

斑点福寿螺肠道菌群结构及功能研究

李淑贤^{1,2}, 林 英¹, 祁 雯³, 陈 燊³, 李雪霞²,
朱善良³, 卫 蔚³, 李 宏¹, 陈 炼²

(1.南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(2.南京林业大学生物与环境学院, 江苏 南京 210037)

(3.江苏第二师范学院生命科学与化学学院, 江苏 南京 210042)

[摘要] 肠道微生物被认为是动物机体的共生体,在营养物质代谢、免疫调控等方面发挥重要作用. 入侵生物斑点福寿螺(*Pomacea maculata*)严重威胁农业生产和生态系统功能. 本研究利用高通量测序技术对 11 只雌、雄斑点福寿螺的肠道微生物多样性、结构和功能进行研究. 结果表明,在门水平上,斑点福寿螺肠道内容物主要优势菌为变形菌门(Proteobacteria)(43.52%)和软壁菌门(Tenericutes)(13.82%);在属水平上,主要优势菌为气单胞菌属(*Aeromonas*)(15.66%)和支原体属(*Mycoplasma*)(7.26%). 雌、雄斑点福寿螺肠道微生物多样性和群落结构没有显著性差异($P>0.05$). 在斑点福寿螺肠道内容物中检测到一些有益菌以及潜在致病菌. 基于 PICRUSt 分析预测斑点福寿螺肠道菌群功能,共得到 24 种代谢功能,其中氨基酸运输和代谢、通用功能预测、信号转导、细胞壁/膜、能量产生和转换丰度较大.

[关键词] 肠道微生物,高通量测序,斑点福寿螺

[中图分类号] Q958 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2022)01-0064-10

Research on the Bacterial Community Structure and Functions in the Intestine of *Pomacea maculata*

Li Shuxian^{1,2}, Lin Ying¹, Qi Wen³, Chen Yu³, Li Xuexia², Zhu Shanliang³,
Wei Wei³, Li Hong¹, Chen Lian²

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2.College of Biology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

(3.School of Life Sciences and Chemistry, Jiangsu Second Normal University, Nanjing 210042, China)

Abstract: Intestine microbiome are considered as symbionts of animal bodies and play an important role in nutrient metabolism and immune regulation. *Pomacea maculata* is an invasive species that has caused serious damage to aquatic crop production and ecosystem functioning. In this study, high-throughput sequencing was used to analyze the intestinal microbial diversity, community structure and function of 11 female and male *P. maculata*. At the phylum level, Proteobacteria (43.52%) and Tenericutes (13.82%) were the dominant bacteria in the intestinal content microbiome of *P. maculata*. At the genus level, the dominant bacteria were *Aeromonas* (15.66%) and *Mycoplasma* (7.26%). No significant difference in intestinal microbial diversity and microbial community structure was found between male and female group ($P>0.05$). Some beneficial bacteria and potential pathogenic bacteria were found in the intestinal content microbiome of *P. maculata*. PICRUSt analysis was used to predict the intestinal microbiome functions of *P. maculata*, and 24 metabolic functions were predicted. The amino acid transport and metabolism, general function prediction only, transcription, cell wall/membrane/envelope biogenesis, energy production and conversion accounted for a large proportion.

Key words: intestinal microbiota, high-throughput sequencing, *Pomacea maculata*

福寿螺属(*Pomacea*)隶属于腹足纲(*Gastropoda*)新进腹足目(*Caenogastropoda*)瓶螺科(*Ampullariidae*),是一类原产于南美洲亚马逊河流域的大型淡水螺。福寿螺属的多个物种通过水产贸易和观赏水族贸易途径入侵至东亚和东南亚 10 多个国家^[1-2]。小管福寿螺(*Pomacea canaliculata*)和斑点福寿螺(*P. maculata*)是福寿螺属中常见且入侵性很强的两种物种^[3]。斑点福寿螺繁殖能力较强,具有较高的耐寒性与耐盐性,对环境适应能力强,可迅速扩散传播,并且与本地螺争夺生存空间、食物,威胁本地螺的生存,对水生生态平衡造成严重破坏^[4-6]。此外,斑点福寿螺主要以大型植物为食,可取食水稻等多种重要水生经济作物,给农业生产造成巨大经济损失^[5]。斑点福寿螺分布在热带及亚热带地区,在柬埔寨、新加坡、韩国、泰国等多个东南亚国家及美国 and 西班牙等其他国家均有分布^[7],在中国重庆、四川、浙江杭州等地报道有分布^[8-10]。

肠道菌群在长期进化过程中,与宿主形成了互惠互利的紧密关系,一方面宿主自身的生长生理状况影响肠道菌群的生长定植;另一方面肠道菌群也在宿主生理代谢和相关营养物质消化吸收方面发挥重要作用,具有调控宿主基因的表达、调节物质代谢、组织器官发育甚至免疫系统成熟等多种功能^[11-13]。此外,已有相关研究表明肠道菌群受性别因素影响。许刚等^[14]发现家蚕(*Bombyx mori*)肠道微生物的组成与丰度比率受性别因素影响。Ma 等^[15]发现雄性大鳍弹涂鱼(*Periophthalmus magnuspinnatus*)肠道微生物多样性显著高于雌性个体。

以往主要借助传统的微生物培养方法和基于 16S rRNA 基因的变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和末端限制性片段分析技术(T-RFLP)等对肠道菌群进行研究^[16-17]。程天印等^[16]利用 DGGE 技术研究小管福寿螺的肠道细菌群落,结果表明,雌、雄小管福寿螺胃、肠内容物菌群组成无显著性差异,共含 22 种细菌。相对于传统的微生物鉴别和分析方法,基于高通量测序技术对肠道微生物进行研究具有准确、高效、高通量解读微生物群落多样性与丰度的优势,能够挖掘新的、具有特定功能的肠道菌群^[18],已广泛应用于软体动物肠道微生物研究^[19-21]。

目前对于小管福寿螺肠道菌群的研究已经取得一定的进展^[16,19],但斑点福寿螺肠道菌群的研究相对缺乏。本研究基于高通量测序技术对雌、雄斑点福寿螺肠道内容物中的微生物群落组成进行研究,发掘一些有益菌、潜在致病菌以及与食性相关的肠道微生物,并基于 PICRUST 分析对其肠道菌群功能进行预测,进一步研究斑点福寿螺肠道微生物的功能,有助于从肠道微生物的角度了解斑点福寿螺对环境的适应性特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生斑点福寿螺于 2017 年 8 月采自重庆铜梁县太平镇水稻田边。选取体长 33 mm~39 mm 左右的斑点福寿螺 11 只,其中雄性个体 6 只、雌性个体 5 只。用无菌生理盐水洗净斑点福寿螺壳上的杂质,用 75% 乙醇擦拭斑点福寿螺体表面进行消毒,在无菌操作条件下解剖,取出弯曲肠道(Coiled gut)部位的肠道内容物放入无菌冻存管中^[22], -80 °C 超低温冰箱中保存。由于斑点福寿螺和小管福寿螺螺壳形态相似,容易混淆,对水稻田采集的所有福寿螺进行形态学分析和分子鉴定^[3,23],确定用于本研究的样本为斑点福寿螺。

1.2 DNA 抽提、扩增及测序

采用 E.Z.N.A.® soil 试剂盒提取斑点福寿螺肠道内容物总 DNA。使用通用引物 338F(5'-ACTCCTACGG-GAGGCAGCAG-3'), 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增 16S rRNA 基因 V3-4 区^[24-25]。利用 Illumina Miseq PE300 平台进行斑点福寿螺肠道微生物 16S rRNA 高通量测序,测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3 数据分析

原始测序序列分别使用 Fastp 软件(版本 0.19.6)和 FLASH 软件(版本 1.2.11)进行质控和拼接。使用 USEARCH(版本 7.0)将序列聚类为操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU),识别阈值为 97%。根据每个样本的最小有效数据对样本数据进行抽平处理。根据 OTU 数值使用 Mothur 软件(版本 1.30.1)生成稀疏曲线。利用 SILVA 的 SSU rRNA 数据库(版本 132)比对序列并进行物种注释,利用 RDP(Ribosomal Database Project)(版本 2.11)确定代表性序列并进行分类^[26]。

在 OTU 水平基于 Mothur 软件(版本 1.30.1)进行 α 多样性分析,其中 Chao 指数、Ace 指数和 Shannon 指数越大,Simpson 指数越小,说明样品中的菌群越丰富^[27]. 基于分类学信息在门、属水平上进行肠道菌群组成分析,基于 Bray-Curtis 距离算法选取属水平上相对丰度前 35 的菌属绘制群落热图. 选择非加权 UniFrac 距离和加权 UniFrac 距离算法对样本进行比较. 通过非度量多维尺度分析(Nonmetric multidimensional scaling,NMDS)进行可视化表达,并结合相似性分析(Analysis of similarities,Anosim)来判断雌、雄斑点福寿螺的肠道菌群结构是否存在差异. 利用 Wilcoxon 秩和检验(Wilcoxon rank-sum test)比较分析雌性与雄性斑点福寿螺的 Alpha 多样性指数和预测功能大小的差异显著性, $P<0.05$ 表明差异显著. 利用 PICRUSt((Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States))软件基于 EggNOG 数据库(<http://eggnog.embl.de/>)预测斑点福寿螺肠道微生物功能^[28].

2 结果与讨论

2.1 测序深度

11 个样品测序并经过初步过滤后,获得 424 259 条有效序列. 序列经聚类后得到 3 319 个 OTU,其中雌雄两组共有 OTU 个数为 2480,占雌性斑点福寿螺总 OTU 数量的 89.11%,占雄性斑点福寿螺总 OTU 数量的 82.23%,雌性组特有的 OTU 数目为 303 个,雄性组特有的 OTU 数目为 536 个. 所有样品 OTU 的覆盖率在 98.6% 以上,说明本次实验测序数据基本可以全面解读各样本中细菌的组成及丰度. 11 个样品的稀疏曲线趋于平缓(图 1),表明本次测序可以代表样本中真实的物种组成情况.

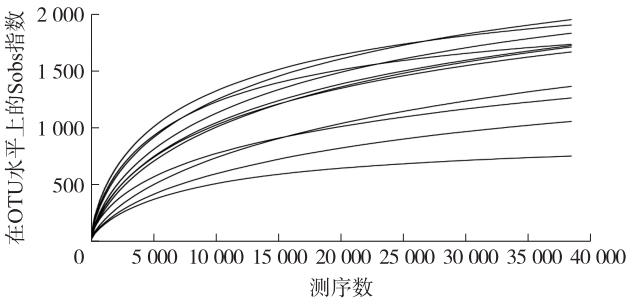


图 1 斑点福寿螺各样品稀疏曲线
Fig. 1 The rarefaction curves of each sample of *Pomacea maculata*

2.2 样品 α 多样性和群落结构分析

雌性斑点福寿螺的 Chao 指数、ACE 指数和 Shannon 指数均大于雄性斑点福寿螺,并且雌性斑点福寿螺的 Simpson 指数小于雄性斑点福寿螺,表明雌性斑点福寿螺肠道微生物多样性大于雄性,但是两者不存在显著性差异($P>0.05$)(表 1).

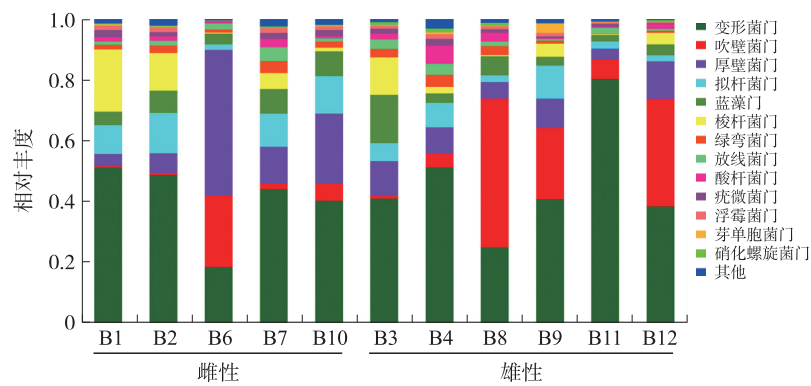
表 1 斑点福寿螺肠道细菌群落多样性指数
Table 1 Diversity indices of the *Pomacea maculata* gut bacterial community

	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
雌性	1994.80±344.00	1987.30±361.11	4.57±0.75	0.06±0.04
雄性	1870.60±560.30	1856.80±547.72	4.38±1.17	0.08±0.07
P 值	0.93	0.78	0.65	0.65

注:数据以(平均值±标准误)和范围表示. $P>0.05$ 表示无显著性差异.

根据物种注释结果,11 个样品在本次检测中所属细菌归类为 38 个门、92 个纲、255 个目、449 个科、902 个属. 基于门水平上的菌群结构分析结果显示斑点福寿螺的肠道菌群中优势菌为变形菌门(Proteobacteria)、软壁菌门(Tenericutes)和厚壁菌门(Firmicutes),相对所占比例分别为 43.52%、13.82%和 13.13%. 此外,斑点福寿螺肠道菌群中丰度大于 1% 的有拟杆菌门(Bacteroidetes, 7.19%)、蓝细菌门(Cyanobacteria, 5.97%)、梭杆菌门(Fusobacteria, 5.69%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 2.07%)、放线菌门(Actinobacteria, 1.95%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 1.85%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 1.30%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 1.05%)(图 2).

将核心菌群定义为斑点福寿螺所有肠道样本都共有的菌群,任何一个样品不含有的菌属都需要排



B1, B2, B6, B7, B10 代表雌性斑点福寿螺样本; B3, B4, B8, B9, B11, B12 代表雄性斑点福寿螺样本

图 2 斑点福寿螺肠道菌群中门的相对丰度 (平均相对丰度>1%)

Fig. 2 Relative abundance of gut microbiome taxa on phylum category in *Pomacea maculata* (mean relative abundance>1%)

除. 经过分析, 丰度大于 0.5% 的共有核心菌群有 33 个属 (表 2). 这些菌属主要分布在变形菌门 (Proteobacteria) 内, 也有一些分布在软壁菌门 (Tenericutes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria) 及梭杆菌门 (Fusobacteria).

表 2 相对丰度大于 0.5% (序列占测序总量比例) 的共有核心菌属

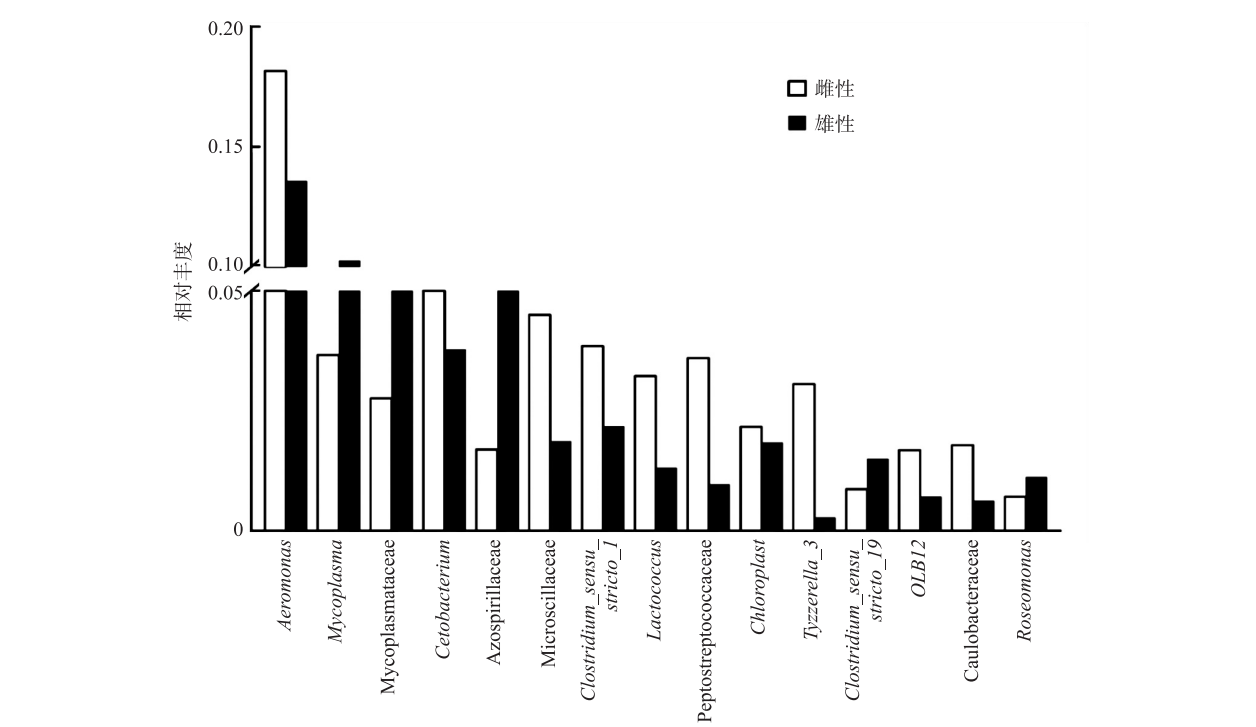
Table 2 The core bacterial genera shared by all samples with relative abundance above 0.5% (sequence percentage of total sequence amount)

Phylum	Family	Genus	Pmf-mean	Pmf-sd	Pmm-mean	Pmm-sd
Proteobacteria	Aeromonadaceae	Aeromonas	18.16	10.00	13.58	13.08
Tenericutes	Mycoplasmataceae	Mycoplasma	3.66	7.46	10.25	9.67
Tenericutes	Mycoplasmataceae	norank	2.76	2.90	9.72	12.58
Fusobacteria	Fusobacteriaceae	Cetobacterium	8.00	8.44	3.77	4.48
Proteobacteria	Azospirillaceae	norank	1.69	1.30	6.28	11.90
Bacteroidetes	Microscillaceae	norank	4.50	2.58	1.86	1.65
Firmicutes	Clostridiaceae	Clostridium_sensu_stricto_1	3.85	1.05	2.18	1.22
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	unclassified	3.60	4.77	0.96	0.44
Firmicutes	Streptococcaceae	Lactococcus	3.22	3.76	1.31	1.29
Cyanobacteria	norank	norank	2.16	1.03	1.83	1.38
Bacteroidetes	Microscillaceae	OLB12	1.68	1.00	0.71	0.97
Firmicutes	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto_19	0.86	1.58	1.49	2.72
Proteobacteria	Acetobacteraceae	Roseomonas	0.71	0.34	1.12	0.77
Proteobacteria	unclassified	unclassified	0.80	0.65	0.88	1.17
Proteobacteria	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio	1.07	0.65	0.50	0.57
Proteobacteria	Beijerinckiaceae	Methylocystis	0.20	0.10	1.33	1.55
Proteobacteria	Steroidobacteraceae	norank	0.40	0.32	0.95	0.86
Proteobacteria	norank	norank	0.53	0.48	0.82	1.02
Acidobacteria	norank	norank	0.55	0.41	0.73	0.95
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	Uliginosibacterium	0.36	0.21	0.91	1.17
Firmicutes	Bacillaceae	Bacillus	0.91	1.52	0.35	0.39
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	unclassified	0.47	0.30	0.73	0.72
Proteobacteria	Rhodocyclaceae	Denitratisoma	0.30	0.16	0.90	0.91
Cyanobacteria	Phormidiaceae	unclassified	0.63	0.36	0.50	0.46
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadaceae	norank	0.22	0.13	0.73	1.20
Planctomycetes	norank	norank	0.68	0.32	0.23	0.19
Acidobacteria	norank	norank	0.35	0.20	0.56	0.64
Proteobacteria	Burkholderiaceae	norank	0.22	0.12	0.64	0.74
Cyanobacteria	Microcystaceae	Microcystis_PCC-7914	0.21	0.08	0.64	1.08
Proteobacteria	Chromobacteriaceae	Crenobacter	0.30	0.23	0.54	0.71
Cyanobacteria	Nodosilineaceae	Nodosilinea_PCC-7104	0.21	0.13	0.60	1.14
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	0.25	0.33	0.50	0.56
Cyanobacteria	Nostocales_Incertae_Sedis	Microseira_Carmichael-Alabama	0.52	0.50	0.06	0.05

注: Pmf 和 Pmm 分别代表雌性斑点福寿螺和雄性斑点福寿螺.

本研究显示,变形菌门在斑点福寿螺肠道菌群中占有最高比例,在其他腹足类肠道菌群中也是优势菌.在黑蛭蛄(*Arion ater*)肠道菌群中变形菌门占比 88.15%,三旋卷丽螺(*Planorbella trivolvis*)中丰度达 54.88%,在耳萝卜螺(*Radix auricularia*)中丰度达 33.63%,在淡水螺(*Potamopyrgus antipodarum*)、淡水扁卷螺(*Biomphalaria pfeifferi*)也是优势菌群^[21,29-30].小管福寿螺肠道中分离出枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),这种菌是一种高活性的纤维素分解菌,也是厚壁菌门中常见菌属之一^[31].变形菌门和厚壁菌门的微生物可以通过产生多种消化酶分解各种纤维素和半纤维素^[32-33],以帮助斑点福寿螺从植物中消化吸收养分.研究指出,蓝细菌门细菌广泛分布于水生环境中,在斑点福寿螺肠道内容物中检测到蓝细菌门细菌,推测其作为水体环境菌群进入斑点福寿螺肠道.在耳萝卜螺的肠道微生物中也有报道蓝细菌门细菌^[34],是耳萝卜螺的主要能量来源^[35].在其他水生生物如白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和美洲真鲮(*Dorosoma cepedianum*)的肠道菌群中也发现了丰度较高的蓝细菌门细菌,推测其与宿主摄食植物的食性密切相关^[36].

在属水平上,气单胞菌属(*Aeromonas*)在斑点福寿螺肠道菌群中丰度最高,其在雌、雄斑点福寿螺肠道微生物所占比例分别为 18.16%和 13.58%;其次为支原体属(*Mycoplasma*),在雌、雄斑点福寿螺肠道微生物中分别占 3.66%和 10.25%;鲸杆菌属(*Cetobacterium*)在雌、雄斑点福寿螺肠道微生物中分别占 7.80%和 3.77%(图 3).



在属水平上未能准确鉴定的,用其所隶属的科描述
Aeromonas:气单胞菌属;*Mycoplasma*:支原体属;*Mycoplasmataceae*:支原体科;*Cetobacterium*:鲸杆菌属;*Azospirillaceae*:Microscillaceae;*Clostridium_sensu_stricto_1*;Lactococcus:乳球菌属;Peptostreptococcaceae:消化链球菌科;*Chloroplast*;Tyzzrella_3;*Clostridium_sensu_stricto_19*;OLB12;Caulobacteraceae:柄杆菌科;*Roseomonas* 玫瑰单胞菌属

图 3 斑点福寿螺肠道微生物属水平相对丰度前 15 的菌群

Fig. 3 Top fifteen genus-level relative abundance of intestinal microbiota in *Pomacea maculata*

气单胞菌属(*Aeromonas*)含有纤维素酶基因^[37],这可能与斑点福寿螺喜食水稻和多种水生植物的食性密切相关^[1].气单胞菌也是鱼类和爬行动物的重要病原体,偶尔也会导致其他动物和人类患病^[38].此外,在杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)和一种深海蜗牛(*Rubyspira osteovora*)肠道菌群中支原体属细菌(*Mycoplasma*)也为优势菌^[39-40],推测这种细菌可能有助于动物消化缺乏营养的食物^[41].支原体属细菌(*Mycoplasma*)也是一种传染性菌种,可以感染人类和广泛的动物物种,并引发疾病^[42],这些潜在致病菌的发生是否会诱发斑点福寿螺的生理疾病还需要进一步的研究.鲸杆菌属(*Cetobacterium*)也是斑点福寿螺肠道微生物优势菌属之一.研究发现从 5 种淡水鱼类的肠道内容物分离培养出的 *Cetobacterium somerae*,该菌株具有高的维生素 B12 生产能力,并具有发酵葡萄糖的功能^[43].在斑点福寿螺肠道内还发现了蛭弧菌

属(*Bdellovibrio*)(相对丰度为0.76%),这种菌可以有序定植于动物体内的粘膜或细胞之间,形成生物屏障有效防治病原微生物生长^[44]. 蛭弧菌作为“活性抗生素”在水产养殖业中得到广泛的应用. 研究表明,蛭弧菌对鱼类增重有明显的促进作用,使用后水质明显改善,成活率也相应提高^[45].

2.3 雌性与雄性斑点福寿螺肠道菌群组成差异性分析

基于非加权 UniFrac 距离的非度量多维尺度分析和群落相似性检验分析表明,雌性与雄性斑点福寿螺的肠道群落组成差异不显著($R=-0.0187, P>0.05$)(图 4A). 基于加权 UniFrac 距离的非度量多维尺度分析和群落相似性检验分析也支持这一结果($R=0.0053, P>0.05$)(图 4B).

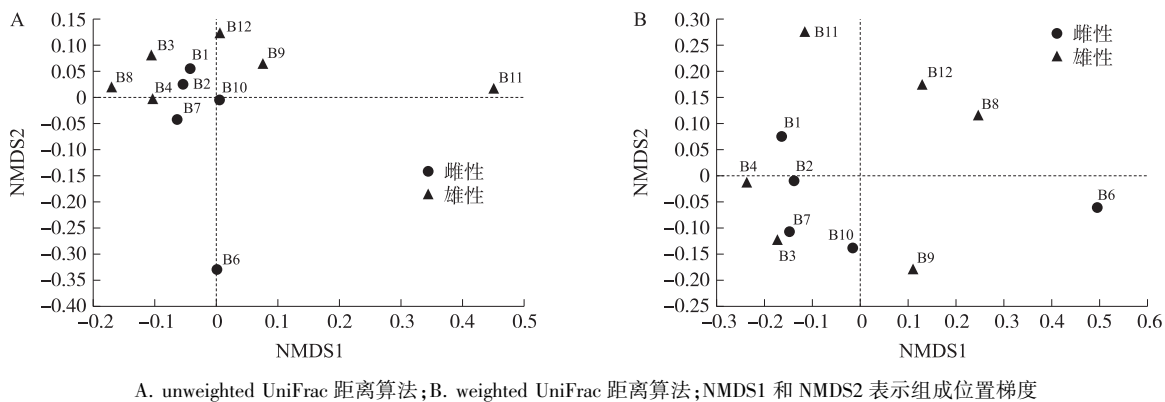
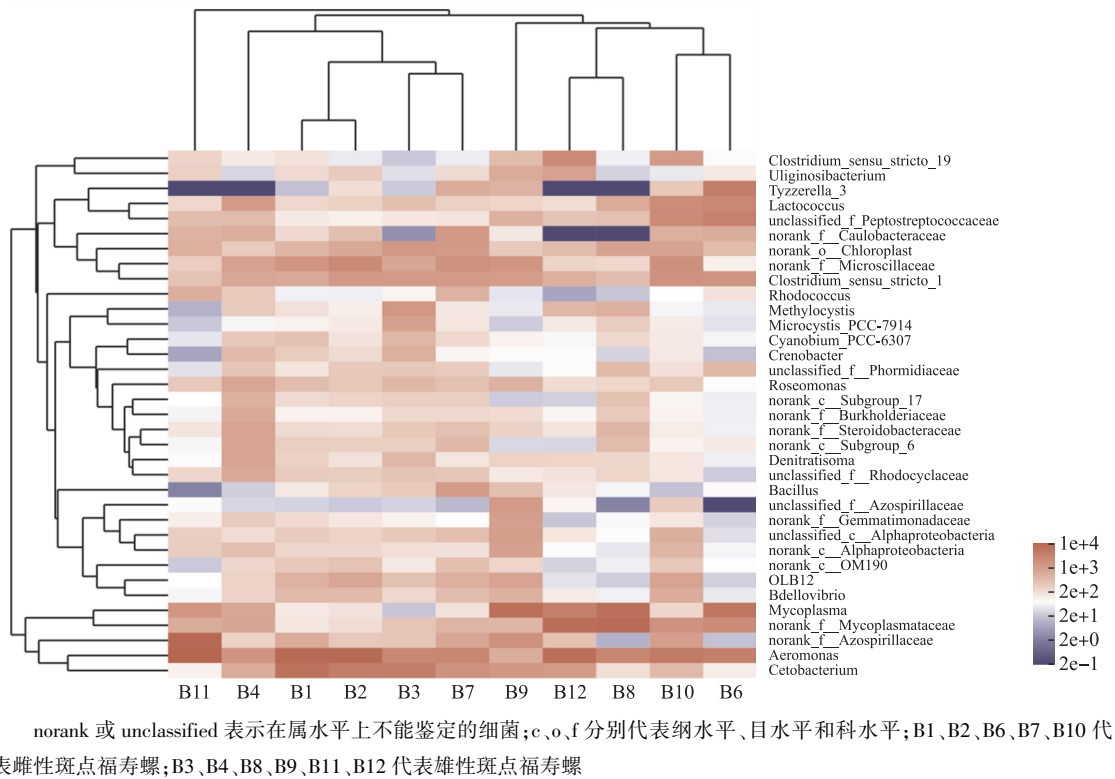


图 4 基于 OTU 水平的非度量多维尺度分析

Fig. 4 NMDS analysis of gut bacterial community based on OTU level

为反映雌性与雄性斑点福寿螺肠道菌群的关系,在属水平上构建含样品聚类关系树和物种聚类关系树的热图(图 5). 样品聚类关系分析显示,11 个斑点福寿螺样本主要聚为两组: B1–B4、B6–B10 和 B12 聚类为一组, B11 单独聚为一组,并未按照不同性别聚类. 物种聚类关系树结果表明,雌性与雄性斑点福寿螺各菌属间的相对丰度大小相似,进一步支持非度量多维尺度分析的结果,说明本研究中雌性与雄性斑点福寿螺肠道菌群结构差异不显著.



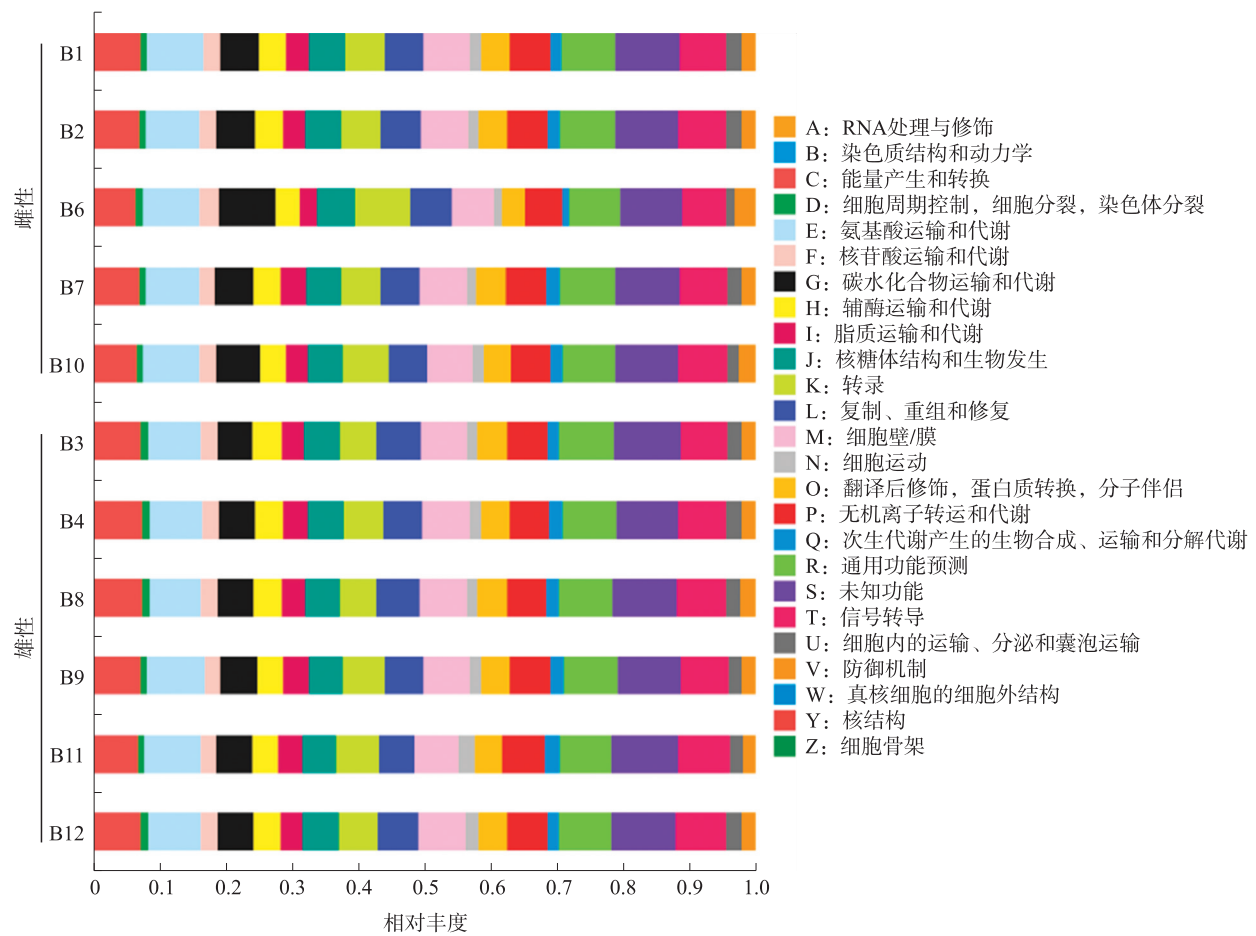
norank 或 unclassified 表示在属水平上不能鉴定的细菌;c、o、f 分别代表纲水平、目水平和科水平; B1、B2、B6、B7、B10 代表雌性斑点福寿螺; B3、B4、B8、B9、B11、B12 代表雄性斑点福寿螺

图 5 样品中肠道菌群热图分析

Fig. 5 Heatmap analysis of intestinal flora

2.4 功能预测

利用每个样本的 16S rRNA 数据进行 PICRUSt 分析,预测斑点福寿螺肠道菌群功能(图 6). 在所有的样本中,共预测有 24 种代谢功能,其中氨基酸的运输和代谢(9.17%)所占比例最高,其次是通用功能预测(9%)、信号转导(7.89%)、细胞壁/膜(7.68%)、能量产生和转换(7.62%)、转录(6.92%)、复制、重组和修复(6.73%)、无机离子转运和代谢(6.72%)、碳水化合物运输和代谢(6.68%)、核糖体结构和生物发生(5.99%)、翻译后修饰、蛋白质转换和分子伴侣(4.67%)、辅酶运输和代谢(4.49%)、脂质运输和代谢(3.83%)等. 通过 Wilcoxon 秩和检验结果表明本研究中雌、雄斑点福寿螺的肠道菌群功能差异不显著($P>0.05$).



B1, B2, B6, B7, B10 代表雌性斑点福寿螺样本; B3, B4, B8, B9, B11, B12 代表雄性斑点福寿螺样本

图 6 斑点福寿螺肠道菌群功能预测

Fig. 6 Functional prediction of intestine microbiome of *Pomacea maculata*

PICRUSt 分析预测的代谢功能中氨基酸的运输和代谢、能量产生和转换以及碳水化合物运输和代谢所占比例较大,这与一些肺螺类软体动物肠道微生物功能组成的研究结果一致^[30,46],这可能是因为福寿螺在溶氧量不足的水环境中,福寿螺通过伸出长长的肺吸管到水面进行“肺”呼吸^[47],所以斑点福寿螺与肺螺类软体动物在肠道菌群功能组成方面存在着一定的相似性. 此外,本研究中信号转导、转录、复制/重组和修复、细胞壁/膜功能比例较高,提示可能与细菌的生长繁殖和宿主的抗逆性密切相关,表明肠道菌群在斑点福寿螺抵抗病原体侵害过程中发挥重要作用.

3 结论

由于两种福寿螺形态的相似性,过去国内对福寿螺属物种的研究主要集中在小管福寿螺. 小管福寿螺与斑点福寿螺在螺壳形态、食性和生存环境等方面相似^[3,5],但相比于小管福寿螺,斑点福寿螺的耐寒性较差^[48],并且两者在对入侵地的破坏程度及扩散等方面也存在一定差异^[3,5]. Li 等^[19]基于 16S rRNA 高通量测序技术研究小管福寿螺口球、胃和肠道不同部位的菌群组成,结果共鉴定出 29 门 111 属的细菌,其

中肠道菌群的优势菌门包括变形菌门、软壁菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和蓝细菌门。斑点福寿螺肠道内容物菌群结构的研究结果也支持这一结论,并且在其他软体动物如非洲大蜗牛(*Achatina fulica*)^[49]、盖罩大蜗牛(*Helix pomatia*)^[50]、钉螺(*Oncomelania hupensis*)^[20]肠道菌群中这5种优势菌也普遍存在。在属水平上小管福寿螺与斑点福寿螺的肠道菌群组成存在明显差异,斑点福寿螺肠道菌群的优势菌属主要以气单胞菌属(*Aeromonas*)、支原体属(*Mycoplasma*)和鲸杆菌属(*Cetobacterium*)为主,而小管福寿螺肠道菌群中未分类的气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)和柔膜菌科(*Mollicutes*)的相对丰度最高^[19],这说明肠道菌群结构受到宿主种类的重要影响,即使是同属物种其肠道菌群组成也会有较大差异。同样地,尽管雉科不同种类的鸟类食性相同,但其肠道菌群仍存在部分分化的现象,说明宿主分类地位是影响肠道菌群结构的重要因素^[51]。

本研究并未发现雌、雄斑点福寿螺的肠道微生物多样性和结构存在显著差异,与程天印等^[16]对雌、雄小管福寿螺肠道菌群的研究结果一致,但本研究中样本量相对较小、生境单一,在今后的研究中可以增加样本量以进一步研究在不同生境下雌、雄斑点福寿螺肠道微生物结构与功能的差异。本研究仅对斑点福寿螺肠道微生物的功能进行预测,今后可以利用宏基因组学技术对斑点福寿螺肠道微生物的功能进行更加深入的研究,为从共生微生物角度解析斑点福寿螺的环境适应性提供依据。

[参考文献]

- [1] COWIE R H. Apple snails(Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management[M]. //BARKER G M(Ed.). Molluscs as crop pests. UK: CAB International, 2002.
- [2] HAYES K A, JOSHI R C, TIENGO S C, et al. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia[J]. Diversity and distributions, 2008, 14(4): 701-712.
- [3] HAYES K A, COWIE R H, TIENGO S C, et al. Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae(Caenogastropoda) [J]. Zoological journal of the linnean society, 2012, 166(4): 723-753.
- [4] BURKS R L, KYLE C H, TRAWICK M K. Pink eggs and snails: field oviposition patterns of an invasive snail, *Pomacea insularum*, indicate a preference for an invasive macrophyte[J]. Hydrobiologia, 2010, 646: 243-251.
- [5] HORGAN F G, STUART A M, KUDAVIDANAGE E P. Impact of invasive apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands[J]. Acta oecological, 2014, 54: 90-100.
- [6] MARTIN C W, VALENTINE J F. Tolerance of embryos and hatchlings of the invasive apple snail *Pomacea maculata* to estuarine conditions[J]. Aquatic ecology, 2014, 48: 321-326.
- [7] ADALLA C B, MAGSINO E A. Understanding the golden apple snail(*Pomacea canaliculata*): biology and early initiatives to control the pest in the Philippines[M]. //JOSHI R C, SEBASTIAN L S(Eds.). Global advances in ecology and management of golden apple snails. Nueva Ecija, Philippines: Philippines Rice Research Institute, 2006.
- [8] LV S, ZHANG Y, LIU H X, et al. Phylogenetic evidence for multiple and secondary introductions of invasive snails: *Pomacea* species in the People's Republic of China[J]. Diversity & distributions, 2013, 19(2): 147-156.
- [9] 杨倩倩, 刘苏汶, 茹炜崧, 等. 基于 DNA 条形码技术对浙江省外来入侵福寿螺进行分子鉴定[J]. 生物多样性, 2016, 24(3): 341-350.
- [10] YANG Q Q, LIU S W, HE C, et al. Invisible apple snail invasions: importance of continued vigilance and rigorous taxonomic assessments[J]. Pest management science, 2018, 75(5): 1277-1286.
- [11] RAWLS J F, SAMUELL B S, GORDON J I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2004, 101(13): 4596-4601.
- [12] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis[J]. Nature reviews microbiology volume, 2008, 6(2): 121-131.
- [13] LEY R E, HAMADY M, LOZUPONE C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. Science, 2008, 320(5883): 1647-1651.
- [14] 许刚, 孙振丽, 胡小龙, 等. 基于 16SrRNA 基因序列分析家蚕肠道细菌的多样性[J]. 蚕业科学, 2015, 41(4): 641-649.
- [15] MA R, WANG S, ZHAO F, et al. Comparative study on intestinal bacterial communities of *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus magnuspinnatus* with different sexes and feeding strategies[J]. Annals of microbiology, 2018, 68(3): 123-33.
- [16] 程天印, 曲凌玄, 王晓君. 应用 PCR-DGGE 技术分析福寿螺胃肠道菌群[J]. 中国农学通报, 2015, 31(11): 98-102.

- [17] 张盛静,赵小金,宋晓玲,等. 人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析[J]. 上海海洋大学学报,2015,24(2): 211–218.
- [18] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16s rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,2011,108(Supplement 1):4516–4522.
- [19] LI L H, LV S, LU Y, et al. Spatial structure of the microbiome in the gut of *Pomacea canaliculata*[J]. BMC microbiology, 2019,19(1):273.
- [20] HAO Y, GUAN W, WU H, et al. Intestinal microbiome profiles in *Oncomelania hupensis* in mainland China[J]. Acta tropica, 2020,201:105202.
- [21] 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[J]. 生物工程学报,2020,36(12): 1–13.
- [22] GODOY M S, CASTRO-VAZQUEZ A, VEGA I A. Endosymbiotic and host proteases in the digestive tract of the invasive snail *Pomacea canaliculata*:diversity, origin and characterization[J]. PLoS one,2013,8(6):e66689.
- [23] YANG Q, LIU S, HE C, et al. Invisible apple snail invasions:importance of continued vigilance and rigorous taxonomic assessments[J]. Pest management science,2019,75(5):1277–1286.
- [24] XU N, TAN G, WANG H, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. European journal of soil biology,2016,74:1–8.
- [25] WANG X, SUN G, FENG T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression[J]. Cell research,2019,29(7):1–17.
- [26] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and environmental microbiology,2007,73(16):5261–5267.
- [27] 刘小改,杨亚军,廖秋菊,等. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析[J]. 昆虫学报,2016,59(9):965–976.
- [28] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nature biotechnology,2013,31(9):814–821.
- [29] TAKACS-VESBACH C, KING K, VAN HORN D, et al. Distinct bacterial microbiomes in sexual and asexual *Potamopyrgus antipodarum*, a new zealand freshwater snail[J]. PLoS one,2016,11(8):e0161050.
- [30] JOYNSON R, PRITCHARD L, OSEMWEKHA E, et al. Metagenomic analysis of the gut microbiome of the common black slug *Arion ater* in search of novel lignocellulose degrading enzymes[J]. Frontiers in microbiology,2017,8:2181.
- [31] GONG M F, GUAN Q L, OU X F, et al. Screening and production of cellulase of bacteria isolated from intestinal tract of *Pomacea canaliculata*[J]. Journal of biobased materials and bioenergy,2017,11(4):278–281.
- [32] MORRISON M, POPE P B, DENMAN S E, et al. Plant biomass degradation by gut microbiomes:more of the same or something new? [J]. Current opinion in biotechnology,2009,20(3):358–363.
- [33] RIMOLDI S, TEROVA G, ASCIONE C, et al. Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources [J]. PLoS one,2018,13(3):e0193652.
- [34] HU Z, CHEN X, CHANG J, et al. Compositional and predicted functional analysis of the gut microbiota of *Radix auricularia* (Linnaeus) via high-throughput Illumina sequencing[J]. Journal of peer,2018,6:e5537.
- [35] QIAO F, LEI K, LI Z, et al. Transcriptomic responses of the freshwater snail (*Parafossarulus striatulus*) following dietary exposure to cyanobacteria[J]. Science of the total environment,2018,624(15):153–161.
- [36] YE L, AMBERG J, CHAPMAN D, et al. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish[J]. The ISME journal,2014,8(3):541–551.
- [37] JIANG Y, XIE C, YANG G, et al. Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes) [J]. Aquaculture research,2011,42(4):499–505.
- [38] CEYLAN E, BERKTAS M, AGAOGLU Z. The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock [J]. Tropical animal health and production,2009,41(2):199–204.
- [39] HUANG Z B, GUO F, ZHAO J, et al. Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*[J]. Aquaculture research,2010,41:e760–e769.
- [40] ARONSON H S, ZELLMER A J, GOFFREDI S K. The specific and exclusive microbiome of the deep-sea bone-eating snail, *Rubyspira osteovora*[J]. FEMS microbiology ecology,2016,93:fiw250.

- [41] SEBASTEN D, MARIE-ANNE P, NELLY L, et al. A tale of two chitons: is habitat specialisation linked to distinct associated bacterial communities? [J]. FEMS microbiology ecology, 2013, 83: 552–567.
- [42] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 1998, 62: 1094–1156.
- [43] TSUCHIYA C, SAKATA T, SUQITA H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish [J]. Letters in applied microbiology, 2008, 46(1): 43–48.
- [44] 王玉堂. 蛭弧菌及其在水产养殖动物疾病防治中的应用 [J]. 中国水产, 2014, 2: 44–47.
- [45] 陈家长, 简纪常, 胡庚东, 等. 利用有益微生物改善养殖生态环境的研究 [J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(4): 33–36.
- [46] CARDOSO A M, CAVALCANTE J J V, CANTÃO M E, et al. Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an invasive snail reveals a rich reservoir of novel genes [J]. PLoS one, 2012, 7(11): e48505.
- [47] 尹绍武, 颜亨梅, 王洪全. 福寿螺的生物学研究 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2000, 23(2): 76–82.
- [48] MATSUKURA K, IZUMI Y, YOSHIDA K, et al. Cold tolerance of invasive freshwater snails, *Pomacea canaliculata*, *P. maculata*, and their hybrids helps explain their different distributions [J]. Freshwater biology, 2016, 61(1): 80–87.
- [49] PAWAR K D, BANSKAR S, RANE S D, et al. Bacterial diversity in different regions of gastrointestinal tract of giant African snail (*Achatina fulica*) [J]. Microbiologyopen, 2012, 1(4): 415–426.
- [50] NICOLAI A, ROULAND-LEFEVRE C, ANSART A, et al. Inter-population differences and seasonal dynamic of the bacterial gut community in the endangered land snail *Helix pomatia* (Gastropoda: Helicidae) [J]. Malacologia, 2015, 59(1): 177–190.
- [51] 沈佳斌, 张雪敬, 吴蔚, 等. 雉科鸟类肠道微生物的多样性与功能及其对食性的适应 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2016, 39(2): 90–95.

[责任编辑: 黄 敏]