

黄翅大白蚁后肠几丁质降解微生物的分离与鉴定

孙新新 李净净 宁娜 谭慧军 倪金凤*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

摘要:【目的】从培养白蚁——黄翅大白蚁后肠微生物菌群中分离能降解几丁质的细菌。【方法】以胶体几丁质为唯一碳源,根据胶体几丁质水解透明圈的大小进行筛选。通过形态学、生理生化以及 16S rRNA 基因序列分析进行菌株鉴定。【结果】从黄翅大白蚁肠道中筛选到 8 株能够降解胶体几丁质的细菌,它们分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)。8 株菌均具有几丁质酶、 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶活性。【结论】从黄翅大白蚁后肠中获得 8 株能够降解胶体几丁质并具有其他碳水化合物降解酶活性的细菌,这一研究为了解白蚁肠道微生物协助白蚁消化食物机制提供了依据。

关键词: 黄翅大白蚁, 分离, 几丁质降解, 肠道微生物

Isolation and identification of chitin-degrading bacteria from the hindgut of *Macrotermes barneyi*

SUN Xin-Xin LI Jing-Jing NING Na TAN Hui-Jun NI Jin-Feng*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: [Objective] This study aims to isolate and identify chitin-degradation bacteria from the hindgut of a fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*. [Methods] Using an oligotrophic medium containing chitin as the only carbon source, chitin-degradation bacteria were screened and identified based on the transparent zone around the clone and morphological, physiological and biochemical properties as well as 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] Eight chitin-degradation strains, which belong to *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cellulomonas*, *Dactylosporangium*, *Flavobacterium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas* and *Stenotrophomonas*, were isolated from the gut of *M. barneyi*. In addition to chitinase activity, the strains also exhibit β -glucosidase and endoglucanase activities. [Conclusion] Eight chitin-degradation strains, which also have other carbohydrate-active degradation activities, were obtained from the hindgut of *M. barneyi*. The study can help us

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31272370); National Basic Research Program of China (No. 2011CB707402)

*Corresponding author: Tel: 86-531-86363323; E-mail: jinfngni@sdu.edu.cn

Received: January 21, 2017; Accepted: March 24, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31272370); 国家 973 计划项目(No. 2011CB707402)

*通讯作者: Tel: 86-531-86363323; E-mail: jinfngni@sdu.edu.cn

收稿日期: 2017-01-21; 接受日期: 2017-03-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

understanding how gut symbionts facilitate termite in its food digest.

Keywords: *Macrotermes barneyi*, Isolation, Chitin-degrading, Symbiotic microorganism

白蚁主要分布于温带至热带地区,是木质纤维素的主要降解者,有助于生态系统的碳循环^[1]。根据白蚁后肠是否含有共生原生动物,可以分为低等白蚁(有共生原生动物)和高等白蚁(无共生原生动物)两大类群,其中低等白蚁占白蚁总数的25%,高等白蚁占75%^[2]。白蚁取食范围极广,包括木材、植物叶片、腐殖质、杂物屑以及食草动物粪便等。低等白蚁主要以木为食,而高等白蚁中有些种类能以土壤、真菌为食^[3]。在低等白蚁肠道内,原生动物在其降解木质纤维素的过程中起了极为重要的作用^[4];高等白蚁肠道内不含原生生物,肠道微生物在降解食物过程中起了主要作用^[5]。

高等白蚁中大白蚁亚科 *Macrotermitinae* 能够在菌圃中培养鸡枞菌 *Termitomyces*, 这类白蚁又称为培菌白蚁,培菌白蚁的食物包括真菌菌丝体和木质纤维素^[6]。鸡枞菌帮助白蚁消化食物的同时也作为其营养来源^[7-8]。通过基因组分析发现,培菌白蚁利用共生真菌和肠道共生细菌产生的酶降解食物^[9-10]。真菌的细胞壁主要由几丁质组成,几丁质酶可以水解几丁质,具有抑制真菌生长的作用;同时几丁质水解产生的几丁单糖及分子大小不等的几丁寡糖,广泛参与碳源和氮源的代谢^[11]。几丁质代谢在培菌白蚁从真菌获得营养或者抵抗其他真菌在菌圃上生长的过程中是必需的^[12],同时几丁质代谢对于白蚁围食膜(主要成分为几丁质)的降解具有重要的作用^[13]。黄翅大白蚁是广泛分布于我国南方的高等培菌白蚁,本研究以黄翅大白蚁后肠为材料,通过常规的平板活性筛选方法,分离具有几丁质降解活性的微生物,为了解共生微生物帮助白蚁降解食物机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄翅大白蚁取自湖南省耒阳市木兰村,采样后立即冻存于-80℃;所用感受态细胞为自制大肠杆

菌感受态 *Escherichia coli* DH5 α ; 测序载体为质粒 pMD18-T (TaKaRa 公司); 几丁质购自 Sigma 公司; 厌氧袋购自青岛海博生物技术有限公司; 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。

改进的几丁质培养基(g/L): 几丁质培养基^[12], 胰蛋白胨 1.00。羧甲基纤维素钠培养基(g/L): CMC-Na 10.00, KNO₃ 1.00, MgSO₄·7H₂O 0.50, KH₂PO₄ 0.50, FeSO₄·7H₂O 0.01; LB 培养基(含柠檬酸铁铵和七叶苷)(g/L): 胰蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, NaCl 5.00, 柠檬酸铁铵 5.00, 七叶苷 2.00。

PBS 缓冲液(g/L, pH 7.4): NaCl 8.00, KCl 0.20, Na₂HPO₄ 1.44, KH₂PO₄ 0.24。

胶体几丁质的制备^[14]: 称取 10 g 几丁质粉加入 100 mL 浓盐酸, 37℃、150 r/min 振摇 1 h, 使几丁质完全溶解。4℃ 静置 24 h, 加入 5 倍体积 50%乙醇(体积比)醇沉 5 h, 加 ddH₂O 1 L, 10 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 去离子水反复洗至中性, 最后配制成浓度为 50 g/L 的胶体几丁质溶液, 4℃ 保存备用。

1.2 样品处理及菌株的分离

1.2.1 样品处理: 将采集的黄翅大白蚁大工蚁在无菌水中清洗两次, 然后用 75%酒精表面消毒 1 min, 最后用 PBS 缓冲液(pH 7.4)漂洗。200 只黄翅大白蚁工蚁在超净台解剖获得后肠, 将获得的后肠放置于 2.0 mL 离心管, 加入 200 μ L 无菌的 0.9% (质量体积比)的 NaCl 溶液^[15], 然后用灭菌的研磨棒研磨至无可见颗粒, 作为后肠微生物培养样品。

1.2.2 菌株的分离与纯化: 后肠样品用无菌的 0.9% 的 NaCl 进行梯度稀释, 取稀释 10⁴ 和 10⁵ 倍的培养液 200 μ L 分别涂布于几丁质培养基平板上, 在有氧和无氧两种条件下培养, 厌氧条件是置于厌氧袋中, 30℃ 培养 5 d。将具有水解圈的单克隆接种至新的几丁质平板。用固体几丁质培养基进行多次划线培养, 均在 30℃ 好氧条件下培养, 直到获得单克隆。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态学观察和生理生化鉴定: 革兰氏染色、氧化酶、过氧化氢酶、V-P 试验、MR 试验、淀粉水解试验、酪素降解试验、酯酶试验、明胶液化试验、吡啶试验均参考文献[16]。

1.3.2 基因组 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增及序列分析: 用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取基因组 DNA, 具体步骤参考文献[17]。16S rRNA 基因扩增引物分别是 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3')。PCR 反应体系: 200–400 ng/μL 模板 DNA 1 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 2.5 μL, 10×PCR buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 8 μL, 5 U/μL *Taq* 酶 0.5 μL, 加 ddH₂O 至终体积 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测。序列测序并进行相似性比较 (<http://old.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>)。用 MEGA 6.0 软件计算进化距离, Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4 纤维素酶酶活的鉴定

1.4.1 内切葡聚糖酶酶活的鉴定: 将获得的单克隆接种至 CMC-Na 培养基固体平板, 30 °C 培养 3 d, 通过刚果红染色鉴定菌株是否产生内切葡聚糖酶。刚果红染色方法具体为: 70%乙醇洗去菌落, 用 0.3%的刚果红溶液染色 20 min, 然后用 1 mol/L NaCl 脱色 20 min。产生水解圈的菌株即可产生内切葡聚糖酶。

1.4.2 β-葡萄糖苷酶酶活的鉴定: 将获得的单克隆接种至含七叶苷和 Fe²⁺的固体 LB 培养基平板上, 30 °C 培养 3 d, 鉴定菌株是否产生 β-葡萄糖苷酶。如果产生 β-葡萄糖苷酶, 会出现棕褐色的水解圈。

2 结果与分析

2.1 白蚁后肠几丁质降解微生物的分离纯化

黄翅大白蚁后肠样品稀释 10⁴ 和 10⁵ 倍后在几丁质培养基上长出约 200 个菌落。根据几丁质降解圈大小, 筛选得到 8 个活性高的菌落, 多次划

线后获得纯菌株。在选择培养基上生长 5 d 的菌落可直接看到明显的降解圈(图 1), 水解圈直径(*D*)和菌落直径(*d*)的比值(*D/d*)介于 2.28–10.69 之间(表 1)。在有氧条件下纯化的菌株分别被命名为 chi-1、chi-2、chi-3、chi-4 和 chi-5; 厌氧袋中分离、有氧条件纯化的菌株分别命名为 an-chi-1、an-chi-2 和 an-chi-3。

2.2 菌株的分类鉴定

2.2.1 形态学观察和生理生化特征: 8 株菌在几丁质培养基上培养 5 d, 除 chi-2 均形成圆形菌落, 大小为 1 mm–6 mm, 其中 chi-2 菌落不规则, 表面有褶皱。不同菌株的生理生化特征存在差异, 8 株菌的生理生化特征见表 2。

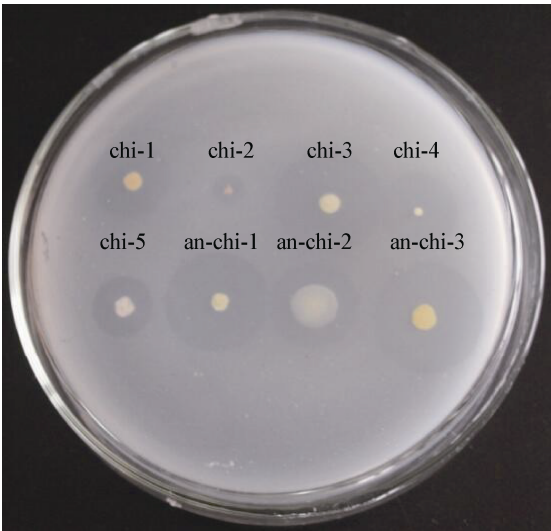


图 1 几丁质培养基纯化的 8 株菌
Figure 1 Eight strains growing in the chitin medium

表 1 产几丁质酶菌落水解圈直径(<i>D</i>)和菌落直径(<i>d</i>)的比值	
Table 1 <i>D/d</i> values of the chitinase producing strains	
Strains	<i>D/d</i>
chi-1	5.24
chi-2	3.67
chi-3	7.33
chi-4	10.69
chi-5	4.30
an-chi-1	7.10
an-chi-2	2.28
an-chi-3	4.64

表 2 8 株菌的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical properties of eight strains

Items	chi-1	chi-2	chi-3	chi-4	chi-5	an-chi-1	an-chi-2	an-chi-3
Shape	Short rod	Finger shaped sporangia	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Gram staining	—	—	+	—	+	—	—	+
Type of catabolism	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic
Catalase	+	—	+	+	+	+	W	+
Oxidase	—	—	—	—	—	—	—	—
MR reaction	—	—	+	+	+	+	—	+
V-P reaction	+	—	+	+	+	+	—	+
Nitrite reduction	—	—	+	+	—	+	—	—
Casein	+	—	—	+	—	W	+	+
Tween 20	+	—	—	—	—	+	—	+
Tween 80	+	—	—	—	—	—	—	+
Starch	+	W	+	+	+	+	—	+
Gelatin liquefaction	—	—	—	—	—	—	—	—
Indole production	—	—	—	—	—	—	—	—

Note: W: Weak reaction; +: Positive reaction; —: Negative reaction.

2.2.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析(图 2): 共分离到 8 株可以降解几丁质的菌株, 16S rRNA 基因序列分析表明 8 株菌分别属于 *Flavobacterium* (黄杆菌属)、*Dactylosporangium* (指孢囊菌属)、*Brevibacillus* (短芽孢杆菌属)、*Sphingomonas* (鞘氨醇单胞菌属)、*Paenibacillus* (类芽孢杆菌属)、*Cellulomonas* (纤维单胞菌属)、*Stenotrophomonas* (寡养单胞菌属)和 *Bacillus* (芽孢杆菌属)。8 株菌的 16S rRNA 基因序

列比对的最大相似性在 98.2%–99.7%之间(表 3)。其中 chi-1、chi-2 和 an-chi-1 属于放线菌门, chi-3、chi-5 和 an-chi-3 属于厚壁菌门, chi-4 和 an-chi-2 属于变形菌门。

2.3 纤维素酶酶活的鉴定

通过刚果红染色鉴定 8 株菌是否产生内切葡聚糖酶, 由图 3A 可知, 8 株菌均可产生内切葡聚糖酶, 其中 chi-5 和 an-chi-1 产生的内切葡聚糖酶酶活

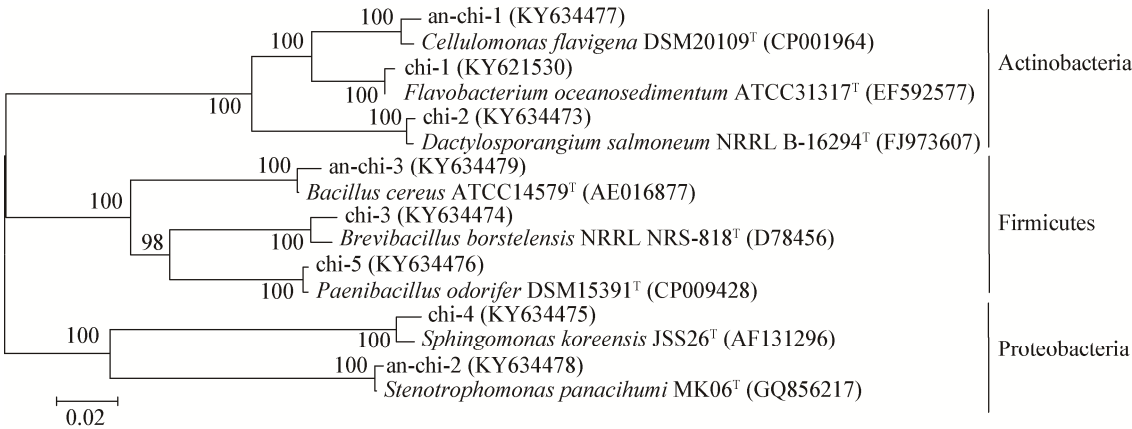


图 2 基于 8 株菌的 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of eight bacterial strains

注: 利用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树; 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比。

Note: The tree was reconstructed by the NJ method using the MEGA 6.0 software. The GenBank accession number of each sequence is shown in parentheses. Numbers at nodes represent bootstrap values (based on 1 000 resamplings).

表 3 16S rRNA 基因系统发育分析参考序列				
Table 3 The reference sequences used in phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene				
Strains	Most similar strain in NCBI	Accession No.	Similarity (%)	Remark
chi-1	<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i>	EF592577	99.7	Type strains
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	

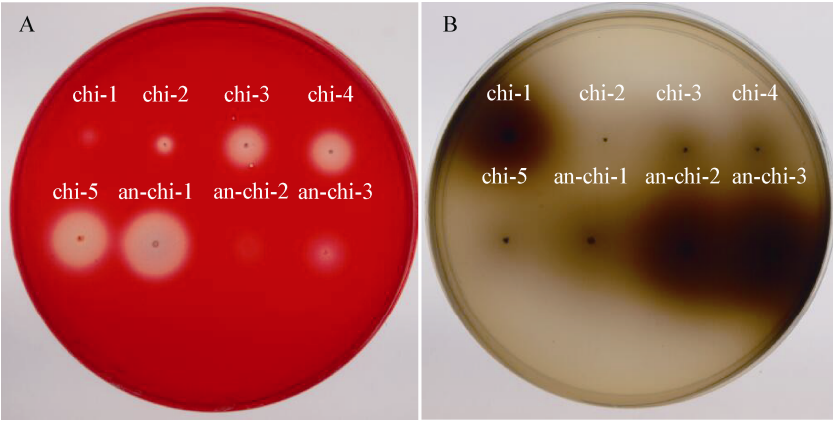


图 3 内切葡聚糖酶(A)和 β-葡萄糖苷酶(B)活性的鉴定
Figure 3 Endoglucanase (A) and β-glucosidase (B) activities assay on the agar plates

较高；通过含 Fe^{2+} 和七叶苷的 LB 平板鉴定 8 株菌是否产生 β-葡萄糖苷酶，由图 3B 可知 8 株菌均可产生 β-葡萄糖苷酶，其中 chi-1、an-chi-2 和 an-chi-3 产生的 β-葡萄糖苷酶酶活较高。

3 讨论

本文从高等培菌白蚁——黄翅大白蚁后肠分离到 8 株具有较强几丁质降解能力的细菌。其中 3 株属于厚壁菌门，2 株属于变形菌门，3 株属于放线菌门。由于 8 株菌为不同的微生物，对培养基的营养需求不同，它们在几丁质培养基上菌落生长情况有所不同。8 株菌均可降解几丁质，所产生的几丁质酶可能与降解真菌孢子从中获得营养、抵抗其

他真菌在菌圃上的生长或者白蚁围食膜的降解有关^[13]。有研究报道培菌白蚁肠道放线菌和芽孢杆菌可以产生次生代谢物而抑制菌圃杂菌生长^[18-19]，该次级代谢产物有可能是几丁质酶来抵抗其他真菌在菌圃中的生长。培菌白蚁是一类体外与真菌共生而体内与细菌共生的高等白蚁，培菌白蚁与其共生真菌关系的模式可以概括为：高龄工蚁收集木质碎屑带回巢内；低龄工蚁取食这些收集入巢的碎屑，初步消化并迅速排便，以这些物质建立起菌圃来培养真菌。低龄工蚁还取食主要由无性孢子组成的菌丝节(Fungus nudoles)。高龄工蚁主要取食菌圃较老的部分，是被真菌降解的植物材料^[3]。体外真

菌帮助白蚁消化木质纤维素^[7],同时也作为白蚁的食物来源^[8]。早期研究报道真菌给培菌白蚁提供纤维素酶,最近研究发现培菌白蚁自身可分泌产生纤维素降解酶,如内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶^[20-21],但尚未有白蚁自身分泌几丁质酶的报道。目前已经在培菌白蚁肠道中分离到与木质纤维素降解有关的微生物^[17,22],通过对培菌白蚁黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 中分离的 *Trabulsiella odontotermitis* 基因组分析发现,该菌具有与几丁质代谢有关的基因(CE9 和 GH23, www.cazy.org)^[12],其他文献尚未报道从培菌白蚁中分离到与几丁质降解有关的菌株。同时 8 株菌均可产生内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶,这可能有助于白蚁降解木质纤维素,对 8 株菌的进一步研究有助于了解培菌白蚁消化食物以及抵抗其他真菌在菌巢生长的机制。

本研究在以胶体几丁质为唯一碳源的选择平板上筛选出 8 株可以降解几丁质的细菌,目前从培菌白蚁分离出能够降解几丁质菌株的研究甚少。未来的工作中,将研究 8 株菌在黄翅大白蚁中具体的作用,以期深入了解几丁质降解微生物在高等培菌白蚁食物消化方面和抑制杂菌生长方面的作用或潜能。

参 考 文 献

- [1] Ni JF, Tokuda G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 838-850
- [2] Hongoh Y. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(8): 1311-1325
- [3] Xiang H, Zhou ZH. Lignocellulolytic enzymes in termite and its symbiotic microbes[J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2009, 46(1): 32-40 (in Chinese)
相辉, 周志华. 白蚁及其共生微生物木质纤维素水解酶的种类[J]. *应用昆虫学报*, 2009, 46(1): 32-40
- [4] Bignell DE, Roisin Y, Lo N. *Biology of Termites: A Modern Synthesis*[M]. 2nd Edition. Netherlands: Springer, 2011: 439-475
- [5] Brune A, Dietrich C. The gut microbiota of termites: digesting the diversity in the light of ecology and evolution[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2015, 69: 145-166
- [6] Donovan SE, Eggleton P, Bignell DE. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites[J]. *Ecological Entomology*, 2001, 26(4): 356-366
- [7] Hyodo F, Inoue T, Azuma JI, et al. Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera: Macrotermitinae)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(5): 653-658
- [8] Aanen DK, de Fine Licht HH, Debets AJM, et al. High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites[J]. *Science*, 2009, 326(5956): 1103-1106
- [9] Poulsen M, Hu HF, Li C, et al. Complementary symbiont contributions to plant decomposition in a fungus-farming termite[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(40): 14500-14505
- [10] Liu N, Zhang L, Zhou HK, et al. Metagenomic insights into metabolic capacities of the gut microbiota in a fungus-cultivating termite (*Odontotermes yunnanensis*)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69184
- [11] Pan JH, Jiang K, Wang TT, et al. Regulation effect of CcpA on chitinase gene *chiA* and *chiB* in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(3): 510-517 (in Chinese)
潘锦华, 姜昆, 汪婷婷, 等. 苏云金芽胞杆菌 CcpA 蛋白对几丁质酶基因 *chiA* 和 *chiB* 的表达调控作用[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(3): 510-517
- [12] Sapountzis P, Gruntjes T, Otani S, et al. The enterobacterium *Trabulsiella odontotermitis* presents novel adaptations related to its association with fungus-growing termites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6577-6588
- [13] Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function[J]. *Annual Review of Entomology*, 1997, 42: 525-550
- [14] Kang SC, Park S, Lee DG. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73(3): 276-281
- [15] Manfredi AP, Perotti NI, Martínez MA. Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(12): 1384-1393
- [16] Yang G. *Microbiology Experiment Course*[M]. Beijing: Science Press, 2004: 159-175 (in Chinese)
杨革. *微生物学实验教程*[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 159-175
- [17] Shi XY, Zhang N, Ning N, et al. Isolation and identification of xylan-degradation bacteria from hindgut of fungus-growing termite[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(3): 504-509 (in Chinese)
石小玉, 张宁, 宁娜, 等. 一株培菌白蚁后肠木聚糖降解细菌的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(3): 504-509
- [18] Mathew GM, Ju YM, Lai CY, et al. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: the implication of *Bacillus* as mutualists[J]. *FEMS microbiology ecology*, 2012, 79(2): 504-517
- [19] Visser AA, Nobre T, Currie CR, et al. Exploring the potential for actinobacteria as defensive symbionts in fungus-growing termites[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(4): 975-985
- [20] Ni JF, Wu Y, Yun C, et al. cDNA cloning and heterologous expression of an endo- β -1,4-glucanase from the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*[J]. *Archives of Insect Biochemistry Physiology*, 2014, 86(3): 151-164
- [21] Wu Y, Chi S, Yun C, et al. Molecular cloning and characterization of an endogenous digestive β -glucosidase from the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2012, 21(6): 604-614
- [22] Bastien G, Arnal G, Bozonnet S, et al. Mining for hemicellulases in the fungus-growing termite *Pseudacanthotermes militaris* using functional metagenomics[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 78