

# 虎斑颈槽蛇肠道微生物组成和分布特征

汤文娇 羊世俊 程雨琦 石倩 张程 朱广香\*

四川农业大学生命科学院 雅安 625014

**摘要:** 蛇类是一种研究能量平衡的模型动物, 而肠道微生物则帮助宿主获取能量和营养。大多数肠道微生物的研究集中在圈养动物上, 而对于野生蛇类的研究很少。本研究从 3 只野生虎斑颈槽蛇 (*Rhabdophis tigrinus*) 的大肠、小肠和泄殖腔内容物提取微生物总 DNA, 进行 16S rRNA 基因 V4 区域扩增子测序, 分析虎斑颈槽蛇肠道核心微生物组成和分布特征。结果表明, 阿尔法指数在不同肠道区域的多样性不存在显著性差异。大肠、小肠和泄殖腔 3 个肠道部位共享 534 个操作分类单元 (OTUs), 大肠包含最多特有 OTUs (388 个)。门水平, 梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 在小肠 ( $52.87\% \pm 14.49\%$ )、大肠 ( $41.12\% \pm 22.60\%$ ) 和泄殖腔 ( $65.70\% \pm 10.44\%$ ) 均为优势菌。属水平, 鲸杆菌属 (*Cetobacterium*) 在小肠 ( $46.36\% \pm 13.86\%$ )、大肠 ( $21.95\% \pm 9.82\%$ ) 和泄殖腔 ( $58.18\% \pm 14.29\%$ ) 为优势菌, 柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 在小肠和泄殖腔中有显著性差异。此外, 在其肠道检测到很多潜在的致病菌, 例如, 柠檬酸杆菌属、明串珠菌属 (*Trichococcus*) 和丹毒丝菌属 (*Erysipelothrix*), 了解了潜在致病菌在虎斑颈槽蛇肠道中的分布情况。在聚类分析中发现泄殖腔的数据重复性较好, 将本研究泄殖腔数据与前人研究过的食鱼蝮 (*Agkistrodon piscivorus*) 泄殖腔高通量测序数据进行联合分析, 为更广泛开展不同蛇类肠道微生物组成的差异性分析提供理论借鉴依据。

**关键词:** 虎斑颈槽蛇; 肠道菌群; 梭杆菌门; 鲸杆菌属

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2019) 04-589-10

## Intestine Microflora Composition and Distribution Characteristics in *Rhabdophis tigrinus* (Squamata: Colubridae)

TANG Wen-Jiao YANG Shi-Jun CHENG Yu-Qi SHI Qian  
ZHANG Cheng ZHU Guang-Xiang\*

College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

**Abstract:** Snakes are model animals for studying vertebrate energy balance. The gut microbes help the host get energy and nutrients. Currently, researches focused on the captive animals, but little is known about the gut microbes in the wild snakes. We described intestinal microflora in large intestine, small intestine and cloaca in 3 wild *Rhabdophis tigrinus* by using a V4 region of 16S rRNA gene amplicon sequencing and

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. SFC31401959), 中国博士后基金项目 (No. 2016M592688);

\* 通讯作者, E-mail: ZhuGX0711@163.com;

**第一作者介绍** 汤文娇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: tangwj1993@163.com。

收稿日期: 2018-10-12, 修回日期: 2019-04-02 DOI: 10.13859/j.cjz.201904016

analyzed the core composition and distribution characteristics of the intestinal microflora. The results showed no significant difference in the diversity of alpha index in different intestinal regions (Table 1). The three intestinal regions shared 534 Operational Taxonomic Units (OTUs), among which the large intestine contained 388 more unique OTUs (Fig. 3c). At the phylum level, Fusobacteria were found to be dominant in the small intestine ( $52.87\% \pm 14.49\%$ ), large intestine ( $41.12\% \pm 22.60\%$ ) and cloaca ( $65.70\% \pm 10.44\%$ ) (Fig. 1). At the genus level, we indicated that the genus of *Cetobacterium* had an advantage in all intestinal segments, including the small intestine ( $46.36\% \pm 13.86\%$ ), large intestine ( $21.95\% \pm 9.82\%$ ) and cloaca ( $58.18\% \pm 14.29\%$ ) (Fig. 2), and that *Citrobacter* showed a significant difference between small intestine and cloaca. In addition, many potentially pathogenic bacteria, for example, *Citrobacter*, *Trichococcus* and *Erysipelothrix*, were detected in the gut, which is helpful for understanding the distribution of potential pathogens in the intestines of *Rhabdophis tigrinus*. In cluster analysis, the data repeatability of cloaca samples were well (Fig. 3d) and combined analysis with the *Agkistrodon piscivorus* data provided the theoretical basis for further comparison analysis of intestinal microflora among different snake species (Fig. 4).

**Key words:** *Rhabdophis tigrinus*; Intestinal microflora; Fusobacteria; *Cetobacterium*

我们生活在生物多样性快速丧失的时期，动物正在以惊人的速度绝灭。某些共生微生物和濒危宿主共同绝灭的可能性是不可否认的 (Saleem 2015)。肠道微生物在宿主的免疫代谢 (Rooks et al. 2016)、营养吸收 (Flint et al. 2012)、生态行为 (Sharon et al. 2010, Diaz-Heijtz et al. 2011, Ezenwa et al. 2012) 等方面起着十分重要的作用。目前，大部分这类研究主要采取粪便微生物作为研究对象，但粪便微生物并不能全面反映整个肠道的微生物组成，肠道不同区域由于生理生化环境不同，会对微生物的组成产生重要影响 (Suzuki et al. 2016, Kohl et al. 2017)。针对野生动物肠道不同区域微生物的研究还较少，尤其是存在于野生爬行动物体内的一些致病菌会导致人类感染一些疾病 (Jho et al. 2011)，因此，对这类动物开展研究具有重要理论和实践意义。

目前，对野生食鱼蝮 (*Agkistrodon piscivorus*) (Colston et al. 2015) 和森林响尾蛇 (*Crotalus horridus*) (McLaughlin et al. 2015) 以及人工养殖的缅甸蟒蛇 (*Python bivittatus*) (Costello et al. 2010) 和黑眉锦蛇 (*Elaphe taeniura*) (时云朵等 2017) 肠道微生物的研究，发现其肠道微生物主要由拟杆菌门 (Bacteroidete)、厚壁

菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 这个 3 个大类构成。但均由于技术的限制，无法更加全面揭示蛇类肠道微生物的组成情况。Colston 等 (2015) 采用焦磷酸测序对食鱼蝮小肠、大肠和泄殖腔的微生物区系进行了检测分析，大肠样品中拟杆菌门最丰富，变形菌门和厚壁菌门次之，而变形菌门是小肠和泄殖腔样品中的主要门类，次之是厚壁菌门和拟杆菌门，该研究的结果反映了不同肠道部位细菌群落在聚类系统发育上无明显差异，但不同肠道部位群落组成成分比例上的差异有统计学意义。分层聚类图没有显示肠道区域聚类或个体聚类的确定模式，但泄殖腔样品倾向于组合在一起，证明了非致命性泄殖腔拭子采样的实用性。该研究奠定了进一步调查蛇类肠道细菌群落结构的基础。

虎斑颈槽蛇 (*Rhabdophis tigrinus*) 是游蛇科 (Colubridae) 颈槽蛇属中的广布物种 (赵尔宓 1998)，主要栖息于海拔 30~2 200 m 有水草之处或农田、水沟、池塘，也见于远离水域但潮湿多草的山地。主要以蛙、蟾类和鱼为食 (赵尔宓 1998)。蛇类作为没有口腔咀嚼能力的肉食性动物，肠道消化能力强，并且具有极强的耐饥饿能力，可长时间不进食，蛇可以作

为研究能量转化的有用模型生物 (Beaupre 2002)。肠道微生物在营养吸收和能量转化过程中扮演重要的角色。因此, 本研究通过 16S rRNA 高通量测序, 检测虎斑颈槽蛇小肠、大肠和泄殖腔的微生物, 揭示其肠道微生物组成和分布特征。通过分析其肠道微生物组成成分与食性之间的联系, 更好地了解其生物学特征。此外, 由于泄殖腔样本采集不会对宿主造成致命损伤, 故本研究中, 将所获得的泄殖腔菌群数据结果与食鱼蝮泄殖腔菌群数据结果 (Colston et al. 2015) 进行比较分析, 进而探讨泄殖腔菌群数据用于开展蛇类不同物种之间肠道微生物组成差异性研究的有效性, 为广泛开展不同蛇类肠道微生物组成差异性研究提供理论借鉴依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2015 年夏季, 于吉林省吉林市昌邑区采集虎斑颈槽蛇 3 号样本, 标记为 RT1、RT2 和 RT3。获取样本后, 立即用手触摸感受确定其胃肠道中不存在猎物。先用乙醚麻醉以减少应激反应对肠道微生物组成的影响, 用酒精棉球擦拭身体, 每只个体单独置于不同的无菌透明塑料瓶中, 加入 75% 酒精, 以保证胃肠道微生物不受环境中微生物的影响。样本置于 -20 °C 小冰箱, 运送到四川农业大学动物学实验室后, 立即解剖。每个个体的肠道内部均未发现可以被识别的食物。分别将每只个体的小肠、大肠和泄殖腔取出并立即放入无菌的 2 ml 收集管中, 立刻置于液氮中快速冷冻, 然后 -80 °C 冷冻保存。

### 1.2 实验方法

吸取 1 000  $\mu$ l CTAB 裂解液 (诺禾测序公司) 至 2.0 ml EP 管里, 加入适量的溶菌酶粉末, 用无菌镊子夹取样品, 用无菌剪刀剪开肠道组织, 将适量的肠道组织加入裂解液中, 摇晃混匀后移除肠道组织, 将含有肠道内容物的裂解液进行 65 °C 水浴, 期间颠倒混匀数

次, 以使肠道内容物充分裂解; 离心取上清液, 酚氯仿法提取样本的微生物基因组 DNA, 加入 ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA 样品; 加 RNase A 消化 RNA, 37 °C 放置 15 min。之后, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 取适量提取的 DNA 用无菌水稀释至 1 mg/L。

16S rRNA 基因使用带有条形码特异性引物 (Suzuki et al. 2016) 进行扩增, 扩增区域为 V4 区, 引物为: 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') 和 806R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3'), 引物中 M 表示 A、C, H 表示 A、C 或 T, V 表示 A、C 或 G, W 表示 A 或 T。扩增反应体系 30  $\mu$ l, 包含 15  $\mu$ l New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (2 $\times$ ), 引物 (0.002 mmol/L) 各 1.5  $\mu$ l, 10 ng 的模板 DNA, 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。反应程序, 98 °C 预变性 1 min; 变性 98 °C 10 s, 退火 50 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 30 个循环; 后延伸 72 °C, 5 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

对每个样本的 PCR 产物浓度进行检测后, 统一样本浓度并各自充分混匀后, 使用 1  $\times$  TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳检测 PCR 产物。选择主带大小在 400 ~ 450 bp 之间的序列, 割胶回收目标条带, 使用 Thermo Scientific 公司 GeneJET 胶回收试剂盒对回收 PCR 产物进行纯化。使用 New England Biolabs 公司的 NEB Next Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测, 合格后, 使用 HiSeq2500 进行上机测序。

### 1.3 测序数据分析方法

将配对末端读数基于其独特的条形码分配给样品, 并通过切断条形码和引物序列而截短。肠道内容物微生物的 16S rRNA 基因测序数据利用微生物生态学定量软件 (quantitative insights into microbial ecology, QIIME) (Caporaso et al. 2010) 分析。单个操作分类单位 (operational

taxonomic unit, OTU) 被删除。所有需要将序列与参考数据库进行比较的步骤都使用 GreenGenes 数据库 (版本 13\_8)。测序读数通过质量过滤器, 使用开放参考策略进入操作分类单位的聚类, 其相似度为达到 97%。为了获得更优质的数据, 再次进行质量筛选, 运行 USEARCH v7.0.1090 并与 SILVA\_119\_SSURef\_Nr99\_tax\_silva.fasta 进行比较: 检测嵌合体, 去除嵌合序列, 并获得最终有效标签。最后, 生成 BIOM 格式的 OTU 表运用于下游更为复杂的数据分析。

通过网上软件 (<http://www.omicshare.com>) 制作三维饼图, Microsoft Excel 制作条形图, 对菌群进行了分析。OTU 丰度信息表的生成包含最少序列的样本, 最大化包含样本分析, 本文统一在 31 022 个序列的均匀深度上进行随机抽样。生成这些归一化的数据, 在 QIIME 中计算出肠道微生物的  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性。利用  $\alpha$  多样性分析物种多样性的复杂性, Observed\_species、Chao1 和 ACE 指数的数量反映物种丰富度, Coverage 指数反映样本低丰度覆盖度, 而 Shannon 指数和 Simpsons 指数则为均匀度和丰富度提供了一个综合衡量指标。对于每个样本, 基于 31 022 个序列的多次抽样计算了 30 次迭代的平均值。利用  $\beta$  多样性分析评估样品在物种复杂性方面的差异, 通过 QIIME 软件计算加权的 unifracs 的  $\beta$  多样性。为了可视化细菌群落的异同, 展开基于 bray\_curtis 的和物种丰度的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和加权 UniFrac 距离 (在考虑细菌种类存在与缺乏的情况下, 同时考虑细菌的相对丰度) 的分层聚类分析。为了揭露 3 个肠段细菌丰度在门水平和属水平上的差异显著性, 通过 STAMP 软件对大肠、小肠和泄殖腔的肠道细菌丰度进行 Welch's *t*-test, 并进行了 Bonferroni 校正。P 值小于等于 0.05 表示差异显著。

另外, 本研究还对虎斑颈槽蛇和食鱼蝮这两种蛇的泄殖腔微生物组成进行门水平差异分析。其中, 食鱼蝮的序列数据 (序列号分别为

SRS823226、SRS823227、SRS823228、SRS823230、SRS823233 和 SRS971611) 从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的序列片段归档数据库 (Sequence Read Archive) 下载。进行 LEfSe 分析, 主要是根据不同的分组条件进行线性判别分析, 找出有显著性差异的细菌种类, 同时进行 Kruskal-Wallis 和 Wilcoxon 秩和检验 (Segata et al. 2011), 并基于未加权 UniFrac 距离 (只考虑细菌种类存在与缺乏的情况) 对虎斑颈槽蛇和食鱼蝮泄殖腔微生物的样本进行分层聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 虎斑颈槽蛇肠道微生物的组成和结构特征

测序数据合并后的扩增子长度为 241 bp。过滤后, 从 455 714 个原始读取中获得 450 933 个高质量的序列, 每个样本平均读取 ( $50\ 104 \pm 3\ 302$ ) 个读数。这些序列总共产生 2 036 个 OTU。所有样本中总序列分为 28 个门和 568 个属, 这些属中准确鉴定的占 51.76%, 未能准确鉴定的占 48.24%。在门水平, 虎斑颈槽蛇小肠包含 21 门, 大肠 26 门, 泄殖腔 24 门; 在属水平, 小肠 387 属, 大肠 480 属, 泄殖腔 418 属, 这反映了虎斑颈槽蛇的肠道微生物群落组成情况。Coverage 指数高于 98.8%, 表明测序的数量已经饱和, 可以真正反映样本情况 (表 1)。 $\alpha$  多样性指标通过单因素方差分析, 进行 Bonferroni 校正后, 大肠、小肠和泄殖腔之间的丰富度和多样性均没有显著性差异 (表 1)。

门水平上, 所有肠道菌群中梭杆菌门 (Fusobacteria) 占据最优势地位, 小肠中占  $52.87\% \pm 14.49\%$ 、大肠  $41.12\% \pm 22.60\%$ 、泄殖腔  $65.70\% \pm 10.44\%$ ; 其次是变形菌门, 在小肠中占  $16.11\% \pm 2.40\%$ 、大肠  $28.02\% \pm 14.93\%$ 、泄殖腔  $6.20\% \pm 2.55\%$ ; 拟杆菌门在小肠中占  $16.62\% \pm 11.39\%$ 、大肠  $13.19\% \pm 5.12\%$ 、泄殖腔  $12.96\% \pm 10.81\%$ ; 厚壁菌门在小肠中占  $11.81\% \pm 7.87\%$ 、大肠  $14.76\% \pm 3.23\%$ 、泄殖

表 1 肠道菌群 16S rRNA 基因高通量测序数据的  $\alpha$  多样性分析  
Table 1 Alpha diversity analyses of bacterial 16S rRNA gene high throughput sequencing data

	Observed_species 指数 Observed_species	Chao1 指数 Chao1	ACE 指数 ACE	覆盖率 Coverage	Simpson 指数 Simpson	Shannon 指数 Shannon
小肠 Small intestine	478.3 ± 189.8	823.5 ± 306.7	891.3 ± 339.3	0.99 ± 0.003	0.7 ± 0.1	3.4 ± 0.6
大肠 Large intestine	651.7 ± 491.7	866.8 ± 516.6	913.4 ± 566.7	0.99 ± 0.004	0.8 ± 0.1	4.4 ± 1.2
泄殖腔 Cloaca	480.7 ± 294.0	739.8 ± 409.2	763.8 ± 464.8	0.99 ± 0.004	0.6 ± 0.2	3.1 ± 0.4
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.215	0.576	0.073	0.888	0.885	0.765

数据以平均值 ± 标准差表示,  $P \leq 0.05$  表示差异显著。

Data are expressed as Mean ± SD,  $P \leq 0.05$  indicates significant difference.

腔 12.02% ± 5.20% (图 1)。对肠道 3 个部位门水平上丰度平均值排序前 10 的细菌, 进行 Welch's *t*-test 分析, 经 Bonferroni 校正后, 并未发现不同肠道部位差异显著的细菌门类。

在属水平上, 所有肠道菌群中梭杆菌属 (*Cetobacterium*) 占据最优势地位, 其在小肠中占 46.36% ± 13.86%、大肠 21.95% ± 9.82%、泄殖腔 58.18% ± 14.29%; 其次是梭杆菌属 (*Fusobacterium*), 在小肠中占 6.51% ± 0.68%、大肠 19.17% ± 22.86%、泄殖腔 7.51% ± 6.87%; 柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 在小肠中占 8.52% ± 0.70%、大肠 12.79% ± 9.31%、泄殖腔 1.05% ± 0.55%; 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 在小肠中占 1.97% ± 0.89%、大肠 9.33% ± 2.67%、泄殖腔 9.02% ± 8.97% (图 2)。对肠道 3 个部位属水平上丰度平均值排序前 15 的细菌, 进

行 Welch's *t*-test 分析, 经 Bonferroni 校正后, 仅发现柠檬酸杆菌属在小肠和泄殖腔中有显著差异 ( $P = 0.002$ ), 柠檬酸杆菌属在小肠中占主导。

## 2.2 肠道 3 个部位间微生物群落的异同

基于 bray\_curtis 的距离生成的 NMDS (non-metric multidimensional scaling) 来比较肠道 3 个部位群落微生物的组成差异。虚线勾勒是相同肠道部位微生物样品的空间定位点图, 其结果反映出大肠的样本点与点之间距离远, 表现出较大的个体差异, 小肠及泄殖腔的个体差异相对较小 (图 3a)。利用细菌的丰度生成的主成分分析中主元得分 (PC1, 63.3%) 占主要贡献值, 第一主成分中大肠和泄殖腔有一定差异 (图 3b)。小肠、大肠和泄殖腔各有 1 140、1 518 和 1 185 个 OTUs, 三者共享 534

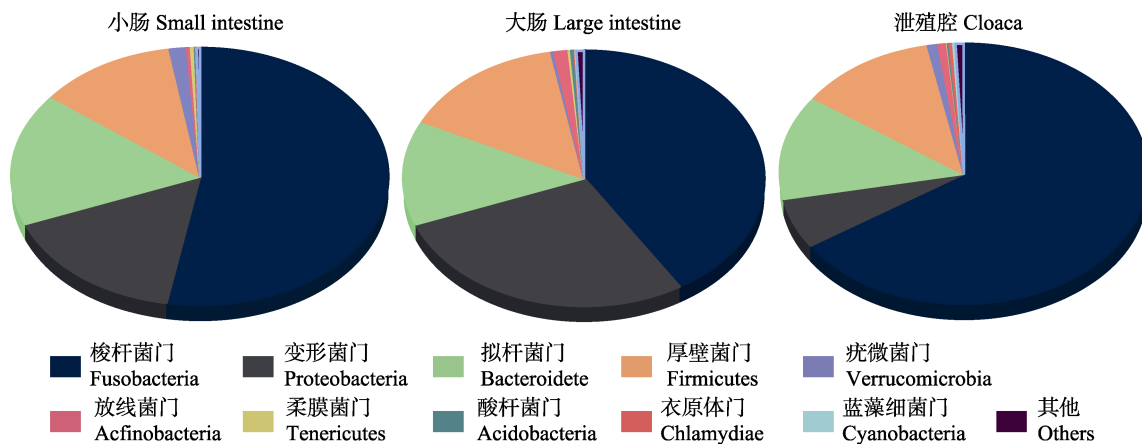


图 1 虎斑颈槽蛇不同肠道区域微生物门水平排名前十的相对丰度

Fig. 1 Top ten phylum-level relative abundance of microbiota in different intestinal regions of *Rhabdophis tigrinus*

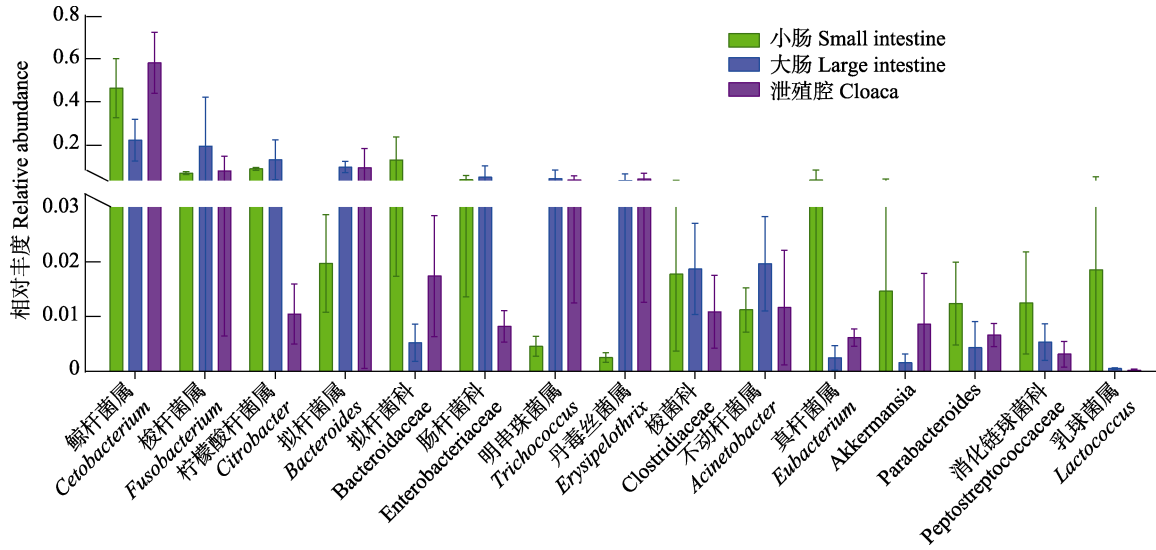


图 2 虎斑颈槽蛇不同肠道区域微生物属水平排名前 15 属的相对丰度

Fig. 2 Top fifteen genus-level relative abundance of microbiota in different intestinal regions of *Rhabdophis tigrinus*

在属水平上未能准确鉴定的，用其所隶属的科描述。Not named at the genus level, described at the family level.

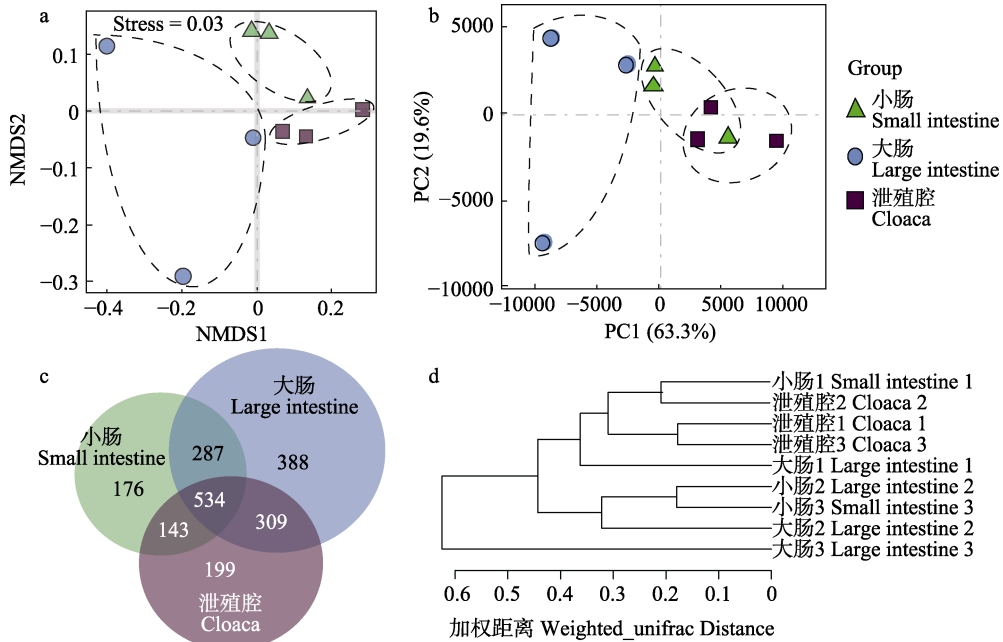


图 3 不同肠道部位微生物的异同分析

Fig. 3 The similarities and differences of microbiota from different intestinal regions

a. 基于 bray\_curtis 距离的非度量多维尺度分析，NMDS1 和 NMDS2 表示组成位置梯度；b. 基于不同肠道片段物种丰度的主成分分析，PC1 和 PC2 表示累计贡献率；c. 韦恩图显示不同肠段之间共享和特异的 OTUs；d. 基于加权 UniFrac 距离的样本分析分层聚类。

a. NMDS (nonmetric multidimensional scaling) plots based on bray\_curtis, NMDS1 and NMDS2 represent com-positional gradients; b. PCA (Principle component Analysis) is based on species abundance of different GI tract segments, PC1 and PC2 represent the cumulative contribution rate; c. Venn diagrams of samples from different intestinal regions based on sharing and unique OTUs; d. Hierarchical clustering of samples analysis based on weighted UniFrac distance.

个 OTUs, 大肠和泄殖腔共享 834 个 OTUs; 大肠包含最多独特的 OTUs (388 个) (图 3c)。在样品分层聚类分析中, 并未以个体聚类, 也未按照肠道部位聚类, 但是小肠和泄殖腔各自的 3 个样本距离更近 (图 3d)。

### 2.3 虎斑颈槽蛇和食鱼蝮泄殖腔微生物群的差异性

虎斑颈槽蛇和食鱼蝮泄殖腔的微生物组成和结构差异十分明显, 一共发现了 9 个差异显著的细菌门类。虎斑颈槽蛇有梭杆菌门、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、柔膜菌门 (Tenericutes)、

疣微菌门 (Verrucomicrobia)、蓝藻细菌门 (Cyanobacteria) 和衣原体门 (Chlamydiae) 6 个细菌门。食鱼蝮有变形菌门、互养菌门 (Synergistetes) 和一个未定义的门类 (Unassigned) (图 4a)。分层聚类能把颈槽蛇的 3 个样本和食鱼蝮的 6 个样本完全分成两大支系 (图 4b)。

### 3 讨论

在本研究中, 梭杆菌门在小肠、大肠和泄殖腔所占的比例都是排名第一的门类, 尤其在

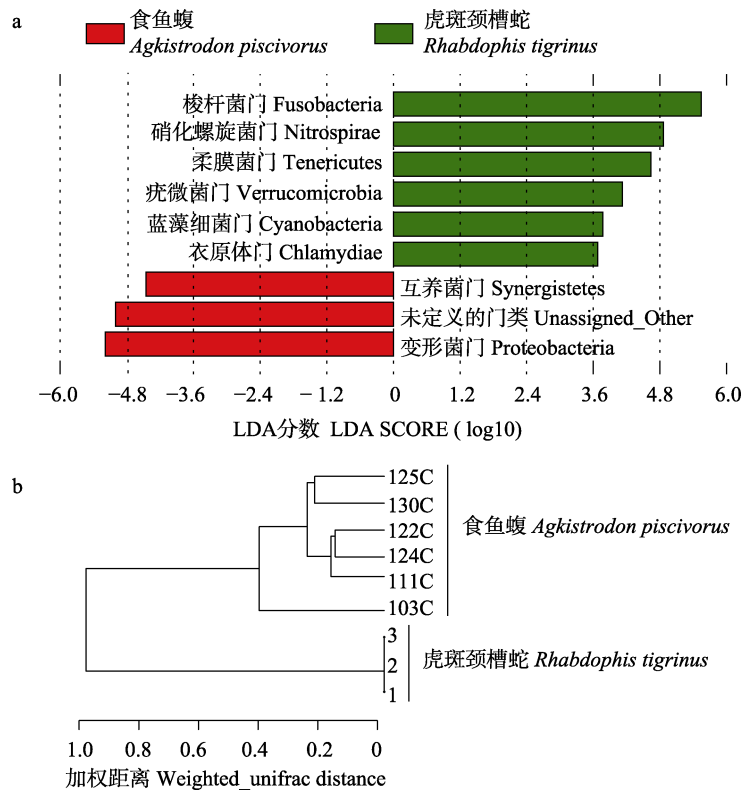


图 4 虎斑颈槽蛇和食鱼蝮泄殖腔微生物的差异性分析

Fig. 4 The differences of cloacal microorganisms in *Rhabdophis tigrinus* and *Agkistrodon piscivorus*

a. 虎斑颈槽蛇和食鱼蝮泄殖腔肠道微生物在门水平的线性判别分析效应大小, 线性判别分析使用在线 LEfSe 项目生成, 横条图长度表示 LDA 分数, 即不同组间显著差异物种的影响程度。图中显示了食鱼蝮 (红色) 与虎斑颈槽蛇 (绿色) 之间差异显著的微生物类群 (LDA 评分 > 2); b. 基于未加权 UniFrac 距离的样本分析分层聚类。

a. LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) of *Rhabdophis tigrinus* and *Agkistrodon piscivorus* from cloaca in the phylum levels (The plot was generated using the online LEfSe project. The length of the bar column represents the LDA score (The influence degree of species was significantly different between different groups). The figure shows the microbial taxa with significant differences between the *Agkistrodon piscivorus* (red) and *Rhabdophis tigrinus* (green) (LDA score > 2); b. Hierarchical clustering of samples analysis based on unweighted UniFrac distance.

泄殖腔中凸显绝对优势，变形菌门所占比例在大肠中比其他部位高。此外，拟杆菌门和厚壁菌门在不同部位所占比例相近，较为稳定。在哺乳动物的肠道中拟杆菌门和厚壁菌门占主导 (Ley et al. 2008); 野生鸟类变形菌门的地位比较突出，在圈养鸡中还是以厚壁菌门和拟杆菌门占主导 (Waite et al. 2014); 蛙类的肠道微生物组主要在以厚壁菌门和变形菌门占主导 (Kohl et al. 2013, Vences et al. 2016); 鱼类主要是变形菌门和厚壁菌门 (Sullam et al. 2012)。与其他动物的核心细菌群落组成对比，在虎斑颈槽蛇虽然组成成分与大多数动物相似，但核心组成比例存在差异。虎斑颈槽蛇核心细菌群落为梭杆菌门，这可能反映了其在虎斑颈槽蛇肠道内独特的生化适应能力。

在一些食腐动物中梭杆菌门普遍存在。通过对蚯蚓肠道内容物细菌 16S rRNA 基因进行变性梯度凝胶电泳发现了梭杆菌门成员 (Hong et al. 2011)。黑秃鹫 (*Coragyps atratus*) 和土耳其秃鹰 (*Cathartes aura*) 中发现大量的梭杆菌门物种，研究指出秃鹰在忍受细菌毒素的同时，也能从腐肉的细菌分解中获益，梭杆菌门与它们的食物来源密切相关 (Roggenbuck et al. 2015)。与此同时，这种细菌主要在杂食和肉食动物的后肠富集 (Ley et al. 2008)。研究指出，梭杆菌属细菌会促进结肠癌的发生 (Rubinstein et al. 2013)。在密河鳄 (*Alligator mississippiensis*) 肠道下段和粪便样品同样发现了较高比例的梭杆菌门细菌，推测这与其消化器官发育和营养功能作用密切相关 (Keenan et al. 2013)。本研究结果显示，梭杆菌门在虎斑颈槽肠道 3 个肠段都普遍存在，与以上这些食腐动物和肉食动物结果一致。之前的研究主要发现的是梭杆菌门的梭杆菌属，而在本研究中发现的却是梭杆菌门的鲸杆菌属在虎斑颈槽 3 个肠道部位中都丰度最高，尤其在泄殖腔中富集程度更高。鲸杆菌属在小须鲸有创伤的口腔中发现，为一种厌氧革兰氏阴性细菌，具有潜在的病理意义 (Foster et al. 2010)。在鱼类肠道内容物分离

培养出鲸杆菌属的细菌成员，研究发现细菌成员与维生素 B12 合成相关，能够进行葡萄糖发酵 (Tsuchiya et al. 2008)。由此证明，鲸杆菌属的成员对宿主的营养吸收、行为和健康状态有重要影响，但是对宿主作用的具体调控机制还需要深入研究。

本研究中发现了大量的有益菌，例如梭杆菌属、拟杆菌属和 *Akkermansia*。前两者主要存在于虎斑颈槽蛇的大肠和泄殖腔。在食鱼蝮和森林响尾蛇的研究中也发现这两属细菌 (Iii et al. 2008)。梭杆菌属为严格厌氧菌，能够分解蛋白质、代谢碳水化合物，产生丁酸 (McCoy et al. 2013)。拟杆菌属为专性厌氧，具有乳糖发酵和代谢碳水化合物等功能，同时参与多种代谢途径，使其对食草和食肉动物都很重要 (Turnbaugh et al. 2006)。*Akkermansia* 主要存在于虎斑颈槽蛇的小肠中，其为严格厌氧菌，能够以宿主黏液作为碳和氮的唯一来源，而且作为一种新型的有益细菌与肠道屏障有关联，与肥胖、糖尿病、心组织代谢疾病和低炎症相关 (Dao et al. 2016, Cani et al. 2017)。此外，*Akkermansia* 在缅甸蟒蛇禁食期间的肠道微生物中有报道，其与肌肉质量正相关，与肥胖和体重增加负相关 (Costello et al. 2010)。本研究还发现了大量潜在致病菌，例如柠檬酸杆菌属、明串珠菌属 (*Trichococcus*) 和丹毒丝菌属 (*Erysipelothrix*) 细菌。柠檬酸杆菌属主要存在于虎斑颈槽蛇的小肠和大肠，该菌群为兼性厌氧菌，对动物具有致病性，会引发肠炎 (Mundy et al. 2010)。明串珠菌属和丹毒丝菌属都在大肠和泄殖腔较为流行。明串珠菌属为兼性厌氧菌，发酵葡萄糖产酸产气，对万古霉素天然耐药，这种致病菌是引起人类感染的机会致病菌 (主要是菌血症) (王莉民等 2013)。丹毒丝菌属则寄生于哺乳动物、鸟类和鱼类，人类通过接触受感染或受污染的动物或动物产品而导致感染，出现皮肤病变和心内膜炎等 (Reboli et al. 1989)。

研究表明，微生物组成成分与食性密切相



关。双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 在爬行动物的消化道富集水平较高，而昆虫是爬行动物主要摄食对象，该种细菌普遍存在于昆虫体内，这种情况揭示了肠道微生物的组成与食物链密切相关 (Kopečný et al. 2010)。在对十多种巴西青蛙肠道微生物研究中发现，蝌蚪时期的肠道微生物多样性高于成年时期，组成成分存在明显差异，这可能是由于蝌蚪时期到成年青蛙时期，食性由杂食性转变为食肉性，这同样反映了食性对肠道微生物的重要影响 (Vences et al. 2016)。在食鱼蝮和虎斑颈槽蛇泄殖腔微生物组成的比较中发现显著性差异。食鱼蝮作为广食性蛇类，可捕食爬行动物、鸟类和无脊椎动物，但主要捕食两栖动物和鱼类，其肠道微生物中变形菌门的丰度比虎斑颈槽蛇更高，而且对食鱼蝮的研究发现其微生物组成成分与鸟类更相似，推断其食物链中鸟类对其肠道微生物的组成影响较大 (Colston et al. 2015)。虎斑颈槽蛇亦食性广，同样主要食物是两栖动物和鱼类，而且生活环境主要在河流、小溪、池塘、稻田等水域附近 (姜雅风 2002)，其与食鱼蝮出现显著差异的几个细菌门类都与水生环境相关 (Akins et al. 2018, Huang et al. 2019)，推测虎斑颈槽蛇肠道微生物组成受到所处的食物链位置或地理环境的影响。

本研究中微生物的丰富度和多样性在肠道不同区域并不存在显著差异，细菌门、属水平肠道不同部位的组成成分也不存在显著差异性，仅在丰度上存在变化。聚类分析中个体差异明显，但是泄殖腔的样本聚类情况较好。虎斑颈槽蛇肠道微生物的核心微生物组成成分与生存环境和食物链密切相关。与食鱼蝮泄殖腔数据的联合分析，可通过肠道微生物的差异明显将两者分开，这可为更广泛开展不同蛇类肠道微生物的比较分析提供理论借鉴依据。

## 参 考 文 献

- Akins L N, Ayayee P, Leff L G. 2018. Composition and diversity of cyanobacteria-associated and free-living bacterial communities during cyanobacterial blooms. *Annals of Microbiology*, 68: 493–503.
- Beaupre S J. 2002. *Biology of Vipers*. Utah: Eagle Mountain Publishing, 463–480.
- Cani P D, Vos W M D. 2017. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1765
- Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335–336.
- Colston T J, Noonan B P, Jackson C R. 2015. Phylogenetic analysis of bacterial communities in different regions of the gastrointestinal tract of *Agkistrodon piscivorus*, the Cottonmouth Snake. *PLoS One*, 10(6): e0128793.
- Costello E K, Gordon J I, Secor S M, et al. 2010. Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. *Isme Journal*, 4(11): 1375–1385.
- Dao M C, Everard A, Aron-Wisnewsky J, et al. 2016. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3): 426–436.
- Diaz-Heijtz R, Wang S, Anuar F, et al. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7): 3047–3052.
- Ezenwa V O, Gerardo N M, Inouye D W, et al. 2012. Animal behavior and the microbiome. *Science*, 338(6104): 198–199.
- Flint H J, Scott K P, Louis P, et al. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 9(10): 577–589.
- Foster G, Ross H M, Naylor R D, et al. 2010. *Cetobacterium ceti* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative obligate anaerobe from sea mammals. *Letters in Applied Microbiology*, 21(3): 202–206.
- Hong S W, Lee J S, Chung K S. 2011. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial community structure in the food, intestines, and feces of earthworms. *Journal of Microbiology*, 49(4): 544–550.
- Huang W, Chen X, Wang K, et al. 2019. Comparison among the microbial communities in the lake, lake wetland, and estuary sediments of a plain river network. *Microbiology Open*, 8(2):

- e00644.
- Iii J G H, Hanning I, Beaupre S J, et al. 2008. Denaturing gradient gel electrophoresis for the determination of bacterial species diversity in the gastrointestinal tracts of two crotaline snakes. *Herpetological Review*, 39(4): 433–438.
- Jho Y S, Park D H, Lee J H, et al. 2011. Aerobic bacteria from oral cavities and cloaca of snakes in a petting zoo. *Korean Journal of Veterinary Research*, 51(3): 243–247.
- Keenan S W, Engel A S, Elsey R M. 2013. The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses. *Scientific Reports*, 3(3): 2877.
- Kohl K D, Brun A, Magallanes M, et al. 2017. Gut microbial ecology of lizards: insights into diversity in the wild, effects of captivity, variation across gut regions, and transmission. *Molecular Ecology*, 26(4): 1175–1189.
- Kohl K D, Cary T L, Karasov W H, et al. 2013. Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6): 899–903.
- Kopečný J, Mrázek J, Killer J. 2010. The presence of bifidobacteria in social insects, fish and reptiles. *Folia Microbiologica*, 55(4): 336–339.
- Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883): 1647.
- McCoy A N, Araújo-pérez F, Azcárate-Peril A, et al. 2013. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One*, 8(1): e53653.
- McLaughlin R W, Cochran P A, Dowd S E. 2015. Metagenomic analysis of the gut microbiota of the Timber Rattlesnake, *Crotalus horridus*. *Molecular Biology Reports*, 42(7): 1187–1195.
- Mundy R, Macdonald T T, Dougan G. 2010. *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cellular Microbiology*, 7(12): 1697–1706.
- Reboli A C, Farrar W E. 1989. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(4): 354–359.
- Roggenbuck M, Bærholm S I, Blom N, et al. 2015. The microbiome of new world vultures. *Scientific Reports*, 5: 5498.
- Rooks M G, Garrett W S. 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6): 341–352.
- Rubinstein, M R, Wang X W, Liu W, et al. 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 14(2): 195–206.
- Saleem M. 2015. *Microbiom Community Ecology*. New York: Springer International Publishing, 89–113.
- Segata N, Izard J, Waldron L, et al. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6): R60.
- Sharon G, Segal D, Ringo J M, et al. 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46): 20051–20056.
- Sullam K E, Essinger S D, Lozupone C A, et al. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*, 21(13): 3363–3378.
- Suzuki T A, Nachman M W. 2016. Spatial heterogeneity of gut microbial composition along the gastrointestinal tract in natural populations of house mice. *PLoS One*, 11(9): e0163720.
- Tsuchiya C, Sakata T, Suqita H. 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1): 43–48.
- Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, et al. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122): 1027–1031.
- Vences M, Lyra M L, Kueneman J G, et al. 2016. Gut bacterial communities across tadpole ecomorphs in two diverse tropical anuran faunas. *Science of Nature*, 103(3/4): 25.
- Waite D W, Taylor M W. 2014. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology*, 5(4): 223.
- 姜雅风. 2002. 虎斑颈槽蛇行为的观察. *四川动物*, 21(1): 29–31.
- 时云朵, 孙豪. 2017. 黑眉锦蛇肠道菌群结构分析. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 43(3): 292–297.
- 王莉民, 楚文瑛. 2013. 6 株明串珠菌属细菌的分离鉴定. *国际检验医学杂志*, 34(13): 1775–1776.
- 赵尔宓. 1998. 中国动物志: 爬行纲 第三卷 有鳞目 蛇亚目. 北京: 科学出版社, 282–295.