

# 白蚁肠道优势厌氧菌的分离与培养

## Isolation and Culture of Dominant Anaerobes from Termite Intestine

杨英杰<sup>1,2,\$,\*</sup>, 马小清<sup>2</sup>, 李福利<sup>2</sup>, 倪金凤<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 微生物技术研究院, 山东大学, 青岛市, 山东省; <sup>2</sup> 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛市, 山东省; <sup>\$</sup>现工作单位: 烟草研究所, 中国农业科学院, 青岛市, 山东省

\*通讯作者邮箱: [jinfgni@sdu.edu.cn](mailto:jinfgni@sdu.edu.cn); [yjyang@sdu.edu.cn](mailto:yjyang@sdu.edu.cn)

**摘要:** 宏基因组等高通量测序方法为我们研究人体、动物、植物的生存环境或者体内的微生物组成提供了一个高效便捷的方法, 也是理解健康和生病个体内微生物区系变化的一个手段。但是如果分离不到单个微生物, 我们就无法通过实验来验证具体的单个微生物在其中的作用, 也无法人工构建这样的微生物群落。为解决这样的问题, 提出了培养组学的概念。直径只有几百微米的白蚁肠道中心部位是一个严格厌氧环境, 厌氧微生物占据优势。为了解其中的厌氧微生物在木质纤维素消化中的功能, 在抗生素选择条件下我们成功地分离了其中的优势菌 *Dysgonomonas* 新菌种。本文主要介绍白蚁肠道厌氧菌的分离培养方法, 为白蚁肠道厌氧菌及其它厌氧环境中细菌的分离培养提供借鉴与参考。

**关键词:** 白蚁肠道, 优势菌群, 厌氧微生物, 抗生素, 分离培养

**研究背景:** 宏基因组学和功能基因的高通量测序彻底改变了人类对各类生态环境中微生物的组成和功能的认识和理解, 特别是对人类和动物肠道微生物菌群、植物根际微生物菌群在宿主与微生物的共生寄主关系以及健康和疾病之间关系的认识和理解, 在此过程中产生了无数未知微生物的序列信息 (Gould 等, 2018; Schretter 等, 2018; Marynowska 等, 2020)。在这样的时代背景下, 许多研究者认为已经过时的微生物纯培养技术又得到了重生。相对于对自然环境中的各种各样的微生物群落的基因组进行研究的微生物组概念, 为获取这些复杂环境中的单个微生物的过程相应地产生了一个培养组学 (culturomics) 的概念。只有获得群落中的单个微生物之后, 才能理解这些微生物的生物学特征和其在群落中的功能, 单个微生物的分离培养对于阐明这些微生物在复杂环境中的作用仍然至关重要。比如, 它们能够利用什么营养? 它们会产生哪些代谢物?

它们在环境中如何与其他微生物相互作用？这些未知的微生物可能具有有用的酶、新的抗菌素和其它的新物质。白蚁是以木质纤维素为主食的昆虫，肠道微生物也在纤维素降解过程中发挥重要的作用 (Tokuda 等, 2018; Marynowska 等, 2020)。通过微电极检测发现直径只有几百微米的肠道，其内容物的氧化还原电位很低，不同于果蝇等昆虫 (Douglas, 2018)，是一个严格厌氧的环境。

从广义上讲，专性厌氧菌 (obligate anaerobes) 可以定义为不能利用氧分子生长的微生物。根据他们与氧气的关系，可进一步分类，如耐氧的厌氧菌 (Aerotolerant anaerobe)、中度厌氧菌 (Moderate anaerobe) 和严格厌氧菌 (Strict anaerobe) 等。耐氧的厌氧菌不能够利用氧气作为末端电子受体，但是对氧气不敏感，部分菌种可在一定时间内耐受空气中的氧气 (耐受时间长短因物种而已)。中度厌氧菌暴露在室温空气中 60~90 min 后再回接到厌氧状态下，其生存率不会损失太多，比如脆弱拟杆菌等 (Loesche, 1969)。严格厌氧菌对氧气非常敏感，环境中的溶解氧高于 5  $\mu$ M 时就会影响它们的生长 (Engelkirk 等, 1992)。短时间内暴露在低浓度的氧气中就会死亡或者停止生长，它们一般含有一套不同于好氧微生物的氧化还原系统。因此，在处理这些微生物的所有步骤中保持缺氧状态非常重要。为了维持严格厌氧菌的生长，要保证培养基的氧化还原电位低于 -330 mV，这可以通过添加还原剂实现。大多数厌氧微生物是很苛刻的，需要复杂的添加物才能生长。结合 16S 高通量测序也发现白蚁肠道内厌氧微生物占据优势。我们团队前期从白蚁肠道中分离了一些厌氧细菌 (Yang 等, 2014)，结合当前兴起的人类肠道培养组学的发展，就白蚁肠道厌氧菌的分离培养方法和注意事项介绍如下。

## 材料与试剂

1. 一次性医用无菌注射器 (1 ml、5 ml、10 ml)
2. 刃天青 (生工生物工程有限公司, catalog number: A606726 )
3. L-胱氨酸 (生工生物工程有限公司, catalog number: A610088)
4. 半胱氨酸盐酸盐 (生工生物工程有限公司, catalog number: A506578)
5. 维生素 K1 (生工生物工程有限公司, catalog number: A606528)
6. 氯化血红素 (生工生物工程有限公司, catalog number: A602521)
7. 诺氟沙星 (生工生物工程有限公司, catalog number: A506250)
8. L-色氨酸 (生工生物工程有限公司, catalog number: A601911)

9. L-精氨酸 (生工生物工程有限公司, catalog number: A600205)
10. 琼脂 (生工生物工程有限公司, catalog number: A505255)
11. 胰酶解蛋白胨 (Oxoid, England, catalog number: LP0042)
12. 酵母粉 (Oxoid, England, catalog number: LP0021)
13. 蛋白胨 (北京奥博星生物技术有限责任公司, catalog number: 01-001)
14. 大豆蛋白胨 (青岛海博生物技术有限公司, catalog number: HB8275)
15. 牛肉浸粉 (青岛海博生物技术有限公司, catalog number: HB8272)
16. 肝浸粉 (青岛海博生物技术有限公司, catalog number: HB8289)
17. 无机盐 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ , 磷酸钠, 连二亚硫酸钠(俗称保险粉)及葡萄糖, 可溶性淀粉皆购自国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
18. 维生素 (生物素、叶酸、吡哆醇盐酸、硫胺素盐酸、核黄素、烟酸、泛酸钙、维生素 B12、对氨基苯甲酸、硫辛酸) (皆购自国药集团化学试剂有限公司, 中国, 生化试剂)
19. 16S rRNA 通用引物:  
16S-27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 16S-1492R  
(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 合成于北京擎科生物科技有限公司
20. 预还原缓冲液 (0.1 M PBS 缓冲液) (见溶液配方)
21. GAM 培养基 (见溶液配方)
22. MM14 培养基 (见溶液配方)
23. 100 倍微生素溶液 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 厌氧工作站 (COY Laboratory Products, INC, United States, model: AC09-086)
2. 厌氧袋 (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC, model: C-43)
3. 厌氧罐 (OXOID LTD WADE ROAD, ENGLAND 品牌 THERMO OXOID, model: AG0025A)
4. 厌氧管、丁基胶塞、铝盖、铝盖封口钳子、螺旋口厌氧培养瓶 (50 ml、100 ml、250 ml) 等
5. 超净工作台

- 89 6. 高压灭菌锅
- 90 7. 恒温培养箱
- 91 8. 200 °C 烘箱
- 92 9. 磁力搅拌器及其转子
- 93 10. 分析天平
- 94 11. 有机玻璃面罩
- 95 12. 气瓶 (德海伟业科技公司, 青岛)
- 96 13. PCR 仪 (伯乐, 北京)

97

## 98 软件和数据库

- 99 1. 利用细菌 16S 序列进行菌种鉴定网站
- 100 <https://www.ezbiocloud.net/identify/>
- 101 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 102 2. Lasergene 等 DNA 序列分析软件
- 103 3. 各国菌种保藏中心网址 (可参考各种培养基的配制方法, 并且每种微生物都有其对
- 104 应的培养基)
- 105 1) 德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) Leibniz Institute DSMZ-German
- 106 Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>)
- 107 2) 日本菌种保藏中心 (JCM) Japan Collection of Microorganisms
- 108 (<https://jcm.brc.riken.jp/en/>)
- 109 3) 韩国菌种保藏中心 (KCTC) Korean collection for type cultures
- 110 (<https://kctc.kribb.re.kr/En/Kctc>)
- 111 4) BacDive 的数据库, 其中罗列了来自 34 个细菌门和 3 个古细菌门的超过
- 112 80,000 株培养菌株的特性和培养条件, 包括约 90%的模式菌株 ([https://b](https://bacdiv.dsmz.de/)
- 113 [acdiv.dsmz.de/](https://bacdiv.dsmz.de/))
- 114 5) 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) China General Microbiologic
- 115 al Culture Collection Center (<http://www.cgmcc.net/>)
- 116 6) 美国典型菌种保藏中心 (ATCC) American Type Culture Collection, 可通过
- 117 国内北纳生物等代理公司购买。

## 118 实验步骤

## 一、厌氧培养基和预还原溶液的配制

1. 预还原缓冲液的配制：按照常规方法室温配制好 0.1 M 磷酸缓冲液后，煮沸驱氧 10 min，冷却后加入刃天青指示剂 (1 mg/L)，在厌氧工作站内搅拌可由蓝色变至粉红色，表明溶液内含氧量已经比较少了，之后经过高温蒸汽灭菌，厌氧瓶内气体膨胀致使残留的氧气排出，最终溶液变为无色。在使用前如果变为粉红色，可滴加保险粉溶液 (1 g/L) 至无色。
2. 用 60  $\mu$ l 冰醋酸溶解 5 mg 维生素 K1，现用现配。维生素 K1 是黄色透明粘稠的液体，在水中不溶。大多数厌氧微生物是非常脆弱的，需要许多成分复杂的添加物作为生长的培养基，像维生素 B12 也经常添加。在不确定的情况下，都要添加微生物复合物。参照溶液配方中的 100 倍微生物溶液，厌氧过滤除菌存于 4 °C 冰箱的厌氧瓶内，在培养基使用前加入维生素。
3. 血红素溶解在 0.1 M 碳酸钠水溶液中制成 2 mg/ml 的 200 倍储存液 50 ml，过滤后存于 4 °C 冰箱，在培养基使用前加入。培养肠道等动物来源的厌氧微生物经常见到其他培养基成分灭菌后添加 5% 的无菌动物血，因为厌氧微生物营养需求复杂，需在培养基使用前加入。
4. 厌氧培养基中的还原剂成分跟氮源、无机盐等其他成分混合溶解后在厌氧工作站内磁力搅拌除氧，同时将主要碳源和氮源粉末称量后放在干净的烧杯一起放入厌氧工作站内。除氧过程需要持续几个小时甚至过夜使氧化还原指示剂刃天青由粉红色变为无色。两者分开的目的是避免在厌氧工作站内长时间除氧过程中杂菌的繁殖生长。粉末和水先分开，除氧后再混到一起。分装至 Hungate 厌氧管或者厌氧瓶，分装量不超过总容积的三分之一，以防灭菌时破裂。
5. 保险粉溶液的配制：首先，用煮沸 10 min 的水溶解保险粉制成 1 g/L 溶液。其次，在超净工作台内利用一次性无菌滤器过滤于无菌试管内，再利用一次性无菌注射器针头分装于充满无氧气体（如氮气、氮气/二氧化碳混合气等）的无菌厌氧瓶。注意在注射时先利用溶液将针头和注射器顶部内空气排出。另外，为避免针头和塞子表面染菌在超净台内转移两个厌氧管内液体时也要注意两个厌氧瓶内的气体压力差，注射液体后回吸同样体积的气体到取样瓶中。可以用保险粉来降低氧化还原电位。新制备的保险粉储备溶液在黑暗、室温下只能储存 2~3 周，最好现配现用。如



果培养基在使用前发现变色，可以添加保险粉溶液至无色。对培养厌氧要求非常苛刻的菌也可以添加保险粉溶液。

## 二、固体厌氧平板和固体厌氧管的准备

1. 装有固体培养基的厌氧瓶高压蒸汽灭菌后，将一次性无菌培养皿和冷却到 60 °C 左右的无菌厌氧培养基放入消毒过的厌氧工作站内。倒入平板的培养基厚度达到平板厚度的二分之一，立即盖上平板盖子，冷却后倒置于厌氧工作站内，放置两三天。目的是除去冷凝水、验证没有杂菌污染，同时保证刃天青不变红。
2. 装有固体培养基的厌氧管高压蒸汽灭菌后，不必再放入厌氧工作站内。冷却至 60 °C 后，置于加入自来水（室温）的容器中，缓慢旋转，待固体培养基在厌氧管内壁凝固形成一薄层。一般用厌氧管体积的 1/5~1/4 比较合适。

## 三、样品的准备和分离培养

1. 白蚁肠道在超净工作台内，解剖镜下操作取出后立即放入装有适宜体积预还原磷酸缓冲液的厌氧瓶内，盖上丁基胶塞。许多种类的白蚁在离开野外环境后，在短时间内会死亡，首先选取健康的白蚁是关键的一步。另外白蚁肠道直径仅有几百微米，由肠道的外围向中心点氧化还原电位逐渐降低。当肠道取出后如果不立即放入还原液中，对于极端厌氧微生物来说，在空气中暴露就会被抑制或者死亡。
2. 血清瓶或者厌氧瓶中富集培养是尽可能多地获取宏基因组测序数据中未知序列对应的微生物的手段之一。除了需要营养成分丰富的培养基和刃天青指示的氧气造成的氧化还原电位之外，无氧气体的成分比例也影响分离到的微生物种类和数量。许多厌氧细菌的生长需要 CO<sub>2</sub>。对于肠道优势菌的分离培养可以省去此步富集培养步骤。
3. 在超净工作台内利用无菌注射器针头缓慢吹打方式弄破肠道，梯度稀释于无菌厌氧的磷酸缓冲液厌氧管内。
4. 将稀释液，厌氧罐或者厌氧袋移到厌氧工作站内，取 50~100 μl 涂布于步骤二中准备的厌氧固体平板。稀释液挥发掉后，放入厌氧罐或者厌氧袋。也可以利用无菌厌氧注射器针头直接将稀释液接种到步骤二中准备的厌氧固体滚管中，通过转动让接

种液在固体培养基表面均匀分布，随后将试管垂直放置于试管架上，避免冷凝水浸过固体培养基表面。

5. 将装有平板的厌氧罐或者厌氧袋放入培养箱，设定特定温度后静置培养。装入厌氧袋比较容易观察平板上的菌落大小。

6. 等到菌落大小合适后，再放入厌氧工作站进行菌落转接。

## 结果与分析

按照上述实验步骤，配制 GAM 培养基，白蚁肠道稀释液梯度稀释涂布于厌氧平板，经过三天 28 °C 培养，生长出直径 1 毫米左右，形状色泽单一的菌落。挑取十余个菌落，进行菌落 16S rRNA PCR 扩增测序。利用 16S 通用引物 16S-27F 和 16S-1492R 测序组装成近似全长的 16S rRNA。利用 EzBioCloud 网站鉴定为乳球菌属。但是该属细菌序列并没有出现在 16S 高通量测序中。这说明了高通量测序的数据有一定的局限，正说明了肠道微生物区系的复杂性。类似的白蚁肠道细菌分离工作也验证了我们的初期分离结果是没有问题的，从白蚁肠道中分离鉴定了许多乳球菌新种 (Noda 等, 2018; Yuki 等, 2018; Noda 等, 2020)。

为了分离到优势菌群，我们通过添加抗生素的方式，改变培养条件来抑制非选择性培养基中出现的优势菌落。在添加诺氟沙星抗生素 (40 mg/L，在配制培养基的过程中添加，可耐高温灭菌) 的情况下，分离到了第二位优势菌群 *Dysgonomonas* spp.(Yang 等, 2014)。首先,利用 16S rRNA 对该菌进行了初步鉴定，16S rRNA 基因的序列相似性最高的两个模式菌株 *Dysgonomonas capnocytophagoides* JCM 16697<sup>T</sup> 和 *Dysgonomonas gadei* CCUG 42882<sup>T</sup>，相似度分别是 94.6%和 90.9%，都小于不同菌种间 97%的相似度。在发表该菌的分类学论文之时，该属包括已发表获得认可的五个模式菌种，其中 4 种是从人类临床标本中分离出来的，最后一种来自微生物燃料电池。之后，我们按照细菌分类学杂志 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 细菌分类学鉴定的一般流程，购买了相关的模式菌株 *D. capnocytophagoides* JCM 16697<sup>T</sup>，进行了细胞脂肪酸成分分析、发酵葡萄糖产酸成分分析等一系列试验。

为了探讨该菌在培菌白蚁肠道微生物群中的作用，我们重点对该细菌菌株的碳源代谢能力进行了分析。除了利用各种梅里埃公司 API 试剂条来检测各种酶活之外，我们还

配制各种碳源基础培养基来检测该菌的碳源利用试验。这对于了解该菌在白蚁肠道中协助降解木质纤维素提供了参考。为了研究单一碳源的同化作用，在含有改良 1/10 PYGV 培养基、0.5 g/L 胰蛋白胨和 10 mmol/L HEPES (pH 7.3) 基础蛋白胨 (BP) 培养基中检测发酵生长。每种添加碳源的浓度为 0.5% (w/v)。以未接种无外加碳源的培养基为阴性对照，添加葡萄糖的培养基接种菌株为阳性对照。通过测量 OD<sub>600</sub> 和添加的刃天青变色情况来监测生长情况。以下底物被用作唯一碳源：葡萄糖、甘露糖、N-乙酰基-b-氨基葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、纤维二糖、麦芽糖、乳糖、D-甘露糖、D-核糖、L-鼠李糖、果糖、蜜糖、盐生素、蛋氨酸、L-半胱氨酸、酵母提取物、桦木木聚糖、山毛榉木聚糖和淀粉。以下底物不作为唯一碳源使用：海藻糖、蔗糖、山梨糖、棉子糖、D-山梨醇、D-甘露醇、肌醇、甘氨酸、精氨酸、天冬酰胺、亮氨酸、赖氨酸、组氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、甲醇、乙醇、2-丙醇、甲酸、乙酸盐、柠檬酸、葡萄糖酸、癸酸、己二酸、苹果酸，苯乙酸、蛋白胨 (Sango Biotech)、胰蛋白胨、燕麦木聚糖、CMC 纤维素和结晶纤维素。

## 失败经验

根据前期 16S V3-V4 区域的高通量测序结果，我们的分离目标是占据 70% 测序读数的菌属细菌 *Alistipes* spp.。通过查阅文献和白蚁肠道内部环境，我们发现可能是由于前期样品的厌氧处理技术不过关，造成了极端严格厌氧菌，也就是第一位优势菌的大量死亡。尤其是对于不能人工饲养的昆虫，要分离健康的或者自然环境下昆虫的肠道内厌氧细菌，取样就显得很关键。

根据对 O<sub>2</sub> 的耐受程度，可将厌氧菌分为三大类：对氧极端敏感的厌氧菌，对厌氧条件要求很高，在空气中暴露就会被抑制或者死亡，临床上很难分离出。中度厌氧菌，比如脆弱拟杆菌、产气荚膜梭菌等临床分离常见的厌氧菌。它们在空气中暴露 60~90 min 或在脓汁抽出 72 h 后仍然能分离出来。耐氧厌氧菌不能利用氧，在无氧条件下生长好，而在有氧条件下生长不佳 (Loesche, 1969)。

## 注意事项

- 厌氧管：**合适的预还原培养基容器是培养厌氧菌成功的重要前提。至关重要的是橡胶塞的材料。只有丁基橡胶可以有效地防止空气渗入小瓶。然而，多次使用注射针



头插入可以使它们变得透氧。通常情况下，塞子越厚，使用频率越高可以在不丧失抗渗性的情况下重复使用。有两种类型的厌氧管 **Hungate** 型管由丁基橡胶隔膜塞子和顶端开口的螺帽封闭而成，开口可以让注射针刺穿隔膜塞子。**Balch** 型管比 **Hungate** 型管更稳定，可在管内压超过 2 到 3 bar 的情况下使用。它们用厚丁基橡胶塞塞紧，该塞子再用一次性铝盖压封。需要密封和拆卸铝制压接的专用钳子。预还原的培养基在以上两种管内，室温下放在暗处几个星期也不会氧化。但是有些产气的厌氧菌，液体培养基只能装三分之一以下，并且每天都要放气，操作时要带防护面罩，以防瓶子爆裂。

2. **氧化还原指示剂染料**：通常要加在培养厌氧菌的培养基中，以监测氧化还原电位。最常用的氧化还原指示剂是刃天青 (**resazurin**)，因为它通常对微生物无毒，并且在 0.5 到 1 mg/L 的极低浓度下有效。该指示剂染料呈暗蓝色，呈非活性形式，在 pH 值接近中性时呈粉红色 (颜色可能碱性条件下改为蓝色)。在约 -110 mV 的氧化还原电位下，变得完全无色，在高于 -51 mV 的氧化还原电位下恢复为粉红色。但是，有些生物体需要低于 -110 mV 的氧化还原电位，因此即使培养基是无色的，也可能无法开始生长。另一方面，粉红色的媒介并不意味着它被氧气氧化。例如，某些硝酸盐还原菌在生长过程中会产生亚硝酸盐，作为强氧化剂，因此可能会将氧化还原电位提高到 -51 mV 以上。

3. **还原剂**：添加到大多数厌氧培养基中，以降低和平衡氧化还原电位在最佳水平。最常见的还原剂是巯基乙醇酸钠、L-半胱氨酸盐酸水合物、**Na<sub>2</sub>S**、**FeS**、二硫苏糖醇和连二亚硫酸钠 (俗称保险粉)。巯基乙醇酸钠通常与抗坏血酸结合使用。巯基乙酸盐还原剂的优点是在室温下相对稳定，因此可以预先加入培养基中。它只有在 100 °C 以上加热才能激活，然后有效地去除氧气。因此，在配药之前，不必太注意避免氧气混入中。然而，硫乙醇酸盐的标准氧化还原电位 (约 -100 mV) 单独使用通常不足以引发大多数严格厌氧菌的生长需要的低氧化还原电位。除巯基乙酸盐以外的还原剂，应在氮气环境下制备储备溶液。在制备还原剂原液时，避免将气体套管插入液体中，因为这会对还原能力产生负面影响。

4. **抗生素和抑制剂**：添加大肠杆菌素 (50~100 µg/ml) 或卡那霉素 (10 µg/ml) 可抑制革兰氏阴性菌的生长，万古霉素 (10~50 µg/ml) 可抑制革兰氏阳性菌的生长。

对临床微生物学中多种常用的抑制剂，如胆汁提取物、伊红，亚甲蓝、柠檬酸钠、硫代硫酸钠。

5. **富集培养基**：一般情况下，厌氧细菌需要营养丰富的成分。在利用血清瓶或者厌氧瓶富集培养时，除了微量元素和维生素之外，要加入动物血成分，肠道粪便提取液，瘤胃提取液等。

## 溶液配方

1. 预还原缓冲液 (0.1 M PBS 缓冲液)

氯化钠 8.5 g

十二水合磷酸钠 57.0 g

去离子水 1,000 ml, pH 7

2. **GAM 培养基**

蛋白胨 5.0 g

大豆蛋白胨 3.0 g

胰酶解蛋白胨 5.0 g

血清粉 10.0 g

酵母粉 2.5 g

牛肉浸粉 2.2 g

肝浸粉 1.2 g

葡萄糖 0.5 g

可溶性淀粉 5.0 g

L-半胱氨酸盐酸盐 0.3 g

巯基乙酸钠 0.3 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g

NaCl 3.0 g

L-色氨酸 0.2 g

L-精氨酸 1.0 g

维生素 K1 5 mg

氯化血红素 10 mg

- 290 刃天青 1 mg
- 291 琼脂 15.0 g
- 292 去离子水 1,000 ml
- 293 3. MM14 培养基
- 294 根据 Medium 14 而来, 日本菌种保藏中心 Japan Collection of Microorganisms
- 295 (<https://jcm.brc.riken.jp/en/>)
- 296 牛肉浸粉 2.4 g
- 297 胰酶解蛋白胨 10.0 g
- 298 酵母粉 5.0 g
- 299  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.0 g
- 300 葡萄糖 1.5 g
- 301 可溶性淀粉 0.5 g
- 302 L-胱氨酸 0.2 g
- 303 琼脂 15.0 g
- 304 L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g
- 305 消化血清粉 5.0 g
- 306 氯化血红素 5 mg
- 307 刃天青 1 mg
- 308 去离子水 950 ml
- 309 血红素事先溶解在 0.1 M 碳酸钠水溶液中制成 2 mg/ml 储存液, 过滤后存于 4 °C
- 310 冰箱。将胱氨酸溶解到 50 ml 1 N 的盐酸溶液中, 调整 pH 值到 7.6~7.8, 补足溶液
- 311 到 1,000 ml。高压蒸汽灭菌 (121 °C, 15 min) 冷却到 50 °C 后倒无菌平板或者分
- 312 装到无菌管。
- 313 4. 100 倍微生素溶液
- 314 *注: 过滤除菌于无氧气体的厌氧瓶, 4 °C 冰箱保存, 无菌注射器抽取。*
- 315 生物素 2.0 mg
- 316 叶酸 2.0 mg
- 317 吡哆醇盐酸盐 10.0 mg
- 318 硫胺素盐酸盐 5.0 mg

核黄素 5.0 mg  
烟酸 5.0 mg  
泛酸钙 5.0 mg  
维生素 B12 0.1 mg  
对氨基苯甲酸 5.0 mg  
硫辛酸 5.0 mg  
去离子水 1,000 ml

## 致谢

本项目得到国家重点基础研究发展计划 (973 计划, No.2011CB707402), 国家自然科学基金 (Nos.31272370, 30870085), 中国科学院生物燃料重点实验室开放课题 (CASKLB201305)的资助。我们非常感谢农业农村部沼气科学研究所 (成都市) 马诗淳副研究员在成稿过程中对文稿的审阅和修改意见。依据本方法我们从白蚁肠道中分离到了优势菌, 并定义为一个新种发表于细菌分类学杂志 *IJSEM* 64(Pt 9): 2956-2961. (*Dysgonomonas macrotermitis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite)。

## 参考文献

1. Douglas, A. E. (2018). [The \*Drosophila\* model for microbiome research](#). *Lab Anim (NY)* 47(6): 157-164.
2. Engelkirk, P. G., Duben-Engelkirk, J. and Dowell, V. R. (1992). Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology (Star Publishing Company, Belmont, California).
3. Gould, A. L., Zhang, V., Lamberti, L., Jones, E. W., Obadia, B., Korasidis, N., Gavryushkin, A., Carlson, J. M., Beerenwinkel, N. and Ludington, W. B. (2018). [Microbiome interactions shape host fitness](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(51): E11951-E11960.
4. Lagier, J. C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J. M., Fournier, P. E. and Raoult, D. (2018). [Culturing the human microbiota and culturomics](#). *Nat Rev Microbiol* 16: 540-550.
5. Loesche, W. J. (1969). [Oxygen Sensitivity of Various Anaerobic Bacteria](#). *Appl Microbiol* 18(5): 723-727.
6. Marynowska, M., Goux, X., Sillam-Dusses, D., Rouland-Lefevre, C., Halder, R., Wilmes, P., Gawron, P., Roisin, Y., Delfosse, P. and Calusinska, M. (2020). [Compositional and functional](#)

- characterisation of biomass-degrading microbial communities in guts of plant fibre- and soil-feeding higher termites. *Microbiome* 8(1): 96.
7. Noda, S., Koyama, F., Aihara, C., Ikeyama, N., Yuki, M., Ohkuma, M. and Sakamoto, M. (2020). *Lactococcus insecticola* sp. nov. and *Lactococcus hodotermopsidis* sp. nov., isolated from the gut of the wood-feeding lower termite *Hodotermopsis sjostedti*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(8): 4515-4522.
8. Noda, S., Sakamoto, M., Aihara, C., Yuki, M., Katsuhara, M. and Ohkuma, M. (2018). *Lactococcus termiticola* sp. nov., isolated from the gut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 68(12): 3832-3836.
9. Schretter, C. E., Vielmetter, J., Bartos, I., Marka, Z., Marka, S., Argade, S. and Mazmanian, S. K. (2018). A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature* 563(7731): 402-406.
10. Tokuda, G., Mikaelyan, A., Fukui, C., Matsuura, Y., Watanabe, H., Fujishima, M. and Brune, A. (2018). Fiber-associated spirochetes are major agents of hemicellulose degradation in the hindgut of wood-feeding higher termites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(51): E11996-E12004.
11. Yang, Y. J., Zhang, N., Ji, S. Q., Lan, X., Zhang, K. D., Shen, Y. L., Li, F. L. and Ni, J. F. (2014). *Dysgonomonas macrotermitis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 9): 2956-2961.
12. Yuki, M., Sakamoto, M., Nishimura, Y. and Ohkuma, M. (2018). *Lactococcus reticulitermitis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 68(2): 596-601.