

美洲大蠊成虫肠道菌群多样性分析

郝艳芹¹, 周闯¹, 晋家正¹, 沈咏梅², 张修月¹, 岳碧松^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;

2. 药用美洲大蠊四川省重点实验室, 成都 610081)

摘要: 美洲大蠊 *Periplaneta americana* 既是卫生害虫, 也是重要的药用昆虫。许多研究表明, 其肠道菌群种类和数量与宿主健康密切相关。本实验利用 16S rRNA 高通量测序技术分析人工饲养的美洲大蠊成虫肠道菌群。结果得到有效序列 67 492 条, 归类为 581 个操作分类单元, 注释到 21 门 79 目 193 属。厚壁菌门 Firmicutes (56.96%) 和拟杆菌门 Bacteroidetes (33.13%) 为美洲大蠊成虫肠道的优势菌门。葡萄球菌属 *Staphylococcus* (16.59%)、芽孢杆菌属 *Bacillus* (13.26%) 和副杆菌属 *Parabacteroides* (10.26%) 为美洲大蠊成虫肠道的优势菌属。研究结果为进一步探讨美洲大蠊肠道菌群多样性以及与宿主之间的关系打下了基础。

关键词: 美洲大蠊; 肠道菌群; 高通量测序

中图分类号: Q969.25 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2018)04-0415-05

Analysis on the Intestinal Microbiota Diversity of Adult *Periplaneta americana*

HAO Yanqin¹, ZHOU Chuang¹, JIN Jiazheng¹, SHEN Yongmei², ZHANG Xiuyue¹, YUE Bisong^{1*}

(1. Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Sichuan Key Laboratory of Medicinal American Cockroach, Chengdu 610081, China)

Abstract: *Periplaneta americana* is not only an important pest affecting human health, but also a medicinal economic insect. Many studies have suggested that the type and quantity of intestinal microbiota are closely related to the host health. In this study, 16S rRNA high-throughput sequencing technique was used to analyze the intestinal microbiota of artificially fed *P. americana*. The results showed that a total of 67 492 16S rRNA sequences classified as 581 operational taxonomic units, annotated to 193 genera, 79 orders and 21 phyla, were obtained. Specifically, among the identified species in the intestinal microbiota of *P. americana*, Firmicutes (56.96%) and Bacteroidetes (33.13%) were the dominant phyla, Bacteroidales (32.11%), Bacillales (29.89%), Clostridiales (12.93%) and Lactobacillales (10.73%) were the dominant orders, *Staphylococcus* (16.59%), *Bacillus* (13.26%) and *Parabacteroides* (10.26%) were the dominant genera, and *Staphylococcus sciuri* (14.95%) was the most prevalent species. These results laid a solid foundation for further exploring the intestinal microbiota diversity and its relationship with the host *P. americana*.

Keywords: *Periplaneta americana*; intestinal microbiota; high-throughput sequencing

宿主肠道中微生物群落与其健康相关, 它们能够与宿主相互协作增加机体整体适应性(张振宇等, 2017)。肠道菌群能合成胆汁酸、胆碱以及短链脂肪酸等对机体健康有利的代谢产物(Nicholson & Wil-

son, 2003), 微生物还能与宿主代谢互作产生维持宿主正常免疫的代谢产物, 如小肽、多胺和甲基供体等(Nicholson *et al.*, 2012)。

美洲大蠊 *Periplaneta americana* 隶属于蜚蠊目

收稿日期: 2018-03-12 接受日期: 2018-05-15

基金项目: 四川好医生攀西药业有限责任公司资助项目

作者简介: 郝艳芹(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子生态学, E-mail: 1849853004@qq.com

* 通信作者 Corresponding author, E-mail: bsyue@scu.edu.cn

Blattaria 蜚蠊科 Blattidae 大蠊属 *Periplaneta*, 杂食特性和超强的环境适应能力使其成为研究宿主与肠道菌群间协同进化关系的重要模型之一 (Mullins, 2015)。Ondrejch (2016) 以美洲大蠊为模型研究肠道菌群与宿主关系时发现, 使用抗生素消除肠道菌群后, 宿主的代谢速率减缓且体质量降低, 表明肠道菌群可能为宿主提供必要的营养物质。Sabree 等 (2009) 在构建美洲大蠊的内共生菌——蟑螂杆状体属 *Blattabacterium* 的消化通路时, 发现内共生菌能为宿主提供自身不能合成的氨基酸和维生素等, 以提高宿主对营养不均衡食物的利用率。美洲大蠊肠道菌群具有高度多样性的特征, 刘晓飞等 (2015) 采用体外培养从美洲大蠊成虫肠道中分离出 20 种细菌, 它们多数属于变形杆菌门 Proteobacteria 和拟杆菌门 Bacteroidetes 这两大类昆虫肠道优势菌门。Bagde 等 (2013) 在研究美洲大蠊成虫肠道时发现, 可培养细菌不仅有芽孢杆菌属 *Bacillus*, 还有肠杆菌属 *Enterobacteria*、志贺氏杆菌 *Shigas basillus* 等机会致病菌, 还有伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi* 等致病菌。这些研究多集中在肠道菌群功能及它们是否能体外培养等方面, 对美洲大蠊成虫肠道菌群结构的研究较为缺乏。本研究采用 16S rRNA 高通量测序技术研究美洲大蠊成虫肠道菌群多样性, 避免遗漏体外不能分离培养的细菌, 以期鉴定出更全面的美洲大蠊肠道菌群群落, 深入研究肠道菌群与宿主相互关系。

1 实验方法

1.1 实验材料

实验采用的美洲大蠊成虫来源于四川好医生攀西药业有限责任公司美洲大蠊养殖基地。随机选取 6 只成虫, 饥饿 24 h, 在无菌室用 75% 乙醇表面消毒 30 s, 再用无菌水漂洗 3 次。剪去虫体的翅膀和腿, 用大头针固定头部, 从背面中部的肛门开始剪开, 直到头部。将整个肠道移到 2 mL EP 管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 (Carrasco *et al.*, 2014)。

1.2 总 DNA 提取和 PCR 扩增及测序

混合 6 个肠道样品后用液氮研磨。参考十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取总 DNA (李钧敏, 金则新, 2006)。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 无菌水稀释样品至 $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。使用 16S rRNA V4 可变区的通用引物: 515F (GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA)、806R (GACTACNNGGTATCTAAT) 进行 PCR

扩增, 20 μL 体系包括: High-Fidelity PCR Master Mix 10 μL , 带 Barcode 的特异引物各 1 μL , 高保真酶 0.3 μL , 模板 DNA 1 μL , 剩余部分由 ddH₂O 补齐, 反应程序为: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min; 30 个循环 ($98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。产物送北京诺禾致源科技有限公司用 HiSeq PE250 平台测序。

1.3 数据分析

参照 Qiime (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html) 的 Tags 质量控制流程对获得的测序数据进行拼接和过滤处理。将处理后的数据以 97% 的一致性利用 Uparse (Edgar, 2013) 全部聚类成操作分类单元 (OTUs)。同时选取 OTUs 的代表性序列, 使用 Mothur (Wang *et al.*, 2007) 与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库 (Quast *et al.*, 2013) 进行物种注释分析并统计各样本的菌群组成。

2 结果

2.1 肠道菌群门水平上的多样性

通过 16S rRNA 测序检测到细菌序列 67 492 条, 归类为 581 个 OTUs, 物种注释到 21 个门。肠道的优势菌门为厚壁菌门 Firmicutes (56.96%) 和拟杆菌门 (33.13%), 其后依次为变形杆菌门 (6.65%)、放线菌门 Actinobacteria (1.11%) 和浮霉菌门 Planctomycetes (1.03%) 等 (表 1)。

2.2 肠道菌群目水平上的多样性

从目水平上对美洲大蠊成虫肠道菌群组成进行分析发现, 相对丰度 $\geq 0.1\%$ 的目占总目数的 18.99% (15/79)。优势菌目主要为拟杆菌目 Bacteroidales (32.11%)、芽孢杆菌目 Bacillales (29.89%)、梭菌目 Clostridiales (12.93%) 和乳杆菌目 Lactobacillales (10.73%) (表 2)。

2.3 肠道菌群属水平上的多样性

对样品检测到的所有 OTUs 序列进行聚类注释后得到 193 个属, 其中相对丰度 $\geq 0.1\%$ 的菌属有 39 个。除变形杆菌门的脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* (0.94%) 等 6 个属、放线菌门的微球菌属 *Micrococcus* (1.00%) 和软壁菌门 Tenericutes 的无胆甾原体属 *Acholeplasma* (0.18%) 外, 其余 31 属均属于厚壁菌门和拟杆菌门这两大优势菌门。厚壁菌门中的优势菌属分别为葡萄球菌属 *Staphylococcus* (16.59%)、芽孢杆菌属 *Bacillus* (13.26%) 和 *Lactobacillus* (8.92%); 拟杆菌门中的优势菌属为副杆菌属 *Parabacteroides* (10.26%) (表 3)。

表 1 美洲大蠊肠道菌群门类组成
Table 1 The intestinal microbiota composition of *Periplaneta americana* on phylum category

分类 Taxonomy	测序序列数 Number of sequences	相对丰度 Relative abundance/%
厚壁菌门 Firmicutes	38 455	56. 96
拟杆菌门 Bacteroidetes	22 436	33. 13
变形杆菌门 Proteobacteria	4 438	6. 65
放线菌门 Actinobacteria	796	1. 11
浮霉菌门 Planctomycetes	697	1. 03
软壁菌门 Tenericutes	251	0. 41
酸杆菌门 Acidobacteria	77	0. 16
广古菌门 Euryarchaeota	53	0. 07
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	38	0. 05
脱铁杆菌门 Deferribacteres	27	0. 05
螺旋体门 Spirochaetes	22	0. 02
梭杆菌门 Fusobacteria	19	0. 02
绿弯菌门 Chloroflexi	13	0. 02
疣微菌门 Verrucomicrobia	10	0. 02
蓝细菌 Cyanobacteria	7	0. 01
迷踪菌门 Elusimicrobia	5	0. 01
CKC4	3	<0. 01
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	2	<0. 01
栖热链球菌门 Deinococcus-Thermus	2	<0. 01
硝化螺旋菌门 Nitrospirae	1	<0. 01
RsaHF231	1	<0. 01

注: 相对丰度 = 物种有效序列数/样本总有效序列数; 下同
Note: Relative abundance = number of valid sequences of the species/number of total valid sequences; the same below

表 2 美洲大蠊肠道菌群目水平相对丰度 (≥0. 1%)
Table 2 The intestinal microbial abundance of *Periplaneta americana* (≥0. 1%) on order category

目 Order	测序序列数 Number of sequences	相对丰度 Relative abundance/%
拟杆菌目 Bacteroidales	21 748	32. 11
芽孢杆菌目 Bacillales	20 191	29. 89
梭菌目 Clostridiales	8 666	12. 93
乳杆菌目 Lactobacillales	7 300	10. 73
丹毒丝菌目 Erysipelotrichales	2 467	3. 07
假单胞菌目 Pseudomonadales	2 053	1. 70
脱硫菌目 Desulfobacterales	1 145	1. 17
微球菌目 Micrococcales	784	1. 07
脱硫弧菌目 Desulfovibrionales	728	0. 98
肠杆菌目 Enterobacteriales	643	0. 84
Rs-K70_termite_group	550	0. 28
Selenomonadales	185	0. 24
Mollicutes_RF9	168	0. 21
Acholeplasmatales	129	0. 18
海洋螺菌目 Oceanospirillales	116	0. 12

表 3 美洲大蠊肠道菌群属水平相对丰度 (≥0. 1%)
Table 3 The intestinal microbial abundance of *Periplaneta americana* (≥0. 1%) on genus category

优势菌门 Dominant phylum	属 Genus	相对丰度 Relative abundance/%	
厚壁菌门 Firmicutes	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	16. 59	
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	13. 26	
	<i>Lactobacillus</i>	8. 92	
	<i>Christensenellaceae</i> R-7_group	2. 29	
	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	0. 97	
	<i>Erysipelatoclostridium</i>	0. 53	
	劳特氏菌属 <i>Blautia</i>	0. 49	
	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0. 48	
	<i>Anaerotruncus</i>	0. 40	
	<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-001	0. 39	
	罕见小球菌属 <i>Subdoligranulum</i>	0. 29	
	<i>Ruminococcaceae</i> UCG-014	0. 25	
	<i>Catenibacterium</i>	0. 22	
	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	0. 19	
	<i>Candidatus soleiferrea</i>	0. 17	
	肉食杆菌属 <i>Carnobacterium</i>	0. 16	
	<i>Holdemanella</i>	0. 16	
<i>Ruminiclostridium 9</i>	0. 14		
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i> group	0. 12		
<i>Ruminococcus gauvreauii</i> group	0. 12		
<i>Lachnoclostridium</i>	0. 10		
<i>Eubacterium hallii</i> group	0. 10		
<i>Coprococcus 3</i>	0. 10		
拟杆菌门 Bacteroidetes	副杆菌属 <i>Parabacteroides</i>	10. 26	
	类杆菌属 <i>Bacteroides</i>	3. 29	
	<i>Dysgonomonas</i>	2. 46	
	另枝菌属 <i>Alistipes</i>	1. 77	
	<i>Candidatus symbiothrix</i>	0. 70	
	<i>Tannerella</i>	0. 62	
	<i>Paludibacter</i>	0. 16	
	<i>Prevotella 9</i>	0. 12	
	变形杆菌门 Proteobacteria	脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	0. 94
		冷杆菌属 <i>Psychrobacter</i>	0. 92
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>		0. 72	
脱硫球茎菌属 <i>Desulfobulbus</i>		0. 57	
<i>Desulfatiferula</i>		0. 19	
放线菌门 Actinobacteria	盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	0. 12	
	微球菌属 <i>Micrococcus</i>	1. 00	
软壁菌门 Tenericutes	无胆甾原体属 <i>Acholeplasma</i>	0. 18	

2.4 美洲大蠊肠道优势菌属中的菌种多样性

在美洲大蠊成虫肠道菌群中,共注释到 83 种细菌,但由于测序片段较短,数据并不可信。统计美洲大蠊排名前 5 的优势菌属中注释到的菌种,葡萄球菌属中注释到的松鼠葡萄球菌 *Staphylococcus sciuri* (14.95%) 是美洲大蠊成虫肠道中的优势菌种。副杆菌属中注释到的菌种为 *Parabacteroides merdae*。*Lactobacillus* 中注释到的菌种为加氏乳杆菌 *L. gasseri*、戊糖乳杆菌 *L. pentosus*、粘膜乳杆菌 *L. mucosae* 和动物乳杆菌 *L. animalis* (表 4)。

表 4 美洲大蠊肠道优势菌属中的菌种统计
Table 4 Statistical analysis of species in the dominant genus of the *Periplaneta americana* intestinal microbiota

优势菌属 Dominant genus	种名 Species	相对丰度 Relative abundance/%
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	14.95
副杆菌属 <i>Parabacteroides</i>	<i>P. merdae</i>	0.02
<i>Lactobacillus</i>	加氏乳杆菌 <i>L. gasseri</i>	1.03
	戊糖乳杆菌 <i>L. pentosus</i>	0.29
	粘膜乳杆菌 <i>L. mucosae</i>	0.11
	动物乳杆菌 <i>L. animalis</i>	0.04

3 讨论

美洲大蠊成虫肠道菌群与其他昆虫具有一定的相似性,以厚壁菌门、拟杆菌门为主要优势类群 (Sabree & Moran, 2014; Douglas, 2015), 这 2 个菌门中的许多种类能够消化纤维素、碳水化合物和蛋白质等。例如,厚壁菌门的优势菌属芽孢杆菌属和 *Lactobacillus* 为发酵类细菌,它们不仅能够利用碳水化合物生成乳酸,促进营养物质的吸收,还可以产生细菌素等物质抵抗真菌的侵害 (Inglin *et al.*, 2015); 拟杆菌门类杆菌属 *Bacteroides* 的大部分细菌拥有水解多糖的酶,能够把复杂的多糖转变成简单的可供宿主利用的营养物质 (Xu *et al.*, 2007)。除此之外,有研究发现变形杆菌门的优势菌属脱硫弧菌属是存在于人体肠道内常见的条件致病菌,它们在无氧条件下可将硫酸盐还原为对肠道上皮细胞具有毒性作用的硫化物,还可诱导上皮细胞的异常增殖,造成非炎症性肠病等 (Loubinoux *et al.*, 2002), 而其在美洲大蠊肠道

中的作用有待进一步研究。放线菌门的许多种类能够参与宿主的碳氮循环和抵抗病菌侵染 (Flint, 2011; 张晓杰等, 2016)。这些主要优势菌门和其他一些菌属的存在为美洲大蠊的生长、发育和繁殖提供了有利的保障。

Bertino-Grimaldi 等 (2013) 对美洲大蠊成虫肠道菌群研究时发现,其优势菌门为拟杆菌门和变形杆菌门,这与本研究结果差异较大。这种差异的产生可能与美洲大蠊的来源有关,本研究检测的是人工饲养种群,而 Bertino-Grimaldi 等 (2013) 检测的是野生种群。研究表明,美洲大蠊肠道微生物能够随着宿主饮食的改变而改变,当它取食高纤维食料时,厚壁菌门显著增加 (Danielle *et al.*, 2013), 取食高蛋白食料时肠道菌群的丰富性增加 (Pérezcobas *et al.*, 2015)。本实验所采用的样本为人工饲养种群,其生存条件和摄取的营养物质与生活在环境较为恶劣的下水道等地的野生种群有很大差异,所以与其他研究结果中优势菌门不一致是合理的。由于 16S rRNA 高通量测序片段较短,许多序列并不能注释到种,注释到种的结果可信度也不高。因此,只对排名前 5 的优势菌属中注释到的细菌进行了统计。结果发现,优势菌种为葡萄球菌属的松鼠葡萄球菌,它是一种常见的动物病原菌,不但能引起黄鳝 *Monopterus albus*、黄喉拟水龟 *Mauremys mutica* 等动物感染,还能引起人脑膜炎、尿路等感染 (段荟芹, 王利, 2015), 但它是否会引起人工饲养的美洲大蠊患病尚无研究。*Lactobacillus* 中的戊糖乳杆菌在人类肠道中占优势,能够帮助宿主降解肉类食物,同时还能够通过产生过氧化氢来帮助宿主抵抗致病菌的侵染 (Tailliez, 2004)。据此推测,它可能为美洲大蠊肠道中的益生菌,但其具体功能有待进一步研究。

本研究发现,美洲大蠊肠道菌群种类丰富,这可能与美洲大蠊适应性强、生存力强、食性杂有关。本研究为美洲大蠊与其肠道菌群之间的关系研究提供一定的理论参考,也为美洲大蠊的健康养殖提供了新思路。

参考文献:

- 段荟芹, 王利. 2015. 耗儿鱼松鼠葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 42(5): 1288-1293.
李钧敏, 金则新. 2006. 一种高效可直接用于 PCR 分析的土

- 壤总微生物 DNA 抽提方法[J]. 应用生态学报, 17(11): 2107-2111.
- 刘晓飞, 刘娟, 田蕾, 等. 2015. 美洲大蠊成虫肠道可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 42(11): 2207-2214.
- 张晓杰, 莫晓畅, 莫建初. 2016. 白蚁共生放线菌研究进展[J]. 环境昆虫学报, 38(2): 437-444.
- 张振宇, 圣平, 黄胜威, 等. 2017. 昆虫肠道菌群的多样性、功能及应用[J]. 氨基酸和生物资源, 39(4): 231-239.
- Bagde US, Uma G, Ram P. 2013. Isolation and characterization of gut-associated microbes in cockroach [J]. African Journal of Microbiology Research, 7(19): 2034-2039.
- Bertino-Grimaldi D, Medeiros MN, Vieira RP, et al. 2013. Bacterial community composition shifts in the gut of *Periplaneta americana*, fed on different lignocellulosic materials [J]. SpringerPlus, 2: 609. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-609>.
- Carrasco P, Pérez-Cobas AE, van de PC. 2014. Succession of the gut microbiota in the cockroach *Blattella germanica* [J]. International Microbiology, 17(2): 99-109.
- Douglas AE. 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms [J]. Annual Review of Entomology, 60(1): 17-34.
- Edgar RC. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 10(10): 996-998.
- Flint H. 2011. Obesity and the gut microbiota [J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 45: S128-S132.
- Inglin R, Stevens M, Meile L, et al. 2015. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species [J]. Journal of Microbiological Methods, 114: 26-29.
- Loubinoux J, Bronowicki J, Pereira IAC. 2002. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases [J]. FEMS Microbiology Ecology, 40(2): 107-112.
- Mullins D. 2015. Physiology of environmental adaptations and resource acquisition in cockroaches [J]. Annual Review of Entomology, 60: 473-492.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. Science, 336(6086): 1262-1267.
- Nicholson JK, Wilson ID. 2003. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2(8): 668-676.
- Ondrejch A. 2016. Effect of diet and bacterial clearance on energy expenditure in the cockroach *Periplaneta americana* [R]. Columbus: The Ohio State University Denman Undergraduate Research Forum.
- Pérezcobas AE, Maiques E, Angelova A, et al. 2015. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 91(4). DOI: 10.1093/femsec/fiv022.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 41(Database issue): 590-596.
- Sabree ZL, Kambhampati S, Moran NA. 2009. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 106(46): 19521-19526.
- Sabree ZL, Moran NA. 2014. Host-specific assemblages typify gut microbial communities of related insect species [J]. SpringerPlus, 3(1): 138. DOI: 10.1186/2193-1801-3-138.
- Tailliez P. 2004. Lactobacilli: properties, habitats, physiological role and importance in human health [J]. Antibiotiques, 6(1): 35-41.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. 2007. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied & Environmental Microbiology, 73(16): 5261-5267.
- Xu J, Mahowald MA, Ley RE, et al. 2007. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine [J]. PLoS Biology, 5(7): e156. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050156.