

甲氰菊酯对意大利蜜蜂生存、生理和肠道菌群的影响*

李来** 刘鹏 叶良 朱玉洁 施腾飞*** 余林生***

(安徽农业大学, 植物保护学院, 蜂业研究所, 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室, 合肥 230036)

摘要 【目的】杀虫剂甲氰菊酯广泛应用于农业生产中, 但有关该杀虫剂对蜜蜂健康影响的研究较少。本研究旨在探究甲氰菊酯对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 生存、取食、免疫和解毒相关基因表达以及肠道菌群的影响。【方法】利用亚致死浓度的甲氰菊酯饲喂意大利蜜蜂 7 d 后, 统计各组意大利蜜蜂的生存率和取食量; 采用荧光定量 PCR 技术检测蜜蜂解毒和免疫相关基因表达的变化; 利用 16S rDNA 测序技术检测蜜蜂肠道菌群组成结构的变化。【结果】甲氰菊酯能显著降低蜜蜂的生存率和糖水取食量 ($P<0.05$); 甲氰菊酯显著抑制了蜜蜂 *Hymenoptaecin*、*Apidaecin* 和 *Cyp9q1* 的表达 ($P<0.05$), 5 mg/L 剂量的甲氰菊酯显著诱导了 *Defensin* 的上调表达 ($P<0.05$)。与对照相比, 5 mg/L 和 1 mg/L 剂量的甲氰菊酯对 *Abaecin* 表达的影响虽无显著性差异, 但是 5 mg/L 处理组 *Abaecin* 的表达水平显著高于 1 mg/L 处理组的 ($P<0.05$); 甲氰菊酯对意大利蜜蜂肠道菌群的 Alpha 多样性和 Beta 多样性无显著影响, 但对特定肠道菌的丰度造成了影响。【结论】甲氰菊酯的暴露可能对意大利蜜蜂的免疫、解毒系统以及肠道菌群的组成产生了一定的影响。

关键词 意大利蜜蜂; 甲氰菊酯; 生存; 基因表达; 肠道菌群

Effects of fenpropathrin on the survival, physiology and gut microbiota of the honeybee (*Apis mellifera ligustica*)

LI Lai** LIU Peng YE Liang ZHU Yu-Jie SHI Teng-Fei*** YU Lin-Sheng***

(Anhui Agricultural University, School of Plant Protection, Apiculture Research Institute, Anhui Province
Key Laboratory of Crop Integrated Pest Management, Hefei 230036, China)

Abstract 【Objectives】The honeybee (*Apis mellifera ligustica*) is an important pollinating insect which is inevitably exposed to various pesticides when pollinating crops. Fenpropathrin, a member of the pyrethroid family of insecticides, is widely used for pest control, however the effects of this insecticide on honeybee health have rarely been studied. We investigated the effects of sublethal doses of fenpropathrin on the survival, food consumption, expression of immune and detoxification related genes and the gut microbiota, of honeybees. 【Methods】The effects of sublethal doses of fenpropathrin on honeybee food (sugar solution) consumption and survival was assessed using the “oral-feeding tube” method. (2) Changes in the expression of detoxification and immune related genes, and in the gut microbiota, were measured 7 d after bees had been fed sublethal doses of fenpropathrin (1 mg/L and 5 mg/L). 【Results】Consumption of fenpropathrin significantly reduced the survival and food consumption of honeybees. Exposure to sublethal doses of fenpropathrin significantly inhibited *Hymenoptaecin*, *Apidaecin* and *Cyp9q1* expression in honeybees, but up-regulated the expression of *Defensin*. The expression of *Abaecin* in the 5 mg/L treatment group was significantly higher than in the 1 mg/L treatment group. The effect of fenpropathrin on overall gut microbiota diversity was not significant, but it affected the gut microbiota distribution.

*资助项目 Supported projects: 现代农业蜂产业技术体系建设专项资金 (CARS-45-KXJ10); 国家自然科学基金 (32102604); 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2020A0122); 安徽农业大学自然科学青年基金项目 (2020zd23)

**第一作者 First author, E-mail: 920809351@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: stf0623@163.com, yulinsheng@ahau.edu.cn.

收稿日期 Received: 2021-04-21; 接受日期 Accepted: 2021-11-12

[Conclusion] Fenpropathrin can potentially affect the detoxification mechanism, immune system and gut microbiota, of honeybees. These results provide a basis for further exploring the complex molecular interactions between fenpropathrin and honeybees.

Key words *Apis mellifera ligustica*; fenpropathrin; survival; gene expression; gut microbiota

蜜蜂是世界范围最为常见的传粉昆虫并具有很高的经济和生物学价值(Hung *et al.*, 2018)。然而,在过去的几十年里,蜂群数量的下降引起了越来越多学者的关注(Potts *et al.*, 2010),最近的研究发现蜂群崩溃的原因包括可供蜜蜂采集花的丰富度和多样性的下降、蜂群被暴露在杀虫剂中、受到从人类传播而来的新的寄生虫以及自然栖息地的缺乏等,其中,研究者发现蜂群崩溃的重要原因之一是蜂群过度的被暴露在杀虫剂中(Vanengelsdorp and Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015)。

新烟碱类农药是目前全球范围内使用最为广泛的杀虫剂之一,有很多研究发现该类型农药对蜜蜂的伤害很大,例如有研究表明亚致死剂量的新烟碱农药能够影响蜜蜂的生长发育,学习能力以及归巢能力(Tison *et al.*, 2016; Catae *et al.*, 2019; Monchanin *et al.*, 2019)。因此,早在2013年欧盟就颁布了关于限制新烟碱类农药户外施用的相关政策(段丽芳等, 2013)。然而,农药的相关法规的重点都聚焦于保护有益昆虫免受杀虫剂、除草剂和杀菌剂的直接毒害。但是,蜜蜂长期接触农药所受到的慢性毒性也是不容忽视的,已有研究表明,当蜜蜂接触到亚致死剂量的杀虫剂时,蜜蜂的死亡率很低或者不死亡,但是其正常的生长发育,生理代谢和行为活动会受到干扰(Liao *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)。例如此前的研究已发现氟氯苯菊酯长期接触蜜蜂会影响蜜蜂的寿命和学习功能(Tan *et al.*, 2013),噻虫嗪会影响蜜蜂的归巢能力(Monchanin *et al.*, 2019),所以,亚致死剂量的拟除虫菊酯和新烟碱类农药能对蜜蜂的健康和生理功能造成不同的影响。

拟除虫菊酯类杀虫剂具有化学性质稳定、不易光解、无特殊臭味及安全系数高、低浓度的用量上就有非常好的触杀作用、灭虫效果好和残留时间持久等优点(姜辉等, 2005),深受广大农

业工作者的欢迎。然而,其残留时间长特点也使其成为我国主要农药残留之一的原因,并对重要授粉昆虫蜜蜂的安全和健康造成严重威胁(骆爱兰等, 2004)。甲氰菊酯是目前我国使用较广泛的拟除虫菊酯类杀虫剂之一,与其他该杀虫剂一样,甲氰菊酯具有神经毒性,其作用机理是干扰电位依赖的 Na^+ 通道闸门开闭的动力学,使 Na^+ 通道关闭延迟,引发重复后放和轴突传递的阻断(Laskowski, 2002)。一项对中国农药在花粉和蜂粮中残留的调查中记录了甲氰菊酯在花粉中的残留量为14.2 ng/g,残留比例达到45%;在蜂粮中的残留量为11.2 ng/g,比例达到48%(Tong *et al.*, 2018)。然而,目前还未知此类杀虫剂是否会扰乱蜜蜂的肠道菌群和免疫能力。

肠道菌群在维持宿主健康中扮演着重要的角色。蜜蜂的肠道菌群有9个主要的菌种群,占整个细菌总数的95%-99%,具有帮助肠道消化、参与免疫及抵御病原体等功能(Martinson *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2017; Hori *et al.*, 2018)。因此,研究农药对蜜蜂肠道菌群的影响有助于控制农药的用量并更有效的保护蜜蜂。近年来,一些研究已经探究了蜜蜂肠道微生物群和杀虫剂之间的关系(Liu *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020)。然而,关于拟除虫菊酯类杀虫剂,特别是甲氰菊酯对蜜蜂肠道菌群影响的研究却很少。

本文主要研究了甲氰菊酯对意大利蜜蜂生存、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 供试蜜蜂

本次实验所使用的蜜蜂样品均为意大利蜜蜂,取自安徽农业大学蜂场,群势强无明显疾病症状且无农药污染。从健康蜂群提取一张即将出

房的封盖子脾,装入限王产卵框中,在恒温培养箱中培养(温度 33 °C,相对湿度 60%,黑暗环境)。在培养箱中培养 24 h 后,收集足够数量刚出房的幼蜂(定义为 1 日龄)分别装入 9 个塑料蜂笼后,放入气候箱进行饲养(温度 28 °C,相对湿度 70%,黑暗环境),每天饲喂充足的 50% 的糖水和花粉,连续饲喂 4 d 并每天清理记录死亡蜜蜂,其中第 1 和第 3 天分别对采集的蜜蜂进行定殖饲喂,方法如下:采集 5 只来自同一蜂群的健康成年蜜蜂,提取其整个肠道后加入 1 mL 的 PBS 后充分研磨,加入 29 mL 的 50%糖水混匀后饲喂蜜蜂。饲喂 4 d 后,选择 5 日龄蜜蜂用于后续试验。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂:甲氰菊酯(德国 Dr 公司),Trizol(天根,中国北京),去基因组逆转录反应试剂盒(东洋纺,中国上海),增强版荧光定量预混试剂盒(SYBR Green),RIPA 蛋白裂解液(碧云天,中国上海),PMSF(碧云天,中国上海),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,中国上海),蔗糖 AR(aladdin,中国上海)。主要仪器:高速冷冻离心机(艾本德,中国上海),StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞,中国上海),NanoDrop2000 超微量分光光度计(赛默飞,中国上海),酶标仪(美谷分子仪器有限公司,中国上海)。

1.3 杀虫剂处理

9 个蜂笼分为两个处理组和一个对照组,则各组分别有 3 个重复,每重复包含 30 只蜜蜂。根据中国 5 个蜂业主产区花粉中甲氰菊酯残留量(Tong *et al.*, 2018),称取 0.25 g 甲氰菊酯溶解于 5 mL 的丙酮溶液中,制备成 5×10^4 mg/L 的母液,随后取适量的甲氰菊酯母液于 50%糖水中配制成 1 mg/L 和 5 mg/L,然后将含有等体积丙酮的糖水作为对照。随后每日饲喂处理的蔗糖溶液和花粉,供蜜蜂自由取食。每日定时更换蔗糖溶液和花粉并记录蜜蜂蔗糖溶液取食量和花粉取食量,记录蜜蜂死亡数,及时清理死亡蜜蜂。连续饲喂 7 d 后,对 5 mg/L 农药处理组和对照

组各收集 15 只蜜蜂,放入 -20 °C 冰箱 5 min 后取出置于冰盒上,对每只蜜蜂进行体表灭菌后用无菌镊子取出蜜蜂这个肠道,每 5 个肠道装入 1.5 mL 离心管中,立即放入液氮中冰冻后再放入 -80 °C 冰箱进行保存用于后续肠道微生物 16S rDNA 测序实验使用。剩余蜜蜂置于 -20 °C 冰箱 5 min 后取出,记录数量后分别装入 15 mL 离心管,液氮冷冻后放入 -80 °C 冰箱保存用于后续基因表达测定实验。

1.4 RNA 提取和反转录反应

取出 1.3 中 -80 °C 冰箱保存的蜜蜂置于冰盒上,用灭菌手术刀剪下头部,每 5 个头部为一组利用 Trizol 法提取总 RNA。对提取的总 RNA 进行浓度测定,并将其稀释成 500 ng/ μ L 用于反转录反应。将 0.5 mL 离心管放于冰盒上,吸取 2 μ L 总 RNA 于离心管中,放入 PCR 仪中 65 °C 反应 5 min,随后加入 4 $\times$ DNMaster 4 μ L, nuclease-free water 10 μ L,然后放入 PCR 仪中 37 °C 反应 5 min,反应结束后再加入 5 $\times$ RT master-Mix 4 μ L,再次放入 PCR 仪中,反应条件:37 °C, 15 min; 50 °C, 5 min; 98 °C, 5 min。等待温度降到 4 °C 后反应完成获得第一链 cDNA,利用 DEPC 水进行 5 倍稀释后分装 -20 °C 保存,用于后续荧光定量 PCR。

1.5 引物的设计与合成

本实验所使用的所有目的基因和内参基因的上下游引物均委托上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列信息见表 1。

1.6 荧光定量 PCR

对 1.4 的已稀释的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应。按照 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒要求,qRT-PCR 反应体系为 50 μ L 体系。取八连管于冰上,然后依次加入 2.2 μ L cDNA 模板、上下游引物各 1.3 μ L、2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 25 μ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 5 μ L 和 dd H₂O 16 μ L。PCR 扩增程序为两步法,反应条件:95 °C 预变性 15 min;然后是 40 个循环扩增反应:95 °C 10 s, 60 °C 30 s;最后生成溶解

表 1 本研究中用到的上下游引物序列
Table 1 The sequences of forward and reverse primers of genes used in the present study

基因 Genes	引物序列(5'-3')Primer sequences (5'-3')
<i>Abaecin</i>	F: TGTCTGGCCTTCTCTTCATGG R: TGACCTCCAGCTTTACCCAAA
<i>Hymenoptaecin</i>	F: ATATCCCGACTCGTTTCCGA R: TCCCAAACCTCGAATCCTGCA
<i>Defensin</i>	F: CTGCACCTGTTGAGGATGAA R: GCGCAAGCACTGTCATTAAC
<i>Apidaecin</i>	F: TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTG R: GAAGGTCGAGTAGGCGGATCT
<i>Vitellogenin</i>	F: GCAGAATACATGGACGGTGT R: GAACAGTCTTCGGAAGCTTG
<i>Cyp9q1</i>	F: TCGAGAAGTTTTTCCACCG R: CTCTTTCCTCCTCGATTG
<i>Cyp9q2</i>	F: GATTATCGCCTATTATTACTG R: GTTCTCCTTCCCCTCTGAT
<i>Cyp9q3</i>	F: GTTCCGGGAAAATGACTAC R: GGTCAAAATGGTGGTGAC
<i>RpS5</i>	F: AATTATTTGGTCGCTGGAATTG R: TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA

曲线。本实验使用 *Rps5* 为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因相对表达水平进行校正(Schmittgen and Livak, 2008)。

1.7 16S rDNA 测序

对 1.3 中 - 80 ℃ 保存的肠道样品按照 E.Z.N.A®Stool DNA Kit 试剂盒要求各自提取 DNA, Nuclear-free water 被用于空白样本, 提取的总 DNA 在 50 μL 洗脱缓冲液中洗脱后放入 - 80 ℃ 冰箱保存。使用的引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 可变区 (V3 + V4) 进行 PCR 扩增。反应条件为: 98 ℃ 30 s; 98 ℃ 10 s; 54 ℃ 30 s 循环 35 次; 72 ℃ 45 s; 72 ℃ 10 min, 产物 4 ℃ 保存。后续样品上机测序委托杭州联川生物技术股份有限公司协助完成。

1.8 数据分析

各组蜜蜂死亡率和基因表达差异运用 SPSS Statistics 软件中的单因素方差分析 (ANOVA) 进行运算, 显著性差异运用 Duncan's 法进行检测; 本文中的图形运用 GraphPad Prism 5 软件进

行制作。
测序部分采用 FLASH (v1.2.8) 软件, 根据双端序列的 Overlap 关系, 将序列拼接 (Merge) 成长的 Tag, 并将序列上建库引入的 Barcode 和引物序列去除, 然后采用 Vsearch (v2.3.4) 过滤嵌合体。预处理之后 Clean Data 使用 Vsearch 将序列相似性大于 97% 的 Clean Tags 定为一个 OTU, 挑选最佳的 Centroids (位于几何中心) 序列作为该 OTU 的代表序列使用 QIIME (v1.8.0) 分析 Alpha 多样性以及 Beta 多样性, 使用 Blast 进行序列比对, 将 OTU 代表序列与 RDP (核糖体数据库) 以及 NCBI-16S 数据库对每个代表性序列进行物种注释。其它图片均是使用 R 包 (V3.2.5) 实现。

2 结果与分析

2.1 甲氰菊酯对意大利蜜蜂取食量的影响

甲氰菊酯处理蜜蜂 7 d 后, 对比各组蜜蜂的糖水和花粉的累积取食量。如图 1 所示, 对照组蜜蜂的糖水取食量显著大于饲喂 5 mg/L 和 1 mg/L 的农药处理组 ($P<0.05$), 而 5 mg/L 和 1 mg/L 农药处理组之间的糖水取食量的差异并不显著 ($P>0.05$)。对照组蜜蜂的花粉取食量小于被饲喂 5 mg/L 和 1 mg/L 的农药处理组蜜蜂, 但显著性差异分析显示 3 组之间并无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.2 甲氰菊酯对意大利蜜蜂生存的影响

蜜蜂经过甲氰菊酯处理后, 在恒温培养箱中每天记录各组蜜蜂死亡数, 7 d 后收集数据制作生存曲线图。如图 2 所示, 对照组蜜蜂的平均存活率为 97.5%; 5 mg/L 和 1 mg/L 农药处理组平均存活率分别为 71.8% 和 90.7%。统计分析结果显示, 5 mg/L 处理组的生存率显著低于 1 mg/L 处理和对照组 ($P<0.05$), 而 1 mg/L 处理和对照组之间的生存率并无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.3 甲氰菊酯对蜜蜂免疫和解毒相关基因表达的影响

本次研究以丙酮组蜜蜂为对照, 检测了

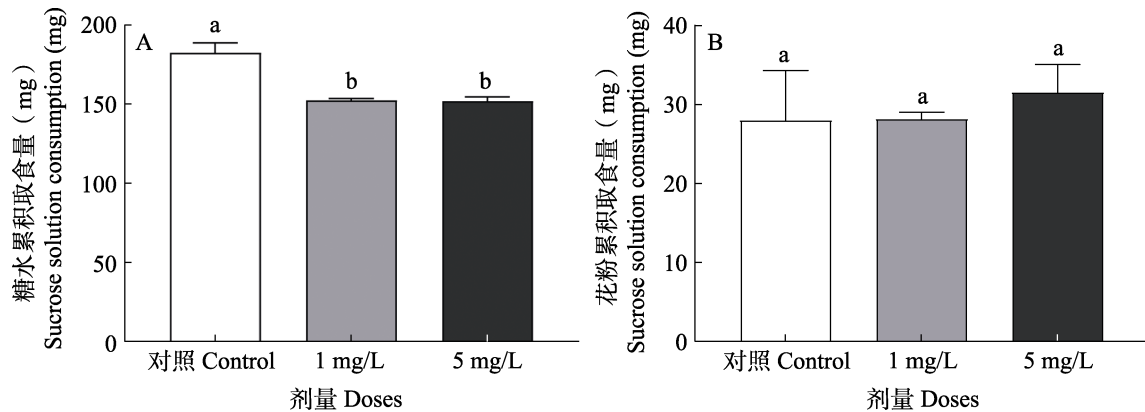


图 1 各组蜜蜂糖水 (A) 和花粉 (B) 累积取食量

Fig. 1 Sucrose solution (A) and pollen consumption (B) of *Apis mellifera ligustica* in different groups

柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) (Duncan's 多重检验法)。下同。

Histograms with different lowercase letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$) (Duncan's multiple test). The same below.

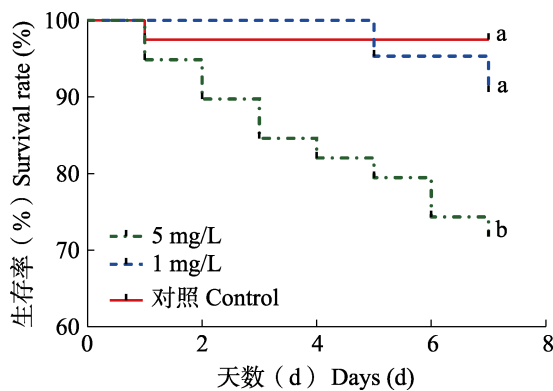


图 2 各组蜜蜂的生存率

Fig. 2 Survival rate of *Apis mellifera ligustica* in different groups

5 mg/L 和 1 mg/L 剂量的甲氰菊酯经口处理蜜蜂后对蜜蜂解毒和免疫相关基因表达的影响。

由图 3 (A) 可知, 甲氰菊酯处理 7 d 后, 1 mg/L 处理组的蜜蜂体内 *Hymenoptaecin* 和 *Apidaecin* 的相对表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而 *Abaecin* 和 *Defensin* 的相对表达水平与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。5 mg/L 处理组蜜蜂 *Hymenoptaecin* 和 *Apidaecin* 的相对表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), *Defensin* 的相对表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), *Abaecin* 的相对表达水平与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

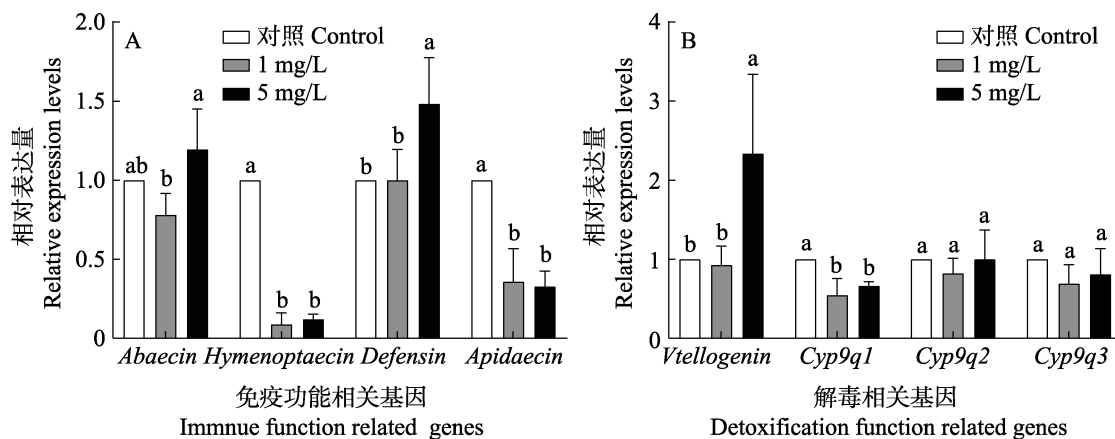


图 3 甲氰菊酯对蜜蜂的免疫 (A) 和解毒 (B) 相关基因表达的影响

Fig. 3 Effects of fenpropathrin on the expressions of immune (A) and detoxification (B) related genes of *Apis mellifera ligustica*

由图 3 (B) 可知, 甲氧菊酯处理 7 d 后, 1 mg/L 处理组蜜蜂 *Cyp9q1* 的相对表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), *Cyp9q2*、*Cyp9q3* 和 *Vtlogenin* 与对照组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$)。5 mg/L 处理组的蜜蜂 *Vtlogenin* 的相对表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), *Cyp9q1* 的相对表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而 *Cyp9q2* 和 *Cyp9q3* 表达量与对照组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 甲氧菊酯对意大利蜜蜂肠道菌群的影响

2.4.1 蜜蜂肠道菌群测序信息分析 对原始下机数据进行双端拼接、质量控制和嵌合体过滤后, 进行高质量数据统计, 经过质控, 平均得到 62 071 条有效数据, 通过 QIIME2 软件经过过滤、去重和嵌合体过滤等操作, 去除背景噪音获得的特征表和特征序列后, 总共得到 654 个 feature, 对特有的 feature 分析后, 得到对照组和农药组共有 181 个 feature, 对照组特有的 feature 个数有 255 个, 农药组特有的 feature 个数有 218 个。

2.4.2 甲氧菊酯胁迫下的蜜蜂肠道组成及相对丰度的改变 根据 feature 注释结果和各样品 feature 特征表, 获得界 (Domain)、门 (Phylum)、纲 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus) 和种 (Species) 水平物种丰度表, 并针对不同水平物种丰度表进行不同样品 (组) 物种组成及差异分析, 参数阈值的置信度为 0.7。研究蜜蜂肠道菌群相对丰度的变化, 我们选择门 (Phylum) 和属 (Genus) 的水平上排名前 10 的菌种进行分析并制作柱状图进行展示。

从门的水平上分析, 有 9 种菌门被检测出, 分别是变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、软壁菌门 (Tenericutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和 ϵ -变形菌 (Epsilonbacteraeota), 由图 4 (A) 可知, 变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 为蜜蜂肠道的优势菌门, 微生物的比例占所有的菌种的 98% 以上。在甲氧菊酯胁迫下, 蜜蜂肠道中变形菌门 (Proteobacteria)

和放线菌门 (Actinobacteria) 的占比略有下降, 而厚壁菌门 (Firmicutes) 的占比略有上升。

在属的水平上分析, 检测出的占比排名前 10 的菌属分别是 *Lactobacillus* 属、*Klebsiella* 属、*Snodgrassella* 属、*Gilliamella* 属、*Enterobacter* 属、*Pantoea* 属、*Bifidobacterium* 属、*Frischella* 属、*Bombella* 属和 *Fructobacillus* 属, 由图 4 (B) 可知, *Lactobacillus* 属、*Klebsiella* 属、*Snodgrassella* 属、*Gilliamella* 属、*Enterobacter* 属、*Pantoea* 和 *Bifidobacterium* 属为优势菌属, 在甲氧菊酯胁迫下, *Snodgrassella* 属、*Gilliamella* 属、*Pantoea* 属和 *Bifidobacterium* 属的占比略有下降, *Lactobacillus* 属、*Klebsiella* 属和 *Enterobacter* 属的占比略有上升。

2.4.3 甲氧菊酯胁迫下的蜜蜂肠道菌群多样性分析

2.4.3.1 蜜蜂肠道菌群 Alpha 多样性 Alpha 多样性主要通过 Chao1、Observed species、Goods_coverage、Shannon 和 Simpson 等指数来反映丰富度和均匀性。由表 2 可知, 各组样品的 Coverage 均达到 1 说明每组样品的序列全被检测出且达到饱和, 其中 F23 的 Chao 值最高, 说明该样品的丰富度最高, 其余 5 组样品间数据都比较接近。本实验选择 Chao1 反映肠道菌群丰富度, Shannon 和 Simpson 反映肠道菌群多样性。如图 5 (A) 中可知, 农药组平均水平略低于对照组 (中位数值), 但是农药组的波动程度和离散程度均高于对照组, 由图 5 (B, C) 可知, 对照组和处理组间 Alpha 多样性差异并不显著 ($P > 0.05$)。

2.4.3.2 蜜蜂肠道菌群 Beta 多样性 实验选择非多维尺度分析 (Multidimensional scaling, NMDS) 和主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 分析肠道菌群 Beta 多样性。由图 6 (A) 可知, 首先 Stress < 0.05 反映样品具有很好的代表性, 从图 6 中样品分布可知, 对照组的样品点较为集中, 说明样品之间差异程度较低; 而处理组的样品点较为分散, 说明样品之间差异程度较高。由图 6 (B) 可知, 对照组较为集中而处理组较为分散, 但是 P 值大于 0.05 说明样品之间

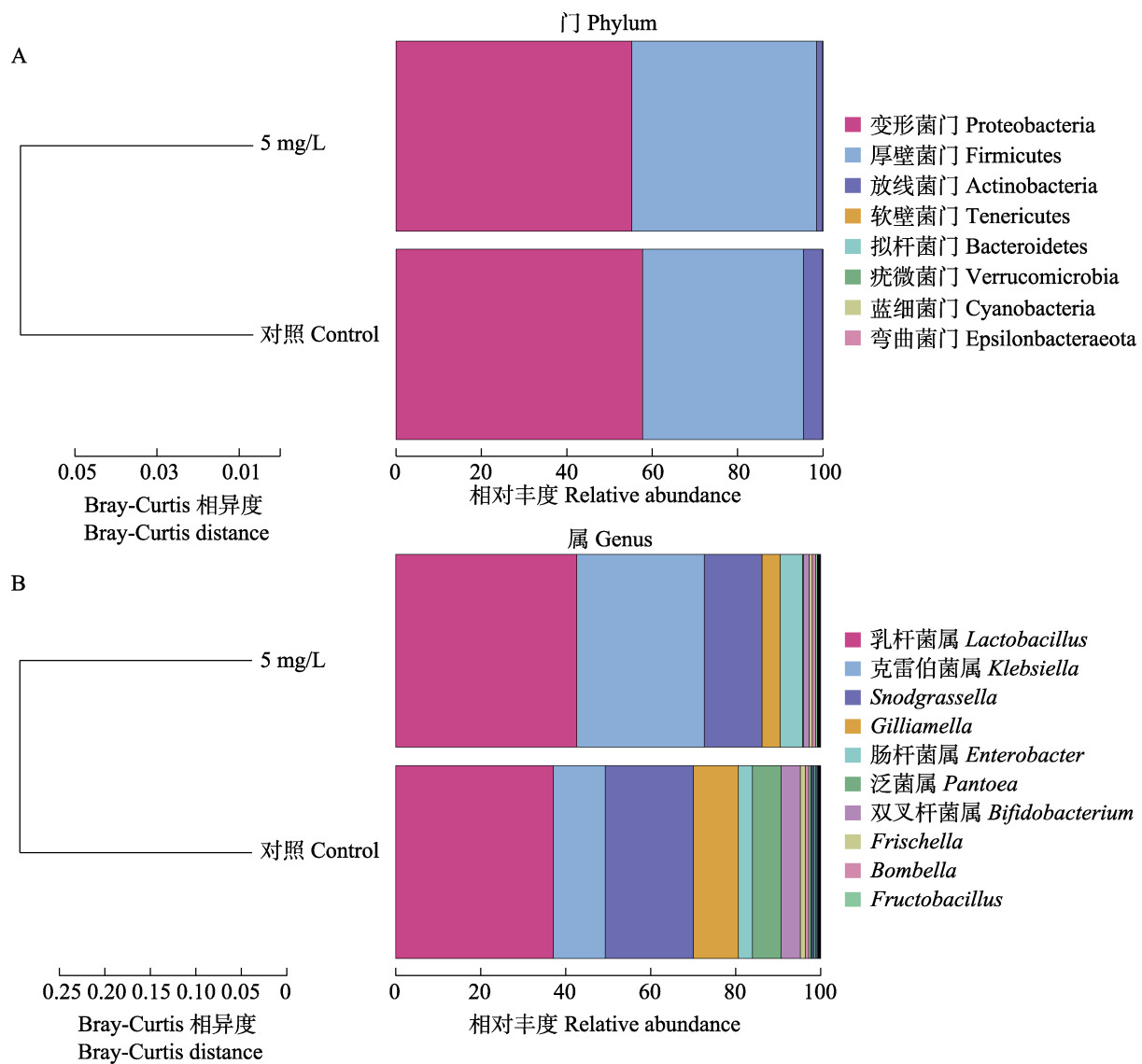


图 4 门 (A) 和属 (B) 水平上肠道菌群相对丰度比较
Fig. 4 Comparison in relative abundance of gut microbiota in phylum (A) and genus (B) level

表 2 Alpha 多样性指数统计
Table 2 Alpha diversity index statistics

样本名 Sample name	检测数据 Observed_otus	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	Chao1 指数 Chao1	覆盖值 Goods coverage
CK1	216	4.52	0.87	217.17	1
CK2	194	5.53	0.96	194.00	1
CK3	207	5.60	0.95	207.09	1
F21	161	4.56	0.89	161.50	1
F22	202	5.31	0.94	202.50	1
F23	239	4.51	0.82	239.43	1

CK1-CK3 的样品属于对照组的 3 个重复, F21-F23 的样品属于 5 mg/L 处理组的 3 个重复。
CK1-CK3 samples belong to three replicates of the control group, and F21-F23 samples belong to three replicates of the 5 mg/L treatment group.

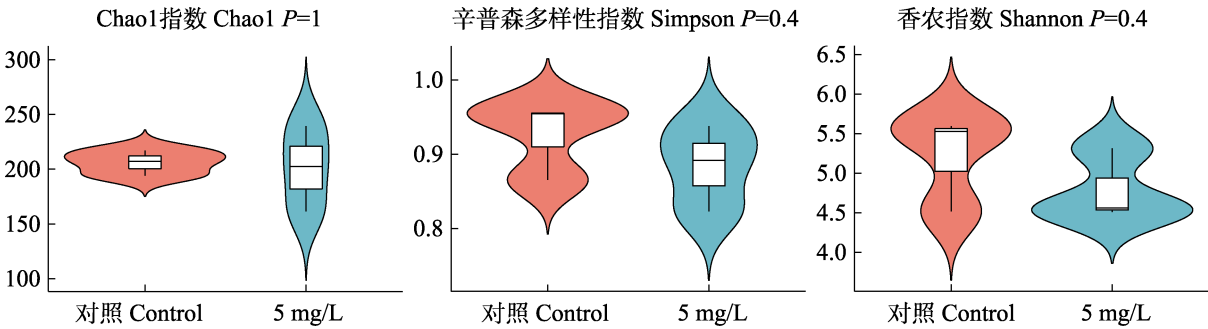


图 5 对照组和 5 mg/L 处理组的 Alpha 多样性分析
Fig. 5 Alpha diversity analysis of gut microbiota in different group

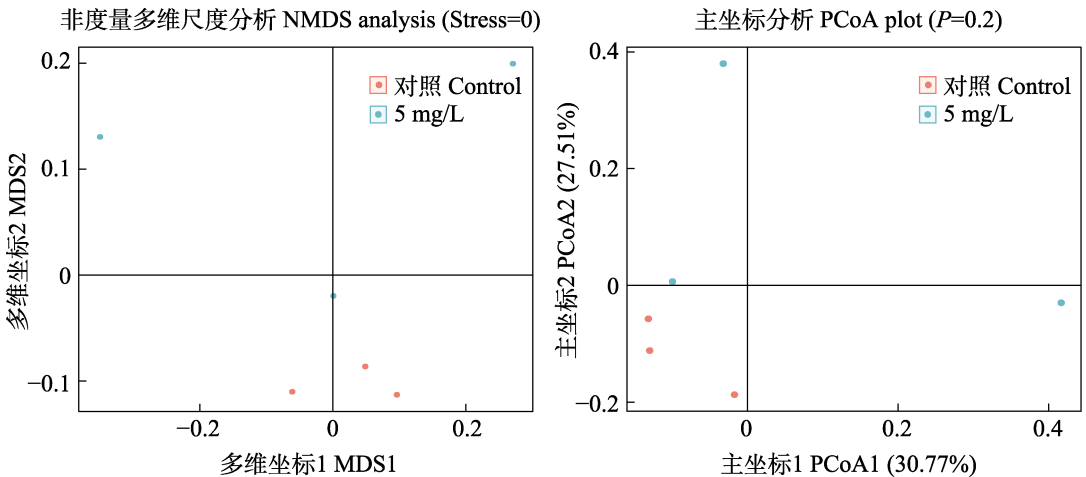


图 6 对照组和 5 mg/L 处理组的 Beta 多样性分析
Fig. 6 Beta diversity analysis of gut microbiota in different group

无显著性差异。

2.4.4 蜜蜂肠道菌群相对丰度分析 为了进一步研究存在显著性差异的菌群,我们对图 4 中相对丰度发生变化的肠道菌群进行显著性分析,并通过 Barplot 图进行展示。由图 7 可知,从门的水平上,具有显著性差异的菌门只有放线菌门 (Actinobacteria),在甲氧菊酯胁迫下,该菌门的占比下降了 ($P<0.05$)。从属的水平上,具有显著性差异的菌属有 8 种,分别是: *Gilliamella* 属、*Pantoea* 属、*Bifidobacterium* 属、*Raoultella* 属、*Proteus* 属和 *Shigella* 属以及根瘤菌目下和变形菌门 γ 亚群的两种未知菌属。在甲氧菊酯胁迫下, *Gilliamella* 属、*Pantoea* 属、*Bifidobacterium* 属、*Shigella* 属和 2 种未知菌属的丰度降低了,而 *Raoultella* 属和 *Proteus* 属的丰度升高了 ($P<0.05$)。

随后再对肠道菌群进行 LefSe (LDA effect

size) 检测,如图 8 可知,从门和属的水平进行分析,我们发现分析结果与图 7 中基本一致,但有趣的是还有一种病原菌属在处理组中占比上调了,这种菌被称为 *Klebsiella* 属。

3 讨论

甲氧菊酯是一种常用的拟除虫菊酯类杀虫剂,近几年来广泛运用于农业病虫害的防治中,关于甲氧菊酯对传粉昆虫蜜蜂影响的相关研究则比较少。本研究首先检测了甲氧菊酯对蜜蜂取食的影响,此前有研究发现菊酯类农药的趋避结果会使昆虫取食量减少 (Ozawa *et al.*, 1992),新出房的蜜蜂为了加快发育会消耗花粉,Carla 等 (2016) 发现花粉能够调节蜜蜂细胞色素 P450 解毒酶,细胞色素 P450 解毒酶主要参与蜜蜂的解毒功能。而本研究结果发现对照组的糖水累积取食量明显高于农药组,而 5 mg/L 农药组中花

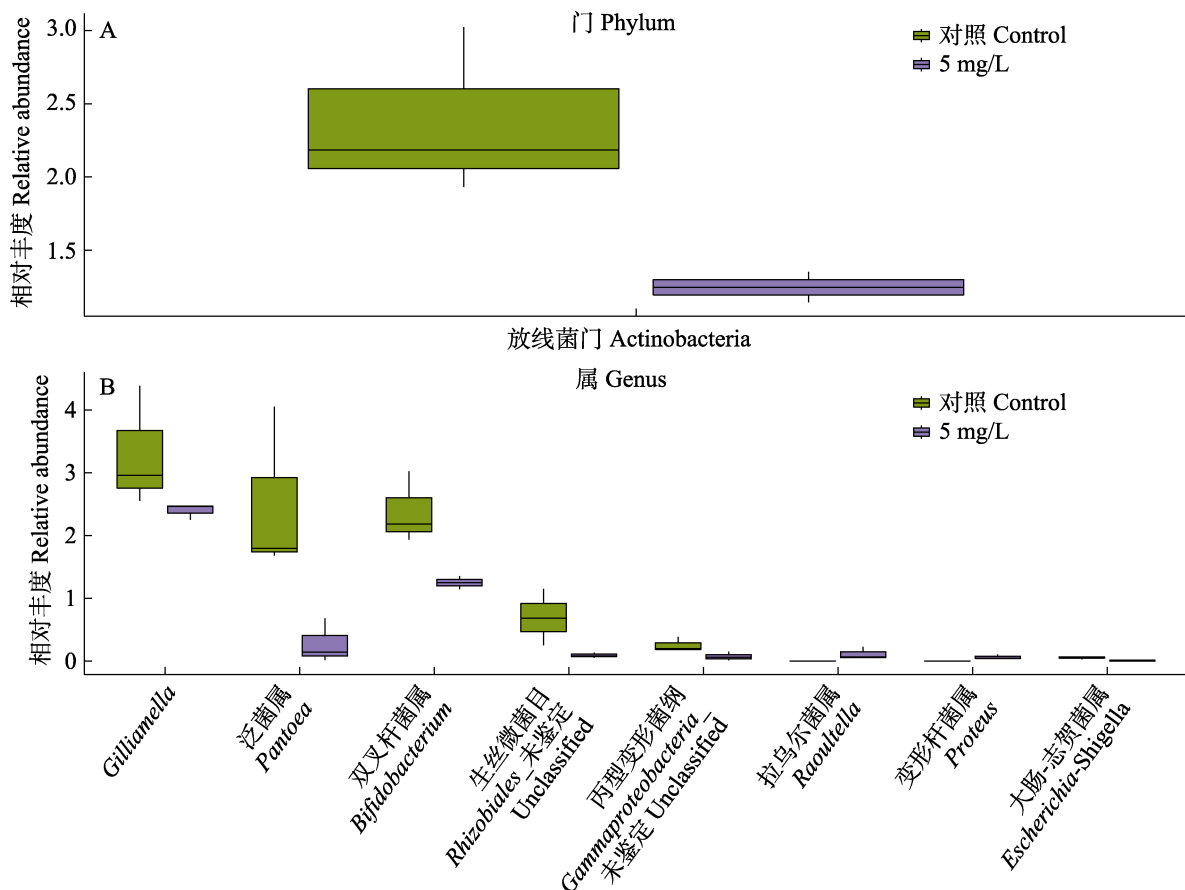


图 7 门 (A) 和属 (B) 水平上肠道菌群的 Barplot 差异分析

Fig. 7 Barplot differential analysis of gut microbiota in phylum (A) and genus (B) level

粉累积取食量明显高于 1 mg/L 和对照组印证了此前的发现。生存曲线可以发现 5 mg/L 农药处理组蜜蜂存活率明显小于对照组和 1 mg/L 的处理组,说明蜜蜂受到了亚致死剂量下甲氰菊酯的影响,说明蜜蜂长期接触亚致死剂量的甲氰菊酯也会引起其死亡。

抗菌肽是蜜蜂免疫系统中重要的组成部分,蜜蜂体内的抗菌肽主要由 *Hymenoptaecin*、*Apidaecin*、*Defensin* 和 *Abaecin* 四大家族组成 (Casteels, 1990)。它们在蜜蜂体内主要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的侵害 (Randolt *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2012)。这四大家族在对蜜蜂体内免疫通路的调节机制非常的复杂,其中 *Abaecin* 具有广谱的抗菌能力, *Defensin* 能抑制微生物的生长, *Hymenoptaecin* 和 *Apidaecin* 对抑制革兰氏阴性菌有非常高效的效果 (Lehrer *et al.*, 1991; Casteels *et al.*, 1993; Casteels and

Tempst, 1994)。本研究显示,甲氰菊酯处理 7 d 后显著抑制了 *Hymenoptaecin* 和 *Apidaecin* 的表达 ($P < 0.05$) 这说明甲氰菊酯可能对蜜蜂的免疫系统造成了一定的伤害。5 mg/L 剂量的甲氰菊酯显著诱导了蜜蜂 *Defensin* 的表达 ($P < 0.05$), *Defensin* 在蜜蜂体内的含量极少,且受到病原体刺激后的反应相比其他几种抗菌肽较为滞后,我们发现低剂量的甲氰菊酯没有刺激 *Defensin* 的表达,而随着甲氰菊酯浓度的升高 *Defensin* 的免疫通路被激活并随着甲氰菊酯的刺激开始显著表达以对抗甲氰菊酯的入侵。

细胞色素 P450 单氧酶 (Cytochrome P450 monooxygenase, CYP) 是昆虫体内非常重要的多功能解毒酶,能参与昆虫体内的激素和信息素的代谢和合成的,同时还在对杀虫剂的代谢和解毒发挥着重要的作用 (Feyereisen, 2006)。相比于黑腹果蝇和冈比亚疟蚊,蜜蜂的解毒代谢酶的数量相对较少,这可能是蜜蜂对农药等外源性有

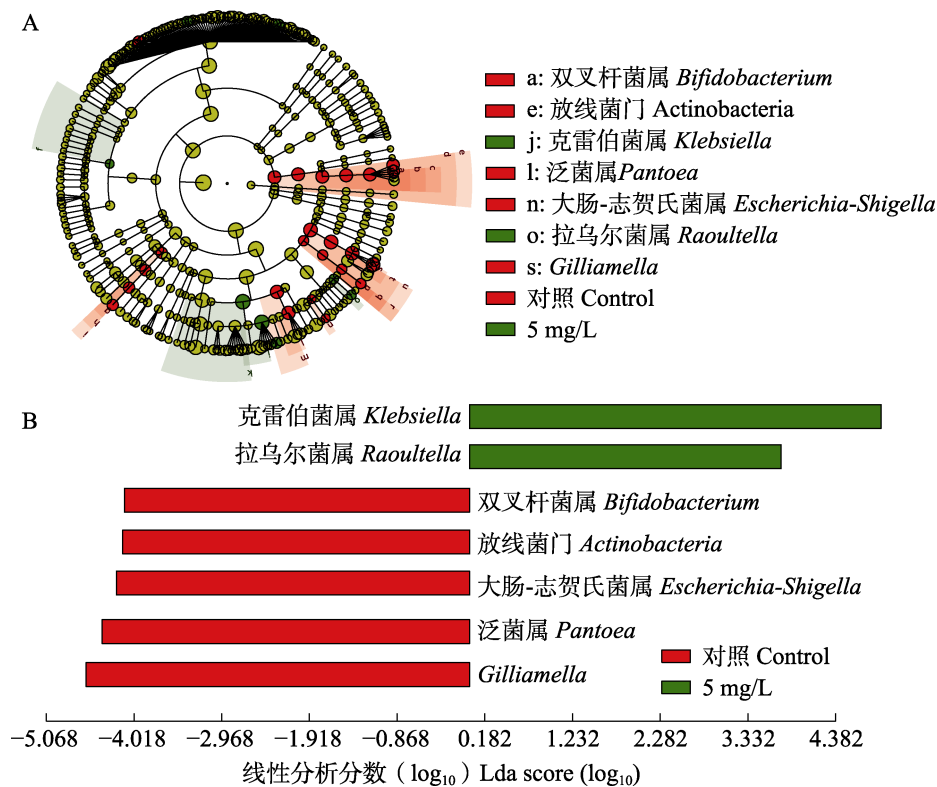


图 8 门和属水平上肠道菌群的 LefSe 分析

Fig. 8 LefSe analysis of gut microbiota in phylum and genus level

A. LefSe 分析进化分枝图, 该图从内至外辐射分别代表从界到种的 7 个分类级别。着色原则: 无差异显著的物种统一着色为黄色, 差异显著的 biomarker 跟随组别进行着色。B. LDA 值分布柱状图, LDA 值分布柱状图中展示了处理组 and 对照组样本中丰度差异显著的菌群, 柱状图的长度代表差异菌群的影响大小。

A. Cladogram generated from LefSe analysis. The picture of the radiation from inner to outer circle represents from domain to species of the seven classification level. Coloring principle: No significant difference of species unified color is yellow significant differences of biomarker follow the group of staining. B. The histogram of the distribution of LDA values show the significant differences in abundance between treatments and control, and the length of the histogram represents the impact of the differences.

毒物质敏感性较高的原因 (Claudianos *et al.*, 2010)。不同农药对蜜蜂解毒酶表达的影响是不同的, Mao 等 (2011) 研究发现氟胺氰菊酯能诱导 *Cyp9q3* 的上调表达, 而另一种菊酯类农药联苯菊酯却能抑制 *Cyp9q3* 的表达, 但却能诱导 *Cyp9q1*、*Cyp9q2* 的过表达。本研究显示, 甲氧菊酯处理蜜蜂 7 d 后, 显著抑制了 *Cyp9q1* 的表达 ($P<0.05$), 说明甲氧菊酯有可能损坏了上述解毒基因的解毒通路, 导致解毒基因的表达被抑制。

蜜蜂卵黄蛋白原 (Vitellogenin, Vg) 是一种由脂肪体合成的糖脂蛋白, 能影响蜜蜂的行为还能调节蜜蜂的寿命 (Amdam *et al.*, 2004)。结果显示, 甲氧菊酯处理蜜蜂 7 d 后, 仅 5 mg/L 剂

量的甲氧菊酯显著诱导了 Vg 的上调表达。蜜蜂出房后的第 2 至第 3 天, 蜜蜂血淋巴中的 Vg 含量会迅速增加并在第 5 至第 15 天达到顶峰。我们猜测随着甲氧菊酯浓度的升高刺激了 Vg 的表达, 蜜蜂血淋巴中 Vg 的表达量增加提高免疫力以应对农药的入侵。

蜜蜂是通过群居性活动获得肠道菌群 (Powell *et al.*, 2014), 蜜蜂的肠道菌群结构相对比较简单, 蜜蜂的肠道菌群中主要菌群只有 8-10 种, 占总菌群数的 98% (Sabree *et al.*, 2012)。肠道菌群和蜜蜂肠道的关系是一种动态平衡, 在相互制约和相互依存的状态实现一种稳态 (Feldhaar and Gross, 2009; Hooper and Gordon,

2015)。但是这种稳态如果遭到破坏,蜜蜂的生理功能会发生紊乱,进而可能会造成蜜蜂的死亡(Anderson *et al.*, 2011; Crotti *et al.*, 2013)。2006 在美国暴发的蜜蜂蜂群崩溃综合征导致当地出现了严重的授粉危机也使全世界开始关注蜜蜂的健康问题,而这一现象的出现就有可能和蜜蜂肠道菌群失调有关(Evans and Schwarz, 2011)。聚焦于蜜蜂肠道菌群的研究也越来越多,高通量测序的最新技术为研究蜜蜂肠道菌群提供了一个全新的途径(Moran and Nancy, 2015)。

本实验对甲氰菊酯胁迫下的蜜蜂肠道菌群进行了 16S rDNA 测序分析,主要获得了变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、软壁菌门(Tenericutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)等 8 种菌门,其中变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)这 3 种菌门占肠道菌群所有菌门的 98%以上,是肠道菌群的优势菌门,我们的测序结果与前人(Engel *et al.*, 2012)的研究成果是一致的,例如一项对世界各国西方蜜蜂肠道菌群的研究显示,蜜蜂肠道菌群中 95% 以上都属于以上几类菌群。蜜蜂肠道菌群之间相互协调形成稳态,我们的研究发现变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)是两组间门水平上占比最高的两种菌门,其中变形菌门都是革兰氏阴性菌(G^-),而厚壁菌门都是革兰氏阳性菌(G^+),和前人(Jagoueix *et al.*, 1994)的研究一致,这两种菌门在所有菌群中占比最高并且在肠道菌群中相互协调构成菌群的稳态环境。一项对泰国蜜蜂的研究显示,蜜蜂体内的放线菌属于一种非常重要的菌群,其可以产生具有抗生素性质的生物活性化合物(Promnuan *et al.*, 2009)。我们的研究发现甲氰菊酯胁迫下蜜蜂肠道菌群中放线菌门的相对丰度显著降低($P<0.05$),说明甲氰菊酯的胁迫下使放线菌的生长受到抑制导致抗生素性质的生物活性的化合物的合成匮乏,这可能对蜜蜂免疫产生了一定的影响,如果环境中的蜜蜂在甲氰菊酯的胁迫下继续遭受其他环境因子的压力,有可能会造成蜂群的崩溃。

在属的水平上,我们发现以下几种菌属的相

对丰度具有显著性差异,分别是 *Gilliamella* 属、*Pantoea* 属、*Bifidobacterium* 属、*Raoultella* 属、*Proteus* 属、*Shigella* 属和 *klebsiella* 属,我们的检测结果和 Gilliam (1997) 的研究成果基本一致,他们的研究发现 *Gilliamella* 属和 *Bifidobacterium* 属是蜜蜂肠道菌群的优势菌,这两种菌属协同配合参与蜜蜂肠道中果胶和半纤维素的降解,并在水解多糖的同时自身释放对宿主有益的短链脂肪酸和宿主可以吸收的单糖等,促进宿主对营养物质的吸收。我们的研究发现,甲氰菊酯胁迫下的蜜蜂肠道菌群中这两种菌的相对丰度都显著下调($P<0.05$),说明甲氰菊酯的干扰下,这两种菌的生长受到了抑制可能导致蜜蜂消化功能受到一定的影响,从而影响到蜜蜂的健康。*Pantoea* 属包含数种与植物相关的物种并广泛分布于自然界,已从多种生态位种分离出来,包括土壤、水、植物、动物和人类(Delétoile *et al.*, 2009)。我们推测这种菌可能是由于蜜蜂通过授粉、饮水的过程中从环境中获得,并进入肠道与蜜蜂共生。*Shigella* 属是我们从蜜蜂属水平检测到的一种含量较少的病原菌,这种菌感染人类会造成伤寒和腹泻(Black *et al.*, 1987)。我们的研究发现 *Pantoea* 属和 *Shigella* 属在甲氰菊酯的胁迫下在肠道菌群中的丰度占比也显著下降了($P<0.05$),说明这两种菌的生长受到了抑制,甲氰菊酯为何会引起这两种病原菌的丰度下降有待后续的研究。*klebsiella* 属是蜜蜂肠道中的一种常见菌种,侵染个体后会能引起人畜发生肺炎、子宫炎、乳房炎及其他化脓性炎症等疾病(Diancourt *et al.*, 2005)。*Proteus* 属和 *Raoultella* 属也都是病原菌, *Proteus* 属广泛分布于自然界(土壤、水和污水)中,在生态系统中发挥着重要作用, *Proteus* 属包含多种条件致病菌,当依附于更高的生态位时,这些菌群在人体的不同区域会引起不同的病理事件(Rózalski *et al.*, 1997)。*Raoultella* 属是一类革兰氏阴性厌氧菌,广泛分布于环境(水和土壤)中,被称为环境细菌(Bagley *et al.*, 1981)。有研究表示,这类菌和 *klebsiella* 有相似作用,可导致人体出现一系列炎症(Olson *et al.*, 2013)。我们的研究发现

klebsiella 属、*Proteus* 属和 *Raoultella* 属这三类病原菌在蜜蜂肠道中由于甲

氧菊酯的胁迫丰度均显著增加,说明可能在甲氧菊酯的胁迫下,肠道中发挥免疫功能的益生菌的生长受到了抑制,导致病原菌失去了益生菌的制约促进了其生长。

综上所述,甲氧菊酯的暴露可能对意大利蜜蜂的免疫、解毒系统以及肠道菌群的组成产生了一定的影响,本研究对甲氧菊酯与意大利蜜蜂分子机制上的互相作用以及对肠道菌群的互相作用有生物学的意义。

参考文献 (References)

- Amdam GV, Simões ZL, Hagen A, Norberg K, Schröder K, Mikkelsen O, Kirkwood TB, Omholt SW, 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39(5): 767–773.
- Anderson K, Sheehan T, Eckholm B, Mott B, Degrandi-Hoffman G, 2011. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58(4): 431–444.
- Bagley ST, Seidler RJ, Brenner DJ, 1981. *Klebsiella planticola* sp. nov.: A new species of enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments. *Current Microbiology*, 6(2): 105–109.
- Black RE, Levine MM, Lou CM, Genevieve L, Deirdre H, Sanford B, Formal SB, 1987. Prevention of shigellosis by a salmonella typhi-*Shigella sonnei* bivalent vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 1987(6): 1260–1265.
- Carla S, Paula A, Patrícia V, 2016. Relationships of *Echium plantagineum* L. beepollen, dietary flavonoids and their colonic metabolites with cytochrome P450 enzymes and oxidative stress. *RSC Advances*, 6(8): 6084–6092.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P, 1993. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10): 7044–7054.
- Chan QW, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ, 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *BMC Genomics*, 10(1): 387–387.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2010. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615–636.
- Crotti E, Sansonno L, Prosdociimi EM, Vacchini V, Hamdi C, Cherif A, Gonella E, Marzorati M, Balloi A, 2013. Microbial symbionts of honeybees: A promising tool to improve honeybee health. *New Biotechnology*, 30(6): 716–722.
- Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, Arlet G, Brisse S, 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* Strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2): 300–310.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S, 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8): 4178–4182.
- Duan LF, Li XB, Ke CJ, Zhang HJ, Ji L, 2013. Risk evaluation of implications of eu's policy on the restriction of use of neonicotinoids to domestic pesticide industry. *Pesticide Science and Administration*, 34(9):15–20.[段丽芳, 李贤宾, 柯昌杰, 张宏军, 季颖, 2013. 欧盟新烟碱类农药限用政策对我国农药相关产业的风险分析. *农药科学与管理*, 34(9): 15–20.]
- 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 of the United States of America*, 109(27): 11002–11007.
- Evans JD, Schwarz RS, 2011. Bees brought to their knees: Microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19(12): 614–620.
- Feldhaar H, Gross R, 2009. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(1): 1–8.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6): 1252–1255.
- Gilliam M, 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1): 1–10.
- Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1435–1435.
- Hooper L, Gordon J, 2015. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519): 1115–1118.
- Hori A, Kurata S, Kuraishi T, 2018. Unexpected role of the IMD pathway in *Drosophila* gut defense against *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495(1): 395–400.
- Hung KLJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR, 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 285(1870): 20172140.
- Jagoueix S, Bove JM, Garnier M, 1994. The phloemlimited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a

- subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3): 379–386.
- Jiang H, Lin RH, Tao CJ, Liu L, Qu WG, 2005. Advance of studies on effect of pyrethroid insecticides to aquatic organisms. *Pesticide Science and Administration*, 26(10):14–19. [姜辉, 林荣华, 陶传江, 刘亮, 瞿唯钢, 2005. 菊酯类农药对水田生物影响研究进展. *农药科学与管理*, 26(10): 14–19.]
- Laskowski DA, 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 174(1): 149–170.
- Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, 1991. *Defensins*: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*, 64(2): 229–230.
- Liao CH, Wu J, Wang ZL, Zeng ZJ, Wu XB, 2017. Effect of fenpropathrin on the viability and homing ability of worker bees *Apis mellifera*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4): 1063–1066.
- Luo AL, Yu XY, Zhang CZ, Zhu SD, Liu XJ, 2004. Research progress of residue analysis for pyrethroids. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 20(2):120–125. [骆爱兰, 余向阳, 张存政, 祝树德, 刘贤进, 2004. 拟除虫菊酯类农药残留分析研究进展. *江苏农业学报*, 20(2):120–125.]
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR, 2011. Cyp9q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31): 12657–12662.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA, 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8): 2830–2840.
- Monchanin C, Henry M, Decourtye A, Dalmon A, Fortini D, Bœuf E, Dubuisson L, Aupinel P, Chevallereau C, Petit J, 2019. Hazard of a neonicotinoid insecticide on the homing flight of the honeybee depends on climatic conditions and Varroa infestation. *Chemosphere*, 224: 360–368.
- Moran H, Powell S, 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*, 7(4): e36393.
- Ozawa A, Sato M, Inoue Y, Mochizuki A, Ozaki S, 1992. Influence of fenpropathrin EC to honeybee activity on strawberry in vinyl-houses. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society*, 1992(39): 223–225.
- Potts S, Roberts S, Dean R, Marris G, Brown M, Jones R, Neumann P, Settele J, 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 15–22.
- 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 Environmental Microbiology*, 80(23): 7378–7387.
- Promnuan Y, Kudo T, Chantawannakul P, 2009. Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9): 1685–1689.
- Randolt K, Gimple O, Geissendörfer J, Reinders J, Beier H, 2008. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69(4): 155–167.
- Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM, 2012. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 13(1): 1–18.
- Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K, 1997. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1): 65–89.
- Sabree ZL, Hansen AK, Moran NA, 2012. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS ONE*, 7(7): e41250.
- Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101–1108.
- Tan K, Yang S, Wang Z, Menzel R, 2013. Effect of flumethrin on survival and olfactory learning in honeybees. *PLoS ONE*, 8(6): e66295.
- Tison L, Hahn ML, Holtz S, Rößner A, Greggers U, Bischoff G, Menzel R, 2016. Honeybees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the field. *Environ. Sci. Technol.*, 50(13): 7218–7227.
- Tong Z, Duan JS, Wu YC, Liu QQ, He QB, Shi YH, Cao HQ, 2018. A survey of multiple pesticide residues in pollen and bee bread collected in China. *Science of the Total Environment*, 640(1): 1578–1586.
- Vanengelsdorp D, Meixner MD, 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1): S80–S95.
- Wu Y, Zheng Y, Chen Y, Wang S, Chen Y, Hu F, Zheng H, 2020. Honey bee (*Apis mellifera*) gut microbiota promotes host endogenous detoxification capability via regulation of P450 gene expression in the digestive tract. *Microbial Biotechnology*, 13(4): 1201–1212.
- 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 of the United States of America*, 114(18): 4775.
- Zhu L, Qi S, Xue X, Niu X, Wu L, 2019. Nitenpyram disturbs gut microbiota and influences metabolic homeostasis and immunity in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Pollution*, 258: 113671.