

不同饲料饲养家蚕其肠道微生态优势菌群 类型的组成及差异性

向芸庆, 王晓强, 冯 伟, 周 围, 谢洪霞, 万永继*

(西南大学生物技术学院, 重庆北碚 400716)

摘要:为探讨鳞翅目昆虫的生长发育及抗病性与肠道微生态状况的关系,以不同的桑科植物柘叶与桑叶分别饲养家蚕,采用纯培养分离检测技术、16S rDNA 序列测定和系统发育分析方法,对 4、5 龄家蚕肠道优势菌群的类型进行了鉴定和差异性分析。结果表明:柘叶与桑叶饲养家蚕共有的优势菌群有短波单胞杆菌属(*Brevundimonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*) 4 个类群。从桑叶饲养家蚕肠道中检索到的优势菌群还有气单胞菌属(*Aeromonas*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*) 5 个类群,而从柘叶饲养家蚕肠道中检索到的优势菌群仅有假单胞菌属(*Pseudomonas*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*) 2 个类群。饲料的改变导致家蚕肠道微生态细菌种群组成的变化,从柘叶饲养家蚕肠道中分离出的优势菌群与桑叶饲养的家蚕相比,出现较大差异且不如桑叶饲养家蚕的菌群丰富。推测这种改变可能与柘叶饲养家蚕生长发育不良、容易患病具有相关性。

关键词:微生态优势菌群;肠道;家蚕;类型;差异性;柘叶;桑叶

Comparative analysis of the composition of dominant intestinal microflora in silkworm reared with different forages

XIANG Yunqing, WANG Xiaoqiang, FENG Wei, ZHOU Wei, XIE Hongxia, WANG Yongji*

College of Biotechnology, Southwest University, Beibei, Chongqing 400716, China

Abstract: The insect intestinal tract is a complex microecosystem that contains abundant microorganisms. To explore the relationship of the intestinal microflora of lepidopteran insects with host growth, development and disease resistance, we reared silkworm larvae with tricuspid cudrania leaves and mulberry leaves (both belong to the family Moraceae) respectively, used methods of pure culture isolation, 16S rDNA sequence determination and phylogenetic analysis to investigate the gut microorganisms in fourth and fifth instar silkworm in order to find the composition changes of the microbial community that induced by forages. A total of 56 dominant strains were isolated from intestine of silkworm larvae and classified into twelve different genera according to the characteristics of colonial morphology, mycelial, physiological-biochemical identification and 16S rDNA phylogeny. These twelve genera are *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* and *Bacillus*. Only four genera of these dominant strains (*Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* and *Staphylococcus*) were common existence in the intestine of silkworm larvae reared with tricuspid cudrania and mulberry leaves. Besides, five genera of these dominant strains (*Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Citrobacter*, *Escherichia* and *Klebsiella*) were detected in the intestine of the silkworm larvae which reared with mulberry leaves, while only two genera (*Pseudomonas* and *Agrobacterium*) were presented in the intestine of the silkworm larvae reared with tricuspid cudrania leaves. The composition of dominant intestinal microflora had shown significant difference between two kinds of silkworm larvae that reared with different forages. While the silkworm larvae were reared with tricuspid cudrania leaves, it was

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金

收稿日期:2009-10-10; **修订日期:**2010-03-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: canbl3312@126.com

notable that the diversity of dominant intestinal microflora was considerably lower than that of silkworm larvae which reared with mulberry leaves. In addition, we made preliminary studies on the relationship among different dominant intestinal strains of the silkworm larvae that reared with tricuspid cudrania and mulberry leaves respectively. The certain dominant intestinal strains from silkworm larvae that reared with two different leaves mentioned above were combined together as microbial additive to feed silkworm larvae. Taking 3 independent experiments for each combination, we found that the silkworm larvae got sickness induced by some combinations with the symptoms such as spitting yellow liquid, head shaking and finally led to death within 24 hours. These results suggested that there could be substantial change on intestinal microflora of silkworm larvae, possibly the gut microbial community structure changes, induced by different forages. The composition changes of intestinal microflora were qualitatively differed from the changes of that along with the inter-instar changes of silkworm larvae reared with the same forage. According to the studies, we speculated that the community structure changes and lower diversity of dominant microflora in intestine of silkworm larvae reared with tricuspid cudrania leaves might be related to their retarded growth and susceptibility to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV).

Key Words: dominant microflora; intestine; silkworm; type; difference; tricuspid cudrania leaf; mulberry leaf

昆虫肠道中栖居着大量的微生物,构成了肠道的微生态系统。肠道微生物菌群对宿主是有益的,它们通过参与昆虫的消化、吸收和抵抗病原微生物的侵袭等^[1-2],促进机体胃肠道正常生态平衡的恢复和稳定,维持宿主健康,减少疾病。国内外学者对昆虫与肠道内微生物及优势菌群关系的研究主要集中在等翅目昆虫白蚁上^[3-4],而对其他种类昆虫肠道微生物的研究则较少。鳞翅目是昆虫纲的一个重要类群,已有研究表明鳞翅目昆虫的肠道内栖息着相当数量的微生物类群^[5],这些微生物对该类昆虫的营养和代谢同样起着重要作用。

早在 20 世纪 60 年代, Takizawa 和 Iizuka 对家蚕肠道内细菌进行过一些研究^[6]。我国学者对家蚕肠道菌的研究要晚些, 1982 年马文石初步调查了病蚕肠道微生物的种类^[7]。1996 年孙雪奇等从家蚕肠道中分离出 16 类细菌,利用它们研制微生态制剂以增强家蚕对营养物质的吸收^[8]。2000 年李蒙英等研究发现家蚕肠道内容物中,以葡萄球菌属细菌居多,其次为阴沟肠杆菌^[9]。2002 年张剑飞等发现家蚕肠道中有着丰富的细菌类型,其中优势菌是微球菌和芽孢杆菌^[10]。2007 年田贞华等从家蚕肠道中分离出 14 个不同类型的微生物,揭示了家蚕肠道细菌种群的多样性^[11]。从这些报道可以看出,人们对家蚕肠道微生物有了一定的认识,但以上研究并未揭示家蚕肠道微生物与宿主健康性的关系。

柘树[*Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur.] 与桑树(*Morus alba* L.) 是桑科(*Moraceae*) 不同属的植物,我国及日本很早就有用柘叶养蚕的历史记载^[12]。最近的研究显示,4 龄起蚕用柘叶替代桑叶饲养,家蚕虽然能完成生活世代,但其个体瘦弱,同时上簇率、结茧率、全茧量和茧层量等性状成绩都低于桑叶饲养的家蚕^[13],特别是柘叶饲养的家蚕易感染病毒发生脓病的现象引起了对脓病发生机制新的关注^[14],有必要从多角度研究和探讨家蚕脓病发生机制,本实验以柘叶替代桑叶饲养家蚕,比较和研究不同饲料饲养条件下家蚕肠道优势菌群类型的变化,以探讨家蚕的生长发育及抗病性与肠道微生态状况的关系,为研究优势菌群菌种在家蚕肠道中的功能和作用奠定基础,为进一步构建鳞翅目昆虫肠道健康性的微生态模型提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

洞庭×碧波杂交蚕种由北碚蚕种厂提供。柘叶采自西南大学校内,桑叶由西南大学桑园提供。

实验用的培养基^[15] 牛肉膏蛋白胨培养基(NA)、马铃薯琼脂培养基(PDA)、高氏 1 号培养基(GSA)、查氏培养基(CA)。以上培养基高压灭菌后,调 pH 至 9.2—9.8。

对照菌株 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌,由西南大学蚕丝学实验室提供。

PCR 扩增用的试剂均购自 TaKaRa 公司,DNA 片段快速纯化回收试剂盒购自北京鼎国公司,基因组扩增引物 1:27F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、引物 2:1492R(5'-CGGTTAC CTTGTTACGACTT-3'),由南京金

斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 取材

按照常规方法催青,1—3 龄用桑叶饲养,4 龄起分成相同的两组,分别用桑叶和柘叶饲养,直到上簇。从 4 龄第 1 天到 5 龄第 7 天,每隔 1d,各取家蚕 20 头,饥饿过夜。在无菌条件下,用 75% 的乙醇擦拭和火焰灼烧对家蚕体表进行灭菌,无菌水冲洗 3 次,取出中肠,用无菌注射器抽取肠液,每 5 头家蚕肠液作为一个收集单位。

1.2.2 优势菌菌株的分离

优势菌定义标准 在最高稀释度上,菌落数占总菌落数的比例为 10% 以上。每份样本可有 2 种以上的优势菌,称为优势菌群。以此为标准筛选出优势菌的菌株^[16]。

好氧及兼性厌氧菌的分离 取 1 mL 家蚕肠液,按 10 倍稀释法进行稀释,各取最高稀释度的肠液 0.1 mL 涂布于不同固体培养基上,所有处理均重复 3 次。30℃ 培养箱中培养 3—5d,挑取优势菌单菌落,在分离培养基上多次划线分离纯化、镜检(为单一菌),得到纯菌株,接种到相应的斜面培养基上保存。

1.2.3 优势菌群初步鉴定

将分离到的菌株在相应培养基上划线,30℃ 培养 18—24h,观察菌落形态。采用革兰氏染色法、芽孢染色法观察菌体形态^[15,17-18]并进行其他生理生化试验:接触酶试验、氧化酶试验、葡萄糖发酵试验和运动性试验^[19]。综合以上三方面鉴定结果对优势菌菌株进行初步分类。

1.2.4 优势菌群分子生物学鉴定

(1) 优势菌菌落 PCR 悬液的制备

从平板中直接挑取一环菌株,加入 100 μ L 无菌双蒸水,漩涡混匀后,沸水浴 2 min,10800 r/min 离心 5 min,上清液中即含有 16S rDNA,直接用于 PCR 扩增^[20]。

(2) 优势菌 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序

PCR 扩增反应采用 50 μ L 体系^[20],扩增条件为:95℃ 5 min,29 个循环(94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min)最后 72℃ 延伸 5 min。将 6 μ L PCR 反应液与载样缓冲液混合后,加至质量分数 0.8% 的琼脂糖凝胶泳道中,在另一泳道中加入 DNA 分子量标记,进行电泳。在凝胶成像仪下切下目的 DNA 条带,按北京鼎国公司回收试剂盒的说明将 PCR 产物纯化,送到南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

(3) 优势菌群系统发育分析

采用 Blast 软件将测得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行相似性比对,选取同源性 90% 以上的前 3 条序列作为参比对象,用 MEGA 4.0 软件以邻接法^[21]构建系统发育树,重复取样,拓扑分析为 1000 次。

1.2.5 柘叶与桑叶饲养家蚕肠道中微生态优势菌群类型及差异性分析

通过形态学、分子生物学和生理生化相结合的方法鉴定出优势菌群,统计柘叶与桑叶饲养的 4、5 龄家蚕肠道优势菌群类型并分析其差异性。

2 结果与分析

2.1 柘叶与桑叶饲养家蚕肠道中优势菌菌落形态和菌体特征

在 4、5 两个龄期,分离所得的优势菌共 56 株,按照菌落形态分为 12 类,分别用代表性的菌株 SW83、SW48、SW42、SW115、SW54、SW81、SW86、SW101、SW82、SW75、SW38 和 SW41 表示其类型。柘叶饲养家蚕肠道中优势菌菌落形态有 7 类,桑叶饲养家蚕肠道中优势菌菌落形态有 10 类,它们共有的菌落形态有 4 类。其中 SW83、SW48、SW42、SW115 和 SW54 类的优势菌各有 1 株,SW81 和 SW41 类的优势菌各有 2 株,SW86 类的优势菌有 3 株,SW101 类的优势菌有 16 株,SW82 和 SW75 类的优势菌各有 8 株,SW38 类的优势菌有 12 株。菌落直径大约在 1—10 mm 之间,其特征显示如下(表 1)。

表 1 桑叶与柘叶饲养家蚕肠道中优势菌菌落形态和菌体特征

Table 1 Colonial morphology and mycelial characteristics of dominant intestinal microflora in silkworm reared with tricuspid cudrania and mulberry leaves respectively

菌株类型 Culture type	培养基 Culture medium	菌落形态 Colonial morphology	菌体特征 Mycelial characteristics
SW83	NA	黄色,菌落小,凸起,边缘整齐	杆状,单个
SW48	PDA	乳白色,奶油状,边缘整齐	杆状,单个或成对排列
SW42	PDA	黄色,边缘整齐	杆状,单个,两端圆
SW115	PDA	白色,菌落小,边缘整齐	杆状,单个或成对,长短不一
SW54	NA	橙黄色,菌落小,边缘整齐	短杆状
SW81	GSA	白色,凸起,边缘不整齐	杆状,单个、成对或短链
SW86	GSA	淡黄色,菌落大,边缘整齐	直杆状,单个
SW101	PDA	白色,凸起,边缘整齐	杆状,单个
SW82	PDA	黄色,奶油状,边缘针状	杆状,单个
SW75	PDA	淡黄色,边缘整齐	杆状
SW38	NA	橙黄色,凸起,边缘整齐	球状,单个、成对排列或成不规则的堆团
SW41	PDA	白色,粘稠状,凸起,边缘整齐	直杆状

SW: 西南大学; SW83 和 SW48 为柘叶饲养家蚕肠道特有的优势菌类型; SW42, SW115, SW54, SW81 和 SW86 是桑叶饲养家蚕肠道特有的优势菌类型; SW101, SW82, SW75 和 SW38 为柘叶与桑叶饲养家蚕肠道共有的优势菌类型; SW41 是只从四龄家蚕肠道中分离到的优势菌类型.

2.2 优势菌群的生理生化特征

生理生化鉴定见表 2,并结合菌落形态、菌体特征分析,结果表明:SW83、SW48、SW42、SW115、SW54、SW81、SW86、SW101、SW82、SW75、SW38、SW41 分别与假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、短波单胞杆菌属(*Brevundimonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)很接近.

表 2 优势菌群生理生化特征

Table 2 Physiological-biochemical characteristics of different dominant intestinal microflora in silkworm

菌株类型 Culture type	革兰氏染色 Gram stain	芽孢染色 Spore stain	氧化酶 Oxidase	接触酶 Catalase	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	运动性 Motility
SW83	-	-	+	+	-	+
SW48	-	-	+	+	-	+
SW42	-	-	+	+	+	+
SW115	-	-	-	+	⊕	+
SW54	+	-	+	+	-	-
SW81	-	-	-	+	⊕	-
SW86	-	-	-	+	⊕	+
SW101	-	-	强阳	+	-	+
SW82	-	-	-	+	-	+
SW75	-	-	-	+	⊕	+
SW38	+	-	-	+	+	-
SW41	+	绿色,位于端部	-	+	+	+

+: 阳性或发酵葡萄糖产酸不产气; -: 阴性、无芽孢或不发酵葡萄糖; ⊕: 发酵葡萄糖产酸产气

2.3 优势菌群 16S rDNA 扩增结果

将 12 个培养类型的优势菌菌株进行 16S rDNA 扩增,测定其分子量在 1455—1545bp 之间(图 1)。分子量最小的是 7 泳道,为 1455bp;分子量最大的是 11 泳道,为 1545bp。

2.4 优势菌群序列比对及系统发育分析

以 16S rDNA 建立的无根系统发育树表明(图 2), 柞叶饲养家蚕肠道特有的优势菌类型 SW83、SW48 分别与已知的细菌属 *Pseudomonas* 和 *Agrobacterium* 具有较高同源性。桑叶饲养家蚕肠道特有的优势菌类型 SW42、SW115、SW81、SW86 和 SW54 分别与已知的 4 个细菌属和 1 个放线菌属 *Aeromonas*、*Citrobacter*、*Klebsiella*、*Escherichia* 和 *Brevibacterium* 有较高同源性。二者共同的优势菌类型是 SW101、SW82、SW38 和 SW75, 其中前 3 类优势菌分别与已知的 3 个细菌属 *Brevundimonas*、*Stenotrophomonas* 和 *Staphylococcus* 有较高的同源性, 而 SW75 与 *Enterobacter* 和 *Klebsiella* 均有较高同源性(图 2), 但进一步结合形态学及生理生化结果分析表明(表 1, 表 2), SW75 属于 *Enterobacter*。只从 4 龄家蚕肠道中分离到的优势菌类型 SW41 与细菌属 *Bacillus* 有较高同源性。上述结果与初步鉴定结果吻合。

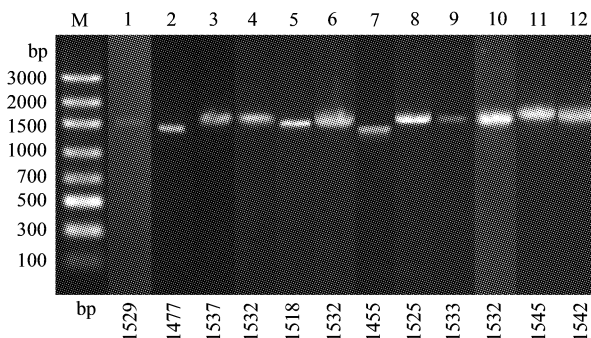


图 1 优势菌群 16S rDNA 扩增电泳图谱

Fig.1 Agrose gel electrophoretic patterns of 16S rDNA amplification of different dominant intestinal microflora in silkworm

M: DL3000 分子质量标准; 泳道 1—12 分别表示 SW83, SW48, SW42, SW115, SW54, SW81, SW101, SW82, SW86, SW75, SW38 和 SW41 这 12 个菌株类型

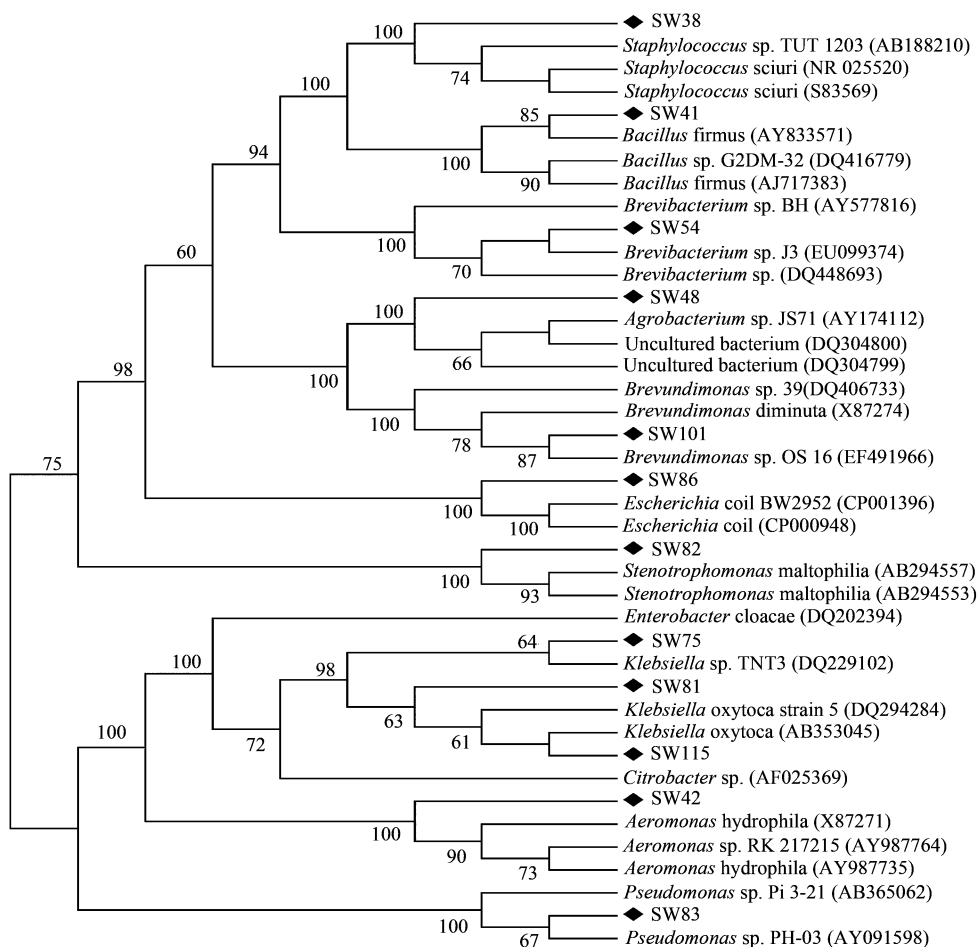


图 2 从柞叶与桑叶饲养家蚕肠道中分离的优势菌群系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of dominant intestinal microflora in silkworm reared with tricuspid cudrania and mulberry leaves

用◆标记家蚕肠道菌株的 16S rDNA 序列, 括号内为序列的登录号; 每个分支点上的数字为引导值的支持百分率, 显示的值大于 60%

2.5 柘叶与桑叶饲养家蚕肠道中微生态优势菌群类型及差异性分析

本试验结果表明(表3),柘叶与桑叶饲养家蚕肠道中优势菌群类型都存在龄期的变化,4、5龄柘叶饲养家蚕肠道中优势菌分别有6种和5种,桑叶饲养家蚕肠道中优势菌分别有8种和6种。同时,同一龄期不同饲料饲养家蚕肠道中微生态优势菌群类型也存在较大差异。

表3 柘叶与桑叶饲养家蚕肠道中微生态优势菌群比较

Table 3 Difference of dominant intestinal microflora in silkworm reared with tricuspid cudrania and mulberry leaves

龄期 Instar larvae	柘叶饲养家蚕肠道中优势菌群 Dominant intestinal microflora in silkworm reared with tricuspid cudrania leaves	桑叶饲养家蚕肠道中优势菌群 Dominant intestinal microflora in silkworm reared with mulberry leaves
4龄 4th instar larvae	土壤杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>
	短波单胞杆菌属 <i>Brevundimonas</i>	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>
	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	短波单胞杆菌属 <i>Brevundimonas</i>
	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>
5龄 5th instar larvae		肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>
		葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>
	短波单胞杆菌属 <i>Brevundimonas</i>	克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i>
	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	短波单胞杆菌属 <i>Brevundimonas</i>
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>
	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>
		葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>

4龄柘叶饲养家蚕肠道优势菌类型与桑叶饲养家蚕相比差异较大,各自出现特有的优势菌,分别是柘叶饲养家蚕肠道中的 *Agrobacterium* 与桑叶饲养家蚕肠道中的 *Aeromonas*、*Brevibacterium* 和 *Escherichia*(表3)。5龄两者优势菌类型相比也产生了差异,柘叶饲养家蚕特有的优势菌是 *Pseudomonas*,桑叶饲养家蚕特有的优势菌是 *Citrobacter* 和 *Klebsiella*(表3)。对于整个研究阶段,差异更显著,柘叶饲养家蚕特有的优势菌只有2类,是 *Agrobacterium* 和 *Pseudomonas*;桑叶饲养家蚕特有的优势菌有5类,是 *Aeromonas*、*Brevibacterium*、*Escherichia*、*Citrobacter* 和 *Klebsiella*(表3)。饲料的改变导致家蚕肠道微生态菌群组成发生较大变化,这种变化有可能打破健康肠道内微生态菌群结构的平衡性^[22-23]。

3 讨论

近年来,已有报道采用宏基因组法即非培养分析法对昆虫肠道微生物进行研究^[23-24],但此法不能获得相关菌株,不利于研究昆虫肠道微生物之间及微生物与宿主之间的相互作用^[24-25]。本研究采用纯培养法从家蚕肠道中分离出56株菌株,并且新分离到2类优势菌短波单胞杆菌属(*Brevundimonas*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*),这些菌株为进一步研究昆虫的生长发育及抗病性与肠道微生态状况的关系提供了丰富的材料。

本研究从桑叶饲养家蚕肠道中分离出10类优势菌,从柘叶饲养家蚕肠道中分离出7类优势菌,它们共有的优势菌有4类。从柘叶饲养家蚕肠道中分离出的优势菌缺少 *Aeromonas*、*Citrobacter*、*Escherichia*、*Klebsiella* 和 *Brevibacterium* 5个类群,这些菌群是桑叶饲养家蚕肠道中的主要菌群^[8,11,26],已有研究表明前4类细菌为化能有机营养型、兼性厌氧,能通过糖酵解和戊糖磷酸途径降解碳水化合物^[27],由此推测,它们可能与家蚕肠道内物质的消化分解有关,短杆菌属(*Brevibacterium*)在代谢过程中有可能产生与抗性有关的酶,从而在一定程度上增强宿主抵御病原微生物的能力^[28]。柘叶饲养家蚕肠道中出现特有的优势菌 *Pseudomonas* 和 *Agrobacterium*,已有研究表明,昆虫肠道微生物与宿主的抗病性有着很大关系^[29-30],*Pseudomonas* 广泛分布于

自然界, *Agrobacterium* 一般存在于土壤中, 多数都是致病菌, 它们可能导致柞叶饲养家蚕的抗病力降低。共有的优势菌群中葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*) 主要与昆虫的营养消化有关^[3,8-9], 而本研究新发现的短波单胞杆菌属 (*Brevundimonas*) 和寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 的功能和作用有待于进一步的研究。

从试验结果看, 同一种饲料饲养家蚕, 为适应龄期的生理变化家蚕肠道微生态菌群的组成也有变化^[10,26], 但不同饲料即分别用柞叶与桑叶饲养家蚕, 微生物菌群的变化则可能是肠道内微生态菌群结构性的改变, 我们将柞叶饲养家蚕分离的一些菌和桑叶饲养家蚕分离的菌混合喂养家蚕, 发现其中某些混合菌群的组合饲喂家蚕后 24h 以内出现了吐液、摇头等症状, 然后蚕群体死亡, 3 次平行重复试验均表现出相同现象, 说明不同饲料饲养家蚕肠道微生物的变化与同一种饲料饲养家蚕肠道微生物的变化存在质的不同。关于家蚕肠道内微生物与微生物之间的关系以及微生物对宿主的影响有待深入研究。

References:

- [1] Rio R V M, Hu Y J, Aksoy S. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(7): 325-336.
- [2] Dillon R J, Vennard C T, Buckling A, Chamley A K. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 2005, 8: 1291-1298.
- [3] Chen H, Mei J F, Min H. Microorganisms in termite gut. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(2): 75-78.
- [4] Eutick M L, O'Brien R W, Slaytor M. Bacteria from the gut of Australian termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 35(5): 823-828.
- [5] McKillip J L, Small C L, Brown J L, Brunner J F, Spence K D. Sporogenous midgut bacteria of the leafroller, *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology* 1997, 26: 1475-1481.
- [6] Takizawa Y, Iizuka T. The aerobic bacterial flora in the gut of larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. The relation between media and numbers of living cells. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 1968, 37: 295-305.
- [7] Ma W S. Gut bacteria of the silkworm with Tussah soft disease and its pathogenicity. *Jilin Sericulture*, 1982, 34(1): 44-53.
- [8] Sun X Q, Huang Y X, Dong C J, Liu Z H, Zheng C W, Liu H Y. Study on aerobes, facultative anaerobes from silkworm intestine and microecologies of silkworm. *Sichuan Sericulture*, 1996, 24(1): 13-15.
- [9] Li M Y, Xu H Q, Yu X H, Wang Y R. Study on flora from the intestine of the silkworm. *Jiangsu Sericulture*, 2000, 22(2): 5-7.
- [10] Zhang J F, Wang L L, Zhou Z Y. Primordial study of bacterial community of larval midgut of the silkworm strain K100 and E23. *Sichuan Sericulture*, 2002, (3): 8-12.
- [11] Tian Z H, Hui F L, Ke T, Kan Y C, Wen Z Z. Molecular analysis of the bacteria community composition in silkworm midgut. *Science of Sericulture*, 2007, 33(4): 592-595.
- [12] Li R. *Silkworm Ecology*. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1987: 97-110.
- [13] Xue Y W, Tu Z, Wang Y J, Xiang Y Q, Xie H X, Feng L C. Effects of tricuspid cudrania leaves on growth and development and activity of three metabolic enzymes in the silkworm (*Bombyx mori*). *Science of Sericulture*, 2009, 35(2): 408-411.
- [14] Xie H X, Tu Z, Wang Y J, Xue Y W, Feng L C, Wang X Q. Effects of different forages on BmNPV resistance and activities of three metabolic enzymes of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Science of Sericulture*, 2009, 35(3): 642-647.
- [15] Zhou D Q. *Manual of Microbiology Experiment*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986: 14-228.
- [16] Li W J. Establishment of the separation methods and preliminary application of dominant obligate aerobes in silkworm intestines. *Chinese Journal of Microecology*, 1999, 11(5): 315-316.
- [17] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Translation group of institute of microbiology of Chinese academy of sciences. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 274-1321.
- [18] John G H, Nobel R K, Peter H A, James T S, Stanley T W. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press, 1994.
- [19] Bacterial Classification Group of Institute of Microbiology of Chinese Academy of Sciences, Academia Sinica. *Common Identification Methods of Ordinary Bacteria*. Beijing: Science Press, 1978: 14-193.
- [20] Yun L H. Study on Optimization of Fermentation Conditions and Characterization of a Lipase-proudcng Strain: *Burkholderia mana* SYBC LI-1. Wuxi: Southern Yangtze University, 2008.

- [21] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [22] Broderick N A, Raffa K F, Goodman R M, Handelsman J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (1): 293-300.
- [23] Xiang H, Li M W, Zhao Y, Zhao L P, Zhang Y H, Huang Y P. Bacterial community in midguts of the silkworm larvae estimated by PCR/DGGE and 16S rDNA gene library analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 50(3): 222-233.
- [24] Reeson A F, Jankovic T, Kasper M L, Rogers S, Austin A D. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Molecular Biology*, 2003, 12(1): 85-91.
- [25] Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rolleke S. Application of broadrange 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *Journal Microbiological Methods*, 2003, 52: 251-260.
- [26] Yi F P, Wang L L, Zhou C, Chen J L, Zhang J F, Zhou Z Y. Studies on obligate aerobes in the intestines of silkworm. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, 23(2): 117-119.
- [27] Prescott L M, Harley J P, Donald A K. *Microbiology*. 5th ed. Beijing: Higher Education Press/McGraw-Hill Companies, 2002: 498-507.
- [28] Fernandez J, Mohedano A F, Gaya P, Medina M, Nunez M. Purification and properties of two intracellular aminopeptidases produced by *Brevibacterium linens* SR3. *International Dairy Journal*, 2000, 10(4): 241-248.
- [29] Xu H X, Zheng X S, Liu S P, Ye G Y, Lu Z X. The role of endosymbionts in insect host resistance against adverse factors. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2009, 46(3): 350-354.
- [30] Ansari M A, Tirry L, Moens M. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Control*, 2003, 28(1): 111-117.

参考文献:

- [3] 陈虹, 梅建凤, 闵航. 白蚁肠道微生物. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 75-79.
- [7] 马文石. 柞蚕吐白虫病蚕中肠内的细菌种类及其致病性的研究. *吉林蚕业*, 1982, 34(1): 44-53.
- [8] 孙雪奇, 黄玉祥, 董长江, 刘智慧, 郑常文, 刘鸿莺. 家蚕肠道好氧和部分兼性厌氧微生物及蚕用微生态制剂的研究. *四川蚕业*, 1996, 24(1): 13-15.
- [9] 李蒙英, 许宏庆, 虞晓华, 王懿仁. 家蚕肠道菌群的研究. *江苏蚕业*, 2000, 22(2): 5-7.
- [10] 张剑飞, 王林玲, 周泽扬. 家蚕 K100 E23 肠道微生物初探. *四川蚕业*, 2002, (3): 8-12.
- [11] 田贞华, 惠丰立, 柯涛, 阚云超, 文桢中. 家蚕肠道细菌种群结构分析. *蚕业科学*, 2007, 33(4): 592-595.
- [12] 李瑞. 家蚕生态学. 南京: 江苏科学技术出版社, 1987: 97-110.
- [13] 薛英伟, 涂增, 万永继, 向芸庆, 谢洪霞, 冯丽春. 柞叶饲养对桑蚕 (*Bombyx mori* L.) 生长发育及 3 种代谢酶活性的影响. *蚕业科学*, 2009, 35(2): 408-411.
- [14] 谢洪霞, 涂增, 万永继, 薛英伟, 冯丽春, 王晓强. 不同饲料饲养对家蚕抗核型多角体病毒病的能力以及体内 3 种代谢酶活性的影响. *蚕业科学*, 2009, 35(3): 642-647.
- [15] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 14-228.
- [16] 李文建. 肠道需氧优势菌群分离方法的建立及初步应用. *中国微生态学杂志*, 1999, 11(5): 315-316.
- [17] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所翻译组, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-1321.
- [19] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978: 14-193.
- [20] 恽丽红. *Burkholderia mana* SYBC LI-1 产脂肪酶发酵条件优化及酶学性质研究. 无锡: 江南大学, 2008.
- [23] 相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. *昆虫学报*, 2007, 50(3): 222-233.
- [26] 易发平, 王林玲, 周成, 陈家莲, 张健飞, 周泽扬. 家蚕肠道好氧微生物菌群的研究. *西南农业大学学报*, 2001, 23(2): 117-119.
- [29] 徐红星, 郑许松, 刘淑平, 叶恭银, 吕仲贤. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. *昆虫知识*, 2009, 46(3): 350-354.