate, female and male body length also increased, and the number of days from hatching to the prepupal stage was reduced. There was no significant effect on larval survival rate, adult emergence ratio and adult longevity. Different *Bacillus* strains had different effects on larval growth.

Key words *Hermetia illuens*, *Bacillus subtilis*, chicken manure, growth and development

摘 要 以利用黑水虻 *Hermetia illucens* L. 肠道共生细菌不同菌株培养液预发酵的鸡粪为培养料,研究了添加不同菌株的发酵鸡粪对黑水虻幼虫生长发育的影响。结果表明,添加不同菌株的预发酵鸡粪能显著增加预蛹和蛹的重量,显著提高化蛹率并增加雌、雄成虫体长,缩短预蛹所需时间,但对幼虫存活率、成虫羽化率、成虫寿命没有显著影响。同时,不同菌株的作用效果有所不同。

关键词 黑水虻,枯草芽孢杆菌,鸡粪,生长发育

黑水虻 *Hermetia illucens* L.,是一种重要的资源昆虫[1],幼虫和预蛹含有丰富的营养,能够部分替代豆粕用于猪[2]、鸡[3]和罗非鱼养殖[4,5],并能部分替代鱼粉和鱼油用于虹鳟鱼养殖[6]。Sheppard 和 Newton[7]及 Newton 等[8]利用黑水虻开展的鸡粪和猪粪的转化研究显示黑水虻可能在畜禽粪便的资源化应用方面发挥重要的作用。但迄今为止,黑水虻仍然未能在畜禽粪便的集约化处理上大显身手,主要原因是黑水虻工业化应用的一些重要参数研究滞后造成。Tomberlin 等开发出黑水虻幼虫的人工饲料配方,并对影响黑水虻交配和产卵的环境因子展开了研究[9,10]。Sheppard 等研究获得了黑水虻的人工饲养方法[11]并成功在人工条件下繁殖和传代黑水虻种群,为黑水虻的应用打下基础。但由于黑水虻其它的生物学和生态学研究数据的严重不足,使得规模化应用黑水虻处理畜禽粪便的技术一直处于探索之中。

Newton 等[8]以猪粪为转化目标,将黑水虻人工繁殖技术和粪便机械化收集技术结合,进行了有益的尝试,在这个转化系统中,猪粪被收集到转化池中,然后接种一定量的黑水虻幼虫,转化后收获的预蛹一部分保留以繁殖后代维持系统正常运转,另一部分冻存起来做其它用途,这种处理方法为黑水虻的产业化应用提供了重

* 资助项目:广东省农业攻关项目(2007B020803001)。

** 通讯作者,E-mail: ygh76411@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-01-26,修回日期:2010-04-13

要的借鉴。

黑水虻生长发育速度较慢，在实际应用中存在转化周期长的问题。近年来我国畜禽粪便中污染物成分发生了明显变化，集约化养殖的畜禽粪便污染物含量高于传统养殖和 20 世纪 90 年代的同类粪便[12~14]，鸡粪样品检测获得的总 N 和总 P 平均含量分别为 3.01% 和 2.48%，明显高于传统养殖[15]，并比 20 世纪 90 年代测得的数据[16]分别增加 28.63% 和 166.67%，是 Newton 等[8]所测定猪粪 N 和 P 的 32 倍左右。且鸡粪中粗蛋白的 50% 左右为尿酸、氨、尿素、肌酸酐等[17]，有机磷的含量在 3.4% ~13.5% 之间[14]，不易被消化吸收。如何提高转化效率、缩短转化周期以降低生产成本是黑水虻应用研究中需要解决的问题之一。本文从黑水虻肠道共生产酶微生物着手，利用从黑水虻肠道分离的几株具有蛋白质和有机磷分解能力的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）[18]为研究材料，测定用这些芽孢杆菌预发酵鸡粪对黑水虻幼虫生长发育的影响，以筛选有利于提高产量和转化速率的微生物用于生产实践。为了使获得的数据更加接近生产，设计时没有对鸡粪灭菌，也没有对昆虫无菌化。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

利用珠海本地黑水虻资源建立的种群，在珠海市农业科学研究中心实验室使用 Tomberlin 等[9]筛选的紫花苜蓿人工饲料饲养，传代 6 代。

1.2 供试用培养基和供试微生物

LB 培养基：酵母提取物 5 g，胰化蛋白胨 10 g，NaCl 10 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1 000 mL，pH7.0，121℃灭菌 20 min。

纳豆芽孢杆菌 D1（*Bacillus natto* D1），由珠海市派尔尼生物技术有限公司提供的饲料用微生物，对大肠杆菌（*Escherichia coli*）和金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）具有一定的抑制效果[19]。

从黑水虻肠道分离的具有蛋白质分解能力和有机磷分解能力的枯草芽孢杆菌 S15、S16、S19，在平板上对大肠杆菌，沙门氏菌（*Salmonella* sp.）和金黄色葡萄球菌有一定的抑制效果。

上述微生物接种灭菌鸡粪时，均使用 LB 培养基摇瓶发酵，使发酵液活菌数达到 10^8 cfu/mL。

1.3 鸡粪的预发酵处理

收集新鲜湿鸡粪，测定原始鸡粪含水量，将鸡粪分装到口径 12 cm，高 10 cm 的圆筒形塑料食品盒中，每盒 200 g。离心收集发酵液中的菌体，用无菌水重悬，使各供试菌液含有活菌数 10^8 cfu/mL，然后将 2 mL 无菌水重悬的菌液接种到鸡粪中，对照加入 2 mL 无菌水，每个菌株 3 个重复，在超净工作台上混合均匀后，盖好盒盖，置于 30℃培养箱中静置发酵 4 d，发酵后测定鸡粪含水量（表 1），用于养殖实验。

表 1 不同处理鸡粪含水量

处理	含水量
鸡粪	70.38% ±0.91%
发酵 4 d 后鸡粪	71.30% ±0.92%

1.4 预发酵鸡粪对幼虫存活率和预蛹的影响

收集 3 000 粒同日产的卵（产卵时间相差不超过 3 h），将卵置于口径 12 cm，高 10 cm 的圆筒形塑料食品盒中，在人工气候箱中（27℃ ±3℃，RH 80% ±8%，L∶D = 14∶10）保湿孵化后，加入 Tomberlin 等[9]筛选的人工饲料饲养 4 d后，随机挑取 100 头 4 日龄幼虫置于塑料食品盒中作为一个重复，每个处理 3 个重复，并置于上述人工气候箱中饲养。第一头幼虫变成预蛹时，开始每日记录预蛹的数量并挑出预蛹，吸干预蛹体表的水分称重，直至所有的幼虫均变成预蛹。根据预蛹的数量计算幼虫存活率，并计算从孵化到幼虫开始预蛹的发育时间、从幼虫孵化到 90% 幼虫变成预蛹的发育时间以及第一头幼虫变成预蛹到 90% 的幼虫变成预蛹过程的持续时间及其差异。

1.5 预发酵鸡粪对化蛹的影响

第一头预蛹化蛹时，开始每日记录化蛹的数量并对蛹称重，每个重复称 50 头蛹，并根据

时间记录计算从卵孵化到开始化蛹的发育时间、从卵孵化到 90% 预蛹化蛹的发育时间以及第一头预蛹化蛹到 90% 预蛹化蛹过程的持续时间及其差异。

1.6　预发酵鸡粪对成虫羽化的影响

第一头成虫羽化时,开始区分雌雄,记录羽化的成虫体长和时间(体长数据不包括触角和生殖器官的长度),并根据记录数据计算从卵孵化到开始羽化的发育时间、从卵孵化到 90% 成虫羽化的发育时间以及第一头成虫羽化到 90% 成虫羽化过程持续时间及其差异。

1.7　数据统计

实验中的所有数据均使用 SPSS 13.0 统计分析软件中的方差分析和 LSD 多重比较方法比较。

2　结果与分析

2.1　预发酵鸡粪对预蛹重量、幼虫存活率的影响

在非灭菌鸡粪中添加产酶枯草芽孢杆菌 S15、S16 和 S19 以及产酶纳豆芽孢杆菌 D1 发酵 4 d 后,再接入黑水虻 4 日龄幼虫,待幼虫开始预蛹后逐一将预蛹取出,并计数和称重,统计分析后发现微生物处理能够显著提高黑水虻预蛹的重量(表 2)。S16 处理、D1 处理、S15 处理、S19 处理分别使相应的黑水虻预蛹分别比对照增重 8.62%、9.22%、14.89% 和 15.87%。这意味着,在相同的接种密度下,添加微生物发酵,可以增加黑水虻的收获最高增加达到 15.87%。

表 2　不同菌株预发酵鸡粪对黑水虻预蛹平均重量和幼虫存活率的影响

菌株	预蛹重量(g)	幼虫存活率(%)
S15	0.0888 ± 0.0171 c	94.00 ± 7.21 a
S16	0.0840 ± 0.0144 b	99.67 ± 0.58 a
S19	0.0896 ± 0.0163 c	92.33 ± 5.51 a
D1	0.0845 ± 0.0148 b	97.67 ± 2.08 a
CK	0.0773 ± 0.0122 a	98.00 ± 2.65 a

注:同一列数据后的不同小写字母表示方差分析和 LSD 检验差异显著($P < 0.05$)。(下表同)

添加微生物发酵鸡粪对黑水虻幼虫的存活率没有明显影响(表 2),各处理的存活率差异不显著。S16 处理存活率最高,其次为 CK 处理,S19 处理存活率最低。

2.2　预发酵鸡粪对黑水虻蛹重、化蛹率的影响

在非灭菌鸡粪中添加产酶枯草芽孢杆菌 S15、S16 和 S19 及产酶纳亚芽孢杆菌 D_1 发酵后

将上述各处理收集的预蛹在化蛹后分别逐一称重和计数,统计分析后发现不同处理的黑水虻蛹重量差异显著,微生物处理的蛹重显著高于对照(表 3)。对照蛹平均重量与 D1 处理差异不显著,但显著低于 S15、S16 和 S19 处理。

不同处理的黑水虻化蛹率存在差异,S19 和 S16 处理的化蛹率显著高于对照,也高于其它微生物处理,但差异不显著(表 3)。

表 3　不同处理对黑水虻蛹重和化蛹率的影响

菌株	蛹重量(g)	化蛹率(%)
S15	0.0731 ± 0.0144 b	94.34 ± 4.11 ab
S16	0.0721 ± 0.0494 b	96.60 ± 2.95 b
S19	0.0732 ± 0.0118 b	98.50 ± 1.79 b
D1	0.0638 ± 0.0133 a	96.53 ± 0.58 ab
CK	0.0606 ± 0.0103 a	91.92 ± 1.87 a

2.3　预发酵鸡粪对黑水虻成虫羽化的影响

由表 4 可以看出,对照羽化率最高,但与其他处理差异均不显著;S19 处理雌成虫寿命最长,与其他处理比较差异亦不显著。S15 处理雄虫寿命最长,与其他处理间也无显著差异。雄虫寿命普遍比雌虫长,尤其是 S16 和 D1 处理,雄虫寿命显著长于雌虫。

2.4　预发酵鸡粪对黑水虻各发育阶段历期的影响

不同处理幼虫开始预蛹的时间差异不显著(表 5),但 90% 幼虫结束预蛹的时间与对照相比差异显著,对照 90% 幼虫发育到预蛹期所需时间最长。S19 处理的幼虫,90% 幼虫完成预蛹比对照缩短了将近 3 d。

不同处理黑水虻从卵孵化到开始化蛹的发育时间差异不显著(表 5),从卵孵化到 90% 的预蛹化蛹的发育时间差异也不显著,90% 个体

完成化蛹的过程持续时间差异不显著，但总体算来，S15 处理的黑水虻化蛹过程持续时间最短，其后依次是 S16 处理、S19 处理、D1 处理，对照黑水虻化蛹持续时间最长。

表 4 不同菌株发酵鸡粪对黑水虻成虫体长、羽化率和寿命的影响

菌株	体长(cm)		羽化率(%)	寿命(d)	
	雌虫	雄虫		雌虫	雄虫
S15	1.26 ± 0.08 c	1.23 ± 0.09 cd	99.66 ± 0.59 a	7.10 ± 1.67 a	7.80 ± 1.73 a
S16	1.22 ± 0.09 b	1.22 ± 0.09 bc	98.67 ± 2.31 a	6.50 ± 1.55 a	7.50 ± 1.59 a
S19	1.27 ± 0.07 c	1.25 ± 0.09 d	98.85 ± 1.99 a	7.69 ± 1.51 a	7.20 ± 1.67 a
D1	1.23 ± 0.08 b	1.20 ± 0.09 ab	98.24 ± 1.64 a	6.50 ± 1.43 a	7.57 ± 1.14 a
CK	1.20 ± 0.06 a	1.18 ± 0.08 a	100.00% ± 0.00 a	7.17 ± 1.51 a	7.60 ± 1.16 a

不同处理对黑水虻的羽化过程产生显著影响(表 5)，不同处理的黑水虻成虫开始羽化的时间有差异，S16 处理与对照处理开始羽化的时间基本一致，并早于 S15、S19 和 D1 处理。90% 的成虫羽化完毕所需的发育时间不同处理间差异不显著。90% 的蛹羽化过程持续时间各处理差异显著，其中 S19 最短，其次为 D1，均显著低于 CK。如果按照生产设计，90% 的幼虫完成预蛹就结束生产，所有的微生物处理都可以缩短生产周期；如果以收集蛹作为目标，各处理没有差异；如果以收集成虫作为目标，S15、S16 处理可略微缩短处理时间。由此可见，在粪便中添加肠道微生物发酵鸡粪后，再添加黑水虻幼虫，对于提高黑水虻生长速度、增加黑水虻产量和缩短转化周期具有一定的意义。

表 5 不同菌株预发酵鸡粪对黑水虻不同发育阶段发育历期的影响

时间(d)	S 15	S16	S 19	D1	CK
从虫卵孵化到第一个预蛹出现所需天数	22.33 ± 0.58 a	22.00 ± 0.00 a	23.00 ± 0.00 a	22.67 ± 0.58 a	23.00 ± 1.00 a
从虫卵孵化到 90% 幼虫完成预蛹天数	32.00 ± 2.00 a	31.33 ± 0.58 a	30.67 ± 0.58 a	31.33 ± 0.58 a	34.00 ± 0.00 b
90% 预蛹持续预蛹过程的天数	10.67 ± 2.08 ab	10.33 ± 0.58 ab	9.33 ± 0.58 a	9.67 ± 0.58 a	12.00 ± 1.00 b
从虫卵孵化到第一个蛹出现所需天数	31.00 ± 1.00 a	30.00 ± 0.00 a	30.67 ± 0.58 a	30.67 ± 1.15a	30.33 ± 0.58 a
从虫卵孵化到 90% 预蛹完成化蛹过程的天数	39.00 ± 1.73 a	38.33 ± 0.58 a	39.33 ± 1.15 a	39.33 ± 1.53 a	39.67 ± 0.58 a
90% 预蛹完成化蛹过程的天数	9.00 ± 2.00 a	9.33 ± 0.58 a	9.67 ± 1.53 a	9.67 ± 0.58 a	10.33 ± 0.58 a
从虫卵孵化到成虫开始羽化的天数	40.67 ± 1.17 a	39.00 ± 0.58 b	40.67 ± 0.58 a	40.00 ± 0.00 ab	39.33 ± 0.58 ab
从虫卵孵化到 90% 成虫羽化的时间	48.00 ± 1.00 a	48.00 ± 0.00 a	48.33 ± 0.58 a	48.67 ± 1.15a	49.33 ± 0.58 a
90% 成虫完成羽化过程的天数	9.33 ± 1.15b c	10.67 ± 0.58 ab	8.67 ± 1.15 c	9.00 ± 0.00 c	11.33 ± 1.15 a
从虫卵孵化到成虫全部羽化所需天数	53.33 ± 0.58 c	62.33 ± 1.15 a	59.67 ± 2.31ab	59.67 ± 4.16 ab	55.67 ± 1.53 bc

注：以幼虫孵化的当天作为统计的第 1 天。

3 结论与讨论

在新鲜鸡粪中添加一定量的产酶枯草芽孢杆菌菌株或纳豆芽孢杆菌发酵 4 d，可以显著提高随后接种的黑水虻预蛹重量、蛹重量、成虫体长，并在一定程度上缩短预蛹的发育周期。总体看来，在相同的接种密度下，通过单一的微生物接种处理可以提高黑水虻的产量最高达到 15.87%，缩短预蛹历期最高达 2.67 d 左右，预蛹过程的缩短可能与微生物处理后粪便的营养更有利于幼虫吸收，从而使幼虫的发育较为整齐有关。

黑水虻的发育时间过长是黑水虻在生产应用上的一个弊病，本研究显示对照黑水虻在 27℃ 从孵化到开始预蛹所需的时间在 26 d 左右，比 Tomberlin 等用人工饲料饲养的时间略长[9]，与 Myers 等用牛粪饲养的时间相当[20]，因而缩短预蛹过程持续的时间对生产实践中缩

短处理周期具有重要的意义。总体说来,添加不同的微生物获得不同的效果。纳豆芽孢杆菌 D1 和枯草芽孢杆菌 S16 与黑水虻同时添加到鸡粪中的处理除了可以提高黑水虻预蛹的平均重量、提高雌雄成虫的体长外,并能缩短 90% 幼虫完成预蛹所需要的发育时间,在生产应用上具有一定的实用性。但提前添加微生物处理鸡粪在生产实践中应用还存在一定的局限性,且这些菌株是否还存在协同作用,是否还对鸡粪中的抗生素污染和重金属污染的消除也有帮助,还需要进一步的研究,且这些微生物是否能够在黑水虻肠道定殖以及是否能够提高黑水虻肠道的相应蛋白酶和有机磷分解酶的活性,也需要进一步的研究。

参 考 文 献

1 喻国辉,陈燕红,喻子牛,等. 黑水虻幼虫和预蛹的饲料价值研究进展. 昆虫知识,2009,**46**(1):41 ~45.

2 Newton G. L.,Booram C. V.,Barker R. W.,*et al*. Dried *Hermetia illucens* larvae meal as a supplement for swine. *J. Anim. Sci.*,1977,**44**:395 ~399.

3 Hale O. M. Dried *Hermetia illucens* larvae (Diptera: stratiomyidae) as a feed additive for poultry. *J. Georgia Entomol. Soc.*,1973,**8** (1):16 ~20.

4 Bondari K.,Sheppard D. C. Soldier fly larvae as feed in commercial fish production. *Aquaculture*,1981,**24**:103 ~109.

5 Bondari K.,Sheppard D. C. Soldier fly,*Hermetia illucens* L.,lavae as feed for channel catfish,*Ictalurus punctarus* (Rafinesque),and blue tilapia,*Oreochromis aureus* (Steindachner). *Aquac. Fish Manag.*,1987,**18**(3):209 ~220.

6 St-Hilaire S.,Cranfill K.,McGuire M. A.,*et al*. Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout,*Oncorhynchus mykiss*. *J. World Aquac. Soc.*,2007,**38** (1):59 ~67.

7 Sheppard C. D,Newton G. L. A value added manure management system using the black soldier fly. *Biores. Tec.*,1994,**50**:275 ~279.

8 Newton G. L.,Sheppard C. D.,Watson D. W.,*et al*. Using the black soldier fly,*Hermetia illucens*,as a value-added tool for the management of swine manure. 2005,URL http//www.p2pays.org/ref/37/36122.pdf.

9 Tomberlin J. K.,Sheppard D. C,Joyce J. A. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) reared on three artificial diets. *Annals of the Entomologieal Society of America*,2002,**95** (3):379 ~386.

10 Tomberlin J. K,Sheppard C. D. Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Strationmyidae) in a colony. *J. Entomol. Sci.*,2002,**37** (4):345 ~352.

11 Sheppard C. D.,Tomberlin J. K.,Joyce J. A.,*et al*. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *J. Med. Entomol.*,2002,**39** (4):695 ~698.

12 张树清,张夫道,刘秀梅,等. 规模化养殖畜禽粪便主要有害成分测定分析研究. 植物营养与肥料学报,2005,**11** (6):822 ~829.

13 李书田,刘荣乐,陕红. 我国主要畜禽粪便养分含量及变化分析. 农业环境科学学报,2009,**28**(1):179 ~184.

14 李艾芬,章明奎. 规模化养殖场鸡粪营养物质和污染元素的组成特点. 生态与农村环境学报,2009,**25**(2):64 ~67.

15 姚丽贤,李国良,党志. 集约化养殖畜禽粪中主要化学物质调查. 应用生态学报,2006,**17** (10):1 989 ~1 992.

16 全国农业技术推广服务中心. 中国有机肥料养分志. 北京:中国农业出版社. 1999.

17 兰云贤,林鹏,邰秀林. 鸡粪青贮取代奶牛精料效果试验. 饲料研究,2001,(11):21 ~22,24.

18 喻国辉,牛春艳,何国宝,等. 黑水虻幼虫肠道和体表产酶细菌的分离和鉴定. 昆虫知识,2010,**47**(5):889 ~894.

19 董尚智,陈远凤,黄燕华,等. 纳豆芽孢杆菌的饲料学特性研究. 动物营养学报,2009,**21**(3):371 ~378.

20 Myers H. M.,Tomberlin J. K.,Lambert B. D.,*et al*. Development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae fed dairy manure. *Environ. Entoml.*,2008,**37**(1):11 ~15.