内蒙古地区母乳中乳酸菌和双歧杆菌的多样性

徐海燕, 刘亚华, 靳昊, 王佼, 余中节, 刘文俊, 张和平, 孙志宏*

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, 呼和浩特 010018

* 联系人, E-mail: sunzhihong78@163.com

2018-08-03 收稿, 2018-08-30 修回, 2018-08-31 接受, 2018-11-22 网络版发表

国家自然科学基金(31720103911, 31622043)和内蒙古科技重大专项资助

摘要 母乳中存在的乳酸菌和双歧杆菌对婴儿健康有着直接的影响. 本研究从内蒙古呼和浩特市采集了25份母乳样品, 利用乳酸菌和双歧杆菌特异性引物分别扩增样品中乳酸菌的16S rRNA基因v1~v4区和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的*rpsK*基因, 由三代测序技术(Pacific Biosciences (PacBio) single molecule real-time sequencing technology, SMRT)对其扩增产物进行靶序列测定, 采用生物信息学方法全面解析母乳中的乳酸菌和双歧杆菌的组成和结构. 结果发现, 母乳中含有德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、*Lactobacillus gallinarum*、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、轻型链球菌(*Streptococcus mitis*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)等120种乳酸菌以及链状双歧杆菌(*Bifidobacterium catenulatum*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、粪双歧杆菌(*Bifidobacterium stercoris*)和两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)等11种双歧杆菌. 乳酸菌的结构和组成与泌乳阶段显著相关, 而双歧杆菌的结构不随泌乳阶段而改变. 其中, 过渡乳中的德氏乳杆菌($P<0.01$)、植物乳杆菌($P<0.01$)、婴儿链球菌(*Streptococcus infantarius*)($P<0.05$)等乳酸菌的相对含量显著低于初乳和成熟乳, 而初乳中的鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)相对含量显著高于过渡乳和成熟乳($P<0.05$), 过渡乳中的瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)相对含量显著高于其他两个时间段的母乳($P<0.05$). 基于母乳中乳酸菌种水平相对含量的差异, 内蒙古地区的母乳可分为3个类型. 有趣的是, 大部分样品的分型和泌乳阶段有着密切的关系, 88.88%成熟乳属于第Ⅰ型, 75%的过渡乳归为Ⅱ型, 只有初乳被分散在了Ⅰ和Ⅱ两个类型中. 本研究为特定生境中乳酸菌和双歧杆菌多样性研究建立新的方法, 同时为分离筛选适合国人的母乳源益生菌提供了理论基础和指导意义.

关键词 母乳, 乳酸菌, 双歧杆菌, 多样性, 三代测序技术

母乳中除了含有碳水化合物、蛋白质、脂类、维生素等婴儿生长和发育所必需的营养物质之外, 还有很多生物活性因子, 如免疫球蛋白、细胞因子、生长因子、抗炎因子、益生元、益生菌、溶菌酶、乳铁蛋白和其他免疫调节因子等, 这些生物活性物质在婴儿免疫系统的构建和发展、抵抗外源微生物感染、健全代谢功能等方面发挥着重要作用^[1~3]. 最近的一些研究已揭示, 母乳中含有大量的细菌, 是婴儿肠道菌群的直接来源, 母乳喂养有助于婴儿塑造更为健

康的肠道菌群, 因此研究母乳中微生物群落至关重要^[4,5]. 已有研究证实, 母乳中细菌的多样性丰富, 且不同个体间存在明显的差异. 分娩方式、哺乳时间、妊娠期健康状况、母亲体重、饮食等对母乳中细菌的组成和结构都有一定的影响^[3,5,6].

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类发酵碳水化合物产生乳酸的革兰氏阳性细菌的总称, 它并不是分类学概念, 只是一个范畴, 通常包含常见的乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、毛螺

引用格式: 徐海燕, 刘亚华, 靳昊, 等. 内蒙古地区母乳中乳酸菌和双歧杆菌的多样性. 科学通报, 2019, 64: 348–359

Xu H Y, Liu Y H, Jin H, et al. Diversity and composition of lactic acid bacteria and Bifidobacterium in breast milk from mothers living in Inner Mongolia (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 348–359, doi: 10.1360/N972018-00584

菌属(*Lachnospira*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、酒球菌属(*Oenococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、链球菌属(*Streptococcus*)、罗氏菌属(*Roseburia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)等40多个属。而母乳中的大部分乳酸菌和双歧杆菌可以发酵多糖产生有机酸、细菌素等特异性抗菌化合物来改善婴儿胃肠道内的环境,从而抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)等致病菌的生长和繁殖^[7]。近年来,越来越多的研究开始关注母乳中的乳酸菌和双歧杆菌,但是研究结果并不一致。大多数研究表明,母乳作为婴儿肠道有益菌的来源之一,普遍含有乳酸菌和双歧杆菌,但大部分相对含量较低^[8,9];也有研究报道母乳中并没有乳杆菌和双歧杆菌^[10,11]。台湾的一个研究团队,之前基于纯培养的方式在19份母乳中试图分离乳杆菌和双歧杆菌,仅有1份样品中分离得到格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*),并没有分离得到双歧杆菌^[12]。近期他们又基于二代测序技术(Illumina Miseq sequence)测定了33份健康母乳中微生物的组成,只在7份母乳中检出乳杆菌属,而几乎没有检测到双歧杆菌^[13]。但是,近期另一项关于母乳中细菌组成的研究报道发现,尽管双歧杆菌在母乳中相对含量较低,但乳杆菌科的相对含量为6.2%,是优势细菌之一^[14]。总之,关于母乳中乳酸菌和双歧杆菌的研究虽然越来越多,但并没有统一的结果,所以母乳中这些细菌的组成和结构还比较模糊,究其原因可能是因为母乳中确实大部分乳酸菌特别是乳杆菌和双歧杆菌的占比并不是处于绝对的优势地位,甚至含量较低,所以普通的研究方法不能够完全捕获它们,加之各种研究方法的不同导致研究结果存在较大的差异。

基于上述,本研究采用三代测序技术(Pacific Biosciences (PacBio) single molecule real-time sequencing technology, SMRT)的靶向序列(target sequence)测序策略,经过特异性引物扩增目的片段后测序,旨在种水平解析母乳中的乳酸菌和双歧杆菌的多样性,同时试图建立一种新的研究特定生境中乳酸菌和双歧杆菌多样性的方法。

1 材料和方法

(i) 样品来源。本研究母乳样品于2017年12月到2018年3月采集自中国内蒙古呼和浩特市25位健康

志愿者产妇(年龄范围为26~38岁),所有志愿者在妊娠期内未服用任何抗生素或益生菌。人体样本的使用经过内蒙古农业大学批准,所有志愿者均表示同意参加本试验,具体志愿者信息见表1。其中9个志愿者提供了分娩后22~332天的母乳样品,12个志愿者提供分娩后5天以内的母乳,4个志愿者提供了6~9天的母乳样品。另外,母亲的分娩方式包括自然分娩和剖宫产。

(ii) 试剂。OMEGA EZNA@Soil微生物宏基因组DNA提取试剂盒(美国OMEGA公司);KAPA HiFi HotStart ReadyMIX PCR体系试剂(美国KAPA生物系统公司);5×Tris-硼酸电泳缓冲液(TBE, Tris碱54 g、Na₂EDTA·2H₂O 3.72 g、硼酸 27.5 g,定容至1000 mL, pH 8.0),1.0%的琼脂糖胶(1.0 g琼脂糖溶于100 mL

表1 参与试验志愿者信息

Table 1 The information of experimental volunteer

样品编号	年龄(岁)	分娩胎次	分娩方式	泌乳时间(分娩后的第几天)
MR1	26	一胎	剖宫产	第4天
MR2	31	二胎	剖宫产	第2天
MR3	29	一胎	剖宫产	第5天
MR4	38	二胎	自然分娩	第22天
MR5	29	一胎	自然分娩	第2天
MR6	30	二胎	剖宫产	第9天
MR7	35	二胎	剖宫产	第6天
MR8	31	一胎	剖宫产	第5天
MR9	33	二胎	剖宫产	第2天
MR10	29	二胎	剖宫产	第3天
MR11	30	一胎	剖宫产	第6天
MR12	37	二胎	自然分娩	第332天
MR13	31	二胎	自然分娩	第31天
MR14	35	二胎	剖宫产	第4天
MR15	27	一胎	剖宫产	第3天
MR16	38	二胎	自然分娩	第76天
MR17	31	二胎	自然分娩	第154天
MR18	28	一胎	剖宫产	第3天
MR19	29	一胎	剖宫产	第148天
MR20	29	一胎	自然分娩	第32天
MR21	31	一胎	剖宫产	第4天
MR22	32	二胎	剖宫产	第5天
MR23	29	二胎	自然分娩	第31天
MR24	28	一胎	剖宫产	第7天
MR25	31	一胎	自然分娩	第239天

0.5×TBE缓冲液)(天津基准化学试剂公司); SMRT建库试剂盒(DNA Template Prep Kit 1.0)、测序试剂(DNA/Polymerase Binding Kit P6 v2和DNA Sequencing Bundle 4.0)(美国太平洋生物科学公司)。

(iii) 引物. 本试验采用三代测序技术的靶序列测序模式完成母乳中乳酸菌和双歧杆菌的测定, 首先通过特异性PCR引物捕获乳酸菌16S rRNA基因的v1~v4区和双歧杆菌的*rpsK*基因, 进而构建测序文库来准确测定样品中的乳酸菌和双歧杆菌. 因此特别使用内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室设计的乳酸菌和双歧杆菌特异性引物, 分别对母乳样品中的乳酸菌和双歧杆菌进行特异性扩增, 引物序列信息见表2。

其中乳酸菌引物设计涵盖母乳中最为常见的乳酸菌这一范畴内的7个菌属, 乳杆菌属、链球菌属、魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属、片球菌属、肠球菌属和肠膜明串珠菌属的443个菌种. 具体设计步骤: (1) 从LPSN(<http://www.bacterio.net/>)查询这443个菌种的模式菌株, 之后通过NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)下载模式菌株的16S rRNA基因序列. (2) 将模式菌株的16S rRNA基因序列用Mega 6.0进行一致性比对, 找出共有序列(为了更为准确地鉴定到种水平, 尽可能找较长的共有序列, 目标序列长度>400 bp), 共有序列约位于16S rRNA基因序列的v1~v4区. (3) 基于共有序列使用Primer 5设计乳酸菌特异性引物. 双歧杆菌属引物设计下载目前NCBI所有已上传全基因组序列的58个种的模式菌株的全基因组序列, 同样采用Mega 6.0进行一致性比对, 找出共有序列片段, 这段共有序列包含了核心基因*rpsK*基因, 然后基于共有序列使用Primer 5设计双歧杆菌属的特异性引物。

(iv) 仪器与设备. SMRT RS II测序平台(美国Pacific Biosciences公司); ML-30L型全自动高压蒸汽灭菌器(日本三洋公司); Applied Biosystems PCR仪

(美国应用生物系统公司); ND-1000型微量紫外分光光度计(美国赛默飞科技公司); HWS24型恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); CDS8000型UPV凝胶成像分析系统(上海赛智创业科学公司); Eppendorf 5810R高速冷冻离心机(德国艾本德公司); Qubit 2.0(美国生命技术有限公司)。

(v) 样品采集. 所有志愿者产妇手动收集母乳5~15 mL于无酶无菌离心管中, 用封口膜将采样管管口封好, 之后迅速置于液氮中冷冻, 置于厌氧罐中, 用4℃便携式冰箱将母乳样品转移到内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 4 h内进行预处理并提取DNA。

(vi) 母乳样品中细菌DNA提取. 取2 mL母乳样品充分混匀, 采用OMEGA EZNA®Soil试剂盒, 依照说明书的提取步骤抽提样品中细菌DNA, 之后将提取的DNA选用1.0%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检验DNA的完整度、纯度以及浓度, 将符合后续试验要求的DNA置于-80℃冰箱, 备用。

(vii) 乳酸菌和双歧杆菌靶序列扩增. 25个样品的细菌DNA的乳酸菌和16个样品DNA的双歧杆菌靶序列被扩增(有9个样品的DNA由于母乳采集到的体积较少, DNA在完成乳酸菌的PCR后就已经用完, 所以双歧杆菌只有16个样品可用). 其中, 将上述提取的DNA作为模板, 扩增引物用表2所述引物, 且引物的5'端添加不同的识别标签序列(barcode), 按照专利中所述的扩增条件分别对样品中乳酸菌和双歧杆菌进行PCR扩增, 即PCR程序设置为: 95℃预变性1 min; 95℃变性30 s, 60℃退火40 s, 72℃延伸1 min, 共循环28次; 72℃终端延伸7 min, 4℃终止. 具体扩增体系如表3所示。

(viii) 文库构建和PacBio SMRT II三代测序. 每个样品的PCR产物经AMPure beads纯化后用PacBio SMRT II测序平台配套试剂盒构建文库, 根据厂商提供的说明书按照如下步骤进行: (1) 将扩增产物纯化

表2 特异性引物信息

Table 2 The information of specific primers

目标细菌	引物名称	引物序列	靶序列片段长度(bp)	扩增基因	专利申请号
乳酸菌	Lab-6F	5'-GCTCAGGAYGAACGCGYGG-3'	750	16S rRNA基因v1~v4区	201711456825.4
	Lab-6R	5'-CACCGCTACACATGRADTTC-3'			
双歧杆菌属	Bif-6F	5'-GGTAAGAGTCGGACGCTGTGCAATAA-3'	625	<i>rpsK</i> 基因	正在申请中
	Bif-6R	GAAAGAAGAAGGCCACCAAGTAA			

表 3 聚合酶链式反应扩增条件

Table 3 The condition of polymerase chain reaction amplification

体系	剂量(μL)
KAPA HiFi HotStart ReadyMIX PCR体系试剂	25
正向引物(10 pmol/ μL)	1.0
反向引物(10 pmol/ μL)	1.0
基因组DNA模板(100 ng/ μL)	1.5
ddH ₂ O	补充至50

后每10个样品等质量混合, 其中一个文库混入11个样品, 但是都保证每个样品一个独特的barcode, 之后再AMPure beads纯化, 纯化后取2 μg 作为建库的模板DNA, 首先进行End repair修复. (2) 将修复后的DNA用AMPure beads纯化, 去掉修复失败的DNA, 然后加接头, 形成环状的DNA文库. (3) 在文库中加入Exo酶切掉建库失败的DNA, 最后再用AMPure beads纯化, 获得高质量的DNA环状文库. 将构建好的文库, 加测序引物和聚合酶后, 使用PacBio SMRT II仪器采用Diffusion的方式进行测序.

(ix) 生物信息学分析. 使用RS_ReadsOfinsert.1对原始序列进行质控, 只保留符合以下标准的序列: (1) 插入片段重复测序的次数 ≥ 5 ; (2) 最小预测精确度为90%; (3) 乳酸菌的最短插入序列长度为650 nt, 双歧杆菌最短插入序列为600 nt; (4) 乳酸菌最长序列长度为850 nt, 双歧杆菌最长序列为800 nt. 符合以上标准的序列定义为高质量的序列, 根据每个样品的标签序列将原始序列划分到每个样品中并应用QIIME平台(v1.70)对高质量的序列进行生物信息学分析, 主要分析步骤详见文献[15]中所述, 其中, 唯一不同的是, 双歧杆菌比对数据库和乳酸菌的不同. 因为双歧杆菌扩增的目的片段为*rpsK*基因, 基于双歧杆菌基因组提取目的片段的方式构建了双歧杆菌数据库, 涵盖了目前已经测得基因组的双歧杆菌的58个种, 具体基因组信息见表S1. 其他生物信息学分析与乳酸菌过程相同.

(x) 数据处理. 全部统计学分析是利用R语言(v3.3.2), 基于Wilcoxon秩和检验检测不同分组样品中乳酸菌和双歧杆菌的种属差异, 斯皮尔曼(Spearman)相关系数被计算来分析样品中乳酸菌和双歧杆菌的相关关系. 全部图由Graphpad 6.0和R语言软件(v3.3.2)完成.

(xi) 核酸序列登录号. 本试验所有测序数据上

传到MG-RAST数据库(<http://metagenomics.anl.gov/>), 项目号为mgp86051.

2 结果

2.1 测序质量评估

基于乳酸菌特异性引物的PacBio SMRT测序测定25份母乳样品, 我们共获得了94174条序列, 经过质控后保留高质量序列92608条(范围: 1133~8123, 平均值为3704, SD=2147). 其中剔除非特异性序列(不属于乳酸菌的序列)6818条后, 保留乳酸菌序列85790条(乳酸菌序列占比为92.64%), 平均每个样本序列数为 3431 ± 2122 条. 这些属于乳酸菌的序列按照97%的相似性阈值被划分了16701个操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs), 平均每个样本的OTUs数为 1077 ± 508 个, 详见表4. 同样地, 基于双歧杆菌特异性引物扩增后, 测定了16份母乳样品共获得90890条优质的双歧杆菌属序列, 平均每个样本双歧杆菌的序列数为 5681 ± 1349 条. 按照97%的相似性阈值划分了25984个OTUs, 每个样本双歧杆菌OTUs数目为 1624 ± 323 (表4). 为了评估测序深度是否覆盖了全部样品中绝大多数的乳酸菌和双歧杆菌, 分别绘制了每个样品的乳酸菌和双歧杆菌香农指数(Shannon diversity index)图谱(图S1), 全部样品香农曲线已进入或接近平台期, 说明当前测序量已经覆盖了样品中大部分乳酸菌和双歧杆菌的多样性, 满足后续分析要求.

2.2 乳酸菌和双歧杆菌的组成分析

25个母乳样品基于乳酸菌靶序列测序共鉴定到14个乳酸菌属, 其中优势的乳酸菌包括乳杆菌属、链球菌属和葡萄球菌属, 平均相对含量分别为79.39%, 12.76%和5.15%. 另外11个菌属分别是乳球菌属(1.38%)、肠球菌属(0.77%)、肠膜明串珠菌属(0.19%)、魏斯氏菌属(0.14%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 0.12%)、瘤胃球菌属(0.03%)、气球菌属(*Aerococcus*, 0.03%)、片球菌属(0.02%)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*, 0.02%)、孪生球菌属(*Gemella*, 0.005%)以及肉食杆菌属(*Carnobacterium*, 0.003%)(图1(a)). 在种水平, 发现了120个乳酸菌的种, 德氏乳杆菌占比最高且检出率为100%(25个样品中均检出), 平均相对含量达到49.96%. 另外大于1%的菌种还有植物乳杆菌(9.14%)、

表4 测序深度评估^{a)}Table 4 The evaluation of sequencing depth^{a)}

样品编号	乳酸菌		双歧杆菌	
	序列数	OTU数目	序列数	OTU数目
MR1	1231	534	5061	1746
MR2	2422	845	5035	1402
MR3	1575	603	5064	1583
MR4	1571	631	5689	1590
MR5	1503	494	×	×
MR6	1998	447	×	×
MR7	2332	910	6036	1796
MR8	2717	830	3473	1170
MR9	1114	459	6271	1694
MR10	2008	666	×	×
MR11	2545	782	×	×
MR12	2732	966	×	×
MR13	3692	1206	4082	1101
MR14	7907	1664	7150	1891
MR15	3835	1475	6122	1744
MR16	3668	1112	6056	1500
MR17	3429	1326	×	×
MR18	1086	487	4443	1378
MR19	5206	1789	8859	2482
MR20	7776	1810	4605	1446
MR21	4353	1530	7387	1865
MR22	2753	1106	×	×
MR23	5794	1704	×	×
MR24	8303	2215	5557	1596
MR25	4240	1346	×	×

a) “×”表示没有样品被测序

Lactobacillus gallinarum(8.14%)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*, 4.33%)、表皮葡萄球菌(4.18%)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*, 4.08%)、副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*, 2.95%)、鼠李糖乳杆菌(2.56%)、轻型链球菌(1.99%)、唾液链球菌(1.98%)以及乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, 1.35%), 其中只有植物乳杆菌、*Lactobacillus gallinarum*、发酵乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和唾液链球菌的检出率也为100%, 而副干酪乳杆菌等占比较高的乳酸菌的检出率为96%(24/25). 轻型链球菌的检出率为80%(20/25). >0.1%且<1%的菌种包括粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、类食品乳杆菌(*Lactobacillus paralimentarius*)、头状葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)、溶血性

葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和副血链球菌(*Streptococcus parasanguinis*), 它们在样品中的分布情况见图1(b), 其中类食品乳杆菌和头状葡萄球菌虽然平均相对含量分别仅占0.4%和0.2%, 但检出率分别达到84%(21/25)和92%(23/25), 此外大部分相对含量较高的乳酸菌检出率也较高, 平均相对含量较低特别是低于0.1%的菌种只出现在少数个别样品中.

同时, 母乳中共检测到11个双歧杆菌种. 其中链状双歧杆菌(49.88%)、长双歧杆菌(28.88%)、粪双歧杆菌(15.44%)和两歧双歧杆菌(3.42%)是优势种, 检出率都为100%(16/16). 另外, 除了假长双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudolongum*)和*Bifidobacterium mongoliense*只在1个样品中被检测到, 其他如青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*, 0.62%)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*, 0.41%)和*Bifidobacterium kashiwanohense*(0.35%)几个种虽然含量较低, 但是检出率也为100%(图1(c)).

2.3 乳酸菌和双歧杆菌的群落结构分析

为了确定哪些因素影响母乳中乳酸菌的结构, 基于多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)评估了泌乳阶段、分娩方式和母亲分娩的胎次对乳酸菌结构的影响, 结果发现, 泌乳阶段是唯一显著影响母乳中乳酸菌结构的因素($F=1.99$, $P=0.01$)(图2(a)). 进一步基于Bray-Curtis 距离的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)显示, 25份母乳样品大致聚为3个类群, 虽然有个别样品出现交叠现象, 但是大部分样品是按照泌乳阶段聚类的. 即分娩5天内采集的母乳聚为一类, 定义为初乳; 分娩后6~14天采集的母乳为过渡乳, 聚为一类; 15天以上的母乳样品聚为一类, 定义为成熟乳^[10]. 其中发现, 比起初乳和成熟乳之间的距离, 过渡乳与初乳和成熟乳的距离更远. 此外, 有3个初乳样品归在成熟乳的类群中, 而成熟乳的一个样本(MR4, 分娩后第22天的样品, 是成熟乳样品中泌乳时间最短的样品)的乳酸菌结构和初乳相近(图2(b)). 然而, 16份母乳样品的双歧杆菌PERMANOVA分析结果揭示, 无论是泌乳阶段、分娩方式还是分娩胎次都没有影响母乳中双歧杆菌的群落结构, 其中PCoA分析也没有按照这3个不同因素的分组呈现明

图1 内蒙古地区母乳中乳酸菌和双歧杆菌多样性谱图。(a) 乳酸菌属水平组成图；(b) 相对含量大于0.1%的乳酸菌种水平检出图；(c) 双歧杆菌种水平组成图

Figure 1 The diversity profile of LAB and *Bifidobacterium* in human breast milk from mothers in Inner Mongolia. (a) The composition of LAB at genus level; (b) heatmap of the relative abundance more than 0.1% of LAB species; (c) the bars of *Bifidobacterium* composition

显的聚类趋势(图2(c)~(e)),也可能是因为双歧杆菌的研究中过渡乳样品只有2份,样本量太少而导致差异不显著,有待进一步研究。

2.4 乳酸菌和双歧杆菌的差异分析

根据2.2节的分类学鉴定结果,结合上述群落结构分析,我们选择种水平进行不同分组间母乳中乳酸菌和双歧杆菌变化研究。结果发现,不同泌乳时间的样品中有10个乳酸菌存在显著性差异($P<0.05$),其中,过渡乳中的德氏乳杆菌和植物乳杆菌、头状葡萄球菌、格登链球菌、副乳房链球菌、婴儿链球菌和食蜜魏斯氏菌相对含量显著低于初乳和成熟乳,而初乳中的鼠李糖乳杆菌的相对含量显著高于过渡乳和成熟乳($P<0.05$)。成熟乳中的蜡样芽孢杆菌显著高于初乳($P<0.01$)和过渡乳($P<0.05$)。此外,过渡乳中的瑞士乳杆菌显著高于初乳和成熟乳($P<0.05$)(图3(a))。

虽然乳酸菌在不同泌乳时间表现出一些菌种的显著变化,但双歧杆菌属的11个种均未在不同时间、不同分娩方式等分组状态下显示出明显的差异。

基于母乳中优势乳酸菌群落的多样性和丰富度差异,将25份母乳进行了分型(图3(b)),第I类型母乳中德氏乳杆菌含量大于50%;第III类型的母乳中德氏乳杆菌含量大于5%,且德氏乳杆菌相对含量小于50%;第II类型有更丰富的植物乳杆菌和不能鉴定到种水平的乳酸菌,且大部分样品中植物乳杆菌含量较高。同时,发现88.89%的成熟乳隶属于第I类型,75%的过渡乳样品隶属于第III类型,初乳较分散,其中1个样品在第III类型,而4个初乳样品属于第II类型,7个初乳样品属于第I类型。

2.5 乳酸菌和双歧杆菌关联分析

为了探究母乳中乳酸菌和双歧杆菌之间的关系,

图2 基于Bray-Curtis距离的母乳中乳酸菌和双歧杆菌 β 多样性分析。(a) 基于Bray-Curtis距离矩阵的PERMANOVA分析泌乳阶段、胎次和分娩方式对母乳中乳酸菌群落结构的影响;(b) 基于Bray-Curtis的乳酸菌PCoA分析;基于Bray-Curtis距离的不同泌乳期(c)、不同分娩方式(d)和不同胎次(e)母乳中双歧杆菌PCoA分析

Figure 2 The β diversity of LAB and *Bifidobacterium* based on Bray-Curtis distance. (a) The PERMANOVA analysis based on Bray-Curtis distance; (b) the PCoA of LAB based on Bray-Curtis distance; the PCoA profiles of *Bifidobacterium* in human milk from different lactation period (c), different delivery mode (d), different delivery times (e)

基于Spearman分析了它们之间的相关关系(图4)。结果发现, *Bifidobacterium kashiwanohense*是和乳酸菌关系最为密切的双歧杆菌, 它和德氏乳杆菌呈显著正相关($P<0.01$), 与*Lactobacillus gallinarum*($P<0.05$)、格式乳球菌(*Lactococcus garvieae*, $P<0.05$)、表皮葡萄球菌($P<0.05$)、轻型链球菌($P<0.01$)和副乳房链球菌($P<0.05$)均呈显著负相关。粪双歧杆菌和短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)与肠膜明串珠菌显著正相关($P<0.05$), 青春双歧杆菌和*Lactobacillus gallinarum*显著正相关($P<0.05$), 动物双歧杆菌和唾液链球菌呈显著正相关($P<0.05$)。 *Bifidobacterium dentium*和两歧双歧杆菌分别与鼠李糖乳杆菌呈现显著正相关和负相关关系($P<0.05$)。

3 讨论和结论

众多研究已经证实, 母乳中普遍存在着乳酸菌和双歧杆菌, 其中乳杆菌属和双歧杆菌属的相对含量较低, 仅占母乳中细菌总数的2%~3%^[8,9], 而链球

菌和葡萄球菌等乳酸菌含量丰富。近些年, 科学家发现其中一些有益的乳酸菌和双歧杆菌在人类生命之初肠道菌群建立过程中扮演着重要的角色, 它们往往通过黏附婴儿肠道上皮细胞来发挥潜在的益生作用, 抵抗致病菌感染的同时, 产生短链脂肪酸促进有益细菌的生长^[16~18]。然而, 特别是一些低丰度的乳酸菌和双歧杆菌的群落结构并没有完全被人们了解。基于三代测序技术最常使用的细菌通用引物27F/1492R一般情况下只能捕获乳酸菌序列占总序列数不到3%。本文使用特异性引物捕获的乳酸菌序列占总数的92.64%。另外, 双歧杆菌的特异性引物测序获得的序列平均可以鉴定到种水平的序列占比为99.38%, 而其他已报道的引物捕获的序列属于双歧杆菌科的占比24.1%~94.4%, 甚至更少^[19~21]。因此, 本研究采用特异性引物扩增与单分子实时测序技术相结合的方法, 尽可能捕获更多种乳酸菌和双歧杆菌, 在种水平上全面的解析母乳中乳酸菌和双歧杆菌的群落结构。

图3 母乳中乳酸菌差异分析。(a) 不同泌乳期母乳中乳酸菌种水平差异性分析, C为初乳组, T为过渡乳组, M为成熟乳组; (b) 基于乳酸菌种水平差异的母乳分型. **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$

Figure 3 The compared analysis of LAB among different samples. (a) The compared analysis of LAB among different lactation period, C is represented colostrum, T is represented transitional milk, M is represented mature milk; (b) the breast milk types according to the difference of LAB species level **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$

研究结果显示, 母乳中广泛存在着德氏乳杆菌、植物乳杆菌、*Lactobacillus gallinarum*和发酵乳杆菌等乳杆菌, 且属于优势乳酸菌。同时, 也普遍存在着链状双歧杆菌、长双歧杆菌、粪双歧杆菌和两歧双歧杆菌等11个双歧杆菌种。但是, 引言中提到的台湾的

一项基于Illumina Miseq测序的研究表明母乳中乳杆菌检出率仅为21%, 仅检测到瑞士乳杆菌、嗜性乳杆菌(*Lactobacillus iners*)、玉米乳杆菌(*Lactobacillus zeae*)和格式乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)4种乳杆菌^[13], 而它们在内蒙古地区母乳样品中的占比很低,

图4 母乳中优势乳酸菌和双歧杆菌关联分析热图(***: $P<0.001$, **: $P<0.01$, *: $P<0.05$)

Figure 4 The Spearman correlation between LAB and *Bifidobacterium* in human breast milk (***: $P<0.001$, **: $P<0.01$, *: $P<0.05$)

不足0.1%。2016年该团队基于454-焦磷酸测序技术得到的结果是母乳中含有的乳杆菌是副干酪乳杆菌、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌和阴道乳杆菌(*Lactobacillus vaginalis*)，同时还称母乳中双歧杆菌极少见，仅在个别样品中检测了青春双歧杆菌、齿双歧杆菌(*Bifidobacterium dentium*)、长双歧杆菌和粪双歧杆菌以及长双歧杆菌婴儿亚种，其中长双歧杆菌最为优势，检出率为62.4%相对丰度为0.3%^[12]。2017年一项关于母乳和婴儿粪便菌群相似性的研究，却报道母乳中的优势乳杆菌属是植物乳杆菌，优势的双歧杆菌是短双歧杆菌^[4]。虽然这些研究结果不同，但是都透露出一个信息：母乳中乳杆菌和双歧杆菌的相对含量较低且不是所有的母乳样本中都能够分离到乳杆菌和双歧杆菌，有可能是因为样品采集方法、运输和贮藏以及测序平台、样品采集地等不同导致不一致的结果。然而，我们基于目前的技术手段，将特异性引物和三代测序技术相结合来捕获乳酸菌和双歧杆菌，进而发现了母乳中更为丰富的乳酸菌和双歧杆菌资源，特别是之前报道的含量较低的菌种。

另外，母乳中还存在着葡萄球菌属和链球菌属等其他乳酸菌，本研究中也发现表皮葡萄球菌、轻型链球菌和唾液链球菌等相对含量较高，这与之前的

研究结果一致。Sakwinska等人^[22]在研究来自中国母乳中微生物多样性时也发现这两个菌属是仅次于不动杆菌属(*Acinetobacter*)的优势菌。Hunt等人^[11]也报道了葡萄球菌和链球菌是母乳中含量最丰富的乳酸菌。内蒙古地区的母乳样品中也富含这些细菌，其中表皮葡萄球菌属于皮肤细菌，而轻型链球菌和唾液链球菌均是口腔细菌，可能从婴儿口腔传递到了母乳中，这些细菌存在于乳汁中不但不会对母亲和婴儿造成不良的影响，反而可以有效地抑制母乳中的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[23]。

值得关注的是，泌乳阶段显著影响着母乳的乳酸菌群落结构，而母亲分娩胎次和分娩方式并没有影响乳酸菌的结构。早期的研究也报道了分娩方式(剖腹产和自然分娩)虽然对母乳的微生物群落结构有一定的影响，但并没有统计学意义^[24]。Boix-Amoros等人^[10]也证实西班牙母亲乳汁中的细菌组成在不同的哺乳阶段发生着显著的变化：在初乳中最常见的菌属是葡萄球菌，在过渡乳中最优势的是链球菌，而在成熟乳中最常见的是不动杆菌。之前提到的2016年台湾的研究却发现不同泌乳时期的样品之间微生物组成不存在显著的差异，但是他们分析的母乳样品的3个阶段是小于3个月、3~6个月和大于6个月，然而大多数研究的结果是大于15天的乳汁已经进入成熟乳

阶段^[10], 所以他们的研究只能说明不同时间的成熟乳间的细菌组成没有显著性差异^[14]. 此外, 根据乳酸菌相对含量不同的分型研究发现, 初乳中乳酸菌结构更加分散, 个体差异影响更大, 这和母乳中整体微生物的变化趋势一致. 有研究证实在婴儿出生后的前6个月里, 母乳中的微生物群落更加分散, 个体差异更大, 这种差异在6个月后逐渐减少^[25]. 遗憾的是, 我们没有发现不同泌乳阶段和分娩方式、分娩胎次的母乳中双歧杆菌结构存在差异. 可能是因为样本量较少, 或者是母乳中的双歧杆菌丰度太低, 或者结构较为稳定. 但是, 之前有研究报道了剖宫产母亲乳汁中的双歧杆菌较自然分娩的更为丰富^[26], 这个问题将在随后的大样本研究中继续关注.

本研究还比较了初乳、过渡乳和成熟乳中乳酸菌和双歧杆菌种水平的显著性差异, 结果发现, 一些乳酸菌在种水平随着泌乳阶段的不同发生着显著的变化, 而双歧杆菌并没有变化. 初乳中德氏乳杆菌、植物乳杆菌的相对含量都较高, 特别是鼠李糖乳杆菌显著高于过渡乳和成熟乳. 植物乳杆菌早在1979年就已经从母乳中分离到, 是母乳中普遍存在的优势乳杆菌^[27], 鼠李糖等乳杆菌可以有效抑制母乳中的金黄色葡萄球菌^[2], 它们在初乳中的高比例存在可以更好地保护新生婴儿的健康. 虽然过渡乳中的德氏乳杆菌、植物乳杆菌显著低于初乳和成熟乳, 但瑞士乳杆菌显著高于其他两个组. 而Chen等人^[13]的研究也只在过渡乳(7天)中检测到了0.5%的瑞士乳杆菌, 其他时期的样品中没有发现. 瑞士乳杆菌拥有强大的蛋白水解能力产生多种活性肽, 菌株自身也可以提高T细胞表达进而发挥免疫调节作用^[28], 同时它能适应多种环境, 包括高温、低pH、低渗透压、低氧等^[29]. 总之, 随着泌乳阶段的变化, 母乳中的一些低

丰度的乳酸菌也发生着显著的变化, 而这些变化之前并没有引起研究者的足够重视, 应该是受限于这些菌的低丰度, 人们还不能够准确确定母乳中乳酸菌的多样性, 所以它们的变化机理也无从知晓. 此外, 双歧杆菌相对含量虽然在不同泌乳阶段的样品中没有发现显著差别, 但是, 一些双歧杆菌和部分乳酸菌有着显著的相关性, 可能是因为双歧杆菌可以降解母乳中的寡糖, 为乳酸菌的生长提供物质基础, 同时还可以抑制一些潜在致病菌的生长^[30].

综上所述表明, 在特异性引物扩增靶向序列的基础上, 采用三代测序技术可发现母乳中更为丰富的乳酸菌和双歧杆菌资源, 其中德氏乳杆菌、植物乳杆菌、*Lactobacillus gallinarum*等乳杆菌和表皮葡萄球菌、轻型链球菌、唾液链球菌是内蒙古地区健康母亲乳汁中的优势乳酸菌. 同时, 母乳中存在着链状双歧杆菌、长双歧杆菌、粪双歧杆菌和两歧双歧杆菌等11种双歧杆菌. 此外, 泌乳阶段显著影响着母乳中乳酸菌的多样性, 但是没有影响双歧杆菌的结构和组成. 且不同泌乳阶段的母乳中一些乳酸菌如德氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、表皮葡萄球菌和轻型链球菌等存在显著差异, 与成熟乳和过渡乳相比, 初乳中的乳酸菌分型更为多样化, 受到个体差异的影响更大; 而双歧杆菌种水平相对含量差异不显著, 这有可能是因为样本数量较少, 使得本研究有一定的局限性, 而我们团队已经开始大量采集全国各地母乳样品, 将在后续研究中更深入地报道母乳中的乳酸菌和双歧杆菌的多样性. 另外, 近几年, 我国逐渐展开了对母乳源益生菌的开发研究, 试图从母乳中分离出更多适合国人的益生菌制剂, 该研究建立了一种评估母乳中乳酸菌和双歧杆菌多样性的新方法, 并为母乳中益生菌的分离筛选提供了理论基础和指导意义.

参考文献

- 1 Cacho N T, Lawrence R M. Innate immunity and breast milk. *Front Immunol*, 2017, 8: 584
- 2 Heikkilä M P, Saris P E J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*, 2003, 95: 471–478
- 3 Jeurink P V, van Bergenhenegouwen J, Jimenez E, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. *Benef Microbes*, 2013, 4: 17–30
- 4 Murphy K, Curley D, O'Callaghan T F, et al. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Sci Rep*, 2017, 7: 40597
- 5 Urbaniak C, Angelini M, Gloor G B, et al. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*, 2016, 4: 1
- 6 Cabrera-Rubio R, Collado M C, Laitinen K, et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96: 544–551

- 7 Turróni F, Milani C, Duranti S, et al. *Bifidobacteria* and the infant gut: An example of co-evolution and natural selection. *Cellul Mol Life Sci*, 2018, 75: 103–118
- 8 Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, et al. Breast milk: A source of *Bifidobacteria* for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 2007, 92: 64–66
- 9 Martin R, Jimenez E, Heilig H, et al. Isolation of *Bifidobacteria* from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time pcr. *Appl Environ Microb*, 2009, 75: 965–969
- 10 Boix-Amoros A, Collado M C, Mira A. Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front Microbiol*, 2016, 7: e57782
- 11 Hunt K M, Foster J A, Forney L J, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*, 2011, 6: e21313
- 12 Chen P W, Tseng S Y, Huang M S. Antibiotic susceptibility of commensal bacteria from human milk. *Curr Microbiol*, 2016, 72: 113–119
- 13 Chen P W, Lin Y L, Huang M S. Profiles of commensal and opportunistic bacteria in human milk from healthy donors in Taiwan. *J Food Drug Anal*, 2018, 26: 1235–1244
- 14 Li S W, Watanabe K, Hsu C C, et al. Bacterial composition and diversity in breast milk samples from mothers living in Taiwan and mainland China. *Front Microbiol*, 2017, 8: 965
- 15 Xu H Y, Huang W Q, Hou Q C, et al. The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows. *Sci Bull*, 2017, 62: 767–774
- 16 Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, et al. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 1998, 84: 759–768
- 17 Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73: 386S–392S
- 18 Fernandez M F, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 2003, 94: 449–455
- 19 Milani C, Hevia A, Foroni E, et al. Assessing the fecal microbiota: An optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One*, 2013, 8: e68739
- 20 Turróni F, Peano C, Pass D A, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One*, 2012, 7: e36957
- 21 Zheng H J, Liang H, Wang Y Z, et al. Altered gut microbiota composition associated with eczema in infants. *PLoS One*, 2016, 11: e0166026
- 22 Sakwinska O, Moine D, Delley M, et al. Microbiota in breast milk of chinese lactating mothers. *PLoS One*, 2016, 11: e0160856
- 23 Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*, 2003, 143: 754–758
- 24 Martin R, Heilig H G H J, Zoetendal E G, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol*, 2007, 158: 31–37
- 25 Pannaraj P S, Li F, Cerini C, et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr*, 2017, 171: 647–654
- 26 Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, et al. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *J Dev Orig Health Dis*, 2016, 7: 54–60
- 27 West P A, Hewitt J H, Murphy O M. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol*, 1979, 46: 269–277
- 28 Patten D A, Leivers S, Chadha M J, et al. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the epps isolated from *Lactobacillus helveticus* sp rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp 5e2. *Carbohydr Res*, 2014, 384: 119–127
- 29 Taverniti V, Guglielmetti S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. *Front Microbiol*, 2012, 3: 392
- 30 Underwood M A, Davis J C C, Kalanetra K M, et al. Digestion of human milk oligosaccharides by *Bifidobacterium* Breve in the premature infant. *J Pediatr Gastr Nutr*, 2017, 65: 449–455

补充材料

图 S1 各样品乳酸菌和双歧杆菌香农指数

表 S1 双歧杆菌数据库使用的菌株基因组信息表

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “内蒙古地区母乳中乳酸菌和双歧杆菌的多样性”

Diversity and composition of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* in breast milk from mothers living in Inner Mongolia

Haiyan Xu, Yahua Liu, Hao Jin, Jiao Wang, Zhongjie Yu, Wenjun Liu, Heping Zhang & Zhihong Sun*

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

* Corresponding author, E-mail: sunzhihong78@163.com

Human breast milk contains commensal lactic acid bacteria (LAB) and *Bifidobacterium*. Several reports have suggested that human milk is a direct source of commensal bacteria found in the infant gut, and some commensal LAB and *Bifidobacterium* in human milk may bring positive effects to the health of breast-fed babies by shaping their gut microbiota. Therefore, researching on LAB and *Bifidobacterium* in breast milk is important.

A total of 25 human breast milk samples were collected in Huhhot city of Inner Mongolia. The bacterial DNA of all samples was extracted, and the target sequences of LAB and *Bifidobacterium* were amplified using specific primers. The PCR products were sequenced by Pacific Biosciences (PacBio) single-molecule, real-time sequencing technology (SMRT). Then the diversity and composition of LAB and *Bifidobacterium* were analyzed at species level using bioinformatic methods. We found 120 species of LAB including *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* and so on, as well as 11 species of *Bifidobacterium* including *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium stercoris* and *Bifidobacterium bifidum* and so on. Among them, the species *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus salivarius* were detected in all samples. Additionally, almost all of the detected *Bifidobacterium* species were present in all samples, except *Bifidobacterium pseudolongum* and *Bifidobacterium mongoliense*. The lactation stage had a significant effect on the diversity and composition of LAB but not *Bifidobacterium*. Results from PERMANOVA based on Bray-Curtis distances further confirmed the significant effect of lactation stage on LAB structure in human milk ($P < 0.05$). To compare the structure of the LAB community among three milk groups (i.e. colostrum, less than 5 d after delivery; transitional milk, 5–14 d after delivery; mature milk, more than 15 d after delivery), we performed Bray-Curtis PCoA based on OTU distribution and abundance. The PCoA results suggested apparent LAB structural differences among the three groups, as the symbols representing the individual groups were separated on the score plot with only minor overlap. In addition, the relative abundances of *Lactobacillus delbrueckii* ($P < 0.01$) and *Lactobacillus plantarum* ($P < 0.05$) in colostrum and mature milk were significantly higher than that of the transitional milk. Significantly more *Lactobacillus rhamnosus* was found in colostrum than in transition milk and mature milk ($P < 0.05$), whereas, the *Lactobacillus helveticus* in transition milk was remarkably higher than another two stages human milk ($P < 0.05$). However, there was no difference in the distribution of *Bifidobacterium* species among human milk of three lactation stages. The breast milk from the sampled mothers in Inner Mongolia could be divided into three subtypes according to the LAB composition: the first subtype contained high proportion of *Lactobacillus delbrueckii* ($> 50\%$); the second subtype had less than 50% of *Lactobacillus delbrueckii* together with more *Lactobacillus plantarum* and other unclassified LAB species; the third subtype contained more than 5% of *Lactobacillus gallinarum*. Interestingly, the three subtypes were largely consistent with the grouping by lactation stage except for the colostrum. Nevertheless, most colostrum samples belonged to the first and second subtypes. We also found significant correlations between some LAB and *Bifidobacterium*.

In recent years, we have started isolating probiotics from human breast milk in order to identify suitable probiotic bacteria in breast milk of the Chinese population. This study has established a new method to assess the diversity of LAB and *Bifidobacterium*, which will serve as reference and guiding protocol for screening probiotics in human breast milk.

human breast milk, lactic acid bacteria, *Bifidobacterium*, diversity, PacBio single-molecule real-time sequencing technology

doi: 10.1360/N972018-00584