



香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无茵猪肠道中的定殖

韩姗姗^{1,2}, 杜梦璇^{1,3}, 刘畅¹, 牛鹏霞¹, 冯婕¹, 张志刚⁴, 刘双江^{1,3*}

1 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室和环境微生物与生物技术中心, 北京 100101

2 中国科学技术大学生命科学与医学部, 安徽 合肥 230026

3 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 250002

4 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091

韩姗姗, 杜梦璇, 刘畅, 牛鹏霞, 冯婕, 张志刚, 刘双江. 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无茵猪肠道中的定殖. 微生物学报, 2022, 62(10): 3981–3996.

Han Shanshan, Du Mengxuan, Liu Chang, Niu Pengxia, Feng Jie, Zhang Zhigang, Liu Shuangjiang. Colonization of germ-free pig guts by *Enterococcus xiangfangensis* and *Lactobacillus reuteri* strains from different origins. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3981–3996.

摘要:【背景】已有研究表明, 微生物在宿主肠道中的定殖受宿主、肠道环境、微生物物种特性和菌株来源等多个因素的影响。一般认为, 来源于同类宿主的微生物菌株, 在该类宿主肠道中具有定殖优势, 但缺乏在物种和菌株水平上研究微生物自身特性在宿主肠道中定殖的研究报道。

【目的】将不同来源(同类宿主肠道、非同类宿主肠道和非肠道环境)、具有不同生物学特性的3株香坊肠球菌(*Enterococcus xiangfangensis*)和4株罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)对无茵猪肠道进行定殖, 在物种和菌株2个水平上探究物种特性和菌株来源对宿主肠道定殖的偏好性, 揭示影响微生物定殖效率的关键因素。【方法】在本项研究中, 将从藏猪(Tibetan pigs)、小鼠(ob/ob mice)、食蟹猴(*Macaca fascicularis*)和发酵食品中分离得到的多株香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌, 制成混合菌剂对无茵巴马香猪(Bama miniature pig)进行为期4周的饲喂, 并通过实时荧光定量PCR方法检测这7株菌在无茵猪肠道中的定殖情况。【结果】在物种水平上, 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无茵猪体内具有相近的定殖细胞数目。但是在菌株水平上, 小鼠来源的香坊肠球菌(EX-MS)和罗

基金项目: 国家重点研发项目(2019YFA0905601); 中国科学院先导专项(XDB38020300); 中国科学院微生物组项目(KFZD-SW-219)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905601), by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDB38020300) and by the China Microbiome Initiative of Chinese Academy of Sciences (KFZD-SW-219)

*Corresponding author. E-mail: liusj@im.ac.cn

Received: 24 February 2022; Revised: 2 May 2022; Published online: 14 June 2022

伊氏乳杆菌(LR-MS)定殖的细胞数目显著高于其他 5 株菌, 表明小鼠来源的菌株具有定殖优势。在体外混合培养中, 将 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌分别等比例混合培养 72 h 后, 发现香坊肠球菌 EX-MS 菌株的细胞数目高于香坊肠球菌 EX-MK 和 EX-PG 菌株; 在罗伊氏乳杆菌中, 4 株菌的细胞数目相近。7 株菌相互作用表明, EX-MS 菌株对 EX-MK 和 EX-PG 菌株均有明显的抑制作用, 但对 4 株罗伊氏乳杆菌无抑制作用。【结论】本次定殖实验的结果表明, 在物种水平上, 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌均具有在无菌猪肠道中良好的定殖能力; 但在菌株水平上, 小鼠来源的香坊肠球菌 EX-MS 菌株和罗伊氏乳杆菌 LR-MS 菌株具有定殖优势; 同时发现, 小鼠来源的香坊肠球菌 EX-MS 菌株通过抑制同物种的 EX-PG 和 EX-MK 菌株, 获得了在宿主肠道中的定殖优势。

关键词: 肠道微生物; 香坊肠球菌; 罗伊氏乳杆菌; 无菌猪; 定殖偏好性

Colonization of germ-free pig guts by *Enterococcus xiangfangensis* and *Lactobacillus reuteri* strains from different origins

HAN Shanshan^{1,2}, DU Mengxuan^{1,3}, LIU Chang¹, NIU Pengxia¹, FENG Jie¹, ZHANG Zhigang⁴, LIU Shuangjiang^{1,3*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources and Environmental Microbiology and Biotechnology Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

³ State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 250002, Shandong, China

⁴ School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: [Background] Previous studies suggested that the colonization of microorganisms in the host's intestinal tract was affected by both host and microbial behaviors, including many factors such as the host's intestinal environment, the origin of microbial strain and species characteristics. It is generally believed that the microbial strains have advantages in colonizing the intestinal tract of the same category of hosts, but there were few reports on the colonization of host intestinal tract at the species and strain levels. [Objective] This study aims to explore the colonization of host guts by different microbial species and strains, and to reveal the key factors affecting the rate of microbial colonization. [Methods] In this study, three strains of *Enterococcus xiangfangensis* and four strains of *Lactobacillus reuteri* from Tibetan pigs, ob/ob mice, *Macaca fascicularis* and fermented food were prepared into a mixed agent to feed germ-free Bama miniature pigs for four weeks, and the colonization of germ-free pig guts by these seven strains were detected with quantitative real-time PCR. [Results] At the species level, *E. xiangfangensis* and *L. reuteri* colonized similar number of cells in the germ-free pigs. However, at the strain level, *E. xiangfangensis* EX-MS and *L. reuteri* LR-MS that originated from mice colonized more cells than the other five strains, indicating that these mouse-originated strains had an advantage of colonizing germ-free pigs. After the three strains of *E. xiangfangensis* and four strains of *L. reuteri* were respectively mixed in equal proportions and cultured for 72 h, *E. xiangfangensis*

EX-MS colonized more cells than EX-MK and EX-PG, while the four strains of *L. reuteri* colonized similar number of cells. The interaction test between the seven strains demonstrated that EX-MS exerted inhibitory effects on EX-MK and EX-PG, while it had no inhibitory effect on the four strains of *L. reuteri*.

[Conclusion] At the species level, both *E. xiangfangensis* and *L. reuteri* had good ability of colonizing the intestinal tract of germ-free pigs. At the strain level, *E. xiangfangensis* EX-MS and *L. reuteri* LR-MS that originated from mice had colonization advantages. Moreover, EX-MS gains the colonization advantage in the host intestine by inhibiting the growth of *E. xiangfangensis* EX-PG and EX-MK respectively originated from Tibetan pigs and *M. fascicularis*.

Keywords: gut microbiota; *Enterococcus xiangfangensis*; *Lactobacillus reuteri*; germ-free pigs; colonization preference

人类微生物组计划的实施揭示了人体微生物的多样性和重要性^[1]。事实上,我们身体上几乎所有部位都被微生物占据,肠道微生物菌群被认为是调节宿主健康的关键因素之一^[2]。当宿主处于正常的生理状况时,肠道微生物菌群系统保持稳态平衡^[3],并且,肠道微生物能够分泌如维生素等人体必需的营养元素,帮助人体从日常的食物中获取更多的营养^[3]。而肠道微生物菌群紊乱与宿主多种疾病相关^[4],如乳糜泻疾病^[5]、结直肠癌^[6]和慢性肝病^[7]等。肠球菌属(*Enterococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)中一些菌株是公认安全的益生菌(generally regarded as safe, GRAS)^[8],具有制成益生菌制剂的前景。已有研究表明,摄入益生菌不仅能有效改善宿主肠道疾病如肠道菌群失调引起的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)^[9],还能缓解儿童哮喘^[10]和辅助改善胃癌术后短期结果^[11]。肠球菌在生长过程中产生一些抑菌物质如细菌素(bacteriocin)等具有较好的酸碱耐受性以及温度不敏感性,能直接杀伤食源性病原菌如单核增生李斯特菌等,在食品加工和贮藏等领域拥有较好的应用前景^[12]。乳杆菌属细菌可将糖类转化为酸性物质,降低环境 pH,抑制病原菌在肠道内的定殖^[13]。由于外源微生物在肠道中定殖受多种因素影响,如菌株分离来源^[14]、宿主

和肠道环境^[2,15]以及微生物物种特性^[16]等,益生菌能否在肠道中有效定殖是一个备受关注的问题。

许多研究表明,外源性微生物在宿主体内具有宿主定殖偏好性(host-specific colonization preference)^[4,17]。与动物共生的特定肠道微生物会随着宿主共同进化,并表现出宿主特异性,因此,这些共生微生物会更倾向于定殖于其同源宿主(遗传背景相同)^[14]。罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)广泛存在于多种脊椎动物的胃肠道中,并分化为不同的具有宿主特异性的系统发育谱系^[18]。如啮齿动物分离源的罗伊氏乳杆菌在小鼠体内显示出高度的定殖适应性,家禽分离源的罗伊氏乳杆菌也在鸡体内高度富集。但是人源和猪源的罗伊氏乳杆菌几乎不在人和猪的肠道中占据定殖优势^[14]。宿主定殖偏好性在金黄色葡萄球菌中也存在,将牛和猪来源的金黄色葡萄球菌进行系统发育聚类分析发现,牛来源和猪来源的金黄色葡萄球菌菌株各自聚集在一起,且猪来源的分离株共享一个牛来源菌株不存在的基因,这表明金黄色葡萄球菌可能存在特异的宿主适应性基因^[19]。宿主定殖偏好性在鸟类^[20]、海绵^[21-22]和浮游植物^[23]中同样存在。以上研究表明,微生物具有宿主特异性定殖特性,不同的宿主来源可能比环境变化等

对微生物定殖更为重要,但这种定殖偏好背后的机制目前尚未完全解析。

不同肠道微生物的物种或菌株特异性特征在细菌定殖宿主中也起着关键作用^[22]。嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*)以黏液蛋白为生长碳源、氮源和能源,可在宿主黏液层定殖^[24],大肠杆菌益生菌株 Nissle 的 F1C 菌毛和 1 型菌毛有助于微生物定殖并结合小鼠肠道上皮^[16]。粪肠球菌利用群体感应策略,通过细胞溶解素、LuxS 系统和 Fsr 系统调控种群密度来调节基因表达,增强粪肠球菌在人体中的定殖强度^[25]。此外,肠道微生物产生各种具有抗菌作用的代谢产物,包括短链脂肪酸、次级胆汁酸和细菌素^[26]。短链脂肪酸通过改变细胞内的 pH 值^[27]和肠道致病菌代谢功能^[28]来破坏细菌的生长,抑制外源微生物在肠道中的定殖能力。经初级胆汁酸转化得到的去氧胆酸,通过破坏细胞膜和泄漏细胞内容物抑制许多如金黄色葡萄球菌、双歧杆菌和乳酸菌等的生长^[29–30]。而细菌素可以直接抑制亲缘关系密切细菌的定殖和生长,如唾液乳杆菌 UCC 118 的细菌素 Abp118 能直接杀死单核增生李斯特菌并保护小鼠^[31]。所以,不同的肠道微生物或依靠菌毛或群体感应策略促进自身在肠道中的定殖能力,或表达具有抑菌作用的代谢产物与其他肠道微生物竞争生态位。

虽然宿主定殖偏好性和微生物的特异性特征都影响微生物在宿主肠道的定殖效率,但是在这些影响因素中,究竟是哪一类因素对定殖影响的优先级是最高的,或者不同因素共同在宿主肠道定殖中发挥作用的条件和程度,依然有待进一步的探究。本研究将不同来源分离得到的 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌对无菌猪进行定殖,探究宿主定殖偏好性是否普遍存在,以及哪些因素是影响定殖效率的决定因素。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌分别分离于藏猪粪便、小鼠粪便、食蟹猴的粪便和发酵食品,分别简称为 EX-PG (藏猪粪便来源)、EX-MS (小鼠粪便来源)、EX-MK (食蟹猴粪便来源)、LR-PG (藏猪粪便来源)、LR-MS (小鼠粪便来源)、LR-MK (食蟹猴粪便来源)和 LR-JJ (发酵食品来源)。LR-JJ 来自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),其余 6 株菌均由本实验室从不同的粪便中分离得到。3 株香坊肠球菌接种于 mGAM 液体培养基,4 株罗伊氏乳杆菌接种于 MRS 液体培养基,在 37 °C 培养箱中厌氧静置培养。相关厌氧实验操作在厌氧台(COY)进行,厌氧台气体环境为 1.5%–4.0% H₂, N₂ 平衡。

1.2 无菌猪定殖

首先将 7 株菌分别培养至 OD₆₀₀=1.0 进行接种培养,将 3 株香坊肠球菌按照细胞数量等比例收菌,然后与保护剂(5%脱脂乳粉、3% α-乳糖和 2%甘油)混合均匀,分装冻干,制成冻干粉;4 株罗伊氏乳杆菌同样等比例收菌,然后与保护剂混合均匀,制成冻干粉。

7 株菌定殖无菌仔猪实验周期共 28 d,分为观察期(3 d)、给菌期(14 d)和定殖期(11 d)。观察期:无菌仔猪出生后先观察 3 d,淘汰体弱仔猪。给菌期:无菌仔猪观察 3 d 后挑取一只体态中等仔猪进行试菌,观察 1 d 后无腹泻等非健康症状,然后开展实验。定殖组共选择 8 只仔猪,随机分为 4 只一组,分别在 No.7 和 No.12 无菌培养箱培养。无菌组共选择 8 只仔猪,随机分为 4 只一组,分别在 No.10 和 No.16 无菌培养箱培养。试菌正常后,将等比例混合香坊

肠球菌和罗伊氏乳杆菌的冻干粉喂养定殖组仔猪(取 0.25 g 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌冻干粉混合物加入 50 mL 牛奶中混匀饲喂仔猪, 等仔猪进食完毕再补奶正常饮食), 无菌组按照定殖组相同的进食频率喂养不添加微生物冻干粉的牛奶。仔猪出生后 1 d 给奶 6 次(包括定殖组和无菌组), 每次 100 mL, 根据进食量适当增加给奶量并减少给奶次数, 给奶量最高 800 mL。每次记录给奶量与仔猪的进食量, 弃余奶, 洗食槽。每天统计给奶量与仔猪进食量, 观察仔猪的健康状况。定殖组连续给菌 3 d, 每天喂养 1 次含有菌冻干粉的牛奶, 共 3 次; 再间隔 1 d 给菌, 给菌日喂养 1 次含有菌冻干粉的牛奶, 至给菌期结束共给菌 5 次。在给菌期定殖组一共给菌 8 次。定殖期: 给菌期结束后正常饲养至 28 日龄处置采样。无菌猪喂养流程如图 1 所示。

无菌猪(巴马香猪)来自于重庆荣昌无菌猪实验基地, 无菌动物实验全部在该实验基地完

成, 并得到了重庆市畜牧科学院实验动物伦理委员会的批准(批准号为 Cqaa2019003)。

1.3 主要培养基

MRS 培养基(g/L)^[32]: 蛋白胨 10, 牛肉粉 8, 酵母粉 4, 葡萄糖 20, 磷酸氢二甲 2, 柠檬酸氢二铵 2, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.04, 乙酸钠 5, 半胱氨酸 0.5, 吐温-80 1 mL, 刃天青 5 mL (0.1%), 定容至 1 L, pH 6.5。

MRS 固体培养基: MRS 培养基添加 1.3% 琼脂。

改良 GAM (mGAM)培养基(g/L)^[33]: 改良 GAM 基础培养基 60, 半乳糖 0.5, 海藻糖 0.5, 果糖 0.5, 甘露糖 0.5, 菊粉 0.5, 帕拉金糖 0.5, 鼠李糖 0.5, 纤维二糖 0.5, 半胱氨酸 0.5, 精氨酸 0.5, 色氨酸 0.3, 无水乙酸钠 2.46, 碳酸氢钠 2, 氯高铁血红素 5 mL (0.1%), 刃天青 1 mL (0.1%), 定容至 1 L, pH 7.2。改良 GAM 固体培养基添加 1.3% 琼脂。

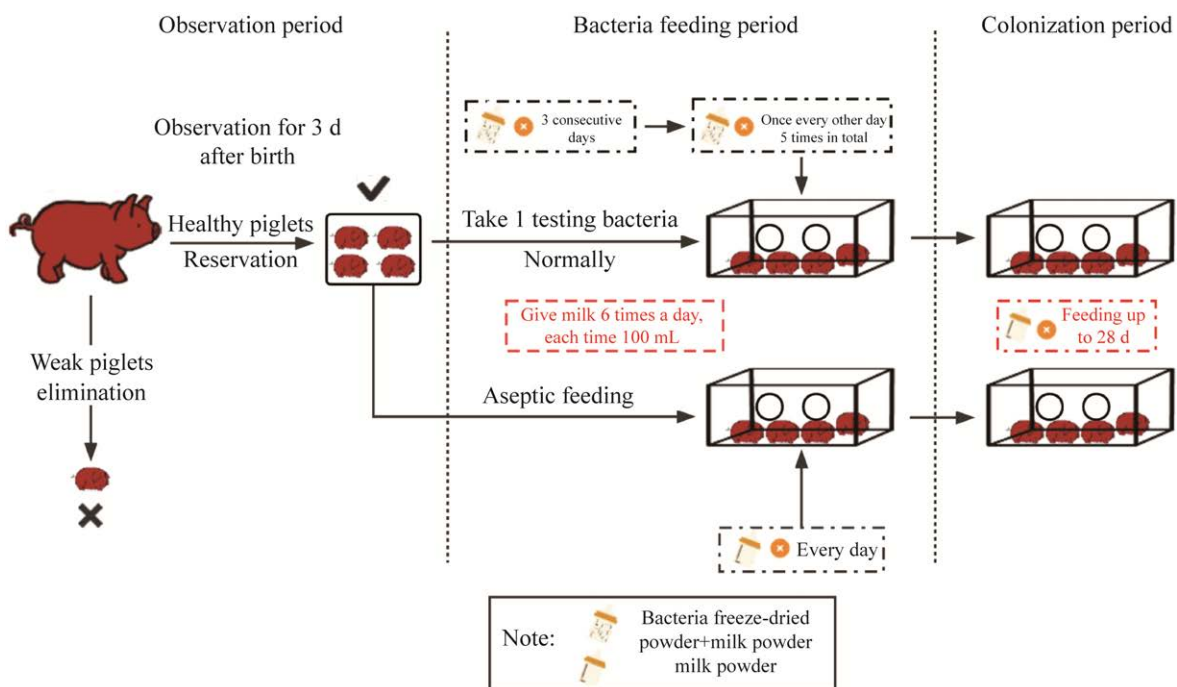


图 1 无菌猪肠道菌株定殖实验流程图

Figure 1 Flowchart of bacterial colonization of germ-free pigs.

MIX 培养基: 将 MRS 培养基和改良 GAM (mGAM)培养基 1:1 等比例混合, 调节 pH 至 7.0。

上述培养基均需要通过抽换气装置用氮气将培养基中的氧气置换出来。当培养基中含有氧气时, 由于刃天青的存在, 培养基呈淡粉色; 当氧气被氮气置换完全时, 培养基中粉色消失, 变为培养基本身的颜色。

1.4 七株菌生长曲线的测定

以 1%接种量在 mGAM 和 MRS 液体培养基中分别接种(种子 OD_{600} 约为 1.0) 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌, 放置在 37 °C 培养箱中静置培养。每隔 2、4、24 h, 以空白的 mGAM 和 MRS 液体培养基校准, 测定吸光度 OD_{600} 值, 持续检测到 72 h, 每个时间点测定 3 次吸光度 OD_{600} 值, 取其平均值作为这个时间点的 OD_{600} 值。以每株菌的生长时间为横坐标, 以生长时间的对应测得的 OD_{600} 值为纵坐标, 绘制细菌生长曲线。根据生长曲线推算出细菌每分裂一次/细菌数目增加一倍所需要的时间, 称为代时 (generation time), 用 G 表示; 比生长速率(μ)为微生物每小时的分裂数。使用 GraphPad Prism v8.3.0.538 (GraphPad Software)软件进行统计学分析, 计算公式分别为:

$$G=(T1-T2)/(\lg W2-\lg W1)\times\lg 2; \mu=1/G。$$

T1 和 T2 是 7 株菌对数生长期中的 2 个时间点, W1 和 W2 分别为对应数生长期测得的细胞数。

1.5 DNA 提取、引物、探针设计和 qPCR 定量

从无菌猪的肠道中选取小肠部位的回肠以及大肠部位的盲肠、结肠和直肠, 一共 4 种肠段, 参照 DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen)说明书, 提取 4 种肠段中微生物的基因组 DNA, 样品保存于-20 °C, 用于后续测定 7 株菌在无菌猪体内定殖的细胞数目的实验。

将 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌这 7 株菌分为 3 组。3 株香坊肠球菌为一组等比例接种于 mGAM 培养基, 4 株罗伊氏乳杆菌为一组等比例接种于 MRS 培养基, 这 7 株菌为一组混合等比例接种于 MIX 培养基, 在 37 °C 培养箱中厌氧静置培养, 分别在间隔 0、4、8、12、24、48、72 h 时吸取 1 mL 混合菌液, 参照 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)说明书, 提取 3 个实验组在不同时间点的基因组 DNA, 通过 Qubit 4.0 荧光定量仪(Thermo Fisher Scientific)检测提取的 DNA 浓度。提取的基因组 DNA 用于后续在物种水平和菌株水平上检测 7 株菌在体外混合培养条件下不同培养时间点的细胞数目。

香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌的基因组采用 Prokka 软件进行预测分析^[34], 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌的泛-核心(pan-core)基因集^[35]由 Roary 软件(v3.6.1)^[36]构建。选取同种菌株基因组中相似度高于 80%的基因作为核心基因, 作为菌株的特异标记区域。使用 Primer Express v3.0.1 (Whitehead Institute and Howard Hughes Medical Institute)软件在此区域内设计特异性引物和探针(表 1)。香坊肠球菌选取的特异基因为 *accC*, 罗伊氏乳杆菌选取的特异基因为 *xytB*, 通过凝胶电泳观察到目标产物在 124–203 bp 之间, 扩增片段的大小与预期一致。使用 qPCR 对 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌的混合基因组 DNA 样品进行检测, 每株菌的引物和探针特异性扩增目的 DNA 片段结果为阳性, 扩增其余 6 株菌结果为阴性; 用上述方法对香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌的 16S rRNA 探针进行交叉检测, 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌的探针仅能扩增目的 DNA 片段结果为阳性, 交叉扩增结果为阴性, 表明 Taqman 探针具有良好的特异性。引物(表 1)由北京天一辉远公司合成, 探针由北京擎科生物科技有限公司合成。构建 7 株菌的标

表 1 引物和 Taqman 探针序列

Table 1 Primers and Taqman probe sequences

Detection object	Primer/probe	Sequences (5'→3')	Target genes	Product size/bp
EX-PG	P_accC_228_Fpg	GGCGATCCATCCAGGTTTTG	<i>accC</i>	193
	P_accC_420_Rpg	TGTATTGATCGCACCATCGCT		
	T_accC_278_pg	CGATGTGTGCTGAATGCAATATCA		
EX-MS	P_accC_210_Fms	ATCCATCCAGGTTTTGGTTT	<i>accC</i>	196
	P_accC_405_Rms	GGAATAACTGGGACTCCTGC		
	T_accC_278_ms	CGATGTGTGCTGAGTGTAACATT		
EX-MK	P_accC_241_Fmk	GGCTTTGGGTTCTTGTCCGAA	<i>accC</i>	124
	P_accC_364_Rmk	GGACGCCGGCTTTTTGCATTAA		
	T_accC_269_mk	TATTTGCGACGATGTGCGCCGA		
LR-PG	P_xylB_303_Rpg	TGCCCAAGTGATTAACCATG	<i>xylB</i>	174
	P_xylB_130_Fpg	GAACAAGAGCCAGAAGAAGT		
	T_xylB176_pg	ATGATGTAGCTAGGGCAG		
LR-MS	P_xylB_833_Rms	TCTGGGTCAATAACAGGATG	<i>xylB</i>	203
	P_xylB_631_Fms	ACTGGTTTAGTGCCCGAAGC		
	T_xylB675_ms	ACTTGAGTACCCGCTAATA		
LR-MK	P_xylB_512_Fmk	AGGTTGATATGTCAATCGCTTCC	<i>xylB</i>	154
	P_xylB_665_Rmk	GCTTCGGGCACTAAACCAGT		
	T_xylB538_mk	ACCGGCTTGATGAACCTTAA		
LR-JJ	P_xylB_294_Rjj	GATTAACCGTGAAAGAGGCT	<i>xylB</i>	141
	P_xylB_154_Fjj	AATGCTGCGGAACAACTAT		
	T_xylB216_jj	ACTGGCAGTCTCAATTTCA		
Eall/Lall	P_16S_613_F	TAGCACTCATCGTTTACGGC	16S rRNA	150
	P_16S_762_R	CCATGTGTAGCGGTGAAATG		
	T_16S_657_Eall	TGTTTGCTCCCCACGCTTTC		
	T_16S_657_Lall	TGTCGCTACCCATGCTTTC		

准质粒, 采用质粒小提试剂盒(ZOMANBIO)提取质粒 DNA, 利用 LightCycler 480 定量 PCR 系统和软件(Roche)构建标准曲线, 以灵敏度、特异性和重复性等特征检验标准曲线的准确性。以 Taqman 荧光定量 PCR (qPCR)法检测 7 株菌的细胞数目。

1.6 细菌相互作用

用改良的琼脂孔扩散法检测 7 株菌的相互作用。在厌氧操作台中, 首先, 将已灭菌处理 (115 °C、30 min)固体培养基温度降到 40–50 °C, 选择 1 株菌作为指示菌, 将其以 1%的接种比例接种到培养基中, 使其均匀混合在培养基中。其次, 在空白平板上放置已灭菌的牛津杯, 将

上述培养基倾倒在平板除牛津杯外的空白处, 静置 30 min 等待培养基凝固, 然后将每一个牛津杯取出。其余 6 株菌各取 100 μL 菌液直接加入到相应标记的孔中, 并将平板保持水平状态, 放置在 37 °C 恒温的厌氧操作台中培养过夜, 检测是否有抑菌圈形成。如果有抑菌圈则表示这株菌能抑制指示菌, 反之则不能。

2 结果与分析

2.1 七株菌的生长曲线和代时

从 7 株菌的生长曲线(图 2)可知, 7 株菌在培养 2 h 后, OD_{600} 值迅速上升。3 株香坊肠球菌在培养 10 h 后, OD_{600} 值达到最高, 为 1.2–1.3,

表明香坊肠球菌在 2–10 h 处于菌株生长的对数期；而培养 10 h 后，3 株菌的 OD_{600} 值不再直线增加，表明 3 株香坊肠球菌的生长趋于平稳。4 株罗伊氏乳杆菌在培养 16 h 后， OD_{600} 值达到最高，为 1.6–1.7，表明罗伊氏乳杆菌在 2–16 h 处于生长的对数期；在培养 16 h 后，4 株罗伊氏乳杆菌的生长曲线呈下降的趋势。7 株菌的代时和比生长速率见表 2 和表 3。在 3 株香坊肠球菌中，EX-MK 的生长速率为 0.73 h^{-1} ，快于 EX-PG 和 EX-MS，但单因素方差分析结果表明，3 株香坊肠球菌的代时 [$F(2,6)=3.20$, $P=0.11$] 和比生长速率 [$F(2,6)=3.46$, $P=0.10$] 不存在显著差异。在 4 株罗伊氏乳杆菌中，LR-MK 的生长速率是 0.70 h^{-1} ，快于其他 3 株罗伊氏乳杆菌。方差分析结果表明，

4 株罗伊氏乳杆菌的代时 [$F(3,8)=22.79$, $P=0.000\ 3$] 和比生长速率 [$F(3,8)=11.06$, $P=0.003$] 存在显著差异。进一步 Tukey 多重比较结果表明，LR-MK 的代时与 LR-PG 不存在显著差异 ($M_D=-0.05$, $P=0.99$)，但与 LR-MS ($M_D=-1.10$, $P=0.000\ 8$) 和 LR-JJ ($M_D=-0.88$, $P=0.003$) 的代时存在显著差异；LR-MK 的比生长速率与 LR-PG 不存在显著差异 ($M_D=0.03$, $P=0.98$)，但与 LR-MS ($M_D=0.31$, $P=0.009$) 和 LR-JJ ($M_D=0.28$, $P=0.02$) 的比生长速率存在显著差异。虽然生长速率各不相同，但是 4 株罗伊氏乳杆菌物种亲缘关系密切，所以生长趋势彼此相近。随着培养时间的不断延长，LR-MS 和 LR-JJ 的生物量明显下降，LR-MK 和 LR-PG 的生物量也趋于下降。

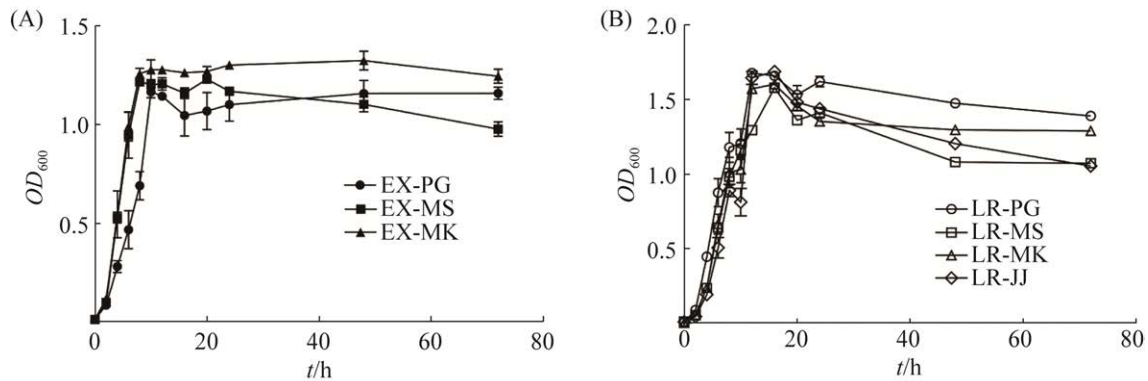


图 2 香坊肠球菌(A)和罗伊氏乳杆菌(B)不同菌株的生长曲线
Figure 2 Growth curves of *E. xiangfangensis* (A) and *L. reuteri* (B) strains.

表 2 三株香坊肠球菌的代时和比生长速率($M\pm SD$)及方差分析结果

Table 2 Generation time and specific growth rate ($M\pm SD$) and variance analysis results of 3 strains of *E. xiangfangensis*

Growth	EX-PG ($n=3$)	EX-MS ($n=3$)	EX-MK ($n=3$)	F(2,6)
Generation time/h	1.61 ± 0.12	1.52 ± 0.03	1.38 ± 0.14	3.20
Growth rate/(h^{-1})	0.62 ± 0.05	0.66 ± 0.01	0.73 ± 0.07	3.46

表 3 四株罗伊氏乳杆菌的代时和比生长速率($M\pm SD$)及方差分析结果

Table 3 Generation time and specific growth rate ($M\pm SD$) and variance analysis results of 4 strains of *L. reuteri*

Growth	LR-PG ($n=3$)	LR-MS ($n=3$)	LR-MK ($n=3$)	LR-JJ ($n=3$)	F(3,8)
Generation time/h	1.50 ± 0.23	$2.55\pm 0.23^{***}$	1.45 ± 0.25	$2.33\pm 0.03^{**}$	22.79
Growth rate/(h^{-1})	0.68 ± 0.11	$0.39\pm 0.04^{**}$	0.70 ± 0.12	$0.43\pm 0.01^*$	11.06

***: $P<0.000\ 2$; **: $P<0.002\ 1$; *: $P<0.033\ 2$.

2.2 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无菌猪肠道内定殖和体外混合培养生长情况

在物种水平上, 采用 qPCR 检测了 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌在无菌猪不同肠段区域中定殖情况。结果表明, 在无菌猪体内, 香坊肠杆菌和罗伊氏乳杆菌在回肠、盲肠、结肠和直肠均可被检测到, 每克肠道内容物大约有 10^6 – 10^7 个细胞。香坊肠杆菌在 4 种肠段(回肠、盲肠、结肠和直肠)中的细胞数量分别是 1.51×10^6 、 4.49×10^6 、 8.06×10^7 和 5.20×10^6 cells/g, 罗伊氏乳杆菌在 4 种肠段(回肠、盲肠、结肠和直肠)中的细胞数量分别是 2.76×10^5 、 2.15×10^6 、 2.08×10^7 和 1.05×10^6 cells/g (图 3A)。虽然香坊肠球菌在 4 种肠段中定殖的细胞数目均稍高于罗伊氏乳杆菌, 但是差异并不显著。由此可见, 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌能很好地定殖在无菌猪肠道内。另外, 在无菌猪的 4 种肠段中, 我们发现香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无菌猪大肠中定殖的细胞数目高于其在小肠中定殖的细胞数目(差异不显著)。

将香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌按细胞数量等比例 1:1 体外混合培养, 采用 qPCR 方法检测混合培养的不同时间下香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌的细胞数目。结果表明, 在混合培养的 0–72 h 时间里, 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌的细胞数目基本相同, 不存在显著差异(图 3B)。随着培养时间的延长, 观察到香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在不同时间点的细胞数目并没有显著变化, 维持着基本的波动变化。上述结果表明, 2 种菌混合培养时, 这 2 种菌之间维持着稳定的状态, 细胞数目基本不变, 因此, 推测香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌之间不存在相互竞争和抑制作用。

2.3 不同来源的罗伊氏乳杆菌在无菌猪肠道内定殖和体外混合培养生长情况

在 4 株罗伊氏乳杆菌中(图 4A), LR-MS 在无菌猪的回肠、盲肠和直肠定殖的细胞数目显著高于 LR-PG、LR-MK 和 LR-JJ ($P < 0.05$); 在结肠中, LR-MS 定殖的细胞数目高于 LR-PG、LR-MK 和 LR-JJ, 但不存在显著差异。没有观

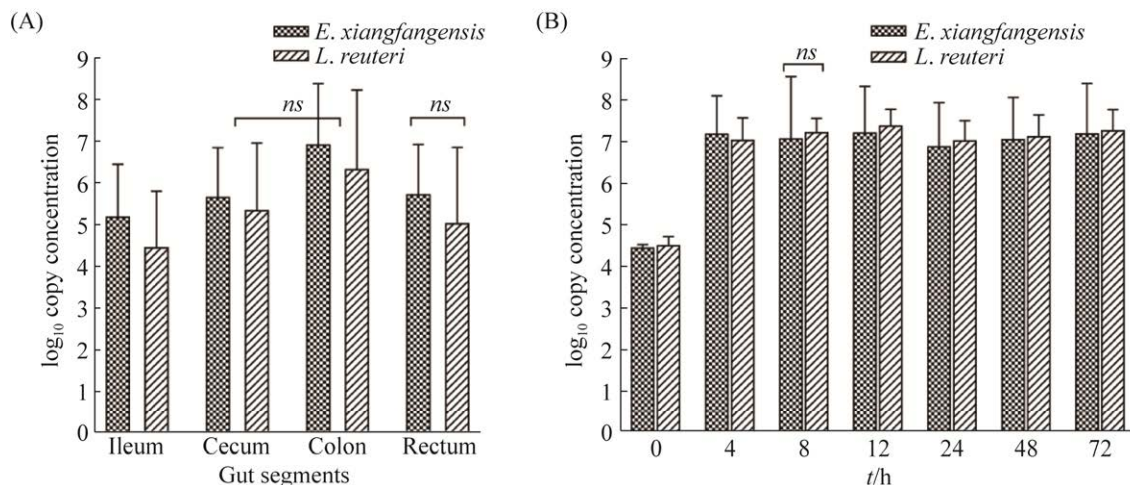


图 3 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在体内外物种水平的定量检测

Figure 3 The number of colonization cells of *E. xiangfangensis* and *L. reuteri* in vivo (A) and in vitro (B) at species level. A: two species in germ-free pig four intestinal tracts; B: two species mixture culturing in vitro. ns stands for $P \geq 0.05$; error bars indicate standard deviations.

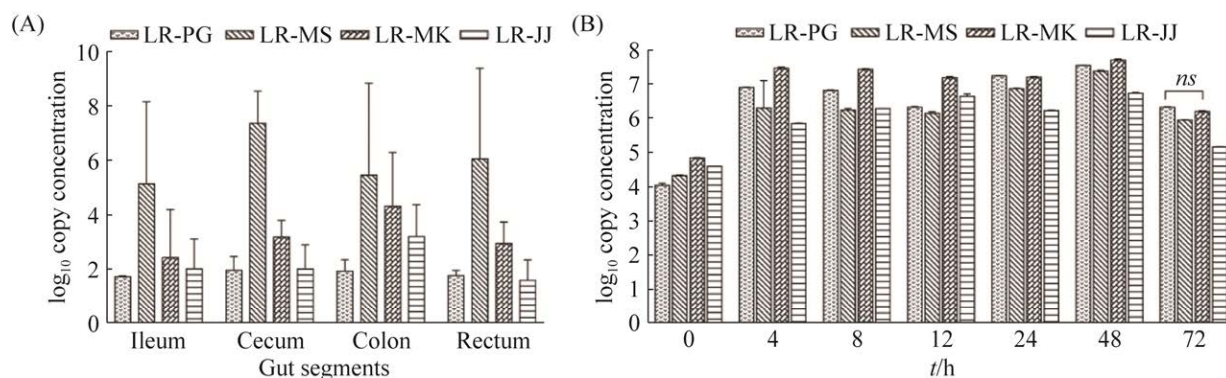


图 4 不同来源的罗伊氏乳杆菌在体内外条件下的定量检测

Figure 4 The number of colonization cells of *L. reuteri* *in vivo* and *in vitro*. A: 4 strains of *L. reuteri* in germ-free pig four intestinal tracts; B: 4 strains of *L. reuteri* mixture culturing *in vitro*. ns stands for $P \geq 0.05$; error bars indicate standard deviations.

察到藏猪来源的罗伊氏乳杆菌在无菌猪体内占据优势的现象，而是小鼠来源的菌株在无菌猪体内占据优势。

将 4 株罗伊氏乳杆菌体外等比例混合培养 72 h，不同时间点取样测定 4 株罗伊氏乳杆菌的细胞数目，qPCR 荧光定量结果显示，LR-MK 和 LR-PG 的细胞数目高于 LR-MS 和 LR-JJ (图 4B)，与 4 株罗伊氏乳杆菌单独培养条件下的生长速率和代时相似。体外混合培养排除了无菌猪的肠道环境对微生物生长的影响，表明 4 株菌体外混合培养的结果与单菌的生长特性相关，而 4 株罗伊氏乳杆菌之间不存在抑制性相互作用。因此推测 LR-MS 在无菌猪肠道中具有的稳定优势可能与菌株自身有关，无菌猪的肠道环境有可能对 4 株不同来源的罗伊氏乳杆菌具有较大的影响作用，更倾向于选择小鼠来源的罗伊氏乳杆菌定殖，其原因需要进一步探究。

2.4 不同来源的香坊肠球菌在无菌猪肠道内定殖和体外混合培养的生长情况

在 3 株香坊肠球菌中(图 5A)，在无菌猪的回肠、盲肠和直肠的 3 个肠段中，EX-MS 定殖的细胞数目显著高于 EX-PG 和 EX-MK ($P < 0.05$)；

在结肠中，EX-MS 定殖的细胞数目高于 EX-PG 和 EX-MK，但不存在显著差异。没有观察到藏猪来源的香坊肠球菌在无菌猪体内占据优势的现象，而是小鼠来源的菌株在无菌猪体内占据定殖优势。

将 3 株香坊肠球菌体外等比例混合培养 72 h，不同时间点取样测定 3 株香坊肠球菌的细胞数目，荧光定量结果显示(图 5B)，EX-MS 的细胞数目显著高于 EX-PG 和 EX-MK ($P < 0.05$)，与 3 株香坊肠球菌在无菌猪体内的定殖情况相似。3 株香坊肠球菌体外混合培养排除了无菌猪的肠道环境对微生物生长的影响，但出现了无菌猪体内定殖和体外混合培养条件下 EX-MS 的细胞数目显著高于 EX-PG 和 EX-MK 的现象，因此推测这种现象可能表明 3 株菌香坊肠球菌之间存在相互抑制作用关系，且 EX-MS 产生抑制性代谢物质抑制细菌生长。

将 7 株菌按照 1:1 等比例体外混合培养时，在不同培养时间点中的细胞数目与 3 株香坊肠球菌和 4 株罗伊氏乳杆菌单独混合培养时相似(图 5C)。上述无菌猪体内定殖 qPCR 检测结果表明，藏猪来源的肠道微生物在无菌猪肠道定

殖实验中不占据优势地位,小鼠来源的香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌反而在无菌猪肠道定殖实验中占据优势地位。不同宿主来源的香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌混合定殖无菌猪没有选择偏好性。这7株菌在无菌猪体内定殖效率可能与这7株菌本身的特性更具有关联性。

2.5 细菌相互作用

我们进一步研究了罗伊氏乳杆菌与香坊肠球菌在固体平板上的相互作用。结果表明,在物种水平上,未发现罗伊氏乳杆菌(4株)对香坊肠球

菌(3株)存在相互竞争和抑制的情况(图 6A-1 和 A-2),与液体培养的结果一致。在菌株水平上,也未观察到4株罗伊氏乳杆菌有相互作用的情况(图 6B-1 和 B-2),如 LR-PG 对 LR-MS 和 LR-MK 无抑制作用,其余结果相同(省略)。但发现了香坊肠球菌不同菌株之间具有相互作用情况,观察到菌株 EX-MS 在以菌株 EX-MK (图 6C-1)和 EX-PG (图 6D-1)为指示菌时具有抑菌圈,这表明菌株 EX-MS 对菌株 EX-MK 和 EX-PG 有抑制作用。而 EX-MK (图 6C-2)和

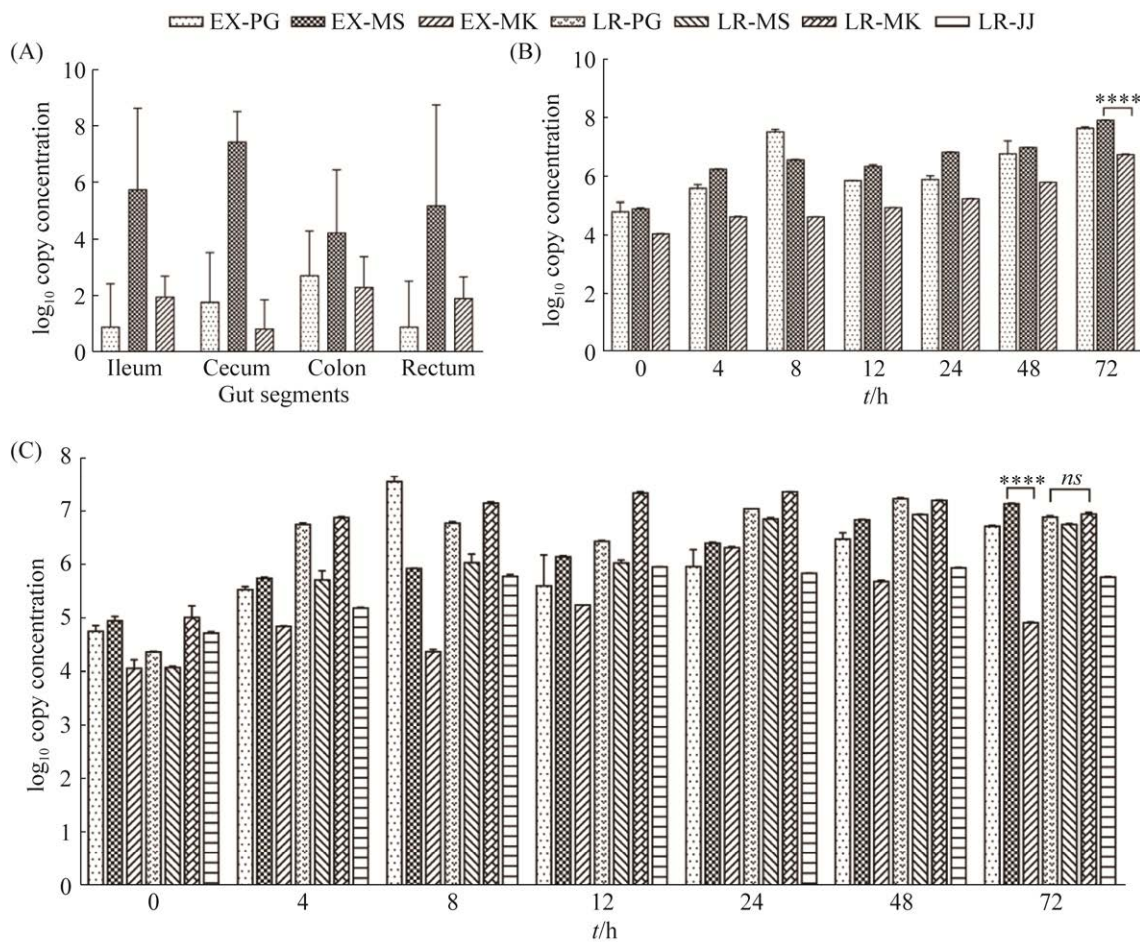


图 5 不同来源的香坊肠球菌在体内外条件下的定量检测

Figure 5 The number of colonization cells of *E. xiangfangensis* in vivo and in vitro. A: 3 strains of *E. xiangfangensis* in germ-free pig four intestinal tracts; B: 3 strains of *E. xiangfangensis* mixture culturing in vitro; C: 7 strains mixture culturing in vitro. ****: $P < 0.0001$, ns: $P \geq 0.05$; error bars indicate standard deviations.

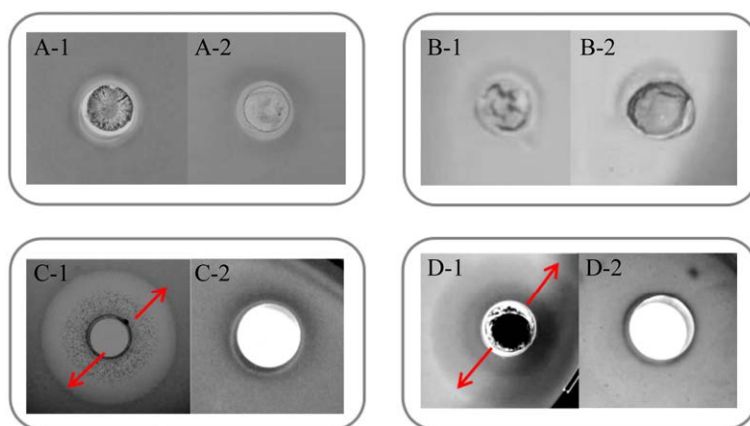


图 6 香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌不同菌株间的相互作用

Figure 6 Interactions between 7 strains of *E. xiangfangensis* and *L. reuteri*. A-1: *L. reuteri* had no inhibitory effect on *E. xiangfangensis*, A-2: *E. xiangfangensis* had no inhibitory effect on *L. reuteri*; B-1: LR-PG had no inhibitory effect on LR-MS, B-2: LR-PG had no inhibitory effect on LR-MK; C-1: EX-MS inhibited EX-MK, C-2: EX-MK had no inhibitory effect on EX-MS; D-1: EX-MS inhibited EX-PG, D-2: EX-PG had no inhibitory effect on EX-ES. Arrows indicate the range of inhibitory zones.

EX-PG (图 6D-2)在以菌株 EX-MS 为指示菌时没有抑菌圈,表明 EX-MK 和 EX-PG 对 EX-MS 没有抑制作用。

3 讨论

罗伊氏乳杆菌和香坊肠球菌是广泛存在于多种脊椎动物肠道中的革兰氏阳性细菌^[37-38]。罗伊氏乳杆菌随多种脊椎动物共同进化,分化为具有宿主特异性的不同系统发育谱系^[18],其谱系特异性基因组差异也反映了不同宿主肠道中的生态位特征^[39]。来自共同或相关宿主的罗伊氏乳杆菌可以有效定殖在该类宿主中,这一现象已在无乳酸杆菌小鼠模型中得到验证,因为只有啮齿动物来源的罗伊氏乳杆菌能有效地在小鼠中定殖^[17]。但罗伊氏乳杆菌与其他脊椎动物共同进化的机制尚未确定^[14],猪来源的罗伊氏乳杆菌在猪等宿主中的定殖特异性存在与否依然有待研究。本研究将从藏猪、食蟹猴和小鼠的肠道内容物以及发酵食品中分离得到的

4 株罗伊氏乳杆菌和 3 株香坊肠球菌定殖无菌猪,发现藏猪分离源罗伊氏乳杆菌和香坊肠球菌在无菌巴马香猪肠道中没有定殖优势,而是小鼠来源的罗伊氏乳杆菌和香坊肠球菌具有定殖优势,定殖的细胞数目显著高于其余菌株。鉴于藏猪和巴马香猪亲缘关系较远,本研究结果难以判断肠道菌株来源与宿主定殖特异性的关系。

由于体外混合培养消除了无菌猪的肠道环境对微生物生长的影响,且 4 株罗伊氏乳杆菌之间不存在抑制性相互作用,这表明可能小鼠来源的罗伊氏乳杆菌的独特特性和宿主环境相互作用使得其在无菌猪肠道中具有定殖优势。3 株香坊肠球菌之间存在抑制性相互作用,小鼠来源的香坊肠球菌可以显著抑制藏猪和食蟹猴来源菌株的生长,且在无菌猪体内和体外混合培养 2 种条件下表型一致,这表明小鼠来源的香坊肠球菌 EX-MS 极有可能产生抑制性代谢物质,抑制 EX-PG 和 EX-MK 的生长,帮助 EX-MS

在无菌猪体内占据更多的生态位, 从而拥有显著的定殖优势。

小鼠来源的罗伊氏乳杆菌的菌株特性可能在于与其他谱系分支的罗伊氏乳杆菌相比, 啮齿类动物谱系菌株的遗传异质性较高^[18], 相比于猪、家禽和人类群体的基因变异和重组的发生概率要高得多。啮齿类动物特有的罗伊氏乳杆菌富含 1 个表达上皮粘附因子、特异性蛋白质转运、细胞聚集、环境感知和细胞裂解的基因集, 这个基因集有助于罗伊氏乳杆菌形成生物膜和在宿主特异性定殖, 并且这个基因集已在小鼠肠道环境中被证明具有宿主特异性的生态学意义^[40]。其中特别是富含丝氨酸的重复蛋白(*serine-rich repeat protein*, *SRRP*)表面粘附蛋白与专用运输系统(*SecA2-SecY2*)途径有助于啮齿类动物谱系罗伊氏乳杆菌形成生物膜和在小鼠前胃中的定殖, 这可能是赋予啮齿类动物来源的罗伊氏乳杆菌在小鼠肠道内具有宿主定殖特异性的原因之一^[40-41]。因此在本研究中, 小鼠来源的罗伊氏乳杆菌可能具有这个特异的基因集, 所以相较于藏猪、食蟹猴和发酵食品来源的罗伊氏乳杆菌具有较好的黏附能力, 即使不是在相关来源的宿主环境中, 也更容易定殖。其次, 根据罗伊氏乳杆菌分离菌株的种群结构和表型特征可知, 宿主环境是影响罗伊氏乳杆菌分化的主要因素。虽然我们还不知道驱动菌株多样化的确切生态因素, 但种群遗传结构表明, 宿主之间存在显著差异且宿主环境对特异性定殖起到很大作用^[37]。无菌猪的肠道环境可能具有较大影响, 更倾向于选择小鼠来源的罗伊氏乳杆菌定殖, 促进其在肠道内占据了优势生态位。

而肠球菌属的微生物基本上都会表达由核糖体合成的抗菌肽或细菌素^[42], 抑制种属相近细菌的生长。细菌素的种类较多, 可以依据初

级结构间的差异、分子量大小、是否具有热稳定性以及是否具有遗传特性等^[43], 分为 3 类细菌素: 羊毛硫菌素(如 *nisin*)、非羊毛硫菌素(如 *pediocin* PA-1)和高分子量肽(如 *helveticins* J)。这些细菌素可以杀死或抑制争夺同一生态位或营养的细菌, 这就使得许多细菌素的抑菌谱很窄, 因为细菌素可能对稀缺相同营养的且亲缘关系密切的细菌最有效^[44]。小鼠来源的香坊肠球菌在无菌猪体内和体外混合培养 2 种条件下可以显著抑制藏猪和食蟹猴来源菌株的生长, 且表型一致。因此推测小鼠来源的香坊肠球菌 EX-MS 可能产生某种细菌素, 抑制同种肠球菌 EX-PG 和 EX-MK 的生长, 帮助 EX-MS 在无菌猪体内争夺更多的生态位和营养物质, 使得 EX-MS 在无菌猪肠道中具有显著的定殖优势。

有研究通过外源性菌群分段移植证明细菌沿胃肠道定殖的空间异质性, 即来自一个特定位置的菌群选择性定殖于其同源的肠道区域^[45]。香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无菌猪大肠(盲肠、结肠和直肠)中定殖的细胞数目分别高于其在小肠(回肠)中定殖的细胞数目。因为这 7 株菌大都分离于肠道内容物, 属于大肠微生物, 推测它们更倾向于在大肠中定殖, 所以这 2 种菌在大肠中定殖的细胞数目高于小肠肠段。罗伊氏乳杆菌和许多其他乳酸菌是近端胃肠道的主要定殖菌^[41], 猪的胃食管末端的 pH 值相对较低, 而向幽门方向的 pH 值较高, 所以形成了沿着胃肠道的纵向 pH 梯度^[46]。啮齿类动物来源的罗伊氏乳杆菌表面粘附蛋白 *SRRP* 在低 pH 条件下易与膳食成分结合, 而在中性条件 pH 条件下可与宿主上皮细胞结合, 这可能有利于罗伊氏乳杆菌在胃肠道中定殖的持久性^[41]。微生物发酵主要发生在猪盲肠、结肠及直肠部位, 乳酸菌能发酵碳水化合物, 产生有机酸, 从而降低肠道 pH 值^[47], 促进罗伊氏乳杆菌与膳食成

分结合。在本研究中,罗伊氏乳杆菌在大肠中定殖的细胞数目略高于小肠(差异不显著),有可能是实验选用的大肠肠段中拥有较多的肠道内容物,结合的罗伊氏乳杆菌可能也较多,所以这可能促使更多的罗伊氏乳杆菌在大肠中定殖。

小鼠来源的罗伊氏乳杆菌因特有的促进生物膜黏附和宿主特异性定殖的基因集,小鼠来源的香坊肠球菌因可能表达具有抑菌作用的细菌素,这2株菌从而在无菌猪肠道定殖实验中占据优势地位。而与无菌猪具有相关来源的罗伊氏乳杆菌和香坊肠球菌在无菌猪肠道定殖实验中没有占据优势地位,表明这7株菌在无菌猪体内定殖效率可能与菌株本身的特性更具有关联性。宿主环境也是影响肠道微生物分化的主要因素,但驱动菌株多样化的确切生态因素还需要进一步研究。此外,EX-MS、EX-PG和EX-MK是不同来源的同一种菌株,其基因组相似性很高,但EX-MS却能抑制EX-MK和EX-PG的生长,据此推测EX-MS可能具有和EX-PG与EX-MK不同的抑菌抗性的独特基因,产生了具有抑菌活性的物质,这需要通过基因组分析进一步确定其特异基因,才能进一步探究其独特的抑菌作用机制。

4 结论

本研究基于实验室从藏猪、小鼠和食蟹猴粪便和发酵食品分离得到的3株香坊肠球菌和4株罗伊氏乳杆菌,通过在无菌猪体内定殖和体外混合培养,发现在不同来源的香坊肠球菌和罗伊氏乳杆菌在无菌猪的肠道定殖中,具有促生物膜黏附基因的小鼠来源的罗伊氏乳杆菌和具有抑菌特性的小鼠来源香坊肠球菌具有定殖优势,表明菌株本身的特性可能是影响定殖效率的决定因素。本研究通过7株菌在无菌猪体内和体外混合培养实验的互补,为宿主与微

生物相互作用的机制提供了新的信息,并为香坊肠球菌作为益生菌在宿主中的应用提供了研究基础。

参考文献

- [1] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*, 2007, 449(7164): 804–810.
- [2] De Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 2022, 71(5): 1020–1032.
- [3] Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 2012, 489(7415): 231–241.
- [4] Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 2018, 67(9): 1716–1725.
- [5] Leonard MM, Valitutti F, Karathia H, Pujolassos M, Kenyon V, Fanelli B, Troisi J, Subramanian P, Camhi S, Colucci A, Serena G, Cucchiara S, Trovato CM, Malamisura B, Francavilla R, Elli L, Hasan NA, Zomorodi AR, Colwell R, Fasano A, CD-GEMM Team. Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *PNAS*, 2021, 118(29): e2020322118.
- [6] Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell*, 2018, 33(6): 954–964.
- [7] Trebicka J, Macnaughtan J, Schnabl B, Shawcross DL, Bajaj JS. The microbiota in cirrhosis and its role in hepatic decompensation. *Journal of Hepatology*, 2021, 75(Suppl 1): S67–S81.
- [8] Pfeiler EA, Klaenhammer TR. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(12): 546–553.
- [9] Ben Braïek O, Smaoui S. *Enterococci*: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International*, 2019, 2019: 5938210.
- [10] Drago L, Cioffi L, Giuliano M, Pane M, Amoroso A, Schiavetti I, Reid G, Ciprandi G, Group PS. The probiotics in pediatric asthma management (PROPAM) study in the primary care setting: a randomized, controlled, double-blind trial with *Ligilactobacillus salivarius* LS01 (DSM 22775) and *Bifidobacterium breve* B632 (DSM 24706). *Journal of Immunology Research*, 2022, 2022: 3837418.

- [11] Liu G, Cao SG, Liu XD, Li ZQ, Tian YL, Zhang XQ, Zhong H, Zhou YB. Effect of perioperative probiotic supplements on postoperative short-term outcomes in gastric cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy: a double-blind, randomized controlled trial. *Nutrition: Burbank, Los Angeles County, Calif*, 2022, 96: 111574.
- [12] Wang J, Xu H, Liu S, Song B, Liu H, Li F, Deng S, Wang G, Zeng H, Zeng X, Xu D, Zhang B, Xin B. Toyoncin, a novel leaderless bacteriocin that is produced by *Bacillus toyonensis* XIN-YC13 and specifically targets *B. cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e0018521.
- [13] 王阶平, 刘波, 刘欣, 刘芸. 乳酸菌的系统分类概况. 生物资源, 2019, 41(6): 471–485.
Wang JP, Liu B, Liu X, Liu Y. Taxonomy of lactic acid bacteria. *Biotic Resources*, 2019, 41(6): 471–485. (in Chinese)
- [14] Duar RM, Frese SA, Lin XB, Fernando SC, Burkey TE, Tasseva G, Peterson DA, Blom J, Wenzel CQ, Szymanski CM, Walter J. Experimental evaluation of host adaptation of *Lactobacillus reuteri* to different vertebrate species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(12): e00132-17.
- [15] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(1): 20–32.
- [16] Lasaro MA, Salinger N, Zhang J, Wang YT, Zhong ZT, Goulian M, Zhu J. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 246–251.
- [17] Frese SA, Benson AK, Tannock GW, Loach DM, Kim J, Zhang M, Oh PL, Heng NC, Patil PB, Juge N, Mackenzie DA, Pearson BM, Lapidus A, Dalin E, Tice H, Goltsman E, Land M, Hauser L, Ivanova N, Kyrpides NC, Walter J. The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genetics*, 2011, 7(2): e1001314.
- [18] Oh PL, Benson AK, Peterson DA, Patil PB, Moriyama EN, Roos S, Walter J. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *The ISME Journal*, 2010, 4(3): 377–387.
- [19] Matuszewska M, Murray GGR, Harrison EM, Holmes MA, Weinert LA. The evolutionary genomics of host specificity in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(6): 465–477.
- [20] Hird SM, Sánchez C, Carstens BC, Brumfield RT. Comparative gut microbiota of 59 neotropical bird species. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1403.
- [21] Reveillaud J, Maignien L, Murat Eren A, Huber JA, Apprill A, Sogin ML, Vanreusel A. Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *The ISME Journal*, 2014, 8(6): 1198–1209.
- [22] Mallott EK, Amato KR. Host specificity of the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(10): 639–653.
- [23] Jackrel SL, Yang JW, Schmidt KC, Denef VJ. Host specificity of microbiome assembly and its fitness effects in phytoplankton. *The ISME Journal*, 2021, 15(3): 774–788.
- [24] Zhai QX, Feng SS, Arjan N, Chen W. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(19): 3227–3236.
- [25] Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: its role in virulence and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 960.
- [26] Ducarmon QR, Zwitter RD, Hornung BVH, Van Schaik W, Young VB, Kuijper EJ. Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2019, 83(3): e00007-19.
- [27] Repaske DR, Adler J. Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellents. *Journal of Bacteriology*, 1981, 145(3): 1196–1208.
- [28] Roe AJ, O'Byrne C, McLaggan D, Booth IR. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology: Reading, England*, 2002, 148(Pt 7): 2215–2222.
- [29] Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, Yokota A. Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(5): 1979–1986.
- [30] Sannasiddappa TH, Lund PA, Clarke SR. *In vitro* antibacterial activity of unconjugated and conjugated bile salts on *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1581.

- [31] Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CGM. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *PNAS*, 2007, 104(18): 7617–7621.
- [32] 范佳晨, 赵云龙, 徐丹, 徐凯, 徐再, 赵维达. 乳酸菌分离用 MRS 培养基, 其制备方法及其分离和纯化方法. 中国: CN107488604A. 20171219.
- [33] Liu C, Du MX, Abuduaini R, Yu HY, Li DH, Wang YJ, Zhou N, Jiang MZ, Niu PX, Han SS, Chen HH, Shi WY, Wu L, Xin YH, Ma J, Zhou Y, Jiang CY, Liu HW, Liu SJ. Enlightening the taxonomy darkness of human gut microbiomes with a cultured biobank. *Microbiome*, 2021, 9(1): 119.
- [34] Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 2015, 31(22): 3691–3693.
- [35] 王宇, 赵洁, 孙志宏, 孙天松, 张和平. 基于比较基因组学分析嗜热链球菌的遗传多样性和防御系统. *微生物学报*, 2020, 60(5): 924–938.
- Wang Y, Zhao J, Sun ZH, Sun TS, Zhang HP. Comparative genomics of genetic diversity and defense system in *Streptococcus thermophilus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(5): 924–938. (in Chinese)
- [36] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [37] Walter J, Britton RA, Roos S. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *PNAS*, 2011, 108(Suppl 1): 4645–4652.
- [38] Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
- [39] Wegmann U, MacKenzie DA, Zheng J, Goesmann A, Roos S, Swarbrick D, Walter J, Crossman LC, Juge N. The pan-genome of *Lactobacillus reuteri* strains originating from the pig gastrointestinal tract. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1023.
- [40] Frese SA, Mackenzie DA, Peterson DA, Schmaltz R, Fangman T, Zhou Y, Zhang C, Benson AK, Cody LA, Mulholland F, Juge N, Walter J. Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont. *PLoS Genetics*, 2013, 9(12): e1004057.
- [41] Sequeira S, Kavanaugh D, MacKenzie DA, Šuligoj T, Walpole S, Leclaire C, Gunning AP, Latousakis D, Willats WGT, Angulo J, Dong C, Juge N. Structural basis for the role of serine-rich repeat proteins from *Lactobacillus reuteri* in gut microbe-host interactions. *PNAS*, 2018, 115(12): E2706–E2715.
- [42] O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*, 2015, 2: 51–57.
- [43] Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1/2/3): 39–85.
- [44] Parada JL, Caron CR, Medeiros A, Socol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology Technology*, 2007, 50(3): 512–542.
- [45] Li N, Zuo B, Huang SM, Zeng BH, Han DD, Li TT, Liu T, Wu ZH, Wei H, Zhao JC, Wang JJ. Spatial heterogeneity of bacterial colonization across different gut segments following inter-species microbiota transplantation. *Microbiome*, 2020, 8(1): 161.
- [46] Corner AH. Pathology of domestic animals. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 41(3): 91–92.
- [47] 张依, 王攀, 曹琚, 田耀耀, 闫轶洁, 王安如, 龚利敏. 约氏乳杆菌菌粉对断奶仔猪生产性能、免疫功能、肠道 pH 值及有机酸含量的影响. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(23): 64–68.
- Zhang Y, Wang P, Cao J, Tian YY, Yan YJ, Wang AR, Gong LM. Effects of *Lactobacillus johnsonii* on growth performance, immune function, intestinal pH and organic acid concentration in weaned pigs. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(23): 64–68. (in Chinese)