

微塑料对入侵种红耳滑龟和土著种 中华草龟肠道菌群的影响

陈 燊¹, 何鑫妮², 常婷婷², 高 朔^{2,3}, 李 宏²

(1. 江苏第二师范学院, 江苏 南京 210013)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(3. 生态环境部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

[摘要] 全球淡水生态系统均受到不同程度的微塑料污染, 微塑料对水生生物的影响受到广泛关注. 通过比较土著种和入侵种对微塑料暴露生理响应的差异, 可以评估微塑料对生物的毒性效应, 也有助于了解入侵种在逆境胁迫下的适应策略. 本研究以外来入侵种红耳滑龟和土著种中华草龟作为研究对象, 评估在龟卵孵化期添加微塑料(1 mg/L)和稚龟生长期添加不同浓度的微塑料(0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L)对两种龟肠道菌群的影响. 结果表明, 在孵化期添加微塑料造成两个物种肠道菌群丰度和多样性下降. 在生长期添加微塑料并没有使两个物种肠道菌群的多样性和丰度出现显著差异, 但使组成结构出现显著差异. 在门水平, 变形菌门(Proteobacteria)、厚壁杆菌门(Firmicutes)等是两个物种共有的优势菌门; 在属水平, 两个物种的优势菌属除杆菌属(*Bacteroides*)外各有不同, 且各种菌所占比例均差异显著. 抵抗不良环境的菌在红耳滑龟体内显著富集, 而多种条件致病菌在中华草龟体内显著富集. 研究结果表明, 红耳滑龟耐受微塑料胁迫的能力比中华草龟更强.

[关键词] 红耳滑龟, 中华草龟, 微塑料, 肠道微生物, 入侵物种

[中图分类号] Q955 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2025)01-0056-10

Comparative Study of Responses to Microplastics in Alien Invasive *Trachemys scripta elegans* and Native *Chinemys reevesii*

Chen Yu¹, He Xinni², Chang Tingting², Gao Shuo^{2,3}, Li Hong²

(1. Jiangsu Second Normal University, Nanjing 210013, China)

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

(3. Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China)

Abstract: Global freshwater ecosystems are subject to different degrees of microplastics pollution, and the effects of microplastics on aquatic organisms have received considerable attention. By comparing the differences in physiological responses to microplastic exposure between native and invasive species, the toxic effects of microplastics on organisms can be assessed, and it will also help to understand the adaptive strategies of invasive species under adversity stress. The present study had investigated the impact of microplastics on the gut microbiota of two turtle species including the invasive *Trachemys scripta elegans* and the native *Chinemys reevesii*. Microplastics were added to the incubation period (1 mg/L) and the growth period of juvenile turtles (0.1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L) in laboratory environment. The results suggested that exposure to microplastics during incubation period resulted in a reduction in the abundance and diversity of gut microbiota in *T. scripta elegans* and *C. reevesii*. Exposure to different concentrations of microplastics during the growth period did not cause significant differences in the diversity and abundance of gut microbiota, but caused significant differences in the compositional structure of the gut microbiota. Proteobacteria, Firmicutes were the dominant phyla shared by two species. The dominant genera of the two species were different except for *Bacteroides*, and the proportions of various bacteria varied significantly. Bacteria resistant to adverse environments were significantly enriched in *T. scripta elegans*, while a variety of conditionally pathogenic bacteria were significantly enriched in *C. reevesii*. The results showed that *T. scripta elegans* was more tolerant to adverse environments than the *C. reevesii*.

Key words: *Trachemys scripta elegans*, *Chinemys reevesii*, microplastic, intestinal microbiome, invasive species

收稿日期: 2023-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32171495).

通讯作者: 高朔, 助理研究员, 研究方向: 动物生理生态. E-mail: gaoshuo19970419@163.com

微塑料(microplastics, MPs)是指直径小于 5 mm 的塑料颗粒、泡沫、薄膜等^[1]. 目前,全球淡水生态系统均受到不同程度的微塑料污染,浓度为 100~3 500 个·L⁻¹^[2]. 在韩国洛东江中检测到 20 μm 以上的微塑料含量为(293±83)~(4 760±5 242)个/m³^[3]. 在中国的长江、珠江等淡水水域也存在微塑料污染问题,长江流域等 20 多个河湖中微塑料含量达到了(1 660.0±639.1)~(8 925±1 591)个/m³^[4]. 微塑料可以通过进入各类食物链,对生物造成危害甚至死亡^[5]. 聚苯乙烯作为环境中检出率最高的微塑料类型之一,其对水生生物造成的影响不容忽视. 聚苯乙烯微塑料暴露对斑马鱼(*Danio rerio*)幼鱼的免疫系统产生毒性,相关免疫基因表达水平下调^[6]. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)幼鱼和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)暴露于聚苯乙烯微塑料后,其肠道健康受到影响,消化酶活性降低,肠道微生物多样性发生变化^[7-8]. 聚苯乙烯还会对水生动物的生殖产生负面影响,聚苯乙烯暴露导致斑马鱼子代行为学异常和死亡率增加,还导致青鳉(*Oryzias latipes*)产卵数减少^[9-10]. 目前,聚苯乙烯微塑料对土著水生生物的影响已有较多报道,而有关微塑料对土著与入侵水生生物的比较研究相对较少. 通过研究土著种和入侵种对微塑料暴露生理响应的差异,可以评估微塑料对生物的毒性效应,也有助于了解入侵种在逆境胁迫下的适应策略.

红耳滑龟(*Trachemys scripta elegans*)原产于密西西比河流域,被国际自然保护联盟(IUCN)列为全球最危险的 100 种入侵物种之一^[11]. 红耳滑龟的生长速率极快、繁殖能力强,易存活,竞争和耐受不良环境能力极强^[12]. 由于宠物弃养、养殖逃逸、宗教放生等因素^[13],红耳滑龟在野外扩散形势十分严峻,全国 34 个省级行政区均有红耳滑龟的分布,占据中国本土物种的生态位,造成了本土龟鳖类濒危或灭绝,极大地破坏了自然生态平衡^[14]. 中华草龟(*Chinemys reevesii*)主要分布在中国、日本、韩国等亚洲地区^[15],其适应能力强、易繁殖、寿命长,是中国主要的经济养殖动物之一^[16].

入侵物种和土著物种之间的差异不仅体现在形态、行为方面,而且体现在生理方面^[17]. 肠道微生物在不同宿主物种之间存在差异,而外界环境通常会改变肠道微生物,肠道微生物群落的可塑性可能使动物肠道适应环境变化的速度比宿主整体适应的速度更快^[18]. 入侵物种拥有更多的可塑性肠道菌群,这可能会使它们在新的环境中表现出更强的表型可塑性^[19]. 入侵物种肠道菌群的高可塑性也增强了入侵物种开发新栖息地的能力^[20]. 而且,相比于亲缘关系相近的土著种,入侵种常常表现出更强的抗逆耐受能力,例如,红耳滑龟比中华花龟(*Ocadia sinensis*)具有更强的对亚硝酸盐的耐受能力^[21].

本研究以入侵种红耳滑龟和土著种中华草龟作为研究对象,通过比较聚苯乙烯微塑料暴露对两种动物肠道菌群的影响,了解入侵种和土著种对微塑料暴露生理响应的差异. 从生理角度,为了解红耳滑龟的生态入侵机制提供依据,也为微塑料污染对水生生物的毒性效应提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验动物的采集

中华草龟和红耳滑龟各 300 枚卵采集自江苏省扬州市宝应县山阳镇水产站(33°12'26" N, 119°14'43" E). 龟卵带回南京师范大学两栖爬行动物实验室孵化,孵化箱(KB240, Binder, Germany)温度设置为 28 ℃,孵化期间不断补充水分以保持孵化基质湿度始终保持在-12 kPa(即水和孵化基质比为 1:1),并及时去除已变质的卵,直至稚龟全部孵出.

1.2 实验材料

荧光单分散聚苯乙烯(polystyrene, PS)微球(直径 80 nm)悬浮液(100 mg/10 mL)和单分散聚苯乙烯微球(直径 10 μm)悬浮液(2.5%, w/v)购于天津倍思乐色谱技术开发中心. 采用荧光显微镜和光学显微镜对微塑料的形貌和个体尺寸进行表征.

1.3 实验处理

1.3.1 孵化期荧光微塑料暴露实验

将高温灭菌后干燥的蛭石分别与曝气水(对照组)和含有 1 mg/L 荧光聚苯乙烯微塑料的曝气水(实验组)1:1 混合,并分别放入两个孵化盒中. 在每个孵化盒中,放入红耳滑龟和中华草龟的卵各 60 枚. 每天检查对照组和实验组的孵化情况,并向两个组的蛭石中分别喷洒曝气水和含有 1 mg/L 荧光聚苯乙烯微塑料的曝气水,使孵化盒中保持湿润,直至中华草龟和红耳滑龟完全孵出.

分别将孵出的中华草龟和红耳滑龟稚龟在保持湿润的饲养箱中生活一周,以便稚龟能完全吸收体内

的剩余卵黄. 对孵出后的中华草龟和红耳滑龟稚龟进行分组饲养,红耳滑龟分为 RC、RF、RFW 组,中华草龟分为 CC、CF、CFW 组. RC 与 CC 组孵化期间和稚龟生长期均不添加荧光微塑料;RF 与 CF 组孵化期间添加荧光微塑料,但稚龟生长期不添加荧光微塑料;RFW 与 CFW 组孵化期间和稚龟生长期均添加荧光微塑料. 饲养箱内提供稚龟晒背场所,饲养箱上方悬挂全光谱灯,在阴雨天或低温条件下为幼体提供热源,光照,黑暗周期保持在 $L=14:D=10$. 每天(8:00—10:00)投喂 1 次 3%~5%体重的商品饲料(寸金,中国).

1.3.2 生长期不同浓度微塑料暴露实验

将单分散聚苯乙烯微塑料微球按照要求分别制备成 3 个浓度:0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L,搅动使微塑料微球分布均匀. 将在孵化期未经微塑料暴露而孵出的 120 只红耳滑龟和 120 只中华草龟在保持湿润的饲养箱中生活一周,以防稚龟未能完全吸收完卵黄下水感染死亡. 对下水后的稚龟进行分组饲养,每个物种设置 4 个分组,即红耳滑龟分为对照组(RC)、0.1 mg/L 组(RL)、1 mg/L 组(RM)、10 mg/L 组(RH);中华草龟分为对照组(CC)、0.1 mg/L 组(CL)、1 mg/L 组(CM)、10 mg/L 组(CH). 每个物种的每个处理组设置 3 个平行重复,每个重复包含 10 只稚龟. 饲养箱中的饲养条件同上.

采用安乐死法处死稚龟,用无菌剪刀和镊子解剖稚龟,剪开肠道壁后用镊子轻轻刮拭,取出肠道内容物置于冻存管中(Sangon Biotech, Shanghai, China),并保存肠道壁组织样品以检测微塑料的吸收情况. 将取出后的肠道内容物放入冻存管,并立刻放入液氮速冻,再将样品转移到 -80°C 超低温冰箱保存,每个处理组取 6 份样品($n=6$). 肠道内容物送至北京诺禾致源生物科技有限公司(Novogene Bioinformatics Institute, Beijing, China),利用 Illumina NovaSeq PE250 进行高通量测序.

2 数据分析

对 72 份样品进行高通量测序后,用 fastp 软件(V 0.20.0)对获得的原始的测序序列进行质量过滤并通过 FLASH(V 1.2.11)软件进行拼接. 生成的序列通过 DADA2 方法降噪去重,产生特征序列(Amplicon Sequence Variants, ASVs),并利用 Vsearch 软件(V 2.15.0)识别和移除嵌合体序列^[22]. 使用 SILVA 的 SSU rRNA 数据库(V 132, <http://www.arb-silva.de>)^[23]和基于 classify-sklearn 算法(<https://github.com/QIIME2/q2-feature-classifier>)的 QIIME2(<https://docs.qiime2.org/2019.4/tutorials/>) Naive Bayes 分类器进行物种注释^[24-25],并在平台上计算门-属水平上的微生物群落的相对丰度. 以观察到的 ASVs 数为基础,计算 ASV 水平 alpha 多样性指数,通过 Chao1 指数(Chao1 index)、香农-威纳指数(Shannon-wiener index)、辛普森指数(Simpson index)、观测物种数(Observed_otus index)、Goods_coverage 指数(Goods_coverage index)5 个指数分析样品的丰富度、多样性与测序覆盖度^[26]. Chao1 指数和 Observed_otus 指数越大,表明群落丰富度越高. Shannon-wiener 指数和 Simpson 指数越大,群落多样性越高. 此外,Goods_coverage 指数越大说明样品的测序覆盖度越高. 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验对各组菌群丰富度及多样性进行差异显著性比较.

利用 QIIME2 软件计算 Bate 多样性距离矩阵和非距离矩阵,基于 Weighted Unifrac 和 Unweighted Unifrac 距离进行非度量多维尺度分析和群落相似性检验分析,使用 R 语言(V 3.5.3)进行统计分析和作图. 利用 LEfSe 软件(V 1.0)完成组间显著差异性物种分析,采用线性判别分析(LDA)对各组差异菌群进行鉴定^[27],以 $P<0.05$ 和 $|LDA|>4$ 为阈值,制作显著差异物种 LDA 值分布柱状图.

3 实验结果与讨论

3.1 微塑料的表征

在荧光显微镜下,80 nm 的聚苯乙烯荧光微塑料呈圆球状并发出绿色荧光,分布较为均匀,无明显黏附变形现象(图 1A). 在普通光学显微镜下,10 μm 的聚苯乙烯微塑料呈现圆球状,边缘较为规则(图 1B).

3.2 肠道菌群测序深度及 alpha 多样性分析

12 组处理的 72 个样品测序并经过初步过滤后,得到 4 262 006 条有效序列. 序列经聚类后得到 8 373 个 ASVs,所有样品的 ASVs 覆盖率在 99.8%,说明本次实验测序数据可以全面解读各样品中细菌的组成及丰度.

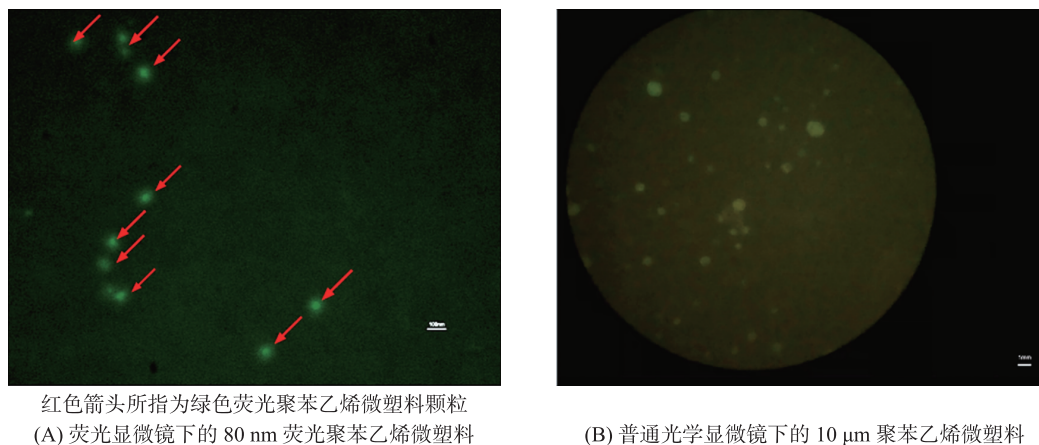
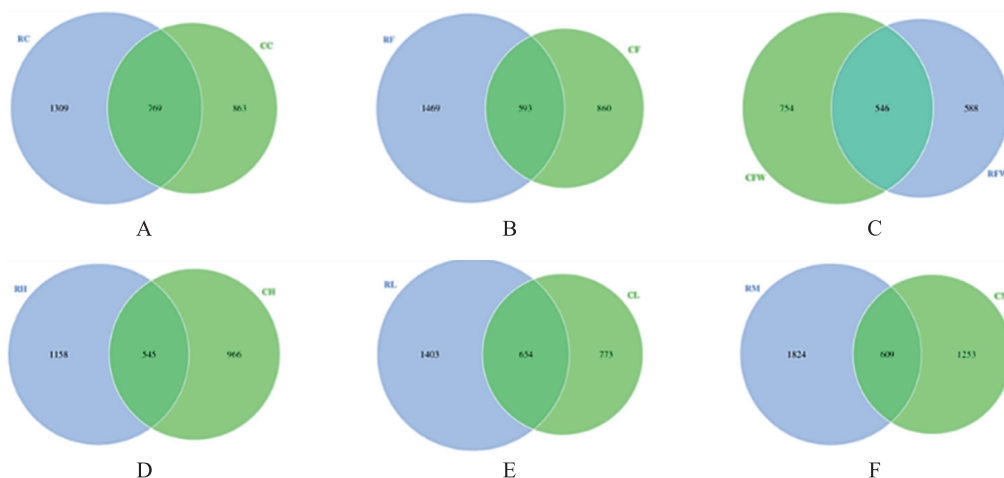


图 1 微塑料表征图

Fig. 1 Characterisation of microplastic

RC 和 CC 组共有的 ASVs 最多,有 769 个,分别占 RC 和 CC 组总 ASVs 的 37.01%和 47.12%。RH 和 CH 组共有的 ASVs 最少,只有 545 个,分别占 RH 和 CH 组总 ASVs 的 32.00%和 35.37%。RF 和 CF 组共有 593 个 ASVs,分别占 RF 和 CF 总 ASVs 的 28.76%和 40.81%;RFW 和 CFW 组共有 546 个 ASVs,分别占 RFW 和 CFW 总 ASVs 的 28.76%和 48.15%(图 2)。



蓝色圆圈表示红耳滑龟的 ASVs 数量,绿色圆圈表示中华草龟的 ASVs 数量,重叠区域表示二者共有的 ASVs 数量。

图 2 不同处理组共有 ASVs 韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of common ASVs in different treatment groups

Alpha 多样性分析结果表明,不同处理组肠道菌群的 Chao1 指数、Shannon-wiener 指数、Simpson 指数、Observed_otus 指数均存在显著差异($P<0.05$)(表 1),这表明经过不同的微塑料处理,中华草龟和红耳滑龟各自肠道微生物群落的丰富度和多样性存在显著改变。两个物种的肠道微生物丰度和多样性差异不显著($P>0.05$)(表 2)。

表 1 不同处理组中华草龟和红耳滑龟肠道微生物群落多样性指数

Table 1 Diversity indices of gut microbial communities of *Chinemys reevesii* and *Trachemys scripta elegans* in different treatment groups

	Chao1 指数	Shannon-wiener 指数	Simpson 指数	Observed_otus 指数
CC	579.29±30.15	6.05±0.07	0.94±0.01	567.67±31.37
CL	486.53±10.09	5.93±0.19	0.93±0.01	477.33±9.17
CM	615.31±31.53	6.36±0.26	0.95±0.02	605.83±31.83
CH	537.02±32.12	5.90±0.28	0.93±0.02	528.33±32.01
CF	556.01±14.47	5.63±0.15	0.92±0.01	548.83±14.45
CFW	459.55±33.07	5.13±0.19	0.91±0.01	452.00±32.18
RC	568.40±76.50	5.55±0.41	0.90±0.02	557.67±73.69
RL	587.39±82.43	5.87±0.41	0.92±0.02	580.50±81.47

续表 1
Table 1 continued

	Chao1 指数	Shannon-wiener 指数	Simpson 指数	Observed_otus 指数
RM	646.62±62.52	6.70±0.22	0.96±0.01	643.83±63.17
RH	497.42±30.33	6.19±0.16	0.95±0.01	495.17±30.57
RF	534.73±43.27	6.28±0.16	0.96±0.01	524.83±40.44
RFW	422.42±32.82	5.42±0.18	0.91±0.01	413.67±31.44
显著性	$H_{11,60} = 24.331$	$H_{11,60} = 28.531$	$H_{11,60} = 23.151$	$H_{11,60} = 24.896$
significance	$P = 0.011$	$P = 0.002$	$P = 0.016$	$P = 0.009$

表中数据以(平均值±标准误)表示,差异显著的因子用黑体表示.

表 2 中华草龟和红耳滑龟肠道细菌群落多样性指数
Table 2 Diversity indices of gut microbial community of *Chinemys reevesii* and *Trachemys scripta elegans*

	Chao1 指数	Shannon-wiener 指数	Simpson 指数	Observed_otus 指数
C	538.95±23.67	5.83±0.17	0.93±0.01	530.00±23.37
R	542.83±31.64	6.00±0.20	0.93±0.01	535.95±32.06
显著性	$t = -0.098$	$t = -0.646$	$t = -0.271$	$t = -0.150$
significance	$P = 0.924$	$P = 0.533$	$P = 0.793$	$P = 0.884$

表中数据以(平均值±标准误)表示,差异显著的因子用黑体表示.

3.3 肠道菌群组成结构分析

根据物种注释结果,72 个样品在本次检测中所属细菌归类为 45 个门、107 个纲、259 个目、402 个科、884 个属. 在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)、厚壁杆菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)是红耳滑龟和中华草龟的优势菌门,在红耳滑龟肠道菌群中占 12.36%~39.71%;在中华草龟中占 23.56%~25.66%. 此外,在红耳滑龟和中华草龟肠道菌群中占比较高的还有梭杆菌门(Fusobacteriota)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、酸杆菌门(Actinobacteriota)、迷踪菌门(Elusimicrobiota)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota)、绿弯菌门(Chloroflexi)(图 3). 在红耳滑龟和中华草龟肠道中,变形菌门(Proteobacteria)、厚壁杆菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Actinobacteriota)和绿弯菌门(Chloroflexi)所占的比例存在显著差异($P<0.05$).

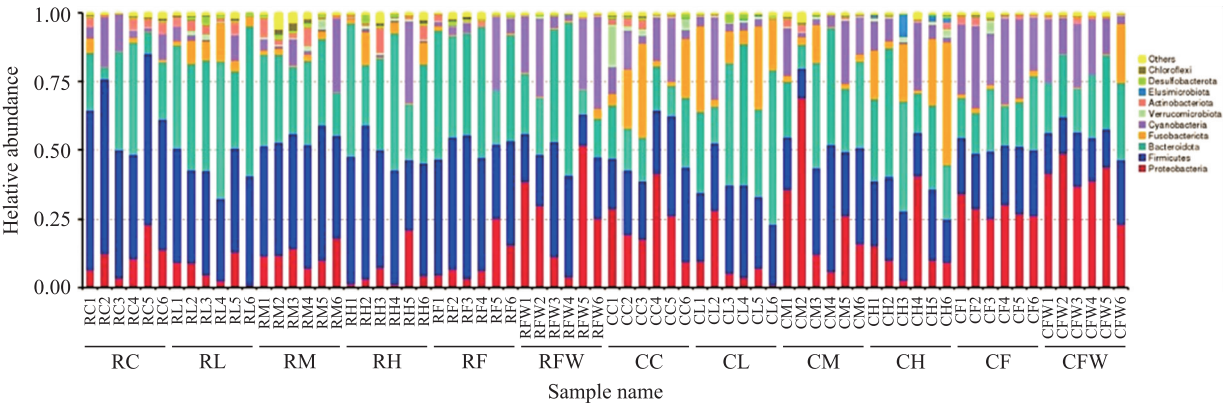


图 3 不同处理下红耳滑龟和中华草龟肠道菌群门的相对丰度
Fig. 3 The relative abundance of gut microbiota taxa on phylum in *Trachemys scripta elegans* and *Chinemys reevesii*

在属水平上,梭菌-1 属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)是红耳滑龟的优势菌属,占 7.46%~14.24%,而鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、管道杆菌属(*Cloacibacterium*)、C39 属(C39)细菌是中华草龟的肠道优势菌属,占 4.06%~9.63%(图 4). 在红耳滑龟和中华草龟肠道中,梭菌-1 属、鲸杆菌属、不动杆菌属、罗姆布茨菌属、管道杆菌属、C39 属的丰度存在显著差异($P<0.05$).

3.4 肠道菌群组成差异分析

基于加权和非加权的 Unifrac 距离的 NMDS 分析表明,不同处理组龟的肠道菌群群落组成差异显著(加权: $R = 0.098, P = 0.005$;非加权: $R = 0.16, P = 0.005$)(图 5 A、B).

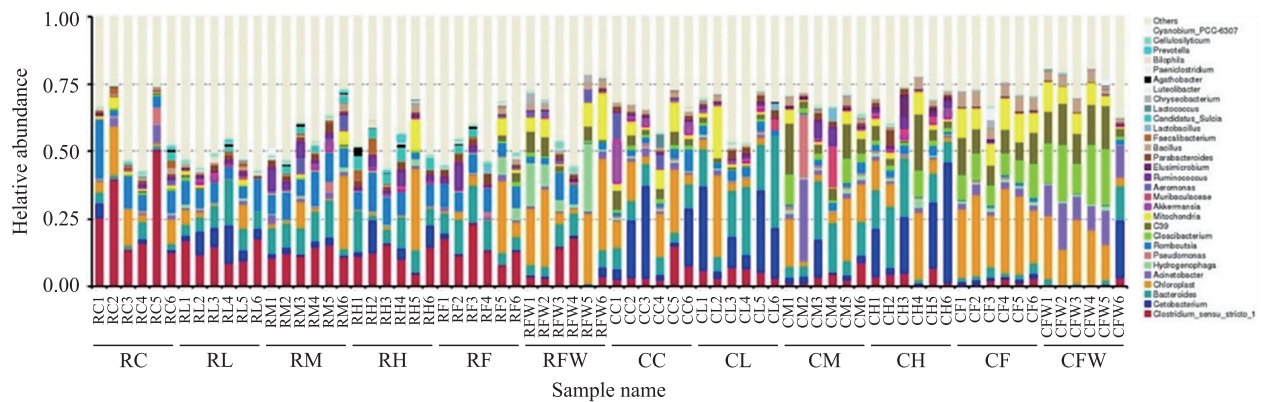
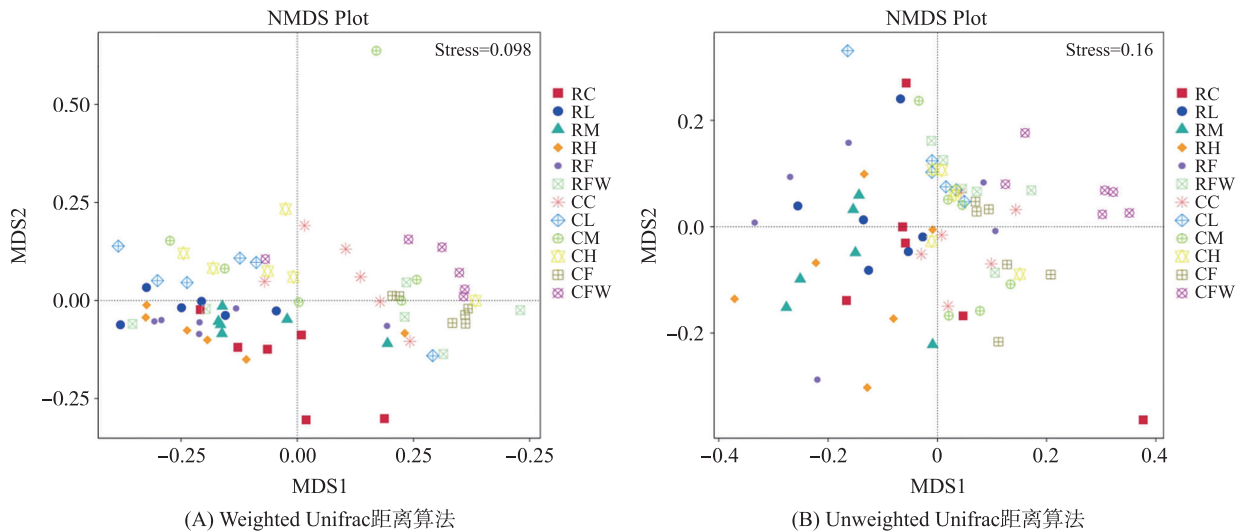


图 4 不同处理下红耳滑龟和中华草龟肠道菌群属的相对丰度

Fig. 4 The relative abundance of gut microbiota taxa on genera in *Trachemys scripta elegans* and *Chinemys reevesii*



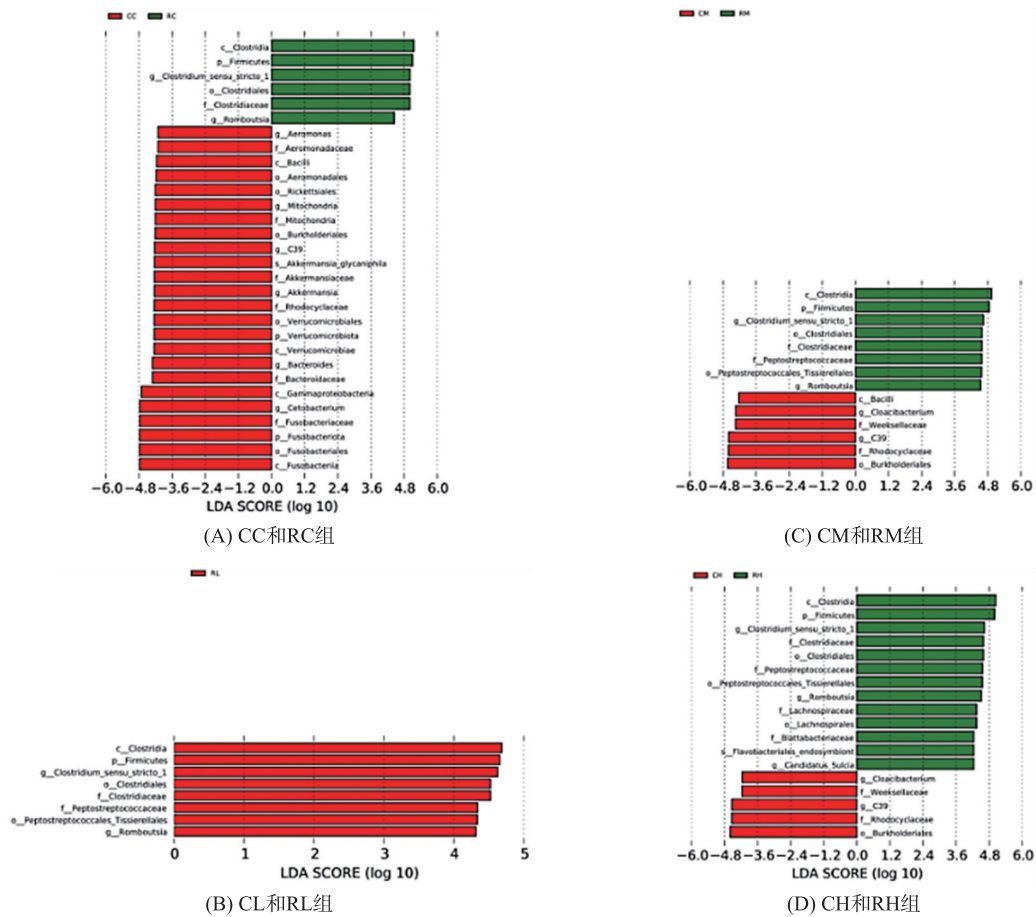
MDS1 和 MDS2 表示组成位置梯度

图 5 基于 ASVs 水平的非度量多维尺度分析

Fig. 5 NMDS analysis of gut microbiota community based on ASVs level

LeSe 分析结果表明,梭杆菌门 (Fusobacteriota)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)和 C39 属在 CC 组显著富集,厚壁菌门 (Firmicutes)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)在 RC 组显著富集(图 6 A). 厚壁菌门 (Firmicutes)和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 在 RL 组显著富集,而在 CL 组并没有出现显著富集的菌群(图 6 B). 厚壁菌门 (Firmicutes)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)和梭菌-1 属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)在 RM 组显著富集,C39 属和管道杆菌属 (*Cloacibacterium*)在 CM 组呈现显著富集(图 6 C). 厚壁菌门 (Firmicutes)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)和梭菌属(*Clostridium*)在 RH 组显著富集,C39 属和管道杆菌属 (*Cloacibacterium*)在 CH 组呈现显著富集(图 6 D).

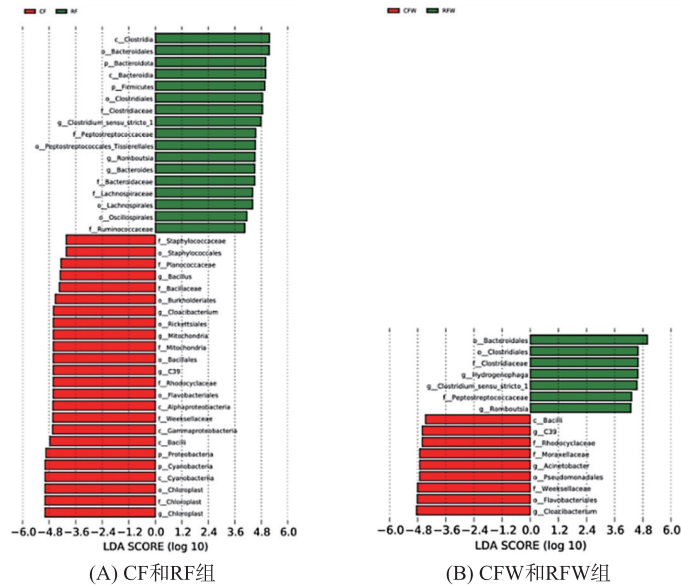
当仅在孵化期间添加微塑料时 ($F^+ + W^-$),在门水平上,变形菌门 (Proteobacteria) 和蓝细菌门 (Cyanobacteria)在中华草龟的肠道菌群中显著富集,而拟杆菌门 (Bacteroidota) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 在红耳滑龟肠道菌群中显著富集;在属水平上,芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、C39 属和管道杆菌属 (*Cloacibacterium*) 在中华草龟肠道菌群中显著富集,而罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和梭菌-1 属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)在红耳滑龟内显著富集(图 7 A). 当孵化成功后继续添加微塑料(F^+W^+),在门水平上,两种龟都没有出现特异性富集的菌群,而在属水平上,C39 属、管道杆菌属 (*Cloacibacterium*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*)在中华草龟肠道内呈现显著富集,而噬氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 和梭菌-1 属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)在红耳滑龟肠道菌群内显著富集(图 7 B).



柱状图的长度代表差异物种的影响大小($|LDA| > 4$)

图 6 两种龟喂食不同浓度微塑料肠道菌群 LDA 值分布柱状图

Fig. 6 Bar chart of LDA value distribution of gut microbiota in two species of turtles fed with microplastics of different concentrations



柱状图的长度代表差异物种的影响大小($|LDA| > 4$)

图 7 两种龟孵化后继续添加微塑料肠道菌群 LDA 值分布柱状图

Fig. 7 Bar chart of LDA value distribution of gut microbiota in two species of turtles after hatching and continuous addition of microplastics

3.5 讨论

采用 16S rRNA 高通量测序技术对红耳滑龟和中华草龟的肠道菌群多样性与结构进行研究. 研究表明,两个物种的肠道菌群丰度和多样性不存在显著差异(表 2),但是两个物种的肠道菌群构成存在显著差异. 孵化期间微塑料会降低两个物种的肠道菌群多样性和丰度(表 1),但是,孵化成功后摄入微塑料并没有显著改变其肠道菌群的物种分布.

虽然红耳滑龟和中华草龟的肠道菌群结构存在显著差异,但是两个物种共同拥有 86.38%~92.55%的 ASVs. 其中,18.11%来自变形菌门(Proteobacteria),31.64%来自厚壁菌门(Firmicutes),28.88%来自拟杆菌门(Bacteroidota),10.85%来自蓝细菌门(Cyanobacteria). 研究表明,构成红耳滑龟肠道菌群的主要菌门是厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidota)^[28],这与本研究结果一致. 这两个菌门也是其他龟类动物肠道内的主要菌门,比如地鼠陆龟(*Gopherus polyphemus*)^[29]、绿海龟(*Chelonia mydas*)^[30]. 厚壁菌门和拟杆菌门在肠道中分别负责将纤维素分解为短链脂肪酸和降解碳水化合物以及促进宿主肠道免疫系统的发育^[31]. 红耳滑龟和中华草龟在不同处理下具有的共同菌群维持了两者的基本功能和肠道菌群的动态变化. 此外,在两个物种的肠道菌群中发现了 10.85%的蓝藻菌门(图 3). 蓝藻菌门作为水体环境中存在较多的细菌,可以通过饮食进入肠道,已经在许多不同种类的水生生物的肠道菌群中发现了丰度较高的蓝藻菌门细菌^[32-33]. 梭杆菌门(Fusobacteriota)在中华草龟的肠道菌群内所占的比例显著高于红耳滑龟(图 3). 梭杆菌门在爬行动物中并不常见,但是可以从受感染的动物的肠道菌群中发现,例如美洲短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)^[34]. 这表明在摄入微塑料后,中华草龟的肠道比红耳滑龟更容易受到感染. 此外,厚壁杆菌门和变形菌门的比例在两个物种中存在显著差异,在红耳滑龟肠道内占 52.07%,而在中华草龟肠道内占 47.41%(图 3). 较高比例的厚壁菌门和变形菌门细菌可以通过产生多种分解纤维素和半纤维素的消化酶帮助宿主消化^[35]. 这说明红耳滑龟消化植物的能力比中华草龟更强,也导致红耳滑龟与中华草龟在发育过程中对食物要求的差异.

在孵化期间添加微塑料造成了两个物种肠道菌群丰度和多样性下降,这与以往的研究结果一致,水生生物摄入微塑料会造成肠道菌群多样性降低^[36-37]. 可能的原因是微塑料在宿主肠道中积累后,通过物理伤害或氧化应激改变宿主肠道中的特定条件,比如 pH 等,使肠道菌群失调^[38]. 但是,孵化成功后摄入不同浓度的微塑料并没有造成两个物种的肠道菌群的多样性和丰度出现显著性差异(表 2),这可能与两种龟的发育阶段密切相关. 研究发现,在胚胎发育到性成熟发育过程中,斑马鱼肠道菌群的组成及物种丰富度的演替指数较低^[39]. 这表明,随着发育时间的增加,肠道菌群组成结构的稳定性增加. 对水生动物的大量相关研究表明,肠道菌群受多种因素影响,例如食物类型、饲养环境、健康状况、生活史阶段等^[40-41]. 因此,本研究采用同龄的红耳滑龟和中华草龟,以及在相同的环境下饲养 14 d,以尽可能排除以上因素的干扰.

动物的肠道与菌群之间通过复杂的相互作用来维持机体的稳态,当菌群的组成或者功能失调时,会引起肠道疾病或者其他疾病^[42]. 通过 LEfSe 分析发现,不同处理组的红耳滑龟和中华草龟各有不同的菌显著富集(图 6、7). 梭杆菌门在中华草龟对照组的肠道菌群内显著富集,而梭杆菌门往往与一些疾病有关^[43]. 厚壁菌门在不同处理组的红耳滑龟的肠道内均显著富集. 厚壁菌门在消化植物纤维过程中起着重要作用^[44],这表明在自然条件下,红耳滑龟有更大的摄取及消化食物的潜力,而这种潜力促进了其入侵成功. 而梭杆菌门在中华草龟的肠道内富集,使得中华草龟更容易遭受不良环境的侵染,存在更高的致病致死率. 同样,条件致病菌属管道杆菌属(*Cloacibacterium*)在摄入中浓度和高浓度的微塑料颗粒的中华草龟肠道内呈现显著富集. 管道杆菌属常与肠道炎症有关,其相对丰度与其宿主的健康状况成反比. 变形菌门 C39 属菌也在中华草龟的肠道内富集,变形菌门细菌的增加往往与炎症发生、肠道黏膜被破坏和肠道通透性有关^[45]. 多种致病菌在中华草龟的肠道菌群中富集. 这表明,在不良条件下,中华草龟具有潜在的高发病率,并且抵抗不良环境的能力较弱. 梭菌属是一种条件致病菌,经常会引起肠道感染等^[46],这种菌仅在摄入高浓度微塑料的红耳滑龟和摄入中浓度微塑料的中华草龟的肠道内富集. 这表明红耳滑龟比中华草龟耐受不良环境的能力更强,这一观点也被以前的研究证实^[47].

比较孵化期间添加微塑料对两个物种肠道菌群的影响发现,多种条件致病菌仅在孵化期间添加微塑料的中华草龟的肠道内富集,比如变形菌门、管道杆菌属. 在孵化期间添加微塑料并在孵化成功后继续添加微塑料的红耳滑龟和中华草龟的肠道菌群内,分别出现了梭菌属和管道杆菌属等多种条件致病菌的富集,表明在孵化期间添加微塑料会对红耳滑龟和中华草龟的肠道菌群造成影响,孵化成功后继续添加微塑

料比仅在孵化期间添加微塑料的危害更大。

4 结论

本研究通过高通量测序技术分析在龟卵孵化期、稚龟生长期添加不同浓度的微塑料对入侵种红耳滑龟和土著种中华草龟肠道菌群的影响,研究发现红耳滑龟和中华草龟两个物种的肠道菌群在多样性和丰度上并没有显著差异,但是在组成结构上存在显著差异。红耳滑龟肠道菌群内存在多种抵抗不良环境的细菌,而中华草龟肠道内存在多种条件致病菌。红耳滑龟和中华草龟暴露于微塑料中肠道微生物的差异性富集,更有助于解释相对于土著物种,红耳滑龟具有更强的生态适应能力,从而可以成功入侵并建立种群的深层次原因。

[参考文献]

- [1] THOMPSON R C, OLSEN Y, MITCHELL R P, et al. Lost at sea: Where is all the plastic? [J]. Science, 2004, 304(5672): 838.
- [2] LI C R, BUSQUETS R, CAMPOS L C. Assessment of microplastics in freshwater systems: A review [J]. Science of the total environment, 2020, 707: 135578.
- [3] EO S, HONG S H, SONG Y K, et al. Spatiotemporal distribution and annual load of microplastics in the Nakdong River, South Korea [J]. Water research, 2019, 160: 228–237.
- [4] HU L, CHERNICK M, HINTON D E, et al. Microplastics in small waterbodies and tadpoles from Yangtze River Delta, China [J]. Environmental science and technology, 2018, 52(15): 8885–8893.
- [5] LAU W, SHIRAN Y, BAILEY R, et al. Evaluating scenarios toward zero plastic pollution [J]. Science, 2020, 369(6510): 1455–1456.
- [6] WAN Z Q. Effects of polystyrene microplastics on the microbiota and metabolism in zebrafish [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.
- [7] GU H, WANG S, WANG X, et al. Nanoplastics impair the intestinal health of the juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. Journal of hazardous materials, 2020, 397: 122773.
- [8] CHAE Y, KIM D, CHOI M, et al. Impact of nano-sized plastic on the nutritional value and gut microbiota of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* via dietary exposure [J]. Environment international, 2019, 130: 104848.
- [9] SÖKMEN TÖ, SULUKAN E, TÜRKOĞLU M, et al. Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*) [J]. Neurotoxicology, 2020, 77: 51–59.
- [10] ZHU M, CHERNICK M, RITTSCHOFF D, et al. Chronic dietary exposure to polystyrene microplastics in maturing Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), 2020, 220: 105396.
- [11] MASIN S, BONARDI A, PADOA-SCHIOPPA E, et al. Risk of invasion by frequently traded freshwater turtles [J]. Biological invasions, 2014, 16(1): 217–231.
- [12] 梁碧霞, 徐艳萍, 武正军, 等. 鲤鱼对外来入侵物种鳄龟及红耳滑龟的视觉识别 [J]. 生态学杂志, 2019, 38(1): 205–209.
- [13] 徐海根, 强胜, 韩正敏, 等. 中国外来入侵物种的分布与传入途径分析 [J]. 生物多样性, 2004, 6: 628–638.
- [14] 龚世平, 杨江波, 葛妍, 等. 外来物种红耳龟在中国野外分布现状及扩散路径研究 [J]. 野生动物学报, 2018, 39(2): 373–378.
- [15] LIU W S, MA J E, LI W X, et al. The long intron 1 of growth hormone gene from reeves' Turtle (*Chinemys reevesii*) correlates with negatively regulated GH expression in four cell lines [J]. International journal of molecular science, 2016, 17(4): 543.
- [16] DU W G, HU L J, LIU J L, et al. Effects of incubation temperature on embryonic development rate, sex ratio and post-hatching growth in the Chinese three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii* [J]. Aquaculture, 2007, 272(1/4): 747–753.
- [17] QU Y, WANG K Z, KANG J K, et al. Effects of rainfall, temperature and illumination on outcrossing rate of male sterile line in soybean [J]. Oil crop science, 2020, 5(1): 17–21.
- [18] ALBERDI A, AIZPURUA O, BOHMANN K, et al. Do vertebrate gut metagenomes confer rapid ecological adaptation? [J]. Trends in ecology and evolution, 2016, 31(9): 689–699.
- [19] DAVIDSON A M, JENNIONS M, NICOTRA A B. Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis [J]. Ecology letters, 2011, 14(4): 419–431.
- [20] FONTAINE S S, KOHL K D. Gut microbiota of invasive bullfrog tadpoles responds more rapidly to temperature than a noninvasive congener [J]. Molecular ecology, 2020, 29(13): 2449–2462.
- [21] 张杰, 洪美玲, 廖广桥, 等. 亚硝酸盐暴露对红耳龟与中华条颈龟幼体的慢性毒性效应 [J]. 四川动物, 2011, 30(2): 173–177.

- [22] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature methods, 2016, 13(7): 581–583.
- [23] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic acids research, 2013, 41(1): 590–596.
- [24] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RIDEOUT J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. Microbiome, 2018, 6: 90.
- [25] BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature biotechnology, 2019, 37(9): 1091.
- [26] LI B, ZHANG X X, GU F, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. Water research, 2013, 47(13): 4207–4216.
- [27] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome biology, 2011, 12(6): R60.
- [28] QU Y F, WU Y Q, ZHAO Y T, et al. The invasive red-eared slider turtle is more successful than the native Chinese three-keeled pond turtle: evidence from the gut microbiota[J]. Peer journal, 2010, 8: e10271.
- [29] YUAN M L, DEAN S H, LONGO A V, et al. Kinship, inbreeding and fine-scale spatial structure influence gut microbiota in a hindgut-fermenting tortoise[J]. Molecular ecology, 2015, 24(10): 2521–2536.
- [30] MCDERMID K J, KITTLE R P, VEILLET A, et al. Identification of gastrointestinal microbiota in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) [J]. Evolutionary bioinformatics, 2020, 16: 1176934320914603.
- [31] JAMI E, ISRAEL A, KOTSER A, et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. ISME journal, 2013, 7(6): 1069–1079.
- [32] 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]. Peer journal, 2018, 6(4): e5537.
- [33] 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.
- [34] KEENAN S W, ENGEL A S, ELSEY R M. The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses [J]. Scientific reports, 2013, 3: 2877.
- [35] 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.
- [36] HUANG J N, WEN B, ZHU J G, et al. Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. Science of the total environment, 2020, 733: 138929.
- [37] WANG K, LI J H, ZHAO L W, et al. Gut microbiota protects honey bees (*Apis mellifera* L.) against polystyrene microplastics exposure risks[J]. Journal of hazardous materials, 2021, 402: 123828.
- [38] 张娜, 周雅雯, 白玉, 等. 微塑料对肠道菌群影响作用的研究进展[J]. 中国塑料, 2020, 34(3): 103–110.
- [39] YAN Q, VAN DER GAST C J, YU Y. Bacterial community assembly and turnover within the intestines of developing zebrafish[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30603.
- [40] EGERTON S, CULLOTY S, WHOOLEY J, et al. The gut microbiota of marine fish[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 873.
- [41] DELPORT T C, POWER M L, HARCOURT R G, et al. Colony location and captivity influence the gut microbial community composition of the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) [J]. Applied environmental microbiology, 2016, 82(12): 3440–3449.
- [42] CHU H T, KHOSRAVI A, KUSUMAWARDHANI I P, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Science, 2016, 352(6289): 1116–1120.
- [43] KEENAN S W, ENGEL A S, ELSEY R M. The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses [J]. Scientific reports, 2013, 3: 2877.
- [44] 段春慧, 王兴金, 李婉萍, 等. 基于宏基因组学研究分析黑叶猴肠道微生物的多样性[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(7): 1–4, 134–137.
- [45] KIM Y S, HO S B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress [J]. Current gastroenterology reports, 2010, 12(5): 319–330.
- [46] 孙桂霞, 徐世文. 鸡源空肠弯曲菌调查与耐药性分析[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(9): 64–68.
- [47] ZHANG Y P, PAN Z C, JI X. Heat tolerance, body temperature and thermal dependence of exercise performance in larvae of the red-eared sliding turtle[J]. Chinese journal of ecology, 2003, 23(6): 1048–1056.

[责任编辑: 黄 敏]