

食品中克罗诺杆菌的分离和鉴定

黄启红, 蔡大川, 张志军, 方军, 陈敏儿, 黄璇莹, 伍玲燕, 熊娟, 简艳婷

(中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070)

摘要: 利用国标方法对食品(蔬菜, 熟食和豆制品)进行了克罗诺杆菌的污染情况调查及其分离菌株的鉴定; 利用 *fusA* 基因对分离的克罗诺杆菌进行了遗传多样性分析, 将克罗诺杆菌属的分离株鉴定到种的水平。主要取得了以下结论和认识: ①39 份食品(蔬菜 23 份, 熟食 14 份和豆制品 2 份)中有 14 份样品检出了克罗诺杆菌, 检出率为 35.9%。蔬菜类检出 8 份(34.8%), 熟食制品检出 4 份(28.6%), 2 份豆制品都检出(100.0%); ②对 14 株克罗诺杆菌分离株进行基于 *fusA* 基因的系统进行分析, 结果显示这些分离株包括 *C. Sakazakii* 和 *C. malonaticus* 2 个种, 其中 *C. sakazakii* 有 9 株, *C. malonaticus* 有 5 株。

关键词: 食品; 克罗诺杆菌; 分离; 种的鉴定

Isolation and Identification of *Cronobacter* spp. in Foods

HUANG Qi-hong, CAI Da-chuan, ZHANG Zhi-jun, FANG Jun, CHEN Min-er,

HUANG Xuan-ying, WU Ling-yan, XIONG Juan, JIAN Yan-ting

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, China National Analytical Center, Guangzhou, Guangzhou 510070, Guangdong, China)

Abstract: The method of national standard was used to detect the occurrence of *Cronobacter* spp. From food (milk, vegetables, cooked and soy) and further identified the isolation strain. *FusA* gene was used to analyze the genetic diversity of separated *Cronobacter* spp., which can identify species. This paper mainly has made the following conclusions and cognition: ①There are 39 other foods (23 vegetables, 14 cooked food and 2 of soy product) test too, 14 of which detected *Cronobacter* spp., in a rate of 35.9%. Vegetables were detected in 8 (34.8%), food products were detected in 4 (28.6%), 2 copies of soy products are detected (100.0%). ②Based on *fusA* gene, the genetic diversity was analyzed for 14 *Cronobacter* spp., the result indicated that there are 9 *C. sakazakii*, and 5 *C. malonaticus* among these isolates.

Key words: foods; *Cronobacter* spp.; detection; characterization

食品安全问题是关系到国民健康的重大民生问题。克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)是近年来倍受关注的重要食源性致病菌,能引起新生婴幼儿脑膜炎、菌血症和小肠结肠炎等严重疾病,致死率高达 30%~80%。流行病学调查表明克罗诺杆菌感染与婴幼儿配方奶粉密切相关,但目前克罗诺杆菌在自然界的污染源仍然

不清楚。鉴于这种情况,本论文通过研究在广州肉菜市场采集不同类型的食品(蔬菜、熟食和豆制品)利用国标方法进行克罗诺杆菌随机抽样检测。克罗诺杆菌属的 7 个种的毒性之间有差异,并不是所有的种都与感染相关,只有阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌与新生儿感染相关^[1]。因此,将这个新属的细菌鉴定到种的水平具有重要意义。本论文用最近国际上新建立的基于 *fusA* 的序列分析技术将分离菌株鉴定到种的水平,可以了解食品中该属种的分布情况,从而确定其毒性,掌握该菌的污染规律,可为控制该菌爆发提供基础数据,对提升食品安全水平具有重要意义。

基金项目:动物源性食品安全检测技术研究和公共服务平台(粤科规财字[2014]208号);广东省专业镇中小微企业服务平台建设项目(2013B091604003)

作者简介:黄启红(1979—),女(汉),助理研究员,硕士,主要从事微生物检验与分析研究。

1 材料与方法

1.1 检测样本

39 份样品分别来源于 2013 年 6 月~8 月从广州越秀区的集贸市场采集蔬菜类、熟食制品类和豆制品。具体样品包括蔬菜类 23 份(2 份小白菜,2 份通菜,大黄瓜、大葱、椰菜、香菜、油麦菜、葱、辣椒圈、韭菜、芥菜、包菜、番薯叶、小塘菜、生菜、潺菜、大青菜、大头菜、番茄、茄子、竹笋各 1 份);熟食制品 14 份(某品牌鸭腿、某品牌烤鸡腿、某品牌黑鸭鸭翅、某品牌鸭脖、香辣鸡扒、某品牌鸡腿、某品牌原味肠、某品牌鸡翅、鸡肉粉、炒青菜、熟鱼、热牛腩、红烧豆腐、豆角炒叉烧)和豆制品 2 份(豆皮和嫩豆腐)。

1.2 设备

SHP-250 型生化培养箱:上海一恒科技有限公司; DXY-33A 电泳仪:北京六一仪器厂;ImageQuant 350 system UVP 凝胶成像仪:美国 GE Healthcare 公司;T-Professional thermocycler PCR 仪:德国 Biometra 公司。

1.3 试剂及培养基

改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素:广东环凯微生物科技有限公司;阪崎显色培养基:法国科玛嘉公司;阪崎肠杆菌生化试剂鉴定盒:广东环凯微生物科技有限公司;GoldViewTM Nucleic Acid Stain:北京赛百盛基因技术有限公司;细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、2×PCR DSMix:广州东盛生物工程有限公司。

1.4 方法

主要根据 GB 4789.40-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》第一法进行检验,分离后进行 *fusA* 扩增引物和测序引物合成,进一步进行克罗诺杆菌基因组 DNA 的提取、PCR 扩增、产物测序、最后进行序列分析比对,构建系统进化树,将分离菌株鉴定到种。

2 结果

2.1 不同样品类型检测结果

本研究共采集 39 份样品(蔬菜类 23 份,熟食制品 14 份和豆制品 2 份),其中有 14 份样品检出了克罗诺杆菌,检出率为 35.9%。蔬菜类检出 8 份(34.8%),熟食制品检出 4 份(28.6%),2 份豆制品都检出(100.0%)结果见图 1。共分离到 14 株克罗诺杆菌(H1-H14)。

2.2 克罗诺杆菌分离株的种水平鉴定中 PCR 基因扩增结果

提取到的 14 株克罗诺杆菌分离株 DNA 进行

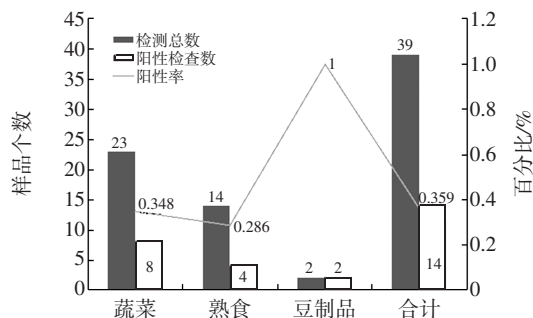


图 1 不同样品类型检测结果

Fig.1 Samples of different types of test results

PCR 扩增,将扩增产物进行凝胶电泳,结果可以看出所有分离株都扩增出目标基因预期片段大小 1 300 bp 左右结果见图 2,可以进行测序。

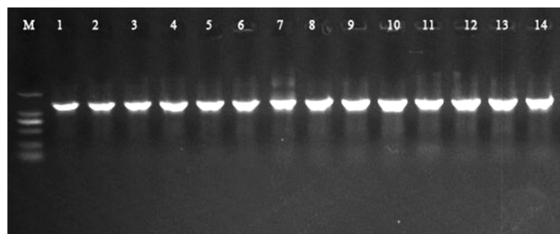


图 2 14 株克罗诺杆菌分离株的 *fusA* 基因扩增结果

Fig.2 The *fusA* gene amplification results that 14 grams of *Cronobacter* spp. isolates

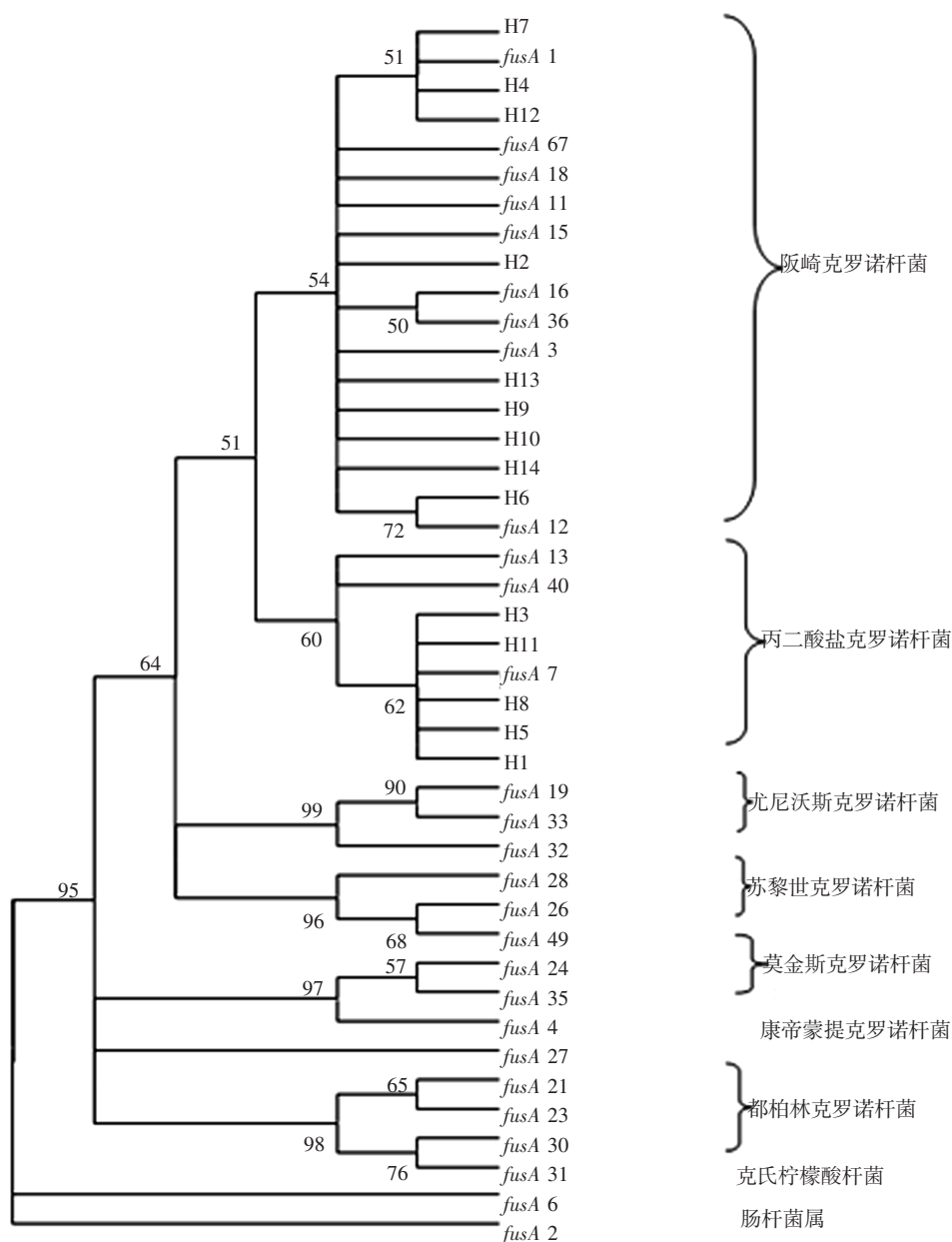
2.3 构建进化树

将本实验中分离出来的 14 株克罗诺杆菌的 *fusA* 基因和相关菌株的 *fusA* 基因序列进行比对,这些 *fusA* 基因序列可以从 GenBank 软件上下载得到,再用 ClustalX 软件进行比对,从而构建系统发育树,见图 3。从进化树可以比对出,这些分离株包括 *C. Sakazakii* 和 *C. malonaticus* 2 个种,其中 *C. sakazakii* 有 9 株,*C. malonaticus* 有 5 株。

3 讨论

本文调查了 39 份样品,克罗诺杆菌在这些食品的污染率较高,高达 35.9%,连熟食中的污染率都高达 28.6%。克罗诺杆菌在煮熟的情况下会被杀灭,这些熟食在蒸煮或油炸过程中克罗诺杆菌已被杀灭,而实际检测结果却证明这些熟食含有克罗诺杆菌。熟食制品的克罗诺杆菌污染应该来源于做熟后的操作,也叫二次污染,比如在熟食蒸煮或油炸后放置熟食的器皿,后期加工时用的砧板、刀具、擦拭工具的抹布或是操作人员的手等都可能造成污染。

分离株的种水平鉴定结果显示食品中克罗诺杆菌分离株的优势菌种为阪崎克罗诺杆菌,这与国际上

图3 基于 *fusA* 基因构建的克罗诺杆菌系统发育树Fig.3 The *Cronobacter* spp. phylogenetic trees based on *fusA* gene

其他的有关克罗诺杆菌本身的鉴定结果和分型的研究一致^[2-3]。出现此类情况一方面原因可能是由于环境中阪崎克罗诺杆菌的分布范围广,从而容易成为奶粉或其他食品的污染源。

参考文献:

- [1] Kucerova E, Clifton S W, Xia X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species[J]. PLoS One, 2010 (5): 9556

- [2] Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. 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[J]. BMC Evol Biol, 2007(7):64

- [3] Xu X, Wu Q, Zhang J, et al. Occurrence and Characterization of *Cronobacter* spp. in Powdered Formula from Chinese Retail Markets [J]. Foodborne Pathog Dis, 2014(5):1180-1185

收稿日期:2015-03-05