微生物於昆蟲飼養之研究進展

陳妤欣[1] 洪乙庭[1] 馬威鈞[1] 吳明城[1,*]

[1]國立中興大學昆蟲學系。台灣 台中市。

摘要

昆蟲擁有豐富的昆蟲微生物資源，這些微生物可以幫助宿主分解食物、降解來自環境中的化合物、合成一些必需營養或抵抗病菌的物質等，具有廣泛的應用價值。已有多篇研究證實，於昆蟲腸道中共生之微生物可間接或直接影響宿主的健康狀況。本研究室主要進行蜂類 (西方蜂、東方蜂、熊蜂、無螫蜂等) 生物學研究，其中針對蜂腸道微生物進行分離，並分析微生物對於蜂之生理影響，本文特別介紹從本土熊蜂腸道分離出之腸膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 之特性、其發酵菌液對蜂基因表現之影響和該菌於蜂群之擴散現象；此外我們同時衍伸介紹常見的雙翅目和半翅目昆蟲之微生物研究。

關鍵詞：微生物、雙翅目、半翅目、蜜蜂。

前言

昆蟲是世界上物種數量最多、個體數量最大、生活方式最多樣的生物，因此造就多樣性的微生物與其共生，這些微生物可以幫助宿主分解食物、降解來自環境中的化合物、合成一些必需營養或抵抗病菌的物質等，具有廣泛的應用價值 (Engel & Moran 2013; Beemelmanns *et al*. 2016; Berasategui *et al*. 2016; Jing *et al*. 2020)。許多昆蟲已經被大量飼養成為我們農業經濟的重要一環，如下：(1)做為可食性動物飼料使用，例如：蟋蟀 (cricket)、麵包蟲 (*Tenebrio molitor*, mealworm)、黑水虻 (*Hermetia illucens*, black soldier fly)、家蠅 (*Musca domestica*, housefly) 等，(2) 蜂產品和農作物授粉使用，例如：西方蜂 (*Apis mellifera*)、東方蜂 (*Apis cerana*)、無螫蜂亞科 (Meliponinae) 和熊蜂 (*Bombus* spp.) 等，(3)做為天敵使用，例如：菸盲椿象 (*Nesidiocoris tenuis*)、蚜繭蜂科 (Aphidlidae)、龜紋瓢蟲 (*Propylea japonica*)、基徵草蛉 (*Mallada basalis*) 等，昆蟲於大量飼養的過程會遭遇病原菌和宿主營養的問題，因此各昆蟲的腸道益生菌種類已被廣泛探討，其中以蜜蜂腸道菌種類以及其功能開發最深入 (Jung *et al.* 2014; Kwong & Moran 2016; Smith *et al.* 2017; Park *et al.* 2019; Klammsteiner *et al.* 2020; Shan *et al.* 2021)。

現今聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 和世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 將益生菌定義為「足量使用的情況下，可改善宿主腸內微生物相之平衡，並對宿主健康有益的單種或多種混合之微生物」，活的微生物於生物體皮膚、腸道及生殖道等環境定殖，沒有致病性且能與致病微生物競爭，便有潛力成為益生菌。益生菌對人類常見的益處有腸胃道保健、減緩過敏、生殖道保健、調節血糖及改善免疫力等 (FAO/WHO, 2001)。

*論文聯繫人
E-mail: mcwu12@gmail.com

以人類腸道而言，腸道負責消化食物並經由上皮細胞運輸營養物質至全身，提供生存所需要的能量。在消化過程中，腸道共生菌群提供膳食營養，並刺激細胞更新、黏膜形成和蠕動來發揮腸道屏障功能，且健康的微生物群還可以抵抗入侵病原菌 (Boleij & Tjalsma 2012)。已有多篇的研究證實，於宿主腸道中共生之微生物可間接或直接影響宿主的健康狀況，當腸道菌群多樣性降低或致病菌入侵嚴重時，甚至會造成人類的罹癌 (Boleij & Tjalsma 2012)、慢性腎臟病 (Sampaio-Maia *et al.* 2016)、精神疾病 (Sherwin, Dinan *et al.* 2018)，因此腸道共生菌成為改善宿主體質的研究焦點。以昆蟲而言，腸道微生物可協助宿主降解腸道食物，供給營養給昆蟲；另外，也可釋放代謝物提供給昆蟲，影響昆蟲生理；目前已有研究證實移除腸道內共生菌會使昆蟲無法生存 (Douglas 2014)。

昆蟲的消化道基本結構在不同的種類中是相似的，分為前腸 (foregut)、中腸 (midgut) 與後腸 (hindgut) 三個部分 (圖 1) (Engel & Moran 2013)，前腸通常負責暫時儲存或磨碎食物；中腸為主要行消化吸收的部分，有一個由上皮細胞分泌的圍食膜 (peritrophic matrix) 的構造，會不斷地脫落更換，圍食膜使微生物與上皮細胞不會直接接觸；後腸為大部分微生物菌群定殖處；昆蟲的馬式管 (Malpighian tubules)，位於中後腸的交界處，為後腸前端的延伸，延伸至體腔中吸收廢物。後腸含有含氮廢物及食物代謝物，為腸道共生菌創造生存環境，有一些昆蟲的後腸也有吸收養分的功能，例如：某些蟑螂的後腸壁包含細胞間通道，營養物質，包括共生菌產生的脂肪酸和胺基酸，可從後腸腔送至血淋巴 (Cruden & Markovetz 1987; Zurek & Keddie 1996)。昆蟲的共生微生物甚至可以透過卵殼或雌蟲分泌於卵上的物質進行垂直傳播 (Engel & Moran 2013)。昆蟲的前腸和後腸會隨著蛻皮一同脫落，而中腸的圍食膜更換會使所包含之物質被清除，因此有研究團隊透過蚊子發育時的腸道微生物定殖狀況，發現蛻皮會導致腸道細菌幾乎完全被清除 (Moll *et al.* 2001)。有一些昆蟲演化出可幫助微生物持續存在腸道中的空間 (crypts or paunches)，例如：某些植食性的異翅亞目昆蟲在中腸有特化的隱窩、高等白蟻於後腸分為兩腔室，前端為特化的發酵區等(Engel & Moran 2013)。

據統計，昆蟲腸道含有的微生物是昆蟲總細胞的 10 倍，微生物基因是動物基因的 100 倍 (Rajagopal 2009)。微生物於環境中透過食物、糞便或卵殼進入消化道定殖於昆蟲腸道，並在消化和新陳代謝中發揮重要作用，目前已知其中一些共生菌對宿主為有益的益生菌，例如: 白蟻腸道中的微生物可以幫助分解纖維素 (Breznak 2000; Noda *et al.* 2018)，並代謝產生醋酸、二氧化碳及氫氣，可供白蟻作為能量來源使用，還可幫助固氮作用 (Lilburn *et al.* 2001)；蟑螂為雜食性的昆蟲，其腸道菌相可隨著攝食不同食物而改變，幫助其代謝不同的食物(Jahnes & Sabree 2020)，且若是移除其腸道菌，會造成其高死亡率、生長緩慢、繁殖能力下降 (Brooks & Richards 1955)；黑水虻的幼蟲可透過腸道菌將有機廢棄物轉化為高價值的生物質 (biomass)，而其腸道微生物可以幫助轉化更多營養物質或更容易吸收養分，使其體重及蛹長增加 (Callegari, Jucker *et al.* 2020)，證實共生菌幫助黑水虻；中華瘧蚊 (*Anopheles sinensis*) 腸道中分離到黏質沙雷氏桿菌 (*Serratia marcescens* Y1)，發現可以透過調控中腸基因增強免疫反應，幫助其宿主抵抗瘧原蟲感染 (Bai, Wang *et al.* 2019)；黑斑土椿象 (*Parastrachia japonensis*) 為亞社會性昆蟲，其若蟲食性專一，需透過雌蟲帶回青皮木 (*Shoepfia jasminodora*) 的核果餵食，此種植物結果期僅於 6 月的 2 個星期，因此黑斑土椿象成蟲後便進入冬眠期，可長達 8-20 個月，冬眠期間他們透過腸道共生菌進行尿酸回收利用，作為合成胺基酸的原料，若是將共生菌移除，其體內胺基酸含量便明顯降低，其共生菌中含有合成硫胺素和類胡蘿蔔素的基因組，表示其可能具有幫助宿主抗氧化和避免 DNA 損傷功能 (Mondal *et al.* 2020)。

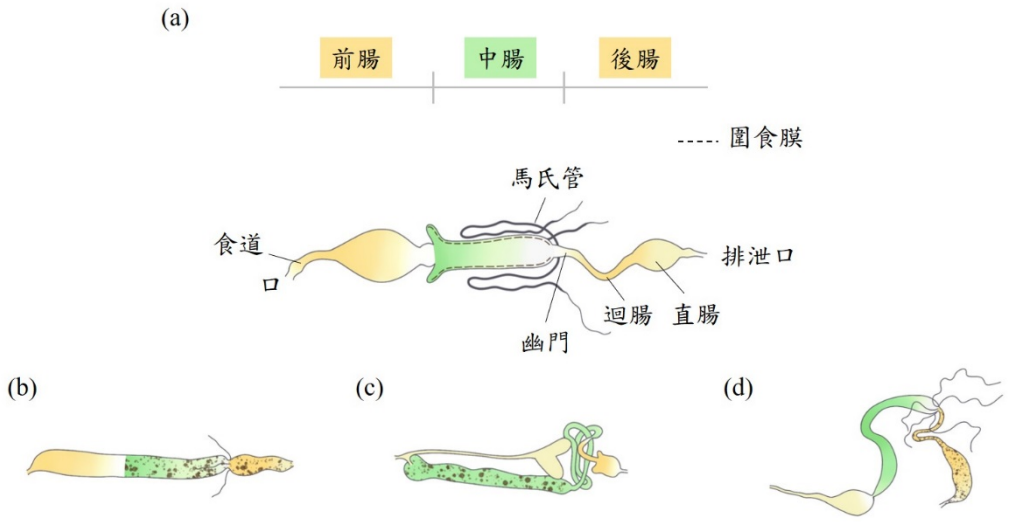


圖 1. 不同昆蟲之腸道示意圖。(a) 昆蟲典型之腸道結構：前腸、中腸及後腸；中腸有圍食膜 (虛線)，(b) 鱗翅目：幼蟲，(c) 雙翅目：果蠅，(d) 膜翅目：蜜蜂。黑色點為腸道菌分布位置。(引用並修改自 Engel & Moran 2013)

Fig. 1. Schematic diagram of the intestines of different insects. (a) typical insect intestinal structure: foregut, midgut and hindgut; midgut has peritrophic membrane (dashed line), (b) Lepidoptera: larva, (c) Diptera: Drosophila, (d) Hymenoptera: bees. The black dots are the distribution locations of intestinal bacteria. (Adapted from Engel & Moran 2013).

昆蟲微生物研究- 雙翅目、半翅目、蜜蜂

(一)雙翅目昆蟲

雙翅目昆蟲中，果蠅、蚊子、家蠅由於與人類生活範圍接近、頻繁觸及，經常成為許多學門的研究對象，而這些昆蟲的微生物共生菌群，也引起了部分學者的深入探討。腸道共生菌影響雙翅目昆蟲的行為及生理的例子相當多，其中較為有名的例子為兩種共生菌 (*Acetobacter pomorum*, AP) 及 (*Lactobacillus plantarum*, LP) 對黑腹果蠅繁殖行為的影響 (Erkosar *et al.* 2013; Morimoto *et al.* 2017)。AP 和 LP 兩種共生菌為黑腹果蠅腸道內常見的共生菌種，對於果蠅在各發育階段的生長皆具有非常顯著的效益，例如：LP 藉由調節激素合成路徑上的 TOR pathway，以影響宿主蛻皮激素表達量，可幫助黑腹果蠅幼蟲度過營養不足的逆境，亦可以調控宿主對胺基酸的食慾，直接提升果蠅的生理健康 (Shin *et al.* 2011; Storelli *et al.* 2011; Leitão-Gonçalves *et al.* 2017)。然而最為特別的是 AP 和 LP 對果蠅的交配偏好及後代影響，過往文獻指出，果蠅會偏好與腸道共生菌組成較接近的個體交配 (Erkosar *et al.* 2013)，並且有 LP 共生的雄性較 AP 共生的雄性能交配更長的時間 (Morimoto *et al.* 2017)，同時，與 LP 共生雄性交配後的雌性，在產生後代的數量上也較多；另外，皆具

AP 共生的雌雄果蠅，在交配後所產生的後代雌性個體體重會明顯較低，即為生理表現較差。這些共生菌種導致果蠅繁殖利益上的差距，也使得研究果蠅的學者，在人工飼料上需將飼料所含菌種列為重要的參考條件。

在蚊子的共生菌案例中，*Asaia* 屬的細菌在蚊子體內共生的比例非常高，在腸道、唾腺以及雌性的生殖系統，比例分別為 41%、25%以及 20%，顯著的比例加上特殊的分布位置(唾腺及性腺)，使此屬菌對蚊子的生理影響以及拮抗瘧原蟲的能力上受到學界許多關注 (Favia *et al.* 2007)。此菌已被證實可透過影響蚊子免疫及營養相關基因的表達而延長蚊子各生活史之存活率、壽命和幼蟲之化蛹成功率 (Mancini *et al.* 2020)。另外，研究發現該菌可刺激瘧蚊免疫基因，提升主要控制蟲體中腸上皮細胞之瘧原蟲囊體數量的 *TEP1* 及 *LRIM1* 基因，以及負責蟲體內微生物群平衡的 C 型凝集素基因 *CTL4* 的表達，從而抗瘧原蟲 (Bassene *et al.* 2019; Cappelli *et al.* 2019)。

家蠅的腸道菌群隨著不同成長階段而有顯著的差別。卵期具有相當高多樣性的菌種，這些菌群被推測應可以提供剛孵化的幼蟲初階的養分，並減少營養不足所可能導致的同類相食 (Lam *et al.* 2009)；在幼蟲期間，腸道菌群的組成多樣性會隨著齡期而增加，剛孵化的 1 齡幼蟲，腸道菌群 99%以上皆為 Weissella 屬菌，而發育至 2 齡幼蟲時，菌群中 *Stenotrophomonas* 屬, *Bacillus* 屬和 *Lactococcus* 屬菌的比例會明顯上升，*Ochrobactrum* 屬、*Pseudochrobactrum* 屬和 *Paenochrobactrum* 屬等紅螺菌目以及 *Lactococcus* 屬等醋酸菌的菌種則會開始出現於 3 齡幼蟲期間。在整個幼蟲成長至成蟲的過程，被偵測出的 OTUs 量從 1 齡幼蟲的 40 至成蟲的 200 單位，2 齡幼蟲後的腸道菌群組成會隨時間有較大的改變，而不同世代成蟲間腸道菌群的組成也相當不同。目前推測這些齡期內以及齡期間的共生菌種差異，來自於兩個方面。不同世代間成蟲菌群的差別被認為與成蟲獲得營養的媒介有相當大的關聯，包括成蟲的生長環境、食物來源以及經常接觸的家畜種類不同 (Zhao *et al.* 2017; de Jonge *et al.* 2020)。幼蟲至蛹期間的菌群則與營養代謝途徑的明顯改變有關，隨著齡期的增長，碳水化合物代謝相關基因的表達會愈加明顯，而蛹期的胺基酸代謝則會比幼蟲期高出許多 (de Jonge *et al.* 2020)。這些代謝需求以及個體發育上的改變，與宿主體內的共生菌群變化趨勢相關，雖然其中細部的機制仍未被深入探討，但已足夠做為共生菌群對家蠅生長影響的間接證據。

在上述的 3 種雙翅目昆蟲及其共生菌的案例中，可以發現微生物共生菌群對宿主的影響層面極廣。於基因層面，共生菌的參與影響了許多宿主基本代謝以及免疫相關基因的表達 (Grogan *et al.* 2021)；於生長及發育方面，微生物在昆蟲體內幫助食物的代謝進行，提升了宿主的存活率，影響範圍甚至可擴展到生活史的長短 (Grogan *et al.* 2021)；於行為方面，黑腹果蠅共生菌造成其繁殖行為的偏好外，也會刺激果蠅的取食 (Grogan *et al.* 2021)。共生菌群在雙翅目昆蟲的研究，直接證明了這些昆蟲的存活、行為、繁殖等多方面，不僅與其本身相關，亦須考量到在其體內的微生物所可能帶來的利益或是影響，而對於我們人類而言，這些研究更可以提供我們在應用上不同的想法，例如以基因轉殖的手段，將帶有可表達抗瘧原蟲基因的質體植入瘧蚊共生菌 *Asaia* 屬中，藉由其於蚊子體內大量的複製來達到殺死瘧原蟲的效果 (Grogan *et al.* 2021)。這些學術及應用上的高價值，使得微生物共生菌群在雙翅目昆蟲的研究上不得忽視。

(二)半翅目昆蟲

半翅目 (Hemiptera) 的昆蟲包含植食性椿象、蚜蟲，或具有傳播植物病原細菌、病毒能力的粉蝨、葉蟬等重要農業經濟害蟲。部分植食性半翅目昆蟲具有懷菌細胞如蚜蟲、粉蝨和葉蟬，可與特定共生菌行專性共生 (obligate symbiosis)，其提供宿主必需胺基酸或維生素；然植食性椿象大多缺乏懷菌細胞，其專性共生菌多存在中腸的後半部。椿象的專性共生菌經由卵巢以多種形式進行垂直傳播，如：紅椿象

(*Pyrrhocoris apterus*) 的專性共生菌 *Coriobacterium glomerans* 會附著於卵表面；若蟲孵化時，藉由接觸卵表面而獲得共生菌 (Kaltenpoth, *et al.* 2009)；而在椿象科 (pentatomid) 的雌成蟲的中腸後部具有數個隱窩 (crypt)，稻綠椿象 (*Nezara viridula*) 雌成蟲即可從隱窩中釋放出其共生菌於中腸中，再藉由排泄作用使共生菌由肛門轉移至卵表面進行水平傳播 (Prado *et al.* 2006)；龜蝽科 (plataspid) 的 *Megacopta punctatissima* 會於產卵時排出含有共生菌的囊狀構造 (symbiont capsules)，待若蟲孵化後會藉由取食膠囊獲取共生菌 (Fukatsu & Hosokawa 2002)；另一種特別的垂直傳播方式則是透過凝膠狀的介質，異尾椿科 (Urostylididae) 椿象的共生菌 *Candidatus Tachikawaea* gelatinosa 透過凝膠狀的介質附著於卵殼上，初孵化的若蟲藉由取食膠狀物同時獲得共生菌與必需胺基酸 (Kaiwa *et al.* 2014)。共生菌於族群中的水平傳播也在特定椿象中被發現，如：*Burkholderia* 主要儲藏於中腸的隱窩中，仰賴宿主以水平傳播進入中腸中 (Kikuchi & Yumoto 2013)。

植食性椿象因為宿主食性單一，多和特定共生菌形成互利共生關係，腸道共生菌提供營養方面的功能，如：龜蝽科 (plataspid) 的 *M. punctatissima* 椿象和其專一性腸道共生菌 *Ishikawaella* spp. 的相關研究中，移除共生菌會使若蟲發育速度下降和死亡率提高，證實 *Ishikawaella* spp.合成宿主食物中缺乏的必需胺基酸和維生素 (Nikoh *et al.* 2011)；而褐翅椿象 (*Halyomorpha halys*) 其體內共生菌 *Pantoea carbekii* 可以提供宿主必需胺基酸和維生素，使其可以適應許多不同寄主作物 (Kenyon *et al.* 2015)。除了常見的營養方面的功能，共生菌在椿象體內也提供其他方面的功能，例如：存在於點蜂緣蝽 (*Riptortus pedestris*) 中腸後部的 *Burkholderia* 具有降解殺蟲劑的功能 (Kikuchi *et al.* 2012)，同時存在雌成蟲體內的 *Burkholderia* 也會提升椿象體內特定的青春激素 juvenile hormone)，具有調節雌蟲產卵的重要功能 (Lee *et al.* 2019)。

(三)蜜蜂

蜜蜂 (*Apis mellifera*) 於自然生態上扮演重要的授粉角色。牠不但是農業上最重要的幫手，對全球農作物的產值貢獻高達 2000 億美金以上 (Gallai *et al.* 2009)，而其產物如蜂蜜、蜂王乳與蜂膠等也常被用於我們日常生活中。但由於氣候、環境變遷劇烈導致蜂群健康受到挑戰，許多策略，例如：優化環境，減少農藥使用、增加多樣性蜜粉源植物、開發高營養蜂糧，以及腸道菌開發等被應用於改善蜂群健康。

環境中的花蜜、花粉和水為蜜蜂獲取腸道微生物菌相的來源，腸道微生物可以影響蜜蜂營養、免疫等基因的表達；以及營養物質的吸收。蜜蜂腸道以昆蟲腸道前、中、後腸來定義，這三個部分皆有菌落的分佈，前腸是蜜囊，用於儲蜜，因此該部位菌落是依環境蜜源微生物而有所變化，所以菌種與菌數量變化很大；至於中腸與後腸之菌種數高達兩萬種，且擁有10^8以上的菌落(Rangberg *et al.* 2012; Katsnelson 2015; Moran 2015)。美國德州大學Moran研究團隊利用次世代定序分析 (next generation sequencing, NGS) 解析蜜蜂腸道菌落組成，最常見的細菌種類有乳酸菌、醋酸菌、桿菌與鏈黴菌，以及兩種常見於蜜蜂腸道之厭氧菌*Snodgrassella alvi* 和*Gilliamella apicola*等，它們所扮演的角色功能眾多 (Kwong & Moran 2016; Anderson & Ricigliano 2017; Bonilla-Rosso & Engel 2018)，例如：可以幫助蜜蜂消化，增加體重 (Zheng *et al.* 2017)、轉化有毒糖類 (Zheng *et al.* 2016)，提升宿主免疫力 (Kwong *et al.* 2017)等；就目前最新的蜜蜂腸道菌相研究可知花粉到中後腸時，花粉上的糖與細胞壁成份 (pectin) 會被細菌*G. apicola*所代謝，經代謝所形成的有機酸則可再被吸附於腸道的細菌*Snodgrassella alvi*再次代謝，最後剩餘的花粉粒到後腸末端時，則由乳酸菌屬的菌進行代謝分解 (Bonilla-Rosso & Engel 2018) (圖2)。

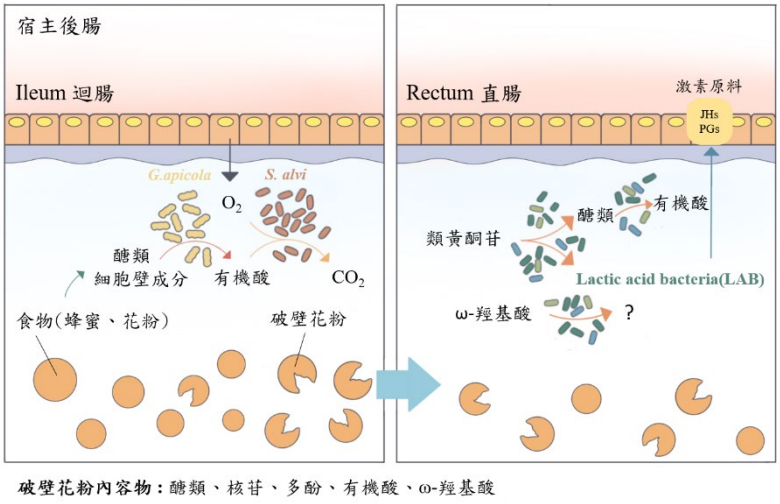


圖2. 蜜蜂腸道之微生物菌相活動，引用自Bonilla-Rosso & Engel 2018。

Fig. 2. Microbial activity in the intestines of bees. Adapted from Bonilla-Rosso & Engel, 2018.

蜜蜂食物中含有多種醣類，其中如：阿拉伯糖 (arabinose)、木糖 (xylose)、半乳糖 (galactose)、甘露糖 (mannose)、蜜二糖 (melibiose) 和棉籽糖 (raffinose) 等，蜜蜂無法將其代謝 (Barker & Lehner 1974)，而其腸道菌如：*G. apicola*、*F. perrara*、*Lactobacillus* Firm-4、*Lactobacillus* Firm-5 及 *B. asteroides* 等可協助蜜蜂代謝 (Kwong & Moran 2016)。透過某些乳酸菌菌種的全基因解序，可發現該類菌有許多參與糖攝取的磷酸轉移酶系統的基因組 (Ellegaard *et al.* 2015; Kwong *et al.* 2014)；*B. asteroides* 和 *Lactobacillus* Firm-5 具有用於合成和利用海藻糖的基因組，海藻糖為昆蟲用於能量儲存的醣類。*Bifidobacterium* spp.及*Lactobacillus* spp. 通常具有蜜蜂缺乏的負責糖合成和降解的基因 (Ellegaard *et al.* 2015)。

除了營養代謝之外，越來越多研究也發現腸道細菌可以抑制病菌--病毒、細菌、真菌等的生長，例如：美國Dr. Jay Evans研究團隊發現*S. alvi* 可藉由促進蜜蜂免疫系統達到有效抑制病毒增生 (Katsnelson 2015)；阿根廷研究團隊發現蜜蜂腸道中的*Bacillus subtilis*可以有效抑制美洲幼蟲病病原菌的生長 (Sabate *et al.* 2009)；美國Dr. Vanessa Corby-Harris 研究室發現*P. apium*可以有效抵抗微粒子病 (Corby-Harris *et al.* 2016)；沙烏地阿拉伯研究團隊發現*B. subtilis*與一個螢光假單胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*) 可有效抑制白堊病的發生(Omar *et al.* 2014)。

我們在4年前也開始投入本土西方蜂、熊蜂腸道菌的篩選和特性探討，已獲得數株具有開發潛力菌種，本報告以腸膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 進行簡略介紹。該菌已被美國FDA認為是一般公認安全 (generally recognized as safe, GRAS) 的菌株，也被歐盟列在最新的安全資格認定 (qualified presumption of safety, QPS) 列表中，且臺灣行政院農業委員會亦公告該菌「可用於供給家畜、家禽、水產動物之飼料添加物中」。我們所分離的該株菌具有很好的耐糖滲透壓 (50% sucrose solution)、耐酸 (pH5.0)、可代謝多種醣類，其中還包含對蜜蜂

有毒的醣類，如：阿拉伯糖、木糖、半乳糖、甘露糖、蜜二糖和棉籽糖等、產多種有機酸，例如：蘋果酸(malic acid)、乳酸 (lactic acid)、醋酸 (acetic acid)和檸檬酸 (citric acid)等、產胞外多醣體(exopolysaccharide, EPS)、抑制病原菌美洲幼蟲病原，以及發酵液經蜜蜂取食後，可刺激蜜蜂之營養和免疫基因表達；此外，該菌經冷凍乾燥後，菌粉仍有高活菌數；藉此菌粉添加入糖水中，餵食蜂群，發現該菌可於一天內擴散至每一個蜂個體，且腸道菌數於5天內可維持在10^8以上，而以總菌量來看，總量菌變化幅度不大，該研究成果已投稿，正審查中 (Huang *et al.* 2021)。根據英國蜜蜂研究團隊分析健康蜂群和不健康蜂群之腸道菌菌相組成，發現健康蜂群腸道菌相有高比例*Leuconostoc*屬的菌，因此他們推測該屬的菌可做為蜂群健康指標 (Budge *et al.* 2016)。我們也因此對於*L. mesenteroides*作為蜜蜂益生菌極具信心。

展望

昆蟲微生物的研究日漸受到重視，除了了解昆蟲腸道及體腔之菌相組成外，其共生機制及對昆蟲生理及行為的影響都是熱門的研究方向，甚至亦有些微生物應用正在進行，例如：昆蟲病原菌開發成防治害蟲之生物製劑、添加益生菌於食物中，促進授粉昆蟲健康等。鑒於高多樣性的昆蟲微生物種類和功能，實有必要投入更多資源挖掘此天然微生物寶庫，該昆蟲微生物應用範圍除了害蟲防治 (降低農藥使用)、促進經濟昆蟲飼養健康，尚可應用到分解廢棄物、食品處理等領域，可進一步降低化學處理所帶來的環境副作用，而達到與符合目前全球追求的綠色永續循環經濟目標。

參考文獻

Anderson, K. E. and V. A. Ricigliano. 2017. Honey bee gut dysbiosis: a novel context of disease ecology. Curr. Opin. Insect Sci. 22: 125-132.

Bai, L., L. Wang, J. Vega-Rodríguez, G. Wang, and S. J. F. i. m. Wang. 2019. A gut symbiotic bacterium *Serratia marcescens* renders mosquito resistance to Plasmodium infection through activation of mosquito immune responses. Front. Microbiol. 10: 1580-1591.

Barker, R. J. and Y. Lehner. 1974. Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Exp. Zool. 187: 277-285.

Bassene, H., E. H. A. Niang, F. Fenollar, S. Doucoure, B. Samb, O. Faye, D. Raoult, C. Sokhna, and O. Mediannikov. 2019. A pilot study on isolation of *Asaia* and detecting its co-presence with *Plasmodium falciparum* in two major malaria vectors in Senegal. J. Parasitol. Vector Biol. 11: 1-9.

Beemelmanns, C., H. Guo, M. Rischer, and M. Poulsen. 2016. Natural products from microbes associated with insects. Beilstein J. Org. Chem. 12: 314-327.

Berasategui, A., S. Shukla, H. Salem, and M. Kaltenpoth. 2016. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100: 1567-1577.

Boleij, A. and H. Tjalsma. 2012. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 87: 701-730.

Bonilla-Rosso, G. and P. Engel. 2018. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. Curr. Opin. Microbiol. 43: 69-76.

Breznak, J. A. 2000. Ecology of prokaryotic

microbes in the guts of wood-and litter-feeding termites. Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology, Springer: 209-231.

Brooks, M. A. and A. G. Richards. 1955. Intracellular symbiosis in cockroaches. I. Production of aposymbiotic cockroaches. Biol. Bull. 109: 22-39.

Budge, G. E., I. Adams, R. Thwaites, S. Pietravalle, G. C. Drew, G. D. D. Hurst, V. Tomkies, N. Boonham, and M. Brown. 2016. Identifying bacterial predictors of honey bee health. J. Invertebr. Pathol. 141: 41-44.

Callegari, M., C. Jucker, M. Fusi, M. G. Leonardi, D. Daffonchio, S. Borin, S. Savoldelli, and E. Crotti. 2020. Hydrolytic profile of the culturable gut bacterial community associated with *Hermetia illucens*. Front. Microbiol. 11: 1965-1978.

Cappelli, A., C. Damiani, M. V. Mancini, M. Valzano, P. Rossi, A. Serrao, I. Ricci, and G. Favia. 2019. Asaia activates immune genes in mosquito eliciting an anti-Plasmodium response: implications in malaria control. Front. Genet. 10: 836-847.

Corby-Harris, V., L. Snyder, C. A. Meador, R. Naldo, B. Mott, and K. E. Anderson. 2016. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to Nosema. J. Econ. Entomol. 109: 1-12.

Cruden, D. and A. Markovetz. 1987. Microbial ecology of the cockroach gut. Annu. Rev. Microbiol. 41: 617-643.

de Jonge, N., T. Y. Michaelsen, R. Ejbye-Ernst, A. Jensen, M. E. Nielsen, S. Bahrndorff, and J. L. Nielsen. 2020. Housefly (*Musca domestica* L.) associated microbiota across different life stages. Sci. Rep. 10: 7842-7851.

Douglas, A. E. 2014. The molecular basis of bacterial–insect symbiosis. J. Mol. Biol. 426: 3830-3837.

Engel, P. and N. A. Moran. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS Microbiol. Rev. 37: 699-735.

Erkosar, B., G. Storelli, A. Defaye, and F. Leulier. 2013. Host-intestinal microbiota mutualism: "learning on the fly". Cell host & microbe 13: 8-14.

Favia, G., I. Ricci, C. Damiani, N. Raddadi, E. Crotti, M. Marzorati, A. Rizzi, R. Urso, L. Brusetti, and S. Borin. 2007. Bacteria of the genus Asaia stably associate with Anopheles stephensi, an Asian malarial mosquito vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 9047-9051.

Fukatsu, T. and T. Hosokawa. 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 389-396.

Gallai, N., J. M. Salles, J. Settele, and B. E. Vaissière. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol. Econ. 68: 810-821.

Grogan, C., M. Bennett, S. Moore, and D. Lampe. 2021. Novel *Asaia bogorensis* Signal Sequences for Plasmodium Inhibition in *Anopheles stephensi*. Front. Microbiol. 12: 633667-633681.

Huang, Y. H., Y. H. Chen, P. S. Hsu, T. H. Wu, C. F. Lin, and M. C. Wu. 2021. *Leuconostoc mesenteroides*, a potential probiotics for

honey bee, *Apis mellifera*. Scientific report submitted.

Jahnes, B. C. and Z. L. Sabree. 2020. Nutritional symbiosis and ecology of host-gut microbe systems in the Blattodea. Curr. Opin. Insect. Sci. 39: 35-41.

Jing, T. Z., F. H. Qi, and Z. Y. Wang. 2020. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision? Microbiome 8: 38-58.

Jung, J., A. Heo, Y. W. Park, Y. J. Kim, H. Koh, and W. Park. 2014. Gut microbiota of *Tenebrio molitor* and their response to environmental change. J. Microbiol. Biotechnol. 24: 888-897.

Kaiwa, N., T. Hosokawa, N. Nikoh, M. Tanahashi, M. Moriyama, X. Y. Meng, T. Maeda, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, and M. Ito. 2014. Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host' s ecological adaptation. Curr. Biol. 24: 2465-2470.

Kaltenpoth, M., S. A. Winter, and A. Kleinhammer. 2009. Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs. FEMS Microbiol. Ecol. 69: 373-383.

Katsnelson, A. 2015. Microbiome: The puzzle in a bee's gut. Nature 521: S56-S56.

Kenyon, L. J., T. Meulia, Z. L. Sabree, and evolution. 2015. Habitat visualization and genomic analysis of "Candidatus Pantoea carbekii," the primary symbiont of the brown marmorated stink bug. Genome Biol. 7: 620-635.

Kikuchi, Y., M. Hayatsu, T. Hosokawa, A. Nagayama, K. Tago, and T. Fukatsu. 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109: 8618-8622.

Kikuchi, Y. and I. Yumoto. 2013. Efficient colonization of the bean bug Riptortus pedestris by an environmentally transmitted Burkholderia symbiont. Appl. Environ. Microbiol. 79: 2088-2091.

Klammsteiner, T., A. Walter, T. Bogataj, C. D. Heussler, B. Stres, F. M. Steiner, B. C. Schlick-Steiner, W. Arthofer, and H. Insam. 2020. The core gut microbiome of black soldier fly (*Hermetia Illucens*) larvae raised on low-bioburden diets. Front. Microbiol. 11: 1-14.

Kwong, W. K., A. L. Mancenido, and N. A. Moran. 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. R. Soc. Open Sci. 4: 170003-170011.

Kwong, W. K. and N. A. Moran. 2016. Gut microbial communities of social bees. Nat. Rev. Microbiol. 14: 374-384.

Lam, K., C. Geisreiter, and G. Gries. 2009. Ovipositing female house flies provision offspring larvae with bacterial food. Entomol. Exp. Appl. 133: 292-295.

Lee, J., C. H. Kim, H. Am Jang, J. K. Kim, T. Kotaki, T. Shinoda, T. Shinada, J. W. Yoo, and B. L. Lee. 2019. Burkholderia gut symbiont modulates titer of specific juvenile hormone in the bean bug *Riptortus pedestris*. Dev. Comp. Immunol. 99: 103399-103405.

Leitão-Gonçalves, R., Z. Carvalho-Santos, A. P. Francisco, G. T. Fioreze, M. Anjos, C. Baltazar, A. P. Elias, P. M. Itskov, M. D. Piper, and C. Ribeiro. 2017. Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. PLoS Biol. 15: e2000862-e2000891.

Lilburn, T., K. Kim, N. Ostrom, K. Byzek, J. Leadbetter, and J. Breznak. 2001. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. Science 292: 2495-2498.

Mancini, M. V., C. Damiani, S. M. Short, A. Cappelli, U. Ulissi, A. Capone, A. Serrao, P. Rossi, A. Amici, and C. Kalogris. 2020. Inhibition of Asaia in adult mosquitoes causes male-specific mortality and diverse transcriptome changes. Pathogens 9: 380-390.

Moll, R. M., W. S. Romoser, M. C. Modrakowski, A. C. Moncayo, and K. Lerdthusnee. 2001. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. J. Med. Entomol. 38: 29-32.

Mondal, S. I., A. Akter, R. Koga, T. Hosokawa, M. Dayi, K. Murase, R. Tanaka, S. Shigenobu, T. Fukatsu, and T. Kikuchi. 2020. Reduced genome of the gut symbiotic bacterium "Candidatus Benitsuchiphilus tojoi" provides insight into its possible roles in ecology and adaptation of the host insect. Front. Microbiol. 11: 840-855.

Moran, N. A. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. Curr. Opin. Insect Sci. 10: 22-28.

Morimoto, J., S. J. Simpson, and F. Ponton. 2017. Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. Biol. Lett. 13: 20160966-20160971.

Nikoh, N., T. Hosokawa, K. Oshima, M. Hattori, and T. Fukatsu. 2011. Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment. Genome Biol. Evol. 3: 702-714.

Noda, S., D. Shimizu, M. Yuki, O. Kitade, and M. Ohkuma 2018. Host-symbiont cospeciation of termite-gut cellulolytic protists of the genera Teranympha and Eucomonympha and their Treponema endosymbionts. Microbes Environ.: ME17096-ME17104.

Omar, M. O. M., A. M. Moustafa, M. J. Ansari, A. M. Anwar, B. F. Fahmy, A. Al-Ghamdi, and A. Nuru. 2014. Antagonistic effect of gut bacteria in the hybrid carniolan honey bee, *Apis mellifera* Carnica, against *Ascosphaera apis*, the causal organism of chalkbrood disease. J. Apic. Sci. 58: 17-27.

Park, R., M. C. Dzialo, S. Spaepen, D. Nsabimana, K. Gielens, H. Devriese, S. Crauwels, R. Y. Tito, J. Raes, B. Lievens, and K. J. Verstrepen. 2019. Microbial communities of the house fly *Musca domestica* vary with geographical location and habitat. Microbiome 7: 147-159.

Prado, S. S., D. Rubinoff, and R. P. Almeida. 2006. Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. Ann. Entomol. Soc. Am. 99: 577-585.

Rajagopal, R. 2009. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. Indian J. Microbiol. 49: 114-119.

Rangberg, A., D. B. Diep, K. Rudi, and G. V. Amdam. 2012. Paratransgenesis: an approach to improve colony health and molecular insight in honey bees (*Apis mellifera*)? Integr. Comp. Biol. 52: 89-99.

Sabate, D. C., L. Carrillo, and M. C. Audisio. 2009. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. Res. Microbiol. 160: 193-199.

Sampaio-Maia, B., L. Simões-Silva, M. Pestana, R. Araujo, and I. Soares-Silva. 2016. The role of the gut microbiome on chronic kidney disease. Adv. Appl. Microbiol. 96: 65-94.

Shan, H., W. Wu, Z. Sun, J. Chen, and H. Li. 2021. The gut microbiota of the insect infraorder pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) for the light of ecology and evolution. Microorganisms 9: 464-480.

Sherwin, E., T. G. Dinan, and J. F. Cryan. 2018. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1420: 5-25.

Shin, S. C., S. H. Kim, H. You, B. Kim, A. C. Kim, K. A. Lee, J. H. Yoon, J. H. Ryu, and W. J. Lee. 2011. Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. Science 334: 670-674.

Smith, C. C., R. B. Srygley, F. Healy, K. Swaminath and U. G. Mueller. 2017. Spatial structure of the mormon cricket gut microbiome and its predicted contribution to nutrition and immune function. Front. Microbiol. 8: 1-15.

Storelli, G., A. Defaye, B. Erkosar, P. Hols, J. Royet, and F. Leulier. 2011. *Lactobacillus plantarum* promotes Drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. Cell Metab. 14: 403-414.

Zhao, Y., W. Wang, F. Zhu, X. Wang, X. Wang, and C. Lei. 2017. The gut microbiota in larvae of the housefly *Musca domestica* and their horizontal transfer through feeding. AMB Express 7: 147-147.

Zheng, H., A. Nishida, W. K. Kwong, H. Koch, P. Engel, M. I. Steele, and N. A. Moran. 2016. Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. MBio 7: e01326-e01334.

Zurek, L. and B. A. Keddie. 1996. Contribution of the colon and colonie bacterial flora to metabolism and development of the american cockroach *Periplaneta americana* L. J. Insect Physiol. 42: 743-748.

Research Progress of Microorganisms in Insects

Yu-Hsin Chen[1], Yi-Ting Hung[1], Wei-Jyun Ma[1], and Ming-Cheng Wu[1,*]

[1] Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

Abstract

Insects have rich microbial resources. These microbes from insects can help the host decompose food, degrade compounds from the environment, synthesize some essential nutrients or resist pathogens, and have a wide range of potential applications. Many studies have confirmed that the microorganisms in the intestinal tract of insects can indirectly or directly affect the health of the host. The researches in our laboratory mainly focus on biology of bees, including honey bees, bumble bees and stingless bees, in which the intestinal microbes of bees are isolated and the physiological effects of microbes on bees are analyzed. One of the isolated bacteria, named *Leuconostoc mesenteroides* isolated from the gut of bumble bee was introduced and shown the characteristics of *L. mesenteroides*, the effect of its fermentation broth on gene expression of bees and the spread of the bacteria in the colony in this article. Additionally, we also introduced the microbial researches from insects of Diptera and Hemiptera.

Keywords: Microbes, Diptera, Hemiptera, Bees.

*Corresponding author.
E -mail: mcwu12@gmail.com