

## 绿孔雀粪便细菌多样性及其酶活性研究

曹艳茹<sup>1,2</sup>, 孔德军<sup>1,2</sup>, 李有龙<sup>3</sup>, 刘建惠<sup>1,2</sup>, 刘永张<sup>4</sup>, 师 蕾<sup>4</sup>, 王定康<sup>5\*</sup>

(1. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214; 2. 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室, 云南 昆明 650214;  
3. 云南野生动物园, 云南 昆明 650218; 4. 圆通山动物园, 云南 昆明 650000; 5. 昆明学院 农学院, 云南 昆明 650214)

**摘要:**以绿孔雀粪便为研究对象,通过纯培养的方法研究细菌的数量、种类.结果表明,分离的25株菌分别为,小单孢菌属(*Micromonospora*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)、微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、异常球菌属(*Deinococcus*)和巴尔加瓦属(*Bhargavaea*).检测分离菌株的4种酶活,淀粉酶呈阳性的菌株有8株,纤维素酶有11株,蛋白酶有14株,脂肪酶有10株.这些阳性菌株可为微生物酶资源的开发应用提供材料,也可为认识绿孔雀肠道微生物的功能提供数据支持.

**关键词:**绿孔雀粪便;细菌;多样性;酶活

**中图分类号:**Q939;S858 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2017)03-0075-04

**DOI:**10.14091/j.cnki.kmxyxb.2017.03.018

### Diversity and Enzymatic Activities Analysis of Bacteria Isolated from *Pavomuticus Feces*

CAO Yanru<sup>1,2</sup>, KONG Dejun<sup>1,2</sup>, LI Youlong<sup>3</sup>, LIU Jianhui<sup>1,2</sup>, LIU Yongzhang<sup>4</sup>, SHI Lei<sup>4</sup>, WANG Dingkan<sup>5\*</sup>

(1. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Key laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization in Universities  
of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China 650214;

3. Yunnan Wild Animal Park, Kunming, Yunnan, China 650218; 4. Yuantong Zoo, Kunming, Yunnan, China 650000;

5. Agriculture College, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

**Abstract:** Using *Pavomuticus's* feces as the object of study, we studied the amount and sorts of fecal Bacteria with culture-dependent approach. The result showed that the twenty-five representative isolates were *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Sporosarcina*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Deinococcus* and *Bhargavaea*. Four enzyme activities were examined from the isolated bacterial stains among which 8 stains were positive for amylase; 11 strains were positive for cellulose; 14 strains were positive for protease and 10 strains were positive for lipase. The positive stains enrich potential resource used for Bacteria development and utilization, and offer data for inferring the function of fecal microbes.

**Key words:** *Pavomuticus's* feces; bacteria; diversity; enzyme activity

绿孔雀,属鸡形目雉科.杂食性,嗜食棠梨、黄泡等浆果和稻谷等<sup>[1]</sup>,此外,还摄食昆虫,例如蟋蟀、蚱蜢等.属于国家一级保护濒危珍稀动物,羽色美丽,是一种著名的观赏鸟类,它的消化系统与一般鸟类的大致相似.绿孔雀主要分布在中国的云南省,现存数量比较稀少,属于直肠动物,其排泄系统不同于

哺乳动物.目前关于绿孔雀的肠道细菌纯培养研究较少.因此,以绿孔雀粪便为研究对象,探讨其肠道细菌纯培养的多样性及酶活性.

细菌的生存环境很广泛,如水体、植物体内、陆地土壤及各种极端环境,此外,动物体内包括肠道、口腔、体表等也有大量细菌存在<sup>[4-5]</sup>.研究<sup>[6]</sup>表明,

收稿日期:2017-03-01

**基金项目:**云南省应用基础研究计划资助项目(2013FZ096);昆明学院云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金资助项目(GXK2015);云南省高校优势特色重点学科(生态学)建设项目资助;国家自然科学基金项目(31300012,31660002);云南省生物多样性保护专项资金项目(Y3038891121).

**作者简介:**曹艳茹(1983—),女,内蒙古乌海人,副教授,博士,主要从事微生物研究.

\* **通讯作者:**王定康(1965—),男,云南曲靖人,教授,博士,主要从事生态遗传学研究,E-mail:wdk117@163.com.

很多动物肠道微生物的优势类群是:厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门以及变形菌门. 其中被称之为放线菌的这类细菌,是人们研究的热点,它是菌落呈放射状、G+C 大于 50 mol% 的一类革兰氏阳性细菌,属于细菌域放线菌门(Actinobacteria)<sup>[7]</sup>,这类微生物是目前为止药用抗生素的主要产生者. 在很多高等脊椎动物的消化道中也分离得到了多种类群的放线菌. Zhu 等<sup>[8]</sup>用宏基因组的方法研究大熊猫的肠道微生物,结果表明,放线菌占 7.1%,有 5.9% 为未培养类群. Kaltenpoth 等<sup>[9]</sup>在欧洲土蜂(European bee-wolf)的触角腺中发现一种链霉菌,该链霉菌可在宿主产卵前进入宿主血细胞,被幼虫吸附于茧壁上,起到保护蜂茧免受病原真菌感染的作用,从而提高幼虫的存活率. Anderson 等<sup>[10]</sup>在牛瘤胃中分离到一株厌氧放线菌 *Denitrobacterium detoxificans*,该菌株可降解某些饲料含中的毒素 3-硝基-1-丙醇及 3-硝基-1-丙酸,推测可能与牛的解毒机制有关.

地球上的动物种类各异、食性也不尽相同,其数量高达 150 万种之多,这些具有不同消化特点的动物消化道为肠道细菌提供了“独一无二”的栖居地. 那么在绿孔雀这种稀有的禽类肠道中又有哪些放线菌和细菌类群呢? 通过本试验,既可认识绿孔雀粪便细菌和放线菌的多样性,同时酶活阳性菌株又可作为继续研究的微生物资源,此外,本研究还可为观察孔雀的健康状况提供一定的参考依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及预处理

#### 1.1.1 样品采集

本项目研究的粪便样品采自云南野生动物园的散养绿孔雀粪便(1 号样)和昆明圆通山动物园的圈养绿孔雀粪便(2 号样). 采样时,观察到绿孔雀排泄后,立刻将粪便的中间部分用无菌镊子置于无菌袋中,然后放进冰盒,带回实验室置于 4℃ 冰箱里保存待用.

#### 1.1.2 样品处理

将采集到的 2 份粪便各取出一部分放入垫有无菌纸的 2 个无菌培养皿中,将培养皿盖上,置于室温至粪便干燥. 然后各称取 1 g 样品,分别稀释至  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  倍.

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 分离培养基的制备

试验过程中采用了 9 种培养基(g/L),具体成

分如下:

1)改进的 HV 培养基. 淀粉 2 g, 硝酸钾 0.5 g, 氯化钾 1.7 g, 硫酸镁 0.5 g, 磷酸氢二钠 0.5 g, 碳酸钙 0.02 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 硫胺素 0.5 mg, 烟酸 0.5 mg, 泛酸 0.5 mg, 对氨基苯甲酸 0.5 mg, 核黄素 0.5 mg, 维生素 B6 0.5 mg, 肌醇 0.5 mg, 生物素 0.25 mg, 琼脂 15~18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2<sup>[11]</sup>.

2)改进的 Bennet 培养基. 葡萄糖 10 g, 酪蛋白水解物 2 g, 酵母膏 2 g, 牛肉膏 1 g, 放线菌酮 30 mg, 琼脂 15~18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0<sup>[11]</sup>.

3)小米液体培养基. 小米 10 g, 葡萄糖 10 g, 碳酸钙 2 g, 氯化钠 2.5 g, 蛋白胨为 3 g, 蒸馏水为 1 000 mL, pH7.2~7.4<sup>[11]</sup>.

4)BP 培养基. 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15~18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0<sup>[11]</sup>.

5)淀粉酪蛋白培养基. 可溶性淀粉 10 g, 酵母浸出粉 4 g, 酪蛋白 2 g, 琼脂为 15 g, 天然海水为 1 000 mL, pH7.2~7.4<sup>[12]</sup>.

6)几丁质培养基. 几丁质 1.5 g, 磷酸氢二钾 2.0 g, 氯化钾 0.5 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 氯化钙为 0.1 g, 硫酸镁 0.7 g, 酵母粉 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 琼脂 15 g, 天然海水 1 000 mL, pH7.2~7.4<sup>[12]</sup>.

7)海水 R2A 培养基. 酵母膏 0.5 g, 蛋白胨 0.5 g, 酪蛋白水解物 0.15 g, 葡萄糖 0.15 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 丙酮酸钠 0.3 g, 磷酸氢二钾 0.3 g, 硫酸镁 0.05 g, 陈海水 1 000 mL, pH7.2~7.4<sup>[12]</sup>.

8)M2 培养基. 乙酸钠 5.0 g, 蛋白胨 0.5 g, 酵母粉 0.5 g, 普通肉汁培养基 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 蔗糖 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 柠檬酸三钠 0.05 g, 苹果酸 0.05 g, 酒石酸钾钠 0.05 g, 硝酸铵 1.0 g, 氯化铵为 0.2 g, 琼脂 15 g, 海水 1 000 mL, pH7.5~7.6<sup>[12]</sup>.

9)可溶性淀粉—酵母粉培养基. 可溶性淀粉 10.0 g, 酵母粉 10.0 g, 玉米淀粉 10.0 g, 氯化钠为 2.0 g, 调 pH 至 7.0<sup>[13]</sup>.

#### 1.2.2 酶活筛选培养基

4 种酶活基础培养基(1 L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.24 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  14.03 g, pH7.0, 琼脂 13 g, 120℃ 灭菌 30 min.

蛋白酶筛选培养基(脱脂奶粉培养基):加入灭菌脱脂牛奶至终质量分数 1.5%.

淀粉酶筛选培养基(淀粉培养基):加入灭菌可溶性淀粉至终质量分数 0.2%.

脂肪酶筛选培养基(三丁酸甘油酯培养基):加入灭菌三丁酸甘油酯乳化液至终质量分数1.0%.

纤维素酶筛选培养基(羧甲基纤维素钠培养基):加入灭菌CMC300-800至终质量分数0.2%.

1.3 分离培养

按照培养基的成分配制培养基,并编号.

用1 mL 无菌吸管分别吸取 $10^{-4}$ , $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ 的稀释菌液1 mL,对号放入编好号的无菌培养皿中,每一稀释质量浓度对应3个平板.用无菌涂布棒将样品稀释液涂匀.

将培养皿放入28℃恒温培养箱倒置培养7 d,然后观察和统计细菌数量和种类.

将分离培养得到的不同种类的细菌又分别接种到斜面培养基.接种完毕,将培养皿放入28℃恒温箱培养7 d,然后纯化和统计细菌,以及纯化、保藏并鉴定细菌.保藏采用牛奶管、甘油管和斜面.

1.4 菌株的16S rRNA基因测序

1.4.1 DNA的提取

本次试验中提取DNA的方法具体如下:

- 1)称取50 mg 湿菌体;
- 2)加入500 μL 用无菌水稀释成质量浓度为2 mg/mL的溶菌酶(lysozyme);
- 3)加入50 μL 20%的SDS和5 μL的蛋白酶震荡混匀1 min,于55℃烘箱烘烤30~60 min;
- 4)加入550 μL 酚氯仿,震荡混匀后,转速为12 000 r/min离心10 min,吸取上清液;
- 5)加3 mol/L 乙酸钠50 μL 上下翻转混匀,再加异丙醇500 μL,室温放置片刻;
- 6)用转速为12 000 r/min 离心10 min,弃上清液;
- 7)加体积分数为70%乙醇200 μL,上下翻转,低温下转速为12 000 r/min 离心5 min,弃乙醇;
- 8)去水干燥后加30~50 μL TE(1×TE)溶解DNA,保存于4℃待用.

1.4.2 DNA的测序

本次扩增引物采用细菌核糖体16S rRNA基因通用引物(PA:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3';PB:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3').使用PCR仪为Biometra.

提取各菌株基因组总DNA作为模板,进行16S rRNA基因PCR扩增反应(表1).

PCR反应程序:预变性94℃下5 min,变性94℃1 min,引物结合54~57℃1 min,链延伸72℃2 min(30个循环),72℃6 min.

表1 PCR反应体系

体系组成	用量/μL
10×Buffer	5.0
dNTP	4.0
PA	1.0
PB	1.0
Taq酶	0.3
D. D. Water	37.7
DNA Template	1.0

PCR扩增产物用0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳分析,用型号为GEL Logic 200 Imaging System凝胶成像仪检测试验结果.

根据琼脂糖凝胶电泳检测结果,将合格的PCR产物送至上海生工测序公司,完成菌株的16S rRNA基因测序工作<sup>[14]</sup>.

1.5 菌株的酶活检测

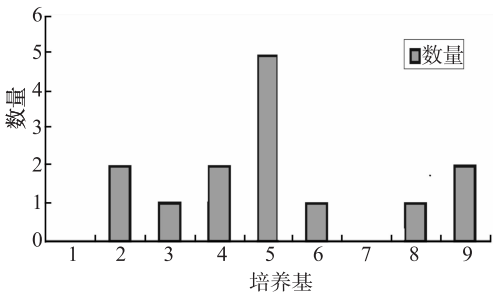
将25株待测菌进行活化,分别接种于脱脂奶粉培养基、淀粉培养基、三丁酸甘油酯培养基、羧甲基纤维素钠培养基中,倒置于28℃恒温培养箱中培养1周.

蛋白酶和脂肪酶活性鉴定可直接观察菌株是否产生透明圈.纤维素酶活性鉴定需要加入5 mL 1%刚果红溶液,染色1 h,倒出染料再加入1.0 mol/L NaCl溶液脱色20 min,观察菌落周围是否出现清晰、透亮的透明圈.淀粉酶活性鉴定则需要在平板中加入5 mL 碘液,观察其是否产生水解圈.

2 结果与分析

2.1 各类培养基上的微生物生长状态

从下图1可以看出,淀粉酪蛋白培养基的效果最好,最适宜细菌和放线菌的生长.改进的HV培养基和海水R2A培养基不适合细菌和放线菌的生长.



1.改进的HV培养基; 2.改进的Bennet培养基; 3.小米液体培养基; 4.BP培养基; 5.淀粉酪蛋白培养基; 6.几丁质培养基; 7.海水R2A培养基; 8.M2培养基; 9.可溶性淀粉-酵母粉培养基.

图1 各类培养基上的微生物生长状况

2.2 分离结果

试验最后得到 25 株菌株,检测得到 7 个菌属:小单孢菌属(*Micromonospora*) 菌株有 6 株、棒状杆菌属(*Corynebacterium*) 菌株有 7 株、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*) 菌株有 2 株、微球菌属(*Micrococcus*) 菌株有 3 株、节杆菌属(*Arthrobacter*) 菌株有 5 株、异常球菌属(*Deinococcus*) 和巴尔加瓦属(*Bhargavaea*) 菌株各 1 株.

由下表 2 中可以看出,从云南野生动物园的绿孔雀粪便中分离得到了 16 株菌株,分属于 4 个菌属,分别是小单孢菌属、棒状杆菌属、芽孢八叠球菌属、微球菌属;从昆明圆通山动物园的绿孔雀粪便中分离得到了 9 株菌株,分属于 4 个菌属,分别是微球菌属、节杆菌属、异常球菌属和巴尔加瓦属. 它们共同有微球菌属,其他几个均属不一样,说明绿孔雀的肠道微生物与养殖和生活方式有一定相关性.

表 2 两处样品肠道细菌和放线菌多样性的对比

云南野生动物园	圆通山动物园
<i>Micromonospora</i>	<i>Bhargavaea</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Sporosarcina</i>	<i>Deinococcus</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus</i>

2.3 酶活筛选结果

为进一步讨论这些分离菌株的功能,对其进行 4 种酶活(淀粉酶、纤维酶、蛋白酶、脂肪酶)检测,结果如表 3 所示.

表 3 酶活筛选结果

菌种编号	淀粉酶	纤维酶	蛋白酶	脂肪酶
L4	±	-	++	+
L5	-	+	-	-
L8	-	-	±	-
L9	-	-	±	+
L11	-	-	-	-
L14	+	+	±	++
L16	±	+	±	+
L19	±	++	±	+
L20	-	++	-	-
L26	-	-	±	±
L27	-	-	-	-
L28	-	-	-	-
L30	+	++	±	+
L31	-	++	-	-
L33	+	++	++	+
L34	-	++	-	-
L36	-	-	±	±
L37	-	+	±	-
L38	+	+	±	-
L40	-	-	-	-
L44	-	-	-	-

续表 3

菌种编号	淀粉酶	纤维酶	蛋白酶	脂肪酶
L45	+	-	+	+++
L47	-	-	-	-
L49	-	-	±	-
L50	-	-	-	-

注:+++ 活性较强;++ 活性强;+ 活性一般;± 活性弱;- 没有活性.

从表 3 可以看出,检测了 25 个菌株,其中淀粉酶有 8 株,分别是 L4, L14, L16, L19, L30, L33, L38, L45, 其中 L4, L16, L19 这 3 株的活性较弱;纤维酶有 11 株,分别是 L5, L14, L16, L19, L20, L30, L31, L33, L34, L37, L38, 其中 L19, L20, L30, L31, L33, L34 这 6 株的活性较强;蛋白酶有 14 株,分别是 L4, L8, L9, L14, L16, L19, L26, L30, L33, L36, L37, L38, L45, L49, 其中 L8, L9, L14, L16, L19, L26, L30, L36, L37, L38, L49 这 11 株的活性较弱,2 株 L4, L33 活性强;脂肪酶有 10 株,分别是 L4, L9, L14, L16, L19, L26, L30, L33, L36, L45, 其中 L26 和 L36 这 2 株的活性较弱, L14 活性强, L45 活性较强.

3 讨论

从酶活筛选试验中可以看出,云南野生动物园的这 4 种酶活有的比较多,而昆明圆通山动物园的比较少,说明生存环境及饲养方式与动物肠道微生物的功能存在一定关系. 另外,通过本试验还可以发现,采自于不同动物园的两个样品细菌、放线菌类群组成不同,推测可能是由于饲养条件不一样导致的,此外,不同饮食和生存环境下的动物肠道微生物的酶活(即功能)也存在一定差异.

目前,国内外研究动物肠道细菌和放线菌的工作主要是以免培养居多,纯培养研究却很少,尚有很多动物肠道细菌和放线菌未能培养出,且肠道微生物的筛选和培养仍然存在技术上的一些问题. 因此探索出对动物肠道细菌和放线菌最优的分离方法,对进一步认识和利用动物肠道细菌将是有益的,也是对动物肠道细菌开发药物和活性天然物质产物的重要新来源的尝试. 本研究获得的酶活阳性菌株也说明了动物肠道微生物是一类具有应用开发价值的微生物资源,也为我们认识绿孔雀肠道微生物的种类和功能提供了更多参考数据.

(下转第 94 页)

1)改善水体质量. 利用水生植物改善水体质量,水生植物可去除水体中氮、磷等营养物质,向水体中释放化感物质以抑制浮游藻类生长,为微生物和浮游动物提供附着基质和栖息场所<sup>[15]</sup>. 此外,可采取多种措施,进一步改善水体质量.

2)培植相关植物. 浮叶和漂浮植物如凤眼莲、浮萍耐污能力较好,它们不仅可用来净化富营养化废水,还可遏制底泥营养盐向水体的释放.

3)保持鱼类生物多样性. 对于鱼类的养殖方式,应保持合适的放养密度,多种鱼类混合放养,确保鱼类生物多样性.

#### [参考文献]

- [1] 韩晓余. 韩长赋谈水产养殖和保护水域生态环境:“十三五”期间沿海减少 2 万艘渔船[EB/OL]. [2017-03-25]. [http://news.cnr.cn/zl2017/2017h/lhzb/nyb/zbkx/20170307/t20170307\\_523641949.shtml](http://news.cnr.cn/zl2017/2017h/lhzb/nyb/zbkx/20170307/t20170307_523641949.shtml).
- [2] 张文良. 工程周期注重生态、梯级水电绿色开发:三峡集团近 75 亿元投向环保[EB/OL]. [2017-03-25]. <http://news.gscn.com.cn/system/2017/03/02/011623360.shtml>.
- [3] 太湖管理委员会办公室. 江苏太湖小型鱼类资源生态调控研究取得重要进展[EB/OL]. [2017-03-25]. [http://www.shuichan.cc/news\\_view-309523.html](http://www.shuichan.cc/news_view-309523.html).
- [4] 史赞荣. 长江口鱼类群落多样性及基于多元排序方法群落动态的研究[D]. 上海:上海海洋大学,2012.
- [5] 邹淑珍. 赣江中游大型水利工程对鱼类及其生态环境的影响研究[D]. 南昌:南昌大学,2011.
- [6] 管伟,徐兆礼,陈佳杰. 福建南日岛南部水域鱼类群落结构及多样性[J]. 生态学报,2017(9):1-10.
- [7] 360 百科. 肥满度[EB/OL]. [2017-03-25]. <http://baike.so.com/doc/2262435-2393565.html>.
- [8] 司守奎. 数学建模算法与应用[M]. 2 版. 北京:国防工业出版社,2011.
- [9] 吴礼斌. 经济数学实验与建模[M]. 2 版. 北京:国防工业出版社,2013.
- [10] 邓聚龙. 灰色理论基础[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2002.
- [11] 360 百科. 灰色系统[EB/OL]. [2017-03-25]. <http://baike.so.com/doc/6775047-6990374.html>.
- [12] 姚俊英,朱红蕊,南极月,等. 基于灰色理论的黑龙省暴雨洪涝特征[J]. 灾害学,2012,27(1):59-63.
- [13] 360 百科. 鲫鱼[EB/OL]. [2017-03-25]. <http://baike.so.com/doc/1089392-1152762.html>.
- [14] 袁杰,曹玉萍,谢松. 衡水湖鲫鱼的生态学特性[J]. 河北大学学报,2004,24(3):294-298.
- [15] 陈斌. 杭州西溪国家湿地公园水质改善的生态措施[J]. 杭州科技,2008(6):63-64.

(上接第 78 页)

#### [参考文献]

- [1] 周美娟. 人体组织学与解剖学[M]. 北京:高等教育出版社,1999:6.
- [2] 罗克. 家禽解剖学与组织学[M]. 福州:福建科学技术出版社,1983:26-28.
- [3] 曹艳茹. 动物粪便放线菌多样性及生物活性研究[D]. 陕西:西北农林科技大学,2012.
- [4] ROOKS M G, GARRETT W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16:341-352.
- [5] ZHERNAKOVA A, KURILSHIKOV A, BONDER M J, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity [J]. Science, 2016, 352:565-569.
- [6] LEY R E, HAMADY M, LOZUPONE C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. Science, 2008, 320:1647-1651.
- [7] 田新朋,张偲,李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. 微生物学报,2011,51(2):161-169.
- [8] ZHU L, WU Q, DAI J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(43):17714-17719.
- [9] KALTENPOTH M, WINTER S A, KLEIHSMER A. Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs[J]. Federation of European Microbiological Societies Microbial Ecology, 2009, 69:373-383.
- [10] ANDERSON R C, RASMUSSEN M A, JENSEN N S, et al. *Denitrobacterium detoxificans* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium that respire on nitro-compounds[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50:633-638.
- [11] 贾文文. 南大西洋深海放线菌的分离与多样性分析[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2013.
- [12] 黄路枝,胡兆农,郭正彦,等. 土壤稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性研究[J]. 农药学报,2007,9(1):59-65.
- [13] 曾庆飞. 根结线虫拮抗放线菌的筛选及菌株 HA10002 和 DA09202 活性物质的研究[D]. 海口:海南大学,2011.
- [14] 刘小凤,罗勇,傅俊英. DNA 测序技术的专利计量研究[J]. 现代生物医学进展,2010,10(6):1173-1181.