



寇若玫, 窦飞越, 李红英, 周泽扬, 龙金桂, 黄敦元. 油茶地蜂不同龄期幼虫肠道细菌多样性及其差异分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 402–413.

# 油茶地蜂不同龄期幼虫肠道细菌多样性及其差异分析

寇若玫, 窦飞越, 李红英, 周泽扬, 龙金桂, 黄敦元\*

(重庆师范大学, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

**摘要:** 蜜蜂肠道微生物在其宿主健康与调控宿主生长发育中起着重要作用。油茶地蜂 *Andrena camellia* Wu 是油茶的优势传粉昆虫。本研究从野外挖掘该蜂典型样地的巢穴得到油茶地蜂 1~5 龄及滞育阶段的幼虫, 通过 PCR 扩增得到幼虫肠道微生物 16S rRNA 基因文库, 利用 Illumina Miseq 二代高通量测序技术首次研究了油茶地蜂不同龄期幼虫肠道细菌的群落结构和多样性。结果显示, 油茶地蜂幼虫肠道细菌菌群共检测到 27 个门, 72 个纲, 155 个目, 278 个科, 570 个属。其中, 最主要的门为变形菌门 Proteobacteria (占 40.05%), 最主要的目为乳杆菌目 Lactobacillales (占 12.16%), 最主要的科为乳杆菌科 Lactobacillaceae (占 11.27%), 最主要的属是乳杆菌属 *Lactobacillus* (占 11.27%)。核心细菌群落组间差异、Alpha 多样性以及 Beta 多样性分析显示: 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落在组成、多样性以及结构上均存在显著差异。线性判别分析结果显示, 不动杆菌属 *Acinetobacter* 和红球菌属 *Rhodococcus* 主要存在于 5 龄幼虫阶段, 巴尔通氏体属 *Bartonella* 和肠杆菌属 *Enterobacter* 主要存在于 1 龄幼虫阶段。本研究明确了油茶地蜂不同龄期幼虫肠道微生物组成、优势菌群及其群落变化规律, 为油茶地蜂等土壤筑巢独栖野生蜜蜂肠道微生物学及其保护生物学的相关研究提供理论依据及研究角度。

**关键词:** 油茶地蜂; 幼虫; 高通量测序; 肠道细菌; 细菌多样性

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 02-0402-12

## Gut bacterial divergence between different larval instars of *Andrena camellia* Wu (Hymenoptera: Andrenidae)

KOU Ruo-Mei, DOU Fei-Yue, LI Hong-Ying, ZHOU Ze-Yang, LONG Jin-Gui, HUANG Dun-Yuan\*  
(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** Gut microbes play an important role in health and control of growth and development of honey bees. *Andrena camellia* Wu is the main solitary pollinator of *Camellia oleifera*. The typical nests of this bee were excavated in the wild to obtain the larvae at the 1~5<sup>th</sup> instar and diapause stage. The gene library of 16S rRNA was obtained by PCR from the DNA extracted from the gut contents of the larvae. The structure and biodiversity of gut bacterial community were studied for the first time by Illumina Miseq second-generation high-throughput sequencing technology. The results showed that 27 phyla, 72 classes, 155 orders, 278 families and 570 genera were detected in the gut flora of the larvae of *A. camellia*. The main phylum, order, family and genera were Proteobacteria (40.05%), Lactobacillales (12.16%), Lactobacillaceae (11.27%), and *Lactobacillus* (11.27%), respectively. There was significant statistical difference in core bacterial communities' composition, biodiversity and community structure. The line

基金项目: 科技部科技基础资源调查专项 (2018FY100405); 国家自然科学基金 (31970484, 31770160); 成渝地区双城经济圈建设科技创新项目上 (kjcx2020021)

作者简介: 寇若玫, 女, 1994 年生, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: kouruomei@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 黄敦元, 博士, 教授, 研究方向为野生蜜蜂传粉生态学, E-mail: huangdunyan@126.com

收稿日期 Received: 2020-10-05; 接受日期 Accepted: 2021-03-17

discriminant analysis showed that *Acinetobacter* and *Rhodococcus* were mainly in the fifth instar larvae, while the *Bartonella* and *Enterobacter* were mainly in the first instar larvae. In this study, the composition of intestinal bacterial communities, dominant flora and community variation of different instar larvae of *A. camellia* were determined, which provided theoretical basis and research perspective for intestinal microbiology and protective biology of soil-nesting wild bees such as *A. camellia*.

**Key words:** *Andrena camellia* Wu; larva; high-throughput sequencing; gut bacteria; bacterial diversity

蜜蜂共生菌群在其宿主健康中扮演着重要角色。一方面,在群居蜜蜂肠道微生物功能研究中发现,泰国黑小蜜蜂 *Apis andreniformis*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、东方蜜蜂 *Apis cerana* 等的共生细菌具有抑制微生物病原定植和入侵的作用 (Ahmed *et al.*, 2012; Killer *et al.*, 2014); 美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens* 肠道微生物具有对复杂碳水化合物发酵和吸收以及重要营养物质生物合成的功能作用 (Martinson *et al.*, 2014)。另一方面,独栖野生蜜蜂共生微生物同样显示出对宿主的有利作用,例如: 苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* 共生益生菌中米氏乳杆菌 *Lactobacillus micheneri* 具有潜在花粉消化、解毒以及病原抑制活性 (Vuong *et al.*, 2019); *Heriades truncorum* 共生菌中类芽孢杆菌 MBD-MB06 *Paenibacillus* MBD-MB06 具有抑制病原真菌入侵的作用 (Keller *et al.*, 2018)。

随着微生物群落研究技术的发展,蜜蜂肠道菌群组成及其动态变化等方面的研究得到不断加强。营社会性的群居蜜蜂中,工蜂的核心微生物主要涉及到 5 个物种分支,包括: 变形菌门 Proteobacteria 中的 *Snodgrassella alvi* 和 *Gilliamella apicola* (Kwong & Moran, 2013); 厚壁菌门 Firmicutes 中的 *Lactobacillus* Firm-4 和 *Lactobacillus* Firm-5 (Martinson *et al.*, 2011); 放线菌门 Actinobacteria 中的 *Bifidobacterium asteroides* (Bottacini *et al.*, 2012)。独栖野生蜜蜂的肠道中同样存在稳定的核心菌群,包括: 醋酸菌科 Acetobacteraceae、芽孢杆菌科 Bacillaceae、伯克氏菌科 Burkholderiaceae、梭菌科 Clostridiaceae、丛毛单胞菌科 Comamonadaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、毛螺菌科 Lachnospiraceae、乳杆菌科 Lactobacillaceae、甲基杆菌科 Methylobacteriaceae、莫拉菌科 Moraxellaceae、鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae 和草酸杆菌科 Oxalobacteraceae (Voulgari-Kokota *et al.*, 2019)。与此同时,蜜蜂共生微生物群落组成与结构会随着蜜蜂生长发育阶段的不同而发生显著变化。据

报道,群居社会性蜜蜂中的工蜂喂养行为对幼虫宿主摄取获得大量微生物至关重要。例如,在刚开始进食期间,幼虫肠道微生物会迅速增长 (Kwong & Moran, 2016),随着幼虫的发育,肠道微生物的组成结构会发生显著变化,生物多样性也逐渐增多 (Smagghe *et al.*, 2013)。而对于独栖野生蜜蜂来说,它们不存在口器喂养的行为,雌性个体将采集到的花粉(花蜜)与唾液腺分泌物混合制作成蜂粮提前放入筑好的虫室中供其孵化幼虫发育所需 (Voulgari-Kokota *et al.*, 2019)。Martha 等 (1984) 研究表明,筑巢材料及蜜源植物的共生菌,可能是其幼虫肠道菌群形成的重要驱动因素; 另外,独栖蜜蜂幼虫肠道微生物与群居蜜蜂幼虫肠道微生物菌群结构存在明显差异,且独栖蜜蜂肠道菌群结构更加不稳定。Kathrin 等 (2006) 通过比较同一植被环境条件下不同时期独栖野生蜜蜂 *Osmia bicorn* 和两种群居蜜蜂幼虫肠道菌群(西方蜜蜂和欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*),发现两者之间存在显著不同。并且,不同时期的 *Osmia bicornis* 幼虫肠道微生物组成发生明显变化。然而,关于不同龄期独栖蜜蜂幼虫肠道微生物变化趋势报道还处于相对匮乏状态。

油茶地蜂 *Andrena camellia* Wu 属膜翅目 Hymenoptera 蜜蜂总科 Apoidea 地蜂科 Andrenidae 地蜂属 *Andrena*, 是江西、湖南、贵州、重庆、湖北等地油茶的主要传粉昆虫。油茶地蜂具有典型的寡食性,仅到访茶和油茶等山茶属植物 (黄敦元等, 2008; 黄敦元等, 2017; 邱建生等, 2018)。然而目前为止,关于油茶地蜂等野生独栖蜜蜂幼虫肠道微生物及其发育过程中的相关研究相对匮乏,鉴于蜜蜂肠道微生物对宿主的重要生物学意义,本研究采用 Illumina MiSeq 二代高通量测序方法,对油茶地蜂幼虫肠道细菌进行研究并比较分析不同龄期的幼虫肠道细菌结构和生物多样性差异,以期后续土壤筑巢独栖野生蜂肠道微生物研究奠定基础,也为此类蜜蜂的保护生物学研究提供新的角度与方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 油茶地蜂幼虫样品采集

本研究所用不同龄期的油茶地蜂幼虫样本均采集于江西省宜春市袁州区彬江镇 (27°80'N, 114°38'E) 附近几个油茶地蜂巢穴密集区, 采集时间 2018 年 11 月 - 2019 年 3 月。幼虫解剖前用 70% 酒精进行虫体体表消毒 30 s, 0.1% Triton-X-100 溶液处理 5 min, 最后用超纯水冲洗 3 次, 将清洗干净的幼虫放到 Ringer's 溶液中解剖并得到肠道样品放入 2 mL 离心管中 (Haw *et al.*, 2015), 经液氮速冻, 存入 -80°C 冰箱。共获取 6 个实验组, 每个实验组 3 个重复, 每个重复 10 头幼虫。

### 1.2 油茶地蜂幼虫肠道细菌基因组 DNA 的提取

分离得到的肠道细菌基因组 DNA (提取采用 NucleoSpin<sup>®</sup> 96 Soil kit 试剂盒 (德国 MACHEREY-NAGEL 公司)), 提取步骤按试剂盒的说明书。分离得到的 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并切下目的条带测定, 在  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  分光光度检测。

### 1.3 16S rRNA 基因片段扩增, 文库构建与测序

利用细菌 16S rRNA 基因片段 V3-V4 区通用引物 (338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWCTAAT-3') (Li *et al.*, 2018) 扩增得到 16S rRNA 基因片段 V3-V4 区。PCR 反应体系: DNA 样品 (60 ng), dNTPs (1  $\mu$ L, 10  $\mu$ M each), high GC enhancer (10  $\mu$ L), Q5 DNA polymerase (with high-fidelity) (0.2  $\mu$ L), Buffer (10  $\mu$ L)。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 15 个循环; 72°C 延伸 7 min (Koichi-Takebayashi *et al.*, 2000)。用 VAHTSTM DNA Clean Beads 纯化第一步得到的 PCR 产物, 随后, 在 40  $\mu$ L 的反应体系中进行第二轮 PCR, 反应体系: 第一步中 PCR 产物 (10  $\mu$ L), 2  $\times$  Phusion HF MM (20  $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O (8  $\mu$ L), primer (10  $\mu$ M)。反应条件: 98°C 预变性 30 s; 98°C 变性 10 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 10 个循环; 72°C 延伸 5 min。最后, 用 Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA HS Reagent 进行定量, 并将其整合到一起。最后, 将整合纯化得到的产物利用 Illumina HiSeq PE250 测序平台进行双端测序。

### 1.4 测序数据分析

利用 FLASH (version 1.2.11) 软件 (Tanja *et al.*, 2011) 对双端数据进行拼接; 利用 Trimmomatic (Version 0.33) (Bolger *et al.*, 2014) 进行数据过滤并除去低于 200 bp 的序列和大于 8 bp 的同聚体; 利用 UCHIME Algorithm 去除嵌合体序列, 质控获得高质量的 clean reads。

利用 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME V1.7.0) 对测序结果进行同源比对并将相似度在 97% 水平上的序列聚类成 OTU (Operational Taxonomic Unit) (cluster 方法) (Edgar, 2013), 并利用 SILVA 数据库对得到的 16S rRNA 基因序列进行注释 (Quast *et al.*, 2013)。通过 Ribosomal Database Program (RDP) (V2.2) 在不同分类水平 (门、纲、目、科、属) 进行分类注释 (Wang *et al.*, 2007), 并且利用 OTUs 数据结果进行稀释曲线的绘制, 以验证数据的可靠性 (Wang *et al.*, 2012)。

利用 Mothur v. 1.30 (Patrick *et al.*, 2009) 分别对 OTU 水平 alpha 多样性指数进行评估, 包括: Shannon 和 Chao1; 利用 SPSS 25.0 进行单因素方差分析研究其组间是否存在显著差异; 利用 GraphPad Prism 8 进行可视化。基于 QIIME 软件聚类得到的 OTU, 利用 Bray-Curtis 算法计算得到组间 Beta 距离, 非度量多维标定法 NMDS (Nonmetric Multidimensional Scaling) 降维并进行可视化, 最后, 利用置换多元方差分析 PERMANOVA (Adonis) 计算组间差异性 (利用 R 软件)。线性判别分析效应量 (LDA (Line Discriminant Analysis) LefSe (Effect Size)) 能够在不同组间寻找具有统计学差异的 Biomarker, 采用此分析, 揭示出差异显著且最有可能解释细菌群落差异的分类特征 (LDA > 4.5) (Nicola *et al.*, 2011)。LefSe 分析利用在线分析软件 Galaxy workflow framework。基于每个 OTU 在 Greengenes 基因数据库 (<http://greengenes.secondgenome.com/>) 中对应的基因获得 COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) 蛋白家族信息, 利用 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (Langille-Morgan *et al.*, 2013) 比对测序数据获得的物种组成信息, 推测样本中的功能基因组成, 利用 SPSS 进行单因素方差分析以及多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 油茶地蜂幼虫肠道细菌测序结果分析

利用 Illumina MiSeq 平台对 16S rRNA 基因 V3-V4 区扩增子双端测序, 从 18 个样本中质控优化后平均每龄期幼虫得到  $57\,483 \pm 1\,735.8$  条有效序列 (reads), 平均长度为  $416 \pm 4$  bp (表 1)。稀释曲线显示, 随着抽样序列数量的增多, 每组样本所观测到的物种数趋于平缓饱和 (图 1), 说明本实验的数据具有可靠性以及反应数据的真实性。根据 97% 的序列相似度对所有序列进行同源比对得到 OTU, 并对结果进行注释得到 27 个门, 72 个纲, 155 个目, 278 个科, 570 个属 (表 1)。

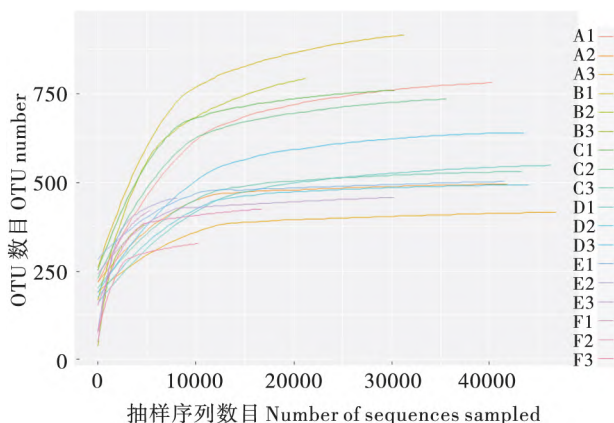


图 1 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌组成稀释曲线  
Fig. 1 Rarefaction curves of the observed species of gut bacteria in different instar larvae of *Andrena camellia*

注: A (1, 2, 3), 1 龄幼虫; B (1, 2, 3), 2 龄幼虫; C (1, 2, 3), 3 龄幼虫; D (1, 2, 3), 4 龄幼虫; E (1, 2, 3), 5 龄幼虫; F (1, 2, 3), 滞育阶段。表 1 同。Note: A (1, 2, 3), First instar larvae; B (1, 2, 3), Second instar larvae; C (1, 2, 3), Third instar larvae; D (1, 2, 3), Fourth instar larvae; E (1, 2, 3), Fifth instar larvae; F (1, 2, 3), Diapause larvae. Same to Table 1.

表 1 油茶地蜂幼虫肠道细菌 16S rRNA 基因测序基本信息

Table 1 Basic information of high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA gene of *Andrena camellia*

样品 Sample	原始标签数 Number of raw tags	有效标签数 Effective tags	平均片段 长度 (bp) AvgLen	不同分类水平物种数量统计 Statistics of the number of classify distribution				
				门 Phyla	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
A1	68 251	55 909	421	22	48	105	190	376
A2	68 187	57 980	420	19	46	95	156	290
A3	69 209	59 432	420	18	42	90	145	250
B1	68 099	56 216	418	23	55	120	215	431
B2	65 666	50 807	417	17	45	104	180	374
B3	66 298	60 220	407	16	36	75	125	231
C1	66 278	53 844	418	22	51	108	186	361
C2	67 395	54 803	420	20	48	103	188	355
C3	65 635	56 708	416	17	39	85	151	275
D1	68 661	60 282	421	20	43	88	149	286
D2	68 200	59 695	420	17	40	84	142	257
D3	68 015	59 096	420	20	45	98	173	340
E1	67 903	55 696	419	22	52	108	169	306
E2	66 453	59 651	409	20	45	91	157	276
E3	67 012	58 517	413	19	41	94	156	283
F1	66 233	59 736	408	18	37	80	128	225
F2	65 306	55 720	411	17	39	87	147	257
F3	67 728	60 386	410	17	37	81	134	207
总计 Total			416	27	72	155	278	570

## 2.2 幼虫肠道主要细菌群落组成分析

对注释到的物种组成进行统计并挖掘到油茶地蜂幼虫肠道核心菌群,主要的门为:变形菌门 Proteobacteria (占 40.05%)、厚壁菌门 Firmicutes (占 26.62%)、放线菌门 Actinobacteria (占 12.78%)、拟杆菌门 Bacteroidetes (占 9.78%)、绿弯菌门 Chloroflexi (占 2.65%) 等;主要的目为:乳杆菌目 Lactobacillales (占 12.16%)、梭菌目 Clostridiales (占 11.76%)、拟杆菌目 Bacteroidales (占 8.20%)、肠杆菌目 Enterobacteriales (占

8.17%)、交替单胞菌目 Alteromonadales (占 7.19%) 等;主要的科为:乳杆菌科 Lactobacillaceae (占 11.27%)、肠杆菌科 Enterobacteriaceae (占 8.17%)、希万氏菌科 Shewanellaceae (占 6.81%)、诺卡氏菌科 Nocardiaceae (占 5.27%)、毛螺菌科 Lachnospiraceae (占 4.42%) 等;主要的属为:乳杆菌属 *Lactobacillus* (占 11.27%)、希万氏菌属 *Shewanella* (占 6.81%)、红球菌属 *Rhodococcus* (占 5.19%)、拟杆菌属 *Bacteroides* (占 2.22%)、绿脓杆菌属 *Pseudomonas* (占 2.18%) 等。具体结果见图 2。

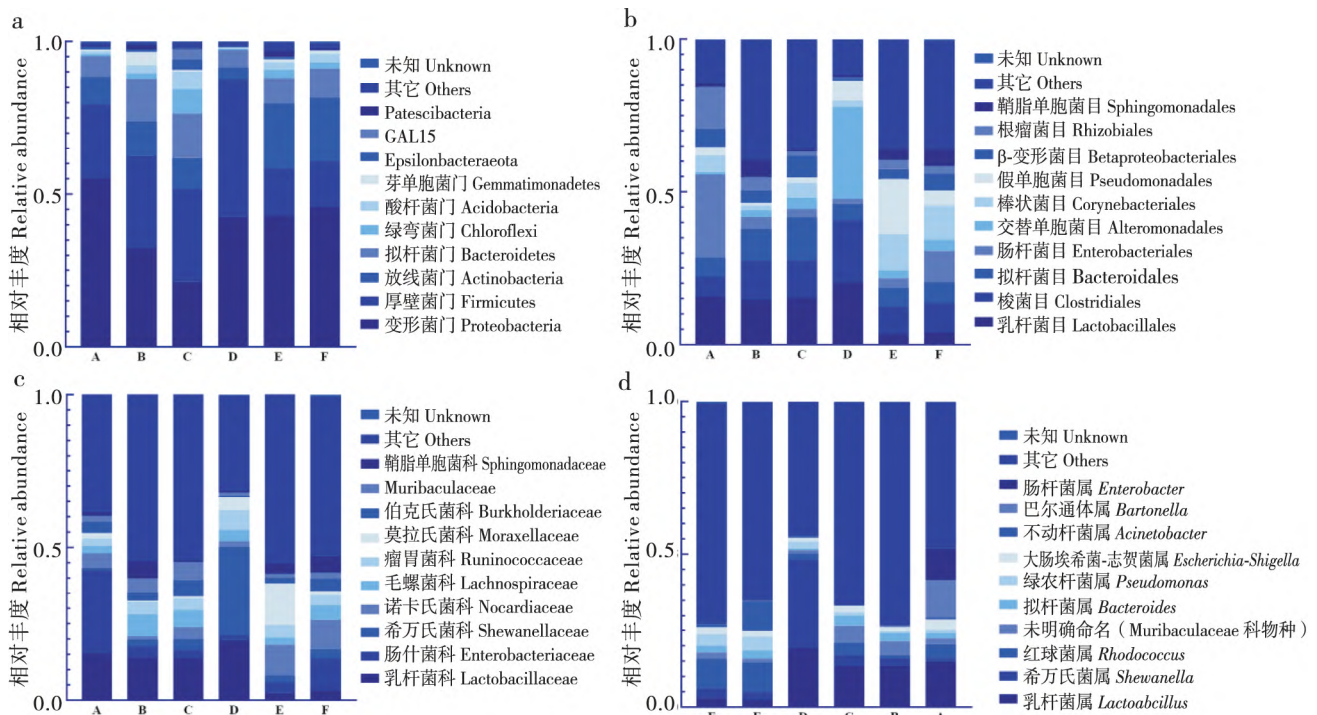


图 2 门 (a)、目 (b)、科 (c)、属 (d) 水平油茶地蜂幼虫肠道细菌组成的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of the dominant gut bacterial communities of different instar larvae and diapause (*Andrena camellia*) at phylum (a), order (b), family (c) and genus (d) levels

注: A, 1 龄幼虫期; B, 2 龄幼虫期; C, 3 龄幼虫期; D, 4 龄幼虫期; E, 5 龄幼虫期; F, 滞育阶段。图 4-7 和表 2 同。Note: A, First instar larvae; B, Second instar larvae; C, Third instar larvae; D, Fourth instar larvae; E, Fifth instar larvae; F, Diapause larvae. Same to Fig. 4-7 and Table 2.

## 2.3 不同龄期幼虫肠道细菌菌群变化分析

### 2.3.1 不同阶段幼虫肠道核心菌群差异分析

油茶地蜂幼虫肠道核心菌群随龄期变化发生变化。采用线性判别分析 (LDA) 效应量 (LefSe) 分析,揭示差异显著且最有可能解释细菌群落差异的分类特征 (LDA > 4.5)。Cladogram 显示 14 个分类单元在不同龄期存在差异。分析结果

显示,在门水平:放线菌门 Actinobacteria 显著存在于 5 龄幼虫阶段,绿弯菌门 Chloroflexi 显著存在于 3 龄阶段;在纲水平:放线菌纲 Actinobacteria 显著存在于 5 龄幼虫阶段, $\alpha$ -变形菌纲 Alphaproteobacteria 显著存在于 1 龄幼虫阶段;在目水平:棒状菌目 Corynebacteriales 和假单胞菌目 Pseudomonadales 显著存在于 5 龄幼虫阶段,根瘤

菌目 Rhizobiales 显著存在于 1 龄幼虫阶段；在科水平：莫拉菌科 Moraxellaceae 和诺卡氏菌科 Nocardiaceae 显著存在于 5 龄幼虫阶段，根瘤菌科 Rhizobiaceae 显著存在于 1 龄幼虫阶段；在属水平：不动杆菌属 *Acinetobacter* 和红球菌属 *Rhodococcus* 显著存在于 5 龄幼虫阶段，巴尔通氏体属 *Bartonella* 和肠杆菌属 *Enterobacter* 显著存在于 1 龄幼虫阶段（图 3）。本研究进一步对不同龄期幼虫肠道核心细

菌群落组成进行差异分析，结果显示：油茶地蜂 4 龄幼虫肠道中的希万氏菌属显著高于其它龄期 ( $P < 0.05$ )；1 龄幼虫肠道中的肠杆菌属显著高于其它龄期 ( $P < 0.05$ )；5 龄幼虫和滞育期幼虫肠道中的红球菌属显著高于 2 龄幼虫 ( $P < 0.05$ ) 与 4 龄幼虫 ( $P < 0.05$ )；1 龄幼虫肠道中的巴尔通氏体属显著高于其它龄期 ( $P < 0.05$ )（图 4）。

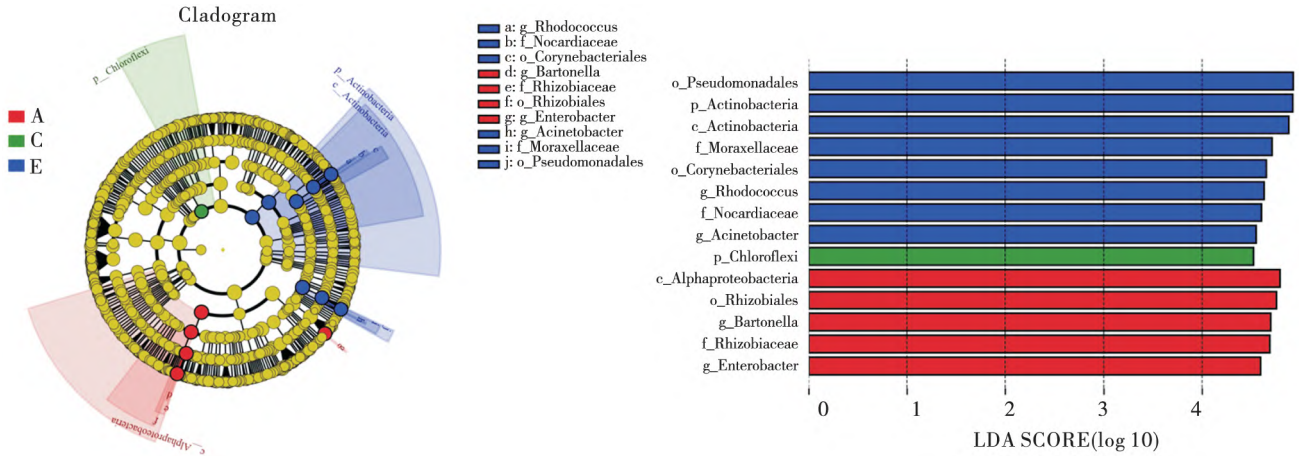


图 3 组间显著存在的细菌差异分析（线性判别分析 LefSe analysis (LDA Effect Size)）

Fig. 3 Significant ranking of abundant modules (LefSe analysis (LDA Effect Size))

注：A，1 龄幼虫；C，3 龄幼虫；E，5 龄幼虫。门 Phyla (p)，放线菌门 Actinobacteria、绿弯菌门 Chloroflexi；纲 Class (c)，放线菌纲 Actinobacteria、 $\alpha$ -变形菌纲 Alphaproteobacteria；目 Order (o)，假单胞菌目 Pseudomonadales、棒状菌目 Corynebacteriales、根瘤菌目 Rhizobiales；科 Family (f)，莫拉菌科 Moraxellaceae、诺卡氏菌科 Nocardiaceae、根瘤菌科 Rhizobiaceae；属 Genus (g)，肠杆菌属 *Enterobacter*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、红球菌属 *Rhodococcus*、巴尔通氏体属 *Bartonella*。Note: A, First instar larvae; C, Third instar larvae; E, Fifth instar larvae.

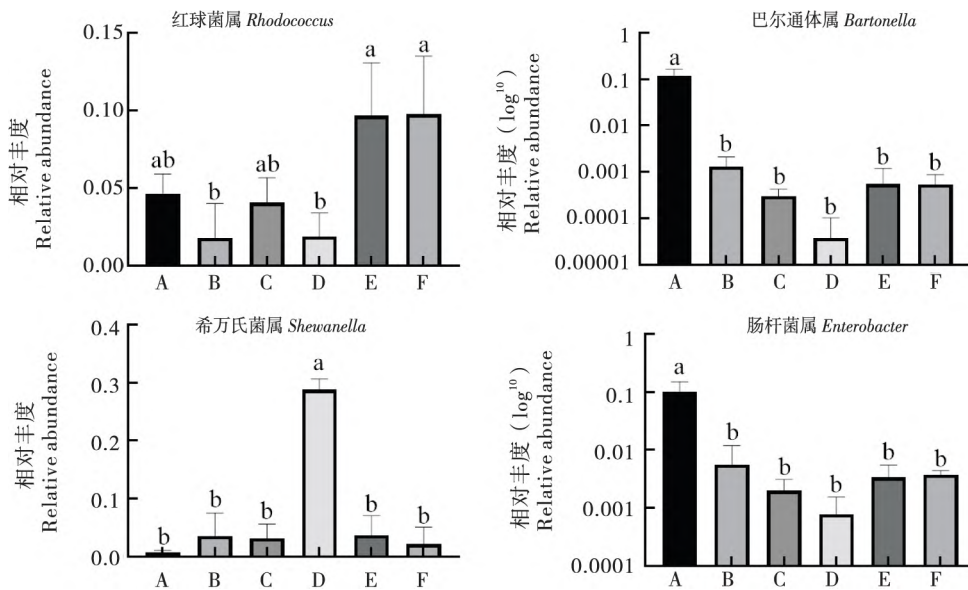


图 4 油茶地蜂不同龄期幼虫肠道核心细菌群落组成差异分析

Fig. 4 Composition difference analysis of the gut core bacterial communities in different instar larvae of *Andrena camellia*

### 2.3.2 不同龄期幼虫肠道细菌群落结构差异分析

基于 OTU 注释水平, Beta 多样性分析 (NMDS 分析) 结果显示: 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落结构存在差异 (Stress = 0.163)。进一步对数据进行置换多元方差分析以计算组间差异显著性, 结果显示: 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落结构差异显著 ( $F = 2.6090, P = 0.0001$ ), 但相邻龄期幼虫肠道细菌群落结构差异不显著 (图 5 和表 2)。

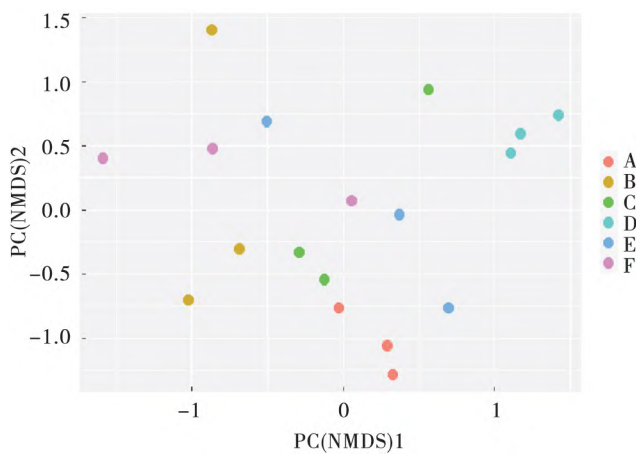


图 5 非度量多维尺度法 (NMDS) 分析

Fig. 5 Non-metric multidimensional scaling (NMDS)

### 2.3.3 不同龄期幼虫肠道细菌群落多样性与丰富度差异分析

Alpha 多样性分析结果显示, 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落多样性存在显著差异, 表现为: 4 龄幼虫肠道细菌群落 Shannon 指数显著低于 2 龄幼虫 ( $P < 0.01$ )、3 龄幼虫 ( $P < 0.01$ )、5 龄幼虫 ( $P < 0.05$ ) 以及滞育期 ( $P < 0.05$ ); 另外, 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落丰富度差异不显著, 表现为: 不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落 Chao1 指数差异不显著 (图 6)。

### 2.4 油茶地蜂幼虫肠道细菌群落功能预测

利用 COG 数据库对油茶地蜂幼虫肠道菌群进行基因功能预测, 同源族分析结果显示, 注释到的功能包括三大类: 信息储存与处理 (Information storage and processing) (占 19.54%), 新陈代谢 (Metabolism) (占 40.98%), 细胞生理过程与信号 (Cellular physiological processes and signaling) (占 19.73%) 以及占比 19.76% 的缺乏特征的功能预测。利用单因素方差分析进一步分析显示, 新陈代谢相关功能在组间存在显著差异, 即: 4 龄幼虫肠道细菌的新陈代谢相关功能显著低于 5 龄 ( $P < 0.05$ ) 和滞育期 ( $P < 0.05$ ) 幼虫 (图 7)。

表 2 不同龄期油茶地蜂肠道细菌群落置换多元方差分析

Table 2 PERMANOVA (Adonis) of the gut bacterial communities of different instar larvae of *Andrena camellia*

		置换数 N	组间平方和	组内平方和	F 值	P 值
		Permutation N	Total sum of squares	Within-group sum of squares	F value	P value
总体 Total		9 999	5.462	2.6170	2.6090	0.0001
A	B	9 999	1.522	0.9226	2.5970	0.1016
	C	9 999	2.33	1.3840	2.0500	0.0159
	D	9 999	3.403	1.4070	3.7830	0.0005
	E	9 999	4.407	1.9850	3.0500	0.0002
	F	9 999	5.462	2.6170	2.6090	0.0001
	B	C	9 999	1.483	1.1330	1.2390
D		9 999	2.451	1.1560	3.3630	0.0113
E		9 999	3.470	1.7340	2.6710	0.0014
F		9 999	4.503	2.3660	2.2580	0.0012
C	D	9 999	1.256	0.4841	6.3760	0.0978
	E	9 999	2.341	1.0620	3.6110	0.0035
	F	9 999	3.429	1.694	2.7300	0.0021
D	E	9 999	1.335	0.6011	4.8870	0.105
	F	9 999	2.450	1.2330	2.9600	0.0366
E	F	9 999	1.473	1.2100	0.8691	0.9012

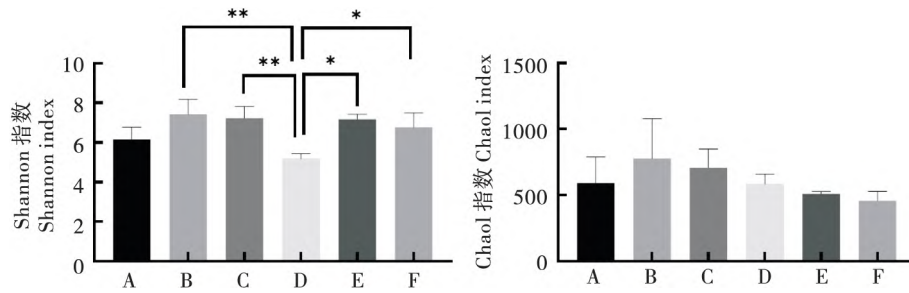


图6 Alpha多样性指数及组间差异分析(单因素的方差分析)

Fig. 6 Alpha-diversity index and one-way ANOVA

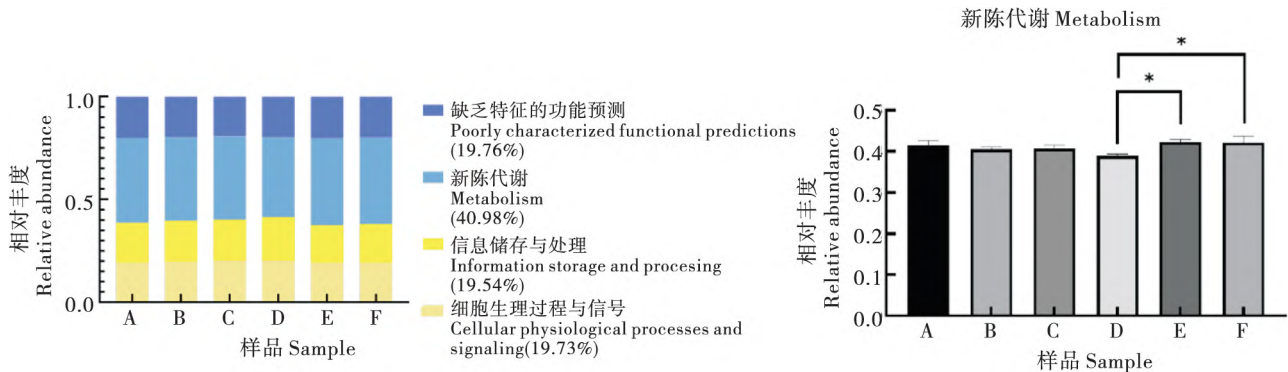


图7 油茶地蜂幼虫肠道细菌16S rRNA基因功能COG同源族分析

Fig. 7 COG (Cluster of Orthologous Group) annotation of gut bacterial 16S rRNA gene in different stage groups of *Andrena camellia* larvae

### 3 结论与讨论

随着分子生物学技术的发展,高通量测序技术已经广泛应用于肠道微生物的相关研究中,其中也包括利用于蜜蜂肠道微生物研究(Martinson *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2020)。本研究利用高通量测序技术对油茶地蜂不同龄期幼虫肠道细菌群落进行探究,注释得到的优势物种与之前独栖野生蜜蜂研究结果有一定的相似性(Voulgari-Kokota *et al.*, 2019),例如:伯克氏菌科 Burkholderiaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、毛螺菌科 Lachnospiraceae、乳杆菌科 Lactobacillaceae、莫拉菌科 Moraxellaceae、鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae 都在本研究优势菌群分析被挖掘得到。另外,油茶地蜂幼虫核心菌群还包括:Muribaculaceae、瘤胃菌科 Ruminococcaceae、诺卡氏菌科 Nocardiaceae、希万氏菌科 Shewanellaceae 4种。独栖野生蜜蜂共生微生物受到环境因素影响较大,其相关微生物可能是通过环境相关路径所获得(McFrederick *et al.*, 2016)。独栖蜂具有独特的觅食偏好、筑巢

习性以及筑巢过程中需要借助泥土、树叶与树脂筑巢材料,这些特性都是影响其共生微生物的重要因素(Voulgari-Kokota *et al.*, 2019)。据报道,独栖蜂 *Ceratina australensis*、苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* 由于其觅食偏好特点,在采集特定花粉和花蜜的同时会获得相对保守的相关植物共生微生物(McFrederick *et al.*, 2018; Rothman *et al.*, 2018)。土壤筑巢野生蜜蜂 *Osmia bicornis* 在筑巢活动期间,雌蜂会在适宜土壤中构筑巢穴,逐一完成单个独立虫室并采集花粉(花蜜)完成后代繁殖,其幼虫共生微生物与森林、土壤甚至排水和污泥系统或水源有关(Keller *et al.*, 2013)。本研究对象油茶地蜂属于典型土壤筑巢寡食性野生蜜蜂(黄敦元等, 2008),其幼虫肠道菌群可能与到访山茶属植物花部共生菌群、环境土壤共生菌群相关,这些问题还有待于后续研究进一步证实。

核心菌群组间差异分析和Beta多样性分析结果显示,不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落组成和结构变化显著,并且不同龄期油茶地蜂幼虫肠道细菌群落多样性也显示出显著变化,表现为细菌群落多样性在1龄幼虫到2龄幼虫变化不够显



著; 在2龄幼虫到5龄幼虫阶段, 随着幼虫发育而表现显著变化; 5龄幼虫到滞育阶段变化不够显著的特点, 总体表现出从高到低再又增高的趋势。这与群居蜜蜂幼虫肠道微生物变化趋势不同, 研究发现, 群居蜂中, 随着幼虫的发育生长, 其肠道微生物多样性成逐步增高的现象, 这一现象可能与幼虫生长过程中进食息息相关 (Smagghe *et al.*, 2013; Kwong & Moran, 2016)。油茶地蜂为典型独栖类群, 其摄食行为与群居社会性蜜蜂幼虫有明显的不同, 其是在单独的巢室中摄食雌蜂提前备好的蜂粮以获取营养 (黄敦元等, 2008)。并且, 与群居蜜蜂相比, 独栖蜜蜂肠道微生物群落稳定性更低 (Mohr *et al.*, 2006)。另一方面, 油茶地蜂幼虫肠道微生物变化趋势可能也与其进食规律引起微生物对肠道环境适应有关。油茶地蜂幼虫进食速率并不是稳定不变的, 低龄期进食缓慢, 随着虫体的长大, 其对花粉球的需求开始增加, 此时幼虫生长迅速, 逐渐花粉球被消耗净进入滞育期停止进食 (黄敦元等, 2008)。研究发现, 动物肠道菌群对食物胁迫下引起的肠道环境变化存在逐渐适应的特征 (Tilocca *et al.*, 2017), 同样在蜜蜂中, 其共生微生物对饮食的变化也表现出显著的敏感性 (Voulgari-Kokota *et al.*, 2019)。

独栖蜜蜂不同龄期幼虫肠道微生物虽目前研究匮乏, 但其核心菌群却有研究报道。在 *Osmia bicornis* 幼虫肠道微生物研究中发现, 主要菌群包括:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -变形菌纲  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes 与绿弯菌门 Chloroflexi (Mohr *et al.*, 2006)。本研究通过线性判别分析揭示出不同龄期油茶地蜂幼虫的优势物种: 巴尔通体属 *Bartonella* (属  $\alpha$ -变形菌纲) 和肠杆菌属 *Enterobacter* (属  $\gamma$ -变形菌纲) 这两个属显著存在于1龄幼虫肠道中。不动杆菌属 *Acinetobacter* (属  $\gamma$ -变形菌纲) 和红球菌属 *Rhodococcus* (属放线菌纲) 显著存在于5龄幼虫阶段。其余龄期幼虫肠道中并无显著优势菌群。另外, 组间差异分析同样显示, 油茶地蜂幼虫肠道中的4种核心菌群 (希万氏菌属、肠杆菌属、红球菌属、巴尔通体属) 随龄期变化而发生显著变化。表明: 油茶地蜂幼虫生长发育过程中, 其肠道细菌群落优势菌群组成上发生着改变。这与之前的研究相似。群居蜜蜂-卡尼鄂拉蜜蜂 *Apis*

*mellifera carnica* 幼虫肠道微生物的研究中发现, 优势菌群主要包括: 放线菌门 Actinobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes 以及  $\gamma$ -变形菌纲 Gammaproteobacteria。其中, 拟杆菌门的相对丰度随着龄期增加呈下降趋势, 其它3种呈上升趋势 (Hroncova *et al.*, 2015)。另外, Vojvodic (2013) 等对管理条件下的欧洲蜜蜂 (managed Europeans bees) 与非管理条件下的非洲化蜜蜂 (Africanized non-managed bees) 幼虫肠道微生物研究发现, 随着幼虫的生长发育, 肠道菌群的种类变多, 1~3龄幼虫肠道主要为  $\alpha$ -变形菌纲 (醋酸菌科) 与厚壁菌门 (*Lactobacillus kunkeei*、*Lactobacillus* sp. B、*Lactobacillus* sp. A 以及 *Fructobacillus fructosus*) 中的物种, 而4龄幼虫以后, 幼虫肠道中出现  $\beta$ -变形菌纲 (Neisseriaceae) 中的物种。

另一方面, 本研究挖掘得到的不同龄期所存在的优势物种对动物宿主具有重要的生物学意义, 其可能在油茶地蜂幼虫健康中发挥着重要作用。巴尔通体属在东方蜜蜂和西方蜜蜂肠道中都有发现 (Ahn *et al.*, 2012), 并在蜜蜂肠道糖类代谢中起着重要作用 (Ribiere *et al.*, 2019)。而在肠杆菌属 *Enterobacter* 的研究中, 目前未表明它是一种益生菌, 但是这一菌群却在一种西方蜜蜂 *A. mellifera jemenitica* 中被分离得到 (Khan *et al.*, 2017)。不动杆菌属广泛存在于动物宿主中, 例如: 在人体临床标本 (粪便等) 中发现两种不动杆菌属的物种 (贝氏不动杆菌 *A. beijerinckii* sp., *A. gyllenbergii* sp.) (Nemec *et al.*, 2009), 在马粪中发现简德不动杆菌 *A. gandensis* (Smet *et al.*, 2014), 在蜜蜂肠道中分离到蜂属不动杆菌 *A. apis* 和蜜源不动杆菌 *A. nectaris* (Kim *et al.*, 2014)。然而, 目前为止, 这一细菌群的成员对寄主的有利功能还未见报道, 因此仍有待研究。红球菌属 *Rhodococcus* 的物种在环境中普遍存在, 并且作为一种益生菌被广泛用于水产养殖中, 研究指出这些微生物在促进生长和预防传染病 (即弧菌病) 方面对宿主具有巨大的生物学作用, 红球菌 SM2 *Rhodococcus* SM2 能够诱导虹鳟鱼 *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) 产生保护性免疫从而对鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 产生抑制作用 (Sharifuzzaman, 2010; Sharifuzzaman *et al.*, 2011)。在昆虫肠道研

究中, 猎蝽 *Rhodnius prolixus* 的正常生长发育依赖于肠道中的 *R. rhodnii* (Bell *et al.*, 1998); 在 gypsy moth 幼虫肠道中也分离得到了红球菌属 (Broderick *et al.*, 2004)。综上, 研究表明, 不同龄期幼虫肠道中存在的优势细菌群落在宿主糖代谢、抗病原以及提高宿主免疫中可能发挥着重要作用。另外, 油茶地蜂幼虫肠道菌群功能注释同源分析显示, 其肠道菌群功能主要为三个方面: 新陈代谢、细胞生理过程与信号、信息储存与处理。进一步分析发现, 新陈代谢相关功能基因在不同龄期幼虫之间存在显著变化, 表明肠道菌群在不同龄期油茶地蜂幼虫中发挥着不同程度的新陈代谢相关功能。前期研究发现, 肠道菌群新陈代谢相关功能在蜜蜂生长发育中发挥着重要作用, 特别在对食物营养物质利用中 (张晴晴等, 2020)。油茶地蜂幼虫发育到后期, 巢穴中的花粉球被摄取耗尽进入滞育期 (黄敦元等, 2008), 肠道微生物新陈代谢相关功能的增加有助于宿主更有效地利用相对少的食物营养。这也进一步说明肠道微生物的存在与变化可能在油茶地蜂幼虫的生长与存活中具有重要意义。然而, 这些优势菌群是否在油茶地蜂幼虫发育过程中实际发挥作用还有待被其它实验所验证。

基于蜜蜂肠道微生物在宿主健康与调控宿主生长发育中发挥着重要作用以及独栖野生蜜蜂幼虫肠道微生物相关研究匮乏, 本研究首次对独栖野生蜜蜂中的油茶地蜂幼虫肠道细菌群落进行了初步探讨, 明确了不同龄期幼虫肠道细菌群落组成、群落变化规律以及不同发育阶段的优势类群。进一步分析发现, 油茶地蜂幼虫肠道菌群与其他独栖蜜蜂肠道微生物的群落组成存在一定的相似性; 不同龄期的优势菌群具有免疫、代谢等生物学功能。因此, 肠道微生物的存在与变化可能在油茶地蜂幼虫的生长与存活中具有重要意义。本研究为独栖野生蜜蜂肠道微生物学及此类野生蜜蜂保护生物学研究提供了理论依据。

### 参考文献 (References)

Ahn JH, Hong IP, Bok JI, *et al.* Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea [J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50: 735 – 745.

Ahmed N, Vásquez A, Forsgren E, *et al.* Symbionts as major

modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (3): e33188.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (15): 2114 – 2120.

Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, *et al.* Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (1): 293 – 300.

Bell KS, Philp JC, Aw DW, *et al.* The genus *Rhodococcus* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 85: 195 – 210.

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.

Edgar RC. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10 (10): 996 – 998.

Harry J, Flint KP, Scott PL, *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9 (10): 577 – 589.

Haw CL, Chia CC, Manfredo JS, *et al.* Deep sequencing and ecological characterization of gut microbial communities of diverse bumble bee species [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (3): e0118566.

Huang DY, Ding L, Zhang YZ, *et al.* Life history and relevant biological features of *Andrena camellia* Wu (Hymenoptera: Andrenidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51 (7): 778 – 783. [黄敦元, 丁亮, 张彦周, 等. 油茶地蜂生活史及相关生物学特性 [J]. *昆虫学报*, 2008, 51 (7): 778 – 783]

Huang DY, He B, Gu P, *et al.* Discussion on current situation and research direction of pollination insects of *Camellia oleifera* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (1): 213 – 220. [黄敦元, 何波, 谷平, 等. 油茶传粉昆虫研究现状于方向的探究 [J]. *环境昆虫学报*, 2017, 39 (1): 213 – 220]

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 (3): e0118707.

Killer J, Dubná S, Sedláček I, *et al.* *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an *in vitro* inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64 (1): 152 – 157.

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 (10): e78296.

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 (5): 1061 – 1068.

Koichi-Takebayashi MD, Kenji-Takakura MD, Hua QW, *et al.* Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes

- in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome [J]. *Reproductive Endocrinology*, 2000, 74 (5): 976 – 979.
- Kwong WK, Moran NA. Gut microbial communities of social bees [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14 (6): 374 – 384.
- Kwong WK, Moran NA. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: Description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of *Orbaceae* fam. nov. *Orbales* ord. nov., a sister taxon to the order ‘Enterobacteriales’ of the Gammaproteobacteria [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63: 2008 – 2018.
- Keller A, Brandel A, Becker MC, et al. Wild bees and their nests host *Paenibacillus* bacteria with functional potential of avial [J]. *Microbiome*, 2018, 6 (1): 229.
- Kim PS, Shin NR, Kim JY, et al. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52 (8): 639 – 645.
- Kathrln IM, Christoph CT. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (2): 258 – 272.
- Langille-Morgan GI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31 (9): 814 – 821.
- Li YM, Hu XL, Yang S, et al. Comparison between the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic captive musk deer [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 300.
- Luo ZW, Dong ZX, Chen YF, et al. Comparative analysis of the gut microbiota of *Apis cerana* in Yunnan using high-throughput sequencing [J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202: 2557 – 2567.
- Langille-Morgan GI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31 (9): 814 – 821.
- Martha G, Stephen LB, Brenda JL. Microbial flora of the larval provisions of the solitary bees, *Centris pallida* and *Anthophora* sp. *Apidologie* [J]. *Springer Verlag*, 1984, 15 (1): 1 – 10.
- 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 (3): 619 – 628.
- Martinson VG, Magoc T, Koch H, et al. Genomic features of a bumble bee symbiont reflect its host environment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (13): 3793 – 3803.
- McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL, et al. Flowers and wild megachilid bees share microbes [J]. *Microbial Ecology*, 2016, 73 (1): 188 – 200.
- McFrederick QS, Vuong HQ, Rothman JA. *Lactobacillus micheneri* sp. nov., *Lactobacillus timberlakei* sp. nov. and *Lactobacillus quenuiae* sp. nov., lactic acid bacteria isolated from wild bees and flowers [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68: 1879 – 1884.
- 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 – 2840.
- 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 – 272.
- Nemec A, Musilek M, Maixnerova M, et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., *Haemolytic organisms* isolated from humans [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59 (Pt 1): 118 – 124.
- Nicola S, Jacques I, Levi W, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biology*, 2011, 12: R60.
- Patrick D, Schloss S, Westcott L, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (23): 7537 – 7541.
- Philipp E, Nancy AM. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37 (5): 699 – 735.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: D590 – 596.
- Qiu JS, Zhang NN, Liu TT, et al. Biological characteristics of pollination of *Andrena camellia* Wu [J]. *Biotic Resources*, 2018 (2): 176 – 181. [邱建生, 张念念, 刘童童, 等. 油茶地蜂的传粉生物学特性研究 [J]. *生物资源*, 2018 (2): 176 – 181]
- 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.
- Smagge G, Vojvodic S, Rehan SM, et al. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (8): e72106.
- Smet A, Cools P, Krizova L, et al. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64 (Pt 12): 4007 – 4015.
- Sharifuzzaman SM, Abbass A, Tinsley JW, et al. Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30 (1): 347 – 353.
- Sharifuzzaman SM. Studies on Probiotics for the Control of Vibriosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [D]. Edinburgh,

- United Kingdom: Heriot-Watt University Dissertation Thesis ,2010.
- Tilocca B , Burbach K , Heyer-Charlotte ME , *et al.* Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal microbiome – from days to weeks [J]. *Microbiology* , 2017 , 5: 144.
- Tanja M , Salzberg SL. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics* , 2011 , 27 ( 21 ) : 2957 – 2963.
- Voulgari-Kokota A , McFrederick QS , Steffan-Dewenter I , *et al.* Drivers , diversity , and functions of the solitary-bee microbiota [J]. *Trends in Microbiology* , 2019 , 27 ( 12 ) : 1034 – 1044.
- Vuong HQ , McFrederick QS , Angert E. Comparative genomics of wild bee and flower isolated lactobacillus reveals potential adaptation to the bee host [J]. *Genome Biology and Evolution* , 2019 , 11 ( 8 ) : 2151 – 2161.
- Vojvodic S , Rehan SM , Anderson KE. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars [J]. *PLoS ONE* , 2013 , 8: e72106.
- Wang Q , Garrity GM , Tiedje JM , *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 ( 16 ) : 5261 – 5267.
- Wang Y , Sheng HF , He Y , *et al.* Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater , intertidal wetland , and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2012 , 78 ( 23 ) : 8264 – 8271.
- Zhang QQ , Fang OY , Feng GE. Diversity and function of the gut microbiota of the honeybee [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology* , 2020 , 57 ( 5 ) : 1064 – 1075. [张晴晴, 欧阳芳, 戈峰. 蜜蜂肠道微生物的多样性及功能研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2020 , 57 ( 5 ) : 1064 – 1075]