

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :683 - 690; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140392

454 焦磷酸测序分析几种哺乳动物粪便细菌多样性

陈秀^{1,3}, 张晓君², 李沁元¹, 薛正晟², 李桂鼎¹, 贾鳧¹, 赵立平², 姜怡^{1*}

¹ 云南大学云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091

² 上海交通大学生命科学技术学院生物科学与技术系, 上海 200240

³ 东北大学生命科学与健康学院, 辽宁 沈阳 110819

摘要:【目的】分析比较几种哺乳动物粪便细菌群落多样性, 了解粪便细菌多样性与动物进化和食物的关系。【方法】采集 6 种哺乳动物粪便样品; 提取总 DNA; PCR 扩增, 获得 16S rDNA V3 标签片段; 用 454 焦磷酸测序技术进行高通量测序; 主要基于 QIIME 平台分析比较粪便细菌多样性。【结果】分析发现, 厚壁菌门和拟杆菌门广泛存在于各样品中, 并且占绝对优势。 α 多样性分析发现, 杂食性的长臂猿、黑猩猩和川金丝猴的多样性最高, 其次是肉食性的东北虎, 来自熊科杂食性的亚洲黑熊和大熊猫的多样性最低。 β 多样性分析发现, 白眉长臂猿、黑猩猩、川金丝猴几种灵长目动物粪便的菌群相似, 而大熊猫菌、黑熊、孟加拉虎几种食肉目动物粪便细菌群相似但食肉动物孟加拉虎主要又因含梭杆菌门而区别于其他动物。【结论】动物粪便细菌优势类群明显; 同种动物重复样本的相似性最高, 各种动物多样性存在差异, 但几种灵长类动物粪便细菌多样性更丰富; 动物粪便细菌的组成和动物的进化及食物相关。本研究为哺乳动物粪便菌资源及后续研究提供了借鉴。

关键词: 哺乳动物, 粪便细菌, 454 高通量测序, 16S rDNA, 多样性

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0683-08

肠道细菌与宿主动物的健康和疾病等有着密切关系。近年来, 人类肠道细菌的研究受到各国的广泛关注, 开启了人类微生物组计划, 取得了重要进展^[1]。人类肠道细菌区系基因组包含的基因数量大约是宿主本身基因数量的 100 倍或者更高, 且人体肠道菌中约 99.1% 左右是属于细菌, 其中厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门占绝对优势, 仅有 0.8% 左右是古菌, 另外不到 0.1% 是真菌^[2-3]。近些年来, 人体肠道菌的研究有很多, 各种动物肠道菌的研究也逐渐增多^[4-7]。为了获取新资源对研究对象进行

高通量测序, 以分析了解微生物的多样性及这些微生物与环境因子之间的一些关系是开发利用的前提之一。在本研究中, 选取 3 种灵长目动物和 3 种食肉目的动物粪便作为研究对象, 利用 454 焦磷酸测序技术, 对粪便环境总 DNA 提取并进行 16S rDNA V3 区扩增测序, 在分析肠道细菌群落多样性的基础上, 分析动物粪便细菌群落在科、属两种水平上的多样性, 分析粪便细菌群落与动物进化及食物的相关性。

基金项目: 国家自然科学基金 (31270001, 31460005)

* 通信作者。Tel: +86-871-65034073; Fax: +86-871-65173878; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

作者简介: 陈秀 (1989 -), 女, 四川广安人, 硕士研究生, 主要从事放线菌资源研究。E-mail: chenxiu2007@126.com

收稿日期: 2014-08-07; 修回日期: 2014-10-28

1 材料和方法

1.1 实验样品信息

本研究中,选取 3 种食肉目动物(两种熊科动

物及专性食肉的孟加拉虎)和 3 种灵长目动物的粪便作为研究对象。表 1 是本研究中各样品来源动物的具体信息。

表 1. 采集粪便的动物信息

Table 1. Information of animals sampled for feces*

Animals	Abbreviation	Latin name	Order	Family	Diet habits
Giant Panda	GP	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Carnivora	Ursidae	omnivorous
Black Bear	BB	<i>Ursus thibetanus</i>	Carnivora	Ursidae	omnivorous
Siberian Tiger	ST	<i>Panthera tigris altaica</i>	Carnivora	Felidae	carnivore
Hoolock Gibbon	HG	<i>Hylobates hoolock</i>	Primata	Hylobatidae	omnivorous
Chimpanzee	C	<i>Pan troglodytes</i>	Primata	Pongidae	omnivorous
Golden Monkey	GM	<i>Rhinopithecus roxellanae</i>	Primata	Cercopithecidae	omnivorous

* All animals are vertebrates mammalian.

1.2 实验样品采集

所有粪便样品采自云南野生动物园处于半野生状态的健康成年动物。采样时,在动物排便后,立即用无菌镊子将粪便中间部分放入无菌袋中,每种动物的粪便样本包括 5-8 个个体的粪便混合物(大熊猫样品是 3 个个体的粪便混合物)。将样品置于准备好的干冰箱中,带回实验室,置于 -70°C 低温冰箱中备用。

1.3 粪便样品 DNA 的提取

将每种动物的原始粪便样品解冻、混匀后,各取 2 份等量(0.2 g)的样品进行 DNA 提取。这 2 份样品在后续实验中相互独立,为 2 份重复,以便检验测序结果的一致性。样品使用 InviMag® Stool DNA kit (Invitex, Germany) 试剂盒提取 DNA^[8]。用 0.8% (W/V) 的琼脂糖胶电泳和 V3 区预扩增检测 DNA 的大小和片段完整性,使用 Fluorescent and Radioisotope Science Imaging Systems FLA-5100 (Fujifilm, Tokyo, Japan) 确定 DNA 的浓度。

1.4 16S rDNA 的 V3 区 PCR 扩增和测序

对细菌的 16S rRNA 基因的 V3 区进行扩增。扩增引物^[9]为:P1 (V3F): 5'-NNNNNNNCCTACGGAGGCAGCAG-3', P2 (V3R): 5'-NNNNNNNNATTACCGCGCTGCT-3'。

引物两端带有 8 个碱基(NNNNNNNN, IDtag)以识别不同的样品的 16S rRNA 基因扩增产物。

16S rDNA 的 V3 区的扩增参照 Zhang 等^[10]和 Wang 等^[11]描述方法。扩增后检测纯化合格的总 PCR 产物进行后续的 454 测序,使用 GS FLX

Titanium (Roche) 系统测序^[12]。

1.5 各样点序列的分离及低质序列去除

使用自编程序将原始序列根据每个样本的识别标记(IDtag)及 PCR 引物进行整理,从原始数据中对同一个样点序列进行抽提,并形成单独的文件,同时对低质量序列进行去除。同时为了减少数据量,将符合标准的高质量序列中 100% 完全一致的序列合并,随机抽取一条代表作为 unique 序列,形成样本 × unique 序列丰度的矩阵用于后续的系统发育分析及生物信息学分析。通过在线分析软件 NAST multi-aligner ([http://greengenes. lbl. gov/cgi-bin/nph-NAST_align. cgi](http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-NAST_align.cgi))^[13]对应的本地软件 PyNAST 进行比对。该软件不仅可以制定参考序列库,更具有并行运算的能力,大大提高了分析的速度。此外,该软件与 QIIME 平台紧密整合。在该平台下(v 1.2.1)调用 PyNAST 进行本地多重序列比对,参数设置:最小比对长度为 100 bp,最小相似度为 75%。

1.6 RDP-Classifer 分析

RDP-Classifer 软件的本地版本(v 2.0)已集成在 QIIME 平台中,本实验是在 QIIME 平台下进行分析的,置信度参数设置为 50%。

1.7 序列的系统发育分析

本实验是在本地环境下通过 QIIME 平台进行分析的,调用 UCLUST 划分 OTU,在 100% 和 97% 的序列相似度水平下对序列进行归并。基于 Neighbor-Joining 算法,使用 Jukes-cantor correction 计算距离矩阵。距离矩阵输入 DOTUR 软件^[14]根据不同的序列相似性水平划分操作分类单位(operational

taxonomic units, OTU), 并将 unique 序列的丰度计算入每个 OTU 内。挑选每个 OTU 内部与其他序列距离平方之和最小的序列作为 OTU 的代表序列。为了鉴定序列的系统发育地位, 将所有 unique 序列通过在线的 RDP II 数据库 RDPquery^[15] 寻找每条序列的最相似菌, 再结合 OUT 信息分析不同动物的粪便菌群组成。

1.8 序列评价和多样性分析

根据每个样本文库的 OTU 丰度信息, 使用 spade 软件完成 α 和 β 多样性分析, 使用 analytic rarefaction1.3 构建稀释度曲线^[16], 使用 past (ver. 2.17) 进行主成分分析和聚类分析。通过 Chao1 和 Shannon index 多样性曲线评估序列文库的多样性, 以评价测序量是否能够代表原始群落的多样性^[17]。

2 结果和讨论

2.1 粪便 DNA 的提取

使用 InviMag[®] Stool DNA kit (Invitex, Germany) 试剂盒共提取 DNA 12 份 ($n = 6 \times 2$)。电泳结果以及 DNA 的浓度检测显示两次的结果较一致。

2.2 454 序列信息的预处理

数据分析在 QIIME 平台下进行 (v1.2.1)。后续分析时发现大熊猫一份样本测序失败, 此样本排除。以下分析结果是基于余下的质量可靠的 11 份样本。根据序列质量控制标准及比对结果, 测序共获得 39457 条原始序列。测序量最低的为大熊猫 (2301 条), 最高的为东北虎 1 (4995 条), 每个样本平均测序 3587 条。序列 99% 以上的净长度范围为 130–170 bp 之间, 而细菌 16S rRNA 基因 V3 区的平均长度为 180 bp^[9], 因此本次实验的测序长度基本能覆盖 V3 区全长。用 UCLUST 在 100% 的序列相似度水平下对序列进行归并, 获得 Unique sequences。

2.3 454 序列的多样性评价

97% 序列相似度认为是种 (species) 的分类水平^[18], 以该相似度水平归并的 OTU 计算了各样本的 α 多样性。本次研究共获得 731 个 OTUs, 为了验证测序量是否足够大才能够反映原始微生物群落多样性, 根据 97% 水平下 OTU 的丰度信息, 使用 Chao1 和 Shannon–Wiener index 多样性指数对动物粪

便细菌群落多样性进行评估。如图 1 所示, 对于两种多样性指数, 各样本的重复性均较为理想。多样性曲线显示, 随着测序量的不断增大, OTU 数目的增加趋于平缓, 说明本次实验的测序量达到饱和 (图 1), 表明该测序量已经基本能够反映该实验中动物粪便细菌群落多样性。从图 1 也可看出杂食性动物白眉长臂猿、黑猩猩和川金丝猴的粪便细菌群落多样性较高, 而熊科的大熊猫、亚洲黑熊和专性肉食动物东北虎的则相对较低。其中, Chao1 多样性指数曲线显示同属于灵长目的川金丝猴、白眉长臂猿和黑猩猩的粪便细菌群落多样性更高且比较相似; 熊科的亚洲黑熊和大熊猫的比较相近。以上数据结果表明: 分类地位越相近, 其粪便细菌群落多样性程度也更相近。

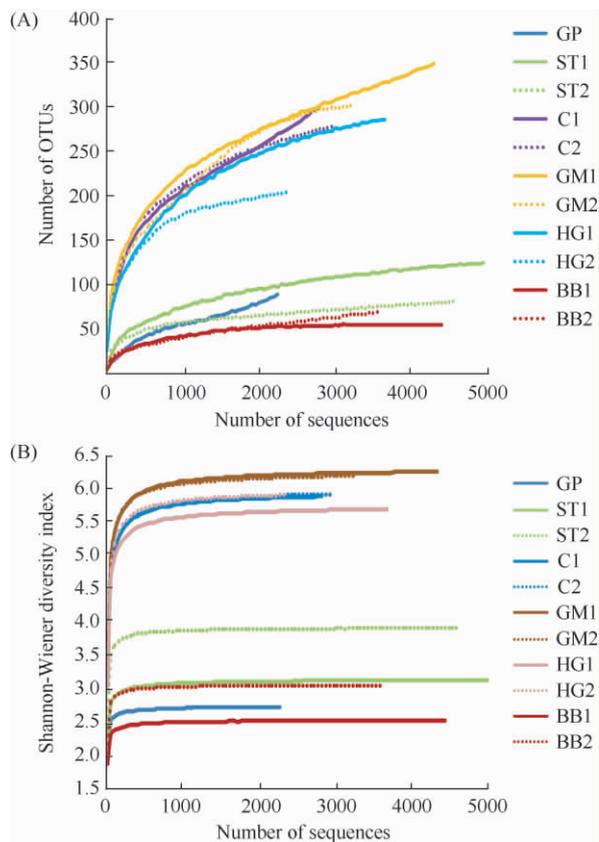


图 1. 各样本的 α 多样性

Figure 1. The α diversity of different samples. A: Chao1; B: Shannon–Wiener index. GP: Giant Panda; ST: Siberian Tiger; C: Chimpanzee; GM: Golden Monkey; HG: Hoolock Gibbon; BB: Black Bear, 1 and 2 represent repetition.

2.4 主成份和聚类分析

为了进一步验证 454 测序方法的可靠性及重现性, 使用 past 进行 PCoA 分析, 不管在门一级还是在

属一级(细菌分类地位)作图,各个动物的两个重复样本都能较好的聚在一起(图2),这说明同种动物重复样本的粪便细菌群落多样性无显著性差异。进行聚类分析也是如此,不管在门一级还是在属一级(细菌分类地位)聚类,各个动物的重复样本都能很好的聚在一起(图3),且发现分类地位相近的动物聚类更近,这说明同种动物重复样本的粪便细菌群落多样性无显著性差异,动物的粪便群落多样性和动物的分类地位相关。

(Firmicutes)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、纤维杆菌门(*Fibrobacteres*)、柔膜菌门(*Tenericutes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和暂定的 *TM7* 门。其中厚壁菌门在几种动物中所占的比例都很大,这和厚壁菌门很多是厌氧的相对应。在门水平未能鉴定的序列数为 762,这表明在动物粪便中存在着大量分类地位很高的未知新类群。各样本在门和属水平的分布如图4。

根据各样本在门水平分布的分析可以看出(图4-A),川金丝猴、白眉长臂猿和东北虎粪便细菌都分别有7个门;其次是亚洲黑熊(有5个门);大熊猫最少(只有4个门)。在黑猩猩、川金丝猴和白眉长臂猿的样品中都发现了较多的未知细菌类群。各样本中厚壁菌门和拟杆菌门广泛存在,并且占绝对优势,这和其他文献报道的一些动物肠道菌组成是相似的^[3-4,19]。厚壁菌门的数量在亚洲黑熊中比例最高(高达95%),而拟杆菌门的数量在白眉长臂猿中的比例最高(近70%),变形菌门在大熊猫样品中比例最高(45%以上),而在其他样品中相对较少。有趣的是,梭杆菌门在食肉动物东北虎中的比例约占25%,而在其他动物样品中的都较少甚至没有。梭杆菌是一类严格的专性厌氧菌,革兰氏染色阴性、菌体呈梭状、营养要求较高、在血平板上生长良好,这是否和它的宿主食肉有关需要进一步研究。

根据各样本在属(OUT条数大于0.5%)水平分布的分析再结合图4-B可知,白眉长臂猿和黑猩猩的多样性最丰富,分别有37和35个属;川金丝猴有32个属;东北虎有28个属;大熊猫有20个属;亚洲黑熊最少仅有17个属。细菌类群在大熊猫、东北虎以及亚洲黑熊的多样性较低,而在其他杂食性动物中较高。未确定分类地位的细菌类群,在各样点都有分布,在黑猩猩中占的比例最高。

门及属水平的分析也发现了分类地位近且食性相近的动物,其粪便细菌组成也相近;如大熊猫、黑熊、东北虎3个食肉目动物的细菌群落分布更相似,而白眉长臂猿、黑猩猩和川金丝猴3个灵长类动物的细菌群落分布更相似;另外食肉目动物中食肉的东北虎的细菌群落又较杂食的大熊猫和黑熊差异比较大。以上说明动物肠道细菌群落多样性和动物的

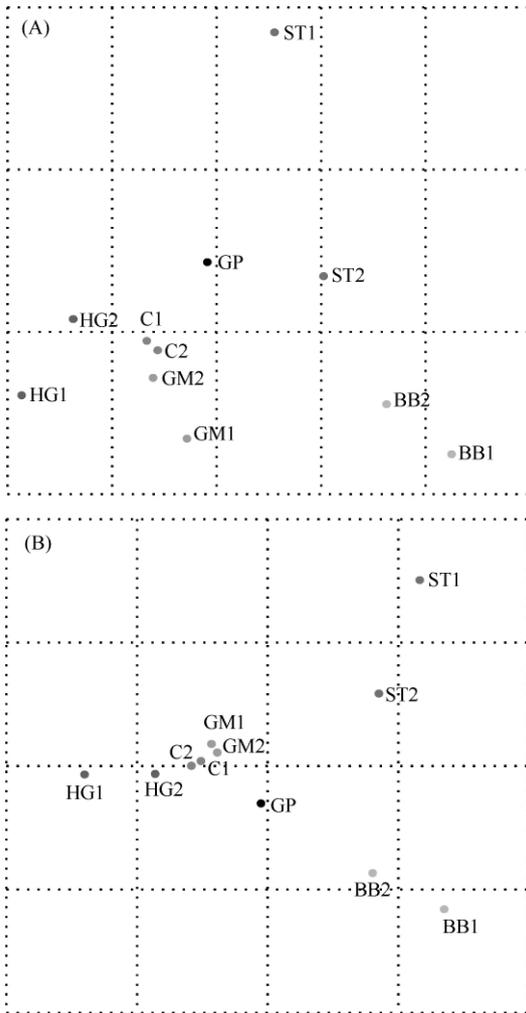


图2. UniFrac PCoA分析(A:门一级,B:属一级)

Figure 2. UniFrac PCoA analysis. A: based on phylum; B: based on genus. GP: Giant Panda; ST: Siberian Tiger; C: Chimpanzee; GM: Golden Monkey; HG: Hoolock Gibbon; BB: Black Bear, 1 and 2 represent repetition.

2.5 细菌多样性组成

采用 RDP classifier 对 Unique 序列进行分类地位的鉴定,发现这些序列分属于 13 个门:厚壁菌门

进化相关,同时也和动物的食物相关。

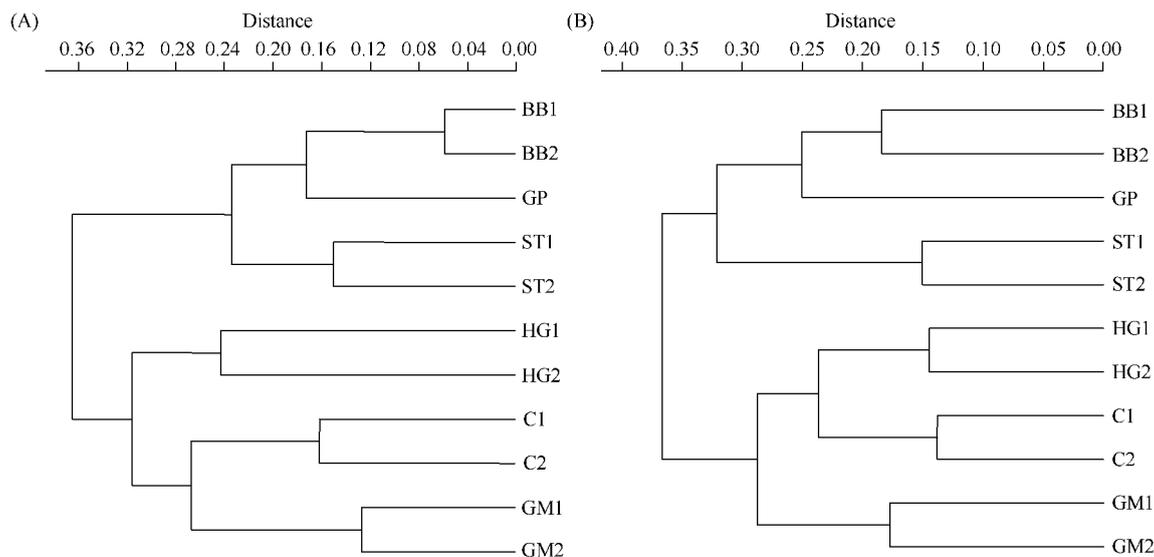


图 3. Past UPGMA 聚类分析 (A: 门一级聚类, B: 属一级聚类 “1,2” 表示两个重复)

Figure 3. Past UPGMA clustering analysis. A: Based on phylum; B: Based on genus. GP: Giant Panda; ST: Siberian Tiger; C: Chimpanzee; GM: Golden Monkey; HG: Hoolock Gibbon; BB: Black Bear, 1 and 2 represent repetition.

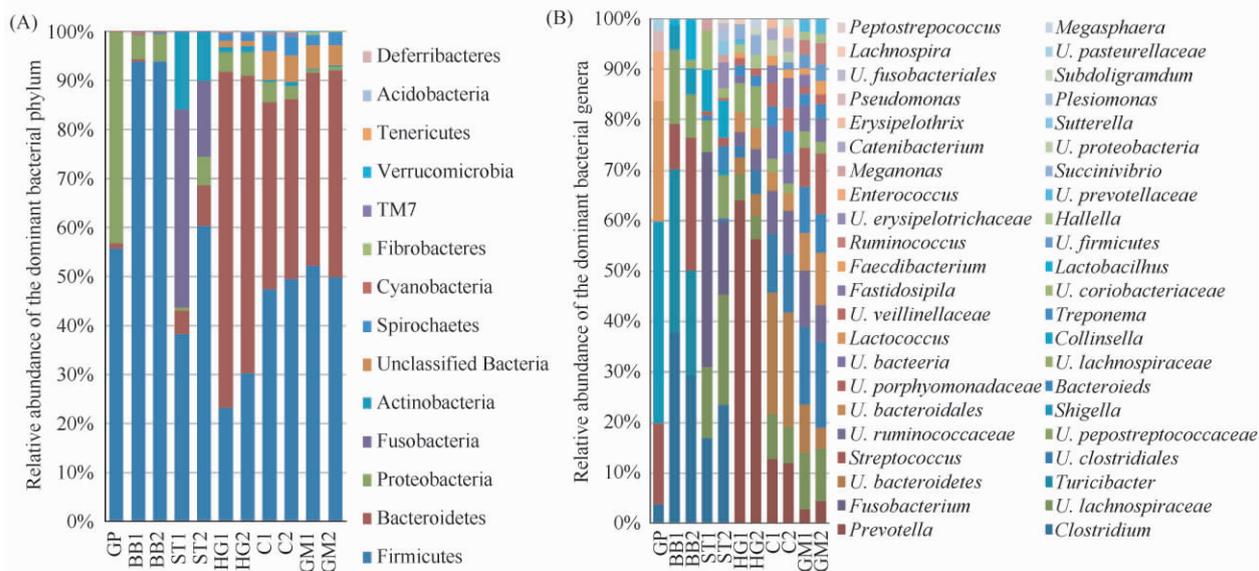


图 4. 各样本在门和属水平的菌落分布

Figure 4. The relative abundance of the dominant bacterial phylum (A) and genera (B) in different samples. ST: Siberian Tiger, C: Chimpanzee, GM: Golden Monkey, HG: Hoolock Gibbon, BB: Black Bear, 1 and 2 represent repetition. ‘U’ is the abbreviation of unclassified. Only genera greater than 10% were listed in picture B.

2.6 不同动物粪便菌群异同比较

在分析几种动物粪便细菌群落多样性的基础上,我们对不同动物粪便菌群的异同进行了比较,再结合动物的特征,以期分析各个菌群可能对动物的作用。图 5 显示的是各个动物的菌群异同,结合丰

度图(图 4)可以看出,不管是杂食的大熊猫和黑熊还是肉食的东北虎,梭菌属(*Clostridium*)和志贺氏菌属(*Shigella*)都存在,说明这类菌可能是食肉目动物的进化中一直有的或者和肉类食物消化相关,而志贺氏杆菌属为一种人类致病菌,可能引起痢

疾^[20,21],但在健康的动物中却普遍存在值得我们研究,这可能对于研究在种水平上这类菌群与引起人类痢疾的这类菌群的关系有一定帮助。*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* 是食肉目杂食动物黑熊和大熊猫中存在而在食肉动物东北虎中不存在,说明这类菌可能是食肉目动物后来进化出来的或者和动物的非肉类食物相关。从食肉目和灵长目两类动物的菌异同比较和丰度图(图 5-B)可以看出 *Bacteroides*, *Erysipelotrichaceae* *Incertae Sedis*, *Lachnospiraceae* *Incertae Sedis*, *Lactobacillus*, *Sarcina*, *Shigella* 这几类菌是两类动物所共有的,特别是 *Shigella* 更是所有动物都存在,它可能是宿主通过某种“利益关系”建立了一个共生关系,而 *Shigella* 中如前所述有的是人类的致病菌,研究这类菌可能对哺乳动物的健康有一定作用。

3 总结

本研究通过高通量的 454 测序技术详细而全面的揭示了大熊猫、亚洲黑熊、东北虎、白眉长臂猿、黑猩猩和川金丝猴的粪便细菌群落多样性。从以上分析结果可知,各种动物的两份样本在分类鉴定的比较时,重复时略有差异。这些差异可能是由于实验及测序误差导致的,也有可能是最初提取 DNA 时两次取样部位不同所致(如粪便样本很难保证完全均质化)。但是这些差异并不影响对不同动物的粪便细菌组成进行比较,在 β 多样性分析中,同种动物的样本间的相似性显著高于不同动物间的群落相似性,说明该数据集是可靠的,分析结果也合理可信。

454 测序数据分析发现动物粪便中存在着丰富的微生物类群,从注释的菌可看出厌氧菌占绝大多数。其中既包含一些特有的优势类群,同时也包括了一些同样存在于其它环境的类群,而且动物粪便样品中存在许多未知的细菌类群。部分类群在实验动物粪便类群中所占比例较大,如厚壁菌门区别于其他很多环境,在肠道中占很大的比例,可以推测这些物种可能在动物宿主肠道中发挥着重要的作用。

从 6 种动物粪便样品中共获得 42540 条原始序列,采用 RDP classifier 对 Unique 序列进行分类地位的鉴定,发现这些序列属于细菌域的 13 个门:厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、变形菌门、放线菌门、螺

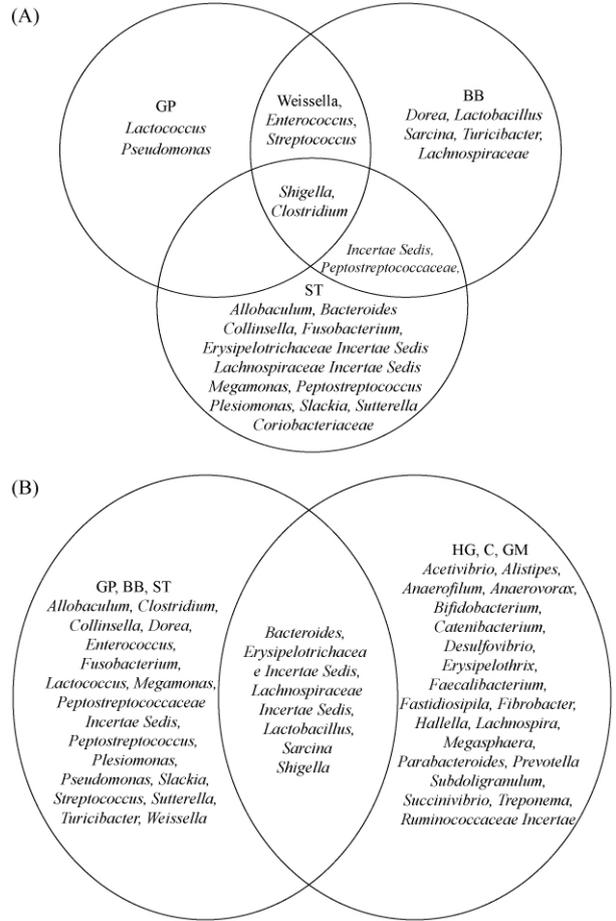


图 5 各类动物粪便细菌属一级异同比较

Figure 5. Comparisons of fecal genera among different kinds of animals. A represent the comparison among the Carnivora, B represent the comparison between the Carnivora and Primata. ST: Siberian Tiger, C: Chimpanzee, GM: Golden Monkey, HG: Hoolock Gibbon, BB: Black Bear, Only the content (OUT number) greater than 0.5% were listed.

旋体门、蓝藻门、纤维杆菌门、柔膜菌门、酸杆菌门、脱铁杆菌门、疣微菌门和暂定的 TM7 门,在门水平未能鉴定的序列数为 762;共鉴定获得 112 个细菌属,说明粪便中蕴藏的细菌物种丰富。几种动物中均有大量未知的新类群,说明粪便是一个可用于挖掘新微生物资源的环境。

多样性指数分析、聚类分析、门及属水平的分析发现了分类地位近且食性相近的动物,其粪便细菌类群也相近;说明动物肠道菌的群落结构和动物的进化紧密相关,同时又和动物的食物相关。并且在比较动物粪便细菌异同时发现动物粪便菌中 *Shigella* 属可能是较好的用于研究人类痢疾微生物类群之一。

致谢: 在昆明野生动物园采样的过程中, 李有龙、邱树妹、黄俊龙等同志给予了我们热情的帮助, 感谢实验师杨春花的帮助, 在此表示衷心的感谢!

参考文献

- [1] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Gordon RK&JL. The Human Microbiome Project. *Nature*, 2007, 449 (7164): 804-810.
- [2] Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich C, Gordon JJ. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2004, 101 (44): 15718-15723.
- [3] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Paslier DL, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz PT, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Consortium M, Bork P, Ehrlich D, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464 (7285): 59-65.
- [4] Deng GH, Cha LY, Wang Y, Li YT, Li RB, Zhou HW. Comparison of human and animal fecal microbiota with Illumina sequencing of 16S rRNA tags. Sciencepaper Online. 2013, 01: <http://www.paper.edu.cn/html/releasepaper/2013/01/933/>. (in Chinese)
邓冠华, 查龙应, 王玉, 黎耀涛, 李若玟, 周宏伟. 高通量 16S rRNA 标签测序法比较人与不同动物肠道细菌组多样性. 中国科技论文在线. 2013, 01: <http://www.paper.edu.cn/html/releasepaper/2013/01/933/>.
- [5] 李伟. 几种常用实验动物与人肠道主要菌群多样性比较. 西南大学硕士学位论文, 2011.
- [6] 赵述森. 猪源益生芽孢杆菌的分离筛选与应用研究. 华中农业大学博士学位论文, 2009.
- [7] Pang XY, Hua XG, Yang Q, Ding DZ, Che CY, Cui L, Jia W, Bucheli P, Zhao LP. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *The ISME Journal*, 2007, 1:156-162.
- [8] 李旻. 人体肠道菌群结构与宿主代谢的相关性研究. 上海交通大学博士学位论文, 2009.
- [9] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (3): 695-700.
- [10] Zhang HH, Chen L. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences reveals distal gut bacterial diversity in wild wolves (*Canis lupus*). *Molecular Biology Reports*, 2010, 37: 4013-4022.
- [11] Wang TT, Cai GX, Qiu YP, Na F, Zhang MH, Pang XY, Jia W, Cai SJ, Zhao LP. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME Journal*, 2012, 6 (2): 320-329.
- [12] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman AM, Chen YJ, Chen ZT, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu PG, BerleyRF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, 437 (7057): 376-380.
- [13] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2006, 22 (13): 1658-1659.
- [14] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (3): 1501-1506.
- [15] Dyszynski G. RDPquery: A Java program from the Sapelo Program Microbial Observatory for automatic classification of bacterial 16S rRNA sequences based on Ribosomal Database Project taxonomy and Smith-Waterman alignment. (http://simo.marcei.uga.edu/public_db/rdp_query.htm. 2006.
- [16] Hooland SM (2003) user's guide and application. <http://strata.uga.edu/software/anRareReadme.html>. accessed 10 jan 2011.
- [17] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbial Ecology*, 2004, 47 (2): 161-177.
- [18] McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, Aye PP, Lackner

A, Liu Z, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Bushman FD. The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathogens*, 2008, 4 (2) : 20.

[19] 陈磊. 狼肠道菌群生态及犬科线粒体基因组比较和系统发育. 东北农业大学博士学位论文, 2010.

[20] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of Shigella infections: implications for

vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*, 1999, 77: 651-666.

[21] Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi A. Characterization of Shigella Strains in Iran by Plasmid Profile Analysis and PCR Amplification of *ipa* Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44 (8) : 2879-2883.

Diversity of faecal bacteria in several mammals by 454 high-throughput sequencing

Xiu Chen^{1,3}, Xiaojun Zhang², Qinyuan Li¹, Zhengsheng Xue², Guiding Li¹, Man Jia¹, Liping Zhao², Yi Jiang^{1*}

¹Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, 650091, Yunnan Province, China

²School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

³College of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to analyze the diversities and differences of several mammalian's faecal bacteria, to understand the relationships between bacterium diversities and animals' evolutionary and animals' feeds.

[Methods] Genomic DNA of feces was extracted and amplified for the 16S rDNA V3 tags, and then the tags were sequenced by 454 sequencing. QIIME were used to analyze faecal bacterial diversities. [Results] Faecal bacteria of all animals were dominated by *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. Bacterial diversities of *Hylobates hoolock*, *Pan troglodytes* and *Rhinopithecus roxellanae* were the highest, followed by *Panthera tigris altaica*, *Ailuropoda melanoleuca* and *Ursus thibetanus* were the lowest through α diversity analysis. The constituents of faecal bacteria among *Hylobates hoolock*, *Pan troglodytes* and *Rhinopithecus roxellanae* were similar. The constituents of faecal bacteria among *Ailuropoda melanoleuca*, *Ursus thibetanus*, and *Panthera tigris altaica* were similar. Mainly for containing *Fusobacteria*, the faecal bacterial of *Panthera tigris altaica* differed from the other two carnivore animals through β diversity analysis.

[Conclusion] The dominating faecal bacteria were obvious, the bacteria similarities of the two repetitions were the highest. The diversities of each animal were different and higher in the primates. Both evolution and food were related to faecal bacteria. This study provided some references for exploring the new microorganism and further research of faecal bacteria.

Keywords: mammalian, faecal bacteria, 454 sequencing, 16S rDNA, diversity

(本文责编: 张晓丽)