



## 混合菌群调节果蝇产卵偏嗜性

王子光<sup>1#</sup>, 门杰<sup>2#</sup>, 张津<sup>1</sup>, 黄永存<sup>3\*</sup>, 刘威<sup>2,4\*</sup>

- 1 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157000
- 2 山西医科大学汾阳学院, 基础医学部, 山西 汾阳 032200
- 3 牡丹江医学院附属第二医院, 黑龙江 牡丹江 157000
- 4 安徽农业大学植物保护学院, 安徽 合肥 230036

王子光, 门杰, 张津, 黄永存, 刘威. 混合菌群调节果蝇产卵偏嗜性. 微生物学报, 2022, 62(1): 321–332.

Wang Ziguang, Men Jie, Zhang Jin, Huang Yongcun, Liu Wei. Mixed bacteria modulate oviposition preference of *Drosophila*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 321–332.

**摘要:**【目的】利用果蝇产卵偏嗜性作为评价指标, 研究影响混合菌群平衡的因素及竞争机制, 并揭示混合菌对果蝇后代存活率的影响。【方法】将植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和二者混合菌发酵处理酪蛋白琼脂食物; 利用双向选择产卵器检测成年雌性果蝇的产卵偏嗜性; 平板计数法检测细菌数量; 通过蛹存活率探究两菌互作对果蝇存活率的影响。【结果】在 37 °C 发酵果蝇食物, 果蝇喜欢在植物乳杆菌底物上产卵, 而厌恶在大肠杆菌底物上产卵, 同时对等比例混合菌具有显著的产卵避性, 产卵指数为-0.46, 说明果蝇产卵偏嗜性可作为一个研究混合菌群平衡的模型。增加混合菌中植物乳杆菌比例可降低果蝇产卵避性, 甚至逆转, 说明接种比例影响着菌群平衡。涂板计数证实, 大肠杆菌数量在培养基中占据优势, 是植物乳杆菌的 4.43 倍, 所以引起果蝇产卵避性。当植物乳杆菌与大肠杆菌等比例混合后改变培养温度, 25 °C 对应的产卵指数为 0.41, 30 °C 对应的产卵指数为-0.06, 35 °C 对应的产卵指数为-0.45, 说明温度影响着菌群平衡。植物乳杆菌代谢物, 特别是乳酸可抑制大肠杆菌生长, 从而间接地调控果蝇产卵偏嗜性。大肠杆菌占据着优势时, 蛹存活率仅为 14%, 而植物乳杆菌占据着优势时, 蛹存活率为 91%, 说明混合菌生长平衡影响果蝇存活率。【结论】接种比例与温度是影响菌群平衡的关键因素, 果蝇根据菌群平衡而调整其产卵行为, 以提高后代的存活率。

**关键词:** 植物乳杆菌; 大肠杆菌; 接种比例; 温度; 产卵偏嗜性; 存活率

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. HUANG Yongcun, Tel: +86-453-8927090, E-mail: 363401587@qq.com; LIU Wei, Tel: +86-27-72350332, E-mail: liuwei@sxmu.edu.cn

Received: 21 April 2021; Revised: 5 July 2021; Published online: 4 November 2021

# Mixed bacteria modulate oviposition preference of *Drosophila*

WANG Ziguang<sup>1#</sup>, MEN Jie<sup>2#</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>, HUANG Yongcun<sup>3\*</sup>, LIU Wei<sup>2,4\*</sup>

1 Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, Heilongjiang, China

2 Basic Medical School, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi, China

3 Second Affiliated Hospital, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, Heilongjiang, China

4 School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

**Abstract:** [Objective] This study aims to investigate how mixed bacteria modulate the oviposition preference of *Drosophila* through competition and to explore the effect of bacterial balance on *Drosophila* offspring based on the survival rate and developmental duration. [Methods] *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, and the mixture of the two (hereinafter referred to as the mixture) were coated on the casein-sucrose-agar medium (food of *Drosophila*), respectively. The egg-laying behavior of *Drosophila* was assayed by a two-choice device. Bacterial count was calculated with the plate method and the effect of the mixture on the survival of *Drosophila* was evaluated based on the survival rate of pupa. [Results] *Drosophila* avoided laying eggs on the food that was fermented by *E. coli* at 37 °C, while it was attracted to lay eggs on the food fermented by *L. plantarum* at 37 °C. The mixture (at the ratio of 1:1) significantly repelled the oviposition of *Drosophila*, as manifested by the oviposition index (OI) of only -0.46, suggesting *Drosophila* oviposition preference is an ideal mode for studying the balance of mixed bacteria. Bacterial counting showed that *E. coli* dominated the medium, with the count 4.43 folds that of *L. plantarum*, which caused the oviposition avoidance of *Drosophila*. As expected, increase in the ratio of *L. plantarum* in the mixed bacteria mitigated or even reversed the oviposition avoidance of *Drosophila* to fermented diet, indicating that the inoculation ratio of bacteria affected the balance of the flora. With *L. plantarum* and *E. coli* mixed at equal ratio, the OI of *Drosophila* was 0.41 at 25 °C, -0.06 at 30 °C, and -0.45 at 35 °C, suggesting temperature impacted bacterial balance. The metabolites of *L. plantarum*, particularly lactic acid, inhibited the growth of *E. coli*, which contributed to the oviposition preference of *Drosophila*. The survival rate of pupa was 14% when *E. coli* dominated and 91% when *L. plantarum* was dominant, indicating that the growth balance of the mixture influenced the survival rate of *Drosophila*. [Conclusion] Bacterial ratio and culturing temperature determined the final oviposition selection of *Drosophila* and *Drosophila* adjusted the oviposition behavior based on bacterial balance to facilitate the survival of offspring.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*; *Escherichia coli*; inoculation ratio; temperature; oviposition preference; survival rate

大多数自然环境都存在着大量的微生物。最近，分子生物学方法，如宏基因组测序和深度微生物标记测序，已经揭示了微生物的多样性和复杂性。在菌群中细菌个体间不断发生着相互交流，产生社会行为，这些信息可塑造微

生物群落的结构平衡。在这些社会行为中，最为显著的关系便是竞争，细菌之间相互争夺有限的空间和资源，可以抑制甚至杀死其他微生物<sup>[1]</sup>。通常认为，数量上占优势的微生物种群源自一个高度多样化、低丰度的起始种群。某

些稀有成员在适宜的条件下快速增殖, 可以出现种群爆发, 打破原有平衡, 成为优势种群<sup>[2]</sup>。因此, 揭示影响群落成员的因素对理解和调控菌群平衡具有重要研究和应用价值。然而, 自然群落复杂而又多变, 直接研究它会困难重重, 亟需某些模式菌种构建研究模型。

果蝇的共生菌种类较为繁多<sup>[3]</sup>, 多达 20 多种, 广义上既包括益生菌, 如植物乳杆菌和肠球菌等, 又包括有害细菌, 如条件致病菌大肠杆菌和真菌等<sup>[4]</sup>。研究发现, 植物乳杆菌在果蝇肠道内能发酵碳水化合物产生代谢产物, 特别是乳酸, 能维持果蝇肠道内低 pH 环境, 抑制大肠杆菌的生长与繁殖<sup>[5]</sup>。同时, 植物乳杆菌具有提高机体免疫力、维持肠道内菌群平衡和促进营养物质的吸收等多种作用<sup>[6]</sup>。大肠杆菌是肠杆菌科革兰阴性菌, 主要栖生于人和动物大肠内。其既能在宿主体内生存, 也能吸附在环境中固体介质表面形成生物膜而得以存活和传播<sup>[7]</sup>。大肠杆菌是果蝇体内的条件致病菌, 当大肠杆菌过度繁殖时, 会阻碍果蝇卵的生长和发育, 甚至导致其死亡<sup>[8]</sup>。这 2 种细菌常存在于果蝇体内和周围, 但目前仍然不清楚哪些因素可以影响二者之间的竞争平衡。

尽管高通量测序可以解析菌落物种结构和平衡, 然而迄今为止尚缺乏一种简单易行的检测微生物竞争结果的指示方法, 正成为后基因组时代的一大挑战。

由于果蝇产卵需要消耗母体大量的能量和营养, 并且幼虫运动能力弱, 容易遭受天敌攻击。因此, 为促进后代的生长和发育, 雌性果蝇在产卵之前, 必须利用多种感觉系统<sup>[9]</sup>, 并且综合多种因素, 最终才会选择在适宜的地方产卵<sup>[10-11]</sup>。果蝇产卵的选择是果蝇一个非常重要的行为, 该行为易于观察和量化, 对刺激敏

感, 并且抗外界干扰因素强, 可为我们提供一个生物指示剂以研究菌群平衡<sup>[11]</sup>。因此, 本研究尝试将果蝇作为指示生物, 通过其产卵选择性判断菌群平衡, 并进一步探讨影响混合菌群平衡的因素及竞争机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 果蝇品系与培养方法

本研究选用野生型黑腹果蝇品系 *Oregon R* (OR) 和 *Canton S* (CS) 作为实验材料。如无特别说明, 所有果蝇均培养在温度 25 °C、相对湿度 60% 的恒温箱中, 培养光周期为 12 L:12 D<sup>[12]</sup>。在通常情况下, 果蝇使用玉米-酵母培养基饲养, 由于酵母粉中成分复杂, 为避免酵母对果蝇产卵行为的影响, 行为学分析中使用的果蝇食物为水解酪蛋白-蔗糖-琼脂培养基。

### 1.2 试剂和仪器

试剂: Walch 消毒液(广州威莱); 次氯酸 (Sigma); 酵母(安琪); MRS 琼脂培养基北京奥博星生物; 麦康凯琼脂培养基北京奥博星生物。

仪器: 25 °C 恒温恒湿培养箱(恒丰, WS-01Y); 天平(Denver Instrument, XE-310); 显微镜(Olympus SZX7; Nikon SMZ745T); 低温高速离心机(上海力申, Neofuge 13R); 分光光度计(岛津, UV-1800)。

### 1.3 菌落培养

#### 1.3.1 菌株来源

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 均为本实验室前期分离和鉴定的菌株, 对应的 NCBI 编号为 KY038178<sup>[13]</sup> 和 ATCC25922<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.2 不同温度下培养

控制 2 种菌接种量一致, 分别从 OD 值为 1 的培养瓶中各取 2 种菌的原菌液 1 mL, 离心后

弃上清液加入 PBS 磷酸盐溶液振荡洗涤,再离心,重复 2 次;加入 100  $\mu$ L PBS,超净台中将 2 种菌株混合,涂布固体平板酪蛋白食物表面后装入盛有沾水纱布的密封袋中,分别放入 25、30、35  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 48 h;培养完成后在-80  $^{\circ}$ C 下速冻 24 h,解冻准备实验。

### 1.3.3 不同接种比例培养

控制培养温度一致,取 OD 值均为 1 的 2 种菌原菌液 1 mL,按上述步骤离心洗涤 2 次后,加入 100  $\mu$ L PBS,通过倍比稀释,将原菌液稀释至合适浓度后接种。

### 1.3.4 乳酸平板食物培养

制作空白酪蛋白食物时,食物灭菌后超净台中加入乳酸,振荡摇匀,乳酸食物浓度分别为 25、50、75、100 mmol/L,制作平板食物,培养步骤同空白组相同。

## 1.4 混合菌落计数

检测平板食物表面发酵后 2 种菌数量,超净台中取发酵后的平板食物 1/4,放入盛有 10 mL PBS 缓冲液中振荡摇匀,取 100  $\mu$ L,倍比稀释后注入选择性固体培养基 MRS 和麦康凯,涂布均匀后培养计数植物乳杆菌和大肠杆菌数目。

## 1.5 果蝇产卵行为检测

实验选用中空透明圆柱体为双向产卵装置,高 80 mm、直径 60 mm,底部放入用于产卵的培养皿<sup>[14]</sup>。果蝇食物经 121  $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 20 min,稍许冷却倒入平板。将 100  $\mu$ L 无菌水或混合菌群涂布食物表面,密封袋中规定温度下培养 48 h。用刀片沿中线切为两半,无差别拼装成双选择果蝇产卵培养基。每个产卵器中放入黑腹果蝇雌性 20 只、雄性 10 只,使用酵母平板育肥 2-3 d;无伤害放入产卵器产卵 12 h,产卵结束取下食物平板,显微镜下计数果蝇胚胎数量。产卵指数(OI)=(实验组卵数-对照组卵数)/(实验组卵数+对照组卵数)<sup>[12]</sup>。

## 1.6 存活率实验

使用酵母膏育肥果蝇后将其转移至产卵装置中,用葡萄汁琼脂板(700 mL H<sub>2</sub>O, 300 mL 葡萄汁, 30 g 琼脂, 30 g 蔗糖)收集 8 h 新产的卵,分别转移 40 粒卵于对照组和实验组食物上,在培养箱中规定条件下孵育,每天记录胚胎成蛹数量及成蛹后羽化数量。存活率=蛹或成虫数目/总卵数目 $\times$ 100%。实验重复 3 次。

## 1.7 数据分析与作图

使用 Excel 软件整理分析数据,每组数据得平均值(mean)和标准误(SE),用 SPSS 24.0 软件对各处理组间的差异进行 *t* 检验分析(Student's *t*-test)。用 GraphPad 和 Adobe Illustrator 软件完成相关图的制作。

# 2 结果与分析

## 2.1 混合菌影响果蝇产卵偏嗜性

按照图 1 A 流程所示,分别将植物乳杆菌、大肠杆菌和二者 1:1 混合涂布到果蝇食物上,37  $^{\circ}$ C 培养 48 h,处理后食物与对照组食物拼成双选择产卵地点,分别检测上述 3 种处理对果蝇产卵偏嗜性的影响。实验结果显示,雌性野生型果蝇 *Oregon R* (OR)将 88.5%的卵产在植物乳杆菌培养的食物一侧,产卵指数(oviposition index, OI)为 0.77 (图 1B),说明植物乳杆菌可吸引果蝇产卵。相反,果蝇将 90%的卵产在大肠杆菌培养的食物一侧, OI 为-0.80 (图 1C),说明大肠杆菌排斥果蝇产卵。以上结果说明不同种细菌可以引起果蝇截然相反的产卵偏好性。另一个野生品系 *Canton S* (CS)对植物乳杆菌、大肠杆菌处理后食物的 OI 分别为 0.81 和 -0.84 (图 1B, C),与上述 OR 果蝇产卵偏嗜性一致,可排除果蝇遗传背景的影响,也与包括我们在内的前人报道相一致<sup>[8,13]</sup>,说明这种产卵偏嗜性为果蝇特有的行为。这两种细菌可分别

作为吸引和排斥果蝇产卵的代表性菌株, 为研究混合菌群影响果蝇产卵偏嗜性提供了很好的素材。首先等比例混合植物乳杆菌和大肠杆菌, 然后将混合菌接种到果蝇食物, 检测果蝇产卵偏嗜性。结果发现, 当植物乳杆菌与大肠杆菌等比例时, 果蝇的 OI 为 $-0.46$  (图 1D), 介于两者单纯培养的 OI 之间, 仍然具有强烈的产卵避

性, 说明大肠杆菌排斥产卵效应占据优势, 大于植物乳杆菌吸引产卵效应, 最终表现出果蝇产卵避性。同样, 植物乳杆菌与大肠杆菌等比例混合引起 CS 果蝇产卵避性, 果蝇的 OI 介于两者单纯培养的 OI 之间(图 1E)。以上结果说明, 纯菌株和混合菌可作为重要因子而影响果蝇产卵偏嗜性。

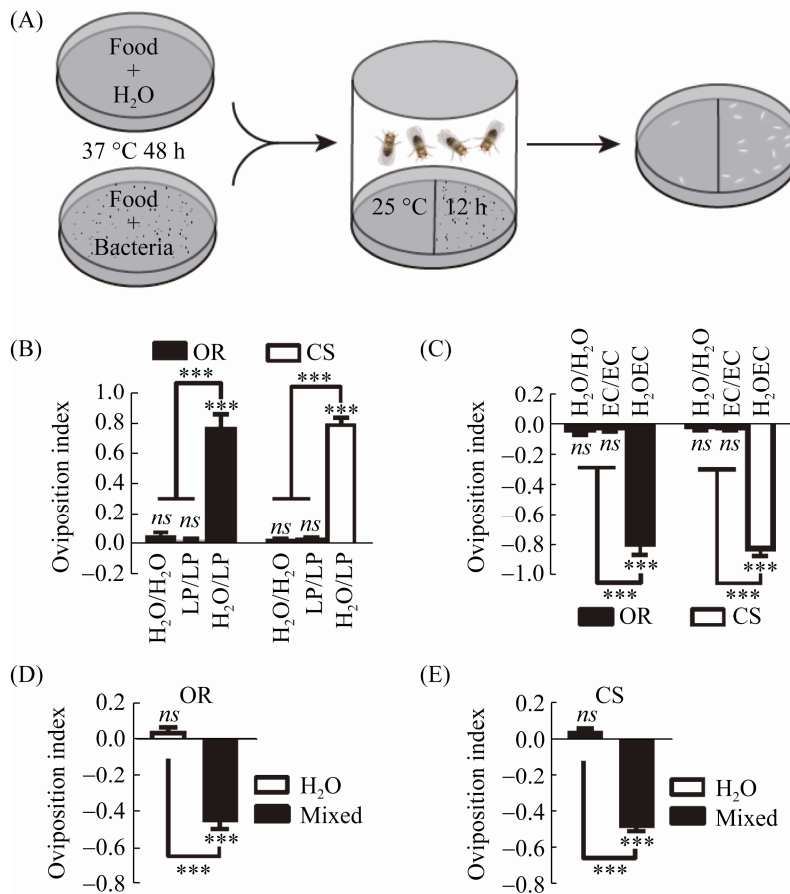


图 1 植物乳杆菌与大肠杆菌分别及混合时对果蝇产卵偏嗜性的影响

Figure 1 Effects of *L. plantarum*, *E. coli* and mixture on the oviposition preference of *D. melanogaster*. A: a diagram of the oviposition preference assay; B: effect of *L. plantarum* on the oviposition preference of wild-type *D. melanogaster* OR and CS; C: effect of *E. coli* on the oviposition preference of wild-type *D. melanogaster* OR and CS; D: effects of the mixed bacteria (*L. plantarum* and *E. coli* 1:1) on the oviposition preference of wild-type *D. melanogaster* OR; E: effects of the mixed bacteria (*L. plantarum* and *E. coli* 1:1) on the oviposition preference of wild-type *D. melanogaster* CS. Data in the figure are mean $\pm$ SE. ANOVA tests with LSD post hoc analysis. Single sample *t*-test. ns:  $P>0.05$ ; \*:  $0.01<P<0.05$ ; \*\*:  $0.001<P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

## 2.2 接种比例影响菌群平衡

以上结果提示了植物乳杆菌与大肠杆菌相互竞争,并且在上述条件下,大肠杆菌占据着优势。两种细菌在同一培养基上相互竞争,可通过改变细菌起始接种数量而改变原有的菌群平衡。为此,提高混合菌中植物乳杆菌比例 $10^4:1$ , $10^3:1$ , $10^2:1$ 和 $10^1:1$ ,然后检测对应的果蝇 OI。结果显示,果蝇的 OI 对应为 0.58, 0.52, 0.21, -0.22 (图 2A),植物乳杆菌在混合菌中比例大于 $10^2:1$ 时,植物乳杆菌吸引效应才抵消大肠杆菌的排斥效应,并表现出最终的吸引效应。而提高混合菌中大肠杆菌比例这种排斥效应将会增强(图 2A),这与预期结果一致。

为了比较细菌数量相对量,利用涂板计数法检测发酵后菌群中这两种细菌数量。结果显示,随着植物乳杆菌初始接种比例的改变,混合菌群中两种细菌也发生着动态改变。起初,植物乳杆菌 colony-forming units (CFUs)为 $1.36 \times 10^9$ ,大肠杆菌 CFUs 为 $4.88 \times 10^7$ ,植物乳杆菌数量占据着优势,是大肠杆菌的 34.4 倍,为优势菌(图 2B),故吸引果蝇产卵。当植物乳杆菌与大肠杆菌为 $10^2:1$ 时,植物乳杆菌 CFUs

为 $4.58 \times 10^8$ ,大肠杆菌 CFUs 为 $1.86 \times 10^8$ ,植物乳杆菌是大肠杆菌的 3.1 倍,植物乳杆菌仍然占据优势,但随着初始植物乳杆菌接种比例降低到 $10^2:1$ 与 $10^1:1$ 之间,二者培养后数量相当。之后,植物乳杆菌降为劣势菌,大肠杆菌数量开始占据优势。所以,上述的结果与预期相符合,即当菌群中某些细菌占据数量优势时,优势菌对果蝇产卵的效应占据主导地位。

## 2.3 温度调控菌群的平衡

除了接种比例之外,我们进一步探究其他影响此菌群平衡的重要因素。培养温度是影响微生物发酵因素之一,因为植物乳杆菌与大肠杆菌适宜的生长温度不同。 $37^\circ\text{C}$  是大肠杆菌增殖最适宜温度,而植物乳杆菌耐受温度范围较广泛,所以推测培养温度可能会影响果蝇对混合菌群的产卵偏嗜性。为此,按照图 3A 流程所示,将植物乳杆菌与大肠杆菌等比例混合涂布到果蝇食物上,分别在 $25^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$ 、 $35^\circ\text{C}$  培养 48 h,处理后食物与未培养食物拼接成产卵地点,利用产卵双选择装置,检测果蝇产卵对其偏嗜性。实验结果显示,在 $25^\circ\text{C}$  培养条件下,果蝇的 OI 为 0.41 (图 3B),表明果蝇偏

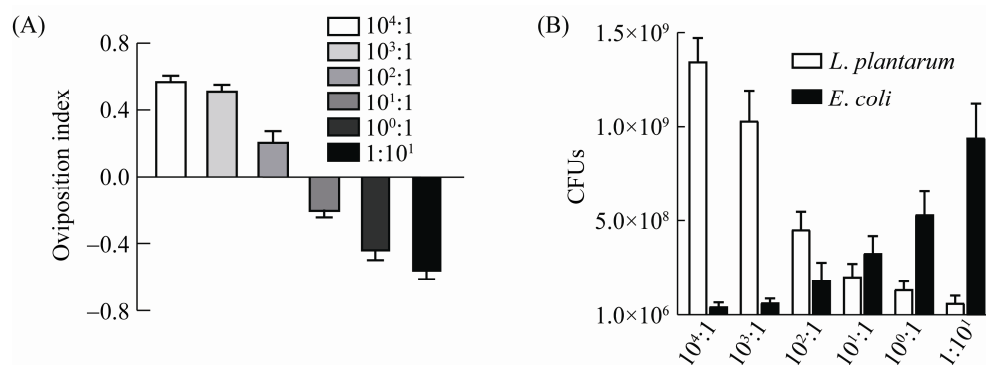


图 2 接种比例对果蝇产卵偏嗜性的影响

Figure 2 Effects of the proportion of mixed bacteria on the oviposition preference of *D. melanogaster*. A: effects of different proportion of mixed bacteria on the oviposition preference of *D. melanogaster* at  $37^\circ\text{C}$ ; B: CFUs of mixed bacteria after culture with different inoculation ratios at  $37^\circ\text{C}$ . Data in the figure are mean $\pm$ SE.

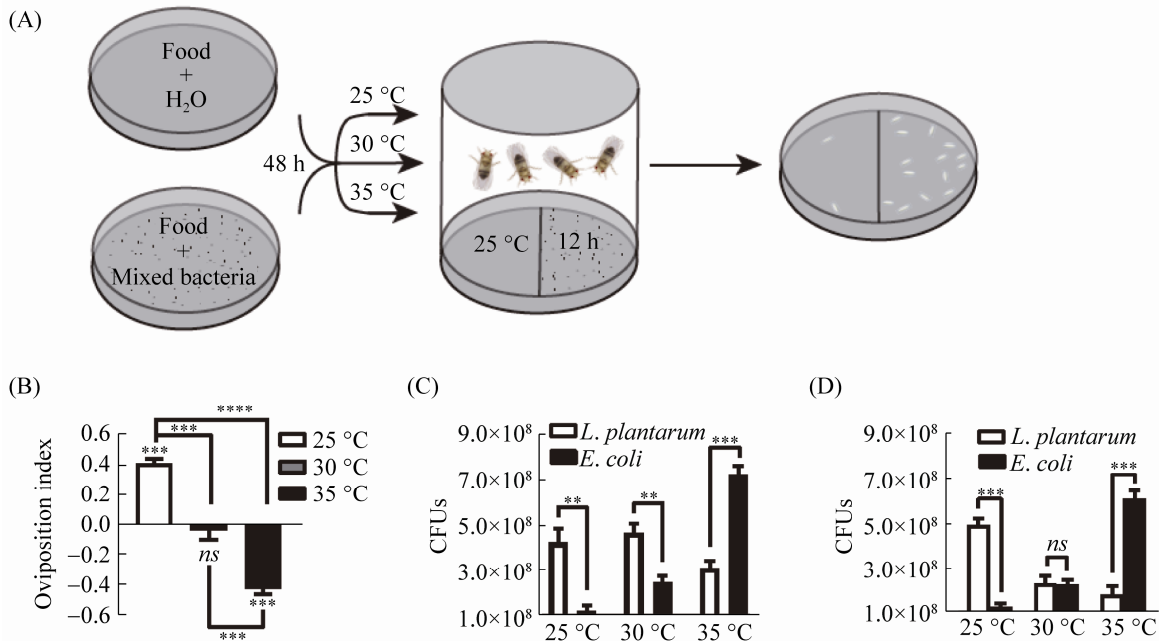


图3 温度对混合菌群平衡的影响

Figure 3 The influence of temperature on the balance of mixed flora. A: a diagram of the oviposition preference assay; B: effects of mixed bacteria on the oviposition preference of *D. melanogaster* at different temperatures; C: relationships between the number of bacteria after separate cultivation at different temperatures; D: relationships between the number of bacteria after co-cultivation at different temperatures. Data in the figure are mean±SE. Single sample *t*-test. *ns*:  $P>0.05$ ; \*:  $0.01<P<0.05$ ; \*\*:  $0.001<P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

好在混合菌群地点产卵；30 °C，产卵指数为-0.04，两侧产卵数量相当，偏嗜性不明显；35 °C，OI为-0.43，果蝇有躲避行为。上面的结果说明，培养菌群的温度是一个影响果蝇产卵偏嗜性的重要因素。

两菌单独培养时，植物乳杆菌随温度升高而繁殖速度变化较小，而大肠杆菌随温度升高，其繁殖速度迅速增加(图3C)，说明不同类型的细菌具有各自适宜生长的温度范围。25 °C共培养时植物乳杆菌CFUs为 $4.9 \times 10^8$ ，大于大肠杆菌CFUs  $1.1 \times 10^8$ (图3D)，是大肠杆菌的4.54倍，说明此温度培养条件下，植物乳杆菌较大肠杆菌占据优势，所以植物乳杆菌吸引果蝇产卵效应大于大肠杆菌群的排斥效应。30 °C

共培养时植物乳杆菌与大肠杆菌数量相当，植物乳杆菌吸引果蝇产卵效应与大肠杆菌群的排斥效应相当，所以表现出偏好性不明显。而35 °C共培养时植物乳杆菌却低于大肠杆菌数量，是大肠杆菌的0.3倍，所以植物乳杆菌吸引果蝇产卵效应小于大肠杆菌群的排斥效应。当在不同温度两菌单独培养时，发现单独培养的大肠杆菌要比共培养生长状况好，而植物乳杆菌在25 °C反而不如30 °C时的CFUs，其原因可能是共培养时和单独培养时细菌面临的生存压力不同。上述结果说明，温度影响植物乳杆菌与大肠杆菌的相互竞争，低温更有利于植物乳杆菌增殖，能赋予植物乳杆菌以竞争优势。



## 2.4 接种比例与温度互作影响菌群平衡

为了进一步研究接种比例与温度互作对菌群平衡的影响,提高 25 °C 培养的混合菌中大肠杆菌比例。结果发现,只有当大肠杆菌与植物乳杆菌比例超过 10:1 时,植物乳杆菌的吸引效应才会被大肠杆菌排斥效应抵消(图 4A),说明接种比例与温度互作而影响菌群平衡。并且在 25 °C,植物乳杆菌与大肠杆菌 10<sup>3</sup>:1 时混合菌对果蝇的吸引效应最强。接下来检测低温与接种比例联合效应,比较不同温度与不同比例对果蝇产卵偏嗜性影响。结果显示,25 °C 植物乳杆菌与大肠杆菌 10<sup>3</sup>:1 对应的果蝇 OI (0.79),高于 35 °C 植物乳杆菌与大肠杆菌 10<sup>3</sup>:1 对应的果蝇 OI (0.55),也高于 25 °C 植物乳杆菌与大肠杆菌 1:1 对应的果蝇 OI (0.42),说明了低温与接种比例可协同调控果蝇产卵偏嗜性(图 4B)。

## 2.5 植物乳杆菌通过代谢产物抑制大肠杆菌

已知有两种细菌间抑制机制,其一为细胞接触依赖性抑制,其二为代谢产物依赖性抑制。

为验证植物乳杆菌抑制大肠杆菌的机制,分别将无菌水、热灭活植物乳杆菌细胞和植物乳杆菌上清液分别与大肠杆菌共同涂布于果蝇食物,30 °C 培养 48 h,随后检测果蝇产卵偏嗜性。结果显示,大肠杆菌组 OI 为-0.73,大肠杆菌与热灭活植物乳杆菌细胞组 OI 为-0.71(图 5A),与大肠杆菌组无差异,说明植物乳杆菌细胞不是通过细胞接触方式抑制大肠杆菌。大肠杆菌与植物乳杆菌上清液组 OI 为-0.06,与大肠杆菌组差异显著,说明植物乳杆菌代谢产物抑制了大肠杆菌的生长。乳酸是植物乳杆菌重要代谢产物之一,所以推测乳酸可以抑制大肠杆菌的增殖而影响果蝇产卵偏嗜性。为了验证此推论,将不同浓度的乳酸与大肠杆菌混合涂布于果蝇食物上,检测产卵偏嗜性。结果显示,随着乳酸浓度升高,果蝇产卵指数增加,当浓度达到 75 mmol/L 时可检测完全消除大肠杆菌的排斥果蝇产卵效应(图 5B)。为了直接观测植物乳杆菌和乳酸对大肠杆菌的抑制作用,将无菌水、植物乳杆菌和 75 mmol/L 乳酸分别与大肠

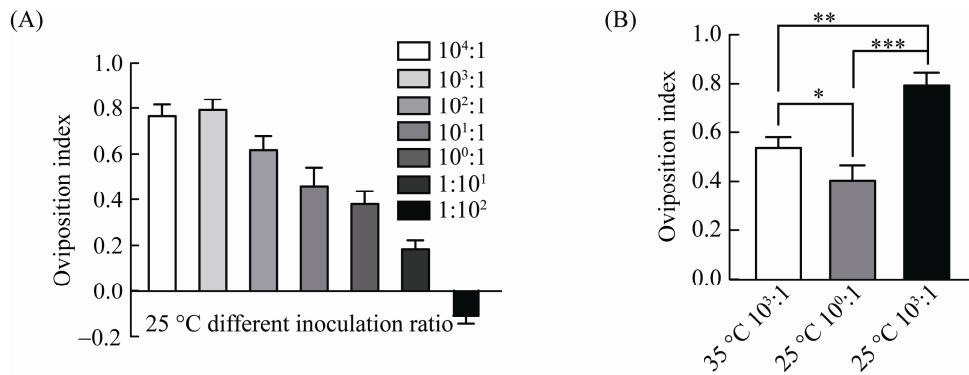


图 4 接种比例与温度互作对混合菌群平衡的影响

Figure 4 The influence of the interaction between inoculation ratio and temperature on the balance of mixed flora. A: effects of different proportion of mixed bacteria on the oviposition preference of *D. melanogaster* at 25 °C; B: effects of different proportion of mixed bacteria and temperature on the oviposition preference of *D. melanogaster*. Data in the figure are mean±SE. Single sample *t*-test. ns:  $P>0.05$ ; \*:  $0.01<P<0.05$ ; \*\*:  $0.001<P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .



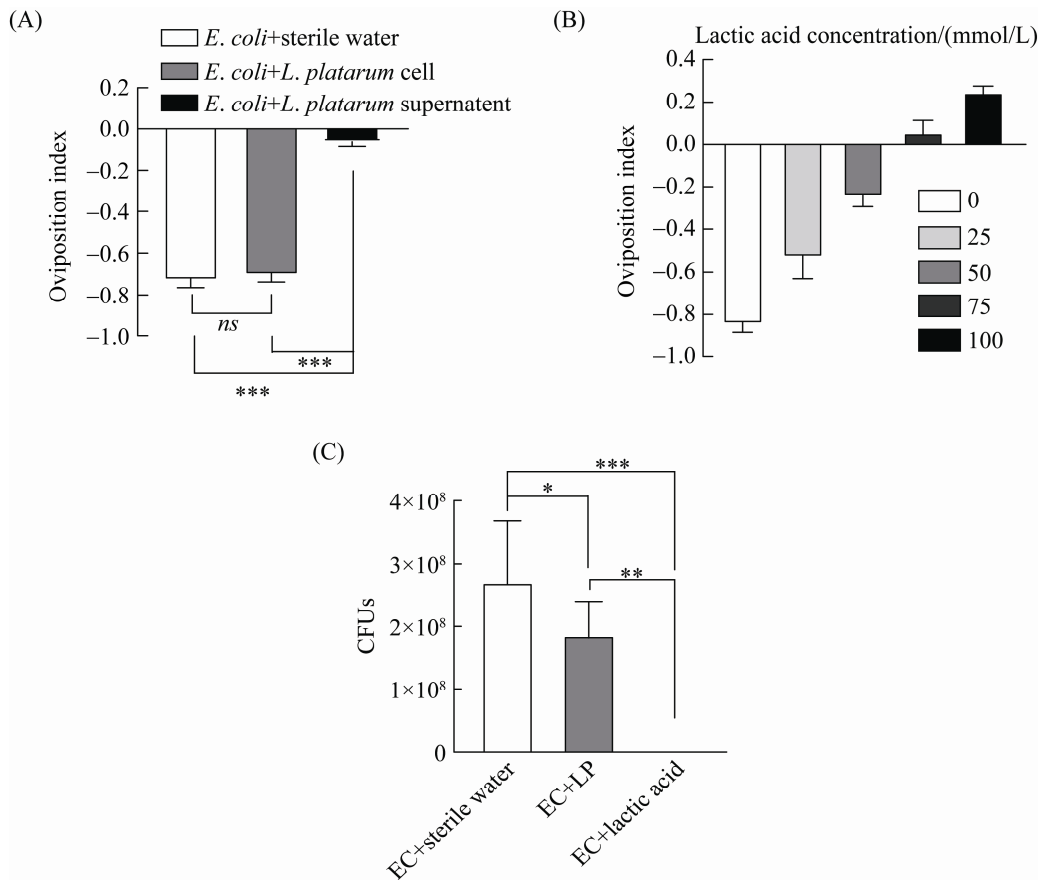


图 5 植物乳杆菌细胞及其代谢产物对大肠杆菌的影响

Figure 5 Effects of *L. plantarum* cells and their metabolites on *E. coli*. A: effect of co-culture of *L. plantarum* cells and supernatant with *E. coli* on the oviposition preference of *Drosophila*; B: effects of different concentrations of lactic acid on the growth of *E. coli*; C: CFUs of *E. coli* co-cultured with *L. plantarum* cells and supernatant. Data in the figure are mean±SE. Single sample *t*-test. ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

杆菌共培养, 检测大肠杆菌 CFUs。结果符合预期, 植物乳杆菌显著地抑制了大肠杆菌的生长, 75 mmol/L 乳酸能完全抑制大肠杆菌的生长 (图 5C)。以上结果说明, 植物乳杆菌通过代谢产物, 特别是乳酸, 抑制大肠杆菌的生长, 从而影响了果蝇产卵的偏好性。

## 2.6 混合菌群平衡影响果蝇存活率

雌果蝇的产卵选择行为可以提高后代果蝇存活率, 扩大种群的繁殖<sup>[11]</sup>。为此, 我们进一步研究接种比例和培养温度对果蝇后代存活率

的影响。首先, 选择 30 °C 作为培养温度, 因为此温度下植物乳杆菌与大肠杆菌生长速度相当, 易于调控二者。结果发现, 在植物乳杆菌单独培养的食物上存活率为 86%, 而在大肠杆菌单独培养的食物上存活率仅为 19% (图 6A)。可能因为大肠杆菌会在食物上形成水样粘液, 隔绝了氧气, 影响了果蝇胚胎孵化<sup>[8]</sup>。等比例混合的果蝇存活率为 64%, 介于二者单独培养的存活率之间 (图 6A), 说明果蝇产卵偏好性与果蝇后代存活率紧密相连。检测混合菌

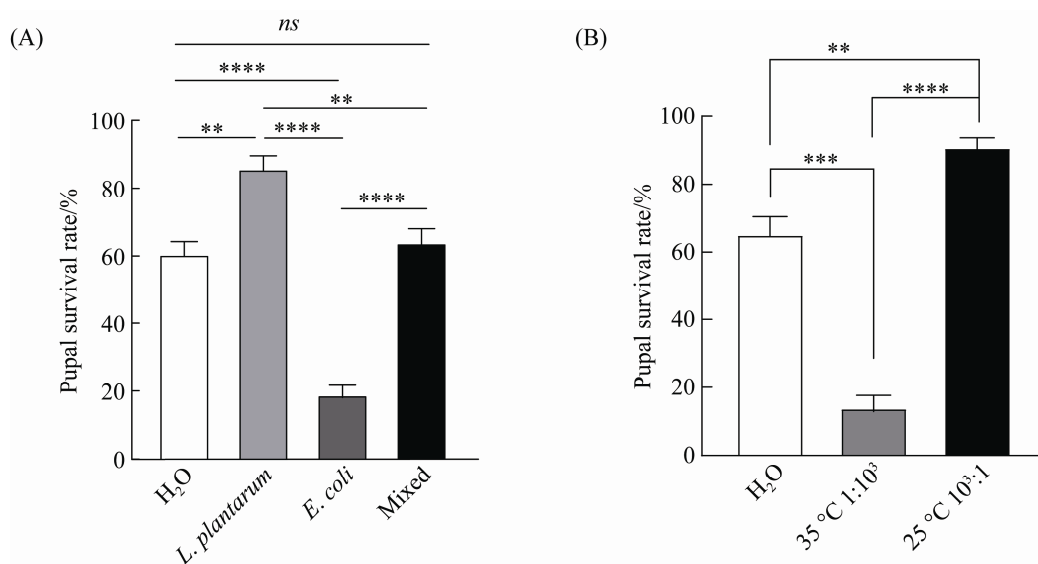


图 6 混合菌群平衡对果蝇存活率的影响

Figure 6 The effect of mixed flora balance on the oviposition preference of *D. melanogaster*. A: effects of *L. plantarum* and *E. coli* and mixed bacteria (*L. plantarum* and *E. coli* 1:1) on the pupal survival rate of *Drosophila* at 30 °C; B: effects of mixed bacteria on the pupal survival rate of *Drosophila*. Data in the figure are mean±SE. Single sample *t*-test. ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

群平衡对果蝇蛹存活率的影响, 35 °C 植物乳杆菌与大肠杆菌 1:10<sup>3</sup>, 大肠杆菌占据优势时, 蛹存活率仅为 14%, 而 25 °C 植物乳杆菌与大肠杆菌 10<sup>3</sup>:1, 植物乳杆菌占据优势时, 蛹存活率为 91% (图 6B)。以上结果说明, 温度和接种比例能影响混合菌群生长平衡, 进而调控果蝇产卵偏嗜性。

### 3 讨论

自然界或生物体内都存在着大量的微生物, 它们复杂且多样, 在空间上和时间上都是动态变化的。在菌群中细菌个体间在不断发生着信息交流, 影响微生物群落的平衡。在菌群中不仅有群落内部的交流, 细菌也会和外界进行信息交流, 对外界不断变化的环境条件做出反应, 协调各自基因的表达, 实现动态平衡<sup>[15]</sup>。

揭示影响菌群平衡的因素对理解和调控菌群平衡具有重要的研究价值。以益生菌植物乳杆菌与条件致病菌大肠杆菌构建研究模型, 研究影响菌群平衡的因素以及对果蝇的产卵行为的影响。

首先, 在 37 °C, 黑腹果蝇对植物乳杆菌和大肠杆菌具有产卵趋向性和产卵避性, 将植物乳杆菌与大肠杆菌等比例混合时, OI 为-0.46, 介于两者单独培养的 OI 之间, 仍具有产卵避性 (图 1)。改变细菌的初始接种比例可以改变甚至逆转果蝇的产卵偏嗜性 (图 2)。在初始接种数量增加到一定程度时, 即使在相同条件下生长情况处于劣势, 也会逆转劣势成为优势菌。菌群中细菌占据数量优势成为优势菌之后, 对果蝇的产卵效应也占据优势。混合菌中植物乳杆菌和大肠杆菌的最适生长温度不同, 因此我们推

测温度也是影响菌群平衡的重要因素。25 °C, 植物乳杆菌与大肠杆菌等比例混合时, 果蝇 OI 为 0.41, 表现出吸引效应, 与 35 °C 时恰好相反。此时菌落数量也显示植物乳杆菌数量占据优势(图 3), 说明温度影响植物乳杆菌与大肠杆菌的相互竞争, 低温能赋予植物乳杆菌以竞争优势。并且接种比例与温度能互作而影响果蝇产卵嗜性(图 4), 低温和接种数量优势下 OI 要高于两者单独情况下的 OI。

在有限的空间和资源下, 菌群中不同细菌会形成不同的社会关系, 其中最为显著的便是共生与竞争, 在共生中细菌间既有求同也有存异<sup>[16]</sup>, 而在竞争中细菌之间为争夺有限的空间和资源, 可以抑制甚至杀死其他微生物<sup>[17]</sup>。混合菌中益生菌植物乳杆菌和条件致病菌大肠杆菌呈相互竞争状态, 植物乳杆菌可抑制大肠杆菌的生长。在 30 °C, 发现植物乳杆菌的代谢产物, 特别是乳酸可以抑制大肠杆菌的生长, 而植物乳杆菌灭活细胞则不具备这种作用(图 5)。植物乳杆菌的代谢产物能影响混合菌的生长平衡, 继而调控果蝇产卵的偏好性。微生物能提高果蝇后代的存活率<sup>[18]</sup>, 混合菌中植物乳杆菌占据优势时, 蛹存活率显著提高, 而大肠杆菌占据优势时蛹存活率极低, 混合菌群的平衡能影响果蝇后代的存活率(图 6)。

我们的研究表明, 接种比例和温度是影响菌群平衡的重要因素, 而菌群平衡能调控果蝇的产卵行为, 影响其后代的存活率。本研究阐述了影响菌群平衡的重要因素以及混合菌群互作的机制, 为混合菌群方面的研究做了很好的铺垫, 具有重要的理论意义。通过改变一些外部条件来调节菌群的生长平衡, 使菌群朝着有利于宿主的方向生长是一个很好的利用菌群的思路。

## 参考文献

- [1] Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(1): 15–25.
- [2] Jia X, Dini-Andreote F, Falcão Salles J. Community assembly processes of the microbial rare biosphere. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(9): 738–747.
- [3] Broderick NA, Lemaitre B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 307–321.
- [4] Adair KL, Wilson M, Bost A, Douglas AE. Microbial community assembly in wild populations of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *The ISME Journal*, 2018, 12(4): 959–972.
- [5] Su WZ, Liu JL, Bai P, Ma BC, Liu W. Pathogenic fungi-induced susceptibility is mitigated by mutual *Lactobacillus plantarum* in the *Drosophila melanogaster* model. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 1–12.
- [6] Li P, Zhou QQ, Gu Q. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins. *Journal of Biotechnology*, 2016, 234: 66–70.
- [7] Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(3): 570–581.
- [8] 刘威, 张珂, 李恩惠, 徐皓哲, 张策. 大肠杆菌改变果蝇产卵嗜性. *昆虫学报*, 2017, 60(2): 173–179. Liu W, Zhang K, Li EH, Xu HZ, Zhang C. *Escherichia coli* alters the oviposition preference in *Drosophila*. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(2): 173–179. (in Chinese)
- [9] Ezenwa VO, Gerardo NM, Inouye DW, Medina M, Xavier JB. Microbiology. Animal behavior and the microbiome. *Science*, 2012, 338(6104): 198–199.
- [10] Richmond RC, Gerking JL. Oviposition site preference in *Drosophila*. *Behavior Genetics*, 1979, 9(3): 233–241.
- [11] Yang CH, Belawat P, Hafen E, Jan LY, Jan YN. *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science: New York, N Y*, 2008, 319(5870): 1679–1683.

- [12] Gilbert DG. Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia*, 1980, 46(1): 135–137.
- [13] 李玉娟, 苏琬真, 胡坤坤, 李鹏程, 刘威, 姚红. 植物乳杆菌促进黑腹果蝇生长发育. *昆虫学报*, 2017, 60(5): 544–552.  
Li YJ, Su WZ, Hu KK, Li PC, Liu W, Yao H. *Lactobacillus plantarum* promotes the growth and development of *Drosophila melanogaster*. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(5): 544–552. (in Chinese)
- [14] Joseph RM, Devineni AV, King IFG, Heberlein U. Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(27): 11352–11357.
- [15] Chandler JA, Morgan Lang J, Bhatnagar S, Eisen JA, Kopp A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genetics*, 2011, 7(9): e1002272.
- [16] Schretter CE, Vielmetter J, Bartos I, Marka Z, Marka S, Argade S, Mazmanian SK. A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature*, 2018, 563(7731): 402–406.
- [17] Ghoul M, Mitri S. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(10): 833–845.
- [18] 金虹云, 潘梦瑶, 王明亮, 闫琴, 李耀星, 赵锐, 张恒, 白芑, 刘威. 共生菌通过氧气浓度调控果蝇产卵嗜性. *微生物学报*, 2020, 60(5): 1010–1022.  
Jin HY, Pan MY, Wang ML, Yan Q, Li YX, Zhao R, Zhang H, Bai P, Liu W. Symbiotic bacteria regulate *Drosophila* oviposition preference by oxygen concentration. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(5): 1010–1022. (in Chinese)

(本文责编 李磊)