

Doi: 10.3969/j.issn.2095-1787.20230153

杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛不同致死浓度对福寿螺肠道微生物群落特征的影响

王梓孚¹, 杨海君¹, 万自学¹, 黎 标^{2*}

¹湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; ²湖南中拓环境工程有限公司, 湖南 长沙 410128

摘要:【目的】探究杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛对福寿螺肠道微生物群落结构的影响,以及福寿螺肠道微生物对其的响应。【方法】以体长 25~30mm,健康、无损的福寿螺为研究对象,研究杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛 LC₂₅、LC₅₀处理下福寿螺(静水饥饿处理 96 h)的存活情况及活体福寿螺肠道微生物群落的结构变化。采用 Illumina Miseq 高通量测序技术对 14 个福寿螺肠道微生物样品进行了细菌 16S rRNA V3~V4 区域测序与分析。【结果】四聚乙醛 LC₂₅、LC₅₀处理组福寿螺实际死亡率分别高于理论死亡率 9.44%、12.22%,而杀螺胺乙醇胺盐 LC₂₅、LC₅₀处理下福寿螺(雄、雌)实际死亡率分别平均低于理论死亡率(降低 3.89%~4.44%)。2 种药剂处理后,肠道微生物多样性均被抑制,四聚乙醛组物种丰富度下降 25.2%~32.0%,显著高于杀螺胺组的 7.8%~15.7%。β 分析显示,杀螺胺乙醇胺盐处理下福寿螺肠道微生物细菌菌群差异较小,而四聚乙醛处理致菌群结构显著改变,克劳斯氏菌属丰度从 61.49%降至 7.78%~11.92%,拟杆菌属升至 21.46%~62.21%,且四聚乙醛 LC₂₅、LC₅₀处理后细菌菌群之间存在一定差异。【结论】四聚乙醛对福寿螺肠道菌群平衡的破坏大于杀螺胺乙醇胺盐,尤其是对维持肠道关键菌群平衡中的克劳斯氏菌属、乳球菌属、拟杆菌属。雌雄螺肠道微生物群落对杀螺胺乙醇胺盐与四聚乙醛的响应存在差异,相比雄螺,雌螺肠道中有益菌群的维持水平更高,耐受药剂的能力更强。雌雄福寿螺可以通过增强肠道微生物代谢或调节宿主免疫功能来缓解杀螺胺乙醇胺盐、四聚乙醛的胁迫。

关键词: 杀螺胺乙醇胺盐; 四聚乙醛; 致死浓度; 福寿螺; 肠道微生物; 高通量测序



开放科学标识码
(OSID 码)

Effects of different lethal concentrations of niclosamide ethanolamine salt and metaldehyde on the gut microbiota structure of *Pomacea canaliculata*

WANG Zifu¹, YANG Haijun¹, WAN Zixue¹, LI Biao^{2*}

¹College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

²Hunan Zhongtuo Environmental Engineering Co., Ltd, Changsha, Hunan 410128, China

Abstract: 【Aim】 To investigate the effects of two molluscicides, niclosamide ethanolamine salt and metaldehyde, on the gut microbiota structure of *Pomacea canaliculata*, and the responses of the gut microbiota. 【Method】 Healthy individuals of *P. canaliculata* with the body length of 25 mm to 30 mm were treated with niclosamide ethanolamine salt and metaldehyde at LC₂₅ and LC₅₀ and under static starvation conditions for 96 h. The survival rates and the structural changes of gut microbiota were analyzed. Illumina MiSeq high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA V3-V4 region was conducted for 14 gut samples of *P. canaliculata*. 【Result】 The actual mortality rates of *P. canaliculata* exposed to metaldehyde at LC₂₅ and LC₅₀ were 9.44% and 12.22%, respectively, higher than theoretical values. The actual mortality rates of *P. canaliculata* exposed to niclosamide ethanolamine salt at LC₂₅ and LC₅₀ were 3.89%-4.44% lower than the theoretical values. Both molluscicides decreased the gut microbiota diversity. Metaldehyde reduced the species richness by 25.2%-32.0%, which significantly exceeded the reduction (7.8%-15.7%) caused by niclosamide ethanolamine salt. The β-diversity analysis showed minor differences of the gut microbiota structure under niclosamide ethanolamine salt treatment. However, metaldehyde

收稿日期(Received): 2023-12-14 接受日期(Accepted): 2024-03-30

基金项目: 省市联合基金项目(2022JJ50247)

作者简介: 王梓孚, 男。研究方向: 生物信息学。E-mail: 1183708383@qq.com

* 通信作者(Author for correspondence), 黎标, E-mail: 2772976105@qq.com

drastically altered the gut microbiota structure, decreasing the relative abundance of *Cloacibacterium* from 61.49% to 7.78%-11.92% and increasing the relative abundance of *Bacteroides* to 21.46%-62.21%. Moreover, distinct gut microbiota variations were observed after treatments with metaldehyde at LC_{25} and LC_{50} . 【Conclusion】 Metaldehyde causes greater disruption to the gut microbiota balance of *P. canaliculata* than niclosamide ethanolamine salt, especially affecting key genera (*Cloacibacterium*, *Lactococcus*, and *Bacteroides*) involved in the balance. Gender-specific responses to the two molluscicides are observed. Female snails maintain higher levels of beneficial bacteria in the gut and stronger molluscicide tolerance than male snails. Both male and female *P. canaliculata* may alleviate molluscicide stress by enhancing gut microbiota metabolism or regulating host immune functions.

Key words: niclosamide ethanolamine salt; metaldehyde; lethal concentration; *Pomacea canaliculata*; gut microbiota; high-throughput sequencing

福寿螺 *Pomacea canaliculata* (Lamarck) 为严重危害我国农业生态系统和其他重要水域生态系统的入侵物种。在其暴发成灾区域易造成水稻 *Oryza sativa* L.、莲藕 *Nelumbo nucifera* Gaertn.、茭白 *Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. ex Stapf 等的减产与绝收。目前,人工拾螺、除卵、拦截、诱集、调水防控等控螺手段(储少媛等, 2018; 郭靖等, 2016; 刘军等, 2013; 张泽宏等, 2014; Wang *et al.*, 2012) 仅适用于面积小或水资源相对丰富的农田区域, 对于成片水田福寿螺的防控管理难以取得实效。基于物理手段控螺的不足, 研究者也探寻了养殖中华鳖 *Pelodiscus sinensis* (Wiegmann)、青鱼 *Mylopharyngodon piceus* (Richardson) 及养鸭等生物手段防控坑塘、沟渠及农田中的福寿螺, 但存在见效慢、难以落地的问题。故当前对福寿螺的防控仍以化学药剂为主, 常见药剂有杀螺胺乙醇胺盐(niclosamide ethanolamine salt, NES)、四聚乙醛(metaldehyde, MD)、阿维菌素(abamectin, ABM)及其复配药剂(陈晓娟等, 2013; 郭靖和章家恩, 2015; 贾道田, 2012; 任学祥等, 2018; 王昱莎等, 2014; 薛晶等, 2021)。其中, 杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛分别为苯甲酰胺类农药和有机醛类农药, 前者针对氧化磷酸化和无氧代谢的毒理机制表现出较强的非靶标毒性, 后者常用于工业杀菌, 这 2 种农药在使用过程中是否影响福寿螺肠道微生物的代谢功能、抗性及其生态学变化等方面尚未见报道(查晓宗等, 2012; 苏奕人等, 2020)。

本研究以杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛为供试药剂, 应用 Illumina MiSeq 平台, 结合生物信息学手段, 解析杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛处理下活体福寿螺肠道微生物群落结构和多样性的变化, 探究二者对肠道微生物群落结构的影响, 以及福寿螺肠道微生物对其的响应, 以期了解这 2 种典型药剂的杀螺机制, 为福寿螺的有效防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试福寿螺来源于长沙县黄花镇望江村成片水稻种植区上游沟渠($E113^{\circ}12'31.10''$, $N28^{\circ}17'29.04''$), 沟渠及其周围近一个月内未使用任何灭螺药剂。98%杀螺胺乙醇胺盐原药购自北京谨明生物科技有限公司, 98%四聚乙醛原药购自上海萨恩化学技术有限公司。新鲜生菜 *Lactuca sativa* var. *ramosa* Hort. 采自农户自种菜地, 未使用任何农药。试验过程中使用到解剖刀、解剖剪、解剖针、解剖盘、超净工作台等。

1.2 方法

1.2.1 福寿螺预处理 选取体长 25~30 mm, 健康、无损的福寿螺 630 只, 雌、雄性个体分别 315 只, 放入无氯超纯净水箱中室内饲养, 水深 25 cm, 每天喂食足量新鲜生菜, 室内养殖 7 d 待用。

1.2.2 试验设计与样品采集 药剂处理浓度分别设杀螺胺乙醇胺盐 LC_{25} (雄螺 $0.448 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 雌螺 $0.356 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 LC_{50} (雄螺 $0.699 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 雌螺 $0.581 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、四聚乙醛 LC_{25} (雄螺 $0.495 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 雌螺 $0.478 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 LC_{50} (雄螺 $0.587 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 雌螺 $0.723 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。用药前, 对室内养殖 7 d 后的福寿螺静水饥饿处理 24 h。试验分别设原始对照组 CK0、四聚乙醛对照组 CK96、四聚乙醛处理组 SJ25、SJ50、杀螺胺乙醇胺盐对照组 CKY96、杀螺胺乙醇胺盐处理组 SL25、SL50 7 个大组, 每个大组处理分别设雌、雄螺 2 个小组(分别在组名前加上 F/M 来代表雌/雄螺), 每小组分别投放雌、雄螺各 15 只, 每组处理设 3 个重复(福寿螺体长和体重基本一致), 每个处理超纯水或药液体积为 3000 mL。其中, 四聚乙醛对照组以超纯水饲养处理, 杀螺胺乙醇胺盐对照组以 1 : 600 乙醇兑超纯水饲养处

理,四聚乙醛 LC₂₅、LC₅₀组均以超纯水为溶液配置药液,杀螺胺乙醇胺盐 LC₂₅、LC₅₀组均以乙醇为溶剂,按 1 : 600 比例兑超纯水配置药液,静水饥饿处理 96 h,期间不喂食任何食物,每间隔 12 h 清除试验过程中死亡的福寿螺。除 CK0 为 0 h 取样,96 h 后从每组每个重复中分别取 1 只存活的福寿螺进行肠道样品采集(薛晶等,2021),每 3 只为一个样品。

1.2.3 肠道微生物 16S rRNA 测序 样品委托中国上海生工科技有限公司测序,使用 Illumina Miseq 高通量测序技术对原始对照组、对照组及药剂处理组的 14 个福寿螺肠道微生物样品进行细菌 16S rRNA V3~V4 区域测序。用 PEAR (version 0.9.8) 软件将 2 个短 Illumina 读数按照 overlap 进行拼接,并对 fastq 文件进行处理,生成单独的 fasta 和 qual 文件,然后用标准方法进行分析。使用 Usearch (version 11.0.667) 软件将有效标签聚类成≥97% 相似性的操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU),去除嵌合体序列和单一 OTUs,剩余序列根据 OTUs 排序到每个样品中。在每个簇内选择丰度最高的标签序列作为代表序列。将细菌 OTU 代表序列与 RDP 数据库进行比对后开展生物学分类。

1.3 统计分析

使用 SPSS 26 软件进行数据分析。采用邓肯氏新复极差值 (Duncan's, DMRT) 和最小显著差法 (least significant range, LSR) 比较各处理间的显著性差异。 α -多样性指数 (包括 Chao1、Simpson 和 Shannon 指数) 以 OTU 丰富度进行量化。对观察到的 OTU 数目构建稀释曲线,评估样本的充足性。所有 α 多样性指数均使用 Mothur (version 3.8.31) 软件计算。在 R (version 3.6.0) 中绘制 OTU 稀释曲线和等级丰度曲线。通过 *T* 检验计算样品内 α 多样性,并进行多组比较。利用 PICRUST (v1.1.4) 软件将已有的 16S rRNA 基因测序数据与已知代谢功能的微生物参考基因组数据库进行比对,对细菌和古菌进行功能预测分析。

2 结果与分析

2.1 药剂处理下福寿螺的死亡率

药剂处理下福寿螺的死亡率与实际死亡率见图 1。四聚乙醛 LC₂₅、LC₅₀处理下福寿螺(雄、雌)死亡率分别高于高于理论死亡率(25%、50%) (李幼

子等,2012)9.44%、12.22%;杀螺胺乙醇胺盐 LC₂₅、LC₅₀处理下福寿螺(雄、雌)实际死亡率分别低于理论死亡率 3.89%、4.44%。

2.2 样品测序结果

各处理组肠道微生物样品测序后得到 14 个样本序列数据,共得到原始序列 737152 条,经拼接、质控后得到有效序列 725872 条,平均序列长度为 424 bp。由图 2 可知,随着福寿螺肠道微生物测序数量的增加,稀释曲线斜率均降低,曲线趋向平坦,说明测序数据量较为合理。

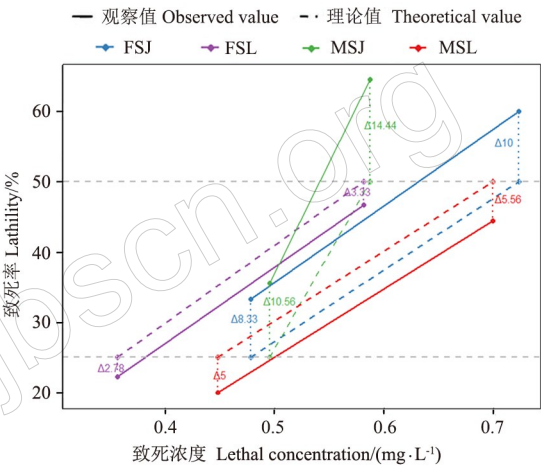


图 1 药剂处理 96 h 福寿螺的死亡率
Fig.1 Mortality rate of *P. canaliculata* after 96 hours of chemical treatments
Δ: 观察值与理论值的差值。

Δ: Difference between the observed value and the theoretical value.

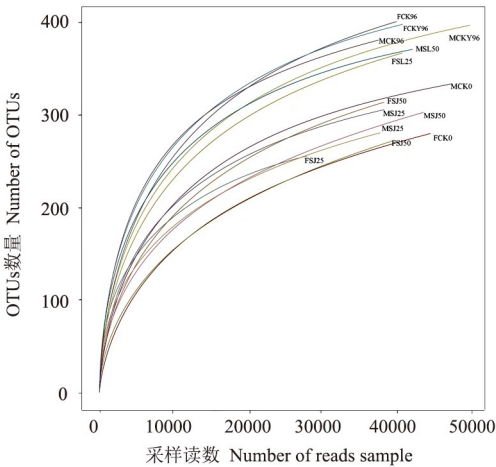


图 2 各处理中福寿螺肠道微生物样品稀释曲线
Fig.2 Dilution curve of intestinal microbial samples of *P. canaliculata* in each treatment

2.3 肠道微生物群落多样性和丰富度分析

2.3.1 α 多样性指数组间差异分析 由图 3 可知,经过 96 h 的超纯水中饲养,2 个药剂对照组的福寿

螺肠道微生物群落整体丰富度均高于原始对照组,四聚乙醛处理组和杀螺胺乙醇胺盐处理组的肠道微生物群落整体丰富度均显著低于药剂对照组($P<0.05$)。由图 4 可知,与原始对照组相比,四聚乙醛对照和杀螺胺乙醇胺盐对照肠道微生物的丰富度和多样性均上升;四聚乙醛对照与杀螺胺乙醇胺盐对照之间的肠道微生物丰富度、多样性基本一致;四聚乙醛、杀螺胺乙醇胺盐各浓度处理组与各自对照组相比,丰富度和多样性均降低,但差异不显著。

2.3.2 α 多样性分析 采用主坐标(PCoA)分析确

定四聚乙醛、杀螺胺乙醇胺盐不同处理小组间活体福寿螺肠道微生物群落的差异,结果显示,第一主成分累积方差占总方差的 62%,第二主成分则占 15%,共解释了 77%的数据差异(图 5)。根据 PERMANOVA 分析,不同药剂处理下的福寿螺肠道微生物菌群存在差异($R^2 = 0.577, p<0.01$),与对照组(CK)相比,杀螺胺乙醇胺盐处理下细菌菌群差异较小,而四聚乙醛处理下细菌菌群差异较大,且四聚乙醛 LC_{25} 、 LC_{50} 致死浓度处理组的雌、雄螺细菌菌群之间也存在一定差异。

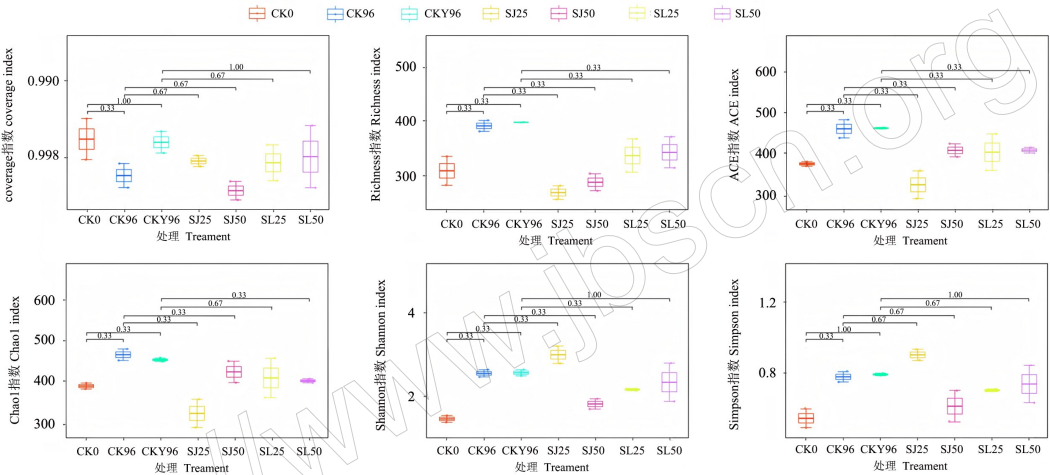


图 3 α 多样性指数的分组箱线图(浓度处理)
Fig.3 The box plot of α diversity index (concentration treatment)

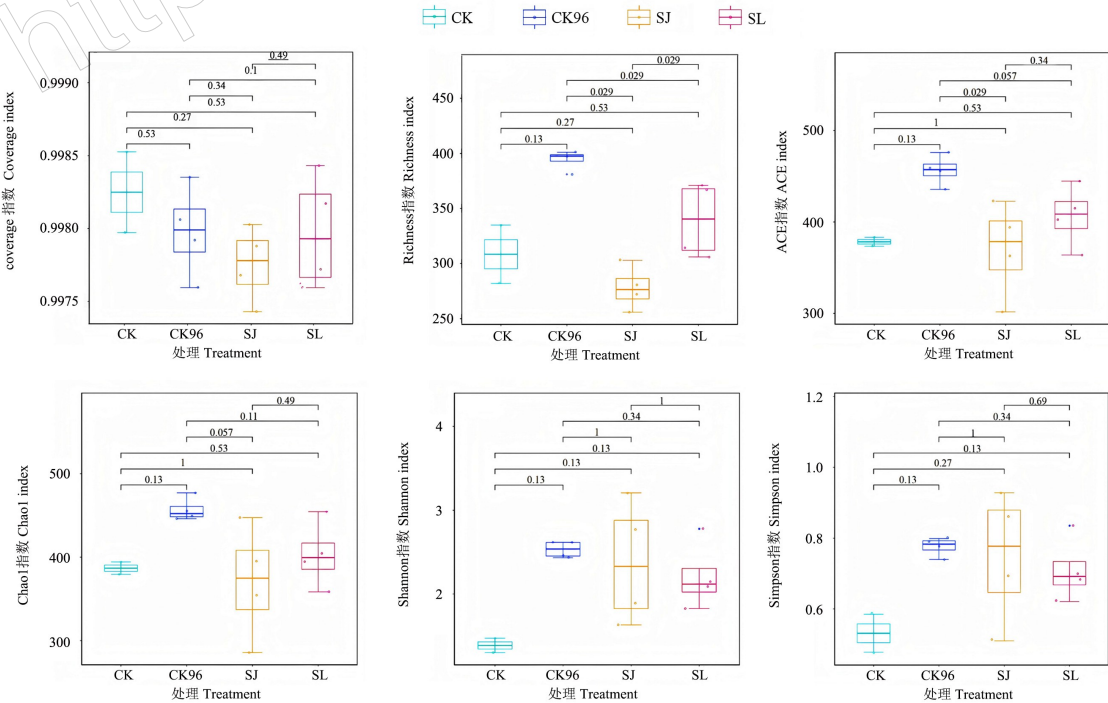


图 4 α 多样性指数的分组箱线图(药剂处理)
Fig.4 The box plot of α diversity index (chemical treatment)

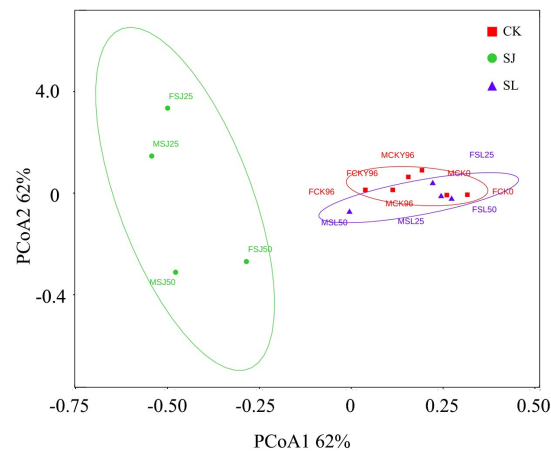


图 5 福寿螺肠道微生物菌群 PCoA 分析

Fig.5 PCoA analysis of the intestinal microbial community of *P. canaliculata*

2.4 肠道微生物群落结构分析

2.4.1 群落差异分析 由图 6A 可知,14 个处理组共有 OTUs 为 97,其中雌螺四聚乙醛对照组(FCK96)中肠道微生物 OTUs 最多(401),其余 3 个药剂对照组(MCK96、MCKY96、FCKY96) OTUs 均处于较高水平,杀螺胺乙醇胺盐处理组(FSL25、FSL50、MSL25、MSL50)的 OTUs 次之,四聚乙醛处理组(FSJ25、FSJ50、MSJ25、MSJ50)的 OTUs 最低。

由图 6B 可知,相比原始对照组(FCK0),雌螺药剂对照组(FCK96、FCKY96)和药剂处理组(FSJ25、FSJ50、FSL25、FSL50)特征 OTUs 均增加,其中药剂对照组 OTUs 增加数均多于 2 种药剂处理组;四聚乙醛处理组(FSJ25、FSJ50) OTUs 增加数多于杀螺胺乙醇胺盐处理组(FSL25、FSL50),LC₂₅处理组(FSJ25、FSL25) OTUs 增加数多于 LC₅₀处理组(FSL50、FSJ50)。

由图 6C 可知,相比原始对照组(MCK0),雄螺各药剂对照组(MCK96、MCKY96)和药剂处理组(MSJ25、MSJ50、MSL25、MSL50)特征 OTUs 均有增加,但处理组之间特征 OTUs 数增加幅度不大。

据各处理组雌、雄螺肠道微生物数据合并后绘制成韦恩图(图 6D),7 个处理大组(CK0、CK96、CKY96、SJ25、SJ50、SL25、SL50)共有物种 116 种,其中,原始对照组(CK0)、四聚乙醛对照组(CK96)、杀螺胺乙醇胺盐 LC₅₀组(SL50)、四聚乙醛 LC₅₀组(SL50)的样本中均仅增加了 1 组特征 OTU,表明在药剂处理下,福寿螺肠道微生物仅在原有种群的基础上发生变化。

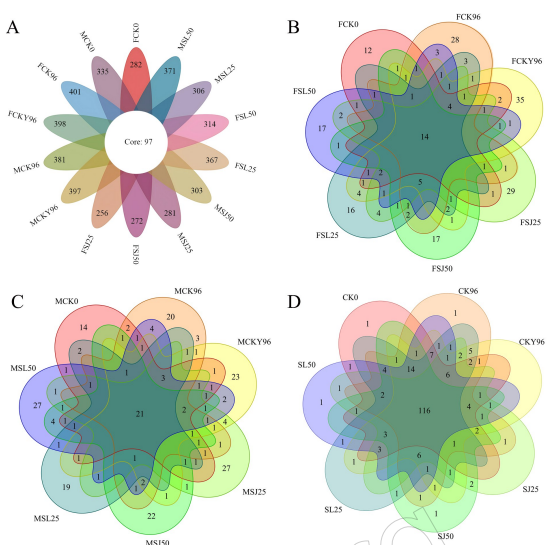


图 6 各处理花瓣图(A)、雌、雄螺处理组韦恩图(B、C)及浓度处理组韦恩图(D)

Fig.6 Petal diagrams for each treatment group (A), Venn diagrams comparing female and male treatment groups (B, C), and Venn diagrams for different concentration treatment groups (D)

2.4.2 群落组成分析 物种注释结果显示,在本次检测中,14 个样品所属细菌归为 19 个门、39 个纲、63 个目、110 个科、203 个属,各处理组微生物群落在门和属水平的丰度占比分别见图 7、8。基于门水平的微生物菌群结构分析结果显示,原始对照组(CK0)福寿螺肠道微生物菌群中优势菌为拟杆菌门 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes 和变形菌门 Proteobacteria,所占比例分别为 66.62%、25.39% 和 5.77%;四聚乙醛对照组(CK96)样品中变形菌门增至 17.24%,厚壁菌门降至 4.77%,梭杆菌门 Fusobacteria 取代厚壁菌门成为优势菌门(7.08%);杀螺胺乙醇胺盐对照组(CKY96)样品中变形菌门占比增至 15.88%,厚壁菌门占比降至 19.98%;四聚乙醛 LC₂₅组中,拟杆菌门占比大幅降低(42.84%),未知菌门增至 32.55%,厚壁菌门降至 0.69%;四聚乙醛 LC₅₀组(SJ50)中拟杆菌门占比增至 76.92%,与四聚乙醛对照组(CK96)相比,变形菌门降至 7.88%,厚壁菌门增至 5.87%,其中厚壁菌门丰度占比略低于未知菌门(7.72%);杀螺胺乙醇胺盐 LC₂₅(SL25)和 LC₅₀处理组(SL50)均以拟杆菌门(58.67%、65.40%)、变形菌门(19.47%、18.12%)和厚壁菌门(15.97%、11.83%)为优势菌门,SL25 处理组中拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门与杀螺胺乙醇胺盐对照组(CKY96)菌门变化无显著差异。

基于属水平的微生物菌群结构分析结果显示,原始对照组(CK0)福寿螺肠道微生物群落中克劳斯氏菌属 *Cloacibacterium* 丰度最高(61.49%),其次为乳球菌属 *Lactococcus* (25.02%)。在四聚乙醛相关处理组(CK96、SJ25、SJ50),CK96 中克劳斯氏菌属仍为丰度最高的属,但占比降至 44.84%;拟杆菌属 *Bacteroides* 则升至第二优势属(15.85%)。四聚乙醛 LC₂₅(SJ25)和 LC₅₀(SJ50)处理组的肠道微生物组成则发生了较大变化,克劳斯氏菌属大幅降低(分别降至 7.78%和 11.92%);拟杆菌属则分别升至 21.46%和 62.21%,未分类细菌属丰度显著增(分别升至 32.55%和 7.72%)。其他未分类至属的丰祐菌纲 unclassified_Opitutae、拟杆菌纲 unclassified_Porphryomonadaceae、变形菌纲 unclassified_Gamma-proteobacteria 等丰度也均有增加,该变化可能与四聚乙醛处理组中福寿螺肠道受损腐烂而出现更多未知菌属有关。在杀螺胺乙醇胺盐相关处理组(CKY96、SL25、SL50)中,CKY96 中克劳斯氏菌属仍为丰度最高的属,占比降至 41.68%,乳球菌属丰度仍处于第二,占比降至 19.54%,拟杆菌属相对丰度排第三,占比升至 6.33%。与杀螺胺乙醇胺盐对照组相比,杀螺胺四聚乙醛 LC₂₅(SL25)处理组中福寿螺肠道微生物克劳斯氏菌属丰度上升,拟杆菌属和乳球菌属丰度均下降,分别降至 4.10%和 15.56%,在 LC₅₀(SL50)处理组,拟杆菌属丰度则升至 11.14%,乳球菌属丰度降至 11.28%。

各处理组中 2 种药剂不同浓度影响雌、雄福寿螺肠道微生物群落的组成和变化。在四聚乙醛处理组(SJ25、SJ50)中,雌、雄螺肠道微生物群落组成和变化的差异主要表现在克劳斯氏菌属的变化幅度上。相比 MCK96(克劳斯氏菌占比 48.41%),MSJ25 和 MSJ50 中克劳斯氏菌属分别降至 4.47%和 5.47%,而 FSJ25 和 FSJ50 中克劳斯氏菌属的占比则从 FCK96 中的 41.26% 分别降至 11.07%和 18.37%,可以看出,雌螺处理小组中克劳斯氏菌属的丰度占比降幅较小。在杀螺胺乙醇胺盐处理组(SL25、SL50)中,雌、雄福寿螺肠道微生物群落的差异较四聚乙醛处理组更加明显,主要表现在 LC₅₀处理组中。克劳斯氏菌属在 MSL50 中表现为下降,从 MCKY96 中的 42.62%降至 34.43%,但 FSL50 中该菌的占比相比 FCKY96(占 40.73%)却大幅上升(59.42%)。其次是 MSL50 中的拟杆菌属,相比

MCKY96 中的 5.71%升至 19.78%,而 FSL50 中拟杆菌属则从 FCKY96 中的 6.95%下降至 2.51%。这种区别可能在一定程度上反映了不同性别福寿螺对药剂抗胁迫能力的差异。

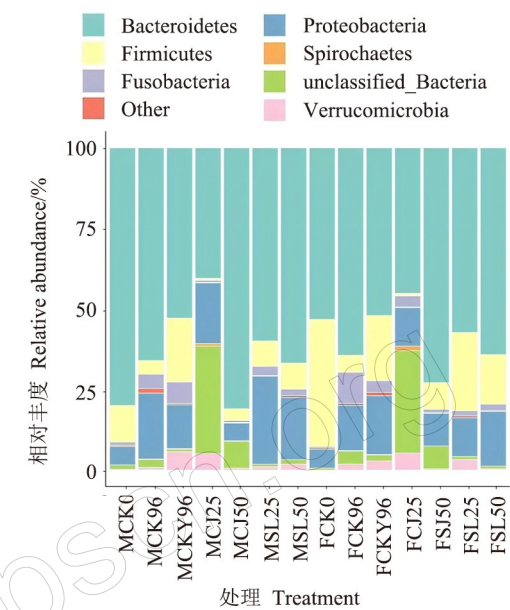


图 7 各处理福寿螺肠道微生物门相对丰度变化
Fig.7 Changes in the relative abundance of intestinal microflora in each treatment at phylum level

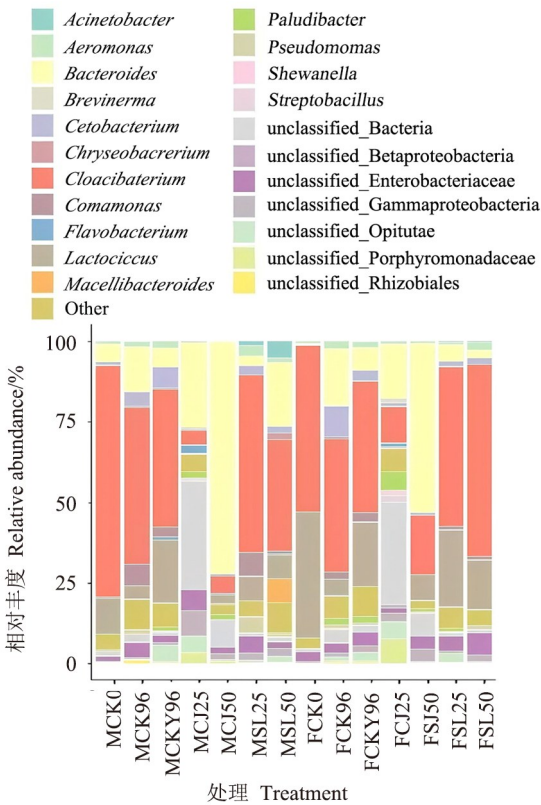


图 8 各处理福寿螺肠道微生物属相对丰度变化
Fig.8 Changes in the relative abundance of intestinal microflora in each treatment at genus level

2.4.3 差异菌分析 线性判别 (linear discriminant analysis, LDA) 分析从门到属所有水平下原始对照组 (CK0)、药剂对照组 (CK96)、杀螺胺乙醇胺盐处理组 (SL) 和四聚乙醛处理组 (SJ) 的所有结果, 默认取 Score (log10 水平下) >4 的微生物种群, 得到图 9。原始对照组 (CK0) 含量较高的细菌主要集中在黄杆菌纲 *Flavobacteriia*、克劳斯氏菌属; 药剂对照组 (CK96) 含量较高的细菌群落主要集中在梭杆菌门 *Fusobacteria*、 β -变形菌纲 *Betaproteobacteria*、伯克氏菌目 *Burkholderiales*、丛毛单胞菌科 *Comamonadaceae*、*Blastocatella*、色杆菌科 *Chitinilyticum*、丛毛单胞菌属 *Comamonas*、鲸杆菌属 *Cetobacterium*; 四聚乙醛处理组 (SJ) 含量较高的细菌主要集中在未明确分类的 γ -变形菌门 *unclassified_Gammaproteobacteria*、拟杆菌纲 *Bacteroidia*、未明确分类的紫单胞菌科 *unclassified_Porphyrionadaceae* 和 *Terrimonas* 等; 杀螺胺乙醇胺盐处理组 (SL) 含量较高的细菌主要集中在莫拉菌科 *Moraxellaceae*、假单胞菌属 *Pseudomonadales*、不动杆菌属 *Acinetobacter*。

2.5 肠道菌群功能预测分析

根据 COG 数据库对所有组别福寿螺肠道微生物进行功能预测 (图 10), 结果表明, 在原始对照组

(CK0) 中, 福寿螺肠道微生物的主要功能集中在调控基因的转录、信号转导组分和反应调节蛋白、营养物质的摄取和转运、参与代谢和降解反应以及 DNA 分子的重组和转移等方面。在 2 个药剂对照组 (CK96 和 CKY96) 中, 主要功能与原始对照组功能类似, 区别在于代谢增强, 感受环境信号并在细胞内传递信号以调节细胞的生理过程的功能丰度上升。在四聚乙醛 LC_{25} 处理组 (FSJ25 和 MSJ25) 与 LC_{50} 处理组 (FSJ50 和 MSJ50) 中, 与代谢相关的蛋白和酶增多, 例如铁载体蛋白、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -木糖苷酶、脱氢酶等, 意味着对铁离子、多糖类物质、木质素和纤维素等的代谢作用增强, 以 Na^+ 驱动的多重药物外排泵作用机制也逐渐增强, 而该机制与增强细菌的耐药性和药物代谢有关 (徐宁等, 2015)。在杀螺胺乙醇胺盐 LC_{25} 处理组 (FSL25 和 MSL25) 和 LC_{50} 处理组 (FSL50 和 MSL50) 中, 与信号传导机制、无机离子转运和代谢、细胞运动等相关的功能丰度高于对照组 (CKY96), 而脂质转运和代谢、能源生产和转换等相关功能丰度低于对照组 (CKY96), 且多重耐药外排泵机制则使生物体对毒性物质等化合物产生抗性等功能也逐渐增强, 该功能对生物体的保护具有重要作用。

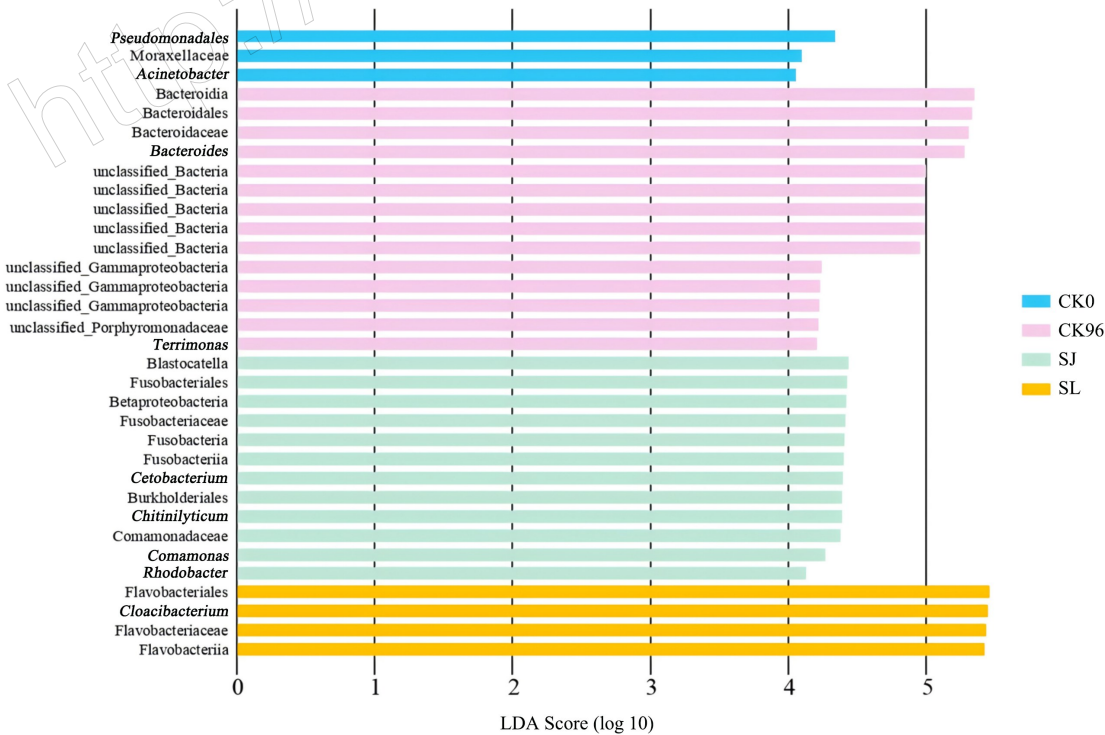


图 9 不同处理组差异菌种的 LDA 分析

Fig.9 The LDA analysis of different strains in different treatment

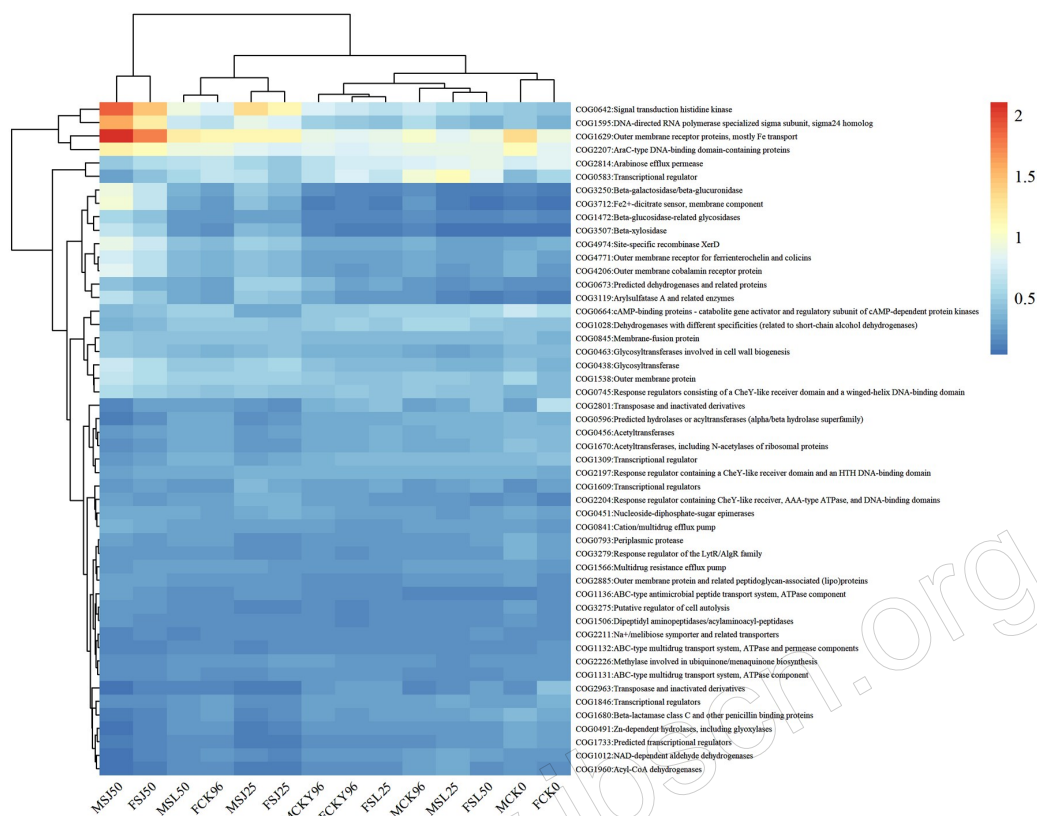


图 10 COG 功能丰度热图
Fig.10 Heat map of COG functional abundance

3 讨论

肠道微生物是一个由不同种类微生物组成的多元群体,具有多样复杂的功能,如辅助宿主代谢、增强宿主免疫和抗逆能力等 (Marchesi *et al.*, 2016)。目前普遍认为,生物的肠道菌群丰富度和多样性越高,菌群的稳定性越好,抗胁迫能力越强 (王晨赫等,2020)。福寿螺作为一种外来入侵水生动物,其多样性的肠道微生物群落有效提升了其对复杂环境的适应能力 (刘川等,2022; 郁维娜等, 2018; Huang *et al.*, 2020)。本研究中,经过杀螺胺乙醇胺盐和四聚乙醛处理后,福寿螺肠道微生物的丰富度均明显下降,其中四聚乙醛处理组下降尤为明显,表明药剂处理在一定程度上对福寿螺肠道微生物种群数量产生了抑制作用。这种抑制作用基于四聚乙醛引发软体动物体内大量释放乙酰胆碱酯酶 (吴昌寿等,1996)。大量的乙酰胆碱酯酶在乙酰胆碱接触突出后膜前便将其水解为乙酸和胆碱,使福寿螺在遭受病理性微生物种侵害时无法及时 进行调节肠道平衡,且无法合成抗生素进行抵御,致使肠道环境被破坏,严重损害肠道菌群结构。而杀螺胺乙醇胺盐的灭螺机理不同,其通过破坏福寿

螺氧化磷酸化和无氧代谢阻碍糖的摄取及代谢而降低呼吸作用,但是肠道本身处于厌氧环境,且福寿螺呼吸被抑制并不会过分改变肠道环境,所以四聚乙醛对福寿螺肠道微生物的种群数量、结构影响大于杀螺胺乙醇胺盐。

福寿螺肠道微生物群落和结构的差异变化可以更清晰地反映福寿螺在接受药剂处理后的应激能力。本研究中,拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门是福寿螺肠道微生物中典型的优势菌门,与 Chen *et al.* (2021)报道一致。在其他生物的肠道微生物研究中,上述三大门类的微生物被认为具有辅助宿主进行降解代谢、合成营养元素、增强免疫等功能,但也存在导致肠道炎症等病理性微生物种的风险 (Arthur *et al.*, 2012; Shreiner *et al.*, 2015)。克劳斯氏菌属、乳球菌属和拟杆菌属则是各处理组中丰度变化最大的 3 个属,其中克劳斯氏菌属在参与调节肠道菌群的平衡和代谢物的合成过程中具有重要作用,其数量增加可减少炎症反应 (Marchesi *et al.*, 2016);乳球菌属通过调节免疫反应、产生抗菌素、抑制有害菌的生长等方式发挥益生作用 (杨求华, 2022);而拟杆菌属的种类和数量在一定程度上反

映代谢功能的变化,其改变与多种疾病的发生和发展密切相关(Wu *et al.*, 2011)。

结合各处理组中的核心菌群分析和功能预测结果,原始对照组中含量较高的细菌主要集中在黄杆菌纲和克劳斯氏菌属,是因为黄杆菌纲和克劳斯氏菌属微生物主要参与肠道食物吸收代谢和生态平衡的调节,且黄杆菌在自然水体中也广泛存在,水体微生物群落的本来状态可能一定程度上促成了肠道微生物群落的形成(Bai *et al.*, 2012; Ley *et al.*, 2006);药剂对照组中含量较高的细菌主要集中在梭杆菌门、 β -变形菌纲、色杆菌科、伯克氏菌目、丛毛单胞菌科、丛毛单胞菌属、鲸杆菌属等具备辅助代谢和营养吸收功能的菌群(Qin *et al.*, 2010),增强了福寿螺在饥饿条件下的代谢能力;四聚乙醛处理组中含量较高的细菌主要集中在未分类的 γ -变形菌门、拟杆菌纲、Terrimonas 及其他一些未分类紫单胞菌科细菌,这些细菌群落中通常包括一些常见的致病菌,可能具备一定的代谢功能,可能是四聚乙醛破坏了福寿螺原有的肠道微生物群落平衡或直接造成肠道损伤,一方面造成原有有益菌群落的丰度下降,另一方面又促进参与降解代谢相关的细菌增加(Fuentes *et al.*, 2014; Sommer & Bäckhed, 2013; Wu *et al.*, 2011)。杀螺胺乙醇胺盐处理组中含量较高的细菌主要集中在莫拉菌科、假单胞菌属和不动杆菌属,这些种群中的细菌群落能通过增强代谢、调节肠道黏液及调节肠道环境 pH 值等措施抑制肠道炎症反应,从而影响和参与宿主肠道物质的代谢和免疫调节(Chen *et al.*, 2020; Chiu *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018),与杀螺胺乙醇胺盐处理组中微生物群落的功能预测相一致。

从不同药剂处理下福寿螺肠道微生物组成的结果来看,四聚乙醛处理组中(SJ25、SJ50)肠道微生物组成变化较大,表现在厚壁菌门、克劳斯氏菌属和乳球菌属占比明显下降,拟杆菌属和未分类细菌丰度升高。杀螺胺乙醇胺盐处理组(SL25、SL50)中克劳斯氏菌属丰度明显升高,乳球菌属丰度下降,拟杆菌属丰度变化不明显。这种差异可能与药物本身的特性有关,杀螺胺乙醇胺盐的杀螺活性是通过抑制线粒体氧化磷酸化和 ATP 产生来介导的,对 NADH 向 NAD⁺的转化的过程也存在影响,这 2 个过程均为有氧呼吸,而肠道微生物多数为厌氧菌,对有氧过程的抑制作用表现不敏感,因此杀螺

胺乙醇胺盐对肠道微生物影响不显著(Andrews *et al.*, 1982; Park, 2006)。最后,从性别角度来看,雌、雄福寿螺肠道微生物群落结构存在差异。原始对照组雌螺处理小组肠道微生物中厚壁菌门及其下属乳球菌属的丰度占比相对于雄螺更高,由于厚壁菌门在肠道中主要发挥增强消化和抗菌作用的作用,在四聚乙醛处理后的雌螺肠道菌群中克劳斯氏菌属丰度下降幅度低于雄螺中该菌属的下降幅度;而克劳斯氏菌属和拟杆菌属在杀螺胺乙醇胺盐 LC₅₀处理组(SL50)的雌、雄螺肠道菌群中的丰度变化情况相反,这可能是雌螺抗逆性强于雄螺的原因之一(李淑贤等, 2022; Ley *et al.*, 2006)。

参考文献

- 陈晓娟, 何忠全, 郎冬梅, 汪世元, 毛建辉, 何树林, 2013. 四川稻田福寿螺的发生与防控. 植物保护, 39(2): 188-191.
- 储少媛, 章家恩, 郭靖, 陈昊, 谭熠华, 2018. 不同插秧方式诱集稻田福寿螺产卵的效应. 华南农业大学学报, 39(5): 39-46.
- 郭靖, 章家恩, 2015. 福寿螺的生物防治现状、问题与对策. 生态学杂志, 34(10): 2943-2950.
- 郭靖, 章家恩, 张春霞, 项瑶, 2016. 利用稻田养萍诱集控制福寿螺危害的效应研究. 生态科学, 35(5): 8-14.
- 贾道田, 2012. 三种药剂对福寿螺生长发育繁殖影响的研究. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学.
- 李淑贤, 林英, 祁雯, 陈燊, 李雪霞, 朱善良, 卫蔚, 李宏, 陈炼, 2022. 斑点福寿螺肠道菌群结构及功能研究. 南京师大学报(自然科学版), 45(1): 64-73.
- 李幼子, 邢云天, 李洪军, 曲国立, 汪伟, 魏剑英, 梁幼生, 戴建荣, 2012. 杀螺剂室内筛选实验方法标准化的研究 IV 不同月份钉螺对氯硝柳胺乙醇胺盐可湿性粉剂的敏感性. 中国血吸虫病防治杂志, 24(1): 35-39.
- 刘军, 谭济才, 钟浪, 王志高, 2013. 几种农业防控稻田福寿螺措施的效果评价. 浙江农业学报, 25(6): 1321-1325.
- 刘川, 万自学, 喻夜兰, 杨海君, 2022. 福寿螺肠道微生物群落特征与其入侵关系的研究进展. 湖南农业科学(9): 99-104.
- 任学祥, 王士梅, 苏贤岩, 白一松, 杨联松, 张爱芳, 叶正和, 陈超, 2018. 甲维盐和四聚乙醛复配对福寿螺的联合毒力测定. 农药, 57(11): 855-856, 858.
- 王晨赫, 周彦锋, 方弟安, 张希昭, 张丽, 刘剑羽, 郑泽, 尤洋, 2019. 饥饿与重摄食对河蟹肠道菌群结构的影响. 水生生物学报, 43(4): 748-756.
- 王昱莎, 梁立成, 覃荣乐, ABID ALI, 贾道田, 贤振华,

2014. 影响杀螺胺乙醇胺盐药效的因素及使用技术. 农药, 53(5): 369–371.
- 吴昌寿, 刘官陵, 刘心胜, 1996. 四聚乙醛及杀虫丁杀螺筒介. 寄生虫病防治与研究, 25(3): 165.
- 徐宁, 程海娇, 刘清岱, 刘君, 马延和, 2015. 细菌 NA^+/H^+ 逆向转运蛋白的研究进展. 微生物学通报, 42(10): 2002–2011.
- 薛晶, 赵丽娅, 樊丹, 冯海平, 李兆华, 2021. 不同灭螺药剂对福寿螺的药效实验. 湖北大学学报(自然科学版), 43(3): 254–257, 270.
- 杨求华, 2022. 乳酸乳球菌 XP-15 对仿刺参生长、免疫及肠道菌群结构的影响. 应用海洋学学报, 41(3): 407–413.
- 郁维娜, 戴文芳, 陶震, 熊金波, 2018. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究. 水产学报, 42(3): 399–409.
- ANDREWS P, THYSSEN J, LORKE D, 1982. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacology & Therapeutics*, 19(2): 245–295.
- ARTHUR J C, PEREZ-CHANONA E, MÜHLBAUER M, TOMKOVICH S, URONIS J M, FAN T J, CAMPBELL B J, ABUJAMEL T, DOGAN B, ROGERS A B, RHODES J M, STINTZI A, SIMPSON K W, HANSEN J J, KEKU T O, FODOR A A, JOBIN C, 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*, 338: 120–123.
- BAI Y, SHI Q, WEN D, LI Z, JEFFERSON W A, FENG C, TANG X, 2012. Bacterial communities in the sediments of Dianchi Lake, a partitioned eutrophic waterbody in China. *PLoS ONE*, 7(5): e37796.
- CHEN L, LI S, XIAO Q, LIN Y, LI X, QU Y, WU G, LI H, 2021. Composition and diversity of gut microbiota in *Pomacea canaliculata* in sexes and between developmental stages. *BMC Microbiology*, 21(1): 200.
- CHEN W, ZHANG S, WU J, YE T, WANG S, WANG P, XING D, 2020. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 507: 236–241.
- CHIU C M, HUANG W C, WENG S L, TSENG H C, LIANG C, WANG W C, YANG T, YANG T L, WENG C T, CHANG T H, HUANG H D, 2014. Systematic analysis of the association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics approaches. *BioMed Research International*, 2014: 906168.
- FUENTES S, VAN NOOD E, TIMS S, HEIKAMP-DE JONG I, TER BRAAK C J, KELLER J J, ZOETENDAL E G, DE VOSWM, 2014. Reset of a critically disturbed microbial ecosystem: faecal transplant in recurrent *Clostridium difficile* infection. *The ISME Journal*, 8(8): 1621–1633.
- HUANG Q, SHAM R C, DENG Y, MAO Y, WANG C, ZHANG T, LEUNG K M Y, 2020. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors. *Molecular Ecology*, 29(24): 5019–5034.
- LEE H, LEE Y, KIM J, AN J, LEE S, KONG H, SONG Y, LEE C K, KIM K, 2018. Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes*, 9(2): 155–165.
- LEY R E, PETERSON D A, GORDON J I, 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4): 837–848.
- MARCHESI J R, ADAMS D H, FAVA F, HERMES G D, HIRSCHFIELD G M, HOLD G, QURAIISHI M N, KINROSS J, SMIDT H, TUOHY K M, THOMAS L V, ZOETENDAL E G, HART A, 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2): 330–339.
- PARK J, 2006. A new stability analysis of delayed cellular neural networks. *Applied Mathematics and Computation*, 181: 200–205.
- QIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF K S, MANICHANH C, NIELSEN T, PONS N, LEVENEZ F, YAMADA T, MENDE D R, LI J, XU J, LI S, LI D, CAO J, WANG B, LIANG H, ZHENG H, XIE Y, WANG J, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59–65.
- SHREINER A B, KAO J Y, YOUNG V B, 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1): 69–75.
- SOMMER F, BÄCKHED F, 2013. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4): 227–238.
- WANG Z G, TAN J C, TAN L, LIU J, 2012. Control the egg hatchling process of *Pomacea canaliculata* (Lamarck) by water spraying and submersion. *Acta Ecologica Sinica*, 32(4): 184–188.
- WU G D, CHEN J, HOFFMANN C, BITTINGER K, CHEN Y Y, KEILBAUGH S A, BEWTRA M, KNIGHTS D, WALTERS W A, KNIGHT R, SINHA R, GILROY E, GUPTA K, BALDASSANO R, NESSEL L, LI H, BUSHMAN F D, LEWIS J D, 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334: 105–108.