

蜜蜂肠道菌群的培养方法及特性研究进展*

董志祥^{1**} 李还原¹ 陈奕霏¹ 张麒麟¹ 李继莲^{2***} 郭 军^{1***}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500 ;

2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 农业部授粉昆虫生物学重点实验室, 北京 100093)

摘 要 肠道菌群在蜜蜂的消化、营养和抗病性等方面发挥了很多潜在的益生作用。为了加深对以蜜蜂为主的传粉昆虫肠道菌群的了解, 本文综述了蜜蜂肠道菌群的人工厌氧培养方法及特性, 重点综述了 *Snodgrassella* 属、*Gilliamella* 属、*Frischella* 属、*Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属和 Alpha-1, Alpha-2 厌氧细菌类群。旨在通过特定的培养方法获取纯培养的细菌, 以供进一步研究特定肠道菌群与特定功能的直接联系。希望这些培养技术能帮助大家提升对蜜蜂肠道共生菌在蜜蜂营养和健康方面所起的作用有所了解。

关键词 蜜蜂, 肠道菌群, 厌氧培养

Advances in research on honey bee gut microbiota, including anaerobic culturing methods

DONG Zhi-Xiang^{1**} LI Huan-Yuan¹ CHEN Yi-Fei¹
ZHANG Qi-Lin¹ LI Ji-Lian^{2***} GUO Jun^{1***}

(1. College of Life Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2. Institute of Apiculture, Chinese Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

Abstract Gut microbiota have many potential beneficial effects on the digestion, nutrition, resistance and health, of bees. To better understand the gut microbiota of pollinators, this paper summarizes artificial cultivation methods for, and biological characteristics of, honey bee gut microbiota, including the bacterial genera *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Frischella*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacterium*, as well as two anaerobic bacterial compositions, alpha-1 and alpha-2. This knowledge will help isolate bacterial species for further research on their specific function in the honey bee, an approach that will facilitate better understanding of the role played by gut microbiota in bee nutrition and health.

Key words honeybee, gut microbiota, anaerobic cultivation

蜜蜂是全球最重要的传粉昆虫之一, 自 2006 年爆发引起蜜蜂大量死亡的 CCD (Colony Collapse Disorder, 蜂群衰竭失调) 现象以来, 美洲、欧洲等国蜂群损失严重 (Cox-Foster *et al.*, 2007), 蜜蜂的健康问题也开始成为各国政府和科学家关注的热点 (Cox-Foster *et al.*, 2007)。研究调查表明, CCD 现象产生的重要原因之一是蜜蜂肠道病原微生物的流行。蜜蜂的肠道是其

消化、食物加工、营养吸收和供给的主要部位, 也是各种病原菌 (De Graaf *et al.*, 2013) 如微孢子虫 *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 2013) 及大部分的蜜蜂病毒 (Miranda *et al.*, 2013) 的感染位点。但是值得庆幸的是, 蜜蜂肠道中的有益菌群能间接提高寄主的免疫能力, 或者通过种间竞争抑制病原微生物的发展。总之, 当前已有研究表明肠道共生菌在蜜蜂个体和群体的消化、抵抗

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31660695)

**第一作者 First author, E-mail: 15771396135@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: guojun0591@126.com; lijilian@caas.cn

收稿日期 Received: 2018-04-21, 接受日期 Accepted: 2018-06-12

疾病感染、营养和常规健康上均起到重要的作用 (Koch and Schmid-Hempel, 2011b)。

肠道菌群在营养供给、消化及吸收上起到了至关重要的作用, 并通过这种方式影响宿主的发育和健康 (Hosokawa *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2007)。研究表明肠道共生菌可为宿主提供氨基酸 (Nikoh *et al.*, 2011)、维生素 B (Eichler and Schaub, 2002) 以及固醇等营养物质, 并参与物质代谢作用及合成作用 (Douglas, 1993)。利用宏基因组分析方法, 研究人员预测了蜜蜂八大类肠道共生菌之一的 Alpha-1 含有维生素 B₁₂ 的合成系统, 可能为蜜蜂合成维生素 (Engel *et al.*, 2012)。蜜蜂共生菌可将花粉转化为蜂粮 (Evans and Lopez, 2004), 蜂粮比花粉含有更多的维生素、更少的多糖以及不同的氨基酸, 这些营养成分的变化很可能是共生的乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 参与转化而成 (Babendreier *et al.*, 2007; Mattila *et al.*, 2012)。进一步的实验也证实了 *Gilliamella*、*Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 等蜜蜂肠道共生菌编码果胶降解酶 (Pectin-degrading enzymes)、糖苷水解酶 (Glycoside hydrolases) 和多糖水解酶 (Polysaccharide lyases), 表明了蜜蜂肠道菌群参与了蜂蜜的酿造和糖类物质的代谢 (Engel *et al.*, 2012, Engel *et al.*, 2013 b)。此外, 很多昆虫都依赖共生菌作为一种专用氮代谢机制来补充机体对氮代谢机制的缺乏, 如白蚁可利用宿主的含氮排泄物, 并将它们回收成高价值的营养物质, 或者直接排到大气中 (Hongoh *et al.*, 2008); 蟑螂、白蚁和一些食草性蚂蚁肠道内栖息着一些内共生菌, 它们可进行氮的回收和一些必需氨基酸的生物合成 (Sabree *et al.*, 2012)。肠道菌群还具有潜在的食物解毒功能 (Hehemann *et al.*, 2010)。

传统的微生物学研究主要基于微生物个体、菌落等形态学特征、次生代谢产物等描述其代谢、生理学、生化和生态学等特征, 因此严重的依赖对微生物的分离纯化培养。然而在宏观和微环境中的很多微生物在现有实验室条件下无法培养。DNA 测序技术, 尤其是新一代 (第二代)

高通量测序技术的发展为我们探索这些“暗箱”中的菌群提供了极大帮助。基于第二代高通量测序技术 (如 454 焦磷酸测序、Solexa、Illumina 测序), 研究人员发现蜜蜂肠道中占主导地位的细菌有八大类, 部分类别已经鉴定到种, 其中 Gamma-1 (代表种: *Gilliamella apicola*) 和 Gamma-2 (代表种: *Frischella perrara*) 属于 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria), Beta 类群 (代表种: *Snodgrassella alvi*) 属于 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria), Alpha-1 和 Alpha-2 属于 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria), Firm-4 和 Firm-5 属于乳酸菌目 (Lactobacillales), Bifido 类群属于放线菌属 (*Actinomycetes*), 并在全球的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中得到证实 (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Mohr and Tebbe, 2006; Babendreier *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011, 2012; Cornman *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Moran *et al.*, 2012; Sabree *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012), 在亚洲的一些无刺蜂 (Ahn *et al.*, 2012) 及熊蜂属 (*Bombus*) 的很多种 (Koch and Schmid-Hempel, 2011a; Koch *et al.*, 2012; 徐龙龙等, 2014; Li *et al.*, 2015a), 一些先前认为的种也被重新定义, 甚至上升到了近缘属的分类学水平。最近的测序方法表明蜜蜂肠道中容易培养、完全好氧的细菌只占其肠道微生物中的很少一部分, 这与传统培养方法所得的研究结果完全不一致。

随着 DNA 测序技术的发展, 科研人员识别微生物类群的信息范围在不断扩大, 也使我们对肠道微生物有了更深入的认识。但一些特定的技术, 如 DNA 提取、PCR 技术和微生物群落的分析方法由于技术更新速度慢, 很可能在一段时间内保持现状。随着对蜜蜂肠道菌群多样性信息的不断积累, 研究的重点将逐步过渡到细菌功能尤其是菌株水平的细菌功能的研究, 因此, 单菌株的分离培养显得尤为重要。利用传统的培养手段已经成功获得蜜蜂肠道中的优势菌或新发现种 (Olofsson and Vásquez, 2008; Vásquez *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2013b; Kwong and Moran, 2013; Kwong *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015b; Praet

et al., 2015 ; *Filannino et al.*, 2016) 。培养的策略与非培养条件下的分子检测相结合, 将会加快推进蜜蜂肠道菌群的相关研究。

本文对当前的蜜蜂肠道优势细菌培养的研究现状进行简要总结, 介绍了蜜蜂肠道细菌培养研究的具体方法和步骤, 并对蜜蜂肠道共生菌的研究进行了展望, 以期帮助进一步了解和认识蜜蜂肠道菌群的重要功能角色, 促进蜜蜂的保护和病虫害的防控。

1 蜜蜂肠道菌群人工培养的研究历史

蜜蜂肠道微生物群落的研究最早可追溯到 20 世纪早期。研究人员对来自蜜蜂肠道和蜂巢的生物体进行培养, 记录了这些细菌的各种代谢和功能活动 (*Gilliam and Prest*, 1972, 1987 ; *Gilliam and Valentine*, 1974 ; *Gilliam and Morton*, 1978 ; *Evans and Armstrong*, 2006) 。利用传统纯培养的方法, 研究者从蜜蜂肠道中观察到 6 000 多种细菌菌株 (*Engel et al.*, 2013a) , 然而, 很多观察到的结果与前人的发现存在不一致。此外, 早期对蜜蜂肠道微生物的研究主要集中在对西方蜜蜂巢脾中致病菌的鉴定上, 而共生微生物很少受到重视。研究表明, 从特定环境中培养的微生物只是实际栖息在这一环境中的很小一部分, 通常在特定的栖息环境下只有 1% 的细菌可以培养 (*Rappé and Giovannoni*, 2003) , 在特殊的培养基和环境条件下, 较多的有机体可能生长, 但从环境中采集的微生物样品绝大部分都无法在实验室中进行培养 (*Stevenson et al.*, 2004) , 或尚未找到最优化的培养条件, 直到 DNA 测序技术的出现才解决了一些问题。

最近研究发现, 蜜蜂肠道细菌主要分为八大类, 并且大部分都是厌氧或兼性厌氧菌, 这也是最新研究方法所得结论与传统有氧纯培养方法不一致的主要原因。人工培养的方法可能使科研人员感兴趣的微生物分离成为可能, 并进一步描述其化学及形态特征, 并进一步开展相关实验。

2 蜜蜂肠道菌群的人工培养方法及生理特性

人工培养蜜蜂肠道细菌的一般流程是: 采取无菌措施从蜜蜂肠道中取样, 放入优化过的最佳培养基中培养, 随后将培养皿放置在 35-37 °C 的培养箱中培养。蜜蜂肠道中的大部分细菌需要厌氧或低氧环境才能较好的生长, 通常将培养皿放置在专用的 CO₂ 培养箱、密封的皮质袋中或产 CO₂ 的罐子装置中以满足这种生长条件。需要在缺氧环境下生长的细菌可以在置换氮气的厌氧培养箱中进行培养, 或者在密封的皮质袋中或一些已经商业销售的厌氧培养装置中进行 (*Engel et al.*, 2013b) 。

对细菌的鉴定应结合 DNA 条形码的方法而不是完全依赖表型观察, 因为同一个种的细菌菌株的菌落形态和生化特性可能存在异质性。需要注意的是细菌培养受所选择的培养条件的影响, 下文列出了蜜蜂肠道优势细菌的培养条件, 但是这种培养条件或技术可能并不能获取到每个组群内所有细菌的多样性。

2.1 蜜蜂肠道的解剖

实验前, 用 75% 酒精对试验台进行消毒。使用 1% 的氯水溶液 (二氯异氰尿酸钠或过氯酸钠) 擦拭, 使蜜蜂体表微生物及其核酸得以清除。每只蜜蜂浸泡 2-7 min 后, 用无菌纯净水冲洗 3 次。可以在振动台上用 24 孔板完成这一操作。由于氯的存在会降解 DNA 从而抑制 PCR 反应, 因此应在解剖前清洗掉所有的氯 (*Engel et al.*, 2013b) 。

在通 N₂ 的厌氧培养箱中解剖蜜蜂, 用灭菌镊子拉出整个蜜蜂肠道组织 (包括蜜囊、前、中、后肠) 并放入 1.5 mL 的无菌离心管中。在解剖下一只蜜蜂前, 用卫生纸擦去镊子 (建议使用无齿痕的镊子) 上残留的肠道组织, 再用酒精冲洗, 最后在酒精灯上对镊子进行高温灭菌。若需培养不同肠道部位的细菌, 则需用无菌剪刀先将不同部位剪断分离至不同的小管中, 再进行下一步操作。

2.2 蜜蜂肠道细菌的分离操作步骤

蜜蜂肠道组织解剖后, 加入适量无菌 Krebs-Ringer 溶液, 在漩涡振荡器上用灭菌的研磨棒充分研磨肠道。然后将研磨液用无菌厌氧的生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 取 10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 3 个梯度的稀释液 (100-150 μL) 涂布于不同培养基的培养皿上 (也可放入液体培养基中)。将涂布后的平板分别放至 35-37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养箱 (含氧量 $\leq 1\%$) 中培养 48-72 h。每个培养基和梯度设 3 次重复, 对表征不同的菌落进行厌氧挑菌, 之后采取上述方法继续厌氧纯化培养。

2.3 蜜蜂肠道细菌的分子标记鉴定

提取 DNA 是鉴定微生物群落的第一步。不论何种细菌 DNA 提取方法, 都包括破坏细菌孢子和一些顽固细菌的细胞壁 (Marmur, 1961)。科研人员建议采用 bead-beating 法, 该方法可以对厚壁细菌细胞壁形成有效破碎, 使得胞内 DNA 更容易暴露出来, 也是蜂类相关的肠道菌群高通量测序时最佳的 DNA 提取方法 (Engel *et al.*, 2013a; Mattila *et al.*, 2012; Mcfredericket *et al.*, 2012)。用牙签挑取培养的细菌单菌落 (若是液体培养基则吸取部分菌液), 按照操作步骤提取 DNA, 然后对 16S rRNA 基因序列进行测序分析。

微生物多样性调查和分类鉴定主要是基于 16S rRNA (细菌和古细菌) 的分子生物学方法。这种分子存在于所有细胞中, 在特定物种或分类群都是极其保守的, 其序列信息可以与公共数据库中已知的物种序列进行比较, 从而进行物种分类鉴定 (Mcdonald *et al.*, 2012)。

2.4 蜜蜂肠道中优势细菌及其培养条件

2.4.1 *Snodgrassella* 属

2.4.1.1 最佳生长条件 ① 5% 的 CO_2 ; ② 温度为 35-37 $^{\circ}\text{C}$; ③ 培养基: 胰酪胨大豆琼脂培养基, 胰酪胨大豆琼脂培养基 + 5% 去血纤维蛋白羊血, 心浸液琼脂培养基, 脑心浸液琼脂, 以及 LB 琼脂; 在胰酪胨大豆肉汤培养基中生长较弱。

2.4.1.2 细菌特征 菌落光滑, 白色, 圆形, 直径

约 1 mm, 在 2 d 内形成。革兰氏阴性, 非运动, 杆状。*Snodgrassella* 属细菌可以利用苹果酸或柠檬酸为主要碳源; 对过氧化氢酶和硝酸还原酶呈阳性, 对氧化酶呈阴性 (Engel *et al.*, 2013b)。

该属中唯一被描述的种为 *S. alvi*, 隶属于奈瑟菌科和 β -变形菌纲 (Martinson *et al.*, 2012; Kwong and Moran, 2013)。*S. alvi* 最初被称为 “Beta” 类群或隶属于 β -变形菌纲 (Babendreier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012)。*S. alvi* 菌株已经从蜜蜂和熊蜂肠道内分离到, 典型的菌株为 *S. alvi* wkB2T (Kwong and Moran, 2013)。这一类型的菌株可以从细菌培养保藏中心获得 (登记号: BAA-2449T, 美国标准菌库, Manassas, VA, USA (ATTC) 或 14803T, 英国国家工业食品和海洋细菌汇编, 阿伯丁 NCIMB)。*Snodgrassella* 属细菌占蜜蜂工蜂个体肠道细菌总数的 0.6%-39% (Moran *et al.*, 2012)。

2.4.2 *Gilliamella* 属

2.4.2.1 最佳生长条件 ① 5% 的 CO_2 ; ② 温度为 35-37 $^{\circ}\text{C}$; ③ 培养基: 胰酪胨大豆琼脂培养基或胰酪胨大豆肉汤, 胰酪胨大豆琼脂培养基 + 5% 去血纤维蛋白羊血, 心浸液琼脂培养基, 脑心浸液琼脂, 以及 LB 琼脂 (Kwong and Moran, 2013)。

2.4.2.2 细菌特征 菌落光滑, 形态多变, 白色, 圆形, 直径约 2.5 mm, 在 2 d 内形成。革兰氏阴性, 杆状, 非运动, 并可能形成细丝链。*Gilliamella* 属细菌对过氧化氢酶、硝酸还原酶以及氧化酶呈阴性 (Kwong and Moran, 2013)。

该属中唯一被描述的种为 *G. apicola*, 隶属于 Orbaceae 科和 γ -变形菌纲 (Martinson *et al.*, 2012; Kwong and Moran, 2013)。*G. apicola* 最初被称为 “Gamma-1” 类群 (Babendreier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012), 2012 年由 Moran 等重新命名。*G. apicola* 是蜜蜂肠道细菌中的新属, 该菌株已经从蜜蜂和熊蜂肠道内分离到, 模式菌株为 *G. apicola* wkB1T (Kwong and Moran, 2013)。该菌株可以从细菌培养保藏中心得到 [BAA-2448T, (ATTC) 或 14804T (NCIMB)]。*Gilliamella* 属细菌占蜜蜂

工蜂个体肠道细菌总数的 0.6%-30% (Moran *et al.*, 2012)。

Koch 和 Schmid-Hempel (2012) 及 Li 等 (2012) 检测并分别归到巴斯德氏菌科 (Pasteurellaceae) 和肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的这两个种也已证实为 Gamma-1。该细菌的菌株最适宜生长在微氧环境中, 且在标准大气压下不易生长。*G. apicola* 菌株的 16S rRNA 与亲缘关系最近的 *Orbus hercynius* CN3T 有 93.9% 的相似性, 还与一些与昆虫相关的未被培养的细菌序列关系较近, 系统发育进化关系表明 *G. apicola* 是肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的姊妹枝 (Kwong and Moran, 2013)。

2.4.3 *Frischella* 属

2.4.3.1 最佳生长条件 ① 5% 的 CO₂ 或厌氧; ② 温度为 35-37 °C; ③ 培养基: 胰酪胨大豆琼脂培养基 + 5% 去血纤维蛋白羊血, 心浸液琼脂培养基, 脑心浸液琼脂, 以及胰酪胨大豆肉汤 (Engel *et al.*, 2013b)。

2.4.3.2 细菌特征 *Frischella* 属是兼性厌氧细菌, 但在完全厌氧的条件下不能生长 (Engel *et al.*, 2013b)。菌落形态为杆状, 可能形成细丝链; 菌落呈半透明状, 平坦, 光滑, 直径约 1 mm, 并在 3 d 内形成。*Frischella* 属细菌能够通过发酵果糖、葡萄糖或甘露糖来获得碳源。它们对过氧化氢酶呈阳性, 对硝酸还原酶及氧化酶呈阴性。*Frischella* 属细菌在大多数工蜂肠道内普遍存在 (Moran *et al.*, 2012)。

该属中被记录的种为 *F. perrara* (Strain PEB0191), 最初被称为 “Gamma-2” 类群 (Babendreier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012), 2013 年被重新命名 (Engel *et al.*, 2013b), 隶属于 Orbaceae 科和 γ -变形菌纲。与 *Gilliamella* 属同科, 同 *Orbus* 属的亲缘关系最近。*F. perrara* 菌株已从西方蜜蜂肠道内分离到, 但在欧洲的熊蜂中并未检测到 (Koch and Schmid-Hempel, 2011a), 而在中国的熊蜂肠道菌群中则检测到了该种的存在 (Li *et al.*, 2015a)。该种的模式菌株为 PEB0191T, 该菌株可以从细菌培养保藏中心得到 (登记号: BAA-2450T,

ATCC, 或 14821T, NCIMB)。

2.4.4 *Lactobacillus* 属

2.4.4.1 最佳生长条件 ① 培养环境为需氧或厌氧; ② 温度为 35-37 °C; ③ 培养基: 胰酪胨大豆肉汤 (Oxoid; Basingstoke, Hampshire, UK), 琼脂 (Rogosa agar, Merck), 西红柿汁琼脂培养基 (Oxoid; Basingstoke, Hampshire, UK), 乳酸细菌培养基 (MRS), 液体培养基 (Lactobacillus Carrying Media) (Efthymiou and Hansen, 1962), MRS 肉汤补充 0.5% 的半胱氨酸或 20% 的果糖 (Olofsson and Vásquez, 2008; Forsgren *et al.*, 2010)。

2.4.4.2 细菌特征 *Lactobacillus* 属细菌细胞形态变化多样, 从长细杆状到短球杆状变化, 但都为典型的凸起状, 菌落光滑, 无色不透明 (Hammes and Hertel, 2006)。蜜蜂相关的 *Lactobacillus* 对过氧化氢酶和孢子形成呈阴性, 革兰氏染色阳性, 通过同型发酵产生乳酸 (Olofsson and Vásquez, 2008)。*Lactobacillus kunkeei* 分支比较嗜果糖, 可优先利用果糖而不是葡萄糖作为碳源 (Neveling *et al.*, 2012)。*Lactobacillus* 属细菌的很多种在自然界中普遍存在, 并能在大多数动物、植物和食品中存在。乳酸杆菌 (*Lactobacilli*) 被广泛用作益生菌 (Kleerebezem and Vaughan, 2009)。与蜜蜂相关的 *Lactobacillus* 主要为 “Firm-4” 和 “Firm-5” (Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012)。其进化分支与其它 *Lactobacillus* 距离较远, 它们的 16S rRNA 基因约有 90% 的一致 (Olofsson and Vásquez, 2008), 因此最后可能归于一类新种。

其它一些种, 如 *L. kunkeei* 可能是人工培养实验中最常见的 *Lactobacillus* 成员 (Tajabadi *et al.*, 2011; Neveling *et al.*, 2012)。然而, 基于分子生物学技术发现 “Firm-4” 和 “Firm-5” 是蜜蜂肠道中的优势乳酸菌而并非是 *L. kunkeei* (Moran *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2012)。*L. kunkeei* 已经在花中 (Neveling *et al.*, 2012) 和红酒 (Edwards *et al.*, 1998) 中发现, 这表明它们可以在蜜蜂肠道外的自然环境中独立存在 (McFrederick *et al.*, 2012)。*Lactobacillus* 是蜜蜂肠道中最丰

富的细菌群落,在单个工蜂肠道中其丰度预计在20%-99% (Moran *et al.*, 2012)。

乳酸菌是重要的益生菌之一,它们的存在有利于宿主的健康,并在自然界广泛存在,与许多动植物和食物都有联系 (Kleerebezem and Vaughan, 2009)。这个属的细菌常与双歧杆菌属细菌一起形成蜜蜂体内的益生菌群 (Forsgren *et al.*, 2010; Killer *et al.*, 2010; Vásquez *et al.*, 2012)。代谢通路显示乳酸菌具有将各种碳水化合物(如乳糖、甘露糖、果糖、山梨糖、木酮糖、蔗糖、海藻糖、N-乙酰葡萄糖胺)发酵成乳酸的功能,其组编码有大量的胞外蛋白,也很可能有助于几丁质的降解 (Sánchez *et al.*, 2011)。

2.4.5 *Bifidobacterium* 属

2.4.5.1 最佳生长条件 ① 培养环境为需氧或厌氧;② 温度为 37 °C;③ 培养基:血琼脂培养基 (Oxoid; Basingstoke, Hampshire, UK), 乳酸细菌培养基 (MRS), 液体培养基 (Efthymiou and Hansen, 1962), MRS 肉汤补充 0.5% 的半胱氨酸或 20% 的果糖 (Olofsson and Vásquez, 2008; Forsgren *et al.*, 2010)。

2.4.5.2 细菌特征 *Bifidobacterium* (双歧杆菌属) 隶属于放线菌亚纲 (Actinobacteridae), 双歧杆菌在一些社会性昆虫中比较普遍 (Bunesova *et al.*, 2014), 是有益于蜜蜂和熊蜂种群健康的重要益生菌 (Forsgren *et al.*, 2010; Killer *et al.*, 2010; Vásquez *et al.*, 2012)。双歧杆菌属包括 48 个种和亚种,随着新种的发现,这一数字还有望继续增加。它们的大量存在与宿主的健康密切相关。*B. asteroides*, *B. coryneforme* 和 *B. indicum* 是蜜蜂中特有的双歧杆菌 (Dellaglio *et al.*, 2007; Bottacini *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2013), 其中 *B. asteroides* 的基因组序列已经测出 (Biavati *et al.*, 1982)。通过对来自不同消化道环境和生活阶段中培养的两株双歧杆菌全基因组测序结果表明双歧杆菌具有较强的处理碳水化合物的功能 (Anderson *et al.*, 2013)。

Bifidobacterium 属细菌是典型的厌氧菌和微量需氧菌;然而研究发现蜜蜂肠道菌中的

Bifidobacterium 细菌成员可以在有氧环境中生长 (Biavati *et al.*, 1982)。菌落在 2 d 内形成,点状,凸面,光滑,颜色呈灰白色 (Bottacini *et al.*, 2012)。蜜蜂肠道内的 *Bifidobacterium* 对过氧化氢酶和孢子形成呈阴性,革兰氏阳性,可产生乳酸和乙酸 (Olofsson and Vásquez, 2008), 和乳酸杆菌 *Lactobacilli* 类似,双歧杆菌 *Bifidobacteria* 是动物肠道菌群中常见的细菌类群,已经被用作益生菌 (Kleerebezem and Vaughan, 2009)。

Bifidobacterium 属细菌的模式菌株来自 ATCC: *B. asteroides* 25910T, *B. coryneforme* 25911T, and *B. indicum* 25912T。*Bifidobacterium* 存在于大多数成年工蜂肠道中,据估计, *Bifidobacterium* 细菌约占蜜蜂肠道细菌的 15% (Moran *et al.*, 2012)。

2.4.6 Alpha-1 和 Alpha-2 细菌

2.4.6.1 最佳生长条件 ① 5% 的 CO₂;② 温度为 35-37 °C;③ 培养基:胰酪胨大豆琼脂培养基,胰酪胨大豆琼脂培养基+5%去血纤维蛋白羊血,心浸液琼脂培养基。

2.4.6.2 细菌特征 Alpha-1 类群细菌属于 α -变形菌纲,醋酸菌科。菌落光滑,圆形,1 d 后形成白色的菌落,并与一些蚂蚁相关的细菌亲缘关系较近 (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Babendreier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011)。

醋酸菌科的共生细菌物种丰富多样,它们在昆虫肠道总中比较常见,也能从唾液腺和生殖组织中分离得到,可为昆虫宿主提供营养,可促进昆虫宿主组织器官的发育,还可调控免疫系统的发育和平衡 (Corby-Harris *et al.*, 2014)。醋酸菌科的细菌在蜜蜂肠道内主要为 Alpha-1 和 Alpha-2。Alpha-1 类群属于巴尔通氏体属 (*Bartonella*), 在西方蜜蜂肠道中普遍存在,但其含量较低 (< 4%)。Alpha-2 类群的 16S rRNA 序列与醋杆菌属 (*Acetobacter*) 和葡萄糖杆菌属 (*Gluconobacter*) 的一些细菌序列相似 (Corby-Harris *et al.*, 2014); Alpha-2 又分为 Alpha-2.1 和 Alpha-2.2。Alpha 2.2 分离自蜜蜂肠道,基于 16S rRNA 序列分析显示其与 *Saccharibacter* sp. 进化关系较近 (Martinson *et al.*, 2011)。

Corby-Harris 等 (2014) 发现 Alpha 2.2 和其它一些细菌一样, 如 *Lactobacillus kunkeei*, 可栖息于哺育蜂蜜囊、咽下腺以及王浆中, 但在蜜蜂中肠和后肠中几乎不存在 (Corby-Harris *et al.*, 2014)。Alpha 2.2 存在于蜂粮、采集蜂的蜜囊里以及幼虫体内, 但在哺育蜂和采集蜂的中肠和后肠中的含量微乎其微, 可能与蜜蜂对花粉的消化有关 (Anderson *et al.*, 2013)。系统发育关系表明蜜蜂体内的 Alpha 2.2 这一细菌对蜜蜂具有独特的特性, 通过与上颚腺分泌物一起促进蜂群内的蜂子发育, 此外, Alpha2.2 与 *Saccharibacter* (醋酸菌科下的一种属) 类型并不相同, 而后者经常在年轻工蜂中发现。Alpha 2.2 细菌不属于肠道细菌, 但在蜜囊-上颚腺-王浆-幼虫这一生态位中具有较丰富的含量, 并通过哺育蜂的哺育行为传播给发育中的蜂巢 (卵、幼虫和蛹) (Corby-Harris *et al.*, 2014)。

3 展望

蜜蜂肠道微生物是影响蜜蜂健康的重要因素, 也是研究微生物与宿主共生进化的很好模型 (Philipp *et al.*, 2016), 高通量测序方法的快速发展为科研人员提供了一种新手段来进行大规模的调查, 提高了蜜蜂肠道微生物的研究水平和准确性, 也加深了我们对蜜蜂肠道微生物的认识。

然而, 在基本弄清蜜蜂肠道菌群结构后, 仍然需要通过人工纯培养方法获取单菌株以深入研究肠道菌的功能。人工培养方法可使研究者分离出特定的感兴趣的细菌, 以便进行深入研究或用于基因鉴定, 从而有助于评定特定肠道共生菌的功能。但在研究中发现, 蜜蜂肠道中未被培养的细菌 (Uncultured bacteria) 尽管含量很低, 但其种类较多, 约占蜜蜂肠道细菌种类总数的 32.42% (郭军, 2015), 然而, 这些目前人工尚无法培养的菌群在蜜蜂肠道内是否发挥功能, 还需要进一步研究。随着人工培养技术的发展, 科研人员通过优化培养条件和改善培养基营养也将培养出更多目前暂时无法培养的细菌和未知

细菌。目前, 综合利用多重培养条件、MALDI-TOF (基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱) 及 16s rRNA 测序相结合的微生物培养组学 (Culturomics) 法已经成功的培养出一些“未被培养的细菌” (Lagier *et al.*, 2016)。

我国是世界第一养蜂大国, 也是世界上蜂种资源最丰富的国家, 蜂群总数和蜂产品的产量均居世界首位。我国地理环境的多样化为蜜蜂提供了广阔的栖息地, 生境的多样性催生了蜜蜂的物种多样性, 与其协同进化的肠道微生物, 能够帮助蜜蜂宿主很好地适应不同的生境, 但是其蕴含的丰富基因资源及生物学功能仍然有待深入挖掘。本文总结了蜜蜂优势肠道共生菌的研究方法, 希望对传粉蜂类肠道共生菌的研究提供参考。同时, 通过肠道细菌分离培养的研究, 可为进一步研究和阐述共生菌和病原菌之间的相互作用和深入挖掘蜜蜂肠道菌群的营养功能、益生功能及抗病功能奠定基础。

参考文献 (References)

- Ahn JH, Hong IP, Bok JI, Kim BY, Song J, Weon HY, 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50(5): 735–745.
- Anderson KE, Johansson A, Sheehan TH, Mott BM, Corby-Harris V, Johnstone L, Sprissler R, Fitz W, 2013. Draft genome sequences of two *Bifidobacterium* sp. from the honey bee (*Apis mellifera*). *Gut Pathogens*, 5(1): 42.
- 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.
- Biavati B, Scardovi V, Moore WEC, 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *bifidobacterium* and proposal of four new species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(3): 358–373.
- Bottacini F, Milani C, Turrone F, Sánchez 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.
- Bunesova V, Vlkova E, Rada V, Killer J, Musilova S, 2014.

- Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*, 5(4): 377–388.
- Corby-Harris V, Snyder LA, Schwan MR, Maes P, McFrederick QS, Anderson KE, 2014. Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24): 7460–7472.
- Cornman RS, Tarpy DR, Chen YP, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, van Engelsdorp D, Evans JD, 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 7(8): e43562.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Brieseman T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons F, Egholm M, Pettis J, Lipkin W, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283–287.
- De Graaf DC, Alippi AM, Antúnez K, Aronstein KA, Budge G, De Koker D, De Smet L, Dingman DW, Evans JD, Foster LJ, Fünfhaus A, Garcia-Gonzalez E, Gregore A, Human H, Murray KD, Nguyen BK, Poppinga L, Spivak M, van Engelsdorp D, Wilkins S, Genersch E, 2013. Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1–26.
- Dellaglio F, Felis GE, Tannock GW, 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2): 44–61.
- Douglas AE, 1993. The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecological Entomology*, 18(1): 31–38.
- Edwards CG, Haag KM, Collins MD, Hutson RA, Huang YC, 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5): 698.
- Efthymiou C, Hansen PA, 1962. An antigenic analysis of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Infectious Diseases*, 110(3): 258–267.
- Eichler S, Schaub GA, 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, 100(1): 17–27.
- Engel P, James R, Koga R, Kwong WK, McFrederick QS, Moran NA, 2013a. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52(4): 13–23.
- Engel P, Kwong WK, Moran NA, 2013b. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honey bee, *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.
- Evans JD, Armstrong TN, 2006. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology*, 6(1): 4.
- Evans JD, Lopez DL, 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3): 752–756.
- Filannino P, Di Cagno R, Addante R, Pontonio E, Gobbetti M, 2016. Metabolism of fructophilic lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut: a focus on the phenolic acids as external electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(23): 6899–6911.
- Forsgren E, Olofsson TC, Vásquez A, FRIES I, 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41(1): 99–108.
- Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martin-Hernandez R, Natsopoulos M, Paxton RJ, Tanner G, Webster TC, Williams G, 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(41): 1–4.
- Gilliam M, Morton HL, 1978. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *Apidologie*, 9(3): 213–222.
- Gilliam M, Prest DB, 1972. Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20(1): 101–103.
- Gilliam M, Prest DB, 1987. Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(1): 70–75.
- Gilliam M, Valentine DK, 1974. Enterobacteriaceae isolated from foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 23(1): 38–41.
- Guo J, 2015. Diversity and influencing factors of gut microbiota in honey bees. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences.[郭军, 2015. 蜜蜂肠道菌群多样性及其影响因素研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Hammes WP, Hertel C, 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Berlin Heidelberg: Springer. 320–403.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czierek M, Michel G, 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290): 908–912.
- Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Taylor TD, Kudo T, Sakaki Y, Toyoda A, Hattori M, Ohkuma M, 2008. Complete

- genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14): 5555–5560.
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Fukatsu T, 2007. How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect: bacterium mutualism. *Molecular Ecology*, 16(24): 5316–5325.
- 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.
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T, 2007. Insect-microbe mutualism without vertical transmission—a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13): 4308–4316.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Rada V, Dubna S, Marounek M, 2010. Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. *Anaerobe*, 16(2): 165–170.
- Kleerebezem M, Vaughan EE, 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Review of Microbiology*, 63(1): 269–290.
- Koch H, Cisarovsky G, Schmid-Hempel P, 2012. Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 81(6): 1202–1210.
- Koch H, Schmid-Hempel P, 2011a. Bacterial communities in central European bumblebees: low diversity and high specificity. *Microbial Ecology*, 62(1): 121–133.
- Koch H, Schmid-Hempel P, 2011b. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48): 19288–19292.
- Koch H, Schmid-Hempel P, 2012. Gut microbiota instead of host genotype drive the specificity in the interaction of a natural host–parasite system. *Ecology Letters*, 15(10): 1095–1103.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA, 2014. Genome sequences of *Lactobacillus* sp. Strains wkB8 and wkB10, members of the Firm-5 Clade, from honey bee guts. *Genome Announcements*, 2(6): e01176.
- 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: 2008–2018.
- Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, Caputo A, Cadoret F, Traore SI, Seck EH, Dubourg G, Durand G, Mourembou G, Guilhot E, Togo A, Bellali S, Bachar D, Cassir N, Bittar F, Delerce J, Mailhe M, Ricaboni, Bilen M, Niekro NP, Badiane NMD, Valles C, Mouelhi D, Diop K, Million M, Musso D, Abrahão J, Azhar EI, Bibi F, Yasir M, Diallo A, Sokhna C, Djossou F, Vitton V, Robert C, Rolain JM, Scola BL, Fournier PE, Levasseur A, Raoult D, 2016. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology*, 1(2): 179.
- Li JL, Powell JE, Guo J, Evans JD, Wu J, Williams P, Lin QH, Moran NA, Zhang ZZ, 2015a. Two dominant ecotypes of gut microbiome in Chinese bumble bees. *Current Biology*, 25(15): R635–R653.
- Li JL, Qin HR, Wu J, Sadd BM, Wang XH, Evans JD, Peng WJ, Chen YP, 2012. The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS ONE*, 7(11): e47955.
- Li LL, Praet J, Borremans W, Nunes OC, Manaia CM, Cleenwerck I, Meeus I, Smagghe G, Vuyst LD, Vandamme P, 2015b. *Bombella intestini* gen. nov. sp. nov. an acetic acid bacterium isolated from bumble bee crop. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1): 267–273.
- Marmur JA, 1961. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 3(2): 208.
- Martinson VG, Danforth B, 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 honey bee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8): 2830–2840.
- Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton ILG, 2012. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS ONE*, 7(3): e32962.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P, 2012. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6(3): 610–618.
- McFrederick QS, Wcislo WT, Taylor DR, Ishak HD, Dowd SE, Mueller UG, 2012. Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Molecular Ecology*, 21(7): 1754.

- Miranda JRD, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier L, Genersch E, de Graaf DC, Ribiere M, Ryabov E, De Smet L, van der Steen JJM, 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4): 1–56.
- Mohr KI, Tebbe CC, 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8(2): 258–272.
- Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree Z, 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*, 7(4): e36393.
- Neveling DP, Endo A, Dicks LM, 2012. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Current Microbiology*, 65(5): 507–515.
- Nikoh N, Hosokawa T, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T, 2011. Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment. *Genome Biology and Evolution*, 3: 702–714.
- Olofsson TC, Vásquez A, 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57(4): 356–363.
- Philipp E, Kwong WK, Quinn MF, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Cornman RS, Dainat J, de Miranda JR, Doublet V, Emery O, Evans JD, Farinelli L, Flenniken ML, Granberg F, Grasis JA, Gauthier L, Hayer J, Koch H, Kocher S, Martinson VG, Moran N, Munoz-Torres M, Newton I, Paxton RJ, Powell E, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Song SJ, Schwarz RS, vanEngelsdorp D, Dainat B, 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *Mbio*, 7(2): e02164.
- Praet J, Meeus I, Cnockaert M, Aerts M, Smagghe G, Vandamme P, 2015. *Bifidobacterium commune* sp. nov. isolated from the bumble bee gut. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(5): 1307–1313.
- Rappé MS, Giovannoni SJ, 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57(1): 369–394.
- Sabree ZL, Huang CY, Arakawa G, Tokuda Gaku, Lo N, Watanabe H, Moran NA, 2012. Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1): 204–210.
- Sánchez B, González-Tejedo C, Ruas-Madiedo P, Urdaci MC, Margolles A, 2011. *Lactobacillus plantarum* extracellular chitin-binding protein and its role in the interaction between chitin, Caco-2 cells, and mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3): 1123–1126.
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA, 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4748–4755.
- Tajabadi N, Mardan M, Manap MYA, 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.
- Thong OA, Suzuki K, Noda S, Inoue JI, Kajiura S, Ohkuma M, 2012. Isolation and characterization of anaerobic bacteria for symbiotic recycling of uric acid nitrogen in the gut of various termites. *Microbes and Environments*, 27(2): 186–192.
- Tian B, Fadhil NH, Powell JE, Kwong WK, Moran NA, 2012. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *MBio*, 3(6): e00377.
- Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton R, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC, 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7(3): e33188.
- Xu LL, Wu J, Guo J, Li JL, 2014. Dynamic variation of symbionts in bumblebees during hosts growth and development. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(10): 2030–2037. [徐龙龙, 吴杰, 郭军, 李继莲, 2014. 共生菌群在熊蜂生长发育过程中的动态变化. 中国农业科学, 47(10): 2030–2037.]