

DOI:10.14188/j.ajsh.2020.02.010

蟋蟀后肠纤维素降解细菌的分离与鉴定

张科^{1,2}, 苏智鹏¹, 许阳¹, 李清利², 王瑜¹, 刘丽¹, 李冰洁¹, 周云霞¹, 夏西超¹

(1. 平顶山学院 医学院, 河南 平顶山 467000;

2. 汝州市畜牧局, 河南 汝州 467599)

摘要: 近年来,具有农业、能源和环保价值的昆虫微生物种类和基因得到了开发,昆虫肠道微生物展示了其巨大的应用潜力,本研究旨在从蟋蟀后肠分离和鉴定纤维素降解细菌。首先采用羧甲基纤维素钠液体培养基对蟋蟀后肠中的微生物进行富集培养,然后使用羧甲基纤维素钠固体培养基分离和筛选单菌落,再通过16S rRNA测序对纤维素降解细菌进行分子鉴定,最后通过刚果红染色来进一步分析细菌降解纤维素的能力。从蟋蟀后肠中共分离出20株纤维素降解细菌,16S rRNA基因测序结果显示来自肠杆菌属(*Enterobacter*)9株,不动杆菌属(*Acinetobacter*)7株,克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)2株,鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)1株和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)1株。刚果红染色试验结果显示,克雷伯氏菌属两株PDSCDXS_2B和8B,鞘氨醇杆菌属PDSCDXS_7C和不动杆菌属PDSCDXS_12C具有较高的纤维素降解能力。这是首次从蟋蟀后肠分离和筛选出来具有纤维素降解能力的细菌,为昆虫源纤维素降解细菌的研究提供了微生物资源。

关键词: 蟋蟀;纤维素降解细菌;16S rRNA

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2020)02-0228-06

Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria in the posterior intestine

ZHANG Ke^{1,2}, SU Zhipeng¹, XU Yang¹, LI Qingli², WANG Yu¹, LIU Li¹, LI Bingjie¹, ZHOU Yunxia¹,
XIA Xichao¹

(1. College of Medicine, Pingdingshan University, Pingdingshan, Henan 467000, China;

2. Animal Husbandry Bureau of Ruzhou, Ruzhou, Henan 467599, China)

Abstract: In recent years, insect microbial species and genes with agricultural, energy and environmental values have been developed, and insect intestinal microorganisms have demonstrated their great potential for application. Our purpose is to isolate and identify cellulose-degrading bacteria from the posterior intestine of crickets. First, carboxymethyl cellulose sodium liquid medium was used to enrich and cultivate microorganisms in the posterior intestine, then carboxymethyl cellulose sodium solid medium was used to separate and screen monophyletic colonies, and the cellulose degradation bacteria were identified by 16S rRNA sequencing. Finally, the ability of bacteria to degrade cellulose was further analyzed by congolese red staining. In our research, 20 cellulose-degrading bacteria were isolated from the posterior intestine of crickets. The sequencing results of the 16S rRNA gene showed that 9 strains were from *Enterobacter*, 7 from *Acinetobacter*, 2 from *Keleiboshi*, 1 from *Sphingobacterium* and 1 from *Staphylococcus*. The results of the congo red stain test showed that *Keleiboshi* has two PDSCDXS_2B and 8B strains, *Schwannosin* is PDSCDXS_7C, and *Acetobacter* is PDSCDXS_12C have high cellulose degradation ability. For the first time, we isolated and screened cellulose-degrading bacteria from the posterior intestine of crickets, which provided clues and scientific basis for the study of insect-derived cellulose-degrading bacteria.

收稿日期: 2019-08-19 修回日期: 2019-11-13 接受日期: 2019-11-26

作者简介: 张科(1983-),男,博士,讲师,研究方向为寄生虫与微生物。E-mail:kekely555@126.com

基金项目: 平顶山学院博士启动基金项目(PXY-BSQD-2015006);河南省高等学校科学技术研究重点项目(16B180004)。

引用格式:张科,苏智鹏,许阳,等. 蟋蟀后肠纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. 生物资源, 2020, 42(2): 228-233.

Zhang K, Su Z P, Xu Y, et al. Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria in the posterior intestine [J]. Biotic Resources, 2020, 42(2): 228-233.

lose degradable bacteria.

Key words: posterior intestine; cellulose-degrading bacteria; 16S rRNA

0 引言

昆虫是自然界数量最多、进化历史最悠久、分布最广泛的动物类群之一。昆虫肠道微生物在与昆虫宿主长期共进化的过程中,也形成了极为多样的种群结构和生物学功能,对昆虫宿主的发育、生殖、抗逆、抗药、行为乃至生存等方面都产生重要的影响^[1]。并且,昆虫肠道微生物群落结构往往具有一定的宿主物种稳定性,表现出协同进化的特征。因此,昆虫肠道微生物是十分理想的研究材料^[2]。

蟋蟀隶属于直翅目(Orthoptera),蟋蟀总科(Grylloidea),油葫芦属(*Teleogryllus*)^[3],它是食用昆虫、药用昆虫和文化昆虫,也是农业害虫,同时它善于打斗,食性繁杂,具有丰富的肠道微生物资源,是人类的微生物资源宝库^[4]。前期我们采用宏基因组测序的手段解析了蟋蟀的前中肠和后肠的细菌群落结构,发现蟋蟀的后肠中含有大量未分类的瘤胃菌球科的成员^[5],也就是说作为杂食性昆虫的蟋蟀,其后肠是分解代谢纤维素的场所。蝗虫是植食性的昆虫,曾献春等^[6]在蝗虫肠道内分离和筛选出有良好纤维素降解能力的细菌。然而,作为杂食性的蟋蟀,其肠道纤维素降解细菌的分离和鉴定方面的研究却未见报道。

本研究采用富集和分离培养的手段从蟋蟀后肠筛选出具有降解纤维素能力的细菌,并进行了分子鉴定和刚果红染色试验。本研究首次从蟋蟀肠道分离出来纤维素降解细菌,为探索昆虫源纤维素降解细菌的多样性提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2016年9月,在河南省平顶山市白龟湖国家湿地公园的路灯下采集蟋蟀成虫,带回平顶山学院医学院微生物与免疫实验室,−80℃保存备用。

1.2 样品处理

于−80℃冻箱中取形态相似的6只蟋蟀,在超净工作台中,用75%酒精将蟋蟀浸泡3次进行体表消毒,每次1 min。然后,用无菌生理盐水冲洗3遍,解剖蟋蟀,取其后肠的内容物。于预冷的无菌研钵内,加2 mL预冷(4℃)的无菌生理盐水(0.9%)进行研磨。一部分组织用于进行分子鉴定^[3]。

1.3 细菌分离与纯化

将研磨好的蟋蟀后肠内容物加2 mL的生理盐水,制备成菌悬液,取0.5 mL接种于羧甲基纤维素液体培养基^[7](CMC-Na液体培养基)(羧甲基纤维素10 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, CaCl_2 0.001 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004 g/L,胰蛋白胨2 g/L)中进行富集培养,37℃培养24~48 h。待液体培养基变浑浊后,取2 mL培养液加入新的CMC-Na液体培养基中再富集培养24~48 h。然后,取1 mL菌液进行10倍梯度稀释,(分别为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}),取0.2 mL不同稀释浓度的菌液涂布到羧甲基纤维素固体培养基^[5](CMC-Na固体培养基)(羧甲基纤维素10 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, CaCl_2 0.001 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004 g/L,胰蛋白胨2 g/L,琼脂粉15 g/L),37℃培养24~48 h。最后,对长出的单菌落进行反复划线分离,直至出现单菌落。

1.4 细菌产纤维素酶活性大小的鉴定以及统计分析

将纯化的细菌菌落用枪头点种于CMC-Na培养基平板上,37℃培养48 h。在CMC-Na培养基平板中加入刚果红溶液进行染色,在长出菌落的培养基上,覆盖质量浓度为1 mg/mL的刚果红溶液,1 h后,倒去刚果红溶液,加入1 mol/L的NaCl溶液,30 min后倒掉NaCl溶液。此时,产生纤维素酶的菌落周围将会出现透明圈。在染色结束后,测量水解圈的直径(D)以及菌落的直径(d)。以水解圈直径与菌落直径之比(D/d)的大小为参考依据,判断细菌产纤维素酶的能力,即比值越大,表示该菌株的产纤维素酶的能力越大,反之越小^[8]。

1.5 纤维素降解细菌16S rRNA基因的PCR扩增与测序

本次PCR扩增以细菌DNA为模板,采用细菌鉴定通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCC TG-GCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGTTACCTTGT-TACGACTT-3')。PCR反应体系(30 μL):15.0 μL的2×TaqPCRMix(天根,KT201-02),0.2 μL的引物27F,0.2 μL的引物1492R,2.0 μL的模板DNA,12.6 μL的ddH₂O。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸2 min,运行35个循环;72℃延伸7 min,之后4℃保存。1%

琼脂糖凝胶电泳分析PCR结果,PCR产物合格即送交华大基因研究院测序。

1.6 纤维素降解细菌的遗传进化分析

将所得细菌的16S rRNA基因序列,在NCBI数据库中进行BLAST比对分析,选择同源参考序列(表1)。最后使用MEGA 6.0^[9]软件中,对序列进行同源比对,计算序列差异,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)^[10],系统树各分支置信度Bootstrap 1 000次检验,构建蟋蟀源纤维素降解细菌的系统发育树。

2 实验结果

本实验一共分离到20株具有纤维素降解能力的细菌,分子鉴定的结果显示它们分布在5个属:9株为肠杆菌属(*Enterobacter*),7株为不动杆菌属(*Acinetobacter*),2株为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),1株为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*),1株为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。刚果红染色试验的结果显示,纤维素降解能力较强的是鞘氨醇杆菌属的7C,克雷伯氏菌属的2B和8B,以及不动杆菌属的12C。

2.1 纤维素降解细菌16SrRNA序列及比对分析

将测得细菌的16S rRNA序列与NCBI核酸序列数据库中的序列进行比对获取相似片段并进行分析。使用Mega 6.0构建遗传进化树(图1),可以发现,菌株12A、1C、3C、11C、5A和10C,以及3B、7B和8A与肠杆菌属的成员聚类在一起;菌株8B和2B与克雷伯氏菌属的成员聚类在一起;菌株11A、2A、6A、3A、4A、4C和12A与不动杆菌属的成员聚类在

一起;菌株7C与菌菌株9A与鞘氨醇杆菌属的成员聚类在一起;菌株7C与葡萄球菌属的成员聚类在一起。

2.2 蟋蟀后肠道中产纤维素酶细菌的产酶能力分析

将20株菌株经培养和刚果红染色,并测量菌株产水解圈的直径和自身菌落直径。结果,其中有16株多次染色结果都不明显,有4株细菌的染色结果很明显。我们对这四株细菌的水解圈直径和菌落直径进行了测量,这些菌株有较明显的水解圈直径大小在(0.97±0.09) cm到(1.35±0.29) cm之间,水解圈直径和菌落直径比值的范围为在2.01±0.25到3.11±0.22之间(表2)。

3 讨 论

昆虫肠道微生物种类繁多、数量巨大。近年来,具有农业、能源和环保价值的微生物种类和基因得到了开发,展示了巨大的应用潜力^[2]。蟋蟀作为一种常见的杂食性昆虫,纤维素很可能是其摄入的重要营养成分之一。前期研究也发现,在其后肠有着纤维素降解的菌群^[5]。因此,本研究通过羧甲基纤维素选择性培养从蟋蟀后肠内容物中分离并鉴定出能够降解纤维素的细菌。

我们分离到的纤维素降解能力比较强的是克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium*)。这三类细菌在物质降解方面都有良好的表现。虽然克雷伯氏菌属的一些成员是重要的条件致病菌,对人类有很强的致病性,然而该菌属的另外一些成员具有降解黄曲

表1 蟋蟀后肠道纤维素降解细菌16SrRNA序列比对结果
Table 1 Comparison of 16SrRNA sequence alignment of post-intestinal cellulose-degrading bacteria

分离株	参考菌株登录号	相似度/%	属
PDSCDXS_10C	KY264129.1	99	克雷伯氏菌
PDSCDXS_11C	MG557815.1	99	克雷伯氏菌
PDSCDXS_3B, 7B, 2A, 3A, 4A, 5A, 8A,	MH368381.1	100	肠杆菌属
PDSCDXS_12A, 4C	KM538690.1	100	肠杆菌属
PDSCDXS_6A, 8B	MH211249.1	100	不动细菌属
PDSCDXS_11A	KJ806471.1	99	不动细菌属
PDSCDXS_2B	KJ806471.1	100	不动细菌属
PDSCDXS_9A	KY951361.1	100	不动细菌属
PDSCDXS_7C	MF353934.1	99	不动细菌属
PDSCDXS_12C	KY049895.1	100	不动细菌属
PDSCDXS_1C	KR476410.1	100	葡萄球菌
PDSCDXS_3C	KX082881.1	98	鞘氨醇杆菌

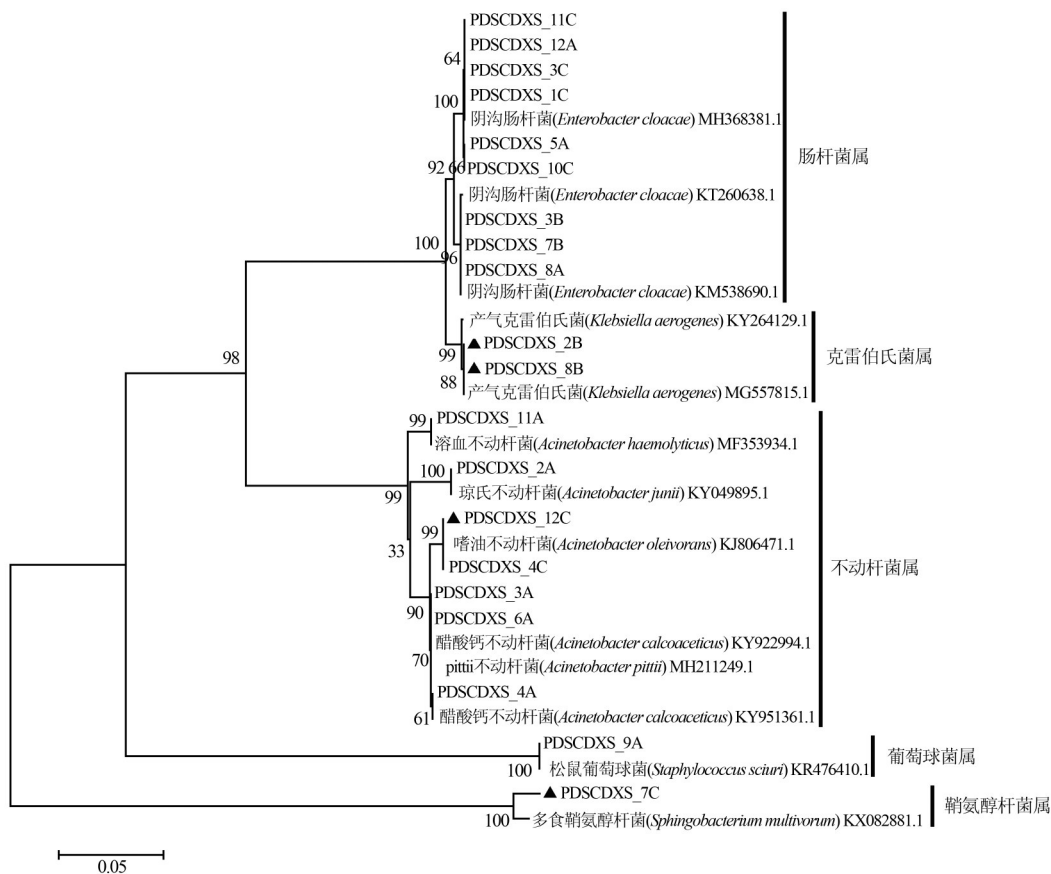


图1 基于16S rRNA基因序列构建的蟋蟀后肠道纤维素降解细菌的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of cellulose-degrading bacteria in the intestine.

表2 蟋蟀后肠道中产纤维素酶细菌的降解能力(平均数±标准误差)

Table 2 Degradability of cellulase-producing bacteria in the intestine after sputum (mean ± standard error)

分离株	菌落直径(d)/mm	水解圈直径(D)/mm	D/d
PDSCDXS_8B	1.05±0.15	2.59±0.47	2.46±0.79
PDSCDXS_7C	0.97±0.09	1.95±0.54	2.01±0.25
PDSCDXS_12C	1.35±0.29	4.04±0.58	3.11±0.22
PDSCDXS_2B	1.02±0.23	2.14±0.27	2.12±0.23

注:其余16株菌株菌落直径较小且形成的水解圈较小,因此没有测量成功。

Note: The remaining 16 strains had smaller colonies and formed smaller hydrolyzed circles, thus the diameters were not measured successfully.

霉素^[11]、四环素^[12]、联苯菊酯^[13]、以及解磷^[14]等的降解能力。同样,不动杆菌属也是重要的机会致病菌,同样对石油烃^[15]、硝基苯^[16]、磷^[17]等具有较强的降解能力。而鞘氨醇杆菌对多环芳烃^[18]、丁草胺^[19]等具有降解能力。我们的研究发现,蟋蟀后肠的克雷伯氏菌属、不动杆菌和鞘氨醇杆菌对纤维素具有较好的降解能力。这些发现与该菌属在植食性动物铜绿丽金龟蛴螬体内^[20]、斜纹夜蛾幼虫肠道^[21]、松墨天牛幼虫肠道^[22]等的发现比较一致,并且蟋蟀的肠道微生物并未表现出更强的纤维素降解能力。另外,我们还分离到了比例较高的肠杆菌属,但是它们的纤维

素降解能力较弱。这与王立秀等^[23]在跳虫肠道微生物中的研究结果比较一致。蟋蟀肠道的纤维素降解细菌与植物食性昆虫肠道中的纤维素降解细菌类似,这些结果表明,蟋蟀后肠具有较强的消化和吸收纤维素的能力,另外也表明蟋蟀的饮食习惯更偏向植物食性,可能是偶尔打斗才采食肉类。

先前的研究发现在蟋蟀后肠存在大量未分类的瘤胃球菌科的成员,因此,我们推测其具有纤维素降解的能力。然而,通过纤维素降解的分离培养试验,我们并没有找到瘤胃球菌科的细菌。这有可能是我们采用的分离培养基在高压的过程中,琼脂和培养基

的其他成分发生了一些化学反应,产生了大量的过氧化氢,制造了很强的有氧环境^[24,25],而瘤胃菌科的成员是厌氧菌。另外,刘冰等^[26]分别采用厌氧培养和喜氧培养的方法从白蚁分离纤维素降解细菌,发现获得的厌氧菌菌株是好氧菌菌株的两倍。也就是说,蟋蟀后肠可能存在好氧与厌氧至少两种类型的纤维素降解细菌,我们的结果仅包含了好氧的部分,而通过厌氧培养来筛选纤维素降解细菌是我们将来的研究方向。

4 结 论

本研究从蟋蟀后肠道内容物中分离到了20株能够降解纤维素的细菌,其中鞘氨醇杆菌属和不动杆菌属各1株,克雷伯氏菌属2株,共计4株细菌表现出较好的纤维素降解能力。蟋蟀后肠纤维素降解细菌的种属分布以及纤维素降解能力与植食性昆虫类似,这一结果提示我们蟋蟀的食性可能更偏植物,偶有打斗才进食肉类。另外,厌氧培养可以成为我们下一步探寻微生物资源的研究方向。

参考文献

- [1] Shin S C, Kim S H, You H, *et al.* Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling [J]. Science, 2011, 334 (6056): 670-674.
- [2] 张振宇, 圣平, 黄胜威, 等. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用[J]. 生物资源, 2017, 39(4): 231-239. Zhang Z Y, Sheng P, Huang S W, *et al.* Diversity, function and application of insect gut microbiota [J]. Biotic Resources, 2017, 39(4): 231-239.
- [3] 蒋国芳, 陈爱辉, 冯金叶. 九种蟋蟀 mtDNA-16S rRNA 基因序列及其系统进化(直翅目:蟋蟀科)[J]. 昆虫分类学报, 2004, 26(4): 249-254. Jiang G F, Chen A H, Feng J Y. Phylogenetic relationships of nine crickets based on partial sequences of 16S rRNA gene (Orthoptera: Gryllidae) [J]. Entomotaxonomia, 2004, 26(4): 249-254.
- [4] Satokari R M, Vaughan E E, Akkermans A D, *et al.* Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 504-513.
- [5] 张科, 刘伍限, 郑新华, 等. 蟋蟀肠道细菌多样性的宏基因组分析[J]. 应用昆虫学报, 2017, 54(3): 417-425. Zhang K, Liu W X, Zheng X H, *et al.* Metagenome analysis of bacterial diversity in cricket intestines [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2017, 54(3): 417-425.
- [6] 曾献春, 季荣, 牟贵平. 巴里坤草原西伯利亚蝗虫肠道内高产纤维素酶菌株筛选[J]. 食品科学, 2007, 28 (9): 388-392. Zeng X C, Ji R, Mu G P. Screen of high yield cellulase strain from intestinal of *Gomphocercus sibiricus* [J]. Food Science, 2007, 28(9): 388-392.
- [7] 王微微, 吴山功, 邹红, 等. 草鱼肠道纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2014, 38(2): 291-297. Wang W W, Wu S G, Zou H, *et al.* Characterization of cellulose-decomposing bacteria in the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (val.) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica. 2014, 38(2): 291-297.
- [8] 昌艳萍, 田其凡, 郭欣, 等. 蜗牛肠道细菌及其纤维素酶性质[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2017, 37(4): 400-404. Chang Y P, Tian Q F, Guo X, *et al.* Composition of the intestinal bacteria and their cellulase characterization in *Cathaica fasciola* [J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2017, 37(4): 400-404.
- [9] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-25.
- [11] 李俊霞, 梁志宏, 关舒, 等. 黄曲霉毒素 B1 降解菌株的筛选及鉴定[J]. 中国农业科学, 2008, 41(5): 1459-1463. Li J X, Liang Z H, Guan S, *et al.* Screening and identification of aflatoxin B1 degradation strains [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(5): 1459-1463.
- [12] 徐伊婷, 李思雨, 祝溢靖, 等. 四环素降解菌的筛选及其降解特性[J]. 浙江树人大学学报(自然科学版), 2017, 17(3): 17-21. Xu Y T, Li S Y, Zhu Y J, *et al.* Screening and degradation characteristics of tetracycline-degrading strains [J]. J Zhejiang Shuren Univ Acta Sci Nat, 2017, 17(3): 17-21.
- [13] 胡桂萍, 石旭平, 管帮富, 等. 降解联苯菊酯微生物菌剂的制备及其稳定性测定[J]. 江苏农业科学, 2017 (19): 257-260. Hu G P, Shi X P, Guan B F, *et al.* Preparation and stability determination of bifenthrin-degrading microbial agent [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017(19): 257-260.
- [14] 王小妹, 袁生, 常志州, 等. 一株土生克雷伯氏杆菌 (*K. pneumoniae*) 溶磷能力的初步研究[J]. 土壤通报,

- 2006, 37(4): 753-756.
- Wang X M, Yuan S, Chang Z Z, *et al.* Phosphate-dissolving ability of an isolated bacterium under pure culture condition [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2006, 37(4): 753-756.
- [15] 刘玉华, 王慧, 胡晓珂. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌降解石油烃的研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1579-1589.
- Liu Y H, Wang H, Hu X K. Recent advances in the biodegradation of hydrocarbons by *Acinetobacter* species [J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1579-1589.
- [16] 蔡邦成, 高士祥, 肖琳, 等. 羟丙基- β -环糊精对不动杆菌属菌株降解硝基苯的影响研究[J]. 重庆环境科学, 2003, 25(11): 58-60.
- Cai B C, Gao S X, Xiao L, *et al.* Effect on Hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the biodegradation of nitrobenzene by *Acinetobacter* species [J]. Chongqing environmental science, 2003, 25(11): 58-60.
- [17] 姜莉, 史艳芳, 刘鑫, 等. 不动杆菌 D10 对土壤中对硫磷的降解[J]. 科技导报, 2011, 29(13): 33-39.
- Jiang L, Shi Y F, Liu X, *et al.* Biodegradation of parathion in Soil by *Acinetobacter* sp. D10 [J]. Science and Technology Review, 2011, 29(13): 33-39.
- [18] 李季, 刘芳, 梁金松, 等. 一株矢野口鞘氨醇杆菌及其在降解多环芳烃中的应用: CN102120976A [P]. 2011-07-13.
- Li J, Liu F, Liang J S, *et al.* A *Sphingobacterium sagittatum* and its application in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: CN102120976A [P]. 2011-07-13.
- [19] 林晓燕, 牟仁祥, 曹赵云, 等. 镉胁迫下嗜温鞘氨醇杆菌降解丁草胺的蛋白质组学研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(12): 2738-2745.
- Lin X Y, Mou R X, Cao Z Y, *et al.* Proteomics of butachlor-degrading bacterium *Sphingobacterium thalpophilum* under cadmium stress [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(12): 2738-2745.
- [20] 薛志静, 庄桂芬, 黄振东, 等. 铜绿丽金龟蛴螬肠道产消化酶细菌的分离与鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(8): 878-883.
- Xue Z J, Zhuang G F, Huang Z D, *et al.* Screening and identification of digestive enzyme-producing bacteria from the intestine of *Anomala corpulenta* larvae [J]. Chin J Microecol, 2017, 29(8): 878-883.
- [21] 孙博通, 蓝波妙, 王倩, 等. 斜纹夜蛾幼虫肠道细菌分离鉴定及其功能初步分析[J]. 生物资源, 2017, 39(4): 264-271.
- Sun B T, Lan B M, Wang Q, *et al.* Isolation and preliminary functional analysis of the larval gut bacteria from *Spodoptera litura* [J]. Biotic Resources, 2017, 39(4): 264-271.
- [22] 胡霞, 傅慧静, 李俊楠, 等. 松墨天牛幼虫肠道纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2018, 47(3): 322-328.
- Hu X, Fu H J, Li J N, *et al.* Isolation and identification of cellulolytic bacteria associated with the gut of *Monochamus alternatus* larvae [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2018, 47(3): 322-328.
- [23] 王立秀, 陈伟, 谢桂林, 等. 阿南原等跳肠道细菌的分离鉴定及降解纤维素细菌的筛选[J]. 昆虫学报, 2018, 61(7): 835-842.
- Wang L X, Chen W, Xie G L, *et al.* Isolation and identification of intestinal bacteria and screening of cellulolytic bacteria in *Proisotoma ananevae* (Collembola: Isotomidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2018, 61(7): 835-842.
- [24] Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, *et al.* A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(24): 7659-7666.
- [25] Kawasaki K, Kamagata Y. Phosphate-catalyzed hydrogen peroxide formation from agar, gellan, and κ -carrageenan and recovery of microbial cultivability *via* catalase and pyruvate [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(21): e01366-17.
- [26] 刘冰, 林景栋, 宋水林, 等. 白蚁肠道可培养菌群及其功能初探[J]. 生物灾害科学, 2012, 35(2): 172-176.
- Liu B, Lin J D, Song S L, *et al.* The microbes cultured and their function in the gut of termites [J]. Biological Disaster Science, 2012, 35(2): 172-176.

□

(编辑: 梅楠)