

# 家禽屠宰场微生物菌群结构及大肠杆菌耐药性评估

王佩佩<sup>1,2,3</sup>, 戴贤君<sup>1</sup>, 杨 华<sup>2,3</sup>, 肖英平<sup>2,3,\*</sup>

(1.中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 2.浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 浙江 杭州 310021;  
3.浙江省植物有害生物防控省部共建国家重点实验室培育基地, 浙江 杭州 310021)

**摘要:** 家禽屠宰场的水体、地面和屠宰器械表面微生物对鸡肉微生物交叉污染有重要的影响。本研究的主要目的是分析家禽屠宰场水体、地面和与鸡肉接触的屠宰器械表面的细菌结构及其耐药基因携带状况, 并从中分离大肠杆菌进行耐药性评估和肠杆菌基因间重复共有序列-聚合酶链式反应(enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction, ERIC-PCR)分型分析。在浙江省某大型屠宰场的挂禽间、宰杀沥血间、浸烫脱羽间、净膛间、预冷间、包装间、冷藏间、内脏间区域采集水体, 并用无菌纱布擦拭各区域的地面和器械表面采集微生物, 基于16S rRNA V3~V4的Illumina高通量测序方法分析其菌群结构多样性, 并从中分离大肠杆菌, 分别用PCR对总细菌和大肠杆菌进行9大类耐药基因的检测分析和大肠杆菌的ERIC-PCR分型研究。结果表明: 屠宰场不同区域水体、地面和屠宰器械表面微生物均以变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)为主; 优势菌属为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、链球菌属(*Streptococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等一些腐败菌属与致病菌属。屠宰场不同区域的水体、地面和屠宰器械表面存在的耐药基因种类较多, 共检测到21种耐药基因分布在这些样品中, 其中*sulI*、*sulII*、*blaTEM*、*aadA1*、*floR*、*tetA*、*ereA*和*qnrS*等8种耐药基因检出率达88.9%以上, 与从中分离的大肠杆菌耐药基因检出情况吻合度较低, 这表明还存在其他携带耐药基因的菌株, 此外分离的大肠杆菌菌株多重耐药现象严重。ERIC-PCR分型结果表明, 大肠杆菌可以沿屠宰生产链进行克隆传播。本实验将为探究屠宰环境微生物与鸡肉污染微生物之间的关系提供理论参考。

**关键词:** 家禽屠宰场; 菌群结构; 耐药基因; 高通量测序

Analysis of Microbial Community Structure in Poultry Slaughterhouses and Antibiotic Resistance Assessment of *Escherichia coli*

WANG Peipei<sup>1,2,3</sup>, DAI Xianjun<sup>1</sup>, YANG Hua<sup>2,3</sup>, XIAO Yingping<sup>2,3,\*</sup>

(1. College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China;  
2. Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;  
3. State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** Microorganisms in the environment as well as on the surface of slaughtering equipment play a significant role in microbial cross-contamination during chicken processing in slaughterhouses. The aim of this study was to investigate the microbial community structure and antibiotic resistance genes in the water as well as on the ground and slaughtering equipment of a slaughterhouse. Moreover, *Escherichia coli* were isolated for drug resistance evaluation and genomic typing by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Water was sampled from the hanging, slaughtering, scalding and dehairng, evisceration, pre-cooling, packaging, refrigeration and viscus storage sections and bacterial samples were collected from the ground of each section and the surface of slaughtering equipment using sterile gauze swab. The microbial community structure was analyzed by high-throughput 16S rRNA V3–V4 gene sequencing on Illumina Hiseq, and the total bacteria and *E. coli* isolated were evaluated for resistance genes to 9 classes of 24 antibiotics

收稿日期: 2018-05-18

基金项目: 浙江省农业农村厅特色农产品全产业链安全风险管控重大专项(ZJNY2018001-011);

浙江省公益技术应用研究项目(2016C32073)

第一作者简介: 王佩佩(1991—)(ORCID: 0000-0002-5068-6712), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

E-mail: 244960537@qq.com

\*通信作者简介: 肖英平(1984—)(ORCID: 0000-0002-7949-1126), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为畜产品质量安全。

E-mail: ypxiaozju@126.com

by PCR. The results showed that Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria were the predominant phyla in all the slaughterhouse samples and the dominant genera were spoilage and pathogenic *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Psychrobacter* and *Pseudomonas*. A total of 21 drug resistance genes were detected in these samples, and the prevalence of *sull*, *sulII*, *blaTEM*, *aadA1*, *floR*, *tetA*, *ereA* and *qnrS* was more than 88.9%, which did not coincide with that in the *E. coli* isolates. This indicates that there may be some other strains carrying drug resistance genes and the multiple drug resistance of the *E. coli* isolates is serious. ERIC-PCR genotyping results showed that *E. coli* can be cloned and propagated along the slaughter production chain. This study will lay the theoretical foundation for exploring the relationship between microorganisms in the slaughterhouse environment and the contaminant microorganisms in chicken.

**Keywords:** poultry slaughterhouse; microbial community structure; drug resistance gene; high-throughput sequencing

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180518-261

中图分类号: S851.43

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 13-0195-08

引文格式:

王佩佩, 戴贤君, 杨华, 等. 家禽屠宰场微生物菌群结构及大肠杆菌耐药性评估[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 195-202.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180518-261. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Peipei, DAI Xianjun, YANG Hua, et al. Analysis of microbial community structure in poultry slaughterhouses and antibiotic resistance assessment of *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2019, 40(13): 195-202. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180518-261. <http://www.spkx.net.cn>

肉鸡在屠宰加工生产链中易受到微生物的污染, 如各屠宰区域的水、屠宰设备中微生物的交叉污染, 从而增加鸡肉的微生物污染水平<sup>[1]</sup>。屠宰场环境中存在的腐败菌会影响鸡肉品质和货架期, 一些致病菌威胁着人类的健康<sup>[2]</sup>。肉鸡在屠宰过程中的产生物如血、毛、粪便等废弃物可能含有耐药基因, 将直接污染屠宰场区域的水体和地面, 未经处理排放入环境中还可能会污染周边水体和土壤。因此家禽屠宰场的微生物分布状况不仅直接影响鸡肉的质量安全, 也关系到生态环境和人类健康。目前国内外对肉鸡的屠宰加工过程中特定食源性致病菌的研究较多, 如James等<sup>[3]</sup>发现肉鸡屠宰加工生产链中存在单核细胞增生李斯特菌、弯曲杆菌、沙门氏菌、粪便梭菌等病原微生物, 但对检出率较高的大肠杆菌污染溯源以及易造成鸡肉微生物交叉污染的家禽屠宰场区域水体、地面以及屠宰器械表面微生物结构和耐药基因研究较少。本研究基于16S rRNA V3~V4的Illumina高通量测序方法, 分析家禽屠宰场不同区域水体、地面和屠宰器械表面微生物结构特征, 并从中分离大肠杆菌, 通过VITEK2进行耐药性评估, 应用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测磺胺类、喹诺酮类和四环素类基因等9大类耐药基因, 为全面、准确地认识家禽屠宰场环境微生物多样性、耐药基因传播扩散与环境风险间的关系提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

缓冲蛋白胨水、平板计数琼脂培养基、孟加拉红

培养基、月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤、煌绿乳糖胆盐肉汤、麦康凯培养基、伊红-美蓝琼脂培养基、LB琼脂、LB肉汤 杭州微生物试剂有限公司; 氯化钠 浙江常青化工有限公司; ex-Taq聚合酶、loading buffer、DL5000 DNA Marker 大连宝生物公司。

### 1.2 仪器与设备

CF 16RXII高速低温离心机 日本Hitachi公司; YXQ-LS-50立式压力蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司; PL202-L电子分析天平 瑞士梅特勒-托利多公司; 恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; 生物安全柜 山东博科生物产业有限公司; -80 °C超低温冰箱 美国Thermo公司; VTTEEK微生物自动鉴定仪 法国梅里埃公司; 检测卡(GNI)和药敏卡(GN-AST) 杭州怡丹生物技术有限公司; PCR仪 美国应用生物系统公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 屠宰区域水体微生物样品采集

选择浙江省某屠宰场, 其屠宰区域主要包括挂禽间、宰杀沥血间、浸烫脱羽间、净膛间、预冷间、包装间、冷藏间、内脏间, 用5 mL无菌枪头分别在车间的4个角落和中间各吸取6 mL的地面水或器械水混合均匀后放入无菌离心管中, 4 °C保存。样品编号分别为挂禽间地表水(WH)、宰杀沥血间地表水(WS)、浸烫脱羽间地表水(WD)、净膛间地表水(WE)、预冷间地表水(WPr)、包装间地表水(WPa)、冷藏间地表水(WPrM)、内脏间地表水(WV)、浸烫脱羽间浸烫水(WScM)、预冷水(WC)。

### 1.3.2 地面和屠宰器械表面微生物样品采集

将7.5 cm×7.5 cm的纱布在无菌生理盐水中蘸湿，均匀擦拭屠宰场各个加工区域中地面以及与鸡肉直接接触的挂钩、操作台或传送带，最后放置到盛有生理盐水的无菌离心管中，4 ℃保存。样品编号为挂禽间挂钩表面纱布（SHH）、净膛间挂钩表面纱布（SHE）、预冷间挂钩表面纱布（SHPr）、宰杀沥血间沥血槽表面纱布（SDS）、预冷间预冷机器表面纱布（SPrM）、包装间篮筐表面纱布（SPcB）、包装间桌面纱布（SPcT）、内脏间桌面纱布（SVT）。

### 1.3.3 样品处理和细菌基因组DNA提取

将屠宰区域水体、地面和屠宰器械表面微生物样品按照ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep<sup>TM</sup>提取总细菌DNA。具体操作：将纱布擦拭微生物样品置于摇床振荡30 min，然后7 000 r/min离心10 min，去除上清液；采集水样直接离心，将沉淀重悬于200 μL无菌生理盐水后，加入ZR BashingBead Lysis Tube，按照试剂盒说明书提取DNA，进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3.4 耐药基因的PCR扩增

本实验从9类抗生素耐药基因中共选取了24种耐药基因，包括2种磺胺类基因（*sull*、*sulII*）、5种喹诺酮类基因（*qnrA*、*qnrD*、*qnrS*、*qepA*和*oqxB*）、4种四环素类基因（*tetC*、*tetB*、*tetK*和*tetA*）、3种氯霉素类基因（*cmlA*、*floR*和*cfr*）、3种大环内酯类基因（*ereA*、*ermB*和*mef*）、2种β-内酰胺类基因（*blaTEM*和*blaCTX-M*）、2种青霉素类基因（*mecA*和*mecC*）、1种氨基糖苷类基因（*aadA1*）、2种多黏菌素类基因（*pmrA*和*pmrB*）。所用引物见表1。PCR程序：95 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，共32个循环；最后16 ℃保存。扩增反应后进行琼脂糖凝胶电泳并成像。

**表1 PCR反应引物**  
**Table 1 PCR primers used in this study**

目的基因	引物序列（5'-3'）	产物长度/bp	参考文献
<i>sull</i>	F: TCACCGAGGACTCCTTCTTC R: CAGTCGGCCTCAGCAATATC	331	[4]
<i>sulII</i>	F: CCTGTTCTGCCGACACAGA R: GAAGCGCAGCCGCAATTATC	435	[4]
<i>qnrA</i>	F: TTCAAGAAGGATTCTCA R: GGCAGCACTATTACTCCAA	500	[5]
<i>oqxB</i>	F: TTCTCCCCGGCGGGAAAGTAC R: CTCGGCCATTGGCGCGTA	512	[6]
<i>qnrD</i>	F: TTACGGGAATAGAGTTA R: AATCAGCAAAGACCAAT	468	[7]
<i>qnrS</i>	F: ACATAAAGACTTAAGTGAC R: CAATTAGTCAGGATAAAC	619	[5]
<i>qepA</i>	F: CCAGCTCGCAACTTGATAC R: ATGCTCGCCTCCAGAAAA	570	[8]
<i>floR</i>	F: AACCCGCCCTGGATCAAGTCAA R: CAAATCACGGGCCACGCTGTATC	548	[9]
<i>cmlA</i>	F: CGCCACGGTTGTTGTTAT R: GCGACCTGCGTAAATGTCAC	394	[4]
<i>ereA</i>	F: AACACCTGAACCCAAGGGACG R: CTTCACATCCGGATTGCGCTGA	420	[10]

续表1

目的基因	引物序列（5'-3'）	产物长度/bp	参考文献
<i>ermB</i>	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTAAATGTTTAC	639	[10]
<i>mef</i>	F: AGTATCATTAACTACTAGTGC R: TTCTCTGGTACTAAAGTGG	348	[10]
<i>blaCTX-M</i>	F: AACCGTCACGCTGTTAG R: TTGAGGCTGGGTGAAGTAAG	766	[4]
<i>blaTEM</i>	F: TCGCCGCATACACTATTCTAGAATGA R: ACGCTCACGGCTCCAGATTAT	445	[11]
<i>tetC</i>	F: TTGCGGGATATCGTCCATT R: CATGCCAACCGTTCCATGT	831	[4]
<i>tetB</i>	F: CCCAGTGTGTTGTTGTAT R: CCACCACAGCCAATAAAAT	723	[4]
<i>tetK</i>	F: TCGATAGGAACAGCAGTA R: CCGCAGATCCTACTCCTT	169	[12]
<i>tetA</i>	F: GCGCCTTCCTTTGGGTCT R: CCACCCGTTCCACGTGTTA	831	[4]
<i>mecA</i>	F: AAAATCGATGTAAGGTTGGC R: AGTCTGCAGTACCGGATTG	533	[13]
<i>mecC</i>	F: GAAAAAAAGGCTTAGAACGCC R: GAAGATCTTCCGTTTCAGC	533	[13]
<i>aadA1</i>	F: TATCCAGCTAAAGCGCGAAC R: ATTGCGCAGTACCTTGGT	447	[14]
<i>pmrA</i>	F: AGTTTCTCTATTCCGGACCA R: TACCAAGCTGCGGATGATATTCT	714	[15]
<i>pmrB</i>	F: GGATGGCCTGATGTCAGC R: GCGCGCTTGGCTATATGCTG	1 312	[15]
<i>cfr</i>	F: TAAGAAGTATAATGAGC R: TATAGAAAGTCTACGAGG	518	[16]

### 1.3.5 高通量测序及数据分析

以提取的DNA为模板，扩增环境细菌16SrRNA基因V3~V4区，引物为338F（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'）和806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）。测序由北京诺致源生物信息科技有限公司完成。通过QIIME软件对获取的序列进行质控和过滤，采用ucluster方法根据相似性不小于97%原则将通过质控的有效序列聚类成为操作分类单元（operational taxonomic unit, OTU）<sup>[17]</sup>。通过绘制稀释曲线评价所测序量是否覆盖全部类群，并采用QIIME软件默认参数计算各样品的alpha多样性指数（ChaoI、ACE、Simpson、Shannon和覆盖度指数），以及Sliva和RPD数据库对所有OTU的代表性序列进行物种匹配，最后分别在门和属的水平上对样品的细菌组成进行菌群统计绘制柱状图。根据各个样品OTU的种类及其丰度，计算样品的加权UniFrac距离，再对18个样品进行主坐标分析（principal coordinate analysis, PCoA）。

### 1.3.6 大肠杆菌的分离鉴定和耐药性评估

大肠杆菌的分离方法参照GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》。除预冷间的预冷水未检测出大肠杆菌，其余17个样品均检测出疑似大肠杆菌，采用VITEK2 Compact全自动微生物分析系统仪标准操作流程进行鉴定<sup>[18]</sup>，显示均为大肠杆菌。随后继续使用VITEK2进行大肠杆菌药敏实验，质控菌株为大肠杆菌ATCC25922。从9类抗生素耐药基因

中选取9种耐药基因，包括磺胺类基因(*sull*)、喹诺酮类基因(*qnrS*)、四环素类基因(*tetB*)、氯霉素类基因(*floR*)、大环内酯类基因(*ermB*)、 $\beta$ -内酰胺类基因(*blaTEM*)、青霉素类基因(*mecC*)、氨基糖苷类基因(*aadA1*)、多黏菌素类基因(*pmra*)，对分离获得的17株大肠杆菌进行耐药基因检测，所用引物如表1所示。

### 1.3.7 大肠杆菌的ERIC-PCR分型

肠杆菌基因间重复共有序列 (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC) -PCR扩增引物<sup>[19]</sup>为ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') 和ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')，由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。基因组DNA提取同1.3.3节方法，ERIC-PCR体系 (25 μL)：10×buffer 2.5 μL、Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 2 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL、上下游引物 (各10 μmol/L) 均为0.5 μL、Taq DNA聚合酶 (1 U/μL) 1 μL、模板2.5 μL，其余用ddH<sub>2</sub>O补齐。反应程序：94 °C预变性3 min；94 °C变性1 min，55 °C退火7 min，72 °C延伸2 min，共72个循环；最后72 °C延伸5 min。取PCR扩增产物与6倍体积上样缓冲液混匀后，经质量分数1%的琼脂糖凝胶（含0.5 mg/L溴化乙锭）以100 V电压电泳2 h后，在凝胶成像仪中观察结果并拍照，并进一步分析。

根据电泳图谱相同分析范围内的片段数目及相对位置，以条带的选择为基础，ERIC-PCR产物以“0”、“1”统计，即在相同迁移位置上（相同分子质量片段）有扩增带的标记为“1”，无扩增带的标记为“0”。将每个菌株对应的扩增谱带按“1”和“0”进行统计，经CrossCheck软件处理后形成二进制数列的矩阵图后导入NTSYS-pc 2.10软件，按非加权对数算术平均法进行聚类分析，绘制大肠杆菌遗传关系图。凡相似度大于0.8者为同一亚型，在自然进化过程中有着比较近的亲缘关系，可能来自于同一克隆，小于0.8者为不同的基因型<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

## 2.1 样品微生物物种丰富度及多样性

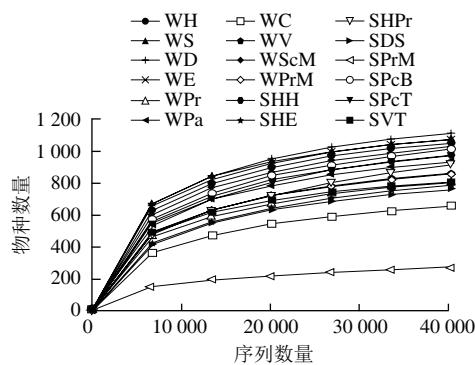


图 1 各样品稀释曲线

**Fig. 1** Rarefaction curves of each sample

表 2 样品测序概况

**Table 2** Overview of sequencing results of each sample

样品名称	序列数量	物种数量	Shannon指数	Simpson指数	Chao1指数	ACE指数	覆盖度指数
WH	6 112	1 050	7.368	0.984	1 133.506	1 155.664	0.996
WS	2 439	1 074	7.704	0.986	1 162.219	1 171.672	0.996
WD	3 506	1 110	7.532	0.976	1 199.553	1 238.928	0.995
WE	3 381	1 072	7.578	0.982	1 166.898	1 195.391	0.996
WPr	5 902	805	5.518	0.875	919.920	936.492	0.996
WPa	8 046	934	6.967	0.977	1 042.851	1 058.797	0.996
WC	6 241	655	6.067	0.967	740.574	778.949	0.996
WV	4 686	860	6.832	0.964	992.167	1 004.206	0.995
WScM	5 028	1 026	7.068	0.969	1 170.797	1 176.330	0.995
WPrM	5 089	854	5.998	0.930	973.984	977.481	0.996
SHH	2 221	972	6.752	0.957	1 092.312	1 116.635	0.995
SHE	3 726	787	5.214	0.864	900.757	951.843	0.995
SHPr	2 908	916	6.675	0.967	1 511.123	1 288.728	0.992
SDS	1 546	760	4.996	0.890	887.124	890.514	0.996
SPrM	613	272	4.044	0.884	316.688	339.629	0.998
SPcB	6 526	1 011	7.122	0.980	1 130.429	1 173.025	0.995
SPcT	6 767	973	6.769	0.961	1 127.396	1 138.915	0.995
SVT	5 737	806	6.913	0.977	891.162	898.002	0.997

经过质控、过滤、拼接等处理，本实验最终获得673 888条有效序列，其中屠宰区域水体样品（W）有370 425条有效序列，屠宰器械表面微生物样品（S）有303 463条有效序列。所获得的有效序列根据97%相似性水平进行OTU聚类分析，各样品最终获得320~1 242个OTU，各样品的覆盖度指数为0.992~1.000，表明样本中序列没有被测出的概率极低，因此本次测序结果能够代表样本的真实多样性组成。各样品的稀释曲线均趋于平缓（图1），说明测序已趋于饱和，测序深度已基本覆盖样品中所有的物种。进一步使用ChaoI指数、ACE指数、Shannon指数及Simpson指数对样本内细菌群落的丰富度和多样性进行评估（表2）。

## 2.2 屠宰区域水体、地面对和屠宰器械表面细菌菌群结构

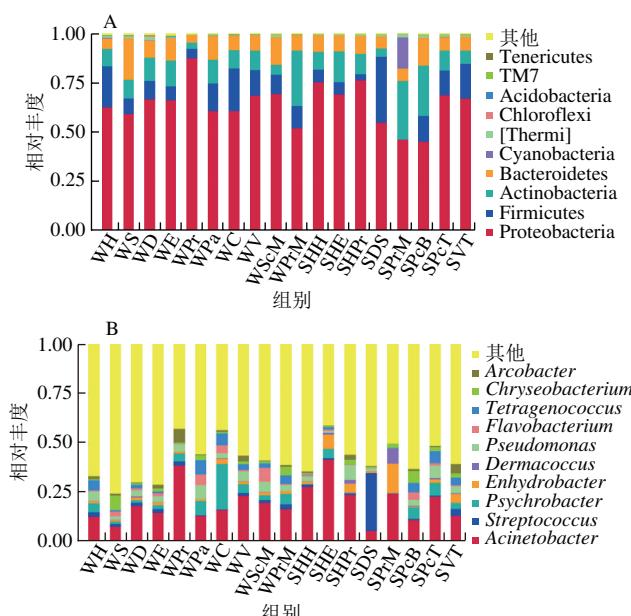


图2 各样品在门(A)和属(B)水平上相对丰度前10名的菌群

**Fig. 2** Top 10 phyla (A) and genera (B) in each sample

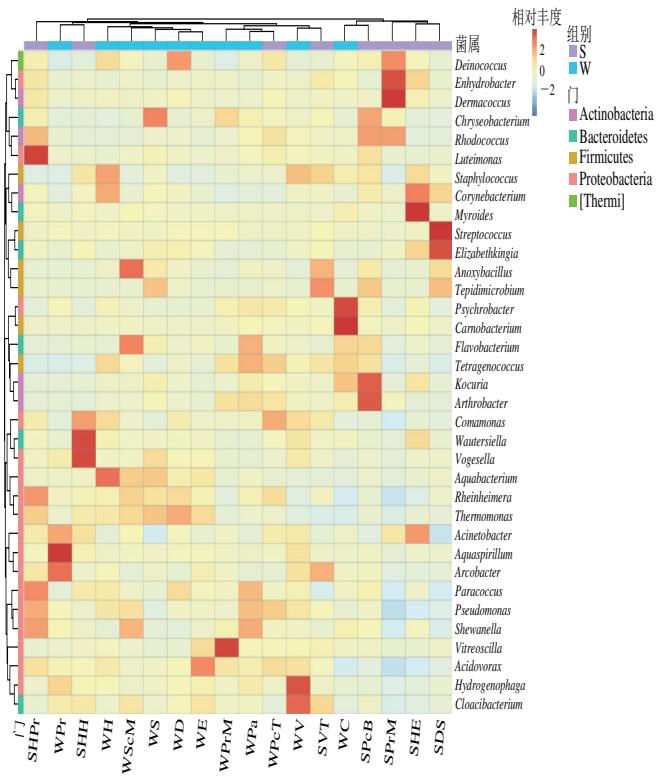


图3 家禽屠宰场不同区域菌群丰度热图(属水平)

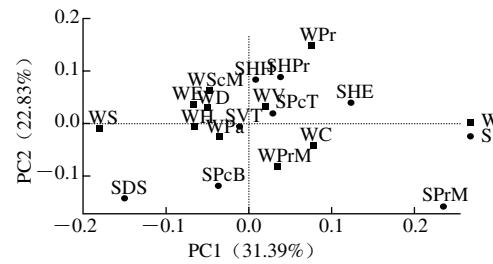
Fig. 3 Abundance of bacteria in different section of slaughterhouse  
(at the genus level)

将18个屠宰区域水体(W)、地面与屠宰器械表面微生物(S)样品用于细菌结构测序分析,获得的OTU分别在门和属水平上进行物种注释。由图2A可知,在门水平上,屠宰区域水体、地面和屠宰器械表面微生物主要分属于9个门,其中变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度分别为45.18%~87.74%、0.09%~33.46%、3.34%~28.09%,三者共同构成了屠宰场区域水体、地面和屠宰器械表面细菌菌群的主要结构。

由图2B可知,属水平上,优势菌属为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、链球菌属(*Streptococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、水栖菌属(*Enhydrobacter*)、皮生球菌属(*Dermacoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、乳球菌属(*Tetragenococcus*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和弓形杆菌属(*Arcobacter*)。其中不动杆菌属(*Acinetobacter*)在屠宰区域水体、地面和屠宰器械表面的相对丰度分别为16.18%~19.88%、7.86%~38.64%、5.66%~41.62%。不动杆菌属在低温潮湿环境下能快速繁殖,是禽肉及水产品低温保存过程中的常见腐败菌<sup>[15]</sup>。不动杆菌属具有一定的致病性,属于条件致病菌,可引起肺部、伤口、皮肤和泌尿生殖系统感染,甚至会引起菌血症、脑膜炎等临床疾病<sup>[21]</sup>。链球菌属的3种重要致病菌可引起各种化脓性炎症、医源

性伤口感染、新生儿败血症、细菌性心内膜炎以及风湿热、肾小球肾炎等超敏反应性疾病<sup>[22]</sup>。嗜冷杆菌属是在0~20℃之间最适宜生长的细菌,为革兰氏阴性,主要产生陈腐味<sup>[23]</sup>。不动杆菌属在净膛间挂钩表面微生物中的相对丰度高达19.88%。这些条件致病菌和腐败菌广泛存在于屠宰场区域水体、地面和屠宰器械表面中,可与屠宰加工的鸡肉构成交叉污染,致鸡肉加速腐败,还可能引起食源性疾病的发生。各样品相对丰度前35名的菌属见图3。

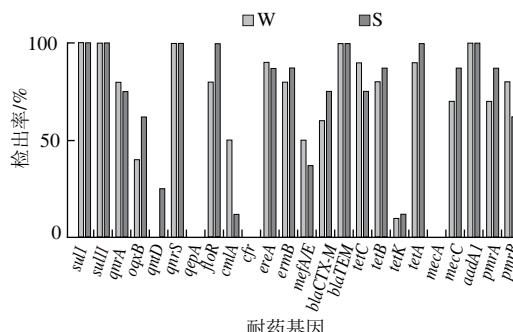
### 2.3 样品的聚类与PCoA分析

图4 各样品菌落结构的PCoA分析  
Fig. 4 Principal coordination analysis of the dissimilarity among different samples

根据各样品OTU的种类及其丰度,计算样品间的加权UniFrac距离,对18个屠宰区域水体与屠宰器械表面微生物样品进行了PCoA分析(图4)。结果表明,同种样品如屠宰区域水体微生物之间、屠宰场地面和屠宰器械表面微生物之间显示出明显聚集,而屠宰区域水体跟屠宰场地面和屠宰器械表面微生物之间相距较远,与图3的菌群丰度热图结果类似。

### 2.4 屠宰区域水体、地面和屠宰器械表面微生物样品的耐药基因检测结果

通过对18个屠宰区域水体、地面和屠宰器械表面微生物样品中的9大类抗生素24种耐药基因的PCR扩增发现,21种耐药基因分布在这些样品中。由此可见屠宰场微生物的耐药基因检出率很高,其中*sulI*、*sulII*、*qnrS*、*blaTEM*和的检出率为100%,*floR*、*tetA*和*ereA*的检出率为88.9%以上(图5)。

图5 屠宰场不同区域水体、地面和器械表面微生物耐药基因  
PCR检测结果  
Fig. 5 PCR results of drug resistance genes of bacteria existing in water samples, on the ground and on surface of slaughtering equipment

畜牧业中滥用抗生素会使有害菌种产生耐药性及畜产品药物残留，通过食物链进入到人体中，对人类健康造成巨大的威胁<sup>[24-25]</sup>。环境中耐药微生物促进了耐药致病菌的产生和扩散，抗生素耐药基因作为一种环境中难以去除的新型污染物，具有可遗传性和可转移性<sup>[26-27]</sup>。家禽屠宰场环境中存在21种耐药基因，屠宰场的水体、地面和屠宰器械表面存在的耐药基因有些许差异，*qnrD*和*qepA*基因只分布在屠宰场器械表面。一旦肉鸡在屠宰加工生产链中受到处理水、屠宰器械的微生物交叉污染，这些耐药基因极有可能会转移到鸡肉上。耐药基因随着人们食用受其污染的鸡肉进入人体中，危及人类健康。此外含有耐药基因的屠宰场废弃物若不经过处理直接排放，还有可能会污染地下水和增加土壤的微生物耐药性。本研究在定性水平上展示了耐药基因在屠宰场的分布状况，屠宰场对耐药基因的传播起到了推进作用，对人类健康和生态环境存在着一定的危害。

## 2.5 大肠杆菌的耐药表型和耐药基因检测情况

表3 大肠杆菌的药敏实验结果

Table 3 Drug susceptibility of *Escherichia coli*

分类	抗生素	耐药菌株数	耐药率/%
单环β-内酰胺类	氨苄西林(AMP)	11	64.71
	阿莫西林(AMO)	1	5.88
	哌拉西林(PIP)	0	0
头孢菌素类	头孢唑啉(CEFA)	5	29.41
	头孢西丁(CEFO)	1	5.88
	头孢曲松(CEFT)	5	29.41
	头孢吡肟(CEFE)	1	5.88
碳青霉烯类	厄他培南(ERT)	0	0
	氨曲南(IMI)	3	17.65
氨基糖苷类	阿米卡星(AMI)	1	5.88
	庆大霉素(GEN)	2	11.76
	妥布霉素(TOB)	2	11.76
喹诺酮类	环丙沙星(CIP)	3	17.65
	左氧氟沙星(LEV)	3	17.65
甘氨酰四环素类	替加环素(TIG)	0	0
	硝基呋喃(NIT)	0	0
磺胺类	复方新诺明(TRI)	6	35.29

表4 大肠杆菌的多重耐药性分析结果

Table 4 Multi-drug resistance of *Escherichia coli*

耐药数	抗生素	菌株数	比例/%
0		6	35.29
1	AMP	2	11.76
2	AMP+TRI	3	17.65
3	AMP+CIP+TRI	1	5.88
5	AMP+CEFA+CEFT+IMI+TRI	1	5.88
6	AMP+CEFA+CEFT+IMI+GEM+TRI	1	5.88
8	AMP+CEFA+CEFT+IMI+TOB+CIP+LEV+TRI	1	5.88
9	AMP+CEFA+CEFT+CEFE+IMI+GEN+LEV+CIP+TRI	1	5.88
10	AMP+AMO+CEFA+CEFO+CEFT+AMI+GEN+TOB+CIP+LEV	1	5.88

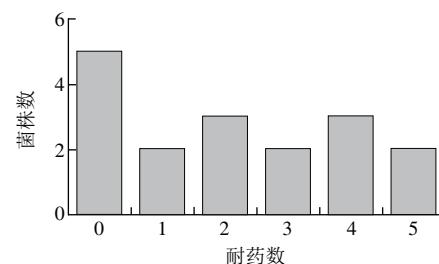


图6 大肠杆菌多重耐药性的菌株数统计结果  
Fig. 6 Multi-drug resistance of *Escherichia coli*

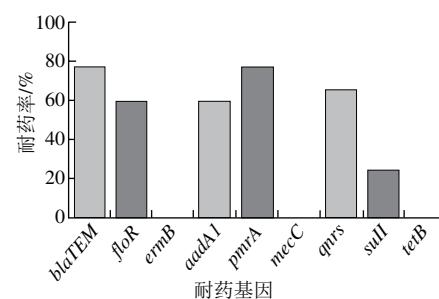


图7 大肠杆菌耐药基因的检测结果  
Fig. 7 Drug resistance genes of *Escherichia coli*

大肠杆菌的多重耐药性情况如表3、4及图5~7所示，通过对分离获得的17株大肠杆菌的耐药表型进行分类整理。结果显示大肠杆菌对17种抗生素产生了不同的耐药性，对氨苄西林耐药率最高（64.71%），其次为复方新诺明、头孢唑啉、头孢曲松，耐药率分别为35.29%、29.41%、29.41%，对哌拉西林、厄他培南、替加环素、硝基呋喃均不敏感。从耐药菌株数来看，大肠杆菌耐8、9种和10种药物各一株，另外同时耐氨苄西林和复方新诺明2种药物的大肠杆菌菌株比例较大，约占17.65%，耐3种及以上抗生素的大肠杆菌菌株占35.28%。多重耐药指一种微生物对3类（如磺胺类、青霉素类、喹诺酮类）或3类及以上抗生素同时耐药，而不是对同一类3种抗生素耐药。由图6可知，分离的17株大肠杆菌中，多重耐药菌株为7株，占41.18%，最多耐5种类型的抗生素，分别为单环β-内酰胺类、头孢菌素类、氨基糖苷类、碳青霉烯类和磺胺类，同时耐4类抗生素类型的菌株最多，数目为3株（17.65%），其中同时耐2类抗生素的有3株（17.65%），同时耐3种类型抗生素的有2株（11.76%）。

通过对17株大肠杆菌的9大类9种耐药基因的PCR扩增发现（图7），6种耐药基因分布在这些菌株中，由此可见屠宰场大肠杆菌的耐药基因耐药率很高。大肠杆菌对blaTEM和pmrA的耐药基因耐药率最高，均达到了75%，其次为qnrS、floR、aadA1、sull，耐药率分别为

70.59%、58.82%、58.82%、23.53%，对 $ermB$ 、 $mecC$ 、 $tetB$ 无检出。与屠宰场不同区域水体、地面和器械表面微生物的耐药基因PCR检测结果相比较，说明屠宰场不同区域水体、地面和器械表面微生物的耐药基因主要来自于样品中的大肠杆菌。

## 2.6 屠宰场水体、地面和器械来源大肠杆菌分离株的ERIC-PCR分型

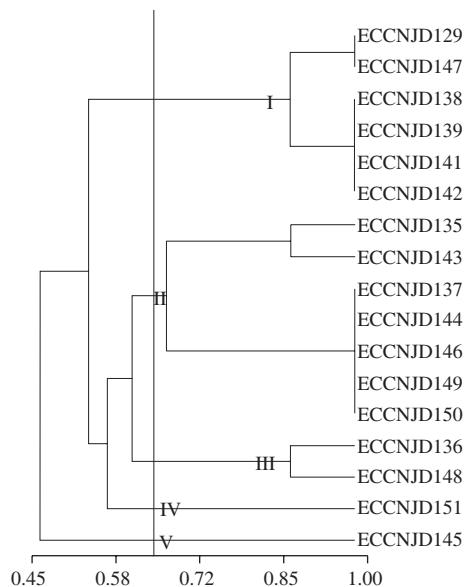


图8 屠宰场水体、器械和地面来源大肠杆菌的遗传关系聚类树状图  
Fig. 8 Phylogenetic tree of *Escherichia coli* in slaughterhouse samples

表5 大肠杆菌分型结果  
Table 5 Typing of *Escherichia coli*

菌型(菌株数)	菌株编号	来源
I (6)	ECCNJD129	挂禽间地表水
	ECCNJD147	内脏间地表水
	ECCNJD138	浸烫脱羽间地表水
	ECCNJD139	浸烫脱羽间浸烫水
	ECCNJD141	预冷间预冷机器表面纱布
	ECCNJD142	预冷间挂钩表面纱布
II (7)	ECCNJD135	宰杀沥血间地表水
	ECCNJD143	净膛间挂钩表面纱布
	ECCNJD137	预冷间预冷水
	ECCNJD144	包装间筐表面纱布
	ECCNJD146	包装间桌面纱布
	ECCNJD149	宰杀沥血间沥血槽表面纱布
	ECCNJD150	包装间地表水
III (2)	ECCNJD136	挂禽间挂钩表面纱布
	ECCNJD148	净膛间地表水
IV (1)	ECCNJD151	冷藏间地表水
V (1)	ECCNJD145	预冷间地表水

相似度在50%以上的菌株有相关性亲缘关系；相似度在50%以下的菌株被认为流行病学不相关。屠宰场存在水体、地面和与鸡肉接触的器械中大肠杆菌的遗传相

似性在66%~100%。由图8可知，屠宰场水体、地面和器械来源分离的大肠杆菌在相似系数0.80的水平上，可分为I~V 5种菌型（表5）。其中ECCNJD145可能是由于采样的原因或者是实验操作的原因单独呈一个亲缘关系较远的基因型，可忽略不计。处于一楼的宰杀沥血间地表水分离的大肠杆菌，与位于二楼的包装间地表水分离的大肠杆菌具有相同的ERIC-PCR菌型，表明两者属于同一克隆体，大肠杆菌可以沿冷鲜鸡屠宰链进行克隆传播。因此在屠宰过程中，处于较低的地表水极有可能在屠宰过程中飞溅从而污染到悬挂着的肉鸡。

## 3 讨论

本实验通过 Illumina高通量测序技术发现家禽屠宰场区域水体、地面和屠宰器械表面微生物的菌群结构以变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）和放线菌门（Actinobacteria）为优势门；在属的水平上主要为不动杆菌属（*Acinetobacter*）、链球菌属（*Streptococcus*）、嗜冷杆菌属（*Psychrobacter*）等一些腐败菌属和致病菌属。从定性水平上反映出屠宰场不同区域的水体、地面和屠宰器械表面存在种类较多的耐药基因，这些区域来源的大肠杆菌分离株对氨苄西林（64.71%）、复方新诺明（35.29%）耐药最明显，且多重耐药现象严重。此外大肠杆菌分离株对9大类9种耐药基因的检出情况与18个屠宰区域水体、地面与屠宰器械表面微生物样品耐药基因的检出情况吻合度较低，由此说明18个样品中还存在其他种类的耐药菌株。这些屠宰环境的微生物污染状况会影响周边环境卫生以及冷鲜鸡肉的食品安全问题。

ERIC-PCR技术操作简单、灵敏度高、可重复性和可靠性好、特异性强，现已成功应用于不同肠杆菌科微生物的基因分型，包括基因作图、群体分析、菌株多样性检测、流行病学以及系统发育与分类学关系的证明<sup>[28]</sup>。本实验中大肠杆菌分离株的ERIC-PCR分型研究结果表明，冷鲜鸡屠宰场中各环节大肠杆菌呈现较近的亲缘关系，大肠杆菌可以沿屠宰生产链进行传播。接下来可深入研究屠宰生产链冷鲜鸡肉来源的大肠杆菌分离株与屠宰环境来源的大肠杆菌分离株的亲缘关系，进一步分析屠宰环境和冷鲜鸡肉之间可能存在的大肠杆菌交叉污染关系，以及推断出屠宰场冷鲜鸡肉中微生物污染较严重的生产区域。

## 参考文献：

- [1] HINTON A, CASON J A, INGRAM K D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(2): 155-165. DOI:10.1016/S0168-1605(03)00377-5.

- [2] 樊静, 李苗云, 张建威, 等. 肉鸡屠宰加工中的微生物控制技术研究进展[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 80-84. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2011.02.018.
- [3] JAMES C, VINCENT C, LIMA T I D A, et al. The primary chilling of poultry carcasses: a review[J]. International Journal of Refrigeration, 2006, 29(6): 847-862. DOI:10.1016/j.ijrefrig.2005.08.003.
- [4] CHEN S, ZHAO S, WHITE D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 1-7. DOI:10.1128/AEM.70.1.1-7.2004.
- [5] WU J J, KO W C, TSAI S H, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 29(4): 1223-1227. DOI:10.1128/AAC.01195-06.
- [6] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J M, DÍAZ D A P, BRIALES A, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(1): 68-73. DOI:10.1093/jac/dks377.
- [7] CAVACO L M, HASMAN H, XIA S, et al. *qnRD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2009, 53(2): 603-608. DOI:10.1128/AAC.00997-08.
- [8] XIA L N, LI L, WU C M, et al. A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2010, 7(2): 207-215. DOI:10.1089/fpd.2009.0378.
- [9] GHODDUSI A, NAYERI B F, KARIMI V, et al. Molecular identification of *Salmonella* Infantis isolated from backyard chickens and detection of their resistance genes by PCR[J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2015, 16(3): 293-297. DOI:10.22099/IJVR.2015.3198.
- [10] SINGH K V, MALATHUM K, MURRAY B E. Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2016, 45(1): 263-266. DOI:10.1128/AAC.45.1.263-266.2001.
- [11] MONSTEIN H J, ÖSTHOLM-BALKHED Å, NILSSON M V, et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*SHV, *bla*TEM and *bla*CTX-M genes in *Enterobacteriaceae*[J]. APMIS, 2007, 115(12): 1400-1408. DOI:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x.
- [12] GAROFALO C, VIGNAROLI C, ZANDRI G, et al. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(1): 75-83. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.015.
- [13] ARGUDÍN M A, DODÉMONT M, VANDENDRIESSCHE S, et al. Low occurrence of the new species *Staphylococcus argenteus* in a *Staphylococcus aureus* collection of human isolates from Belgium[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2016, 35(6): 1017-1022. DOI:10.1007/s10096-016-2632-x.
- [14] VAN T T H, CHIN J, CHAPMAN T, et al. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(3): 217-223. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.029.
- [15] QUESADA A, PORRERO M C, TÉLLEZ S, et al. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(1): 71-74. DOI:10.1093/jac/dku320.
- [16] 牟迪, 王秀梅, 初胜波, 等. 多重耐药基因cfr在广东地区猪源肠球菌中的流行特点[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(11): 859-862. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.2014.11.08.
- [17] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10: 996-998. DOI:10.1038/nmeth.2604.
- [18] 杨毓环, 陈伟伟. VITEK全自动微生物检测系统原理及其应用[J]. 海峡预防医学杂志, 2000, 6(3): 38-39. DOI:10.3969/j.issn.1007-2705.2000.03.026.
- [19] KHOSRAVI A D, HOVEIZAVI H, MOHAMMADIAN A, et al. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR[J]. Acta Cirúrgica Brasileira, 2016, 31(3): 206-211. DOI:10.1590/S0102-86502016003000009.
- [20] 肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 等. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌ERIC-PCR分型与耐药性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1092-1099. DOI:10.3724/SP.J.1118.2011.01092.
- [21] 王冉, 刘铁铮, 王恬. 抗生素在环境中的转归及其生态毒性[J]. 生态学报, 2006, 26(1): 265-270. DOI:10.3321/j.issn:1000-0933.2006.01.032.
- [22] 蒋红飞, 郁小龙, 李卫兵. 发热患者链球菌感染抗“O”的流行性调查[J]. 现代预防医学, 2006, 33(10): 1856-1857. DOI:10.3969/j.issn.1003-8507.2006.10.045.
- [23] 孟晓华, 段杉. 生鲜罗非鱼片在冷藏过程中细菌群落演替的PCR-DGGE分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 343-347; 351.
- [24] MEAD G C, ADAMS B W, PARRY R T. The effectiveness of in-plant chlorination in poultry processing[J]. British Poultry Science, 1975, 16(5): 517-526. DOI:10.1080/00071667508416220.
- [25] 冀秀玲, 刘芳, 沈群辉, 等. 养殖场废水中磺胺类和四环素抗生素及其抗性基因的定量检测[J]. 生态环境学报, 2011, 20(5): 927-933. DOI:10.3969/j.issn.1674-5906.2011.05.025.
- [26] HAO H H, CHENG G Y, IQBAL Z, et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5(7): 288. DOI:10.3389/fmicb.2014.00288.
- [27] TURNIDGE J. Antibiotic use in animals: prejudices, perceptions and realities[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 53(1): 26-27. DOI:10.1093/jac/dkg493.
- [28] LI W J, RAOULT D, FOURNIER P E. Bacterial strain typing in the genomic era[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 892-916. DOI:10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x.