微米尺度KM鼠肠道菌群空间分布特征研究

付瑞标1,王 猛2*,肖 栋3*,李 进1,李忠鹏1,周 瑞1,邵 帅1,张秀智1

¹徐州医科大学附属徐州市立医院(徐州市第一人民医院), 胃肠外科, 江苏 徐州 ²深圳市龙岗区疾病预防控制中心, 微生物检验科, 广东 深圳 ³中国矿业大学, 煤炭精细勘探与智能开发全国重点实验室, 江苏 徐州

收稿日期: 2025年4月3日; 录用日期: 2025年6月4日; 发布日期: 2025年6月16日

摘要

肠道菌群对宿主的健康具有重要影响。目前,相关研究多使用宏观尺度样品(毫米至厘米级),而对于微观尺度(<100μm)下微生物群落的空间分布特征尚缺乏系统认知。本文以7只昆明小鼠为研究对象,使用 16S rRNA基因扩增子测序技术对378个结肠微颗粒样品(20~40μm)和32个结肠块状样品进行了测序。 结果表明,昆明小鼠肠道菌群在物种和功能基因组成上具有明显的空间异质性,其中功能基因的异质性 显著小于物种组成的异质性。微颗粒所能容纳的物种和功能基因数显著低于块状样品,微颗粒间的物种 和功能基因组成的差异显著高于块状样品。基于块状样品和微颗粒样品构建的共现网络存在明显差异。 综上,本研究拓展了微米尺度下小鼠肠道微生物群落空间分布特征的认知,证明使用不同尺度样品推断 得到的种间关系存在明显差异。

关键词

采样尺度,肠道菌群,KM小鼠,微尺度,共现网络

Spatial Distribution of Gut Microbiota in KM Mice at the Micrometer Scale

Ruibiao Fu¹, Meng Wang^{2*}, Dong Xiao^{3*}, Jin Li¹, Zhongpeng Li¹, Rui Zhou¹, Shuai Shao¹, Xiuzhi Zhang¹

¹Department of Gastrointestinal Surgery, Xuzhou Municipal Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University (Xuzhou First People's Hospital), Xuzhou Jiangsu

²Department of Clinical Microbiology, Longgang Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen Guangdong

³National Key Laboratory of Coal Precision Exploration and Intelligent Development, China University of Mining and Technology, Xuzhou Jiangsu

Received: Apr. 3rd, 2025; accepted: Jun. 4th, 2025; published: Jun. 16th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 付瑞标, 王猛, 肖栋, 李进, 李忠鹏, 周瑞, 邵帅, 张秀智. 微米尺度 KM 鼠肠道菌群空间分布特征研究[J]. 微生物前沿, 2025, 14(2): 66-74. DOI: 10.12677/amb.2025.142009

Abstract

The gut microbiota exerts significant impacts on host health. Current studies primarily utilize bulk samples (millimeter to centimeter), while systematic understanding of the spatial distribution characteristics of microbial communities at micrometer resolutions (<100 μ m) remains limited. In this study, we analyzed 7 Kunming mice using 16S rRNA gene amplicon sequencing, including 378 colonic micro-scale grains (20~40 μ m) and 32 bulk samples. Distinct spatial heterogeneity in both taxonomic and functional gene composition of gut microbiota in Kunming mice were observed, with functional heterogeneity being significantly lower than taxonomic heterogeneity. Micro-scale grains accommodated significantly fewer species and functional genes compared to bulk samples, while exhibiting significantly greater inter-grain variability in both taxonomic and functions. Co-occurrence networks constructed from bulk samples and micro-scale grains displayed marked topological differences. This study expands our understanding of spatial distribution patterns in gut microbial communities at micrometer scale, and demonstrates that interspecies relationships inferred from samples of different scales exhibit substantial discrepancies.

Keywords

Sampling Scale, Gut Microbiota, KM Mice, Micro-Scale, Co-Occurrence Network

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

1. 引言

肠道菌群是宿主生理功能的参与者,其组成与空间分布特征对宿主的营养代谢、免疫调节及疾病发 生具有重要影响[1]-[3]。近年来,随着高通量测序技术的快速发展,尤其是宏基因组学方法的应用,人们 对肠道菌群的物种与功能组成已经有了深入的认知,并构建了一系列菌株和基因组数据库[4]-[6]。与此同 时,宏基因组学方法在揭示菌群空间异质性方面也存在一定的局限性,即宏基因组学方法会在菌群基因 组的提取过程中将样品均一化,从而丢失菌群的空间分布信息[7]。因此,目前人们在微观尺度上对于肠 道中细菌的空间分布认识相当有限。

为了更好地了解微生物空间分布信息,近些年来,研究者开发了一系列的空间微生物组学技术(如 HiPR-FISH、SEER-FISH、SHM-seq 等),这些方法使得人们对少数样品中微生物的生物地理学分布模式 有了一定的认知[8]-[10]。研究表明,微生物在样品中的分布是不均匀的,存在一定的空间结构[6]-[10]。 传统宏基因组学方法得到的微生物组成信息往往是样品中数以万计的子群落的平均信息[11]。微生物群 落的空间特异性不仅影响细菌间的代谢相互作用,还会对宿主的代谢和健康造成影响[1]-[3]。目前针对 微观尺度(<100 μm)下肠道菌群的空间分布的研究较少,人们对微观尺度下菌群的分布情况尚缺乏足够 的认知。

本研究以 KM 小鼠作为研究对象,使用扩增子测序技术对 KM 鼠结肠微颗粒进行研究。结果表明, KM 鼠结肠菌群在空间分布上具有显著的异质性,使用微颗粒样品得到的共现关系远与块状样品存在明 显区别。总而言之,本研究拓展了人们在微观尺度上对 KM 鼠肠道菌群空间分布的认知。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

选择 6 周龄的 SPF 级雌性昆明小鼠 7 只,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司(许可证号: SCXK (鲁) 2019 0003)。饲养期间饮用水为灭菌超纯水,使用实验鼠标准饲料喂养,自由采食,饲养周期为 6 周。本项目已通过徐州市第一人民医院医学伦理委员会审核,审核资料见附件。

2.2. 结肠样品的固定

小鼠使用颈椎脱臼法处死后,结肠微颗粒的制备方法按照 Sheth 等人所描述的方法完成[7]。具体如下:取小鼠肠道置于 Methacam 溶液中固定 24 小时。将固定后的结肠裁剪成小于 3 mm 的片段。将含有内容物的片段置于 PBS 溶液中浸泡 5 min,转移至含有 0.1%曲拉通 X-100 的 PBS 溶液中再浸泡 5 分钟,用无菌纸吸干结肠表面的水分。将每个结肠片段放在 PCR 管中,加入凝胶溶液覆盖结肠表面。置于冰上 孵育 5 min,使用移液器移除过量的凝胶液,然后重新添加新的凝胶液,置于冰上孵育 2 小时。移除多余的凝胶溶液后,放在 37℃培养箱中 4 个小时使其完成交联反应。用无菌剃刀剔除表面不含样品的凝胶基质,使用 PBS 洗涤两次后使用 TET 缓冲液洗涤一次[7]。

2.3. 微颗粒的制备与酶解

将包埋后的小鼠结肠片段放入研磨管中,液氮冷冻 5 min,立即使用研磨仪研磨 20 秒。向研磨管中加入 1 ml PBS 溶液,收集其中已破碎的凝胶颗粒。重复冷冻、破碎、收集,直至凝胶块完全破碎。13,000 xg 离心 2 分钟,收集凝胶颗粒。向凝胶颗粒中加入 500 μL 裂解缓冲液,37℃孵育 1 h,再加入 500 μL 消化缓冲液,65℃孵育 15 min;最后 95℃孵育 5 min 以使蛋白酶 K 丧失活性。13,000 xg 离心 2 min 收集凝 胶颗粒,并使用 TET 缓冲溶液洗涤 3 次[7]。

2.4. 微颗粒的分选、PCR 扩增与测序

为了去除颗粒中大颗粒,首先使用 40 μm 细胞筛过滤凝胶颗粒,收集滤液,重复该步骤 2 次以将大颗粒去除干净。使用孔径为 20 μm 尼龙滤网(密理博)对滤液进行过滤,收集滤膜上的凝胶颗粒,重复该步骤 2 次,所得即为粒径介于 20 μm~40 μm 之间的微颗粒[12]。将微颗粒分散于 PBS 缓冲液中,在超净台中,借助于高清电子显微镜(GP-660V),使用 2.5 μL 的移液枪对微颗粒进行分选,将分选出的微颗粒转移 至灭菌的 PCR 中,本次实验总共收集了 4 只小鼠 400 个微颗粒用于后续实验,空白对照为移液枪未吸取 微颗粒,其余操作与实验组相同[12]。

使用引物对 515F: GTG YCA GCM GCC GCGGTA A 和 806R: GGA CTA CNVGGG TWT CTA AT 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V4 区[13] [14]。PCR 扩增体系如下: 0.5 µL 牛血清蛋白(20 mg/ml), 12.5 µL 2 x Taq Plus Master Mix, 0.5 µL 515F (1 µM), 0.5 µL 806R (1 µM), 2.5 µL 样品, 9 µL 无核酸酶水。扩增条 件如下: 98℃ 2 分钟; 25 循环(98℃ 10 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 40 秒); 72℃ 5 分钟; 10℃保藏。扩增产 物使用 PCR 产物纯化试剂盒(CW2301M)进行纯化,凝胶电泳未在空白对照中观测到条带。接下来,为了 给扩增产物添加 Illumina 测序平台的接头,对纯化后的产物再一次进行了扩增,扩增条件如下 98℃ 30 秒; 8 循环(98℃ 10 秒; 55℃ 30 秒; 72℃ 40 秒); 72℃ 5 分钟; 10℃保藏。扩增完成之后,使用胶回 收试剂盒对扩增产物进行纯化,使用 Qubit 对纯化后产物进行定量,各个样品等量混合之后,使用 Illumina NovaSeq6,000 平台进行测序。

2.5. 小鼠结肠样品 DNA 的提取、PCR 扩增与测序

本实验中小鼠结肠除了一部分用于制备凝胶颗粒外,剩下部分用于微生物基因组 DNA 的提取。具体

如下:于超净工作台中,使用剪刀轻轻剥离出肠道内容物,取 0.5g内容物,称之为块状样品。使用粪便 基因组 DNA 提取试剂盒(D2700, Solarbio),按照说明书,对块状样品进行 DNA 的提取。块状样品的 PCR 扩增、文库的构建及测序与 2.4 节相同。

2.6. 生物信息学分析

在获得原始测序序列后,使用 Fastp (v 0.23.2)过滤掉低质量序列[15]。使用 Usearch (v 11.0.667)对序 列进行拼接,舍弃序列数低于 5000 的样品。通过降噪生成 ASVs,同时通过 Denovo 方法和基于参考数 据库(Silva_123)去除 ASVs 中的参考序列[16][17]。香农指数、辛普森指数、Chao1 指数以及样品间 Bray-Curtis 距离使用 R 软件(v 4.3.1)中的 vegan 包进行计算。置换多元方差分析(Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA)用于检测微生物群落之间差异。本研究中变异系数(Coefficient of Variation, CV) 被定义为某一分类单元在样品之间的标准差除以平均值[18]。在计算 ASVs 之间的共现关系时,为了避免 稀有 ASVs 所带来的偶然偏差,仅纳入至少在 10%的颗粒上相对丰度大于 0.1%的 ASVs 用于共线分析。 若两个 ASV 之间的斯皮尔曼系数小于-0.45 或者大于 0.45,且 q 值小于 0.05 (Benjamini-Hochberg),则认 为这两个 ASVs 之间存在显著关联,使用 Gephi (v 0.9.2)绘制共现网络[19]。微生物群落功能基因的预测 使用 PICRUSt2 完成[20]。

3. 结果与分析



3.1. 微颗粒样品微生物多样性显著低于块状样品



本研究中,使用扩增子测序技术对小鼠结肠块状样品和微颗粒样品进行了研究。在过滤掉低质量序 列和去除序列数少于 5000 的样品之后,总共获得 9,074,371 条高质量序列,分属于 410 个样品,其中包 含块状样品 32 个(7 只小鼠),微颗粒样品 378 个(4 只小鼠)。为了便于样品间的比较,我们对样品进行了 抽平处理,每个样品均包含 5016 条序列。稀疏曲线分析表明,随着序列数的增长,ASVs 的增长趋势逐 渐趋于平缓,表明当前序列数能够反映样品中微生物群落的组成(图 1)。经过降噪处理以及嵌合体的去除, 总共获得 1480 个 ASVs。在块状样品中发现 893 个 ASVs,在微颗粒样品中发现 1422 个 ASVs。在块状 样品发现的 893 个 ASVs 中,有 835 个 ASVs 在微颗粒样品中被发现,这 835 个 ASVs 在块状样品和微 颗粒样品中的相对丰度分别为 99.14% ± 1.76、97.61% ± 3.62,说明手工挑选的微颗粒样品具有代表性, 能够反映小鼠结肠微生物群落组成。

如图 2 所示,结肠微颗粒中所观测到的 ASV 数量、香农指数和 Chao1 指数显著低于块状样品(p < 0.001, p < 0.001, p < 0.001, Wilcoxon Test) (图 2(A)~(C)),而辛普森指数显著高于块状样品,说明微颗粒样品中微生物的丰度和多样性显著低于块状样品(p < 0.001, Wilcoxon Test) (图 2(D))。即,随着样品尺度的减小,群落多样性也随之降低。



Figure 2. Microbial diversity between micro-grains and bulk samples from mouse colon. (A) ASV count; (B) Shannon index; (C) Chao1 index; (D) Simpson index; (E) PCoA analysis based on Bray-Curtis distance at ASV level; B representing bulk samples, S micro-grains, and M1~M12 individual mice. *** represents p < 0.001 **图 2.** 小鼠结肠微颗粒与块状样品微生物多样性比较。(A) ASV 数量; (B) 香农指数; (C) Chao1 指数; (D) 辛普森指数; (E) ASV 水平基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析; 其中 B 代表块状样品, S 代表微颗粒, M1~M12 代表不同小鼠。***代表 p < 0.001

3.2. 微颗粒间微生物群落组成存在异质性

如图 3 所示,块状样品和微颗粒样品中厚壁菌门的含量最高,其平均相对丰度为 58.64%,接下来为 拟杆菌门(27.78%)、变形菌门(6.54%)和放线菌门(3.66%)。块状样品和微颗粒样品两者优势菌门一致, 同样证明了微颗粒样品的代表性,即能够反映小鼠结肠微生物群落组成情况。即便是在门水平,微生物 在颗粒间的分布也是不均一的。比如,以小鼠 9 M 为例,厚壁菌门在块状样品间的相对丰度介于 49.3%~ 55.6%,而在微颗粒间的相对丰度介于 29.8%~83.8%。放线菌门在块状样品中的相对丰度介于 5.28%~ 8.13%,在微颗粒间的相对丰度介于 0.02%~30.6%。图 4(A)分别计算了各个菌门在块状和微颗粒样品间 的变异系数,结果显示各个菌门在微颗粒间的变异系数(3.05±3.04)显著高于块状样品(0.24±0.37) (p < 0.001, Paired Wilcoxon Test)。在 ASVs 水平上,微颗粒间微生物群落组成的变异更为明显,各个 ASVs 在 微颗粒间的变异系数(3.51±2.88)同样显著大于块状样品(0.51±0.60) (p < 0.001, Paired Wilcoxon Test), 且变异数值较菌门水平更大(图 4(B))。值得注意的是,没有一个 ASV 存在于所有的微颗粒中,仅有 23 个 ASVs 在一半以上的颗粒中出现。PCoA 分析也发现,同一只小鼠结肠块状样品微生物群落组成较为 相近,而微颗粒样品则差异较大(图 2(E))。微颗粒样品间的 Bray-Curtis 距离值显著大于块状样品(p < 0.001, Wilcoxon Test) (图 4(C))。因此,同一只小鼠块状样品,微颗粒间的微生物群落组成差异大,即存 在异质性。



Figure 3. Microbial community composition at phylum level, with B denoting bulk samples and S micro-grains 图 3. 门水平微生物群落组成; 其中 B 代表块状样品, S 代表微颗粒

3.3. 微颗粒间功能基因组成的异质性显著低于物种组成异质性

通过 PICRUSt2, 总共从 410 个样品中预测得到 6706 个功能基因。PCoA 分析显示, 块状样品的功能 基因组成与微颗粒存在显著差异(PERMANOVA, R² = 0.012, p = 0.004) (图 4(E))。微颗粒间功能基因的差 异显著大于块状样品(p < 0.001, Wilcoxon Test)。但是, 样品间功能基因的异质性显著低于物种组成的异 质性(p < 0.001, Wilcoxon Test) (图 4(C),图 4(D))。与微颗粒间不存在共有 ASVs 有所不同,这些微颗粒 间共存在 1845 个共有基因,其相对丰度为 94.13%±1.22。在块状样品中,平均每个样品含有 276±8 个 代谢途径(KEGG Level 3);而对于微颗粒样品,平均每个微颗粒含有 263±9 个代谢途径(KEGG Level 3)。 假定块状样品上的微生物所含功能基因能完成所有肠道生态功能,虽然单个微颗粒中 ASVs 的数量仅有 块状样品的 29.87%,但却可以完成绝大部分生态功能(85.04%)。



Figure 4. Intra-group variation comparison between micro-grains and bulk samples from mouse colon. (A) Coefficient of variation at phylum level; (B) Coefficient of variation at ASV level; (C) Inter-sample Bray-Curtis distances at the ASV level; (D) Inter-sample Bray-Curtis distances at the functional genes level; (E) PCoA analysis based on functional gene Bray-Curtis distances, with B denoting bulk samples, S micro-grains, and M1~M12 individual mice. *** represents p < 0.001 **图 4.** 小鼠结肠微颗粒与块状样品组内差异性比较。(A) 门水平变异系数; (B) ASV 水平变异系数; (C) 样品间 ASVBray-Curtis 距离; (D) 样品间功能基因 Bray-Curtis 距离; (E) 基于功能基因 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析; 其

中 B 代表块状样品, S 代表微颗粒, M1~M12 代表不同小鼠。***代表 p < 0.001

3.4. 微生物共现网络分析

为了比较由块状样品和微颗粒样品构建微生物共现网络的异同,本节分别对7只小鼠结肠块状样品、9M、10M、11M、12M这4只小鼠的结肠微颗粒分别构建了共线网络。为了避免随机性的影响,仅选择至少在10%样品中相对丰度大于0.1%的ASVs用于共现网络的绘制。结果如图5所示,块状样品得到的共现网络是由252个节点、8011条边所组成(图5(A)),明显较由微颗粒样品绘制的共线关系网络复杂。比如10M微颗粒共现网络,仅由26个节点、16条边所组成(图5(B));12M微颗粒的共现网络仅由46个节点、36条边所组成(图5(C))。除此之外,块状样品构建的共现网络和由微颗粒构建的共现网络仅有少数共现关系共有。比如10M微颗粒中的16个共现关系,仅有5个在块状样品中发现;12M微颗粒中的36个共现关系,也仅有5个在块状样品中发现。基于块状样品构建的共现网络显示绝大部分共现关系发生在厚壁菌门和拟杆菌门的ASVs之间,且同时存在正相关关系(43%)和负相关关系(57%)。而基于微颗粒构建的共现网络则表明,绝大部分共现关系与拟杆菌门的ASVs相关,且只存在正相关关系。总而言之,基于块状样品和微颗粒构建的共现关系网络具有明显的差异。



Figure 5. Co-occurrence network analysis at ASV level of micro-grain and bulk samples from mouse colon. (A) Co-occurrence network of bulk samples; (B) Co-occurrence network of micro-grains from 10 M; (C) Co-occurrence network of micro-grains from 12 M, with red connectors denoting positive correlations, green connectors negative correlations, each node representing distinct ASVs, node colors corresponding to bacterial phyla, and node sizes reflecting the number of co-occurrence interactions **2 5.** ASV 水平小鼠结肠微颗粒与块状样品共现网络比较。(A) 块状样品的共现网络分析; (B) 小鼠 10 M 微颗粒共现网络分析; (C) 小鼠 12 M 微颗粒共现网络分析; 其中红色连线代表正相关关系, 绿色连线代表负相关关系, 每个圆圈代表不同 ASV, 圆圈的颜色代表不同菌门, 圆圈的大小代表与其他 ASV 共现关系的数量

4. 讨论

随着测序技术尤其是宏基因组学技术的发展,人们对动植物以及各种自然环境下微生物群落的组成 和功能已经做了深入的研究,这些研究大部分是基于宏观尺度样品进行的。因此,目前人们对微观尺度 下的微生物的分布状态了解较少,仅有少数研究报道了土壤团聚体、活性污泥和人体肠道等环境中的微 生物微观尺度的分布状态,这些研究均表明自然环境状态下,微生物群落存在异质性[21]-[24]。本研究通 过对 7 只小鼠的结肠块状样品和微颗粒样品进行了研究,结果表明,虽然厚壁菌门和拟杆菌门均为这两 种样品中的优势菌门,但是微颗粒间微生物群落组成的差异要显著高于块状样品,表明小肠肠道微生物 群落组成也存在一定的异质性。此外,由于微颗粒的体积远小于块状样品,其所能容纳的微生物数量变 少,这可能是微颗粒样品物种多样性和丰度均显著低于块状样品的原因。

本研究发现,微颗粒上功能基因的异质性要显著低于物种组成的异质性,这反映出小鼠肠道存在功 能冗余这一现象。功能冗余这一现象在微生物群落中广泛存在,即具有特定功能微生物的多样性,以应 对环境变化带来的不确定性[25]。虽然该项结果是通过预测得到的,但是随着单细胞测序技术的发展,以 及其在肠道菌群研究上的应用,功能冗余这一现象会得到更为直接的实验证据[26]。

微生物共现网络通常被用于描述微生物间的相互作用关系。一些研究表明,从宏观尺度样品得到的 微生物共现网络通常反映的是微生物群落对一些环境因子的响应,而并非真正的种间关系;相应地,微 观尺度微生物群落的研究往往会得到更加真实的种间关系[11]。本研究发现,虽然块状样品和微颗粒主要 物种组成相一致,但通过微颗粒得到的共现数量要远远少于通过块状样品得到的数量,并且仅有少数共 现关系在块状样品和微颗粒样品中同时发现。这表明在不同尺度上对相同的样品进行研究往往会得到不 同的共现关系,但究竟何种能够代表真正的种间关系,还需要后续通过实验进行深入地验证。

总而言之,本研究使用扩增子测序技术对小鼠结肠微颗粒和块状样品进行了研究。结果表明,块状样品和微颗粒中的微生物群落组成和功能基因组成具有显著差异。微颗粒中所能容纳的微生物数量和功能基因数显著低于块状样品。微颗粒间的微生物群落组成差异和功能基因显著高于块状样品。基于块状样品构建的共现网络共现关系多于微颗粒样品,且共现关系种类存在差异。本研究拓展了微观尺度下小鼠肠道微生物群落组成、功能和分布状态的认知。

基金项目

徐州市重点研发计划(社会发展)项目(KC22137)《胃旁路术对肥胖糖尿病大鼠肠道菌群多样性变化 影响》。

参考文献

- Schirmer, M., Garner, A., Vlamakis, H. and Xavier, R.J. (2019) Microbial Genes and Pathways in Inflammatory Bowel Disease. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 497-511. <u>https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6</u>
- [2] Roje, B., Zhang, B., Mastrorilli, E., Kovačić, A., Sušak, L., Ljubenkov, I., et al. (2024) Gut Microbiota Carcinogen Metabolism Causes Distal Tissue Tumours. Nature, 632, 1137-1144. <u>https://doi.org/10.1038/s41586-024-07754-w</u>
- [3] Song, X., Zhang, H., Zhang, Y., Goh, B., Bao, B., Mello, S.S., et al. (2023) Gut Microbial Fatty Acid Isomerization Modulates Intraepithelial T Cells. *Nature*, 619, 837-843. <u>https://doi.org/10.1038/s41586-023-06265-4</u>
- [4] Liu, C., Zhou, N., Du, M., Sun, Y., Wang, K., Wang, Y., et al. (2020) The Mouse Gut Microbial Biobank Expands the Coverage of Cultured Bacteria. *Nature Communications*, 11, Article No. 79. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13836-5
- [5] Liu, C., Du, M., Abuduaini, R., Yu, H., Li, D., Wang, Y., *et al.* (2021) Enlightening the Taxonomy Darkness of Human Gut Microbiomes with a Cultured Biobank. *Microbiome*, 9, Article No. 119. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01064-3
- [6] Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M., Strozzi, F., Beracochea, M., Shi, Z.J., et al. (2020) A Unified Catalog of 204,938 Reference Genomes from the Human Gut Microbiome. Nature Biotechnology, 39, 105-114. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3
- [7] Sheth, R.U., Li, M., Jiang, W., Sims, P.A., Leong, K.W. and Wang, H.H. (2019) Spatial Metagenomic Characterization of Microbial Biogeography in the Gut. *Nature Biotechnology*, 37, 877-883. <u>https://doi.org/10.1038/s41587-019-0183-2</u>
- [8] Shi, H., Shi, Q., Grodner, B., Lenz, J.S., Zipfel, W.R., Brito, I.L., et al. (2020) Highly Multiplexed Spatial Mapping of Microbial Communities. Nature, 588, 676-681. <u>https://doi.org/10.1038/s41586-020-2983-4</u>
- [9] Cao, Z., Zuo, W., Wang, L., Chen, J., Qu, Z., Jin, F., et al. (2023) Spatial Profiling of Microbial Communities by

Sequential FISH with Error-Robust Encoding. *Nature Communications*, **14**, Article No. 1477. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-023-37188-3</u>

- [10] Lötstedt, B., Stražar, M., Xavier, R., Regev, A. and Vickovic, S. (2023) Spatial Host-Microbiome Sequencing Reveals Niches in the Mouse Gut. *Nature Biotechnology*, 42, 1394-1403. <u>https://doi.org/10.1038/s41587-023-01988-1</u>
- [11] Cordero, O.X. and Datta, M.S. (2016) Microbial Interactions and Community Assembly at Microscales. Current Opinion in Microbiology, 31, 227-234. <u>https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.015</u>
- [12] Wang, M., Zhao, K., Li, X. and Xie, B. (2023) Insights into the Composition and Assembly Mechanism of Microbial Communities on Intertidal Microsand Grains. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1308767. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1308767</u>
- [13] Apprill, A., McNally, S., Parsons, R. and Weber, L. (2015) Minor Revision to V4 Region SSU rRNA 806R Gene Primer Greatly Increases Detection of SAR11 Bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75, 129-137. <u>https://doi.org/10.3354/ame01753</u>
- [14] Parada, A.E., Needham, D.M. and Fuhrman, J.A. (2015) Every Base Matters: Assessing Small Subunit rRNA Primers for Marine Microbiomes with Mock Communities, Time Series and Global Field Samples. *Environmental Microbiology*, 18, 1403-1414. <u>https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023</u>
- [15] Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. and Gu, J. (2018) Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34, i884-i890. <u>https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560</u>
- [16] Edgar, R.C. (2016) UNOISE2: Improved Error-Correction for Illumina 16S and ITS Amplicon Sequencing. Biorxiv. https://doi.org/10.1101/081257.
- [17] Edgar, R.C. (2016) UCHIME2: Improved Chimera Prediction for Amplicon Sequencing. Biorxiv. <u>http://dx.doi.org/10.1101/074252.</u>
- [18] Zhao, B., Chen, L., Zhang, M., Nie, C., Yang, Q., Yu, K., et al. (2023) Electric-Inducive Microbial Interactions in a Thermophilic Anaerobic Digester Revealed by High-Throughput Sequencing of Micron-Scale Single Flocs. Environmental Science & Technology, 57, 4367-4378. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.2c08833</u>
- [19] Bastian, M., Heymann, S. and Jacomy, M. (2009) Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media*, 3, 361-362. https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937
- [20] Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., et al. (2020) PICRUST2 for Prediction of Metagenome Functions. Nature Biotechnology, 38, 685-688. <u>https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6</u>
- [21] Liu, H., Hart, M. and Kong, Z. (2022) The Distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities at Soil Aggregate Level in Subtropical Grasslands. Archives of Agronomy and Soil Science, 68, 1755-1767. <u>https://doi.org/10.1080/03650340.2021.1928088</u>
- [22] Chen, L., Zhao, B., Palomo, A., Sun, Y., Cheng, Z., Zhang, M., et al. (2022) Micron-Scale Biogeography Reveals Conservative Intra Anammox Bacteria Spatial Co-Associations. Water Research, 220, Article 118640. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118640</u>
- [23] Richardson, M., Zhao, S., Lin, L., Sheth, R.U., Qu, Y., Lee, J., et al. (2025) SAMPL-Seq Reveals Micron-Scale Spatial Hubs in the Human Gut Microbiome. Nature Microbiology, 10, 527-540. <u>https://doi.org/10.1038/s41564-024-01914-4</u>
- [24] Geier, B., Sogin, E.M., Michellod, D., Janda, M., Kompauer, M., Spengler, B., et al. (2020) Spatial Metabolomics of in Situ Host-Microbe Interactions at the Micrometre Scale. Nature Microbiology, 5, 498-510. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0664-6
- [25] Louca, S., Polz, M.F., Mazel, F., Albright, M.B.N., Huber, J.A., O'Connor, M.I., et al. (2018) Function and Functional Redundancy in Microbial Systems. *Nature Ecology & Evolution*, 2, 936-943. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1
- [26] Lloréns-Rico, V., Simcock, J.A., Huys, G.R.B. and Raes, J. (2022) Single-Cell Approaches in Human Microbiome Research. Cell, 185, 2725-2738. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.040</u>