•研究报告•

用于蜜蜂和熊蜂肠道微生物分类的 细菌16S rRNA数据库优化

张 雪¹ 李兴安² 苏秦之¹ 曹棋钠¹ 李晨伊¹ 牛庆生^{2*} 郑 浩^{1*}¹ (北京市食品营养与人类健康高精尖创新中心, 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)² (吉林省养蜂科学研究所蜜蜂遗传育种重点实验室, 吉林省吉林市 132108)

摘要: 蜜蜂和熊蜂是重要的传粉昆虫, 对农业生产及生态平衡的维持具有重要作用。近年来, 研究发现蜜蜂及熊蜂肠道内含有大量微生物, 其组成简单、特异。正常的肠道微生物群落对蜜蜂的生长、激素调节、致病菌抵抗等具有重要作用。随着高通量测序的发展, 研究者们也可快速获得传粉蜂肠道微生物组成, 这给生物多样性和物种保护及蜂类健康等的研究带来了便捷。但是由于蜜蜂和熊蜂肠道微生物群落均由特殊菌种组成, 目前的细菌16S rRNA数据库无法对其进行准确的分类, 并且部分东方蜜蜂(*Apis cerana*)特有的肠道微生物菌种缺乏16S rRNA序列信息。本文从来源于5个不同省份的东方蜜蜂肠道中分离得到在东方蜜蜂中普遍含有的*Apibacter*菌属纯菌, 获取其全长16S rRNA序列, 并对目前蜜蜂和熊蜂肠道的5个核心菌种的分类进行了综述, 对其分类和命名进行了修正。根据蜜蜂肠道微生物的明确分类, 在目前常用的SILVA细菌分类数据库基础之上对其进行了命名及分类优化, 并加入东方蜜蜂中普遍含有的*Apibacter*序列, 从而获得了优化数据库Bee Gut Microbiota-Database (BGM-Db)。通过1组东方蜜蜂及1组西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的肠道菌群高通量测序结果, 分析不同数据库的表现, 我们发现相比于SILVA和Ribosomal Database Project (RDP), BGM-Db对蜜蜂肠道16S rRNA高通量测序短序列实现了菌种级别的分类, 分辨率更高。

关键词: 蜜蜂; 肠道微生物; 高通量测序; 数据库; 16S rRNA

A curated 16S rRNA reference database for the classification of honeybee and bumblebee gut microbiota

Xue Zhang¹, Xing'an Li², Qinzhi Su¹, Qina Cao¹, Chenyi Li¹, Qingsheng Niu^{2*}, Hao Zheng^{1*}¹ Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083² Provincial Key Laboratory of Bee Genetics and Breeding, Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin City, Jilin Province 132108

Abstract: Honey and bumble bees are import pollinators, playing significant roles in the agricultural industry and maintaining the bio-ecosystem balance. Recently, it was found that the bees harbor a simple, yet specific gut microbiota. The normal bee gut microbiota makes essential contributions to host growth, endocrine signaling, and pathogen resistance. With the development of high through-put sequencing technology, researchers can now quickly identify the gut community structure for a low cost. This is helpful for biodiversity, conservation and bee health studies. However, the currently-used 16S rRNA databases are not specific enough to classify the bee gut microbiota properly. Many of the specific bacteria that enrich the gut of *Apis cerana* are in the genus *Apibacter*. Here, we isolated *Apibacter* species from *A. cerana* collected in five provinces of China, and added them to the current SILVA database. We also curated the nomenclature of some existing sequences and re-classified them in the updated database. Based on the analysis of the 16S rRNA sequencing data from one *A. cerana* and one *Apis mellifera* sample, our Bee Gut Microbiota-Database (BGM-Db) offers a more accurate classification of bee gut microbiota at a higher resolution than either the

收稿日期: 2019-01-25; 接受日期: 2019-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(31870472; 31470123)

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: 1463199779@qq.com; hao.zheng@cau.edu.cn

SILVA or Ribosomal Database Project (RDP) database.

Key words: honey bee; gut microbiota; high-throughput sequencing; database; 16S rRNA

蜜蜂是重要的农业昆虫,除生产蜂蜜、蜂王浆、蜂胶等蜂产品外,其更重要的功能是作为媒介为农作物授粉,保障农业产量(Klein et al, 2007)。近年来,由于生态环境改变、农药的过量施用等原因,蜜蜂种群数量锐减。自2006年首次报道以来,全球范围内多次暴发蜂群崩溃综合征(colony collapse disorder, CCD),使得美国23%的蜂农蜜蜂损失达45%以上(Cox-Foster et al, 2007)。导致CCD的原因是多方面的(vanEngelsdorp et al, 2009)。近年来对于蜜蜂肠道微生物群落的研究发现,正常的肠道微生物对于蜜蜂的生长、健康、食物代谢、激素调节、提高免疫力、抵抗外源致病菌入侵等方面都有重要作用(Raymann et al, 2017; Zheng et al, 2017)。通过对西方蜜蜂(*Apis mellifera*)肠道菌的16S rRNA测序发现,其肠道菌群组成简单并且较为保守,受地理和环境等因素的影响较小。蜜蜂肠道菌群主要由8种特异核心菌种组成,占其肠道微生物群落的95%以上(Engel et al, 2014; Martinson et al, 2011),包括3种革兰氏阳性菌及5种革兰氏阴性菌。而其他蜂种,例如东方蜜蜂(*Apis cerana*)、熊蜂(*Bombus*)及其他无刺蜂也具有和西方蜜蜂相似的肠道菌群结构(Martinson et al, 2011)。蜜蜂肠道菌具有高度特异性,目前发现的来源于蜜蜂肠道的菌种均为蜜蜂特有菌种,在其他环境中并不存在,并且不同蜂种也具有各自特异的菌种(Kwong et al, 2014a, 2017)。因此,研究不同蜂种、蜂群肠道菌群多样性及其与蜂群健康的关系等需要在较高的分辨率上准确分析。

蜜蜂及熊蜂的主要肠道菌种都可以进行体外培养。近年来随着对蜜蜂及熊蜂的深入研究,分离得到大量核心肠道菌并且获得了大量纯菌基因组信息,测得的全长或接近全长的16S rRNA序列储存在SILVA (Pruesse et al, 2007)和核糖体数据库项目(Ribosomal Database Project, RDP; Cole et al, 2014)等通用数据库中,用于高通量测序结果的比对。但是通用数据库并没有针对来源于蜜蜂肠道菌的序列进行优化,其中的蜜蜂肠道菌存在命名模糊、菌种水平分类不清等问题。另外,虽然东方蜜蜂和熊蜂具有很多和西方蜜蜂相近的肠道菌属,但

也含有其特殊肠道菌。Kwong等(2017)发现,东方蜜蜂、大蜜蜂(*Apis dorsata*)和熊蜂中含有不同于西方蜜蜂的一种特殊肠道菌属——*Apibacter*,而目前测得的*Apibacter*的16S rRNA全长序列较少,分离得到的纯菌也仅有来自于熊蜂的1株*Apibacter men-salis* (Praet et al, 2016)和来自于东方蜜蜂和大蜜蜂的3株*Apibacter adventoris* (Kwong & Moran, 2016)。因此目前数据库中*Apibacter*属的参考序列多样性较低,这会影响对东方蜜蜂、熊蜂和大蜜蜂中*Apibacter*菌种的鉴定(Kwong & Moran, 2016; Kwong et al, 2017)。

随着测序技术的发展,通过对16S rRNA基因进行高通量测序来鉴定蜜蜂肠道菌群,对不同蜂种及不同地域、不同健康状况的蜂群进行比较分析等具有重要作用。而目前基于Illumina等平台的高通量测序得到的16S rRNA序列主要为部分的高变区域,基于片段序列的菌种鉴定则需要利用RDP的朴素贝叶斯分类器(Ribosomal Database Project's Naïve Bayesian Classifier, RDP-NBC)对微生物群落的分类学组成及结构进行预测(Wang et al, 2007),而分类的准确性很大程度上依赖作为训练集(training set)的接近16S rRNA全长(细菌约1,500 bp)的参考数据库分类的深度和解析度(Mikaelyan et al, 2015)。目前最常用的16S rRNA短序列分类数据库包括SILVA (Yilmaz et al, 2014)和RDP (Cole et al, 2014)。而对于某些特殊环境如昆虫肠道中的样品,由于缺乏长片段的16S rRNA克隆文库序列,无法构建用于分类鉴定的训练集,影响了分类的准确性(Newton & Roeselers, 2012; Mikaelyan et al, 2015)。特别是对于蜜蜂肠道,其细菌群落均为特异的分类类群,而在其他环境中基本没有发现。另外,虽然蜜蜂肠道菌群结构相对简单,在菌种水平上只有8种核心菌,但是在16S rRNA序列相似性大于97%的同一菌种内存在较高的菌株间多样性。之前对于蜜蜂肠道菌菌株间多样性的研究发现,某些菌株即使其16S rRNA序列相似性达到99%,它们的基因组结构及功能也存在很大差异(Engel et al, 2014; Zheng et al, 2016)。另外目前对于蜜蜂肠道的研究主要集中于西

方蜜蜂, 对于东方蜜蜂等其他蜂种肠道菌群的分离鉴定还存在不足, 造成数据库的分辨率和分类准确性不高。

因为目前并没有针对蜜蜂等蜂类肠道菌优化的16S rRNA数据库, 本文基于最为常用且更新频率较高的SILVA数据库, 将其中蜜蜂肠道特有细菌的分类和命名进行系统校正。另外, 从来自于吉林、四川、青海、海南和江西的东方蜜蜂中分离出96株东方蜜蜂特有菌属*Apibacter*菌株, 利用Sanger测序获得接近全长的16S rRNA序列, 并将其补充到优化的数据库中。通过新序列的补充及对原有数据库分类和名称的优化, 我们构建了针对蜜蜂16S rRNA高通量测序分析的数据库Bee Gut Microbiota Database (BGM-Db)。并且通过对1组东方蜜蜂和1组西方蜜蜂的肠道菌16S rRNA的高通量测序结果进行分类, 对SILVA、RDP和BGM-Db数据库的表现进行了比较。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂样品及菌株分离

东方蜜蜂样品分别采自吉林省敦化市大石头林业局沟口林场、青海省海南藏族自治州贵德县河阴镇、海南省三亚市临春岭公园、江西省永修县燕山镇七里长坑、四川省平武县木皮藏族乡关坝村蜂场和马尔康市松岗镇阿坝东方蜜蜂保种场。将活蜜蜂冻于冰上5–10 min后用尖头镊子解剖肠道并在100 uL的25%甘油溶液中(v/v) (PBS pH = 7.4)充分匀浆。用接种环挑取少量匀浆, 分别在添加有5%脱纤维无菌绵羊血的脑心浸液培养基(HIA, OXOID)、5%脱纤维无菌绵羊血的哥伦比亚固体培养基(OXOID)及添加1 g/L莫匹罗星(大连美仑生物技术有限公司)的TPY琼脂培养基(青岛海博生物技术有限公司)进行划线。35℃下5% CO₂培养箱中培养48 h或者在厌氧环境操作台内培养144 h后挑取单菌落, 进行16S rRNA菌落PCR扩增(引物分别是27F和1492R; Lane, 1991), 将测序结果与NCBI 16S rRNA数据库序列进行Blast比对, 鉴定是否为*Apibacter*。

1.2 *Apibacter*全长16S rRNA序列分析

将获得的全长*Apibacter* 16S rRNA序列在MEGA 7软件中进行序列比对, 并将获得的比对序列进行人工修正, 然后在MEGA 7软件中利用最大似然法构建系统发育树。获得的*Apibacter*的16S

rRNA序列提交到GenBank数据库, 序列号为MH478207–MH478300。

1.3 数据库分类优化

BGM-Db的分类框架优化基于SILVA数据库的原有系统发育分类。对SILVA数据库中含有大部分蜜蜂肠道菌来源序列的细菌进化分支进行系统发育分析, 从而重新定义或进一步解析基于节点的分类, 其命名基于前期对蜜蜂肠道菌的分类命名。经过质控的96株*Apibacter*菌株的接近全长16S rRNA序列, 通过与Mothur网站上的SILVA数据库参考序列进行比对, 利用ARB软件包上传到SILVA数据库。利用UCLUST, 以98%相似性为阈值去除冗余的16S rRNA基因序列。

1.4 16S rRNA基因的高通量测序和分类比较

选取东方蜜蜂和西方蜜蜂各1只, 将抽取的肠道在含有20 uL蛋白酶K溶液(20 mg/mL)的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)缓冲液中匀浆, 参考已有的微球破碎方法提取肠道DNA, 进行16S rRNA基因的V3+V4区PCR扩增。对扩增子进行Illumina高通量测序, 将获得结果作为检测不同数据库表现的原始数据。原始数据进行质量控制后分别利用BGM-Db及原始的SILVA数据库和常用的RDP数据库进行细菌分类。采用Mothur软件包的RDP朴素贝叶斯分类法, 基于80%的置信区间, 将排名前10的分类结果进行比较。

2 结果

2.1 对数据库中蜜蜂核心菌分类名称的校正

由于目前对于蜜蜂肠道细菌的分类比较模糊, 命名也比较繁杂、多样, 因此首先对蜜蜂肠道核心菌的发现历史进行简要总结, 进而对其分类及命名进行规范。2010年Martinson等(2011)通过16S rRNA克隆建库的方法对西方蜜蜂、大蜜蜂、黑小蜜蜂(*Apis andreniformis*)和熊蜂肠道共生菌进行了系统的研究, 发现社会性蜜蜂核心肠道共生菌8种, 将相应的分类类群命名为Alpha-1, Alpha-2.1, Alpha-2.2, Beta, Firm-4, Firm-5, Gamma-1, Gamma-2(表1)。但是当时并没有得到这几种核心菌的纯菌, 因此没有具体的菌种命名。在接下来的研究当中, 陆续分离得到了相应纯菌, 逐步构建了蜜蜂肠道菌的命名体系。

(1) β -变形菌*Snodgrassella*菌属。高通量测序分

表1 蜜蜂肠道核心菌命名校正
Table 1 List of the nomenclature of the curated bacterial species from bee gut

属名 Genus	种名 Species	其他名 Other names	BGM-Db数据库聚类名 BGM-Db names	参考文献 References
<i>Snodgrassella</i>	<i>Snodgrassella alvi</i>	Beta	<i>Snodgrassella</i>	Martinson et al, 2012; Kwong & Moran, 2013
<i>Gilliamella</i>	<i>Gilliamella apicola</i>	Gamma-1	<i>Gilliamella</i>	Martinson et al, 2012; Kwong & Moran, 2013
<i>Frischella</i>	<i>Frischella perrara</i>	Gamma-2	<i>Frischella</i>	Engel et al, 2013
<i>Schmidhempelia</i>	' <i>Candidatus Schmidhempelia bombi</i> '		<i>Schmidhempelia</i>	Martinson et al, 2014
<i>Bartonella</i>	<i>Bartonella apis</i>	Alpha-1	<i>Bartonella apis</i>	Moran, 2015
<i>Commensalibacter</i>	<i>Commensalibacter intestini</i>	Alpha-2.1	<i>Commensalibacter</i> Alpha2.1	Kwong et al, 2014b
<i>Bombella</i>	<i>Bombella apis</i>	Alpha-2.2	<i>Bombella</i> Alpha2.2	Yun et al, 2017
	<i>Bombella intestini</i>			Yun et al, 2017
<i>Parasaccharibacter</i>	<i>Parasaccharibacter apium</i>			Moran, 2015
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus mellis</i>	Firm-4	<i>Lactobacillus</i> Firm-4	Olofsson et al, 2014; Moran, 2015
	<i>Lactobacillus mellifer</i>			
	<i>Lactobacillus apis</i>	Firm-5	<i>Lactobacillus</i> Firm-5	Kwong et al, 2014b
	<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>			Olofsson et al, 2014; Moran, 2015
	<i>Lactobacillus melliventris</i>			
	<i>Lactobacillus kimbladii</i>			
	<i>Lactobacillus kullabergensis</i>			
	<i>Lactobacillus apinorum</i>			
	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	/	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	Moran, 2015
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	/	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Bottacini et al, 2012
	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	/	<i>Bifidobacterium coryneforme/indicum</i>	Ellegaard et al, 2015
	<i>Bifidobacterium indicum</i>	/		Ellegaard et al, 2015
	<i>Bifidobacterium bombi</i>	/	<i>Bifidobacterium bombi/commune/bohemicum</i>	Killer et al, 2009
	<i>Bifidobacterium commune</i>	/		Praet et al, 2015
	<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	/		Killer et al, 2011
<i>Bombiscardovia</i>	<i>Bombiscardovia coagulans</i>	/	<i>Bombiscardovia</i>	Killer et al, 2010
<i>Apibacter</i>	<i>Apibacter adventoris</i>	/	<i>Apibacter</i>	Kwong & Moran, 2016
	<i>Apibacter mensalis</i>	/		Praet et al, 2016

析发现, β -变形菌(Beta)这个分类在蜜蜂肠道中丰度较高, 在西方蜜蜂和东方蜜蜂中丰度约为12%, 在熊蜂中丰度更高, 为14%–40% (Kwong et al, 2017), 主要定殖于回肠部位, 贴肠道壁生长。16S rRNA序列分析表明, 这些“Beta”菌属于Neisseriaceae科, 与Simonsiella、Neisseria和Alysiella菌属相近, 序列差异性大于5%, 并形成单独的分类群(Martinson et al, 2012)。Kwong等(2014a)从西方蜜蜂和熊蜂中分离到了多株Beta单菌wkB2、wkB12和wkB29, 其间的相似度在99%以上, 与之关系最近的是来源于白蚁肠道的Stenoxybacter acetivorans (93.8%)。由于形成新的分类簇, 作者将其命名为Snodgrassella菌属, 菌

种命名为Snodgrassella alvi。Beta菌在肠道中主要分布于回肠, 通过FISH方法对西方蜜蜂肠道菌的可视化研究发现, Snodgrassella和肠道壁接触生长(Martinson et al, 2012)。基因组分析发现, 这2种菌富含与细胞运动和分泌功能相关的基因, 这些功能与细胞膜的生成相关, 而细胞膜的形成可以抵抗外源致病菌对肠道的入侵。并且这2种菌具有编码RTX蛋白的基因, RTX蛋白可以发挥细菌素的功能从而抵抗外源致病菌。Steele等(2017)发现Snodgrassella alvi含有多重T6SS作用因子, 并且在蜜蜂肠道内其表达增强, 说明了Beta菌在肠道中与宿主、其他共生菌和致病菌等相互作用。不同Snodgrassella alvi

单菌中T6SS作用因子有所不同,说明在不同蜜蜂当中不同分类群的*Snodgrassella*功能或者基因组具有不同特点。

(2) γ -变形菌 *Gilliamella*, *Frischella*, ‘*Candidatus Schmidhempelia bombi*’。蜜蜂中的 γ -变形菌主要来自 *Orbaceae* 科,包括Gamma-1和Gamma-2两个不同菌属(Martinson et al, 2011)。16S rRNA分析表明Gamma-1广泛存在于各种社会性蜜蜂肠道中,且丰度较高,为15%–40% (Kwong et al, 2017)。Gamma-1与 *Pasteurellaceae* 和 *Enterobacteriaceae* 相近,但是形成不同的聚类,其差异超过10%,该菌属被命名为*Gilliamella* (Martinson et al, 2012),主要定殖于回肠部位,占比约为47%。Kwong和Moran (2013)从西方蜜蜂和熊蜂中分离到3株*Gilliamella*纯菌,并将菌种命名为*Gilliamella apicola*。宏基因组分析发现Gamma-1基因组中富集碳水化合物代谢途径,并且含有能够降解花粉主要成分果胶的裂解酶(Engel et al, 2012)。花粉降解产物中部分单糖对蜜蜂具有毒性,如甘露糖。Zheng等(2016)对42株*Gilliamella*基因组测序发现,部分*Gilliamella*菌株编码甘露糖降解酶,并通过体外实验验证了其功能,说明其在蜜蜂解毒中发挥作用。

Gamma-2与其近源物种 *Orbus* 和 *Gilliamella* 有大概95%的相似度,进化上形成独立分支。Engel等(2013)从西方蜜蜂中分离到Gamma-2纯菌,命名为*Frischella perrara*。该菌特殊定殖在西方蜜蜂中肠与后肠之间的幽门区域,但不存在于熊蜂中,*Frischella*的定殖引起蜜蜂的类似免疫黑化反应,形成痢状表型,该菌与西方蜜蜂的相互作用及其在免疫和代谢中发挥的作用尚待研究(Engel et al, 2015)。

Martinson等(2014)从熊蜂(*Bombus impatiens*)的宏基因组中拼接得到熊蜂特有的1株Gamma变形菌的基因组信息,与*Gilliamella*和*Frischella*同属于 *Orbales* 目,但形成不同的单独分类簇。用野生和实验室饲养的*B. impatiens*对该菌属进行特异性PCR验证,发现该菌存在于90%的*B. impatiens*中。基因组分析发现该菌中缺乏大部分参与三羧酸循环的基因和NADH脱氢酶,但保留和低氧环境代谢相关的基因,具有共生菌特有的简化的基因组。表明了该菌与熊蜂的共同进化过程。Martinson等(2014)将其命名为“*Candidatus Schmidhempelia bombi*”,在本文的BGM-Db中也将相关序列群命名为“*Schmid-*

hempelia”。

(3) α -变形菌。蜜蜂肠道的 α -变形菌是主要的肠道共生菌,约占肠道微生物总量的20%左右(Engel et al, 2012)。蜜蜂中Alpha菌群主要有3类: Alpha-1、Alpha-2.1和Alpha-2.2,分别对应*Bartonella*、*Commensalibacter*和*Bombella*属。*Bartonella*为*Apis*属蜜蜂的特有菌(Kwong et al, 2017),实验表明*Bartonella*能降解果胶中的多聚半乳糖醛酸,帮助蜜蜂代谢花粉(Engel et al, 2012),并且编码大量氨基酸及辅助因子生物合成、氮代谢相关的基因(Segers et al, 2017)。但其在肠道中的定殖位置还未有报道。*Commensalibacter*主要存在于熊蜂中(Praet et al, 2018),也存在于果蝇肠道中(Kim et al, 2012)。Alpha-2.2主要存在于蜜蜂的食物、蜜囊和幼虫中。聚类为3种,分别命名为*Bombella intestini*, *Bombella apis*和*Parasaccharibacter apium*。*Bombella intestine*是由Li等(2015)从熊蜂蜜囊中分离到的乙酸菌,能以氨作为唯一碳源。*Bombella apis*从西方蜜蜂中肠中分离得到,为严格厌氧菌。*Parasaccharibacter apium*能帮助提高幼虫存活率和抵抗螨虫的感染(Corby-Harris et al, 2014, 2016)。

(4) 乳杆菌 *Lactobacillus* Firm-4, Firm-5。蜜蜂肠道中的*Lactobacillus*与人肠道的相同菌属属于不同的分类分支。*Lactobacillus*主要有2种系统型,分别是属于厚壁菌门的Firm-4和Firm-5,主要分布在蜜蜂的后肠(回肠和直肠),在蜜蜂微生物中的丰度为5%–50%,具有丰富的属内及种内多样性(Ellegaard et al, 2015)。含有大量编码细胞膜蛋白的基因和涉及糖摄取的磷酸转移酶系统(Kwong et al, 2014b),可能与花粉等植物组分的吸附和降解相关(Ellegaard et al, 2015)。Firm-4包括*Lactobacillus mellis*和*Lactobacillus mellifer*, Firm-5在蜜蜂肠道中丰度更高,包括多个菌种,主要有*Lactobacillus apis*、*Lactobacillus helsingborgensis*、*Lactobacillus melliventris*、*Lactobacillus kimbladii*、*Lactobacillus kullabergensis*和*Lactobacillus apinorum* (Kwong et al, 2014b; Olofsson et al, 2014)。不属于Firm-4和Firm-5的另一种*Lactobacillus kunkeei*主要存在于蜂蜜、花粉、蜜蜂蜜囊中,可以诱导产生IgA抗体,提高蜜蜂的免疫响应(Asama et al, 2015)。

(5) 双歧杆菌。*Bifidobacterium*是另一蜜蜂核心肠道菌,具有丰富的属内多样性,主要分布在蜜蜂

的直肠,丰度较高,在*Apis*属的蜜蜂肠道中丰度范围在10%–30%,在不同熊蜂种群中丰度差异较大(Kwong et al, 2017)。目前从蜜蜂中分离到的*Bifidobacterium*可分为多个菌种(表1),其中*Bifidobacterium asteroides*被分离到的概率最高,说明其分布广、丰度高。1株从西方蜜蜂后肠分离到的该菌种单菌PRL2011于2012年被Bottacini等(2012)测序,证实其富集碳水化合物代谢相关基因,在呼吸代谢上发挥重要的作用。*Bifidobacterium coryneforme*和*Bifidobacterium indicum*由于物种相似度较高,与*Bifidobacterium asteroides*进化距离较近,但系统发育形成一个单独聚类,在本文建立的BGM-Db中被命名为*Bifidobacterium coryneforme/ indicum*组。而从熊蜂中分离到的*Bombiscardovia coagulans*,其16S rRNA序列与这2种菌的相似度较高,在92%左右,但分类到Bifidobacteriaceae目的另一菌属(Killer et al, 2010)。与以上菌种进化距离较远的*Bifidobacterium bombi*、*Bifidobacterium commune*和*Bifidobacterium bohemicum*均从熊蜂中分离得到(Killer et al, 2009, 2011; Praet et al, 2015), 3个菌种通过200多个核糖体基因被聚为一类,在本文建立的BGM-Db中命名为*Bifidobacterium bombi/commune/bohemicum*。

虽然蜜蜂的核心肠道菌具有保守性,但其组成又随分工的不同而有所差别。在西方蜜蜂中,工蜂和蜂王、雄蜂的肠道菌也不同。蜂王肠道菌以 α -变形菌为主,这与工蜂蜜囊中的菌群组成相似。雄蜂的肠道菌群组成与工蜂相似,但是具有更多的*Lactobacillus* (Tarcy et al, 2015)。不同种类的蜜蜂其肠道菌群结构有所不同,不同蜜蜂含有某些特异的核心菌,如东方蜜蜂、大蜜蜂和部分熊蜂中含有Flavobacteriales目的特殊肠道菌,命名为*Apibacter*。该菌目前已知只有4株培养纯菌,分别是从小蜜蜂和大蜜蜂中分离到的*Apibacter adventoris* (Kwong & Moran 2016; Kwong et al, 2017)和从熊蜂中分离到的*Apibacter mensalis* (Praet et al, 2016)。由于已知菌株较少,会影响数据库中*Apibacter*参考序列的解析度,从而影响对16S rRNA测序结果的比对。

(6) 东方蜜蜂肠道菌*Apibacter*。为增加数据库中*Apibacter*参考序列的深度,我们从5个省份的东方蜜蜂个体中分离了96株*Apibacter*菌,对其进行接近全长的16S rRNA测序。将测得的序列与数据库中已有的*Apibacter* 16S rRNA序列进行比对并构建进

化树(图1)。系统发育分析结果表明,东方蜜蜂与熊蜂中的*Apibacter*在进化树上处于并行分支,而与西方蜜蜂和大蜜蜂中的序列进化距离较远;我们分离到的东方蜜蜂*Apibacter*与Kwong和Moran (2016)从马来西亚东方蜜蜂中分离得到的菌株按照地理位置的不同而聚类在一起,表明存在宿主与共生*Apibacter*的共进化现象。而不同省份之间的*Apibacter*聚类又有交叉,说明除地理分化的影响外,*Apibacter*属内又可能进化出多种不同的菌种。我们将测得的东方蜜蜂肠道*Apibacter*接近全长的序列添加到对蜜蜂其他肠道核心菌的命名校正过的SILVA数据库中,构建了新的用于蜜蜂肠道菌16S rRNA测序分类的新的数据库,并命名为BGM-Db。

2.2 不同数据库的分类结果比较

为比较不同16S rRNA数据库在对蜜蜂肠道菌测序结果分类上的差别,我们分别选取1只西方蜜蜂和1只东方蜜蜂样品,利用Illumina对其肠道菌16S rRNA扩增结果进行高通量测序,将测序结果分别利用BGM-Db与已有的SILVA和RDP数据库进行分类(图2)。

提取西方蜜蜂和东方蜜蜂中丰度前10的分类簇,计算其百分比。其中西方蜜蜂中丰度最高的为 α -变形菌,44%以上的菌种在不同数据库其分类结果有所不同(图2)。BGM-Db将其鉴定为*Brucella*菌属,而其他2个数据库则将其分类为*Ensifer*菌属。*Brucella*和*Ensifer*属于Rhizobiales目不同科的菌属,与西方蜜蜂的核心肠道菌*Bartonella*属于同一个目。而3个数据库的分类结果均未将其分类到*Bartonella*属,甚至*Bartonellaceae*科,可能是由于样品测序污染所致,或者是该西方蜜蜂主要肠道菌与已知的*Bartonella*进化距离较远,分化为新的物种,使其分类到其他科的菌属。另一种 α -变形菌,通过BGM-Db可以将其分类到菌种水平,为蜜蜂肠道菌*Commensalibacter Alpha-2.1*;而SILVA数据库只能将其分类到*Commensalibacter*属,RDP数据库则只能将其分类到Rhodospirillales科。

对于蜜蜂肠道核心菌*Lactobacillus*,利用BGM-Db数据库可以将其准确分类到Firm-4和Firm-5这2个组,其中Firm-5中的菌种丰度明显高于Firm-4。而利用SILVA数据库则只能将其分类到*Lactobacillus*属,另外有0.12%的测序读长只能将其分类到*Lactobacillales*目,0.04%分类到Firmicutes门。RDP

图1 基于接近全长16S rRNA序列(1,168 bp)的东方蜜蜂*Apibacter*菌属系统发育树。节点处白圈表示自展支持率大于75%，黑圈表示大于95%。

Fig. 1 A maximum-likelihood tree of the *Apibacter* genus from *A. cerana* based on the near full-length 16S rRNA sequences (1,168 bp). Bootstrap values are indicated at the branching nodes (● > 95%, ○ > 75%).

数据库的分类结果类似，将其分类到*Lactobacillus*属和*Lactobacillales*目。

对于蜜蜂肠道核心菌*Gilliamella*，BGM-Db和RDP的分类结果比SILVA分别多出了0.03%和0.51%的序列只分类到*Orbaceae*科，这可能是由于SILVA首先对其数据库中所有的序列进行建模聚类，再从每个聚类中挑取代表性的序列用于查询序列的比

对，而BGM-Db和RDP则用其数据库中所有的序列对查询序列进行比对。在比对到*Orbaceae*科的下一分类等级时，可能有多多个属的参考序列与查询序列相似，因此BGM-Db和RDP数据库无法将其准确分类到*Gilliamella*属。这也说明蜜蜂肠道菌存在属间多样性。

与西方蜜蜂相比，东方蜜蜂肠道菌的

图2 利用BGM-Db、SILVA及Ribosomal Database Project (RDP)数据库对东方蜜蜂和西方蜜蜂16S rRNA测序结果分类比较
Fig. 2 Comparison of the behaviors of the BGM-Db, SILVA, and Ribosomal Database Project (RDP) databases when they are used in the classification of the gut microbiota of *Apis cerana* and *Apis mellifera*

*Lactobacillus*丰度更高,而 α -变形菌则比较稀少。同样,对于*Lactobacillus*,与其他2个数据库相比,BGM-Db数据库可以将其准确鉴定到菌种水平,说明蜜蜂肠道的*Lactobacillus*属内主要菌种为已知的蜜蜂核心菌Firm-4和Firm-5。而对于*Bifidobacteriaceae*科,相比于SILVA数据库,BGM-Db数据库可以从中分出占比0.19%的*Bifidobacterium*属的*coryneforme*和*indicum*种,说明对数据库进行优化后,可以增加对16S rRNA基因序列的分辨率。对大部分的*Bifidobacteriaceae*,BGM-Db和SILVA都只将其分类到科的级别,而RDP数据库将其全部分类为*Bifidobacterium*属,这可能是由于RDP的参考序列较其他2个数据库少,因此在比对时,排除了其近源菌属的干扰。但较少的参考序列在与其他一些菌属比对时,如对 β -变形菌分类时,对于一部分的序列只能将它们分类到科和目的级别,而BGM-Db和SILVA数据库则将绝大部分序列准确地分类到了菌属水平。又如*Flavobacteriaceae*科下的*Apibacter*菌属,作为新分离的蜜蜂肠道菌(Praet et al, 2016; Kwong & Moran, 2016; Kwong et al, 2017)在RDP数据库中未得到及时更新,因此只能将东方蜜蜂中的*Apibacter*序列分类到上一级的*Flavobacteriaceae*科,BGM-Db和SILVA数据库则将其准确分类到*Apibacter*菌属。

3 讨论

SILVA和RDP作为全细菌16S rRNA基因序列数据库,对于某些特殊环境菌,如昆虫肠道共生菌缺

乏系统的校正,分辨率较低。我们以SILVA数据库为基础,根据蜜蜂肠道菌的命名规范,对SILVA数据库中的蜜蜂肠道菌分支进行了系统校正和重新命名,并且对于*Flavobacteriaceae*科下新的蜜蜂肠道菌属*Apibacter*,从东方蜜蜂肠道中分离了96株新的菌株,将其16S rRNA全长序列上传到SILVA数据库,更正后的新的蜜蜂肠道特殊分类数据库命名为BGM-Db。相比于SILVA和RDP数据库,BGM-Db对蜜蜂肠道16S rRNA高通量测序短序列实现了菌种级别的分类,分辨率更高;并且系统命名后也更方便将新测得的序列与原有的已知蜜蜂肠道菌进行比较,对于蜜蜂肠道菌的分类鉴定具有重要意义。BGM-Db包括一个16S rRNA序列数据库的FASTA文件及一个物种分类信息的taxonomy文件(<https://www.zhenghaolab.com/bgm-db>)。BGM-Db文件适用于Mothur分析软件,可直接替换Mothur中classify_seqs步骤的默认文件,相关使用方法可参照Mothur手册(https://www.mothur.org/wiki/Classify_seqs)。

参考文献

- Asama T, Arima TH, Gomi T, Keishi T, Tani H, Kimura Y, Tatefuji T, Hashimoto K (2015) *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 818–826.
- 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, e44229.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2014) Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D633–D642.
- Corby-Harris V, Snyder L, Meador CAD, Naldo R, Mott B, Anderson KE (2016) *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. *Journal of Economic Entomology*, 109, 537–543.
- 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, 7460–7472.
- 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, 283–287.
- Ellegaard KM, Tamarit D, Javelind E, Olofsson TC, Andersson SGE, Vásquez A (2015) Extensive intra-phylo-type diversity in *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* from the honeybee gut. *BMC Genomics*, 16, 284.
- Engel P, Bartlett KD, Moran NA (2015) The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *mBio*, 6, 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, 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, USA*, 109, 11002–11007.
- Engel P, Stepanauskas R, Moran NA (2014) Hidden diversity in honey bee gut symbionts detected by single-cell genomics. *PLoS Genetics*, 10, e1004596.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Havlík J, Koppová I, Benada O, Rada V, Kofroňová O (2010) *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology*, 33, 359–366.
- Killer J, Kopečný J, Mrazek J, Koppova I, Havlik J, Benada O, Kott T (2011) *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1315–1321.
- Killer J, Kopečný J, Mrazek J, Rada V, Benada O, Koppova I, Havlik J, Straka J (2009) *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2020–2024.
- Kim EK, Kim SH, Nam HJ, Choi MK, Lee KA, Choi SH, Seo YY, You H, Kim B, Lee WJ (2012) Draft genome sequence of *Commensalibacter intestini* A911T, a symbiotic bacterium isolated from *Drosophila melanogaster* intestine. *Journal of Bacteriology*, 194, 1246.
- Klein AM, Vaissière 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, 303–313.
- 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, USA*, 111, 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 Announcements*, 2, e01176-14.
- Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing KW, Soh EJY, Ascher JS, Jaffé R, Moran NA (2017) Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances*, 3, 1–16.
- 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.
- Kwong WK, Moran NA (2016) *Apibacter adventoris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from honey bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1323–1329.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic* (eds Stackebrandt E, Goodfellow M), pp. 115–175. John Wiley and Sons, New York.
- Li L, Praet J, Borremans W, Nunes OC, Manaia CM, Cleenwerck I, Meeus I, Smagghe G, De Vuyst L, Vandamme P (2015) *Bombella intestini* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from bumble bee crop. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 267–273.
- 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, 619–628.
- Martinson VG, Mago T, Koch H, Salzberg SL, Moran NA

- (2014) Genomic features of a bumble bee symbiont reflect its host environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 3793–3803.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2830–2840.
- Mikaelyan A, Köhler T, Lampert N, Rohland J, Boga H, Meuser K, Brune A (2015) Classifying the bacterial gut microbiota of termites and cockroaches: A curated phylogenetic reference database (DictDb). *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 472–482.
- Moran NA (2015) Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 22–28.
- Newton IL, Roeselers G (2012) The effect of training set on the classification of honey bee gut microbiota using the Naïve Bayesian Classifier. *BMC Microbiology*, 12, 221.
- Olofsson TC, Alsterfjord M, Nilson B, Butler E, Vásquez A (2014) *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3109–3119.
- Praet J, Aerts M, Brandt ED, Meeus I, Smagghe G, Vandamme P (2016) *Apibacter mensalis* sp. nov.: A rare member of the bumblebee gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1645–1651.
- 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, 1307–1313.
- Praet J, Parmentier A, Schmid-Hempel R, Meeus I, Smagghe G, Vandamme P (2018) Large-scale cultivation of the bumblebee gut microbiota reveals an underestimated bacterial species diversity capable of pathogen inhibition. *Environmental Microbiology*, 20, 214–227.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35, 7188–7196.
- Raymann K, Shaffer Z, Moran NA (2017) Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*, 15, e2001861.
- Segers FH, Kešnerová L, Kosoy M, Engel P (2017) Genomic changes associated with the evolutionary transition of an insect gut symbiont into a blood-borne pathogen. *The ISME Journal*, 11, 1232–1244.
- Steele MI, Kwong WK, Whiteley M, Moran NA (2017) Diversification of type VI secretion system toxins reveals ancient antagonism among bee gut microbes. *mBio*, 8, e01630-17.
- Tarpy DR, Mattila HR, Newton ILG (2015) Development of the honey bee gut microbiome throughout the Queen-Rearing Process. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3182–3191.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haugbruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS (2009) Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4, e6481.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261–5267.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42, D643–D648.
- Yun JH, Lee JY, Hyun DW, Jung MJ, Bae JW (2017) *Bombella apis* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from the midgut of a honey bee. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2184–2188.
- Zheng H, Nishida A, Kwong WK, Koch H, Engel P, Steele MI, Moran NA (2016) Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio*, 7, e01326-16.
- 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, USA*, 114, 4775–4780.

(特邀责任编辑: 周欣 责任编辑: 黄祥忠)