蜜蜂专栏

蜜蜂肠道微生物的多样性及功能研究进展*

张晴晴[1,2**] 欧阳芳[1] 戈 峰[1,2***]

（1. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100101；
2. 中国科学院大学，生物互作卓越创新中心，北京 100049）

摘 要 近年来，随着全球气候变化、栖息地丧失、农药不合理使用、病原物等多种环境和疾病的压力，蜜蜂的生存受到严重威胁。意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 作为重要的传粉昆虫，其体内肠道微生物群在新陈代谢、生长发育、抵御病原体和免疫等方面发挥着重要作用。而且，蜜蜂体内含有相对简单但高度特化的肠道微生物，可以实现体外培养，从而也成为研究微生物与宿主的互作模型。本文基于国内外研究进展，系统论述了意大利蜜蜂肠道微生物群落组成、在肠道中的分布结构及变化规律，阐述了肠道菌群在宿主体内发挥的作用，特别是在抵抗病原物和影响宿主生长发育等方面的重要功能，进一步探讨了保护蜜蜂的措施及未来需要解决的关键科学问题，为蜜蜂的保护利用提供参考。

关键词 蜜蜂；肠道微生物；多样性；功能；微生物编辑

Diversity and function of the gut microbiota of the honeybee

ZHANG Qing-Qing[1,2**] OUYANG Fang[1] GE Feng[1,2***]

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. CAS Center for Excellence in Biotic Interactions, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract In recent years, the survival of the Western honeybee, *Apis mellifera*, an important pollinator, has been severely threatened by climate change, habitats loss, pesticides, pathogens and other environmental pressures. Gut microbiota plays an important role in honeybee metabolism, growth, development, disease resistance and immune response. Honeybees contain relatively simple, but highly specialized, gut microbiota, which can be cultured in vitro and used as a model for insect gut microbiota in general. Based on domestic and overseas research, we elaborated the composition of the gut microbiota of honeybees, their distribution in the gut, and how they respond to environmental change, especially when challenged by pathogens and during host growth and development. In addition, we discuss measures to protect honeybees and the key obstacles to improved protection and utilization of these essential insects.

Key words social honeybees; gut microbiome; diversity; function; editing the microbiome

世界上已知的具有授粉功能的动物约 20 万种，其中昆虫占传粉者的 99.5%。据欧阳芳等（2019）统计，2005 年昆虫对我国 22 类主要农作物 1.8 亿吨农产品进行授粉的服务价值高达 8 860.5 亿元，占当年 GDP 的 1.3%。而蜜蜂作为重要的传粉昆虫，其价值除蜂蜜、蜂蜡、蜂胶和蜂王浆等产品外，更主要的是为农作物创造授粉服务价值（Klein *et al.*，2007）。根据联合国粮食及农业组织估计，在提供全球 90%食物的约 100 种农作物中，约有 71 种是经蜜蜂授

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划重点专项（2017YFD0200400）

**第一作者 First author，E-mail：zhangqingqing@ioz.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：gef@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2020-08-03；接受日期 Accepted：2020-08-29

粉的，每年在全球产生的经济价值约 2 000 亿美元。其中，蜜蜂授粉对我国 36 种作物生产贡献的经济价值约为 3 042.20 亿元，占这些作物总产值的 36.25%，相当于全国农业总产值的 12.30%（李海燕等，2013）。显然，蜜蜂对于保障农作物产量，维护我国粮食与生态安全起十分重要作用。

近年来，随着经济的高速发展，蜜蜂均受到不同程度的威胁（Kluser *et al.*，2010）。威胁蜜蜂生存的主要因子分为生物与非生物两类。其中生物因素主要包括病毒、螨类、细菌、微孢子虫等。这些因子的综合作用导致蜜蜂突然出现成群工蜂无法返巢的“蜂群衰竭失调”现象（Colony collapse disorder，CCD），严重影响了蜜蜂的生存。据 2006-2007 年间美国蜜蜂养殖协会（Apiary Inspectors of America，AIA）对 384 个蜂农进行调查统计，显示“蜂群衰竭失调”引起蜜蜂平均损失量高达 37.6%（Vanengelsdorp *et al.*，2007）。Powney 等（2019）估计，1983 年至 2013 年英国每 1 km^2 范围内“蜂群衰竭失调”导致授粉者损失超过 270 万个。除上述病毒、螨类等生物因素外，抗生素、农药、全球气候变化、农田景观的变化等非生物因素也是威胁蜜蜂生存的重要因素（Schwarz *et al.*，2015；Potts *et al.*，2016）。如草甘膦作用于植物或者细菌的莽草酸途径的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶（EPSPS），抑制芳香氨基酸的合成。而编码 EPSPS 的基因序列存在于几乎所有蜜蜂肠道细菌的基因组中，导致暴露于草甘膦中的蜜蜂肠道中 *S. alvi* 和 *Bifidobacterium* sp.数量显著减少，更易感染沙雷氏菌 *Serratia* sp.（Motta *et al.*，2018）。Raymann 等（2018）用亚致死浓度的吡虫啉饲喂蜜蜂发现，吡虫啉可以显著增加蜜蜂的死亡率，但是对肠道微生物没有显著影响。说明蜜蜂的肠道微生物组成与变化对蜜蜂的生存有重要的影响。

自人类微生物组计划项目启动以来，人类对肠道微生物有了全新的认识，肠道菌群对于保障宿主的健康具有十分重要的作用（Ley *et al.*，2008）。在蜜蜂体内，肠道微生物群在新陈代谢、生长发育、抵御病原体和免疫等方面发挥着重要作用。已有研究表明，蜜蜂肠道细菌群落的不平衡导致其对病原体感染的几率增加（Yang and Cox-Foster，2005；Kwong and Moran，2013，2016；Leonard *et al.*，2020）。而且，蜜蜂体内的多种肠道微生物可以实现体外培养，从而为研究微生物与宿主的互作奠定良好基础（Engel *et al.*，2013；Kwong and Moran，2013；Powell *et al.*，2014）。尤其是意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 作为其中重要的社会性传粉昆虫，体内含有相对简单但高度特化的肠道微生物，因此国内外非常重视意大利蜜蜂肠道微生物的研究。本文概括了近年来有关意大利蜜蜂肠道微生物（细菌）的物种及群落组成、结构特征，分析了不同时间、等级的肠道微生物变化规律，总结了肠道共生菌在宿主生长发育和抵抗病原物中的作用，并对如何保护蜜蜂健康抵消不良因素的干扰进行探讨和展望。

1　蜜蜂肠道菌群的特征

1.1　蜜蜂肠道微生物群落组成

经过长期的进化，意大利蜜蜂体内拥有特有的微生物种群，不同群落中蜜蜂的肠道微生物种类及数量无显著差异（Martinson *et al.*，2012；Moran，2015）。意大利蜜蜂肠道中 95%的微生物由 8 个主要类群组成，分别是 *Lactobacillus* Firm-4，*Lactobacillus* Firm-5，*Gilliamella* Gamma-1，*Gammaproteobacteria* Gamma-2，*Snodgrassella* Beta，*Bartonella* Alpha-1，*Acetobacteraceae* Alpha-2，*Bifidobacterium* Bifido（Martinson *et al.*，2012）。Martinson 等（2011）通过蜜蜂肠道微生物 16S rRNA 测序，构建主要菌群的系统发育树，发现 Firm-4 位于 *Lactobacillus acidophilus* 的进化姊妹枝，Firm-5 位于嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）的进化枝。其中，Gamma-1 和 Gamma-2 均属 γ-变形菌纲，Gamma-1 是意大利蜜蜂肠道内的细菌新属，为纪念蜜蜂研究先驱 Martha Gilliam，将该菌株命名为 *Gilliamella*（Martinson *et al.*，2012）。Beta 属于 β-变形菌纲，Beta 类群已经分离出一种蜜蜂肠道中普遍存在的革兰氏阴性菌 *Snodgrassella alvi*，以科学家 Robert E. Snodgrass

的名字命名（Martinson *et al.*，2012；Kwong and Moran，2013）。Alpha-1 和 Alpha-2 属于 α-变形菌纲，Alpha-1 位于巴尔通氏体属相关的支系，该属细菌多为人类的病原菌；Alpha-2 包含两个不同支系，支系 1 的序列在果蝇属 *Drosophila* 及木蜂属 *Xylocopa* 中均有存在，支系 2 属于 *Gluconobacter* 葡糖杆菌属，只存在于意大利蜜蜂体内（Russell *et al.*，2009；Martinson *et al.*，2011）。Bifido 属于双歧杆菌属 *Bifidobacterium*，蜜蜂肠道微生物中的双歧杆菌属分两个分支，*Bifidobacterium asteroids* 形成一个支系，而 *B. coryneforme* 和 *B. indicum* 形成另外一个支系（Martinson *et al.*，2011）。

蜜蜂的肠道核心微生物种类主要由 *Lactobacillus* Firm-4，*Lactobacillus* Firm-5，*Snodgrassella alvi*，*Gilliamella apicola* 和 *Bifidobacterium asteroids* 5 种组成（Babendreier *et al.*，2007；Martinson *et al.*，2011；Bottacini *et al.*，2012；Kwong and Moran，2013）。其中，厚壁菌门的 *Lactobacillus* Firm-4 和 *Lactobacillus* Firm-5 是蜜蜂的体内数量丰富且普遍存在的革兰氏阳性菌（Babendreier *et al.*，2007）。变形菌门的 *Snodgrassella alvi* 和 *Gilliamella apicola* 是蜜蜂肠道中普遍存在的两种革兰氏阴性菌（Raymann and Moran，2018；Kwong and Moran，2013）。*Bifidobacterium asteroids* 属于放线菌门双歧杆菌属，其在成年工蜂的肠道内分布普遍（Scardovi and Trovatelli，1969；Jeyaprakash *et al.*，2003）。较少见的微生物种类是 4 种，分别是 *Frischella perrara*、*Bartonella apis*、*Parasaccharibacter apium* 和一种与 *Gluconobacter* 相关的细菌（Raymann and Moran，2018）。2013 年，Engel 等（2013）从蜜蜂的肠道内首次分离出 *Frischella perrara*。以上 9 种细菌构成了蜜蜂肠道的优势菌群。由于不同共生菌所需的生存环境条件及营养物质的限制等导致数量的差异（Donaldson *et al.*，2016）。

1.2 蜜蜂肠道微生物群落结构特征

肠道是蜜蜂体内的重要器官，主要由蜜囊、中肠、幽门、回肠和直肠 5 部分组成，其中回肠和直肠组成后肠（Chapman，1998）。蜜囊是蜜蜂用来储藏花粉和生产花蜜的器官，细菌种类和数量较少，主要以肠杆菌科 Enterobacteriaceae 为主，与肠道中的其他部分相比，蜜囊内的 Beta、Firm-5 及 Gamma-1 菌群最少（Martinson *et al.*，2012）。Anderson 等（2013）发现蜜蜂蜜囊中的优势种为 *Lactobacillus kunkeei*，*L. kunkeei* 同时可以在花蜜及蜂巢中定殖。中肠内含有无脊椎动物中特有的膜状结构围食膜，围食膜由中肠细胞分泌形成，其包裹食物紧贴中肠内壁，具有保护中肠上皮细胞和有助于食物消化吸收的功能（Lehane，1997；Engel and Moran，2013）。由于中肠上的围食膜反复产生和脱落几丁质等物质，不能为微生物的定殖提供稳定环境（Moll *et al.*，2001）。幽门位于中肠、回肠和马氏管的交界处，*F. perrara* 主要定殖于此处（Engel *et al.*，2015a）。

后肠中含有经中肠消化的食物残渣及代谢产物，为微生物提供丰富的营养物质和稳定的繁殖场所，是肠道微生物的主要聚集区。Martinson 等（2012）基于 16S rDNA 分析发现，蜜蜂后肠中含有的微生物数量达 10^8-10^9 个。后肠被分成回肠和直肠两个独立的区域，各有不同的微生物群落分布。回肠是一个狭窄的管状结构，内有六道纵向褶皱。主要由革兰氏阴性细菌组成，*S. alvi* 直接分布在回肠的表面形成保护膜，*G. apicola* 覆盖在 *S. alvi* 上面，同时也存在少量革兰氏阳性菌 *Lactobacillus* Firm-4 和 *Lactobacillus* Firm-5（Martinson *et al.*，2012；Kwong and Moran，2016）。直肠中的主要微生物类群由数量丰富有发酵作用的 *Lactobacillus* Firm-4 和 *Lactobacillus* Firm-5 两种革兰氏阳性菌以及 *B. asteroids* 组成（Martinson *et al.*，2012；Donaldson *et al.*，2016）。

1.3 蜜蜂肠道菌群的变化规律

蜜蜂肠道微生物受个体发育阶段与蜂龄、社会等级的影响（Hroncova *et al.*，2015）。蜜蜂属于完全变态发育类型，在个体发育过程中经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段。蜜蜂的发育期一般为 21 d，其卵经 3 d 孵化成幼虫，9 日龄开始封盖化蛹，再经过 12 d 蛹羽化为成蜂，21 日龄

以上的蜜蜂开始出巢活动。Hroncova 等（2015）发现 3 日龄的蜜蜂幼虫肠道微生物数量较低，6 日龄时数量翻倍；在幼虫到蛹的变态发育过程中，肠道壁会发生脱落，化蛹过程中蜜蜂的肠道微生物数量显著下降；新出现的成年蜜蜂肠道内几乎没有微生物，在离开蜂巢前的几天内，菌群种类和数量达到峰值并趋于稳定，随着蜂龄的增加肠道微生物数量逐渐减少（Winston，1985；Hroncova *et al.*，2015）。

典型的意大利蜜蜂蜂群由蜂王、雄蜂和工蜂 3 种类型组成。蜂王是蜂群中生殖器官发育完全的雌蜂；雄蜂是由蜂巢中的未受精卵发育而成，没有花粉篮、蜇针、毒囊、蜡腺等，有从蜂巢内摄食蜂蜜的短舌，可以与蜂王交配产生受精卵；工蜂是由受精卵发育而成的雌性个体，但生殖器官发育不完全，除在蜂群中出现无蜂王的异常情况下，它们一般不产生后代（Winston，1985）。蜂王幼虫和新出生的蜂王成虫肠道内含有大量的 *Escherichia*，幼虫肠道内 *Escherichia* 和 *Gamma-1* 类群占肠道菌群的 78%；伴随着蜂龄的增长，成熟后的蜂王肠道内 *Escherichia* 逐渐减少，优势菌群被 *Acetobacteraceae* Alpha-2 类群取代，其中 Alpha-2.1 占 46%，Alpha-2.2 占 25%，其次为 *Lactobacillus* Firm-4 和 *Lactobacillus* Firm-5（Tarpy *et al.*，2015）。蜂王在与雄蜂交配后，肠道内微生物种群无显著变化（Tarpy *et al.*，2015）。雄蜂的花粉消耗量及蛋白水解活性等均低于工蜂，肠道内的优势种为 *Lactobacillus* Firm-4 和 *Lactobacillus* Firm-5（Moritz and Crailsheim，1987；Kapheim *et al.*，2015）。蜂王和雄蜂的肠道微生物多样性显著低于工蜂（Kapheim *et al.*，2015）。工蜂的肠道微生物几乎不含 *Escherichia*，Alpha-2.1 和 Alpha-2.2 的数量均较少，体内核心的优势菌群为 5 种，分别为 *Lactobacillus* Firm-4、*Lactobacillus* Firm-5、*Snodgrassella alvi*、*Gilliamella apicola* 和 *Bifidobacterium asteroids*。其中，Beta、Firm-5 和 Gamma-1（BFG）组成优势功能群（Martinson *et al.*，2012；Tarpy *et al.*，2015）。工蜂用腺体中分泌的蜂蜜喂食蜂巢中的幼虫，这种社会性的哺育行为可能是维持蜜蜂肠道微生物稳定存在的原因（Engel *et al.*，2012；Powell *et al.*，2014）。

2　蜜蜂肠道微生物的功能

昆虫的肠道为微生物定殖提供了独特的环境，反过来肠道中的共生菌又为它们的宿主提供许多有益的服务，昆虫的基本功能在很大程度上依赖于其肠道微生物（Engel and Moran *et al.*，2013）。蜜蜂肠道微生物的代谢可以影响蜜蜂的行为、生长、激素信号和肠道内环境等，对于改善饮食耐受性和保持蜜蜂宿主的健康方面具有关键作用。伴随着基因组、代谢组及转录组学的发展，人类逐渐在揭示蜜蜂肠道微生物的对宿主的作用机制（Moran，2015）。蜜蜂肠道不同微生物常常需要相互协作它的主要功能体现在以下三个方面。

2.1　抵抗病原物

在长期进化的过程中，社会性昆虫形成了个体免疫和群体防御病原物的两种策略。群体防御策略主要体现在工蜂移除被病原物感染的幼虫及蚂蚁用抗菌材料建造巢穴等（Spivak and Reuter，2001；Christe *et al.*，2003）。个体免疫体现在蜜蜂拥有先天免疫防御系统，即体液免疫和细胞免疫。体液免疫主要包括 Toll、Imd、JNK 和 JAK/STAT 4 条信号通路，通过由模式识别受体激活免疫应答反应，诱导产生活性氧及抗菌肽等效应因子杀死入侵的病原物；细胞免疫是由血细胞介导的一系列反应，主要对病原物起包裹作用、吞噬作用和集结作用等（Evans *et al.*，2006）。除蜜蜂自身的免疫防御系统外，肠道微生物也可以直接或者间接起到抵抗病原菌的作用。肠道微生物抵抗病原菌的潜在的机制包括营养及生态位竞争、为肠道提供物理屏障和启动宿主免疫反应。

肠道微生物可以通过与病原微生物竞争营养和生态位来抵抗其入侵。Koch 和 Schmid-Hempel（2011）分别为拥有正常肠道菌群的熊蜂的粪便（a）、分离的肠道菌群 *Gammaproteobacteria*（b）和无菌糖水（c）3 个处理饲喂无菌的欧洲熊蜂

Bombus terrestris 成虫，发现处理 a 的肠道菌群中熊蜂短膜虫含量显著低于其他处理，且拥有与自然状态下的欧洲熊蜂相似的肠道菌群。该研究表明，欧洲雄蜂的肠道微生物可以抵抗熊蜂短膜虫病原菌的感染，肠道内稳态的紊乱使宿主更容易受到感染。昆虫的免疫力受饮食中常量营养元素的影响，Srygley 等（2009）发现远距离迁飞性昆虫螽斯可能通过肠道微生物的重要营养物质介导启动宿主的免疫反应（Srygley *et al.*，2009；Cotter *et al.*，2011）。*S. alvi* 形成“菌膜屏障”在一定程度上提高宿主蜂对病原物及有毒物质的防御能力（Emery *et al.*，2017）。

昆虫先天免疫系统的激活是肠道菌群增强宿主免疫力的途径之一（Schwarz *et al.*，2015），昆虫体内的信号通路在肠道微生物群的许多方面起介导作用。乳酸菌 *Lactobacillus* 是蜜蜂肠道中稳定存在的核心菌群，其摄入可以显著上调蜜蜂体内编码抗菌肽和模式识别受体肽聚糖识别蛋白基因的表达，同时 Toll 和 Imd 通路中的其他物质（dorsal，cactus，kenny，relish）也发生了显著的变化，从而激活蜜蜂体内的免疫反应增强抵抗病原物的能力。昆虫在感染革兰氏阴性菌欧文氏菌 *Erwinia carotovora* 后诱导体内的 Imd 和 JAK-STAT 路径的免疫应答反应，肠道内环境平衡通过细胞损伤和干细胞分裂修复之间的平衡来维持，同时 Imd 途径转录因子 Caudal 可以阻止肠道共生菌对免疫系统的过度刺激（Ryu *et al.*，2008；Buchon *et al.*，2009）。Hori 等（2017）研究发现昆虫会利用围食膜和 Imd 信号通路调节抗菌肽的表达，从而抵抗肠道中的革兰氏阳性细菌的感染。*F. perrara* 会诱导蜜蜂体内强烈的免疫反应，编码模式识别受体、抗菌肽、转运蛋白的基因上调，引起蜜蜂的黑化反应（Engel *et al.*，2015a；Emery *et al.*，2017）。*F. perrara* 也会导致真核生物 DNA 损伤（Engel *et al.*，2015b），但其产生的次生代谢物质对宿主的作用还需进一步研究。

2.2 调节生长发育

蜜蜂生长发育所需的碳水化合物和氨基酸主要来源于花粉，花粉中含有丰富的多糖，主要包括纤维素、半纤维素和果胶，但动物体内往往缺乏相应的多糖降解酶（Fanning *et al.*，2012；Wybouw *et al.*，2016）。果胶是一种存在于植物细胞壁和细胞内层的多糖，Engel 等（2012）发现意大利蜜蜂肠道中的 γ-变形菌存在编码果胶降解酶的基因，γ-变形菌可能会参与花粉壁的降解，Martinson 等（2012）将该 γ-变形菌定名为 *Gilliamella apicola*（Mitsuoka and Kaneuchi，1977）。通过细菌的基因组序列和蜜蜂肠道微生物宏基因组学分析鉴定，Zheng 等（2019）进一步发现蜜蜂的肠道内负责半纤维素和果胶降解的微生物类群为 *Bifidobacterium* 和 *Gilliamella*，这些微生物在水解多糖的同时释放出对宿主有益的短链脂肪酸（SCFA）及可以被宿主吸收的单糖等，从而促进肠道及宿主的发育（Flint *et al.*，2008；Ríos-Covián *et al.*，2016；Zheng *et al.*，2017，2019）。*Snodgrassella* 和 2 个 *Lactobacillus* 类群几乎没有多糖降解基因（Kwong *et al.*，2014a；Zheng *et al.*，2019）。以上研究表明不同的肠道微生物分工合作在降解花粉细胞壁的过程中起重要作用。

与人类的肠道相似，蜜蜂肠道中相当一部分的微生物群可以对花粉中的碳水化合物进行发酵，主要包括双歧杆菌属 *Bifidobacterium* 和乳酸菌属 *Lactobacillus*。其中，双歧杆菌 *Bifidobacterium* 是广泛分布于哺乳动物、鸟类和社会学昆虫肠道中的厌氧菌（Turroni *et al.*，2008；Martinson *et al.*，2012；Lugli *et al.*，2014）。Bottacini 等（2012）从蜜蜂体内分离出 *B. asteroids* PRL2011 菌株，发现蜜蜂体内的双歧杆菌可以在低氧状态下进行呼吸代谢，编码多种酶以应对呼吸产生的有毒产物，对宿主的新陈代谢和生理机能有重要作用（Flint *et al.*，2008；Ríos-Covián *et al.*，2016）。Lactobacillus Firm-4 和 Lactobacillus Firm-5 在蜜蜂的肠道中含量丰富，乳酸菌属的磷酸转移酶系统主要与糖的代谢和转运有关，全基因组测序分析发现乳酸杆菌 Firm-4 和 Firm-5 类群中含有大量磷酸转移酶系统（PTS）（Kwong *et al.*，2014b）。海藻糖是昆虫体内能力储存的双糖，可以增加对高温、高渗透压等恶劣环境的耐受性，*B. asteroides* 和

Lactobacillus Firm-5 也有合成和利用海藻糖的基因簇（Ellegaard *et al.*，2015）。此外，一些菌株携带着利用稀有糖的基因，包括那些不易被蜜蜂消化和潜在有毒的糖，例如：乳糖和半乳糖、甘露糖等（Barker and Lehner，1974）。

2.3　调控蜜蜂的行为

肠道微生物也会对蜜蜂的行为产生影响。Zheng 等（2017）通过对比含有正常菌群的蜜蜂和无菌蜂，发现肠道微生物可以增加蜜蜂的喙伸反应，提高蜜蜂对蔗糖的敏感度（Zheng *et al.*，2017）。蜜蜂的肠道微生物可能经肠-脑轴影响蜜蜂的行为，如蜜蜂肠道中的双歧杆菌可以诱导保幼激素的生成，这可能是肠道菌群与大脑之间交流的方式（Martinson *et al.*，2012；Kešnerová *et al.*，2017）。

3　蜜蜂肠道微生物研究方法

3.1　蜜蜂肠道微生物的鉴定及定量分析

肠道微生物的鉴定主要依赖观察和测序的方法。观察法只能判断不同属菌落相差较大的微生物，但是对于相同属的微生物难以区分。测序法是目前常用的鉴定方法，一种是通过分离培养的方式获得单菌落进行测序。首先，需要抽取蜜蜂的肠道在 25%的甘油中研磨，然后接种到相应的培养基上进行培养。经过多次划线培养后获得单菌落，经裂解后进行 PCR 扩增，常用的通用引物为 27F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）1492R（5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′）。将样品进行一代 Sanger 测序，通过数据库比对确定菌株属于哪一个物种。另外一种是提取菌液的 DNA 进行 16srRNA 高通量测序，然后通过已有的数据库进行比对，鉴定菌液中包含的种类（Martinson *et al.*，2011；Kwong *et al.*，2014b）。测序法中前者适用于研究某一种或多种微生物互作时，对微生物进行分离鉴定；后者则适用于研究不同干扰对肠道微生物不同种群的影响。

3.2　蜜蜂肠道微生物的互作研究

蜜蜂微生物群落的相互作用过程十分复杂，单独分析微生物群的组分或者在不改变其他组分的情况下改变其中的单一组分非常困难（Ley *et al.*，2008）。目前主要包括直接法和间接法 2 种研究微生物互作的方法。

直接法　蜜蜂是一种社会学昆虫，其大部分的肠道微生物来源于成虫对幼虫的交哺行为，因此，幼虫期及蛹期的蜜蜂体内微生物含量极少。将蜂蛹取出，在无菌环境中培养可以构建无菌蜂体系，例如 Evans 等（2009）制作的无菌杯，不仅可以通过饲喂无菌糖水为蜜蜂营造无菌环境，还可以通过饲喂细菌、病毒及小孢子虫等，评估病原物对蜜蜂寿命的影响。构建无菌蜂体系，将通过离体培养的一种或多种微生物饲喂给蜜蜂，让目的微生物在蜜蜂的肠道内定殖，从而达到研究微生物互作及功能的目的（Powell *et al.*，2014；Zheng *et al.*，2018），例如：Zheng 等（2017）通过构建无菌蜂体系，对比无菌蜜蜂和有菌蜜蜂的体重、肠道重量，发现肠道微生物可以促进蜜蜂的生长，并且影响蜜蜂的激素信号，行为及肠道的理化条件。

间接法　通过对肠道微生物群组进行宏基因组测序，在获得特定微生物的基因组数据后，可以通过对基因内容进行注释，推断肠道微生物的功能（Engel *et al.*，2012）。由于缺少大多数蜜蜂肠道微生物的系统发育参考数据，序列只能在门/纲水平上进行分类（Engel *et al.*，2012）。对功能基因进行聚类分析绘制基因图谱，可以阐明不同微生物种群之间的关系。例如：Zheng 等（2019）通过对蜜蜂肠道菌群的宏基因组分析，发现蜜蜂肠道中负责水解半纤维素和果胶的微生物是 *Bifidobacterium* 和 *Gilliamella*。间接法主要依赖于测序及基因注释来推断蜜蜂肠道微生物的功能，因此，需要设计进一步的实验验证。

3.3　蜜蜂肠道微生物基因编辑靶向疗法

蜜蜂肠道微生物除了受个体发育阶段与蜂龄、社会等级的影响外（Hroncova *et al.*，2015），抗生素、农药、全球气候变化、农田景观的变化等非生物因素也会影响蜜蜂肠道微生物结构与功能（Schwarz *et al.*，2015；Potts *et al.*，2016）。

CRISPR-Cas9 基因编辑技术操作简单、成本较低且效率高，在疾病的靶向治疗、农作物改良、生态系统保护及病毒检测等方面均取得了突破性进展（Jinek *et al.*，2012；Cong *et al.*，2013；Doudna and Charpentier，2014）。近年来，人类逐渐认识到肠道有益菌在促进大脑发育、维持宿主代谢平衡、抵抗病原物及增强免疫力等方面的重要功能（Ridaura *et al.*，2013；Brown *et al.*，2019）。然而抗生素的使用，常常在杀死治病菌的同时杀死肠道有益菌，从而影响宿主的新陈代谢并降低宿主的免疫力（Abt *et al.*，2016）。因此，针对单一物种的靶向微生物治疗技术是解决该问题的关键。如痢疾的主要诱因是梭状芽胞杆菌 *Clostridium difficile* 的感染，传统的抗生素治疗会引发机体肠道菌群紊乱、耐药性及复发性感染等，Nale 等（2018）通过基因编辑优化的噬菌体靶向清除梭状芽胞杆菌，并且可以防止进一步定殖。除编辑噬菌体外，Leonard 等（2020）设计了一种诱导 RNA 干扰（RNAi）免疫反应的蜜蜂肠道共生菌 *S. alvi*，经过改造的 *S. alvi* 可以稳定地定殖在蜜蜂的肠道中，并产生双链 RNA dsRNA 来激活瓦螨的 RNAi，从而杀死寄生性瓦螨，这种方法不仅可以杀死病原物，还可以提高蜜蜂感染病毒后的存活率。肠道微生物基因编辑，包括有针对性地引入工程有益菌，可以潜在地提高宿主的适应性。

4 未来研究展望

蜜蜂肠道菌群具有稳定的种类和结构，包含 8 个主要类群和 5 个核心菌种。在对蜜蜂肠道共生菌与宿主互作关系的研究中发现蜜蜂与人类的肠道具有诸多相似性，其研究对于医学、农业及生态学等均有重要作用，是研究肠道微生物的重要模式生物（Engel and Moran，2013）。因此，进一步研究蜜蜂肠道菌群的种类、功能并通过基因编辑构建抗逆菌群，可以为改善蜜蜂乃至人类的健康提供新思路。

4.1 蜜蜂肠道菌群模型构建

一个健康的肠道菌群应该是怎么样的？目前没有明确的答案。如果通过肠道微生物的种类、基因组及代谢组等信息建立完整的肠道菌群模型，可以为实现靶向治疗提高理论基础。蜜蜂的后肠有大量微生物定殖，除常见的厚壁菌门、变形菌门及放线菌门外，也普遍存在一些未鉴定出的微量微生物，这些微生物的鉴定可以为肠道菌群模型的构建提供数据基础。如 Martinson 等（2011）通过 16s rRNA 分析构建肠道微生物系统发育树，发现蜜蜂体内含有少量蓝细菌门的微生物。蓝细菌是可进行光合作用及化能作用的古老细菌，其可分布于海洋、土壤、岩石表面及陆地深处、海洋及动物的体内（Cox *et al.*，2003；Tellenbach *et al.*，2016；Puente-Sánchez *et al.*，2018）。存在于海洋的蓝细菌常常能产生微囊藻毒素，而存在于植物根际土壤中的蓝细菌可以产生 *β*-甲氨基-L-丙氨酸（β-methylamino-L-alanine，BMAA）脑神经毒素，BMAA 经食物链富集作用后进入人体，可导致关岛型阿尔兹海默症（Kamjunke *et al.*，2002；Cox *et al.*，2003；Murch *et al.*，2004；Zhang *et al.*，2009）。但是，存在于蜜蜂体内的蓝细菌种类、种群结构及功能目前尚不清楚。此外，越来越多的研究利用肠道菌群的 16S rRNA 分析方法，但其中许多研究并没有提供细菌细胞数量的估计，对绝对密度的估计将有助于补充多样性数据，从而了解肠道微生物群的丰富度和稳定性。因此，蜜蜂肠道内的微量微生物有待于进一步鉴定并计数。

4.2 蜜蜂肠道菌群功能挖掘

目前，已知蜜蜂的肠道菌群具有抵抗病原物、增强宿主免疫、促进消化、影响大脑发育及调控宿主行为等作用（Engel *et al.*，2012，2013；Zheng *et al.*，2017，2019；Liberti and Engel，2020）。但是，这些研究尚不能充分了解肠道菌群的功能及不同微生物之间的互作补偿机制。

Evans 等（2006）通过对蜜蜂免疫相关的全基因组分析，发现蜜蜂的免疫相关基因为 71 个，而果蝇 *Drosophila* 体内为 196 个，不到果蝇体内的一半（Lemaitre and Hoffmann，2007），表明蜜蜂的免疫基因与果蝇不同。此外，果蝇的肠道内

没有核心菌群，蜜蜂存在 5 种稳定的核心菌群（Martinson *et al.*，2012；Wong *et al.*，2013）。因此，果蝇肠道微生物与宿主相互作用的免疫过程研究不能代替蜜蜂相关的研究。Imd 信号通路是蜜蜂体内重要的免疫通路，该通路在保护肠道上皮免受感染中的作用，其与肠道微生物更多作用机制有待研究。有关 Imd 信号通路和其他信号通路的相互作用如何调控蜜蜂的健康可以增加我们对蜜蜂免疫抵抗能力的了解，同时也对人类免疫应答的保守机制提供更加充分的认识。

已有研究表明，昆虫及哺乳动物的肠道菌群与大脑存在交流，但是交流方式目前并不清楚（Liberti *et al.*，2020）。Rothhammer 等（2018）研究表明肠道共生菌的代谢产物可以改变大脑小胶质细胞免疫反应，又能调节星形胶质细胞的活性，促进或预防炎症。蜜蜂体内的双歧杆菌可能通过产生保幼激素和前列腺素与大脑进行交流（Kešnerová *et al.*，2017）。肠-脑轴线的作用机制有待于进一步验证。蜜蜂微生物组的代谢对蜜蜂生长发育及某些必须氨基酸的合成影响目前尚不清楚。Quinn 等（2020）使用质谱、信息学和数据可视化方法，通过比较来自无菌和无特异性病原体小鼠的代谢组学数据，来评估微生物组对整个哺乳动物化学的影响，发现微生物组的代谢可以影响所有器官，甚至影响新氨基酸的合成。而肠道微生物组的代谢对蜜蜂器官的发育还有待于进一步研究。此外，蜜蜂肠道内的有益菌结构蛋白的研究有助于解释其功能。例如，乳酸杆菌表面含有大量功能未知的表面蛋白，亟待进一步探索。除有益的共生菌外，我们对蜜蜂肠道条件致病菌的了解有限，这阻碍了宿主肠道细菌保护宿主的具体机制的研究，肠道微生物抵抗病原菌的机制目前尚不明确。

4.3　蜜蜂肠道微生物基因编辑提高宿主适应性

蜜蜂面临的主要威胁包括病原物、农药、全球气候变化及栖息地丧失等多种压力。蜜蜂抵抗病毒很大程度上依赖于免疫反应，RNAi 是包括蜜蜂在内的昆虫重要的抗病毒防御机制。利用基因编辑 CRISPR-Cas9 技术可以编辑蜜蜂肠道内的共生菌达到靶向抵抗病原物的目的。如 Leonard 等（2020）构建 *S. alvi* 转基因工程菌，可以激活瓦螨体内的 RNAi 反应，显著降低寄生蜜蜂的瓦螨存活率并降低蜜蜂感染病毒的几率。一些昆虫体内的肠道微生物具有降解农药的功能。如主要危害豆科植物的点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 体内的共生菌伯克霍尔德菌 *Burkholderia* 可以降解杀螟硫磷（Kikuchi *et al.*，2011，2012）。降解农药功能基因的发现有利于通过基因编辑提高蜜蜂的抗药能力。特别是针对全球气候变化造成的传粉昆虫适生范围发生变化，Zhang 等（2019）发现共生菌 *Buchnera* 的热敏感性可以影响宿主的耐热性，因此可以通过内共生菌调整昆虫的耐热性。蜜蜂体内的很多共生菌可以进行基因编辑，在不破坏菌群平衡的基础上保护蜜蜂的健康。此外，微生物基因编辑将有助于提高蜜蜂的抗逆能力，保护传粉昆虫，也可以为人类疾病的治疗奠定基础。

未来蜜蜂肠道微生物的研究，一方面可以利用体外培养及宏基因组等鉴定肠道微生物的种类，在此基础上利用基因组及代谢组等信息建立完整的肠道菌群模型；另一方面可以利用基因编辑（如 CRISPR-Cas9）、转基因等技术，系统深入的挖掘肠道共生菌基因的功能、肠-脑轴线作用机制、肠道共生菌代谢物的作用及与相关免疫通路互作机制，通过基因工程构建抗逆菌种。此外，蜜蜂的肠道菌群与哺乳动物（包括人类）在某些方面具有一定的相似性，深入了解蜜蜂肠道菌群，也可为人类疾病的动态监测以及多种疾病的预防及治疗提供参考。

参考文献 (References)

Abt MC, McKenney PT, Pamer EG, 2016. Clostridium difficile colitis: Pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10): 609–620.

Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, Schwan MR, Walton A, Jones BM, Corby-Harris V, 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8(12): e83125.

Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F, 2007.

Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3): 600–610.

Barker RJ, Lehner Y, 1974. Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Zoology*, 187(2): 277–285.

Bottacini F, Milani C, Turroni F, Sanchez B, Foroni E, Duranti S, Serafini F, Viappiani A, Strati F, Ferrarini A, Delledonne M, Henrissat B, Coutinho P, Fitzgerald GF, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M, 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS ONE*, 7(9): e44229.

Brown EM, Kenny DJ, Xavier RJ, 2019. Gut microbiota regulation of T cells during inflammation and autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, 37: 599–624.

Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B, 2009. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: Activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host & Microbe*, 5(2): 200–211.

Chapman RF, 1998. The Insects: Structure and Function, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 17–109.

Christe P, Oppliger A, Bancalà F, Castella G, Chapuisat M, 2003. Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters*, 6(1): 19–22.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121): 819–823.

Cotter SC, Simpson SJ, Raubenheimer D, Wilson K, 2011. Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits. *Functional Ecology*, 25(1): 186–198.

Cox PA, Banack SA, Murch SJ, 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23): 13380–13383.

Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK, 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1): 20–32.

Doudna JA, Charpentier E, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213): 1258096.

Ellegaard KM, Tamarit D, Javelind E, Olofsson TC, Andersson SGE, Vásquez A, 2015. Extensive intra-phylotype diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC Genomics*, 16(1): 284.

Emery O, Schmidt K, Engel P, 2017. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 26(9): 2576–2590.

Engel P, Bartlett KD, Moran NA, 2015a. The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *MBio*, 6(3): e00193–15.

Engel P, Kwong WK, Moran NA, 2013. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(10): 3646–3651.

Engel P, Martinson VG, Moran NA, 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27): 11002–11007.

Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.

Engel P, Vizcaino MI, Crawford JM, 2015b. Gut symbionts from distinct hosts exhibit genotoxic activity via divergent colibactin biosynthesis pathways. *Applied Environmental Microbiology*, 81(4): 1502–1512.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 645–656.

Evans JD, Chen YP, Prisco G, Pettis J, Williams V, 2009. Bee cups: Single-use cages for honey bee experiments. *Journal of Apicultural Research*, 48(4): 300–302.

Fanning S, Hall LJ, Cronin M, Zomer A, MacSharry J, Goulding D, Motherway MO, Shanahan F, Nally K, Dougan G, Sinderen DV, 2012. *Bifidobacterial* surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6): 2108–2113.

Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA, 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2): 121–131.

Hori A, Kurata S, Kuraishi T, 2008. Unexpected role of the IMD pathway in *Drosophila* gut defense against *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1): 395–400.

Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Doskocil I, Tyl J, Kamler M, Titera

D, Hakl J, Mrazek J, Bunesova V, Rada V, 2015. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLoS ONE*, 10(3): e0118707.

Jeyaprakash A, Hoy MA, Allsopp MH, 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera* capensis and *Apis mellifera* scutellata (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2): 96–103.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096): 816–821.

Kamjunke N, Schmidt K, Pflugmacher S, Mehner T, 2002. Consumption of cyanobacteria by roach (*Rutilus rutilus*): Useful or harmful to the fish?. *Freshwater Biology*, 47(2): 243–250.

Kapheim KM, Rao VD, Yeoman CJ, Wilson BA, White BA, Goldenfeld N, Robinson GE, 2015. Caste-specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 10(4): e0123911.

Kešnerová L, Mars RAT, Ellegaard KM, Troilo M, Sauer U, Engel P, 2017. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS Biology*, 15(12): e2003467.

Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T, 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22): 8618–8622.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T, 2011. An ancient but promiscuous host-symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME Journal*, 5(3): 446–460.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*: *Biological Sciences*, 274(1608): 303–313.

Kluser S, Neumann P, Chauzat MP, Pettis JS, Peduzzi P, Witt R, Fernandez N, Theuri M, 2010. Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. https://archive-ouverte.unige.ch/unige:32251.

Koch H, Schmid-Hempel P, 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48): 19288–19292.

Kwong WK, Engel P, Koch H, Moran NA, 2014a. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31): 11509–11514.

Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA, 2014b. Genome sequences of *Lactobacillus* sp. strains wkB8 and wkB10, members of the firm-5 clade, from honey bee guts. *Genome Announcement*, 2(6): e01176-14.

Kwong WK, Moran NA, 2013. 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(6): 2008–2018.

Kwong WK, Moran NA, 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6): 374–384.

Lehane MJ, 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42: 525–550.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697–743.

Leonard SP, Powell JE, Perutka J, Geng P, Heckmann LC, Horak RD, Davies BW, Ellington AD, Barrick JE, Moran NA, 2020. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. *Science*, 367(6477): 573–576.

Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI, 2008. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 776–788.

Liberti J, Engel P, 2020. The gut microbiota-brain axis of insects. *Current Opinion in Insect Science*, 39: 6–13.

Li HY, Wu J, Liu PF, 2013. Economic values of bee pollination to China's agriculture. National Bee Product Market Information Exchange meeting and China (Pudong) Bee Expo proceedings in 2013. Shanghai: 29–36. [李海燕, 吴杰, 刘朋飞, 2013. 中国农业蜜蜂授粉的经济价值评估. 2013 年全国蜂产品市场信息交流会暨中国(浦东)蜂业博览会论文集. 上海: 29–36.]

Lugli GA, Milani C, Turroni F, Duranti S, Ferrario C, Viappiani A, Mancabelli L, Mangifesta M, Taminiau B, Delcenserie V, van Sinderen D, Ventura M, 2014. Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics. *Applied and Environment Microbiology*, 80(20): 6383–6394.

Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, Rueppell O, Tingek S, Moran NA, 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3): 619–628.

Martinson VG, Moy J, Moran NA, 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee

worker. *Applied and Environment Microbiology*, 78(8): 2830–2840.

Mitsuoka T, Kaneuchi C, 1977. Ecology of the bifidobacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 30(11): 1799–1810.

Moll RM, Romoser WS, Modrakowski MC, Moncayo AC, Lerdthusnee K, 2001. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, 38(1): 29–32.

Moran NA, 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 10: 22–28.

Moritz B, Crailsheim K, 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 33(12): 923–931.

Motta EVS, Raymann K, Moran NA, 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41): 10305–10310.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA, 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33): 12228–12231.

Nale JY, Redgwell TA, Millard A, Clokie MRJ, 2018. Efficacy of an optimised bacteriophage cocktail to clear Clostridium difficile in a batch fermentation model. *Antibiotics*, 7(1): 13.

Ouyang F, Wang LN, Yan Z, Men XY, Ge F, 2019. Evaluation of insect pollination and service value in China's agricultural ecosystem. *Acta Ecologica Sinica*, 39(1): 131–145. [欧阳芳, 王丽娜, 闫卓, 门兴元, 戈峰, 2019. 中国农业生态系统昆虫授粉功能量与服务价值评估. 生态学报, 39(1): 131–145.]

Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ, 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632): 220–229.

Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA, 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environment Microbiology*, 80(23): 7378–7387.

Powney GD, Carvell C, Edwards M, Morris RKA, Roy HE, Woodcock BA, Isaac NJB, 2019. Widespread losses of pollinating insects in Britain. *Nature Communications*, 10(1): 1–6.

Puente-Sánchez F, Arce-Rodríguez A, Oggerin M, Garcia-Villadangos M, Moreno-Paz M, Blanco Y, Rodriguez N, Bird L, Lincoln SA, Tornos F, Prieto-Ballesteros O, Freeman KH, Pieper DH, Timmis KN, Amils R, Parro V, 2018. Viable cyanobacteria in the deep continental subsurface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42): 10702–10707.

Quinn RA, Melnik AV, Vrbanac A, Fu T, Patras KA, Christy MP, Bodai Z, Belda-Ferre P, Tripathi A, Chung LK, Downes M, Welch RD, Quinn M, Humphrey G, Panitchpakdi M, Weldon KC, Aksenov A, da Silva R, Avila-Pacheco J, Clish C, Bae S, Mallick H, Franzosa EA, Lloyd-Price J, Bussell R, Thron T, Nelson AT, Wang M, Leszczynski E, Vargas F, Gauglitz JM, Meehan MJ, Gentry E, Arthur TD, Komor AC, Poulsen O, Boland BS, Chang JT, Sandborn WJ, Lim M, Garg N, Lumeng JC, Xavier RJ, Kazmierczak BI, Jain R, Egan M, Rhee KE, Ferguson D, Raffatellu M, Vlamakis H, Haddad GG, Siegel D, Huttenhower C, Mazmanian SK, Evans RM, Nizet V, Knight R, Dorrestein PC, 2020. Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations. *Nature*, 579(7797): 123–129.

Raymann K, Moran NA, 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 26: 97-104.

Raymann K, Motta EVS, Girard C, Riddington IM, Dinser JA, Moran NA, 2018. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. *Applied and Environment Microbiology*, 84(13): e00545–18.

Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Semenkovich CF, Funai K, Hayashi DK, Lyle BJ, Martini MC, Ursell LK, Clemente JC, Van Treuren W, Walters WA, Knight R, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI, 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341(6150): 1241214.

Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N, 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7: 185.

Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, de Lima KA, Gutierrez-Vazquez C, Hewson P, Staszewski O, Blain M, Healy L, Neziraj T, Borio M, Wheeler M, Dragin LL, Laplaud DA, Antel J, Alvarez JI, Prinz M, Quintana FJ, 2018. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, 557(7707): 724–728.

Russell JA, Moreau CS, Goldman-Huertas B, Fujiwara M, Lohman DJ, Pierce NE, 2009. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50): 21236–21241.

Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ, 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila. *Science*, 319(5864): 777–782.

Scardovi V, Trovatelli LD, 1969. New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis* indica F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskr Ankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*, 123(1): 64–88.

Schwarz RS, Huang Q, Evans JD, 2015. Hologenome theory and the honey bee pathosphere. *Current Opinion in Insect Science*, 10: 1–7.

Spivak M, Reuter GS, 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32(6): 555–565.

Srygley RB, Lorch PD, Simpson SJ, Sword GA, 2009. Immediate protein dietary effects on movement and the generalised immunocompetence of migrating Mormon crickets *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Ecological Entomology*, 34(5): 663–668.

Tarpy DR, Mattila HR, Newton ILG, 2015. Development of the honey bee gut microbiome throughout the queen-rearing process. *Applied and Environment Microbiology*, 81(9): 3182–3191.

Tellenbach C, Tardent N, Pomati F, Keller B, Hairston NGJ, Wolinska J, Spaak P, 2016. Cyanobacteria facilitate parasite epidemics in Daphnia. *Ecology*, 97(12): 3422–3432.

Turroni F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M, 2008. Human gut microbiota and bifidobacteria: From composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(1): 35–50.

Vanengelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes JJ, 2007. Estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*. 147(7): 599–603.

Winston ML, 1985. The Biology of the Honey Bee. Cambridge: Harvard University Press. 17–51.

Wong ACN, Chaston JM, Douglas AE, 2013. The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *The ISME Journal*, 7(10): 1922–1932.

Wybouw N, Pauchet Y, Heckel DG, Van Leeuwen T, 2016. Horizontal gene transfer contributes to the evolution of arthropod herbivory. *Genome Biology and Evolution*, 8(6): 1785–1801.

Yang X, Cox-Foster DL, 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21): 7470–7475.

Zhang B, Leonard SP, Li Y, Moran NA, 2019. Obligate bacterial endosymbionts limit thermal tolerance of insect host species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(49): 24712–24718.

Zhang DW, Xie P, Liu YQ, Qiu T, 2009. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the Total Environment*, 407(7): 2191–2199.

Zheng H, Perreau J, Powell JE, Han B, Zhang Z, Kwong WK, Tringe SG, Moran NA, 2019. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(51): 25909–25916.

Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA, 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18): 4775–4780.

Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EVS, Moran NA, 2018. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47(11): 317–325.