



母婴群体乳杆菌组成及优势种副干酪乳酪杆菌的遗传差异性

高慧娟^{1,2,3}, 袁丽霞³, 张雪玲³, 倪永清^{3*}

- 1 河西学院 生命科学与工程学院, 甘肃 张掖 734000
- 2 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000
- 3 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832003

高慧娟, 袁丽霞, 张雪玲, 倪永清. 母婴群体乳杆菌组成及优势种副干酪乳酪杆菌的遗传差异性[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3295-3313.

GAO Huijuan, YUAN Lixia, ZHANG Xueling, NI Yongqing. Community composition of *Lactobacillus* spp. and genetic differences of the dominant species *Lacticaseibacillus paracasei* in mother-infant pairs[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3295-3313.

摘要: 肠道中的有益细菌影响人体健康, 一般认为早期是通过母乳喂养构建了婴儿肠道菌群。目前对不同人群的母婴群体间有益细菌组成差异及是否具有族群特异性证据很少。【目的】探究不同民族母婴群体间乳杆菌的组成及占优势种——副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)的垂直传递和遗传差异, 为开发个性化的益生菌株提供理论基础。【方法】从我国 3 个不通婚的民族共 39 对健康母婴对分离乳杆菌, 基于基因外重复回文序列 PCR 分型技术(repetitive extragenic palindromic PCR, rep-PCR)结合功能基因(*groEL* 基因)序列鉴定菌株, 对最常见种 *L. paracasei* 的 83 株菌采用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)进行种群遗传差异分析。【结果】三个民族母婴对乳杆菌种类组成和数量存在差异, 共分离原乳杆菌属的菌株 945 株, 根据最新修订的分类学隶属于 4 属 1 种。汉族母婴以黏膜黏液乳杆菌(*Lacticaseibacillus rhamnosus*, 20.07%)、*L. paracasei* (16.54%)和奶酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus casei*, 11.90%)为优势种, 和田维吾尔族母婴以 *L. casei* (13.55%)、*L. paracasei* (12.69%)和唾液宿主关联乳杆菌(*Ligilactobacillus salivarius*,

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

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

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

ORCID: GAO Huijuan (0009-0005-7085-5527); NI Yongqing (0000-0003-4876-589X)

Received: 2024-02-23; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-06-14

11.47%)为优势种,海南黎族母婴以口腔黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus oris*, 24.55%)、*L. paracasei* (15.85%)和加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*, 10.87%)为优势种。83株 *L. paracasei* 划分为11个 rep-PCR 群,基于 MLST 等位基因谱也分为11群、31个序列型(sequence type, STs),不同民族菌株的 ST 存在特异性,同源重组事件很少;来自同一对母子的 *L. paracasei* 分离株有相同的 STs,同一种族母婴群体的 *L. paracasei* 遗传相似性更高。【结论】不同民族母婴群体乳杆菌菌群组成存在明显差异,来源相同的 *L. paracasei* 菌株遗传相似性更高,支持菌株水平上的垂直传递和种族间的特异性。

关键词: 副干酪乳酪杆菌; 多位点序列分型; 遗传多样性; 指纹图谱

Community composition of *Lactobacillus* spp. and genetic differences of the dominant species *Lacticaseibacillus paracasei* in mother-infant pairs

GAO Huijuan^{1,2,3}, YUAN Lixia³, ZHANG Xueling³, NI Yongqing^{3*}

1 College of Life Sciences and Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China

2 Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye 734000, Gansu, China

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

Abstract: Beneficial bacteria in the gut affect human health, and it is generally believed that the assemblage of healthy gut flora is achieved through vertical transmission of by breastfeeding in early infancy. There is limited evidence for the difference in the composition of beneficial bacteria across different mother-infant cohorts and the presence of population-specific microbial taxa **[Objective]** To investigate *Lactobacillus* spp. and the vertical transmission and genetic differences of the dominant species *Lacticaseibacillus paracasei* among mother-infant cohorts of different ethnic groups, providing a theoretical basis for developing personalized probiotic regimens. **[Methods]** *Lactobacillus* strains were isolated from 39 mother-infant pairs of three ethnic groups without mixed marriage in China and identified by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) and *groEL* sequences. The genetic differences of 83 strains of *L. paracasei*, a representative species, were analyzed by multilocus sequence typing (MLST). **[Results]** The species and abundance of *Lactobacillus* varied among the mother-infant pairs of different ethnic groups. A total of 945 *Lactobacillus* strains were isolated, belonging to 15 species of 4 genera. *L. rhamnosus* (20.07%), *L. paracasei* (16.54%), and *L. casei* (11.90%) were dominant species in the Han ethnic group, while *L. casei* (13.55%), *L. paracasei* (12.69%), and *Ligilactobacillus salivarius* (11.47%) were dominant bacteria in Uighur ethnic group in Hotan. The dominant species in the Li ethnic group in Hainan were *Limosilactobacillus oris* (24.55%), *L. paracasei* (15.85%), and *Lactobacillus*

gasseri (10.87%). The 83 strains of *L. paracasei* were classified into 11 phylogenetic groups by rep-PCR and 31 sequence types (STs) by MLST, demonstrating ethnic specificity. *L. paracasei* isolates from the same mother-infant pair had the same STs, and isolates from the mother-infant pairs of the same ethnic group had higher genetic similarity. **[Conclusion]** *Lactobacillus* species varied in the mother-infant pairs of different ethnic groups, and *L. paracasei* strains from the same origin displayed higher genetic similarity, which supported vertical transmission at strain level and ethnic specificity.

Keywords: *Lacticaseibacillus paracasei*; multilocus sequence typing; genetic diversity; fingerprint

人体的肠道中分布着大量的共栖细菌,通过影响宿主的生理、免疫成熟^[1]、神经发育过程^[2],进而影响人类的健康^[3]。婴儿早期是肠道菌群建立的关键阶段,尤其是一些关键种群的定殖对人体终生的健康至关重要^[4]。目前认为婴儿肠道中最关键的菌群主要来自母亲。婴儿出生后,产道暴露、母乳喂养是母亲共栖细菌传递到婴儿肠道的主要途径^[5],通过母乳喂养构建了婴儿健全的肠道菌群^[6]。文献报道,婴儿早期阶段,肠道中最早成功的定殖者是双歧杆菌^[7],但是研究发现乳杆菌也是母乳中常见的共栖细菌^[8],作为人类最早认识的益生菌,母乳中的乳杆菌应该受到更广泛的研究。

研究发现,母亲和婴儿亲密关系是通过母亲肠道-母乳-婴儿肠道 3 个生态位之间共栖微生物的传递来维持的^[9-11]。文献报道,母乳中的双歧杆菌,尤其是长双歧杆菌、短双歧杆菌、两歧双歧杆菌被证明是通过母乳途径垂直传递到婴儿肠道^[12-15]。然而,肠道中以乳杆菌、拟杆菌、嗜黏蛋白-阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK)为代表的更多的共栖菌是否遵循母乳途径的垂直传递,目前文献报道很少。

乳杆菌是人类肠道共栖菌的典型代表,对人体同样发挥生理、免疫调控、延缓衰老等各种益生功能。来自各种植物基食品中的原生乳杆菌菌株被广泛开发应用于发酵食品,生产功能性产

品。事实上,各种乳杆菌有不同的生活史,根据生态位分布的宽度可区分为自由生活型、游牧生活型和宿主关联型^[16]。在实践中,成人由于共享各种发酵食品、植物基食品,使得食品中的自由生活型、游牧生活型乳杆菌,例如植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、*L. rhamnosus*、*L. casei*等,在人群中扩散,进而在肠道定殖,为人体宿主提供益处。因此成人肠道中的乳杆菌种群的来源可能包括先天母乳的垂直传递和后天食品共享的横向传递。然而在婴幼儿阶段,单一的母乳喂养或者不含活菌饭食的混合喂养条件下,婴儿肠道中的乳杆菌只有母乳来源途径^[17-18]。目前我们对婴儿阶段乳杆菌的垂直传递了解很少。

本研究中,从新疆和田维吾尔族、海南昌江黎族和甘肃武威的汉族共 39 对健康母婴中分离乳杆菌,通过热激蛋白 *groEL* 功能基因更有效地鉴定乳杆菌^[19-20],比较不同民族母婴对队列间乳杆菌种群组成的差异,揭示母婴肠道内的乳杆菌种群发生和传递是否严格遵循垂直传播。此外,考虑到共栖细菌与宿主之间存在紧密的协同进化关系,以及细菌对宿主饮食来源碳水化合物代谢的依赖性形成的适应性,可能造成乳杆菌种群的人群特异性,采用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术,研究了分离株中优势种群副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)

的遗传差异,以期提供乳杆菌从母亲到婴儿垂直传递的证据,从母婴共享的角度,为开发针对局地个性化人群开发功能性食品、微生态益生菌菌株提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

在中国新疆和田地区、海南昌江黎族自治县和甘肃武威市共招募了 39 对母婴,所有参加者均身体健康,粪便采集前近一个月内无胃肠道疾病,母亲在分娩前 6 个月未服用抗生素或影响肠道微生物的药物,无益生菌摄入,母婴采集样本信息见表 1。婴儿主要喂养方式为母乳、母乳和奶粉混喂的方式;每个研究对象收集新鲜的母婴粪便约 10–15 g,粪便自采集后立即放入已灭菌的取样管。母乳采样时用蘸有无菌水的无菌棉签清洁乳头和乳晕,弃去前几滴乳液,

然后利用无菌手套手动收集 3–5 mL 母乳,将收集到的母乳装入无菌采样管中。采集样品贴标签后置于车载冰箱–20 °C 冷藏,尽快运回实验室进行菌种分离。

1.1.2 培养基

改良 MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 10.0, 酵母浸粉 5.0, 柠檬酸二铵 2.0, 乙酸钠 5.0, 葡萄糖 20.0, K_2HPO_4 2.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, 吐温-80 1 mL/L。

含万古霉素和溴甲酚绿的乳酸杆菌厌氧培养基 (*Lactobacillus anaerobic* MRS with vancomycin and bromocresol green, LAMVAB) (g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 8.0, 酵母浸粉 4.0, 柠檬酸二铵 2.0, 乙酸钠 5.0, 葡萄糖 20.0, K_2HPO_4 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05, 溴甲酚绿 0.05, 盐酸万古霉素 20, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, 吐温-80 1 mL/L。

表 1 母亲和婴儿临床特征统计

Table 1 The characteristics and demographic data of the mothers and infants

Characteristics	Characteristic value		
	Uighur ethnic group	Li ethnic group	Han ethnic group
Sex of infants			
Male	8	7	3
Female	9	7	5
Weight of infants (kg)	7.27±0.07*	7.29±0.57*	7.41±0.03
Height of infants (cm)	66±3	71±2	69±2
Mothers' BMI			
Normal (18.5–23.9)	8	10	3
Mild obesity (24.0–26.9)	1	3	4
Obesity (27.0–29.9)	7	1	1
Unknown	1	0	0
Infants' age (months)	6–12	6–14	1–4
Mothers' age			
Fetus number	1 fetus/2 fetus	1 fetus/2 fetus	1 fetus/2 fetus
Stage of lactation	Mature milk	Mature milk	Mature milk

*表示和汉族婴儿体重对比,差异性显著($P<0.05$)

* indicates significant statistically difference compared with Han infants' weight ($P<0.05$).

1.2 主要试剂和仪器

2× *Taq* Plus Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 万古霉素、L-半胱氨酸盐酸盐、溴甲酚绿, 天津鹏程生物科技有限公司。

厌氧培养箱, DS 公司; 垂直流超净工作台, 上海智城分析仪器制造有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪, Techne 公司; 水平电泳仪、Gel DOC XR 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 细胞破碎仪, 天津欧诺仪器股份有限公司; 酶标仪, Biotek 公司。

1.3 乳杆菌的分离鉴定

取 1 g 解冻粪使用无菌生理盐水稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} , 解冻母乳原液稀释至 10^{-1} , 分别取 100 μ L 涂布于含有万古霉素的 MRS、LAMVAB 琼脂培养基上, 置于 37 °C 厌氧箱中培养 48 h, 每个样品 3 个重复。使用相差显微镜对单菌落进行镜检, 将长杆状、链杆状和短杆状菌株转接划线培养 3 次, 挑选纯化后的单菌落于含有万古霉素的 MRS、LAMVAB 液体培养基中厌氧培养, 通过革兰氏染色和接触酶实验初步筛选疑似乳杆菌^[21]。

菌株基因 DNA 的提取采用 CTAB 方法。rep-PCR 指纹分型去重筛选, 引物使用 BoxAIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') 和 (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3')^[22]。PCR 反应体系(25 μ L): 2×PCR Premix *Taq* 12.5 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s [(GTG)₅ 为 51 °C], 65 °C 延伸 2 min [(GTG)₅ 为 72 °C 4 min], 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 用紫外凝胶成像仪拍照并记录结果。指纹图谱使用 GelCompar II v6.0 软件进行带型比较。

从每组相同相近带谱中选择 1–2 代菌株, 采

用副干酪乳酪杆菌特异的 *groEL* 基因进行测序, 引物为 *Lac-groEL-F* (5'-GCGGGTGCWAACCCNGTTGG-3') 和 *Lac-groEL-R* (5'-AANGTNCCVCGVATCTTGTT-3')^[23]。经琼脂糖凝胶电泳后得到大约 500 bp 的清晰单一条带。扩增产物送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序, 测序结果提交到 GenBank 数据库, 利用 BLAST 进行序列同源性分析, 比对相似值大于 97% 初步确定菌种的物种。利用 MEGA 6.0 软件的 p-distance 和 Kimura-2 参数 distance 构建系统发育树, 并进行 1 000 次 bootstrap 测试^[24]。

1.4 副干酪乳酪杆菌的 MLST 分析

参考 Diancourt 等^[25]的方法, 对副干酪乳酪杆菌进行 MLST 分析, 选取 *pyrG* (CTP 合成酶)、*fusA* (蛋白质延伸因子 f-2)、*ileS* (isoleucyl-tRNA 合成酶)、*lepA* (GTP-binding 蛋白质 LepA)、*recG* (ATP-dependent DNA helicase)、*recA* (recombinase A)、*rlpB* (50S ribosomal protein L2) 共 7 个管家基因进行 MLST 分析。将 *L. paracasei* 提取的基因组 DNA 稀释到 100 ng/ μ L 进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50–55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。扩增后获得的 7 个管家基因的 PCR 产物送到苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.5 数据处理和分析

系统发育树的构建采用 MEGA 7.0 软件, 采用 GelCompar II v6.0 软件对所得凝胶图像进行分析。多位点序列分型得到的序列文件采用 Chromas 2.4.1 软件编辑后使用 ClustalW 计算, 在 MEGA 6.0 软件中对齐进行系统发育分析。将各个管家基因测序后获得的序列导入 BIONUMERICS v8.0 (Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium) 软件识别每个菌株的管家基因的等位基因号, 根据每株菌株的 7 个管

家基因的等位基因号确定相对应的 ST 型, 基于该软件中 Prim's 算法构建最小生成树(minimum spanning tree, MSTree), 确定各菌株间及菌株与分离源之间的进化关系。菌株的母婴间共发生分析采用软件 Cytoscape 3.9.0 绘制^[26]。

2 结果与分析

2.1 研究人群

本研究纳入的 39 对母子, 其中 17 对来自新疆和田维吾尔族, 14 对来自海南昌江的黎族, 武威汉族有 8 对, 对各民族的饮食进行调查, 对婴儿的体重、身高和饮食情况进行统计(表 2)。发现和田地区维吾尔族人的饮食以动物性食品、干果和奶制品为主, 而海南昌江的黎族人则喜欢富含水果和海鲜的饮食, 相比于这 2 个民族而言, 甘肃威武的汉族人饮食较为复杂, 无民族特定的饮食习惯。婴儿主要喂养方式为母乳、母乳和奶粉混喂的方式; 不同民族和地域的母亲在哺

乳期的饮食习惯不太相同。鉴于肠道乳酸菌对母婴饮食中复合多糖或宿主来源多糖的代谢存在显著差异, 不同民族母婴的饮食习惯的差异可能会造成母婴肠道和母乳中的乳酸菌种类的不同。

2.2 乳酸菌分离和鉴定

对不同来源 39 对母婴粪便和母乳样本, 用 2 种选择性培养基培养、平板计数显示, 母乳中细菌数量较低($0-1.8 \times 10^3$ CFU/mL), 而粪便在改良 MRS 培养基中检测到菌落数约 $4.3 \times 10^3-9.5 \times 10^6$ CFU/mL, 在 LAMVAB 选择性培养基中检测到菌落数为 $9.50 \times 10^2-1.04 \times 10^6$ CFU/mL。根据形态、生理生化指标分析, 确定为乳酸菌的疑似株为 1 350 株。经 *groEL* 基因测序、NCBI 相似性对比, 共确认 945 株乳杆菌, 其中维吾尔族人群中 356 株, 汉族人群中 315 株, 海南黎族人群中 274 株。

基于 *groEL* 基因对 3 个民族母婴样本共 69 株代表性菌株构建系统发育树(图 1)。根据乳杆菌

表 2 研究人群中母亲和婴儿主要特征和饮食习惯

Table 2 The survey overview of main dietary habit of mothers and infants in the population during breastfeeding

Ethnic groups		Characteristic value			Main daily diet
		Quantity (pairs)	Weight (kg)	Height (cm)	
Li ethnic groups	Mother	14			Staple food: rice porridge, papaya porridge, powder soup (seafood), occasionally pickles, porridge, fried meat with sour melon, sauerkraut, fish, snails, the occasional chicken and duck Complementary food: coconut, mango and papaya Feeding pattern: breastfeeding or milk powder
	Infant		7.29±0.57*	71±2	
Uighur ethnic groups	Mother	17			Staple food: milk tea, soy milk, milk, naan noodles, mutton and rice, beef, onion, soup and rice noodles Complementary food: dried fruit, rose sauce and cheese Feeding pattern: breastfeeding, milk powder, occasionally feeding liquid diet
	Infant		7.27±0.07*	66±3	
Han ethnic groups	Mother	8			Staple food: millet porridge, milk, fish soup, fish, chicken, mutton soup, pasta, pork, etc., vegetable porridge and chicken soup Complementary food: dairy products, dried fruit and fruit Feeding pattern: breastfeeding, breastfeeding+milk powder
	Infant		7.41±0.03	69±2	

*: $P < 0.05$.

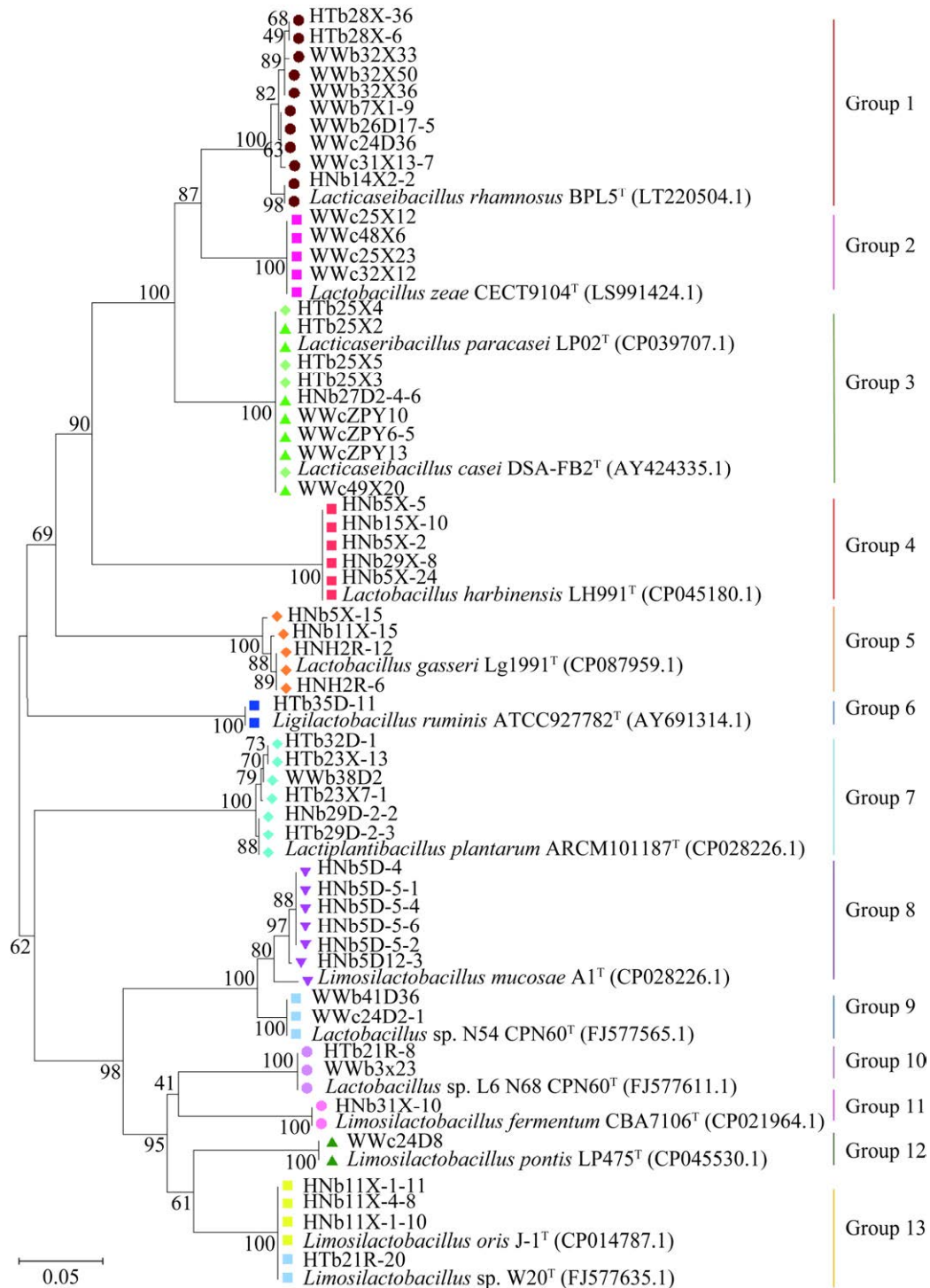


图 1 基于 *groEL* 基因序列的母婴对来源乳杆菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of *Lactobacillus* strains from mother and infant based on *groEL* gene sequences. The serial number in parentheses is the login number of the corresponding sequence in GenBank login number. The name of the model strain used to identify species affiliation is indicated by superscript (^T). Numbers on the branch points represented the level of bootstrap support from 1 000 replicates. The scale 0.05 indicates 5% in sequence divergence.

最新的分类学修订^[27],所有菌株隶属于4个属15个相近种。发育树显示了13个已知种、2个未鉴定种的菌株,分别对应13个组(group),第9组、10组菌株未鉴定到种,分别与已知种黏膜黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus mucosae*)、发酵黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)亲缘关系较近,需要进一步确认分类地位。

不同民族母婴队列中乳杆菌的种类和比例不同(图2),和田维吾尔族母婴中菌株的多样性较高,共有16种乳杆菌,主要为奶酪乳酪杆菌(*L. casei*, 13.55%)、*L. paracasei* (12.69%)、唾液宿主关联乳杆菌(*Ligilactobacillus salivarius*, 11.47%)、香肠伴生乳杆菌(*Companilactobacillus farciminis*, 10.49%)和发酵黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*, 9.55%)。海南黎族母婴中分离到11种乳杆菌,以口黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus oris*, 24.55%)、*L. paracasei* (15.85%)、加氏乳杆

菌(*Lactobacillus gasseri*, 10.87%),植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*, 9.77%)和*L. casei* (8.08%)为优势种。甘肃武威汉族母婴中共检出8种乳杆菌,主要有*L. rhamnosus* (20.07%)、*L. paracasei* (16.54%)、*L. casei* (11.90%)和黏膜黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus mucosae*, 10.59%)。*Companilactobacillus farciminis*、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、*Limosilactobacillus fermentum*和*Ligilactobacillus salivarius*只在维吾尔族母婴对样品中分离到,而且在母乳、母亲粪便和婴儿粪便中菌株数量显著不同(图2),而罗伊氏黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)只在维吾尔族婴儿肠道中分离到。在3个民族的大部分样本中都有分离到*L. casei*和*Lactiplantibacillus plantarum*,分别占总数的比例不同(维吾尔族中有6.03%,黎族中有13.98%,汉族中有13.64%),仅在武威汉族的母乳和婴儿肠道中未检测到;相

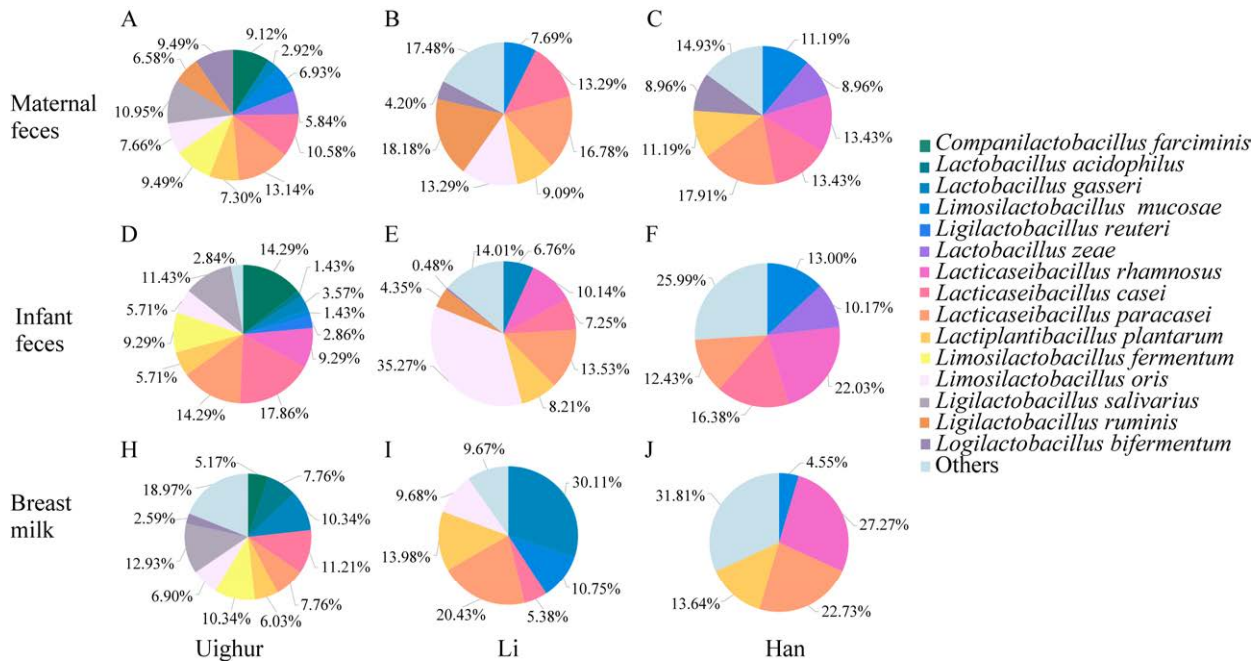


图2 不同民族母婴样本中可培养乳杆菌种类和数量分布图

Figure 2 Distribution of culturable *Lactobacillus* species in maternal and infant samples of different nationalities. A: Uighur ethnic groups maternal feces. B: Li ethnic groups maternal feces. C: Han ethnic groups maternal feces. D: Uighur ethnic groups infant feces. E: Li ethnic groups infant feces. F: Han ethnic groups infant feces. H: Uighur ethnic groups breast milk. I: Li ethnic groups breast milk. J: Han ethnic groups breast milk.

比之下, *L. paracasei* 是分离频率最高的种, 在 3 个民族的母乳、母亲粪便和婴儿肠道三类样品分离菌株中所占比例也不同(维吾尔族中有 7.76%, 黎族中有 20.43%, 汉族中有 22.73%)。总体上, 母亲粪便分别以 *L. paracasei* (维吾尔族中有 10.58%, 黎族中有 13.29%, 汉族中有 17.91%) 和 *L. casei* (维吾尔族中有 6.03%, 黎族中有 13.98%, 汉族中有 13.43%) 为优势种; 婴儿肠道以 *L. rhamnosus* (维吾尔族中有 9.29%, 黎族中有 10.14%, 汉族中有 22.03%)、*L. casei* (维吾尔族中有 6.03%, 黎族中有 13.98%, 汉族中有 13.64%) 和 *L. paracasei* (维吾尔族中有 14.29%, 黎族中有 13.53%, 汉族中有 12.43%) 为优势种。母乳中分离到的乳杆菌数量很少, 有 25.0% 的样品中未分离到菌株。

2.3 母婴间乳杆菌的共发生

由于母乳中分离到菌株相对困难, 对母婴队列的 3 个生态位(母亲粪便-母乳-婴儿粪便)同时分离到的乳杆菌做了统计(图 3)。在黎族母婴间 3 个生态位共有的乳杆菌为黏膜粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus mucosae*, 1 对), 而汉族为 *L. paracasei* (2 对)、*Limosilactobacillus mucosae* (1 对) 和 *L. rhamnosus* (2 对), 维吾尔族为 *L. casei* (1 对)、*L. paracasei* (1 对) 和 *Ligilactobacillus salivarius* (2 对); 在母乳和婴儿粪便这 2 个生态位同时分离到的乳杆菌, 黎族为 *Limosilactobacillus mucosae* (1 对), 汉族为 *L. paracasei* (1 对)、*Limosilactobacillus mucosae* (1 对), 维吾尔族为 *L. paracasei* (2 对)、*Ligilactobacillus salivarius* (1 对) 和 *Lactiplantibacillus plantarum* (1 对); 在维吾尔族和黎族母亲和婴儿粪便中同时分离到的种包括 *L. casei* (3 对)、*L. paracasei* (16 对)、*Ligilactobacillus salivarius* (3 对)、*Lactobacillus gasseri* (3 对) 和 *Limosilactobacillus oris* (2 对), 而汉族中则仅有 *L. paracasei* (1 对)、*L. mucosa* (1 对)。*L. paracasei* 是所有 3 个生态位中出现频

率最高的种, 因此本研究对 3 个民族的母婴中共 83 株 *L. paracasei* 进行多基因测序, 提供了母婴间存在菌株垂直传递的证据。

2.4 基于 rep-PCR 指纹图谱对优势菌株副干酪乳酪杆菌的遗传差异性分析

从 BoxAIR-PCR 和 (GTG)₅-PCR 指纹聚类图(图 4)中可以看出, 3 个族群母婴来源的 83 株 *L. paracasei* 扩增产物的大小在 300–5 000 bp 之间, 分别包括 3–8 个和 1–10 个明显的亮带, 并有一些弱带, 大多数产物的条带数大于 5 条以上, 指纹图谱带型较丰富, 能够反映菌株在种水平上的遗传差异。研究发现, 3 个族群母婴来源的 *L. paracasei* 在指纹分型上共划分为 11 个 group, 表明 *L. paracasei* 的指纹图谱带型具有较高的遗传差异性。在 group II、group VII、group X 中的菌株均来自和田维吾尔族, group VI 中的菌株均来自武威的汉族; 其他 group 是混合族群来源的菌株, 来自不同民族的菌株的指纹图谱带型不同, 同一民族来源的菌株更有可能聚集为同一类群, 聚集在一起的菌株指纹聚类体现出一定的族群特异性。指纹聚类图显示, 在母婴对中存在菌株共发生的情况, 如 group IV 中的 W40, group V 中的 N9, group VII 中的 T10, group IX 中的 N45、N27 和 group XI 中的 N27 母婴对中的菌株, 指纹图谱一致。

2.5 基于 MLST 技术对优势菌株副干酪乳酪杆菌的遗传差异性分析

使用 BIONUMERIC v7.6 软件对不同来源的 *L. paracasei* 的 7 个持家基因进行分型。从图 5 中可以看出 3 个民族不同菌株通过序列型聚类分析共划分为 11 个群(cluster), 34 个 ST 型, 表明 *L. paracasei* 在 3 个民族中有较高多样性。其中维吾尔族共聚类为 5 个群, 分别是 cluster A、cluster C、cluster F、cluster H、cluster J; 黎族共分为 cluster A、cluster B、cluster D 和 cluster I 和这 4 个群; 汉族有 5 个, 分别为

cluster C、cluster E、cluster G、cluster I 和 cluster G。来自不同民族母婴对的菌株划分为多个 ST 序列，黎族人群的 31 个菌株有 7 个 STs，汉族的 19 株菌有 7 个 STs，而 33 株维吾尔族人群

的菌株有 20 个 STs。来自不同民族的菌株序列型不同，尽管个别菌株也会出现在其他民族的分群中，但相同的民族来源的菌株遗传结构更相似，具有明显的人群族群特异性。

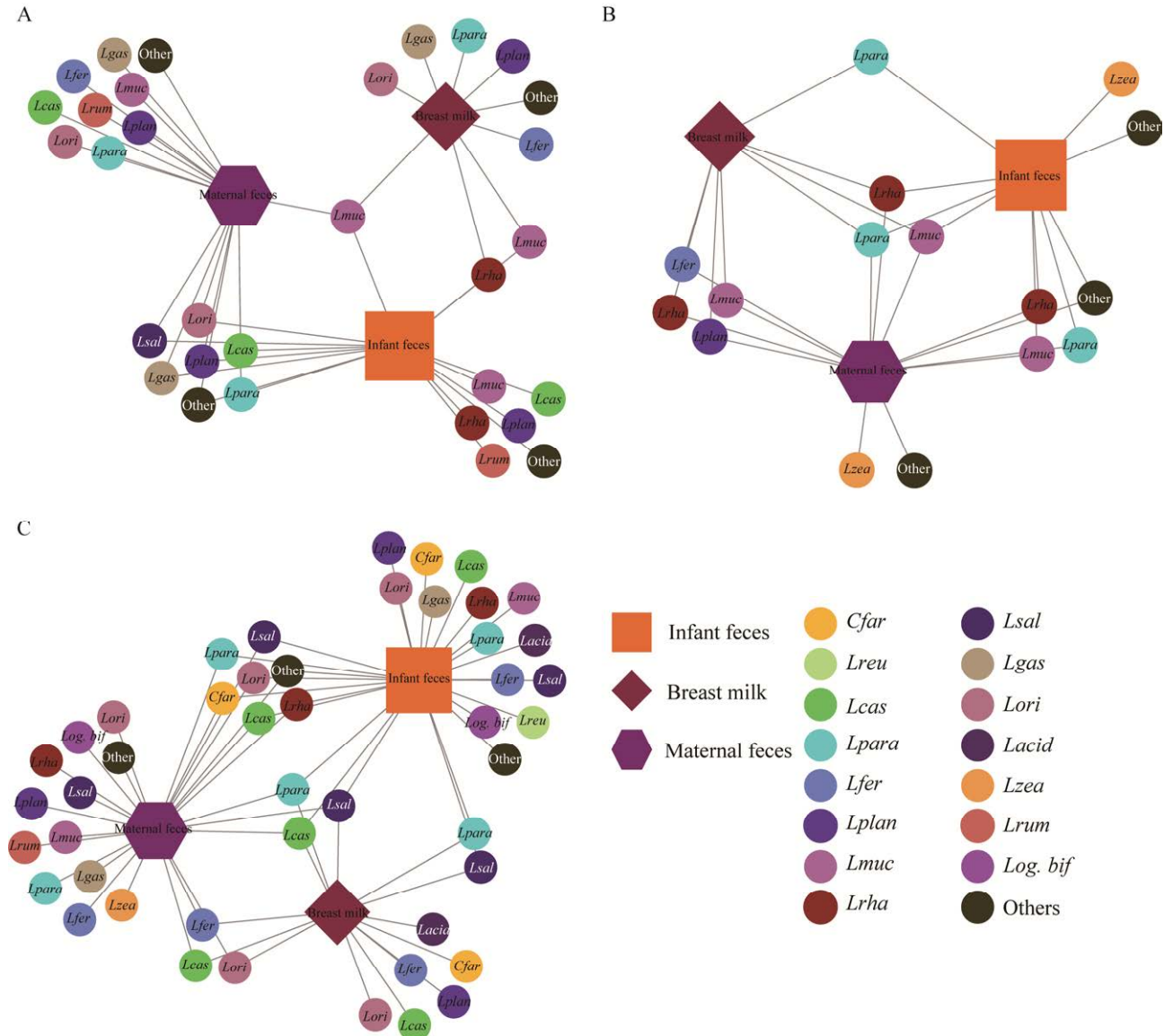


图 3 不同民族母婴对共发生乳杆菌物种分布图

Figure 3 The *Lactobacillus* species shared by mother-infant pairs in different ethnic groups. A: The *Lactobacillus* species shared by mother-infant pairs in Hainan Li. B: The *Lactobacillus* species shared by mother-infant pairs in Wuwei Han. C: The *Lactobacillus* species shared by mother-infant pairs in Hetian Uighur. *Cfar*: *Companilactobacillus farciminis*; *Lreu*: *Limosilactobacillus reuteri*; *Lcas*: *Lacticaseibacillus casei*; *Lpara*: *Lacticaseibacillus parasei*; *Lfer*: *Limosilactobacillus fermentum*; *Lplan*: *Lactiplantibacillus plantarum*; *Lmuc*: *Limosilactobacillus mucosae*; *Lrha*: *Lacticaseibacillus rhamnosus*; *Lsal*: *Ligilactobacillus salivarius*; *Lgas*: *Lactobacillus gasseri*; *Lori*: *Limosilactobacillus oris*; *Lacid*: *Lactobacillus acidophilus*; *Lzea*: *Lactobacillus zaei*; *Lrum*: *Ligilactobacillus ruminis*; *Log.bif*: *Loigolactobacillus bif fermentans*.

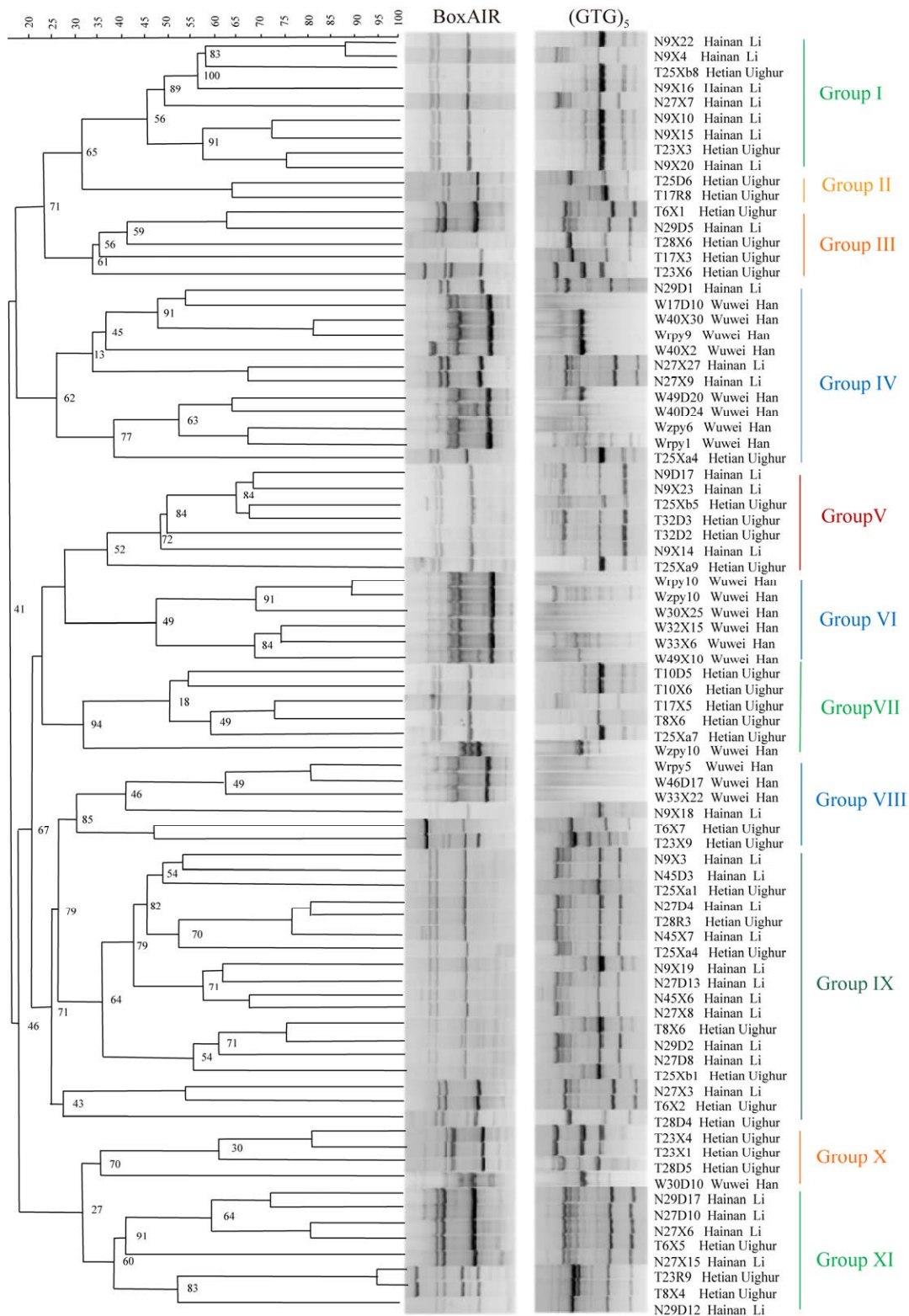


图 4 基于 BoxAIR 和(GTG)₅ 引物对的 83 株副干酪乳酪杆菌代表性菌株指纹分型聚类分析

Figure 4 Fingerprint typing cluster analysis of 83 representative *Lacticaseibacillus paracasei* strains based on BoxAIR and (GTG)₅ primers.

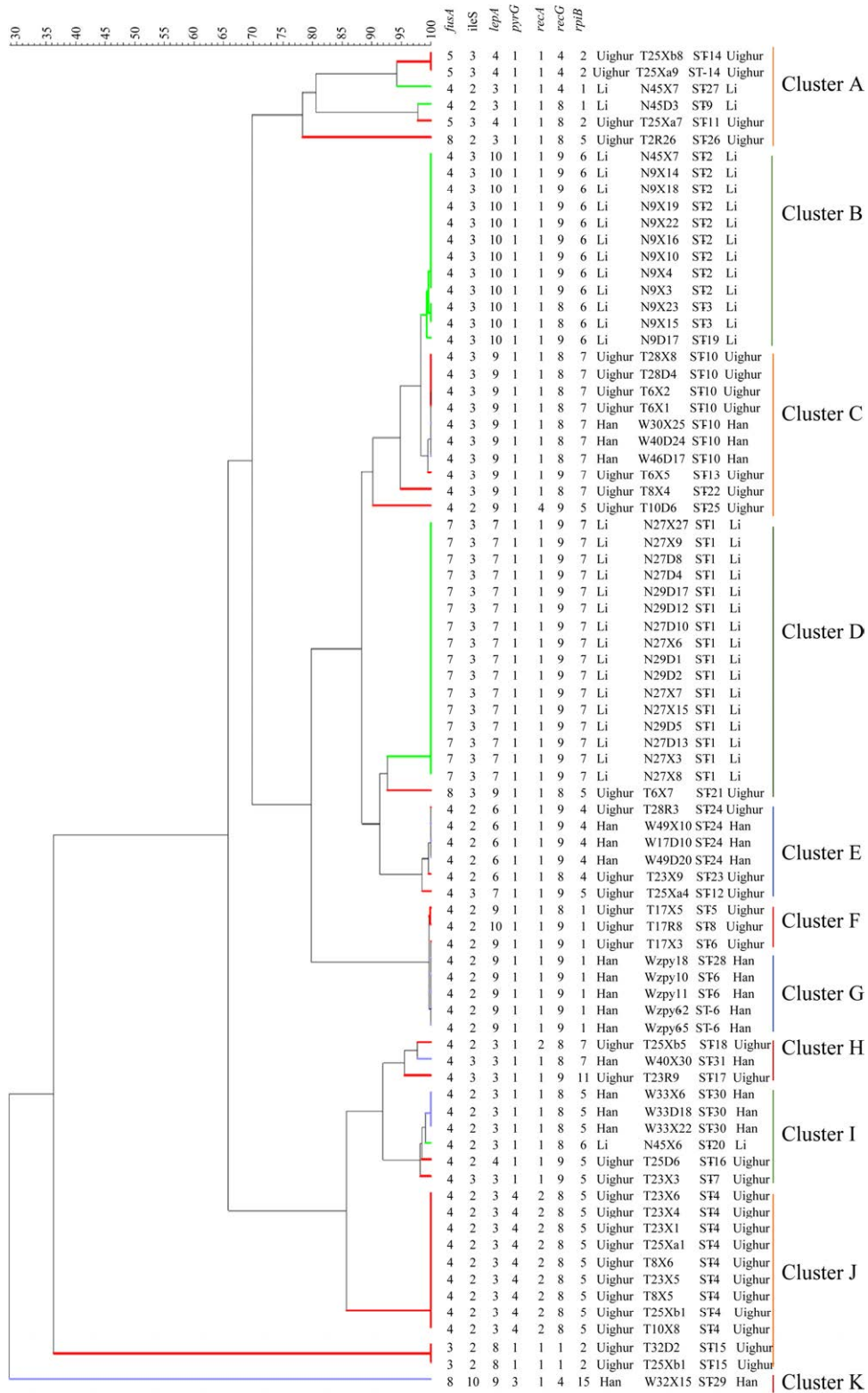


图 5 基于 MLST 对副干酪乳酪杆菌菌株的 ST 划分与其来源人群的关联

Figure 5 ST of *Lactocaseibacillus paracasei* strains based on MLST and its association with isolating source population as shown in an UDPGMA dendrogram.

ST-4 有 9 株菌, 均来自和田的维吾尔族, ST-10 有 7 株菌, 来自维吾尔族和汉族, ST-6、ST-24 和 ST-30 分别有 5、4 和 3 株菌, 均来自武威的汉族; ST-3、ST-14 和 ST-15 均有 2 株菌, 分别来自黎族和维吾尔族, 其余的 ST 型隶属于单一序列型(只有 1 株菌)。此外, 来自同一母婴对的菌株都会出现在同一个 ST 中, 例如来自母婴对 27D-X、9D-X、28D-X、28R-X、25D-X 菌株分别在 ST-1、ST-2、ST-10、ST-12 和 ST-24 中, 其序列型完全一致, 很可能显示了母婴之间 *L. paracasei* 的垂直传递(由于母乳中分离菌株的难度, 部分母婴对未分离出相同的菌株)。值得注意的是, 来自同一母婴对的 *L. paracasei* 菌株也存在隶属于多个序列型的情况, 例如母婴对 9X (ST-3, ST-2)、17X (ST-5, ST-6) 和 6X (ST-10, ST-13) 中存在多个 STs, 可能存在食品来源的菌株, 这需要进一步研究。

通过 eBURST 分析, 进一步将具有相似等

位基因谱的更密切相关的菌株定义为相同的克隆复合物(clone complexes, CCs), 即在一组被调查的菌株中包含至少 2 个或更多个 STs。图 6 显示, 共 83 株代表性菌株划分为 5 个 CCs 和 8 个 singletons。菌株同样体现出一定的民族来源聚集性, 黎族包含 CC3、CC4、CC5 这 3 个单独的克隆复合体, 维吾尔族主要为 CC1 和 CC2。同一个民族同一个母婴对(28D-X、23R-X、17R-X、45D-X 和 9D-X)的菌株或者来自同一个个体的不同菌株属于同一个 CC。值得注意的是, 汉族与维吾尔族来源的菌株具有共享 ST 的情况, 如 ST-6、ST-10 和 ST-24。然而, 在黎族和汉族之间以及维吾尔族和黎族并未出现共享 ST 的情况。

2.6 副干酪乳酪杆菌种群结构分析

为了进一步阐明不同 *L. paracasei* 菌株间的进化关系, 基于 7 个管家基因的串联序列对 83 株 *L. paracasei* 分离株构建了系统发育树(图 7)。

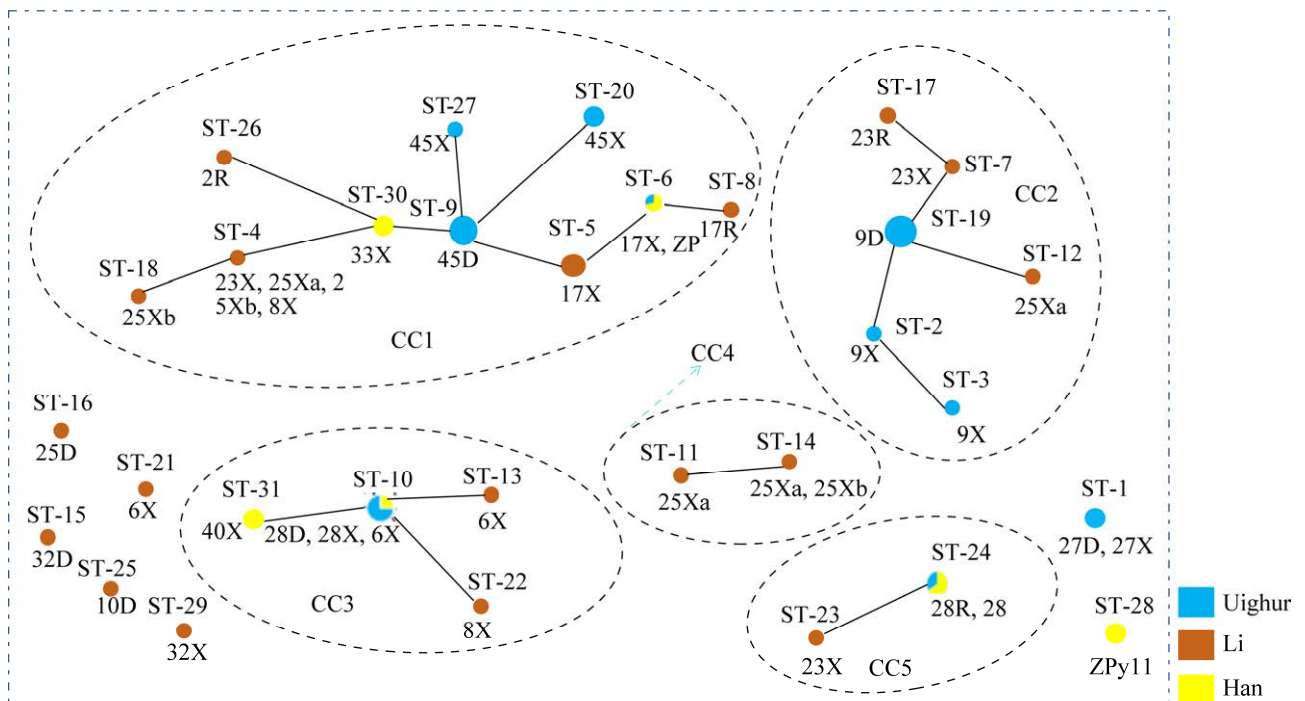


图 6 基于 eBURST 软件的 83 株代表性副干酪乳酪杆菌的种群结构分析

Figure 6 Population structure of 83 representative *Lactocaseibacillus paracasei* strains based on eBURST software.

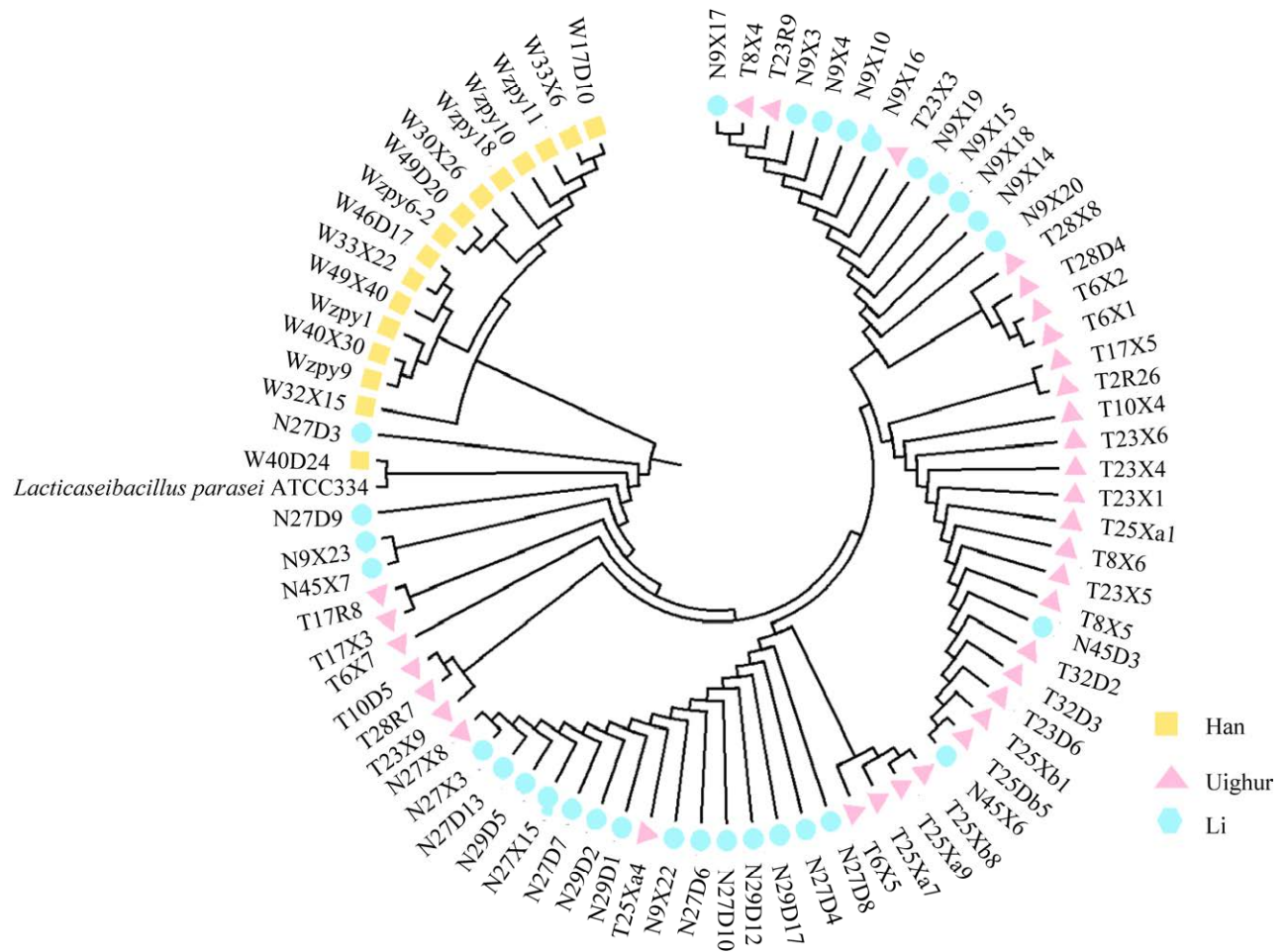


图 7 基于 UPGM 算法的 83 株副干酪菌株 7 个管家基因串联序列系统发育分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of seven genes in 83 *Lacticaseibacillus paracasei* strains based on UPGM algorithm.

3 种颜色分别代表不同菌株的民族来源, 虽然并非是所有菌株与民族来源一致, 但来自同一个民族的大多数菌株在系统发育树中亲缘关系更相近, 基本隶属于同一进化分支(clade)。一些菌株与另一个民族来源的菌株组成了同一进化分支, 例如在维吾尔族来源的分支中存在黎族来源的分离株(菌株 N45D3、N45X6), 同样地, 在黎族的分支中也存在维吾尔族来源的菌株(菌株 T25Xa4、T23X3)。此外, 黎族来源的菌株总体上隶属于 2 个不同的进化分支, 维吾尔族来源菌株中, 有 6 个菌株与大群亲缘关系较远。总体上,

相同分离源的大多数菌株亲缘关系更近, 独立成群趋势明显。

3 讨论与结论

本研究选择的 3 个民族人群在地域上相距较远, 空间存在隔离, 生存环境存在很大差异。近年来研究表明, 宿主遗传背景、生活环境, 尤其是民族特异性饮食习惯差异可能是导致肠道微生物物种组成和菌群差别的主要因素^[28-29]。长期且相对固定的饮食模式下, 母亲摄入食物类型的不同, 也会使肠道暴露在不同复杂多糖环境

中, 不仅影响整个肠道菌群组成, 也会造成肠道菌群中乳杆菌的组成差异和优势菌的不同^[30]。同时在菌株水平上施加选择性作用驱动一些乳杆菌种内特异的遗传分化。来自动物和人类的研究显示, 怀孕或者哺乳期间母亲饮食会显著影响新生儿肠道微生物群, 因此通过饮食或口服益生菌, 调节母亲肠道微生物, 为生命早期调节婴儿肠道微生物提供了一个潜在的机会。特征地域性的益生菌菌株更适应局域人口的肠道环境和饮食, 因此, 乳杆菌种内分化的人群特异性的证实, 将为开发针对局部人群的个性化益生菌提供了证据^[31]。

本研究采用 *groEL* 基因对 3 个民族母婴来源乳杆菌进行分离鉴定, 基于原乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 最新的分类学修订, 统计显示维吾尔族母婴可培养乳杆菌共有 7 个属, 15 个种; 黎族共 5 个属, 10 个种; 汉族共 4 个属, 11 个种。3 个民族母婴不同样本中的可培养乳杆菌在组成上存在明显差异, 粪便中乳杆菌以 *L. paracasei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Ligilactobacillus salivarius* 和 *L. rhamnosus* 为主要的菌株, 这一结果与 Murphy 等研究结果一致^[32-34]。在母乳样品中分离频率最高的是 *Lactobacillus gasseri*、*L. paracasei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Limosilactobacillus oris* 和 *Limosilactobacillus fermentum*, 与 Kirtzalidou 等研究结果相似, 这些乳杆菌种可能是人类肠道持久定殖者^[35]。然而, 我们的研究结果与 Mehanna 等^[36]对埃及人群母乳中的研究结果不同, 他们的结果优势种是 *L. rhamnosus*。此外发现在黎族母婴间 3 个生态位共有的乳杆菌为 *L. casei*、*L. paracasei* 和 *Lactiplantibacillus plantarum*, 维吾尔族为 *L. casei*、*L. paracasei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Limosilactobacillus fermentum* 和 *Ligilactobacillus salivarius*, 而汉族为 *L.*

paracasei、*Limosilactobacillus mucosae* 和 *L. rhamnosus*, 3 个不同民族之间存在母婴间乳杆菌的共发生不一致, 这可能确实显示了民族间菌群的差异, 也可能是样品取样的随机性造成的, 需要通过免培养法进一步确认。特别是 3 个民族的母亲-母乳-婴儿 3 个生态位中, 均分离到 *L. paracasei* 菌株, 尽管这一菌株在母乳中分离到的菌株明显少于粪便样品, 但整体数量上是优势种。

微生物与宿主形成密切的联系, 尤其是脊椎动物与微生物之间长期的共生关系是近年来探究的热点。揭示宿主肠道共栖菌群与宿主的协同进化是其中一个关注的问题。从生态角度看, 乳杆菌属于人体兼性共生微生物, 不同的种系具有一定程度的生态位保守性和不同的生活史, 包括自由生活型、宿主适应型和游牧生活型^[16]。然而, 研究表明乳杆菌的宿主适应型谱系是从自由生活的祖先进化而来, 逐渐由自由生活向宿主依赖和社会宿主特异性转变^[5]。Frese 和 Oh 等对不同宿主来源的肠道罗伊特氏黏液乳杆菌 (*Limosilactobacillus reuteri*) 的研究结果表明, *Limosilactobacillus reuteri* 是高等哺乳动物肠道共栖微生物与宿主共进化及宿主特异性的典范, 不同宿主来源的菌株几乎严格对应特定宿主的系统发育, 形成了宿主特异的谱系进化分支^[37-38]。就人体肠道中具体某个乳杆菌种系来说, 发生可能有多个来源。游牧型生活史的乳杆菌, 例如 *Lactiplantibacillus plantarum*、*L. rhamnosus*、*L. casei* 有可能通过母亲垂直传递到婴儿肠道, 也有可能通过饮食共享从食品中获得。*L. paracasei* 也是游牧型生活史的代表种, 在各种传统的手工发酵食品中广泛存在。在本研究中, 基于 rep-PCR 聚类分析(图 4)和 MLST 的系统发育分析结果(图 5), 不同民族来源的分离株具有明显的民族聚集性。虽然并非所有菌株的遗传分型结

果完全与其民族来源分群一致,有个别菌株出现在另一个民族菌株的进化分支中(如图 6 中维吾尔族分支中存在黎族来源的分离株 N45D3 和 N45X6),但绝大多数菌株与母婴群体民族来源相一致,很大程度上显示了宿主特异性,表现为特异的进化分支,这很可能是由于菌株在不同生活方式人群中的长期共存,饮食中碳水化合物选择的结果。某个进化分支的菌株来自 2 个以上的民族,可以通过采样时这些菌株在人群肠道栖息时间有限,未经过足够的选择进化来解释;或者两个民族共有相同的菌株,很可能是由于共享了商业化的发酵食品,这需要不同时间段取样,分离更多菌株的测序数据来确证。事实上,目前多个研究的确发现,乳杆菌在宿主连续的传代过程中,宿主饮食的确会导致乳杆菌菌株基因组的变异,形成特异的进化趋势^[34]。同时也发现,在人体宿主生命期限内,肠道细菌的确会发生群体遗传分化,形成多个菌株。

此外,在本研究中,尽管观察到有些母婴对分离的 *L. paracasei* 属于 2 个不同的序列型(ST),但由于只有一个等位基因的差异,这些分离株仍然被认为属于同一个亲缘关系非常相近的克隆,这意味着相同菌株通过母乳喂养从母亲的肠道垂直转移到婴儿的肠道。同一母婴对之间(27D-X、9D-X、28D-X、28R-X 和 25D-Xa)的确分别存在同一序列型菌株(ST-1、ST-2、ST-10、ST-12 和 ST-24),这在菌株水平上证实了乳杆菌在母婴间的垂直传递。一项关于乳杆菌在日本母婴间的垂直传递的研究证明,在婴儿 1 个月的时候发现存在与母亲同样的 *L. paracasei*^[39],我们的研究进一步肯定了这一结果。

截至目前,人们对共生微生物与人类关系的研究主要集中在病原微生物方面,对于有益细菌与人类的共生关系研究较少。就乳杆菌的资源利用来说,游牧型乳杆菌,如植物乳杆菌、鼠李糖

乳杆菌、奶酪乳酪杆菌在生产实践中被广泛应用,相当一部分开发的菌株来源于区域性的地方发酵食品。然而,一些著名的商业化菌株,例如 *Lactobacillus rhamnosus* GG、*Lactobacillus casei* Shirota、*Lactobacillus acidophilus* LA-1、*Lactiplantibacillus plantarum* 299v 和 WCFS1 均分离自人体。理论上讲,相比于外源的菌株,长期适应宿主的内源性特定菌株应该对宿主更有益^[40]。因此,有必要对各种乳杆菌的生活史和进化关系进行广泛研究,确定食品来源的乳杆菌是否或者多大程度上能够快速适应肠道环境并可能在人体肠道中持续定殖,产生宿主特异性和宿主特异的益生特性^[41]。为有效地开发益生菌提供个性化、地缘人群特异的菌株来源提供理论依据。

参考文献

- [1] AMES SR, LOTODKI LC, AZAD MB. Comparing early life nutritional sources and human milk feeding practices: personalized and dynamic nutrition supports infant gut microbiome development and immune system maturation[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2190305.
- [2] ANDRADE MEG de, SIQUEIRA CG de. The gut microbiota, associated diseases and possible treatments: a narrative review[J]. *Research Society and Development*, 2024, 13(1): e6113141719.
- [3] ASNICAR F, MANARA S, ZOLFO M, TRUONG DT, SCHOLZ M, ARMANINI F, FERRETTI P, GORFER V, PEDROTTI A, TETT A, SEGATA N. Studying vertical microbiome transmission from mothers to infants by strain-level metagenomic profiling[J]. *mSystems*, 2017, 2(1): e00164-16.
- [4] 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.
- [5] BOGAERT D, van BEVEREN GJ, de KOFF EM, LUSARRETA PARGA P, BALCAZAR LOPEZ CE, KOPPENSTEINER L, CLERC M, HASRAT R, ARP K, CHU MLJN, de GROOT PCM, SANDERS EAM, van HOUTEN MA, de STEENHUIJSEN PITERS WAA. Mother-to-infant microbiota transmission and infant microbiota development across multiple body sites[J]. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(3): 447-460.e6.
- [6] AJEEB TT, GONZALEZ E, SOLOMONS NW, VOSSENAAR M, KOSKI KG. Human milk microbiome: associations with maternal diet and infant growth[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2024, 11: 1341777.
- [7] TAFT DH, LEWIS ZT, NGUYEN N, HO S, MASARWEH C, DUNNE-CASTAGNA V, TANCREDI DJ, HUDA MN, STEPHENSEN CB, HINDE K, von MUTIUS E, KIRJAVAINEN PV, DALPHIN JC, LAUENER R, RIEDLER J, SMILOWITZ JT, GERMAN JB, MORROW AL, MILLS DA. *Bifidobacterium* species colonization in infancy: a global cross-sectional comparison by population history of breastfeeding[J]. *Nutrients*, 2022, 14(7): 1423.
- [8] DAMACENO QS, SOUZA JP, NICOLI JR, PAULA RL, ASSIS GB, FIGUEIREDO HC, AZEVEDO V, MARTINS FS. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(4): 371-379.
- [9] MANARA S, SELMA-ROYO M, HUANG KD, ASNICAR F, ARMANINI F, BLANCO-MIGUEZ A, CUMBO F, GOLZATO D, MANGHI P, PINTO F, VALLES-COLOMER M, AMOROSO L, CORRIAS M V, PONZONI M, RAFFAETA R, CABRERA-RUBIO R, OLCINA M, PASOLLI E, COLLADO MC, SEGATA N. Maternal and food microbial sources shape the infant microbiome of a rural Ethiopian population[J]. *Current Biology*, 2023, 33(10): 1939-1950.e4.
- [10] RASPINI B, VACCA M, PORRI D, De GIUSEPPE R, CALABRESE FM, CHIEPPA M, LISO M, CERBO RM, CIVARDI E, GAROFOLI F, De ANGELIS M, CENA H. Early life microbiota colonization at six months of age: a transitional time point[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 590202.
- [11] KUTTY PK. “Mother-microbe-infant-microbe” synchrony-a mini review[J]. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 2020, 32(24): 136-146.
- [12] 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): 66.
- [13] FERNÁNDEZ L, PANNARAJ PS, RAUTAVA S, RODRÍGUEZ JM. The microbiota of the human mammary ecosystem[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 586667.
- [14] FERRETTI P, PASOLLI E, TETT A, ASNICAR F, GORFER V, FEDI S, ARMANINI F, TRUONG DT, MANARA S, ZOLFO M, BEGHINI F, BERTORELLI R, de SANCTIS V, BARILETTI I, CANTO R, CLEMENTI R, COLOGNA M, CRIFÒ T, CUSUMANO G, GOTTARDI S, et al. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(1): 133-145.e5.
- [15] FREITAS AC, HILL JE. Quantification, isolation and characterization of *Bifidobacterium* from the vaginal microbiomes of reproductive aged women[J]. *Anaerobe*, 2017, 47: 145-156.
- [16] DUAR RM, FRESE SA, LIN XB, FERNANDO SC, BURKEY TE, TASSEVA G, PETERSON DA, BLOM J, WENZEL CQ, SZYMANSKI CM, WALTER J. Experimental evaluation of host adaptation of *Lactobacillus reuteri* to different vertebrate species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(12): e00132.
- [17] WANG KL, XIA XF, SUN LN, WANG H, LI Q, YANG Z, REN J. Microbial diversity and correlation between breast milk and the infant gut[J]. *Foods*, 2023, 12(9): 1740.
- [18] MARTIN R, HEILIG GHJ, ZOETENDAL EG, SMIDT H, RODRIGUEZ JM. Diversity of the *lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and

- potential role in the colonization of the infant gut[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2638-2644.
- [19] HUNG WW, CHEN YH, TSENG SP, JAO YT, TENG LJ, HUNG WC. Using *groEL* as the target for identification of *Enterococcus faecium* clades and 7 clinically relevant *Enterococcus* species[J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2019, 52(2): 255-264.
- [20] YANG B, CHEN YQ, STANTON C, ROSS RP, LEE YK, ZHAO JX, ZHANG H, CHEN W. *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): 3306.
- [21] 林杨, 顾美英, 孙建, 唐琦勇, 李雪, 朱静, 古丽尼沙·沙依木, 张志东. 阿克苏地区传统酸乳中乳酸菌筛选及安全性初步评价[J]. *微生物学杂志*, 2022, 42(1): 26-33.
- LIN Y, GU MY, SUN J, TANG QY, LI X, ZHU J, GULINISHA Shayimu, ZHANG ZD. Screening and safety evaluation of lactobacteria from traditional yogurt in Aksu region[J]. *Journal of Microbiology*, 2022, 42(1): 26-33 (in Chinese).
- [22] 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.
- [23] DUCKCHUL P. Genomic DNA isolation from different biological materials[M]//*Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*. New Jersey: Humana Press, 2007: 3-14.
- [24] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [25] 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.
- [26] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT, RAMAGE D, AMIN ND, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [27] ZHENG JS, WITTOUCK S, SALVETTI E, FRANZ CMAP, HARRIS HMB, MATTARELLI P, O'TOOLE PW, POT B, VANDAMME P, WALTER J, WATANABE K, WUYTS S, FELIS GE, GÄNZLE MG, LEBEER S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2782-2858.
- [28] KOHL KD, DEARING MD, BORDENSTEIN SR. Microbial communities exhibit host species distinguishability and phyllosymbiosis along the length of the gastrointestinal tract[J]. *Molecular Ecology*, 2018, 27(8): 1874-1883.
- [29] QUAN C, LI YF, LIU XY, WANG YH, PING J, LU YM, ZHOU GQ. Characterization of structural variation in Tibetans reveals new evidence of high-altitude adaptation and introgression[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 159.
- [30] COUCH CE, STAGAMAN K, SPAAN RS, COMBRINK HJ, SHARPTON TJ, BEECHLER BR, JOLLES AE. Diet and gut microbiome enterotype are associated at the population level in African buffalo[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2267.
- [31] SINDI AS, GEDDES DT, WLODEK ME, MUHLHAUSLER BS, PAYNE MS, STINSON LF. Can we modulate the breastfed infant gut microbiota through maternal diet?[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, 45(5): fuab011.
- [32] MURPHY K, CURLEY D, O'CALLAGHAN TF, O'SHEA CA, DEMPSEY EM, O'TOOLE PW, ROSS RP, RYAN CA, STANTON C. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40597.
- [33] VAUGHAN EE, HEILIG HGJ, BEN-AMOR K, de VOS WM. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 477-490.

- [34] ZHANG XY, MUSHAJIANG S, LUO BL, TIAN FW, NI YQ, YAN WL. The composition and concordance of *Lactobacillus* populations of infant gut and the corresponding breast-milk and maternal gut[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 597911.
- [35] KIRTZALIDOU E, PRAMATEFTAKI P, KOTSOU M, KYRIACOU A. Screening for *lactobacilli* with probiotic properties in the infant gut microbiota[J]. *Anaerobe*, 2011, 17(6): 440-443.
- [36] MEHANNA N, TAWFIK N, SALEM ME. Assessment of potential probiotic bacteria isolated from breast milk[J]. *Middle East Journal of Scientific Research*, 2013, 14(3): 354-360.
- [37] FRESE SA, BENSON AK, TANNOCK GW, LOACH DM, KIM J, ZHANG M, OH PL, HENG NCK, PATIL PB, JUGE N, MacKENZIE DA, PEARSON BM, LAPIDUS A, DALIN E, TICE H, GOLTSMAN E, LAND M, HAUSER L, IVANOVA N, KYRPIDES NC, et al. The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(2): e1001314.
- [38] 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.
- [39] MUEHLBAUER AL, RICHARDS AL, ALAZIZI A, BURNS M, GOMEZ A, CLAYTON JB, PETRZELKOVA K, CASCARDO C, RESZTAK J, WEN XQ, PIQUE-REGI R, LUCA F, BLEKHMANN R. Interspecies variation in hominid gut microbiota controls host gene regulation[J]. *SSRN Electronic Journal*, 2021, 37(8): 110057
- [40] MATSUMIYA Y, KATO N, WATANABE K, KATO H. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2002, 8(1): 43-49.
- [41] NISHIDA AH, OCHMAN H. A great-ape view of the gut microbiome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20: 195-206.