

## 蜈蚣肠道菌抑菌活性和酶活性检测

曹艳茹<sup>1,2</sup>, 岳朝元<sup>1</sup>, 刘子超<sup>1</sup>, 余磊<sup>3</sup>

(1. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214;

2. 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室, 云南 昆明 650214;

3. 昆明学院 农学院, 云南 昆明 650214)

**摘要:**随着微生物各项培养及鉴定技术的快速发展,动物的肠道微生物研究也取得了很大进展.蜈蚣是一种有毒的节肢动物,其药用价值很高.它的肠道微生物有什么功效,相关报道极少.采用3种培养基分离培养了其肠道微生物,共获得10株菌,其中有9种细菌,1种放线菌.最后对10株菌进行4种酶活性检测和6种致病菌抑菌活性检测.酶活性检测结果显示,W10具有纤维素酶活,W12具有蛋白酶活,W1,W4,W6,W10,W15和W22具有脂肪酶活,没有检测到有淀粉酶活的菌株.抑菌检测结果显示,没有菌株抑制茄病镰刀菌,W10能够抑制细极链格孢菌,W12,W16和W22能够抑制炭疽病菌,抑制甘薯黑斑病菌的阳性菌株有W4,W6,W10,W12,W15和W22,W14能够抑制小新壳梭孢病菌,抑制稻梨孢菌的阳性菌株有W4,W6,W15和W16.对微生物酶活性的研究可了解蜈蚣肠道内微生物的消化功能;而对微生物抑菌活性的研究可对蜈蚣毒素的分泌提供一些参考,同时为新药物的研究提供菌种来源.

**关键词:**蜈蚣;肠道微生物;酶活性;抑菌活性

**中图分类号:**R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2015)06-0060-03

**DOI:**10.14091/j.cnki.kmxyxb.2015.06.014

### Detecting the Antimicrobial and Enzyme Activity of Centipede's Intestinal Bacteria

CAO Yan-ru<sup>1,2</sup>, YUE Chao-yuan<sup>1</sup>, LIU Zi-chao<sup>1</sup>, YU Lei<sup>3</sup>

(1. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;

2. Key Laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization  
of Universities in Yunnan Province, Yunnan Kunming 650214, China;

3. Agriculture College, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

**Abstract:** With the development of microbial identification technology and insect cultivation, the research on the gut microbe of the insect is developing fast. Centipede is one of poisonous arthropods, but its medicinal value is very high. Few is reported about the function of gut microbe of centipede. Three kinds of culture media were used to isolate its intestinal microorganisms, and 10 strains of bacteria were obtained, including 9 kinds of bacteria and 1 actinomycete. Then the activity of protease, lipase, cellulase and amylase was detected for the 10 strains by using the plate ring method. Antimicrobial activities against six fungi were tested using agar well diffusion method. The result of enzyme activity detection showed that W10 has cellulase activity; W12 has the protease activity; W4, W6, W10, W15, W22 have the lipase activity and the amylase activity was not detected. Antimicrobial test results showed that no strain inhibited *Fusarium solani*; W10 could inhibit *Alternaria alternate*; W12, W16, W22 could inhibit *Colletotrichum capsici*; W4, W6, W10, W12, W15, W22, W14 could inhibit *Neofusicoccum parvum* and W4, W6, W15, W16 could inhibit *Pyricularia oryzae*. Enzyme activity screening can understand the function of centipede gut microbes in the digestive. The study of antimicrobial activity can provide some reference for comprehending toxin secretion of centipede. The strains showed high antimicrobial activities can be further researched for exploiting new compounds of pharmaceutical.

**Key words:** centipede; gut microbe; enzyme activity; antimicrobial activity

收稿日期:2015-09-11

基金项目:云南省应用基础研究计划资助项目(S2012FZ0030);昆明学院云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金资助项目(GXK2015).

作者简介:曹艳茹(1983—),女,内蒙古乌海人,副教授,博士,主要从事微生物教学及研究.

蜈蚣为常用药材,性温、味辛、有毒。具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛之功能。目前对蜈蚣的研究主要集中在中药,以及蜈蚣的毒素、蜈蚣的提取物及其药理活性等方面。蜈蚣属于节肢动物门、唇足纲、整形目的蜈蚣科,其药用价值最初记载于2 000多年前的《神农本草经》,为传统的动物中药材<sup>[1]</sup>。蜈蚣毒素是蜈蚣前颚毒腺分泌的液体,近年来成为研究的热点。国内外对蜈蚣毒素的研究多数都停留在粗毒的研究水平上,对其有效成分及药理学活性的研究仍有待于进一步深入<sup>[2]</sup>。但是蜈蚣体内真正有药用价值的成分是什么,一直是当前的研究热点。目前蜈蚣有效成分的提取仍然采用酒浸渍、水提、醇提及醇提后药渣再水煮等工艺<sup>[3]</sup>。微生物是蜈蚣肠道系统的重要组成部分,并伴随取食、消化、排泄等活动而变化。一般认为这些微生物是寄主动物进行正常生命活动所必需的<sup>[4]</sup>。而对昆虫肠道微生物酶活性的研究可以了解微生物对昆虫的消化到底有何作用;对昆虫肠道微生物抑菌活性的研究可以探究肠道微生物与毒素分泌的关系,也可为中药的开发提供科学依据。同时,抑菌活性的研究也可以研究微生物的分泌物,为新药物的开发提供来源。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

取哈氏蜈蚣消化道内容物2 g,在灭菌研钵中研磨,将研磨液用灭菌水稀释待用。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 蜈蚣消化道细菌分离

1)培养基配制。本试验首先采用3种固体培养基,分别是SOB培养基<sup>[5]</sup>、金氏B培养基<sup>[5]</sup>、营养琼脂培养基<sup>[6]</sup>。倒平板前按50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的量加入用乙醇溶解的放线菌酮<sup>[7]</sup>作为真菌抑制剂。

2)分离培养。将蜈蚣肠道内容物稀释至 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ ,将3个稀释度涂布于上述平板。将平板倒置,于30  $^{\circ}\text{C}$ 中恒温培养。观察生长的菌落,用于进一步纯化分离。

3)划线分离。用接种针进行培养基平板划线培养,获取单个菌落,即纯培养物。

4)斜面接种。将获得单菌落的菌株转接于斜面培养基培养保存。

#### 1.2.2 抑菌活性检测

配制酵母膏-麦芽汁琼脂培养基,灭菌冷却后,

将10种菌接种到培养基上,接种好之后放在28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温下培养3 d,待长出菌落之后备用。

配制马铃薯液体培养基<sup>[8]</sup>,分装到6个小锥形瓶中灭菌。将培养好的6种指示菌接种到马铃薯培养基中,放到摇床上28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养0.5 d,待长出指示菌之后即可用于抑菌活性检验。该6种指示菌为茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)、炭疽病菌(*Collutotrichum capsici*)、甘薯黑斑病菌(*Ceratocystis fimbriata*)、小新壳梭孢病菌(*Neofusicoccum parvum*)、稻梨孢菌(*Pyricularia oryzae*)。

将已长指示菌的马铃薯培养基倒入已长出10种菌体的培养基中。将这些培养基放入恒温培养箱中培养1 d,观察结果。

#### 1.2.3 酶活性检测

1)基础培养基。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 mol/L) 38.5 mL,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 mol/L) 61.5 mL, agar 18 g, 蒸馏水800 mL, pH7.0。121  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min。冷却至55  $^{\circ}\text{C}$ 左右时,加入预热的(55  $^{\circ}\text{C}$ )底物,底物的准备如下所述。

##### 2)底物的准备。

(a)用于淀粉酶活性检测:将100 mL 2.0%可溶性淀粉,于121  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min,添加到上述基础培养基中,至终质量浓度0.2%。

(b)用于纤维素酶活性检测:将100 mL 2.0%的CMC 300-800,于121  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min,添加到上述基础培养基中,至终质量浓度0.2%。

(c)用于蛋白酶活性检测:将100 mL 15%脱脂牛奶,于121  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min,添加到上述基础培养基中,至终质量浓度1.5%。

(d)用于脂肪酶活性检测:将100 mL 10%三丁酸甘油酯乳化液,添加到上述基础培养基中,至终质量浓度1.0%。乳化液的准备:20 g阿拉伯树胶,100 g三丁酸甘油酯,1 000 mL无菌蒸馏水,搅拌使之乳化。

纤维素酶:将5 mL 0.1%刚果红溶液倒入平板中,染色1 h后,倒出染料,加入5 mL 1.0 mol/L NaCl溶液脱色20 min,观察菌落周围出现的清晰、未染色的区域,看菌落边缘是否有透明圈。

淀粉酶:在平板上倒入5 mL碘液,若产生淀粉酶,则淀粉变成糊精或被利用吸收,遇到碘液不变色,即为透明圈;如不产生淀粉酶,则菌落周围部位遇到碘液呈蓝色。倒出碘液,看是否有透明圈。

脂肪酶:直接观察记录平板上菌落周围的透明圈。

蛋白酶:直接观察记录平板上菌落周围的透明圈.

## 2 结果与分析

### 2.1 蜈蚣消化道细菌分离结果

通过对蜈蚣肠道内容物稀释液进行进一步稀释,获得 3 个稀释度,将 3 个稀释度的稀释液用平板进一步稀释培养,再通过不断的纯化培养,最终获得 10 种纯菌株,其中 1 种为放线菌,另外 9 种为细菌.这 10 种菌株分别是 W1,W16,W12,W22,W4,W15,W6,W14,W3,W10.

### 2.2 抑菌活性检测结果

从下表 1 可以看出,所有的菌对茄病镰刀菌都没有活性,说明这些菌对茄病镰刀菌没有抑制作用,W1 和 W3 对 6 种指示菌都没有活性,都不起抑制作用,说明其分泌的活性物质对这些菌没有活性,或者直接就不产生活性物质.W6 的活性最强,对甘薯黑斑病菌和稻梨孢菌都具有活性,且抑制作用较强.其他的菌也有相应活性,有相应的抑制作用,只是相对 W6 较弱一点.蜈蚣毒素的分泌是否与这些有抑菌活性的肠道菌有关,还需要进一步研究.

表 1 抑菌检测结果

指示菌 编号	茄病镰刀菌	细极链格孢菌	炭疽病菌	甘薯黑斑病菌	小新壳梭孢病菌	稻梨孢菌
W1	-	-	-	-	-	-
W3	-	-	-	-	-	-
W4	-	-	-	+	-	++
W6	-	-	-	++	-	++
W10	-	++	-	+	-	-
W12	-	-	++	+	-	-
W14	-	-	-	-	++	-
W15	-	-	-	++	-	+
W16	-	-	+	-	-	+
W22	-	-	++	+	-	-

注: - 为无活性; + 为有活性; ++ 为活性较强.

### 2.3 酶活性检测结果

由下表 2 可以看出,10 种菌对淀粉酶的分解都不起作用,W10 对纤维素酶的分解可起作用,其他 9 种没有作用;W12 对蛋白酶的消化可起作用,其他不起作用;W1,W22,W4,W15,W6 对脂肪酶的分解虽起

到作用,但是相对 W10 较弱.从这些结论可以看出,肠道微生物和宿主关系密切,对宿主的食性和食物消化这些会产生一定影响.虽然这 10 株菌对淀粉酶的消化不起作用,但是可能在其肠道内存在着此次研究没有培养出的菌体可对淀粉酶起消化作用.

表 2 酶活性检测结果

菌号 酶	W1	W3	W4	W6	W10	W12	W14	W15	W16	W22
淀粉酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纤维素酶	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
蛋白酶	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
脂肪酶	±	-	±	±	+	-	-	±	-	±

注: - 为无活性; ± 为活性较弱; + 为普通活性; ++ 为活性较强.

## 3 讨论与结论

通过本试验结果可以分析得出,人工培养存在很多的缺陷和不足,并且人在试验过程中的操作对试验结果的影响也较大,而不同的微生物对营养和环境的

需求是不同的,因此 3 种培养基存在很大的局限,实验室培养条件也不同于生物体内的环境.所以要获得蜈蚣肠道内的所有微生物在今天来说是非常困难的,要想取得更理想的结果还有待于进一步深入研究.

(下转第 79 页)

已经泛滥,因此不是单靠化学防治就能解决其危害的,并且不能长期依赖于化学防治,更不能长期依赖一种药剂,建议结合生物、农业、物理等防治措施综合防治。

#### [参考文献]

- [1] 陈剑山,李鹏,刘奎,等. 3种药剂对豇豆蓟马的田间防效评价[J]. 中国植保导刊,2015,35(5): 66-67.
- [2] 肖春雷,刘勇,吴青君,等. 不同药剂对三亚地区豇豆上普通大蓟马的毒力[J]. 植物保护,2014,40(6):164-166.
- [3] 张敏敏,赵巍巍,慕卫,等. 番茄斑萎病毒对多杀菌素抗性西花蓟马发育繁殖和药剂敏感性的影响[J]. 昆虫学报,2014,57(10):1171-1179.
- [4] 张为丽,姚海峰,郑薇薇,等. 八节黄蓟马高效低毒防治药剂的筛选[J]. 果树学报,2014(6):1134-1138.
- [5] 张安盛,庄乾营,周仙红,等. 日光温室防治棕榈蓟马药剂筛选[J]. 植物保护,2013,39(6):180-183.
- [6] 王自然,张宏瑞,岳建强,等. 云南德宏柠檬花期蓟马种类调查及药剂防治[J]. 植物保护,2013,39(1):178-180.
- [7] 谢永辉,李朝琴,李正跃,等. 芒果蓟马种类及常见药剂对优势种的田间防效[J]. 植物保护,2013,39(3):136-140.
- [8] 李飞,王相晶,吴青君,等. 三种药剂喷雾和灌根施药方式对西花蓟马的残留毒力[J]. 植物保护,2013,39(3):173-177.
- [9] 沈宝明,符伟,刘勇,等. 室内药剂交替使用对西花蓟马抗性发展的影响[J]. 植物保护,2012,38(2):133-135.
- [10] 张安盛,张思聪,李丽莉,等. 3种环境友好型药剂对西花蓟马的室内毒力与田间防效[J]. 植物保护,2012,38(4):175-177.
- [11] 贾彦霞,朱春花,马丁. 几种药剂防治温室黄瓜蓟马的田间药效试验[J]. 北方园艺,2012(22):138-140.
- [12] 魏书艳,陆德玲,曲耀训,等. 五种药剂对芒果及豆角田蓟马的防效试验[J]. 环境昆虫学报,2012,34(4):519-524.
- [13] 孔祥义,肖春雷,刘勇,等. 5种药剂对蓟马的室内毒力测定及防治效果研究[J]. 广东农业科学,2012(20):70-72.
- [14] 王健立,李洪刚,郑长英. 西花蓟马与烟蓟马药剂敏感性的比较[J]. 应用昆虫学报,2011(3):548-552.
- [15] 余德亿,胡进锋,姚锦爱,等. 盆栽榕树蓟马的发生与防控药剂配方筛选[J]. 热带作物学报,2011,33(3):480-484.
- [16] 陈炳旭,董易之,陆恒,等. 花生花蓟马室内药剂筛选及田间药效试验[J]. 花生学报,2009(3):1-5.
- [17] 陈青. 防治节瓜蓟马、桃蚜高效药剂筛选[J]. 植物保护,2004,30(1):77-79.

(上接第62页)

通过对分离的10株菌的抑菌活性检测,我们获得了1株对细极链格孢菌有抑制作用的菌株,1株对小新壳梭孢病菌有抑制活性的菌株,3株对炭疽病菌有抑制活性的菌株,4株对稻梨孢菌有抑制活性的菌株,6株对甘薯黑斑病菌有抑制作用的菌株,这些活性菌株为生防菌的相关研究提供了很好的研究材料。

对10株菌酶活性检测的结果显示,淀粉酶活性筛选全部为阴性,纤维素酶为阳性的有1株菌,蛋白酶为阳性的也有1株菌,而脂肪酶为阳性的有6株菌,这些活性菌株可以作为下一步酶领域的研究应用。

本研究获得的细菌菌株及抑菌活性、酶活性菌株为我们更深入地认识蜈蚣肠道微生物提供了更多数据,同时也为我们探讨蜈蚣的中药制造带来了一些启发。迄今为止,人们对动物和其肠道中的微生物间复杂的作用关系,以及微生物在动物生理活动中所起的具体作用和机制尚知之甚少。所以肠道细菌的研究空间还很大,药用动物“蜈蚣”的肠道微生物也还有很多东西等着我们去挖掘和探索。

#### [参考文献]

- [1] 周永芹,韩莉. 中药蜈蚣的研究进展[J]. 中药材,2008,31(2):315-319.
- [2] 姜璐璐,曹艳华,王诗敏,等. 蜈蚣毒素的研究进展[J]. 西北药学杂志,2009(6):517-520.
- [3] 周莉莉. 蜈蚣提取物制备及药理活性研究[D]. 北京:北京化工大学,2008.
- [4] 黄云,詹先进,蓝家祥,等. 昆虫肠道微生物的研究进展[J]. 湖北农业科学,2009,48(11):2887-2890.
- [5] 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.
- [6] 程丽娟,薛泉宏,来航线. 微生物学实验技术[M]. 北京:世界图书出版公司,1988.
- [7] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,2003.
- [8] 张尔亮,李维,王汉臣. 微生物学实验教程[M]. 重庆:西南师范大学出版社,2012.