

刘龙江, 刘潇雨, 程天印, 等. 刻点血蜱成蜱中肠菌群结构的分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 54-60.

LIU L J, LIU X Y, CHENG T Y, et al. Analysis of the midgut microbial community structure in adult ticks of *Haemaphysalis punctata* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 54-60.

## 刻点血蜱成蜱中肠菌群结构的分析

刘龙江<sup>1</sup>, 刘潇雨<sup>2</sup>, 程天印<sup>2</sup>, 段德勇<sup>2</sup>, 吴平顺<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃省迭部县动物疫病预防控制中心, 甘肃 迭部 747400;

2. 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 旨在探明雌、雄刻点血蜱中肠菌群结构特征及其差异。从新疆沙湾市绵羊体表采集刻点血蜱雌、雄蜱, 无菌条件下收集雌、雄蜱中肠内容物, 提取各样本细菌总 DNA, PCR 扩增细菌 16S rDNA V3-V4 区, 运用 Illumina NovaSeq 高通量双末端测序, 对数据进行拼接和过滤, 扩增子序列变异 (ASVs) 降噪与物种注释后, 对比分析雌、雄蜱中肠菌群结构的组成及差异。结果: 雌蜱中肠菌群多样性高于雄蜱; 在门水平上, 变形菌门、厚壁菌门、异常球菌门、拟杆菌门、放线菌门在雌、雄蜱中肠内相对丰度较高, 其中变形菌门相对丰度最高, 为 2 个样本的优势菌门, 且变形菌门在雄蜱中肠内的含量大于雌蜱; 在属水平上, *Schlegelella*、不动杆菌属、拟杆菌属、乳杆菌属、短波单胞菌属、罗姆布茨菌属等在雌、雄蜱中肠内的相对丰度较高, 其中 *Schlegelella* 的丰度最高, 且在雌蜱 (41.7%) 中的含量高于雄蜱 (0.8%); 注释到种水平且 2 个样本共有的菌种包括: 西尔瓦诺斯亚栖热菌、鲍曼不动杆菌、柯克斯氏体共生菌、肠乳杆菌、长双歧杆菌、巴氏杆菌拟杆菌等。本研究表明, 刻点血蜱雌、雄蜱中肠菌群结构较为相似, 但各细菌在不同分类级别上的相对丰度差异较大, 这可能与雌、雄蜱吸血及生理特性不同有关。

**关键词:** 刻点血蜱; 雌蜱; 雄蜱; 中肠; 菌群结构

中图分类号: S852.746

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)04-0054-07

## Analysis of the midgut microbial community structure in adult ticks of *Haemaphysalis punctata*

LIU Longjiang<sup>1</sup>, LIU Xiaoyu<sup>2</sup>, CHENG Tianyin<sup>2</sup>, DUAN Deyong<sup>2</sup>, WU Pingshun<sup>1\*</sup>

(1. Diebu County Animal Disease Control and Prevention Center, Diebu 747400, China;

2. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In this study, we aimed to investigate the characteristics of and differences in the midgut microbial community structure of female and male *Haemaphysalis punctata*. The female and male *H. punctata* were collected from the body of sheep in Shawan, Xinjiang. The midgut contents of both sexes were collected under sterile conditions, the total bacterial DNA of each sample was extracted, and the bacterial 16S rDNA V3-V4 region was amplified by PCR and sequenced using Illumina NovaSeq high-throughput double-end sequencing. After splicing and filtering the data, denoising with ASVs, and species annotation, the composition of and differences in the midgut microbial community structure in female and male *H. punctata* were compared and analyzed. The results showed that the diversity of midgut microbial community in the female ticks was higher than that in the male. At the phylum level, the relative abundance of Proteobacteria, Firmicutes, Deinococcota, Bacteroidota, and Actinobacteriota was high in the midgut of the female and male ticks, with Proteobacteria having the highest abundance and being the dominant phylum in the two samples. And the relative abundance of Proteobacteria in the midgut of the male ticks was higher than that of the female. At the genus level, the relative abundance of *Schlegelella*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Brevundimonas*, *Romboutsia* was high in the midgut of both male and female ticks, with *Schlegelella* having the highest abundance and being superior in the female (41.7%) compared with those in the male (0.8%). Annotated to the species level, the bacteria species common to the two samples included *Meiothermus silvanus*, *Acinetobacter baumannii*, *Coxiella endosymbiont*, *Lactobacillus intestinalis*, *Bifidobacterium longum*, and *Bacteroides barnesiae*. The present results indicated that the midgut microbial community structure was relatively similar in both female and male *H. punctata*, but the relative abundance of each bacterium varied greatly at different taxonomic levels, which might be related to the different

收稿日期: 2023-05-09; 修回日期: 2024-01-16

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31902294)

第一作者: 刘龙江, 男, 本科, 畜牧师

\* 通信作者: 吴平顺, 农业技术推广研究员, 主要从事动物疫病防控方面的工作, E-mail: 1444077243@qq.com.

blood-sucking and physiological characteristics of female and male *H. punctata*.

**Keywords:** *Haemaphysalis punctata*; female ticks; male ticks; midgut; microbial community

刻点血蜱 (*Haemaphysalis punctata*) 属于硬蜱科、血蜱属, 常寄生于牛、马、羊等家畜, 广泛分布于英国、美国、西班牙、意大利、以色列等国<sup>[1]</sup>, 在我国其主要分布于新疆地区<sup>[2]</sup>。已有研究表明, 刻点血蜱可传播大巴贝斯虫 (*Babesia major*)、莫氏巴贝斯虫 (*B. motasi*)、双芽巴贝斯虫 (*B. bigemina*)、伯纳特氏立克次氏体 (*Rickettsia burneti*)、斑点热群立克次氏体 (Spotted fever group rickettsiae)、羊泰勒虫 (*Theileria* sp.) 等病原体<sup>[2-3]</sup>。由于雌、雄蜱生活习性、生活周期、吸血特性的不同, 常导致由致病菌、共生菌组成的蜱菌群结构表现不同<sup>[4]</sup>, 如 Choubdar 等<sup>[5]</sup>证实小亚璃眼蜱 (*Hyalomma anatolicum*) 雌蜱中肠菌群多样性高于雄蜱; Kim 等<sup>[6]</sup>发现不同性别长角血蜱 (*H. longicornis*) 体内的菌群结构存在显著差异, 其雌蜱体内的柯克斯氏体共生菌 (*Coxiella endosymbiont*) 相对丰度高于雄蜱。因此, 了解不同性别蜱中肠菌群结构及差异对防控蜱和蜱传病意义重大。

近年来, 随着高通量测序技术的发展, 学者们对不同蜱种的不同发育阶段、不同组织器官、不同地域来源、不同饱血状态中肠菌群结构进行了大量研究<sup>[7-10]</sup>。Portillo 等<sup>[11]</sup>利用 Illumina Miseq 高通量测序技术, 对来源于西班牙拉里奥哈地区不同性别刻点血蜱的中肠菌群结构进行了研究, 发现在雌、雄刻点血蜱中变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌门, 埃立克体属 (*Ehrlichia*) 为优势菌属, 宫本疏螺旋体 (*Borrelia miyamotoi*) 为优势菌种, 且立克次体属 (*Rickettsia*) 在雌蜱中肠内的相对丰度高于雄蜱, 埃立克体属、沃尔巴克氏体属 (*Wolbachia*) 在雄蜱中肠内的含量高于雌蜱。但有研究证实, 地域及宿主不同将影响蜱菌群结构的组成<sup>[12-13]</sup>。因此, 本研究运用 Illumina NovaSeq 高通量测序技术对采自于我国新疆地区绵羊体表的不同性别刻点血蜱中肠菌群结构进行分析, 探究其特征和差异, 为蜱和蜱传病的防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

带 Barcode 的细菌 16S rDNA V3-V4 区扩增引物, 341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3', 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。DNA 片段快速纯化/回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司 (北京); Phusion<sup>®</sup>

High-Fidelity PCR Master Mix、NEB Next<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit 均购自 New England Biolabs 公司。

### 1.2 刻点血蜱样本

20 只饱血刻点血蜱雌蜱和 30 只刻点血蜱雄蜱采自于新疆沙湾市绵羊体表, 并送至湖南农业大学动物医学院寄生虫与媒介中心保存。

### 1.3 细菌 DNA 提取

取雌蜱 5 只、雄蜱 10 只, 75% 酒精对虫体表面进行消毒, 无菌水冲洗, 去除体表杂质。在超净工作台用灭菌眼科剪沿蜱腹部剪开体壁, 将雌蜱、雄蜱中肠内容物分别收集至 2 个含有 1 mL 3.8% 柠檬酸钠无菌生理盐水溶液的灭菌离心管中, 800 r/min 离心 10 min; 取上清液, 12 000 r/min 离心 1 min; 弃去上清液, 将雌蜱和雄蜱中肠内容物沉淀物分别编号为 Hp. F 和 Hp. M。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取各样品细菌基因组 DNA。

### 1.4 16S rDNA 基因扩增及高通量测序

以雌、雄蜱中肠细菌总 DNA 为模板, 以 341F 和 806R 为扩增引物扩增细菌 16S rDNA V3-V4 区。反应体系 (50  $\mu$ L): DNA 模板 1  $\mu$ L, Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix 25  $\mu$ L, 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。扩增条件: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。将扩增片段经 NEB Next<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit 修饰、加测序接头, 并用 Qubit @ 2.0 Fluorometer 定量和 qPCR 检测合格后, 运用 Illumina NovaSeq 平台进行双末端测序。

### 1.5 数据处理

根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据, 截去 Barcode 和引物序列后, 使用 FLASH (V1.2.11, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 软件<sup>[14]</sup>对样本的 reads 进行拼接, 得到 Raw Tags。随后使用 fastp 软件对 Raw Tags 进行质控, 得到 Clean Tags。最后使用 Vsearch 软件将 Clean Tags 与数据库进行比对以检测嵌合体并进行去除<sup>[15]</sup>, 得到 Effective Tags。

### 1.6 扩增子序列变异 (ASVs) 降噪和物种注释

对以上得到的 Effective Tags, 使用 QIIME2 软件中的 DADA2 模块进行降噪, 并过滤掉丰度小于 5 的序列<sup>[16]</sup>, 获得 ASVs 以及特征表。随后, 使用 QIIME2 软件中的 classify-sklearn<sup>[17-18]</sup>模块将 ASVs 与

数据库比对, 得到每个 ASV 的物种信息, 并分别在不同分类水平上统计 2 个样本的群落组成, 以样品中数据量最少的为标准进行均一化处理, 进行 Alpha 多样性分析。

### 1.7 Alpha 多样性分析

使用 QIIME2 软件计算 Observed otus (直观观测到的物种数目), Shannon (样品中的分类总数及其占比), Simpson (表征群落内物种分布的多样性和均匀度), Chao1 (估计群落样品中包含的物种总数), Goods coverage (覆盖度) 和 Pielou\_e (均匀度) 指数, 并绘制稀释曲线。

## 2 结果

### 2.1 数据处理和 ASVs 统计

经测序雌蟀样本 (Hp. F) 获得原始序列 106 252 条, 雄蟀样本 (Hp. M) 获得原始序列 114 803 条。经过质控和去除嵌合体后, Hp. F 和 Hp. M 2 组样本获得的有效序列分别为 87 395 条和 98 740 条, 数据有效率分别达到 82.3% 和 86.1%。将有效序列进行降噪后, Hp. F、Hp. M 获得的 ASVs 数分别为 523 和 415 个, 其中 219 个为 2 个样本所共有 (图 1)。

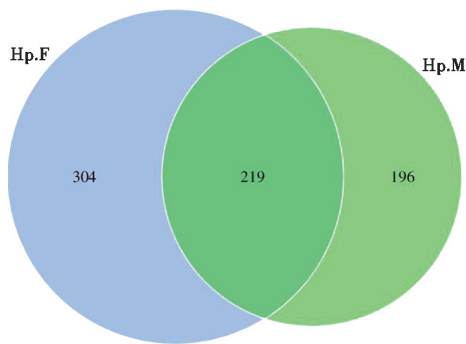


图 1 刻点血蟀 2 个肠内容样本 ASVs 分布韦恩图

### 2.2 细菌在门水平上的分布

获得的 ASVs 经物种注释后, 在门水平上, Hp. F 和 Hp. M 中共发现 11 个门, 每个细菌门在 2 组样品中的相对丰度见表 1。从表 1 中可见, Hp. F 与 Hp. M 中含有的共有菌门为 8 个, 包括: 变形菌门, 厚壁菌门 (Firmicutes), 异常球菌门 (Deinococcota), 拟杆菌门 (Bacteroidota), 放线菌门 (Actinobacteriota), 蓝细菌门 (Cyanobacteria), 脱硫菌门 (Desulfobacterota) 和疣微菌门 (Verrucomicrobiota), 其中变形菌门的相对丰度最高, 且在 Hp. M 内的含量 (81.1%) 高于 Hp. F (65.2%), 为 2 组样本的优势菌门; 厚壁菌门、异常球菌门 (Deinococcota)、拟杆菌门在 Hp. F 中的相对丰度 (16.9%、10.5%、4.7%) 高于

Hp. M (13.0%、0.2%、2.3%); 放线菌门在 Hp. M 中的相对丰度 (2.4%) 高于 Hp. F (1.1%)。除共有菌门外, 弯曲菌门 (Campilobacterota) 和螺旋体门 (Spirochaetota) 为 Hp. F 特有菌门; 梭杆菌门 (Fusobacteriota) 为 Hp. M 独有菌门。

表 1 2 组样品在门水平上的物种相对丰度

细菌门	Hp. F	Hp. M
变形菌门 Proteobacteria	0.652	0.811
厚壁菌门 Firmicutes	0.169	0.130
异常球菌门 Deinococcota	0.105	0.002
拟杆菌门 Bacteroidota	0.047	0.023
放线菌门 Actinobacteriota	0.011	0.024
蓝细菌门 Cyanobacteria	0.006	0.004
脱硫菌门 Desulfobacterota	0.001	0.002
弯曲菌门 Campilobacterota	0.002	0
疣微菌门 Verrucomicrobiota	0.002	0.001
梭杆菌门 Fusobacteriota	0	0.000
螺旋体门 Spirochaetota	0.000	0

### 2.3 细菌在属水平上的分布

Hp. F 和 Hp. M 2 组样本共检测到 189 个细菌属, 其中共有菌属为 119 个, 相对丰度前 10 的共有细菌属在 2 组样本中的分布特点见图 2, 前 50 除前 10 之外的其余 40 种共有细菌属相对丰度见表 2。从图 2 可见, 2 组样本中相对丰度较高的细菌属主要为 *Schlegelella* 属, 不动杆菌属 (*Acinetobacter*), 拟杆菌属 (*Bacteroides*), 乳杆菌属 (*Lactobacillus*), 短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 和罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 等, 且以上菌属在 Hp. F 中的相对丰度均高于 Hp. M。除上述丰度较高的菌属外, 在 2 组样本中均检测到了柯克斯体属 (*Coxiella*), 立克次体属 (*Rickettsia*), 寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*), 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*), 泛菌属 (*Pantoea*), 肠杆菌属 (*Enterobacter*), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 等相对丰度较低的共生菌和致病菌属。另外, Hp. F 内特有菌属 39 种, 其中相对丰度较高的菌属有: 八叠球菌属 (*Sarcina*), 螺杆菌属 (*Helicobacter*), *Rikenellaceae RC9 gut group* 属, *Quinella* 属, *Prevotellaceae UCG-003* 属和小杆菌属 (*Dialister*) 等; Hp. M 内特有菌属 31 种, 其中相对丰度较高菌属包括: CAG-352 菌属, 巨单胞菌属 (*Megamonas*), 劳森菌属 (*Lawsonia*), 细杆菌属 (*Microbacterium*), *Rubellimicrobium* 属和土地芽胞杆菌属 (*Terribacillus*) 等, 这表明雌、雄蟀中肠内菌群结构在属水平上存在较大差异。

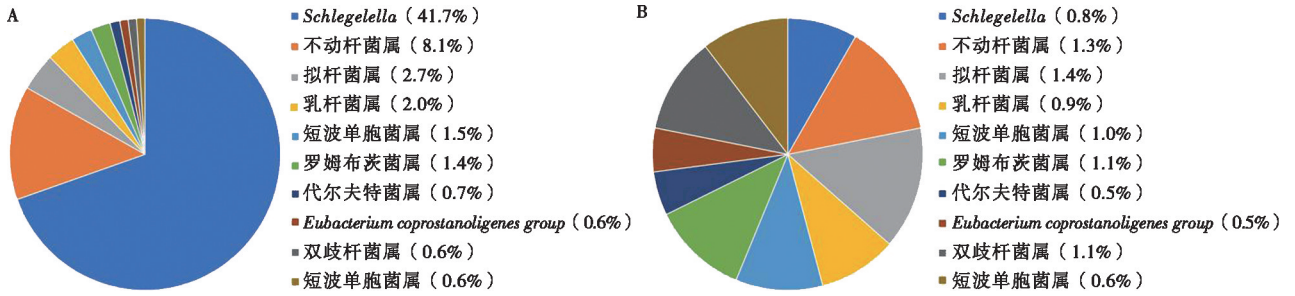


图 2 Hp. F (A) 和 Hp. M (B) 样品前 10 共有菌属的相对丰度

表 2 前 50 中 40 个共有菌属 (前 10 除外) 的相对丰度

细菌属	Hp. F	Hp. M	细菌属	Hp. F	Hp. M
大肠杆菌志贺菌属 <i>Escherichia-Shigella</i>	0.002	0.043	马赛菌属 <i>Massilia</i>	0.002	0.002
杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.001	0.020	<i>Anaerostipes</i>	0.001	0.001
粪杆菌属 <i>Faecalibacterium</i>	0.004	0.007	阿克曼菌属 <i>Akermansia</i>	0.002	0.001
柯克斯体属 <i>Coxiella</i>	0.010	0.002	<i>Terrisporobacter</i>	0.002	0.001
立克次体属 <i>Rickettsia</i>	0.006	0.004	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	0.003	0.001
柯林斯菌属 <i>Collinsella</i>	0.001	0.006	罗氏菌属 <i>Roseburia</i>	0.002	0.001
嗜冷杆菌属 <i>Psychrobacter</i>	0.001	0.005	<i>Dorea</i>	0.001	0.001
<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	0.003	0.005	鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	0.002	0.001
罕见小球菌属 <i>Subdoligranulum</i>	0.004	0.004	脱硫弧菌属 <i>Desulfotribrio</i>	0.001	0.001
胃瘤球菌属 <i>Ruminococcus torques group</i>	0.000	0.003	<i>Turcibacter</i>	0.002	0.001
<i>Agathobacter</i>	0.002	0.003	赖氨酸芽胞杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	0.001	0.001
泛菌属 <i>Pantoea</i>	0.000	0.003	丛毛单胞菌属 <i>Comamonas</i>	0.005	0.001
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	0.002	0.003	金黄杆菌属 <i>Chryseobacterium</i>	0.001	0.001
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	0.004	0.002	<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	0.002	0.001
纺锤链杆菌属 <i>Fusicatenibacter</i>	0.002	0.002	<i>Monoglobus</i>	0.001	0.001
副拟杆菌属 <i>Parabacteroides</i>	0.004	0.002	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	0.001	0.001
<i>Muribaculaceae</i>	0.005	0.002	棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	0.000	0.001
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	0.001	0.002	<i>Colidextribacter</i>	0.001	0.001
<i>Clostridia UCG-014</i>	0.004	0.002	<i>Ruminococcus gauvreauii group</i>	0.001	0.001
萨特氏菌属 <i>Sutterella</i>	0.000	0.002			

### 2.4 细菌在种水平上的分布

注释到种水平且 Hp. F 和 Hp. M 2 个样本中共有的菌种有 28 个, 各菌种相对丰度见表 3。相对丰度较高的菌种包括: 西尔瓦诺斯亚栖热菌 (*Meiothermus silvanus*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、柯克斯氏体共生菌 (*Coxiella endosymbiont*)、肠乳杆菌 (*Lactobacillus intestinalis*)、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、巴氏杆菌拟杆菌 (*B. barnesiae*) 等。除以上共有菌种外, 2 个样本中还分别存在独有菌种, 如双环瘤胃球菌 (*Ruminococcus bicirculans*)、多氏拟杆菌 (*B. dorei*)、粪便乳杆菌 (*Lactobacillus faecis*)、*Butyricoccus* sp.、*Paenibacillus dar-*

*winianus*、*Dialister invisus* 等仅在 Hp. F 被检测到; 类芽胞杆菌 (*Paenibacillus pasadenensis*)、单形拟杆菌 (*B. uniformis*)、马葡萄球菌 (*S. equorum*)、普通拟杆菌 (*B. vulgatus*)、粪便拟杆菌 (*B. stercoris*)、产黑素普氏菌 (*Prevotella melaninogenica*) 等仅在 Hp. M 中被检测到。

### 2.5 Alpha 多样性分析

对 Hp. F 和 Hp. M 2 个样本的 Alpha 多样性指数进行统计, 结果表明 (表 4): 2 个样本的 Goods coverage 均为 1 即 100%, 表明本研究的测序覆盖率高, 测序结果具有高精度性、高有效性和高可信度。Hp. F 的 Simpson 指数和 Shannon 指数均大于 Hp. M,

表明雌蜱菌群多样性大于雄蜱。

表 3 2 组样品在种水平上的物种相对丰度

细菌种	Hp. F	Hp. M
西尔瓦诺斯亚栖热菌 <i>Meiothermus silvanus</i>	0.104	0.002
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	0.059	0.002
柯克斯氏体共生菌 <i>Coxiella endosymbiont</i>	0.010	0.002
肠杆菌 <i>Lactobacillus intestinalis</i>	0.006	0.002
长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	0.001	0.004
巴氏杆菌拟杆菌 <i>Bacteroides barnesiae</i>	0.003	0.001
<i>Brevundimonas staley</i>	0.000	0.003
水生丛毛单胞菌 <i>Comamonas aquatica</i>	0.002	0.001
肠罗斯氏菌 <i>Roseburia intestinalis</i>	0.000	0.001
粪拟杆菌 <i>Parabacteroides merdae</i>	0.001	0.001
<i>Bacteroides coprocola</i>	0.001	0.001
<i>Alistipes putredinis</i>	0.001	0.000
唾液链球菌 <i>Streptococcus salivarius</i>	0.000	0.001
抗辐射不动杆菌 <i>Acinetobacter radioresistens</i>	0.001	0.000
平常拟杆菌 <i>Bacteroides plebeius</i>	0.001	0.000
<i>Bacteroides caccae</i>	0.000	0.000
伶俐瘤胃球菌 <i>Ruminococcus callidus</i>	0.000	0.000
停滞棒杆菌 <i>Corynebacterium stationis</i>	0.000	0.000
<i>Bacterium New</i>	0.000	0.000
格陵兰史前细菌 <i>Chryseobacterium greenlandense</i>	0.000	0.000
<i>Ruminococcus sp.</i>	0.000	0.000
伪旋毛虫 <i>Trichinella pseudospiralis</i>	0.000	0.000
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0.000	0.000
<i>Aquabacterium citratiphilum</i>	0.000	0.000
<i>Bacterium YE57</i>	0.000	0.000
偏白副萨特菌 <i>Parasutterella secunda</i>	0.000	0.000
粪厌氧棒状菌 <i>Anaerostipes hadrus</i>	0.000	0.000
<i>Alistipes finegoldii</i>	0.000	0.000

表 4 样品的 Alpha 多样性分析指数

样本	Chao1	Goods coverage	Observed otus	Pielou_e	Shannon	Simpson
Hp. F	523	1	523	0.508	4.585	0.807
Hp. M	415	1	415	0.46	4.002	0.797

### 3 讨论

本研究利用 Illumina NovaSeq 高通量测序技术，

对刻点血蜱雌、雄蜱中肠菌群结构进行了分析，发现 2 组样本菌群结构之间存在显著差异，共鉴定到 11 个细菌门、189 个细菌属、28 个细菌种。在门水平上，变形菌门为刻点血蜱雌、雄蜱中肠内的优势菌门，这与微小扇头蜱<sup>[10]</sup>、长角血蜱<sup>[19]</sup>、褐黄血蜱 (*H. flava*)<sup>[20]</sup> 的研究结果相一致。Portillo 等<sup>[11]</sup> 发现雌、雄刻点血蜱在属水平上存在明显差异，这与本研究的部分研究结果相一致，如本研究中的立克次体属在刻点血蜱雌蜱体内的相对丰度远高于雄蜱。而立克次体属中诸多菌种作为蜱传病原，已在不同地域的革蜱属 (*Dermacentor*)、血蜱属 (*Haemaphysalis*)、硬蜱属 (*Ixodes*)、扇头蜱属 (*Rhipicephalus*)、璃眼蜱属 (*Hyalomma*) 等蜱中被相继检测到<sup>[21-22]</sup>。本研究中雌、雄刻点血蜱中肠内均检测到该菌属，说明不同性别刻点血蜱可携带立克次体，但由于高通量测序技术的局限性，未能将该菌属鉴定到种水平。

不动杆菌属为革兰阴性菌，已被正式命名的菌种达 38 个，其中大部分为非致病菌，常分布于潮湿的土壤和水域中；少部分菌种为条件性致病菌，可导致呼吸系统、泌尿系统、中枢神经系统等的感染<sup>[23]</sup>。该菌属已在长角血蜱雌蜱中被检测到，且为优势菌属<sup>[24]</sup>，这与本研究结果相一致。除此之外，本研究还发现刻点血蜱雌蜱中肠内的不动杆菌属相对丰度 (8.1%) 高于雄蜱 (1.3%)。有研究表明<sup>[25]</sup>，不动杆菌广泛存在于土壤中，其在蜱体内的出现通常是由于蜱长时间暴露于宿主体表所致，这与雌蜱寄生在宿主体表至饱血的时间远大于雄蜱的生活习性相一致。

鞘氨醇单胞菌属为好氧型革兰阴性杆菌，包括 103 余种菌种，广泛分布于各种水体、沉积物和土壤中，对重金属环境的生物修复与多环芳烃的生物降解具有一定作用<sup>[26]</sup>。少动鞘氨醇单胞菌 (*S. paucimobilis*) 是一种条件致病菌，由其污染的水体或土壤可引发社区及医院内感染，常引起关节炎、骨髓炎、败血症及局部化脓性溃疡等病症，该菌种已在西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 体内被检测到<sup>[27]</sup>。本研究虽未检测到少动鞘氨醇单胞菌，但发现鞘氨醇单胞菌属在刻点血蜱雌、雄蜱中肠内均存在，说明刻点血蜱可携带该菌属，这与在微形血蜱 (*H. wellingtoni*)、豪猪血蜱 (*H. hystricis*)、二棘血蜱 (*H. bispinosa*) 中的发现相一致<sup>[28]</sup>。

与 Portillo 等<sup>[11]</sup> 未检测到葡萄球菌属的研究结果不同，本研究在雌、雄刻点血蜱中皆检测到了葡萄球菌属，且其在雄蜱中肠内的相对丰度高于雌蜱。葡萄球菌属中的菌种多为条件性致病菌，是临床上最常见的革兰阳性菌，其中金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 是一种能引起肺炎、菌血症等多种感染性疾病的化脓性

病原菌<sup>[29]</sup>，且已在黄粉虫 (*Tenebrio molitor*)<sup>[30]</sup>，黑水虻 (*Hermetia illucens*)<sup>[31]</sup>，大蜡螟 (*Galleria mellonella*)<sup>[32]</sup>等昆虫体内被检测到。本试验检测出的葡萄球菌为马葡萄球菌，且该菌种只在刻点血蜱雌蜱中存在，该菌种同样被报道在微小扇头蜱 (*R. microplus*) 和一些血蜱属、璃眼蜱属蜱体内存在<sup>[33]</sup>。

本研究将刻点血蜱雌、雄蜱中肠内的柯克斯体属注释为柯克斯氏体共生菌，且雌蜱中肠内的相对丰度大于雄蜱。柯克斯氏体共生菌已在微小扇头蜱<sup>[34]</sup>，*Amblyomma nuttalli*<sup>[35]</sup>，*Ornithodoros maritimus*，边缘革蜱 (*D. marginatus*) 和六角硬蜱 (*I. hexagonus*)<sup>[36]</sup>等蜱种体内被检测到。有研究表明<sup>[37-38]</sup>，蜱在寄生吸血过程中，由于进食条件不平衡，导致其体内缺乏部分必需营养元素，如 B 族维生素，而柯克斯氏体共生菌正好可为蜱提供 B 族维生素，从而促进蜱的生长发育，发挥互利共生的作用。本研究还发现，柯克斯氏体共生菌在刻点血蜱雌蜱中的含量远高于雄蜱，可能是由于雌蜱生长发育速度较雄蜱快，且与雌蜱在新陈代谢、生理活动时物质消耗量高于雄蜱有关<sup>[39]</sup>。

综上，通过对比不同性别刻点血蜱中肠菌群结构，发现其在门、属、种水平上存在较大差异，这可能与雌、雄蜱吸血及生理特性不同有关。

## 参考文献:

- [1] MEDLOCK J M, HANSFORD K M, VAUX A G C, et al. Has the red sheep tick, *Haemaphysalis punctata*, recently expanded its range in England [J]. Med Vet Entomol, 2018, 32 (4): 473-480.
- [2] 殷宏, 吕文顺. 刻点血蜱生活史的研究 [J]. 中国兽医科技, 1995 (10): 8-10.
- [3] PHIPPS L P, HERNÁNDEZ-TRIANA L M, GOHARRIZ H, et al. Detection of *Theileria luwenshuni* in sheep from Great Britain [J]. Parasit Vectors, 2016, 9: 203.
- [4] BATOOL M, BLAZIER J C, ROGOVSKA Y V, et al. Metagenomic analysis of individually analyzed ticks from Eastern Europe demonstrates regional and sex-dependent differences in the microbiota of *Ixodes ricinus* [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2021, 12 (5): 101768.
- [5] CHOUBDAR N, KARIMIAN F, KOOSHA M, et al. An integrated overview of the bacterial flora composition of *Hyalomma anatolicum*, the main vector of CCHF [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 5 (6): e0009480.
- [6] KIM M, KIM J Y, YI M H, et al. Microbiome of *Haemaphysalis longicornis* tick in Korea [J]. Korean J Parasitol, 2021, 59 (5): 489-496.
- [7] DUAN D Y, LIU Y K, LIU L, et al. Microbiome analysis of the midguts of different developmental stages of *Argas persicus* in China [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2022, 13 (1): 101868.
- [8] GRANDI G, CHIAPPA G, ULLMAN K, et al. Characterization of the bacterial microbiome of Swedish ticks through 16S rRNA amplicon sequencing of whole ticks and of individual tick organs [J]. Parasit Vectors, 2023, 16 (1): 39.
- [9] KRAWCZYK A I, RÖTTJERS L, FONVILLE M, et al. Quantitative microbial population study reveals geographical differences in bacterial symbionts of *Ixodes ricinus* [J]. Microbiome, 2022, 10 (1): 120.
- [10] 段德勇, 程天印. 不同饱血状态微小牛蜱中肠和唾液菌群结构的分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48 (3): 530-537.
- [11] PORTILLO A, PALOMAR A M, DE TORO M, et al. Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: to investigate the vectors for diagnosis [J]. PLoS One, 2019, 14 (3): e0213384.
- [12] CLOW K M, WEESE J S, ROUSSEAU J, et al. Microbiota of field-collected *Ixodes scapularis* and *Dermacentor variabilis* from eastern and southern Ontario, Canada [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2018, 9 (2): 235-244.
- [13] RENÉ-MARTELLET M, MINARD G, MASSOT R, et al. Bacterial microbiota associated with *Rhipicephalus sanguineus* (s. l.) ticks from France, Senegal and Arizona [J]. Parasit Vectors, 2017, 10 (1): 416.
- [14] MAGOČ T, SALZBERG S B L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27 (21): 2957-2963.
- [15] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. Genome Res, 2011, 21 (3): 494-504.
- [16] LI M, SHAO D, ZHOU J, et al. Signatures within esophageal microbiota with progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Chin J Cancer Res, 2020, 32 (6): 755-767.
- [17] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RIDEOUT J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin [J]. Microbiome, 2018, 6 (1): 90.
- [18] BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. Nat Biotechnol, 2019, 37 (8): 852-857.
- [19] ZHANG R, HUANG Z, YU G, et al. Characterization of microbiota diversity of field-collected *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) with regard to sex and blood meals [J]. J Basic Microbiol, 2019, 59 (2): 215-223.
- [20] DUAN D, CHENG T. Determination of the microbial community features of *Haemaphysalis flava* in different developmental stages by high-throughput sequencing [J]. J Basic Microbiol, 2017, 57 (4): 302-308.
- [21] 韩婧, 贺真, 邵中军. 常见蜱传立克次体的研究进展 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2022, 28 (1): 86-89.
- [22] 别双双, 杜春红. 我国新发蜱传立克次体病研究进展 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2021, 28 (4): 263-270.
- [23] 李德宪, 谭守勇. 医院感染不动杆菌属控制进展 [J]. 广东医学, 2015, 36 (12): 1807-1809.
- [24] AGWUNOBI D O, WANG M, WANG Z, et al. The toxicity of the monoterpenes from lemongrass is mitigated by the detoxifying symbiosis of bacteria and fungi in the tick *Haemaphysalis longicornis* [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 247: 114261.
- [25] CLAYTON K A, GALL C A, MASON K L, et al. The characterization and manipulation of the bacterial microbiome of the Rocky

- Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* [J]. Parasit Vectors, 2015, 8: 632.
- [26] ASAF S, NUMAN M, KHAN A L, et al. *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth [J]. Crit Rev Biotechnol, 2020, 40 (2): 138–152.
- [27] ANJUM S I, SHAH A H, AURONGZEB M, et al. Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan [J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25 (2): 388–392.
- [28] KHOO J J, CHEN F, KHO K L, et al. Bacterial community in *Haemaphysalis* ticks of domesticated animals from the Orang Asli communities in Malaysia [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2016, 7 (5): 929–937.
- [29] 李萍, 许红霞, 孟葆林, 等. 金黄色葡萄球菌耐药机制研究进展 [J]. 临床合理用药, 2023, 16 (4): 178–181.
- [30] MCGONIGLE J E, PURVES J, ROLFF J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor* [J]. Dev Comp Immunol, 2016, 59: 34–38.
- [31] GORRENS E, VAN LOOVEREN N, VAN MOLL L, et al. *Staphylococcus aureus* in Substrates for black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and its dynamics during rearing [J]. Microbiol Spectr, 2021, 9 (3): e0218321.
- [32] SHEEHAN G, TULLY L, KAVANAGH K A. *Candida albicans* increases the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* during polymicrobial infection of *Galleria mellonella* larvae [J]. Microbiology (Reading), 2020, 166 (4): 375–385.
- [33] MEUGNIER H, BES M, VERNZOY-ROZAND C, et al. Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese [J]. Int J Food Microbiol, 1996, 31: 325–331.
- [34] GUIZZO M G, TIRLONI L, GONZALEZ S A, et al. *Coxiella* endosymbiont of *Rhipicephalus microplus* modulates tick physiology with a major impact in blood feeding capacity [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 868575.
- [35] NARDI T, OLIVIERI E, KARIUKI E, et al. Sequence of a *Coxiella* endosymbiont of the tick *Amblyomma nuttalli* suggests a pattern of convergent genome reduction in the *Coxiella* genus [J]. Genome Biol Evol, 2021, 13 (1): evaa253.
- [36] BUYSSE M, PLANTARD O, MCCOY K D, et al. Tissue localization of *Coxiella*-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2019, 10 (4): 798–804.
- [37] DURON O, MOREL O, NOËL V, et al. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways [J]. Current Biology, 2018, 28 (12): 1896–1902.
- [38] SONG X, ZHONG Z, GAO L, et al. Metabolic interactions between disease-transmitting vectors and their microbiota [J]. Trends Parasitol, 2022, 38 (8): 697–708.
- [39] BEN-YOSEF M, ROT A, MAHAGNA M, et al. *Coxiella*-like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is required for physiological processes during ontogeny [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 493.