

- strains isolated from humans and animals [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996,40(10):2380-2386.
- [44] Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007,51(9):3354-3360.
- [45] Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S, et al. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52 (4) : 1564-1566.
- [46] Lunn A D, Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, et al. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates [J]. International Microbiology, 2010,13(1):15-20.
- [47] HE L, Partridge S R, YANG X, et al. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33; A-; B- type epidemic plasmid carrying *bla*_{CTX-M-65}, *fosA3* and *rmtB* from China [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(1):46-50.
- [48] Carattoli A, Bertini A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63 (3) : 219-228.
- [49] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(9):2233.
- [50] Barrett T J, Gerner-Smith P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2006, 3(1):20-31.

论著

浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽胞杆菌的分离及鉴定

董银苹¹, 徐进¹, 王伟¹, 白莉¹, 胡晓², 甘辛¹, 闫韶飞¹, 李志刚¹, 余东敏¹, 李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 中国人民武装警察部队后勤学院 天津市职业与环境危害防制重点实验室, 天津 300162)

摘要:目的 采用多种方法对新西兰进口浓缩乳清蛋白粉及其制品、市售婴幼儿配方粉样品中分离的梭状芽胞杆菌进行鉴定。方法 根据分离菌株的生长特性、革兰氏染色、生化反应、普通显微镜和电子显微镜下形态特征等表型特征, 结合 16S rRNA 基因克隆测序及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱等结果, 对分离菌株进行综合鉴定。结果 78 份样品中有 16 份(20.5%)被梭状芽胞杆菌污染, 其中 2 份为浓缩乳清蛋白粉及其制品, 14 份为婴幼儿配方粉样品。共分离到梭状芽胞杆菌 17 株, 包括生孢梭菌 12 株、拜氏梭菌 2 株、丁酸梭菌 2 株和第三梭菌 1 株。结论 新西兰进口浓缩乳清蛋白粉及其制品中厌氧微生物污染严重, 经鉴定污染的主要微生物为生孢梭菌。

关键词: 浓缩乳清蛋白粉; 生孢梭菌; 鉴定; 16S rRNA; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 婴幼儿配方乳粉; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155; Q93-3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015) 05-0494-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.002

Isolation and identification of *Clostridium* from whey protein concentrate and its products

DONG Yin-ping, XU Jin, WANG Wei, BAI Li, HU Xiao, GAN Xin, YAN Shao-fei,

LI Zhi-gang, YU Dong-min, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective *Clostridium* was isolated and characterized from powdered infant formula (PIF), whey protein concentrate (WPC) suspected to be contaminated with *C. botulinum* and WPC-based products, as well as PIF collected from Beijing market. **Methods** *Clostridium* isolates were characterized by morphological characteristics, gram's stain, microscopic and electron microscopy characteristics, biochemical test, 16S rRNA sequencing and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) methods. **Results** Among 78 samples, 16

收稿日期: 2015-03-06

作者简介: 董银苹 女 助理研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail: dongyinping@cfsa.net.cn

通讯作者: 李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

(20.5%, including 2 WPC and 14 PIF) samples were contaminated with *Clostridium*. A total of 17 isolates were obtained, of which 12 isolates were identified as *C. sporogenes*, 2 isolates of *C. beijerinckii*, 2 isolates of *C. butyricum* and 1 isolate of *C. tertium*. **Conclusion** WPC imported from New Zealand and WPC-based PIF were heavily contaminated by *Clostridium*, and the most predominant species of *Clostridium* detected was *C. sporogenes*.

Key words: Whey protein concentrate; *Clostridium sporogenes*; identification; 16S rRNA; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; infant formula milk powder; foodborne pathogen; food safety

2013年8月3日,新西兰某企业从其生产的浓缩乳清蛋白粉产品中分离到产芽胞的厌氧微生物,其代谢产物对实验动物显示出类似肉毒毒素的毒性,随之怀疑该批浓缩乳清蛋白粉产品可能受到肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)污染,国际食品安全当局网络(INFOSAN)随即向各国通报了“新西兰乳制品企业在浓缩乳清蛋白粉中检出肉毒梭菌”的消息,由此引发全球范围内该企业生产的浓缩乳清蛋白粉及用该浓缩乳清蛋白粉生产的乳制品大批量召回。根据国家食品药品监督管理局的部署,本课题组对相关企业送检的新西兰召回批次问题浓缩乳清蛋白粉、用问题浓缩乳清蛋白粉生产的婴幼儿配方粉及含乳饮品样品、北京市场抽检与问题浓缩乳清蛋白粉无关的婴幼儿配方粉样品进行了应急检测,并对检出的主要微生物进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

生胞梭菌(*C. sporogenes*)标准株(CICC 10385)购自中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)。

1.1.2 样品

本试验样品共78份,其中包括相关企业送检的新西兰召回问题批次浓缩乳清蛋白粉样品(WPC)2份、用问题浓缩乳清蛋白粉生产的婴幼儿配方粉样品(PIF)14份和含乳饮品样品42份、北京市场抽检与问题浓缩乳清蛋白粉无关的婴幼儿配方粉样品20份。

1.1.3 主要仪器与试剂

VITEK2 Compact全自动微生物鉴定/药敏分析系统、厌氧培养装置均购自法国Biomérieux,普通PCR仪(美国BIO-RAD),基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS,德国Bruker),恒温培养箱,生物安全柜(美国Labconco),冷冻离心机。

庖肉肉汤培养基(cooked meat medium)、胰蛋白胨葡萄糖酵母浸膏肉汤培养基(TPGY)、含铁牛乳培养基均购自北京陆桥技术责任有限公司,哥伦比亚血琼脂平板、革兰氏染液、API 20A厌氧菌鉴定系统、VITEK2 ANC TEST KIT均购自法国梅里埃生物制品有限公司,pMDI9-T Vector Cloning Kit、JM109

感受态细胞、DL2000 marker均购自日本TaKaRa, DNA提取试剂盒(德国Qiagen), 2 × Pfu PCR MasterMix购自天根生化科技(北京)有限公司,乙腈、三氟乙酸、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -CCA)均购自美国Sigma。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离

参照GB/T4789.12—2003《食品卫生微生物检验方法 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》及美国FDA《Bacteriological analytical manual(BAM): chapter 17 *Clostridium botulinum* 2001》方法,进行所有样品中肉毒梭菌的分离^[1-2]。

1.2.2 分离菌株鉴定

表型鉴定:分离菌株经纯化后,接种于哥伦比亚血琼脂平板,35℃厌氧培养48h,进行菌落形态、生长特性及溶血现象观察;另取单菌落革兰氏染色后进行显微镜下特征观察,同时进行电子显微镜微观镜像观察。

生化鉴定:分离菌株经纯化后,接种于哥伦比亚血琼脂平板,35℃厌氧培养24h;一部分菌落按照API 20A操作说明进行生化鉴定,另一部分用VITEK2 Compact全自动微生物鉴定系统进行生化鉴定。同时按照仪器操作要求将纯菌种接种于哥伦比亚血琼脂平板,分别在厌氧及有氧条件下培养,观察分离菌株的纯度及活性。

待用API 20A完成鉴定后,另取该菌单菌落接种于庖肉肉汤培养基中,35℃厌氧培养48h,取1ml培养液接种于10ml含铁牛乳培养基内,(46±0.5)℃水浴中培养2h,每小时观察培养液的“暴裂发酵”现象,进行牛奶发酵补充试验。

1.2.3 16S rRNA基因克隆测序

DNA提取:挑取分纯后的菌种接种于哥伦比亚血琼脂平板,35℃厌氧培养24h后,按照DNA提取试剂盒操作说明书进行DNA提取,提取后的DNA于-20℃保存用于基因扩增。

基因扩增及扩增产物纯化:PCR反应体系(50μl):2 × pfu PCR MasterMix 25μl,上下游引物(上游引物FD1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物RP2:5'-ACGGCTACCTTGTTCAGACTT-3')^[3]各0.5μl,DNA模板2μl,用无菌蒸馏水补足

至 50 μl 。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

PCR 产物检测及纯化:取扩增后的 PCR 产物 5 μl , 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 以分子量 100 ~ 2 000 bp 的 Marker 作为参照, 凝胶成像系统中成像。确定为阳性结果后, PCR 剩余产物经试剂盒纯化后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 PCR 产物克隆及基因测序

PCR 产物克隆按照 *pMD19-T Vector Cloning Kit* 操作说明书进行。菌株克隆成功后, 按照上述 PCR 反应体系及条件, 以 *M13* 为引物进行 PCR 确认, 结果为阳性的菌株送雅捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.2.5 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定

分离菌株纯化后接种于哥伦比亚血琼脂平板, 35 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h 后, 取单菌落适量, 加入 300 μl 无菌水混匀, 再加入 900 μl 无水乙醇, 12 000 r/min 离心 2 min 后弃上清; 加入 50 μl 70% 甲酸, 混匀后加入 50 μl 乙腈, 12 000 r/min 离心 2 min; 取 1 μl 上清置于样品靶上, 室温晾干后用 1 μl α -CCA 覆盖, 室温自然挥发后进行 MALDI-TOF-MS 检测。用 MALDI Biotyper 2.0 软件进行数据处理, 若得分在 2.300 ~ 3.000 表示对所鉴定的细菌在种水平高度可信, 得分在 2.000 ~ 2.299 表示在种水平鉴定可信, 得分在 1.700 ~ 1.999 表示在属水平鉴定可信, 得分在 0.000 ~ 1.699 表示鉴定结果不可信。

2 结果

2.1 菌株分离结果

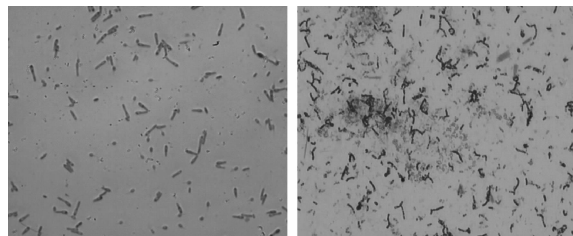
检测结果显示, 78 份样品中有 16 份 (20.5%) 样品厌氧微生物检测结果阳性, 其中包括 2 份问题批次浓缩乳清蛋白粉样品及 14 份婴幼儿配方粉样品, 共分离出 19 株菌。

2.2 鉴定结果

2.2.1 菌落表型特性及显微镜下特征

19 株菌在哥伦比亚血琼脂平板上的菌落形态主要有 2 种: 一种菌落呈白色, 边缘不规则, 根状生长, 不溶血, 严格厌氧菌, 菌落紧紧附着于培养基表面生长, 不易刮取; 第二种菌落呈白色, 边缘略不规则, 呈蜡状, 溶血, 兼性厌氧菌。革兰氏染色后显微镜下结果显示, 19 株分离菌均为革兰阳性杆菌, 显微镜下菌体形态可分为 2 类: 17 株 A 类杆菌有芽胞, 芽胞为卵圆形, 大于菌体宽度, 位于菌体的次极

端, 使菌体呈匙形或网球拍状; 2 株 B 类杆菌菌体成短或长链, 芽胞圆形或柱形, 中生或近中生。分离菌株在哥伦比亚血琼脂平板 48 h 培养后电镜下可见, A 类杆菌在菌体的次极端可见芽胞产生; B 类杆菌未见芽胞产生。A、B 两种杆菌经革兰氏染色后显微镜和电镜下结果分别见图 1、2。

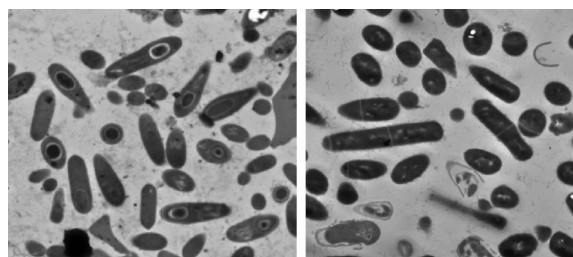


a.A类杆菌革兰氏染色图

b.B类杆菌革兰氏染色图

图1 革兰氏染色结果(1 000 \times)

Figure 1 Gram staining of *Bacillus A* and *Bacillus B*



a.A类杆菌电镜观察图

b.B类杆菌电镜观察图

图2 电镜观察结果(10 000 \times)

Figure 2 Electron microscopy of *Bacillus A* and *Bacillus B*

2.2.2 16S rRNA 基因克隆测序结果

16S rRNA 基因克隆测序结果显示, 19 株杆菌中有 17 株被鉴定为梭状芽胞杆菌, 其中 12 株被鉴定为生胞/肉毒梭菌 (*C. sporogenes/botulinum*), 2 株为拜氏梭菌 (*C. bifermens*), 2 株为丁酸梭菌 (*C. butyricum*), 1 株为第三梭菌 (*C. tertium*)。另外 2 株被鉴定为蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*), 因此仅凭 16S rRNA 基因克隆测序方法不能将生胞梭菌和肉毒梭菌完全区分。

2.2.3 生化鉴定结果

API 20A 和 VITEK2 两种生化方法对 17 株梭状芽胞杆菌分离株的鉴定结果显示, API 20A 将其中的 10 株鉴定为生胞/肉毒梭菌 (这些菌株中的 9 株也被 VITEK2 鉴定为生胞梭菌), 2 株被鉴定为梭状芽胞杆菌属 (而 VITEK2 将其中的 1 株鉴定为生胞梭菌); 剩余 5 株菌均被鉴定为拜氏/丁酸梭菌 (而 VITEK2 鉴定结果为 2 株双酶梭菌、2 株丁酸梭菌和 1 株第三梭菌)。因此单凭 API 20A 生化鉴定方法不能将生胞梭菌和肉毒梭菌完全分开。进一步的牛奶发酵补充生化鉴定结果显示, 10 株被 API 20A 鉴定为生胞/肉毒梭菌的菌株, 牛奶发酵试验结果

均为阴性(而肉毒梭菌在本项补充试验的结果应为阳性),所以生化鉴定方法最终将此 10 株菌鉴定为生胞梭菌。

2.2.4 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

17 株梭状芽胞杆菌分离株的 MALDI-TOF-MS 鉴定结果显示,12 株被鉴定为生胞梭菌,2 株为拜氏

梭菌,2 株为丁酸梭菌,1 株为第三梭菌。

综合上述表型、生化、基因型和蛋白质谱等 4 种方法的鉴定结果,从浓缩乳清蛋白粉及其制品中分离出的 14 株梭状芽胞杆菌中的 12 株被鉴定为生胞梭菌,2 株为拜氏梭菌,2 株为丁酸梭菌,1 株为第三梭菌。具体结果见表 1。

表 1 浓缩乳清蛋白粉及婴幼儿配方粉中梭状芽胞杆菌分离株鉴定结果
Table 1 Identification of *Clostridium* isolated from WPC and PIF samples

菌株编号	样品编号	样品	是否问题批次	培养	溶血	鉴定结果				综合鉴定结果
						16S rRNA 克隆测序	API 20A 及补充生化试验	VITEK2	MALDI-TOF-MS	
1	8	PIF	否	A	—	第三梭菌	拜氏/丁酸梭菌	第三梭菌	第三梭菌	第三梭菌
2	8	PIF	否	A	—	拜氏梭菌	拜氏/丁酸梭菌	拜氏梭菌	拜氏梭菌	拜氏梭菌
3	13	PIF	否	A	—	拜氏梭菌	拜氏/丁酸梭菌	拜氏梭菌	拜氏梭菌	拜氏梭菌
4	14	PIF	否	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
5	15	PIF	否	A	—	生胞/肉毒梭菌	梭菌属	生胞/拜氏梭菌/难辨梭状芽胞杆菌	生胞梭菌	生胞梭菌
6	19	WPC	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
7	63	PIF	否	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
8	67	PIF	否	A	—	丁酸梭菌	拜氏/丁酸梭菌	丁酸梭菌	丁酸梭菌	丁酸梭菌
9	69	PIF	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	梭菌属	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
10	70	PIF	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
11	72	PIF	否	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
12	73	PIF	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
13	74	PIF	否	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
14	75	PIF	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌
15	76	PIF	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞/拜氏梭菌/难辨梭状芽胞杆菌	生胞梭菌	生胞梭菌
16	77	PIF	是	A	—	丁酸梭菌	拜氏/丁酸梭菌	丁酸梭菌	丁酸梭菌	丁酸梭菌
17	78	WPC	是	A	—	生胞/肉毒梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌	生胞梭菌

注: A 表示厌氧环境下培养;—表示不溶血;生胞/肉毒梭菌表示既可能是生胞梭菌,又可能是肉毒梭菌,以此类推

2.3 样品中菌相分布结果

本次检测的 78 份样品中,2 份问题批次浓缩乳清蛋白粉样品中均检出了生胞梭菌;用问题浓缩乳清蛋白粉生产的同一品牌 14 份婴幼儿配方粉样品中 9 份检出了梭状芽胞杆菌,包括 7 株生胞梭菌和 2 株丁酸梭菌,其中 2 份样品还同时被生胞梭菌及蜡样芽胞杆菌污染;市场抽检 20 份与问题批次浓缩乳清蛋白粉样品无关的婴幼儿配方粉中有 5 份检出梭状芽胞杆菌,包括 3 株生胞梭菌、2 株拜氏梭菌和 1 株第三梭菌,其中从一个样品中同时检出拜氏梭菌和第三梭菌;因此用问题批次乳清蛋白粉生产的婴幼儿配方粉中生胞梭菌污染率高于市场抽检样品,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,用问题批次浓缩乳清蛋白粉生产的 42 份含乳饮品样品均未检出梭状芽胞杆菌,可能与含乳饮品中浓缩乳清蛋白粉使用量较低有关。

3 讨论

虽然 16S rRNA 测序广泛用于细菌的鉴定,但生物的系统发育学和生理学并非总是相关。本研究结果显示,16S rRNA 克隆测序结果并不能将生胞梭菌和肉毒梭菌进行准确区分,这是因为生胞

梭菌和 A 型、B 型肉毒梭菌的 16S rRNA 序列有 99% 以上同源,因此仅凭 16S rRNA 测序结果难以将生胞梭菌和肉毒梭菌鉴别开。API 20A 和 VITEK2 两种生化鉴定方法在鉴定过程中出现部分菌株只鉴定到属水平,或某些项目下的鉴定结果不一致的情况,这与两种生化鉴定方法所用试剂不完全相同、以及菌株本身生化反应典型性等有关。MALDI-TOF-MS 是近年发展起来的一种全新用于微生物鉴定和分型的技术,原理是细菌成分解吸附并电离后,样品离子在加速电场作用下通过飞行时间确定离子的质荷比,产生 MALDI-TOF-MS 特征峰,从而对样品进行定性和定量分析^[4],具有鉴别同基因型菌株表面特异的解离物质间微小差异的能力,可完成细菌种水平的鉴定和分型,MALDI-TOF-MS 方法在本研究中有较好的鉴定结果。由此可见,单纯的一种细菌表型、基因型或蛋白型的鉴定方法均不能对本研究分离菌株进行准确鉴定,而将多种鉴定方法相结合进行综合判断,可获得准确可靠的鉴定结果。

16 份梭状芽胞杆菌阳性样品均为婴幼儿配方粉样品或浓缩乳清蛋白粉样品,而 42 份用问题浓缩乳清蛋白粉生产的含乳饮品样品均为阴性,与含乳

饮品中浓缩乳清蛋白粉成分较少有关。生孢梭菌在本次检测样品中分离率最高,占所分离梭状芽胞杆菌总数的70.6%(12/17)。经统计学分析,与问题浓缩乳清蛋白粉样品无关的婴幼儿配方粉样品和问题浓缩乳清蛋白粉成产的婴幼儿配方粉样品梭状芽胞杆菌检出率差异均有统计学意义($P < 0.05$),由此可见,问题浓缩乳清蛋白粉生产的婴幼儿配方粉样品梭状芽胞杆菌污染严重。

生孢梭菌与肉毒梭菌在生化及遗传学特性等方面都非常相似,二者的区别在于生孢梭菌本身不产生肉毒毒素,由于二者有相似的生物学特性,所以生孢梭菌的检出可提示样品有被厌氧微生物污染甚至肉毒梭菌污染的可能^[5]。有报道称生孢梭菌也可产生不同于肉毒毒素的其他有毒代谢产物如溶血毒素等^[6-8]。Barash等^[5]从婴儿型肉毒中毒病例食用的配方粉中,分离到十几种梭状芽胞杆菌,其中生孢梭菌分离率最高。此外本研究还分离到了第三梭菌、拜氏梭菌和丁酸梭菌3种梭状芽胞杆菌。目前国内外对生孢梭菌、第三梭菌、拜氏梭菌和丁酸梭菌研究较少,其致病性及其致病机制亦不清楚。Hauser等^[9]发现,肉毒梭菌中产肉毒毒素的毒力基因能在菌株间不稳定地平行转移,从而既可产生不产毒的变种,又可使梭菌属中的丁酸梭菌和巴氏梭菌等获得产毒基因而产生毒素。关于食品尤其是婴幼儿配方食品中生孢梭菌、丁酸梭菌等厌氧微生物污染与消费者健康的关系,有待在未来的研究进一步探讨。

此外,生孢梭菌、丁酸梭菌、第三梭菌、拜氏梭菌均属亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌(*Sulfite-reducing clostridia*, SRC), SRC为一群厌氧、过氧化氢酶阴性、能将亚硫酸盐还原为硫化物的革兰阳性梭状芽胞杆菌,最初被作为梭状芽胞杆菌污染的指标菌提出来,目的是判断食品,尤其是罐头食品和婴幼儿配方食品是否被不同来源的梭状芽胞杆菌(如粪便来源的产气荚膜梭菌和土壤来源的肉毒梭菌)污染。由于此类细菌芽胞抵抗力强,可在加工不当的食品中存活,适宜条件下又可生长繁殖而造成食品品质降低或腐败,甚至引起食物中毒,因此目前越来越多地将 SRC 用于指示食品被粪便污染、加工环境卫生状况控制、食品生产过程控制指标,以监测产芽胞厌氧菌的潜在生长和存活力,评估食品、食品加工设备及食品生产环境等微生物污染指示菌^[10-11]。

但到目前为止,绝大多数国家和国际组织未将 SRC 作为常规检测项目列入乳与乳制品的安全控制。根据已有资料,在乳制品中设置 SRC 强制性限量标准的国家仅有俄罗斯和阿尔及利亚^[11]。美国乳品出口协会也提出乳制品中 SRC 建议限量值为 10 ~ 25 cfu/g。2013 年,国际微生物学会提出乳制品中 SRC 的建议值为 100 cfu/g^[11]。

我国尚无 SRC 的官方检测方法和限量要求,建立食品中梭状芽胞杆菌的分离鉴定方法,了解从乳品原料到成品全过程 SRC 污染动态变化规律,提出适宜的防控措施,是保障乳制品质量、确保消费者安全亟待解决的问题。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 12—2003 食品卫生微生物检验方法 肉毒梭菌及肉毒毒素检验[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [2] FDA. Bacteriological analytical manual (BAM): chapter 17 *Clostridium botulinum*[S]. 2001.
- [3] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Bacteriol*, 1991, 173(2):697-703.
- [4] 刘海洪. MALD-TOF-MS 在细菌检测和鉴定中的应用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2003, 31(2):47-53.
- [5] Barash J R, Hsia J K, Arnon S S, et al. Presence of soil-dwelling *Clostridia* in commercial powdered Infant formulas[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2010, 156(3):402-408.
- [6] Hara-Kudo Y, Yamakawa Y, Kumagai S. Purification and some properties of *Clostridium sporogenes* hemorrhagic toxin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 227(2):413-418.
- [7] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop[J]. *Microb Pathog*, 1997, 22(1):31-38.
- [8] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Characteristics of toxicity and haemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* in various animals and cultured cells[J]. *J Med Microbiol*, 1997, 46(4):270-275.
- [9] Hauser D, Gibert M, Marvaud J C, et al. *Botulinum neurotoxin-CI* complex genes, *Clostridial* neurotoxin homology and genetic transfer in *Clostridium botulinum*[J]. *Toxicon*, 1995, 33(4):515-526.
- [10] 熊海元, 崔强. 生孢梭菌孢子作为生物指示剂的研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34(7):354-356.
- [11] International Commission on Microbiological Specifications for Foods, International Union of Microbiological Society. Usefulness of testing for *Clostridium botulinum* in powdered infant formula and dairy-based ingredients for infant formula[Z]. 2013.