

黄翅大白蚁后肠几丁质降解微生物的分离与培养

Isolation and Cultivation of Chitin-degrading Microorganisms from the Hindgut of *Macrotermes barneyi*

张硕^{1, #}, 蒋宇彤^{1, #}, 孙新新^{1, 2}, 倪金凤^{1, *}

¹ 微生物技术研究院, 微生物技术国家重点实验室, 山东大学, 青岛市, 山东省; ² 转化医学研究联合实验室, 聊城市人民医院, 聊城市, 山东省

*通讯作者邮箱: jinfngni@sdu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

摘要: 黄翅大白蚁是广泛分布于中国南部的一种主要高等培菌白蚁。本文介绍以几丁质为碳源从黄翅大白蚁后肠分离获得几丁质降解菌株的方法。

关键词: 培菌白蚁, 黄翅大白蚁, 肠道微生物, 几丁质降解

背景: 白蚁肠道中存在多种共生微生物包括细菌、真菌和原生动物如鞭毛虫, 根据白蚁后肠有无鞭毛虫, 可将白蚁分为低等白蚁 (有) 和高等白蚁 (无) 两大类 (Ni and Tokuda 2013)。高等白蚁根据食性又分为食木/草白蚁、食土/腐殖质白蚁和培菌白蚁。培菌白蚁属于白蚁科大白蚁亚科, 其在蚁巢中专一培养真菌鸡枞菌 (*Termitomyces*) (Aanen 等, 2009), 两者存在共生互惠关系。白蚁取食鸡枞菌的无性孢子—小白球菌 (*Termitosphaeria duthiei* (Berk.) Ciferri.), 获得必需的氮源, 而小白球菌在白蚁肠道与木质颗粒混合, 经过消化后被排泄到体外形成新的菌圃 (Poulsen 2015)。真菌细胞壁主要由几丁质、葡聚糖和蛋白质组成, 因此几丁质代谢是培菌白蚁营养利用以及抑制菌圃上其它杂菌生长的关键环节。通过分离培养能够降解几丁质的肠道微生物, 为进一步研究培菌白蚁消化利用真菌和抵御杂菌在菌圃的生长奠定基础。

材料与试剂

1. 琼脂 (生工生物工程有限公司, 产品目录号: A505255)
2. 酵母粉 (Oxoid, England, 产品目录号: LP0021)
3. 胰蛋白胨 (生工生物工程有限公司, 上海, 产品目录号: A505247)

4. 无机盐 (NaCl , KCl , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (国药集团化学试剂有限公司, 上海, 分析纯)
5. 几丁质 (Sigma 公司, 美国, 产品目录号: C7170)
6. 盐酸 (国药集团化学试剂有限公司, 上海, 分析纯)
7. 乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 上海, 分析纯)
8. 引物合成及 PCR 产物测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成
9. 16S rRNA 通用引物: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')
10. 基因组提取试剂盒 (Bacterial DNA Kit 500, D3350-01, Omega Bio-Tek 公司)
11. DNA 纯化试剂盒 (Gel Extraction Kit 200, D2500-02, Omega Bio-Tek 公司)
12. PBS 缓冲液 (见溶液配方)
13. 胶体几丁质 (见溶液配方)
14. 几丁质培养基 (见溶液配方)
15. LB 培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 超净工作台 (品牌 AIRTCH, 型号: SW-CJ-2FD)
2. 分析天平 (赛多利斯公司, 北京, 型号: ALC-110.4&1100.2)
3. 高压灭菌器 (申安医疗器械厂, 上海, 型号: LDZM-80L)
4. 恒温培养箱 (精宏实验设备公司, 上海, 型号: DNP-9052)
5. 恒温摇床 (知楚仪器公司, 上海, 型号: ZQZY-BF8)
6. PCR 仪 (品牌 TaKaRa, 型号: TP600)
7. 电泳仪 (六一电泳器材厂公司, 北京, 型号: DYY-10C)
8. 恒温金属浴 (博日科技公司, 杭州, 型号: CHB-100)
9. 凝胶成像仪 (品牌 UVItec, 型号: 97-0094-16)
10. 离心机 (品牌 Eppendorf, 型号: Centrifuge 5417)
11. 厌氧袋 (品牌 MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC, 型号: C-43)

软件和数据库

1. 利用细菌 16S rRNA 序列进行菌种鉴定的网站

1.1 <https://www.ezbiocloud.net/identify/>

1.2 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2. 各国菌种保藏中心网址(可参考各种培养基的配制方法, 并且每种微生物都有其对应的培养基)

2.1 德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

<https://www.dsmz.de/>

2.2 日本菌种保藏中心 (JCM) Japan Collection of Microorganisms.

<https://jcm.brc.riken.jp/en/>

2.3 韩国菌种保藏中心 (KCTC) Korean collection for type cultures.

<https://kctc.kribb.re.kr/En/Kctc>

3. MAGE7.0 软件 下载地址 MEGA7.0.26_win64_setup.exe

实验步骤

一、白蚁肠道几丁质降解菌的分离与纯化

1. 本实验所涉及白蚁材料为黄翅大白蚁, 采自湖南省耒阳县木兰村 (112° 967262" E, 26° 609833" N)。白蚁后肠样品准备参照前面的方法 (白蚁肠道微生物样品收集与制备)。

2. 取各个梯度 PBS 稀释液 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5}) 200 μ l 分别涂布于几丁质培养基平板上, 在有氧和厌氧两种条件下 30 °C 培养 5 d。厌氧条件是将平板放置于厌氧袋中进行培养。

3. 将产生水解圈的单菌落接种至新的几丁质培养基平板, 在几丁质培养基平板上进行多次划线培养, 直到获得纯菌株。

二、白蚁肠道分离菌株的序列分析

1. 用已灭菌的牙签挑取纯化的菌体接入 15 ml LB 液体培养基中, 30 °C 培养 2 d 后, 在 4 °C 条件下 10,000 r/min 离心 1 min 收集菌体。

2. 利用基因组试剂盒提取菌株的基因组 DNA，用分光光度计检测 DNA 纯度，用琼脂糖电泳法检测 DNA 浓度。
3. 利用细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA 基因片段，PCR 扩增体系为：细菌基因组 DNA (50-200 ng/μl) 1 μl，27F 引物 1 μl，1492R 引物 1 μl，引物浓度为 10 μM，dNTPs 4 μl，10× Buffer 5 μl，EasyTaq 1 μl，ddH₂O 37 μl。PCR 扩增条件为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 30 s，58 °C 45 s，72 °C 2 min，30 个循环；72 °C 延伸 10 min。
4. 将获得的 PCR 产物进行琼脂糖 (1%) 凝胶电泳。
5. 切胶回收扩增获得的 1,500 bp 片段，用 DNA 纯化试剂盒进行纯化（按试剂盒要求进行）。
6. 将回收的 PCR 片段送上海生工测序。
7. 测序结果在 NCBI 系统中进行 Blast 比对，下载相似性最高的相关细菌菌株序列，利用 MAGE7.0 软件邻位法构建系统发育树，确定分离菌株的分类地位。

结果与分析

一、分离到 8 株几丁质降解菌

稀释 10⁻³ 倍数的后肠组织样品在几丁质培养基平板上，长出 50 个左右的菌落。筛选几丁质降解圈大的菌落，多次在几丁质培养基上划线纯化，最后获得纯培养菌株。纯菌株在几丁质培养基上培养 5 d，若观察到明显的几丁质降解圈，表明筛选的纯菌株可产生几丁质酶。在有氧条件下分离到 5 个纯菌株，分别记为 chi-1、chi-2、chi-3、chi-4 和 chi-5；在厌氧条件下分离到 3 个纯菌株，分别记为 an-chi-1、an-chi-2 和 an-chi-3 (图 1)。

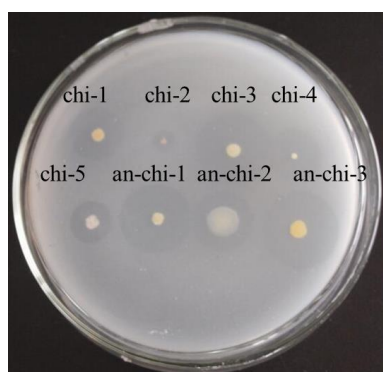


图 1.8 株几丁质降解菌的培养特征

二、16S rRNA 序列分析

纯化后的菌株，通过 16SrRNA 基因测序，然后对其序列进行比对分析，发现它们属于不同属的菌株。它们分别与 *Flavobacterium oceanosedimentum*, *Dactylosporangium salmoneum*, *Brevibacillus borstelensis*, *Sphingomonas koreensis*, *Paenibacillus odorifer*, *Cellulomonas flavigena*, *Stenotrophomonas panacihumi* 和 *Bacillus cereu* 相似度最高，相似度均大于 97%(表 1)。其中黄杆菌属 *Flavobacterium*、指孢囊菌属 *Dactylosporangium* 和纤维单胞菌属 *Cellulomonas* 属于放线菌菌门，鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 和寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 属于变形菌门，短芽孢杆菌属 *Brevibacillus*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* 和芽孢杆菌属 *Bacillus* 属于厚壁菌门 (图 2)。

表 1.8 株几丁质降解菌 16S rRNA 的序列在 GenBank 中的比对结果

菌株编号	相似性最高菌株	GenBank 登录号	相似性
Strains	Most similar strain in NCBI	Accession number	Similarity (%)
chi-1	<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i>	EF592577	99.7
chi-2	<i>Dactylosporangium salmoneum</i>	FJ973607	99.5
chi-3	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	D78456	98.2
chi-4	<i>Sphingomonas koreensis</i>	AF131296	98.3
chi-5	<i>Paenibacillus odorifer</i>	CP009428	99.5
an-chi-1	<i>Cellulomonas flavigena</i>	CP001964	98.3
an-chi-2	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	GQ856217	99.6
an-chi-3	<i>Bacillus cereus</i>	AE016877	99.4

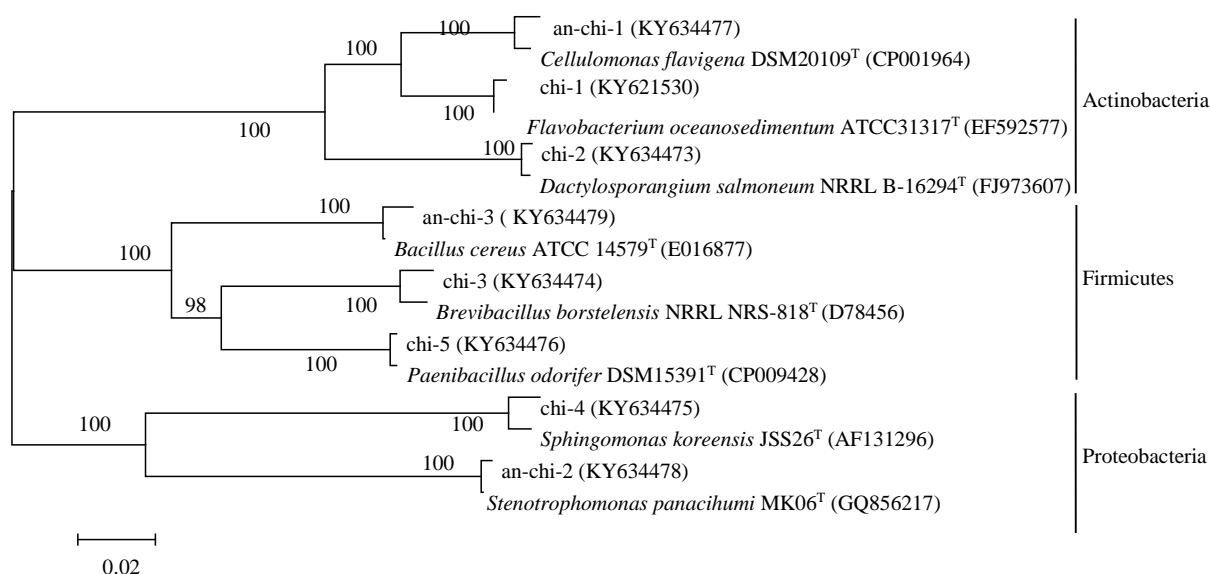


图 2. 分离纯化的 8 株几丁质降解菌基于 16S rRNA 基因序列构建的进化树

注意事项

1. 胶体几丁质配制呈酸性会导致配制失败，因而需不断的用去离子水冲洗几丁质沉淀，将其洗至 pH 为中性 7.0。
2. 采集到的白蚁材料尽量在新鲜状态下立即解剖，以保证几丁质降解菌的分离效果。
3. 在解剖白蚁前，清洗消毒白蚁体表，以防止体外菌的污染。
4. 解剖过程中镊子夹住白蚁头部，用解剖针从尾部缓缓拉出肠道，以保持肠道的完整性。

溶液配方

1. PBS 缓冲液

NaCl 4 g, KCl 0.1 g, Na₂HPO₄ 0.72 g, NaH₂PO₄ 0.12 g, 加入灭菌去离子水至终体积为 500 ml, 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.4。

2. 胶体几丁质

称取 10 g 几丁质粉末缓慢加入 100 ml 盐酸中，4 °C、150 r/min 摇床振摇 1 h，使几丁质完全溶解。放于 4 °C 冰箱中静置 24 h，加入 5 倍体积的 50%乙醇 (体积比) 静置 5 h，加蒸馏水定容至 1 L，室温条件下 10,000 r/min 离心 10 min，弃上清液，用去离子水将沉淀反复冲洗至 pH 为 7.0，配置溶液终浓度为 50 g/L，

4 °C 冰箱保存备用。

3. 固体几丁质培养基

胶体几丁质 200 ml, FeSO₄·7H₂O 0.01g, MgSO₄·5H₂O 0.5 g, 胰蛋白胨 1 g, ZnSO₄ 0.01 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MnCl₂ 0.01 g, K₂HPO₄ 0.7g, 琼脂 18 g, 加蒸馏水定容至 1 L。121° C, 高压蒸汽灭菌 20 min。

4. LB 液体培养基

NaCl 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水定容至 1 L。121° C, 高压蒸汽灭菌 20 min。

致谢

本项目获得国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 编号: 2011CB707402), 国家自然科学基金 (编号: 31970119, 31272370, 30870085) 及山东大学微生物技术国家重点实验室自主设置课题的支持。依据本实验方案我们从培菌白蚁肠道中分离到几丁质降解菌, 并发现鉴定到一个新菌种 (孙新新等, 2017; Sun 等, 2018)。

参考文献

- Aanen, D. K., de Fine Licht, H. H., Debets, A. J., Kerstes, N. A., Hoekstra, R. F. and Boomsma, J. J. (2009). [High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites](#). *Science* 326(5956): 1103-1106.
- Ni, J. and Tokuda, G. (2013). [Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota](#). *Biotechnol Adv* 31(6): 838-850.
- Poulsen, M. (2015). [Towards an integrated understanding of the consequences of fungus domestication on the fungus-growing termite gut microbiota](#). *Environ Microbiol.* 17(8): 2562-2572.
- Sun, X., Li, J., Du, J., Xiao, H. and Ni, J. (2018). [Cellulomonas macrotermis sp. nov., a chitinolytic and cellulolytic bacterium isolated from the hindgut of a fungus-growing termite](#). *Antonie Van Leeuwenhoek* 111(3): 471-478.
- 孙新新, 李净净, 宁娜, 谭慧军 and 倪金凤 (2017). [黄翅大白蚁后肠几丁质降解微生物的分离与鉴定](#). *微生物学通报* 44 (7): 1649-1654