

## · 微生物组测序与分析专题 ·

牛化欣 博士，内蒙古民族大学教授、硕士生导师，主要从事动物营养与品质调控方面的研究。主持和参与国家、省部级以上科研项目 8 项，发表学术论文 90 余篇，其中以第一作者发表 SCI 和 EI 收录文章 9 篇（含通讯作者），著作 2 部，授权发明专利 2 项和实用新型专利 2 项。中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会常务理事。荣获 2020 年内蒙古自治区青年创新人才。



# 高通量测序方法分析两种草食性淡水螺肠道菌群多样性

胡宗福<sup>1</sup>，常杰<sup>1</sup>，佟庆<sup>2</sup>，于建华<sup>1</sup>，李树国<sup>1</sup>，牛化欣<sup>1</sup>

1 内蒙古民族大学 动物科技学院，内蒙古 通辽 028000

2 东北农业大学 动物医学院，黑龙江 哈尔滨 150038

胡宗福，常杰，佟庆，等. 高通量测序方法分析两种草食性淡水螺肠道菌群多样性. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2622–2634.  
Hu ZF, Chang J, Tong Q, et al. High-throughput sequencing analysis of intestinal flora diversity of two freshwater snails (*Radix auricularia* and *Planorbella trivolvis*). Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2622–2634.

**摘要：**淡水螺是水生态系统中重要的生物类群，也是多种寄生虫的中间宿主。肠道菌群在动物能量代谢和抵抗病原体方面起着重要作用。本文分析了耳萝卜螺 *Radix auricularia* 和三旋卷丽螺 *Planorbella trivolvis* 肠道菌群的多样性。结果表明：在门水平上，耳萝卜螺有 23 个菌门，以变形菌门 (Proteobacteria, 33.63%)、蓝细菌门 (Cyanobacteria, 15.33%)、绿弯菌门 (Chloroflexi, 13.95%) 和放线菌门 (Actinobacteria, 12.99%) 为主；三旋卷丽螺有 13 个菌门，以变形菌门 (54.88%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 28.49%) 和放线菌门 (7.65%) 为主。属水平上，耳萝卜螺有厚皮藻属 *Pleurocapsa*、硫网菌属 *Thiodictyon*、纤毛菌属 *Leptotrichia* 及类诺卡氏菌属 *Nocardioides* 等 445 个属；三旋卷丽螺有 *Cloacibacterium*、OM60NOR5\_clade、假单胞菌属 *Pseudomonas* 及红杆菌属 *Rhodobacter* 等 238 个属。有 93 个菌属为两种螺的共有核心菌群（所有样本中都存在），其中 27 个菌属丰度大于 0.5%。两种

**Received:** June 4, 2020; **Accepted:** November 13, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31860730, 31460692), Open Project Program of Inner Mongolia Key Laboratory of Toxicant Monitoring and Toxicology (Nos. MDK2018031, MDK2019077), First Level Training Project of Inner Mongolia Autonomous Region "Prairie Talent Project" Youth Innovation and Entrepreneur Talents (No. Q2017022), Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, China (Nos. 2018MS03022, 2018LH03015), Natural Science Foundation of Inner Mongolia University for Nationalities (No. NMDYB1705).

**Corresponding author:** Huaxin Niu. Tel: +86-475-8314845; E-mail: niuhx@imun.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31860730, 31460692), 内蒙古毒物监控及毒理学重点实验室开放课题 (Nos. MDK2018031, MDK2019077), 内蒙古自治区“草原英才工程”青年创新创业人才第一层次培养项目 (No. Q2017022), 内蒙古自治区自然科学基金 (Nos. 2018MS03022, 2018LH03015), 内蒙古民族大学科学研究基金 (No. NMDYB1705) 资助。

网络出版时间: 2020-12-15

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201214.1647.001.html>

螺肠道菌群结构差异显著 ( $P=0.027$ )。PICRUSt 功能预测分析表明, 两种螺肠道菌群 KEGG 功能组成相似, 氨基酸代谢、碳水化合物代谢及膜转运丰度较大。综上, 两种草食性淡水螺肠道菌群多样性较高且差异显著, 但有数量较多的共有核心菌群。

关键词: 耳萝卜螺, 三旋卷丽螺, 16S rRNA 高通量测序, 肠道菌群

## High-throughput sequencing analysis of intestinal flora diversity of two freshwater snails (*Radix auricularia* and *Planorbella trivolvis*)

Zongfu Hu<sup>1</sup>, Jie Chang<sup>1</sup>, Qing Tong<sup>2</sup>, Jianhua Yu<sup>1</sup>, Shuguo Li<sup>1</sup>, and Huaxin Niu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

<sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150038, Heilongjiang, China

**Abstract:** Freshwater snail is an important biological group in aquatic ecosystem and an intermediate host of many parasites. Intestinal flora plays an important role in animal energy metabolism and resistance to pathogens. We analyzed the intestinal microbiota diversity of *Radix auricularia* (RA) and *Planorbella trivolvis* (PL) by 16S rRNA high-throughput sequencing. At the phylum level, RA had 23 phyla, including Proteobacteria (33.63%), Cyanobacteria (15.33%), Chloroflexi (13.95%), and Actinomycetes (12.99%). PL had 13 phyla, including Proteobacteria (54.88%), Bacteroidetes (28.49%), and Actinomycetes (7.65%). At the genus level, there were 445 genera in RA, including *Pleurocapsa*, *Thiodictyon*, *Leptotrichia*, and *Nocardioides*. There were 238 genera in PL, including *Cloacibacterium*, OM60NOR5\_clade, *Pseudomonas*, and *Rhodobacter*. Ninety-three genera were the common core flora of the two snail species (all the samples were present), and 27 genera had an abundance greater than 0.5%. The structure of intestinal microbiota was significantly different between the two groups ( $P=0.027$ ). We performed the functional prediction of intestinal microbiota using Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt), and the results show that the KEGG functional composition of the intestinal flora of the two snails was similar, and the abundance of the amino acid metabolism, carbohydrate metabolism and membrane transport were large. In summary, the intestinal microbiota of the two snails was high in diversity and significantly different, but there were a large number of common core flora.

**Keywords:** *Radix auricularia*, *Planorbella trivolvis*, 16S rRNA high-throughput sequencing, gut microbiota

淡水螺是水生生态环境中常见的生物类群, 在水生态系统中具有重要的地位和作用。在缺少鱼类等大型消费者的小水体中, 淡水螺类是主要的初级消费者, 对初级生产力的生物量和能量的转化具有重要的作用<sup>[1-2]</sup>。淡水螺还是很多寄生虫的中间宿主, 在某些重要人畜寄生虫传染病的防治中有重要地位<sup>[3-4]</sup>。

动物的肠道菌群不但在动物的能量代谢和抵抗病原体方面起着重要的作用, 还在生长、发育、免疫、繁殖等多个方面发挥重要的功能<sup>[5-7]</sup>。当前, 脊椎动物肠道菌群的研究已经取得了广泛的进展<sup>[8-9]</sup>, 但软体动物肠道微生物的研究相对滞后。

对软体动物腹足纲的肠道微生物研究主要集中于贝类肠道微生物区系的研究和功能性肠道微生物的研究。淡水螺肠道菌群区系研究方面仅见一篇报道, Horn 等<sup>[10]</sup>采用 16S rRNA 基因高通量测序方法, 调查了来自非洲和北美的 3 种淡水扁卷螺 (*Planorbidae*, 腹足纲 *Pulmonata*) 的肠道菌群, 观察到的细菌分布在 18 个门中, 证明了在 3 种淡水螺中存在高度多样化的肠道细菌群落, 并表明需要进一步的研究来确定肠道细菌在螺生理和免疫学中的作用。陆生蜗牛是软体动物腹足类肠道微生物研究相对较多的种类。Nicolai 等<sup>[11]</sup>使用 PCR-DGGE 指纹分析技术揭示了蜗牛 *Helix pomatia* 肠道

微生物在不同生境群体间的差异和季节性的变化,还发现有些菌群属于不随季节变化而影响的常驻菌群。贝类功能性肠道微生物方面的研究目前主要集中于纤维素分解菌的挖掘。Cardoso 等<sup>[12]</sup>对非洲大蜗牛 *Achatina fulica* 肠道微生物进行了宏基因组研究,发现了很多与木质纤维素分解相关的基因,在 2 700 个 GH (Glycoside hydrolase) 编码基因中约有 36% 的基因序列与纤维素酶和半纤维素酶编码基因序列相似,这有助于通过分解木质纤维素产生乙醇燃料来缓解目前紧张的全球能源问题。Joynson 等<sup>[13]</sup>采用宏基因组学的方法研究了一种黑蛞蝓 *Arion ater* 的肠道菌群的多样性及功能,揭示了肠道菌群中大量存在的木质纤维素酶的基因。

三旋卷丽螺源自北美,食谱范围广和适应力强的特性使其能够随观赏鱼贸易携带进入我国<sup>[14]</sup>。耳萝卜螺则广泛分布于各种淡水水体中,从湖泊水库到小型水体。耳萝卜螺以水草、藻类和落叶为食<sup>[1]</sup>。淡水肺螺类肠道微生物群落的研究尚处于起步阶段,为补充这种研究匮乏,本实验以三旋卷丽螺和耳萝卜螺两种淡水螺为研究对象,采用 16S rRNA 基因 Miseq 高通量测序技术,对其肠道微生物群落进行研究,分析了两种草食性淡水螺的核心菌群,为研究软体动物淡水腹足类肠道微生物生态学和功能提供数据支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本采集与处理

实验材料包括两种淡水螺,耳萝卜螺 (*Radix auricularia*, RA) 采自内蒙古通辽市一小池塘内。池塘水深约 0.5 m,水温约 23 °C,池塘内主要食物种类为刚毛藻、落叶及底栖微藻。所采螺的平均壳高约 (9.7±0.3) mm,平均壳长约 (20±0.5) mm。三旋丽卷螺 (*Planorbella trivolvis*, PL) 来自实验室养殖,螺壳直径为 (10.53±0.45) mm,缸内水温约 26 °C,螺的食物来源为干苜蓿及缸内孳生的藻类。

实验螺采回实验室后,5 h 内取样完毕。先用

自来水洗净螺壳上的杂质,然后用 70% 酒精擦拭螺体表面。在超净台内进行无菌操作,破坏螺壳,解剖、分离和取出肠道。将肠道连同内容物一起装入无菌 1.5 mL 离心管,-80 °C 保存,用于细菌 DNA 的提取。鉴于螺个体微小,为满足取样要求,将 5 个螺的肠道及其内容物装于一个离心管内成为一个重复样本,每种螺各有 4 个重复样本。

### 1.2 肠道菌群多样性的测定

取螺肠道样品约 0.5 g,按照使用 MP-bio 土壤 DNA 提取试剂盒说明提取细菌基因组,将提取的 DNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并用 NanoDrop 对 DNA 的浓度和  $OD_{260}/OD_{280}$  值进行测定。

采用 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物 (338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增,引物两端带有 12 bp 的条形码,用以识别不同样品的序列。PCR 扩增使用 TransStart FastPfu (全式金,北京,中国) 试剂盒。反应体系: 4.0 μL 5×FastPfu 缓冲液, 2 μL dNTPs (各 2.5 mmol/L), 0.4 μL FastPfu DNA 聚合酶, 10 ng DNA 模板, 0.8 μL 正向引物 338F (5 mmol/L), 0.8 μL 反向引物 806R (5 mmol/L), 然后用 ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。程序如下: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环数为 26 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,使用 Thermo Scientific 公司的 GeneJET 胶回收试剂盒回收产物,使用 Illumina 测序专用的 NEB Next<sup>®</sup> Ultra DNA Library Prep Kit 试剂盒建立基因克隆文库。构建好的文库送交上海美吉生物工程有限责任公司通过 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序。

### 1.3 数据统计

使用 Usearch (version 7.0) 软件 (<http://drive5.com/uparse/>), 将所得序列根据 97% 相似度关系进行操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTU) 聚类分析,产生 OTU 表,并与 Silva 数据

库 (<http://www.arb-silva.de>) 比对进行分类学分析, 所用平台为 QIIME 平台 ([http://qiime.org/scripts/assign\\_taxonomy.html](http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)), 统计后得到各样本的群落组成。然后对群落进行基于 OTU 水平的  $\alpha$  多样性分析, 所用软件为 Mothur (version v.1.30.1, [http://www.mothur.org/wiki/Schloss\\_SOP#Alpha\\_diversity](http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)), 分析指标包括 Sobs 指数、Shannon 指数、Chao 指数、Simpson 指数、Ace 指数以及覆盖度 (Coverage)。肠道菌群组成分析及热图使用 R 语言工具作图, 主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 采用 R 语言的 vegan 软件包进行分析和作图。肠道菌群的基因功能预测使用 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 软件进行分析。系统发育进化树使用 IQ-TREE 进行分析制作。差异显著性用 Kruskal-Wallis 秩和检验比较, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示,  $P<0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 16S rRNA 基因测序的肠道菌群多样性及组成分析

测序得到的双端序列经过质量控制, 包括去除质量值低于 20 的尾部碱基及含氮的碱基, 根据双端序列间的重叠关系进行双端序列的拼接, 通过末端条形码识别得到每个样本的序列, 8 个样品最终得到有效序列数 367 979 条, 平均序列长度为 425.48 bp。其中三旋卷丽螺 (PL) 4 个样共获得有效序列 225 592 条, 平均每个样品 56 398 条, 耳萝卜螺 (RA) 4 个样共获得有效序列 142 837 条, 平均每个样品为 35 597 条。基于 97% 序列同源性划分共得到 1 117 个 OTU, 其中 PL 组有 505 个 OTU, 分属 297 个属、173 科、105 目、36 纲、19 门; RA 组有 949 个 OTU, 分属 457 个属、218 科、129 目、42 纲、24 门。在后续分析中, 将每个样本序列数抽平至 25 733 条, 过滤掉含 Chloroplast 的 OTU, 最后获得 967 个 OTU, 其中

PL 组有 382 个 OTU, 分属 238 个属、137 科、86 目、28 纲、15 门; RA 组有 874 个 OTU, 445 个属、209 科、126 目、41 纲、23 门。维恩图显示, 虽然两种螺种类和采集水域不同, 但其共有 OTU 达 289 个, 分别占 PL 及 RA 的 75.65% 及 33.07%。RA 特有 OTU (585 个) 远高于 PL 特有 OTU 数 (93 个)。在属水平上, 共有菌属有 204 个, 分别占 PL 及 RA 的 85.71% 及 45.84%, RA 特有菌属 (241 个) 远高于 PL 特有菌属 (34 个)。此外, 在门水平上, 共有菌门 15 个, 占 PL 总门数的 100%, 占 RA 总门数的 64.22% (图 1)。

由表 1 可见, 两组样本的  $\alpha$  多样性指数显著差异 ( $P<0.05$ ), Sobs 指数 RA 组显著大于 PL 组 ( $P<0.05$ ), 表明耳萝卜螺样本中所观察到的物种数目少于三旋卷丽螺; Shannon 指数 RA 组显著高于 PL 组 ( $P<0.05$ ), Simpson 指数 RA 显著低于 PL 组 ( $P<0.05$ ), 表明耳萝卜螺肠道菌群多样性比三旋卷丽螺高; Chao 指数 RA 组高于 PL 组 ( $P<0.05$ ), Ace 指数 RA 组高于 PL 组 ( $P<0.05$ ), 表明耳萝卜螺肠道菌群物种丰富度较三旋卷丽螺组高。两组螺菌群样本的稀释曲线显示均已进入平台期, 表明测序深度可靠, 能够真实反映样本中大多数菌群组成 (图 2)。

在门水平上, PL 和 RA 肠道菌群含有的菌门分别为 13 和 23 个, 其中相对丰度大于 1% 的门分别有 7 个和 10 个 (表 2)。变形菌门 (Proteobacteria) 在两组中都是丰度最大的菌门, 在 PL 和 RA 中的相对丰度分别为 54.88% 和 33.63%。此外, PL 组相对丰度较高的有拟杆菌门 (Bacteroidetes, 28.49%)、放线菌门 (Actinobacteria, 7.65%)、绿弯菌门 (Chloroflexi, 2.55%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 2.76%) 和衣原体门 (Chlamydiae, 1.22%)。在 RA 肠道菌群中, 除变形菌门外, 蓝细菌门 (Cyanobacteria, 15.33%)、放线菌门 (Actinobacteria, 12.99%) 和绿弯菌门 (Chloroflexi, 13.95%) 也具有一定优势。此外, RA 肠道菌群中丰度大于 1% 的还有厚壁菌门 (Firmicutes, 7.09%)、

拟杆菌门 (Bacteroidetes, 2.27%)、软壁菌门 (Tenericutes, 6.10%)、一种未鉴定的菌门 (Unclassified, 4.80%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 1.49%) 和梭杆菌门 (Fusobacteria, 1.23%) (表 2)。

在属水平上, RA 组中丰度高于 1% 的菌属有

17 个, 有 9 个不能分类到属水平, 可在高一级的水平得到分类 (科、目或纲), 丰度低于 1% 的属的总丰度达 52.18% (图 3)。各属间丰度依次下降, 其中丰度相对较高的菌属有绿屈挠菌科未知属 (Unclassified\_f\_Chloroflexaceae, 6.92%)、支原体

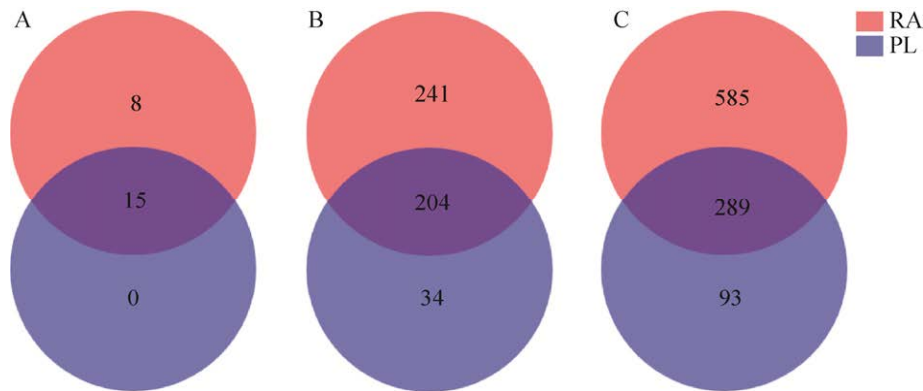


图 1 基于门水平 (A)、属水平 (B) 及 OTU 水平 (C) 的 Venn 分析

Fig. 1 Venn analysis of gut bacterial community based on phylum (A), genus (B) and OTU (C) level.

表 1 两种淡水螺肠道菌群  $\alpha$  多样性

Table 1  $\alpha$ -diversity indexes of intestinal microbial flora of two snails

Samples	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Sequences
PL	3.41±0.21 <sup>b</sup>	0.09±0.03 <sup>a</sup>	324.38±10.47 <sup>b</sup>	329.06±14.05 <sup>b</sup>	56 318.50±12 717.32 <sup>a</sup>
RA	5.00±0.26 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>b</sup>	774.08±30.88 <sup>a</sup>	780.70±41.74 <sup>a</sup>	33 777.33±1 977.36 <sup>b</sup>

Notes: PL stands for the gut microflora of *Planorbella trivolvis*; RA stands for the gut microflora of *Radix auricularia*. The letter "a" and "b" represent the significant different between two groups ( $P < 0.05$ ).

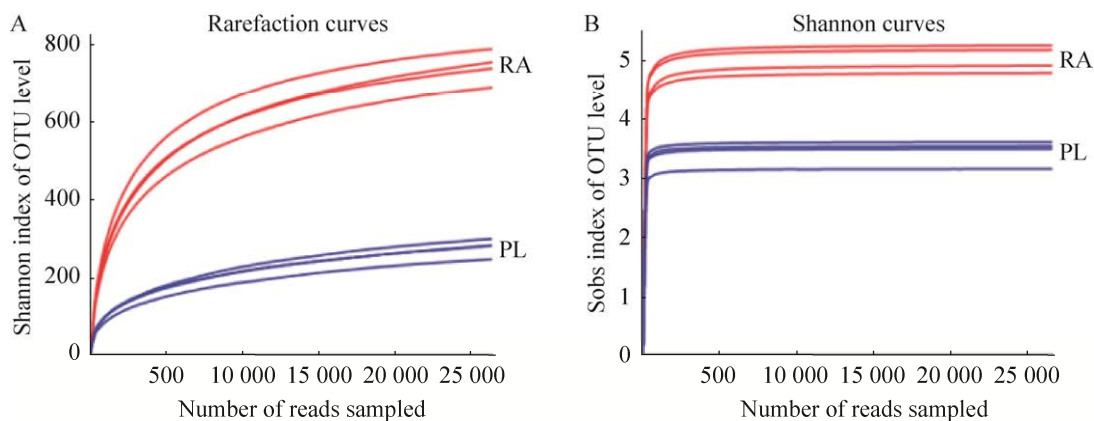


图 2 稀释曲线和香农指数曲线

Fig. 2 Sobs and Shannon indexes of snail gut microbiota. (A) Rarefaction curves of snail gut microbiota. (B) Shannon curves of snail gut microbiota. PL represents the samples of *Planorbella trivolvis* group, RA represents the samples of *Radix auricularia* group.

表 2 相对丰度大于 0.15% (序列占测序总量比例) 的菌门

Table 2 Bacterial phyla with relative abundance above 0.15% (sequence percentage of total sequence amount)%

Phylum	Groups			
	PL	RA	PL-Sd	RA-Sd
Proteobacteria	54.88	33.63	4.10	4.32
Bacteroidetes	28.49	2.27	7.12	1.18
Actinobacteria	7.65	12.99	1.76	2.85
Cyanobacteria	1.35	15.33	0.56	5.75
Chloroflexi	2.55	13.95	0.56	5.09
Firmicutes	0.58	7.09	0.52	3.28
Tenericutes	0	6.101	0	5.19
Unclassified	0	4.80	0	3.14
Verrucomicrobia	2.76	1.49	1.59	0.97
Fusobacteria	0.18	1.23	0.11	0.34
Chlamydiae	1.22	0.010	0.56	0.12
Planctomycetes	0.25	0.20	0.14	0.10
Acidobacteria	0.06	0.35	0.02	0.15
Deinococcus-Thermus	0	0.19	0	0.27

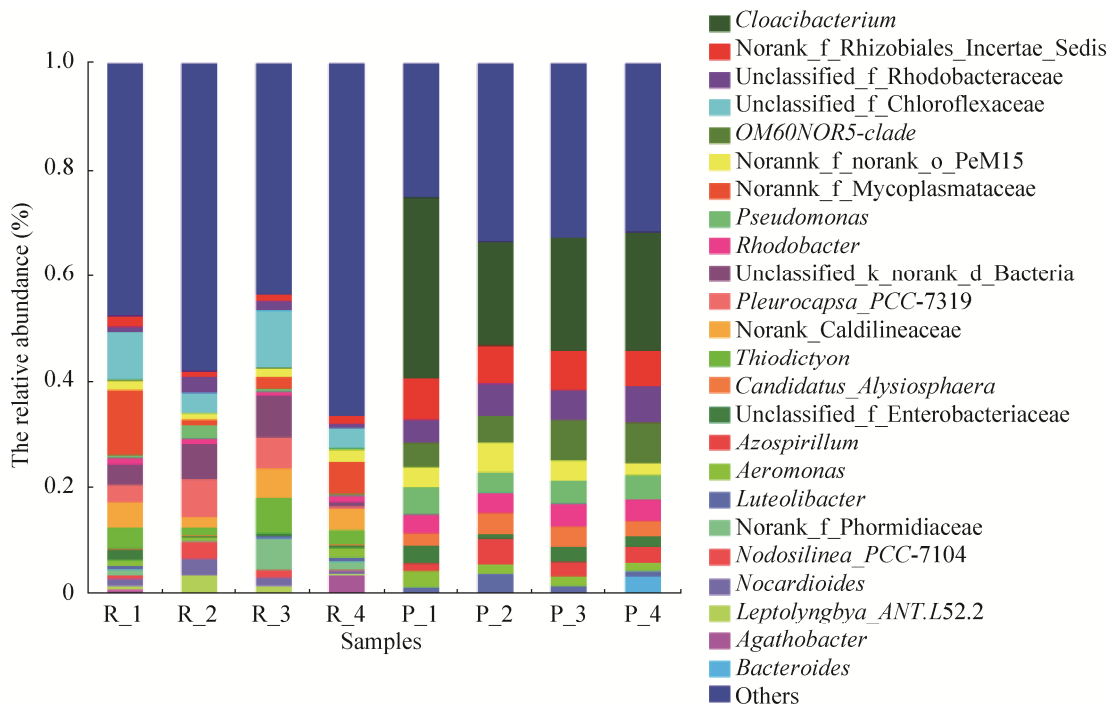


图 3 基于属水平的淡水螺肠道菌群组成

Fig. 3 The composition of gut bacterial community in *Radix auricularia* and *Planorbella trivolvis*. Notes: all the genera with abundance below 0.03 was showed as others; norank or unclassified represent the bacteria can not identified in genus level; f\_ represents family; o\_ represents order; R\_1–R\_4 stand for the intestinal microflora of *Radix auricularia* (RA); P\_1–P\_4 stand for the intestinal microflora of *Planorbella trivolvis* (PL).

科未知属 (Norank\_f\_Mycoplasmataceae, 5.42%)、厚皮藻属 (*Pleurocapsa*, 4.27%)、硫网菌属 (*Thiodictyon*, 3.70%) 和暖绳菌科未知属

(Norank\_f\_Caldilineaceae, 4.08%)。其他还有席藻科 (Phormidiaceae, 2.04%)、*Nodosilinea* (1.58%)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*, 1.49%)、鞘丝藻属

(*Leptolyngbya*, 1.44%)、纤毛菌属 (*Leptotrichia*, 1.23%)、红杆菌科未知属 (Unclassified\_f\_Rhodobacteraceae, 1.64%) 和根瘤菌科未知属 (Norank\_f\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis, 1.48%) 等(图3)。

而 PL 组中丰度高于 1% 的菌属有 14 个, 有 6 个不能分类到属水平, 可在高一级的水平得到鉴定(科、目或纲)。其他丰度低于 1% 的菌属占总丰度的 14.25% (图 3)。以 *Cloacibacterium* 的丰度最高(达 24.33%)。其他丰度大于 1% 的菌属由高到低依次为根瘤菌科未知属 (Norank\_f\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis, 7.33%)、*OM60NOR5*\_clade (6.25%)、

红杆菌科未知属 (Unclassified\_f\_Rhodobacteraceae, 5.76%)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 4.45%)、红杆菌属 (*Rhodobacter*, 3.86%)、*Candidatus\_Alysiosphaera* (3.39%)、肠杆菌科未知属 (Unclassified\_Enterobacteriaceae, 2.28%)、固氮螺菌属 (*Azospirillum*, 3.01%)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*, 2.15%)、气单胞菌属 (*Aeromonas*, 1.97%) 及 *Luteolibacter* (1.85%) 等 (图 3)。

## 2.2 共有核心菌群分析

表 3 为属水平上两种淡水螺共有核心菌群, 即两种螺共有的核心菌群。将核心菌群定义为

表 3 相对丰度大于 0.5% (序列占测序总量比例) 的共有核心菌属

Table 3 The core bacterial genera shared by all samples in two snail species with relative abundance above 0.5% (sequence percentage of total sequence amount)

Phylum	Family	Genus	PL-mean	PL-SD	RA-mean	RA-SD
Proteobacteria	Rhizobiales_Incertae_Sedis	Norank	7.33	0.49	1.48	0.45
Proteobacteria	Haliaceae	OM60NOR5_clade	6.25	1.68	0.08	0.07
Proteobacteria	Rhodobacteraceae	Unclassified	5.76	1.05	1.64	0.99
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	4.45	0.40	0.97	1.06
Proteobacteria	Rhodobacteraceae	Rhodobacter	3.86	0.44	0.96	0.31
Proteobacteria	Geminococcaceae	Candidatus_Alysiosphaera	3.39	0.75	0.13	0.06
Chloroflexi	JG30-KF-CM45	Norank	2.54	0.55	1.36	0.65
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	Unclassified	2.28	0.84	0.94	0.81
Actinobacteria	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	2.15	0.48	0.39	0.08
Proteobacteria	Aeromonadaceae	Aeromonas	1.97	0.71	0.78	0.66
Verrucomicrobia	Rubritaleaceae	Luteolibacter	1.85	1.29	0.54	0.31
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	Polymorphobacter	1.62	0.36	0.14	0.05
Proteobacteria	Reyranellaceae	Reyranella	1.34	0.37	0.10	0.11
Proteobacteria	Acetobacteraceae	Roseomonas	1.13	0.09	0.41	0.15
Bacteroidetes	Chitinophagaceae	Dinghuibacter	1.09	0.36	0.035	0.06
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	1.08	0.32	0.40	0.49
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	Bacteroides	0.88	1.65	0.12	0.15
Actinobacteria	Microbacteriaceae	Aurantimicrobium	0.68	0.16	0.74	0.20
Proteobacteria	Burkholderiaceae	Polynucleobacter	0.62	0.09	0.12	0.11
Proteobacteria	Burkholderiaceae	Norank	0.52	0.18	0.23	0.12
Proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	0.47	0.17	0.56	0.09
Fusobacteria	Leptotrichiaceae	Leptotrichia	0.18	0.11	1.23	0.34
Proteobacteria	Burkholderiaceae	Hydrogenophaga	0.14	0.05	0.56	0.27
Proteobacteria	Rhodobacteraceae	Paracoccus	0.03	0.01	0.78	0.38
Proteobacteria	Acetobacteraceae	Unclassified	0.01	0.01	0.51	0.21
Chloroflexi	Caldilineaceae	Norank	0.01	0.01	4.08	1.43
Actinobacteria	Microbacteriaceae	Microbacterium	0.01	0.01	0.55	0.40

该螺所有的肠道样本都享有的菌群, 任何一个样品不含有的菌属都需要剔除。经过分析, 获得了 93 个共有核心菌群, 其中丰度大于 0.5% 的共有核心菌群有 27 个属 (表 3)。这些菌属主要分布在变形菌门 (Proteobacteria) 内, 个别也分布在绿弯菌门 (Chloroflexi)、放线菌门 (Actinobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 及梭杆菌门 (Fusobacteria)。

### 2.3 两种螺肠道菌群差异性分析

PCoA 分析用来表示不同样品间的菌群多样性, 如图 4 所示, 在非加权丰度因素 (Unweighted unifracs) 的条件下分析 (图 4A), 两种螺各自的样本都能显著分为一个群体 ( $R^2=0.735$ ,  $P=0.027$ ), PC1 坐标轴的影响因素占总成分的 73.59%。在加权丰度因素 (Weighted unifracs) (图 4B), 两种螺的样本分群同样显著 ( $R^2=0.843$ ,  $P=0.027$ ), PC1 坐标轴的影响因素占总成分的 84.65%。两种螺样本在两种分析水平上 (非加权丰度因素和加权丰度因素) 均显著分群 ( $P<0.05$ ), 表示两种螺的微生物群落的结构和丰度都有自己明显的特征。

为反映两种淡水螺的肠道菌群的关系, 构建了含物种聚类关系树、样品聚类关系树的热图分

析 (图 5), 图中样品的颜色代表了菌群的相对丰度, 图左侧即为基于属水平的菌群聚类关系树, 图中顶端代表样品的聚类关系。物种聚类关系树显示, 所有的菌群按其其在样品中的丰度分为两个大的聚类分支, 其中 PL 肠道菌群丰度较高的菌群聚类为一个大的聚类分支, 而 RA 的肠道菌群可聚类为一个大的聚类分支。样品聚类关系分析显示, 来自 RA 的 4 个样本彼此临近, 同样来自 PL 的 4 个样本彼此临近, 说明 2 种螺在组内各样品之间肠道菌群相似度较大。

### 2.4 基于 PICRUSt 的肠道菌群基因功能预测

通过对三旋卷丽螺 (PL) 和耳萝卜螺 (RA) 肠道菌群 KEGG pathway (level-2) 进行丰度组成分析, 结果显示, 与物种组成相比, 两组样本的 KEGG 功能组成较为相似 (图 6)。丰度相对较大的代谢通路如氨基酸代谢 (RA, 10.44%; PL, 11.65%)、碳水化合物代谢 (RA, 10.10%; PL, 10.45%) 及膜转运 (RA, 12.10%; PL, 10.95%); 丰度居中的如能量代谢 (RA, 6.78%; PL, 5.70%)、遗传信息的复制与修复 (RA, 6.87%; PL, 6.53%)、脂类代谢 (RA, 3.71%; PL, 4.24%)、辅酶因子和维生素代谢 (RA, 4.60%; PL, 4.30%) 及外源物质降解与代谢 (RA, 3.73%; PL, 4.33%) (图 6)。

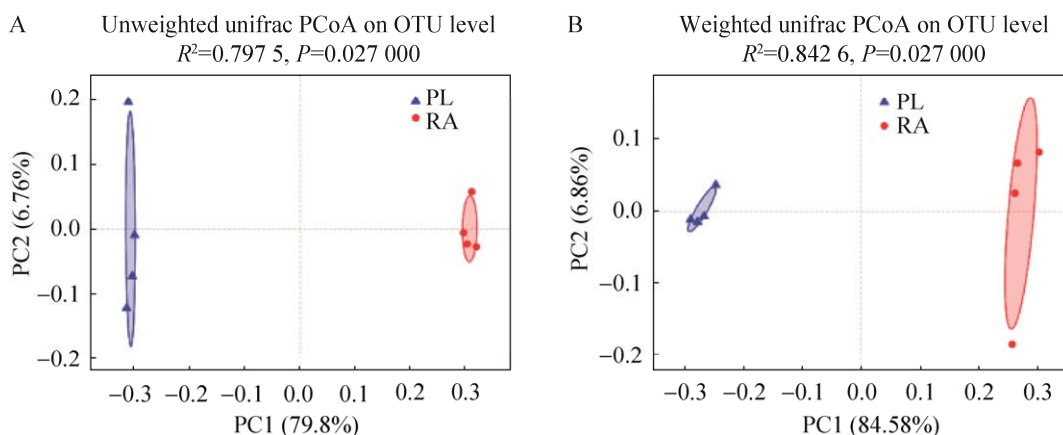


图 4 基于 OTU 水平的 PCoA 分析

Fig. 4 PCoA analysis of gut bacterial community based on OTU level. (A) Analysed by unweighted unifracs calculate mode. (B) Analysed by weighted unifracs calculate mode.  $R^2$  and  $P$  were the correlation coefficient and significance of Adonis of two snail gut microflora.



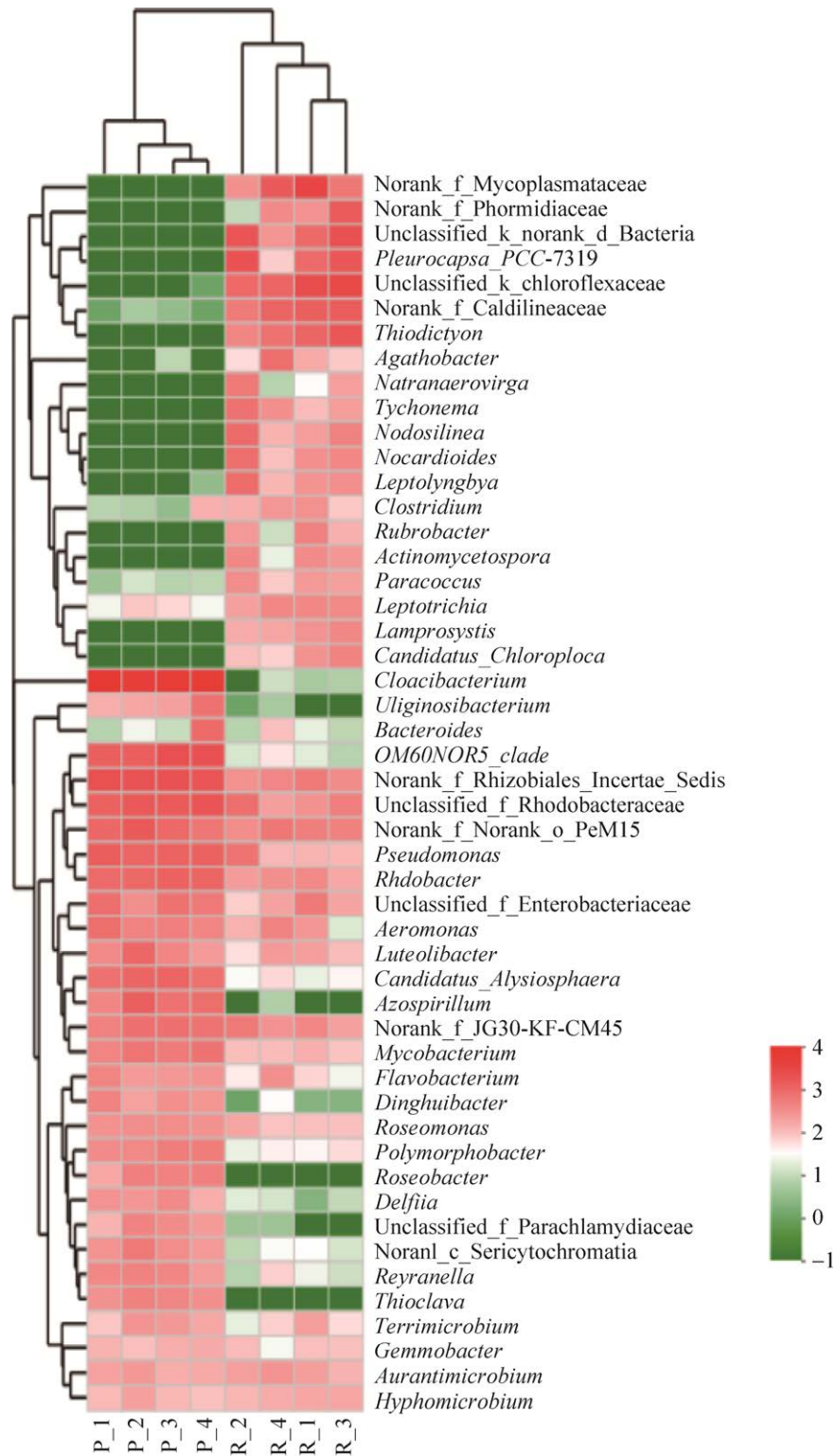


图 5 样品中肠道菌群热图分析

Fig. 5 Heatmap analysis of intestinal flora. Norank or unclassified represent the bacteria can not identified in genus level; f\_ represents family; o\_ represents order; R\_1–R\_4 stand for the intestinal microflora of *Radix auricularia* (RA); P\_1–P\_4 stand for the intestinal microflora of *Planorbella trivolvis* (PL).

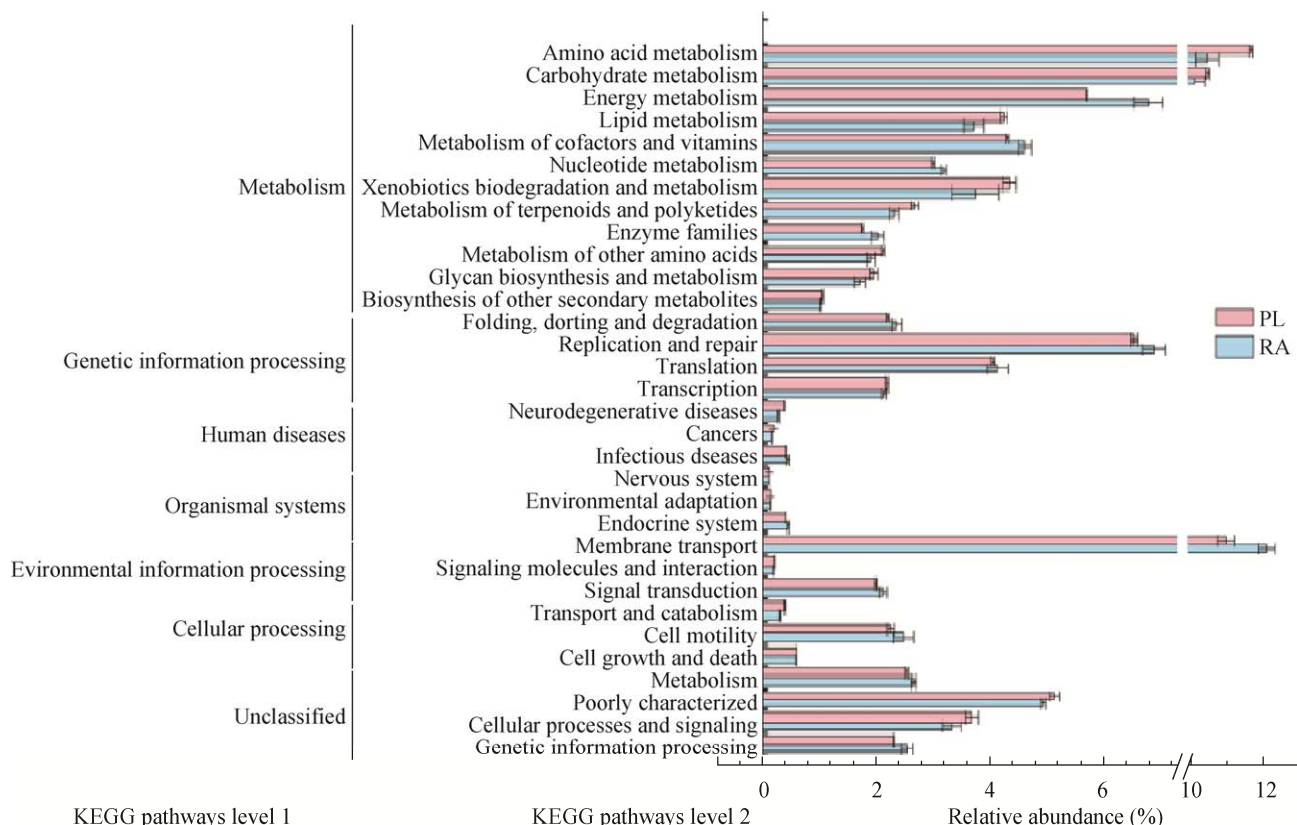


图 6 基于 PICRUSt 的肠道菌群基因功能预测

Fig. 6 Genomic functional prediction of snail gut bacterial community by PICRUSt.

### 3 讨论

通常认为无脊椎动物肠道与微生物群落联系有限<sup>[15]</sup>,但相关研究表明无脊椎动物也具有复杂的肠道微生物群落,曾有研究提出无脊椎动物可能与更复杂的微生物群落共同进化<sup>[16]</sup>。本文基于 16S rRNA 基因高通量测序分析显示,两种淡水螺具有很高的肠道菌群多样性,OTU 数达到了 967 个,Shannon 指数在两种螺都大于 3.4,Chao 指数都大于 350。本研究中螺肠道菌群多样性要高于 Horn 等<sup>[10]</sup>对 3 种不同地区淡水螺肠道菌群的研究。从菌群多样性指数来看,耳萝卜螺显著高于三旋卷丽螺,这可能与耳萝卜螺采自野生群体有关,野外水体具有更多多样性的食物和更复杂的环境,而三旋卷丽螺为室内养殖,饵料与环境较为单一,由于这种环境和饵料的差异,会对多样性结果造

成影响<sup>[11]</sup>。

由结果可见,尽管在门水平上,变形菌门是优势菌门,但是在较低的分类水平上,优势菌群之间丰度差距不大,例如在耳萝卜螺中,最大的菌属绿屈挠菌科未知属 (Unclassified\_F\_Chloroflexaceae) 丰度仅为 6.92%,丰度大于 4% 的菌属有 4 个,而丰度大于 1% 的菌属达到了 17 个,三旋卷丽螺也存在相同的趋势。因此,对菌群的关注不应局限于丰度较大的菌属。

本研究显示,变形菌门是两种螺共同的优势菌门,在三旋卷丽螺中占比达 54.88%,在耳萝卜螺占比 33.63%。在其他腹足类肠道菌群中,变形菌门也占优势地位,如在黑蛞蝓肠道菌群中丰度达到了 88.15%,在非洲大蜗牛 *A. fulica*、淡水螺 *Potamopyrgus antipodarum*、淡水扁卷螺 *Biomphalaria pfeifferi* 也是优势菌群<sup>[17-18]</sup>。变形菌

门还在其他食物组成富含木质纤维素的草食性昆虫肠道菌群中占优势地位<sup>[19-20]</sup>。对 *Biomphalaria pfeifferi* (非洲)、*Bulinus africanus* (非洲) 和 *Helisoma duryi* (北美) 等 3 种扁卷螺肠道菌群进行的 16S rRNA 扩增子测序研究显示, 细菌多样性分布在 18 个门中, 其中来自变形菌门  $\gamma$  亚群、拟杆菌门和酸杆菌门的序列数最多。

*Cloacibacterium* 是 PL 的特有物种, 在 PL 样本中呈优势存在, 而不分布在 RA 中。*Cloacibacterium* 属于黄杆菌科 (Flavobacteriaceae), 是一种具有黄色色素的兼性厌氧、革兰氏阳性杆菌, 可从淡水底泥中分离得到<sup>[21]</sup>, 富含各种脂肪酸, 该菌还在人类帕金森病患者血液及腺瘤患者肠道内富集<sup>[22-23]</sup>, 对人类可能有致病作用。此外, 红杆菌科、假单胞菌属、红杆菌属、固氮螺菌属等也在 PL 组中显著存在。在新西兰的一种淡水螺 *Potamopyrgus antipodarum* 肠道菌群内也发现了红杆菌科假单胞菌属的存在<sup>[18]</sup>。红杆菌属属于变形菌门, 广泛分布在海水和淡水中, 是一种可进行光合作用的具有新能源利用价值的菌种, 红杆菌属在螺肠道内的出现说明了其通过水环境向动物肠道迁徙的路线。Vesbach 等<sup>[18]</sup>认为红杆菌已经定植于淡水螺 *Potamopyrgus antipodarum* 肠道内与宿主形成共生体, 另外在海绵 *Halichondria panicea* 和水蚤 *Daphnia* 体内也发现了红杆菌的共生现象<sup>[24-25]</sup>。

在耳萝卜螺肠道中显著富集的物种有绿弯菌科未知属、支原体科未知属、暖绳菌科未知属、厚皮藻属、网硫菌属、席藻科未知属等。绿弯菌科未知属和暖绳菌科未知属都属绿弯菌门, 是一种能够进行光合作用的革兰氏染色阴性的自养菌<sup>[26-27]</sup>, 这种菌在耳萝卜螺的出现说明其作为水体环境菌群进入螺肠道。支原体是动物和环境广泛存在的一类原生动物, 有些种类可引起动物疾病, 因此耳萝卜螺肠道菌群内支原体的作用需要进一步关注和研究。厚皮藻属是一种淡水藻

类, 网硫菌属是一种能进行光合作用的革兰氏阴性菌, 属丙型变形菌门, 都作为水体微生物进入螺肠道, 属于螺肠道暂居菌群。席藻科属于蓝藻门, 是一类淡水中常见的自养藻类。可见, 在耳萝卜螺中显著富集的菌群很大一部分是来自其水生环境。

研究显示有 289 个 OTU、204 个菌属及 15 个门为两种螺肠道菌群所共有, 进一步的核心菌群分析显示有 93 个菌属为两种淡水螺共有的核心菌群, 其中有 27 个菌属丰度大于 0.5%, 这些菌群一定程度上反映了作为草食性淡水螺肠道菌群的共同特征, 分类学显示以变形菌门为主, 其他还有拟杆菌门及放线菌门<sup>[11,13]</sup>。较为代表性的有气单胞菌属、假单胞菌属、*Luteolibacter*、黄杆菌属、拟杆菌属、细杆菌属及 *Aurantimicrobium*。在非洲大蜗牛及黑蛞蝓肠道中也发现了丰度较大的气单胞菌属、假单胞菌属、黄杆菌属及肠杆菌属<sup>[13,28]</sup>。

本研究通过菌群基因组的功能预测分析发现, 两种螺肠道菌群功能丰度的组成基本相似, 丰度较大的均以氨基酸代谢、碳水化合物分解代谢、膜转运及能量代谢为主。这与以往对于非洲大蜗牛及欧洲黑蛞蝓肠道微生物功能组成的研究结果保持了一致, 提示肺螺类软体动物在肠道菌群功能组成方面存在着相似性<sup>[12-13]</sup>。而基于欧洲黑蛞蝓及非洲大蜗牛的肠道微生物宏基因组分析发现, 螺类之间的肠道菌群功能组成的差异要小于其与奶牛、大蜗牛、白蚁及长角亚洲甲虫等物种肠道菌群功能组成的差异<sup>[13]</sup>。此外, 两种螺肠道菌群在外源物质降解与代谢及萜类和聚酮化合物的代谢两种代谢通路的丰度也较大, 提示两种螺肠道菌群在分解外源性有毒有害化合物等方面有一定的作用, 这使其具有较高的生理适应性<sup>[12]</sup>。由于三旋卷丽螺的外来物种属性, 这种适应性提高了其适应新环境的能力<sup>[14]</sup>。

综上所述, 两种螺肠道菌群存在高度的多样

性,二者之间既有物种分布和丰度的差异,又有多种共有核心菌群。本文对淡水螺肠道菌群的研究有助于发掘微生物资源库,深化对淡水软体动物肠道菌群的认识,对研究肠道菌群在淡水软体动物生理学、免疫学及生态学中的作用具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Dewitt TJ, Sih A, Hucko JA. Trait compensation and cospecialization in a freshwater snail: size, shape and antipredator behaviour. *Anim Behav*, 1999, 58(2): 397–407.
- [2] Eckblad J. Biomass and energy transfer by a specialized predator of aquatic snails. *Freshwater Biol*, 2010, 6(1): 19–21.
- [3] Soldánová M, Selbach C, Sures B, et al. Larval trematode communities in *Radix auricularia* and *Lymnaea stagnalis* in a reservoir system of the Ruhr river. *Parasite Vector*, 2010, 3: 56.
- [4] Bargues MD, Vigo M, Horak P, et al. European *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect Genet Evol*, 2001, 1(2): 85–107.
- [5] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(4): 227–238.
- [6] Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*, 2011, 12(1): 5–9.
- [7] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189–200.
- [8] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005, 307(5717): 1915–1920.
- [9] Fan PX, Bian BL, Teng L, et al. Host genetic effects upon the early gut microbiota in a bovine model with graduated spectrum of genetic variation. *ISME J*, 2020, 14(1): 302–317.
- [10] Van Horn DJ, Garcia JR, Loker ES, et al. Complex intestinal bacterial communities in three species of Planorbis snails. *J Mollus Stud*, 2012, 78(1): 74–80.
- [11] Nicolai A, Rouland-lefèvre C, Ansart A, et al. Inter-population differences and seasonal dynamic of the bacterial gut community in the endangered land snail *Helix pomatia* (gastropoda: heliidae). *Malacologia*, 2015, 59(1): 177–190.
- [12] Cardoso AM, Cavalcante JJV, Cantão ME, et al. Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an invasive snail reveals a rich reservoir of novel genes. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e48505.
- [13] Joynson R, Pritchard L, Osemwexha E, et al. Metagenomic analysis of the gut microbiome of the common black slug *Arion ater* in search of novel lignocellulose degrading enzymes. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2181.
- [14] Li XH, Gao ST, Gu WB, et al. Species identification of freshwater snail *Planorbella trivolvis* and analysis of its potential distribution. *Chin J Schistosom Control*, 2015, 27(3): 268–272 (in Chinese). 李晓恒, 高世同, 顾文彪, 等. 淡水螺类三旋丽卷螺的物种鉴定及其潜在适生区分析. *中国血吸虫病防治杂志*, 2015, 27(3): 268–272.
- [15] Mcfall-Ngai M. Adaptive immunity: care for the community. *Nature*, 2007, 445(7124): 153.
- [16] Loker ES, Adema CM, Zhang SM, et al. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev*, 2004, 198(1): 10–24.
- [17] Cardoso AM, Cavalcante JJV, Vieira RP, et al. Gut bacterial communities in the giant land snail *Achatina fulica* and their modification by sugarcane-based diet. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33440.
- [18] Takacs-Vesbach C, King K, Van Horn D, et al. Distinct bacterial microbiomes in sexual and asexual *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand freshwater snail. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0161050.

- [19] Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*, 2004, 49: 71–92.
- [20] Russell JA, Moreau CS, Goldman-Huertas B, et al. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(50): 21236–21241.
- [21] Allen TD, Lawson PA, Collins MD, et al. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal waste water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(6): 1311–1316.
- [22] Qian YW, Yang XD, Xu SQ, et al. Detection of microbial 16S rRNA gene in the blood of patients with Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 156.
- [23] Sanapareddy N, Legge RM, Jovov B, et al. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J*, 2012, 6(10): 1858–1868.
- [24] Althoff K, Schütt C, Steffen R, et al. Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar Biol*, 1998, 130(3): 529–536.
- [25] Qi WH, Nong G, Preston JF, et al. Comparative metagenomics of *Daphnia* symbionts. *BMC Genomics*, 2009, 10: 172.
- [26] Overmann J. The family *Chlorobiaceae*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al, Eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006: 359–378.
- [27] Martins MD, Rigonato J, Taboga S R, et al. Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of Phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66(6): 2396–2405.
- [28] Pinheiro GL, Correa RF, Cunha RS, et al. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 860.

(本文责编 郝丽芳)