

野生及人工饲养牟氏螺蛳肠道微生物多样性的比较研究

郑健^{1,2}, 杨锁柱¹, 周艳萍¹, 向泓铨¹, 赵津^{1,2*}

(1. 玉溪农业职业技术学院, 云南玉溪 653100; 2. 玉溪华大高原农业基因测序中心, 云南玉溪 653100)

摘要 通过3代测序技术调查并比较野生和人工饲养的牟氏螺蛳肠道菌群组成和多样性差异,并分析了造成这些差异的原因。结果表明, Proteobacteria、Firmicutes 和 Bacteroidetes 是野生和人工饲养牟氏螺蛳肠道微生物的主要门水平组成。人工饲养和野生牟氏螺蛳的肠道微生物存在显著差异,这一差异是由于在人工饲养驯化过程中低丰度物种的丢失造成的。该研究首次揭示了牟氏螺蛳肠道微生物多样性及其在人工饲养过程中肠道微生物群落构建机制的差异,为牟氏螺蛳的研究和保护提供了一定的理论基础。

关键词 牟氏螺蛳; 肠道菌群; 多样性; 实时单分子测序

中图分类号 S917 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)03-0072-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.03.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Comparison Study of Intestinal Microbial Diversity between Wild and Cultured *Margarya monodi*

ZHENG Jian^{1,2}, YANG Suo-zhu¹, ZHOU Yan-ping¹ et al (1. Yuxi Agriculture Vocation-Technical College, Yuxi, Yunnan 653100; 2. Yuxi-BGI Joint Sequencing Center for Plateau Agriculture, Yuxi, Yunnan 653100)

Abstract Based on the the third generation sequencing technology, the composition and diversity differences of intestinal flora between wild and cultured *Margarya monodi* were investigated. And the reasons for these differences were analyzed. The results showed that main phylum composition of intestinal flora in wild and cultured *M. monodi* were Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. There were significant differences of intestinal flora between wild and cultured *M. monodi*, which were caused by the loss of low-abundance species in the process of artificial breeding and domestication. The differences of intestinal microbial diversity and the construction mechanism of intestinal microbial community in the process of artificial breeding were firstly revealed in this research, which provided some theoretical basis for the study and protection of *M. monodi*.

Key words *Margarya monodi*; Intestinal flora; Diversity; Real-time single molecule sequencing

螺蛳是一种软体动物,隶属田螺科(Viviparidae)螺蛳属(*Margarya*),仅分布在我国云南省的高原湖泊中,为我国特有物种^[1-2]。螺蛳不仅是高原湖泊物种多样性的重要组成部分,而且被列为《国家重点保护动物名录》二级保护动物。除了在物种多样性方面具有重要的生态地位外,螺蛳在重金属污染、水体有机污染等方面也有着独特的生态指示功能^[3-4]。滇池是云南省最大的高原淡水湖泊。王丑明等^[5]2011年调查结果表明,滇池中的螺蛳属包括螺蛳(*Margarya melanioides*)、牟氏螺蛳(*M. monodi*)、光肋螺蛳(*M. mansugi*)、长螺蛳(*M. elongata*)、乳顶螺蛳(*M. tropidophora*)等。其中,牟氏螺蛳(*Margarya monodi*)是螺蛳属中的一个特殊物种,仅分布在滇池。20世纪80年代以来水体污染、过度捕捞越来越严重,包含牟氏螺蛳在内的螺蛳种群数量急剧减少,2009年螺蛳被世界自然保护联盟列为极危物种。牟氏螺蛳的种群变化不仅是螺蛳属物种多样性变化的指征,而且是滇池水环境的重要指征。然而,目前对牟氏螺蛳在内的螺蛳属生物的相关研究还相对较少,特别是对螺蛳生存的微生物环境等方面缺乏了解。

近年来,随着测序技术的进步,学者对人和其他动物肠道微生物的研究证实了肠道微生物对宿主健康、行为有着巨大的影响^[6-7]。对于水生生物及软体动物,肠道微生物同样与它们的生存环境及健康密切相关^[8-10]。肠道菌群作为螺

蛳体内微生物生态的一部分,其群落构建的机制及其对螺蛳的影响尚不清楚。笔者通过使用3代全长扩增子测序技术对牟氏螺蛳肠道菌群的16S rRNA基因进行高通量测序,比较野生和人工饲养牟氏螺蛳肠道微生物组成和多样性的差异,旨在揭示螺蛳肠道菌群的形成机制,为螺蛳的保护、驯养提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品搜集 2021年6月,从云南省昆明市的滇池水域采集并鉴定了8个活体牟氏螺蛳。选取其中4个进行解剖,将其肠道内容物洗脱至5 mL无菌水中,-80℃下冷冻保存,作为野生组(W组)用于后续测序分析;其余4个牟氏螺蛳放置在水箱中,使用25℃滇池水,以蒸煮后的海菜花和南瓜以及市售硅藻粉和螺旋藻粉为食物,在通气条件下喂养2个月,然后进行解剖,作为饲养组(C),取样方法与W组相同。具体样品信息见表1。

表1 采样信息

Table 1 The sample information

组别 Group	编号 No.	滇池水域 Water area
野生组(W) Wild group	W1	昆明市晋宁区
	W2	昆明市呈贡区
	W3	昆明市晋宁区
	W4	昆明市晋宁区
饲养组(C) Culture group	C1	昆明市呈贡区
	C2	昆明市呈贡区
	C3	昆明市晋宁区
	C4	昆明市晋宁区

基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目(2021J1049)。

作者简介 郑健(1987—),男,云南通海人,助教,硕士,从事微生物资源开发与利用、环境微生物研究。*通信作者,讲师,硕士,从事动物病疫方面的研究。

收稿日期 2022-03-10

1.2 DNA 提取及 3 代全长扩增子测序 含有肠道内容物的液体混匀后,吸取 250 μL ,使用 ZymoBIOMICS DNA Mini-prep Kit 进行总 DNA 提取。提取后的 DNA 使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,随后使用 Tecan F200 进行核酸浓度检测 (PicoGreen 染料法)。质量检测合格的 DNA 使用引物对 8F (5'-AGAGTTTGATCATGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CGGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行全长 16S rRNA 基因扩增。PCR 程序如下:预变性 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,1 个循环;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,28 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,1 个循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶进行目的片段电泳检测。检测合格的样品取目的条带使用 Zymoclean Gel Recovery Kit (D4008) 进行回收,并使用 Tecan F200 定量;将所有样品的待测产物等摩尔量混合后,使用 Nanopore Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) 以及 Nanopore Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002) 构建测序文库。最后,使用 Nanopore GridION Mk1 测序仪及 MinION Flow Cell R9.4.1 芯片,送至成都罗宁生物科技有限公司完成 3 代测序工作,单个样本测序量保证 3 万条以上。

1.3 数据分析 原始 Fast5 序列使用 Guppy 软件进行碱基解析 (base calling),获得 Fastq 格式的序列文件。Fastq 文件使用 qcat 进行样品拆分。对拆分后的数据进行质量控制,保留序列平均质量 >Q10、长度 1 300~1 600 bp 的序列。使用 Kraken2 软件结合 SILVA 数据库 v138 对质量控制后的序列进行物种注释,并合并每个物种的序列数目,构建物种丰度

表 (OTU 表)。随机选取每个物种内的一条序列作为代表性序列,使用 MUSCLE 进行多重比对,随后使用 FastTree 构建 Maximum-likelihood 系统发育树。

使用 R 语言 V4.1.0 进行数据统计分析。使用 vegan 包函数 diversity 计算样品的 α 多样性指数 Chao1 和 Simpson。 α 多样性的组间 Kruskal-Wallis 秩和检验使用 kruskal.test 函数。使用 GUniFrac 包分别计算 Weighted (丰度加权) UniFrac 和 Unweighted (非丰度加权) UniFrac β 多样性矩阵。NMDS (非度量多维尺度) 分析使用 vegan 包中的 metaMDS 函数。 β 多样性矩阵的组间 ANOSIM 分析使用 vegan 包中的 anosim 函数进行。random forest 差异物种分析使用 random forest 包。

2 结果与分析

2.1 野生和饲养牟氏螺螂的肠道菌群群落组成 从群落组成角度,该研究重点关注了门水平和种水平的群落组成及组间差异。从门水平来看,野生组和饲养组的主要物种组成差异不大 (图 1)。相对丰度在 1% 以上的门为 Proteobacteria、Firmicutes 和 Bacteroidetes。从种水平来看,主要使用韦恩图分析了组间独有和共有物种的组成情况。2 组间共有物种 670 个,这些物种占总体物种丰度的 96.97%。W 组独有物种为 262 个、C 组独有物种为 159 个,分别占总体物种丰度的 1.93% 和 1.10%。由此可见,野生和饲养牟氏螺螂的微生物组成总体区别不大,虽然 2 组存在多种稀有物种,但占比极低。由此可见,野生牟氏螺螂在人工饲养驯化过程中,核心肠道菌群保持了相对的鲁棒性。

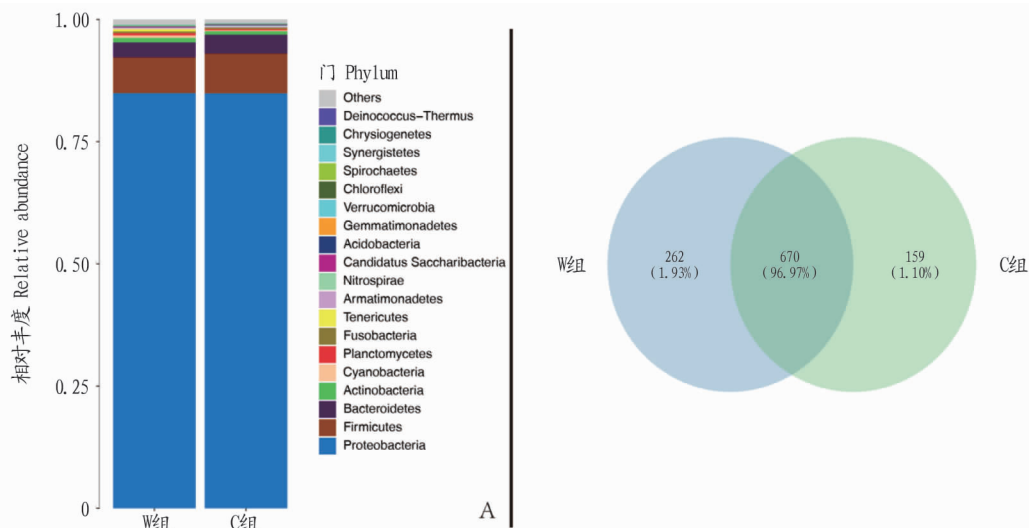


图 1 野生 (W 组) 和人工饲养 (C 组) 牟氏螺螂门水平 (A) 和种水平 (B) 组成分析

Fig. 1 The composition analysis of *M. monodi* at phylum level (A) and species level (B) in wild group (W) and culture group (C)

2.2 野生和饲养牟氏螺螂的肠道菌群多样性差异 群落多样性分别从 α 多样性和 β 多样性 2 个角度进行了分析。 α 多样性表征的是样品的多样性指标,图 2 分别展示了 Chao1 指数和 Simpson 指数的多样性结果。总体来看,2 个 α 多样性指数都表现出 W 组比 C 组有着更高的多样性。其中 Chao1 指数 W 组和 C 组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。Simpson 指数虽然 2 组间存在一定差异,但 2 组间差异不显著。究其原因,Chao1 指数对稀有物种较 Simpson 指数有更多的加权。

由此可见,从 α 多样性角度来看,W 组和 C 组间的差异更多地体现在稀有物种的丢失导致的群落丰富度和均匀度的降低。

组间的多样性差异使用 β 多样性来表征,这里采用基于 UniFrac 距离矩阵的 β 多样性 NMDS 排序分析 (图 3)。基于加权的 UniFrac 距离的 NMDS 分析 (图 3A) 中,W 组和 C 组并没有出现明显的分隔;基于非加权的 UniFrac 距离的 NMDS 分析 (图 3B) 中,W 组和 C 组存在明显的各自成簇趋

势。基于 2 种 UniFrac 距离矩阵的 ANOSIM 的定量差异统计分析也证实了这一结果:加权的 UniFrac 组间 ANOSIM 分析结果中 $r=0.2813$ 、 $P=0.135$,表示不存在显著差异;非加权

的 UniFrac 组间 ANOSIM 分析结果中 $r=0.7083$ 、 $P=0.031$ 、 $P<0.05$ 表示存在显著差异。这表明群落构建的组间差异主要是由于物种组成的变化而不是物种丰度的变化造成的。

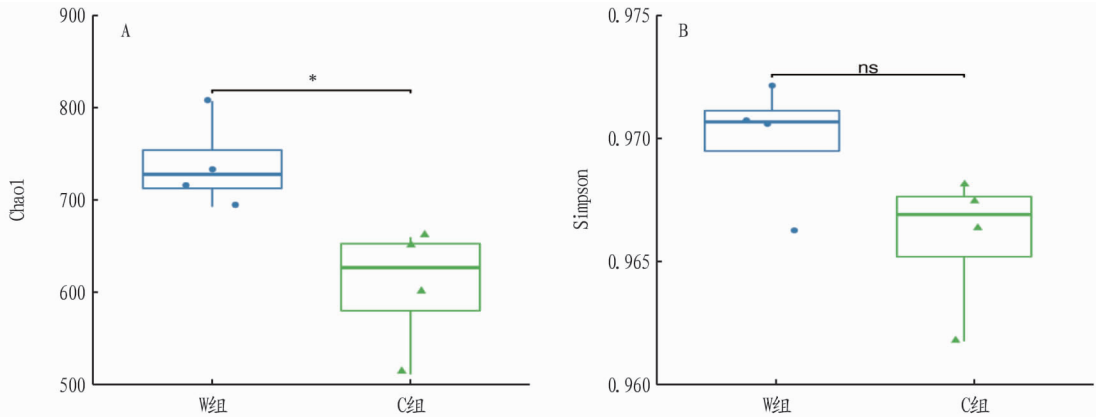
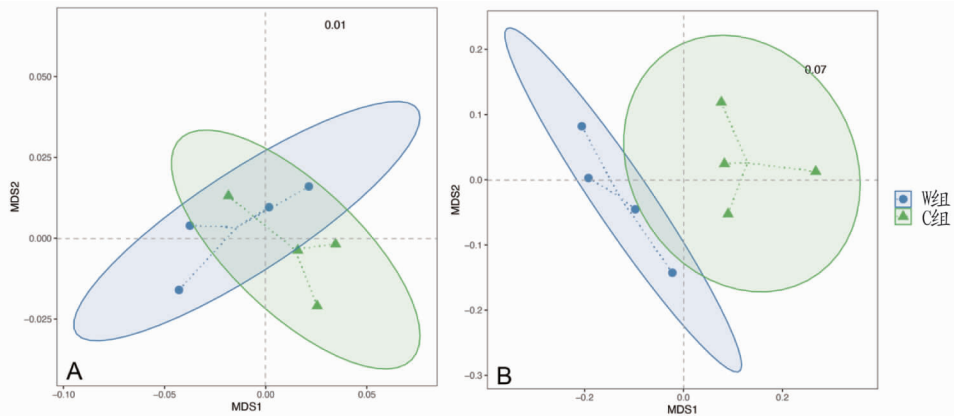


图 2 野生(W组)和人工饲养(C组)牟氏螺蛳肠道菌群 α 多样性比较

Fig. 2 Alpha diversity comparison of intestinal flora in *M. monodi* between wild group (W) and culture group (C)



注:A. Weighted UniFrac; B. Unweighted UniFrac。

图 3 基于 UniFrac 距离的 NMDS 排序图

Fig. 3 NMDS ranking based on UniFrac distance

上述基于多样性的分析结果表明,野生和饲养牟氏螺蛳的肠道微生物存在差异。这一差异是由于稀有菌群在驯化饲养过程中的丢失造成的。由于饲养过程中主要是食物产生了变化,因此推测造成这一结果的原因有 2 个:一是由于在饲养过程中食物是经过高温灭菌的,所以食物所携带的微生物变少,饲养螺蛳失去了来自食物的微生物在其肠道中的持续定殖,因此肠道微生物呈现多样性降低的过程。二是食物种类的变化对宿主肠道微生物有较大的影响。食物的类型会显著影响宿主肠道微生物的多样性,例如 Bolnick 等^[11]研究发现三刺鱼和河鲈的肠道微生物多样性与食物的多样性呈负相关,而牟氏螺蛳的食物多样性降低带来了肠道菌群多样性的降低。

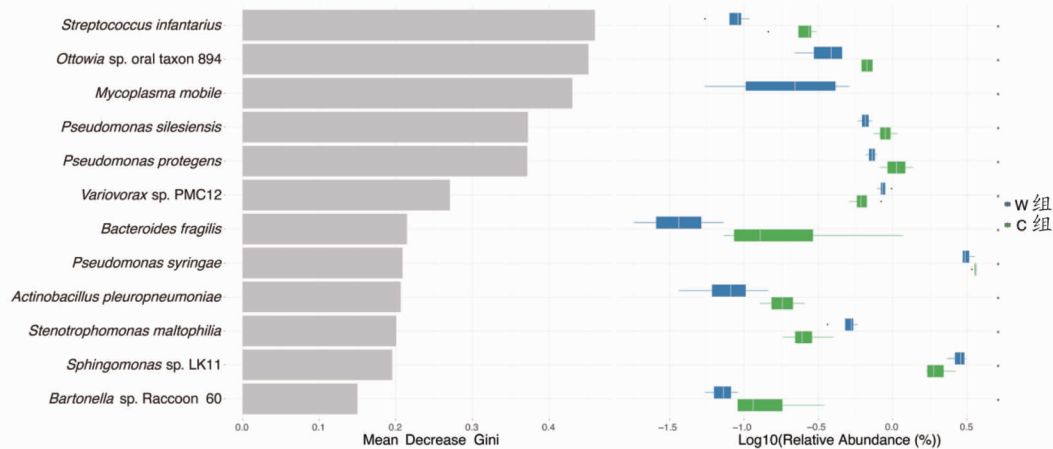
2.3 野生和饲养牟氏螺蛳的肠道菌群差异物种分析 从组成和多样性角度来看,W 组和 C 组间的差异主要是由于低丰度物种的丢失造成的。该研究使用基于随机森林的机器学习方法来鉴定存在组间差异的物种(图 4),平均基尼指数下降度(Mean Decrease Gini)越大,说明该物种对组间差异的贡献度越大。该研究共筛选出 12 个存在组间差异的物种($P<$

0.05),其中 10 个为相对丰度均低于 1% 的低丰度物种,其余 2 个物种的相对丰度也低于 5%。这一结果进一步验证了多样性研究的结论。12 个物种中 8 个物种在培养过程中被富集(C 组相对丰度大于 W 组),分别为 *Streptococcus infantarius*、*Ottowia* sp. oral taxon 894、*Pseudomonas silesiensis*、*Pseudomonas protegens*、*Bacteroides fragilis*、*Pseudomonas syringae*、*Actinobacillus pleuropneumoniae* 以及 *Bartonella* sp. Raccoon 60。4 个在培养过程中被选择性过滤的物种分别为 *Mycoplasma mobile*、*Variovorax* sp. PMC12、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Sphingomonas* sp. LK11。无论是富集还是被过滤掉的差异微生物,绝大多数都属于变形菌门。这些微生物也是环境中常见的物种,通常分布在人、动植物的生存环境中,很多是宿主的病原菌^[12-14]。

组间差异物种中,*M. mobile* 相对于其他差异物种而言比较特殊。虽然该菌在野生组中的平均相对丰度很低(0.27%),但在人工饲养过程中直接消失。该菌是 1987 年首次被报道从鱼肠道中分离得到的一种病原菌^[15]。North 等^[16]通过高通量测序的方法发现了一种未分类的 *Mycoplas-*

ma sp., 该物种以极低的丰度存在于 *Biomphalaria glabrata*、*Cipangopaludina japonica* 等田螺科物种的肠道中。*Mycoplasma* sp. 是一类寄生在细胞间的微生物, 其与软体动物的结合能力被认为与动物唾液酸的残留有关^[17-18]。由于该研究采用 3 代测序技术测定了全长 16S rRNA 基因, 因此在前人研究的基础上进一步确定了在牟氏螺蛳中这一微生物为 *M.*

mobile。由于 *M. mobile* 在野生和人工饲养牟氏螺蛳内的分布特点, 其可以作为区分牟氏螺蛳来源的指征菌。综上所述, 差异物种分析验证了多样性分析结果, 低丰度的稀有物种是造成组间差异的重要原因。同时, 笔者发现 *M. mobile* 在人工驯化饲养的过程中会完全消失, 可以作为区分野生和饲养牟氏螺蛳的指征微生物。



注: A. Weighted UniFrac; B. Unweighted UniFrac。

图 4 基于随机森林方法的组间差异物种分析

Fig. 4 Differential species analysis between different groups based on random forest method

3 结论

牟氏螺蛳作为滇池特有的螺蛳属物种和极危物种, 具有很高的研究价值。该研究首次通过使用 3 代全长 16S rRNA 基因高通量测序, 对野生和饲养牟氏螺蛳的肠道微生物进行了比较。该研究发现野生和饲养牟氏螺蛳肠道的核心菌群相似性很高, 主要由 Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes 等门组成。多样性和差异物种分析表明, 占总体物种丰度较小的稀有物种在人工饲养过程中的丢失是造成牟氏螺蛳肠道菌群组间差异的主要原因。此外, *M. mobile* 可以作为野生和饲养牟氏螺蛳的指征菌, 在饲养过程中该菌会消失。笔者首次报道了牟氏螺蛳在野生和人工饲养过程中肠道微生物的组成及多样性的变化, 为牟氏螺蛳的保护和繁育提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 黄晓燕, 王丽珍. 5 种螺蛳属动物和中国圆田螺 COI 基因序列分析 [J]. 水生态学杂志, 2008, 29(5): 106-108.
- [2] 杜丽娜, 杨君兴, VON RINTELEN T, 等. 中国特有腹足类——螺蛳属 (*Margarya*) 的系统发育学 [J]. 科学通报, 2013, 58(16): 1483-1491.
- [3] 袁维佳, 俞膺浩, 谷瑗, 等. 螺蛳对重金属元素的富集作用 [J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2000, 29(3): 73-79.
- [4] 孟顺龙, 吴伟, 胡庚东, 等. 底栖动物螺蛳对池塘底泥及水质的原位修复效果研究 [J]. 环境污染与防治, 2011, 33(6): 44-47.
- [5] 王丑明, 谢志才, 宋立荣, 等. 滇池大型无脊椎动物的群落演变与成因分析 [J]. 动物学研究, 2011, 32(2): 212-221.
- [6] ESTEVE E, RICART W, FERNÁNDEZ-REAL J M. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: Did gut microbiota co-evolve with insulin resistance? [J]. Current opinion in clinical nutrition & metabolic care, 2011, 14(5): 483-490.
- [7] BUTEL M J. Probiotics, gut microbiota and health [J]. Médecine et mala-

- dies infectieuses, 2014, 44(1): 1-8.
- [8] ROMERO J, RINGØ E, MERRIFIELD D L. The gut microbiota of fish [M]//MERRIFIELD D, RINGØ E. Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2014: 75-100.
- [9] GÓMEZ G D, BALCÁZAR J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish [J]. FEMS immunology & medical microbiology, 2008, 52(2): 145-154.
- [10] CHALIFOUR B, LI J C. A review of the molluscan microbiome: Ecology, methodology and future [J]. Malacologia, 2021, 63(2): 285-304.
- [11] BOLNICK D I, SNOWBERG L K, HIRSCH P E, et al. Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch) [J]. Ecology letters, 2014, 17(8): 979-987.
- [12] AN S Q, BERG G. *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. Trends in microbiology, 2018, 26(7): 637-638.
- [13] LEE S A, KIM H S, KIM Y, et al. Complete genome sequence of *Variovorax* sp. PMC12, a plant growth-promoting bacterium conferring multiple stress resistance in plants [J]. Korean journal of microbiology, 2018, 54(4): 471-473.
- [14] ASAF S, KHAN A L, KHAN M A, et al. Complete genome sequencing and analysis of endophytic *Sphingomonas* sp. LK11 and its potential in plant growth [J]. 3 Biotech, 2018, 8(9): 1-14.
- [15] KIRCHHOFF H, BEYENE P, FISCHER M, et al. *Mycoplasma mobile* sp. nov., a new species from fish [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 1987, 37(3): 192-197.
- [16] NORTH E, MINTON R L. Diversity and predicted function of gut microbes from two species of viviparid snails [J]. Freshwater mollusk biology and conservation, 2021, 24(2): 104-113.
- [17] NISHIKAWA M S, NAKANE D, TOYONAGA T, et al. Refined mechanism of *Mycoplasma mobile* gliding based on structure, ATPase activity, and sialic acid binding of machinery [J/OL]. mBio, 2019, 10(6) [2021-09-27]. <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/mBio.02846-19>.
- [18] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 1998, 62(4): 1094-1156.