

婴幼儿羊奶粉及米粉中的细菌多样性分析

王鸣秋¹, 杨硕², 刘艳¹, 辛瑞鹏³, 李诗瑶¹, 张莉¹

(1. 湖北省食品质量监督检验研究院, 湖北武汉 430075)

(2. 武汉市卫生健康委员会, 湖北武汉 430014) (3. 武汉市公安局刑侦局, 湖北武汉 430000)

摘要: 为探究婴幼儿奶粉和米粉辅食中细菌群落结构, 对婴幼儿食品生产质量控制和监管提供理论依据, 本研究采用 Ion torrent PGM 二代高通量测序平台对 14 个婴幼儿食品样本中细菌 16S rRNA 的 V₄-V₅ 可变区进行了测序分析。测序共获得 13805 个不同的 OTU, 隶属于 2 界、10 门、20 纲、50 目、84 科、144 属。分析结果表明, 婴幼儿羊奶粉样品比米粉样品具有更高的群落多样性, 奶粉样品组内差异较米粉样品小。羊奶粉样品中占绝对优势菌群隶属于厚壁菌门(65.58%)和变形菌门(16.01%), 在属水平上以链球菌属(24.86%)和乳球菌属(21.44%)为主; 而米粉样品中蓝藻菌门(41.79%)占有绝对优势, 厚壁菌门(30.99%)和变形菌门(24.48%)次之, 推测主要与两种产品的原料不同有关。另外, 沙门氏菌(8.75%)、李斯特氏菌(3.61%)等与食源性疾病相关的细菌种类在米粉样品组中普遍存在, 经组间差异性分析表明与奶粉样品中相应丰度有统计学差异($p < 0.05$), 提示婴幼儿米粉产品存在潜在的食品安全隐患, 其原料和生产加工环节的质量控制亟需引起生产企业和食品监管部门的重视。

关键词: 婴幼儿奶粉; 婴幼儿米粉; 高通量测序; 细菌多样性

文章编号: 1673-9078(2020)02-137-143

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.020

Bacterial Diversity Analysis of Infant Food Based on 16S rRNA High-throughput Sequencing

WANG Ming-qi¹, YANG Shuo², LIU Yan¹, XIN Rui-peng³, LI Shi-yao¹, ZHANG Li¹

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China) (2. Wuhan Municipal Health Commission, Wuhan 430014, China) (3. Wuhan Public Security Bureau, Wuhan 430000, China)

Abstract: In order to investigate the bacterial community structure in infant formula milk and rice flour, and provide theoretical basis for the quality control and supervision of infant food production, the 16S rRNA V₄-V₅ regions of bacteria from 14 infant food samples were sequenced based on ion torrent PGM platform. A total of 13,805 different OTUs were obtained by sequencing analysis, belonging to 2 kingdoms, 10 phyla, 20 classes, 50 orders, 84 families and 144 genera. The results showed that the bacterial community diversity of the infant milk powder samples was higher than that of the rice flour, and the difference within group of milk powder was smaller than that of rice flour. The absolute dominant flora in goat milk powder belonged to Firmicutes (65.58%) and Proteobacteria (16.01%) on phylum level, *Streptococcus* (24.86%) and *Lactococcus* (21.44%) on genus level. While, Cyanobacteria (41.79%) was the most dominant in rice flour samples, followed by Firmicutes (30.99%) and Proteobacteria (24.48%), which might be related to the different raw materials of two products. In addition, foodborne pathogens such as *Salmonella* (8.75%) and *Listeria* (3.61%) existed in most of the rice flour samples, and the difference of abundance was significant ($p < 0.05$) between the milk powder and rice flour samples, which indicated that infant rice flour products might have potential food safety risks. Therefore, the enterprises and food supervision department should pay more attention to the quality control of infant rice flour production.

Key words: infant milk powder; infant rice flour; high-throughput sequencing; bacterial diversity

婴幼儿属于特殊、敏感群体, 婴幼儿“口粮”的安全性至关重要。据国家统计局数据显示, 我国已成为

收稿日期: 2019-09-09

基金项目: 湖北省食品质量监督检验研究院自主立项科研项目 (ZZLX2017007)

作者简介: 王鸣秋(1986-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 张莉(1978-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全检测与管理

位居美国之后的世界第二大婴儿配方奶粉消费市场^[1]。近年来, 国家颁布了一系列法规制度加强对婴幼儿配方乳粉生产加工行业的整顿、规范和监管, 但对于婴幼儿米粉、谷物等辅食的监管措施相对滞后^[2]。在婴幼儿食品行业有序化升级阶段, 与时俱进地开展针对这类产品关键性质量安全指标的全面深入研究工作非常必要^[3]。其中, 对这类产品中微生物污染的种类、丰度、分布等方面进行综合检测, 以此判断婴幼

儿食品中是否存在致病、致死或致耐药的细菌是重要的一个方面,但不只限于国家食品安全标准中明确规定的致病菌种类,更应以发现未知生物性风险因素作为目的和重点。

因此,开展婴幼儿乳粉和辅食中菌群结构研究,分析其细菌多样性,有利于掌握该类食品中细菌分布状况,对婴幼儿食品的生产质量控制、卫生监管具有一定的指导意义。

在婴幼儿食品的微生物指标监测中,通常采用分离培养、生化鉴定的方法对群落结构进行研究,但是目前尚有99%以上的微生物无法在现有实验室条件下进行培养,传统方法仅能得到微生物群落中极少数信息而不能真正反映出全部的微生物群落信息^[4,5]。而且这些已灭活或难培养微生物在生产加工过程中产生的具有极高稳定性耐热脂肪酶、蛋白酶、耐热毒素等代谢产物可能影响产品品质及风味、增加产品安全性风险^[6]。近年来高通量测序技术不断完善,克服了传统培养方法的不足,具有成本低、通量大、实时检测等优点,在分子生物学领域得到了广泛应用^[7,8],其中基于16S rRNA基因的扩增子测序已成为研究微生物群落多样性和系统进化关系的重要手段。16S rRNA基因高通量测序的影响因素主要包括可变区的选择^[9]、测序平台^[10]、DNA提取方法^[11]、样品类型^[12]等。FIONA Fouhy等报道基于16S rRNA的V₄-V₅可变区序列和Ion PGM平台的组合在模拟细菌组合测序中得到了最优的结果,而不同DNA提取方法对结果影响差异不大^[13]。

因此,本研究利用Ion PGM测序平台对湖北省市售的婴幼儿配方奶粉、米粉等样品中的细菌16S rRNA V₄-V₅区进行测序分析,研究不同种类产品中菌群结构的异同,从而为评估该类食品微生物污染水平、卫生质量控制提供基础数据,为产品加工工艺的改进提供思路。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

从湖北省市场超市、母婴店共采集14份婴幼儿食品样品,其中包括婴幼儿米粉7份(编号为MF₁-MF₇),婴幼儿配方羊奶粉7份(编号为NF₁-NF₇)。

Takara MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit,大连宝生物公司;PCR引物,上海生工;金牌Mix PCR预混液,武汉擎科生物;Ion PGM文库制备试剂盒、Ion PGM测序试剂盒、Ion 316测序

芯片,美国Thermo Fisher公司。

1.2 仪器与设备

Ion torrent PGM测序平台,美国Thermo Fisher公司;Bio-Rad C1000 Touch PCR仪,美国Bio-rad公司;QIAxpert核酸浓度检测仪、QIAxcel凝胶电泳系统,德国Qiagen公司;5424R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌基因组DNA的提取

按照Takara MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit说明书操作步骤提取样品中细菌DNA,并用QIAxpert核酸浓度检测仪测定DNA的纯度和浓度。

1.3.2 16SrDNA V₄-V₅区PCR扩增及纯化

针对细菌16SrDNA基因V₄-V₅可变区,选择通用特异性引物515F(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3')和909R(5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3')进行扩增^[14],扩增时每个样品均使用了不同的条形码序列(Barcode)标识。PCR扩增反应条件:98℃预变性2 min;98℃变性10 s,56℃退火10 s,72℃延伸40 s,30个循环;72℃终延伸5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,选择450 bp左右PCR产物进行胶回收纯化。回收后的核酸片段进行浓度测定,混样。

1.3.3 文库制备、模板制备及高通量测序

按照文库制备试剂盒说明书,连接接头、修复缺口,构建文库;利用Ion One Touch™2和Enrichment System进行测序模板扩增和制备;测序仪初始化、芯片检测、芯片上样,进行测序,获取测序原始序列。

1.3.4 生物信息学分析

利用Usearch软件对原始序列进行拼接、Tags过滤、去除嵌合体等,得到有效序列(Effective Tags),并对有效序列在97%的相似度水平下进行聚类,划分OTU(operational taxonomic units);利用QIIME平台、RDP Classifier软件将OTU的代表序列与Silva分类学数据库进行比对注释物种分类信息,在界、门、纲、目、科、属等分类学水平上统计各样品群落组成,生成物种丰度表,再利用R语言工具绘制成群落结构图、等级丰度曲线等。通过Alpha多样性分析研究单个样品内部的物种多样性,使用Mothur软件评估各样品在97%相似度水平下的Sobs、ACE、Chao1、Shannon及Simpson指数,绘制样品稀释性曲线;使用QIIME软件采用不同算法计算距离矩阵,进行Beta多样性分

析, 获得相应距离下的奶粉和米粉两组样品的 PCoA 图、层次聚类树等; 利用 R 语言的 stats 包和 Python 语言的 Scipy 包, 选用 Welch's t 检验进行组间物种差异分析。

2 结果与讨论

2.1 菌群丰度及多样性分析

2.1.1 OTU 分析

14 个样品测序共获得 946482 条 Clean 序列, 946428 条有效序列 (Effective Tags), 序列平均长度集中在 410 bp 左右; 其中样品 MF_1 产生的有效序列最少为 12636 条, 样品 MF_5 产生的有效序列最多为 145702 条, 每个样品平均产生 67602 条有效序列。对所有有效序列进行聚类分析, 相似度高于 97% 划分为一个 OTU, 共获得 13805 个不同的 OTU, 隶属于 2 界、10 门、20 纲、50 目、84 科、144 属。其中样品 MF_5 可归类 OTU 数量最少为 1272 个, 样品 NF_5 可归类 OTU 数量最多为 5320 个。

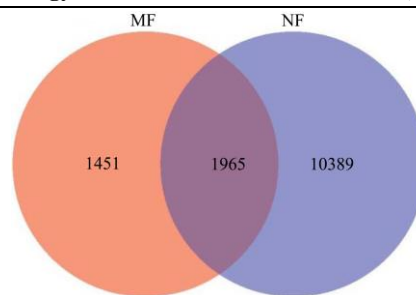


图1 婴幼儿羊奶粉组 (NF) 和米粉组 (MF) OTU Venn 图

Fig.1 OTU Venn figure of infant goat milk powder (NF) and rice powder (MF)

利用 Venn 图可以展示样品之间共有和特有的 OTU 数目, 直观地表现出样品间 OTU 的重合情况^[15]。根据不同种类的样品 OTU-Venn (图 1) 可以发现, 米粉和羊奶粉样品共有 OTU 数量为 1965 个, 占两者总序列数的 14.23%, 米粉样品特有的 OTU 有 1451 个, 羊奶粉为 10389 个, 可见婴幼儿羊奶粉和米粉样品细菌构成不甚相同, 且羊奶粉样品群落结构多样性明显较米粉样品丰富。

2.1.2 Alpha 多样性分析

表 1 样品 Alpha 多样性指数统计表

Table 1 Alpha diversity index

Sample\Estimators	Sobs	Shannon	Simpson	ACE	Chao1	Coverage
MF_1	1533	5.1096	0.0253	2053.90	2129.94	0.98869
MF_2	1461	5.0597	0.0274	1959.82	1944.89	0.98953
MF_3	1798	4.7525	0.0527	2410.32	2413.97	0.98614
MF_4	2018	5.7396	0.0146	2568.96	2520.92	0.98694
MF_5	1272	4.9719	0.0298	1563.31	1566.15	0.99267
MF_6	1789	5.4420	0.0157	2303.30	2382.47	0.98754
MF_7	1639	4.9685	0.0355	2149.12	2203.19	0.98827
NF_1	2415	4.4225	0.0707	6144.45	4667.07	0.98101
NF_2	4466	5.5708	0.0597	12332.06	8417.82	0.98348
NF_3	3118	5.1565	0.0268	8341.66	5995.00	0.98148
NF_4	4391	5.4284	0.0699	11706.98	8043.74	0.98533
NF_5	5320	6.1130	0.0295	12809.67	9443.54	0.98542
NF_6	4539	6.0847	0.0145	12130.98	8767.13	0.98311
NF_7	2871	4.5842	0.0509	7918.48	5506.84	0.98397

Alpha 多样性用于分析单个样品内的微生物群落多样性和丰富度, 它有多种衡量指标: Sobs 指数表示样本中观察到的物种数目, Chao1 和 ACE 指数衡量物种丰度, Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性, 受群落中各物种丰度和均匀度的影响^[16]。OTU 覆盖率数值越高, 则样品中物种被测出的概率越高。如表 1 所示, 所有样品的 OTU 覆盖率均在 98% 以上, 说明测序结果可以反应样本中微生物真实情况。样品 NF_5 的 ACE 和 Chao1 指数最高, 说明其物种数量最

多, 而且其 Shannon 指数最高, Simpson 指数较小, 说明其物种丰度和均匀度最高, 即多样性最高; 样品 MF_5 的 ACE 和 Chao1 指数最低, 说明其物种数量最少; 样品 NF_1 的 Shannon 指数最低, Simpson 指数最高, 其物种多样性最低。

从样本序列中随机抽取一定数量序列, 以抽到的序列数与其对应的 Shannon 指数构建曲线, 用于验证测序数量是否足以反映样品中的物种多样性^[17]。如图 2 所示, 当测序量增大时曲线逐渐趋于平坦, 若测序

数据量足够大, OTU 种类不再随着测序量的增加而增长, 说明样品序列充分, 可用于数据分析。

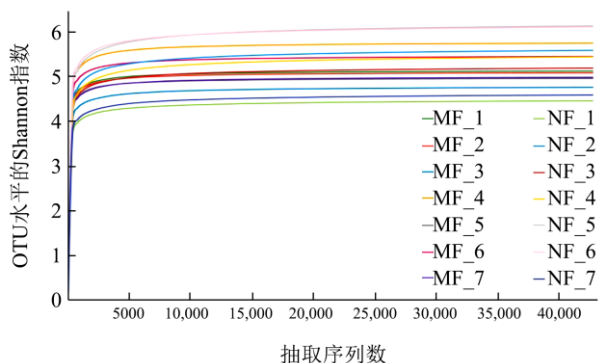


图2 样品 Shannon 指数曲线

Fig.2 Shannon Index curve

2.2 菌群组成分析

2.2.1 门水平的菌群分析

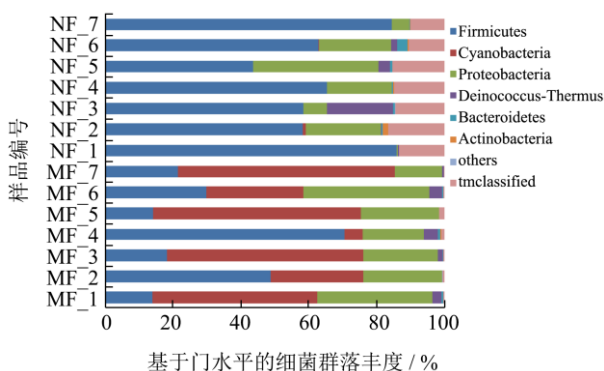


图3 基于门水平的样品细菌群落丰度

Fig.3 Bacteria community abundance on phylum level

在门水平上(图3), 7份羊奶粉样品中占绝对优势的菌群为厚壁菌门(Firmicutes, 65.58%), 其次为变形菌门(Proteobacteria, 16.01%), 这与马慧敏^[6]利用 PacBio 测序对羊奶粉以及 Zalewskal 等^[18]对巴氏杀菌后羊奶的微生物构成研究结果一致, 但是 Mcinnis 等^[19]发现羊奶原奶中优势微生物为变形菌门和放线菌门, 而 Zhang 等^[20]报道中国关中羊奶的微生物构成中占绝对优势为变形菌门, 其次才是厚壁菌门。虽然都是羊奶及羊奶制品, 结果不一致的原因可能与羊奶品种、加工操作、生产企业卫生状况等多种因素相关。

另外, 与羊奶粉样品不同的是, 本研究中7份米粉样品除了厚壁菌门(30.99%)和变形菌门(Proteobacteria, 24.48%)占优外, 蓝藻门(Cyanobacteria, 41.79%)也占有绝对优势, 推测主要与两组样品的原料成分不同密切相关。

2.2.2 属水平的菌群分析

在属水平上, 米粉和奶粉两组间主要细菌属构成存在较大的差异, 在同组内不同样品间也有一定的差

异。如图4所示, 7个奶粉样品中, 占比大于3%的菌属依次为链球菌属(*Streptococcus*, 24.86%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 21.44%)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*, 8.60%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 5.30%)、栖热菌属(*Thermus*, 3.49%)、乳杆菌属(*Lactobacillus*, 3.55%)。其中, 乳球菌属在 NF_4 中占比最高为 48.96%, 链球菌属在 NF_7 中占比最高为 78.23%, 乳杆菌属在 NF_6 中占比最高为 16.31%。乳杆菌属、乳球菌属和链球菌属均为厚壁菌门细菌, 是乳及乳制品生产中重要的有益细菌。Giannino 等^[21]对牛奶中的细菌种类、特有病原微生物及腐败微生物进行检测后报道, 原料乳中主要污染菌属为乳球菌属、链球菌属和明串珠菌属; Quigley 等^[22]对 62 个爱尔兰干酪进行 454 测序分析微生物群落构成时发现, *Lactococcus* 为爱尔兰干酪中主要污染菌属。这些结论与本研究奶粉中主要污染菌属基本一致。

除了原料乳中带入的污染微生物之外, 加工过程也是婴幼儿配方奶粉中微生物污染的另一个主要途径。原料乳在投入生产前会在贮乳罐中储存数小时至数天, 长时间低温状态导致了嗜冷菌的大量繁殖, 并产生耐热性蛋白分解酶、脂肪分解酶和磷脂酶等, 嗜冷菌在后续加工过程中会被高温灭活, 因此通过传统培养方法检测成品乳很难对该类细菌进行监测, 但其产生的耐热酶仍会产生作用, 导致乳品腐败变质。较常见嗜冷菌包括假单胞菌属、不动杆菌属、肠杆菌属、产碱杆菌、厌氧梭状芽孢杆菌等^[23-25]。7个样品中占比较高的厌氧芽孢杆菌属和不动杆菌属均属于常见嗜冷菌范畴, 其中样品 YN_1 中厌氧芽孢杆菌属占比 54.62%, 推测其原料乳在加工过程中储存时间过长, 导致嗜冷菌大量繁殖。而在样品 YN_5 中发现了致病细菌成分, 包括沙门氏菌、不动杆菌、大肠埃希氏菌-志贺氏菌属, 说明该样品存在一定的食品安全风险。

不同于乳粉样品的是, 米粉样品中占比较高的菌群除了乳球菌属(11.64%)、链球菌属(7.60%)之外, 无法分类的蓝藻细菌占有绝对优势(41.79%)。蓝藻菌在土壤、水体、植物中广泛存在, 米粉样品的主要原料为大米, 而很多蓝藻种类(如念珠藻)与水稻种植中的固氮作用密不可分, 因此大米作为原料加工时不可避免的带入较多的蓝藻细菌。另一种可能是蓝藻在水体中过量繁殖, 形成水华而导致水稻中含有大量蓝藻, 这些推测有必要在之后的研究中进一步证实。此外, 沙门氏菌属(8.75%)、李斯特氏菌属(3.61%)和其他无法分类的肠杆菌科(5.99%)细菌在米粉样品中占比普遍较奶粉样品高, 可见米粉样品中的致病细菌质量控制环节较乳粉加工更加薄弱。

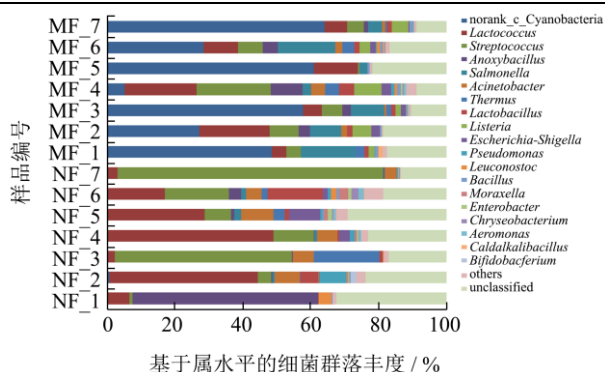


图4 基于属水平的样品细菌群落丰度

Fig.4 Bacteria community abundance on genus level

2.2.3 属水平物种丰度聚类热图

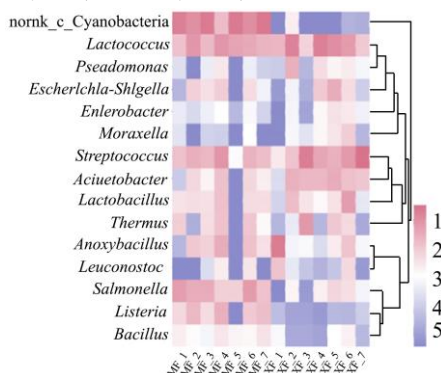


图5 基于属水平的样品物种丰度聚类热图

Fig.5 Bacteria community abundance heatmap on genus level

热图是以颜色梯度来表征二维矩阵或表格中的数据大小，直观地呈现群落物种组成信息。根据物种间丰度的相似性进行聚类，并将结果呈现在群落热图上，可使高丰度和低丰度的物种分块聚集，通过颜色变化与相似程度来反映不同分组在各分类水平上群落组成的相似性和差异性。图5为基于属水平的物种丰度居前20的聚类热图(去除 unclassified 的种属)，右侧图例为颜色梯度代表的数值，由蓝色到红色表示物种丰度由低到高，可见每个样品物种丰度不尽相同，但链球菌属和乳球菌属在所有样品中均有分布，且丰度较高(均为红色)，米粉样品中蓝藻菌丰度较高，与柱状图结论一致。

2.3 Beta 多样性分析

2.3.1 样本层次聚类分析

选取 Unweighted UniFrac 非加权距离矩阵算法，采用非加权配对平均法 (Unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA) 对样品进行层次聚类，选择 Average linkage 计算方法，构建聚类树，用来判断各样品间物种组成的相似性和差异性。由于环境中微生物复杂多样，物种组成差异较为剧烈，所以通常采用非加权方法进行分析，非加权算法主要比

较物种的有无，不考虑物种丰度；而 UniFrac 是基于系统发生树，考虑物种间的进化距离来比较样品间的物种群落差异^[26]。样品聚类树中样品越靠近，枝长越短，其物种组成越相似。如图6所示，米粉样品和奶粉样品明显分成两个显著不同的类群，说明两组样品细菌群落组成差异明显。7份米粉样品被分为两簇，MF_3、MF_4和MF_6聚为一簇，MF_1、MF_2、MF_5、MF_7聚为一簇，其中MF_3和MF_6距离最近，物种组成最相似；而7份奶粉样品彼此聚集在一起，其中NF_4和NF_5距离最近，NF_1与其他样品距离最远，说明它与其他奶粉物种组成差异最大。

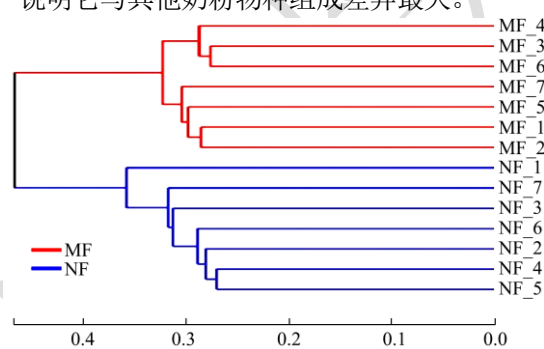


图6 基于 OTU 水平的层次聚类树

Fig.6 Hierarchical clustering tree on OTU level

2.3.2 PCoA 分析

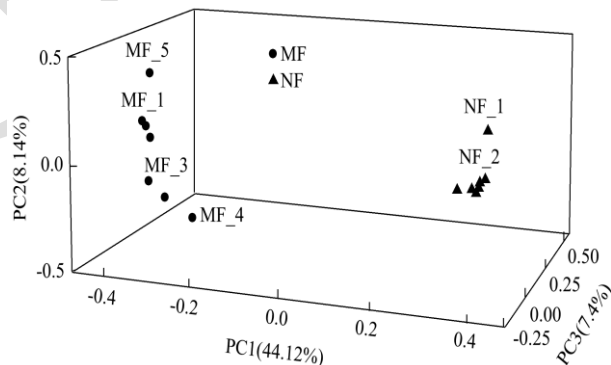


图7 基于 OTU 水平的 3D PCoA 分析图

Fig.7 3D-PCoA on OTU level

基于 Unweighted UniFrac 非加权距离矩阵算法对所有样品进行 PCoA 分析，观察个体和组间的物种差异。结果如图所示，第一主成分 (PC1)、第二主成分 (PC2) 和第三主成分 (PC3) 的贡献率分别为 44.12%、8.14% 和 7.4%。坐标图上距离越近的样品，物种组成相似性越大^[27]。整体来看 (图7)，奶粉和米粉样品明显分布于坐标轴的两个区域，在 PC1 成分上距离较远，说明两组样品物种组成差异较组内差异大。7个奶粉样品组内，NF_1 (0.2927, 0.0159, 0.5073) 在 PC3 轴与同组其他样品距离较远，说明其物种差异较组内其他样品大；7个米粉样品较奶粉组分布略分散，主要表现在 PC2 成分上，MF_3\4\6 和 MF_1\2\5\7 分别

聚在一起, 这些与 UPGMA 分析结果一致。

2.4 组间物种差异分析

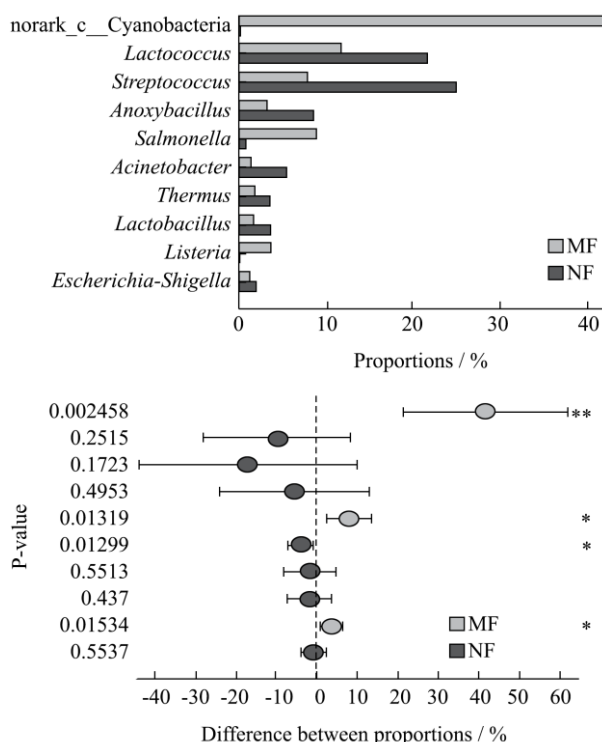


图8 基于属水平的 Welch's t 检验条形图

Fig.8 Welch's t test bar plot on genus level

针对奶粉和米粉两组样品, 选用适用于两组独立样本非参数检验的 Welch's t 检验 (Welch's t test), 对其物种丰度进行显著性差异分析, 并用 *fdr* 对 *p* 值进行多重检验校正。如图 8 所示, 属水平上物种丰度均值在 1~10 的样品 (去除了 unclassified 种属) 差异显著性检验结果显示, 蓝藻细菌、沙门氏菌、不动杆菌属、李斯特氏菌属在两组样品中存在极显著性差异 ($p < 0.01$) 或显著性差异 ($p < 0.05$), 米粉样品中蓝藻细菌、沙门氏菌、李斯特氏菌丰度显著高于奶粉, 而奶粉样品的不动杆菌属丰度显著高于米粉样品。沙门氏菌和李斯特氏菌是食源性致病菌, 特别是对婴幼儿特殊群体具有更高的安全风险, 即使在终产品中致病菌被灭活, 生产企业仍应加强对米粉原料和加工环节的管控, 降低致病菌污染风险, 同时提示相关部门应重视对婴幼儿米粉辅食的食品安全监管。不动杆菌属是原料乳中常见的嗜冷菌, 若大量繁殖会影响破坏乳成分, 导致腐败变质^[25], 企业应采取积极措施改善加工工艺, 如缩短原料乳 4 °C 存放时间, 快速实时监测原料乳中嗜冷菌的变化情况, 防止嗜冷菌对成品乳品质的影响。

3 结论

本研究以婴幼儿羊奶粉及米粉样品为研究对象, 采用二代高通量测序技术对样品中细菌的多样性进行了研究, 结果表明, 婴幼儿羊奶粉样品比米粉样品具有更高的群落多样性, 奶粉样品组内差异较米粉样品小, 但两组样品组间物种组成具有显著差异。羊奶粉样品中占绝对优势菌群隶属于厚壁菌门和变形菌门, 在属水平上以链球菌属和乳球菌属为主; 而米粉样品中蓝藻菌门占有绝对优势, 厚壁菌门和变形菌门次之, 推测主要与两种产品的原料不同有关。除此之外, 沙门氏菌、李斯特氏菌等与食源性疾病相关的细菌种类在米粉样品中普遍存在, 与奶粉样品中丰度有显著性差异 ($p < 0.05$), 提示婴幼儿米粉产品存在一定的食品安全隐患, 其原料和生产加工环节的质量控制亟需引起生产企业和食品监管部门的重视。米粉作为婴幼儿必要的谷物类辅助食品, 直接关系到婴幼儿的生命健康, 本研究首次利用高通量测序技术聚焦婴幼儿米粉微生物污染问题, 对米粉产品的工艺改进和市场监管具有一定的指导意义。

参考文献

[1] 佟成元, 吴迪, 钱贵霞. 中国奶粉市场消费分析与趋势展望 [J]. 农业展望, 2013, 9(6): 69-72

TONG Cheng-yuan, WU Di, QIAN Gui-xia. Analysis of China's milk powder consumption and its trend prospect [J]. Agricultural Outlook, 2013, 9(6): 69-72

[2] 董倩, 郭树荣, 蒋忠瑄, 等. 晋城地区市售婴幼儿谷类辅助食品微生物污染状况评价 [J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29(2): 109-111

DONG Qian, GUO Shu-rong, JIANG Zhong-tang, et al. Evaluation of microbial contamination of market selling cereal-based complementary foods for infants and children in Jincheng district [J]. J of Pub Health and Prev Med, 2018, 29(2): 109-111

[3] 张峰. 浅谈婴幼儿配方乳粉的标准法规、检测技术及监管制度 [J]. 中国食品药品监管, 2018, 2: 30-34

ZHANG Feng. The standard regulation, inspection technology and supervision system of infant formula milk powder [J]. China Food & Drug Administration Magazine, 2018, 2: 30-34

[4] 许文涛, 郭星, 罗云波, 等. 微生物菌群多样性分析方法的研究进展 [J]. 食品科学, 2009, 7(30): 258-265

XU Wen-tao, GUO Xing, LUO Yun-bo, et al. Research progress on analysis methods of diversity of microbial flora [J]. Food Science, 2009, 7(30): 258-265

[5] 刘新武, 于艳妮, 滕海风, 等. 16S rDNA 序列在细菌鉴定和检

- 测分析中的应用价值[J].医学检验与临床,2017,28(7):30-32
- LIU Xin-wu, YU Yan-ni, TENG Hai-feng, et al. Application value of 16S rDNA sequence in bacterial identification and analysis [J]. Medical Laboratory Science and Clinics, 2017, 28(7): 30-32
- [6] 马慧敏.利用 PacBio SMRT 测序技术对羊奶粉中污染微生物的评估[D].包头:内蒙古农业大学,2018
- MA Hui-min. Evaluation of the bacterial contamination in goat milk powder using PacBio SMRT sequencing technology [D]. Baotou: Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [7] Shokralla S, Spall J L, Gibson J F, et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research [J]. Mol Ecol, 2012, 21(8): 1794-1805
- [8] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9:387-402
- [9] Walker A W, Martin J C, Scott P, et al. 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice [J]. Microbiome, 2015, 3(1): 1-11
- [10] Salipante S J, Kawashima T, Rosenthal C, et al. Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(24): 7583-7591
- [11] Kennedy N A, Walker A W, Berry S H, et al. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing [J]. Plos One, 2014, 9(2): 88982
- [12] Raoult D, Henrissat B. Are stool samples suitable for studying the link between gut microbiota and obesity? [J] Eur J Epidemiol, 2014, 29(5):307-309
- [13] Fouhy F, Clooney A G, Stanton C, et al. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform [J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 123
- [14] Ansari M I, Harb M, Jones B, et al. Molecular-based approaches to characterize coastal microbial community and their potential relation to the trophic state of red sea [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 9001
- [15] Chen H, Boutros P C. Venn Diagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 35-40
- [16] Kong H H, Conlan S, Grice E A, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192
- [17] Wang Y, Sheng H F, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8264-8271
- [18] Zalewska B, Kaevska M, Slana I. Sequence analysis of changes in microbial composition in different milk products during fermentation and storage [J]. Current Microbiology, 2018, 75(2): 202-205
- [19] Mcinnis E A, Kalanetra K M, Mills D A, et al. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity [J]. Food Microbiology, 2015, 46(46): 121-131
- [20] Zhang F, Wang Z, Lei F, et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China [J]. Journal of Dairy Science, 2017
- [21] Giannino M L, Aliprandi M, Feligini M, et al. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78(2):181-188
- [22] Quigley L, O'Sullivan O, Beresford T P, et al. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5717-5723
- [23] Collins E B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms [J]. Journal of Dairy Science, 1981, 64(1): 157-160
- [24] Chen L, Daniel R, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(4): 270-275
- [25] 吕元.原料奶中嗜冷菌的快速检测[D].杭州:浙江大学,2010
- LYU Yuan. A rapid method of detecting psychrotrophic in raw milk [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010
- [26] Lozupone C, Knight R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8228-8235
- [27] Calderón K, Spor A, Breuil M C, et al. Effectiveness of ecological rescue for altered soil microbial communities and functions [J]. The ISME Journal, 2017, 11(1): 272