

免培养法研究野生川金丝猴肠道内生细菌多样性

杨曼¹ 兰阿峰^{1,2} 郭素芬¹ 丁小维^{1,2} 邓百万^{1,2*}

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院 陕西 汉中 723001)

(2. 陕西省食药菌工程技术研究中心 陕西 汉中 723001)

摘要:【目的】了解野生川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)肠道内生细菌的组成及其多样性。

【方法】提取川金丝猴肠道内生细菌总 DNA, 选用细菌通用引物 799F 和 1492R 对总 DNA 进行 16S rRNA 基因特异性扩增, 构建川金丝猴肠道内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 对阳性克隆进行限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)分析, 并对 *Hae* III 酶切带谱菌株进行测序, 构建系统发育树。【结果】根据酶切带谱分析和测序结果, 将随机挑取的 157 个阳性克隆归为 27 个不同的可操作分类单元(OTUs)。系统发育分析表明这些克隆序列有 62.10% 属于厚壁菌门(Firmicutes), 其中包括梭菌属(*Clostridium*)、*Cellulosilyticum* 属、*Robinsoniella* 属、*Anaerofustis* 属、*Blautia* 属和 *Anaerovorax* 属, 有 37.90% 属于未培养细菌。【结论】川金丝猴肠道内生细菌多样性丰富, 并且可能存在新的分类单元。

关键词: 免培养, 川金丝猴, 肠道内生细菌, 多样性

Culture-independent analysis of intestinal microbial diversity from *Rhinopithecus roxellana*

YANG Man¹ LAN A-Feng^{1,2} GUO Su-Fen¹ DING Xiao-Wei^{1,2} DENG Bai-Wan^{1,2*}

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: [Objective] The composition and diversity of intestinal microbial diversity of wild Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*) were investigated. [Methods] The total DNA extracted from endophytic bacterial was performed 16S rRNA gene specific amplification by used bacteria-specific primers 799F and 1492R and constructed a clone library. Then, 16S rRNA gene phylogenetic tree was established by analyzed positive clones used polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and by sequenced some of the clones. [Results] The 157 clones analyzed were grouped into 27 operational taxonomic units (OTUs), where the clone distribution was as follows: 62.10% of Firmicutes which contained *Clostridium*, *Cellulosilyticum*, *Robinsoniella*, *Anaerofustis*, *Anaerovorax* and *Blautia*, 37.90% of uncultured bacteria. [Conclusion] The intestine bacterial of wild Sichuan snub-nosed monkey has a rich diversity and maybe exist new taxon.

基金项目: 陕西省科技厅科技统筹创新计划项目(No. 2012HBGC-20); 陕西理工学院人才引进启动项目

*通讯作者: ☒: 2210309868@qq.com

收稿日期: 2013-10-29; 接受日期: 2013-12-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

Keywords: Culture-independent, Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*), Intestinal microbial, Biodiversity

金丝猴(*Rhinopithecus*)是我国特有的珍贵动物,群栖高山密林中,分为川金丝猴、黔金丝猴、滇金丝猴和 2012 年新近发现的“怒江金丝猴”(暂定名)^[1-3]。此外还有越南金丝猴和缅甸金丝猴两种金丝猴,均已被列为国家一级保护动物。但是由于多样性的缺乏和人类长期对森林植被的乱砍滥伐,使得其栖息地的生境日趋破碎化,并日益呈“岛屿”状分布,金丝猴的生存受到了极大的威胁,濒危程度令人担忧^[3]。川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)是我国特有的珍稀物种,国家I级保护动物,分布于我国陕西、四川、甘肃及湖北等地^[1-2]。川金丝猴总数约为 15 000 只^[3],是濒危野生动植物国际贸易公约(CITES)附录I物种,已被世界自然保护联盟(IUCN)红皮书列为易危(VU),中国濒危动物红皮书列为濒危^[4]。

微生物广泛存在于自然界中,如在空气、水、土壤、食物中以及人和动植物体内均普遍存在,它们有些是致病菌,有些是益生菌,有些则对其它生物没有明显的影响,据此可将微生物分为病原菌群、有益菌群和中间菌群^[5]。人和动物的肠道内存着大量的微生物,这些微生物形成复杂的动态平衡微生物区系^[5]。目前,动物肠道内生细菌的研究报道很多,例如王海青等做了海洋经济动物肠道细菌群落的种群分子多样性分析^[6],赵凯等研究了白蚁肠道共生微生物多样性及其防治方法^[7],李可俊等研究了几种水生动物肠道细菌的分子生态学^[8]。通过对动物肠道微生物多样性研究,我们可以更好地了解这些动物健康及生理状态,进而更好地去保护它们或者利用它们为人类做出更大贡献。

动物肠道微生物的研究,主要手段分为传统的培养方法和现代分子生物学方法。传统的培养方法分离到的微生物数量很少,有报道称传统方法分离到的微生物物种只有微生物总量的 1%–5%左右,而其余 95%–99%微生物种群还仍然未被分离和识别^[9]。而现代分子生物学方法又称免培养方法,与

传统的分离鉴定方法完全不同,能够有效地解决传统的培养方法无法获取微生物的缺点^[10]。目前利用免培养方法研究微生物多样性报道较多,其好处在于不需要对微生物进行培养,只要提取其 DNA,设计微生物 16S/18S rRNA 的引物,利用该引物扩增后测序,并进行序列比对,就可以知道微生物的种类及各个物种之间的亲缘关系^[5,11]。川金丝猴作为一种珍稀保护动物,其肠道微生物多样性研究鲜见报道,所以本文通过免培养技术对川金丝猴肠道细菌多样性进行研究,为川金丝猴的人工饲养及检测其健康状况等工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 本实验材料取自陕西省佛坪自然保护区,是一只健康成年雄性野生川金丝猴直肠内容物,该雄性金丝猴在猴王争夺战中受伤后死亡,取其直肠冻存于–70 °C 待用。

1.1.2 主要仪器和试剂: 凝胶扫描成像系统(Gel Doc)、PCR 扩增仪(Mycycler),美国 Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R)、核酸测定仪(Bio Photometer plus)、移液器系列(Eppendorf),德国 Eppendorf 公司;Ultra Clear® Fecal DNA Isolation Kit 提取试剂盒,美国 MO BIO 公司;感受态细胞制备试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物快速克隆试剂盒、Taq DNA 聚合酶、PCR 引物、X-gal、IPTG 等均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 金丝猴肠道内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建

1.2.1 提取总 DNA: 直肠内容物总 DNA 的提取使用美国 MO BIO 公司生产的 Ultra Clear® Fecal DNA Isolation Kit 试剂盒。按照试剂盒说明提取 DNA 后将其干燥,加入 20 μL TE 缓冲液溶解

DNA, -20°C 储存备用。

1.2.2 16S rRNA 基因扩增：细菌 16S rRNA 基因通用引物选择参考邱服斌等^[12]和李振东等^[13]的研究,采用 799F: 5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3' 和 1492R: 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3' 进行扩增,预期扩增长度为 730 bp 左右。PCR 反应体系(25 μL): $2\times\text{Taq}$ Master Mix 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下引物各 1.5 μL , 模板 DNA 4 μL , ddH₂O 5.5 μL 。反应条件: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 2 min, 共 33 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖电泳检测。

1.2.3 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选：Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒将扩增后 730 bp 左右的目的条带切胶纯化回收。纯化产物与 pMD18-T vector 连接,连接产物转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞。阳性克隆子的初步筛选参照文献[14]: 将转化后的细胞涂布含氨苄青霉素(100 mg/L)、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板 37°C 避光培养 14–16 h 进行蓝白斑筛选。

1.3 PCR-RFLP 分析

挑取阳性克隆子用 pMD18-T 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段进行菌落 PCR 验证。菌落 PCR 体系: $2\times\text{Taq}$ Master Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下引物各 1.5 μL , ddH₂O 7 μL , 菌液 1 μL , 总体积为 20 μL 。反应程序: 95°C 5 min; 94°C 50 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min, 共 33 个循环; 72°C 10 min。限制性内切酶 *Hae* III 对菌落 PCR 产物进行酶切,酶切体系 20 μL : $10\times\text{Buffer}$ 2 μL ; *Hae* III 1 μL ; PCR 产物 5 μL ; ddH₂O 12 μL 。 37°C 酶切过夜。酶切产物用 2.5% 的琼脂糖电泳检测。酶切图谱用 Quantity One 软件进行分析,选取酶切带型不同的代表克隆对应的菌液送往上海生工进行测序。将 *Hae* III 酶切带谱分析不同且测序结果也不同的克隆的归为 1 个 OTU。克隆文库覆盖率统计分析应用公式: $C=[1-(n/N)]\times 100\%$ ^[15], 这里 n 代表在 16S rRNA 基因克隆文库仅出现一次

的 OTU 的数量, N 代表 16S rRNA 基因克隆文库的总数。

1.4 克隆文库发育分析

测序结果在 NCBI 网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 运用 VecScreen 在线检验工具去除载体序列,并运用 CHECK_CHIMERA 程序在 RDP (Ribosomal Database Project) 在线数据库(<http://rdp8.cme.msu.edu/cgiis/chimera.cgi>) 对序列进行嵌合体检验。之后提交到 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行 BLAST 检索,下载同源性较高的模式菌株的数据,生成 Fasta 格式文件。所有 Uncultured bacteria 使用 RDP classifier 进行分类^[16]。用 ClustalX 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 MEGA 5 按照 Neighbor-Joining 法聚类,选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析,构建系统发育树。所得的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 数据库,登录号为: KF233597–KF233704。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取及 16S rRNA 基因特异性扩增

提取川金丝猴肠道内生细菌总 DNA,应用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行特异性扩增,得到 730 bp 的目标片段,见图 1。

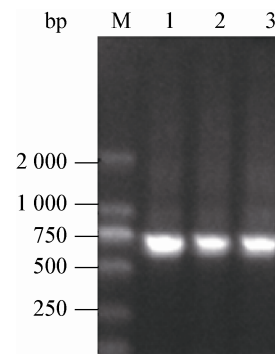


图 1 川金丝猴肠道内生细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增图

Figure 1 Amplification results of 16S rRNA gene of endophytic bacteria from the intestinal tract of *Rhinopithecus roxellana*

Note: M: DL2000 marker; 1–3: Bacterial 16S rRNA gene products.

2.2 PCR-RFLP 分析

从构建的 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选了 157 个阳性克隆,以质粒通用引物进行菌落 PCR 扩增(图 2),扩增产物(>900 bp)用 *Hae* III 进行插入片段的 RFLP 分析,挑选酶切带谱不同的克隆送往上海生工生物工程有限责任公司测序部测序。部分片段检测结果见图 3。由图 3 可见酶切充分,条带均在 100–750 bp 之间,其总和均接近于菌落 PCR 产物大小。测序结果去除嵌合序列,并排除重复序列后共得到 27 个 OTUs (代表 124 个有效序列)。根据公式,计算得克隆文库的覆盖率 *C* 为 91.9%,可以代表川金丝猴肠道内生细菌的多样性。

2.3 细菌 16S rRNA 基因系统发育分析

选取不同酶切带谱对应的阳性克隆进行测序,序列比对结果将 124 个阳性克隆(去除嵌合体 and 重

复序列)归为 2 个类群:厚壁菌门(Firmicutes)的梭状芽胞杆菌纲(Clostridia)和未培养细菌(Uncultured bacteria)。经序列比对 124 个阳性克隆分别属于 Lachnospiraceae、Peptostreptococcaceae、Eubacteriaceae、Ruminococcaceae、Epulopiscium_f、Mogibacterium_f、Christensenellaceae、Porphyromonadaceae 9 个科。文库中梭状芽胞杆菌占总克隆总数的 62.10%,分为 9 个 OTUs,其中包括 Peptostreptococcaceae 科的 4 个属 *Robinsoniella* 属、*Anaerofustis* 属、*Blautia* 属、*Cellulosilyticum* 属和 *Anaerovorax* 属。文库中有 37.90% (代表 47 个序列)属于未培养细菌,包括 18 个 OTUs,有 5 个 OTUs 可以确定到属,与可培养菌相比,*Barnesiella* 属是独有的。未能确定种属的有 13 个 OTUs,其中 10 个 OTUs 归于 Christensenellaceae 科中,Lachnospiraceae 科和 Ruminococcaceae 科各自有 1 个 OTU,还有 1 个 OTU 归于 Bacteroidales 门中。在总文库中(124 个有效序列),有 30.65% 的 16S rRNA 基因序列与已知基因序列相似性小于 97%,具体结果见表 1。根据细菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树见图 4。

2.3.1 Clostridia: 克隆文库中梭状芽胞杆菌纲(Clostridia)包含了 77 个序列,占总克隆文库的 62.10%,代表了 9 个 OTUs,为该克隆文库的优势类群。其中,67 个克隆与梭菌属(*Clostridium*)具有较高的相似性,占整个克隆文库的 54.03%,为该克隆文库的最优势菌属。比对结果显示,这 67 个序列与已知序列相似度从 99.04%到 99.31%不等,但其与梭菌属(*Clostridium*)相似度均在 97%以上;还有 2 个 OTUs 属于 *Cellulosilyticum* 属和 *Anaerovorax* 属;其余 3 个 OTUs 分别与 *Robinsoniella*、*Anaerofustis* 和 *Blautia* 在系统发育树上聚为一簇。

2.3.2 未培养细菌: 克隆文库中有 47 个序列属于未培养细菌,这 47 个序列与已知未培养细菌序列相似性从 89.47%到 99.28%,代表 18 个 OTUs。其中有 22 个序列相似度在 97%以上,占这 47 个序

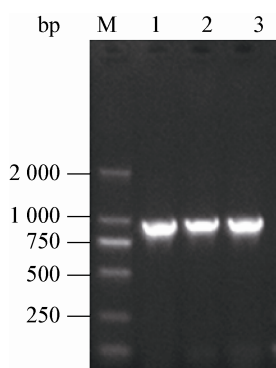


图 2 pMD18-T 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段的菌落 PCR 扩增图

Figure 2 The colony PCR amplification of the insert by the universal primer: M13-47 and M13-48

Note: M: DL2000 marker; 1–3: Positive clones.

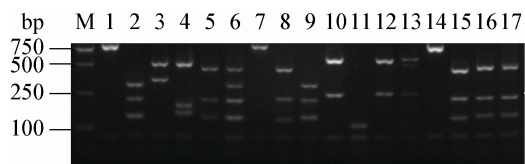


图 3 部分细菌阳性克隆子的 *Hae* III 酶切图谱

Figure 3 *Hae* III restriction patterns of some amplified 16S rRNA genes

Note: M: DL2000 marker; 1–17: Positive clones.

列的 46.81%。经使用 RDP classifier 比对发现这 47 个未培养细菌有 5 个 OTUs 可以确定到种或者属，有 2 个 OTUs 分别属于 Lachnospiraceae 科和 Ruminococcaceae 还有 1 个 OTU 归于 Bacteroidales 门中，在进化树中形成独立分支。其余有 10 个 OTUs 包含 26 个序列都属于梭菌目中的 Christensenellaceae 科，占未培养细菌总数的 55.32%，属于未培养细菌中的优势类群。

表 1 野生川金丝猴肠道内生细菌 16S rRNA 基因序列比对结果				
Table1	Sequence alignment results of the endophytic bacterium 16S rRNA gene from the <i>Rhinopithecus roxellana</i>			
类群 Group	克隆数量 Clone numbers	代表克隆 Representative clones	最相似菌株 The most similar strains	相似度 Identity (%)
Clostridia (62.10%)	77			
Peptostreptococcaceae	53	J91	<i>Clostridium lituseburense</i> (M59107)	99.13
	11	J23	<i>Clostridium bartlettii</i> (DQ238609)	99.31
	1	J26	<i>Clostridium mayombeii</i> (FR733682)	99.04
	2	J12	<i>Clostridium</i> (EU762270)	99.17
Lachnospiraceae	5	J43	<i>Robinsoniella</i> (AF445285)	96.10
	1	J92	<i>Blautia faecis</i> (HM626178)	91.92
Eubacteriaceae	1	J45	<i>Anaerofustise</i> (DQ353937)	93.84
Epulopiscium_f	2	J3	<i>Cellulosilyticum</i> (AF087643)	93.00
Mogibacterium_f	1	J130	<i>Anaerovorax</i> (AM500802)	92.17
Uncultured bacteria (37.90%)	47			
Peptostreptococcaceae	3	J96	<i>Clostridium</i> XI (EF682951)	99.28
Mogibacterium_f	3	J104	<i>Anaerovorax</i> (GQ451179)	92.17
Porphyromonadaceae	5	J10	<i>Barnesiella</i> (GQ451223)	98.61
Epulopiscium_f	2	J65	<i>Cellulosilyticum</i> (AF087643)	91.88
	2	J43	<i>Robinsoniella peoriensis</i> (HQ742846)	96.10
Lachnospiraceae	2	J101	Uncultured bacterium (DQ800447)	92.13
Ruminococcaceae	3	J44	Uncultured bacterium (AM500796)	99.13
Christensenellaceae	6	J1	Uncultured bacterium (GQ897477)	95.88
	1	J8	Uncultured bacterium (EU844016)	96.43
	4	J14	Uncultured bacterium (GQ451290)	98.76
	4	J16	Uncultured bacterium (EU773391)	96.66
	2	J19	Uncultured bacterium (GQ451312)	99.04
	1	J20	Uncultured bacterium (EF402471)	93.11
	3	J54	Uncultured bacterium (EU774423)	95.41
	2	J55	Uncultured bacterium (AY858538)	93.20
	2	J61	Uncultured bacterium (FJ374206)	95.22
	1	J58	Uncultured bacterium (DQ796030)	89.47
Bacteroidales	1	J10	Uncultured bacterium (GQ451223)	98.61

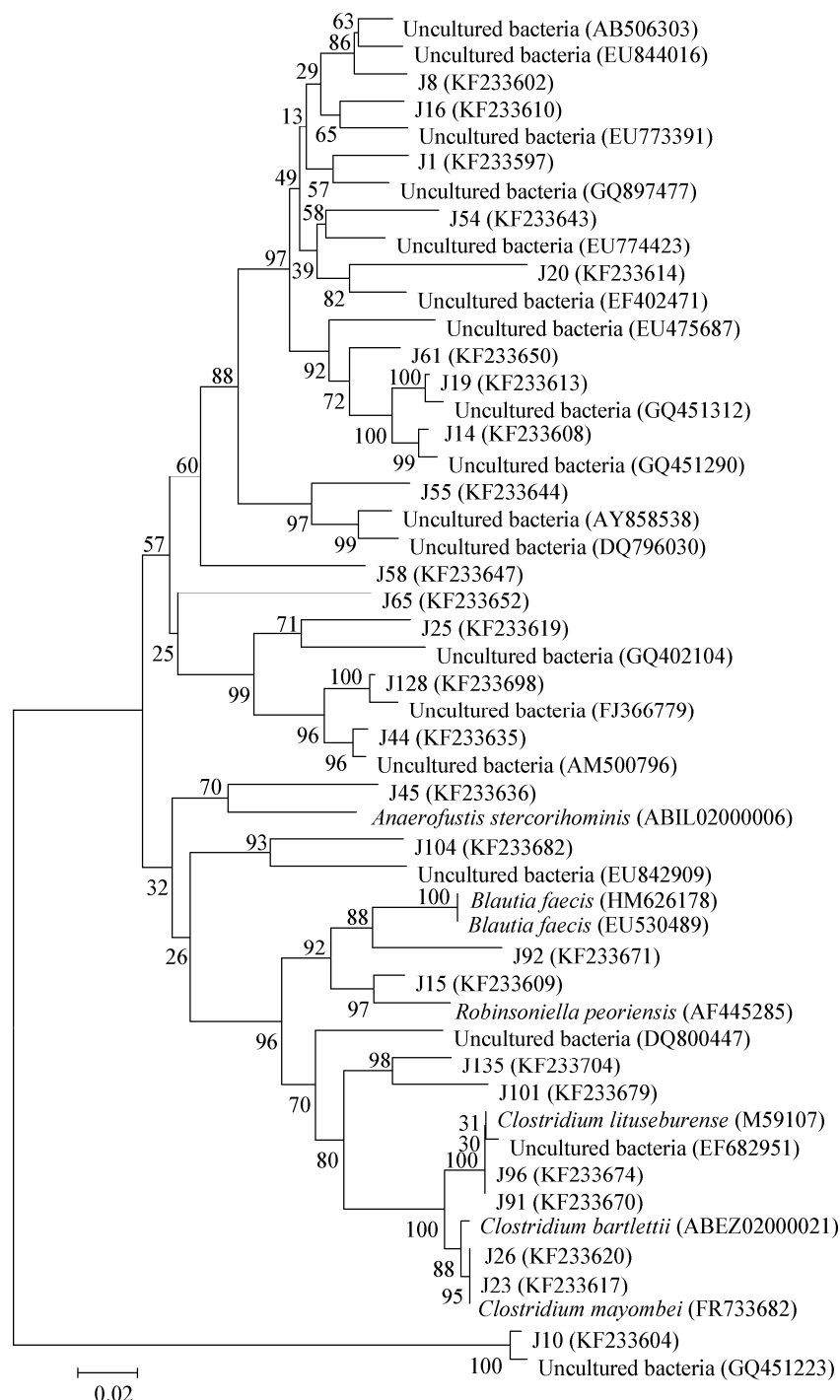


图 4 川金丝猴肠道内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene clone library from *Rhinopithecus roxellana*

Note: Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of intestinal microbial of *Rhinopithecus roxellana*. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

3 讨论

本研究通过免培养获得野生川金丝猴肠道微生物序列,序列比对发现梭菌属为优势类群,有报道称梭菌属的细菌与纤维素降解有关^[17]。*Blautia* 属和 *Anaerovorax* 属的细菌在奶牛粪便中属于优势类群^[18],与植物体中的物质降解也有很大关系^[19]。*Cellulosilyticum* 属的菌在牛瘤胃分离到,其功能为降解纤维素^[20]。*Anaerofustis* 属菌与人类肠道 pH 平衡,纤维素降解等过程相关^[21]。可见野生川金丝猴肠道中微生物大都与纤维素降解相关。野生川金丝猴食性很杂,秦岭川金丝猴冬季和夏季共取食 42 种植物^[22],这些植物大都纤维素含量较高。由此可见野生川金丝猴肠道微生物种类与其食性是密切相关的。*Barnesiella* 属和 *Robinsoniella* 属在人类的粪便中都分离到了,然而其作用目前还不是很清楚^[17,23-24]。

免培养方法研究动物肠道微生物多样性有其缺陷性,因为它涉及的过程较多,每一步的操作对实验结果有一定的影响^[25]。因此免培养方法所获得的川金丝猴肠道微生物多样性有必要与其它动物肠道微生物多样性相比较。本研究结果显示川金丝猴肠道微生物以厚壁菌门为优势细菌,而在厚壁菌门内以梭菌纲为主,滇金丝猴粪便和牛粪便中微生物优势类群也是厚壁菌门的梭菌纲,野生川金丝猴肠道微生物与牛和滇金丝猴粪便微生物多样性基本一致^[18,26]。此外,我们在川金丝猴肠道分离到的 *Robinsoniella* 属、*Anaerofustis* 属和 *Blautia* 属均在人类和大猩猩肠道分离到,由此可见金丝猴与人类和大猩猩肠道微生物有部分相似性^[27-28]。金丝猴属于灵长类,与人类和大猩猩在各个方面均有较高的相似性,然而野生金丝猴食性以纤维素含量较高的植物为主,而人类和大猩猩更为高等,食性更杂,所以人类和大猩猩肠道微生物中包含了相当一部分可以降解蛋白及脂肪等物质的菌群^[27-28],而川金丝猴食性相对单一,其主要食物均是纤维素含量较

高的植物类^[22],其肠道微生物与食草动物牛等相似性更高一些。

综上所述,本研究采用免培养方法初步研究了野生川金丝猴直肠内容物的细菌多样性,并获得了一些可靠的数据,这些数据为野生川金丝猴保护工作提供理论依据,尤其对其食性,健康状况等方面提供理论依据。但对于一个濒危物种而言,还需要今后各方面研究及保护工作积极开展。

参 考 文 献

- [1] Quan GQ, Xie JH. Research on the Golden Monkey[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technological Press, 2002, 79-102.
- [2] 张荣祖, 陈立伟, 瞿文元, 等. 中国灵长类生物地理与自然保护[M]. 中华人民共和国国家林业局野生动植物保护司. 北京: 中国林业出版社, 2002.
- [3] 高云芳, 王慧平, 李宝国, 等. 秦岭山中的川金丝猴[J]. 微生物学通报, 2004, 39(10): 10-12.
- [4] 陈服官, 罗时有, 谢文治. 金丝猴属分类地位的研究[A]// 金丝猴研究进展[M]. 西安: 西北大学出版社, 1989: 20-25.
- [5] 冯霞, 殷幼平, 王中康. 现代分子生物学技术在动物肠道微生物多样性研究中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 381-387.
- [6] 王海青. 八种海洋经济动物肠道细菌群落的种群分子多样性分析[D]. 北京: 中国科学院研究生院硕士学位论文, 2010.
- [7] 赵凯, 常志威, 张小燕, 等. 白蚁肠道共生微生物多样性及其防治方法[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 331-337.
- [8] 李可俊. 几种水生动物肠道细菌的分子生态学[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2007.
- [9] Amann RI, Ludwig E, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [10] 唐勇, 刘旭, 周定刚. 黄鳝肠道 cDNA 文库构建及营养相关表达序列标签分析[J]. 动物营养学报, 2010, 22(4): 992-999.
- [11] 张惠文, 张倩茹, 周启星, 等. 分子微生物生态学及其研究进展[J]. 应用生态学报, 2003, 14(2): 286-292.
- [12] 邱服斌. 培养法与非培养方法对人参根际内生细菌的研究[D]. 北京: 首都师范大学博士学位论文, 2007.
- [13] 李振东. 东祁连山高寒草地优势植物内生细菌多样性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2010.
- [14] Spanggaard B, Huber I, Nielson J, et al. The microflora of

- rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification[J]. *Aquaculture*, 2000, 182(1/2): 1-15.
- [15] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. *Biometrika*, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [16] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [17] Carlier JP, Bedora-Faure M, K'ouas G, et al. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Séguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(3), 585-590.
- [18] Girija D, Deepa K, Xavier F, et al. Analysis of cow dung microbiota-A metagenomic approach[J]. *Indian Journal of Biotechnology*, 2013, 12(3): 372-378.
- [19] Furuya H, Ide Y, Hamamoto M, et al. Isolation of a novel bacterium, *Blautia glucerasei* sp. nov., hydrolyzing plant glucosylceramide to ceramide[J]. *Archives of Microbiology*, 2010, 192(5): 365-372.
- [20] Cai S, Li J, Hu FZ, et al. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2010, 76(12): 3818-3824.
- [21] Finegolda SM, Lawsond PA, Vaisanen ML, et al. *Anaerofustis stercorihominis* gen. nov., sp. nov., from human feces[J]. *Anaerobe*, 2004, 10(1): 41-45.
- [22] 李言阔, 蒋志刚, 缪涛. 青木川自然保护区川金丝猴食性的季节性变化[J]. *兽类学报*, 2013, 33(3): 246-257.
- [23] Shen D, Chen R, Ye L, et al. *Robinsoniella peoriensis* bacteremia in a patient with pancreatic cancer[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(9): 3448-3450.
- [24] Morotomi M, Nagai F, Sakon H, et al. *Dialister succinatiphilus* sp. nov. and *Barnesiella intestinhominis* sp. nov., isolated from human faeces[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(12): 2716-2720.
- [25] Von Wintzingerode F, Goebel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis[J]. *FEMS Microbiology Review*, 1997, 21(3): 213-222.
- [26] Wu C, Yang F, Gao R, et al. Study of fecal bacterial diversity in Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) using phylogenetic analysis of cloned 16S rRNA gene sequences[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(38): 6278-6289.
- [27] Frey JC, Rothman JM, Pell AN, et al. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2006, 72(5): 3788-3792.
- [28] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。