

基于高通量测序的紫贻贝中微生物群落分析

赵金丽, 魏婉莹, 沈春蕾, 张小利, 张宾

(浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江舟山 316022)

摘要: 为探究不同状态下紫贻贝制品表面附着的微生物菌群组成情况。本实验以新鲜紫贻贝、冻藏紫贻贝、自制紫贻贝干, 贮藏自制紫贻贝干和市售紫贻贝干为研究对象, 通过对紫贻贝表面附着微生物提取及高通量测序分析, 获得不同紫贻贝样品中微生物组成及变化情况。实验结果表明, 各样本中有效序列范围为 30066~40563 条, Operational taxonomic unit (OTU) 范围为 28~128, 其中市售紫贻贝干 OTU 数最低, 而冻藏紫贻贝 OTU 数相对较高; 新鲜紫贻贝和自制紫贻贝干中主要是嗜冷杆菌属和不动杆菌属, 冻藏紫贻贝干中主要为嗜冷杆菌属, 贮藏紫贻贝干中主要为假单胞菌属和嗜甲基菌属, 而市售紫贻贝干中优势菌群为葡萄球菌属和肠球菌属。不同状态下的紫贻贝样品的菌群组成均存在着较大距离, 表明紫贻贝状态、加工过程及贮藏销售环境等, 均对贻贝产品菌群组成产生较大的影响。研究结果可为保障紫贻贝制品的质量与安全提供参考。

关键词: 紫贻贝; 高通量测序; 微生物

文章编号: 1673-9078(2019)02-253-258

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.035

Microbial Community Analysis of Mussel (*Mytilus edulis*) Based on High-throughput Sequencing

ZHAO Jin-li, WEI Wan-ying, SHEN Chun-lei, ZHANG Xiao-li, ZHANG Bin

(Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: To explore the composition of microbial flora attached to the surface of mussel (*Mytilus edulis*) under different conditions. The fresh mussel, the frozen mussel, the stored mussel, the homemade mussel, and the commercial mussel were used as objects by microbial extraction and high-throughput sequencing analysis of the surface of mussel (*Mytilus edulis*). The composition and changes of microorganism in different samples of mussel were obtained. The experimental results showed that the effective sequence range of each sample was from 30066 to 40563, and the operational taxonomic unit (OTU) range was from 28 to 128. The OTU number of commercially available mussels was the lowest, while the OTU number of frozen purple mussels was relatively higher compared with the other samples. Based on the analysis of microorganisms, it was found that the *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were mainly found in fresh mussels and homemade mussels, and the *Psychrobacter* was detected in frozen mussels as the dominant microorganisms. In addition, the *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were confirmed as the major microorganisms in the stored mussels, while the dominant flora in the commercial mussels were found as *Staphylococcus* and *Enterococcus*, respectively. The results indicated that there were significant differences in the microbes, microbial structure, abundance and mutual proportion of the mussel samples when they were under different states. It is necessary to design different controlling techniques for different types of mussel products. The composition of the mussels under different conditions had remarkable difference, which indicated that the state of the mussels, the processing process and the storage and sales environment all had a great influence on the composition of the mussels. The results of the study can provide a reference for ensuring the quality and safety of mussel products.

Key words: mussel (*Mytilus edulis*); high-throughput sequencing; microorganism

紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 俗称“海虹”、“青口”, 其干制品称为“淡菜”, 是营养丰富的优质海产品。紫贻

收稿日期: 2018-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871871); 浙江省自然科学基金项目 (LY18C200008)

作者简介: 赵金丽 (1993-), 女, 研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏

通讯作者: 张宾 (1981-), 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工及贮藏

贝及其制品味道鲜美、营养丰富, 素有“海中鸡蛋”的美称, 深受国内外消费者喜爱。紫贻贝作为我国水产品出口创汇重要品种之一, 总产量连续多年名列世界第一, 其主要分布于黄海、渤海和东海沿岸, 并以浙江沿海资源最大。紫贻贝原料收获及加工季节性很强, 收获后经突击加工成冷冻贻贝、半干及干制贻贝等产品。贻贝制品的加工自动化程度较低, 主要以手工制

备为主,且其加工处理条件较为温和,常存在微生物危害潜在风险,控制不当时会残存部分致病微生物,致使贻贝及其加工制品存在一定的安全隐患。

目前,关于紫贻贝及其制品中微生物菌群组成及加工过程中的菌群变化情况等,尚未见相关报道。近年来,发展起来的宏基因组学技术避开了传统微生物的分离培养方法,而直接从测试样品中提取总 DNA 进行分析,能更完整地反映样品中微生物的群落特征。目前,高通量测序技术已成为了现代生命科学研究的常用技术,其实现了同时对几百万 DNA 分子的测序,达到了鉴定微生物单一基因或全基因组的目的。相比于传统的实时定量荧光聚合酶链式反应、变性梯度凝胶电泳及末端限制性片段长度多态性分析技术等,具有显著的优势^[1]。随着现代测序技术快速发展,高通量测序技术已成功应用于多个学科领域,如植物多样性,海洋和肠道环境、发酵食品、人类健康与疾病等多个方面^[2]。本研究基于高通量测序技术,研究新鲜紫贻贝干、冻藏紫贻贝干、自制紫贻贝干以及市售紫贻贝干等中微生物组成差异情况,旨在为紫贻贝及其制品中菌群组成及相关调控技术提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

TransStart FastPfu DNA Polymerase, TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 等测序用试剂, Illumina 公司; AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, AXYGEN 公司; ABIGeneAmp®9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司等。

1.2 试验分组与处理

紫贻贝样品分为:新鲜紫贻贝(直接蒸汽开壳后取得全贝肉)、冻藏紫贻贝(蒸汽开壳取得全贝肉后,置于无菌袋中, -18℃冰箱冻藏 30 d)、自制紫贻贝干(实验室条件下,将蒸汽开壳所取贝肉置于烘箱中, 30℃烘制 8 h 所得)和贮藏自制紫贻贝干(将自制贻贝干密封于无菌袋中,室温贮藏 30 d);市售紫贻贝干(市售紫贻贝干,购买后置于无菌袋内运回)。

1.3 微生物提取与分析

1.3.1 紫贻贝表面微生物提取^[3]

将以上各组贻贝样品 10 g 置于无菌锥形瓶中,加入 9 倍无菌生理盐水,在培养摇床中以 300 r/min 提取 60 min (室温),然后采用无菌纱布过滤、无菌水淋洗后,滤液以 12000 r/min 离心 10 min,将离心获得菌体

沉淀物进行微生物菌落分析。

1.3.2 紫贻贝表面微生物群落分析

将提取的贻贝表面微生物进行基因组 DNA 抽提,并利用 1%琼脂糖凝胶电泳,检测抽提的基因组 DNA。按指定测序区域,合成带有 barcode 特异引物,进行 PCR 扩增。针对 16SrRNA 基因 V3/V4 区合成特异引物,利用 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')引物进行 PCR 扩增。采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量,而后进行 Illumina Miseq 2x 300 bp 高通量测序及生物信息学分析(结果统计分析,由微生物科技(上海)有限公司协助完成)。

1.3.3 紫贻贝表面微生物信息分析

采用 MiSeq 测序平台进行数据分析。首先按照 Barcode 序列对数据进行拆分,去除 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列;采用 FLASH 对拆分好数据中每个样品的 reads 进行拼接,拼接好的序列为原始 Tags 数据(Raw Tags)^[4];根据 Qiime^[5]的 Tags 步骤,将 Raw Tags 从≤3 连续低质量值碱基数达到设定长度的第一个低质量碱基位点截断;Tags 经过截取后得到 Tags 数据集,进一步过滤掉其中连续高质量碱基长度小于 Tags 长度 75%的 Tags;经处理后得到的 Tags 序列与数据库(Gold database)进行比对(UCHIME Algorithm)^[6]检测嵌合体序列,并最终去除其中的嵌合体序列^[7],得到最终的有效数据(Effective Tags)。生物多样性和群落分析,采用 Uparse 软件(v7.0.1001)^[8]将序列按照序列相似性为 97%的阈值进行 OTUs 操作分类单元聚类。基于 OTU 聚类分析结果,进行多种多样性指数分析,以及对测序深度进行检测。基于分类学信息,在各个分类水平上进行群落结构统计^[9]。在上述分析基础上,最后进行群落结构和系统发育等统计学和可视化分析。

2 结果与分析

2.1 样品测序数据分析

采用 Illumina 高通量测序,获得不同样本原始序列数据后,再经序列优化及统计后,得到各实验组有效序列范围为 30066~40563 条,平均长度范围为 447.72~449.97 bp。对样品序列进行聚类分析,在 97%相似水平下的 OTU 生物信息统计发现,各组样品 OTU 数量范围为 28~128。其中,冻藏贻贝肉的 OTU 数量最高为 128,而市售紫贻贝干的 OTU 数量最低仅为 28。由此可知,新鲜紫贻贝经蒸汽开壳、手工剥取,

获得贻贝肉表面微生物种类相对较少。经较长时间冻藏后, 贻贝肉表面部分嗜冷微生物可能逐渐适应了低温环境, 而逐渐恢复活力而缓慢生长, 致使冻藏贻贝肉表面微生物种类明显增加^[10]。实验室自制的贻贝干制品, 表面微生物种类相对较多, 可能与实验室环境、加工器具及操作过程等有关。自制紫贻贝干制品经贮藏后微生物种类明显下降, 可能是干燥环境、低水分

活度对部分微生物有较强的抑制作用, 从而降低了微生物种类及其数量^[11]。市售紫贻贝干微生物种类相对较少, 可能由于工厂标准化加工生产、高温灭菌或添加剂部分抑菌, 添加剂使得表面微生物种类减少。(此外, 本研究中采集市售紫贻贝干样品数量有限, 后期将增加样品采集量、拓展样品代表性, 针对市售贻贝产品中微生物组成差异性进行深入分析)。

表 1 各组样品有效序列与 OTU 数量统计

Table 1 Observed valid sequence and OTU numbers in different mussels

分组	优化有效序列	碱基数量	平均长度/bp	OTU 数量
新鲜紫贻贝	32790	14728441	449.17	81
冻藏紫贻贝	34571	15480436	447.79	128
自制紫贻贝干	39762	17891609	449.97	116
贮藏紫贻贝干	30066	13461065	447.72	47
市售紫贻贝干	40563	18251413	449.95	28

表 2 各组样品的多样性指数分析

Table 2 Diversity of bacterial community in different group

分组	Ace	Chao	Coverage	Shannon	Simpson
新鲜紫贻贝	97	92	0.99	1.99	0.21
冻藏紫贻贝	133	134	0.99	2.53	0.18
自制紫贻贝干	74	59	0.99	2.02	0.21
贮藏紫贻贝干	121	123	0.99	1.98	0.24
市售紫贻贝干	30	28	0.99	1.52	0.31

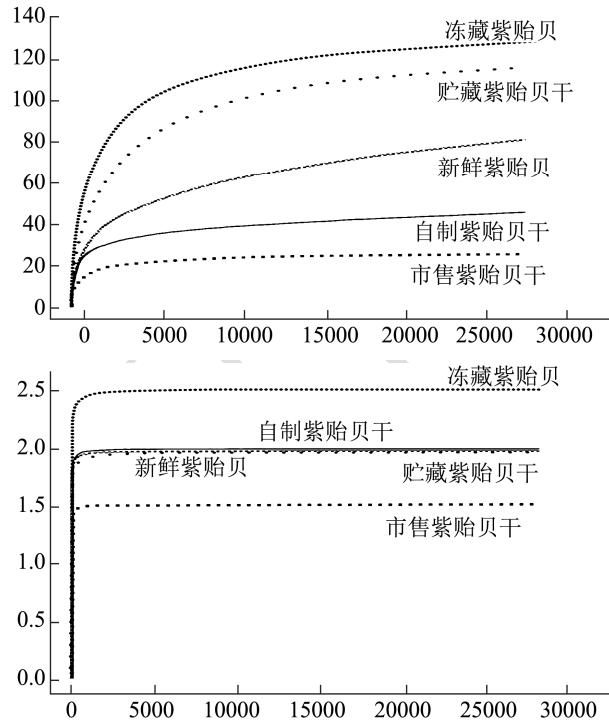


图 1 稀释曲线(左)和 Shannon-Wiener 曲线(右)分析
Fig.1 Results of the Rarefaction curves (left) and
Shannon-Wiener curves (right)

2.2 样品多样性指数分析

样本微生物多样性, 可通过单样本多样性分析 (Alpha 多样性) 反映微生物群落的丰度和多样性。表征样品菌群丰度 (Community richness) 主要有 Ace 和 Chao 指数, 表征菌群多样性 (Community diversity) 主要有 Shannon 和 Simpson 指数^[12]。此外, Coverage 代表各样本文库覆盖率, 其数值越高, 则样本中序列被测出的概率越高, 而没有被测出的概率越低, 直接反映测序结果是否代表样本中微生物的真实情况^[13]。由表 2 结果可知, 各样本测序覆盖率 (Coverage) 均在 0.99 以上, 说明测序对样本中细菌的覆盖率很高、测序深度适合, 可满足贻贝样品中细菌多样性分析的需要^[14]。

市售紫贻贝干相对于其它组样品, 其 Ace、Chao 和 Shannon 指数值最低, 而 Simpson 指数最高, 表明其菌群丰度级多样性较低, 可能是由于样品在制作过程中经过工厂灭菌处理, 已清除了一些对于温度耐受性低的菌种。相比于新鲜紫贻贝肉样品, 冻藏贻贝肉贻贝肉样品 Ace、Chao 和 Shannon 指数数值均有所上升, 同时 Simpson 指数有所下降, 说明其菌群丰富度

多样性经冻藏后有所提高。这可能是由于实际操作及冻藏过程中，贻贝肉表面残留的部分嗜冷微生物，经过一段时间低温胁迫后嗜冷微生物活力逐渐恢复，而导致紫贻贝肉表面菌群种类增加^[15]。自制的紫贻贝干经过贮藏，表现出 Ace、Chao 指数上升，而 Shannon、Simpson 指数下降，说明经过一段时间的贮藏，紫贻贝干中微生物总数有所提高，但其菌群多样性有所下降。这可能是由于紫贻贝肉经过干制后，水分活度降低，只有少数耐旱菌存活。该结果与高乾坤等^[16]报道的冷藏带鱼中微生物群落变化情况一致。

2.3 纲分类水平上的菌群样本组成分析

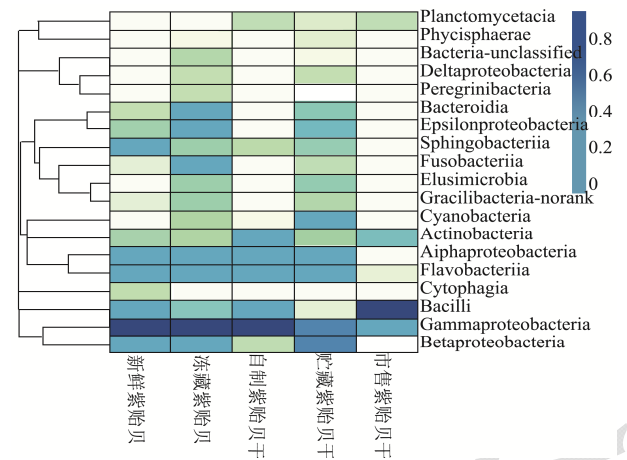


图2 不同紫贻贝样品微生物丰度聚类热图（纲水平）

Fig.2 Mcrobial community heatmap analysis at class level for different mussel

注：同一行中颜色深浅，表示该微生物在不同样品中的丰度差。

Heatmap 用颜色变化来反映二维矩阵或表格中数据信息，可直观的将数据值大小以定义颜色深浅表示出来。在 Heatmap 图上，将高丰度和低丰度物种分块聚集，通过颜色梯度及相似程度来反映多个样本群落组成相似性和差异性^[17]。从物种和样本两个层面对 OTU 进行聚类，绘制物种丰度热图，结果如图 2 所示。结果发现，紫贻贝中细菌组成在冻藏、干制等过程中发生显著变化。从整体来看，新鲜紫贻贝肉和冻藏紫贻贝菌群结构相似度较高，而自制的紫贻贝干与市售紫贻贝干菌群结构相似度较高。而自制的紫贻贝干，相比于市售的紫贻贝干，经贮藏后其表面菌群组成发生了较大变化，其原因可能与贮藏环境（如温度、湿度、外界微生物等）有关^[18]。对于菌纲丰度聚类分析发现，各组样品中微生物组成中比例较大的均为 γ -变形菌纲（*Gammaproteobacteria*）。紫贻贝肉经冻藏后，拟杆菌纲（*Bacteroidia*）、 ϵ -变形菌纲（*Epsilonproteobacteria*）及梭杆菌纲（*Fusobacteriia*）

等为代表的菌类含量有明显提升，这可能是由于上述菌类适应低温环境能力较强，在冷冻过程中菌群数量不断提升成为紫贻贝中的优势菌群。以浮霉状菌（*Planctomycetacia*）、藻类菌（*Phycisphaerae*）为代表的菌类含量几乎没有变化，在进化关系上较为相似。自制紫贻贝经贮藏后， β -变形菌纲（*Betaproteobacteria*）含量明显提升，而放线菌纲（*Actinobacteria*）、杆菌纲（*Bacilli*）含量有所减少，这可能是由于这些菌类种对较低水分活度的条件不耐受引起的。

由上可知，紫贻贝样品处于不同状态下，其优势微生物、菌群结构、丰度及相互比例，均发生了显著性变化。自制紫贻贝干的微生物种类，相对而言比新鲜紫贻贝和冻藏紫贻贝少。目前一些研究表明，水产品品质变化的过程中，仅有那些微生物数量多，生存能力强的才会起到关键作用。它们在生存过程中会产生一些小分子物质，导致贮藏过程中有异味。因此，针对于不同类型的贝类产品，需采取不同的控制条件及工艺技术，以保障贝类产品的质量与安全^[19]。

2.4 属分类水平上的物种注释及分析

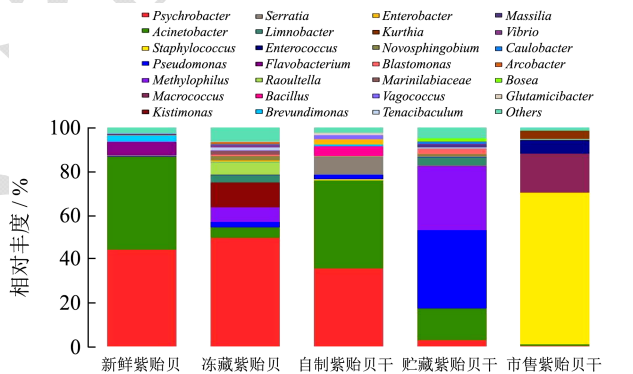


图3 不同紫贻贝样品微生物物种组成（属水平）

Fig.3 Bacterial community composition at genus level in different mussel

在属水平上（图 3），新鲜紫贻贝中的优势微生物（具有最适生活度、繁殖最快、数量最多的微生物种群）主要是嗜冷杆菌属（*Psychrobacter*）和不动杆菌属（*Acinetobacter*），还存在少量的黄杆菌属（*Flavobacterium*）。经低温冻藏后，紫贻贝表面嗜冷杆菌属相对丰度有所增加。嗜冷杆菌属为典型的耐寒性细菌类，其喜好低温环境，在南极磷虾、鲑鱼和大黄鱼等多种水产品中均有大量检出，并可随冷藏时间的延长而含量逐渐上升^[20]。在冻藏紫贻贝中，不动杆菌属的相对丰度显著下降，可能与其低温耐受性相对较弱有关。也有研究指出，不动杆菌属菌群含量可显著影响水产品腐败程度，其相对丰度增加可加速水产

品的腐败。该报道与本实验中低温冻藏显著抑制了紫贻贝中不动杆菌属增加的结果相一致。此外,冻藏紫贻贝中菌群种类数显著增多,如 *Kistimonas*、嗜甲基菌属 (*Methylophilus*)、拉乌尔菌属 (*Raoultella*) 等,其原因可能与贻贝加工环境、低温条件及潜在嗜冷菌属菌群有关,因此冷冻水产品的加工及贮藏环境,应为保障产品质量、有效控制微生物污染的重点环节。该部分研究与前面样品的 OTU、多样性指数分析结果相一致^[21]。

新鲜紫贻贝经加工制成(自制)紫贻贝干后,其表面微生物组成仍以嗜冷杆菌属、不动杆菌属为优势菌群,其与所用紫贻贝原料的原始菌群组成密切相关。同时,相比于新鲜紫贻贝,相对丰度较低、具有一定耐受低水分活度的芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 也少量存在。经室温贮藏后,自制紫贻贝干中的嗜冷杆菌属和不动杆菌属所占比例均大幅下降,主要是由于该两种菌属对低水分活度环境不耐受以及相对较高的加工温度所致。同时,假细胞菌属 (*Pseudomonas*) 和嗜甲基菌属所占比例也有大幅度上升。其中,假细胞菌属作为水产品中常见微生物,不同温度、贮藏环境及水产品加工制品中均有大量发现。此外,贮藏紫贻贝干中也有少量芽单胞菌属 (*Blastomonas*)、*Limnobacter* 新鞘脂菌属 (*Novosphingobium*)、马赛菌属 (*Massilia*) 等菌群存在^[22]。

对于市售的紫贻贝干产品,其中菌群主要包含葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、巨型球菌属 (*Macroccoccus*)、库尔特氏杆菌属 (*Kurthia*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 等。其中,葡萄球菌属分布及其广泛,并可通过空气传播、贮藏容器、销售人员及消费者手接触等多种途经、多种方式污染紫贻贝干制品,其应为市场紫贻贝干制品流通、销售过程中重点调控的目标菌群。此外,巨型球菌属、肠球菌属等菌群主要分布于自然环境及人和动物消化道内,其与产品的污染程度密切相关^[23]。由此可见,部分采用的市售紫贻贝干中,可能潜在多种肠道微生物污染情况,尤其在市场销售过程中,需重点强调其卫生状况及可能存在的接触性污染。

2.5 β 多样性分析

PCoA 分析 (Principal Component Analysis), 即主成分分析, 其通过分析不同样本 OTU (97%相似性) 组成, 可反映样本间的差异和距离。PCoA 运用方差分解, 将多组数据的差异反映在二维坐标图上。不同样本可能表现出分散和聚集的分布情况, 样本组成越

相似, 其反映在 PCoA 图中的距离越近。由结果可知 (图 4), 对于主成分 PC1-2 分析, 新鲜紫贻贝、冻藏紫贻贝和自制紫贻贝干样本较为相近, 说明在 PC1 主成分水平上其菌群特征较为相近, 该三个样品均为实验室自制, 因此在相同环境下保持着相对稳定的菌群组成关系。而自制紫贻贝与市售紫贻贝干相距较远, 也表明实验室环境与实际加工、贮藏及产品销售环境差距较大, 造成二者菌群关系差别加大。对于主成分 PC1-3、PC2-3 分析, 整体来看, 以上几组样品在该主成分水平上, 均存在着较大距离, 表明紫贻贝状态、加工过程及贮藏销售环境等, 均对贻贝产品菌群组成产生较大的影响, 因此在贻贝不同加工阶段, 应重点调控不同的优势微生物。紫贻贝加工过程中的优势微生物种类及相应的控制技术研究, 仍需进一步探索。

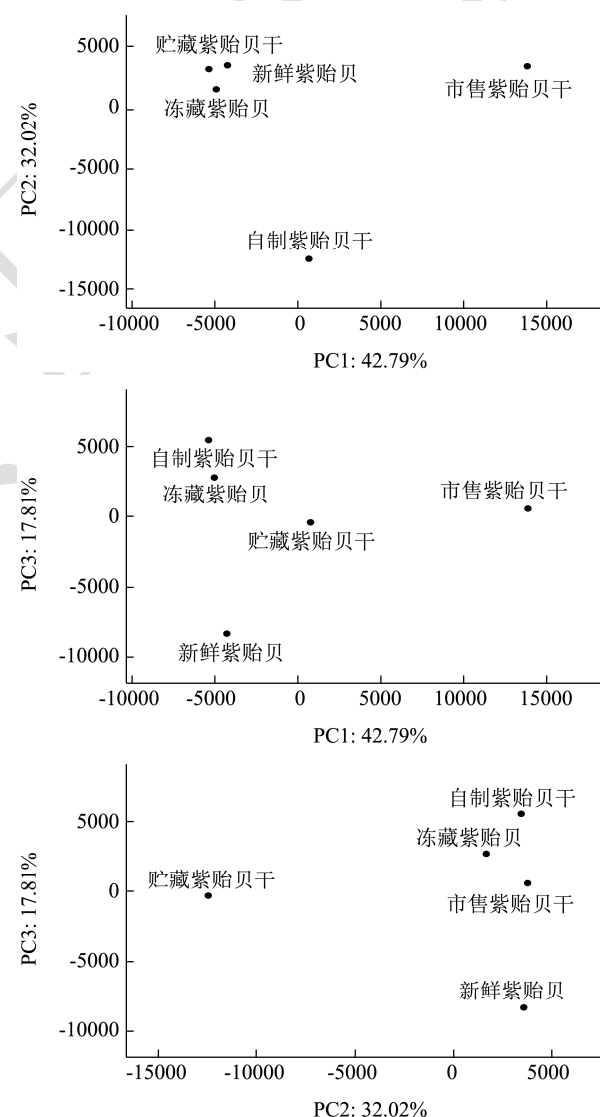


图 4 不同紫贻贝样品 PCoA 分析。

Fig.4 Principal component analysis (PCoA) for different mussel

注: PC1-2, PC1-3 和 PC2-3 分别是用前三个主要成分, 两两组合作图。

3 结论

高通量测序可详细的反映紫贻贝表面附着的微生物种类及其丰度信息。本研究以不同加工形式的紫贻贝样品为研究对象,通过微生物菌群组成对比分析发现,新鲜紫贻贝、冻藏紫贻贝、贮藏紫贻贝干和市售紫贻贝干中菌群组成差异较大,其中冻藏紫贻贝微生物主要有嗜冷杆菌属、不动杆菌属、*Kistimonas*、嗜甲基菌属、拉乌尔菌属等;贮藏紫贻贝干中主要为假单胞菌属和嗜甲基菌属;市售紫贻贝干微生物则主要为葡萄球菌属、肠球菌属,污染程度相对较高。冻藏贝肉微生物种类最多,而市售紫贻贝干微生物种类最少;需要注意的是,这几个菌属对于紫贻贝质量安全与品质保障具有重要影响作用,在加工及贮藏过程中应加以重点关注。

参考文献

- [1] 曹荣,刘洪,赵玲,等.基于高通量测序的牡蛎冷藏过程中微生物群落分析[J].农业工程学报,2016,32(20):275-280
- CAO Rong, LIU Qi, ZHAO Ling, et al. Microbial community analysis of oyster during cold storage based on high throughput sequencing [J]. Journal of Agricultural Engineering, 2016, 32(20): 275-280
- [2] Di Bj, Ba Y, Gloor G B, et al. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research [J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(3): 401-414
- [3] HU De-ke, PAN Li-qi, ZHAO Qi, et al. Transcriptomic response to low salinity stress in gills of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Marine Genomics, 2015, 24: 297-304
- [4] Mago T, Salzberg S L. Flash: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27: 2957-2963
- [5] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 7: 335-336
- [6] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27: 2194-2200
- [7] Haas B J, Gevers D, Earl A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. Genome Research, 2011, 21: 494-504
- [8] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10: 996-998
- [9] Lu X M, Lu P Z. Characterization of bacterial communities in sediments receiving various waster effluents with high-throughput sequencing analysis [J]. Microbial Ecology, 2014, 67(3): 612-323
- [10] Kakatkar A S, Gautam R K, Shashidhar R. Combination of glazing, nisin treatment and radiation processing for shelf-life extension of seer fish (*Scomberomorous guttatus*) steaks [J]. Radiation Physics & Chemistry, 2017, 130: 303-305
- [11] Miget R J. Microbiology of crustacean processing: Shrimp, crawfish, and prawns [M]. Microbiology of Marine Food Products, Springer US, 1991, 65-87
- [12] Preidis G A, Ajami N J, Wong M C, et al. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, 26(10): 1050-1057
- [13] 杨俊花,赵志辉,郭文博,等.应用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术分析脱氧雪腐镰刀菌烯醇对小鼠肠道菌群的影响[J].动物营养学报,2017,29(1): 158-167
- YANG Jun-hua, ZHAO Zhi-hui, GUO Wen-bo, et al. The effect of deoxynivalenol on intestinal flora of mice was analyzed by Illumina-MiSeq high throughput sequencing technique [J]. Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(1): 158-167
- [14] 刘柳,孔保华.温度及气调包装对冷却猪肉中单核细胞增生性李斯特菌生长的影响[J].食品科学,2008,29(1):334-337
- LIU Liu, KONG Bao-hua. Effects of temperature and atmosphere modulated packaging on the growth of *Listeria monocytogene* in chilled pork [J]. Food Science, 2008, 29(1): 334-337
- [15] 江艳华,姚琳,李凤铃,等.基于高通量测序的冷冻南极磷虾中细菌菌群结构分析[J].食品安全质量检测学报,2016,7(7): 2840-2845
- JIANF Yan-hua, YAO Lin, LI Feng-ling, et al. Analysis of bacterial flora in frozen Antarctic krill based on high throughput sequencing [J]. Journal of quality Inspection of Food Safety, 2016, 7(7): 2840-2845
- [16] 陈慧斌,孙钧政,王梅英,等.基于 16srDNA-DGGE 技术的真空包装鲢鱼片腐败菌群研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,4(1):157-162
- CHEN Hui-bin, SUN Jun-zheng, WANG Mei-ying, et al. Studies on spoilage of silver carp slices in vacuum packaging based on 16srDNA-DGGE [J]. Journal of Northwest University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2015, 41: 157-162

- [17] 孙振丽,宣引明,张皓,等.南美白对虾养殖环境及其肠道细菌多样性分析[J].中国水产科学,2016,23(3):594-605
SUN Zhen-li, XUAN Ying-ming, ZHANG Hao, et al. Diversity analysis of the culture environment and intestinal bacteria of *Penaeus vannamei* [J]. Chinese Fisheries Science, 2016, 23(3): 594-605
- [18] 曲巍,张智,马建章,等.高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响[J].食品科学,2017,38(1):214-219
QU Wei, ZHANG Zhi, MA Jian-zhang, et al. Study on the effect of probiotics on intestinal flora of mice by high throughput sequencing [J]. Food Science, 2017, 38(1): 214-219
- [19] 李仁伟,霍健聪.嵊泗贻贝冷藏过程中特定腐败菌研究及货架期模型预测[J].食品工业,2013,3:134-136
LI Ren-wei, HUO Jian-cong. Studies on specific spoilage bacteria and shelf life model prediction of mussels in Shengsi [J]. Food Industry, 2013, 3: 134-136
- [20] Romero-Isart N, Vasák M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 88(3-4): 388-396
- [21] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [22] 原林,丁长河.冷藏食品中的常见微生物及其防控[J].粮食与食品工业,2016,23(6):29-33
YUAN Lin, DING Chang-he. Common microorganisms in refrigerated foods and their prevention and control [J]. Food and Food Industry, 2016, 23(6): 29-33
- [23] 向红,周黎,廖春,等.金黄色葡萄球菌及其引起的食物中毒的研究进展[J].中国食品卫生杂志,2015,27(2):196-199
XIANG Hong, ZHOU Li, LIAO Chun, et al. Research progress of *Staphylococcus aureus* and its food poisoning [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(2): 196-1996