



四种 K:CA 荚膜型别克罗诺杆菌的荚膜多糖组分研究

王希浩¹, 凌娜^{1,2}, 偶德馨¹, 叶应旺^{1,2*}, 吴清平^{1,2*}

1 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601

2 广东省科学院微生物研究所 广东省微生物安全与健康重点实验室, 广东 广州 510070

王希浩, 凌娜, 偶德馨, 叶应旺, 吴清平. 四种 K:CA 荚膜型别克罗诺杆菌的荚膜多糖组分研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1490-1500.

WANG Xihao, LING Na, OU Dexin, YE Yingwang, WU Qingping. Capsular polysaccharide components from four K:CA capsular types of *Cronobacter*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1490-1500.

摘要: 【目的】克罗诺杆菌(*Cronobacter*)是一类以奶粉为主要传播媒介的食源性致病菌, 能够引起坏死性小肠结肠炎、脑膜炎、菌血症等疾病。荚膜是细菌常见的毒力因子, 本研究对 4 种 K:CA 型别的 *Cronobacter* 荚膜多糖进行分析, 以期发现荚膜型别与荚膜多糖的单糖组成的关联规律。

【方法】本研究通过苯酚-硫酸法和氢核磁共振(¹H NMR)分别对 28 株 *Cronobacter* (4 种 K:CA 型别)荚膜多糖的产量和单糖组成进行分析。【结果】文章研究了不同培养基、培养时间对 *Cronobacter* 荚膜多糖产生的影响, 确定了最佳培养条件为在牛奶琼脂培养基中培养 48.0 h, 而且不同条件下未改变 *Cronobacter* 荚膜多糖的单糖组成。本研究进一步发现, 4 种 K:CA 型别菌株间的荚膜多糖产量具有显著差异, K2:CA2 型别的荚膜多糖平均产量最高。其中, 2 株荚膜多糖产量高的菌株 *C. sakazakii* ATCC 12868 和 *C. sakazakii* ATCC 29004 也均为 K2:CA2 型别, 产量分别为 19.6%和 28.4%。此外, 通过 ¹H NMR 测定出 28 株 *Cronobacter* 的荚膜多糖中的单糖组分有 8 种, 其中在 *C. malonaticus* cro1754B2 和 *C. sakazakii* cro1573B3 发现了 β-ManpNAc, 只在 *C. sakazakii* cro771A2 中发现了 β-Ribp, 本研究还发现大多数 K1:CA1 型别荚膜多糖中均有 α-Rhap, 大部分 K1:CA2 型别和 K2:CA1 菌株荚膜多糖由 β-Glcp 构成, 其中 α-Glcp 为 K2:CA2 荚膜多糖

资助项目: 国家自然科学基金(32102104, 32230084); 中央高校基本科研专项资金(JZ2022HG7B0271); 安徽省杰出青年基金项目(2208085J11)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32102104, 32230084), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JZ2022HG7B0271), and the Anhui Science Fund for Distinguished Young Scholars (2208085J11).

*Corresponding authors. YE Yingwang, Tel/Fax: +86-551-62901536, E-mail: yeyw04@mails.ucas.ac.cn;

WU Qingping, Tel/Fax: +86-20-87688132, Email: wuqp203@163.com

Received: 2022-08-15; Accepted: 2022-11-04; Published online: 2022-11-08

的主要单糖组分。【结论】本研究初步揭示了4种荚膜型别 *Cronobacter* 的多糖分泌规律,发现 K2:CA2 型别的荚膜多糖平均产量最高,发现了 *Cronobacter* 荚膜多糖的单糖组成与荚膜型别的相关性,为 *Cronobacter* 的荚膜特性深入研究奠定了理论和技术基础。

关键词: 克罗诺杆菌; 荚膜多糖; 氢核磁共振($^1\text{H NMR}$); 荚膜型别

Capsular polysaccharide components from four K:CA capsular types of *Cronobacter*

WANG Xihao¹, LING Na^{1,2}, OU Dexin¹, YE Yingwang^{1,2*}, WU Qingping^{1,2*}

1 School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, Anhui, China

2 Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Objective] *Cronobacter*, a foodborne pathogen transmitted mainly by powdered infant formula, can cause necrotizing enterocolitis, bacteraemia, meningitis and other diseases. We analyzed the composition of capsular polysaccharides from four K:CA types of *Cronobacter* to explore the correlation between different capsular types and monosaccharide composition of capsular polysaccharides. [Methods] We measured the yields of capsular polysaccharides from 28 *Cronobacter* strains (4 K:CA types) by phenol-sulfuric acid method and determined the monosaccharide composition of the capsular polysaccharides by $^1\text{H NMR}$. [Results] The capsular polysaccharide yield of *Cronobacter* was the best when the bacteria were cultured in milk agar for 48.0 h, while the monosaccharide composition did not change under different culture conditions. The yield of capsular polysaccharides varied among the four K:CA types of *Cronobacter*, of which the K2:CA2 type had the highest average yield. Further, we identified that two strains *C. sakazakii* ATCC 12868 and *C. sakazakii* ATCC 29004 with high yields of capsular polysaccharides (19.6% and 28.4%, respectively) were of K2:CA2 type. The capsular polysaccharides of 28 *Cronobacter* isolates contained 8 monosaccharides, among which β -ManpNAc was only in *C. malonaticus* cro1754B2 and *C. sakazakii* cro1573B3, and β -Ribp only in *C. sakazakii* cro771A2. In addition, α -Rhap, β -Glc, and α -Glc were the dominant monosaccharide components of capsular polysaccharide in strains of K1:CA1 type, K1:CA2 and K2:CA1 types, and K2:CA2 type, respectively. [Conclusion] This study preliminarily revealed the polysaccharide yields of four K:CA capsular types of *Cronobacter* and found that K2:CA2 type had the highest average yield of capsular polysaccharide. We confirmed the correlation between the monosaccharide composition of capsular polysaccharide and the capsular types of *Cronobacter*, which provided a theoretical and technical foundation for further research on the capsular properties of *Cronobacter*.

Keywords: *Cronobacter* spp.; capsular polysaccharide; $^1\text{H NMR}$; capsular types

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)原名阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*), 是一类重要的食源性致病菌, 主要通过婴幼儿配方奶粉为传播媒介, 导致婴幼儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎、菌血症等严重疾病^[1-4]。目前, *Cronobacter* 包括七 7 个种, 分别为阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condimenti*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*)和都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)^[5-8]。此外, 有研究表明与新生儿感染有关的种主要包括 *C. sakazakii*、*C. malonaticus* 和 *C. turicensis*, 其中 *C. sakazakii* 最为常见^[9], 并且有报道称, 感染 *Cronobacter* 的婴幼儿, 致死率可达 40%–80%, 即便康复也会留下伴随终生的后遗症^[8]。鉴于此, 研究 *Cronobacter* 潜在的致病因子对人体健康具有十分重要的意义。细菌表面的荚膜(主要由荚膜多糖组成)是常见的毒力因子, 可赋予细菌抵御各种环境压力的保护作用, 尤其是在感染动物宿主期间对免疫系统的逃逸作用^[10]。荚膜多糖的多样性是对许多细菌进行分型分化的基础^[11]。*Cronobacter* 也可根据荚膜的差异性进行分型, 有研究在 104 株 *Cronobacter* 菌株中都发现了以前未鉴定的荚膜区(K-capsule), 该区域与先前报道的大肠杆菌 K 抗原基因簇同源, 由 3 个部分组成, K 抗原区域 1 (*kpsEDCS*)和区域 3 (*kpsTM*)在整个属中都是保守的, 区域 2 有 2 个变体, 可拉酸(colanic acid)编码基因簇位于 O 抗原区域附近并由 *galF* 隔开, 发现 2 种变异, CA1 和 CA2 分别由 21 和 20 个基因组成, 不同之处在于 CA1 中存在 *galE*, 而在 CA2 中不存在; 由此可将 *Cronobacter* 的荚膜分为 4 种型别: K1:CA1、

K1:CA2、K2:CA1 和 K2:CA2^[12], 研究者推测不同型别荚膜多糖可能与该菌的毒力具有一定的相关性。然而, 目前 *Cronobacter* 的荚膜多糖研究主要是基于生物信息学分析, 尚未有该菌荚膜多糖生理功能表征的相关实验研究。通过对荚膜多糖分类的了解, 我们可以通过一些手段对其单糖组成和结构进行表征和分析, 从荚膜型别角度研究荚膜多糖单糖的组成规律, 可能会为 4 种荚膜类型的 *Cronobacter* 的致病性规律提供见解。核磁共振光谱是鉴定荚膜多糖结构的最重要和最有用的技术之一, 糖残基中异头质子在氢核磁共振(¹H NMR)光谱中可被识别出来^[13]。因此, 本研究对提取的 4 种 K:CA 型别 *Cronobacter* (28 株)的荚膜多糖运用苯酚-硫酸法进行产量分析, 通过 ¹H NMR 实验对其单糖组分进行鉴定, 以期明晰 4 种 K:CA 型别的荚膜多糖规律性, 为 *Cronobacter* 的荚膜多糖进一步结构解析和功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

实验所用 *Cronobacter* 菌株(*C. sakazakii* ATCC BAA-894、*C. sakazakii* ATCC 29544、*C. sakazakii* ATCC 12868、*C. sakazakii* ATCC 29004、*C. sakazakii* cro771A2、*C. sakazakii* cro837A1、*C. sakazakii* cro2375w、*C. sakazakii* cro1573B3、*C. sakazakii* cro751B2-1、*C. sakazakii* cro672B3-1、*C. sakazakii* cro2224A2、*C. sakazakii* cro536C1、*C. sakazakii* cro2451A1、*C. sakazakii* cro3525W、*C. sakazakii* cro1931W、*C. sakazakii* CFS、*C. muytjensii* ATCC 51329、*C. muytjensii* cro1187W、*C. muytjensii* cro1187A3、*C. malonaticus* cro2902B3、*C. malonaticus* cro2249W、*C. malonaticus* cro1754B2、*C. malonaticus* cro1751W、*C.*

malonicus cro125-1、*C. malonicus* 587B1-1、*C. malonicus* cro653A1、*C. malonicus* cro1474A1、*C. turicensis* cro3005A1)均保藏于本实验室, LB 琼脂培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司), 平板计数牛奶琼脂培养基(北京索莱宝科技有限公司), 3-(三甲基甲硅烷基)丙酸-d4 钠盐(tsp-d4) (上海麦克林生化科技有限公司), 重水(阿拉丁试剂有限公司), 0.9%氯化钠溶液(援生制药股份有限公司)。

1.2 仪器

立式恒温摇床(上海博讯医疗有限公司), 生化细菌培养箱(上海陪因仪器有限公司), 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), VNMRS600 型超导核磁共振波谱仪(Varian 公司), 多功能酶标仪(TECAN 公司), 超净无菌操作台(苏州净化设备有限公司)。

1.3 *Cronobacter* 的培养条件

将 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 复苏至对数期, 分别涂布于 LB 琼脂培养基和平板计数牛奶琼脂培养基, 将其分别培养 24.0 h 和 48.0 h。产量结果显示在平板计数牛奶琼脂培养基中培养 48.0 h 产量最高。因此, 28 株 *Cronobacter* 的培养均参照此条件。

1.4 荚膜多糖的提取

将 *Cronobacter* 复苏至对数期, 涂于平板计数牛奶琼脂培养基, 37.0 °C 培养 48.0 h 后, 细菌在培养基上生长成菌苔。每个培养皿加入 3.0 mL 生理盐水, 然后收集培养皿上的菌体及其分泌物, 放入 50.0 mL 圆底离心管中, 15 000 r/min 离心 25.0 min, 收集上清液冷冻干燥。

1.5 荚膜多糖浓度的测定

称取 5.0 mg 冻干的荚膜多糖溶于 500.0 μ L 双蒸水中, 并采用苯酚-硫酸法测定荚膜多糖的浓度。具体而言, 将葡萄糖配置成浓度为

0.6 mg/mL 的标准溶液, 然后分别取 0.0、4.8、9.6、14.4、19.2、24.0、28.8 和 33.6 μ L 于 1.5 mL EP 管, 再分别加入 180.0 μ L 显色液(浓硫酸与 5%苯酚溶液的体积比为 5:1), 最后加入去离子水定量至 240.0 μ L, 充分混匀放于沸水浴加热 30.0 min。随后从各 EP 管中取 100 μ L 溶液加入 96 孔板, 利用酶标仪检测 490 nm 处的光密度, 并以糖浓度(μ g/ μ L)为横坐标, 490 nm 的光密度值为纵坐标, 制作的糖标准曲线为 $y=0.3676x+0.0546$, 然后用同样的方法将溶解的样品与显色液反应, 并将光密度作为 y 值带入标准曲线, 计算出 x 值即为糖浓度。

1.6 NMR 样品的制备和分析

称取 5.0 mg 冻干的粗多糖样品溶于 500.0 μ L 重水中(含 1.0 mmol/L tsp-d4), 12 000 r/min 离心 10.0 min, 取上清液。将处理后的样品于 5.0 mm 核磁管中, 在 VNMRS600 型超导核磁共振波谱仪进行 ^1H NMR 实验, 扫描次数为 256 次。

2 结果与分析

2.1 培养条件对 *Cronobacter* 荚膜多糖分泌的影响

通过苯酚硫酸法对 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 在不同条件先产生的荚膜多糖进行产量测定。培养时间相同的条件下, 在平板计数牛奶琼脂培养基中培养 24.0 h 和 48.0 h 荚膜多糖产量分别为 1.9 μ g/ μ L 和 2.2 μ g/ μ L, 在 LB 琼脂培养基中培养 24.0 h 和 48.0 h 的产量分别为 1.4 μ g/ μ L 和 1.7 μ g/ μ L (图 1)。由图 1 发现在相同培养基中将 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 培养 48.0 h 比培养 24.0 h 荚膜多糖产量高, 在将 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 培养相同时间的条件下, 在牛奶琼脂培养基中比在 LB 琼脂培养基中的荚膜多糖产量高。

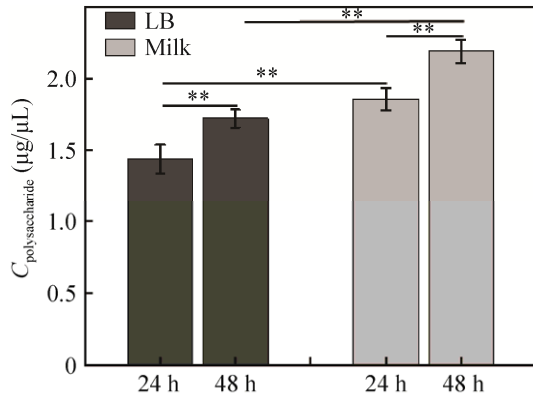


图 1 *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 在不同培养条件下多糖产量比较

Figure 1 Comparison of polysaccharide yield of *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 under different conditions. There was a significant difference in the yield of capsular polysaccharide in different media ($P < 0.01$), and there was a significant difference in the yield of capsular polysaccharide in the same medium for the same time ($P < 0.01$).

^1H NMR 结果显示 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 在 24.0 h 和 48.0 h 产生荚膜多糖的单糖组成是相同的, 在 LB 琼脂培养基和牛奶琼脂培养基的单糖组成也是相同的(图 2)。

2.2 不同 K:CA 型别 *Cronobacter* 荚膜多糖的产量

Cronobacter 的荚膜覆盖在细菌的表面, 通

过高速离心将 *Cronobacter* 的荚膜与菌体分离, 获得了 *Cronobacter* 分泌的粗多糖。28 株 *Cronobacter* 在相同培养条件下产生的多糖含量不同, 其中 *C. sakazakii* ATCC 12868 和 *C. sakazakii* ATCC 29004 产量最高, 离心后肉眼可见黄色的菌体上层的黏液较多, 而相比之下 28 株 *Cronobacter* 中 *C. sakazakii* cro536C1 和 *C. sakazakii* cro3525W 离心后其对应的黏液量较少(图 3)。

本研究还通过葡萄糖标准曲线计算出了提取的 28 株 *Cronobacter* 的多糖产量, 计算出 28 株 *Cronobacter* 荚膜多糖平均产量为 $1.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 4 种荚膜型别荚膜多糖的平均产量分别是: K1:CA1 为 $1.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, K1:CA2 为 $1.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, K2:CA1 为 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, K2:CA2 为 $1.7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。其中产量最高的菌株是 *C. sakazakii* ATCC 29004, 产量为 $2.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 产量最低的菌株是 *C. sakazakii* cro3525W, 产量为 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。由图 4 可知 *C. sakazakii* ATCC 12868 和 *C. sakazakii* ATCC 29004 产量最多, 分别为 19.6% 和 28.4%, 通过离心后的黏液量观察也能发现(图 3), 值得注意的是这 2 株菌的荚膜型别都为 K2:CA2, 而且 K2:CA2 型别的 7 株菌产量都在 10% 以上。

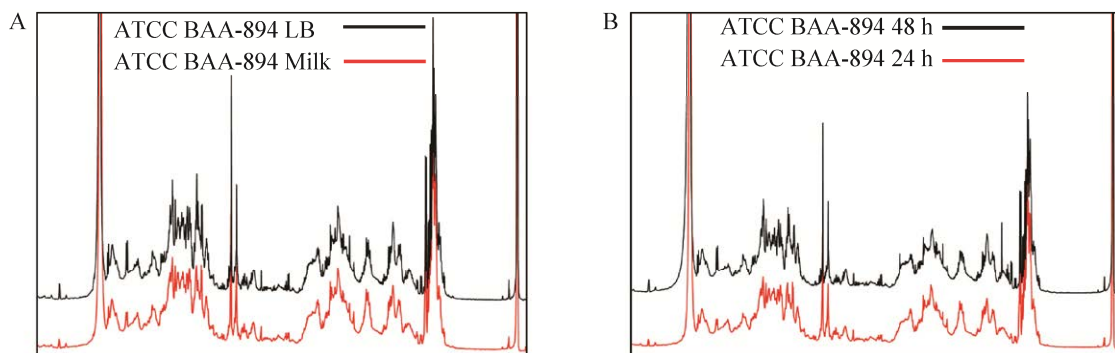


图 2 *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 在不同培养条件下的荚膜多糖 ^1H NMR 图谱

Figure 2 ^1H NMR spectra of capsular polysaccharides of *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 under different conditions. A: *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 cultured in LB agar medium and milk agar medium for 24.0 h. B: *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 at 24.0 h and 48.0 h.

通过 one-way 分析发现, 4 种 K:CA 型别菌株之间的荚膜产量具有显著差异, 其中 K2:CA2 型别的荚膜多糖平均产量最高。

2.3 通过 ^1H NMR 进行 *Cronobacter* 荚膜中单糖组成分析

图 5 为 28 株 *Cronobacter* 的荚膜多糖 ^1H NMR 图谱, 结果表明 28 株 *Cronobacter* 的荚膜多糖提取物由多种物质构成, 显示了 8 个异头质子的信号 4.47–5.42, 其中 $\delta 5.42$ 为 $\alpha\text{-Glc pNAc}$ 的化学位移, $\delta 5.24$ 为 $\alpha\text{-Glc p}$ 的化学位移, $\delta 5.17$ 为 $\alpha\text{-Rhap}$ 的化学位移, $\delta 4.97$ 未知单糖组成, $\delta 4.64$ 为 $\beta\text{-Glc p}$ 的化学位移, $\delta 4.47$ 为 $\beta\text{-Galp}$ 或 $\beta\text{-Ribp}$ 的化学位移, $\delta 4.68$ 为 $\beta\text{-Glc pNAc}$ 的化学位移, $\delta 4.85$ 为 $\beta\text{-ManpNAc}$ 的化学位移(图 6)。

通过 ^1H NMR 分析在 28 株 *Cronobacter* 中

发现了 20 种单糖组成, 并在其中发现了 8 种单糖(表 1), 其中包括 $\alpha\text{-Glc p}$ 、 $\alpha\text{-Glc pNAc}$ 、 $\alpha\text{-Rhap}$ 、 $\beta\text{-Ribp}$ 、 $\beta\text{-ManpNAc}$ 、 $\beta\text{-Glc pNAc}$ 、 $\beta\text{-Glc p}$ 和 $\beta\text{-Galp}$, 其中 $\beta\text{-Rhap}$ 、 $\alpha\text{-Glc pNAc}$ 和 $\beta\text{-Glc p}$ 这

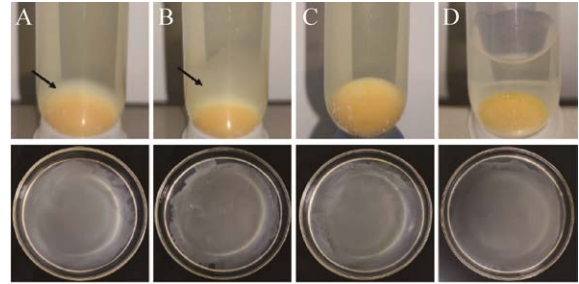


图 3 四株 *Cronobacter* 多糖产量肉眼观察
Figure 3 Macroscopic observation of polysaccharide production of 4 strains of *Cronobacter*. A: *C. sakazakii* ATCC 12868. B: *C. sakazakii* ATCC 29004. C: *C. sakazakii* cro536C1. D: *C. sakazakii* cro3525W. Black arrows are capsular polysaccharides.

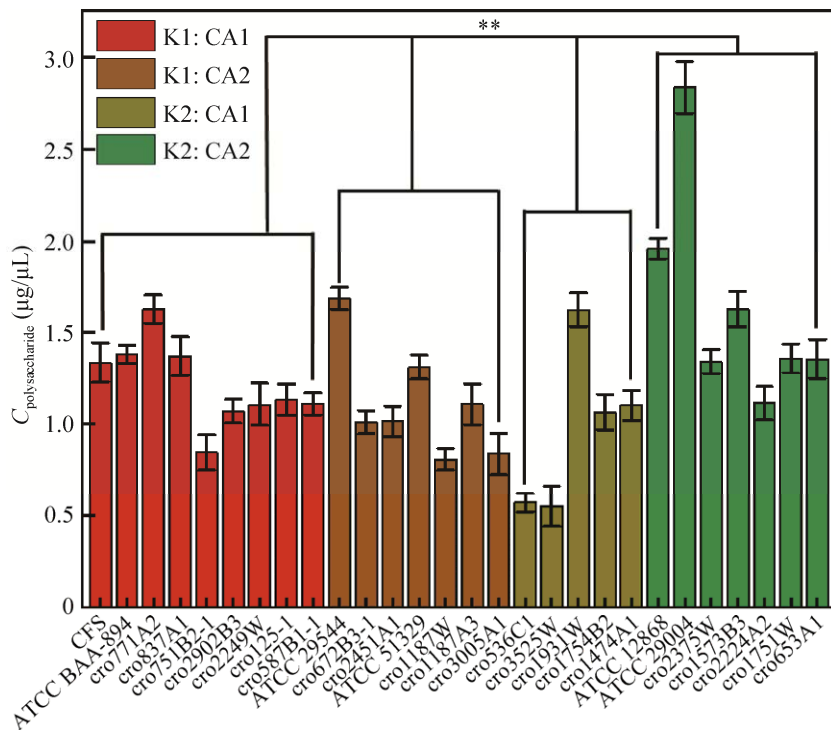


图 4 28 株 *Cronobacter* 多糖产量比较

Figure 4 Comparion with the polysaccharide yield of 28 strains of *Cronobacter*. The yield of 4 types of capsular polysaccharides had significant differences ($P < 0.01$).

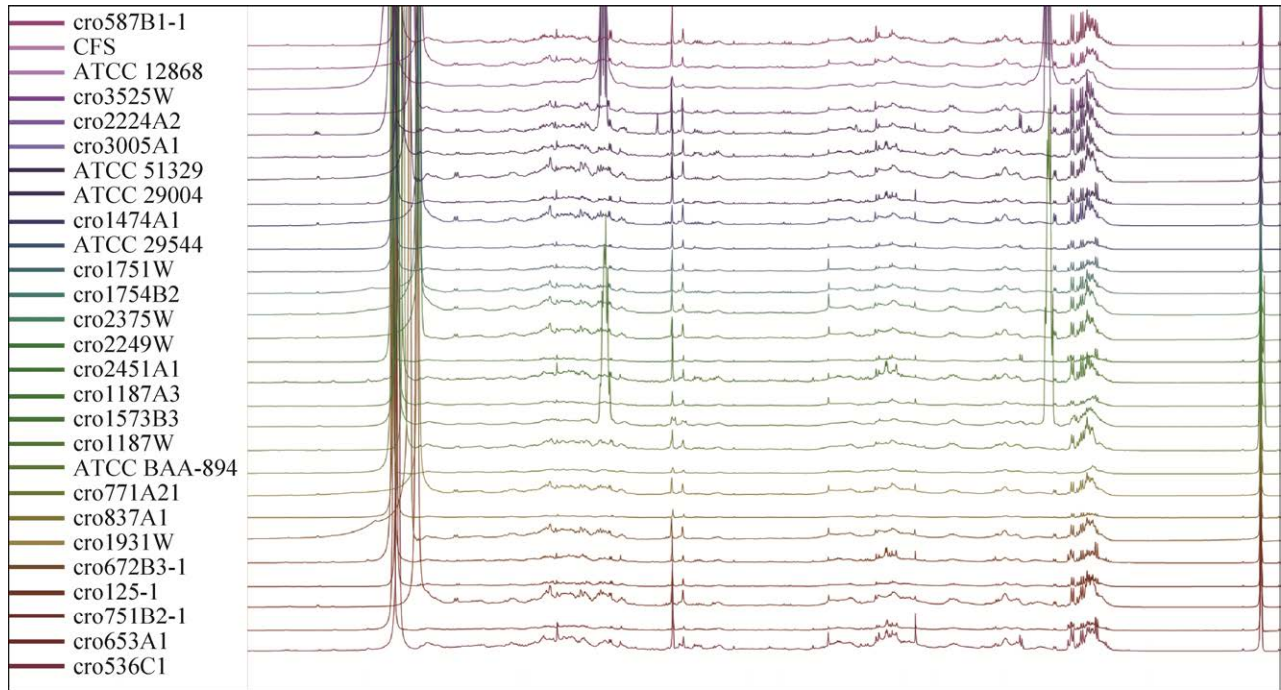


图 5 28 株 *Cronobacter* 的 ^1H NMR 图谱

Figure 5 ^1H NMR spectra of 28 strains of *Cronobacter*.

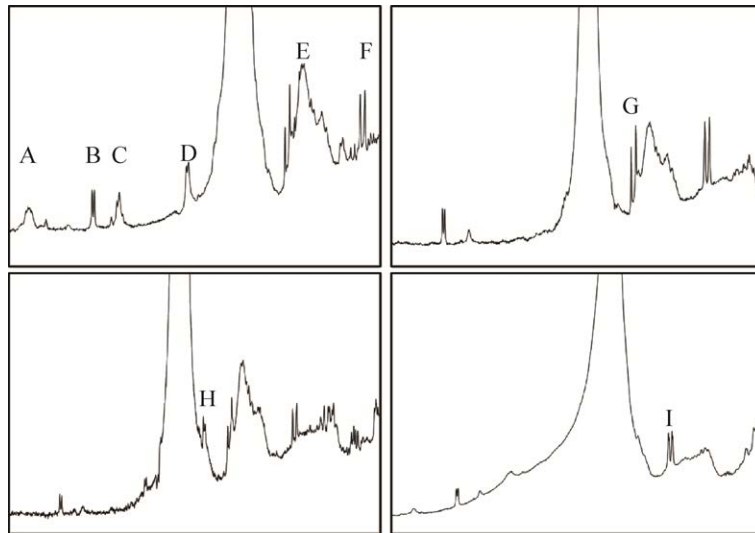


图 6 单糖异头质子峰的化学位移

Figure 6 Chemical shift of monosaccharide isomeric hydrogen. A: $\delta=5.42$; B: $\delta=5.24$; C: $\delta=5.17$; D: $\delta=4.97$; E: $\delta=4.64$; F and I: $\delta=4.47$; G: $\delta=4.68$; H: $\delta=4.85$.

3 种糖的异头质子峰在大多数多糖样品中出现。值得注意的是在 *C. malonaticus* cro1754B2 和 *C. sakazakii* cro1573B3 发现了 β -ManpNAc 的异

头质子峰, 只在 *C. sakazakii* cro771A2 中发现了 β -Ribp 的异头质子峰。K1:CA1 型别的荚膜多糖的单糖组分 α -Rhap 出现次数较多, K1:CA2

型别和 K2:CA1 型别的荚膜多糖的单糖组分 β -GlcP 出现次数较多, 其中 K2:CA2 荚膜多糖的单糖组分 α -GlcP 出现的次数较多。

从表 2 可以看出 K2:CA1 包含的单糖种类

较多。从表 2 可以发现 28 株 *Cronobacter* 四种型别荚膜多糖包含的单糖种类, 分别为 K1:CA1 有 6 种, K1:CA2 有 5 种, K2:CA1 有 7 种, K2:CA2 有 6 种。

表 1 *Cronobacter* 的荚膜多糖的单糖组成

Table 1 Monosaccharide composition of capsular polysaccharide of *Cronobacter*

Number	Monosaccharide composition	Strain
1	α -GlcPNAc, α -Rhap, β -GlcP	CFS (K1:CA1), cro125-1 (K1:CA1) ATCC 51329 (K1:CA2)
2	α -Rhap, β -Galp, β -GlcP	ATCC BAA-894 (K1:CA1)
3	α -Rhap, β -Ribp	cro771A2 (K1:CA1)
4	α -GlcP, α -GlcPNAc	cro837A1 (K1:CA1)
5	α -GlcP, α -Rhap, β -GlcP	cro751B2-1 (K1:CA1)
6	α -GlcPNAc, α -Rhap, β -GlcP	cro2902B3 (K1:CA1)
7	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -Galp	cro2249W (K1:CA1)
8	β -Galp, β -GlcP	cro587B1-1 (K1:CA1)
9	α -Rhap, β -GlcP	ATCC 29544 (K1:CA2), cro672B3-1 (K1:CA2), cro536C1 (K1:CA2), ATCC 12868 (K2:CA2)
10	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -Galp, β -GlcP	cro2451A1 (K1:CA2), cro3005A1 (K1:CA2)
11	α -GlcP, α -GlcPNAc, β -Galp, β -GlcP	cro1187W (K1:CA2), cro1187A3 (K1:CA2)
12	α -GlcPNAc, α -Rhap, β -GlcP, β -GlcPNAc	cro3525W (K2:CA1)
13	α -GlcPNAc, β -GlcP	cro1931 (K2:CA1)
14	α -GlcP, β -GlcP, β -ManpNAc	cro1754B2 (K2:CA1)
15	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -Galp, β -GlcP, β -GlcPNAc	cro1474A1 (K2:CA1), cro653A1 (K2:CA2)
16	α -GlcP, α -Rhap	ATCC 29004 (K2:CA2)
17	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -GlcP, β -GlcPNAc	cro2375W (K2:CA2)
18	α -GlcP, α -GlcPNAc, β -Galp, β -GlcP, β -GlcPNAc, β -ManpNAc	cro1573B3 (K2:CA2)
19	α -Rhap, β -GlcP, β -GlcPNAc	cro2224A2 (K2:CA2)
20	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap	cro1751W (K2:CA2)

表 2 四种型别 *Cronobacter* 荚膜多糖包含的单糖

Table 2 Monosaccharides contained in 4 types of *Cronobacter* capsular polysaccharides

Type	Monosaccharide	Strains
K1:CA1	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -Galp, β -GlcP, β -Ribp	CFS, ATCC BAA-894, cro771A2, cro837A1, cro751B2-1, cro2902B3, cro2249W, cro125-1, cro587B1-1
K1:CA2	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -GlcP, β -ManpNAc	ATCC 29544, cro672B3-1, cro2451A1, ATCC 51329, cro1187W, cro1187A3, cro3005A1
K2:CA1	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -Galp, β -GlcP, β -GlcPNAc, β -ManpNAc	cro536C1, cro3525W, cro1931W, cro1754B2, cro1474A1
K2:CA2	α -GlcP, α -GlcPNAc, α -Rhap, β -Galp, β -GlcP, β -GlcPNAc	ATCC 12868, ATCC 29004, cro2375W, cro1573B3, cro2224A2, cro1751W, cro653A1

3 讨论与结论

细菌荚膜多糖一般由 2–7 个单糖组成的重复单元连接而成^[14], 由于其糖残基数量较少, 所以可通过 ¹H NMR 分析出荚膜多糖的糖残基。研究发现细菌荚膜多糖产量受培养条件的影响^[15]。本研究通过 ¹H NMR 实验分析在不同培养条件下培养的 *C. sakazakii* ATCC BAA-894 产生的荚膜多糖, 发现其单糖组成完全相同, 而 *Cronobacter* 在牛奶琼脂培养基中的荚膜多糖产量较 LB 琼脂培养基中显著升高。研究表明 *Cronobacter* 可以在奶粉中长期存活^[16], 因此我们推测在奶粉中可能更利于 *Cronobacter* 的荚膜多糖分泌, 而荚膜多糖的高分泌量更利于 *Cronobacter* 抵御奶粉中的胁迫环境(如低水分活度)。*Cronobacter* 在牛奶琼脂培养基中培养 48.0 h 时荚膜多糖的分泌量较高, 因此我们选择该培养条件进行后续的荚膜多糖相关研究。

本研究通过苯酚-硫酸法测定了 28 株 *Cronobacter* 荚膜多糖的产量, 4 种 K:CA 型别菌株之间的荚膜产量具有显著差异, 其中 K2:CA2 型别的荚膜多糖平均产量最高, K2:CA1 型别的荚膜多糖平均产量最低。通过荚膜多糖产量分析结果还可以发现, *C. sakazakii* ATCC 12868 和 *C. sakazakii* ATCC 29004 的产量较高, 且 2 株菌的型别均为 K2:CA2。荚膜多糖作为病原菌外层的保护成分, 可保护其逃脱宿主的免疫反应, 使其有更多的机会对宿主细胞进行黏附和入侵。当细菌处于极端条件下, 荚膜多糖对细菌的保护作用也会发挥重大作用, 还可以转化为碳源和氮源给细菌供能^[17]。研究报告 K2:CA2 型别的 *Cronobacter* 与新生儿脑膜炎和坏死性小肠结肠炎密切相关^[12], 本研究间接证实了荚膜型别为 K2:CA2 的 *C. sakazakii* ATCC 12868 和 *C. sakazakii* ATCC 29004 可能有

较强毒力及耐受干燥的能力。细菌的荚膜多糖结构主要通过 NMR 和化学方法进行分析, 利用这些手段可以确定荚膜多糖的重复单元和连接方式^[18–21]。本研究对 28 株 *Cronobacter* 的荚膜多糖进行分离, 利用 NMR 在提取的 28 株 *Cronobacter* 的荚膜多糖中发现了 20 种不同的单糖组合类型, 说明 *Cronobacter* 荚膜多糖的单糖组成具有多样性。此外, 本研究发现了 8 种糖残基, 值得注意的是在其他革兰氏阴性菌的荚膜多糖中也发现了这 8 种糖残基^[18,22–24], 说明革兰氏阴性菌荚膜多糖的单糖组成有一定的相似性。而且, 本研究还发现大多数 K1:CA1 型别荚膜多糖中均有 α -Rhap, 大多数 K1:CA2 和 K2:CA1 型别的荚膜多糖的单糖组分有 β -Glc, 其中 α -Glc 为 K2:CA2 型别荚膜多糖的主要单糖组分, 说明这些单糖是 *Cronobacter* 荚膜多糖的基本组成成分。

荚膜多糖是通过糖苷键将单糖连接成由重复单元组成的均多糖或杂多糖^[20]。细菌的荚膜多糖发挥生理功能往往受到其组分和结构的共同影响, 荚膜多糖的差异不仅是因为单糖的组成, 也包括单糖之间的连接方式和空间结构等^[25]。因而, 进一步对 *Cronobacter* 的荚膜多糖结构进行分析可能将会对其结构差异性和功能差异性有着更加清晰的认识。多糖的结构决定功能, *Cronobacter* 的荚膜多糖的结构对逃避宿主免疫机制、对宿主细胞的黏附入侵可能具有重要作用, *Cronobacter* 的荚膜结构的研究缺乏, 其具体的致病机制还不清楚, 需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] FARMER JJ 3rd. My 40-year history with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii*-lessons learned, myths debunked, and recommendations[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2015, 3: 84.

- [2] MULLANE NR, MURRAY J, DRUDY D, PRENTICE N, WHYTE P, WALL PG, PARTON A, FANNING S. Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6325-6330.
- [3] BAR-OZ B, PREMINGER A, PELEG O, BLOCK C, ARAD I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn[J]. Acta Paediatrica: Oslo, Norway: 1992, 2001, 90(3): 356-358.
- [4] ZENG HY, LEI T, HE WJ, ZHANG JM, LIANG BS, LI CS, LING N, DING Y, WU S, WANG J, WU QP. Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015[J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(11): 2121-2124.
- [5] STEPHAN R, GRIM CJ, GOPINATH GR, MAMMEL MK, SATHYAMOORTHY V, TRACH LH, CHASE HR, FANNING S, TALL BD. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt_10): 3402-3410.
- [6] 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[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt_6): 1277-1283.
- [7] IVERSEN C, MULLANE N, MCCARDELL B, TALL BD, LEHNER A, FANNING S, STEPHAN R, JOOSTEN H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(6): 1442-1447.
- [8] BRADY C, CLEENWERCK I, VENTER S, COUTINHO T, de VOS P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(5): 309-319.
- [9] HUANG Y, PANG YH, WANG H, TANG ZZ, ZHOU Y, ZHANG WY, LI XG, TAN DM, LI J, LIN Y, LIU XL, HUANG WY, SHI YL. Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in dehydrated rice powder from Chinese supermarket[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131053.
- [10] CRESS BF, ENGLAENDER JA, HE WQ, KASPER D, LINHARDT RJ, KOFFAS MAG. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(4): 660-697.
- [11] WHITFIELD C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*[J]. Annual Review of Biochemistry, 2006, 75: 39-68.
- [12] OGRODZKI P, FORSYTHE S. Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 758.
- [13] YAO HYY, WANG JQ, YIN JY, NIE SP, XIE MY. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: progress, challenge and perspective[J]. Food Research International, 2021, 143: 110290.
- [14] 王楷成, 赵峡, 陆承平, 姚火春. 猪链球菌 1、2、14、

- 1/2 型荚膜多糖的单糖组成比较[J]. 微生物学报, 2014, 54(6): 656-662.
- WANG KC, ZHAO X, LU CP, YAO HC. Comparison of monosaccharide composition of capsular polysaccharides in *Streptococcus suis* serotype 1, 2, 14 and 1/2[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(6): 656-662 (in Chinese).
- [15] 杨正涛, 张乃生, 刘庆涛, 杨琦, 尹荣兰. 培养条件对奶牛金葡菌 5 型荚膜多糖产量的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(16): 6813-6814, 6820.
- YANG ZT, ZHANG NS, LIU QT, YANG Q, YIN RL. Effect of culture condition on type 5 capsular polysaccharide production of *Staphylococcus aureus* from dairy cattle[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(16): 6813-6814, 6820 (in Chinese).
- [16] DU XJ, WANG XY, DONG X, LI P, WANG S. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2867.
- [17] COSTERTON JW, IRVIN RT, CHENG KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1981, 35: 299-324.
- [18] SHAN WL, KAN JS, CAI XQ, YIN ML. Insights into mucoid *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological characteristics, virulence, and pathogenic mechanisms in a threatening nosocomial pathogen[J]. *Microbiological Research*, 2022, 261: 127057.
- [19] 谢黎卿, 杨洋, 彭远义, 李能章. 病原微生物荚膜多糖的生物学功能[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(3): 576-587.
- XIE LQ, YANG Y, PENG YY, LI NZ. Research progress on the function and immunity of capsular polysaccharide[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(3): 576-587 (in Chinese).
- [20] ARBATSKY NP, WANG M, SHASHKOV AS, CHIZHOV AO, FENG L, KNIREL YA, WANG L. Structure of the O-polysaccharide of *Cronobacter sakazakii* O₂ with a randomly O-acetylated L-rhamnose residue[J]. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(14): 2090-2094.
- [21] AZURMENDI HF, VEERAMACHINENI V, FREESE S, LICHAA F, FREEDBERG DI, VANN WF. Chemical structure and genetic organization of the *E. coli* O6: K15 capsular polysaccharide[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 12608.
- [22] TSVETKOV YE, YASHUNSKY DV, SUKHOVA EV, KURBATOVA EA, NIFANTIEV NE. Synthesis of oligosaccharides structurally related to fragments of *Streptococcus pneumoniae* type 3 capsular polysaccharide[J]. *Russian Chemical Bulletin*, 2017, 66(1): 111-122.
- [23] TU IF, LIN TL, YANG FL, LEE IM, TU WL, LIAO JH, KO TP, WU WJ, JAN JT, HO MR, CHOU CY, WANG AHJ, WU CY, WANG JT, HUANG KF, WU SH. Structural and biological insights into *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharide degradation by a bacteriophage K1 lyase: implications for clinical use[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 29(1): 9.
- [24] ARBATSKY NP, SHNEIDER MM, KENYON JJ, SHASHKOV AS, POPOVA AV, MIROSHNIKOV KA, VOLOZHANTSEV NV, KNIREL YA. Structure of the neutral capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* NIPH146 that carries the KL37 capsule gene cluster[J]. *Carbohydrate Research*, 2015, 413: 12-15.
- [25] ARBATSKY NP, SUN YM, SHASHKOV AS, WANG M, LIU B, DAEVA ED, WANG L, KNIREL YA. Structure and genetics of the O-antigen of *Cronobacter sakazakii* G2726 (serotype O3) closely related to the O-antigen of *C. muytjensii* 3270[J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 355: 50-55.