

母乳及婴儿粪便菌群分析及功能菌株筛选

吕临征¹, 张兰威², 张 萌³, 刘 丽³, 韩 雪^{1*}

(1. 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 哈尔滨 150006; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003;
3. 黑龙江中医药大学附属第三医院, 哈尔滨 150040)

摘 要: **目的** 探究母乳喂养婴儿粪便菌群及母乳菌群相关性, 获得具有潜在益生功能菌株。**方法** 对健康母子母乳及婴儿粪便样本进行 Illumina 高通量测序, 探究母乳与婴儿粪便样本菌群结构组成, 母乳菌群在婴儿肠道垂直传递情况。通过体外益生性质研究, 对分离的菌株进行筛选。**结果** 母乳中的主要菌科为肠杆菌科、莫拉氏菌科、葡萄球菌科和链球菌科; 而婴儿粪便中主要为肠杆菌科和双歧杆菌科。母乳对婴儿肠道菌群的平均贡献率为 44.90%。根据其表面疏水性、模拟胃肠道耐受性和对细胞的黏附性质的研究, 从 123 株分离菌株中筛选出 8 株具有益生功能菌株, 分别为 2 株假小链双歧杆菌、1 株两歧双歧杆菌和 5 株粪肠球菌。**结论** 母乳菌群与婴儿肠道菌群密切相关, 存在菌群垂直传递的情况。最终获得 8 株性能优良的益生菌株, 为开发益生菌补充剂提供理论基础。

关键词: 母乳菌群; 婴儿粪便菌群; 微生物多样性; 母婴传递; 益生菌

Comparative analysis of microbiotas in breast milk and infant stools and screening of functional strains

LV Lin-Zheng¹, ZHANG Lan-Wei², ZHANG Meng³, LIU Li³, HAN Xue^{1*}

(1. Harbin Institute of Technology, School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin 150006, China; 2. Ocean University of China, College of Food Science and Engineering, Qingdao 266003, China; 3. Third Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: Objective To explore the correlation between stools and breast milk of exclusively breastfed infants, and obtain potential probiotic strains. **Methods** Illumina high-throughput sequencing was performed on breast milk and infant fecal samples of healthy mother and child to explore the composition of the microflora of breast milk and infant fecal samples, and the vertical transmission of breast milk microflora in the infant intestine. Furthermore, the isolated strains in breast milk and infant stools were evaluated and selected based on their probiotic properties *in vitro*. **Results** Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Staphylococcaceae, and Streptococcaceae were major families in breast milk, while Enterobacteriaceae and Bifidobacteriaceae were predominant in infant stool. The average contribution rate of breast milk to the intestinal flora of infants was 44.90%. Among the 123 isolated strains, 8 strains were screened based on their hydrophobicity, tolerance to intestinal conditions and adhesion to cells, and identified as 2 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* strains, 1 *Bifidobacterium bifidum* strain, and 5 *Enterococcus faecalis* strains.

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFC1604302)、黑龙江省应用技术与开发计划重大项目(GA16B201-2)

Fund: Supported by the National Key Research and Development of China (2018YFC1604302), and the Heilongjiang province Key Science and Technology Plan (GA16B201-2)

***通信作者:** 韩雪, 博士, 教授, 主要研究方向为乳品科学与技术、传统食品产业化、乳酸菌发酵。E-mail: xhan@hit.edu.cn

***Corresponding author:** HAN Xue, Ph.D, Professor, School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, No.92, Xidazhi Road, Nangang District, Harbin 150006, China. E-mail: xhan@hit.edu.cn

Conclusion Breast milk microbiota is closely related to infant gut microbiota, and there is vertical transmission of microbiota. Finally, 8 strains of probiotics with good performance are screened, which provides a theoretical basis for the development of probiotic supplements.

KEY WORDS: breast milk bacteria; infant intestinal bacteria; microbial diversity; maternal transmission; probiotics

0 引言

母乳作为婴儿最理想的食物, 不仅能为婴儿提供生长所需的营养物质, 其中所含的微生物还能提高婴儿对环境的耐受能力, 抑制病原微生物在婴儿肠道的生长定植^[1-2]。婴儿出生以前母亲体内微生物通过内源途径传递到婴儿体内, 胎盘和羊水水中的菌群组成与婴儿胎便相似, 多为变形菌门^[3]。婴儿出生后, 随着哺乳的进行, 加速了母-婴菌群的传递, 其中, 主要包括乳杆菌、双歧杆菌、链球菌、肠球菌、丙酸杆菌和葡萄球菌等^[4-5]。

肠道中的细菌、真菌、病毒及宿主细胞, 构成了一个庞大的肠道微生态系统^[6]。由于肠道中氧气的存在, 需氧菌及兼性厌氧菌最先定植。细菌生长繁殖后逐渐消耗肠道内氧气, 创造出厌氧条件。严格厌氧菌开始快速增殖, 如双歧杆菌属、拟杆菌属等^[7]。双歧杆菌对婴儿肠道黏膜屏障及体液免疫有着很好的促进及调节作用, 可以促进肠道黏膜B淋巴细胞增殖及免疫球蛋白的分泌^[4]。乳杆菌是人体肠道微生态系统中重要的组成部分。干酪乳杆菌可以通过调节树突细胞影响调节性T细胞^[8]。发酵乳杆菌通过产生抗菌肽及激活先天性免疫应答抑制病原菌生长, 有效地预防婴儿呼吸道感染^[9]。鼠李糖乳杆菌可以通过抑制病原菌的生长, 增强机体免疫力^[10]。肠道菌群的定植对婴儿早期肠道功能和免疫系统的发育起着至关重要的作用^[11]。

目前对于中国东北地区母乳及婴儿肠道菌群关系研究较少, 为了进一步探究母乳与婴儿肠道菌群相关性, 本研究使用Illumina高通量基因测序技术, 分析了哈尔滨市母乳和婴儿粪便样本中的菌群结构组成, 对母乳菌群与婴儿粪便菌群之间的相关性进行探究。通过益生指标的研究, 对潜在的功能菌株进行筛选, 为开发婴儿益生菌制剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MRS培养基(man rogosa sharpe, MRS)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 肠球菌显色培养基(青岛海博生物公司); 乙酸乙酯(分析纯, 天津科密欧化学试剂公司); 萘啶酮酸(纯度 $\geq 98\%$)、 β -半乳糖苷酶显色底物(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, X-gal)、胆盐($\geq 70\%$)、胃蛋白酶(250 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、

磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L)、细菌基因组DNA提取试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司); 大鼠小肠隐窝上皮细胞(intestinal crypt epithelial cells-6, IEC-6, 国家生物医学实验细胞资源库)。

1.2 仪器与设备

ES124S 万分之一电子天平(北京赛多利斯公司); ZHJH-1109 垂直流超净工作台(苏州净化设备有限公司); LDZX-40AI 高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂); TGL-16G 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); BCD-215TD GA 冰箱(海尔集团); HWS24 数显恒温水浴锅(上海一恒有限公司); 202-3 型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器)。

1.3 实验方法

1.3.1 样本人群选择

本实验纳入的人群应满足以下条件: 健康母亲及其婴儿; 婴儿无先天性疾病, 出生时Apgar评分大于7分; 母亲本次孕期身体健康, 母亲未患有严重的妇产科疾病, 如妊娠期糖尿病, 妊娠期高血压, 先兆子痫或子痫; 既往无严重的心、肝、肺、肾疾病、内分泌疾病以及精神病等病史。

1.3.2 样本采集及储存方法

母乳及婴儿粪便严格对应跟踪取样。分别采集初乳(1~7 d)、过渡乳(8~14 d)及成熟乳(>14 d)样本。样本采集容器为无菌离心管^[12]。采集的母乳及婴儿粪便样本尽快转存于实验室超低温-80℃冰箱^[13]。

1.3.3 Illumina 高通量测序及分析方法

使用Agilent 2100生物分析仪对文库的片段范围及浓度进行检测。检测合格的文库根据插入的片段大小, 通过Illumina HiSeq 2000平台进行PE250测序。使用R软件包, 对样本 α 多样性(Chao1和Shannon指数)和 β 多样性中分类单元(operational taxonomic unit, OTU)的差异进行分析。使用R软件包(ade4)分析母乳和婴儿粪便样本中的细菌多样性。使用距离矩阵(adonis, R vegan package)分析母乳和婴儿粪便样本物种组成^[14]。使用了Source Tracker 0.9.5, 分析母乳菌群对婴儿肠道菌群的贡献率^[15]。

1.3.4 菌种分离、纯化

将母乳及稀释后的粪便样本, 涂布于半选择性MRS固体培养基上。双歧杆菌及乳杆菌采用MRS琼脂培养基添加萘啶酮酸, X-gal进行分离^[16-17]; 肠球菌采用肠球菌显色培养基进行分离。通过革兰氏染色, 筛选出具有双歧杆菌、乳杆菌及肠球菌特征的菌株。双歧杆菌呈现分叉状如

Y 形和 V 形; 乳杆菌呈现链杆状或球杆状; 肠球菌呈球形或卵圆形^[18]。革兰氏染色均为阳性。筛选后的菌株以 ML(母乳来源)或 FL(婴儿粪便来源)加数字方式命名。以 20%丙三醇作为保护剂, 冷冻保藏于-80 °C 冰箱中备用^[12]。

1.3.5 表面疏水性筛选

细菌于 37 °C 下静置培养 36 h。6000 r/min、10 min 离心菌液, 弃上清, 收集菌体沉淀。菌体用无菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤两次, 再重新悬浮于 PBS 缓冲液中, 使菌悬液的吸光度达到 0.5 ± 0.02 (A_0)。取 2 mL 菌悬液与乙酸乙酯混匀后在室温静置 10 min。将两相体系涡旋振荡后静置 20 min, 重新形成为两相体系。小心吸取水相, 600 nm 下测定吸光度(A_1)。计算方法见公式(1)^[19-20]。

$$\text{表面疏水性}/\% = (1 - \frac{A_1}{A_0}) \times 100 \quad (1)$$

1.3.6 模拟胃肠道耐受筛选

将胃蛋白酶(3 g/L)悬浮于 10 mL 无菌生理盐水溶液中(0.85% NaCl, *m:I*), 将 pH 调节至 2.5 制作模拟胃液。菌种于 37 °C 培养 36 h, 接种到模拟胃液中, 37 °C 下孵育 3 h^[19]。将胆盐(0.3%, *m:I*)和胰蛋白酶(1 mg/mL)溶解在 10 mL 无菌生理盐水中制备模拟肠液。将 pH 调节至 8.0。菌种于 37 °C 培养 36 h, 接种到模拟肠液中, 并在 37 °C 下孵育 4 h^[19]。将作用后的菌液稀释至适当浓度后, 涂布于 MRS 平板中, 37 °C 培养 24 h, 采用平板计数法对菌种进行计数, 以判断菌株对胃肠道的耐受能力。

1.3.7 细菌黏附肠道细胞 IEC-6 能力筛选

将菌株在 MRS 培养基中 37 °C 培养 36 h, 活化三代备用。将菌液 6000 r/min 离心 10 min, 除去上清液, 收集沉淀的菌体, 将菌体和 RPMI-1640 细胞培养基重新混合, 使其浓度达到 1×10^6 CFU/mL。将长成单层的 96 孔组织细胞培养板中加入 100 μ L 1×10^6 CFU/mL 菌液-RPMI 1640 混合液, 将细胞培养板在 5% CO₂、95% 空气的 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 4 h,

用 PBS 缓冲溶液清洗 3 次除去未黏附的益生菌。连续稀释后涂布于 MRS 琼脂培养基中计算活菌的数量^[21]。

1.3.8 细菌鉴定方法

使用细菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[22]。所采用的 PCR 程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 45 s, 退火温度 56 °C 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共循环 30 次; 72 °C 终端延伸 10 min, 4 °C 终止^[7]。配制 1% 琼脂糖凝胶, 电泳在 1×TAE 缓冲液中进行, 电压 100 V, 时间 60 min^[22]。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司检测。

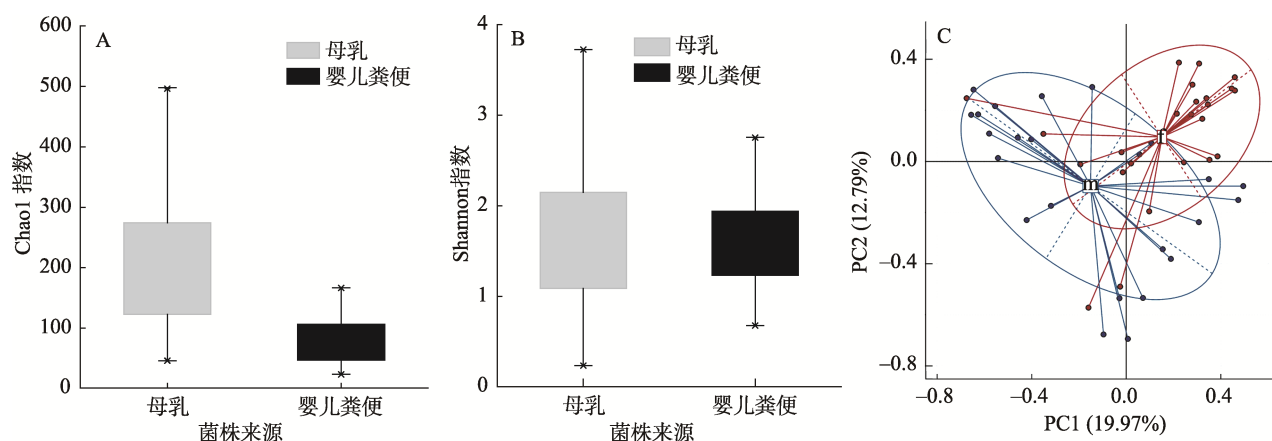
1.3.9 数据处理及统计分析

数据分析处理由 Excel 2019、SPSS 20 完成。图形绘制由 Origin 8.5 绘制完成。

2 结果与分析

2.1 母乳与婴儿粪便样本菌群多样性分析

对 24 对母乳及婴儿粪便样本进行多样性分析, 研究发现母乳样本中 Chao1 指数高于婴儿粪便样本(图 1A), 这表明母乳中的物种多样性较婴儿粪便样本更丰富。同时, 婴儿粪便样本的 Shannon 指数略低于母乳样本的 Shannon 指数(图 1B), 这表明婴儿粪便样本均一性低于母乳样本。MURPHY 等^[23]发现, 在婴儿出生后 1、3、6 及 12 周, 母乳样本的 Chao1 指数及 Shannon 指数均高于婴儿粪便样本。对 2、5、10 d, 1~4 月母乳及婴儿粪便 Shannon 指数进行分析, 发现在婴儿 1 个月前母乳 Shannon 指数高于婴儿粪便^[24]。综上, 对于样本物种多样性及均一性的研究, 母乳均高于婴儿粪便, 这与本研究结果一致。细菌群落的 β 多样性分析如图 1C 所示, PC1 为第一主坐标, 对总体菌群的贡献率为 19.97%; 纵坐标为第二主坐标, 其贡献率为 12.79%。母乳和粪便样本分为两组, 并且母乳和婴儿粪便之间的微生物群落存在一些差异。



注: A. 母乳及婴儿粪便 Chao1 指数分析; B. 母乳及婴儿粪便 Shannon 指数分析; C. β 多样性分析。

图 1 母乳及婴儿粪便 α 及 β 多样性分析($n=24$)

Fig.1 α and β diversity analysis of flora of breast milk and infant stools ($n=24$)

2.2 母乳与婴儿粪便样本物种组成分析

通过与数据库进行比对, 在门及科分类水平对样品物种组成进行分析。由图 2A 所示, 母乳及婴儿粪便主要包括 4 种菌门: 放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门。母乳中, 变形菌门>厚壁菌门>拟杆菌门>放线菌门。婴儿粪便中, 变形菌门>厚壁菌门>放线菌门>拟杆菌门。对于变形菌门, 婴儿粪便样本中的相对丰度显著低于母乳样本($P<0.05$)。但是对于放线菌门、拟杆菌门及厚壁菌门, 母乳中相对丰度低于婴儿粪便。由图 2B 所示, 母乳及婴儿粪便样本中, 主要包括 11 种菌科。母乳样本中主要菌科为肠杆菌科、莫拉氏菌科、葡萄球菌科和链球菌科。婴儿粪便样本中主要菌科为肠杆菌科和双歧杆菌科。母乳样本与婴儿粪便样本对比分析可得, 对于双歧杆菌科、梭菌科、肠球菌科、乳杆菌科及韦荣氏菌科, 母乳中菌群相对丰度极显著小于粪便样本中菌群相对丰度($P<0.01$); 而链球菌科、莫拉氏菌科及假单胞菌科, 母乳中菌群相对丰度极显著大于婴儿粪便中相对丰度($P<0.01$)。

有很多研究已经证实, 母乳及婴儿粪便样本中菌群主要为厚壁菌门及变形菌门^[23,25]。科水平上婴儿粪便以肠杆菌科及双歧杆菌科为主; 母乳中肠杆菌科相对丰度最高, 其次为莫拉氏菌科、链球菌科、葡萄球菌科及假单胞菌科^[15]。然而, 本研究发现婴儿粪便样本中双歧杆菌科的相对丰度低于前人报告研究中的结果^[15], 这可能是由于婴儿年龄的差异导致^[26]。研究表明, 在婴儿出生后第 1 年中, 双歧杆菌科的相对丰度随年龄增长而增加^[15]。在本研究中, 婴儿纳入范围为 1~30 d, 较之前研究中的婴儿纳入范围小, 这可能是差异出现的根本原因。

2.3 母乳与婴儿粪便样本物种组成趋势分析

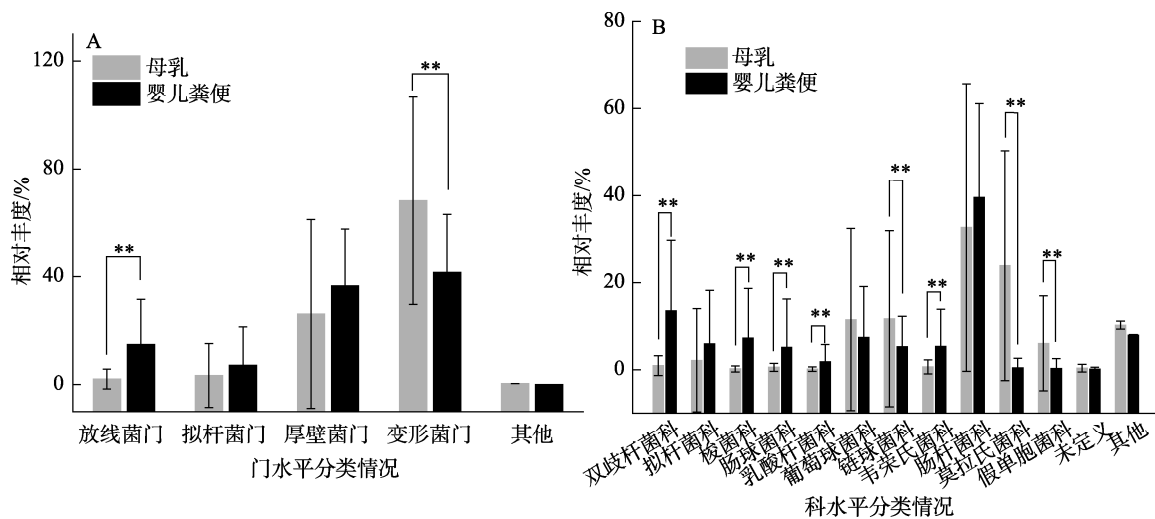
婴儿出生后, 母亲开始分泌乳汁, 以供给婴儿日常营

养需求。婴儿出生后 1~7 d 母亲分泌免疫活性强、营养价值高的略带黄色的乳汁称为初乳; 8~14 d 的乳汁称为过渡乳; 15 d 以后分泌的乳汁称为成熟乳^[27]。

不同阶段母乳菌群门水平相对丰度分析结果如图 3A 所示, 母乳中优势菌门为变形菌门。随着时间的变化, 变形菌门相对丰度呈现先减少后增加的趋势, 其中成熟乳中变形菌门相对丰度显著高于过渡乳中变形菌门相对丰度($P<0.05$)。通过科水平分析可知(图 3B), 拟杆菌科相对丰度随着时间变化而减少, 成熟乳中拟杆菌科相对丰度显著小于初乳中拟杆菌科相对丰度($P<0.05$)。葡萄球菌科相对丰度呈现先增加后减少的趋势, 其中过渡乳中葡萄球菌科相对丰度显著高于初乳中葡萄球菌科相对丰度($P<0.05$), 成熟乳葡萄球菌科相对丰度显著小于过渡乳中葡萄球菌科相对丰度($P<0.05$)。如图 3C 所示, 与母乳中优势菌群相同, 婴儿粪便中优势菌群也为变形菌门。随着时间的变化, 变形菌门相对丰度先增加后减少, 在过渡乳阶段变形菌门相对丰度达到最高。梭菌科相对丰度先递减再增加, 过渡乳显著低于初乳($P<0.05$)。葡萄球菌科相对丰度呈现递减的趋势, 过渡乳及成熟乳中葡萄球菌科相对丰度显著低于初乳中葡萄球菌科相对丰度($P<0.05$)(图 3D)。

2.4 菌群垂直传递分析

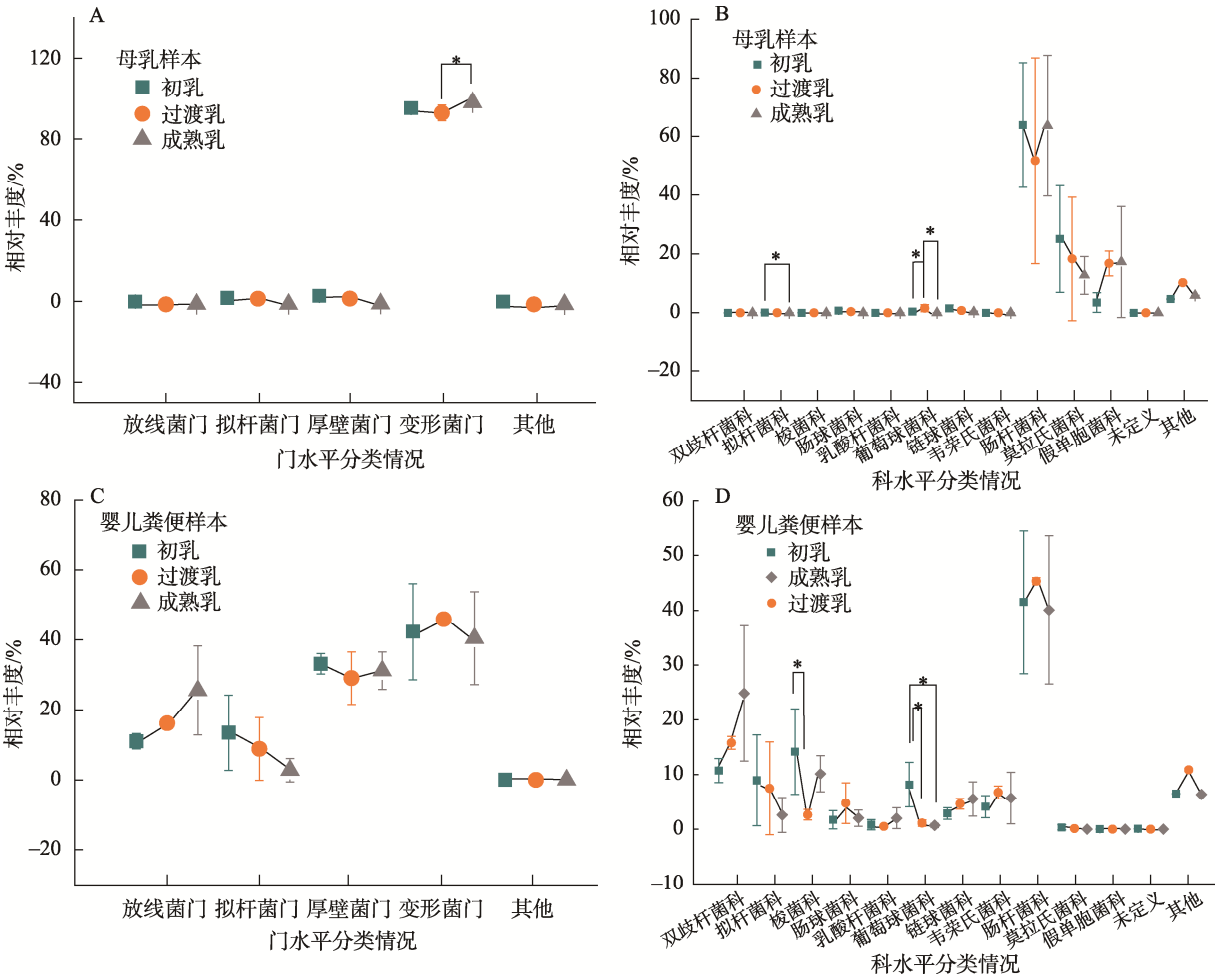
菌群垂直传递结果如图 4 所示, 在婴儿粪便样本中的微生物群落平均有 44.90%来自母乳。研究表明, 在婴儿出生后第 1 个月, 母乳中的菌群在婴儿肠道中出现的概率最大^[15]。新生儿出生 1 d 的贡献率约为 50%^[28]。1 岁婴儿肠道的母乳菌群贡献率约为 20%^[15]。正如 BACKHED 等^[18]研究发现, 贡献率随着辅食添加时间的增长而降低。饮食逐渐多样化是导致母乳菌群贡献率下降的关键因素。



注: **表示母乳菌群与婴儿粪便菌群具有极显著差异($P<0.01$); A. 门水平母乳及婴儿粪便菌群相对丰度分析; B. 科水平母乳及婴儿粪便菌群相对丰度分析。

图 2 门及科水平母乳及婴儿粪便菌群结构分析($n=24$)

Fig.2 Analysis of microbiota structure of breast milk and infant stools at phylum and family levels ($n=24$)



注: *表示母乳菌群及婴儿粪便菌群具有显著差异($P<0.05$); A. 母乳门水平相对丰度分析; B. 母乳科水平相对丰度分析; C. 婴儿粪便门水平相对丰度分析; D. 婴儿粪便科水平相对丰度分析。

图 3 门及科水平菌群随时间变化趋势($n=24$)
Fig.3 Changes of flora with time at the level of phylum and family ($n=24$)

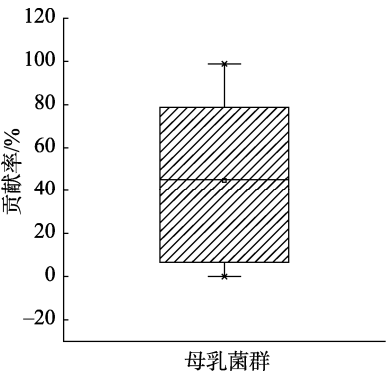


图 4 母乳菌群对婴儿肠道贡献率($n=24$)
Fig.4 Contribution rates of breast milk flora to infant intestine ($n=24$)

2.5 菌株表面疏水性筛选

细菌表面疏水性的强弱主要取决于细菌表面非极性

基团的多少,与表面蛋白、菌毛、脂磷壁酸及荚膜等结构有关,菌株表面结构不同,导致其表面疏水性的差异。不同种类细菌与有机相吸附的能力间接表示了细菌表面疏水性的强弱^[29]。对分离出的 123 株细菌进行表面疏水性研究,结果如图 5A 所示。63 株细菌具有良好的表面疏水性。其中包括母乳样本来源菌株 31 株,婴儿粪便样本来源菌株 32 株。母乳样本来源的 ML-227 菌株,具有最好的表面疏水性($64.69\%\pm 1.34\%$)。而来源于婴儿粪便菌株 FL-124 的表面疏水性最低($21.47\%\pm 6.60\%$)。

2.6 菌株模拟胃肠道耐受筛选

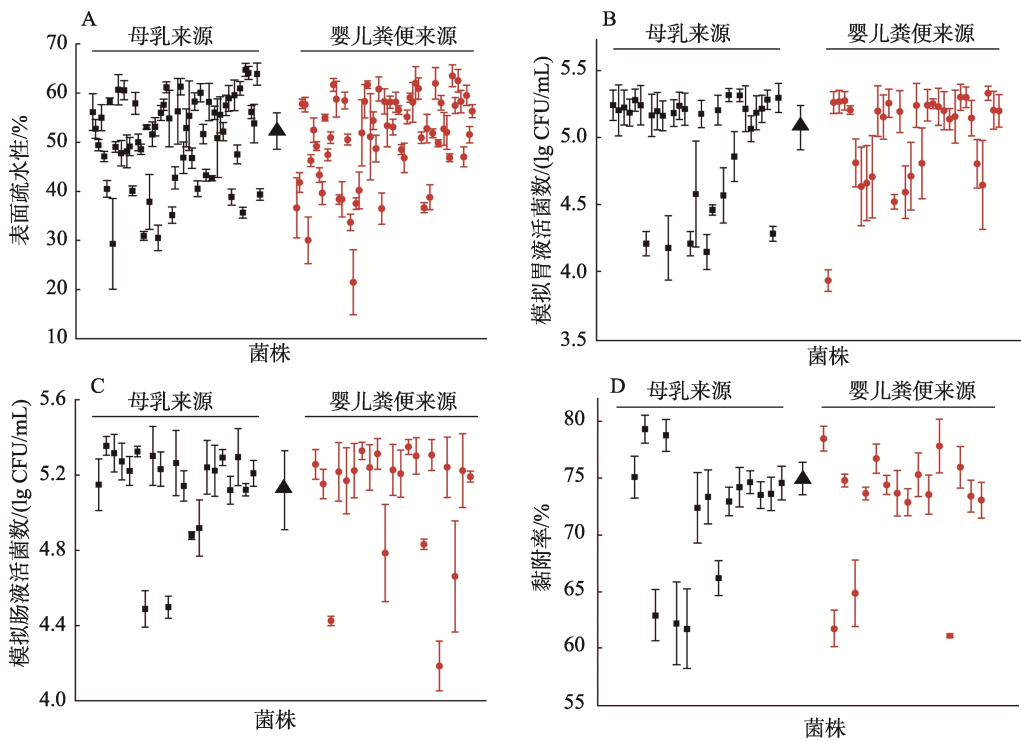
细菌进入肠道定植的过程中首先要经过胃,胃酸低 pH 的环境,对细菌的活性造成很大的影响。通过体外模拟胃液的方法,对具有良好表面疏水性的 63 株菌进行模拟人体胃液耐受的实验,以鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus*

rhamnosus GG, LGG)为阳性对照组进行各菌株胃液耐受实验, 结果见图 5B。结果显示, 42 株菌具有较好的胃液耐受性, 其中 21 株菌来源于母乳, 21 株菌来源于婴儿粪便。其中 FL-231 菌株具有最好的胃液耐受性(5.35 ± 0.05 lg CFU/mL), FL-10 对胃液的耐受最差(3.95 ± 0.08 lg CFU/mL)。通过模拟肠液实验对菌株进行进一步的筛选, 以 LGG 为阳性对照组, 共筛选出 31 株具有良好的肠液耐受功能的菌株, 其中 15 株来源于母乳, 16 株来源于婴儿粪便, 其中 ML-120 具有最好的肠液耐受性(5.35 ± 0.05 lg CFU/mL), 具体结果见图 5C。不同种类细菌对于模拟胃肠液的耐受性各不相同。当食物在肠道中消化吸收, 由于胆盐的影响, 食物中的细

菌活性也会降低, 因此益生菌的耐胆盐能力同样是其益生功能筛选的重要指标, 以确定益生菌是否耐受肠道环境。

2.7 菌株黏附肠道上皮细胞 IEC-6 能力筛选

细菌在肠道中发挥作用的前提是定植在肠道黏膜表面。这种定植依赖于细菌黏附细胞的能力, 对于细菌在肠道内发挥益生功能十分重要。通过体外模拟黏附实验, 最终筛选了 8 株具有较好细胞黏附性的菌株, 结果见图 5D。其中母乳来源 3 株, 婴儿粪便来源 5 株。FL-224 细胞黏附能力较差($61.10\%\pm0.22\%$), ML-2 具有最好的细胞黏附性($79.30\%\pm1.23\%$)。



注: ▲ 代表 LGG 菌株; A. 菌株的表面疏水性; B. 菌株模拟胃液耐受情况; C. 菌株模拟肠液耐受情况; D. 菌株对 IEC-6 细胞的黏附能力。

图 5 菌株体外性质研究(n=3)
Fig.5 Study on the properties of strains in vitro (n=3)

2.8 菌种鉴定

将上述筛选出来的菌株进行 16S rRNA 检测。共筛选出 8 株具有良好益生特性的菌株, 其中母乳来源 3 株, 均为粪肠球菌。婴儿粪便来源 5 株, 其中 2 株为粪肠球菌、2 株为假小链双歧杆菌及 1 株两歧双歧杆菌。结果见表 1。

3 结 论

本研究确定了母乳与婴儿粪便菌群的相关性。母乳中的主要菌科为肠杆菌科、莫拉氏菌科、葡萄球菌科和链球菌科; 而婴儿粪便中主要为肠杆菌科和双歧杆菌科。粪便样本中 44.90% 的微生物群落来自母乳。最后, 从 123 株菌

株中筛选出 8 株具有良好表面疏水性, 胃肠道耐受性及细胞黏附性的菌株, 通过 16S rRNA 分子生物学鉴定为 2 株假小链双歧杆菌、1 株两歧双歧杆菌、5 株粪肠球菌。这些菌株对于进一步研究其具体的益生作用至关重要, 为研发益生菌制剂提供参考依据。

表 1 细菌鉴定结果
Table 1 Bacterial identification results

菌株编号	来源	鉴定结果	
ML-1	母乳	<i>Enterococcus faecalis</i> strain	粪肠球菌
ML-2	母乳	<i>Enterococcus faecalis</i> strain	粪肠球菌
ML-7	母乳	<i>Enterococcus faecalis</i> strain	粪肠球菌

表 1(续)

菌株编号	来源	鉴定结果
FL-11	婴儿粪便	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 粪肠球菌
FL-136.1	婴儿粪便	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 粪肠球菌
FL-215	婴儿粪便	<i>Bifidobacterium Pseudocatenulatum</i> strain 假小链双歧杆菌
FL-216.9	婴儿粪便	<i>Bifidobacterium Pseudocatenulatum</i> strain 假小链双歧杆菌
FL-228.1	婴儿粪便	<i>Bifidobacterium bifidum</i> strain 两歧双歧杆菌

参考文献

[1] PRNNEN KMM, JENNI H, MELINA M, *et al.* Early-life formula feeding is associated with infant gut microbiota alterations and an increased antibiotic resistance load [J]. *Am J Clin Nutr*, 2022, 115(2): 407–421.

[2] O'BRIEN CE, MEIER AK, CERNIOGLO K, *et al.* Early probiotic supplementation with *b. Infantis* in breastfed infants leads to persistent colonization at 1 year [J]. *Pediatr Res*, 2022, 91: 627–636.

[3] CARMEN CM, SAMULI R, JUHANI A, *et al.* Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23129.

[4] LAURSEN MF, SAKANAKA M, VON BURG N, *et al.* *Bifidobacterium* species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(11): 1367–1382.

[5] MOOSSAVI S, SEPEHRI S, ROBERTSON B, *et al.* Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors [J]. *Cell Host Microb*, 2019, 25(2): 324–335.

[6] COLLADO MC, SELMA-ROYO M, CALATAYUD M, *et al.* Perinatal environment shapes microbiota colonization and infant growth: Impact on host response and intestinal function [J]. *Microbiome*, 2020, 8: 167.

[7] KUANG YS, LI SH, GUO Y, *et al.* Composition of gut microbiota in infants in china and global comparison [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36666.

[8] SMITS HH, ENGERING A, VANDER-KLEIJ D, *et al.* Selective probiotic bacteria induce il-10-producing regulatory t cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin [J]. *J Allergy Clin Immun*, 2005, 115(6): 1260–1267.

[9] MALDONADOLOB NJA, GILCAMPOS M, MALDONADO J, *et al.* Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* cect5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 95–96: 12–19.

[10] YAN F, POLK DB. Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea [J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2006, 9(6): 717.

[11] MYUNGHO K, CAROLINA G, HILL AA, *et al.* Critical role for the microbiota in cx3cr1⁺ intestinal mononuclear phagocyte regulation of intestinal t cell responses [J]. *Immunity*, 2018, 49(1): 151–163.

[12] NIU H, ZHOU X, ZHANG X, *et al.* Breast milk contains probiotics with

anti-infantile diarrhoea effects that may protect infants as they change to solid foods [J]. *Environ Microbiol*, 2021, 23(3): 1750–1764.

[13] 黄卫强. 中国四个地区人母乳中微生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.

HUANG WQ. Microbial diversity of human breast milk in four areas of China [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015.

[14] PRAGMAN AA, LYU T, BALLER JA, *et al.* The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 7.

[15] PANNARAJ PS, LI F, CERINI C, *et al.* Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome [J]. *Jama Pediatr*, 2017, 171(7): 647–654.

[16] 江晓, 陈晓蔚, 贾力敏, 等. 混合制剂中快速计数双歧杆菌鉴别培养基的研究[J]. *中国乳品工业*, 2004, (3): 22–24.

JIANG X, CHEN XW, JIA LM, *et al.* Study on identical medium for rapidly enumerate *bifidobacterium* in mixture [J]. *China Dairy Ind*, 2004, (3): 22–24.

[17] 孙雪, 陈树兴, 朱文学, 等. X-gal 在双歧杆菌分离与活菌计数方面的应用研究[J]. *现代食品科技*, 2005, (2): 64–65.

SUN X, CHEN SX, ZHU WX, *et al.* Application and study of X-gal in isolation and counting *Bifidobacterium* [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2005, (2): 64–65.

[18] BACKHED F, ROSWALL J, PENG Y, *et al.* Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(5): 690–703.

[19] XU X, LUO D, BAO Y, *et al.* Characterization of diversity and probiotic efficiency of the autochthonous lactic acid bacteria in the fermentation of selected raw fruit and vegetable juices [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2539–2539.

[20] 加勒哈斯别克·塞力克, 孙昕, 阿曼古丽·杰木斯, 等. 新疆传统发酵乳品中益生菌的益生特性 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(5): 502–508.

SAILIKE JLHSBK, SUN X, JIEMUSI A, *et al.* Probiotic characteristics of probiotics in Xinjiang traditional fermented dairy products [J]. *China J Microecol*, 2019, 31(5): 502–508.

[21] OH YJ, JUNG DS. Evaluation of probiotic properties of *lactobacillus* and *pediococcus* strains isolated from omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in korea [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 63(1): 437–444.

[22] MENG Z, ZHANG L, XIN L, *et al.* Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(4): 2887–2896.

[23] MURPHY K, CURLEY D, O'CALLAGHAN T, *et al.* The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40597.

[24] WILLIAMS JE, CARROTHERS JM, LACKEY KA, *et al.* Strong multivariate relations exist among milk, oral, and fecal microbiomes in

- mother-infant dyads during the first six months postpartum [J]. J Nutr, 2019, 149(6): 902–914.
- [25] LI P, NIU Q, WEI Q, *et al.* Microbial shifts in the porcine distal gut in response to diets supplemented with *Enterococcus faecalis* as alternatives to antibiotics [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41395–41395.
- [26] CASABURI G, DUAR RM, BROWN H, *et al.* Metagenomic insights of the infant microbiome community structure and function across multiple sites in the united states [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1472.
- [27] 毕烨, 洪新宇, 董彩霞, 等. 中国城乡乳母不同泌乳阶段乳汁中宏量营养素含量的研究[J]. 营养学报, 2021, 43(4): 322–327.
- BI Y, HONG XY, DONG CX, *et al.* Macronutrient concentrations in human milk at different lactation stages from urban and rural areas of China [J]. Acta Nutr Sin, 2021, 43(4): 322–327.
- [28] KORPELA K, COSTEA P, COELHO LP, *et al.* Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome [J]. Genome Res, 2018, 28(4): 561–568.
- [29] 黄娇丽, 黄丽. 益生乳酸菌黏附特性评价体系的研究进展[J]. 食品工

业, 2017, 38(7): 258–262.

HUANG JL, HUANG L. The research progress of the evaluation system based on the adhesion properties of probiotic lactic acid bacteria [J]. Food Ind, 2017, 38(7): 258–262.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



吕临征, 博士研究生, 主要研究方向为肠道菌群及益生功能研究。

E-mail: lyulinzheng@163.com



韩 雪, 博士, 教授, 主要研究方向为乳品科学与技术, 传统食品产业化, 乳酸菌发酵。

E-mail: xhan@hit.edu.cn