

研究报告

蜜蜂成虫工蜂肠道可培养细菌群落结构分析

王洪秀¹ 靳亮² 陈庆隆¹ 魏云辉¹ 姚健¹ 马吉平¹ 张诚^{1*}

(1. 江西省农业科学院农业应用微生物研究所 江西 南昌 330200)

(2. 江西省科学院微生物研究所 江西 南昌 330029)

摘要:【目的】研究 2 种蜜蜂(健康意大利蜜蜂和健康中华蜜蜂)成虫工蜂肠道可培养细菌的群落结构组成。【方法】利用 16S rRNA 基因的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分析技术,结合菌落形态观察和生理生化特征鉴定细菌种类。【结果】从 2 种蜜蜂成虫工蜂肠道 200 株可培养细菌得到 18 种不同细菌遗传型,分属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)和肠球菌科(Enterococcaceae) 3 个科。其中肠杆菌科是肠道可培养细菌最优势的细菌种类。同样以序列相似性大于 97%的菌株归为相同细菌种类为标准,找到了 2 种蜜蜂可培养细菌的共有菌种,结合菌落形态观察和生理生化特征鉴定,确定肠道可培养细菌为肠杆菌属 8 株,克雷伯氏菌属 1 株,肠球菌属 2 株,以及气单胞菌属 1 株。【结论】通过研究健康意大利蜜蜂和中华蜜蜂成虫工蜂肠道可培养细菌群落结构组成,可为开展蜜蜂的微生态研究提供基础性资料。

关键词: 蜜蜂, 16S rRNA 基因, 肠道细菌, 变性梯度凝胶电泳, 群落结构

Diversity and community structure of intestinal cultivable bacteria in adult worker-bee

WANG Hong-Xiu¹ JIN Liang² CHEN Qing-Long¹ WEI Yun-Hui¹ YAO Jian¹
MA Ji-Ping¹ ZHANG Cheng^{1*}

(1. Institute of Agricultural Applied Microbiology, Jiangxi Agricultural Academy of Sciences, Nanchang, Jiangxi 330200, China)

(2. Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, Jiangxi 330029, China)

Abstract: [Objective] In order to identify the diversity and community structure of the cultivable

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31460490); Open Research Fund Program of the Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Chinese Academy of Sciences (No. 2014AEM003); Jiangxi Youth Science and Technology Foundation (No. 20142BAB214021); Doctor-Recruiting Program of Jiangxi Academy of Agricultural Sciences (No. 2012CBS006); Collaborative Innovation Project of Jiangxi Academy of Agricultural Sciences (No. JXXTCX2015003-010)

***Corresponding author:** E-mail: zhangcheng2255@sina.com

Received: March 04, 2016; **Accepted:** May 17, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 07, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31460490); 中国科学院农业与环境微生物学重点实验室开放研究基金项目(No. 2014AEM003); 江西省青年科学基金项目(No. 20142BAB214021); 江西省农业科学院创新基金博士启动项目(No. 2012CBS006); 江西省农业科学院协同创新项目(No. JXXTCX2015003-010)

***通讯作者:** E-mail: zhangcheng2255@sina.com

收稿日期: 2016-03-04; **接受日期:** 2016-05-17; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-06-07

bacteria inhabiting the intestinal tract in worker adults of honeybee from healthy *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana* Fabricius populations. **[Methods]** 16S rRNA gene PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) molecular methods was employed to study the bacterial diversity. In addition, the cultivable bacteria were identified by colony morphology, physiological and biochemical characteristics tests. **[Results]** A total of 200 culturable bacteria from above two populations were classified into 18 unique phylotypes. All sequenced bacteria strains were grouped into three families: Enterobacteriaceae, Vibrionaceae and Enterococcaceae. The Enterobacteriaceae was dominated in all the populations. The closely related sequences (>97% sequence similarity) which had been retrieved from culturable bacteria of two populations were grouped as one common species. We identified the cultivable bacteria: eight strains of bacteria as *Enterobacter*, one strain of *Klebsiella*, two strains of *Enterococcus*, and one strain of *Aeromonas*. **[Conclusion]** The present study significantly contributes to the available information on bacterial isolates from worker adults of honeybee.

Keywords: Honeybee, 16S rRNA gene, Intestine cultivable bacteria, Denaturing gradient gel electrophoresis, Community structure

蜜蜂属于昆虫纲(Insecta)膜翅目(Hymenoptera)细腰亚目(Apocrita)针尾部(Aculeata)蜜蜂总科(Apoidea)蜜蜂科(Apidae)蜜蜂亚科(Apinae)蜜蜂属(*Apis*), 是以雌性个体为主的社会性群体生活昆虫, 分布于除南北极以外的世界各地^[1]。蜜蜂种类不多, 但是种群水平高、个体数量大, 对人类生活和农业生产产生巨大影响。蜜蜂不仅是农作物最好的授粉者, 蜂产品还具有很高的营养和医疗保健价值。另外, 蜜蜂主要病害有美洲幼虫腐臭病、中蜂囊状幼虫病、蜜蜂白垩病和微孢子虫病。我国和其他一些国家都把美洲幼虫腐臭病和白垩病列为重点检疫的病害之一^[2]。这些幼虫性病害虽然发生在幼虫虫体上, 但成年蜂是否携带还不清楚。

昆虫肠道中存在着大量正常微生物, 一般认为这些微生物是寄主昆虫正常生长发育所不可缺少的。它们不仅在维生素的合成、脂肪和碳水化合物吸收与利用中起着重要作用, 而且在抵御外来菌的侵入与定殖, 以及在昆虫免疫系统功能中也起着重要作用^[3-4]。蜜蜂与细菌的共生是一种普遍存在的现象, 许多共生菌对蜜蜂的生长和发育起着重要作用。Evans 和 Armstrong 的研究表明: 某些共生菌对蜜蜂主要病原细菌拟幼虫芽孢杆菌具有抑制效应, 并且共生菌可能对普遍的病原体有自然的拮抗作用^[5]。此外, Gilliam 研究了非致病性微生物对蜜蜂的生化贡献: 例如微生

物在转化、加强和保存花粉储存在蜜蜂巢房的作用; 蜂群内的芽孢杆菌属产生抗真菌物质抵抗真菌疾病, 例如白垩病^[6]。

本研究利用 16S rRNA 基因序列分析技术, 对 2 种蜜蜂(健康意大利蜜蜂, 标记为 Amlc; 健康中华蜜蜂, 标记为 Accc)成虫工蜂肠道可培养细菌进行了分类鉴定, 并结合细菌的菌落形态观察, 以及生理生化反应特征, 将 2 种蜜蜂肠道可培养细菌鉴定到种。采用分子和常规技术相结合的方法客观、准确、全面地分析了蜜蜂成虫工蜂肠道可培养细菌的群落结构。通过研究蜜蜂成虫工蜂肠道可培养细菌群落结构组成, 可为筛选潜在的益生菌奠定基础, 进而改良我国蜜蜂的养殖模式, 优化饲养管理、提高人工养殖蜂群的健康水平, 促进蜂种的生长和发育。另外, 在研究清楚肠道可培养细菌菌群结构的基础上, 进一步了解肠道可培养细菌菌群与蜜蜂种类的关系, 可为更广泛地理解肠道微生物菌群的功能、探索肠道菌群与宿主的共生关系以及宿主肠道内微生物的作用机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 蜜蜂成虫: 实验用成虫工蜂来自 2 种蜜蜂, 分别是健康意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*

cultivable, Amlc)和健康中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* Fabricius cultivable, Acce),由江西省养蜂研究所提供,采虫后2 h内带回实验室进行肠道解剖。

1.1.2 培养基配制: NA 培养基、KB 培养基、NB 培养基制作方法参考文献[7]。

1.1.3 引物序列:使用的上、下游引物为细菌通用引物^[8],由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

968GClamp: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGACGGGGGGAACGCGAAGAACC TTAC-3'; L1401: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'。
27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-AAGTCGTAACAAGGTARCCGTA-3'。

1.1.4 主要试剂和仪器:TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302),北京天根生化科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、克隆 T 载体 pMD18-T、dNTPs、琼脂糖,大连宝生物工程有限公司;PCR 引物,上海立非生物技术有限公司。MyCycler ThermalCycler 型 PCR 仪、基因突变检测仪,美国 Bio-Rad 公司;水平电泳仪及电泳槽,北京六一仪器厂。

1.2 研究方法

1.2.1 肠道细菌的分离:在无菌操作下,分别选取2种蜜蜂的成虫30只,放入70%的酒精中进行虫体表面消毒2-5 min,取出虫体并用无菌水漂洗3次。在加有1 mL水的培养皿中将其解剖,取出肠道在1.5 mL EP管中加入1 mL PBS缓冲液研磨,研磨液用无菌水稀释成 10^{-1} - 10^{-6} ,各稀释度取0.5 mL于NA培养基、KB培养基和NB培养基平板上涂布分离,各稀释度重复3次,在30 °C培养72 h后,选择不同生长性状的菌落进行纯化培养。每个种群各挑取100个单菌落。

1.2.2 细菌 DNA 抽提及 16S rRNA 基因片段的扩增:采用DNA抽提试剂盒提取各细菌基因组DNA(操作步骤按说明书进行)。以各细菌抽提的DNA为模板,利用细菌通用引物968GC/L1401进行PCR扩增。30 μL PCR反应体系为:10 mmol/L dNTPs 0.5 μL,5 U/μL Taq 酶 0.5 μL,10×PCR

buffer 3.0 μL,10 μmol/L引物968GC和L1401各0.5 μL,基因组DNA 1.0 μL,加ddH₂O至30 μL。反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,30个循环;72 °C 10 min;12 °C保存。

1.2.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析:PCR产物采用Bio-Rad公司Dcode™突变检测系统进行分析。使用8%浓度的聚丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为0.5×TAE,变性剂浓度梯度30%-70%(7 mol/L尿素和40%去离子甲酰胺为100%变性),PCR产物上样量为30 μL加5 μL 10倍的Loading buffer。在60 °C恒温下,200 V预电泳10 min,然后85 V电泳16 h。待电泳完毕后,取下凝胶,用AgNO₃溶液染色10 min,NaOH溶液显色,待条带清晰后拿出凝胶放在白光透射仪上,数码相机拍照。

1.2.4 DGGE 分离后的 PCR 产物的电泳条带分析及测序:将DGGE分离到的不同条带对应的各菌株DNA,使用27F/1492R分别扩增其16S rRNA基因片段全长(1.5 kb左右)。PCR反应体积为30 μL,反应体系同1.2.2;反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 110 s,30个循环;72 °C 10 min;12 °C保存。采用Axygen公司生产的DNA凝胶回收试剂盒,对相应菌株PCR产物进行纯化,而后分别连接到pMD18-T载体上,再转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,在加有氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中220 r/min、37 °C培养过夜。采用菌液直接PCR的方法对转化后各菌株的克隆菌液进行鉴定和测序。

1.2.5 序列统计分析与系统发育树构建:将得到的序列提交到Ribosomal Database Project II (RDP)数据库,利用在线检测工具CHECK-CHIMERA检测嵌合体,去除嵌合体后的有效序列通过GenBank的BLASTn程序搜索高同源序列,采用ClustalX程序进行多序列匹配排列,然后通过MEGA 4.0程序中的Neighbor-Joining (NJ)方法、采用Jukes-Cantor计算模型构建系统发育树,Bootstrap值设定为1 000。

1.2.6 序列登录号: 将所得到的 2 种蜜蜂可培养细菌的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 登记, 序列号为 KR269795–KR269812。

1.2.7 肠道可培养细菌的菌落形态观察: 肠道可培养细菌在固体培养基上进行纯培养, 然后对其菌落特征进行观察, 分别从细菌形状、革兰氏染色、芽孢有无、菌落形态、颜色、隆起度、边缘形状、表面状态、光泽、干湿情况、透明度等方面进行。

1.2.8 肠道可培养细菌的生理生化实验: 采用由法国梅里埃公司生产的 ID 32E 肠杆菌科和其它革兰氏阴性杆菌鉴定系统进行鉴定, 具体操作参照使用说明书。

2 结果与分析

2.1 肠道可培养细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

采用 968GC/L1401 通用引物扩增且通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现, 获得的细菌 16S rRNA 基因片段大小在 400–450 bp 左右, 是实验所需目的片段(图 1)。

2.2 可培养细菌的 DGGE 电泳及序列分析

对 2 种蜜蜂的 200 株可培养细菌的 16S rRNA 基因片段进行 DGGE 电泳分析, 部分细菌电泳结果如图 2 所示。

2 种蜜蜂的 200 株可培养细菌(其中 Amlc 和 Accc 均为 100 株), 经 DGGE 分析后, 共得到 18 株不同的细菌(其中 Amlc 和 Accc 中分别是 7 和 11 株)。对 18 株不同的细菌使用引物 27F/1492R 扩增其 16S rRNA 基因片段全长的部分结果如图 3 所示。

2.3 可培养细菌的系统发育分析

系统发育分析表明, 18 株不同细菌分别属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)和肠球菌科(Enterococcaceae) 3 个科。2 种蜜蜂可培养细菌分属各科所占比例如图 4 所示, 其中 Enterobacteriaceae 所占比例分别为 Amlc 中 80%和 Accc 中 90%, 为 2 种蜜蜂可培养细菌的最优势细菌类群。Vibrionaceae 和 Enterococcaceae 在 2 种蜜蜂中只占了很少的菌株数(每个蜜蜂种群都少于 15 株)。

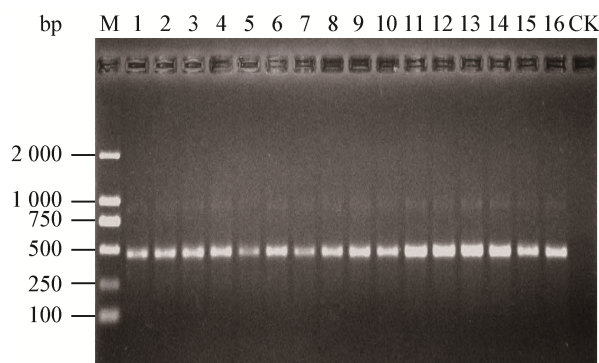


图 1 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene with primer 968GC and L1401

Note: M: Marker DL2000; 1–16: PCR product; CK: Control.

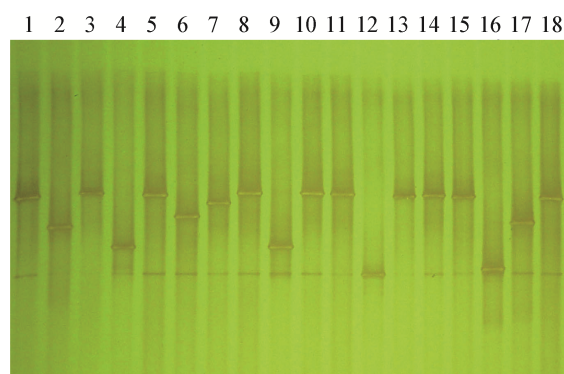


图 2 部分可培养细菌的 DGGE 图谱

Figure 2 DGGE profiles of partial culturable bacterial 16S rRNA gene

Note: 1–18: PCR product of different clones.

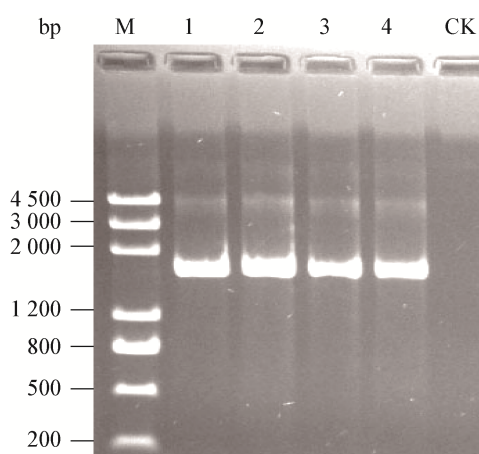


图 3 细菌 16S rRNA 基因全长 PCR 扩增结果

Figure 3 PCR amplification of full-length bacterial 16S rRNA gene with primer 27F and 1492R

Note: M: Marker III; 1–4: PCR product; CK: Control.

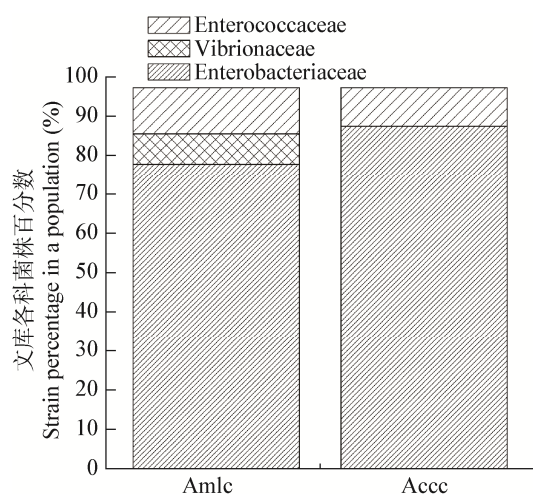


图4 2种蜜蜂不同细菌发育类群的相对比例

Figure 4 Relative proportion of the different bacterial phylogenetic groups prepared from the two populations of honeybee

2种蜜蜂肠道可培养细菌各个属所占比例如图5所示。从图5中可以看出,肠杆菌属(*Enterobacter*)所占比例最大,分别占据2种蜜蜂的60%和64%,其次为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和肠球菌属(*Enterococcus*),在2种蜜蜂中所占比例分别是30%、16%和10%、12%。说明这3个属的细菌是肠道可培养细菌的优势属种类,而气单胞菌属(*Aeromonas*)在2种蜜蜂中所占的比例很小,并且只出现在Amlc中。

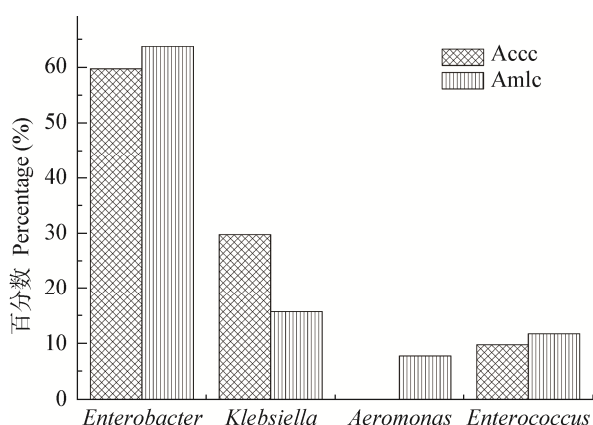


图5 2种蜜蜂不同细菌属的比例

Figure 5 Proportion of the different genera identified from the two populations of honeybee

把2种蜜蜂中序列相似性大于97%的菌株归为相同的细菌种类^[9],共有2组这样的细菌种类,存在于所归类的肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)中(已用虚线框标出,图6)。其中1组(在200株可培养细菌中占据34株,所占比例为17%)隶属于*Enterobacter cloacae* (CP010384.1)和*Enterobacter cloacae* (CP010377.1);另外1组(在200株可培养细菌中占据46株,所占比例为23%)隶属于*Klebsiella pneumoniae* (CP009461.1)、*Klebsiella pneumoniae* (CP010361.1)、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (CP009863.1)和*Klebsiella pneumoniae* (CP008929.1)。

2.4 可培养细菌的纯培养菌落特征

2种蜜蜂的共有菌种分别只取一个代表菌株同两个种群的其余菌株,经纯培养后对其菌落特征进行了观察。结果如表1所示。供试菌株在固体培养基上培养24 h后按照革兰氏染色法区别所有菌株。分析发现,12个细菌菌株中有10个菌株呈革兰氏阴性反应,其余2个菌株呈革兰氏阳性反应。经显微镜观察,其中10个菌体均为杆状,2个为球状。几乎全部的分离细菌都可以在37 °C生长,培养24–48 h后菌落形态明显,但少数菌落需要72 h以后才显示出颜色特征。

2.5 可培养细菌的生理生化鉴定

经ID 32E鉴定系统得到如表2所示的归属为肠杆菌科的各种细菌生理生化特征的判读结果。从表2中可以看出,9个试验菌株在糖分解、利用试验中多呈阳性反应,可见对碳素化合物均有较好的分解利用能力。在对醇、氮素化合物的分解利用及大分子化合物的分解试验中,不同菌株表现出了明显的差异性。

2.6 可培养细菌的菌种名称

根据供试菌株的16S rRNA基因片段全长测序、菌落形态观察和生理生化特征试验,确定了12株可培养细菌的菌种名称(表3)。12株可培养

细菌分别是：肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、蒙氏肠球菌 *Enterococcus mundtii*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、路德维希肠杆菌 *Enterobacter ludwigii*、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、路德维希肠杆

菌 *Enterobacter ludwigii*、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、屎肠球菌 *Enterococcus faecium*、阿氏肠杆菌 *Enterobacter asburiae* 和阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*。其中肠杆菌属 8 株、克雷伯氏菌属 1 株、肠球菌属 2 株和气单胞菌属 1 株。

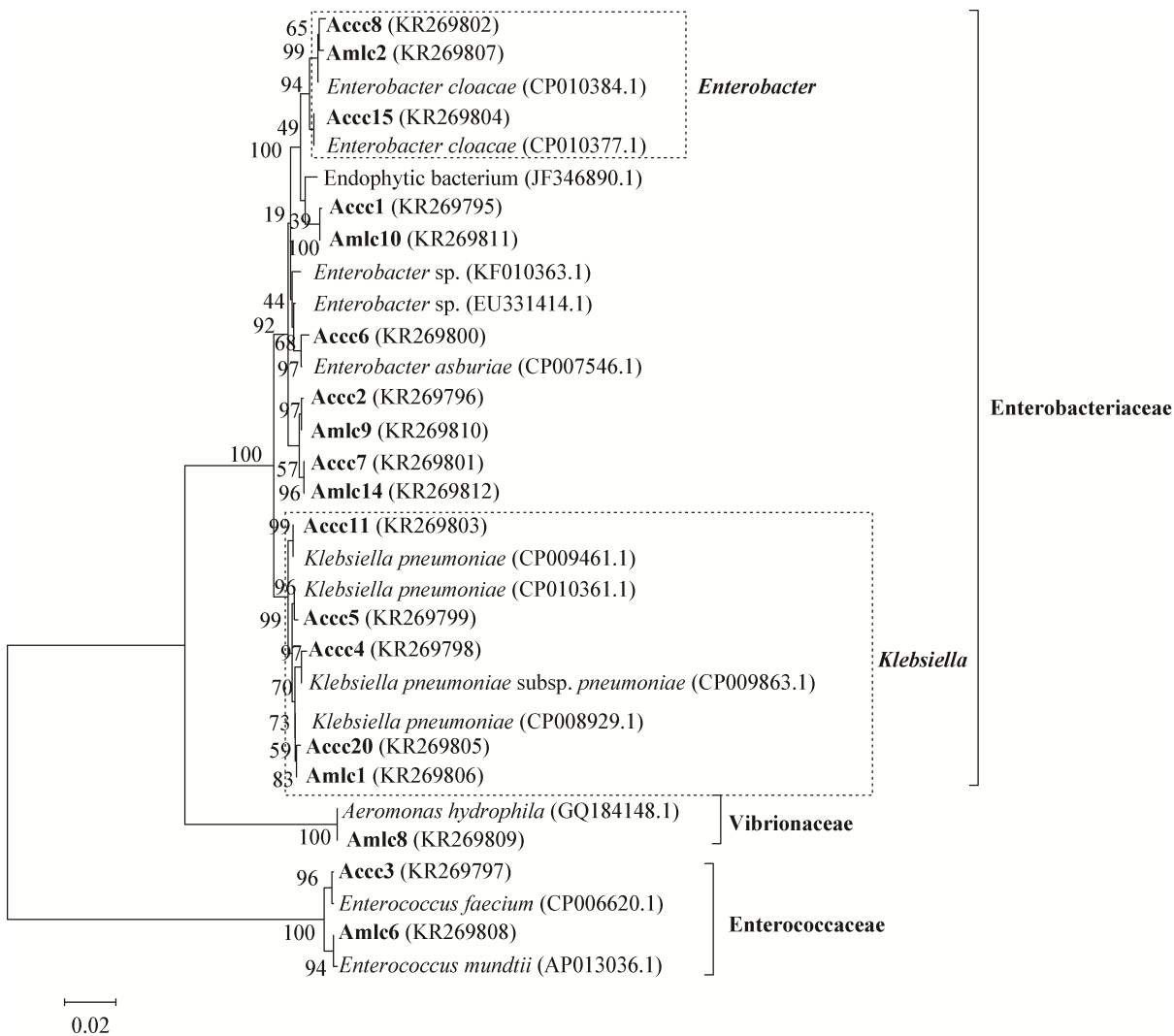


图 6 2 种蜜蜂可培养细菌系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of cultivable bacteria from two populations (Amlc and Accc) of honeybee

注：括号内的数字为 GenBank 序列号；结点处数字为 Bootstrap 值；标尺代表 2% 的序列分歧。

Notes: Numbers in parenthesis represented GenBank accession No.; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; The scale bar represents 2% sequence divergence.

表 1 可培养细菌的菌落特征
Table 1 Colony features of the cultivable bacteria

项目 Item	Amlc1	Amlc2	Amlc6	Amlc8	Amlc9	Amlc10	Amlc14	Accc1	Accc2	Accc3	Accc6	Accc7
细菌形状 Bacterium shape	杆菌	杆菌	球菌	杆菌	杆菌	杆菌	杆菌	杆菌	杆菌	球菌	杆菌	杆菌
革兰氏染色 Gram staining	G ⁻	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁻
芽孢 Spore	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无
菌落形态 Colony shape	圆型	圆型	圆型	圆型	圆型	扩展	圆型	扩展	圆型	圆型	圆型	圆型
菌落颜色 Colony colour	微黄	微黄	乳白色	微黄	黄色	黄色	微黄	黄色	黄色	乳白色	乳白色	微黄
菌落隆起度 Colony elevation	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起
菌落边缘形状 Colony margin	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐
菌落表面状态 Surface state of the colony	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
菌落光泽 Colony gloss	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽
菌落干湿 Colony consistency	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润
菌落透明程度 Colony opacity	不透明	半透明	半透明	不透明	半透明	半透明	半透明	半透明	半透明	半透明	不透明	半透明

Note: G⁺: Positive; G⁻: Negative.

表 2 肠杆菌科细菌生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of Enterobacteriaceae bacteria

特性 Characteristics	Amlc1	Amlc2	Amlc9	Amlc10	Amlc14	Accc1	Accc2	Accc6	Accc7
L-鸟氨酸 L-Ornithine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-精氨酸 L-Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-赖氨酸 L-Lysine	+	-	-	-	-	-	-	-	-
尿素 Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-阿拉伯糖醇 L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
半乳糖醛酸 Galacturonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 酮基-葡萄糖酸钾 5-Keto-potassium gluconate	+	+	+	-	+	-	+	+	+
5-溴-3-羟基吲哚-壬醇 5-Bromo-3-hydroxy-indole-nonanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(待续)

(续表)

丙酮酸钠	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Pyruvate sodium	-	+	+	-	+	-	+	-	+
4-硝基苯基-βD-葡萄糖甙	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
侧金盏花醇	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
古老糖	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Palatinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4-硝基苯基-βD-葡萄糖苷酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Nitrophenyl-β-D-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丙二酸钠	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Malonate sodium	-	+	+	+	+	+	+	-	+
L-色氨酸	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Tryptophan	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5-溴-4-氯-3-indolyl-N-乙酰 1-βD-葡萄糖甙	+	+	+	-	+	-	+	-	+
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acetyl-β-D-glucopyranoside	+	+	+	-	+	-	+	-	+
4-硝基苯基-βD-半乳糖甙	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-Nitrophenyl-β-D-galactoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-阿拉伯醇	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4-硝基苯基-αD-葡萄糖苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-硝基苯基-αD-半乳糖苷	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4-Nitrophenyl-α-D-galactoside	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-海藻糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-鼠李糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肌醇	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Inositol	+	+	+	-	+	-	+	+	+
D-纤维二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-山梨醇	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4-硝基苯基-αD-麦芽糖甙	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Nitrophenyl-α-D-maltose glycoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-天冬氨酸 4-硝基-苯胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Aspartic acid-4-nitroanilide	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: +: Positive; -: Negative.

表3 可培养细菌的菌种名称
Table 3 The name of the cultured bacteria

菌株 Strain	种属 Genus
Amlc1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Amlc2	<i>Enterobacter cloacae</i>
Amlc6	<i>Enterococcus mundtii</i>
Amlc8	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Amlc9	<i>Enterobacter cloacae</i>
Amlc10	<i>Enterobacter ludwigii</i>
Amlc14	<i>Enterobacter cloacae</i>
Accc1	<i>Enterobacter ludwigii</i>
Accc2	<i>Enterobacter cloacae</i>
Accc3	<i>Enterococcus faecium</i>
Accc6	<i>Enterobacter asburiae</i>
Accc7	<i>Enterobacter cloacae</i>

3 讨论

研究通过变性梯度凝胶电泳技术对2种蜜蜂成虫肠道可培养细菌进行了分类鉴定,共得到18种不同的细菌遗传型,其中Amlc为7种,Accc为11种。对不同遗传型的菌株再扩增其16S rRNA基因片段全长、测序及系统发育分析后,主要归为3个科,分别为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)和肠球菌科(Enterococcaceae)。其中肠杆菌科是肠道可培养细菌中最优势的细菌种类。研究选用变性梯度凝胶电泳对2种蜜蜂的200株可培养细菌进行了初筛,将处于同一迁移位置的条带归为相同的系统发育类型(Phylotypes)或操作分类单元(OTUs)^[10]。每种系统发育类型里选取1个代表菌株进行测序,由于处于相同位置的条带仅代表相同菌种,但有可能是不同类型的菌株,后续研究侧重不同类菌种对蜜蜂细菌性病害的拮抗作用,但相同菌种、不同菌株之间对蜜蜂病害的拮抗作用是否有所差别也需要进一步考虑。

对于蜜蜂肠道微生物种类的探索,国外研究者曾采用传统的培养手段进行了初步调查^[6,11]。欧洲

意大利蜜蜂已被报道,包含多种肠道共生菌,其中包括约1%类酵母微生物,29%的革兰氏阳性细菌,如芽孢杆菌(*Bacillus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、链球菌(*Streptococcus*)和梭状芽孢杆菌(*Clostridium*),以及70%的革兰氏阴性或可变的革兰氏细菌,如无色杆菌(*Achromobacter*)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏细菌属(*Erwinia*)、大肠埃希氏菌属(*Escherichia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、变形杆菌(*Proteus*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)^[6,11]。Gilliam等应用纯培养方法研究了意大利蜜蜂肠道细菌,发现了肠道内细菌种类丰富并存在动态变化,其中,芽孢杆菌属 *Bacillus* spp.、肠杆菌属 *Enterobacter* spp.和革兰氏可变多形性细菌占优势^[12]。本研究同样证实了肠杆菌属 *Enterobacter* spp.为2类蜜蜂肠道的优势菌群,比例高达62%。蜜蜂肠道中普遍存在肠杆菌属的革兰氏阴性菌,包括:阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)、产气大肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)和肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*),并且肠杆菌通常出现在14日龄的成蜂肠道中^[12-14]。在成年工蜂和蜂王中,革兰氏可变多形性菌是最常见的肠道微生物^[13,15-16]。本研究经鉴定得到的菌种也主要是阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)和肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)。

研究基于16S rRNA-DGGE方法对中华蜜蜂(Accc)和意大利蜜蜂(Amlc)2种蜜蜂成虫工蜂的肠道可培养细菌菌群结构进行了调查,总体来看,Accc样本所得OTU总数(11个)比Amlc样本所得OTU总数(7个)多,但核心菌群的种类大体相似。这与先前采用细菌纯培养方法对欧洲蜜蜂的研究结果^[5-6,17-20]类似,也与采用T-RFLP方法对泰国东、西方蜜蜂^[21]和小蜜蜂^[22]以及欧洲熊蜂^[23]的肠道菌群研究结果相类似。尽管两个蜂种的采样时间、地点和花期都大致相似,但由于不同的采集时间、不同种类的蜜源以及不同大小的蜜蜂对一些花的采集偏好等因素影响,不同蜜蜂种类的食物分区也有

所不同^[24], 因此, 这可能导致引入不同的细菌到蜂箱中, 也可能进入蜜蜂肠道。此外, 东方蜜蜂善于采集零星蜜源^[25], 而西方蜜蜂利用大宗蜜源的能力较强, 因此, 尽管在同一地区同一蜜源采样, 由于东西方蜜蜂获取蜜源的习惯存在差异, 因而造成采集的食物多样性存在一定差异, 因而可能引起两个蜂种肠道菌群的差异。另外, 东、西方蜜蜂肠道菌群的多样性较其它昆虫如蚜虫、飞蛾以及甲虫低^[26-28], 这可能与蜜蜂的取食范围较窄有关(如蜜蜂仅取食花粉和花蜜)。

根据序列相似性大于 97% 的菌株归为相同的细菌种类, 我们找到了 2 种蜜蜂可培养细菌的共有菌种, 再通过菌落形态特征观察和生理生化试验, 确定了蜜蜂肠道可培养细菌的菌种名称。利用传统的细菌鉴定方法——形态学观察和生理生化特性分析, 以及现代分子生物学方法——16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术相结合的手段鉴定细菌种类, 可以使鉴定准确度提高, 使结果更可信。此种方法已广泛应用于多领域^[29-31], 尤其对具有重要利用价值菌株的鉴定^[32-34]。

肠道菌群的平衡在营养、代谢和免疫功能等方面对昆虫的健康起到了重要的作用, 并对昆虫健康的改善有着重要意义。从广义上来看, 研究蜜蜂微生物系统(Microbial systems)将有助于我们进一步理解蜜蜂微生态学, 并在蜂群管理和疾病预防上具有潜在的应用价值; 另外, 这一研究的最直接意义将有助于商业养蜂中提高蜜蜂肠道微生物健康和疾病管理水平^[35]。下一步, 我们将重点研究 2 种蜜蜂的肠道细菌, 尤其是共有菌株对蜜蜂细菌性以及真菌性病害的拮抗作用。综上所述, 本文通过研究蜜蜂成虫工蜂肠道可培养细菌群落结构组成, 可为筛选潜在的益生菌奠定基础, 进而改良我国蜜蜂的养殖模式, 优化饲养管理, 提高人工养殖蜂群的健康水平, 促进蜂种的生长和发育。另外, 在研究清楚肠道可培养细菌菌群结构的基础上, 进一步了解肠道可培养细菌菌群与蜜蜂种类的关系, 可为更广泛地理解肠道微生物菌群的功能、探索肠道菌群与

宿主的共生关系以及宿主肠道内微生物的作用机理提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Jin TD, Chen SL, Qian JH, et al. Bee disease in China and its prevention and cure[J]. Apiculture of China, 2007, 58(2): 23-24 (in Chinese)
金汤东, 陈盛禄, 钱建华, 等. 我国蜜蜂疾病发生趋势与防治技术[J]. 中国蜂业, 2007, 58(2): 23-24
- [2] Wang JD. The Bees Protection[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997: 197-200 (in Chinese)
王建鼎. 蜜蜂保护学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 197-200
- [3] Hongoh Y, Ohkuma M, Kudo T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae)[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(2): 231-242
- [4] Eutick ML, O'Brien RW, Slaytor M. Bacteria from the gut of Australian termites[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1978, 35(5): 823-828
- [5] Evans JD, Armstrong TN. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease[J]. BMC Ecology, 2006, 6: 4
- [6] Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 155(1): 1-10
- [7] Chen TS. Manufacture and Application of Microbial Culture Medium[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 179-184 (in Chinese)
陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 179-184
- [8] Zhang H, Jackson TA. Autochthonous bacterial flora indicated by PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments from the alimentary tract of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(5): 1277-1285
- [9] 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(2): 258-272
- [10] Simpson JM, Kocherginskaya SA, Aminov RI, et al. Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species[J]. Integrative and Comparative Biology, 2002, 42(2): 327-331
- [11] Snowdon JA, Cliver DO. Microorganisms in honey[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 31(1/3): 1-26
- [12] Gilliam M, Valentine DK. Enterobacteriaceae isolated from foraging worker honey bees, *Apis mellifera*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1974, 23(1): 38-41
- [13] Gilliam M, Lorenz BJ, Richardson GV. Digestive enzymes and micro-organisms in honey bees, *Apis mellifera*: influence of streptomycin, age, season and pollen[J]. Microbios, 1988, 55: 95-114
- [14] Gilliam M, Morton HL. Enterobacteriaceae isolated from honey bees, *Apis mellifera*, treated with 2,4-D and antibiotics[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1974, 23(1): 42-45
- [15] Gilliam M, Taber III S, Lorenz BJ, et al. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1988, 52(2): 314-325
- [16] Gilliam M. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from selected organs of queen honey bees, *Apis mellifera*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1978, 31(3): 389-391
- [17] Gilliam M, Valentine DK. Bacteria isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*: the genus *Bacillus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1976, 28(2):

- 275-276
- [18] Gilliam M, Morton HL. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics[J]. *Apidologie*, 1978, 9(3): 213-222
- [19] Gilliam M, Buchmann SL, Lorenz BJ, et al. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* associated with three species of solitary bees[J]. *Apidologie*, 1990, 21(2): 99-105
- [20] Mohr KI, Tebbe CC. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(3): 573-582
- [21] Disayathanoowat T, Young JPW, Helgason T, et al. T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(2): 273-281
- [22] Saraihong P, Li YH, Saenphet K, et al. Bacterial community structure in *Apis florea* larvae analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequencing[J]. *Insect Science*, 2015, 22(5): 606-618
- [23] Koch H, Schmid-Hempel P. Bacterial communities in central European bumblebees: low diversity and high specificity[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(1): 121-133
- [24] Oldroyd B, Rinderer T, Wongsiri S. Pollen resource partitioning by *Apis dorsata*, *A. cerana*, *A. andreniformis* and *A. florea* in Thailand[J]. *Journal of Apicultural Research*, 1992, 31(1): 3-7
- [25] Xu P, Shi M, Chen XX. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*[J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4239
- [26] Haynes S, Darby AC, Daniell TJ, et al. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7216-7223
- [27] 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
- [28] Lehman RM, Lundgren JG, Petzke LM. Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 57(2): 349-358
- [29] Kuzina LV, Peloquin JJ, Vacek DC, et al. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Current Microbiology*, 2001, 42(4): 290-294
- [30] He F, Kang YJ, Shan J, et al. An oxygen-tolerant denitrifying strain and its denitrifying processes[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(1): 35-39 (in Chinese)
何芳, 康贻军, 单君, 等. 一株高耐氧反硝化细菌的筛选及其反硝化产物确定[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(1): 35-39
- [31] Du CM, Guo YC, Liu XM. Evaluation of API 20E system and PCR methods for identification of salmonella[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2005, 12(5): 1006-1007 (in Chinese)
杜春明, 郭云昌, 刘秀梅. API 20E、PCR方法在沙门菌鉴定中的应用[J]. *实用预防医学*, 2005, 12(5): 1006-1007
- [32] Wu XZ, Gao YX, Ou HL, et al. Isolation and characterization of *Selenomonas ruminantium* from the rumen of dairy cows[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(10): 25-28 (in Chinese)
武心镇, 高玉霞, 欧海龙, 等. 奶牛瘤胃中反刍兽月形单胞菌的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2008, 29(10): 25-28
- [33] Yang Y, Wan MX, Peng H, et al. Isolation and characterization of bacterium for chalcopyrite bioleaching[J]. *Journal of Central South University (Science and Technology Edition)*, 2007, 38(4): 639-644 (in Chinese)
杨宇, 万民熙, 彭宏, 等. 一株黄铜矿专属浸出细菌的分离与鉴定[J]. *中南大学学报: 自然科学版*, 2007, 38(4): 639-644
- [34] Feng YY, Chen J, Liu B, et al. Identification and characterization of a PTA-degrading bacterial strain[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2006, 57(8): 1968-1973 (in Chinese)
冯杨阳, 陈俊, 刘波, 等. 一株对苯二甲酸降解菌的鉴定及其降解特性[J]. *化工学报*, 2006, 57(8): 1968-1973
- [35] Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, et al. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*)[J]. *Insectes Sociaux*, 2011, 58(4): 431-444