

# 漂白粉对家蚕中肠产消化酶细菌的影响\*

李 畅<sup>1\*\*</sup> 周 沂<sup>1\*\*</sup> 张玉琴<sup>1</sup> 陈 林<sup>1</sup> 杨仁奎<sup>2\*\*\*</sup> 冯丽春<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 西南大学生物技术学院, 重庆 400716;

2. 重庆市蚕业科学技术研究院, 重庆 400700)

**摘 要** 【目的】本研究以漂白粉液浸渍消毒(以下简称浸消)桑叶饲喂家蚕为处理组,分析了不同组之间家蚕中肠细菌数量的差异;探讨了各组家蚕中肠产消化酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶)细菌的菌株数量、产酶种类及相对产酶能力的差异。【方法】用 16S rDNA 测序技术对产酶菌株进行了鉴定,比较各组产酶菌种类的不同。【结果】饲喂不同有效氯浓度漂白粉液浸消叶对家蚕中肠细菌的数量、产酶菌数量均有抑制作用,且随有效氯浓度升高抑制作用增强;各处理组产蛋白酶菌株平均相对产酶能力均低于清水组,且清水组肠液中产淀粉酶菌株数明显多于各处理组;取食漂白粉液浸消桑叶后,家蚕中肠产消化酶细菌类群构成有一定变化,清水组和全程 0.3%组产酶菌属相对较丰富,有 *Staphylococcus* sp.、*Lelliottia* sp. 和 *Buttiauxella* sp., 其他处理组的产酶菌属相对单一,只有 *Staphylococcus* sp.。【结论】以上结果说明漂白粉对家蚕中肠内细菌及产酶菌的增殖有抑制作用,中肠内产蛋白酶菌的产酶能力和产淀粉酶菌株的数量也受到抑制,对产酶菌类群构成有一定影响。

**关键词** 漂白粉; 家蚕; 中肠; 产酶菌

## Effects of bleach powder on the midgut digestive enzymes of silkworms

LI Chang<sup>1\*\*</sup> ZHOU Yi<sup>1\*\*</sup> ZHANG Yu-Qin<sup>1</sup> CHEN Lin<sup>1</sup> YANG Ren-Kui<sup>2\*\*\*</sup> FENG Li-Chun<sup>1\*\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Sericulture Biology and Genetic Breeding in Ministry of Agriculture and Rural Science,

College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Sericulture Science and Technology Research Institute, Chongqing 400700, China)

**Abstract** [Objectives] To investigate the effect of bleach powder on silkworm intestinal bacteria and digestive enzymes, [Methods] Silkworms were either fed mulberry leaves that had been disinfected with bleach powder or untreated mulberry leaves, and their intestinal bacteria were isolated and identified by 16S rDNA sequencing. [Results] The overall amount of bacteria, and of enzyme-producing bacteria, in the midgut was generally inhibited by bleach powder, regardless of the effective chlorine concentration although there was a positive correlation between the strength of this inhibitory effect and chlorine concentration. Compared to the Control, the abundance of amylase-producing bacteria, as well as the average production of protease, were significantly lower in larvae that had been fed leaves treated with bleach powder. With the exception of the lowest effective chlorine concentration, 0.3%, exposure to all other concentrations of bleach powder reduced the diversity of mid-gut bacteria to a single genus; *Staphylococcus* sp.. In contrast, the control group and the 0.3% treatment group had relatively diverse enzyme-producing bacteria, including *Staphylococcus* sp., *Lelliottia* sp., and *Buttiauxella* sp. [Conclusion] Both intestinal bacterial community diversity and bacterial digestive enzymes were significantly inhibited by bleach powder, particularly bacterial protease production and the abundance of amylase-producing bacteria.

**Key words** bleaching powder; silkworm; midgut; enzyme producing bacteria

\*资助项目 Supported projects: 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-18); 商务部茧丝绸产业科技转化服务项目(TXJ-010-2017212)

\*\* 共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 49301514@qq.com; 281674515@qq.com

\*\*\*共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: 630525623@qq.com; flc1220@aliyun.com

收稿日期 Received: 2018-07-30, 接受日期 Accepted: 2018-11-14

家蚕作为生命科学研究的模式生物之一,其价值已体现在经济、文化、科学研究、药用、保健等多方面(桂仲争等,2001;魏兆军和姜绍通,2005),因此科学高效地饲养出健康的家蚕具有重要意义。而家蚕微粒子病因其具有食下传染和胚胎传染两种传播途径而被称为家蚕的“癌症”,给蚕业生产带来巨大的损失。漂白粉是一种广谱消毒剂,日常生活中常利用其氧化作用杀菌消毒,由于对病毒、真菌、细菌及家蚕微粒子孢子等有很强的杀灭作用,且具有价格便宜、高效等特点而被大量应用于蚕业生产上。养蚕中全程饲喂漂白粉液浸渍消毒(以下简称浸消)的桑叶,已经成为有效防控微粒子病的方法,被广泛应用于蚕种生产上。然而长期饲喂漂白粉液浸消桑叶,家蚕出现了蚕体肥大、熟蚕蚕体缩小、死蛹增加、化性不稳定等现象(杜强远,2006)。针对这些问题,学者们从家蚕饲育成绩、生长发育等方面着手进行了探究,但关于漂白粉对家蚕肠道微生物菌群变化的研究鲜有报道。

本实验结合生产实际,用不同有效氯浓度的漂白粉液浸消桑叶喂食家蚕,研究不同处理组家蚕肠道细菌总量、产消化酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶)细菌数量及产酶能力的差异,以期探讨漂白粉对家蚕肠道微生态的影响,寻找家蚕生长发育受到影响的原因,为蚕业生产上安全使用漂白粉消毒、更好地饲养家蚕提供科学指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 家蚕:**“秋丰”品种,由重庆市北碚蚕业科学研究院提供蚕种,常规饲养。

### 1.1.2 药品与仪器

药品:漂白粉(有效氯 28%,购自川云龙化工有限公司)、冰醋酸、碘化钾、硫代硫酸钠、氯化钠、氢氧化钠、蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉、干酪素、橄榄油、聚乙烯醇、可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠、Tris(生工生物)、盐酸、硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钙、磷酸氢二钾、酵母粉、三

丁酸甘油酯、碘、碘酸钠、中性红、刚果红、异丙醇、细菌基因组提取试剂盒(Omega公司)等。

仪器:电子天平(FA2104,上海精天电子仪器有限公司)、SPX型生化培养箱(常州菲普实验仪器厂)、Thermo高速冷冻离心机、磁力搅拌器、摇床(苏州培英实验设备有限公司)、超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司)、PCR仪(ABI)、DYY-6C型电泳槽(北京六一仪器厂)、BIO-RAD凝胶成像系统、PHS-3C酸度计、SX-500高压蒸汽灭菌锅、制冰机(SANYO)、Galanz微波炉、SX-500高压蒸汽灭菌锅、PHS-3C酸度计、HWS-26电热恒温水浴锅等。

### 1.1.3 主要试剂配制

卢戈氏碘液:先在容量瓶中加入约 10 mL 蒸馏水,加入 10 g KI 用玻璃棒搅拌溶解,加入 5 g 碘,搅拌使之完全溶解,加蒸馏水至 100 mL 并混匀,倒入棕色瓶中,现配现用。

5 mg/mL 刚果红溶液:称取 1.5 g 刚果红,加入 300 mL 蒸馏水,用玻璃棒搅拌溶解。

### 1.1.4 主要培养基配制

牛肉膏蛋白胨培养基(NA):蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5 g,琼脂粉 18 g,双蒸水 1 L,调节 pH 值为 9.2-9.8;

牛肉膏蛋白胨液体培养基(NB):蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5 g,双蒸水 1 L,调节 pH 值为 9.2-9.8;

产蛋白酶菌株筛选培养基(高绘菊等,2007)称取 10 g 干酪素,用少量 0.2 mol/L NaOH 润湿,然后倒入配好的 1 L NA 培养基,调节 pH 值为 9.2-9.8;

产脂肪酶菌株初筛培养基:在 NA 培养基中加入 120 mL/L 的橄榄油乳化液和 0.005% 的中性红,调节 pH 值为 7.2;橄榄油乳化液配制方法(汪静杰等,2014):取 20 g 聚乙烯醇加入到 1 L 蒸馏水中,在 95 ℃ 水浴锅中保温 2 h,中间每 20 min 用玻璃棒搅拌 1 次使其完全溶解,得到 2% 聚乙烯醇溶液。将橄榄油和 2% 聚乙烯醇溶液按 1:3 的比例混合,10 000 r/min 连续乳化 3 次,每次乳化 3 min,即得到橄榄油乳化液。可放于

#### 4 保存, 每次用时重新乳化;

产脂肪酶菌株复筛培养基(李江华等, 2000; 林容霞等, 2006): 在 450 mL Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.0) 中加入三丁酸甘油酯乳化液 50 mL 和 1.5% 琼脂, 调节 pH 为 7.2-7.5; 三丁酸甘油酯乳化液 配制 3% 聚乙烯醇溶液 100 mL, 加入三丁酸甘油酯 ( $\rho=1.032$ ) 适量, 10 000 r/min 连续乳化 3 次, 每次乳化 3 min, 得到 100 g/L 三丁酸甘油酯乳化液;

产纤维素酶菌株筛选培养基 (邹昌瑞, 2011): NaCl 6 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g, CMC-Na 15 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g, 酵母粉 1 g, 水 1 L, 琼脂 18 g, 自然 pH 值, 加热并磁力搅拌使其溶解;

产淀粉酶菌株筛选培养基: 将 1% 的可溶性淀粉加入 NA 培养基中, 调节 pH 值为 9.2-9.8;

以上各培养基配好后均在 121 °C 灭菌 20 min。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分区** 实验设置清水对照组和处理组, 处理组根据漂白粉有效氯浓度分为 0.3% 组、0.4% 组、0.5% 组、0.6% 组 (皆从 4 龄起蚕开始饲喂漂白粉浸消叶), 另设全程 0.3% 组 (从收蚁到上簇全程饲喂 0.3% 有效氯浓度漂白粉液浸消叶), 按雌雄分区, 每个处理组设 3 区重复, 后文图表中各组分别用 CK、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、QC0.3% 表示。桑叶处理方式: 1-3 龄浸泡 8 min, 4-5 龄浸泡 10 min (清水组与漂白粉液处理组浸泡时间相同), 保持桑叶 30 min 湿润, 晾干后喂蚕, 每隔 8 h 喂食一次, 每天喂食 3 次。

**1.2.2 样品处理** 取 5 龄 4 d 的各组家蚕饥饿处理 24 h, 用 75% 的酒精浸泡体表 15 s, 无菌水冲洗 3 次, 在无菌条件下解剖取其围食膜及肠液, 将肠液收集到无菌的 1.5 mL 的离心管中; 将围食膜取于无菌研钵中, 并加入 200  $\mu\text{L}$  无菌生理盐水和适量无菌的石英砂, 用无菌研棒将其研磨充分至匀浆, 放入无菌的 1.5 mL 离心管中。

**1.2.3 家蚕肠道细菌的分离及纯化** 将已取得的家蚕肠液 (后文图表中用 Y 表示) 及围食膜

研磨液 (后文图表中用 M 表示) 离心后按梯度稀释法做  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ ..... $10^{-7}$  稀释。各取 200  $\mu\text{L}$  肠液和围食膜研磨液稀释液于 NA 平板上, 每个稀释度 3 次重复, 28 °C 培养 48 h 后挑取生长较快的单菌落在 NA 平板上纯化获得纯培养。并用以下公式进行家蚕肠道细菌总数的计算 (李冠楠, 2015)。

样品的菌数 (个/mL) = 相同稀释度 3 组重复的菌落数量平均值  $\times$  稀释倍数。

**1.2.4 家蚕肠道产消化酶细菌的筛选** 将初筛获得的菌株点接在筛选培养基的表面, 每个菌株 3 个重复, 于 28 °C 培养 72 h。

产蛋白酶菌株筛选: 根据菌体在筛选培养基平板上水解圈直径 ( $D_1$ ) 和菌落直径 ( $d_1$ ) 比值的大小, 判断菌株产蛋白酶的活性并记录, 选取直径比 ( $D_1/d_1$ ) 较大且生长迅速的菌株进行下一步研究。

产淀粉酶菌株筛选 (杨文静等, 2011): 根据菌体在筛选培养基上是否产生透明水解圈和透明水解圈的直径 ( $D_2$ ) 和菌落直径 ( $d_2$ ) 比值的大小来判断菌株产淀粉酶的活性并记录, 选取直径比 ( $D_2/d_2$ ) 较大且生长迅速的菌株进行下一步研究。

产脂肪酶菌株筛选: 用接种针沾取少量单菌落, 点接在产脂肪酶初筛培养基上, 28 °C 倒置培养 72 h; 将菌落周围呈粉红色的菌株接种在 NB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床上过夜培养, 再滴取在复筛培养基上, 28 °C 培养 48 h, 根据培养基平板水解圈直径 ( $D_3$ ) 和菌落直径 ( $d_3$ ) 比值的大小, 判断菌株产蛋白酶的活性并记录, 选取直径比 ( $D_3/d_3$ ) 较大且生长迅速的菌株进行下一步研究。

产纤维素酶菌株筛选: 根据筛选培养基菌落周围是否出现黄色水解圈来鉴别其是否产纤维素酶, 若有水解圈, 测量透明水解圈的直径 ( $D_4$ ) 和菌落直径 ( $d_4$ ) 并记录, 选取直径比 ( $D_4/d_4$ ) 较大且生长迅速的菌株进行下一步研究。

统计处理不同组的产酶菌差异及其相对产酶能力强弱, 同时, 挑取单菌落至灭菌 NB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 过夜摇菌至浑浊,

将菌种液和 50%甘油各取 0.5 mL 混合于灭菌 1.5 mL 离心管中,用封口膜封好,标记好菌种名称及保种日期,放于 -80 保存。

将目的菌株接种至 NB 培养基过夜摇菌,提取基因组 DNA 作为模板,用细菌 16S rDNA 基因通用引物进行 PCR 扩增,引物序列为 27F 和 1492R。PCR 反应条件为:95 预变性 4 min,94 变性 30 s,52 退火 45 s,72 延伸 1 min,30 个循环,72 延伸 8 min,10 保存至从 PCR 仪中取出,扩增产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,筛选出条带清晰且片段长度正确的 PCR 产物送至生工生物测序,将 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 各处理组家蚕中肠细菌菌落总数

用 NA 培养基分别从不同处理组家蚕肠液和围食膜中分离得到 109 株细菌。饲喂漂白粉液浸消叶后雌雄家蚕肠液中细菌总数均显著减少,且随有效氯浓度升高呈逐渐降低的趋势。全程 0.3%组与清水组比较,雌雄分别下降 69.2%和 42.3%,差异显著。不同处理组之间变化极显著,雌雄之间无明显变化规律(图 1)。

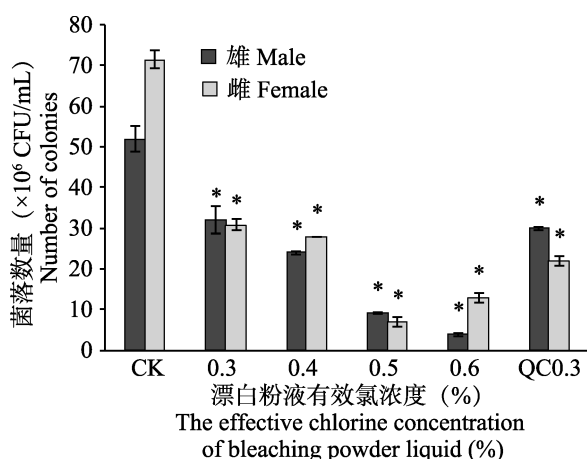


图 1 不同处理组和对照组肠液菌落总数变化  
Fig. 1 The comparison of colonies' number in the intestinal fluid of 5<sup>th</sup> instar silkworm larva in the different treatment groups and the control group

\* 代表差异显著(单因素方差分析法)。下同。

\* indicates significant difference by One-way analysis. The same below.

饲喂漂白粉液浸消叶后雌雄家蚕围食膜上留存细菌总数也明显减小,且随有效氯浓度升高呈逐渐降低的趋势。全程 0.3%组细菌菌落总数与清水对照组相比雌雄分别减少 83.5%和 89.9%。不同处理组之间变化显著,雌雄之间无明显变化规律(图 2)。

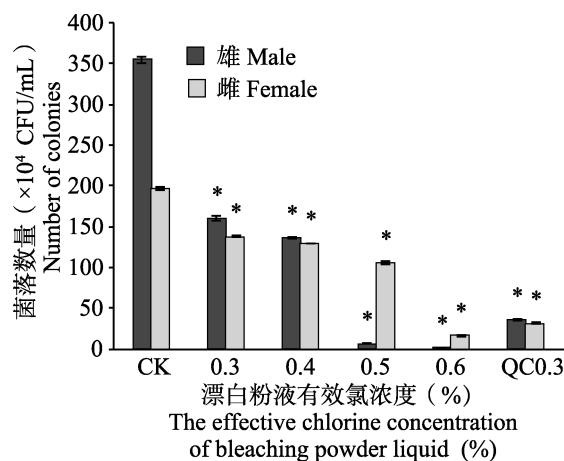


图 2 不同处理组和对照组围食膜细菌总数变化  
Fig. 2 The comparison of colonies' number on the penitrophic membrane of 5<sup>th</sup> instar silkworm in the different treatment groups and the control group

### 2.2 产消化酶细菌的筛选

用 NA 培养基从各处理组的肠液和围食膜中共分离纯化出 59 个产酶菌株(图 3)。其中同时产蛋白酶和纤维素酶的菌株有 2 株,同时产蛋白酶和淀粉酶的菌株有 7 株,同时产蛋白酶和脂肪酶的菌株有 1 株,同时产脂肪酶和纤维素酶的菌株有 1 株;只产蛋白酶的有 43 株,只产脂肪酶的有 1 株,只产淀粉酶的有 2 株,只产纤维素酶的有 2 株。各产酶菌分离株在不同的筛选培养基上呈现不同的水解圈(图 4)。

### 2.3 各处理组产酶菌株数量及产酶种类比较

分析比较不同处理组的产酶菌株数量发现,各处理组菌株总数均少于清水对照组,特别是肠液中,随着有效氯浓度升高产酶菌株总数减少,全程 0.3%处理组产酶菌株数量低于 0.3%处理组;各处理组围食膜上产酶菌株数量在 0.3%组、0.5%组和 0.6%组显著减少(表 1)。

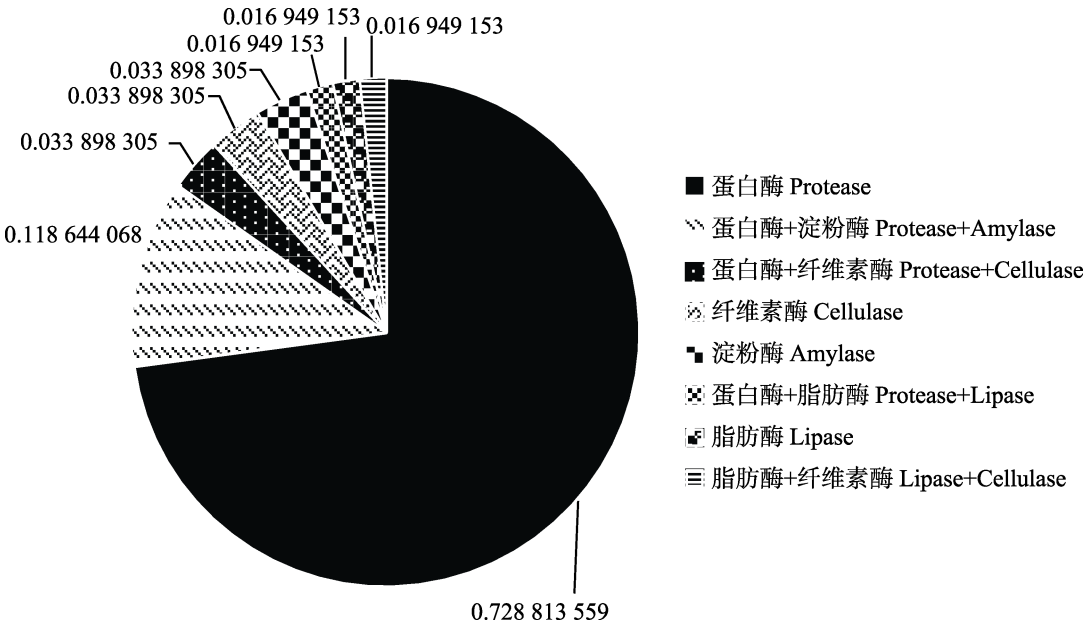


图 3 产酶菌分离株产酶种类  
Fig. 3 Enzyme-producing strains

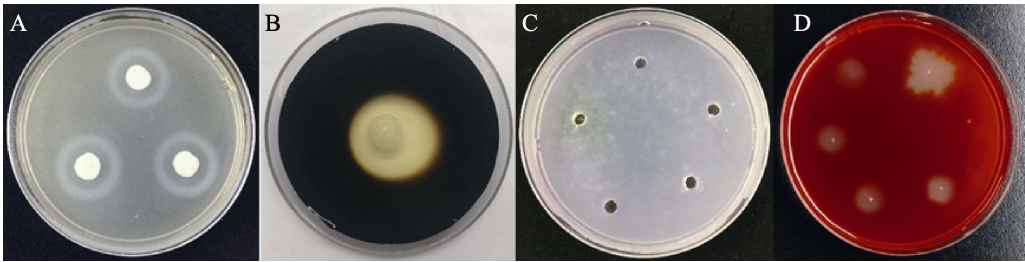


图 4 不同产酶菌在筛选培养基上形成的水解圈

Fig. 4 Hydrolysis zones of different enzyme-producing bacteria on 4 kinds of selected medium

A. 产蛋白酶菌株在筛选培养基上形成的水解圈；B. 产淀粉酶菌株在筛选培养基上形成的水解圈；  
C. 产脂肪酶菌株在筛选培养基上形成的水解圈；D. 产纤维素酶菌株在筛选培养基上形成的水解圈。  
A. A hydrolyzed circle formed by a protease-producing strain on a screening medium; B. A hydrolyzed circle formed on a screening medium by an amylase producing strain; C. A hydrolyzed circle formed on a screening medium by a lipase producing strain; D. A hydrolyzed circle formed on a screening medium by a cellulase producing strain.

表 1 不同处理组家蚕肠液和围食膜上产酶菌总数

Table 1 The enzyme-producing bacteria's total number in the intestinal fluid and on the penitrophic membrane of silkworm in different treatment groups

漂白粉液有效氯浓度（%） The effective chlorine concentration of bleaching powder liquid (%)	产酶菌分离株数量（个） Number of strains producing enzymes		
	总数 Total	M（围食膜组） M (Peritrophic membrane)	Y（肠液组） Y (Intestinal fluid)
CK	13	5	8
0.3%	9	3	6
0.4%	10	6	4
0.5%	8	3	5
0.6%	7	3	4
QC 0.3%	12	7	5

筛选出的产酶菌中产蛋白酶菌株最多,其次是产淀粉酶,产纤维素酶菌株和产脂肪酶菌株较少。高浓度(0.5%组、0.6%组)处理组中肠产蛋白酶菌株数比清水对照组明显减少;处理组肠液中产淀粉酶菌株数显著少于清水对照组;产脂肪酶菌只在0.6%组的肠液和全程0.3%组围食膜及肠液中各分离出1株;产纤维素酶菌只在清水对照组肠液分离2株,在全程0.3%组围食膜上分离出3株。从产酶菌种类看,全程0.3%组中产4种消化酶的细菌都有,清水组中无产脂肪酶细菌,而0.3%、0.4%、0.5%处理组中只有产蛋白酶和淀粉酶的细菌,0.6%组只有产蛋白酶和脂肪酶的细菌(表2)。

## 2.4 产酶菌相对产酶能力对比

分析不同处理组产酶菌的相对产酶能力,结果发现,围食膜上处理组产蛋白酶菌株平均相对产酶能力均低于清水对照组,降低趋势不呈规律

性变化(图5);处理组肠液中产蛋白酶菌株平均相对产酶能力均低于清水对照组,且随着有效氯浓度升高逐渐降低,QC0.3%组与对照组比较降低7.3%(图5);各处理组产淀粉酶菌株平均相对产酶能力没有明显变化规律,只是清水对照组肠液中产淀粉酶菌株数明显多于处理组,在0.6%处理组中并未筛选到产淀粉酶菌株;产脂肪酶菌株只在0.6%和QC0.3%处理组中筛选到,0.6%处理组平均产脂肪酶能力高于全程0.3%处理组;产纤维素酶菌株只在清水组和QC0.3%处理组中筛选得到,平均产酶能力无明显差异。

## 2.5 产酶菌菌株鉴定

将筛选出的59个产酶菌分离株提取其基因组,以提取的细菌DNA为模板,27F和1492R作为正反向引物进行16S rDNA扩增,克隆测序得到的细菌16S rDNA片段长度均在1440-1460 bp之间(图6)。

表2 不同处理组家蚕肠液和围食膜的各产酶菌数量  
Table 2 The enzyme-producing bacteria's number in the intestinal fluid and on the peritrophic membrane of silkworm larva

漂白粉液有效氯浓度(%) The effective chlorine concentration of bleaching powder liquid (%)	产酶菌分离株数量(个) Number of strains producing enzymes							
	蛋白酶 Protease		淀粉酶 Amylase		脂肪酶 Lipase		纤维素酶 Cellulase	
	M	Y	M	Y	M	Y	M	Y
CK	5	5	—	5	—	—	—	2
0.3%	3	6	1	—	—	—	—	—
0.4%	6	4	—	1	—	—	—	—
0.5%	3	5	—	1	—	—	—	—
0.6%	3	3	—	—	—	1	—	—
QC0.3%	5	5	1	—	1	1	3	—

M: 围食膜组; Y: 肠液组。“—”表示产酶菌数量为零。

M: Peritrophic membrane; Y: Intestinal fluid. “—” indicates that the number of enzyme producing bacteria is zero.

将测定的59个产消化酶细菌分离株的16S rDNA序列与NCBI数据库进行BLAST同源性比对,分析结果表明,筛选出的59个产酶菌分离株中,有54个是葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp.的,3个是 *Lelliottia* sp.的,2个是布丘氏菌属 *Buttiauxella* sp.的。饲喂漂白粉液浸消叶后家蚕肠道产消化酶菌群构成有一定变化,从不同处理

组及对照组的肠液内产酶菌来看,清水组产酶菌属相对较丰富,其他处理组的产酶菌属相对单一(图7)。

## 3 讨论与结论

家蚕肠道中寄居着大量的微生物,构成了肠道稳定的微生物体系,其可能参与家蚕的生长发

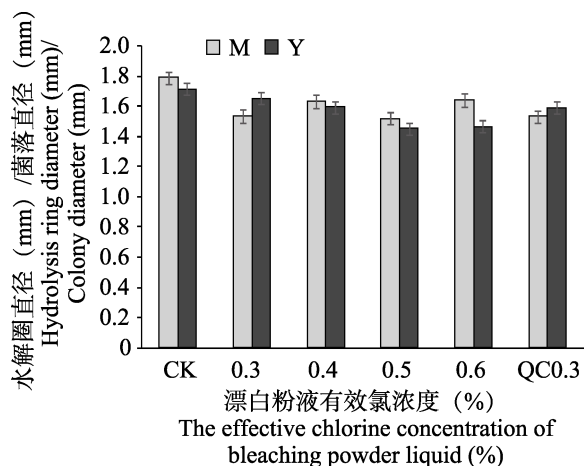


图 5 围食膜和肠液产蛋白酶菌株的相对产酶能力对比

Fig. 5 Comparison of relative enzyme production capacity of protease-producing strains on the peritrophic membrane and intestinal juice

M: 围食膜组; Y: 肠液组。

M: Peritrophic membrane; Y: Intestinal fluid.

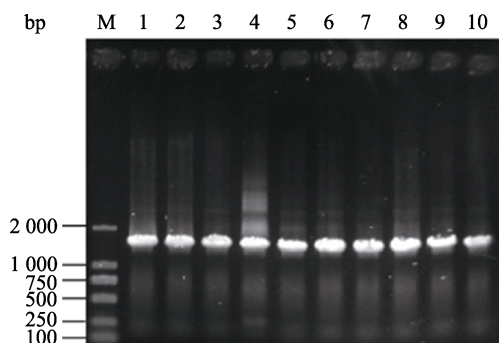


图 6 部分细菌 16SrDNA 的 PCR 产物

Fig. 6 The PCR product of part of bacteria 16S rDNA

M: DNA 分子量标准 1-10: 细菌分离株的 16S rDNA 扩增产物。

M: DNA molecular weight standard; 1-10: 16S rDNA amplification product of bacterial isolate.

育、营养消化吸收、繁殖、激素的合成以及抵御外界胁迫,对家蚕的生长发育起着至关重要的作用 (Reeson *et al.*, 2003; Rio *et al.*, 2004), 甚至有些细菌是宿主生长发育、繁殖所必须的 (相辉和黄勇平, 2008)。研究家蚕肠道产酶菌有重要的意义。目前宏基因组测序技术即非培养分析法已经发展成为一种较成熟的研究昆虫肠道微生物的手段 (Reeson *et al.*, 2003; Schabereitertgurtner *et al.*, 2003), 但此法不能获得菌株, 对于本实验中研究家蚕肠道菌群产酶功能的研究目的不太适合。故本实验采用了传统的分离培养法研究

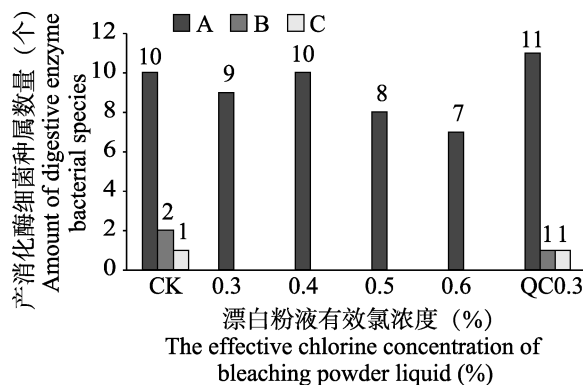


图 7 家蚕肠道产消化酶细菌的种属

Fig. 7 Species of digestive enzymes in the intestinal tract of the silkworm

A: 葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp.; B: *Lelliottia* sp.; C: 布丘氏菌属 *Buttiauxella* sp.

图中柱状图上的数字为相应产酶菌属内产酶菌分离株数量。

The number on the histogram in the graph is the number of isolates of the enzyme-producing bacteria in the corresponding enzyme-producing genus.

不同处理组及对照组家蚕肠道细菌的差异及产酶菌的差异。

实验结果表明,饲喂各有效氯浓度漂白粉液浸消叶均抑制了家蚕肠液内及围食膜上可培养细菌的总数,且随有效氯升高抑制作用增强,全程饲喂 0.3%有效氯浓度的漂白粉液浸消叶菌落总数也显著减少。推测可能与有效氯胁迫下改变家蚕肠道 pH 等环境、有效氯的强氧化性等有关。饲喂漂白粉液浸消叶明显抑制了家蚕中肠内部分产酶菌菌株数量及产酶能力,其中产蛋白酶菌株数量减少,尤其是 0.5%和 0.6%组显著减少,平均相对产酶能力随有效氯升高逐渐降低,全程 0.3%组酶活力也明显减小;处理组产淀粉酶菌株数量明显减少,而产脂肪酶菌株只在 0.6%组和全程 0.3%组中发现,且 0.6%组产酶能力明显高于全程 0.3%组,这可能是家蚕抵御有效氯胁迫的一种抗性反应;此外,饲喂漂白粉液浸消叶后家蚕中肠产消化酶菌群构成有一定变化,清水组和全程 0.3%组产酶菌属相对较丰富,有 *Staphylococcus* sp.、*Lelliottia* sp.、*Buttiauxella* sp., 其他处理组的产酶菌属相对单一,只有 *Staphylococcus* sp.



由此可见,饲喂漂白粉液浸消叶后家蚕中肠内产酶菌数量减少、产酶能力减弱,从而使其分泌的消化酶减少,影响家蚕对桑叶营养的消化吸收,导致其免疫力降低,进而影响其生长发育和代谢。尤其是蚕种生产上为了防控微粒子病,全程采用 0.3%有效氯浓度漂白粉液浸消桑叶饲蚕,对家蚕的肠道微生态有一定影响。因此,应该改进漂白粉的使用方式,或筛选更有效的蚕用药物,以保证蚕种生产的安全进行。

## 参考文献 (References)

- Du YQ, 2006. Analysis on the advantages and disadvantages of mulberry leaf disinfection on silkworm production. Proceedings of the Fourth Western Conference on Primary Species. 85–86. [杜强远, 2006. 桑叶消毒对蚕种生产的利弊分析. 第四次西部选原种学术研讨会论文集. 85–86.]
- Gao HJ, Lu GB, Zha CY, 2007. Isolation and screening of enzyme producing bacteria from *Bombyx mori*. *Sericulture Science*, 33(2): 228–233. [高绘菊, 路国兵, 查传勇, 等, 2007. 家蚕肠道产酶菌的分离与筛选. 蚕业科学, 33(2): 228–233.]
- Gui ZZ, Chen J, Chen WH, 2001. Study on the effect and mechanism of whole silkworm powder (SP) in reducing blood sugar. *Sericulture Science*, 27(2): 114–118. [桂仲争, 陈杰, 陈伟华, 2001. 全蚕粉(SP)降血糖的作用效果及其机理的研究. 蚕业科学, 27(2): 114–118.]
- Li GN, 2015. Effects of fluoride stress on intestinal micro-ecological environment of different resistant silkworms. Doctor dissertation. Chongqing: Southwest University. [李冠楠, 2015. 氟胁迫对不同抗性家蚕肠道微生态环境的影响. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Li JH, Fang J, Wu XZ, 2000. Plate screening model for alkaline lipase-producing bacteria. *Food and Fermentation Industry*, 26(6): 11–14. [李江华, 房峻, 邬显章, 2000. 碱性脂肪酶高产菌的平板筛选模型. 食品与发酵工业, 26(6): 11–14.]
- Lin RX, Ma YH, Tan TW, 2006. Screening and identification of low temperature lipase producing bacteria. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition)*, 33(1): 31–35. [林容霞, 马延和, 谭天伟, 2006. 低温脂肪酶产生菌的筛选及鉴定. 北京化工大学学报(自然科学版), 33(1): 31–35.]
- Reeson AF, Jankovic T, Kasper ML, Rogers S, Austin AD, 2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp, *Vespula germanica*. *Insect Molecular Biology*, 12(1): 85.
- Rio RVM, Hu Y, Aksoy S, 2004. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *Trends in Microbiology*, 12(7): 425–436.
- Schabereitgurtner C, Lubitz W, Rölleke S, 2003. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 52(2): 251.
- Wang JJ, Zhao DY, Liu YG, Ao X, Fan R, Duan ZQ, Liu YP, Chen QX, Jin ZX, Wan YJ, 2014. Antagonistic effect of lipopeptide metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* SWB16 strain on *Beauveria bassiana*. *Journal of Microbiology*, 54(7): 778–785. [汪静杰, 赵东洋, 刘永贵, 敖翔, 范蕊, 段正巧, 刘艳萍, 陈倩茜, 金志雄, 万永继, 2014. 解淀粉芽孢杆菌 SWB16 菌株脂肽类代谢产物对球孢白僵菌的拮抗作用. 微生物学报, 54(7): 778–785.]
- Wei ZJ, Jiang ST, 2005. Research progress on silkworm feeding and development. *Food Science*, 26(9): 592–596. [魏兆军, 姜绍通, 2005. 蚕饲喂开发研究进展. 食品科学, 26(9): 592–596.]
- Xiang H, Huang YP, 2008. The symbiotic relationship between intestinal microbes and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693. [相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 687–693.]
- Yang WJ, Wang ZG, Liu CL, Wei GQ, Zhu BJ, Zou CR, 2011. Isolation and identification of amylase producing bacteria from silkworm intestine and cloning and expression of its enzyme gene. *Journal of Laser Biology*, 20(2): 219–229. [杨文静, 王在贵, 刘朝良, 魏国清, 朱保健, 邹昌瑞, 2011. 家蚕肠道产淀粉酶细菌的分离鉴定及其酶基因的克隆与表达. 激光生物学报, 20(2): 219–229.]
- Zou CR, 2011. Analysis of intestinal flora of tussah and screening and identification of enzyme-producing bacteria. Doctor dissertation. Anhui Agricultural University. [邹昌瑞, 2011. 柞蚕肠道菌群分析及产酶菌的筛选与鉴定. 博士学位论文. 合肥: 安徽农业大学.]