

林麝粪便细菌多样性研究

周美丽¹ 王立志^{1*} 闫天海¹ 杨莹² 徐琴¹ 王继文¹ 郭伟¹

(1. 四川农业大学 动物营养研究所/动物抗病营养教育部重点实验室, 四川 雅安 625014;

2. 四川省养麝研究所, 四川 都江堰 611800)

摘要 为研究林麝粪便细菌的结构与组成,选取6只2~3岁的圈养条件相同且健康的公林麝,饲喂精粗比为2:8的饲料,收集其新鲜粪便,提取其总DNA,然后用16S rRNA细菌通用引物进行PCR扩增,并用Illumina Miseq250PE测序平台,对扩增子进行Miseq双端测序。结果显示:1)借助Illumina Miseq250PE测序平台对样品进行测序,共获得85 091条有效序列,5 133个有效OTU。2)所得OTU经物种注释被归类为23个门,其中厚壁菌门(Firmicutes)(51.1%±19.9%)、拟杆菌门(Bacteroidetes)(35.6%±15.5%)、变形菌门(Proteobacteria)(5.2%±5.6%)和未分类菌门(* Unassigned)(2.2%±1.0%)为优势菌门,其总和达到菌群相对含量的94.1%;将其进一步分为240个菌属,其中18个为共享菌属,拟杆菌目(* Bacteroidales)(16.5%±10.2%)、瘤胃菌科(* Ruminococcaceae)(14.7%±13.8%)和梭菌目(* Clostridiales)(13.7%±3.9%)含量相对较高。3)OTUs稀释曲线均未达到平台期,说明测序深度不足以覆盖所有的菌群。4)非加权聚类图(PUGMA)显示样品B和E、C和F的菌群多样性相似度较高,而样品A和其他样品的相似度相对较低。由此可见,在正常状态下,健康林麝粪便分布有23个门类细菌群落,以Firmicutes、Bacteroidetes和Proteobacteria为优势菌群,进一步将林麝粪便细菌群落细分为240个属且发现林麝个体间菌群差异性较小且与其他草食动物优势菌群结构相似。

关键词 林麝;菌群结构;OTU稀释曲线;共享菌群

中图分类号 S 865.4⁺1

文章编号 1007-4333(2016)02-0100-07

文献标志码 A

Exploring the diversity of musk deer fecal bacterial community

ZHOU Mei-li¹, WANG Li-zhi^{1*}, YAN Tian-hai¹, YANG Ying², XU Qin¹, WANG Ji-wen¹, GUO Wei¹

(1. Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of Ministry of Education, Ya'an 625014, China;

2. Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611800, China)

Abstract To investigate the diversity of the male musk deer hindgut bacterial community, healthy musk deer ($n=6$; 2-3 years of age) were fed using the diet consisting of 20% concentrate and 80% roughage ad libitum. Then we sampled fresh feces and extracted total DNA. The universal bacterial primers were used to amplify the V4-V5 region of 16S rRNA genes. We identified and characterized the overall fecal bacteria composition by all musk deer using the 16S rRNA high-throughput sequencing on the Illumina Miseq sequencing platform. Results showed that the sequencing data exhibited that the overall number of OTUs and valid reads using the Miseq sequencing of 16S rRNA gene reached 5 133 OTUs (similarity $\geq 97\%$) and 85 091 reads, respectively. In total, 23 phyla were detected in the samples. Among them, the Firmicutes (51.1% ± 19.9%), Bacteroidetes (35.6% ± 15.5%), * Unassigned (2.2% ± 1.0%) and Proteobacteria (5.2% ± 5.6%) were the dominant phyla which consisted 94.1% of the overall bacteria community. At the genus level, 240 genera could be found in all samples or part of samples. Among genera, the 18 shared genera were present in all fecal samples, and the * Bacteroidales (16.5% ± 10.2%), * Ruminococcaceae (14.7% ± 13.8%), * Clostridiales (13.7% ± 3.9%) are the predominant shared genera. The OTU rarefaction curves didn't reach the

收稿日期: 2015-04-03

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目(2013HH0043)

第一作者: 周美丽, 硕士研究生, E-mail: zml19880419@163.com

通讯作者: 王立志, 副教授, 硕士生导师, 主要从事反刍动物营养研究, E-mail: wanglizhi@aliyun.com

saturation plateau in the samples reflecting there were not enough coverage estimations. Furthermore, UPGMA analysis of the samples showed that the similarity of B and E, C and F bacteria communities were the highest. Therefore, our research revealed that hindgut bacteria communities from healthy musk deer fed using the basal diet were classified 23 phyla. Among them, Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria were regarded as the dominant hindgut bacteria phyla. Further genus-level analysis showed that 240 genera were discovered across all stool samples, 18 genera of which were common bacteria communities. The similarity of hindgut bacteria distribution among different musk deer was relatively high, which was also similar with the dominant hindgut bacteria communities from the other herbivores.

Keywords musk deer; structure of bacteria community; OTU rarefaction curve; shared bacteria community

林麝 (*Moschus berezovskii*), 又名香獐、林獐、麝獐等, 是重要的东亚特产动物, 隶属麝科麝属^[1], 主要分布于中国西南部, 是我国一级重点野生动物^[2]。林麝所产麝香, 具有很高的药用价值, 被誉为“软黄金”^[3], 从 20 世纪 60 年代起我国便开始进行人工林麝养殖。但到目前为止, 林麝的养殖规模仍旧难以扩大, 其中一个主要因素是人工养殖的林麝疾病发生率非常高^[4], 其中尤其以细菌感染所引发的疾病最为常见且致死率高。

刘春燕^[5]研究了 12 个林麝死亡病例, 其中有 9 例均为细菌感染, 比例高达 75%。感染林麝的细菌一方面来自外界环境, 另一方面主要源自林麝自身胃肠道菌群结构失调。因此, 目前降低林麝胃肠道菌群失调引发的感染之先决条件是探究林麝胃肠道菌群的结构与组成, 但是林麝肠道正常菌群结构与组成的有关研究报道较少^[6]且测序技术局限于小规模测序, 仅能反映林麝胃肠道的优势菌群。虽然有与其同属鹿科的动物, 如麋鹿和驯鹿等胃肠道菌群的相关研究作为参考^[7], 但是林麝和麋鹿等动物隶属不同的属, 其胃肠道菌群分布必然存在一定的差异性, 所以, 在麋鹿等动物胃肠道菌群研究的基础上研究林麝胃肠道菌群分布很有必要。

本研究采用 Illumina Miseq 测序技术, 快速、全面地研究健康林麝粪便菌群的结构与组成, 有助于人们深入探究林麝粪便菌群组成对饲料利用率及对健康的影响, 旨在为通过调控林麝肠道菌群平衡提高林麝的抗病能力和生产性能提供理论依据, 同时为林麝粪便的菌群后续培养和分离奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

试验动物为体重约 8.0 kg 的 6 只健康公林麝, 2~3 岁, 圈养于四川省养麝研究所。林麝饲料按精粗比 2:8 配制。粗料为野青草和甘薯叶, 精料主要成分为玉米、大麦、麸皮、豆粕和苜蓿草粉, 并添加食

盐(0.40%)、矿物质(1.00%)、微量元素(0.15%)和维生素(0.15%)。稳定饲喂上述日粮 28 h 后, 分别采集各林麝新鲜粪便 20 g, 依次编号为 A、B、C、D、E 和 F, 快速放入装满氮气的无菌聚乙烯自封袋中并密封, 置于液氮罐中带回实验室, 然后于 -80 °C 超低温冰箱中冻存备用。

1.2 DNA 提取

分别称取各粪便样品 200 mg, 放入 5 mL 离心管中, 加入 1 mL Stool lysis buffer (ASL) 缓冲液和 0.5 g 皓微珠(提高菌群 DNA 获得率), 振荡混匀后, 用 QIAamp H DNA 粪便提取试剂盒 (Qiagen, Germany) 提取林麝粪便中总 DNA, 具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 8000 原子分光光度计 (Thermoscientific, Australia) 检测抽提的基因组 DNA。为了减小试验误差, 每个样品抽提 DNA 时设置 3 个重复。提取的 DNA 送往上海美吉公司进行后续的 PCR 扩增及高通量测序。

1.3 PCR 扩增和基于 16S rRNA 的 Illumina Miseq 测序

采用带有 barcode 的细菌通用引物对 (338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3')^[8-9], 以林麝粪便中总 DNA 为模板, 针对细菌 16S rDNA 的 V4-V5 区(基于 Miseq 测序平台限制读长约 300 bp 而选择 V4-V5 区)用 PCR 仪 (ABI, GeneAmp® 9700) 扩增。PCR 反应体系中 1×PCR 缓冲液、上下游引物及 DNA 聚合酶添加量分别为 1.0 μL、0.4 μmol/L、0.4 μmol/L 和 0.4 μL。

扩增反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 °C 延伸 5 min。

每个样品 3 个重复, 将同一样品的 PCR 产物混合后用含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen) 切胶回

收 PCR 产物,用 Tris_HCL 洗脱,2%琼脂糖凝胶电泳检测。参见电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega)检测定量,之后按照每个样品的测量量要求,进行相应比例的混合。然后送至上海美吉生物医药科技有限公司,利用 Illumina's MiSeq 测序平台构建文库、MiSeq 测序。

构建文库过程:连接“Y”字形接头;使用磁珠筛选去除接头自连片段;利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;氢氧化钠变性,产生单链 DNA 片段。

MiSeq 测序流程:DNA 片段的一端与引物碱基互补,固定在芯片上;另一端随机与附近的另一个引物互补,也被固定住,形成“桥”;PCR 扩增,产生 DNA 簇;DNA 扩增子线性化成为单链;加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP,每次循环只合成一个碱基;用激光扫描反应板表面,读取每个模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类;将“荧光基团”和“终止基团”化学切割,恢复 3' 端粘性,继续聚合第 2 个核苷酸;统计每轮收集到的荧光信号结果,获知模板 DNA 片段的序列。

1.4 数据分析

利用 QIIME1.8.0^[10] 软件对测序所得 Raw data 进行初次质控,去除质量 < Q20、未知碱基数 > 6 及同聚物太大的序列,只保留长度在 100~300 bp 的序列,将 Barcode 序列和引物序列去除,然后在 Mothur 软件中将质控后的序列进行合并;在 QIIME1.8.0 软件中,使用 uclust 方法^[11] 和 furthest 聚类算法将序列进行 OTU (Operational Taxonomic Units) 聚类(序列相似性 $\geq 97\%$ 则聚为同一个 OTU),并挑选每个 OTU 中丰度最高的序列作为代表序列;采用 PyNAST 法^[12],将所有代表序列与 Greengenes 参考数据库 (<http://greengenes.lbl.gov/>) 进行序列比对,然后用 uclust 识别分类分配器进行指定分类。将有效序列去除 gap 序列和 lanemask 值为 0 的序列,然后用 FastTree 法进行多序列比对并构建 OTU 表。

在 QIIME1.8.0 软件中,剔除 rep_set.fasta、OTU table 和 rep_set.tree 中的嵌合体和 Singletons,统计样品序列数和 OTU 数,在各水平(界、门、纲、目、科、属)。进行物种注释,并绘制各样品在门和属水平物种组成的柱状图;基于去除嵌合体和 Singletons 之后的 OTU table、rep_set.tree 文件及其抽样最大深度,计算菌群多样性及丰度指数并绘

制各样品的稀释曲线;结合不同样本的 OTU 种类及其丰度进行计算,获得样品间 weighted Unifrac 距离矩阵,利用非加权组聚类法,在 MEGA5.0 软件中,绘制聚类图;对样品的共享菌属进行分析,用 R x64 3.0.2 软件,根据共享菌属的组成及其在各样品中所占比例,绘制样品间共享菌属的聚类热图。

2 结果与分析

2.1 各样品序列及 OTU 分布

借助 Illumina MiSeq 测序平台,根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将测序所得 Raw Data 中成对的 reads 拼接成一条序列,然后去除质量 < Q20、未知碱基数 > 6、同聚物太大的序列、含有嵌合体的序列和 Singletons,最终共获得 85 091 条有效序列 (Clean Data),平均每个样品为 $14\ 182 \pm 4\ 607$ 条序列(图 1)。其中,样品 F 所含有效序列最多,达到 21 345 条;样品 A 的有效序列最少,仅有 8 071 条有效序列。按序列相似度大于 97% 的标准对有效序列进行 OTU 聚类,最终共获得 5 133 个 OTUs,单个样品平均 OTU 个数为 $1\ 817 \pm 594$ (图 2)。

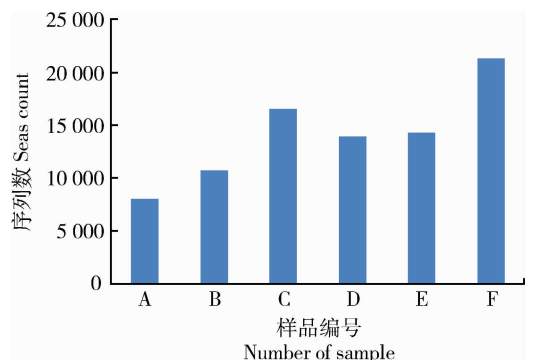


图 1 各样本有效序列分布图

Fig. 1 Distribution of sequences count per sample

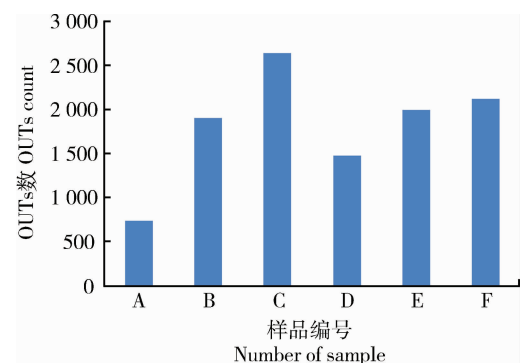


图 2 样本 OTUs 丰度图

Fig. 2 Distribution of OTUs count per sample

2.2 样品 OTU 稀释曲线

综合考量样品间菌群的丰富度(Richness)和均匀度(Evenness)所获得的各样品的稀释曲线能在一定程度上反映不同样品菌群多样性。根据图 3 可以看出,所有样品的稀释曲线已经趋于平缓,但仍未达到平台期,说明测序量仍有少量的菌群不能够被覆盖,如果增大测序量,仍然有可能发现少量新的 OTUs。根据图 3 还可以看出,各样品物种多样性由高到低依次为 C、B、E、F、D 和 A。

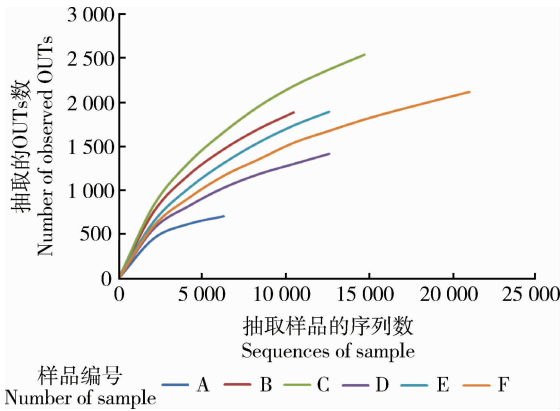


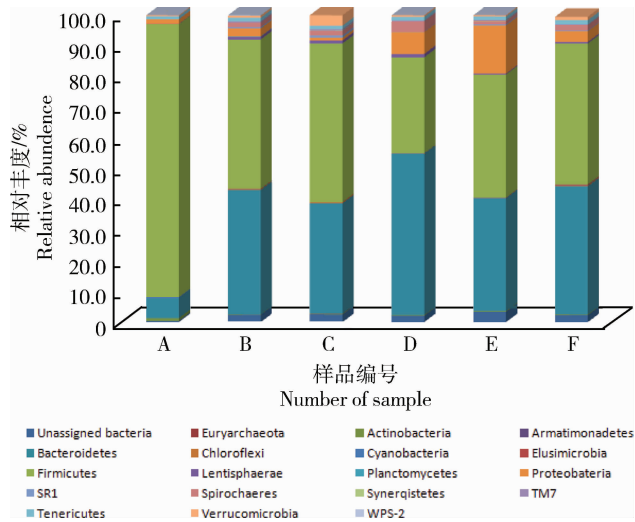
图 3 不同粪便样品的稀疏曲线

Fig. 3 Individual rarefaction curves for each feces sample taken

2.3 各样品菌群结构及组成

利用 QIIME1.8.0 软件,分析各样品在不同分类水平上(门、纲、目、科及属)菌群的组成和结构。物种注释获得 23 个门,240 个属。微生物群落主要为细菌,相对含量达 97.7%,Unassigned 微生物和古菌分别仅占 2.2%和 0.1%。

在门水平上,相对含量在 1%以上的优势菌群从高到低依次分别为 Firmicutes (51.5% ± 19.9%)、Bacteroidetes (35.6% ± 15.5%)、Proteobacteria (5.2% ± 5.6%)、* Unassigned (2.2% ± 1.0%)、螺旋体门 Spirochaetes (1.5% ± 1.1%)、无壁菌门 Tenericutes (1.2% ± 0.1%) 和疣微菌门 Verrucomicrobia (1.1% ± 1.2%),7 个门的总和占到所有菌群的 97.9%(图 4)。虽然各样品菌群门类相同,但是同一菌门的相对丰度差异较大。例如, Firmicutes 在样品 A 中含量为 88.9%,而在样品 D 中仅为 31.2%;样品 D 中 Bacteroidetes 的含量 (52.5%)是样品 A 中同一菌门的含量 (6.5%)的近 9 倍。



在门水平上菌群尚未被注释出特定菌名,则用 unassigned bacteria。

Sequences that could not be classified into any known group were assigned as unassigned bacteria.

图 4 各样品在门水平上的菌群分布

Fig. 4 Composition of bacteria community structure at the phylum level

2.4 聚类分析

利用 QIIME1.8.0 软件,基于 OTU 的种类及其相对丰度计算样本间的 weighted Unifrac 距离矩阵,林麝不同个体间 weighted Unifrac 距离最大为 0.67(A 与 D 之间),最小为 0.23(B 与 E 之间)。利用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,然后在 MEGA5.0 软件中绘制聚类图(图 5)。结果显示:B 和 E、C 和 F 分别聚在一起,表明 B 和 E、C 和 F 距离较近,菌群组成相似度较高,而样品 A、D 和其他样品距离较远,菌群组成差异性较大。

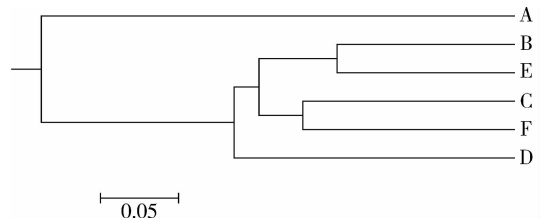


图 5 UPGMA 聚类分析图

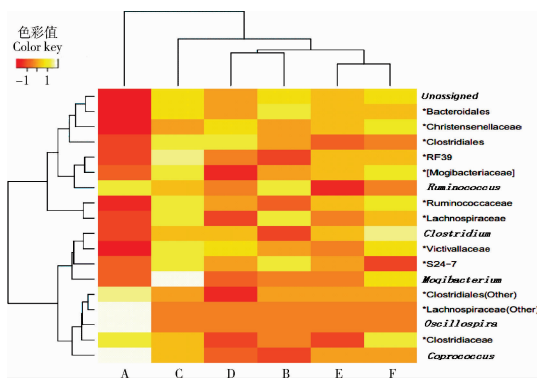
Fig. 5 UPGMA analysis of the samples

2.5 样品间共享属菌群分析

经统计,6 个林麝粪便样品间共有 18 个共享菌属。其中,相对含量在 1%以上的主要共享菌属由高到低依次为 * Bacteroidales (16.5% ± 10.2%)、* Ruminococcaceae (14.7% ± 13.8%)、* Clostridiales

(13.7% ± 3.9%)、* *Lachnospiraceae* (6.5% ± 1.7%)、* *Unassigned* (2.2% ± 1.0%)、*Ruminococcus* (1.6% ± 0.8%) 和 * *Christensenellaceae* (1.3% ± 1.1%)，其占总菌属的比例高达 56.5%。

共享菌属聚类热图见图 6，图中颜色显示越亮代表 OTU 丰度越高，即菌群组成的丰度越高。各样品虽然共享 18 个菌属，但同一菌属在不同样品中的相对含量差异较大。



在属水平上菌群尚未被注释出特定菌名，则用 unassigned；若属水平菌群没有菌名或菌被注释为 other，则用其属以上菌名加“*”表示。

Sequences that could not be classified into any known group were assigned as unassigned. Moreover, sequences without bacterial name or assigned as “other” would be defined at genus level marked with *.

图 6 共享菌群在属水平上的聚类热图

Fig. 6 Log-scaled percentage heatmap of bacteria community structure at the shared-genus level

3 讨论

1) 原始数据 (Raw data) 经生物信息学去噪和质控后，发现 6 只公林麝个体有效序列条数为 8 071~21 345，个体间测定的有效序列数差异性较大。究其原因如下：① 试验动物。由于本试验选择的 6 只林麝体格和健康状况相同，且在 28 h 试验期间饲喂相同日粮及采食量，因此，动物性别、体重、健康和饲喂方式不影响林麝个体有效测序量。但是，6 只林麝的肠道菌群可能存在一定的遗传性差异，在饲喂 28 h 后，将会带来林麝个体间有效测序量的差异性。② 测序深度。本试验测序深度不足以覆盖所有林麝粪便的微生物菌群，所检测到的胃肠道菌群具有一定的随机性，也有可能影响不同林麝个体有效测序量。基于高通量测序法的特点，很难挖掘足够的测序深度覆盖所有菌群，很多学者得出的稀释曲

线均未达到平台期^[13-15]。

样品的 OTU 稀释曲线能直观、真实地反映各个样品菌群多样性，根据曲线是否达到平台期，可以看出测序量是否足以覆盖全部菌群。如果各样品的 OTU 稀释曲线仍然有升高的趋势，说明增大测序量，仍然能发现新的 OTU；若曲线趋于平缓，说明测序量足以覆盖样品的几乎所有物种。曾有学者研究表明^[14]，草食动物 (牛、羊和小羚羊等) 胃肠道微生物测序深度达到 1 700~20 000 条，就足以覆盖样品中全部微生物菌群。本研究中，首次通过高通量测序技术研究林麝粪便菌群多样性，样品平均测序量达 14 182 条，样品最高测序量达 21 345 条，但各个样品稀释曲线均趋于平缓，而未达到平台期，说明测序量不足以覆盖林麝粪便的所有菌群。由此表明，林麝粪便中菌群多样性比一般草食动物胃肠道菌群多样性高。

2) 在很多草食动物胃肠道微生物的研究中，厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 均为含量最高的 2 个优势菌门^[16-18]。例如，Koike 等^[19]以主要饲喂鸭茅和苜蓿干草的绵羊为试验动物，研究其瘤胃内容物中细菌多样性，结果发现 Firmicutes 和 Bacteroidetes 分别占到瘤胃总细菌的 44% 和 43%。另有学者^[20]研究了绵羊瘤胃固相内容和液相内容物的细菌多样性，结果显示，瘤胃固相内容物所占比例最大的细菌门类为厚壁菌门 (70%)，而在液相内容物中优势菌门为拟杆菌门 (40%)。本研究结果也表明厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 是林麝粪便细菌中含量最高的 2 个菌门，这与前人^[16-18]关于草食动物胃肠道微生物的研究相一致。但林麝粪便中这 2 个优势菌门所占总菌的比例和其他草食动物有所差异，可能是由于动物品种、饲料和 DNA 测序方法等不同造成的。

林麝和其他草食动物胃肠道中厚壁菌门和拟杆菌门占优势的主要原因，可能是因这些动物均是以粗饲料为食。它们胃肠道中的拟杆菌和厚壁菌在粗纤维的消化过程中发挥着重要作用。李志鹏等^[21]分析了采食以柞树叶为主要粗饲料的梅花鹿瘤胃中的菌群，结果发现，其中 87.9% 的 16S rRNA 基因序列都属于拟杆菌门中能降解纤维的菌种序列。还有研究发现，肉牛瘤胃中厚壁菌门和拟杆菌门随饲料干草含量的增加而增加，厚壁菌的这一特性表现得尤其突出^[22]。

共享菌群的分析对于动物胃肠道微生物多样性的研究极其重要。一方面,通过共享菌群的分析,探究动物间共享菌群的异同,进而从品种、饲料、日龄等角度,分析普通共享菌及特有共享菌存在的原因。另一方面,根据普遍共享菌群的功能特点,寻求调控动物胃肠道菌群结构的通用对策,从而提高动物的生产性能及免疫力。

本研究从林麝粪便中,在属水平上共发现了18种共享菌,其中含量在1%以上的优势共享菌属由高到低依次为* Bacteroidales (15.7% ± 9.6%)、* Ruminococcaceae (14.7% ± 13.6%)、* Clostridiales (13.2% ± 3.4%)、* Lachnospiraceae (6.2% ± 1.6%)、* Unassigned (5.6% ± 3.0%)、*Butyrivibrio* (2.9% ± 1.6%)和*Ruminococcus* (1.6% ± 0.8%)。Jami等^[18]对16头荷斯坦泌乳奶牛瘤胃菌群的组成进行研究,结果发现了32种共享菌属,本研究中林麝粪便的大多数优势共享菌属和Jami等^[18]一致,但同一菌群的丰度有所差异,差异性可能来源于动物种类(奶牛 vs 林麝)、取样部位(瘤胃内容物 vs 粪便)等。

这些优势共享菌群可能在草食动物胃肠道营养物质的消化方面发挥着重要作用。例如,*Ruminococcus*、*Butyrivibrio*在本研究和其他有关草食动物的研究^[18,23-24]中都属于优势共享菌属,在种水平上,前者包括黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)及白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*),后者包括溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*),这些都是重要的纤维降解菌,能将草食动物采食的纤维素降解为挥发性脂肪酸供宿主利用。

*Clostridium*是草食动物胃肠道内另一种常见共享菌属^[13],在纤维素、蛋白质等复杂有机物的消化方面发挥着重要作用,其在胃肠道菌群中的相对含量一般较低。在本研究中其含量仅为0.8% ± 0.8%。

参 考 文 献

- [1] 邓学智,罗强,李亚敏. 林麝人工养殖技术[J]. 当代畜牧, 2014(15):038
Deng X Z, Luo Q, Li Y M. Musk artificial breeding technology [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2014(15): 038 (in Chinese)
- [2] 周瑜,赵克雷,田永强,李旭鑫,张修月,王红宁,岳碧松. 几种药物对圈养林麝化粪池隐秘杆菌菌膜的影响[J]. 四川动物, 2013(3):005
Zhou Y, Zhao K L, Tian Y Q, Li X X, Zhang X Y, Wang H N, Yue B S. Effect of drugs on biofilm production among trueperella pyogenes recovered from abscesses of forest musk deer [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2013(3): 005 (in Chinese)
- [3] 许珂,卜书海,梁宗锁,王洪水,罗承军,朱承嗣. 林麝研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(7):051
Xu K, Bu S H, Liang Z S, Wang H Y, Luo C J, Zhu C S. Research progress in forest musk deer [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(7): 051 (in Chinese)
- [4] 赵克雷,李旭鑫,曾博,张修月,岳碧松. 圈养林麝脓肿病原菌分离鉴定及药敏分析[J]. 四川动物, 2011,30(4):522-526
Zhao K L, Li X X, Zeng B, Zhang X Y, Yue B S. Isolation and identification of purulent bacteria from forest musk deer and analysis of drug sensitivity [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2011,30(4):522-526 (in Chinese)
- [5] 刘春燕. 林麝(*Moschus berezovskii*)养殖种群死亡原因及其生命生理特征研究[D]. 上海:华东师范大学, 2008
Liu C Y. Study on reasons of death and physiological features for breeding forest musk deer [D]. Shanghai: East China Normal University. 2008 (in Chinese)
- [6] 马炳存. 林麝肠道部分正常微生物的分离,鉴定,分型及微生态制剂的研制[D]. 雅安:四川农业大学, 2012
Ma B C. Isolation and identification and type-confirmation of forest musk deer intestinal microflora and research of a novel microbial ecological agent [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [7] Gruninger R J, Sensen C W, McAllister T A, Forster R J. Diversity of rumen bacteria in Canadian cervids [J]. *Plos One*, 2014,9(2):e89682
- [8] Pereira L B, Vicentini R, Ottoboni L M. Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel [J]. *Plos One*, 2014,9(5):e96605
- [9] Srinivasan S, Hoffman N G, Morgan M T, Matsen F A, Fiedler T L, Hall R W, Ross F J, McCoy C O, Bumgarner R, Marrazzo J M, Fredricks D N. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: High resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria [J]. *Plos One*, 2012,7(6):e37818
- [10] Fliegerova K, Tapio I, Bonin A, Mrazek J, Callegari M L, Bani P, Bayat A, Vilkki J, Kopečný J, Shingfield K J, Boyer F, Coissac E, Taberlet P, Wallace R J. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population [J]. *Anaerobe*, 2014,29:80-84
- [11] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 26(19):2460-2461.
- [12] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, DeSantis T Z, Andersen G L, Knight R. PyNAST: A flexible tool for aligning

- sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(2):266-267
- [13] Wu S, Wang G, Angert E R, Wang W, Li W, Zou H. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. *Plos One*, 2012, 7(2):e30440
- [14] Gulino L M, Ouwerkerk D, Kang A Y H, Maguire A J, Kienzle M, Klieve A V. Shedding light on the microbial community of the macropod foregut using 454-Amplicon pyrosequencing[J]. *Plos One*, 2013, 8(4):e61463
- [15] Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2013, 7(6):1069-1079
- [16] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P J, Ramey R R, Bircher J S, Schlegel M L, Tucker T A, Schrenzel M D, Knight R, Gordon J I. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. *Science*, 2008, 320(5883):1647-1651
- [17] Pope P B, Denman S E, Jones M, Tringe S G, Barry K, Malfatti S A, McHardy A C, Cheng J F, Hugenholtz P, McSweeney C S, Morrison M. Adaptation to herbivory by the Tammar wallaby includes bacterial and glycoside hydrolase profiles different from other herbivores [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(33):14793-14798
- [18] Jami E, Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals[J]. *Plos One*, 2012, 7(3):e33306
- [19] Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, Tanaka K. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria [J]. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2003, 229(1):23-30
- [20] Larue R, Yu Z, Parisi V A, Egan A R, Morrissio M. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4):530-543
- [21] 李志鹏, 刘哈璐, 崔学哲, 荆祎, 鲍坤, 徐超, 杨福合, 李光玉. 基于 16S rRNA 基因序列分析梅花鹿瘤胃细菌多样性[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(9):2044-2050 (in Chinese)
- Li Z P, Liu H L, Cui X Z, Jing W, Bao K, Xu C, Yang F H, Li G Y. Bacterial diversity in rumen of sika deer (*cervus nippon*) based on 16s rRNA sequences analysis[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(9):2044-2050
- [22] Chen Y, Penner G B, Li M, Ob, M. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(16):5770-5781
- [23] Mackie R I, White B A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output [J]. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73(10):2971-2995
- [24] Perumbakkam S, Mitchell E A, Craig A M. Changes to the rumen bacterial population of sheep with the addition of 2,4,6-trinitrotoluene to their diet [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 99(2):231-240

责任编辑: 苏燕