



专论与综述

常见疾病、抗生素及农药对意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*) 肠道微生物多样性的影响研究进展

李佳欢¹ 齐素贞² 吴黎明² 赵文婷³ 黄少康^{*1}

1 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院) 福建 福州 350000

2 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093

3 北京农学院生物与资源环境学院 北京 102206

摘要: 蜜蜂是对农业生产十分重要的授粉昆虫。蜜蜂肠道微生物与蜜蜂健康有密切关系, 但肠道微生物也会受多种外界因素的影响。本文就蜜蜂疾病、抗生素等蜂病治疗药物、农药, 以及益生菌的应用等对意大利蜜蜂工蜂肠道微生物影响的研究进行了归纳总结, 并对蜜蜂与其肠道菌关系研究进行了展望。

关键词: 蜜蜂, 肠道微生物, 多样性, 疾病, 农药

Advances in effects of common diseases, antibiotics and pesticides on gut microbiota diversity of *Apis mellifera ligustica*

LI Jiahuan¹ QI Suzhen² WU Liming² ZHAO Wenting³ HUANG Shaokang^{*1}

1 College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350000, China

2 Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China

3 College of Bioscience and Resources Environment, Beijing Agricultural University, Beijing 102206, China

Abstract: Honey bees are very important pollinators to agriculture. Gut microbiota is closely related to honey bee health, and affected by many external factors. Herein, the influences on gut microbiota diversity of *Apis mellifera ligustica* caused by diseases, antibiotics used for disease treatment, and pesticides were analyzed. Furthermore, the researches on application of honey bee gut microbiota as probiotics was summarized. The prospect of research on honey bee and its microbiota is suggested.

Keywords: honey bee, gut microbiota, diversity, disease, pesticide

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21707162); Fuzhou Science and Technology Project (2019-N-3, KH190316A, KH190025A)

***Corresponding author:** Tel: 86-591-83789216; E-mail: skhuang@fafu.edu.cn

Received: 22-09-2020; **Accepted:** 30-11-2020; **Published online:** 01-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(21707162); 福州市科技计划项目(2019-N-3, KH190316A, KH190025A)

***通信作者:** Tel: 0591-83789216; E-mail: skhuang@fafu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-22; **接受日期:** 2020-11-30; **网络首发日期:** 2021-03-01

农业生产离不开授粉,全球 115 种主要农作物中,75%依赖动物授粉,动物授粉者中 84%是昆虫。蜜蜂是分布和应用最广、养殖数量最多的授粉昆虫。据统计,2005 年,昆虫授粉对世界农业贡献价值达 1 530 亿欧元^[1]。2006–2008 年,蜜蜂授粉对我国 36 种农作物生产年均贡献价值高达 3 042.2 亿元^[2]。养蜂业对农业生产的贡献巨大,是农业生产中不可或缺的一员。因此,维护蜜蜂健康不仅是蜂业的基本要求,更是农业生产安全的重要保障。

成年蜜蜂的消化道分前肠、中肠和后肠 3 部分。前肠和中肠中菌群数量较少,绝大部分细菌分布在后肠。后肠由小肠(也称回肠, Ileum)与直肠(Rectum)组成,菌量可达 10^8 – 10^9 个^[3-4]。中肠中细菌有乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)、奈氏菌科(*Neisseriaceae*)及醋酸菌科(*Acetobacteraceae*)等^[5]。小肠中主要有 *Snodgrassella alvi* 和 *Gilliamella apicola*; *S. alvi* 紧附于小肠纵褶表面,形成一层生物膜, *G. apicola* 覆于其上,两者在代谢上互相依存,共同保护着小肠免受病原微生物的侵害。直肠中最主要的是乳杆菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifdobacterium*),这 4 种菌是工蜂肠道的核心菌群^[6-7],蜜蜂肠道主要菌群组成及功能可参见表 1。此外,蜜蜂肠道中还有 *Bartonella apis*、*Apibacter*

adventor, 以及 *Frischella perrara* 和沙雷氏菌 *Serratia*、蜂房哈夫尼亚菌 *Hafnia alvi* 等机会性致病菌^[11]。蜜蜂的肠道细菌不仅可以帮助蜜蜂消化酶难分解或有毒的食物成分、提供必需的营养、促进生长发育、参与机体代谢、增强免疫和防御病害能力,还具有提高蜜蜂对蔗糖的敏感度等方面的功能^[12-14]。

越来越多的研究证实,蜜蜂肠道微生物对蜜蜂健康至关重要^[15-17]。同时,其又受食物、环境等压力,以及疾病、化学药物等因素的影响^[18]。本文归纳总结了近 5 年来国内外关于疾病、农药、抗生素等内外源风险因素,以及饲喂共生菌对意大利蜜蜂肠道微生物的影响的相关研究成果。由于相关研究主要以意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)为主,下文如未专门指出,均默认为意大利蜜蜂。

1 主要疾病对蜜蜂肠道微生物多样性的影响

蜜蜂一生中可能受到多种病害侵袭,有细菌、真菌、病毒、原虫及蜂螨等危害。绝大多数微生物病原都是“病从口入”,通过消化道再侵入机体其他组织;有些病原主要感染的就是肠道,因此也会影响肠道的微生态。蜜蜂易患 2 种细菌病:欧洲

表 1 意大利蜜蜂工蜂肠道菌群主要组成及功能(数据来源^[8-10])
Table 1 Main composition and function of intestinal bacteria of *Apis mellifera ligustica* workers (data source^[8-10])

细菌种类		主要功能	影响因素
Bacterial species		Main function	Influence factors
变形菌门 <i>Proteobacteria</i>		生长发育	农药
α-变形菌纲	<i>Bartonella apis</i>	Growth development	Pesticides
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	抵御病原	抗生素
	<i>Bombella (Parasaccharibacter)</i>	Against pathogens	Antibiotics
β-变形菌纲	<i>Snodgrassella alvi</i>	解毒作用	疾病
<i>Betaproteobacteria</i>		Detoxification	Diseases
γ-变形菌纲	<i>Gilliamella apicola</i>	免疫及代谢功能	饮食
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Frischella perrara</i>	Immune and metabolic functions	Diet
厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	Firm-4 and Firm-5 <i>Lactobacillus</i> sp.		气候/季节
放线菌门	<i>Bifdobacterium astero</i> or <i>coryneform</i>		Climate/Season
<i>Actinomycetes</i>			蜂种和日龄
			Species and age of bees
			其他因素
			Other factors

幼虫腐臭病(简称欧幼病, European Foulbrood, EFB)和美洲幼虫腐臭病(简称美幼病, American Foulbrood, AFB)。欧幼病由蜂房球菌(*Melissococcus plutonium*)感染引起, 美幼病由幼虫类芽胞杆菌(*Paenibacillus larvae*)感染引起, 2种病害均具传染性, 严重时会导致蜂群衰亡。

欧幼病和美幼病虽然发生在幼虫上, 但病原菌主要是通过成年蜂的交哺饲喂等行为传播。研究发现, 从患 EFB 蜂群中采集的成年工蜂, 其肠道中蜂房球菌的菌量比同场无 EFB 症状的工蜂高 75 倍, 而且病原菌还会影响成年工蜂的肠道菌群组成^[19]。患病群工蜂肠道中的果葡芽孢杆菌(*Fructobacillus fructosus*)、昆氏乳杆菌(*L. kunkeei*)、*G. apicola*、*F. perrara*、*B. coryneforme* 的相对丰度均显著高于无症状群的工蜂; 患病群工蜂肠道中的乳杆菌 *L. mellis* 的相对丰度高于来自无 EFB 的蜂场的对照组工蜂; 而对照组工蜂肠道内的 *S. alvi*、*L. helsingborgensis*、*L. kullabergensis* 和 *L. melliventris* 相对丰度显著高于患病群工蜂和无症状群工蜂, 说明 EFB 对成年工蜂的肠道菌群也有明显影响^[19]。

美幼病同样也会影响成年工蜂肠道菌群稳态^[20]。对来自患 AFB 蜂场的无症状工蜂和患病群工蜂进行的比较表明, 患病群和无症状群的工蜂肠道中弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)和蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)的相对丰度高于无 AFB 病的蜂场对照群工蜂; 而幼虫类芽胞杆菌的菌量较高的患病群工蜂肠道中, 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)、螺旋菌(*Spiroplasma melliferum*)和摩根氏菌(*Morganella morganii*)的相对丰度降低, 即幼虫类芽胞杆菌的丰度与这几种菌呈负相关, 可能幼虫类芽胞杆菌对这些菌有抑制作用^[20]。

蜜蜂囊状幼虫病是一种常见的病毒性传染病, 病原是囊状幼虫病病毒(Sacbrood Virus, SBV), 病毒于幼龄时经口侵入, 幼虫于前蛹期发病死亡。

Yongsawas 等^[21]用意蜂的 SBV 感染东方蜜蜂(*A. cerana*)和意蜂幼虫, 发现感染后的东方蜜蜂幼虫中, *G. apicola* 的相对丰度由 35.54%显著下降到 2.96%, 而 *S. alvi* 和果葡芽孢杆菌的比例显著升高; 在感染了的意蜂幼虫中, 这 3 种菌的比例与对照无显著差异, 说明意蜂囊状幼虫病毒对不同蜂种肠道的菌群影响不同。

蜜蜂微孢子虫病是最常见的成年蜂病之一, 病原有西方蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)和东方蜜蜂微孢子虫(*N. ceranae*), 目前主要以后者为主。蜜蜂微孢子虫主要感染中肠, 导致肠道功能受损, 机体免疫受抑制, 加速老龄化, 寿命缩短, 蜂群繁殖和生产能力也会严重下降^[22-23]。研究表明, 蜜蜂微孢子虫病会显著改变蜜蜂肠道的菌群组成^[24]。意蜂工蜂感染东方蜜蜂微孢子虫后, 后肠的双歧杆菌^[25]、*Gilliamella*^[26]比例会显著升高; 菌群失调又可以促进微孢子虫的早期侵染, 并且微孢子虫感染数量的增加与 *F. perrara* 的增加显著相关^[27]。

研究报道, 东方蜜蜂微孢子虫以 10^5 孢子/蜂的剂量接种意蜂出房工蜂, 对 1-6 日龄的工蜂肠道 DNA 进行微生物组测序比较发现, 感染的意蜂工蜂肠道中 *Erwinia rhapontici*, 肠杆菌(*Enterobacter* sp.)和 *E. aerogenes*, 柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*), 克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*), 以及 *S. alvi* 等至少 15 种细菌的丰度显著减少; 另一组在接种孢子时, 饲喂了蜜蜂 *Dicer* 基因的 siRNA, siRNA 成功抑制了肠道中微孢子虫的繁殖, 同时, 以上大多数细菌及 *G. apicola* 等的丰度显著增加^[28]。但也有不同报道, 给小于 2 日龄的意蜂工蜂接种 10^5 孢子/蜂后的第 3、7、11 天, 用定量 PCR 法比较接种孢子组与对照组肠道的 α -、 γ -变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门, 以及 *G. apicola* 和 *S. alvi* 的表达量变化, 未发现感染组与对照组之间有显著差别^[29]。东方蜜蜂微孢子虫感染也会对中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)成蜂工蜂中肠菌群的多样性有显著影响。感染后中肠中的周螺菌

(Weeksellaceae), 葡萄醋杆菌(*Gluconacetobacter*)的相对丰度显著增加, 而地神菌(*Telluria*)、沙雷氏菌和肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)的相对丰度降低^[30]。

狄氏瓦螨(*Varroa destructor*)是对西方蜜蜂最具破坏性的寄生性害虫。狄氏瓦螨不仅可直接影响蜜蜂健康, 还是多种蜜蜂病毒的载体, 螨害严重时可导致蜂群崩溃。Hubert 等^[24,31]研究发现, 蜂螨感染率高的蜂群中, 工蜂肠道中的巴尔通氏体属和乳杆菌的相对丰度下降, 而 *S. alvi* 和醋酸杆菌的相对丰度增加; 认为狄氏瓦螨感染对肠道微生物的影响比微孢子虫、蜜蜂普氏罗曼锥虫(*Lotmaria passim*)感染对成蜂肠道微生物造成的影响更显著。

意蜂的枣花病是我国北方枣花花期常见病害。与健康个体相比, 患枣花病的工蜂肠道菌群组成和功能会发生明显改变, 病蜂的中、后肠中变形杆菌门相对丰度下降, 厚壁菌门和放线菌门的丰度增加; 病蜂体内碳水化合物、核苷酸、氨基酸、辅酶和维生素的代谢增加, 而能量代谢、异种生物降解和代谢减少^[32]。

2 蜂用药物对蜜蜂肠道菌群的影响

养蜂生产中常用土霉素、四环素等抗生素治疗欧幼病, 国外常用泰乐菌素(Tylosin)治疗美幼病。但是, 抗生素在杀死病原菌时, 也会杀死其他细菌, 从而破坏肠道菌群稳态, 导致抗病性减弱, 对其他病原的易感性增加^[33-35]。对曾使用过四环素蜂群中的工蜂肠道细菌研究发现, 肠道菌中抗生素基因位点频率比未使用过的高得多。例如, 曾用过四环素的蜂场工蜂中发现 8 个四环素抗性基因, 其中 6 个是外排泵耐药基因和 2 个核糖体保护基因位点; 68% 的抗性基因来自 *S. alvi*, 其次是 α -变形菌^[34]。来自瑞典等国的 25 年未使用过抗生素的工蜂肠道菌中, 仅发现 3 个抗性基因位点^[34], 说明长期使用抗生素会导致肠道中具抗抗生素的菌群比例增加, 菌群多样性下降。Raymann 等^[35]选取 *G. apicola* 的蛋白基因 *rimM*、*pfl* 和 *S. alvi* 的蛋白

基因 *guaA* 和 *gluS* 分别作为 2 种细菌种内多样性分析指标, 对比饲喂了四环素 5 d 的工蜂和对照组工蜂发现, 四环素显著降低了 *G. apicola* 菌株多样性, 而 *S. alvi* 菌株多样性受影响较小。这说明, 抗生素会降低无抗生素抗性的菌群的种内多样性, 而菌株遗传多样性的丧失会影响菌群功能, 不利于宿主健康。

意蜂工蜂羽化出房后, 一般 4–10 d 即可建立起主要的肠道菌群, 此后基本保持稳定。当蜂群使用抗生素后, 抗生素能快速杀死大部分细菌, 破坏肠道菌群平衡; 而且, 菌群恢复缓慢, 菌群失衡的个体感病性显著增加^[33]。据报道^[33], 给外勤蜂饲喂 4 h 的抗生素, 20 h 后检测肠道菌数量, 结果发现, 土霉素或泰乐菌素(188 $\mu\text{mol/L}$)分别使肠道总菌量下降 78% 和 84%。即使是 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 杀真菌的百菌清(*Chlorothalonil*)和治疗微孢子虫病的烟曲霉素(55 $\mu\text{mol/L}$)也可使总菌量分别下降 44% 和 68%。百菌清还使肠道乳杆菌目(*Lactobacillaceae*)丰度显著降低, *S. alvi* 增加^[33]。有研究表明^[29], 给意蜂工蜂饲喂 450 $\mu\text{g/mL}$ 四环素 5 d 后, 肠道菌群总量, 以及双歧杆菌、乳杆菌、*G. apicola*、*S. alvi* 相对丰度均显著下降; 将同样处理的工蜂放回蜂群 7 d 后, 总菌量增加非常缓慢; 双歧杆菌、乳杆菌和巴通氏菌(*B. apis*)的相对丰度仍显著小于对照, 仅 *G. apicola* 相对丰度显著升高。给 2 日龄成年工蜂饲喂含 200 IU/mL 的联合抗生素(青霉素和链霉素)的糖浆, 3 d 后, 工蜂肠道总菌量显著下降; 7 d 后下降更显著; 同时, 抗菌肽基因 *abaecin*、*defensin* 和 *hymenoptaecin* 的表达量显著下降; 并且饲喂抗生素后, 个体抗病性严重削弱, 肠道中微孢子虫的繁殖量显著高于未饲喂抗生素的个体^[29]。

我们最近的研究发现^[36], 微塑料单独或与四环素协同作用, 都会对工蜂肠道菌有显著影响; 0.5–5.0 mg/mL 的 25 μm 粒径的微塑料饲喂工蜂 14 d 后, 肠道中乳杆菌属相对丰度显著升高, *Commensalibacter* 相对丰度显著下降; 四环素与微

塑料协同作用时,会大大增加微塑料对蜜蜂的致死率^[36]。尽管微塑料对生物体的影响可能需要长时间的暴露累积,但它的广泛存在以及与抗生素的协同作用对蜜蜂的风险值得关注和研究。

除了抗生素外,蜂群中另一类药物污染来自化学杀螨剂。常见的杀螨剂有氟胺氰菊酯(Tau-Fluvalinate)、双甲脒(Amitraz)、蝇毒磷(Coumaphos)、草酸等。氟胺氰菊酯作为主要杀螨剂使用在我国已有近30年的历史,国外约有40年。因具有亲脂的特性,使其易在蜂胶、蜂蜡中残留,并且降解慢、易累积。氟胺氰菊酯在蜂蜡中的残留可达500–3 500 ng/g,蜂胶中残留量更高。研究发现,蜂群中使用氟胺氰菊酯挂片30 d后,工蜂中可检出14–160 ng/g的残留^[37]。氟胺氰菊酯使用6周后,工蜂肠道的肠杆菌目(*Enterobacteriales*)和柄杆菌目(*Caulobacteriales*)相对丰度显著变化。蝇毒磷使用6周后,双歧菌目(*Bifidobacteriales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*)细菌的相对丰度显著增加,红环菌目(*Rhodocyclales*)相对丰度显著变化^[38]。但真菌群落无明显变化,仍以子囊菌(*Ascomycetes*)和担子菌(*Basidiomycetes*)为主^[38]。双甲脒使用后,其降解物2,4-二甲苯甲酰胺(Dimethylphenyl Formamide, DMPF)在花粉可检测到1.1 mg/kg的残留,在蜂蜡中的残留可高达43 mg/kg;但含1.0 mg/L双甲脒的糖水饲喂15 d或30 d,意蜂工蜂与中蜂工蜂肠道细菌相对丰度之间均无显著差异^[5]。

3 农药对蜜蜂肠道菌群的影响

现代农业生产离不开农药,但其过度使用会破坏生态环境,对非靶标生物造成的危害也非常严重。蜜蜂、采集的花蜜和花粉,以及巢脾均受到不同程度的农药污染,蜂群衰竭症(Colony Collapse Disorder)中大约30%的蜂群损失是由农药造成的^[39]。

草甘膦(Glyphosate)是近几十年来应用最广泛的广谱除草剂。其能够抑制植物莽草酸途径中的5-烯醇丙酮基莽草素-3-磷酸合成酶(5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase ,

EPSPS),该酶催化莽草素向色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等芳香族氨基酸转化,因此草甘膦能干扰转化而抑制植物蛋白质合成,最终导致植物死亡,从而达到除草的目的^[40]。不同物种的EPSPS基因序列不同,分子量也有差异。根据物种EPSPS对草甘膦敏感性差异,可分为敏感型EPSPS(Class I EPSPS)生物和不敏感型EPSPS(Class II EPSPS)生物。所有植物的EPSPS均属于敏感型;由于动物中没有草甘膦的靶标酶EPSPS,因此,草甘膦对动物有较高的安全性。然而大肠杆菌(*Escherichia coli*),以及蜜蜂肠道菌*S. alvi*、*Gilliamella* spp.和*Bifidobacterium*是敏感型EPSPS,但金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜜蜂肠道中的乳杆菌(*Lactobacillus Firm-4*)、*B. apis*则属于不敏感型,对草甘膦有较高的耐受性^[40-41]。

研究发现^[42],草甘膦对蜜蜂等非靶标昆虫也有不良影响。影响大小与使用剂量、农药暴露的发育阶段、暴露时长有关。据报道,给意蜂2日龄工蜂幼虫分别连续饲喂含0.8、4、20 mg/L草甘膦的幼虫饲料,幼虫体重会显著减轻;20 mg/L草甘膦会导致工蜂存活率显著下降,羽化的工蜂中肠细菌菌群多样性和丰度发生了显著变化^[42]。另一研究发现,给新出房工蜂饲喂5 mg/L的草甘膦后,肠道细菌总量会显著减少,*S. alvi*、*Bifidobacterium*、*Firm-5*等主要菌类绝对数量显著减少^[40]。给1日龄(尚未完全建立肠道菌群)或5日龄(初步建立肠道菌群)的成年工蜂饲喂0.07–1.00 mmol/L的草甘膦,都会显著减少*S. alvi*的菌量,个体免疫水平下降,更易受粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)等机会性致病菌的感染而导致死亡率显著升高;同样剂量下,1日龄工蜂中*Gilliamella*的菌量显著减少^[41]。由于试验所用剂量参考的是蜂蜜、花粉,以及环境中的残留剂量,推测蜂群中的幼年工蜂很可能会受到类似的影响。

吡虫啉(Imidacloprid)是世界上最畅销的第一代的新烟碱类杀虫剂,具有良好的内吸性,植

物吸收后可转移到花蜜和花粉中。工蜂取食吡虫啉后,学习记忆、归巢定位以及免疫能力下降。虽然吡虫啉会改变黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)幼虫的肠道菌组成,但已有试验尚未发现其会影响蜜蜂肠道菌群^[43]。烯啶虫胺(Nitenpyram)是第二代的新烟碱类杀虫剂,也具有广谱、高效、低毒的特点,但其对蜜蜂有较高毒性。我国已在多个蜂蜜样品中检测到 14–31 $\mu\text{g/kg}$ 的残留量,英国也报道在花粉中有检出^[44]。研究发现,用含 300 $\mu\text{g/L}$ 烯啶虫胺的糖浆饲喂意蜂工蜂 14 d 后,肠道中 γ -变形菌纲的相对丰度显著下降,仅为 10.09%,而对照组为 40.34%; α -和 β -变形菌纲、杆菌的相对丰度均有不同程度的增加;烯啶虫胺还会干扰工蜂的生理代谢和免疫,降低蜜蜂的食物消耗和生存率^[45]。噻虫嗪(Thiamethoxam)也是第二代新烟碱类杀虫剂,其会损伤工蜂的学习、飞行能力,单独或与微孢子虫感染共同作用下均可显著降低蜜蜂的存活率,当两者共同作用时 γ -变形菌的相对丰度会显著增加,而 β -变形菌和乳酸杆菌的相对丰度没有显著变化^[46]。

有机磷杀虫剂使用量约占世界农药总量的 30%–50%^[39]。毒死蜱(Chlorpyrifos)以其广谱、高效等优点而成为有机磷农药中使用最广泛的一种。意大利一项历时 3 年的调查发现,30%的蜂花粉中检出毒死蜱,是检出比例最高的农药种类,而且 168 份阳性花粉样品中 166 份检出量超过了每日允许摄入量(Acceptable Daily Intake, ADI)^[47];在蜜蜂个体中的残留量最高可达 180.20 ng/g ,高过蜂蜜和花粉^[48],而且毒死蜱对意蜂工蜂高毒^[49]。Yang 等^[5]研究发现,1.0 mg/L 毒死蜱对中蜂和意蜂工蜂的生存无显著影响,但饲喂 30 d 后,与饲喂 15 d 的中蜂中肠菌群相比, *Gilliamella* 相对丰度显著下降,乳杆菌显著增加;而意蜂中的 *Gilliamella* 相对丰度增加。西维因(Carbaryl)是一种氨基甲酸酯类杀虫剂,亚致死剂量对工蜂肠道菌有显著影响^[50]。给油菜施用西维因 2 h 后,检测暴露于油菜地的意

蜂工蜂的肠道菌,暴露个体的肠道菌总量显著减少,菌种多样性降低。 γ -变形菌门中的 *Orbales* 和肠杆菌目(*Enterobacteriales*)细菌比例均显著减少;芽孢杆菌目(*Bacillales*)、巴斯德氏菌目(*Pasteurellales*)和红螺菌目(*Rhodospirillales*)缺失^[50]。

并不是所有的农药都会影响蜜蜂的肠道菌。苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)的毒素蛋白对多种农业害虫有毒性,Bt 是世界上应用最广泛的微生物杀虫剂。研究发现,使用 20 ng/mL 、200 ng/mL 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 Bt 毒素蛋白 Cry1Ie 连续饲喂中蜂成年工蜂 30 d,工蜂肠道菌的丰富度和多样性均没有显著变化^[51]。

4 补充益生菌对蜜蜂肠道微生物多样性的影响

由于抗生素的使用易产生抗药性和残留的问题,而自然界或蜜蜂自身都具有抑制蜜蜂病原物的共生菌。2007 年前后,一种非蜜蜂共生菌的微生物混合菌剂 EM 原露在蜜蜂上试验,在体外有抑制蜜蜂微孢子虫发芽的能力,对细菌性病原也有一定的抑制作用^[52–53]。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)分泌的表面活性素(Surfactin)具有无污染和抑菌作用,而且不易产生耐药性;Porrini 等^[54]研究发现,将含 10 mg/mL 表面活性素混入糖浆或花粉饲料中喂工蜂,对蜂无毒性,并能显著降低东方蜜蜂微孢子虫严重感染个体的比率;但粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)和鸟肠球菌(*En. avium*)产生的细菌素 Bacteriocins 未显示抑制效果。近年来,更多研究关注来自蜜蜂自身的益生菌。

乳酸菌(LAB)是传统的动物益生菌,蜜蜂肠道的 2 种优势菌——乳杆菌和双歧杆菌,均属乳酸菌。研究表明,意蜂工蜂肠道乳酸菌的某些菌株能诱发抗菌肽基因 *Apidaecin* 上调,提高免疫力^[55]。蜜蜂肠道的昆氏乳杆菌(*L. kunkeei*)能显著抑制蜂房球菌、幼虫类芽胞杆菌在培养基上的生长;其菌液饲喂工蜂,不仅能显著降低幼虫类芽胞杆菌导致的死亡率^[56–59],还能降低成年工蜂中微孢子虫的

数量^[60]。Alberoni 等^[59]将分离自蜜蜂肠道的 3 种双歧杆菌 *B. asteroides*、*B. coryneforme* 和 *B. indicum*, 与 3 种乳杆菌 *L. kunkeei*、*L. plantarum* 和 *L. johnsonii* 分别培养后, 配制成混合含菌的 50%蔗糖糖浆喷巢脾表面, 每周一次, 连续 4 周后, 处理组与对照组相比: 幼虫数量增加了 46.2%, 花粉贮量增加了 53.4%, 蜂蜜贮量增加了 59.21%。对喷洒过菌液的新一代工蜂肠道菌群检测表明, 醋杆菌科和双歧杆菌属的细菌相对丰度有所增加^[59]。这些结果令人鼓舞, 说明蜜蜂来源的乳杆菌和双歧杆菌有可能作为益生菌。

Rangberg 等^[60]应用转基因共生菌(Paratransgenesis)技术, 以葡萄球菌核酸酶基因作为报告基因, 将含该基因的质粒 pLp3050NucA-SH76 转化昆氏乳杆菌, 转化细菌再以 0.4–0.5 (OD_{600})的浊度在 15%蔗糖液中供工蜂自由取食 7 d, 未发现对工蜂存活率有不良影响, 转化菌在中肠中至少能存活 48 h。虽然目前对转化菌是否有更高的糖度耐受性、耐受时长, 在肠道中是否能定殖, 靶标基因是否会漂移或丢失等诸多问题仍不清楚, 但 Rangberg 等开创了以蜜蜂共生菌为菌源的转化应用研究。2020 年, Leonard 等^[61]成功将携带靶向蜜蜂残翅病毒(Deformed Wing Virus, DWV)的 dsRNA 表达质粒转入 *S. alvi* 后, 将其饲喂工蜂, 该菌成功在工蜂肠道内定殖, 而且抑制了工蜂体内的 DWV, 室内试验还发现试验组的螨死亡率也较对照组高。尽管离实用仍有距离, 如在群体水平是否有效? 是否有副作用? 对其他个体影响如何? 是否会造成生物污染? 这一系列问题有待研究和回答, 但该成果将蜜蜂病害防治提升到一个全新的高度, 意义重大。

除乳酸菌外, 其他共生菌也可作为益生菌。在微孢子虫感染的情况下, 使用含蜜蜂肠道菌 *Bombella* (*Parasaccharibacter*) *apium* 和 *Bacillus* sp. 以及 2 种商用广谱益生菌(Bactocell[®]和 Levucell SB[®])饲喂蜜蜂 2 周后, 可使工蜂存活率比对照组

提高 20%–40%^[62]。

不是所有的乳酸菌都可作为蜜蜂的益生菌。据报道, 用菌量分别含 1 250 CFU/mL 和 3 750 CFU/mL 的鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)糖液饲喂喀蜂(*Apis mellifera carnica*)出房工蜂, 21 d 后存活率较对照组显著下降; 无论是在接种感染东方蜜蜂微孢子虫前饲喂或感染后饲喂, 工蜂的存活率都比对照组显著下降, 副作用明显^[63], 原因尚不明确。用 *S. alvi* 饲喂工蜂会显著影响其发育及解毒反应, 导致肠道菌群失调, 对蜜蜂普氏罗曼锥虫(*L. passim*)更易感^[64]。Tauber 等^[65]利用从蜜蜂中肠分离出的酵母菌菌株(*Wickerhamomyces anomalus*)饲喂工蜂, 结果发现在建立了正常菌群的个体中, 酵母菌增加后影响了正常的微生物群落组成, 同时也降低了免疫和激素相关基因表达; 而未建立正常菌群环境的蜜蜂(小于 1 日龄)中则无影响。这表明, 即使来自蜜蜂自身的菌也未必一定安全, 人工添饲有可能打破肠道菌群的原有平衡, 从而造成不良影响。

5 展望

近十多年来, 依赖于高通量测序技术的发展, 从微生物组、单菌基因组、基因序列功能解读以及多组学的联合技术应用, 人们对动物肠道微生物的研究取得了很大进展, 这也促进我们对蜜蜂肠道微生物的研究。尽管蜜蜂肠道核心细菌种类不超过 10 种, 但每种菌内都有许多不同生理特性的菌株, 还有数量不多但种类丰富的其他微生物, 它们数量巨大, 菌群内部或群间关系复杂, 而且又与宿主的生理、营养、环境、药物等诸多因素密切相关; 在蜂群这个社会性群体内, 不同个体、群与群之间又存在着关联, 这种高度的复杂性暗示, 我们现今对它的认知是不完整的, 片面的, 甚至有些是错误的, 还需要深入的研究。

为利用蜜蜂肠道微生物来维护蜂群健康, 未来可从以下几个方面开展研究: (1) 蜜蜂肠道菌的分离、培养、功能鉴定, 进而了解菌与菌之间的相关关系。(2) 肠道菌在维护蜜蜂健康和抗病方面的机

制,特别是与重要蜜蜂病害的关系。(3) 筛选合适的共生菌应用于转基因共生菌技术,在肠道内表达抗病靶标基因的 RNAi,完善技术细节,使之可用于重要病害的防控;或用于表达能降解特定化合物的酶,以化解农药、有毒蜜粉等中毒或抗生素等污染物产生的风险。此外,蜜蜂具有个体数量大,操作简单、成本低的优势,而且其肠道菌群具有组成简单、菌群相对稳定、蜜蜂肠道核心菌种均可进行体外培养的特点,因此蜜蜂肠道菌群也是动物和人类肠道相关疾病研究的理想动物模型,相信在未来将获得更广泛的关注,在宿主代谢、免疫、抗病等健康研究方面获得更广泛的应用。

REFERENCES

- [1] Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline[J]. *Ecological Economics*, 2009, 68(3): 810-821
- [2] Liu PF, Wu J, Li HY, Lin SW. Economic values of bee pollination to China's agriculture[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(24): 5117-5123 (in Chinese)
刘朋飞, 吴杰, 李海燕, 林素文. 中国农业蜜蜂授粉的经济价值评估[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(24): 5117-5123
- [3] 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
- [4] Li HY, Dong ZX, Chen YF, Guo J. Advances in research of colonization of gut microbiota in the honeybee[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(11): 3091-3101 (in Chinese)
李还原, 董志祥, 陈奕霏, 郭军. 蜜蜂肠道菌群定殖研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(11): 3091-3101
- [5] Yang Y, Ma SL, Yan ZX, Liu F, Diao QY, Dai PL. 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
- [6] Xu LL, Wu J, Li JL. Research progress in symbiotic bacteria in bees[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(6): 107-112 (in Chinese)
徐龙龙, 吴杰, 李继莲. 蜜蜂共生菌研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(6): 107-112
- [7] Donaldson GP, Melanie Lee S, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(1): 20-32
- [8] Li CY, Zhou X, Zheng H. Gut microbiota of social honey bees[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1016-1024 (in Chinese)
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
- [9] 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(2): 96-103
- [10] 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
- [11] Wu MH, Sugimura Y, Taylor DM, Yoshiyama M. Honeybee gastrointestinal bacteria for novel and sustainable disease control strategies[J]. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture*, 2013, 8(2): 85-90
- [12] Raymann K, Moran NA. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2018, 26: 97-104
- [13] Raymann K, Shaffer Z, Moran NA. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees[J]. *PLoS Biology*, 2017, 15(3): e2001861
- [14] Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. 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(18): 4775-4780
- [15] Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions[J]. *Annual Review of Entomology*, 2004, 49(1): 71-92
- [16] Kešnerová L, Mars RAT, Ellegaard KM, Troilo M, Sauer U, Engel P. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut[J]. *PLoS Biology*, 2017, 15(12): e2003467
- [17] Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(23): 7378-7387
- [18] Hubert J, Kamler M, Nesvorna M, Ledvinka O, Kopecky J, Erban T. Comparison of *Varroa destructor* and worker honeybee microbiota within hives indicates shared bacteria[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(2): 448-459
- [19] Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Hortova B, Nesvorna M, Tyl J, Titera D, Markovic M, Hubert J. Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3816
- [20] Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Nesvorna M, Hortova B, Tyl J, Titera D, Markovic M, Hubert J. Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5084
- [21] Yongsawas R, Chaimanee V, Pettis JS, Boncristiani HF Jr,

- Lopez D, In-On A, Chantawannakul P, Disayathanoowat T. Impact of sacbrood virus on larval microbiome of *Apis mellifera* and *Apis cerana*[J]. Insects, 2020, 11(7): 439
- [22] Huang SK, Ye SZ, Dong J. The infectivity of *Nosema* from *Apis mellifera ligustica* to different aged adult workers of *Apis cerana cerana*[J]. Apiculture of China, 2007, 58(8): 8-10 (in Chinese)
黄少康, 叶生祖, 董捷. 意蜂来源的微孢子虫对不同日龄中蜂成年工蜂的侵染性[J]. 中国蜂业, 2007, 58(8): 8-10
- [23] Huang SK, Yang SS, Wang LH, Fu ZM. Infectivity of *Microsporidium* from *Apis cerana cerana* to Italian honey bee worker[J]. Apiculture of China, 2007, 58(1): 7-8,12 (in Chinese)
黄少康, 杨守深, 王丽华, 付中民. 中蜂来源的微孢子虫对意蜂工蜂的侵染性研究[J]. 中国蜂业, 2007, 58(1): 7-8,12
- [24] Hubert J, Bicianova M, Ledvinka O, Kamler M, Lester PJ, Nesvorna M, Kopecky J, Erban T. Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(3): 685-698
- [25] Zhang YK, Lu XX, Huang SK, Zhang LN, Su SK, Huang WF. *Nosema ceranae* infection enhances *Bifidobacterium* spp. abundances in the honey bee hindgut[J]. Apidologie, 2019, 50(3): 353-362
- [26] Rubanov A, Russell KA, Rothman JA, Nieh JC, McFrederick QS. 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(1): 3820
- [27] Maes PW, Rodrigues PAP, Oliver R, Mott BM, Anderson KE. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*)[J]. Molecular Ecology, 2016, 25(21): 5439-5450
- [28] Huang Q, Evans JD. Targeting the honey bee gut parasite *Nosema ceranae* with siRNA positively affects gut bacteria[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 258
- [29] Li JH, Evans JD, Li WF, Zhao YZ, Degrandi-Hoffman G, Huang SK, Li ZG, Hamilton M, Chen YP. 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(11): e0187505
- [30] Huang SK, Ye KT, Huang WF, Ying BH, Su X, Lin LH, Li JH, Chen YP, Li JL, Bao XL, et al. Influence of feeding type and *Nosema ceranae* infection on the gut microbiota of *Apis cerana* workers[J]. mSystems, 2018, 3(6): e00177-18
- [31] Hubert J, Erban T, Kamler M, Kopecky J, Nesvorna M, Hejdankova S, Titera D, Tyl J, Zurek L. Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(3): 640-654
- [32] Ma WH, Zheng XY, Li LX, Shen JS, Li WH, Gao Y. Changes in the gut microbiota of honey bees associated with jujube flower disease[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 198: 110616
- [33] Gabriel BJ. Gut symbiont viability in honey bees exposed to agrochemical stressors[D]. Lincoln: Master's Thesis of University of Nebraska-Lincoln, 2018: 1-70
- [34] Tian BY, Fadhil NH, Powell JE, Kwong WK, Moran NA. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees[J]. mBio, 2012, 3(6): e00377-12
- [35] Raymann K, Bobay LM, Moran NA. Antibiotics reduce genetic diversity of core species in the honeybee gut microbiome[J]. Molecular Ecology, 2018, 27(8): 2057-2066
- [36] Wang K, Li JH, Zhao LW, Mu XY, Wang C, Wang M, Xue XF, Qi SZ, Wu LM. Gut microbiota protects honey bees (*Apis mellifera* L.) against polystyrene microplastics exposure risks[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 402: 123828
- [37] Bonzini S, Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Vighi M. Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax[J]. Apidologie, 2011, 42(3): 378-390
- [38] Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1255
- [39] Shafiq-ur-Rehman, Rehman S, Waliullah MIS. Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage in bee[J]. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2012, 4(1): 30-36
- [40] Motta EVS, Moran NA. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure[J]. mSystems, 2020, 5(4): e00268-20
- [41] 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(41): 10305-10310
- [42] Dai PL, Yan ZX, Ma SL, Yang Y, Wang Q, Hou CS, Wu YY, Liu YJ, Diao QY. 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(29): 7786-7793
- [43] Raymann K, Motta EVS, Girard C, Riddington IM, Dinser JA, Moran NA. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(13): e00545-18
- [44] Song SB, Wu GJ, Pan HD, Yang H, Hu ML, Li Q, Yan QX, Xiao G. The quality of total mesorectal excision specimen: a review of its macroscopic assessment and prognostic significance[J]. Chronic Diseases and Translational Medicine, 2018, 4(1): 51-58
- [45] Zhu LZ, Qi SZ, Xue XF, Niu XY, Wu LM. Nitenpyram disturbs gut microbiota and influences metabolic homeostasis and immunity in honey bee (*Apis mellifera*

- L.][J]. Environmental Pollution, 2020, 258: 113671
- [46] Paris L, Peghaire E, Moné A, Diogon M, Debroas D, Delbac F, El Alaoui H. Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 172: 107348
- [47] Tosi S, Costa C, Vesco U, Quaglia G, Guido G. A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides[J]. Science of the Total Environment, 2018, 615: 208-218
- [48] Villalba A, Maggi M, Ondarza PM, Szawarski N, Miglioranza KSB. Influence of land use on chlorpyrifos and persistent organic pollutant levels in honey bees, bee bread and honey: beehive exposure assessment[J]. Science of the Total Environment, 2020, 713: 136554
- [49] Wu CX, Wang Q, Zhao XP, Wu SG, Chen LP. Study on toxicity and safety evaluation of chlorpyrifos and fenprothrin to *Trichogramma*[J]. Agrochemicals, 2008, 47(2): 125-127 (in Chinese)
吴长兴, 王强, 赵学平, 吴声敢, 陈丽萍. 毒死蜱和甲氧菊酯对赤眼蜂毒性与安全评价[J]. 农药, 2008, 47(2): 125-127
- [50] Nogrado K, Lee S, Chon K, Lee JH. Effect of transient exposure to carbaryl wettable powder on the gut microbial community of honey bees[J]. Applied Biological Chemistry, 2019, 62(1): 1-8
- [51] Jia HR, Dai PL, Geng LL, Jack CJ, Li YH, Wu YY, Diao QY, Ellis JD. No effect of Bt CryIIc toxin on bacterial diversity in the midgut of the Chinese honey bees, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera, Apidae)[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41688
- [52] Zhu ZX, Jin TD, Deng SZ, Yan WY, Liao XS, Zheng WH, Han G, Zeng GH, Zeng ZJ. Inhibition of microbial ecological agents on germination of *Nosema apis* in vitro[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2007, 29(1): 114-117, 137 (in Chinese)
朱芝秀, 金汤东, 邓舜洲, 颜伟玉, 廖祥生, 郑文华, 韩国, 曾贵华, 曾志将. 微生态制剂 EM 对蜜蜂微孢子体外发芽抑制实验[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(1): 114-117, 137
- [53] Hang BL, Li J, Hu JH, Liu LY. EM application in beekeeping[J]. Apiculture of China, 2008, 59(12): 28-29 (in Chinese)
杭柏林, 李杰, 胡建和, 刘丽艳. EM 在蜜蜂养殖上的应用[J]. 中国蜂业, 2008, 59(12): 28-29
- [54] Porrini MP, Audisio MC, Sabaté DC, Ibarguren C, Medici SK, Sarlo EG, Garrido PM, Eguaras MJ. Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*[J]. Parasitology Research, 2010, 107(2): 381-388
- [55] Janashia I, Alaux C. Specific immune stimulation by endogenous bacteria in honey bees (Hymenoptera: Apidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(3): 1474-1477
- [56] Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33188
- [57] Forsgren E, Olofsson TC, Vásquez A, Fries I. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* honey bee larvae[J]. Apidologie, 2010, 41(1): 99-108
- [58] Arredondo D, Castelli L, Porrini MP, Garrido PM, Eguaras MJ, Zunino P, Antúnez K. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*[J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(2): 279-290
- [59] Alberoni D, Baffoni L, Gaggia F, Ryan PM, Murphy K, Ross PR, Stanton C, Di Gioia D. Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L.[J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(2): 269-278
- [60] Rangberg A, Mathiesen G, Amdam GV, Diep DB. The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(4): 513-523
- [61] Leonard SP, Powell JE, Perutka J, Geng P, Heckmann LC, Horak RD, Davies BW, Ellington AD, Barrick JE, Moran NA. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens[J]. Science: New York, NY, 2020, 367(6477): 573-576
- [62] El Khoury S, Rousseau A, Lecoœur A, Cheaib B, Bouslama S, Mercier PL, Demey V, Castex M, Giovenazzo P, Derome N. Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its microsporidian intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administering either endogenous or allochthonous gut microbiota strains[J]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2018, 6: 58
- [63] Ptaszyńska AA, Borsuk G, Mułenko W, Wilk J. Impact of vertebrate probiotics on honeybee yeast microbiota and on the course of nosemosis[J]. Medycyna Weterynaryjna, 2016, 72(7): 430-434
- [64] Schmidt K, Engel P. Probiotic treatment with a gut symbiont leads to parasite susceptibility in honey bees[J]. Trends in Parasitology, 2016, 32(12): 914-916
- [65] Tauber JP, Nguyen V, Lopez D, Evans JD. Effects of a resident yeast from the honeybee gut on immunity, microbiota, and *Nosema* disease[J]. Insects, 2019, 10(9): 296