

美洲大蠊成虫肠道可培养细菌多样性研究

刘晓飞 刘娟 田蕾 陈芳敏 杨雅琳 张小平*

(四川农业大学 资源环境学院 微生物系 四川 成都 611130)

摘要:【目的】了解美洲大蠊成虫肠道可培养细菌的多样性。【方法】运用纯培养法、数值分类和 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对样品中可培养细菌多样性进行研究。【结果】从 NA 培养基中分离得到 54 株细菌, 根据形态观察和部分生理生化特性, 选取 32 个代表性菌株进行 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明, 数值分类中的代表菌株在 82%相似水平上可分为 12 个表观群; 这些分离菌株代表 20 个物种, 属于 4 个大的系统发育类群(Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria)的 10 个科、15 个属。多数菌株属于 Proteobacteria 门(15 株, 占 46.9%)和 Bacteroidetes 门(10 株, 占 31.3%)。【结论】美洲大蠊成虫肠道内存在较为丰富的细菌多样性。

关键词: 美洲大蠊成虫, 可培养细菌, 系统发育分析, 多样性

Diversity of culturable bacteria isolated from *Periplaneta americana* adult gut

LIU Xiao-Fei LIU Juan TIAN Lei CHEN Fang-Min YANG Ya-Lin
ZHANG Xiao-Ping*

(Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University,
Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Objective] To understand the diversity of culturable bacteria isolated from *Periplaneta americana* adult gut. [Methods] Bacteria were isolated from the sample by using conventional culture-dependent method and then investigated by using numerical taxonomy and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. [Results] Totally 54 bacteria strains were selected on nutrient agar plate. On the basis of morphological, physiological and biochemical characteristics, we selected 32 strains to perform a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. The results showed that the strains can be divided into 12 apparent groups on the 82% similarity level by numerical taxonomy; 32 isolates represented 20 species, belonging to 15 genera of 10 families in four phylogenetic groups (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Actinobacteria). The most abundant and diverse isolates were within the Proteobacteria (15 strains, 46.9%) and the Bacteroidetes (10 strains, 31.3%). [Conclusion] Overall, the study results presented above demonstrated that there are abundant bacteria diversity in the *Periplaneta americana* adult gut.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102802-05)

*通讯作者: ✉: zhangxiaopingphd@126.com

收稿日期: 2015-02-01; 接受日期: 2015-04-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-28

Keywords: *Periplaneta americana* adult, Culturable bacteria, Phylogenetic analysis, Bacterial diversity

昆虫是动物界中最大的类群, 现存种类已超过 100 万种, 并以每年 7 000 种的速度递增^[1]。我国昆虫资源相当丰富, 约占世界昆虫总数的 10%^[2]。肠道是特殊的生活环境, 昆虫食性的多样性和肠道结构的多样性决定肠道微生物种类的多样性^[3]。昆虫共生菌可能是新型天然产物的广泛来源^[4]和新活性天然产物的重要来源^[5], 但是昆虫肠道微生物的研究尚欠系统和深入, 所涵盖的昆虫种类仅零星少数, 如蝎子^[6]、蜜蜂^[7]等。较为详细的研究主要集中在白蚁^[8], 还有松毛虫^[9]等农作物害虫, 而美洲大蠊肠道微生物的研究鲜有报道。

美洲大蠊(*Periplaneta americana*)属节肢动物门, 昆虫纲, 蜚蠊目。在地球上已经生存了 3.5 亿年, 是世界上生命力最强、最古老、至今繁衍最成功的昆虫类群之一。它食性广泛, 喜食糖和淀粉, 污染食物、传播病菌和寄生虫, 是世界性卫生害虫, 但其药用价值早已引起人们的重视。李时珍的《本草纲目》中记载:“蜚蠊主治淤血、寒热, 破集聚, 通利血脉”, 并明确提到“此物乃血药”。云南大理医学院研制的肝龙胶囊(国药准字 Z20050113), 其主要成分为美洲大蠊提取物, 具有抗乙型肝炎的功效^[10]。他们还从美洲大蠊提取出氨基酸和粘多糖, 这些化学物具有治疗各种创伤、溃疡、结肠炎、较强的抗艾滋病病毒等作用。这些药用价值与肠道内共生菌可能存在密切关系。为此, 本文以分离于美洲大蠊的内生细菌为对象, 通过表型性状测定和 16S rRNA 基因序列分析对它们的表型、系统发育和多样性进行研究, 以期发现有药用价值的菌种或新菌种, 扩大药用菌种的来源, 也可为相关微生物资源的研究和利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 美洲大蠊成虫, 购于四川荣县某养殖场, 以饲料、秸秆为食。

1.1.2 主要仪器与试剂: Tgradient PCR 扩增仪, 德国 Biometra 公司; Gel-Doc2000 凝胶成像分析仪, Bio-Rad 中国公司; GXZ 型智能光照培养箱, 宁波东南仪器有限公司; YQX 型厌氧培养箱, 上海跃进医疗器械厂。

细菌 DNA 提取纯化和 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增所用酶、引物和试剂参照 Cui 等^[11]。NA 培养基^[12], TSA 培养基^[13]。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集和处理: 选取健康成虫 60 只, 随机均分成 3 组, 饥饿 24 h 排空体内食物残渣, 具体消毒方法参照刘玉升等^[14]的报道。取最后一次漂洗无菌水 300 μ L 涂布在 TSA 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24–72 h, 进行表面消毒检测。若无菌株生长, 说明表面消毒彻底, 否则不可用。

1.2.2 细菌的分离和纯化: 将肠道研磨液稀释至 10^{-1} – 10^{-8} , 吸取 0.1 mL 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 三个稀释度的稀释液涂于 NA 平板上, 重复 3 次。放在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24–72 h, 挑取表征各异的菌落于 NA 培养基上划线培养, 同时镜检其纯度, 直至获得纯的微生物菌株。

1.2.3 生理生化特性测定: 生理生化试验均设 3 个平行及阳性和阴性对照。对供试菌株进行生理生化特性测定, 包括接触酶、苯丙氨酸脱氢酶、赖氨酸脱羧酶等 7 个酶, 硝酸盐、甲基红等 6 种含氮化合物, 山梨醇、肌醇、半乳糖等 21 种糖醇及其他含碳化合物, 具体方法参照东秀珠等^[13]。将测定的生理生化特性阳性结果记为“1”, 阴性记为“0”, 不能确定记为“N”进行编码, 采用平均连锁法进行聚类分析。

1.2.4 16S rRNA 基因的系统发育分析: 基因组 DNA 提取参照 Cui 等^[11]的方法进行。室温干燥后溶于 50 μ L TE 缓冲液中, 1.0% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量。引物为细菌通用引物^[15]8-27F 和

1523-1504R。PCR 扩增体系: DNA 模板(70 mg/L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 12.5 μ L, 8-27F (20 μ mol/L) 1.0 μ L, 1523-1504R (20 μ mol/L) 1.0 μ L, 补足 ddH₂O 到 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 PCR 产物直接测序, 由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。所得序列提交 GenBank 注册, 获取序列号。根据测序结果, 利用 BLAST 软件与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析, 获得相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 再用 Clustal X 进行多序列比对^[16], 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 5.0 (Molecular evolutionary genetics analysis)软件包采用邻接法构建系统进化树^[17], 重复取样 1 000 次进行自展值分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性^[18]。

1.2.5 物种多样性分析: 定义 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 作为同一种^[19], 采用 Shannon-Wiener 指数(H')和均匀度指数(E)计算多样性^[20]。 $H' = -\sum_{i=1}^s P_i \cdot \ln P_i$, $E = H' / \ln S$ 。式中 S 为菌种数, P_i 为第 i 种的多度比例, 可以用 $P_i = n_i / N$ 求出, n_i 是第 i 种的菌株数, N 为所有菌株数总和。

2 结果与分析

2.1 分离细菌表型特征多样性

根据菌落大小、形态、颜色等特征, 挑取分离平板上的单菌落进行划线纯化, 最终从本次采集的 3 组样品中共分离到 54 株细菌。再通过菌落形态、细胞显微形态和部分生理生化等去冗余, 选取 32 个代表菌株, 采用平均链锁法对其进行聚类分析。参与数值分类的代表菌株在 82% 相似水平上可分为 12 个表观群, 聚类结果如图 1 所示, 具体分类组成和典型生理生化特征如表 1 所示。

2.2 分离细菌 16S rRNA 基因序列类群多样性

对 32 株代表性菌株进行 16S rRNA 基因序列测定, 将获得的序列通过在线比对引擎 BLAST 与 GenBank 数据库中已报道的 16S rRNA 基因序列进行相似性比对分析。相似性比对分析表明(表 2), 32

个分离菌株属于细菌域 4 个大的系统发育类 (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria) 的 10 个科、15 个属。多数菌株属于变形菌门(Proteobacteria, 15 株, 占 46.9%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 10 株, 占 31.3%), 其次属于厚壁菌门(Firmicutes, 6 株, 占 18.8%)。

2.3 物种与遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 作为同一种的归类原则^[19], 32 个分类菌株可以归为 20 个物种(表 1 和图 2)。Shannon-Wiener 多样性指数(H') 为 4.87, 均匀度指数(E) 为 1.62, 表明美洲大蠊相关可培养细菌具有较高的物种多样性和均匀度。除了 9 株(SCAU2、3、4、5、9、17、18、20 和 25) 分别与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100% 外(表 1), 其他分离菌株与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 99%, 说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关菌株之间存在着一定的遗传差异。

3 结论

近年来, 多相分类的应用使细菌的分类得到了巨大的发展。其中数值分类是细菌分类研究中传统的方法, 能揭示菌株的具体表型特征, 并能对大量菌株进行初步分群。本文首次采用纯培养法, 表型特征鉴定和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对美洲大蠊肠道可培养细菌的多样性进行了研究。结果表明, 数值分类中的实验菌株在 82% 相似性水平上被划分为 12 个群, 所选菌株基本上按种群分开; 用于系统发育分析的 32 株菌分别归属于 4 个大的系统发育群, 10 个科, 15 个属, 可以分为 20 个物种。系统发育分类与表型特征分类基本吻合, 但略有差异。如在系统发育 Bacteroidetes 门中, 表现为 2 个表观群, 其中菌株 SCAU11 独立为一个表观群, 其余菌株为另一个群; 而在 Firmicutes 门中, 表现为 3 个表观群; 在 Proteobacteria 门中, 表现为 9 个群。特别是表观群 11, 包含上述 3 个门中的某些菌。菌株在系统发育分类中, 大部分菌株与

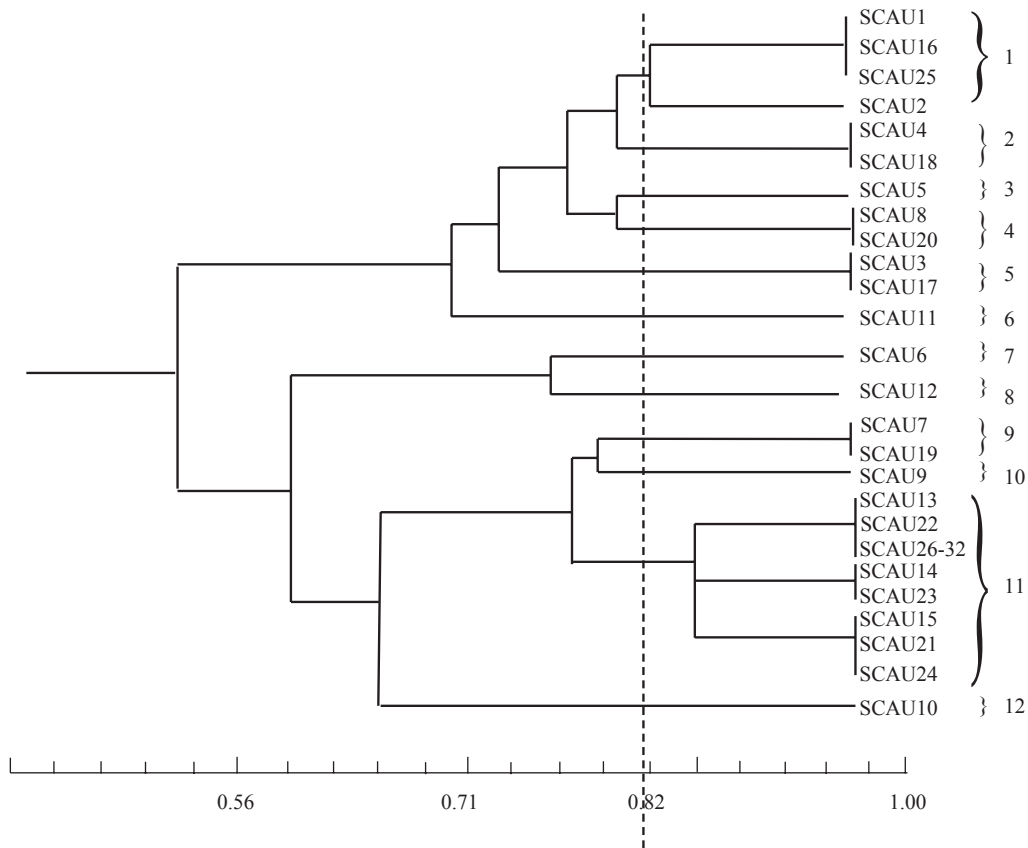


图 1 数值分类聚类图

Figure 1 Dendrogram generated from numerical taxonom

其系统发育的关系最密切的已知物种典型菌株之间的 16S rRNA 基因序列间都有一定差异, 这些结果揭示了美洲大蠊相关可培养细菌较丰富的系统发育多样性、遗传多样性和物种多样性。

本研究表明, Proteobacteria (15 株, 占 46.9%) 和 Bacteroidetes (10 株, 占 31.3%) 在美洲大蠊肠道菌群结构中占绝对优势, 这与房伟等^[21]的研究结果基本吻合, 该文献指出美洲大蠊肠道微生物主要包括变形杆菌门(Proteobacteria, 占 66.4%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 占 17.8%)、厚壁菌门(Firmicutes, 占 14.5%)和梭杆菌门(Fusobacteria, 占 0.6%)。Bertino-Grimaldi 等^[22]实验表明, 美洲大蠊肠道优势菌群为 Proteobacteria 和 Bacteroidetes。Bagde 等^[23]在研究美洲大蠊成虫肠道时发现, 可培养细菌不仅包含肠杆菌属、芽孢杆菌等, 而且还含有伤寒沙门

氏菌、志贺氏杆菌等。一些属于易于培养的微生物在本次实验中未分离出, 可能原因如下: (1) 生活环境和食物来源不同, 本次实验用的是人工养殖的美洲大蠊, 以饲料、秸秆为食; (2) 培养条件和肠道环境不一致; (3) 将肠道微生物限定在营养基质简单、pH 等参数恒定的 NA 平板上培养, 使许多微生物丧失了自由生长的必要条件, 从而表现为不可培养^[24]; (4) 在常规培养中, 忽视某些群体效应, 使美洲大蠊肠道环境的生态依存关系遭到破坏, 菌群间的生物信息交流体系也会发生根本性的改变, 适应性强的物种生长迅速, 而生长缓慢的微生物类型则因营养物的匮乏以及种群信息流通的障碍而受到抑制^[25]。但是, 通过实验, 我们对于美洲大蠊肠道可培养细菌有了一定的初步了解, 为相关微生物资源的研究、保护、开发和利用提供了一定的理

论基础和实践指导。

在实验中分离到相当数量的假单胞菌属和芽孢杆菌属菌种, 可以作为产生河豚毒素(TTX)的来源^[26]。本研究只分离得到 20 种不同的可培养细菌样本, 不同种类的部分细菌可能未被分离出, 还需通过更广泛的采样才能分离到更多的种类。鉴于传统培养方法具有一定的局限性, 后续工作将运用分

子生物学技术进一步判别未培养细菌的种类, 并根据其所属种类的营养需求和生理生化特点, 设计选择性培养基进行分离培养。因此, 有效地结合传统培养方法与 DGGE、荧光原位杂交和样品宏基因组等分子生物学技术将有助于阐明美洲大蠊肠道可培养细菌多样性。

表 1 表观群组成和典型生理生化特征
Table 1 Apparent group of typical composition and physiological and biochemical characteristics

表观群名称 Apparent group name	包含菌株 Contains strains	典型特征 Typical characteristics
1	SCAU1, 2, 16, 25	接触酶阳性, 不能利用苯丙氨酸脱羧酶和脲酶, 硝酸盐还原阳性, 可利用葡萄糖产酸产气, 但不能水解淀粉
2	SCAU4, 18	氧化酶阴性, 可利用麦芽糖、甘露醇和海藻糖作为唯一碳源, 葡萄糖产酸
3	SCAU5	能以硝酸盐和葡萄糖作为唯一的碳氮源, 但不能产生 H ₂ S
4	SCAU8, 20	可液化明胶, 能利用甘露醇和肌醇, 但不产生吲哚
5	SCAU3, 17	接触酶呈阳性, 可以分解鸟氨酸、赖氨酸和精氨酸, 还可以还原硝酸盐, 但是不能分解尿素
6	SCAU11	氧化酶、接触酶阳性, 可利用蔗糖、麦芽糖、甜醇和肌醇等, 可水解淀粉和七叶灵, 但不能利用柠檬酸钠
7	SCAU6	革兰氏阴性, 可利用苯丙氨酸和尿素, 还可还原硝酸盐, 产生 H ₂ S 和吲哚, 液化明胶较慢, 山梨醇和甘露醇中不产酸
8	SCAU12	甲基红试验呈阴性, 但可液化明胶, 葡萄糖发酵产酸, 还原硝酸盐
9	SCAU7, 19	革兰氏阴性, 不运动, 可产生接触酶和氧化酶, 甲基红和 V-P 呈阴性, 可还原硝酸盐, 可利用麦芽糖和纤维二糖作为唯一碳源
10	SCAU9	氧化酶阳性, 不能产生 H ₂ S 和吲哚, 不能利用葡萄糖、蔗糖等产酸, 但是能水解淀粉
11	SCAU13-5, 21-24, 26-32	最大的一个群, 该菌群接触酶呈阳性, 鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶呈阴性, 不能利用半乳糖、甘露醇和山梨醇等作为唯一碳氮源
12	SCAU10	V-P 试验呈阴性, 明胶不液化, 吲哚阳性, 可利用柠檬酸盐和酒石酸盐, 能在肌醇和甘露醇中产酸, 葡萄糖产酸但是不产气

表 2 美洲大蠊可培养细菌与其系统发育关系最密切的典型菌株间的 16S rRNA 系统发育关系

Table 2 Phylogenetic closest neighbors of strains isolated from *Periplaneta americana* based on the 16S rRNA gene sequenc

Phylogenetic groups/Family	Strain (Accession number)	Closest type strain (Accession number)	Similarity (%)
Proteobacteria (15/32)	SCAU1 (KP125977)	<i>Enterobacter hormaechei</i> (KC634321)	99
Enterobacteriaceae (8)	SCAU2 (KP125978)	<i>Citrobacter</i> sp. (KJ726569)	100
	SCAU4 (KP125980)	<i>Serratia marcescens</i> (JQ308606)	100
	SCAU18 (KP125994)	<i>Serratia marcescens</i> (AM691030)	99
	SCAU10 (KP125986)	<i>Providencia vermicola</i> (KF886279)	99
	SCAU6 (KP125982)	<i>Proteus vulgaris</i> (X07652)	100
	SCAU25 (KP126001)	<i>Enterobacter</i> sp. (JQ781590)	99
	SCAU16 (KP125992)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (AM992182)	99
	SCAU7 (KP125983)	<i>Pseudomonas putida</i> (HG416957)	99
Pseudomonadaceae (2)	SCAU19 (KP125995)	<i>Pseudomonas</i> sp. (KJ939322)	99
Sphingomonadaceae (1)	SCAU12 (KP125988)	<i>Novosphingobium panipatense</i> (NR-044210)	99
	SCAU14 (KP125990)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (KF535149)	99
Alcaligenaceae (2)	SCAU23 (KP125999)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (KC414681)	100
	SCAU3 (KP125979)	<i>Acinetobacter</i> sp. (EF412969)	100
Moraxellaceae (2)	SCAU17 (KP125993)	<i>Acinetobacter</i> sp. (JX286668)	99
	SCAU11 (KP125987)	<i>Flavobacterium</i> sp. (DQ778318)	99
Bacteroidetes (10/32)	SCAU13 (KP125989)	<i>Myroides odoratimimus</i> (EU660317)	98
Flavobacteriaceae (10)	SCAU22 (KP125998)	<i>Myroides odoratimimus</i> (EU373431)	99
	SCAU26 (KP126002)	<i>Myroides profundus</i> (KF730743)	99
	SCAU27 (KP126003)	<i>Myroides odoratimimus</i> (EU373415)	99
	SCAU28 (KP126004)	<i>Myroides odoratimimus</i> (EU660317)	99
	SCAU29 (KP126005)	<i>Myroides odoratimimus</i> (GU549435)	99
	SCAU30 (KP126006)	<i>Myroides</i> sp. (JF766694)	99
	SCAU31 (KP126007)	<i>Myroides</i> sp. (KJ000848)	99
	SCAU32 (KP126008)	<i>Myroides odoratimimus</i> (EU331413)	99
Firmicutes (6/32)	SCAU8 (KP125984)	<i>Bacillus subtilis</i> (JQ308573)	99
Bacillaceae (2)	SCAU20 (KP125996)	<i>Bacillus subtilis</i> (KJ469796)	100
Micrococcaceae (1)	SCAU5 (KP125981)	<i>Staphylococcus</i> sp. (AB689746)	100
Kineococcaceae (3)	SCAU15 (KP125991)	<i>Kurthia gibsonii</i> (JN600482)	99
	SCAU21 (KP125997)	<i>Kurthia gibsonii</i> (AM184261)	99
	SCAU24 (KP126000)	<i>Kurthia gibsonii</i> (EF032677)	99
Actinobacteria(1/32)	SCAU9 (KP125985)	<i>Kocuria salsicia</i> (HG934379)	100
Coryneform of bacteria (1)			

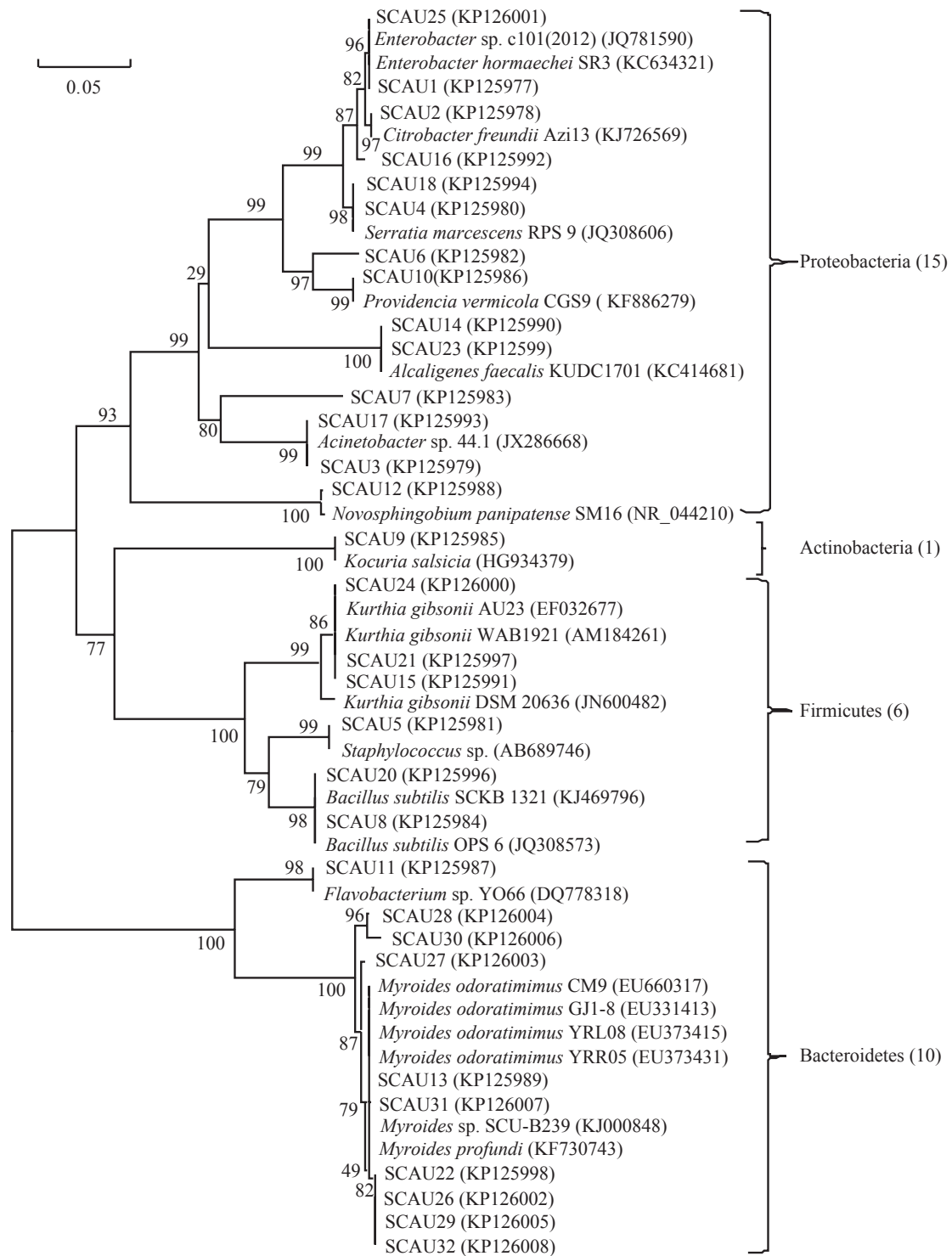


图 2 纯培养方法分离到的美洲大蠊肠道细菌 16S rRNA 基因系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA genes of bacteria community in *Periplaneta americana* gut using culture-dependent method

参考文献

- [1] Huang DJ. The development and utilization of insect resources in China[J]. Journal of Biology, 1999, 16(2): 33-39 (in Chinese)
黄德娟. 我国昆虫资源的开发利用[J]. 生物学杂志, 1999, 16(2): 33-39
- [2] Jiang SJ. Medical Insects Integration in China[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999 (in Chinese)
蒋三俊. 中国药用昆虫集成[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999
- [3] Steele HL, Streit WR. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(2): 105-111
- [4] Poulsen M, Oh DC, Clardy J, et al. Chemical analyses of wasp-associated Streptomyces bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16763
- [5] Ge HM, Tan RX. Symbionts, an important source of new bioactive natural products[J]. Progress in Chemistry, 2009, 21(1): 30-46 (in Chinese)
戈惠民, 谭仁祥. 共生菌——新活性天然产物的重要来源[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 30-46
- [6] Wang BJ, Liu Y, Jiang JT, et al. Microbial diversity in scorpion intestine (*Buthus martensii* Karsch)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 888-893 (in Chinese)
王保军, 刘纘, 姜嘉彤, 等. 蝎子肠道内微生物多样性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 888-893
- [7] Jia HR, Wang X, Zhou T. Introduction of intestinal tract microorganisms in honeybees[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(4): 116-121 (in Chinese)
贾慧茹, 王星, 周婷. 蜜蜂肠道微生物研究概况[J]. 动物医学进展, 2014, 35(4): 116-121
- [8] Zhao K, Chang ZW, Zhang XY, et al. Recent advances in diversity of symbiotic microbes in termite gut and termite control methods[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2012, 18(2): 331-337 (in Chinese)
赵凯, 常志威, 张小燕, 等. 白蚁肠道共生微生物多样性及其防治方法研究现状[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 331-337
- [9] Wang JH, Li B, Zhang WX, et al. Analysis of the diversity of intestinal aerobic bacteria from the 5th instar larvae of *Dendrolimu kikuchii*[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2013, 50(1): 230-234 (in Chinese)
王金华, 李彪, 张武先, 等. 五龄恩茅松毛虫幼虫的肠道好氧细菌多样性分析[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(1): 230-234
- [10] Du YM, Li SN, Chen HS, et al. Experimental research on antiviral activity of Ganlong capsule against duck hepatitis B virus[J]. Journal of Dali University, 2006, 5(4): 6-8 (in Chinese)
杜一民, 李树楠, 陈鸿珊, 等. 新药肝龙胶囊对雏鸭体内鸭乙型肝炎病毒的抑制效果[J]. 大理学院学报, 2006, 5(4): 6-8
- [11] Cui XL, Mao PH, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 2): 357-363
- [12] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265-270
- [13] Dong XZ, Cai MY. Common Bacteria Manual System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [14] Liu YS, Li ML, Liu JZ, et al. Study on the intestinal bacteria in *L. migratoria manilensis*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2007, 19(1): 34-36,39 (in Chinese)
刘玉升, 李明立, 刘俊展, 等. 东亚飞蝗肠道细菌的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2007, 19(1): 34-36,39
- [15] Stackebrandt E, Ludwig W, Fox GE. 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloguing[J]. Methods in Microbiology, 1985, 18: 75-107
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [17] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120
- [18] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791
- [19] Suzuki MT, Rappé MS, Haimberger ZW, et al. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 983-989
- [20] Chen M. Discussion on the theory of ecosystem and biodiversity[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2003, 27(5): 30-34 (in Chinese)
陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2003, 27(5): 30-34
- [21] Fang W, Fang ZM, Liu ZM, et al. Phylogenetic analysis of bacterial community in the gut of American cockroach (*Periplaneta americana*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(9): 984-994 (in Chinese)
房伟, 方泽民, 刘智苗, 等. 美洲大蠊(*Periplaneta americana*)肠道微生物多样性分析[J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 984-994
- [22] Bertino-Grimaldi D, Medeiros MN, Vieira RP, et al. Bacterial community composition shifts in the gut of *Periplaneta americana* fed on different lignocellulosic materials[J]. Springer Plus, 2013, 2(1): 1-11
- [23] Bagde U, Gopi U, Prasad R. Isolation and characterization of gut-associated microbes in cockroach[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(19): 2034-2039
- [24] Peng LL, Wang Q, Xing MX. Advanced in uncultivable microorganisms in nature[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(2): 75-79 (in Chinese)
彭伶俐, 王琴, 辛明秀. 自然界中不可培养微生物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 75-79
- [25] Zhou Y, Liu XJ, Zhu CG, et al. Quorum sensing in bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(1): 122-126 (in Chinese)
周玥, 刘小锦, 朱晨光, 等. 细菌中群体感应调节系统[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 122-126
- [26] Wang GN, Xie LP, Zhang RQ. The distribution of tetrodotoxin and the antagonistic mechanism against TTX in animals[J]. Marine Science Bulletin, 2007, 26(1): 107-113 (in Chinese)
王冠男, 谢丽萍, 张荣庆. 河豚毒素的分布及动物对它的拮抗作用[J]. 海洋通报, 2007, 26(1): 107-113