

研究报告

基于多位点序列分型对新疆伊宁学龄儿童肠道两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)群体遗传差异解析

金之烜¹, 王平¹, 张雪玲¹, 田丰伟², 倪永清^{*1}

1 石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832003

2 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

金之烜, 王平, 张雪玲, 田丰伟, 倪永清. 基于多位点序列分型对新疆伊宁学龄儿童肠道两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)群体遗传差异解析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5487-5504.

JIN Zhixuan, WANG Ping, ZHANG Xueling, TIAN Fengwei, NI Yongqing. Genetic differences of intestinal *Bifidobacterium bifidum* among school-age children in Yining, Xinjiang: a study based on multilocus sequence typing[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5487-5504.

摘要: 【背景】两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)是专性代谢人体母乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)和宿主肠道黏膜上皮黏蛋白聚糖的肠道共栖益生菌, 对生命早期健康和发育至关重要, 目前对其不同人群来源的群体遗传报道较少。【目的】探究在有限地域内遗传、饮食相近人群来源的 *B. bifidum* 菌株集的遗传结构是否具有族群特异的规律性, 为开发个性化的益生菌菌株提供理论基础。【方法】对来自新疆伊宁两个族群(维吾尔族和哈萨克族)学龄儿童队列的肠道两歧双歧杆菌进行分离和鉴定, 共获得 115 个菌株, 对基于细菌基因组重复序列 PCR (repetitive sequence-PCR, rep-PCR)方法筛选的 53 株代表菌株采用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)进行群体遗传差异分析。【结果】53 株代表菌株共分为 37 个序列型(sequence type, ST), 具有很高的遗传多样性; 其中 26 株源自维吾尔族儿童的菌株有 17 个 ST, 而 20 个 ST 来自 27 株哈萨克族儿童的菌株, 两个族群来源的菌株之间检测到较少的同源基因重组事件。goeBURST 分析显示, 来自同一族群的 *B. bifidum* 分离株比来自另一族群的菌株更有可能被归入特定的系统发育分支或克隆复合体(clonal complexes, CC)。【结论】不同族群来源的 *B. bifidum* 分离株显示出较高的遗传多样性, 群体遗传结构一定程度上呈现出民族族群来源的特异性, 需要更大规模的取样证实。

资助项目: 石河子市财政科技项目(2020PT01); 国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目(U1903205); 新疆生产建设兵团创新团队建设项目(2020CB007)

This work was supported by the Shihezi Financial Science and Technology Project (2020PT01), the National Natural Science Foundation of China-Xinjiang Uyghur Autonomous Region Joint Fund Key Project (U1903205), and the Xinjiang Uyghur Autonomous Region Production and Construction Corps Innovation Team Construction Project (2020CB007).

*Corresponding author. E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: 2023-04-21; Accepted: 2023-06-10; Published online: 2023-07-12

这为进一步开展体内外实验并筛选针对区域族群的特色优良益生菌株提供了理论基础。

关键词：两歧双歧杆菌；多位点序列分型；遗传多样性；克隆复合群；持家基因

Genetic differences of intestinal *Bifidobacterium bifidum* among school-age children in Yining, Xinjiang: a study based on multilocus sequence typing

JIN Zhixuan¹, WANG Ping¹, ZHANG Xueling¹, TIAN Fengwei², NI Yongqing^{*1}

1 School of Food Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

2 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Bifidobacterium bifidum*, an obligate intestinal bacterium that specifically metabolizes human milk oligosaccharides (HMOs) and mucin glycans of host gut epithelium, is essential for early life health and development. However, little is known about the genetic differences of this bacterium among different populations. [Objective] To investigate whether the *B. bifidum* strains from genetically similar populations with similar diets in a limited geographic area have population-specific regularities and to reveal the genetic differences of *B. bifidum* among different populations. [Methods] A total of 115 strains of *B. bifidum* were isolated and identified from school-age children of Uyghur and Kazak ethnic minorities in Yining, Xinjiang. Further, we performed multilocus sequence typing (MLST) for 53 representative strains screened out by rep-PCR to understand the genetic differences of *B. bifidum* between different ethnic groups. [Results] The 53 strains belonged to 37 sequence types (STs), showing high genetic diversity. Among them, 17 STs were identified for 26 isolates from the children of Uyghur ethnic minority, while 20 STs for 27 isolates from the children of Kazak ethnic minority. Only a few homologous genetic recombination events were detected between strains from both ethnic groups. goeBURST showed that *B. bifidum* isolates from the same population were more likely to be assigned to a specific phylogenetic clade or clonal complex than the isolates from the other population. [Conclusion] *B. bifidum* isolates from different ethnic groups showed high genetic diversity. The host (ethnic group) specificity of their genetic structure needs to be confirmed by larger sampling. Our findings provide a theoretical basis for further screening of elite probiotic strains tailored to localized population by *in vivo* and *in vitro* experiments.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*; multi-locus sequence typing; genetic diversity; clonal complexes; house-keeping genes

人类肠道是一个复杂的微生物生态系统。双歧杆菌(*Bifidobacterium* sp.)是新生儿肠道的最早定殖者^[1-3]。研究表明双歧杆菌影响人类宿主的

代谢途径，进而影响人类早期的发育^[4]。在母乳喂养的婴儿肠道中，除了长双歧杆菌(*B. longum* subsp. *longum*)，两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)也是

占优势的谱系之一, 被称为“婴儿型双歧杆菌”^[5]。定殖于肠道内的双歧杆菌在保护婴儿肠黏膜免受致病细菌侵害方面发挥着关键作用, 除了影响宿主的正常生理和疾病易感性, 它们还有助于免疫系统的发育成熟, 因此受到了广泛关注。虽然双歧杆菌在成人肠道的相对丰度很低, 但是母乳寡糖(human milk oligosaccharide, HMO)特殊的益生元功能促使它们在代谢上形成与人类进化上的共生特异性, 被称为人源双歧杆菌(human-residential bifidobacteria, HRB)^[5]。随着宿主年龄的增长, 人体肠道内 *B. bifidum* 的数量减少甚至检测不到^[6]。因此, 在益生菌资源开发中, 目前研究报道比较多的是长双歧杆菌和动物双歧杆菌, 而针对 *B. bifidum* 的研究较少, 商业化菌株也很少。

研究发现, *B. bifidum* 菌株在人体上皮细胞黏附、宿主来源聚糖利用、肠道适应性等方面具有显著的生理和遗传差异^[7-9]。然而这种差异的最根本原因是研究发现 *B. bifidum* 代谢人类饮食来源的多糖能力极差, 只能专性利用 HMO 和肠道黏膜上皮黏蛋白聚糖侧链^[10-11], 而且两歧双歧杆菌与长双歧杆菌、短双歧杆菌存在营养交互作用(cross-feeding)^[12-14], 两歧双歧杆菌很可能和嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK 菌)为代表的黏液层细菌存在复杂的食物网关系^[15]。由于母乳寡糖和肠道肠上皮黏液层糖蛋白的生物合成由宿主的遗传决定, 因此宿主遗传很可能会对这些肠道黏膜微生物组在物种组成甚至是菌株水平上产生选择, 二者的相互适应性形成协同进化关系^[16]。很可能 *B. bifidum* 群体遗传差异体现在宿主来源的局域人群甚至个体水平之间^[17], 不同民族来源的菌株对上皮细胞黏附、肠道定殖和宿主来源聚糖利用的差异导致了益生功能的菌株水平特异性, 体现在实际应用中菌株筛选的无规

律性。但是在一个有限的地域内, 来源于遗传相近、饮食相同人群的 *B. bifidum* 群体是否体现为族群特异的规律性并不清楚。

本研究中, 我们从新疆伊宁两个民族族群(维吾尔族和哈萨克族, 自然地理村落相对隔离, 较少通婚)健康学龄前和学龄儿童的肠道中分离 *B. bifidum* 菌株, 通过多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术探究人源共栖细菌 *B. bifidum* 种群结构是否表现出对特定宿主人群(亚群体)的特异性, 以期筛选适合特定局域人群的个性化益生菌菌株和功能食品、医药制剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 参与者和样品采集

于 2021 年 6 月 8-11 日在新疆伊犁哈萨克自治州共招募哈萨克族学前儿童 48 名(4-7 岁)、学龄儿童 91 名(7-14 岁), 维吾尔族学前儿童 45 名(5-7 岁)和学龄儿童 94 名(7-14 岁)纳入研究。所有参与者均身体健康, 至少 6 个月未使用抗生素或其他药物。本研究两个族群居住在伊犁河旁地理距离大约 8-10 km 的两个自然村落, 分别在各自自然村幼儿园、小学就读。饮食上两个族群有一定差别: 维吾尔族以面类为主食, 奶茶最常见, 牛羊肉、水果和蔬菜食用较多; 哈萨克族饮食有游牧生活的特点, 以奶类、牛羊肉为主要食物, 主食以面食居多, 吃蔬菜相对较少, 日常饮食中马奶酒、奶疙瘩常见。每个研究对象收集 10-15 g 粪便样本, 样本在 -20 °C 的车载冰箱中储藏, 72 h 内运回实验室进行细菌分离。本研究根据《赫尔辛基宣言》的指导方针^[18]进行, 研究通过石河子大学医学院第一附属医院伦理委员会的批准(2017-117-01)。样品仅用于菌株分离, 获得所有参与者或其监护单位的知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

TE 缓冲液 [10 mmol/L Tris (pH 8.0), 10 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)]、*Taq* Plus Master Mix (2×) 和 100 bp Plus Marker, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 引物由江苏金唯智生物科技有限公司合成; 琼脂糖 Goldview, 北京全式金生物技术有限公司。PCR 扩增仪, SensoQuest 公司; Power Pac Universal 水平电泳仪, Bio-Rad 公司; BioNumerics v8.0, Applied Maths 公司; 测序由江苏金唯智生物科技有限公司进行。

1.3 培养基

改良 MRS (Man-Rogosa-Sharpe agar medium) 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.000, 牛肉膏 10.000, 酵母提取物 5.000, 葡萄糖 20.000, 吐温-80 1 mL, K_2HPO_4 2.000, 乙酸钠 5.000, 柠檬酸二铵 2.000, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.580, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.250, 琼脂 20.000, L-半胱氨酸盐酸盐 0.500, 制霉菌素 0.025, 莫匹罗星 0.050, pH 6.0, 115 °C 灭菌 20 min。

改良 Wilkins-chalgren (MAN) 培养基(g/L): 改良 Wilkins-chalgren 琼脂 48.00, 大豆蛋白胨 5.00, 吐温-80 1 mL, 冰醋酸 1 mL, L-半胱氨酸盐酸盐 0.50, 莫匹罗星 0.05, 诺氟沙星 0.20, 115 °C 灭菌 20 min。

1.4 菌株的分离和鉴定

选择粪便样本(5–10 g)使用倍比稀释涂布法分离双歧杆菌: 粪便样本在室温下解冻, 用加 0.5% 半胱氨酸的无菌生理盐水梯度稀释至 10^{-3} – 10^{-4} 。将 100 μ L 粪便样品的稀释液涂在改良的 MRS 琼脂培养基(每升添加 50 mg 莫匹罗星)和改良 Wilkins-chalgren (MAN) 培养基上^[19], 在 37 °C 厌氧培养 24–48 h (每个样品重复 3 次)后显微镜镜检。每个平板随机选择 15–20 个菌落, 每个样品获得 30–60 个菌落。连续划线至少 3 次,

镜检初步断定疑似双歧杆菌^[20], 将纯培养物在含有 20% 甘油的 MRS 液体培养基中于 -80 °C 保存备用。

基因组 DNA 提取参照 Ventura 等^[21]描述的方法, rep-PCR 指纹分型去重筛选, 引物使用 Boxair (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') 和 M13 (5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3')^[22]。PCR 反应体系(25 μ L): *Taq* Plus Master Mix (2×) 12.5 μ L, 基因组 DNA 模板 3 μ L (50 ng), 正向和反向引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s (M13 为 51 °C), 72 °C 4 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。采用软件 GelCompar II v6.0 (Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgium) 进行带型比较。依据无加权算术平均配对分组法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)进行聚类, 从每组相同和相近带谱中选择 1–2 代菌株采用双歧杆菌特异的 *groEL* 基因进行测序, 使用 BLAST 进行序列同源性分析, 在种水平上进行鉴定。将获得的序列提交到 GenBank 数据库。试验对获得的 115 株两歧双歧杆菌进行指纹分型、基因测序, 共确定 53 株代表菌株。

1.5 两歧双歧杆菌的 MLST 分析

采用 Makino 等^[23]的方法, 对两歧双歧杆菌进行 MLST 分析, 选取 *clpC* (编码蛋白酶)、*fusA* (GTP 结合延伸因子 EF-G)、*groEL* (分子伴侣 GroEL)、*ileS* (异亮氨酰转运 RNA 合成酶)、*purF* (酰胺磷酸核糖基转移酶)、*rplB* (50S 核糖体亚基蛋白 L2) 和 *rpoB* (RNA 聚合酶的 β 亚基) 共 7 个持家基因进行(引物由江苏金唯智生物技术有限公司提供), 持家基因及其对应的引物序列见表 1。PCR 扩增参照 Diancourt 等^[24]描述的方法。测序由江苏金唯智生物技术有限公司进行。

表 1 管家基因及其引物信息

Table 1 Housekeeping genes and primer information

管家基因	引物名称	引物序列	产物长度	退火温度
Housekeeping genes	Primer name	Sequence (5'→3')	Size of analyzed fragment (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>clpC</i>	ClpC-uni	GAGTACCGCAAGTACATCGAG	744	58
	ClpC-rev	CATCCTCATCGTCTCGAACAGGAAC		
<i>fusA</i>	fusAB3	ATCGGCATCATGGCYCACATYGAT	784	60
	fusAB4	CCAGCATCGGCTGMACRCCCTT		
<i>groEL</i>	Bif-groEL-F	TCCGATTACGAYCGYGAGAAGCT	500	60
	Bif-groEL-R	CSGCTCGGTSGTCAGGAACAG		
<i>ileS</i>	ileSB3	ATCCCGCGYTACCAGACSATG	789	64
	ileSB4	CGGTGTCGACGTAGTCGGCG		
<i>purF</i>	PurF-uni	CATTCGAACTCCGACACCGA	976	60
	PurF-rev	GTGGGGTAGTCGCCGTTG		
<i>rplB</i>	rplBB3	GGACAAGGACGGCRTSCCSGCCAA	498	60
	rplBB4	ACGACCRCCGTGCGGGTGRITCGAC		
<i>rpoB</i>	rpoBB3	GCGGAGCTGTCCAGAACCA	1 057	55
	rpoBB4	GCATCCTCGTAGTTGTASCC		

1.6 数据分析

用 GelCompar II v6.0 软件对所得凝胶图像进行分析。使用 MEGA 7.0 软件对单个和串联的序列进行比对^[25], 基于邻接法构建系统发育树, 自展值为 1 000。采用 DnaSP v5.1 计算每个持家基因的等位基因数、平均 GC 含量、多态性位点、dN/dS 比值、多样性(π)值^[26], 并通过计算 Tajima's *D* 检验持家基因在进化过程中是否遵循中性进化模型。使用 BioNumerics 软件 v8.0 (Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium)采用 UPGMA 法和分类相似系数对等位基因序列和 MLST 进行分析, 基于 Prims 算法构建最小生成树。使用 SplitTree4.0 分别以单个和 7 个持家基因的串联序列构建分裂重组树^[27], 采用 phi-test 检测等位基因是否存在显著的重组。使用 goeBURST 对两歧双歧杆菌不同基因型进行分组和聚类^[28], 以明确菌株之间的进化关系。

2 结果与分析

2.1 学龄儿童双歧杆菌分离和鉴定

从哈萨克族和维吾尔族儿童粪便中共分离得到 571 株双歧杆菌, 基于 rep-PCR 指纹分型和 *groEL* 基因测序, 初步鉴定结果为长双歧杆菌(*B. longum*) 398 株、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*) 115 株、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*) 18 株、链状双歧杆菌(*B. catenulatum*) 31 株、假小链双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*) 6 株、动物双歧杆菌(*B. animalis* subsp. *lactis*) 1 株、短双歧杆菌(*B. breve*) 1 株、瘤胃双歧杆菌(*B. merycicum*) 1 株。其中, 115 株两歧双歧杆菌来自 13 名哈萨克族学前儿童、15 名哈萨克族学龄儿童、9 名哈萨克族学前儿童、17 名哈萨克族学龄儿童。

2.2 两歧双歧杆菌系统发育及 DNA 指纹分型分析

对 115 株两歧双歧杆菌进行 BoxAIR 和 M13 rep-PCR 指纹分型后, 尽可能筛选出不同

指纹带型的菌株, 每个带型选取 2–3 个代表菌株, 结果共获得 53 株代表性菌株进行指纹聚类分析。如图 1 所示, 两个族群儿童来源的两歧双歧杆菌菌株共划分为 7 个簇。其中, A、D 和 E 簇中的菌株主要来自哈萨克族儿童, B、F 和 G 簇中的菌株主要来自维吾尔族儿童, 但是 C 簇是一个混合族群来源的菌株。同一个民族来源的菌株更有可能聚集为同一个簇。此外, 将两歧双歧杆菌 *groEL* 基因序列在 GenBank 数据库中进行同源比对, 选取序列相似度最高的部分菌株构建系统发育树(图 2), 虽然 *B. bifidum* 的 *groEL* 基因比 16S rRNA 基因有更快的进化速率, 能够很好地区分属内相近种的菌株, 但是系统发育树显示种内差异仍然较小, 表明菌株鉴定的可靠性。

2.3 持家基因序列多样性分析

测序结果表明, 7 个持家基因的扩增片段长度为 498 (*rplB*)–1 057 (*rpoB*)之间。使用 DnaSP v5.1 软件对 53 株两歧双歧杆菌的 7 个持家基因(*clpC*、*fusA*、*groEL*、*ileS*、*purF*、*rplB* 和 *rpoB*)进行分析, 其等位基因数量、GC 含量、核苷酸多样性、dN/dS 等的计算结果见表 2。7 个持家基因等位基因数量为 2–12 个; *ileS* 的等位基因数量最多, 为 12 个; *rplB* 的等位基因数量最少, 为 2 个。7 个持家基因的 GC 含量为 62%–68%, 菌株间差异较小, 表明这 7 个基因在 *B. bifidum* 的长期进化过程中保持了较高的保守性, 能真实地反映菌株间的进化关系。通常用 dN/dS 值判断生物在进化过程中基因是否受到环境因素选择压力的作用^[29]。7 个基因的 dN/dS 值在 0.172 09 (*fusA*)–2.520 37 (*clpC*)之间, *fusA*、*ileS* 和 *rplB* 这 3 个基因的 dN/dS 值小于 1, 表明它们大多进行同义替换, 在进化过程中更多受到净化选择压力作用; *clpC*、

groEL、*purF* 和 *rpoB* 基因的 dN/dS 值大于 1, 表明它们大多进行非同义替换, 在进化过程中更多受到正选择作用。核苷酸多样性(π)表示两两序列间位点差异的平均数^[30], 为 0.018 04 (*groEL*)–0.077 93 (*ileS*)。Tajima's *D* 统计检测能鉴定基因在进化过程中是否符合中性理论模型, 即是否受到选择压力作用。如果 Tajima's *D* 值小于 0, 表明检测的基因受到纯化选择作用, 而该值大于 0 则表明受到多样化选择作用。本研究中选择的 7 个持家基因的 Tajima's *D* 值小于 0, 表明它们受到纯化选择作用。

2.4 ST 型划分

用 BioNumerics v8.0 软件分析获得的 7 个管家基因的序列, 以确定等位基因的数量。每个菌株的等位基因数量按顺序连接, 形成等位基因图谱。对 53 个代表性菌株的 7 个基因片段进行了等位基因组合, 并通过等位基因组合的唯一性来鉴定 ST。

图 3 结果表明这 53 株两歧双歧杆菌可以划分为 37 个 ST 型, 说明这两个民族儿童肠道中的两歧双歧杆菌多样性较高。其中, ST-6 包含 5 个分离株, ST-27 包含 4 个分离株, ST-7 和 ST-1 包含 3 个分离株, ST-11、ST-19、ST-22、ST-26 和 ST-8 包含 2 个分离株, ST-1、ST-6 和 ST-22 中菌株均来自哈萨克族, ST-7、ST-8、ST-11、ST-19、ST-26 和 ST-27 中菌株均来自维吾尔族。研究发现, 来自不同个体的菌株序列型不同, 但来自同一个体的菌株也可能存在多个序列型, 如 ST-1 和 ST-31 均来自于 YLH1B11。所有菌株都根据民族起源分为 7 个簇。簇 3、4 和 7 中菌株来自哈萨克族, 簇 1、5 中菌株来自维吾尔族。树状图表明聚集在一起的菌株大多具有相同的民族来源, 有一定的族群特异性。

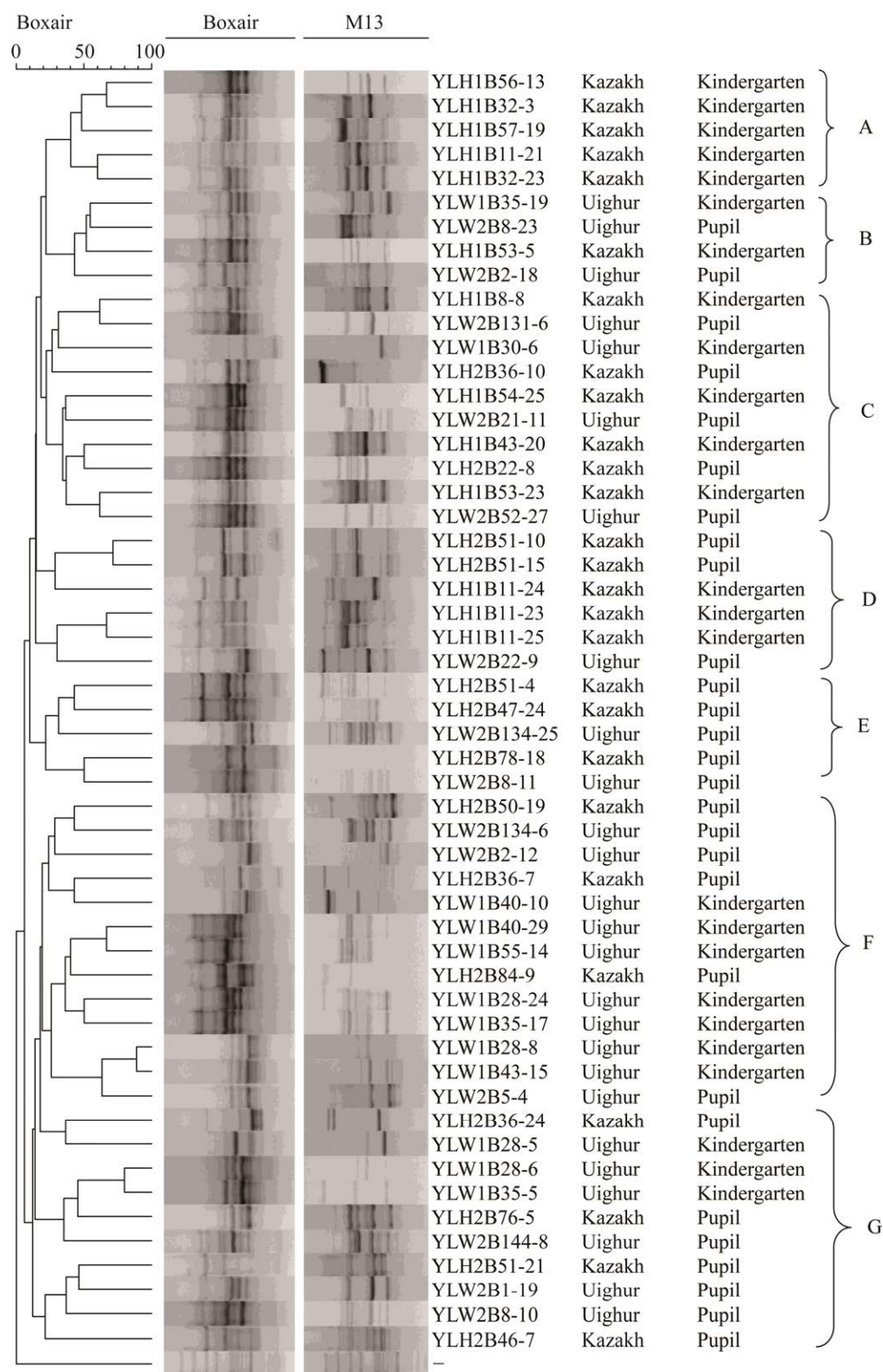


图 1 基于 Boxair 和 M13 引物对 53 株两歧双歧杆菌代表性菌株的 rep-PCR 指纹分型聚类分析
 Figure 1 rep-PCR fingerprint typing cluster analysis of 53 representative *Bifidobacterium bifidum* strains based on Boxair and M13 primers.

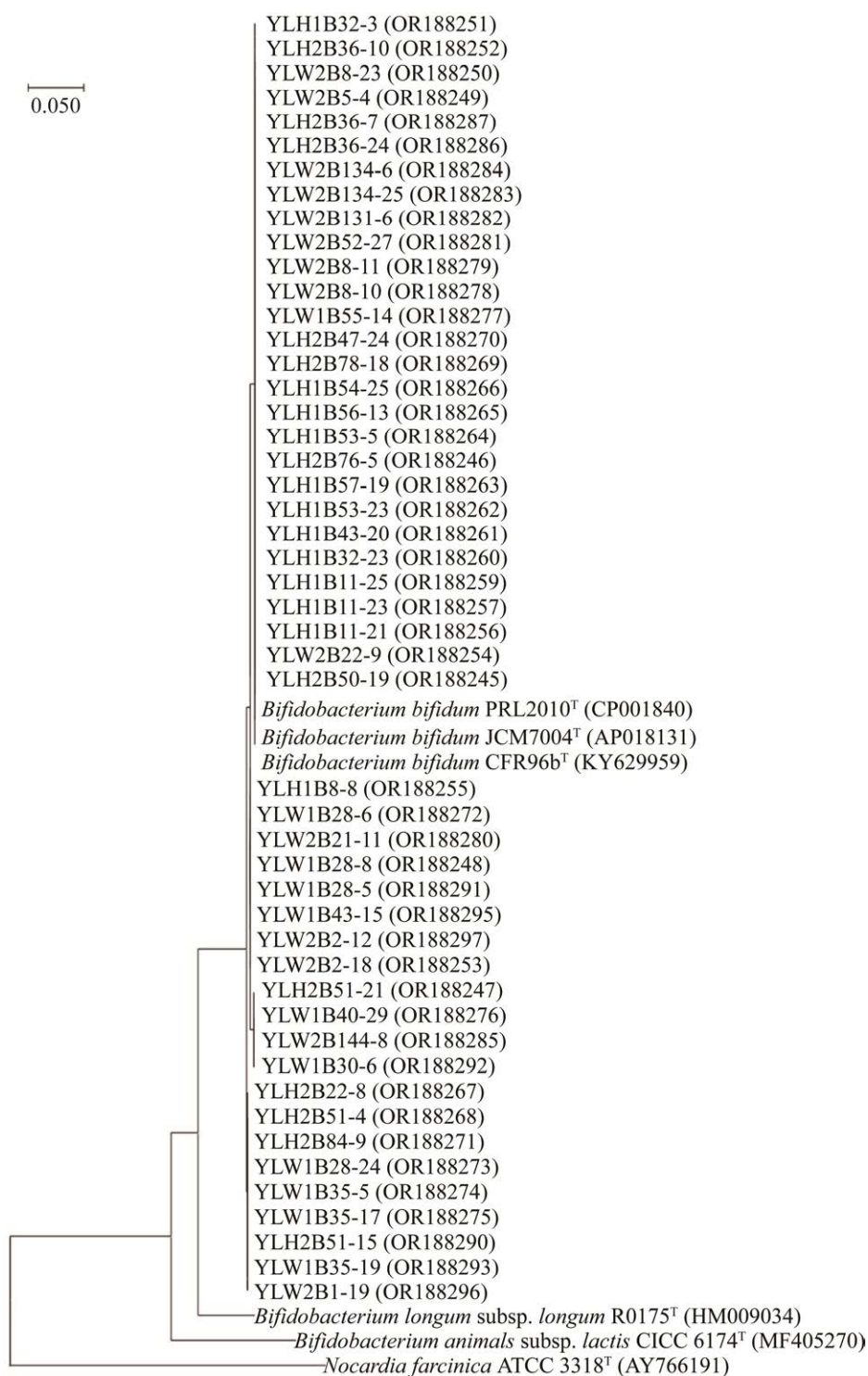


图 2 基于 *groEL* 基因序列两歧双歧杆菌系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 用于鉴定种属关系的模式菌株名称后用上标(T)表示; 比例尺 0.050 表示核苷酸碱基差异为 5%

Figure 2 Phylogenetic tree of *Bifidobacterium bifidum* strains based on *groEL* gene sequences. The serial number in parentheses is the GenBank login number; The name of the model strain used to identify species affiliation is indicated by superscript (T); Scale 0.050 indicates a nucleotide base difference of 5%.

表 2 用于 MLST 分析的持家基因序列多样性

Table 2 Diversity of seven house-keeping gene sequences used for MLST analysis

Gene	Polymorphic sites	Number of alleles	GC	dN/dS	Tajima's <i>D</i> -value	π	<i>phi</i> -test
<i>clpC</i>	77	6	64.7	2.520 37	0.261 22	0.029 22	0.458 90
<i>fusA</i>	107	9	62.4	0.172 09	-1.825 00	0.067 52	0.061 87
<i>groEL</i>	39	4	68.4	6.852 41	-1.950 31	0.018 04	0.590 10
<i>ileS</i>	119	12	62.5	0.995 75	-1.680 69	0.077 93	0.258 30
<i>purF</i>	98	7	63.8	1.489 89	-1.875 62	0.041 20	0.000 29
<i>rplB</i>	46	2	66.5	0.321 99	-0.206 20	0.032 19	1.000 00
<i>rpoB</i>	20	9	64.0	1.428 65	-2.447 10	0.044 49	0.000 06

2.5 基于 STs 的克隆群鉴定

使用 goeBURST 软件进一步定义具有类似等位基因图谱的更密切相关的菌株。等位基因图谱相似的菌株被划分为相同的克隆复合体 (CCs), 本研究将至少包含 2 个 STs 型定义为一个克隆复合体。如图 4 所示, 53 株 *B. bifidum* 的 37 个 ST 型被划分为 7 个 CC 和 4 个独特型 (singleton)。其中 7 个 CC 包括 49 个菌株, 占总菌株数的 92.45%。CC2 共 15 株菌, 划分为 8 个不同的 ST 型, 占总菌株数的 28.30%, 为优势克隆复合体。CC1、CC4 中的菌株均来自维吾尔族儿童, 而 CC6、CC7 中的菌株均来自哈萨克族儿童。

2.6 不同民族两歧双歧杆菌菌株的比较分析

将 7 个持家基因序列串联连接的序列利用最大似然法构建系统发育树来分析 53 株两歧双歧杆菌的遗传相关性。由 53 株两歧双歧杆菌划分的 ST 型, 可以划分为 4 个谱系, 如图 5 所示, 谱系具有较低的序列多样性。谱系 1、4 中菌株绝大部分来自维吾尔族儿童, 谱系 2、3 中菌株则来自哈萨克族儿童。串联序列聚类揭示了一些明显的民族相关谱系。这些结果表明肠道来源的两歧双歧杆菌具有一定的族群特异性。

使用 BioNumeris 通过构建 37 个 ST 型的最

小生成树来说明 ST 与不同菌株分离来源之间的关系。如图 6 所示, 53 个两歧双歧杆菌分离株被分为 3 个主要分支。图中黑色圆圈代表源于维吾尔族儿童肠道的 ST 型, 白色圆圈代表源于哈萨克族儿童肠道的 ST 型。定义一个克隆谱系 (clone complex, CC) 至少含有 2 个 ST 型。

分支 A 主要包括来自维吾尔族的菌株, 分支 B 的菌株均来自哈萨克族。分支 A 包含 3 个克隆复合体和 16 个 ST 型, 共容纳了 22 株双歧杆菌, 主要来自维吾尔族儿童。分支 B 含有 2 个克隆复合体和 11 个 ST 型, 包括 14 株双歧杆菌。分支 B 内菌株都来自维吾尔族儿童。分支 C 内有 1 个克隆复合体和 16 个 ST 型, 包括 19 株双歧杆菌。这与基于 goeBURST 算法的分析结果基本一致。尽管发现个别来源于维吾尔族的分离株与哈萨克族的分离株有密切的亲缘关系, 但从整体上看, 来自同一民族的两歧双歧杆菌菌株趋向于聚集在一起, 亚群的划分反映了两歧双歧杆菌对不同民族宿主群的适应性。

2.7 持家基因重组分析

细菌的高重组率加速了基因组多样化的速度, 从而影响了菌株间基因组差异。同源重组导致了序列数据中核苷酸位点之间的差异, 利用劈裂分解分析能可视化地检测出这些差异, 并用网络图来表示它们之间的关系。为了进一步探索重组对种群的影响, 对两歧双歧杆菌的

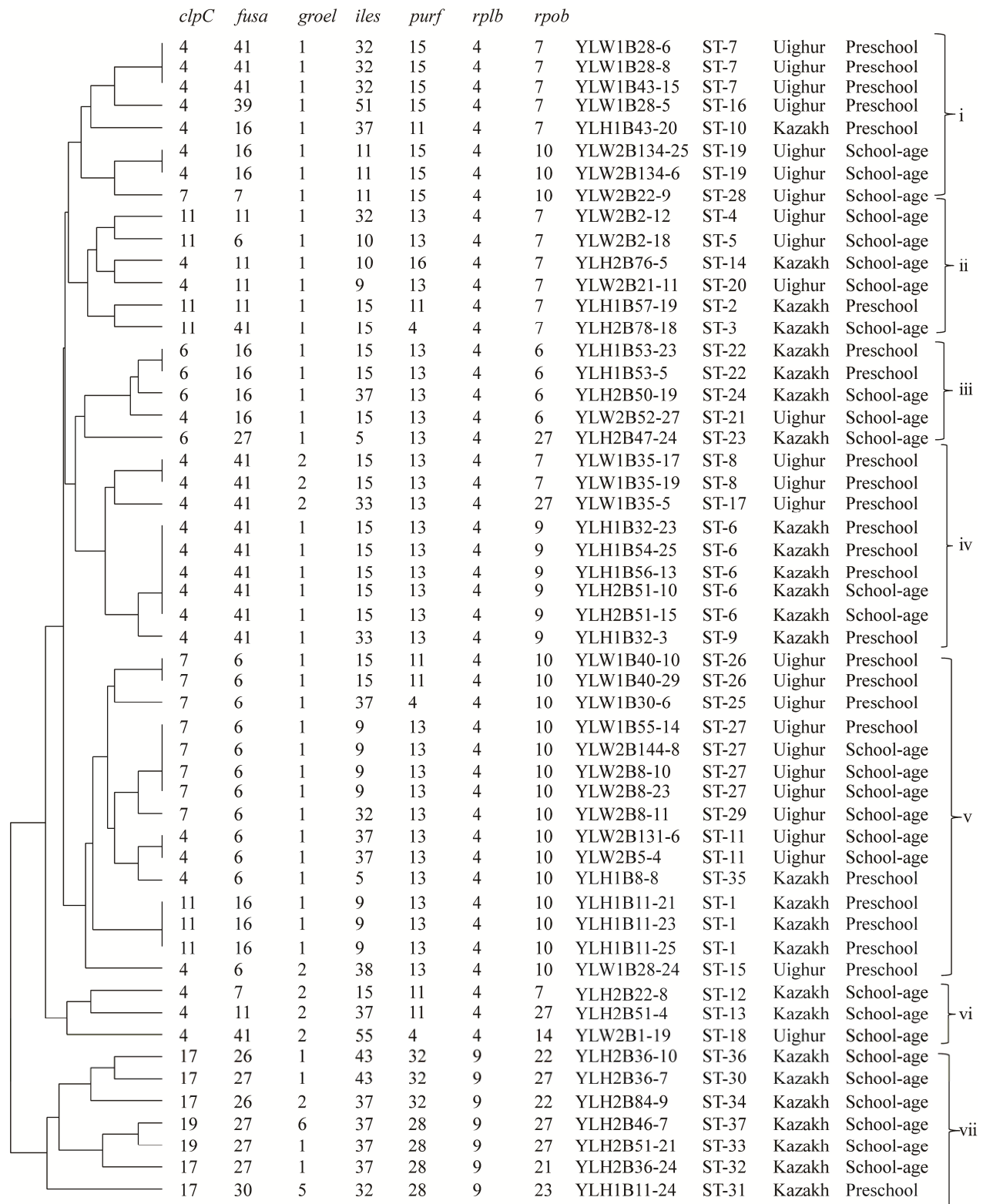


图3 基于 MLST 对两歧双歧杆菌菌株的 ST 划分及其与来源人群的关联

Figure 3 ST of 53 representative *Bifidobacterium bifidum* strains based on MLST and its association with isolation source populations as shown in an UPGMA dendrogram.

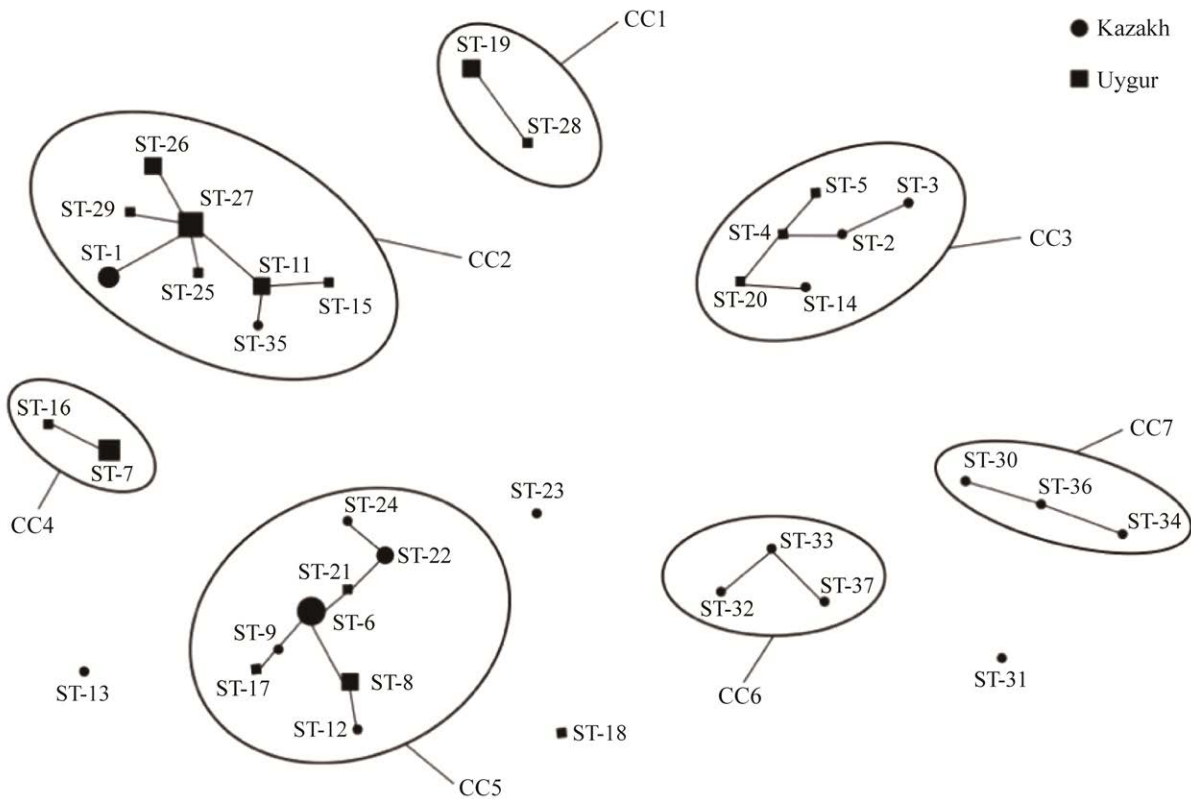


图 4 基于 goeBURST 算法的 37 个 ST 谱系分析 各实心圆点或方块代表一个 ST，圆或方块的大小表示该 ST 中菌株数量多少。实心形状表示菌株的分离民族来源，圆形表示哈萨克族，方形表示维吾尔族

Figure 4 Clonal complex analysis of 37 STs based on goeBURST algorithm. Each solid circle or square represents an ST, and the size of the circle or square indicates the number of strains in that ST. The solid shape indicates the isolated ethnic origin of the strain, the circle represents the Kazak ethnic group, and the square indicates the Uyghur ethnic group.

结构进行了分解分析。使用 SplitTree v4.0 软件分别构建了 7 个持家基因及串联序列劈裂重组分析图，结果见图 7 和图 8。在本研究中，所有基因都具有明显的平行四边形结构，表明这些基因在进化过程中受到了基因重组的影响。此外，基于 SplitTree v4.0 的 phi-test 分别检验了 7 个持家基因是否发生了重组事件。结果显示，这 7 个持家基因发生重组事件的 *P* 值为 0.000 068 08 (*rpoB*)–1 (*rplB*)之间，7 个基因都存在极显著的重组现象，这与劈裂重组图一致；7 个基因的串联序列显示出明显的网状结

构，表明根据 phi 检验在 7 个基因中发生了重组事件。

3 讨论与结论

目前，关于真核生物与微生物互作体系的生态、进化理论的范式研究认为大部分生物都是由宿主及其体内外的微生物共同构成的共生功能体(holobiont)，在进化上作为一个选择单元或实体而存在。共生功能体的概念认为宿主和特殊的微生物只有在长期互动中形成严格的共生机制和高度的忠贞性(high partner fidelity)才

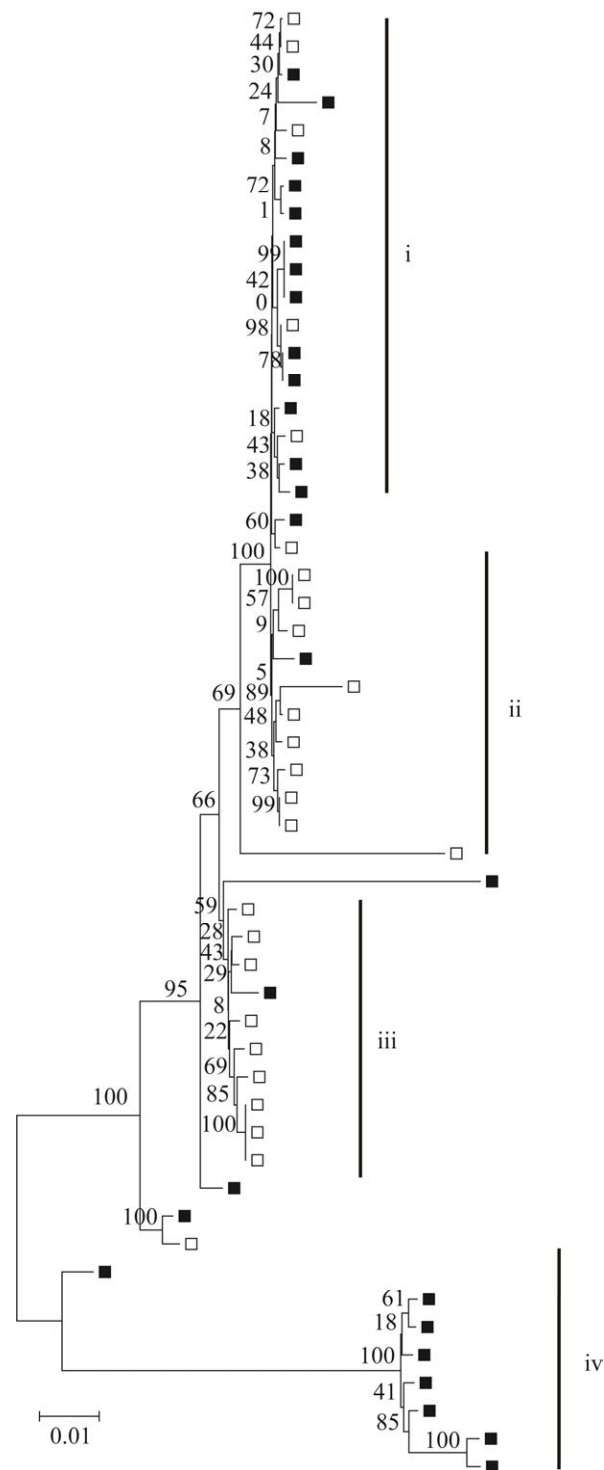


图 5 基于持家基因 37 个 ST 型串联序列的最大似然法系统发育树 方块表示菌株的分离民族来源，白色表示哈萨克族，黑色表示维吾尔族，罗马字母代表菌株的基因型

Figure 5 Maximum likelihood phylogenetic tree obtained from the concatenated nucleotide sequence of 37 ST types. The solid square indicates the isolated ethnic origin of the strain, white indicates Kazak and black indicates Uyghur. Roman letters represent the genotype of the strains.

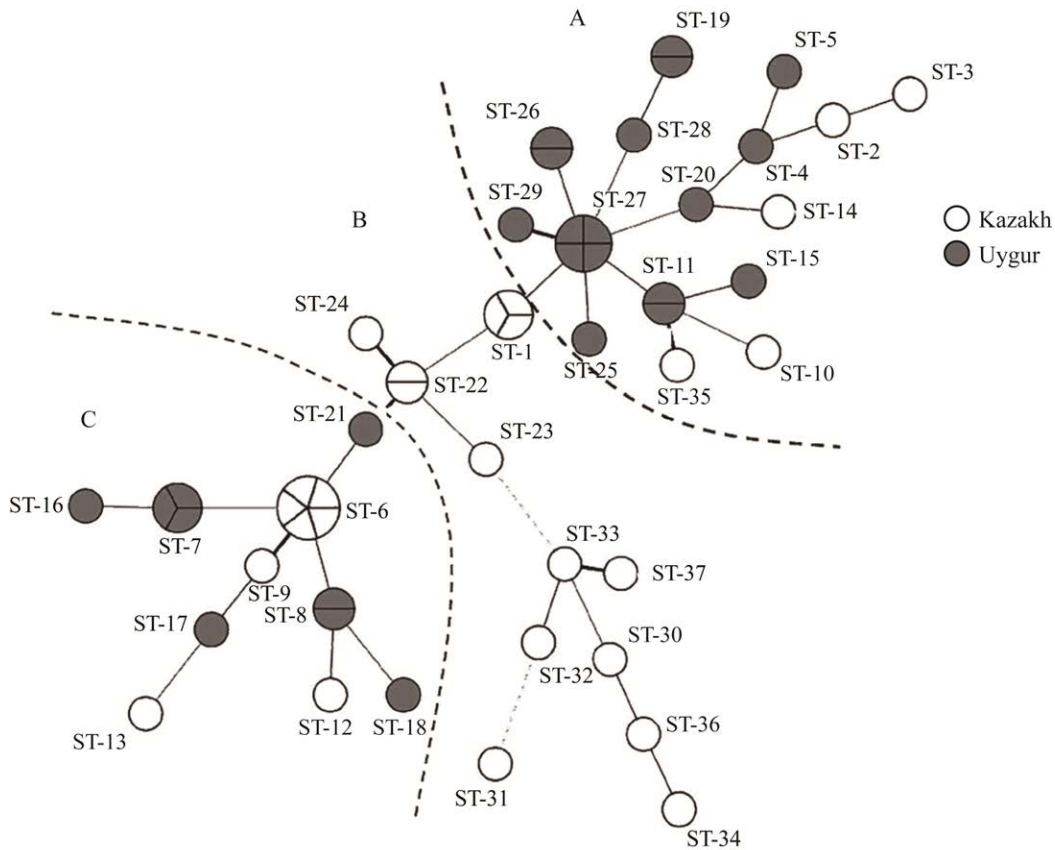


图 6 53 株两歧双歧杆菌基于 MLST 的最小生成树 各圆点代表一个 ST, 圆的大小表示该 ST 中菌株数量多少. 圆的颜色表示菌株的分离民族来源, 白色表示哈萨克族, 黑色表示维吾尔族, A、B 和 C 分别表示 3 个分支

Figure 6 Minimum-spanning tree analysis of 53 *Bifidobacterium bifidum* strains based on MLST. Each dot represents an ST, and the size of the circle indicates the number of strains in that ST. The color of the circle indicates the isolated ethnic origin of the strain, white indicates Kazakh, black indicates Uyghur, and A, B and C indicate three branches.

能形成, 这类微生物称为共生体(symbiont)^[31]。从生态学角度来看, 人体和部分肠道菌群也能形成共生功能体 holobiont。研究认为人类最重要的微生物类群与遗传因子一样可以垂直传递, 尤其是人类婴幼儿期间通过母乳喂养和产道分娩途径获得的来自母亲的菌株基本是完全的厌氧或者兼性厌氧细菌, 主要包括双歧杆菌、拟杆菌、梭杆菌和 AKK 等被认为是传统或新一代益生菌的代表^[32-34]。

研究发现 *B. bifidum* 最为显著的特征是专

性利用母乳寡糖和宿主肠道黏膜上皮黏蛋白聚糖, 而利用人类饮食来源外源聚糖的能力极差^[10-11]。但是与长双歧杆菌、短双歧杆菌等同属细菌可能存在营养交互作用(cross-feeding), 表现为利他行为的生理特点, 也很可能和 AKK 菌为代表的黏液层细菌存在复杂的食物网关系^[35-37]。因此, 从生态位宽度来说, *B. bifidum* 被认为是一种明显局限于婴幼儿肠道的特有型细菌 (specialist), 具有明显的生态位适应性。目前在人体肠道中频繁发现的双歧杆菌至少有 12 个种

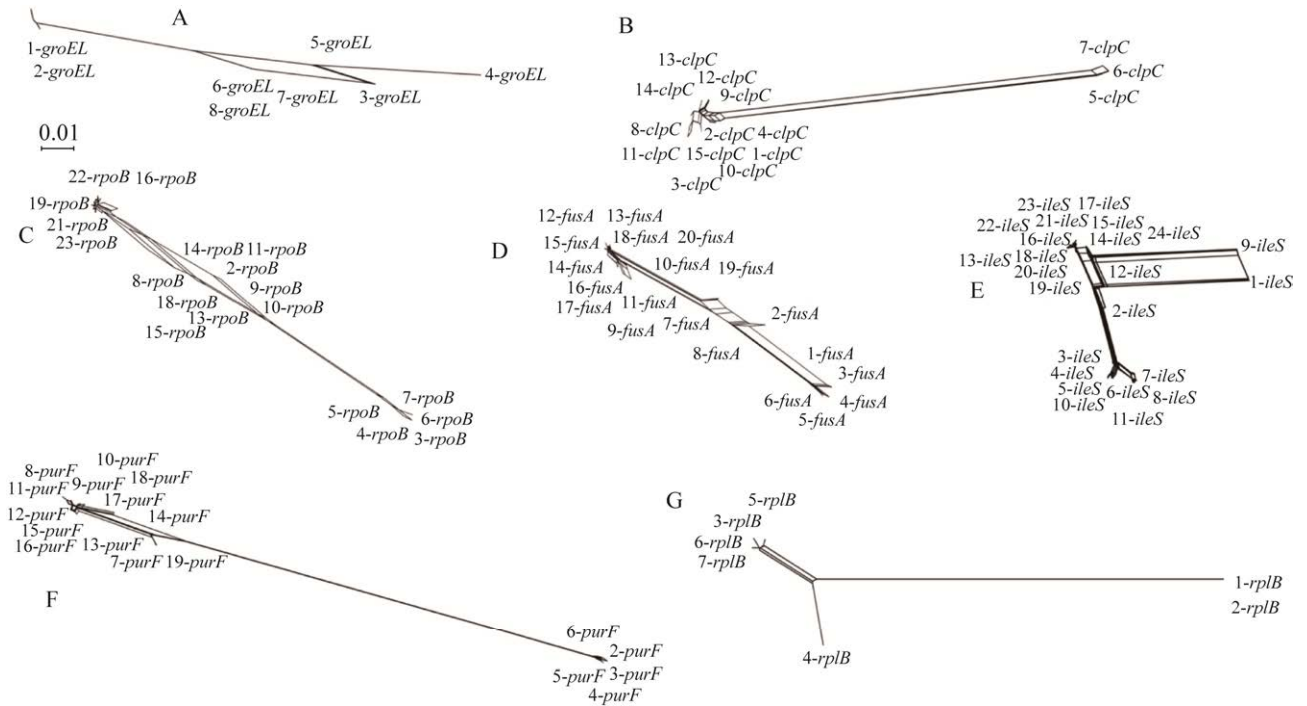


图 7 两歧双歧杆菌 7 个持家基因的等位基因分裂重组分析

Figure 7 Split decomposition analysis of *Bifidobacterium bifidum* based on alleles of seven house-keeping genes. A: *groEL* gene. B: *clpC* gene. C: *rpoB* gene. D: *fusA* gene. E: *ileS* gene. F: *purF* gene. G: *rplB* gene.

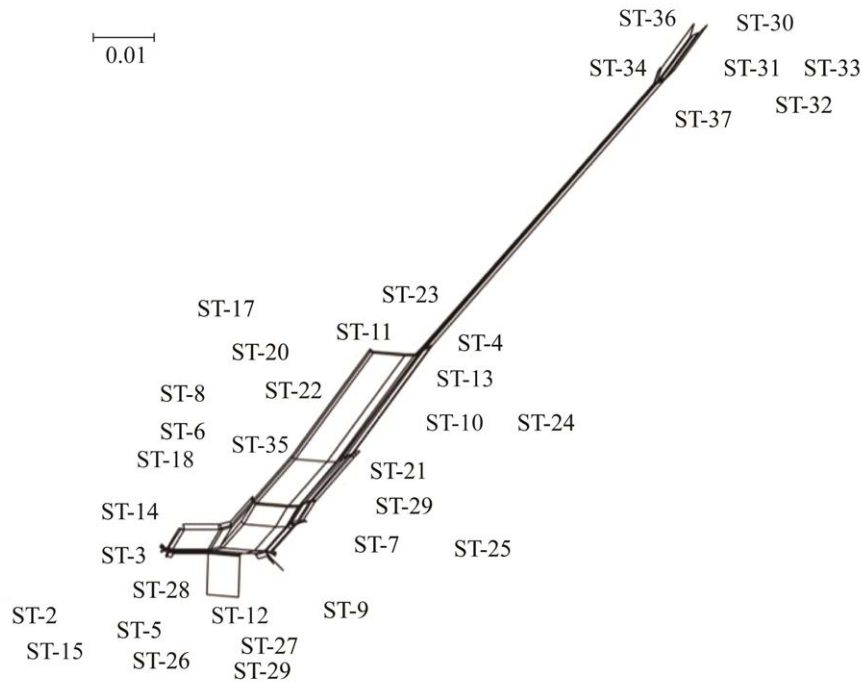


图 8 两歧双歧杆菌 7 个持家基因串联序列的等位基因分裂重组分析

Figure 8 Split decomposition analysis of *Bifidobacterium bifidum* based on concatenated allele sequences of seven house-keeping genes.

及亚种, 在正常顺产健康的母乳喂养婴儿肠道内, *B. bifidum*、*B. longum* subsp. *infantis* 和 *B. breve* 为优势种, 被定义为“婴儿型双歧杆菌”(infant-type HRB)。在成年化人肠道中, 占主导地位的是长双歧杆菌长亚种(*B. longum* subsp. *longum*)、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)等, 而 *B. bifidum* 丰度很低, 有报道人群样本中分离率不到 30%^[38]。在本研究中, 肠道菌群成人化的学龄儿童中, *B. bifidum* 的分离比率是 38.80%。根据多个文献报道, 在不同地域的人群中, 各种双歧杆菌的分离率和相对丰度差异很大, 不仅与年龄有关, 而且与饮食、地理、族群有关^[38]。*B. bifidum* 主要存在于断奶前的婴幼儿肠道中, 以母乳寡糖为碳源、能源, 断奶后数量急剧下降; 不能代谢成人化肠道中饮食来源的多糖, 因此越是成人化的肠道其数量越少, 可能仅仅通过代谢人体肠道黏膜层黏蛋白生存, 除了维持婴幼儿早期肠道菌群平衡和肠道健康之外, 通过与 *B. longum* 等对母乳寡糖(human milk oligosaccharide, HMO)、外源多糖的营养交互作用产生短链脂肪酸、人体不能合成的 B 族维生素对婴幼儿甚至成人发挥益生菌功能^[35]。因此, *B. bifidum* 代谢的独特性决定了其与肠道黏膜层环境的适应性, 很可能与特定人群遗传紧密相关, 但目前并不清楚两者的互作机理。

由于母乳寡糖和宿主肠道黏膜上皮黏蛋白聚糖的合成决定于宿主的遗传机制, 而不同地域的民族人群其母乳寡糖组成非常多样(目前已经鉴定的多达 200 种以上)^[39], 此外宿主黏膜上皮黏蛋白聚糖也和人体本身的免疫、代谢息息相关, 决定了 *B. longum* 与人体宿主的密切关系。很可能在现代人类进化过程中, 由于地理迁徙、分群, 造成肠道内共生的双歧杆菌群体遗传结构与其宿主的协同进化, 即群体遗传结构呈现不同民族族群来源的特异性。

在本研究中, 分离的 *B. bifidum* 菌株来自新疆伊宁两个民族族群(维吾尔族和哈萨克族, 自然地理村落相对隔离, 很少通婚)学龄儿童肠道, 我们通过多位点序列分型(MLST)分析了 *B. bifidum* 分离株的种群结构和不同族群来源之间的关系。53 个具有代表性的分离株被分为 37 个 ST, 其多样性为 69.81%, 显示较高的遗传多样性。有研究表明, 345 株长双歧杆菌长亚种分离株被划分为 35 个 ST 型, 多样性为 10.14%^[40]。Makino 等^[41]从分娩前的母亲粪便和分娩后的婴儿粪便中分离出的 207 个双歧杆菌中鉴定了 26 个 ST, 多样性为 12.56%。这些差异可能是由于每项研究中使用的分离株来自不同的地理位置, 并选择了不同的持家基因进行分析。

多个研究发现 *B. bifidum* 菌株分群和分离株来源之间有一定的关联。在本研究中, 基于 7 个持家基因的 UPGMA 树状图显示, 7 个谱系中谱系 1、4 和 6 菌株来自维吾尔族, 谱系 3、7 中菌株来自哈萨克族。将所有 ST 型集聚类为 7 个克隆复合体(CC), CC1、CC4 中的菌株来自维吾尔族儿童, CC6、CC7 中的菌株来自哈萨克族儿童, 显示出一定程度的族群特异性。最近一个研究对不同人群宿主来源的 *B. bifidum* 菌株进行比较基因组研究显示, 美洲人群来源的菌株组成了一个单独的组, 而中国人群来源菌株构成了多个组, 但未报道中国人群地理来源和族群差异的相关数据^[42]。类似的针对多个动物宿主来源(host-adapted)而非人类专性共栖菌的代表罗伊氏乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)的群体遗传研究显示, 菌株基因组分群结果与其宿主动物来源相一致^[43]。相反地, 流浪型乳杆菌的代表植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)不能依据来源对菌株进行分群^[44]。对于人类肠道专性共栖菌 *B. bifidum* 来说需要更大规模的取样,

采用比较基因组学手段深入研究。

越来越多的证据表明, 宿主基因型不仅在群落水平上影响肠道微生物的组成, 在菌株水平上也影响肠道特定细菌的遗传进化, 进而影响在不同个体中的定殖能力和益生特性。一项对具有不同亲缘关系成年人肠道中优势细菌的研究发现, 宿主基因型对决定种群的物种组成有显著影响^[45]。这与本研究得到的结果相吻合, 肠道共栖细菌的群体遗传在不同族群个体内发生动态的遗传变化。考虑到肠道微生物群落的复杂性、控制环境变量的困难, 以及许多宿主基因可能参与这一过程的假设, 试图解开造成此类差异的遗传机制将是一项挑战。要明确以肠道两歧双歧杆菌为代表的专性共栖细菌是否与不同民族群存在协同进化需要大尺度、大范围的人群检测。

REFERENCES

- [1] HARMSSEN HJM, RAANGS GC, HE T, DEGENER JE, WELLING GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2982-2990.
- [2] ROGER LC, COSTABILE A, HOLLAND DT, HOYLES L, McCARTNEY AL. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life[J]. *Microbiology*, 2010, 156(11): 3329-3341.
- [3] VAISHAMPAYAN PA, KUEHL JV, FROULA JL, MORGAN JL, OCHMAN H, FRANCINO MP. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2010, 2: 53-66.
- [4] VENTURA M, TURRONI F, MOTHERWAY MO, MACSHARRY J, van SINDEREN D. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(10): 467-476.
- [5] WONG CB, ODAMAKI T, XIAO JZ. Insights into the reason of human-residential bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, 44(3): 369-385.
- [6] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, FERRARIO C, LUGLI GA, MANCABELLI L, van SINDEREN D, VENTURA M. Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(1): 103-118.
- [7] TURRONI F, PEANO C, PASS DA, FORONI E, SEVERGNINI M, CLAESSEON MJ, KERR C, HOURIHANE J, MURRAY D, FULIGNI F, GUEIMONDE M, MARGOLLES A, de BELLIS G, O'TOOLE PW, van SINDEREN D, MARCHESI JR, VENTURA M. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36957.
- [8] LUGLI GA, MILANI C, DURANTI S, ALESSANDRI G, TURRONI F, MANCABELLI L, TATONI D, OSSIPRANDI MC, SINDEREN D, VENTURA M. Isolation of novel gut bifidobacteria using a combination of metagenomic and cultivation approaches[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 1-6.
- [9] DURANTI S, LUGLI GA, MANCABELLI L, ARMANINI F, TURRONI F, JAMES K, FERRETTI P, GORFER V, FERRARIO C, MILANI C, MANGIFESTA M, ANZALONE R, ZOLFO M, VIAPPIANI A, PASOLLI E, BARILETTI I, CANTO R, CLEMENTI R, COLOGNA M, CRIFÒ T, et al. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 1-13.
- [10] GUGLIELMETTI S, TAMAGNINI I, MINUZZO M, ARIOLI S, PARINI C, COMELLI E, MORA D. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines[J]. *Current Microbiology*, 2009, 59(2): 167-172.
- [11] SERAFINI F, STRATI F, RUAS-MADIEDO P, TURRONI F, FORONI E, DURANTI S, MILANO F, PEROTTI A, VIAPPIANI A, GUGLIELMETTI S, BUSCHINI A, MARGOLLES A, van SINDEREN D, VENTURA M. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010[J]. *Anaerobe*, 2013, 21: 9-17.
- [12] EGAN M, O'CONNELL MOTHERWAY M, KILCOYNE M, KANE M, JOSHI L, VENTURA M, van SINDEREN D. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based

- medium[J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 1-14.
- [13] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, MANCABELLI L, MANGIFESTA M, VIAPPIANI A, LUGLI GA, FERRARIO C, GIOIOSA L, FERRARINI A, LI J, PALANZA P, DELLEDONNE M, van SINDEREN D, VENTURA M. Deciphering bifidobacterial-mediated metabolic interactions and their impact on gut microbiota by a multi-omics approach[J]. The ISME Journal, 2016, 10(7): 1656-1668.
- [14] DURANTI S, LUGLI GA, MILANI C, JAMES K, MANCABELLI L, TURRONI F, ALESSANDRI G, MANGIFESTA M, MANCINO W, OSSIPRANDI MC, IORI A, ROTA C, GARGANO G, BERNASCONI S, di PIERRO F, SINDEREN D, VENTURA M. *Bifidobacterium bifidum* and the infant gut microbiota: an intriguing case of microbe-host co-evolution[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(10): 3683-3695.
- [15] TURRONI F, van SINDEREN D, VENTURA M. Bifidobacteria: insights into the biology of a key microbial group of early life gut microbiota[J]. Microbiome Research Reports, 2021:1-2.
- [16] DURANTI S, MILANI C, LUGLI GA, TURRONI F, MANCABELLI L, SANCHEZ B, FERRARIO C, VIAPPIANI A, MANGIFESTA M, MANCINO W, GUEIMONDE M, MARGOLLES A, van SINDEREN D, VENTURA M. Insights from genomes of representatives of the human gut commensal *Bifidobacterium bifidum*[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(7): 2515-2531.
- [17] YUAN LX, ZHANG XL, LUO BL, LI X, TIAN FW, YAN WL, NI YQ. Ethnic specificity of species and strain composition of *Lactobacillus* populations from mother-infant pairs, uncovered by multilocus sequence typing[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 814284.
- [18] ASSOCIATION WM. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects[J]. The Journal of the American Medical Association, 2013, 310(20): 2191-2194.
- [19] VLKOVÁ E, SALMONOVÁ H, BUNEŠOVÁ V, GEIGEROVÁ M, RADA V, MUSILOVÁ Š. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria[J]. Anaerobe, 2015, 34: 27-33.
- [20] MODESTO M. Isolation, cultivation, and storage of bifidobacteria[M]//The Bifidobacteria and Related Organisms. Amsterdam: Elsevier, 2018: 67-98.
- [21] VENTURA M, RENIERO R, ZINK R. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2760-2765.
- [22] JAROCKI P, PODLEŚNY M, KOMOŃ-JANCZARA E, KUCHARSKA J, GLIBOWSKA A, TARGOŃSKI Z. Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 159.
- [23] MAKINO H, KUSHIRO A, ISHIKAWA E, KUBOTA H, GAWAD A, SAKAI T, OISHI K, MARTIN R, BEN-AMOR K, KNOL J, TANAKA R. Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78331.
- [24] DIANCOURT L, PASSET V, CHERVAUX C, GARAUULT P, SMOKVINA T, BRISSE S. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6601-6611.
- [25] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [26] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [27] HUSON DH, BRYANT D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies[J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(2): 254-267.
- [28] FEIL EJ, LI BC, AANENSEN DM, HANAGE WP, SPRATT BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(5): 1518-1530.
- [29] KRYAZHIMSKIY S, PLOTKIN JB. The population genetics of dN/dS[J]. PLoS Genetics, 2008, 4(12): e1000304.
- [30] ZHANG WY, LIU WJ, SONG YQ, XU HY, MENGHE B, ZHANG HP, SUN ZH. Multilocus sequence typing of a dairy-associated *Leuconostoc mesenteroides* population reveals clonal structure with intragenic homologous recombination[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(4): 2284-2293.

- [31] ALBERDI A, MARTIN BIDEGUREN G, AIZPURUA O. Diversity and compositional changes in the gut microbiota of wild and captive vertebrates: a meta-analysis[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 22660.
- [32] WANG SP, RYAN CA, BOYAVAL P, DEMPSEY EM, ROSS RP, STANTON C. Maternal vertical transmission affecting early-life microbiota development[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(1): 28-45.
- [33] HOU FY, TANG JY, LIU YY, TAN YF, WANG Y, ZHENG LJ, LIANG DB, LIN YQ, WANG LK, PAN ZY, YANG RF, BI YJ, ZHI FC. Safety evaluation and probiotic potency screening of *Akkermansia muciniphila* strains isolated from human feces and breast milk[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e0336122.
- [34] MILANI C, MANCABELLI L, LUGLI GA, DURANTI S, TURRONI F, FERRARIO C, MANGIFESTA M, VIAPPIANI A, FERRETTI P, GORFER V, TETT A, SEGATA N, van SINDEREN D, VENTURA M. Exploring vertical transmission of bifidobacteria from mother to child[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(20): 7078-7087.
- [35] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, MAHONY J, van SINDEREN D, VENTURA M. Glycan utilization and cross-feeding activities by bifidobacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(4): 339-350.
- [36] BUNESOVA V, LACROIX C, SCHWAB C. Mucin cross-feeding of infant bifidobacteria and *Eubacterium hallii*[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 75(1): 228-238.
- [37] TURRONI F, ÖZCAN E, MILANI C, MANCABELLI L, VIAPPIANI A, van SINDEREN D, SELA DA, VENTURA M. Glycan cross-feeding activities between bifidobacteria under *in vitro* conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1030.
- [38] DERRIEN M, TURRONI F, VENTURA M, SINDEREN D. Insights into endogenous *Bifidobacterium* species in the human gut microbiota during adulthood[J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(10): 940-947.
- [39] ZHANG WY, VERVOORT J, PAN JC, GAO P, ZHU HQ, WANG XD, ZHANG YM, CHEN BR, LIU Y, LI YY, PANG XY, ZHANG SW, JIANG SL, LU J, LYU JP. Comparison of twelve human milk oligosaccharides in mature milk from different areas in China in the Chinese Human Milk Project (CHMP) study[J]. *Food Chemistry*, 2022, 395: 133554.
- [40] ZHANG M, HANG XM, TAN J, YANG H. The host genotype and environment affect strain types of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* inhabiting the intestinal tracts of twins[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14): 4774-4781.
- [41] MAKINO H, KUSHIRO A, ISHIKAWA E, MUYLAERT D, KUBOTA H, SAKAI T, OISHI K, MARTIN R, BEN AMOR K, OOZEER R, KNOL J, TANAKA R. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 6788-6793.
- [42] LU WW, PEI ZM, ZANG MN, LEE YK, ZHAO JX, CHEN W, WANG HC, ZHANG H. Comparative genomic analysis of *Bifidobacterium bifidum* strains isolated from different niches[J]. *Genes*, 2021, 12(10): 1504.
- [43] 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[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(3): 377-387.
- [44] MARTINO ME, BAYJANOV JR, CAFFREY BE, WELS M, JONCOUR P, HUGHES S, GILLET B, KLEEREBEZEM M, van HIJUM SAFT, LEULIER F. Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12): 4974-4989.
- [45] ZOETENDAL EG, AKKERMANS ADL, AKKERMANS-VAN VLIET WM, de VISSER JAGM, de VOS WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract[J]. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 2001, 13(3): 4774-4781.