

哈尔滨城市和乡村青年居民肠道菌群多样性研究

乔健敏 王丽凤 郑艺 张家超 侯强川 黄卫强 霍冬雪

孙志宏 刘文俊 陈永福 郭壮 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】分析居住于哈尔滨城市和乡村的青年居民肠道菌群多样性的异同。【方法】采用 PCR 和 DGGE 技术相结合的方法对生活于哈尔滨城市和乡村的青年志愿者肠道菌群多样性进行研究。基于 DGGE 指纹图谱, 分别使用聚类法和 PCA 分析对志愿者肠道微生物相似性进行分析, 使用 Shannon-Weine 多样性指数(H')、丰度(S)和均匀度(E_H)对志愿者肠道微生物多样性进行分析, 对图谱中具有代表性的共性和特异性条带进行胶回收和克隆测序以分析志愿者肠道微生物组成。基于 PCR 技术在种水平上对城乡志愿者肠道内乳杆菌属和双歧杆菌属多样性进行定性分析。【结果】相似性分析显示, 城乡青年居民间肠道微生物群落结构存在分开趋势, 相似性小于城市或乡村青年居民内部; 多样性分析显示, 城乡青年居民肠道微生物多样性差异不显著; 测序结果表明, 城乡居民肠道微生物组成在门水平上相同, 但是在种属水平上存在差异。PCR 定性分析显示 *Lactobacillus plantarum*、*L. casei* 和 *L. salivarius* 在哈尔滨城乡青年居民肠道内检出率接近 100%, *Bifidobacterium longum* 和 *B. breve* 的检测率约 90%, 在哈尔滨城乡青年居民肠道内普遍存在; 乳杆菌属和双歧杆菌属各细菌种在城乡居民肠道中的检出频率差异不显著。【结论】哈尔滨城市和乡村青年居民肠道微生物多样性差异不显著。

关键词: 城市和乡村, 肠道菌群, 多样性, PCR, DGGE

Analysis of gut microbial diversity on young people living in rural and urban of Harbin

QIAO Jian-Min WANG Li-Feng ZHENG Yi ZHANG Jia-Chao HOU Qiang-Chuan
HUANG Wei-Qiang HUO Dong-Xue SUN Zhi-Hong LIU Wen-Jun
CHEN Yong-Fu GUO Zhuang ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] The current study aimed at studying the diversity of gut microbiota on young people living in rural Harbin and urban Harbin. [Methods] A combination of polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to examine the diversity of gut microbiota of the subjects. Based on the DGGE profile, the similarity was performed

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设项目(No. CARS-37)

*通讯作者: Tel: 86-471-4319940; Fax: 86-471-4305357; 信箱: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2014-03-20; 接受日期: 2014-05-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-04

by analysis of clustering and PCA; the analysis of diversity was evaluated by the Shannon-Weine index, richness and evenness; and the composition of gut microbiota was characterized by sequencing of the common and special bands of the lanes in DGGE profile. Based on the PCR, the species diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the gut of rural subjects and urban subjects were analyzed. **[Results]** There was a separated tendency in structure of gut microbiota between rural and urban residents of Harbin, and the similarity of intestinal flora between rural and urban residents was lower than the similarity among rural people or urban people. The differences of diversity of gut microbiota between urban people and rural persons were not significant. The results of sequencing showed that the compositions of gut microbiota of urban subjects and rural subjects were same in phylum level, but different in the level of species and genus. The results of PCR showed that *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were prevalence bacteria in the gut of rural and urban young subjects of Harbin, and there was no significant difference in detection rate on the species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* between rural subjects and urban subjects. The detection rate of *L. plantarum*, *L. casei* and *L. salivarius* was nearly 100%, and *B. longum* and *B. breve* was about 90%. **[Conclusion]** By the present research, the conclusion can be made that the diversity of gut microbiota was not significantly difference between the young subjects from rural Harbin and urban Harbin.

Keywords: Urban and rural, Gut microbiota, Diversity, PCR, DGGE

人体肠道中栖息着约 30 个属 500 多种动态细菌,其作为一种共生生物与人体共代谢。这些动态细菌在人体的健康状况中扮演着不可替代的角色,直接参与人体的营养消化与吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节和病原菌抵抗等^[1-3]。因此,随着微生物领域研究的深入,研究者们把由这些细菌构成的人体肠道微生态系统称为“人体遗忘的器官”^[4]。

据研究报道,影响人体肠道微生物组成的因素包括人的基因型、性别、年龄、身体质量指数、地理环境、膳食结构以及生活方式等。肠道内的微生物群落结构在个体 1 岁时变化很大,随着年龄的增长,变化逐渐减小,3 岁后微生物群落结构逐渐趋于稳定且成人化^[5-6]。随着个体微生物群落结构的成人化,因地理或文化差异而引起的环境和饮食差异可能成为决定个体肠道菌群群落结构更重要的因素^[5-7]。近些年,随着现代化和城市化进程的加快,研究者们发现,城市居民肠道微生物的多样性和丰度逐渐降低,而这可能是引起诸如过敏等疾病在城市居民中发病率高的原因。因此,研究者们把热点转向了研究具有不同生活环境和饮食习惯的城乡生活方式对肠道菌群构成的影响^[8-9]。Benno

等^[10]曾采用纯培养的方法对生活在日本 Yuzurihara 长寿村的农村老人和生活在东京的城市老人的肠道微生物构成情况进行比较分析,发现农村老人肠道内死亡梭杆菌(*Fusobacterium mortiferum*)和青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)的含量明显偏高,但拟杆菌属细菌(*Bacteroides*)含量偏低。Mah K. W.等也采用纯培养的方法对生活在泰国南部农村和新加坡城市的儿童肠道微生物构成进行了研究,结果发现农村儿童体内乳酸菌、大肠杆菌以及葡萄球菌的含量要高于城市儿童^[8]。虽然国外关于不同生活环境和膳食结构人体肠道微生物群落结构的报道较多,但关于国内人群的报道甚少,众所周知,不同国籍的人群具有不同的肠道菌群结构。

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)是一种不依赖于培养过程而对复杂微生物群落结构进行有效分析的分子生物学技术,因其克服了传统培养方法只可检测可培养微生物的局限性,也克服了荧光原位杂交技术或 q-PCR 技术只能检测环境中已知细菌的弊端,且具有低成本、可靠、可重复、操作方便等优点,近些年被广泛应用于肠道微生物群落结构的研究^[11]。Simpson

等^[12]曾对不同年龄、饲喂不同饲料的猪个体肠道微生物组成进行研究,根据断奶前后及肥育猪 DGGE 图谱中共性和特异性条带的不同,证实了不同饲喂阶段猪肠道微生物群落结构的不同。白秀娟等^[13]基于 DGGE 技术分析了不同日龄和不同肠段部位断奶仔猪的肠道微生物群落结构及多样性,结果发现肠段部位和日龄对断奶仔猪肠道微生物群落结构和多样性影响很大。

本文应用 DGGE 技术和 PCR 技术相结合的方法对哈尔滨城市和乡村青年居民肠道菌群多样性进行研究,并结合城乡居民生活环境和饮食习惯的分析,以探索哈尔滨城乡居民肠道菌群多样性的异同。

1 材料与方法

1.1 样品来源

选择 30 位居住于哈尔滨城市和乡村、近一周内无出行记录的本地居民为研究对象。志愿者年龄均在 19–35 岁之间,身体质量指数(BMI)范围在 18.5–25.0,近 3 个月内无抗生素类药物摄入,并签订知情同意书。同时,根据食品频率问卷调查(Food frequency questionnaire, FFQ)记录志愿者近三日膳食信息,并根据《中国食物成分表》计算志愿者脂肪、蛋白和碳水化合物等营养成分的日摄入量^[14],样品采集点包括哈尔滨城市的道里区、道外区、南岗区和松北区以及乡村的木兰县和通河县,各采样点间距离约 200–300 km 左右,具体采样信息见表 1,志愿者平均日常膳食信息见表 2。

1.2 试剂

试验所用引物由上海桑尼生物科技有限公司合成;PCR 扩增试剂均购于北京全式金生物技术有限公司;其他试验药品均为大连宝生物技术有限公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 粪便样品采集:于早餐前采集每一位志愿者新鲜粪便样品适量放入采样管中,并立即加入适量保护剂(粪便:保护剂为 1:2,体积比),迅速在液氮中速冻后,存放于冷冻条件下 72 h 内送回实验室,于–80 °C 冷冻储存以备。

1.3.2 粪便菌体基因组 DNA 提取:粪便菌体基因组 DNA 提取使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)试剂盒提取^[15]。得到的基因组 DNA 用 ND-1000 型微量紫外分光光度计测定浓度及 A_{260}/A_{280} 值,同时用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,调整 DNA 浓度至 100 mg/L 左右,于–20 °C 冷冻保存以用于后续试验。

1.3.3 基因组 DNA 16S rRNA V3 区 PCR 扩增:16S rRNA 基因序列是细菌染色体上既具有保守性又高度可变的基因片段,且 16S rRNA V3 区基因片段长度(196 bp)满足 DGGE 技术对所分离靶基因长度的要求(小于 500 bp),因此 16S rRNA V3 可变区域常被 DGGE 技术作为靶基因用于微生物群落组成的检测和鉴定^[11–13]。使用通用引物 V3F+GC (5'-GCCGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 V3R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')进行 16S rRNA 基因 V3 区扩增,扩增片段长度为 220 bp,所用仪器为 Applied Biosystems 公司 PCR 仪,PCR 反应体系(50 μ L)为: 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/ μ L) 4 μ L, 正反向引物(10 pmol/ μ L)各 1.5 μ L,模板 DNA 1.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 补足至 50 μ L。反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。得到的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,其余置于–20 °C 冷冻保存以用于后续 DGGE 分析^[16–17]。

1.3.4 粪便菌体基因组 DNA 的 DGGE 分析:使用 DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad)仪器、参照 Muyzer 等^[18]的方法,对 16S rRNA 基因 V3 区扩增产物进行 DGGE 分析。分析所用变性剂浓度为 8%,变性梯度为 27%–52%,灌胶后 60 °C、200 V 电泳 5 h。使用银染方法对所得胶图进行染色,拍照获得 DGGE 图谱^[18–19]。

1.3.5 乳杆菌属和双歧杆菌属类群定性分析:应用乳杆菌属和双歧杆菌属内常见种的特异性引物(表 3)对粪便菌体基因组 DNA 进行 PCR 扩增^[9,19–20],定性分析各目标细菌在样品中的出现频率。乳杆菌

表 1 样品信息表				
Table 1 Information of subjects				
样本 Subjects	年龄 Age	身体质量指数 BMI	样本采集地点 Location	城市/乡村 Rural/Urban
FDB 1	33	19.1	Mulan County Harbin	Rural
FDB 2	32	25.0	Mulan County Harbin	Rural
FDB 3	32	21.8	Mulan County Harbin	Rural
FDB 4	32	18.8	Mulan County Harbin	Rural
FDB 5	27	21.5	Tonghe County Harbin	Rural
FDB 6	32	22.5	Tonghe County Harbin	Rural
FDB 7	33	19.6	Tonghe County Harbin	Rural
FDB 8	32	18.8	Tonghe County Harbin	Rural
FDB 9	29	25.0	Daoli District Harbin	Urban
FDB 10	29	25.0	Daoli District Harbin	Urban
FDB 11	33	23.7	Nangang District Harbin	Urban
FDB 12	25	20.7	Nangang District Harbin	Urban
FDB 13	32	19.8	Songbei District Harbin	Urban
FDB 14	33	22.9	Songbei District Harbin	Urban
FDB 15	25	19.1	Daowai District Harbin	Urban
FDB 16	32	19.7	Daowai District Harbin	Urban
FDB 17	32	25.2	Mulan County Harbin	Rural
FDB 18	25	19.7	Mulan County Harbin	Rural
FDB 19	27	23.7	Mulan County Harbin	Rural
FDB 20	31	21.6	Mulan County Harbin	Rural
FDB 21	35	24.8	Tonghe County Harbin	Rural
FDB 22	21	23.2	Tonghe County Harbin	Rural
FDB 23	21	23.0	Daoli District Harbin	Urban
FDB 24	33	21.6	Daoli District Harbin	Urban
FDB 25	25	19.8	Songbei District Harbin	Urban
FDB 26	24	21.3	Nangang District Harbin	Urban
FDB 27	26	21.9	Nangang District Harbin	Urban
FDB 28	28	19.1	Daowai District Harbin	Urban
FDB 29	28	22.9	Daowai District Harbin	Urban
FDB 30	31	22.0	Daowai District Harbin	Urban

表 2 志愿者日常膳食信息表					
Table 2 Daily dietary information of subjects (n=30)					
营养成分 Nutrients	乡村 Rural	城市 Urban	营养成分 Nutrients	乡村 Rural	城市 Urban
Protein (g)	64.38±7.88	63.74±7.82	Mg (mg)	404.26±43.41	407.31±38.74
Fat (g)	62.52±10.62	66.20±11.50	Ca (mg)	379.97±53.13	380.85±36.60
Carbohydrate (g)	367.53±48.86	380.91±56.91	Fe (mg)	24.58±3.09	24.74±3.07
VA (μg)	334.74±65.15	326.29±28.98	Zn (mg)	12.38±1.64	11.22±1.68
VC (mg)	71.24±5.17	78.95±9.05	Cu (mg)	0.64±0.09	0.64±0.08
VB1 (mg)	1.31±0.19	1.44±0.14	Mn (mg)	1.36±0.16	1.41±0.19
VB2 (mg)	0.43±0.04	0.44±0.07	K (mg)	2 228.03±294.28	2 326.73±347.03
Nicotinic acid (mg)	11.11±1.28	12.34±1.39	P (mg)	767.48±77.19	780.47±49.67

注：差异显著性分析显示城乡样本间各营养元素均差异不显著($P>0.05$).
Note: There is no significant difference between the samples of urban and rural in nutrients ($P>0.05$).

属(*Lactobacillus*)检测种包括 *L. plantarum* (植物乳杆菌)、*L. salivarius* (唾液乳杆菌)、*L. casei* (干酪乳杆菌)、*L. acidophilus* (嗜酸乳杆菌)、*L. helveticus* (瑞士乳杆菌)和 *L. fermentum* (发酵乳杆菌); 双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)检测种包括 *B. longum* (长双歧杆菌)、*B. animalis* (动物双歧杆菌)、*B. breve* (短双歧杆菌)和 *B. adolescentis* (青春双歧杆菌)。扩增体系(25 μ L)为: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/ μ L) 2 μ L, 正反向引物(10 pmol/ μ L)各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, T_m (表 3) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。得到的 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测^[19]。

1.4 数据处理

1.4.1 统计学分析: 使用 Mann-Whitney 对城乡样本营养成分摄入量和肠道微生物多样性指数进行差异显著性分析,使用 2 乘 2 配对资料方差分析进行 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 各种在城乡样本中的分布差异性分析^[9],上述分析均基于 Statistical

Analysis System 9.0 (SAS, USA)软件进行。

1.4.2 DGGE 图谱聚类分析和 PCA 分析: 使用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱条带去除背景强度和设定噪声水平,自动获得图谱密度剖面图,完成条带检测,利用条带间相似度采用戴斯系数 (Dice coefficient)计算各样品间相似性,得到样品相似性矩阵图,并用 UPGMA 算法绘制系统树状图,完成图谱聚类分析;同时使用 Statistical Analysis System 9.0 (SAS, USA)软件对相似性矩阵进行 PCA 分析,并用 Origin 7.0 (Microcal, USA)绘图软件进行绘图得到基于 PC1 和 PC2 的赋值样本 PCA 分布图^[21-22]。

1.4.3 样品微生物群落多样性统计学分析:使用多样性指数 Shannon-Weiner 指数(H')、丰度(S)和均匀度(E_H)等指标比较样品的微生物多样性^[22]。计算公式为:

Shannon-Weiner 指数(H'): $H' = -\sum_{i=1}^s (P_i \ln P_i)$ (1)

$P_i = n_i/N$ (2)

均匀度(E_H): $E_H = H/H_{\max} = H/\ln S$

表 3 乳杆菌属和双歧杆菌属部分种特异性引物 Table 3 Species specific primers of <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i>				
种 Species	引物名 Primers	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段大小 Product sizes (bp)	退火温度 T_m ($^{\circ}$ C)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acid-F	GAAAGAGCCCAAAACCAAGTGATT	85	58
	Acid-R	CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA		
<i>Lactobacillus casei</i>	Case-F	CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT	132	59
	Case-R	CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Ferm-F	ACTTAACCTTACTGATCGTAGATCAGTC	88	59
	Ferm-R	AACCGAGAACACCGCGTTAT		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plan-F	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT	144	58
	Plan-R	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAAATA		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helv-F	CTCTTCTCGGTCGCCTTG	160	60
	Helv-R	GAAGTGATGGAGAGTAGAGATTA		
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Sali-F	GTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGA	97	61
	Sali-R	TAAACAAAGTATTCGATAAATGTACAGGTT		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Adol-F	CTCCAGTTGGATGCATGTC	71	60
	Adol-R	CGAAGGCTTGCTCCCAGT		
<i>Bifidobacterium breve</i>	Breve-F	CCGGATGCTCCATCACAC	118	59
	Breve-R	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT		
<i>Bifidobacterium longum</i>	Long-F	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	109	59
	Long-R	GGAAGCCGTATCTCTACGA		
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Anim-F	CACCAATGCGGAAGACCAG	184	64
	Anim-R	GTTGTTGAGAATCAGCGTGG		

公式中, S 为每条泳带中条带数目总和, n_i 为单一条带 i 的峰面积, N 为所有峰的总面积, P_i 为特定条带亮度相对于所有条带总亮度的比率。通过软件自动获得图谱密度剖面图并利用条带间相似度按照上述公式进行计算。

1.4.4 DGGE 条带的序列测定: 选择 DGGE 图谱中清晰的共性和特异性条带标记后进行切胶回收、纯化、测序, 测序交由上海美吉生物医药科技有限公司进行^[17]。

2 试验结果

2.1 粪便菌体基因组 DNA 的提取

采用试剂盒法提取样品基因组 DNA, 得到的基因组 DNA 浓度为 100–130 mg/L, A_{260}/A_{280} 介于 1.8–2.0, 电泳观察各样品总 DNA 条带清晰, 无拖尾, 片段大小约为 23 kb, 满足后续试验使用。

2.2 16S rRNA V3 区的 PCR 扩增

以 16S rRNA V3 区通用引物扩增得到的各样品 DNA 产物, 电泳观察各样品扩增产物条带清晰, 无拖尾, 片段大小为 220 bp。

2.3 哈尔滨城乡居民肠道微生物 PCR-DGGE 指纹图谱

选择分别居住于哈尔滨道里区(2 位)、道外区(2 位)、南岗区(2 位)、松北区(2 位)、木兰县(4 位)和通河县(4 位)的共 16 位志愿者样本(即样品信息表中的 1–16 号样本)的 16S rRNA V3 区 PCR 产物进行 DGGE 分析, 得到样本 PCR-DGGE 指纹图谱(图 1A), 采用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行条带检测和泳道分析得到 DGGE 图谱条带提取图(图 1B)。每一条泳道代表一位志愿者肠道菌群的 DGGE 指纹图谱, 不同位置的条带代表该样品

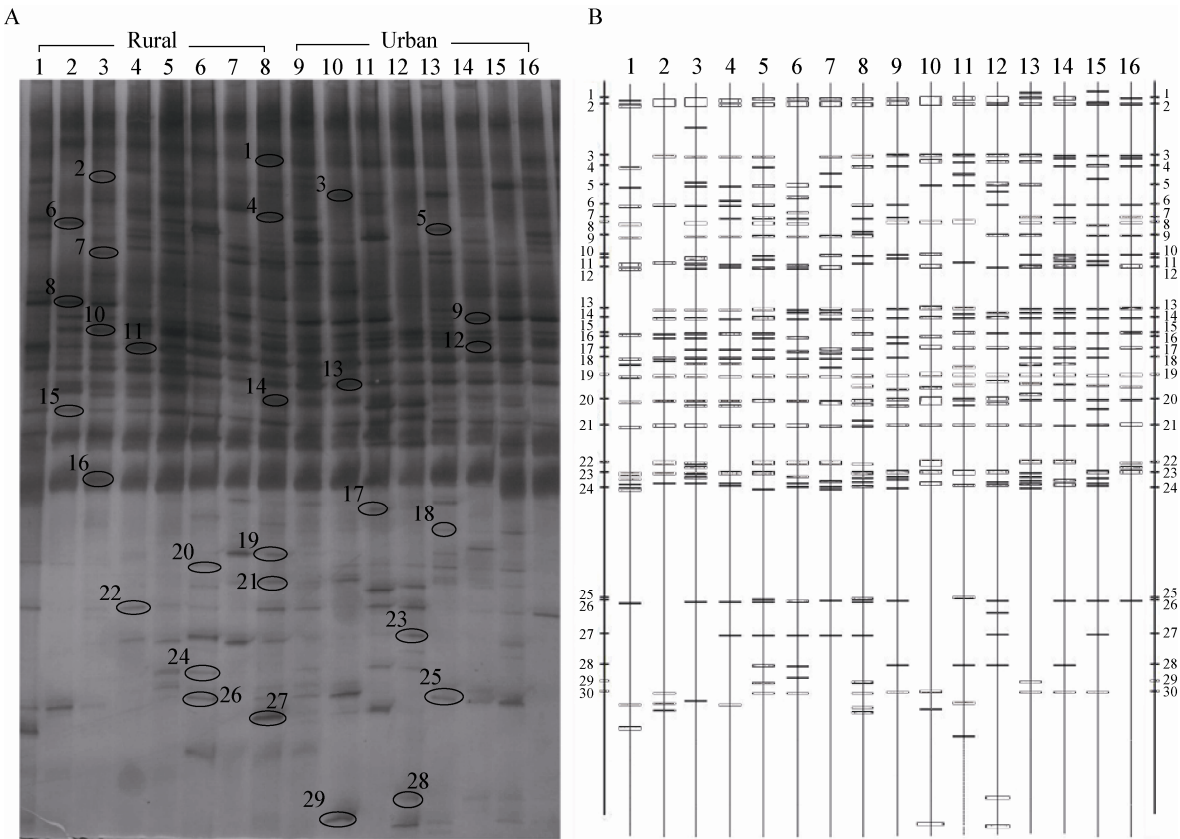


图 1 城乡居民肠道微生物 DGGE 指纹图谱
Figure 1 The DGGE profiles of intestinal microflora on samples of urban and rural subjects

中不同细菌的 16S rDNA V3 区基因片段。由图 1 可知,每个样品中含有的条带数目不等、位置各异、亮度不同。

2.4 基于 PCR-DGGE 指纹图谱的城乡居民肠道微生物多样性分析

DGGE 指纹图谱中,每个泳道中电泳条带的多少直观地反映样品中细菌群落的多样性,条带的亮度反映出该细菌的相对生物量,泳道中条带越多,亮度越亮,则表示该样品中微生物多样性越丰富,该种属细菌的相对数量越多。研究中,依据电泳图谱各条带信息,使用 Quantity One 软件计算各样品丰度(*S*)、均匀度(*E_H*)和 Shannon-Weine 多样性指数(*H'*),以综合分析城乡样本的肠道微生物多样性(表 4)。由表 4 可知,各样品均匀度相似,多样性指数不同,丰度迥异,这个结果与 DGGE 图谱的直观观测结果一致。乡村的 8 号样本丰度和多样性指数最高,分别为 37 和 3.603 9,表明 8 号志愿者肠道微生物多样性最高;2 号样本丰度和多样性指数最低,分别为 22 和 3.084 5,表明 2 号志愿者肠道微生物多样性最低。城市样本的丰度均介于 27–34,多样性指数介于 3.216 8–3.520 9,较乡村

组集中。
分别对城乡样本各丰度、多样性指数和均匀度求算数平均值可知,城乡样本均匀度相近,都为 0.998,但丰度和多样性指数城市居民大于乡村居民,分别为 29.50 和 3.365 0,29.38 和 3.358 6,差异显著性分析显示城乡样本间丰度和多样性指数均无显著差异(*P*>0.05),说明城乡居民肠道微生物多样性差异不显著。

2.5 基于 PCR-DGGE 指纹图谱的城乡居民肠道微生物相似性分析

基于 DGGE 指纹图谱,计算各样品间群落相似性系数可以得到各样品细菌种类差异信息。表 5 为样品间微生物群落相似性结果。整体而言,各样品间的微生物群落相似性系数介于 30.1%–69.6%,较低,说明各样本微生物群落结构差异较大。其中,相似性系数较高的有城市样本的 9 号和 15 号、11 号和 12 号、13 号和 14 号,分别为 64.6%、64.3%和 69.6%;以及乡村样本的 1 号和 3 号、2 号和 4 号、3 号和 4 号,相似性系数分别为 67.7%、62.1%和 63.2%。相似性系数较低的有城市的 15 号和乡村的 1 号、2 号及 5 号,分别为 36.3%、36.1%和 35.7%;以及乡村的 1 号样本和城市的 10

表 4 城乡居民样本 DGGE 条带多样性指数、丰度及均匀度							
Table 4 Shannon-Wiener Index (<i>H'</i>), Richness (<i>S</i>) and Evenness (<i>E_H</i>) of each sample from urban and rural subjects by DGGE bands patterns							
乡村 Rural	丰度 Richness (<i>S</i>)	均匀度 Evenness (<i>E_H</i>)	香农指数 Shannon-Wiener index (<i>H'</i>)	城市 Urban	丰度 Richness (<i>S</i>)	均匀度 Evenness (<i>E_H</i>)	香农指数 Shannon-Wiener index (<i>H'</i>)
1	24	0.998 9	3.174 5	9	27	0.997 7	3.288 3
2	22	0.997 9	3.084 5	10	29	0.998 4	3.327 0
3	36	0.997 9	3.575 9	11	27	0.998 2	3.290 0
4	27	0.997 7	3.288 2	12	30	0.998 0	3.325 7
5	30	0.997 4	3.392 3	13	34	0.998 5	3.520 9
6	32	0.997 7	3.457 6	14	33	0.998 2	3.490 3
7	27	0.998 7	3.291 5	15	32	0.998 6	3.460 8
8	37	0.998 1	3.603 9	16	27	0.999 4	3.216 8
均值 Average	29.38±5.40	0.998 0±0.000 5	3.358 6 ±0.183 9	均值 Average	29.50±2.98	0.998 4±0.000 5	3.365 0 ±0.110 6

注：差异显著性分析显示城乡样本间多样性指数、丰度和均匀度均差异不显著(*P*>0.05).
Note: There is no significant difference between the samples of urban and rural on Shannon-Wiener index (*H'*), Richness (*S*) and Evenness (*E_H*) (*P*>0.05).

表 5 城乡居民肠道微生物群落结构相似性分析																
Table 5 Similarity coefficients of microbial community of urban and rural subjects (%)																
泳道 Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	100															
2	58.2	100														
3	67.7	62.5	100													
4	57.0	62.1	63.2	100												
5	53.3	47.3	54.7	48.6	100											
6	52.7	57.6	53.7	54.7	48.0	100										
7	35.8	44.8	45.4	50.0	41.1	54.4	100									
8	42.4	50.3	46.9	58.2	42.8	53.8	53.9	100								
9	47.9	52.6	56.5	56.8	48.6	57.7	51.3	52.0	100							
10	39.2	48.3	47.1	39.7	52.1	47.1	50.0	45.0	47.8	100						
11	52.6	60.6	54.4	53.0	50.1	55.2	49.0	55.0	60.0	55.9	100					
12	43.9	49.7	50.9	55.2	53.7	50.4	45.9	51.7	53.7	55.3	64.3	100				
13	55.0	56.5	62.7	57.2	55.0	58.7	51.7	62.9	59.0	62.9	62.7	63.7	100			
14	51.7	55.4	64.4	57.8	50.3	58.3	58.9	61.5	64.3	50.5	61.0	60.6	69.6	100		
15	36.3	36.1	43.7	56.3	35.7	43.7	53.2	60.0	64.6	30.1	40.8	44.6	62.1	62.2	100	
16	48.0	46.0	52.8	58.1	53.6	48.8	43.7	65.1	58.1	42.7	50.2	51.4	62.4	60.7	59.3	100

号样本,相似性系数为 39.2%。结合样品采集点分析,1 号、2 号、3 号和 4 号样本都采集自哈尔滨乡村的木兰县,11 号和 12 号样本来自城市的南岗区,13 号和 14 号来自城市的松北区,而 10 号和 15 号样本分别采集自城市的道里区和道外区,由此可知,采集自同一地方、距离较近的居民样本微生物群落结构相似性较高,而采集自不同地方的样本相似性较低,说明生活环境相似的居民肠道微生物群落结构相似性高于其他环境居民。

对图谱进行聚类分析以进一步观察哈尔滨城乡青年居民肠道微生物群落结构相似性,结果如图 2A 所示,城市样本的 9 号、13 号、14 号、15 号和 16 号样本以 60%的相似性聚为一簇(族群 1),10 号、11 号和 12 号样本以 55%的相似性聚为一簇(族群 2),以及乡村样本的 1 号、2 号、3 号和 6 号样本以 57%的相似性聚为一簇(族群 3),提示城乡样本内部分别呈现聚类趋势,城乡样本间呈现分开趋势;族群 2 (城市样本)和族群 3 (乡村样本)以 49%的相似性聚为一簇,且以46%的相似性与族群 1 (城

市样本)聚为一簇,城乡居民样本以较低的相似性聚在一起,说明城乡青年居民间肠道微生物群落相似性小于城市或乡村青年居民内部;乡村样本的 4 号和 7 号样本分别以 56%和 47%的相似性与城市样本(族群 1)聚为一簇,乡村的 5 号样本以 52%的相似性与城市样本(族群 2)聚为一簇,以及乡村的 8 号样本与城市的 16 号样本以 65.1%的相似性聚为一簇,表明乡村的 4 号、5 号、7 号和 8 号样本的肠道微生物群落结构与其他乡村样本差异性较大,更相近于城市样本,提示城乡比较而言,城市青年居民的肠道微生物群落结构相似性更高,个体差异较小,而乡村青年居民肠道微生物群落结构个体差异较大。

对图谱进行 PCA 分析以进一步观察样本间的集聚趋势(图 2B),主成分因子 1 (PC1)的贡献率为 37.44%,主成分因子 2 (PC2)的贡献率为 19.99%。城乡样本分别都呈现了集聚趋势(椭圆形区域 1、2),并彼此有分开趋势。此外,也有个别城乡样本集聚的现象(椭圆形区域 3)。

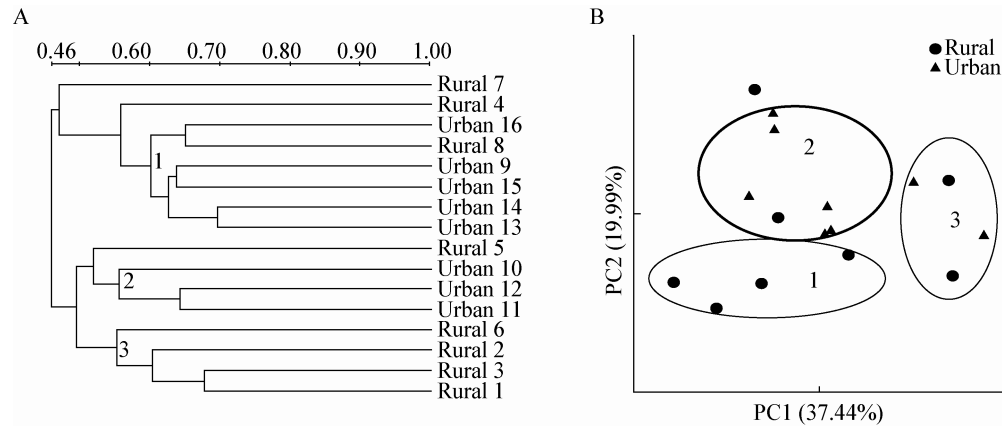


图2 基于 DGGE 指纹图谱的聚类分析
Figure 2 Analysis of cluster and PCA on DGGE profiles

综上所述,相似性分析说明居住距离较远、生活环境不同的哈尔滨城乡青年居民肠道微生物群落结构存在分开趋势,相似性小于居住距离较近、生活环境相似的哈尔滨城市或乡村居民内部。

2.6 基于 PCR-DGGE 指纹图谱对城乡青年居民肠道微生物组成的分析

DGGE 指纹图谱不仅可直观地反映样本细菌群落结构和多样性,也可进一步通过切胶回收测序分析样本细菌群落组成。研究中,选取图谱中具有代表性的共性和特异性条带(图 1A)进行切胶回收和纯化测序,以分析不同人群肠道菌群组成的异同。试验共选取条带 29 条,其中有 18 个条带为所有样本中共有,分别为条带 1、3-16、22、25-26,测序结果显示(表 6),它们为硬壁菌门的乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、粪球菌属(*Coprococcus*)和考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、放线菌门的双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、变形菌门的不动杆菌属(*Acinetobacter*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、莫拉氏菌科(*Moraxellaceae*)以及拟杆菌门的普氏菌属(*Prevotella*);条带 17-21、23-24 和 27 共 7 条带是部分城乡样本中共有的,测序结果为硬壁菌门的梭菌属(*Clostridium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、柔嫩梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)和放线菌门的

双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。此外,条带 2 在乡村样本中都含有而城市样本中只有 9 号含有,测序结果为杆菌属菌(*Bacterium*);28 和 29 只在部分城市样本中含有而乡村样本中未被检测,为不可培养杆菌属细菌。综上所述,测序结果表明城乡青年居民肠道微生物组成在门水平上相同,都含有硬壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门,但是在种属水平上存在差异。

2.7 乳杆菌属和双歧杆菌属类群定性分析结果

具有抑制病原菌生长、促进宿主营养消化吸收并提升宿主免疫力等益生特性的乳杆菌属和双歧杆菌属细菌是人体肠道微生态系统重要的生理性菌群,近些年受到广泛关注^[19-20]。本研究使用 PCR 技术对乳杆菌属和双歧杆菌属的若干个种在哈尔滨城乡青年居民肠道菌群中的出现频率进行检测。使用琼脂糖凝胶电泳观察各 PCR 扩增产物,如果出现清晰、明亮的条带,则扩增成功,说明该样品中含有该目标细菌,否则说明该样品中不含有该目标细菌,结果如表 7 所示。结果显示,乳杆菌属细菌中 *L. plantarum*、*L. casei* 和 *L. salivarius* 的检出率较高,接近 100%,双歧杆菌属中 *B. longum* 和 *B. breve* 的检出率较高,约为 90%;乳杆菌属的 *L. helveticus* 和 *L. acidophilus* 以及双歧杆菌属的 *B.*

animalis 和 *B. adolescentis* 的检出率适中, 分别约为 30%和 60%;此外,乳杆菌属细菌的 *L. fermentum* 的检出率低于 15%。城乡比较而言, *L. casei*、*L. helveticus* 、 *L. fermentum* 、 *B. longum* 和 *B. adolescentis* 的检出率乡村样本高于城市样本, *L. plantarum*、*L. acidophilus*、*B. animalis* 和 *B. breve* 的检出率城市样本高于乡村样本, *L. salivarius* 的检出率城乡样本相同,使用 2 乘 2 配对资料方差分析对乳杆菌属和双歧杆菌属各类群菌在城乡样本中的分布差异性进行分析,结果显示均无显著性存在。

表 6 肠道菌群 PCR-DGGE 特征条带序列比对结果				
Table 6 Alignment of intestinal microflora PCR-DGGE band to its most-similar GenBank sequence				
条带 Number	序列比对结果 Sequencing results	门 Phylum	相似性 Homology (%)	NCBI 序列号 NCBI serial number
1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	100	NR044975
2	<i>Bacterium</i> A5S_VP6_G11	—	99	GU319625
3	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	100	MJD01000180
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Firmicutes	100	HW155374
5	Uncultured Moraxellaceae bacterium clone	Proteobacteria	96	JN038281
6	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain W1109-B23	Proteobacteria	98	JQ815206
7	Uncultured bacterium clone	—	100	AB453760
8	<i>Lactobacillus</i> sp. strain	Firmicutes	100	JQ406676
9	<i>Prevotella</i>	Bacteroidetes	100	NR 041364
10	<i>Variovorax</i> sp. RK06	Proteobacteria	90	HM484318
11	Uncultured organism clone	—	99	Q792734
12	<i>Bacterium</i> het-w-11	—	98	KC810253
13	<i>Prevotella</i>	Bacteroidetes	100	NR 041364
14	<i>Streptococcus mitis</i> strain	Firmicutes	100	JQ342909
15	<i>Coprococcus</i>	Firmicutes	100	NZ GG662017
16	Uncultured Moraxellaceae bacterium clone	Proteobacteria	99	DQ065799
17	Uncultured Clostridiaceae bacterium	Firmicutes	98	JF928144
18	Clostridiales bacterium AP3	Firmicutes	94	GQ922846
19	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Firmicutes	100	NZ GL538333
20	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Firmicutes	100	NZ GL538341
21	<i>Ruminococcus</i>	Firmicutes	99	NR 025930
22	<i>Bifidobacterium longum</i>	Actinobacteria	100	NR 044691
23	<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	Firmicutes	100	CP003259
24	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Actinobacteria	100	M84785
25	<i>Phascolarctobacterium</i>	Firmicutes	100	NR 026111
26	<i>Phascolarctobacterium</i>	Firmicutes	100	NZ GL830920
27	Firmicutes bacterium BTY6	Firmicutes	99	KC331157
28	Uncultured bacterium clone	—	99	AB376337
29	Uncultured bacterium clone	—	98	KC302808

Note: “Numbers” above correspond to bands in Figure 1. The V3 regions of the 16S rRNA gene sequences were compared with those in GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI). The size of the sequences is 220 bp.

表 7 哈尔滨城市和乡村居民肠道中乳杆菌属和双歧杆菌属各种的定性分析					
Table 7 Qualitative analysis of some species of <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> in intestinal tract of urban and rural Harbin					
种 Species	检出率 Rate (%)		种 Species	检出率 Rate (%)	
	乡村 Rural (n=14)	城市 Urban (n=16)		乡村 Rural (n=14)	城市 Urban (n=16)
<i>L. plantarum</i>	92.86	93.75	<i>L. salivarius</i>	100	100
<i>L. casei</i>	100	93.75	<i>B. animalis</i>	50.00	62.50
<i>L. helveticus</i>	28.57	25.00	<i>B. longum</i>	92.86	87.50
<i>L. fermentum</i>	14.29	12.50	<i>B. breve</i>	85.71	93.75
<i>L. acidophilus</i>	28.57	31.25	<i>B. adolescentis</i>	64.29	62.50

注：差异显著性分析显示城乡样本间多样性指数、丰度和均匀度均差异不显著($P>0.05$).
Note: There is no significant difference between the samples of urban and rural on the detection rate ($P>0.05$).

3 讨论

人体肠道是一个复杂的微生态系统,细菌种类有几百到上千种。据报道,这些细菌可分属为硬壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门等 4 个菌门^[1-4]。基于 DGGE 图谱的 V3 区测序结果在门水平上进行分析,得到了与报道一致的结论。这些细菌中,硬壁菌门的乳杆菌属、链球菌属、瘤胃球菌属、粪球菌属和梭菌属细菌,放线菌门的双歧杆菌属细菌,拟杆菌门的普氏菌属细菌为青年人肠道中的优势菌属,在人体肠道中占有较高的相对含量,如梭菌属细菌为 6.9%、瘤胃球菌属细菌为 2.2%^[9]。本研究的测序结果中,以上这些细菌种属在城乡样本中都有检出,尤其乳杆菌属、链球菌属、粪球菌属和普氏菌属细菌为所有哈尔滨样本中共有,由此可知,它们为哈尔滨青年居民肠道中的优势菌属。

肠道内以乳杆菌属和双歧杆菌属为代表的益生乳酸菌因其可通过代谢食物中的糖类物质生成乳酸及其他代谢物保护肠道上皮细胞,加强肠道自身免疫系统功能,抵抗肠道肿瘤及炎症等疾病,是近些年研究的热点。使用 PCR 方法定性分析健康青年肠道中乳酸杆菌属多样性,Stsepetova 等^[20]曾报道健康成年人肠道中 *L. casei*、*L. acidophilus* 和 *L. helveticus* 的检出率分别为 90%、90%和 70%;徐洁^[19]报道四川地区健康青年人肠道中 *L. casei*、

L. acidophilus 和 *L. plantarum* 的检出率约 80%,是主要的优势乳杆菌;郭壮^[9]报道 *L. casei*、*L. salivarius*、*L. plantarum*、*L. helveticus* 和 *L. acidophilus* 在西藏藏区居民肠道菌群中普遍存在,检出率分别为 100%、93.0%、88.4%、86.0%和 72.1%。本研究中,*L. casei*、*L. salivarius* 和 *L. plantarum* 在哈尔滨城乡样本中检测率均高于 90%,且城乡样本间差异不显著,综合上述报道可知,*L. casei*、*L. salivarius* 和 *L. plantarum* 在哈尔滨城乡青年居民肠道内普遍存在,是哈尔滨青年居民肠道内的优势乳杆菌。此外,值得一提的是,因为 *L. plantarum*、*L. helveticus*、*L. acidophilus* 以及 *L. casei* 为西藏传统发酵乳制品中的优势乳酸菌种^[9],所以郭壮认为传统发酵乳制品的食用是西藏藏区居民肠道内 *L. plantarum*、*L. helveticus*、*L. acidophilus* 和 *L. casei* 普遍存在的原因。酸菜,作为中国北方传统的腌渍蔬菜制品,是东北居民饮食中不可缺少的食物,据报道,*L. casei* 和 *L. plantarum* 是东北酸菜中的优势乳酸杆菌^[23-24],因此,研究推测传统发酵酸菜的食用可能是哈尔滨居民肠道内 *L. casei* 和 *L. plantarum* 普遍存在的原因。

双歧杆菌属定性分析中,*B. longum* 和 *B. breve* 的检测率高于 90%,*B. animalis* 和 *B. adolescentis* 的检出率高于 60%,且城乡样本间无显著性差异。

郭壮^[9]报道, *B. longum*、*B. breve*、*B. animalis* 和 *B. adolescentis* 在西藏藏区居民样本和城市居民样本中的检测率均接近 90%, 且藏区居民和城市居民间差异不显著, 从而证实以上 4 种双歧杆菌在西藏居民肠道内普遍存在; 且其根据 Matsuki 等^[16]报道推测 *B. longum*、*B. breve*、*B. animalis* 和 *B. Adolescentis* 4 种双歧杆菌为健康青年肠道中的优势双歧杆菌, 对宿主健康起着积极作用。此研究结果与报道一致, *B. longum*、*B. breve*、*B. animalis* 和 *B. adolescentis* 亦为哈尔滨青年居民肠道内的优势双歧杆菌, 对居民健康发挥作用。

生活环境和饮食习惯调控着人体肠道微生物的群落结构和多样性, 在肠道微生物的塑造中扮演着至关重要的角色。在对样本的多样性分析中, 城乡居民肠道微生物多样性差异不显著; 且在乳杆菌属和双歧杆菌属定性分析中, 各类群细菌在城乡青年居民肠道内的检出频率也无显著性差异。饮食的多样性决定着肠道微生物的多样性^[1,5], 对膳食调查表进行分析, 结果显示城乡青年居民日常膳食中蛋白质、脂肪、维生素及矿物质等营养元素的摄入相当, 无显著性差异, 说明哈尔滨城乡青年居民日常饮食结构相似, 相似的饮食习惯可能是引起城乡青年居民肠道微生物多样性差异不大的原因。

研究中, 基于 DGGE 图谱的相似性分析显示, 居住于同一环境、饮食相似的哈尔滨城市或乡村青年居民肠道微生物群落结构呈现明显聚类趋势, 相似性较高, 而居住距离较远的城乡青年居民之间肠道微生物群落结构呈现区分趋势, 相似性较低。Yatsunenko 等^[5]曾对生活在美国、马拉维和印第安的居民肠道菌群进行研究, 结果表明同一国家的个体微生物群落具有明显的集聚现象, 而不同国家个体微生物群落明显分离, 尤其是具有西方饮食习惯的美国居民与非西方饮食的马拉维和印第安居民, 微生物群落明显分为两簇。Finegold 等^[25]也通过对坚持传统日式饮食习惯的日本居民和已适应西方饮食习惯的日裔美国居民的肠道微生物进行研究,

结果发现两个人群的肠道菌群结构明显不同。本研究得到了与 Finegold^[25]和 Yatsunenko^[5]相似的研究结果。

在分析中还发现, 城市样本间的肠道微生物群落结构相似性较乡村高, 个体差异较小, 且在聚类分析中, 有部分乡村样本(4、5、7 和 8 号)并没有与其他乡村样本聚为一类, 反而与城市样本聚为一簇, PCA 分析也显示部分城乡样本有集聚趋势。近几十年, 随着现代化和城市化进程的加快, 人民生活水平的提高, 乡村居民的饮食习惯和生活方式已开始趋同于城市居民, 尤其是随着交通的日趋便利, 城市和乡村的饮食日渐相似, 从而使城乡居民肠道菌群日渐趋同化^[9], 这有可能是造成这一差异的原因。

综上所述, 哈尔滨城市和乡村青年居民肠道微生物多样性差异不显著, 相似性小于城市和乡村青年居民内部。本研究通过 DGGE 技术在属水平上初步分析了哈尔滨城市和乡村青年居民肠道菌群多样性的异同, 并结合 PCR 技术在种水平上对城乡青年居民肠道内的优势菌属乳杆菌属和双歧杆菌属各细菌种进行定性分析, 从而揭示了哈尔滨城乡青年居民的肠道微生物多样性, 为后续国内人群肠道微生物群落结构的研究提供基础数据。

参 考 文 献

- [1] Gary D, Wu JC, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes[J]. Science, 2011, 334(7): 105-108.
- [2] Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease[J]. Lancet, 2003, 361(9356): 512-519.
- [3] 金红芝, 李堃宝. 人肠道微生态系统的研究进展[J]. 自然杂志, 2004, 2(26): 88-91.
- [4] O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ[J]. European Molecular Biology Organization, 2006, 7(7): 688-693.
- [5] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(14): 226.
- [6] Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view[J]. Cell, 2012, 148(6): 1258-1270.
- [7] Zhu BL, Wang X, Li L. Human gut microbiome: the second genome of human body[J]. Protein Cell, 2010, 1(8):

- 718-725.
- [8] Mah KW, Sangsupawanich P, Tunyapanit W, et al. Gut microbiota of children living in rural south Thailand and urban Singapore[J]. *Allergology International*, 2008, 57(1): 65-71.
- [9] 郭壮. 应用焦磷酸测序技术对不同人群肠道微生物群落结构的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013.
- [10] Benno Y, Endo K, Mizutani T, et al. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(5): 1100-1105.
- [11] 刘新宇. 土壤细菌16S rRNA 基因 V3区种属特异性检测的法医学应用研究[D]. 沈阳: 中国医科大学硕士学位论文, 2008.
- [12] Simpson JM, McCracken VJ, White BA, et al. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 167-179.
- [13] 白秀娟, 刘诚刚, 杜智恒, 等. PCR-DGGE 技术分析断奶仔猪肠道微生物菌群结构及多样性[J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43(9): 64-69.
- [14] 杨月欣, 王光亚, 潘兴昌. 中国食物成分表[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009.
- [15] Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2009, 56(1): 80-87.
- [16] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5445-5451.
- [17] Cocolin L, Bisson LF, Mills DA. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 189(1): 81-87.
- [18] Muyzer G, 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [19] 徐洁. 四川地区不同年龄健康人肠道菌群的比较研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012.
- [20] Stsepetova J, Sepp E, Kolk H, et al. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly[J]. *British Journal of Nutrition*, 2011, 105(8): 1235-1244.
- [21] 高亦豹, 王海燕, 徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(7): 999-1004.
- [22] 刘慧杰, 杨彩云, 田蕴, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构[J]. *微生物学报*, 2010, 50(7): 923-930.
- [23] 张鲁冀, 孟祥晨. 自然发酵东北酸菜中乳杆菌的分离与鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(11): 125-131.
- [24] 张杨, 孟祥晨. 自然发酵酸菜中乳杆菌的分离鉴定与多态性分析[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(2): 19-22.
- [25] Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1974, 27(12): 1456-1469.