

一株致皮蛋“爆蛋”的嗜碱菌株分离鉴定及其 De novo 测序分析

张昊, 杨林杰, 张腾飞, 孙静, 梁振华, 皮劲松, 杜金平*
(湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北武汉 430064)

摘要: 该研究采用传统微生物培养法从皮蛋“爆蛋”样品中分离出一株“致爆”菌 BD 菌株, 经形态学观察、生理生化分析及 16S rDNA 测序比对, 对菌株进行鉴定, 并构建系统发育树。通过细菌学试验探究了菌株的生长性能、耐盐耐碱特点和产气能力, 并对该菌进行 De novo 测序, 获得菌株基因组框架图。结果表明, 该菌 16S rDNA 序列与麦氏弧菌 (*Vibrio metschnikovii*) 同源性高达 99.92%。该菌株最适生长温度为 25~40 °C, 可在高碱 (pH 12) 环境下生长, 具有产气能力。该菌株基因组大小为 3.70 Mb, 共编码 3381 个基因, 对蛋白编码基因功能注释结果显示, 该菌株基因组中含有大量碳水化合物代谢通路、膜转运功能相关通路基因, 推测其在皮蛋内通过调节相关基因表达耐受高碱环境。BD 菌株的碱耐受能力为其在皮蛋中增殖提供了有利条件, 而其生理特点为皮蛋“爆蛋”控制提供依据, 也为微生物高碱、高脂质环境适应相关功能基因的挖掘提供参考。

关键词: 皮蛋; “爆蛋”; 分离鉴定; 麦氏弧菌; De novo 测序

文章编号: 1673-9078(2022)03-49-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0659

Isolation and Identification of a Basophilic Bacterium BD from “Bursting” Pidan and De novo Sequencing Analysis of the Strain

ZHANG Hao, YANG Linjie, ZHANG Tengfei, SUN Jing, LIANG Zhenhua, PI Jinsong, DU Jinping*

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: A Gram-negative bacterial strain named BD was isolated from the “bursting” Pidan by traditional microbial culture method. The strain was identified by morphological observation, biochemical analysis and 16S rDNA. The phylogenetic tree was also constructed. The growth performance, alkali resistance and the gas production capacity of the strain were investigated through bacteriological experiment. The whole genome of the strain was sequenced using De novo system and a draft map was obtained. The results showed that the physiological and biochemical characteristics of the strain were *Vibrio* genus, and the homology of 16S rDNA sequence with *Vibrio metschnikovii* reached 99.92%. This strain could grow in a high alkali (pH 12) environment, and the optimal growth temperature was 25~40 °C. De novo sequencing of the strain showed that the genome size of the strain was 3.70 Mb, encoding 3381 genes in total. Functional annotation of protein-coding genes showed that the genome of this strain contained a large number of genes related to carbohydrate metabolism pathway and membrane transport function pathway. This study provides a theoretical basis for the development of the “burst” control scheme of Pidan processing, and provides a reference for the mining of functional genes related to the adaptation of microorganisms to high alkali and high lipid environment.

Key words: pidan; “bursting” Pidan; isolation and identification; *Vibrio metschnikovii*; de novo sequencing

引文格式:

张昊,杨林杰,张腾飞,等.一株致皮蛋“爆蛋”的嗜碱菌株分离鉴定及其 De novo 测序分析[J].现代食品科技,2022,38(3):49-55,+73

ZHANG Hao, YANG Linjie, ZHANG Tengfei, et al. Isolation and identification of a basophilic bacterium BD from “bursting” Pidan and de novo sequencing analysis of the strain [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 49-55, +73

收稿日期: 2021-06-23

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-42-26)

作者简介: 张昊 (1985-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 水禽健康养殖与蛋品加工, E-mail: 15172520011@163.com

通讯作者: 杜金平 (1963-), 男, 研究员, 研究方向: 水禽蛋品加工, E-mail:

ddjinp@163.com

皮蛋是具有悠久历史的中国传统蛋制品, 由鲜鸭蛋经 5 周左右腌制而成, 其风味独特, 营养丰富。皮蛋制作不但延长了蛋品的保存期, 还使其具有抗肠炎^[1]、调控肠道微生物菌群等功能^[2]。鸭蛋由蛋壳包裹, 蛋清黏度高, 且蛋清中含溶菌酶, 这些特点可一定程度阻止细菌的入侵、增殖^[3]。但受原料蛋品质和加工

条件和影响,某些皮蛋加工企业也会出现“爆蛋”现象。“爆蛋”是由于皮蛋内压力增大,超过蛋壳承载力导致的。皮蛋加工过程出现“爆蛋”,往往不是单个蛋品出现,而是整缸或成批出现,对企业造成巨大损失。因此,对皮蛋“爆蛋”进行微生物溯源,提出控制“爆蛋”的有效方案具有重要产业意义。

麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*)是麦契尼可夫弧菌的简称,是一种厌氧/兼性厌氧短杆菌,属于非 O₁ 群霍乱弧菌,一般不致病^[4,5],于 1981 年首次分离得到^[6],广泛存在于污水^[7,8]、人畜粪便^[9]、水产品^[10,11]、河流、海湾^[12]和污染的水禽蛋^[13]中。由于其分布广泛、致病力不强,相关报道有限。一般认为该菌属嗜盐性菌,在无盐水中不能生长^[14]。且该菌不耐低温,具有耐碱和胆盐的特征^[15]。目前有关于麦氏弧菌影响再制鸭蛋成品率的研究报道较少。

全基因组 De novo 测序也称为从头测序,可不依赖参考基因组序列,进行建库测序。测序结果通过拼接组装,绘制测序物种的完整基因组序列图谱。基因组测序不仅可以获得测序物种的全基因组序列图谱,分析开放性阅读框,确定基因数量,还可通过进一步分析,确定测序物种进化特点、生物学分类、基因功能富集情况和主要代谢通路,为特定环境适应性等相关研究奠定基础^[16,17]。

本研究从爆蛋样品中分离出一株革兰氏阴性菌,命名为 BD 菌株。通过形态学观察,16S rDNA 序列比对,初步鉴定其为弧菌属细菌。通过弧菌试剂盒检测生理生化功能,确定其生长代谢特点。并确定了其最适生长温度、耐盐度和耐碱度,为皮蛋加工企业“爆蛋”控制方案制定提供参考。鉴于菌株生长环境特点,进一步通过 De novo 测序,初步解析 BD 菌株适应高碱度环境的生物学机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

“爆蛋”皮蛋样品由湖北省江夏区某皮蛋加工厂提供。

主要培养基: LB 固体培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基、MC 培养基、MRS 培养基、芽孢杆菌培养基、MA 培养基,青岛高科园海博生物技术有限公司。

主要试剂: DP302 TIANampBateria DNA Kit,天根生化科技(北京)有限公司; KOD taq、Loading buffer、核酸染料,Transgene 生物科技有限公司;弧菌科细菌生化鉴定盒(16 种×5 次),广东环凯微生物

技术有限公司; NEBNext@Ultra™ DNA Library Prep Kitfor illumine 试剂盒,NEB 有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平,上海佑科仪器仪表有限公司; Eclipse Ts2R 倒置显微镜,尼康株式会社; LX-B35 L 型立式压力蒸汽灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司; PCR 仪,美国赛默飞世尔科技公司; PYL-125 型生化培养箱,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂; GelDocXR+全自动凝胶成像系统,美国 Bio-red 公司。

1.3 方法

1.3.1 “爆蛋”样品细菌的分离纯化

鉴于“爆蛋”皮蛋样品蛋白无明显变化,蛋黄内出现变质、颜色异常,因此,将“爆蛋”样品变质蛋黄作为菌株的分离材料,取各批次“爆蛋”蛋黄 0.5 g 进行后续试验。样品无菌条件下充分研磨后转入加入 200 mL,0.9% 无菌 NaCl 的锥形瓶,200 r/min 振荡 30 min,静置 5 min,用 0.9% NaCl 10 倍梯度稀释,选择 5 个稀释梯度,各取 100 μL 梯度稀释液于不同培养皿内,并涂布均匀,倒置于培养箱中 37 °C 培养 24±2 h。根据菌落的形状,大小和颜色等形态特征,挑取不同选择培养基上单菌落进行纯化,镜检,斜面保藏。

1.3.2 细菌形态特征的观察

菌落特征:对菌落的颜色、大小、形状、光滑度和透明度等进行观察并记录。

对菌落形态进行观察和拍照。将分离纯化后的细菌进行革兰氏染色,在显微镜下观察细菌形态特征。

1.3.3 菌株基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因扩增测序

将待测菌株分别使用分离菌株所采用的固体培养基对应的液体培养基 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 获得新鲜细胞悬浮液,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA(步骤参照说明书)。以提取的 DNA 为模板,选择细菌 16S rDNA 的通用引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL: 2×FastTaq Premix 12.5 μL,模板 DNA 1 μL,上、下游引物各 0.75 μL,添加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,确定扩增片段长度于目标片段长度相同、无杂带后送往武汉奥科鼎盛生物科技有限公司

进行纯化并测序。

1.3.4 同源性及进化树分析

扩增产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测后,送武汉生工生物技术有限公司进行测序,将测序进行 BLAST 比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),综合分析菌株 16S rDNA 序列比对结果。选择同源性高的细菌序列,用 MEGAX 软件,采用 Neighbor-Joining 法构建菌株系统发育树。

1.3.5 细菌生长曲线绘制

浓度为 1.0×10^6 CFU/mL 的细菌培养液,以 1% 的接种量接种于 LB 液体培养基中,37 °C,200 r/min 振荡培养,分别选取 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 时间测定菌液的 OD₆₀₀ 值。以培养时间为横坐标,OD₆₀₀ 值为纵坐标绘制细菌生长曲线,共进行 3 次重复试验并统计分析。

1.3.6 细菌培养特性试验

(1) 细菌生长最适温度试验

将细菌的培养液接种到 3.5 mL 的 LB 液体培养基中,分别在 15、20、25、30、35、40、45、50 °C 条件下,200 r/min 培养过夜。次日分别测取 OD₆₀₀ 值,进行 3 次重复并统计分析。

(2) 细菌耐碱试验

将细菌的培养液接种到 3.5 mL 的 LB 液体培养基中,调节培养基的 pH 值分别为 8、9、10、11、12、13、14。接种后 200 r/min,37 °C 培养 12 h 后,取适量样品测 OD₆₀₀ 值。进行 3 次重复,统计分析。

(3) 细菌耐盐试验

将细菌的培养液接种到 3.5 mL 的 LB 液体培养基中 (pH 10±0.2),并调节培养基中的 NaCl 浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%,37 °C 培养 12 h 后,取适量样品测 OD₆₀₀ 值。进行 3 次平行试验,统计分析。

(4) 细菌生化试验

取纯培养物置于已配备的无菌生理盐水中,与 0.5 Mc Farland 的浊度管比浊,将菌悬液制备成 0.5 Mc Farland,用吸管吸取 2 滴菌悬液加入每种微量生化管中,参照弧菌科细菌生化鉴定盒说明书进行实验。

1.3.7 细菌基因组 De novo 测序

采用 SES 方法对样本的基因组 DNA 进行提取,之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性,利用 Qubit 进行定量后,对 DNA 样品用超声破碎仪随机打断成长约 350 bp 的片段。利用建库试剂盒,经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤制备测序文库。文库构建后,使用 Qubit 2.0 进行初步定量,稀释文库至 2 ng/μL,随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段进行检测,片段大小符合预期后,

使用 qPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。构建好的文库通过 Illumina PE150 平台进行细菌框架图测序。测序完成后,构建细菌基因组框架图,并对基因进行 GO 富集、KEGG 分析等生物信息学分析。

1.3.8 统计分析

本试验统计分析采用单因素方差分析,应用 SPSS 软件中的 ANOVA 方法计算均值±SD 和 p 值。

2 结果与分析

2.1 “爆蛋”样品分离获得的细菌形态、菌落特征及 16S rDNA 序列分析

多批次样品细菌分离结果发现,“爆蛋”样品中的微生物可在 LB 固体培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基中生长,菌落均呈浅黄色,表面光滑且不透明。分离纯化后,菌落形态相同,均如图 1 所示,在 LB 固体培养基中形成浅黄色、表面光滑、边缘整齐且不透明的近似圆形的菌落。显微镜检特点相同,菌株革兰氏染色阴性,短杆状,不透明菌株。单个存在,少数链状排列(图 1)。



图 1 LB 固体培养基生长特性(36 h)及革兰氏染色光镜检测结果
Fig.1 Growth characteristics of LB agar medium (36 h) and the result of isolate by microscope (200×)

微生物的 16S rDNA 结构具有保守性,可反映微生物间的亲缘关系和进化特征。16S rDNA 序列比对法对未知菌株种属分类具有快速、准确、灵敏等优点。对 BD 菌株的基因组 DNA 模板进行 16S rDNA 片段 PCR 扩增,扩增到大小约为 1400 bp 条带。利用 NCBI 中 blast 工具对 BD 菌株 16S rDNA 扩增片段测序结果进行比对分析,BD 菌株 (Genbank accession number: MZ723937) 与弧菌属多个近缘种的 16S rDNA 基因相似性在 99% 以上,其中与麦氏弧菌 (*Vibrio metschnikovii* strain KT986183.1),印第安弧菌 (*Vibrio injenensis* strain KC634073.2),辛辛那提弧菌 (*Vibrio cincinnatiensis* strain NR026122.1),需钠弧菌 (*Vibrio natriegens* strain NR115679.1) 的相似性分别为 99.92%、99.75%、99.83%、97.76%。由于 16S rDNA

的保守性高,未知菌属序列比对分析是目前确定其分类的常用手段,但对相似率极高的近缘种只能进行属水平上的鉴定。

选取 7 个同源性较高的不同种的弧菌序列,用 MegaX 软件建立系统发育树。从系统发育树可以看出, BD 菌株与麦氏弧菌处于较近分支,且聚集在一起,形成一簇(图 2)。综合序列比对结果和系统发育树构建结果,初步确定 BD 菌株为麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*)。进一步利用菌株 De nove 测序结果的分析,可将菌株鉴定到种。

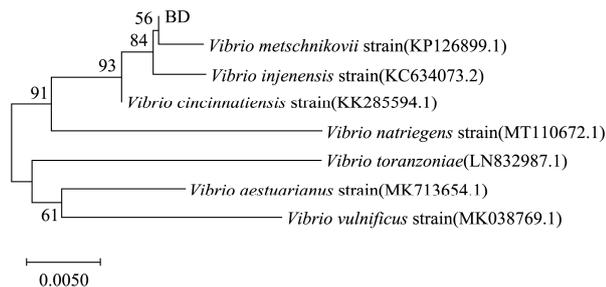


图 2 基于 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences

2.2 细菌生长曲线结果

供试菌在培养 4 h 后进入对数生长期,并持续到 12 h 左右,14 h 后进入稳定期(图 3)。在试验组中,所有检测点 3 组数据均差异不显著($p>0.05$),重复性良好。

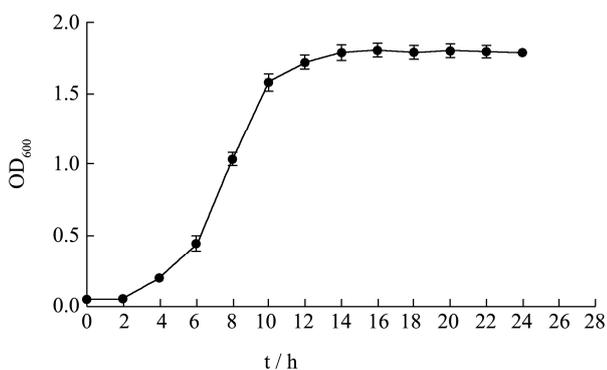


图 3 BD 菌株的生长曲线

Fig.3 Growth curve of BD strain

2.3 细菌培养特性试验结果

供试菌在 15 °C 培养条件下,生长缓慢,当温度达到 25 °C,即可开始生长,最适生长温度为 25~40 °C(图 4)。供试菌株的 OD₆₀₀ 值随 pH 值的增大呈先增加后下降的趋势,其在 pH 12 时 OD₆₀₀ 值达到最大值,pH 进一步增加,细菌则无法增殖(图 5)。供试菌培养基中 NaCl 浓度从 2.5%至 5%增加时,该弧菌增殖速度随盐浓度的提高而加快,当 NaCl 浓度从 5%至

7.5%继续增加时,该弧菌增殖速度变慢(图 6)。细菌培养特性试验的试验重复性均表现良好。

由于该菌株多富集于水体、海鲜及动物粪便中。基于 BD 菌株的生长特性,加工企业应重点关注原料蛋品收集、运输,减少使用细菌污染的次品蛋,尤其我国南方地区在春夏之交,气温升高的气候条件下更需重点关注。此外,在腌制车间内、蛋品出缸后以及商品皮蛋在储运、货架期管理时,也要注意控温,避免温度过高,引发“爆蛋”。

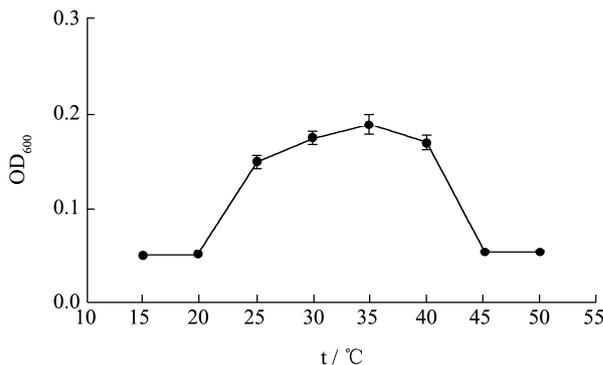


图 4 温度对 BD 菌株生长情况的影响

Fig.4 Effect of temperature on the growth of BD strain

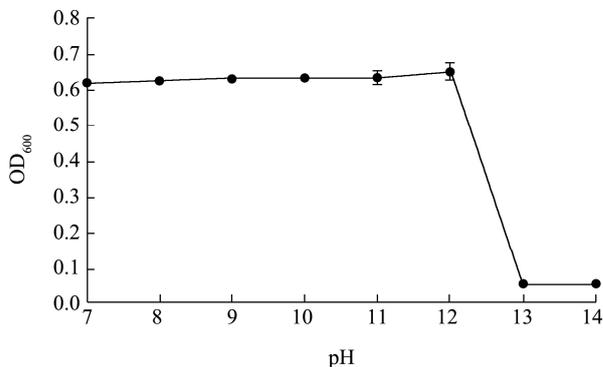


图 5 pH 值对菌株生长的影响

Fig.5 Effect of pH value on strain growth

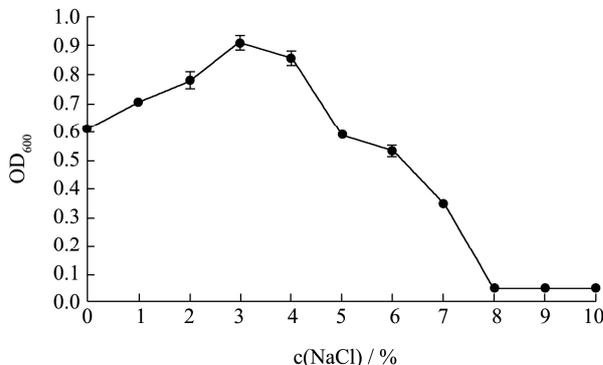


图 6 NaCl 对菌株生长的影响

Fig.6 Effect of NaCl on strain growth

2.4 生理生化特性

供试菌株蔗糖、阿拉伯糖、肌醇分解试验结果阴

性；甘露糖分解试验结果阳性。菌株 1% NaCl 葡萄糖产气、1% NaCl 精氨酸双水解酶试验结果阳性；1% NaCl 赖氨酸脱羧酶试验结果阴性。低浓度（0%~6%）NaCl 胨水试验阳性，高浓度（8%~10%）NaCl 胨水试验阴性。相关试验结果详见（表 1）。该结果表明，BD 菌株除适应高碱环境外，还具有产气能力，能够在 6% 的盐浓度条件下生长。

表 1 BD 菌株的生理生化分析

Table 1 Physiological and biochemical analysis of BD strain

项目	结果
1% NaCl 葡萄糖产气	+
1% NaCl 葡萄糖磷酸盐胨水	-
1% NaCl 蛋白胨水	-
1%蔗糖	-
甘露糖	+
阿拉伯糖	-
肌醇	-
1% NaCl 赖氨酸脱羧酶	-
1% NaCl 精氨酸双水解酶	+
无盐胨水	+
3% NaCl 胨水	+
6% NaCl 胨水	+
8% NaCl 胨水	-
10% NaCl 胨水	-

2.5 细菌基因组 De novo 测序分析

通过对下机数据处理，序列组装发现，BD 菌株基因组大小为 3.70 Mb，GC 含量 43.62%。基因组分析表明，BD 菌株共编码 3381 个基因，基因平均长度为 942 bp，编码基因长度占基因组比例为 86.58%。非

编码 RNA 预测发现，BD 菌株共有 84 个 tRNA，13 个 sRNA。采用 IslandPath-DIOMB 软件预测 BD 菌株基因岛发现，BD 菌株存在 5 个基因岛，基因岛总长度 40270 bp，平均长度 8054 bp。

选取 GO、KEGG 和 COG 三个数据库对功能基因进行注释。其中，GO (Gene Ontology) 按照功能基因的分子功能、生物学过程和细胞组分进行聚类。GO 注释结果的分类如图 7 所示，细菌生物学过程和分子功能基因活跃，其中参与细胞过程（1348 条）、代谢过程（1345 条）、结合（1133 条）、催化活性（1262 条）的基因较多。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 从分子信号通路角度进行注释，获得菌株相关分子间的互作网络。BD 菌株 KEGG 代谢通路分析结果如图 8 所示。从 KEGG 通路注释结果表明，该菌株参与碳水化合物代谢及膜转运的相关基因数量最多，此外，参与氨基酸代谢、维生素和辅因子代谢通路的相关基因数量也较多。通过对蛋白编码基因功能注释表明，该菌株基因组中含有大量碳水化合物代谢通路、膜转运功能相关通路基因。有研究表明，嗜碱细菌细胞膜上的 Na⁺/H⁺ 转运载体在调节细胞质 pH 方面起关键作用^[18,19]。BD 菌株中的大量膜转运相关基因可转录翻译成的蛋白，以离子泵的形式保证细菌胞质中 pH 值相等稳定^[20]。分离菌株基因组中同时含有较多的碳水化合物代谢通路相关基因，这些功能基因可能参与细菌利用蛋内碳源物质为离子转运供能。对于 GO 注释将基因富集到的基因中，双组分传感因子活性相关基因可能与该菌株适应碱性环境有关^[21]，甘油-3-磷酸盐分解代谢活性相关基因可能也参与了碱环境适应^[22]。

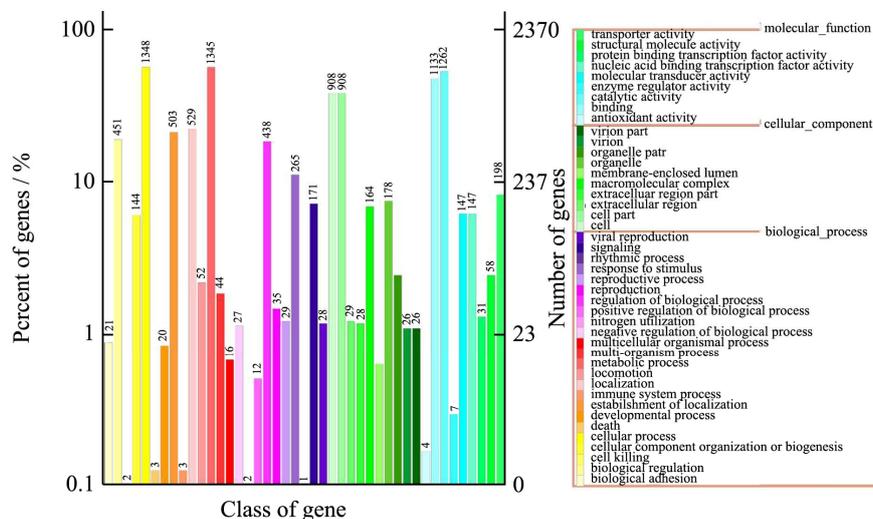


图 7 BD 菌株 GO 注释图

Fig.7 Go annotation results of strain BD

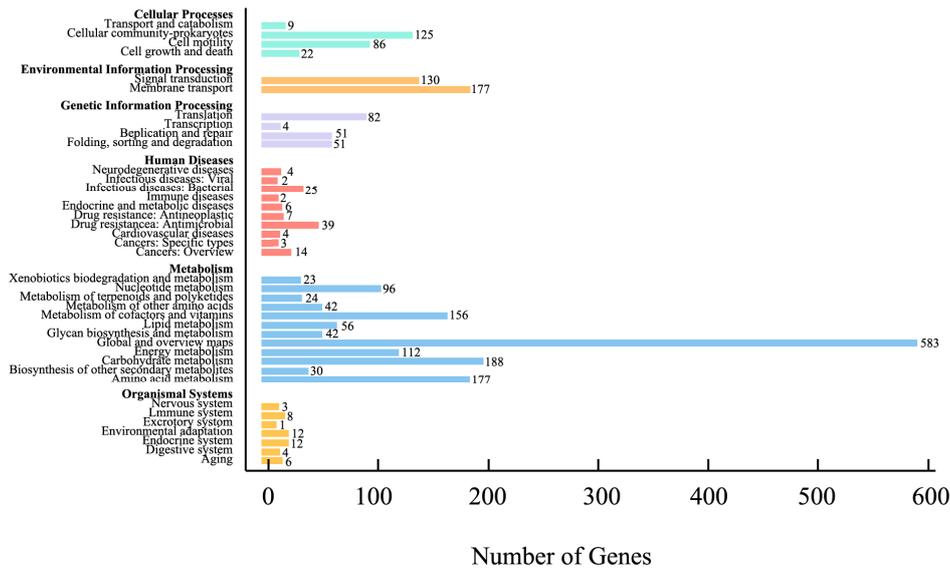


图8 BD 菌株的KEGG 分析统计图

Fig.8 KEGG analysis results of strain BD

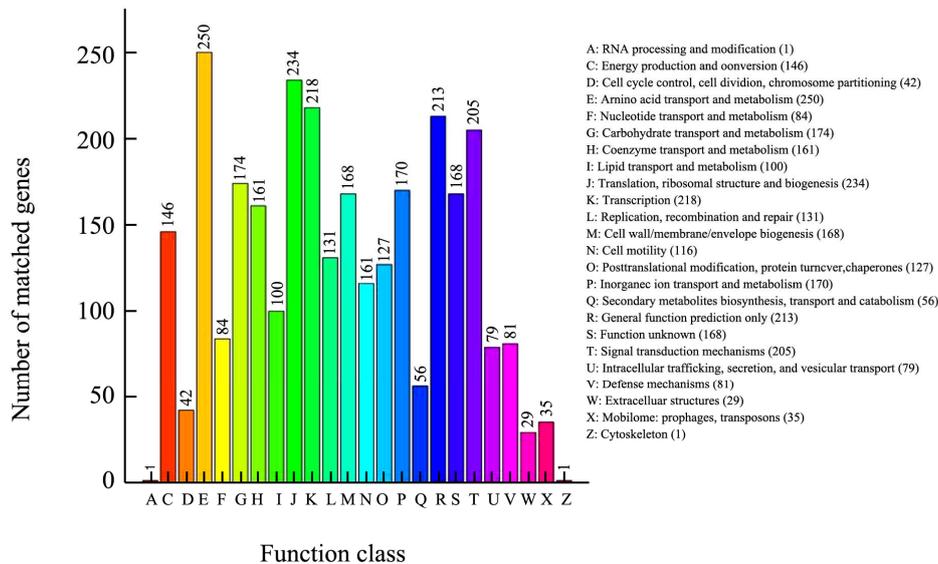


图9 BD 菌株的COG 功能分类图

Fig.9 COG function classification results of strain BD

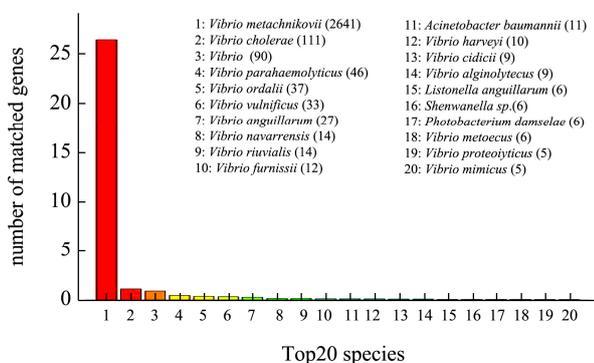


图10 BD 菌株的NR 注释结果

Fig.10 NR Annotation results of strain BD

COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) 数据库注释结果表明 (图 9), BD 菌株相关基因富集

于氨基酸转运代 (250 个); 翻译、核糖体结构和起源 (234 个); 转录因子 (218 个), 结果对 GO 注释和 KEGG 注释结果进行了补充和印证。

NR 数据库 (Non-Redundant Protein Database) 是一个非冗余的蛋白质数据库, 其特点在于内容比较全面, 同时注释结果中会包含有物种信息, 可作物种分类用。该数据库由 NCBI 创建并维护, 根据基因编码蛋白注释到的物种情况, 统计注释到的物种及蛋白数目。结果表明, BD 菌株编码的 3381 个蛋白, 有 2641 个注释到麦氏弧菌中, 其富集度最高 (见图 10)。结合前期 16S rDNA 测序比对结果, 确定从皮蛋“爆蛋”样品中分离获得的 BD 菌株为麦氏弧菌 (*Vibrio metchnikovii*)。

3 结论

3.1 本研究通过分离、镜检、染色、16S rDNA 测序比对和 De novo 从头测序, 确定从皮蛋“爆蛋”样品中分离获得的 BD 菌株为麦氏弧菌 (*Vibrio metschnikovii*)。生长特性研究发现其适宜生长温度为 25~40 °C, 可耐受 pH≤12 的碱环境, 耐盐且具有产气能力。但该腐败菌 BD 菌株如何侵入蛋品内部, 其代谢过程中产生的气体是何种成分, 还需要进一步开展相关研究。

3.2 研究分离获得的 BD 菌株 De novo 测序分析表明, 该菌株基因组中有大量参与碳水化合物代谢、膜转运、氨基酸代谢、维生素和辅因子代谢通路的基因, 通过相关基因表达来适应高碱环境, 为皮蛋“爆蛋”菌在蛋黄中的生长机制研究提供了一定基础, 但功能基因的挖掘和作用机制研究也有待后续试验进行深入研究。

参考文献

- [1] 赵燕,徐明生,姚瑶,等.皮蛋蛋白水提物在肠道系统中的抗炎作用研究[J].中国食品学报,2019,19(6):36-45
ZHAO Yan, XU Mingsheng, YAO Yao, et al. Anti-inflammatory effects of preserved egg protein water extract in the intestinal system [J]. Chinese Journal of Food Science, 2019, 19(6): 36-45
- [2] Meng Y, Chen C, Qiu N, et al. Modulation of gut microbiota in rats fed whole egg diets by processing duck egg to preserved egg [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(1): 54-62
- [3] Alabdeh M, Lechevalier V, Nau F, et al. Role of incubation conditions and protein fraction on the antimicrobial activity of egg white against *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(1): 24
- [4] Linde H J, Kobuch R, Jayasinghe S, et al. *Vibrio metschnikovii*, a rare cause of wound infection [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(10): 4909-4911
- [5] Joakim, Jensen, Ersgaard M, et al. Severe septic shock and cardiac arrest in a patient with *Vibrio metschnikovii*: a case report [J]. Journal of Medical Case Reports, 2014
- [6] 闻玉梅,陆德源.现代微生物学[M].上海:上海医科大学出版社,1991
WEN Yumei, LU Deyuan. Modern Microbiology [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1991
- [7] 李源.医院污水中致病性弧菌的调查[J].职业与健康,2003,5:47-48
LI Yuan. Investigation of pathogenic vibrio in hospital sewage [J]. Occupation and Health, 2003, 5: 47-48
- [8] 丁业荣,时全,刘国生,等.自然水中麦氏弧菌生物学性状的研究[J].中国卫生检验杂志,1995,1:12-15
DING Yerong, SHI Quan, LIU Guosheng, et al. Study on the biological characteristics of *Vibrio mckii* in natural water [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 1995, 1: 12-15
- [9] 李楠,郝镗,李忠义,等.野鸟粪便中细菌种类及耐药性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2014,14:123-125
LI Nan, HAO Zhuo, LI Zhongyi, et al. Analysis of bacterial species and drug resistance in wild bird feces [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, 14: 123-125
- [10] 李正义,贾俊涛,曹际娟,等.一株分离自美国龙虾的麦氏弧菌的鉴定及其低温状态下细胞脂肪酸的变化[J].微生物学报,2013,53(6):628-634
LI Zhengyi, JIA Juntao, CAO Jijuan, et al. Identification of a strain of *Vibrio mckii* isolated from American lobster and its changes in cell fatty acids under low temperature [J]. Acta Microbi Sinica, 2013, 53(6): 628-634
- [11] 陈春艳,窦文超,田师一,等.智舌快速检测水产品中的麦氏弧菌[J].食品科学,2012,33(18):165-170
CHEN Chunyan, DOU Wenchao, TIAN Shiyi, et al. Rapid detection of *Vibrio metschnikovii* by smartongue [J]. Food Science, 2012, 33(18): 165-170
- [12] 刘秀梅,邵守峰.自腹泻病人,海水,海产品中分离出麦氏弧菌及其毒素原性的研究[J].中国卫生检验杂志,1998,8(6):359-360
LIU Xiumei, SHAO Shoufeng. Study on the isolation of *Vibrio mckii* and its toxinogenicity from patients with diarrhea, seawater and seafood [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 1998, 8(6): 359-360
- [13] 智秀娟,郝艳芳,仝其根,等.天鹅蛋中主要致腐微生物的分离与鉴定[J].食品工业科技,2016,37(7):103-106,111
ZHI Xiujuan, HAO Yanfang, TONG Qigen, et al. Isolation and identification of main spoilage microorganisms in swan eggs [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(7): 103-106, 111
- [14] 罗隆泽,刘红露,李燕春,等.2株与霍乱弧菌 O139 诊断血清发生凝集的麦氏弧菌鉴定[J].疾病监测,2009,8:588-589
LUO Longze, LIU Honglu, LI Yanchun, et al. Identification of 2 strains of *Vibrio mclarenii* agglutinating with the diagnostic serum of *Vibrio cholerae* O139 [J]. Disease Surveillance, 2009, 8: 588-589

(下转第 73 页)