

3个不同地区母婴粪便来源嗜黏蛋白阿克曼菌的分离及其体外益生特性分析

万开瑞¹, 孟凡姝¹, 陈丽澜¹, 田丰伟², 黄丽丽^{1,*}, 倪永清^{1,*}

(1.石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832003; 2.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:本研究采用改良的黏蛋白富集培养基结合实时聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)检测了48份母婴粪便样品,优化了分离效果,从8份阳性样品中分离纯化到24株嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, *Akk*)。基于16S rRNA基因测序以及*Akk*菌株特异引物PCR扩增结果,24株菌全部隶属于*Akk*。基因外重复回文序列PCR遗传指纹图谱可将24株菌划分为4个基因型小群。同时对24株菌的模拟胃肠液耐受能力、疏水性、抗生素敏感性、聚糖利用能力进行体外检测。结果显示,菌株HN18D-1、HN18D-3、WW48D1-13对模拟胃、肠液耐受性最高。所有*Akk*分离株对万古霉素、克林霉素、卡那霉素和红霉素具有一定的耐药性,低聚木糖、大豆低聚糖对*Akk*菌株具有益生元效应。综合以上各项体外益生特性,*Akk*分离株HN18D-1、HN18D-3、WW48D1-13可作为潜在益生菌菌株进行后续系统的研究。

关键词:嗜黏蛋白阿克曼菌; 16S rRNA; 分离株鉴定; 益生特性

Isolation and *in Vitro* Probiotic Characteristics of *Akkermansia muciniphila* from Maternal and Infant Feces in Three Different Regions

WAN Kairui¹, MENG Fanshu¹, CHEN Lilan¹, TIAN Fengwei², HUANG Lili^{1,*}, NI Yongqing^{1,*}

(1. Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, a combination of an improved mucin enriched medium with real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) was used to test 48 samples of maternal and infant feces for *Akkermansia muciniphila* (*Akk*). Under optimized conditions, 24 *Akk* strains were isolated from eight positive samples. All these strains were confirmed as *Akk* by 16S rRNA gene sequencing and PCR with *Akk*-specific primers. Repetitive extragenic palindrome-polymerase chain reaction (rep-PCR) fingerprinting classified the 24 strains into four genotypic groups. Subsequently, these strains were tested *in vitro* for simulated gastrointestinal fluid tolerance, hydrophobicity, antibiotic susceptibility, and glycan utilization capacity. The results showed that strains HN18D-1, HN18D-3, and WW48D1-13 had the highest tolerance to simulated gastric and intestinal fluids. All *Akk* strains were resistant to vancomycin, clindamycin, kanamycin and erythromycin. Xylooligosaccharides and soybean oligosaccharides had prebiotic effects on the *Akk* strains. Collectively, *Akk* isolates HN18D-1, HN18D-3 and WW48D1-13 can be used as potential probiotic candidates for subsequent in-depth studies.

Keywords: *Akkermansia muciniphila*; 16S rRNA; isolate identification; probiotic characteristics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230505-030

中图分类号: Q938

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)02-0195-08

引文格式:

万开瑞, 孟凡姝, 陈丽澜, 等. 3个不同地区母婴粪便来源嗜黏蛋白阿克曼菌的分离及其体外益生特性分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 195-202. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230505-030. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-05-05

基金项目: 第八师石河子市科技专项(2020PT01); NSFC-新疆联合基金重点项目(U1903205);

新疆生产建设兵团科技创新团队项目(2020CB007)

第一作者简介: 万开瑞(1995—)(ORCID: 0009-0005-2577-6002), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与发酵。

E-mail: 346396043@qq.com

*通信作者简介: 黄丽丽(1990—)(ORCID: 0000-0001-8811-0922), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。

E-mail: huanglili@shzu.edu.cn

倪永清(1969—)(ORCID: 0000-0003-4876-589X), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。

E-mail: niyqlzu@sina.com

WAN Kairui, MENG Fanshu, CHEN Lilan, et al. Isolation and *in vitro* probiotic characteristics of *Akkermansia muciniphila* from maternal and infant feces in three different regions[J]. Food Science, 2024, 45(2): 195-202. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20230505-030. <http://www.spkx.net.cn>

嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, *Akk*) 被认为是专性共栖于人类和高等动物肠道黏膜层的一种严格厌氧的革兰氏阴性菌, 分类上隶属于疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)^[1]。其最显著的特征是生长于肠道黏液层中, 专性利用黏液层中的黏蛋白作为碳、氮源和能源而生存。此外, *Akk*菌株能利用母乳寡糖作为底物生长。研究发现, *Akk*菌株对维持肠道黏膜层的厚度、保护肠道屏障的完整性、通过生态位竞争抵御外来病原体在肠道的定植发挥重要作用^[2]。动物和临床研究显示, *Akk*菌株对缓解炎症性肠病^[3]、肥胖^[4]、糖尿病^[5]、心血管疾病^[6]、酒精性脂肪肝^[7]等有明显效果, 目前在功能食品、医药等领域被认为是极具开发价值的新一代益生菌而备受关注。根据文献报道, *Akk*在人类十二指肠 (0.068 8%)、回肠 (0.038 7%)、空肠内容物 (0.01%) 中的丰度很低; 而在结肠和直肠黏膜层中分布更多的杯状细胞, 分泌大量的黏蛋白, *Akk*的丰度相对较高^[8]。

目前, 由于直接从人类小肠、大肠肠道内容物、黏液层取样较为困难, 一般通过粪便进行取样, 而粪便中 *Akk*菌株的丰度很低, 故大多以粪便作为菌株分离来源的研究, 其报道结果差异极其悬殊。此外, 由于 *Akk*菌株严格厌氧、离体生长条件要求苛刻、生长缓慢, 使其在固体培养基上难以与粪便中其他革兰氏阳性菌株竞争生长。截至目前, 从人群粪便中直接分离得到 *Akk*菌株仍然是研究开发该菌株的关键性挑战, 使得相关研究工作受到限制^[9]。关于 *Akk*菌株的模式动物实验、临床试验, 多数研究依然针对模式菌株 *A. muciniphila* Muc^T (ATCC BAA-835) 开展。最近多个研究发现, 肠道中 *Akk*种群存在显著遗传差异和多样生理特性。有报道显示, 人肠道中至少有 8 个不同的 *Akk*亚型, 菌株之间的 16S rRNA 序列相似性最低 95%。采用 188 个分离菌株基因组和 2 226 个宏基因组组装基因组, 对 *Akk*进行了大规模基因组学分析, 重建系统发育树显示, 人源 *Akk*菌株很可能分为 5 个不同的候选亚种; 其中 *Akk*分为 4 个亚种, 具有不同的宿主偏好和功能特征^[10]。但是, 目前没有得到其他亚种或基因型的可培养物。

鉴于目前全球各地区人群 *Akk*菌株的研究报道, 了解中国人群肠道中 *Akk*菌株的多样性和分布状况, 开发新的有潜力、适合于中国人群的新一代益生菌很有必要。本研究收集我国新疆和田、海南昌江、甘肃武威人群的粪便样品, 探究粪便样本 *Akk*菌株分离的有效方法, 初步揭示 *Akk*菌株在宿主人群中的分布差异, 分析 *Akk*菌株的遗传多样性与体外益生特性。旨在为进一步研究 *Akk*菌株与

不同区域宿主人群的健康关系、开发本土化的益生菌奠定前期基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品

2019年11月至2020年9月采集健康的母婴人群粪便样品共48份 (新疆和田、海南昌江、甘肃武威8对各16份)。标记好样品后保存于-18℃的车载冰箱3d内运回实验室, 同时详细调查并记录采集对象的信息, 包括年龄、体质量、饮食习惯、抗生素使用情况等。每位参与者签署了知情同意书, 本项研究通过石河子大学医学院第一附属医院医学伦理委员会审核。

1.1.2 培养基与试剂

改良的富集培养基 (1 L)^[11]: 脑心浸出液肉汤 (brain heart infusion, BHI) 38.5 g、黏蛋白4.0 g、L-苏氨酸5.0 g、N-乙酰-D-氨基葡萄糖5.0 g、大豆蛋白胨16.0 g、葡萄糖11.3 g、L-半胱氨酸0.5 g、吐温80 1.0 mL。

改良BHI培养基 (1 L)^[12]: BHI 38.5 g、黏蛋白4.0 g、L-半胱氨酸0.5 g、万古霉素0.005 g。

益生元培养基 (1 L)^[11]: 大豆蛋白胨32.0 g、苏氨酸6.0 g、N-乙酰-D-氨基葡萄糖6.0 g、氯化钠5.0 g、磷酸氢二钾2.5 g、黏蛋白4.0 g、吐温80 1.0 mL、L-半胱氨酸0.5 g、益生元8.0 g。

*Akk*模式菌株 广东省微生物菌种保藏中心 (ATCC BAA-835); BHI 青岛海博生物技术有限公司; 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) Master Mix、ddH₂O 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Marker 天根生化科技 (北京) 有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

DG520厌氧培养箱 英国Don Whitley Scientific公司; Fresco21高速冷冻离心机 德国Thermo公司; Multiskan FC酶标仪 美国赛默飞世尔科技有限公司; TC-512 PCR仪 英国Techne公司; Gel DOC XR凝胶成像系统、PowerPac Universal水平电泳仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 对不同母婴阳性样品的筛选和*Akk*菌株的分离

取1 g粪便样品, 用含有5% L-半胱氨酸的生理盐水稀释至10⁻²、10⁻³、10⁻⁴, 混匀后吸取500 μL, 加入4.5 mL

改良的富集培养基中,置于37℃厌氧箱中富集培养4 d。根据翟齐啸等^[13]的方法提取样品总DNA,采用特异性引物(AM1: 5'-CAGACGTGAAGGTGGGGAC-3'; AM2: 5'-CCTTGC GGTTGGCTTCAGAT-3')进行实时PCR(real-time PCR)扩增阳性率检测。反应体系: 2×PCR Master Mix 5.0 μL、AM1 0.5 μL、AM2 0.5 μL、样品DNA 2.0 μL,补充ddH₂O至10.0 μL。扩增条件: 95℃预变性5 min后,35个循环(95℃变性30 s,59℃退火30 s,72℃延伸1 min),最后72℃延伸10 min^[14]。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶检测,选择与Akk模式菌株(ATCC BAA-835)扩增产物条带一致的阳性扩增样品进行固体平板的分离培养。样品同样进行梯度稀释后,取100 μL菌悬液均匀涂布于改良BHI培养基平板上,按照上述条件厌氧培养4~5 d。

1.3.2 Akk菌株的筛选和鉴定

挑取直径在1 mm以内、乳白色、黏稠状菌落,连续转接2次重新划线在固体平板上,每次培养72 h,最后挑取单菌落,镜检至纯菌株后,接种于液体BHI改良培养基中,培养5~7 d。根据上述方法提取筛选菌株的DNA,再次用Akk特异引物进行PCR扩增,鉴定并选择阳性菌株,送至金唯智生物科技有限公司进行16S rRNA基因测序,测序结果提交至GenBank数据库中进行序列同源比对(BLAST),并用MEGA 7.0软件构建系统进化树。

1.3.3 基于基因外重复回文序列PCR(repetitive extragenic palindrome-PCR, rep-PCR)指纹图谱的遗传差异分析对Akk菌株的筛选

将上述获得分离菌株的DNA采用通用引物(GTG)₅和BOXAir扩增,进行rep-PCR指纹分型分析,参照魏小晶等^[15]的扩增条件,所有反应在25 μL体系中进行,其中: PCR Master Mix 12.5 μL,引物(GTG)₅或BOXAIR 1 μL, DNA模板2 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR扩增产物上样至1.6 g/120 mL的琼脂糖凝胶,在1×TAE Buffer中100 V电泳2 h后,用紫外凝胶成像仪观察结果并拍照保存,采用GelCompar v8.0软件进行指纹图谱聚类分析。

1.3.4 筛选Akk菌株的体外益生特性分析

1.3.4.1 菌株的模拟胃液耐受性

参考魏小晶等^[15]的方法略有改动,用盐酸将蒸馏水pH值调节至3.5,加入胃蛋白酶,使其终质量浓度为10 mg/mL,过滤除菌得到模拟胃液。0.68 g KH₂PO₄溶于50 mL蒸馏水中,pH值调节至7,在加入胰蛋白酶1 g后,定容至100 mL,过滤除菌得到模拟肠液。将菌液培养24 h后,按体积比1:10混合于模拟胃液中,37℃恒温厌氧静置培养,4 h后稀释并进行平板涂布及菌落计数。在模拟胃液中作用4 h后的混合液进一步以1:10的体积比混合于模拟肠液中,在4 h后稀释后平板涂布菌落计数。将菌液加入未经处理的无菌磷酸盐缓冲液中进行对照。每组3个平行,按式(1)计算存活率:

$$\text{存活率}/\% = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: N_1 为模拟胃液或肠液处理后的活菌数/(CFU/mL); N_0 为对照中的活菌数/(CFU/mL)。

1.3.4.2 菌株的疏水性

通过测定细菌对碳氢化合物的黏附能力可以反映其疏水性,基于Cozzolino等^[16]方法使用二甲苯对细菌进行黏附能力实验,并进行修改。将Akk菌株过夜培养24 h后,洗涤2次并重新悬浮在磷酸缓冲液中,以达到 0.50 ± 0.05 的吸光度($A_{600 \text{ nm}}$)。然后将细菌悬浮液和二甲苯等量混合,两相系统彻底混合后在室温下孵育15 min和60 min,取水相,使用酶标仪测量其在600 nm波长处的吸光度。设置3个平行,按式(2)计算Akk菌株对二甲苯的亲合力(疏水性):

$$\text{疏水性}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 、 A_1 分别为试剂混匀前后菌液在600 nm波长处的吸光度。

1.3.4.3 抗生素敏感实验

根据Das等^[17]方法对分离出来的Akk菌株进行8种抗生素药敏实验,采用纸片琼脂扩散法,将活化好的Akk菌株悬液均匀涂布于改良BHI琼脂平板表面,将药片贴于其上,37℃倒置厌氧培养72 h,检测抑菌圈半径,每种抗生素做3个平行,抑菌圈直径平均值用TB-tools软件作图。本实验选择使用万古霉素(30 μg)、红霉素(15 μg)、氯霉素(30 μg)、卡那霉素(30 μg)、庆大霉素(120 μg)、克林霉素(2 μg)、链霉素(300 μg)、诺氟沙星(10 μg)8种抗生素。

1.3.4.4 Akk菌株益生元利用实验

在逢晓阳等^[18]方法的基础上,采用含有黏蛋白的益生元培养基对Akk菌株进行益生元利用实验。10种益生元(包括低聚木糖、低聚麦芽糖、低聚半乳糖、棉子糖、果糖、葡萄糖、水苏糖、抗性淀粉、菊糖、脑心浸出液)加入益生元液体培养基中,将待测的Akk菌株在改良BHI培养基中复苏活化,在厌氧工作站中培养24 h后,将复苏活化后菌液以5%接种量接种到益生元培养基中,设置3个平行,以添加葡萄糖作为阳性对照,不添加其他碳源为阴性对照,在600 nm波长处测OD值,测定0 h的OD_{600 nm}为OD₁。37℃厌氧培养72 h,测定OD_{600 nm}为OD₂,最终OD_{600 nm} = OD₁ - OD₂,根据最终OD_{600 nm}用TB-tools软件作热图。

1.3.4.5 Akk菌株抗氧化能力的测定

Akk菌株对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力的测定根据文献[19]方法略有改动。称取0.004 g DPPH,用95%乙醇溶液溶解,定容至100 mL,配制成0.04 mg/mL的DPPH自由

基溶液, 4 °C 避光保存。将前面分离得到的 *Akk* 菌株与 ATCC BAA-835 菌株在改良 BHI 培养基中, 以相同厌氧条件下 37 °C 过夜培养 72 h 后, 将细胞悬浮液在 4 °C 的条件下以 8 000 r/min 离心 8 min, 取其上清液, 将 1 mL 上清液与 1 mL 新鲜配制的 DPPH 无水乙醇溶液混合均匀, 室温放置 30 min, 无水乙醇作为空白调整, 在 517 nm 波长处测定吸光度, 按式 (3) 计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 为 1 mL 无水乙醇 + 1 mL DPPH 自由基溶液的吸光度; A_i 为 1 mL 样品溶液 + 1 mL DPPH 自由基溶液的吸光度; A_j 为 1 mL 样品溶液 + 1 mL 无水乙醇的吸光度。

2 结果与分析

2.1 对不同母婴阳性样品的筛选和 *Akk* 菌株的检测结果
real-time PCR 对 3 个地域 (甘肃武威、新疆和田、海南昌江) 采集的 48 份母婴粪便中 *Akk* 菌株的检测结果表明, 武威母婴人群的 16 份粪便样本阳性率为 31.25% (母亲 3 份、婴儿 2 份), 和田母婴 16 份粪便样本中阳性检测率 75% (母亲 6 份、婴儿 6 份), 昌江母婴 16 份粪便样本中阳性检测率为 37.5% (母亲 3 份, 婴儿 3 份)。48 份样品中, *Akk* 菌株的总体阳性检测率为 47.92%, 其中成年人阳性率为 50%, 婴儿阳性率为 45.83%; 不同地域母婴族群 *Akk* 菌株阳性检测率具有一些差异, 和田母婴 (75%) > 昌江母婴 (37.5%) > 武威母婴 (31.25%), 成年人 > 婴幼儿。

2.2 *Akk* 菌株的分离、筛选、鉴定和遗传差异分析

对 3 个地域母婴来源检测阳性的 23 份粪便样品富集培养, 稀释液平板涂布分离, 根据菌株表型特征, 获得的分离株进行 16S rRNA 基因测序、BLAST 比对后, 24 株分离菌株初步鉴定为 *Akk*, 来自 8 份 *Akk* 菌株检测阳性的粪便样品。但是 real-time PCR 检测阳性率最高的和田粪便样品并没有分离到菌株。选择其中 10 株代表菌株与其他参考菌株构建系统进化树 (图 1), 可以看出分离菌株与 *Akkermansia* 属的 *Akk* 亲缘关系最近, 所有菌株的 16S rRNA 基因与 *Akk* ATCC BAA-835 高度相近, 属于同一个单系的进化分支, 与该属另一个种 *A. glycaniphila* 亲缘关系较远。所有菌株与登录号为 CP048438.1 的 *Akk* JCM30893 相似度达到 99% 以上, 结合 *Akk* 特异引物的 PCR 阳性扩增菌株筛选, 将所有 24 株菌鉴定为 *Akk* 菌株。

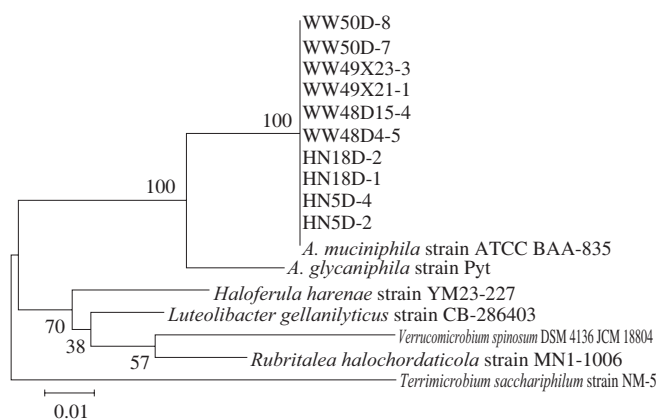


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的 10 株 *Akk* 代表菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 10 representative *Akk* strains based on 16S rRNA gene sequences

选择 18 株代表性 *Akk* 分离菌株和模式菌株 ATCC BAA-835 进行 rep-PCR 指纹图谱聚类分析, 由图 2 可知, 19 株 *Akk* 菌株在 55% 的相似性水平上被分成了 2 个大群、4 个小群: 第 1 群的 4 株分离株和 ATCC BAA-835 的基因型高度相近; 第 2 群的 8 株分离株与第 3 群的 2 株分离株基因型接近, 同属于一个大的分支; 第 4 群的 4 株菌株与隶属于第 2、3 群菌株有一定程度的遗传差异。

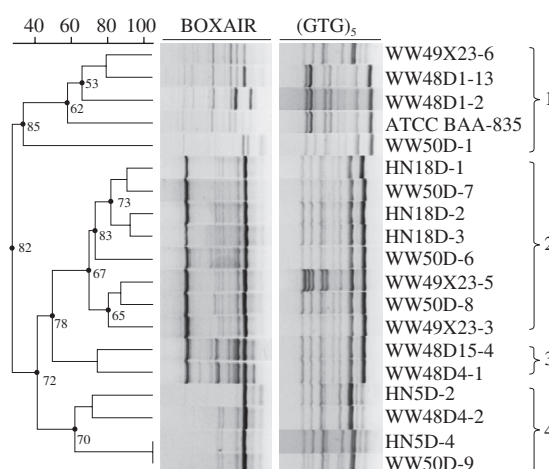


图 2 基于 rep-PCR 对 18 株代表性 *Akk* 的指纹图谱进行聚类

Fig. 2 Clustering of fingerprint profiles of 18 representative *Akk* strains based on rep-PCR

2.3 筛选 *Akk* 菌株的表征特性分析

2.3.1 分离 *Akk* 菌株的模拟胃肠液耐受性

通过模拟胃、肠液计算存活率, 检测分离 *Akk* 菌株的耐受能力, 结果见表 1。除 WW48D4-1 以外, 剩下所有测试菌株都对模拟胃液具有一定程度的耐受力, 但是菌株之间差异显著, 其中菌株 ATCC BAA-835、HN18D-1、HN18D-3、WW49X23-1 具有较好的耐受性, 在经过 4 h 的模拟胃液处理后, 存活率达到 10% 以上, 菌株 WW48D1-13 经处理后存活率为 9.55%。随后进行模拟肠液实验, 菌株 ATCC BAA-835、HN18D-1、HN18D-3、

WW48D1-13、WW48D15-4、WW50D-9在4 h之后仍有1%以上的存活率。综合胃液、肠液耐受性，菌株ATCC BAA-835、HN18D-1、HN18D-3、WW48D1-13对模拟胃液耐受能力最优。

表1 Akk经模拟胃肠液处理后的存活率

Table 1 Survival rates of Akk strains in simulated gastrointestinal fluid

菌株编号	存活率/%	
	模拟胃液	模拟肠液
ATCC BAA-835	12.303±0.221	1.479±0.009
HN18D-1	18.621±4.037	1.820±0.206
HN18D-2	0.132±0.022	0.006±0.001
HN18D-3	12.882±3.213	2.951±0.293
HN18D-4	0.813±0.049	0.191±0.055
HN18D-5	0.013±0.002	<0.000 1
HN18D-6	3.715±1.284	0.110±0.086
WW48D1-13	9.550±3.632	1.738±0.675
WW48D4-53	0.038±0.025	<0.000 1
WW48D1-2	0.043±0.005	<0.000 1
WW48D4-1	<0.000 1	<0.000 1
WW48D15-4	4.467±0.441	1.513±0.371
WW48D4-2	0.036±0.026	<0.000 1
WW48D15-5	1.023±0.731	0.138±0.062
WW49X23-6	0.661±0.190	0.069±0.008
WW49X23-5	0.009±0.002	<0.000 1
WW49X23-3	0.019±0.020	0.009±0.001
WW49X23-1	11.749±3.306	0.447±0.277
WW50D-1	0.032±0.007	0.005±0.002
WW50D-6	0.427±0.265	0.078±0.017
WW50D-7	0.095±0.021	0.032±0.031
WW50D-8	0.058±0.033	<0.000 1
WW50D-9	8.128±3.091	1.047±0.773
HN5D-2	0.068±0.214	0.036±0.005
HN5D-4	0.055±0.014	<0.000 1

2.3.2 分离Akk菌株的疏水性

分离Akk菌株的疏水性结果显示，所有实验菌株都具有疏水性，不同菌株的疏水性有明显差异（图3）。在60 min，模式菌株ATCC BAA-835的疏水性为33.04%，本实验中4株菌株（WW48D15-4、WW48D4-2、WW50D-6、WW49X23-3）的疏水性相对较高，超过40%，有10株分离菌株的疏水性都接近或者高于ATCC BAA-835。

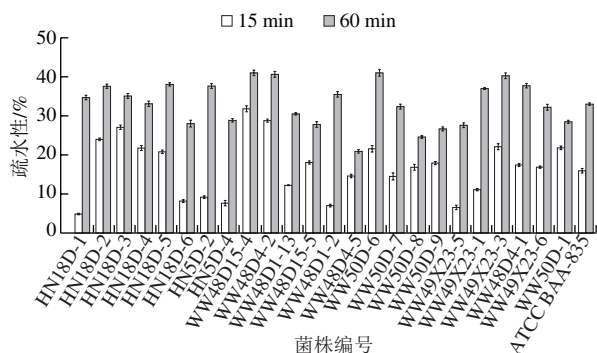


图3 Akk分离株与模式菌株ATCC BAA-835在二甲苯接触15、60 min后的疏水性比较

Fig. 3 Comparison of hydrophobicity of 24 Akk strains with that of the type strain ATCC BAA-835 exposure to xylene for 15 or 60 min

2.3.3 抗生素敏感实验

25株Akk菌株对8种抗生素的敏感性实验采用热图形式显示（图4），颜色梯度（红色、淡红色、黄绿色、灰色、浅蓝色、深蓝色）直观地反映菌株对抗生素的抑菌圈半径依次减小。不同分离株对抗生素敏感性有差异。总体上，所有Akk菌株对4种抗生素（万古霉素、克林霉素、卡那霉素和红霉素）显示了一定程度的耐药性。所有分离株对氯霉素有很高的敏感性，对庆大霉素、链霉素、诺氟沙星的敏感性和文献报道ATCC BAA-835的敏感性相似。

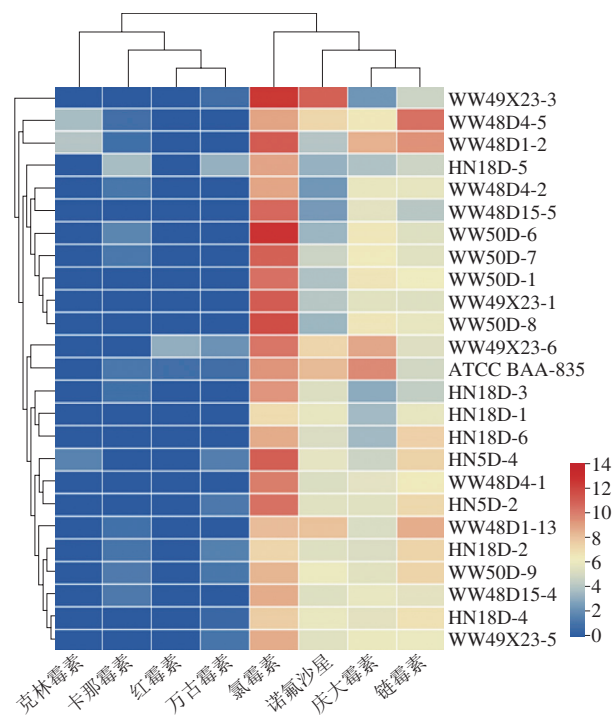


图4 基于抑菌圈半径对25株Akk的抗生素抗性热图分析

Fig. 4 Heatmap analysis of antibiotic resistance to 24 Akk strains and the type strain ATCC BAA-835 based on the radius of inhibition zone

2.3.4 含有黏蛋白的益生元培养基对分离Akk菌株的作用

图5为600 nm波长处吸光度的热图，显示了在黏蛋白培养基中添加各种益生元对分离Akk菌株生长的作用，菌株之间存在差异。以葡萄糖作为阳性对照，培养基添加低聚木糖、大豆低聚糖能够显著促进Akk菌株的生长，其他益生元对Akk菌株的生长促进相对较弱。其中菊糖对菌株WW48D1-2有促进作用外，其他益生元都对其生长促进作用不大。

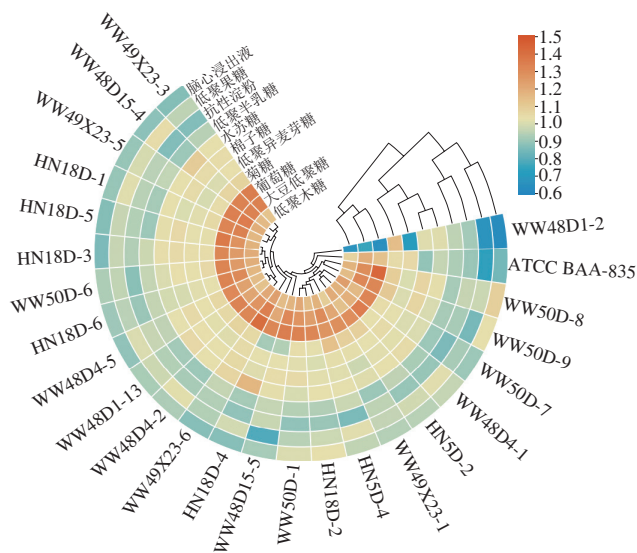


图5 黏蛋白益生元培养基对分离Akk株生长的作用

Fig. 5 Addition of xylooligosaccharides and soybean oligosaccharides to mucin-enriched medium promoted the growth of 24 *Akk* strains

2.3.5 分菌Akk菌株体外抗氧化能力分析

依据遗传差异相近程度,对包括模式菌在内的17株代表性Akk菌株,测试Akk菌株的DPPH自由基清除能力。由图6可知,Akk菌株的DPPH自由基清除能力存在差异,菌株HN18D-1(63.22%)、HN18D-6(57.76%)、WW50D-7(58.91%)、HN50D-4(58.05%)、WW50D-1(57.47%)、WW48D1-11(54.63%)对DPPH自由基清除率都达到50%以上,显示出较好的体外抗氧化特性。

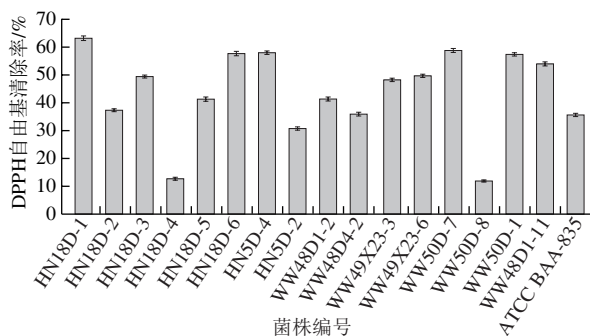


图6 16株Akk代表性菌株与模式菌株ATCC BAA-835体外抗氧化能力比较
Fig. 6 Comparison of *in vitro* antioxidant capacity of 16 representative *Akk* strains with that of the type strain ATCC BAA-835

3 讨论与结论

自2004年第一次从人类粪便中分离得出Akk菌株以来,关于Akk菌株的研究报道逐渐成为热门。尤其发现肠道菌群的变化可导致宿主出现肥胖、2型糖尿病等诸多代谢疾病^[20]。通过小鼠实验证实,肥胖、2型糖尿病的

患病程度和肠道中Akk菌株的丰度呈显著相关,但是其作用机制目前尚不明确^[21]。随着对Akk菌株研究的深入,其在癌症治疗^[22]、缓解结肠炎^[23]、减轻肝损伤^[24]、改善代谢^[25]、治疗渐冻症^[26]、延缓衰老^[27]等方面的巨大潜力逐渐显现。最近,有研究发现灭活的Akk菌株对于改善肥胖人群的代谢功能有显著效果,能够降低体质量^[28]。这些研究极大促进了Akk菌株作为商业化益生菌的可能性。

目前,虽然研究表明结肠和直肠黏膜层中Akk的丰度相对较高,但直接取样人类肠道内容物、黏液层困难很大。粪便中Akk菌株的丰度很低,大多以粪便作为菌株分离来源的研究,其报道结果差异极其悬殊。前期研究根据翟齐啸等^[13]的专利,选择先富集粪便样品,进行初步筛选样品后再进行涂布,成功分离到了Akk菌株。但其富集培养基不仅添加了黏蛋白,而且加入了极复杂的微量组分,操作复杂。本研究以Akk菌株复合培养基为基础,综合文献报道,在富集培养基中除黏蛋白外,还加入了BHI培养基、苏氨酸等促进Akk菌株生长的多个成分,简化了富集培养的步骤,从48份粪便样品的富集液中的8份样品成功分离到Akk菌株。其次,本实验在选择培养过程中加入万古霉素外,同时加入卡那霉素、庆大霉素能够有效抑制粪便中其他竞争性菌株的生长,提高筛选的阳性率。Ouwkerk等^[29]研究发现,纯化后Akk菌株在微量氧气下生长状态更好。但是分离的初步阶段要处于严格厌氧环境,否则粪便中其他微耗氧杂菌生长旺盛,增加纯化的难度。此外,本研究采用富集母婴粪便样品结合real-time PCR检测的方法,显示有近50%的样品检测阳性,但实际上只有8份样品成功分离到菌株。这与翟齐啸等^[13]在7份粪便样品检测出1份阳性,从中分离出9株Akk菌株结果相近,表明取样的粪便样品中Akk菌株存活率较低。

最近多个研究发现,肠道中Akk种群存在显著的遗传差异和多样的生理特性。人肠道中的至少有8个不同的Akk亚型,菌株之间的16S rRNA序列相似性最低95%。分离菌株基因组和宏基因组组装基因组分析显示,人源Akk菌株很可能分有多个不同的候选亚种^[10]。本研究分离的24株菌的16S rRNA基因序列与Akk的模式菌株ATCC BAA-835基本一致,因此全部隶属于Akkermansia属的Akk,与从蟒蛇粪便发现的该属A. glycaniphila亲缘关系较远^[30]。采用rep-PCR遗传指纹图谱技术研究了分离Akk菌株种群的遗传差异,发现可以划分为4个亚群,在分析它们体外表型特征的基础上,后续将对其基因组特征和其他表型开展更详尽的解析。

目前,因分离培养Akk菌株的挑战性,关于Akk分离菌株的体外研究较少,大多以Akk菌株的模式菌株

(ATCC BAA-835)为研究对象。疏水性是一个重要的益生指标,本研究分离的菌株中,13株*Akk*菌株的疏水性都高于模式菌ATCC BAA-835,11株分离株具有中等以上疏水性。几乎所有*Akk*菌株对万古霉素、克林霉素、卡那霉素和红霉素都具有一定程度的耐药性,这与近期关于分离纯化*Akk*菌株的探究中,在培养基中加入万古霉素、卡那霉素、克林霉素可实现有效的选择性分离培养结果一致^[1]。

对目前广泛作为益生元的各种低聚寡糖和多糖能否被*Akk*菌株有效利用的报道较少。有研究表明,给肥胖模型小鼠额外补充低聚果糖,其粪便中*Akk*菌株含量由 10^7 cells/g提高到 10^9 cells/g^[21]。另一研究显示,*Akk*菌株基础培养基中,低聚木糖能作为有效益生元促进*Akk*菌株的生长^[18]。从*Akk*菌株分离的难度,推测各种低聚寡糖和多糖被*Akk*菌株直接利用的效果还很差,有可能存在协同作用,目前机理尚不清楚。本实验基于9种益生元对24株*Akk*菌株分离株的促生长作初步研究,与葡萄糖作为阳性对照相比,大豆低聚糖、低聚木糖能够明显促进*Akk*菌株的生长,但其他益生元效果不明显。尤其需要验证所有低聚糖的纯度,以便确认这两种低聚糖可以作为*Akk*菌株的益生元,在合生元配方或者微胶囊加工中加以组合利用。

综上,本研究针对分离新的*Akk*菌株难度较大的现状,采用改良的黏蛋白富集培养基结合real-time PCR检测粪便样品,优化了分离效果,但即使富集检测阳性的样品也不一定能成功分离到菌株。通过对比*Akk*模式菌株ATCC BAA-835与分离株的疏水性、抗生素敏感性、体外抗氧化特性和益生元利用的性能,得出*Akk*分离株HN18D-1、HN18D-3、WW48D1-13可作为潜在益生菌菌株进行下一步系统的研究。

参考文献:

- [1] BECKEN B, DAVEY L, MIDDLETON D R, et al. Genotypic and phenotypic diversity among human isolates of *Akkermansia muciniphila*[J]. mBio, 2021, 12(3): e00478-21. DOI:10.1128/mBio.00478-21.
- [2] DERRIEN M, VAUGHAN E E, PLUGGE C M, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1469-1476. DOI:10.1099/ijs.0.02873-0.
- [3] ZHANG T, LI Q Q, CHENG L, et al. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic[J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(6): 1109-1125. DOI:10.1111/1751-7915.13410.
- [4] DAO M C, EVERARD A, ARON-WISNEWSKY J, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology[J]. Gut, 2016, 65(3): 426-436. DOI:10.1136/gutjnl-2014-308778.
- [5] ZHANG J, NI Y Q, QIAN L L, et al. Decreased abundance of *Akkermansia muciniphila* leads to the impairment of insulin secretion and glucose homeostasis in lean type 2 diabetes[J]. Advanced Science, 2021, 8(16): e2100536. DOI:10.1002/adv.202100536.
- [6] CANI P D, DE VOS W M. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1765. DOI:10.3389/fmicb.2017.01765.
- [7] RAO Y, KUANG Z Q, LI C, et al. Gut *Akkermansia muciniphila* ameliorates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease by regulating the metabolism of *L*-aspartate via gut-liver axis[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-19. DOI:10.1080/19490976.2021.1927633.
- [8] LUO Y H, LAN C, LI H, et al. Rational consideration of *Akkermansia muciniphila* targeting intestinal health: advantages and challenges[J]. Npj Biofilms and Microbiomes, 2022, 8(1): 81. DOI:10.1038/s41522-022-00338-4.
- [9] CAPUTO A, DUBOURG G, CROCE O, et al. Whole-genome assembly of *Akkermansia muciniphila* sequenced directly from human stool[J]. Biology Direct, 2015, 10: 5. DOI:10.1186/s13062-015-0041-1.
- [10] KARCHER N, NIGRO E, PUNCOCHAR M, et al. Genomic diversity and ecology of human-associated *Akkermansia* species in the gut microbiome revealed by extensive metagenomic assembly[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 209. DOI:10.1186/s13059-021-02427-7.
- [11] PLOVIER H, EVERARD A, DRUART C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice[J]. Nature Medicine, 2017, 23(1): 107-113. DOI:10.1038/nm.4236.
- [12] GUO X, ZHANG J, WU F, et al. Different subtype strains of *Akkermansia muciniphila* abundantly colonize in southern China[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(2): 452-459. DOI:10.1111/jam.13022.
- [13] 翟齐啸, 陈卫, 冯赛赛, 等. 一种阿克曼氏菌特异性筛选培养基及其制备方法和应用: 201811452576.6[P]. 2021-03-26[2023-05-04].
- [14] COLLADO M C, DERRIEN M, ISOLAURI E. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7767-7770. DOI:10.1128/AEM.01477-07.
- [15] 魏小晶, 周桓丞, 靳亚梅, 等. 新疆喀什地区维吾尔族婴幼儿肠道双歧杆菌遗传差异及益生特性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 93-100. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190217-083.
- [16] COZZOLINO A, VERGALITO F, TREMONTE P, et al. Preliminary evaluation of the safety and probiotic potential of *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 in comparison with *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 189. DOI:10.3390/microorganisms8020189.
- [17] DAS P, KHOWALA S, BISWAS S. *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 73: 383-390. DOI:10.1016/j.lwt.2016.06.029.
- [18] 逢晓阳, 吕加平, 提盼盼, 等. 阿克曼氏菌细菌培养基及其制备方法: 201680026054.2[P]. 2022-02-18[2023-05-04].
- [19] CHEN P, ZHANG Q X, DANG H, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity[J]. Food Control, 2014, 35(1): 65-72. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.06.027.

- [20] WEICKERT M O, ARAFAT A M, BLAUT M, et al. Changes in dominant groups of the gut microbiota do not explain cereal-fiber induced improvement of whole-body insulin sensitivity[J]. *Nutrition Metabolism*, 2011, 8: 90. DOI:10.1186/1743-7075-8-90.
- [21] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. *Proceeding of the National Academy of Science*, 2013, 110(22): 9066-9071. DOI:10.1073/pnas.1219451110.
- [22] DEROSA L, ROUTHY B, THOMAS A M, et al. Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Nature Medicine*, 2022, 28(2): 315. DOI:10.1038/s41591-021-01655-5.
- [23] QU S W, FAN L N, QI Y D, et al. *Akkermansia muciniphila* alleviates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis by NLRP3 activation[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e0073021. DOI:10.1128/Spectrum.00730-21.
- [24] XIA J F, LV L X, LIU B Q, et al. *Akkermansia muciniphila* ameliorates acetaminophen-induced liver injury by regulating gut microbial composition and metabolism[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0159621. DOI:10.1128/spectrum.01596-21.
- [25] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Serum metabolite profiling yields insights into health promoting effect of *A. muciniphila* in human volunteers with a metabolic syndrome[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1994270. DOI:10.1080/19490976.2021.1994270.
- [26] BLACHER E, BASHIARDES S, SHAPIRO H, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice[J]. *Nature*, 2019, 572(7770): 474-480. DOI:10.1038/s41586-019-1443-5.
- [27] BARCENA C, VALDÉS-MAS R, MAYORAL P, et al. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(8): 1234-1242. DOI:10.1038/s41591-019-0504-5.
- [28] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1096-1103. DOI:10.1038/s41591-019-0495-2.
- [29] OUWERKERK J P, VAN DER ARK K C H, DAVIDS M, et al. Adaptation of *Akkermansia muciniphila* to the oxic-anoxic interface of the mucus layer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(23): 6983-6993. DOI:10.1128/AEM.01641-16.
- [30] OUWERKERK J P, AALVINK S, BELZER C, et al. *Akkermansia glycaniphila* sp. nov., an anaerobic mucin-degrading bacterium isolated from reticulated python faeces[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(11): 4614-4620. DOI:10.1099/ijsem.0.001399.