

研究报告

斑须蝽肠道菌的分离鉴定及产纤维素酶菌株的筛选与酶活力测定

王琪¹, 陈芳敏^{*1,2}, 陈广青¹, 夏琬婷^{1,2}, 刘宁¹, 游博¹, 朱海¹¹ 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 110044² 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

王琪, 陈芳敏, 陈广青, 夏琬婷, 刘宁, 游博, 朱海. 斑须蝽肠道菌的分离鉴定及产纤维素酶菌株的筛选与酶活力测定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3497-3509.

WANG Qi, CHEN Fangmin, CHEN Guangqing, XIA Wanting, LIU Ning, YOU Bo, ZHU Hai. Screening and enzyme activity determination of cellulase-producing strains from the gut bacteria of *Dolycoris baccarum* L.[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3497-3509.

摘要:【背景】斑须蝽(*Dolycoris baccarum* L.)是危害高粱、玉米、大豆等多种作物及果树的植食性害虫,其肠道菌的研究对斑须蝽的防治和肠道功能菌资源的挖掘都十分必要。【目的】了解斑须蝽成虫肠道可培养细菌的组成,筛选出产纤维素酶功能菌株,并检测其酶活性,对部分菌株的产酶条件进行初步探究。【方法】采用传统细菌分离培养法获得斑须蝽肠道菌,结合形态学以及 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定;水解圈法筛选纤维素降解菌,利用 3,5-二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)法测定菌株产纤维素酶活力。【结果】从斑须蝽肠道中共分离出 35 株菌,可归为 5 属 10 种,其中肠球菌属(*Enterococcus*) 3 种,芽孢杆菌属(*Bacillus*) 4 种,乳球菌属(*Lactococcus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)与泛菌属(*Pantoea*)各 1 种。筛选出 13 株具有产纤维素酶功能的菌株,菌株 B8、B22、B23 和 B25 产纤维素酶能力较强,其中沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*) B22 的产酶能力最为突出($D/d=7.01$)。酶活力测定结果显示,在实验设定的梯度范围内,发酵培养基 pH 为 5.0,菌株 B8、B23 和 B25 培养 24 h、菌株 B22 培养 36 h 时产酶活力最强。【结论】斑须蝽肠道可培养菌资源丰富,分离获得的肠道菌中具有产纤维素酶功能的菌株高达 37%,可协助食物消化影响宿主健康。发酵时间与发酵培养基 pH 均影响功能菌株的产纤维素酶活性,菌株 B22 具有较强的产酶能力可进一步开发利用。

关键词: 斑须蝽; 肠道菌分离鉴定; 产纤维素酶功能菌; 纤维素酶活性

资助项目: 国家自然科学基金(42177406); 辽宁省自然科学基金(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: 2023-12-17; Accepted: 2024-02-14; Published online: 2024-04-16

Screening and enzyme activity determination of cellulase-producing strains from the gut bacteria of *Dolycoris baccarum* L.

WANG Qi¹, CHEN Fangmin^{*1,2}, CHEN Guangqing¹, XIA Wanting^{1,2}, LIU Ning¹, YOU Bo¹, ZHU Hai¹

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

² Key Laboratory of Eco-restoration of Regional Contaminated Environment, Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: [Background] *Dolycoris baccarum* L. is a herbivorous pest that harms sorghum, maize, soybean and other crops and fruit plants. Studying its gut bacteria is essential for the control of *D. baccarum* L. and the exploration of functional bacterial resources from the gut. [Objective] This study aims to gain insights into the culturable bacteria in the gut of *D. baccarum* L. and screen out cellulase-producing strains. The cellulase activities of the strains screened out were determined. The enzyme production conditions of several strains were explored. [Methods] The gut bacteria of *D. baccarum* L. were isolated by the culture method and identified by morphological observation and 16S rRNA gene sequencing. The inhibition zone method was employed to screen out the strains capable of producing cellulase. The cellulase activities of the strains were determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. [Results] A total of 35 strains were isolated from the gut of *D. baccarum* L., they are 10 species of bacteria belonging to 5 genera, including 3 species of *Enterococcus*, 4 species of *Bacillus*, and 1 species of *Lactococcus*, *Serratia*, and *Pantoea*, respectively. A total of 13 strains capable of producing cellulase were screened out. Strains B8, B22, B23, and B25 had strong cellulase-producing capacity, among which B22 had the most prominent cellulase-producing ability ($D/d=7.01$). The cellulase-producing capacity was the strongest in the medium with pH 5.0, culture with B8, B23, and B25 for 24 h, or culture with B22 for 36 h. [Conclusion] The gut of *D. baccarum* L. harbors rich culturable bacteria and 37% of the isolates can produce cellulose, which can assist in food digestion and influence the host health. Both fermentation time and medium pH influence the cellulase production of functional strains. Strain B22 with strong cellulase-producing ability should be further developed and utilized.

Keywords: *Dolycoris baccarum* L.; isolation and identification of gut bacteria; cellulase-producing bacteria; cellulase activity

昆虫是生物界中种类最丰富、数量最大且分布最广泛的动物群体，在农业生产及人类健康方面具有重大影响^[1]。昆虫消化道内的所有微生物统称为昆虫肠道菌群，关于昆虫肠道菌

研究在医学和农业生产等领域的经济开发中都具有重要意义^[2]。肠道菌主要通过参与促进宿主的必要营养代谢、分解中和毒素、提高免疫力、抵御病原体及抵抗不良环境和调节宿主激

素信号来影响宿主的生长发育^[3]。Jing 等对木虱和象鼻虫的肠腔和肛门液滴菌群进行质谱检测以及蛋白质组学分析, 研究发现肠道细菌最主要作用是对宿主必要的营养供应, 其次是消化和解毒^[4]。有些昆虫无法依靠自身高效吸收消化所摄入的食物, 营养受限环境对昆虫的生理活动影响显著^[5]。昆虫肠道菌可帮助宿主分解利用食物, 为宿主昆虫提供维生素、辅酶、消化酶、氮源及氨基酸等^[6]。如具有纤维素降解功能的肠道菌在昆虫肠道内可产纤维素酶, 协助宿主分解消化摄入体内的植物叶片、茎秆及表皮等具有高纤维素的食物, 从而促进宿主对食物的吸收^[7]。Wang 等^[8]研究 3 种蝗虫的肠道菌发现变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)最常见, 但不同种类蝗虫肠道菌群结构存在差异, 对纤维素的消化率也各异。黄婉秋等^[9]在白星花金龟幼虫的肠道中筛选出一株纤维素降解能力较强的纤维单胞菌(*Cellulomonas fimi*), 何雨薇等^[10]与夏琬婷等^[11]分别在马蜂和杜比亚蟑螂肠道中筛选出 6 株和 10 株具有产消化酶的功能菌。

斑须蝽(*Dolycoris baccarum* L.)属半翅目(*Hemiptera:Heteroptera*)蝽科(*Pentatomidae*)刺吸式口器植食性农业害虫, 寄主广泛, 可侵害多种田间作物如大豆、小麦、烟草及果树苗木, 在农业和林业方面造成一定程度的经济损失^[12]。斑须蝽作为农林业害虫, 国内外学者的研究主要集中在其生理生态方面^[13]。20 世纪 80 年代, 我国学者开始对斑须蝽的卵、若虫和成虫从形态特征、生物学特性、地理分布、寄主、危害及防治措施等方面进行了详细的研究报道^[14]。近些年对斑须蝽的研究逐步进入分子水平。Zhang 等^[15]对甘肃省和青海省的斑须蝽种群进行线粒体基因组学分析, 发现不同省份斑须蝽种群在基因组序列和表达水平上存在差异, 并且线粒

体基因组序列大小与表达模式在种群之间发生了显著改变, 表明对不同地区海拔的适应性与其线粒体基因组有相关性。目前, 斑须蝽有人工、化学及生物这 3 种防治方法, 其中生物防治技术可利用靶向清除昆虫体内必需的微生物群从而达到净化害虫种群的目的, 具有安全、无污染的特点, 是克服农作物发生虫害、减少化学农药使用的重要途径之一^[16]。斑须蝽肠道作为体内微生物类群最密集的部位, 其肠道的菌群结构及肠道菌功能还有待研究。斑须蝽肠道微生物的研究有助于了解其肠道微生物与昆虫的关系, 揭示肠道可培养菌的种类及其系统发育地位, 有助于功能菌株的筛选, 同时为生物防治斑须蝽带来的农业灾害提供新思路。

本研究采用传统的分离纯化方法从斑须蝽成虫肠道分离菌株, 筛选产纤维素酶功能的菌株并进行产酶活力的测定, 以期对斑须蝽的绿色防治及肠道菌资源的开发与利用提供科学依据与研究材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

于辽宁省沈阳市大溪地获取 30 只斑须蝽成虫, 并依据《沈阳昆虫原色图鉴》^[17]进行鉴定。将供试昆虫禁食 24 h, 使其排空体内食物及粪便, 存于-80 °C冰箱备用。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 2×*Taq* Plus Master Mix, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 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; 酶标仪, Tecan 公司。

1.1.3 培养基

乳酸细菌培养基德曼-罗戈萨-夏普(de Man,

Rogosa and Sharpe, MRS)培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth, TSB)和胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;1/3 TSA 培养基(g/L):TSB 10.0,琼脂 15.0;羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose Na, CMC-Na)培养基与发酵培养基参照文献[18]配制。

1.2 斑须蝽肠道样品的制备

解剖前对斑须蝽进行表面消毒,浸泡于75%酒精中,3 000 r/min 涡旋 5 min,连续操作5–10次。消毒后对其进行无菌水漂洗,涡旋3 min,连续操作5次,并取第5次漂洗液200 μ L涂布在TSA培养基上作为对照。将斑须蝽解剖,无菌操作取出完整肠道放入装有1.5 mL 0.85%氯化钠溶液的匀浆棒中。匀浆完成后将匀浆液移入2 mL EP管中,用0.5 mL生理盐水清洗匀浆棒,将2 mL样品存于–80 °C冰箱备用。解剖和匀浆处理所用器皿和溶液均灭菌处理。

1.3 肠道菌的分离及形态学鉴定

取100 μ L肠道匀浆样品进行浓度梯度稀释(10^{-2} – 10^{-7}),每个浓度分别取200 μ L稀释液均匀涂布到对应的1/3 TSA培养基和MRS培养基上,于37 °C恒温培养箱倒置培养24–48 h后进行观察,每个浓度样品做3个平行。取0.5 mL样品85 °C金属浴加热15 min,取100 μ L重复前面的操作。挑取菌落形态特征各异的单菌落利用平板划线分离法进一步纯化。经过至少3次纯化获得纯培养物,并通过革兰氏染色镜检结合形态学特征对菌株进行初步鉴定。将初步鉴定的菌株进行编号,并用甘油悬液保藏法保存菌种于–80 °C超低温冰箱备用。

1.4 菌株16S rRNA基因的鉴定

将肠道分离菌株接种到TSB培养基中,37 °C、150 r/min富集培养至 OD_{600} 约为0.5。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取分离菌

株的总DNA。选用细菌16S rRNA基因通用引物27F (5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')^[15]对菌株进行PCR扩增。PCR反应体系(50 μ L):2 \times Taq Plus Master Mix 25 μ L,引物27F (100 μ mol/L) 2 μ L,引物1492R (100 μ mol/L) 2 μ L, DNA模板3 μ L, ddH₂O 18 μ L。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左右的合格样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行切胶纯化及双向测序。

对测序结果进行序列拼接及人工校对检查后,将所得序列信息提交至NCBI,采用BLAST在线服务器(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在GenBank数据库中对未知菌种基因序列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^[19]。使用MEGA 11.0软件中Kimura 2-parameter model模型计算进化距离,选用最大似然法(maximum likelihood method)构建系统发育树,设置重复1 000次重排序列位点建树计算自展值(bootstrap)来检验发育树分支的置信度。

1.5 纤维素降解菌的筛选

利用CMC-Na培养基将斑须蝽肠道中分离所得的肠道菌进行筛选,获得具有产纤维素酶的菌株。采用点接法将供试菌株接种到CMC-Na培养基平板的三分点位置,在37 °C恒温培养箱中倒置培养24–48 h。用1%的刚果红染色30 min,随后用5%氯化钠溶液脱色30 min,用电子游标卡尺分别测量水解圈直径(D)和菌落直径(d),计算两者的比值(D/d),根据其比值大小判断菌株产纤维素酶能力的强弱。

1.6 产纤维素酶的单因素试验

采用 3,5-二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)法^[20]测定酶活来探究菌株产酶活力最佳的发酵时间与发酵培养基 pH。在接种量为 1%、发酵培养基起始 pH 7.0 及培养 24 h 的基础条件下, 设定单因素条件梯度, 发酵时间为 4、8、16、24、36 和 48 h, 发酵培养基 pH 5.0–9.0。基于功能筛选结果的定性和定量分析, 挑取纤维素降解功能较强的代表菌株进行不同因素下酶活性的测定。将斑须蝽肠道分离菌接种于 TSB 培养基 37 °C、170 r/min 振荡过夜, 制备菌液。取菌液接种于发酵培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。将发酵液 6 000 r/min 离心 10 min, 取 150 μ L 上清液作为粗酶液, 加入 150 μ L 1% 羧甲基纤维素钠 45 °C 水浴 10 min, 最后加入 300 μ L DNS 100 °C 水浴 10 min 充分反应, 利用酶标仪测定粗酶液在波长 520 nm 处的 OD 值。所测吸光值为 x , 代入葡萄糖标准曲线中 $y=2.478\ 6x-0.078\ 6$, $R^2=0.997\ 4$, 分别计算 4 株肠道菌的纤维素酶活力并进行差异分析, 每组设置 3 个重复, 并以 100 °C 金属浴高温灭活的粗酶液为空白对照。酶活力定义: 在一定的条件下, 每 1 mL 粗酶液在 1 min 内催化底物生成 1 μ mol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位(U/mL)^[21-22]。

1.7 数据分析

采用 GraphPad prime 9.0 软件的 One-way ANOVA 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 斑须蝽肠道菌的分离与形态学鉴定结果

采用可培养方法从斑须蝽成虫肠道样品中共分离获得 35 株可培养肠道菌株, 编号为 B1–B35。其中 1/3 TSA 培养基分离出 29 个菌株,

有 5 个菌株来自加热处理样品, MRS 培养基分离出 6 个菌株, 均来自不加热样品。革兰氏染色镜检细胞形态观察结果发现主要为球菌和杆菌, 其中 5 株为革兰氏阴性菌, 分别为菌株 B5、B8、B16、B23 和 B25, 其余 30 株皆为革兰氏阳性菌。结合菌落的形态特征并查阅 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608> 进行初步鉴定。部分斑须蝽肠道菌的菌落形态和革兰氏染色结果如图 1 所示。

2.2 菌株 16S rRNA 基因鉴定结果

将菌株 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库, 序列登录号为 QQ103358–QQ103391。基于菌株形态学特征和革兰氏染色镜检的初步鉴定结果, 并通过 BLAST 与 GenBank 中已知 16S rRNA 基因序列比对分析对菌株进行鉴定。结果显示斑须蝽肠道菌可归为 2 门 5 属 10 种。如表 1 所示, 从斑须蝽肠道分离出的 35 株菌, 均为厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*), 其中厚壁菌门占比高达 85.7%。在属的分类地位上, 主要为肠球菌属(*Enterococcus*), 芽孢杆菌属(*Bacillus*)和沙雷氏菌属(*Serratia*), 分别为 17 株、11 株和 4 株。

结合菌株形态学鉴定结果, 选取 10 个代表菌株和模式菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 如图 2 所示, 它们可归为 5 属 10 种。其中, 菌株 B1、B3 和 B20 为肠球菌属(*Enterococcus*); 菌株 B29 为乳球菌属(*Lactococcus*); 菌株 B2、B15、B22 和 B28 为芽孢杆菌属(*Bacillus*); 菌株 B25 为沙雷氏菌属(*Serratia*); 菌株 B8 为泛菌属(*Pantoea*)。

2.3 产纤维素酶功能菌株的筛选

在 35 个分离菌株中共筛选出 13 株具有产纤维素酶功能的菌株, 分别是蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) B6、B13、B15、B19 和 B26,

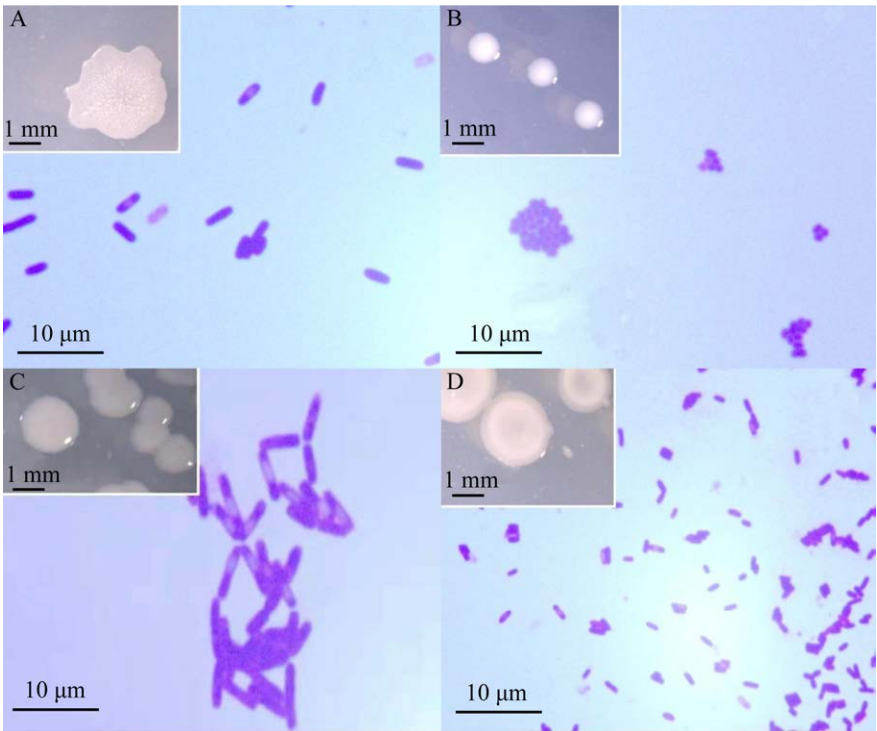


图 1 斑须蝽肠道代表菌株的菌落形态和革兰氏染色结果 左上角窗口为菌落形态图. A: 菌株 B2, 革兰氏阳性, 芽孢杆菌属. B: 菌株 B4, 革兰氏阳性, 肠球菌属. C: 菌株 B6, 革兰氏阳性, 芽孢杆菌属. D: 菌株 B28, 革兰氏阳性, 芽孢杆菌属

Figure 1 Colony morphology and Gram staining results of representative strains of gut bacteria of *Dolycoris baccarum* L. The upper left windows of A–D are the pictures of colony morphology. A: Strain B2, Gram-positive, *Bacillus*. B: Strain B4, Gram-positive, *Enterococcus*. C: Strain B6, Gram-positive, *Bacillus*. D: Strain B28, Gram-positive, *Bacillus*.

表 1 斑须蝽肠道菌分离鉴定结果

Table 1 Isolation and identification results of bacteria from the gut of *Dolycoris baccarum* L.

细菌门类	细菌属类	细菌种类	菌株编号
Bacterial phylum	Bacterial genera	Bacterial species	Strain No.
厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	肠球菌属	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	B1, B12, B17, B24
		屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	B3, B4, B7, B9, B14, B18, B27, B30, B31, B32, B33, B35
		小肠肠球菌 <i>Enterococcus hirae</i>	B20
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	B2, B11, B19
		蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	B6, B13, B15, B21, B26, B10
		沙福芽孢杆菌 <i>Bacillus safensis</i>	B22
		短芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	B28
		乳酸球菌 <i>Lactococcus lactis</i>	B29, B34
	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>		
	沙雷氏菌属	居泉沙雷氏菌 <i>Serratia fonticola</i>	B5, B16, B23, B25
变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	<i>Serratia</i>		
	泛菌属 <i>Pantoea</i>	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>	B8

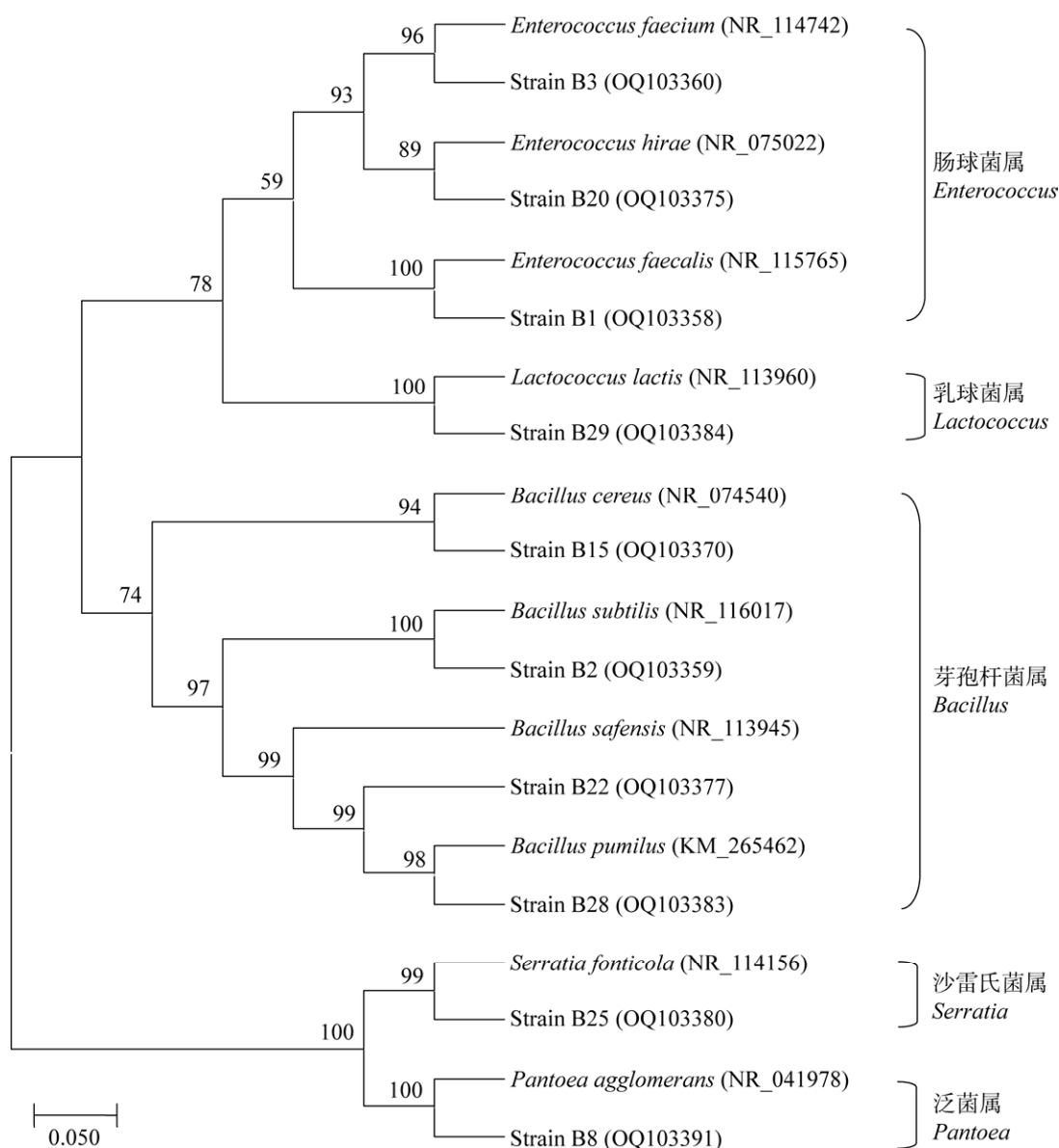


图2 基于斑须蝽肠道菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内编号为序列的 GenBank 登录号；节点处数字为自展值，代表进化树分支的可信度的百分比；标尺代表 5% 的序列分歧

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of gut bacteria of *Dolycoris baccarum* L. Numbers in brackets are GenBank login numbers of sequences; Numbers at nodes are bootstrap values, which represent the percentage of credibility of evolutionary tree branches; The scale represents 5% sequence divergence.

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B2、B11，沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*) B22，居泉沙雷氏菌(*Serratia fonticola*) B5、B16、B23、B25 和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) B8。图 3 为产纤维

素酶代表菌株的筛选结果。

从斑须蝽肠道菌筛选出的 13 株产纤维素酶功能菌株的产酶能力各异。如图 4 所示，其中有 4 株产纤维素酶能力较强，分别是菌株 B8、



图3 产纤维素酶代表菌株的筛选结果 A: 菌株 B2. B: 菌株 B11. C: 菌株 B15. D: 菌株 B22

Figure 3 Screening results of representative strains producing cellulase. A: Strain B2. B: Strain B11. C: Strain B15. D: Strain B22.

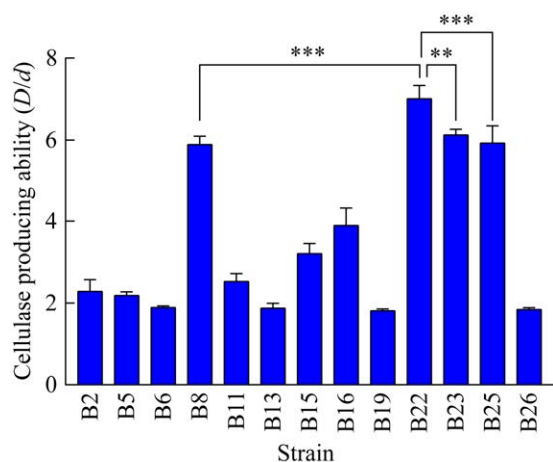


图4 斑须蝽肠道产纤维素酶菌株及其产酶能力分析

Figure 4 Analysis of cellulase-producing capacity of isolates from the gut of *Dolycoris baccarum* L. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

B22、B23 和 B25。其中，菌株 B22 的产纤维素酶能力最强，与其余 3 株差异显著， D/d 值高达 7.01。

2.4 单因素对产纤维素酶能力的影响

2.4.1 发酵时间对产纤维素酶的影响

发酵时间是产酶菌株发酵必要条件之一，可直接影响其产酶能力。在发酵时间分别为 4、8、16、24、36 和 48 h 时，菌株 B8、B22、B23、B25 的产酶能力如图 5 所示。

由图 5 可见，4 株肠道菌在 6 个发酵时间梯度下均有先上升后下降的趋势。在 4–16 h 时产纤维素酶能力均稳步上升，在 24 h 时，菌株 B8 产酶活力为 8.56 U/mL，菌株 B23、B25 和 B22 的产酶活力分别为 9.06 U/mL、8.95 U/mL 和 10.62 U/mL。在 36 h 时，菌株 B8、B23 及 B25 产纤维素酶能力下降，菌株 B22 产酶能力最强，酶活力达到 15.49 U/mL。在 48 h 时，4 株肠道菌的产酶能力均呈现下降趋势。菌株 B8、B23 及 B25 的最适产酶时间为 24 h，菌株 B22 的最适产酶时间为 36 h，并且菌株 B22 产纤维素酶能力最强。单因素方差分析及最小显著差

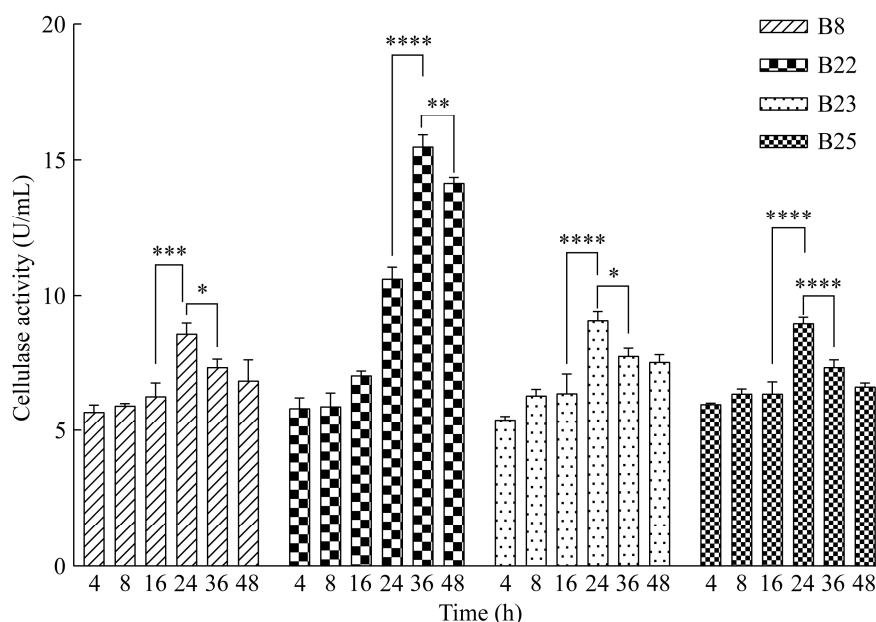


图 5 发酵时间对菌株产纤维素酶能力的影响

Figure 5 The effects of fermentation time on the cellulase production ability of strains. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

异法多重比较结果显示, 4 株产纤维素酶菌株在不同发酵时间条件下的酶活力差异性显著。

2.4.2 发酵培养基 pH 对产纤维素酶的影响

采用 DNS 法测定菌株产纤维素酶能力, 设置初始发酵培养基 pH 值为 5.0–9.0, 培养 24 h。在不同 pH 值条件下菌株 B8、B22、B23 和 B25 产纤维素酶能力如图 6 所示。

由图 6 可见, 4 株肠道菌的产纤维素酶能力受 pH 影响。在 pH 5.0 时, 产酶能力均为最高值, 其中 B22 的产纤维素酶活力最大, 达到了 15.23 U/mL。菌株 B8、B23 和 B25 的产纤维素酶活力分别为 9.23、8.25 和 8.67 U/mL。结果显示, 本研究检测的 4 个肠道菌株均在 pH 5.0 的酸性环境下产纤维素酶能力更强。单因素方差分析及最小显著差异法多重比较结果显示, 4 株产纤维素酶菌株在发酵培养基 pH 不同的条件下酶活力差异性显著。

综上所述, 发酵时间和发酵培养基的初始

pH 都是影响菌株产纤维素酶能力的重要因素。结果显示, 在发酵培养基初始 pH 5.0 的条件下, 菌株 B8、B23 和 B25 培养 24 h 时, 菌株 B22 培养 36 h 时产酶能力最强。其中, 沙福芽孢杆菌 B22 产酶能力最强。影响产纤维素酶功能菌株产酶能力的最关键因素及最佳发酵条件还有待进一步探究。

3 讨论与结论

肠道微生物对昆虫的生命活动和生理代谢具有重要意义, 可与宿主协同进化, 参与宿主消化代谢, 提供维生素、消化酶、必需氨基酸等^[23-25]。昆虫肠道菌群处于一个动态平衡, 菌群结构受宿主自身的食性特点、肠道结构和内环境、个体差异及外界环境等因素影响, 有研究发现昆虫肠道菌群中变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为主要优势菌门^[26-29]。直翅目的花胫绿纹蝗(*Aiolopus tamulus*)、半翅目的

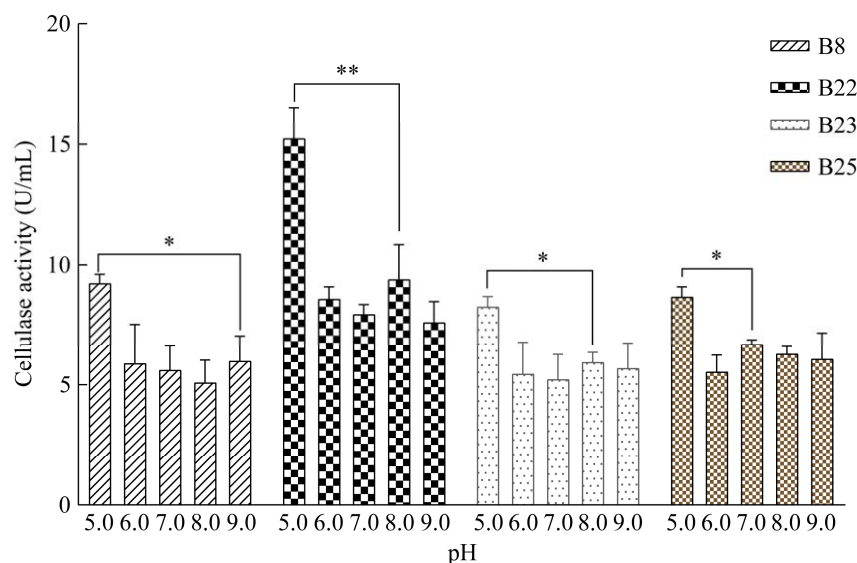


图6 发酵培养基 pH 对菌株产纤维素酶能力的影响

Figure 6 The effects of fermentation medium pH on the cellulase production ability of strains. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*), 以及鳞翅目的家蚕(*Bombyx mori*)和草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)等昆虫肠道菌中, 变形菌门与厚壁菌门均为高丰度的优势菌群^[30-32]。这与本研究发现的斑须蝽肠道菌群结构相似, 从斑须蝽肠道分离出的 35 株菌均为厚壁菌门和变形菌门, 其中厚壁菌门占比 85.7%。肠球菌可长期寄生在动植物、食品以及水等环境中, 其毒性较低, 可躲避宿主的非特异性免疫防御系统而在宿主体内定殖, 是昆虫肠道分离菌中占比最高的菌属, 其中粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)最为突出^[33]。粪肠球菌是肠道内的正常菌群, 但一部分为条件致病菌, 可在人与动物之间水平传播^[34-35]。本研究结果也发现肠球菌属(*Enterococcus*)为斑须蝽肠道菌的主要类群。有研究报道, 昆虫肠道菌中的沙雷氏菌具有产生多种消化酶的能力, 能够帮助宿主消化吸收多种大分子营养物质^[10-11]。本研究分离的居泉沙雷氏菌隶属于沙雷氏菌属, 是一种条件致病菌, 在与宿主的共生关系中, 沙雷氏菌属的致病种类和致病阈值

得深入研究。

肠道微生物协助宿主昆虫消化食物, 在植食性昆虫中表现尤为突出^[36], 本研究从斑须蝽肠道分离出的 35 个菌株中共筛出 13 株产纤维素酶菌株, 占比高达 37.1%。这些功能菌株一方面发挥营养供给和物质代谢的功能, 帮助斑须蝽降解摄入体内的纤维素生成必要的营养物质^[37]; 另一方面肠道共生菌可参与并协同昆虫行为调节, 刺吸式口器昆虫肠道菌会合成分泌纤维素酶等水解酶化学物质, 间接抑制寄主植物的生长发育, 导致作物的产量降低与质量下降, 从而危害农作物^[38]。芽孢杆菌是产纤维素酶的常见菌属, 广泛存在于环境和昆虫肠道中, 王渭霞等^[39]实验证明共生芽孢杆菌可提高褐飞虱存活率, 所以共生芽孢杆菌可能对刺吸式口器昆虫具有保护作用。从斑须蝽肠道分离出的 13 个产纤维素酶菌株中, 有 8 株是芽孢杆菌, 其中沙福芽孢杆菌 B22 的产纤维素酶能力最为突出。大多数细菌生长最适 pH 值为 6.0–7.0, 而大部分鳞翅目与双翅目昆虫中肠 pH 值为 8.0–10.0,

一些双翅目幼虫中肠 pH 只有 3.0, 这可能导致不同种类昆虫主要肠道菌种类以及最适生长条件不同^[40-41]。本研究结果显示, 在其他培养条件一致时, 培养基初始 pH 为 5.0, 或发酵时间为 36 h 的条件下菌株 B22 产酶活力最强, 均可大于 15 U/mL。李宏伟等发现弱碱性环境下草地贪夜蛾幼虫肠道菌产纤维素酶活力更强^[42], 本研究发现弱酸性环境下斑须蝽成虫肠道菌的产纤维素酶活力更强, 这可能与不同种类宿主肠道环境条件不同有关。

本研究首次对斑须蝽肠道菌进行体外分离鉴定, 筛选出具有产纤维素酶功能的菌株, 并对其产纤维素酶活力进行定性和定量分析, 还对产酶活性的影响因素进行了初步探索。丰富了昆虫肠道菌资源库, 可为通过调控肠道功能菌对害虫进行绿色防治提供新思路。此外, 肠道产纤维素酶功能菌作为植食性动物消化食物的益生菌可进一步开发与利用, 为饲料生产、食品加工、环境修复等行业提供性能优良的产纤维素酶菌株资源。

REFERENCES

- [1] 王渭霞, 朱廷恒, 赖凤香. 昆虫共生微生物及其功能研究进展[J]. 昆虫学报, 2021, 64(1): 121-140.
WANG WX, ZHU TH, LAI FX. Research advances in symbiotic microorganisms in insects and their functions[J]. Acta Entomologica Sinica, 2021, 64(1): 121-140 (in Chinese).
- [2] SHAKEEL M, MUHAMMAD A, LI SZ, DE MANDAL S, XU XX, JIN FL. Insect microbiota and host immunity: an emerging target for pest control[M]//New and Future Development in Biopesticide Research: Biotechnological Exploration. Singapore: Springer, 2022: 261-280.
- [3] ZHANG XC, ZHANG F, LU XM. Diversity and functional roles of the gut microbiota in lepidopteran insects[J]. Microorganisms, 2022, 10(6): 1234.
- [4] 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.
- [5] SKIDMORE IH, HANSEN AK. The evolutionary development of plant-feeding insects and their nutritional endosymbionts[J]. Insect Science, 2017, 24(6): 910-928.
- [6] 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).
- [7] 曾文婷, 覃绍敏, 吴健敏, 梁小莉, 白安斌, 刘金凤, 陈凤莲, 秦树英, 马玲. 竹鼠肠道纤维素降解菌的分离鉴定及其产酶特性研究[J]. 动物营养学报, 2021, 33(7): 4142-4152.
ZENG WT, TAN SM, WU JM, LIANG XL, BAI AB, LIU JF, CHEN FL, QIN SY, MA L. Isolation, identification and enzyme production characteristics of cellulolytic bacterium from intestine of bamboo rats[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(7): 4142-4152 (in Chinese).
- [8] WANG JM, BAI J, ZHENG FY, LING Y, LI X, WANG J, ZHI YC, LI XJ. Diversity of the gut microbiome in three grasshopper species using 16S rRNA and determination of cellulose digestibility[J]. PeerJ, 2020, 8: e10194.
- [9] 黄婉秋, 石冬冬, 蔡红英, 于大力, 孟昆, 杨培龙. 白星花金龟幼虫肠道中纤维素降解菌的筛选及其全基因组分析[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 51-58.
HUANG WQ, SHI DD, CAI HY, YU DL, MENG K, YANG PL. Identification and genome analysis of a cellulose degrading strain from the intestinal tract of *Protaetia brevitarsis* larva[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(6): 51-58 (in Chinese).
- [10] 何雨薇, 陈芳敏, 夏婉婷, 刘嫻, 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 YW, CHEN FM, XIA WT, LIU X, HUANG CC. 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 (in Chinese).
- [11] 夏婉婷, 陈芳敏, 何雨薇, 袁霞, 刘洛源. 杜比亚蟑螂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, 2022, 49(12): 4999-5008.
XIA WT, CHEN FM, HE YW, YUAN X, LIU MY. Isolation and identification of gut bacteria from *Blattella dubia* and screening of digestive enzyme-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 4999-5008 (in Chinese).
- [12] 萨初如拉, 巴都木才茨克, 田睿林, 侯占铭, 王振兴. 花生、大豆及胡萝卜对斑须蝽生长发育和成虫成活率的影响[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(6): 1337-1340.

- Sachurula, Badumucaicike, TIAN RL, HOU ZM, WANG ZX. Effects of peanut, soybean and carrot as feed on development and adult survival of *Dolycoris baccarum*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2022, 44(6): 1337-1340 (in Chinese).
- [13] 赵亮, 刘燕茹. 斑须蝽防治效果试验[J]. 现代农村科技, 2022(9): 76.
- ZHAO L, LIU YR. Experiment on control effect of stinkbug with spotted beard[J]. Modern Rural Science and Technology, 2022(9): 76 (in Chinese).
- [14] 刘华. 玉米田二星蝽和斑须蝽的发生及防治[J]. 现代农村科技, 2020(2): 45.
- LIU H. Occurrence and control of two-star stinkbug and spotted stinkbug in corn field[J]. Modern Rural Science and Technology, 2020(2): 45 (in Chinese).
- [15] ZHANG QL, YANG XZ, ZHANG L, FENG RQ, ZHU QH, CHEN JY, YUAN ML. Adaptive evidence of mitochondrial genomes in *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae) to divergent altitude environments[J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2019, 30(1): 9-15.
- [16] 张娜, 赵曼, 王关红. 昆虫共生微生物在病虫害防治的研究进展[J]. 植物保护学报, 2022, 49(1): 220-230.
- ZHANG N, ZHAO M, WANG GH. Research progress on microbial symbionts against pest and disease[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(1): 220-230 (in Chinese).
- [17] 张治良, 赵颖, 丁秀云. 沈阳昆虫原色图鉴[M]. 沈阳: 辽宁民族出版社, 2009: 399.
- ZHANG ZL, ZHAO Y, DING XY. Illustrated Book of Primary Colors of Insects in Shenyang[M]. Shenyang: Liaoning Nationality Publishing House, 2009: 399 (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] 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 *Blaptica dubia* and their biological activities[J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(1): 170-179 (in Chinese).
- [20] 张运晖, 赵瑛, 张艳萍, 王立光. 一株玉米秸秆纤维素降解放线菌的筛选、鉴定及酶学特性研究[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(3): 52-59.
- ZHANG YH, ZHAO Y, ZHANG YP, WANG LG. Isolation, identification and enzymology characteristics of a corn stalk cellulose-degradable *Actinomycetes* strain[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(3): 52-59.
- [21] 张慧, 赵恪, 林陈强, 林戎斌, 陈龙军, 陈济琛. 纤维素降解菌的分离筛选及产酶条件优化[J]. 福建农业学报, 2023, 38(9): 1117-1123.
- ZHANG H, ZHAO K, LIN CQ, LIN RB, CHEN LJ, CHEN JC. Isolation and enzymatic activity of cellulose-degrading bacteria[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(9): 1117-1123 (in Chinese).
- [22] 张元昊, 李豪, 张敏琪, 徐雪明, 赵莹, 张然, 张振东, 桂仲争. 一株蚕沙纤维素降解菌的鉴定及产酶优化和生物强化效果[J]. 蚕业科学, 2023, 49(6): 551-559.
- ZHANG YH, LI H, ZHANG MQ, XU XM, ZHAO Y, ZHANG R, ZHANG ZD, GUI ZZ. Identification of a cellulose-degrading bacteria from silkworm excrement and optimization of enzyme production and its bioaugmentation effect[J]. Acta Sericologica Sinica, 2023, 49(6): 551-559 (in Chinese).
- [23] 付东冉, 许小霞, 冯淑杰, 金丰良. 小菜蛾肠道成团泛菌 *PxG45* 的分离鉴定及其抗真菌活性[J]. 昆虫学报, 2023, 66(10): 1343-1353.
- FU DR, XU XX, FENG SJ, JIN FL. Isolation and identification of *Pantoea agglomerans* PxG45 from *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) gut and its antifungal activities[J]. Acta Entomologica Sinica, 2023, 66(10): 1343-1353.
- [24] 陆秋成, 何恒果, 蒲德强. 昆虫肠道微生物种类及其功能研究进展[J]. 四川农业科技, 2023(2): 48-52.
- LU QC, HE HG, PU DQ. Research progress on species and functions of intestinal microorganisms in insects[J]. Sichuan Agricultural Science and Technology, 2023(2): 48-52 (in Chinese).
- [25] 栾军波, 王四宝. 昆虫共生微生物: 研究进展与展望[J]. 昆虫学报, 2023, 66(10): 1271-1281.
- LUAN JB, WANG SB. Insect symbionts: research progresses and prospects[J]. Acta Entomologica Sinica, 2023, 66(10): 1271-1281 (in Chinese).
- [26] 李丹红, 王誉, 杨红. 高效降解木质纤维素的白蚁肠道微生物组[J]. 微生物学报, 2017, 57(6): 876-884.
- LI DH, WANG Y, YANG H. Gut microbiome of wood-feeding termites[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(6): 876-884 (in Chinese).
- [27] 马玲, 曹靖瑜, 白建洋, 徐喆, 李璐, 张月, 闵梦茹.

- 昆虫肠道微生物及其功能研究方法进展[J]. 昆虫学报, 2023, 66(10): 1415-1424.
- MA L, CAO JY, BAI JY, XU Z, LI L, ZHANG Y, MIN MR. Progress in research methods of insect intestinal microbiota and its function[J]. Acta Entomologica Sinica, 2023, 66(10): 1415-1424 (in Chinese).
- [28] COLMAN DR, TOOLSON EC, TAKACS-VESBACH CD. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities?[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(20): 5124-5137.
- [29] LUO J, CHENG YX, GUO LB, WANG AL, LU M, XU LT. Variation of gut microbiota caused by an imbalance diet is detrimental to bugs' survival[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 771: 144880.
- [30] BAI J, LING Y, LI WJ, WANG L, XUE XB, GAO YY, LI FF, LI XJ. Analysis of intestinal microbial diversity of four species of grasshoppers and determination of cellulose digestibility[J]. Insects, 2022, 13(5): 432.
- [31] LV DB, LIU XY, DONG YL, YAN ZZ, ZHANG X, WANG P, YUAN XQ, LI YP. Comparison of gut bacterial communities of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) reared on different host plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(20): 11266.
- [32] 唐名艳, 蒋满贵, 唐亮, 赵烨芸, 黄深惠, 陈小青. 家蚕肠道微生物多样性及功能研究进展[J]. 广西蚕业, 2022, 59(1): 51-58.
- TANG MY, JIANG MG, TANG L, ZHAO YY, HUANG SH, CHEN XQ. Research progress on microbial diversity and function of silkworm intestinal tract[J]. Guangxi Sericulture, 2022, 59(1): 51-58 (in Chinese).
- [33] 周改玲, 乔宏兴. 番鸭感染粪肠球菌与沙门氏菌的分离鉴定、遗传进化及耐药基因检测分析[J]. 家畜生态学报, 2023, 44(10): 82-88.
- ZHOU GL, QIAO HX. Isolation, identification, genetic evolution analysis and drug resistance gene detection of *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* in Muscovy duck infection[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2023, 44(10): 82-88 (in Chinese).
- [34] CHEN KJ, LAI CC, CHEN HC, CHONG YJ, SUN MH, CHEN YP, WANG NK, HWANG YS, CHAO AN, WU WC, YEUNG L, SUN CC, LIU L, CHEN YH, CHOU HD. *Enterococcus faecalis* endophthalmitis: clinical settings, antibiotic susceptibility, and management outcomes[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 918.
- [35] 狄婷婷, 高原. 粪肠球菌主要毒力因子研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(3): 231-234.
- DI TT, GAO Y. Advances in research on pathogenicity islands of *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2012, 7(3): 231-234 (in Chinese).
- [36] AUTA HS, EMENIKE CU, FAUZIAH SH. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation[J]. Environmental Pollution, 2017, 231(Pt 2): 1552-1559.
- [37] SCHMIDT K, ENGEL P. Mechanisms underlying gut microbiota-host interactions in insects[J]. The Journal of Experimental Biology, 2021, 224(Pt 2): jeb207696.
- [38] 孙晓妮, 曹蓓蓓, 束长龙, 耿丽丽, 王泽宇, 张杰. 对半翅目害虫具有活性的 Bt 杀虫蛋白研究进展[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 390-398, 409.
- SUN XN, CAO BB, SHU CL, GENG LL, WANG ZY, ZHANG J. Advances in Bt insecticidal proteins against hemipteran pests[J]. Plant Protection, 2023, 49(5): 390-398, 409 (in Chinese).
- [39] 王渭霞, 朱廷恒, 赖凤香, 魏琪, 万品俊, 何佳春, 傅强. 芽孢杆菌的引入对褐飞虱微生物群和生长发育的影响[J]. 昆虫学报, 2023, 66(10): 1289-1301.
- WANG WX, ZHU TH, LAI FX, WEI Q, WAN PJ, HE JC, FU Q. Effects of introduction of *Bacillus* spp. on the microbiota and growth and development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2023, 66(10): 1289-1301 (in Chinese).
- [40] 莫潜渊, 肖德琴, 朱勇文, 杨琳, 王文策. 肠道微生物降解植物多糖的机制研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(10): 4058-4069.
- MO QY, XIAO DQ, ZHU YW, YANG L, WANG WC. Research progress in the mechanism of degradation of plant polysaccharides by intestinal microorganisms[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(10): 4058-4069 (in Chinese).
- [41] 曹乐, 宁康. 昆虫肠道的宏基因组学: 微生物大数据的新疆界[J]. 微生物学报, 2018, 58(6): 964-984.
- CAO L, NING K. Metagenomics of insect gut: new borders of microbial big data[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(6): 964-984 (in Chinese).
- [42] 李宏伟, 杨晓洁, 向奕舟, 林连兵, 张棋麟. 草地贪夜蛾幼虫肠道细菌的分离鉴定及纤维素降解细菌的筛选[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(3): 608-616.
- LI HW, YANG XJ, XIANG YZ, LIN LB, ZHANG QL. Isolation and identification of the intestinal bacteria, and screening of the cellulolytic bacteria, of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuid) larvae[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2020, 57(3): 608-616 (in Chinese).