

DOI: 10.11766/trxb.201301210042

Sherlock MIS 系统鉴定土壤中大肠杆菌 O157:H7 的研究*

顾海萍 姚志远 张桃香 汪海珍[†] 吴建军 徐建明[†]

(浙江大学土水资源与环境研究所, 浙江省亚热带土壤与植物营养重点开放实验室, 杭州 310058)

IDENTIFICATION OF *E. COLI* O157:H7 IN SOIL USING SHERLOCK MIS

Gu Haiping Yao Zhiyuan Zhang Taoxiang Wang Haizhen[†] Wu Jianjun Xu Jianming[†]

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropical Soil and Plant Nutrition, Institute of Soil and Water Resources and Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

关键词 大肠杆菌 O157:H7; Sherlock MIS; 磷脂脂肪酸; 相似指数

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A

污水灌溉和人畜粪肥施用一直是国内外农业中有机废弃物资源化利用的重要途径, 这种现象在我国尤为普遍。然而, 生活污水含有大量细菌, 工业和医院废水更是富含各种病原体, 污泥、垃圾和粪肥均可能携带大量病原微生物和寄生虫卵。显而易见的是, 这些有害生物种群可随污水灌溉和粪肥施用进入环境中, 并通过污染土壤、水源、大气和农畜产品等途径传播或“引燃”疫情的爆发, 从而对人类健康构成危害。其中, 大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7) 就是一种危害严重的人畜共患病的病原菌, 对人的致病力较强, 每克感染载体含菌 10 个以上即引起感染^[1], 可导致患者出现剧烈腹痛, 引起出血性结肠炎甚至溶血性尿毒综合症、血栓性血小板减少性紫癜等严重的并发症^[2]。自 1982 年美国首次报道由该菌污染的汉堡包引起的出血性肠炎爆发以来, 世界上许多发达国家和部分发展中国家均发生了 *E. coli* O157:H7 感染的疫情, 该菌的感染已成为全球性备受关注的公共健康问题^[3]。因此, 快速准确地鉴定环境样品中 *E. coli* O157:H7 对于污染、疾病地防控工作具有重要意义。

E. coli O157:H7 传统的鉴定方法主要有聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术、限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)、扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 等^[4-5], 这些方法大多操作步骤复杂、比较费时、而且成本比较高。自 1963 年 Abel 率先将气相色谱应用于肠杆菌的菌体脂肪酸成分分析以来, 随着分析仪器和分析软件的逐渐成熟, 菌体脂肪酸分析已成为微生物化学分类方法的重要组成部分^[6]。磷脂脂肪酸 (Phospholipid Fatty Acid, PLFA) 是构成活体细胞膜的重要组分, 不同类群的微生物能通过不同生化途径形成不同的 PLFAs^[7]。菌体脂肪酸组成相对稳定, 不受生化反应变异及质粒丢失等因素的影响。此外, 磷脂不能作为细胞的储存物质, 一旦生物细胞死亡, 其中的磷脂化合物就会很快消失。因此, PLFA 可以代表微生物群落中“存活”的那部分群体。研究表明, 根据细胞脂肪酸的组成, 一般可通过单次试验比较准确地将微生物

* 国家自然科学基金项目 (40971255) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: mywhz@163.com, jmxu@zju.edu.cn

作者简介: 顾海萍 (1988—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为污染土壤生物修复。E-mail: guhaiping.1357@163.com

收稿日期: 2013-01-21; 收到修改稿日期: 2013-06-04

物鉴定到种的水平^[8]。基于此原理,美国 MIDI 公司开发成功的 Sherlock MIS (Microbial Identification System) 微生物鉴定自动化系统操作安全、简单、快速,实验成本也相对较低^[9]。但 Sherlock MIS 系统主要用于医学、防疫学或出入境检验检疫等领域,在土壤、农业、环境科学等领域的应用很少^[10]。Oka 等^[11]认为该系统是鉴定土壤或根际微生物的一个很好的方法。目前,有关阐述 Sherlock MIS 微生物鉴定系统应用于土壤中 *E. coli* O157: H7 鉴定方面的文献几乎为空白。为此,本文运用 Sherlock MIS 微生物鉴定系统,分析 *E. coli* O157: H7 的 PLFAs,探讨该方法对土壤中 *E. coli* O157: H7 鉴定的准确性以及培养基、活化时间、取菌量等因素对鉴定结果的影响,为监测土壤或其他环境样品中 *E. coli* O157: H7 及其污染风险提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

E. coli O157: H7 EDL933, 含有志贺样毒素 (*stx1*, *stx2*) 和肠上皮细胞微绒毛粘附抹平因子 (*eaeA*)。将菌株接种于蔬菜土壤中 25℃ 培养 25 d 后^[12],取土壤样品培养分离获得菌株并用于鉴定分析。沙门氏菌为实验室保存菌株。

1.2 培养基

Sherlock MIS 系统推荐的 TSBA1 培养基 (Trypticase Soy Broth with Granular Agar): 30 g 胰蛋白胍大豆肉汤 1 (TSB1)、15 g 粒状琼脂 (Granular agar) 和 1 L 去离子水混合加热溶解。

TSBA2 培养基 (Trypticase Soy Broth with Nutrient Agar): 30 g 胰蛋白胍大豆肉汤 2 (TSB2)、15 g 营养琼脂 (Nutrient agar) 和 1 L 去离子水混合加热溶解。

SMAC (Sorbitol MacConkey) 培养基: 称取 48.6 g 粉末状 SMAC 溶于 1 L 去离子水。

培养基均在 121℃、15 min 灭菌后使用,其中 TSB1、Granular agar 购于 BD 公司,TSB2、Nutrient agar 购于 Scharlab 公司,SMAC 购于 LAB 公司。

1.3 试剂

所有有机试剂均为 HPLC 级,购于 Scharlab 公司;无机试剂均为优级纯。根据 MIDI 公司推荐方法配制以下试剂:

皂化试剂:混合 150ml 水和 150ml 甲醇,加入 45 g NaOH,同时搅拌至完全溶解。

甲基化试剂:将 325ml 6 mol L⁻¹ 的盐酸加入到 275ml 甲醇中,混合均匀。

萃取试剂:加 200ml 甲基叔丁基醚到 200ml 正己烷中,混合均匀。

碱洗液:在 900ml 去离子水中加入 10.8 g NaOH,搅拌至完全溶解。

饱和 NaCl 溶液:在 100ml 去离子水中加入 40 g NaCl。

1.4 仪器设备

安捷伦 6890N 气相色谱仪 (氢火焰离子检测器,Agilent 19091B-102 色谱柱 (25.0 m × 200 μm × 0.33 μm))、Sherlock MIS 系统 (MIDI Inc., Newark, DE)、旋转式混合振荡仪、水浴锅、IKA Vortex Genius 3 涡旋仪、10ml 带聚四氟乙烯盖的玻璃管等。所有的玻璃器皿均需在马福炉中 400℃ 下烘烤 2 h。

1.5 试验方法

为探究 Sherlock MIS 鉴定大肠杆菌 O157: H7 的最佳条件,本试验设计了培养基,活化时间以及取菌量这 3 个可能的影响因素。土壤样品经 SMAC 培养基培养分离获得 *E. coli* O157: H7 菌株以及经 TSBA1、TSBA2 培养基进一步活化 1 次/2 次的 *E. coli* O157: H7 菌株,分别在 10 mg、40 mg 取菌量条件下进行皂化、甲基化、萃取、洗涤后,采用安捷伦 6890N 气相色谱测定分析菌株的磷脂脂肪酸种类及含量 (图 1)。此外,为进一步验证 Sherlock MIS 鉴定从土壤样品中分离获得的 *E. coli* O157: H7 的准确度与灵敏度,在最佳鉴定条件下对 *E. coli* O157: H7 和沙门氏菌纯菌株进行了鉴定。具体操作方法如下:

按照三步划线法将 *E. coli* O157: H7/沙门氏菌接种到相应的培养基上,28℃ 恒温培养箱中培养 24 h 为活化 1 次。按照 MIDI 推荐的方法,第三区取样获取的菌株脂肪酸最具代表性,故挑取该区单菌落转接相应培养基上,28℃ 恒温培养箱中培养 24 h 为活化 2 次。然后,用一次性接种环分别刮取第三区总湿重约 10 和 40 mg 的菌落至 10ml 带聚四氟乙烯盖的玻璃管中。当第三区菌株较少时,可同时选用第二区的菌株混合一起分析,对鉴定结果影响不大^[9]。在取好菌株样的玻璃管中加入 1.0ml 的皂化试剂,旋涡振荡 5 ~ 10 s,于 100℃ 的沸水浴中加热 5 min,稍冷却后振荡 5 ~ 10 s,再将玻璃管放入 100℃ 水浴中继续加热 25 min,然后冷却至室温。每个玻璃管中加入甲基化试剂 2.0ml,旋涡振荡后,放入 80℃ 水浴加热 10 min,再将玻璃管冷却至室温。

往玻璃管中加入 1.25ml 萃取试剂,旋转式混合振荡仪上温和旋转振荡 10 min 后,保留每个样品的上层有机相,下层水相吸出丢弃。每个玻璃管中加入 3.0ml 碱洗液,旋转式混合振荡仪上温和旋转振荡 5 min。静置几分钟,若两相界面不清楚,加数滴饱和 NaCl 溶液。取上层有机相用安捷伦 6890 N 气相色谱测定,在下述色谱条件下分析脂肪酸甲酯混

合物标样和待检样本:二阶程序升高柱温,170℃ 起始,5℃ min⁻¹ 升至 260℃,而后 40℃ min⁻¹ 升温至 310℃,维持 90 s;汽化室温度为 250℃、检测器温度为 300℃;载气为氢气(2ml min⁻¹)、尾吹气为氮气(30ml min⁻¹);柱前压 10.00 psi (1 psi = 6.895 kPa);进样量 1 μl,进样分流比 100:1。

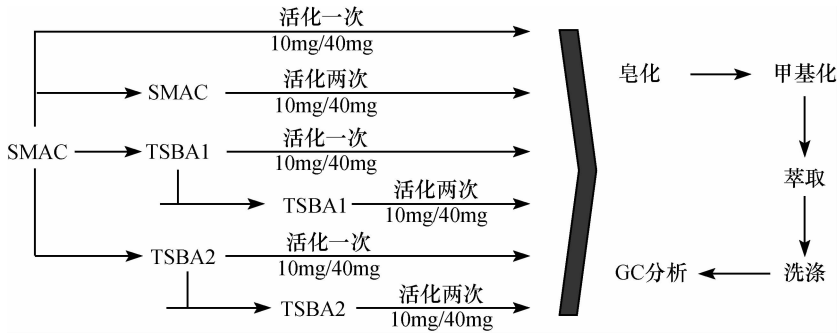


图 1 试验设计流程图

2 结果

2.1 *E. coli* O157:H7 的脂肪酸成分

土壤中分离获得的 *E. coli* O157:H7 菌株和 *E. coli* O157:H7 纯菌株的鉴定结果中所含脂肪酸共有 13 种(表 1),且方差分析发现,土壤中分离的 *E. coli* O157:H7 菌株与 *E. coli* O157:H7 纯菌株所含的磷脂脂肪酸平均含量差异不显著($p = 0.956$)。其中,本次试验菌株所含的优势脂肪酸分别有 16:0、18:1 ω 7c、Sum In Feature 3、Sum In Feature 2、14:0、17:0CYCLO、12:0,而 MIDI 数据库中肠杆菌共有的 PLFA 成分有 12:0、14:0、16:0、17:0CYCLO、Sum In Feature 2、Sum In Feature 3、Sum In Feature 8。比较发现,本试验结果中脂肪酸类型缺少 Sum In Feature 8,多了 18:1 ω 7c。但事实上,Sum In Feature 8 中包含 18:1 ω 7c,即表明本次试验菌株所含的脂肪酸几乎与 MIDI 数据库中肠杆菌共有脂肪酸成分一致。因此,Sherlock MIS 微生物鉴定系统能够比较准确地分析出土壤中 *E. coli* O157:H7 所含的主要磷脂脂肪酸。

2.2 不同因素对土壤中 *E. coli* O157:H7 的 MIS 系统鉴定结果的影响

在鉴定结果的判断上,系统根据各组分保留时间计算等链长值来确定目标组分的存在,采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量,再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算出相似指数 SI

(Similarity Index)。MIDI 操作手册指明,当鉴定结果第一选择的相似指数在 0.500 以上,其中肠杆菌科细菌可信度水平一般需 $SI \geq 0.700$ ^[6],且第一选择和第二选择的相似指数差值大于 0.100,则可以认为鉴定成功,鉴定结果为第一选择所列的菌种名;若 SI 值在 0.300 至 0.500 之间,且第一选择和第二选择的相似指数差值大于 0.100,则表明第一选择与第二选择分开,鉴定可能成功,但是第一选择所列的菌种为非典型的菌株;当 SI 值小于 0.300 时,则认为该菌株不存在于数据库中,但软件会给出一个最相关的菌株。

表 1 大肠杆菌 O157:H7 各脂肪酸的平均含量(%)

脂肪酸	<i>E. coli</i> O157:H7 纯菌	土壤中分离 <i>E. coli</i> O157:H7
16:0	28.35 ± 0.33	28.01 ± 0.25
18:1 ω 7c	24.94 ± 0.41	24.99 ± 0.08
Sum In Feature 3	17.73 ± 0.82	18.25 ± 0.06
Sum In Feature 2	8.11 ± 0.10	7.87 ± 0.19
14:0	6.75 ± 0.08	6.81 ± 0.03
17:0 CYCLO	6.46 ± 0.77	6.16 ± 0.15
12:0	3.88 ± 0.06	3.83 ± 0.05
17:0	1.12 ± 0.04	1.26 ± 0.06
unknown 14.502	0.90 ± 0.02	0.95 ± 0.02
19:0 CYCLO ω 8c	0.63 ± 0.10	0.61 ± 0.04
18:0	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.05
13:0	0.34 ± 0.02	0.41 ± 0.03
17:1 ω 8c	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.05

鉴定结果表明,培养基、活化时间以及取菌量影响了 Sherlock MIS 微生物鉴定系统对 *E. coli* O157: H7 鉴定的准确率(表 2)。土壤中培养 25 d 后分离获得的 *E. coli* O157: H7,经不同培养基培养后,其鉴定结果差异较大。Sherlock MIS 微生物鉴定系统对于 SMAC 培养基培养的 *E. coli* O157: H7 鉴定 SI 值较低,甚至出现不是 *E. coli* 的鉴定选择;使用 TSBA 培养基活化之后,鉴定准确率提高,且系统推荐的 TSBA1 培养基上的 SI 值(0.652 ~ 0.877)高于 TSBA2 (非系统推荐)的 SI 值(0.520 ~ 0.824)。说明培养基中营养琼脂的成分影响了鉴定结果。比较表 2 中 SI 值发现,40 mg 的取菌量的 SI 值明显高于 10 mg 取菌量的 SI 值,活化 2 次鉴定的 SI 值及其选择序数结果稍优于活化 1 次的结果。对鉴定结果为 *E. coli* 的 SI 值进行多因素方差分析,结果亦表明,培养基和取菌量对鉴定结果影响极显著($p < 0.001$),F 值分别为 44.09 和 25.30;而活化次数的影响未达到显著水平($F = 0.856$, $p = 0.36$)。结合本课题组之前的研究报道^[9],为获得 Sherlock MIS 微生物鉴定系统对 *E. coli* O157: H7 较高的鉴定准确率,建议 SMAC 培养基上获得的 *E. coli* O157: H7 菌株,应由 TSBA1 培养基活化 2 次后,取 40 mg 的菌株进行鉴定。

2.3 最佳条件下病原菌 MIS 系统鉴定效果

土壤中培养 25 d 后分离获得的 *E. coli* O157:

H7 菌株和 *E. coli* O157: H7 纯菌株在最佳条件下(TSBA1 培养基活化 2 次,40 mg 取菌量)的鉴定结果如表 3 所示,鉴定的相似指数 SI 值范围为 0.798 ~ 0.879,但发现 MIS 系统对土壤中分离获得的 *E. coli* O157: H7 菌株和 *E. coli* O157: H7 纯菌株的鉴定选择结果在痢疾志贺氏菌菌种(*Shigella-dysenteriae*)和大肠杆菌菌种(*E. coli*)上难以区分。这应该与本研究中所采用的 *E. coli* O157: H7 菌株含有志贺样毒素(*stx1*, *stx2*)以及志贺氏菌属(*Shigella*)和大肠杆菌(*E. coli*)的亲缘关系有关。Reeves 等^[13-14]指出,从基因序列和进化角度来看,包含痢疾志贺氏菌(*Shigella-dysenteriae*)、福氏志贺氏菌(*Shigella-flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella-boydii*)、宋内氏志贺氏菌(*Shigella-sonnei*)四个菌种的志贺氏菌属(*Shigella*)均从属于埃希氏菌属(*Escherichia*)中的大肠杆菌菌种(*E. coli*),*Shigella* 从 *E. coli* 进化而来,进化时间在 3 万 5 千年至 27 万年间。此外,方差分析发现,土壤中获取的 *E. coli* O157: H7 菌株与 *E. coli* O157: H7 纯菌株鉴定的 SI 值差异不显著, p 值为 0.993。也即表明,*E. coli* O157: H7 在供试的蔬菜土壤中培养 25 d 后,存活的菌株仍旧保持着这些毒素。因此,在蔬菜土壤中 *E. coli* O157: H7 的存活及其污染风险应该引起重视。

表 2 不同处理下细菌鉴定的相似指数(SI)

培养基	质量(mg)	活化 1 次			活化 2 次		
		样品 1	样品 2	样品 3	样品 1	样品 2	样品 3
TSBA1	10	0.875(I)	0.892(I)	0.871(I)	0.826(I)	0.861(I)	0.878(I)
		0.652(IV)	0.699(IV)	0.725(II)	0.775(III)	0.771(III)	0.740(III)
	40	0.877(I)	0.848(I)	0.865(I)	0.867(I)	0.867(I)	0.868(I)
		0.877(I)	0.848(I)	0.845(II)	0.867(I)	0.867(I)	0.851(II)
TSBA2	10	0.836(I)	0.747(I)	0.870(I)	0.818(I)	0.625(I)	0.758(I)
		0.542(VI)	0.597(II)	0.618(V)	0.657(III)	0.520(IV)	0.660(II)
	40	0.844(I)	0.854(I)	0.832(I)	0.865(I)	0.881(I)	0.888(I)
		0.751(II)	0.773(II)	0.824(II)	0.814(IV)	0.752(III)	0.747(III)
SMAC	10	0.771(I)	0.709(I)	0.747(I)	0.763(I)	0.790(I)	0.750(I)
		—	—	0.459(VI)	0.471(V)	—	0.472(IV)
	40	0.747(I)	0.733(I)	0.841(I)	0.590(I)	0.737(I)	0.733(I)
		0.515(IV)	0.493(IV)	0.560(VI)	0.515(III)	0.447(IV)	0.492(IV)

注:括号中的希腊数字为 MIS 系统给出鉴定结果的选择序数,每组结果第一行均为第一选择的 SI 值,第二行为鉴定 *E. coli* 的 SI 值。

为进一步验证此方法的准确性,取 SMAC 培养基上生长的沙门氏菌纯菌株经 TSBA1 培养基活化 2 次后,挑取 40 mg 菌株进行了鉴定分析。在检测的沙门氏菌中共得到 11~12 种不同的脂肪酸成分,优势的脂肪酸分别为 16:0(占 29.61%),18:1 ω 7c(占 22.30%), Sum In Feature 3(占 17.96%), 17:0CYCLO(占 9.71%), Sum In Feature 2(占 8.16%),14:0(占 6.86%),12:0(占 3.66%),均属于 MIDI 数据库中肠杆菌共有的磷脂脂肪酸成分。此外,由表 3 可见,MIS 系统鉴定结果第一选择均达到沙门氏菌属(*Salmonella*)水平,鉴定的相似指数 SI 值达 0.815~0.933。因此,若从土壤、水体或食

品等样品中分离得到了沙门氏菌,在最佳鉴定条件下,MIS 系统能准确的将其鉴定到属的水平。另值得注意的是,虽然病原菌 *E. coli* O157:H7 与沙门氏菌鉴定结果的相似指数 SI 值均大于 0.700,但第一选择与第二选择相似指数 SI 值之差小于 0.1。试验结果亦即说明,Sherlock MIS 微生物鉴定系统对病原菌 *E. coli* O157:H7 与沙门氏菌在菌种或亚种水平上的鉴定灵敏度还不够高。宋红梅等^[6]研究结果也表明,应用气相色谱技术和 MIS 数据分析系统可准确、方便地将沙门氏菌鉴定到属,但在菌株鉴定方面需结合传统形态、生化反应结果来判断。

表 3 最佳处理条件下获得的病原菌的鉴定结果

病原菌	平行样品	鉴定结果	相似指数	
土壤中分离 获得的 <i>E. coli</i> O157:H7 菌株	1	<i>Shigella-dysenteriae</i> (与 <i>E. coli</i> DNA 同源性高)	0.867	
		<i>Enterobacter-cloacae</i>	0.854	
	2	<i>Salmonella-choleraesuis-choleraesuis</i> -GC subgroup A	0.801	
		<i>Shigella-dysenteriae</i> (与 <i>E. coli</i> DNA 同源性高)	0.867	
		<i>Enterobacter-cloacae</i>	0.860	
		3	<i>Salmonella-choleraesuis-choleraesuis</i> -GC subgroup A	0.809
	<i>Enterobacter-cloacae</i>		0.868	
		<i>Shigella-dysenteriae</i> (与 <i>E. coli</i> DNA 同源性高)	0.851	
		<i>Salmonella-choleraesuis-choleraesuis</i> -GC subgroup A	0.813	
	<i>E. coli</i> O157:H7 纯菌株	1	<i>Shigella-dysenteriae</i> (与 <i>E. coli</i> DNA 同源性高)	0.879
			<i>Enterobacter-cloacae</i>	0.856
			<i>Salmonella-choleraesuis-choleraesuis</i> -GC subgroup A	0.798
2			<i>Escherichia-coli</i> -GC subgroup F (与 <i>Shigella</i> DNA 同源性高)	0.833
		<i>Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae</i> -GC subgroup B	0.826	
3		<i>Shigella-dysenteriae</i> (与 <i>E. coli</i> DNA 同源性高)	0.808	
		<i>Shigella-dysenteriae</i> (与 <i>E. coli</i> DNA 同源性高)	0.870	
		<i>Enterobacter-cloacae</i>	0.869	
		<i>Salmonella-choleraesuis-salamae</i>	0.815	
沙门氏菌纯菌株		1	<i>Salmonella-choleraesuis-choleraesuis</i> -GC subgroup A	0.933
			<i>Leclercia-adeboxylata</i>	0.837
		2	<i>Salmonella-typhimurium</i> -GC subgroup A	0.812
	<i>Salmonella-bongori</i>		0.871	
		<i>Escherichia-coli</i> -GC subgroup B (与 <i>Shigella</i> DNA 同源性高)	0.808	
		<i>Enterobacter-aerogenes</i> -GC subgroup A	0.804	
	3	<i>Salmonella-typhi</i> -GC subgroup B(需其他试验证实)	0.815	
		<i>Salmonella-bongori</i>	0.811	
		<i>Enterobacter-aerogenes</i> -GC subgroup A	0.809	

3 结 论

研究表明,用 Sherlock MIS 微生物鉴定系统鉴定土壤、水体或食品等样品中分离得到的病原菌 *E. coli* O157: H7 或沙门氏菌时,在系统推荐的 TSBA1 培养基上活化 2 次后 40 mg 取菌量条件下的鉴定效果最好,*E. coli* O157: H7 能鉴定到大肠杆菌菌种 (*E. coli*) 的水平,沙门氏菌能准确鉴定到属的水平。若要准确区分病原菌菌种或亚种,该鉴定方法需进一步结合菌落色谱图特征、菌落形态以及生理生化等特性进行综合判断。另值得注意的是,培养 25 d 后蔬菜土壤中存活的 *E. coli* O157: H7 仍保持着志贺样毒素,其污染风险应该引起重视。

参 考 文 献

- [1] Griffin P M, Tauxe R V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, 1991, 13(1): 60—98
- [2] Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5(5): 607—625
- [3] 孟祥升,辛崇兴,邵晔. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 研究进展. *中国动物检疫*, 2011, 28(11): 69—71
- [4] Radu S, Ling O W, Rusul G, et al. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J Microbiol Meth*, 2001, 46(2): 131—139
- [5] Zhao S, Mitchell S E, Meng J, et al. Genomic typing of *Escherichia coli* O157: H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. *Microbes Infect*, 2000, 2(2): 107—113
- [6] 宋红梅,李波,李丽婕,等. 气相色谱法分析沙门氏菌脂肪酸组成的研究. *现代预防医学*, 2009, 36(22): 4324—4326
- [7] 张建栋,王梦亮,刘滇生. PLFA 方法对堆肥化过程中微生物群落结构变化的影响. *安徽农业科学*, 2006, 34(3): 534—535
- [8] 王秋红,蓝江林,朱育菁,等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用. *福建农业学报*, 2007, 22(2): 213—218
- [9] 吴愉萍,徐建明,汪海珍,等. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究. *土壤学报*, 2006, 43(4): 642—647
- [10] 黄朱梁,裘迪红. MIDI Sherlock 微生物自动鉴定系统鉴定方法的建立. *宁波大学学报*, 2011, 24(2): 8—13
- [11] Oka N, Hartel P G, Finlay-Moore O, et al. Misidentification of soil bacteria by fatty acid methyl ester (FAME) and BIOLOG analyses. *Biol Fert Soils*, 2000, 32: 256—258
- [12] Yao Z Y, Wei G, Wang H Z, et al. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in soils from vegetable fields with different cultivation patterns. *Appl Environ Microb*, 2013, 79(5): 1755—1756
- [13] Lan R, Reeves P R. *Escherichia coli* in disguise: Molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect*, 2002, 4: 1125—1132
- [14] Pupo G M, Lan R, Reeves P R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *P Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19): 10567—10572

(责任编辑:檀满枝)