

文章编号:1000-5641(2012)06-0122-09

华东师范大学在校生皮肤上葡萄球菌 类型及其抗药性分析

蒋德明, 马海龙, 古丽斯坦·努尔艾合麦提, 买尔丹·帕力合提
(生命科学学院 华东师范大学, 上海 200062)

摘要: 实验采集了华东师范大学在校学生皮肤表面的细菌样品, 通过 Baird Parker 培养基选择性分离葡萄球菌属菌株, 对分离到的菌株进行染色体 DNA 的提取, 并扩增 16S rRNA 基因; 通过 16S rRNA 基因序列分析菌株类型及菌株之间的系统发育关系; 最后利用纸片琼脂扩散法 (K-B 法) 检测葡萄球菌菌株对 10 种常见的抗生素敏感性并进行分析. 结果分离得到了共 31 株葡萄球菌菌株, 然后对各菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育关系分析, 将其分为 6 个不同的葡萄球菌种. 通过对抗生素敏感性分析显示, 31 株菌株中对 10 种抗生素检测没有完全敏感的菌株, 其中氨苄青霉素、阿莫西林和恩诺沙星 3 种抗生素抗菌效果都比较低, 抗性率分别为 91%, 91% 和 72%; 阿米卡星的抗葡萄球菌效果最好, 在 31 株菌株中只有 3 株菌株对阿米卡星具有抗性. 上述结果显示, 不管是维族人群还是汉族人群, 皮肤表面都存在大量葡萄球菌, 而维族人群中存在的数量高于汉族人群, 但在菌株类型上并没有显著差异. 存在于健康人体表面的葡萄球菌对常见 10 种抗生素具有较高的抗性, 阿米卡星对葡萄球菌的敏感性最好.

关键词: 皮肤微环境; 葡萄球菌; 16S rRNA 基因; 系统发育关系; 抗药性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2012.06.014

Species distribution and antibiotic susceptibility of *Staphylococci* isolated from the healthy human skins of East China Normal University students

JIANG De-ming, MA Hai-long, GULISITAN Nueraihemaity,
MAIERDAN Paliheti

(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: *Staphylococcus* were isolated from the healthy human skin samples using Baird Parker medium. The taxonomy and phylogenetic relationship of *Staphylococcus* were analyzed based on the 16S rRNA gene sequences. Antibiotic susceptibility of *Staphylococci* was detected by B-K method. A total of 31 strains of *Staphylococcus* were isolated which can be classified into 6 different species. Each of 31 *Staphylococcus* strains was able to resist to at least one antibiotic among

收稿日期:2011-08

基金项目:华东师范大学创新基金(78210049);华东师范大学厦杯基金

第一作者:蒋德明,男,讲师,研究方向为微生物资源与生态. E-mail: dmgiang@bio.ecnu.edu.cn.

10 tested antibiotics. The highest resistance rate was found against Amoxicillin and Ampicillin with 91%. Only 3 strains among the isolated *Staphylococcus* strains were resistant to Amikacin. The results indicated that *Staphylococcus* strains were abundant in both Uyghur and Han's skins and the population level of *Staphylococcus* species was higher in Uyghur human skin samples than in Han's. Furthermore, our study also suggested that *Staphylococcus* strains isolated from healthy human skin samples of East China Normal University students had high resistance ability to 10 tested antibiotics.

Key words: skin microenvironment; *Staphylococci*; 16S rRNA gene; phylogenetic relationship; antibiotic susceptibility

0 引 言

皮肤是人体抵抗致病菌入侵的第一道防线,时常与环境中的各类微生物接触,同时皮肤表面又生长着大量的共生细菌. Gao 等人通过分子生态学方法对人体手臂表面共生细菌群落组成进行分析,发现人体皮肤表面存在着 8 个细菌门,182 个细菌种的共生细菌,其中放线菌门(Actinobacteria),厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)共占了 94.6%,而葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的细菌占了皮肤表面细菌总数的 11.1%^[1]. 葡萄球菌即广泛存在于自然环境中又定植于人体皮肤表面,对于健康人群并不致病,但可伴随“异物”(高分子材料如塑料等)进入病人体内,并通过粘附形成生物膜,入侵血循环而致败血症等,是医院交叉感染的重要来源^[2]. 其致病性随细菌侵入途径、菌量、毒力及机体免疫力不同而异^[3].

对皮肤上正常葡萄球菌群落分布的了解有助于对人类和动物上葡萄球菌相关的皮肤疾病的致病性认识. 近年来国外学者对皮肤共生葡萄球菌类型分布和抗药性进行了一定的研究,如 Hauschild 等人通过从食虫动物和啮齿动物身上分离到 197 株葡萄球菌菌株,通过分析菌株 *rpoB* 和 *dnaJ* 基因序列发现,琥珀葡萄球菌(*Staphylococcus succinus*)占总数的 28%,其次为木糖葡萄球菌(*S. xylosus*)占 20.8%,斯氏葡萄球菌(*S. stepanovicii*)占 18.3%^[4]. Nagase 等人对 7 种不同的动物和人体皮肤上葡萄球菌的种类分布进行了研究,发现在动物皮肤上主要以木糖葡萄球菌和松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*)为主,而在人体皮肤上主要以表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)为主,说明在动物身上和人体身上葡萄球菌分布的类型具有明显的不同^[5]. 另外研究发现,皮肤上葡萄球菌群落的组成差异与皮肤疾病密切相关. 如 Dekio 等人对患有慢性腿部溃疡病人的皮肤细菌群落进行了分析,发现和对照组正常人皮肤上的细菌组成相比,金黄色葡萄球菌(*S. Aureus*)在患者皮肤上的组成比例明显上升^[6]. Gao 等人对牛皮癣病人伤口皮肤表面的细菌组成进行了分析,发现和对照的正常皮肤细菌群落比较,其中头状葡萄球菌(*S. capitis*)和山羊葡萄球菌(*S. caprae*)数量明显减少,而八叠葡萄球菌(*S. hominis*)数量明显增加,表皮葡萄球菌的数量在正常皮肤和伤口皮肤上没有明显区别^[7].

国内对皮肤共生葡萄球菌的类型和抗药性研究主要集中在医院临床菌株上,如王帮勇等人对重症监护病房的患者各类标本分离的凝固酶阴性葡萄球菌进行鉴定和药敏试验,结果显示,分离的凝固酶阴性葡萄球菌以表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌(*S. haemolyticus*)为

主,菌株对青霉素、红霉素和苯唑西林耐药率最高,分别达 100%、93.44%和 91.80%^[8].陈丽阳等人对广西医科大学第一附属医院 2009 年 1~12 月检出的葡萄球菌及药敏结果进行分析,结果临床标本中分离出葡萄球菌 796 株.药敏结果显示,葡萄球菌对青霉素 G 和红霉素的耐药率均大于 50%,其中耐甲氧西林葡萄球菌对多种抗菌药的耐药性均高于甲氧西林敏感的葡萄球菌,但对万古霉素和利奈唑胺的耐药率为 0^[9].但国内对健康人群皮肤上的葡萄球菌基本没有什么实质上的研究进展.因此,健康人群皮肤上的葡萄球菌菌株类型以及对抗生素的耐药性等方面还了解得很少.

本文通过采集华东师范大学在校生皮肤表面的细菌样品,通过 Baird Parker 培养基选择性分离葡萄球菌属菌株,通过 16S rRNA 基因序列分析菌株类型及菌株之间的系统发育关系;最后利用纸片琼脂扩散法对葡萄球菌菌株对 10 种常见的抗生素敏感性进行分析.可在一定程度上了解正常人体表面的葡萄球菌的种类和耐药状况,对于健康人体细菌的分布、耐药性研究以及医学上指导临床合理用药等都有一定的指导意义.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 在学校邀请了 30 位本校学生,他们都身体健康,且近一个月内没有服用过抗生素,其中维族 15 人,汉族 15 人.提取了他们手背皮肤表面的细菌样品,采集方法为用灭菌棉签沾取取样液(0.15 mol/L NaCl,0.1% Tween 20)在被采集者的手背擦拭后,将棉签放入盛有 500 μ L 取样液的离心管中清洗,如此重复 3 次获得皮肤表面细菌样品.样品编号按照英文字母顺序编写,维族人群样品用大写字母;汉族人群样品用小写字母.

1.1.2 主要试剂和仪器 基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物有限公司,北京),小量质粒提取试剂盒(北京天根生物有限公司,北京),PCR 扩增仪(Eppendorf,德国),凝胶成像系统(Bio-Rad,美国),PCR 纯化试剂盒(上海生工生物有限公司,上海),稳压稳流电泳仪和电泳槽,离心机,数码相机,pMD19-T(大连宝生物生物有限公司,大连)载体,大肠杆菌 DH5 α ,药敏纸片(上海欧韦达生物技术有限公司,上海)等.

1.2 葡萄球菌菌株分离

将采集的皮肤表面样品取 100 μ L 涂布于 Baird Parker 培养基(每 100 mL 含胰蛋白胨 1.0 g,牛肉浸粉 0.5 g,酵母浸粉 0.1 g,丙酮酸钠 1.0 g,甘氨酸 1.2 g,氯化锂 0.5 g,卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL,琼脂 1.5 g,pH 值 7.2) 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h.根据菌落表型不同随机选取不同的菌落,接种在 LB 液体培养基中培养 16 h,加入甘油使其终浓度达到 15%, -80° C 冻存备用.

1.3 细菌基因组 DNA 提取

将 -80° C 冻存菌株转接到 LB 液体培养基中,培养 16 h 后,取 2 mL 菌液到离心管中,按照基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明提取细菌基因组 DNA,DNA 溶液取 5 μ L 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4 菌株 16S rRNA 基因扩增,ARDRA 分型与测序

使用细菌通用引物 27F 和 1492R^[13]对 78 菌株 16S rRNA 基因进行扩增;PCR 反应体系(20 μ L):2 \times Premix Taq 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,模板 DNA 100 ng 左右.PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 4 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 10

min. 以无菌水为空白作为阴性对照,做2个PCR扩增平行实验. 取PCR反应产物5 μL 进行1%琼脂糖凝胶电泳检测.

对于分离到的葡萄球菌菌株,利用扩增片段限制性酶切(ARDRA)分型方法来确定菌株的类型. PCR产物用PCR产物纯化试剂盒纯化和回收,对纯化的PCR产物用 *Hinf* I 和 *Csp6* I 进行酶切分析. 酶切体系20 μL : *Hinf* I 或 *Csp6* I 1 μL , 10 \times buffer 2 μL , PCR产物8 μL , ddH₂O 6 μL . 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切4 h后加2 μL 10 \times Loading buffer 终止反应. 通过琼脂糖凝胶电泳初步判断不同菌株类型.

为了克隆菌株16S rRNA基因,纯化的PCR产物与pMD19-T Vector载体连接,转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中. 转化子扩大培养后,利用煮沸法^[14]提取质粒,电泳检测具有目的片段插入的阳性克隆,阳性克隆直接送英俊测序中心测序.

1.5 序列分析和核酸序列收录号

阳性克隆利用引物27F和1492R进行双向测序,测序结果用Contig软件进行拼接,获得近乎全长的16S rRNA基因序列. 16S rRNA基因序列与GenBank中的已知序列进行了分析比对,从GenBank中取得相关序列作为参考菌株序列,首先使用ClustalX^[15]将序列进行完全比对,然后用Neighbor-joining法^[16]取得序列的进化距离. 使用软件Mega^[17]作出系统进化树,数据自展重抽样次数1000次. 16S rRNA基因序列进化树以溶酪大球菌(*Macrococcus caseolyticus*) ATCC 13548 (GenBank序列号Y15711)作为进化树的根. 本实验中所得到的细菌16S rRNA基因序列已提交至GenBank数据库,收录号为JN175356-JN175386.

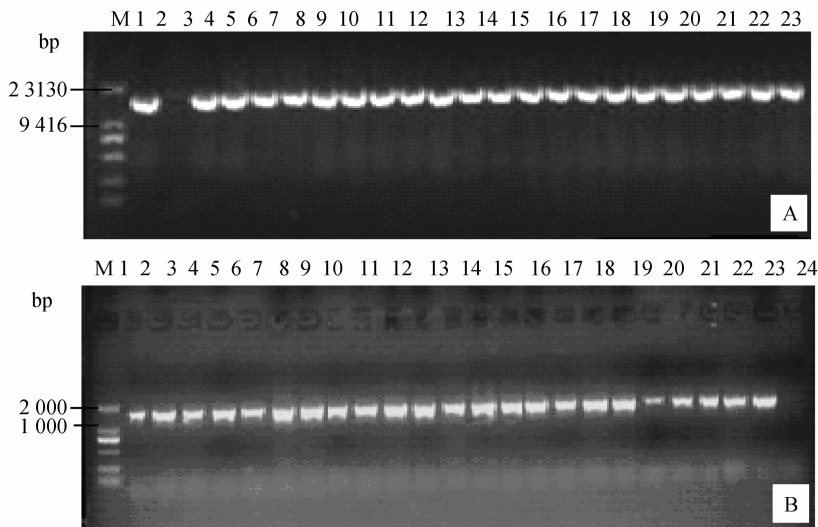
1.6 葡萄球菌菌株抗生素敏感性分析

利用纸片琼脂扩散法对31株分离到的葡萄球菌菌株的抗生素敏感性进行检测,方法见文献报道^[18]. 本研究选用了10种不同类型的常见抗生素来检测葡萄球菌抗药性,根据产生的抑菌圈直径的大小来确定抗生素抗性情况. 选取抗生素和抗性判断标准如下:阿米卡星(Amikacin) 30 μg , $R < 14$, $I = 14 \sim 17$, $S > 17$; 阿莫西林(Amoxicillin) 10 μg , $R < 28$, $I = 28 \sim 36$, $S > 36$; 氨苄西林(Ampicillin) 10 μg , $R < 28$, $I = 28 \sim 29$, $S > 29$; 先锋IV(Cefalexin) 30 μg , $R < 14$, $I = 14 \sim 18$, $S > 18$; 氯霉素(Chloromycetin) 30 μg , $R < 12$, $I = 12 \sim 18$, $S > 18$; 环丙沙星(Ciprofloxacin) 5 μg , $R < 15$, $I = 15 \sim 21$, $S > 21$; 恩诺沙星(Enrofloxacin) 5 μg , $R < 22$, $I = 22 \sim 28$, $S > 28$; 红霉素(Erythromycin) 15 μg , $R < 13$, $I = 13 \sim 23$, $S > 23$; 庆大霉素(Gentamicin) 10 μg , $R < 12$, $I = 12 \sim 15$, $S > 15$; 新霉素(Neomycin) 30 μg , $R < 12$, $I = 12 \sim 17$, $S > 17$. 上述抗性标准中, R 代表具有抗药性的抑菌圈大小, S 代表对抗生素敏感的抑菌圈大小, I 代表处于两者之间的临界范围.

2 结 果

2.1 菌株基因组DNA提取和16S rRNA基因扩增

由图1A中可以看出所提取的基因组DNA片段基本都大于10 kb,并且较为完整,无明显降解适合于后续PCR扩增,其中2号菌株DNA条带不明显,又重新进行了提取并看到了明显条带. 细菌16S rRNA基因PCR扩增结果如图1B所示,目的片段大小都为1500 bp左右,并且特异性较好.



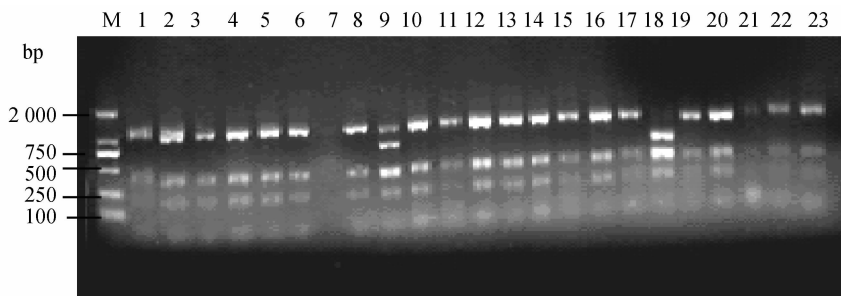
注: (A)M 泳道为 Lambda DNA Marker;1—23 泳道为提取的葡萄球菌菌株基因组 DNA;
(B)M 为 DNA Marker DL2000;1—23 泳道为扩增的菌株 16S rRNA 基因 PCR 产物;24 泳道为 PCR 阴性对照

图 1 部分菌株提取的基因组 DNA (A)和菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果(B)

Fig. 1 Genomic DNA extracted from *Staphylococci* isolated from healthy skin (A) and bacterial 16S rRNA genes amplified by PCR (B)

2.2 菌株 16S rRNA 基因 ARDRA 分型

本研究中,首先对分离得到的葡萄球菌菌株进行 ARDRA 分型,然后选取独特类型的菌株进行后续的 16S rRNA 序列测定和抗生素敏感性分析.经过酶切分型后,得到共 31 株葡萄球菌菌株.部分酶切图谱检测结果如图 2 所示,PCR 产物酶切条带均小于 1 500 bp,因而认为酶切较为充分,并且分辨率较高.酶切图谱显示,每一个人员皮肤细菌样品中存在着至少一种以上不同类型的葡萄球菌,最高发现有 3 种不同类型的葡萄球菌菌株,随后将对这些菌株进行进一步的鉴定.



注:M 为 DNA Marker DL2000;1—8 泳道为从 UA 样品分离的葡萄球菌菌株酶切图;9—16 泳道为从 UB 样品分离的葡萄球菌菌株酶切图;17—23 泳道为从 Ha 样品分离的葡萄球菌菌株酶切图

图 2 部分菌株 16S rRNA 基因扩增产物的 *Hinf* I 酶切图谱

Fig. 2 *Hinf* I restriction patterns of some amplified 16S rRNA genes of *Staphylococci* strains

2.3 葡萄球菌类型及多样性分析

经过酶切分型以后,共获得了 31 株不同类型的葡萄球菌菌株,对这些菌株的 16S

rRNA 基因序列进行了测定,结果发现 31 株菌株可以分为 6 个不同的种(见表 1). 其中表皮葡萄球菌有 19 株,占总数的 61.3%. 这些菌株中分离自维族人群有 11 株,它们来自于 10 位维族人的样品,检出率为 66.7%. 另外 8 株分离自汉族人群中,它们来自于 8 位汉族人的样品,检出率为 53.3%. 金黄色葡萄球菌发现有 3 株分别是 *S. aureus* ECNU-UH3, *S. aureus* ECNU-UK2, *S. aureus* ECNU-UM4, 分离自维族人群样品 H, K, M 中. 金黄色葡萄球菌作为一种致病菌,也可能存在于健康人体皮肤表面但并不会引起致病,这一结果与之前 Laub 等人报道的结果一致^[19]. 腐生葡萄球菌菌株有 3 株,其中 *S. saprophyticus* ECNU-UA1, *S. saprophyticus* ECNU-UA3, *S. saprophyticus* ECNU-UF1 菌株分离自维族人群样品 A 和 F 中. 山羊葡萄球菌菌株有 4 株,其中 *S. caprae* ECNU-UJ2, *S. caprae* ECNU-UF4 菌株分离自维族人群样品 J, F 中,而 *S. caprae* ECNU-Hd1, *S. caprae* ECNU-Hj3 分离自汉族人群样品 d, j 中. 另外巴氏葡萄球菌和孔氏葡萄球菌都只发现 1 株菌株,说明在人体皮肤微环境中存在的数量较少.

表 1 华东师范大学在校学生皮肤微环境中存在的葡萄球菌类型

Tab. 1 Identification of various staphylococcal strains isolated from human skin samples of East China Normal University students by sequencing 16S rRNA gene

类型	民族	数量
<i>S. epidermidis</i>	U/H	19
<i>S. aureus</i>	U	3
<i>S. caprae</i>	U/H	4
<i>S. saprophyticus</i>	U	3
<i>S. cohnii</i>	U	1
<i>S. pasteurii</i>	U	1

注:U 代表从维吾尔族学生皮肤样品中分离的葡萄球菌菌株;H 代表从汉族学生皮肤样品中分离的葡萄球菌菌株

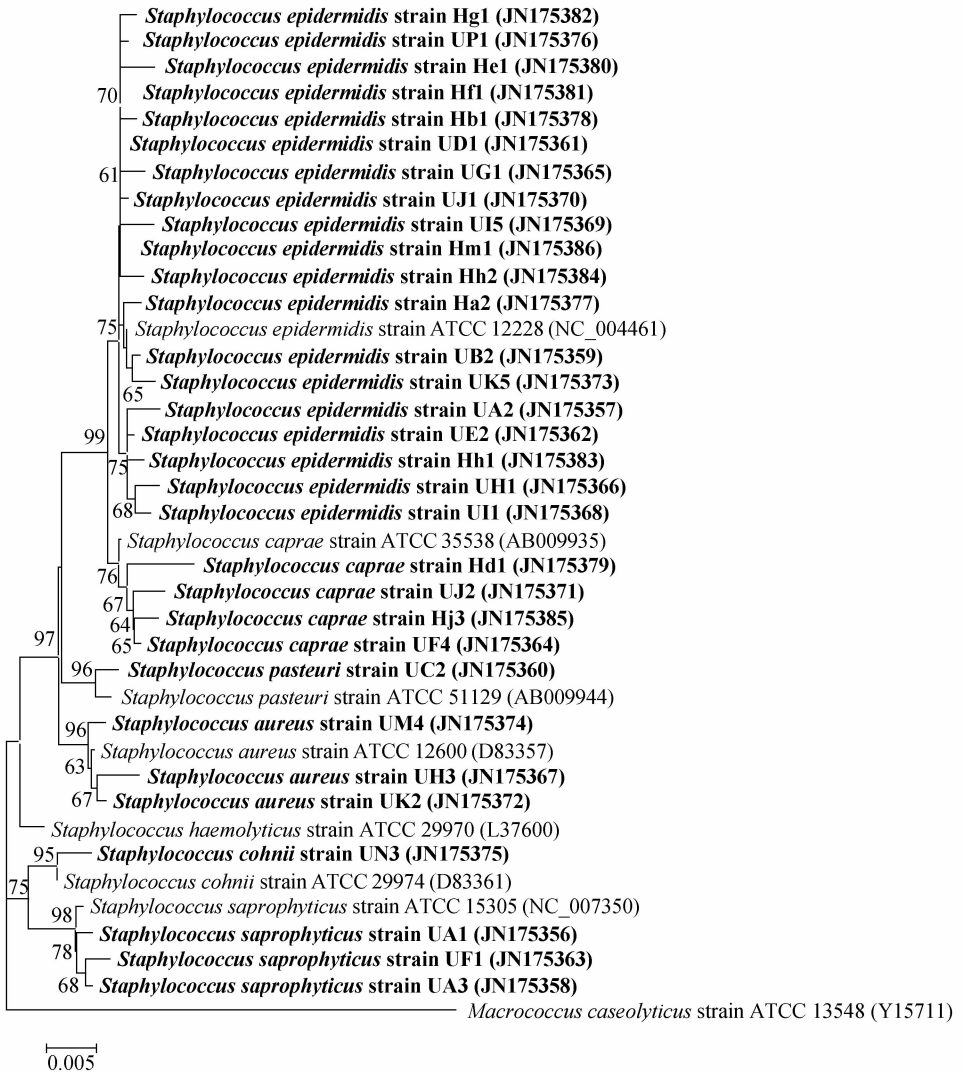
为了分析 31 株葡萄球菌属菌株之间的系统发育关系,构建了系统进化树,从图 3 中可以看出,6 种不同的葡萄球菌种都位于各自的进化分支内,其中金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌有较近的系统进化关系,而腐生葡萄球菌与表皮葡萄球菌的亲缘关系较远. 表皮葡萄球菌都位于同一分支内,很多菌株之间的同源性在 99% 以上;由于表皮葡萄球菌菌株之间 16S rRNA 基因差异不显著,无法正确显示菌株之间的系统进化关系,因此有必要考虑用其他持家基因如 HSP60 等来进行进一步的分析.

2.4 葡萄球菌菌株抗生素敏感性分析

虽然分离的葡萄球菌是来自健康人的皮肤,属于人体正常共生细菌,并且菌样采自 20~24 岁的青年,使用抗生素的机会不会很大,但在研究的 31 株菌中没有出现一例对于 10 种抗生素完全敏感的现象,相反地菌株的多重抗性非常普遍,对 3 种及以上抗生素具有抗药性的概率为 81.2%(见表 2). 3 株金黄色葡萄球菌菌株对氨苄西林和阿莫西林都具有明显抗性,而对环丙沙星和庆大霉素都敏感. 同时发现山羊葡萄球菌 Hj3 除了对氯霉素和新霉素抗性处于临界状态外其他 7 种抗生素均具有抗性,只对阿米卡星敏感的严重耐药性现象.

从图 4 中可以看出,在 10 种抗生素中,氨苄青霉素,阿莫西林和恩诺沙星 3 种抗菌效果都较低. 其中对氨苄青霉素敏感的菌株只有 3 株菌株,分别是表皮葡萄球菌 UE2, UI5 和腐生葡萄球菌 UA1. 对阿莫西林敏感的菌株并没有发现,且只有 3 株菌株对其敏感性处于临

界范围. 对恩诺沙星敏感的菌株并没有发现, 但有 9 株菌株对其敏感性处于临界范围. 阿米卡星的抗葡萄球菌效果最好, 在 31 株菌株中只有 3 株菌株对阿米卡星有抗性, 它们分别是表皮葡萄球菌 UK5, UJ1 和金黄色葡萄球菌 UK2. 其次是新霉素, 抗药性在 3.1%, 只有表皮葡萄球菌 Hh2 对其敏感, 但有 11 株菌株对新霉素的敏感性处于临界范围. 环丙沙星, 氯霉素和先锋 IV 的抗药性则处于较低水平, 为 9%~20% 之间. 庆大霉素和红霉素的抗药性处于中等水平, 分别为 21.9% 和 31.3%.



注: 括号内的数字代表序列在 GenBank 中的序列号; 每一分支上的数字代表的是分支的数据自展重抽样的支持率; 标尺长度代表的是 0.5% 的序列差异; 黑体代表的是分离自华东师范大学在校生皮肤样品的葡萄球菌菌株 16SrRNA 基因序列; 解酪蛋白巨球菌菌株 ATCC 13548 的 16S rRNA 基因序列作为系统进化树的根

图 3 31 株葡萄球菌及对照菌株的 16S rRNA 基因系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree constructed by the 16S rRNA gene sequences of the 31

Staphylococcus strains and references

表 2 分离自华东师范大学在校学生皮肤微环境的葡萄球菌菌株对抗生素的抗药性

Tab. 2 Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* strains isolated from healthy human skin samples of East China Normal University students

菌株 Strain	阿米卡星 Ami	阿莫西林 Amo	氨苄西林 Amp	先锋 IV Cef	氯霉素 Chl	环丙沙星 Cip	恩诺沙星 Enr	红霉素 Ery	庆大霉素 Gen	新霉素 Neo
UA1	S	R	S	R	I	I	R	I	S	I
UA2	S	I	R	S	I	S	R	I	R	I
UA3	S	I	R	S	R	S	R	R	S	S
UB2	S	R	R	S	S	I	I	I	S	I
UC2	S	R	R	S	S	S	R	I	S	S
UD1	S	R	R	R	I	I	R	I	S	S
UE2	S	I	S	S	I	S	I	I	S	I
UF1	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S
UF4	S	R	R	S	S	S	I	R	R	S
UG1	S	R	R	S	S	S	I	S	S	I
UH1	S	R	R	S	I	S	R	I	S	S
UH3	I	R	R	S	R	S	I	S	S	S
UI1	S	R	R	S	I	S	I	S	S	S
U15	S	I	S	S	S	S	R	I	R	I
UJ1	R	R	R	S	I	I	I	R	S	S
UJ2	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S
UK2	R	R	R	I	S	S	R	I	S	I
UK5	R	R	R	S	R	I	R	I	S	I
UM4	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S
UN3	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S
UP1	I	R	R	I	S	R	I	I	R	I
Ha2	S	R	R	I	S	S	R	I	S	S
Hb1	S	R	R	S	S	R	R	I	S	I
Hd1	S	R	R	I	S	S	R	I	S	S
He1	S	R	R	I	R	S	R	S	S	S
Hf1	S	R	R	I	S	S	R	S	S	S
Hg1	S	R	R	R	I	I	I	R	I	S
Hh1	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S
Hh2	S	R	R	R	I	S	R	I	S	R
Hj3	S	R	R	R	I	R	R	R	R	I
Hm1	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R

注: R 代表该菌株对此抗生素具有抗性;S 代表该菌株对此抗生素敏感;I 代表该菌株对此抗生素的抗性能力介于抗性与敏感之间

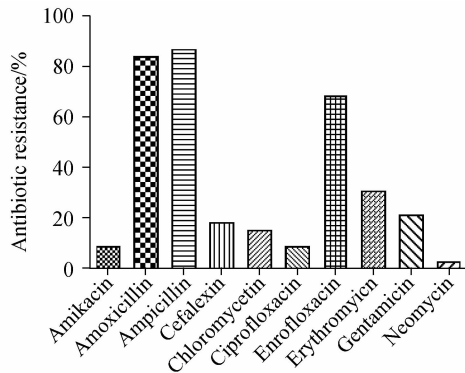


图 4 31 株葡萄球菌菌株对 10 种抗生素的耐药率

Fig. 4 Antibiotic resistance of 31 *Staphylococcus* strains against 10 different antibiotics

3 结 论

通过对华东师范大学在校学生的皮肤上葡萄球菌的类型分析,发现手背皮肤上主要以表皮葡萄球菌为主,而巴氏葡萄球菌和孔氏葡萄球菌都只发现 1 株菌株,说明在这些皮肤细菌样品中存在的数量较少.在这些皮肤细菌样品中有一半来自于维族人,一半来自于汉族人,结果显示在两个民族的皮肤细菌样品中,维族人群样品中分离的葡萄球菌数量较多,但没有发现显著的菌株类型的不同.由于采集的样品数量有限,而且在校维族学生已在沪生活最少 1 年以上,没有办法采集真正生活在新疆的维族人的皮肤菌样,所以两种民族皮肤葡萄球菌菌种真正的差别仍需要深入研究.

在葡萄球菌的测序结果中得到的菌种多数为表皮葡萄球菌,而进化树显示虽属同一个种但得到的表皮葡萄球菌同源性的差异也比较大,有的同源性非常近($>99\%$),有的则存在比较大的差异.而从进化树中也可以看出同属于葡萄球菌属的几种葡萄球菌之间的亲缘关系.但对于同一种类的菌株来看,由于 16S rRNA 基因差异不显著,无法得出正确的系统进化关系,可能需要对其他持家基因进行分析.纵览整个进化树可以看出金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌有较近的亲缘关系,而腐生葡萄球菌与表皮葡萄球菌的亲缘关系较远.

在抗生素敏感性的检测中,发现虽然所采集的细菌来自健康人的皮肤,但其对于抗生素的耐药性仍然很强,氨苄青霉素、阿莫西林和恩诺沙星 3 种抗菌效果都比较低,阿米卡星的抗葡萄球菌效果最好,在 31 株菌株中只有 3 株菌株对阿米卡星有抗性.

[参 考 文 献]

- [1] GAO Z, TSENG C H, PEI Z H, et al. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(8): 2927-2932.
- [2] 徐秀华,文细毛,任南,等.我院表皮葡萄球菌检出率的增高及评价[J].中华医院感染学杂志,2000, 10(3): 179-181.
- [3] SPEAKER M G, MILCH F A, SHAH M K, et al. Role of external bacteria flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis[J]. Ophthalmology, 1991, 98: 639-649.
- [4] HAUSCHIDA T, SLIZEWSKIA P, MASIEWICZ P. Species distribution of *Staphylococci* from small wild mammals[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33: 457-460.
- [5] NAGASE N, SASAKI A, YAMASHITA K, et al. Isolation and species distribution of *Staphylococci* from animal and human skin[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2002, 64(3): 245-250.
- [6] BROOK I, FRAZIER E H. Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers[J]. International Journal of Dermatology, 1998, 37: 126-8.
- [7] GAO Z, TSENG C H, PEI Z H, et al. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2719.
- [8] 王帮勇,陈霞,朱秋丽,等.重症监护病房凝固酶阴性葡萄球菌分布及耐药性分析[J].中国微生态学杂志,2011(4): 356-357.
- [9] 陈丽阳,郭世辉,钟品玲,等.临床标本中葡萄球菌的检测及耐药性研究[J].检验医学与临床,2011(2): 189-190.
- [10] BROSIOUS J, PALMER M L, KENNEDY P J, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1978, 75: 4801-4805.
- [11] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

与於红^[4]的研究结果相一致. PE 膜在维持鲜切哈密瓜较低呼吸水平同时,也保持较低的水分散失.

本试验中,将哈密瓜鲜切成 3 cm 厚度立体梯形状后,用 PP 材质托盘和 0.03 mm PE 膜包装,并置于 5 ℃、相对湿度 85%~95%条件下贮藏 10 d,仍能维持良好的商品价值. PE 膜保鲜效果显著优于 PE 微孔膜、OPP 膜和 PVC 膜.

[参 考 文 献]

- [1] OLUSOLA LAMIKANRA. Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market[M]. USA: CRC Press, 2002: 1.
- [2] 罗海波,姜丽,余坚勇,等. 鲜切果蔬的品质及贮藏保鲜技术研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 307-311.
- [3] 李灿,饶景萍,李善菊. 薄膜包装在果蔬采后保鲜上的应用[J]. 北方园艺, 2010(3): 162-165.
- [4] 於红,王传永,顾姻,等. 不同包装处理对蓝浆果贮藏期间生理和贮藏性的影响[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 631-634.
- [5] 胡花丽,李鹏霞,王毓宁,等. 薄膜包装限气贮藏在李果实上的保鲜效果[J]. 西北农业学报, 2011, 20(3): 138-143.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [7] 张飞,岳田利,费坚,等. 果胶酶活力的测定方法研究[J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 134-137.
- [8] 赵玉萍,杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 116-118.
- [9] AGUAYO E, JANSASITHORN R, KADER A A. Combined effects of 1-methylcyclopropene, calcium chloride dip, and/or atmospheric modification on quality changes in fresh-cut strawberries[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 40: 269-278.
- [10] ADATO I, GAZIT S. Water-deficit stress, ethylene production, and ripening in avocado fruit[J]. Plant Physiol, 1974, 53: 45-46.
- [11] BEN-YEHOSHUA S, SHAPIRO B, CHEN Z E, et al. Mode of action of plastic film in extending life of lemon and bell pepper fruits by alleviation of water stress[J]. Plant Physiol, 1983, 73: 87-93.
- [12] 郑林彦,韩涛,李丽萍. 国内切割果蔬的保鲜研究现状[J]. 食品科学, 2005, 26(S1): 125-127.

(上接第 130 页)

- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876-4882.
- [13] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987(4): 406-425.
- [14] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004(5): 150-163.
- [15] PENNA B, VARGES R, MEDEIROS L, et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *staphylococci* isolated from canine otitis externa[J]. Veterinary Dermatology, 2010, 21(3): 292-296.
- [16] LAUB K, KARDOS S, NAGY K, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthy young adults from a Hungarian University[J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2011, 58(1): 75-84.