

# 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

夏琬婷<sup>1</sup>, 陈芳敏<sup>\*1,2</sup>, 何雨薇<sup>1</sup>, 袁霞<sup>1</sup>, 刘洺源<sup>1</sup>

1 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

2 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

夏琬婷, 陈芳敏, 何雨薇, 袁霞, 刘洺源. 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 Wanting, Chen Fangmin, He Yuwei, Yuan Xia, Liu Mingyuan. Isolation and identification of gut bacteria from *Blattella dubia* and screening of digestive enzyme-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 4999-5008

**摘要:**【背景】杜比亚蟑螂(*Blattella dubia*)可用于活体饲料、化妆品和医药保健品的生产,其肠道菌的研究对杜比亚蟑螂的饲养和肠道菌资源的开发与利用都十分重要。【目的】揭示杜比亚蟑螂肠道可培养菌的种类,筛选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】采用体外培养法获得杜比亚蟑螂肠道菌,结合形态学和分子生物学方法进行鉴定;用水解圈法分别筛选产纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶菌株。【结果】在杜比亚蟑螂肠道中共分离出4属7种细菌,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)2种,沙雷氏菌属(*Serratia*)和柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)各2种,肠球菌属(*Enterococcus*)1种。从获得的20个菌株中筛选出10个具有产消化酶功能的菌株。其中,芽孢杆菌属的菌株D6、D12和D20具有产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶4种消化酶的功能;沙雷氏菌属的菌株D3、D7、D9、D11和D15具有产纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶3种消化酶的能力;柠檬酸杆菌属的菌株D5具有产纤维素酶的功能;肠球菌属的菌株D17具有产蛋白酶的能力。【结论】杜比亚蟑螂肠道多种细菌具有产消化酶帮助降解大分子营养物质的功能,可通过协助食物消化影响宿主健康。菌株D12、D7和D11分别具有最强产纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶的能力,是可进一步开发利用的肠道功能菌株资源。

**关键词:** 杜比亚蟑螂; 肠道菌; 16S rRNA 基因; 产消化酶功能菌株

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42177406)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (42177406)

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

Received: 2022-08-07; Accepted: 2022-10-15; Published online: 2022-11-03

## Isolation and identification of gut bacteria from *Blaptica dubia* and screening of digestive enzyme-producing strains

XIA Wanting<sup>1</sup>, CHEN Fangmin<sup>\*1,2</sup>, HE Yuwei<sup>1</sup>, YUAN Xia<sup>1</sup>, LIU Mingyuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Liaoning 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 Eco-Restoration of Regional Contaminated Environment, Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

**Abstract:** [Background] *Blaptica dubia* can be used for producing living feed, cosmetics, and healthcare products. Studying the gut bacteria is essential for the breeding of *B. dubia* and development and utilization of gut bacterial resources. [Objective] To disclose the culturable bacterial species from the gut of *B. dubia*, and the strains capable of producing digestive enzymes, so as to provide a scientific basis and research materials for research on the influence of gut bacteria on the host and for utilization of the functional bacterial strains. [Methods] The gut bacteria of *B. dubia* were isolated with the culture method and identified via the methods of morphology and molecular biology. The hydrolysis circle method was employed to screen out the strains capable of producing cellulase, protease, amylase, and lipase, respectively. [Results] A total of 7 species of bacteria belonging to 4 genera were isolated from the gut of *B. dubia*, including 1 species of *Enterococcus*, 2 species of *Bacillus*, 2 species of *Serratia*, and 2 species of *Citrobacter*. Ten strains capable of producing digestive enzymes were screened out from the obtained 20 strains. Among them, *Bacillus* strains D6, D12, and D20 can produce all the 4 digestive enzymes. *Serratia* strains D3, D7, D9, D11, and D15 had the ability to produce 3 digestive enzymes: cellulase, protease, and lipase. *Citrobacter* strain D5 and *Enterococcus* strain D17 can produce cellulase and protease, respectively. [Conclusion] A variety of bacteria in the gut of *B. dubia* can produce digestive enzymes to help degrade macromolecular nutrients, which may affect the health of host by assisting food digestion. Strains D12, D7, and D11 have the strongest ability to produce cellulase, protease, and lipase, respectively, and are the gut functional strain resources worthy of further development and utilization.

**Keywords:** *Blaptica dubia*; gut bacteria; 16S rRNA gene; functional strains capable of producing digestive enzymes

昆虫的多个部位甚至细胞都分布了大量的微生物, 其肠道菌的种类和数量繁多<sup>[1]</sup>。昆虫的生存环境对其肠道菌群有着不可忽视的影响, 通过长期的协同进化, 昆虫肠道共生菌对宿主的健康与环境适应性作用重大, 作为特境微生物, 昆虫肠道菌的未知功能有待挖掘, 具有重要的科研价值。研究发现, 昆虫肠道菌能够协助昆虫进行物质代谢、抵抗有害物质的入侵, 影响昆虫的营养吸收, 在昆虫生长发育的

各个阶段都具有重要的影响<sup>[2]</sup>。对昆虫肠道菌多样性的研究发现, 其与昆虫宿主在协同进化过程中形成新的种群结构和生物学功能<sup>[3]</sup>, 对宿主的生长发育、生殖等多个方面都产生影响, 甚至影响某些害虫的危害特征<sup>[4-6]</sup>。黄振东等从德国小蠊(*Blattella germanica*)肠道中分离出 7 种产蛋白酶和 3 种产淀粉酶的细菌<sup>[7]</sup>; Zhang 等从德国小蠊肠道和粪便中分离出能协助其消化且能保护宿主免受真菌侵染的菌株<sup>[8]</sup>; 单体江等

发现杜比亚蟑螂共生真菌产生的次生代谢产物具有抑菌活性和抗氧化活性<sup>[9]</sup>。

杜比亚蟑螂(*Blattella germanica*)以腐殖质、植物根茎或动物尸体为食, 有营养和药用价值, 可用于生产化妆品、医药保健品等<sup>[10]</sup>。然而, 杜比亚蟑螂的研究和开发还处于初级阶段, 其肠道菌的研究报道尤其缺乏。传统的分离纯化培养方法只能获得肠道中微生物总数的 1%<sup>[11]</sup>, 但是传统的培养方式仍然在微生物学研究中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。采用可培养方式获得纯的菌株可通过其菌落形态、生理特征及分子生物学技术进一步鉴定到种属并筛选潜在的功能性菌株。

本研究采用传统的分离纯化方法从杜比亚蟑螂肠道分离出可培养菌株, 对获得的菌株进行鉴定和功能筛选, 揭示杜比亚蟑螂肠道可培养菌的种类及其系统发育地位, 筛选出具有产消化酶(包括纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶)能力的菌株, 以期为昆虫肠道微生物资源的开发利用及其与宿主的相互作用关系提供科学依据和研究材料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 2×*Taq* Plus Master Mix 试剂盒, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 乳酸细菌培养基(de Man, Rogosa and Sharp, MRS)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; 1/3 胰蛋白胨大豆固体(1/3 tryptic soy agar, 1/3 TSA)培养基(g/L): TSB 10.0, 琼脂 15.0; 羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)培养基参照文献<sup>[13]</sup>配制; 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参照文献<sup>[14-16]</sup>配制。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

在无菌操作下, 使用实验室养殖的杜比亚蟑螂个体, 经表面消毒解剖出完整肠道组织并匀浆<sup>[17]</sup>。对样品做加热预处理有利于分离出耐高温菌和产芽孢菌, 选择培养基和寡营养的环境也可提高菌株分离效果。将匀浆样品分为两等份: 一份使用金属浴 85 °C 加热 15 min; 另一份未加热处理。两组样品分别进行浓度梯度稀释( $10^{-2}$ – $10^{-7}$ ), 选用  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  浓度的样品溶液分别涂布在 MRS 培养基和 1/3 TSA 培养基上, 于 37 °C 恒温培养箱倒置培养 24 h 后进行观察, 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菌株初步鉴定, 并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

将供试菌株接种到 TSB 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 富集培养至 600 nm 波长下的光密度( $OD_{600}$ )约为 0.5。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取杜比亚蟑螂肠道菌的总 DNA。选用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTGTTCAGACTT-3')<sup>[18]</sup>进行肠道共生菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×*Taq* Plus Master Mix 25 μL, 正向引物 27F (10 μmol/L) 2 μL, 反向引物 1492R (10 μmol/L) 2 μL, DNA 模板 3 μL, ddH<sub>2</sub>O 18 μL。阴性对照用 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, 合格的样品送生工生物工程(上海)股份有限公

司进行测序。将测序结果提交(National Center for Biotechnology Information, NCBI)核苷酸数据库(nucleotide database), 使用 BLAST 在 GenBank 数据库中进行 16S rRNA 基因序列的同源性比对分析, 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>[9]</sup>。采用 MEGA 7.0 软件中的 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)来检验进化树分支的置信度。

#### 1.4 杜比亚蟑螂肠道可培养菌株的功能筛选

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。用点接法将待筛选菌株分别接种到上述 4 种培养基平板的 3 分点的位置, 在 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 48 h。其中, 产纤维素酶筛选平板经过 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; 产淀粉酶筛选培养基经过 48 h 培养后用碘液进行染色后, 观察是否存在水解圈; 产脂肪酶筛选平板和产蛋白酶筛选平板经过 48 h 培养后, 直接观察是否存在水解圈。用电子游标卡尺测量水解圈直径  $D$  与菌落直径  $d$ , 计算  $D$  与  $d$  的比值( $D/d$ ), 根据比值大小判断菌株产消化酶的能力。

#### 1.5 统计学分析

用 Excel 对试验结果进行计算, 采用 SPSS 20.0 软件中的单因素方差分析实验结果  $D/d$  是否具有统计学意义, 当方差齐时选用 S-N-K 多重比较方法, 方差不齐时选用 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 菌株的分离与形态学鉴定结果

使用可培养方法从杜比亚蟑螂肠道中分离获得 20 个可培养菌株, 编号为 D1–D20。其中革兰氏阳性菌( $G^+$ ) 11 株, 分别为 D2、D6、D10、D12、D13、D14、D16、D17、D18、D19 和 D20; 革兰氏阴性菌( $G^-$ ) 9 株, 分别为 D1、D3、D4、D5、D7、D8、D9、D11 和 D15。仅 D12 和 D20 这 2 个菌株是从 MRS 培养基上分离获得, 其他菌株皆是从 1/3TSA 培养基中分离获得。镜检结果发现细胞形态主要为球菌和杆菌, 部分菌株革兰氏染色结果和菌落形态如图 1 所示。

### 2.2 菌株的 16S rRNA 基因序列鉴定结果

20 个菌株 16S rRNA 基因的测序结果提交到 NCBI 的核苷酸数据库, 序列登录号为 MW548669–MW548688。通过 BLAST 与 GenBank 中已知 16S rRNA 基因序列相似性比对分析结果显示, 这些菌株可鉴定为 4 属 7 个种。其中, D3、D7、D9、D11、D15 为褪色沙雷氏菌(*Serratia marcescens*), D1 为气味沙雷氏菌(*Serratia odorifera*), D5 为费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*), D4、D8 为魏氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter werkmanii*), D6、D12 为东洋芽孢杆菌(*Bacillus toyonensis*), D20 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), D2、D10、D13、D14、D16、D17、D18、D19 为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。可见, 在杜比亚蟑螂肠道可培养细菌中, 肠球菌属占优势, 有 8 株, 占总数的 40%; 其次为沙雷氏菌属 6 株, 占总数的 30%; 柠檬酸杆菌属和芽孢杆菌属各 3 株, 均占比 15%。结合革兰氏染色结果和功能筛选结果, 选取最具代表性菌株进行系统发育分析, 如图 2 所示, 它们归为 4 个属。菌株 D1、D3、D7、D9、D11、D15 为沙雷氏菌属(*Serratia*), 菌株 D14、D17

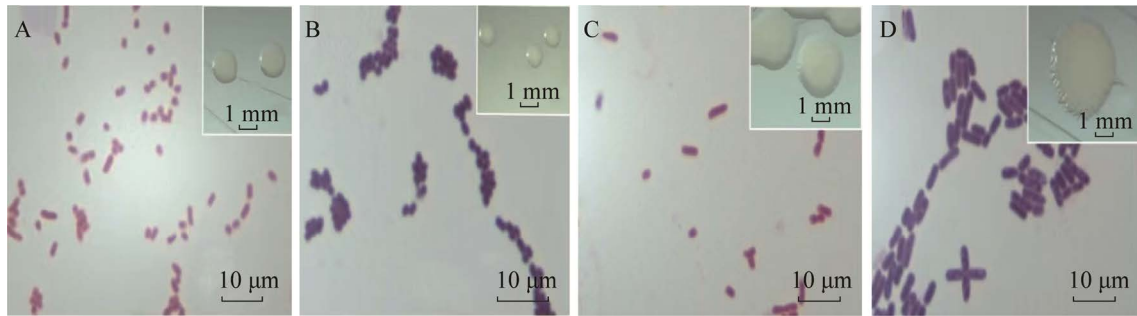


图 1 代表菌株的革兰氏染色结果及菌落形态图 A-D: 右上角窗口为菌落形态图。A: 菌株 D1,  $G^-$ , 菌落形态: 黄色不透明, 圆形隆起, 边缘规整; B: 菌株 D2,  $G^+$ , 菌落形态: 白色透明, 圆形似水滴状, 边缘规整; C: 菌株 D4,  $G^-$ , 菌落形态: 白色不透明, 圆形隆起, 边缘规整; D: 菌株 D6,  $G^+$ , 菌落形态: 黄色不透明, 圆形扁平, 边缘毛糙

Figure 1 Gram staining results and colony morphology of representative strains. The upper right windows of A-D are the pictures of colony morphology. A: Strain D1,  $G^-$ , colony morphology: yellow opaque, round bulge and regular edge; B: Strain D2,  $G^+$ , colony morphology: white and transparent, round like a water drop, with regular edges; C: Strain D4,  $G^-$ , colony morphology: white opaque, round bulge, regular edge; D: Strain D6,  $G^+$ , colony morphology: yellow opaque, round and flat, rough edges.

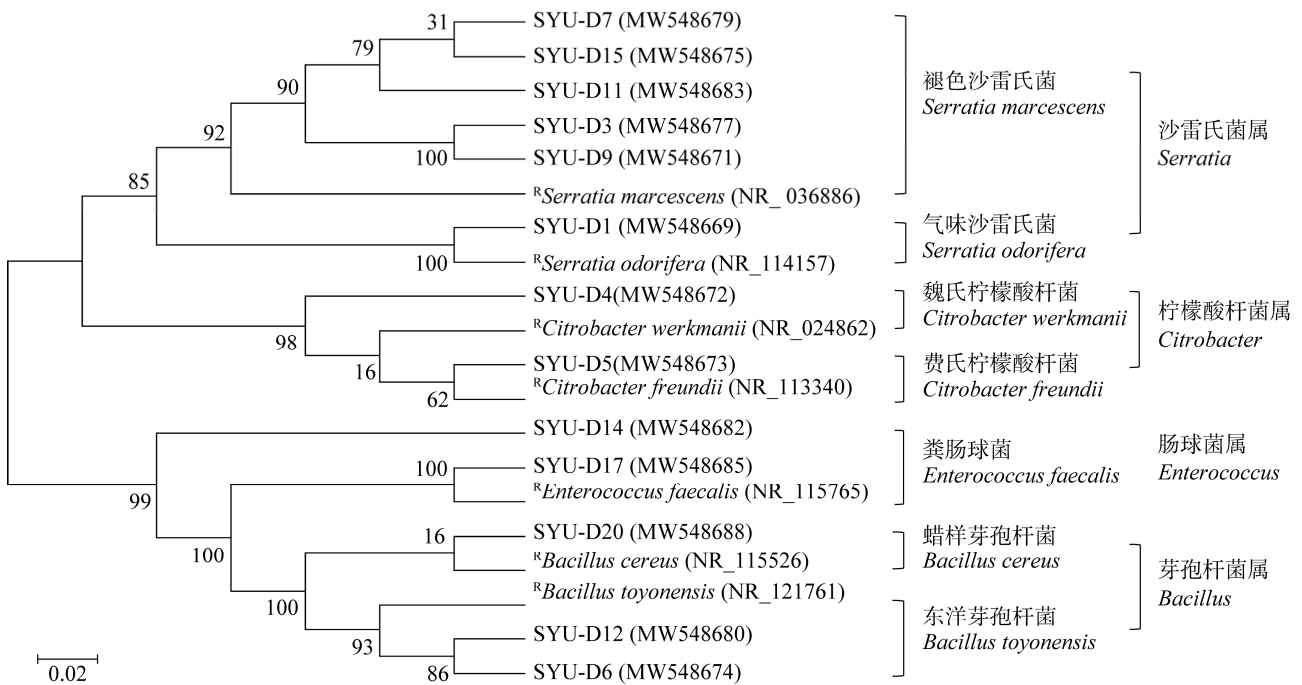


图 2 基于杜比亚蟑螂肠道菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 菌株编号左上标 R 的为参比菌株; 括号内的编号为序列的 GenBank 登录号; 结点处数字为自展值; 代表进化树分支的可信度的百分比; 标尺代表 2% 的序列分歧

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of gut bacteria of *Blaptica dubia*. The strain with the left superscript R is reference strain; numbers in brackets are GenBank accession numbers of sequences; Numbers at nodes are bootstrap values, which represent the percentage of credibility of evolutionary tree branches; The scale represents 2% sequence divergence.

为肠球菌属(*Enterococcus*), 菌株 D4、D5 为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*), 菌株 D6、D12、D20 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

### 2.3 产消化酶菌株筛选结果

分别对获得的菌株进行了产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶功能的筛选。图 3 为产消化酶筛选实验结果为阳性的代表菌株功能筛选平板图, 结果显示降解圈明显, 降解能力较强。

实验结果显示, 10 个菌株具有产消化酶功

能, 占总数的 50%, 详见表 1。其中, 沙雷氏菌属的菌株 D3、D7、D9、D11、D15 具有产纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶的能力, 芽孢杆菌属的菌株 D6、D12、D20 具有产 4 种消化酶的能力, 柠檬酸杆菌属的菌株 D5 具有产纤维素酶的能力, 肠球菌属的 D17 具有产蛋白酶的能力。

### 2.4 肠道菌产酶能力分析

如图 4 所示, 从杜比亚蟑螂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。筛选出 9 株具有产纤维素酶功能菌株, 产酶能

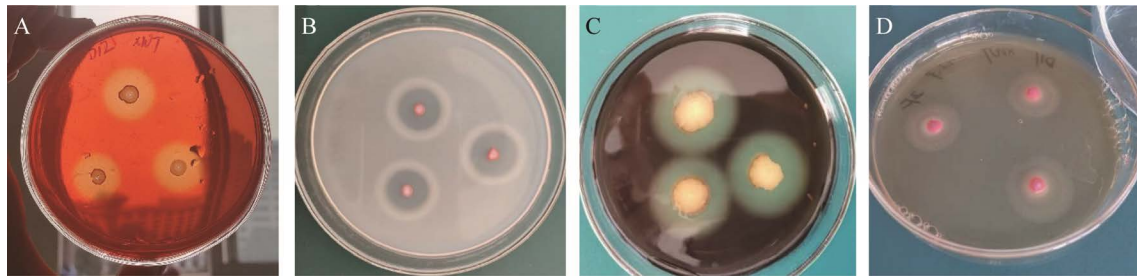


图 3 产消化酶代表菌株筛选结果平板图 A: 产纤维素酶菌株 D12; B: 产蛋白酶菌株 D7; C: 产淀粉酶菌株 D20; D: 产脂肪酶菌株 D11

Figure 3 Screening results of representative strains producing digestive enzymes. A: Cellulase-producing strain D12; B: Protease-producing strain D7; C: Amylase-producing strain D20; D: Lipase-producing strain D11.

表 1 杜比亚蟑螂肠道菌产消化酶菌株筛选结果

Table 1 Screening results of digestive enzyme-producing strains of gut bacteria of *Blattella germanica*

菌株编号 Strain No.	细菌种类 Bacterial species	纤维素酶 Cellulase	蛋白酶 Protease	淀粉酶 Amylase	脂肪酶 Lipase
D3	褪色沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	+	+		+
D7	褪色沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	+	+		+
D9	褪色沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	+	+		+
D11	褪色沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	+	+		+
D15	褪色沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	+	+		+
D6	东洋芽孢杆菌 <i>Bacillus toyonensis</i>	+	+	+	+
D12	东洋芽孢杆菌 <i>Bacillus toyonensis</i>	+	+	+	+
D20	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+
D5	费氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	+			
D17	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>		+		

注: +表示菌株具有产该消化酶的能力

Note: + means that the strain has the ability to produce the corresponding digestive enzyme.

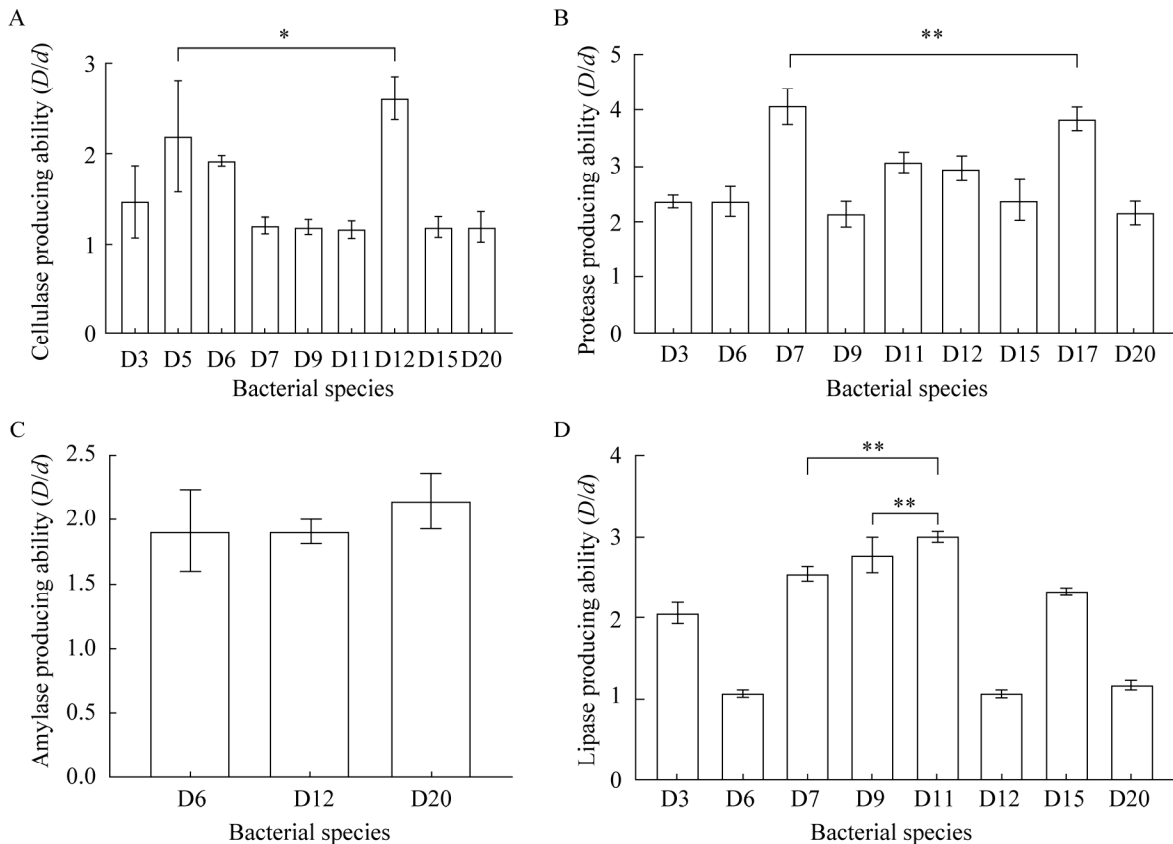


图 4 杜比亚蟑螂肠道产消化酶菌株及其产酶能力分析 A: 产纤维素酶菌株及其产酶能力; B: 产蛋白酶菌株及其产酶能力; C: 产淀粉酶菌株及其产酶能力; D: 产脂肪酶菌株及其产酶能力。D/d 为降解圈直径 D 与菌落直径 d 的比值, 根据比值大小评估菌株产酶的能力; \*:  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\*:  $P < 0.01$ , 差异极显著

Figure 4 Analysis of digestive enzyme-producing strains and their enzyme-producing ability of gut bacteria from *Blaptica dubia*. A: Strains producing cellulase and their cellulase-producing ability; B: Strains producing protease and their protease-producing ability; C: Strains producing amylase and their amylase-producing ability; D: Strains producing lipase and their lipase-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; \*:  $P < 0.05$ , and the difference is significant; \*\*:  $P < 0.01$ , and the difference is extremely significant.

力如图 4A 所示。其中菌株 D12 和 D5 的产纤维素酶能力较强( $D/d > 2$ ), D12 产酶能力最强, 与 D5 的降解能力相比具有显著性差异。具有产蛋白酶功能的 9 个菌株, 其产酶能力分析如图 4B 所示, 菌株 D7 与 D17 的产蛋白酶能力较强 ( $D/d > 3.5$ ), 与 D17 相比, D7 的产蛋白酶能力具

有极显著优势。菌株 D6、D12 和 D20 均具有产淀粉酶功能, 产酶能力如图 4C 所示。8 株菌株具有产脂肪酶功能, 其能力大小分析如图 4D 所示, 菌株 D7、D9 和 D11 的产脂肪酶能力较强 ( $D/d > 2.5$ ), 其中 D11 的降解能力最强, 而且与菌株 D7、D9 的降解能力相比具有极显著性

差异。

杜比亚蟑螂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。芽孢杆菌属的 3 个菌株 D6、D12、D20 都具有产纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶这 4 种消化酶的能力。其中, 东洋芽孢杆菌 D12 产消化酶的综合能力最强, 并且产纤维素酶能力最强 ( $D/d=2.60$ )。沙雷氏菌属中褪色沙雷氏菌 D3、D7、D9、D11、D15 具有较强的产蛋白酶和脂肪酶的能力, 产纤维素酶的能力相对较弱, 尚未发现具有产淀粉酶的功能。其中, 菌株 D7 产蛋白酶的能力最强 ( $D/d=4.05$ ), 菌株 D11 产脂肪酶的能力最强 ( $D/d=2.99$ )。费氏柠檬酸杆菌 D5 和粪肠球菌 D17 分别具有产纤维素酶和产蛋白酶能力, 未发现产其他 3 种消化酶的功能。

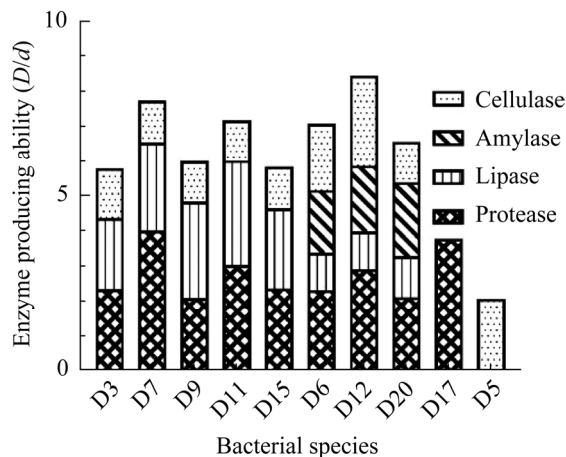


图 5 杜比亚蟑螂肠道产消化酶菌株的产酶种类和能力分析  $D/d$  为降解圈直径  $D$  与菌落直径  $d$  的比值, 根据比值大小评估菌株的产酶能力

Figure 5 Analysis of enzyme producing species and capacity of digestive enzyme producing strains of *Blaptica dubia*.  $D/d$  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.

综上所述, 杜比亚蟑螂肠道分离出的菌株有高达 50% 具有产消化酶功能。筛选出的 10 株菌株都具有开发利用潜力, 尤其东洋芽孢杆菌 D12 和褪色沙雷氏菌 D7 和 D11 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

肠道菌群间分工合作, 共同促进宿主的生长发育<sup>[19]</sup>。肠道菌中的益生菌群也能够通过促进肠道运动性、增加胰蛋白酶活力和改善肠道组织形态来促进宿主的消化吸收功能, 进而提高宿主的体重, 同时又不会带来不良影响<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, 芽孢杆菌属的菌株主要降解食物中的淀粉和纤维素, 而沙雷氏菌属中褪色沙雷氏菌主要降解食物中的蛋白质和脂肪。在杜比亚蟑螂肠道内分离出的 8 株粪肠球菌, 仅菌株 D17 具有降解蛋白质的能力, 其他 7 株菌未发现具有产消化酶的能力。粪肠球菌是肠道菌群中重要的一部分, 具有较强的耐受力和定殖能力<sup>[21]</sup>, 可改善动物胃肠功能, 促进生长和提高生产性能<sup>[22]</sup>。胡红伟等筛选的粪肠球菌 DY-F03 具有重要的益生性能, 为微生态制剂的开发应用提供了菌种资源<sup>[23]</sup>。本研究筛选的粪肠球菌其益生性能评价及与宿主之间的相互作用机理有待进一步研究。杜比亚蟑螂共生真菌及次生代谢产物均表现出一定的抗菌活性<sup>[9]</sup>。本研究还使用点接法和滤纸片法检验从杜比亚蟑螂肠道分离菌株的抗大肠杆菌活性, 结果暂未发现具有抗大肠杆菌活性的菌株。杜比亚蟑螂肠道菌其他抗病原菌能力与活性还有待探究。

本研究采用传统的微生物分离培养技术从杜比亚蟑螂肠道中分离获得 20 株菌株, 鉴定为 4 属 7 种, 共筛选出 10 株产消化酶功能菌株。



其中, 东洋芽孢杆菌 D12 可产纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶与淀粉酶 4 种消化酶, 而且产纤维素酶能力最强; 菌株 D7 和 D11 分别产蛋白酶和脂肪酶的能力最强。在本研究筛选出杜比亚蟑螂肠道具产消化酶功能菌株的基础上, 可进一步对杜比亚蟑螂肠道益生菌进行挖掘, 探究这些菌株的益生功能及其与宿主的相互作用机理, 可为益生菌资源的应用提供研究基础, 也可利用肠道菌来提高杜比亚蟑螂的饲养水平, 推动对昆虫资源的开发与利用。

## REFERENCES

- [1] Douglas AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms[J]. *Annual Review of Entomology*, 2015, 60: 17-34
- [2] 梅承, 范硕, 杨红. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 985-994  
Mei C, Fan S, Yang H. The strategies of isolation of insect gut microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 985-994 (in Chinese)
- [3] 张振宇, 圣平, 黄胜威, 赵永顺, 张宏宇. 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 ZY, Sheng P, Huang SW, Zhao YS, Zhang HY. Diversity, function and application of insect gut microbiota[J]. *Biotic Resources*, 2017, 39(4): 231-239 (in Chinese)
- [4] 张某, 杨璞, 朱家颖, 袁远, 桂富荣, 高熹, 吴国星. 基于 16S rDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析[J]. *昆虫学报*, 2016, 59(2): 200-208  
Zhang M, Yang P, Zhu JY, Yuan Y, Gui FR, Gao X, Wu GX. Analysis of the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis* (Diptera: Trypetidae) based on 16S rDNA gene sequence[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(2): 200-208 (in Chinese)
- [5] Akbar N, Siddiqui R, Iqbal M, Sagathevan K, Khan NA. Gut bacteria of cockroaches are a potential source of antibacterial compound(s)[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 66(5): 416-426
- [6] 魏舸, 白亮, 曲爽, 王四宝. 昆虫共生微生物在病虫害和疾病控制上的应用前景[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1090-1102  
Wei K, Bai L, Qu S, Wang SB. Insect microbiome and their potential application in the insect pest and vector-borne disease control[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1090-1102 (in Chinese)
- [7] 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  
Huang 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)
- [8] Zhang F, Sun XX, Zhang XC, Zhang S, Lu J, Xia YM, Huang YH, Wang XJ. The interactions between gut microbiota and entomopathogenic fungi: a potential approach for biological control of *Blattella germanica* (L.) [J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(2): 438-447
- [9] 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 germanica* and their biological activities[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42(1): 170-179 (in Chinese)
- [10] 章敏, 肖晓, 田代志, 萧闵, 孙江桥. 新型活体饲料杜比亚蟑螂的饲养与繁育技术[J]. *科学养鱼*, 2012(10): 72-73  
Zhang M, Xiao X, Tian DZ, Xiao M, Sun JQ. Feeding and breeding technology of new living feed *Blattella germanica* [J]. *Scientific Fish Farming*, 2012(10): 72-73 (in Chinese)
- [11] Pandiarajan J, Krishnan M. Comparative bacterial survey in the gut of lepidopteran insects with different bionetwork[J]. *Microbiology*, 2018, 87(1): 103-115
- [12] 何欢, 杨明飞, 杨美华, 康冀川. 塑料饲养大蜡螟幼虫肠道可培养细菌多样性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(3): 577-586  
He H, Yang MF, Yang MH, Kang JC. Diversity of the culturable gut bacteria of the wax moth larvae fed with polyethylene plastic[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(3): 577-586 (in Chinese)
- [13] 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)

- [14] 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 sea cucumber intestinal tract[J]. Feed Industry, 2012, 33(20): 28-32 (in Chinese)
- [15] 依妮皮姑丽·麦提依明, 艾麦尔江·麦提库尔班, 阿依安·布胡达西, 迪力木拉提·木合塔尔, 迪丽拜尔·托乎提. 一株产  $\alpha$ -淀粉酶芽孢杆菌的分离及产酶条件的优化[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2017, 56(4): 126-132  
Henipigul M, Emerjan M, Ayan B, Dilmurat M, Dilbar T. Isolation of an  $\alpha$ -amylase producing *Bacillus* and optimization of its fermentation conditions[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2017, 56(4): 126-132 (in Chinese)
- [16] 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)
- [17] 彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 梁广文, 宋敦伦. 普通昆虫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 107-111  
Cai WZ, Pang XF, Huang BZ, Liang GW, Song DL. General Entomology[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2001: 107-111 (in Chinese)
- [18] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703
- [19] 谭清峰, 李菁, 杨雨欣, 刘岳阳, 刘晨. 昆虫肠道菌群及其功能简述[J]. 科技风, 2021(26): 167-169  
Tan QF, Li J, Yang YX, Liu YY, Liu C. Intestinal flora of insects and its functions[J]. keji feng, 2021(26): 167-169 (in Chinese)
- [20] 刘飞, 郝婧宇, 段素芳, 司徒文佑, 洪维鍊, 刘伟贤, 赵子夫, 霍贵成. 益生菌对断奶鼠消化酶活力、肠道运动性及粘膜形态的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 353-360  
Liu F, Hao JY, Duan SF, Situ WY, Hong WL, Liu WX, Zhao ZF, Huo GC. Effect of probiotics on digestive enzymatic activity, intestinal mobility and mucosal morphology of weaned rodents[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 353-360 (in Chinese)
- [21] Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J, Vogel RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(5): 966-975
- [22] 邬向东, 刘明珠, 包淋斌, 瞿明仁, 钟启平. 乳酸粪肠球菌对常用抗生素耐受性及肠道致病菌抑制作用[J]. 饲料研究, 2013(8): 83-84  
Wu XD, Liu MZ, Bao LB, Qu MR, Zhong QP. Tolerance of *Enterococcus faecalis* to common antibiotics and inhibition of intestinal pathogenic bacteria[J]. Feed Research, 2013(8): 83-84 (in Chinese)
- [23] 胡红伟, 段明房, 闫凌鹏, 麻啸涛, 陈茹茹, 赵帅, 李自茹. 产细菌素粪肠球菌的分离、鉴定及体外益生特性研究[J]. 饲料广角, 2017(11): 27-32  
Hu HW, Duan MF, Yan LP, Ma XT, Chen RR, Zhao S, Li ZR. Isolation, identification and *in vitro* probiotic characteristics of *Enterococcus faecalis* producing bacteriocin[J]. Feed China, 2017(11): 27-32 (in Chinese)