

双歧杆菌的数值分类及代表性菌株同源性的分析*

凌代文 周岩 袁秋

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 对不同来源的 55 株双歧杆菌进行了数值分类研究。这些菌包括 13 株参照菌株和 42 株新分离物。在这些菌株中 19 株来源于人体, 25 株来自动物源, 11 株分离自污水。有的菌株是从未曾报道过的动物来源分离到的。通过数值分析比较了 75 项性状(形态、生理生化和对抗生素敏感性等), 以不加权平均链锁聚类的方式进行族群归类。在 70% Sm 水平上划分成 5 个聚类群和 12 个亚群。对这些聚类群菌株间的关系进行了分析。在数值分类树状图谱的族群归类中, 人和动物来源的菌株基本上彼此分开, 而分离自污水的菌株穿插在人或动物来源的聚类群中。在数值分类的基础上对各聚类群中的一些菌株的 DNA 中 G + C mol% 进行了测定。依据 16S rRNA 可变区序列的分析, 以 PCR 方法合成的生物素标记探针, 对某些代表性菌株的 DNA 片段同源性进行了分析。同种的菌株间与不同种菌株间的同源性显示有差别。

关键词 双歧杆菌, 数值分类, DNA 同源性

分类号 Q939

1990 年 Tissier 首先报道了分离自母乳哺育婴儿粪便的双歧杆菌菌株。后陆续又有人发现这类菌, 它们来源于成人和多种动物的肠道、反刍动物的瘤胃、人齿及污水等处。由于不同研究者对它们的认识存有异议, 因此这类菌在分类历史上冠有不同的属名^[1]。直到《伯杰细菌鉴定手册》第八版(1974)才将双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)作为认可的属名列入放线菌目的放线菌科内^[2]。在《伯杰氏系统细菌学手册》第二卷(1986)列入 24 个种^[3], 其后又有些新种的报道^[4~8]。对这些不同来源的种和种间的关系仍有待研究。我们分离和收集到一些不同来源的双歧杆菌, 对它们进行了一系列的表型特征的试验, 然后作了数值分类, 划归族群, 再选择其中某些代表性菌株进行 DNA 的 G + C 含量测定和 DNA 片段同源性的研究, 以探索双歧杆菌属种和种间的关系。本文是此项研究工作的初步报道。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株来源于婴儿、成人和多种动物的肠道粪便以及污水发酵液。动物来源的菌株是从实验动物和动物园的某些观赏动物粪便中分离的。污水发酵液的菌株分离自实验的厌氧消化器中的发酵豆腐废水。个别菌株分离自食用菌液(或剂)。由日本理化研究所微生物系统保存室和意大利 Bologna 大学微生物研究所提供的已定名的 13 株双歧杆菌也参与

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1997-02-21

实验。有 42 株菌系本实验室分离并鉴定。实验菌株及其来源见表 1, 其中 15~20 号菌株来源于动物, 这些动物源是从未报道过的。

表1 实验菌株

Table I Strains used in this study

菌株编号	原始标记	来源	菌株编号	原始标记	来源
1	M1	大鼠粪便	29	B12	豆腐废液
2	M2(2)	大鼠粪便	30	B38	豆腐废液
3	M3	大鼠粪便	31	B45	豆腐废液
4	Mu1	小鼠粪便	32	B46	豆腐废液
5	Mu2	小鼠粪便	33	B47	豆制品废液
6	Mu3	小鼠粪便	34	2h4	豆制品废液
7	Mu4	小鼠粪便	35	2h6	豆制品废液
8	Mu5	小鼠粪便	36	2h8(1)	豆制品废液
9	Mu6	小鼠粪便	37	2h8(2)	豆制品废液
10	Mu7	小鼠粪便	38	S.5822	污水
11	Mu8	小鼠粪便	39	6w	成人粪便
12	Vt-2	食用菌液(人肠道)	40	H12	成人粪便
13	NC	食用菌液(人肠道)	41	NC-13	成人粪便
14	HS-B	食用菌液(人肠道)	42	B14	成人粪便
15	I-1	野驴粪便	43	TJ	人粪便
16	III-1	麋鹿粪便	44	JCM.1210	婴儿肠道
17	III-3	麋鹿粪便	45	JCM.1217	成人肠道
18	III-6	小鹿粪便	46	JCM.1195	人牙髓
19	III-7	小鹿粪便	47	JCM.1218	兔子粪便
20	III-9	日本梅花鹿粪便	48	JCM.5820	瘤胃
21	IV-3	白长角羚粪便	49	JCM.5821	污水
22	D1	兔子粪便	50	JCM.1222	婴儿肠道
23	Fb4	成人粪便	51	JCM.1257	成人肠道
24	Fb6	成人粪便	52	Ru687	瘤胃
25	Fb7	成人粪便	53	Ru915B	瘤胃
26	Fb8	成人粪便	54	JCM.1205	猪粪便
27	Fb9	成人粪便	55	JCM.1269	小猪粪便
28	Fb10	成人粪便			

1.2 方法

从不同来源分离并鉴别双歧杆菌属鉴别的菌株是依据 Scardovi^[3]对该属综述的性状, 先观察其特有的细胞形态, 测定其生理生化特性和代谢产物, 再进行其他性状的试验。

1.2.1 培养基的制备和菌株的分离纯化:采用 Hungate 氏厌氧技术^[9]。日常维持菌株生长培养基是参考 TPY^[3]和 PYG^[10]培养基的组分配制而成, 其主要成分是大豆蛋白胨、胰胨、酵母浸物(粉剂)和葡萄糖。

1.2.2 生理生化特性的测定:主要参考 Holdeman 等^[10]的《厌氧菌实验室手册》, 其次是 Sutter 等^[11]的《厌氧细菌学手册》中的方法。

1.2.3 抗生素敏感性试验:以最低抑菌浓度(MIC)反映实验菌株对抗生素的敏感性。抗生素包括多粘菌素、卡那霉素、链霉素、新霉素、万古霉素、四环素、氟霉素、红霉素、氨卞青霉素和庆大霉素。参照《抗菌素临床应用手册》^[12]和美国临床实验室标准委员会推荐使用的药敏测定方法,在适宜的培养液中加入不同浓度的抗生素,接种后适温培养和检测^[13]。

1.2.4 DNA的G+C含量测定:对DNA的提取是按Marmur略加改进的方法,测定其中的G+C mol%是采用热变性温度法^[14]。

1.2.5 DNA/DNA(片段)杂交和同源性分析:根据Barry等^[15]对16S rRNA的可变区序列分析,我们试用了由本研究所DNA合成仪合成的两个引物RI和RII,其序列如下:

RI: 5'-AATTGAAGAGTTTGATCATG-3' RII: 5'-ACATTACTCACCCGTCCGGC-3'

将RI和RII作为引物进行PCR扩增,并以生物素作为标记合成DNA探针(100bp)。对数值分类聚类群中某些代表性菌株进行DNA/DNA片段的杂交。采用磷酸酶显色法检测以生物素作标记的探针杂交结果^[16]。

1.2.6 数据的编码和计算机分析:实验的性状选取“两性性状”,即结果为“阳性”或“阴性”。对那些没有数值分类价值的性状不列入数据表中。对双歧杆菌细胞形态多样性的判断及实验的统计处理和抗生素敏感性范围在等级的划分时,都尽可能避免人为的因素。按以上原则对试验菌株比较了75项性状,依数值分类数据编码的要求进行整理^[17]。数据由本研究所数值MINTS数据分类系统处理,以不加权平均链锁聚类方式进行簇群归类,并对所形成的树状图谱进行分析。

2 结果和讨论

2.1 双歧杆菌的数值分类

2.1.1 数值分类的树状图谱:对不同来源的双歧杆菌通过数值分类形成的树状图谱见图1。试验菌株DNA的G+C mol%测定结果和参照菌株的G+C含量^[18]以及菌株的鉴定名称见图1右侧。

2.1.2 数值分类树状图谱的聚类群分析:从数值分类的树状图谱来看,可将试验的双歧杆菌的菌株在70% Sm水平上划分为5个聚类群和12个亚群。对各聚类群分析如下:

聚类群A:包括10株菌,它们在83% Sm水平上聚类。此聚类群尚可分为A-1和A-2亚群,它们由来源于大鼠和小鼠而定名同为大双歧杆菌(*B. magnum*)的菌株组成。A-2亚群中包含大双歧杆菌的参照菌株47。这些菌株的归类与树状谱的聚类群是一致的。

聚类群B:由17个菌株组成。从树状图谱的聚类群又可再分成4个亚群。B-1亚群是由定名为假长双歧杆菌(*B. pseudolongum*)的菌株17、24、25和这个种的参照菌株54(JCM.1205)以及定名为球双歧杆菌(*B. globosum*)的菌株26组成,它们的Sm值为88%。此外,还有大双歧杆菌的菌株与这两个种聚类。这三个种的密切关系与Gavini等^[19]和Bahaka等^[20]最近先后进行双歧杆菌数值分类的结果相类似。Lauer等^[21]采用DNA/DNA杂交检验双歧杆菌种间同源性,结果也说明*B. pseudolongum*与*B. globosum*的同源性很高,几乎像同种的两个菌株。B-2亚群中尚有长双歧杆菌的参照菌株45(JCM.1217)。它与B-1亚群中的*B. pseudolongum*和*B. globosum*的关系与Bahaka等^[20]报道的聚类群II类似。

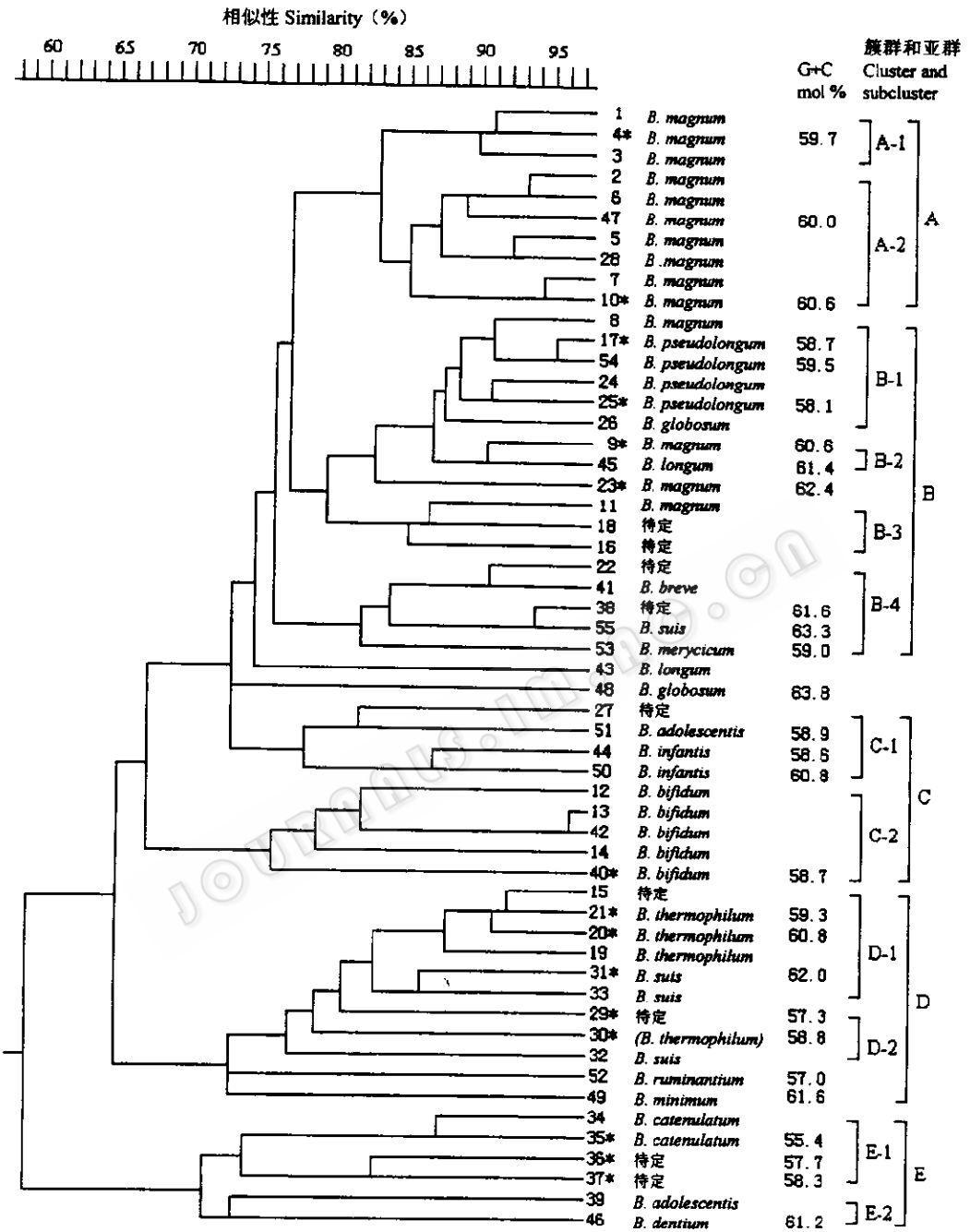


图1 不同来源的双歧杆菌数值分类树状谱

Fig.1 Dendrogram of numerical analysis based on unweighted pair clustered average linkage

带*号菌株的G+C mol%由本实验室测定。

The G+C mol% of the strains with "*" is gained in our laboratory.

B 群的B-1~B-3亚群中有大双杆菌的菌株,它们未归入聚类群 A。这可能是由于数

值分类中利用了抗生素敏感性的性状,而大双歧杆菌对抗生素的敏感性范围较其他种宽所致^[13]。B-4亚群中有猪双歧杆菌(*B. suis*)的参照菌株 55 号,它未与聚类群 D 中定名为 *B. suis* 聚类,这是由于菌株 55 未参与抗生素敏感性试验,在数据编码上存有差异相关。

聚类群 C: 本群又分为 C-1 和 C-2 亚群。C-1 亚群中定名除 *B. adolescentis* 的菌株 51 因未参与抗生素敏感性试验,它在聚类群中所处的位置存有疑点外,其他 *B. infantis* 和 *B. bifidum* 菌株的聚类都合乎情理。

聚类群 D: D 群又分为 D-1 和 D-2 亚群。后一亚群为一松散群,暂以亚群而论。D 群主要由定名为 *B. thermophilum* 和 *B. suis* 的一些菌株组成。此结果与 Gavini 等^[19]报道中这两个种同在其 II 聚类群相似。D-2 亚群中尚有菌株 29 和 30(原编号 B12 和 B38),有关这两菌株的特征我们曾已报道^[22]。它们与假长双歧杆菌和嗜热双歧杆菌有相近处,但又有差异。暂将菌株归入嗜热双歧杆菌,待以后检验。

聚类群 D 与 E 之间有菌株 52 和 49,它们是反刍双歧杆菌(*B. ruminantium*)和最小双歧杆菌(*B. minimum*)的参照菌株。Biavati 等^[7]首次命名 *B. ruminantium* 的菌株即是菌株 52(原 Ru687),在其报道中已表明这个种与双歧杆菌属其他种的同源性都不高。Gavini 等^[17]的数值分类中 *B. minimum* 也未归入任何簇群。Lauer 等^[21]的工作也说明 *B. minimum* 不仅在表型上与其他种差异大,而且在遗传上与其他种关系也小。在我们数值分析的树状图谱中这两个种与其他种的疏远关系也显而易见。

聚类群 E: 这一群又可分为 E-1 和 E-2 亚群,它们分别由定名为 *B. catenulatum*、*B. adolescentis* 和 *B. dentium* 的菌株及尚待定名的菌株组成。这三个已定名的种在 E 群中聚类关系与 Gavini 等^[19]和 Bahaka 等^[20]报道的极为相似。

从上数值分类聚类群组成的菌株就其来源而言,聚类群 A 由动物来源的菌株组成; B 群以动物来源菌株为主,其中 B-4 亚群的菌株来自动物和污水源; 聚类群 C 的菌株来源于人体; 聚类群 D 的 D-1 和 D-2 亚群由动物和污水来源的菌株搀和在一起聚类; 聚类群 E 的两个亚群分别由来源于污水和人体的菌株组成。由上可见,人与动物来源的菌株在数值分类的聚类群中基本上彼此分开,而污水来源的菌株又搀杂在人和动物来源的聚类群中。此结果与 Gavini 等^[19]的报道类同。目前报道的双歧杆菌属的已知种中,其来源各有差异。其中是否暗示着这些种同源性的差异和亲缘关系的疏密? 尚待进一步研究。

2.2 DNA / DNA(片段)同源性的检测

在数值分类的聚类群中选择了其中有代表性的 8 个菌株进行了 DNA / DNA(片段)杂交试验,以检测其同源性。结果表 2 表明,试验菌株 16S rRNA 可变区的 DNA / DNA 杂交结果,其同源性都高于 60%。这可能与探针片段较短有关,而且与试验菌株 DNA 的 G + C 含量相差范围小也相关。但从表 2 仍可看出供试的双歧杆菌中种间和种内的同源性仍存有差异。种间同源性差异的大小又与在数值分类树状图谱中所处的聚类群有关。例如菌株 47 是大双歧杆菌 *B. magnum* 的参照菌株,它与聚类群 E 的 *B. catenulatum* 菌株 35, 聚类群 D 的 *B. thermophilum* 菌株 20, 聚类群 B 的 *B. longum* 菌株 45, 它们的同源性分别为 65.5%, 77.4% 和 75.6%, 86.6% 和 84.5%。该菌株与同种菌株 9 的同源性则高达 92.5% 和 89.4%。将两菌株划归聚类群 A 和 B 的原因如前述,经 DNA / DNA 杂交检测也证实它们是同种的不同菌株。

表2 DNA/DNA(片段)杂交

Table 2 DNA/DNA (segment) hybridization

菌株号 No. of stram	<i>B. magnum</i> 9	<i>B. thermo- philum</i> 20	<i>B. pseudo- longum</i> 25	?	<i>B. catenu- latum</i> 35	<i>B. magnum</i> 47	<i>B. meryci- cum</i> 53	<i>B. longum</i> 45
9	100	77.4	73.9	61.2	65.5	92.5	89.4	86.6
20	77.5	100	79.8	79.1	76.1	75.6	77.5	79.1
25	77.5	83.6	100	86.7	76.1	75.6	77.5	79.1
30	63.2	77.4	85.3	100	76.1	65.5	77.5	79.1
35	63.2	70.7	79.8	70.7	100	65.5	89.4	79.1
47	89.4	77.4	73.9	61.2	65.5	100	77.5	86.6
53	77.5	83.6	73.9	70.7	84.5	75.6	100	79.1
45	77.5	77.5	79.8	70.7	76.1	84.5	77.5	100

对菌株 30(原 B38)经上述的杂交试验,可表明它与 *B. pseudolongum* 和 *B. thermophilum* 关系相近,但仍有差异。说明 DNA / DNA(片段)同源性试验也可用于对疑难菌株进行检测,而且这方面工作仍待继续。

应用 16S rRNA 可变区的片段 DNA 杂交方法研究双歧杆菌属种和种间同源性,经我们初步探索虽从整体而言同源性偏高,但所获结果仍较满意。如将此法扩大用于与双歧杆菌异源性较大的相关属分类的研究,估计同源性会下降。这样,同一方法既可用于属内,又可应用于属间亲缘关系的探讨也是可取的。但必竟 DNA / DNA 杂交试验目前尚不能用于分类鉴定的常规工作,我们的实验结果说明, DNA / DNA 杂交在分类上的应用也须建立在对试验菌株表型性状了解的基础上。数值分类作为一种方法或手段,有助于对表型相似的菌株进行簇群归类,从而选择其中代表性菌株再作深入的研究。

致谢 气相色谱测定承苏京军同志的协助,分子杂交试验和数值分析数据处理分别得到邱并生和赵玉峰先生的帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Poupard J A, Husain I, Norris R F. *Bacteriol Rev*, 1973, 37(2):148~158.
- [2] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974. 669~676.
- [3] Scardovi V. Genus *Bifidobacterium*. In: Sneath P H A *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 1418~1434.
- [4] Watabe J, Benno Y, Mitsuoka T. *Int J Syst Bacteriol*, 1983, 33:127~132.
- [5] Lauer E. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, 40:100~102.
- [6] Biavati B, Mattarelli P, Crociani F. *Syst Appl Microbiol*, 1991, 14:389~392.
- [7] Biavati B, Mattarelli P. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41(1):163~168.
- [8] Crociani F, Biavati B, Alessandrini A *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(2):564~571.
- [9] Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J R *et al.* ed *Methods in Microbiology* Vol 3B. London & New York: Academic Press, 1969. 117~132.
- [10] Holdeman L V, Cato E P, Moore W E C. *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute & State University, 1977. 27~75.

- [11] Sutter V L, Citron D M, Finegold S M. *Wadsworth Anaerobic Bacterology Manual*. London: Mosby Co, 1980. 109~111.
- [12] 戴自英编. 抗菌素临床应用手册. 北京:人民出版社, 1986. 6~22.
- [13] 凌代文, 周岩. 微生物学通报, 1996, 23(1): 27~33.
- [14] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, 3: 208~218.
- [15] Barry T, Powell R, Gannon F. *Bio / Technol*, 1990, 8: 233~236.
- [16] Denman R B, Miller D L. *Biotech*, 1989, 7(2): 138~141.
- [17] Sneath P H A, Sokal R R. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman W H, 1973.
- [18] Japan Collection of Microorganisms. *JCM Catalogue of Strains*. 5th. ed. Tokyo: Toppan Co Ltd, 1992. 27~31.
- [19] Gavini F, Pourcher A M, Neut C *et al*. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 548~557.
- [20] Bahaka D, Neut C, Khattabi A *et al*. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 565~573.
- [21] Lauer E, Kandler O. *Syst Appl Microbiol*, 1983, 4: 42~64.
- [22] 凌代文, 刘聿太, 乐华爱等. 微生物学报, 1992, 32(2): 79~84.

NUMERICAL TAXONOMY OF BIFIDOBACTERIA AND HOMOLOGY ANALYSIS OF SOME REPRESENTATIVE STRAINS

Ling Daiwen Zhou Yan Yuan Qiu

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract Fifty five strains of bifidobacteria belonging to *Bifidobacterium* from various sources were studied by using numerical taxonomic techniques. These organisms included 13 reference strains and 42 newly isolated strains (19 strains of human sources, 25 strains of animal sources and 11 strains obtained from sewage). Several strains isolated from the animals weren't isolated before. Overall similarities of the strains for 75 characters contained morphological, physiological and biochemical characteristics and antibacterial susceptibility were determined. Dendrogram of numerical analysis based on unweighted pair cluster average linkage were achieved. Five clusters were defined at 70% Sm level. The relationships of these strains among five clusters were analysed. The strains of human sources were basically separated from the animal strains, and the sewage strains were distributed between the animal clusters and the human clusters. On the basis of the numerical analysis, the G + C content of DNA of some representative strains among these clusters were measured. Biotin-labeled DNA segments, complementary to variable regions of 16S rRNA, were amplified using PCR as probes. In the dot-blot hybridization the relationships of DNA segments among some strains were discussed. The test results showed that the homologies among the strains in same species and various species were different. The studies are valuable for further research in the relationships of some species among bifidobacteria of various sources.

Key words Bifidobacteria, Numerical taxonomy, Homology