

● 综述

无刺蜂与微生物的相互作用研究进展

曹 喆¹, 汪正威², 王 凯³, 付朝敏¹, 郭 军¹(1.昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500; 2.中国科学院西双版纳热带植物园
热带森林生态学重点实验室, 云南 昆明 650223; 3.中国农业科学院蜜蜂研究所,
北京 100093)

摘 要: 无刺蜂是一个单系的真社会群居昆虫类群, 是最丰富多样的一类蜜蜂群体。在世界上所有的热带和亚热带地区都有分布, 也是这些地区植物的传粉昆虫之一。无刺蜂主要依靠共生微生物的发酵来保存蜂蜜和转化储存食物中的花粉。蜂巢里有各种各样的微生物群, 包括细菌、酵母菌、丝状真菌和病毒。这些微生物可以通过共生关系与无刺蜂相互作用, 或者它们可以作为昆虫的食物, 或者产生生物分子, 帮助蜂产品进行生物转化, 如蜂蜜和蜂粮的酿造。某些微生物种类也能产生抗菌化合物, 抑制无刺蜂病原体发生。综述了无刺蜂蜂巢环境中的各种微生物、肠道菌群、真菌及病毒的研究进展, 并阐述了相关微生物的功能及与无刺蜂的相互作用。

关键词: 无刺蜂; 肠道菌群; 真菌; 酵母菌;
相互作用

中图分类号: S897 **文献标识码:** A

文章编号: 1003-9139 (2022) 11-0018-05

1 引言

无刺蜂 (Stingless Bee) 别名蚁蜂、小酸蜂, 是蜜蜂总科 (Apoidea)、蜜蜂亚科 (Apinae)、麦蜂族 (Meliponini) 中的一个大属, 在我国已记录的无刺蜂有 10 多种, 主要分布于云南南部、海南和台湾。顾名思义, 这一群体的所有物种都有一个区别于蜜蜂的特殊特征, 即没有功能刺。虽然无刺蜂包含了大约 61 个属、550 个种的多样性群体, 但许多特征对于大多数无刺蜂物种来说是共同

的。几乎所有的无刺蜂种群都生活在多年生巢穴中, 这些巢穴通常位于用植物树脂和蜂蜡密封的巢穴内, 这些无刺蜂能长时间储存食物, 并通过蜂群繁殖, 将巢穴材料从亲代转移到新建的子代群体中。无刺蜂蜂群的上述属性加上热带环境的高温、高湿, 非常有利于无刺蜂在整个生活史中建立与各种微生物的相互作用。

2 蜂巢环境对无刺蜂食物存储的有益作用

当蜜源资源匮乏时, 蜜蜂会放弃巢穴, 迁徙到资源更丰富的地区。然而, 这种迁徙行为在无刺蜂中却很少见, 为了在资源可用性较低的时期能确保种群的生存, 无刺蜂群体在开花旺季最大限度地觅食, 储存收集花蜜以供蜜源缺乏时食用。另外, 一些无刺蜂物种在蜜源不足时会减少觅食活动, 并将它们的产卵量下调到维持群体所需的最低水平, 而这些产卵量的变化主要与储存花粉的数量有关。居住在季节变化明显地区的其他物种在不利的氣候条件下会减少甚至中断它们的产卵, 它们的生殖滞育是由非生物环境因素触发的。

蜜蜂族 (Apini) 的蜜蜂一般使用扇翅蒸发的脱水方式来保存蜂蜜, 但无刺蜂主要依靠共生微生物的发酵来实现蜂蜜的保藏。虽然无刺蜂也会使花蜜脱水达到一定的浓度, 但在潮湿的环境中, 特别是在巢穴中, 要使

收稿日期: 2022-06-02

作者简介: 曹喆 (1994-), 男, 云南玉溪人, 硕士研究生, E-mail: 879033832@qq.com

通讯作者: 郭军 (1981-), 男, 湖北襄阳人, 博士, 副教授, E-mail: guojun0591@126.com

无刺蜂蜂蜜的糖分达到高浓度是极其困难的。因此,无刺蜂蜂蜜的糖浓度一般为 60%~75% (最低 55%, 最大 86%), 这使得它们成为适宜多种微生物生长的介质。

花粉在贮藏后也会发酵,这一过程的特点是水分和乳酸增加,微生物也增加。据推测,无刺蜂更喜欢发酵花粉而不是新鲜花粉,这一假设目前已通过实验验证。研究发现,大多数无刺蜂以发酵花粉为食,这种花粉的消耗率是新鲜花粉的 2.2 倍。相反,Carrol 等研究发现蜜蜂族 (Apini) 的蜜蜂对新鲜储存的花粉表现出明显的偏好。无刺蜂在采集中用蜂蜜把花粉带到后足上。当 2 条后足上的花粉形成大颗粒时,它们会返回巢穴,将收集到的花粉放入食物罐中,待食物罐装满花粉,无刺蜂再将其密封。因此,食物罐温暖、潮湿、营养丰富,是微生物增殖的理想环境。几乎所有无刺蜂的另一个重要特征是它们在筑巢时使用植物树脂。无刺蜂一般将树脂和蜂蜡混合,生产出筑巢的主要材料,这些材料被用于建造孵卵室和食物罐等巢内结构。植物树脂以其强大的抗菌性而闻名,无刺蜂利用树脂的这种策略可能是对一些微生物压力的反应,因为很多微生物可以迅速利用无刺蜂巢内的有利条件。虽然我们对无刺蜂胶的特性所知甚少,但其他群居昆虫的例子表明,无刺蜂蜂胶的很多有趣作用有待揭示。例如,木蚁 (*Formica paralugubris*) 从针叶树上收集固化树脂,然后与它们的巢材料混合,这大大提高了暴露于病原体的成虫和幼虫的存活率。在西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 中,植物树脂的采集和蜂箱内使用是一种重要的社会免疫机制,它可以保护蜂群免受病原菌的侵害,稳定蜜蜂微生物组。马来西亚的一种无刺蜂几乎完全使用树脂筑巢,并在储存的食物中产生极端水平的发酵。

无刺蜂的繁育系统和模式也被认为有助于稳定其与微生物之间的有益关系。当工蜂在筑巢过程中将筑巢材料和储存的食物从母蜂群运送到子蜂群时,母蜂群中的微生物极有可能被运送到新建的子蜂群中。通过这种方式,蜂

群中微生物实现了传播。目前还不清楚无刺蜂种群中的有益微生物是垂直传播到子代,还是从环境中获取。

3 与无刺蜂有关的微生物群

与无刺蜂蜂巢相关的微生物群包括病毒、细菌、酵母菌和丝状真菌。细菌和酵母菌在蜂箱中具有代谢活性,它们的生理特性,包括酶的产生、糖的发酵和有机酸的产生,在花粉和花蜜的微生物转化过程中起着重要作用,通过引发生化反应,可能为幼虫和成蜂提供营养等。无刺蜂与病毒或丝状真菌之间的相互作用及是否会导致蜜蜂相似的疾病症状还缺乏深入研究。

3.1 无刺蜂肠道菌群的组成

与无刺蜂相关的主要细菌属有乳酸杆菌、芽孢杆菌、链霉菌、梭状芽孢杆菌、葡萄球菌、链球菌、肠杆菌、雷斯顿菌、泛菌、假单胞菌、果杆菌、赖氨酸杆菌和奈瑟菌。Kwong 等人报道,与蜜蜂和熊蜂相比,无刺蜂的微生物群在组成、丰富度和均匀度方面似乎存在很大差异。这一研究证明了吉里氏菌、双歧杆菌、乳酸杆菌在这 3 个蜂群中普遍存在,这表明这些分类群构成了无刺蜂肠道微生物群的核心,此外,类醋酸杆菌似乎是无刺蜂的特异性肠道菌群。而对我国云南西双版纳地区的 3 种主要无刺蜂 (顶无刺蜂、黄纹无刺蜂、黑胸无刺蜂) 肠道菌群的多样性研究发现,在属水平上,丰度排名前 6 位的属分别为类醋酸杆菌 (*norank-f-Acetobacteraceae*)、*Snodgrassella*、乳杆菌、嗜冷杆菌、假单胞菌和双歧杆菌。相对丰度大于 1% 的属共有 18 个,但蜜蜂 5 大核心肠道菌属中的 *Gilliamella* 并没有出现在此次测序的 3 种无刺蜂肠道样品优势菌属中 (Leonhardt 和 Kaltenpoth 与 Koch 等都没有在无刺蜂肠道中检测到 *Gilliamella* 的存在)。我们的研究在黑胸无刺蜂中发现了 *Snodgrassella*, 且丰度高达 28.88%, 而在其他 2 组中并未检测到。*Snodgrassella* 属于变形菌门、 β -变形菌纲,革兰氏阴性菌。其 16S rRNA 与分支最近的西蒙斯氏菌属 (*Simonsiella*), 小链菌属 (*Alysiella*), 和金氏菌属 (*Kingella*) 约有 94%

的相似。*Snodgrassella* 作为蜜蜂的 5 种核心肠道菌属之一, 普遍存在于蜜蜂属的中华蜜蜂与意大利蜜蜂肠道中, 具有帮助宿主抵御寄生虫和病原菌入侵的作用。本次研究中, 黑胸无刺蜂肠道中 *Snodgrassella* 的丰度较高, 表明黑胸无刺蜂相对于其他 2 种无刺蜂可能具有更强的抵御寄生虫与病原菌的能力。

3.2 无刺蜂肠道菌群的功能

Kwong (2017) 对 13 种无刺蜂肠道进行了调查, 研究显示醋酸杆菌属的细菌在 10 种无刺蜂肠道中占据了重要的生态位, 醋酸杆菌科属于醋酸细菌 (AABs), 常见于昆虫 (如蜜蜂、果蝇和白蛉) 的内脏中, 并被认为是许多昆虫的次级共生菌, 这些昆虫依赖糖基食物 (如花蜜、果糖或韧皮部汁液)。研究表明醋酸杆菌可以在酸性环境中分解碳水化合物, 而糖酵解是蜜蜂肠道的主要代谢活动, 说明其对蜜蜂的营养吸收和保护起着重要作用。在大多数情况下, 蜜蜂肠道细菌具有重叠代谢能力, 包括醋酸杆菌与乳酸菌在内的几种肠道菌会共同代谢同一化合物。最近发现这几种肠道菌可以调节果蝇的免疫系统稳态, Corby Harris 等从非洲蜜蜂中发现了一株伞形副杆菌 (属于醋杆菌科), 已被证明有助于提高蜜蜂对微孢子虫感染的抵抗力。它们也在一种独居蜜蜂 *Osmia bicornis* 的肠道中被检测到。但现有资料显示, 目前还没有对类醋酸杆菌的功能进行深入研究。类醋酸杆菌究竟是否能在无刺蜂体内发挥与醋酸杆菌类似的作用, 还需要进一步的研究确定。

有研究表明, 无刺蜂蜂巢中的某些细菌可能是抗菌化合物的生产者。*Streptomyces* sp. ICBG1323 和 *Micromonospora* sp. ICBG1321 也是从无刺蜂中分离出来的, 它们产生的聚酮对美洲幼虫腐臭病的致病原 *Paenibacillus larvae* (幼虫芽孢杆菌) 具有不同程度的抵抗性, 而这种病原体以前从未在无刺蜂的样本中检测到。这一结果表明, 与无刺蜂相关的微生物产生的抗菌化合物可以保护它们的宿主免受病原体的侵害。这些细菌产生的生物活性代谢物可能有利于无刺蜂的健康, 一些乳酸

菌和芽孢杆菌表现出的益生菌特性, 表明它们具有防治无刺蜂病原体危害的潜力。Ngalimat 等人的研究也发现, 马来西亚无刺蜂相关的细菌分离物能够利用碳水化合物、氨基酸、羧酸和各种衍生物。某些芽孢杆菌菌株表现出蛋白水解、脂解和纤维素分解活性。这些细菌分离物产生的酶可能参与花蜜和花粉中碳水化合物和蛋白质的分解, 这些酶活性可能在提高无刺蜂产品的营养价值方面发挥了关键作用。

3.3 与无刺蜂有关的酵母及其功能

无刺蜂中常见及最容易分离的酵母主要是 *Starmerella*, 这个属包括大约 50 个物种, 其中大部分被描述为与蜜蜂物种及其花生态位有关。这种酵母经常可以从花粉、花蜜、未成熟和成熟的蜂蜜及成年无刺蜂中分离出来。其中的某些酵母还能与细菌一起发酵蜜蜂采集的花蜜。另外, *Starmerella* 也能从蜜蜂和熊蜂中分离出来。然而, 这些酵母菌对蜜蜂的有益作用仍有待阐明。

已发现的接合酵母菌属 (*Zygosaccharomyces*) 几种嗜渗酵母与蜜蜂和无刺蜂群的不同方面有关, 包括冈比亚接合酵母菌 (*Zygosaccharomyces gambellarensis*)、梅利斯接合酵母菌 (*Zygosaccharomyces mellis*) 和暹罗接合酵母菌 (*Zygosaccharomyces siamensis*)。接合酵母属的一些菌株似乎参与了蜂巢中食物的变质。然而, 最近的一些研究发现, *Z. siamensis* 与蜂蜜发酵过程有关。无刺蜂对巢内垃圾具有很好的“分类管理”能力, 能快速地将个体较小的“垃圾”清理出巢房, 对于个体较大的“垃圾” (如入侵者的尸体), 无刺蜂通常用树脂、蜂胶将其快速做成“木乃伊”, 这一点跟蜜蜂具有一定的相似性。研究发现, 接合酵母菌 *Zygosaccharomyces machadoi* 与巴西的无刺蜂的上述垃圾颗粒有关。蜂蜜被认为是嗜渗酵母菌的自然栖息地, 嗜渗酵母菌可以从不同种类的成熟和未成熟蜂蜜样品中获得, 也能从部分植物的花粉及巴西无刺蜂的成熟蜂蜜中分离到。

尽管无刺蜂、蜜蜂和熊蜂在内的蜂群中都

有接合酵母菌的报道,但对它们的生态功能和对宿主蜜蜂的益处知之甚少。一种新型的结合酵母菌与无刺蜂 (*Scaptotrigona depilis*) 相互作用中涉及营养/激素共生的分子机制已被报道。这种真菌对幼虫的生存和蜕变至关重要。昆虫的变态受2种激素系统的平衡控制,这2种激素系统包括保幼激素和蜕皮激素。昆虫从它们的食物中获取甾体化合物作为蜕皮甾体生物合成的前体,因为它们不能从头合成这些激素。与巴西无刺蜂相关的酵母菌属在其细胞质脂滴中积累类固醇麦角甾醇。通过对巴西无刺蜂发育的体外实验发现,饲喂麦角甾醇的幼虫能够与采食酵母菌属的幼虫以相似的速率完成变态。从而揭示了这种共生相互作用的分子机制。接合酵母菌 (*Zygosaccharomyces* sp.) 在无刺蜂 (*S. depilis*) 蜂群中的生长很可能部分受另外2种微生物——念珠菌属 (*Candida* sp.) 和红曲霉 (*Monascus ruber*) 产生的小分子物质调节。这种念珠菌产生乙醇和异戊醇挥发物,刺激接合酵母的生长。相比之下,红曲霉可产生洛伐他汀 (一种类固醇生物合成抑制剂) 和红霉素,洛伐他汀可抑制接合酵母的生长,而红霉素抑制念珠菌的生长。这些研究证明了无刺蜂哺幼室的微生物群和无刺蜂之间的复杂关系。接合酵母菌与其他种类的无刺蜂之间是否存在着相似的共生现象还值得进一步研究。

3.4 真菌与无刺蜂的互利共生关系

与无刺蜂及其蜂巢相关的丝状真菌通常具有腐生的生活方式。这些真菌的一些种类也被报道为蜜蜂的有害病菌。Barbosa 等从花粉和蜂巢内鉴定出一些真菌并证实了这些物种能够产生具有生物活性的外向体,但这些化合物对宿主的益处尚未确定。有研究表明,真菌菌丝可为无刺蜂幼虫发育提供营养,尽管这些孢子的营养价值低于花粉。这些微生物与无刺蜂的有益关系,以及与这些昆虫相关的真菌的物种丰富度,都缺乏深入研究。

据巴西科学家的研究发现,无刺蜂有着固定的哺育幼虫流程。首先,保育蜂 (工蜂的一类) 会产生半流体食物,并预分配到哺幼室

中。之后,蜂王会在食物上产卵。工蜂随后将产有卵的哺幼室用蜂蜡封闭,直到幼虫成熟才将之开启。在幼虫开始孵化时,一种真菌也在哺幼室中开始大量繁殖。这些真菌在幼虫3日龄时达到最多,而在随后的2天内,幼虫会在哺幼室做环形运动,用上颚切断菌丝,并将这些真菌一点一点地吃掉。为了确定这些幼虫是否需要这些真菌才能存活,科研人员将幼虫分为2组,一组饲喂灭菌的食物,而另一组在食物里重新混入真菌菌丝再饲喂。结果吃了含真菌的幼虫,成活率 (76%) 要远高于没吃真菌的组 (8%), 通过该实验充分证实无刺蜂幼虫在发育过程中需要吃掉这些真菌才能存活。经过对蜂巢和无刺蜂进行分别检测后发现这些真菌只存在于组成蜂巢的“建筑材料”——蜂蜡之中。尽管蜂蜡被用于建造不同的蜂巢结构,但只有哺幼室的蜂蜡中的真菌菌丝在接触到半液体的幼虫食物时,才能开始迅速扩增。这意味着,蜂蜡中的真菌很可能也依赖着幼虫食物的营养来进行生长。而除了通过幼虫的啃食来控制真菌的数量,无刺蜂的哺幼室可能还存在一个出色的湿度控制系统以防止真菌的过度生长。这或许和其他微生物,尤其是假丝酵母和芽孢杆菌有关,这可能是这些真菌没有在自然条件下迅速增长的原因。研究还发现无刺蜂的种群扩张是通过分蜂行为来完成的,一群工蜂和一只蜂王从原来的蜂巢出发,迁移到新的领地,重新筑巢。然而,工蜂会从母巢带着食物、蜂蜡等筑巢材料到新巢,这种母巢和新巢之间的联系,直到新巢完全筑成、新蜂王开始产卵时才会终止。而微生物也将在这种分蜂过程完成了传播,尤其是蜂巢内传播真菌的这种方式,在所有培育真菌的昆虫中是独一无二的。在其他物种中,常常是有繁殖能力的个体负责传播真菌。而在无刺蜂中,负责在蜂巢内传播真菌并将其转移到新巢的,是那些循环利用蜂蜡的工蜂们。此外,哺幼室的蜂蜡也会得到重复利用。这一过程中,真菌从旧蜂巢被转移到了新蜂巢。研究人员认为真菌为无刺蜂提供保护的可能性更大。在他们的实验中发现没有这种真菌的幼虫食物非常难闻,并且有腐败

迹象。这些红曲属真菌的次级代谢物可能参与保护这些食物免受细菌污染。事实上,在亚洲一些国家,人类一直在用一些类似的真菌来保存食物。

3.5 与无刺蜂有关的病毒

目前,科研人员对感染无刺蜂的病毒研究得还很少。无刺蜂体内发现的病毒包括急性蜜蜂麻痹病毒(acute bee paralysis virus, ABPV)、残翅病毒(deformed wing virus, DWV)和黑蜂王台病毒(black queen cell virus, BQCV)。Caesar 等利用高通量测序对 *Melipona quadrifasciata* 病毒群进行了描述,试图检测潜在的致病性病毒。在健康蜜蜂的宏基因组中,共定位到病毒重叠峰为 40 621 个,而在健康蜜蜂的病毒重叠峰中仅定位到 11 个。双病毒科、细小病毒科和圆环病毒科在不健康蜜蜂中存在最多的拷贝数。文中作者指出在无刺蜂中存在多种未知的蜜蜂病毒。Guimaraes-Cestaro 等利用 PCR 分析,报道了 10 种无刺蜂蜂巢样本中存在病毒。其中 ABPV 最普遍,其次是 DWV 和 BQCV。Teixeira 等研究了巴西 2 个州的 *Melipona* sp. 的患病蜂,但作者没有在任何所取样中检测到病毒。然而,其他具有有益特性的病毒可能与蜜蜂有关。Bonilla-Rosso 等利用宏基因组测序研究了与意大利蜜蜂肠道微生物群相关的噬菌体。该研究中发现的大多数噬菌体被认为是未分类的,属于新型病毒。在无刺蜂的肠道微生物群中也可能存在这些尚未分类的噬菌体。

4 总结

无刺蜂及其相关微生物群具有重要的相关性。与无刺蜂相关的微生物群通过促进储存食物的微生物转化为这些昆虫提供了各种便利和优势。从无刺蜂的蜂产品及其蜂巢中分离出的酵母菌和细菌能够产生酶、有机酸、抗菌物质和类固醇等物质,充分表明无刺蜂的这些微生物对其生命周期是必不可少的。细菌、酵母菌和丝状真菌的孢子已被认为是无刺蜂幼虫和成虫的食物来源,这些微生物也是昆虫必需的浓缩蛋白质和维生素的来源。

酵母菌 (*Zygosaccharomyces* sp.) 和无刺蜂 (*S. depilis*) 之间的相互作用表明营养/激素的共生关系有一部分是通过念珠菌属和红曲霉产生的小分子物质控制的。

无刺蜂肠道菌群的研究在我国刚刚起步,还有很多地方未揭示清楚,例如,类醋酸杆菌 *norank-f-Acetobacteraceae* 在大部分样本中含量都最高,而这一细菌还未正式命名,我们对这一优势细菌的还缺乏认识,其在无刺蜂肠道中发挥了什么功能也尚不清楚,因此还需要深入开展研究。另外,无刺蜂蜂蜜浓度较低,但不容易发酵,其乳酸菌含量也较高,这也可能是无刺蜂蜂蜜口感酸甜的原因之一,然而引起这种酸甜口感及不易发酵的机理目前还未揭示清楚,都需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] DE PAULA G T, MENEZES C, PUPO M T, et al. Stingless bees and microbial interactions[J]. Curr Opin Insect Science. 2021, 44: 41-47.
- [2] DE SOUSA L P. Bacterial communities of indoor surface of stingless bee nests[J]. PLoS One. 2021, 16(7): e0252933.
- [3] QIHE TANG, CHUNHUI MIAO, YIFEI CHEN, et al. The composition of bacteria in gut and bee-bread of stingless bees (Apidae: Meliponini) from tropics Yunnan, China[J]. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2021, 114: 1293-1305.
- [4] MENEZES C, VOLLET-NETO A, Marsaioli A J, et al. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive[J]. Current Biology. 2015, 25 (21): 2851-2855.