



联苯菊酯对西方蜜蜂生存、生理和肠道菌群的影响

施腾飞^{1,2**}, 张清^{1*}, 牛井亨¹, 叶良¹, 黄明飞¹,
于泽南¹, 余林生¹

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 联苯菊酯广泛应用于蜜源作物害虫防治中, 可能会对蜜蜂健康造成危害。本文主要探究了亚致死浓度联苯菊酯对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 生存、取食、免疫解毒相关基因表达及肠道菌群的影响。利用 5 mg/L 和 0.5 mg/L 的联苯菊酯对西方蜜蜂处理 7 d, 统计各组蜜蜂的生存率和取食量; 利用 qPCR 技术检测蜜蜂中肠中免疫和解毒基因表达变化; 采用 16S rDNA 测序技术检测蜜蜂肠道菌群丰度、结构变化。结果显示: (1) 5 mg/L 联苯菊酯能够显著降低蜜蜂的生存率和花粉取食量 ($P < 0.05$), 而对含联苯菊酯的糖水取食量没有显著影响; (2) 5 mg/L 联苯菊酯显著抑制蜜蜂中肠中 *CYP6AS3* 和 *CYP6AS10* 基因的表达 ($P < 0.05$), 而诱导 *Abaecin*、*Apidaecin*、*Defensin*、*Hymenoptaecin* 基因上调表达 ($P < 0.05$); 0.5 mg/L 联苯菊酯显著抑制蜜蜂中肠中 *Lysozyme*、*CYP6AS10* 基因的表达 ($P < 0.05$), 而诱导 *Apidaecin*、*Defensin* 基因上调表达 ($P < 0.05$); (3) 联苯菊酯处理改变了蜜蜂肠道菌群的多样性, 并影响特定肠道菌群的丰度。结果表明联苯菊酯暴露不仅损害西方蜜蜂的生存和取食, 并对其中肠的免疫解毒系统以及肠道稳态造成影响。

关键词: 西方蜜蜂; 联苯菊酯; 生存; 基因表达; 肠道菌群

中图分类号: Q963

文献标识码: A

Effects of bifenthrin on the survival, physiology and gut microbiota in honeybees (*Apis mellifera* L.)

SHI Teng-Fei^{1,2**}, ZHANG Qing^{1*}, NIU Jing-Heng¹, YE Liang¹, HUANG Ming-Fei¹, YU Ze-Nan¹,
YU Lin-Sheng^{1*} (1. Anhui Agricultural University, School of Plant Protection, Hefei 230036,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32102604); 国家蜂产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-45-KXJ10)

*共同第一作者: 施腾飞, 男, 博士, 讲师, 研究方向为资源昆虫与利用, E-mail: stf1791@163.com; 张清, 女, 硕士研究生, 研究方向为资源昆虫与利用, E-mail: 1767259121@qq.com

**通讯作者 Author for correspondence: 施腾飞, 男, 博士, 讲师, 研究方向为资源昆虫与利用, E-mail: stf1791@163.com

收稿日期 Received: 2024-07-11; 修回日期 Revision received: 2024-09-11; 接受日期 Accepted: 2024-09-13

China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Crop Integrated Pest Management, Hefei 230036, China)

Abstract: Bifenthrin is widely used for pest control in nectariferous crop, which may harm honeybees *Apis mellifera* L. health. This study aimed to investigate effects of sublethal concentrations of bifenthrin on survival, feeding, immune and detoxification related genes expression and the gut microbiota in honeybees. The honeybees were fed with 5 mg/L and 0.5 mg/L bifenthrin for 7 d, and the survival and food consumption in each group were calculated. Changes in the expression of immune and detoxification related genes in honeybee midguts were detected by qPCR, and the abundance and structural of gut microbiota was analyzed by 16S rDNA sequencing technology. The results showed that: (1) 5 mg/L bifenthrin significantly reduced the survival and pollen consumption ($P < 0.05$), but had no significant effect on syrup consumption in honeybees; (2) 5 mg/L bifenthrin significantly inhibited *CYP6AS3* and *CYP6AS10* expression ($P < 0.05$), while up-regulated the expression of *Abaecin*, *Apidaecin*, *Defensin* and *Hymenoptaecin* ($P < 0.05$); 0.5mg /L bifenthrin significantly inhibited *Lysozyme* and *CYP6AS10* expression ($P < 0.05$), while up-regulated the expression of *Apidaecin* and *Defensin* ($P < 0.05$); (3) Bifenthrin treatment induced changes in Alpha and Beta diversity, and affected the abundance of specific bacteria. This study indicated that bifenthrin exposure not only damaged the survival and food consumption, but also influenced the immune and detoxification systems and intestinal homeostasis in honeybees.

Key words: *Apis mellifera* L.; bifenthrin; survival; genes expression; gut microbiota

蜜蜂作为生态系统中的优势传粉昆虫，在农作物授粉、维持生态系统稳定和保护生物多样性等方面占据着举足轻重的地位（Iwasaki and Hogendoorn, 2021）。不过，近年来发生的蜂群崩溃失调症（Colony collapse disorder, CCD）对全球养蜂业造成严重影响，其特征表现为：蜂群中工蜂突然消失，但蜂群附近极少发现或并无死亡蜜蜂，蜂箱内留有蜂王、卵、幼虫以及部分幼龄工蜂，蜜蜂的健康问题也受到越来越多的关注（Tang *et al.*, 2020）。目前，虽然造成 CCD 现象发生的具体原因尚不明确，很多研究表明杀虫剂的滥用和大量使用可能是造成蜜蜂蜂群下降的重要原因（Hristov *et al.*, 2021）。

拟除虫菊酯类杀虫剂是天然除虫菊素的人工合成类似物，具有广谱的触杀和胃毒作用，因其高效低毒、低残留、环境相容性高、持效期久等诸多优点，而被广泛开发利用。然而，其在防控农业害虫的同时，也会对有益昆虫，如重要传粉昆虫蜜蜂的生存和健康产生威胁（刘文斌等，2022）。联苯菊酯是目前使用较广的拟除虫菊酯类杀虫剂之一，作为 I 型该类

杀虫剂，其主要通过干扰电位依赖的 Na^+ 通道闸门开闭，延长受害昆虫神经细胞 Na^+ 通道的开放时间，使其过度兴奋、惊厥，最后麻痹而死 (Gammon *et al.*, 2019)。研究表明联苯菊酯在蜂产品中具有较高的残留量 (Tong *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2022)，并对蜜蜂健康造成影响。Dai 等 (2010) 实验发现，亚致死浓度暴露能显著降低西方蜜蜂的繁殖力和成虫羽化率，延长蜜蜂幼虫的发育期。江鹏 (2023) 对中国 18 个省市蜂蜡农药残留调查显示，联苯菊酯检出率为 65.74%，平均残留量为 140.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，且亚致死浓度联苯菊酯 (1 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 胁迫显著降低西方蜜蜂卵的孵化率，并损害蜜蜂幼虫和蛹的生存。

研究表明杀虫剂胁迫会对蜜蜂免疫解毒系统造成影响。Zhao 等 (2022) 研究发现亚致死浓度印楝素暴露显著降低中华蜜蜂抗菌肽基因表达并抑制多酚氧化酶活性。亚致死浓度吡虫啉长期胁迫能够引起蜜蜂 P450 介导的解毒系统和肠道代谢功能紊乱，进而降低蜜蜂取食量和生存率 (Zhu *et al.*, 2020)。肠道菌群在维持宿主健康中扮演着重要的角色。蜜蜂肠道菌群结构相对简单，主要由 8 大类细菌组成，主要包括放线菌门的 *Bifidobacterium asteroides*， γ -变形菌纲的 *Gilliamella apicola* 和 *Frischella perrara*， β -变形菌纲的 *Snodgrassella alvi*， α -变形菌纲的 *Alpha-1*、*Alpha-2.1* 和 *Alpha-2.2*，以及厚壁菌门的 *Firm-4*、*Firm-5* 等 (李还原等, 2019)。它们在蜜蜂营养代谢、生长发育和免疫调控等方面发挥着重要作用 (张晴晴等, 2020)。因此，研究杀虫剂对蜜蜂肠道菌群的影响有助于控制杀虫剂用量并更有效的保护蜜蜂。近年来，很多研究探究了杀虫剂与蜜蜂肠道菌群的互作关系 (李来等, 2022; Jiang *et al.*, 2024)。然而，关于联苯菊酯对蜜蜂免疫解毒能力和肠道菌群影响的研究却鲜有报道。

本文主要研究了联苯菊酯对西方蜜蜂生存、取食、免疫和解毒相关基因表达以及肠道菌群的影响，以期为此类杀虫剂在蜜源植物上的使用提供了一定的指导作用。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂

本研究所用的西方蜜蜂来自安徽农业大学蜂场。选择群势健康强盛并且蜂王产卵能力强的蜂群，实验采样前的 2 个月利用除螨剂对蜂群进行除螨管理，之后实验过程中蜂群不会接触到任何杀虫剂。从蜂群中提取一张即将出房的封盖子蜂脾，带回实验室在恒温恒湿培养箱 (温度 35°C，相对湿度 60%，微光) 中培养 24 h 后，收集刚羽化的蜜蜂 (定义为 1 日龄) 到塑料蜂笼中 (15 cm \times 10 cm \times 8 cm)，提供足量的 50% 糖水和花粉，放在培养箱中适应培养 2 d，然后选取 3 日龄蜜蜂用于后续杀虫剂胁迫实验 (李来等, 2022)。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂：联苯菊酯原药（德国 Dr 公司，纯度 99.1%），蔗糖 AR（aladdin，中国上海），Trizol（天根，中国北京）ReverTra qPCR RT Master Mix gDNA remover Kit（东洋纺，中国上海），Super Real PreMix Plus (SYBR Green)（天根）；主要仪器：微量移液器，NanoDrop2000 超微量分光光度计，高速冷冻离心机，博日普通 PCR 仪，ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System 等。

1.3 杀虫剂处理

根据联苯菊酯在中国大陆地区蜂蜜、蜂粮等中的残留量，选取 5 mg/L 和 0.5 mg/L 作为亚致死处理浓度（Xiao *et al.*, 2022）。取 50 mg 联苯菊酯原药溶于 10 mL 丙酮中配置成 5000 mg/L 母液，然后取适量母液加入 50%糖水中使联苯菊酯浓度分别为 5 mg/L 和 0.5 mg/L，丙酮终体积比不超过 0.1%，50%糖水中加入等体积的丙酮作为对照。本研究共设置 2 个处理组和 1 个对照组，每组 5 个生物学重复，每重复包含 30 头蜜蜂。各组蜜蜂提供足量相应联苯菊酯污染或对照糖水，每 2 d 更换食物，每天记录和统计每组蜜蜂死亡数和取食量并及时清除死蜂，7 d 后收集各组活蜂，液氮速冻后，置于超低温冰箱（-80°C）保存备用。

1.4 总 RNA 提取及反转录反应

取出 1.3 中保存蜜蜂在冰上进行解剖并获取中肠，每 5 个中肠作为一组，利用 Trizol 法提取总 RNA。对获得的总 RNA 进行浓度测定，并将其稀释成 500 ng/L，并以此作为模板进行反转录反应：吸取 2 μL 总 RNA 于 0.2 mL 离心管中，放入 PCR 仪中 65°C 反应 5 min，反应完成后置于冰上速冷 1 min；依次加入 4 μL 5×RT master-Mix 和 14 μL ddH₂O，混匀后再次放入 PCR 仪中，在以下条件进行反应：37°C，15 min；50°C，5 min；98°C，5 min。待温度降到 4°C 后反应完成获得 cDNA；利用 ddH₂O 对 cDNA 进行 5 倍稀释，分装至 -20°C 保存，用于后续 qPCR 反应。

1.5 引物设计与合成

利用 Oligo 7 软件设计目的基因和内参基因上游和下游引物，并委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成，序列信息见表 1。

表 1 本研究中上下游引物序列

Table 1 The forward and reverse primer sequences

基因 Genes	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	基因 Genes	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>Abaecin</i>	F: TGTCGGCCTTCTCTCATGG	<i>CYP9Q2</i>	F: GATTATCGCCTATTATTACTG
	R: TGACCTCCAGCTTACCCAAA		R: GTTCTCCTTCCCTCTGAT

<i>Hymenoptaecin</i>	F: ATATCCCGACTCGTTTCCGA R: TCCCAAACCTCGAATCCTGCA	<i>CYP9Q3</i>	F: GTTCCGGGAAAATGACTAC R: GGTCAAAATGGTGGTGAC
<i>Defensin</i>	F: TGCCTGCTAACTGTCTCAG R: AATGGCACTTAACCGAAACG	<i>CYP6AS1</i>	F: GCGACCAATGCGAATGAAAC R: TCACGGCATTCCACCATTTC
<i>Apidaecin</i>	F: TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG R: GAAGGTCGAGTAGGCGGATCT	<i>CYP6AS3</i>	F: TCGAAAGGGACGAGGATATG R: AGTCATGGGATGCCTACTGG
<i>Glucose dehydrogenase</i>	F: CTGCACAACCACGTCTCGTT R: ACCGCCGAAGAAGATTTGG	<i>CYP6AS4</i>	F: GGCTGGATTTGAAACGTCAT R: CGCGTGGAATTCCTTTCATTT
<i>Lysozyme</i>	F: ACACGGTTGGTCACTGGTCC R: GTCCACGCTTTGAATCCCT	<i>CYP6AS10</i>	F: TGGCAGTGTATCATTTTACAAAACA R: TGGTATTGGCTTGGGTCCAG
<i>CYP9Q1</i>	F: TCGAGAAGTTTTTCCACCG R: CTCTTCTCCTCGATTG	<i>RpS5</i>	F: AATTATTGGTTCGCTGGAATTG R: TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA

1.6 qPCR

利用 1.4 中获得稀释后的 cDNA 作为模板进行 qPCR 反应，检测基因相对表达水平。20 μ L 反应体系：cDNA 1 μ L，上下游引物（10 μ M）0.6 μ L，2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μ L，50 \times ROX Reference Dye 2 μ L，ddH₂O 6.4 μ L。反应条件：95 $^{\circ}$ C 15 min 1 \times ；95 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，40 \times 。反应完成后生成溶解曲线，以 *RpS5* 为内参基因，利用 2^{- Δ C_t}法计算目的基因的相对表达量（Schmittgen and Livak, 2008）。

1.7 16S rDNA 测序

取出 1.3 中保存蜜蜂在冰上进行解剖获取整个肠道，每 5 个肠道作为一组，提取其总 DNA，然后委托杭州联川生物科技股份有限公司利用高通量测序技术对蜜蜂肠道 16S rDNA 的 V3-V4 区进行测序和数据分析工作。

1.8 数据分析

所有数据分析均在 SPSS 25.0 软件中进行，生存曲线使用 log-rank Kaplan–Meier 生存分析；各组蜜蜂取食量、基因表达变化利用单因素方差分析（ANOVA），并利用 Duncan’s 多重比较进行显著性差异检验；利用 GraphPad Prism 8 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 联苯菊酯对西方蜜蜂生存和取食的影响

连续饲喂 7 d 后，统计联苯菊酯处理组和对照组蜜蜂死亡数，并绘制生存曲线。结果显示，5 mg/L 和 0.5 mg/L 处理组及对照组蜜蜂生存率分别为 85%、93%和 95%。5 mg/L 处

理组蜜蜂生存率显著低于对照组 ($P < 0.5$), 而 0.5 mg/L 对蜜蜂生存没有显著影响 (图 1)。

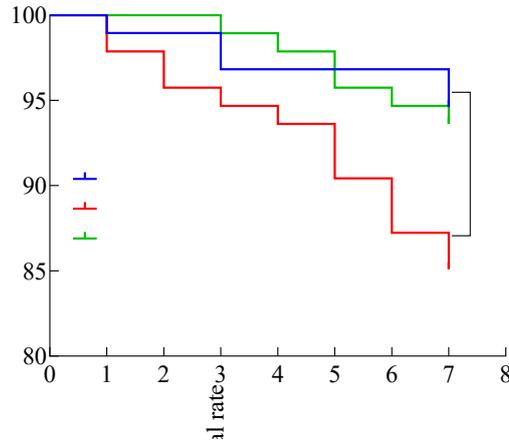


图 1 蜜蜂生存曲线

Fig. 1 Honeybee survival curves

5 mg/L 联苯菊酯处理能够显著降低蜜蜂花粉累积取食量 ($P < 0.5$), 而不影响糖水累积取食量; 0.5 mg/L 联苯菊酯处理对糖水和花粉取食量均没有显著影响 (图 2)。

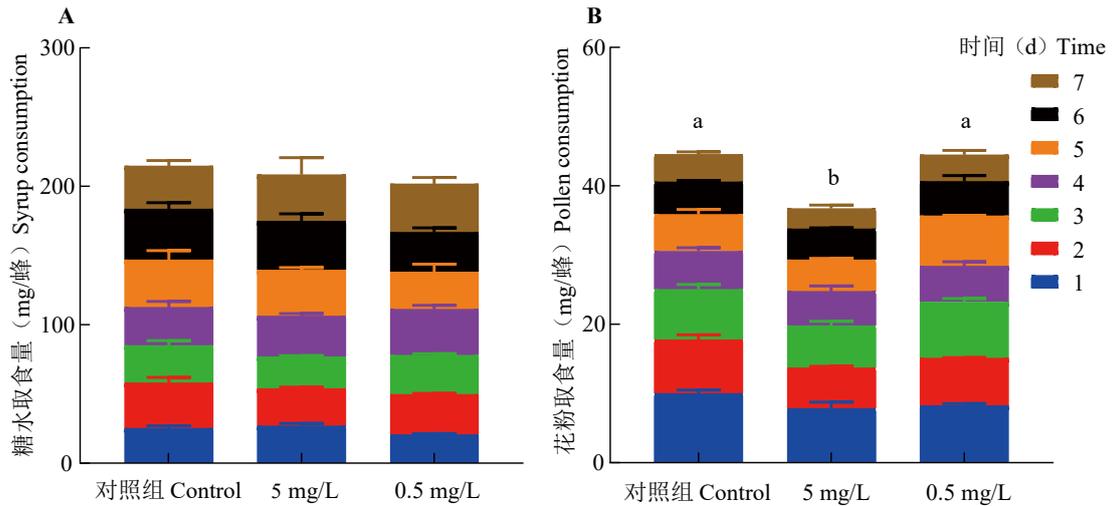


图 2 联苯菊酯对蜜蜂糖水和花粉取食量的影响

Fig. 2 Effects of bifenthrin on syrup and pollen consumption in honeybees

注: 图中数据为平均数 \pm 标准误; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) (Duncan's 多重检验法)。下图同。Note: Data were mean \pm SE; different lowercase letters indicated significant differences ($P < 0.05$) (Duncan's multiple test). The same below.

2.2 联苯菊酯对西方蜜蜂免疫解毒基因表达的影响

本研究利用 qPCR 技术检测了联苯菊酯处理对西方蜜蜂中肠免疫和解毒相关基因表达的影响。结果显示, 5 mg/L 联苯菊酯处理组 *Abaecin*、*Apidaecin*、*Defensin*、*Hymenoptaecin* 基因表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), *Lysozyme* 和 *Glucose dehydrogenase* 基因表达量没有显著变化; 0.5 mg/L 联苯菊酯处理诱导 *Apidaecin* 和 *Defensin* 基因上调表达 ($P < 0.05$), 抑制 *Lysozyme* 基因表达 ($P < 0.05$), 而对 *Abaecin*、*Glucose dehydrogenase* 和

Hymenoptaecin 基因表达没有显著影响（图 3-A）。

解毒基因表达结果显示，5 mg/L 联苯菊酯处理组蜜蜂 *CYP6AS3* 和 *CYP6AS10* 基因的表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)，*CYP9Q1*、*CYP9Q2*、*CYP9Q3*、*CYP6AS1* 和 *CYP6AS4* 基因表达量没有显著变化；0.5 mg/L 联苯菊酯处理显著抑制 *CYP6AS10* 基因表达 ($P < 0.05$)，而对 *CYP9Q1*、*CYP9Q2*、*CYP9Q3*、*CYP6AS1*、*CYP6AS3* 和 *CYP6AS4* 基因表达没有显著影响（图 3B）。

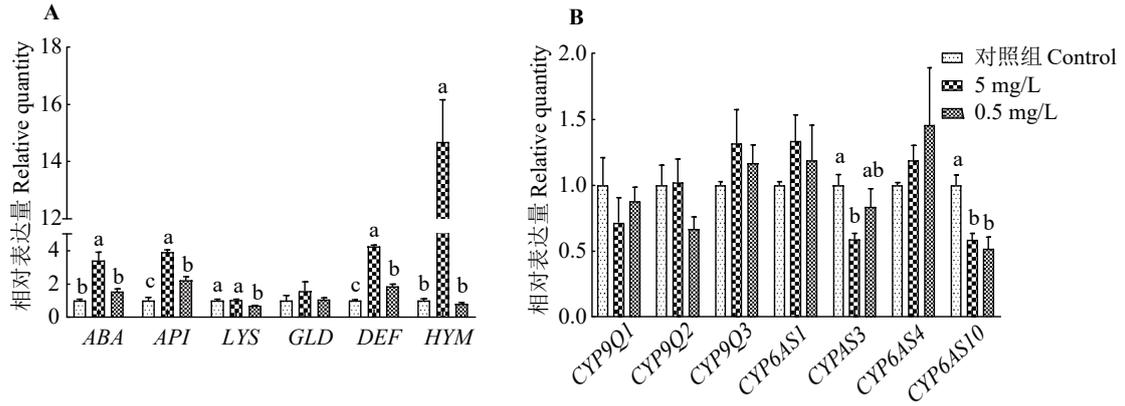


图 3 联苯菊酯对蜜蜂免疫 (A) 和解毒 (B) 基因表达的影响

Fig.3 Effects of bifenthrin on immune (A) and detoxification (B) genes expression in honeybees

注: ABA, Abaecin; API, Apidaecin; LYS, Lysozyme; GLD, Glucose dehydrogenase; DEF, Defensin; HYM, Hymenoptaecin.

2.3 联苯菊酯对西方蜜蜂肠道菌群的影响

2.3.1 蜜蜂肠道菌群测序数据分析

利用 overlap 对原始双端数据进行拼接、质控、嵌合体过滤后，获得 1 080 932 条有效数据。通过 DADA2 软件对有效数据进行去噪处理后获取 Amplicon Sequence Variant (ASV) 特征表和特征序列，共获得 ASV 数目为 2 132 个，其中 3 组蜜蜂肠道共有 ASV 数目 382 个，对照组、5 mg/L 处理组、0.5 mg/L 处理组特有 ASV 数目分别为 504 个、441 个、377 个，联苯菊酯处理组蜜蜂肠道 ASV 特征值数目均低于对照组（图 4）。

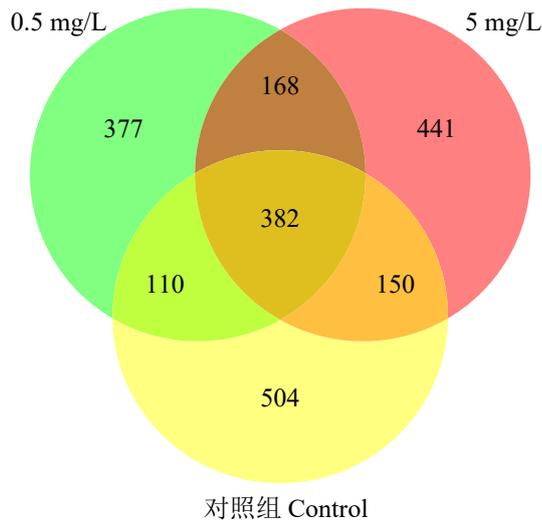


图4 蜜蜂肠道菌群 ASV 特征值 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of ASV in honeybee gut microbiota

2.3.2 蜜蜂肠道菌群组成及丰度分析

根据 ASV 特征序列的注释结果和各组样品的 ASV 丰度，分别在界 (Kingdom)、门 (Phylum)、纲 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、种 (Species) 水平中对各组样本蜜蜂的肠道微生物群落进行物种组成分析，基于物种丰度表和物种注释表，选取了门级和属级水平上丰度排名前 15 的菌种进行分析和展示。

在门级水平上，共有 28 种菌门被检出，包括有厚壁菌门 Firmicutes、变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteriota、拟杆菌门 Bacteroidota、疣微菌门 Verrucomicrobiota 和蓝藻菌门 Cyanobacteria 等。其中，厚壁菌门和变形菌门的菌群丰度占比最高，分别为 51.45% 和 45.14%。5 mg/L 处理组与对照组相比，厚壁菌门和变形菌门丰度有所下降；0.5 mg/L 处理组，厚壁菌门丰度有所上升，而变形菌门丰度则下降。

在属级水平上，乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、*Bombilactobacillus* 属、*Snodgrassella* 属、*Gilliamella* 属、*Apilactobacillus* 属、共生菌属 *Commensalibacter*、*Frischella* 属、*Bombella* 属和双歧杆菌属 *Bifidobacterium* 等 9 种细菌为蜜蜂肠道的优势菌属，菌群丰度占比在 93.33% 以上。其中乳酸杆菌属、*Snodgrassella* 属、*Gilliamella* 属、*Frischella* 属和双歧杆菌属等 5 种为蜜蜂肠道中的核心菌群，占总菌属的 53.98%，并且所有样本中 *Lactobacillus* 属的相对丰度最高，占比为 21%，其他 4 个核心菌群的丰度占比也均在 2% 以上。

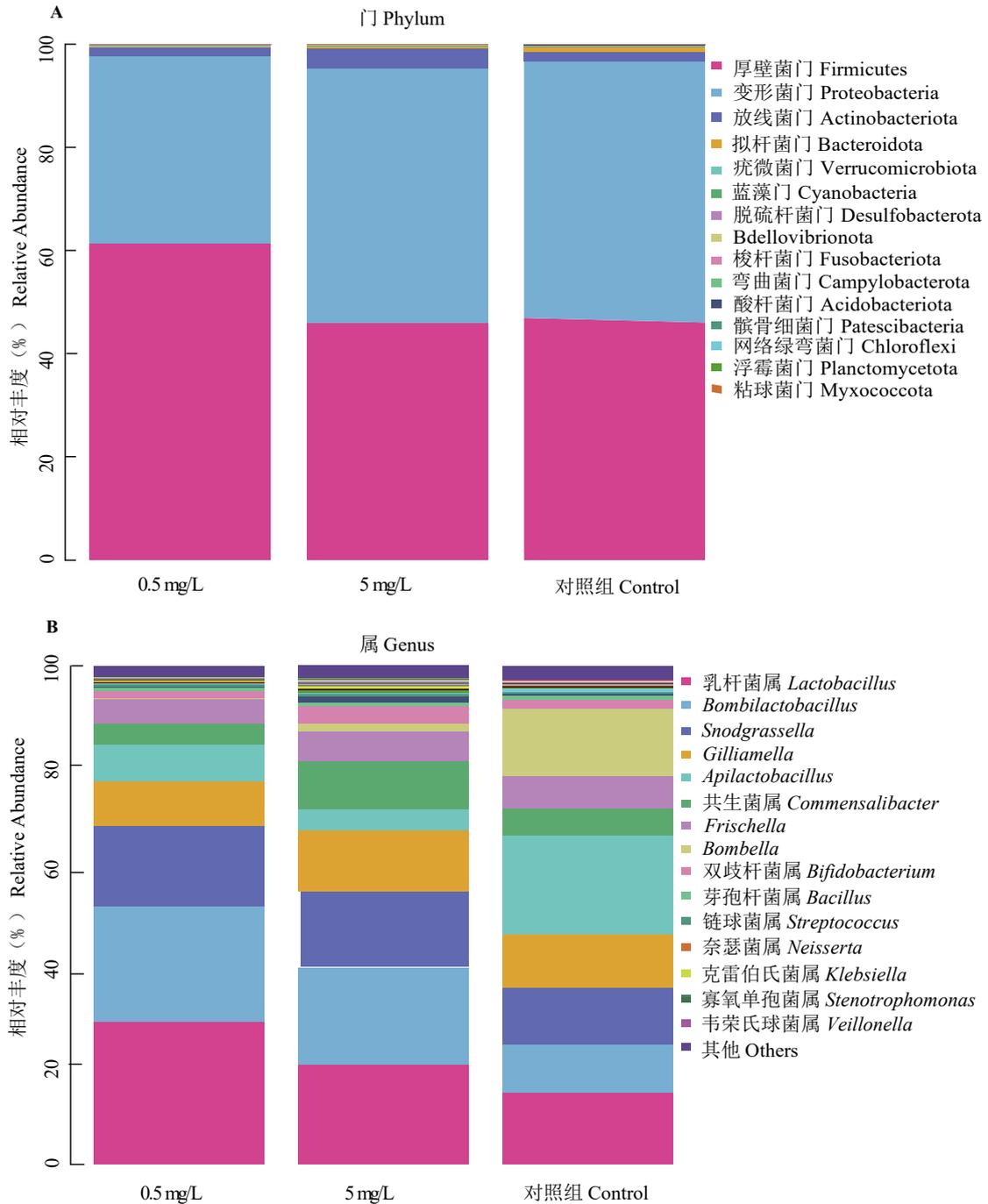


图 5 门和属水平蜜蜂肠道菌群相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of honeybee gut microbiota in phylum and genus levels

2.3.3 蜜蜂肠道菌群多样性分析

2.3.3.1 蜜蜂肠道菌群 Alpha 多样性

蜜蜂肠道菌群 Alpha 多样性主要由通过 Chao1、shannon、Simpson、Goods_coverage 等指数来反映。本研究中各组样本 goods_coverage 指数均达到 1，说明样本物种检出率高，测序结果具有真实可靠性（表 2）。Chao1 指数主要用来估计群落中所包含的物种数目，而 Shannon 和 Simpson 指数则主要用来衡量群落中物种的多样性，Shannon 指数越大，

Simpson 数值越接近 1，说明群落中物种的多样性越高。本研究中，0.5 mg/L 处理组与对照组相比，以上 3 各指数均没有显著差异；5 mg/L 处理组 Shannon 和 Simpson 指数均显著高于对照组，而 Chao1 指数没有显著变化（表 2），说明高浓度联苯菊酯胁迫诱导蜜蜂肠道菌群丰富度和多样性升高。

表 2 蜜蜂肠道菌群 Alpha 多样性分析

Table 2 Alpha diversity analysis of honeybee gut microbiota in different groups

组别 Groups	检测到种类 Observed_Otus	香农指数 Shannon	辛普森系数 Simpson	物种总数 Chao1	微生物覆盖率 Goods_coverage
对照组 Control	402.60 ± 32.63	4.98 ± 0.58 b	0.92 ± 0.04 b	403.07 ± 32.62	1.00
5 mg/L	429.20 ± 31.64	5.98 ± 0.22 a	0.96 ± 0.01 a	429.52 ± 31.91	1.00
0.5 mg/L	379 ± 46.01	5.60 ± 0.46 b	0.95 ± 0.02 b	379.31 ± 45.87	1.00

注：表中数据为平均数 ± 标准误；不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) (Duncan's 多重检验法)。Note: Data were mean ± SE; different lowercase letters indicated significant differences ($P < 0.05$) (Duncan's multiple test).

2.3.3.2 蜜蜂肠道菌群 Beta 多样性

本研究利用非度量多维尺度分析 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) 和主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 对蜜蜂肠道菌群 Beta 多样性进行分析。对照组和 0.5 mg/L 处理组样品点较为集中，说明样品间差异程度较低，两组间差异不显著；而 5 mg/L 处理组样品点较为分散，说明样品间差异程度较高，且与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) (图 6)。

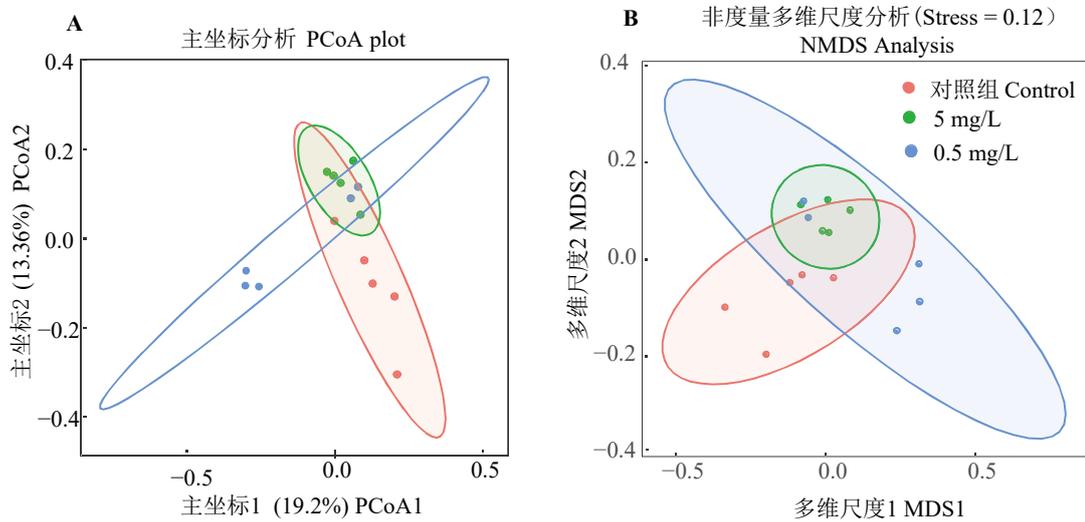


图 6 蜜蜂肠道菌群 Beta 多样性分析

Fig. 6 Beta diversity analysis of honeybee gut microbiota in different groups

2.3.4 蜜蜂肠道菌群相对丰度差异分析

对蜜蜂肠道菌群进行 LEfSe (LDA Effect Size) 检测，分析获得各组间在丰度上具有显著性差异的物种，本研究主要对 LDA score 大于 3.0 的显著差异物种进行展示。在门级水平上，5 mg/L 处理组和 0.5 mg/L 处理组拟杆菌门 Bacteroidota 相对丰度显著低于对照组 ($P <$

0.05) (图 7)。在属级水平上, 5 mg/L 联苯菊酯胁迫下, 共生菌属 *Commensalibacter* 和 *Klebsiella* 属相对丰显著升高, *Apilactobacillus* 属的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$); 0.5 mg/L 联苯菊酯胁迫下, 肠道核心菌乳杆菌属 *Lactobacillus* 相对丰度显著升高, 而 *Bombella* 属的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$) (图 7)。

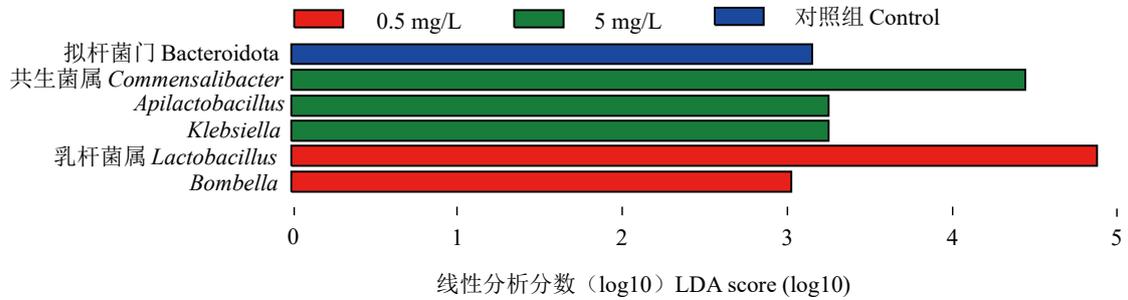


图 7 蜜蜂肠道菌群 LEfSe 差异分析

Fig. 7 LEfSe analysis of honeybee gut microbiota in different groups

3 结论与讨论

联苯菊酯是一种常见的拟除虫菊酯类杀虫剂, 被广泛用于蜜粉源作物害虫防治, 而关于该杀虫剂对重要传粉昆虫蜜蜂健康影响方面研究较少。本研究主要探究了亚致死浓度联苯菊酯长期经口胁迫对西方蜜蜂生存、取食、免疫解毒基因和肠道菌群的影响。结果发现 5 mg/L 联苯菊酯能够显著降低蜜蜂生存率, 而 0.5 mg/L 联苯菊酯虽然对蜜蜂生存率影响不显著, 但随着胁迫时间的延长也呈现生存率下降的趋势。前人研究也发现联苯菊酯暴露剂量和时间与蜜蜂死亡率呈现明显的正相关关系 (Qualls *et al.*, 2010), 表明蜜蜂长期取食被联苯菊酯污染的食物, 会对其生存造成威胁。蜂蜜和花粉是蜜蜂取食的主要重要食物, 也是蜜蜂生长发育过程中营养和能量的重要来源 (Nicolson, 2011)。本研究发现, 5 mg/L 联苯菊酯胁迫能够抑制蜜蜂取食量, 而不影响糖水取食。此前有研究发现菊酯类杀虫剂的趋避作用会造成昆虫取食量降低 (Ozawa *et al.*, 1992), 这可能是联苯菊酯抑制花粉取食量的重要原因。

抗菌肽是昆虫先天免疫系统重要组成部分, 蜜蜂体内抗菌肽主要由 Apidaecin、Hymenoptaecin、Defensin 和 Abaecin 四大抗菌肽家族组成。蜜蜂受到外源物质侵害时, 抗菌肽基因被迅速诱导表达, 产生大量抗菌肽参与清除和抑制细菌、真菌和病原体等, 保护蜜蜂免受外来致病物质侵害 (Rahnamaeian, 2011; Richard *et al.*, 2012)。本研究显示, 联苯菊酯胁迫下, 蜜蜂 4 种抗菌肽基因均能诱导上调表达, 且 5 mg/L 处理诱导作用明显强于 0.5 mg/L 处理, 表明随着联苯菊酯浓度的升高由抗菌肽介导的免疫通路被激活以对抗该杀虫剂对蜜蜂的胁迫 (李来等, 2022)。溶菌酶 (Lysozyme) 是一种重要的免疫酶, 能够通

过水解细菌细胞壁肽聚糖多糖成分达到杀菌目的 (Callewaert and Michiels, 2010), 在昆虫细胞免疫过程中发挥重要作用。本研究发现 0.5 mg/L 联苯菊酯处理能够抑制 *Lysozyme* 基因表达, 表明联苯菊酯可能会损害蜜蜂细胞免疫过程。

细胞色素 P450 单氧酶 (Cytochrome P450 monooxygenase, CYP) 是昆虫体内重要的多功能解毒酶, CYP 介导的解毒代谢过程是害虫抗药性形成的重要原因 (Yu *et al.*, 2015)。相较于果蝇 (*Drosophila*) 等其他害虫, 蜜蜂基因组中解毒酶基因数量较少, 这也是蜜蜂对杀虫剂等有毒物质敏感性较高的原因 (Claudianos *et al.*, 2006)。研究结果发现, 5 mg/L 联苯菊酯处理显著抑制 *CYP6AS3* 和 *CYP6AS10* 基因的表达, 0.5 mg/L 抑制 *CYP6AS10* 表达, 表明联苯菊酯暴露能够损害蜜蜂解毒系统, 造成蜜蜂死亡。

动物肠道菌群在维持宿主健康中发挥着重要的功能, 蜜蜂肠道菌群组成和结构相对简单, 主要菌群由 8 大类细菌组成, 占总菌群 98% (Martinson *et al.*, 2012; Sabree *et al.*, 2012)。蜜蜂肠道菌群稳态对宿主健康至关重要, 若这种稳态被破坏, 蜜蜂各种生理会发生紊乱, 进而可能会导致蜜蜂死亡 (Hooper and Gordon, 2001; Crotti *et al.*, 2013)。本研究对联苯菊酯胁迫下西方蜜蜂肠道菌群组成和结构进行了分析, 总共获得了 28 种菌门, 其中厚壁菌门 (51.45%) 和变形菌门 (45.14%) 占比最高, 这与 Yun 等 (2018) 研究结果一致, 他们也发现这两种菌门丰度以 56.65% 和 42.16% 的比列占主导地位。这两种菌门在肠道菌群中相互协调是构成菌群稳态环境的重要保证 (Engel and Philipp, 2012)。但是, 联苯菊酯胁迫显著降低了拟杆菌门的相对丰度。拟杆菌门是一种革兰氏阴性菌, 是人类和动物肠道中的主要菌群之一, 具有降解复杂聚合物促进宿主食物消化和营养获取的能力, 并可以保护肠道细胞形态免受致病菌的伤害 (Pan *et al.*, 2023)。联苯菊酯胁迫下抑制拟杆菌门生长, 可能会破坏蜜蜂肠道菌群稳态平衡, 导致蜜蜂消化吸收功能减弱、免疫力下降。

在联苯菊酯胁迫下, 本研究发现相对丰度较高且发生显著性变化的菌属主要有乳杆菌属、共生菌属、*Apilactobacillus* 属、*Bombella* 属等。乳杆菌属是蜜蜂肠道优势菌属, 不仅参与糖的代谢和转运 (Zhang *et al.*, 2018), 还具有粘附宿主细胞的能力, 促进宿主细胞的持久和定殖, 通过各种机制保护粘膜屏障, 保护宿主肠道免受病原的侵害 (Sengupta *et al.*, 2013)。共生菌属广泛存在于蜂巢、蜂粮和蜜蜂肠道中, 全基因组测序分析发现共生菌属类群中含有大量编码合成糖类和维生素的基因簇, 促进宿主对营养物质的吸收 (Botero *et al.*, 2023)。*Apilactobacillus* 属隶属于乳杆菌科, 该菌属不仅可以降解花粉中的有害物质酚酸, 降低花粉中有毒物质对蜜蜂的影响, 还能释放有益酶为蜜蜂提供营养 (Vergalito *et al.*, 2020)。同时, *Apilactobacillus* 属在宿主遇到不良因子胁迫时还具有免疫刺激作用

(Matsuzaki *et al.*, 2022)。Bombella 属类群基因组中富含编码磷酸戊糖酶和膜结合脱氢酶的基因，在宿主对碳水化合物代谢方面发挥关键作用；此外，该菌属还具有抗真菌活性，保护宿主免受病原真菌侵害 (Härer *et al.*, 2022; 张维等, 2023)。联苯菊酯胁迫下这些重要肠道菌属丰度变化，可能会引起肠道稳态紊乱，导致蜜蜂营养消化吸收、免疫能力等下降。

综上所述，联苯菊酯暴露不仅损害西方蜜蜂生存和取食，并对其免疫解毒系统以及肠道稳态造成影响。研究结果对深入探究联苯菊酯与蜜蜂分子机制上的互相作用以及对肠道菌群的互相作用具有一定生物学的意义。

参考文献 (References)

- Botero J, Sombolostani AS, Cnockaert M, *et al.* A phylogenomic and comparative genomic analysis of Commensalibacter, a versatile insect symbiont [J]. *Animal Microbiome*, 2023, 5 (1): 25.
- Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom [J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35 (1): 127-160.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson R, *et al.* A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15 (5): 615-636.
- Crotti E, Sansonno L, Prosdocimi EM, *et al.* Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health [J]. *New Biotechnology*, 2013, 30 (6): 716-722.
- Dai PL, Wang Q, Sun JH, *et al.* Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 2010, 29 (3): 644-649.
- Engel, Philipp. 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 (27): 11002-11007.
- Gammon DW, Liu Z, Chandrasekaran A, *et al.* Pyrethroid neurotoxicity studies with bifenthrin indicate a mixed Type I/II mode of action [J]. *Pest Management Science*, 2019, 75 (4): 1190-1197.
- Härer L, Hilgarth M, Ehrmann MA. Comparative genomics of acetic acid bacteria within the genus Bombella in light of beehive habitat adaptation [J]. *Microorganisms*, 2022, 10 (5): 1058.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut [J]. *Science*, 2001, 292 (5519): 1115-1118.
- Hristov P, Shumkova R, Palova N, *et al.* Honey bee colony losses: Why are honey bees disappearing? [J]. *Sociobiology*, 2021, 68 (1): e5851.
- Iwasaki JM, Hogendoorn K. How protection of honey bees can help and hinder bee conservation [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2021, 46: 112-118.
- Jiang P. Residues of Bifenthrin and Carbendazim in Beeswax and Effects on Bee Egg Development [D]. Hefei: Anhui Agricultural University Master Thesis, 2023. [江鹏. 蜂蜡中联苯菊酯和多菌灵残留及对蜜蜂卵发育的影响 [D]. 合肥: 安徽农业大学硕士论文, 2023]
- Jiang X, Guan D, Li Q, *et al.* Effects of tefluthrin and guadipyr on the midgut bacteria of adult *Apis mellifera* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2024, 202: 105940.
- Li HY, Dong ZX, Chen YF, *et al.* Advances in research of colonization of gut microbiota in the honeybee [J]. *Microbiology China*, 2019, 46 (11): 3091-3101. [李还原, 董志祥, 陈奕霏, 等. 蜜蜂肠道菌群定殖研究进展 [J]. 微生物学通报, 2019, 46 (11): 3091-3101]
- Liu WB, Duan XL, Xia XF, *et al.* Toxicity and sublethal effects of pyrethroids on honey bees [J]. *Journal of Biosafety*, 2022, 31 (1): 1-8. [刘文斌, 段辛乐, 夏晓峰, 等. 拟除虫菊酯类杀虫剂对蜜蜂的毒性和影响 [J]. 生物安全学报, 2022, 31 (1): 1-8]

- Martinson VG, Moy J, Moran NA. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (8): 2830-2840.
- Matsuzaki C, Shiraiishi T, Chiou TY, *et al.* Role of lipoteichoic acid from the genus *Apilactobacillus* in inducing a strong IgA response [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88 (8): e00190-00122.
- Nicolson SW. Bee food: The chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two [J]. *African Zoology*, 2011, 46 (2): 197-204.
- Ozawa A, Sato M, Inoue Y, *et al.* Influence of fenpropathrin EC on honeybee [*Apis mellifera*] activity on strawberry in vinyl-houses [J]. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society*, 1992, 1992 (39): 223-225.
- Pan X, Raaijmakers JM, Carrión VJ. Importance of *Bacteroidetes* in host-microbe interactions and ecosystem functioning [J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31 (9): 959-971.
- Qualls WA, Xue R-D, Zhong H. Impact of bifenthrin on honeybees and *Culex quinquefasciatus* [J]. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2010, 26 (2): 223-225.
- Rahnamaeian M. Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2011, 6 (9): 1325-1332.
- Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*) [J]. *Bmc Genomics*, 2012, 13: 558.
- Sabree ZL, Hansen AK, Moran NA. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (7): e41250.
- Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, *et al.* The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract [J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013 (1): 237921.
- Tang J, Ma C, Shi W, *et al.* A national survey of managed honey bee colony winter losses (*Apis mellifera*) in China (2013–2017) [J]. *Diversity*, 2020, 12 (9): 318.
- Tong Z, Duan J, Wu Y, *et al.* A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640: 1578-1586.
- Vergalito F, Testa B, Cozzolino A, *et al.* Potential application of *Apilactobacillus kunkeei* for human use: Evaluation of probiotic and functional properties [J]. *Foods*, 2020, 9 (11): 1535.
- Xiao J, He Q, Liu Q, *et al.* Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 805: 150292.
- Yu L, Tang W, He W, *et al.* Characterization and expression of the cytochrome P450 gene family in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8952.
- Yun JH, Jung MJ, Kim PS, *et al.* Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 2019.
- Zhao KY, Wu H, Hou RQ, *et al.* Effects of sublethal azadirachtin on the immune response and midgut microbiome of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 229 (2022): 113089.
- Zhu LZ, Qi SZ, Xue XF, *et al.* Nitenpyram disturbs gut microbiota and influences metabolic homeostasis and immunity in honey bee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258 (2020): 113671.
- Zhang QQ, OuYang F, Ge F. 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]
- Zhang W, Wang HF, Xu BH. Effects of the enterobacteria *Bombella intestini* on the nutritional metabolism of *Apis mellifera* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2023, 60 (3): 764-771. [张维, 王红芳, 胥保华. 肠道菌 *Bombella intestini* 对意大利蜜蜂营养代谢的影响 [J]. 2023, 60 (3): 764-771]
- Zhang Z, Lv J, Pan L, *et al.* Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102: 8135-8143.