

# 人源分离长双歧杆菌长亚种的体外益生特性分析

王明芳<sup>1</sup>, 陈丽澜<sup>1</sup>, 张雪玲<sup>1</sup>, 田丰伟<sup>2</sup>, 倪永清<sup>1,\*</sup>

(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)

**摘要:** 对新疆伊宁县哈萨克族学龄儿童粪便样品双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 进行分离鉴定, 重点开展长双歧杆菌长亚种 (*B. longum* subsp. *longum*) 菌株的体外益生特征实验。依据 *groEL* 功能基因测序和重复性外源性回文聚合酶链反应指纹分型技术, 416 株双歧杆菌隶属于 *B. longum*、*B. bifidum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. catenulatum* 和 *B. breve*。依据优势种 *B. longum* subsp. *longum* 的指纹分型, 27 种基因型显示了个体间菌株的遗传差异, 同时发现同一个体肠道有多菌株共存现象。27 株代表菌株的体外实验结果表明, 菌株 2B3-21、1B23-11、2B33-3 和 1B68-16 的耐酸、耐胆盐能力最优, 菌株 1B68-16、2B13-5、2B33-3 和 1B39-2 的抑菌能力较强; 菌株 1B38-1、2B33-3、1B68-16 和 2B13-28 体外抗氧化能力较强, 综合所有菌株的抗生素耐药性和利用多种植物源聚糖的能力进行考虑, 筛选菌株 1B68-16 和 2B33-3 作为潜在的益生菌菌株后续开展体内益生特性研究, 本研究可为开发适应特定区域人群的优良益生菌菌株及产品奠定基础。

**关键词:** 哈萨克族; 学龄儿童; 长双歧杆菌长亚种; *groEL*; 指纹图谱; 益生特性

## Probiotic Characteristics of Human-Residential *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Strains

WANG Mingfang<sup>1</sup>, CHEN Lilan<sup>1</sup>, ZHANG Xueling<sup>1</sup>, TIAN Fengwei<sup>2</sup>, NI Yongqing<sup>1,\*</sup>

(1. Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

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

**Abstract:** This study was conducted to isolate and identify *Bifidobacterium* from the feces of Kazakh school-age children in Yining, Xinjiang and evaluate the *in vitro* probiotic characteristics of *B. longum* subsp. *longum* isolates. By *groEL* gene sequencing and repetitive element sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) fingerprinting, 416 *Bifidobacterium* strains were identified to belong to *B. longum*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum* and *B. breve*. According to the fingerprints of *B. longum* subsp. *longum*, 27 genotypes showed genetic differences between individual strains and the coexistence of multiple strains in the gut was found. The *in vitro* experimental results showed that out of 27 representative strains, strains 2B3-21, 1B23-11, 2B33-3, and 1B68-16 were optimal in acid and bile salt tolerance, strains 1B68-16, 2B13-5, 2B33-3, and 1B39-2 had broad-spectrum antibacterial properties, and strains 1B38-1, 2B33-3, 1B68-16, and 2B13-28 showed a strong antioxidant capacity. Considering the antibiotic resistance of all strains and their ability to utilize plant-derived glycans, strains 1B38-1 and 2B13-28 were selected to assess their *in vivo* probiotic potentials. This study may lay the foundation for the development of excellent probiotics and related products for populations from specific areas.

**Keywords:** Kazakh; school-age children; *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*; *groEL*; fingerprints; probiotic characteristics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230408-068

中图分类号: Q938

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0155-08

引文格式:

王明芳, 陈丽澜, 张雪玲, 等. 人源分离长双歧杆菌长亚种的体外益生特性分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 155-162.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230408-068. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-08

基金项目: NSFC-新疆联合基金重点项目 (U1903205); 第八师石河子市科技专项 (2020PT01);

新疆生产建设兵团科技创新团队项目 (2020CB007)

第一作者简介: 王明芳 (1998—) (ORCID: 0000-0002-3813-0789), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与发酵。

E-mail: 1746047177@qq.com

\*通信作者简介: 倪永清 (1969—) (ORCID: 0000-0003-4876-589X), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。

E-mail: niyqlzu@sina.com

WANG Mingfang, CHEN Lilan, ZHANG Xueling, et al. Probiotic characteristics of human-residential *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains[J]. Food Science, 2024, 45(2): 155-162. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230408-068. <http://www.spkx.net.cn>

人体肠道菌群在整个生命活动过程处于动态变化,但是在生命早期最关键的2~3岁婴幼儿阶段,肠道微生物逐渐趋于成人化,之后处于相对稳定阶段<sup>[1]</sup>。其中,随着宿主年龄的变化,双歧杆菌(*Bifidobacterium*)种群结构也发生变化<sup>[2]</sup>。在正常顺产健康的母乳喂养婴儿肠道内,由于母乳寡糖特殊的益生元功能<sup>[3]</sup>,以专性代谢各种母乳寡糖的两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)、长双歧杆菌长亚种(*B. longum* subsp. *longum*)、长双歧杆菌婴儿亚种(*B. longum* subsp. *infantis*)和短双歧杆菌(*B. breve*)为优势双歧杆菌种,被定义为“婴儿型双歧杆菌”<sup>[4]</sup>。而在成人化人肠道中,占主导地位的是*B. longum* subsp. *longum*、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)、假小链双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*)和链状双歧杆菌(*B. catenulatum*),被定义为“成人型双歧杆菌”<sup>[5]</sup>。其中,*B. longum* subsp. *longum*在婴幼儿、成人甚至百岁老人肠道中普遍存在<sup>[6]</sup>。因此,就发生和母婴间垂直传递来说,婴儿和成人肠道双歧杆菌的种类并没有明确的界限<sup>[4]</sup>。实际上*B. longum* subsp. *longum*在更宽泛年龄段人群的发生取决于其高度的遗传多样性和灵活的聚糖代谢能力,以及对宿主肠道多样的饮食适应性<sup>[7-8]</sup>。

数百万年来,由于人类与以双歧杆菌为代表的肠道专性共栖菌群的共生,这些肠道微生物谱系和人类相互适应并形成了紧密的协同进化关系,被称为共生体<sup>[9]</sup>。在人类的生产实践中,人口大规模迁移往往伴随着生活方式的周期性变化,主要反映在各个民族群体生存环境和饮食习惯的差异上<sup>[10]</sup>。肠道微生物的共生是建立在人类长期特色饮食中聚糖类化合物营养代谢的互惠关系<sup>[11]</sup>。此外,宿主的遗传决定了母乳寡糖和肠道肠上皮黏液层糖蛋白的合成,从而使人类遗传也会影响肠道重要共生细菌的多样性和组成<sup>[12]</sup>。因此,人类饮食和遗传差异将会对肠道微生物组成、物种组成甚至是菌株水平产生宿主的选择性<sup>[13]</sup>。可以预期不同民族来源的肠道菌群蕴含丰富的益生菌菌株资源。

目前报道显示,*B. longum* subsp. *longum*在治疗胃肠道相关疾病、维持肠道微生物平衡、调节宿主免疫、缓解过敏症状以及抗感染等方面展现出卓越的益生特性,在医药、食品领域作为潜在益生菌资源受到普遍关注<sup>[14]</sup>。本研究基于新疆地域宽广、各民族之间很少通婚的区域特点,针对新疆伊宁县哈萨克族学龄儿童,对其粪便中双歧杆菌进行分离鉴定,重点开展占优势的*B. longum* subsp. *longum*菌株的耐酸、耐胆盐能力、抑菌活性、抗生素耐药性、体外抗氧化能力、碳水化合物代谢

等体外益生特征实验。从中筛选具有潜在益生特性的菌株,以期为后期体内实验开发适应特定区域人群的高活性益生双歧杆菌及产品奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 样品采集

19份哈萨克族学龄儿童粪便样品采集自新疆维吾尔自治区伊宁县某小学。提前联系好志愿者,签订知情同意书,记录志愿者年龄、性别、身高、体质量和饮食习惯等基本信息。粪便采集前3个月内,儿童均未使用过抗生素,无益生菌摄入,无胃肠道疾病。采样时,取样人员戴无菌手套,用取样勺采集粪便约5~10g,粪便自采集后立即放入已灭菌的取样管,贴标签后置于车载冰箱-10℃冷藏,尽快运回实验室进行菌种分离。

#### 1.1.2 指示菌

抑菌实验选用6种常见致腹泻的病原菌,分别为致泻大肠埃希氏菌CICC 10411、出血性大肠埃希氏菌CICC 21530、鼠伤寒血清型肠沙门氏菌肠亚种CICC 10420、产肠毒素大肠埃希氏菌CICC 10421、单核细胞性李斯特菌CGMCC 1.9136、血清型肠炎沙门氏菌肠亚种CGMCC 1.10754,均购自中国工业微生物菌种保存管理中心。

#### 1.1.3 培养基与试剂

Taq Plus Master Mix (2×) 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 0.22 μm微孔滤膜 上海兴亚净化材料厂; Wilkins-Chalgren厌氧琼脂培养基 山东拓普生物工程有限公司; 改良MRS培养基、LB培养基、蛋白胨酵母浸膏葡萄糖(peptone yeast extract glucose, PYG)培养基、胰酪大豆琼脂(trypcasein soy agar, TSA)培养基 北京博奥拓达科技有限公司; 18种碳源(纯度≥90%) 上海源叶生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

DG520厌氧培养箱 英国DS公司; 5810R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司; TC-512聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 英国Techne公司; PoerPac Universal水平电泳仪、Gel DOC XR凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 双歧杆菌的分离鉴定

将1g新鲜粪便用9mL无菌生理盐水进行梯度稀释,涂布于Wilkins-Chalgren固体培养基<sup>[15]</sup>, 37℃厌氧培养

48~72 h, 每个样品选取30个菌落, 划线培养3次, 镜检至纯。菌株DNA的提取依据苯酚-氯仿-玻璃珠击打的方法进行<sup>[16]</sup>。提取好的DNA进行groEL基因(表1)扩增<sup>[17]</sup>, 经琼脂糖凝胶电泳后得到500 bp左右的清晰单一条带。扩增产物送至江苏金唯智生物有限公司进行测序, 测序结果提交至GenBank数据库中进行序列同源性比对(BLAST), 比对相似值大于99%初步确定菌种物种。采用MEGA v7.0软件构建系统发育进化树。

表1 扩增引物名称及序列  
Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

引物	序列 (5'-3')	参考文献
Bif-groEL-F	TCCGATTACGAYCGYGAGAAGCT	[17]
Bif-groEL-R	CSGCTCGGTSCTCAGGAACAG	
Sia-266F	GACGAGGAGGAATACAGCAG	[18]
Sia-676R	CACGAACAGCGAATCATGGATT	
GH-750F	GCGCCATCTGGTGATGTTATT	[18]
GH-1248R	CTACGTGATCTGGGAGAGTTTC	
HH-60F	CCACAATGTCATCGACCATCTG	[18]
HH-534R	CCGAAGTATTCGGATGCCTATG	
GH-492F	CGATGATGTGCTGGATTCTGTC	[18]
GH-1002R	CTCGACCATTCCAAGATGCTCA	
BOXAIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	[19]
(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	[19]
m13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	[20]
m13-R	CACACAGGAAACAGCTATGAC	

### 1.3.2 B. longum亚种鉴定

对B. longum进行4种母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)代谢基因(表1)扩增<sup>[18]</sup>, PCR条件: 94℃预变性30 s, 94℃变性30 s, 58℃(59℃)退火60 s, 72℃延伸60 s, 共进行30个循环, 最后68℃终延伸5 min。将PCR产物进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪拍照并记录结果。

### 1.3.3 rep-PCR指纹图谱分析

采用通用引物BOXAIR、m13和(GTG)<sub>5</sub>(表1)对菌株进行重复性外源性回文聚合酶链反应(repetitive exogenous palindrome polymerase chain reaction, rep-PCR)指纹图谱分析<sup>[19-20]</sup>。PCR条件: 94℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 52℃退火30 s((GTG)<sub>5</sub>为50℃), 72℃延伸4 min, 共进行35个循环, 最后72℃终延伸10 min。将PCR产物进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪拍照并记录结果。指纹图谱使用GelCompar II v6.0软件进行聚类。

### 1.3.4 双歧杆菌益生特性分析

#### 1.3.4.1 耐酸、耐胆盐实验

参照Tang Wei等<sup>[21]</sup>的方法并作适当改进, 采用平板菌落计数法测定双歧杆菌对酸和胆盐的耐受性。分别配制普通MRS培养基和不同pH值(3.5和4.0)的MRS培养基, 按照2%接种量将活化好的菌悬液分别接入相应的

液体培养基中振荡混匀, 于厌氧工作站内进行培养。分别在0 h和4 h测定接种于普通MRS培养基和不同pH值的MRS培养基中双歧杆菌活菌数, 进行3次平行实验。以相同的方法分别配制普通MRS培养基和不同胆盐质量分数(0.1%和0.2%)的MRS培养基, 接菌后厌氧培养, 分别在0 h和2.5 h测定活菌数, 进行3次平行实验。统计结果, 按式(1)计算存活率:

$$\text{存活率}/\% = \frac{N_1}{N} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $N_1$ 为不同pH值或胆盐质量分数处理后平板上的活菌数/(CFU/mL);  $N$ 为对照样品中的活菌数/(CFU/mL)。

#### 1.3.4.2 抑菌实验

将活化后的双歧杆菌按2%的接种量接种于添加0.5% L-半胱氨酸的改良MRS液体培养基<sup>[22]</sup>中, 37℃厌氧培养48 h后将菌株发酵液离心(12 000×g, 10 min, 4℃), 通过0.22 μm微孔滤膜过滤得到无细胞发酵上清液, 4℃保存备用。

将指示菌株致泻大肠埃希氏菌CICC 10411、出血性大肠埃希氏菌CICC 21530、鼠伤寒血清型肠沙门氏菌肠亚种CICC 10420、产肠毒素大肠埃希氏菌CICC 10421分别接种于LB液体培养基, 单核细胞性李斯特菌CGMCC 1.9136接种于PYG液体培养基, 血清型肠炎沙门氏菌肠亚种CGMCC 1.10754接种于TSA液体培养基, 37℃培养18 h, 取1 mL指示菌悬液于无菌生理盐水中梯度稀释至浓度约为 $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL。将稀释液涂布于对应固体培养基, 向牛津杯中加入200 μL发酵上清液, 同时以不接菌的MRS培养基为空白对照。在4℃冰箱预扩散6 h后, 37℃恒温培养24 h, 测定抑菌圈直径, 实验重复3次取平均值。

#### 1.3.4.3 药敏实验

抗生素药敏实验采用纸片琼脂扩散法(K-B法)进行, 吸取100 μL活化后浓度在 $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL的双歧杆菌菌悬液, 使用无菌棉签将其均匀涂布于MRS琼脂平板表面, 将药片贴于其上, 37℃倒置厌氧培养48 h, 检测抑菌圈直径, 每种抗生素做3个平行。16种常用抗生素药敏纸片中抗生素的含量分别为: 青霉素(10 μg/片)、氨苄西林(10 μg/片)、苯唑西林(1 μg/片)、头孢噻啶(30 μg/片)、利福平(5 μg/片)、庆大霉素(10 μg/片)、四环素(30 μg/片)、万古霉素(30 μg/片)、米洛环素(30 μg/片)、阿卡米星(30 μg/片)、左氧氟沙星(5 μg/片)、链霉素(300 μg/片)、氨基曲南(30 μg/片)、诺氟沙星(10 μg/片)、卡那霉素(30 μg/片)、安西林(100 μg/片)。



## 1.3.4.4 体外抗氧化能力测定

2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 阳离子自由基清除能力测定: 参照Kim等<sup>[23]</sup>的方法, 将7 mmol/L ABTS工作液与2.45 mmol/L过硫酸钾水溶液按照1:1 (V/V) 混合均匀后避光放置12~16 h (室温)。加入无水乙醇溶液调节ABTS工作液浓度, 使得工作液在734 nm波长处的吸光度约为0.700±0.005。取待测样品0.5 mL与调整好浓度的ABTS工作液3.0 mL混合均匀, 室温放置30 min后在734 nm波长处测定吸光度。空白组以等体积蒸馏水代替待测样品, 测其吸光度, 计算方法如式(2)所示:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_c - A}{A_c} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A$ 为样品吸光度;  $A_c$ 为空白组吸光度。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力测定: 参照Zhao Li等<sup>[24]</sup>的方法并略作改进, 取0.1 mmol/L DPPH自由基溶液4.0 mL于试管中, 加入待测样品2.0 mL和50%乙醇溶液1.0 mL, 混匀后暗处避光反应60 min, 12 000 r/min离心20 min, 取上清液在517 nm波长处测定吸光度。空白组以等体积蒸馏水代替待测样品, 测其吸光度, 计算公式同式(2)。

## 1.3.4.5 碳水化合物代谢实验

将活化后的双歧杆菌按2%接种量接种于添加0.5% L-半胱氨酸盐酸盐的改良MRS液体培养基中, 37 °C厌氧培养48 h, 无菌条件下离心(10 000×g, 5 min, 4 °C)弃上清液, 用无菌生理盐水将菌体洗涤2次后, 重悬于1 mL生理盐水中<sup>[25]</sup>。以2%的接种量将菌悬液接种到含有不同碳源(抗性淀粉、低聚木糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖、D-(+)-海藻糖、大豆低聚糖、低聚半乳糖、菊粉、果胶、麦芽糊精、D-(+)-绵子糖、水苏糖、木糖醇、甘露醇、聚葡萄糖、壳寡糖、L-山梨醇)的改良MRS液体培养基中, 以葡萄糖为阳性对照, 不添加碳源为阴性对照, 测定0 h的OD<sub>600 nm</sub>并记为OD<sub>1</sub>。37 °C厌氧培养48 h, 测定OD<sub>600 nm</sub>并记为OD<sub>2</sub>, 最终OD<sub>600 nm</sub> = OD<sub>1</sub> - OD<sub>2</sub>。定义OD<sub>600 nm</sub> < 0.15为不生长, OD<sub>600 nm</sub> = 0.15~0.35为有限生长, OD<sub>600 nm</sub> > 0.35为生长良好。实验重复3次取平均值。

## 1.4 数据处理与分析

采用Gel Compar II v6.0凝胶分析软件进行指纹图谱聚类分析, 系统发育树的构建采用MEGA v7.0软件, 热图的绘制采用TBtools软件。

## 2 结果与分析

## 2.1 双歧杆菌的分离与鉴定

经groEL基因测序, 19份学龄儿童粪便样本中共分离得到416株双歧杆菌, 其中*B. longum* 336株、*B. bifidum* 35株、*B. pseudocatenulatum* 14株、*B. catenulatum* 19株、*B. breve* 12株。选取部分菌株groEL基因序列构建系统发育树见图1。双歧杆菌分布在3个大分支中, 其中*B. longum*、*B. bifidum*和*B. breve*位于独立的分支, *B. pseudocatenulatum*和*B. catenulatum*共同组成一个分支。

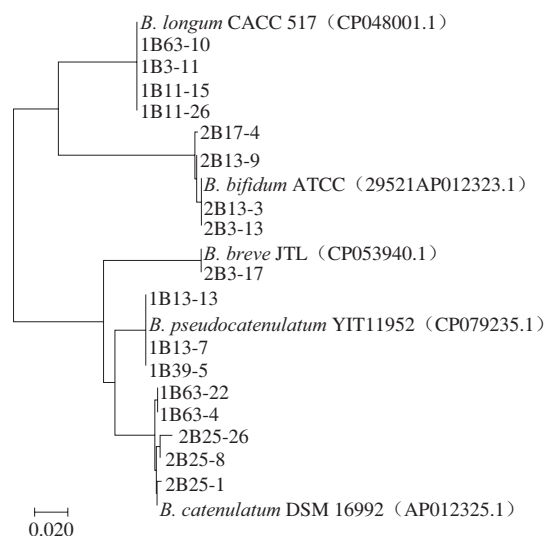


图1 基于groEL基因序列双歧杆菌代表菌株系统发育树  
Fig. 1 Phylogenetic tree of representative *Bifidobacterium* strains based on the groEL gene sequences

2.2 *B. longum* subsp. *longum*遗传差异性分析

对*B. longum*进行HMOs基因扩增, 凝胶电泳结果显示均为*B. longum* subsp. *longum*。根据rep-PCR指纹分型技术, 从带型相同的菌株中挑选2~4个典型菌株, 共得到27株代表性菌株(表2), 采用Gel Compar II软件将3种不同引物对应的指纹图谱进行聚类。由BOXAIR-PCR、m13-PCR和(GTG)<sub>5</sub>-PCR指纹聚类图(图2)可见, *B. longum* subsp. *longum*的指纹图谱带型丰富, 遗传多样性较高。

表2 筛选出的*B. longum* subsp. *longum*菌株及其宿主信息

Table 2 Host information of selected strains of <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>											
菌株	年龄	性别	菌株	年龄	性别	菌株	年龄	性别	菌株	年龄	性别
1B11-26	6	男	1B39-2	9	男	2B102-10	10	女	2B25-16	12	男
1B13-11	7	男	1B5-4	6	男	2B102-3	10	女	2B3-21	11	女
2B17-16	11	男	1B62-15	9	女	2B12-22	10	女	2B33-3	12	女
1B23-1	7	女	1B62-16	9	女	2B130-3	13	男	2B3-6	11	女
1B23-11	7	女	1B63-15	8	男	2B130-4	13	男	2B6-23	11	男
1B3-21	9	女	1B68-10	9	男	2B13-28	10	女	2B6-28	11	男
1B38-1	8	男	1B68-16	9	男	2B13-5	10	女			

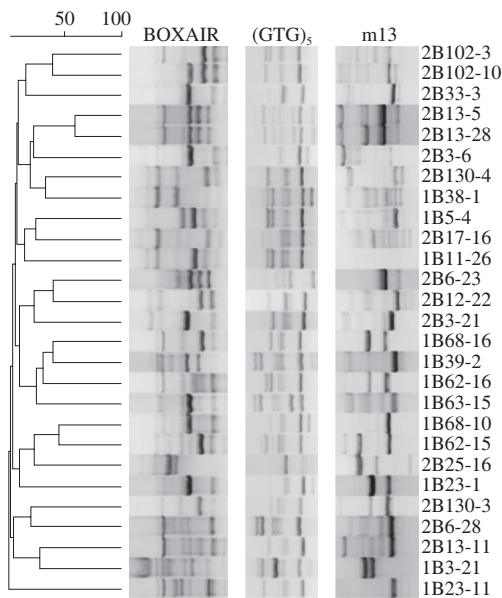


图2 基于rep-PCR扩增的27株代表性*B. longum subsp. longum*的聚类图  
Fig. 2 Cluster map of 27 representative *B. longum subsp. longum* according to the genetic profiles obtained by rep-PCR

2.3 益生特性分析

2.3.1 酸、胆盐耐受性分析

表3 27株*B. longum subsp. longum*代表菌株耐酸耐胆盐存活率  
Table 3 Acid and bile tolerance of 27 representative strains of *B. longum subsp. longum*

菌株编号	耐酸存活率/%		耐胆盐存活率/%	
	pH 3.5	pH 4.0	0.10%胆盐	0.20%胆盐
1B11-26	<0.000 1	46.34±0.03	71.08±0.01	8.13±0.02
2B6-23	1.82±0.02	37.27±0.05	78.74±0.04	6.45±0.03
2B3-6	1.87±0.02	20.37±0.05	49.44±0.05	6.71±0.06
2B102-3	2.84±0.01	18.61±0.04	25.75±0.02	4.56±0.04
2B6-28	6.57±0.04	15.36±0.04	22.97±0.01	<0.000 1
2B13-5	23.14±0.00	40.67±0.02	5.31±0.01	1.86±0.00
2B33-3	4.32±0.02	170.83±0.05	68.53±0.05	41.55±0.01
2B3-21	4.44±0.04	69.28±0.04	53.42±0.03	3.64±0.04
2B102-10	0.28±0.00	1.97±0.01	28.38±0.03	0.44±0.01
1B62-16	<0.000 1	17.74±0.23	32.50±0.04	19.15±0.05
1B38-1	7.89±0.02	29.03±0.02	31.11±0.04	54.91±0.04
2B13-28	0.96±0.00	6.12±0.02	48.83±0.01	64.05±0.01
1B5-4	7.01±0.06	58.11±0.05	37.65±0.03	3.27±0.04
1B39-2	9.29±0.02	31.43±0.04	22.65±0.01	24.56±0.03
2B130-4	<0.000 1	5.84±0.01	22.46±0.01	0.33±0.00
2B12-22	16.17±0.03	34.31±0.04	44.84±0.01	9.11±0.05
2B17-16	2.99±0.01	33.00±0.03	11.40±0.02	0.17±0.00
1B23-1	13.84±0.04	26.96±0.02	26.67±0.01	2.93±0.01
1B23-11	13.54±0.03	64.35±0.05	81.81±0.05	41.14±0.06
2B25-16	5.88±0.01	35.82±0.04	38.53±0.05	21.07±0.04
1B3-21	15.34±0.05	110.89±0.05	37.45±0.03	12.38±0.02
1B63-15	17.77±0.03	40.57±0.04	33.70±0.01	20.01±0.02
2B130-3	21.76±0.03	52.26±0.01	8.26±0.01	2.76±0.01
1B68-10	1.85±0.01	54.12±0.01	32.72±0.04	14.65±0.05
1B13-11	3.62±0.01	17.46±0.03	39.65±0.01	9.23±0.01
1B68-16	32.16±0.01	128.52±0.04	57.08±0.03	39.52±0.02
1B62-15	<0.000 1	26.22±0.04	29.40±0.03	18.87±0.04

如表3所示, 厌氧培养4 h后, 所有菌株在pH 4.0的MRS培养基中均能存活, 且菌株2B33-3在pH 4.0的存活

率达到170.83%; 但菌株1B11-26、1B62-16、1B62-15和2B130-4在pH 3.5的MRS培养基中存活率低于0.000 1%。总体而言, 27株*B. longum subsp. longum*代表菌株均具有较强的耐酸能力, 其中菌株2B3-21、2B13-5、2B33-3和1B68-16的耐受性最强。

厌氧培养2.5 h后, 实验中所有*B. longum subsp. longum*均能够在添加0.1%胆盐的MRS培养基中存活, 菌株1B23-11的存活率最高, 为81.81%, 菌株2B13-5的存活率最低, 为5.31%。当胆盐质量分数为0.2%时, 菌株2B6-28的存活率低于0.000 1%, 菌株2B13-28的存活率最高, 为64.05%。相对而言, 菌株1B23-11、1B68-16、2B13-28和2B33-3的耐胆盐能力最优。

2.3.2 抑菌活性分析

采用牛津杯法检测27株*B. longum subsp. longum*代表菌株对常见致腹泻病原菌的抑菌活性, 结果见表4。实验菌株中有22株*B. longum subsp. longum*发酵上清液具有较好的抑菌性能, 均可以抑制致泻大肠埃希氏菌CICC 10411、出血性大肠埃希氏菌CICC 21530、鼠伤寒血清型肠沙门氏菌肠亚种CICC 10420、产肠毒素大肠埃希氏菌CICC 10421、单核细胞性李斯特菌CGMCC 1.9136、血清型肠炎沙门氏菌肠亚种CGMCC 1.10754, 其中菌株1B68-16、2B13-5、2B33-3和1B39-2的抑菌能力较强。

表4 27株*B. longum subsp. longum*代表菌株抑菌活性分析  
Table 4 Bacteriostatic activities of 27 representative strains of *B. longum subsp. longum*

菌株编号	抑菌圈直径/mm					
	CGMCC1.10754	CGMCC1.9136	CICC10411	CICC10420	CICC10421	CICC21530
1B62-16	—	12.13±0.03	28.96±0.04	24.33±0.02	19.12±0.02	20.78±0.02
2B6-28	18.07±0.04	15.71±0.01	—	24.17±0.02	23.29±0.03	26.80±0.02
2B3-6	14.96±0.02	12.23±0.02	25.20±0.02	27.48±0.02	28.83±0.02	23.50±0.02
1B38-1	19.32±0.03	13.97±0.03	21.60±0.03	13.33±0.03	24.65±0.02	17.88±0.03
1B68-16	17.82±0.03	16.27±0.03	22.75±0.03	25.93±0.06	29.87±0.03	28.39±0.03
2B102-3	14.75±0.02	15.10±0.02	24.10±0.02	26.76±0.02	23.29±0.02	22.16±0.02
2B102-10	17.86±0.03	18.91±0.02	25.52±0.02	23.43±0.04	17.86±0.02	27.62±0.03
2B13-28	16.36±0.03	13.42±0.03	28.20±0.03	27.18±0.03	21.33±0.03	24.11±0.03
2B13-5	22.43±0.02	20.00±0.02	36.80±0.02	24.27±0.01	20.55±0.02	23.35±0.02
2B3-21	20.00±0.02	19.42±0.03	22.62±0.02	15.24±0.02	17.23±0.02	21.48±0.02
2B130-4	19.98±0.03	17.82±0.02	28.05±0.03	21.87±0.02	19.73±0.02	22.15±0.02
2B130-3	16.56±0.01	19.10±0.03	24.12±0.02	13.32±0.02	22.32±0.02	21.49±0.03
2B12-22	18.12±0.03	17.10±0.02	23.94±0.02	23.68±0.02	26.08±0.03	22.66±0.03
1B39-2	20.32±0.02	19.59±0.02	24.60±0.01	22.82±0.02	20.20±0.02	33.14±0.02
1B5-4	16.56±0.02	20.02±0.02	26.02±0.03	21.25±0.01	16.05±0.02	19.62±0.02
1B23-1	21.49±0.02	19.00±0.02	21.98±0.03	23.67±0.02	12.66±0.02	17.02±0.03
1B11-26	20.52±0.03	19.38±0.02	22.28±0.03	19.98±0.02	—	18.02±0.02
1B23-11	22.51±0.02	20.77±0.01	22.99±0.04	23.46±0.02	15.39±0.02	19.23±0.03
1B3-21	21.77±0.02	33.50±0.02	26.24±0.04	22.97±0.03	16.18±0.02	20.96±0.03
1B68-10	14.32±0.02	18.92±0.02	20.00±0.05	22.46±0.03	18.89±0.02	16.93±0.02
1B13-11	16.31±0.03	18.40±0.02	27.48±0.02	24.86±0.03	21.52±0.02	19.54±0.02
2B17-16	9.83±0.02	16.82±0.02	25.18±0.01	23.31±0.02	17.89±0.02	18.49±0.02
1B63-15	17.61±0.02	20.55±0.02	18.77±0.03	19.22±0.02	15.90±0.02	15.82±0.02
2B25-16	15.24±0.03	17.02±0.02	22.99±0.02	38.13±0.02	18.43±0.02	16.44±0.01
2B6-23	13.69±0.02	—	14.09±0.04	15.41±0.03	10.67±0.03	17.97±0.04
2B33-3	20.91±0.03	20.33±0.02	28.47±0.02	31.86±0.02	16.67±0.02	17.95±0.01
1B62-15	10.77±0.03	—	22.32±0.02	16.01±0.03	16.51±0.03	19.93±0.04

注: 一. 无抑制; 抑菌圈直径包含牛津杯的直径。

### 2.3.3 耐药性分析

根据纸片琼脂扩散法对27株*B. longum* subsp. *longum*代表菌株进行16种抗生素抗性分析,从图3可知,所有菌株对氨苄西林、利福平、米诺环素敏感,对安西林、卡那霉素、诺氟沙星、氨基糖苷类、左氧氟沙星表现中敏或耐药。14株对头孢噻肟敏感,20株对青霉素敏感,21株对四环素敏感,14株对庆大霉素敏感,24株对链霉素敏感,7株对万古霉素敏感。除菌株1B62-16对阿卡米星敏感,菌株1B23-11、2B130-3和1B5-4对苯唑西林敏感,其余菌株对以上两种抗生素均表现中敏或耐药。总体而言,菌株2B13-28、2B6-28、2B102-10对大多数抗生素耐药。

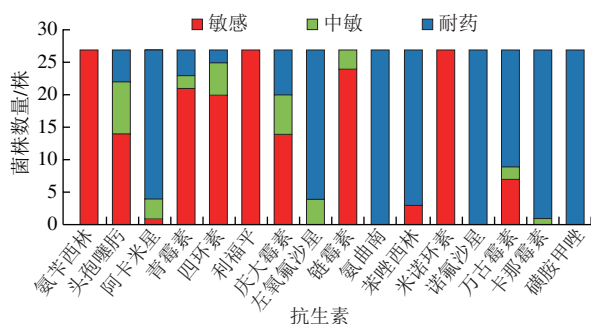
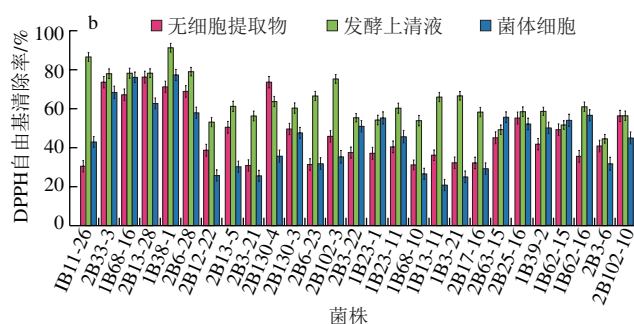
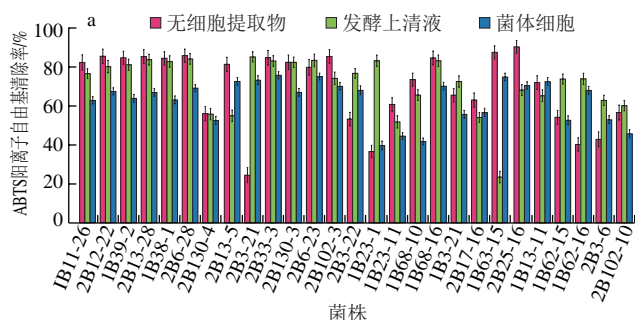


图3 27株*B. longum* subsp. *longum*代表菌株抗生素耐药性分析  
Fig. 3 Antibiotic resistance of 27 representative strains of *B. longum* subsp. *longum*

### 2.3.4 体外抗氧化能力分析

#### 2.3.4.1 ABTS阳离子自由基清除能力

由图4a可知,待测*B. longum* subsp. *longum*无细胞提取物组对ABTS阳离子自由基清除率最高,13株菌株的清除率高于80%,其中菌株2B25-16清除率最高,达到89.49%;菌株2B3-21清除率最低,为24.21%。发酵上清液组的ABTS阳离子自由基清除率略低于无细胞提取物组,其中菌株2B3-21的清除率最高,为84.4%;菌株1B63-15的清除率最低,为23.29%。而菌株细胞组对ABTS阳离子自由基清除水平最低,其中菌株2B33-3的清除率最高,为74.95%;菌株1B23-1清除率最低,为39.26%。综上,待测菌株对ABTS阳离子自由基清除作用的代谢物可能主要存在于无细胞提取物中,菌株2B13-28、2B6-28、2B33-3和1B68-16对ABTS阳离子自由基总体清除效果较好。



a. ABTS阳离子自由基清除能力; b. DPPH自由基清除能力。

图4 27株*B. longum* subsp. *longum*代表菌株抗氧化能力

Fig. 4 Antioxidant capacity of 27 representative strains of *B. longum* subsp. *longum*

#### 2.3.4.2 DPPH自由基清除能力

由图4b可知,待测*B. longum* subsp. *longum*发酵上清液组对DPPH自由基清除率最高,除菌株1B63-15和2B3-6外,其余菌株的清除率均高于50%,其中菌株1B38-1清除率最高,达到91.81%。待测菌株无细胞提取物组的DPPH自由基清除率介于30%~80%之间,其中菌株2B13-28的清除率最高,为76.69%;菌株1B11-26的清除率最低,为30.79%。菌株细胞组对DPPH自由基清除水平体现了较大的菌株差异性,其中菌株1B38-1的清除率最高,为77.6%,其次是菌株1B68-16,其余菌株的清除率均低于70%。菌株1B13-11的清除率最低,为20.9%。综上,待测菌株对DPPH自由基清除作用的代谢物可能主要存在于发酵上清液中,菌株1B38-1、2B33-3、1B68-16和2B13-28对DPPH自由基总体清除效果较好。

#### 2.3.5 碳水化合物代谢分析

*B. longum* subsp. *longum*能利用多种宿主与饮食来源的聚糖是其在不同年龄段人群肠道内均能定植的主要因素之一。本研究选取18种植物源聚糖对27株*B. longum* subsp. *longum*进行糖发酵实验,碳源代谢结果使用TBtools软件绘制热图并聚类(图5)。受试菌株中,15株能有效利用低聚果糖,16株能有效利用低聚异麦芽糖,17株能有效利用大豆低聚糖,8株能很好地利用菊粉,10株能有效利用苹果果胶,17株能有效利用棉子糖,18株能有效利用麦芽糊精,17株有效利用水苏糖,9株有效利用聚葡萄糖,10株有效利用壳寡糖。除菌株1B3-21外,其余菌株都不能有效利用木糖醇。相反,除菌株1B11-26外,其余26株菌株都能很好地利用低聚半乳糖。菌株1B38-1和2B130-3能有效利用抗性淀粉,菌株1B5-4、1B39-2、1B63-15和2B102-10能有效利用低聚木糖,菌株1B38-1、2B130-3、2B130-4、1B13-11和1B3-21能有效利用D-海藻糖,菌株2B102-3、1B23-11、1B13-11、2B6-28和2B17-16能很好地利用甘露糖醇和L-山梨糖。



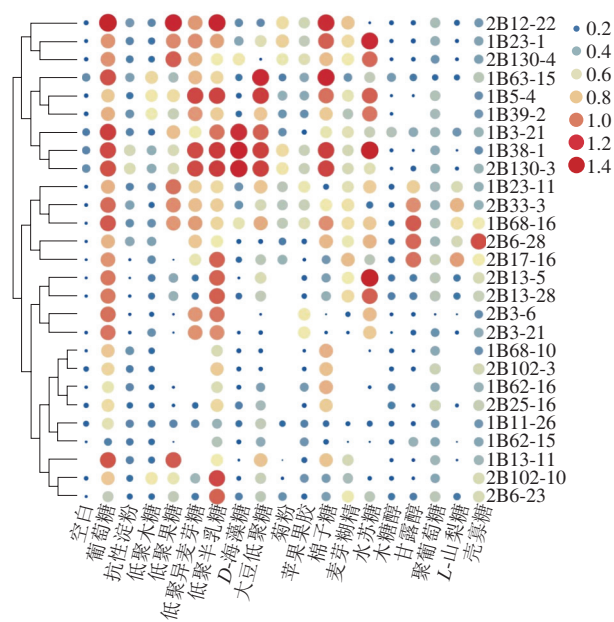


图5 27株代表性*B. longum subsp. longum*碳水化合物代谢谱的聚类分析  
Fig. 5 Cluster analysis of carbohydrate utilization profiles of 27 representative strains of *B. longum subsp. longum*

### 3 讨论与结论

针对新疆少数民族肠道双歧杆菌的研究前期主要集中在母婴群体的差异性方面,课题组从新疆维吾尔族婴幼儿粪便中分离得到双歧杆菌*B. longum subsp. infantis*、*B. longum subsp. suis*、*B. bifidum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. adolescentis*<sup>[26]</sup>;从另一组维吾尔族母婴肠道中分离到双歧杆菌*B. longum subsp. longum*、*B. pseudolongum*、*B. breve*、*B. animal subsp. lactis*<sup>[27-28]</sup>。根据文献报道,大部分母乳喂养、顺产的婴幼儿以婴儿型双歧杆菌为主,在成人化的学龄儿童中*B. longum subsp. longum*是最常见的种,在一部分儿童中有报道以*B. breve*为优势种<sup>[2]</sup>;除此之外,学龄儿童成人型双歧杆菌的频繁分离,显示“婴儿型双歧杆菌”与“成人型双歧杆菌”只有相对丰度差异,没有明确的年龄界限<sup>[29]</sup>,很可能双歧杆菌菌群结构的演变需要更长的时间。同时,本研究基于BOXAIR、m13和(GTG)<sub>3</sub> 3种rep-PCR指纹分型技术的遗传差异研究显示,所有*B. longum subsp. longum*菌株分型聚类共获得27种基因型,显示了高度的遗传多样性。不仅揭示了不同个体肠道内*B. longum subsp. longum*菌株遗传差异,同时发现来自同一个体有多个菌株基因型现象存在,例如来自同一个体的菌株2B3-6和2B3-21,这表明人类个体在有限的时间内双歧杆菌同种肠道细菌群体遗传结构呈现进化的动态变化特征和遗传多态性,这和拟杆菌等其他细菌的报道<sup>[6-7,30]</sup>相一致,但仍需要开展更深入、全面的研究。这对于揭示以双歧杆菌为代表的益生菌理论的认

识和拓展目前仅认为益生特性是菌株特异性的有限认知很有必要<sup>[19,31-33]</sup>。

*B. longum subsp. longum*在人体胃肠道定植过程中会受到酸、胆盐、各种消化酶、宿主免疫以及肠道内其他微生物和抗生素的影响<sup>[34-35]</sup>。然而,*B. longum subsp. longum*通过对宿主源以及植物源多糖的竞争优势成功定植于不同年龄段人群胃肠道中,并保持极高的丰度<sup>[8]</sup>。Wei Yanxia等<sup>[34]</sup>对*B. longum*进行pH 3.5耐受性测试,结果显示存活率在30%~60%。本研究受试菌株的耐酸耐胆盐能力较强,个别菌株在低pH值和较高胆盐质量分数的培养液中的存活率可分别达到170.83%、81.81%。赵志霞等<sup>[28]</sup>从母乳中分离得到的所有双歧杆菌都对产肠毒大肠埃希氏菌有较强的抑菌能力,50%的菌株对出血性大肠埃希氏菌抑菌能力较强。本研究抑菌活性分析结果表明,所有受试菌株都对出血性大肠埃希氏菌和鼠伤寒血清型肠沙门氏菌表现出抑菌活性。有研究表明,*B. longum subsp. longum*对氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素表现出耐药<sup>[24]</sup>。此外,本研究耐药分析结果表明受试菌株对β-内酰胺类和四环素类抗生素表现敏感。体外抗氧化能力分析结果表明,菌株的无细胞提取物对ABTS阳离子自由基清除能力最强,发酵上清液对DPPH自由基清除率最高,与其他研究结果<sup>[24]</sup>一致。*B. longum subsp. longum*除了可以有效利用HMOs外,还能代谢多种植物源寡糖和聚糖,例如半纤维素和果胶<sup>[3,36-38]</sup>。本实验中除菌株1B62-15外,受试菌株都能有效利用多种植物源聚糖。

本研究对哈萨克族学龄儿童肠道双歧杆菌进行分离鉴定,通过基因型和表型相结合的方法对*B. longum subsp. longum*代表性菌株进行分析后发现,菌株1B68-16和2B33-3可作为潜在益生菌菌株进行后期体内益生特性研究。

### 参考文献:

- [1] AVERSHINA E, LUNDGARD K, SEKELJA M, et al. Transition from infant- to adult-like gut microbiota[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(7): 2226-2236. DOI:10.1111/1462-2920.13248.
- [2] KATO K, ODAMAKI T, MITSUYAMA E, et al. Age-related changes in the composition of gut *Bifidobacterium* species[J]. Current Microbiology, 2017, 74(8): 987-995. DOI:10.1007/s00284-017-1272-4.
- [3] LAWSON M A E, O'NEILL I J, KUJAWSKA M, et al. Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote *Bifidobacterium* interactions within a single ecosystem[J]. The ISME Journal, 2020, 14(2): 635-648. DOI:10.1038/s41396-019-0553-2.
- [4] TURRONI F, PEANO C, PASS D A, et al. Diversity of *Bifidobacteria* within the infant gut microbiota[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e36957. DOI:10.1371/journal.pone.0036957.
- [5] ISHIKAWA E, MATSUKI T, KUBOTA H, et al. Ethnic diversity of gut microbiota: species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(2): 265-270. DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.02.010.

- [6] ZHANG Z D, HOU Q C, WANG Y R, et al. Evaluation of bacterial diversity and evolutionary dynamics of gut *Bifidobacterium longum* isolates obtained from older individuals in Hubei province, China[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0144221. DOI:10.1128/spectrum.01442-21.
- [7] ODAMAKI T, BOTTACINI F, KATO K, et al. Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human lifespan[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 85. DOI:10.1038/s41598-017-18391-x.
- [8] ZHANG C C, YU Z M, ZHAO J X, et al. Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 53: 157-165. DOI:10.1016/j.jff.2018.12.022.
- [9] ESSOCK-BURNS T, BENNETT B D, ARENCIBIA D, et al. Bacterial quorum-sensing regulation induces morphological change in a key host tissue during the *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* symbiosis[J]. *mBio*, 2021, 12(5): e02402-21. DOI:10.1128/mBio.02402-21.
- [10] SPURGIN L G, ILLERA J C, JORGENSEN T H, et al. Genetic and phenotypic divergence in an island bird: isolation by distance, by colonization or by adaptation?[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(5): 1028-1039. DOI:10.1111/mec.12672.
- [11] HE Y, WU W, ZHENG H M, et al. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1532-1535. DOI:10.1038/s41591-018-0164-x.
- [12] GOODRICH J K, WATERS J L, POOLE A C, et al. Human genetics shape the gut microbiome[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 789-799. DOI:10.1016/j.cell.2014.09.053.
- [13] BRINKER P, FONTAINE M C, BEUKEBOOM L W, et al. Host, symbionts, and the microbiome: the missing tripartite interaction[J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(6): 480-488. DOI:10.1016/j.tim.2019.02.002.
- [14] WONG C B, ODAMAKI T, XIAO J Z. Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: modulation of gut microbiome as the principal action[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 54: 506-519. DOI:10.1016/j.jff.2019.02.002.
- [15] NOVAKOVA J, VLKOVA E, SALMONOVA H, et al. Anticlostridial agent 8-hydroxyquinoline improves the isolation of faecal bifidobacteria on modified Wilkins-Chalgren agar with mupirocin[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, 62(4): 330-335. DOI:10.1111/lam.12552.
- [16] MATSUKI T, WATANABE K, FUJIMOTO J, et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria[J]. *Applied in Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 167-173. DOI:10.1128/AEM.70.1.167-173.2004.
- [17] YANG B, CHEN Y Q, STANTON C, et al. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* composition at species level and gut microbiota diversity in infants before 6 weeks[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13). DOI:10.3390/ijms20133306.
- [18] TSO L, BONHAM K S, FISHBEIN A, et al. Targeted high-resolution taxonomic identification of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* using human milk oligosaccharide metabolizing genes[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2833. DOI:10.3390/nu13082833.
- [19] MASCO L, HUYS G, GEVERS D, et al. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(4): 557-563. DOI:10.1078/072320203770865864.
- [20] DURAND L, PLANCHON S, GUINEBRETIERE M H, et al. Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*[J]. *Food Microbiology*, 2015, 45: 103-110. DOI:10.1016/j.fm.2014.01.015.
- [21] TANG W, LI C, HE Z G, et al. Probiotic properties and cellular antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibetan Kefir grains[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(3): 523-533. DOI:10.1007/s12602-017-9349-8.
- [22] VLKOVA E, SALMONOVA H, BUNESOVA V, et al. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria[J]. *Anaerobe*, 2015, 34: 27-33. DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.04.001.
- [23] KIM H, KIM J S, KIM Y, et al. Antioxidant and probiotic properties of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* of human origins[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2020, 25(3): 421-430. DOI:10.1007/s12257-020-0147-x.
- [24] ZHAO L, WANG S, DONG J H, et al. Identification, characterization, and antioxidant potential of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains isolated from feces of healthy infants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 756519. DOI:10.3389/fmicb.2021.756519.
- [25] KUJAWSKA M, LA ROSA S L, ROGER L C, et al. Succession of *Bifidobacterium longum* strains in response to a changing early life nutritional environment reveals dietary substrate adaptations[J]. *iScience*, 2020, 23(8): 101368. DOI:10.1016/j.isci.2020.101368.
- [26] 魏小晶, 周恒丞, 靳亚梅, 等. 新疆喀什地区维吾尔族婴幼儿肠道双歧杆菌遗传差异及益生特性分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(6): 93-100. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190217-083.
- [27] 蔡静静, 徐晓裕, 张艳, 等. 新疆维吾尔族肠道中高产胞外多糖双歧杆菌的筛选及其抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 144-151. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190305-044.
- [28] 赵志霞, 许翠, 安美玲, 等. 新疆喀什地区维吾尔族母乳源双歧杆菌分离筛选及其益生特性分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 185-192. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181017-170.
- [29] WONG C B, ODAMAKI T, XIAO J Z. 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. DOI:10.1093/femsre/fuaa010.
- [30] LI M J, ZHOU X Y, STANTON C, et al. Comparative genomics analyses reveal the differences between *B. longum* subsp. *infantis* and *B. longum* subsp. *longum* in carbohydrate utilisation, CRISPR-Cas systems and bacteriocin operons[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8). DOI:10.3390/microorganisms9081713.
- [31] HILDEBRAND F, GOSSMANN T I, FRIOUX C, et al. Dispersal strategies shape persistence and evolution of human gut bacteria[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(7): 1167-1176. DOI:10.1016/j.chom.2021.05.008.
- [32] LADAU J, ELOE-FADROSH E A. Spatial, temporal, and phylogenetic scales of microbial ecology[J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(8): 662-669. DOI:10.1016/j.tim.2019.03.003.
- [33] KUMAR H, COLLADO M C, WOPEREIS H, et al. The bifidogenic effect revisited-ecology and health perspectives of *Bifidobacterium* colonization in early life[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 1855. DOI:10.3390/microorganisms8121855.
- [34] WEI Y X, GAO J, LIU D B, et al. Adaptational changes in physiological and transcriptional responses of *Bifidobacterium longum* involved in acid stress resistance after successive batch cultures[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 156. DOI:10.1186/s12934-019-1206-x.
- [35] KELLY S M, LANIGAN N, O'NEILL I J, et al. *Bifidobacterium* biofilm formation is a multifactorial adaptive phenomenon in response to bile exposure[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 11598. DOI:10.1038/s41598-020-68179-9.
- [36] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, et al. Glycan utilization and cross-feeding activities by *Bifidobacteria*[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(4): 339-350. DOI:10.1016/j.tim.2017.10.001.
- [37] FUSHINOBU S, HACHEM M A. Structure and evolution of the bifidobacterial carbohydrate metabolism proteins and enzymes[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(2): 563-578. DOI:10.1042/BST20200163.
- [38] SANDRA M K, JOSE M M, DOUWE V S. Plant glycan metabolism by *Bifidobacteria*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 609418. DOI:10.3389/fmicb.2021.609418.