



厚壳贻贝不同组织中的微生物群落结构

何治江, 贾梦雪, 王锦乙, 严小军, 廖智, 何建瑜*

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 海洋生物蛋白质工程研究室, 浙江舟山 316022)

摘要: 为了解厚壳贻贝各组织中微生物的分布差异, 本实验在 Illumina MiSeq 测序平台利用 16S *rDNA* 克隆子测序 (V3~V4 区) 对嵎泗养殖贻贝的血淋巴、消化腺、肾脏、鳃、外套膜、性腺和足等 7 种组织中的微生物群落结构进行分析, 并比较组织间微生物的多样性差异。结果显示, 21 个样本平均产生 36 860 条高质量序列。血淋巴共有 1 237 个操作分类单元 (OTU), 其次是消化腺 (1 014 个 OTU) 和肾脏 (1 015 个 OTU), 性腺最少 (仅有 553 个 OTU)。尽管血淋巴 OTU 数最高, 但仅有 9 个独有 OTU。肾脏拥有最多 172 个独有 OTU, 消化腺次之 (144 个独有 OTU)。所有组织中均以变形菌门、拟杆菌门和疣微菌门为主要菌群。通过 Bray-Curtis 相似矩阵, 血淋巴、消化腺、肾脏和足的细菌聚成一支, 而鳃、性腺和外套膜的细菌群落更为相似。Alpha 多样性指数分析显示, 血淋巴、消化腺和肾脏微生物多样性最高。研究表明, 厚壳贻贝微生物存在一定的组织差异性, 这将为今后深入阐释厚壳贻贝与微生物之间的相互作用及其调控机理奠定基础。

关键词: 厚壳贻贝; 微生物群落; 组织差异分布; 16S *rDNA*

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

海洋是生物多样性最高的生境之一, 其中主要物种类群为海洋微生物 (包括海洋细菌和原生生物), 约占海洋生物总量的 70%^[1]。海洋微生物的群落结构与多样性水平对海洋生态的稳定发挥了重要的作用。这些海洋微生物或浮游于海水, 或依附在无机基质表面, 或共/寄生于其他生物体内, 与生物体相互作用, 形成功能各异的微生境, 成为海洋生态系统不可或缺的组成部分, 影响着海洋的生态功能, 包括海洋初级生产力、氮磷元素的转化等^[2]。研究海洋微生物与生物宿主之间的相互作用是了解微生境的重要一环, 也是评估海洋生态环境的重要指标之一。

滤食性的双壳贝类 (如贻贝、牡蛎、扇贝等) 在海洋生态系统中具有重要的生态位^[3], 也是研究海洋微生物与宿主相互作用的重要模型生物之

一^[4]。与脊椎动物不同, 具有开放式循环系统的双壳贝类其组织表面常附着大量的微生物, 如低温海水 (1~8 °C) 下的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 中血淋巴含有活菌数约 $1.4 \times 10^2 \sim 5.6 \times 10^2$ CFU/mL, 且优势菌属为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、弧菌属 (*Vibrio*) 和气单胞菌属 (*Aeromonas*)^[5]。根据功能特性, Venier 等^[3]将附着微生物分为三大类: 共生菌群 (commensal organisms)、机会菌群 (opportunistic organisms) 和有害菌群 (pathogenic organisms)。它们或参与宿主的生理代谢活动, 或参与生物地球化学循环, 亦或感染宿主。贻贝是我国第四大养殖贝类, 也是双壳贝类中极少发生病害, 且具有较强环境适应性的贝类^[6]。目前已知微生物可以影响贻贝的生理代谢活动, 例如贻贝的附着^[7]。这表明贻贝与微生

收稿日期: 2021-01-07 修回日期: 2021-06-29

资助项目: 国家自然科学基金 (42020104009, 31671009)

第一作者: 何治江 (照片), 从事海洋生物学研究, E-mail: 1309574671@qq.com

通信作者: 何建瑜, 从事海洋微生物学研究, E-mail: hejianyu@zjou.edu.cn



物之间存在复杂的相互作用。已有研究表明,自然海域中弧菌生物被膜可以有效促进厚壳贻贝稚贝附着^[7],同时厚壳贻贝自身的肠道微生物菌群结构也可影响稚贝附着^[8];此外,考虑到贻贝滤食性以及开放式循环系统特征,其附着的微生物与食品安全也具有重要联系^[9]。因此,深入研究滤食性贝类及其微生物的相互作用有着重要的现实意义。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 俗称“淡菜”,主要分布于黄海、渤海和东南沿海地区,在我国养殖历史悠久,尤其在浙江省舟山市嵊泗县,该县亦被称为“贻贝之乡”。贻贝因其营养丰富^[10],味道鲜美而被人们广泛食用。根据已有报道^[11],厚壳贻贝可以耐受大多数水产致病菌,例如灿烂弧菌 (*V. splendidus*)^[12]、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)^[13] 等。贻贝对疾病的耐受性往往表现为其体内会富集高丰度的微生物群落^[11]。除了对疾病的耐受性,贻贝还表现出对各种环境因子,如温度、盐度、pH 值,以及各种污染物等环境因素的强适应能力。然而,过往研究多集中在贻贝本身的免疫特性上,例如丰富的抗菌肽和免疫基因^[14-15],贻贝强大的免疫耐受性背后的内在机制目前尚不明确,特别是贻贝体内富集的各种微生物是否与其环境耐受性具有关联性等方面仍存在较大的研究空间。我们推测贻贝体内富集的微生物可能对宿主的免疫效应因子如对抗菌肽等具有耐受性,从而保证微生物在宿主体内存活^[16]。另一方面,这些微生物可能反过来也影响到宿主的环境适应能力。

了解和掌握微生物在其宿主贻贝体内的分布情况是研究上述问题的先决条件。Musella 等^[17]对紫贻贝 (*M. galloprovincialis*) 的鳃、血淋巴、消化腺、胃和足等 5 种组织的微生物群落进行研究,结果发现微生物群落在其体内具有明显的组织差异性分布特征。目前,对厚壳贻贝组织微生物的研究较少,仅有血淋巴^[18]、肠道^[19]等少数组织有过研究,故尚缺乏对其内在微生物群落结构的系统性认识。根据最新的研究报道,李斯远等^[20]虽从厚壳贻贝鳃、性腺、消化腺、外套膜和足中分离和培养出了假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、弧菌属和蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 等,但其结果未经高通量测序的验证。因此,本实验主要采用高通量 16S *rDNA* 扩增子测序手段,系统分析厚壳贻贝血淋巴、消化腺、肾脏、鳃、外套膜、性腺和足等 7 种代表性组织中的微生物群落

结构,并对其独有的微生物种类进行分析。研究结果将有助于了解厚壳贻贝不同组织中微生物的差异性分布,揭示滤食性贝类与微生物之间的内在关联,从而为深入了解微生物与其贻贝之间的相互作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2020 年 8 月从浙江省舟山市嵊泗县枸杞岛养殖地采集厚壳贻贝(约 2 龄),置于充气的洁净海水后立即返回实验室。在恒温水族箱(25 °C)中暂养 24 h,每天定期更换新的洁净海水,并捞出已死亡个体。暂养后的厚壳贻贝个体进行微生物组织差异性实验。

1.2 实验方法

厚壳贻贝组织采集 在超净工作台中,将厚壳贻贝开壳后去除体内多余海水,随即用 5 mL 无菌注射器从厚壳贻贝后闭壳肌中抽取血淋巴。血淋巴置于无菌离心管中并标记,4 °C 条件下 1 000 ×g 离心 10 min,去除上清液,收集血细胞。将 3 只厚壳贻贝的血淋巴充分混合后保存于-80 °C 超低温冰箱中。厚壳贻贝个体随后进行无菌解剖,分别获得消化腺、肾脏、鳃、外套膜、性腺和足等 6 种组织。各组织均来自 3 只厚壳贻贝个体,所提取的组织经无菌水充分漂洗后立即用液氮研磨至粉末状,置于 1.5 mL RNase free 离心管中并标记,随后进行 DNA 提取,3 组重复。

组织微生物总 DNA 提取、文库构建和 16S *rDNA* 克隆子测序 取各组织样品,以 TIANamp Genomic DNA Kit(DP304, TIANGEN, 中国)试剂盒提取样品总 DNA,利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 (THERMO, 美国)检验 DNA 的分子量、纯度和浓度。总 DNA 经检验合格后,采用细菌通用引物 B341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 B785R(5'-ACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 进行 16S *rDNA* V3 ~ V4 区测序文库构建。文库构建采用 2 轮 PCR 进行,第 1 轮 PCR 反应体系(25 μL):总 DNA(10 ~ 50 ng/μL) 2 μL, 2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix 12.5 μL, B341F (25 μmol/L) 0.25 μL, B785R 0.25 μL, PCR Grade Water 10 μL。PCR 扩增条:95 °C 预变性 3 min, 25 个反应循环(95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 72 °C 末端延伸 5 min。PCR 产

物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测和纯化后进行第 2 轮 PCR 反应。25 μ L 反应体系: 第 1 轮 PCR 产物 2.5 μ L, 2 \times KAPA HiFi HotStart Ready Mix 12.5 μ L, B341F (25 μ mol/L) 0.25 μ L, B785R 0.25 μ L, PCR Grade Water 9.5 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 8 个反应循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 72 $^{\circ}$ C 末端延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后对目的片段进行切胶回收, 方法参照 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒 (QIAGEN, 德国) 说明书进行。文库 DNA 质量浓度采用 Qubit Fluorometer (美国) 检测, 片段长度分布采用 Qseq100 DNA Analyzer (BIOptic, 光鼎公司, 中国台湾) 检测, 摩尔浓度用 KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, 美国) 进行定量。文库经上述检验合格后利用 Illumina MiSeq 测序平台 (美国) 进行高通量两端并行测序 (PE250)。文库构建和高通量测序在浙江杭州开泰生物技术有限公司进行。使用软件 Vsearch v2.13.6^[21] 的 fastq_mergepairs 模块对原始序列进行拼接后, 采用软件 Cutadapt v2.4^[22] 去除序列中的标签 Barcode, 同时采用 Vsearch 的 fastq_filter 模块去除低质量序列、嵌合体序列以及长度小于 100 bp 的序列, 对得到的高质量序列进行统计。

生物信息学分析 利用 MOTHUR^[23] 对上述高质量序列按 97% 相似度进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 归并, 从而获得每个组织样本的 OTU 丰度矩阵。将 OTU 中频数最高的序列作为代表序列, 利用 RDP (Ribosomal database project)^[24] 数据库进行 OTU 的物种注释。去除 reads <2 的低丰度 OTU 后进行抽平, 获得 OTU_TAX 表。微生物共有和独有分析主要采用 nVennR 包进行。核心菌属的流行分析 (Prevalence of core taxa)^[25] 主要采用 microbiome 和 microbiomeutilities 包进行。Alpha 多样性分析主要为计算 Observed OTU (Obs)、Chao1 指数、Inverse_Simpson 指数 (InS) 和 Shannon 指数。所有分析均在 R v4.0.3 环境下调用 ggplot2、phyloseq^[26]、amplicon、ggalluvial 和 vegan^[27] 包进行分析。

统计分析 Alpha 多样性指数的显著性差异分析主要采用混合线性效应模型 (Linear mixed effect model, LMEM), 组织作为模型的固定效应, 个体重复作为模型的随机效应, 性腺的多样性指数作为基线, 从而比较各个多样性指数的均值变

化。LMEM 分析在 R v4.0.3 环境下调用 lmerTest^[28] 包进行。 $P < 0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果

2.1 厚壳贻贝不同组织 OTU 丰富度差异分析

7 种厚壳贻贝组织样本测序获得平均原始序列数 (raw reads) 为 (141 949 \pm 5 916) 条 [(range = 124 908~165 502, 标准差 (standard deviation, SD) = 15 652, 表 1], 平均产生高质量序列 (110 581 \pm 4 400) 条 (range = 99 950~128 003, SD = 11 643, 表 1)。21 个样本平均产生 36 860 条高质量序列 (range = 20 104~70 703, SD = 16 846, 表 1)。去除只包含 1 条序列的低丰度 OTU 后进行抽平分析, 基本达到平衡状态, 可进一步进行多样性分析 (图 1-a)。

表 1 序列统计表

Tab. 1 The information for sequencing reads

组织 tissues	编号 ID	原始序列数/条 raw reads	质控后序列数/条 clean reads	质控比/% ratio
鳃 gill	S_1	61 946	52 131	84.16
	S_2	40 835	28 738	70.38
	S_3	34 409	24 380	70.85
性腺 gonad	X_1	75 003	60 344	80.46
	X_2	29 017	20 104	69.28
	X_3	29 277	20 306	69.36
消化腺 digestive gland	D_1	77 109	63 231	82.00
	D_2	40 038	30 032	75.01
	D_3	48 355	34 740	71.84
外套膜 mantle	W_1	57 232	48 608	84.93
	W_2	34 282	25 945	75.68
	W_3	37 302	28 068	75.25
血淋巴 hemolymph	C_1	77 070	62 039	80.50
	C_2	33 481	25 569	76.37
	C_3	32 632	25 009	76.64
足 foot	Z_1	65 727	55 402	84.29
	Z_2	28 842	21 618	74.95
	Z_3	30 339	22 930	75.58
肾脏 kidney	N_1	85 733	70 703	82.47
	N_2	31 588	23 503	74.40
	N_3	43 426	30 671	70.63

为了解厚壳贻贝不同组织微生物分布的特异性, 首先对不同组织 unique OTU 差异进行分析 (图 1-b, c)。去除重复 OTU 后, 结果显示, 厚壳贻贝血淋巴中的微生物 unique OTU 数最高 (1 237

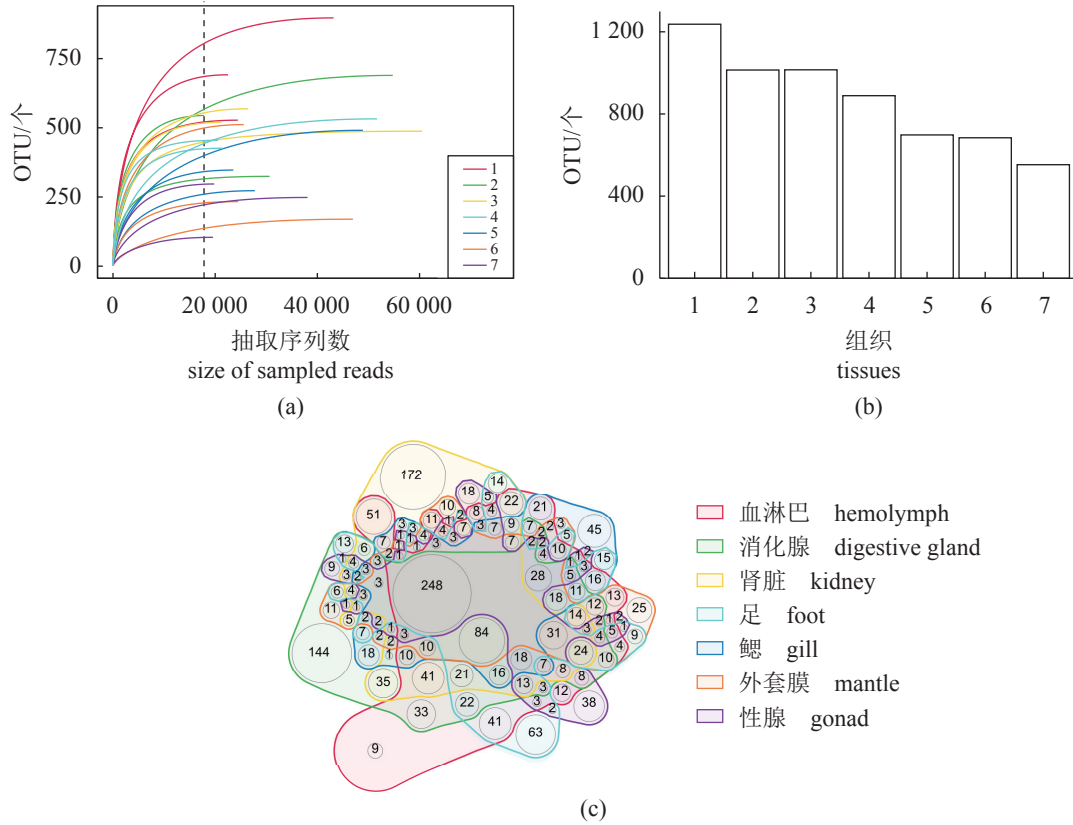


图 1 厚壳贻贝不同组织 OTU 丰富度差异

(a) 样本稀释曲线; (b) 各组织总 unique OTU 数, 1. 血淋巴, 2. 消化腺, 3. 肾脏, 4. 足, 5. 鳃, 6. 外套膜, 7. 性腺; (c) 韦恩图展示不同组织 OTU 的共有和特有情况

Fig. 1 The richness of OTU in different tissues of *M. coruscus*

(a) rarefaction curves of subsampled OTU in individual sample; (b) the total number of unique OTU in different tissues, 1. hemolymph, 2. digestive gland, 3. kidney, 4. foot, 5. gill, 6. mantle, 7. gonad; (c) Venn diagram indicates the common and unique OTU in different tissues

个), 其次是消化腺和肾脏(1 014 和 1 015 个), 最低为性腺(仅有 553 个)。Venn 图显示血淋巴中 OTU 绝大部分与其他组织共有, 独有的 OTU 仅有 9 个(约占 0.72%), 然消化腺和肾脏中独有 OTU 数较高(分别为 144 和 172 个, 占 14.10% 和 17.05%)。由此可见, 厚壳贻贝各组织微生物可能存在一定差异性。

2.2 厚壳贻贝不同组织微生物群落结构分析

采用 Bray-Curtis 相似距离矩阵进行样本聚类, 并在门水平上对各组织群落结构进行展示。Bray-Curtis 距离聚类表明血淋巴、消化腺、肾脏和足的细菌群落组成有较高相似性, 鳃、性腺和外套膜的细菌群落组成有较高相似性。厚壳贻贝组织中所鉴定的微生物来自 20 个门, 其中堆叠条形图显示了在门水平上相对丰度居前 10 的群落结构(图 2)。结果显示, 厚壳贻贝所有组织中均以变形菌门(Proteobacteria, 占 76.32%)、拟杆菌门(Bac-

teroidetes, 占 13.65%) 和疣微菌门(Verrucomicrobia, 占 4.71%) 为主, 而放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、软壁菌门(Tenericutes)等相对丰度较低, 分别占 2.41%、0.84% 和 0.79%。

厚壳贻贝组织中共发现 471 个菌属。热图展示了在属水平上相对丰度居前 50 的 OTUs(图 3-a)。主要包括变形菌门中的 OTU6(盐单胞菌属 *Halomonas*)、OTU7(*Kistimonas* 菌属)、OTU1384(远洋杆菌属 *Pelagibacterium*)、OTU1385(叶杆菌科 Phyllobacteriaceae, 属分类未定)、OTU1400(红杆菌科 Rhodobacteraceae, 属分类未定)、OTU12(Gamma 变形菌纲, 属分类未定)、OTU8(黄单胞菌科 Xanthomonadaceae, 属分类未定)等; 拟杆菌门中的 OTU524(黄杆菌科 Flavobacteriaceae, 属分类未定); 疣微菌门中的 OTU11(Rubritalea 属)。对核心菌属进行流行分析, 结果显示, 厚壳贻贝微生物中共有 40 个核心菌属(core genus), 在最低检出阈值 0.01% 时, 所有核心菌属均被组织共享。

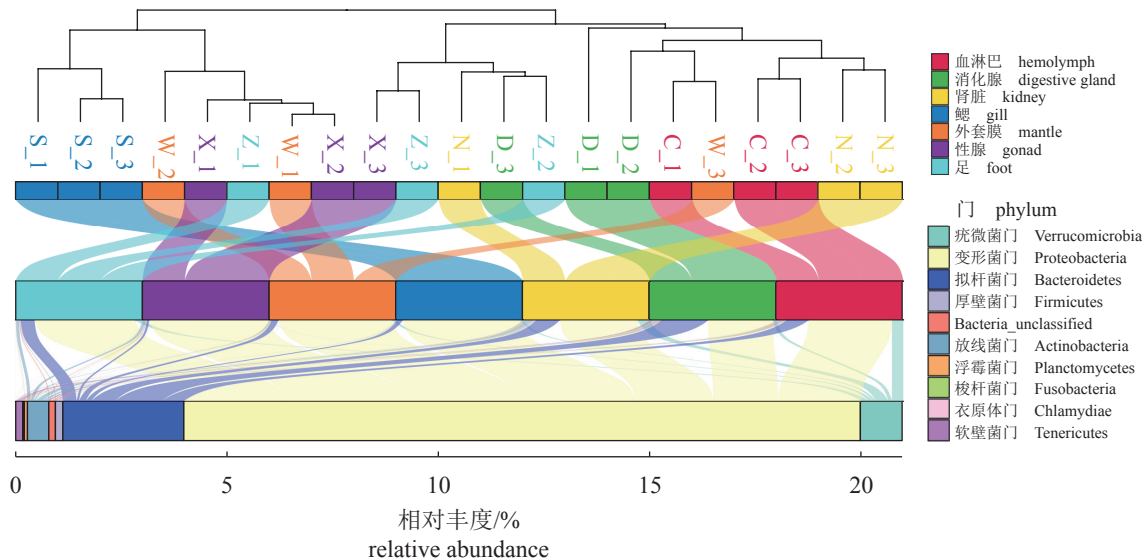


图 2 厚壳贻贝各组织微生物门水平群落结构组成

基于 Bray-Curtis 相似距离进行样本聚类, 彩色堆叠条形图表示相对丰度前 10 的群落组成

Fig. 2 Bacterial community composition at Phylum level for each tissue of *M. coruscus*

Bray-Curtis similarity-based dendrogram was used to cluster the samples, for each sample, community composition of top-10 abundance at phylum level is described with stacked barplot

随着检出阈值的提高 (0.29%), 部分核心菌属消失, 其中嗜盐单胞菌属流行率最高 (图 3-b)。这说明厚壳贻贝可能对微生物选择具有一定的偏好性。

2.3 厚壳贻贝不同组织微生物群落 Alpha 多样性分析

多样性指数的 LMEM 检验结果显示, 相较于性腺中的微生物 Observed OTU(Obs, LMEM: $\gamma_{Obs} = 269 \pm 62$, 图 4), 血淋巴中的微生物 OTU 数最高 ($\gamma_{Obs} = 465 \pm 88$, $P < 0.01$), 其次为肾脏 ($\gamma_{Obs} = 290 \pm 88$, $P < 0.01$) 和消化腺 ($\gamma_{Obs} = 268 \pm 88$, $P < 0.01$) 和足 ($\gamma_{Obs} = 229 \pm 88$, $P < 0.05$), 但鳃 ($\gamma_{Obs} = 143 \pm 88$, $P > 0.05$) 和外套膜 ($\gamma_{Obs} = 84 \pm 89$, $P > 0.05$) 中的 OTU 数未发现明显差异。从 Chao1 指数来看, 相较于性腺 ($\gamma_{Chao1} = 350 \pm 79$, 图 4), 血淋巴中的微生物多样性最高 ($\gamma_{Chao1} = 499 \pm 112$, $P < 0.01$), 其次为消化腺 ($\gamma_{Chao1} = 303 \pm 112$, $P < 0.05$)、肾脏 ($\gamma_{Chao1} = 287 \pm 112$, $P < 0.05$)、足 ($\gamma_{Chao1} = 251 \pm 112$, $P < 0.05$) 和鳃 ($\gamma_{Chao1} = 239 \pm 112$, $P < 0.05$), 仅外套膜 ($\gamma_{Chao1} = 104 \pm 112$, $P > 0.05$) 未显示出明显差异。相比于性腺微生物的 Shannon 指数 ($\gamma_{Shannon} = 1.44 \pm 0.48$, 图 4), 血淋巴 ($\gamma_{Shannon} = 3.07 \pm 0.58$, $P < 0.01$)、肾脏 ($\gamma_{Shannon} = 2.65 \pm 0.58$, $P < 0.01$)、消化腺 ($\gamma_{Shannon} = 2.19 \pm 0.58$, $P < 0.01$) 和足 ($\gamma_{Shannon} = 1.61 \pm 0.58$, $P < 0.05$) 同样表现出显著的差异。相比于性腺中微生物

的 Inverse_Simpson 指数 (\lnSimp , $\gamma_{\lnSimp} = 2.64 \pm 7.37$, 图 4), 仅血淋巴 ($\gamma_{\lnSimp} = 25.93 \pm 9.40$, $P < 0.05$) 和肾脏 ($\gamma_{\lnSimp} = 24.18 \pm 9.40$, $P < 0.05$) 中的微生物表现出显著差异。上述结果说明, 厚壳贻贝微生物在血淋巴、肾脏、消化腺、足中多样性程度较高, 这也提示厚壳贻贝微生物存在较为明显的组织差异性。

3 讨论

3.1 厚壳贻贝组织微生物群落结构分析

厚壳贻贝各组织中细菌种类丰富。基于 16S rDNA(V3 ~ V4 区) 克隆子测序分析表明, 厚壳贻贝 7 种组织的微生物群落结构中, 变形菌门和拟杆菌门占绝对优势。据相关文献报道, 变形菌门是海洋细菌中较为庞大的一个类群^[29], 广泛存在于海洋无脊椎动物组织中, 如长牡蛎的血淋巴^[30]、偏顶蛤 (*Modiolus modiolus*) 的血淋巴^[5]、海绵 (*Mycale laxissima*)^[31] 等。曹荣等^[32] 采用高通量测序对牡蛎体附着的微生物群落进行分析, 结果显示, 变形菌门的相对丰度占比约 77.5%。本结果与 Li 等^[18] 在 2018 年所采集的厚壳贻贝后的血淋巴中的微生物主要优势菌群相似^[18]。不同海域的贻贝微生物组成略有差别。例如, Vezzulli 等^[33] 发现弧菌属和假交替单胞菌属是意大利海域紫贻贝血淋巴和消化腺中的主要菌属。如此的组织微生物群落结

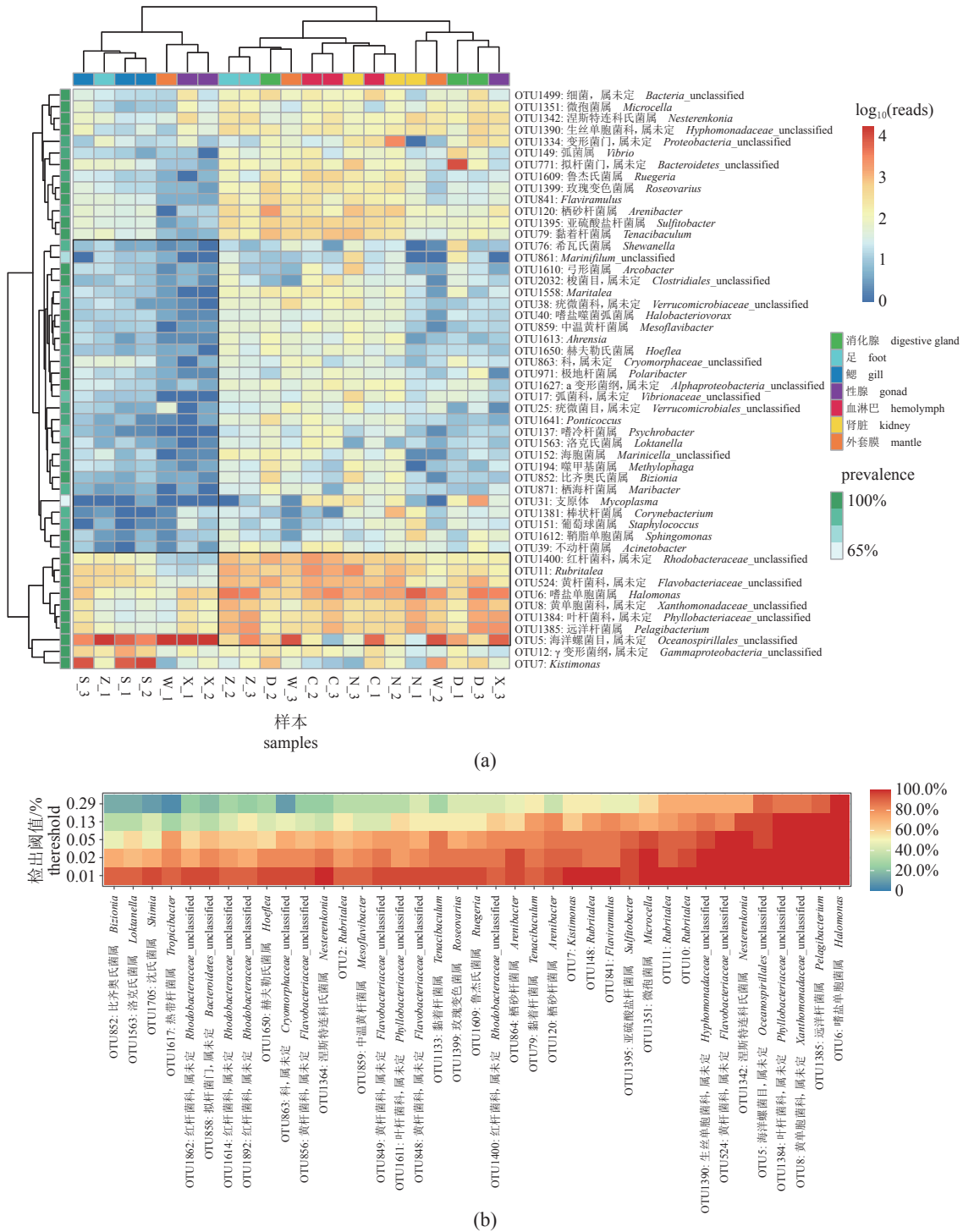


图3 厚壳贻贝各组织微生物属水平群落结构组成

(a) 热图展示相对丰度前 50 的属水平群落结构, (b) 核心菌属的流行分析; 核心均属的最小相对丰度为 1×10^{-4} , 最低流行度为 90%; 样本聚类均基于 Bray-Curtis 相似距离

Fig. 3 Bacterial community composition at genus level for each tissue of *M. coruscus*

(a) heatmap shows the community of the top 50 genera with relative abundance, (b) prevalence of core taxa; core taxa at minimum abundance of 1×10^{-4} and minimum prevalence of 90%; Bray-Curtis similarity-based dendrogram was used to cluster the samples

构可能与其生活的海域环境有关。一般来说, 厚壳贻贝在海水中营滤食生活, 开放式循环系统让

其充分暴露于海洋环境中, 这就给海洋细菌菌群提供一个潜在的定殖条件, 故海域环境的微生物

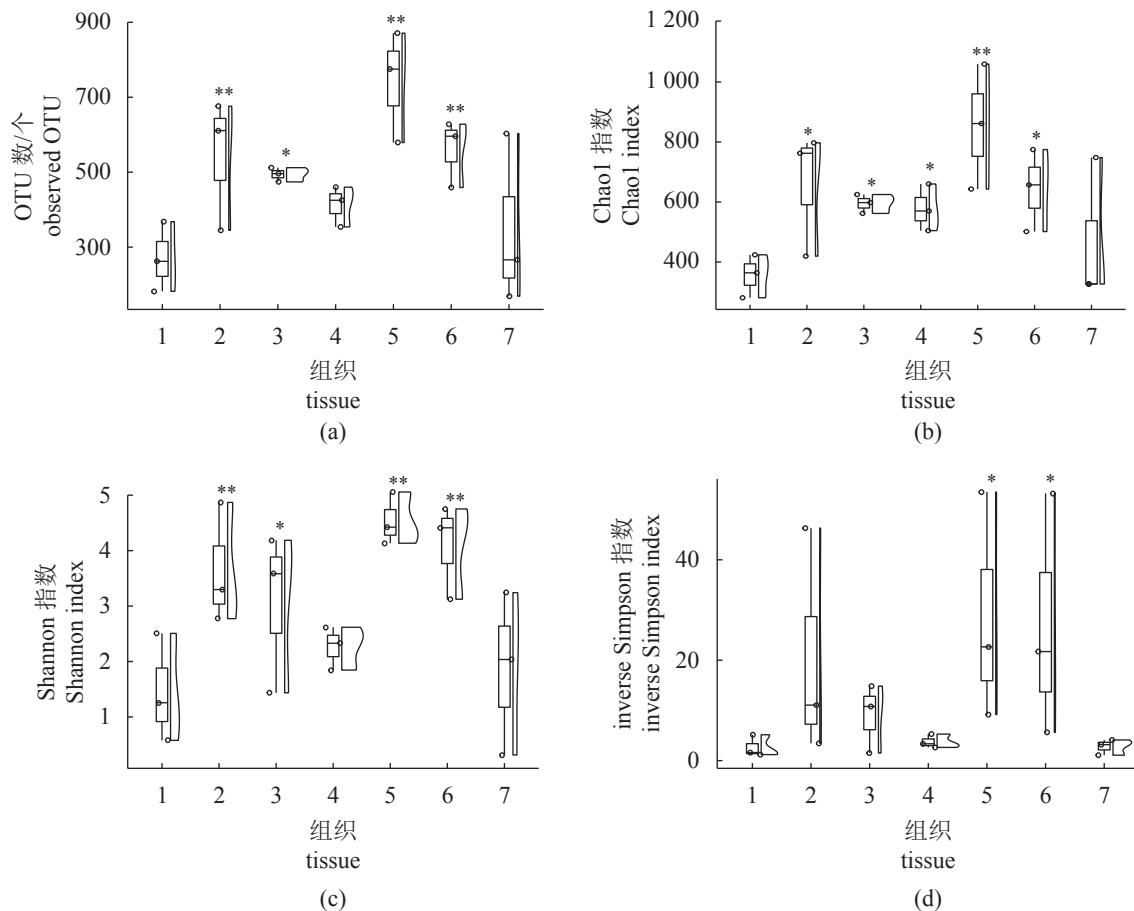


图 4 厚壳贻贝各组织微生物 Alpha 多样性分析

1. 性腺, 2. 消化腺, 3. 足, 4. 鳃, 5. 血淋巴, 6. 肾脏, 7. 外套膜; * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$, 均相对于性腺, 具有显著差异

Fig. 4 Alpha diversity analysis in bacterial community composition for each tissue of *M. coruscus*

1. gonad, 2. digestive gland, 3. foot, 4. gill, 5. hemolymph, 6. kidney, 7. mantle; * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$ mean significant different from the gonad

群落结构可能就影响了组织微生物的群落分布。舟山海域位于长江入海口附近, 刘晓辉等^[34]对长江口及邻近海域表层海水细菌多样性及群落结构进行分析, 变形菌门为主要类群(占 60.61%), 拟杆菌门次之(占 15.18%)。尹冰玉等^[35]调查枸杞岛海域微生物群落结构, 变形菌门依然为优势类群。李斯远等^[20]通过比较厚壳贻贝养殖海域与天然生长海域的微生物群落, 结果显示, 嵊泗养殖区海域和野生生长区海域微生物均以变形菌门和拟杆菌门作为优势门类。本次样品来源于嵊泗养殖区, 与上述研究结果基本一致。因此, 该实验认为厚壳贻贝组织微生物受环境影响, 但存在一定的组织特异性。

3.2 厚壳贻贝组织微生物差异性分析

厚壳贻贝血淋巴等 7 种组织中的微生物丰度和多样性存在较为明显的差异。从研究结果来看,

厚壳贻贝血淋巴中的微生物种类丰富, 群落结构复杂, 多样性水平较高, 但独有性不高。消化腺和肾脏中既有较高的多样性, 同时又具有较多的独有 OTU。性腺中 OTU 数最低且群落结构相对单一。在贻贝的开放式循环中, 血淋巴一方面与海水直接接触, 另一方面会接触到所有组织, 推测这可能是导致血淋巴中微生物的 OTU 数最高, 但独有性很低的原因之一。消化腺和肾脏作为消化和物质代谢活动的主要场所, 造成功能特异的微生物富集也是可能的原因之一。丰富多样的微生物在组织上富集, 例如鳃, 这可能有助于帮助贻贝摄食和消化, 以及抵御病原菌的侵入^[36]。这可能反映了贻贝与微生物之间存在某种共生关系^[20], 也反映了组织对微生物的定殖具有一定的选择性。在样本聚类分析中, 并非所有相同组织聚为一支, 这可能与组织的特异性有关。据相关

文献报道, 贻贝的外套膜和性腺组织受血淋巴的渗透影响较大, 即贻贝的血淋巴通过渗透方式会进入到外套膜和性腺等组织内部^[37], 这就可能会造成不同组织微生物之间的相互影响。也有文献报道贝类中的鳃和血淋巴可能通过过滤活性或免疫识别作用, 对内部组织(如消化腺)的微生物菌群的选择发挥重要作用^[38-39]。以上结果表明贻贝微生物的群落形成具有一定的复杂性。

Musella 等^[17]在紫贻贝中也发现类似的组织分布差异性, 鳃、血淋巴、消化腺、胃和足等组织微生物群落组成不同, 反映出微生物对不同组织生态位的特殊适应。一般认为, 生态位理论和中性理论是微生物群落构建的两大主要理论假说, 其机制分别由确定性过程(如生态位分化等)和随机性过程(如扩散作用等)两种动力驱动^[40]。我们认为贝类微生物可能受到扩散作用力驱动, 也可能有生态位的分化, 这两种动力并非完全独立, 可能相互作用下共同影响贻贝微生物群落结构。接下来将深入研究厚壳贻贝组织微生物的定殖机制。

此外, 微生物在厚壳贻贝各组织分布的差异也可能受制于宿主的免疫效应分子, 例如与其含有丰富的抗菌肽有关。贻贝是目前已知抗菌肽分子多样性最为丰富的海洋生物之一^[14,41-45], 不同贻贝抗菌肽在贻贝不同组织中具有明显的表达差异性^[14], 由此可能介导了微生物的选择性定殖过程。Qin 等^[46]发现, 具有抗革兰氏阳性菌和抗真菌的 Mytichitin-1 在厚壳贻贝性腺中的表达量高出其他组织上百倍, 高表达的 Mytichitin-1 抗菌肽可能因此下调了性腺中的微生物丰度。因此结合不同家族抗菌肽的抗菌谱差异^[14], 实验推测, 贻贝抗菌肽不同家族的组织特异性表达可能会对贻贝各组织微生物群落结构产生重要影响, 但该推测还需进一步分析。厚壳贻贝组织微生物的选择性定殖不是单一作用下的结果, 可能是多种因素(包括生态学过程、宿主生理作用、功能代谢产物、免疫效应分子等)综合导致的。综上所述, 厚壳贻贝组织中微生物群落具有差异性。该结构差异与贻贝生活环境的物理、化学因素有关, 也与环境中的微生物种群结构有关, 为进一步机理分析提供依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Bar-On Y M, Phillips R, Milo R. The biomass distribution on earth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(25): 6506-6511.

- [2] Bolhuis H, Cretoiu M S. What is so special about marine microorganisms? Introduction to the marine microbiome-from diversity to biotechnological potential[M]// Stal L J, Cretoiu M S. *The Marine Microbiome*. Cham: Springer, 2016: 3-20.
- [3] Venier P, Varotto L, Rosani U, et al. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 69.
- [4] Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. Persistence of *Vibrio* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(6): 761-772.
- [5] Olafsen J A, Mikkelsen H V, Giæver H M, et al. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(6): 1848-1854.
- [6] Figueras A, Moreira R, Sendra M, et al. Genomics and immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in a changing environment[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 440-445.
- [7] 黄道芬, 梁箫, 彭莉华, 等. 不同来源海洋弧菌微生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(7): 1140-1147.
- Huang D F, Liang X, Peng L H, et al. Effects of *Vibrio* biofilms of different sources on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1140-1147 (in Chinese).
- [8] 杨娜. 厚壳贻贝肠道细菌群落组成及肠道细菌对稚贝附着的作用研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- Yang N. The gut bacterial community composition and effects of gut bacteria on the plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [9] Daczowska-Kozon E G, Pan B S. Environmental effects on seafood availability, safety, and quality[M]. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2016.
- [10] 何建瑜, 赵荣涛, 刘慧慧. 舟山海域厚壳贻贝软体部分营养成分分析与评价[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(4): 37-42.
- He J Y, Zhao R T, Liu H H. Analysis and evaluation of nutritional composition of *Mytilus coruscus* in Zhoushan

- sea area[J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(4): 37-42 (in Chinese).
- [11] Domeneghetti S, Varotto L, Civettini M, *et al.* Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(1): 37-44.
- [12] 梁箫, 张亚, 刘钰珠, 等. 灿烂弧菌对厚壳贻贝免疫指标和消化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(9): 1438-1445.
- Liang X, Zhang Y, Liu Y Z, *et al.* Influence of *Vibrio splendidus* on immune indexes and digestive enzyme activity of *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 1438-1445 (in Chinese).
- [13] Liu H H, Wu J, Xu M S, *et al.* A novel biomarker for marine environmental pollution of HSP90 from *Mytilus coruscus*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 111(1-2): 428-434.
- [14] Yang J Y, He J Y, Liu L, *et al.* Expression profiles of antimicrobial peptides in *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2021: 737709.
- [15] Liao Z, Wang X C, Liu H H, *et al.* Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 610-616.
- [16] Destoumieux-Garzón D, Dupertuy M, Vanhove A S, *et al.* Resistance to antimicrobial peptides in *Vibrios*[J]. *Antibiotics*, 2014, 3(4): 540-563.
- [17] Musella M, Wathsala R, Tavella T, *et al.* Tissue-scale microbiota of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and its relationship with the environment[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 717: 137209.
- [18] Li Y F, Chen Y W, Xu J K, *et al.* Temperature elevation and *Vibrio cyclitrophicus* infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 16391.
- [19] Li Y F, Yang N, Liang X, *et al.* Elevated seawater temperatures decrease microbial diversity in the gut of *Mytilus coruscus*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 839.
- [20] 李斯远, 何治江, 吕泓玥, 等. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)养殖海域与天然生长海域的微生物群落比较研究[J]. *海洋与湖沼*, 2021, 52(1): 196-205.
- Li S Y, He Z J, Lv H Y, *et al.* Comparative study on microbial community in mussel *Mytilus coruscus* body and seawater of its natural and cultural sea area in Zhoushan, Zhejiang[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(1): 196-205 (in Chinese).
- [21] Rognes T, Flouri T, Nichols B, *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [22] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *EMBnet journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [23] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [24] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [25] Shetty S A, Hugenholtz F, Lahti L, *et al.* Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(2): 182-199.
- [26] McMurdie P J, Holmes S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61217.
- [27] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology[J]. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14(6): 927-930.
- [28] Kuznetsova A, Brockhoff P B, Christensen R H B. lmerTest package: tests in linear mixed effects models[J]. *Journal of Statistical Software*, 2017, 82(13): 1-26.
- [29] Sfanos K, Harmody D, Dang P, *et al.* A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(3): 242-264.
- [30] Lokmer A, Wegner K M. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 670-682.
- [31] Mohamed N M, Cicirelli E M, Kan J J, *et al.* Diversity

- and quorum-sensing signal production of *Proteobacteria* associated with marine sponges[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(1): 75-86.
- [32] 曹荣, 张井, 孟辉辉, 等. 高通量测序与传统纯培养方法在牡蛎微生物群落分析中的应用对比[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 137-141.
- Cao R, Zhang J, Meng H H, *et al.* Microbial flora analysis of oyster: a comparison between traditional plate culture method and high throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 137-141 (in Chinese).
- [33] Vezzulli L, Stagnaro, Grande C, *et al.* Comparative 16S *rDNA* gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy)[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 75(2): 495-504.
- [34] 刘晓辉, 王健鑫, 王帅兵, 等. 长江口及邻近海域表层海水细菌多样性及群落结构[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(6): 1531-1541.
- Liu X H, Wang J X, Wang S B, *et al.* Bacterial diversity and community structure in surface seawater of Changjiang river estuary and adjacent areas[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(6): 1531-1541 (in Chinese).
- [35] 尹冰玉, 章守宇. 枸杞岛海藻场冬季细菌群落结构分析[J]. *海洋湖沼通报*, 2012(1): 79-91.
- Yin B Y, Zhang S Y. Bacterial community structure in seaweed beds of Gouqi island during winter[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2012(1): 79-91 (in Chinese).
- [36] Yu J J, Wang M X, Liu B Z, *et al.* Gill symbionts of the cold-seep mussel *Bathymodiolus platifrons*: composition, environmental dependency and immune control[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 246-252.
- [37] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, *et al.* Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(17): 12954-12962.
- [38] Burgos-Aceves M A, Faggio C. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 513-517.
- [39] Ikuta T, Tame A, Saito M, *et al.* Identification of cells expressing two peptidoglycan recognition proteins in the gill of the vent mussel, *Bathymodiolus septemdiarium*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 815-822.
- [40] Stegen J C, Lin X J, Fredrickson J K, *et al.* Quantifying community assembly processes and identifying features that impose them[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(11): 2069-2079.
- [41] Sonthi M, Cantet F, Toubiana M, *et al.* Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 45-50.
- [42] Mitta G, Hubert F, Noël T, *et al.* Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265(1): 71-78.
- [43] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, *et al.* Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge[J]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(23): 4233-4242.
- [44] Leoni G, De Poli A, Mardirossian M, *et al.* Myticalins: a novel multigenic family of linear, cationic antimicrobial peptides from marine mussels (*Mytilus* spp.) [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(8): 261.
- [45] Gerdol M, De Moro G, Manfrin C, *et al.* Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 390-399.
- [46] Qin C L, Huang W, Zhou S Q, *et al.* Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 362-370.

Differential distribution of indigenous microbiome in tissues of *Mytilus coruscus*

HE Zhijiang, JIA Mengxue, WANG Jinyi, YAN Xiaojun, LIAO Zhi, HE Jianyu*

(Laboratory of Marine Biology Protein Engineering, College of Marine Science and Technology,
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: Filter-feeding bivalves provide habitats for microbial colonization. Microbes also affect the growth and development of host organisms. *Mytilus coruscus* not only has economic importance in China but also shows powerful immune tolerance to environmental changes. However, the underlying tissue-specific pattern of microbial communities of *M. coruscus* is still poorly understood. To fill these knowledge gaps, we collected 7 tissues of *M. coruscus* cultured in Shengsi breeding area. These tissues included hemolymph, digestive glands, kidneys, gills, mantles, gonads and feet. Through the 16S *rRNA* gene amplicon sequencing targeting the V3-V4 variable region on the Illumina MiSeq platform, we characterized the community structure and distribution of microbiota. On average, a total of 36 860 high-quality reads were obtained from 21 samples of *M. coruscus*. The highest number of OTU (1 237) was detected in hemolymph, followed by digestive glands and kidneys (1 014 and 1 015 OTUs), and the gonad had the lowest (only 553 OTUs). Although the number of OTU in hemolymph was the highest, there was only 9 unique OTUs in hemolymph. The kidney had a maximum of 172 unique OTUs, followed by digestive glands (144 unique OTUs). Compositional distribution showed that Proteobacteria, Bacteroidetes and Verrucomicrobia were the main phyla in all tissues. The Bray-Curtis distance results indicated that the bacterial composition of hemolymph, digestive gland, kidney and foot were clustered and the bacterial community from gills, gonads and mantle had higher similarity. Analysis of alpha diversity indicated that the microbiota in hemolymph, digestive glands and kidneys were more diverse than those in other tissues. The variation of indigenous microbiome was attached to different tissues of *M. coruscus*. Overall, our results will help improve the knowledge of mussel-associated microbial community, and provide a better understanding for revealing the interaction between the mussel and its host-associated microbiota.

Key words: *Mytilus coruscus*; microbiota; tissue-scaled distribution; 16S *rDNA*

Corresponding author: HE Jianyu. E-mail: hejianyu@zjou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (42020104009, 31671009)