

文章编号: 1000-8020(2020)02-0233-05

·调查研究·

基于高通量测序技术分析营养包对婴幼儿 肠道菌群的影响



王丽媛¹ 宫照龙¹ 霍军生¹ 卓勤¹ 秦文¹
杨倬¹ 王晶波¹ 沈施¹

¹ 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 国家卫生健康委员会
微量元素国家重点实验室, 北京 100050

摘要: 目的 探讨营养包对早期婴幼儿肠道菌群的影响。方法 选择“2018年早期儿童营养包干预远期效果项目”中覆盖县河南嵩县和未覆盖县对照县汝阳县, 采用按规模大小成比例的概率抽样法抽中3~5个样本村, 对抽中样本村中所有6~24月龄婴幼儿采用随机等距抽样方法, 最终抽取118例婴幼儿为调查对象, 其中嵩县60例, 汝阳县58例。于2018年9月体检时收集调查对象粪便, 采用高通量测序技术对肠道菌群构成与丰度进行分析比较。结果 12~24月龄婴幼儿营养包干预组的肠道菌群Alpha多样性显著高于对照组; 6~24月龄婴幼儿营养包干预组厚壁菌门呈上升趋势; 6~11月龄婴幼儿营养包干预组普雷沃氏菌(*Prevotella*)丰度显著低于对照组; 12~17月龄婴幼儿营养包干预组粪杆菌属(*Faecalibacterium*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)丰度显著高于对照组, 双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和普雷沃氏菌丰度显著低于对照组; 18~24月龄婴幼儿营养包干预组乳杆菌属(*Lactobacillus*)丰度显著低于对照组。结论 营养包可改善肠道菌群多样性, 对促进婴幼儿肠道菌群平衡发挥重要作用。

关键词: 高通量测序 营养包 婴幼儿 肠道菌群

中图分类号: Q591.5 R174 R153.2

文献标志码: A

DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2020.02.011

Effects of nutrition package on intestinal flora of infants by high-throughput sequencing

Wang Liyuan¹, Gong Zhaolong¹, Huo Junsheng¹, Zhuo Qin¹,
Qin Wen¹, Yang Zhuo¹, Wang Jingbo¹, Shen Shi¹

¹ National Institute for Nutrition and Health, China CDC; Key Laboratory of Trace Element Nutrition,
National Health Commission of the People's Republic of China, Beijing 100050, China

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of nutrition package on intestinal flora of infants aged 6–24 months. **METHODS** A total of 118 infants in Songxian County and Ruyang County of Henan Province, 60 infants in Songxian County with nutrition package coverage, and 58 infants in Ruyang County of the control county were selected for the long-term effects of early childhood nutrition package intervention project in 2018. All infant faeces were collected, and the composition and abundance of intestinal flora were analyzed and compared by high-throughput sequencing technology.

基金项目: 早期儿童营养包干预长期营养健康作用评估项目(2018-2020)

作者简介: 王丽媛, 女, 硕士, 食品工程师, 研究方向: 营养与食品卫生, 肠道微生态, E-mail: wangly@ninh.chinacdc.cn

通信作者: 沈施, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 营养与食品卫生, E-mail: shenshi@ninh.chinacdc.cn

RESULTS The Alpha diversity of intestinal flora in the nutrition package intervention group was significantly higher than that in the control group. Firmicutes were on the rise in the nutrition package intervention group of infants aged 6 – 24 months. The abundance of *Prevotella* in the intervention group was significantly lower than that in the control group. The abundance of *Faecalibacterium* and *Bacteroides* in the nutrition package treatment group for infants aged 12 to 17 months was significantly higher than that of the control group, while the abundance of *Bifidobacterium* and *Prevotella* was significantly lower than that of the control group. *Lactobacillus* was significantly less abundant in the 18 – 24 month old infant nutrition package intervention group than in the control group.

CONCLUSION Nutrition package can improve the diversity of intestinal flora, also play an important role in promoting the balance of intestinal flora of infants.

KEY WORDS: high throughput sequencing, nutrition package, infants, intestinal flora

肠道菌群深刻地影响宿主的营养物质加工、能量平衡、免疫功能、胃肠道发育以及其他多种重要的生理活动^[1-2]。人类肠道菌群的建立从胎儿时期就已经开始了^[3],与健康成年人相比,婴幼儿的肠道菌群组成截然不同^[4],婴幼儿肠道菌群定植与发展呈连续的动态变化^[5],肠道菌群对婴幼儿发育及免疫系统构建至关重要,婴幼儿时期肠道菌群失衡除患常见的代谢类疾病外,还易患某些细菌类疾病,如流感、肺炎等^[6]。研究表明婴幼儿时期,营养素的摄入对维持肠道菌群的平衡有显著作用,其中矿物质(如钙、铁、镁、锌)的吸收利用率对宿主肠道菌群的组成有很大影响,肠道菌群与维生素代谢相互作用,促进人体的健康成长^[7]。营养包作为改善贫困地区6~24月龄婴幼儿生长发育的营养补充品^[8],富含蛋白质、脂肪、矿物质、微量元素等营养素^[9],本文应用高通量测序技术分析营养包对婴幼儿肠道菌群的影响。

1 对象与方法

1.1 试剂和仪器

粪便基因组 DNA 提取试剂盒, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, 德国。AC2-4S1 生物安全柜购自新加坡 Esco 公司; 5427R 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; 5355 Thermomixer comfort, 德国 Eppendorf 公司; Tissue lyser II 样品破碎系统, 德国 Qiagen 公司; Nano Drop 紫外分光光度计, 美国 Thermo 公司; Illumina HiSeq2500 测序仪, 美国 Illumina 公司。

1.2 调查对象

选取“贫困地区儿童营养改善项目”覆盖的河南省嵩县,对所有乡(镇)按照人均纯收入排

队,采用入样概率与该乡(镇)活产数成比例的概率比例规模(probability proportionate to size sampling, PPS)抽样方法,抽取5个样本乡(镇);在抽中的样本乡(镇)内,对所有村按照人均纯收入排队,采用入样概率与该村活产数成比例的PPS抽样方法,抽取3~5个样本村;在抽中的样本村内,对该村所有6~24月龄婴幼儿按照出生日期排序,采用随机等距抽样方法抽取60名婴幼儿作为营养包干预组。在项目未覆盖的经济水平基本一致的河南汝阳县,以同样方法抽取58名6~24月龄婴幼儿作为对照组,对照组未给予安慰剂。

本项目通过中国疾病预防控制中心营养与健康所伦理委员会审查(No. 2018-017),婴幼儿看护人知晓调查内容并签署了知情同意书。

1.3 高通量测序技术

1.3.1 粪便采集 于2018年9月婴幼儿体检时集中采集粪便样本。采集中段内部粪便约1g于粪便采集管内,避免混入尿液,保护液没过粪便样本,-20℃冰箱储存。共采集样本118份,其中营养包干预组6~11月龄婴幼儿粪便17份、12~17月龄幼儿23份、18~24月龄幼儿20份,对照组分别是19份、18份和21份。

1.3.2 DNA 提取和测序 参照 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 说明书进行粪便细菌 DNA 提取,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,使用通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rDNA 的 V4 区进行 PCR 扩增。使用 Agencourt AMPure XP 磁珠进行纯化并溶于洗脱缓冲液中,完成文库构建,使用 Agilent 2100

Bioanalyzer 检测文库的片断范围及浓度。应用 HiSeq2500 平台对 PCR 产物进行测序,测序类型为 PE250。

1.3.3 生物信息学分析 下机数据滤除低质量的读序,获得清除数据。序列拼接使用软件 FLASH (fast length adjustment of short reads) v1.2.11,将双末端测序得到的读序拼接成序列,利用软件 USEARCH (v7.0.1090) 将优化好的序列在 97% 的相似度下聚类为分类操作单元 (operational taxonomic units, OTU),通过 RDP classifier (v2.2) 软件将 OTU 代表序列与数据库比对进行物种注释,物种复杂度分析以及利用 Mothur 软件 (v1.31.2) 对组间物种 Alpha 多样性进行分析。

1.4 统计学分析

数据分析采用软件 SPSS 16.0 处理,各组以变异数 ANOVA 进行比较分析,数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 营养包食用情况

营养包干预组调查对象均领用营养包,各月龄婴幼儿营养包平均服用情况见表 1,随着月龄增加,婴幼儿服用营养包时长和服用量均逐渐增加。将每周服用 4 包以上定义为营养包有效服用,营养包干预组婴幼儿营养包有效服用率为 100%。

表 1 婴幼儿营养包服用情况 ($n = 60 \bar{x} \pm s$)

月龄	服用时间/月	服用量/包
6 ~ 11	3.06 ± 1.56	78.88 ± 41.92
12 ~ 17	8.74 ± 1.21	256.48 ± 45.49
18 ~ 24	15.28 ± 1.56	448.67 ± 48.09

2.2 营养包对婴幼儿肠道菌群物种丰度及 Alpha 多样性的影响

由图 1 可知,随着测序数量的增加,累积曲线末端上升趋势趋于平缓,表明采样量足够,测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种。

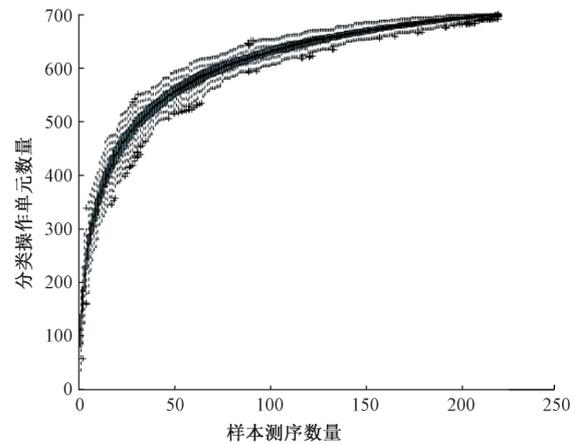


图 1 婴幼儿粪便菌群稀释曲线

由表 2 可知 6 ~ 11 月龄婴儿,营养包干预组肠道菌群在物种丰富度和多样性上与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 12 ~ 17 月龄幼儿,营养包干预组肠道菌群物种丰富度和多样性高于对照组 ($P < 0.05$); 18 ~ 24 月龄幼儿,营养包干预组肠道菌群物种丰富度和多样性显著高于对照组 ($P < 0.01$),也显著高于其他各组。

表 2 婴幼儿肠道菌群 Alpha 多样性 ($\bar{x} \pm s$)

月龄	组别	n	Observed-species 指数	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
6 ~ 11	对照组	58	67.42 ± 21.26	86.58 ± 21.90	89.66 ± 20.95	2.05 ± 0.41	0.22 ± 0.08
	营养包组	60	67.71 ± 16.93	94.48 ± 31.38	92.19 ± 23.70	2.02 ± 0.28	0.23 ± 0.07
12 ~ 17	对照组	58	97.72 ± 26.25	132.09 ± 32.60	143.07 ± 40.02	2.12 ± 0.47	0.23 ± 0.10
	营养包组	60	100.48 ± 33.57	123.31 ± 42.96	127.19 ± 41.79	2.43 ± 0.57 ⁽¹⁾	0.17 ± 0.09 ⁽¹⁾
18 ~ 24	对照组	58	121.76 ± 18.54	149.12 ± 27.99	153.79 ± 29.15	2.45 ± 0.42	0.21 ± 0.11
	营养包组	60	134.8 ± 30.50	159.54 ± 36.45	160.87 ± 31.56	2.90 ± 0.35 ⁽²⁾	0.12 ± 0.05 ⁽²⁾

注:与对照组相比 (1) $P < 0.05$ (2) $P < 0.01$

2.3 营养包对婴幼儿肠道菌群门水平相对丰度的影响

在 118 份样品中共检测到 7 个主要菌门。由表 3 可知,所有样品中 99% 以上的序列主要由 4 个菌门组成,分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)。各组均以厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌。在 6 ~ 11 月龄婴儿中,营养包干预组厚壁菌门、变形菌门丰度较对照组

呈上升趋势,拟杆菌门和放线菌门丰度较对照组呈下降趋势,但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 12 ~ 17 月龄幼儿中,营养包干预组厚壁菌门、拟杆菌门丰度呈上升趋势,放线菌门和变形菌门丰度低于对照组,其中放线菌门与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 18 ~ 24 月龄幼儿中,营养包干预组厚壁菌门丰度高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),拟杆菌门呈下降趋势。

表 3 婴幼儿肠道菌群在门水平的相对丰度($\bar{x} \pm s$)

%

门	6~11 月龄		12~17 月龄		18~24 月龄	
	对照组 (n=58)	营养包组 (n=60)	对照组 (n=58)	营养包组 (n=60)	对照组 (n=58)	营养包组 (n=60)
放线菌门(Actinobacteria)	31.39 ± 14.46	23.19 ± 11.99	22.52 ± 14.59	12.17 ± 9.95 ⁽¹⁾	8.20 ± 9.46	8.11 ± 9.25
拟杆菌门(Bacteroidetes)	21.99 ± 21.73	20.42 ± 25.86	25.22 ± 23.42	235.83 ± 19.54	47.70 ± 20.75	38.49 ± 18.35
蓝细菌门(Cyanobacteria)	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	1.58 ± 6.14	0.12 ± 0.44 ⁽¹⁾	0.01 ± 0.05	0.11 ± 0.39
厚壁菌门(Firmicutes)	29.59 ± 12.07	33.86 ± 13.15	39.01 ± 19.05	44.22 ± 15.11	36.54 ± 17.79	46.93 ± 14.49 ⁽¹⁾
梭杆菌门(Fusobacteria)	0.01 ± 0.03	1.62 ± 6.54	0.99 ± 4.13	0.03 ± 0.08	1.05 ± 4.69	0.21 ± 0.53
变形菌门(Proteobacteria)	16.95 ± 10.03	20.82 ± 14.95	10.56 ± 6.95	7.55 ± 7.73	6.47 ± 6.40	6.05 ± 7.60
疣微菌门(Verrucomicrobia)	0.04 ± 0.16	0.05 ± 0.19	0.06 ± 0.14	0.07 ± 0.14	0.01 ± 0.05	0.08 ± 0.22

注: (1) 与对照组相比 $P < 0.05$

2.4 营养包对婴幼儿肠道菌群属水平相对丰度的影响

由表 4 可见,各年龄段婴幼儿属水平肠道菌群丰度存在一定差异。6~11 月龄婴幼儿主要优势菌群是双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、大肠埃希氏菌属(*Escherichia*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*); 12~17 月龄幼儿主要优势菌群是拟杆菌属、双歧杆菌属、韦荣氏球菌属、粪杆菌属(*Faecalibacterium*); 18~24 月龄幼儿主要优势菌群是拟杆菌属、普雷沃氏菌属

(*Prevotella*)、粪杆菌属、双歧杆菌属。6~11 月龄婴儿中,营养包干预组普雷沃氏菌属丰度显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); 12~17 月龄幼儿中,营养包干预组粪杆菌属和拟杆菌属丰度显著高于对照组,双歧杆菌属和普雷沃氏菌属丰度显著低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$); 18~24 月龄幼儿中,营养包干预组乳杆菌属(*Lactobacillus*)丰度显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 婴幼儿肠道菌群在属水平的相对丰度($\bar{x} \pm s$)

%

属	6~11 月龄		12~17 月龄		18~24 月龄	
	对照组 (n=58)	营养包组 (n=60)	对照组 (n=58)	营养包组 (n=60)	对照组 (n=58)	营养包组 (n=60)
双歧杆菌属(<i>Bifidobacterium</i>)	30.22 ± 13.95	22.89 ± 12.00	22.33 ± 14.54 ⁽¹⁾	11.93 ± 9.80	7.74 ± 8.27	7.81 ± 8.99
粪杆菌属(<i>Faecalibacterium</i>)	1.22 ± 2.53	2.36 ± 7.47	3.27 ± 4.32 ⁽²⁾	14.54 ± 9.82	13.79 ± 13.52	13.47 ± 8.24
拟杆菌属(<i>Bacteroides</i>)	16.14 ± 18.33	16.92 ± 24.30	17.00 ± 17.53 ⁽¹⁾	29.84 ± 18.82	22.96 ± 18.13	28.64 ± 17.67
韦荣氏球菌属(<i>Veillonella</i>)	10.90 ± 9.99	15.00 ± 12.34	12.20 ± 17.36	7.19 ± 12.25	0.43 ± 0.60	1.59 ± 3.10
普雷沃氏菌属(<i>Prevotella</i>)	3.49 ± 13.30 ⁽¹⁾	3.32 ± 13.66	8.02 ± 21.00 ⁽¹⁾	5.86 ± 19.38	23.51 ± 30.85	8.33 ± 20.20
巨单胞菌属(<i>Megamonas</i>)	3.25 ± 7.33	1.69 ± 5.75	3.61 ± 10.10	4.38 ± 9.33	2.69 ± 3.98	2.73 ± 4.26
大肠埃希氏菌属(<i>Escherichia</i>)	13.72 ± 10.84	17.07 ± 15.39	4.35 ± 5.04	3.92 ± 7.72	2.65 ± 4.27	1.28 ± 2.43
罗氏菌属(<i>Rothia</i>)	0.07 ± 0.30	0.15 ± 0.62	0.37 ± 1.30	3.15 ± 4.93	4.09 ± 5.18	3.30 ± 4.43
梭菌属(<i>Clostridium</i>)	2.32 ± 3.22	4.21 ± 5.03	4.79 ± 10.21	2.45 ± 2.28	2.84 ± 3.49	3.26 ± 3.37
瘤胃球菌属(<i>Ruminococcus</i>)	0.51 ± 1.02	1.55 ± 2.28	1.24 ± 2.84	1.89 ± 2.24	1.50 ± 1.70	1.85 ± 1.83
布劳特氏菌属(<i>Blautia</i>)	0.12 ± 0.30	0.41 ± 1.16	0.39 ± 0.48	1.53 ± 1.78	1.26 ± 0.82	2.37 ± 3.05
萨特氏菌属(<i>Sutterella</i>)	1.17 ± 2.09	1.43 ± 3.46	2.46 ± 4.57	1.36 ± 1.96	2.08 ± 2.50	1.61 ± 1.87
乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	1.39 ± 3.20	1.78 ± 3.59	0.91 ± 1.39	0.04 ± 0.14	0.19 ± 0.45 ⁽¹⁾	0.06 ± 0.19
毛螺菌属(<i>Lachnospira</i>)	0.09 ± 0.26	0.29 ± 0.83	1.87 ± 5.40	1.34 ± 1.78	2.20 ± 1.84	2.70 ± 4.10
嗜血杆菌属(<i>Haemophilus</i>)	0.43 ± 1.02	0.22 ± 0.33	2.71 ± 4.14	1.13 ± 1.81	1.47 ± 2.75	2.73 ± 4.26
链球菌属(<i>Sireptococcus</i>)	5.33 ± 5.88	3.00 ± 4.29	4.19 ± 7.35	1.04 ± 1.80	0.36 ± 0.42	1.26 ± 2.46
粪球菌属(<i>Coprococcus</i>)	0.03 ± 0.07	0.22 ± 0.63	0.66 ± 1.07	1.02 ± 1.22	1.38 ± 1.25	2.96 ± 6.99

注: 与对照组相比 (1) $P < 0.05$ (2) $P < 0.01$

3 讨论

婴幼儿肠道菌群的平衡离不开营养素的摄入。营养包所含蛋白以大豆蛋白为主,有报道指出与牛奶来源的蛋白相比,大豆蛋白能够促进肠道菌群多样性^[10]。维生素 D 可通过信号传导来增强肠道结构屏障的完整性和提高肠道免疫反应

能力,进而稳定菌群在肠道的定植和数量平衡^[11]。矿物质中钙、铁、锌等对维持儿童肠道菌群平衡也有重要作用。

本研究结果显示,营养包干预从婴儿 6 月龄开始,随着添加量的增多,婴幼儿肠道菌群的多样性差异逐渐显著,18~24 月龄幼儿肠道菌群多样

性最为丰富。在婴幼儿6~11、12~17、18~24的3个月龄阶段,肠道菌群优势菌门均由厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)组成,但丰度差异显著。6~11月龄婴儿大都未断母乳,辅食添加有限且营养包干预时间较短,婴幼儿肠道菌群定植受母乳喂养影响较大,主要以厌氧菌为主,如双歧杆菌属、拟杆菌属、肠杆菌属等,其中双歧杆菌数量最高,与相关研究结果一致^[12],因此营养包干预组和对照组肠道菌群在门和属水平上丰度未见显著差异。12~24月龄幼儿肠道菌群发生明显改变,在门水平上,营养包干预组厚壁菌门丰度显著高于对照组($P < 0.05$),厚壁菌门包括真细菌、罗氏菌、柔嫩梭菌和粪球菌种,这类细菌代谢产物主要是短链脂肪酸,而短链脂肪酸能够降低结肠内pH,防止病原菌生长,刺激水和钠吸收,参与胆固醇合成等^[13];在属水平上,粪便中拟杆菌属数量最高,营养包干预组粪杆菌属(*Faecalibacterium*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)丰度显著高于对照组($P < 0.05$),而双歧杆菌和乳酸菌均显著减少($P < 0.05$)。刘黎明等^[14]研究发现,维生素A、磷的摄入能增加拟杆菌数量,同时维生素A与肠道双歧杆菌、乳酸菌都表现为显著负相关,与本研究结果一致。这与维生素A促进儿童生长发育作用相悖,需要进一步探索其作用机制。

综上所述,营养包对贫困地区婴幼儿生长发育起到良好的促进作用,但应进一步结合膳食摄入、微量元素水平与肠道菌群进行关联性分析,以期全面评价营养包干预效果,为达到精准营养干预提供理论依据。

参考文献

- [1] HOOPER L V, WONG M H, THELIN A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine [J]. *Science*, 2001, 291 (5505): 881-884.
- [2] WU G D, CHEN J, HOFFMANN C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial

enterotypes [J]. *Science*, 2011, 334 (6052): 105-108.

- [3] AAGAARD K, MA J, ANTONY K M, et al. The placenta harbors a unique microbiome [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(237): 237-265.
- [4] PALMER C, BIK E M, DIGIULIO D B, et al. Development of the human infant intestinal microbiota [J]. *PLoS Biol*, 2007, 5: e177.
- [5] CLEMENTE J C, URSELL L K, PARFREY L W, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view [J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1258-1270.
- [6] 张和平, 霍冬雪. 婴幼儿肠道菌群研究现状 [J]. *中国食品学报* 2013, 13(7): 1-6.
- [7] 刘彩虹, 张和平. 肠道菌群与肠道内营养物质代谢的相互作用 [J]. *中国乳品工业*, 2014, 42(5): 33-37.
- [8] 张倩男. 营养包对我国南北两贫困县6~23月龄婴幼儿营养干预效果评估 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 2015.
- [9] 徐娇, 霍军生, 孙静, 等. 国内外6~24月龄婴幼儿辅食营养包干预研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(5): 550-555.
- [10] BUTTEIGER D N, HIBBERD A A, MCGRAW N J, et al. Soy protein compared with milk protein in a western diet increases gut microbial diversity and reduces serum lipids in golden syrian hamsters [J]. *J Nutr*, 2016, 146(4): 697-705.
- [11] 祝海波, 周苗苗, 王海, 等. 婴儿早期维生素D补充水平对生长发育和肠道菌群的影响 [J]. *中国食物与营养* 2018, 24(12): 87-89.
- [12] JIMÉNEZ E, MARÍN M L, MARTÍN R, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile [J]. *Res Microbiol* 2008, 159(3): 187-193.
- [13] 范文广, 王婷婷, 霍贵成. 婴幼儿肠道菌群的定植特征 [J]. *食品工业科技* 2014, 35(6): 383-386.
- [14] 刘黎明, 张水平, 孙晓勉, 等. 婴幼儿肠道菌群与辅食添加状况的相关性研究 [C]// 膳食营养、身体活动与健康—达能营养中心第十一次学术年会. 广州: 达能营养中心, 2008: 129-136.

收稿日期: 2019-07-25