

研究报告

短头熊蜂肠道拮抗菌株的分离筛选鉴定及其生物特性评价

曹喆[#], 周晨焯[#], 李丹, 贺兰婷, 丛越飞, 李万里, 黄琪, 唐启河, 郭军^{*}

昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

曹喆, 周晨焯, 李丹, 贺兰婷, 丛越飞, 李万里, 黄琪, 唐启河, 郭军. 短头熊蜂肠道拮抗菌株的分离筛选鉴定及其生物特性评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4798-4808

Cao Zhe, Zhou Chenye, Li Dan, He Lanting, Cong Yuefei, Li Wanli, Huang Qi, Tang Qihe, Guo Jun. Isolation, screening, identification, and biological characterization of antagonistic strains in intestinal tract of *Bombus breviceps*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4798-4808

摘要:【背景】近年来, 由于栖息地减少、农药的大量使用及病原菌侵染等综合因素, 导致全世界的熊蜂种类与数量逐年减少, 病原菌的侵染可通过微生物在自身生长过程中产生的抑菌物质进行有效抑制或杀灭。【目的】短头熊蜂(*Bombus breviceps*)长期生存在野外环境中, 其肠道内存在着大量微生物资源。从短头熊蜂肠道内筛选拮抗菌株, 并对其抑菌特性进行研究。【方法】采用牛津杯双层法筛选拮抗菌株, 测定抑菌活性最佳菌株发酵液的抑菌物质稳定性与抑菌广谱性等抑菌特性, 并借助细胞膜通透性、流式细胞仪检测等试验探究其抑菌机制。【结果】得到了5株具有明显抑菌作用的拮抗菌株, 其中果杆菌(*Fructobacillus tropaeoli*) CZ01对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)和无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)这5种病原指示菌都具有高度抑菌效果。菌株CZ01对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最佳, 抑菌圈直径可达到(21.21±0.25) mm, 在121 °C处理后仍具有67.36%以上的抑菌活性, 调整pH值为10.0时仍具有78.16%的抑菌活性。【结论】短头熊蜂肠道微生物资源较丰富, 尤其是果杆菌(*F. tropaeoli*) CZ01具有抑菌活性高、稳定性好、抑菌谱广等特性, 对金黄色葡萄球菌具有良好的杀灭效果, 显示出良好的应用潜能。

关键词: 短头熊蜂; 拮抗菌株; 抑菌作用; 肠道微生物

基金项目: 云南省基础研究专项(CB22052C156A); 国家自然科学基金(31660695)

[#]对本文贡献相同

Supported by: Yunnan Provincial Fundamental Research Projects (CB22052C156A); National Natural Science Foundation of China (31660695)

[#]These authors equally contributed to this work

***Corresponding author:** E-mail: guojun0591@126.com

Received: 2022-04-20; **Accepted:** 2022-07-06; **Published online:** 2022-07-22

Isolation, screening, identification, and biological characterization of antagonistic strains in intestinal tract of *Bombus breviceps*

CAO Zhe[#], ZHOU Chenye[#], LI Dan, HE Lanting, CONG Yuefei, LI Wanli, HUANG Qi, TANG Qihe, GUO Jun^{*}

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] In recent years, bumblebee species and number have been decreasing worldwide due to habitat reduction, abuse of pesticides, and infection of pathogens. The pathogens can be effectively killed by the antimicrobial substances produced by microorganisms during their growth. [Objective] *Bombus breviceps* lives in the wild for a long time and has rich microbial resources in the intestinal tract. We screened antagonistic strains from the intestinal tract of *B. breviceps* and studied their antibacterial properties. [Methods] The Oxford cup double-layer method was used to screen out the antagonistic strains and determine the stability of antibacterial substances and the inhibition spectrum of the fermentation broth of the strains with strong inhibitory activity. Further, cell membrane permeability and flow cytometry were employed to investigate the inhibition mechanism. [Results] Five antagonistic strains with significant antibacterial effect were obtained, among which *Fructobacillus tropaeoli* CZ01 demonstrated strong inhibitory effect on all the five indicator bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, and *Streptococcus agalactiae*. It showed the strongest inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, with an inhibition zone diameter of (21.21±0.25) mm. Moreover, the inhibitory activity was still 67.36% after treatment at 121 °C and 78.16% after the medium was adjusted to pH 10.0. [Conclusion] *B. breviceps* carries rich microbial resources in intestinal tract. In particular, *F. tropaeoli* CZ01 with high antibacterial activity, good stability, and wide intestinal spectrum, has good killing effect on *S. aureus* and demonstrates good application potential.

Keywords: *Bombus breviceps*; antagonistic strain; antibacterial effect; intestinal microbiota

短头熊蜂 (*Bombus breviceps*) 属昆虫纲 (*Insecta*) 膜翅目 (*Hymenoptera*) 蜜蜂科 (*Apidae*) 熊蜂属 (*Bombus*), 也是番茄、瓜果类和浆果类等作物最有效的传粉者^[1]。目前, 我国熊蜂资源丰富, 有 120 多种, 广泛分布于我国西南地区^[2-3]。熊蜂具有较长的口器, 采集力强, 同时具有适应环境能力强、传粉效率高等优势^[4]。熊蜂授粉可以提升授粉效率, 从而提高农产品产量和品质、有效降低农业生产中的病虫害和激素残留问题^[5-6]。因此, 熊蜂授粉有助于农业

增产增收, 保护生物多样性。近年来, 温度升高和频繁的极端天气导致了欧美熊蜂的灭绝^[7]。由于气候变暖、农药残留和病原菌侵染等原因改变了熊蜂的生存环境, 导致全球熊蜂资源正在减少, 包括我国熊蜂资源丰富的西南地区其熊蜂数量也在减少^[8]。因此, 要利用熊蜂为可控环境下的农作物传粉, 首先要实现熊蜂的人工饲养。我国目前开发出几种授粉熊蜂, 如兰州熊蜂、云南的短头熊蜂等。以兰州熊蜂为例, 该熊蜂具有易于饲养、群势大及授粉效果好等

特点^[9]。越来越多的国家开始着手本土熊蜂的筛选与驯化,我国的熊蜂种类资源丰富,目前已经开始对熊蜂人工饲养及农业授粉等进行研究^[10],为工厂化人工饲养本土熊蜂积累了很好的前期基础。

昆虫具有种类繁多、适应能力强、分布广泛等特点^[11]。昆虫肠道内的微生物菌群能很好地帮助寄主消化并吸收食物中的营养物质,从而供给自身和寄主生长所需^[12]。同时,昆虫作为无脊椎动物,不具备完善的免疫系统,使得昆虫更易遭到致病性微生物的侵害^[13],但是昆虫自身和肠道细菌能够分泌抗菌肽蛋白,有效地抵御致病性微生物的侵害。以蜜蜂为例,蜜蜂肠道微生物在其漫长的进化演变史中起着至关重要的作用,丰富的肠道菌群维持着体内环境的稳态^[14]。此外,肠道菌群在人体及动植物中发挥着不可或缺的作用,这已经得到学术界的广泛认可。例如,肠道菌群参与了营养物质的代谢,这有助于在保障自身充足营养的情况下有效地抵御病原菌侵害^[15];雷清芝等^[16]研究东方蜜蜂工蜂,从其肠道中分离出的5株罗伊氏乳杆菌均能抑制鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌和福氏志贺氏菌3种致病菌的生长。而且肠道微生物在生长过程中能分泌具有抑菌活性的蛋白或者多肽,具备抑菌效果好、安全可靠的特点,拥有良好的应用前景^[17]。已经有研究发现,熊蜂短膜虫是熊蜂的主要寄生虫,其肠道菌在抵御短膜虫侵染时发挥了关键作用^[18]。然而,短头熊蜂作为我国重要的可开发的熊蜂种类之一,其肠道菌群资源及功能信息均未得到深入揭示。因此,本文以我国本土优势蜂种——短头熊蜂为实验材料,从成年工蜂肠道中筛选拮抗菌株,对其抑菌效果和特性进行评价,并初步探讨其抑菌机制,以期为后续开发高效、无毒的生物杀菌剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

病原指示菌株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)均保存于本实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器

蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶和木瓜酶,上海源叶生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;ABP 双荧光素酶检测试剂盒,ABP Biosciences 公司;LB 培养基、MRS 培养基,上海汉尼生物技术有限公司;PCR 试剂和通用引物 27F、1492R,生工生物工程(上海)股份有限公司。

超净工作台,上海苏坤实业有限公司;台式离心机, Eppendorf 公司;PCR 扩增仪,杭州博日科技有限公司;恒温培养箱,三洋电器股份有限公司;恒温摇床,上海一恒科学仪器有限公司;超低温冰箱,赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 短头熊蜂肠道细菌的筛选

成年短头熊蜂工蜂采集自昆明理工大学,于采集墨西哥鼠尾草时抓捕,并通过生物学特征鉴定所采集样本为短头熊蜂工蜂。首先,取12只短头熊蜂,3只为一组,试验前饥饿处理24h。然后,用75%酒精浸泡1min,再用无菌水冲洗后,置于超净工作台解剖盘上,用灼烧后的镊子拉出其肠道,置于装有1mL生理盐水的已灭菌EP管中,使用研磨棒充分研磨匀浆^[19]。按照 10^{-1} 、 10^{-3} 和 10^{-5} 3个稀释梯度均匀涂布于LB和MRS固体培养基上,接种量为100 μ L,置于二氧化碳培养箱37 $^{\circ}$ C恒温培养

36–48 h。挑取单菌落划线纯化 3 次以上得到纯菌株。最后, 将分离得到的菌株根据菌落形态特征和革兰氏染色结果进行初步鉴定, 保存于超低温冰箱中备用。

1.3 拮抗菌株的筛选

将获得的各菌株, 以 100 μL 接种量接种于 5 mL MRS 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min 得到发酵上清液。然后通过 0.22 μm 的微孔滤膜进一步去除菌体细胞, 得到无细胞发酵上清液。采用牛津杯双层平板法^[20]测定发酵上清液的抑菌效果, 得到具有抑制金黄色葡萄球菌的拮抗细菌, 以等量高温灭活后的各菌株对应发酵上清液作为对照, 每组进行 3 个平行试验, 以进一步明确各菌株的抑菌效果。

抑菌效果的评定标准: 抑菌圈直径 < 6 mm 为无抑菌效果, 抑菌圈直径 < 10 mm 为低度抑菌效果, 10 mm < 抑菌圈直径 < 15 mm 为中度抑菌效果, 抑菌圈直径 > 15 mm 为高度抑菌效果^[21]。

1.4 拮抗细菌的 DNA 提取与菌种鉴定

将具有抑制金黄色葡萄球菌的菌株, 根据基因组 DNA 快速提取试剂盒的说明书提取菌株基因组 DNA^[11]。以菌株基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGACTTAACCCCAA TCGC-3') 扩增 16S rRNA 基因序列。PCR 反应体系 (20 μL): 2 \times Mix 10 μL , 上、下游引物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 (50 ng/ μL) 1 μL , ddH₂O 7 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 30 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。经琼脂糖电泳对 PCR 扩增产物检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果上传至 GenBank 数据库, 并在 NCBI 数据库进行 BLAST 与已知序列比对, 然后使用 MEGA X 软件构建系统发育树。

1.5 发酵液的抑菌物质稳定性

1.5.1 发酵液的酶敏感性

将获得的发酵上清液 pH 值调至 7.0, 在发酵上清液中加入浓度为 1 mg/mL 的不同酶溶液, 放入水浴锅中 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 2 h 后, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 使酶变性失活^[22]。以未经酶处理的发酵上清液作为对照, 平行试验 3 次。

1.5.2 发酵液的热、酸碱稳定性分析

将发酵上清液使用水浴或者金属浴处理 30 min, 温度为 37–121 $^{\circ}\text{C}$, 自然冷却至室温后再进行热稳定性测定。使用 5 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将发酵上清液 pH 值调至 2.0–10.0, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 将 pH 值调回 7.0 再进行酸碱稳定性测定。以未经处理的发酵上清液作为对照, 平行试验 3 次。

1.5.3 发酵液抑菌谱评估

采用牛津杯双层平板法评估发酵上清液对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、大肠杆菌、福氏志贺氏菌、霍乱沙门氏菌 5 种致病菌的抑制效果。以高温灭活后的发酵液作为对照平行试验 3 次。抑菌效果评定标准同 1.3。

1.6 细胞活力检测

为了测定发酵液作用于金黄色葡萄球菌后的细胞膜通透性变化。将 0.5 mL 金黄色葡萄球菌 (10^7 CFU/mL) 添加到的 5 mL EP 管中, 加入 1 mL 的发酵上清液, 用 LB 液体培养基补齐至 3 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 2 h。处理后 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液收集菌体, 使用生理盐水使菌体悬浮后, 再离心收集菌体, 此步骤重复 3 次, 以得到清洗的菌体。菌体中加入 100 μL 生理盐水, 按照 ABP 双荧光素酶检测试剂盒的步骤, 黑暗处染色 15 min 置于荧光倒置显微镜下观察。以未经发酵上清液相同处理的金黄色葡萄球菌菌体作为对照, 平行试验 3 次。

1.7 流式细胞仪检测

为了检测发酵液作用于金黄色葡萄球菌前

后的变化。使用 1.6 相同的处理方法后,用流式细胞仪检测。以未经发酵液相同处理的金黄色葡萄球菌菌体作为对照,平行试验 3 次。

1.8 数据分析

试验中数据均通过平行试验 3 次测得,并以平均值 \pm 标准差($\bar{X}\pm S$)方式呈现。数据整理分析使用 Origin 9.0 和 IBM SPSS 26.0 统计软件进行。采用 *t* 检验(student's *t* test)、单因素方差分析和最小显著差异法进行数据对间显著性检验,以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选

通过牛津杯双层平板法,筛选得到 5 株对

金黄色葡萄球菌具有较高抑菌活性的菌株(图 1 和表 1)。结果显示,5 株菌对金黄色葡萄球菌的抑菌直径范围在(12.89 \pm 0.17) mm–(21.21 \pm 0.25) mm 之间,与对照相比均存在显著差异($P<0.05$)。菌株 CZ03、CZ07 和 CZ01 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性分别为(18.66 \pm 0.30) mm、(18.12 \pm 0.33) mm 和(21.21 \pm 0.22) mm,菌株 CZ02 和 CZ11 抑菌活性次之,分别为(13.89 \pm 0.16) mm 和(15.46 \pm 0.31) mm。所获得的 5 株菌中 CZ01、CZ03、CZ07 和 CZ11 都具有高度抑菌效果,CZ02 具有中度抑菌效果,其中菌株 CZ01 的抑菌效果最好,因此选择该菌株作为后续研究对象。如图 1 所示,菌株 CZ01 对大肠杆菌(A)、无乳链球菌(B)和金黄色葡萄球菌(C)均具有抑菌效果。

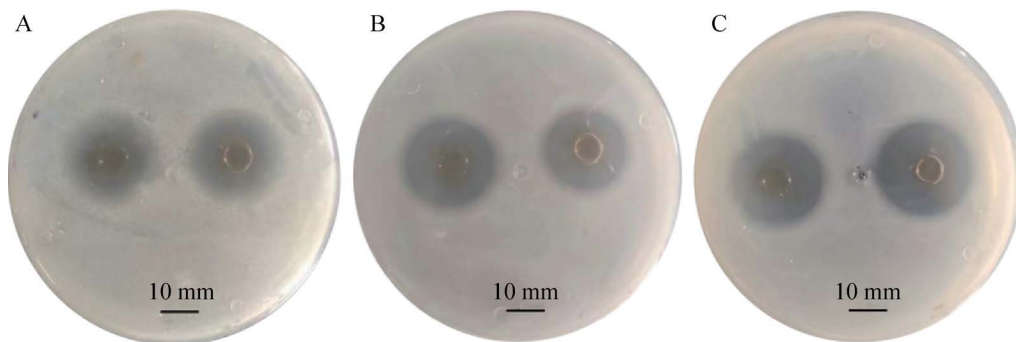


图 1 拮抗菌株抑菌效果图展示 A: 大肠杆菌; B: 无乳链球菌; C: 金黄色葡萄球菌

Figure 1 Display of bacteriostatic effect of antagonistic strains. A: *Escherichia coli*; B: *Streptococcus agalactiae*; C: *Staphylococcus aureus*.

表 1 拮抗菌株发酵液抑菌圈直径

Table 1 Diameter of inhibition circle of fermentation broth of antagonistic strain

序号 No.	菌株 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	对照组 Control group (mm)	抑菌效果 Bacteriostatic effect
CZ01	<i>Fructobacillus tropaeoli</i>	21.21 \pm 0.22*	8.04 \pm 0.07	Highly bacteriostatic
CZ03	<i>Lactobacillus sakei</i>	18.66 \pm 0.30*	8.05 \pm 0.06	Highly bacteriostatic
CZ07	<i>Bacillus pumilus</i>	18.12 \pm 0.33*	8.07 \pm 0.06	Highly bacteriostatic
CZ11	<i>Weissella bombi</i>	15.46 \pm 0.31*	8.03 \pm 0.05	Highly bacteriostatic
CZ02	<i>Bacillus subtilis</i>	13.89 \pm 0.16*	8.03 \pm 0.03	Moderately bacteriostatic

注: *代表差异显著($P<0.05$), $n=9$, 为 3 次平行试验中每次的样本总量。下同

Note: *: Significant difference in representation ($P<0.05$), $n=9$, is the total number of samples in each of the 3 parallel trials. The same below.

2.2 拮抗菌株 CZ01 的鉴定

2.2.1 菌株 CZ01 形态学观察结果

菌株 CZ01 在 MRS 固体培养基平板上培养 12 h 后(图 2A), 菌落呈圆形、白色、表面光滑不透明、边缘整齐; 如图 2B 所示, 菌株 CZ01 经革兰氏染色后于光学显微镜下观察, 菌体呈紫色, 证明该菌株为革兰氏阳性菌, 菌体呈杆状。

2.2.2 菌株 CZ01 的分子鉴定结果

经牛津杯双层法筛选后, 对抑制金黄色葡萄球菌效果最佳的菌株 CZ01 进行了 16S rRNA 基因测序, 并将测序序列提交到 GenBank 数据库, 登录号为 ON310799。基于 16S rRNA 基因序列分析, 在 GenBank 数据库中与已知序列进

行相似性比较, 选取相似性在 99% 以上的细菌种类确定为目标物种, 得到系统发育树, 确定拮抗菌株 CZ01 为果杆菌 *F. tropaeoli* (图 3)。

2.3 发酵液的抑菌特性

2.3.1 发酵液酶敏感性结果

菌株 CZ01 产生的发酵上清液经不同酶溶液处理后, 通过牛津杯双层法评价发酵上清液的抑菌效果。如图 4 所示, 抑菌活性均保持在 50% 以上, 其中胃蛋白酶和碱性蛋白酶处理之后的发酵上清液抑菌活性变化不大, 抑菌圈直径与对照组相比, 抑菌圈直径并未发生显著下降($P>0.05$); 蛋白酶 K、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶处理后抑菌圈直径显著减小, 抑菌活性均有不

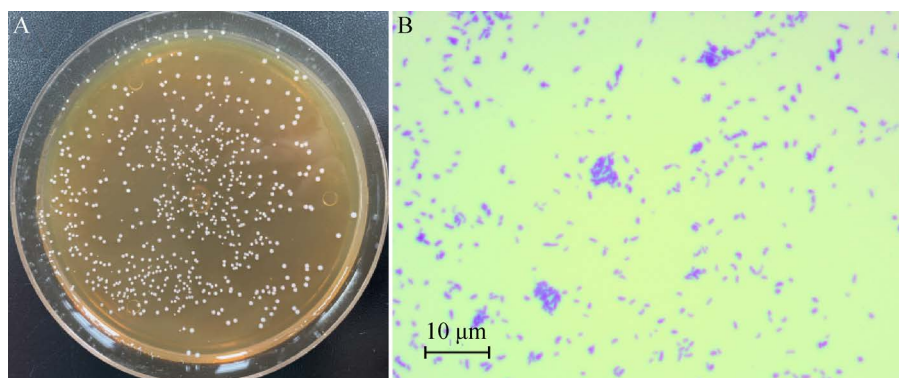


图 2 菌株 CZ01 的形态学特征 A: 菌落形态图; B: 革兰氏染色镜检图

Figure 2 Morphological characteristics of strain CZ01. A: Colony morphology diagram; B: Gram stain microscopic examination.

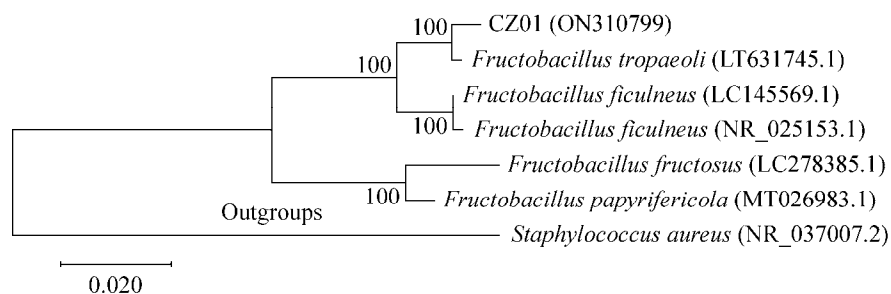


图 3 菌株 CZ01 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 标尺表示遗传距离; 分支点数字表示置信度; 括号中内容表示菌株 GenBank 登录号

Figure 3 Phylogenetic tree of strain CZ01 based on 16S rRNA gene sequence. The ruler indicates genetic distance; The number of branch points indicates the confidence; The contents in brackets indicate the strain GenBank accession number.

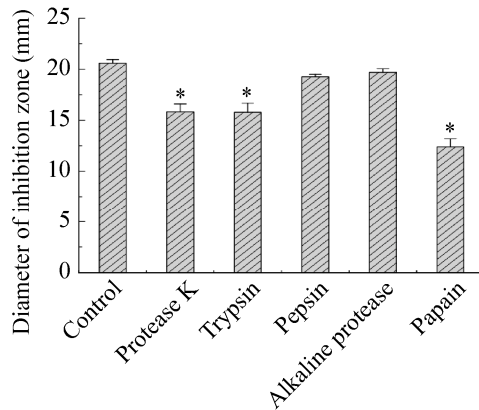


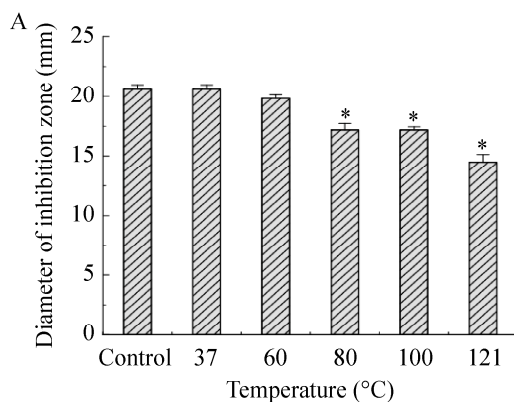
图4 发酵上清液的酶敏感性 *：差异显著 ($P<0.05$)

Figure 4 Enzyme sensitivity of fermentation broth. *: Significant difference ($P<0.05$).

同程度的下降,分别为蛋白酶K下降了25.35%、胰蛋白酶下降了25.76% ($P<0.05$)以及木瓜酶下降了43.24% ($P<0.05$)。

2.3.2 发酵液热、酸碱耐受性测试结果

通过不同温度梯度和酸碱度梯度的测试,发酵上清液酸碱耐受与热稳定性的结果如图5A所示,发酵上清液在37–121 °C范围内处理后,随着温度的升高抑菌活性也逐渐下降,从80 °C开始下降幅度比较明显,在80 °C和100 °C时抑菌活性分别为81.13%±2.49%和80.79%±1.78%,



出现了显著差异,在121 °C时活性损失的幅度最大,在121 °C抑菌活性最低,仅为67.36%±1.46%。另外,在酸性条件下,发酵上清液的抑菌活性无明显变化,在pH 2.0–6.0时发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性未发生显著下降;但随着pH值的逐渐上升,在pH 8.0–10.0时抑菌活性开始出现下降,表现出显著差异,在pH 10.0时达到最低,仅保持了78.16%±1.89%的抑菌活性(图5B)。

2.3.3 拮抗菌株发酵液的抑菌谱

使用发酵上清液对5种致病指示菌进行广谱抑菌效果测定。结果发现,发酵液对所选择的5株致病菌均显示出了良好的抑制效果。发酵上清液对无乳链球菌、大肠杆菌、霍乱沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和福氏志贺氏菌5种食源性致病菌的抑菌圈直径均达到了15 mm以上,尤其是对金黄色葡萄球菌抑菌效果最好,为(20.97±0.14) mm,抑制效果均为高度抑菌(图6和表2)。

2.4 细胞活力检测结果

金黄色葡萄球菌经发酵上清液处理后,通过荧光显微镜观察其细胞活力。如图7A所示,未经发酵上清液处理的只检测到绿色的荧光;

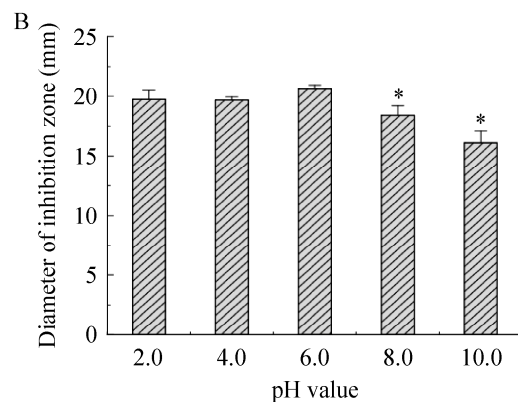


图5 发酵上清液的热稳定性与酸碱耐受性 A：热稳定性；B：酸碱耐受性；*：差异显著 ($P<0.05$)

Figure 5 Thermal stability and acid base tolerance of fermentation broth. A: Thermal stability; B: Acid base tolerance; *: Significant difference ($P<0.05$).

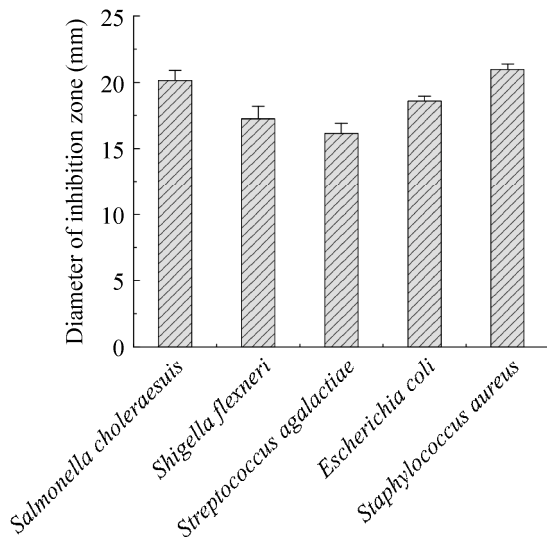


图 6 发酵液抑菌谱

Figure 6 Fermentation broth bacterial inhibition spectrum.

表 2 发酵上清液抑菌谱

Table 2 Fermentation broth bacterial inhibition spectrum

指示菌株 Tested strains	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	对照组 Control group (mm)	抑菌效果 Bacteriostatic effect
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.97±0.14*	8.03±0.04	Highly bacteriostatic
<i>Salmonella choleraesuis</i>	20.13±0.34*	8.02±0.07	Highly bacteriostatic
<i>Escherichia coli</i>	18.54±0.31*	8.06±0.11	Highly bacteriostatic
<i>Shigella flexneri</i>	17.27±0.23*	8.07±0.09	Highly bacteriostatic
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16.17±0.16*	8.03±0.12	Highly bacteriostatic

Note: *: Significant difference ($P < 0.05$).

而如图 7B 所示, 在发酵上清液处理后, 除了绿色荧光外出现了大量的红色荧光。此外, 通过流式细胞仪分析图(图 8)也可以看到, 处理组与对照组相比, 处理组的荧光信号强度从 6.33% 增强到 49.90%。这些结果说明, 经过发酵液处理后致病菌细胞活力下降, 有一部分被杀灭, 导致细胞膜通透性变化, 对金黄色葡萄球菌显示显著的抑制作用。

3 讨论与结论

熊蜂是农业生态系统中非常重要的传粉媒介, 但它们目前正承受着越来越大的环境压力。由于致病菌、营养不良和寄生虫等环境压力因素的多样性^[23], 对熊蜂的保护需要多样化和综

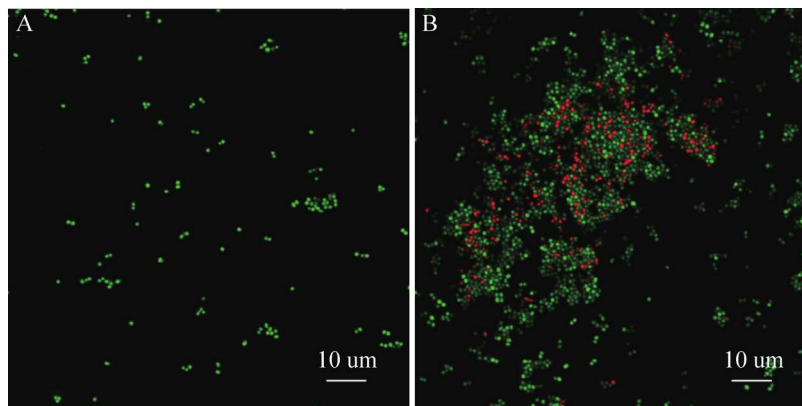


图 7 发酵上清液对细胞活力的影响 A: 对照; B: 处理

Figure 7 Effect of fermentation supernatant on cell viability. A: Control; B: Treatment.

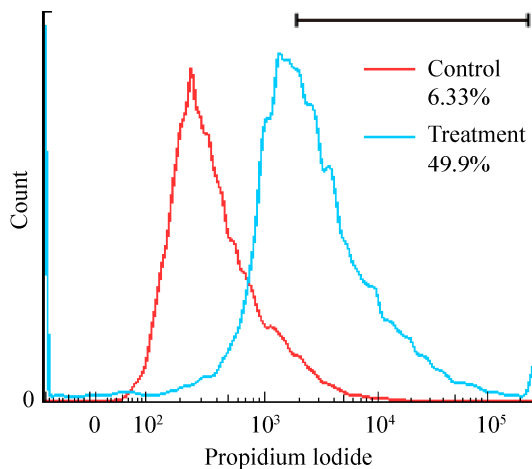


图8 流式细胞仪分析图

Figure 8 Flow cytometry analysis chart.

合性的方法。熊蜂在生长发育过程中,其肠道菌群是动态变化的^[24]。有研究表明,熊蜂肠道的微生物菌群可以保护宿主免受短膜虫侵害^[25],并对多种致病菌形成较好的抑制效果,说明熊蜂肠道微生物在熊蜂生长过程中起到了重要的作用,如前文提到蜜蜂肠道菌群参与代谢,能够抵御致病性微生物侵害,可以保障熊蜂的营养,提高生产能力。因此,探究熊蜂肠道菌群的功能可以为熊蜂的人工饲养和保障蜂群健康提供帮助。

本研究从短头熊蜂肠道中筛选拮抗菌株,结合菌株形态学特征和16S rRNA基因序列分子鉴定,发现该菌株是果杆菌(*Fructobacillus tropaeoli*),具有高度抑菌效果。已经有研究表明,蜜蜂蜂巢中含有的果杆菌属细菌(*Fructobacillus* sp.)可以促进蜜蜂肠道核心菌群的生长,并且能够利用单糖果糖和葡萄糖,对保障蜂群营养起到了关键作用^[26]。这一结果同目前产抗菌肽或细菌素的细菌资源相似,因此也说明果杆菌属细菌在维持短头熊蜂肠道菌群稳定和健康上起了重要作用^[27-29]。此外,虽然另外4株菌的抑菌效果稍弱于菌株CZ01,但是抑菌活性也较高,均达到了高度抑菌效果,说明这些细菌在

熊蜂生长发育过程中可能参与对致病菌侵害的保护作用。因此,本研究通过挖掘短头熊蜂肠道菌群资源的同时,丰富了人们对短头熊蜂肠道菌群的认识,也为功能性益生菌保护短头熊蜂肠道菌群健康提供了一定的理论基础。

抑菌特性优良与否,往往决定了可开发利用的前景。本研究发现,发酵上清液可以有效抑制金黄色葡萄球菌、霍乱沙门氏菌、大肠杆菌和福氏志贺氏菌4种食源性致病菌。而且经过多种蛋白酶溶液处理后发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性发生了下降,推测抑菌物质是一类蛋白质^[28]。同时,发酵液经过pH值高于8.0和温度高于80℃处理后,表现出良好的酸碱、热耐受能力。抑菌活性在过碱和高温的影响下,分别在pH 10.0和温度为121℃时达到最低,抑菌活性保留了78.16%±1.89%和67.36%±1.46%;伴随着pH值和温度的上升,抑菌活性出现下降。说明发酵上清液中抑菌物质可能是蛋白质或多肽,过碱和高温条件处理导致蛋白结构变性失活,从而造成抑菌活性降低^[30]。虽然抑菌活性受过碱和高温条件的影响,但在相同条件下其抑菌活性下降程度明显弱于目前所发现的大多数抑菌物质^[31-32]。另外,利用5种指示病原菌评估拮抗菌株CZ01发酵上清液的抑菌活性后发现,对于5种指示病原菌的抑菌圈直径均在15mm以上,达到高度抑菌效果,具有良好的广谱抑菌特性^[33-34]。经过发酵液处理的致病菌细胞活力有明显的下降,因此,本次筛选获得的拮抗菌株CZ01抑菌活性高、抑菌物质稳定性强,有较强的酸碱耐受性且热稳定性强,还能够有效地抑制多种食源性致病菌,保护熊蜂免受病原菌侵染,具有较好的应用潜能。

短头熊蜂肠道内为厌氧环境,有可能还存在大量兼性厌氧的微生物资源,后续可以从以下几个方面开展研究:(1)继续研究菌株CZ01

的代谢产物, 鉴定并得到抑菌纯物质, 深入揭示其抑菌的分子机制;(2) 筛选培养更多的熊蜂肠道益生菌资源, 了解菌与菌之间的相关关系, 逐步开发替代抗生素的微生物制剂, 并将其应用于熊蜂和蜜蜂饲养中, 将能很好地改善蜂群微环境并减少抗生素的使用, 保障农业生产安全和增强传粉蜂类的健康水平。

REFERENCES

- [1] 刘新宇, 高崇东. 熊蜂人工繁育与授粉应用[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2011
Liu XY, Gao CD. Artificial Breeding and Pollination of Bumblebee[M]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University Press, 2011 (in Chinese)
- [2] Cameron SA, Sadd BM. Global trends in bumble bee health[J]. Annual Review of Entomology, 2020, 65: 209-232
- [3] Sun C, Huang JX, Wang Y, Zhao XM, Su L, Thomas GWC, Zhao MY, Zhang XT, Jungreis I, Kellis M, et al. Erratum to: genus-wide characterization of bumblebee genomes provides insights into their evolution and variation in ecological and behavioral traits[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3031
- [4] 黄训兵, 李辉, 代晓彦, 吴光安, 周浩, 陈浩, 郑礼, 翟一凡. 熊蜂行为特性与授粉应用研究进展[J]. 山东农业科学, 2021, 53(8): 130-137
Huang XB, Li H, Dai XY, Wu GA, Zhou H, Chen H, Zheng L, Zhai YF. Research progress of bumblebee behavior and pollination application[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2021, 53(8): 130-137 (in Chinese)
- [5] 黄家兴, 安建东, 吴杰, 国占宝. 熊蜂为温室茄属作物授粉的优越性[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 5-9
Huang JX, An JD, Wu J, Guo ZB. Advantage of bumblebee as pollinator for *Solanum* in greenhouse[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(3): 5-9 (in Chinese)
- [6] Ayasse M, Jarau S. Chemical ecology of bumble bees[J]. Annual Review of Entomology, 2014, 59: 299-319
- [7] Soroye P, Newbold T, Kerr J. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents[J]. Science, 2020, 367(6478): 685-688
- [8] Kwong WK, Engel P, Koch H, Moran NA. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(31): 11509-11514
- [9] 彭文君, 黄家兴, 吴杰, 安建东. 华北地区六种熊蜂的地理分布及生态习性[J]. 昆虫知识, 2009, 46(1): 115-120, 168
Peng WJ, Huang JX, Wu J, An JD. Geographic distribution and bionomics of six bumblebee species in north China[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2009, 46(1): 115-120, 168 (in Chinese)
- [10] Liang C, Ding GL, Huang JX, Zhang XW, Miao CH, An JD. Characteristics of the two Asian bumblebee species *Bombus friseanus* and *Bombus breviceps* (Hymenoptera: Apidae)[J]. Insects, 2020, 11(3): 163
- [11] Dijkstra KDB, Monaghan MT, Pauls SU. Freshwater biodiversity and aquatic insect diversification[J]. Annual Review of Entomology, 2014, 59: 143-163
- [12] Almasia NI, Molinari MP, Maroniche GA, Nahirñak V, Barón MPB, Taboga OA, Rovere CV. Successful production of the potato antimicrobial peptide snak-in-1 in baculovirus-infected insect cells and development of specific antibodies[J]. BMC Biotechnology, 2017, 17(1): 75
- [13] 裘婷婷, 谢辛慈, 施莹, 彭亚明, 沈熠菁, 陈勇, 吕正兵, 聂作明. 昆虫抗菌肽的研究与开发进展[J]. 药物生物技术, 2015, 22(6): 545-548
Qiu TT, Xie XC, Shi Y, Peng YM, Shen YJ, Chen Y, Lv ZB, Nie ZM. Advances in research and development of insect antibacterial peptide[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 22(6): 545-548 (in Chinese)
- [14] Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Rada V, Dubná S, Marounek M. *Bifidobacteria* in the digestive tract of bumblebees[J]. Anaerobe, 2010, 16(2): 165-170
- [15] Fisher K, Watrous KM, Williams NM, Richardson LL, Woodard SH. A contemporary survey of bumble bee diversity across the state of California[J]. Ecology and Evolution, 2022, 12(3): e8505
- [16] 雷清芝, 汪思凡, 殷桦娟, 程燕东, 余行, 潘洪彬, 林秋叶, 曹振辉. 罗伊氏乳杆菌 LP4 对东方蜜蜂成年工蜂存活率、肠道菌群结构和抗菌肽 mRNA 表达量的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(5): 796-803
Lei QZ, Wang SF, Yin HJ, Cheng YD, Yu H, Pan HB, Lin QY, Cao ZH. Effects of *Lactobacillus reuteri* LP4 on the survival rate, intestinal microbiota composition and gut antimicrobial peptide gene expression in adult workers of *Apis cerana fabricius*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science, 2020, 35(5): 796-803 (in Chinese)
- [17] Li HW, Xiang YZ, Zhang M, Jiang YH, Zhang Y, Liu YY, Lin LB, Zhang QL. A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: isolation, purification, identification, antibacterial and

- antibiofilm activity[J]. LWT, 2021, 140: 110826
- [18] 唐裕杰. 熊蜂短膜虫与肠道菌群研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2019
Tang YJ. Study on *Crithidia* and gut bacteria in bumblebee[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [19] 陈奕霏. 云南地区部分野生蜂肠道菌群多样性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2021
Chen YF. Study on gut microbiota of a part of wild bees in Yunnan[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2021 (in Chinese)
- [20] 江宇航, 李宏伟, 杨晓洁, 林连兵, 张棋麟. 马尾松毛虫肠道产细菌素细菌的筛选及抑菌特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 123-134
Jiang YH, Li HW, Yang XJ, Lin LB, Zhang QL. Screening and antibacterial activity of bacteriocin-producing bacteria in intestine of *Dendrolimus punctatus*[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 123-134 (in Chinese)
- [21] 朱成科, 王建, 周燕, 雷骆, 邓星星, 蒲德成, 郑宗林, 周朝伟, 郑永华. 150 种中草药体外抑杀维氏气单胞菌的药效研究[J]. 淡水渔业, 2018, 48(1): 80-85, 96
Zhu CK, Wang J, Zhou Y, Lei L, Deng XX, Pu DC, Zheng ZL, Zhou CW, Zheng YH. Antimicrobial activities for 150 kinds of Chinese herbal medicines against *Aeromonas veronii* *in vitro*[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(1): 80-85, 96 (in Chinese)
- [22] 辛维岗, 江宇航, 陈诗雨, 徐美余, 周红兵, 张棋麟, 林连兵. 滇池金线鲃肠道产细菌素细菌的筛选鉴定及细菌素 LSP01 的抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 242-255
Xin WG, Jiang YH, Chen SY, Xu MY, Zhou HB, Zhang QL, Lin LB. Screening and identification of bacteriocin-producing bacteria in the intestines of *Sinocyclocheilus grahami* in Dianchi and the antibacterial effect of bacteriocin LSP01[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 242-255 (in Chinese)
- [23] Janashia I, Alaux C. Specific immune stimulation by endogenous bacteria in honey bees (*Hymenoptera: Apidae*)[J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(3): 1474-1477
- [24] 徐龙龙, 吴杰, 郭军, 李继莲. 共生菌群在熊蜂生长发育过程中的动态变化[J]. 中国农业科学, 2014, 47(10): 2030-2037
Xu LL, Wu J, Guo J, Li JL. Dynamic variation of symbionts in bumblebees during hosts growth and development[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(10): 2030-2037 (in Chinese)
- [25] Koch H, Schmid-Hempel P. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(48): 19288-19292
- [26] Rokop ZP, Horton MA, Newton ILG. Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7261-7270
- [27] Zhao HB, Cai CE, Liu XY, Jiao BH, Chen B, Cai MH, He PM. Secondary metabolites of Antarctic fungi antagonistic to aquatic pathogenic bacteria[J]. Open Life Sciences, 2018, 13: 11-21
- [28] Zhang Y, Yang JM, Liu Y, Wu YQ, Fang ZJ, Wang YL, Sun LJ, Deng Q, Gooneratne R, Xiao LX. A novel bacteriocin PE-ZYB₁ produced by *Pediococcus pentosaceus* zy-B isolated from intestine of *Mimachlamys nobilis*: purification, identification and its anti-listerial action[J]. LWT, 2020, 118: 108760
- [29] Lü XR, Miao LH, Ma HH, Bai FL, Lin Y, Sun MT, Li JR. Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(3): 695-703
- [30] Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The continuing story of class IIa bacteriocins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2006, 70(2): 564-582
- [31] Golneshin A, Gor MC, Williamson N, Vezina B, Van TTH, May BK, Smith AT. Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21[J]. Heliyon, 2020, 6(8): e04715
- [32] Zhao RX, Lu YQ, Ran JJ, Li G, Lei S, Zhu Y, Xu BC. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* zrx01[J]. Food Bioscience, 2020, 38: 100754
- [33] Peng SD, Song JJ, Zeng WY, Wang HW, Zhang Y, Xin JW, Suo HY. A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SHY 21-2 from yak yogurt: purification, antimicrobial characteristics and antibacterial mechanism[J]. LWT, 2021, 142: 110955
- [34] Ye PX, Wang JW, Liu MM, Li P, Gu Q. Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* ZFM54[J]. LWT, 2021, 143: 111125