

3 种培养基对鸡肉产品中两类耐药菌培养的影响

Effects of three media on the isolation of two kinds of antimicrobial-resistant bacteria from chicken products

黄柳娟¹ 樊彦莉² 钟海³ 蒋静² 邵毅¹

HUANG Liujuan¹ FAN Yanli² ZHONG Hai³ JIANG Jing² SHAO Yi¹

(1. 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403; 2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 3. 上海海关, 上海 200135)

(1. Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China; 3. Shanghai Customs, Shanghai 200002, China)

摘要:目的:评估不同培养基对鸡肉产品表面四环素耐药(T^r)菌和磺胺耐药(S^r)菌菌群的培养效果差异。方法:基于高通量测序技术,分析分别在脑心浸液肉汤(BHI)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和平板计数琼脂(PCA)3种培养基上培养获得的冷鲜鸡和鸡肉熟食表面T^r菌和S^r菌的菌群结构及丰度。结果:在冷鲜鸡表面鉴定到的101个属的耐药细菌中,仅在BHI、TSA和PCA培养基上获得培养的特有T^r菌属各有30,5,3个,特有S^r菌属各有9,8,14个;在鸡肉熟食样品表面鉴定到的50个属的耐药菌中,3种培养基上的特有T^r菌属分别为3,2,1个,特有S^r菌属分别为1,6,0个。耐药菌属丰度差异的Metastat分析结果表明,BHI和TSA对耐药菌群的结构影响具有较高的相似性,冷鲜鸡表面4种T^r菌(气单胞菌属 *Aeromonas* spp.、水栖菌属 *Enhydrobacter* spp.、乳杆菌属 *Lactobacillus* spp.和泛菌属 *Pantoea* spp.)和2种S^r菌(肠球菌属 *Enterococcus* spp.和乳杆菌属 *Lactobacillus* spp.)在PCA培养基上获得培养的稳定性及丰度均较高。结论:不同培养基获得耐药菌的种类及丰度存在差异,应汇总多种培养基培养所得菌群的测序信息,才能完整描述鸡肉样品表面耐药菌的组成。

关键词:鸡肉;脑心浸液肉汤培养基(BHI);胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA);平板计数琼脂培养基(PCA);四环素

耐药菌;磺胺耐药菌;高通量测序

Abstract: **Objective:** To evaluate the isolation effects of different media on antimicrobial resistant (ART) bacteria flora from the surface of cold fresh and cooked chicken products. **Methods:** Based on high-throughput sequencing technology, the flora structure and abundance of tetracycline-resistant (T^r) and sulfamethazole-resistant (S^r) bacteria isolated by brain heart infusion (BHI), tryptic soy agar (TSA) and plate count agar (PCA) media was comparatively analyzed. **Results:** Among the 101 genera of ART bacteria from cold fresh chicken samples, 30, 5 and 3 genera of T^r bacteria were isolated only on BHI, TSA and PCA media respectively, while the genus numbers of S^r bacteria were 9, 8 and 14 respectively. Among the 50 genera of ART bacteria from cooked chicken samples, the endemic genera were 3, 2 and 1 in T^r bacteria as well as 1, 6 and 0 in S^r bacteria isolated from the three media. Metastat analysis of the ART bacteria abundance showed that, a high similarity was existed in BHI and TSA considering their effects on the structure of ART bacteria, while the stability and abundance of four genus of T^r bacteria, i. e. *Aeromonas* spp., *Enhydrobacter* spp., *Lactobacillus* spp. and *Pantoea* spp. As well as two genus of S^r bacteria, i. e. *Enterococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. were significantly higher on PCA in cold fresh chicken samples. **Conclusion:** Differences of types and abundance of cultivable ART bacteria are existed between the three medias. Therefore, it is necessary to integrate the sequencing information of flora isolated from multifarious media to comprehensively describe the composition of ART bacteria on the surface of chicken samples.

Keywords: chicken; brain heart infusion (BHI); tryptic soy agar (TSA); plate count agar (PCA); tetracycline-resistant (T^r) bacteria; sulfamethazole-resistant (S^r) bacteria; high-

基金项目:上海市科技兴农项目(编号:2022-02-08-00-12-F01089);国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:31401599)

作者简介:黄柳娟,女,上海市农业科学院研究实习员,硕士。

通信作者:邵毅(1982—),女,上海市农业科学院副研究员,博士。

E-mail: shao_saas@163.com

收稿日期:2022-12-21 **改回日期:**2023-06-01

throughput sequencing

养殖业抗生素的滥用导致农业生产成为抗生素耐药菌(Antimicrobial resistant bacteria, ART)的一大来源^[1], 农业源 ART 菌可能通过食物链传播至人类^[2]。水平基因迁移(Horizontal gene transfer, HGT)是耐药基因在各类细菌中扩散的重要方式^[3], 但相较于致病菌, 数量庞大、遗传背景丰富、可能更频繁地参与 HGT 的非致病菌的耐药性尚未受到系统监测和研究^[4]。其中标准化、批量化培养、分离 ART 菌技术的缺乏, 是制约非致病菌耐药性研究的瓶颈问题之一。

活细菌的分离检测对于细菌种类的进一步表征至关重要^[5]。培养基类型和成分浓度^[6]会影响可培养细菌群落构成^[7]和单类细菌的生长速率^[8], 以及对抗生素的耐受性^[9-10]。针对未知耐药细菌群落的初步筛查或耐药基因的迁移研究, 科研人员使用脑心浸液肉汤(BHI)^[11-12]、麦康凯琼脂^[13]、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)^[14]、LB^[15]、平板计数琼脂(PCA)^[16]等培养基, 但这些培养基对不同基质中的不同 ART 菌的培养效果并未得到评估。

培养基营养物质的丰富度对可培养细菌的种类和数量的影响尚无定论^[17], 鉴于 BHI、TSA 和 PCA 培养基对细菌培养的普适性或在标准化操作中的广泛应用^[18-19], 研究拟以这 3 种培养基为例, 基于高通量测序技术, 分析在不同培养基上培养获得的冷鲜鸡和鸡肉熟食表面四环素耐药(Tetracycline resistant, T^r)菌和磺胺耐药(Sulfamethoxazole resistant, S^r)菌的菌群结构和菌属丰度, 为评估培养基对不同基质上不同 ART 菌的培养效果提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

4 份冷鲜鸡产品(整鸡、鸡胸肉、鸡腿肉和鸡翅, 编号分别为 F1、F2、F3 和 F4)和 3 份散装鸡肉熟食制品(白斩鸡、盐水鸡和烤鸡, 编号分别为 R1、R2 和 R3); 无菌袋包装后置于冰袋中, 3 h 内送回实验室, 市售;

PCA 培养基、BHI 培养基及 TSA 培养基: 英国 OXOID 公司;

真菌抑制剂放线菌酮(Cyc): 分析纯, 美国 AMRESCO 公司;

四环素(Tet)、磺胺甲恶唑(Sul)、甲氧苄啶(Tri): 分析纯, 美国 SIGMA 公司;

生理盐水: 广东环凯微生物科技有限公司;

医用酒精: 国药集团化学试剂有限公司;

细菌基因组提取试剂盒: 德国 QIAGEN 公司;

聚合酶链式反应(PCR)试剂盒、琼脂糖电泳试剂盒:

北京全式金生物技术有限公司;

PCR 产物电泳凝胶回收试剂盒: 美国 Thermo Scientific 公司;

PCR 引物: 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

均质机: BAGMIXER400 型, 法国 Interscience 公司;

水平核酸电泳系统: Mini-Sub cell GT 型, 美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像系统: Criterion Stain Free 型, 美国 Bio-Rad 公司;

超微量分光光度计: NanoDrop 2000c 型, 美国 Thermo 公司;

高压灭菌锅: SX-500 型, 日本 TOMY 公司。

1.2 方法

1.2.1 T^r 菌和 S^r 菌的培养 根据 GB 4789.2—2016 和 Huang 等^[11]的方法从鸡肉样品表面初步培养出对四环素或磺胺甲恶唑耐药的细菌。无菌条件下将样品表面(深度不超过 5 mm)的组织剪碎, 混匀, 准确称量 25 g 于无菌袋中, 加入 225 mL 0.9% 无菌生理盐水, 用均质机拍打 2 min 制成均质液。吸取 200 μ L 均质液分别均匀涂布于 3 种培养基(BHI、TSA、PCA)平皿上, 每种培养基平皿中含有 16 μ g/mL Tet 和 100 μ g/mL Cyc(分别记为 BHI_{tet} 组、TSA_{tet} 组和 PCA_{tet} 组), 或 152 μ g/mL Sul、8 μ g/mL Tri 和 100 μ g/mL Cyc(分别记为 BHI_{sul} 组、TSA_{sul} 组和 PCA_{sul} 组), 或仅含有 100 μ g/mL Cyc(分别记为 BHI_{cyc} 组、TSA_{cyc} 组和 PCA_{cyc} 组), 分别对样品中的可培养 T^r 菌、可培养 S^r 菌和可培养总菌进行培养。每个处理重复 3 次。所有平皿于 (30 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 下倒置培养 48 h, 将同组的 3 个平皿中的菌体全部刮取并混合, 提取细菌总脱氧核糖核酸(DNA)后进行菌群多样性分析。

1.2.2 细菌总 DNA 的提取 用 2 mL 生理盐水重悬刮取培养皿上的菌体, 充分混匀, 取 100 μ L 菌悬液, 用细菌基因组提取试剂盒提取细菌总 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计测定后, 对 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行扩增, 上游引物为 341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3', 下游引物为 806R: 5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物质量后, 委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行高通量测序。

1.2.3 高通量测序 基于 IonS5™ XL 测序平台进行测序, 使用 Cutadapt(V1.9.1)^[20]对 reads 进行低质量部分剪切, 得到最终的有效数据(Clean Reads)。利用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001)^[21]对所有样品的全部 Clean Reads 进行聚类, 默认以 97% 的一致(Identity)将序列聚类成为 OTUs, 对 OTUs 序列进行物种注释。对各样品的数据进

行均一化处理,以样品中数据量最少的为标准进行均一化处理,最终确定各物种的相对丰度。基于均一化处理后的数据,利用 β 多样性分析中的主坐标分析(PcoA)比较样本之间的差异,并用 MetaStat 方法对组间的物种丰度数据进行假设检验得到 P 值,根据 P 值筛选具有显著性差异的物种。

2 结果与分析

2.1 两类可培养 ART 菌的菌群结构及可培养总菌的差异

由图 1、图 2 可知,不论使用哪种培养基,每个样品中的两类 ART 菌与总菌相比,排名前十的优势菌属在种类和丰度上均有差异,甚至在冷鲜鸡和鸡肉熟食样品中分别有 5(样品 F2,用 PCA 培养)~30(样品 F1,用 BHI 培养)、8(样品 R2,用 PCA 培养)~20(样品 R2,用 BHI 培养)个属的耐药细菌在对应的可培养总菌(从不含抗生素

的培养基上培养获得)中并未得到鉴定,说明冷鲜鸡和鸡肉熟食表面各类耐药细菌菌群的组成各不相同。因此,有必要研究不同培养基对某类 ART 菌菌群培养效果的影响。

2.2 3 种培养基对两类可培养 ART 菌组分的影响

由表 1、表 2 可知,冷鲜鸡表面共鉴定出 78 个属的 T^r 菌和 77 个属的 S^r 菌,多于前期研究^[22]及单一 BHI 培养基中的。其中 34 个种属的 T^r 菌和 33 个种属的 S^r 菌在 3 种培养基上被鉴定出,而仅在 BHI、TSA 和 PCA 培养基上鉴定出的特有 T^r 菌属各有 30,5,3 个,S^r 菌属为 9,8,14 个。

在鸡肉熟食样品表面共鉴定出 28 个属的 T^r 菌和 43 个属的 S^r 菌,其中 3 种培养基的共有菌属分别为 19,28 个,特有 T^r 菌属分别为 3,2,1 个,S^r 菌属分别为 1,6,0 个。微生物菌群中某个菌株或某类菌属是否能获得培

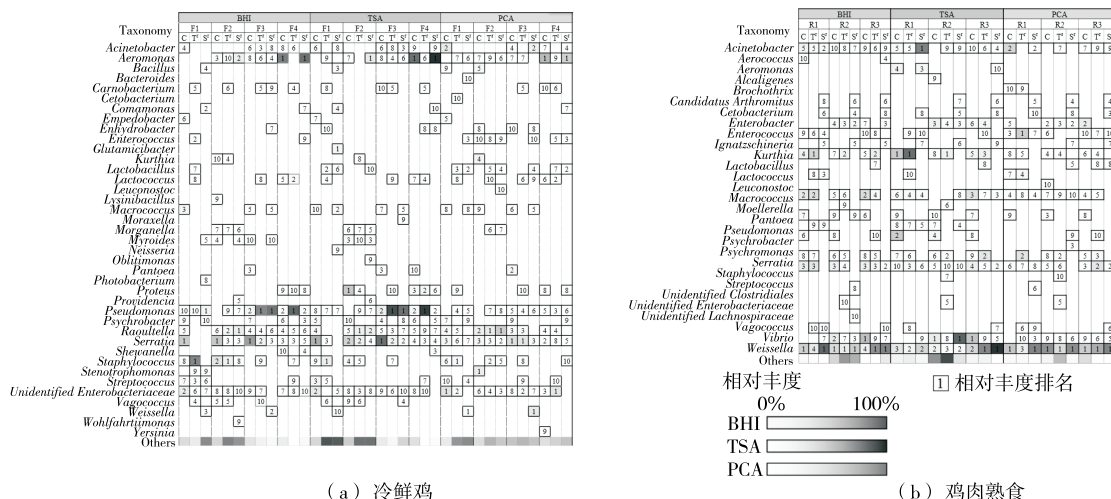


图 1 3 种培养基上的可培养总菌(C)、T^r 菌和 S^r 菌的优势菌属及丰度排名

Figure 1 Predominant genera and abundance ranking of culturable total bacteria, tetracycline-resistant bacteria and sulfonamide-resistant bacteria on three media

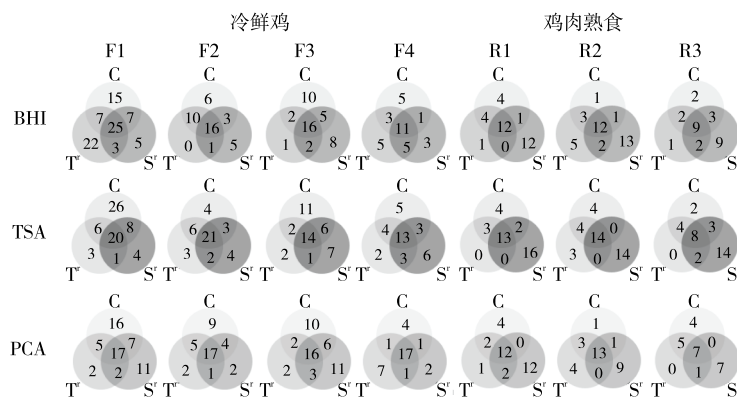


图 2 3 种培养基上的可培养总菌(C)、T^r 菌和 S^r 菌的种属数维恩图

Figure 2 Venn diagrams of genus numbers of culturable total bacteria, tetracycline-resistant bacteria and sulfonamide-resistant bacteria on three media

养,除受培养基能提供的营养支持及抗生素抑制外,还受到周边菌群的协同促进或竞争抑制。鸡肉熟食表面只在 PCA 培养基上得到培养的 T^r 菌为环丝菌属 (*Brochothrix* spp.),只在 BHI 培养基上得到培养的 S^r 菌为乳杆菌属 (*Lactobacillus* spp.),只在 TSA 培养基上得到培养的 S^r 菌为拟杆菌属 (*Bacteroides* spp.)和肉杆菌属

(*Carnobacterium* spp.),但这些菌属在冷鲜鸡样品中的 3 种培养基上均能得到培养;而冷鲜鸡表面只在 PCA 培养基上得到培养的 S^r 菌 *Cetobacterium* spp.在鸡肉熟食样品中的 3 种培养基上均能得到培养,慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium* spp.)在鸡肉熟食样品中用 TSA 培养基也能得到培养。因此,培养基对表1、表2中涉及的菌

表 1 3 种培养基特异性培养的 T^r 菌

Table 1 Tetracycline-resistant bacteria cultured on one media only

门	BHI		TSA		PCA	
	冷鲜鸡	鸡肉熟食	冷鲜鸡	鸡肉熟食	冷鲜鸡	鸡肉熟食
放线菌门 (Actinobacteria)	双歧杆菌属 (<i>Bifidobacterium</i> spp.)、 <i>Iamia</i> spp.、微杆菌属 (<i>Microbacterium</i> spp.)、分枝 杆菌属 (<i>Mycobacterium</i> spp.)、罗氏菌属(<i>Rothia</i> spp.)	/	/	/	/	/
	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	铁锈菌属 (<i>Ferruginibacter</i> spp.)、未知的腐螺旋菌科属 (unidentified <i>Saprospiraceae</i>)	<i>Muribaculum</i> spp.	/	/	/
厚壁菌门 (Firmicutes)	无杆菌属 (<i>Agathobacter</i> spp.)、拟梭菌属 (<i>Clostridioides</i> spp.)、艾森伯 格菌(<i>Eisenbergiella</i> spp.)、杜 氏杆菌属(<i>Dubosiella</i> spp.)、 黄曲霉属 (<i>Flavonifractor</i> spp.)、 <i>Lachnoclostridium</i> spp.、束毛球菌属 (<i>Trichococcus</i> spp.)、未知的 丹毒丝菌科属 (unidentified <i>Erysipelotrichaceae</i>)	微小杆菌属 (<i>Exiguobacterium</i> spp.)、未知的瘤胃 球菌科属 (unidentified <i>Ruminococcaceae</i>)	乏养菌属 (<i>Abiotrophia</i> spp.)、 赖氨酸芽孢杆菌属 (<i>Lysinibacillus</i> spp.)、八叠球菌属 (<i>Sporosarcina</i> spp.)	未知的梭菌目属	明串珠菌属 (<i>Leuconostoc</i> spp.)	环丝菌属 (<i>Brochothrix</i> spp.)
	硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)	未知的硝化螺旋菌科属 (unidentified <i>Nitrospiraceae</i>)	/	/	/	/
变形菌门 (Proteobacteria)	食酸菌属(<i>Acidovorax</i> spp.)、 <i>Allysiosphaera</i> spp.、水小杆 菌属 (<i>Aquabacterium</i> spp.)、 水单胞菌属 (<i>Aquimonas</i> spp.)、慢生根瘤菌属 (<i>Bradyrhizobium</i> spp.)、丛毛 单胞菌属(<i>Comamonas</i> spp.)、 脱氯菌属 (<i>Dechloromonas</i> spp.)、代尔夫特菌属(<i>Delftia</i> spp.)、 <i>Dokdonella</i> spp.、螺杆 菌属 (<i>Helicobacter</i> spp.)、 <i>Inhella</i> spp.、 <i>Nordella</i> spp.、 发光杆菌属 (<i>Photobacterium</i> spp.)、鞘脂单胞菌属 (<i>Sphingomonas</i> spp.)	产碱菌属 (<i>Alcaligenes</i> spp.)	希万氏菌属 (<i>Shewanella</i> spp.)	短波单胞菌属 (<i>Brevundimonas</i> spp.)	水栖菌属 (<i>Enhydrobacter</i> spp.)、莫拉菌属 / (<i>Moraxella</i> spp.)	/

表 2 3 种培养基特异性培养的 S^r 菌
Table 2 Sulfamethoxazole-resistant bacteria cultured on one media only

门	BHI		TSA		PCA	
	冷鲜鸡	鸡肉熟食	冷鲜鸡	鸡肉熟食	冷鲜鸡	鸡肉熟食
放线菌门 (Actinobacteria)	节杆菌属 (<i>Arthrobacter</i> spp.)、考克氏菌属 (<i>Kocuria</i> spp.)		罗氏菌属 (<i>Rothia</i> spp.)		暂定 <i>Aquiluna</i> spp.、皮生球菌属 (<i>Dermacoccus</i> spp.)	
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	/	/	金黄杆菌属 (<i>Chryseobacterium</i> spp.)	拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i> spp.)	另枝菌属 (<i>Alistipes</i> spp.)、穆里巴库鲁姆菌属 (<i>Muribaculum</i> spp.)、热芽胞杆菌属 (<i>Thermobacillus</i> spp.)	/
厚壁菌门 (Firmicutes)	拟梭菌属 (<i>Clostridioides</i> spp.)、艾森伯格菌 (<i>Eisenbergiella</i> spp.)、黄曲霉属 (<i>Flavoni fractor</i> spp.)、 <i>Lachnoclostridium</i> spp.	乳杆菌属 (<i>Lactobacillus</i> spp.)	孪生菌属 (<i>Gemella</i> spp.)	肉杆菌属 (<i>Carnobacterium</i> spp.)、罗斯氏菌属 (<i>Roseburia</i> spp.)、暂定 <i>Stoquefichus</i> spp.	无杆菌属 (<i>Agathobacter</i> spp.)、花球菌属 (<i>Anthococcus</i> spp.)	/
硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)	/	/	/	/	/	/
变形菌门 (Proteobacteria)	产碱菌属 (<i>Alcaligenes</i> spp.)、发光杆菌属 (<i>Photobacteriu</i> spp.)、 <i>Wohlfahrtiimonas</i> spp.	/	弓形杆菌属 (<i>Arcobacter</i> spp.)、莫拉菌属 (<i>Moraxella</i> spp.)、奈瑟菌属 (<i>Neisseria</i> spp.)、 <i>Oblitimonas</i> spp.、拉恩氏菌属 (<i>Rahnella</i> spp.)	慢生根瘤菌属 (<i>Bradyrhizobium</i> spp.)、莫拉菌属 (<i>Moraxella</i> spp.)	无色杆菌属 (<i>Achromobacter</i> spp.)、暂定 <i>Alysiosphaera</i> spp.、慢生根瘤菌属 (<i>Bradyrhizobium</i> spp.)、代尔夫特菌属 (<i>Delftia</i> spp.)、嗜血菌属 (<i>Haemophilus</i> spp.)、鞘脂单胞菌属 (<i>Sphingomonas</i> spp.)	/
梭杆菌门 (Fusobacteria)	/	/	/	/	<i>Cetobacterium</i> spp.	/

属的培养偏好性还需进一步验证。

2.3 3 种培养基对两类可培养 ART 菌丰度的影响

主坐标分析结果表明,经 3 种培养基培养后,冷鲜鸡和鸡肉熟食样品表面两类可培养 ART 菌的主要群落结构差异不大。进而用 Metastat 法分析经 3 种培养基培养后丰度产生差异的 ART 菌菌属,即在 BHI_{tet} 组、TSA_{tet} 组和 PCA_{tet} 组之间分别进行两两比较。组间聚类结果表明,BHI 和 TSA 对所培养细菌的丰度具有较高的相似性。由图 3、图 4 可知,冷鲜鸡表面有 5 个属的 T^r 菌和 3 个属的 S^r 菌在不同培养基上产生了显著差异。其中,4 种 T^r 菌(气单胞菌属 *Aeromonas* spp.、水栖菌属 *Enhydrobacter* spp.、乳杆菌属 *Lactobacillus* spp.和泛菌属 *Pantoea* spp.)和 2 种 S^r 菌(肠球菌属 *Enterococcus* spp.和乳杆菌属 *Lactobacillus* spp.)在 PCA 培养基上能获得

培养的稳定性及丰度均较高,而 1 种 T^r 菌(漫游菌属 *Vagococcus* spp.)和 1 种 S^r 菌(类香味菌属 *Myroides* spp.)在 BHI 培养基上获得培养的稳定性及丰度均显著较高。上述菌属中,肠球菌属、乳杆菌属、漫游菌属和类香味菌属曾被报道是冷鲜鸡肉产品表面的优势菌属^[23],肠球菌属和乳杆菌属的细菌还被证实较多地参与了耐药基因的水平迁移^[24]。因此,当研究对象包含上述菌属时,可针对性地选择更适合的培养基以获得更多的目标菌株。

由图 5、图 6 可知,鸡肉熟食样品表面有 1 个属的 T^r 菌和 5 个属的 S^r 菌在 3 种培养基上产生了显著差异。其中,对四环素耐药的库特氏菌属 *Kurthia* spp.在 BHI 培养基上的丰度显著高于 PCA 培养基上的;而 2 种 S^r 菌(依格纳季氏菌属 *Ignatzschineria* spp.和未知的毛螺菌

科 *Lachnospiraceae* 属)在 BHI 培养基上的丰度显著较高,3 种 *S⁺* 菌(经黏液真杆菌属 *Blautia* spp.、巨球菌属 *Macroccus* spp.和未知的瘤胃球菌科 *Ruminococcaceae* 属)在 TSA 培养基上的丰度较高。

营养物质可用性的差异会影响菌落形成的程度^[25],

可能是造成 3 种培养基对鸡肉产品中两类耐药菌培养效果差异的原因。由于可能高达 99.999% 的微生物物种无法通过常规的培养方法获得^[26],因此,突破现有常用培养基的局限、优化培养基成分是微生物菌种分离领域的重要研究方向。其中,稀释传统培养基^[27]或添加细菌来源

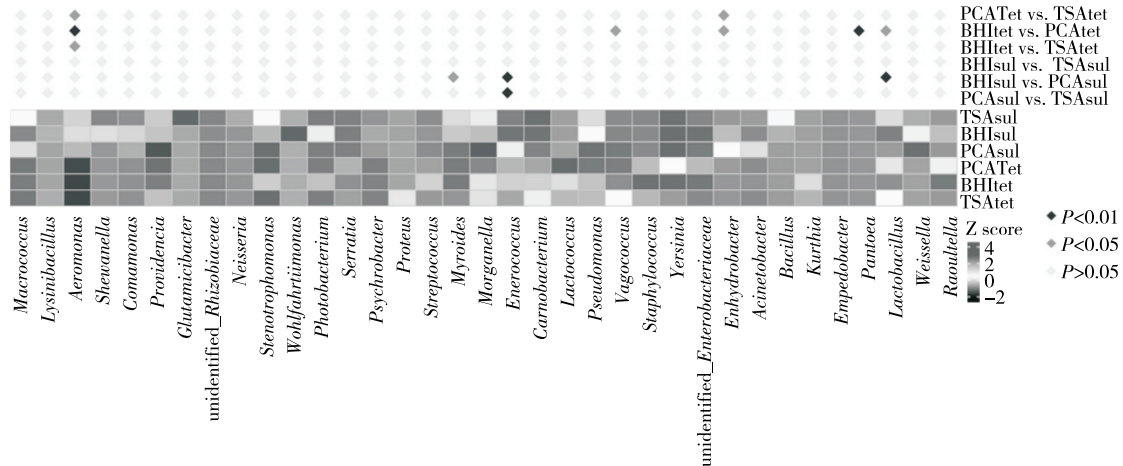


图 3 冷鲜鸡表面耐药菌经不同培养基培养后的差异菌属

Figure 3 Different genera of ART bacteria from cold fresh chicken isolated with different media

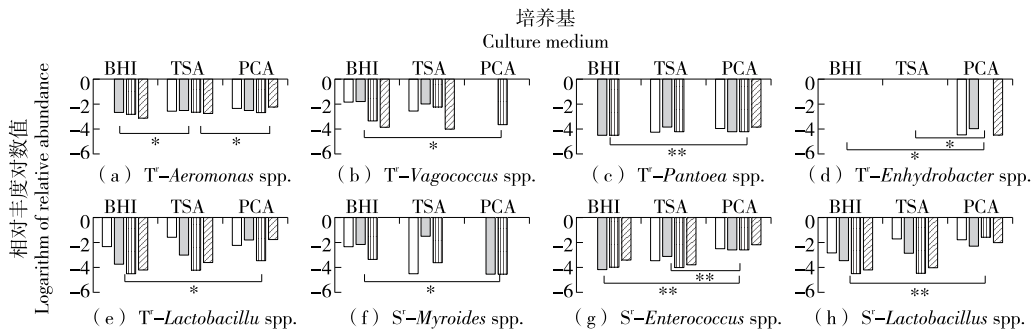


图 4 冷鲜鸡表面差异耐药菌菌属的丰度

Figure 4 Abundance of ART bacteria with discrepancy in cold fresh chicken

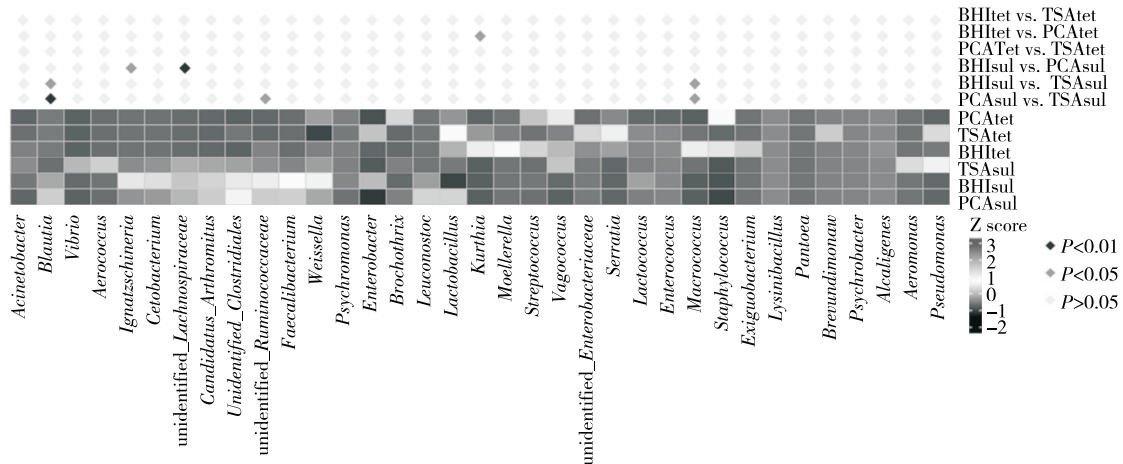


图 5 鸡肉熟食表面耐药菌经不同培养基培养后的差异菌属

Figure 5 Different genera of ART bacteria from cooked chicken isolated with different media

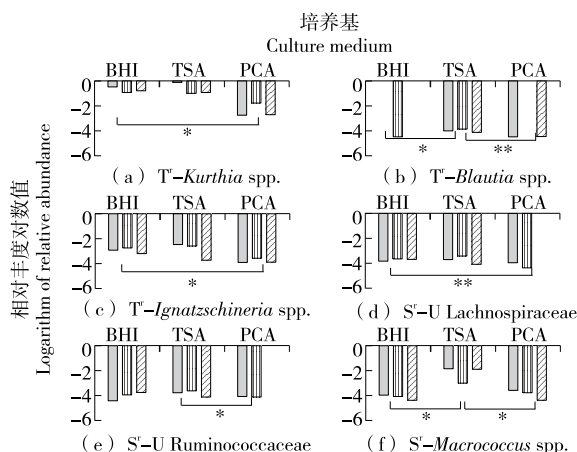


图 6 鸡肉熟食表面差异耐药菌菌属的丰度

Figure 6 Abundance of ART bacteria with discrepancy in cooked chicken

环境成分作为培养基补充物^[28]是提高可培养细菌的物种数量乃至发现新物种的有效途径。这些方法在鸡肉可培养耐药菌多样性的提高方面的可用性,以及适宜的稀释倍数或添加物浓度还需更加深入的研究。

3 结论

研究基于高通量测序技术,以脑心浸液肉汤培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基和平板计数琼脂培养基 3 种培养基为例,分析比较了不同培养基上培养获得的冷鲜鸡和鸡肉熟食表面四环素耐药(T^r)菌和磺胺耐药(S^r)菌的菌群结构。结果表明,3 种培养基上均能获得培养的菌属数仅为总可培养的抗生素耐药菌属数的 43.59%(34/78,冷鲜鸡 T^r 菌),42.86%(33/77,冷鲜鸡 S^r 菌),67.86%(19/28,鸡肉熟食 T^r 菌)和 65.12%(19/28,鸡肉熟食 S^r 菌)。3 种培养基对冷鲜鸡和鸡肉熟食样品表面两类可培养抗生素耐药菌的主要菌落结构的影响不大,但对部分菌属的丰度产生了显著影响,这些菌属可能在数量或特性上是耐药研究需要重点关注的菌群。因此,汇总多种培养基上获得的菌群信息可以更完善地描述鸡肉样品表面抗生素耐药菌的组成。

参考文献

- [1] CHANG Q Z, WANG W K, GILI R Y, et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? [J]. Evolutionary Applications, 2015, 8(3): 240-247.
- [2] WANG H H, MANUZON M, LEHMAN M, et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254(2): 226-231.
- [3] WANG H H, SCHAFFNER D W. Antibiotic resistance: How much do we know and where do we go from here? [J]. Applied and

Environmental Microbiology, 2011, 77(20): 7 093-7 095.

- [4] 周畅, 张陆, 王子华, 等. 抗生素耐药性的多重风险因子及针对性管控策略[J]. 微生物学报, 2018, 58(11): 2 040-2 050.
ZHOU Y, ZHANG L, WANG Z H, et al. Key risk factors of antibiotic resistance ecology and targeted control strategies[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(11): 2 040-2 050.
- [5] MARTIENSSEN M, BOLLMANN J, NIXDORF B, et al. Calculation of hypolimnic denitrification in a dimictic freshwater lake during summer stratification [J]. Aquatic Microbial Ecology, 2019, 83(2): 189-201.
- [6] BARTELME R P, CUSTER J M, DUPONT C L, et al. Influence of substrate concentration on the culturability of heterotrophic soil microbes isolated by high-throughput dilution-to-extinction cultivation[J]. mSphere, 2020, 5(1): e00024.
- [7] AAGOTN, NYBROE O, NIELSEN P, et al. An altered pseudomonas diversity is recovered from soil by using nutrient-poor pseudomonas-selective soil extract media [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5 233-5 239.
- [8] 黄燕燕, 何嘉敏, 赵珊, 等. 植物乳杆菌 DMDL 9010 培养基优化及其安全性评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 130-139.
HUANG Y Y, HE J M, ZHAO S, et al. Medium optimization and its safe assessment of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 130-139.
- [9] DI VENANZIO G, FLORES-MIRELES A L, CALIX J J, et al. Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes [J]. Nature Communication, 2019, 10: 2 763.
- [10] 曲星伊, 刘笑芬, 卞星晨, 等. 比较在肉汤及人工痰液培养基中多黏菌素 E 对鲍曼不动杆菌的杀菌效果[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(2): 194-200.
QU X Y, LIU X F, BIAN X C, et al. The bactericidal effect of colistin against *Acinetobacter baumannii* in broth versus artificial sputum medium [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2021, 21(2): 194-200.
- [11] HUANG Y, ZHANG L, TIU L, et al. Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 914.
- [12] ARIAS C A, PANESSO D, SINGH K V, et al. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(10): 4 240-4 246.
- [13] THALLER M C, MIGLIORE L, MARQUEZ C, et al. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galápagos Land Iguanas: No man, no resistance [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e8989.
- [14] LAW A, SOLANO O, BROWN C J, et al. Biosolids as a source of antibiotic resistance plasmids for commensal and pathogenic bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 606409.

- [15] HYDE J, GORHAM C, BRACKNEY D E, et al. Antibiotic resistant bacteria and commensal fungi are common and conserved in the mosquito microbiome[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0218907.
- [16] LEHMAN M. Assessment of antibiotic resistant commensal bacteria in food[D]. Columbus: Ohio State University, 2006: 27.
- [17] BLLMANN J, MARTIENSSEN M. Comparison of different media for the detection of denitrifying and nitrate reducing bacteria in mesotrophic aquatic environments by the most probable number method[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 168: 105808.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求: GB 4789.28—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 14.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National standard for food safety: Quality requirements for culture media and reagents for microbiological examination of food: GB 4789. 28—2013 [S]. Beijing: China Standards Press, 2013: 14.
- [19] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-2.
- State Food and Drug Administration, National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National standard for food safety: Microbiological examination of food: Determination of total bacterial count: GB 4789. 2—2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 1-2.
- [20] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *Embnet Journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [21] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [22] 邵毅, 姚春霞, 黄柳娟, 等. 冷鲜鸡肉表面四环素和磺胺耐药菌的菌群多样性分析[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(17): 301-308.
- SHAO Y, YAO C X, HUANG L J, et al. Diversity of tetracycline- and sulfamethoxazole-resistant bacteria on surface of cold fresh chicken[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35(17): 301-308.
- [23] 黄柳娟, 冯博, 刘海燕, 等. 冷鲜鸡肉表面及内部细菌菌群的多样性分析[J]. *上海农业学报*, 2021, 37(1): 104-109.
- HUANG L J, FENG B, LIU H Y, et al. Diversity of bacterial flora in surface and internal tissue of cold fresh chicken [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2021, 37(1): 104-109.
- [24] ROSSI F, RIZZOTTI L, FELIS G E, et al. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspective[J]. *Food Microbiology*, 2014, 42(1): 232-243.
- [25] YAMAMOTO K, TOYA S, SABIDI S, et al. Diluted Luria-Bertani medium vs. sewage sludge as growth media: Comparison of community structure and diversity in the culturable bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105: 3 787-3 798.
- [26] LOCEY K J, LENNON J T. Scaling laws predict global microbial diversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113: 5 970-5 975.
- [27] SUN J, GUO J, YANG Q, et al. Diluted conventional media improve the microbial cultivability from aquarium seawater [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(9): 759-768.
- [28] CHAUDHARY D K, KHULAN A, KIM J. Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6 666.
- (上接第 17 页)
- [25] YUAN H, LI J, PAN L, et al. Particulate toxicity of metal-organic framework UiO-66 to white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 247: 114275.
- [26] SUN Y, HARLOFF J, KOSSLICK H, et al. Influence of the framework on the catalytic performance of Rh-supported Zr-MOFs in the hydroformylation of α -alkenes[J]. *Molecular Catalysis*, 2022, 517: 112005.
- [27] CHEN J, OUYANG J, CHEN W, et al. Fabrication and adsorption mechanism of chitosan/Zr-MOF (UiO-66) composite foams for efficient removal of ketoprofen from aqueous solution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 431: 134045.
- [28] WANG F, CHEN Z, CHEN H, et al. Interplay of lewis and bronsted acid sites in Zr-based metal-organic frameworks for efficient esterification of biomass-derived levulinic acid[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(35): 32 090-32 096.
- [29] CAVKA J H, JAKOBSEN S, OLSBYE U, et al. A new zirconium inorganic building brick forming metal organic frameworks with exceptional stability[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(42): 13 850-13 851.
- [30] FURUKAWA H, GANDARA F, ZHANG Y B, et al. Water adsorption in porous metal-organic frameworks and related materials[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(11): 4 369.
- [31] MONDAL T, MANDAL B. Engineered peptidic constructs metabolize amyloid beta by self-assembly-driven reactions [J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(34): 4 933-4 936.
- [32] FISCHER T, RIEDL R. Inhibitory antibodies designed for matrix metalloproteinase modulation[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2 265.
- [33] CHEN S, HUA Y, DAI L, et al. High proton conductivity of MOF-808 promotes methane production in anaerobic digestion[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(4): 1 419-1 429.
- [34] RADZICKA A, WOLFENDEN R. Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(26): 6 105-6 109.