油菜花期东方蜜蜂及西方蜜蜂蜜囊细菌多样性*

王 淼[1,2**] 徐 鸿[2] 尹革芬[3] 赵文正[2] 和绍禹[2***]

（1. 云南农业大学植物保护学院，昆明 650201；2. 云南农业大学东方蜜蜂研究所，昆明 650201；
3. 云南农业大学动物科学学院，昆明 650201）

摘 要 **【目的】** 本研究对油菜花期的东方蜜蜂 *Apis cerana*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 蜜囊细菌进行分离培养及分子鉴定，通过序列比对及系统发育树分析彼此间的多样性差异和来源，为蜂群饲养管理过程中细菌的控制和应用提供理论依据。**【方法】** 对东、西方蜜蜂蜜囊细菌进行分离、纯化培养；并对分离菌株的 16S rDNA 基因片段进行扩增和测序，序列比对后进行系统发育分析。**【结果】** 蜜囊中解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 占总菌数的百分比为 69.81%~95.97%，*P* 值在 0.007~0.009 之间，显著高于其它细菌占总菌数百分比（4.03%~30.19%），是优势菌；275 株培养特征和表现型不同的菌株共有 9 种不同的单倍型菌株，通过比对其相似度>99%；其中 16 株细菌 16S rDNA 基因序列已提交 GenBank 数据库，登录号：kf710012~kf710033；东方蜜蜂蜜囊细菌包括 2 个属中的 5 个种，西方蜜蜂蜜囊细菌包括 5 个属中的 7 个种，花蜜中细菌包括 2 个属中的 2 个种；系统发育树分析表明，簇Ⅰ和簇Ⅱ分别与参考菌株 EF565944、EF565939 和 EF565936 属同一种；未分离到参考簇Ⅴ；簇Ⅲ、簇Ⅳ、簇Ⅵ、簇Ⅶ这 4 个属的蜜囊细菌是首次报道并提交 GenBank。**【结论】** 东、西方蜜蜂蜜囊细菌除了共有的优势菌解淀粉芽孢杆菌，细菌多样性有明显的差异；与国外蜜蜂蜜囊研究存在地理差异；解淀粉芽孢杆菌可以作为蜂粮的添加剂，提高蜜蜂抗病性。

关键词 东方蜜蜂，西方蜜蜂，蜜囊，16S rDNA，细菌多样性

Diversity of bacteria in the honey stomach of *Apis cerana and Apis mellifera* during the rape blooming period

WANG Miao[1, 2**] XU Hong[2] YIN Ge-Fen[3] ZHAO Wen-Zheng[2] HE Shao-Yu[2***]

(1. Plant Protect College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Eastern Bee Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract **[Objectives]** To analyze the diversity, origin and differences in the cultured bacterial community present in the honey stomach of *Apis cerana and Apis mellifera*. **[Methods]** Bacteria were isolated and cultivated to obtain pure isolates in the honey stomach of *A.cerana and A. mellifera*. The isolates were compared and a phylogeny constructed analysis based on 16S rDNA sequences amplification and sequencing. **[Results]** *Bacillus amyloliquefaciens* was the dominant bacteria comprising 69.81% to 95.97% of the total found in each bee species respectively, significantly higher than other bacteria, which comprised just 4.03% to 30.19%. *P*-values for these differences were 0.007 to 0.009, respectively. A total of 275 bacterial isolates were selected and identified from different phenotypes. All bacterial 16S rRNA sequences from the different samples showed nine haplotypes and >99% similarity to the phylotype in GenBank. 16 isolates were submitted to GenBank and obtained accession numbers from kf710012 to kf710033. The honey stomach of *A. cerana* contained five bacterial species

* 资助项目：国家现代蜜蜂产业技术体系（CARS-45-kxj14）

** E-mail：ynbee@163.com

***通讯作者，E-mail: kmhsy@163.com

收稿日期：2014-02-25，接受日期：2014-08-29

from two genera, in comparison, the honey stomach of *A. mellifera* contained seven species from five genera and nectar contained two species from two genera. Phylogenetic analysis indicated that clusters Ⅰ and Ⅱ were the same species as the previously described EF565944、EF565939 and EF565936. Cluster Ⅴ(*Lactobacillus*) was not found in this study. Clusters Ⅲ, Ⅳ, Ⅵ and Ⅶ were also not found in the reference strains. This is the first time that bacteria in the honey stomach of *A. cerana and A. mellifera* have been described and submitted to GenBank. **[Conclusion]** Except for the common dominant bacteria *B. amyloliquefaciens*, bacterial diversity in the honey stomach is obviously different between *A. cerana and A. mellifera*. Comparison with previous, overseas studies of the honey stomach bacterial community suggests that there are geographic differences in bacterial community composition. *B. amyloliquefaciens* can be used as a food additive that enhances disease resistance in honeybees.

Key words *Apis cerana, Apis mellifera*, honey stomach, 16S rDNA, bacterial diversity

东方蜜蜂 *Apis cerana* 和西方蜜蜂 *A. mellifera* 是蜜蜂属的两个种，是重要的蜂蜜生产的经济昆虫。在国内，东方蜜蜂一部分在野外生存，一部分通过人工驯化饲养，是一些山区农民的重要经济来源。然而，在过去的 20 年，引进西方蜜蜂品种对东方蜜蜂产生干扰竞争，造成不良的生态效应，导致巨大的农业经济损失（Genersch *et al.*，2005）。东方蜜蜂数量减少会降低当地植物授粉总量，使多种植物授粉受到影响，结果导致植物多样性减少，必须采取相应的措施保护东方蜜蜂（Xu *et al.*，2009）。因此，对东、西方蜜蜂差异的研究是必要的和紧迫的。这些研究，也包括对微生物多样性方面。

蜜蜂有采集花蜜转化为蜂蜜的能力（Oertel *et al.*，1951）。在酿蜜过程中，工蜂采集花蜜，暂时储存在蜜囊内，一般蜜囊能充满约 60 μL 的液体（Naef *et al.*，2004），然后吐回蜂巢进行酿造，形成成熟蜂蜜。蜜囊位于蜜蜂消化道前端，由于蜜蜂采集花蜜与消化液混合存于蜜囊，相对环境是开放的，其细菌多样性受花蜜和蜜囊土著细菌的影响。在这个过程中，蜂蜜中的细菌也会受到花蜜、蜜囊土著细菌种类和数量的影响（Aizenberg-Gershtein *et al.*，2013），因此，研究蜜囊中细菌的多样性，可以为进一步研究和控制蜂蜜酿造过程中细菌来源提供前期的数据支持。

蜂群崩溃症(Colony collapse disorder，CCD)，是与蜜蜂有关的微生物导致蜂群整体崩溃的一种症状。蜂群崩溃症在国外大量发生，而在国内暂时没有相关报道。CCD 现象可能与蜜蜂疾病有关，如细菌病，病毒病等。在 2006—2007 冬季美国曾遭受蜂群崩溃症，养蜂业平均损失 45%（Diana *et al.*，2007）。蜜蜂蜜囊相对开放的环境，直接与外界相通，蜜囊对微生物的传播、抑制或过滤，对于蜜蜂本身的防御显得尤为重要。因此，研究东、西方蜜蜂蜜囊细菌的多样性，并与国外的研究进行系统发育分析，可为两种蜜蜂过路菌群和土著菌群的种类差异以及蜂群饲养管理过程中细菌的控制和应用提供理论依据。

近年来，国外对蜜蜂蜜囊细菌的研究逐渐活跃，利用 16S rDNA 基因序列通过对西方蜜蜂和大蜜蜂 *A. dorsata* 两个蜂种的蜜囊进行研究，结果主要的类型是乳酸菌 *Lactobacillus* spp.和双歧杆菌 *Bifidobacterium* spp.两个属（Olofsson and Vasquez，2008；Vasquez and Olofsson，2009；Tajabadi *et al.*，2011），其次还有不动杆菌属 *Acinetobacter* spp.和假单胞菌属 *Pseudomonas* spp.（Loncaric *et al.*，2011）。从熊蜂属大黄蜂蜜囊中分离鉴定的细菌也归于乳杆菌属 *Lactobacillus* spp.（Olofsson and Vasquez，2009）。这些研究表明，无论是过路菌群和土著菌群，其细菌种类的相对稳定对蜜蜂的健康、蜂群的群势都非常重要（Anderson *et al.*，2011）。国外对蜜蜂蜜囊细菌多样性进行研究主要集中在西方蜜蜂、大蜜蜂和熊蜂属的大黄蜂方面，而国内没有蜜囊细菌研究的相关报道，东方蜜蜂蜜囊细菌的研究也未见报道。

本研究基于 16S rDNA 基因序列，对同一蜜源期（油菜花期）东、西方蜜蜂的蜜囊以及油菜

花花蜜中的细菌进行分离、鉴定，并与已发布的蜜囊细菌菌株序列构建系统发育树，分析其多样性差异和来源，为蜂群饲养管理过程中细菌的控制和应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料和采集条件

材料：东、西方蜜蜂蜂群；油菜花花蜜。

采集条件：油菜花盛花期，选择东、西方蜜蜂标准化养殖蜂场，相距 15 km；无菌条件下采集出勤蜂和采集蜂，表面消毒后，在无菌水中处理 1 min，蜜囊在无菌箱内进行无菌切除，10 只蜜囊为一个样本。采样液为 10 mL 无菌生理盐水，含有 0.9% w/v 氯化钠、0.1% w/v 吐温 80 和 0.1% w/v 蛋白胨。油菜花花蜜采用无菌毛细管收集。所有样品采集后立即冷冻，储存于－20℃。

1.2　细菌培养和分析

采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA），胰蛋白胨大豆肉汤琼脂培养基和乳酸菌琼脂培养基（MRS）；培养方法：好氧培养 37℃ 2~3 d 和厌氧培养 37℃ 3~4 d，采用厌氧罐 Anaerocult（Merck，Darmstadt，德国）进行厌氧培养；从含有 30~300 个菌落的平板随机选择了 5~20 个培养特征不同的菌落，进行纯培养，获得纯种；平板计数采用不同稀释度的平均值；按照不同菌种占总菌数的百分比与占总菌数最高百分比进行两独立样本 Mann-Whitney *U* 检验，计算 *P* 值，分析其显著性，确定优势菌，以上统计均在 SPSS19.0 分析完成。

1.3　DNA 提取和 PCR

离心收集 0.1~0.3 g 细菌菌体，使用 Tianamp 细菌 DNA 提取试剂盒以及相应试剂 *Taq* 酶、溶菌酶、蛋白酶 K（购自北京天根生物技术公司）提纯 DNA；PCR 引物：16S rDNA 基因序列扩增引物由上海生工生物有限公司合成，引物序列如下：正向引物 27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'），反向引物 1387R（5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'）。

PCR（MJ，Research，T100TM Thermal Cycler；Bio-Rad Co.，Hercules，CA，USA）反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，58℃退火 60 s，72℃延伸 90 s，共 30 个循环；72℃延伸 7 min；4℃保存。反应体系总体积为 50 μL，其中包括 DNA 模板 4 μL、正、反向引物各 0.2 μL、2× TransTaqTM II HiFi PCR SuperMix II（购自北京天根生物技术公司）25.0 μL、ddH_2O 20.6 μL。

1.4　测序和系统发育分析

使用引物 27F 和 1387R 对 PCR 产物进行双向测序（上海生工生物科技有限公司），正、反向序列经过人工校正、修剪后生成一致序列。将结果与 NCBI 的 GenBank 数据库进行 Blast 比对（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/），同时下载各个菌株的近缘序列为参考序列。使用 Bioedit 软件的 Clustal-W 算法进行 Alignment 计算，计算各条序列间的距离矩阵，利用 MEGA5.0 软件（Tamura *et al.*，2011）采用 Neighbour-Joining 法（邻接法）构建系统发育树，Bootstrap 值设置为 1 000，用 Kimura 双参数距离进行运算。

1.5　参考序列的选择

为了进一步分析本试验与国外蜜囊细菌研究之间的相似和差异，选择 7 株不同的西方蜜蜂蜜囊细菌作为系统发育分析的参考菌株：昆氏乳酸杆菌 *Lactobacillus kunkeei*（GQ451636），乳酸杆菌属 *Lactobacillus* spp.（GQ451619），玉米乳杆菌 *Lactobacillus vermiforme*（GQ451615）（Tajabadi *et al.*，2011），乳酸杆菌属 *Lactobacillus* spp.（EF187245）（Olofsson and Vasquez，2008），不动杆菌属 *Acinetobacter* spp.（EF565936）和假单胞菌属 *Pseudomonas* spp.（EF565944；EF565939）（Loncaric *et al.*，2011）。

2　结果与分析

2.1　样品采集及菌落数分析结果

云南罗平采样点：东方蜜蜂蜂场（N24°57′，E104°22′）和西方蜜蜂蜂场（N24°49′，E104°18′）；

采样结果：东、西方蜜蜂出勤蜂和采集蜂蜜囊各10只，共40只蜜囊样品；4 650朵油菜花收集花蜜3 mL。

通过对琼脂平板培养的细菌菌落不同稀释梯度计算平均值，结合测序结果分析。图1所示细菌菌落总数从花蜜的230 CFU/mL到西方蜜蜂出勤蜂蜜囊细菌菌落总数15 100 CFU/mL不等，其中 *B. amyloliquefaciens* 在花蜜中为210 CFU/mL，在东、西方蜜蜂出勤蜂蜜囊中分别为11 300 CFU/mL和12 800 CFU/mL；而在采集蜂蜜囊中分别降为370 CFU/mL和1 190 CFU/mL。通过SPSS19.0软件分析，蜜囊和花蜜中 *B. amyloliquefaciens* 占总菌数百分比为69.81%~ 95.97%，*P* 值0.007~0.009（$P<0.05$），显著高于其它细菌占总菌数百分比4.03%~30.19%，表明 *B. amyloliquefaciens* 是蜜囊和花蜜的优势细菌。

采集蜂蜜囊细菌数量的降低，与采集花蜜的量有关，试验的采集蜂蜜囊都充满花蜜，其细菌数量相对于出勤蜂降低幅度较大，除了受液体量稀释影响外，还受花蜜的糖度、pH值，溶氧量、渗透压等因素的影响。

2.2 东、西方蜜蜂蜜囊和花蜜细菌类型及比较

选择275株培养特征和表现型不同的菌株进行纯化培养，通过16S rDNA基因序列鉴定，共有9种不同的单倍型菌株，通过比对与GenBank中相似菌株相似度>99%（表1）。本试验不同来源、不同单倍型的16株细菌16S rDNA基因序列已提交到GenBank数据库，并获得相应的登录号（kf710012~ kf710033）。

通过表1可以看出，东方蜜蜂蜜囊细菌包括2个属中的5个种，除相似的 *B. amyloliquefaciens* 以外，*B. subtilis* 和 *B. megaterium* 属于出勤蜂蜜囊；*S. epidermidis* 和 *S. warneri* 属于采集蜂蜜囊；西方蜜蜂蜜囊细菌包括5个属中的7个种，除相似的 *B. amyloliquefaciens* 以外，*B. subtilis*、*P. gessardii*、*B. vesicularis* 和 *Acinetobacter* spp.属于出勤蜂蜜囊；*Sphingomonas* spp.和 *Pseudomonas* spp.属于采集蜂蜜囊；而花蜜中细菌只有2个属中的

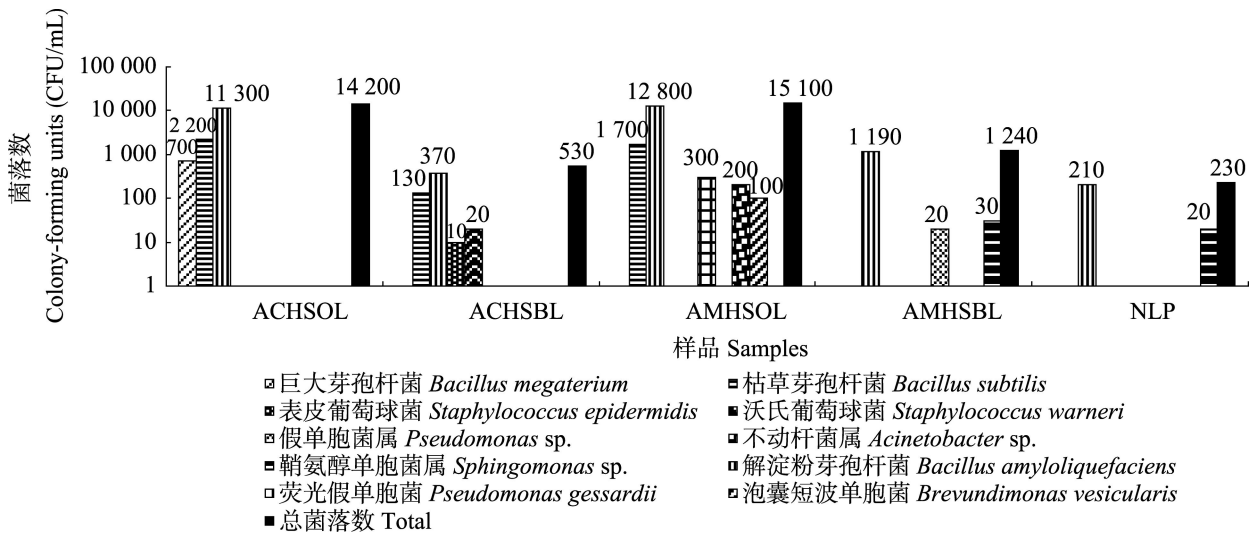

图1 蜜囊及花蜜细菌菌落数（CFU/mL）

Fig. 1 Bacterial isolates number (CFU/mL) in honey stomach and nectar

ACHSOL：东方蜜蜂出勤蜂蜜囊；ACHSOL：东方蜜蜂采集蜂蜜囊；AMHSOL：西方蜜蜂出勤蜂蜜囊；AMHSOL：西方蜜蜂采集蜂蜜囊；NLP：花蜜。

ACHSOL: Honey stomach of outgoing *A. cerana*; ACHSBL: Honey stomach of returning *A. cerana*; AMHSOL: Honey stomach of outgoing *A. mellifera*; AMHSBL: Honey stomach of returning *A. mellifera*; NLP: Nectar.

表 1　东、西方蜜蜂蜜囊和花蜜的细菌类型

Table 1　Bacterial phylotypes from the honey stomach of *Apis cerana and Apis mellifera* and nectar

样品 Samples	分离株 Isolates [a]	登录号 Accession numbers [b]	相似菌株及登录号 Most closely related type strain and accession numbers [c]	相似序列长度及相似度 Sequence lengths and similarity [d]
东方蜜蜂蜜囊 Honey stomach of *A. cerana*	ACHSOL271	KF710017	*B. amyloliquefaciens* strain LZBA-Y1-3 (JX997921)	1 236 (100%)
	ACHSOL96	KF710022	*B. subtilis* strain *BAB-448* (KF535118)	1 308 (100%)
	ACHSOL5	KF710019	*B. megaterium* strain BJ51 (KC857474)	1 317 (100%)
	ACHSBL24	KF710014	*S. epidermidis* strain 258 (P37A) (KF254632)	1 295 (100%)
	ACHSBL19	KF710012	*S. warneri* strain y357 (KF306379)	1 295 (100%)
花蜜 Nectar	ACHSBL41	KF710015	*B. amyloliquefaciens* strain LZBA-Y1-3 (JX997921)	1 279 (99%)
	NLP242	KF710032	*Sphingomonas* sp. ARS171-11 (JX827622)	1 240 (99%)
	NLP245	KF710033	*B. amyloliquefaciens* strain LZBA-Y1-3 (JX997921)	1 310 (99%)
西方蜜蜂蜜囊 Honey stomach of *A. mellifera*	AMHSOL108	KF710026	*B. subtilis* strain *BAB*-448 (KF535118)	1 308 (100%)
	AMHSOL259	KF710027	*P. gessardii* strain KMBMa1 (KF481916)	1 213 (100%)
	AMHSOL273	KF710030	*B. vesicularis* strain HX-J01 (KF501480)	1 147 (100%)
	AMHSOL275	KF710031	*B. amyloliquefaciens* strain LZBA-Y1-3 (JX997921)	1 307 (100%)
	AMHSOL272	KF710029	*Acinetobacter* sp. 7-14 (KC170355)	1 234(100%)
	AMHSBL243	KF710023	*Sphingomonas* sp. ARS171-11 (JX827622)	1 242 (99%)
	AMHSBL263	KF710025	*Pseudomonas* sp. 9DLP (KC884675)	1 234 (99%)
	AMHSBL248	KF710024	*B. amyloliquefaciens* strain LZBA-Y1-3 (JX997921)	1 309 (99%)

[a] 通过 16S rDNA 序列鉴定的菌株；[b] 菌株在 GenBank 中获得的登录号；[c] 相似菌株：通过 NCBI 比对后确定的相似菌株及登录号；[d] 最接近的相似菌株序列长度和百分率（括号中）。

[a] The 16S rDNA gene sequence identities were generated from isolates; [b] Isolates correspond to GenBank accession numbers; [c] Similarity strains. Taxonomic affiliation was established by comparing the sequence in the NCBI; [d] The similarity to the closest type strain sequence is shown as a percentage within parentheses.

2 个种，即：*Sphingomonas* sp.和 *B. amyloliquefaciens*。

对照花蜜中的细菌种类，东、西方蜜蜂出勤蜂和采集蜂蜜囊中均有 *B. amyloliquefaciens*，说明在长期的共生菌进化过程中，环境细菌在蜜囊中有拓殖能力，逐渐形成蜜囊中较为稳定的细菌类群，并占有一定的优势地位。东方蜜蜂采集蜂蜜囊分离出 *S. epidermidis* 和 *S. warneri*，说明东方蜜蜂除了采集油菜花蜜外，还采集零星蜜源，这与其生物学特性是一致的。

2.3　东、西方蜜蜂蜜囊和花蜜细菌的系统发育树的构建

基于 16S rDNA 部分基因序列（长度为 874 bp），采用 Neighbour-Joining（邻接法）构建系统发育树，分析了包括本试验采集的 6 株东方蜜蜂蜜囊和 8 株西方蜜蜂蜜囊细菌序列，2 株花蜜细菌序列以及共有的 10 株细菌相似序列，文献中选择 7 株参考细菌的序列，另外包括 1 株外群细菌序列，共计 34 条。

树枝的拓扑结构基于 bootstrap 值 1 000 构建，如分支点所示，7 个簇都有不低于 79 的自举值，刻度标尺表示 5%的进化差异。7 个簇：簇 I 为假单胞菌属 *Pseudomonas*、簇 II 为不动杆菌属 *Acinetobacter*、簇 III 为鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、簇 IV 为泡囊短波单胞菌属 *Brevundimonas*、簇 V 为乳酸菌属 *Lactobacillus*、簇VI为葡萄球菌属 *Staphylococcus* 和簇VII为芽孢

杆菌属 *Bacillus*。超嗜热菌 *Aquifex pyrophilus*（L37096）作为参照外群。

系统发育树分析表明，从蜜囊中分离的菌株有 2 个属与文献描述的相似，即：簇 I 的 AMHSOL259 和 AMHSBL263 与参考菌株 EF565944 和 EF565939；簇 II 的 AMHSOL272 与参考菌株 EF565936（图 2 和表 1）；说明西方蜜蜂蜜囊土著细菌虽然来自不同的地理类群（参考菌株采集于奥地利），但其具有高度的相似性，属同一种。而东方蜜蜂蜜囊中未分离到与参考菌株相似的细菌，说明不同种的蜜蜂蜜囊，其土著细菌有差异。从罗平分离的簇III、IV、VI和VII没有在参考菌株中发现，说明不同地域，蜜囊细菌的形成与外界环境、细菌在蜜囊中的适应、拓殖

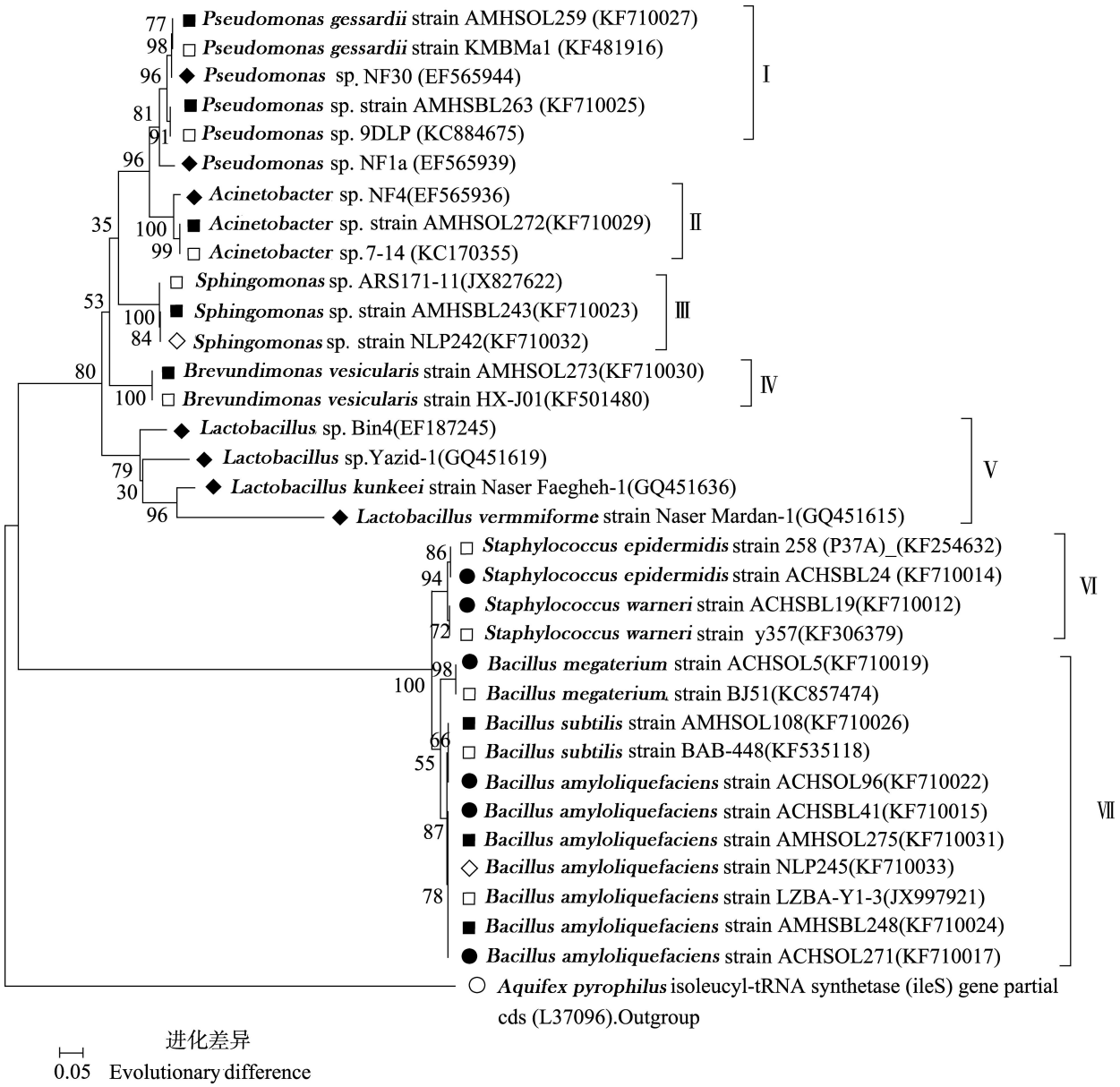

图 2　东、西方蜜蜂蜜囊和花蜜细菌的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic analysis of bacteria in honey stomach of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and nectar

●东方蜜蜂蜜囊细菌；■西方蜜蜂蜜囊细菌；□相似菌株；◆参考菌株；◇花蜜细菌；○外群。

●Honey stomach bacteria of *A. cerana*; ■Honey stomach bacteria of *A. mellifera*; □Similarity strain; ◆Reference strain; ◇Nectar bacteria; ○Out group.

能力有一定的关系。簇Ⅶ中的 *B. subtilis* 和 *B. amyloliquefaciens* 在东、西方蜜蜂出勤蜂蜜囊中存在（图 2 和表 1 所示），说明其有相同的土著细菌。西方蜜蜂在引进后，逐渐适应国内蜜源条件、气候和环境等方面，蜜囊细菌的结构也随之发生改变，尤其是优势细菌与东方蜜蜂的一致性。本研究中并未分离到参考簇Ⅴ（参考菌株采集于马来西亚和瑞典），更进一步说明了地理差异对细菌结构的重要影响。

3　讨论

昆虫与其体内共生菌在长期协同进化过程中，相互依赖、相互影响、协同进化（Baumann *et al.*，1995）。体内共生菌在昆虫营养、解毒、调控生殖及与寄主适应性等方面起着十分重要的作用（徐红星等，2009）。蜜囊位于蜜蜂消化道的前端，其细菌多样性直接影响消化道如肠道细菌的多样性，因此，对蜜囊细菌的研究有利于进一步研究整个消化道对外界病原菌的防御作用。

本试验选择全国蜜蜂春繁基地罗平进行采样，在同一油菜花期内，同时饲养东方蜜蜂和西方蜜蜂蜂群，蜜源及外界条件相对稳定统一，通过试验能较好地对花蜜和东、西方蜜蜂蜜囊细菌进行比较，可以较好地说明蜜囊细菌是来自花蜜或是蜜囊本身的土著菌群。通过分离纯化培养和 16S rDNA 基因序列分析，属和种的序列 99%到 100%的相似性（表 1），高于通常用于定义一个物种阈值 95%～97%水平（Ludwig *et al.*，1998），因此，鉴定结果是可靠的。

本研究结果表明，在东、西方蜜蜂蜜囊和花蜜细菌中，解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 是优势菌。作为好氧、产芽孢的杆状细菌，解淀粉芽孢杆菌大量存在于环境中（Samuel，1996）。解淀粉芽孢杆菌菌株能够产生淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶，降解许多化学成分如油脂、蛋白质和淀粉（Snyder *et al.*，2009）。Hairul Islam 等（2011）报道从喜马拉雅土壤分离出解淀粉芽孢杆菌作为功能性食品或药物的添加剂，其细菌孢子可以作为蜜蜂的饲料添加剂刺激蜜蜂的免疫应答（Evans and Lopez，2004）。此外，解淀粉芽孢杆菌表现出很强的抗菌活性（Meng *et al.*，2012），其产生的抗菌化合物环状脂肽和伊枯草菌素表明，解淀粉芽孢杆菌是一种较好的生物防治制剂（Arguelles-Arias *et al.*，2009）。Yoshiyama 和 Kimura（2009）研究表明在日本蜜蜂肠道中许多拮抗细菌属于芽孢杆菌属。Benitez 等（2012）研究表明，解淀粉芽孢杆菌能产生抗菌因子伊枯草菌素肽抑制 *Paenibacillus larvae*。西方蜜蜂采集能力优于东方蜜蜂，在饲养管理方面可以进行新型饲料添加剂的开发利用，因此，在蜂粮中添加解淀粉芽孢杆菌，可增强对疾病的防御能力。

东方蜜蜂蜜囊细菌的种类相对西方蜜蜂少，是因为东方蜜蜂产生丰富的抗菌肽多样性对外源细菌有抵抗作用，而西方蜜蜂在长期的驯化过程中导致抗菌肽编码基因的多样性减少，从而对外源细菌的抵御能力降低，细菌种类多（Xu *et al.*，2009），这与本试验东、西方蜜蜂蜜囊土著细菌种类差异结果是一致的。正是由于东方蜜蜂对本土环境的适应性，以及比西方蜜蜂在抗病性方面的优势，选择在山区及养蜂条件相对较差的地区饲养东方蜜蜂有其独特的种质资源优势。

基于 16S rDNA 鉴定西方蜜蜂蜜囊细菌，是 Olofsson 和 Vasquez（2008）两位科学家开始在瑞典山区的覆盆子盛花期进行研究的，其鉴定结果是乳酸杆菌属和双歧杆菌属。本试验是在国内油菜花期进行，在东、西方蜜蜂蜜囊中未分离到这两个属的细菌，表明蜜蜂蜜囊细菌与地理差异和不同蜜源植物类型有关。Disayathanoowat 等（2012）报道，蜜囊细菌群落结构在一定程度上与地理位置、蜜源植物、蜜蜂种类和生命阶段密切相关。

西方蜜蜂出勤蜂蜜囊中除了 *Pseudomonas* sp.在采集蜂蜜囊中分离出，但并不同种，其余均未分离到；而采集蜂蜜囊的 *Sphingomonas* sp.与花蜜中的菌是一致的，说明西方蜜蜂更倾向于采集大蜜源的生物学特性（Qin *et al.*，2012）。

东方蜜蜂出勤蜂蜜囊中的 *B. subtilis* 和 *B. megaterium* 在采集蜂蜜囊中未分离到，而西方蜜

蜂出勤蜂蜜囊中的 *B. subtilis*、*P. gessardii*、*B. vesiculari* 和 *Acinetobacter* sp.在采集蜂蜜囊中未分离到，如前所述，由于采集后花蜜液体的大量稀释作用，以及花蜜中渗透压、溶氧浓度、pH 值等因素的影响和抑制。这一现象在 Tan 等（2009）的试验中也被证实：花蜜对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌有较强的抑制作用。另外，这些细菌相对菌数较低（图 1）、分离技术以及分离过程的偶然性因素也会导致菌株不能一一对应。

鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp.在西方蜜蜂采集蜂蜜囊和花蜜样品中发现，表明花蜜有污染物，因鞘氨醇单胞菌能降低许多残留于环境中的顽固的化合物（Gabriel *et al.*，2005），是一种环境污染的指示剂；而短波单胞菌 *Brevundimonas* sp.在西方蜜蜂采集蜂蜜囊发现，说明西方蜜蜂在长期的转地过程中，受到运输过程的污染，从而形成独特的土著细菌，因短波单胞菌是重要原油降解菌，可以有效降解油污（梁静儿等，2010）。

本试验从蜜囊分离的细菌：簇III *Sphingomonas*、簇IV *Brevundimonas*、簇VI *Staphylococcus* 和簇VII *Bacillus* 均未在涉及蜜囊的 GenBank 数据库和参考文献中发现，本研究首次将这 4 个属的蜜囊细菌提交到 GenBank 数据库中报道。

尽管本试验在相对稳定的外界条件进行，但并不清楚这两种蜜蜂蜜囊细菌多样性建立是否与蜜蜂消化花蜜、蜜囊本身的营养基质以及拓殖是否稳定相关，这些过程有待进一步研究。另外，其它地区的油菜花期、不同的蜜源、不同蜂种是否对蜜囊细菌多样性有影响？通过不断的完善和改进培养技术、微生物分离鉴定的方法，将会进一步提高我们对蜜囊细菌多样性的认识。

参考文献 (References)

Aizenberg-Gershtein Y, Izhaki I, Halpern M, 2013. Do honeybees shape the bacterial community composition in floral nectar? *PLoS One*, 8(7): e67556. DOI: 10.1371/journal. pone. 0067556.

Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM, Grandi-Hoffman G, 2011. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insect. Soc*., 58 (4): 431–444.

Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P, 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb.Cell. Fact*., DOI: 10. 1186/ 1475-2859-8-63.

Baumann P, Baumann L, Lai CY, Rouhbakhsh D, Moran NA, Clark MA, 1995. Genetics, physiology and revolutionary relationship of the genus *Buchnera* intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol*., 49(10):55–94.

Benitez LB, Velho RV, Motta SA, Segalin J, Brandelli A, 2012. Antimicrobial factor from *Bacillus amyloliquefaciens* inhibits *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Arch. Microbiol.*, 194(3):177–185.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848):283–287.

Disayathanoowat T, Young JP, Helgason T, Chantawannakul P, 2012. T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand. FEMS. *Microbiol. Ecol*., 79(2): 273–281.

Evans JD, Lopez DL, 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol*., 97(3): 752–756.

Gabriel FL, Heidlberger A, Rentsch D, Giger W, Guenther K, Kohler HP, 2005. A novel metabolic pathway for degradation of 4-Nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *J. Biol. Chem*., 280(16): 15526–15533.

Genersch E, Ashiralieva A, Fries I, 2005. Strain- and genotypespecific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp.larvae, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol*., 71(11): 7551–7555.

Hairul Islam VI, Prakash BN, Pandikumar P, Ignacimuthu S, 2011. Isolation and characterization of putative probiotic bacterial strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan soil based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 3(3/4): 175–185.

Loncaric I, Ruppitsch W, Licek E, Moosbeckhofer R, Busse HJ, Rosengarten R, 2011. Characterization of selected Gram-negative non-fermenting bacteria isolated from honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, 42(3): 312–325.

Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner M, Schleifer KH, 1998. Bacterial

phylogeny based on comparative sequence analysis (review). *Electrophoresis*, 19(4): 554–568.

Meng QX, Jiang HH, Hanson LE, Hao JJ , 2012. Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application. *J. Appl. Microbiol*., 113(5): 1165–1175.

Naef R, Jaquier A, Velluz A, Bachofen B, 2004. From the linden flower to linden honey-volatile constituents of linden nectar, the extract of bee-stomach and ripe honey. *Chem. Biodivers*., 1(12): 1870–1879.

Oertel E, Fieger EA, William VR, Andrews EA, 1951. Inversion of cane sugar in the honey stomach of the bee. *J. Econ. Entomol*., 44(4): 487–492.

Olofsson TC, Vasquez A, 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol*., 57(4): 356–363.

Olofsson TC, Vasquez A, 2009. Phylogenetic comparison of bacteria isolated from the honey stomachs of honey bees *Apis mellifera* and bumble bees *Bombus* spp. *J. Apicult. Res*., 48(4): 233–237.

Qin QH, He XJ, Tian LQ, Zhang SW, Zeng ZJ, 2012. Comparison of learning and memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A*, 198(10): 777–786.

Samuel B, 1996. Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston. Galveston (TX), Chapter 15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/.

Snyder A, 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* Strain. U. S. P. A. Publication. US 2011/0230345 A1.

Tajabadi N, Mardan M, Abdul MMY, Shuhaimi M, Meimandipour A, Nateghi L, 2011. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, 42(5): 642–649.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*., 28(10): 2731–2739.

Tan HT, Rahman RA, Gan SH, Halim AS, Hassan SA, Sulaiman SA, Kirnpal-Kaur B, 2009. The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC. Complem. Altern. M*, DOI: 10.1186/1472-6882-9-34.

Vasquez A, Olofsson TC, 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apicult. Res*., 48(3): 189–195.

Xu P, Shi M, Chen XX, 2009. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 4(1):e4239. DOI: 10.1371/journal.pone.0004239.

Yoshiyama M, Kimura K, 2009. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of *American foulbrood*. *J. Invertebr. Pathol*., 102(2): 91–96.

梁静儿, 李宇, 叶倩, 李太武, 苏秀榕, 2010. 原油降解微生物的 16S rDNA 序列研究. 海洋环境科学, 29(4): 513–515. [Liang JE, Li Y, Ye Q, Li TW, Su XR, 2010. 16S rDNA sequence study for crude oil degraded by micro-organisms. *Marine Environmental Science*, 29(4): 513-515.]

徐红星, 郑许松, 刘淑平, 叶恭银, 吕仲贤, 2009. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. 昆虫知识, 46(3): 350–354. [Xu HX, Zheng XS, Liu SP, Ye GY, Lv ZX, 2009. The role of endosymbionts in insect host resistance against adverse factors. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(3): 350-354.]