

日本弓背蚁消化道厌氧细菌的分离培养*

朱卓琳** 南小宁 王云果 贺虹***

(西北农林科技大学林学院, 杨陵 712100)

摘 要 【目的】采用自行设置的厌氧装置, 分离培养日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 消化道厌氧细菌。【方法】改进了一种简易的厌氧装置——平皿夹层法, 利用 4 种培养基对日本弓背蚁消化道内厌氧或兼性厌氧菌进行分离培养。【结果】从日本弓背蚁消化道共分离到 22 个不同的菌株, 隶属于厚壁菌门、放线菌门和变形菌门 3 大类群的 17 个属; 4 种培养基分离到的细菌种类存在明显差异, 选择性较强, 其中从 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基上分离到的细菌种类较多, 分别为 10 种和 8 种; 从 MRS 和 LBS 培养基上分离到的细菌较少, 分别为 3 种和 1 种; 大工蚁和小工蚁的消化道细菌组成也存在差异, 可能与其在巢群中担负的功能和职责有关, 还有待于进一步研究分析。【结论】利用平皿夹层法可以成功分离到日本弓背蚁肠道的厌氧细菌, 该方法对于其他昆虫消化道厌氧菌的分离培养具有一定的参考价值。

关键词 日本弓背蚁, 昆虫消化道微生物, 厌氧细菌, 平皿夹层法

The isolation of anaerobic bacteria from the gut of *Camponotus japonicus*

ZHU Zhuo-Lin** NAN Xiao-Ning WANG Yun-Guo HE Hong***

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract [Objectives] An anaerobic device was designed to culture anaerobic bacteria from the digestive tract of *Camponotus japonicus*. [Methods] A simple anaerobic device; the Interlayer Petri Dish Method, was improved to isolate anaerobic bacteria from the digestive tract of *C. japonicus* using four kinds of culture media (LB medium, Beef extract peptone, MRS medium and LBS medium). [Results] Twenty-two different bacterial strains were isolated from the guts of *C. japonicus*. These belonged to 17 genera of the Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacterium. Four kinds of culture mediums had high selectivity, and isolated different bacterial species. More bacterial species were isolated from LB and beef extract peptone medium (10 and 8 species respectively), less were isolated from LBS and MRS medium (3 and 1 species respectively). In addition, bacterial species isolated from the digestive tracts of major and minor workers differed, which may be related to their functions and responsibilities in the colony. Further research will be required to clarify this. [Conclusion] Several anaerobic bacteria were successfully isolated from the guts of *C. japonicus* using the Interlayer Petri Dish Method, which provides a reference for isolating the gut bacteria of other insects.

Key words *Camponotus japonicus*, gut bacteria, anaerobic bacteria, Interlayer Petri Dish Method

昆虫消化道内栖居着大量的微生物, 形成了一个复杂的微生态系统, 这些微生物在寄主昆虫的生长发育、营养利用、生殖、以及免疫等方面发挥着重要的作用 (Dillon *et al.*, 2005; 相辉和

黄勇平, 2008)。目前一般采用传统的分离培养方法和分子生物技术相结合来揭示昆虫消化道内微生物的群落结构和多样性水平 (Vasanthakumar *et al.*, 2006; 张丽等, 2006;

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31070342)

**第一作者 First author, E-mail: 506052109@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hehong@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-12-10, 接受日期 Accepted: 2015-05-11

Park *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2009)。分子生物学研究方法可以简单、高效、快速地揭示昆虫肠道内存在的微生物,但是不能获得纯培养的细菌进而开展菌株水平的研究(冯霞等, 2005);传统的分离培养方法虽然费时费力且仅能培养出自然环境中 1%左右的微生物种类,但是可以获得纯培养的菌株,为进一步开展特殊微生物的利用提供了条件(叶姜瑜和罗固源, 2005;郭斌等, 2006)。因此,传统的培养方法和分子生物学技术相互结合、互相补充成为研究昆虫消化道微生物的有效途径。

弓背蚁属蚂蚁是蚁科昆虫的第一大属,并且因为该属蚂蚁的消化道中普遍存在专性共生菌 *Blochmannia* 而成为研究蚁科昆虫和微生物关系的一个独特蚂蚁类群。关于弓背蚁属蚂蚁内共生菌 *Blochmannia* 已进行了非常深入及广泛的研究(Sauer *et al.*, 2002; Wolschin *et al.*, 2004; Wernegreen *et al.*, 2009),但是其消化道内其他微生物的研究信息相当缺乏。为了揭示弓背蚁属蚂蚁消化道内其他细菌种类,He 等(2011)利用 16S rRNA-RFLP 方法发现日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 消化道内除了优势的专性内共生菌 *Blochmannia* 外,还存在少量的 *Candidatus Serratia symbiotica*、*Fructobacillus fructosus* 和 *Burkholderiales* 细菌;Li 等(2012)进一步利用传统培养方法和 DGGE 分析技术对日本弓背蚁消化道不同部位的细菌组成进行了研究,检测到 12 个属的细菌和 3 个未知种类细菌。这些研究表明采用不同的方法可以揭示出日本弓背蚁消化道内更为丰富的细菌类群。

昆虫的消化道是一个相对厌氧的环境,其中厌氧菌和兼性厌氧菌占有很大的比例。因此,在利用传统的分离培养方法进行消化道微生物研究时,需要考虑这些厌氧性细菌的特点,创造一个无氧的环境如在厌氧培养箱中或生物耗氧法对其进行分离培养(王菲菲等, 2009;刘冰等, 2012)。在本文中,作者参考穆军和张肇铭(1998)的方法,利用培养皿设置了一种简单的厌氧环境,进行了日本弓背蚁消化道内厌氧或兼性厌氧微生物的分离培养,并结合 PCR 技术对其进行

分子鉴定,试图为其他昆虫消化道内厌氧菌的分离培养提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

实验用的日本弓背蚁采自于陕西杨凌西北农林科技大学校园内,在 2014 年 7 月到 8 月采集外出觅食的大工蚁和小工蚁各若干头带回实验室进行消化道的解剖。

消化道的解剖在超净工作台上进行,具体步骤参照 Li 等(2012)的方法进行。首先将蚂蚁在 -20°C 冰箱冷冻至昏迷,然后将其置于 75% 酒精中进行表面消毒 1 min,再用无菌水冲洗 3 次。将体表消毒后的蚂蚁个体用昆虫针固定在蜡盘中,滴灭菌的 0.9% NaCl 溶液淹没其腹部,然后在双目解剖镜(SMZ-168)下用灭菌的尖头镊子轻轻撕开其腹部表皮,暴露出整个消化道,小心去除粘附于消化道的脂肪体及其他结构,只保留消化道;用吸水纸吸掉肠液,再用灭菌的 0.9% NaCl 溶液冲刷消化道表面 3 次,最后将消化道组织保存在 1.5 mL 灭菌离心管中备用。实验重复 3 次,每次解剖获得 10 头大工蚁和 10 头小工蚁的完整消化道分别作为两个样品,同时进行微生物的分离培养。

1.2 日本弓背蚁消化道微生物分离培养

采用 4 种培养基进行微生物的分离培养, LB 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基按周德庆(1982)和陈天寿(1995)介绍的方法配制, MRS 及 LBS 培养基参考王友湘等(2007)的方法配制。

将解剖获得的大工蚁和小工蚁的消化道称重后,根据 1:10 比例在 1.5 mL 离心管中加入相应比例的灭菌生理盐水,研磨制成匀浆原液,然后按 10 倍梯度稀释至 10^{-2} 备用。

平皿夹层厌氧法的设置:准备好一套灭菌的培养皿,先将培养基倒入上盖中(较大的皿);等培养基凝固后,将准备好的消化道稀释液涂布接种于培养基上;然后将下盖底部(较小的皿)直接压于培养基上,轻轻挤压排出空气,并用塑

封膜将培养皿边缘封严,从而营造一个厌氧的环境条件;最后将培养皿置于恒温培养箱(29 ± 1 °C)进行培养操作流程见图 1。

4 种培养基均按照以上方法进行涂布接种,根据预实验结果,将 10^{-1} 和 10^{-2} 消化道稀释液各 100 μ L 分别涂布在 4 种培养基上,所有的处理均做 3 个重复,每种培养基做 1 个无菌水阴性对照。

培养 2 d 后,依据菌落的外部形态特征(大小、颜色、形状等),初步区分不同的细菌种类,然后挑取不同形态菌落采用划线培养法进行分离纯化培养,得到细菌单菌落。

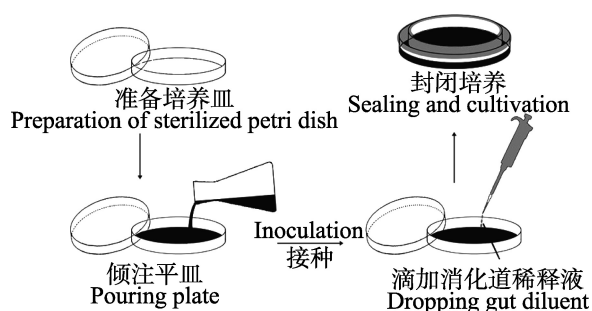


图 1 平皿夹层厌氧法装置及操作流程

Fig. 1 Flow chart of anaerobic bacteria cultivation by using Interlayer Petri Dish method

1.3 消化道微生物的分子鉴定

采用菌落 PCR 的方法对分离得到的微生物进行鉴定。先在 PCR 管中加入 10 μ L 无菌水,再用 10 μ L 枪头挑取单菌落放入无菌水中,混匀制成菌悬浮液,以此为 PCR 扩增模板,采用细菌 16S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACC TTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增 (Li *et al.*, 2012)。

PCR 扩增体系为: 5 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2.5 μ L dNTP (1 mol/L), 引物 (10 μ mol/mL) 各 1 μ L, 0.25 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补充体积至 25 μ L。PCR 反应条件为: 92 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电

泳检测达到足够的浓度和纯度后送上海生工生物技术公司测序。

1.4 序列分析

利用软件 DNASTAR Lasergene 7 对原始序列进行拼接和校对,并切除首尾乱序。然后在 GenBank NCBI 数据库中进行 Blast 比对并下载同源性最高的序列,将全部序列在 ClustalX 2.1 软件 (Larkin *et al.*, 2007) 中进行多重比对,比对结果在 MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) 中构建最大似然系统发育树 (Maximum likelihood tree),并结合 Ribosomal Database Project 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 确定细菌的分类地位,依据细菌 97% 的序列相似性作为判定种类的标准。

2 结果与分析

2.1 日本弓背蚁消化道细菌的分离结果

从 4 种培养基上共检测到 22 种不同形态的菌落,挑取不同形态的菌落分别进行纯培养、菌落 PCR 和测序,这些菌株的序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对结果表明,22 个序列与 17 个属的细菌具有较高的同源性 (表 1)。

通过最大似然树 (Maximum likelihood tree)

(图 2) 可以看出,这些细菌隶属厚壁菌门、放线菌门和变形菌门 3 大类群。其中,厚壁菌门包括 11 个菌株,分别属于芽孢杆菌属 *Bacillus*、动性杆菌属 *Planomicrobium*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*、魏斯氏菌属 *Weissella* 和乳球菌属 *Lactococcus* 6 个属;放线菌门包括 6 个菌株,分别属于链霉菌属 *Streptomyces*、细杆菌属 *Microbacterium*、纤维菌属 *Cellulomonas*、短状杆菌属 *Brachybacterium*、微球菌属 *Micrococcus* 和考克氏菌 *Kocuria* 6 个属;变形菌门包括 5 个菌株,分别属于醋杆菌属 *Acetobacter*、肠杆菌属 *Enterobacter*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌属 *Acinetobacter* 和莫拉氏菌 *Moraxella* 5 个属。

不同培养基分离到的细菌种类差别较大 (表

1), 其中 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基分离到的细菌种类较多, 分别为 10 种和 8 种; 从 MRS 和 LBS 培养基上分离到的细菌很少, 分别为 3 种和 1 种。这表明 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基适合大

表 1 4 种培养基分离到的日本弓背蚁工蚁消化道细菌种类

Table 1 Bacterial strains isolated from the guts of *Camponotus japonicus* workers using four kinds of media

菌株编号 No. of the strains	GenBank 登录号 GenBank accession no.	GenBank 中同源性最高的细菌种类 Closest related species in GenBank	一致性 Identity	大工蚁 Major workers	小工蚁 Minor workers
LB 培养基 LB medium	L5-1	<i>Bacillus endophyticus</i> (KF535129.1) (Firmicutes, Bacillaceae)	100%	-	+
	L4-3	<i>Bacillus</i> sp. (AY205296.1)	99%	-	+
	L5-3	<i>Bacillus</i> sp. (KF831375.1)	100%	-	+
	L7-3	<i>Bacillus</i> sp. (KF668639.1)	98%	-	+
	L1-2	<i>Brachybacterium muris</i> (KF876891.1) (Actinobacteria, Dermabacteraceae)	99%	+	-
	L2-2	<i>Exiguobacterium</i> sp. (GU339294.1) (Firmicutes, Bacillales Family XII. Incertae Sedis)	99%	+	-
	L3-2	<i>Microbacterium</i> sp. (JQ977461.1) (Actinobacteria, Microbacteriaceae)	99%	-	+
	L4-2	<i>Streptomyces</i> sp. (JN936839.1) (Actinobacteria, Streptomyetaceae)	99%	-	+
	L5-2	<i>Cellulomonas</i> sp. (EU303278.1) (Actinobacteria, Cellulomonadaceae)	98%	-	+
	L1-3	<i>Planomicrobium glaciei</i> (HQ202816.1) (Firmicutes, Planococcaceae)	99%	+	-
牛肉膏蛋 白胨培养 基 Beef extract-pep tone medium	N1-2	<i>Bacillus</i> sp. (GU113076.1)	99%	+	-
	N1-3	<i>Kocuria marina</i> (KJ573536.1) (Actinobacteria, Micrococcaceae)	99%	-	+
	N2-2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (KJ870187.1) (Gammaproteobacteria, Pseudomonadaceae)	99%	+	-
	N2-3	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (FJ860882.1) (Proteobacteria, Moraxellaceae)	99%	-	+
	N3-1	<i>Micrococcus luteus</i> (KF410697.1) (Actinobacteria, Micrococcineae)	99%	-	+
	N3-2	<i>Bacillus</i> sp. (KF956662.1)	99%	+	-
	N4-1	<i>Staphylococcus</i> sp. (KF779128.1) (Firmicutes, Staphylococcaceae)	99%	-	+
	N4-2	<i>Moraxella osloensis</i> (HQ130446.1) (Proteobacteria, Moraxellaceae)	99%	-	+
MRS 培养基 MRS medium	M1	<i>Weissella</i> sp. (AB682516.1) (Firmicutes, Leuconostocaceae)	95%	-	+
	M2	<i>Enterobacter</i> sp. (HE662664.1) (Proteobacteria, Enterobacteriaceae)	99%	+	-
	M3	<i>Acetobacter</i> sp. (KF924238.1) (Proteobacteria, Acetobacteraceae)	90%	+	-
LBS 培养基 LBS medium	LBS1	<i>Lactococcus</i> sp. (KF384111.1) (Firmicutes, Streptococcaceae)	99%	+	-

“+”指出现,“-”指没有出现。

“+” means “present”,“-” means “not present”.

表 2 日本弓背蚁大工蚁和小工蚁消化道细菌的组成比较

Table 2 Comparion of gut bacterial composition between major and minor workers of *Camponotus japonicus*

工蚁类型 Type of worker	细菌种类数 Number of bacterial species	细菌种类 Bacterial species
大工蚁 Major worker	8	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> spp., 小鼠小短状杆菌 <i>Brachybacterium muris</i> , 微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i> sp., 斯氏假单胞菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i> , 动性杆菌 <i>Planomicrobium glaciei</i> , 肠杆菌 <i>Enterobacter</i> sp., 醋杆菌 <i>Acetobacter</i> sp., 乳酸乳球菌 <i>Lactococcus</i> sp.
小工蚁 Minor worker	10	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> spp., 葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> sp., 细杆菌 <i>Microbacterium</i> sp., 链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp., 纤维菌 <i>Cellulomonas</i> sp., 藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i> , 奥斯莫拉氏菌 <i>Moraxella osloensis</i> , 考克氏菌 <i>Kocuria marina</i> , 鲁氏不动杆菌 <i>Acinetobacter lwoffii</i> , 魏斯氏菌 <i>Weissella</i> sp.

部分细菌的生长,而 MRS 和 LBS 培养基更适合乳酸菌类细菌的分离培养。

2.2 大工蚁和小工蚁消化道细菌组成比较

从大小工蚁消化道分离到的微生物种类可以看出,大小工蚁消化道可培养的厌氧细菌的种类差异非常明显,从大工蚁消化道中分离到 8 种细菌,分别是芽孢杆菌、短状杆菌、微小杆菌、假单胞菌、动性杆菌、肠杆菌、醋酸菌和乳球菌;从小工蚁中分离到 10 种细菌,分别是芽孢杆菌、葡萄球菌、细杆菌、链霉菌、纤维菌、藤黄微球菌、奥斯莫拉氏菌、考克氏菌、鲁氏不动杆菌和魏斯氏菌。其中,仅芽孢杆菌 *Bacillus* 在大小工蚁中均可分离到。日本弓背蚁大、小工蚁消化道细菌组成的差异是否可能与其各自在巢群中担负的功能和职责有关,还有待于进一步研究。

3 讨论

在利用常规的分离培养进行昆虫消化道微生物研究方面,一般采用不同的培养基进行(贝绍国等,2005;陈虹等,2005;刘玉升等,2006;刘莉等,2008;王菲菲等,2009;杨志波和张绍升,2010)。许多学者也对厌氧菌培养进行了研究探索,刘冰等(2012)采用生物好氧法对白蚁肠道厌氧菌进行了分离培养,但该方法以化学反应为依据,培养装置相对比较复杂;穆军和张肇铭(1998)在综合比较了各种厌氧细菌的分离方

法后,首次采用平皿夹层法进行了硫酸盐还原菌和脱硫杆菌的培养,认为该方法能够直观地随时进行菌落的观察和取菌落时方便定点取菌。并且方法简便,省时省力且减少了污染,兼备了好氧和厌氧分离方法的优点。但是该方法还没有被应用于昆虫消化道微生物的研究。

在本研究中,我们改用塑封膜代替琼脂进行培养皿边缘的密封,操作更为简单和方便。该方法的操作中,特别需要注意两点:(1)在进行密封前,把培养皿底部从边缘开始与培养基接触,尽量把空气排出,不要留有气泡,营造一个厌氧环境;(2)培养完成时,在揭开平皿时需要非常小心,不能错移,以便菌落之间互相感染。通过该方法,本文利用 4 种培养基从日本弓背蚁消化道中分离到 17 个属的细菌;而 Li 等(2012)年单独使用 LB 培养基采用常规的培养方法仅分离到芽孢杆菌 *Bacillus*、类芽孢杆菌 *Paenibacillus* 和肠杆菌 *Enterococcus* 3 个属的细菌。说明采用平皿夹层法简单而有效,可解决实验室没有相关厌氧设备的难题,且能够分离到更多的肠道细菌,也为其他昆虫消化道内厌氧菌的分离培养提供一定的理论依据。

同时,本文的研究结果也表明,不同培养基的分离效果存在明显的差异,从 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基中分离到的细菌最多,从 MRS 和 LBS 培养基中分离到的种类比较少,说明 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基适合大多数细菌的生长,而



Fig. 2 Phylogenetic analysis for 16S rRNA sequence of the anaerobic bacteria isolated from the guts of *Camponotus japonicus* workers

MRS 和 LBS 培养基属于乳酸菌类培养基, 适合部分厌氧类细菌的生长。因此, 在进行肠道微生物的分离培养时最好选用多种培养基进行, 才可能获得更多的微生物种类。

此外, 在利用分子技术对日本弓背蚁消化道微生物进行研究的过程中, 发现大工蚁和小工蚁消化道微生物的优势细菌存在差异, 因此在本实验中, 我们对大小工蚁的消化道微生物进行了分开培养, 结果也发现大小工蚁消化道细菌组成存在着显著差异, 仅芽孢杆菌在大小工蚁中都有存在。蚂蚁是社会型昆虫, 蚁巢内由不同品级的蚂蚁组成, 且各自具有明确的社会分工, 大小工蚁消化道微生物组成的差异是否可能与其在蚁群中分别担负的功能不同, 还是与其取食类型和取食环境有关, 还有待于进一步的研究和验证。

致谢: 衷心感谢西北农林科技大学资环学院薛泉宏教授对本研究的指导和帮助。

参考文献 (References)

- Bei SG, Liu YS, Cui JX, 2005. Isolation and identification of bacteria from gastrointestinal tract of *Ceroplastes japonicus* Green. *Journal of Shandong Agricultural University*, 36(2): 209–212. [贝绍国, 刘玉升, 崔俊霞, 2005. 日本龟蜡蚧肠道细菌分离及鉴定研究, 山东农业大学学报, 36(2): 209–212.]
- Chen H, Mei JF, Min H, 2005. Microorganisms in termite gut. *Journal of Microbiology*, 25(2): 75–79. [陈虹, 梅建凤, 闵航, 2005. 白蚁肠道微生物. 微生物学杂志, 25(2): 75–79.]
- Chen TS, 1995. *Manufacture and Application of Microbial Culture Medium*. Beijing: China Agriculture Press. 301–381. [陈天寿, 1995. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社. 301–381.]
- Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Letters*, 8(12): 1291–1298.
- Feng X, Yin YP, Wang ZK, 2005. Application of modern molecular biological techniques in the research of microbial diversity in animal intestines. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 11(3): 381–387. [冯霞, 殷幼平, 王中康, 2005. 现代分子生物学技术在动物肠道微生物多样性研究中的应用. 应用与环境生物学报, 11(3): 381–387.]
- Guo B, Wu XL, Qian Y, 2006. Method and measure of improving the culturability of microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 46(3): 504–507. [郭斌, 吴晓磊, 钱易, 2006. 提高微生物可培养性的方法和措施. 微生物学报, 46(3): 504–507.]
- He H, Chen YY, Zhang Y L, Wei C, 2011. Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr. *Environ. Entomol.*, 40(6): 1405–1409.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Li XP, Nan XN, Wei C, He H, 2012. The gut bacteria associated with *Camponotus japonicus* Mayr with culture-dependent and DGGE methods. *Curr. Microbiol.*, 65(5): 610–616.
- Liu B, Lin JD, Song SL, 2012. The microbes cultured and their function in the gut of termites. *Biological Disaster Science*, 35(2): 172–176. [刘冰, 林景栋, 宋水林, 2012. 白蚁肠道可培养菌群及其功能初探. 生物灾害科学, 35(2): 172–176.]
- Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008. Diversity analysis in gut bacteria of *Hepialus gonggaensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616–622. [刘莉, 王中康, 俞和韦, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622.]
- Liu YS, Ye BH, Lv F, Zheng JF, 2006. Study on the primary identification of intestinal bacteria in *Clavis bilineata*. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 37(3): 345–348. [刘玉升, 叶保华, 吕飞, 郑继法, 2006. 豆天蛾幼虫肠道细菌分离及初步鉴定研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 37(3): 345–348.]
- Morales JJ, Zúñiga G, Villa TL, Hernández RC, 2009. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microb. Ecol.*, 58(4): 879–891.
- Mu J, Zhang ZM, 1998. A new method of isolation and purification of anaerobic bacteria: culture dish sandwich anaerobic method. *Journal of Shanxi University (Natural Science)*, 21(4): 363–367. [穆军, 张肇铭, 1998. 一种分离纯化厌氧细菌的新方法——平皿夹层厌氧法. 山西大学学报(自然科学版), 21(4): 363–367.]
- Park DS, Oh HW, Jeong WJ, Kim H, Park HY, Bae KS, 2007. A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *J. Microbiol.*, 45(5): 394–401.
- Sauer C, Dudaczek D, Holldobler B, Gross R, 2002. Tissue

- localization of the endosymbiotic bacterium “*Candidatus Blochmannia floridanus*” in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Appl. Environ. Microb.*, 68(9): 4187–4193.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Vasanthakumar A, Delalibera I, Handelsman J, Klepzig KD, Schloss PD, Raffa F, 2006. Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environ. Entomol.*, 35(6): 1710–1717.
- Wang FF, Liu YS, Ji XX, Zheng JF, 2009. The isolation and identification of intestinal microflora of adult *Potosia brevitarsis*. *Chinese Journal of Microecology*, 21(9): 798–800. [王菲菲, 刘玉升, 姬小雪, 郑继法, 2009. 白星花金龟成虫肠道细菌的分离鉴定, 中国微生态学杂志, 21(9): 798–800.]
- Wang YX, Chen QS, Yan YL, 2007. Screen and application of a few culture media in isolation and identification *Lactobacillus*. *Food Science*, 28(9): 374–378. [王友湘, 陈庆森, 阎亚丽, 2007. 用于乳酸菌分离鉴定的几种培养基的筛选及应用. 食品科学, 28(9): 374–378.]
- Wernegreen JJ, Kauppinen SN, Brady SG, Ward PS, 2009. One nutritional symbiosis begat another: phylogenetic evidence that the ant tribe *Camponotini* acquired *Blochmannia* by tending sap-feeding insects. *BMC Evol. Biol.*, doi: 10.1186/1471-2148-9-292.
- Wolschin F, Holldobler B, Gross R, Zientz E, 2004. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. *Appl. Environ. Microb.*, 70(7): 4096–4102.
- Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 690–691. [相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 690–691.]
- Yang ZB, Zhang SS, 2010. Identification of bacterial species in honeybee intestine at over-summering. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 39(4): 398–402. [杨志波, 张绍升, 2010. 越夏期蜜蜂肠道细菌种类鉴定. 福建农林大学学报, 39(4): 398–402.]
- Ye JY, Luo GY, 2005. Release for ecology and countermeasures of low culturability of microorganism. *Acta Microbiologica Sinica*, 45(3): 478–482. [叶姜瑜, 罗固源, 2005. 微生物可培养性低的生态学释因与对策. 微生物学报, 45(3): 478–482.]
- Zhang L, Liu YS, Liu DW, He H, Lv F, 2006. Comparison of bacteria isolated from gastrointestinal tract of *Tenebrio obscurus* and *T. molitor*. *Entomological Journal of East China*, 15(1): 17–21. [张丽, 刘玉升, 刘大伟, 何华, 吕飞, 2006. 黑粉虫和黄粉虫幼虫肠道细菌的比较. 华东昆虫学报, 15(1): 17–21.]
- Zhou DQ, 1982. Microbiology Laboratory Manual. Shanghai: Shanghai Science Press. 97–137. [周德庆, 1982. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学出版社. 97–137.]