

# 自贡冷吃兔主要原辅料中细菌的鉴定及溯源分析

袁先铃<sup>1\*</sup>, 郑贻丹<sup>1</sup>, 罗燧<sup>1</sup>, 林洪斌<sup>2</sup>

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644005) (2. 西华大学食品与生物工程学院, 四川成都 610039)

**摘要:** 通过对冷吃兔生产所用冷鲜兔、辣椒、花椒、八角、芝麻、孜然、山奈、香料、桂皮、生产用水中的微生物数量进行测定并采用传统培养法结合 16S rDNA 测序技术鉴定, 确定了原料和各种辅料中细菌的主要种属, 最后通过构建系统发育树进行溯源分析。结果表明, 原辅料中共分离 76 株菌, 分布于 20 个属; 不同原辅料菌落总数从大到小为: 兔肉>孜然>辣椒>香料>生产用水>山奈>八角>桂皮>花椒>芝麻; 不同原辅料含细菌属水平数量排序为: 原料肉>辣椒、孜然>香料、生产用水>花椒、八角、芝麻、桂皮>山奈; 不同原辅料含细菌种水平数量排序为: 香料>原料肉>桂皮>辣椒>八角>山奈>孜然、花椒>芝麻、生产用水。在冷吃兔原辅料中细菌多样性高, 芽孢杆菌属在原辅料中普遍存在, 原料肉所含的细菌量最多。本研究深入了解了冷吃兔原辅料中的污染情况并能为从源头控制细菌种类与数量提供理论依据, 更好的控制管理生产过程, 使其安全性提升。

**关键词:** 自贡冷吃兔; 原辅料; 细菌; 鉴定; 溯源分析

文章编号: 1673-9078(2022)08-53-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1344

## Identification and Traceability Analysis of Bacteria in the Main Ingredients of Zigong Leng-chi Rabbit

YUAN Xianling<sup>1\*</sup>, ZHENG Yidan<sup>1</sup>, LUO Yi<sup>1</sup>, LIN Hongbin<sup>2</sup>

(1.College of Biological Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin 644005, China)

(2.College of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

**Abstract:** The number of microorganisms in chilled rabbit meat, chili pepper, Chinese prickly ash, star anise, sesame, cumin, aromatic ginger, spices, cinnamon, and process water used in the production of Leng-chi rabbit was determined, and the main species of bacteria in these raw materials and various auxiliary materials were identified using a traditional culture method combined with 16S rDNA sequencing. Subsequently, traceability analysis was performed by constructing a phylogenetic tree. The results showed that a total of 76 bacterial strains from 20 genera were isolated from the raw and auxiliary materials. The materials were ranked according to the total number of colonies as follows: rabbit meat > cumin > chili pepper > spices > process water > aromatic ginger > star anise > cinnamon > Chinese prickly ash > sesame. The materials were ranked for the number of bacterial genera present, as follows: raw meat > chili pepper, cumin > spices, process water > Chinese prickly ash, star anise, sesame, cinnamon > aromatic ginger. Additionally, the ranking for number of bacterial species present was: spices > raw meat > cinnamon > chili pepper > star anise > aromatic ginger > cumin, Chinese prickly ash > sesame, process water. The bacterial diversity was high in the raw and auxiliary materials for Leng-chi rabbit. *Bacillus* was common in all materials; however, raw meat contained the most bacteria. This study provides an in-depth understanding of the contamination of raw and auxiliary materials used in the production of Leng-chi rabbit. Thus, it provides a theoretical basis for controlling the species and quantity of bacteria from each source and improving production process management and safety.

**Key words:** Zigong Leng-chi rabbit; raw and auxiliary materials; bacteria; identification; traceability analysis

引文格式:

袁先铃,郑贻丹,罗燧,等.自贡冷吃兔主要原辅料中细菌的鉴定及溯源分析[J].现代食品科技,2022,38(8):53-65

YUAN Xianling, ZHENG Yidan, LUO Yi, et al. Identification and traceability analysis of bacteria in the main ingredients of Zigong Leng-chi rabbit [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 53-65

收稿日期: 2021-11-29

基金项目: 四川省科技计划项目 (2020YFN0151)

作者简介: 袁先铃 (1979-), 女, 副教授, 研究方向: 食品安全工程, E-mail:

82745373@qq.com

自贡冷吃兔, 是自贡乃至川南地区的一种特色传统肉制品, 以鲜兔肉为原料, 辅以辣椒、花椒、姜等香辛料, 经预煮、腌制、炒制等工艺加工而成<sup>[1]</sup>, 其色泽亮黄, 具有川菜特有的麻辣鲜香, 嚼劲十足且爽

口不绵。2014年,自贡冷吃兔成为国家地理标志保护产品,2020年,发布行业标准《地理标志产品自贡冷吃兔》<sup>[2]</sup>。以兔肉为原料的自贡冷吃兔产品营养丰富,但自贡冷吃兔加工与生产环节为开放式,并且多采用巴氏杀菌,容易出现微生物污染,导致产品在流通、储藏过程中易腐败变质,造成自贡冷吃兔货架期短,从而限制了企业的发展、产品的流通销售等。

作为自贡冷吃兔的原料兔肉,近年来颇受大众欢迎,是人们摄取营养物质的优秀来源<sup>[3-5]</sup>。目前,兔产业因新冠疫情有所影响,但肉兔产业预计将继续维持上升趋势,兔产业整体发展也将持续上升<sup>[6]</sup>。研究调查显示中国对兔肉的消费主要取决于加工水平,而在国外更加在意兔肉的来源<sup>[7]</sup>。目前对兔肉的研究主要集中在提升兔肉品质<sup>[8,9]</sup>,兔肉结构特性<sup>[10]</sup>分析以及兔的饲养<sup>[11]</sup>等。在熟肉中常见污染微生物有乳酸菌、肉毒梭状芽孢杆菌、沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、热杀索丝菌和大肠杆菌等<sup>[12-14]</sup>。李冉等<sup>[15]</sup>对气调包装狮子头冷藏过程中微生物变化及菌群结构分析,发现狮子头腐败时期的菌群结构主要肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)、乳酸菌属(*Lactobacillus* spp.)以及嗜冷杆菌属(*Psychrobacter* spp.)等组成。彭先杰等<sup>[16]</sup>发现腐生葡萄球菌、巴氏葡萄球菌、鸡葡萄球菌和枯草芽孢杆菌是香辣仔鹅的特征腐败菌。在冷吃兔整个生产工艺中,生产原辅料是主要的微生物污染来源,其原带菌数是生产工艺中关键控制点,原辅料本身就存在卫生状况较差的现状,风险较高,不仅可能造成终产品的食品安全问题,还有存在交叉污染的风险,因此要严格把控原辅料带菌数,从源头降低微生物污染<sup>[17-19]</sup>。

本研究对自贡冷吃兔的原料和主要辅料中的微生物数量进行测定,采用传统培养法结合16S rDNA测序技术鉴定,确定原料和各种辅料中细菌的主要种属,建立潜在污染细菌库,并进行溯源分析。为从冷吃兔生产源头控制细菌种类与数量提供理论依据,从而延长自贡冷吃兔的货架期,扩大产品的流通范围。同时,也为川菜工业化产品细菌控制提供参考,为川菜产品走向全国、乃至全世界提供一定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

冷鲜兔、辣椒、花椒、八角、芝麻、孜然、山奈、香料、桂皮、生产用水,自贡市某食品有限公司;氯化钠(分析纯),上海源叶生物科技有限公司;PCA平板计数琼脂、Baird-Parker琼脂基础、结晶紫中性红

胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)、MRS培养基、LB培养基、亚蹄酸盐卵黄增菌液,青岛海博生物技术有限公司;甘油,上海麦克林生化科技有限公司;1×TSE101金牌mix、TSINGKE高纯度低电渗琼脂糖、DNA凝胶回收试剂盒、DL5000 Marker, Tsingke公司。

HLD-30002型电子天平,杭州友恒称重设备有限公司;DK-98-11型万用电炉,北京科伟永兴仪器有限公司;LS-75HD型立式压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备有限公司;101-3AB型数显恒温鼓风干燥箱,北京中兴伟业仪器有限公司;DZKW-D-2型电热恒温水浴锅,上海科恒实业发展有限公司;Hws-250B型恒温恒湿培养箱,天津市宏诺仪器有限公司;SW-CJ-2FD型净化工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;QYC-2102型双层小容量全温恒温摇床,上海福玛试验设备有限公司;3730XL型测序仪,Applied Biosystems;Legend Micro17型离心机,Thermo;2720 thermal cycler型PCR仪,Applied Biosystems;JY300C型电泳仪、JYDF(定制)型电泳槽、JY04S-3C型凝胶成像仪,君意东方;DFD-700型水浴锅,北京中兴伟业;L550型板式离心机, cence湘仪。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 取样及处理

##### 1.2.1.1 样品来源

真空冷吃兔样品及冷吃兔生产原料取自自贡市某食品有限公司,未添加任何防腐保鲜剂,采用同一批次随机取样,每一种原料或辅料,设立三个平行,在真空密封低温的条件下运输至实验室检测及保存。

##### 1.2.1.2 真空包装冷吃兔生产工艺流程

选择原辅料→兔肉切丁→焯水→腌制→炒制→真空包装→灭菌→成品

##### 1.2.1.3 腐败样品预处理

将样品置于25℃贮藏至产生气泡、胀袋,得到腐败终点样品。

#### 1.2.2 原辅料的 数量测定

参照GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》<sup>[20]</sup>、GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》<sup>[21]</sup>、GB 4789.41-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验》<sup>[22]</sup>和GB 4789.10-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》<sup>[23]</sup>对原辅料进行菌落总数、乳酸菌数量、肠杆菌数数量、金黄色葡萄球菌数量测定。

表1 细菌的培养条件

Table 1 Bacterial culture conditions

微生物	培养基	培养温度/℃	培养时间/h
菌落总数	平板计数琼脂 (PCA)	36±1	48
乳酸菌	MRS 培养基	36±1	72
肠杆菌	结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA)	36±1	24
金黄色葡萄球菌	Baird-Parker 琼脂基础	36±1	48

表2 主要原辅料细菌检测结果

Table 2 Bacterial detection results of main raw materials

原辅料名称	活菌数/lg(CFU/g)或 lg(CFU/mL)			
	菌落总数 (PCA)	乳酸菌属 (MRS)	金黄色葡萄球菌 (BP)	肠杆菌属 (VRBGA)
兔肉	7.45±0.06 <sup>a</sup>	5.79±0.04 <sup>a</sup>	6.02±0.06 <sup>a</sup>	5.71±0.04 <sup>a</sup>
辣椒	5.25±0.11 <sup>a</sup>	4.73±0.12 <sup>a</sup>	3.89±0.07 <sup>b</sup>	3.11±0.09 <sup>b</sup>
花椒	2.21±0.26 <sup>b</sup>	1.62±0.11 <sup>b</sup>	/	/
八角	2.35±0.10 <sup>b</sup>	2.13±0.12 <sup>b</sup>	/	/
芝麻	1.03±0.11 <sup>b</sup>	1.62±0.15 <sup>b</sup>	/	/
孜然	6.08±0.07 <sup>c</sup>	5.42±0.66 <sup>c</sup>	2.91±0.07 <sup>b</sup>	5.84±0.07 <sup>c</sup>
山奈	2.37±0.08 <sup>d</sup>	2.22±0.19 <sup>d</sup>	1.61±0.17 <sup>bc</sup>	/
香料	4.64±0.14 <sup>d</sup>	4.56±0.05 <sup>d</sup>	2.52±0.12 <sup>c</sup>	3.00±0.05 <sup>d</sup>
桂皮	2.24±0.06 <sup>d</sup>	1.87±0.12 <sup>f</sup>	/	/
生产用水	2.89±0.06 <sup>d</sup>	/	/	/

注:表中数值表示为平均值±标准偏差, /表示未检出,且同一列不同字母之间表示存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

### 1.2.3 原辅料细菌的分离纯化

挑选菌落数量测定后菌落数量在 30~300 的培养基,观察菌落的颜色、大小、形态、边缘结构、隆起程度、光泽度及透明度等特征。挑选典型菌落,进行革兰氏染色,在显微镜下观察,并进行划线分离纯化,至少进行 3 次划线,直至得到纯化单菌落。挑取纯菌落于 LB 培养基中,过夜培养,加入终浓度为 20% 的甘油, -20 °C 保藏、备用。

### 1.2.4 细菌的分子鉴定

#### 1.2.4.1 扩增与测序

取 1 mL 保藏的菌液转接于 LB 培养基, 37 °C 过夜培养, 4 °C, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 获得细菌菌体沉淀。采用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒 (通用型) 提取纯化菌株的 DNA, 以提取的 DNA 样品作为模版, 采用 16S rDNA 细菌通用引物 27F: 5' -AGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R: 5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 为引物, PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L: 上下游引物各 1  $\mu$ L, 模版 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 2 $\times$ Tap Master Mix, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。反应程序为: 98 °C 预变性 2 min, 38 个循环 (98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 15 s), 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。

#### 1.2.4.2 16S rDNA 序列同源性分析

将返回的 16S rDNA 基因测序结果通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库对各菌株进行 Blast 相似序列检索, 一般来讲, 在种分类等级上, 如果 2 个分类单位间的 16S rDNA 序列同源性大于 97.5%, 则认为属于同一个种。

#### 1.2.4.3 系统发育树的构建

以确定的细菌 16S rDNA 序列为构建系统发育树的参考菌株, 用未知序列与已知序列进行序列对比后, 通过 MEGA X 软件中 Neighbor Join 法构建系统发育树。

## 1.3 数据处理

每组试验均进行 3 次及以上平行测定, 采用 Microsoft Excel 2016、SPSS Statistics 22 和 Origin 2019 对试验数据进行处理、统计和制图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同原辅料中细菌数量分析

由表 2 主要原辅料细菌检测结果可知: 不同原辅料菌落总数从大到小为: 兔肉>孜然>辣椒>香料>生产

用水>山奈>八角>桂皮>花椒>芝麻；未在生产用水中检出乳酸菌属细菌，其余原辅料中均检出乳酸菌属细菌，其中兔肉、辣椒、孜然、香料含乳酸菌数目大；金黄色葡萄球菌存在于兔肉、辣椒、孜然、山奈、香料，其中兔肉中高达 6.02 lg(CFU/g)；肠杆菌属细菌在兔肉、辣椒、孜然、香料中检出，兔肉与孜然中肠杆菌含量最高。生产所用原辅料中，兔肉、辣椒、孜然、香料带菌量大，且均存在乳酸菌、金黄色葡萄球菌、肠杆菌；花椒、八角、芝麻、桂皮中主要存在乳酸菌，山奈中存在乳酸菌和金黄色葡萄球菌；生产用水虽未检出乳酸菌、金黄色葡萄球菌、肠杆菌，其菌落总数为 2.89 lg(CFU/mL) (GB 5749-2006《生活饮用水卫生标准》规定车间生产用水菌落总数应≤100 CFU/mL 且

不得检出大肠菌群<sup>[24]</sup>)。自贡冷吃兔生产所用兔肉、辣椒、孜然、香料为潜在细菌污染源，生产用水超标，采用超标的生产用水清洗，可能对兔胴体起不到清洗减菌作用，且会增加交叉污染的可能性。应当严格控制原辅料的采购，对运输、储存、生产条件进行标准、规范、卫生管理。

## 2.2 细菌生理形态特征分析

通过 4 种选择培养基对自贡冷吃兔生产原料及各种辅料中的细菌进行稀释涂布筛选，至少 3 次平板划线得到单菌落，共分离到 76 株菌，针对每种原辅料选取菌落数量最多的菌株进行菌落形态特征描述，见表 3。

表 3 原辅料中部分细菌的菌落形态特征

Table 3 Colony morphological characteristics of some bacteria in raw materials

菌株编号	菌株来源	形态	隆起度	颜色	光泽度	透明度	菌落大小/mm	革兰氏染色
TR6	兔肉	不规则圆形	轻微凸起	淡白色	有光泽	半透明	2~3	G-
TR10	兔肉	不规则圆形	高凸起	淡白色	无光泽	不透明	2~4	G+
LJ2	辣椒	不规则圆形	低凹	淡棕色	无光泽	不透明	2	G+
LJ3	辣椒	圆形	轻微凸起	乳白色	无光泽	不透明	1~3	G+
HJ4	花椒	圆形	扁平	黄色	有光泽	不透明	1~2	G+
BJ8	八角	圆形	扁平	淡黄色	有光泽	不透明	1	G+
ZM2	芝麻	圆形	轻微凸起	白色	有光泽	不透明	1	G+
ZR1	孜然	圆形	轻微凸起	淡白色	有光泽	半透明	1~2	G-
SN3	山奈	圆形	四周隆起	淡黄色	无光泽	不透明	1	G+
XL4	香料	不规则形状圆形	扁平	白色	有光泽	半透明	3	G+
GP9	桂皮	裂叶状	扁平	淡白色	无光泽	透明		G-
S3	生产用水	圆形	凸起	乳白色	有光泽	不透明	3	G+

注：TR 为兔肉，LJ 为辣椒，HJ 为花椒，BJ 为八角，ZM 为芝麻，ZR 为孜然，SN 为山奈，XL 为香料，GP 为桂皮，S 为生产用水。

## 2.3 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图谱

采用通用引物 27F/1492R 对 76 株菌 16S rDNA 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，其中部分菌株电泳图如图 1。

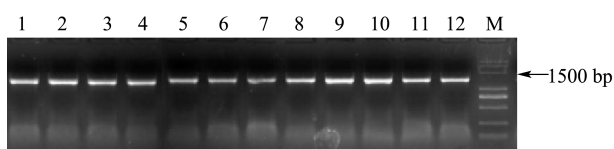


图 1 部分菌株 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of 16S rDNA PCR amplification products of some strains

注：“M”为 DNA Maker；“1~12”分别代表编号 TR6、TR10、LJ2、LJ3、HJ4、BJ8、ZM2、ZR1、SN3、XL4、GP9、S3 的菌株。

如图 1 所示，电泳图谱显示均得到大约 1500 bp

的 PCR 扩增片段，条带明亮清晰，满足后续测序要求，随后进行测序。

## 2.4 鉴定结果

用 ContigExpress 拼接测序结果，并去除两端不准的部分，将拼接好的序列在 NCBI 数据库 (blast.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行比对，选取同源性 (≥99%) 最高的菌株序列，结果如表 4 至 11 所示。

### 2.4.1 原料兔肉中的主要细菌

由表 4 可知，从冷鲜兔中分离出的 11 株菌，分布于 8 个属，其中 2 株 (菌株号 TR1、TR5) 与土生拉乌尔菌 (*Raoultella terrigena*)<sup>[25]</sup> 相似度高达 99%、TR2 与扩展短杆菌 (*Brevibacterium linens*)<sup>[26]</sup> 相似度高达 99%、TR3 为蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*)<sup>[27]</sup>、TR4 为河生莱略特氏菌 (*Lelliottia amnigena*)<sup>[28]</sup>、TR6 为弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)<sup>[29]</sup>、TR7 为液

化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*)<sup>[30]</sup>、TR9 为 *Empedobacter falsenii*<sup>[31]</sup>、2 株 (TR8、TR11) 解鸟氨酸拉乌尔菌 (*Raoultella ornithinolytica*)<sup>[32]</sup>、TR10 为乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)<sup>[33]</sup>。

#### 2.4.2 辣椒中的主要细菌

从辣椒中分离到 10 株菌, 属于 4 个属, 其中 2 株 (LJ4、LJ8) 鉴定为霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)<sup>[34]</sup>, 2 株 (LJ6、LJ10) 肠杆菌 (*Enterobacter sp*)<sup>[35]</sup>, LJ1 为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)<sup>[36]</sup>, LJ2 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)<sup>[37]</sup>, LJ3 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[38]</sup>, LJ5 为甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)<sup>[39]</sup>, LJ7 为 *Siccibacter colletis*<sup>[40]</sup>, LJ9 为栖热菌 (*Thermus sp*)<sup>[41]</sup>。

#### 2.4.3 花椒与八角中的主要细菌

从花椒中分离得到 4 株菌, 分布于 2 个属, HJ1 为水管致黑栖热菌 (*Thermus scotoductus*)<sup>[42]</sup>, HJ2 为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)<sup>[43]</sup>, HJ3 为枯草芽孢

杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[38]</sup>, HJ4 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)<sup>[44]</sup>。

从八角中分离到 8 株菌, 属于 2 个属, 2 株 (菌株号 BJ6、BJ7) 与巨大芽孢杆菌相似度最高, BJ1 为芽孢杆菌 (*Bacillus sp*)<sup>[45]</sup>, BJ2 为水管致黑栖热菌 (*Thermus scotoductus*)<sup>[42]</sup>, BJ3 为萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*)<sup>[46]</sup>, BJ4 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)<sup>[47]</sup>, BJ5 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[38]</sup>, BJ8 为阿氏芽孢杆菌 (*Bacillus aryabhattai*)<sup>[48]</sup>。

#### 2.4.4 芝麻和孜然中的主要细菌

从芝麻中分离到 3 株菌, 分别鉴定为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)<sup>[47]</sup>, 乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)<sup>[49]</sup>, 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)<sup>[37]</sup>。从孜然中分离到 4 株菌, 分别为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)<sup>[50]</sup>, *Siccibacter colletis*, 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)<sup>[36]</sup>, 考氏科萨克氏菌 (*Kosakonia cowanii*)<sup>[51]</sup>。

表 4 冷鲜兔肉中主要细菌的鉴定

Table 4 Identification of main bacteria in chilled rabbit meat

菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
TR1	1441	<i>Raoultella terrigena</i> (MN551790.1)	土生拉乌尔菌	99
TR2	1430	<i>Brevibacterium linens</i> (MW672489.1)	扩展短杆菌	99
TR3	1443	<i>Hafnia alvei</i> (JN409459.1)	蜂房哈夫尼菌	99
TR4	1453	<i>Lelliottia amnigena</i> (KY400219.1)	河生菜略特氏菌	99
TR5	1443	<i>Raoultella terrigena</i> (MK757978.1)	土生拉乌尔菌	99
TR6	1441	<i>Citrobacter freundii</i> (MN208068.1)	弗氏柠檬酸杆菌	99
TR7	1445	<i>Serratia liquefaciens</i> (MK981171.1)	液化沙雷氏菌	100
TR8	1442	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (MT545114.1)	解鸟氨酸拉乌尔菌	99
TR9	1441	<i>Empedobacter falsenii</i> (MG780344.1)	/	100
TR10	1449	<i>Lactococcus lactis</i> (MT473552.1)	乳酸乳球菌	100
TR11	1439	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (MW405821.1)	解鸟氨酸拉乌尔菌	99

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, TR 为兔肉; /代表暂无英文名称, 下同。

表 5 生产所用辣椒中主要细菌的鉴定

Table 5 Identification of main bacteria in pepper used in production

菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
LJ1	1441	<i>Enterobacter cloacae</i> (MK241852.1)	阴沟肠杆菌	99
LJ2	1442	<i>Bacillus licheniformis</i> (MK859971.1)	地衣芽孢杆菌	99
LJ3	1451	<i>Bacillus subtilis</i> (MN945444.1)	枯草芽孢杆菌	100
LJ4	1440	<i>Enterobacter hormaechei</i> (KJ863539.1)	霍氏肠杆菌	99
LJ5	1452	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (KC790303.1)	甲基营养型芽孢杆菌	99
LJ6	1441	<i>Enterobacter sp</i> (MF289158.1)	肠杆菌属	100
LJ7	1441	<i>Siccibacter colletis</i> (NR-134807.1)	/	100
LJ8	1441	<i>Enterobacter hormaechei</i> (MW582678.1)	霍氏肠杆菌	99
LJ10	1440	<i>Enterobacter sp</i> (MF289158.1)	肠杆菌属	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, LJ 为辣椒。

表6 生产所用花椒与八角主要细菌的鉴定

Table 6 Identification of main bacteria in prickly ash and aniseed used in production

原辅料	菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
花椒	HJ1	1463	<i>Thermus scotoductus</i> (NR-024867.1)	水管致黑柄热菌	99
	HJ2	1453	<i>Bacillus cereus</i> (MW559375.1)	蜡样芽孢杆菌	100
	HJ3	1454	<i>Bacillus subtilis</i> (MN330138.1)	枯草芽孢杆菌	100
	HJ4	1457	<i>Bacillus megHJterium</i> (MT925631.1)	巨大芽孢杆菌	99
八角	BJ1	1453	<i>Bacillus</i> sp (KJ944109.1)	芽孢杆菌	100
	BJ2	1448	<i>Thermus scotoductus</i> (Y18410.1)	水管致黑柄热菌	99
	BJ3	1452	<i>Bacillus atrophaeus</i> (FJ194959.1)	萎缩芽孢杆菌	99
	BJ4	1451	<i>Bacillus pumilus</i> (EU379272.1)	短小芽孢杆菌	99
	BJ5	1446	<i>Bacillus subtilis</i> (KY621524.1)	枯草芽孢杆菌	100
	BJ6	1454	<i>Bacillus megaterium</i> (MN830159.1)	巨大芽孢杆菌	100
	BJ7	1453	<i>Bacillus megaterium</i> (JX312585.1)	巨大芽孢杆菌	100
	BJ8	1451	<i>Bacillus aryabhatai</i> (MN062938.1)	阿氏芽孢杆菌	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, HJ 为花椒, BJ 为八角。

表7 生产所用芝麻和孜然主要细菌的鉴定

Table 7 Identification of main bacteria of sesame and cumin used in production

原辅料	菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
芝麻	ZM1	1452	<i>Bacillus pumilus</i> (EU379272.1)	短小芽孢杆菌	100
	ZM2	1473	<i>Pediococcus acidilactici</i> (MT158627.1)	乳酸片球菌	100
	ZM3	1448	<i>Bacillus licheniformis</i> (KT720300.1)	地衣芽孢杆菌	99
孜然	ZR1	1438	<i>Pseudomonas putida</i> (HQ162489.1)	恶臭假单胞菌	99
	ZR2	1437	<i>Siccibacter colletis</i> (KF021738.1)	肠杆菌科细菌	99
	ZR3	1440	<i>Enterobacter cloacae</i> (AB681725.1)	阴沟肠杆菌	99
	ZR4	1441	<i>Kosakonia cowanii</i> (MN833596.1)	考氏科萨克氏菌	99

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, ZM 为芝麻, ZR 为孜然。

表8 生产所用山奈中主要细菌的鉴定

Table 8 Identification of main bacteria of Sanai used in production

菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
SN1	1451	<i>Bacillus subtilis</i> (MK521066.1)	枯草芽孢杆菌	99
SN2	1451	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (JF460743.1)	甲基营养型芽孢杆菌	99
SN3	1450	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KY328743.1)	解淀粉芽孢杆菌	99
SN4	1452	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (JF496398.1)	解淀粉芽孢杆菌	99
SN5	1445	<i>Bacillus subtilis</i> (EU729126.1)	枯草芽孢杆菌	99
SN6	1451	<i>Bacillus licheniformis</i> (MT043736.1)	地衣芽孢杆菌	99

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, SN 为山奈。

#### 2.4.5 山奈中的主要细菌

从山奈中分离纯化得到6株菌, 全属于芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp), 其中 SN1 与 SN5 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[38]</sup>, SN2 为甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)<sup>[39]</sup>, SN3、SN4 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)<sup>[52]</sup>, SN6 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)<sup>[37]</sup>。

#### 2.4.6 香料中的主要细菌

从香料中分离出15株菌, 属于3个属, 其中3株 (XL6、XL7、XL11) 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[38]</sup>, 3株 (XL2、XL14、XL15) 属于 *Mixta calida*, 2株 (XL1、XL9) 热生泛菌 (*Pantoea calida*)<sup>[53]</sup>, XL4 为沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*)<sup>[54]</sup>, XL5 为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp)<sup>[45]</sup>, XL8 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)<sup>[47]</sup>, XL10 为克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)<sup>[55]</sup>, XL12 为贝莱斯芽孢杆菌

(*Bacillus velezensis*)<sup>[56]</sup>, XL12 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)<sup>[37]</sup>。

#### 2.4.7 桂皮中的主要细菌

从桂皮中分离纯化得到 12 株菌,属于 2 个属,其中 4 株(GP1、GP5、GP6、GP11)枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[38]</sup>, GP2 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)<sup>[47]</sup>, GP3 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)<sup>[52]</sup>, GP4 为甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)<sup>[39]</sup>, GP7 为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)<sup>[56]</sup>, GP8 为死亡谷芽孢杆菌

(*Bacillus vallismortis*)<sup>[57]</sup>, GP9 为栖热菌 (*Thermus scotoductus*)<sup>[41]</sup>, GP10 高地芽孢杆菌 (*Bacillus altitudinis*)<sup>[58]</sup>, GP12 为东京芽孢杆菌 (*Bacillus toyonensis*)<sup>[59]</sup>。

#### 2.4.8 生产用水中的主要细菌

从生产用水中分离 3 株菌,分别为类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp)<sup>[60]</sup>, 离中不粘柄菌 (*Asticcacaulis excentricus*)<sup>[61]</sup>, 沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*)<sup>[62]</sup>。

表 9 生产所用香料中主要细菌的鉴定

Table 9 Identification of main bacteria of fragrances used in production

菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
XL1	1441	<i>Pantoea calida</i> (LC192167.1)	热生泛菌	99
XL2	1441	<i>Mixta calida</i> (MN215912.1)	/	100
XL3	1453	<i>Pantoea</i> sp (KY194304.1)	泛菌属	99
XL4	1451	<i>Bacillus safensis</i> (MN227495.1)	沙福芽孢杆菌	99
XL5	1451	<i>Bacillus</i> sp (MG867504.1)	芽孢杆菌属	99
XL6	1453	<i>Bacillus subtilis</i> (JQ308571.1)	枯草芽孢杆菌	99
XL7	1452	<i>Bacillus subtilis</i> (MT111085.1)	枯草芽孢杆菌	100
XL8	1449	<i>Bacillus pumilus</i> (KX426046.1)	短小芽孢杆菌	99
XL9	1442	<i>Pantoea calida</i> (LC192167.1)	热生泛菌	99
XL10	1449	<i>Bacillus clausii</i> (MH305350.1)	克劳氏芽孢杆菌	100
XL11	1449	<i>Bacillus subtilis</i> (MH373533.1)	枯草芽孢杆菌	99
XL12	1452	<i>Bacillus velezensis</i> (KY962352.1)	贝莱斯芽孢杆菌	100
XL13	1445	<i>Bacillus licheniformis</i> (MT356172.1)	地衣芽孢杆菌	99
XL14	1441	<i>Mixta calida</i> (MN215912.1)	/	100
XL15	1441	<i>Mixta</i> sp (MN305767.1)	/	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, XL 为香料。

表 10 生产所用桂皮中主要细菌的鉴定

Table 10 Identification of main bacteria of cinnamon used in production

菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
GP1	1449	<i>Bacillus subtilis</i> (EU729126.1)	枯草芽孢杆菌	100
GP2	1447	<i>Bacillus pumilus</i> (KX426046.1)	短小芽孢杆菌	100
GP3	1450	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (MG548650.1)	解淀粉芽孢杆菌	99
GP4	1442	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (KR855691.1)	甲基营养型芽孢杆菌	99
GP5	1450	<i>Bacillus subtilis</i> (JQ308571.1)	枯草芽孢杆菌	99
GP6	1452	<i>Bacillus subtilis</i> (MT111085.1)	枯草芽孢杆菌	100
GP7	1454	<i>Bacillus velezensis</i> (KY962352.1)	贝莱斯芽孢杆菌	99
GP8	1454	<i>Bacillus vallismortis</i> (LC506467.1)	死亡谷芽孢杆菌	100
GP9	1443	<i>Thermus scotoductus</i> (Y18410.1)	栖热菌	99
GP10	1449	<i>Bacillus altitudinis</i> (MT225779.1)	高地芽孢杆菌	100
GP11	1449	<i>Bacillus subtilis</i> (MH100679.1)	枯草芽孢杆菌	100
GP12	1453	<i>Bacillus toyonensis</i> (MN330083.1)	东京芽孢杆菌	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, GP 为桂皮。

表 11 生产用水主要细菌的鉴定

Table 11 Identification of main bacteria in production water

菌株号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
S1	1458	<i>Paenibacillus</i> sp (JX566566.1)	类芽孢杆菌属	99
S2	1374	<i>Asticcacaulis excentricus</i> (GU199450.1)	离中不粘柄菌	99
S3	1455	<i>Staphylococcus warneri</i> (MH910124.1)	沃氏葡萄球菌	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, S 为生产用水。

表 12 腐败冷吃兔中细菌鉴定结果

Table 12 Bacteria identification results in spoilage Leng-Chi rabbits

菌株号	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
FB-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT585523.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT604781.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-3	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i> (MT585557.1)	-	100
FB-4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT613456.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-5	<i>Bacillus licheniformis</i> (MT534569.1)	地衣芽孢杆菌	100
FB-6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT409907.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT581477.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT613456.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT505647.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-10	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (MT065812.1)	-	100
FB-11	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (MT459810.1)	-	100
FB-12	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT613456.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-13	<i>Bacillus oleronius</i> (KY773585.1)	蔬菜芽孢杆菌	100
FB-14	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (KT719989.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-15	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT585400.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MF429180.1)	表皮葡萄球菌	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, FB 为腐败冷吃兔。

#### 2.4.9 腐败冷吃兔中的细菌

从腐败终点样品 (25 °C 贮藏至产生气泡、胀袋) 共筛选 16 株菌, 分属于 3 个属, 11 株 (FB-1、FB-2、FB-4、FB-6、FB-7、FB-8、FB-9、FB-12、FB-14、FB-15、FB-16) 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)<sup>[63]</sup>、1 株 (FB-5) 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)<sup>[64]</sup>、1 株 (FB-3) *Rummeliibacillus stabekisii*<sup>[65]</sup>、2 株 (FB-10、FB-11) *Bacillus paralicheniformis*<sup>[66]</sup>、1 株 (FB-13) 蔬菜芽孢杆菌 (*Bacillus oleronius*)<sup>[67]</sup>。

#### 2.5 腐败细菌与原辅料细菌同源性分析

将从腐败冷吃兔筛选得到的 16 株腐败菌和原辅料中细菌进行多序列比对, 采用 NJ 法构建系统发育树, 去除低置信度分支。根据图 2 可知, 从腐败样品中分离的芽孢杆菌属细菌 *Bacillus licheniformis*、*Bacillus paralicheniformis* 分别与芝麻 (在炒制结束时加入, 未达到完全灭菌状态) 中的细菌 *Bacillus licheniformis*、山奈中的细菌 *Bacillus licheniformis* 处于

一个分支, 且具有较高同源性, 说明了真空包装自贡冷吃兔芽孢杆菌属细菌的污染极有可能来源于辅料芝麻和山奈。芝麻含有大量的脂肪和蛋白质, 追溯生产工艺发现芝麻是先经行炒熟再在自贡冷吃兔炒制末尾时加入, 而此时炒制温度逐渐降低, 存在潜在污染风险; 山奈具有药食两用的特点, 含有丰富的活性物质, 需放置干燥通风处, 在工厂生产时可能由于储存不当而导致污染。腐败样品中葡萄球菌属细菌与生产用水中 *Staphylococcus warneri* 同源性高, 表明生产用水是冷吃兔产品葡萄球菌属细菌重要的污染来源, 通过分析发现是由于生产厂家对生产用水进行了储存, 在储存期间导致生产用水受到沃氏葡萄球菌污染。冷吃兔产品经 100 °C 杀菌处理 25 min 以后, 其贮藏期能达到 10 周, 而 *Bacillus licheniformis* 耐热性极强, 其生长不受处理时间和温度影响<sup>[68]</sup>; *Bacillus paralicheniformis* 在高温处理后, 依然有良好的耐受性, 存活率均在 60% 以上<sup>[69]</sup>; *Staphylococcus warneri* 耐热性强, 巴氏杀菌条件下不易杀死<sup>[70]</sup>。



在生产工艺中,选择带菌量少的原辅料不仅可以从源头降低微生物污染,还可以有效防止交叉污染;对原辅料进行清洗、焯水时,应选择纯净水,减少水源二次污染;通过腌制、炒制、灭菌可将原辅料中大部分细菌杀灭,但少量细菌耐受性较强,仍会导致自贡冷吃兔产品保质期不长,可针对性的对部分辅料进行灭菌后再使用。

达 7 CFU/g 以上,辣椒、孜然、香料细菌总数对数值位于 4-5 CFU/g,是自贡冷吃兔产品潜在的细菌污染源;花椒、八角、芝麻和桂皮清洁度较高,符合 GMP 规定原辅料要求;生产用水菌落总数超标,不符合企业卫生标准。从自贡冷吃兔生产所用原辅料中共分离 76 株菌,分布于 20 个属,其中芽孢杆菌属在辅料中普遍存在,从山奈中分离鉴定的 6 株菌全属于芽孢杆菌属。根据不同原辅料菌落总数从大到小为:兔肉>孜然>辣椒>香料>生产用水>山奈>八角>桂皮>花椒>芝麻;属水平数量排序为:原料肉>辣椒、孜然>香料、生产用水>花椒、八角、芝麻、桂皮>山奈;种水平数量排序为:原料肉、香料、桂皮>辣椒>八角>山奈、花椒>芝麻、孜然、生产用水。通过同源性分析,确定腐败样品中芽孢杆菌属细菌来源于芝麻、山奈,葡萄球菌属细菌来源于生产用水,原料兔肉是乳杆菌属的主要污染源。

3.2 本研究丰富了自贡冷吃兔原辅料中细菌数据库,为自贡冷吃兔微生物控制提供了理论支撑,同时也为川菜工业化产品腐败菌多样性研究提供参考。下一步研究,可根据潜在细菌污染源,在实际生产中制定合理有效的消杀措施,从源头与过程把控产品初始菌数量与种类;针对优势腐败菌,探讨合理高效的防腐保鲜技术,提高产品货架期。

参考文献

[1] 四川牧天食品有限公司.冷吃兔的制备方法:中国,CN201410204534.6[P].2014-07-23  
Sichuan PateTian Food Co., Ltd. The preparation method of cold eating rabbit: China, CN201410204534.6 [P]. 2014-07-23

[2] T/ZGZLJSQXH 1-2020,地理标志产品 自贡冷吃兔[S]  
T/ZGZLJSQXH 1-2020, Geographical Indication Products Zigong Cold Eating Rabbit [S]

[3] 李韬,袁先铃,于跃,等.不同品种兔肉营养成分与质构比较研究[J].肉类研究,2020,34(5):6-10  
LI Tao, YUAN Xianling, YU Yue, et al. Comparative study of nutritional composition and texture of meat from different rabbit breeds [J]. Meat Research, 2020, 34(5): 6-10

[4] Marco Cullere, Antonella Dalle Zotte. Rabbit meat production and consumption: state of knowledge and future perspectives [J]. Meat Science, 2018, 143: 137-146

[5] A V Antipov, Antipov A V, Prantsuz O S, et al. Methods of storing rabbit meat to ensure functional nutrition [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 548(7): 072028

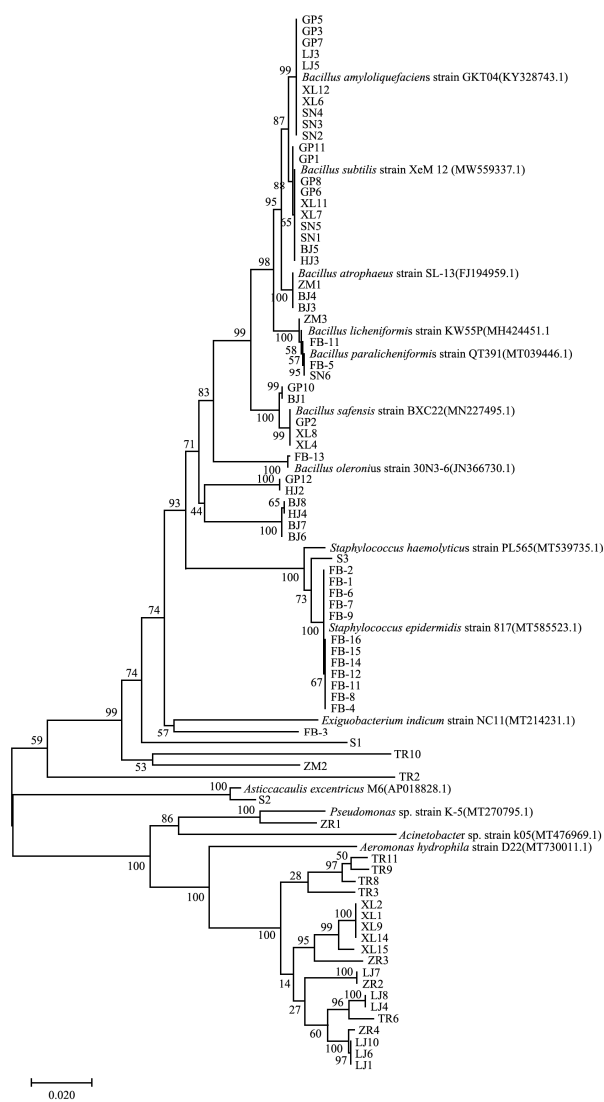


图 2 腐败细菌与原辅料细菌同源性系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of homology between spoilage bacteria and raw material bacteria

3 结论

3.1 通过对自贡冷吃兔生产所需的原料兔肉及主要辅料:辣椒、花椒、八角、芝麻、孜然、山奈、香料、桂皮、生产用水的细菌数量进行测定,采用传统培养法结合 16S rDNA 测序对其中含有的主要菌群进行鉴定,结果发现自贡冷吃兔生产所用的原料肉、辣椒、孜然、香料含菌量高,其中原料肉细菌总数对数值高

- [6] 武拉平,秦应和.2020年我国兔业生产概况及2021年发展形势展望[J].中国畜牧杂志,2021,57(3):258-262  
WU Laping, QIN Yinghe. The production profile of rabbit industry in China in 2020 and the development situation outlook in 2021 [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(3): 258-262
- [7] Szendrő Katalin, Szabó-Szentgróti Eszter, Szigeti Orsolya. Consumers' attitude to consumption of rabbit meat in eight countries depending on the production method and its purchase form [J]. Foods (Basel, Switzerland), 2020, 9(5): 654
- [8] 谢跃杰,贺稚非,李洪军.饲养因素对兔肉脂肪酸组成影响的研究进展[J].食品工业科技,2016,37(1):387-391  
XIE Yuejie, HE Zhifei, LI Hongjun. Research progress in fatty acid composition of rabbit meat affected by feeding [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(1): 387-391
- [9] Dorota Kowalska, Andrzej Gugolek, Janusz Strychalski. Evaluation of slaughter parameters and meat quality of rabbits fed diets with silkworm pupae and mealworm larvae meals [J]. Annals of Animal Science, 2020, 20(2)
- [10] 叶凤凌,池玉闽,周敏之,等.氧化对兔肉肌原纤维蛋白结构、乳化性和凝胶性的影响研究[J].食品工业科技,2020,41(24):22-30  
YE Fengling, CHI Yumin, ZHOU Minzhi, et al. Effect of oxidation on the structure, emulsification and gel ability of rabbit meat myofibrillar protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 22-30
- [11] Nadia Musco, Pietro Lombardi, Nicola Francesco Addeo, et al. Mirrors can affect growth rate, blood profile, carcass and meat traits and caecal microbial activity of rabbits reared in a "small group" free-range system [J]. Animals, 2019, 9(9): 639
- [12] 姬瑞,曹慧,徐斐,等.即食熟肉制品中主要致病菌的风险排序[J].食品科学,2015,36(11):197-201  
JI Rui, CAO Hui, XU Fei, et al. Risk ranking of main pathogenic bacteria in deli meat [J]. Food Science, 2015, 36(11): 197-201
- [13] Yang Shuran, Xiaoyan Pei, Dajin Yang, et al. Microbial contamination in bulk ready-to-eat meat products of China in 2016 [J]. Food Control, 2018, 91: 113-122
- [14] N-Horita Claudia, Rafaela C-Baptista, Magdevis Y-R-Caturla, et al. Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 72
- [15] 李冉,朱和源,叶可萍,等.气调包装狮子头冷藏过程中微生物变化及菌群结构分析[J].食品工业科技,2021,11:99-105  
LI Ran, ZHU Heyuan, YE Keping, et al. Analysis of microbial counts and bacterial community in modified atmosphere packaging meatballs [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 11: 99-105
- [16] 彭先杰,陈崇艳,袁玉梅,等.香辣仔鹅特定腐败菌的分离及鉴定[J].中国调味品,2020,45(7):39-43  
PENG Xianjie, CHEN Congyan, YUAN Yumei, et al. Isolation and identification of specific spoilage bacteria in spicy goose [J]. China Condiment, 2020, 45(7): 39-43
- [17] 李兵兵,刘纯成,侯海燕,等.灌肠类熟肉产品生产环节微生物污染风险评估[J].食品研究与开发,2016,37(22):191-195  
LI Bingbing, LIU Chuncheng, HOU Haiyan, et al. Risk assessment of microbial contamination during production of sausage [J]. Food Research and Development, 2016, 37(22): 191-195
- [18] 杨舒然,杨大进,闫琳,等.火腿肠加工过程中微生物风险研究[J].中国食品卫生杂志,2019,31(1):59-63  
YANG Shuran, YANG Dajin, YAN Lin, et al. Study on microbial contamination risk in sausage processing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 59-63
- [19] 李小成,李成国,金迪,等.南京市某食品厂酱卤熟肉制品生产加工过程微生物污染状况分析[J].中国食品卫生杂志,2019,31(5):465-469  
LI Xiaocheng, LI Chengguo, JIN Di, et al. Analysis of microbial contamination in the production process of stewed meat products in a food factory in Nanjing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(5): 465-469
- [20] GB 4789.2-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]  
GB 4789.2-2016, National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Determination of Total Bacterial Count [S]
- [21] GB 4789.35-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]  
GB 4789.35-2016, National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Examination of Lactic Acid Bacteria [S]
- [22] GB 4789.3-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验[S]  
GB 4789.3-2016, National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Enterobacteriaceae [S]

- [23] GB 4789.10-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验[S]  
GB 4789.10-2016, National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Examination of *Staphylococcus aureus* [S]
- [24] GB 5749-2006,生活饮用水卫生标准[S]  
GB 5749-2006, Hygienic Standard for Drinking Water [S]
- [25] Lekhniuk Nadiia, Fesenko Ulbolgan, Pidhirnyi Yaroslav, et al. *Raoultella terrigena*: current state of knowledge, after two recently identified clinical cases in Eastern Europe [J]. *Clinical Case Reports*, 2021, 9(5): e04089
- [26] 赵津,李朝,赵国洪,等.某猪场苍蝇体表携带细菌情况分析[J].云南畜牧兽医,2021,2:10-13  
ZHAO Jin, LI Chao, ZHAO Guohong, et al. Analysis of bacteria carried on fly body surface in a pig farm [J]. *Yunnan Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021, 2: 10-13
- [27] 朱耀磊,曲继发,桑雪,等.海产品中蜂房哈夫尼菌的鉴定及相关特性研究[J].中国食品学报,2021,21(4):295-302  
ZHU Yaolei, QU Jifa, SANG Xue, et al. Studies on the identification and characteristics of *Hafnia alvei* from seafood [J]. *Journal of Chinese Institute Of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 295-302
- [28] Martín Guerra Javier Miguel, Martín Asenjo Miguel, Dueñas Gutiérrez Carlos Jesús. Pyonephrosis by *Lelliottia amnigena* [J]. *Medicina Clinica*, 2018, 151(10): 419-420
- [29] 陈绮梨,常藕琴,张德峰,等.加州鲈源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J].南方农业学报,2021,52(2):465-474  
CHEN Qili, CHANG Ouqin, ZHANG Defeng, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Citrobacter freundii* from *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(2): 465-474
- [30] Begrem Simon, Jérôme Marc, Leroi Françoise, et al. Genomic diversity of *Serratia proteamaculans* and *Serratia liquefaciens* predominant in seafood products and spoilage potential analyses [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 354: 109326
- [31] Zhang Ren Gang, Tan Xu, Liang Ye, et al. Description of *Chishuiella changwenlii* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater, and transfer of *Wautersiella falsenii* to the genus *Empedobacter* as *Empedobacter falsenii* comb. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt\_8): 2723-2728
- [32] 田佳琪,董文龙,王巍,等.猪源解鸟氨酸拉乌尔菌分离鉴定与大环内酯耐药基因检测[J].中国预防兽医学报,2018,40(1):1-4  
TIAN Jiaqi, DONG Wenlong, WANG Wei, et al. Isolation and identification of *Raoultella ornithinolytica* and detection of macrolide resistance gene [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(1): 1-4
- [33] 张丰薇,林敏,区海蕴,等.鸡源乳酸乳球菌的分离鉴定与抑菌实验[J].江西畜牧兽医杂志,2019,3:7-10  
ZHANG Fengwei, LIN Min, OU Haiyun, et al. Isolation, identification and bacteriostatic experiment of *Lactococcus lactis* from chicken [J]. *Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 3: 7-10
- [34] 李璐瑶,刘梦佳,滕明明,等.霍氏肠杆菌生物学特性的研究[J].畜牧兽医杂志,2017,36(4):1-2,6  
LI Luyao, LIU Mengjia, TENG Mingming, et al. Study on the biological characteristics of *Enterobacter hormaechei* [J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 36(4): 1-2, 6
- [35] 叶玲清,陈伟伟,李闽真,等.福建省特殊膳食食用食品中肠杆菌科污染状况调查[J].海峡预防医学杂志,2021,27(1):73-75  
YE Lingqing, CHEN Weiwei, LI Minzhen, et al. Investigation on contamination of Enterobacteriaceae in special dietary food in Fujian province [J]. *Strait Journal of Preventive Medicine*, 2021, 27(1): 73-75
- [36] 刘琦涛,黄志艺,孙延杰,等.牛蛙致病性阴沟肠杆菌的分离、鉴定和药敏分析[J].韩山师范学院学报,2021,42(3):44-49  
LIU Qitao, HUANG Zhiyi, SUN Yanjie, et al. Isolation, identification and drug susceptibility analysis of pathogenic Enterobacteriaceae in *Rana catesbeiana* [J]. *Journal of Hanshan Normal University*, 2021, 42(3): 44-49
- [37] 布帕提买木·麦麦提,潘姣姣,阿迪莱·卡哈曼,等.地衣芽孢杆菌的分离和鉴定[J].农业与技术,2020,40(17):14-18  
Bupati Maemu-Mai Mai Ti, Pan Jiaojiao, Adilai Kahaman, et al. Isolation and identification of *Bacillus licheniformis* [J]. *Agriculture and Technology*, 2020, 40(17): 14-18
- [38] Xu Yinglei, Yu Yang, Shen Yuanyuan, et al. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers [J]. *Poultry Science*, 2021, 100(9): 101358
- [39] 张可可,席宇,吴少雄,等.甲基营养型芽孢杆菌的分离鉴定及其广谱抗菌性能初步研究[J].中国调味品,2019,44(10):31-34,45  
ZHANG Keke, XI Yu, WU Shaoxiong, et al. Isolation and identification of *Bacillus methylotrophicus* and preliminary study on its broad-spectrum antibacterial activity [J]. *China*

- Condiment, 2019, 44(10): 31-34, 45
- [40] Emily E Jackson, Naqash Masood, Khaled Ibrahim, et al. Description of *Siccibacter colletis* sp. nov., a novel species isolated from plant material, and emended description of *Siccibacter turicensis* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 4): 1335-1341
- [41] 王浩竹,王正祥.利用针对 16S rDNA 序列的限制性酶切分析鉴定栖热菌属[J].生物技术,2009,19(2):13-15  
WANG Haozhu, WANG Zhengxiang. Identification of *Thermus* to the species level using 16S rDNA gene restriction fragment patterns [J]. Biotechnology, 2009, 19(2): 13-15
- [42] Saghatelian Ani, Panosyan Hovik, Trchounian Armen, et al. Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1 [J]. Microbiology Open, 2021, 10(1): e1149
- [43] 王佰涛,权淑静,杨文玲,等.1 株蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学功能研究[J].饲料研究,2021,14:88-92  
WANG Baitao, QUAN Shujing, YANG Wenling, et al. Effects of a xylanase-producing *Bacillus cereus* on the composition and fermented products of cigar leaves [J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 14: 88-92
- [44] 方春玉,吕枫,赵兴秀,等.1 株巨大芽孢杆菌特性、解磷条件研究及其应用初探[J].环境科学与技术,2021,44(3):16-22  
FANG Chunyu, LYU Feng, ZHAO Xingxiu, et al. Research on the growth characteristics, phosphate-solubilizing conditions and application of a strain *Bacillus megaterium* [J]. Environmental Science & Technology, 2021, 44(3): 16-22
- [45] 田照辉,徐绍刚,董颖,等.6 株芽孢杆菌的分离鉴定和生物学特性[J].江苏农业科学,2021,49(13):157-161  
TIAN Zhaohui, XU Shaogang, DONG Ying, et al. Isolation and identification of six *Bacillus* strains and preliminary analysis of their biological characteristics [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(13): 157-161
- [46] 马顶虹,龚海燕,李萌萌,等.萎缩芽孢杆菌生理生化特征与检测鉴定[J].安徽农学通报,2014,20(7):33-35  
MA Dinghong, GONG Haiyan, LI Mengmeng, et al. Physiological and biochemical identification of *Bacillus atrophaeus* [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2014, 20(7): 33-35
- [47] 丁飞鸿,耿云龙,樊士德,等.抑制食源性致病菌脂肽的分离鉴定及生物学特性分析[J].食品与发酵工业,2022,48(6): 195-203  
DING Feihong, GENG Yunlong, FAN Shide, et al. Isolation and identification of lipopeptides from *Bacillus pumilus* inhibiting foodborne pathogens and analysis of its biological characteristics [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(6): 195-203
- [48] 熊乙,欧翔,贾蓉,等.阿氏芽孢杆菌应用研究进展[J].生物技术,2018,28(3):302-306  
XIONG Yi, OU Xiang, JIA Rong, et al. Research progress in application of *Bacillus aryabhatai* [J]. Biotechnology, 2018, 28(3): 302-306
- [49] Liu Ling, Yang Danlu, Zhang Zhiyu, et al. High-efficiency genome editing based on endogenous CRISPR-Cas system enhances cell growth and lactic acid production in *Pediococcus acidilactici* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021: 87(20): e0094821
- [50] Akbar Shukria, Stevens D Cole. Functional genomics study of *Pseudomonas putida* to determine traits associated with avoidance of a myxobacterial predator [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 16445
- [51] Berinson Benjamin, Bellon Eugen, Christner Martin, et al. Identification of *Kosakonia cowanii* as a rare cause of acute cholecystitis: case report and review of the literature [J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 366
- [52] 贺海滨,苏峻冬,滕凯,等.解淀粉芽孢杆菌研究进展[J].现代农业科技,2021,2:101-104  
HE Haibin, SU Jundong, TENG Kai, et al. Research progress on *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2021, 2: 101-104
- [53] Ajam Mustafa, Shokr Mohamed, Ajam Firas, et al. Rare case of implantable cardioverter defibrillator infection caused by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pantoea calida* [J]. BMJ Case Reports, 2019, 12(8): e230506
- [54] Hascoët Anne Sophie, Ripolles Avila Carolina, Cervantes Huamán Brayan R H, et al. *In vitro* preformed biofilms of *Bacillus safensis* inhibit the adhesion and subsequent development of *Listeria monocytogenes* on stainless-steel surfaces [J]. Biomolecules, 2021, 11(3): 475
- [55] Li Jialin, Jiang Luying, Cao Xue, et al. Improving the activity and stability of *Bacillus clausii* alkaline protease using directed evolution and molecular dynamics simulation [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 147: 109787
- [56] 缪伏荣,陈鑫珠,邱华玲,等.一株贝莱斯芽孢杆菌的分离与鉴定[J].中国农学通报,2021,37(18):109-116  
MIAO Furong, CHEN Xinzhu, QIU Hualing, et al. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* strain [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(18): 109-116
- [57] 乔文文,宁欣强,张蕾,等.死谷芽孢杆菌分离鉴定及其污泥减量特性[J].环境工程,2014,32(12):52-56,61

- QIAO Wenwen, NING Xinqiang, ZHANG Lei, et al. Screening and identification of a *Bacillus vallismortis* stain and analysis of its properties of sludge reduction [J]. Environmental Engineering, 2014, 32(12): 52-56, 61
- [58] Lemjiber Naima, Naamani Khalid, Merieau Annabelle, et al. Identification and genomic characterization of pathogenic *Bacillus altitudinis* from common pear trees in Morocco [J]. Agronomy, 2021, 11(7): 1344
- [59] Nour Mohamed A, ElHindawy Mohamed M, Qattan Shaza Y A, et al. Effect of graded levels of dietary *Bacillus toyonensis* and *Bifidobacterium bifidum* supplementation on growth, carcass traits and ileal histomorphometry and microbiota of growing quails [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(8): 4532-4541
- [60] 花榜清,刘振民,吴正钧,等.类芽孢杆菌抗菌物质的研究进展[J].应用化工,2018,47(7):1462-1467,1472
- HUA Bangqing, LIU Zhenmin, WU Zhengjun, et al. Research progress of antimicrobial substance produced by *Paenibacillus* [J]. Applied Chemical Industry, 2018, 47(7): 1462-1467, 1472
- [61] 王敏,尚海涛,顾军农,等.饮用水处理中活性炭池微生物风险评估[J].给水排水,2014,40(5):120-124
- WANG Min, SHANG Haitao, GU Junnong, et al. Microbial risk assessment of activated carbon pool in drinking water treatment [J]. Water & Wastewater Engineering, 2014, 40(5): 120-124
- [62] 彭先杰,黄婷婷,于跃,等.冷吃兔特定腐败菌的分离与鉴定[J].肉类研究,2019,33(5):19-23
- PENG Xianjie, HUANG Tingting, YU Yue, et al. Isolation and identification of specific spoilage organisms in cold spicy rabbit meat [J]. Meat Research, 2019, 33(5): 19-23
- [63] Curry Elyse C, Hart Ryan G, Habtu Danni Y, et al. Detection and partial characterization of extracellular inducers of persistence in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Medical Microbiology, 2021, 70(6): 1392
- [64] 于秀菊,韩小涛,李钰钰,等.地衣芽孢杆菌类细菌素的分离、鉴定及其原核表达[J].生物工程学报,2021,37(7):2453-2462
- YU Xiuju, HAN Xiaotao, LI Yuyu, et al. Isolation, identification and prokaryotic expression of a bacteriocin-like substance from *Bacillus licheniformis* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(7): 2453-2462
- [65] Tan Heng Yih, Chen Sai-Wei, Hu Shao-Yang. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 265-275
- [66] Abdelgalil Soad A, Soliman Nadia A, AboZaid Gaber A, et al. Author correction: dynamic consolidated bioprocessing for innovative lab-scale production of bacterial alkaline phosphatase from *Bacillus paralicheniformis* strain APSO [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 6071
- [67] Rodney Owusu-Darko, Mushal Allam, Arshad Ismail, et al. Comparative genome analysis of *Bacillus sporothermodurans* with its closest phylogenetic neighbor, *Bacillus oleronius*, and *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* groups [J]. Microorganisms, 2020, 8(8)
- [68] 宋萌萌,黄天然,周兴虎,等.烧鸡中产芽孢菌的分离鉴定及耐受性比较研究[J].肉类研究,2021,35(10):18-24
- SONG Mengmeng, HUANG Tianran, ZHOU Xinghu, et al. Isolation and identification of spore-forming bacteria from braised chicken and comparison of their environmental tolerance [J]. Meat Research, 2021, 35(10): 18-24
- [69] 张建新,李梦,郭祥瑞,等.产酸芽孢杆菌的筛选与生物学特性研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2021,49(5):96-103
- ZHANG Jianxin, LI Meng, GUO Xiangrui, et al. Screening and biological characteristics of an acid producing *Bacillus* strain [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2021, 49(5): 96-103
- [70] 鞠慧萍,宋白薇.沃氏葡萄球菌 VITEK 鉴定分析[J].畜牧兽医科技信息,2010,9:44
- JU Huiping, SONG Baiwei. VITEK identification and analysis of *Staphylococci walker* [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 9: 44