

研究报告

三株双歧杆菌鉴定及遗传特征分析

任秀¹,赵帅¹,丁波²,余文¹,李景云¹,崔生辉¹

(1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050;2. 烟台市食品药品检验检测中心,山东烟台 264000)

摘要:目的 对3株双歧杆菌用不同方法进行鉴定,并结合药物敏感性测试结果和全基因组测序(WGS)数据,对菌株获得性耐药元件及其可转移性进行分析。方法 分别采用生化、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)及WGS方法对3个益生菌产品中分离的3株双歧杆菌进行鉴定,测试菌株对氨苄西林等8种抗生素的敏感性,结合WGS数据,使用在线数据库分析菌种携带的获得性耐药元件,并对其可转移性进行分析。结果 对3株双歧杆菌,生化方法可给出较为可靠的属水平鉴定结果;MALDI-TOF MS方法可给出可靠的种水平鉴定结果;基于WGS结果计算平均核苷酸一致性和DNA-DNA杂交值,可给出可靠的种和亚种水平鉴定结果,结合wgSNP及wgMLST分析,3株菌鉴定结果均为动物双歧杆菌乳亚种。3株菌对四环素和庆大霉素均呈现敏感性下降表型,其中庆大霉素敏感性下降与厌氧菌种转运系统缺乏有关,为固有表型;3株菌染色体上均携带tet(W),且其下游均存在IS5序列,说明该耐药基因可能为可转移元件,经与GenBank中58个来自不同种属细菌的tet(W)对比发现,动物双歧杆菌乳亚种中的tet(W)序列具有一定的保守性。结论 双歧杆菌的鉴定与遗传特征分析应结合生化、MALDI-TOF MS、抗生素敏感性和WGS等技术综合开展,尤其WGS技术不仅可以对双歧杆菌进行亚种水平的精准鉴定,还可以针对耐药元件及可转移性进行深入分析,为益生菌相关菌种产品的研发和监管、益生菌类保健食品行业的健康发展提供有力的技术支持。

关键词:全基因组测序;双歧杆菌;精准鉴定;tet(W);药物敏感性测试

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)10-1099-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.10.001

Identification and genetic analysis of three strains of *Bifidobacterium*REN Xiu¹, ZHAO Shuai¹, DING Bo², YU Wen¹, LI Jingyun¹, CUI Shenghui¹

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Yantai Inspection and Testing Center for Food and Drug Control, Shandong Yantai 264000, China)

Abstract: Objective To identify three *Bifidobacterium* strains using different methods and analysis of acquired antimicrobial resistance determinants and their transferability combined with antimicrobial susceptibility testing results and whole genome sequencing (WGS) data. **Methods** Three *Bifidobacterium* strains were isolated from three probiotic products, respectively, and identified using biochemical tests, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and WGS. The antimicrobial susceptibility of the strains to eight antibiotics, including ampicillin, was tested using the broth microdilution method. The WGS data were used to analyze the acquired antimicrobial resistance determinants carried by the strains and assess their transferability using online databases. **Results** The results showed that biochemical methods could provide reliable genus-level identification, MALDI-TOF MS could provide reliable species-level identification, and WGS-based average nucleotide identity and DNA-DNA hybridization values could provide reliable species and subspecies-level identification. Combined with wgSNP and wgMLST analysis, all three strains were identified as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. The three strains showed decreased susceptibility to tetracycline and gentamicin. The decreased susceptibility to gentamicin was associated with the lack of transport system in the anaerobes and was an intrinsic phenotype. All three strains carried tet(W) on their chromosomes, and there were IS5

收稿日期:2024-02-25

基金项目:国家重点研发计划(2022YFF1100704)

作者简介:任秀 女 主管药师 研究方向为微生物学、分子生物学 E-mail: wanwan329@sina.cn

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品安全检测 E-mail: cuishenghui@aliyun.com

李景云 男 主任技师 研究方向为食品药品微生物检验 Email: Lijy@nifdc.org.cn

崔生辉和李景云为共同通信作者

sequences downstream of *tet(W)*, suggesting that this resistance gene may be a mobile element. A comparison of *tet(W)* sequences from 58 bacteria of different species and genera in GenBank showed that *tet(W)* sequences in *B. animalis* subsp. *lactis* have a certain degree of conservation. **Conclusion** The identification and genetic analysis of *Bifidobacterium* should be comprehensively carried out by combining biochemical tests, MALDI-TOF MS, antimicrobial susceptibility and WGS. WGS technology can not only perform precise identification of *Bifidobacterium* at the subspecies level but also conduct in-depth analysis of resistance determinants and transferability. It provides strong technical support for the research, supervision and healthy development of related probiotic products and the food industry.

Key words: Whole genome sequencing; *Bifidobacterium*; precise identification; *tet(W)*; drug susceptibility testing

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)为革兰氏阳性、非运动、厌氧菌,是人类肠道菌群中的重要成员^[1],在维持肠道健康和人体整体健康方面发挥着重要的作用^[2]。目前已发现的主要功能包括促进消化和吸收、免疫调节、降低胆固醇水平、预防癌症^[3]等,被广泛应用于食品、保健食品及婴幼儿食品中^[4]。双歧杆菌属共包括32个种,多来源于人类、动物及昆虫的肠道、口腔等,可应用于食品的主要是青春双歧杆菌、动物双歧杆菌、两歧双歧杆菌、短双歧杆菌和长双歧杆菌,且一些种的双歧杆菌还存在多个亚种,不同亚种间发挥的功能也存在较大差异^[5],因此我国发布了相关公告,进一步明确了可用于食品、保健食品及婴幼儿食品的双歧杆菌种及亚种信息^[6-7]。

为保障食品用菌种的安全性,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)发布了《食品中益生菌评价指南》^[8],规定了食品用益生菌的评价准则和要求,包括菌种的鉴定、安全性评估、功能特性评估等。欧盟食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)及美国食品药品监督管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)均要求对食品用菌种进行准确的鉴定和安全评价^[9-10]。2020年,我国国家市场监督管理总局发布了《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则(2020年版)》,要求对保健食品用菌种进行种或株水平鉴定,并要求对包括菌种的致病性、耐药基因、毒力基因分析等项目进行评估^[11],识别潜在安全风险^[12]。

常用于细菌鉴定及分类的方法主要有生化、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer, MALDI-TOF MS)、16s rDNA测序等针对菌种某些特征进行抽样测定的方法及针对菌种总体DNA信息测定的全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)方法。抽样测定类方法基于其出现和当时技术的局限、成本、时效因素等原因,在双歧杆菌的鉴

定和研发过程中发挥了重要作用,目前仍是我国国家标准《食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验》(GB 4789.34—2016)采纳的方法^[13]。但对于双歧杆菌在内的一些存在亚种的细菌进行鉴定时,以上抽样测定类方法存在一些不足。传统的生化鉴定方法,可基于种内的生化差异对双歧杆菌亚种进行鉴定,方法可参照GB 4789.34—2016及伯杰氏手册^[14],但由于受到的影响因素较多,如人员操作、菌株状态、个别菌株的特殊性,导致结果不稳定,亲缘关系较近的不同亚种菌株也不能区分^[15]。鉴于生化鉴定的不确定性,此后一段时间研究者推荐使用分子生物学方法进行检测,如基于16s rDNA测序、小分子基因保守序列检测(*hsp60*基因、*ldh*基因等^[16])等,检测后与模式菌株构建进化树后依据聚类关系结果得到亚种信息,但由于以上区域序列具有高度保守性,仍不能得到理想的区分结果。而WGS是近十年被广泛应用于菌种总体DNA信息测定的方法,通过对菌种全部DNA序列测定,可以对菌种进行种、亚种,甚至株水平的精确鉴定溯源,并分析基因组中毒力基因、耐药基因的存在与可能的传递机制等,为双歧杆菌菌种的安全评价提供了重要可靠的技术支撑。

本研究对分离自3个厂家益生菌粉产品的3株双歧杆菌用不同方法进行了鉴定,分析了不同方法鉴定结果之间的差异,并结合药物敏感性测试结果和WGS测序数据,对菌株毒力基因存在情况、耐药基因元件及其转移的可能性进行了分析,旨在为相关菌种产品的鉴定、安全性评价研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

研究用3株双歧杆菌FC13331、FC13332、FC13359分离自3个厂家的益生菌粉产品(种属信息均标识为动物双歧杆菌乳亚种),研究用标准菌株包括长双歧杆菌CICC6186(等同于其他菌种保藏中心编号:ATCC15707)、金黄色葡萄球菌ATCC29213、动

物双歧杆菌动物亚种 ATCC25527、动物双歧杆菌乳亚种 CGMCC 1.2226,菌种均保存于-70 °C的 50% 甘油-脑心浸液肉汤中备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

Thermo PR205050GC 生化培养箱、SWB25 恒温振荡水浴(美国 Thermo 公司),PL2002 电子天平(美国 Mettler Toledo 公司),MLS3780 高压灭菌器(日本 Sanyo 公司),EDDY JET/FLASH AND GO 全自动微生物螺旋加样系统(德国 IUL 公司),Hiseq2500 基因测序仪(美国 Illumina 公司),PacBio Sequel 基因测序仪(美国 Pacific Biosciences 公司),基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(德国布鲁克公司)、全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司)、Qubit 1.0 荧光计(美国 Thermo 公司)。

MRS 琼脂培养基(美国 BD 公司),MRS 液体培养基(美国 BD 公司),氯化钠注射液(国药集团容生制药有限公司),Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L 厌氧产气袋(美国 Thermo 公司),厌氧菌及棒状杆菌鉴定 ANC 卡片、API 50CH 碳水化合物鉴定试剂条、API 50CHL MEDIUM 培养基(法国梅里埃公司),HCCA 基质(德国 Bruker 公司),甲酸(北京百灵威科技有限公司),Dneasy Blood & Tissue 试剂盒(Qiagen 公司),Qubit dsBR Assay kit(美国 Invitrogen 公司),Lysozyme 酶(翊圣生物公司),Triton® X-100(美国 Sigma 公司),Tris-HCL(Invitrogen 公司),EDTA(Thermo Scientific 公司),IST 肉汤培养基(上海瑞楚生物公司),L-半胱氨酸盐酸盐(北京奥博星公司),琼脂(美国 BD 公司),氨苄西林(TRANSGENE 公司),测试用抗生素标准品:万古霉素、庆大霉素、链霉素、红霉素、克林霉素、四环素、氯霉素(中国食品药品检定研究院)。

软件:Bionumerics 7.6 软件(比利时 Applied Maths 公司),Ridom SeqSphere 软件(德国 Ridom 公司),Sequencher V4.1.4(美国 Gene Codes 公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性测试

依据欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)的 *Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance* 及 ISO 10932:2010 *Milk and milk products—Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to Bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria* (LAB),采用琼脂稀释法和 LSM-Cys 琼脂培养基,测试 3 株双歧杆菌对氨苄西林、万古霉素、庆大霉素、链霉素、红霉素、克林霉素、四环素、氯霉素的敏感

性,使用长双歧杆菌 CICC6186(=ATCC 15707)、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 作为质控菌株。

1.2.2 生化鉴定

挑取 3 株双歧杆菌新鲜培养物进行革兰氏染色,显微镜下观察细菌形态。依据伯杰氏手册及 GB 4789.34,使用 API 50CH 及 ANC 厌氧菌鉴定卡进行 33 个关键生化反应测试。将生化结果阳性用“1”标示,阴性用“0”标示,使用 BioNumerics 7.6 软件录入结果,选择 UPGMA 方法(非加权分组平均法)进行生化反应的进化树构建。

1.2.3 MALDI-TOF-MS 鉴定

取 MRS 平板二代新鲜培养物单个菌落,涂布于 MALDI-TOF-MS 靶板上,加 1 μL/孔 70% 甲酸晾干后,滴加 1 μL/孔 HCCA 基质晾干,用 MALDI-TOF MS 进行检测,检测条件:使用线性正离子模式 MALDI 离子源,波长为 337 nm,频率为 60 Hz 的 N2 激光器,质量采集范围 2 000~20 000 m/z,每个样品采集 240 次激光脉冲叠加信号,使用 MALDI Biotyper RTC 软件进行分析。用 ATCC25527 及 CGMCC 1.2226 作为参考菌株,使用 BioNumerics 7.6 软件,选择 UPGMA 方法(非加权分组平均法)^[17] 构建 MALDI-TOF-MS 系统进化树。

1.2.4 WGS 测序分析

使用 Dneasy Blood & Tissue Kit 试剂盒提取菌株基因组 DNA,并使用 Qubit 1.0 荧光计及 Qubit dsBR Assay Kit 测定 DNA 浓度。对检测合格的基因组 DNA 构建文库后,使用 Illumina Hiseq 2500 及 PacBio Sequel 平台进行测序,过滤低质量 reads(如去除所含低质量碱基(质量值≤20)超过一定比例(默认设为 40%)的 reads、去除 N 碱基达到一定比例的 reads(默认设为 10% 等)。使用 SMRT Link、Arrow 软件^[18-19] 进行基因组组装、比对、优化及使用二代测序数据进行校正,最终得到环状基因组完成图。

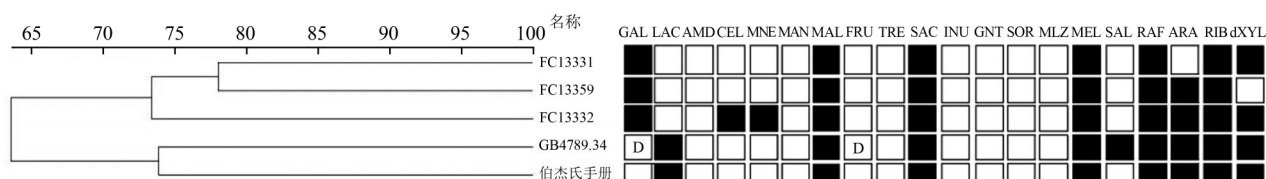
1.2.5 WGS 耐药基因、毒力基因及鉴定分析

WGS 鉴定:将菌株基因组组装数据上传至 Type Strain Genome Server(TYGS, <https://tygs.dsmz.de/>)进行菌种鉴定,将数据库推荐的相似模式菌株作为平均核苷酸一致性(Average nucleotide identity, ANI)分析比对的参考菌株。使用 ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>) 计算 3 株菌的 ANI 值,95% 作为细菌种水平判定阈值^[20-21]。同时使用 Genome-to-Genome Distance Calculator(GGDC 3.0, <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) 公式计算 3 株菌与参考菌株的 DNA-DNA 杂交(DNA-DNA hybridization, DDH)值作为辅助验证,70% 作为原核生物种水平判定阈值^[20-21]。wgSNP:菌株

fq. clean 文件导入 Bionumerics 7.6 软件,以 NCBI GenBank 中 CP001853.2 (*B. animalis* subsp. *lactis* BB-12)的全基因组序列作为参考序列进行组装,同时使用动物双歧杆菌动物亚种 ATCC25527、动物双歧杆菌 CMCC93906、动物双歧杆菌乳亚种 DSM10140 作为参考菌株,选择 Strict SNP filtering(Closed SNP set)模式进行全基因组单核苷酸多态性(wgSNP)分析。核心基因组多位点序列分型(Core Genome multilocus sequence typing, cgMLST):菌株基因组组装数据以 FASTA 格式导入 Ridom SeqSphere 软件,以 CP001853.2 (*B. animalis* subsp. *lactis* BB-12)为种子基因组(seed genome)并进行比对,使用 UPGMA 方法构建基于 MLST 分型管家基因的等位基因系统发育树状图。

将菌株基因组组装数据上传至 CARD (Comprehensive Antibiotic Research Database)及 Center for Genomic Epidemiology (CGE, <http://www.genomicepidemiology.org/>)中的 Resfinder 数据库,识别基因组中耐药基因序列;同时上传至 VFDB (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria)及 CGE VirulenceFinder 数据库,识别基因组中毒力基因序列。用 Blast 软件(版本 2.12, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)构建本地比对库进行分析(覆盖度 $\geq 60\%$,匹配度 $\geq 85\%$)。

查找 GenBank 中双歧杆菌及其他种属细菌的



注:图中黑色方块表示结果为阳性,无色方块表示结果为阴性;“D”表示 11%~89% 菌株结果为阳性。“GAL”为 D-半乳糖反应,“LAC”为 D-乳糖反应,“AMD”为淀粉反应,“CEL”为 D-纤维二糖反应,“MNE”为 D-甘露糖反应,“MAN”为甘露醇反应,“MAL”为 D-麦芽糖反应,“FRU”为 D-果糖反应,“TRE”为 D-海藻糖反应,“SAC”为蔗糖反应,“INU”为菊粉反应,“GNT”为葡萄糖酸钠反应,“SOR”为 D-山梨醇反应,“MLZ”为松三糖反应,“MEL”为蜜二糖反应,“SAL”为水杨甙反应,“RAF”为棉子糖反应,“ARA”为 L-阿拉伯糖反应,“RIB”为 D-核糖反应,“dXYL”为 D-木糖反应

图1 双歧杆菌生化鉴定结果分析

Figure 1 Analysis of biochemical identification results of *Bifidobacterium*

经查阅法国梅里埃公司 50CH 及 ANC 鉴定数据库,3 株菌生化鉴定推荐结果均为双歧杆菌属,匹配度分别为 88%、97%、94%,与 GB 4789.34 及伯杰氏手册中所列 6 个种(两歧双歧杆菌、长双歧杆菌婴儿亚种、长双歧杆菌、青春双歧杆菌、动物双歧杆菌及短双歧杆菌)的主要生化反应均有不同程度差异,无法准确分类到种水平。

2.2 MALDI-TOF MS 鉴定

经 MALDI-TOF MS 鉴定,3 株菌推荐鉴定结果均为动物双歧杆菌,鉴定得分分别为 2.117、2.497 及 2.431,均 > 1.9 ,按设备厂商推荐的判定规则,鉴定结果为高可信度。对 MALDI-TOF MS 图谱分析

tet(W) 基因并下载,使用 Sequencher V4.1.4 进行统一长度的剪切及比对处理(最小匹配相似度为 85%)。将处理后序列导入 Bionumerics 7.6 软件,采用多序列比对中的 UPGMA 方法构建系统进化树^[17]。

2 结果

2.1 生化鉴定

针对 3 株菌,本研究共测试了 33 个生化反应,包括伯杰氏手册和 GB 4789.34 中共有的 20 个生化反应,以及 GB 4789.34 中单独列出的 13 个生化反应。经查阅 GB 4789.34 与伯杰氏手册,基于动物双歧杆菌共有的 20 个生化反应结果显示(图 1),3 株菌 D-半乳糖(GAL)和 D-乳糖(LAC)测试结果均与预期结果不符合;FC13332 的 D-纤维二糖(CEL)和 D-甘露糖(MNE)测试结果也与预期结果不符合;3 株菌水杨甙(SAL)测试结果均为阴性,与伯杰氏手册一致,但与 GB 4789.34 不符合;FC13331 L-阿拉伯糖(ARA)和 FC13359 D-木糖(dXYL)测试结果与伯杰氏手册和 GB 4789.34 均不一致。GB 4789.34 单独列出的 13 个生化反应测试显示,3 株菌的甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷(MDG)和苦杏仁甙(AMY)测试结果均与 GB 4789.34 不符合;FC13332 和 FC13359 龙胆二糖(GEN)测试结果也与 GB 4789.34 不符合。

显示(图 2),3 株双歧杆菌与动物双歧杆菌动物亚种 ATCC25527 和动物双歧杆菌乳亚种 CGMCC 1.2226 亲缘关系较远。

2.3 WGS 鉴定与分析

WGS 分析结果显示,菌株 FC13331、FC13332 和 FC13359 的染色体大小分别为 1 959 974、1 965 298 和 1 944 824 bp,均未携带质粒。使用 TYGS 网站分析显示,3 株菌均为动物双歧杆菌乳亚种,匹配标准菌株为 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140,通过与高得分片段(high-scoring segment pairs, HSPs)进行比对,其 d_0 、 d_6 均为 100%, d_4 为 99.3%~99.4% (d_0 :所有 HSPs 的长度除以总基因组长度;

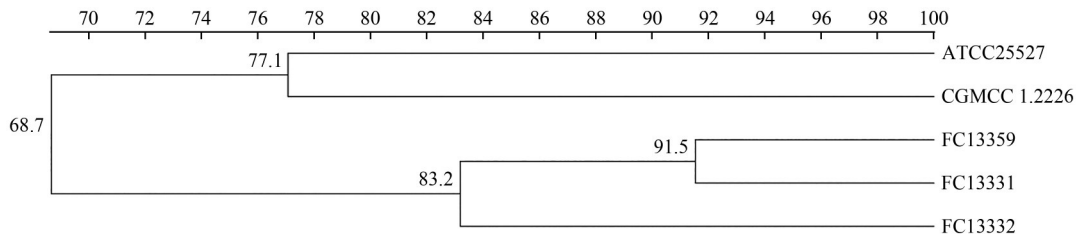


图2 双歧杆菌 MALDI-TOF MS 树状聚类分析进化图

Figure 2 Evolutionary diagram of MALDI-TOF MS tree clustering analysis of *Bifidobacterium*

d_4 :与模式菌株比对得到的相同 HSPs 总长度占总 HSP 长度比例; d_6 :与模式菌株比对得到的相同 HSPs 总长度占总基因组长度比例),匹配度较高,结果可靠。使用 ANI 及 GGDC 计算 FC13331、FC13332 和 FC13359 与 TYGS 推荐模式亚种菌株间的 ANI 值分别为 99.89%、99.94% 及 99.92%, DDH 值分别为 99.30%、99.40%、99.40%,均符合种水平判定阈值,鉴定到种(亚种)水平结果可靠。wgSNP 分析显示(图 3),FC13331、FC13332、FC13359、HN019、BB-12 及 CMCC93906 聚类到一簇,其中 FC13331 与

HN019、FC13332 与 CMCC93906 显示 0 个差异位点。与 DSM 10140 具有较近亲缘关系,有 47 个差异位点,但与 ATCC 25527 差异大于 200 个位点。cgMLST 分析显示(图 4),FC13331、FC13332、FC13359 与常见动物双歧杆菌乳亚种模式菌株(其中网站公布的 CMCC 93906 现有菌株信息未能明确到亚种)可聚集到一簇,但与双歧杆菌其他种(亚种)差异较大。综上,wgSNP 分析与 cgMLST 在双歧杆菌亚种水平鉴定分析具有一致性,都能很好地将种及不同亚种区分。

wgsnp (SNPs)

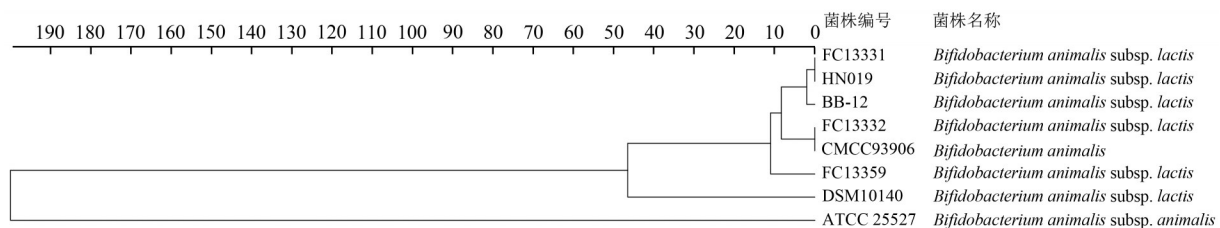
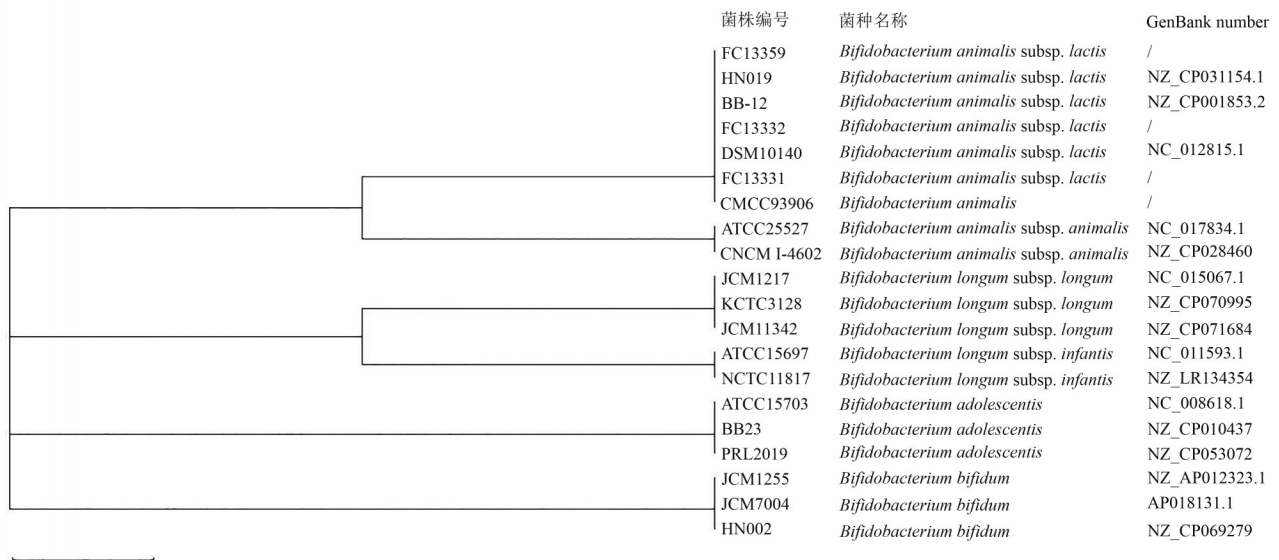


图3 全基因组单核苷酸多态性(wgSNP)分析结果

Figure 3 Results of genome-wide single nucleotide polymorphism (wgSNP) analysis



注:“/”表示菌株分析用数据来源于本研究测试结果

图4 核心基因组多位点序列分型(cgMLST)分析结果

Figure 4 Results of core genome multilocus sequence typing (cgMLST) analysis

2.4 药物敏感性测试结果

经测试,3株双歧杆菌对所测试的8种抗生素

均敏感,其中对氨苄西林、万古霉素、红霉素、氯霉素、链霉素和克林霉素的 MIC 值显著低于耐药折

点。其中四环素耐药折点为 16 mg/L,3 株菌测试结果均为 8 mg/L,庆大霉素耐药折点为 128 mg/L,3 株菌测试结果均为 64 mg/L,二者的 MIC 值都比耐药折点低一个稀释度,测试结果见表 1。

表 1 三株双歧杆菌对七类抗生素的敏感性测试结果

Table 1 Sensitivity test results of three *Bifidobacterium* strains to seven kinds of antibiotics

抗生素类别	抗生素	耐药折点/(mg/L)	MIC 值/(mg/L)		
			FC13331	FC13332	FC13359
青霉素类	氨苄西林	4	1	1	1
多肽类	万古霉素	4	0.5	0.5	0.5
氨基糖苷类	庆大霉素	128	64	64	64
	链霉素	256	64	64	64
大环内酯类	红霉素	2	0.06	0.03	0.03
四环素类	四环素	16	8	8	8
苯丙醇类	氯霉素	8	2	2	2
林可酰胺类	克林霉素	2	0.015	0.015	0.015

注:MIC 最小抑菌浓度:体外试验中,抗菌药物能抑制培养基中细菌生长的最低药物浓度;耐药折点:用以判断敏感、耐药等的 MIC 值,小于等于折点为敏感,大于为耐药

2.5 毒力基因分析

经与 VFDB 及 CGE VirulenceFinder 数据库中包括黏附、侵袭、外毒素等合计 14 类毒力因子类型的毒力基因进行比对,均未识别出已知的毒力基因序列。

2.6 耐药基因分析

经 CARD 和 ResFinder 数据库分析,3 株菌染

色体上均携带编码核糖体保护蛋白的四环素耐药相关基因 *tet(W)*,可使菌种对四环素类抗生素敏感性下降,3 株菌 *tet(W)* 序列未见差异。对 3 株菌 *tet(W)* 周边基因分析发现,*tet(W)* 下游均可见编码 IS5 家族转座子基因的序列,序列经比对一致且均未见其他序列或碱基的插入(图 5)。除此之外未发现包括点突变在内的其他特异性耐药机制。

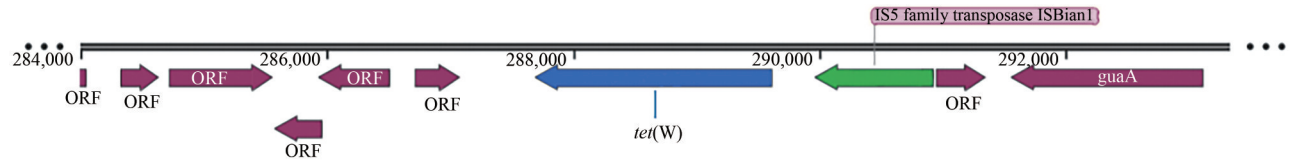


图 5 *tet(W)* 周边基因结构注释图

Figure5 Annotation of peripheral gene structure of *tet(W)*

对 GenBank 中来自短双歧杆菌($n=7$)、长双歧杆菌($n=9$)、两歧双歧杆菌($n=4$)、动物双歧杆菌乳亚种($n=14$)、嗜热双歧杆菌($n=3$)和 17 个非双歧杆菌种属($n=21$)的 58 条 *tet(W)* 序列分析可见,FC13331、FC13332、FC13359 和 13 个动物双歧杆菌乳亚种的 *tet(W)* 同源性>99%,与来自其他双歧杆菌和其他种属细菌的 *tet(W)* 存在一定的差异(图 6)。

3 讨论

在食品用菌种市场逐渐增长的趋势下,菌种的准确鉴定和安全性评价显得愈发重要。目前我国国家标准 GB 4789.34—2016 中对双歧杆菌的鉴定主要依赖于形态和生化分析^[13],本研究还使用了 MALDI-TOF MS 和 WGS 方法对 3 株双歧杆菌进行了深入鉴定,发现除 WGS 外,其他方法均不能可靠地鉴定到亚种水平。此外,WGS 还为菌种的同源性、耐药基因及其周边遗传结构的深入分析提供了可靠的数据基础,结合在线数据库,可深入阐明菌

种携带的耐药元件及其周边的遗传结构,分析该元件是否具有可传递性,进而为菌种的安全性评价提供了可靠的遗传学证据。

明确菌种的种属信息是菌种工业化使用的先决条件。双歧杆菌是一类广泛应用于保健食品、食品及药品中的常见食用益生菌。在 GB 4789.34—2016 国家标准及伯杰氏手册中,对其种水平生化鉴定反应有明确的要求和判定标准。众所周知,生化反应结果会受到菌株培养状态、人员操作、生化试剂质量等多种因素影响,其实验过程需要良好的质量控制手段。此外,同一种内不同菌株间,由于个体的遗传差异,对同一生化项目也会呈现不同结果^[15]。本研究中的 3 株双歧杆菌与 GB 4789.34、伯杰手册中的生化项目推荐结果存在不同程度的差异,查阅梅里埃 50CH 和 ANC 数据库,仅能给出属水平鉴定结果,不能给出准确的种水平鉴定结果。MALDI-TOF MS 鉴定结果的准确性与厂家建库用菌种的丰富性密切相关,针对本研究中的 3 株双歧杆菌,该方法给出可靠种水平鉴定结果,虽然得分良

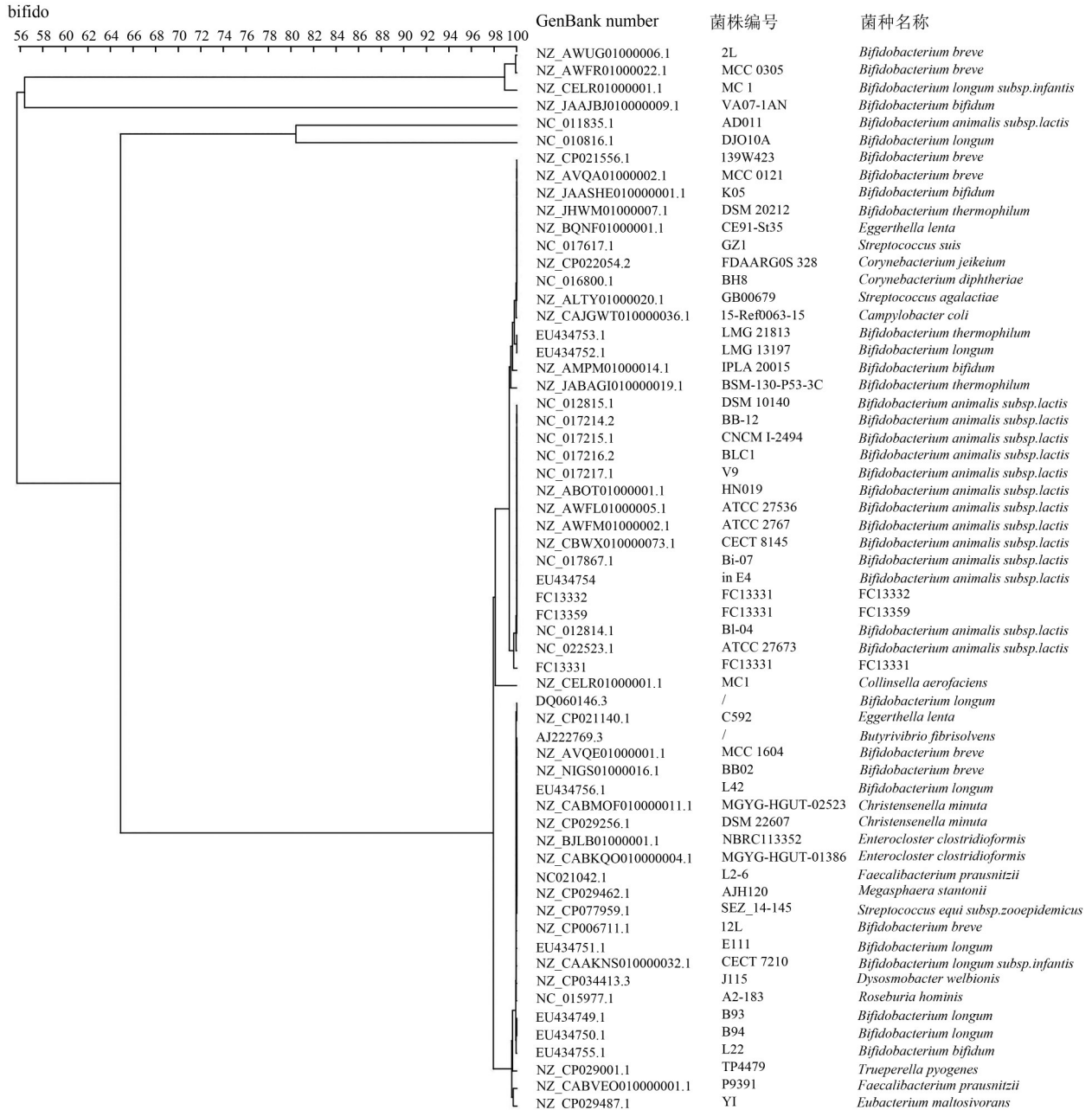


图6 不同种属细菌中tet(W)序列的同源性分析

Figure 6 Homology analysis of tet(W) sequences in different species of bacteria

好,但经对峰图的同源性分析,与动物双歧杆菌乳亚种标准菌株的亲缘关系较远,鉴定到亚种水平仍存在不确定性。这些结果对 GB 4789. 34 的修订也提出了迫切需求。

目前,WGS 方法可以一次性获得菌株的全部遗传信息,包括菌株的基因组序列、基因数量、基因功能等。结合在线分析软件,可与该亚种模式菌株全基因组序列进行比对分析,计算 ANI 和 DDH 值,得到明确、可靠的亚种鉴定结果;同时使用生物信息学工具,结合 wgSNP 或 cgMLST^[22]分析,从整体水平阐明不同菌株间的同源性,cgMLST 可以比较同属下不同种或亚种的亲缘关系,而 wgSNP 侧重分析亲缘关系非常近菌种的单个碱基差异,因此更适用于

不同亚种之间的鉴定,二者分析结果具有一致性,均为菌株水平的鉴定结果提供可靠的数据支持,进而为生产用菌种的审评、管理、使用提供坚实的技术基础。

通过 WGS 数据分析,本研究从 3 株动物双歧杆菌的染色体上均识别出四环素特异性耐药元件 tet(W)。tet(W)编码核糖体保护蛋白,通过与细菌核糖体 16S rRNA 结合,阻止四环素与核糖体的结合,从而干扰蛋白质合成,使宿主对四环素的敏感性下降^[23],该结果与这 3 株菌对四环素敏感性下降的表型(8 mg/L)相一致。该基因在革兰氏阴性和革兰氏阳性菌中均有检出^[24],是四环素耐药基因家族中传播最广的一种^[25-26],在长双歧杆菌、嗜热双歧

杆菌、两歧双歧杆菌中均有检出的报道^[27-28]。对该基因周边的序列分析发现,其下游存在 IS5 序列,其中未见其他序列或碱基插入,因此编码的 IS5 家族转座子完整,这进一步提示,该耐药基因可能为可转移元件。但值得注意的是,有研究表明 IS5 家族转座子似乎只在动物双歧杆菌乳亚种中出现,且一侧往往与 *tet(W)* 基因相连接^[29],不会单独移动。文献报道,一些对 *tet(W)* 基因进行转移性的实验均没有成功^[30],且 IS5 家族转座子与 *tet(W)* 基因存在共转录情况,IS5 家族转座子似乎只参与 *tet(W)* 基因的表达而不是导致其移动^[31]。但鉴于目前的研究结果,无法确切给出其是否会导致转移的结论。经过与 GenBank 中 58 个来自不同种属细菌的 *tet(W)* 对比发现,本研究识别的 *tet(W)* 序列在动物双歧杆菌乳亚种中具有一定的保守性,造成这一现象的具体原因是否为该亚种进化过程中偶然获得并持续保持有待进一步研究^[28,31]。鉴于目前研究还不能明确 *tet(W)* 是否因此具有转移的可能性,为防止耐药基因的播散,本研究中的 3 株菌应慎重用于食品工业生产。

本研究还发现 3 株菌均对庆大霉素也存在敏感性下降的现象,这一表型与双歧杆菌属等厌氧微生物缺乏庆大霉素的转运系统和细胞壁过厚造成的通透性差有关^[32-33],为双歧杆菌属的固有表型^[34]。特定的膜蛋白可充当泵或转运蛋白,主动将抗生素从外部环境转移到细胞内,从而杀死或抑制细菌生长,其中一些转运系统具有抗生素特异性,而另一些则具有广谱性^[35]。目前双歧杆菌属缺乏庆大霉素转运系统的原因尚不清楚,可能与进化过程、代谢差异等有关,转运系统的缺失还会影响该菌对其他抗生素的敏感性,如卡那霉素、四环素、红霉素等^[36-37],这些固有表型同时也为双歧杆菌属在益生菌中的应用提供了选择性优势。

由于目前市场上常用于食品、保健食品等的双歧杆菌菌株具有特定性,因此本研究分离的双歧杆菌数量有限,但均属于不同菌株编号的双歧杆菌。今后随着菌株应用的不断拓展,我们会进一步拓展样品数量、丰富菌株,更加完善和深化相关研究。综上,双歧杆菌的鉴定与安全评价应结合生化、MALDI-TOF MS、抗生素敏感性分析和 WGS 分析等技术综合开展,尤其 WGS 技术不仅可以对双歧杆菌进行精准亚种水平的鉴定,还可以针对耐药元件及转移性进行深入分析,为相关菌种产品的研发和监管,为益生菌类保健食品、食品行业的健康发展提供有力的技术支撑。

参考文献

- [1] VENTURA M, TURRONI F, LUGLI G A, et al. *Bifidobacteria* and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives[J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 2014, 94(2): 163-168.
- [2] 叶震中, 雷泉, 牛彩琴, 等. 肠通方联合双歧杆菌三联活菌胶囊治疗老年慢性功能性便秘的效果[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(11): 2629-2632.
YE Z Z, LEI X, NIU C Q, et al. The effect of Changtong Formula Decoction combined with BIFICO in the treatment of elderly patients with chronic functional constipation[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2023, 43(11): 2629-2632.
- [3] 杨海莺, 刘爱萍, 蒋菁莉, 等. 双歧杆菌 BBMN01 体内免疫刺激功能研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(2): 369-372.
YANG H Y, LIU A P, JIANG J L, et al. Research on in vivo Immunostimulatory Function of *Bifidobacterium* Strain BBMN01 [J]. *Food Science*, 2008, 29(2): 369-372.
- [4] 高慧宇, 马姗姗, 张雪松, 等. 1996—2022 年中国含益生菌保健食品调查分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(4): 543-549.
GAO H Y, MA S J, ZHANG X S, et al. Analysis of health food containing probiotics in China during 1996 to 2022[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(4): 543-549.
- [5] 刘宪夫, 牛琴, 覃树林, 等. 双歧杆菌分类、生理功能及应用研究进展[J]. *生物产业技术*, 2017(3): 100-105.
LIU X F, NIU Q, QIN S L, et al. Advances in the Classification, Physiological Functions, and Application Research of *Bifidobacteria* [J]. *Biotechnology & Business*, 2017(3): 100-105.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于《可用于食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿食品的菌种名单》更新的公告 [A]. 2022.
National Health Commission of the People's Republic of China. Announcement on the Update of 《The List of Microorganisms Allowed for Use in Food》 and 《The List of Microorganisms Allowed for Use in Infant Food》 [A]. 2022.
- [7] 卫生部办公厅. 关于印发《可用于食品的菌种名单》的通知 [A]. 2010.
National Health Commission Office of the People's Republic of China. Notice on Issuing the《List of Microorganisms Allowed for Use in Food》[A]. 2010.
- [8] WHO/FAO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food [EB/OL] (2002-05-01)[2018-11-19] https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
- [9] EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA-Opinion of the Scientific Committee [J]. *EFSA Journal* 2007, 5(12):587.
- [10] USFDA. Guidance for industry: enzyme preparations: recommendations for submission of chemical and technological data for food additive petitions and GRAS notices[M]. 2010.
- [11] 国家市场监督管理总局. 保健食品原料用菌种安全性检验与评价指导原则(2020年版)[A]. 2020.
State Administration for Market Regulation. Guidelines on the Safety Inspection and Evaluation of Strains used in Health Food Raw Materials (2020)[A]. 2020.

- [12] 陈潇, 王君. 我国食品用菌种安全性管理现状及国内外管理方式对比研究[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(1): 117-126. CHEN X, WANG J. Safety management of microbial food cultures in China and comparison of national and international management mode[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(1): 117-126.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品微生物学检验 双歧杆菌检验: GB 4789.34—2016[S]. 北京: 国家标准出版社, 2016. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Food Safety National Standard of the People's Republic of China Microbiological Examination of Food Bifidobacteria Examination: GB 4789.34—2016[S]. Beijing: National Standard Press, 2016
- [14] GPODFELLOW M, KAMPFER P B H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. New York: Springer Science Business Media, 2012: 33-2028.
- [15] 许再元. 食品检测中单纯使用生化鉴定系统鉴定双歧杆菌的可行性研究[J]. 现代食品, 2018(3): 109-110. XU Z Y. Study on the Feasibility of Using API Identification System to Identify *Bifidobacterium* [J]. Modern Food, 2018(3): 109-110.
- [16] STENICO V, MICHELINI S, MODESTO M, et al. Identification of *Bifidobacterium* spp. using *hsp60* PCR-RFLP analysis: an update[J]. Anaerobe, 2014, 26: 36-40.
- [17] CHEN W, WANG H. Phylogenetic Tree Selection by Testing Substitution Number in Clade[J]. Diversity, 2022, 14(7): 543.
- [18] ARDUI S, AMEUR A, VERMEESCH J R, et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(5): 2159-2168.
- [19] REINER J, PISANI L, QIAO W, et al. Cytogenomic identification and long-read single molecule real-time (SMRT) sequencing of a Bardet-Biedl Syndrome 9 (BBS9) deletion[J]. NPJ Genomic Medicine, 2018, 3(1): 3.
- [20] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(45): 19126-31.
- [21] MATURANA J L, CÁRDENAS J P. Insights on the evolutionary genomics of the *Blautia* genus: Potential new species and genetic content among lineages [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 660920.
- [22] 朱丽萍, 张文成, 颜世敢, 等. 细菌核心基因组多位点序列型 (cgMLST) 与溯源评价[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(6): 140-146. ZHU L P, ZHANG W C, YAN S G, et al. Evaluation of core genome multilocus sequence typing and traceability of bacteria [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(6): 140-146.
- [23] AMMOR M S, FLOREZ A B, ÁLVAREZ-MARTÍN P, et al. Analysis of tetracycline resistance tet (W) genes and their flanking sequences in intestinal *Bifidobacterium* species [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(4): 688-693.
- [24] WARBURTON P J, AMODEO N, ROBERTS A P. Mosaic tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016, 71(12): 3333-3339.
- [25] KAZIMIERCZAK K A, FLINT H J, SCOTT K P. Comparative analysis of sequences flanking tet (W) resistance genes in multiple species of gut bacteria [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2006, 50(8): 2632-9.
- [26] BILLINGTON S J, SONGER J G, JOST B H. Widespread distribution of a Tet W determinant among tetracycline-resistant isolates of the animal pathogen *Arcanobacterium pyogenes* [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2002, 46(5): 1281-7.
- [27] FATAHI-BAFGHI M, NASERI S, ALIZEHI A. Genome analysis of probiotic bacteria for antibiotic resistance genes [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2022, 115(3): 375-89.
- [28] GUEIMONDE M, FLÓREZ A B, VAN HOEK A H, et al. Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* [J]. Applied and environmental microbiology, 2010, 76(10): 3364-9.
- [29] ROZMAN V, LORBEG P M, ACCETTO T, et al. Characterization of antimicrobial resistance in lactobacilli and bifidobacteria used as probiotics or starter cultures based on integration of phenotypic and in silico data [J]. International journal of food microbiology, 2020, 314: 108388.
- [30] RAEISI S N, GHODDUSI H B, BOLL E J, et al. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria from probiotic milk products and determination of the genetic basis of tetracycline resistance in *Enterococcus* species after in vitro conjugation with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* [J]. Food Control, 2018, 94: 205-11.
- [31] NØHR-MELDGAARD K, STRUVE C, INGMER H, et al. The tetracycline resistance gene, tet (W) in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* follows phylogeny and differs from tet (W) in other species [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 658943.
- [32] SHEN S, LIN H, CHEN J, et al. Assessment of the Safety, Growth, and Gut Microbiota Modulation of Neonates Consuming Infant Formula with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CP-9 or *Lactobacillus salivarius* AP-32: Insights from a Four-Month Clinical Study in Newborn Infants Under Two Months Old [J/OL]. Research Square. (2023-12-28) [2024-12-27]. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3718044/v1.
- [33] SORI N, KHAN M. Gamma Amino Butyric Acid (GABA) and Ferulic Acid Esterase (FAE) Producing Psychobiotic Bacteria Isolated from Cereal-Based Fermented Food [J]. Current Microbiology, 2024, 81(2): 1-14.
- [34] MASCO L, VAN HOORDE K, DE BRANDT E, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(1): 85-94.
- [35] CAMPEDELLI I, MATHUR H, SALVETTI E, et al. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp [J]. Applied and environmental microbiology, 2019, 85(1): e01738-18.
- [36] GIOK F X. Antimicrobial resistance in direct-fed microbial preparations used in cattle [D] Manhattan: Kansas State University, 2016.
- [37] DEVIRGILIS C, BARILE S, PEROZZI G. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota [J]. Genes & Nutrition, 2011, 6(3): 275-84.