

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.010

冷鲜鸡接触者手部抗生素耐药菌菌群多样性分析

Diversity of antibiotic resistant bacteria isolated from cold fresh chicken handlers' hands

黄柳娟¹ 邵毅^{1,2} 冯博¹ 周昌艳^{1,2}

HUANG Liu-juan¹ SHAO Yi^{1,2} FENG Bo¹ ZHOU Chang-yan^{1,2}

(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. 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403)

(1. Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403, China)

摘要:为探索冷鲜鸡表面抗生素耐药菌在生产加工和消费加工中向人迁移的潜在风险,利用选择性培养和 IonS5™XL 测序平台对 6 位冷鲜鸡接触者手部的四环素耐药菌(TET^r)和磺胺耐药菌(SUL^r)进行计数和多样性分析。结果表明,与冷鲜鸡接触后,操作者手部的两类耐药菌显著增加至 $4.80 \times 10 \sim 2.66 \times 10^6$ CFU/cm²; TET^r 菌和 SUL^r 菌中各注释出 21, 19 个菌属的共有菌群,其中,不动杆菌等 9 个属的细菌已被证实在禽源和人源分离株中均存在多重耐药性,且耐药基因在禽源和人源细菌间可能发生水平迁移;而布丘氏菌等 14 个菌属的禽源细菌的耐药特性尚无研究报道。研究证实 TET^r 菌和 SUL^r 菌在直接接触中会从冷鲜鸡肉产品表面迁移至操作者手上。

关键词:四环素耐药菌;磺胺耐药菌;菌群多样性;冷鲜鸡

Abstract: In order to investigate the potential migration of antibiotic resistant (ART) bacteria from cold fresh chicken to humans during handling in production and consumption, selective culture technology and IonS5™ XL sequencing platform were used for counting and diversity analysis of tetracycline-(TET^r) and sulfamethoxazole-resistant bacteria (SUL^r) on the surface of six handlers' hands contacting with cold fresh chicken products. The results showed that the two ART bacteria from the handlers' hands significantly increased to $4.80 \times 10 \sim 2.66 \times 10^6$ CFU/cm²

基金项目:上海市农委基础研究项目(编号:沪农科攻字[2014]第 7-3-6 号);国家自然科学基金项目(编号:31401599);上海市市级农口系统青年人才成长计划(编号:沪农青字[2018]第 1-38 号);上海市农业科学院学科领域建设专项(编号:农科农助 2019C10)

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:2019-05-28

after contacting with cold fresh chicken. Furthermore, 21 and 19 genera of shared flora were identified in the TET^r and SUL^r bacteria, respectively, among which the multi-drug resistance of avian and human *Acinetobacter* and other eight genera bacteria had been already confirmed by extensive research, and the potential transmission of antibiotic resistance genes between avian and human isolates were existed. However, the characteristics of antibiotic resistance of *Buttiauxella* and other 14 genera had not been reported yet. Our results illustrated the migration of TET^r and SUL^r bacteria from cold fresh chicken products to the handlers' hands by direct contact, and provided a basis for risk assessment of antibiotic resistance exposure to chicken products handlers.

Keywords: tetracycline-resistant bacteria; sulfamethoxazole-resistant bacteria; diversity; cold fresh chicken

抗生素耐药细菌(antibiotic resistant bacteria, ART bacteria)在医疗和农业养殖中的快速增多对人类公共卫生安全造成巨大威胁^[1], ART 致病菌在医院的接触转移及控制策略方面得到了深入研究^[2], 手卫生成为控制院感多重 ART 菌的重要手段^[3-4]。在农业养殖和肉品加工领域,动物源性 ART 菌可能通过食物链^[5]或在养殖、加工和消费各环节^[6]向人类扩散,预示耐药风险同样存在于并未滥用抗生素的普通民众中。研究人员^[7]从食品加工者的手上分离到了多重耐药的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,但除此以外,动物源 ART 菌向食品从业人员或消费者手部迁移的研究还未展开。相对于致病菌,普通细菌数量众多,且包含的耐药基因(antibiotic resistance genes, AR genes)和迁移元件更为多样,不同种属细菌的耐药程度^[8]和耐药性迁移潜势^[9-11]差异巨大,因此肉品加工者手部 ART 菌菌群组成的揭示,是评估其耐药性暴露风险的基础之一。

目前,在养鸡场和生鲜鸡肉产品表面已发现了大量的四环素耐药菌和磺胺耐药菌,且存在 AR 基因在不同菌种间迁移的潜势^[12-15]。研究模拟冷鲜鸡生产加工和消费初加工中操作人员徒手接触鸡肉的过程,以四环素类耐药菌和磺胺耐药菌为例,拟通过选择性培养和 IonS5™ XL 测序平台分析手部 ART 菌的菌落结构,为进一步揭示鸡肉加工操作人员的抗生素耐药暴露风险提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

冷鲜鸡肉产品:科宝 500 或浦东鸡,上海大型超市和生鲜超市。随机选取上海市 6 个大型超市和生鲜超市,每个超市购买 1 份冷鲜鸡样品(2 份鸡翅中,2 份鸡大胸,2 份鸡腿,每类包括散装和预包装样品各 1 份,共 6 份,分别编号为 A~F)。样品用无菌袋盛装,采样时避免外源污染微生物,在冰盒(约 4 °C)中于 3 h 内运回实验室,用于徒手接触鸡肉的模拟试验;

脑心浸液肉汤(Brain heart infusion broth, BHI)琼脂培养基:英国 OXOID 公司;

四环素(Tetracycline, TET)、磺胺甲恶唑(Sulfamethoxazole, SUL)和甲氧苄啉(Trimethoprim, TRI):分析纯,美国 SIGMA 公司;

真菌抑制剂放线菌酮(Cycloheximide, CYC):分析纯,美国 AMRESCO 公司;

Swab 涂抹棒:3M 中国有限公司;

细菌基因组提取试剂盒、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)试剂盒和琼脂糖电泳试剂盒: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:100 μmol,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

生物安全柜:1300 SERIES A2 型,美国 Thermo 公司;

恒温培养箱:Medcenter Einrichtungen GmbH 型,德国 Friocell 公司;

灭菌锅: SX-500 型,日本 Tomy Digital Biology 公司;

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

离心机: 5424 型,德国 Eppendorf 公司;

单道可调微量移液枪: Research Plus 型,德国 Eppendorf 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。

1.2 方 法

1.2.1 徒手接触鸡肉的模拟和取样 参考 Zapka 等^[16]的方法对冷鲜鸡生产加工和消费初加工中操作人员徒手接触鸡肉的过程进行模拟和取样,具体修改:6 位操作者均用洗手液充分洗手 2 min 并冲净后,用 75% 酒精棉擦拭手掌,然后用涂抹棒翻转充分擦拭手心 5 cm×5 cm 区域后,放入 10 mL 缓冲蛋白胍水溶液,反复震荡,获得第 1 份手心细菌悬浊液样品,编号为 WH-1, WH-2, ..., WH-6。6 位操作者分别徒手各抓取 1 份冷鲜鸡样品(第 1 位操作者抓取鸡肉样品 A,第 2 位抓取 B,以此类推),并一直保持手掌与肉接触并揉搓 2 min 后,再次用涂抹棒擦拭手心,获得第 2 份手心细菌悬浊液样品,编号为 MP-1, WP-2, ..., MP-6。

1.2.2 手部 ART 菌的分离和计数 参考 Huang 等^[17]的方法对四环素耐药菌(TET^r)和磺胺甲恶唑/甲氧苄啉耐药菌(SUL^r)进行分离:手心细菌悬浊液原液经 10 倍稀释后,用移液枪吸取 1 mL 原液及各稀释液,均匀涂布于含有 CYC+TET 或 CYC+SUL+TRI 的 BHI 平板上,30 °C 培养 24 h。手心细菌悬浊液原液的平板培养物用于菌群多样性分析,分离出单菌落的平板用于菌落计数。所有处理重复 3 次。参考美国临床和实验室标准协会(CLSI)^[18]对四环素或磺胺甲恶唑/甲氧苄啉耐药折点的规定,将培养皿中 TET、SUL 和 TRI 的浓度点分别定为 16, 76, 4 μg/mL;所有平板中 CYC 的浓度均为 100 μg/mL。

1.2.3 DNA 提取及 PCR 扩增 刮取原液培养皿上所有菌体,用 2 mL 生理盐水重悬,混匀,取 100 μL 菌悬液提取细菌总 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪分析确认 DNA 的提取质量后,使用带 Barcode 的特异引物对 16S rDNA 的 V3-V4 区进行 PCR 扩增。上游引物为 341F; 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3', 下游引物为 806R; 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'。用 2% 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪检测 PCR 扩增产物的质量,委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司利用单端测序(Single-End)的方法,基于 IonS5™ XL 测序平台^[19],对构建的小片段文库进行高通量测序。

1.2.4 高通量测序数据分析 将下机数据导出 fastq 文件,根据 barcode 序列区分各个样本的数据,嵌合体过滤后得到用于后续分析的有效数据^[20]。用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001)以 97% 的一致性对所有样本的有效标签进行操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)的聚类^[21],用 SILVA132(<http://www.arb-silva.de/>)的 SSU rRNA 数据库^[22]在界、门、纲、目、科、属和种

7 个水平进行物种注释分析。进而,用 Qiime 软件(Version 1.9.1)计算物种数指数(Observed species)、超指数(Chao1)、香农指数(Shannon)、辛普森指数(Simpson)和菌群覆盖度指数(Goods coverage)等 α -多样性指数,评估样品的复杂度,生成各分类水平下各类细菌的丰度^[19]。其中,Observed Species 指数和 Chao1 指数反映了样品的菌群丰度,Shannon 指数和 Simpson 指数反映了样品的菌群多样性,Goods Coverage 指数反映了测序深度。用 R 软件绘制花瓣图,获得不同样本的共有菌群^[23] OTUs 信息。

1.3 数据处理

手部 ART 菌的计数结果用(平均值±标准误差)表示,用 SPSS 16.0 的单因素方差分析(one-way ANOVA)方法比较徒手接触鸡肉前后手部 ART 菌计数的差异显著性,当 $P < 0.05$ 时,判断差异显著,否则不显著。

2 结果与分析

2.1 菌群计数

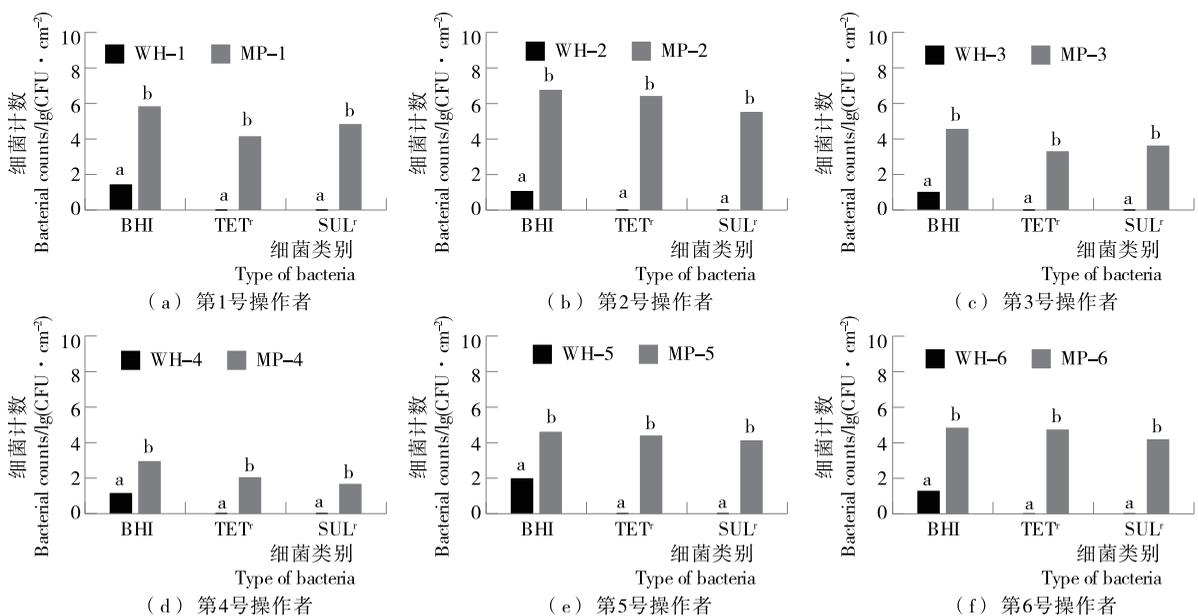
接触冷鲜鸡肉前经充分洗手后,用 BHI 培养基在 6 位操作者的手部仅检出约 $11 \sim 99$ CFU/cm² 的细菌,未检出 TET^r 菌或 SUL^r 菌;与冷鲜鸡接触后,操作者手部的两种 ART 菌分别显著增加到 $1.14 \times 10^2 \sim 2.66 \times 10^6$, $4.80 \times 10 \sim 3.40 \times 10^5$ CFU/cm² (图 1, $P = 0.000$),说明通过直接接触,冷鲜鸡肉产品表面的两类 ART 菌均有转移到操作者的手部。因此,用高通量测序技术对迁移至手

部的两类 ART 菌进行组成的多样性分析。

2.2 菌群多样性分析

2.2.1 样品复杂度 所有样品中两种 ART 菌的菌群覆盖度指数为 $0.999 \sim 1.000$ (表 1),说明几乎所有的目标序列都被测出,多样性分析结果能反映样品菌群组成的真实情况。从所有 6 位操作者手部 ART 菌样品测序共获得 400 种不同的 OTUs,平均每个样品的 TET^r 菌和 SUL^r 菌中分别获得 159,188 个 OTUs。

2.2.2 菌群结构 在门水平上,ART 菌中丰度最高的 3 个门均为变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*);在属水平上,TET^r 菌和 SUL^r 菌中各注释出 79,97 种已明确属名的属。与冷鲜鸡表面细菌的主要菌属^[24-25]相比,10 种主要菌属中除了黄杆菌属(*Flavobacterium* spp.)未在试验涉及的手部细菌样品中发现外,其余 9 种均得了鉴定,再次验证了接触冷鲜鸡后操作者手部分离到的 ART 菌主要来自冷鲜鸡表面,同时,也间接说明了冷鲜鸡表面的细菌有多种菌属可能已具有抗生素耐药性。此外,有研究^[10-11]表明,肉杆菌属(*Carnobacterium* spp.)、肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、乳杆菌属(*Lactobacillus* spp.)、乳球菌属(*Lactococcus* spp.)和葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)等种属的细菌较多地参与了 AR 基因的水平迁移,而在试验中,上述种属的细菌在手部分离到的两类 ART 菌中均有检出,因此有必要在今后的研究中进一步确认这几类 ART 菌的手部分离株的耐药性,并评估其参与动物源



字母不同表示同个样品的同类细菌中,WH 组和 MP 组差异显著($P < 0.05$)

图 1 与冷鲜鸡肉接触前后操作者手部总细菌、TET^r 菌和 SUL^r 菌的计数

Figure 1 Counting of total bacteria, tetracycline-resistant and sulfamethoxazole-resistant bacteria of handlers' hands before and after touching with cold fresh chicken samples

表 1 手部两种耐药菌菌群的 OTUs 检出数量和 α -多样性指数

Table 1 The OTUs numbers and the Alpha diversity index of two antibiotic resistant bacteria isolated from handlers' hands

| 操作者 编号 | 检出 OUT 种类数 | | 物种数指数 | | 超指数 | | 香农指数 | | 辛普森指数 | | 菌群覆盖度指数 | |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | TET ^r | SUL ^r |
| 1 | 157 | 186 | 121 | 127 | 130.69 | 138.08 | 4.17 | 4.01 | 0.91 | 0.87 | 1.000 | 1.000 |
| 2 | 162 | 150 | 121 | 115 | 125.19 | 119.09 | 4.58 | 4.58 | 0.93 | 0.93 | 1.000 | 1.000 |
| 3 | 127 | 225 | 96 | 117 | 100.26 | 137.75 | 3.47 | 3.11 | 0.86 | 0.79 | 1.000 | 0.999 |
| 4 | 138 | 139 | 93 | 94 | 101.26 | 100.55 | 3.23 | 2.73 | 0.81 | 0.72 | 1.000 | 1.000 |
| 5 | 179 | 229 | 128 | 139 | 135.67 | 150.35 | 3.64 | 4.22 | 0.82 | 0.89 | 1.000 | 1.000 |
| 6 | 190 | 199 | 131 | 140 | 144.94 | 151.71 | 4.16 | 4.41 | 0.90 | 0.92 | 1.000 | 1.000 |

AR 基因向人类共生菌迁移的风险。

2.2.3 共有菌群 共有菌群在 6 位操作者的手部细菌样品中均有检出,反映所有样品的菌群组成共性^[23],推测其在冷鲜鸡中普遍存在,对冷鲜鸡加工操作者来说暴露风险较高。花瓣图分析结果表明,TET^r菌和 SUL^r菌各有

70 种 OUTs 的共有菌群(图 2),除各自的 10,7 个 OUTs 未鉴定到属水平外,其他 OUTs 分属 3 个门的 21,19 个属(图 3)。

在冷鲜禽肉操作者手部分离到的 TET^r菌和 SUL^r菌的共有菌群中,不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)^[26]、假单

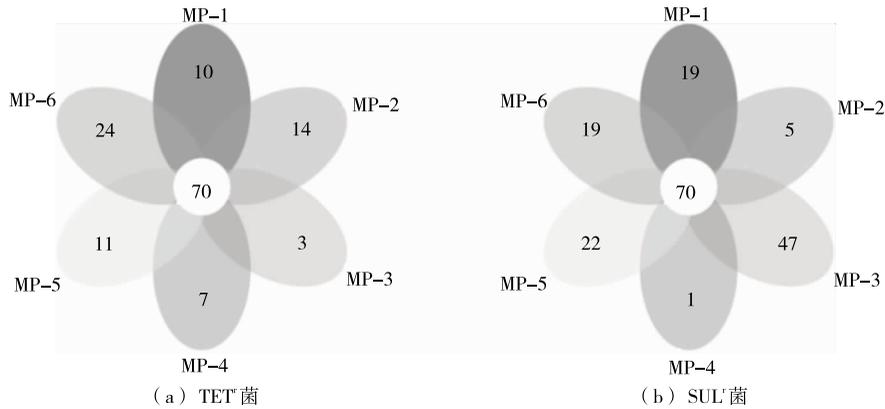


图 2 手部 TET^r 菌和 SUL^r 菌中共有和特有 OTUs 数的花瓣图

Figure 2 Flower figures of unique and common OTUs of tetracycline-resistant bacteria and sulfamethoxazole-resistant bacteria isolated from handlers' hands

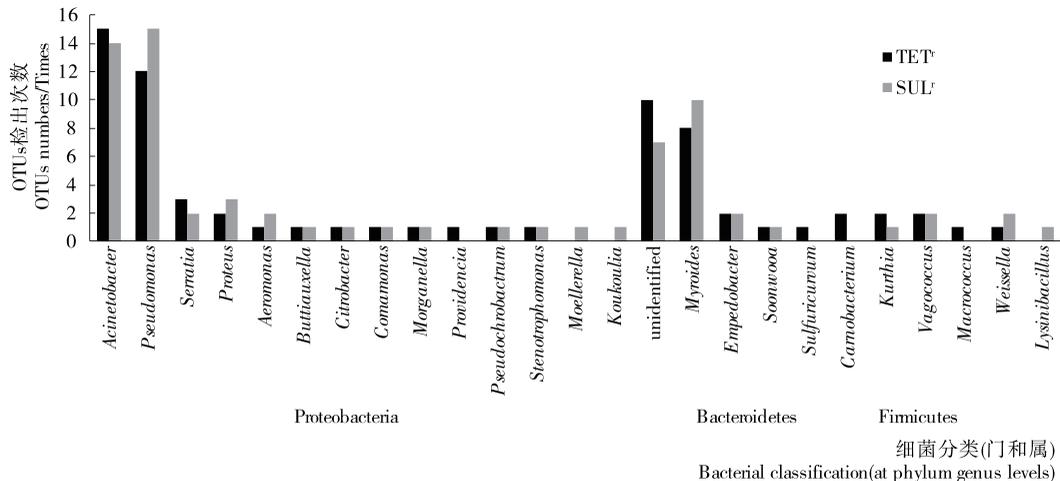


图 3 TET^r 菌共享菌群和 SUL^r 菌共享菌群的组成

Figure 3 The shared flora of tetracycline-resistant and sulfamethoxazole-resistant bacteria

胞菌属 (*Pseudomonas* spp.)^[27]、沙雷氏菌属 (*Serratia* spp.)^[28]、变形杆菌属 (*Proteus* spp.)^[29]、气单胞菌属 (*Aeromonas* spp.)^[30]、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* spp.)^[31]、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* spp.)^[32-33]、香味菌属 (*Myroides* spp.)^[34]、漫游球菌属 (*Vagococcus* spp.)^[35] 和巨型球菌属 (*Macrococcus* spp.)^[36] 的禽源分离株已被证实具有多重耐药性,且可能存在 AR 基因水平迁移的风险。同时,人类的临床数据^[2]表明,除气单胞菌属、漫游球菌属和巨型球菌属外,上述其他属的细菌近十几年来的检出率呈上升趋势,且具有多重耐药性,其中的鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 更是已成为中国目前最主要的“超级细菌”^[37]。而气单胞菌也可导致人类肠道感染,是中国夏季腹泻的常见病原菌之一^[38];河流漫游球菌与人类感染有关^[39]。因此,应特别注意这些在鸡和人类中都能分离到的 ART 菌,禽源和人源分离株之间是否存在 AR 基因迁移的可能需要进一步深入研究和确认。

除了上述菌属,试验中冷鲜鸡肉加工操作者手中发现的共有 TET^r 菌和 SUL^r 菌中的布丘氏菌属 (*Buttiauxella* spp.)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas* spp.)、摩根氏菌属 (*Morganella* spp.)、普罗维登斯菌属 (*Providencia* spp.)、假苍白杆菌属 (*Pseudochrobactrum* spp.)、莫勒菌属 (*Moellerella* spp.)、*Koukoulia* 属、稳杆菌属 (*Empedobacter* spp.)、*Soonwooa* 属、*Sulfuricurvum* 属、肉杆菌属、库特氏菌属 (*Kurthia* spp.)、魏斯氏菌属 (*Weissella* spp.) 和赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus* spp.) 等菌属的禽源耐药菌株和耐药特性尚未见报道,需要在后续的研究中对相应的菌株进行分离和验证。

试验利用高通量测序技术证实鸡肉表面的多种 TET^r 菌和 SUL^r 菌能通过直接接触的途径从冷鲜鸡肉产品表面迁移至操作者手上,但因为两类 ART 菌的获得仍基于选择性培养基的筛选,而不同的培养参数均会影响细菌的分离结果^[40],因此,单一的培养条件会限制微生物多样性分析结果的全面性,冷鲜鸡产品中能通过直接接触向人类迁移的 ART 菌的种属,还需配合其他培养方法或开发不依赖于培养的分析技术进行完善。此外,尽管人类皮肤暴露于各种环境下,但皮肤微生物群落仍倾向于保持一定的稳定性^[41],通过直接接触而迁移到人类手部的动物源 ART 菌能在手部皮肤表面定殖时间,以及从人类手部有效地去除这些动物源 ART 菌的方法值得进一步研究。

3 结论

试验通过模拟冷鲜鸡生产加工和消费初加工中操作人员徒手接触鸡肉的过程,用选择性培养、菌落计数和菌群多样性分析等方法,证实了 TET^r 菌和 SUL^r 菌两类

ART 菌在直接接触中能从冷鲜鸡肉产品表面迁移至操作者手部。其中的不动杆菌属、假单胞菌属、沙雷氏菌属、变形杆菌属、气单胞菌属、柠檬酸杆菌属、寡养单胞菌属、香味菌属和漫游球菌属的禽源和人源分离株已被多次证实具有多重耐药性,因此,应充分重视冷鲜鸡肉表面细菌的抗生素耐药性问题,并深入研究 AR 基因在上述禽源和人源细菌间水平迁移的潜在风险;共有菌群中的布丘氏菌属等 14 种菌属的禽源耐药株的耐药特性应进一步确认,其污染来源和迁移风险有待揭示。

参考文献

- [1] CENTERZ T J. Efforts to slacken antibiotic resistance; Labeling meat products from animals raised without antibiotics in the United States[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 563(9): 1 088-1 094.
- [2] GUAN Xiang-dong, HE Li-xian, HU Bi-jie, et al. Laboratory diagnosis, clinical management and infection control of the infections caused by extensively drug-resistant Gram-negative bacilli: A Chinese consensus statement[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(S1): S15-S25.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention. Handwashing: cleanhands save lives[EB/OL]. (2019-06-13)[2019-07-18]. <http://www.cdc.gov/handwashing/index.html>.
- [4] 邵小平, 茅艇华, 蒋卓娟, 等. 手卫生管理系统对降低 ICU 多药耐药菌感染的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(17): 4 053-4 055.
- [5] WANG Hua, 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.
- [6] 张利锋. 山东商品鸡养殖、屠宰、销售环节中细菌耐药性传播规律研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2016: 13-15.
- [7] TAN S, LEE Y, MAHYUDIN A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, isolated from food handler's hands[J]. *Food Control*, 2014, 44(3): 203-207.
- [8] 张可欣, 李忠海, 任佳丽. 食源性细菌耐药性检测方法的研究进展[J]. *食品与机械*, 2018, 34(2): 181-184, 212.
- [9] QIAO Min, YING Guang-guo, SINGER S, et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment[J]. *Environment International*, 2018, 110: 160-172.
- [10] WANG Hua. Commensal bacteria, microbial ecosystems, and horizontal gene transmission: Adjusting our focus for strategic breakthroughs against antibiotic resistance[M]. JAYKUS L, WANG H, SCHLESINGER L. *Foodborn Microbes: Shaping the Host Ecosystems*. Washington DC: ASM Press, 2009: 267-281.
- [11] ROSSI F, RIZZOTTI L, FELIS E, et al. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge

- and future perspective[J]. *Food Microbiology*, 2014, 42(9): 232-243.
- [12] ZHANG Peng, SHEN Zhang-qi, ZHANG Chun-ping, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli*, from chicken and swine, China, 2008-2015[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 203: 49-55.
- [13] 李姝, 邵毅, 周昌艳, 等. 市售鸡肉及内脏中磺胺耐药菌污染特征[J]. *食品科学*, 2017, 38(21): 170-174.
- [14] 邵毅, 李姝, 黄柳娟, 等. 市售鸡肉中四环素耐药菌污染特征初探[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(1): 250-256.
- [15] 费鹏, 赵胜娟, 姜亦超, 等. 东北市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的分离鉴定、分型及耐药性分析[J]. *食品与机械*, 2018, 34(6): 46-49.
- [16] ZAPKA C, LEFF J, HENLEY J, et al. Comparison of standard culture-based method to culture-independent method for evaluation of hygiene effects on the hand microbiome[J]. *Mbio*, 2017, 8(2): e00093-17.
- [17] HUANG Ying, ZHANG Lu, TIU Laura, et al. Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 914-919.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 28th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 30-97.
- [19] 米瑞芳, 陈曦, 熊苏玥, 等. 传统自然发酵酸肉中细菌群落多样性与风味品质分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(2): 85-92.
- [20] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [21] HASS J, GEVERS D, EARL M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [22] WANG Qiong, GARRITY M, TIEDJE M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5 261-5 267.
- [23] 林奕岑, 徐帅, 倪学勤, 等. 利用 Illumina MiSeq 测序平台分析肉鸡盲肠微生物多样性[J]. *中国农业大学学报*, 2016, 21(12): 65-73.
- [24] 肖英平, 何祥祥, 戴宝玲, 等. 采样方法对冷鲜鸡表面细菌 DNA 提取及高通量测序结果的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(24): 260-264.
- [25] 温冬玲, 成淑君, 刘悦, 等. 高通量测序分析不同增菌温度下冷鲜鸡肉细菌的群落多样性[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 156-161.
- [26] LIU Dong, LIU Zeng-shan, HU Pan, et al. Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China[J]. *Microbiology and Immunology*, 2016, 60(8): 533-539.
- [27] ANSARI F, KHATOON H. Multiple antibiotic resistance among gram negative bacteria isolated from poultry[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1994, 32(3): 211-212.
- [28] KILONZO-NTHENGE A, ROTICH E, NAHASHON N. Evaluation of drug-resistant *Enterobacteriaceae* in retail poultry and beef[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(4): 1 098-1 107.
- [29] 李欣南, 韩饒竹, 宁宜宝. 鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(6): 165-167.
- [30] ABU-ELALA N, ABDELSALAM M, MAROUF S, et al. Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance, and *gyrB* based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 61(5): 429-436.
- [31] 刘星, 孟韩冰, 孔祥彬. 鸡肠毒综合征致病菌的自动生化鉴定及药敏分析[J]. *河南畜牧兽医: 综合版*, 2008, 29(7): 7-9.
- [32] 陈力力, 杨伊磊, 青文哲, 等. 鸡蛋壳表面细菌数量及种群多样性分析[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 74-79.
- [33] 戴宝玲, 肖英平, 孙凤来, 等. 家禽定点屠宰场不同屠宰区域空气的微生物结构[J]. *食品科学*, 2018, 39(21): 219-223.
- [34] SUGANTHI R, SHANMUGA-PRIYA T, SARANYA A, et al. Relationship between plasmid occurrence and antibiotic resistance in *Myroides odoratimimus* SKS05-GRD isolated from raw chicken meat[J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2013, 29(6): 983-990.
- [35] 牛天琦. 鸡粪中多重耐药细菌的分离鉴定及介导抗性基因水平转移元件的检测[D]. 新乡: 河南师范大学, 2015: 62-67.
- [36] LI Gen, DU Xu-sheng, ZHOU De-fang, et al. Emergence of pathogenic and multiple-antibiotic-resistant *Macrocooccus caseolyticus* in commercial broiler chickens[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(6): 1 605-1 614.
- [37] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. *中国医药科学*, 2012, 2(8): 3-8.
- [38] 万颖. 杭州地区不同来源气单胞菌的毒力基因分布与耐药性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016: 1.
- [39] 李仲兴, 张新华, 刘怀军. 漫游球菌的研究进展[J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(9): 631-634.
- [40] 杨虎, 向文良, 张弛, 等. 培养和非培养法分析冷藏鸡肉胴体中的细菌多样性[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(10): 1 451-1 456.
- [41] OH J, BYRD A, PARK M, et al. Temporal stability of the human skin microbiome[J]. *Cell*, 2016, 165(4): 854-866.