

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240115002

结合平板计数与宏基因组学研究方法分析 气调保鲜卤鸭掌中微生物污染

宋 晟^{1,2}, 杨 华³, 郭焜鹏^{1,2}, 高 晗^{1,2}, 何 娟^{1,2}, 周培华^{1,2}, 王 芳^{1,2*}

(1. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 长沙 410000; 2. 湖南省产商品质量检验研究院, 长沙 410000; 3. 湖南云天检测技术有限公司, 株洲 412005)

摘 要: **目的** 研究气调保鲜卤鸭掌中微生物污染的菌相组成及主要致病菌、致病基因与耐药基因的相关情况。**方法** 从市场采购气调保鲜鸭掌样品, 提取 DNA, 检测 DNA 浓度, 测序、注释, 菌种鉴定与丰度分析等, 并检验菌落总数。**结果** 菌落总数结果为 1200 CFU/g, 符合食品安全国家标准要求, DNA 浓度为 6.54 ng/μL, 存在一定程度微生物污染; 采用宏基因组研究方法分析菌相组成, 共测出 48 种微生物, 诺卡氏菌丰度最高, 约 75.7%, 大肠杆菌、不动杆菌、慢生根瘤菌、盐单胞菌、克雷伯菌、沙门氏菌、弧菌丰度大于 1%; 比对 SEED 数据库, 检出对稳态铜的抗性基因; 比对 KEGG 数据库, 发现 13 种代谢通路可感染宿主; 比对 ARBD 数据库, 发现 4 个多重耐药性基因, 1 个氯霉素抗性基因。**结论** 宏基因组结合传统微生物研究方法可有效分析样品中微生物状况, 并能从分子层面研究致病因子, 以及耐药基因的传播机理, 对于微生物污染防控, 耐药基因传播阻断机制, 有重要的借鉴性意义。

关键词: 气调保鲜卤鸭掌; 宏基因组; 菌相组成

Analysis of microbial contamination in modified atmosphere preservation bittern duck feet based on aerobit plate count and metagenomics

SONG Sheng^{1,2}, YANG Hua³, GUO Kun-Peng^{1,2}, GAO Han^{1,2},
HE Juan^{1,2}, ZHOU Pei-Hua^{1,2}, WANG Fang^{1,2*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha 410000, China;
2. Hunan Provincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha 410000, China;
3. New Sky Testing Services, Zhuzhou 412005, China)

ABSTRACT: Objective To study the microflora composition of microbial contamination in bittern duck palms preserved by modified atmosphere and the correlation between the main pathogenic bacteria, pathogenic genes and drug resistance genes. **Methods** Samples of modified atmosphere preserved duck feet were purchased from the market, DNA was extracted, DNA concentration was detected, sequencing, annotation, strain identification and abundance analysis were carried out, and the total number of colonies was tested. **Results** The total number of colonies was 1200 CFU/g, which met the requirements of national food safety standards. The DNA concentration was

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2022JJ90028)

Fund: Supported by the Hunan Provincial Natural Science Foundation Project (2022JJ90028)

*通信作者: 王芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究与风险评估。E-mail: 493646602@qq.com

*Corresponding author: WANG Fang, Master, Engineer, Hunan Provincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha 410000, China. E-mail: 493646602@qq.com

6.54 ng/ μ L, and there was a certain degree of microbial pollution. Using metagenomic research methods to analyze microbial composition, a total of 48 microorganisms were identified, with *Nocardia* having the highest abundance of about 75.7%, and *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Salmonella*, and *Vibrio* having an abundance greater than 1%. Compare the SEED database to detect resistance genes to steady-state copper; comparing with the KEGG database, it was found that 13 kinds of metabolic pathways can infect the host; comparing with the ARBD database, 4 multidrug-resistant genes and 1 chloramphenicol resistance gene were found. **Conclusion** The combination of metagenomics and traditional microbial research methods can effectively analyze the microbial status in samples, and can study the pathogenic factor mechanism and the transmission mechanism of drug resistance genes at the molecular level. This has important reference significance for studying microbial pollution prevention and control, as well as the transmission blocking mechanism of drug resistance genes.

KEY WORDS: modified atmosphere preservation bittern duck feet; metagenomics; microbial composition

0 引言

气调保鲜卤鸭掌是一种经过特殊工艺处理的鸭掌产品,一般采用冻鸭掌,经解冻、清洗、卤制、气调、袋装等工艺制造而成。气调保鲜技术,即通过控制包装内的气体比例,如充入氮气或二氧化碳气等,使其中的氧气浓度降低,减缓产品的呼吸作用和微生物生长速度,达到保鲜的效果,延缓食品变质,延长食品保质期^[1-4]。气调保鲜卤鸭掌的特点是口感鲜美、营养丰富,比较二次加热杀菌的酱卤肉制品,新鲜程度更高,且口感更为脆爽,在市场上仍然受到消费者的青睐^[5-7]。近年来,二次加热杀菌的酱卤肉制品食品安全监督抽检较多,而气调保鲜卤鸭掌因保质期短,且需要冷链运输等原因,一定程度上限制了食品安全抽检工作的开展。该类样品抽检少,微生物污染与菌相组成的报道较少,是否存在致病菌,是否存在食品安全问题,在一定程度上被忽视^[8-10]。

宏基因组测序是一种不参照任何序列,采用生物信息学方法进行拼接,获得基因组序列,与数据库比对,实现微生物鉴定、基因结构与功能分析的技术手段,其规避了传统微生物学培养分离方法,结果包含可培养和不可培养的微生物遗传信息,较传统微生物分析方法更为全面真实^[11-15]。实验室在市场上随机采集一批气调保鲜卤鸭掌,采用菌落总数与 DNA 浓度测定评价产品的微生物污染程度,并通过测序,与 NR、KEGG、ARDB、SEED 等数据库进行比对等,进行菌相组成分析与功能基因注释,识别可能样品中致病菌及相关微生物,分析其致病菌来源与可能存在的影响,并从分子层面深入分析包括致病基因及致病机理、耐药基因及耐药机理,以及基因的来源。该研究对于气调保鲜鸭掌微生物污染程度的评价,有助于食品生产企业有的放矢地提高产品质量,有助于消费者增强食品安全风险防范意识,有助于食品安全监管部门加大食品安全监管与风险防控工作力度,同时致病菌的致病基因与耐药基因的研究也有助于提高养殖业的无抗养殖意识。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

气调保鲜卤鸭掌(市场购买某知名厂家)。

平板计数琼脂(北京陆桥技术股份有限公司); E.Z.N.A.TM Mag-Bind Soil DNA Kit 提取试剂盒(美国 OMEGA 公司); Qubit3.0 DNA 检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 仪器

PL602E 电子天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒托利多公司); Masticator Silver 拍击式均质器(西班牙 IUL 公司); MIR-254L-PC 低温培养箱(日本松下电器产业株式会社); Qubit@3.0 荧光仪(美国 Invitrogen 公司); ETC 811 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司); FR-980A 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.3 样品中菌落总数的检测

无菌操作将样品剪碎至小于 1 cm³, 混合均匀后, 称取 25.0 g, 至均质袋, 倒入 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液, 均质 1 min, 梯度稀释后, 吸取 1 mL 样液于平皿内, 倒入平板计数琼脂培养基约 15 mL, 旋转平板混合均匀, 待琼脂充分凝固后, (36±1)°C 翻转培养 48 h, 计数。

1.4 样品中污染微生物 DNA 的提取与浓度测定

液氮研磨样品至粉末状, 称取 250 mg 样品, 加入 2 mL 灭菌离心管, 依据 E.Z.N.A.TM Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒说明书提取样品中污染微生物的 DNA, 样品经裂解, 破坏细胞壁和核膜后, 加入磁性珠子, 与 DNA 结合形成复合物, 通过磁场的作用将 DNA 与磁珠分离, 洗涤去除污染物, 溶解得到高纯度的 DNA。将 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒中 1 号 DNA 标准品、2 号 DNA 标准品与样品一起加入荧光预混料, 涡旋, 室温反应 3 min, 采用 Qubit@3.0 荧光仪检测 DNA 样本浓度。

1.5 样品的宏基因组分析

Illumina Miseq™/Hiseq™测序后, 对测序的原始数据进行质量评估、数据过滤, 拼接成较为完整的重叠 DNA 序列, 经 Bin 提纯、定量、重组装和鉴定, 得到单菌基因组草图。采用 Prodigal 进行 ORF 基因预测, 双向并行推理 (dual-phase) 算法以及构建偏差模型的方法计算基因丰度后, 与 NR、KEGG、ARDB、SEED 等数据库进行比对, 获得基因的物种注释信息和功能注释信息。

基因组 DNA 的提取、测序、物种分类、功能注释等工作由上海生工生物工程有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 菌落总数与 DNA 提取分析

样品依据 GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》检验, 菌落总数结果为 1200 CFU/g, 符合 GB 2726—2016《食品安全国家标准 熟肉制品》标准要求; 样品采用 Qubit3.0DNA 检测试剂盒测定, DNA 浓度为 6.54 ng/μL, 样本基因组主条带较弱, 基因组可能存在降解(图 1)。

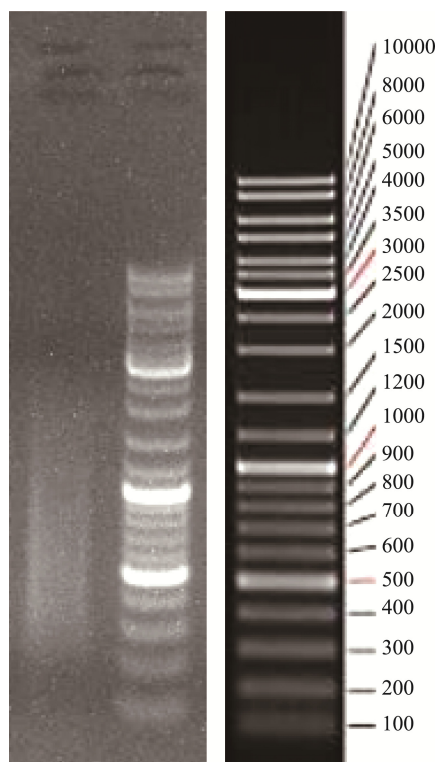


图 1 样品 DNA 电泳图

Fig.1 Sample DNA electrophoresis map

2.2 宏基因组菌相组成柱状图分析

使用 DIAMOND 软件将基因集蛋白序列与 Nr 数据库, blastp 同源性比对, 进行功能注释和同源物种鉴定。样品中

共有 48 种微生物, 其中诺卡氏菌、大肠杆菌、不动杆菌、慢生根瘤菌、盐单胞菌、克雷伯菌、沙门氏菌、弧菌丰度大于 1%, 诺卡氏菌丰度最高, 约占 75.7%, 大肠杆菌丰度为 9.6%; 并检出微小病毒、 α 逆转录病毒(表 1、图 2)。诺卡氏菌是一种革兰氏阳性杆菌, 具有潜在的致病性, 属于人畜共患, 可感染免疫能力低下的人, 导致肺部感染、皮肤感染等, 严重的可导致败血症和器官功能衰竭等^[16]。禽类感染星形诺卡菌的概率并不高, 但也有可能发生, 主要取决于其所处的环境、免疫力以及接触到的传染源等因素^[17]。大肠杆菌是常见的肠道菌, 可作为粪便污染的评价指标, 经粪-口途径传播或食用被污染的食物或水等方式感染, 产生腹泻、发烧等症状。逆转录病毒可感染人、牛等多种生物, 导致不同的疾病, 且具有传染性。微小病毒目前发现的含 DNA 的最小病毒之一, 可引起咽炎等疾病^[18-20]。

2.3 宏基因组 SEED 数据库分析

使用 DIAMOND 将基因集蛋白序列与 SEED 数据库进行 blastp 同源性比对, 可知, 蛋白质代谢丰度为 33.6%、细胞调节信号丰度为 27.7%、碳水化合物丰度为 8.8%、脂肪酸、脂质和类异戊二烯丰度为 6.5%、DNA 代谢丰度为 5.6%、氨基酸和衍生物丰度为 5.2%、呼吸丰度为 2.2%、RNA 代谢丰度为 1.6%、基于聚类的子系统丰度为 1.5%、磷代谢丰度为 1.3%、毒力、疾病和防御丰度为 1.1%、应激反应丰度为 1.0%、核苷和核苷酸丰度为 1.0%、辅因子、维生素、修复基团、色素丰度为 0.9%、钾代谢丰度为 0.9%、细胞壁和荚膜丰度为 0.7%、噬菌体、预防物、可转运元件、质粒丰度为 0.3%、硫代谢丰度为 0.3%, 并有对稳态铜的抗性基因, 丰度为 1.11%(图 3)。铜可与微生物中的蛋白质、酶、核酸在新陈代谢过程中发生相互作用, 或对细胞壁、细胞膜、细胞内部产生影响, 从而形成毒性, 但高浓度的铜也会导致微生物产生金属抗性。铜抗性机理, 可能是通过编码蛋白质与铜结合, 降低铜的毒性或者是改变细胞膜的通透性或产生巯基化合物等机制, 来抵抗铜的毒性^[21]。

2.4 宏基因组 KEGG 数据库分析

KEGG 包括各种生物学通路信息, 使用 DIAMOND 将基因集蛋白序列与 KEGG 数据库进行比对, 可知, 细胞过程丰度为 17.8%、环境信息处理丰度为 3.7%、遗传信息处理丰度为 37.3%、人类疾病丰度为 16.4%、代谢丰度为 0.2%、生物系统丰度为 24.6%, 其中克雷伯菌、假单胞菌、 α 逆转录病毒、微粒孢子虫、盐单胞菌、沙门氏菌、气单胞菌、诺卡氏菌、草螺菌、副球菌具有包括细菌性感染病、细菌性神经退行性疾病、病毒性内分泌和代谢疾病、病毒性翻译传染病、病原体免疫性疾病、细菌性免疫性疾病、细菌性内分泌和代谢疾病等多种 KEGG 生物学通路(表 2、图 4), 推测以上微生物可通过表 2 中 13 种代谢通路感染宿主。

表 1 样品菌相组成
Table 1 Sample microbial composition

微生物名称	丰度/%	微生物名称	丰度/%	微生物名称	丰度/%
诺卡氏菌	75.720	嗜冷菌	0.00713	副球菌	0.00078
大肠杆菌	9.620	芽孢杆菌	0.00656	α 逆转录病毒	0.00077
不动杆菌	3.103	假单胞菌	0.00550	β -杆菌	0.00075
慢生根瘤菌	2.628	罗斯氏菌	0.00342	香菇多糖杆菌	0.00067
盐单胞菌	2.009	双歧杆菌	0.00291	链球菌	0.00053
克雷伯菌	1.949	普里斯蒂亚	0.00282	左旋杆菌	0.00049
沙门氏菌	1.798	猩红肉杯菌	0.00245	草螺菌	0.00036
弧菌	1.452	气单胞菌	0.00240	里默雷氏菌	0.00033
肠杆菌	0.517	梭状芽孢杆菌	0.00219	尾灰蝶	0.00029
南海济州岛古名菌	0.390	微小病毒	0.00214	乳球菌	0.00028
衣原体	0.338	拉斯顿尼亚	0.00145	类芽胞杆菌	0.00026
弯曲杆菌	0.196	浮游蓝丝藻	0.00135	肠球菌	0.00020
链霉菌	0.081	葡萄球菌	0.00134	乳酸杆菌	7.2E-05
变形杆菌	0.054	莫拉克菌	0.00093	希瓦氏菌	6.0E-05
微粒孢子虫	0.048	带线藻	0.00086	乳酸杆菌	5.2E-05
伪单胞菌	0.047	拟分枝杆菌类	0.00084	逆转录病毒	4.3E-05

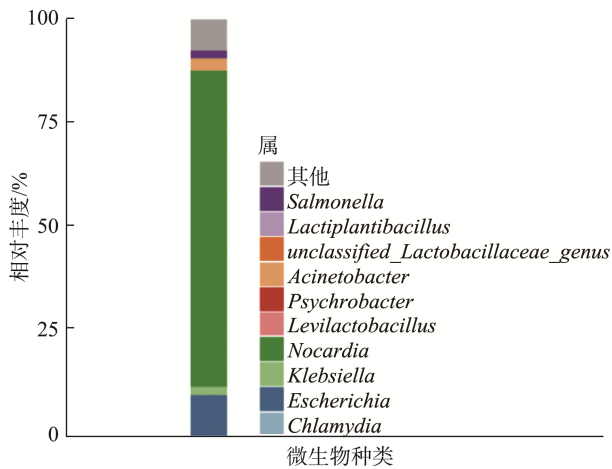


图 2 样品菌相组成柱状图
Fig.2 Sample bar chart of microbial composition

2.5 宏基因组 ARDB 数据库分析

微生物可能携带 ARGs 的质粒、整合子以及转座子等，可在同种属菌株间和不同种属的菌株间发生水平基因转移。使用 UBLAST 筛选潜在的 ARGs 序列和 16srRNA 序列比对 ARDB 抗性基因数据库，可知，样品中微生物具有 ARGs 多重耐药性基因 *mexF* 1 个，多重耐药性基因 *mexE* 1 个，多重耐药性基因 *mexD* 1 个，多重耐药性基因 *adeJ* 1 个，氯霉素抗性基因 *chloramphenicol exporter* 1 个(图 5)。多重耐药性基因的抗性机理主要为抗生素外排泵或膜转运蛋白的突变，而 ARGs 多重耐药性基因的来源主要包括土壤、食品废弃物或粪便等。氯霉素耐药性产生的主要机理是含耐药遗传基因的质粒，产生氯霉素乙酰转移酶，使氯霉素不能与细菌核糖体结合，而样品中发现的氯霉素抗性基因 *chloramphenicol exporter*，主要通过外排泵的形式，产生抗性^[22-26]。

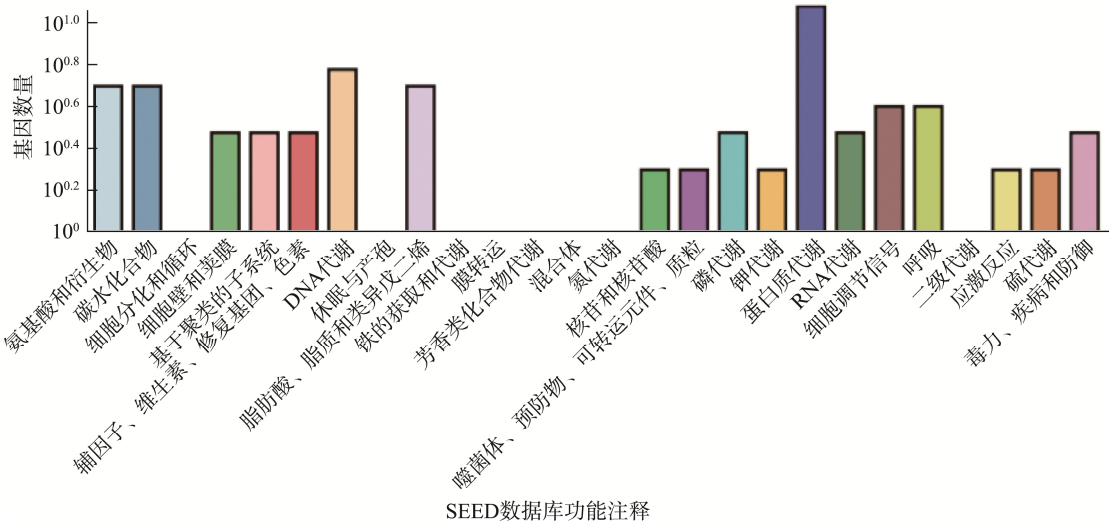


图 3 样品 SEED 数据库丰度图
Fig.3 Sample SEED database abundance map

表 2 样品 KEGG 通路注释表

Table 2 Sample KEGG pathway table

微生物名称	KO 编号	通路注释	丰度/%
微粒孢子虫	K11254	病原体免疫性疾病	0.0018
假单胞菌	K11253	细菌性免疫性疾病	0.0018
盐单胞菌	K04634	细菌性内分泌和代谢疾病	0.0014
沙门氏菌	K09490	细菌性感染病	9.7E-05
气单胞菌	K03231	细菌性感染病	9.2E-05
克雷伯菌	K03231	细菌性感染病	8.3E-05
假单胞菌	K05692	细菌性感染病	5.3E-05
克雷伯菌	K05209	细菌性神经退行性疾病	2.4E-05
α 逆转录病毒	K04379	病毒性内分泌和代谢疾病	2.1E-05
克雷伯菌	K02984	病毒性翻译传染病	2.0E-05
诺卡氏菌	K03882	细菌性神经退行性疾病	1.9E-05
草螺菌	K02955	病毒性翻译传染病	1.4E-05
α 逆转录病毒	K04361	病毒性内分泌和代谢疾病	8.5E-06
副球菌	K03884	细菌性神经退行性疾病	5.7E-06

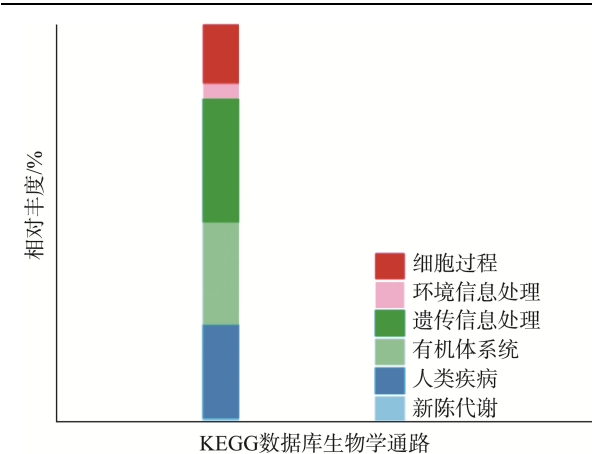


图 4 样品 KEGG 数据库丰度图

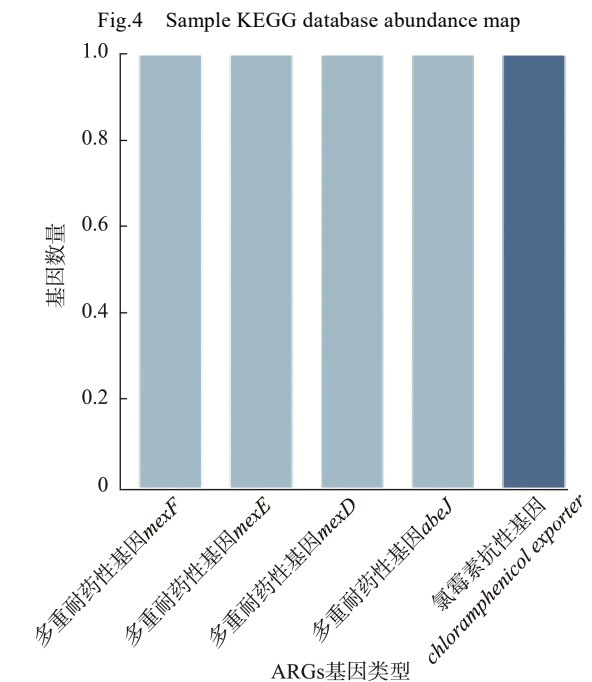


图 5 样品 ARGs 基因图

Fig.5 Sample ARGs gene map

3 讨论与结论

酱卤鸭肉制品一般采用二次加热灭菌，真空包装方式销售，但近年来，为了进一步提高新鲜度与口感，采用气调保鲜技术加工熟肉制品成为一种潮流，即将酱卤鸭掌熟制后放入密封包装，然后充入氮气或二氧化碳气惰性气体保鲜，该类产品一般采用冷链运输销售，保质期短，多为一周。因其熟制后直接包装，减少了高温高压灭菌或辐照杀菌这一生产工艺，所以，该类产品并非绝对无菌^[4-7]。

实验室综合运用微生物和分子生物学技术，集成传统微生物研究方法与宏基因组等生物信息学研究手段，开展气调保鲜鸭掌的微生物污染研究。结果表明该样品在保质期内，菌落总数符合食品安全国家标准要求，但通过宏基因组研究鉴定出包括诺卡氏菌、大肠杆菌、不动杆菌、慢生根瘤菌、盐单胞菌、克雷伯菌、沙门氏菌、弧菌等多达 48 种微生物，其中诺卡氏菌丰度达 75.7%，大肠杆菌丰度为 9.6%，属于较为常见的致病菌，可能来源于饲养、屠宰、剁肉等环节^[27]；可能来源于存在于生产和加工环境中的污染源，如，生产场所的水源、设备、工具和工作台面等；也可能与其他食品或污染源接触而交叉污染^[28-30]。实验室在前期研究成果的基础上，下一步将对饲养、屠宰、生产环节，以及生产原料、生产工具、生产环境等进行取样检验深入分析污染菌来源，采取针对性的防控措施，消除污染源，以提高气调保鲜卤鸭掌的产品质量安全。通过 ARDB 抗性基因数据库比对，发现 5 种 ARGs 抗性基因，主要存在于质粒、转座子、整合子中，通过编码蛋白质或其他分子机制，产生耐药性，其从某种微生物平行传递至另外一种微生物，导致抗性基因的广泛传播。抗性基因的来源有多种途径，一是自然突变或表达潜在抗性基因等方式；二是人或畜禽粪便中存在抗性基因在养殖场等环境中的富集，进一步提高了抗性基因的传播率。为了应对抗性基因的传播，首先，需要合理使用抗生素，减少不必要的抗生素使用；其次，需要加强环境监测和污染控制，防止耐药菌在环境中的传播。此外，更加深入地研究抗性基因的传播机制，对于阻断抗性基因的传播也具有现实性意义，实验室下一步可通过对养殖场、土壤、粪便、水等进行靶向性抗性基因检测，来研究其传播方式。

参考文献

[1] MADONNA M, PRAMOD V, MAHAJA N, *et al.* Influence of different types of modified atmosphere packaging films and storage time on quality and bioactive compounds in fresh cut cauliflower [J]. Food Packag Shelf, 2019, 22(15): 131–139.

[2] ŞAFAK U, ÖZKAN Ö. Preservation of stuffed mussels at 4°C in modified

- atmosphere packaging [J]. *J Aquat Food Prod Technol*, 2011, 20(3): 319–330.
- [3] GALVAN M, IMELADA J, MCKAY B, *et al.* Mode of action of nisin on *Escherichia coli* [J]. *Can J Microbiol*, 2020, 66(2): 161–168.
- [4] 党亚丽, 徐思雨, 曹锦轩, 等. 不同含氧气调包装方式对调理鸭肉制品的保鲜效果[J]. *食品科学*, 2019, 40(13): 216–221.
- DANG YL, XU SY, CAO JX, *et al.* The preservation effect of different oxygen containing packaging methods on conditioned duck meat products [J]. *Food Sci*, 2019, 40(13): 216–221.
- [5] 李德红. 气调包装酱鸭食管优势腐败菌分离鉴定及抑菌研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- LI DH. Isolation, identification, and antibacterial study of dominant spoilage bacteria in the esophagus of modified atmosphere packaged sauce duck [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.
- [6] 祁玉霞, 李宏宇, 吴熙, 等. 不同杀菌方式对烟熏鸭胸产品品质的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(22): 259–267.
- QI YX, LI HY, WU X, *et al.* Effects of different sterilization methods on the quality of smoked duck breast products [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(22): 259–267.
- [7] 郭梦嫣, 王海滨, 廖鄂减, 等. 减盐条件下卤汤重复使用制作的卤鸭腿理化指标变化规律研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(7): 48–55.
- GUO MY, WANG HB, LIAO EJ, *et al.* Study on the change law of physicochemical indexes of duck legs stewed in brine reused under salt reduction conditions [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(7): 48–55.
- [8] 姬莉莉, 闫雪. 食品中微生物限量要求及检测技术发展趋势[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 459–465.
- JI LL, YAN X. Requirements of microbial limit and development trend of detection technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 459–465.
- [9] 智文莉, 高天蓝星, 王赛楠, 等. 2019 年河南省食品安全抽检数据分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(14): 4912–4919.
- ZHI WL, GAO TLX, WANG SN, *et al.* Analysis of food safety supervision and sampling inspection in Henan Province in 2019 [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(14): 4912–4919.
- [10] 禹长海, 杨燕, 林治钰. 2019 年度山东省食品安全监督抽检数据统计分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(21): 8131–8140.
- YU CH, YANG Y, LIN ZY. Statistical analysis of food safety supervision and sampling inspection data in Shandong Province in 2019 [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(21): 8131–8140.
- [11] HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products [J]. *Chem Biol*, 1998, 5(10): R245–9.
- [12] HUANG X, WU W, TIAN X, *et al.* A total infectome approach to understand the etiology of infectious disease in pigs [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 73.
- [13] LIU J, WANG X, ZHANG W, *et al.* Comparative analysis of gut microbiota in healthy and diarrheic yaks [J]. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 111–124.
- [14] BERG G, RYBAKOVA D, FISHER D, *et al.* Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 103–119.
- [15] FERRAVANTE C, MEMOLI D, PALUMBO D, *et al.* HOME-BIO (shotgun metagenomic analysis of biological entities): A specific and comprehensive pipeline for metagenomic shotgun sequencing data analysis [J]. *BMC Bioinform*, 2021, 22(7): 106–118.
- [16] 武文明, 崔巧珍, 时东彦. 39 株诺卡菌的临床疾病特点及药敏结果分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 12(47): 1326–1330.
- WU WM, CUI QZ, SHI DY. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility analysis of 39 *Nocardia* isolates [J]. *J Antibiot*, 2022, 12(47): 1326–1330.
- [17] 李芳基. 基于 SS-PCR 及 RAA 技术对诺卡菌检测方法的研究[D]. 拉萨: 西藏大学, 2023.
- LI FJ. Research on the detection method of *Nocardia* based on SS-PCR and RAA technology [D]. Lhasa: Tibet University, 2023.
- [18] 刘鳌. 新疆部分地区马源大肠杆菌的分离鉴定与部分生物学特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2023.
- LIU AO. Isolation, identification and partial biological characteristics of *Escherichia coli* from horses in some regions of Xinjiang [D]. Alar: Tarim University, 2023.
- [19] LIU J, WANG X, ZHANG W, *et al.* Comparative analysis of gut microbiota in healthy and diarrheic yaks [J]. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 111–125.
- [20] GAO R, HUANG H, HAMEL J, *et al.* Application of a high-throughput targeted sequence ampliSeq procedure to assess the presence and variants of virulence genes in *Salmonella* [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 856–871.
- [21] 王玲玲. 铜离子胁迫下微生物 EPS 分泌及相关抗性基因表达和代谢水平变化的探究[D]. 南京: 南京林业大学, 2023.
- WANG LL. Exploration of changes in microbial EPS secretion, expression of related resistance genes, and metabolic levels under copper ion stress [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2023.
- [22] 管永晶. 环境压力下澜河抗生素耐药性赋存特征及扩散机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- GUAN YJ. Research on the occurrence characteristics and diffusion mechanism of antibiotic resistance in Bahe River under environmental pressure [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.

- [23] ZHU T, CHEN T, CAO Z, *et al.* Antibiotic resistance genes in layer farms and their correlation with environmental samples [J]. Poul Sci, 2021, 100(12): 101–119.
- [24] SOUQUE C, ESCUDERO JA, MACLEAN RC. Integron activity accelerates the evolution of antibiotic resistance [J]. eLife, 2023, 14(2): 2357–2371.
- [25] WANG N, LUO J, DENG F, *et al.* Antibiotic combination therapy: A strategy to overcome bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 808–819.
- [26] WANG CY, TANG YA, LEE IW, *et al.* Development and validation of an expanded targeted sequencing panel for non-invasive prenatal diagnosis of sporadic skeletal dysplasia [J]. BMC Med Genom, 2021, 14(3): 212–226.
- [27] 吴萱, 杨璐, 刘艳超, 等. 北京市售鸡肉和猪肉中大肠杆菌污染情况及耐药特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(3): 211–216.
- WU X, YANG L, LIU YC, *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in raw chicken and pork from Beijing [J]. Chin J Food Hyg, 2022, 34(3): 211–216.
- [28] DOGAN OB, CLARKE J, MATTOS F, *et al.* A quantitative microbial risk assessment model of *Campylobacter* in broiler chickens: Evaluating processing interventions [J]. Food Control, 2019, 100: 97–110.
- [29] ZWEIFEL C, ALTHAUS D, STEPHAN R. Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs [J]. Food Control, 2015, 51: 37–42.
- [30] NORTHCUTT JK, SMITH DP, MUSGROVE MT, *et al.* Microbiological impact of spray washing broiler carcasses using different chlorine concentrations and water temperatures [J]. Poul Sci, 2005, 84(10): 1648–1652.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



宋 晟, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与食品微生物。
E-mail: 55074740@qq.com



王 芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究与风险评估。
E-mail: 493646602@qq.com