

双叉犀金龟(*Trypoxylus dichotomus*)幼虫肠道微生物多样性及纤维素降解菌筛选

邹鑫¹, 彭梅芳², 阚新锐¹, 黄文丽^{2*}

1 成都大学 食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

2 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川 成都 610066

邹鑫, 彭梅芳, 阚新锐, 黄文丽. 双叉犀金龟(*Trypoxylus dichotomus*)幼虫肠道微生物多样性及纤维素降解菌筛选[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 225-238.

ZOU Xin, PENG Meifang, KAN Xinrui, HUANG Wenli. Exploration of microbial diversity and identification of cellulose-degrading bacteria in the gut of *Trypoxylus dichotomus* larvae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 225-238.

摘要: 【目的】揭示双叉犀金龟(*Trypoxylus dichotomus*)幼虫肠道微生物群落的结构组成和功能特征, 挖掘纤维素降解细菌资源。【方法】通过宏基因组测序, 对肠道细菌的结构组成和功能进行分析。以羧甲基纤维素(sodium carboxymethyl cellulose, CMC)为唯一碳源从幼虫肠道分离筛选纤维素降解细菌, 进一步采用形态学观察和分子生物学方法对菌株进行鉴定。【结果】肠道微生物以细菌为主, 占比为 81.3%, 门水平分布上, 厚壁菌门(*Firmicutes*, 45.8%)和拟杆菌门(*Bacteroidota*, 20.3%)为优势菌门, 丰度排名前三的菌属为梭菌属(*Clostridium*, 3.90%)、拟杆菌属(*Bacteroides*, 3.52%)、营发酵单胞菌属(*Dysgonomonas*, 2.41%)。宏基因组功能水平分析显示, 肠道微生物基因主要与碳水化合物、氨基酸和能量代谢相关, 在 KEGG 数据库注释中, 碳水化合物代谢相关基因占据主导地位。CAZy 注释结果表明, 48 856 个(7.43%)基因成功注释到 344 个碳水化合物代谢酶家族, 糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH) (48.67%)是肠道细菌中占最大优势的酶家族, 相对丰度前十的功能酶类有 6 个属于 GH 家族。此外, 从肠道中分离获得 3 株纤维素降解细菌 TRC-3 (*Bacillus subtilis*)、TRC-5 (*Bacillus subtilis*)和 TRC-6 (*Bacillus safensis*), 其中 TRC-3 的滤纸酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶活性更强。【结论】双叉犀金龟幼虫肠道微生物群落具有较高的多样性和复杂性, 拥有大量编码碳水化合物活性酶的基因, 存在丰富的纤维素降解细菌资源。

资助项目: 四川省农业科学院“2035 原始创新”计划(YSCX2035-005); 四川省自然科学基金(2022NSFSC0164); 四川省农业科学院自主创新项目(2022ZZCX028)

This work was supported by the “2035 Original Innovation” Project of Sichuan Academy of Agricultural Sciences (YSCX2035-005), the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0164), and the Independent Innovation Project of Sichuan Academy of Agricultural (2022ZZCX028).

*Corresponding author. E-mail: wenlih11@126.com

Received: 2024-07-29; Accepted: 2024-10-18; Published online: 2024-10-23

关键词：双叉犀金龟；宏基因组；肠道微生物；纤维素降解

Exploration of microbial diversity and identification of cellulose-degrading bacteria in the gut of *Trypoxylus dichotomus* larvae

ZOU Xin¹, PENG Meifang², KAN Xinrui¹, HUANG Wenli^{2*}

¹ College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, Sichuan, China

² Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, Sichuan, China

Abstract: [Objective] To elucidate the structural and functional characteristics of the gut microbiota of *Trypoxylus dichotomus* larvae and isolate cellulose-degrading bacteria. [Methods] Metagenomic sequencing was employed to analyze the structure and functions of the gut microbiota. Cellulose-degrading bacteria were isolated and screened from the larval gut with carboxymethyl cellulose (CMC) as the sole carbon source. The strains were identified based on morphological characteristics and molecular evidence. [Results] The gut microbiota was dominated by bacteria, which accounted for 81.3%. At the phylum level, *Firmicutes* (45.8%) and *Bacteroidota* (20.3%) were the dominant phyla. The top three abundant genera were *Clostridium* (3.90%), *Bacteroidia* (3.52%), and *Dysgonomonas* (2.41%). The functional analysis of metagenome data revealed that the genes of the gut microbiota were mainly associated with carbohydrate, amino acid, and energy metabolism. The annotation in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) revealed that the genes related to carbohydrate metabolism were predominant. The annotation in the carbohydrate-active enzyme database (CAZy) indicated that 48 856 (7.43%) genes were successfully annotated to 344 carbohydrate metabolism enzyme families, with glycoside hydrolase (GH, 48.67%) being the most dominant enzyme family in the gut bacteria. Among the top ten functionally abundant enzymes, six belonged to the GH family. Additionally, three strains of cellulose-degrading bacteria, TRC-3 (*Bacillus subtilis*), TRC-5 (*B. subtilis*), and TRC-6 (*B. safensis*), were isolated from the gut. TRC-3 exhibited stronger activities of filter paper enzyme, endoglucanase, exoglucanase, and β -glucosidase. [Conclusion] The gut microbiota of *Trypoxylus dichotomus* larvae exhibits high diversity and complexity, carrying a large number of genes encoding carbohydrate-active enzymes and harboring rich cellulose-degrading bacteria.

Keywords: *Trypoxylus dichotomus*; metagenome; gut microbiota; cellulose degradation

双叉犀金龟(*Trypoxylus dichotomus*), 属鞘翅目(Coleoptera)金龟子科(Scarabaeidae), 因其雄性成虫头部的独特双叉状犄角而得名。*T. dichotomus* 最早是由 Linnaeus 从东南亚收集的

标本中发现的, 在中国、朝鲜半岛、日本、泰国、老挝等亚洲国家和地区分布广泛^[1]。在中国分布于东南部的的主要亚种为 *T. dichotomus*^[2], 其对生态环境几乎不会产生危害。作为受国家保护的“三有动物”即具有重要经济、科学研究价值的昆虫, 在具有观赏作用的同时也具有较高的药用价值, 在中药材中被命名为独角蜚螂, 具有息风镇惊、破瘀止疼等功效^[3]。在 1976 年已有人从其体内提取出具有一定抗癌作用的独角仙素(dicotastin)。双叉犀金龟不仅具有重要的药用价值, 还因其在生态系统中分解有机质和循环养分的作用而受到关注。成虫与幼虫的食性具有较大差异, 成虫主要以肉质厚实、水分和糖分含量高的瓜果为食^[3]; 其幼虫则主要以腐木及落叶为主要食物来源^[4], 因其可以分泌包括纤维素酶、聚糖酶和糖苷酶等多种消化酶, 能够有效分解复杂的木质纤维素, 其这一特性已被工业化用于生物转化食用菌生产中产生的菌渣^[5]。

木质纤维素是生物质主要的组成部分, 是最为丰富的可再生有机资源, 约占光合作用所产生有机质的 50%。其主要由纤维素(通常占细胞壁的 40%–50%)、半纤维素(通常占细胞壁 15%–25%)及木质素(通常占细胞壁 13%–30%)组成, 各组分之间通过共价键和非共价力紧密交织在一起^[6], 3 种成分构成复杂的网络, 造成了木质纤维素难降解的特性^[7]。由于木质纤维素分子结构的复杂性, 其降解需要多种酶的协同作用。自然界中, 许多微生物通过分泌多种酶类实现木质纤维素的降解。昆虫肠道被认为是木质纤维素降解微生物的一个重要来源, 特别是以植物为食的昆虫, 其肠道内含有丰富且多样的微生物群落, 这些微生物在木质纤维素含量丰富的食物消化过程中起着至关重要的作用^[8]。白蚁作为广为人知的食木昆虫, 已有大量研究对其肠道微生物群落结构和功能基因进

行了深入的分析^[9–12]。白蚁肠道共生细菌在纤维素和木聚糖水解释中起直接作用, 宏基因组分析揭示了大量参与纤维素和木聚糖水解释的基因。研究者们已从白蚁肠道微生物中分离鉴定出多株具有纤维素降解能力的细菌^[13]。除此之外, 蝗虫^[14]、蟑螂^[15]、甲虫^[16]等昆虫的肠道微生物也被发现具有高度特化的纤维素和木质素降解能力。这些食木昆虫通常依赖于肠道共生菌对木质纤维素进行降解, 但也可以从自身肠道组织(唾液腺和中肠)产生木质纤维素酶协助木质纤维素的消化^[17–18]。

近 3 年来, 鞘翅目昆虫在纤维素降解领域受到了很大的关注。Takeishi 等^[19]发现 *T. dichotomus* 可以产生与纤维素降解相关的多种酶类, 如纤维素酶、木聚糖酶和糖苷酶等。通过对 *T. dichotomus* 的全基因组和肠道转录组分析, 发现多个编码纤维素酶基因^[20]。从双叉犀金龟幼虫肠道内分离到具有纤维素及半纤维素分解能力的微生物^[21–22], 而基于细菌相对丰度构建的人工微生物体系显示出最高的木质纤维素降解能力。因此, 为了进一步了解 *T. dichotomus* 幼虫肠道微生物群落的结构和功能, 本研究通过高通量测序技术分析双叉犀金龟幼虫肠道微生物的多样性, 系统揭示其微生物群落的组成和结构特征。此外, 通过培养筛选方法, 分离并鉴定具纤维素降解能力的菌株, 筛选具有木质纤维素降解能力的目标菌株, 不仅为深入理解双叉犀金龟幼虫的生态角色提供了科学依据, 也为探索昆虫肠道微生物的多样性及其潜在应用价值开辟了新的方向。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

样品双叉犀金龟 3 龄幼虫购自广东养殖商

户。经分子生物学鉴定为 *Trypoxylus dichotomus*, 适应性培养 2 周后进行实验, 适应性培养过程中饲喂发酵杂木屑。采样前禁食 24 h。

1.1.2 培养基

CMC 培养基(g/L): CMC 20.00, K_2HPO_4 1.00, $NaNO_3$ 3.00, $FeSO_4$ 0.01, KCl 0.50, $MgSO_4$ 0.50, 琼脂 15.00。SDY 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母粉 10.00, 葡萄糖 40.00。发酵产酶培养基(g/L): CMC 20.00, 蛋白胨 3.00, 酵母膏 0.50, $(NH_4)_2SO_4$ 2.00, KH_2PO_4 4.00, $CaCl_2$ 0.30, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.30, Tween-80 0.20。

1.1.3 主要试剂和仪器

E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit, Omega Bio-Tek 公司。

超声波破碎仪, Covaris 公司; Qubit 2.0 Fluorometer、PCR 仪、NanoDrop, Thermo Fisher Scientific 公司; 生物分析仪, Agilent 公司; 测序仪, Illumina 公司; 凝胶成像仪、电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.2 样品采集

将幼虫用无菌水反复冲洗后用 75%乙醇对幼虫表面进行消毒, 置于无菌操作台中在紫外光下照射 5–10 min。用灭菌后的剪刀剪掉幼虫头部, 将幼虫从尾部剖开, 分离出肠道, 取后肠内容物, 置于无菌离心管于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 用于提取 DNA 进行测序。

1.3 DNA 提取及测序

使用 E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit 提取肠道内容物的 DNA, 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的纯度和完整性, 使用 NanoDrop 进一步检测 DNA 纯度, Qubit 对 DNA 浓度进行精确定量。检测合格的 DNA 样品用 Covaris 超声波破碎仪随机打断成长度约为 350 bp 的片段, 经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成文库构建。库检合格后, 按照有效浓度及

目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina PE150 测序。

获得的原始数据(raw data)使用 readfq 对原始的测序数据进行预处理, 去除含低质量碱基(质量值 ≤ 38)的 reads、N 碱基达到 10 bp 的 reads 以及与 adapter 之间 overlap 超过 15 bp 的 reads, 获取用于后续分析的有效数据(clean data)。使用 MEGAHIT 软件对过滤后的有效数据进行拼接组装, 得到的 scaffolds 从 N 连接处打断, 获得不含 N 的 scaftigs^[23], 过滤掉 500 bp 以下的片段, 进行统计分析和后续基因预测。

1.4 生物信息学分析

用 MetaGeneMark 对各样品的 scaftigs (≥ 500 bp)进行开放阅读框预测(open reading frame, ORF)^[24], 并过滤掉预测结果中长度小于 100 nt 的序列^[25]。对 ORF 预测结果, 采用 CD-HIT 软件进行去冗余^[26], 以获得非冗余的初始 gene catalogue。采用 Bowtie2 将各样品的有效数据比对至初始 gene catalogue, 计算得到基因在各样品中比对上的 reads 数目, 过滤掉各个样品中 reads 数目 ≤ 2 的基因^[27], 获得最终用于后续分析的 unigenes。

利用 Diamond 软件^[28]将 unigenes 与 KEGG、eggNOG 和 CAZy 数据库进行比对, 得到相关基因的注释结果。使用 Diamond 软件将 unigenes 与从 NCBI 的 NR 数据库中抽提出的细菌(bacteria)、真菌(fungi)、古菌(archaea)和病毒(viruses)序列进行比对。对于每一条序列的比对结果, 选取 E value \leq 最小 E value $\times 10$ 的结果, 由于每一条序列可能有多个比对结果, 采取最近公共祖先算法(least common ancestors, LCA)^[29], 将出现第一个分支前的分类级别, 作为该序列的物种注释信息。

1.5 纤维素降解细菌的富集培养及筛选

将上述肠道内容物置于 5 mL 生理盐水中

匀浆, 将 1 mL 肠道匀浆接种至含 100 mL LB 培养基的锥形瓶中, 32 °C、200 r/min 富集培养 48 h。将菌液梯度稀释从 10^{-3} 至 10^{-8} 。将 100 μ L 梯度稀释后的菌液涂布至刚果红纤维素培养基, 每个梯度做 3 个平行。置于 32 °C 恒温培养箱孵育 72 h, 观察具有降解圈的菌落, 将其挑取接种于 LB 固体培养基, 通过反复划线进行纯化, 将纯化菌株于 32 °C、200 r/min 富集培养 24 h 后与 50% 甘油 1:1 混合, 储存于 -80 °C。

将保存的菌液活化后接种于 CMC 培养基中央, 每个菌株接种 3 个平板, 32 °C 培养 3-7 d。取 1% 刚果红染色液铺满平板, 染色 30 min 后用 1 mol/L NaCl 溶液洗涤 30 min。用游标卡尺对菌落直径(d)和水解圈直径(D)进行测量。 D/d 比值越大, 相应菌株纤维素降解能力越强。

1.6 纤维素降解细菌的鉴定

将分离得到的纤维素降解细菌划线接种于 LB 固体培养基, 32 °C 恒温培养 24 h, 观察菌落形状、大小、颜色、边缘、透明等形态特征, 并通过革兰氏染色和芽孢染色结合形态学特征对菌株进行初步鉴定。使用细菌 DNA 提取试剂盒提取各菌株的 DNA, 细菌通用引物 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492F (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系 (50 μ L): 1 \times TSE101 金牌 Mix 45 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 3 min, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 39 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物由北京擎科生物科技股份有限公司进行测序, 用 ContigExpress 拼接测序结果, 使用 BLAST 将菌株 16S rRNA 基因的拼接序列与 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中已知序列进行比对。在 MEGA 11.0 软件中采用近邻相接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树。

1.7 酶活测定

将菌株接种至 SDY 培养基中, 32 °C、200 r/min 活化 48 h, 之后按 10% 接种量接种至 100 mL 产酶培养基中, 32 °C、200 r/min 摇瓶培养 3 d, 每株菌设 3 个重复。取 10 mL 发酵液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 所得上清液即为粗酶液。采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法^[30], 以滤纸、羧甲基纤维素钠、脱脂棉、水杨苷为底物分别测定滤纸酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的活性。具体操作步骤: 取 0.5 mL 粗酶液加入 1.5 mL 含不同底物的柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 4.5), 混合均匀后于 50 °C 水浴孵育 30 min。加入 1.5 mL DNS 试剂, 沸水浴 10 min 后冷却至室温, 定容至 10 mL, 测定 OD_{540} 。以高温灭活的粗酶液为空白对照。所测吸光值在葡萄糖标准曲线 ($y=6.6971x+0.0339$, $R^2=0.991$) 中计算葡萄糖含量, 酶活性的定义为 1 mL 粗酶液在 1 min 内水解底物产生 1 μ mol 葡萄糖的所需酶量为 1 个酶活单位, 单位为 U/mL, 计算如公式(1)所示。

$$\text{酶活性(U/mL)} = \frac{A \times n \times 1000}{T \times V} \quad (1)$$

式中: A 为样品吸光值在标准曲线上相应葡萄糖含量(mol); n 为稀释倍数; 1 000 为 mg 到 μ g 的转换系数; T 为反应时间(min); V 为酶液体积(mL)。

1.8 统计分析

使用软件 SPSS 26.0 进行数据的统计分析, 所有描述性数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 多重极差检验进行组间比较, $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 宏基因组数据质量评估

从 *T. dichotomus* 后肠道内容物中共获得 6 308.76 Mb 的原始数据, 经处理后得到有效数

据为 6 270.77 Mb, 经质控后有效数据占原始数据比例达到 99%以上, G+C 含量约为 46%。有效数据中测序错误率小于 0.01 的碱基数目的百分比超过 98%, 95%以上的碱基测定准确率超过 99.9%。研究表明本次测序数据有较高可靠性, 可以进行后续分析。通过预处理后的数据经过组装总共得到 210 126 条 scafitigs, 总长度为 262 246 232 bp, N50 长度超过 1 400 bp, N90 长度超过 570 bp。

2.2 肠道微生物结构组成

通过注释结果可知肠道微生物在各分类水平的组成结构和丰度分布。双叉犀金龟幼虫肠道微生物在界水平主要分布于细菌(bacteria, 81.3%)、真菌(eukaryota, 0.3%)、病毒(viruses, 2.0%)和古细菌(archaea, 0.3%), 部分分布于未知微生物(unknown, 14.1%)和未分类微生物(unclassified, 2.0%)。在细菌界门水平上, 主要以厚壁菌门(*Firmicutes*, 45.8%)和拟杆菌门(*Bacteroidota*, 20.3%) 2 个门类为主, 少量分布于放线菌门(*Actinomycetota*, 2.6%)、假单胞菌门(*Pseudomonadota*, 1.9%)、*Uroviricota* 门(1.4%)等其他门类(图 1)。厚壁菌门和拟杆菌门存在大

量能够降解木质纤维素的微生物。在属水平上, 相对丰度前 10 位的菌属依次为梭菌属(*Clostridium*, 3.90%)、拟杆菌属(*Bacteroides*, 3.52%)、营发酵单胞菌属(*Dysgonomonas*, 2.41%)、*Massilibacteroides* 属(1.07%)、木聚糖单胞菌属(*Xylanimonas*, 0.97%)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*, 0.89%)、*Lachnoclostridium* 属(0.65%)、分支菌酸小杆菌属(*Mycolicibacterium*, 0.64%)、*Anaeropeptidivorans* 属(0.59%)、厌氧棍状菌属(*Anaerotruncus*, 0.57%)。梭菌属、拟杆菌属、营发酵单胞菌属等均具有纤维素降解能力, Kato 等^[31]分离出具有纤维素降解能力的梭菌解草秸梭菌(*Clostridium straminisolvens* sp. nov.); Weiss 等^[32]通过宏基因组学在甘蔗渣中发现拟杆菌属具有降解纤维素潜力; 营发酵单胞菌属中大多菌株分离自白蚁肠道内, 如黄翅大白蚁(*Macrotermes barneyi*)中分离出大白蚁营发酵单胞菌(*Dysgonomonas macrotermidis*)^[33]、自白蚁(*Reticulitermes speratu*)中分离出的白蚁营发酵单胞菌(*Dysgonomonas termitidis*)^[34]。这些均说明 *T. dichotomus* 后肠中存在丰富的纤维素降解菌资源。

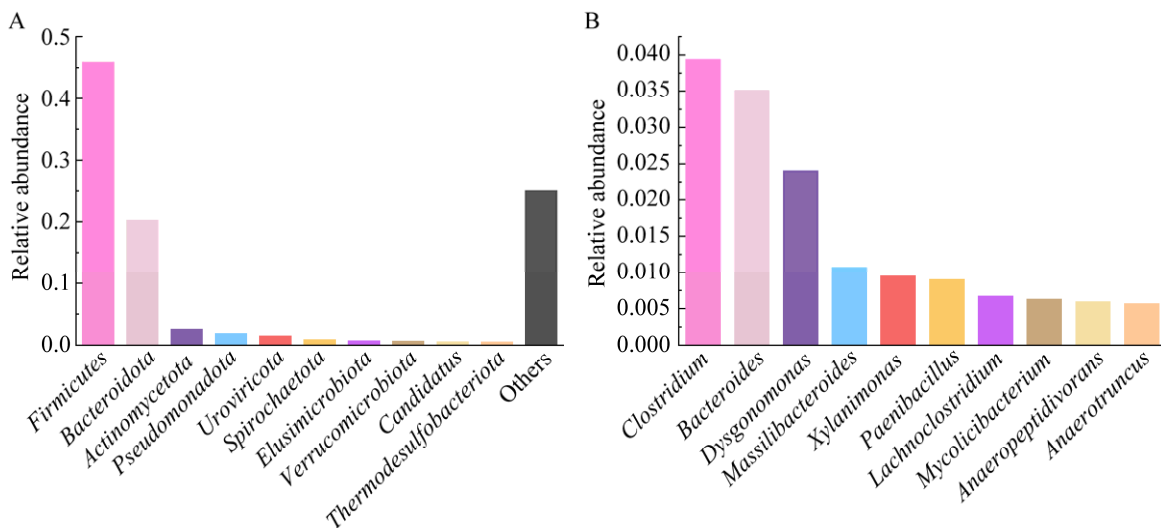


图 1 双叉犀金龟肠道微生物门和属水平上的分布

Figure 1 Diversity of the microbiota in *Trypoxylus dichotomus* guts at phylum and genus level. A: Phylum level; B: Genus level.

2.3 基因预测及功能注释分析

基于 KEGG^[35-36]数据库, 共有 186 585 个 (27.03%) 基因注释到细胞过程 (cellular processes)、环境信息处理 (environmental information processing)、遗传信息处理 (genetic information processing)、人类疾病 (human diseases)、新陈代谢 (metabolism)、生物体系统 (organismal systems) 六大类生物代谢通路中。其中注释到新陈代谢通路相关的基因数目最多 (89 945 个), 其次是遗传信息处理 (33 121 个), 生物体系统的基因数目最少 (6 452 个)。在二级水平上相对丰度前 10 的功能中, 大部分基因与代谢通路相关, 注释到碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 的基因数目最多 (30 266 个), 约占新陈代谢通路的 33.65%, 氨基酸代谢 (amino acid metabolism) 和能量代谢 (energy metabolism) 也占据了较大的比重, 注释的基因数目分别为 24 567 个和 16 935 个 (图 2A)。基于 eggNOG^[37]数据的注释结果显示, 在已知基因功能分类中, 注释基因数目最多的类别是复制、重组和修复 (replication, recombination and repair), 其次是碳水化合物转运与代谢 (carbohydrate transport and metabolism), 相关的基因数目为 42 649 个。转录 (transcription)、细胞壁/膜/包膜的生物发生 (cell wall/membrane/envelope biogenesis) 和氨基酸转运和代谢 (amino acid transport and metabolism) 3 个类别的注释数目也较多 (图 2B)。

为了进一步了解肠道微生物菌群在木质纤维素食物消化中的功能, 基于 CAZy^[38]数据库对碳水化合物酶类进行分析。48 856 个 (7.43%) 基因成功注释到糖苷水解酶 (glycoside hydrolase, GH)、糖基转移酶 (glycosyl transferase, GT)、多糖裂合酶 (polysaccharide lyase, PL)、碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterase, CE)、辅助氧化还原酶 (auxiliary activity, AA) 和碳水化合物结合模块

(carbohydrate-binding module, CBM) 六大功能类的 344 个酶家族。GH、PL、CE 和 AA 主要负责催化碳水化合物和多糖复合物的分解或修饰, 这对于木质纤维素的降解和利用非常重要。GH 是双叉犀金龟肠道菌群中占最大优势酶家族, 基因数目 23 779 个 (48.67%), 分别注释到 143 个 GH 家族, 占据已知 GH 功能酶类的 75.66%。其次是 GT (15 198 个)、CBM (6 964 个)、CE (2 031 个), 基因数目最少的是 AA (200 个) (图 3)。GT 催化糖苷键的形成, 对生物发育和环境适应至关重要。CBM 作为非催化模块, 是纤维素酶中的一个重要组成部分, 能特异性地调节纤维素酶的生物学活性。在二级水平上, GT2 和 GT4 是肠道菌群中丰度最高的酶家族, 相对丰度前 10 的功能酶类有 6 个属于 GH 家族, 包括 GH13、GH2、GH3、GH43、GH28 和 GH23。

2.4 *T. dichotomus* 幼虫纤维素降解细菌的分离与鉴定

从 *T. dichotomus* 幼虫后肠中分离得到 3 株纤维素降解细菌, 分别命名为 TRC-3、TRC-5、TRC-6。3 株细菌均能降解微晶纤维素, 在刚果红染色的纤维素培养基上显示不同大小的透明圈 (表 1), 通过刚果红培养基透明圈大小 (D) 与菌落直径 (d) 比值初步判断纤维素降解能力的强弱。其中, 细菌 TRC-3 产纤维素酶的能力最强, D/d 值高达 5.05, 与其余 2 株细菌有显著差异 ($P < 0.05$), TRC-6 的 D/d 值最小。使用 DNS 法对 3 株纤维素降解细菌的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和滤纸酶的活性进行定量分析, 结果发现, TRC-3 的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和滤纸酶活性均高于 TRC-5 和 TRC-6 ($P < 0.05$)。特别是, TRC-3 内切葡聚糖酶的活性高达 16.64 U/mL, 远高于其余 2 株细菌。TRC-5 和 TRC-6 的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和滤纸酶活性无明显差异。

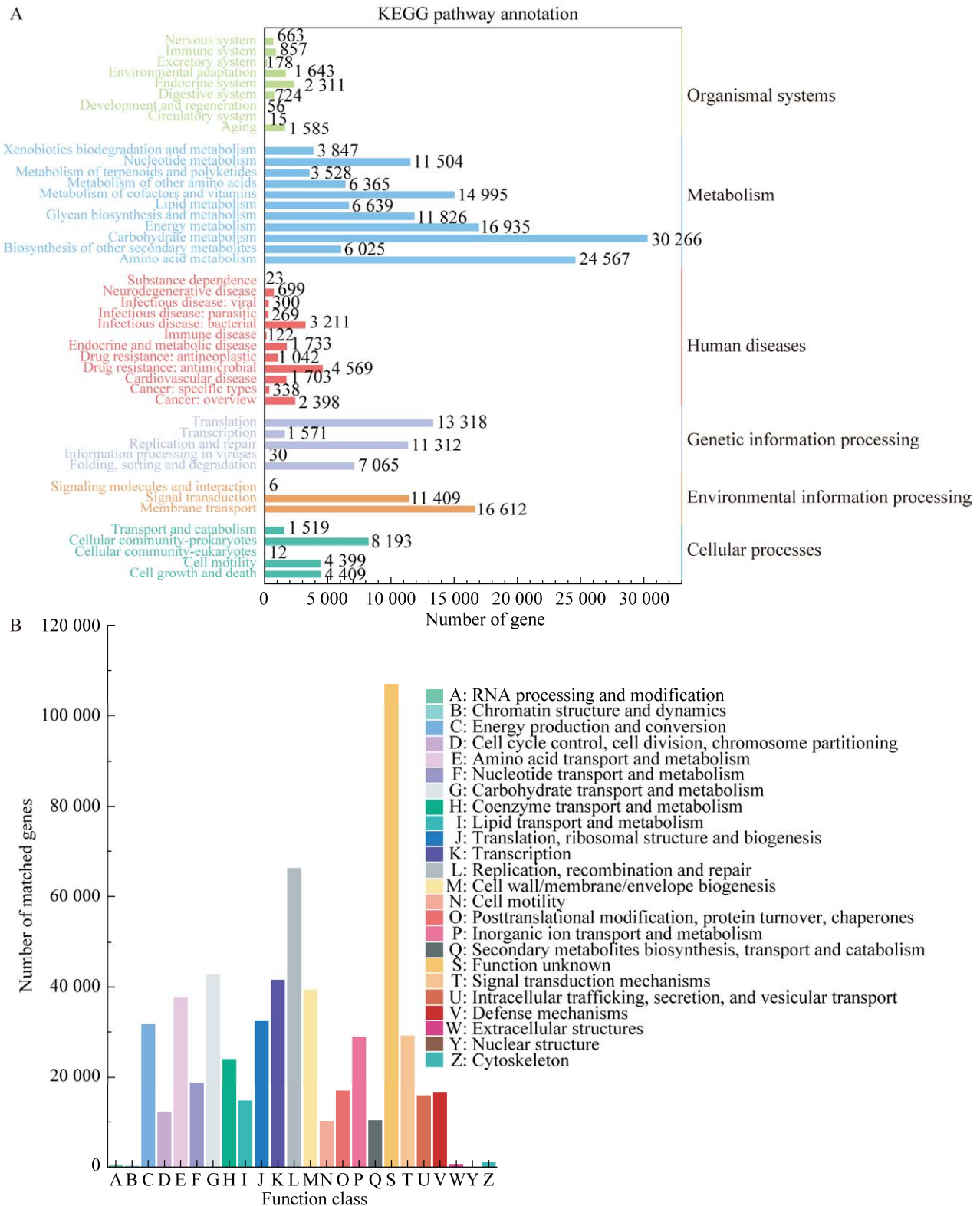


图2 KEGG 和 eggNOG 基因功能分类对非冗余基因集的注释数目

Figure 2 The annotation number for non-redundant gene sets based on the functional classification KEGG and eggNOG. A: KEGG; B: eggNOG.

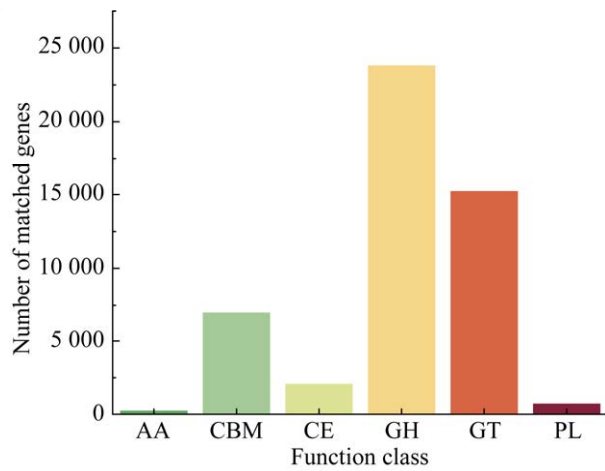


图 3 CAZy 注释基因数目统计图

Figure 3 The gene number of CAZy annotation. AA: Auxiliary activity; CBM: Carbohydrate-binding module; CE: Carbohydrate esterase; GH: Glycoside hydrolase; GT: Glycosyl transferase; PL: Polysaccharide lyase.

将上述筛选的 3 株纤维素降解细菌划线接种于 LB 固体培养基，培养 24 h 后对其进行革兰氏、芽孢染色及形态观察。结果发现，3 株菌均为杆状，革兰氏染色、芽孢染色均显示为阳

性(表 2)。3 株细菌在菌落形态上有明显的差异(图 4)，TRC-3 的菌落不规则，有明显突起，表面干燥有明显褶皱，边缘呈波浪形；TRC-5 的菌落不规则，略微突起，表面干燥光滑；TRC-6 菌落圆形，有明显突起，表面湿润光滑。3 株细菌的菌落颜色有略微差异，TRC-3 和 TRC-5 为米白色偏黄，TRC-6 为乳白色。

将 3 株纤维素降解细菌的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 数据库，通过 BLAST 与 GenBank 中已知的 16S rRNA 基因序列进行比对。结果发现，TRC-3 和 TRC-5 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的相似度最高，相似度达 99%，TRC-6 与沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)相似度达 99%。结合菌株的形态特征和染色镜检结果，确定分离到的纤维素降解细菌 TRC-3 和 TRC-5 均属于枯草芽孢杆菌，TRC-6 属于沙福芽孢杆菌。使用 MEGA 11.0 软件对 16S rRNA 基因多重序列比较构建系统发育树，3 株分离菌中，TRC-3 与 TRC-5 亲缘关系更近，TRC-6 在芽孢杆菌的另一个分支(图 5)。

表 1 纤维素降解细菌的产酶能力

Table 1 The enzyme production capability of cellulose-degrading bacteria

Strain	TRC-3	TRC-5	TRC-6
Transparent circle diameter <i>D</i> (cm)	2.03±0.21a	2.31±0.03b	2.38±0.04b
Colony diameter <i>d</i> (cm)	0.41±0.04a	1.15±0.14b	1.40±0.08b
<i>D/d</i> ratio	5.05±0.13a	2.02±0.22b	1.71±0.12b
Endoglucanase (U/mL)	16.64±2.94a	1.24±0.25b	0.31±0.14b
Exoglucanase (U/mL)	2.40±0.57a	0.56±0.15b	0.69±0.27b
β-glucosidase (U/mL)	9.80±1.53a	3.09±0.52b	2.36±0.39b
Filter paper activity (U/mL)	1.52±0.29a	0.97±0.91b	1.14±0.08b

Different letters denote significant disparities among different strains ($P < 0.05$).

表 2 菌株的形态特征

Table 2 Morphological structure of strain

Strain	Strain morphology	Colony color	Gram staining	Spore staining	Strain morphology
TRC-3	Irregularity; Rough	Rice white to yellow	+	+	Rod
TRC-5	Irregularity; Smooth	Rice white to yellow	+	+	Rod
TRC-6	Round; Smooth	Milky white	+	+	Rod

+: Positive.

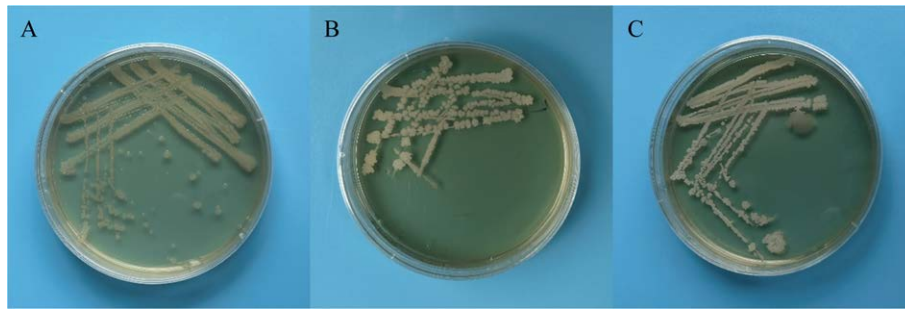


图 4 TRC-6、TRC-5、TRC-3 菌落的形态

Figure 4 Morphology of TRC-6, TRC-5, TRC-3. A: TRC-6; B: TRC-5; C: TRC-3.

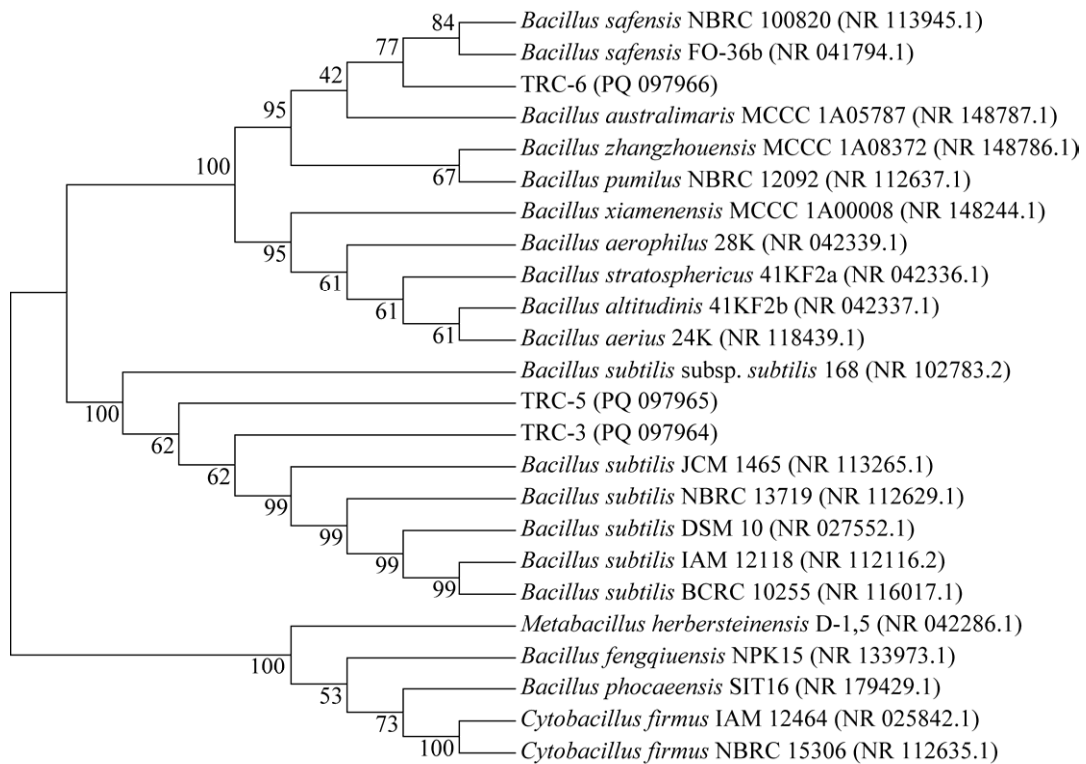


图 5 利用 16S rRNA 多重序列比对构建纤维素降解细菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of cellulose degrading bacteria based on multiple sequence alignment of 16S rRNA. The value on the branch represents the confidence (%) of 1 000 bootstrap tests in the NJ algorithms for this node.

3 讨论与结论

腐食性昆虫的肠道微生物已成为挖掘木质纤维素降解菌的重要来源。宏基因组显示 *T. dichotomus* 幼虫后肠肠道中的微生物群落具有较高的多样性和复杂性，主要由细菌组成(占

81.3%)，其次是病毒、古菌和真菌。厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*)是幼虫肠道中的两大主要类群，其中厚壁菌门通常与放线菌门、疣微菌门和纤维杆菌门协同，在降解残留植物的过程中发挥重要作用^[39]。拟杆菌门在低等白蚁肠道中尤为常见^[40]，具有显著的纤

纤维素降解能力^[41]。*T. dichotomus* 幼虫肠道微生物的结构组成与其他金龟子科昆虫类似, 厚壁菌门和拟杆菌门也是云杉树皮甲虫 (*Ips typographus* L.) 的肠道优势菌门^[42]。金龟子科白星花金龟 (*Protaetia brevitarsis*) 肠道微生物也以厚壁菌门和拟杆菌门为主, 这些微生物能够产生多种纤维素酶和半纤维素酶, 显著促进木质纤维素的降解^[43]。Huang 等^[44]在对不同龄期、不同地理区域的暗黑鳃金龟 (*Holotrichia parallela*) 幼虫的肠道菌群研究中发现, 肠道菌群的多样性和结构会随幼虫生长发育而变化, 早期幼虫中拟杆菌门占主导, 而后期幼虫中厚壁菌门逐渐成为主要类群。然而, 在眉斑并脊天牛 (*Glenea cantor*)^[45]和稻水象甲 (*Lissorhoptrus oryzophilus*)^[46]等昆虫中, 变形菌门成为主导类群, 这可能与这些昆虫不同的饮食结构有关。

在基因功能水平上, *T. dichotomus* 幼虫肠道微生物反映出强大的代谢能力, 特别是在碳水化合物代谢方面。通过 KEGG 数据库的注释, 发现与碳水化合物代谢相关的通路基因数量最多, 这与幼虫的腐食性密切相关。共生的肠道细菌通过生产宿主无法合成的碳水化合物活性酶, 促进纤维素等难降解物质的消化, 从而为宿主提供代谢底物和能量^[47]。CAZy 注释结果发现, *T. dichotomus* 后肠中微生物木质纤维素降解酶具有较高的多样性和丰度, 与瘤胃宏基因组相似^[48]。在 344 个碳水化合物活性酶类中, GH 是最占优势的酶家族, 涵盖了一系列纤维素和半纤维的水解酶类, 这些酶主要由厚壁菌门和拟杆菌门的肠道共生菌贡献^[49]。肠道细菌的功能显著富集于碳水化合物的代谢途径, 这也说明参与该功能的肠道细菌的丰度也相应较高。在 *T. dichotomus* 后肠中, 梭菌属 (*Clostridium*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 是丰度最高的菌属, 其中多个物种被报道具有木质纤维素降解

能力^[50]。营发酵单胞菌属 (*Dysgonomonas*) 在 *T. dichotomus* 幼虫肠道中也占据了较大的比重, 作为黄翅大白蚁后肠的第二优势微生物, 它被发现具有多个木质纤维素降解酶基因, 且具备完整的木质纤维素降解通路^[51]。

基于对 *T. dichotomus* 幼虫肠道微生物群落结构及功能基因分析, 反映出其肠道内具有丰富的纤维素降解细菌资源。从双叉犀金龟幼虫后肠分离出的 3 株纤维素降解细菌, 经鉴定均属于芽孢杆菌属, 包括 2 株枯草芽孢杆菌和 1 株沙福芽孢杆菌。芽孢杆菌能够产生纤维素酶和木聚糖酶等多种木质纤维素水解酶类, 常被应用在农业废弃物堆肥以及植物原料的降解中^[52-53]。Liu 等^[54]从白蚁肠道中分离到一株枯草芽孢杆菌, 显示出内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、滤纸酶和木聚糖酶活性, 并在与麦秸共培养发酵时能显著破坏木质纤维素的结构, 增加还原糖的含量。TRC-3 展示出更强的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和滤纸酶活力, 在木质纤维素的降解中展现出巨大的潜力。

综上所述, 本研究通过宏基因组技术揭示了 *T. dichotomus* 幼虫肠道微生物的生态特征及其在碳水化合物代谢中的功能, 分离并鉴定了 3 株具有木质纤维素酶活性的芽孢杆菌菌株, 为未来木质纤维素生物质降解的研究和应用提供了重要的微生物资源。这些发现不仅丰富了对腐食性昆虫肠道微生物的认识, 也为农业废弃物的高效利用开辟了新的方向。未来的研究应继续挖掘这些功能微生物资源, 探索其实际应用潜力, 特别是在农业废弃物的堆肥处理和可再生能源开发中的作用。需要注意的是, 饲料中的微生物群落可能对独角仙肠道微生物的组成和功能产生影响, 因此, 后续研究应进一步关注饲料微生物与肠道微生物的相互作用, 这将有助于更准确地揭示肠道微生物在木质纤

纤维素降解过程中的实际作用。

作者贡献声明

邹鑫：实验设计与实施，数据收集与分析，论文撰写，图表制作；彭梅芳：项目管理；阚新锐：实验设计与实施，数据收集；黄文丽：论文编辑与校对，项目管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] EO J, NA YE, KIM MH. Influence of rhinoceros beetle (*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*) larvae and temperature on the soil bacterial community composition under laboratory conditions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 108: 27-35.
- [2] von LINNÉ C. Car. a Linné Mantissa P Intarum: Generum Editionis VI. et Specierum Editionis II[M]. Holmiæ: Impensis Direct. Laurentii Salvii, 1767.
- [3] 顾国华, 刘立春, 杨顾新, 王涛, 陈建军, 陈惠祥, 陈马钧, 王万里, 陈蔚, 陈惠年, 陈德山, 孟继元, 谢孝辰. 药用独角仙的形态与生物学特性观察[J]. *昆虫知识*, 1995(3): 154-156.
GU GH, LIU LC, YANG GX, WANG T, CHEN JJ, CHEN HX, CHEN MJ, WANG WL, CHEN W, CHEN HN, CHEN DS, MENG JY, XIE XC. Observation on morphological and biological characteristics of medicinal one-horned fairy[J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1995(3): 154-156 (in Chinese).
- [4] CAVE RD, RATCLIFFE BC. Scarab beetles (*Coleoptera: Scarabaeoidea*)[M]//CAPINERA JL. *Encyclopedia of Entomology*. 2nd ed. Netherlands: Springer Dordrecht, 2008: 3273-3286.
- [5] 包金亮, 王盼, 张苏炯, 陈子林. 一种林-菌-虫循环生态种养方法: CN109964723A.X[P]. 2019-07-05.
BAO JL, WANG P, ZHANG SJ, CHEN ZL. A type of forest-fungus-insect circular ecological breeding method: CN109964723A.X[P]. 2019-07-05 (in Chinese).
- [6] KLEMM D, HEUBLEIN B, FINK HP, BOHN A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(22): 3358-3393.
- [7] SUN QN, FOSTON M, MENG XZ, SAWADA D, PINGALI SV, O'NEILL HM, LI HJ, WYMAN CE, LANGAN P, RAGAUSKAS AJ, KUMAR R. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 150.
- [8] 刘琦, DIEN VTM, 王新茹, 王华玲, 曾健勇, 李会平. 基于昆虫肠道纤维素降解菌领域的文献计量分析[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4754-4767.
LIU Q, DIEN VTM, WANG XR, WANG HL, ZENG JY, LI HP. Based on quantitative analysis of literature in the field of cellulose degrading bacteria in insect gut[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4754-4767 (in Chinese).
- [9] ALI HRK, HEMEDA NF, ABDELALIEM YF. Symbiotic cellulolytic bacteria from the gut of the subterranean termite *Pseudotermes hypostoma* Desneux and their role in cellulose digestion[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 111.
- [10] WARNECKE F, LUGINBÜHL P, IVANOVA N, GHASSEMIAN M, RICHARDSON TH, STEGE JT, CAYOUILLE M, McHARDY AC, DJORDJEVIC G, ABOUSHADI N, SOREK R, TRINGE SG, PODAR M, MARTIN HG, KUNIN V, DALEVI D, MADEJSKA J, KIRTON E, PLATT D, SZETO E, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite[J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 560-565.
- [11] BRUNE A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(3): 168-180.
- [12] LI HJ, YELLE DJ, LI C, YANG MY, KE J, ZHANG RJ, LIU Y, ZHU N, LIANG SY, MO XC, RALPH J, CURRIE CR, MO JC. Lignocellulose pretreatment in a fungus-cultivating termite[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(18): 4709-4714.
- [13] POURRAMEZAN Z, GHEZELBASH GR, ROMANI B, ZIAEI S, HEDAYATKHAH A. Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus* (Silvestri)[J]. *Mikrobiologija*, 2012, 81(6): 796-802.
- [14] LING Y, LI WJ, LI FF, XUE XB, GAO YY, WANG L, LIANG K, LI XJ. Microbial gut diversity in four grasshopper species and its correlation with cellulose digestibility[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1002532.
- [15] BAUER E, LAMPERT N, MIKAELIAN A, KÖHLER T, MAEKAWA K, BRUNE A. Physicochemical conditions, metabolites and community structure of the bacterial microbiota in the gut of wood-feeding cockroaches (*Blaberidae: Panesthiinae*)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(2): 1-14.
- [16] HANDIQUE G, PHUKAN A, BHATTACHARYYA B, BARUAH AALH, RAHMAN SW, BARUAH R. Characterization of cellulose degrading bacteria from the larval gut of the white grub beetle *Lepidiotia mansueta* (*Coleoptera: Scarabaeidae*)[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2017, 94(2): 21370.
- [17] NAKASHIMA K, WATANABE H, SAITOH H, TOKUDA G, AZUMA JI. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(7): 777-784.
- [18] SCHARF ME, TARTAR A. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2(6): 540-552.
- [19] TAKEISHI H, ANZAI H, URAI M, AIZAWA T, WADA N, IWABUCHI N, SUNAIRI M, NAKAJIMA

- M. Xylanolytic and alkaliphilic *Dietzia* sp. isolated from larvae of the Japanese horned beetle, *Trypoxylus dichotomus*[J]. *Actinomycetologica*, 2006, 20(2): 49-54.
- [20] WANG QY, LIU LW, ZHANG SJ, WU H, HUANG JH. A chromosome-level genome assembly and intestinal transcriptome of *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera: Scarabaeidae) to understand its lignocellulose digestion ability[J]. *GigaScience*, 2022, 11: giac059.
- [21] AIZAWA T, URAI M, IWABUCHI N, NAKAJIMA M, SUNAIRI M. *Bacillus trypoxylicola* sp. nov., xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae (*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 1): 61-66.
- [22] ZHAO CX, LIU JN, LI BQ, REN D, CHEN X, YU J, ZHANG Q. Multiscale construction of bifunctional electrocatalysts for long-lifespan rechargeable zinc-air batteries[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(36): 2003619.
- [23] KARLSSON FH, FÅK F, NOOKAEW I, TREMAROLI V, FAGERBERG B, PETRANOVIC D, BÄCKHED F, NIELSEN J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1245.
- [24] KARLSSON FH, TREMAROLI V, NOOKAEW I, BERGSTRÖM G, BEHRE CJ, FAGERBERG B, NIELSEN J, BÄCKHED F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 99-103.
- [25] ZHU WH, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(12): e132.
- [26] LI WZ, GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [27] ZELLER G, TAP J, VOIGT AY, SUNAGAWA S, KULTIMA JR, COSTEA PI, AMIOT A, BÖHM J, BRUNETTI F, HABERMANN N, HERCOG R, KOCH M, LUCIANI A, MENDE DR, SCHNEIDER MA, SCHROTZ-KING P, TOURNIGAND C, van NHIEU JT, YAMADA T, ZIMMERMANN J, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer[J]. *Molecular Systems Biology*, 2014, 10(11): 766.
- [28] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [29] HUSON DH, MITRA S, RUSCHEWEYH HJ, WEBER N, SCHUSTER SC. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4[J]. *Genome Research*, 2011, 21(9): 1552-1560.
- [30] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [31] KATO S, HARUTA S, CUI ZJ, ISHII M, YOKOTA A, IGARASHI Y. *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(Pt 6): 2043-2047.
- [32] WEISS B, SOUZA ACO, CONSTANCIO MTL, ALVARENGA DO, PYLRO VS, ALVES LMC, VARANI AM. Unraveling a lignocellulose-decomposing bacterial consortium from soil associated with dry sugarcane straw by genomic-centered metagenomics[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 995.
- [33] YANG YJ, ZHANG N, JI SQ, LAN X, ZHANG KD, SHEN YL, LI FL, NI JF. *Dysgonomonas macrotermitis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt_9): 2956-2961.
- [34] PRAMONO AK, SAKAMOTO M, IINO T, HONGO H, OHKUMA M. *Dysgonomonas termitidis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt 2): 681-685.
- [35] KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, AOKI-KINOSHITA KF, ITOH M, KAWASHIMA S, KATAYAMA T, ARAKI M, HIRAKAWA M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Database issue): D354-D357.
- [36] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, SATO Y, MORISHIMA K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D353-d361.
- [37] HUERTA-CEPAS J, SZKLARCZYK D, FORSLUND K, COOK H, HELLER D, WALTER MC, RATTEI T, MENDE DR, SUNAGAWA S, KUHN M, JENSEN LJ, von MERING C, BORK P. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D286-D293.
- [38] CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D233-D238.
- [39] BERNARD L, MOUGEL C, MARON PA, NOWAK V, LÉVÊQUE J, HENAU C, HAICHAR FZ, BERGE O, MAROL C, BALESDENT J, GIBIAT F, LEMANCEAU P, RANJARD L. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 752-764.
- [40] TARAYRE C, BAUWENS J, MATTÉOTTI C, BRASSEUR C, MILLET C, MASSART S, DESTAIN J, VANDENBOL M, de PAUW E, HAUBRUGE E, FRANCIS F, THONART P, PORTETELLE D, DELVIGNE F. Multiple analyses of microbial communities applied to the gut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes* fed on artificial diets[J]. *Symbiosis*, 2015, 65(3): 143-155.
- [41] SU LJ, LIU YQ, LIU H, WANG Y, LI Y, LIN HM, WANG FQ, SONG AD. Linking lignocellulosic dietary patterns with gut microbial enterotypes of *Tsaiitermes ampiclops* and comparison with *Mironasutitermes*

- shangchengensis*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 13954-13967.
- [42] FANG JX, ZHANG SF, LIU F, ZHANG X, ZHANG FB, GUO XB, ZHANG Z, ZHANG QH, KONG XB. Differences in gut bacterial communities of *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae) induced by enantiomer-specific α -pinene[J]. *Environmental Entomology*, 2020, 49(5): 1198-1205.
- [43] WANG K, GAO PW, GENG LL, LIU CQ, ZHANG J, SHU CL. Lignocellulose degradation in *Protaetia brevitarsis* larvae digestive tract: refining on a tightly designed microbial fermentation production line[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 90.
- [44] HUANG SW, ZHANG HY. The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57169.
- [45] SU RR, PAN BQ, LUO YX, ZHENG XL, LU W, WANG XY. Characterization of bacterial diversity and screening of cellulose-degrading bacteria in the gut system of *Glenea cantor* (Fabricius) larvae[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1340168.
- [46] LU F, KANG XY, LORENZ G, ESPINO L, JIANG MX, WAY MO. Culture-independent analysis of bacterial communities in the gut of rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae)[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2014, 107(3): 592-600.
- [47] FLINT HJ, SCOTT KP, DUNCAN SH, LOUIS P, FORANO E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 289-306.
- [48] SHA YZ, HU J, SHI BG, DINGKAO RQ, WANG JQ, LI SB, ZHANG W, LUO YZ, LIU X. Characteristics and functions of the rumen microbial community of cattle-yak at different ages[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 3482692.
- [49] SVARTSTRÖM O, ALNEBERG J, TERRAPON N, LOMBARD V, de BRUIJN I, MALMSTEN J, DALIN AM, EL MULLER E, SHAH P, WILMES P, HENRISSAT B, ASPEBORG H, ANDERSSON AF. Ninety-nine *de novo* assembled genomes from the moose (*Alces alces*) rumen microbiome provide new insights into microbial plant biomass degradation[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(11): 2538-2551.
- [50] LI ZY, WAGHMARE PR, DIJKHUIZEN L, MENG XF, LIU WF. Research advances on the consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass[J]. *Engineering Microbiology*, 2024, 4(2): 100139.
- [51] 孙新新, 未建华, 李净净, 倪金凤. 黄翅大白蚁后肠优势菌大白蚁营发醇菌的全基因组序列分析[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 995-1003.
- SUN XX, WEI JH, LI JJ, NI JF. Whole-genome analysis of the dominant bacterium *Dysgonomonas macrotermis* in the hindgut of *Macrotermes barneyi*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 995-1003 (in Chinese).
- [52] ZAINUDIN MHM, SINGAM JT, SAZILI AQ, SHIRAI Y, HASSAN MA. Indigenous cellulolytic aerobic and facultative anaerobic bacterial community enhanced the composting of rice straw and chicken manure with biochar addition[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 5930.
- [53] MA LL, WANG X, ZHOU JW, LÜ X. Degradation of switchgrass by *Bacillus subtilis* 1AJ3 and expression of a beta-glycoside hydrolase[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 922371.
- [54] LIU GW, ZHANG K, GONG HX, YANG KY, WANG XY, ZHOU GC, CUI WY, CHEN YL, YANG YX. Whole genome sequencing and the lignocellulose degradation potential of *Bacillus subtilis* RLI2019 isolated from the intestine of termites[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 130.