

健康朱鹮消化道正常菌群的分离与鉴定

史怀平,杨增岐,操 胜

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】了解健康朱鹮消化道正常菌群,为进一步研制适用于朱鹮的微生态制剂奠定基础。【方法】无菌采集健康朱鹮的新鲜粪便,分离、培养、鉴定其细菌。以小白鼠和小鸡为试验动物,对分离、鉴定出的细菌进行毒性试验,确定分离的细菌对动物是否有致病性。【结果】从朱鹮粪便中分离得到 22 株细菌,分别为蜡状芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、泛酸芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、最小双歧杆菌、口乳杆菌、短乳杆菌、面包乳杆菌、马乳杆菌、瑞士乳杆菌、嗜酸乳杆菌、丙酸丙酸杆菌、粪肠球菌、类肠膜明串球菌、少酸链球菌、肠膜链球菌、乳链球菌、克雷伯菌属、柠檬酸菌属、变形菌属和粪拟杆菌。其中,环状芽孢杆菌和泛酸芽孢杆菌可致小白鼠和小鸡死亡;短乳杆菌可致小白鼠死亡,但对小鸡无致病性;其他菌株对小白鼠和小鸡无致病性。【结论】分离鉴定出的朱鹮消化道 22 株细菌,其中适合制作微生态制剂的细菌有两歧双歧杆菌、最小双歧杆菌、口乳杆菌、面包乳杆菌、马乳杆菌和嗜酸乳杆菌。

【关键词】 朱鹮;消化道;正常菌群;分离鉴定
【中图分类号】 S858.99 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)03-0069-06

Isolation and Identification of normal flora in healthy
Nipponia Nippon enteron

SHI Huai-ping, YANG Zeng-qi, CAO Sheng

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 71200, China)

Abstract: 【Objective】 The research was to know normal flora in healthy *Nipponia Nippon* enteron in order to provide basis for ibis' microecologic preparation. 【Method】 Bacteria of fresh feces of *Nipponia Nippon* were cultured. According to different colonies from the solid culture mediums, they were isolated, purified and confirmed through microscopic observation and then identified tests were carried out. After that challenged tests were taken to detect germs' pathogenicity in animals. 【Result】 30 strains of bacteria firstly were isolated. Finally, 22 strains of bacteria were identified by biochemistry tests. They were *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. pantothenicus*, *B. bifidum*, *B. mininmum*, *L. oris*, *L. brevis*, *L. panis*, *L. mali*, *L. helvericus*, *L. acidophicus*, *P. acidpropionici*, *E. faecalis*, *L. paramesenteroides*, *S. acidominimus*, *S. intestinalis*, *lactococcus*, *klebsiella*, *citrobater*, *proteus* and *B. caccae*. The results of challeged test to all i-solated strains showed that *B. circulans* and *B. pantothenicus* were pathogenic to animals apparently; other isolated germs had no evident pathogenic effect on animals. 【Conclusion】 22 strains of bacteria of *Nipponia Nippon* enteron were isolated and identified, of which the bacteria used to make microecologic pre-parion are *B. bifidum*, *B. mininmum*, *L. oris*, *L. panis*, *L. mali*, *L. acidophicus* and et al. And these provide very valueable materials for more research on microecologic preparation.

* [收稿日期] 2007-03-06
[基金项目] 陕西省 2003 年林业科学研究课题
[作者简介] 史怀平(1974—),男,陕西宝鸡人,讲师,主要从事动物学研究。

Keyword: *Nipponia Nippon*; enteron; normal flora; isolation and identification

朱鹮是当今世界极度濒危鸟类,属留鸟^[1],为我国一级重点保护动物^[2]。自 1981 年 5 月在陕西省秦岭南麓的洋县发现朱鹮以来,我国成为世界上唯一拥有野生朱鹮的国家,对野生朱鹮的研究、保护工作也随即展开^[3]。世界上许多专家学者在朱鹮解剖学、生理学、组织学和生活习性、饲养繁殖、遗传进化及生态环境保护等方面做了大量研究工作,并取得了阶段性成果。但是,在朱鹮的人工饲养与扩群过程中,每年因疾病死亡的朱鹮达 20 多只,成为朱鹮生栖繁衍的严重阻碍。在这些疾病中,已报道的有朱鹮新城疫^[4]、大肠杆菌病^[5]、结核病^[6]、寄生虫病^[7]、便秘^[8]等,治疗上常使用抗生素、疫苗或驱虫药。虽然,抗生素或驱虫药能很快使发病的朱鹮得到康复,但这些药物的副作用又给朱鹮的健康带来了新问题,最明显的是消化系统菌群的变化,导致更为严重的疾病发生。因此,寻找适用于朱鹮的更为理想的新型药剂显得尤为重要。研制可以调整朱鹮肠道菌群、提高其机体抗病能力而又无副作用的微生态制剂,成为人们关注的焦点。要研制适用于朱鹮的微生态制剂,首先要搞清楚朱鹮消化道正常菌群的分布,但是目前尚未见此方面的研究报道。因此,本试验对健康朱鹮消化道正常菌群进行了分离、鉴定,以期为进一步研制适用于朱鹮的微生态制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 培养基 普通培养基(普通绵羊血脱纤维板、厌氧肉肝汤、普通肉汤)、特殊培养基(LBS 培养基、BS 培养基、锰培养基)和生化试验用培养基(硝酸钾蛋白胨水、明胶培养基及各种糖培养基等),均为西北农林科技大学动物医学院禽病研究室制备。

1.1.2 试验动物 小白鼠,22~25 g,48 只,由第四军医大学动物试验中心提供。20 日龄小公鸡,48 只,由西北农林科技大学畜牧试验农场养鸡场提供。

1.2 朱鹮消化道细菌的采集

无菌采集健康朱鹮的新鲜粪便,分别接种于普通肉汤和厌氧肉肝汤试管中,于 37 ℃培养 24~48 h 后染色镜检,观察有无细菌生长。

1.3 朱鹮消化道细菌的分离

1.3.1 菌落的观察与挑纯 将上述培养物转接于固体培养基(血琼脂平板、LBS 培养基、BS 培养基),

分别进行需氧培养和厌氧培养,观察固体培养基上菌落生长的形态,对不同的菌落进行分辨、归类、计数,筛选出优势菌株。挑纯需氧菌和厌氧菌,直至分离到纯培养物。

1.3.2 芽孢的鉴定 将分离到的 G⁺ 无芽孢杆菌接种于锰培养基平板,37 ℃培养 18~24 h,染色镜检观察有无芽孢生成。

1.4 朱鹮消化道细菌的鉴定

对挑纯的菌株进行生化试验,包括 MR 与 VP 试验、接触酶试验、明胶试验、硝酸盐还原试验、吡啶试验、嗜盐性试验、柠檬酸盐利用试验和糖醇发酵试验等。根据菌落形态,镜检和生化试验结果,参考《常见细菌鉴定手册》^[9]等细菌鉴定相关资料,对分离的朱鹮消化道细菌进行鉴定。

1.5 朱鹮消化道细菌的毒力试验

取健康小白鼠 48 只,随机分为试验组和对照组,试验组 44 只,腹腔注射细菌肉汤培养物(细菌含量约 1.0×10¹⁰ cfu/mL)0.5 mL,每株菌注射 2 只小白鼠;对照组 4 只,注射等量的生理盐水,观察 7 d,记录小白鼠发病情况。

按照以上试验方法,用小鸡作相应的试验,观察分离菌株对小鸡有无致病性。

2 结果与分析

2.1 朱鹮消化道细菌种类的初步确定

根据菌落形态、芽孢鉴定试验及染色镜检结果,初步确定出 G⁺ 芽孢杆菌 4 株(编号 1~4)、G⁺ 无芽孢杆菌 9 株(编号 5~13)、G⁺ 球菌 5 株(编号 14~18)、G⁻ 杆菌 4 株(编号 19~22)。

2.2 朱鹮消化道细菌的鉴定结果

根据表 1~4 的生化试验结果,结合菌落的生长表现及染色特性综合分析可知,4 株 G⁺ 芽孢杆菌中,1 号菌株为蜡状芽孢杆菌,2 号菌株为环状芽孢杆菌,3 号菌株为凝结芽孢杆菌,4 号菌株为泛酸芽孢杆菌;9 株 G⁺ 无芽孢杆菌中,5 号菌株为两歧双歧杆菌,6 号菌株为最小双歧杆菌,7 号菌株为口乳杆菌,8 号菌株为短乳杆菌,9 号菌株为面包乳杆菌,10 号菌株为马里乳杆菌,11 号菌株为瑞士乳杆菌,12 号菌株为嗜酸乳杆菌,13 号菌株为丙酸丙酸杆菌;5 株 G⁺ 球菌中,14 号菌株为粪肠球菌,15 号菌株为类肠膜明串球菌,16 号菌株为少酸链球菌,17 号菌株为肠膜链球菌,18 号菌株为乳链球菌;4 株

G⁻ 杆菌中,19 号菌株为克雷伯菌属,20 号菌株为柠檬酸杆菌。
柠檬酸菌属,21 号菌株为变形菌属,22 号菌株为粪拟

表 1 朱鹮消化道 G⁺ 芽孢杆菌的生化试验结果

Table 1 Biochemical test results of G⁺ spore bacilli of *Nipponia Nippon* enteron

试验项目 Item	试验结果 Identified result			
	1	2	3	4
葡萄糖 Glucose	±	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	+	—	—
木糖 Xylose	+	+	—	—
甘露醇 Mannitol	—	+	±	—
明胶 Gelatin	+	—	—	—
接触酶 Catalase	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+
柠檬酸钠 Sodium citrate	+	—	—	+
需氧性试验 O ₂ test	+	+	+	+
2% Nacl 试验 2% Nacl test	+	+	+	+
5% Nacl 试验 5% Nacl test	+	+	+	+
7% Nacl 试验 7% Nacl test	+	+	+	+
10% Nacl 试验 10% Nacl test	—	—	—	—
VP 试验 VP test	—	—	—	—
丙二酸钠 Sodium malonate	—	+	—	—
pH 5.7 试验 pH 5.7 test	+	+	+	+
pH 6.8 试验 pH 6.8 test	+	+	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	—	+	+

注：—代表阴性或不生长；+代表阳性或生长；±代表弱阳性。下表同

Note: — means negtive or no growing;+ means positive or growing;± means little positive. The following tables is the same.

表 2 朱鹮消化道 G⁺ 无芽孢杆菌的生化试验结果

Table 2 Biochemical test results of G⁺ bacilli without spore of *Nipponia Nippon* enteron

试验项目 Item	试验结果 Identified results								
	5	6	7	8	9	10	11	12	13
葡萄糖 Glucose	—	±	+	±	+	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	—	—	+	—	+	—	+	+	+
果糖 Fructose	—	—	+	—	+	—	—	+	+
麦芽糖 Maltose	—	—	+	+	+	—	—	+	+
山梨醇 Sorbic alcohol	—	—	+	—	+	—	—	—	+
蔗糖 Sucrose	—	±	+	±	+	±	+	+	±
阿拉伯糖 Arabinose	—	—	+	±	+	±	—	—	—
纤维二糖 Cellobiose	—	—	—	—	—	—	—	—	+
棉籽糖 Gossypose	—	—	—	—	+	—	—	—	+
木糖 Xylose	±	—	+	—	+	+	—	—	+
鼠李糖 Rhamnose	—	—	+	—	+	—	—	—	—
乳糖 Lactose	—	—	+	—	+	—	—	+	—
甘露醇 Mannitol	—	±	+	±	±	—	—	—	+
水杨酸 Salicylic acid	—	—	—	—	±	+	—	+	+
明胶 Gelatin	—	—	—	—	—	—	—	—	—
接触酶 Catalase	—	—	+	+	+	+	+	—	—
吲哚 Indole	—	—	+	—	—	—	—	n	n
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	—	+	+	+	—	n
柠檬酸钠 Sodium citrate	—	—	—	—	+	—	+	n	n
需氧性试验 O ₂ test	+	+	+	+	+	+	+	n	n
土温 80 Tween 80	—	—	—	—	—	—	—	n	n
MR 试验 MR test	—	—	+	—	+	—	—	n	n
淀粉 Starch	—	+	—	—	—	—	—	n	n

注:n代表未测定。表 3 同。

Note: n means unidentified. Table 3 is the same.

表 3 朱鹮消化道 G⁺ 球菌的生化试验结果

Table 3 Biochemical test results of G ⁺ coccobacteria of <i>Nipponia Nippon</i> enteron					
试验项目 Item	试验结果 Identified results				
	14	15	16	17	18
葡萄糖 Glucose	+	n	+	±	+
果糖 Fructose	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	—	+	+	+	—
蔗糖 Sucrose	—	±	—	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	—	±	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	n	n	n
棉籽糖 Gossypose	—	+	—	±	±
木糖 Xylose	+	+	+	+	±
鼠李糖 Rhamnose	—	n	n	n	n
乳糖 Lactose	—	n	+	+	+
甘露糖 Mannose	+	n	+	—	+
甘露醇 Mannitol	+	n	—	+	+
山梨糖 Sorbitol	+	n	+	—	+
水杨酸 Salicylic acid	+	±	+	+	±
精氨酸 Arginine	n	—	—	—	+
明胶 Gelatin	—	—	—	+	—
接触酶 Catalase	—	—	—	—	—
吲哚 Indole	—	—	—	—	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	—	—	—	—	—
柠檬酸钠 Sodium citrate	—	n	n	n	n
需氧性试验 O ₂ test	+	n	n	n	n
7% Nacl 试验 7% Nacl test	+	n	n	n	n
运动性 Motion	—	n	n	n	n
醋酸铅琼脂 Lead acetate medium	—	n	n	n	n
VP 试验 VP test	+	n	n	n	n

表 4 朱鹮消化道 G⁻ 杆菌的生化试验结果

Table 4 Biochemical test results of G ⁻ bacilli of <i>Nipponia Nippon</i> enteron				
试验项目 Item	试验结果 Identified results			
	19	20	21	22
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	—	+
乳糖 Lactose	—	+	—	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	n
明胶 Gelatin	—	—	+	+
三糖铁 Trisaccharide iron	—	—	—	n
精氨酸 Arginine	+	+	—	n
接触酶 Catalase	+	+	+	—
吲哚 Indole	+	+	+	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	—
柠檬酸钠 Sodium citrate	+	+	+	n
O/F 试验 O/F test	+	+	+	+
VP 试验 VP test	—	—	—	n
MR 试验 MR test	+	+	+	n

注:在 O/F 反应中,一代表氧化型,+代表发酵型。

Note: In the reaction of O/F,— means oxygenation;+ means fermentable.

2.3 朱鹮消化道细菌的毒力试验结果

感染蜡状芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、粪肠球菌、面包乳杆菌、口乳杆菌、马里乳杆菌、瑞士乳杆菌、两歧双歧杆菌、最小双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、少酸链球菌、乳链球菌、肠膜链球菌、类肠膜明串球菌、粪拟杆

菌、丙酸丙酸杆菌的小白鼠和小鸡均未出现明显的病理症状;感染环状芽孢杆菌和泛酸芽孢杆菌的小白鼠和小鸡均死亡;短乳杆菌对小鸡无致病性,但可致小白鼠死亡。

根据以上结果可确定,适合制作微生态制剂的

细菌有两歧双歧杆菌、最小双歧杆菌、口乳杆菌、面包乳杆菌、马里乳杆菌和嗜酸乳杆菌。

3 讨 论

本试验从朱鹮消化道初步分离出 30 株细菌,其中大部分为兼性厌氧菌,首次获得了朱鹮消化道正常菌群较为详细的资料,为研制朱鹮微生态制剂奠定了基础。在鉴定出的 22 种细菌中,约有 6 种适合作微生态制剂,其中 2 种双歧杆菌均为兼性厌氧菌。试验分离到的适宜做微生态制剂的双歧杆菌、乳杆菌、乳链球菌、肠膜明串珠菌等皆包括在美国食品药品监督管理局和美国饲料管理协会 1989 年公布的 43 种“通常认为是安全的”微生物清单之中,其中双歧杆菌和乳杆菌包括在我国农业部批准使用的 6 种益生菌之中^[10]。

何明清等^[11]的研究表明,鸡肠道,尤其是直肠占优势的菌群为双歧杆菌、乳酸杆菌及拟杆菌,其次为消化球菌及弯曲杆菌等厌氧菌。赖国旗等^[12]对健康鸡、猪等动物粪便进行了分析,结果表明肠道正常存在的细菌有粪链球菌、屎链球菌、坚韧链球菌、青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、詹氏乳杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌及酵母菌,其中乳杆菌和双歧杆菌均为兼性厌氧菌。本试验结果表明,朱鹮消化道中的细菌大部分为双歧杆菌、乳酸杆菌、芽孢杆菌,双歧杆菌和乳酸杆菌均为兼性厌氧菌。本试验鉴定出的 22 种细菌中,只有 3 种与赖国旗等^[12]的研究结果一致,说明朱鹮肠道的正常菌群与鸡肠道的正常菌群在种类上存在极大的差异,具有不同于一般动物的特殊正常菌群,这一发现对于朱鹮保护具有重大的意义。

动物致病性试验是鉴定细菌生理特性的重要环节,也是研制微生态制剂的必经步骤。本研究的毒力试验结果表明,分离自朱鹮肠道的环状芽孢杆菌、泛酸芽孢杆菌、短乳杆菌能致小白鼠死亡,但短乳杆菌对小鸡无致病性。环状芽孢杆菌和泛酸芽孢杆菌的毒力与文献^[13]的记载一致;短乳杆菌是益生菌的一类,导致小白鼠死亡有背文献记载,原因可能如下:一是短乳杆菌可能是一种条件菌,离开肠道进入机体其他部位后会引起动物发病;二是动物种属的差异性,朱鹮短乳杆菌进入小白鼠体内后,作为异源物引起小白鼠严重的腹膜炎而导致动物死亡;三是小白鼠在饲养中可能由于其他原因导致死亡。有关短乳杆菌致小白鼠死亡的确切原因还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王中裕,王 刚,路宝忠,等. 环志朱鹮生命及繁殖情况的分析研究[J]. 汉中师范学院学报:自然科学版,2000,18(1):65-68. Wang Z Y, Wang G, Lu B Z, et al. The life table and the analysis of *Nipponia nippon* marked with rings in reproduction[J]. Journal of HanZHong teachers college: Nature Science Edition, 2000,18(1):65-68. (in Chinese)
- [2] 刘 斌,韩之明,刘 彦,等. 朱鹮的随机扩增多态 DNA 分析与种内亲缘关系研究[A]. 99 国际朱鹮保护研讨会论文集[C]. 中国林业出版社,2000:31-36. Liu B, Han Z M, Liu Y, et al. Study of ibis' random amplified polymorphism DNA analysis and genonomy[A]. 99 international ibis' protection seminar proceeding[C]. Chinese forestry publishing company,2000:31-36. (in Chinese)
- [3] 柳荫增. 朱鹮在秦岭的重新发现[J]. 动物学报,1981(3):273. Liu Y Z. Recovery of Japanese crested ibis qin-ling range[J]. Acta Zoologica Sinica,1981(3):273. (in Chinese)
- [4] 屈红丽,姜焕宏,朱华萍. 朱鹮新城疫的诊治[J]. 中国兽医科技,2003,33(2):61-62. Qu H L, Jiang H H, Zhu H P. The diagnosis and treatment of ibis' New castle disease[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology,2003,33(2):61-62. (in Chinese)
- [5] 任建设,黄治学,高更更. 雏朱鹮大肠杆菌的临床诊断及治疗[J]. 动物医学进展,2004,25(2):121. Ren J S, Huang Z X, Gao G G. The clinical diagnosis and treatment of young ibis' *Ecoli* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2004,25(2):121. (in Chinese)
- [6] 周红超,范光丽,曹永汉,等. 1 只人工饲养朱鹮死亡的病理学诊断[J]. 西北农业大学学报,2000,28(2):60-64. Zhou H C, Fan G L, Cao Y H, et al. The pathological diagnosis of the death of a domesticated crested ibis [J]. The Journal of Northwest agricultural university,2000,28(2):60-64. (in Chinese)
- [7] 刘世修,席永梅,王跃进. 国产丙硫苯咪唑对朱鹮幼鸟消化道寄生蠕虫的驱虫试验[J]. 四川动物,1995,14(3):136. Liu S X, Xi Y M, Wang Y J. The helminthicide test of chinese albendazole to ibis' digestive canal parasites[J]. Sichuan Animal,1995,14(3):136. (in Chinese)
- [8] 庆保平,马来玲,路宝忠,等. 雏朱鹮便秘的诊治[J]. 中国兽医科技,2001,31(9):43. Qing B P, Ma M L, Lu B Z, et al. The diagnosis and treatment of little ibis' constipation [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology,2001,31(9):43. (in Chinese)
- [9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001. Dong X Z, Cai M Y. Common bacterium systemic identification handbook [M]. Beijing: Science Publishing Company,2001. (in Chinese)
- [10] 李晓辉. 饲用微生物的种类和主要作用[J]. 饲料工业,2002,23(2):30-32. Li X H. The strains and main contribution of feeding microorganisms [J]. Feeding Industry,2002,23(2):30-32. (in Chinese)

nese)

[11] 何明清. 动物微生物生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
He M Q. Animal ecology[M]. Beijing: Chinese Agricultural Publishing Company, 1994. (in Chinese)

[12] 赖国旗, 韦 克, 张德纯, 等. 健康动物肠道正常菌群的分离与鉴定 [J]. 中国微生态杂志, 1997, 9(2): 23-25.
Lai G Q, Wei K, Zhang D C, et al. Isolation and identification of enteric normal flora from healthy animals [J]. Chinese Journal of Microecology, 1997, 9(2): 23-25. (in Chinese)

[13] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
Harbin veterinary researching center of chinese agricultural science academy. Veterinary microbiology[M]. Beijing: Chinese Agricultural Publishing Company, 1997. (in Chinese)

(上接第 68 页)

[7] 王高学, 王建福, 原居林, 等. 博落回杀灭鱼类指环虫和病原菌活性成分的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1650-1655.
Wang G X, Wang J F, Yuan J L, et al. The activity of sanguinarine from *Maleaya Cordata* to *Dactylogyrus* and six pathogenic bacteria in aquaculture[J]. Acta Botanica Boreali-Occident Sinica, 2007, 27(8): 1650-1655. (in Chinese).

[8] 毛佐华, 俞培忠, 孙 锴, 等. 银杏酸 5 种同系物单体的制备及其杀灭钉螺的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫杂志, 2007, 25(4): 274-278.
Mao Z H, Yu P Z, Sun K, et al. Preparation of five *Ginkgolic* acid monomers and their molluscicidal effects against *oncomelania hupensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(4): 274-278. (in Chinese).

[9] 朱述钧, 王春梅, 沈寿国, 等. 香豆素类化合物在农业上的应用[J]. 江西农业报, 2006, 18(2): 97-100.
Zhu S J, Wang C M, Shen S G, et al. Application of coumarin in agriculture [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2006, 18(2): 97-100. (in Chinese).

[10] 曾 涛, 黎柳峰, 韦德卫, 等. 鸦胆子提取物对菜青虫幼虫蛋白酶活性和蛋白质含量的影响 [J]. 植物护, 2006, 32(5): 58-60.
Zeng T, Li L F, Wei D W, et al. Effects of the extracts from *Brucea javanica* on protease activity and the protein contents of *Pieris rapae* [J]. Plant Protection, 2006, 32(5): 58-60. (in Chinese).

[11] 田喜凤, 戴建军, 董 路, 等. 槟榔南瓜子合剂对猪带绦虫作用的超微结构观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(6): 363-364.
Tian X F, Dai J J, Dong L, et al. Ultrastructure observation on taenia solium expelled by decoction of areca and pumpkin seeds [J]. Chin J Parasit Dis Con, 2002, 15(6): 363-364. (in Chinese).

[12] 廖世城, 曾 涛, 书桥现. 黄荆提取物的杀虫生物活性研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 304-305.
Liao S H C, Zeng T, Shu Q X. Study on insecticidal activity of vitex negundo extracts [J]. Chinese agriculture science bulletin, 2006, 22(6): 304-305. (in Chinese).

[13] 宋晓平, 王晶钰, 李引乾, 等. 地锦草体外抑菌有效部位的筛选试验 [J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(5): 75-78.
Song X P, Wang J Y, Li Y Q, et al. Selection of bacteriostasis positions of *eurphobia humifusa* wild *in vitro* [J]. Acta Universitatis Agricul Turalis Boreali-Occidentlis, 1999, 27(5): 75-78. (in Chinese).