

## 研究报告

## 马蜂肠道菌的分离鉴定及产消化酶功能菌株的筛选

何雨薇<sup>1</sup>, 陈芳敏<sup>\*1,2</sup>, 夏琬婷<sup>1</sup>, 刘娴<sup>1</sup>, 黄晨晨<sup>1</sup><sup>1</sup> 沈阳大学生命科学与工程学院 辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室, 辽宁 沈阳 110044<sup>2</sup> 沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

何雨薇, 陈芳敏, 夏琬婷, 刘娴, 黄晨晨. 马蜂肠道菌的分离鉴定及产消化酶功能菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2624-2634.

HE Yuwei, CHEN Fangmin, XIA Wanting, LIU Xian, HUANG Chenchen. Isolation and identification of gut bacteria from *Vespa mandarinia* Smith and screening of digestive enzyme-producing strains[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2624-2634.

**摘要:**【背景】马蜂(*Vespa mandarinia* Smith)可以防治多种田间害虫, 还具有药用价值, 其肠道菌群结构和功能还有待研究。【目的】获得马蜂肠道可培养细菌并筛选出具有产消化酶功能的菌株, 为理解肠道菌对宿主的影响机理及功能菌株的利用提供科学依据和研究材料。【方法】采用传统细菌分离培养法获得马蜂肠道菌, 结合形态学以及 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定; 利用水解圈法分别筛选产蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶菌株; 通过测量水解圈  $D$  与菌落直径  $d$  的比值, 比较不同细菌的产酶能力。【结果】在马蜂肠道中共分离出 6 属 10 种细菌, 其中芽孢杆菌属 5 种, 肠球菌属、葡萄球菌属、明串珠菌属、乳球菌属和不动杆菌属各 1 种。从获得的 61 个菌株中筛选出 6 个具有产消化酶功能的菌株。其中, 苏云金芽孢杆菌 V44 具有产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶 4 种消化酶的能力; 粪肠球菌 V6 具有产淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶 3 种消化酶的能力; 蜡样芽孢杆菌 V43 具有产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶 3 种消化酶的能力; 粪肠球菌 V20、蜡样芽孢杆菌 V19 和维德曼氏芽孢杆菌 V22 均具有产蛋白酶的能力。【结论】马蜂肠道细菌资源较丰富, 部分有产消化酶的功能, 可帮助马蜂消化食物, 对宿主健康有一定影响。本研究筛选的 6 个菌株都能产蛋白酶, 其中菌株 V43 和 V44 分别具有最强产淀粉酶和脂肪酶的能力, 是可进一步开发利用的肠道功能菌株资源。

**关键词:** 马蜂; 肠道菌; 16S rRNA 基因; 产消化酶功能菌株

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(42177406); 辽宁省自然科学基金面上项目(2023-MS-319)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42177406) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2023-MS-319).

\*Corresponding author. E-mail: fangminchen@syu.edu.cn

Received: 2022-09-09; Accepted: 2022-12-27; Published online: 2023-02-09

# Isolation and identification of gut bacteria from *Vespa mandarinia* Smith and screening of digestive enzyme-producing strains

HE Yuwei<sup>1</sup>, CHEN Fangmin<sup>\*1,2</sup>, XIA Wanting<sup>1</sup>, LIU Xian<sup>1</sup>, HUANG Chenchen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Liaoning Province Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Ecological Restoration of Regional Contaminated Environment, Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

**Abstract:** [Background] *Vespa mandarinia* Smith can control a variety of field pests and has medicinal values. The structure and function of gut bacteria in *V. mandarinia* remain to be studied. [Objective] To obtain the culturable bacteria from the gut of *V. mandarinia* and screen out the bacterial strains capable of producing digestive enzyme, so as to provide a basis and research materials for understanding the influence of gut bacteria on the host and for utilization of the functional bacterial strains. [Methods] The gut bacteria of *V. mandarinia* were isolated by the culture method, and 16S rRNA gene sequencing was employed to identify the strains. Halo-forming method was adopted to screen out the strains producing protease, lipase, amylase, and cellulase, and the ratio of halo diameter ( $D$ ) to bacterial colony diameter ( $d$ ) was used to compare the strain capability of producing digestive enzymes. [Results] A total of 10 species of bacteria belonging to 6 genera were isolated from the gut of *V. mandarinia*, including 5 species of *Bacillus*, 1 species of *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Acinetobacter*, respectively. Six strains producing digestive enzymes were screened out from the 61 strains obtained. Among them, *B. thuringiensis* V44 had the ability to produce protease, amylase, lipase, and cellulase. *E. faecalis* V6 was capable of producing amylase, protease, and lipase. *B. cereus* V43 can produce protease, amylase, and cellulase. *E. faecalis* V20, *B. cereus* V19, and *B. wiedmannii* V22 demonstrated the ability to produce protease. [Conclusion] The gut bacteria resources of *V. mandarinia* were abundant, and some strains were capable of producing digestive enzymes, which can facilitate the digestion and affection of health of *V. mandarinia*. All the 6 strains screened out in this study could produce protease. Strains V43 and V44 showed the strongest ability to produce amylase and lipase, respectively, which could be further developed as gut functional strain resources.

**Keywords:** *Vespa mandarinia* Smith; gut bacteria; 16S rRNA gene; functional strains producing digestive enzymes

昆虫肠道中存在着丰富的菌群<sup>[1]</sup>。研究发现, 肠道菌与其宿主之间发生着复杂的相互作用, 对宿主的新陈代谢和生理活动等都有重要影响<sup>[2]</sup>。参与宿主的营养代谢从而协助其消化食

物是昆虫肠道菌群的重要作用之一<sup>[3-4]</sup>。许多昆虫的肠道菌群具有分泌多种消化酶的能力<sup>[5]</sup>, 如家蚕肠道菌群能产生淀粉酶、纤维素酶等多种消化酶<sup>[6]</sup>。肠道菌群对其宿主昆虫的生长发育

等生命活动也发挥着重要的作用<sup>[7]</sup>, 而昆虫的健康状态也与其肠道菌群的调节作用密切相关<sup>[8]</sup>。昆虫肠道系统是一个可变的动态环境, 而肠道微生物的多样性往往与昆虫的个体差异、取食、生长发育的不同阶段有关<sup>[9-11]</sup>。

马蜂(*Vespa mandarinia* Smith)是一种重要的天敌昆虫, 可以防治多种田间害虫。我国是世界上率先利用马蜂来防治田间害虫的国家<sup>[12]</sup>。马蜂还具有药用保健价值, 是一种可利用的宝贵资源<sup>[13]</sup>, 如其蜂毒提取物可用于治疗类风湿关节炎<sup>[14]</sup>。然而马蜂肠道菌的结构和功能及其对宿主的影响还有待研究。本研究采用传统的分离纯化方法从马蜂肠道分离可培养菌株, 对获得的菌株进行鉴定和功能筛选, 揭示马蜂肠道可培养菌的种类及其系统发育地位, 筛选具有产消化酶(包括淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶)能力的菌株, 以期为马蜂肠道菌的开发利用及其对宿主健康的影响提供科学依据和研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×*Taq* Plus Master Mix 试剂盒、乳酸细菌(de Man, Rogosa and Sharp, MRS)培养基和胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth, TSB), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 蛋白酶筛选培养基参照文献<sup>[15]</sup>配制, 淀粉酶筛选培养基参照文献<sup>[16]</sup>配制; 1/3 胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)培养基(g/L): TSB 10.0, 琼脂 15.0; 脂肪酶筛选培养基参照文献<sup>[17]</sup>配制; 羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium medium, CMC-Na)培养基参照文献<sup>[18]</sup>配制。梯度 PCR 仪, Agilent Technologies 公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad

公司; 体视显微摄像系统, Leica 公司。

### 1.2 肠道菌的分离与形态学鉴定

将实验室养殖的马蜂样品进行表面消毒: 用 75%酒精漂洗 2 次, 每次 5 min; 再用无菌水漂洗 5 次, 每次 3 min。然后在无菌操作下解剖取出马蜂完整肠道并进行匀浆。将匀浆样品分成两份, 一份(样品 1)不进行加热处理; 另一份(样品 2)进行金属浴加热处理(85 °C 加热 15 min)用于分离耐热菌和产芽孢菌。然后将 2 组样品分别进行 10 倍倍比梯度稀释, 样品 1 和样品 2 分别取 6 个不同浓度( $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ )的样品溶液 0.2 mL, 均匀涂布在 MRS 培养基和 1/3 TSA 培养基上。用 MRS 培养基选择性分离乳酸菌, 用 1/3 TSA 培养基营造寡营养的环境来提高菌株分离效果。将涂布好的培养基平板于 37 °C 恒温培养箱倒置培养 24 h 后观察, 每个浓度样品做 3 个平行分离平板。挑菌落形态特征各异的单菌落进一步分离纯化。经过至少 3 代纯化获得纯培养物并观察记录菌落形态特征。通过革兰氏染色镜检结果结合形态学特征进行初步鉴定, 用甘油悬液保藏法保存菌种。

### 1.3 基于 16S rRNA 基因序列分析的菌株鉴定

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取马蜂肠道分离菌株的总 DNA。选用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[19]</sup>对马蜂肠道分离菌株进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2×*Taq* Plus Master Mix 25  $\mu$ L, 正向引物 27F (100  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 反向引物 1492R (100  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, DNA 模板 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。阴性对照为 ddH<sub>2</sub>O 代替菌株 DNA 模板。PCR 反应条件: 95 °C

3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪观察结果, 条带单一且长度为 1 500 bp 左右的合格样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果提交 NCBI 核苷酸数据库(nucleotide database), 用 BLAST 进行同源性比对分析, 一般认为比对结果相似率>99% 视为同种, 相似率 95%–99% 鉴定为同一属<sup>[20]</sup>。采用 MEGA 7.0 软件中的 Kimura 2-parameter model 模型计算进化距离; 用最大似然法(maximum likelihood method)构建系统发育树。

#### 1.4 马蜂肠道菌的功能筛选

使用 CMC-Na 培养基、淀粉酶筛选培养基、蛋白酶筛选培养基和脂肪酶筛选培养基分别筛选产纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶的菌株。将从马蜂肠道分离出的供试菌株分别接种于蛋白酶筛选培养基、淀粉酶筛选培养基和脂肪酶筛选培养基的三分点位置和产纤维素酶筛选培养基的四分点的位置, 于 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 48 h, 观察培养基上是否出现水解圈。其中淀粉酶筛选培养基培养 48 h 后用碘液进行染色, 观察是否存在水解圈; 产纤维素酶筛选培养基经过 48 h 培养后用 0.3 g/L 刚果红染色液染色 1 h, 然后倒掉染色液用蒸馏水轻轻冲洗, 再用 5% 的 NaCl 溶液脱色 1 h, 观察是否存在水解圈。用电子游标卡尺测量并记录水解圈的直径  $D$  和菌落的直径  $d$ , 通过计算  $D$  与  $d$  的比值( $D/d$ )来比较各菌产酶能力的大小。

#### 1.5 统计学分析

利用 SPSS 20.0 软件的单因素方差分析实验结果  $D/d$  是否具有统计学意义, 当方差齐时用 S-N-K 多重比较方法; 方差不齐时用 Dunnett's T3 进行显著性分析,  $P<0.05$  有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 马蜂肠道菌株的分离结果与形态学鉴定结果

使用可培养方法从马蜂肠道中分离获得 61 个可培养菌株, 编号为 V1–V61。分离结果显示 1/3 TSA 培养基和 MRS 培养基都有较好的分离效果, 但 1/3 TSA 培养基分离得到的菌株更多。对于未加热样品, 在 1/3 TSA 培养基上,  $10^{-3}$  稀释度样品的分离效果最好; 在 MRS 培养基上,  $10^{-4}$  稀释度样品的分离效果最好。对于加热样品, 在 1/3 TSA 培养基和 MRS 培养基上均为稀释度  $10^{-3}$  样品的分离效果最好。未加热样品在 1/3 TSA 培养基上分离出 34 个菌株, 在 MRS 培养基上分离出 14 个菌株。加热处理的样品在 1/3 TSA 和 MRS 培养基上分别获得 10 个和 3 个菌株。革兰氏染色镜检结果发现菌株皆为革兰氏阳性菌, 细胞形态主要为球菌和杆菌, 代表菌株的革兰氏染色结果如图 1 所示。

### 2.2 菌株的 16S rRNA 基因鉴定结果

依据菌株形态学特征和革兰氏染色镜检的初步鉴定结果, 结合 16S rRNA 基因序列分析进行菌株鉴定。结果显示从马蜂肠道分离获得的 61 个菌株可鉴定为 6 个属 10 个种。其中, 菌株 V13、V14、V18、V27、V29 和 V42 为肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*); 菌株 V22、V31 和 V39 为维德曼氏芽孢杆菌(*Bacillus wiedmannii*); 菌株 V19 和 V43 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*); 菌株 V4 和 V35 为格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*); 菌株 V49 为运动芽孢杆菌(*Bacillus mobilis*); 菌株 V3 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 菌株 V44 为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*); 菌株 V2 为表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*); 菌株 V1 为约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*); 其

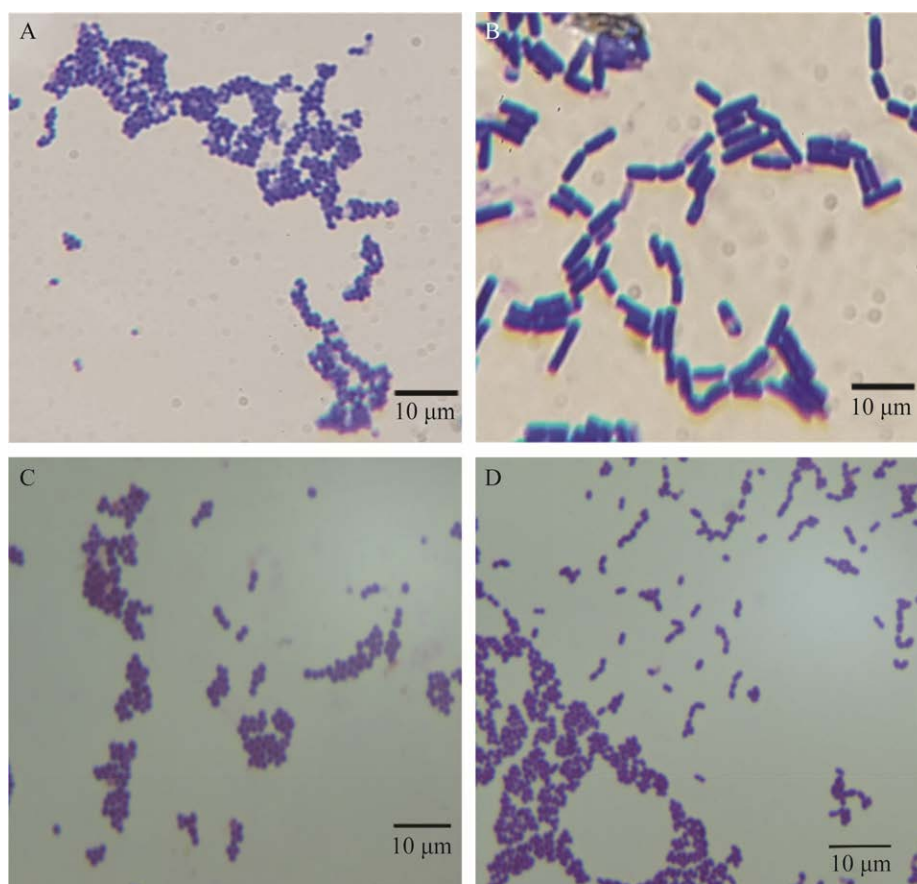


图 1 代表菌株的革兰氏染色结果图 A: 菌株 V2,  $G^+$ , 葡萄球菌属. B: 菌株 V19,  $G^+$ , 芽孢杆菌属. C: 菌株 V6,  $G^+$ , 肠球菌属. D: 菌株 V13,  $G^+$ , 明串珠菌属

Figure 1 Gram staining results of representative strains. A: Strain V2,  $G^+$ , *Staphylococcus*. B: Strain V19,  $G^+$ , *Bacillus*. C: Strain V6,  $G^+$ , *Enterococcus*. D: Strain V13,  $G^+$ , *Leuconostoc*.

余 43 个菌株为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。可见, 在马蜂肠道可培养细菌中, 肠球菌属占优势, 有 43 株, 占比高达 70.5%; 芽孢杆菌属 8 株, 占总数的 13%; 明串珠菌属 6 株, 占总数的 10%; 乳球菌属 2 株, 占总数的 3%; 葡萄球菌属和不动杆菌属各 1 株, 均占比 2%。选出 26 个代表菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 的核苷酸数据库(nucleotide database), GenBank 登录号为 ON745454–ON745481。选取最具代表菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析, 如图 2 所示, 它们可归于 6 个

属。其中, 菌株 V3、V19、V22、V43、V44 和 V49 为芽孢杆菌属(*Bacillus*); 菌株 V2 为葡萄球菌属(*Staphylococcus*); 菌株 V6 和 V20 为肠球菌属(*Enterococcus*); 菌株 V13 为明串珠菌属(*Leuconostoc*); 菌株 V4 和 V35 为乳球菌属(*Lactococcus*); V1 为不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

### 2.3 产消化酶菌株筛选结果

分别对获得的菌株进行产蛋白质酶、淀粉酶、脂肪酶以及纤维素酶功能的筛选, 图 3 为产消化酶筛选实验结果为阳性的代表菌株功能

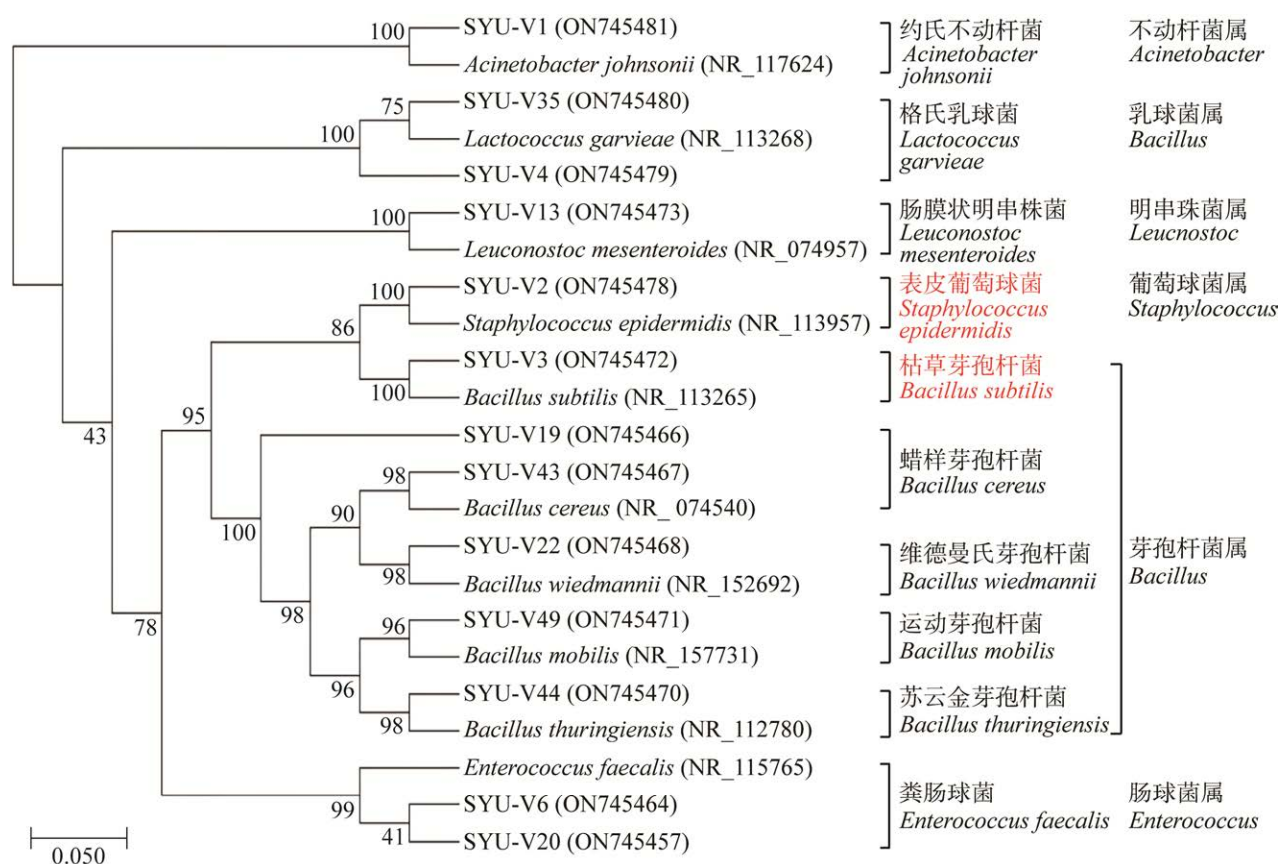


图2 基于马蜂肠道菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内的编号为序列的 GenBank 登录号; 结点处数字为自展值, 代表进化树分支的可信度的百分比; 标尺代表 5% 的序列分歧

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of gut bacteria of *Vespa mandarinia* Smith. Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values, which represent the percentage of credibility of evolutionary tree branches; The scale represents 5% of sequence divergence.

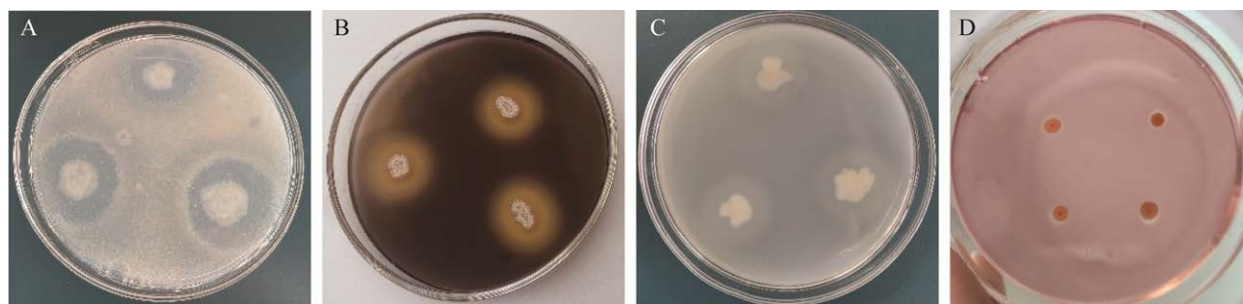


图3 产消化酶代表菌株筛选结果 A: 产蛋白酶菌株 V22. B: 产淀粉酶菌株 V6. C: 产脂肪酶菌株 V44. D: 产纤维素酶菌株 V43

Figure 3 Medium plate screening results of representative strains producing digestive enzymes. A: Protease-producing strain V22. B: Amylase-producing strain V6. C: Lipase-producing strain V44. D: Cellulase-producing strain V43.



筛选平板图,结果显示降解圈明显,说明降解能力较强。

筛选结果显示 6 个菌株具有产消化酶功能,占总数的 10%,详见表 1。其中,芽孢杆菌属的菌株 V44 具有产 4 种消化酶的能力;芽孢杆菌属的菌株 V43 具有产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的能力;肠球菌属的菌株 V6 具有产淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶的能力;芽孢杆菌属的菌株 V19、V22 和肠球菌属的菌株 V20 具有产蛋白酶的能力。

## 2.4 肠道菌产酶能力分析

结果显示,从马蜂肠道菌筛选出的具有产酶功能菌株的产酶种类和能力各异。如图 4 所示,筛选出 6 个具有产蛋白酶功能的菌株,其中菌株 V19、V20、V22、V43 和 V44 的产蛋白酶能力较强( $D/d > 1.8$ ),5 株菌中又以菌株 V22 的降解能力最强,与菌株 V19、V20、V43 和 V44 的降解能力相比具有极显著性差异(图 4A);如图 4B 所示,菌株 V6、V43 和 V44 均具有产淀粉酶功能,其中菌株 V43 产酶能力较强( $D/d > 3$ );如图 4C 所示,菌株 V6 和 V44 具有产脂肪酶功能,其中菌株 V44 的降解能力较强( $D/d > 2$ );菌株 V43 和 V44 具有产纤维素酶功能(图 4D)。

马蜂肠道产消化酶功能菌株的产酶种类和能力综合比较结果如图 5 所示。芽孢杆菌属中

的苏云金芽孢杆菌 V44 具有产纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶这 4 种消化酶的能力,其产消化酶的综合能力最强,并且产脂肪酶能力最强( $D/d = 2.12$ )。芽孢杆菌属中的蜡样芽孢杆菌 V43 具有较强的产淀粉酶能力( $D/d = 3.16$ ),产蛋白酶和纤维素酶的能力相对较弱,尚未发现具有产脂肪酶的功能。肠球菌属的菌株 V6 具有较强的产淀粉酶的能力( $D/d = 2.50$ ),产蛋白酶和脂肪酶的能力相对较弱,尚未发现具有产纤维素酶的功能。芽孢杆菌属的菌株 V19、V22 和肠球菌属的菌株 V20 均具有产蛋白酶的功能;其中 V22 的产蛋白酶能力最强( $D/d = 2.06$ ),尚未发现具有产其他 3 种消化酶的功能。

综上所述,马蜂肠道分离出的菌株有近 10%具有产消化酶功能,筛选出的 6 个菌株都具有开发利用潜力,尤其是芽孢杆菌属的蜡样芽孢杆菌 V43 和苏云金芽孢杆菌 V44 产酶能力突出,可作为后续研究肠道菌对宿主健康影响及肠道菌开发利用的资源菌株。

## 3 讨论与结论

昆虫肠道是其肠道菌的定殖环境。昆虫肠道菌群因其食性、所处环境和虫龄等差异而具有多样性<sup>[21-23]</sup>。昆虫肠道菌群的多样性使昆虫肠道菌群的功能同样具有多样性,因此在促进

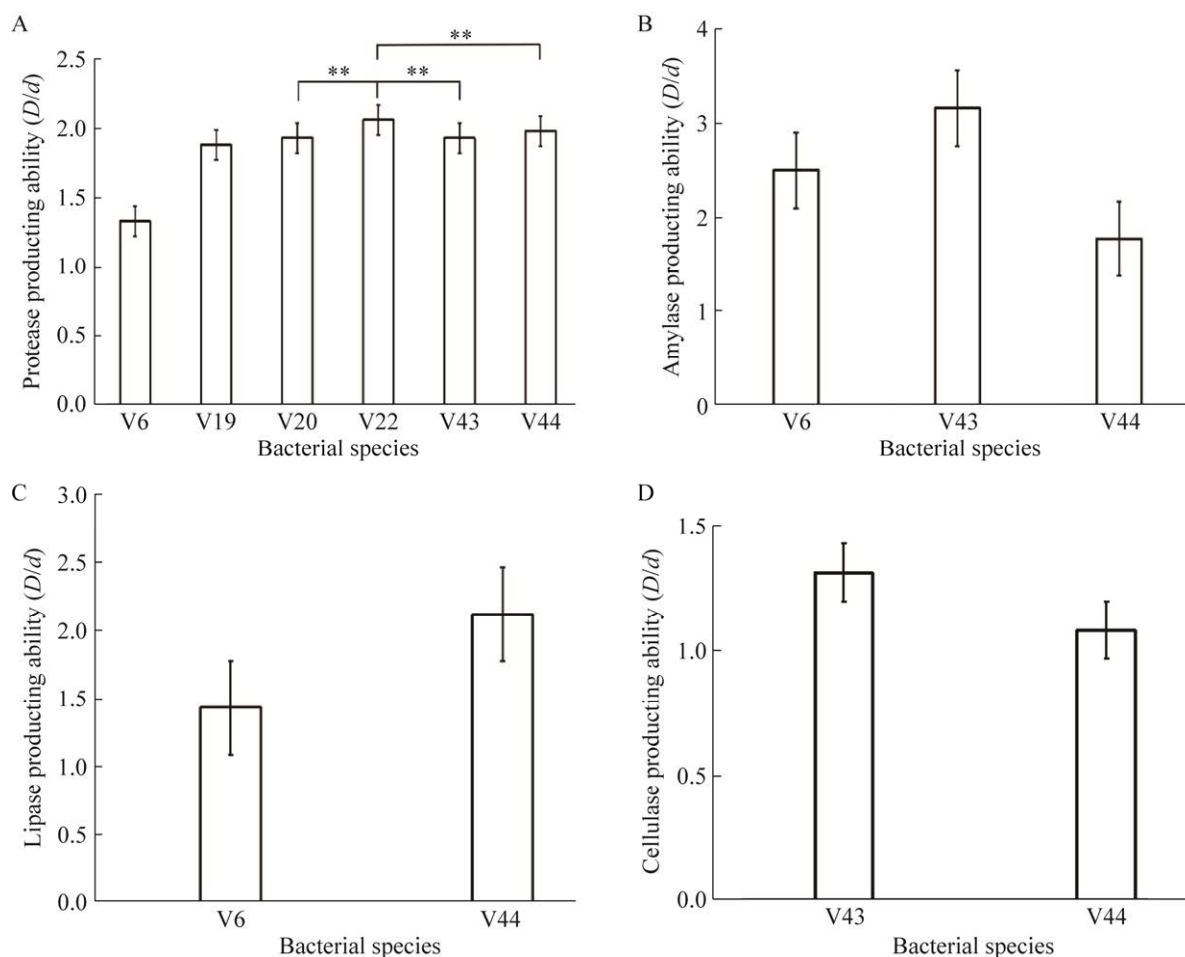
表 1 马蜂肠道菌产消化酶结果

Table 1 Results of digestive enzyme production by gut bacteria of *Vespa mandarinia* Smith

菌株编号 Strain No.	细菌种类 Bacterial species	蛋白酶 Protease	淀粉酶 Amylase	脂肪酶 Lipase	纤维素酶 Cellulase
V6	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	
V19	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+			
V20	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	+			
V22	维德曼氏芽孢杆菌 <i>Bacillus wiedmannii</i>	+			
V43	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	+		+
V44	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+	+

+: 菌株具有产该消化酶的能力

+: The strain has the ability to produce this digestive enzyme.



**图 4 马蜂肠道菌产消化酶菌株及其产酶能力分析** A: 产蛋白酶菌株及其产酶能力. B: 产淀粉酶菌株及其产酶能力. C: 产脂肪酶菌株及其产酶能力. D: 产纤维素酶菌株及其产酶能力.  $D/d$  为降解圈直径  $D$  与菌落直径  $d$  的比值, 根据比值大小评估菌株产酶的能力. \*\*代表均值差的显著性水平  $<0.01$ , 差异极显著

**Figure 4** Analysis of digestive enzyme producing strains and their enzyme producing ability of gut bacteria from *Vespa mandarinia* Smith. A: Strains producing protease and their protease producing ability. B: Strains producing amylase and their amylase producing ability. C: Strains producing lipase and their lipase producing ability. D: Strains producing cellulase and their cellulase producing ability.  $D/d$  is the ratio of the diameter of the degradation circle ( $D$ ) to the diameter of the colony ( $d$ ). According to the ratio, the ability of the strain to produce enzymes was evaluated. \*\* means the significance level of the mean difference is  $<0.01$ , and the difference is extremely significant.

农业生产、害虫防治和人类疾病研究等方面具有重要意义<sup>[24]</sup>。本研究采用传统的分离培养法, 从马蜂肠道中分离出 61 个菌株, 结合形态学特征和分子生物学技术可鉴定为 6 属 10 种; 筛选出 6 个具有产消化酶功能的菌株, 发现菌株 V43

和 V44 分别具有最强产淀粉酶和脂肪酶的能力, 都具有开发利用的潜力。本研究从马蜂肠道细菌中筛选出 6 个具有产消化酶功能的菌株, 发现均能产蛋白酶, 而马蜂主要以鳞翅目幼虫为食<sup>[25]</sup>, 推测这种现象与马蜂的食性有关。



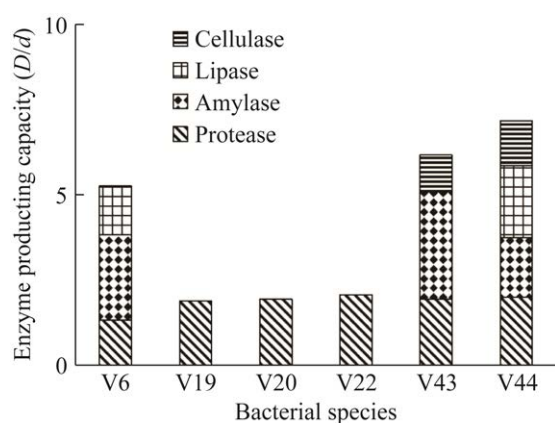


图5 马蜂肠道产消化酶菌株的产酶种类和能力分析  $D/d$  为降解圈直径  $D$  与菌落直径  $d$  的比值, 根据比值大小评估菌株的产酶能力

Figure 5 Analysis of enzyme producing species and capacity of digestive enzyme producing strains of *Vespa mandarinia* Smith.  $D/d$  is the ratio of the diameter of the degradation circle ( $D$ ) to the diameter of the colony ( $d$ ). According to the ratio, the ability of the strain to produce enzymes was evaluated.

本研究发现, 在马蜂肠道可培养菌的组成中, 芽孢杆菌属的细菌有 8 株, 其中有 4 株菌具有产消化酶的能力。芽孢杆菌属包括致病菌和非致病菌。从马蜂肠道分离出的蜡样芽孢杆菌是一种条件致病菌, 可引起食物中毒<sup>[26]</sup>; 而从马蜂肠道分离出的枯草芽孢杆菌是一种非致病菌, 对食物的消化吸收具有重要意义, 也是目前使用较多的益生菌<sup>[27]</sup>; 本研究获得该属的苏云金芽孢杆菌, 在害虫防治和农业生产等方面都发挥着重要的作用<sup>[28]</sup>。粪肠球菌可使人和动物体患上感染性疾病, 危害人类健康, 阻碍畜牧业的发展<sup>[29]</sup>。从马蜂肠道分离获得的 61 株菌中, 粪肠球菌有 43 株, 占比高达 70.5%, 其可能在马蜂肠道黏膜中具有比较强的耐受力 and 适应力, 对马蜂抵抗病原微生物具有较大的作用。在以后的研究中, 可以将粪肠球菌筛选出来进一步研究其作用, 为医学和食品工业提供更有

针对性的研究前提和基础。马蜂肠道中含有的表皮葡萄球菌、约氏不动杆菌和肠膜状明串珠菌, 它们都有不同程度的致病作用和极高的耐药率。其中不动杆菌属是引发疾病感染的常见细菌之一, 并且耐药率很高<sup>[30]</sup>。不动杆菌属的微生物广泛分布在日常生活环境中, 极易使人受到感染。因此, 对它们进行更深入地研究可为抵抗这些致病菌的医学研究提供研究思路和供试菌株。

本研究结果显示, 马蜂肠道菌中具有产消化酶功能的主要是肠球菌属和芽孢杆菌属的菌株。其中, 苏云金芽孢杆菌 V44 可产纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶与淀粉酶这 4 种消化酶, 综合产酶能力强且产脂肪酶能力最突出。在筛选出马蜂肠道具有产消化酶功能菌株的基础上, 可进一步对其肠道中苏云金芽孢杆菌进行其他功能挖掘, 为其在农林害虫防治领域的应用提供科学依据。

## REFERENCES

- [1] ZHENG H, STEELE MI, LEONARD SP, MOTTA EVS, MORAN NA. Honey bees as models for gut microbiota research[J]. Lab Animal, 2018, 47(11): 317-325.
- [2] ENGEL P, MORAN NA. The gut microbiota of insects: diversity in structure and function[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 699-735.
- [3] JING TZ, QI FH, WANG ZY. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision?[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 38.
- [4] KUCUK RA. Gut bacteria in the holometabola: a review of obligate and facultative symbionts[J]. Journal of Insect Science, 2020, 20(4): 22.
- [5] 吕文祥, 刘丽娟, 公茂庆. 昆虫肠道菌群的功能及检测方法研究进展[J]. 热带病与寄生虫学, 2021, 19(5): 284-287, 296.  
LÜ WX, LIU LJ, GONG MQ. Advances in functions and detection methods of insect intestinal microflora[J]. Journal of Tropical Diseases and Parasitology, 2021, 19(5): 284-287, 296 (in Chinese).
- [6] 刘语涵. 新疆家蚕肠道菌群多样性及肠球菌功能研

- 究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2022.
- LIU YH. Diversity of intestinal flora and functional study of *Enterococcus* in *Bombyx mori* from Xinjiang[D]. Ala'ar: Master's Thesis of Tarim University, 2022 (in Chinese).
- [7] DOUGLAS AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms[J]. Annual Review of Entomology, 2015, 60: 17-34.
- [8] 郭军, 吴杰, 邓先余, 林连兵, 刘珊, 李继莲. 昆虫肠道菌群的功能研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(6): 1345-1352.
- GUO J, WU J, DENG XY, LIN LB, LIU S, LI JL. Advances in research on insect gut microbiota and their functions[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2015, 52(6): 1345-1352 (in Chinese).
- [9] 相辉, 黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系[J]. 昆虫知识, 2008, 45(5): 687-693.
- XIANG H, HUANG YP. Symbiosis between gut microbiota and insects[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2008, 45(5): 687-693 (in Chinese).
- [10] 杨云秋, 张勇, 陈亦然, 张灿, 赵天宇, 龙雁华. 昆虫肠道细菌的功能和研究方法[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(3): 512-518.
- YANG YQ, ZHANG Y, CHEN YR, ZHANG C, ZHAO TY, LONG YH. Function and research methods of insect intestinal bacteria[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2018, 45(3): 512-518 (in Chinese).
- [11] LEE JH, LEE KA, LEE WJ. Microbiota, Gut Physiology, and Insect Immunity[C]//Advances in Insect Physiology. Amsterdam: Elsevier, 2017: 111-138.
- [12] 杨啸风, 任国栋. 陆马蜂 *Polistes rothneyi grahmi* Vecht 的筑巢行为与习性[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2001, 21(1): 80-84.
- YANG XF, REN GD. Behaviour and habit of building nest of *Polistes rothneyi grahmi* Vecht[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2001, 21(1): 80-84 (in Chinese).
- [13] 王兴旺, 李涛, 卓志航, 邓忠彬, 杨伟, 杨春平. 浅析胡蜂的资源价值及危害[J]. 四川林业科技, 2015, 36(2): 42-47.
- WANG XW, LI T, ZHUO ZH, DENG ZB, YANG W, YANG CP. Analysis of resource value and harm of wasps[J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2015, 36(2): 42-47 (in Chinese).
- [14] 倪连丽. 胡蜂毒对类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞的影响及其机制初探[D]. 大理: 大理大学硕士学位论文, 2020.
- NI LL. The effects and mechanisms of wasp venom on rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[D]. Dali: Master's Thesis of Dali University, 2020 (in Chinese).
- [15] 黄振东, 万晴, 薛志静, 张瑞玲, 张忠. 德国小蠊肠道可培养非厌氧细菌的分离、鉴定与产消化酶活性分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(4): 409-413.
- HUNAG ZD, WAN Q, XUE ZJ, ZHANG RL, ZHANG Z. Isolation and identification of culturable aerobic bacteria from the intestines of *Blattella germanica* and the activity of digestive enzymes produced by these bacteria[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2019, 30(4): 409-413 (in Chinese).
- [16] 白燕, 王维新. 刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶与纤维素酶活性的测定方法[J]. 饲料工业, 2012, 33(20): 28-32.
- BAI Y, WANG WX. Determination of protease, amylase, lipase and cellulase activities in intestinal tract of *Stichopus japonicus*[J]. Feed Industry, 2012, 33(20): 28-32 (in Chinese).
- [17] 余琼, 梁运祥. 产低温脂肪酶假单胞菌的选育及产酶条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(5): 662-665.
- YU Q, LIANG YX. Isolation of *Pseudomonas* strain producing low-temperature lipase and optimization of the lipase producing conditions[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2006, 45(5): 662-665 (in Chinese).
- [18] 李乐, 李明星, 汤国雄, 薛冰, 李星, 刘洋, 邱忠平. 一株纤维素酶产生菌的筛选与产酶特性研究[J]. 环境科技, 2019, 32(1): 24-29.
- LI L, LI MX, TANG GX, XUE B, LI X, LIU Y, QIU ZP. Optimization of enzyme production conditions for a cellulase-producing strain[J]. Environmental Science and Technology, 2019, 32(1): 24-29 (in Chinese).
- [19] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [20] 单体江, 段志豪, 吴春银, 李志强, 王松, 毛子翎. 杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物及其生物活性[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(1): 170-179.
- SHAN TJ, DUAN ZH, WU CY, LI ZQ, WANG S, MAO ZL. Secondary metabolites of symbiotic fungi isolated from *Blattella dubia* and their biological activities[J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(1): 170-179 (in Chinese).
- [21] 吴晓露, 夏晓峰, 陈俊晖, GURR GM, 尤民生. 取食不同食物对小菜蛾幼虫肠道细菌多样性的影响[J].

- 昆虫学报, 2019, 62(10): 1172-1185.
- WU XL, XIA XF, CHEN JH, GURR GM, YOU MS. Effects of different diets on the diversity of larval gut bacteria of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2019, 62(10): 1172-1185 (in Chinese).
- [22] RAYMANN K, SHAFFER Z, MORAN NA. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees[J]. PLoS Biology, 2017, 15(3): e2001861.
- [23] de ALMEIDA LG, ALBERTO BERALDO de MORAES L, TRIGO JR, OMOTO C, CÔNSOLI FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174754.
- [24] 胡紫媛, 夏婧. 昆虫肠道菌群组学研究及功能和应用进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(1): 102-112.
- HU ZY, XIA Q. Advances in the histology study, function and application of insect intestinal flora[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(1): 102-112 (in Chinese).
- [25] 李俊兰, 方海涛. 我国胡蜂的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11426-11427, 11430.
- LI JL, FANG HT. Research progress of *Vespidae* in China[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(26): 11426-11427, 11430 (in Chinese).
- [26] 黄晶菁, 罗静, 何宏轩. 蜡样芽孢杆菌检测方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 635-642.
- HUANG JJ, LUO J, HE HX. Research progress on detection methods for *Bacillus cereus*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(3): 635-642 (in Chinese).
- [27] 朱瑾, 朱红军. 枯草芽孢杆菌的作用机制及其在动物生产中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2019(8): 47-51.
- ZHU J, ZHU HJ. Mechanism of *Bacillus subtilis* and its application in animal production[J]. Cereal & Feed Industry, 2019(8): 47-51 (in Chinese).
- [28] 付成林. 贵州地区苏云金芽孢杆菌杀虫新基因的挖掘与功能验证[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2018.
- FU CL. Excavation and functional verification of new insecticidal genes from *Bacillus thuringiensis* in Guizhou area[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [29] 张恩宝. 浙江省猪源粪肠球菌耐药性及 *optrA* 传播机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2022.
- ZHANG EB. Study on the antibiotic resistance and transmission mechanism of *optrA* resistance gene of *Enterococcus faecalis* from swine in Zhejiang Province[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2022 (in Chinese).
- [30] 翟盼盼, 吴宇骞, 陆坚. 不动杆菌属分类的研究进展[J]. 新发传染病电子杂志, 2020, 5(1): 51-55, 59.
- ZHAI PP, WU YQ, LU J. Progress of study on *Acinetobacter* classification[J]. Electronic Journal of Emerging Infectious Diseases, 2020, 5(1): 51-55, 59 (in Chinese).