锡林郭勒牧场人畜肠道微生物及土壤微生物多样性的比较分析

王佼, 王彦杰, 侯强川, 徐海燕, 孙志宏, 张和平, 孙天松*

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 农业农村部奶制品加工重点实验室, 呼和浩特 010018

* 联系人, E-mail: sts9940@sina.com

2018-08-14 收稿, 2018-10-19 修回, 2018-10-23 接受, 2018-12-25 网络版发表

国家自然科学基金(31720103911, 31622043)、国家现代农业产业(奶牛)技术体系建设(CARS-36)和内蒙古自治区科技重大专项资助

摘要 以内蒙古锡林郭勒镶黄旗呼日敦高勒嘎查牧场内牛、山羊、绵羊、马、人的粪便和土壤为研究对象, 利用PacBio SMRT测序平台对细菌16S rRNA基因全长进行测序, 运用生物信息学分析方法对人畜肠道微生物及土壤微生物多样性进行全面评估。结果发现, 人畜肠道菌群均以厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌门, 而土壤以酸杆菌门和变形菌门为优势菌门。在属水平, 人畜以梭菌属、拟杆菌属为优势菌属, 而土壤以*Blastocatella*和芽孢杆菌属为优势菌属。在种水平人以*Escherichia/Shigella dysenteriae*和*Streptococcus salivarius*为优势菌种, 而4种家畜的优势菌种均为*Oscillibacter valericigenes*和*Eubacterium coprostanoligenes*。土壤以*Blastocatella fastidiosa*和*Bacillus longiquaesitum*为优势菌种。比较各样品 α 多样性发现, 人肠道微生物的多样性显著低于其他食草动物。通过主标和层次聚类分析发现可将6种样品分为: 组1(人)、组2(马)、组3(绵羊、牛、山羊)和组4(土壤)4组。本研究对差异OTU进行比对分析探究了造成该分组的原因。因此本研究揭示了土壤、人和家畜肠道微生物组成和结构存在显著的差异, 为进一步研究不同生境中微生物多样性提供数据参考。

关键词 肠道微生物, 土壤微生物, 单分子实时测序, 多样性, 16S rRNA 基因全长测序

微生物作为生态系统重要组成部分, 广泛分布于各生境中。近年来, 肠道微生物研究受到人们日益关注。肠道微生物及其代谢产物影响着人和动物的营养物质加工、代谢平衡^[1]、免疫功能^[2]、胃肠道发育^[3]等生理活动。随着人和动物肠道菌群研究的深入, 人们已发现膳食^[4]、年龄^[5]、性别^[6]、生活环境^[7]等因素影响着肠道菌群的构成, 而动物物种间的差异对肠道菌群组成的影响更为显著^[8]。陈秀等人^[9]比较了6种哺乳动物粪便细菌多样性, 发现因为进化及食物的不同, 动物粪便细菌的组成在种属水平存在很大差异。罗永久等人^[10]比较不同食性动物肠道菌群发现, 动物肠道菌群的多样性与食物类型密切相

关。相比动物肠道菌群的研究, 人肠道菌群研究的更加透彻, 众多研究者分析了地理位置^[11]、饮食习惯^[12]等因素对人肠道微生物的影响。在较为原始的草原生态系统中, 土壤微生物的多样性至关重要。一方面土壤环境中的微生物是有机物和养分转化与循环的动力, 其多样性越高则土壤的肥力越高, 进而影响人和动物的生存^[13,14]。另一方面人和动物的活动又会影响土壤微生物的多样性^[15]。虽然研究者对于土壤微生物、动物肠道微生物及人肠道微生物做了大量研究, 但是还没有将其作为整体系统研究同一环境下不同生境中微生物多样性的差异。

测序技术的出现为准确全面地认识微生物提供

引用格式: 王佼, 王彦杰, 侯强川, 等. 锡林郭勒牧场人畜肠道微生物及土壤微生物多样性的比较分析. 科学通报, 2019, 64: 337–347

Wang J, Wang Y J, Hou Q C, et al. Comparative analysis of human and animal gut microbiota diversity and soil microbiota diversity in Xilinguole pasture (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 337–347, doi: 10.1360/N972018-00822

了有效手段,尤其对于较多不可培养微生物的研究起到重要作用.近年以PacBio SMRT(single-molecule real-time)为代表的第三代测序技术迅猛发展,被运用越来越广泛,其具有长读长、准确度高等优点^[16],更重要的是无需碎片化,可测定16S rRNA基因全长,将细菌鉴定到“种”水平^[17],为微生物多样性研究提供了更加有效的技术手段.

锡林郭勒盟是内蒙古自治区中部的典型草原牧区,保持着传统的放牧方式,当地主要的家畜有牛、绵羊、山羊、马.因此本研究以锡林郭勒盟镶黄旗呼日敦高勒嘎查牧场内的人、绵羊、山羊、牛、马的粪便及土壤为研究对象,利用PacBio SMRT对其细菌16S rRNA基因全长进行测序,从而探究不同生境内微生物多样性与结构的特点.

1 材料和方法

(i) 实验对象. 本实验56份样品主要包括:牛粪便(N)10份、山羊粪便(SY)9份、绵羊粪便(MY)10份、马粪便(M)11份、人粪便(R)6份、土壤(T)10份.

(ii) 试剂. Omega Soil DNA Kit试剂盒,美国Omega Bio-Tek公司; QIAGEN QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (50)试剂盒,德国QIAGEN; Taq DNA聚合酶, dNTP Mix, 10× Easy Taq Buffer等PCR体系试剂,大连宝生物工程有限公司; 5×TBE电泳缓冲液(Tris碱 54 g, Na₂ EDTA·2H₂O 3.72 g, 硼酸27.5 g, 定容至1000 mL, pH 8.0); 1.0%的琼脂糖凝胶(1.0 g琼脂糖溶于100 mL 0.5×TBE缓冲液),天津基准化学试剂公司; SMRT建库试剂盒(DNA Template Prep Kit 1.0)、测序试剂盒(DNA/Polymerase Binding Kit P6 v2),美国太平洋生物科学公司; 保护剂,日本TaKaRa公司.

(iii) 仪器与设备. PacBio SMRT RS II 测序平台,美国Pacific Biosciences公司; Applied Biosystems PCR仪,美国应用生物系统公司; ND-1000型微量紫外分光光度计,美国赛默飞科技公司; HWS24型恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司; CDS8000型UPV凝胶成像分析系统,上海赛智创业科学公司; Eppendorf 5810R高速冷冻离心机,德国艾本德公司; Qubit 2.0, 美国生命技术有限公司.

(iv) 样品采集. 本实验在锡林郭勒盟镶黄旗呼日敦高勒嘎查牧场内进行了样品采集. 土壤样采集时,随机选取采样点,铲除表土采取距离地表5~10 cm深度的土壤; 家畜粪便样品采样时则随机选取健康家

畜. 采样具体采样方法: 用一次性采样勺分别采集约15 g新鲜粪便样品和土壤样品,装入无酶无菌的离心管,样品采集后立即加入15 mL的保护剂,迅速冷冻、密封、标记样品号,并尽快运回实验室,存放在-80℃冰箱内等待后续的实验操作.

(v) 样品细菌宏基因组DNA提取. 分别取0.3 g充分混匀的粪便和土壤样品,采用QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(50)和Omega Soil DNA Kit试剂盒,依照说明书的提取步骤提取样品中细菌宏基因组DNA. 提取后的DNA用1.0%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检验DNA的完整度、纯度及浓度,上述3个条件都满足后续实验要求的DNA样品暂存到-20℃冰箱备用.

(vi) 文库构建与上机测序. 本研究利用细菌16S rRNA基因全长通用引物, 27F(5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-ACCTTGTTACGAC TT-3')对56份样品细菌宏基因组DNA 16S rRNA基因全长序列进行PCR扩增,为了区分同一个文库中的不同样品,用带有识别标签(barcode)的引物对每个样品进行PCR扩增,以区分每个样品. 将提取的DNA作为模板,用上述引物进行PCR扩增,PCR程序设置为95℃预变性3 min, 98℃变性20 s, 60℃退火15 s, 72℃延伸45 s, 共循环26次, 72℃终端延伸1 min, 4℃终止,具体扩增体系为10×PCR Buffer 5 μL, dNTP Mix 4 μL, 正向引物1.0 μL, 反向引物1.0 μL, DNA模板1.5 μL, TaKaRa Taq酶 0.5 μL, dd H₂O补充至50 μL. 各样品的PCR产物经纯化后等质量混合,用试剂盒构建文库,根据厂商提供的说明书严格执行. 将构建好的文库,加测序引物和聚合酶后,使用PacBio RS II仪器上机测序.

(vii) 高质量序列的提取. 使用SMRT® Analysis Server v2.3.0中包含的RS Reads Ofinsert.1流程对原始序列进行质控,只保留符合以下标准的序列: (1) 插入片段重复测序的次数≥5; (2) 最小预测精确度为90%; (3) 插入序列长度在1400~1800 nt之间. 符合以上标准的序列定义为高质量的序列,并纳入下一步的生物信息学分析.

(viii) 生物信息学分析. 根据标记barcode将原始序列划分到每个样品中,然后去掉barcode和引物序列,使用QIIME平台(v1.7.0)对高质量的序列进行生物信息学分析. 主要的处理过程包括:

(1) PyNAST校准并把序列排齐,在100%相似性

下进行UCLUST归并, 建立无重复的16S rRNA全长序列集; (2) 在97%相似度条件下划分分类操作单元(operational taxonomic u-nits, OTU); (3) 使用chimera slayer去除OTU代表性序列中属于嵌合体的序列; (4) 使用RDP(ribosomal database project, release11.5)和Greengenes(#release 13.8)数据库对OTU代表性序列进行同源性比对, 整合两个数据库的比对结果, 确定每个OTU最终分类学地位; (5) 以样品测序量为基准, 绘制稀疏曲线和香农曲线, 评估测序深度与测序量; 计算各组样品香农指数、辛普森指数、超1指数和发现物种数, 用于评估各样本 α 多样性; (6) 基于Unweighted UniFrac距离进行PCoA主坐标分析; 基于Bray-curtis距离进行层次聚类分析; 筛选在至少4个样品中出现的OTU, 绘制OTU热图。

(ix) 数据处理. 分别采用Wilcoxon秩和检验、Kruskal-Wallis多组检验比较6组间 α 多样性差异. 采用Origin 8.6软件、Graphpad 6.0和R语言软件(v3.3.2)作图。

(x) 核酸序列登记号. 本实验所有测序数据已上传到MG-RAST数据库, ID号为mgp86953。

2 结果

2.1 测序深度及质量评估

经过对PacBio SMRT产生的序列进行质控后, 共得到262802条高质量序列, 平均每个样品产生4692条. 序列按97%相似性进行操作分类单元划分后, 共得到39025个OTU, 去除2536个嵌合体后剩余36489个OTU, 嵌合体去除率为6.5%. 为了评估此次

测序深度是否达到分析要求, 绘制了样品稀疏曲线和香农曲线, 如图1所示。

由图1可知, 随着测序深度的增加发现物种数也随之增加, 与此同时每个样品的香农曲线已逐渐进入平台期. 预示着随着测序量的增加有可能会发现新的细菌种系型, 但样品细菌的多样性已经不再随测序量的增加而发生明显变化. 因此本研究测序量满足后续生物信息学分析的要求。

2.2 人、动物肠道微生物与土壤微生物 α 多样性比较分析

为评估各样品微生物物种多样性和丰度, 本研究基于测序数据计算了超1指数、发现物种数、辛普森指数、香农指数. 超1指数和发现物种数评估样品中细菌丰度信息, 辛普森指数和香农指数评估样品中细菌多样性信息. 不同组的细菌丰富度及微生物多样性信息如图2所示。

由图2可知, 超1指数的大小顺序为绵羊>牛>土>马>山羊>人; 发现物种数指数牛>绵羊>土>马>山羊>人; 辛普森指数牛>土>绵羊>山羊>马>人; 香农指数牛>土>绵羊>马>山羊>人. 值得注意的是, 人粪便样品的细菌多样性和丰度要显著低于其他样品($P<0.01$).

2.3 人、动物肠道微生物与土壤微生物细菌组成

各样品在门水平菌群构成如图3所示, 牛肠道微生物含量大于3%的有厚壁菌门(Firmicutes, 66%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 24%)、柔壁菌门(Tenericutes, 6%); 山羊: 厚壁菌门(64%)、拟杆菌门(23%)、变形

图1 (网络版彩色)样品细菌群体的稀疏曲线(a)和香农曲线(b)

Figure 1 (Color online) Rarefaction (a) and Shannon diversity (b) curves of bacterial populations in the samples

图2 样品 α 多样性指数比较分析。柱形上方标示不同字母代表不同样品有显著性差异($P < 0.05$)

Figure 2 Comparison of the α -diversity index between samples. Different letters above the columns indicate significant difference ($P < 0.05$) between samples

图3 细菌在门水平的组成及相对含量

Figure 3 The composition and relative abundance of bacteria at the phylum level

菌门(Proteobacteria, 6%); 绵羊: 厚壁菌门(69%)、拟杆菌门(18%)、柔壁菌门(4%); 马: 厚壁菌门(60%)、拟杆菌门(23%)、螺旋体门(Spirochaetes, 5%); 人: 厚壁菌门(62%)、变形菌门(8%)、柔壁菌门(4%); 土壤: 酸杆菌门(Acidobacteria, 38.3%)、变形菌门(23%)、拟杆菌门(13%)。除土壤的优势菌门为醋酸杆菌门外, 动物和人都是以厚壁菌门为优势菌门。

各样本在属水平的菌群构成如图4所示, 牛优势菌属主要包括梭菌属(*Clostridium*, 4%)、拟杆菌属(*Bacteroides*, 4%)、颤杆菌属(*Oscillibacter*, 4%); 山羊: 拟杆菌属(4%)、梭菌属(4%)、颤杆菌属(3%); 绵羊: 颤杆菌属(4%)、梭菌属(3%)、拟杆菌属(3%)、密螺旋体属(*Treponema*, 3%); 马: 梭菌属(3%)、真杆菌属(*Eubacterium*, 3%)、密螺旋体属(*Treponema*, 3%); 人: 韦荣球菌属(*Veillonella*, 15%)、梭菌属(9%)、大肠杆菌/志贺氏菌(*Escherichia/Shigella*, 8%)、真杆菌属(8%); 土壤: *Blastocatella*(17%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 4%)、*Flavisolibacter*(4%)。在属水平人与其他动物表现出了一定差异。

在种水平, 牛共鉴定到116个细菌种, 其中相对含量大于0.5%的有6个种, *Oscillibacter valericigenes* (3.6%), *Eubacterium coprostanoligenes* (2.4%), *Caproiciproducens galactitolivorans* (0.8%), *Vampirovibrio chlorellavorus* (0.7%), *Phascolarctobacterium succinatutens* (0.6%), *Anaerocella delicata* (0.6%); 山羊共鉴定到174个细菌种, 其中相对含量大于0.5%的有

7个种, *Oscillibacter valericigenes* (3.65%), *Eubacterium coprostanoligenes* (2.3%), *Phascolarctobacterium succinatutens* (0.9%), *Ruminococcus flavefaciens* (0.8%), *Lactobacillus amylovorus* (0.7%), *Pseudomonas lutea* (0.6%), *Treponema bryantii* (0.5%); 马共鉴定到178个细菌种, 其中相对含量大于0.5%的有10个种, *Oscillibacter valericigenes* (2.9%), *Eubacterium coprostanoligenes* (2.7%), *Treponema bryantii* (2.4%), *Vampirovibrio chlorellavorus* (2.1%), *Clostridium lactatifermentans* (1.7%), *Phascolarctobacterium succinatutens* (1.3%), *Caproiciproducens galactitolivorans* (1.25%), *Saccharofermentans acetigenes* (0.88%), *Phascolarctobacterium faecium* (0.62%), *Fibrobacter succinogenes* (0.5%); 人共鉴定到205个细菌种, 其中相对含量大于0.5%的有12个种, *Escherichia/Shigella dysenteriae* (8.7%), *Streptococcus salivarius* (4.7%), *Eubacterium callanderi* (4.5%), *Clostridium ramosum* (4.4%), *Veillonella dispar* (3.88%), *Eubacterium coprostanoligenes* (3.27%), *Veillonella parvula* (3%), *Phascolarctobacterium faecium* (2.6%), *Lactobacillus gasseri* (2.36%), *Dialister succinatiphilus* (1.6%), *Bacteroides dorei* (1.4%), *Lactobacillus oris* (1.3%), *Faecalibacterium prausnitzii* (1.2%); 土共鉴定到899个细菌种, 其中相对含量大于0.5%的有8个种, *Blastocatella fastidiosa* (17%), *Bacillus longiquaesitum* (2.1%), *Gaiella occulta* (1.2%), *Gemmatimonas aurantiaca* (1.2%), *Bryobacter aggregatus* (1.1%), *Flavisolibacter ginsengiterrae* (1.01%), *Stenotrophobacter terrae* (0.86%), *Rubrobacter* (0.5%); 综上所述, 4种动物的优势菌种均为*Oscillibacter valericigenes*和*Eubacterium*

图4 细菌在属水平的组成及相对含量

Figure 4 The composition and relative abundance of bacteria at the genus level

coprostanoligenes, 而人和土壤的优势菌种则各具特点. 同时与其他样品相比土壤中含有的细菌种类较为丰富.

2.4 人、动物肠道微生物与土壤微生物结构比较

通过以上分析, 本研究发现不同样品间存在差异, 因此本研究基于Unweighted UniFrac距离进行了PCoA主坐标分析, 结果如图5所示. 首先粪便样品与土壤样品分开, 这表明人和动物粪便与土壤样品在菌群结构上存在差异; 其次粪便样品中马和人的样品明显与牛、山羊、绵羊的粪便样品分开, 这表明人、马与这3种动物存在差异; 而牛、山羊、绵羊的粪便样品重叠在一起, 这表明牛、山羊、绵羊三

者菌群结构比较相似.

为了更加清晰地反映样品菌群结构存在的差异, 本研究基于Bray-curtis距离进行了层次聚类分析. 结果如图6所示, 6种样品很明显地被分为4个大类, 人、马、土壤被各为一类, 而牛、绵羊以及山羊被聚为一类. 这表明在菌群结构上, 4个大类存在显著差异, 而牛、山羊和绵羊三者具有一定的相似性.

2.5 人、动物肠道和土壤微生物组成差异比较

上述层次聚类结果将所有样品分为: 组1(人), 组2(马)、组3(绵羊、牛、山羊)、组4(土壤)4类, 为评估造成该现象的原因, 本研究基于OTU丰度绘制了热图(OTU数量取10的对数值), 结果如图7所示, 研

图5 基于非加权UniFrac距离的细菌主坐标分析图

Figure 5 Principal coordinate analysis score plots of bacteria based on the unweighted UniFrac distance

图6 层次聚类图

Figure 6 Hierarchical clustering diagram

究发现不同分组间在OTU水平存在明显差异。

本研究计算了差异OTU占总OTU的百分比,结果显示组1(人)与其他三类的差异OTU共44个,占总OTU 1%,对应细菌种有23种,包含*Lactobacillus gasseri*, *Bacteroides vulgatus*, *Streptococcus salivarius*等;组2(马)与其他三类的差异OTU共751个,占总OTU 19%,对应细菌种21种,包含*Roseburia hominis*, *Pseudobutyrvibrio rumini*等;组3(牛、山羊、绵羊)与其他三类的差异OTU共2302个,占总OTU 64%,对应细菌种42种,包含*Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus albus*等。组4(土)与其他三类的差异OTU 755个,占总OTU 8.4%,对应细菌种42种,主要包含

Bacillus longiquaesitum, *Bacillus niacini*, *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus hum*等。

3 讨论

微生物广泛存在于在不同生境中,扮演不同的角色,微生物利用宿主所提供的空间和营养维持生存,因此微生物必须适应宿主环境以达到最佳的适应性,从而为其生存和传播提供保障,本研究对同一环境内人畜肠道及土壤微生物多样性及构成进行了比较分析。

由微生物多样性分析发现人肠道微生物多样性低于其他食草动物,人与动物相比会摄入更加多样的食物,其微生物多样性反而低于草食性动物,这似

图7 基于OTUs水平的热图

Figure 7 Heatmap constructed based on OTUs

乎与我们所想象的情况相反. 但是查阅相关文献发现, Ley等人^[18]指出哺乳动物与其肠道微生物在进化过程中生理结构和食物的类型(草食-杂食-肉食)决定了肠道微生物的组成. 薛正晟^[19]的研究指出, 人肠道菌群多样性高于食肉动物, 但低于食草动物. 因此本研究推测食性的不同导致了人肠道微生物多样性显著低于其他家畜.

本研究发现在门水平, 大多数人和动物肠道内厚壁菌门为优势菌门, 厚壁菌门中大部分菌属为厌氧菌, 其可以在肠道相对厌氧的环境中发挥作用, 促进纤维的分解, 为人和动物提供能量^[20]. 陈秀等人^[9]研究发现熊科动物和灵长目动物的肠道优势菌同样以厚壁菌门、拟杆菌门为优势菌门. 土壤的优势菌门为酸杆菌门, 酸杆菌一般占土壤细菌总量的20%左右, 甚至高达50%以上, 在土壤微生态中起到降解植物残体、参与铁循环等重要的作用^[21]. 曾全超^[22]研究发现土壤pH、温度和植物多样性是影响土壤酸杆菌群落结构的关键因素. 土壤中的另一个优势菌门为变形菌门, 它主要包含一些自养型的有固氮作用的菌属, 促进植物生长.

在属水平上, 动物的优势菌属为梭菌属、拟杆菌属. 梭杆菌属是一类严格的专性厌氧菌, 它们与肠道营养的吸收和短链脂肪酸的合成等有关^[23]. 拟杆菌属也为严格的专性厌氧菌, 帮助人及动物降解多糖, 为宿主提供额外的能量^[24]. 与人相比, 动物和土壤中存在大量未鉴定到的菌属, 说明动物肠道和土壤环境中还存在大量未知的微生物, 需要后续研究进一步挖掘.

本研究基于层次聚类将56份样品分为4大类, 组4(土壤)与其他样品表现出来最明显的差异. 土壤为有氧状态弱碱性, 而人和动物肠道为缺氧状态弱酸性, 这种截然相反的微生物生存环境会使得它们的微生物菌种存在差异. 另一方面人和动物的免疫和消化系统会在一定程度上阻止外来微生物的入侵, 而土壤作为营养丰富的开放系统更容易被其他微生物的侵入. 因此造成了土壤微生物与人和动物肠道菌群的差异. 值得注意的是, 芽孢杆菌属是土壤的优势菌属, 含量为4%, 而土壤特有菌种中芽孢杆菌种有13种, 如*Bacillus niacini*, *Bacillus simplex*, 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等. 蜡样芽孢杆菌是常见食品污染菌, 其产生的毒素可引起食物中毒, 其中蜡样芽孢杆菌在本研究中只存在于土壤中. 有人认为, 人肠道中的蜡芽孢杆菌不是肠道中固有菌属而是吃了被土壤污染的食物而进入肠道的^[25]. 这与本研究未

从人肠道中鉴定到蜡样芽孢杆菌相一致.

作为单独聚类的一组, 组1(人)与其他动物也存在差异, 本研究发现现在只有人中存在含量较高*Lactobacillus gasseri*^[26], 文献报道其在培养基上有降胆固醇的能力. 人作为杂食动物与食草性动物相比会摄入大量油脂, 而且当地牧民的饮食的特点是以动物性食品和奶制品为主, 可能由于大量脂肪的摄入量, 导致人肠道中存在大量分解脂肪的细菌. 由此本研究推测不同的饮食特点使得人和动物的肠道菌群在长期自然选择过程中形成适合自己饮食结构的肠道微生物菌群.

组2(马)和组3(绵羊、山羊、牛)均为食草动物, 然而两组肠道菌群存在显著差异. 在分类学上牛和羊同属于偶蹄目(artiodactyla)、牛科(Bovidae), 而马属于奇蹄目(Perissodactyla)、马科(Equidae). 它们在消化系统结构上存在差异, 牛和羊都为多胃反刍动物, 而马为单胃非反刍动物. 反刍动物瘤胃内主要依靠微生物产生的酶来分解纤维素, 而对于非反刍动物的微生物消化只是辅助形式. 本研究也发现牛和羊所特有的菌属在种类和含量上都比马的丰富, 它们的差异菌属主要为一些与消化植物性食物有关的菌属, *Ruminococcus albus*文献报道其有分解纤维素的能力^[27], *Ruminococcus bromii*有文献报道增加抗性淀粉的摄入会增加其丰度^[28]. 而马所特有的菌种为一些丁酸盐产生菌*Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Butyrivibrio fibrisolens*^[29,30]等. 因此消化系统的差异是导致肠道菌群结构存在差异的重要原因.

4 结论

微生物广泛存在于自然界中, 在整个生态系统中扮演者重要角色. 本研究对同一牧场内不同人畜肠道微生物以及土壤微生物多样性进行了研究. 尽管他们处于同一环境内, 但其群结构存在较大差异. 动物肠道微生物和土壤微生物存在显著差异, 土壤微生物群落则更为复杂. 人作为杂食性动物肠道微生物多样性显著低于其他草食性动物, 同为草食性动物的牛、山羊、绵羊、马也因为消化系统结构的不同导致肠道微生物结构存在差异. 微生物会在不同生境相互选择共同进化形成独特的微生物结构行使不同的功能. 本研究揭示了土壤、人和家畜肠道微生物组成和结构存在的差异, 为进一步研究不同生境中微生物多样性提供数据参考.

参考文献

- 1 Greiner T U, Bäckhed F. Microbial regulation of GLP-1 and L-cell biology. *Mol Metab*, 2016, 5: 753–758
- 2 Rooks M G, Garrett W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 341
- 3 Liu W, Yao W, Zhu W Y. Advance on mutualism of host-microbiota in human gut (in Chinese). *World Chin J Digestol*, 2006, 14: 1081–1088 [刘威, 姚文, 朱伟云. 人体与肠道微生物间的互惠共生关系. *世界华人消化杂志*, 2006, 14: 1081–1088]
- 4 Chen W. Gut microbiota—A new concern on health regulation (in Chinese). *J Food Sci Technol*, 2015, 33: 1–6 [陈卫. 肠道菌群: 膳食与健康研究的新视角. *食品科学技术学报*, 2015, 33: 1–6]
- 5 Xu J. Comparative study on intestinal microflora of healthy people in different ages in Sichuan Province (in Chinese). Master Dissertation. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012 [徐洁. 四川地区不同年龄健康人肠道菌群的比较研究. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012]
- 6 Suzuki Y, Ikeda K, Sakuma K, et al. Association between yogurt consumption and intestinal microbiota in healthy young adults differs by host gender. *Front Microbiol*, 2017, 8: 847
- 7 Shin J H, Sim M, Lee J Y, et al. Lifestyle and geographic insights into the distinct gut microbiota in elderly women from two different geographic locations. *J Physiol Anthropol*, 2016, 35: 31
- 8 Deng G H, Zha L Y, Zhang G X, et al. Comparison of human and animal fecal microbiota with Illumina sequencing of 16S rRNA tags (in Chinese). *Ecol Sci*, 2014, 33: 851–857 [邓冠华, 查龙应, 张国霞, 等. 高通量 16S rRNA 标签测序法比较人与不同动物肠道微生物组多样性. *生态科学*, 2014, 33: 851–857]
- 9 Chen X, Zhang X J, Li Q Y, et al. Diversity of faecal bacteria in several mammals by 454 high-throughput sequencing (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2015, 55: 683–690 [陈秀, 张晓君, 李沁元, 等. 454 焦磷酸测序分析几种哺乳动物粪便细菌多样性. *微生物学报*, 2015, 55: 683–690]
- 10 Luo Y J, Zhong Z J, Peng G N, et al. Characterization of intestind bacterial diversity for different feeding habit animals by ERIC-PCR fingerprinting (in Chinese). *Chin J Veterin Sci*, 2014, 34: 1764–1769 [罗永久, 钟志军, 彭广能, 等. 不同食性动物肠道菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱分析. *中国兽医学报*, 2014, 34: 1764–1769]
- 11 Rehman A, Rausch P, Wang J, et al. Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut*, 2015, 65: 238
- 12 Kaplan L M, Brancale J. Eat well, or get roommates who do. *Cell Host Microbe*, 2017, 21: 123
- 13 Yang H J, Xiao Q M, Liu A Y. Soil microbial diversity and its action (in Chinese). *J Nanhua Univ (Sci Technol)*, 2005, 19: 21–26 [杨海君, 肖启明, 刘安元. 土壤微生物多样性及其作用研究进展. *南华大学学报: 自然科学版*, 2005, 19: 21–26]
- 14 Torsvik V, Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5: 240–245
- 15 Wang H, Cheng M, Dsouza M, et al. Soil bacterial diversity is associated with human population density in urban greenspaces. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 5115–5124
- 16 Braslavsky I, Hebert B, Kartalov E, et al. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3960–3964
- 17 Tang Y, Liu X. Full-length sequencing of 16S rRNA gene and its analysis based on the SMRT sequencing technology (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2017, 33: 34–39 [唐勇, 刘旭. 基于 SMRT 测序技术的 16S rRNA 基因全长测序及其分析方法. *生物技术通报*, 2017, 33: 34–39]
- 18 Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, 320: 1647–1651
- 19 Xue Z Y. Diversity profile and phylo-functional core of the mammalian gut microbiota-with healthy human and giant panda as models (in Chinese). Doctor Dissertation. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015 [薛正晟. 以健康人和大熊猫为模型的哺乳动物肠道菌群多样性分布与核心功能种属的研究. 博士学位论文. 上海: 上海交通大学, 2015]
- 20 Petri R M, Pourazad P, Khiaosa-Ard R, et al. Temporal dynamics of *in-situ* fiber-adherent bacterial community under ruminal acidotic conditions determined by 16S rRNA gene profiling. *PLoS One*, 2017, 12: e0182271
- 21 Wang G H, Liu J J, Yu Z H, et al. Research progress of Acidobacteria ecology in soils (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2016, 32: 14–20 [王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32: 14–20]
- 22 Zeng Q C. The characteristics of soil properties and microbial under different vegetation ecozones on the Loess Plateau of China (in Chinese). Master Dissertation. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2015 [曾全超. 黄土高原不同植被生态系统土壤微生物多样性及其影响因素研究. 硕士学位论文. 北京: 中国科学院研究生院, 2015]

- 23 Pryde S E, Duncan S H, Hold G L, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *Fems Microbiol Lett*, 2002, 217: 133–139
- 24 Dumas M E, Barton R H, Toye A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12511
- 25 Kniehl E, Becker A, Forster D H. Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. *J Hosp Infect*, 2003, 55: 33–38
- 26 Wang J, Zhang H, Chen X, et al. Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 1645–1654
- 27 Pitta D W, Indugu N, Baker L, et al. Symposium review: Understanding diet-microbe interactions to enhance productivity of dairy cows. *J Dairy Sci*, 2018, 101: 1–19
- 28 Venkataraman A, Sieber J R, Schmidt A W, et al. Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch. *Microbiome*, 2016, 4: 33
- 29 Sakamoto M, Takagaki A, Matsumoto K, et al. *Butyricimonas synergistica* gen. nov., sp. nov. and *Butyricimonas virosa* sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family ‘*Porphyromonadaceae*’ isolated from rat faeces. *Int J Syst Evol Micr*, 2009, 59: 1748
- 30 Zhang Y J, Li S, Gan R Y, et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 7493

Summary for “锡林郭勒牧场人畜肠道微生物及土壤微生物多样性的比较分析”

Comparative analysis of human and animal gut microbiota diversity and soil microbiota diversity in Xilinguole pasture

Jiao Wang, Yanjie Wang, Qiangchuan Hou, Haiyan Xu, Zhihong Sun, Heping Zhang & Tiansong Sun*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

* Corresponding author, E-mail: sts9940@sina.com

As an important part of ecosystem, microbes are widely distributed in various habitats. In recent years, more and more attention has been paid to the study on gut microbiota. The gut microbiota and their metabolites influence human and animal nutrition processing, metabolic balance, immune function, gastrointestinal development and other physiological activities. With the deepening of studies on human and animal gut microbiota, it has been found that some factors, such as diet, age, gender, and living environment, impacting on the composition of gut microbiota, while the differences among animal species have more significant influence on the gut microbiota composition. In relatively primitive grassland ecosystems, soil microbes interact with human and animal activities. On the one hand, microbes in the soil environment are the driving forces for the transformation and circulation of organic matter and nutrients. The improvement of soil microbial community diversity is beneficial for the soil fertility. On the other hand, human and animal activities will affect the diversity of soil microbial community. Although there are a lot of researches on soil microbiota, animal and human gut microbiota, their differences in diversity and composition within the same environment have not been studied.

The advent of sequencing technology provides an effective mean for the accurate and comprehensive understanding of microbes, especially for the study of uncultivable microorganisms. The PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology is advantageous in producing long sequence reads with high accuracy. Based on sequencing the full length 16S rRNA genes, the microbiota composition can be identified to the species level. Therefore, it is an effective approach for studying microbial diversity.

We collected 56 stool and soil samples from Xilinguole, including 6, 10, 11, 9, and 10 stool samples from human, goat, cattle, horse, and sheep, respectively, as well as 10 soil samples. Genomic DNA was extracted from the samples. After DNA extraction and quality check, the 16S rRNA genes of all samples were amplified from the genomic DNA. The PCR products were sequenced using the PacBio RS II instrument. The QIIME software (V1.7) was used to analyze the sequencing data, and the R software (version 3.5.0) was used to further analyze and visualize the results.

Firstly, it was found that the gut microbiota diversity of human was significantly lower than other samples ($P < 0.01$). The overall composition of the human and animal gut microbiota were dominated by the Firmicutes and Bacteroidetes phyla. However, the soil microbiota was dominated by Proteobacteria and Acidobacteria. At the genus level, the sheep, goat and cattle gut microbiota were dominated by *Clostridium*, *Bacteroides*, and *Oscillibacter*, while the horse gut microbiota was mainly composed of *Clostridium*, *Eubacterium*, and *Treponema*. The soil microbiota was composed mainly of *Blastocatella* and *Bacillus*. The human gut microbiota comprised much of *Veillonella*, *Clostridium*, *Escherichia/Shigella*. At the species level, the human gut microbiota mainly contained *Escherichia/Shigella dysenteriae*, *Streptococcus salivarius*. The sheep, goat, cattle, and horse gut microbiota were dominated by *Oscillibacter valericigenes* and *Eubacterium coprostanoligenes*. The major species in soil were *Blastocatella fastidiosa* and *Bacillus longiquaesitum*. Moreover, principal coordinate analysis (PCoA) and hierarchical clustering analysis showed some differences in the microbiota structure among human gut, animal gut and soil samples. The gut microbiota structure was similar among cattle, goats and sheep. They were more different from the samples collected from human, horse and soil. We classified all samples into four clusters. Cluster 1 only included human samples; cluster 2 comprised the horse samples; cluster 3 was consisted of the sheep, goat, and cattle samples; while cluster 4 contained only the soil samples. Lastly, we identified the discriminatory OTUs and assigned them taxonomically to the species level.

In conclusion, there were significant differences between animal gut microbiota and soil microbiota. The soil microbiota was more complex. As an omnivore, human gut microbiota diversity was significantly lower than other herbivorous animal (namely cattle, goat, horse and sheep). Although cattle, sheep, goat and horses are all herbivorous animals, the distinct features of the digestive systems could contribute to the difference in gut microbiota composition of horse from those of sheep, goat and cattle. This study revealed the differences of gut microbiota diversity between human and other animals, as well as from the soil microbial community. This work has laid a theoretical foundation for further studies on microbial diversity in different habitats.

gut microbiota, soil microbiota, single-molecule real-time (SMRT) sequencing technology, diversity, 16S rRNA full-length sequencing

doi: 10.1360/N972018-00822