

克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的分离与鉴定能力 验证结果与分析

崔伟佳¹, 郭庆龙², 刘宏玉¹, 张 谦¹, 赵 峰¹, 王 宇¹, 崔淑华^{1*}

(1. 青岛海关技术中心, 青岛 266002; 2. 黄岛海关, 黄岛 266520)

摘要: 目的 通过能力验证, 提高实验室对克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的检测能力。**方法** 依据 GB 4789.40-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》中的第一法, 对能力验证样品进行检验, 对分离出的可疑菌落进行生化鉴定, 同时用 BIOLOG 鉴定系统对可疑菌落进行鉴定。

结果 编号 G785 和编号 V995 的 2 个能力验证样品皆检出克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)。**结论** 本次能力验证获得满意结果, 证明本实验室具备克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的检测能力。本次能力验证实验过程中, 在以国标法检测的同时, 辅以 BIOLOG 进行鉴定, 与传统生化鉴定结果互为印证, 提高了检测结果的准确性, 对以后的检测工作具有一定的参考价值。

关键词: 克罗诺杆菌属; 能力验证; 苦杏仁甙; BIOLOG 鉴定系统

Capability verification results and analysis of isolation and identification of *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*)

CUI Wei-Jia¹, GUO Qing-Long², LIU Hong-Yu¹, ZHANG Qian¹, ZHAO Feng¹,
WANG Yu¹, CUI Shu-Hua^{1*}

(1. Qingdao Customs Technical Center, Qingdao 266002, China; 2. Huangdao Customs, Huangdao 266520, China)

ABSTRACT: Objective To improve the laboratory's ability to detect *Cronobacter sakazakii* (*E. sakazakii*).

Methods According to the first method in GB 4789.40-2016 *National food safety standard-Food microbiology test -Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), the ability verification samples were tested, the suspicious isolated colonies were biochemical identified, and the suspicious colonies were identified with the BIOLOG identification system. **Results** *Cronobacter* spp. was detected in both G785 and V995 samples. **Conclusion** Satisfactory results have been obtained in this capability verification, which proves that our laboratory has the detection ability of *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*). In this capacity verification experiment, the national standard method is used for testing and BIOLOG is used for identification, which is complementary to the traditional biochemical identification results, improving the accuracy of the test results and providing certain reference value for future testing.

KEY WORDS: *Cronobacter* spp.; ability verification; amygdalin; BIOLOG identification system

*通讯作者: 崔淑华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品农产品安全检测。E-mail: ftalab@163.com

*Corresponding author: CUI Shu-Hua, Ph.D, Senior Engineer, Qingdao Customs Technical Center, Qingdao 266002, China. E-mail: ftalab@163.com

1 引言

克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)(*Cronobacter*)属于肠杆菌科,革兰氏阴性无芽孢菌,广泛存在于自然界中,在水、土壤、食品中皆可分离出该菌^[1,2]。该菌是一种条件致病菌,可引起婴幼儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎及败血症等疾病^[3,4],致死率高达 40%~80%^[5]。阪崎肠杆菌此前一直被认为是一种产黄色素的阴沟肠杆菌,直到 1980 年才被认定为一个新的菌种,并以日本微生物学家 Riichi Sakazakii 的名字正式更名为“阪崎肠杆菌”^[6];2008 年,IVERSENC 等^[7,8]根据其特征又将其划分为肠杆菌科的一个新属,即克罗诺杆菌属。目前阪崎肠杆菌的宿主和传播途径尚不能确定,但多起新生儿阪崎肠杆菌感染事件基本证实了婴儿配方奶粉是主要感染源^[9]。可是近年来,也出现了从进口饼干、巧克力和方便面中检出阪崎肠杆菌的情况^[10],甚至在膨化食品-辣味鱿鱼形洋葱片、辣椒粉、冰激凌及茶饮料中也检出过阪崎肠杆菌^[11-14]。因此,阪崎肠杆菌还需要人们的进一步探索和研究。

本实验室参加了中国检验检疫科学研究院组织的“奶粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的检测能力验证计划”,在传统生化实验的基础上,辅以 BIOLOG 微生物鉴定系统对样品进行鉴定,旨在提高本实验室的检测能力,为日常检测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品

编号 G785 和 V995 的能力验证样品,由中国检验检疫研究院测试评价中心提供。样品为白色冻干块状,为人工污染的奶粉样品,包装于真空西林瓶内。

2.1.2 标准菌株

阪崎肠杆菌 ATCC29544(美国 Microbiologics 公司)。

2.1.3 主要培养基与试剂

缓冲蛋白胨水(buffer 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 medium, mLST-Vm)、阪崎肠杆菌显色培养基(DFI Agar, DFI)、胰蛋白胨大豆琼脂(trypticase soy agar, TSA)、DBI-02 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)干制生化鉴定试剂盒(北京陆桥技术股份有限公司);BUG+B 琼脂培养基(BUA Agar with 5% sheep blood, BUG+B)、GEN III MicroPlate 微孔鉴定板、Inoculating Fluid IF-A 接种液(美国 BIOLOG 公司)。

2.1.4 仪器

SPX-150B-Z 生化培养箱、YXQ-LS-75G 高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);HR40-IIA2 生物安全柜(青岛海尔特种电器有限公司);HG400VM 拍打式均质器(德

国 Wiggins 公司);BIOLOG 鉴定仪、Multichannel Pipettes 多道移液器、Turbidimeter 浊度计(美国 BIOLOG 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 前增菌和增菌

将装有验证样品的西林瓶从冰箱中取出,冷却至室温待用。按照参试指导书进行操作:样品开启后,立即加入 4 mL 稀释液进行再水化,待充分溶解后吸出放入无菌瓶中,再反复用余下的稀释液清理西林瓶内壁,回收清洗液放入上述无菌瓶中,稀释液合计 100 mL,即是待测样品原液。

取水化后的样液 100 mL 于无菌均质袋中,加入 900 mL 已预热至 44 °C 的缓冲蛋白胨水中,均质后,36 °C±1 °C 培养 18 h±2 h;取 1 mL 培养液接种于 10 mL mLST-Vm 肉汤中,44 °C±0.5 °C 培养 24 h±2 h。

2.2.2 分离

从 mLST-Vm 肉汤中各取 1 环,划线接种于 2 个阪崎肠杆菌显色培养基,36 °C±1 °C 培养 24 h±2 h。

2.2.3 阪崎肠杆菌生化鉴定试剂盒鉴定

挑取可疑菌落,划线接种于 TSA 平板,25 °C±1 °C 培养 48 h±4 h。挑取 TSA 平板上的黄色菌落进行生化鉴定。

在 TSA 上挑取可疑黄色菌落至适量 0.85% 生理盐水中,仔细研磨,调整制成 0.5 麦氏浊度的均匀菌悬液。依据阪崎肠杆菌生化鉴定试剂盒说明书进行操作并依据结果判定表进行判定。

2.2.4 BIOLOG 鉴定

从 TSA 平板上挑取可疑菌落划线接种于 BUG+B 琼脂上纯化,用一次性无菌接种棉签挑取经纯化的菌落,将棉签末端伸入 Inoculating Fluid IF-A 接种液中,并来回晃动,以便将细菌释放到接种液中。使用浊度仪测定接种液浊度,调整目标细胞浊度为 90%~98% T。

将菌悬液倒入 V 型加样水槽,使用八道移液器往 GEN III MicroPlate 微孔鉴定板的孔中各加入 100 μL 菌悬液,36 °C 培养 24 h 后进行鉴定。

3 结果与分析

3.1 前增菌及平板分离

将能力验证样品 G785、V995 及阳性对照阪崎标准菌株分别进行前增菌及二次增菌后,划线 DFI,结果如表 1 所示。

表 1 标准菌株与能力验证样品增菌与分离结果统计表
Table 1 Statistical table of bacterial growth and isolation results of standard strains and capability verification samples

名称	BPW	mLST-Vm	DFI
标准菌株 ATCC29544	变浑浊	变浑浊	蓝绿色菌落
能力验证样品 G785	变浑浊	变浑浊	白色、黑色、蓝绿色菌落
能力验证样品 V995	变浑浊	变浑浊	白色、黑色、蓝绿色菌落

通过表 1 可知, 能力验证样品 G785、V995 及标准菌株 ATCC29544 在 BPW 及 mLST-Vm 中皆生长良好并使其变浑浊; 标准菌株在 DFI 平板上呈现单一圆形、蓝绿色菌落; 而能力验证样品 G785 及 V995 皆至少有 3 种菌落生长, 分别为白色菌落, 形态较大, 呈枣核型; 黑色圆形菌落; 蓝绿色圆形菌落, 中心颜色较边缘尤深。因此, 能力验证样品 G785 和 V995 皆产生了阪崎肠杆菌典型菌落, 需要进一步对其进行分析。

3.2 生化实验

从能力验证样品 G785、V995 及标准菌株分离出的典型菌落经 TSA 纯化后, 从中挑取黄色可疑菌落, 按照 DBI-02 阪崎肠杆菌干制生化鉴定试剂盒使用说明书进行操作, 结果如表 2 所示。

表 2 标准菌株与能力验证样品生化实验特征
Table 2 Biochemical test characteristics of standard strains and capability verification samples

生化项目	标准菌株	样品 G785	样品 V995	阪崎生化现象
氨基酸对照	黄色	黄色	黄色	黄色
赖氨酸脱羧酶	- (黄色)	- (黄色)	- (黄色)	-
鸟氨酸脱羧酶	+ (紫色)	+ (紫色)	+ (紫色)	(+)
精氨酸双水解酶	+ (紫色)	+ (紫色)	+ (紫色)	+
西蒙氏柠檬酸盐	+ (蓝色)	+ (蓝色)	+ (蓝色)	(+)
D-山梨醇	- (红色)	- (红色)	- (红色)	(-)
L-鼠李糖	+ (黄色)	+ (黄色)	+ (黄色)	+
D-蜜二糖	+ (黄色)	+ (黄色)	+ (黄色)	+
D-蔗糖	+ (黄色)	+ (黄色)	+ (黄色)	+
苦杏仁甙	- (红色)	- (红色)	- (红色)	+/-

注: “+”表示>99%阳性;“-”表示>99%阴性;“(+)”表示 90%~99%阳性;“(-)”表示 90%~99%阴性。

表 2 统计的生化结果显示, 能力验证样品 G785、V995 及阪崎肠杆菌标准菌株 ATCC29544 的实验生化指标完全一致, 皆符合结果判定表里规定的阪崎肠杆菌标准菌株生化现象, 因此能力验证样品 G785 和 V995 皆检出克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)。

需要特别说明的是, 在 GB 4789.40-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》^[15]中, 克罗诺杆菌属生化特征中的苦杏仁甙应>99%阳性; 而在此次实验中经多次验证, 针对苦杏仁甙一项, 不但 2 个能力验证样品为阴性, 而且作为阳性对照的阪崎肠杆菌标准菌株 ATCC29544 的苦杏仁甙生化结果同样为阴性; 而陆桥阪崎肠杆菌生化鉴定试剂盒在判定表中亦注明经多株标准菌株及分离的大量阳性菌株证明, 传统生化

鉴定的结果大多数为阴性。

据悉, ISO 22964-2017-*Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.*^[16]及《伯杰氏手册》^[17]中皆未要求检测阪崎肠杆菌中苦杏仁甙的生化特征, 这说明苦杏仁甙可能不是阪崎肠杆菌的一项关键特征生化指标。因此关于国标中苦杏仁甙的生化特征还有值得商榷之处。

3.3 BIOLOG 鉴定

经 BIOLOG 鉴定, 阪崎肠杆菌标准菌株、能力验证样品 G785、能力验证样品 V995 为克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的可能性(probability, PROB)分别为 99%、97%、95%; 相似性(similarity, SIM)皆大于 0.5, 说明鉴定结果可靠性很高; 位距(distance, DIS)皆在 5.0 左右, 说明匹配性较好。综合来看, 此鉴定结果与其各自的菌落形态及生化特征相符, 印证了前面生化实验的结果, 结果如表 3 所示。

表 3 BIOLOG 鉴定结果统计
Table 3 Statistics of BIOLOG identification results

	可能性	相似性	位距	类别	种属
标准菌株	0.99	0.682	4.532	GN-Ent	<i>Cronobacter</i> Group
样品 G785	0.97	0.660	4.916	GN-Ent	<i>Cronobacter</i> Group
样品 V995	0.95	0.638	5.236	GN-Ent	<i>Cronobacter</i> Group

4 结论与讨论

经本次能力验证组织方中国检验检疫科学研究院评价, 本实验室参加的此次“奶粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的检测能力验证计划”的实验结果为“满意”, 证明本实验室具备检测食品中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的检测能力。

与传统生化反应不同, BIOLOG 微生物鉴定系统是一种基于碳源利用原理的微生物鉴定系统。不同微生物对碳源的利用具有特异性, 微生物在利用碳源进行新陈代谢时, 产生的某些酶能使四唑类物质发生颜色反应, 使其由无色变为紫色。GEN III MicroPlate 微孔鉴定板中的四唑类氧化还原染料通过色度的变化来指示微生物对碳源的利用程度以及对化学物质的敏感程度, 可以对微生物进行包括 71 种碳源利用测试以及 23 种化学敏感性测试在内的 94 种表型测试, 通过读取微孔鉴定板上所表现出的表型指纹图谱来对细菌进行鉴定。BIOLOG 鉴定系统可鉴定包括细菌、霉菌及酵母菌在内的超过 2650 种微生物, 操作简便, 检测范围广, 用时短, 准确率高。

传统生化实验经济适用, 但操作较为繁琐, 周期长,

且容易出现假阳性和假阴性的情况,造成误判。在日常实际检测过程中,采用传统生化实验与微生物鉴定系统结合,尤其是基于不同原理的微生物鉴定系统(如 BIOLOG),可以有效提高检测结果的准确性,但缺点是会造成工作量及成本的增加。对于疑似阳性的样品除传统生化反应外,建议辅以 BIOLOG 鉴定系统进行检测,将传统方法与仪器鉴定相结合,综合判定,以免造成漏检。

参考文献

- [1] 岳紫馨,梁玉林,徐文文,等.基于环介导等温扩增技术快速检测阪崎肠杆菌[J].食品科技,2020,45(6):366-371.
Yue ZX, Liang YL, Xu WW, et al. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* based on ring-mediated isothermal amplification [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(6): 366-371.
- [2] 张西萌,韩笑,付溥博,等. RAPID'Sakazakii Agar 克罗诺杆菌属显色培养基的性能评价[J]. 检验检疫学刊,2018,28(1):10-13,40.
Zhang XM, Han X, Fu PB, et al. Identification and application of chromogenic medium of *Cronobacter* spp. [J]. J Inspect Quar, 2018, 28(1): 10-13, 40.
- [3] 崔迎,任文鑫,夏天,等.食品中阪崎肠杆菌和单增李斯特氏菌检测能力验证结果与分析[J].现代食品,2020,(9):161-164.
Cui Y, Ren WX, Xia T, et al. Analysis on proficiency testing results of detection ability of *Enterobacter sakazakii* and *Listeria monocytogenes* in foods [J]. Mod Food, 2020, (9): 161-164.
- [4] 周露,马蓉.食品中阪崎肠杆菌能力验证结果分析与探讨[J].绿色科技,2017,18:224-226.
Zhou L, Ma R. Proficiency testing results and analysis of *Enterobacter sakazakii* in food [J]. J Green Sci Technol, 2017, 18: 224-226.
- [5] 费鹏,杨同香,姜亦超,等.克罗诺杆菌分型技术研究进展[J].食品科学,2017,38(21):308-312.
Fei P, Yang TX, Jiang YC, et al. Progress in typing methods for *Cronobacter* spp. [J]. Food Sci, 2017, 38(21): 308-312.
- [6] 苏子行,李振球.能力验证实验中阪崎肠杆菌的检测[J].现代食品,2018,(5):124-125.
Su ZH, Li ZQ. The test of *Enterobacter sakazakii* in CNAS proficiency testing [J]. Mod Food, 2018, (5): 124-125.
- [7] Iversen C, Mullane N, Mccardell B, et al. *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 mytjensii* 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]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58: 1442-1447.
- [8] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2012, 62(6): 1277-1283.
- [9] 陈彬,邵碧英,黄晓蓉,等.奶制品中分离的阪崎肠杆菌温度耐受性的研究[J].食品科学,2008,29(11):460-464.

- Chen B, Shao BY, Huang XR, et al. Study on temperature tolerance of *Enterobacter sakazakii* isolated from milk products [J]. Food Sci, 2008, 29(11): 460-464.
- [10] 黄忠梅,王翀,田延河.从进口饼干、巧克力和方便面中检出阪崎肠杆菌[J].中国食品卫生杂志,2007,(2):137-138.
Huang ZM, Wang C, Tian YH. *Enterobacter sakazakii* detected from biscuit and chocolate and instant noodles [J]. Chin J Food Hyg, 2007, (2): 137-138.
- [11] 李可,方莹,程洁,等.自进口膨化食品-辣味鱿鱼形洋葱片中检出阪崎肠杆菌的报告[J].中国卫生检验杂志,2009,19(12):3004-3005.
Li K, Fang Y, Cheng J, et al. A report of *Enterobacter sakazakii* detected in imported puff food-spicy squid shaped onion tablets [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 19(12): 3004-3005.
- [12] 张敏爱,张建军,李卫华,等.辣椒粉中检出阪崎肠杆菌[J].中国调味品,2011,36(11):79-80.
Zhang MA, Zhang JJ, Li WH, et al. A strain of *Enterobacter sakazakii* detected from chili powder [J]. China Cond, 2011, 36(11): 79-80.
- [13] 贺诗词,林芳,黄海燕.冰激凌中阪崎肠杆菌的检测[J].食品安全质量检测学报,2013,4(4):1213-1216.
He SC, Lin F, Huang HY. Detection of *Enterobacter sakazakii* in ice cream [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(4): 1213-1216.
- [14] 陈雅衡,赵炜,王洋,等.部分茶饮料原料辅料中优势菌-克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)的分离和鉴定[J].中国酿造,2013,32(5):59-61.
Chen YH, Zhao W, Wang Y, et al. Isolation and identification of predominant bacteria *Cronobacter sakazakii* from some tea drink materials [J]. China Brew, 2013, 32(5): 59-61.
- [15] GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验[S].
GB 4789.40-2016 National food safety standard-Food microbiology test-*Cronobacter* spp. (*Enterobacter Sakazakii*) [S].
- [16] ISO 22964-2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. [S].
- [17] 中国科学院微生物研究所译.伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M].北京:科学出版社,1984.
Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences. Bergey's manual of systematic bacteriology (8th edition) [M]. Beijing: Science Press, 1984.

(责任编辑:张晓寒)

作者简介



崔伟佳,助理工程师,主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: micbio4789@163.com



崔淑华,博士,高级工程师,主要研究方向为食品农产品安全检测。

E-mail: ftalab@163.com