



李家豪, 冯启理, 韩日畴. 蜜蜂肠道微生物研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (6): 1369 - 1382.

蜜蜂肠道微生物研究进展

李家豪¹, 冯启理¹, 韩日畴^{2*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; 2. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260)

摘要: 蜜蜂是全球范围内重要的授粉昆虫, 具有很高的经济、生态效益, 但是蜜蜂一生中可能会遇到许多挑战。肠道微生物与蜜蜂的健康息息相关, 不仅在营养物质的消化吸收方面有重要作用, 而且还能抵抗某些病原菌的侵袭以及增强机体免疫力。近年出现的蜜蜂大量死亡现象可能与肠道微生物失调有关。生物以及非生物的因素都可能密切影响蜜蜂肠道微生物的存活, 导致宿主生理功能紊乱甚至死亡。本文综述了蜜蜂的肠道核心微生物组成、分布、变化、影响因素以及主要作用和研究方法, 为肠道微生物的研究和利用提供参考。

关键词: 蜜蜂; 肠道微生物; 健康; 研究方法

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 06-1369-14

Gut microbiota of honey bees

LI Jia-Hao¹, FENG Qi-Li¹, HAN Ri-Chou^{2*} (1. South China Normal University, College of Life Science, Guangzhou 510631, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Honeybee is an important pollinator in the world with great economic and ecological benefits. However, honeybees may encounter many challenges in their life. The gut microorganisms of honeybees not only play an important role in the digestion and absorption of nutrients, but also resist the invasion of some pathogens and enhance the immunity of the bees. The recent mass death of honeybees may be associated with gut microbial disorders. Biological and non-biological factors may closely affect the survival of gut microorganisms of honeybee, leading to the physiological function disorder or even death of the host. This paper reviews the composition, distribution, change, influencing factors, main functions and research methods of the gut core microorganisms of honeybee, providing a reference for the research and utilization of the gut microorganisms.

Key words: Honey bee; gut microbiota; health; research method

蜜蜂作为一种经济昆虫, 不仅酿造造福人类的蜜蜂产品, 更为许多经济作物传粉, 具有重要的经济、生态价值 (Gallai *et al.*, 2009; Hroncova *et al.*, 2019)。全球蜜蜂数量的变化显著影响经济

作物的产量和生态环境植被。动物肠道中的微生物群落可以帮助消化食物、解毒有害物质、提供必要的营养、防止病原体和寄生虫入侵, 调节发育和免疫, 从而使宿主受益 (Hamdi *et al.*,

基金项目: GDAS Project of Science and Technology Development (2019GDASYL-0103061); 广东省科学院科技发展专项 (2018GDASCX-0107)

作者简介: 李家豪, 男, 1996年生, 广东清远人, 硕士研究生, 研究方向为生态学, E-mail: Ljhianmianywm@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 韩日畴, 博士, 研究员, 主要研究方向为资源昆虫与分子生物学, E-mail: hanrc@giabr.gd.cn

收稿日期 Received: 2020-07-25; 接受日期 Accepted: 2020-09-30

2011)。可见微生物群与宿主的健康息息相关。当宿主体内的微生物群遭遇到某种因素的压力,菌群会失调,并导致宿主生理功能无法正常运行,甚至死亡。许多西方国家遇到一种授粉危机,各地出现了大规模蜜蜂的不明原因死亡,称为蜂群衰竭失调 (Colony Collapse Disorder, CCD) (Genersch, 2010)。研究人员调查蜜蜂死亡的原因,发现这个现象可能是在环境压力、蜜蜂饲料(花蜜和花粉)缺乏以及生物压力协同作用下导致的 (Khan *et al.*, 2020)。此外,蜜蜂的肠道微生物菌群研究也是一个良好的模型。本文主要综述了蜜蜂肠道菌群的组成、作用、影响因素以及研究方法,提出了存在的问题以及对未来研究的展望。

1 蜜蜂肠道菌群构成与特征

1.1 蜜蜂核心菌群及特征

蜜蜂体内存在大量的微生物,尤其是肠道体内的微生物与蜜蜂的生理活动密切相关,参与了花粉等物质的消化吸收,同时提高蜜蜂对病毒虫害的抵抗能力 (Cariveau *et al.*, 2014)。目前研究人员通过传统分离培养和 16S r DNA 结合的方法发现在蜜蜂肠道存在 5 种核心菌群和 4 种含量相对较少的菌群 (Donaldson *et al.*, 2016)。5 种核心菌种包括 2 种革兰氏阴性菌 *Snodgrassella alvi* (β -变形菌纲) 和 *Gilliamella apicola* (γ -变形菌纲) (Kwong *et al.*, 2013), 2 个革兰氏阳性的乳杆菌属类群 *Lactobacillus* Firm-4、Firm-5 (Babendreier *et al.*, 2007) 以及双歧杆菌 *Bifidobacterium* (Bottacini *et al.*, 2012)。其余的 4 个菌种 *Frischella perrara*, 巴尔通体菌 *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium* 和葡糖杆菌 *Gluconobacter* 中特定的一个种类群“Alpha 2.1”虽然不会稳定大量地存在蜜蜂肠道中,但最近也证明了它们在肠道有严格的生态位 (李晨伊等, 2018)。

共生菌主要归为九大类,分别是: Gamma-1 (*Gilliamella apicola*)、Gamma-2 (*Frischella perrara*)、Beta (*Snodgrassella alvi*)、Alpha-1 (*Bartonella apis*)、Alpha-2.1、Alpha-2.2 (*Parasaccharibacter apium*)、*Bifidobacterium*、Firm-4 和 Firm-5 (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Babendreier *et al.*, 2007; Moran *et al.*, 2012)。其中 Gamma-1、Beta、Firm-4 和 Firm-5 在蜜蜂肠道中普遍性和丰度都较高 (Babendreier *et al.*, 2007;

Martinson *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2014), *Bifidobacterium* 尽管丰度低,但出现在所有正常蜜蜂肠道中 (Bottacini *et al.*, 2012)。因此 Gamma-1、Beta、Firm-4、Firm-5 和 *Bifidobacterium* 是蜜蜂肠道中最核心的 5 种优势菌 (王红芳和胥保华, 2020)。

东方蜜蜂 *Apis cerana*、熊蜂 *Bombus* 及其他无刺蜂 *Melipona fasciculata* 具有和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 相似的肠道菌群属和结构,但是也有其特殊的肠道菌,群落组成存在细微的差异,这些差异随着季节、饮食、寄主年龄、种和地理位置的变化而变化 (杨志波和张绍升, 2010; Guo *et al.*, 2015; Kapheim *et al.*, 2015)。西方蜜蜂的蜂王有一种 *Parasaccharibacter apium* 菌落明显要丰富于担任其他功能的蜜蜂,大多数不繁殖的工蜂几乎没有 *P. apium* (Kapheim *et al.*, 2015)。社会性蜜蜂的简单微生物群表现出宿主特异性,蜜蜂肠道中的共生物种具有互补的能量代谢能力,这意味着它们在不同的生态位中占有一席之地。此外,不相关的肠道共生菌由于共同寄生于宿主肠道内还会发生基因的水平交换,而不同寄主的菌株已经分化,蜜蜂共生菌在进化和功能上与熊蜂不同,这表明肠道共生体可能是蜜蜂物种间生物差异的关键因素 (Kwong *et al.*, 2014b)。在西方蜜蜂中,肠道菌落的共生交换可能通过接触行为或在同一朵花上觅食而发生。由数百个工蜂和一个蜂王组成的群体建立菌落的模式不会造成肠道细菌数量的瓶颈,也有利于保持菌株的多样性。除了不同蜜蜂中肠道菌可能会不同外,即便是同一种蜜蜂中,群势弱的蜂群的肠道细菌丰富度和多样性明显低于群势强的蜂群,这些相对丰度的显著差异并不是由单个蜂巢的影响造成的,而是作为一个明显的微生物群特征出现的 (Ribiere *et al.*, 2019)。

蜜蜂肠道菌的功能丰富,如 *Gilliamella apicola* 具有代谢甘露糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖的能力。Zheng 等人 (2016) 从蜜蜂组织中测试的所有菌株至少可以利用其中的一种糖,这表明这些肠道共生菌株可能通过帮助消化难降解的碳水化合物来增加宿主的能量摄取 (Zheng *et al.*, 2016),正如在其他昆虫肠道和人类肠道中的细菌所观察到的那样。判断一种细菌是否作为蜜蜂核心或非核心肠道细菌的地位十分困难。*Lactobacillus kunkeei* 是蜜蜂肠道中最常见的细菌,也存在于纯

蜂蜜、花蜜和蜂粮中。然而,也有研究认为,*L. kunkeei*的大量存在是由于培养条件的不同,由于这些细菌在其他独立培养的研究中不存在或很少,仍需要进一步的研究 (Anderson *et al.*, 2013)。

1.2 肠道菌群在不同肠道部位的分布

蜜蜂的肠道大致可分为蜜囊、中肠、幽门和后肠。乳酸杆菌菌群在蜜囊中占据优势,与花蜜和蜂巢的菌群有很高的类似性,因此这些菌群被认为是来自花蜜,并非肠道内的共生菌 (Vasquez *et al.*, 2012; McFrederick *et al.*, 2017)。蜜蜂的最大消化器官是中肠,但是中肠的细菌数量很少,包含3种主要共生菌(即Beta、Firm-5和Gamma-4简称BFG),所含的细菌大部分靠近幽门(张棋麟等,2019)。幽门中的细菌主要是非核心菌株*Frischella perrara* (Emery *et al.*, 2017)。蜜蜂的后肠又可以分为2个独立部分,即回肠和直肠。蜜蜂大部分的细菌都会聚集在肠道的深处,那些未被宿主消化的膳食化合物(如聚糖)积聚在蜜蜂的回肠和直肠,为微生物群提供主要的碳、氮来源 (Flint *et al.*, 2017)。回肠中主要包含*Gilliamella apicola*和*Snodgrassella alvi*两类核心菌群,虽然回肠比中肠小,但是细菌数量远高于中肠。回肠具有较深的内折以扩大了细菌的接触面积来吸收未被中肠消化的营养。直肠有营养十分丰富的环境,因此栖息了绝大部分稳定的微生物,其中*Lactobacillus Firm-4*、*Lactobacillus Firm-5*和*Bifidobacterium asteroides*是优势菌种,主要位于肠腔当中 (Martinson *et al.*, 2012; Kwong *et al.*, 2017)。即便蜜蜂具有许多不同类型的微生物,但是肠道内部的多样性比整个群体的多样性要低得多 (Ellegaard and Engel, 2019)。

1.3 蜜蜂不同发育阶段的核心菌群变化

蜜蜂为全变态膜翅目社会性昆虫,一生经历卵、幼虫、蛹和成虫4个发育阶段,每个发育阶段都有显著的发育特征 (Rembold *et al.*, 1980)。发育中的幼虫在化蛹前有一个不连续的肠道(前肠和后肠没有连接),因此,这一阶段的幼虫是包括细菌或病毒在内的许多主要病原体的目标 (Rauch *et al.*, 2009; Blanchard *et al.*, 2014)。蜜蜂的一生中,肠道菌群的变化会随着蜜蜂不同发育阶段的变化而变化,最后趋向于稳定。研究表明,无论是中华蜜蜂还是西方蜜蜂,新出生的蜜蜂和幼虫肠道中几乎没有或没有细菌 (Martinson *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015)。中华蜜蜂幼虫从

5 d开始,其成年工蜂肠道中具有4种细菌(*Lactobacillus*, *S. alvi*, *Bifidobacterium*, *G. apicola*)数量开始增加,随后下降,并在其余时间保持稳定 (Guo *et al.*, 2015)。蜜蜂会通过蜂巢、孵化卵细胞或者是工蜂的社会接触获得肠道细菌 (Martinson *et al.*, 2012)。当蜜蜂达到成年工蜂的年龄时,它们会面临着充满细菌的环境。对于中华蜜蜂,*Lactobacillus*会在第10天达到高峰 (Guo *et al.*, 2015),在12~21 d期间,蜜蜂最重要的生理生化过程是参与食物生产,如花蜜和蜂粮的加工。如*S. alvi*和*Lactobacillus Firm-5*细菌在20~25 d会趋于稳定,而*Bifidobacterium*属和*G. apicola*则在25~30 d,细菌在第15天后开始下降,肠道细菌的减少可能是由于觅食的蜜蜂在15 d后第一次离开蜂巢时排便所致 (Guo *et al.*, 2015)。*S. alvi*、*G. apicola*和*Bifidobacterium*在15~20 d之间达到高峰,这与花蜜和蜜蜂蜂粮加工的年龄相对应。中华蜜蜂肠道微生物的数量在第15天或第20天之后开始下降,但在20 d之后,细菌有一个稳定的时期。

西方蜜蜂中核心微生物*S. alvi*、*G. apicola*和*F. perrara*是通过社会接触定殖肠道的 (Powell *et al.*, 2014)。因此,在0日龄的工蜂中观察到的无核心肠道菌群可以用工蜂的社会接触最少来解释。此外,*Acinetobacter*的相对丰度在0~1日龄时最高,说明*Acinetobacter*在工蜂肠道中起着重要作用;在0~1日龄这个阶段,肠道菌群的结构发生了迅速的变化,尤其是核心菌属,如*Frischella*、*Snodgrassella*和*Gilliamella*这3个核心属主要占据*Acinetobacter*的生态位 (Dong *et al.*, 2020)。*Lactobacillus*和*Bifidobacterium*有助于蜜蜂对营养的吸收和保护,将从蜜蜂肠道分离出的*Lactobacillus*和*Bifidobacterium*喷洒到蜂巢、孵卵群和花粉上,显著促进了可采蜂蜜的增加 (Alberoni *et al.*, 2018)。这两个核心菌属*Lactobacillus Firm-5*和*Bifidobacterium*的相对丰度在1~3日龄的期间显著增加,在第4天后趋向稳定。*L. kunkeei*在工蜂的其他器官和蜂粮中都能发现,它在7~12日龄时期显著增加,这个时期的工蜂主要工作是加工蜂蜜。蜜蜂个体在实验条件下蜂巢外不接触蜂蜜或哺育的工蜂,即使在8 d后也未能形成一个实质性的肠道群落,而蜜蜂暴露在自然蜂巢条件下,在4~6 d内,其稳定的群落由核心菌种主导 (Powell *et al.*, 2014)。蜜蜂幼虫化蛹后,*Firm*系列的菌群

和 *Gilliamella* 的数量都显著下降 (Hroncova *et al.*, 2015)。蜜蜂的 9~30 日龄期间, 工蜂会离开蜂巢进行花粉、花蜜的采集, 这个时候由于环境和饮食的变化, *Bifidobacterium* 和 *F. perrara* 的丰度都显著降低 (Anderson *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2020)。Anderson 等人 (2018) 认为 *Bifidobacterium* 是评估工蜂年龄的细菌指标, *F. perrara* 是否能作为年龄评估指标需要进一步的研究。当工蜂年龄上升后, 肠道微生物也开始老化, 后肠的核心菌群 *Lactobacillus Firm-4*、*Lactobacillus Firm-5* 和 *B. asteroides* 逐渐耗尽 (Anderson *et al.*, 2018)。

蜜蜂肠道细菌的多样性增加可能是由于幼虫食物中花粉的增加。当花粉粒与稀释的蜂蜜混合并进入后期幼虫的肠道时, pH 值从酸性到中性出现了大幅度的跳跃, 这表明许多适应花蜜、蜂粮和蜂蜜的嗜酸菌可能在幼虫肠道中短暂存在。即便如此, 幼虫微生物群与成年蜜蜂肠道微生物群并无显著差异。虽然这些细菌可能在成年蜜蜂的营养处理中发挥作用, 但在蜜蜂发育的早期和脆弱阶段, 它们可能有助于幼虫免疫 (Vojvodic *et al.*, 2013)。

1.4 蜜蜂获取肠道微生物的方式

蜜蜂是群居昆虫, 群居传播对维持它们的微生物群落很重要 (Martinson *et al.*, 2012; Koch *et al.*, 2013)。社会行为, 如食物的交哺可能让昆虫肠道群体的成员将微生物传给它们的群体成员, 从而建立一致的联系。蜜蜂幼虫个体在蜂巢外不接触巢脾或哺育蜂, 即使在第 8 天后也未能形成一个实质性的肠道群落, 而蜜蜂暴露在自然蜂巢条件下, 在 4~6 d 内, 其稳定的群落由核心物种主导 (Powell *et al.*, 2014)。一些革兰氏阳性的核心微生物群成员可以通过接触蜂巢表面获得, 革兰氏阴性种如 *S. alvi*、*G. apicola* 和 *F. perrara* 似乎是通过接触哺育蜂或新鲜粪便获得的, 而不是通过进食获得的 (Powell *et al.*, 2014)。*G. apicola* 是蜜蜂核心后肠微生物群的一部分, 被认为是蜜蜂肠道特有的 (Kwong *et al.*, 2014b; Kwong and Moran, 2015)。研究人员发现在许多花朵、花粉供应和蜜蜂肠道样本中有一个细菌谱系, 在 16S rRNA 基因序列中与蜜蜂 *G. apicola* 菌株 99% 相同 (Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012), 表明 *G. apicola* 可能是由蜜蜂从花、花粉上的环境细菌进化而来。另一种原产于欧洲和北非的独居蜜蜂 *Osmia bicornis*, 它们的幼虫可能通过土壤获得一些

重要的肠道菌群, 使它在没有细菌或非常有限的细菌的情况下也能有效的消化食物, 以促进其发育 (Keller *et al.*, 2013)。

1.5 不同蜜蜂肠道微生物的比较

随着人们开始关注蜜蜂的健康问题, 东、西方蜜蜂肠道菌群鉴定及多样性研究也受到重视。东、西方蜜蜂肠道核心菌群大致相同, 但西方蜜蜂中含有 Gamma-2 (Gammaproteobacteria)、Alpha-1 (*Bartonella*) 和 Alpha-2 (Acetobacteraceae) 在东方蜜蜂中没有被检测出来, 熊蜂属基本含有与西方蜜蜂相同的核心菌群, 也无法检测出 Alpha-2 (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Mohr and Tebbe, 2006; Babendreier *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011)。

其中 *Bartonella* 主要存在于东方蜜蜂后肠中, *F. perrara* 则主要存在于西方蜜蜂的肠道, 而拟杆菌门中的 *Apibacter* 在东方蜜蜂肠道中含量较高, 西方蜜蜂含量较少 (Kwong and Moran, 2016; 胡冲等, 2020)。有研究发现肠道菌多样性差异最大的是在中蜂幼虫和意大利蜜蜂蛹之间 (张义强, 2013)。同种蜜蜂位于不同地区肠道微生物可能有所不同。Khan 等人 (2017) 对沙特阿拉伯两个不同地理位置 Al-Baha 和 Riyadh 蜜蜂 *A. m. jemenitica* 肠道微生物比较, 发现 Riyadh 比 Al-Baha 地区蜜蜂微生物群落的整体复杂性低 (Khan *et al.*, 2017)。肠道微生物群落的这种差异可能是由于肠道生理条件的差异, 例如 pH 值、来自花蜜和花粉中的环境细菌、蜜蜂的年龄以及影响地理位置的季节或主要环境特征等。

2 影响蜜蜂肠道微生物菌群的因素

2.1 生物因素 (病毒、细菌、瓦螨、微孢子虫等) 对肠道微生物的影响

蜜蜂病毒、细菌和寄生虫等会严重破坏蜜蜂肠道微生物的平衡, 是影响蜜蜂健康的重要因素 (Erban *et al.*, 2015; Fantham and Porter, 2016; Kraberger *et al.*, 2019)。而这些病毒和细菌能够耐受与不同草食性、杂食性和食肉性昆虫种类相关的胃、肠的生理环境 (Lester *et al.*, 2015)。研究发现, 感染欧洲软腐病 (European Foulbrood) 和蜜蜂囊状病 (Sacbrood Virus) 的幼虫肠道菌群比未感染的幼虫少, 表明这些病原体与肠道细菌之间存在负相互作用 (Guo *et al.*, 2015)。共生菌 *S.*

alvi 的含量与 IAPV 的感染率呈显著负相关 (刘姍等, 2017)。

狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 的出现常常伴随着 DWV, 有研究发现两种 γ -蛋白细菌, 即 *Frischella perrara* 和 *Pasteurellaceae bacterium Trml1* 在感染 DWV 的工蜂中有显著升高 (Matsumoto *et al.*, 2014)。而 γ -蛋白细菌物种可能参与花粉壁的破坏 (Engel *et al.*, 2012)。而另外一种美洲幼虫腐臭病 (American foulbrood, AFB), 是最具传染性和破坏性的蜜蜂疾病, 病原是一种革兰氏阳性杆状芽孢杆菌, 称为 *Paenibacillus larvae*, 只有龄期小于 30 h 的蜜蜂幼虫才容易感染 (Yue *et al.*, 2008)。蜜蜂通过摄入含有 *P. larvae* 孢子的食物而感染, 孢子在中肠腔中萌发, 细菌在那里大量繁殖, 最后攻击并破坏中肠上皮细胞, 侵入血腔, 并将幼虫分解成黏液团 (Poppinga and Genersch, 2015)。

粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 是一种常见的存在于成年蜜蜂的病原菌, 在某些条件下, 如正常肠道微生物群受到干扰或存在瓦螨, 会让蜜蜂感染该菌。由于蜜蜂经常暴露在可能破坏肠道微生物群的因素下, 粘质沙雷氏菌感染可能是常见的, 并可能导致菌落丧失; 即使是少数细菌进入血腔也可能是致命的, 这就支持了粘质链球菌的致病性被瓦螨加剧的可能性 (Raymann *et al.*, 2018a)。Good 等人 (2014) 从蜜蜂肠道中分离出一些细菌并接种到花蜜中, 结果发现蜜蜂并不喜欢 *Asaia astilbes*、*Erwinia tasmaniensis* 和 *Lactobacillus kunkeei* 3 种菌落的花蜜, 而 *Metschnikowia reukaufii* 酵母则不影响蜜蜂的取食偏好。肠道微生物不仅可以作为共生菌影响蜜蜂的健康, 还可能通过改变花蜜的化学成分和影响蜜蜂的觅食行为, 影响蜜蜂作为传粉者的功效 (Good *et al.*, 2014)。

瓦螨目前被认为是西方蜜蜂最具毁灭性的病原, 由瓦螨引起的疾病被称为瓦螨病。瓦螨主要以蜜蜂的血淋巴为食, 寄生在蜜蜂幼虫和成虫身上导致幼虫死亡, 如果没有得到及时的防治, 蜂群很快就会衰落死亡。(周婷等, 2007)。瓦螨寄生的蜜蜂肠道细菌中 *Bartonella* 的相对丰度会增加, 在瓦螨病存在下观察到更丰富的细菌是 *S. alvi*, 这种细菌在后肠形成了生物膜的内层, 而另一种细菌 *G. apicola* 形成了外层。*G. apicola* 未受到瓦螨病的影响, 由此推测, 瓦螨寄生的蜜蜂体内的乳酸杆菌和 *Snodgrassella* 的相对丰度与生物膜厚度的增加有关, 这是对瓦螨感染的反应 (Hubert

et al., 2017)。亮热厉螨 *Tropilaelaps mercedesae* 是亚洲蜜蜂的一种寄生虫, 感染了 *T. mercedesae* 的蜜蜂乳酸杆菌丰富度明显高于同期未感染蜜蜂 (Ma *et al.*, 2019)。

微孢子虫病是蜜蜂的主要病害之一, 其病原包括蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 和东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*。微孢子虫只感染蜜蜂的中肠, 会一定程度上改变肠道微生物群的总体组成 (Rubanov *et al.*, 2019)。*N. ceranae* 感染导致饲糖蜜蜂肠道中 *Snodgrassella* 的丰度较高, *Serratia marcescens* 的丰度较低, 此外, 还会抑制与细胞更新有关的基因, 导致营养不良, 增加蜜蜂死亡率 (Huang and Solter, 2013)。抗生素对肠道细菌的清除对蜜蜂免疫系统的功能产生了负面影响, 增加蜜蜂感染微孢子虫病的可能性 (Li *et al.*, 2017)。白垩病是由蜜蜂球囊菌 *Ascospaera apis* (简称球囊菌) 特异性侵染蜜蜂幼虫而导致, 这种菌能够降解宿主体内的营养物质, 最后导致宿主死亡。(郭睿等, 2018)。

2.2 非生物因素 (杀虫剂、除草剂、花粉等) 对肠道微生物群落的影响

除了上述生物因素对蜜蜂肠道微生物产生严重的影响, 一些非生物因素如杀虫剂、花粉、温度、季节以及蜜蜂所处的地理位置等都有可能对蜜蜂的肠道丰度和多样性造成影响 (Gore *et al.*, 2017; Ricigliano *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020)。在测定 3 种农药 (毒死蜱、乐果和双甲脒) 对蜜蜂的毒性时, 发现乐果是 3 种农药中毒性最大的, 并且对西方蜜蜂的毒性大于东方蜜蜂, 而双甲脒对中华蜜蜂和西方蜜蜂毒性最小 (Yang *et al.*, 2019)。接触吡虫啉也会导致蜂巢中蜜蜂的死亡率升高, 并增加了受病原体感染的易感性, 暴露于吡虫啉的蜜蜂血淋巴细胞在体外的过氧化氢水平降低 (Walderdorff *et al.*, 2018)。尽管不同微生物种类之间存在潜在的调节相互作用, 但肠道内过氧化氢水平的降低被认为是导致肠道微生物群发生变化的最可能原因 (Walderdorff *et al.*, 2018)。但是如今并没有发现吡虫啉影响蜜蜂肠道细菌群落的证据, 甚至发现在吡虫啉存在下, 蜜蜂肠道细菌可以生长 (Raymann *et al.*, 2018b)。而一种杀虫剂烯啶虫胺, 则会扰乱肠道微生物的平衡, 降低蜜蜂的摄入量 and 生存率 (Zhu *et al.*, 2020)。氟胺氰菊酯是一种常见的有机杀螨剂, 在西方蜜蜂的食物中添

加少剂量的氟胺氰菊酯导致了蜜蜂肠道 Proteobacteria 类细菌滋生, 高浓度的氟胺氰菊酯则引起子囊菌门的滋生 (廖春华, 2019)。农药会直接或间接对蜜蜂等授粉昆虫产生影响, 而从苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 中提取的 Cry1Ie 蛋白则被认为是我国开发 Bt 玉米新品种防治玉米害虫的候选蛋白, 在实验室条件下, 发现 Cry1Ie 毒素对中国蜜蜂肠道菌群无影响 (Jia *et al.*, 2017)。

除草剂和一些杀菌剂对蜜蜂的影响可能也不亚于杀虫剂。在暴露于草甘膦的蜜蜂中, 占优势的肠道微生物种群的相对和绝对丰度降低, 成年工蜂接触草甘膦之后, 增加了随后接触粘质沙雷氏菌的蜜蜂死亡率 (Motta *et al.*, 2018)。蜜蜂幼虫的免疫功能尚不健全, 更容易受到病原体的侵害, 高浓度的草甘膦影响了新生蜜蜂的肠道细菌群落, 降低了幼蜂的存活率, 由此可推测草甘膦会导致肠道微生物减少, 降低蜜蜂的免疫能力 (Dai *et al.*, 2018)。尽管低剂量杀菌剂对蜜蜂不致命, 但高剂量的接触对蜜蜂也是相当有害的, 导致幼虫死亡率增高, 并改变其觅食行为 (Zhu *et al.*, 2014)。杀菌剂也会导致熊蜂肠道的大量菌落损失 (Steffan *et al.*, 2017)。

花粉也是影响蜜蜂肠道微生物的重要因素。如果蜜蜂需要消耗大量的花粉来获得足够的营养, 便会需要更多的细菌定殖在直肠中消化花粉。花粉的营养质量, 以及不同地点的花粉资源, 也可能影响菌群组成 (Jones *et al.*, 2018)。从花粉中分离出来的酵母菌具有杀菌和发酵的特性, 这两种特性对幼蜂的发育都是至关重要的; 这种生态关联暗示了蜜蜂与其花粉微生物群之间高度的互利共生 (Steffan *et al.*, 2017)。花粉的消耗刺激了对蜜蜂有毒糖 (木糖、阿拉伯糖、甘露糖) 的水解, 在肠道前端产生的糖分积聚在中肠, 并持续存在于后肠, 花粉消耗显著影响消化道细菌总数和特异性丰度 (Ricigliano *et al.*, 2017)。除了花粉之外, 糖分也是影响蜜蜂肠道的重要因素之一。蜜蜂对于蜂蜜的采食明显高于对果葡糖浆及蔗糖的采食, 这有可能是因为果葡糖浆对比蜂蜜缺乏必要的营养和氨基酸, 降低了蜜蜂的采食率 (丁琳, 2016)。Wang 等人 (2020) 测定了蜜蜂冬季取食蜂蜜、蔗糖和高果糖糖浆前后, 中肠和后肠的细菌群落情况, 发现季节、喂食的糖类型以及肠道空间的变化只会影响蜜蜂肠道优势类群的丰度,

但不会影响优势类群的组成, 优势类群是相对保守的; 喂食蔗糖后, 中肠的微生物多样性会高于喂食高果糖浆和蜂蜜组, 而后肠的微生物低于高果糖浆和蜂蜜组。作为冬季食品的糖类对蜜蜂肠道优势菌群的相对丰度有影响, 而对类群的相对丰度没有影响, 从而影响蜜蜂越冬期间的健康和安全, 蔗糖是非常适合蜜蜂越冬的食物 (Wang *et al.*, 2020)。也有研究认为蔗糖日粮增加了 Rhizobiaceae、Acetobacteraceae、*L. kunkeei* 这些亚优势核心菌的相对丰度, 降低了 *F. perrara* 的相对丰度, 显著改变了细菌组成 (Taylor *et al.*, 2019)。

肠道微生物多样性在摄入抗生素后的几天内就会减少, 而且很少能完全恢复到初始细菌群落组成 (Sekirov *et al.*, 2008; Dethlefsen and Relman, 2011)。养蜂人最常用的两种抗生素是四环素 (或相关化合物土霉素) 和泰乐菌素, 而在蜜蜂肠道 8 种核心细菌中, 4 种细菌 *Bifidobacterium*、*Lactobacillus Firm-4*、*Lactobacillus Firm-5* 和 *Snodgrassella alvi* 受到四环素处理后丰度显著下降, 导致蜜蜂死亡率升高 (Gore *et al.*, 2017)。但是同时 Gore 等人 (2017) 也发现具有自然获得肠道微生物群的蜜蜂, 经四环素处理并在实验室无菌条件下保存的蜜蜂表现出更高的死亡率, 这在没有微生物组 (无菌蜜蜂) 的处理蜜蜂中没有观察到, 这意味着不是四环素影响蜜蜂的健康, 而是蜜蜂肠道菌群失调。虽然对无菌蜜蜂没有影响表明抗生素在使用的浓度下对蜜蜂没有直接伤害, 但很难将四环素对肠道微生物群的影响与对宿主的影响分开, 有可能是四环素改变了宿主对病原体的易感性 (Gore *et al.*, 2017)。目前未发现长距离迁移会导致蜜蜂种群肠道微生物群落发生大的变化, 在冬季天然的花卉食物对蜜蜂肠道微生物群的组成和功能只有细微的影响 (Rothman *et al.*, 2018)。

3 蜜蜂肠道微生物的作用

3.1 蜜蜂肠道菌对蜜蜂健康的影响

蜜蜂一生中会遇到各种生物与非生物的压力, 肠道菌对于蜜蜂的健康起到非常重要的作用 (Mattila *et al.*, 2012; Good *et al.*, 2014; Emery *et al.*, 2017)。蜜蜂以花粉为食, 蜜蜂肠道微生物群落能够消化坚硬的花粉外壁, 并消化吸收花粉中多种多糖、富含能量的物质, 在培养的细菌基因组序列和亚基因组数据中获得了多糖降解基因,

揭示了 *Bifidobacterium* 和 *Gilliamella* 消化蜜蜂肠道中的多糖 (Zheng *et al.*, 2019)。一些容易获得的花粉营养物质 (如氨基酸、糖和维生素) 很可能被中肠的细菌吸收, 而更难消化的化合物则由后肠中的微生物菌群来消化 (Kesnerova *et al.*, 2017)。如今可确定 3 个主要活跃在肠道的细菌类 (γ Proteobacteria、Bacilli 和 Actinobacteria) 都参与分解复杂的大分子 (如多糖和多肽)。微生物群落通过使用群落水平的生理特征来实现代谢这些富含碳的食物来源的能力 (Lee *et al.*, 2015)。总的来说, 蜜蜂的肠道微生物区系中存在着具有独特作用的细菌成员, 这些细菌最终可以为宿主处理植物性食物做出贡献。

蜜蜂肠道中含有的各种细菌可共同完成某项功能, 或是各司其职。使用含有 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 的糖浆制剂喷洒在空旷的养蜂场的蜂巢上, 会导致蜜蜂肠道中 *Acetobacteraceae* 和 *Bifidobacterium* spp. 的相对丰度有所增加, 是由于它们参与了蜜蜂的营养和保护 (Alberoni *et al.*, 2018)。而从蜜蜂中肠分离获得的 *L. kunkei* 的混合物能降低感染 *Paenibacillus larvae* 的死亡率, 增加乳酸杆菌的数量, 从而使幼虫生存能力得到了提高 (Arredondo *et al.*, 2018)。同样的, 植物乳酸杆菌 *Lactobacillus plantarum* 也能减轻 *Nosema* spp. 引起的蜜蜂肠道微生物群落的变化 (Diaz *et al.*, 2019)。

Engel 等人 (2015a) 发现蜜蜂肠道中的两种 γ 蛋白杆菌之一的 *Frischella perrara*, 是引起意蜂“结痂”表型的原因; 这种表型的特征是在中肠-后肠交界处的幽门内形成一个深棕色到黑色的沉积物, 形成一个局部的薄条带, 靠近马氏管。该表型在成年工蜂出现后 5~7 d 形成。结痂蜜蜂的比例在不同的蜂群中有所不同 (通常为 40%~90%), 但与肠道中的 *F. perrara* 的丰度密切相关; 同时用实验室出现的蜜蜂进行实验, 表明用培植的 *F. perrara* 菌株定殖足以诱导结痂 (Engel *et al.*, 2015a)。关于蜜蜂饮食质量影响的研究表明, 与后肠的其它肠道细菌相比, 食用陈旧的花粉导致 *F. perrara* 的丰度显著增加, 这与宿主发育受损和死亡率增加有关 (Maes *et al.*, 2016)。但有趣的是 *F. perrara* 不仅诱导黑化反应, 导致结痂表型, 而且还激活宿主免疫系统的其他部分, 包括信号感知和效应器功能 (Emery *et al.*, 2017)。这种现象或许是免疫启动, 预先激活免疫系统可

以增强对随后病原体侵扰的保护, *F. perrara* 与宿主的关系或许不能简单的以有害或有益来概括, 需要更进一步的研究。

3.2 肠道微生物对蜜蜂免疫的影响

肠道微生物群落可以通过调节免疫系统极大地影响蜜蜂的健康。然而, 对于许多重要的昆虫来说, 肠道微生物菌群和其免疫功能之间的关系仍然知之甚少。抗菌肽 (AMPs) 是昆虫抵御病原体入侵的天然免疫系统的重要组成部分。这些短肽在细菌、真菌和原生动感染时释放, 通过穿膜和抑制蛋白折叠而破坏微生物细胞 (Danilíková *et al.*, 2016)。在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的免疫刺激下, 蜜蜂血淋巴中诱导了 4 种 AMPs 产物 Abaecin、Apidaecin、Defensin 和 Hymenoptaecin (Casteels *et al.*, 1990; Danilíková *et al.*, 2016)。Kwong 等人 (2017) 发现, 在蜜蜂肠道微生物可以影响 AMP-Apidaecin 在血淋巴的浓度, 导致 Hymenoptaecin 水平升高; 不同的微生物菌群成员对蜜蜂免疫可能起不同的调节作用, 表明肠道微生物群发挥的作用不仅限于肠道而是整个系统, 包括血淋巴; 此外, 还证明 Apidaecin 存在于肠道腔内, 这打开了蜜蜂免疫系统在构建肠道微生物群落中发挥作用的可能性。单靠 *S. alvi* 的定殖并不能增加 Hymenoptaecin 的表达, 这表明 *S. alvi* 不能进行 Hymenoptaecin 的生产途径 (Kwong *et al.*, 2017)。Al-Ghamdi 等人 (2018) 探讨了幼虫食物中添加 *Paenibacillus larvae* 孢子和肠道细菌是否能够降低 *P. larvae* 感染西方蜜蜂幼虫的致死效应, 结果表明 *L. kunkei* 和 *Bacillus licheniformis* 均能降低蜜蜂幼虫感染孢子后的死亡率, 而其他细菌 *Fructobacillus fructosus* 和 *Bacillus subtilis* 在一定程度上降低幼虫的死亡率 (Al-Ghamdi *et al.*, 2018)。另外, *Bifidobacterium* 群落在蜜蜂肠道中的活性越高, 病原体的活性就越低; 这种相关关系表明, *Bifidobacterium* 可能通过调节蜜蜂的免疫反应或排除病原体, 为蜜蜂提供健康益处 (Evans and Lopez, 2004)。而另一种独居蜜蜂 *Osmia bicornis* 除了蜜蜂典型的肠道微生物群外, 还从其肠道中发现了 G2II、C4 和 M1 株的 *Bacillus subtilis*, 能抑制了 *Ascospaera* spp. 和 *Paenibacillus* 的生长 (Sabate *et al.*, 2009), 这些肠道微生物可能在蜜蜂免疫防御中发挥重要作用。

3.3 肠道微生物菌群对蜜蜂营养代谢的影响

由于蜜蜂不同肠道部位肠道菌的种类不一样,

因此不同的部位代谢物也不同。对蜜蜂血淋巴的单独分析发现,其他昆虫的肠道菌能产生对宿主有益的必需氨基酸,蜜蜂也同样如此(Engel and Moran, 2013)。在蜜蜂对花蜜和花粉的代谢过程中,蜜蜂的肠道菌群起着重要的作用(Ricigliano *et al.*, 2017; Maruscakova *et al.*, 2020)。蜜蜂肠道中相当大一部分微生物菌群进行食物碳水化合物的发酵。考虑到蜜蜂富含碳水化合物的饮食(由花蜜和花粉组成),通过进化肠道微生物菌群以这类资源为生并不奇怪。*G. apicola*、*F. perrara*、*Lactobacillus Firm-4*、*Lactobacillus Firm-5*和蜜蜂相关的*B. asteroides*都能代谢葡萄糖和果糖,这两种糖是蜜蜂食物中含量最丰富的糖(Engel *et al.*, 2013; Ellegaard *et al.*, 2015)。与熊蜂肠道微生物群落成员相比,意蜂中的*B. asteroides*物种群具有丰富多样的基因,负责碳水化合物的利用(Bottacini *et al.*, 2012)。这些发酵细菌包括蜜蜂特有的乳杆菌属和双歧杆菌属。蜜蜂肠道的双歧杆菌和乳酸杆菌都有大量功能未知的细胞表面蛋白,可能参与植物成分的粘附或降解(Kwong *et al.*, 2014a; Ellegaard *et al.*, 2015)。蜜蜂肠道中另一种主要的发酵微生物是*G. apicola*, *G. apicola*菌株的基因组分析已经确定了一大类基因,这些基因负责糖类的吸收和发酵,但存在不完全的三羧酸(TCA)循环和退化的需氧呼吸链(Kwong *et al.*, 2014b)。蜜蜂肠道中存在不同的代谢生态位,这在一定程度上可以解释为细菌沿着肠道各个部位的不同分布(Kesnerova *et al.*, 2017)。肠道微生物菌群诱导了与营养和代谢相关的宿主表型,肠道微生物群改变了不同肠腔的理化性质和代谢谱,而糖酵解是蜜蜂肠道的主要代谢活动(Zheng *et al.*, 2017)。发酵的最终产物因种类而异,但通常包括乳酸和醋酸(Kwong and Moran, 2016)。在大多数情况下,几种肠道菌会代谢同一化合物,表明蜜蜂肠道细菌具有重叠的代谢能力(Bonilla-Rosso and Engel, 2018)。

4 蜜蜂肠道微生物的研究方法

4.1 蜜蜂肠道微生物的分离和培养方法

蜜蜂肠道微生物群落分离和鉴定首先需要确定样本是整个肠道或部分肠道。对于蜜蜂肠道的解剖,使用1%氯水溶液(二氯异氰尿酸钠或过氯酸钠)擦拭蜜蜂全身,清除可能会影响实验结果

的其他微生物及核酸分子。每头蜜蜂浸泡上述溶液2~7 min后,用无菌纯净水冲洗3次。为了避免影响后续PCR的反应,导致结果出现误差,因此需要确保无菌水冲洗了所有含氯试剂(Engel *et al.*, 2015b)。提取DNA之前对昆虫进行表面消毒是一种常见的做法,但也有人质疑这一耗时的步骤是否对微生物群落分析有任何影响,因此分别用5种不同的方法,即冷冻、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)、溴化十六溴铵(CTAB)和无防腐剂室温进行处理,将4种昆虫的复制个体完整保存两个月,然后对整个标本进行16S rRNA基因测序,与未消毒的昆虫相比,表面消毒并没有改变细菌群落结构,这可能是由于昆虫体内的微生物生物量相对于其表面要大得多(Hammer *et al.*, 2015)。在对成百上千的昆虫标本进行大规模的分子研究时,表面消毒可能不值得花费时间和精力,这些信息将有助于研究人员设计不同的方案和策略进行实验。解剖肠道组织后,加入适量无菌Krebs-Ringer溶液,在漩涡振荡器上用灭菌的研磨棒充分研磨肠道,然后将研磨液用无菌厌氧的生理盐水进行10倍梯度稀释,取 10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 3个梯度的稀释液(100~150 μL)涂布于不同培养基的培养皿上(也可放入液体培养基中)。将涂布后的平板分别放至35~37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养箱(含氧量 $\leq 1\%$)中培养48~72 h。每个培养基和梯度设3次重复,对表征不同的菌落进行厌氧挑菌(董志祥等, 2018)。

4.2 蜜蜂肠道微生物的保存方法

目前蜜蜂肠道菌的培养方法是通过无菌操作从蜜蜂肠道中提取共生菌,接入适合该菌生长的培养基(如胰酪胨大豆琼脂培养基、心浸液琼脂培养基、脑心浸液琼脂以及西红柿汁琼脂培养基(Oxoid、Basingstoke、Hampshire、UK),乳酸细菌培养基(MRS),液体培养基(Lactobacillus Carrying Media)等),接着将培养皿放到35~37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中;但大部分蜜蜂肠道菌都需要一个低氧或者无氧的环境才能生长,因此一个专门的密封设备、 CO_2 培养箱和 N_2 的培养箱等装置是有益于肠道菌的培养(Engel *et al.*, 2015b)。

4.3 蜜蜂肠道微生物的分子鉴定方法

随着现代分子生物学技术的发展,一些以16S rRNA基因序列分析为基础的分子技术被广泛用于微生物的鉴定、分类以及微生物之间进化关系的确定等,如DGGE(Denaturing Gradient Gel

Electrophoresis)、TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 等常规分子生物学技术 (Shi *et al.*, 2010), 以及可精确定位细菌在昆虫肠道中分布的位置荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 方法 (Engel and Moran, 2013), 这些技术主要用来鉴定或描述一些特殊菌群的特征。变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 是根据 DNA 在不同浓度的变性剂中解链行为的不同而导致电泳迁移率发生变化, 从而将片段大小相同而碱基组成不同的 DNA 片段分开。DGGE 对微生态的分析一般包括 3 个步骤: 核酸提取、16S rRNA 序列的 PCR 扩增以及 DGGE 指纹图谱分析。通过克隆、测序建立微生物区系的 16S rRNA/DNA 文库, 通过系统发育分析, 建立进化树, 从而获得微生物多样性信息。末端限制性片段长度多态性 (TRFLP) 分析是一种分析生物群落的指纹技术, 它的基础原理涉及末端荧光标记的 PCR 产物的限制性酶切, 优点是可以检测微生物群落中较少的种群。荧光原位杂交技术是一种重要的非放射性原位杂交技术, 原理是利用报告分子 (如生物素、地高辛等) 标记核酸探针, 然后将探针与染色体或 DNA 纤维切片上的靶 DNA 杂交, 若两者同源互补, 即可形成靶 DNA 与核酸探针的杂交体。此时可利用该报告分子与荧光素标记的特异亲和素之间的免疫化学反应, 经荧光检测体系在镜下对 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。微生物组数据的获得通常有 3 种方式, 即 16Sr RNA 基因序列测定、宏基因组测定 (描述细菌的潜在功能)、宏转录组数据 (描述活性基因的表达) (Goodrich *et al.*, 2014)。

4.4 无菌蜜蜂的构建方法

无菌蜜蜂一般使用两种方式构建, 即从蜜蜂卵或者从晚期蛹开始培养。从健康的蜂巢中收集到蜜蜂卵经过消毒后, 挑到无菌的 96 孔板中放置在 34℃、相对湿度为 80% 培养箱内避光培养。前 3 d 使用无菌的蜂王浆喂养, 然后用无菌的蜂粮替代蜂王浆。每 24 h 将幼虫转移至新的含有饲料的孔板内培养, 即将化蛹时, 将幼虫移至垫有两层滤纸的 24 孔板内准备化蛹和羽化。

另一种构建方式根据 Zheng 等人 (2017) 的方法, 从蜂箱的孵卵架中手动取出晚期蛹 (即有深色眼睛和角质层的蛹), 并放入无菌塑料箱中。如果蜜蜂自己啃出蜂巢, 可能会被巢脾表面残留的肠道共生菌接种。让蛹在 35℃ 的生长室中羽化。

新羽化的个体被保存在一个带有可移动底座和通风孔的无菌杯状贮藏笼中, 并用灭菌的蔗糖糖浆 (0.5 M) 和蜂粮喂养。蜂粮提前用 γ 射线 (30 kgy) 灭菌。灭菌的糖浆铺在 LB 板上并在 37℃ 下过夜孵育来验证灭菌是否完全 (Zheng *et al.*, 2017)。

5 蜜蜂肠道微生物的应用

蜜蜂一生中会受到许多病毒、寄生虫等的病原体感染, 为了阻止这些病原体的传播, 科学家们试图基因改造与昆虫相关的共生微生物 (Durvasula *et al.*, 1997)。转基因项目分 3 个阶段展开: 首先, 必须识别并描述来自肠道的细菌, 它们具有作为转基因载体的巨大潜力; 其次, 以报告蛋白转化细菌, 测试并描述其性能, 包括蜜蜂的有效返回、在肠道中的停留时间、不干扰肠道内已建立的微生物区系、未影响蜜蜂存活; 最后, 所选择的细菌被转化为对抗蜜蜂病原体的效应基因 (Rangberg *et al.*, 2012)。

Leonard 等人 (2020) 选定肠道共生菌 *S. alvi*, 用以诱导进行 RNAi 免疫应答, 经过工程化的 *S. alvi* 可以触发瓦螨 RNAi 反应来杀死寄生的瓦螨, 提高了蜜蜂的存活率, 保护了蜜蜂的健康 (Leonard *et al.*, 2020)。副转基因 (Paratransgenesis) 是一种基于基因改造的共生微生物, 使其表达传递效应蛋白, 阻止病原体的发展或传播的方法 (Durvasula *et al.*, 1997)。环境中广泛分布的 *L. kunkei* 也符合成为合适的副转基因候选株所需的 3 个标准: 它是可转化的, 其转化的衍生物不会对蜜蜂的健康产生负面影响, 并且转化的细菌能够在蜜蜂肠道中存活至少一段时间 (Rangberg *et al.*, 2015)。

众所周知, 乳酸菌可以抑制其他微生物的生长, 无论它们是与宿主共同进化还是通过选择伴侣的机制被宿主从环境中吸收, 乳酸菌都是有益的 (McFrederick *et al.*, 2013)。Daisley 等人 (2020) 发现, 以营养小馅饼于蜂箱中添加益生菌乳酸杆菌可抑制自然发生的美洲幼虫腐臭病。利用实验室饲养的蜜蜂幼虫进行的体外实验表明, *Lactobacillus plantarum* Lp39、*Lactobacillus rhamnosus* GR-1 和 *Lactobacillus kunkei* BR-1 (包含在生物制剂中) 可以上调关键免疫基因的表达, 降低病原菌载量, 提高幼虫被感染后的存活率 (Daisley

et al., 2020)。这些发现表明, 使用含有乳酸杆菌的蜂箱补充剂可减少致病菌引起的蜂群损失, 对养蜂人来说是实用和负担得起的。

从健康蜜蜂的消化道中分离出的 *Lactobacillus brevis* B50 以花粉悬浮液的形式应用于蜂群, 发现蜜蜂乳酸菌与肠道菌的比例显著增加, 证实了被测试的益生菌制剂可增强蜂群的免疫力, 从而增强它们对传染病和应激条件的抵抗力 (Maruscakova *et al.*, 2020)。而 *Lactobacillus salivarius* A3iob 从蜜蜂肠道中分离出来 (Audisio and Benitez-Ahrendts, 2011), 最近被证明是一种天然的替代品, 它能提供更高的蜂蜜产量, 从而对养蜂人的经济产生积极的影响 (Fanciotti *et al.*, 2018)。蜜蜂肠道中解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 这两种菌都可用于纳豆的发酵生产 (徐艳等, 2017)。益生菌制剂不仅是对蜜蜂有益的, 还有研究发现从蜜蜂产品中分离出的 *L. kunkei* YB38 可能促进人类产生 IgA, 提高人体的免疫力 (Asama *et al.*, 2015)。随着生物技术的进步, 关于蜜蜂肠道微生物的应用一定会越来越完善, 对人类生产、健康方面都带来积极的影响。

6 问题与展望

随着人们对蜜蜂健康的关注, 近年蜜蜂肠道微生物的研究与应用取得了长足的进展。这一领域之所以成为蜜蜂研究的热点, 主要仍存在许多问题有待突破。

蜜蜂肠道具有一个仅由 5 个菌种组成的简单核心菌群。但是, 蜜蜂的肠道结构、免疫系统、生活环境、食物组成是如何通过长期进化选择核心菌群的? 可否通过外源菌株改造蜜蜂肠道菌群, 从而培育优势蜂群? 蜜蜂肠道中未被培养的细菌约占蜜蜂肠道细菌种类总数的 32.42% (郭军, 2015), 这些目前人工尚未培养的菌群在蜜蜂肠道内的功能研究仍是未来之选。蜜蜂的健康状态和肠道微生物之间存在着平衡关系, 肠道微生物群落失衡时将导致病原体的入侵, 因此有必要深入了解这些细菌在健康群、疾病群和受胁迫群中的结构和功能, 以及它们与蜜蜂发生作用 (如营养和免疫等) 的分子机制。蜜蜂肠道微生物的分子操作是极具吸引力的方向, 可用于构建抵抗病原、提高免疫力、改善营养结构以及提高蜂产品产量的蜜蜂群体 (Casalone *et al.*, 2020)。

参考文献 (References)

- Alberoni D, Baffoni L, Gaggia F, *et al.* Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. [J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9: 269–278.
- Al-Ghamdi A, Ali Khan K, Javed Ansari M, *et al.* Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018, 25: 383–387.
- Anderson KE, Ricigliano VA, Mott BM, *et al.* The queen's gut refines with age: Longevity phenotypes in a social insect model [J]. *Microbiome*, 2018, 6: 108.
- Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, *et al.* Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e83125.
- Arredondo D, Castelli L, Porrini MP, *et al.* *Lactobacillus kunkei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae* [J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9: 279–290.
- Asama T, Arima TH, Gomi T, *et al.* *Lactobacillus kunkei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119: 818–826.
- Audisio MC, Benitez-Ahrendts MR. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies [J]. *Beneficial Microbes*, 2011, 2: 29–34.
- Babendreier D, Joller D, Romeis Jr, *et al.* Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59: 600–610.
- Blanchard P, Guillot S, Antunez K, *et al.* Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan (R) assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 197: 7–13.
- Bonilla-Rosso G, Engel P. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 69–76.
- Bottacini F, Milani C, Turrone F, *et al.* Bifidobacterium asteroides PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e44229.
- Cariveau DP, Elijah Powell J, Koch H, *et al.* Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*) [J]. *The ISME Journal*, 2014, 8: 2369–79.
- Casalone E, Cavalieri D, Daly G, *et al.* Propolis hosts a diverse microbial community [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36: 50.
- Casteels P, Ampe C, Riviere LR, *et al.* Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *FEBS Journal*, 1990, 187: 381–386.

- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder [J]. *Science*, 2007, 318: 283 – 287.
- Dai P, Yan Z, Ma S, *et al.* The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared *in vitro* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66: 7786 – 7793.
- Daisley BA, Pitek AP, Chmiel JA, *et al.* Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees [J]. *The ISME Journal*, 2020, 14: 476 – 491.
- Danihlík J, Aronstein K, Petrivalský M. Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2016, 54: 123 – 136.
- Diaz T, Del-Val E, Ayala R, *et al.* Alterations in honey bee gut microorganisms caused by *Nosema* spp. and pest control methods [J]. *Pest Management Science*, 2019, 75: 835 – 843.
- Ding L. The Effect of Different Saccharides on Honeybee Food consumption, Gut Bacteria and Index of Antioxidant [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2016. [丁琳. 不同糖类对蜜蜂采食量、肠道微生物和抗氧化指标的影响 [D]. 成都: 四川农业大学, 2016]
- Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (Suppl. 1): 4554 – 4561.
- Dong ZX, Li HY, Chen YF, *et al.* Advances in research on honey bee gut microbiota, including anaerobic culturing methods [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2018, 55 (6): 963 – 972. [董志祥, 李还原, 陈奕霏, 等. 蜜蜂肠道菌群的培养方法及特性研究进展 [J]. *应用昆虫学报*, 2018, 55 (6): 963 – 972]
- Dong ZX, Li HY, Chen YF, *et al.* Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages [J]. *Microbiological Research*, 2020, 231: 126370.
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, *et al.* Prevention of insect – borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 3274 – 3278.
- Ellegaard KM, Engel P. Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 446.
- Ellegaard KM, Tamarit D, Javelind E, *et al.* Extensive intra – phylotype diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 284.
- Emery O, Schmidt K, Engel P. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26: 2576 – 2590.
- Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2013, 37: 699 – 735.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109: 11002 – 11007.
- Engel P, Kwong WK, Moran NA. *Frischella perrara* gen. nov., sp. Nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63: 3646 – 3651.
- Engel P, Bartlett KD, Moran NA. The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host [J]. *mBio*, 2015a, 6: e00193 – 15.
- Engel P, James RR, Koga R, *et al.* Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2015b, 52: 1 – 24.
- Erban T, Harant K, Hubalek M, *et al.* In – depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV – complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite [J]. *Scientific Reports*, 2015: 5.
- Evans JD, Lopez DL. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2004, 97: 752 – 756.
- Fanciotti MN, Tejerina M, Benitez – Ahrendts MR, *et al.* Honey yield of different commercial apiaries treated with *Lactobacillus salivarius* A3iob, a new bee – probiotic strain [J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9: 291 – 298.
- Fantham HB, Porter A. The pathogenicity of *Nosema Apisto* insects other than hive bees [J]. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2016, 7: 569 – 579.
- Flint HJ, Duncan SH, Louis P. The impact of nutrition on intestinal bacterial communities [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 38: 59 – 65.
- Gallai N, Salles JM, Settele J, *et al.* Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline [J]. *Ecological Economics*, 2009, 68: 810 – 821.
- Genersch E. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87: 87 – 97.
- Good AP, Gauthier MP, Vannette RL, *et al.* Honey bees avoid nectar colonized by three bacterial species but not by a yeast species isolated from the bee gut [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e86494.
- Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, *et al.* Conducting a microbiome study [J]. *Cell*, 2014, 158: 250 – 262.
- Gore J, Raymann K, Shaffer Z, *et al.* Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees [J]. *PLoS Biology*, 2017: 15.
- Guo R, Li WD, Chen DF, *et al.* Highly – expressed gene differences between *Ascosphaera apis* stressing the larval gut of *Apis mellifera ligustica* and the pure culture of *Ascosphaera apis* [J]. *Microbiology China*, 2018, 45 (2): 368 – 375. [郭睿, 李汶东, 陈大福, 等. 意大利蜜蜂幼虫肠道内球囊菌及其纯培养的高表达基因差异分析 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45 (2): 368 – 375]
- Guo J, Wu J, Chen Y, *et al.* Characterization of gut bacteria at different developmental stages of Asian honey bees *Apis cerana* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 127: 110 – 114.
- Guo J, Li JL, Wu J. The formation of specific gut bacteria during the individual development of bees [J]. *Apiculture of China*, 2015,

- 66 (2): 62–65. [郭军, 李继莲, 吴杰. 蜜蜂个体发育过程中特定肠道菌的形成 [J]. 中国蜂业, 2015, 66 (2): 62–65]
- Hamdi C, Balloi A, Essanaa J, et al. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2011, 135: 524–533.
- Hammer TJ, Dickerson JC, Fierer N. Evidence – based recommendations on storing and handling specimens for analyses of insect microbiota [J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1190.
- Hroncova Z, Havlik J, Killer J, et al. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0118707.
- Hroncova Z, Killer J, Hakl J, et al. In – hive variation of the gut microbial composition of honey bee larvae and pupae from the same oviposition time [J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19: 110.
- Hu C, lv Y, Zhang XY, et al. Analysis of the diversity of gut microbiota of *Apis cerana* in the Aba areaby high – throughput sequencing [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020: 1–12. [胡冲, 吕言, 张小燕, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序分析阿坝地区东方蜜蜂肠道菌群多样性 [J]. 应用与环境生物学报, 2020: 1–12]
- Huang WF, Solter LF. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 113: 35–41.
- Hubert J, Bicianova ML, edvinka O, et al. Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor* and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim* [J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73: 685–698.
- Javorsky P, Fecskeova LK, Hrehova L, et al. Establishment of *Lactobacillus plantarum* strain in honey bee digestive tract monitored using gfp fluorescence [J]. *Beneficial Microbes*, 2017, 8: 291–297.
- Jeyaprakash A, Hoy MA, Allsopp MH. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 84: 96–103.
- Jia HR, Dai PL, Geng LL, et al. No effect of Bt Cry1Ie toxin on bacterial diversity in the midgut of the Chinese honey bees *Apis cerana cerana* (Hymenoptera Apidae) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41688.
- Jones JC, Fruciano C, Hildebrand F, et al. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees [J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8: 441–451.
- Kapheim KM, Rao VD, Yeoman CJ, et al. Caste – specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0123911.
- Keller A, Grimmer G, Steffan – Dewenter I. Diverse microbiota identified in whole intact nest chambers of the red mason bee *Osmia bicornis* (Linnaeus 1758) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e78296.
- Kesnerova L, Mars RAT, Ellegaard KM, et al. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut [J]. *PLoS Biology*, 2017, 15: e2003467.
- Khan KA, Ansari MJ, Al – Ghamdi A, et al. Investigation of gut microbial communities associated with indigenous honey bee (*Apis mellifera jemenitica*) from two different eco – regions of Saudi Arabia [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, 24: 1061–1068.
- Khan KA, Al – Ghamdi AA, Ghramh HA, et al. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 138: 103793.
- Koch H, Abrol DP, Li J, et al. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees [J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22: 2028–44.
- Krabberger S, Cook CN, Schmidlin K, et al. Diverse single – stranded DNA viruses associated with honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2019, 71: 179–188.
- Kwong WK, Medina LA, Koch H, et al. Dynamic microbiome evolution in social bees [J]. *Science Advances*, 2017, 3: e1600513.
- Kwong WK, Moran NA. Evolution of host specialization in gut microbes: The bee gut as a model [J]. *Gut Microbes*, 2015, 6: 214–20.
- Kwong WK, Moran NA. Gut microbial communities of social bees [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14: 374–84.
- Kwong WK, Moran NA. *Apibacter adventoris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from honey bees [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66: 1323–1329.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. Genome sequences of *Lactobacillus* sp. strains wkB8 and wkB10, members of the Firm – 5 clade from honey bee guts [J]. *Genome Announc*, 2014a: 2.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees [J]. *Royal Society Open Science*, 2017, 4: 170003.
- Kwong WK, Engel P, Koch H, et al. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014b, 111: 11509–14.
- Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, et al. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17: 796–815.
- Leonard SP, Powell JE, Perutka J, et al. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens [J]. *Science*, 2020, 367: 573–576.
- Lester PJ, Bosch PJ, Gruber MA, et al. No evidence of enemy release in pathogen and microbial communities of common wasps (*Vespula vulgaris*) in their native and introduced range [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0121358.
- Liao CH. Effect of Fluvalinate on the Development of Larvae, Survival and Gut Microbiota of Honeybee Workers, *Apis mellifera* [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2019. [廖春华. 氟胺氰菊酯对西方蜜蜂幼虫发育、工蜂生存能力及肠道菌群的影响 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2019]
- Li CY, Zhou X, Zheng H. Gut microbiota of social honey bees [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58 (6): 1016–1024. [李晨伊, 周欣, 郑浩. 蜜蜂肠道微生物群落研究进展 [J]. 微生物学报, 2018, 58 (6): 1016–1024]

- Li JH, Evans JD, Li WF, *et al.* New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0187505.
- Liu S, Wang LH, Guo J, *et al.* The variation of pathogens, parasites and symbionts in migratory honeybees (*Apis mellifera ligustica*) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50 (5): 951–958. [刘珊, 王刘豪, 郭军, 等. 转地蜂群病原微生物及肠道共生菌的变化 [J]. 中国农业科学, 2017, 50 (5): 951–958]
- Ma S, Yang Y, Jack CJ, *et al.* Effects of *Tropilaelaps mercedesae* on midgut bacterial diversity of *Apis mellifera* [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2019, 79: 169–186.
- Maes PW, Rodrigues PA, Oliver R, *et al.* Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25: 5439–5450.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78: 2830–40.
- Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, *et al.* A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees [J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20: 619–28.
- Maruseakova IC, Schusterova P, Bielik B, *et al.* Effect of application of probiotic pollen suspension on immune response and gut microbiota of honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2020.
- Matsumoto H, Nomura S, Hayakawa Y. Changes of RNA virus infection rates and gut microbiota in young worker *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) of a chalkbrood-infected colony after a pollination task in a greenhouse [J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2014, 49: 395–402.
- Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, *et al.* Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e32962.
- McFrederick QS, Wcislo WT, Taylor DR, *et al.* Environment or kin: Whence do bees obtain acidophilic bacteria [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21: 1754–68.
- McFrederick QS, Cannone JJ, Gutell RR, *et al.* Specificity between lactobacilli and hymenopteran hosts is the exception rather than the rule [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79: 1803–1812.
- McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL, *et al.* Flowers and wild megachilid bees share microbes [J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73: 188–200.
- Mohr KI, Tebbe CC. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (*Apoidea*) at an oilseed rape field [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8: 258–72.
- Moran NA, Hansen AK, Powell JE, *et al.* Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e36393.
- Motta EVS, Raymann K, Moran NA, Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115: 10305–10310.
- Poppinga L, Genersch E. Molecular pathogenesis of American Foulbrood: How *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2015, 10: 29–36.
- Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, *et al.* Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80: 7378–7387.
- Rangberg A, Diep DB, Rudi K, *et al.* Paratransgenesis: An approach to improve colony health and molecular insight in honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2012, 52: 89–99.
- Rangberg A, Mathiesen G, Amdam GV, *et al.* The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera* [J]. *Beneficial Microbes*, 2015, 65: 13–23.
- Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, *et al.* Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 3344–3347.
- Raymann K, Coon KL, Shaffer Z, *et al.* Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees [J]. *Mbio*, 2018a, 9.
- Raymann K, Motta EVS, Girard C, *et al.* Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018b, 84.
- Rembold H, Kremer J, Ulrich GM. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. [J]. *Apidologie*, 1980, 11: 29–38.
- Ribiere C, Hegarty C, Stephenson H, *et al.* Gut and whole-body microbiota of the honey bee Separate thriving and non-thriving hives [J]. *Microbial Ecology*, 2019, 78: 195–205.
- Ricigliano VA, Fitz W, Copeland DC, *et al.* The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2017, 96.
- Rothman JA, Carroll MJ, Meikle WG, *et al.* Longitudinal effects of supplemental forage on the honey bee (*Apis mellifera*) microbiota and inter- and intra-colony variability [J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76: 814–824.
- Rubanov A, Russell KA, Rothman JA, *et al.* Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 3820.
- Sabate DC, Carrillo L, Audisio MC. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples [J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160: 193–199.
- Sekirov I, Tam NM, Jogova M, *et al.* Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection [J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76: 4726–4736.
- Shi W, Syrenne R, Sun JZ, *et al.* Molecular approaches to study the

- insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age [J]. *Insect Science*, 2010, 17: 199–219.
- Steffan SA, Dharampal PS, Diaz-Garcia L, et al. Empirical metagenomic and computational techniques illuminate the mechanisms by which fungicides compromise bee health [J]. *Jove-journal of Visualized Experiments*, 2017.
- Taylor MA, Robertson AW, Biggs PJ, et al. The effect of carbohydrate sources: Sucrose invert sugar and components of manuka honey on core bacteria in the digestive tract of adult honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *PLoS ONE*, 2019, 14: e0225845.
- Vasquez A, Forsgren E, Fries I, et al. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e33188.
- Vojvodic S, Rehan SM, Anderson KE. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e72106.
- Walderdorff L, Laval-Gilly P, Bonnefoy A, et al. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (lipopolysaccharide) of *Escherichia coli* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 108: 17–24.
- Wang H, Liu C, Liu Z, et al. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20: 61.
- Xu Y, Chen F, Yan WD, et al. Isolation and identification of natto fermentation strains in honeybee guts [J]. *Journal of Bee*, 2017, 37 (4): 11–13. [徐艳, 陈芳, 严文东, 等. 蜜蜂肠道纳豆发酵菌株的分离与鉴定 [J]. 蜜蜂杂志, 2017, 37 (4): 11–13]
- Yang Y, Ma S, Yan Z, et al. Effects of three common pesticides on survival food consumption and midgut bacterial communities of adult workers *Apis cerana* and *Apis mellifera* [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 860–867.
- Yang ZB, Zhang SS. Identification and Analysis of honeybee intestinal bacterial in different seasons [J]. *Apiculture of China*, 2010, 61 (5): 11–14. [杨志波, 张绍升. 蜜蜂肠道细菌菌群结构及其季节性变动 [J]. 中国蜂业, 2010, 61 (5): 11–14]
- Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10: 1612–20.
- Zhang QL, Wu J, Li HY, et al. Overview of bee gut flora (continued) [J]. *Apiculture of China*, 2019, 70 (2): 37–39. [张棋麟, 吴杰, 李还原, 等. 蜜蜂肠道菌群概述 (续) [J]. 中国蜂业, 2019, 70 (2): 37–39]
- Zhang YQ. The Study of the Symbiotic Bacteria in Honeybee Intestinal Tract [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013. [张义强. 蜜蜂肠道共生菌的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013]
- Zheng H, Powell JE, Steele MI, et al. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114: 4775–4780.
- Zheng H, Nishida A, Kwong WK, et al. Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola* [J]. *mBio*, 2016, 7 (6): e01326–16.
- Zheng H, Perreau J, Powell JE, et al. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116: 25909–25916.
- Zhou T, Wang Q, Yao J, et al. Research progress of *Varroa destructor* (Bee mite) in China [J]. *Apiculture of China*, 2007, 2: 5–7. [周婷, 王强, 姚军, 等. 中国狄斯瓦螨 (*Varroa destructor*, 大蜂螨) 研究进展 [J]. 中国蜂业, 2007, 2: 5–7]
- Zhu L, Qi S, Xue X, et al. Nitenpyram disturbs gut microbiota and influences metabolic homeostasis and immunity in honey bee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113671.
- Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e77547.