

DOI:10.14188/j.ajsh.20240612001

一点缀螟肠道降解食物营养及次生代谢物可培养细菌的筛选研究

姚云昊^{1,2}, 符乔斯^{1,2}, 赵国安³, 沈云峰³, 王文倩^{1,2}, 彭跃进^{1,2}, 杜广祖^{1,2}, 陈斌^{1,2*}

- 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201;
- 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201;
- 云南省保山市植保植检站, 云南 保山 678000

摘要: 一点缀螟 *Paralipsa gularis* (Zeller) 是近年来在云南玉米产区发现的一种严重危害玉米果穗的害虫, 为了明确其肠道可培养细菌对食物营养及次生代谢物质的代谢功能, 本研究采用透明圈生物测定法结合高效液相色谱技术, 筛选研究了一点缀螟幼虫肠道可培养淀粉、纤维素、蛋白质、阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸的降解菌。结果表明, 从一点缀螟肠道可培养细菌中共筛选到 18 株分别具有淀粉、纤维素、蛋白质、阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸降解力的细菌, 其中淀粉降解能力最强的为枯草芽胞杆菌(DH3), 透明圈直径(H_p)和菌落直径(D_p)的比值为 1.70; 纤维素的降解能力最强的是苏云金芽胞杆菌(BS1), H_p/D_p 为 4.46; 蛋白质降解能力最强的为粘质沙雷氏菌(BS5), H_p/D_p 为 3.46; 阿魏酸降解能力最强的是枯草芽胞杆菌(DH3), 降解率达 99.92%; 香草醛的降解能力最强的是假格里尼翁布鲁氏菌(DH5), 降解率达 99.82%; 腐生葡萄球菌(BS2 和 BS7)、平流层芽胞杆菌(BS4)、粘质沙雷氏菌(BS5)、蜡样芽胞杆菌(BS8)和假格里尼翁布鲁氏菌(DH5)的对羟基苯甲酸降解能力都很强, 降解率均达 100%。综上所述, 一点缀螟肠道富含能降解玉米营养物质及玉米次生代谢物质的细菌, 这些肠道细菌在一点缀螟的营养物质和次生代谢物质代谢中发挥了重要作用。该结果将为一点缀螟肠道细菌功能的研究及综合防治提供理论依据, 同时为功能菌株的开发利用提供菌株资源。

关键词: 玉米; 一点缀螟; 肠道细菌; 营养物质; 次生代谢物质; 降解功能

中图分类号: S435

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2024)04-0348-11

Screening studies on culturable bacteria for degradation of food nutrients and secondary metabolites in the intestinal tract of *Paralipsa gularis*

YAO Yunhao^{1,2}, FU Qiaosi^{1,2}, ZHAO Guoan³, SHEN Yunfeng³, WANG Wenqian^{1,2},
PENG Yuejin^{1,2}, DU Guangzu^{1,2}, CHEN Bin^{1,2*}

- College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China;
- State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, Yunnan, China;
- Plant Protection and Inspection Station of Baoshan City in Yunnan Province, Baoshan 678000, China)

Abstract: *Paralipsa gularis* (Zeller) (*P. gularis*) is a serious pest of corn cob found in Yunnan maize production areas in recent years. To clarify the metabolic function of its intestinal culturable bacteria on food nutrients and secondary metabolites, we used the combination method of thylakoid bioassay and high-performance liquid chromatography, to screen and study the degrading bacteria of the larval intestine of *P. gularis* that can be cultured for starch, cellulose, pro-

收稿日期: 2024-06-12 修回日期: 2024-07-16 接受日期: 2024-08-23

作者简介: 姚云昊(2000-), 男, 硕士生, 研究方向为昆虫生理与生化。E-mail: yaoyunh@163.com

* 通讯联系人: 陈斌(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向为害虫综合治理。E-mail: chbins@163.com

基金项目: 云南省科技计划基础研究专项(202401AS070089); 云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y1045)

引用格式: 姚云昊, 符乔斯, 赵国安, 等. 一点缀螟肠道降解食物营养及次生代谢物可培养细菌的筛选研究[J]. 生物资源, 2024, 46(4): 348-358.

Yao Y H, Fu Q S, Zhao G A, et al. Screening studies on culturable bacteria for degradation of food nutrients and secondary metabolites in the intestinal tract of *Paralipsa gularis* [J]. Biotic Resources, 2024, 46(4): 348-358.

tein, ferulic acid, vanillin, and p-hydroxybenzoic acid. The results show that 18 bacterial strains are screened from *P. gularis* intestinal culturable bacteria with starch, cellulose, protein, ferulic acid, vanillin, and p-hydroxybenzoic acid degrading power, respectively. Among them, *Bacillus subtilis* (DH3) has the strongest starch degrading ability, with the ratio of hyaline circle (H_p) and colony diameter (D_p) of 1.70. *Bacillus thuringiensis* (BS1) has the strongest degradation of cellulose, with H_p/D_p of 4.46. *Serratia marcescens* (BS5) has the strongest protein degradation, with H_p/D_p of 3.46. *Bacillus subtilis* (DH3) has the strongest degradation of ferulic acid, with a degradation rate of 99.92%. *Brucella pseudogrignonii* (DH5) has the strongest degradation of vanillin, with a degradation rate of 99.82%. *Staphylococcus saprophyticus* (BS2 and BS7), *Bacillus stratosphericus* (BS4), *Serratia marcescens* (BS5), *Bacillus cereus* (BS8), and *Brucella pseudogrignoniensis* (DH5) all have a strong ability to degrade p-hydroxybenzoic acid (degradation rates: 100%). In summary, the intestinal tract of *P. gularis* is enriched with bacteria that can degrade maize nutrients and maize secondary metabolites, and these intestinal bacteria play an important role in the metabolism of nutrients and secondary metabolites in *P. gularis*. The results will provide not only a theoretical basis for the study of the functions of *P. gularis* intestinal bacteria and the comprehensive control of *P. gularis*, but also the strain resources for development and utilization of functional bacterial strains.

Key words: maize; *Paralipisa gularis* (Zeller); intestinal tract; nutrient; secondary metabolite; degradability

0 引言

一点缀螟 *Paralipisa gularis* (Zeller) (*P. gularis*) 又名一点谷螟、一点织螟, 隶属鳞翅目 Lepidoptera 螟蛾科 Pyralidae, 源起于东南亚, 随农产品贸易进入欧洲, 在中国除西北地区和西藏未发现外, 其余各地均有发现。一点缀螟可以危害种子、坚果、麦麸、罗望子等植物^[1], 中国在 2018 年首次报道一点缀螟表现出特殊的食性, 严重危害玉米果穗表面和穗芯, 同时引起玉米穗腐病的发生, 若防治不及时或未防治, 会导致玉米绝收^[2-4]。

昆虫肠道为微生物提供了一个特定的定殖环境, 肠道菌群为宿主昆虫提供了很多潜在的有益作用^[5]: (1) 协助消化植物组织结构物质和为昆虫提供一些自身无法合成的特定营养物质, 如 B 族维生素、固醇和氨基酸等, 还可产生一些酶类^[6,7]; (2) 影响宿主昆虫的生长发育和行为, 如斑翅果蝇 (*Drosophila suzukii*) 去除肠道菌后生长发育迟缓, 在食物中添加共生肠道菌弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 和产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 后, 能促进宿主的生长发育^[8], 沃尔巴克氏菌在昆虫体内可以合成或分解产生代谢物, 对宿主的睡眠、学习、记忆、交配、进食和攻击行为均会造成影响^[9]; (3) 提升昆虫的解毒作用, 肠道微生物在解毒过程中诱导宿主合成解毒酶, 通过矿化作用或共代谢过程降解农药和植物次生代谢物质^[10,11]; (4) 通过质粒介导的水平转移获得和传播抗生素抗性基因, 可能促进蜜蜂肠道菌及环境之间耐药基因的传播和富集等^[12]; (5) 调节宿主的免疫系统, 增强昆虫对病原微生物和寄生虫的抵抗能力^[13]; (6) 促进宿主与寄

主间的种间通讯等^[14]。香草醛、对羟基苯甲酸和阿魏酸是玉米籽粒主要的酚类次生代谢物质^[15], 这 3 种物质对昆虫具有拒食、毒杀、吸引或排斥作用, 从而保护植物免受昆虫的侵害^[16-19], 测定宿主昆虫肠道微生物对营养物质和次生代谢物质的降解作用有助于解释寄主植物的适应性和为功能细菌的开发利用提供菌株资源。

目前, 国内外对一点缀螟的研究报道较少, 关于其肠道细菌功能和寄主适应的研究还未见有报道。因此, 本研究通过筛选已分离得到的一点缀螟肠道细菌对寄主植物主要营养物质淀粉、纤维素和蛋白质及次生代谢物质阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸的降解菌, 采用高效液相色谱仪测定了共生菌对阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸降解能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 可培养肠道细菌

供试肠道细菌为分离自一点缀螟幼虫肠道的细菌菌株, 保存于云南农业大学植物保护学院昆虫病原体实验室。

1.1.2 主要试剂

阿魏酸、对羟基苯甲酸和香草醛标准品(北京索莱宝科技有限公司)。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g、NaCl 10.0 g、酵母浸粉 5.0 g、琼脂 20.0 g, 无菌水 1 000 mL, 调至 pH 7.0^[20]。

酪蛋白培养基: 酪素 5.0 g、牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 10.0 g、琼脂 15.0 g, 无菌水 1 000 mL, pH 7.0~7.5^[21]。

淀粉培养基:蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 牛肉膏 5.0 g, 可溶性淀粉 20.0 g, 琼脂 20.0 g, pH 7.0, 无菌水 1 000 mL^[22]。

羧甲基纤维素钠培养基: NaNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.5 g, CMC 2.0 g, 蛋白胨 0.2 g, 琼脂 20.0 g, pH 7.2, 无菌水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 15 min^[23]。

碘液:称取 2.0 g KI 溶于少量水中,加入 1.0 g I₂, 溶解后用去离子水定容至 300 mL。

无机盐液体培养基: MgSO₄·7H₂O 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 琼脂 20.0 g, 无菌水 1 000 mL, 阿魏酸、对羟基苯甲酸和香草醛浓度为 0.1 g/L。

1.1.3 主要仪器

游标卡尺 ARZ-1331(艾瑞泽);电子天平 GBT23111(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);台式冷冻离心机 2-16R(湖南恒诺仪器设备有限公司);超净工作台 SW-CJ-2F(苏州安泰空气技术有限公司);高压蒸汽灭菌锅 LT-CPS(立德泰勒上海科学仪器有限公司);精密可编程烘箱 LT-DBX60N(立德泰勒上海科学仪器有限公司);恒温光照培养箱 RG-300(宁波赛福实验仪器有限公司);摇床 ZQLY-180F(上海知楚仪器有限公司);超高效液相色谱仪 LC-20A(岛津仪器(苏州)有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 可培养细菌对淀粉、纤维素和蛋白质的降解作用测定

采用透明圈法测定可培养细菌对淀粉、纤维素和蛋白质的降解能力。将分离纯化得到菌株的单菌落接种于 20 mL LB 液体培养基中,25 °C 下 180 r/min 振荡培养 24 h,吸取 5 μL 菌悬液分别点接在淀粉培养基、羧甲基纤维素钠培养基和酪蛋白培养基上,每个平板重复 3 次,在 25 °C 条件下培养 48 h,在淀粉培养基、羧甲基纤维素钠培养基中加入适量碘液,在酪蛋白培养基中加入适量 1% 三氯乙酸后静置 10 min,观察各菌株透明圈产生情况,采用“十字交叉法”进行测量,依据菌株产生的透明圈直径(H_p)与菌落直径(D_p)的比值(H_p/D_p)大小判断各菌株对淀粉的降解能力,并拍照记录^[21,22]。

1.2.2 可培养玉米籽粒次生代谢物质降解菌的筛选

采用点解法将纯化培养的菌株分别接种至以阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸为唯一碳源的无机盐培养基上,在 25 °C 培养箱培养 72 h,观察是否长出明显菌落。

1.2.3 用高效液相色谱仪测定香草醛、对羟基苯甲酸和阿魏酸降解率

将筛选到的香草醛、对羟基苯甲酸和阿魏酸降解菌活化接种于 LB 液体培养基中,在 28 °C、220 r/min 条件下过夜培养作为种子液。取种子液 1 mL 接入 50 mL 以苯甲酸作底物的无机盐液体培养基中,底物浓度均为 0.10 g/L。分别取零时样品和 37 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 的末时样品,0.22 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱法检测底物量,从而计算底物降解效率。高效液相条件:色谱柱为 Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I. D. × 75 mm L., 1.6 μm);柱温:40 °C;流动相为 A-5Mm 甲酸铵(含 0.05% 甲酸),B-甲醇;洗脱方式为梯度洗脱 1~3 min;流速为 0.3 mL/min;进样体积为 5 μL。

1.2.4 数据分析

利用 Excel 2016 软件和 IBM SPSS Statistics 26 软件进行数据处理及统计分析;利用 GraphPad Prism 9 软件和 Adobe Illustrator 2023 软件制图。

2 结果与分析

2.1 一点缀螟肠道可培养细菌对淀粉、纤维素和蛋白质的降解作用

2.1.1 淀粉降解菌的筛选

通过淀粉培养基上产生的透明圈筛选出具有淀粉降解作用的菌株,结果显示,在一点缀螟肠道可培养细菌中共筛选出 10 株淀粉降解菌(见表 1,图 1),分别是苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)BS1,腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)BS2、BS7,平流层芽胞杆菌(*Bacillus stratosphericus*)BS4、DH4,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)BS5,蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)BS8、DH7,枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)DH3 和嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*)DH8。其中菌株 DH3 的产淀粉酶能力较强($H_p/D_p = 1.70$, 大于 1.5),与菌株 BS5 的降解能力有显著性差异,如图 2 所示。

2.1.2 纤维素降解菌的筛选

在一点缀螟肠道可培养细菌中共筛选出 11 株纤维素降解菌(见表 2,图 3),分别是苏云金芽胞杆菌 BS1,平流层芽胞杆菌 BS4、DH4,粘质沙雷氏菌 BS5,深红沙雷氏菌(*Serratia rubidaea*)BS6,蜡样芽胞杆菌 BS8、DH7,非脱羧勒克氏菌(*Leclercia adecarboxylata*)BS10,枯草芽胞杆菌 DH3,假格里尼翁布鲁氏菌(*Brucella pseudogrignonensis*)DH5 和嗜线虫沙雷氏菌 DH8。有 3 株产纤维素酶能力较强($H_p/D_p > 2.5$),分别是 BS1、BS8 和 DH5。其中,菌

表1 一点缀螟不同地理种群肠道细菌中淀粉降解菌筛选结果

Table 1 Screening results of starch-degrading bacteria in different geographic populations of gut bacteria of *P. gularis*

菌株编号	菌株名称	菌落直径(D_p)	透明圈直径(H_p)	H_p/D_p
BS1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	17.93±0.08	22.29±0.04	1.24±0.01
BS2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7.38±0.13	9.12±0.04	1.24±0.02
BS4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	14.81±0.13	17.00±0.06	1.15±0.01
BS5	<i>Serratia marcescens</i>	13.65±0.38	18.71±0.27	1.37±0.04
BS7	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10.93±0.39	13.14±0.12	1.20±0.03
BS8	<i>Bacillus cereus</i>	15.61±0.10	19.68±0.26	1.26±0.01
DH3	<i>Bacillus subtilis</i>	6.74±0.20	11.47±0.19	1.70±0.04
DH4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	18.62±0.06	20.65±0.09	1.11±0.00
DH7	<i>Bacillus cereus</i>	14.77±0.04	19.07±0.03	1.29±0.00
DH8	<i>Serratia nematodiphila</i>	19.29±0.13	20.16±0.03	1.05±0.01

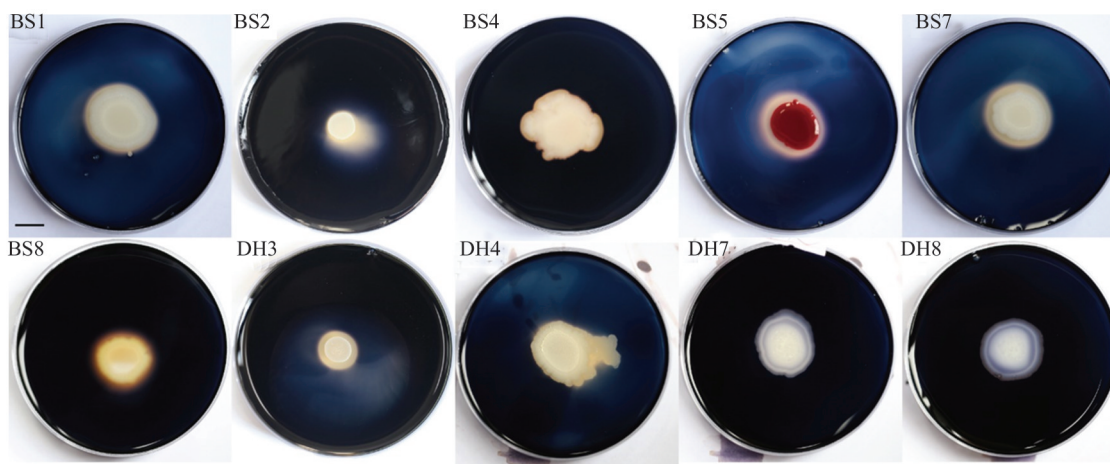


图1 一点缀螟肠道淀粉降解菌透明圈

Fig. 1 Transparent circles of *P. gularis* intestinal starch-degrading bacteria

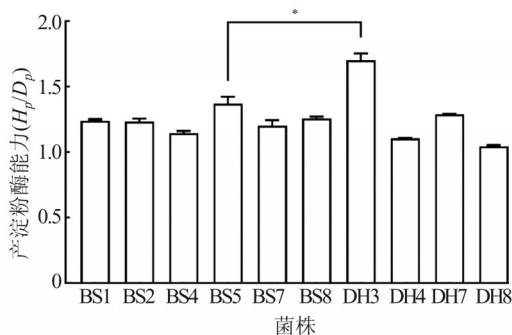


图2 一点缀螟肠道淀粉降解菌 H_p/D_p 差异显著性分析

Fig. 2 Significance analysis of H_p/D_p differences in *P. gularis* intestinal starch degrading bacteria

株BS1的产纤维素酶能力最强($H_p/D_p = 4.46$),与其余2株差异显著(见图4)。

2.1.3 蛋白质降解菌的筛选

在一点缀螟肠道可培养细菌中共筛选出15株蛋白质降解菌(见表3,图5),分别是苏云金芽胞杆菌BS1,腐生葡萄球菌BS2、BS7,高地芽胞杆菌(*Bacillus altitudinis*)BS3、DH2,平流层芽胞杆菌

BS4、DH4,粘质沙雷氏菌BS5,深红沙雷氏菌BS6,蜡样芽胞杆菌BS8、DH7,解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)DH1,枯草芽胞杆菌DH3,假格里尼翁布鲁氏菌DH5和嗜线虫沙雷氏菌DH8。有3株产蛋白酶的能力较强($H_p/D_p > 2.5$),分别为BS5、BS6和BS7。其中,菌株BS5的产蛋白酶能力最强($H_p/D_p = 3.46$),与菌株BS6和BS7相比具有极显著性差异,如图6所示。

2.1.4 一点缀螟肠道菌产酶能力分析

从一点缀螟肠道可培养细菌中筛选出的功能菌株其产酶种类和能力各异(见图7)。综上所述,一点缀螟肠道可培养细菌19株中有16株具有产消化酶的功能,占比高达84.21%。产酶综合能力比较结果如图7所示,菌株BS1、BS4、BS5、BS8、DH3、DH4、DH7和DH8都具有产淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶的能力,其中,苏云金芽胞杆菌BS1的产酶综合能力最强,同时产纤维素酶的能力最强。菌株BS2和BS7具有产淀粉酶和蛋白酶的能力,菌株BS6和

表2 一点缀螟不同地理种群肠道细菌中纤维素降解菌筛选结果

Table 2 Screening results of cellulose-degrading bacteria in different geographic populations of gut bacteria of *P. gularis*

菌株编号	菌株名称	菌落直径(D_p)	透明圈直径(H_p)	H_p/D_p
BS1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	5.20±0.03	23.20±0.14	4.46±0.01
BS4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	6.06±0.44	6.63±0.38	1.09±0.02
BS5	<i>Serratia marcescens</i>	4.72±0.26	5.20±0.20	1.10±0.03
BS6	<i>Serratia rubidaea</i>	5.53±0.10	6.94±0.08	1.25±0.01
BS8	<i>Bacillus cereus</i>	8.50±0.08	24.20±0.10	2.85±0.02
BS10	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	4.85±0.03	5.31±0.03	1.09±0.00
DH3	<i>Bacillus subtilis</i>	6.57±0.06	15.34±0.04	2.33±0.02
DH4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	3.93±0.03	5.36±0.03	1.36±0.00
DH5	<i>Brucella pseudogrignonensis</i>	3.13±0.10	8.17±0.06	2.61±0.07
DH7	<i>Bacillus cereus</i>	6.36±0.05	6.64±0.03	1.04±0.00
DH8	<i>Serratia nematodiphila</i>	8.05±0.04	9.82±0.01	1.22±0.01

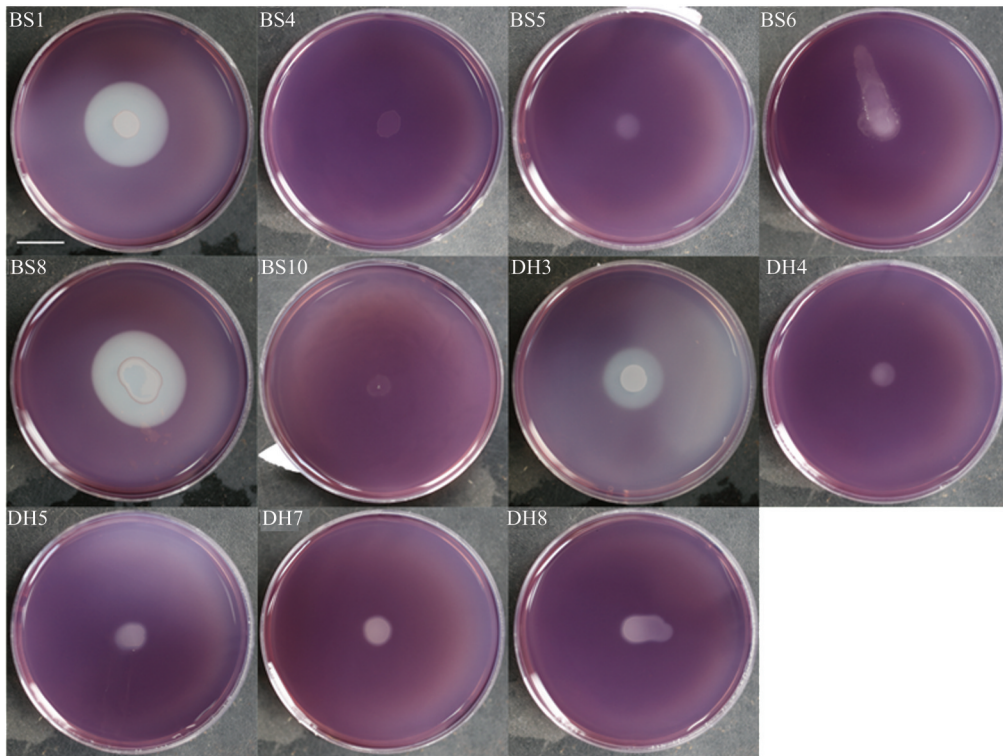


图3 一点缀螟肠道纤维素降解菌透明圈

Fig. 3 Transparent circles of cellulose-degrading bacteria of *P. gularis* intestinal

DH5具有产蛋白酶和纤维素酶的能力。菌株BS3、DH1、DH2和BS10分别具有产蛋白酶和纤维素酶的能力,未发现产其余2种酶的能力。其中苏云金芽孢杆菌BS1、粘质沙雷氏菌BS5、蜡样芽孢杆菌BS8和枯草芽孢杆菌DH3综合产酶能力突出,具有开发利用潜力。

2.2 对玉米籽粒主要次生代谢物降解菌筛选

以阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸为唯一碳源培养基筛选到的玉米籽粒次生代谢物降解菌株如表4所示,除非脱羧勒克氏菌(BS10)和阿尔莱特葡萄球菌(BS11)外,其余菌株都能至少利用一种玉米

籽粒次生代谢物质。根据菌株是否能较好利用阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸,共筛选出阿魏酸降解菌11株9种,其中,苏云金芽孢杆菌(BS1)、蜡样芽孢杆菌(BS8)、枯草芽孢杆菌(DH3)和嗜线虫沙雷氏菌(DH8)生长情况较好。

香草醛降解菌16株12种,其中苏云金芽孢杆菌(BS1)、粘质沙雷氏菌(BS5)、深红沙雷氏菌(BS6)、蜡样芽孢杆菌(BS8)、解淀粉芽孢杆菌(DH1)、枯草芽孢杆菌(DH3)和假格里尼翁布鲁氏菌(DH5)生长情况较好。

对羟基苯甲酸降解菌15株12种,其中,腐生葡

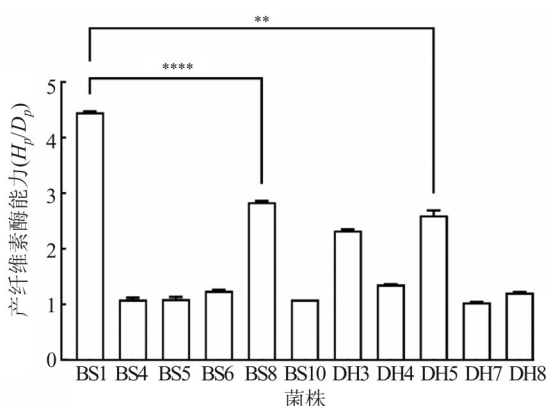


图4 一点缀螟肠道纤维素降解菌 H_p/D_p 差异显著性分析
Fig. 4 Significance analysis of H_p/D_p differences in *P. gularis* intestinal cellulose-degrading bacteria

萄球菌 (BS2 和 BS7)、平流层芽胞杆菌 (BS4 和 DH4)、粘质沙雷氏菌 (BS5)、蜡样芽胞杆菌 (BS8)、鹌鸡肠球菌 (BS9) 和假格里尼翁布鲁氏菌 (DH5) 生长情况较好。

2.3 一点缀螟肠道菌对玉米籽粒主要次生代谢物降解率测定

将筛选得到的一点缀螟肠道阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸降解菌经过无机盐液体培养基震荡培养 72 h 后, 通过高效液相色谱仪得到标准峰面积 (见图 8), 根据降解率公式计算 17 株菌分别对阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸的降解率 (见表 5), 11 株阿魏酸降解菌中只有 1 株对阿魏酸的降解率在 99% 以上, 为 DH3 枯草芽胞杆菌 (99.92%); 菌株 BS3 高地芽胞杆菌、BS8 蜡样芽胞杆菌和 DH2 高地芽胞杆菌

对阿魏酸的降解率在 90% 以上, 分别为 97.22%、94.38%、96.55%; 16 株香草醛降解菌中, 有 10 株的香草醛降解率在 99% 以上, 分别是 BS1 苏云金芽胞杆菌、BS2 腐生葡萄球菌、BS4 平流层芽胞杆菌、BS5 粘质沙雷氏菌、BS6 深红沙雷氏菌、BS7 腐生葡萄球菌、BS8 蜡样芽胞杆菌、DH3 枯草芽胞杆菌、DH4 平流层芽胞杆菌和 DH5 假格里尼翁布鲁氏菌, DH5 的香草醛降解能力最强, 降解率达到 99.82%; 菌株 DH1 解淀粉芽胞杆菌和 DH6 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的香草醛降解率在 90% 以上, 分别为 96.33% 和 96.65%; 15 株对羟基苯甲酸降解菌中有 6 株对对羟基苯甲酸的降解率为 100.00%, 分别是 BS2 腐生葡萄球菌、BS4 平流层芽胞杆菌、BS5 粘质沙雷氏菌、BS7 腐生葡萄球菌、BS8 蜡样芽胞杆菌和 DH5 假格里尼翁布鲁氏菌, 菌株 DH3 枯草芽胞杆菌的对羟基苯甲酸降解率在 90% 以上, 为 94.80%。

综上, 菌株 BS8 蜡样芽胞杆菌和菌株 DH3 枯草芽胞杆菌对 3 种玉米籽粒次生代谢物质的降解率均在 90% 以上, 具有较好的降解作用。

3 讨论

昆虫与植物之间有着复杂的关系, 昆虫从植物获得食料是最原始的生态关系, 植物所含的营养成分是昆虫生长发育和繁殖的必要条件, 而昆虫肠道内的菌群会给昆虫的营养带来影响^[24, 25]。昆虫缺乏完整的酶系统, 需要肠道微生物为食物消化、营养吸

表3 一点缀螟不同地理种群肠道中蛋白质降解菌筛选结果

Table 3 Screening results of protein-degrading bacteria in the gut of different geographic populations of *P. gularis*

菌株编号	菌株名称	菌落直径 (D _p)	透明圈直径 (H _p)	H _p /D _p
BS1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	22.27±0.24	29.68±0.12	1.33±0.01
BS2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	8.90±0.04	12.20±0.02	1.37±0.01
BS3	<i>Bacillus altitudinis</i>	9.54±0.08	16.82±0.05	1.76±0.01
BS4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	9.71±0.09	22.53±0.05	2.32±0.02
BS5	<i>Serratia marcescens</i>	9.89±0.11	34.17±0.04	3.46±0.04
BS6	<i>Serratia rubidaea</i>	10.43±0.15	30.77±0.07	2.95±0.03
BS7	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10.26±0.03	31.43±0.02	3.06±0.01
BS8	<i>Bacillus cereus</i>	19.64±0.21	32.00±0.09	1.63±0.01
DH1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	18.22±0.16	37.82±0.07	2.08±0.02
DH2	<i>Bacillus altitudinis</i>	10.99±0.04	19.67±0.06	1.79±0.00
DH3	<i>Bacillus subtilis</i>	7.40±0.02	15.89±0.04	2.15±0.01
DH4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	11.53±0.06	21.19±0.04	1.84±0.01
DH5	<i>Brucella pseudogrignonensis</i>	15.17±0.04	32.43±0.04	2.14±0.00
DH7	<i>Bacillus cereus</i>	17.48±0.01	25.90±0.02	1.48±0.00
DH8	<i>Serratia nematodiphila</i>	14.90±0.02	32.20±0.10	2.16±0.01

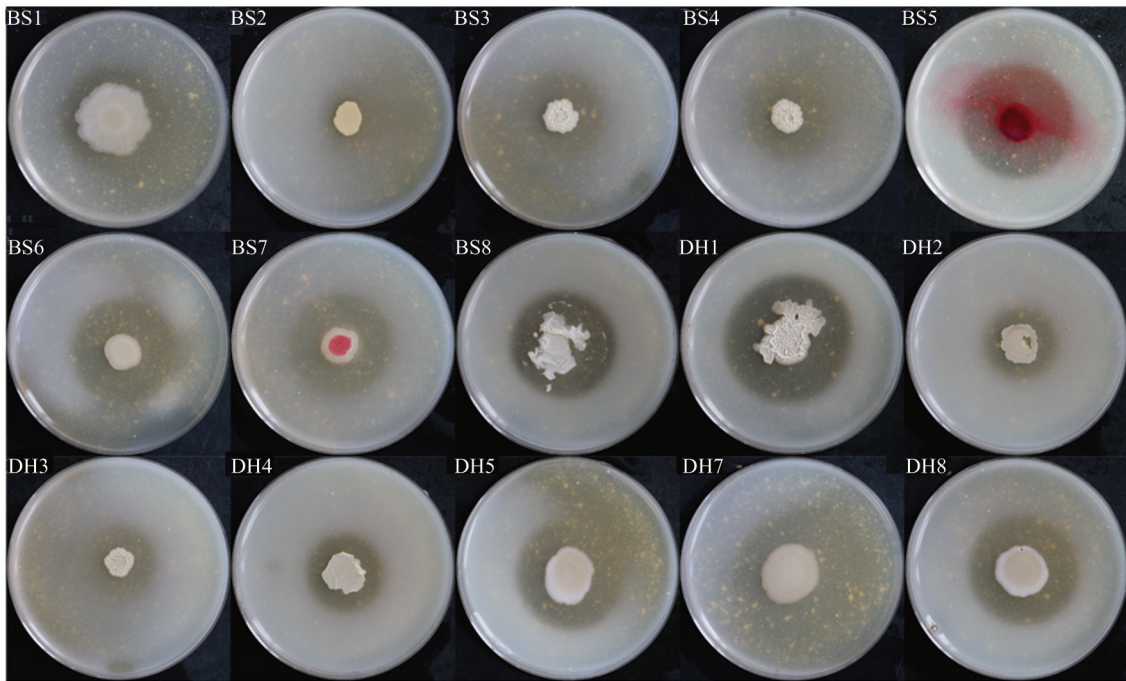


图5 一点缀螟肠道蛋白质降解菌透明圈

Fig. 5 Transparent circles of *P. gularis* intestinal protein-degrading bacteria

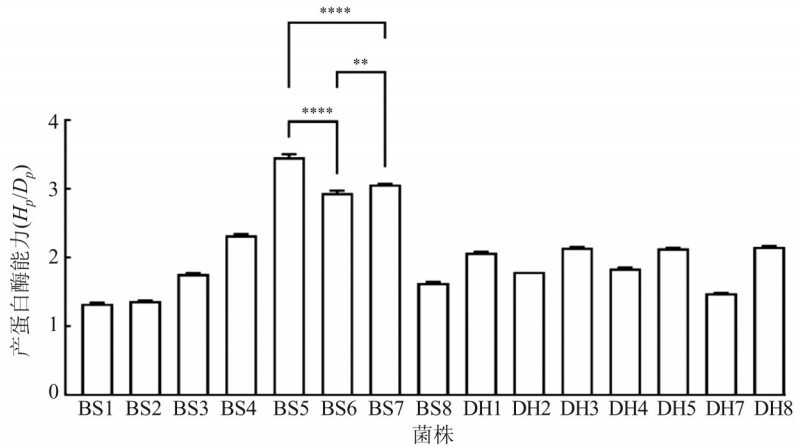


图6 一点缀螟肠道蛋白质降解菌 H_p/D_p 差异显著性分析

Fig. 6 Significance analysis of H_p/D_p differences in *P. gularis* intestinal cellulose-degrading bacteria

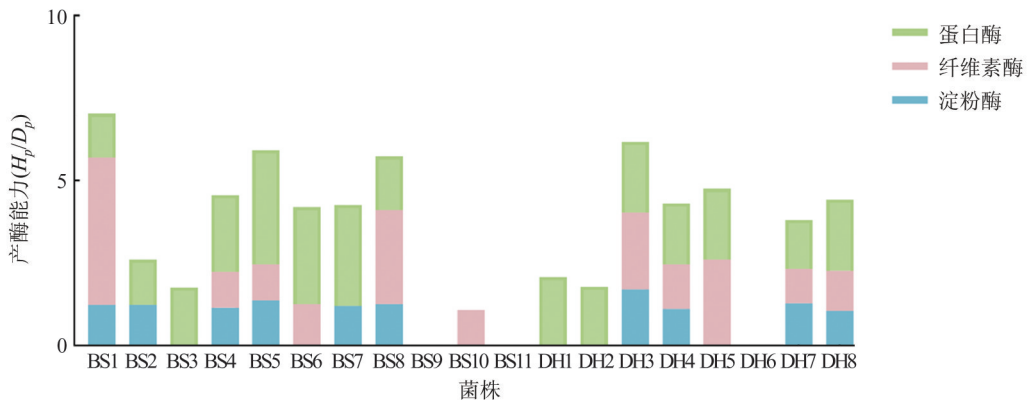


图7 一点缀螟肠道产酶菌株及能力分析

Fig. 7 Analysis of *P. gularis* intestinal enzyme-producing strains and capabilities

收和生物代谢提供不同种类的酶^[26]。本研究通过分离培养,从一点缀螟肠道中筛选出具有降解淀粉、纤

维素、蛋白质、阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸能力的细菌,共18株14种,占有肠道可培养细菌(19

表 4 阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸降解菌筛选结果
Table 4 Screening results of ferulic acid, vanillin and p-hydroxybenzoic acid degrading bacteria

菌株编号	菌株名称	0.1 g/L 阿魏酸	0.1 g/L 香草醛	0.1 g/L 对羟基苯甲酸
BS1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+++	+++	++
BS2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	+	+++
BS3	<i>Bacillus altitudinis</i>	+	++	-
BS4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	-	+	+++
BS5	<i>Serratia marcescens</i>	++	+++	+++
BS6	<i>Serratia rubidaea</i>	++	+++	++
BS7	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	++	+++
BS8	<i>Bacillus cereus</i>	+++	+++	+++
BS9	<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	-	+++
BS10	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-	-	-
BS11	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-	-	-
DH1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	+++	++
DH2	<i>Bacillus altitudinis</i>	+	++	-
DH3	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+
DH4	<i>Bacillus stratosphericus</i>	-	+	+++
DH5	<i>Brucella pseudogrignonensis</i>	++	+++	+++
DH6	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	++
DH7	<i>Bacillus cereus</i>	++	++	++
DH8	<i>Serratia nematodiphila</i>	+++	++	++

注: +++, ++, + 及 - 分别表示从外观观察菌种生长较好、良好、一般和不生长。

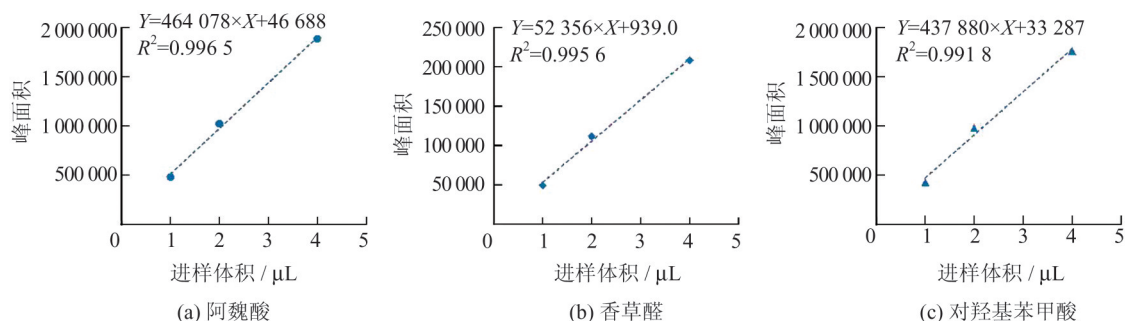


图 8 阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸降解率标准曲线

Fig. 8 Standard curve of degradation rate of ferulic acid, vanillin and p-hydroxybenzoic acid

株)的 94.74%。这些结果表明,一点缀螟的肠道细菌可以帮助其消化、吸收和代谢玉米的营养物质和次生代谢物质。

本研究共筛选出淀粉降解菌 10 株 7 种,其中,枯草芽胞杆菌的淀粉降解能力最强,这与枯草芽胞杆菌分泌的胞外产物中具有淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶是分不开的^[27]。本研究共筛选出纤维素降解菌 11 株 9 种,其中,苏云金芽胞杆菌的纤维素降解能力最强。草地贪夜蛾和蝗虫肠道中的芽胞杆菌具有很强的纤维素降解能力,本研究也发现了类似的现象,在一点缀螟筛选出的 7 株芽胞杆菌也验证了这一结果^[28,29]。本研究发现非脱羧勒克氏菌可以降解纤维素,与 Adams 等^[30]的研究结果相同。沙雷氏菌属细

菌具有较高的产酶活性,因此具有较强的生物降解能力^[31]。本研究共筛选出蛋白质降解菌 15 株 11 种,其中,粘质沙雷氏菌的蛋白质降解能力最强。张利等^[32]发现粘质沙雷氏菌可以产蛋白酶,蛋白酶可以催化蛋白质水解,帮助宿主提高蛋白质消化利用率。本研究结果与德国小蠊和番茄潜叶蛾肠道中粘质沙雷氏菌能够分解利用蛋白质的研究结果一致^[33,34]。江宇航等^[35]在马尾松毛幼虫肠道中发现芽胞杆菌属细菌能产生蛋白酶,其中主要是地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、解淀粉芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌表现出较强的蛋白质降解作用。此外,本研究发现假格里尼翁布鲁氏菌和腐生葡萄球菌也可以分解利用蛋白质。降解蛋白质的菌株是最多的,而一点

表5 阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸降解菌的降解率
Table 5 Degradation rates of ferulic acid, vanillin and p-hydroxybenzoic acid degrading bacteria

菌株编号	峰面积			降解率/%		
	阿魏酸	香草醛	对羟基苯甲酸	阿魏酸	香草醛	对羟基苯甲酸
CK	1 022 813	111 666	978 024			
BS1	874 765	221	668 481	14.47	99.80	31.65
BS2		514	0		99.54	100.00
BS3	28 392	77 114		97.22	30.94	
BS4		657	0		99.41	100.00
BS5	883 429	292	0	13.63	99.74	100.00
BS6	820 217	275	785 351	19.81	99.75	19.70
BS7		224	0		99.80	100.00
BS8	57 452	287	0	94.38	99.74	100.00
BS9			810 947			17.08
DH1		4 098	469 017		96.33	52.04
DH2	35 328	59 537		96.55	46.68	
DH3	788	401	50 887	99.92	99.64	94.80
DH4		231	888 876		99.79	9.12
DH5	802 649	202	0	21.53	99.82	100.00
DH6	743 163	3 746	851 804	27.34	96.65	12.91
DH7	742 963	70 074	890 581	27.36	37.25	8.94
DH8	719 088	40 480	915 860	29.70	63.75	6.36

缀螟主要以成熟的玉米雌穗为食,推测这种现象与一点缀螟的食性有关。

植物次生代谢物质是许多植物抵抗草食性昆虫的关键物质,玉米籽粒对抗昆虫取食的防御化学物质主要为酚酸类物质^[15,36],酚酸降解菌主要是从土壤和植物自身分离^[37]。然而,关于昆虫肠道微生物降解酚酸类物质的情况知之甚少,本研究从19株一点缀螟肠道可培养细菌中筛选出17株酚酸降解菌,表明一点缀螟肠道细菌可以很好地帮助宿主应对玉米雌穗的防御化学物质。其中,蜡样芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌同时能降解阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸,且降解作用最为显著。夏青等^[38]只对枯草芽胞杆菌对土壤酚酸的降解作用及应用进行了研究,蜡样芽胞杆菌和对酚酸的降解作用还未见报道,两种菌是怎样协助一点缀螟适应酚酸的还需进一步研究。这些细菌在一点缀螟肠道中的生理作用可能与其他植食性昆虫肠道共生细菌的生理作用相同,但值得注意的是,目前的工作还不够,深入的研究应集中于测试体内的生理作用及菌株外的环境测试,并阐明这些细菌在代谢降解这些物质中的代谢途径。

从一点缀螟肠道中分离到能降解淀粉、纤维素和蛋白质的细菌分别有7种、9种和11种,其中枯草芽胞杆菌的淀粉降解能力最强,粘质沙雷氏菌的蛋白质降解能力最强,苏云金芽胞杆菌的纤维素降解

能力最强;能降解阿魏酸、香草醛和对羟基苯甲酸的细菌分别有9种、12种和12种,其中枯草芽胞杆菌的阿魏酸降解能力最强,假格里尼翁布鲁氏菌的香草醛降解能力最强,腐生葡萄球菌、平流层芽胞杆菌、粘质沙雷氏菌、蜡样芽胞杆菌和假格里尼翁布鲁氏菌可完全降解对羟基苯甲酸,具有降解功能的细菌占可培养细菌的94.74%,肠道细菌在一点缀螟吸收利用玉米雌穗中的营养物质和抵御防御化学物质发挥了重要功能。

参考文献

[1] Rankhamb S S, Walunj A R, Palande P R, et al. Seasonal incidence and varietal reaction of different tamarind genotypes (*Tamarindus indica* L.) against fruit borer [J]. The Pharma Innovation Journal, 2023, 12(6): 3616-3619.

[2] 太红坤, 白树雄, 韩永连, 等. 一点缀螟生物学特性及其在云南德宏玉米田的为害调查[J]. 植物保护学报, 2018, 45(2): 251-256.

Tai H K, Bai S X, Han Y L, et al. Biological characteristics of the stored nut moth *Paralipsa gularis* (Zeller) and its damage on corn in Dehong Prefecture of Yunnan Province [J]. J Plant Prot, 2018, 45(2): 251-256.

[3] 陈爽. 滇南玉米田一点缀螟的发生特点与关键防治方法[D]. 福州: 福建农林大学, 2023.

- Chen S. Occurrence characteristics and key control methods of a corn borer in southern Yunnan [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2023.
- [4] 谢显彪, 孟继枝, 李海宏, 等. 一点缀螟在云南保山夏玉米田发生为害情况初报[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(3): 38-40.
- Xie X B, Meng J Z, Li H H, *et al.* Preliminary report on the occurrence and damage of a striped borer in summer corn field in Baoshan, Yunnan [J]. China Plant Prot, 2023, 43(3): 38-40.
- [5] Muñoz-Benavent M, Pérez-Cobas A E, García-Ferris C, *et al.* Insects' potential: understanding the functional role of their gut microbiome [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113787.
- [6] Dillon R J, Dillon V M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions [J]. Annual Review of Entomology, 2004, 49: 71-92.
- [7] Douglas A E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms [J]. Annual review of entomology, 2015, 60: 17-34.
- [8] 高欢欢, 覃冬云, 代晓彦, 等. 肠道细菌弗氏柠檬酸杆菌和产酸克雷伯氏菌对斑翅果蝇生长发育和物质代谢的影响[J]. 昆虫学报, 2020, 63(4): 462-469.
- Gao H H, Qin D Y, Dai X Y, *et al.* Effects of intestinal bacteria *Citrobacter freundii* and *Klebsiella oxytoca* on the development and substance metabolism of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)[J]. Acta Entomol Sin, 2020, 63(4): 462-469.
- [9] Bi J, Wang Y F. The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts [J]. Insect Science, 2020, 27(5): 846-858.
- [10] Siddiqui J A, Khan M M, Bamisile B S, *et al.* Role of insect gut microbiota in pesticide degradation: a review [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 870462.
- [11] Wang W Q, Xiao G L, Du G Z, *et al.* *Glutamicibacter halophytocola*-mediated host fitness of potato tuber moth on Solanaceae crops [J]. Pest Management Science, 2022, 78(9): 3920-3930.
- [12] Sun H H, Mu X H, Zhang K X, *et al.* Geographical resistome profiling in the honeybee microbiome reveals resistance gene transfer conferred by mobilizable plasmids [J]. Microbiome, 2022, 10(1): 69.
- [13] Bai S, Yao Z C, Raza M F, *et al.* Regulatory mechanisms of microbial homeostasis in insect gut [J]. Insect Science, 2021, 28(2): 286-301.
- [14] Zhao L L, Mota M, Vieira P, *et al.* Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes [J]. Trends Parasitol, 2014, 30(6): 299-308.
- [15] 翟小童, 韩林, 乔聪聪, 等. 玉米籽粒次生代谢物质分布及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 296-303.
- Zhai X T, Han L, Qiao C C, *et al.* Secondary metabolite distribution and antioxidant activities of corn kernel [J]. Food Science, 2023, 44(2): 296-303.
- [16] 高兴祥, 罗万春, 于天丛, 等. 几种苯甲酸类化合物对甜菜夜蛾多酚氧化酶活性的影响[J]. 农药学报, 2004, 6(1): 26-30.
- Gao X X, Luo W C, Yu T C, *et al.* The effects of benzoic acid compound series on PPO of *Spodoptera exigua* Hübner [J]. Chin J Pestic Science, 2004, 6(1): 26-30.
- [17] 夏道松. 玉米象气味降解酶基因的鉴定及谷胱甘肽S-转移酶 *SzeaGSTd1* 的功能研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2021.
- Xia D S. Identification of corn weevil odor degrading enzyme gene and functional study of glutathione S-transferase *SzeaGSTd1* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2021.
- [18] 杨军. 稻褐飞虱解毒酶基因与水稻芦竹碱和阿魏酸互作及其潜在应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- Yang J. Interaction between detoxification enzyme gene of rice brown planthopper and rice phloridine and ferulic acid and its potential application [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [19] Liu Q, Yin M Z, Ma S, *et al.* Ligand-binding properties of chemosensory protein 1 in *Callosobruchus chinensis* to mung bean volatiles [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2023, 192: 105394.
- [20] 代海燕. 三种储粮害虫内生细菌多样性及其产酶活性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021.
- Dai H Y. Diversity of endophytic bacteria from three stored-grain pests and their enzyme-producing activities [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2021.
- [21] 陈兴, 汪显国, 曾晓鹰, 等. 蛋白质降解菌的筛选及其在烟叶中的作用效果研究[J]. 江西农业学报, 2015, 27(6): 90-91, 97.
- Chen X, Wang X G, Zeng X Y, *et al.* Screening of protein-degrading bacterial strains and their effects on tobacco [J]. Acta Agric Jiangxi, 2015, 27(6): 90-91, 97.
- [22] 张晓瑞. 烟草淀粉降解菌的筛选鉴定及发酵工艺研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- Zhang X R. Screening, identification and fermentation technology of tobacco starch degrading bacteria [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021.
- [23] Kasana R C, Salwan R, Dhar H, *et al.* A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine [J]. Current Microbiology, 2008, 57(5): 503-507.

- [24] 李传明. 食物营养和肠道菌群对稻纵卷叶螟生长发育的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
Li C M. Effects of food nutrition and intestinal flora on the growth and development of rice leaf roller [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.
- [25] 王娅玲. 草地贪夜蛾对基础营养蛋白质和碳水化合物的摄取调节研究[D]. 荆州: 长江大学, 2022.
Wang Y L. Study on Uptake Regulation of *Spodoptera exigua* on Basic Nutrition protein and Carbohydrate [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2022.
- [26] Gandotra S, Bhuyan P M, Gogoi D K, *et al.* Screening of nutritionally important gut bacteria from the lepidopteran insects through qualitative enzyme assays [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2018, 88(1): 329-337.
- [27] Bai J, Franco M, Ding Z T, *et al.* Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on fermentation, dynamics of bacterial community and their functional shifts of whole-plant corn silage [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2022, 13(3): 864-877.
- [28] 李宏伟, 杨晓洁, 向奕舟, 等. 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[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(3): 608-616.
Li H W, Yang X J, Xiang Y Z, *et al.* Isolation and identification of the intestinal bacteria, and screening of the cellulolytic bacteria, of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Nocturid) larvae [J]. Chin J Appl Entomol, 2020, 57(3): 608-616.
- [29] Li W J, Li F F, Bai J, *et al.* Isolation and characterization of intestinal bacteria associated with cellulose degradation in grasshoppers (*Orthoptera*) [J]. Journal of Insect Science, 2023, 23(6): 7.
- [30] Adams A S, Jordan M S, Adams S M, *et al.* Cellulose-degrading bacteria associated with the invasive woodwasp *Sirex noctilio* [J]. The ISME journal, 2011, 5(8): 1323-1331.
- [31] Khakhlari A, Sen S. Culture dependent bacteria from the gut of *Neurozerra conferta* Walker, the insect pest of agarwood trees possess enzymatic functions potentially associated with its aroma [J]. Biologia, 2023, 78(10): 2953-2964.
- [32] 张利, 卢利平, 丁功涛, 等. 一株产蛋白酶粘质沙雷氏菌的分子鉴定与发酵条件优化[J]. 农产品加工, 2021(7): 64-69.
Zhang L, Lu L P, Ding G T, *et al.* Molecular identification and fermentation conditions optimization of a protease producing *Serratia marcescens* [J]. Acad Period Farm Prod Process, 2021(7): 64-69.
- [33] 黄振东, 万晴, 薛志静, 等. 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 Z D, Wan Q, Xue Z J, *et al.* Isolation and identification of culturable aerobic bacteria from the intestines of *Blattella germanica* and the activity of digestive enzymes produced by these bacteria [J]. Chin J Vector Biol Contr, 2019, 30(4): 409-413.
- [34] 常吕恕. 取食马铃薯和番茄的番茄潜叶蛾肠道细菌多样性及功能研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2023.
Chang L. Study on the Diversity and Function of Intestinal Bacteria of *Lycopersicon esculenta*, which feeds on potatoes and tomatoes [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2023.
- [35] 江宇航, 李宏伟, 蔡赛波, 等. 马尾松毛虫肠道细菌的分离鉴定与产蛋白酶细菌的筛选[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(8): 1446-1456.
Jiang Y H, Li H W, Cai S B, *et al.* Isolation and identification of intestinal culturable bacteria of *Dendrolimus punctatus* and screening of protease-producing bacteria [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2020, 32(8): 1446-1456.
- [36] Cao Q J, Wang C, Koski T M, *et al.* Gut bacteria of wood-boring *Streltzoviella insularis* and their involvement in pinoresinol degradation of ash tree (*Fraxinus* sp.) host [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(23): 8941-8951.
- [37] 张春杨, 赵倩, 刘红, 等. 微生物降解植物化感物质酚酸的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 402-418.
Zhang C Y, Zhao Q, Liu H, *et al.* Research advances in microbial degradation of phenolic acids with allelopathic effects [J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 402-418.
- [38] 夏青, 刘子豪, 张晶清等. 强还原处理配施枯草芽孢杆菌对百合土壤酚酸的影响[J]. 土壤, 2023, 55(5): 1016-1024.
Xia Q, Liu Z H, Zhang J Q, *et al.* Effects of reductive soil disinfection and *Bacillus subtilis* inoculant on soil phenolic acids of lily [J]. Soils, 2023, 55(5): 1016-1024

□

(编辑:肖展春)