



不同饲喂下棉铃虫肠道内生菌的分离鉴定及脱毒效果研究

侯敏¹, 张晨曦², 詹发强¹, 杨蓉¹, 龙宣杞¹, 崔卫东^{1*}

1 新疆农科院微生物应用研究所, 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

2 新疆农业大学动物科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

侯敏, 张晨曦, 詹发强, 杨蓉, 龙宣杞, 崔卫东. 不同饲喂下棉铃虫肠道内生菌的分离鉴定及脱毒效果研究. 微生物学报, 2022, 62(1): 305–320.

Hou Min, Zhang Chenxi, Zhan Faqiang, Yang Rong, Long Xuanqi, Cui Weidong. Isolation, identification and detoxification of intestinal endophytes of *Helicoverpa armigera* under different feeding. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 305–320.

摘要:【目的】本研究对比饲喂正常饲料和棉粕饲料下棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)肠道中可培养微生物的异同, 并对筛选菌株进行棉酚耐受及降解作用的研究, 为棉铃虫肠道微生物在棉源饲料中的脱毒作用提供理论和实验支持。【方法】通过饲喂不同饲料、醋酸棉酚单一碳源微生物选择性培养, 分离饲喂正常饲料和棉粕饲料下棉铃虫肠道可培养棉酚耐受性内生菌, 并进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定; 在一定浓度的醋酸棉酚液体中培养, 对菌株进行脱毒作用分析, 复合配比后, 研究棉铃虫肠道复合菌在棉酚降解中的效果。【结果】共计分离得到的 32 株菌株, 其中 17 株细菌可能是新分类单元, 其中 14 株为潜在新种, 3 株为可能的新属。饲喂正常饲料组棉铃虫肠道中分离出 17 株分属于 3 个门、10 个属, 饲喂棉粕饲料组棉铃虫肠道中分离出 15 株属于 2 个门、8 个属。随着选择性培养基醋酸棉酚浓度的升高, 饲喂棉粕饲料组肠道菌耐受 100、300、500、1 000 mg/kg 醋酸棉酚的菌株数均比饲喂正常饲料组高。在所有的耐受菌株中棉酚降解率达到 50% 以上的有 15 株, 对棉酚最高降解率达 90.83%。在肠道菌复合降解棉酚实验中, 棉铃虫肠道内生菌实验组对棉酚的降解率显著高于对照组($P < 0.05$), 棉酚降解率最高为 87.04%。【结论】本研究证明了棉铃虫肠道内生细菌中存在对棉酚具有较高降解能力的菌株, 丰富了棉酚降解菌的菌种资源, 并对复合菌在棉源饲料开发应用的潜力进行了初步研究, 为棉源饲料中棉酚的生物降解提供了一条新途径。

关键词: 棉酚; 棉铃虫; 肠道内生菌; 分离鉴定; 脱毒

基金项目: 国家地区科学基金(31960681); 自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2019021)

Supported by the National Regional Science Foundation (31960681) and by the Special Funds for Basic Research Services of the Autonomous Region Public Welfare Research Institutes (KY2019021)

*Corresponding author. E-mail: cuwedo@163.com

Received: 13 April 2021; Revised: 20 June 2021; Published online: 15 September 2021

Isolation, identification and detoxification of intestinal endophytes of *Helicoverpa armigera* under different feeding

HOU Min¹, ZHANG Chenxi², ZHAN Faqiang¹, YANG Rong¹, LONG Xuanqi¹, CUI Weidong^{1*}

1 Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

2 College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] This study compared the differentiation of endophytes in the intestines of *Helicoverpa armigera* under feeding normal diet and cottonseed meal diet, and studied gossypol tolerance and degradation effects of the screened strains, which provided theoretical and experimental support for further research on the detoxification of *Helicoverpa armigera* intestinal microorganisms in cotton-derived feed. [Methods] The gossypol tolerant endophytic bacteria were isolated in the intestinal tract of *Helicoverpa armigera* under different feeding conditions, selective culture of gossypol acetate single carbon source microorganism, and 16S rRNA gene sequence were analyzed and identified. The detoxification effect of the strains was analyzed by cultivated in a certain concentration of gossypol acetate liquid, and the compound ratio was used to study the effect of the compound bacteria on gossypol degradation. [Results] A total of 32 strains were isolated from *Helicoverpa armigera*, of which 17 strains were potential new taxon, and 14 were potential new species, and 3 were possible potential new genera. 17 strains were isolated from the intestinal tract of *Helicoverpa armigera* under feeding normal diet, belonging to 10 genera in 3 phyla of bacteria, 15 strains were isolated from the intestinal tract of *Helicoverpa armigera* under feeding cottonseed meal diet, belonging to 8 genera in 2 phyla of bacteria. With the increase of the concentration of gossypol acetate in the selective medium, the number of intestinal bacteria resistant to 100, 300, 500, 1 000 mg/kg gossypol acetate in the cottonseed meal feed groups were higher than those in the normal feed groups. Among all the tolerant strains, 15 strains had a degradation rate of more than 50%, and the highest degradation rate of gossypol was 90.83%. In the experiment of compound degradation of gossypol by intestinal bacteria, the degradation rate of gossypol in the experimental group were significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), and the highest degradation rate of gossypol was 87.04%. [Conclusion] It was proved that there were some higher ability of degrading gossypol strains in the intestinal endophytic bacteria of *Helicoverpa armigera*, which enriches the resource of the strains degrading gossypol, and preliminary research on the potential of compound bacteria in the development and application of cotton-derived feed was conducted, which provided a new way for the biodegradation of gossypol in cotton-derived feed.

Keywords: gossypol; *Helicoverpa armigera*; intestinal endophytic bacteria; isolation and identification; detoxification

棉酚是棉花体内重要的次生代谢物, 一定程度上可以促进植物的生长发育^[1], 主要储存在根、茎、叶、花和种子等器官的色素腺体中, 但是它的存在增加了综合开发利用棉花副产品饲料的难度和饲用价值。因为棉酚在植物体内有两种形式存在——结合棉酚(boundgossypol, BG)和游离棉酚(freegossypol, FG), 其中游离棉酚是一种黄色结晶的有害物质, 作为一种饲料抗营养因子具有肝毒性和生殖毒性^[2]; 对动物消化系统造成影响, 抑制消化道中蛋白水解酶活性^[3]; 引起公畜尿结石、生育功能等^[4], 导致母畜早产、流产或产畸形胎^[5]; 严重影响畜禽生产及生产产品的质量^[6]; 棉源饲料饲喂过量时, 可以导致动物死亡。

近年来, 新疆养殖业发展迅速, 由于饲料的匮乏, 丰富的棉源性副产物广泛地成为当地替代反刍动物粗饲料的资源。利用有效技术手段抑制棉酚毒性, 成为当前开发棉源性饲料急需解决的问题。鉴于无抗养殖新时代的来临, 对棉酚降解功能微生物资源的挖掘是饲用微生物及相关微生物技术在棉酚脱毒利用中的最佳途径。

昆虫肠道是宿主与外部环境之间的重要界面^[7], 昆虫肠道微生态系统栖息着大量的微生物^[8], 从昆虫体内分离、鉴定细菌, 有可能挖掘到具有特殊功能的细菌资源^[9], 它们能够参与宿主代谢, 提供营养物质^[10], 参与有害物质降解^[11]。棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)是棉花蕾铃期重要的钻蛀性害虫, 主要蛀食蕾、花、铃和嫩叶。用含游离棉酚(FG)的饲料饲喂棉铃虫幼虫后, 肠道会产生糖基化过程, 可能是棉铃虫体内一种重要的 FG 脱毒机制^[12]。有研究表明, 棉铃虫肠道细菌或代谢产物^[13]可以帮助宿主昆虫解除或抵御棉酚毒素的伤害^[14]。鉴于棉铃虫对环境的强适应力和利用价值, 以及微

生物与昆虫存在的密切关系, 研究棉铃虫肠道微生物及脱毒功能, 对棉酚降解菌株资源开发意义重大。

本研究通过给棉铃虫饲喂一定量具有棉酚毒性的棉粕饲料, 利用可培养方式分离、鉴定棉铃虫肠道中的内生细菌, 对比饲喂正常饲料和棉粕饲料下棉铃虫肠道可培养细菌分布的不同, 初步掌握棉酚对棉铃虫肠道微生物的影响, 并对筛选菌株的棉酚耐受性和脱毒作用进行研究, 为后续挖掘棉铃虫肠道微生物资源以及研究虫肠道内生菌在棉源饲料中的开发利用提供理论和实验支持。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

从乌鲁木齐花卉市场科云生物购买室内饲养敏感品系棉铃虫 1–2 龄幼虫作为虫源, 饲养条件为: 温度 27–28 °C, 相对湿度 50%, 光周期 14L:10D, 根据实验需要饲喂正常饲料或棉粕等。

1.2 供试菌种

粪肠球菌 w13-7、J-4, 枯草芽孢杆菌 w7-1、ht4-2、J-1, 植物乳杆菌 J2-2, 为新疆农业科学院微生物应用研究菌种保藏库所保存(保藏号分别为 XJTR No.1004、XJTR No.1006、XJTR No.2011、XJTR No.1989、XJTR No.1981、XJTR No.1233)

1.3 培养基

1.3.1 分离(种子)培养基

MRS 培养基、高氏 1 号培养基、LB 培养基、NA 培养基见《微生物学实验技术》^[15]。

1.3.2 以醋酸棉酚为唯一碳源的固体培养基

0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.05% NaH₂PO₄·H₂O, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.05% K₂HPO₄, 0.15% 琼脂, 去离子水定容至 1 L。

7×10^4 Pa (表压)(115 °C) 20 min, 待温度低于 50 °C, 将醋酸棉酚溶解于少量的 70%丙酮溶液中, 加入培养基中, 去离子水定容至 1 L, 分别配置成分棉酚浓度为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 mg/kg 醋酸棉酚培养基。以上培养基在超净台里均匀倒入无菌 9 cm 培养皿内, 厚度约 4 mm, 冷却凝固后, 存放于 4 °C 冰箱, 备用。

1.3.3 以醋酸棉酚为唯一碳源的液体培养基

0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05% K_2HPO_4 , 去离子水定容至 100 mL。 7×10^4 Pa (表压)(115 °C) 20 min, 待温度低于 50 °C, 将醋酸棉酚溶解于少量的 70%丙酮溶液中, 加入培养基中, 去离子水定容至 1 L, 分别配置成分棉酚浓度为 400 mg/kg 醋酸棉酚培养基, 备用。

1.4 饲喂材料

棉铃虫专用饲料购于乌鲁木齐市花卉市场, 棉粕购于昌吉米东区。

1.5 试验仪器

培养箱、养虫盘(35 cm×20 cm×12 cm)、电子天平(0.000 1 g)、镊子、玻璃培养皿(90 mm、120 mm)、量筒(100 mL)、搅拌棒、三角瓶、摇床等。

1.6 饲喂试验

供试棉铃虫, 选取色泽鲜亮, 个体健康, 发育良好, 活力强, 龄期(1–2 龄)和体型相近的个体, 于试验前一天进行饥饿处理, 24 h 不予喂食饥饿处理, 使用 60 目分离筛筛除虫粪。称取 1 g 粉碎棉籽粕, 加 30% H_2O 搅拌成粘稠状, 置于养虫盘中, 投入 20 头供试棉铃虫幼虫进行试验, 对照组饲喂正常的棉铃虫饲料。将虫卵置于(28±1) °C 人工气候箱中饲养至 5–6 龄, 相对湿度(60±10)%, 光照 14:10 (L:D), 培养 10–15 d。选大小一致的活虫 1 只作为 1 组, 设

3 组重复, 分别进行涂板, 用于内生细菌的分离、培养。

1.7 棉铃虫肠道内生细菌的分离

取 1 头 6 龄(老熟期)棉铃虫置于 2 mL 试管中, 饥饿 24 h 后, 移于无菌培养皿内, 进行体表消毒, 75%酒精浸泡 30 s, 无菌条件下取出虫体, 至 1%次氯酸钠浸泡 5 min, 无菌水漂洗 10 次。将表面消毒的虫体放在灭菌研钵中研磨, 灭菌水稀释至 10^{-1} – 10^{-4} , 取 10^{-3} 和 10^{-4} 浓度的稀释液, 分别涂布在 MRS 培养基、高氏 1 号培养基、LB 培养基、NA 培养基上, 重复 3 次。将最后一次清洗过的无菌水涂板后放在 30 °C 培养 2 d, 检验表面消毒效果, 检验该样品得到的可信度。涂布好的平板置于培养箱内, 28 °C 下培养 2–5 d。记录不同形态菌落的数量, 将每种形态的菌落挑到相应的平板上划线、纯化、培养、标记菌株号。将纯化的菌落再移植到相应的斜面培养基上, 编号保存, 供 16S rRNA 基因序列分析。

1.8 棉铃虫肠道内生细菌 16S rRNA 基因序列分析

从斜面培养基上, 分别挑取纯化的内生菌株, 采用 TRIS 饱和酚提取 DNA 模板。采用细菌 16S rRNA 基因序列通用引物 27F (5'-CAGA GTTTGATCCTGGCT-3')和 1492R (5'-AGGAG GTGATCCAGCCGCA-3')进行 PCR 扩增、测序。通用引物合成及 PCR 扩增产物测序均由上海生工完成。获得菌株 16S rRNA 基因序列后, 通过 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 将其与 GenBank 数据库中进行核苷酸同源性比对, 获取相似度高的序列^[16], 确定各菌株的系统发育地位, 根据 16S rRNA 基因序列相似度小于 98.65%时, 就可以认定为可能的新种或新属^[17]。

1.9 降解棉酚菌株筛选

1.9.1 耐受菌株筛选

将单菌落在浓度为 100 mg/kg 醋酸棉酚培养基上划线培养, 28 °C 恒温培养箱培养 1–2 d, 观察菌株生长状态。继续在 100 mg/kg 醋酸棉酚培养基上挑取单菌落, 在 200 mg/kg 醋酸棉酚培养基上划线培养 1–2 d。照此方法, 依次在 300、500、1 000 mg/kg 醋酸棉酚培养基上, 观察菌株的生长状态。

1.9.2 耐受菌株对醋酸棉酚的降解效果

挑选耐受菌株, 取一环接 100 mL 种子液体培养基中, 28 °C, 培养 24 h, 取 1 mL 接入以醋酸棉酚为唯一碳源的液体培养基中, 醋酸棉酚浓度为 400 mg/kg, 28 °C、120 r/min, 发酵 10 d, 测定棉酚含量。

1.10 棉铃虫肠道棉酚降解菌组合降解效果

将实验室前期对醋酸棉酚有耐受、降解效果的菌株, 进行组合, 与棉铃虫肠道棉酚降解菌组合进行对比。取混合菌液 1 mL 接入以醋酸棉酚为唯一碳源的液体培养基中, 醋酸棉酚浓度 400 mg/kg, 28 °C、120 r/min, 发酵 10 d, 测定棉酚含量。对照组分组分为 5 组, 分别为: 对照组 1: w13-7+w7-1, 1:1; 对照组 2: w7-1+w13-7+ht4-2, 1:1:1; 对照组 3: J-4+J2-2, 1:1; 对照组 4: J-4+J2-2+J-1, 1:1:1; 对照 5: J-4+J2-2+J-1+ht4-2, 1:1:1:1。

1.11 棉酚含量的测定

按国标 GB13086-91《饲料中游离棉酚的测定方法》测定。

1.12 数据处理与统计分析

数据分析使用 SPSS 13.0 统计软件, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)程序, LSD 法多重比较, 不同处理对棉酚降解率结果以“平均值±标准差”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫肠道可培养细菌的分离、纯化及形态鉴定

将棉铃虫肠道样品进行处理, 梯度稀释后涂布, 培养 2–5 d, 根据菌落形态、湿润度、是否凸起, 从饲喂正常饲料和棉粕饲料下棉铃虫肠道样品中共分离纯化细菌 32 株, 其中正常饲喂虫肠道中分离出 17 株, 饲喂棉粕的虫肠道中分离出 15 株。

从棉铃虫肠道中分离得到菌体和菌落的形态特征丰富多样的细菌(表 1), 其中饲喂正常饲料棉铃虫肠道中分离的细菌(编号从 1-1 至 1-17)菌落多较大; 多呈白色, 少数为黄色或红色, 质地均匀, 表面多光滑湿润, 易挑起; 菌体多为杆状和棒状, 部分为球状和椭圆形; 大部分为革兰氏阳性菌, 少数为革兰氏阴性菌。饲喂棉粕虫肠道中分离的细菌(编号从 2-1 至 2-15), 菌落大的较多, 菌落小的菌株较正常饲喂的菌株有所增加; 多呈黄色或浅黄色或黄绿色, 少数为白色或红色, 质地均匀, 表面多光滑湿润, 易挑起; 菌体大多为棒状, 极少为球状和椭圆形; 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌各占约一半。

2.2 菌株 16S rRNA 序列和系统发育学分析

利用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物长度为 1 500 bp 左右, 对所分离的 32 株菌株进行 16S rRNA 基因 PCR 产物测序, 将各序列提交至 GenBank, 并利用 BLASTn 软件搜索与之具有最高匹配率的模式标准菌株序列。统计结果表明, 16S rRNA 基因序列相似度小于 98.65% 的菌株有 17 株, 其中饲喂正常饲料组有 9 株, 饲喂棉粕饲料组有 8 株, 这些菌可能是新种或新属, 总新种属的比例高达 53.1%。其中菌 1-1、1-11、2-2 最相似模式菌株的相似度均小于 95%, 可能代表潜在的新属^[18], 其他 14 株菌为潜在的新种(表 2)。

表 1 细菌分离株的表型特征

Table 1 The phenotypic characteristics of the isolated bacteria

Strains	Gram	Cell morphology	Colony characteristics
1-1	-	Rod	Moist, larger, raised, brick red, edge extended, opaque
1-2	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, regular edges, opaque
1-3	+	Circular or elliptic	Moist, smaller, raised, milky white, regular edges, opaque
1-4	+	Circular or elliptic	Moist, smaller, raised, milky white, regular edges, opaque
1-5	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, opaque
1-6	+	Short rod-like	Moist, cheesy, raised, red, regular edges, opaque
1-7	+	Rod	Wax drop like, raised, light yellow, irregular edges, opaque
1-8	+	Spherical or elliptic	Moist, smaller, raised, edge neat, white, smooth, opaque
1-9	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, regular edges, opaque
1-10	+	Spherical or elliptic	Small, milky white, regular edge, opaque
1-11	+	Rod	Moist, raised, milky white, regular edges, opaque
1-12	-	Sphere	Raised, red, irregular edge, opaque
1-13	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, regular edges, opaque
1-14	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, regular edges, opaque
1-15	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, irregular edges, opaque
1-16	+	Rod	Moist, larger, raised, milky white, regular edges, opaque
1-17	+	Rod	Moist, larger, milky white, regular edges, opaque
2-1	+	Short rod	Moist, smaller, raised, regular edges, transparent
2-2	-	Rod	Moist, larger, raised, brick red, opaque
2-3	-	Rod	Moist, larger, raised, red, extended edges, opaque
2-4	+	Spherical or elliptic	Moist, smaller, grayish white, smooth surface, regular edges, opaque
2-5	-	Rod	Moist, larger, yellowish green, regular edges, opaque
2-6	-	Rod	Moist, larger, yellowish green, regular edges, opaque
2-7	+	Circular or elliptic	Moist, smaller, raised, milky white, regular edges, opaque
2-8	-	Rod	Moist, yellow, regular edges, opaque
2-9	-	Rod	Moist, larger, raised, yellow, regular edges, opaque
2-10	+	Rod	Moist, smaller, raised, milky white, regular edges, opaque
2-11	-	Rod	Moist, larger, raised, yellow, regular edges, opaque
2-12	+	Rod	Wax drop like, raised, light yellow, irregular edges, opaque
2-13	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, irregular edges, opaque
2-14	-	Rod	Moist, smaller, raised, light yellow, regular edges, translucent
2-15	+	Rod	Dry, larger, wrinkled, white, regular edges, opaque

表 2 不同样品中分离细菌的数目及多样性情况

Table 2 The number and diversity of bacteria isolated from samples

Samples	The number of isolates	The number of isolates identified by 16S rRNA gene sequencing	The number of genera	The number of potential novel strains
Stress feeding	15	17	8	8
Normal feeding	17	19	10	9

饲喂正常饲料组棉铃虫肠道 17 株细菌分属于 10 个属(表 3): 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、普罗威登斯菌属 (*Providencia*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。各属细菌所占比例(图 1), 其中芽孢杆菌属为优势属, 有 7 株, 占分离细菌总数的 41%; 其次是肠球菌属, 有 2 株, 占分离细菌总

表 3 饲喂正常饲料与饲喂棉粕饲料棉铃虫肠道细菌 16S rRNA 的序列分析

Table 3 Sequence analysis of 16S rRNA in intestinal bacteria of *Helicoverpa armigera* fed normal diet and cottonseed meal diet

Strains	Closest match	GenBank accession No.	Similarity/%
1-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MW555629	90.75
1-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MW555630	99.79
1-3	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	MW555631	99.75
1-4	<i>Enterococcus faecium</i>	MW555632	96.81
1-5	<i>Bacillus megaterium</i>	MW555633	97.20
1-6	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	MW555634	95.69
1-7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MW555635	97.34
1-8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MW555636	96.25
1-9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MW555637	99.53
1-10	<i>Lactococcus lactis</i>	MW555638	99.50
1-11	<i>Corynebacterium nuruki</i>	MW555639	90.65
1-12	<i>Serratia marcescens</i>	MW555640	98.83
1-13	<i>Providencia alcalifaciens</i>	MW555641	99.41
1-14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MW555642	96.37
1-15	<i>Bacillus cereus</i>	MW555643	99.33
1-16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MW555644	99.34
1-17	<i>Bacillus megaterium</i>	MW555645	97.17
2-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	MW555646	98.11
2-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MW555647	87.99
2-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MW555648	98.32
2-4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	MW555649	99.06
2-5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MW555650	99.72
2-6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MW555651	99.07
2-7	<i>Enterococcus faecium</i>	MW555652	99.90
2-8	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	MW555653	99.11
2-9	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	MW555654	95.66
2-10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MW555655	96.31
2-11	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	MW555656	99.62
2-12	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MW555657	96.17
2-13	<i>Bacillus cereus</i>	MW555658	98.02
2-14	<i>Massilia timonae</i>	MW555659	95.16
2-15	<i>Bacillus subtilis</i>	MW555660	99.07

数的 12%；假单胞菌属、红球菌属、葡萄球菌属、乳球菌属、棒杆菌属、沙雷氏菌属、普罗威登斯菌属、乳杆菌属各有 1 株。所有细菌共分成 3 个分类单元：变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。放线菌门有 2 个属；厚壁菌门有 5 个属；变形菌门共有 3 个属。

饲喂棉粕饲料组棉铃虫肠道 15 株细菌分属于 8 个属(表 3)：魏斯氏属(*Weissella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、马赛菌属(*Massilia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)。各属细菌所占比例(图 2)，其中假单胞菌属为优势属，有 4 株，占分离细菌总数的 26.7%、其次是芽孢杆菌属，有 3 株，占分离细菌总数的 20%；肠球菌属和鞘氨醇单胞菌属各有 2 株，占分离细菌总数的 13.3%，其余，魏斯氏属、微杆菌属、乳杆菌属、马赛菌属各有 1 株。所有细菌共分成 2 个分类单元：变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)，厚壁菌

门有 4 个属；变形菌门有 4 个属。

2.3 不同饲喂条件下棉铃虫肠道内生细菌棉酚耐受性及棉酚降解率

将不同饲喂条件下的 32 株菌接种于醋酸棉酚为唯一碳源的无机盐培养基中，进行梯度醋酸棉酚耐受性生长实验，28 °C 条件下培养 1–2 d，观察菌株的生长状态。饲喂正常饲料组 17 株菌中，12 株对不同浓度醋酸棉酚具有耐受能力(表 4)。其中，1-1、1-2、1-3、1-8、1-16 对醋酸棉酚没有耐受能力，在醋酸棉酚为碳源的平板上几乎不生长；1-10、1-12、1-13、1-14、1-15 对醋酸棉酚的耐受能力较弱；1-4、1-5、1-6、1-7、1-9、1-11、1-17 对醋酸棉酚的耐受能力相对较强，在不同浓度醋酸棉酚平板上生长良好。饲喂棉粕饲料组 15 株菌对不同浓度醋酸棉酚均具有耐受能力。2-7、2-8、2-11、2-13、2-14、2-15 在不同梯度的醋酸棉酚平板上生长良好，说明它们对醋酸棉酚有很好的耐受性；2-6、2-10、2-12 在醋酸棉酚平板上生长相对较弱。

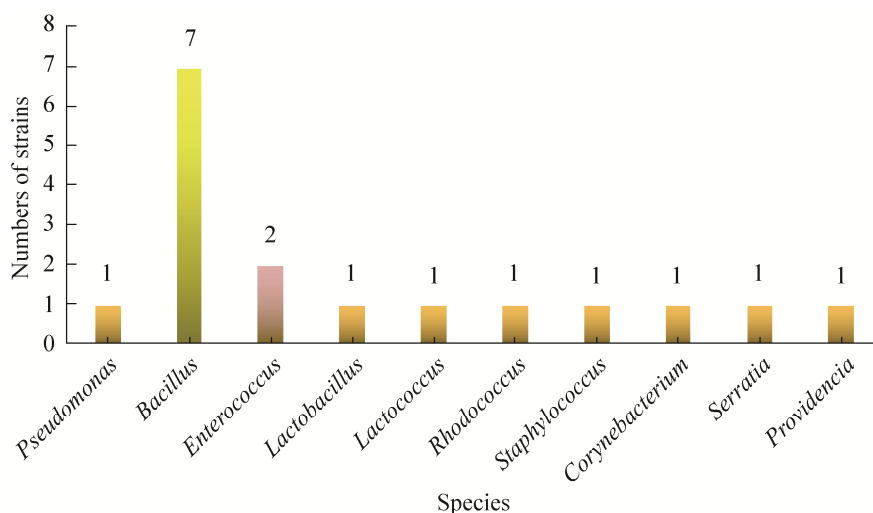


图 1 饲喂正常饲料组棉铃虫肠道内生细菌种类

Figure 1 The group of fed normal diet of species of intestinal endophytic bacteria of *Helicoverpa armigera*.

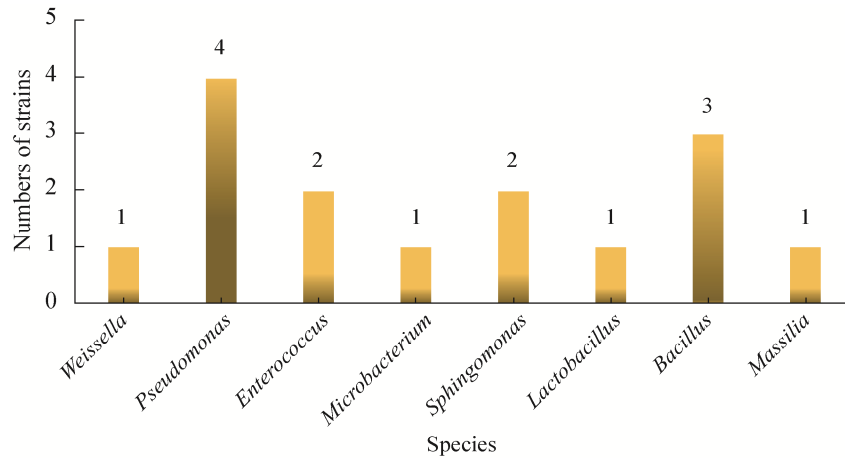


图 2 饲喂棉粕饲料组棉铃虫肠道内生细菌种类

Figure 2 The group of fed cottonseed meal diet of species of intestinal endophytic bacteria of *Helicoverpa armigera*.

表 4 棉铃虫肠道内生菌细菌对醋酸棉酚的耐受性

Table 4 Tolerance of endophytic bacteria in the intestine of *Helicoverpa armigera* to gossypol acetate

Strains	Gossypol acetate concentration/(mg/kg)				Strains	Gossypol acetate concentration/(mg/kg)			
	100	300	500	1 000		100	300	500	1 000
1-1	-	-	-	-	2-1	++	++	++	-
1-2	-	-	-	-	2-2	+++	+++	++	-
1-3	-	-	-	-	2-3	++	++	++	-
1-4	+++	++	++	-	2-4	+++	++	++	-
1-5	+++	++	++	-	2-5	++	++	++	-
1-6	+++	+++	+++	+++	2-6	++	++	-	-
1-7	++	++	+	-	2-7	+++	+++	+++	+++
1-8	-	-	-	-	2-8	+++	+++	+++	+++
1-9	+++	+++	++	-	2-9	+++	++	+	+
1-10	++	+	-	-	2-10	++	+	-	-
1-11	+++	+++	+++	+++	2-11	+++	+++	+++	+++
1-12	++	++	-	-	2-12	++	+	+	-
1-13	+	-	-	-	2-13	+++	+++	+++	++
1-14	++	+	-	-	2-14	+++	+++	+++	+++
1-15	++	+	-	-	2-15	+++	+++	+++	+++
1-16	-	-	-	-					
1-17	+++	+++	+++	+++					

+++; grow well; ++: normal growth; +: weak growth; -: unable to grow.

随着醋酸棉酚浓度的升高,相对饲喂棉粕饲料组,饲喂正常饲料组耐受醋酸棉酚菌株数量下降(图 3)。醋酸棉酚浓度为 100 mg/kg 时,饲喂正常饲料组有 12 株菌株耐受棉酚,饲喂棉粕饲料组有 15 菌株耐受;醋酸棉酚浓度为 300 mg/kg 时,饲喂正常饲料组有 11 株耐受菌株,饲喂棉粕饲料组有 15 株;醋酸棉酚浓度为 500 mg/kg 时,耐受菌株下降到 7 株,饲喂棉粕饲料组有 13 株;醋酸棉酚浓度为 1 000 mg/kg 时,饲喂正

常饲料组只有 3 株耐受菌,它们是菌株 1-6、1-11、1-17;而饲喂棉粕饲料组有 7 株耐受菌,分别是 2-7、2-8、2-9、2-11、2-13、2-14、2-15。

饲喂正常饲料组棉铃虫肠道中 12 株耐受棉酚菌株,其中对醋酸棉酚有降解效果的有 10 株,对棉酚的降解率在 19.87%–88.68%之间,对棉酚降解率达到 50%以上的菌株有 5 株(图 4)。其中,菌株 1-6 对棉酚的降解率最高,达到 88.68%;1-17 对棉酚的降解率为 70.1%,

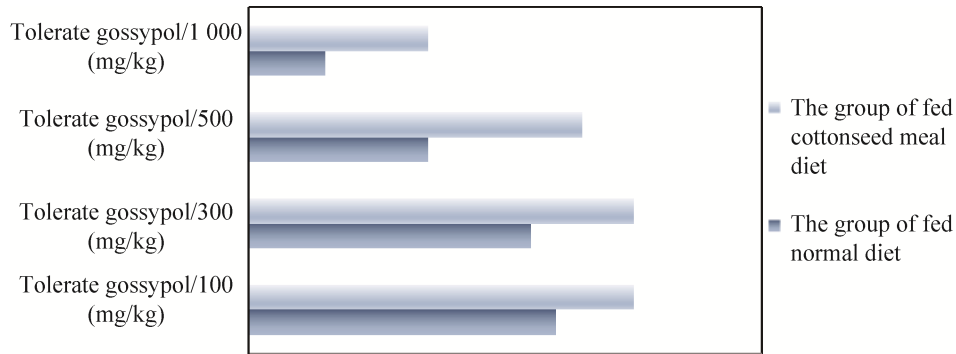


图 3 不同饲喂下棉铃虫肠道内生菌在不同浓度醋酸棉酚下生长菌株数对比图

Figure 3 Comparison of the number of strains growing in the intestinal endophytes of *Helicoverpa armigera* under different concentrations of gossypol acetate under different feeding conditions.

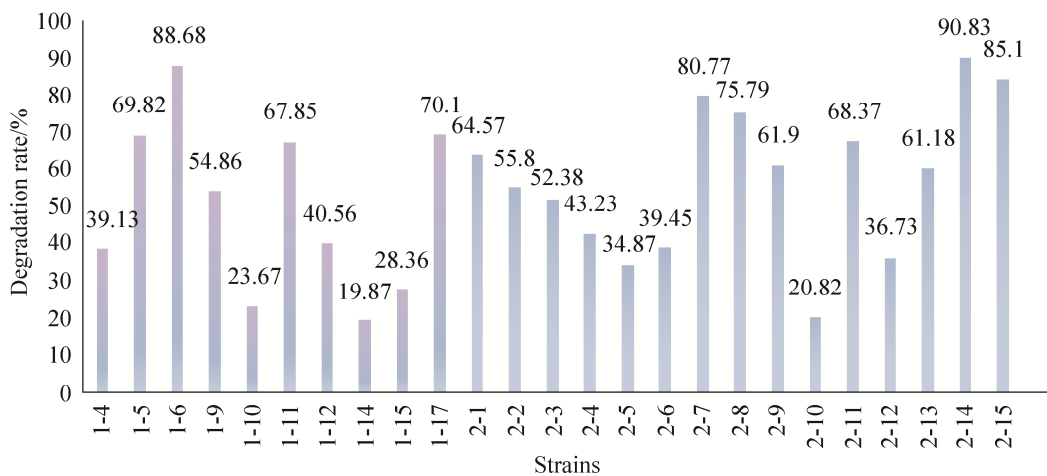


图 4 饲喂正常饲料组与饲喂棉粕饲料组棉铃虫肠道耐受棉酚内生菌的棉酚降解率

Figure 4 Gossypol degradation rate of gossypol endophytic bacteria in the group fed normal diet and cottonseed meal diet.

1-5、1-11 和 1-9 对棉酚降解率分别达到 69.82%、67.85% 和 54.86%；1-14 棉酚降解率最低，为 19.87%。经鉴定，1-6 为嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinivorans*)，1-17 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)，16S rRNA 基因序列相似度分别为 95.69% 和 97.17%，可能是潜在新种。

饲喂棉粕饲料组棉铃虫肠道中 15 株耐受棉酚菌株，其中对醋酸棉酚有降解效果的有 15 株，对棉酚的降解率在 20.82%–90.83% 之间 (图 4)。对棉酚降解率达到 50% 以上的菌株有 10 株，分别是 2-14 棉酚降解率 90.83%、2-15 为 85.1%、2-7 为 80.77%、2-8 为 75.79%、2-11 为 68.37%、2-1 为 64.57%、2-9 为 61.9%、2-13 为 61.18%、2-2 为 55.8%、2-3 为 52.38%。经鉴定，它们分别为蒂莫内马赛菌 (*Massilia timonae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、酯芳香微菌 (*Microbacterium esteraromaticum*)、少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、荧光假单胞菌

(*Pseudomonas fluorescens*)。菌株 2-14 16S rRNA 基因序列相似度为 95.16%，可能是潜在新种。根据菌株对棉酚的降解作用，挑选菌株进行下一步的实验。

2.4 棉铃虫肠道棉酚降解菌组合对棉酚降解的效果

将得到的对醋酸棉酚降解效果较好的棉铃虫肠道内生菌形成 2 种组合，如下：实验组 1：2-15+2-7+2-10，1 : 1 : 1；实验组 2：2-14+2-8+1-6，1 : 1 : 1。与实验室前期形成的棉酚降解菌组进行对比，2 组棉铃虫肠道内生菌实验组对棉酚的降解率显著高于对照组 ($P < 0.05$)，实验组 2 棉酚降解率最高，为 87.04%；实验组 1 棉酚降解率为 84.33%。对照组对棉酚的降解率相对较低，但都到达 70% 以上，分别为 76.6%、79.66%、75.22%、74.78%、81.79% (图 5)。实验组 1 菌剂组成为：枯草芽孢杆菌：粪肠球菌：植物乳杆菌=1 : 1 : 1；实验组 2 菌剂组成为：蒂莫内马赛菌：酯芳香微菌：嗜吡啉红球菌=1 : 1 : 1。

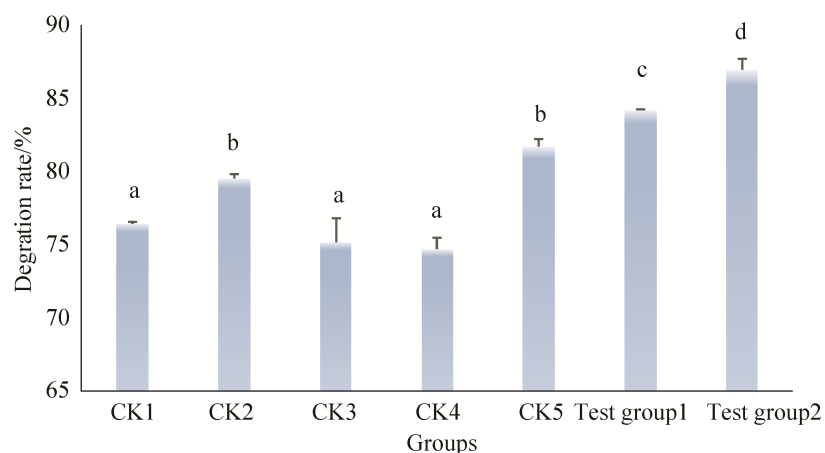


图 5 棉铃虫肠道棉酚降解菌组合降解效果

Figure 5 Degradation effect of combination of gossypol-degrading bacteria in the intestine of *Helicoverpa armigera*.

3 讨论

昆虫肠道是宿主与外部环境之间的重要界面,是一个庞大的微生物资源库^[19],这些细菌参与昆虫肠道防御^[20]及抑制有害物质^[7],直接或间接地影响着宿主昆虫的生长发育^[21]。有实验证明,棉铃虫在取食棉酚后会产生一系列的代谢酶来降解这些次生物质^[22],推测这可能与肠道内生菌有关^[23]。目前,对于棉铃虫肠道内生菌的资源挖掘还不够深入,其对棉酚的降解功能研究也鲜有报道。本文将棉铃虫经过空腹排泄 24 h 后,幼虫的存活率和生长力没有发生变化,饲喂非常规饲料棉粕和正常饲料,饲养至 5–6 龄,培养 10–15 d,研究不同饲喂下肠道内生菌的变化,然后对肠道微生物进行一定的分离鉴定,这与骆伦伦^[24]和胡亚楠等^[16]给虫体饲喂非常规饲料后分离肠道内生菌的方法一致,通过空腹排泄后再饲喂,研究肠道微生物的变化,对肠道微生物进行一定的分离鉴定。本研究利用可培养方法^[25]分离鉴定出的 32 株菌,16S rRNA 基因序列相似度小于 98.65%的菌种有 17 株,其中正常饲料喂组有 9 株,饲喂棉粕饲料组有 8 株。为今后采用高通量技术持续了解棉铃虫肠道内生细菌的种类、数量、分布,收集新种、新属打下良好的基础。

常见昆虫肠道内生细菌有变形菌(*Proteobacteria*)、拟杆菌(*Bacteroidetes*)、厚壁菌(*Firmicutes*)、放线菌(*Actinomycetes*)、螺旋体(*Spirochetes*)、和疣微菌(*Verrucomicrobia*)等^[26]。本研究以不同饲喂方式的棉铃虫为材料,通过饲喂棉粕驯化,采用富集培养、选择性培养等方法筛选可培养的肠道内生菌。饲喂正常饲料虫肠道中分离出 17 株,饲喂棉粕的虫肠道中分离出 15 株。16S rRNA 测序结果表明,本研究饲喂正常饲料组的棉铃虫肠道分离出的细

菌共分成 3 个分类单元:变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*),其中,放线菌门有 2 个属,厚壁菌门有 5 个属,变形菌门共有 3 个属;饲喂棉粕饲料组分成 2 个分类单元:变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*),其中,厚壁菌门有 4 个属,变形菌门有 4 个属。本研究饲喂正常饲料组和饲喂棉粕饲料组棉铃虫肠道内生可培养微生物结构呈现一定的不同,这跟外界的生存环境有一定的相关性^[27],取食可能是造成肠道微生物组成结构存在差异的主要影响因素^[28],饲喂正常饲料组棉铃虫肠道中芽孢杆菌属为优势属,占分离细菌总数的 41%;其次是肠球菌属,占分离细菌总数的 12%;其余各属各 1 株。另有研究表明,在特定条件的作用下分析棉铃虫肠道微生物有助于研究肠道菌群与棉铃虫抗性的联系^[29],本研究饲喂棉粕后,棉铃虫肠道微生物结构发生了变化,假单胞菌属为优势属,占分离细菌总数的 26.7%,芽孢杆菌属呈现了下降,占总菌数的 20%;肠球菌属和鞘氨醇单胞菌属占 13.3%。研究结果说明,假单胞菌、芽孢杆菌、肠球菌等在棉铃虫饲喂棉粕饲料后,对维持其生长和保护肠道起到一定作用^[30]。

昆虫可以适应各种生境的重要原因之一是其肠道微生物在共同进化的过程中形成了复杂多样的种群结构和生物学功能^[31],发掘和利用关键微生物特定的生物学功能,具有重要的实践价值。棉酚是锦葵科棉属植物分泌产生的一种多酚二萜结构衍生物^[32],对动物机体健康产生各种危害^[33–35],而且它也是制约棉源副产物成为优质反刍动物粗饲料的制约因素^[36]。现今,动物饲料呈现绿色、安全、健康、无抗的发展趋势,发掘微生物资源寻求安全经济的生物发酵技术消除饲料中抗营养因子的毒害成为研究热点。

利用微生物降解棉酚的研究始于 20 世纪 80 年代, 但研究进展缓慢。国内所筛选的降解棉酚菌种主要集中在黑曲霉和产阮假丝酵母 2 类^[37], 地衣芽孢杆菌、植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌等益生菌也具有一定的脱毒功能^[36]。有研究表明, 昆虫在一定代谢水平上可以对寄主植物次生物质产生防御机制^[38], 本研究通过可培养的方式分离培养棉铃虫肠道内生微生物, 经过不同程度的胁迫适应性生长, 分别在饲喂正常饲料组和饲喂棉粕饲料组得到对不同浓度醋酸棉酚具有耐受能力的菌株 27 株, 饲喂棉粕饲料组虫肠道中分离出的 15 株菌株几乎对棉酚都有一定的耐受性, 说明在饲喂棉粕饲料的过程中, 虫肠道内生菌对棉酚产生了一定的耐受性, 从而提高了棉铃虫对饲喂环境的适应性^[20]。本研究通过棉酚降解实验得到对棉酚降解效率达 50% 的菌株有 15 株, 棉酚降解率最高达到 90.83%, 是 1 株来自饲喂棉粕饲料组分离的蒂莫内马赛菌(*Massilia timonae*), 属于变形菌门(*Proteobacteria*)。杨恩东等^[39]在对蒂莫内马赛菌的功能性研究上发现其对多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)具有降解作用, 本研究中蒂莫内马赛菌对多酚二萜结构的棉酚毒性有抑制作用, 但其降解机理还需进一步研究。目前, 对多环芳烃毒性物有降解效果的大多为细菌, 包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[40]等。在本研究中, 筛选到的 1 株嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*)对棉酚降解率达到 88.68%, 1 株来自饲喂棉粕饲料组的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对棉酚降解率达 85.1%, 说明在棉铃虫肠道中存在一定的多环芳烃毒性物抑制细菌, 后期应通过高通量技术做更深入的挖掘。

目前, 具有高效生物降解性能的复合制剂还很稀少。通过复配和组合, 确实一定程度上可以加强降解棉酚菌株的功能性^[41-42]。本研究利用与多环芳烃毒性物有降解效果细菌进行混合配比, 与实验室已有的相关棉酚降解菌剂对比, 两组饲喂棉铃虫肠道内生菌实验组对棉酚的降解率显著高于对照组($P < 0.05$)。这是首次报道棉铃虫肠道可培养内生混合菌对棉酚的降解效果, 填补了昆虫肠道微生物在棉酚脱毒应用上的研究空白。本研究结果证实, 棉铃虫肠道内存在棉酚降解细菌, 为棉酚的生物降解菌的发掘提供了一条新途径。在本研究筛选出棉酚降解菌株的基础上, 还要研究通过添加表面活性剂、调整碳氮源、优化培养条件等措施来提高降解效率, 进一步研究降解的关键酶系, 探究降解机制, 以深入挖掘降解菌株的降解潜能, 以期通过微生物及其发酵技术提高棉源副产物饲料的利用率, 提高营养价值, 解决新疆畜牧业饲料供应可持续发展的瓶颈问题。

参考文献

- [1] 钱玉源, 刘祎, 张海娜, 崔淑芳, 金卫平, 王广恩, 李俊兰. 棉酚合成及棉花腺体形成相关基因的研究进展. 棉花学报, 2017, 29(3): 301-306.
Qian YY, Liu Y, Zhang HN, Cui SF, Jin WP, Wang GE, Li JL. Advances in genes related to gossypol biosynthesis and cotton gland formation. *Cotton Science*, 2017, 29(3): 301-306. (in Chinese)
- [2] 胡波, 郑文新, 高维明, 杨海燕. 游离棉酚毒理学与脱毒技术的研究进展. 草食家畜, 2020(3): 1-7, 38.
Hu B, Zheng WX, Gao WM, Yang HY. Research progress of toxicology and detoxification technology of free gossypol. *Grass-Feeding Livestock*, 2020(3): 1-7, 38. (in Chinese)
- [3] 杨震. 高效棉酚降解菌株的筛选鉴定及其差异蛋白质组学研究. 浙江大学学位论文, 2010.

- [4] 周梦宇, 李海芳, 武钰, 姚军. 游离棉酚降解产物四甲氧基棉酚致小鼠精子畸形效应的生殖毒性研究. *新疆医科大学学报*, 2018, 41(6): 744–746.
Zhou MY, Li HF, Wu Y, Yao J. Study on reproductive toxicity of free gossypol degradation products tetramethoxyl gossypol by mice sperm deformity effect. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2018, 41(6): 744–746. (in Chinese)
- [5] Santana AT, Guelfi M, Medeiros HCD, Tavares MA, Bizerra PFV, Mingatto FE. Mechanisms involved in reproductive damage caused by gossypol in rats and protective effects of vitamin E. *Biological Research*, 2015, 48: 43.
- [6] 李建国. 游离棉酚对蛋鸡的毒性研究. 西北农林科技大学学位论文, 2005.
- [7] Stecher B, Hardt WD. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(1): 82–91.
- [8] Kaltenpoth M, Engl T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*, 2014, 28(2): 315–327.
- [9] Smith CC, Srygley RB, Healy F, Swaminath K, Mueller UG. Spatial structure of the Mormon cricket gut microbiome and its predicted contribution to nutrition and immune function. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 801.
- [10] Thong-On A, Suzuki K, Noda S, Inoue JI, Kajiwara S, Ohkuma M. Isolation and characterization of anaerobic bacteria for symbiotic recycling of uric acid nitrogen in the gut of various termites. *Microbes and Environments*, 2012, 27(2): 186–192.
- [11] Ceja-Navarro JA, Vega FE, Karaoz U, Hao Z, Jenkins S, Lim HC, Kosina P, Infante F, Northen TR, Brodie EL. Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature Communications*, 2015, 6: 7618.
- [12] Radominska-Pandya A, Bratton SM, Redinbo MR, Miley MJ. The crystal structure of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C-terminal end is the first mammalian UGT target to be revealed: the significance for human UGTs from both the 1A and 2B families. *Drug Metabolism Reviews*, 2010, 42(1): 133–144.
- [13] Howe GA, Jander G. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 41–66.
- [14] Frago E, Dicke M, Godfray HCJ. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, 27(12): 705–711.
- [15] 叶明. 微生物学实验技术. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2009: 371–373.
- [16] 胡亚楠, 贺旭, 亚森·沙力, 罗明, 张宇宏, 张帅. 大蜡螟和黄粉虫肠道菌中聚乙烯地膜降解细菌的筛选及其降解性能. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4029–4041.
Hu YN, He X, YASENShali, Luo M, Zhang YH, Zhang S. Screening of polyethylene film-degrading bacteria from gut microbiota of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4029–4041. (in Chinese)
- [17] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351.
- [18] Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 1): 249–266.
- [19] Byndloss MX, Bäumlér AJ. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(2): 103–110.
- [20] 姚志超, 白帅, 张宏宇. 昆虫肠道防御及微生物稳态维持机制. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1036–1048.
Yao ZC, Bai S, Zhang HY. Intestinal defense system and mechanism of maintenance of microbiota

- homeostasis in insects. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1036–1048. (in Chinese)
- [21] Crotti E, Balloi A, Hamdi C, Sansonno L, Marzorati M, Gonella E, Favia G, Cherif A, Bandi C, Alma A, Daffonchio D. Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(3): 307–317.
- [22] Tao XY, Xue XY, Huang YP, Chen XY, Mao YB. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Molecular Ecology*, 2012, 21(17): 4371–4385.
- [23] Frago E, Dicke M, Godfray HCJ. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, 27(12): 705–711.
- [24] 骆伦伦. 秸秆对黄粉虫生长发育、消化酶和肠道微生物的影响. 浙江农林大学学位论文, 2017.
- [25] 梅承, 范硕, 杨红. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展. *微生物学报*, 2018, 58(6): 985–994.
- Mei C, Fan S, Yang H. The strategies of isolation of insect gut microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 985–994. (in Chinese)
- [26] Colman DR, Toolson EC, Takacs-Vesbach CD. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology*, 2012, 21(20): 5124–5137.
- [27] Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 699–735.
- [28] Rodríguez-Ruano SM, Kochová V, Rego ROM, Schmidt JO, Roachell W, Hypša V, Nováková V. Microbiomes of North American Triatominae: the grounds for Chagas disease epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1167.
- [29] Xia XF, Sun BT, Gurr GM, Vasseur L, Xue MQ, You MS. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 25. DOI:10.3389/fmicb.2018.00025.
- [30] 姜笑维, 关丹阳, 李清亚, 刘晓, Hongmei LI-BYARLAY, 贺秉军. 七氟菊酯和溴氰菊酯对棉铃虫肠道菌群的影响. *昆虫学报*, 2020, 63(10): 1183–1193.
- Jiang XW, Guan DY, Li QY, Liu X, Libyarlay H, He BJ. Effects of tefluthrin and deltamethrin on gut microbiota in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63(10): 1183–1193. (in Chinese)
- [31] 魏辅文. 动物适应性进化研究的新视角: 动物肠道微生物组. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(11): 1338–1340.
- Wei FW. New angle to study the adaptive evolution: animal gut microbiome. *Scientia Sinica: Vitae*, 2016, 46(11): 1338–1340. (in Chinese)
- [32] 侯敏, 刘亚男, 王宁, 包慧芳, 詹发强, 侯新强, 杨蓉, 崔卫东. 微生物发酵技术在新疆棉籽壳饲料化的应用研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(21): 44–47, 56.
- Hou M, Liu YN, Wang N, Bao HF, Zhan FQ, Hou XQ, Yang R, Cui WD. Advances in the application of microbial fermentation technology on cotton seed husk feed in Xinjiang. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(21): 44–47, 56. (in Chinese)
- [33] Panigrahi S, Hammonds TW. Egg discoloration effects of including screw-press cottonseed meal in laying hen diets and their prevention. *British Poultry Science*, 1990, 31(1): 107–120.
- [34] Santana AT, Guelfi M, Medeiros HCD, Tavares MA, Bizerra PFV, Mingatto FE. Mechanisms involved in reproductive damage caused by gossypol in rats and protective effects of vitamin E. *Biological Research*, 2015, 48: 43.
- [35] Ni ZH, Dai XF, Wang B, Ding W, Cheng PK, Xu L, Lian JQ, He FT. Natural Bcl-2 inhibitor (–)-gossypol induces protective autophagy via reactive oxygen species-high mobility group box 1 pathway in Burkitt lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 2013, 54(10): 2263–2268.
- [36] 侯敏, 包慧芳, 王宁, 詹发强, 杨蓉, 龙宣杞, 崔卫

- 东. 高效降解棉酚菌株的筛选及脱毒条件的研究. *新疆农业科学*, 2016, 53(6): 1114–1121.
- Hou M, Bao HF, Wang N, Zhan FQ, Yang R, Long XQ, Cui WD. Screening and breeding of highly-effected degrading gossypol strains and study on defoxication technology and conditions. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2016, 53(6): 1114–1121. (in Chinese)
- [37] 张文举, 许梓荣, 孙建义, 杨霞, 赵顺红. 假丝酵母 ZD-3 与黑曲霉 ZD-8 复合固体发酵对棉籽饼脱毒及营养价值的影响研究. *中国粮油学报*, 2006, 21(6): 129–135.
- Zhang WJ, Xu ZR, Sun JY, Yang X, Zhao SH. Effect of solid substrate fermentation with mixed cultured *C. tropicalis* ZD-3 and *A. niger* ZD-8 on nutritional value and detoxification of cottonseed meal. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2006, 21(6): 129–135. (in Chinese)
- [38] Krempel C, Heidel-Fischer HM, Jiménez-Alemán GH, Reichelt M, Menezes RC, Boland W, Vogel H, Heckel DG, Joußen N. Gossypol toxicity and detoxification in *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 78: 69–77.
- [39] 杨恩东, 崔丹曦, 汪维云. 马赛菌属细菌研究进展. *微生物学通报*, 2019, 46(6): 1537–1548.
- Yang ED, Cui DX, Wang WY. Research progress on the genus *Massilia*. *Microbiology China*, 2019, 46(6): 1537–1548. (in Chinese)
- [40] 王涛, 蓝慧, 田云, 卢向阳. 多环芳烃的微生物降解机制研究进展. *化学与生物工程*, 2016, 33(2): 8–14.
- Wang T, Lan H, Tian Y, Lu XY. Research progress on microbial degradation mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemistry & Bioengineering*, 2016, 33(2): 8–14. (in Chinese)
- [41] 郭凯, 崔卫东, 王宁, 侯敏, 包慧芳, 房世杰. 黑曲霉 ZD 利用棉花秸秆固体发酵产纤维素酶条件优化. *新疆农业科学*, 2018, 55(9): 1717–1727.
- Guo K, Cui WD, Wang N, Hou M, Bao HF, Fang SJ. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* ZD using solid fermentation of cotton straw. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2018, 55(9): 1717–1727. (in Chinese)
- [42] Oboh G. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp. solid media fermentation techniques. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2006, 9(1): 46–49.

(本文责编 李磊)