



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*

李宏伟^{1,2**} 杨晓洁^{1,2} 向奕舟^{1,2} 林连兵^{1,2} 张麒麟^{1,2***}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2. 云南省高校饲用抗生素替代技术工程研究中心, 昆明 650500)

摘要 【目的】本研究旨在明确草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 幼虫肠道可培养细菌组成, 筛选纤维素降解细菌。【方法】采用传统细菌培养及 16S rDNA 分子标记相结合的方法分离鉴定草地贪夜蛾幼虫肠道可培养细菌; 采用刚果红染色法筛选纤维素降解细菌, 并通过 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定不同 pH (5.0-9.0) 条件下的纤维素酶活力。【结果】从草地贪夜蛾幼虫中筛选分离出 14 种肠道细菌菌株, 分别隶属放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 等 3 门 11 属, 即谷氨酸棒杆菌属 (*Glutamicibacter*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、摩根菌属 (*Morganella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)。2 株产纤维素酶细菌隶属厚壁菌门芽胞杆菌属。酶活力测定结果显示: 2 株纤维素降解细菌的纤维素酶在 pH 6.0-8.0 均有相对较高的活性, 在 pH 8.0 时, 纤维素酶活力最高。【结论】草地贪夜蛾幼虫肠道中细菌种类多样, 其肠道内存在纤维素降解细菌。在偏碱性条件下, 纤维素降解细菌的纤维素酶活力显著高于酸性条件。研究结果丰富了纤维素降解细菌资源, 在饲料生产、食品加工、化学能源等方面具有应用前景。此外, 草地贪夜蛾作为重大农业害虫, 其肠道有益菌群, 有望成为新的防治靶标。

关键词 草地贪夜蛾幼虫; 可培养肠道细菌; 菌种鉴定; 纤维素降解; 防治靶标

Isolation and identification of the intestinal bacteria, and screening of the cellulolytic bacteria, of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuid) larvae

LI Hong-Wei^{1,2**} YANG Xiao-Jie^{1,2} XIANG Yi-Zhou^{1,2} LIN Lian-Bing^{1,2} ZHANG Qi-Lin^{1,2***}

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2. Engineering Research Center for Replacement Technology of Feed Antibiotics of Yunnan College, Kunming 650500, China)

Abstract [Objectives] To determine the composition of culturable bacteria, and screen cellulolytic bacteria, in the intestine of *Spodoptera frugiperda* larvae. [Methods] The traditional bacterial culture method and the 16S rDNA molecular marker were used to identify culturable bacteria in the intestine of *S. frugiperda* larvae. Congo red staining was used to screen cellulolytic bacteria, and cellulase activity was determined with the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method under different pH (5.0-9.0). [Results] Fourteen intestinal bacterial strains were isolated, including *Glutamicibacter*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Ochrobactrum*, which belong to eleven genera of three phyla; Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria. Among these, two cellulolytic bacteria strains from the *Bacillus* genus of Firmicutes were identified. The results show that the cellulase activities of these two cellulolytic strains were relatively higher under pH 5.0-8.0 and peaked at pH 8.0. [Conclusion] The intestine of *S. frugiperda* larvae

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31960286); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2019J0050)

**第一作者 First author, E-mail: lihongwei667@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangql@kust.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-11-22; 接受日期 Accepted: 2020-03-04

contains a diversity of bacteria. The cellulase activity of cellulolytic strains was significantly higher under alkaline than under acid conditions. These results provide new information on cellulolytic bacteria, and contribute to their use in feed production, food processing and chemical energy. In addition, beneficial intestinal bacteria are expected to become a new target for controlling *S. frugiperda* which is now a major global pest.

Key words *Spodoptera frugiperda* larvae; culturable intestinal bacteria; identification of bacteria species; cellulose degradation; control targets

纤维素是陆生植物光合作用的初级产物, 占植物干重的 35%-50%, 是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物, 也是自然界中数量最大的可再生资源之一 (Klemm, 2005; Yadav and Dubey, 2018)。然而, 纤维素中存在大量高能氢键, 导致人们对其水解困难, 利用率低下 (Klemm, 2005)。因此, 如何开发及高效利用纤维素资源是近几十年来研究人员一直探索的问题 (Bianchetti *et al.*, 2011)。昆虫是地球上物种多样性最高、分布最广、适应能力最强的动物类群 (Zhang and Emery, 2012; Dijkstra *et al.*, 2014)。肠道菌群能帮助昆虫吸收利用营养物质并为其提供食物中缺乏的生命元素, 故其对昆虫生态适应和生存有举足轻重的作用 (郭军等, 2015; Giron *et al.*, 2016; 董志祥等, 2018), 主要表现在宿主的营养供给、消化食物、生殖发育和抵抗病原菌等方面 (Kaltenpoth and Engl, 2014; Giron *et al.*, 2016; Provorov and Onishchuk, 2018), 包括宿主对纤维素降解。大多数植食性昆虫能有效利用高纤维的食物, 纤维素酶是降解纤维素的高活性生物催化剂, 植食性昆虫利用其肠道中降解纤维的细菌分解纤维素类物质, 从而促进昆虫对食物的吸收利用 (Chakraborty *et al.*, 2000; Mikaelyan *et al.*, 2014; 王立秀等, 2018)。可见, 昆虫肠道中蕴含大量的降解纤维素细菌资源, 有待进一步发掘。

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 隶属鳞翅目 (Lepidoptera)、夜蛾科 (Noctuidae)、灰翅夜蛾属 (*Spodoptera*), 又称草地夜蛾、伪粘虫, 是一种全球跨国界迁飞性重大农业害虫 (Kakumani *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2019)。2017 年, 草地贪夜蛾被联合国粮农组织列入世界十大植物害虫“黑名单”, 广泛分布于北美洲、中美洲、加勒比海、南亚及东南亚地区 (Yang *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2020)。其幼虫取食玉米、水稻、烟

草等 80 余种农作物的幼嫩叶片、根、茎, 高龄幼虫也会取食农作物的果穗, 造成农作物大量损失 (Wu *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2020)。

鉴于草地贪夜蛾幼虫植食的特性, 本文以其肠道样品为材料, 首次研究草地贪夜蛾幼虫肠道细菌菌群结构, 并基于体外培养获得的细菌, 筛选纤维素降解菌株并进行酶活测试。研究结果将丰富工业生产中纤维素降解细菌资源, 并为草地贪夜蛾的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 草地贪夜蛾幼虫肠道菌的分离及纯化

供试虫源于 2019 年 6 月采自陕西省汉中市洋县玉米田。带回实验室后, 通过 *cox1* 分子标记对草地贪夜蛾进一步确定。为了去除虫体体表杂质和微生物, 用无菌水将 10 头草地贪夜蛾幼虫冲洗 3 次, 75%乙醇冲洗 2 次, 最后再用无菌水冲洗 3 次。在解剖镜下迅速取出肠道, 并置于装有 500 μ L 无菌水的已灭菌 1.5 mL 离心管中, 将其研磨呈匀浆状后, 用无菌水补至 1 mL。分别按梯度稀释至 10^{-7} , 取 10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 4 个梯度菌液各 100 μ L, 分别涂布到 pH 为 7.0 的 LB 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基 (NA)、牛肉膏蛋白胨葡萄糖培养基 (BPDA)、哥伦比亚血琼脂培养基上 (CA), 每个浓度设置 3 个重复。于 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h, 挑取单菌落接种于装有 5 mL 的液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床上培养 24 h, 利用平板划线分离法进一步纯化。将菌株编号, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 震荡培养 12 h 后, 于 50%甘油中保存在 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

1.2 肠道细菌基因组 DNA 提取及 16S rDNA 的 PCR 扩增

细菌 DNA 的纯化按照细菌基因组 DNA 提

取试剂盒（天根/中国）的操作步骤进行。用通用引物 27F、1492R 对细菌的 16S rDNA 进行特异性扩增。配置 25 μL 的 PCR 扩增体系：MIX 12.5 μL ，DNA 模板 2 μL ，27F、1492R 引物各 0.5 μL ，剩余体系用双蒸水补齐。PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，35 个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。PCR 产物大小用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳确认，并送至上海生工生物技术有限公司进行切胶纯化及双向测序。

1.3 菌种鉴定及系统发育树分析

序列进行拼接及人工校对检查后，将其提交至美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Informmion, NCBI）网站的 GenBank 数据库，采用 BLAST 在线服务器（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）将其与细菌数据库进行比对，根据得分最高，且序列一致性在 98% 以上的已知细菌种类确定目标菌种。选取物种地位明确的细菌种类，并下载相应的 16S rDNA 序列。利用 MEGA 6.0 软件包中的 Clustal W 子程序（Tamura *et al.*, 2013），联合所测菌株 16S rDNA 序列进行多重序列比对；采用 Gblocks 软件（Talavera and Castresana, 2007）鉴定序列间适宜用于系统发育分析的区域；将序

列比对结果导入到 MEGA 中，评估最佳碱基替换模型，并利用最大似然法（100 次取样）构建系统发育树，明确各菌株分类地位。

1.4 纤维素降解细菌筛选

将分离得到的细菌菌落点种于羧甲基纤维素钠培养基（CMC）中，37 $^{\circ}\text{C}$ 下，培养 48 h 后用 1% 的刚果红染色 30 min，5% 的 NaCl 脱色 30 min，观察并记录水解圈直径和菌落直径。实验独立重复 3 次。

1.5 纤维素酶活测定

取纯化后的菌液各 100 μL 接种于配置好的不同 pH（5.0-9.0）的液体 LB 培养基中（装液量 5 mL），于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h；取 1.5 mL 培养液于灭菌后的 2 mL 离心管中，13 000 r/min 离心 10 min，取其上清液作为粗酶液，并用 3，5-二硝基水杨酸法（DNS 法）在 530 nm 处测量其消光度。后于 50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 7.0 条件下反应 30 min，每分钟水解羧甲基纤维素产生相当于 1 μg 还原糖所需的酶量，定义为一个酶活力单位，用 U 表示。查葡萄糖标准曲线 $y=0.3068x-0.0535$ ， $R^2=0.9927$ ，计算 2 株纤维素降解菌株的纤维素酶活力，并进行差异分析，每组设置 3 个重复。标准曲线制作数据见表 1。

表 1 葡萄糖标准曲线数据
Table 1 Data of glucose standard curve

试管号 Test tube number	1	2	3	4	5	6
1 mg/mL 葡萄糖标准溶液 (mL) 1 mg/mL glucose standard solution	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蒸馏水(mL) Distilled water	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
葡萄糖浓度 (mg/mL) Glucose concentration	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
pH 4.8 磷酸氢二钠-柠檬酸 (mL) pH 4.8 disodium hydrogen phosphate-citricacid	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
DNS 试剂 (mL) DNS reagent	3	3	3	3	3	3
沸水浴 7 min 后迅速冷却，加入蒸馏水 (mL) Rapid cooling after boiling water bath for 7 minutes, adding distilled water	5	5	5	5	5	5

1.6 数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 对数据进行整理分析，IBM SPSS 22.0 软件对数据进行显著性检

验。采用 One-way ANOVA 方差分析和最小显著差异法（Least-Significant Difference, LSD）测验不同 pH 值下纤维素降解细菌的纤维素酶活力间及多重比较的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾肠道菌的分离

LB、NA、BPDA 和 CA 共 4 种培养基培养草地贪夜蛾幼虫肠道细菌, 共获得 105 个菌落, 根据菌落的形态、大小、颜色共鉴定出 14 种不同的细菌种类: LB 培养基上 6 种, NA 培养基上 5 种, BPDA 培养基上 3 种, CA 培养基上 2 种。14 种细菌的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库比对后, 结果如表 2 所示。14 条序列与 11 个属细菌的 16S rDNA 序列具有较高同源性, 序列一致性在 98%以上并构建系统发育树(图 1)。它们分别属于放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria) 3 门, 谷氨酸棒杆菌属(*Glutamicibacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、摩根菌属(*Morganella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、克洛诺杆菌属(*Cronobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*) 11 属。

2.2 纤维素降解细菌的筛选

在 CMC 筛选培养基上经 1%的刚果红染色 1 h, 5%的 NaCl 脱色 1 h 后, 得到了具有清晰溶解圈的细菌(图 2)。从 14 株细菌中共筛选到 2 株产纤维素酶的细菌种类, 分别为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)和解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 产酶大小用菌株水解圈直径和菌落直径之比表示(表 3)。结果显示: 2 株纤维素降解菌株的菌落直径与水解圈直径之间差异显著($P<0.05$)。

表 2 草地贪夜蛾幼虫肠道可培养细菌 16S rDNA 的分子鉴定
Table 2 Molecular identification of cultivable intestinal isolates in the *Spodoptera frugiperda* larvae based on 16S rDNA sequence analysis

菌株 Strains	分子鉴定 Molecular identification	序列一致性(%) Sequence identity	GeneBank 登录号 GenBank accession No.
放线菌门 Actinobacteria			
3-2	谷氨酸棒杆菌 <i>Glutamicibacter mysorens</i>	100	AJ617482
厚壁菌门 Firmicutes			
3-11	克氏肠球菌 <i>Enterococcus crotali</i>	99	NR156980
4-7	解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	NR117946
4-8	贝莱斯芽胞杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>	100	NR116240
4-12	鹌鸡肠球菌 <i>Enterococcus gallinarum</i>	100	NR104559
4-5	松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	99	NR025520
变形菌门 Proteobacteria			
3-5	摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i>	98	NR113580
3-13-2	霍氏肠杆菌 <i>Enterobacter hormaechei</i>	99	NR042154
3-13-1	福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	98	NR026331
4-4	莫金斯克罗诺杆菌 <i>Cronobacter muytjensii</i>	100	NR118088
4-2	肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	NR041750
4-19	液化沙雷氏菌 <i>Serratia liquefaciens</i>	99	NR112008
5-15-2	路氏肠杆菌 <i>Enterobacter ludwigii</i>	100	NR042349
6-10	人苍白杆菌 <i>Ochrobactrum anthropi</i>	98	NR074243

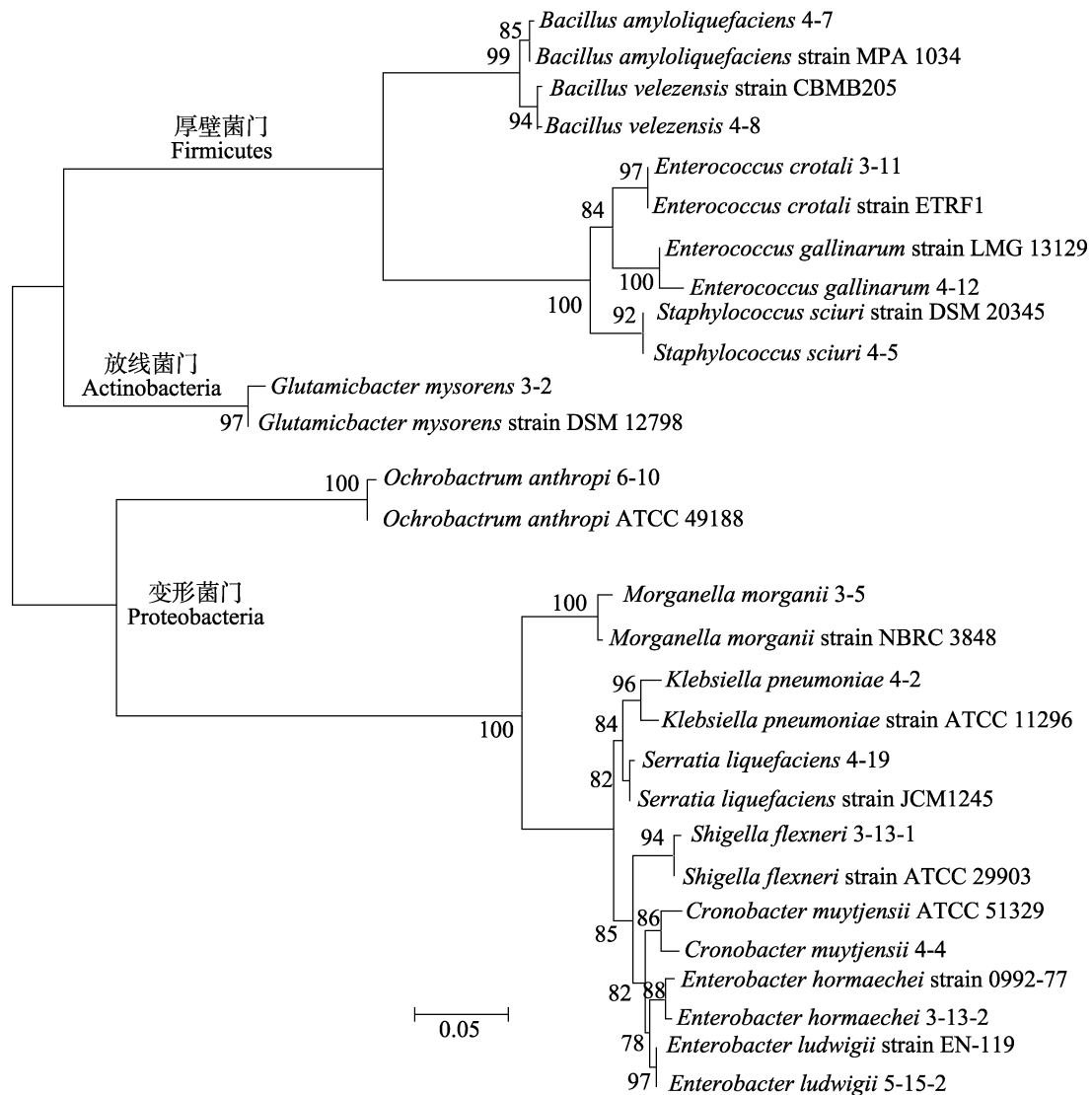


图 1 基于 16S rDNA 序列构建的草地贪夜蛾幼虫肠道细菌系统发育树

Fig. 1 16S rDNA-based phylogenetic tree of intestinal bacteria in the *Spodoptera frugiperda* larvae

Bacillus amyloliquefaciens: 解淀粉芽孢杆菌; *Bacillus velezensis*: 贝莱斯芽孢杆菌; *Enterococcus crotali*: 克氏肠球菌; *Enterococcus gallinarum*: 鹌鸡肠球菌; *Staphylococcus sciuri*: 松鼠葡萄球菌; *Glutamicibacter mysorens*: 谷氨酸棒杆菌; *Ochrobactrum anthropi*: 人苍白杆菌; *Morganella morganii*: 摩氏摩根菌; *Klebsiella pneumoniae*: 肺炎克雷伯氏菌; *Serratia liquefaciens*: 液化沙雷氏菌; *Shigella flexneri*: 福氏志贺氏菌; *Cronobacter muytjensii*: 莫金斯科诺诺杆菌; *Enterobacter hormaechei*: 霍氏肠杆菌; *Enterobacter ludwigii*: 路氏肠杆菌。

2.3 纤维素降解菌株酶活力测定

采用 DNS 法测定纤维素酶活大小,并在 pH 5.0-9.0 之间寻找粗酶降解纤维素的最佳 pH。由图 3 可以看出,粗酶在 pH 5.0-9.0 之间均有酶活力,在 pH 为 9.0 时 pH 值最低, pH 5.0-8.0 粗酶的酶活力逐渐增加,到 pH 为 8.0 时达到最高。单因素方差分析及最小显著差异法多重比较结果显示:2 株纤维素降解细菌在不同 pH 下的酶

活力差异性显著,具有统计学意义($P < 0.05$) (表 4)。

3 讨论

本研究共分离得到 3 门 11 属草地贪夜蛾幼虫肠道细菌,主要以变形菌门和厚壁菌门为主,这与大多数昆虫肠道细菌构成相似 (Adams and Raj, 2005; 郑亚强等, 2017; 王立秀等, 2018),表明这两个门的细菌是昆虫肠道中相对丰度最

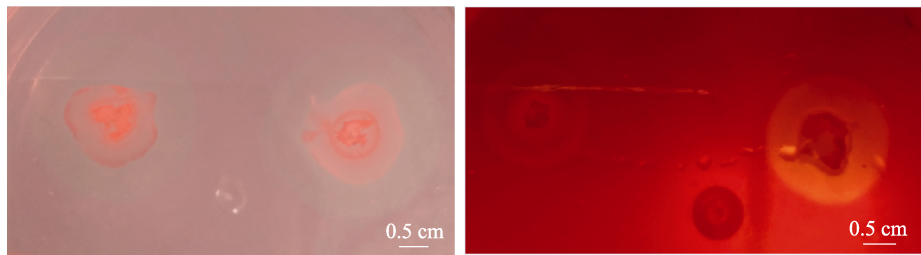


图 2 菌株 4-7、4-8 经刚果红染色后在 CMC 培养基平板上的水解圈
Fig. 2 Hydrolysis circle of strains 4-7 and 4-8 on CMC medium plate after Congo red staining

表 3 草地贪夜蛾幼虫肠道纤维素降解细菌的水解圈统计

Table 3 Statistics for hydrolysis circle of cellulose-degrading bacteria in intestine of the *Spodoptera frugiperda* larvae

菌株 Strains	菌落直径 (mm) Diameter of bacterial colony (d)	水解圈直径 (mm) Diameter of zone (D)	水解圈直径/菌落直径 (D/d)	P 值 P values
4-7	7.30±0.69	23.77±1.09	3.26	0.000
4-8	10.67±0.96	25.73±1.11	2.41	0.000

表中数据为平均值±标准误。Data in the table are mean ± SE.

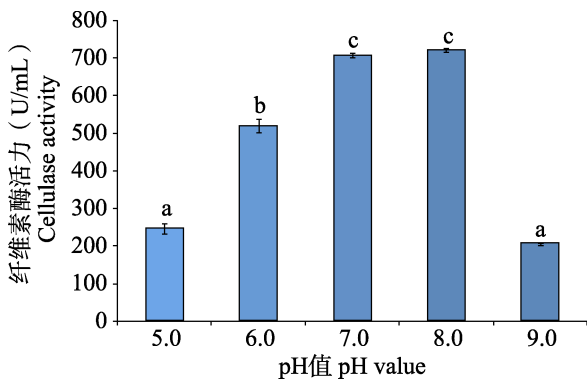


图 3 草地夜蛾幼虫肠道中纤维素降解细菌在不同 pH 值下的纤维素酶活力
Fig. 3 Cellulase activity of cellulose-degrading bacteria in intestinal tract of *Spodoptera frugiperda* larvae at different pH values

柱上标有不同小写字母示差异显著
($P<0.05$, 单因素方差分析)。
Histograms with different small letters indicate significant difference ($P<0.05$, One-way ANOVA).

高的优势菌群。鳞翅目昆虫中,家蚕 *Bombyx mori* 幼虫肠道菌以肠球菌属、不动杆菌属、拟杆菌属、假单胞菌属和甲基杆菌属为优势菌群 (Anand *et al.*, 2010; Cappellozza *et al.*, 2011); 黏虫幼虫肠道中,以肠球菌属、泛菌属 (*Pantoea*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和葡萄球菌属为优势类群 (He *et al.*, 2013); 舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫肠道菌群中,以肠球菌属、葡萄球菌属和假单胞菌属细菌为优势类群 (Broderick *et al.*,

2004)。总之,已有针对鳞翅目昆虫肠道菌群的培养分离结果,均与草地贪夜蛾幼虫肠道菌研究结果相似。可见,鳞翅目昆虫幼虫肠道中,可培养的优势菌主要为葡萄球菌属、芽胞杆菌属、肠杆菌属、肠球菌属等。值得注意的是,由于体外分离培养无法准确地模拟宿主肠道环境,大量的肠道细菌种类还无法进行宿主体外培养。但是随着基于高通量测序的肠道微生物多样性和宏基因组测序技术的发展,人们正在从基因组学数据中了解细菌的生物学特性,从而开发出匹配的培养基。如近年来,有研究者推出了根据 16S rDNA 序列直接对目标菌株进行培养基预测的数据库 (<http://komodo.modelseed.org/default.htm>) (Oberhardt *et al.*, 2015),为挖掘及利用肠道微生物资源提供了新的途径。

本研究获得了 2 株具有纤维素降解能力的芽胞杆菌,这与草地贪夜蛾取食特点密切相关。以往研究表明,纤维素降解细菌在昆虫肠道内不仅可以帮助宿主消化摄入体内的高纤维素食物(如大多数作物的叶片和茎秆),还可将大分子物质分解为可利用的小分子有机物,使其归还到土壤中,促进了生态系统物质循环的物质、能量流动,尤其是碳循环(徐荣等,2012);此外,还可通过进一步优化其纤维素降解酶产出和活性条件,更好地服务于农业与环境等领域(王立秀等,

表 4 草地贪夜蛾幼虫肠道中纤维素降解细菌在不同 pH 值下纤维素酶活力的单因素方差分析及多重比较
Table 4 One-way ANOVA and multiple comparison of cellulase activity of cellulose-degrading bacteria in the intestinal tract of *Spodoptera frugiperda* larvae at different pH values

pH 组 pH groups		平均值 Mean value	标准误 Standard error (SE)	P 值 P value	95%置信区间 95% confidence limits	
					上限 Upper limits	下限 Lower limits
pH 5.0 vs.	pH 6.0	- 273.215	78.870	0.000	- 194.344	- 352.085
	pH 7.0	- 461.031	133.088	0.000	- 327.943	- 594.120
	pH 8.0	- 475.952	137.396	0.000	- 338.557	- 613.348
	pH 9.0	40.779	11.772	0.009	52.551	29.007
pH 6.0 vs.	pH 7.0	- 187.817	54.218	0.000	- 133.599	- 242.035
	pH 8.0	- 202.738	58.525	0.000	- 144.213	- 261.263
	pH 9.0	313.994	90.642	0.000	404.636	223.352
pH 7.0 vs.	pH 8.0	- 14.921	4.307	0.034	- 10.614	- 19.228
	pH 9.0	501.811	144.860	0.000	646.671	356.950
pH 8.0 vs.	pH 9.0	516.732	149.168	0.000	665.899	367.564

多重比较分析采用最小显著差异方法。Multiple comparison analysis was done by the LSD method.

2018)。此外, DNS 法结果显示, pH 5.0 与 pH 9.0 时纤维素酶活最低且相差不大, 证明过酸和过碱均会抑制草地贪夜蛾肠道中纤维素降解细菌的纤维素酶活。pH 5.0-8.0 时, 纤维素酶活逐渐增加, 当 pH 达到 8.0 时, 纤维素酶活达到最大, 且与 pH 7.0 和 pH 9.0 时存在显著差异, 表明弱碱性是草地贪夜蛾幼虫肠道纤维素降解细菌纤维素酶活发挥的最佳条件。值得注意的是, 本研究中鉴定的纤维素降解细菌的纤维素酶活显著高于(相同 pH 下: 4-5 倍)从鞘翅目昆虫阿南原等跳甲 *Proisotoma ananevae* 成虫肠道分离的纤维素降解细菌(王立秀等, 2018)。这些结果表明草地贪夜蛾幼虫肠道纤维素降解细菌具有更好的纤维素降解能力, 这也许是草地贪夜蛾取食量大、迁飞能力强、近期爆发成灾的生物学基础之一。

芽胞杆菌属是产纤维素酶的常见类群, 能够降解纤维素等大分子物质, 广泛存在于环境和昆虫肠道中(Broderick *et al.*, 2006; Auta *et al.*, 2017)。本研究筛选出的两株纤维素降解菌株均为芽胞杆菌, 可见其对草地贪夜蛾纤维素降解的贡献较大。本研究未在肠杆菌属及肠球菌属中筛选到产纤维素酶的菌株, 与家蚕幼虫和阿南原等

跳甲成虫肠道产纤维素酶菌株筛选结果类似(Anand *et al.*, 2010; 王立秀等, 2018)。但是, 肠杆菌属细菌能介导昆虫对芽胞杆菌的敏感性, 并能帮助昆虫降解纤维素(Anand *et al.*, 2010), 暗示了肠杆菌间接地促进草地贪夜蛾对食物中纤维素的降解。此外, 不同昆虫类群肠道中纤维素降解细菌涵盖不同的属, 如本研究为芽胞杆菌属; 阿南原等跳甲成虫肠道中为芽胞杆菌属、土地芽胞杆菌属(*Terribacillus*)、赖氨酸芽胞杆菌属(*Lysinibacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)和谷氨酸棒杆菌属(*Glutamicibacter*)(王立秀等, 2018); 家蚕幼虫中为变形杆菌属(*Proteus*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)和柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)(Anand *et al.*, 2010; Cappellozza *et al.*, 2011)。这些证据表明昆虫肠道中纤维素降解细菌种类的较高多样性, 也许是不同昆虫类群间食性高度多样化导致的。

本研究首次对草地贪夜蛾幼虫肠道细菌进行体外培养, 明确了其中纤维素降解细菌种类, 且对其纤维素降解的生理特性进行了初探。研究结果为将来饲料生产、食品加工、化学能源等行业提供了性能优良的纤维素降解细菌资源。另外, 肠道纤维素降解细菌作为草地贪夜蛾食物消

化的益生菌,其可考虑作为防控草地贪夜蛾灾害的靶标。例如:针对纤维素降解细菌,发掘其特异的噬菌体、克隆表达噬菌体裂解酶、研发低毒特异化学杀菌剂等,对草地贪夜蛾为害区域进行规律喷洒,破坏其肠道菌群功能,致使其失去或减弱消化能力,为草地贪夜蛾防治提供新的思路。

参考文献 (References)

- Adams L, Raj B, 2005. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of *Formosan termite*. *Bioresour. Technol.*, 96(14): 1592–1598.
- Alves DS, Costa VA, Machado ART, Oliveira DF, Carvalho GA, 2020. *Duguetialanceolata* A. St.-Hil. Stem bark produces phenylpropanoids lethal to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Prot.*, 127: 104965.
- Anand AAP, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DIG, Vasan PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ, Vendan SE, 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyxmori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J. Insect Sci.*, 10(1): 107.
- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH, 2017. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environ. Pollut.*, 231(2): 1552–1559.
- Bianchetti CM, Elsen NL, Fox BG, Jr PG, 2011. Structure of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum* in complex with phosphate. *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 67(11): 1345–1349.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1): 293–300.
- Broderick NA, Raffa KF, Jo H, 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(41): 15196–15199.
- Cappellozza S, Alessio S, Gianluca T, Marta S, ElenaV, Paolo P, Eleonora F, Andrea S, 2011. Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet. *J. Invert. Pathol.*, 106(3): 386–393.
- Chakraborty N, Sarkar GM, Lahiri SC, 2000. Cellulose degrading capabilities of cellulolytic bacteria isolated from the intestinal fluids of the silver cricket. *Environmentalist*, 20(1): 9–11.
- Dijkstra KD, Monaghan MT, Pauls SU, 2014. Freshwater biodiversity and aquatic insect diversification. *Annu. Rev. Entomol.*, 59: 143–163.
- Dong ZX, Li HY, Chen YF, Zhang QL, Li JL, Guo J, 2018. Research progress on culture methods and characteristics of honeybee intestinal flora. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(6): 963–972. [董志祥, 李还原, 陈奕霏, 张棋麟, 李继莲, 郭军, 2018. 蜜蜂肠道菌群的培养方法及特性研究进展. 应用昆虫学报, 55(6): 963–972.]
- Giron D, Dedeine F, Dubreuil G, Huguet E, Simon JC, 2016. Influence of microbial symbionts on plant–insect interactions. *Adv. Bot. Res.*, 81: 225–257.
- Guo J, Wu Ji, Deng XY, Lin LB, Liu S, Li JL, 2015. Progress in the study of the function of insect intestinal flora. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1345–1352. [郭军, 吴杰, 邓先余, 林连兵, 刘珊, 李继莲, 2015. 昆虫肠道菌群的功能研究进展. 应用昆虫学报, 52(6): 1345–1352.]
- He C, Nan X, Zhang Z, Li M, 2013. Composition and diversity analysis of the gut bacterial community of the Oriental armyworm, *Mythimna separata*, determined by culture-independent and culture-dependent techniques. *J. Insect Sci.*, 13(1): 165.
- Kakumani PK, Malhotra P, Mukherjee SK, Bhatnagar RK, 2014. A draft genome assembly of the army worm, *Spodoptera frugiperda*. *Genomics*, 104(2): 134–143.
- Kaltenpoth M, Engl T, 2014. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Func. Ecol.*, 28(2): 315–327.
- Klemm D, 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 44(22): 3358–3393.
- Mikaelyan A, Strassert JFH, Tokuda G, Brune A, 2014. The fiber-associated cellulolytic bacterial community in the hindgut of wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Environ. Microbiol.*, 16(9): 2711–2722.
- Oberhardt MA, Zarecki R, Gronow S, Lang E, Klenk H, Gophna U, Ruppert E, 2015. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism–media pairings. *Nat. Commun.*, 13(6): 8943.
- Provorov NA, Onishchuk OP, 2018. Microbial symbionts of insects: Genetic organization, adaptive role, and evolution. *Microbiology*, 87(2): 151–163.
- Wu QL, Jin YY, Wu KM, 2019. Analysis of migration routes of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) from Myanmar to China. *Plant Protection*, 45(2): 1–6.

- Talavera G, Castresana J, 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.*, 56(4): 564–577.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.
- Wang LX, Chen W, Xie GL, Zhou L, 2018. Isolation and identification of bacteria from the genus of *Anan* and the screening of cellulose-degrading bacteria. *Acta Entomologica Sinica*, 61(7): 835–842. [王立秀, 陈伟, 谢桂林, 周亮, 2018. 阿南原等跳肠道细菌的分离鉴定及降解纤维素细菌的筛选. 昆虫学报, 61(7): 835–842.]
- Xuan C, Graham PH, Paula AP, David K, Fei Y, 2019. Fitness costs of Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* on different hosts. *Pest Management Science*, 75(4): 1074–1080.
- Xu R, ZhangKD, Han S, Yi SQ, Lv WY, Li FL, Yang H, 2012. A mixed cellulolytic flora was isolated from the termite like *Nasutitermes* sp. Commemoration of the 60th Anniversary of the Establishment of the Chinese Society of Microbiology and the 2012 Academic Annual Meeting of the Chinese Society of Microbiology. Nanjing. 309–310. [徐荣, 张坤迪, 韩帅, 冀世奇, 吕宛玉, 李福利, 杨红, 2012. 从象白蚁 *Nasutitermes* sp. 中分离到一个能降解纤维素的混合菌群. 纪念中国微生物学会成立六十周年大会暨 2012 年中国微生物学会学术年会. 南京. 309–310.]
- Yadav S, Dubey SK, 2018. Cellulose degradation potential of *Paenibacillus lautus* strain BHU3 and its whole genome sequence. *Bioresour. Technol.*, 262: 124–131.
- Yang F, Williams J, Porter P, Huang F, Kerns DL, 2019. F2 screen for resistance to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa51 protein in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from Texas, USA. *Crop Prot.*, 126: 104915.
- Zhang Y, Emery P, 2012. 15-molecular and neural control of insect circadian rhythms//Gilbert LI (ed.). *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press. 513–551.
- Zheng YQ, Du GZ, Li YF, Chen B, Li ZY, Xiao GL, 2017. Isolation and identification of intestinal bacteria from potato tuber moth and its degradation on plant-derived macromolecular compounds. *J. Enviro. Entomol.*, 39(3): 525–532. [郑亚强, 杜广祖, 李亦菲, 陈斌, 李正跃, 肖关丽, 2017. 马铃薯块茎蛾肠道细菌分离鉴定及其对植物源大分子化合物的降解作用. 环境昆虫学报, 39(3): 525–532.]