

# 长寿猫源青春双歧杆菌选育及其应用效果评价

李云亮<sup>1,2,3</sup>, 王禹程<sup>3</sup>, 卢宇<sup>1</sup>, 张萌<sup>1</sup>, 严子华<sup>1,4</sup>, 段玉清<sup>3</sup>, 马海乐<sup>3\*</sup>

1 卫仕宠物营养科学研究院(江苏)有限公司, 江苏 镇江

2 上海宠幸宠物用品有限公司, 上海

3 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江

4 卫仕宠物营养研究院(芜湖)有限公司, 安徽 芜湖

李云亮, 王禹程, 卢宇, 张萌, 严子华, 段玉清, 马海乐. 长寿猫源青春双歧杆菌选育及其应用效果评价[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 4938-4950.

LI Yunliang, WANG Yucheng, LU Yu, ZHANG Meng, YAN Zihua, DUAN Yuqing, MA Haile. Breeding and application effect evaluation of *Bifidobacterium adolescentis* derived from felines with long life spans[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(11): 4938-4950.

**摘要:** 【目的】选育能够适应猫胃肠环境且具有良好肠道定殖能力的猫源青春双歧杆菌菌株。【方法】从长寿猫和普通猫的粪便中分离出青春双歧杆菌, 通过生长量测试和小鼠寿命试验选育得到原始菌株 QC-Y (寿命延长率达 33.85%), 经鉴定该菌为青春双歧杆菌。QC-Y 经辐射诱变后, 通过生长量测试、胃肠耐受性驯化和评价选育得到 QC-Y-09。【结果】QC-Y-09 的生长量、耐受性评分分别是 QC-Y 的 55.667 倍和 5.66 倍, 其对猫胃肠环境的耐受能力具有良好的遗传稳定性。第 10 代 QC-Y-09 菌株在人工胃液、肠液、无氧和微氧环境中的存活率分别为 18.80%、41.60%、93.26% 和 48.39%, 分别达到 0 代的 62.67%、108.53%、97.92% 和 94.40%。猫肠道定殖试验表明, QC-Y-09 在猫体内的定殖能力显著优于 QC-Y 和人源青春双歧杆菌。停止饲喂菌剂 7 d 后, QC-Y-09 组猫粪便中青春双歧杆菌活菌仍有 4.37 lg CFU/g, 分别比 QC-Y 组和人源组高 1.74 lg CFU/g 和 3.02 lg CFU/g。此外, QC-Y-09 对猫换粮应激具有较好的缓解作用, 能降低猫换粮应激率 85.71%。SNP 分析结果表明 QC-Y-09 在基因层面与 QC-Y 有显著差异, 主要富集在核糖体结构和氨基酰基-tRNA 生物合成的通路上。【结论】本研究选育的猫源青春双歧杆菌 QC-Y-09 菌株能够有效适应猫胃肠环境并在猫肠道中良好定殖, 这为青春双歧杆菌在猫用功能性食品中的应用提供了重要的理论和实践基础。

**关键词:** 青春双歧杆菌; 猫; 寿命; 胃肠耐受; 应激率

资助项目: 卫仕宠物营养研究院(芜湖)有限公司企业资助项目(HX20211045)

This work was supported by the Enterprise-funded Project from Nourse Centre for Pet Nutrition (Wuhu) Co., Ltd. (HX20211045).

\*Corresponding author. E-mail: mhl@ujs.edu.cn

Received: 2025-04-01; Accepted: 2025-05-30; Published online: 2025-07-14

# Breeding and application effect evaluation of *Bifidobacterium adolescentis* derived from felines with long life spans

LI Yunliang<sup>1,2,3</sup>, WANG Yucheng<sup>3</sup>, LU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Meng<sup>1</sup>, YAN Zihua<sup>1,4</sup>, DUAN Yuqing<sup>3</sup>, MA Haile<sup>3\*</sup>

1 Nourse Science Center for Pet Nutrition (Jiangsu) Co., Ltd., Zhenjiang, Jiangsu, China

2 Shanghai Chowsing Pet Products Co., Ltd., Shanghai, China

3 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, China

4 Nourse Centre for Pet Nutrition (Wuhu) Co., Ltd., Wuhu, Anhui, China

**Abstract:** **[Objective]** To breed *Bifidobacterium adolescentis* strains that can adapt to the gastrointestinal environment of felines and have strong intestinal colonization capabilities. **[Methods]** *B. adolescentis* was isolated from the feces of felines with long and regular life spans. The original strain QC-Y (with the life span extension rate reaching 33.85%) was selected through biomass assessments and mouse life span experiments and it was identified as *B. adolescentis*. After radiation-induced mutation, QC-Y-09 was screened out by the biomass assessment, gastrointestinal tolerance domestication, and evaluation. **[Results]** QC-Y-09 showed the biomass 55.667 times and the tolerance score 5.66 times that of QC-Y. Moreover, the tolerance of the strain to the feline gastrointestinal environment showed good genetic stability. The survival rates of the 10th generation of QC-Y-09 in the artificial gastric juice, intestinal juice, anaerobic, and micro-aerobic environments were 18.80%, 41.60%, 93.26%, and 48.39%, respectively, which were 62.67%, 108.53%, 97.92%, and 94.40% of those of the original generation. The intestinal colonization test showed that the colonization ability of QC-Y-09 in felines was significantly stronger than that of QC-Y and human-derived *B. adolescentis*. Seven days after the feeding of the microbial inoculum was stopped, the viable count of *B. adolescentis* in the feline feces of the QC-Y-09 group still reached 4.37 lg CFU/g, which was 1.74 lg CFU/g and 3.02 lg CFU/g, respectively, higher than those of the QC-Y group and the human-derived *B. adolescentis* group. In addition, QC-Y-09 had a good relieving effect on the feline food change stress, reducing the feline food change stress rate by 85.71%. The results of SNP analysis showed that QC-Y-09 was significantly different from QC-Y at the gene level, and the differentially expressed genes were mainly enriched in the ribosome structure and aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway. **[Conclusion]** Feline-derived *B. adolescentis* QC-Y-09 bred in this study can effectively adapt to the gastrointestinal environment and colonize the intestines of felines. This study provides both theoretical and practical bases for the application of *B. adolescentis* in functional food for felines.

**Keywords:** *Bifidobacterium adolescentis*; feline; life span; gastrointestinal tolerance; stress rate

猫的胃肠消化道相对脆弱, 对食物和环境刺激的承受能力较差, 易出现腹泻、呕吐、食欲不振等情况, 若长期得不到维护易发展成消

化不良、胃肠炎、肠应激综合征等消化系统疾病<sup>[1-3]</sup>。猫的胃肠健康直接影响其生活质量和衰老速度。双歧杆菌类微生物能通过调节肠道菌

群平衡增强猫胃肠消化和免疫能力,改善其胃肠健康状态<sup>[4-5]</sup>。特别是青春双歧杆菌,据报道撒丁岛百岁老人的比例是其他地区的10倍,这些百岁老人肠道菌群中青春双歧杆菌的菌群丰度明显高于普通老年人,他们的长寿可能与青春双歧杆菌具有延缓机体衰老的作用有关<sup>[6-8]</sup>。

青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)是一种严格厌氧的革兰氏阳性益生菌,属于双歧杆菌属。该益生菌已添加于人用保健品、益生菌剂产品中,并取得了良好的应用效果<sup>[9-10]</sup>。目前,其应用已拓展至猫用保健品、猫用益生菌剂等产品。然而,市面上使用的青春双歧杆菌多为非猫源的(主要是人源、牛源等)。猫胃肠环境与人、牛及其他哺乳动物相比存在诸多差异,猫肠道温度为38.0–39.5 °C,胃液pH值为1.0–2.0,肠胆盐浓度为0.1%–0.4%<sup>[11-12]</sup>。非猫源的青春双歧杆菌对猫胃肠环境适应性差,阻碍了其在猫肠道的定殖和生长,难以充分发挥其有益功能。因此亟待选育能适应猫胃肠环境的猫专用青春双歧杆菌,但目前这方面的研究鲜有报道。

本研究从长寿猫的黄金粪便中分离青春双歧杆菌,通过延长小鼠寿命测试挑选延长小鼠寿命时间最长的菌株作为原始菌株。该菌株经诱变和猫胃肠环境耐受性驯化后,再从其子代中选育对猫胃肠环境耐受性最好的菌株,即得到猫专用青春双歧杆菌。通过传代稳定性测试评价该菌株传代后对猫肠道环境耐受能力的保持情况,通过猫肠道定殖测试评价该菌株在猫肠道的定殖能力,以期青春双歧杆菌在猫用产品中的应用奠定良好基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

青春双歧杆菌人源菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,菌种保藏号为CICC 6175。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

PBS缓冲液、LB培养基、双歧杆菌琼脂培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、猪胆粉,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;DNA marker,宝日医生物技术(北京)有限公司;细菌基因组提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

ZQZY-78CN恒温摇床,上海知楚仪器有限公司;SPX-350B恒温培养箱,上海力辰仪器科技有限公司;DG250厌氧工作站,唐惠特利科技公司;Multiskan FC酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)公司。

### 1.2 猫源青春双歧杆菌分离

招募不同品种的普通宠物猫(6–9岁)和长寿宠物猫(16–20岁)各3只,采集它们排泄的黄金粪便,混合后用PBS缓冲液重悬,梯度稀释后每梯度各取100 μL涂布于LB琼脂培养基平板<sup>[13]</sup>,39 °C厌氧培养48 h。选取菌落分布均匀且生长良好的平板,挑取单菌落(普通猫组挑取得到842株,长寿猫组挑取得到840株)并进行分子鉴定。其中,黄金粪便的判断标准:长度与香蕉形粪便基本一致,粪便无切口,硬度适中、富有弹性且柔软。

### 1.3 分子鉴定

使用细菌基因组提取试剂盒提取得到的基因组为模板,使用16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')进行PCR扩增与测序鉴定。PCR反应体系(50 μL): TaKaRa Taq (5 U/μL) 0.25 μL, 10×PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5 μL, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL, DNA模板1 μL, ddH<sub>2</sub>O 37.75 μL。PCR反应条件: 95 °C预变性5 min; 94 °C变性20 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C终延伸5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳验证后,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在

NCBI 数据库中进行比对, 并进行普通猫与长寿猫粪便分离培养微生物组成分析。

#### 1.4 生长量测定

挑取青春双歧杆菌单菌落接种于 LB 培养基, 在厌氧环境下培养 15 h 后, 稀释合理倍数, 测定培养前后的菌浓度(波长 600 nm), 计算菌株的生长量, 如公式(1)所示。

$$V = OD_{15} - OD_0 \quad (1)$$

式中:  $V$  为生长量;  $OD_{15}$  和  $OD_0$  为培养 15 h 和 0 h 时菌液的  $OD_{600}$  值。

#### 1.5 延长小鼠寿命测试

三十只 SAMP8 品系快速衰老模型小鼠(雄性, 8 周龄)购自北京大学医学部, 许可证号: SCXK(京)2021-0013。试验方案通过杭州应驰生物科技有限公司伦理委员会审查, 编号为: INCH-IACUC-2022-06-264。30 只小鼠适应环境后, 按体重均匀分为 3 组(试验组 1、试验组 2 和对照组), 每组 10 只。将筛选得到的生长最快的青春双歧杆菌菌种 1 和菌种 2 菌株添加到鼠粮中(浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/g), 分别饲喂试验组 1 和试验组 2 的小鼠, 对照组小鼠饲喂普通鼠粮, 每组每天饲喂鼠粮 40 g, 饮水自由。统计每组小鼠的平均存活时间, 选取延长小鼠寿命时间最长的菌株, 命名为 QC-Y, 作为原始菌株进行后续试验。

#### 1.6 辐射诱变

采用钴 60 射线对原始菌株 QC-Y 进行辐射诱变, 参数为: 辐射剂量 150 Gy, 处理时间 10 min。

#### 1.7 猫胃肠环境耐受驯化

诱变结束后, 将菌种经稀释后涂布于 LB 琼脂培养基平板, 厌氧培养 48 h 后挑取直径较大的菌落进行胃肠环境耐受驯化, 参考耿海波等<sup>[14]</sup>的方法并略作修改。将诱变后的菌株用耐肠消化筛选培养基连续培养 7 d(每天传代 2 次)进行人工肠消化筛选, 其中在第 1 天和第 4 天单独增加人工胃消化筛选。人工胃液的配制参考李

弘等<sup>[15]</sup>的方法进行, 并调整 pH 至 1.5。人工肠液和耐肠消化培养基的配制方法参考薛俊敏<sup>[16]</sup>的方法进行, 调整 pH 至 7.2, 胆盐浓度为 0.4%。驯化后的菌液经梯度稀释后分离培养, 第一轮筛选挑选单菌落直径较大的菌株共 24 株, 再进行第二轮生长量筛选, 得到生长最快的 3 株菌进行猫胃肠环境耐受性评价。

#### 1.8 猫胃肠环境耐受性评价

取驯化、选育得到的生长最快的 3 株菌的菌液 1 mL, 加入 9 mL 人工胃液或人工肠液中, 在 39 °C、90 r/min 条件下厌氧培养 2 h; 另取菌液置于 0.8% 氧分压的微氧环境中处理 2 h。通过对人工胃液、人工肠液和 0.8% 微氧环境处理前和处理 2 h 后的青春双歧杆菌活菌数量进行平板计数, 存活率计算如公式(2)所示。

$$P = \frac{n_2}{n_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $P$  为存活率;  $n_2$  为处理 2 h 的活菌数;  $n_0$  为处理 0 h 的活菌数。

耐受性评分按公式(3)计算, 对菌株的猫胃肠环境耐受性进行评价。

$$S = 1/3 \times P_1 \times 100 + 1/3 \times P_2 \times 100 + 1/3 \times P_3 \times 100 \quad (3)$$

式中:  $S$  为耐受性评分;  $P_1$  为人工胃液存活率;  $P_2$  为人工肠液存活率;  $P_3$  为耐氧存活率。耐受性评分总分小于等于 100。

取耐受性评分最高的一株青春双歧杆菌菌株进行传代稳定性评价和猫肠道定殖测试。

#### 1.9 传代稳定性评价

对耐受性评分最高的菌株每 3 d 传代 1 次, 取第 3 代、第 7 代和第 10 代的菌液 1 mL 于 9 mL 人工胃液或人工肠液中, 在 39 °C、90 r/min 条件下厌氧培养 2 h, 利用平板计数法分别测定 0 h、2 h 的活菌数并计算存活率, 以评价该菌株耐人工胃液、肠液性能以及在无氧和微氧环境中的传代稳定性。菌株的传代稳定性评价标准: 存活率  $\geq 10\%$ , 认为该菌株传代稳定; 否则认为传代不稳定。

### 1.10 猫肠道定殖测试

对人源、原始和诱变选育的青春双歧杆菌菌株进行猫肠道定殖测试。选取普通宠物猫 24 只，体重 3–5 kg，年龄 1–2 岁，健康状态良好，品种包括布偶、英短、美短、加菲、中华田园猫和缅因，每种 4 只。将 24 只猫均匀分为 4 组，分别为空白组、人源组、原始菌株组(QC-Y)和诱变选育菌株组(QC-Y-09)，每组 6 只(每个品种 1 只)。试验共计 40 d，分为适应期(0–7 d)、定殖期(7–21 d)、观察期(21–40 d)。将菌液浓缩后装入胶囊中制成菌制剂胶囊( $10^{11}$  CFU/粒)，在适应期和定殖期时每天给猫饲喂菌制剂胶囊，每天 1 次，每次 1 粒。其中，人源组、QC-Y 组和 QC-Y-09 组的猫饲喂的胶囊中分别含有人源青春双歧杆菌、QC-Y 原始菌株以及诱变选育的 QC-Y-09 菌株，空白组的猫饲喂不含菌剂的空胶囊。进入观察期后停止饲喂菌制剂胶囊。实验期间每 7 d 采集猫的粪便，通过双歧杆菌琼脂培养基平板在厌氧条件下培养，对其进行青春双歧杆菌平板计数并计算定殖活菌数。

### 1.11 换粮应激率

给猫每天提供 60 g 市售猫粮 1，喂食 30 日后挑选无换粮应激表现的猫(无呕吐、腹泻、软便、精神萎靡、食欲不振或消化不良等表现)进行分组。试验分 2 组，分别为对照组和试验组，每组 50 只猫，品种包括东短、英短、美短、布偶、中华田园猫、缅因和加菲等，每组公母各半。对照组的猫换食市售猫粮 2，试验组的猫换食添加有青春双歧杆菌 QC-Y-09 的市售猫粮 2(添加量为  $1 \times 10^8$  CFU/kg)，每只猫每天喂食猫粮 60 g。在猫换粮 7 d 后记录各组猫存在换粮应激的情况，换粮应激率按公式(4)计算。存在呕吐、腹泻、软便、精神萎靡、食欲不振或消化不良等表现时认为该猫存在换粮应激情况。

$$P(\%) = n \times 100 / N \quad (4)$$

式中： $P$  为换粮应激率； $n$  为换粮 7 d 后仍存在

应激表现猫数量； $N$  为该组猫总数。

### 1.12 QC-Y-09 的 SNP 统计分析

QC-Y-09 的 SNP 统计分析工作由生工生物工程(上海)股份有限公司分析完成。

### 1.13 统计学处理

试验数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示，以 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，采用 one-way ANOVA 检验组间数据差异， $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 粪便分离培养微生物组成分析

长寿宠物猫和普通宠物猫粪便微生物组成及占比情况如表 1 所示。在 2 组中占比最高的 7 种菌分别为肠球菌属、埃希氏菌属、芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、双歧杆菌属、乳杆菌属和奈瑟氏菌属，它们在 2 组中的占比之和均超过总数的 98.00%。其中，长寿猫粪便微生物中

表1 普通猫与长寿猫粪便分离微生物组成

Table 1 Microbial composition of fecal isolates from regular and long-lived feline

分类 Classification	普通猫 Ordinary feline (%)	长寿猫 Longevity feline (%)
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	28.52±1.78	18.10±2.12*
埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	18.92±1.46	11.67±1.65*
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	16.03±2.05	25.71±2.64*
梭状芽孢杆菌属 <i>Clostridium</i>	12.61±1.38	12.50±1.52
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	12.35±2.21	21.79±2.14*
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> genus	7.23±1.06	8.10±1.17
奈瑟氏菌属 <i>Neisseria</i>	2.37±0.58	0.24±0.07*
片球菌属 <i>pediococcus</i>	0.66±0.12	0.95±0.19*
盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	0.39±0.06	0.00±0.00*
分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	0.26±0.09	0.00±0.00*
巨单胞菌属 <i>Megamonas</i> genus	0.26±0.11	0.12±0.03*
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	0.26±0.08	0.48±0.14*
巴氏杆菌属 <i>Bacillus</i> genus	0.13±0.04	0.36±0.12*

\*表示与普通猫组间存在显著差异， $P < 0.05$ 。

\* indicates that there is a significant difference compared with the ordinary feline group,  $P < 0.05$ .

有害菌占比减少, 埃希氏菌属和奈瑟氏菌属的占比比普通猫分别降低 38.32% 和 89.87%; 长寿猫粪便微生物中有益菌占比增加, 芽孢杆菌、双歧杆菌、乳杆菌属的占比相比普通猫分别增加 60.39%、76.44% 和 12.03%。其中, 增长最多的是双歧杆菌属。表 2 结果表明, 长寿猫粪便中分离到的青春双歧杆菌数量和双歧杆菌属中的占比均显著高于普通猫, 分别达到 48 株和 26.23%, 其中菌种 1 (*Bifidobacterium adolescentis* C6-5) 和菌种 2 (*Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703) 的数量分别为 30 株和 18 株, 均明显高于普通猫; 而菌种 3 (*Bifidobacterium adolescentis* DMF2) 数量为 0。推测菌种 1、菌种 2 可能与猫的长寿有关, 因此选择菌种 1、菌种 2 进行后续实验。

## 2.2 生长量筛选

青春双歧杆菌菌种 1、菌种 2 分别以 QC1 和 QC2 进行编号命名。如图 1 所示, 菌种 1 和菌种 2 菌液  $OD_{600}$  值在 0.0–0.1 范围均为 0 株; 菌种 1 和菌种 2 菌液  $OD_{600}$  值在 0.1–0.2 范围分别有 11 株和 1 株; 菌种 1 和菌种 2 菌液  $OD_{600}$  值在 0.2–0.3 范围分别有 10 株和 6 株; 菌种 1 和菌种 2 菌液  $OD_{600}$  值在 0.3–0.4 范围分别有 8 株和 7 株; 菌种 1 和菌种 2 菌液  $OD_{600}$  值在 0.4–0.5 范围分别有 1 株和 4 株。在菌种 1 和菌

种 2 中生长最快的菌株分别为 QC1-8 和 QC2-4, 菌液  $OD_{600}$  值分别达到 0.442 和 0.494。

## 2.3 延长小鼠寿命测试

使用 QC1-8 和 QC2-4 菌株分别进行延长小鼠寿命测试, 结果如图 2 所示。试验组 2 的小鼠寿命时间最长, 达到 518 d, 相比试验组 1 和对照组小鼠寿命分别长 21.60% 和 33.85%。这说明 QC2-4 菌株具有延长小鼠寿命的作用, 将其重新命名为 QC-Y。

## 2.4 QC-Y 发育树

QC-Y 的发育树如图 3 所示, 结果表明 QC-Y 与青春双歧杆菌 P2P3、JCM 15918、CLA AA H289、ATCC 15703、Iraq-Basrah 4 和 VB-ES42 为同一支, 该菌株属于青春双歧杆菌。

## 2.5 辐射诱变和生长量筛选

以 QC-Y 作为诱变的原始菌株, 在辐射诱变后, 从培养的子代中挑选直径较大的菌株共 24 株, 分别编号为 QC-Y-01–QC-Y-24。它们的生长量结果如图 4 所示, 菌液  $OD_{600}$  值在 0.0–0.1 范围的有 2 株; 菌液  $OD_{600}$  值在 0.1–0.2 范围的有 4 株; 菌液  $OD_{600}$  值在 0.2–0.3 范围的有 1 株; 菌液  $OD_{600}$  值在 0.3–0.4 范围的有 5 株; 菌液  $OD_{600}$  值在 0.4–0.5 范围的有 4 株; 菌液  $OD_{600}$  值在 0.5–0.6 范围的有 6 株; 菌液  $OD_{600}$  值在 0.6–0.7 范围的有 1 株; 菌液  $OD_{600}$  值在

表2 长寿猫与普通猫粪便中青春双歧杆菌菌种和数量

Table 2 Species and number of *Bifidobacterium adolescentis* in feces of long-lived and normal feline

双歧杆菌菌株种类 Types of <i>Bifidobacterium</i> strains	NCBI 覆盖度 NCBI coverage (%)	NCBI 序列相似性 NCBI sequence similarity (%)	长寿猫菌株数量 Number of strains of long-lived feline	普通猫菌株数量 Number of common feline strains
青春期双歧杆菌 C6-5 (菌种 1) <i>Bifidobacterium adolescentis</i> C6-5 (strain 1)	100	100.00	30	4
青春期双歧杆菌 ATCC 15703 (菌种 2) <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 (strain 2)	100	100.00	18	6
青春期双歧杆菌 DMF2 (菌种 3) <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DMF2 (strain 3)	100	≥99.65	0	5
其他双歧杆菌 Other <i>Bifidobacterium</i> species	100	≥97.75	135	89

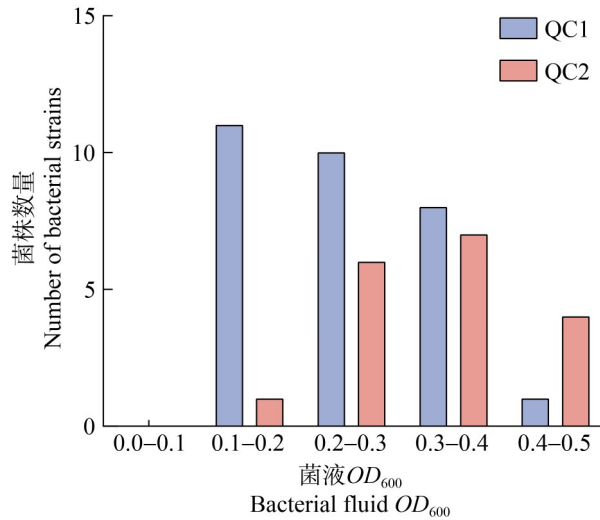


图1 青春双歧杆菌菌株不同生长量的菌株数量分布

Figure 1 The number distribution of *Bifidobacterium adolescentis* strains.

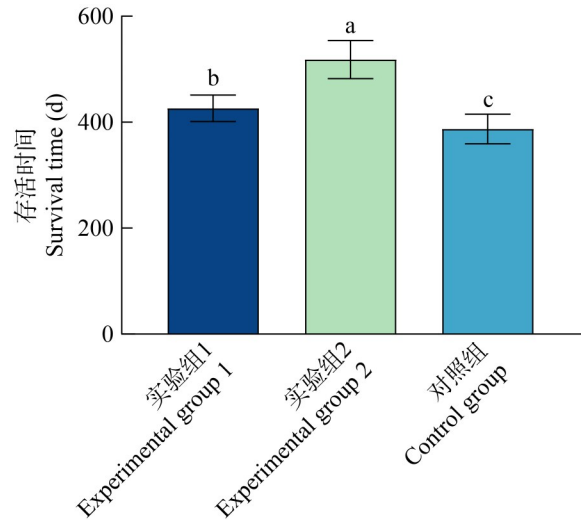


图2 小鼠存活时间

Figure 2 Survival time of mice. Different lowercase letters indicate significant differences between groups,  $P < 0.05$ .

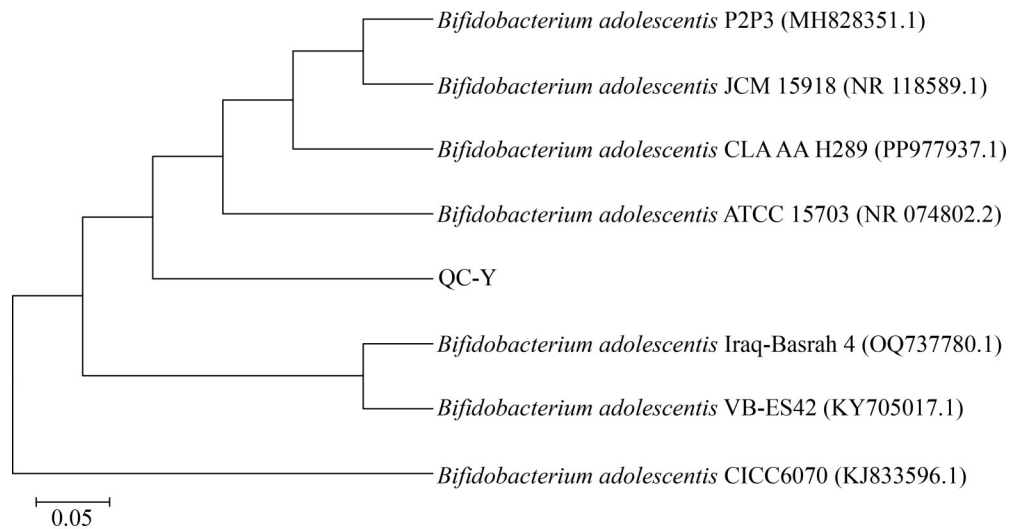


图3 QC-Y系统发育树。括号中的序号为菌种序列号；0.05表示平均每个位点发生了0.05次核苷酸替换。

Figure 3 Phylogenetic tree of QC-Y. The serial number in parentheses is the strain serial number; 0.05 on the evolutionary scale indicates an average of 0.05 nucleotide substitutions per locus.

0.7-0.8 范围的有 1 株；其中 QC-Y-09、QC-Y-23 和 QC-Y-24 生长量最快，菌液  $OD_{600}$  值分别达到 0.668、0.663 和 0.721，是原始菌株 QC-Y ( $OD_{600}$  值为 0.012) 的 55.250 倍、55.667 倍和 60.083 倍，

因此选择这 3 株菌进行猫胃肠环境耐受驯化。

## 2.6 猫胃肠环境耐受性评价和菌株分子鉴定

三株生长量最快的诱变菌株经猫胃肠环境

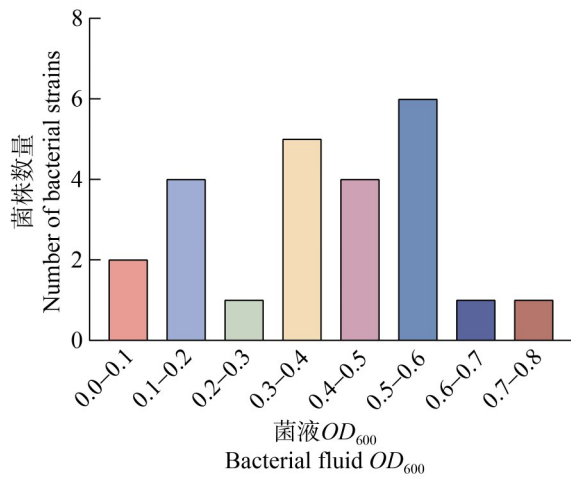


图4 诱变青春双歧杆菌不同生长量的菌株数量分布

Figure 4 The number distribution of mutagenic *Bifidobacterium adolescentis* strains.

耐受驯化后分别进行猫胃肠环境耐受性评价, 结果如图 5 所示。3 株菌株的猫胃肠环境耐受性评分均高于原始菌株 QC-Y, 其中, QC-Y-09 评分最高, 达到 39.90, 分别是 QC-Y、QC-Y-23 和 QC-Y-24 的 5.66 倍、1.75 倍和 1.70 倍。经分子鉴定, QC-Y-09 菌株属于青春双歧杆菌。选育得到的 QC-Y-09 菌株保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏名称为青春双歧杆菌 LifeAge20, 保藏号为 CCTCC NO: M20241746。

## 2.7 传代稳定性评价

QC-Y 和 QC-Y-09 的传代稳定性测试结果如图 6 所示。QC-Y-09 在传代 10 代后, 在胃液、肠液中的存活率分别达到 18.80% 和 41.60%, 分别为原始菌株 QC-Y 的 56.97 倍和 14.15 倍。在无氧、微氧环境的存活率分别为 93.26% 和 48.39%, 分别是原始菌株 QC-Y 的 1.15 倍和 8.45 倍。相较于原始菌株, 诱变株 QC-Y-09 在猫胃肠环境耐受性上具有良好的传代稳定性。

## 2.8 猫肠道定殖测试

人源、QC-Y 和 QC-Y-09 这 3 株青春双歧杆菌在猫肠道定殖测试结果如图 7 所示。3 株菌

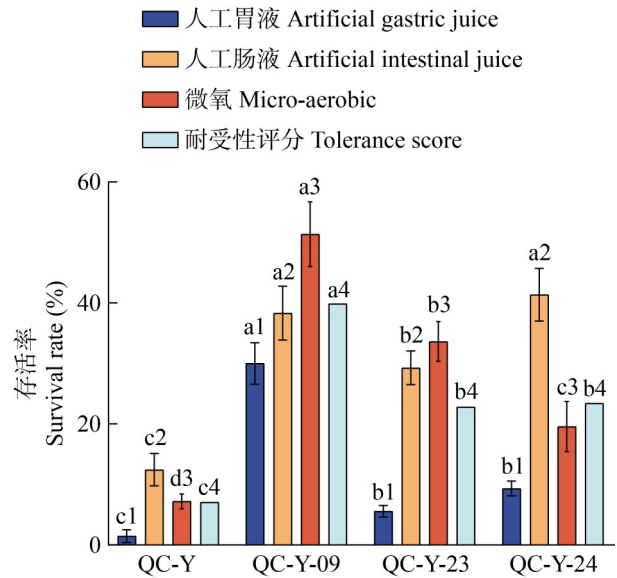


图5 猫胃肠环境耐受性评价。同一个数字表示同一个指标, 同一指标的不同小写字母表示组间存在显著差异,  $P < 0.05$ 。

Figure 5 Evaluation of gastrointestinal tolerance in felines. The same number indicates the same indicator, and different lowercase letters of the same indicator indicate significant differences between groups,  $P < 0.05$ .

株均有一定定殖能力, 其中定殖能力最强的是选育的诱变菌株 QC-Y-09, 在试验 21 d 时 QC-Y-09 组猫粪便中定殖活菌数达到峰值 5.93 lg CFU/g, 比 QC-Y 组高 0.77 lg CFU/g, 比人源组高 3.65 lg CFU/g。在停止饲喂青春双歧杆菌后 7 d, 即试验 28 d 时, 人源组和 QC-Y 组定殖活菌数快速下降, 而 QC-Y-09 组的定殖活菌数仍能达到 4.37 lg CFU/g, 比 QC-Y 组高 1.74 lg CFU/g, 比人源组高 3.02 lg CFU/g。

## 2.9 猫换粮应激率

猫换粮应激率如表 3 所示, 换粮 7 d 后试验组猫换粮应激率为 8%, 相比对照组显著降低 85.71%, 青春双歧杆菌 QC-Y-09 有助于降低猫换粮应激率。

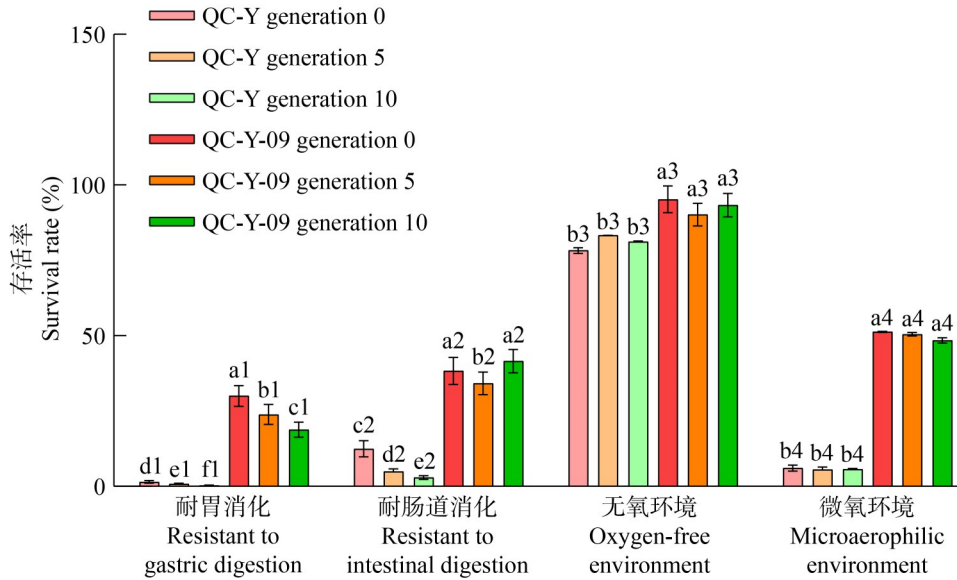


图6 传代稳定性测试结果。同一个数字表示同一个指标，同一指标的不同小写字母表示组间存在显著差异， $P < 0.05$ 。

Figure 6 Results of passage stability test. The same number indicates the same indicator, and different lowercase letters of the same indicator indicate significant differences between groups,  $P < 0.05$ .

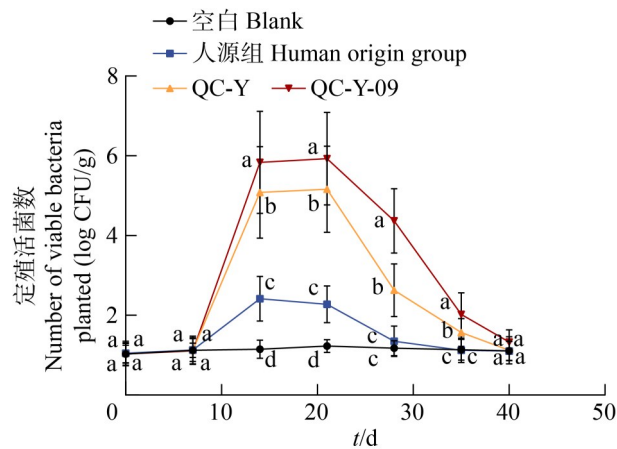


图7 青春双歧杆菌定殖测试结果

Figure 7 Colonization test results of *Bifidobacterium adolescentis*.

### 2.10 QC-Y-09 SNP 统计分析

QC-Y-09 的 SNP 变异分析结果如图 8A 所示。经全基因组测序[由生工生物工程(上海)股份有限公司完成]共检测到 25 781 个 SNP 位点，其中转换变异的比率为 47.21%，包括 C→T

表3 猫换粮应激率

Table 3 Feline food change stress rate

分组	换粮应激率
Groups	Grain exchange stress rate (%)
对照组 Control group	56
试验组 Test group	8*

\* indicating significant difference between groups,  $P < 0.05$ .

(G→A) 和 A→G (T→C); 颠换变异的比率为 52.79%，包括 G→C (C→G)、G→T (C→A) 及 A→T (T→A)。对 SNP 所在基因进行的 KEGG 通路富集分析(图 8B)共注释到 30 条通路，其中核糖体和氨基酰基-tRNA 生物合成通路呈现显著富集( $Q$  值 $< 0.05$ )。核糖体作为蛋白质合成的核心组件，其功能与氨基酰基-tRNA 生物合成系统共同调控细胞的蛋白质翻译效率<sup>[17]</sup>。在核糖体通路中，显著富集的基因包括 *rplB* (编码 L2)、*rpsA* (编码 S7)、*rplC* (编码 L3)、*rplJ* (编码 L10)、*rpsC* (编码 S3)和 *rplK* (编码 L11)等，这些基因产物参与核糖体亚基的组装及翻译过程的

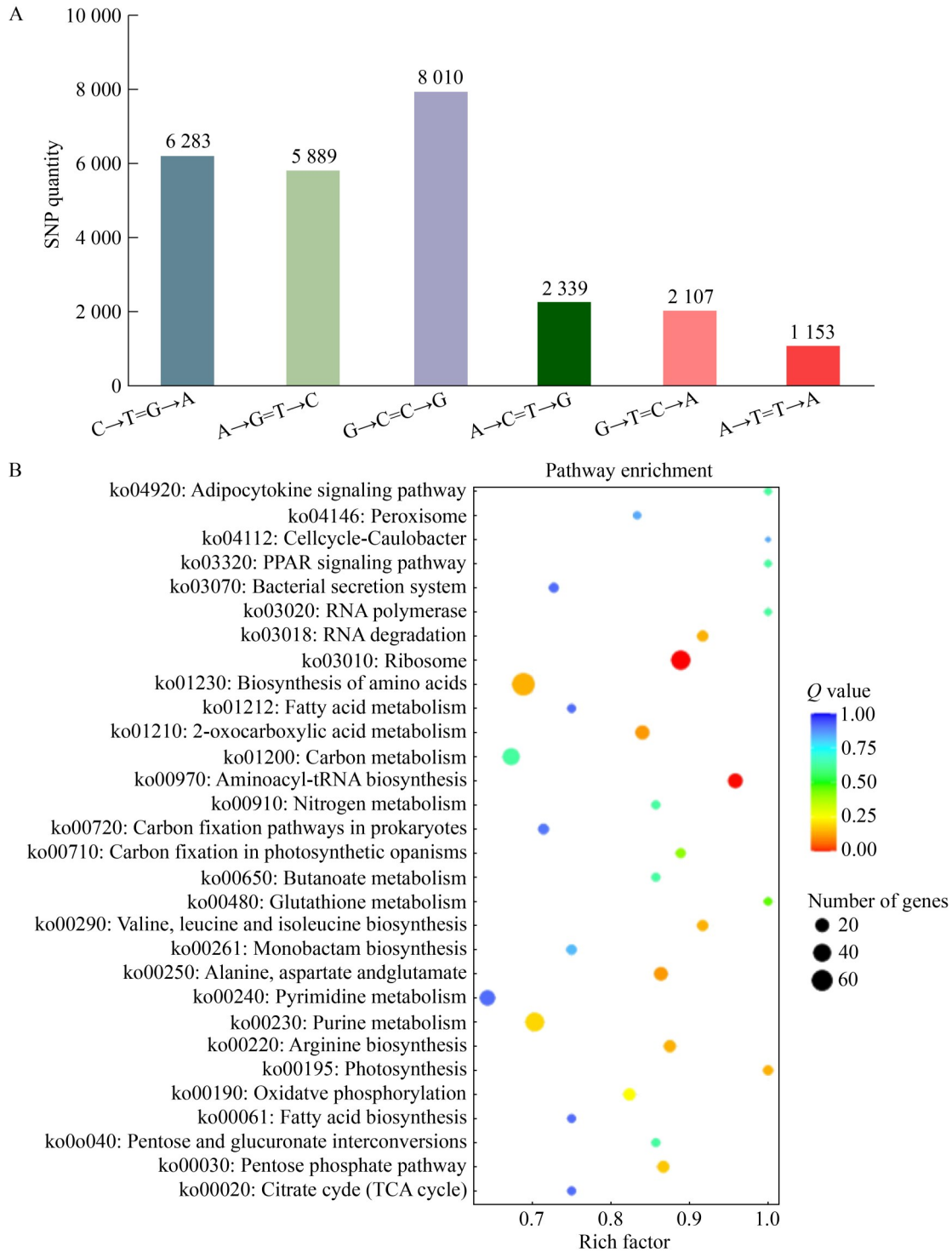


图8 QC-Y-09的SNP及富集通路分析。A: QC-Y-09的SNP分析及SNP突变频谱累积; B: SNP所在基因的KEGG通路。

Figure 8 A SNP and enrichment pathway analysis of QC-Y-09. A: SNP analysis and SNP mutation spectrum accumulation of QC-Y-09; B: KEGG pathway of the gene where the SNP is located.

调控。相比之下，在氨基酰基-tRNA 生物合成通路中富集基因为多种氨基酸-tRNA 连接酶，如 *lysS*、*valS*、*ileS*、*aspS*、*metG* 和 *hisS* 等，均属于催化氨基酸与对应 tRNA 特异性结合的氨基酰-tRNA 合成酶家族，为蛋白质翻译提供活化氨基酸前体。

### 3 讨论与结论

长寿宠物猫和普通宠物猫粪便的分离微生物组成中，占比最高的前 5 种微生物属为肠球菌属、埃希氏菌属、芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属和双歧杆菌属。其中，长寿猫相比普通猫显著增加的仅有芽孢杆菌属和双歧杆菌属，且双歧杆菌属增长率更高，达到了 76.44%。由此可见，双歧杆菌属是长寿猫与普通猫肠道中的一个重要差异菌属。

长寿猫粪便中共分离到双歧杆菌 183 株，其中占比最高的青春双歧杆菌(26.23%)的菌种 1 和菌种 2 分别有 30 株和 18 株，远高于普通猫粪便中分离到的 4 株和 6 株。这 2 组间的巨大差异提示，这 2 个菌种可能与猫寿命的延长有关。研究表明摄入青春双歧杆菌对机体有抗衰老作用，可显著增加血液中超氧化物歧化酶的含量与活性，减少自由基氧化反应对机体细胞的损伤<sup>[18]</sup>。

由于不同生物的生活习性与肠道生态存在差异，动物个体对同源物种的肠道菌具有更好的适应性<sup>[19]</sup>。目前市面上使用的青春双歧杆菌主要是非猫源的，如人源、牛源的。猫的胃肠环境与牛、牛及其他哺乳动物存在诸多不同，例如猫胃酸较酸，pH 为 1.0–2.0，而人和牛的胃酸 pH 为 1.5–3.5；猫肠道胆盐浓度可达 0.4%，人、牛等一般在 0.1%–0.3%；牛作为食草动物、人作为杂食动物，肠道都远比食肉动物的猫长<sup>[20]</sup>。因此在人、牛肠道中食物通过速度相对较慢，青春双歧杆菌有充足的时间和空间进行定殖，而在猫体内青春双歧杆菌则需快速完成定殖，否则很快会被排出体外。研究表明宿主

来源菌在应用于同类宿主时相较于异源菌种具有显著优势<sup>[21]</sup>，本研究中猫肠道定殖试验结果证实了这一说法。在停止补饲菌剂后 7 d，人源组猫粪便中青春双歧杆菌菌数快速降低，而 QC-Y-09 组猫粪便中菌数仍有 4.37 lg CFU/g，比人源组高 3.02 lg CFU/g。

研究表明益生菌具有缓解应激的作用，如能有效缓解小鼠的断奶应激<sup>[22]</sup>，改善人类胃肠道的应激耐受性<sup>[23]</sup>。本研究中 QC-Y-09 能够显著降低猫换粮时的应激情况，可能是因为肠道益生菌菌群在调节情绪方面能发挥重要作用<sup>[24]</sup>，舒缓情绪则有利于缓解应激反应。

经 SNP 分析，选育菌株 QC-Y-09 与原始菌株 QC-Y 在基因层面存在显著差异，差异基因功能主要富集在核糖体结构和氨基酰基-tRNA 生物合成通路上。这些基因翻译后的蛋白主要参与核糖体亚基的组装及蛋白翻译过程的调控。这些遗传变异可能通过以下机制影响菌株表型<sup>[25]</sup>：(1) 改变关键酶(如氨基酰-tRNA 合成酶)的催化活性，调控氨基酸代谢平衡；(2) 影响核糖体组装效率，从而调节蛋白质合成速率；(3) 通过环境响应相关蛋白的翻译调控增强菌株的猫胃肠道环境适应能力。这可能是选育菌株 QC-Y-09 在生长量、猫胃肠环境耐受、定殖能力等方面优于原始菌株的分子原因。

本研究选育得到的青春双歧杆菌 QC-Y-09 菌株对猫胃肠环境具有良好耐受性，且具有良好的传代稳定性。该菌株在猫肠道中的定殖时间显著长于人源菌株。此外，QC-Y-09 对猫的换粮应激反应表现出较好的缓解作用。本研究为青春双歧杆菌在猫用食品中的应用奠定了良好基础。

### 作者贡献声明

李云亮：提出概念、方法论、提供资源、监督管理；王禹程：数据收集与监管、完成呈现、撰写文章；卢宇：数据收集与监管、数据分析；张萌：数据收集与监管、数据分析、撰

写文章; 严子华: 监督管理; 段玉清: 方法论、监督管理; 马海乐: 方法论、提供资源、监督管理。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] BEANE KE, REDDING MC, WANG XF, PAN JH, LE B, CICALO C, JEON S, KIM YJ, LEE JH, SHIN EC, LI Y, ZHAO JC, KIM JK. Effects of dietary fibers, micronutrients, and phytonutrients on gut microbiome: a review[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2021, 64(1): 36.
- [2] 魏宝宁, 何俊慷, 刘文智, 王嘉欣, 詹佩龙, 蔡远荣, 何浩鹏, 张续勳. 犬猫肠道健康的研究进展[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2024, 49(3): 65-70.  
WEI BN, HE JK, LIU WZ, WANG JX, ZHAN PL, CAI YR, HE HP, ZHANG XM. Research progress on the health of canine and feline intestines[J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2024, 49(3): 65-70 (in Chinese).
- [3] 包书芳, 罗佩先, 陈燕妮. 宠物肠道健康与营养调控研究[J]. *兽医导刊*, 2021(5): 91-92.
- [4] 李吉平, 陈雪, 刘建华, 张微, 刘韩. 双歧杆菌生物特性及其功能研究进展[J]. *中国奶牛*, 2020(6): 57-61.  
LI JP, CHEN X, LIU JH, ZHANG W, LIU H. Advances in biological characteristics and functions of *Bifidobacterium*[J]. *China Dairy Cattle*, 2020(6): 57-61 (in Chinese).
- [5] FU YR, YI ZJ, PEI JL, GUAN SZ. Effects of *Bifidobacterium bifidum* on adaptive immune senescence in aging mice[J]. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54(10): 578-583.
- [6] 刘伯阳, 姚淑娟, 夏美玲. 青春双歧杆菌对2型糖尿病模型大鼠肠道菌群和脂质代谢的影响[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2009, 21(10): 877-879.  
LIU BY, YAO SJ, XIA ML. Influence of *Bifidobacterium adolescentis* on intestinal flora and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus rats[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 21(10): 877-879 (in Chinese).
- [7] QI YD, HE JM, ZHANG YW, GE QW, WANG QW, CHEN LY, XU JL, WANG L, CHEN XQ, JIA D, LIN YF, XU CC, ZHANG Y, HOU TY, SI JM, CHEN SJ, WANG LJ. Heat-inactivated *Bifidobacterium adolescentis* ameliorates colon senescence through Paneth-like-cell-mediated stem cell activation[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6121.
- [8] WU L, ZENG TS, ZINELLU A, RUBINO S, KELVIN DJ, CARRU C. A cross-sectional study of compositional and functional profiles of gut microbiota in Sardinian centenarians[J]. *mSystems*, 2019, 4(4): e00325-19.
- [9] 杨阳. 副干酪乳酪杆菌 PC-01 和青春双歧杆菌 B8589 在活性乳酸菌饮料中的应用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.  
YANG Y. Application of *Lactocaseibacillus paracasei* PC-01 and *Bifidobacterium adolescentis* B8589 in active *Lactobacillus* beverage[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [10] LESER T, BAKER A. *Bifidobacterium adolescentis*: a beneficial microbe[J]. *Beneficial Microbes*, 2023, 14(6): 525-551.
- [11] 张安民. 犬、猫体温变化的疾病诊断[J]. *湖北畜牧兽医*, 2001, 22(3): 35-36.  
ZHANG AM. Diagnosis of diseases caused by changes in cat body temperature[J]. *Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2001, 22(3): 35-36 (in Chinese).
- [12] MIYAZAKI T, SASAKI SI, TOYODA A, SHIRAI M, IKEGAMI T, HONDA A. Impaired bile acid synthesis in a taurine-deficient cat model[M]//Taurine 12: A Conditionally Essential Amino Acid. Cham: Springer International Publishing, 2022: 195-203.
- [13] 张敏, 郑媛, 赵玉洋, 周骏辉, 南铁贵, 袁媛. 假单胞菌菌株 ZL8 发酵培养基及发酵条件的优化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(22): 174-181.  
ZHANG M, ZHENG Y, ZHAO YY, ZHOU JH, NAN TG, YUAN Y. Optimization of culture medium and fermentation condition of *Pseudomonas* ZL8[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(22): 174-181 (in Chinese).
- [14] 耿海波, 郑辉, 张丽媛, 郭会灿, 李浩楠, 张世佳, 安丽平. 常压室温等离子体诱变选育耐酸酿酒酵母菌株[J]. *中国酿造*, 2022, 41(2): 144-148.  
GENG HB, ZHENG H, ZHANG LY, GUO HC, LI HN, ZHANG SJ, AN LP. Breeding of acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by ARTP mutation[J]. *China Brewing*, 2022, 41(2): 144-148 (in Chinese).
- [15] 李弘, 陈文明, 刘林, 姜帆. 防风解热合剂对胃液分泌、胃排空及肠蠕动影响的实验研究[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(1): 33-35, 40.  
LI H, CHEN WM, LIU L, JIANG F. Effects of Fangfeng Jiere mixture on gastric juice secretion, gastric emptying and intestinal peristalsis[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2020, 29(1): 33-35, 40 (in Chinese).
- [16] 薛俊敏. 茶多酚对小鼠肠道菌群、肠道酶活性及短链脂肪酸的影响[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.  
XUE JM. Effect of tea polyphenols on intestinal flora, intestinal enzyme activities and short chain fatty acids in mice[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2018 (in Chinese).
- [17] RODRIGUEZ MV. The ribosome as a versatile catalyst: reactions at the peptidyl transferase center[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(4): 595-602.
- [18] CHEN SJ, CHEN LY, QI YD, XU JL, GE QW, FAN YD, CHEN D, ZHANG YW, WANG L, HOU TY, YANG XH, XI YM, SI JM, KANG LJ, WANG LJ. *Bifidobacterium adolescentis* regulates catalase activity and host metabolism and improves healthspan and lifespan in multiple species[J]. *Nature Aging*, 2021, 1(11): 991-1001.
- [19] LI N, ZUO B, HUANG SM, ZENG BH, HAN DD, LI

- TT, LIU T, WU ZH, WEI H, ZHAO JC, WANG JJ. Spatial heterogeneity of bacterial colonization across different gut segments following inter-species microbiota transplantation[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 161.
- [20] DeSESSO JM, WILLIAMS AL. Contrasting the gastrointestinal tracts of mammals: factors that influence absorption[M]//Annual Reports in Medicinal Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2008: 353-371.
- [21] ZMORA N, ZILBERMAN-SCHAPIRA G, SUEZ J, MOR U, DORI-BACHASH M, BASHIARDES S, KOTLER E, ZUR M, REGEV-LEHAVI D, BRIK RB, FEDERICI S, COHEN Y, LINEVSKY R, ROTHSCHILD D, MOOR AE, BEN-MOSHE S, HARMELIN A, ITZKOVITZ S, MAHARSHAK N, SHIBOLET O, et al. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1388-1405.e21.
- [22] 王海玉, 郭云霞, 段春辉, 丁亚伟, 张英杰, 刘月琴, 纪守坤, 严慧. 复合益生菌对哺乳羔羊生长性能及断奶应激的影响[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(8): 5250-5260.
- WANG HY, GUO YX, DUAN CH, DING YW, ZHANG YJ, LIU YQ, JI SK, YAN H. Effects of compound probiotics on growth performance and weaning stress of lactating lambs[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(8): 5250-5260 (in Chinese).
- [23] KOZAWA T, AOYAGI H. Novel method for screening probiotic candidates tolerant to human gastrointestinal stress[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2024, 222: 106945.
- [24] CHAO LM, LIU C, SUTTHAWONGWADEE S, LI YF, LV WJ, CHEN WQ, YU LZ, ZHOU JH, GUO A, LI ZQ, GUO SN. Effects of probiotics on depressive or anxiety variables in healthy participants under stress conditions or with a depressive or anxiety diagnosis: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Frontiers in Neurology*, 2020, 11: 421.
- [25] LUKARSKA M, PALENCIA A. Aminoacyl-tRNA synthetases as drug targets[M]//Biology of Aminoacyl-tRNA Synthetases. Amsterdam: Elsevier, 2020: 321-350.