



# 不同地区人初乳中细菌多样性研究

张蕾, 赵志鑫, 赵飞燕, 孙志宏\*

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古自治区  
乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

张蕾, 赵志鑫, 赵飞燕, 孙志宏. 不同地区人初乳中细菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3173-3186.  
ZHANG Lei, ZHAO Zhixin, ZHAO Feiyan, SUN Zhihong. Bacterial diversity in human colostrum samples from different regions[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3173-3186.

**摘要:** 初乳中的微生物在婴儿生长发育过程中具有多种有益作用。【目的】本研究分析了影响初乳微生物组成的多个因素, 为后续探讨人初乳菌群的相关研究提供新思路。【方法】通过 PacBio SMRT 测序技术对 37 份采集自湖北恩施地区人初乳样本中细菌 16S rRNA 基因序列进行测序, 并结合公共数据库中已公布的来自内蒙古、海南、广西、河北、黑龙江和江苏等地区的 62 份人初乳中微生物组数据, 探究不同地区人初乳中菌群组成与结构特点。【结果】99 份人初乳样本共注释到 345 个属, 937 个种, 其中乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、*Ralstonia insidiosa*、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*)等是人初乳中的优势菌种。基于 jaccard 距离的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)显示, 不同地区之间的人初乳菌群呈现显著分离趋势。同时比较影响初乳微生物组成因素的  $R^2$  大小发现: 地区>婴儿喂养方式>妊娠期健康状态>分娩方式>胎次。【结论】本研究通过比较多个因素对人初乳中细菌菌群的影响, 发现不同地区是影响人初乳微生物组成的主要因素。

**关键词:** 初乳; 地区; 16S rRNA 基因; PacBio SMRT 测序; 细菌多样性

资助项目: 内蒙古自治区科技计划(2022YFSJ0017)

This work was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region Science and Technology Plan Project (2022YFSJ0017).

\*Corresponding author. E-mail: sunzhihong78@163.com

Received: 2022-12-02; Accepted: 2023-02-21; Published online: 2023-02-24

# Bacterial diversity in human colostrum samples from different regions

ZHANG Lei, ZHAO Zhixin, ZHAO Feiyan, SUN Zhihong\*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

**Abstract:** The microorganisms in colostrum have a variety of beneficial effects on the growth and development of infants. **[Objective]** We analyzed several factors affecting the flora composition of colostrum, aiming to provide a new idea for the follow-up study of human colostrum flora. **[Methods]** We used PacBio SMRT sequencing platform to complete the bacterial 16S rRNA gene sequencing of 37 colostrum samples collected from Enshi, Hubei Province. We then used the sequence data and the published data of 62 human colostrum samples from other regions in the public database to explore the composition and structure of bacterial flora in the human colostrum samples from different regions. **[Results]** There were 345 genera and 937 species in 99 colostrum samples. *Lactococcus lactis*, *Ralstonia insidiosa*, and *Gemella haemolysans* were the dominant species in human colostrum. The principal coordinate analysis (PCoA) based on jaccard distance showed a significant separation trend of flora in human colostrum samples between different regions. The  $R^2$  of the factors affecting the composition of colostrum flora followed the trend of region>infant feeding modes>maternal health during pregnancy>mode of delivery>parity. **[Conclusion]** Region was the main factor affecting the flora composition of human colostrum.

**Keywords:** colostrums; regions; 16S rRNA gene; PacBio SMRT sequencing; bacterial diversity

母乳是婴儿成长最自然、最安全和最完整的天然食物，并且母乳中的微生物还有助于孕妇抵抗妊娠期炎症等疾病<sup>[1]</sup>。母乳共分为 3 个阶段：初乳、过渡乳与成熟乳，母亲分娩后 5 d 内产下的母乳叫作初乳<sup>[2]</sup>。相比其他阶段的母乳，初乳中含有更加丰富的营养物质，较少的脂肪和乳糖有助于刚出生的婴儿进行消化吸收，大量的免疫球蛋白 A (immunoglobulin A) 可以降低炎症的发生率，是新生儿的第一剂“疫苗”<sup>[3-4]</sup>。此外，徐燕荣等<sup>[5]</sup>研究显示母亲初乳是刚出生的婴儿肠道内菌群的主要来源之一。

母乳中微生物受众多因素影响，例如母亲的分娩方式、对婴儿的喂养方式和母亲生活的

地理位置等<sup>[6-7]</sup>。Kumar 等<sup>[8]</sup>发现相较于顺产分娩的母亲，剖宫产分娩的母亲母乳中含有更高水平的变形菌门(*Proteobacteria*)。刘婉欣<sup>[9]</sup>通过研究发现，相较于单纯用母乳喂养婴儿与用母乳和奶粉交替喂养婴儿这两种喂养方式，单纯用奶粉喂养婴儿会促使母乳中有害菌增多。Wan 等<sup>[2]</sup>收集了来自北京、杭州和兰州的 117 名产妇的母乳，发现来自不同地区的人母乳菌群结构有显著的分离趋势，且母乳中的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)均存在显著差异。

基于上述，本实验利用 PacBio SMRT 测序

技术解析了 37 份来自恩施地区的人初乳样本数据,并结合数据库中已公开的 62 份其他地区人初乳 16S rRNA 数据,比较不同地区人初乳中的微生物组成,同时讨论婴儿的喂养方式、母亲的分娩方式、母亲分娩前健康状态和胎次对人初乳菌群的影响程度,探究影响人类初乳菌群的主要因素,为日后对人初乳的研究提供重要依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 试验对象

本研究中的 37 份初乳样本均采自中国湖北省恩施市,具体志愿者信息见表 1。其中,母亲妊娠期的健康状态分为健康组和疾病组(健康组母亲妊娠期不患有任何疾病,疾病组母亲妊娠期患有高血压或子宫肌瘤);对婴儿的喂养方式分为单纯用母乳喂养(表中为母乳喂养)、单纯用奶粉喂养(表中为奶粉喂养)、母乳奶粉交替喂养(表中为混合喂养)。本研究人体样本的使用得到了内蒙古农业大学伦理委员会的批准,伦理审批号为: NO.KY (2020011),所有志愿者均同意参与本次试验,具体信息见表 1。

#### 1.1.2 试剂

OMEGA EZNA<sup>®</sup>Soil 微生物宏基因组 DNA 提取试剂盒,OMEGA 公司;KAPA HiFi HotStart ReadyMIX PCR 体系试剂, KAPA 生物系统公司; 5×Tris-硼酸电泳缓冲液(TBE, Tris 碱 54 g, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 3.72 g、硼酸 27.5 g,定容至 1 L, pH 8.0),天津基准化学试剂公司; 0.8%的琼脂糖胶(0.56 g 琼脂糖溶于 70 mL 0.5×TBE 缓冲液),天津基准化学试剂公司; SMRT 建库试剂盒(DNA Template Prep Kit 1.0),太平洋生物科学公司; PacBio SMRT 测序试剂盒(DNA/Polymerase Binding Kit P6 v2 和 DNA Sequencing Bundle

4.0),太平洋生物科学公司。

### 1.2 仪器和设备

PacBio RS II三代测序仪, Pacific Bio-sciences 公司; HA-300MIII1 高压蒸汽灭菌锅, HIRAYAMA 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; ND-1 000 紫外分光光度计, NanoDrop 公司; GDS-8 000 凝胶成像仪, uvp 公司; DYY-6D 电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 样品采集及保存

志愿者产妇戴好无菌手套,并用无菌生理盐水浸泡的纱布对产妇的乳头及乳晕进行擦拭消毒,手动采集初乳,为排除人乳腺管中细菌的干扰,舍弃初始的 500 μL 初乳,取 10–15 mL 至无酶无菌采样管中,即刻放入干冰盒中,后放入–80 °C冰箱冷冻保存,样品置于干冰转运箱中运送至内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室进行 DNA 提取及测序。

#### 1.3.1 母乳样品中细菌 DNA 提取

本实验取 600 μL 初乳样品,采用 OMEGA EZNA<sup>®</sup>Soil 试剂盒,依照说明书的提取步骤提取样品中细菌 DNA 之后,将提取的 DNA 选用 0.8%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检验 DNA 的完整度、纯度以及浓度,将符合后续试验要求的 DNA 置于–20 °C冰箱备用。

#### 1.3.2 母乳样品中细菌 16S rRNA 基因序列全长扩增,建库及测序

本实验将 16S rRNA 基因序列全长作为目的片段,用带有识别标签(barcode)的引物对每个样本进行 PCR 扩增,扩增引物为: 27F (5'-AGAGT TTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-ACCT TGTTACGACTT-3')。将得到的 PCR 产物继续用 AMPure Beads 纯化后得到更高质量的 DNA 片段,将符合条件的 DNA 进行建库,用 PacBio RS II测序仪将建好的文库进行测序。使用 RS\_ReadsOfinsert.1 对原始序列进行质量控制,

表 1 37 名志愿者信息

Table 1 The information of 37 subjects

Sample No.	Mode of delivery	Infant feeding modes	Parity	Maternal health during pregnancy	Nation
EF1	Cesarean section	Mixed feeding	First child	Healthy	Tujia nationality
EF2	Cesarean section	Mixed feeding	Second child	Healthy	Tujia nationality
EF6	Cesarean section	Mixed feeding	First child	Healthy	Tujia nationality
EF9	Natural childbirth	Bottle feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EF10	Natural childbirth	Bottle feeding	First child	Diseased	Tujia nationality
EF11	Natural childbirth	Bottle feeding	Second child	Diseased	Han nationality
EF15	Natural childbirth	Bottle feeding	First child	Diseased	Han nationality
EF17	Natural childbirth	Mixed feeding	Second child	Healthy	Tujia nationality
EF19	Natural childbirth	Bottle feeding	First child	Diseased	Tujia nationality
REF4	Cesarean section	Mixed feeding	First child	Diseased	Han nationality
REF5	Natural childbirth	Mixed feeding	Second child	Healthy	Han nationality
REF13	Cesarean section	Mixed feeding	First child	Healthy	Tujia nationality
REF14	Natural childbirth	Mixed feeding	Second child	Healthy	Tujia nationality
EY1	Natural childbirth	Mixed feeding	First child	Healthy	Tujia nationality
EY2	Cesarean section	Breast feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY3	Cesarean section	Breast feeding	First child	Diseased	Tujia nationality
EY4	Natural childbirth	Breast feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY5	Natural childbirth	Breast feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY7	Natural childbirth	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY10	Cesarean section	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY11	Natural childbirth	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY15	Cesarean section	Breast feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY16	Natural childbirth	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY17	Cesarean section	Mixed feeding	First child	Diseased	Han nationality
EY18	Natural childbirth	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY19	Natural childbirth	Breast feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY20	Cesarean section	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY22	Natural childbirth	Mixed feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY23	Natural childbirth	Breast feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY24	Cesarean section	Mixed feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY25	Natural childbirth	Breast feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY27	Natural childbirth	Mixed feeding	First child	Healthy	Tujia nationality
EY28	Cesarean section	Mixed feeding	First child	Healthy	Han nationality
EY29	Cesarean section	Mixed feeding	Second child	Diseased	Tujia nationality
EY30	Cesarean section	Breast feeding	Second child	Diseased	Han nationality
EY31	Cesarean section	Mixed feeding	Second child	Healthy	Han nationality
EY40	Cesarean section	Breast feeding	Second child	Healthy	Tujia nationality

质控条件参照徐海燕等<sup>[10]</sup>的方法: (1) 同一片段循环测序次数 $\geq 5$ ; (2) 预测精确度 $\geq 90\%$ ; (3) 过滤小于 1 400 bp, 大于 1 800 bp 的序列。

### 1.3.3 生物信息学分析

应用 QIIME 2 平台将 FASTQ 格式的数据进行质量控制, 从经过 DADA2 质控后得到的扩增子序列(amplic sequences variant, ASV)表中挑选出 ASV 代表序列, 与 Sliva 参考数据库(Sliva 132)进行同源性比对, 确定细菌的分类学地位并注释到种水平<sup>[11]</sup>。计算  $\alpha$  多样性, 包括超 1 指数(Chao1 index)、发现物种数(observed species index)、Shannon 指数(Shannon index)和辛普森指数(Simpson index)。基于优势菌属、差异菌属、冗余分析(redundancy analysis, RDA)等相关性分析, 比较不同地区人初乳中的菌群组成。利用置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)比较不同因素对人初乳细菌多样性的影响程度。

为了比较不同地区人初乳菌群的差异, 从 MG-RAST 下载本团队及其新疆石河子大学之前利用 Illumina miseq 和 PacBio SMRT 测序技术对内蒙古、海南、广西、河北、黑龙江和江苏地区的人初乳测序结果, 下载序列分别为: 14 份内蒙古人初乳样本<sup>[12]</sup>、19 份海南人初乳样本<sup>[13]</sup>、7 份广西人初乳样本、7 份河北人初乳样本、7 份黑龙江人初乳样本、7 份江苏人初乳样本<sup>[14]</sup>(MG-RAST: mgp79730; NCBI-PRJNA845888, SRR19548162-SRR19548258; MG-RAST: No. 4703559.3, 4703561.3, 4703619.3)。

### 1.3.4 数据处理

采用 R 软件(V3.3.2)、STAMP (2.1.3)、Adobe Illustrator 对 QIIME 2 产生的结果进行绘制及其整理。

## 1.4 核酸序列登录号

本研究所有序列数据已提交 NCBI 数据库,

序列号为 NCBI-PRJNA906706。

## 2 结果与分析

### 2.1 初乳中微生物组成分析

基于 Sliva 参考数据库, 将 37 份恩施地区人初乳样本数据结合数据库中下载的 62 份其他地区的人初乳序列进行注释, 共鉴定出 357 个属。初乳中相对丰度大于 1% 的菌属分别是葡萄球菌属(21.53%)、链球菌属(19.96%)、不动杆菌属(10.87%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 3.83%)、肠杆菌属(*Enterobacter*, 2.91%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 2.48%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 2.10%)、乳杆菌属(1.62%)、肠球菌属(*Enterococcus*, 1.38%)、角质杆菌属(*Cutibacterium*, 1.25%)、代尔夫特菌属(*Delftia*, 1.25%)、青枯菌属(*Ralstonia*, 1.19%)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 1.10%)。

种水平上, 恩施、内蒙古、海南 3 个地区的 70 份人初乳样本中共注释出 916 个种, 相对丰度大于 1% 的菌种分别是乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, 6.13%)、*Ralstonia insidiosa* (5.78%)、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*, 5.31%)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*, 4.98%)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*, 4.22%)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*, 3.53%)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, 3.10%)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, 2.38%)、琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*, 2.22%)、*Thermus scotoductus* (1.52%)、溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*, 1.36%)、*Cupriavidus gilardii* (1.03%)。进一步分析相同地区的人初乳样本后发现, 在内蒙古地区 14 份人初乳样本中, 相对丰度大于 1% 的菌种共有 12 个, 其中琼氏不动杆菌平均相对含量高达 9.10%、其次为唾液链球菌(8.92%)、溶血孪生球菌(6.21%)等; 在恩施地区 37 份人初乳样本中, 相对丰度大于 1% 的菌种共有 16 个,

其中乳酸乳球菌平均相对含量高达 11.11%，其次为德氏乳杆菌(8.78%)、溶血孪生球菌(4.81%)等；在海南地区 19 份人初乳样本中，相对丰度大于 1%的菌种共有 15 个，其中 *Ralstonia insidiosa* 平均相对含量高达 21.61%，其次为人葡萄球菌(9.00%)、表皮葡萄球菌(8.42%)等(图 1)。

## 2.2 不同地区人初乳中的细菌多样性分析

$\alpha$  多样性是评估样本中菌群丰富度和多样性的重要指标。为了评估不同地区人初乳样本中微生物的多样性，本研究对 99 份人初乳样本的超 1 指数、发现物种数、香农指数和辛普森指数进行比较，结果如表 2 所示，不同地区的人初乳样本的  $\alpha$  多样性均存在显著差异( $P < 0.05$ )。

## 2.3 不同地区人初乳中菌群群落结构及其差异性分析

采用多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)的方式评估地域对人初乳菌群结构的影响,基于 jaccard 距离的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)显示,恩施、内蒙古与海南、江苏、广西、河北、黑龙江地区的人初乳菌群呈现显著分离趋势。通过不同地区人初乳菌群之间的差异,根据  $P$  值大小绘制箱型图,凡具有不同标记字母即为差异显著( $P < 0.05$ ),反之则为差异不显著。根据 PC1 维度将内蒙古、恩施、海南单独分成 3 组,黑龙江、河北、江苏分为 1 组。考虑到

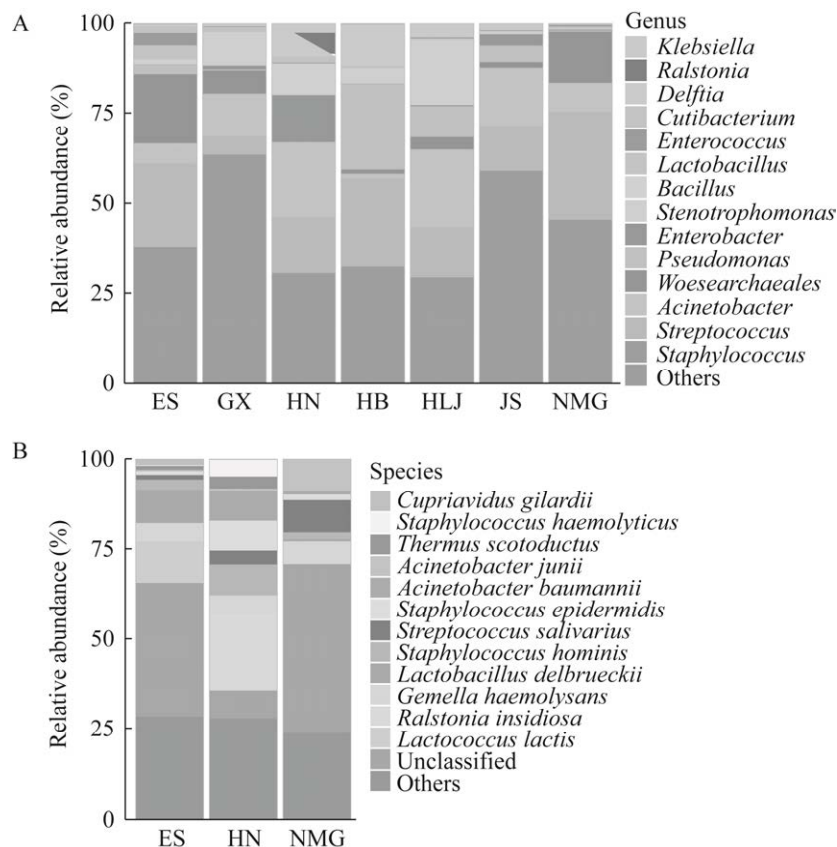


图 1 不同地区人初乳中属、种水平菌落丰度图

Figure 1 Abundance map of human colostrum genus and species in different regions. ES: Enshi; GX: Guangxi; HN: Hainan; HB: Hebei; HLJ: Heilongjiang; JS: Jiangsu; NMG: Inner Mongolia. The following abbreviations have the same meaning as this note.

地理位置、饮食习惯等因素, 将广西与海南并为一组(图 2)。基于以上, 将 7 个地区分成 4 组, 分别为: A 组恩施, B 组内蒙古, C 组海南、广西, D 组黑龙江、江苏、河北。基于不同分

组对人初乳中差异菌属进行分析, 结果发现, 恩施相较于其他 6 个地区人初乳中甲基杆菌属 (*Methylobacterium-Methylorubrum*)、阿菲波菌属 (*Afipia*)、乳杆菌属、金色微菌属(*Chryseomicrobium*)、

表 2 不同地区的人初乳样本  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Human colostrum samples from different regions alpha diversity index

Region	Chao1 index	Observed species index	Shannon index	Simpson index
ES	27 807.79±43 400.52a	3 066.78±1 888.21a	11.10±0.77a	1.00±0.002a
NMG	808 234.35±629 787.74b	5 025.64±1 744.40b	12.04±0.53b	1.00±0.001b
HN	60 700.19±31 174.95d	4 926.37±1 802.46b	10.39±1.05d	0.989±0.02d
GX	178 015.90±76 306.44c	13 648.57±4 007.55c	12.56±0.46c	1.00±0.002cd
HB	175 041.63±54 870.67c	14 295.57±2 722.49c	12.09±0.89c	0.99±0.01cd
JS	203 552.52±56 133.78c	14 791.86±3 362.79c	12.62±0.46c	1.00±0.001c
HLJ	170 784.33±21 490.49c	13 828.14±2 408.93c	12.28±0.24c	0.99±0.002cd

The difference is not significant if there are the same mark letters, and the difference is significant if there are different mark letters.

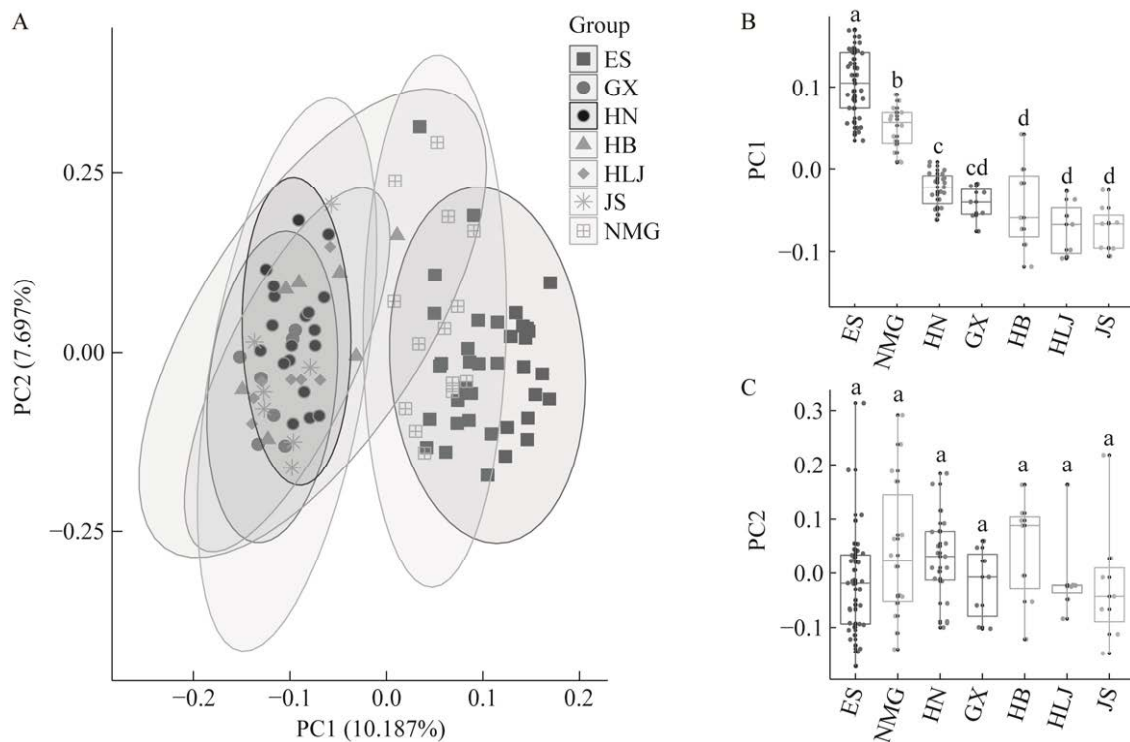


图 2 基于非加权的 jaccard 距离的细菌主坐标分析图

Figure 2 Bacterial principal coordinates analysis based on unweighted jaccard distance. A: Principal coordinate analysis of bacteria in different regions based on unweighted jaccard distance. B: Analysis chart of bacteria principal coordinates in PC1 dimension in different regions. C: Analysis chart of bacteria principal coordinates in PC2 dimension in different regions. The difference is not significant if there are the same mark letters, and the difference is significant if there are different mark letters.

马赛菌属(*Massilia*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、肠球菌属、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)显著增多; 肠杆菌属、寡养单胞菌属、不动杆菌属、罗斯氏菌属(*Rothia*)显著减少( $P < 0.001$ )。内蒙古与其他地区相比人初乳中阿菲波菌属、金色微菌属、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、鞘脂菌属(*Sphingobium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、痤疮丙酸杆菌属、甲基杆菌属、乳球菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、乳杆菌属、寡养单胞菌属、罗斯氏菌属、芽孢杆菌属、肠球菌属显著减少( $P < 0.001$ )。海南、广西与其他地区相比人初乳中阿菲波菌属、肠杆菌属显著增多; 乳杆菌属、金色微菌属、微小杆菌属、马赛菌属、红球菌属、甲基杆菌属、乳球菌属、假单胞菌属、链球菌属、鞘氨醇单胞菌属、肠球菌属显著减少( $P < 0.001$ )。黑龙江、江苏、河北与其他地区相比, 人初乳中罗斯氏菌属显著增多; 微小杆菌属、马赛菌属、痤疮丙酸杆菌属、金色微菌属、乳杆菌属、微球菌属(*Micrococcus*)、乳球菌属、红球菌属、肠球菌属显著减少( $P < 0.001$ ) (图 3)。

#### 2.4 不同地区与人初乳菌群的冗余分析

采用冗余分析(redundancy analysis, RDA)人初乳中细菌优势菌属和不同分组地区之间的相关性, 2个排序轴共解释了99个人初乳样本中细菌群落组成的68.82%, 其中第一排序轴解释了42.72%, 第二排序轴解释了26.10%。RDA图结果显示与A组恩施、D组河北、江苏、黑龙江呈正相关的菌属如乳杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属等与B组内蒙古、C组海南、广西呈现负相关; 与A组恩施、D组河北、江苏、黑龙江呈现负相关的菌属如链球菌属、葡萄球菌属、寡养单胞菌属等与B组内蒙古, C组海南、广西呈现正相关(图4)。

#### 2.5 其他因素对人初乳菌群多样性的影响

基于上述结果, 本实验进一步探究了婴儿的喂养方式、母亲分娩方式、母亲妊娠期健康状态、胎次对人初乳中微生物多样性的影响。本研究对37份恩施地区人初乳样本的超1指数、发现物种数、香农指数和辛普森指数进行比较, 结果如表3所示, 只用奶粉喂养婴儿的超1指数相较于只用母乳喂养和混合喂养婴儿的超1指数显著性增大, 混合喂养婴儿的香农指数相较于单纯用母乳喂养和单纯用奶粉喂养婴儿的香农指数显著性减小。除此之外, 不同的分娩方式(表4)、母亲分娩前的健康状态(表5)和不同的胎次(表6)均不会对人初乳中微生物多样性造成显著影响。

进一步采用置换多元方差分析其他因素对人初乳中微生物的影响程度。 $R^2$ 表示不同分组对样本差异的解释度, 通过比较 $R^2$ 大小得出不同因素对人初乳中微生物菌群的影响程度, 结果显示分娩母亲生活地区因素的 $R^2$ 最大, 为0.17, 对婴儿的喂养方式、母亲妊娠期健康状态、母亲的分娩方式、胎次因素的 $R^2$ 依次为: 0.11、0.03、0.02、0.01, 由 $R^2$ 可知不同因素对人初乳中微生物多样性的影响程度为: 地区>婴儿喂养方式>妊娠期健康状态>分娩方式>胎次。因此本研究得出结论, 分娩母亲生活的地区不同是造成人初乳微生物多样性的主要因素(图5)。

### 3 讨论

初乳作为新生儿营养摄入的重要来源, 被誉为“液态黄金”, 对婴儿的健康及后续的成长至关重要<sup>[3]</sup>。由于Illumina MiSeq测序技术的读长较短, 在一定程度上增加了测序的误差率, 相反PacBio SMRT测序技术可以弥补这方面的缺陷, 更好的在种水平上揭示人初乳中的菌群组成<sup>[15]</sup>。因此本研究基于PacBio SMRT测序技



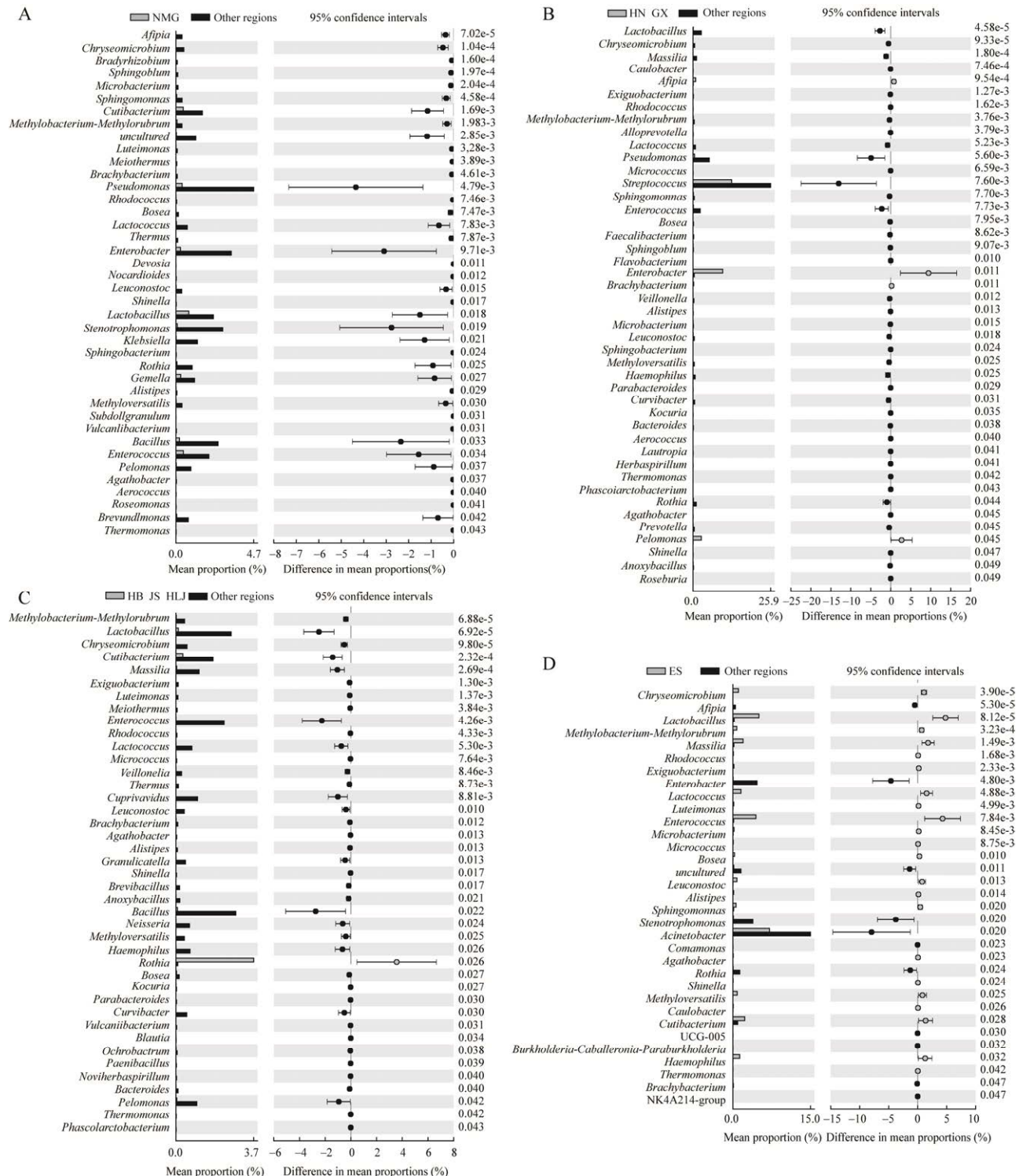


图 3 不同分组地区人初乳中的差异菌属

Figure 3 The different genus of human colostrum from different groups. A: Differential bacteria in human colostrum from Inner Mongolia and other regions. B: Differential bacteria in human colostrum from Hainan, Guangxi and other regions. C: Differential bacteria in human colostrum from Hebei, Jiangsu, Heilongjiang and other regions. D: Differential bacteria in human colostrum from Enshi and other regions.

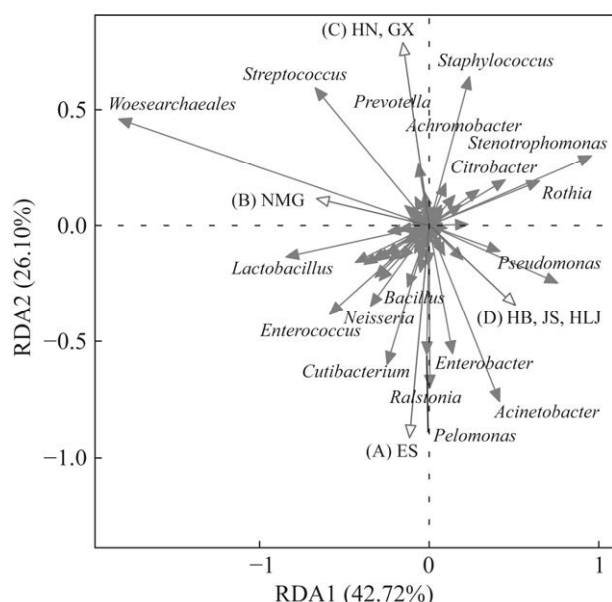


图 4 初乳细菌优势菌属与不同分组地区之间的 RDA 分析

Figure 4 Redundancy analysis of dominant genus of colostrum bacteria and different grouping regions.

术揭示了恩施、内蒙古、海南 3 个地区人初乳中的优势菌种，通过与江苏、河北、黑龙江等地区人初乳样本进行对比后发现恩施、内蒙古、海南地区的人初乳菌群存在显著差异，并且这 3 个地区与广西、江苏、河北、黑龙江的人初乳菌群也存在显著差异，同时比较不同因素对人初乳菌群的影响程度，最终发现不同地区是造成人初乳中细菌多样性具有差异的主要原因。

研究表明葡萄球菌属、链球菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、乳杆菌属等是人初乳中的优势菌属；乳酸乳球菌、*Ralstonia insidiosa*、溶血李生球菌等是恩施、内蒙古、海南人初乳中的优势菌种。Xi 等<sup>[14]</sup>、Boix-Amorós 等<sup>[16]</sup>在研究人初乳菌群时鉴定到的优势菌属与本研究结果一致。徐海燕等<sup>[10]</sup>通过研究内蒙古地区志愿者整个哺乳阶段母乳中的乳酸菌多样性后发现，

表 3 喂养方式的  $\alpha$  多样性指数

Table 3 Feeding mode alpha diversity index

Infant feeding modes	Chao1 index	Observed species index	Shannon index	Simpson index
Breast feeding	3 555.88±2 487.89a	3 555.88±2 487.89a	11.27±0.96a	1.00±0.000 8a
Bottle feeding	70 605.14±65 309.46b	3 060.60±1 084.34a	11.33±0.50a	1.00±0.000 4a
Mixed feeding	41 149.64±45 305.83a	2 636.67±1 264.88a	10.86±0.60b	1.00±0.003a

The difference is not significant if there are the same mark letters, and the difference is significant if there are different mark letters.

表 4 分娩方式的  $\alpha$  多样性指数

Table 4 Mode of delivery alpha diversity index

Mode of delivery	Chao1 index	Observed species index	Shannon index	Simpson index
Cesarean section	18 364.63±36 535.54a	2 658.00±1 720.79a	10.92±0.85a	1.00±0.003a
Natural childbirth	36 666.51±48 182.99a	3 460.95±2 004.61a	11.26±0.71a	1.00±0.002a

The difference is not significant if there are the same mark letters, and the difference is significant if there are different mark letters.

表 5 妊娠期母亲健康状态的  $\alpha$  多样性指数

Table 5 Maternal health during pregnancy alpha diversity index

Maternal health during pregnancy	Chao1 index	Observed species index	Shannon index	Simpson index
Diseased	23 652.65±35 233.56a	1 884.78±1 090.13a	10.49±0.52a	1.00±0.000 8a
Healthy	30 158.91±46 778.34a	3 510.52±1 952.82a	11.31±0.75a	1.00±0.002a

The difference is not significant if there are the same mark letters, and the difference is significant if there are different mark letters.

表 6 胎次的  $\alpha$  多样性指数

Table 6 Parity alpha diversity index

Parity	Chao1 index	Observed species index	Shannon index	Simpson index
First child	29 665.95±48 451.88a	3 175.00±2 141.24a	11.12±0.84a	1.00±0.000 9a
Second child	27 265.37±39 371.90a	3 024.82±1 653.93a	11.09±0.73a	1.00±0.003a

The difference is not significant if there are the same mark letters, and the difference is significant if there are different mark letters.

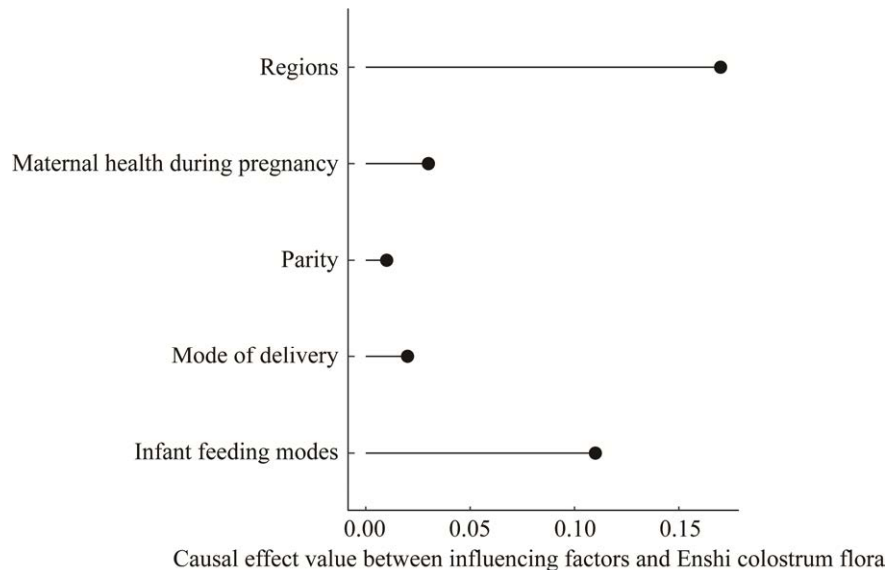


图 5 影响因素置换多元方差分析图

Figure 5 The permutational multivariate analysis of variance of influence factor.

德氏乳杆菌、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、表皮葡萄球菌、唾液链球菌、乳酸乳球菌是人母乳中的优势菌种, 与本研究鉴定到的内蒙古地区人初乳中优势菌种几乎一致, 两项研究中仅有植物乳植杆菌具有差异, 猜测与研究人群哺乳阶段不同有关。

不同地区人初乳中的菌群组成显著不同, Boix-Amorós 等<sup>[16]</sup>通过研究中国、芬兰、南非和西班牙人初乳菌群后得出与本实验相同的结论。Kumar 等<sup>[8]</sup>也发现, 西班牙妇女人乳中含有丰富的拟杆菌门(*Bacteroides*), 中国妇女人乳中的放线菌门(*Actinobacteria*)较为丰富。同时, 黄卫强<sup>[17]</sup>通过比较南方和北方地区人乳中差异菌属发现, 南方地区人乳中葡萄球菌属、草螺菌属

(*Herbaspirillum*)和棒状干菌属(*Corynebacterium*)的丰度大于北方地区, 并且这种差异随着北移距离的增加而逐渐加大。南北方因环境、气候等外界条件导致饮食方面存在巨大差异, 据研究显示, 南北方每日谷物、瓜果、蔬菜、牛奶等摄入量显著不同<sup>[18]</sup>, 或许这是不同地区人乳菌群具有差异的原因。恩施地区海拔高, 地处山区, 并且含有大量的土家族人民, 饮食偏好酸与辣<sup>[19]</sup>。除此之外, 恩施被誉为“世界硒都”, 土壤中硒含量高于全国平均水平, 在此土壤下种植的农作物被称为富硒农产品, 因此恩施人民饮食中硒含量普遍高于其他城市<sup>[20-22]</sup>。硒作为人初乳中的重要矿物质之一, 长期饮食富硒食品可能会影响人初乳中菌群的定殖<sup>[23-24]</sup>。内

蒙古地处高原，气候常年干冷，由于汉族与蒙古族的交融，生活在内蒙古的人民日常饮食以牛羊肉和奶食品为主<sup>[25]</sup>。宋玉玲<sup>[26]</sup>研究发现，肉类的过量摄入会加大蒙古族人民患乳腺癌的风险，国内外大量的研究也证实饮食会影响人乳菌群的组成<sup>[27]</sup>，因此长期饮食具有蒙古族特色的食物可能是内蒙古人初乳菌群与其他地区人初乳菌群呈现显著分离趋势的主要原因。海南和广西均位于中国的最南端，居住着大量的黎族人民，气候常年炎热湿润，人初乳中含有大量的 *Thermus amyloliquefaciens* 等耐高温细菌<sup>[13,28-29]</sup>。由于靠近热带，海南和广西水果种类丰富，人们经常将水果制作成爽口的饭菜，其中尤以芒果椰浆糯米饭著名，研究发现长期使用芒果椰浆糯米饭可以显著降低志愿者体内产甲烷的有害菌，提高嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*) 等有益菌<sup>[30]</sup>，由于饮食会影响人乳菌群的组成，这可能是海南与广西人初乳菌群组成相似，与其他地区不同的原因。江苏、河北、黑龙江都处于中国内陆，城市偏向汉化，民族特色并不明显，也许这是3个地区与其他地区人初乳菌群呈现显著的分离趋势的缘故。同时，由于本研究中样本数量不一致，可能也会对不同地区人初乳菌群的分离趋势造成一定的影响。

为深究影响人初乳菌群的主要因素，本实验分别按照分娩母亲生活的不同地区、对婴儿的喂养方式、妊娠期母亲的健康状态、母亲的分娩方式、胎次等五大因素进行分组，比较人初乳中的细菌多样性指数，结果表明，除地区外，婴儿喂养方式也会影响人初乳菌群的多样性，这与 Moossavi 等<sup>[31]</sup>研究结果一致，他们发现相较于直接母乳喂养，间接母乳喂养(即婴儿不直接与母亲乳房接触)的母亲乳汁中的肠杆菌属和肠球菌属更为丰富。Kumar 等<sup>[8]</sup>通过研

究中国、芬兰、南非等地人乳菌群发现，母亲的分娩方式会影响母乳菌群的组成，Sakwinska 等<sup>[32]</sup>却发现分娩方式并不会影响母乳菌群的组成，与本文研究结果一致，不同研究得出的结论差异可能与研究人群不同等有关，这还需要后续进一步深究。Wan 等<sup>[2]</sup>发现妊娠期母亲健康状态等不会影响母乳菌群的组成，与本文研究结果相同。

## 4 结论

本研究利用 PacBio SMRT 测序技术，比较分析了分娩母亲生活的地区、婴儿喂养方式、母亲妊娠期健康状态、母亲的分娩方式和胎次等因素对人初乳中细菌菌群的影响，发现母亲生活的不同地区是影响人初乳微生物组成的主要因素，其中广西、河北、黑龙江、江苏地区母亲初乳样本主要以葡萄球菌属、链球菌属、不动杆菌属等菌属组成；恩施、内蒙古、海南地区母亲初乳样本主要以乳酸乳球菌、*Ralstonia insidiosa*、溶血李生球菌等菌属组成。

## 参考文献

- [1] LARA-VILLOSLADA F, OLIVARES M, SIERRA S, RODRÍGUEZ JM, BOZA J, XAUS J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2007, 98(suppl 1): S96-S100.
- [2] WAN Y, JIANG JJ, LU MQ, TONG WF, ZHOU RK, LI JM, YUAN JH, WANG FL, LI D. Human milk microbiota development during lactation and its relation to maternal geographic location and gestational hypertensive status[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(5): 1438-1449.
- [3] TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ H, KVERKA M, HRDÝ J. Immunomodulatory components of human colostrum and milk[J]. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 2020, 94: 38-47.
- [4] CASTELLOTE C, CASILLAS R, RAMÍREZ-SANTANA C, PÉREZ-CANO FJ, CASTELL M,

- MORETONES MG, LÓPEZ-SABATER MC, FRANCH À. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk[J]. *The Journal of Nutrition*, 2011, 141(6): 1181-1187.
- [5] 徐燕荣, 肖丽莎. 初乳多次喂养在降低新生儿黄疸发生率中应用价值探讨[J]. *中国基层医药*, 2022, 29(4): 534-537.
- XU YR, XIAO LS. Application value of multiple colostrum feedings in reducing the incidence of neonatal jaundice[J]. *Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy*, 2022, 29(4): 534-537 (in Chinese).
- [6] GÓMEZ-GALLEGO C, KUMAR H, GARCÍA-MANTRANA I, du TOIT E, SUOMELA JP, LINDERBORG KM, ZHANG YM, ISOLAURI E, YANG BR, SALMINEN S, COLLADO MC. Breast milk polyamines and microbiota interactions: impact of mode of delivery and geographical location[J]. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 2017, 70(3): 184-190.
- [7] MILIKU K, DUAN QL, MORAES TJ, BECKER AB, MANDHANE PJ, TURVEY SE, LEFEBVRE DL, SEARS MR, SUBBARAO P, FIELD CJ, AZAD MB. Human milk fatty acid composition is associated with dietary, genetic, sociodemographic, and environmental factors in the child cohort study[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 110(6): 1370-1383.
- [8] KUMAR H, du TOIT E, KULKARNI A, AAKKO J, LINDERBORG KM, ZHANG YM, NICOL MP, ISOLAURI E, YANG BR, COLLADO MC, SALMINEN S. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1619.
- [9] 刘婉欣. 应用 16S rRNA 测序技术研究母婴肠道菌群、乳汁菌群的特征及其影响因素分析[D]. 武汉: 武汉科技大学硕士学位论文, 2021.
- LIU WX. The characteristics of gut microbiota and human milk microbiota of maternal-infant cohort and relevant analysis by 16S rRNA sequencing[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [10] 徐海燕, 刘亚华, 靳昊, 王佼, 余中节, 刘文俊, 张和平, 孙志宏. 内蒙古地区母乳中乳酸菌和双歧杆菌的多样性[J]. *科学通报*, 2019, 64(3): 348-359.
- XU HY, LIU YH, JIN H, WANG J, YU ZJ, LIU WJ, ZHANG HP, SUN ZH. Diversity and composition of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* in breast milk from mothers living in Inner Mongolia[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(3): 348-359 (in Chinese).
- [11] BOKULICH NA, KAEHLER BD, RIDEOUT JR, DILLON M, BOLYEN E, KNIGHT R, HUTTLEY GA, GREGORY CAPORASO J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 90.
- [12] 席晓霞. 初生婴儿肠道菌群与母体各部位菌群相关性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2017.
- XI XX. Correlations between the gut microbiota of newborns and microbial communities of multiple body habitats in mothers[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [13] XIE WY, ZHANG HM, NI YQ, PENG YH. Contrasting diversity and composition of human colostrum microbiota in a maternal cohort with different ethnic origins but shared physical geography (island scale)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 934232.
- [14] XI XX, HUANG WQ, HOU QC, KWOK LY, SUN ZH, SUN TS. Assessment of microbial community structure in human colostrum and mature milk based on geographical location and delivery mode[J]. *Science Bulletin*, 2017, 62(11): 745-747.
- [15] 孙明会, 刘佳美, 王思懿, 朱乐冉, 王紫馨, 叶亚萍, 钱加璐, 顾小雨, 徐细建, 陈大福, 郭睿, 徐国钧. 结合三代测序与二代测序技术揭示蜜蜂球囊菌孢子转录组的复杂性[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2981-2994.
- SUN MH, LIU JM, WANG SY, ZHU LR, WANG ZX, YE YP, QIAN JJ, GU XY, XU XJ, CHEN DF, GUO R, XU GJ. Unraveling the complexity of transcriptome in *Ascospaera apis* spore: based on third-generation and next-generation sequencing[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2981-2994 (in Chinese).
- [16] BOIX-AMORÓS A, PUENTE-SÁNCHEZ F, du TOIT E, LINDERBORG KM, ZHANG YM, YANG BR, SALMINEN S, ISOLAURI E, TAMAMES J, MIRA A, COLLADO MC. Mycobioime profiles in breast milk from healthy women depend on mode of delivery, geographic location, and interaction with bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(9): e02994-e02918.
- [17] 黄卫强. 中国四个地区人母乳中微生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2015.

- HUANG WQ. Microbial diversity of human breast milk in four areas of China[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [18] TANG DS, BU T, LIU YH, DONG XF. The difference of being overweight or obese between the north and south of China[J]. *Research Square*, 2020: 1-22.
- [19] 曾诚. 湖北恩施州饮食结构特点分析[J]. *农村经济与科技*, 2014, 25(12): 78-79.  
ZENG C. Analysis on the characteristics of diet structure in Enshi prefecture, Hubei Province[J]. *Rural Economy and Science-Technology*, 2014, 25(12): 78-79 (in Chinese).
- [20] HUANG Y, WANG QX, GAO J, LIN ZQ, BAÑUELOS GS, YUAN LX, YIN XB. Daily dietary selenium intake in a high selenium area of Enshi, China[J]. *Nutrients*, 2013, 5(3): 700-710.
- [21] 吴巍, 田盼盼, 向龙. 富硒农产品营销存在的问题及对策: 以恩施硒马铃薯为例[J]. *现代农业科技*, 2021(5): 257-259.  
WU W, TIAN PP, XIANG L. Problems and countermeasures in the marketing of selenium-enriched agricultural products—taking Enshi selenium-enriched potato as an example[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2021(5): 257-259 (in Chinese).
- [22] SHU YL, WU MY, YANG SB, WANG YJ, LI HW. Association of dietary selenium intake with telomere length in middle-aged and older adults[J]. *Clinical Nutrition*, 2020, 39(10): 3086-3091.
- [23] VARIKASUVU SR, SATYA PV, KOTHAPALLI J, MANNE M. Brain selenium in alzheimer's disease (brain seed study): a systematic review and meta-analysis[J]. *Biological Trace Element Research*, 2019, 189(2): 361-369.
- [24] EATON CB, ABDUL BAKI AR, WARING ME, ROBERTS MB, LU B. The association of low selenium and renal insufficiency with coronary heart disease and all-cause mortality: nhanes III follow-up study[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 212(2): 689-694.
- [25] 刘成义, 党彤. 内蒙古地区生活、饮食因素对结直肠息肉的影响[J]. *胃肠病学*, 2015, 20(5): 287-291.  
LIU CY, DANG T. Impact of lifestyle and dietary factors on colorectal polyps in Inner Mongolia area[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2015, 20(5): 287-291 (in Chinese).
- [26] 宋玉玲. 蒙古族与汉族女性乳腺癌的相关因素对比分析[D]. 通辽: 内蒙古民族大学硕士学位论文, 2013.  
SONG YL. The contrast analysis of related factors between Mongolian and Han female with breast cancer[D]. Tongliao: Master's Thesis of Inner Mongolia University for the Nationalities, 2013 (in Chinese).
- [27] FENG TY, AZAR FN, DREGER SA, ROSEAN CB, McGINTY MT, PUTELO AM, KOLLI SH, CAREY MA, GREENFIELD S, FOWLER WJ, ROBINSON SD, RUTKOWSKI MR. Reciprocal interactions between the gut microbiome and mammary tissue mast cells promote metastatic dissemination of HR+breast tumors[J]. *Cancer Immunology Research*, 2022, 10(11): 1309-1325.
- [28] YU TT, MING H, YAO JC, ZHOU EM, PARK DJ, HOZZEIN WN, KIM CJ, WADAAN MAM, LI WJ. *Thermus amyloliquefaciens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment sample[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(8): 2491-2495.
- [29] KHAN IU, HABIB N, HUSSAIN F, XIAN WD, AMIN A, ZHOU EM, AHMED I, ZHI XY, LI WJ. *Thermus caldifontis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(8): 2868-2872.
- [30] LI X, VANNESS MA, HOLT RR, HORN W, KEIM N, KEEN C, CARSON J, HACKMAN R. Effects of two weeks of daily mango fruit intake on vascular function, blood pressure and gut fermentation in healthy adult women[J]. *The FASEB Journal*, 2018, 8-65.
- [31] MOOSSAVI S, SEPEHRI S, ROBERTSON B, BODE L, GORUK S, FIELD CJ, LIX LM, de SOUZA RJ, BECKER AB, MANDHANE PJ, TURVEY SE, SUBBARAO P, MORAES TJ, LEFEBVRE DL, SEARS MR, KHAFIPOUR E, AZAD MB. Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 324-335.e4.
- [32] SAKWINSKA O, MOINE D, DELLEY M, COMBREMONT S, REZZONICO E, DESCOMBES P, VINYES-PARES G, ZHANG YM, WANG PY, THAKKAR SK. Microbiota in breast milk of Chinese lactating mothers[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160856.