

研究报告

分离自母婴肠道的假小链双歧杆菌的耐药性分析

马昕玮, 沈婷婷, 路镜达, 郭圆圆, 朱梦缘, 钟智*

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 内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

马昕玮, 沈婷婷, 路镜达, 郭圆圆, 朱梦缘, 钟智. 分离自母婴肠道的假小链双歧杆菌的耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2349-2362.

MA Xinwei, SHEN Tingting, LU Jingda, GUO Yuanyuan, ZHU Mengyuan, ZHONG Zhi. Analysis of antibiotic resistance of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* isolated from the guts of mothers and infants[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2349-2362.

摘要: 【背景】由于滥用抗生素导致细菌耐药性日益严重。对于双歧杆菌, 人们往往注重其益生功能的挖掘而忽视了对其耐药性的研究, 存在一定的安全隐患。【目的】检测母婴肠道中假小链双歧杆菌的耐药性, 探究婴儿肠道中假小链双歧杆菌耐药性的来源。【方法】利用微量肉汤稀释法测定 48 株分离自母婴肠道的假小链双歧杆菌对 14 种抗生素的耐药性, 比较分离自不同家庭母婴肠道中假小链双歧杆菌的耐药性。【结果】48 株母婴肠道分离株对四环素、氯霉素、新霉素、环丙沙星 100% 耐药, 对其余 10 种抗生素耐药率依次为: 卡那霉素 98%、利福平 80%、克林霉素 78%、甲氧苄啶 63%、红霉素 59%、庆大霉素 43%、链霉素 16%、万古霉素 14%、氨苄西林 6%、利奈唑胺 2%。母婴肠道分离株的耐药性无显著差异, 分离自同一家庭母婴肠道的菌株具有相似的耐药表型。【结论】分离自母婴肠道的假小链双歧杆菌对多种抗生素具有耐药性, 婴儿肠道中假小链双歧杆菌的耐药性可能是由母亲肠道垂直传递而来。

关键词: 假小链双歧杆菌; 母婴肠道; 耐药性; 最小抑菌浓度

资助项目: 内蒙古自治区科技计划(2021GG0080)

This work was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region Science and Technology Project (2021GG0080).

*Corresponding author. E-mail: imu150zhongzhi@163.com

Received: 2022-08-21; Accepted: 2022-10-29; Published online: 2022-12-30

Analysis of antibiotic resistance of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* isolated from the guts of mothers and infants

MA Xinwei, SHEN Tingting, LU Jingda, GUO Yuanyuan, ZHU Mengyuan, ZHONG Zhi*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] Caused by the abuse of antibiotics, the rapid emergence of resistant bacteria is occurring worldwide. For *Bifidobacterium*, the probiotic property has been emphasized, while there is a paucity of research on the antibiotic resistance. [Objective] To detect the antibiotic resistance of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* isolated from the feces of mothers and infants and to explore the source of resistant strains in infant gut. [Methods] The resistance of 48 strains of *B. pseudocatenulatum* isolated from the feces of mothers and infants to 14 antibiotics was determined by the minimum inhibitory concentration method, and the resistance of strains isolated from different families was compared. [Results] All the 48 strains were resistant to tetracycline, chloramphenicol, neomycin, and ciprofloxacin, and 98%, 80%, 78%, 63%, 59%, 43%, 16%, 14%, 6%, and 2% of the strains were resistant to kanamycin, rifamycin, clindamycin, trimethoprim, erythromycin, gentamicin, streptomycin, vancomycin, ampicillin, and linezolid, respectively. There were no significant differences in antibiotic resistance between the isolates from mothers and infants, and isolates from the same family had similar antibiotic-resistant phenotypes. [Conclusion] The *B. pseudocatenulatum* isolated from feces of mothers and infants were resistant to a variety of antibiotics. The resistant strains in infant gut may be vertically transmitted from the mother's gut.

Keywords: *Bifidobacterium pseudocatenulatum*; maternal and infant intestines; antibiotic resistance; minimum inhibitory concentration

假小链双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) 是形态变化最大的双歧杆菌菌种^[1], 在儿童、成年人及健康老人的肠道中普遍存在, 是中国人群肠道中的优势菌种之一^[2], 它具有调节机体免疫、减少炎症、调节神经系统和改善肥胖儿童糖脂代谢等益生功能, 常用在食品发酵和医疗保健等众多领域^[3-5]。已有研究表明, 假小链双歧杆菌是母亲和婴儿肠道中的优势菌种^[6], 婴儿时期的肠道菌群定殖与宿主健康有着密不可分的关系, 会影响机体未来

的生长发育和健康状况^[7]。

近年来, 由于滥用抗生素导致细菌耐药性日益严重, 抗生素的滥用严重威胁着公共卫生和人类的健康。目前, 乳酸菌耐药的研究越来越多, 乳酸菌安全性问题也逐渐引起人们的关注。对于双歧杆菌, 人们往往注重益生功能的挖掘而忽视了对其耐药性的研究^[8-9]。耐药性根据其发生原因可分为获得耐药性和固有耐药性^[10]。固有耐药性又称天然耐药性, 由细菌染色体基因决定, 代代相传, 不会轻易改变; 获得性耐

药性可通过各种生态位传播,包括食物、动物、植物尤其是医院环境水平基因转移和哺乳期母亲与子女之间垂直传播^[11]。现基于宏基因组测序和菌株水平分析已发现母亲肠道是健康婴儿胃肠道定殖菌的最大来源^[12],研究婴儿肠道中耐药菌株的来源非常必要。

婴儿肠道中的细菌耐药会造成宿主肠道菌群失调,影响宿主的先天性免疫、适应性免疫及相关的代谢通路。抗生素的长期使用导致肠道菌群组成产生影响^[13]。研究表明,头孢菌素进入肠道会抑制乳酸杆菌和双歧杆菌的生长,促使艰难梭菌过度繁殖引发炎症,同时肠道内的机会性病原菌阴沟肠杆菌也会增加^[14]。目前关于抗生素耐药基因的水平转移已有多项研究,但对母亲体内的菌株耐药性垂直传播的研究并不多。因此,本研究在此基础上测定分离自不同家庭母婴肠道的假小链双歧杆菌对14种常见抗生素的耐药性,进一步分析分离自同一家庭母婴肠道菌株的耐药性是否存在垂直传递现象。测定母婴肠道双歧杆菌耐药性不仅可以了解婴儿肠道中双歧杆菌耐药的原因,还可以为双歧杆菌的安全性评估提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

实验选取的菌株全部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乳酸菌菌种资源库(Lactic Acid Bacteria Collection Center, LABCC)提供,菌株分离自内蒙古呼和浩特市5对处于哺乳期母婴的粪便样品。为更好地评估实验的准确性,选取 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM20438 作质控菌。菌株来源详情见表1。

表1 48株假小链双歧杆菌菌株来源

Table 1 Source of 48 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* strains

Family No.	Strain	Source of the isolate
F	F1M3	Mother feces
F	F6M7	Mother feces
F	F7M13	Mother feces
F	F7M9	Mother feces
F	F3M1	Mother feces
F	F10M13	Mother feces
G	G10M5	Mother feces
G	G8M1	Mother feces
G	G8M2	Mother feces
G	G8M4	Mother feces
G	G8M6	Mother feces
G	G1M1	Mother feces
G	G1M2	Mother feces
G	G2M1	Mother feces
G	G2M9	Mother feces
L	L2M2	Mother feces
L	L7M1	Mother feces
L	L7M6	Mother feces
L	L7M8	Mother feces
L	L8M4	Mother feces
L	L8M5	Mother feces
T	T10M2	Mother feces
T	T13M5	Mother feces
T	T19M4	Mother feces
T	T8M1	Mother feces
T	T9M7	Mother feces
Z	Z0M2	Mother feces
Z	Z0M3	Mother feces
F	F2C18	Infant feces
F	F3C11	Infant feces
F	F3C12	Infant feces
F	F5C10	Infant feces
F	F6C18	Infant feces
F	F10C9	Infant feces
G	G8C12	Infant feces
G	G8C3	Infant feces
L	L6C30	Infant feces
L	L7C12	Infant feces
L	L7C3	Infant feces
L	L7C6	Infant feces
L	L7C7	Infant feces
L	L8C19	Infant feces
T	T16C6	Infant feces
Z	Z0C4	Infant feces
Z	Z0C5	Infant feces
Z	Z0C6	Infant feces
Z	Z0C7	Infant feces
Z	Z0C8	Infant feces

F、G、L、T和Z代表5个家庭

F, G, L, T and Z represent five families.

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

强化梭菌培养基(RCM)配方为:磷酸二氢钾 4.5 g,磷酸氢二钠 6.0 g,L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g,吐温 0.5 g,加去离子水至 1 000 mL。MRS 肉汤培养基(MRS. Broth)和 Iso-Sensitest 肉汤培养基(ISO-SENSITEST Broth)依照参考文献[15]配制。

所用引物(27F, 1492R)由上海桑尼生物有限公司合成;DNA 提取试剂盒,天根生化有限公司;10×*EasyTaq* 缓冲液、dNTPs、*rTaq* 酶和 10×TBE 缓冲液,北京全式金生物科技公司;核酸染料 GELVIEW,北京百泰克。

庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、链霉素(streptomycin)、新霉素(neomycin)、四环素(tetracycline)、克林霉素(clindamycin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、红霉素(erythromycin)、氯霉素(chloramphenicol)、甲氧苄啶(trimethoprim)、利福平(rifamycin)购自北京酷来搏技术有限公司;氨苄西林(ampicillin)、万古霉素(vancomycin)、利奈唑胺(linezolid)购自上海麦克林生化科技有限公司。

电热恒温水浴锅、电热恒温培养箱,上海一恒科技仪器有限公司;超微量紫外分光光度计, NanoDrop 公司;超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;超纯水系统,昆山总馨企业有限公司;电子天平,奥豪斯仪器上海有限公司;厌氧工作站, DWS 公司;光学显微镜, Olympus 公司;漩涡振荡器, Scientific Industries 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化

取出并解冻储藏在-80 °C冰箱中的菌液,用接种环取一环菌液,划线于强化梭菌培养基(RCM),置于厌氧工作站 37 °C厌氧培养 48 h,挑取长势好且周围无杂菌的单个菌落于 RCM

液体培养基,连续传二代以制备种子液。

1.2.2 菌株的分子生物学鉴定

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取活化至二代的菌株 DNA 为模板^[16],采用正向引物 FA-27F (5'-GCAGAGTTCTCGGAGTCACGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和反向引物 RA-1492R (5'-AGCGGATCACTTCACACAGGACTACGGCTACCTTGTTACGA-3')对菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[17],PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 抗生素敏感实验

对活化至二代的菌株需观察菌落形态和染色镜检,确认活化的菌株未受到其他杂菌污染,再划线接种至 RCM 固体培养基,在 37 °C厌氧条件下(90%氮气、5%氢气、5% CO₂)培养 48 h。挑取长势较好的单个菌落用浓度为 0.85%的生理盐水进行稀释,在 625 nm 处测其 OD₆₂₅ 值,直至菌悬液 OD₆₂₅ 值介于 0.16–0.20 之间,此时活菌数为 3×10⁸ CFU/mL。

48 株假小链双歧杆菌分离株采用肉汤稀释法测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。采用 LSM (90% ISO-SENSITEST Broth+10% MRS)液体培养基作为药敏实验稀释剂^[18]。水溶性种子液配制:将菌液按 2%接种量加入药敏稀释剂。水不溶性种子液配制:将菌液按 1%接种量加入药敏稀释剂。水溶性抗生素稀释液中分别取 100 μL 与 500 倍稀释的种子液 100 μL 共同置于 96 孔板中混合均匀。水不溶性抗生素稀释液中分别取 20 μL 与 500 倍稀释的种子液 180 μL 共同置于 96 孔板中混合均匀并 37 °C厌氧培养(90%氮气、5%氢气、5% CO₂) 48 h。分别以不添加种子液和不添加抗生素作为对照组,对每组浓度的抗生素设置 2 个平行。

1.2.4 最低抑菌浓度的测定及抗生素耐药率分析

最低抑菌浓度(MIC)是抑制菌体生长的最低浓度,单位以 mg/L 表示,实验参照国际标准抗生素敏感性实验肉汤微量稀释法测定 48 株假小链双歧杆菌对 14 种抗生素的 MIC 值。假小链双歧杆菌抗生素耐药性的判定参照参考文献[19]和国际标准 ISO 10932 (IDF 223:2010)中双歧杆菌属标准^[15]。

1.2.5 假小链双歧杆菌系统发育分析

基于测序获得的 16S rRNA 基因序列,使用 DNASTar 软件的 SeqMan 模块进行序列组装,使用 MEGA 5.05 软件采用最大似然法(maximum likelihood method)构建系统发育树^[20]并用在线网站 iTOL (itol.embl.de)进行美化。

1.2.6 分离自同一家庭母婴的菌株 16S rRNA 基因序列相似性比较

挑选耐药表型完全相同且分离自同一家庭母婴肠道的菌株,使用 DNAMAN^[21]软件对其 16S rRNA 基因序列进行相似性比对分析。

1.2.7 菌株的 16S rRNA 基因序列登录号

48 株假小链双歧杆菌 16S rRNA 基因序列已提交至国家微生物科学数据中心(National

Microbiology Data Center, NMDC), 获得序列号为 NMDCN00011PT-NMDCN00011RC。

2 结果与分析

2.1 假小链双歧杆菌的菌落形态

分离菌株菌落直径为 1–2 mm,乳白色,圆形,凸起,表面光滑,黏稠湿润,边缘整齐,质地软,符合假小链双歧杆菌特性^[22],其菌落和菌体如图 1 所示。

2.2 分离自不同家庭的假小链双歧杆菌耐药性分析

分离自不同家庭的 48 株假小链双歧杆菌的最低抑菌浓度详细结果见表 2,耐药率见图 2。结果显示,分离自母婴肠道的假小链双歧杆菌对四环素、氯霉素、新霉素和环丙沙星 100%耐药,对其余 10 种抗生素耐药率依次为:卡那霉素 98%、利福平 80%、克林霉素 78%、甲氧苄啶 63%、红霉素 59%、庆大霉素 43%、链霉素 16%、万古霉素 14%、氨苄西林 6%、利奈唑胺 2%。测试菌株对氨苄西林和利奈唑胺耐药率较低,在所有菌株中只有 3 株假小链双歧杆菌



图 1 假小链双歧杆菌的菌落(A)与在显微镜下的形态(B)

Figure 1 Colony (A) and microscopic morphology (B) of *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

表 2 假小链双歧杆菌的最低抑菌浓度值

Table 2 Minimum inhibitory concentration of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ($\mu\text{L/mL}$)

Strains	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL	NEO	LIN	RIF	CIP	TRI
DSM20438	<0.032	2	>256	>1 024	>256	0.125	<0.032	>64	32	>256	1	16	64	16
F1M3	0.062 5	>128	32	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	64	1	16	>128	16
F2C18	0.062 5	1	32	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	64	1	1	>128	16
F3C11	0.25	2	128	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	>256	1	2	>128	8
F3C12	0.25	2	64	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	128	0.5	16	>128	16
F5C10	0.125	2	>256	>1 024	64	>8	>16	>64	32	>256	2	16	>128	16
F6C18	0.25	2	32	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	>256	0.5	16	>128	16
F6M7	0.125	1	64	>1 024	64	0.25	<0.032	>64	>64	>256	0.5	1	>128	16
F7M13	0.125	2	64	>1 024	64	0.25	<0.032	>64	32	>256	1	1	>128	16
F7M9	0.25	2	128	>1 024	64	>8	>16	>64	32	>256	2	16	>128	16
F3M1	1	>128	>256	>1 024	>256	>8	8	>64	>64	>256	4	>64	>128	16
F10M13	4	>128	>256	>1 024	>256	>8	8	>64	>64	>256	4	>64	>128	8
F10C9	1	4	>256	>1 024	>256	>8	>16	>64	>64	>256	4	>64	>128	16
G10M5	0.5	2	>256	>1 024	128	>8	>16	>64	32	>256	2	8	>128	16
G8C12	0.125	1	32	>1 024	64	>8	>16	>64	32	128	2	16	>128	8
G8C3	0.062 5	1	32	>1 024	16	>8	>16	>64	>64	64	2	8	>128	16
G8M1	0.125	2	32	>1 024	64	1	>16	>64	32	64	1	8	>128	16
G8M2	0.032	2	32	>1 024	128	0.25	>16	32	32	64	2	8	>128	8
G8M4	2	2	32	>1 024	64	0.5	>16	32	>64	>256	2	16	>128	32
G8M6	2	>128	128	>1 024	>256	2	>16	>64	>64	>256	4	8	>128	>64
G1M1	2	2	64	>1 024	64	0.5	>16	>64	>64	128	1	4	64	16
G1M2	0.125	2	64	>1 024	32	>8	>16	>64	32	128	2	4	64	8
G2M1	0.125	1	16	>1 024	32	0.25	>16	>64	32	64	2	2	32	16
G2M9	0.125	2	64	>1 024	64	0.5	>16	32	32	>256	1	4	64	8
L2M2	0.125	2	128	>1 024	128	>8	>16	>64	32	>256	0.5	0.5	64	16
L6C30	0.125	1	128	>1 024	128	0.25	0.0625	>64	32	>256	0.5	0.25	>128	16
L7C12	8	1	2	>1 024	32	>8	>16	>64	32	32	0.125	4	32	8
L7C3	1	2	128	>1 024	128	>8	>16	>64	>64	>256	0.5	4	64	8
L7C6	0.5	1	128	>1 024	128	>8	>16	>64	>64	>256	0.5	8	64	16
L7C7	1	1	128	>1 024	>256	0.25	>16	>64	32	>256	0.125	4	32	8
L7M1	0.125	1	32	>1 024	32	>8	>16	>64	32	64	0.5	1	64	8
L7M6	0.062	1	32	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	32	0.5	4	32	8
L7M8	0.125	1	128	>1 024	128	0.062 5	0.062 5	>64	32	>256	0.5	1	32	16
L8C19	0.062	1	16	>1 024	32	0.25	>16	>64	16	16	2	4	32	16
L8M4	0.125	1	16	>1 024	64	>8	4	>64	>64	64	0.25	4	32	16
L8M5	0.25	2	128	>1 024	128	>8	>16	>64	>64	>256	0.5	16	64	16
T10M2	0.25	2	128	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	>256	1	8	>128	32
T13M5	0.125	2	128	>1 024	64	>8	>16	>64	>64	>256	1	4	>128	8
T16C6	0.25	1	128	>1 024	128	>8	>16	>64	>64	>256	1	4	>128	8
T19M4	0.5	2	>256	>1 024	>256	>8	>16	>64	32	>256	1	32	>128	16

(待续)

(续表 2)

Strains	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL	NEO	LIN	RIF	CIP	TRI
T8M1	0.125	2	64	>1 024	64	>8	>16	>64	32	>256	2	8	>128	16
T9M7	0.5	4	>256	>1 024	>256	>8	>16	>64	>64	>256	2	>64	>128	8
Z0C4	0.125	1	4	>1 024	16	1	<0.032	>64	>64	128	<0.032	>64	>128	8
Z0C5	4	2	64	>1 024	128	1	<0.032	>64	>64	>256	>16	>64	>128	8
Z0C6	0.25	4	32	>1 024	64	0.25	<0.032	>64	>64	>256	1	>64	>128	8
Z0C7	0.25	2	32	>1 024	32	0.25	<0.032	>64	>64	128	1	0.25	>128	16
Z0C8	0.5	2	64	>1 024	128	1	<0.032	>64	>64	128	2	>64	>128	16
Z0M2	0.25	1	16	>1 024	32	1	<0.032	>64	>64	128	0.5	>64	>128	16
Z0M3	<0.032	1	16	8	16	>8	>16	>64	>64	16	<0.032	>64	>128	4

AMP: 氨苄西林; VAN: 万古霉素; GEN: 庆大霉素; KAN: 卡那霉素; STR: 链霉素; ERY: 红霉素; CLI: 克林霉素; TET: 四环素; CHL: 氯霉素; NEO: 新霉素; LIN: 利奈唑胺; RIF: 利福平; CIP: 环丙沙星; TRI: 甲氧苄啶
AMP: Ampicillin; VAN: Vancomycin; GEN: Gentamicin; KAN: Kanamycin; STR: Streptomycin; ERY: Erythromycin; CLI: Clindamycin; TET: Tetracycline; CHL: Chloramphenicol; NEO: Neomycin; LIN: Linezolid; RIF: Rifampicin; CIP: Ciprofloxacin; TRI: Trimethoprim.

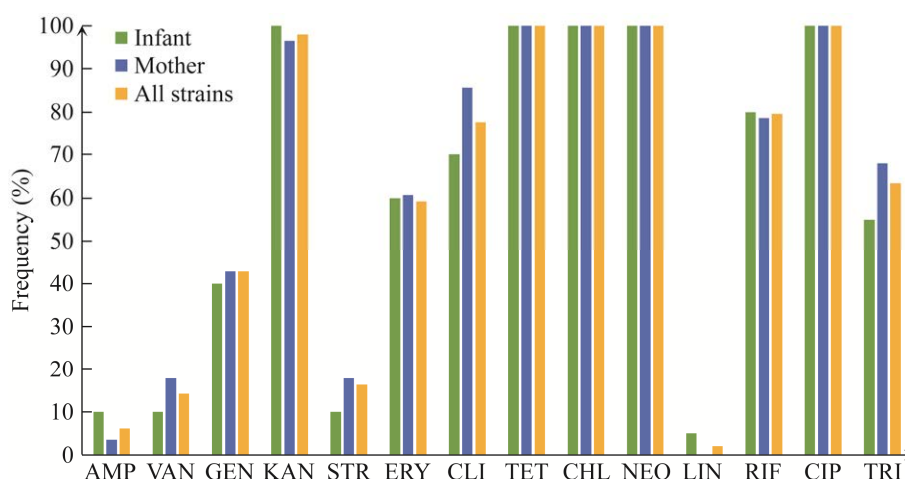


图 2 不同分离源的假小链双歧杆菌对不同种抗生素的耐药率

Figure 2 The resistance frequency of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* from different isolates to different antibiotics. AMP: Ampicillin; VAN: Vancomycin; GEN: Gentamicin; KAN: Kanamycin; STR: Streptomycin; ERY: Erythromycin; CLI: Clindamycin; TET: Tetracycline; CHL: Chloramphenicol; NEO: Neomycin; LIN: Linezolid; RIF: Rifampicin; CIP: Ciprofloxacin; TRI: Trimethoprim.

F10M13、L7C12、Z0C5 对氨苄西林耐药。母亲肠道分离株对利奈唑胺 100%敏感, 婴儿肠道仅有菌株 Z0C5 对利奈唑胺耐药。

比较母婴肠道的假小链双歧杆菌耐药率发现, 婴儿肠道分离株平均对 8.4 种抗生素具有耐药性, 母亲肠道分离株平均对 8.7 种抗生素

耐药。母亲组对克林霉素、甲氧苄啶、万古霉素的耐药率高于婴儿组, 而婴儿组对氨苄西林和利奈唑胺这两种抗生素的耐药率高于母亲组。

2.3 分离自同一家庭的假小链双歧杆菌具有相似的耐药谱

通过分析 48 株假小链双歧杆菌的最低抑

菌浓度值发现, 分离自同一家庭的假小链双歧杆菌具有相似的耐药谱。为进一步分析婴儿肠道的耐药菌株的来源, 基于 48 株假小链双歧杆菌 MIC 值绘制了耐药表型热图, 如图 3 所示。比较分离自同一母婴对假小链双歧杆菌的耐药

表型发现, 源自 5 个家庭的 6 组母婴配对的假小链双歧杆菌对 14 种抗生素的耐药表型完全相同, 分别是菌株 L6C30-L7M8、F5C10-F7M9、F3M1-F10C9、T13M5-T16C6、G8C12-G1M2 与 Z0C8-Z0M2。

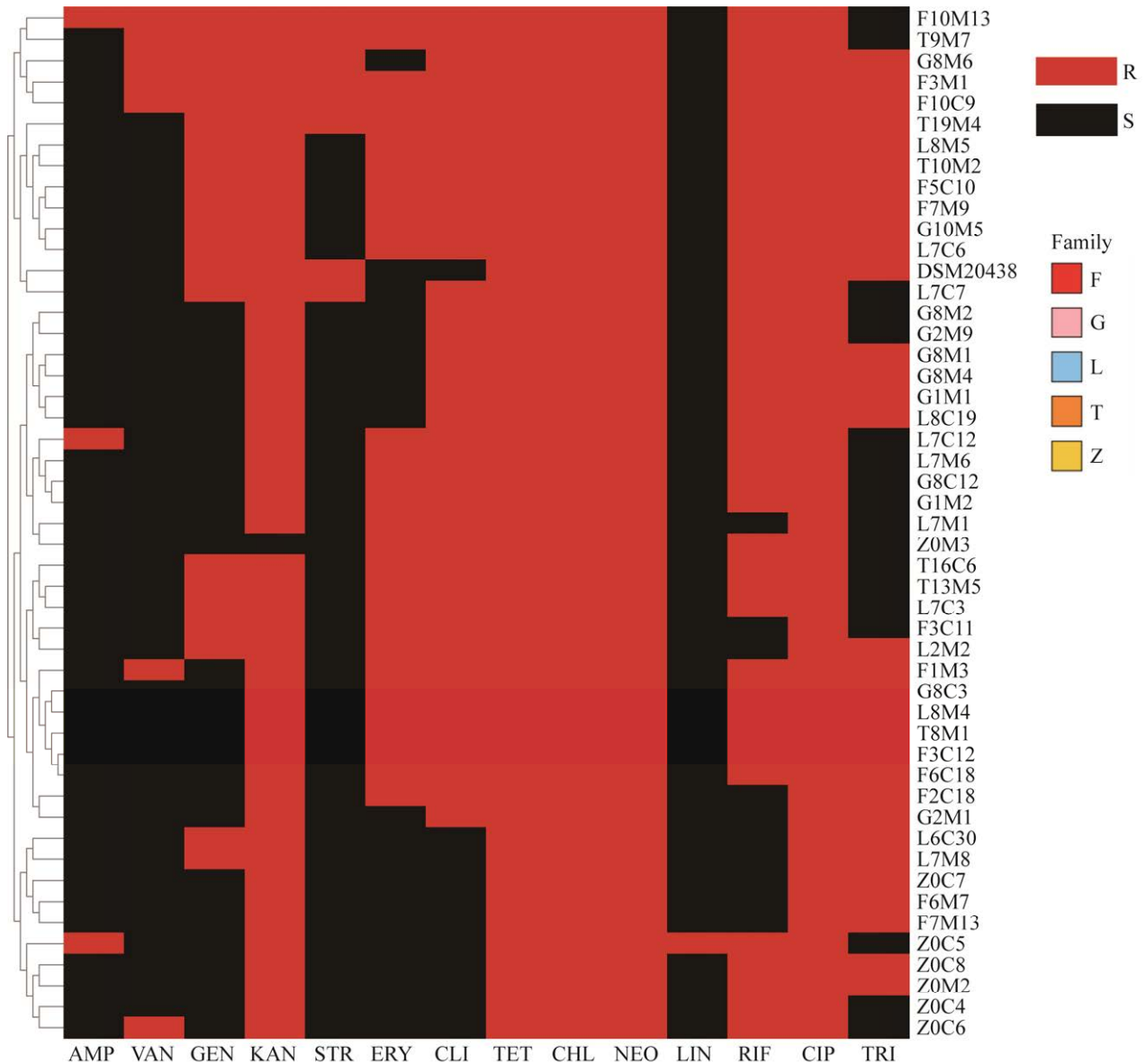


图 3 48 株假小链双歧杆菌耐药表型热图 S: 敏感; R: 耐药; Family: 不同颜色代表菌株源自不同家庭

Figure 3 Heatmap of resistance phenotype of 48 strains of *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. S: Sensitive; R: Resistant; Family: Different colors represent strains from different families.

菌株 L6C30-L7M8 与 Z0C8-Z0M2 耐药数量最少, 对 7 种抗生素耐药。F5C10-F7M9 对 10 种抗生素耐药, 而来自同一家庭的母婴配对菌株 F3M1-F10C9 耐药最严重, 对 12 种抗生素耐药。在 6 组母婴配对的菌株中只有 F3M1-F10C9 对万古霉素和链霉素耐药, 其他家庭未出现对万古霉素和链霉素耐药的菌株, 表明抗生素的耐药性传递存在个体差异。婴儿体内的菌株可能来自于母亲且随着菌株的垂直传递其耐药性很可能也传递到婴儿肠道中。

分离自同一个体菌株的耐药性也不完全相同。例如, 分离自志愿者 F 母亲肠道的菌株 F6M7 与 F10M13 的耐药性都不相同, F6M7 对 6 种抗生素耐药, 而 F10M13 对 12 种抗生素耐药。分离自志愿者 L 婴儿肠道的菌株 L6C30 与 L7C6 对红霉素、克林霉素与利福平的耐药性不同, L6C30 对 7 种抗生素耐药, L7C6 对 10 种抗生素耐药。

2.4 分离自同一家庭的假小链双歧杆菌具有较近的亲缘关系

为进一步了解分离自同一家庭的假小链双歧杆菌的遗传距离, 基于 48 株实验菌株 16S rRNA 基因序列, 通过最大似然法(maximum likelihood method)以 *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 为外群构建了系统发育树。由图 4 可知, 大部分菌株均以家庭为单位聚类, 源自同一母婴对的菌株形成了自己的集群。例如, T16C16-T19M4、L7C6-L2M2、F10M13-F10C9 来自同一家庭的母婴肠道菌株分别聚集在同一小分支上, 表明亲缘关系较近, 婴儿肠道的菌株很可能来自于母亲。Makino 等^[23]从同一家庭母婴肠道中分离出的长双歧杆菌长亚种均以家庭聚到系统发育树的一个分支, 结果与文本一致。

为深入了解耐药表型相同的同一家庭母婴对菌株的同源性, 本研究用 DNAMAN V6.0.3.99 软件对 6 组母婴对的假小链双歧杆菌 16S rRNA

基因序列进行比对, 结果显示: 源自同一家庭母婴对的两条序列具有高度的相似性, 耐药表型相同的母婴对菌株序列相似性高达 100% (表 3), 基于以上结果判定本实验中婴儿肠道的假小链双歧杆菌分离株源自母亲体内, 母亲与婴儿间确实存在菌株共享情况。我们认为母婴对之间耐药表型完全相同很可能是因为母亲体内的假小链双歧杆菌通过菌株的垂直传递进一步把耐药基因传递给婴儿。

3 讨论

婴儿肠道微生物群落在人类发育中发挥着重要作用, 包括免疫系统的成熟、营养利用和改良, 以及病原体定殖的预防。耐药细菌如果进入婴儿肠道会对肠道稳态和身体健康造成威胁。

本团队在前期分菌实验中发现假小链双歧杆菌更普遍存在于母婴肠道, 因此选择该菌进行耐药性分析, 探究婴儿肠道耐药菌株的来源。研究发现 48 株假小链双歧杆菌对四环素、氯霉素、新霉素和环丙沙星与卡那霉素具有较高的耐药性。许多研究也已证实, 双歧杆菌对氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类和青霉素类等抗生素表现出耐药并且在其基因组中也鉴定到相关的耐药基因^[24], 表明双歧杆菌对这些抗生素固有耐药。本实验菌株表现出高耐药率可能与菌种有关, 赵芳^[25]检测不同种双歧杆菌的耐药性发现, 与其他双歧杆菌的菌种相比, 假小链双歧杆菌的耐药率最高。48 株假小链双歧杆菌对庆大霉素、红霉素、克林霉素、利福平和甲氧苄啶的耐药性与 Cao 等^[26]的结果相似, 但与 Chung 等^[27]的研究结果有出入, 分析原因可能是菌株分离地的差异导致假小链双歧杆菌耐药性存在差异。潘琳等^[28]采用微量肉汤稀释法对不同种双歧杆菌进行最小抑制浓度的检测, 发现假小链双歧杆菌对 15 种抗生素的敏感性也

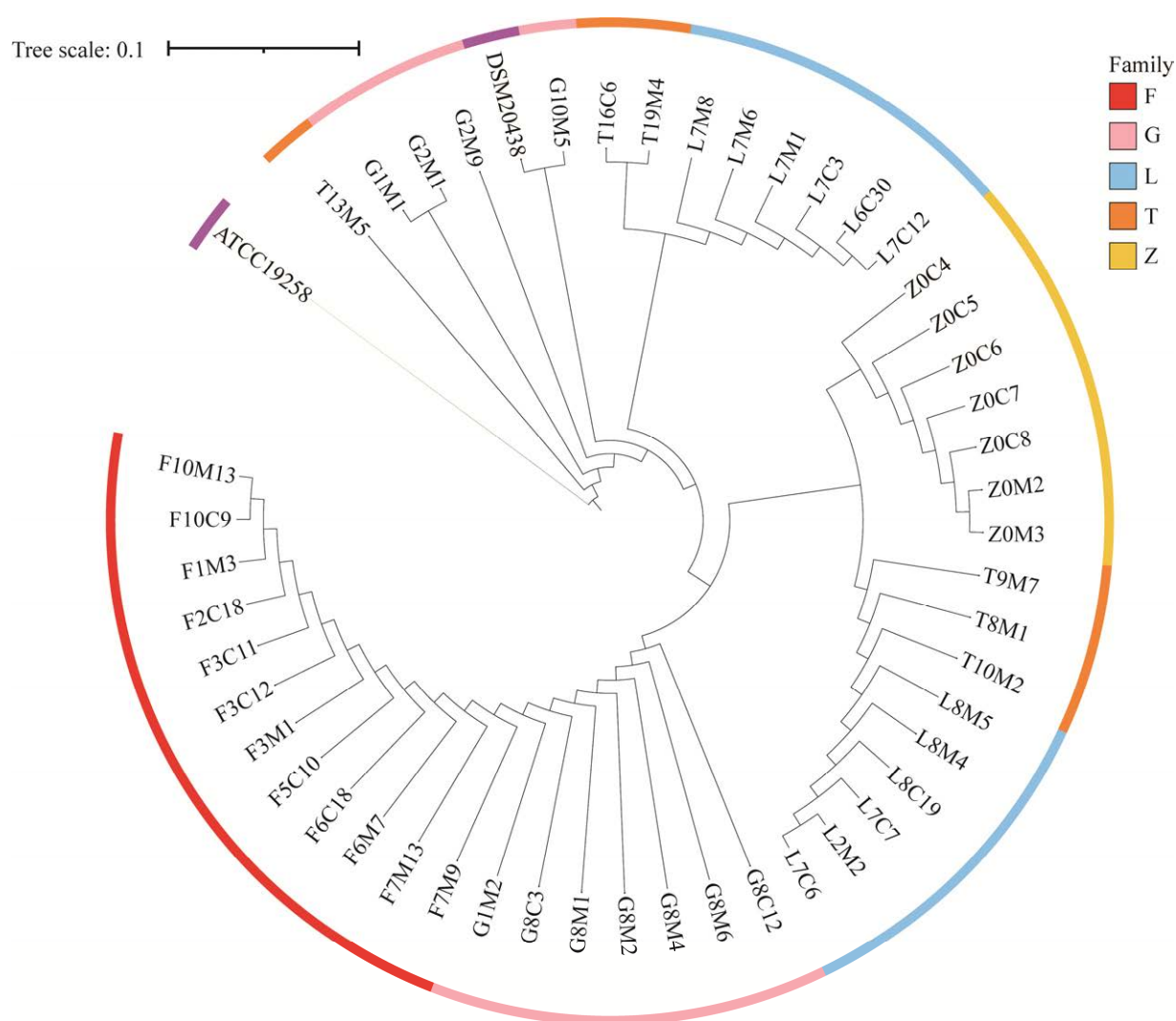


图 4 48 株假小链双歧杆菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 Tree scale: 序列之间差异的数字尺度

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of 48 strains of *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Tree scale: Distance scale of differences between sequences.

存在差异。本实验也说明即使分离自同一个体的菌株对同一种抗生素的耐药性也不完全相同。实验菌株对氨苄西林、万古霉素、链霉素和利奈唑胺的耐药率低于 20%。有研究表明^[29], 假小链双歧杆菌对利奈唑胺敏感, 本实验中仅有一株婴儿肠道分离株对利奈唑胺耐药。新生儿在未接触抗生素的情况下也能够在婴儿粪便样品中检测到耐药菌株, 我们推测婴儿肠道的耐

药菌株可能来自母亲。其他研究结果也表明, 垂直传播是婴儿肠道耐药菌株定殖的途径之一, 母亲和婴儿之间的差异是由于微生物群适应新生儿胃肠道特殊的环境而发生了重大变化^[30]。Kozak 等^[31]在 15 对母婴配对的菌株中发现, 5 组母婴配对的长双歧杆菌婴儿亚种分离株在母婴对之间的序列相似度及抗生素耐药性情况相似, 证明了耐药菌株确实能够从母亲传递给

表 3 分离自同一家庭母婴的假小链双歧杆菌 16S rRNA 基因序列相似性比对

Table 3 16S rRNA gene sequence similarity analysis of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* isolated from mother and infant pairs from the same family

Strains	Accession No.	Sequence length (bp)	Sequence similarity (%)
Z0M2	NMDCN00011RB	1 392	100
Z0C8	NMDCN00011RA	1 392	
F3M1	NMDCN00011Q6	1 407	99.79
F10C9	NMDCN00011Q8	1 407	
F5C10	NMDCN00011Q1	1 525	100
F7M9	NMDCN00011Q5	1 404	
G8C12	NMDCN00011QA	1 525	100
G1M2	NMDCN00011QH	1 525	
L7M8	NMDCN00011QS	1 525	100
L6C30	NMDCN00011QL	1 525	
T13M5	NMDCN00011R1	1 107	99.00
T16C6	NMDCN00011R2	1 110	

婴儿体内,在本次实验中也发现 6 组母婴配对的假小链双歧杆菌 16S rRNA 基因序列以及抗生素耐药表型相同的结果。

关于母婴间的菌群进行传递的时间和方式, Zhang 等^[32]在母乳中观察到抗生物素细菌,但在婴儿配方奶粉和食品中未发现,这就说明母乳可能是婴儿体内耐药菌株的传递途径之一,母体来源的细菌通过母婴传播将耐药菌株转移到胎儿和新生儿肠道中。除了哺乳,新生儿在母体内可能已经与母亲共享了肠道菌群。研究表明,部分新生儿胎便中可检测到多种四环素类及 β -内酰胺类耐药基因,这就意味着耐药菌在新生儿肠道菌群形成初期就已经伴随着正常菌群进入肠道之中^[33]。

本次实验中氨苄西林和利奈唑胺这 2 种抗生素的耐药率婴儿组高于母亲组。表明耐药菌可能不仅通过母婴垂直传递,也可能从环境中传播到人体内^[34]。一项关于新生儿抗生素的研

究显示,在胎儿排泄物中发现了抗药性细菌,由于目前医院环境中的细菌普遍存在,细菌来源于医院的可能性较大^[35]。

近年来,随着抗生素的大量使用,肠道内定殖了大量的耐药菌株甚至多重耐药菌,造成各种感染性疾病使抗菌药物治疗无效,病死率增加,严重危害人类健康,尤其对婴幼儿和老年人、免疫力低下者的生命构成威胁。当宿主使用抗生素时,具有耐药性的益生菌对肠道微生物具有很好的存储和保护作用。适量具有耐药性的双歧杆菌和抗生素的配合使用不但能够抑制致病菌的生长繁殖,同时可以调节肠道菌群有益于宿主肠道内稳态平衡^[36]。因此,将具有耐药性的双歧杆菌和抗生素科学地配伍使用,使人们在益生菌与抗生素的共同应用过程中更合理化及安全化,为双歧杆菌的应用打好基础。

4 结论

为探究分离自同一家庭母婴肠道菌株的耐药性是否存在垂直传递现象,本研究测定分离自 6 组家庭母婴肠道的假小链双歧杆菌对 14 种常见的抗生素的耐药性,结果显示,48 株分离自母婴肠道的假小链双歧杆菌对四环素、氯霉素、新霉素和环丙沙星 100% 耐药,对其余 10 种抗生素表现出不同程度的耐药。源自不同家庭的 6 组母婴配对的菌株对 14 种抗生素耐药表型完全相同,其分离自同一家庭母婴肠道的菌株 16S rRNA 基因序列相似度最高达 100%,初步判定母亲体内的耐药菌株及其耐药性能够垂直传递给婴儿,这表明母亲的肠道菌群在婴儿生命早期建立健康微生物群和免疫发育起着至关重要的作用,并可能会影响婴儿后期抗生素治疗的效果。

REFERENCES

- [1] IN WHITMAN WB, TRUST BM. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria[M]. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015.
- [2] ODAMAKI T, BOTTACINI F, KATO K, MITSUYAMA E, YOSHIDA K, HORIGOME A, XIAO JZ, van SINDEREN D. Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human lifespan[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 85.
- [3] FANG DQ, SHI D, LV LX, GU SL, WU WR, CHEN YF, GUO J, LI A, HU XJ, GUO FF, YE JZ, LI YT, LI LJ. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 and *Bifidobacterium catenulatum* LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8770.
- [4] SANCHIS-CHORDÀ J, del PULGAR EMG, CARRASCO-LUNA J, BENÍTEZ-PÁEZ A, SANZ Y, CODOÑER-FRANCH P. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation improves inflammatory status in insulin-resistant obese children[J]. European Journal of Nutrition, 2019, 58(7): 2789-2800.
- [5] GAYA P, PEIROTÉN Á, MEDINA M, ÁLVAREZ I, LANDETE JM. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815: the first bacterium able to produce urolithins A and B from ellagic acid[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45: 95-99.
- [6] AL-SHERAJI SH, ISMAIL A, MANAP MY, MUSTAFA S, YUSOF RM, HASSAN FA. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536[J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 356-361.
- [7] BERENDONK TU, MANAIA CM, MERLIN C, FATTA-KASSINOS D, CYTRYN E, WALSH F, BÜRGMANN H, SØRUM H, NORSTRÖM M, PONS MN, KREUZINGER N, HUOVINEN P, STEFANI S, SCHWARTZ T, KISAND V, BAQUERO F, MARTINEZ JL. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(5): 310-317.
- [8] SCHWARZ S, LOEFFLER A, KADLEC K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine[J]. Advances in Veterinary Dermatology, 2017, 28(1): 82-e19.
- [9] 王娟, 王新华, 徐海. 多重耐药菌在人类、动物和环境的耐药和传播机制[J]. 微生物学报, 2016, 56(11): 1671-1679.
- WANG J, WANG XH, XU H. Antimicrobial resistance and dissemination of multidrug resistant organisms-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(11): 1671-1679 (in Chinese).
- [10] MATAR GM. Antimicrobial resistance in Lebanon from the food chain: a one health perspective[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2016, 53: 30.
- [11] PATANGIA DV, RYAN CA, DEMPSEY E, STANTON C, ROSS RP. Vertical transfer of antibiotics and antibiotic resistant strains across the mother/baby axis[J]. Trends in Microbiology, 2022, 30(1): 47-56.
- [12] 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.
- [13] 高琰宇, 毕文静, 吴新颜, 朱晓, 罗义. 细菌耐药影响肠道菌群及其宿主免疫调控[J]. 生物工程学报, 2018, 34(8): 1259-1269.
- GAO YY, BI WJ, WU XY, ZHU X, LUO Y. Bacterial resistance influences intestinal flora and host immune regulation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(8): 1259-1269 (in Chinese).
- [14] AZAD MB, KONYA T, PERSAUD RR, GUTTMAN DS, CHARI RS, FIELD CJ, SEARS MR, MANDHANE PJ, TURVEY SE, SUBBARAO P, BECKER AB, SCOTT JA, KOZYRSKYJ AL, INVESTIGATORS CS. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study[J]. BJOG, 2016, 123(6): 983-993.
- [15] International Organization of Standardization/International Dairy Federation (ISO 10932/IDF 223). Milk, and milk products. Determination of the (minimal)inhibitory Concentration (MIC) of Antibiotics Applicable to Bifidobacteria and Nonenterococcal Lactic Acid Bacteria (LAB)[S]. 2010.
- [16] BASTIAN WP, HASAN I, LESMANA CRA, RINALDI I, GANI RA. Gut microbiota profiles in nonalcoholic fatty liver disease and its possible impact on disease progression evaluated with transient

- elastography: lesson learnt from 60 cases[J]. Case Reports in Gastroenterology, 2019, 13(1): 125-133.
- [17] 高旭. 婴儿肠道内双歧杆菌多样性及变化规律研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2020.
- GAO X. Study on the diversity and changing regularity of *Bifidobacterium* in infants' intestines[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [18] 孙雅如, 李伟程, 余中节, 王旭, 李敏, 王佼, 张和平, 钟智. 基于全基因组关联分析研究粪肠球菌发酵食品分离株的耐药性[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 113-122.
- SUN YR, LI WC, YU ZJ, WANG X, LI M, WANG J, ZHANG HP, ZHONG Z. Genome-wide association study on the antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from natural fermented food[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(1): 113-122 (in Chinese).
- [19] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance[J]. EFSA Journal, 2012, 10(6): 2740.
- [20] MODESTO M, SATTI M, WATANABE K, SCARAFI D, HUANG CH, LIOU JS, TAMURA T, SAITO S, WATANABE M, MORI K, HUANG L, SANDRI C, SPIEZIO C, ARITA M, MATTARELLI P. Phylogenetic characterization of two novel species of the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium saimiriisciurei* sp. nov. and *Bifidobacterium platyrrhinorum* sp. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2020, 43(5): 126111.
- [21] 汤旭, 姜海, 赵鸿雁, 朴冬日, 田国忠, 张秋香, 崔步云, 王桂琴. 16S rDNA 序列分析在鉴定布鲁氏菌中的应用[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1290-1296.
- TANG X, JIANG H, ZHAO HY, PIAO DR, TIAN GZ, ZHANG QX, CUI BY, WANG GQ. Application of the 16S rDNA sequence analysis method in identification of *Brucella*[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1290-1296 (in Chinese).
- [22] 张旭东, 庄伟清, 李忠磊, 刘蕾, 刘洪岐, 陈代杰, 邵雷, 谭俊. 健康成人粪便中双歧杆菌的分离鉴定及其发酵乳体内特性研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(1): 33-38.
- ZHANG XD, ZHUANG WQ, LI ZL, LIU Q, LIU HQ, CHEN DJ, SHAO L, TAN J. Isolation and identification of *Bifidobacterium* from adult faeces and its characteristic of fermented milk *in vivo*[J]. China Brewing, 2021, 40(1): 33-38 (in Chinese).
- [23] MAKINO H, KUSHIRO A, ISHIKAWA E, MUYLAERT D, KUBOTA H, SAKAI T, OISHI K, MARTIN R, AMOR KB, 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.
- [24] DURANTI S, LUGLI GA, MANCABELLI L, TURRONI F, MILANI C, MANGIFESTA M, FERRARIO C, ANZALONE R, VIAPPIANI A, van SINDEREN D, VENTURA M. Prevalence of antibiotic resistance genes among human gut-derived bifidobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(3): e02894-e02816.
- [25] 赵芳. 双歧杆菌抗生素耐药性分析及转移风险评估[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020.
- ZHAO F. Antibiotic resistance analysis and metastasis risk assessment of *Bifidobacterium*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [26] CAO L, CHEN H, WANG Q, LI B, HU Y, ZHAO C, HU Y, YIN Y. Literature-based phenotype survey and in silico genotype investigation of antibiotic resistance in the genus *Bifidobacterium*[J]. Current Microbiology, 2020, 77(12): 4104-4113.
- [27] The HC, Minh NNC, Hong CTT, Nguyen TNT, Pike LJ, Zellmer C, Duc TP, Tran TA, Thanh TH, Van MP, Thwaites GE, Rabaa MA, Hall LJ, Baker S. Exploring the genomic diversity and antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* in a vietnamese population[J]. Microbiology spectrum, 2021, 9(2): e00526-21.
- [28] 潘琳, 郭慧玲, 李丽娜, 张文羿, 陈永福, 孟和毕力格. 双歧杆菌分离株的耐药性评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 218-227.
- PAN L, GUO HL, LI LN, ZHANG WY, CHEN YF, MENG H. Antibiotic resistance in *Bifidobacterium* isolates[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(11): 218-227 (in Chinese).
- [29] XIAO JZ, TAKAHASHI S, ODAMAKI T, YAESHIMA T, IWATSUKI K. Antibiotic susceptibility of bifidobacterial strains distributed in the Japanese market[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(2): 336-342.
- [30] GOSALBES MJ, VALLÈS Y, JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ

- N, BALLE C, RIVA P, MIRAVET-VERDE S, de VRIES LE, LLOP S, AGERSØ Y, SØRENSEN SJ, BALLESTER F, FRANCINO MP. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples[J]. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2016, 7(1): 35-44.
- [31] KOZAK K, CHARBONNEAU D, SANOZKY-DAWES R, KLAENHAMMER T. Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breast milk and their infants[J]. *Gut Microbes*, 2015, 6(6): 341-351.
- [32] ZHANG L, KINKELAAR D, HUANG Y, LI YL, LI XJ, WANG HH. Acquired antibiotic resistance: are we born with it?[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7134-7141.
- [33] FARRA A, FRANK T, TONDEUR L, BATA P, GODY JC, ONAMBELE M, RAFAÏ C, VRAY M, BREUREC S. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in healthy children in Bangui, Central African Republic[J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2016, 22(10): 891.e1-891891.e4.
- [34] LI WZ, TAPIAINEN T, BRINKAC L, LORENZI HA, MONCERA K, TEJESVI MV, SALO J, NELSON KE. Vertical transmission of gut microbiome and antimicrobial resistance genes in infants exposed to antibiotics at birth[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2021, 224(7): 1236-1246.
- [35] GONZALEZ-PEREZ G, HICKS AL, TEKIELI TM, RADENS CM, WILLIAMS BL, LAMOUSÉ-SMITH ESN. Maternal antibiotic treatment impacts development of the neonatal intestinal microbiome and antiviral immunity[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2016, 196(9): 3768-3779.
- [36] 刘桂扬, 陈华海, 王欣, 顾青, 尹业师. 双歧杆菌抗生素耐药性研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(3): 360-364.
- LIU GY, CHEN HH, WANG X, GU Q, YIN YS. Advances in research on antibiotic resistance of *Bifidobacteria*[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2019, 31(3): 360-364 (in Chinese).