

一株食源性蜡样芽孢杆菌的分离及其对小鼠肠黏膜免疫相关因子和肠道菌群的影响

高丽^{1#}, 何珊^{2#}, 王利利¹, 刘宇婷¹, 温彤^{1*}

1 包头师范学院 生物科学与技术学院, 内蒙古 包头 014030

2 包头医学院 医学技术与麻醉学院, 内蒙古 包头 014040

高丽, 何珊, 王利利, 刘宇婷, 温彤. 一株食源性蜡样芽孢杆菌的分离及其对小鼠肠黏膜免疫相关因子和肠道菌群的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1759-1772.

GAO Li, HE Shan, WANG Lili, LIU Yuting, WEN Tong. Isolation of a foodborne *Bacillus cereus* strain and its effect on intestinal mucosal immunity-associated factors and gut microbial community in mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1759-1772.

摘要: 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种常见的食源性致病菌, 误食被其污染的食品会引起呕吐或者腹泻, 严重者还会死亡。本研究利用划线培养法从腐败米饭中分离培养出一株蜡样芽孢杆菌。通过药敏试验分析及毒力相关基因 PCR 扩增对其致病性及耐药性进行分析, 并将细菌培养物经过腹腔注射进行小鼠感染试验, 检测其对小鼠肠黏膜免疫相关因子和肠道菌群的影响, 从而分析该病原菌的致病途径及防治手段。结果显示, 本研究所分离的食源性蜡样芽孢杆菌, 对诺氟沙星、呋喃妥因、四环素、米诺环素、环丙沙星、大观霉素、克林霉素、红霉素、克拉霉素、氯霉素、左氧沙星和万古霉素敏感, 对复方新诺明、苯唑西林和青霉素 G 具有耐受性。该菌株携带 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC* 和 *entFM* 7 种毒力相关基因, 可产生致腹泻型毒素。小鼠感染后, 出现腹泻, 肠黏膜免疫球蛋白和炎症因子表达水平显著上调; 肠道菌群检测结果表明, 经该蜡样芽孢杆菌感染后, 小鼠肠道菌群组成发生变化, 标志着机体健康的拟杆菌门(Bacteroidetes)中的 uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae 丰度显著下降, 而标志着菌群失调的变形菌门(Proteobacteria)条件致病菌 uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae 丰度显著升高, 且与 IgM 和 IgG 呈显著正相关($P<0.05$)。这些研究结果表明, 携带致腹泻型毒力相关基因的致病性蜡样芽孢杆菌感染机体后, 可以通过影响肠道菌群激活免疫系统。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 耐药性; 毒力相关基因; 肠黏膜免疫; 肠道菌群

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFC1606800); 包头师范学院高层次人才引进科研启动基金(BTTCRCQD2018-001); 内蒙古自治区自然科学基金(2020MS08075)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFC1606800), the High-level Talents Introduced Scientific Research Startup Fund Project of Baotou Teacher's College (BTTCRCQD2018-001), and the Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation (2020MS08075).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: 66252@bttc.edu.cn

Received: 2022-09-19; Accepted: 2023-01-17; Published online: 2023-01-19

Isolation of a foodborne *Bacillus cereus* strain and its effect on intestinal mucosal immunity-associated factors and gut microbial community in mice

GAO Li^{1#}, HE Shan^{2#}, WANG Lili¹, LIU Yuting¹, WEN Tong^{1*}

1 Faculty of Biology Science and Technology, Baotou Teachers' College, Baotou 014030, Inner Mongolia, China

2 Faculty of Medical Technology and Anesthesiology, Baotou Medical College, Baotou 014040, Inner Mongolia, China

Abstract: *Bacillus cereus* is a common foodborne pathogen. Accidentally eating food contaminated by *B. cereus* will cause vomiting or diarrhea, and even death in severe cases. In the present study, a *B. cereus* strain was isolated from spoiled rice by streak culture. The pathogenicity and drug resistance of the isolated strain were analyzed by drug sensitivity test and PCR amplification of virulence-associated gene respectively. Cultures of the purified strain were injected intraperitoneally into mice to examine their effects on intestinal immunity-associated factors and gut microbial communities, to provide references for the pathogenic mechanism and medication guidance of these spoilage microorganisms. The results showed that the isolated *B. cereus* strain was sensitive to norfloxacin, nitrofurantoin, tetracycline, minocycline, ciprofloxacin, spectinomycin, clindamycin, erythrocin, clarithromycin, chloramphenicol, levofloxacin, and vancomycin, but resistant to bactrim, oxacillin and penicillin G. The strain carries seven virulence-associated genes including *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* and *entFM*, which are involved in diarrhea-causing toxins production. After infecting mice, the isolated *B. cereus* strain was found to cause diarrhea in mice, and the expression levels of immunoglobulins and inflammatory factors in the intestinal mucosae of the challenged mice were significantly up-regulated. Gut microbiome analysis showed that the composition of gut microbial community in mice changed after infection with *B. cereus*. The abundance of the uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae in Bacteroidetes, which is a marker of body health, was significantly decreased. On the other hand, the abundance of uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae, which is an opportunistic pathogen in Proteobacteria and a marker of dysbacteriosis, was significantly increased and was significantly positively correlated with the concentrations of IgM and IgG. These results showed that the pathogenic *B. cereus* carrying diarrhea type virulence-associated gene can activate the immune system by altering the composition of gut microbiota upon infection.

Keywords: *Bacillus cereus*; drug resistance; virulence-associated genes; intestinal mucosal immunity; gut microbiota

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是由病原微生物导致的食物中毒暴发事件中的重要致病因子。食品在生产、运输、销售、储存等环

节均易受该菌污染,高淀粉含量食物受该菌污染尤为严重^[1-2]。致病性的蜡样芽孢杆菌可产生多种耐高温高压,且在食品加工过程中不易

分解的毒素,误食受这类微生物污染的食物可导致急性食物中毒^[3-4]。产毒株按照食物中毒症状分为呕吐型和腹泻型两种^[5-6],严重中毒者还会死亡^[7]。有研究表明,蜡样芽孢杆菌呕吐毒素可剂量依赖性诱导小鼠胸腺细胞凋亡和增殖抑制,降低小鼠的免疫功能^[8],但另有一些研究表明蜡样芽孢杆菌能够促进肉鸡的免疫器官成熟,增强肉鸡的体液免疫功能^[9],增强 IgG 抗体反应,上调细胞因子 γ 干扰素(interferon, IFN- γ)、白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10) mRNA 水平^[10]。所以不同的蜡样芽孢杆菌菌株对于机体免疫系统的作用具有一定的差异。

肠道菌群是维持脊椎动物健康的重要参与者^[11],为宿主的健康发挥了许多必要的保护作用^[12-14],其群落结构的失调与许多人和动物的疾病有关^[15-18]。同时,有研究证实肠道菌群还可以参与机体免疫调节功能,当食源性致病菌进入肠道后,受其影响而失衡的肠道菌群可通过信号因子激活机体免疫系统,并产生免疫应答,从而抵御外源有害微生物入侵^[19]。但是关于致病性蜡样芽孢杆菌感染机体后对机体肠道菌群的影响还未见报道。

为进一步明确食源性蜡样芽孢杆菌进入动物体后对机体免疫系统的作用及其是否会通过调控肠道菌群变化影响免疫系统,本研究以易受蜡样芽孢杆菌污染的高淀粉类主食为实验材料,通过从腐败米饭中进行微生物分离富集、形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学鉴定等方法分离鉴定出一株蜡样芽孢杆菌。对其耐药性、毒力相关基因、对小鼠肠黏膜免疫相关因子及肠道菌群的影响进行了检测,并对宿主肠道菌群及其与免疫应答之间的关联性进行了分析,为深入了解致病性蜡样芽孢杆菌的致病机理提供依据,为防治食源性蜡样芽孢杆

菌感染提供策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用小鼠为无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明白小鼠,均为约6月龄雄性小鼠,购自内蒙古大学实验动物研究中心。试验小鼠共10只,5只为对照组,5只为感染组。所有小鼠饲养在严格消毒的鼠笼内,自由采食、饮水,每天定时更换垫料。所有动物实验均由包头医学院伦理审查委员会批准(批准号:包医伦审2021第(037)号)。光照/暗周期为12 h,室温保持在(25±1) °C,相对湿度为70%±4%。

1.2 蜡样芽孢杆菌的分离

将焖熟的新鲜米饭置于无菌的铝制饭盒中,室温条件下放置3-5 d,待其腐败变质后,称取5 g米饭于灭菌研钵中,加入95 mL无菌生理盐水,研磨制成细菌悬液,通过梯度稀释法制备成 10^{-1} - 10^{-7} 的细菌悬液,并分别取各浓度细菌悬液100 μ L涂布于LB平板培养基上,置于培养箱中37 °C下培养12 h,同时培养未涂抹细菌悬液的平板作空白对照。待有菌落长出后,在超净工作台中挑取菌落于新LB平板培养基上划线培养,直至获得单菌落。

1.3 细菌的形态及生化鉴定

对分离菌株单菌落通过LB液体培养基培养18 h,随后对获得的菌体进行革兰氏染色鉴定并观察其形态,将获得的单菌落接种到乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇生化反应管中进行发酵实验,对其生化特性进行鉴定^[20]。

1.4 细菌16S rRNA基因分子生物学鉴定

选取疑似蜡样芽孢杆菌的单菌落进行扩增,提取细菌基因组DNA,扩增其16S rRNA基因序列进行分子生物学鉴定,PCR程序如下:

95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。所用引物为: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTGTACGACTT-3')。获得的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.5 耐药性鉴定

取 100 μ L 分离所得细菌的培养液用涂菌棒在 LB 平板中涂布均匀, 将复方新诺明、诺氟沙星等 15 种革兰氏阳性菌药敏纸片呈梅花形均匀贴在已涂布分离菌的琼脂平板上, 通过测量抑菌圈直径来判定细菌对待测抗生素的敏感程度, 检测所分离细菌的耐药性。

1.6 细菌毒力相关基因鉴定

以分离菌株基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 方法鉴定所分离细菌株携带的毒力相关基因类型, 共检测 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*entFM* 和 *Ces* 8 个毒力相关基因, 所用引物见表 1。PCR 反应条件同 1.4。取 5 μ L PCR

表 1 用于扩增毒力相关基因的引物

Table 1 Primers used for amplifying the virulence-associated genes

Genes	Primer sequence (5'→3')	Length (bp)
<i>nheA</i>	<i>nheA</i> -F TACGCTAAGGAGGGGA	480
	<i>nheA</i> -R GTTTTATTGCTTCATCGGCT	
<i>nheB</i>	<i>nheB</i> -F CTATCAGCACTATGGCAG	754
	<i>nheB</i> -R ACTCCTAGCGGTGTTCC	
<i>nheC</i>	<i>nheC</i> -F CGGTAGTGATTGCTGGG	564
	<i>nheC</i> -R CAGCATTCGTACTIONGCCAA	
<i>hblA</i>	<i>hblA</i> -F TGCAGATGTTGATGCCGAT	301
	<i>hblA</i> -R ATGCCACTGCGTGACATAT	
<i>hblC</i>	<i>hblC</i> -F AATGGTCATCGGACTIONATAT	731
	<i>hblC</i> -R CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT	
<i>hblD</i>	<i>hblD</i> -F AATCAAGAGCTGTCACGAAT	411
	<i>hblD</i> -R CACCAATTGACCATGCTAAT	
<i>entFM</i>	<i>entFM</i> -F ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG	1269
	<i>entFM</i> -R TTAGTATGCTTTTTGTGTAACC	
<i>Ces</i>	<i>Ces</i> -F GGTGACACATTATCATATAAGGTG	1271
	<i>Ces</i> -R GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	

产物进行琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像系统捕获图片, 并分析该菌株携带的毒力相关基因。毒力相关基因检测实验重复 3 次。

1.7 食源性蜡样芽孢杆菌在小鼠组织中的定殖情况检测

根据已报道蜡样芽孢杆菌的半致死量制备 1.44×10^{10} CFU/mL 攻毒菌液^[21], 感染组小鼠(MA)每只小鼠通过腹腔注射 0.5 mL 攻毒菌液, 对照组小鼠(MB)注射相同体积的 LB 肉汤培养液, 期间观察小鼠状态并在攻毒 10 d 后通过颈椎脱臼法处死小鼠。取小鼠肝、脾、胃、肺、肠组织, 提取 DNA, 并通过 PCR 方法检测蜡样芽孢杆菌在小鼠各组织中的定殖情况。所检测基因为蜡样芽孢杆菌 16S rRNA 基因片段, 所用引物和 PCR 反应条件同 1.4。

1.8 蜡样芽孢杆菌感染对小鼠肠黏膜免疫相关因子的影响

分别采集 5 只感染组和对照组小鼠肠黏膜, 具体步骤为: 每只小鼠 1 cm 回肠样本, 轻轻挤去食糜, 用 4 °C 去离子水冲洗。纵向剪开肠壁, 滤纸吸水后用载玻片轻轻刮取小肠黏膜, 称取 1 g 左右的黏膜, 按 1 g:9 mL 比例加入磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS), 使用匀浆器将小鼠肠黏膜组织在冰浴上进行匀浆, 制成悬浮液, 4 °C、3 000 \times g 离心 10 min 取上清。通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(基因美)测定小鼠免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 以及炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的水平, 详细操作步骤见说明书。感染组与对照组肠黏膜

免疫指标采用 t 检验进行统计学分析, 以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

1.9 蜡样芽孢杆菌感染对小鼠肠道菌群的影响

感染后 10 d 的感染组和对照组小鼠, 处死前收集粪便于灭菌 1.5 mL 离心管中, 按照粪便样本 DNA 提取试剂盒(Qiagen)操作说明提取样品总 DNA, 并扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区, PCR 产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 并纯化、定量、制备扩增子测序池, 通过 Illumina Novaseq 6 000 平台进行测序。测序所得原始数据已上传至 SRA 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA881778>)。对测序数据进行质控过滤后, 以 97%的序列同一性聚类为可操作的分类单位(operational taxonomic unit, OTU), 并分析样品在各分类学水平上的群落组成。通过 ACE、Chao1、Shannon 及 Simpson 指数分析样品 alpha 多样性, 并通过独立样本 t 检验进行统计学分析, 以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。通过 Weighted Unifrac NMDS 分析不同样品微生物群落的 β 多样性, 以 stress 值评估排序的解释意义。利用线性判别分析[line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe]分析组间显著差异的物种(LDA>2.0), 具体方法为: 首先采用非参数因子 Kruskal-Wallis 检验检测不同分组间丰度差异显著的物种, 再利用 Wilcoxon 秩和检验检查显著差异物种中的所有亚种是否趋于同一分类级别, 最后使用线性判别分析(LDA)对数据进行评估, 识别差异最显著的物种(LDA>2.0, $P<0.05$)。通过冗余判别分析(redundancy discriminant analysis, RDA)分析免疫相关因子对样本微生物群落组成的作用, 通过置换检验(permutation test)检测其作用的显著性。通过 Pearson 相关性分析连接微生物群落和免疫相关因子之间的标记物种, 使用双

尾检验(bivariate)法检测其相关性是否显著。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蜡样芽孢杆菌的分离鉴定

分离出的一株单菌落命名为 M9, 对其进行形态学观察, 该菌落为白色扁平近似圆形, 且表面粗糙, 符合蜡样芽孢杆菌形态特征(图 1A)。对其进行革兰氏染色鉴定, 结果显示, 菌体呈现紫色, 表明该菌株为革兰氏阳性菌(图 1B)。生化鉴定结果显示, 该菌株可以发酵蔗糖和葡萄糖, 而无法发酵甘露醇和乳糖。通过对 M9 菌株的 16S rRNA 基因进行扩增测序, 并通过 BLAST 比对, 确定 M9 与已知的蜡样芽孢杆菌序列同源性最高, 表明该分离的菌株为蜡样芽孢杆菌。

2.2 蜡样芽孢杆菌抗药性分析

通过药敏纸片 K-B 方法分析所分离株 M9 的耐药性, 结果如表 2 所示, 该蜡样芽孢杆菌菌株对诺氟沙星、呋喃妥因、四环素、米诺环素、环丙沙星、大观霉素、克林霉素、红霉素、克拉霉素、氯霉素、左氟沙星和万古霉素等抗生素敏感, 对复方新诺明、苯唑西林和青霉素 G 具有耐药性。

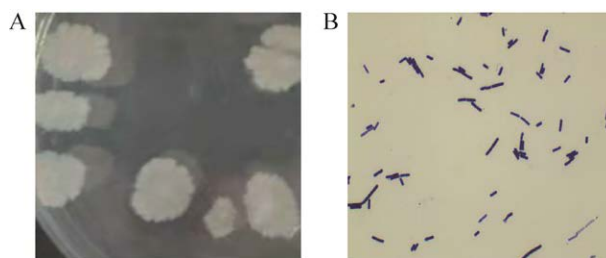


图1 蜡样芽孢杆菌分离株 M9 的分离鉴定 A: 蜡样芽孢杆菌菌落形态. B: 蜡样芽孢杆菌革兰氏染色图(1 000 \times)

Figure 1 Isolation and identification of *Bacillus cereus* strain M9. A: Colony morphology. B: Gram stain (1 000 \times).

2.3 细菌毒力相关基因鉴定

通过 PCR 技术对所分离 M9 蜡样芽孢杆菌的 8 个毒力相关基因进行检测, 检测结果如图 2 所示, 该菌株携带 *hblA*、*hblC*、*hblD*、

nheA、*nheB*、*nheC* 和 *entFM* 7 种毒力相关基因, 不携带 *Ces* 基因。因此, 该菌株可产生致腹泻型毒素, 且致病性强, 容易造成食物中毒。

表 2 分离菌株的药物敏感性试验

Table 2 Antimicrobial susceptibility test of the isolated strains

Name of drugs	Sensitivity standard for diameter of inhibition			Diameter of inhibition zone (mm)	Sensitivity
	Resistant (R)	Intermediate (I)	Sensitive (S)		
Bactrim	≤10	10–15	≥16	0	R
Norfloxacin	≤12	13–16	≥17	20	S
Nitrofurantoin	≤14	15–16	≥17	20	S
Oxacillin	≤10	11–12	≥13	0	R
Tetracycline	≤14	15–18	≥19	30	S
Minocycline	≤14	15–18	≥19	32	S
Ciprofloxacin	≤15	16–20	≥21	31	S
Spectinomycin	≤14	15–17	≥18	23	S
Penicillin G	≤28	–	≥29	10	R
Clindamycin	≤14	15–20	≥21	26	S
Erythrocin	≤13	14–22	≥23	31	S
Clarithromycin	≤13	14–17	≥18	35	S
Chloramphenicol	≤12	13–17	≥18	26	S
Levofloxacin	≤13	14–16	≥17	32	S
Vancomycin	≤14	–	≥15	22	S

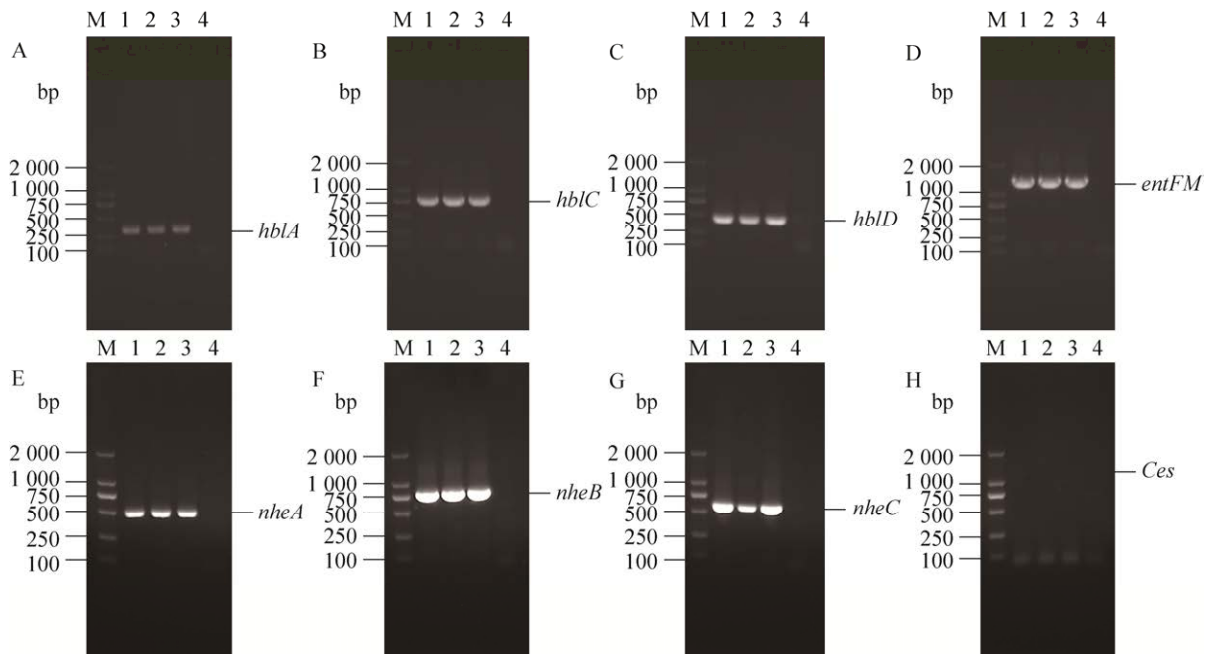


图 2 蜡样芽孢杆菌分离株 M9 的毒力相关基因鉴定 A: *hblA*. B: *hblC*. C: *hblD*. D: *entFM*. E: *nheA*. F: *nheB*. G: *nheC*. H: *Ces*. M: DL2000 DNA marker; 1–3: 目的基因; 4: 阴性对照

Figure 2 Identification of the virulence-associated genes in the isolated *Bacillus cereus* strain M9. A: *hblA*. B: *hblC*. C: *hblD*. D: *entFM*. E: *nheA*. F: *nheB*. G: *nheC*. H: *Ces*. M: DL2000 DNA marker; Lanes 1–3: Target gene; Lane 4: Negative control.

2.4 食源性蜡样芽孢杆菌在小鼠组织中的定殖情况

感染试验期间, 感染小鼠并未出现死亡现象, 但在感染后 5 d 左右出现腹泻症状。结果如图 3 所示, 在小鼠各组织中均检测到了蜡样芽孢杆菌 16S rRNA 基因片段, 证明感染后蜡样芽孢杆菌在小鼠各组织中都出现了定殖。

2.5 食源性蜡样芽孢杆菌对小鼠肠黏膜免疫相关因子的影响

通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定蜡样

芽孢杆菌感染对小鼠肠黏膜分泌型免疫球蛋白和炎性因子表达水平的影响。结果如图 4 所示, 与对照组相比, 感染组小鼠肠黏膜免疫球蛋白 IgA [(30.94±3.24) vs. (18.76±3.36) ng/g]、IgG [(69.04±15.12) vs. (35.97±6.850) ng/g]和 IgM [(18.84±2.94) vs. (9.68±2.45) ng/g]表达水平均显著上调($P<0.05$), 肠黏膜炎性因子 IL-2 [(22.50±2.71) vs. (12.81±2.37) ng/g]、IL-6 [(23.00±2.37) vs. (14.44±1.57) ng/g]和 TNF- α [(27.17±2.50) vs. (14.40±2.16) ng/g]的表达水平

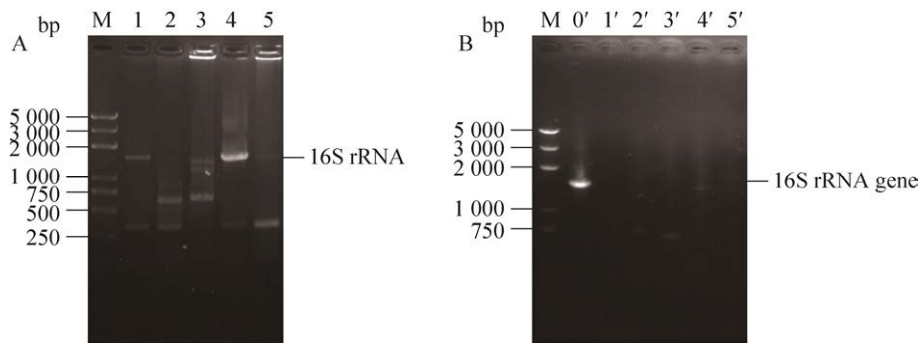


图 3 蜡样芽孢杆菌分离株 M9 在小鼠各组织中的定殖 A: 蜡样芽孢杆菌在感染小鼠各组织中的定殖。M: DL5000 DNA marker; 1: 肝; 2: 脾; 3: 胃; 4: 肺; 5: 肠。B: 蜡样芽孢杆菌在对照小鼠各组织中的定殖。M: DL5000 DNA marker; 0': 阳性对照; 1': 肝; 2': 脾; 3': 胃; 4': 肺; 5': 肠

Figure 3 Colonization of the isolated *Bacillus cereus* strain M9 in various tissues of the infected mice. A: *B. cereus* colonization in each tissue of mice in the infected group. M: DL5000 DNA marker; 1: Liver; 2: Spleen; 3: Stomach; 4: Lung; 5: Intestinal. B: *B. cereus* colonization in each tissue of mice in the control group. M: DL5000 DNA marker; 0': Positive control; 1': Liver; 2': Spleen; 3': Stomach; 4': Lung; 5': Intestinal.

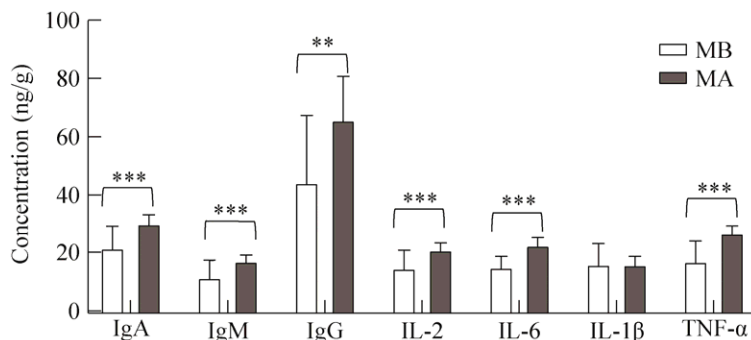


图 4 蜡样芽孢杆菌分离株 M9 感染后对小鼠肠黏膜免疫相关因子的影响 *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. MB: 对照组; MA: 感染组

Figure 4 Effect of the isolated *Bacillus cereus* strain M9 on intestinal mucosal immunity-associated factors in mice. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. MB: Control; MA: Infected group.

显著上调 ($P < 0.05$), IL-1 β [(19.24 \pm 6.30) vs. (13.64 \pm 0.54) ng/g] 表达水平上调, 但不显著 ($P > 0.05$)。表明该蜡样芽孢杆菌感染会激活机体免疫系统功能, 并诱发炎症反应。

2.6 食源性蜡样芽孢杆菌感染对小鼠肠道菌群 α 多样性和 β 多样性的影响

采用 α 多样性指数 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数分析感染组和对照组细菌群落分布的丰富度和多样性, 结果显示, 对照组(MB)和感染组(MA)样本中细菌的 Chao1 指数 (478.49.22 \pm 86.76 和 502.78 \pm 93.47, $P=0.68$), ACE 指数 (473.67 \pm 87.86 和 502.39 \pm 90.06, $P=0.62$), Simpson 指数 (0.97 \pm 0.01 和 0.88 \pm 0.11, $P=0.15$) 和 Shannon 指数 (5.99 \pm 0.37 和 5.19 \pm

1.56, $P=0.32$) 均差异不显著 (图 5A–5D), 表明蜡样芽孢杆菌感染不会显著影响小鼠肠道菌群的丰富度和多样性。采用 β 多样性分析来阐述蜡样芽孢杆菌感染对小鼠肠道菌群组成的影响, 结果显示, 除 MB5 外, 感染组和对照组样本均存在聚类趋势 (图 5E、5F), 表明蜡样芽孢杆菌感染会导致小鼠肠道菌群组成发生改变。

2.7 食源性蜡样芽孢杆菌感染对小鼠肠道菌群组成的影响

为了分析蜡样芽孢杆菌感染对小鼠肠道菌群组成的影响, 统计了对照组和感染组小鼠粪便样本中丰度大于 1% 的细菌信息。基于门水平的分析结果如图 6A, 各样本共鉴定出 18 个细菌门, 蜡样芽孢杆菌感染后, 感染组小

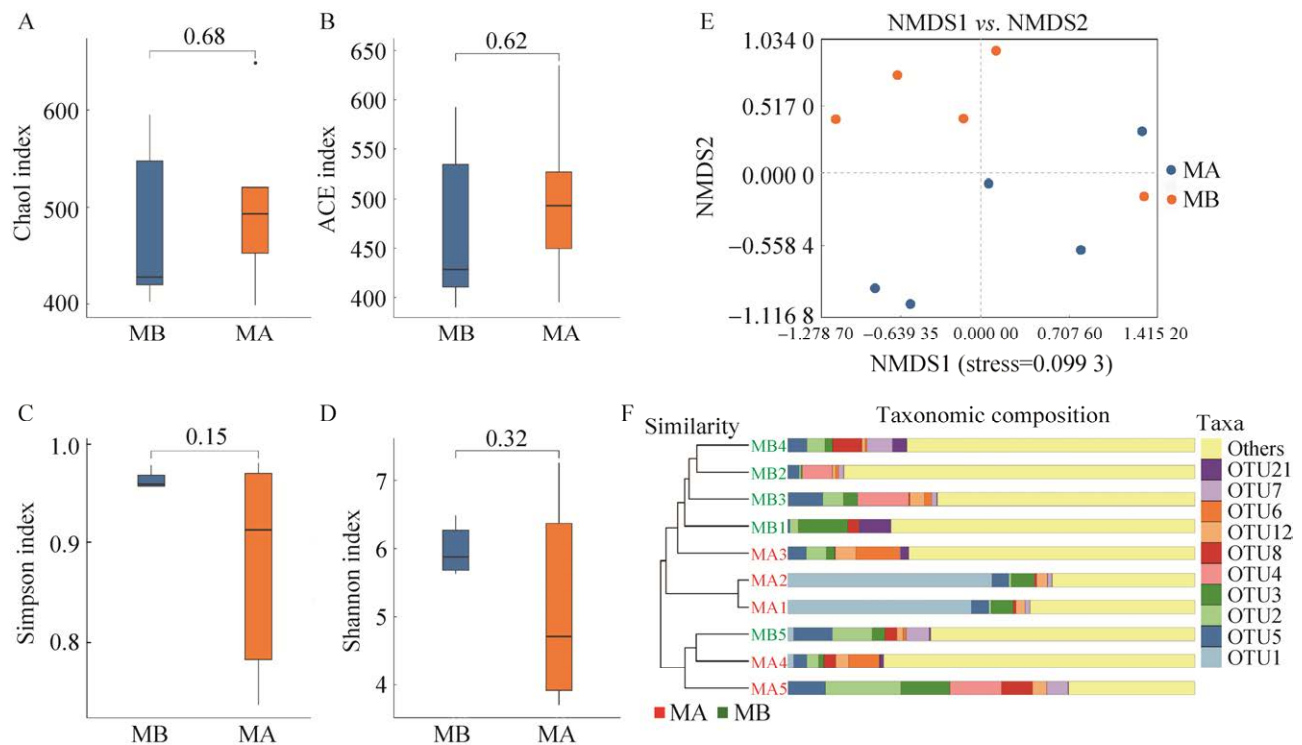


图 5 不同组小鼠肠道菌群的 α 多样性和 β 多样性分析 A: Chao1 指数. B: ACE 指数. C: Simpson 指数. D: Shannon 指数. E: NMDS 分析. F: UPGMA 树状图. MB: 对照组; MA: 感染组

Figure 5 Alpha and beta diversity analysis of gut bacterial communities in different groups of mice. A: Chao1 index. B: ACE index. C: Simpson index. D: Shannon index. E: NMDS analysis. F: UPGMA dendrogram. MB: Control; MA: Infected group.

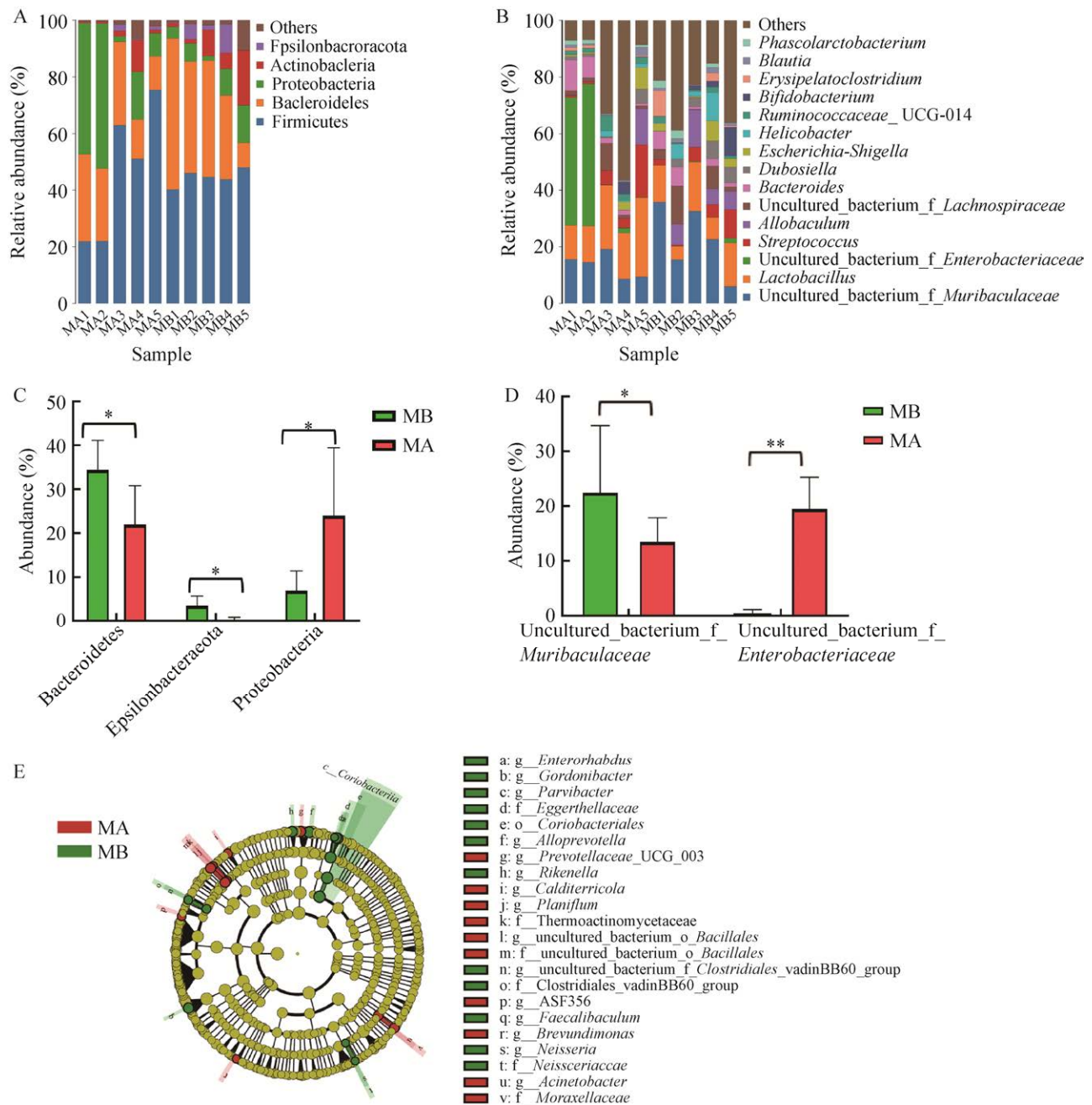


图 6 蜡样芽孢杆菌分离株 M9 处理对小鼠肠道菌群组成的影响 A: 门水平上不同组小鼠肠道菌群的丰富度. B: 属水平上不同组小鼠肠道菌群的丰富度. C: 门水平丰度具有显著差异的微生物. *: $P < 0.05$. D: 属水平丰度具有显著差异的微生物. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. E: 不同组小鼠肠道菌群组间 LEfSe 差异分析. $LDA > 2.0$, $P < 0.05$

Figure 6 Effect of the isolated *Bacillus cereus* strain M9 treatment on gut microbial composition in mice. A: Histogram of species abundances at the phylum level. B: Histogram of species abundances at the genus level. C: Bacteria with significant differences in abundance at the phylum level. *: $P < 0.05$. D: Bacteria with significant differences in abundance at the genus level. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. E: Analysis of LEfSe differences among different groups of mouse gut microbial communities. $LDA > 2.0$, $P < 0.05$.

鼠肠道菌群中拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度显著下降($15.32\% \pm 8.87\%$ vs. $34.46\% \pm 6.68\%$), Epsilonbacteraeota 丰度显著下调($0.79\% \pm 0.85\%$ vs. $3.46\% \pm 2.21\%$), 变形菌门(Proteobacteria)丰度显著升高($24.91\% \pm 22.51\%$ vs. $6.92\% \pm 4.53\%$) (图 6C)。

在属水平上的分析结果如图 6B, 各样本共鉴定出 257 个属, 感染组中 uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae 丰度下降($13.44\% \pm 4.43\%$ vs. $22.48\% \pm 12.22\%$), uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae 丰度显著升高($19.48\% \pm 25.81\%$ vs. $0.39\% \pm 0.71\%$) (图 6D), 螺杆菌属(*Helicobacter*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、丹毒荚膜菌属(*Erysipelatoclostridium*)和考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)在对照组小鼠肠道菌群中丰度大于 1% ($3.46\% \pm 4.21\%$, $2.77\% \pm 4.22\%$, $2.55\% \pm 3.86\%$, $1.41\% \pm 1.30\%$), 而在感染组中其丰度小于 1% ($0.79\% \pm 0.85\%$, $0.89\% \pm 1.88\%$, $0.54\% \pm 0.46\%$, $0.75\% \pm 0.68\%$)。

使用 LEfSe 分析感染组和对照组样品之间细菌组成的差异性, 结果如图 6E 所示, 在门水平上感染组和对照组之间无差异显著的微生物。在属水平上感染组和对照组之间差异显著的微生物有 15 个(LDA>2.0, $P<0.05$), 对照组(MB)中相对丰度较高的差异物种是奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、戈登氏杆菌属(*Gordonibacter*)、肠杆菌属(*Enterorhabdus*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、文肯菌属(*Rikenella*)、uncultured_bacterium_f_Clostridiales_vadinBB60_group、*Parvibacter* 和粪杆菌属(*Faecalibaculum*), 在感染组(MA)中相对丰度较高的差异物种是不动杆菌属(*Acinetobacter*)、ASF356、直丝菌属(*Planifilum*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、*Calditerricola*、uncultured_bacterium_o_Bacillales 和 *Prevotellaceae*_UCG_003。

2.8 小鼠肠道菌群与肠黏膜免疫相关因子的相关性

使用 RDA 分析了肠黏膜免疫相关因子与感染组(MA)和对照组(MB)小鼠肠道菌群之间的相关性。如图 7A 所示, 肠黏膜免疫相关因子对微生物群落的总解释量为 39.05%, 对肠道菌群结构影响最大的免疫相关因子依次为 TNF- α ($R^2=0.34$)、IgA ($R^2=0.32$)、IL-6 ($R^2=0.24$)、IgM ($R^2=0.24$)和 IgG ($R^2=0.18$), 但相关性并不显著($P>0.05$)。通过 Pearson 相关系数分别分析两组小鼠肠道菌群在门和属水平上与肠黏膜免疫相关因子指标的相关性, 如图所示, 在门水平上(图 7B), 变形菌门(Proteobacteria)与 IgM 和 IgG 呈显著正相关($P<0.05$)。在属水平上(图 7C), uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae 与 IgM 和 IgG 呈显著正相关($P<0.05$), 异杆菌属(*Allobaculum*)与 IgG 呈显著负相关($P<0.05$)。

3 讨论

蜡样芽孢杆菌由于能够导致多种疾病而被广泛关注^[22-24], 其能够引起全身性和局部感染, 在免疫功能缺陷个体中感染能够导致宿主死亡^[25]。蜡样芽孢杆菌最常引起的是以腹泻和呕吐为主要症状的食源性疾病, 分别由腹泻相关毒素(HBL, NHE, CYTK)和呕吐毒素引起^[26-27]。毒力相关基因检测结果表明本研究所分离的蜡样芽孢杆菌携带的毒力相关基因有 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*entFM*, 未检测到 *Ces* 基因, 表明该蜡样芽孢杆菌为腹泻型, 且具有强致病性。对小鼠进行感染试验, 感染组小鼠在腹腔注射后 5 d 左右开始出现腹泻症状, 与该菌株所携带的毒力相关基因类型相符合。直到感染后 10 d, 仍未出现死亡个体, 由于本研究分离细菌与易华山等^[21]分离的乳源性蜡样芽孢杆菌所携带的毒力相关基因一致, 所以其

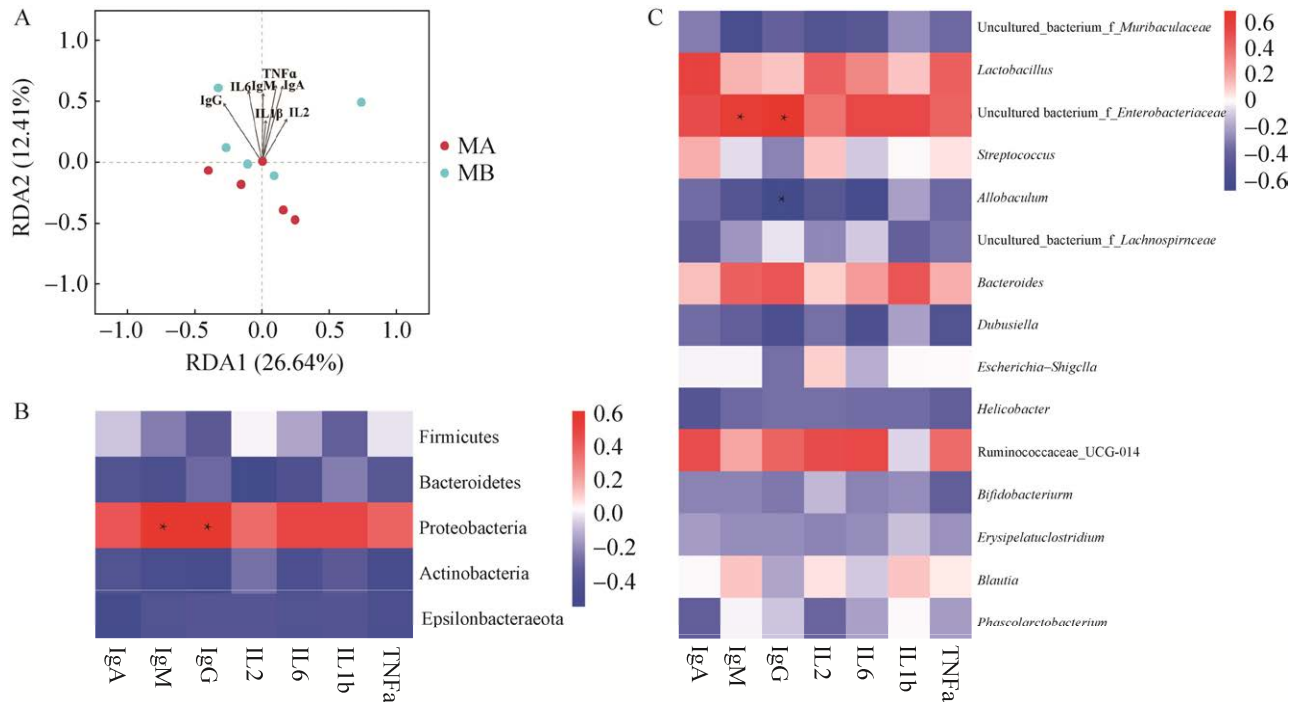


图7 各组小鼠肠道菌群与肠黏膜免疫相关因子之间的相关性分析 A: RDA 分析. B: 门水平丰度大于1%的细菌与肠黏膜免疫相关因子 Pearson 相关性分析. C: 属水平丰度大于1%的细菌与肠黏膜免疫相关因子 Pearson 相关性分析. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

Figure 7 Correlation analysis between mouse gut microbiota and intestinal mucosal immunity-associated factors. A: RDA analysis. B: Pearson's correlation analysis of bacteria with the abundance higher than 1% in the phylum level and intestinal mucosal immunity-associated factors. C: Pearson's correlation analysis of bacteria with the abundance higher than 1% in the genus level and intestinal mucosal immunity-associated factors. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

对小鼠的致病性可能相似, 本研究所用细菌浓度为其研究中的次剂量组, 在他们的研究中, 该浓度感染小鼠后, 致死作用出现在 11 d 之后, 因此, 感染菌液浓度低可能是本研究中小鼠未出现死亡现象的原因。

肠道是机体免疫防御的重要防线, 人体免疫系统有 2/3 都分布在肠道内^[28]。细菌感染后会激活机体免疫系统, 作为肠道的第一层屏障, 肠道黏液层可在被激活后通过分泌 IgA 等免疫球蛋白^[29-30]保护机体, 同时会通过激活炎症因子引发炎症反应从而抵抗外界细菌感染, 清除细胞外的病原菌^[31]。本研究在蜡样芽孢杆菌感

染 10 d 后采集了小鼠肠黏膜, 检测其免疫相关因子表达情况, 从而探讨致病性蜡样芽孢杆菌感染对小鼠免疫系统的影响。结果显示感染组小鼠肠黏膜免疫相关因子 IgA、IgG、IgM 和肠黏膜炎症因子 IL-2、IL-6、TNF- α 的表达水平均上调, 表明该蜡样芽孢杆菌感染会激活肠道免疫系统功能, 并引发炎症反应, 抵御外界细菌感染。

肠道菌群是一个极其复杂的群体, 这些丰富多样的微生物具有极其重要的生理功能。近年来的研究表明, 肠道菌群对于宿主免疫系统的发育和维持起至关重要的作用^[19]。在本研究

中,检测了蜡样芽孢杆菌感染后小鼠肠道菌群的变化,结果表明蜡样芽孢杆菌感染后,小鼠肠道菌群 α 多样性没有显著变化,即蜡样芽孢杆菌感染并未引起肠道菌群多样性的变化。但是感染组小鼠和对照组小鼠相比,微生物群落的组成发生了变化。感染组小鼠肠道菌群中拟杆菌门(Bacteroidetes)中的 uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae 细菌属丰度显著下调,uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae 是一种在高脂小鼠模型中显著下调的细菌属,表明其丰度下降与机体疾病发生具有一定关联性^[32-33],在本研究中,蜡样芽孢杆菌感染后其丰度显著下调,表明蜡样芽孢杆菌感染后使机体处于非健康状态。

另外,肠道菌群分析结果显示,当蜡样芽孢杆菌感染后,变形菌门(Proteobacteria)中肠杆菌科细菌 uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae 丰度显著升高。研究表明,变形菌门是胃肠道中一类适应性强、具有潜在致病性的常见菌^[34],其丰度变化可直接对宿主健康产生影响,哺乳动物肠道菌群失调通常伴随着变形菌门丰度的升高^[35],所以本研究结果提示蜡样芽孢杆菌感染后,小鼠会出现肠道菌群失调,并诱发肠道相关疾病,对机体健康产生不利影响。通过免疫相关因子和肠道菌群的关联性分析结果表明,变形菌门细菌 uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae 与 IgM 和 IgG 呈显著正相关,表明机体菌群失调后会诱发机体免疫反应,防御细菌感染。

4 结论

本研究成功从腐败米饭中分离出一株蜡样芽孢杆菌,其对诺氟沙星、呋喃妥因、四环素、米诺环素、环丙沙星、大观霉素、克林霉素、红霉素、克拉霉素、氯霉素、左氟沙星和万古

霉素等抗生素敏感,对复方新诺明、苯唑西林和青霉素 G 具有较强耐药性。该菌株携带致腹泻型毒素,且致病性强,容易造成食物中毒。攻毒结果显示,受该菌感染后,小鼠会出现明显的腹泻症状,且肠道菌群组成发生变化,属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的标志机体健康的微生物 uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae 在攻毒组小鼠肠道中丰度显著下降,而变形菌门(Proteobacteria)中的标志着菌群失调的条件致病菌 uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae 丰度显著升高。此外机体菌群失调后会诱发免疫反应,防御细菌感染。

REFERENCES

- [1] 张明明,梁美丹,肖剑,张彬彬,蒋佳希,宋安华. 即食米面制品中蜡样芽孢杆菌分离鉴定及毒力基因研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 144-150. ZHANG MM, LIANG MD, XIAO J, ZHANG BB, JIANG JX, SONG AH. Isolation, identification and virulence genes investigation of *Bacillus cereus* from ready-to-eat products of rice and wheat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 144-150 (in Chinese).
- [2] 庄子慧,何丽,郭云昌,裴晓燕,付萍,王晓英. 我国食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因和药物敏感性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 198-201. ZHUANG ZH, HE L, GUO YC, PEI XY, FU P, WANG XY. Virulent gene profiles and antibiotic susceptibility of foodborne *Bacillus cereus* in China[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2013, 25(3): 198-201 (in Chinese).
- [3] PORCELLATO D, ASPHOLM M, SKEIE SB, MELLEGÅRD H. Application of a novel amplicon-based sequencing approach reveals the diversity of the *Bacillus cereus* group in stored raw and pasteurized milk[J]. Food Microbiology, 2019, 81: 32-39.
- [4] EHLING-SCHULZ M, LERECLUS D, KOEHLER TM. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(3): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
- [5] 陆湘华,崔昌,王远萍,朱渭萍. 蜡样芽孢杆菌食物

- 中毒的研究进展[J]. 传染病信息, 2015, 28(4): 251-254.
- LU XH, CUI C, WANG YP, ZHU WP. Research progress of *Bacillus cereus* foodborne diseases[J]. Infectious Disease Information, 2015, 28(4): 251-254 (in Chinese).
- [6] 王琼, 马红梅, 曾瑾, 马臣杰. 食源性蜡样芽孢杆菌的危害及其检测方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(5): 633-637.
- WANG Q, MA HM, ZENG J, MA CJ. Research progress on the hazards of foodborne *Bacillus cereus* and its detection method[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(5): 633-637 (in Chinese).
- [7] 杨艳华, 吕鹏, 陈克平. 蜡样芽孢杆菌主要毒素及检测方法的研究进展[J]. 生命科学研究, 2021, 25(6): 471-478, 487.
- YANG YH, LÜ P, CHEN KP. Research progress on main toxins and detection methods of *Bacillus cereus*[J]. Life Science Research, 2021, 25(6): 471-478, 487 (in Chinese).
- [8] 李月红. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对机体免疫功能影响的实验研究[D]. 石家庄: 河北医科大学博士学位论文, 2003.
- LI YH. Experimental studies on the effects of deoxynivalenol on immunological function *in vitro* and *in vivo*[D]. Shijiazhuang: Doctoral Dissertation of Hebei Medical University, 2003 (in Chinese).
- [9] 杨汉博, 潘康成. 不同剂量益生芽孢杆菌对肉鸡免疫功能的影响[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003, 8(4): 8-10.
- YANG HB, PAN KC. Effects of different doses of probiotic *Bacillus* on immune function of broilers[J]. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives, 2003, 8(4): 8-10 (in Chinese).
- [10] ROOS TB, de LARA AP, DUMMER LA, FISCHER G, LEITE FP. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated bovine herpesvirus type 5 vaccine[J]. Vaccine, 2012, 30(12):2173-2177.
- [11] QIN JJ, LI RQ, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, NIELSEN T, PONS N, LEVENEZ F, YAMADA T, MENDE DR, LI JH, XU JM, LI SC, LI DF, CAO JJ, WANG B, LIANG HQ, ZHENG HS, XIE YL, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [12] TROMPETTE A, GOLLWITZER ES, YADAVA K, SICHELSTIEL AK, SPRENGER N, NGOM-BRU C, BLANCHARD C, JUN T, NICOD LP, HARRIS NL, MARSLAND BJ. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis[J]. Nature Medicine, 2014, 20(2): 159-166.
- [13] NEISH AS. Mucosal immunity and the microbiome[J]. Annals of the American Thoracic Society, 2014, 11(supplement 1): S28-S32.
- [14] CLARKE SF, MURPHY EF, NILAWEERA K, ROSS PR, SHANAHAN F, O'TOOLE PW, COTTER PD. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity[J]. Gut Microbes, 2012, 3(3): 186-202.
- [15] KERSTERS K, de vos P, GILLIS M, SWINGS J, VANDAMME P, STACKEBRANDT E. Introduction to the *Proteobacteria*[A]//The Prokaryotes[M]. New York, NY: Springer New York, 2006: 3-37.
- [16] BÄCKHED F, FRASER CM, RINGEL Y, ELLEN SANDERS M, SARTOR RB, SHERMAN PM, VERSALOVIC J, YOUNG V, FINLAY BB. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(5): 611-622.
- [17] HSIAO EY, McBRIDE SW, HSIEN S, SHARON G, HYDE ER, McCUE T, CODELLI JA, CHOW J, REISMAN SE, PETROSINO JF, PATTERSON PH, MAZMANIAN SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. Cell, 2013, 155(7): 1451-1463.
- [18] GARRETT WS. Cancer and the microbiota[J]. Science, 2015, 348(6230): 80-86.
- [19] CARDING S, VERBEKE K, VIPOND DT, CORFE BM, OWEN LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease[J]. Microbial Ecology in Health & Disease, 2015, 26: 26191.
- [20] 张红芝, 刘雪薇, 顾其芳, 常兆玉, 朱彦祺, 张曦. 基于全基因组测序的蜡样芽孢杆菌食品分离株分子特征及耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(5): 529-535.
- ZHANG HZ, LIU XW, GU QF, CHANG ZY, ZHU YQ, ZHANG X. Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* from foods using whole genome sequencing[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(5): 529-535 (in Chinese).
- [21] 易华山, 马鲜平, 赵瑶, 廖启超, 朱飘, 张云珍, 王艳, 邓艳红, 郑凯, 陈忠琼, 梁望旺, 谢远兵. 1株乳

- 源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(8): 1491-1500.
- YI HS, MA XP, ZHAO Y, LIAO QC, ZHU P, ZHANG YZ, WANG Y, DENG YH, ZHENG K, CHEN ZQ, LIANG WW, XIE YB. Identification and pathogenicity analysis of a strain *Bacillus cereus* isolated from milk-derived[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(8): 1491-1500 (in Chinese).
- [22] GREEN J, KORZA G, GRANADOS MR, ZENICK B, SCHLIEVERT PM, MOK WMK, SETLOW P. Lack of efficient killing of purified dormant spores of Bacillales and Clostridiales species by glycerol monolaurate in a non-aqueous gel[J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 70(6): 407-412.
- [23] CHOI W, KIM SS. Outbreaks, germination, and inactivation of *Bacillus cereus* in food products: a review[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(9): 1480-1487.
- [24] GRÖSCHEL D, BURGESS MA, BODEY GP. Gas gangrene-like infection with *Bacillus cereus* in a lymphoma patient[J]. Cancer, 1976, 37(2): 988-991.
- [25] COBURN PS, MILLER FC, ENTY MA, LAND C, LaGROW AL, MURSALIN MH, CALLEGAN MC. Expression of *Bacillus cereus* virulence-related genes in an ocular infection-related environment[J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 607.
- [26] 林岚, 徐旭东. 蜡样芽孢杆菌毒素 Cereulide 的研究进展[J]. 微生物前沿, 2018(4): 141-148.
- LIN L, XU XD. The research advances in the toxin cereulide produced by *Bacillus cereus*[J]. Advances in Microbiology, 2018(4): 141-148 (in Chinese).
- [27] BOTTONI EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(2): 382-398.
- [28] OWUSU-KWARTENG J, WUNI A, AKABANDA F, TANO-DEBRAH K, JESPERSEN L. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 65.
- [29] KAMADA N, SEO SU, CHEN GY, NÚÑEZ G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(5): 321-335.
- [30] REBOLDI A, CYSTER JG. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier[J]. Immunological Reviews, 2016, 271(1): 230-245.
- [31] JOLLER N, LOZANO E, BURKETT PR, PATEL B, XIAO S, ZHU C, XIA J, TAN TG, SEFIK E, YAJNIK V, SHARPE AH, QUINTANA FJ, MATHIS D, BENOIST C, HAFLE DA, KUCHROO VK. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses[J]. Immunity, 2014, 40(4): 569-581.
- [32] MU HN, ZHOU Q, YANG RY, TANG WQ, LI HX, WANG SM, LI J, CHEN WX, DONG J. Caffeic acid prevents non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through gut microbiota modulation in mice[J]. Food Research International, 2021, 143: 110240.
- [33] dos SANTOS PEREIRA INDIANI CM, RIZZARDI KF, CASTELO PM, FERRAZ LFC, DARRIEUX M, PARISOTTO TM. Childhood obesity and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut microbiota: a systematic review[J]. Childhood Obesity, 2018, 14(8): 501-509.
- [34] 刘倩, 张飞雨, 刘明峰, 李军涛, 邵毅, 闫成, 苏彦雷. 革兰阳性球菌与肠杆菌科细菌所致儿童肺部感染的临床特征比较[J]. 解放军医药杂志, 2022, 34(5): 49-51.
- LIU Q, ZHANG FY, LIU MF, LI JT, SHAO Y, YAN C, SU YL. Comparison of clinical characteristics of pulmonary infections in children caused by Gram-positive cocci and Enterobacteriaceae[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2022, 34(5): 49-51 (in Chinese).
- [35] 郭仕辉, 余永涛, 万佳宏, 毛彦妮, 张浩东, 张津慎, 田新岳, 赵清梅. 变形菌门与哺乳动物结肠肠道菌群失调相关研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(4): 479-484.
- GUO SH, YU YT, WAN JH, MAO YN, ZHANG HD, ZHANG JS, TIAN XY, ZHAO QM. Progress in research on the relationship between *Proteobacteria* and the imbalance of mammalian colonic intestinal flora[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(4): 479-484 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)