

动物双歧杆菌乳亚种 V9 连续传代过程中遗传稳定性评价

刘凯龙, 黄天, 刘晓晔, 玉霞, 姚国强*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室
内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 目的:以具有优良益生特性的动物双歧杆菌乳亚种 V9 为研究对象,对其连续传代过程中的遗传稳定性进行研究。方法:动物双歧杆菌乳亚种 V9 在 TPY 培养基中连续培养 100 代,对其 0,25,50,75,100 代的菌体形态、碳水化合物利用情况以及结合比较基因组学进行综合分析。结果:动物双歧杆菌乳亚种 V9 在连续传代过程中不同代时的菌体形态、碳水化合物利用情况均无显著差异($P>0.05$),并以动物双歧杆菌乳亚种 V9 原始基因组作为参考序列,研究发现不同代时的动物双歧杆菌乳亚种 V9 的基因组大小和 GC 含量与原始基因组均无显著差异($P>0.05$),系统发育树结果表明不同代时的动物双歧杆菌乳亚种 V9 与原始基因组亲缘关系较近,通过识别 SNP 突变位点发现不同代时的动物双歧杆菌乳亚种 V9 基因组保守,均未发现稳定遗传的突变位点,进一步进行碳水化合物代谢活性酶注释,结果发现不同代时菌株具有相似的碳水化合物代谢相关基因,遗传特征高度相似。结论:本研究从表型特性和基因组层面综合评估了动物双歧杆菌乳亚种 V9 的遗传稳定性,可为其进一步开发研究及产业化提供保障。

关键词 动物双歧杆菌乳亚种 V9; 连续传代; 遗传稳定性

文章编号 1009-7848(2023)09-0012-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.002

益生菌即活的、被足量摄入后对宿主有益的微生物^[1],具有降胆固醇、增强免疫、改善胃肠道功能以及抗病毒等作用^[2-5]。益生菌一般分为双歧杆菌属、乳植杆菌属、乳酪杆菌属等^[6],其中双歧杆菌属是最早定植于人体肠道,作为婴幼儿肠道内的核心菌群,对于理想肠道菌群的建立至关重要^[7-8]。目前,动物双歧杆菌乳亚种作为益生菌已被深层次研究并广泛应用到食品加工领域及医疗领域等,然而在菌株生产、使用过程中,通常会出现形态突变、碳水化合物利用能力下降、生长周期延长等衰退现象^[9],因此对于菌株的遗传稳定性评估尤为重要。目前对益生菌遗传稳定性的研究包括对其连续传代过程中的表型特性、细胞学、分子生物学等方面^[10]。随着高通量技术的发展,可在基因层面实现对菌株的遗传稳定性评估,并根据测序结果,推测基因数目、功能及表达机制,揭示菌株的

直系同源序列,从而分析其遗传特性和验证表型演化^[11-12]。

前期研究表明动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *B.animalis* subsp. *lactis*)V9 对胃肠的消化液具有良好的耐受性,体外试验表明,该菌株经胃肠道消化后存活率为 92.44%,可耐受的胆盐质量浓度为 0.3 g/100 mL^[13],并对肠道致病菌具有拮抗作用,可显著提高腹泻康复率,调节免疫等益生功能^[14-15]。本研究拟评价动物双歧杆菌乳亚种 V9 连续传代培养过程中的遗传稳定性,从菌体形态变化、碳水化合物利用能力等表型稳定性方面着手,并结合比较基因组学分析其进化的基本规律,评价其遗传稳定性,为动物双歧杆菌乳亚种 V9 的进一步开发及产业化提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株与试剂 动物双歧杆菌乳亚种 V9(V9),由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。

TPY 液体培养基(配方:葡萄糖 5.00 g/L,水解酪蛋白 10.00 g/L,大豆胨 5.00 g/L,酵母粉 2.00 g/

收稿日期:2022-09-13

基金项目:财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS36);内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(NJZZ22488);内蒙古自治区高层次人才科研支持经费项目(2021)

第一作者:刘凯龙,男,博士生

通信作者:姚国强 E-mail: yaoguoqiang1985@163.com

L, K_2HPO_4 2.00 g/L, 氯化镁 0.50 g/L, 硫酸锌 0.25 g/L, 氯化钙 0.15 g/L, 氯化铁 0.002×10^{-3} g/L, Twain-80 1.00 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10 g/L, L-半胱氨酸 0.50 g/L), 卡迈舒生物科技有限公司; 琼脂糖、核酸染料、2 000 DNA Marker 等, 大连宝生物技术有限公司。

1.1.2 设备与仪器 离心机, 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司; 恒温培养箱, 恒科技仪器股份有限公司; pH 计, 梅特勒(上海)公司; 紫外分光光度计, NanoDrop 公司; BX50 光学显微镜, OLYMPUS 公司(日本); Applied biosystems PCR 仪, 伯乐公司等。

1.2 试验方法

1.2.1 V9 活化及传代培养

1.2.1.1 生长曲线的测定 将 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保藏的供试菌株接种于 TPY(表 1)液体培养基中, 接种量为 1%(体积分数), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 严格厌氧培养(24 ± 0.5) h, 每隔 2 h 取样($N=3$), 于波长 600 nm 处测定其吸光值、pH 值, 绘制生长曲线。

1.2.1.2 连续传代培养 将 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保藏的 V9 原始菌种活化 2 代后划线于固体 TPY 培养基上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养(72 ± 0.5) h, 挑取单菌落, 接种于新鲜液体培养基中, 继续培养 24 h, 再以体积分数 1% 的接种量接种于新鲜液体培养基中连续传代培养, 将 0, 25, 50, 75, 100 代分别标记为 A0, A25, A50, A75 和 A100。

1.2.1.3 菌株代数的计算 通过 1.2.1.1 节确定的稳定期时间作为传代培养时间, 公式为:

$$\text{代数} = \log_2^{100}(N_t/N_0)^{[6]}$$

式中: N_0 ——以 1% 接种量接入新鲜液体培养

基的初始活菌数, CFU/mL; N_t ——稳定期活菌数, CFU/mL。

1.2.2 V9 连续传代培养过程中表型检测

1.2.2.1 菌体形态观察 连续培养 100 代过程中, 对不同代时的 V9 进行革兰氏染色、镜检、观察菌体形态, 并初步确认菌株纯度。

1.2.2.2 碳水化合物代谢能力 按照 API 50CHL 试剂盒说明书制备。将 A0、A25、A50、A75 和 A100 菌悬液吸至 API 50CHL 碳水化合物鉴定试剂条中, 用无菌石蜡封口, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 严格厌氧培养(48 ± 0.5) h, 查看显色结果。培养液中所含溴甲酚紫指示剂变为黄色(25 号管变为黑色)为阳性反应, 表明该菌株可利用对应的碳水化合物; 反之为阴性反应, 表明该菌株不可利用对应碳水化合物。49 种碳水化合物见表 2。

表 1 TPY 液体培养基

Table 1 TPY liquid medium

名称	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$
葡萄糖	5.00
水解酪蛋白	10.00
大豆胨	5.00
酵母粉	2.00
K_2HPO_4	2.00
氯化镁	0.50
硫酸锌	0.25
氯化钙	0.15
氯化铁	0.002×10^{-3}
Twain-80	1.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.10
L-半胱氨酸盐酸盐	0.50

表 2 API 50 CHL 乳杆菌鉴定系统各种碳水化合物一览表

Table 2 API 50 CHL *Lactobacillus* identification system list of various carbohydrates

编号	代码	碳水化合物	编号	代码	碳水化合物
0	-	阴性对照	25	ESC	七叶灵-柠檬酸铁
1	GLY	丙三醇	26	SAL	水杨苷
2	ERY	赤藻糖醇	27	CEL	D-纤维二糖
3	DARA	D-阿拉伯糖	28	MAL	D-麦芽糖
4	LARA	L-阿拉伯糖	29	LAC	D-乳糖
5	RIB	D-核糖	30	MEL	D-蜜二糖
6	DXYL	D-木糖	31	SAC	D-蔗糖
7	LXYL	L-木糖	32	TRE	D-海藻糖

(续表 2)

编号	代码	碳水化合物	编号	代码	碳水化合物
8	ADO	D-核糖醇	33	INU	菊粉
9	MDX	甲基-β-D 吡喃木糖苷	34	MLZ	D-松三糖
10	GAL	D-半乳糖	35	RAF	D-棉子糖
11	GLU	D-葡萄糖	36	AMD	淀粉
12	FRU	D-果糖	37	GLYG	糖原
13	MNE	D-甘露糖	38	XLT	木糖醇
14	SBE	L-山梨糖	39	GEN	D-龙胆二糖
15	RHA	L-鼠李糖	40	TUR	D-土伦糖
16	DUL	卫矛醇	41	LYX	D-来苏糖
17	INO	肌醇	42	TAG	D-塔格糖
18	MAN	甘露醇	43	DFUC	D-岩藻糖
19	SOB	山梨醇	44	LFUC	L-岩藻糖
20	MDM	甲基-α-D-吡喃甘露糖苷	45	DARL	D-阿拉伯醇
21	MDG	甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷	46	LARL	L-阿拉伯醇
22	NAG	N-乙酰葡萄糖胺	47	GNT	葡萄糖酸钾
23	AMY	苦杏仁苷	48	2KG	2-酮基葡萄糖酸钾
24	ARB	熊果苷	49	5KG	5-酮基葡萄糖酸钾

1.2.3 V9 基因组分析

1.2.3.1 基因组 DNA 提取及纯度检测 对 V9 的 A0、A25、A50、A75 和 A100 提取 DNA，将提取的 DNA 通过 Nanodrop 进行纯度测定 (A_{260nm}/A_{280nm} , A_{260nm}/A_{230nm})，使用琼脂糖凝胶电泳对条带完整度及纯度进行检测。使用 STE 传统方法对菌株全基因组进行提取，纯度检测同上，浓度检测使用 Qubit，满足要求后通过 Nanopore 平台进行全基因组测序。

1.2.3.2 组装及环化 通过 NextDenovo 软件组装，然后使用 Circlator 软件将二代数据进行环化^[17]。通过 Pilon 软件使用二代数据对三代数据进行 Polish^[18-19]。最终获得不同代时的 V9 全基因组序列。

1.2.3.3 平均核苷酸一致性计算 参考 Goris 等^[20]的方法，对 V9 不同代时菌株基因组与其原始基因组进行平均核苷酸一致性计算，用自制 Perl 脚本比较菌株间的平均核苷酸一致性值。

1.2.3.4 SNP 位点分析 以 V9 原始序列作为参考基因组，使用 Mummer 软件对菌株不同代时的 SNP 位点进行识别分析，利用 Soapsnp 软件进行 SNP 位点检测验证^[21]。

1.2.3.5 系统发育树构建 将 1.2.2.4 节识别的 SNP 位点整理成序列，利用软件 ITOL 构建系统发育树，进行可视化。

1.2.3.6 碳水化合物活性酶分析 将 V9 不同代时菌株的全基因组与碳水化合物活性酶 (CAZymes) 数据库进行功能注释，根据注释结果统计菌株中潜在的 CAZymes 家族，通过 TBtools 软件进行可视化。

1.3 数据处理

数据以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，统计分析使用 SPSS22.0 软件，显著性水平设定为 0.05。

2 结果与分析

2.1 V9 生长曲线

微生物的不同生长周期，菌种的生理状态有所差异^[22]。菌种的传代通常选择对数生长期末期或者稳定期初期为宜。吸入射光 (OD_{600nm}) 会因细胞的散射作用而呈现对应的变化趋势，当吸光值为 600 nm 时，在一定程度上可以反映培养液中 V9 的生长变化趋势^[23]，如图 1 所示。

V9 在 37 °C、厌氧培养 24 h 过程中 pH 值、 OD_{600nm} 的变化趋势：0~8 h V9 处于延滞期， OD_{600nm}

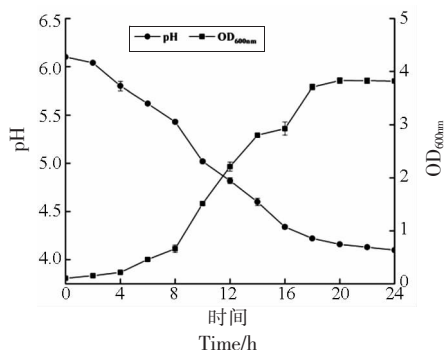


图 1 动物双歧杆菌乳亚种 V9 原始菌株生长曲线

Fig.1 The growth curve of the original *B. animalis* subsp. *lactis* V9

表 3 动物双歧杆菌乳亚种 V9 原始菌株代数结果 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 3 Algebraic results of the starting strain of *B. animalis* subsp. *lactis* V9 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

菌株	初始活菌/ $\times 10^6$ CFU·mL ⁻¹	稳定初期活菌/ $\times 10^8$ CFU·mL ⁻¹	N_t/N_0	代数
V9	2.70 ± 0.52	2.79 ± 0.24	103.33	6.69

2.3 V9 连续传代培养过程中表型研究

2.3.1 菌株连续传代过程中的菌体形态观察 对 V9 在 A0、A25、A50、A75 和 A100 菌悬液进行革

兰氏染色,显微镜下观察菌体形态。对比结果见图 2。V9 连续传 100 代菌体形态均属于动物双歧杆菌典型形态,且不同代时的菌体形态无明显差异。

2.2 V9 菌株代数计算结果

根据上述绘制的 V9 生长曲线,对其在生长初始及稳定初期进行活菌计数,计算菌株的代数。具体结果见表 3。V9 初始活菌数为 $(2.70 \pm 0.52) \times 10^6$ CFU/mL,对数末期活菌数为 $(2.79 \pm 0.24) \times 10^8$ CFU/mL,参照 1.2.1.3 节菌株生长代数计算方法,到达稳定期 V9 的生长代数约为 6.69 代,且在 20 h 进入稳定期,故以 24 h 为传代周期,平均每天传 1 次,约 6.69 代,连续传 100 代,约 15 d 完成。

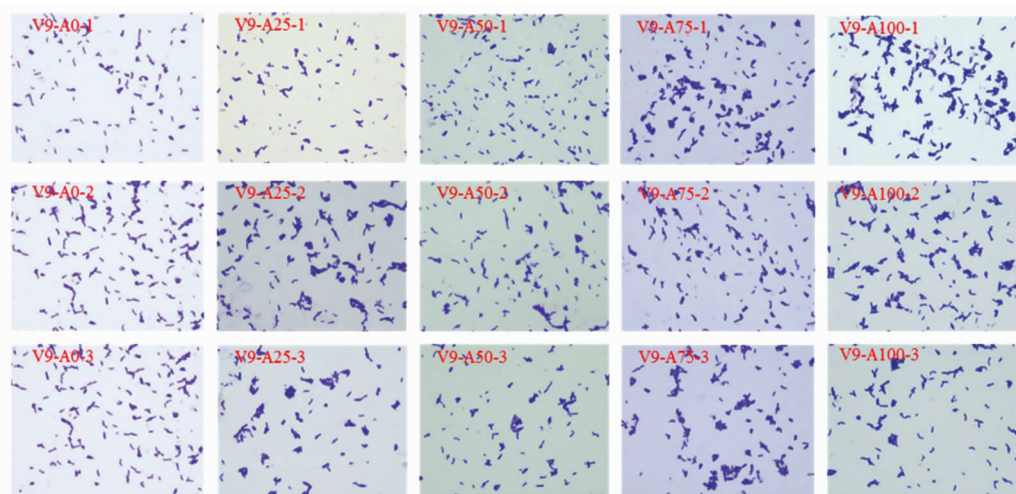
图 2 不同代时动物双歧杆菌乳亚种 V9 菌体形态($\times 100$)

Fig.2 Morphology of the bacteria of *B. animalis* subsp. *lactis* V9 in different generations ($\times 100$)

2.3.2 碳水化合物代谢能力 梅里埃碳水化合物鉴定(API 50CHL)试剂盒可对不同碳水化合物的代谢能力进行分析,并用于菌株鉴定或分型。V9 可利用 12 种碳水化合物,包括 L-阿拉伯糖、D-核

糖、D-葡萄糖、苦杏仁苷、七叶灵柠檬酸铁、D-麦芽糖、D-乳糖、D-密二糖、D-蔗糖、D-棉子糖和 D-龙胆二糖,且 V9 在 A0、A25、A50、A75 及 A100 时碳水化合物代谢能力无显著差异($P>0.05$)。

表4 不同代时动物双歧杆菌乳亚种 V9 碳水化合物(API 50CHL)利用情况($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 4 Utilization of carbohydrates(API 50CHL) of *B. animalis* subsp. *lactis* V9 in different generations ($n=3, \bar{x} \pm s$)

编号	代码	碳水化合物	A0	A25	A50	A75	A100
0	-	-	-	-	-	-	-
1	GLY	丙三醇	-	-	-	-	-
2	ERY	赤藻糖醇	-	-	-	-	-
3	DARA	D-阿拉伯糖	-	-	-	-	-
4	LARA	L-阿拉伯糖	+	+	+	+	+
5	RIB	D-核糖	+	+	+	+	+
6	DXYL	D-木糖	-	-	-	-	-
7	LXYL	L-木糖	-	-	-	-	-
8	ADO	D-核糖醇	-	-	-	-	-
9	MDX	甲基- β -D 吡喃木糖苷	-	-	-	-	-
10	GAL	D-半乳糖	-	-	-	-	-
11	GLU	D-葡萄糖	+	+	+	+	+
12	FRU	D-果糖	-	-	-	-	-
13	MNE	D-甘露糖	-	-	-	-	-
14	SBE	L-山梨糖	-	-	-	-	-
15	RHA	L-鼠李糖	-	-	-	-	-
16	DUL	卫矛醇	-	-	-	-	-
17	INO	肌醇	-	-	-	-	-
18	MAN	甘露醇	-	-	-	-	-
19	SOB	山梨醇	-	-	-	-	-
20	MDM	甲基- α -D-吡喃甘露糖苷	-	-	-	-	-
21	MDG	甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷	-	-	-	-	-
22	NAG	N-乙酰葡萄糖胺	-	-	-	-	-
23	AMY	苦杏仁苷	+	+	+	+	+
24	ARB	熊果苷	-	-	-	-	-
25	ESC	七叶灵柠檬酸铁	+	+	+	+	+
26	SAL	水杨苷	-	-	-	-	-
27	CEL	D-纤维二糖	-	-	-	-	-
28	MAL	D-麦芽糖	+	+	+	+	+
29	LAC	D-乳糖	+	+	+	+	+
30	MEL	D-蜜二糖	+	+	+	+	+
31	SAC	D-蔗糖	+	+	+	+	+
32	TRE	D-海藻糖	-	-	-	-	-
33	INU	菊粉	-	-	-	-	-
34	MLZ	D-松三糖	-	-	-	-	-
35	RAF	D-棉子糖	+	+	+	+	+
36	AMD	淀粉	-	-	-	-	-
37	GLYG	糖原	-	-	-	-	-
38	XLT	木糖醇	-	-	-	-	-
39	GEN	D-龙胆二糖	+	+	+	+	+
40	TUR	D-土伦糖	-	-	-	-	-
41	LYX	D-来苏糖	-	-	-	-	-
42	TAG	D-塔格糖	-	-	-	-	-
43	DFUC	D-岩藻糖	-	-	-	-	-

(续表 4)

编号	代码	碳水化合物	A0	A25	A50	A75	A100
44	LFUC	L-岩藻糖	-	-	-	-	-
45	DARL	D-阿拉伯醇	-	-	-	-	-
46	LARL	L-阿拉伯醇	-	-	-	-	-
47	GNT	葡萄糖酸钾	-	-	-	-	-
48	2KG	2-酮基葡萄糖酸钾	-	-	-	-	-
49	5KG	5-酮基葡萄糖酸钾	-	-	-	-	-

注：“+”表示可利用；“-”表示不可利用。

2.4 V9 连续传代中基因组研究结果

2.4.1 GTDB 基因组数据库比对 利用 NextDenovo 软件对 3 代测序得到的原始 Reads 进行组装, 组装完成后将 5 个代时的 V9(N=3)分别与 GTDB

数据库比对,结果见表 5。GTDB 比对结果显示该菌株属于动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*)。

表 5 GTDB 比对结果

Table 5 GTDB comparison results

Strain	界	门	纲	目	科	属	物种
V9	细菌	放线菌	放线菌	放线菌目	双歧杆菌科	双歧杆菌	动物双歧杆菌

2.4.2 基因组信息 利用 Circlator 软件将组装后的三代数据进行环化, 并使用 Pilon 软件对 Nanopore 测序数据进行验证^[17]。最终得到不同代时 V9 的基因组序列。分析其基因组信息,结果显示 A0、A25、A50、A75 和 A100 的 V9 平均基因组

大小为 1.96 Mb,平均 GC 含量为 60.48%,且无质粒,结果见表 6。参考基因组的大小为 1.94 Mb,GC 含量为 60.50%, 传代过程中的不同代时 V9 与原始参考菌株基因信息无显著差异($P>0.05$)。

表 6 动物双歧杆菌乳亚种 V9 基因组信息

Table 6 *B. animalis* subsp. *lactis* V9 genome information

组	序列	大小/Mb	GC 含量/%	组	序列	大小/Mb	GC 含量/%
V9	1	1.94	60.50	A50-2	1	1.99	60.49
A0-1	1	1.96	60.49	A50-3	1	1.96	60.48
A0-2	1	1.96	60.49	A75-1	1	1.96	60.47
A0-3	1	1.96	60.43	A75-2	1	1.96	60.48
A25-1	1	1.96	60.49	A75-3	1	1.95	60.48
A25-2	1	1.99	60.50	A100-1	1	1.96	60.48
A25-3	1	1.96	60.45	A100-2	1	1.95	60.49
A50-1	1	1.97	60.49	A100-3	1	1.96	60.49

2.4.3 ANI 计算 平均核苷一致性(ANI)是反映近缘菌株间平均碱基相似度最重要的指标。通常,当 ANI 值大于 95%时为同一种或亚种^[24]。为了在基因组水平上评估 V9 连续传代过程中菌株间的遗传关系,计算 V9 5 个代时的 ANI 值,并用 TBtools 软件对 ANI 值可视化。如图 3 所示,不同代时的 V9 间表现出高度相似性,ANI 值均大于 99.99%,表明传代过程中菌株均属同一亚种,即动

物双歧杆菌乳亚种。

2.4.4 SNP 分析 单核苷酸多态性(SNP)是指在基因组层面上,因单个核苷酸的变异而导致的 DNA 序列的多态性^[25]。本研究以 V9 原始序列作为参考基因组,对不同代时的菌株 SNP 位点进行识别分析,结果发现在不同代时菌株中共鉴定到 42 个 SNP 位点,其中包括 4 个同义突变,9 个非同义突变,其余 29 个位于基因间区。将 SNPs 位点结合

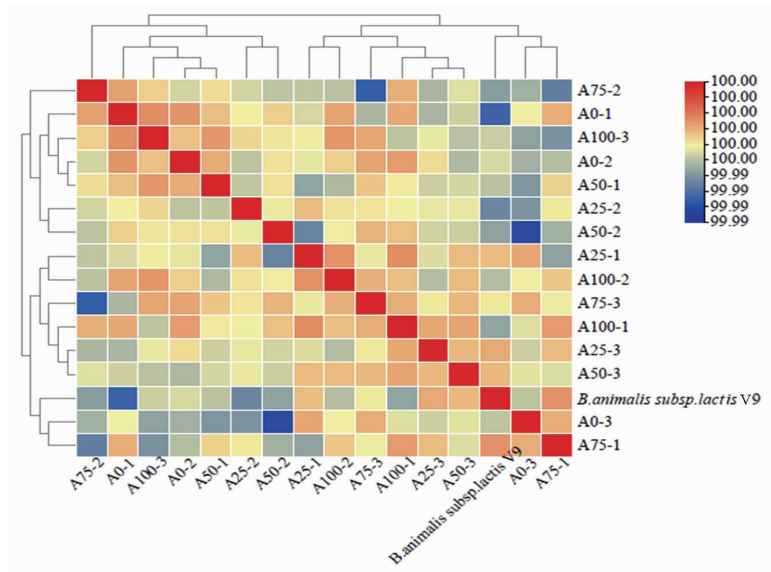


图3 不同代时动物双歧杆菌乳亚种 V9 菌株间的 ANI 值

Fig.3 ANI value between strains of *B. animalis* subsp. *lactis* V9 in different generations

gff 进行功能注释, 得到与 SNPs 突变相关的基因及功能, 如表 7 所示。非同义突变分别位于 ISL3 样元素 IS2001 家族转运酶、ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白/渗透酶、C69 家族二肽酶、糖苷-戊苷-己酮阳离子同向转运的基因上, 同时这些突变均未发生在影响碳水化合物酶功能的基因上。

在连续传代的过程中高频突变数量较少, 检测到 5 个 SNP 发生在第 0 代基因组与参考基因组之间, 一旦建立将稳定存在。菌株低频突变被检测到的数量均小于 21, 其鉴定为同一菌株。分析

发现 0 代的菌株与 25 代菌株相比, 没有稳定遗传的 SNP 位点, A25-3 与 A50-3 菌株在同一基因位点仅发现一个 SNP; 第 50 代与 75 代不存在相同位点 SNP; A75-1 与 A100-1 菌株在同一基因位点仅发现一个 SNP, 并没有稳定遗传。陈霞^[29]以动物双歧杆菌乳亚种 AD011 全基因组序列作为参考, 研究发现动物双歧杆菌乳亚种 V9、Bi04 和 DSM10140 共存在 276 个 SNP 位点, 其中包括 38 个同义突变、178 个非同义突变、60 个位于基因间区, 平均每株菌拥有 92 个 SNP, 判定为少数突

表 7 SNP 突变位点及注释信息

Table 7 SNP mutation sites and annotation information

起始位点和 终止位点	SNP 个数	基因	突变类型	基因编码物质
1 304 297~1 305 592	2	BALV_RS05595	Syn	ISL3-like element IS2001 family transposase
79 093~80 388	1	BALV_RS00355	Syn	ISL3-like element IS2001 family transposase
996 941~997 867	1	BALV_RS04290	Syn	5 -methyltetrahydropteroyltriglutamate --homocysteine S -methyltransferase
1 304 297~1 305 592	2	BALV_RS05595	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
79 093~80 388	1	BALV_RS00355	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
1 309 744~1 311 039	2	BALV_RS05610	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
1 820 681~1 822 477	1	BALV_RS07610	Nonsyn	ABC transporter ATP-binding protein/permease
269 382~271 007	1	BALV_RS01125	Nonsyn	C69 family dipeptidase
281 393~282 688	1	BALV_RS01170	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
565 135~566 652	1	BALV_RS02370	Nonsyn	glycoside-pentoside-hexuronide (GPH):cation symporter

注: syn 表示同义突变; nonsyn 表示非同义突变。

变。相比较 V9 不同代时的 SNP 多态性极少,遗传异质性较低,因此,V9 在连续传代过程中有较好的遗传稳定性。

2.4.5 系统发育树 系统发育树可直观反映同一群体内不同个体间的遗传距离,通过其判断菌株在连续培养过程中的稳定性^[27]。聚集在同一分支,

表明菌株之间的多样性较低,遗传距离较近。进一步了解 V9 不同代时 15 株的遗传距离,以 V9 原始基因组序列为参考基因组,基于 15 株菌的 SNPs 序列,构建系统发育树,如图 4 所示。不同代时的 V9 与参考基因组聚在同一分支,亲缘性较近,具有高度相似的遗传特性。

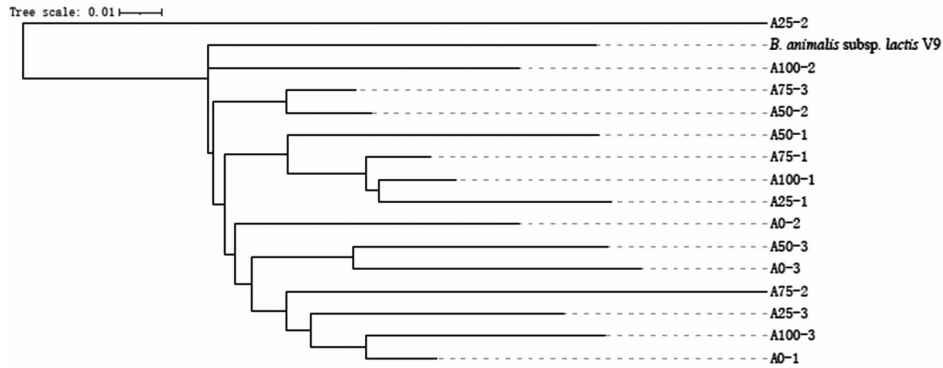


图 4 SNP 位点构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on SNP sites

2.4.6 碳水化合物活性酶注释 碳水化合物是生物体维持生命活动所需能量的主要来源。碳水化合物活性酶数据库(CAZy)是物质对碳水化合物及其衍生物的合成及分解的酶类数据库^[26],其将碳水化合物活性酶分成为六大基因家族,包括糖苷水解酶(GHs)家族、糖基转移酶家族(GTs)家族、多糖裂解酶(PLs)、碳水化合物酯酶(CEs)、辅助氧化还原酶(AAs)和碳水化合物链接模块(CBMs)^[27]。其中 GH s 家族主要作用是糖苷键的

水解和重排,GTs 家族主要作用是糖苷键的形成,PLs 家族主要作用是糖苷键的非水解裂解,CEs 家族主要作用是水解碳水化合物的酯类,AA s 家族主要作用是与 CAZymes 协同作用的氧化还原酶,CBMs 家族主要作用是与碳水化合物结合。为在全基因组水平上了解 V9 不同代时菌株对碳水化合物的代谢能力,通过碳水化合物活性酶数据库在 DBCAN2 网站上对 V9 的碳水化合物活性酶功能基因进行分析,结果如图 5 所示。

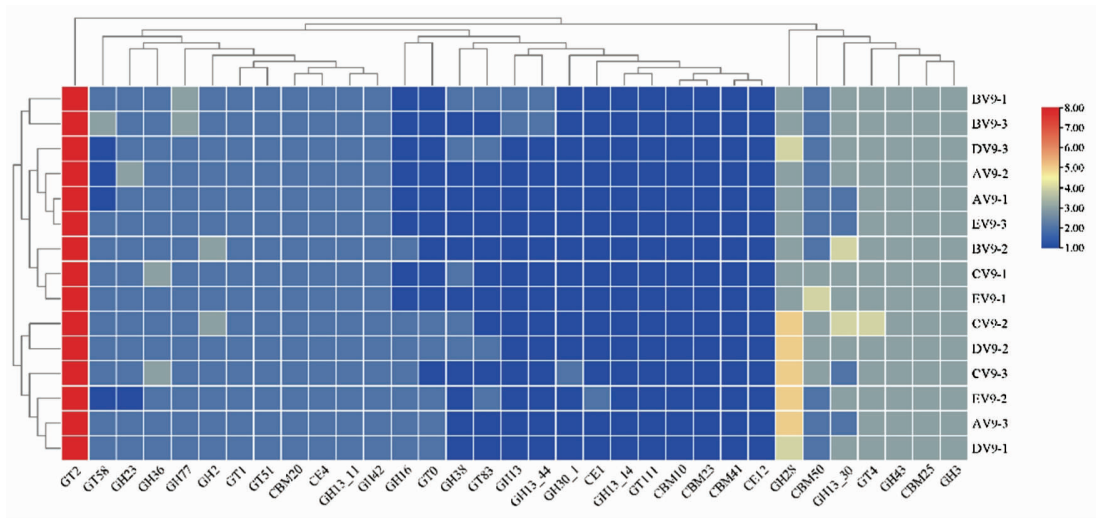


图 5 碳水化合物活性酶注释热图

Fig.5 Carbohydrate active enzyme annotation heatmap

共注释到四大类碳水化合物活性酶的62个小类基因家族,包括15个糖苷水解酶家族(GH)、7个糖基转移酶家族(GT)、6个碳水化合物结合结构域家族(CBM)和3个碳水化合物酯酶家族(CE)。不同代时菌株注释到的碳水化合物活性酶类不存在显著差异($P>0.05$),碳水化合物代谢相关基因基本一致。由此表明V9不同代时菌株碳水化合物代谢功能基因高度保守,遗传稳定性良好。

3 结论

对动物双歧杆菌乳亚种V9连续传100代过程中的表型特征及基因组稳定性进行评价,结果表明:V9在连续传100代过程中具有稳定的表型特征、分子遗传特征,表明其具有良好的遗传稳定性,有利于产业化应用。

参 考 文 献

- [1] WU R, WANG L P, WANG J C, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 318-326.
- [2] AZAD M, KALAM A, SARKER M, et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview[J]. BioMed Research International, 2018, 7(2): 3-5.
- [3] ALLEN S J, MARTINEZ E G, GREGORIO G V, et al. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea[J]. Sao Paulo Medical Journal, 2017, 129(3): 185.
- [4] RAHBAR SAADATY, YARIKHOSROUSHAHIA, POURGHASSEM. A comprehensive review of anticancer, immune modulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217(4): 79-89.
- [5] SEGAL E. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. BMJ, 2018, 361: k2179.
- [6] 吉梦馨. 具有调节肠道动力作用益生乳杆菌的筛选与评价[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [7] MALDONADO GALDEANO C, CAZORLA SILVIA I, LEMME DUMIT JOSÉ M, et al. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2019, 149(1): 15-24.
- [8] MARGOLLES A, RUIZ L. Methods for isolation and recovery of *Bifidobacteria*[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ), 2021, 2278: 1-12.
- [9] 李红, 肖千明, 刘娜, 等. 食用菌菌种退化原因分析及复壮方法的探讨[J]. 辽宁农业科学, 2010(5): 53-55.
- [10] LI H, XIAO Q M, LIU N, et al. Analysis of the causes of degradation of edible mushroom species and discussion of rejuvenation methods[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2010(5): 53-55.
- [10] 刘衍芬. DVS乳酸菌种菌株传代和保存与遗传稳定性分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005.
- [11] LIU Y F. Generation and preservation and genetic stability analysis of DVS lactic acid strains [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [11] JOSUE L, CASTRO-MEJIA, SINEAD OFERRALL, et al. Restitution of gut microbiota in Ugandan children administered with probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) during treatment for severe acute malnutrition[J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 855-867.
- [12] LIU W J, CHEN M X, DUO L, et al. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* isolated from human colostrum[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(5): 4013-4025.
- [13] 高鹏飞, 孙志宏, 麻士卫, 等. 蒙古族儿童源良好益生特性双歧杆菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 210-216.
- [14] GAO P F, SUN Z H, MA S W, et al. Screening and identification of *Bifidobacterium* with good prebiotic characteristics of Mongolian children[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(2): 210-216.
- [14] 高鹏飞, 孙志宏, 麻士卫, 等. *B. animalis* V9对腹泻动物的保护性作用及其机理研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(5): 385-387.
- [15] GAO P F, SUN Z H, MA S W, et al. Study on the protective effect of *B. animalis* V9 on diarrheal animals and its mechanism[J]. Chinese Journal of Microecology, 2009, 21(5): 385-387.
- [15] 王记成, 高鹏飞, 周琦, 等. 双歧杆菌V9对便秘和腹泻患者的临床研究[J]. 营养学报, 2011, 33(1):

- 70–74.
WANG J C, GAO P F, ZHOU Q, et al. *B. animalis* V9 Clinical study of patients with constipation and diarrhea[J]. Journal of Nutrition, 2011, 33(1): 70–74.
- [16] BACHMANN H, STARRENBURG M, MOLENAAR D, et al. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution[J]. Genome Research, 2012, 22(1): 115–124.
- [17] HU J, FAN J P, SUN Z Y, et al. A fast and efficient genome polishing tool for long-read assembly [J]. Bioinformatics, 2020, 36(7): 2253–2255.
- [18] HUNT M, SILVA N D, OTTO T D, et al. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads [J]. Genome Biology, 2015, 16(1): 294–295.
- [19] WALKER B J, ABEEL T, SHEA T, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS ONE, 2014, 9(11): e112963.
- [20] GORIS J, KONSTANTINIDIS K T, KLAPPENBACH J A, et al. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(1): 81–91.
- [21] YU X, SUN S. Comparing a few SNP calling algorithms using low-coverage sequencing data[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14(1):1–15.
- [22] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 135–136.
SHEN P, CHEN X D. Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 135–136.
- [23] MICHELLE R T, HANS-MICHAEL K, FABIAN R. Development and optimisation of a defined high cell density yeast medium [J]. Yeast (Chichester, England), 2020, 37(5): 336–347.
- [24] 宋宇琴. 德氏乳杆菌保加利亚亚种的群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
SONG Y Q. Study on population genetics and functional genomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [25] CELETE J. BROWN, DORAH MTUI, BENJAMIN P. OSWALD. Comparative genomics of *Bifidobacterium* species isolated from marmosets and humans[J]. American Journal of Primatology, 2019, 81(10/11): e983.
- [26] 陈霞. 具有益生功能的乳双歧杆菌 V9 的安全性评估、生理功效及其全基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
CHEN X. Safety evaluation, physiological function and whole genome sequence of potential probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [27] LI W, YANG L, NAN W, et al. Whole-genome sequencing and genomic-based acid tolerance mechanisms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6):1–12.
- [28] 王帅, 陈冠军, 张怀强, 等. 碳水化合物活性酶数据库(CAZy)及其研究趋势[J]. 生物加工过程, 2014, 12(1): 102–108.
WANG S, CHEN G J, ZHANG H Q, et al. Carbohydrate active enzyme database (CAZy) and trends in its research[J]. Bioprocessing Process, 2014, 12(1): 102–108.

Evaluation of Genetic Stability during Continuous Passage of the *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9

Liu Kailong, Huang Tian, Liu Xiaoye, Yu Xia, Yao Guoqiang*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering of Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering of Inner Mongolia Autonomous Region, Huhhot 010018)

Abstract Objective: In this study, the genetic stability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 with excellent probiotic properties was used as the study object to study its genetic stability in continuous passage. Methods: When the

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* V9 was continuously transmitted in TPY medium for 100 generations, the colony morphology, carbohydrate utilization and combined comparative genomics of 0, 25, 50, 75 and 100 generations were comprehensively analyzed. Results: There were no significant differences in phenotypic characteristics such as bacterial morphology and carbohydrate utilization of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 during the continuous passage process ($P>0.05$). And with the original genome of the *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 as a reference sequence, The study found that the genome size and GC content of the *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 at different generations were not significantly different from the original genome ($P>0.05$), and the phylogenetic tree results showed that the *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 at different generations was closely related to the original genome, and by identifying the SNP mutation site, it was found that the genome of the *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 at different generations was conservative, and no stable genetic mutation sites were found, and further carbohydrate metabolism active enzyme annotation was carried out, and it was found that the strains at different generations had similar carbohydrate metabolism-related genes, and the genetic characteristics were highly similar. Conclusion: The *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 has excellent genetic stability during continuous passage, which provides a theoretical basis for the further development and industrialization of probiotics.

Keywords *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9; continuous passage; genetic stability