

食品污染克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)的分离及鉴定

董晓晖^{1,2,3#}, 李程思^{1#}, 吴清平^{1*}, 张菊梅¹, 莫树平¹, 郭伟鹏¹, 杨小鹏¹, 徐晓可¹

¹广东省微生物研究所, 广东省华南应用微生物重点实验室一省部共建国家重点实验室培育基地, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

²中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】对 300 份奶粉样品和 50 份非奶粉类食品中克罗诺杆菌的污染情况做定量检测, 并对分离得到的克罗诺杆菌进行鉴定。【方法】通过分子方法和 9 管法对奶粉和其他食品中克罗诺杆菌的污染情况做定量检测; 通过吲哚产生、丙二酸盐利用、卫矛醇、肌醇、松三糖和松二糖发酵产酸等六种生化试验对分离株进行鉴定; 同时对分离株的 16S rRNA 基因序列进行同源性分析, 通过 N-J (Neighbour-Joining) 法构建系统发育树。【结果】定量检测结果表明, 350 份样品中有 23 份样品分离出克罗诺杆菌, 共分离到 24 株克罗诺杆菌, 检出率为 6.6%; 23 份受污染样品中有 4 个样品的克罗诺杆菌大于 100 MPN/100g; 24 株克罗诺杆菌被鉴定到种或亚种, 其中 19 株为阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*); 2 株为丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*); 2 株为都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种 (*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*); 1 株为莫金斯科罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)。【结论】分子方法和 9 管法联用适合污染率低而定量检测要求高的克罗诺杆菌的奶粉调查; 采用生化和分子生物学方法将 24 株分离株鉴定到种或亚种, 其中阪崎克罗诺杆菌为优势种; 奶粉中克罗诺杆菌的污染问题对婴幼儿安全存在隐患, 应引起消费者和有关部门的重视。

关键词: 克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌), 生化谱, 16S rRNA 基因, 系统发育树

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 05-0429-08

克罗诺杆菌 (*Cronobacter*) 原来称为阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)。该属的细菌是生活于人和动物肠道内的兼性厌氧革兰阴性杆菌, 隶属于肠杆菌科。婴幼儿是克罗诺杆菌感染的高危人群, 感染主要引起菌血症、脑膜炎、坏死性小肠结肠炎等, 致死率高达 40%–80%^[1]。该属现今包括 7 个种, 分别为阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*)、丙二

酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*C. turicensis*)、莫金斯科罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌 (*C. condimenti*)、尤尼沃斯科罗诺杆菌 (*C. universalis*) 和都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*)。其中, 都柏林克罗诺杆菌包括 3 个亚种, 分别是都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种 (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*), 都柏林克罗诺

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010B020316003); 广州市科技计划项目 (2010U1-E00611)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

作者简介: #共同第一作者。董晓晖 (1980–), 女, 河北保定, 博士研究生, 从事食品微生物安全研究, E-mail: dongxiaohuihebei@126.com; 李程思 (1980–), 男, 广东化州, 助理工程师, 从事食品微生物安全研究, E-mail: bamboo.0000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-11-04; 修回日期: 2012-12-27

杆菌奶粉亚种 (*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*) 和都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种 (*C. dublinensis* subsp. *lausannensis*) [2-3]。

作为一种致病剂量较低的食源性致病菌 [4-5], 克罗诺杆菌在婴幼儿奶粉、肉类、水、蔬菜等多种食品中被检测到 [6-7], 其中奶粉是该菌的主要感染渠道。因此定量调查以奶粉为主的食品中的克罗诺杆菌, 通过对分离株的鉴定, 获得食品中各种克罗诺杆菌的定量污染数据, 可有的放矢的防控其污染。本研究通过 9 管法对奶粉、低温鲜奶、肉类制品和蔬菜等食品中的克罗诺杆菌进行定量检测, 并对分离株进行了生化分类和 16S rRNA 基因序列同源性分析, 从而建立食品污染克罗诺杆菌株的准确快速鉴定方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 本实验所用生化反应质控菌株购自广东环凯微生物有限公司, 其特性见表 1, 标准菌株 (*C. sakazaki* ATCC 29544 和 *C. mytjensii* ATCC 51329) 由广东省微生物研究所第一检测室提供。

表 1. 质控菌株的特性及用途

Table 1. Characteristics of quality control strains

Strains	Characteristics
<i>Salmonella typhimurium</i> CMCC 50115	Dulcitol +
<i>Salmonella enteric</i> CMCC 50071	Dulcitol -
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Melezitose +
<i>Streptococcus pneumomae</i> CMCC 31001	Melezitose -
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Malonate +
<i>Proteus vulgaris</i> CMCC 49027	Malonate -
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Indole +
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Indole -
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Turanose +
<i>Staphylococcus xylosum</i> HK 5091	Turanose -
<i>Klebsiella pneumonia</i> CMCC (B) 46117	myo-inositol +
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	myo-inositol -

+ : utilize or produce the chemical compound; - : neither utilize nor produce the chemical compound.

1.1.2 主要培养基和试剂: 缓冲蛋白胨水 (buffered peptone water, BPW)、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin, mLST-Vm)、克罗诺杆菌显色培养基、营养肉汤、营养琼脂、对二甲氨基苯甲醛试剂、卫矛醇、松二糖、松三糖、丙二酸盐和蛋白胨水生化试验

管均购自广东环凯微生物科技有限公司。细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、2 × PCR DSMix 均购自东盛生物工程有限公司。API 20E 鉴定试剂盒购自广州千江生物科技有限公司。

1.1.3 引物: 表 2 是本研究中使用的引物, 所有引物委托北京华大基因有限公司合成。

表 2. 本研究所用引物

Table 2. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
<i>OmpA-F</i>	GGATTTAACCGTGAACCTTTTCC	22
<i>OmpA-R</i>	CGCCAGCGATGTTAGAAGA	19
ITS-F	GGTTGTCTGCGAAAGCGAA	20
ITS-R	GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG	20
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20
1492R	GGCTACCTTGTTACGACTT	19

1.2 样品采集

本次调查共采集 300 份奶粉样品和 50 份非奶粉样品。50 份非奶粉样品包含蔬菜样品 10 份 (2 份香菜、2 份番茄、6 份新鲜菌类), 凉拌粉面 4 份, 肉类样品 30 份 (10 份速冻水饺、10 份冻肉、10 份卤肉), 盒装鲜奶 6 份。300 份奶粉样品的采集和保存在常温条件下进行; 50 份非奶粉样品采集后, 放于无菌密封袋内低温运回实验室马上进行样品检测。

1.3 样品检测

300 份奶粉样品首先利用本实验室建立的双重 PCR 方法进行初步筛查 [8], 分子方法检测为阳性的样本再通过 9 管法进行定量, 增菌过程参考 GB 4789.40—2010 的阪崎肠杆菌检验。分子方法的具体步骤为: 称取 100 g 奶粉样品加入已装有 900 mL BPW 的三角瓶中充分溶解, 置于 37℃ 培养 18 h; 移取 1 mL BPW 培养物至 10 mL mLST-Vm 肉汤, 44℃ 培养 24 h; 取 1 mL mLST-Vm 的增菌培养物提取 DNA, 进行双重 PCR 检测。奶粉样品的 9 管法具体步骤为: 无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各 3 份, 加入分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 的三角瓶中充分溶解, 制成 1:10 样品匀液, 置 37℃ 培养 18 h; 分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤, 44℃ 培养 24 h; 混匀 mLST-Vm 肉汤培养物, 各取增菌培养物 1 环, 划线接种于克罗诺杆菌显色培养基平板, 37℃ 培养 24 h; 在长有蓝绿色菌落的显色培养基上挑取 1-3 个蓝绿色典型菌落进行纯化, 纯化后的菌株利用 API 20E 鉴定试剂盒进行鉴定, 同一样品 API 20E

鉴定码相同的分离株只保存 1 株, 需要保存的分离株用 15% 的甘油保菌, 放于 -80°C 保藏。

50 份非奶粉样品用 9 管法进行定量检测, 具体步骤为: 取 25 g (mL) 样品加入已装有 225 mL mLST-Vm 肉汤的无菌均质袋中拍打混匀, 制成 1:10 的样品匀液, 取 1:10 样品匀液 1 mL 至 9 mL 的 mLST-Vm 肉汤中, 制成 1:100 的样品匀液, 按照上述方法制成 1:1000 的样品匀液; 将 3 种浓度 (1:10、1:100 和 1:1000) 的样品匀液各 3 管 (10 mL/管), 即检样量为 1 g (mL)、0.1 g (mL)、0.01 g (mL) 的各 3 管, 放于 44°C 培养 24 h; 划线显色培养基、纯化、鉴定和保种与奶粉样品的 9 管法相同。

1.4 克罗诺杆菌定量检测记录

奶粉 9 管法的定量检测记录参考 GB 4789.40-2010 的 MPN 表, 单位为 MPN/100 g; 非奶粉样品 9 管法的定量检测记录参考 GB 4789.7-2008 副溶血性弧菌检验的 MPN 表, 检样量为 1 g (mL)、0.1 g (mL)、0.01 g (mL) 的 MPN 值, 单位为 MPN/g (mL)。

1.5 克罗诺杆菌生化试验

分别从冷冻甘油保菌溶液中接种所有供试菌株 (包括生化反应质控菌株、克罗诺杆菌标准菌株和分离株) 于营养肉汤中, 37°C 过夜复壮, 将过夜培养物划线于 NA 平板, 置 37°C 培养 20 h, 从 NA 平板上挑取纯培养物, 用 0.85% 无菌生理盐水稀释至 5McFarland (约 10^9 cfu/mL) 制成菌悬液, 各吸取 2 滴 (约 60-100 μL) 菌悬液分别加入需要测试的生化反应管中, 加入灭菌蒸馏水作为空白对照。

将所有的生化试验管置于 37°C 培养箱中培养 24 h, 记录颜色变化情况。其中蛋白胨水生化试验管要另外滴加对二甲氨基苯甲醛试剂再记录颜色变化。生化试验重复 3 次, 以确保结果准确可靠。

1.6 DNA 提取

将需要提取的培养物于 $13400 \times g$ 离心 1 min, 收集菌体, 用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取菌株 DNA, 将提取的基因组 DNA 放于 -30°C 保存备用。

1.7 PCR 扩增

奶粉样品的双重 PCR 检测采用 ITS 和 *ompA* 两对引物进行扩增^[8]; 克罗诺杆菌分离株的 DNA 采用细菌 16S rRNA 基因测序通用引物对 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增和测序^[9]。PCR 扩增在 Biometra

T3000 PCR 仪上进行, 反应体系: $2 \times \text{PCR DSMix}$ 25 μL , 每个引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 4 μL , DNA 模板 2 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL 。反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 UVP 凝胶成像系统下成像观察。

1.8 序列测定及同源性分析

有扩增条带的 16S rRNA PCR 产物送于华大基因测序, 以 27F 和 1492R 引物为测序引物, 对扩增产物进行正反链双向测序; 双向序列经 Vector NTI Suite8 软件拼接后提交至 GenBank 获得登录号。

从网上下载 17 株克罗诺杆菌属中不同种及 10 株克罗诺杆菌属以外的其他菌种的 16S rRNA 基因序列, 将上述下载序列与本实验得到的序列进行同源性分析, 用 MEGA Version 5.0 构建系统发育树: 按照 N-J (Neighbour-Joining) 法, 基于 Kimura 双参数模型, 以下载的克罗诺杆菌属以外的其他菌种的 16S rRNA 基因序列为外群 (outgroup), 经 Bootstrap (1000 次自检) 检测系统树可靠性。

2 结果

2.1 食品中的克罗诺杆菌污染情况

300 份奶粉样品中, 18 份样品 (6%) 经双重 PCR 扩增出克罗诺杆菌特异的 ITS 和的 *ompA* 基因片段。用 9 管法定量检测, 在其中的 15 份样品 (5%) 中分离到克罗诺杆菌菌株。在未分离到克罗诺杆菌株的 3 个样品中, 扩增的 *ompA* 条带经测序比对确定为克罗诺杆菌。

50 份非奶粉样品中 8 份样品检出克罗诺杆菌, 检出率为 16%; 其中有 1 份卤肉样品 (卤猪肉) 检出了两种克罗诺杆菌。不同样品的检出率见表 3, 不同样品的 MPN 值见表 4。

表 3. 食品中克罗诺杆菌的检出情况

Table 3. Occurrence of *Cronobacter* strains in food

Category of food	Sample number	Sample numbers with <i>Cronobacter</i> isolates detected	Overall% positive samples
Milk powder	300	15	5
Vegetable	10	3	30
Cold noodles with sauce	4	1	25
Meat product	30	4	13.3
Fresh milk	6	0	0
Total	350	23	6.6

2.2 生化反应鉴定结果

通过吲哚产生反应、丙二酸盐利用实验、卫矛醇发酵产酸、肌醇发酵产酸、松三糖和松二糖发酵产酸生化反应可将分离株鉴定到种,从图1中的生化反应可以看出本实验的24株分离株呈现六种生化谱类型(A-F型)。A、B型为阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)的生化谱;C型为丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)的生化谱;D型为莫金斯科罗诺杆菌(*Cronobacter muytjensii*)的生化谱;E型为都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种(*Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi*)的

生化谱;F型生化谱在 Iversen 的分类系统中未能归类。在24株分离株中,15株为A型;4株为B型;2株(PM199和SZJ280)为C型;1株为D型,被命名为*Cronobacter muytjensii* ZJN392B3;1株为E型,被命名为*Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* ZCC207(表4);1株(ZCC202)为F型,因F型的生化反应在现有的分类系统中未能归类,因此分离株ZCC202未能准确命名。模式菌株*C. sakazaki* ATCC 29544和*C. muytjensii* ATCC 51329分属于A型和E型,这与文献报道的一致^[10]。

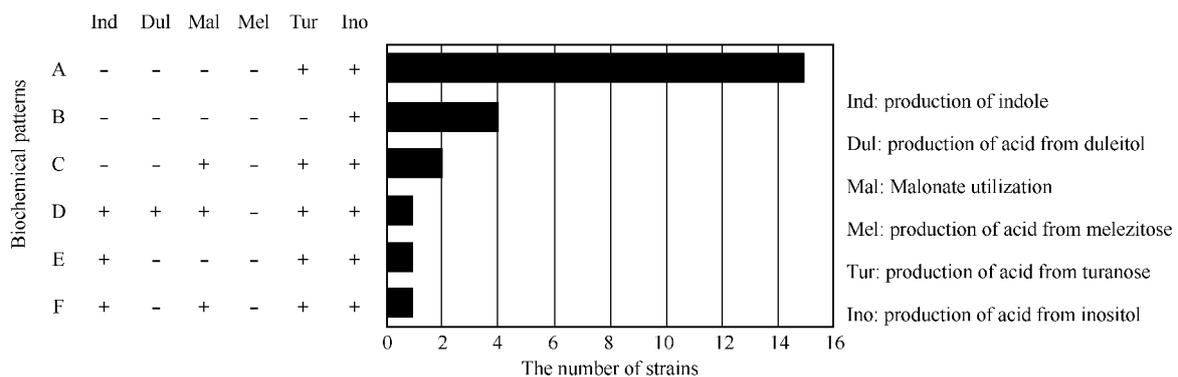


图1. 24株克罗诺杆菌的生化反应谱

Figure 1. Biochemical patterns of 24 *Cronobacter* isolates.

本研究共得到24株克罗诺杆菌分离株,其中奶粉来源的有15株,与其他食品分离株相比所属类群较单一;在生化谱试验中,除1株*C. malonaticus* PM199外,其余14株均为*C. sakazakii*;而这14株*C. sakazakii*分离株中,有11株属于A型生化谱,3株属于B型生化谱。

质控菌株的生化反应符合其生化特征,因此本研究的生化反应管质量良好,生化反应结果可信。克罗诺杆菌分离株的生化反应谱见图1,不同分离株所属的生化反应谱类型见表4。

2.3 基于16S rRNA基因序列构建系统发育树

本实验将24株菌的16S rRNA基因和GenBank上下载相关菌株的16S rRNA基因序列构建了系统发育树(图2)。图2显示,这24株菌属于3个类群,21株属于Group 1,2株属于Group 2,1株属于Group 5。根据16S rRNA基因序列相似性在97%以上的两株菌通常认为属于同一个种^[10],本研究中的

C. dublinensis subsp. *lactaridi* ZCC207分离株和生化试验未能鉴定的分离株ZCC202与其他分离株的相似性在96.9% - 98.0%之间,两株菌的序列相似性为99.0%,表明分离株ZCC202与分离株ZCC207属于同一个种;根据两株菌均与模式菌株*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* E464 (EF059838)聚于系统发育树的Group 2中,因此将分离株ZCC202命名为*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*。

从图2可以看出,16S rRNA基因同源性将克罗诺杆菌属的7个种分成6个类群(Group 1 - Group 6)。*C. turicensis*、*C. muytjensii*、*C. dublinensis*、*C. condimenti*和*C. universalis*五个种通过16S rRNA基因同源性区分,而*C. sakazakii*和*C. malonaticus*的16S rRNA基因同源性高,均位于系统发育树的Group 1^[9,11],因此16S rRNA基因同源性无法分辨它们,需要结合生化试验鉴定。

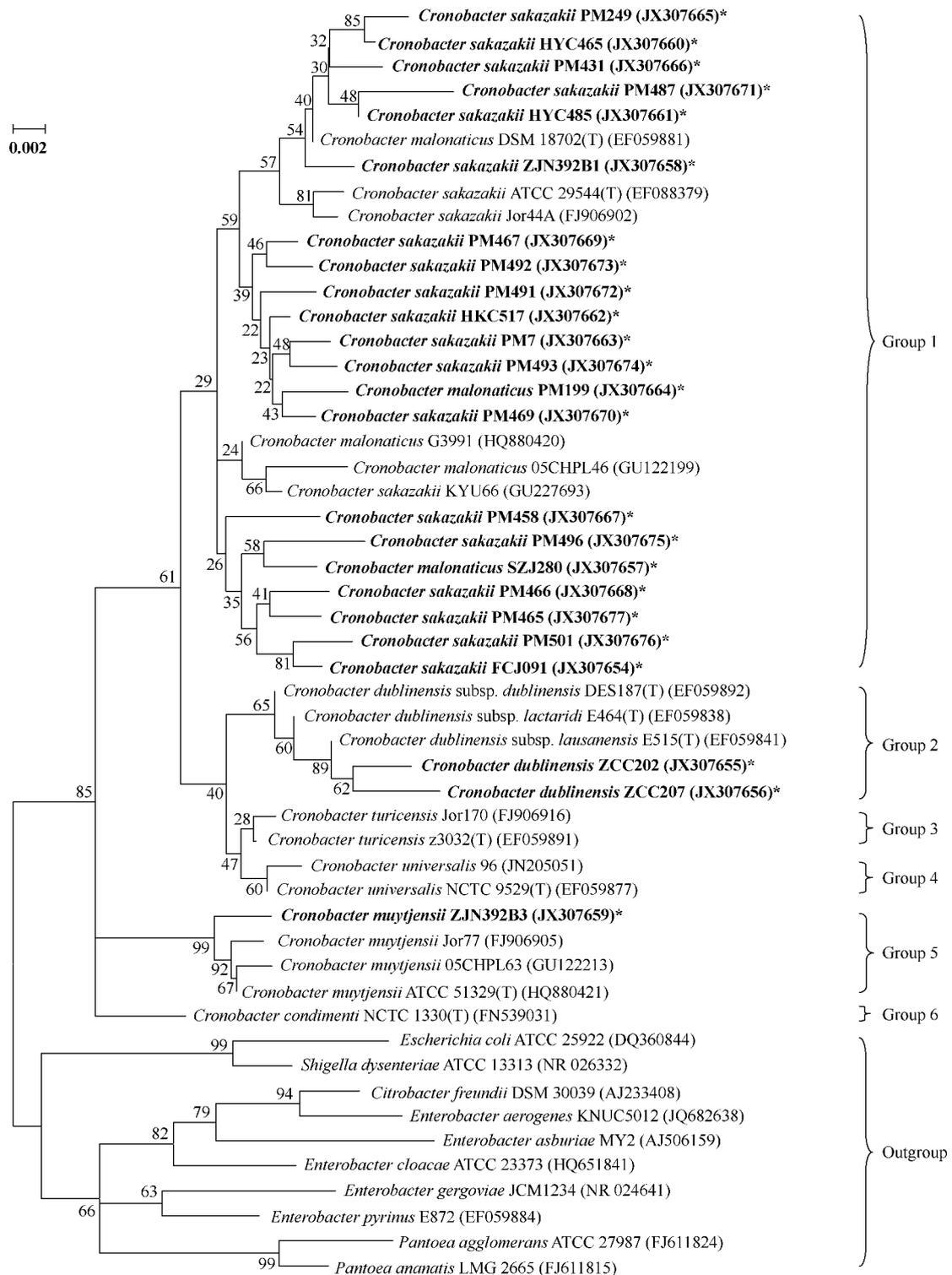


图 2. 基于 16S rRNA 基因序列构建的克罗诺杆菌系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of the new isolates and related species in the genus *Cronobacter* based on the 16S rRNA gene sequences. Number on the branch indicated the credibility level of this branch in Bootstrap. Scale length, 0.002, is substitutions per residue. GenBank accession numbers of sequences are shown in the figure after the science name of each host. * Identification numbers of strains sequenced in this study.

表 4. 食品中克罗诺杆菌的 MPN 值及其鉴定结果

Table 4. Identification and MPN of *Cronobacter* strains in the tested food

Strain number	Isolation source	MPN	Biochemical patterns	16S rRNA gene group	Species
FCJ091	Needle mushroom	9.3 MPN/g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
ZJN392B1	Cooked pork	46 MPN/g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
HYC485	Oyster mushroom	0.3 MPN/g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
HKC517	Frozen mutton	0.36 MPN/g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM7	Powdered milk	3.6 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM458	Powdered milk	3.6 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM466	Powdered milk	29 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM469	Powdered milk	3.6 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM487	Powdered milk	46 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM491	Powdered milk	110 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM492	Powdered milk	110 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM493	Powdered milk	9.3 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM496	Powdered milk	3.6 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM501	Powdered milk	3.6 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM465	Powdered milk	> 110 MPN/100 g	A	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
HYC465	Frozen dumplings	0.3 MPN/g	B	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM249	Powdered milk	3.6 MPN/100 g	B	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM431	Powdered milk	24 MPN/100 g	B	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM467	Powdered milk	24 MPN/100 g	B	Group 1	<i>Cronobacter sakazakii</i>
PM199	Powdered milk	9.3 MPN/100 g	C	Group 1	<i>Cronobacter malonicus</i>
SZJ280	Coriander	> 110 MPN/g	C	Group 1	<i>Cronobacter malonicus</i>
ZJN392B3	Cooked pork	46 MPN/g	D	Group 5	<i>Cronobacter muytjensii</i>
ZCC207	Cold noodles with sauce	0.62 MPN/g	E	Group 2	<i>Cronobacter dublinensis</i>
ZCC202	Frozen dumplings	9.3 MPN/g	F	Group 2	<i>Cronobacter dublinensis</i>

3 讨论

随着科技的进步和公众食品安全意识的提高,与微生物因素相关的食品安全领域正向食源性致病菌定量检测的方向发展,这对于食品安全的风险提示及致病菌防控都有重要意义。但是传统的 9 管法定量检测工作量大,尤其是对于奶粉中克罗诺杆菌的定量检测,每个样品至少需要 3 个 2 L 的无菌三角瓶、3 个 200 mL 的无菌三角瓶和 3 个 20 mL 的无菌试管和相应的其他试剂,这对于大规模定量检测,不论是人员、空间、仪器还是试剂都是一般实验室无法满足的。在本次调查中,采取了先用 PCR 分子检测进行初步筛查,然后针对分子检测阳性的样本进行传统的定量检测,这非常适合污染率较低而定量检测要求较高的克罗诺杆菌的调查,可为今后奶粉中克罗诺杆菌大规模定量检测的开展提供一些参考。

与其他食品相比,由于奶粉含菌量较低,因此在样品的定量检测方法中,所用到的稀释度不同,得到的定量结果会有差异。定量结果显示 350 份样品中

有 23 份样品分离出了克罗诺杆菌,得到 24 株克罗诺杆菌分离株,检出率为 6.6%。300 份奶粉样品双重 PCR 的检出率为 6.0%,9 管法定量检测的检出率为 5.0%,15 份奶粉样品的 9 管法定量检测表明:克罗诺杆菌含量为 1 - 10 MPN/100 g 的样品有 8 份,10 - 100 MPN/100 g 的样品有 4 份,> 100 MPN/100 g 的样品有 3 份。50 份非奶粉样品中共有 8 份样品在 9 管法定量检测中分离到了克罗诺杆菌,在这 8 份非奶粉样品中污染量最高的为香菜,达到 110 MPN/g 以上的水平(表 4)。同一样品中可能含有不同种克罗诺杆菌,如本次调查中的 1 份卤猪肉制品就同时含有阪崎克罗诺杆菌和莫金斯克罗诺杆菌。

本研究分离得到的 24 株克罗诺杆菌分离株经生化谱和 16S rRNA 基因序列分析技术,进行了种的鉴定并命名(表 4)。其中的 15 株奶粉源分离株,大多数菌株均为 *C. sakazakii*,这与国际上克罗诺杆菌分型和鉴定结果研究一致^[9-11]。这种情况可能由两种原因导致,第一是环境中 *C. sakazakii* 的分布范围广,容易成为奶粉或其他食品的污染源;第二是

由于克罗诺杆菌属的检测方法或是检测对象(现在主要集中于婴幼儿食品)的范围过窄,而使检测结果没有真实反映克罗诺杆菌属不同种的分布情况。因此,开发更加准确的检测方法和扩大该菌的检测范围才能对克罗诺杆菌属的分布情况进行科学的判断。

16S rRNA 基因序列分析技术,不能对 *C. sakazakii* 和 *C. malonaticus* 的菌株准确命名,但是这两种克罗诺杆菌可以根据丙二酸盐利用实验进行区分和鉴定;而通过生化谱技术不能鉴定的克罗诺杆菌属的个别菌种,可以通过 16S rRNA 基因序列分析进行分类地位的确定和命名。本研究中 24 株克罗诺杆菌分离株只通过生化谱未能完成种的鉴定,但与 16S rRNA 基因序列分析相结合后,最终实现了所有分离株的准确命名和鉴定。由于本研究所鉴定的菌种有限,不能涵盖该属中所有菌种鉴定时遇到的困难,如果生化试验和 16S rRNA 基因序列都无法对菌株进行种的鉴定时,可结合其它看家基因^[12]或是多基因位点测序(Multilocus sequence typing, MLST)这种分子分型方法解决问题^[13]。同时应该意识到,伴随着研究的深入,该属的菌种将越来越丰富,当分类方法或技术不能与菌株鉴定相同步时,也可能出现菌株鉴定的困难。因此,发展新的检测鉴定技术来打破这个瓶颈是今后该菌的重要研究方向之一。

参考文献

- [1] Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113: 1-15.
- [2] Wu Q, Dong X, Zhang J, Ye Y, Xu X, Yang X, Wu K. Taxonomy and pathogenic mechanism of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*). *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 841-846. (in Chinese)
吴清平, 董晓晖, 张菊梅, 叶应旺, 徐晓可, 杨小鹏, 吴葵. 阪崎肠杆菌分类与致病机制. *微生物学报*, 2010, 50(7): 844-846.
- [3] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, Levican A, Figueras MJ, Forsythe SJ. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 1277-1283.
- [4] World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. Microbiological risk assessment series, no. 6. 2004. [Online.] http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/enterobacter_sakazakii/en/.
- [5] Richardson AN, Lambert S, Smith MA. Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(11): 2363-2367.
- [6] Ryu JH, Ko J, Park H, Yang S, Kim H. Microbial examination of nonheated foods served in feeding programs of elementary schools, Iksan City, Jeonbuk Province, Korea. *Journal of Food Protection*, 2011, 74(9): 1564-1568.
- [7] Norberg S, Stanton C, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF. *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(3): 607-620.
- [8] Zhou Y, Wu Q, Xu X, Yang X, Ye Y, Zhang J. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula. *Food Microbiology*, 2008, 25(5): 648-652.
- [9] Jaradat ZW, Ababneh QO, Saadoun IM, Samara NA, Rashdan A. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 225-235.
- [10] Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 64-74.
- [11] Miled-Bennour R, Ells TC, Pagotto FJ, Farber JM, K erouanton A, Meheut T, Colin P, Joosten H, Leclercq A, Besse NG. Genotypic and phenotypic characterisation of a collection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139(12): 116-125.

- [12] El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 24-33.
- [13] Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50 (9) : 3031-3039.

Isolation and identification of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) strains from food

Xiaohui Dong^{1,2,3#}, Chengsi Li^{1#}, Qingping Wu^{1*}, Jumei Zhang¹, Shuping Mo¹, Weipeng Guo¹, Xiaojuan Yang¹, Xiaoke Xu¹

¹ Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), Guangdong Provincial Key Laboratory of South China Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China

² South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

³ University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] This study aimed to detect and quantify *Cronobacter* in 300 powdered milk samples and 50 non-powdered milk samples. Totally, 24 *Cronobacter* (formerly *Enterobacter sakazakii*) strains isolated from powdered milk and other foods were identified and confirmed. [Methods] *Cronobacter* strains were detected quantitatively using most probable number (MPN) method and molecular detection method. We identified 24 *Cronobacter* strains using biochemical patterns, including indole production and dulcitol, malonate, melezitose, turanose, and *myo-Inositol* utilization. Of the 24 strains, their 16S rRNA genes were sequenced, and constructed phylogenetic tree by N-J (Neighbour-Joining) with the 16S rRNA gene sequences of 17 identified *Cronobacter* strains and 10 non-*Cronobacter* strains. [Results] Quantitative detection showed that *Cronobacter* strains were detected in 23 out of 350 samples yielding 6.6% detection rate. Twenty-four *Cronobacter* strains were isolated from 23 samples and the *Cronobacter* was more than 100 MPN/100g in 4 samples out of 23 samples. The 24 *Cronobacter* spp. isolates strains were identified and confirmed, including 19 *Cronobacter sakazakii* strains, 2 *C. malonicus* strains, 2 *C. dubliensis* subsp. *lactaridi* strains, and 1 *C. muytjensii* strain. [Conclusion] The combination of molecular detection method and most probable number (MPN) method could be suitable for the detection of *Cronobacter* in powdered milk, with low rate of contamination and high demand of quantitative detection. 24 isolated strains were confirmed and identified by biochemical patterns and molecular technology, and *C. sakazakii* could be the dominant species. The problem of *Cronobacter* in powdered milk should be a hidden danger to nursing, and should catch the government and consumer's attention.

Keywords: *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), biochemical patterns, 16S rRNA gene, phylogenetic tree

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Science and Technology Projects of Guangdong (2010B020316003) and by the Science and Technology Projects of Guangzhou (2010U1-E00611)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 4 November 2012 / Revised: 27 December 2012