

## 16S rRNA 基因高通量测序方法检测奶牛场常用干草表面微生物群落结构及多样性

张阁<sup>1</sup> 孙翠丽<sup>2</sup> 彭永<sup>1</sup> 程汝佳<sup>2</sup> 杨宏军<sup>3</sup> 朱良全<sup>1</sup> 胡莉萍<sup>4\*</sup> 丁家波<sup>1\*</sup>

(1. 中国兽医药品监察所 北京 100081)

(2. 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271018)

(3. 山东省农业科学院奶牛研究中心 山东 济南 250231)

(4. 山东省动物疫病预防与控制中心 山东 济南 250022)

**摘要:**【目的】随着中国奶牛业的发展,干草需求量与日俱增。作为天然牧草,干草可以成为家畜传播病原体的载体。以干草表面附着物为研究对象,了解干草中细菌群落结构以及致病菌属特征。【方法】对来自6个不同奶牛场饲草舍的干草样本,应用Illumina MiSeq高通量测序技术测定干草表面附着物细菌的16S rRNA基因V3-V4变异区序列,分析不同干草样本细菌群落组成。【结果】干草样本中的细菌在97%的相似水平下共得到OTU个数为15 416,涵盖了29门87纲144目219科323属的细菌。微生物多样性分析表明,干草样本具有很高的细菌多样性,不同样本多样性存在差异。对干草样本菌群中丰度较高的14种病原菌属进行分析,发现相较于人工种植牧草制备的干草,天然牧草制备的干草中病原菌属丰度较高。【结论】研究解析了干草样本中微生物的多样性、丰度及主要病原菌属的特征,对奶牛场疾病防控有一定指导意义。

**关键词:** 干草, 微生物群落及多样性, MiSeq 测序

**Foundation item:** National Key Research and Development Program (No. 2016YFD0500902); Shandong Agricultural Major Application of Technology Innovation Program

\*Corresponding authors: E-mail: HU Li-Ping: hxyhlp@sina.com; DING Jia-Bo: dingjiabo@126.com

Received: July 06, 2017; Accepted: September 07, 2017; Published online (www.cnki.net): September 07, 2017

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500902); 山东省农业重大应用技术创新项目

\*通讯作者: E-mail: 胡莉萍: hxyhlp@sina.com; 丁家波: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2017-07-06; 接受日期: 2017-09-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-09-07

# Analysis of microbial community structure and diversity on surface of commonly used hay in dairy farm by 16S rRNA gene high-throughput sequencing

ZHANG Ge<sup>1</sup> SUN Cui-Li<sup>2</sup> PENG Yong<sup>1</sup> CHENG Ru-Jia<sup>2</sup>  
YANG Hong-Jun<sup>3</sup> ZHU Liang-Quan<sup>1</sup> HU Li-Ping<sup>4\*</sup> DING Jia-Bo<sup>1\*</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agriculture University, Tai'an, Shandong 271018, China)

(3. Dairy Cattle Research Center of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250231, China)

(4. Shandong Animal Disease Control Center, Jinan, Shandong 250022, China)

**Abstract:** [Objective] With the development of Chinese dairy industry, hay demand is increasing. As an natural forage, hay can be a carrier of livestock pathogens. The aim of this study was to investigate the bacterial community structure and the characteristics of pathogenic bacteria in hay. [Methods] We selected six different dairy farms to take hay samples. The Illumina MiSeq sequencing with 16S rRNA gene V3-V4 variable region was adopted to analyze the surface bacterial community structures of commonly used hay in dairy. [Results] A total number of 15 416 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from hay samples under the similarity level of 97%, including 29 phyla, 87 classes, 144 orders, 219 families, and 323 genera. Microbial diversity analysis showed that hay samples had high bacterial diversity, and the diversity corresponding to each samples was specific. The results suggested that the abundance of pathogens in the natural hay was higher than that in the hay from artificial planted grasses. [Conclusion] The diversity, abundance, and characteristics of the main pathogens in hay samples were analyzed in this study, which would be a helpful reference for disease prevention and control in dairy farms.

**Keywords:** Hay, Microbial community structure and diversity, MiSeq sequencing

干草是一种较好的粗饲料,由青草或其他青绿饲料植物在未结籽实之前刈割后经干制而成<sup>[1]</sup>,是奶牛场冬季和早春饲草供应的重要来源<sup>[2]</sup>。流通领域商品化干草主要包括羊草、苜蓿等,目前我国某些奶牛养殖厂可见到的优质干草还包括藜草等<sup>[3]</sup>。

苜蓿属于人工种植牧草,而羊草、藜草属于可供放牧采食的天然牧草。在天然牧草中,经常夹杂着放牧过程中家畜产生的排泄物以及病畜流产后残留的胎衣等,因此天然牧草品质不稳定,其附带的病原微生物可通过影响奶牛机体的正常生理功能而干扰牛奶品质<sup>[4]</sup>。所以,对干草(尤其是天然牧草干制而成的干草)中的微生物群落进行检测具有重要意义。

通过传统的微生物培养进行检测存在耗时、工作量大、培养基表面长出的微生物重要性被过高估计等缺点<sup>[5]</sup>,并且自然界很多微生物很难分离培养并得到其纯培养物,导致只能检测到部分微生物或

特定病原微生物,在种类和数量分析上存在很大局限性<sup>[6]</sup>。近年来,随着高通量测序技术的不断发展,Illumina公司开发的MiSeq方法成功解决了通量低、准确率低、操作复杂等问题,并已经广泛应用于环境微生物多样性的分析中<sup>[7]</sup>。

本研究以干草表面附着物为研究对象,对其进行16S rRNA基因高通量测序,分析其多样性和丰度,为羊草等干草中混有的微生物多样性的研究奠定基础。同时,找出菌群中报道过的病原微生物和有潜在致病性的微生物,对奶牛场饲草安全有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验奶牛场为规模化的6个奶牛场,分别位于山东省北部的不同城市,采样时间在2015年12月。在每个奶牛场饲草舍中,随机挑取5捆干草,拆开

并抖落干草表面附着物,同时使用空气浮游菌采样仪进行采样,每捆干草使用一块独立的凝胶膜并采集 20 min。将吸附有样品的凝胶膜装入无菌封口聚乙烯袋,做好标记带回实验室。

## 1.2 主要试剂和仪器

1×PBS 缓冲液(pH 7.2–7.4),北京索莱宝公司; PowerSoil DNA Isolation Kit,德国 QIAGEN 公司。AirPort MD8 便携式空气浮游菌采样仪、水溶性凝胶膜,德国 Sartorius 公司; NanoDrop ND-1000 核酸定量仪,美国 Thermo 公司。

## 1.3 DNA 提取与测序

将来自同一奶牛场饲草舍的凝胶膜样品,用 PBS 作为溶解液进行合并溶解后作为一个样本。含有微生物的溶解液通过超滤浓缩,然后用 PowerSoil DNA Isolation Kit 提取总 DNA 并通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。同时,取约 2 μL 提取的 DNA 样本于核酸定量仪(NanoDrop ND-1000)检测其浓度及  $OD_{260}/OD_{280}$ 。DNA 样本浓度均在 40 ng/μL 以上, $OD$  值在 1.7–1.9 之间。提取的 6 份来自不同奶牛场的样本 DNA 送至北京奥维森基因科技有限公司,应用 Illumina MiSeq 平台对细菌和古菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 区(336F–806R)进行测序。

## 1.4 数据分析处理

对于 Illumina 的测序结果进行分析,去掉测序质量不好的序列,并对序列长度进行筛选,删掉长度小于 200 bp 的序列,根据 Barcode 将序列确定为本样品的序列,并去除 Barcode 和引物序列,最终得到有效的序列文件。在 97% 相似度下用 QIIME (v1.8.0) 软件将其聚类为用于物种分类的 OTU

(Operational taxonomic units),统计各个样品每个 OTU 中的丰度信息,OTU 的丰度初步说明了样品的物种丰富程度。利用 QIIME 软件计算样品包括 Chao1 指数<sup>[8]</sup>、Shannon 指数<sup>[9]</sup>、Phylogenetic diversity (谱系多样性)<sup>[10]</sup>的 Alpha 多样性值,经过 UniFrac 算法利用系统进化的信息来比较样品间物种群落差异<sup>[11]</sup>,并进行 Beta 多样性(Beta diversity)分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品测序结果及取样深度验证

通过对干草表面附着物中细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 区(336F–806R)进行测序,6 个样品原始序列条数为 346 849,过滤掉低质量的序列后,有效序列总数为 287 427。根据 Barcode 标签进行样品序列拆分,在对初始序列进行去冗余处理后,获得 16S rRNA 基因 Unique Reads,并在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU,统计得到各个样品在不同 OTU 中的丰度信息,6 个样品共产生 15 416 个 OTU,平均测序读长在 420–480 bp 之间。每个样品的有效序列数量如表 1 所示。

采用随机抽样的方法抽取数据,以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建曲线(图 1),即稀释曲线(Rarefaction)。稀释曲线反映了样品的取样深度,可以用来评价测序量是否足以覆盖所有类群。6 个样品的稀释曲线如图 1 所示,曲线已趋于平缓,即再增大数据量对 OTU 的发现也没有影响,可以说样本的 OTU 的覆盖度已基本饱和,说明测序数据量合理,更多的数据量对发现新 OTU 的边际贡献很小。

表 1 样本的序列信息  
Table 1 Sequence information of samples

样本编号 Sample ID	样本类型 Sample type	Raw_tags	Clean_tags	Reads	OTUs
ak5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	55 846	48 205	45 557	2 880
bl5	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	52 529	45 252	44 028	1 636
dd5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	47 711	46 436	42 723	3 180
kl5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	59 285	43 774	42 037	2 027
qy5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	48 349	41 747	39 372	2 388
zh5	藜草 <i>Phalaris arundinacea</i>	83 129	62 013	56 716	3 305

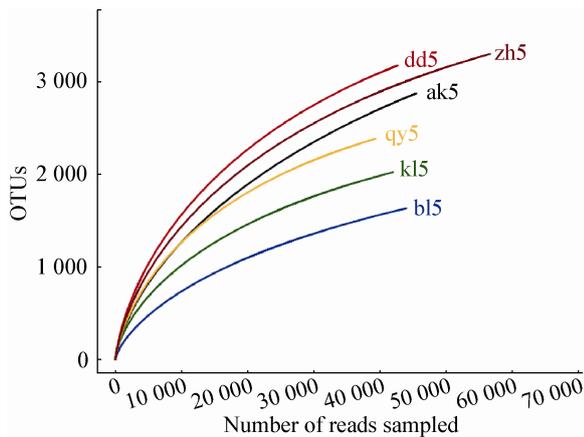


图 1 相似度为 97%条件下各样本的稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curves of each sample at cutoff level of 3%

## 2.2 细菌群落的多样性分析

**2.2.1 Alpha 多样性分析:** Alpha 多样性指数分析是指对单个样品中物种多样性的分析。其中 Chao1 指数是根据所测得的 Tags 和 OTU 的数量以及相对比例来预测样品中微生物的种类，谱系多样性反映了物种组成的系统进化特征多样性，Shannon 指数是一个综合 OTU 丰度和 OTU 均匀度两方面因素的

多样性指数，Shannon 指数、谱系多样性指数越大，表示该样品中的物种越丰富，反之则物种多样性越低。由表 2 可知，bl5 苜蓿样本的 Shannon 指数 4.441 13 和谱系多样性指数 65.610 32 最低；dd5 羊草样本的 Shannon 指数 7.79 841 和谱系多样性指数 111.832 34 最高。对于同样是羊草样本的 ak5、dd5、kl5 和 qy5 这 4 个样本而言，物种多样性由高到低依次为 dd5、ak5、qy5、kl5。

**2.2.2 Beta 多样性分析:** Beta 多样性(Beta diversity)分析是用来比较一对样品在物种多样性方面存在的差异大小。UniFrac 是通过系统进化的信息来比较样品间物种群落差异，其计算结果可以作为一种衡量 Beta 多样性的指数，它考虑了物种间的进化距离，该指数越大表示样品间的差异越大。根据样品的物种分布，计算了 Unweighted UniFrac 距离(只考虑各样本中的物种类别差异)和 Weighted UniFrac 距离(考虑了样本之间物种类别差异以及各类别物种的丰富度差异)。然后，对样品间的距离矩阵进行主成分分析，做出 Beta 多样性的主坐标分析(PCoA)图(图 2)。由图 2 可知，基于 UniFrac 的加权和非加

表 2 样品的 Alpha 多样性指数

Table 2 The Alpha diversity index of the sample

样本编号 Sample ID	样本类型 Sample type	OTUs	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	谱系多样性 Phylogenetic diversity
ak5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	2 880	4 347.421	7.281 73	105.709 72
bl5	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	1 636	2 367.796	4.441 13	65.610 32
dd5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	3 180	4 118.378	7.798 41	111.832 34
kl5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	2 027	2 659.655	6.721 86	79.966 40
qy5	羊草 <i>Leymus chinensis</i>	2 388	3 015.066	7.136 36	92.939 24
zh5	藜草 <i>Phalaris arundinacea</i>	3 305	4 057.180	7.015 18	108.758 07

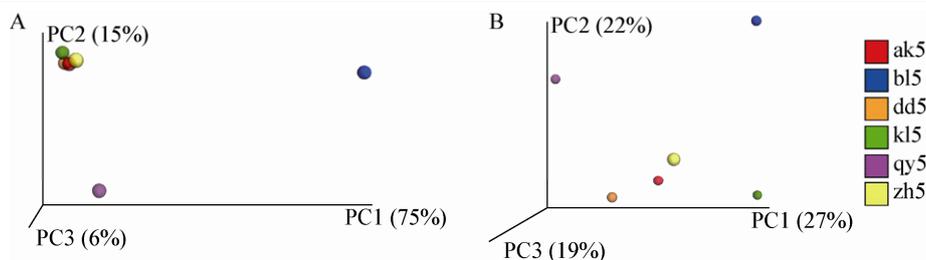


图 2 Beta 多样性的主坐标分析(PCoA)图

Figure 2 Principal coordinate analysis (PCoA) scores plot of beta diversity

注: A: 未加权方法; B: 加权方法.

Note: A: Unweighted method; B: Weighted method.

权的主坐标分析发现其第一主成分、第二主成分和第三主成分的贡献率分别为 75%、15% 和 6%、27%、22% 和 19%，其中明显可以看出，羊草样本 ak5、dd5、kl5、zh5 聚集在一起，说明藜草样本(zh5)与大部分羊草样本(ak5、dd5、kl5)微生物组成结构较为相似。但是羊草样本 qy5 与其他羊草样本之间有明显的分离现象，也就是说，对于不同来源的羊草而言其微生物群落存在差异。

### 2.3 样品群落组成分析

**2.3.1 细菌门分类水平的比较:** 利用 QIIME 软件分析各样品在门分类水平上菌群的组成和结构(图 3)，共得到 29 种细菌类群，在这些样本中含量最高的门是变形菌门(Proteobacteria)，在 6 个样本中相对丰度分别为 72.15%、27.36%、76.41%、77.04%、69.77%、67.58%，其次是放线菌门(Actinobacteria)相对丰度分别为 11.83%、3.08%、9.77%、8.75%、10.36%、12.51%，拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度分别为 10.00%、2.55%、7.87%、9.60%、5.26%、

6.68%，而其他菌类比例相对较低，例如：蓝藻菌门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)等。这表明，在干草表面菌落结构中，变形菌门、放线菌门、拟杆菌门为三大优势菌群，而其他细菌类群为非优势菌群。

**2.3.2 细菌属分类水平的比较:** 利用 QIIME 软件分析各样品在属分类水平上菌群的组成和结构(图 4)，共得到 53 种细菌类群，其中含量最高的是未分类细菌，在 6 个样本中相对丰度分别为 25.05%、72.49%、27.98%、23.88%、35.36%、25.62%；其次是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、薄层菌属(*Hymenobacter*)、Other、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、动球菌属(*Kineococcus*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、螺状菌属(*Spirosoma*)等，这些菌属的丰度比例相对较低。

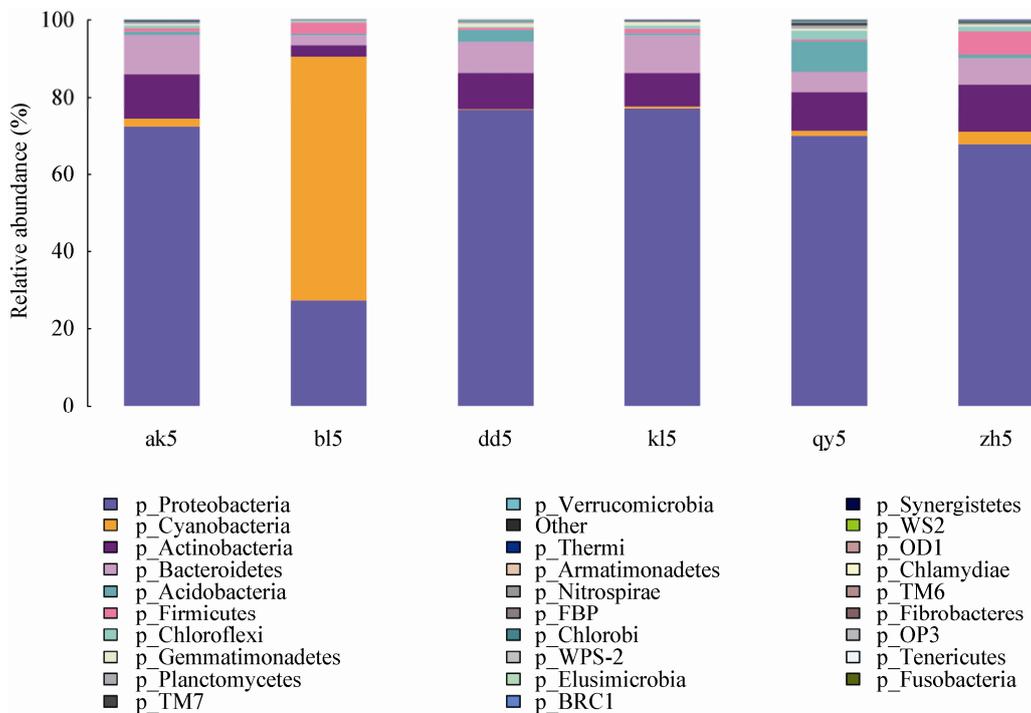


图 3 细菌门分类水平的比较

Figure 3 Comparison of bacteria groups at phylum level

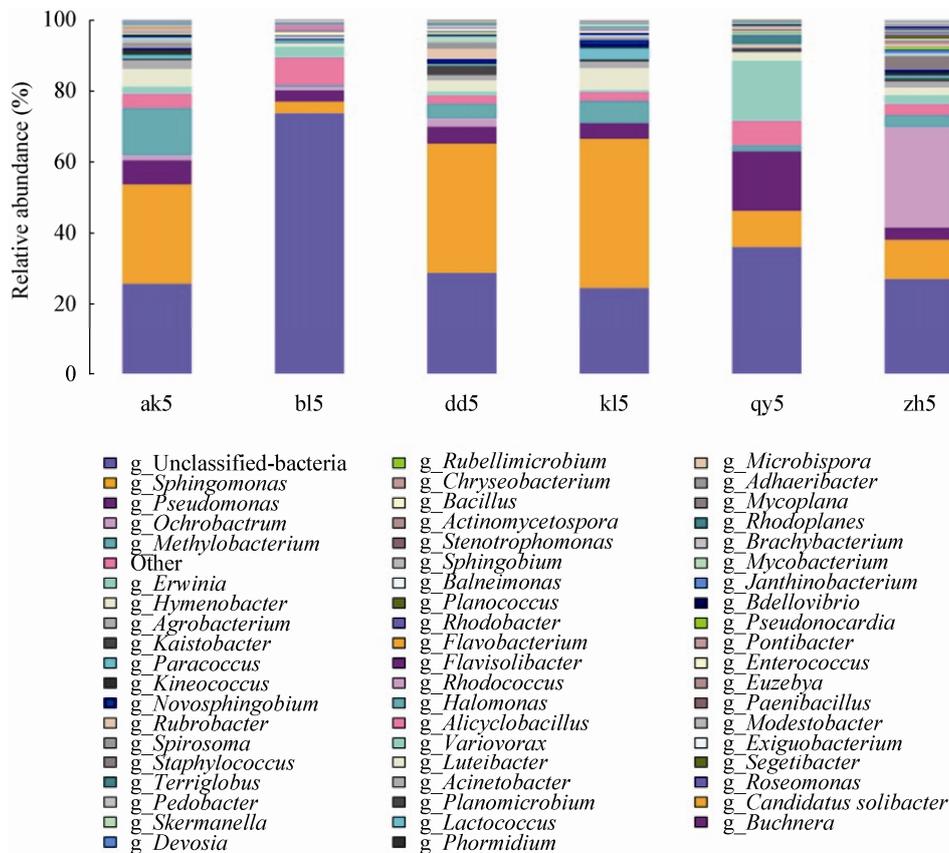


图 4 细菌属分类水平的比较

Figure 4 Comparison of bacteria groups at genus level

## 2.4 菌群结构的差异分析

为了进一步探究微生物群落结构与不同干草样本之间的关系,本研究基于可分类的 29 个不同门类水平上,构建了含系统发育树、样品聚类关系树的热图(Heat map)。分析表明,在门(图 5)水平上,微生物群根据进化关系聚类为两大分支,其中样本 qy5、zh5、ak5、dd5 和 kl5 构成一支,样本 bl5 单独构成另一支,说明样本 bl5 的细菌群落与其他样本明显的不同。此外,样本 qy5 与 zh5 微生物进化关系距离较近;ak5、dd5 和 kl5 微生物进化关系距离较近,dd5 居于 ak5 和 kl5 中间并更趋近于 kl5。对于热图中出现的大面积的蓝色方块,表明这种菌的含量非常低,导致没有数值。

## 2.5 干草中动物细菌类病原的分布

将各干草样本中丰度较高(丰度大于 0.1%)的动

物病原菌进行整理,如表 3 所示为干草样本中检出的 14 种潜在动物病原菌属的分布特征。可以看出,这 14 种潜在动物病原菌属分别隶属于放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria),其中放线菌门、拟杆菌门、变形菌门为干草微生物三大优势菌门。

进一步深入分析发现,除了红球菌属(*Rhodococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)这 3 个潜在动物病原菌属仅在部分干草样本中被检出,而剩余的 11 个潜在动物病原菌属在 6 个干草样本中均有检出。这 3 种潜在动物病原菌属的丰度相对较低,就平均而言分别占 0.14%、0.61%、0.04%。由此可见,不同干草样本的潜在动物病原菌属组成是相似的。此外,不同干

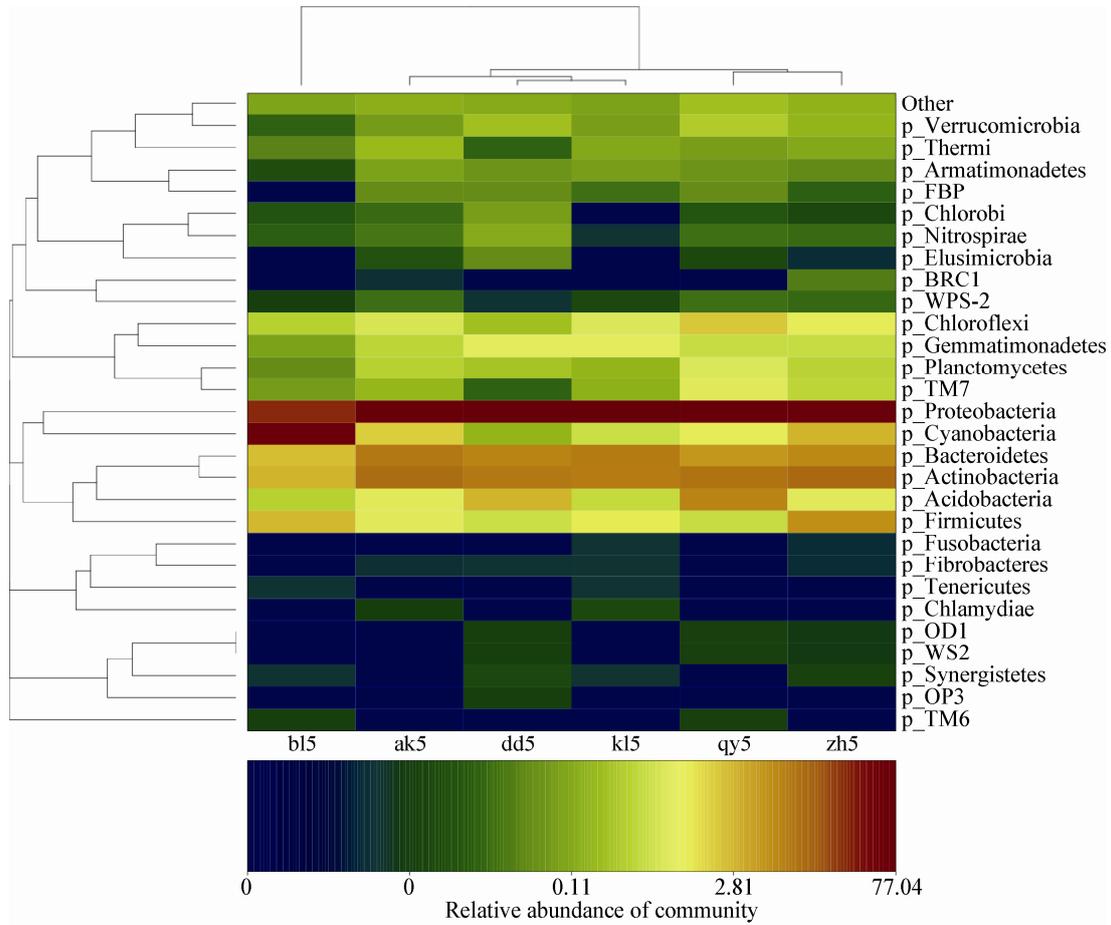


图 5 含系统发育进化树的热图(门水平)

Figure 5 Heat map with phylogenetic tree (phylum level)

表 3 干草样品中潜在动物病原菌分布特征

Table 3 Characteristics of potentially pathogenic microorganisms in the samples of hay

病原菌属 Pathogenic genus	隶属门 Phylum	所占比例 Propotion (%)						Mean
		ak5	bl5	dd5	kl5	qy5	zh5	
<i>Rhodococcus</i>	Actinobacteria	0.35	0.20	0.02	0.19	0.00	0.07	0.14
<i>Mycobacterium</i>	Actinobacteria	0.10	0.02	0.10	0.04	0.14	0.09	0.08
<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes	0.44	0.16	0.15	0.14	0.26	0.47	0.27
<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidetes	0.40	0.09	0.07	0.07	0.07	0.19	0.15
<i>Sphingobacterium</i>	Bacteroidetes	0.06	0.13	0.02	0.03	0.01	0.37	0.10
<i>Bacillus</i>	Firmicutes	0.09	0.71	0.12	0.23	0.11	0.26	0.25
<i>Lactococcus</i>	Firmicutes	0.13	0.21	0.10	0.16	0.03	0.10	0.12
<i>Staphylococcus</i>	Firmicutes	0.01	0.07	0.01	0.00	0.01	3.55	0.61
<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria	6.70	3.19	4.74	4.42	16.65	3.33	6.50
<i>Ochrobactrum</i>	Proteobacteria	1.37	0.92	2.27	0.02	0.08	26.95	5.27
<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria	12.99	0.44	3.97	5.96	1.44	3.15	4.66
<i>Stenotrophomonas</i>	Proteobacteria	0.13	0.18	0.18	0.08	0.47	0.20	0.21
<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria	0.10	0.28	0.06	0.10	0.04	0.17	0.12
<i>Roseomonas</i>	Proteobacteria	0.03	0.00	0.21	0.00	0.00	0.00	0.04
合计 Total		22.89	6.60	12.01	11.44	19.31	38.89	

草样本中潜在动物病原菌属的丰度比例不同,由高到低依次为 zh5>ak5>qy5>dd5>k15>bl5, 据此分析,天然牧草(羊草+藜草)中的潜在动物病原菌属丰度大于人工种植牧草(苜蓿)。

### 3 讨论

本研究利用 Illumina MiSeq 测序技术通过对 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区测序分析,检测了干草表面细菌群落结构的多样性,获得了大量、全面且深入的菌群信息。6 个样品共获得有效序列的总数为 287 427, 平均测序读长在 420-480 bp 之间。在 97% 的相似度水平下共产生有效 OTU 个数为 15 416, 涵盖了 29 门 87 纲 144 目 219 科 323 属的细菌。

通过与 RDP 数据库<sup>[12]</sup>进行比对,在门水平上得到优势菌群均为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门,其中变形菌门的丰度最高;在属水平上,含量最高的为未分类细菌,这说明干草样品中还蕴含着大量人类未知的微生物种类。此外,还有一些动物病原菌属被检测出。这些动物病原微生物不仅包括一般动物病原体,如苍白杆菌、分枝杆菌、鞘氨醇杆菌等,还包括机会致病菌,如芽孢杆菌、不动杆菌、假单胞菌等,能引起的临床症状轻重不等。值得注意的是,苍白杆菌与布鲁氏菌均属于布鲁氏菌科<sup>[13]</sup>,不仅能与布鲁氏菌发生交叉凝集,更重要的是感染后临床表现与布鲁氏菌病极为相似<sup>[14]</sup>,苍白杆菌感染奶牛后极有可能会干扰奶牛布鲁氏菌病的血清学诊断。随着研究的深入,研究人员发现分枝杆菌属中除了结核分枝杆菌以外,其他成员(环境分枝杆菌)也严重危害动物健康<sup>[15]</sup>,比如环境分枝杆菌中的禽分枝杆菌复合体可通过消化道或呼吸道进行传播<sup>[16]</sup>。动物感染环境分枝杆菌后一旦发病还可引起类结核样病变,并产生抗结核类药物的耐药性<sup>[17]</sup>。此外,还有相当一部分细菌不能划分到确定的属,其中可能包含对人畜有致病性的潜在病原菌。

相较于人工种植牧草,天然牧草不仅用于干草的制备,还常用于放牧。尤其是耐牧性好的藜草,

其春季生长较早,第一茬藜草往往先进行放牧利用以延迟调制干草时间<sup>[18]</sup>。本研究发现天然牧草中的动物病原菌属丰度明显高于人工种植牧草,这很有可能是由于放牧家畜的富集作用导致。干草中动物病原菌属的发现也为我们提供一个新思路,即加强饲草污染的防范措施,保障奶牛场的安全生产。

### 参考文献

- [1] Fang F. Modulation and utilization of green[J]. Chinese Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 28(1): 154-155 (in Chinese)  
方芳. 青干草的调制与利用[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012, 28(1): 154-155
- [2] Hou YX. Dairy cow winter feeding and management technical points[J]. China Dairy Cattle, 2011(1): 47-50 (in Chinese)  
侯引绪. 奶牛冬季饲养管理技术要点[J]. 中国奶牛, 2011(1): 47-50
- [3] Chen LL, Yu Z, Mao PS, et al. Development situation of forage grass industry and current status of forage quality safety in China[J]. Feed Industry, 2015, 36(5): 56-60 (in Chinese)  
陈玲玲, 玉柱, 毛培胜, 等. 中国饲草产业发展概况及饲草料质量安全现状[J]. 饲料工业, 2015, 36(5): 56-60
- [4] Shen H, Yu QL, Chen QY, et al. Analysis on the pathogen of the forage grass of White Yak in Tianzhu[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(1): 69-73 (in Chinese)  
沈慧, 余群力, 陈其元, 等. 天祝白牦牛饲草致病菌分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(1): 69-73
- [5] Highlander SK. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems[J]. Animal Health Research Reviews, 2012, 13(1): 40-53
- [6] Huybens N, Houeix J, Licois D, et al. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples[J]. The Veterinary Journal, 2013, 196(1): 109-110
- [7] Polka J, Rebecchi A, Pisacane V, et al. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 342-356
- [8] Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11(4): 265-270
- [9] Hill MO. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences[J]. Ecology, 1973, 54(2): 427-432
- [10] Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(4): 557-578
- [11] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8228-8235
- [12] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new

- bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [13] Horvat RT, El Atrouni W, Hammoud K, et al. Ribosomal RNA sequence analysis of *Brucella* infection misidentified as *Ochrobactrum anthropi* infection[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(3): 1165-1168
- [14] Ozdemir D, Soypacaci Z, Sahin I, et al. *Ochrobactrum anthropi* endocarditis and septic shock in a patient with no prosthetic valve or rheumatic heart disease: case report and review of the literature[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2006, 59(4): 264-265
- [15] Bland CS, Ireland JM, Lozano E, et al. Mycobacterial ecology of the Rio Grande[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 5719-5727
- [16] Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5318-5325
- [17] Govendir M, Hansen T, Kimble B, et al. Susceptibility of rapidly growing mycobacteria isolated from cats and dogs, to ciprofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 147(1/2): 113-118
- [18] Zhang YL, Luo XM. Research progress of Reed Canarygrass[J]. Acta Agrestis Sinica, 2008, 16(6): 659-666 (in Chinese)  
张永亮, 骆秀梅. 藜草的研究进展[J]. 草地学报, 2008, 16(6): 659-666

(上接 p.2794)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>