

土壤动物肠道微生物样本采集及分析方法

Methods for Collection and Analysis of Gut Microbiota in Soil Animals

郝操^{1,2}, 龚鑫³, 朱冬⁴, 吴东辉^{1,2,*}

¹ 东北师范大学环境学院, 国家环境保护湿地生态与植被恢复重点实验室, 长春 130117

² 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 湿地生态与环境重点实验室, 长春 130102

³ 南京农业大学资源与环境科学学院, 土壤生态实验室, 南京 210095

⁴ 中国科学院城市环境研究所, 城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021

*通讯作者: wudonghui@neigae.ac.cn

引用格式: 郝操, 龚鑫, 朱冬, 吴东辉. (2023). 土壤动物肠道微生物样本采集及分析方法. **Bio-101 e2204825**. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2204825.

How to cite: Hao, C., Gong, X., Zhu, D. and Wu, D. H. (2023). Methods for Collection and Analysis of Gut Microbiota in Soil Animals. **Bio-101 e2204825**. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2204825.(in Chinese)

摘要: 土壤动物肠道微生物在与土壤动物协同进化过程中形成了稳定的生态关系, 能够影响宿主的健康, 进而能够介导土壤动物发挥生态功能。近些年, 土壤动物肠道微生物研究工作方兴未艾, 日渐得到重视。土壤动物肠道微生物多样性和群落结构由宿主和环境因素共同塑造, 同时也因宿主肠道形态、发育阶段、食性、物种类别以及栖息生境和时空分布存在较大个体和种群差异。土壤动物种类繁多, 分布广泛, 土壤动物样本的收集和保存方式对土壤动物肠道微生物有直接影响。标准化的土壤动物肠道微生物样本采集流程和分析程序是保证实验结果科学性、可靠性和重复性的充分必要条件。本文依据已经发表的国内外文献, 系统总结了适合肠道微生物研究的不同体型的土壤动物样本收集和储存方法; 重点介绍了野外土壤动物肠道微生物样本采集方法、基因组 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序流程; 同时简述了肠道微生物多样性和群落结构的分析方法, 以期土壤动物肠道微生物研究提供方法上的见解, 利于土壤动物肠道微生物研究的规范

化和程序化。

关键词：土壤无脊椎动物，共生微生物，DNA 提取，高通量测序，标准化工作流程

研究背景

土壤动物种类众多、数量庞大，具有多样的生态型和取食策略。作为土壤生物多样性的的重要组成部分，土壤动物在生态系统物质循环、土壤健康评价方面发挥着重要作用 (邵元虎 等, 2015; 孙新 等, 2021)。土壤动物肠道系统定居着细菌、真菌在内丰富多样的微生物 (Hao et al., 2020; Wang et al., 2021)，这些微生物对土壤动物本身食物消化、营养获取、发育和健康均发挥着至关重要的作用 (Bahrndorff et al., 2018; Zhu et al., 2018)。同时，土壤动物肠道微生物能够直接或间接地调控土壤生态学效应，并影响土壤健康 (Ding et al., 2019; Sun et al., 2020)。肠道微生物是联系土壤动物宿主和外界环境的重要纽带，受宿主和环境因素共同影响。随着高通量测序手段及组学技术的发展，快速和定量研究土壤动物肠道微生物多样性已成为土壤生态学和微生物生态学领域研究热点 (Kudo et al., 2019; Zhu et al., 2021; Gong et al., 2022)。

近些年，土壤动物肠道微生物领域研究年发文量增长快速 (郝操 等, 2022)。目前，土壤动物肠道微生物多样性和群落组成及其驱动机制，群落内物种共存机制和群落构建的理论研究是土壤动物肠道微生物多样性领域研究的前沿 (Berg et al., 2016; Gong et al., 2018; Kudo et al., 2019; Zhu et al., 2021)。土壤动物肠道微生物介导的环境安全如抗性基因、微塑料、人类实践 (土地利用方式和农业施肥管理) 以及两者之间的联系是土壤动物肠道微生物领域的热点研究内容 (Zhu et al., 2018; Ding et al., 2019; Zhang et al., 2021; Song et al., 2022)。土壤动物肠道微生物的提取和分析是土壤动物肠道微生物研究的基础 (郝操 等, 2022)。科学的土壤动物取样和保存方法，可靠的肠道微生物采集方法及准确的微生物多样性分析程序，对于更好地开展土壤动物肠道微生物多样性研究意义重大。但迄今为止，还没有规范的关于土壤动物肠道微生物多样性研究方法的文献和资料的发表。因此，本文从土壤动物样品的收集和保存及其肠道微生物采集、DNA 提取和高通量测序程序几个方面进行详细阐述，以为土壤动物肠道微生物多样性研究提供方法性见解，有利于土壤动物肠道微生物研究的标准化和规范化。

实验流程图



材料与试剂

1. 无菌移液枪头 (10 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L)
2. 无菌 EP 离心管 (1.5 mL 和 2 mL)
3. 无菌手套
4. 无菌剪刀
5. 无菌镊子
6. 无菌药勺
7. 无菌昆虫针
8. 无水乙醇

9. ddH₂O

10. Fast DNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals, American)

11. PCR 用 8 联管

12. 上/下游引物

细菌通用引物集:

515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')

806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAA-3')

真菌通用引物集:

ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')

ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')

13. 2× Taq PCR 预混液 (Diamond)

14. 琼脂糖

15. TAE 缓冲液 (50×; pH 8.0-8.6)

16. 4S Green Plus 无毒核酸染料 (BBI)

17. DNA Marker (100-2,000 bp, Sangon Biotech)

18. AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 试剂盒 (Axygen Biosciences, American)

19. Tris-HCl 缓冲液 (1 mol/L; pH 7.4-7.6)

仪器设备

1. 超净工作台

2. 体视镜

3. 显微镜

4. 涡旋仪

5. 研磨仪 (Fast Prep-24, MP Biomedicals, American)

6. 高速离心机 (Thermo Scientific)

7. Eppendorf 移液枪 (10 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL)

8. 恒温水浴锅 (0~100°C)

9. NanoDrop 2000 超微量分光光度计

10. PCR 仪 (ABI GeneAmp[®] 9700)

11. 制胶槽
12. 凝胶成像系统
13. 荧光投射切胶仪
14. Illumina Miseq PE300 测序平台

实验步骤

一、土壤动物样本收集与保存

1. 土壤动物样本收集

土壤动物样本收集工作是研究其体内肠道微生物群落组成和多样性的基础。土壤动物样本收集方法因动物体型的不同而有所差异。对于小型土壤动物 (以线虫为例), 通常使用浅盘法结合贝尔曼漏斗法对土壤样品内线虫群落进行提取 (骆静梅 等, 2021), 并使用无水乙醇保存线虫, 以固定其肠道微生物群落 (Berg et al., 2016; Zheng et al., 2020); 对于中型土壤动物 (以螨类和跳虫为例), 土壤和凋落物中的螨类使用干漏斗法进行分离提取 (Gong et al., 2018; Zhu et al., 2021)。跳虫通常使用干漏斗法、手捡法和陷阱法进行提取, 并使用无水乙醇对收集到的螨类和跳虫样本进行保存 (Hao et al., 2020; Zhu et al., 2021)。另外, 线虫、螨类和跳虫样本的分离和提取工作应在 6 小时内完成, 以减少其肠道微生物群落的改变 (Zhu et al., 2021); 对于大型土壤动物 (以甲虫和蚯蚓为例), 甲虫通常使用陷阱法和手捡法收集 (Kudo et al., 2019), 而蚯蚓使用手捡法和电击法进行收集 (Zheng et al., 2021; Gong et al., 2022), 同样使用无水乙醇对动物样本进行保存和固定。除选择合适的收集方法外, 依据具体研究目的确保收集到足够土壤动物个体样本。对于野外收集到的土壤动物样品, 为降低肠道内容物被消解的风险, 需要在低温环境下尽快运输回实验室。

2. 土壤动物样本保存

用于研究土壤动物肠道微生物的土壤动物样品, 应储存在于低温环境中。短期内进行肠道微生物 DNA 提取可将土壤动物样本储存于-20℃环境下, 而长期储存则应保存在-80℃环境中。土壤动物样本和微生物 DNA 样本, 储存期间忌反复冻融, 避免因此带来 DNA 降解。研究者有时会采集周围环境微生物样本, 以此来调查环境微生物多样性。环境微生物样本运输和储存条件与土壤动物样本要保持一致。

二、土壤动物肠道样本采集

在土壤动物肠道微生物采集前，需要对土壤动物进行分类和鉴定。可利用形态学特征结合分子学手段确定物种身份 (Zhu et al., 2021)。肠道内容物采集方式因土壤动物肠道组织解剖难易程度而异。对于小、中型土壤动物 (如线虫、螨类和跳虫)，由于个体体型偏小，肠道不易解剖且其肠道内容物提取困难，可通过先去除个体体表微生物进而研究其体内以肠道微生物为主的微生物群落；对于大型土壤动物 (如甲虫和蚯蚓)，通常解剖个体并获得其肠道内容物，进一步研究其肠道微生物群落特征。另外，土壤动物肠道微生物调查研究通常基于单头个体和多头个体混合两种方式进行肠道微生物 DNA 提取和测序。部分中小型土壤动物单头个体提取的肠道微生物 DNA 浓度较低，较难达到测序标准，可采用多头个体混合提取 DNA，所有试验处理混合个体数目需保持一致；大型土壤动物则以单头个体进行肠道微生物研究。以下针对不易解剖肠道和易解剖肠道土壤动物类群，分别介绍获取其肠道内容物具体流程。

1. 不易解剖肠道土壤动物的肠道微生物采集 (以线虫、螨类和跳虫为例)

线虫先使用 0.5%次氯酸钠溶液洗脱 3 次，接着使用无菌磷酸盐缓冲液或无菌水洗脱线虫 5 次，以移除其体表微生物 (Zheng et al., 2019; Zhu et al., 2021)。可利用 20 头 (Zheng et al., 2021)、30 头 (Zhu et al., 2021) 或 100 头 (Berg et al., 2016) 线虫个体进行总 DNA 提取。混合多头个体提取可提高 DNA 浓度和测序成功率，并能够减少个体间肠道微生物的变异。

螨类使用 0.5%次氯酸钠溶液洗脱 3 次，然后使用无菌磷酸盐缓冲液或无菌水洗脱 5 次 (Zhu et al., 2021)；也可利用 1% Tween 20 洗脱 2 min, 98%乙醇洗脱 5 min, 1% Tween 20 洗脱 2 min, 5% bleach (主要成分为次氯酸钠) 洗脱 5 min, 最后由 1% Tween 20 洗脱 2 次的流程对螨类样本进行洗脱 (Gong et al., 2018)。跳虫提取肠道微生物的前处理可遵循与线虫和螨类相同的洗脱程序 (Hao et al., 2020; Zhu et al., 2021)；对于部分活体跳虫，也可低温致跳虫个体麻木后，在体视镜下使用无菌解剖工具获取其肠道组织 (Zhu et al., 2018; Zhang et al., 2021)。目前，多数研究使用多头螨类或跳虫个体进行肠道微生物 DNA 提取和多样性研究。

2. 易解剖肠道土壤动物的肠道微生物采集 (以甲虫和蚯蚓为例)

甲虫个体先用 75%乙醇对虫体体表进行擦拭消毒，接着利用昆虫针固定虫体，借助无菌解剖刀和剪刀将甲虫胸、腹部打开，使用无菌镊子取出各段肠道组织，置于装有 DNA

提取液的裂解离心管中 (Chouaia et al., 2019; Kudo et al., 2019)。通过挑破肠壁的方式释放出肠道内容物，并挑出肠道组织；蚯蚓个体解剖方法与甲虫相似，蚯蚓个体体表先经过消毒处理，接着固定蚯蚓，使用无菌解剖刀从蚯蚓头部至尾端将表皮组织划开 (也可使用剪刀剪开)，取出肠道组织，并释放肠道内容物 (Zheng et al., 2021; Song et al., 2022; Wang et al., 2022)。

三、肠道微生物 DNA 提取 (以 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒为例)

1. 向装有肠道内容物样本的裂解离心管 (Lysing Matrix tube) 中加入 978 μL Sodium Phosphate Buffer 和 122 μL MT buffer，充分混匀。裂解管内确保剩余一定空间，利于高效裂解；
2. 使用研磨仪 (Fast Prep-24, MP Biomedicals) 对装有肠道内容物样本的裂解离心管进行裂解，运行速度 6.0，运行时间 40 s；
3. 高速离心机设置 $14,000 \times g$ 速度，离心 15 min；
4. 将裂解离心管上清液转移到 2 mL 无菌离心管，加入 250 μL PPS (Protein Precipitation Solution)，充分混匀；
5. $14,000 \times g$ 速度下离心 5 min，将上清液转移到 2 mL 无菌离心管。向装有上清液离心管中加入 1 mL Binding Matrix，充分混匀，并静置 10 min；
6. 弃掉 600 μL 上清液，并混合剩余溶液。吸取 500 μL 混合溶液至 SpinTM filter tube 滤网中。 $14,000 \times g$ 速度下离心 1 min，弃掉 SpinTM filter tube 中滤液。原离心管剩余液体混合后再次加入 SpinTM filter tube 滤网中，并离心。反复执行该步骤，直至原离心管无液体剩余；
7. 向 SpinTM filter tube 滤网中加入 500 μL SEWS-M 溶液。使用移液枪将 SEWS-M 溶液与滤膜上的基质充分混匀；
8. $14,000 \times g$ 速度下离心 1 min，弃掉 SpinTM filter tube 中收集到的滤液。可重复 3.7 步骤，以将基质中的杂质充分去除；
9. SpinTM filter tube 在 $14,000 \times g$ 速度下离心 2 min；
10. 将 SpinTM filter tube 的滤网转移到 2 mL 无菌新离心管中。室内无菌环境中放置 5 min 以上，以去除残留乙醇；
11. 向滤网中加入 50~100 μL DES，放在 50~55°C 水浴锅孵育 5 min；

12. $14,000 \times g$ 速度下离心 2 min, 弃掉滤网, 收集 DNA 洗脱液。DNA 浓度使用 NanoDrop 2000 检测, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。DNA 样本放于低温环境中保存。

注意: 如果同时调查环境微生物多样性, 环境微生物 DNA 的提取流程应与肠道微生物保持一致。

四、微生物多样性测序

1. PCR 扩增

使用 515F 和 806R 引物集对细菌 16S rRNA 基因 V4 区进行扩增 (Berg et al., 2016; Kudo et al., 2019; Zhang et al., 2021; Zhu et al., 2021); 使用 ITS1F 和 ITS2 引物集对真菌 ITS1 区进行扩增 (Kudo et al., 2019; Zhang et al., 2021)。各 DNA 样本执行三次技术学重复, PCR 扩增体系 (20 μ l) 包括: 10 ng DNA 模板, 0.8 μ L 上游/下游引物 (5 μ M), 10 μ L Taq PCR Mix, 加 ddH₂O 至 20 μ L。扩增条件为: 95°C/5 min, 35 循环 (95°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/30 s), 最后 72°C 延伸 5 min (Zhu et al., 2018; Ding et al., 2019; Wang et al., 2021)。

注意: 以上是目前土壤动物肠道微生物多数研究使用的引物集及扩增程序, 实际实验中可能需要根据具体研究土壤动物和肠道微生物类群进行一定调整, 以扩增出正确目标产物并满足测序要求。

2. 高通量测序

使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2%琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor™-ST (Promega, USA) 进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2 $\times$ 300 文库。具体步骤为: (1)连接“Y”字形接头, 用于混合测序时区分不同文库样本; (2)使用磁珠筛选去除接头自连片段; (3)利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; (4)氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段。利用 Illumina 公司 Miseq PE300 平台进行测序。

五、微生物多样性分析程序

1. 下机原始数据处理

原始序列利用 QIIME2 (<https://qiime2.org>) 进行分析 (刘永鑫 等, 2021)。使用

DADA2 (Callahan et al., 2016) 对原始序列进行质控、修剪、过滤、拼接、去除嵌合体，并聚类为扩增序列变体 (ASV)。采用内置算法特征分类器 (Feature-classifier)，并基于 Native Bayes 方法训练的 SILVA 13_8 和 UNITE 8.0 数据库对 ASVs 代表序列分别进行细菌和真菌物种注释 (Wang et al., 2021; Zhu et al., 2021)，设置比对阈值为 0.8。去除线粒体、叶绿体、宿主基因序列和单条序列 ASVs，可对所有样本稀释到相同序列深度，得到的 ASV 表用于下游数据分析。

2. 微生物多样性分析

2.1. 微生物多样性和物种组成分析

微生物多样性分析和制图可在 RStudio 中进行。利用 ASV 实际观测数、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、Coverage 指数和 PD 指数进行微生物群落 alpha 多样性分析，主要使用 “vegan” 和 “picante” 包。基于主坐标分析 (PCoA) 方法通常用来分析微生物群落 beta 多样性，基于 “vegan” 和 “ape” 包。PERMANOVA (adonis test) 用于检验不同组间或样品间微生物群落结构的差异情况以及不同分组对微生物群落结构影响程度。微生物群落组成情况可以使用堆积图或热图展示。利用 LEfSe 线性判别分析可以揭示不同组间差异显著的物种情况。STEMP 软件可以实现主成分分析以及两组和多组的物种差异比较。Wilcoxon test 和 Kruskal-Wallis test 可以用于检验两组和多组微生物多样性和相对丰度的显著性差异情况（若为非正态数据）。

2.2. 微生物共现网络分析

微生物共现网络分析愈来愈多地被应运在土壤动物肠道微生物研究当中，用于揭示同一微生物类群内不同物种或不同微生物类群间物种的共现模式及共存机制 (Zhu et al., 2021; Gong et al., 2022)。通常使用 “igraph” 和 “psych” 包计算微生物群落物种之间相关性和显著性重要参数，进一步可利用 Gephi 或 Cytoscape 软件对互作网络图数据进行可视化。

2.3. 微生物群落构建过程分析

微生物群落的多种生态过程，同质性选择和异致性选择 (确定性过程) 以及扩散限制和同质性扩散 (随机性过程) 如何驱动土壤动物肠道微生物群落构建已成为土壤动物肠道微生物领域研究的前沿 (Zhu et al., 2021)。由于系统发育具有保守型，通过平均最近物种距离 β MNTD (between-community mean nearest taxon distance) 和最近物种指数 β NTI (between- community nearest taxon index) 计算样品间的系统发育变化。 β NTI 表

示 β MNTD 的观测值和基于零模型计算的随机值之间的差异。 β NTI 可利用“ape”和“picante”工具包进行计算。 $-2 \leq \beta$ NTI ≤ 2 表示随机性过程； β NTI < -2 为同质性选择过程， β NTI > 2 为异质性选择过程。Bray-Curtis 距离观测值和基于零模型的随机值之间差异的 RC_{bray} (Bray-Curtis-based Raup-Crick), 用来评估扩散过程对群落构建过程的影响。 $|\beta$ NTI| < 2 且 $RC_{\text{bray}} > 0.95$ 为扩散限制； $|\beta$ NTI| < 2 且 $RC_{\text{bray}} < -0.95$ 为同质性扩散； $|\beta$ NTI| < 2 且 $|RC_{\text{bray}}| < 0.95$ 为未知因素。以此，来量化不同生态过程对土壤动物肠道微生物群落构建的相对贡献。

致谢

本研究由国家自然科学基金面上项目 (42071059 和 41671259) 资助。感谢姬俏俏，乌云嘎，张鹏，肖婷婷在稿件准备过程中提供的帮助。

参考文献

1. 郝操, Chen Ting-Wen, 吴东辉. (2022). [土壤动物肠道微生物多样性研究进展](#). *生态学报* 42(8): 3093-3105.
2. 刘永鑫, 陈同, 钱旭波, 白洋. (2021). [使用 QIIME 2 分析微生物组 16S rRNA 基因扩增子测序数据](#). Bio-101 e2003554.
3. 骆静梅, 张晓珂, 梁文举. (2021). [土壤线虫采集、标本制作与数据分析](#). Bio-101 e1010621.
4. 邵元虎, 张卫信, 刘胜杰, 王晓丽, 傅声雷. (2015). [土壤动物多样性及其生态功能](#). *生态学报* 35(20): 6614-6625.
5. 孙新, 李琪, 姚海凤, 刘满强, 吴东辉, 朱冬, 朱永官. (2021). [土壤动物与土壤健康](#). *土壤学报* 58(5): 1073-1083.
6. Bahrndorff, S., de Jonge, N., Hansen, J. K., Lauritzen, J. M. S., Spanggaard, L. H., Sorensen, M. H., Yde, M. and Nielsen, J. L. (2018). [Diversity and metabolic potential of the microbiota associated with a soil arthropod](#). *Sci Rep* 8(1): 2491.
7. Berg, M., Stenuit, B., Ho, J., Wang, A., Parke, C., Knight, M., Alvarez-Cohen, L. and Shapira, M. (2016). [Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial environments](#). *ISME J* 10(8): 1998-2009.

8. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. and Holmes, S. P. (2016). DADA2: [High-resolution sample inference from Illumina amplicon data](#). *Nat Methods* 13(7): 581-583.
9. Chouaia, B., Goda, N., Mazza, G., Alali, S., Florian, F., Gionechetti, F., Callegari, M., Gonella, E., Magoga, G., Fusi, M., et al. (2019). [Developmental stages and gut microenvironments influence gut microbiota dynamics in the invasive beetle *Popillia japonica* Newman \(Coleoptera: Scarabaeidae\)](#). *Environ Microbiol* 21(11): 4343-4359.
10. Ding, J., Zhu, D., Chen, Q. L., Zheng, F., Wang, H. T. and Zhu, Y. G. (2019). [Effects of long-term fertilization on the associated microbiota of soil collembolan](#). *Soil Biol Biochem* 130: 141-149.
11. Gong, X., Chen, T. W., Zhang, L., Pizl, V., Tajovsky, K. and Devetter, M. (2022). [Gut microbiome reflect adaptation of earthworms to cave and surface environments](#). *Anim Microbiome* 4(1): 47.
12. Gong, X., Chen T.-W., Zieger, S. L., Bluhm, C., Heidemann, K., Schaefer, I., Maraun, M., Liu, M. Q. and Scheu, S. (2018). [Phylogenetic and trophic determinants of gut microbiota in soil oribatid mites](#). *Soil Biol Biochem* 123: 155–164.
13. Hao, C., Chen T.-W., Wu Y. G., Chang L. and Wu D. H. (2020). [Snow microhabitats provide food resources for winter-active *Collembola*](#). *Soil Biol Biochem* 143: 107731.
14. Kudo, R., Masuya, H., Endoh, R., Kikuchi, T. and Ikeda, H. (2019). [Gut bacterial and fungal communities in ground-dwelling beetles are associated with host food habit and habitat](#). *ISME J* 13(3): 676-685.
15. Song, J., Li, T., Zheng, Z., Fu, W., Long, Z., Shi, N., Han, Y., Zhang, L., Yu, Y. and Fang, H. (2022). [Carbendazim shapes microbiome and enhances resistome in the earthworm gut](#). *Microbiome* 10(1): 63.
16. Sun, M., Chao, H., Zheng, X., Deng, S., Ye, M. and Hu, F. (2020). [Ecological role of earthworm intestinal bacteria in terrestrial environments: A review](#). *Sci Total Environ* 740: 140008.

17. Wang, H. T., Ma, L., Zhu, D., Ding, J., Li, G., Jin, B. J., Shao, Y. H., Zhang, W. X., Song, M. Y. and Fu, S. L. (2022). [Responses of earthworm *Metaphire vulgaris* gut microbiota to arsenic and nanoplastics contamination.](#) *Sci Total Environ* 806(Pt 2): 150279.
18. Wang, Y. F., Qiao, M., Duan, G. L., Li, G. and Zhu, D. (2021). [Insights into the role of the fungal community in variations of the antibiotic resistome in the soil collembolan gut microbiome.](#) *Environ Sci Technol* 55: 11784-11794.
19. Zhang, Q., Zhang, Z., Lu, T., Yu, Y., Penuelas, J., Zhu, Y. G. and Qian, H. (2021). [Gammaproteobacteria, a core taxon in the guts of soil fauna, are potential responders to environmental concentrations of soil pollutants.](#) *Microbiome* 9(1): 196.
20. Zheng, F., Bi, Q. F., Giles, M., Neilson, R., Chen, Q. L., Lin, X. Y., Zhu, Y. G. and Yang, X. R. (2021). [Fates of Antibiotic Resistance Genes in the Gut Microbiome from Different Soil Fauna under Long-Term Fertilization.](#) *Environ Sci Technol* 55(1): 423-432.
21. Zheng, F., Zhu, D., Chen, Q. L., Bi, Q. F., Yang, X. R., O'Connor, P. and Zhu, Y. G. (2020). [The driving factors of nematode gut microbiota under long-term fertilization.](#) *FEMS Microbiol Ecol* 96(4): fiae037.
22. Zhu, D., Chen Q. L., An X. L., Yang X. R., Christie P., Ke X., Wu L. H. and Zhu Y. G. (2018). [Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition.](#) *Soil Biol Biochem* 116: 302-310.
23. Zhu, D., Delgado-Baquerizo M., Ding J., Gillings M. R. and Zhu Y. G. (2021). [Trophic level drives the host microbiome of soil invertebrates at a continental scale.](#) *Microbiome* 9(1): 189.