

调查研究

营养面条生产过程中克罗诺杆菌污染状况与溯源研究

潘琢, 郭玉梅, 徐保红, 秦丽云

(石家庄市疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 调查营养面条生产加工环节中肠杆菌科和克罗诺杆菌的污染状况,对克罗诺杆菌进行溯源研究。方法 采集某营养面条生产企业的生产原料、中间产品、环境、设备、人员和终产品等共 101 份样品,进行肠杆菌科和克罗诺杆菌检测。利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术对克罗诺杆菌进行分子分型和溯源研究。结果 在整个生产过程的样品中,肠杆菌科检出率为 53.5% (54/101),其中环境样品的肠杆菌科检出率最高(72.7%, 16/22);克罗诺杆菌检出率为 29.7% (30/101),其中终产品的克罗诺杆菌检出率最高(50.0%, 5/10)。31 株克罗诺杆菌分离株共获得 20 个 PFGE 带型,多样性较高,经聚类分析可划分为 6 个簇型。结论 营养面条生产加工环节中存在克罗诺杆菌的污染状况,该致病菌污染可能与原料污染有关。克罗诺杆菌的污染问题需要引起食品安全管理部门重视,加强生产加工过程监测,制定有效措施予以控制。

关键词: 克罗诺杆菌; 营养面条; 生产过程; 脉冲场凝胶电泳; 食源性致病菌; 污染; 溯源; 食品安全

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2018)01-0054-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.01.012

Study on *Cronobacter* spp. contamination of nutritious noodles and source-tracing of during manufacture process

PAN Zhuo, GUO Yu-mei, XU Bao-hong, QIN Li-yun

(Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To investigate *Cronobacter* spp. and *Enterobacteriaceae* contamination in nutritious noodles manufacture process and study the molecular typing and traceability analysis of *Cronobacter* spp. **Methods** Totally 101 samples were collected during the process of production, including raw materials, intermediate products, environment swabs, manufacturing facilities, personnel swabs and final products. *Enterobacteriaceae* and *Cronobacter* spp. were detected. And pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) assay was utilized for the molecular typing of *Cronobacter* spp. **Results** The isolation rate of *Enterobacteriaceae* and *Cronobacter* spp. were 53.5% (54/101) and 29.7% (30/101), respectively. The detection rate of *Enterobacteriaceae* was the highest in the environment swabs (72.7%, 16/22), and the prevalence of *Cronobacter* spp. was 50.0% (5/10) in the final products. A high degree of genetic diversity was observed among the 31 isolates with 20 pulse-types dispersed throughout the dendrogram. And the isolates could be grouped into 6 clusters. **Conclusion** It should be paid more attention that *Cronobacter* spp. contamination existed in nutritious noodles manufacturing process, which might be due to the contaminated materials. In addition, effective control strategies were supposed to be developed during the manufacturing process.

Key words: *Cronobacter* spp; nutritious noodles; manufacturing process; pulsed-field gel electrophoresis; foodborne pathogenic bacteria; pollution; traceability; food safety

克罗诺杆菌是一种条件致病菌,之前被称为阪崎肠杆菌^[1]。该菌可引起小肠结肠炎、脑膜炎和菌

血症,死亡率高达 50% 以上,近年来受到人们的高度重视。克罗诺杆菌的主要感染人群为婴幼儿和免疫功能不全的新生儿,也有研究^[2]显示克罗诺杆菌也会感染成年人,特别是老年人。克罗诺杆菌分布非常广泛,在多种植物、食品和环境均有可能存在,但是其污染源还不确切^[2-3]。

面条是我国传统食品之一,其主要成分是谷物面粉。而营养面条中还含有多种营养添加物,如谷物类、鸡蛋、蔬菜、肉制品等。由于面条的生产过程

收稿日期: 2017-12-15

基金项目: 河北省自然科学基金项目(H2016106028); 石家庄市科学技术
研究与发展指导计划项目(41463063)

作者简介: 潘琢 男 主管技师 研究方向为食品微生物学

E-mail: zhuo_pan@163.com

通信作者: 秦丽云 女 副主任技师 研究方向为食品微生物学

E-mail: qinliyun-@163.com

并非无菌加工,因此,其产品的质量和食品安全性与原料和生产环节的微生物污染状况直接相关。据报道^[4-5],作为面条的主要原料,小麦、燕麦、玉米等谷物类作物,均有可能被克罗诺杆菌污染。由于营养面条作为一种易消化食品常用于婴幼儿和老年人的膳食,因此,市售营养面条中克罗诺杆菌污染状况需要得到更多关注。

脉冲场凝胶电泳(PFGE)是致病菌分子分型的“金标准”,该技术已成熟应用于在克罗诺杆菌分型溯源研究中^[6]。不过,关于克罗诺杆菌污染的调查和溯源研究多集中在婴幼儿配方奶粉及其生产环节等方面^[7-9]。迄今为止,涉及到营养面条克罗诺杆菌污染的研究较少^[10],针对营养面条特别是其生产过程中的克罗诺杆菌污染状况研究鲜有报道。本研究拟采集某营养面条生产企业生产加工过程中各关键环节样品,进行肠杆菌科和克罗诺杆菌检测,并利用PFGE对分离出的菌株进行分子分型和溯源研究,探讨克罗诺杆菌在加工过程中的污染情况并分析可能的污染途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2016年10月分2次从某营养面条生产企业采集样品共计101份。样品覆盖营养面条生产的各个环节:生产原料包括小麦面粉、西兰花粉、香菇粉、菠菜粉、黑米粉、薯粉、西红柿粉、牛肉粉等共16份;中间产品包括和面后样品、成型后样品和干燥后样品共计14份;环境样品包括车间地面、运货电梯、墙壁、生产线附近可疑角落等共计22份;人员样品包括和面车间、压面车间、干燥车间和包装车间等地点工人的工作服、手表面、鞋底等样品共计12份;设备样品包括运送推车车轮、和面机、压面机、压面刀、干燥机、传送带、电子天平、包装机等共计20份;工具样品包括维修、清洁工具等共计7份。终产品营养面条共计10份。各类样品与终产品具有批次相关。

食品样品包括原料、中间产品和终产品,均无菌采集每份500g,环境、人员(手、衣服、鞋底)、仪器设备和工具(维修、清洁)等使用含有10ml缓冲蛋白胨水(BPW)的海绵拭子涂抹采样(采集面积为1m²,如涂抹面积不够1m²则尽量擦拭采集整个物体表面)。

1.1.2 主要仪器与试剂

旋转式恒温振荡器,CHEF MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪、GELXR 凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad。

BPW、胰酪大豆胨琼脂(TSA)、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(mLST-Vm)肉汤和结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)均购自北京陆桥技术股份有限公司,海绵采样拭子(含10ml BPW),阪崎肠杆菌显色琼脂(DFI)培养基(英国 Oxoid),API 20E 生化鉴定试剂盒(法国梅里埃),SeaKem Gold 琼脂糖(美国 Cambrex),限制性内切酶 *Xba* I 和蛋白酶 K(日本 Takara)。

1.2 方法

1.2.1 肠杆菌科和克罗诺杆菌的检验方法

依据 GB 4789.41—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验》^[11]规定的方法检测样品中肠杆菌科的污染状况。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》^[12]规定的方法进行克罗诺杆菌检验和分离。对所有可疑菌株均使用 API 20E 生化鉴定试剂盒进行鉴定。

1.2.2 PFGE

使用 PFGE 对菌株进行分子分型,采用 PulseNet 推荐的克罗诺杆菌分型标准方法^[13],沙门菌 H9812 作为通用标准菌株。菌株使用限制性内切酶 *Xba* I 进行酶切。电泳条件:脉冲时间为 1.8~25 s,电场强度为 6 V/cm,电场角度为 120°,电泳时间为 19 h。

利用 Bionumeric version 7.6 软件(比利时 Applied Maths),进行 PFGE 型别分析以及聚类图的制作,数据分析应用 DICE 系数和非加权配对算数平均(UPGMA)法,条带位置差异容许度 2.0%,优化值 1.5%。

1.3 统计学分析

利用 SPSS 19.0 对肠杆菌科和克罗诺杆菌的检出率进行卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株分离

如表 1 所示,101 份样品的肠杆菌科检出率(53.5%,54/101)高于克罗诺杆菌检出率(29.7%,30/101),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。环境样品的肠杆菌科检出率最高(72.7%,16/22),终产品的克罗诺杆菌检出率最高(50.0%,5/10)。此外,本研究共分离出克罗诺杆菌 31 株(有 1 份原料中分离出 2 株克罗诺杆菌)。克罗诺杆菌在食品样品中的检出率为 40.0%(16/40),在海绵拭子样品中的检出率为 23.0%(14/61)。分离出的菌株均经过 API 20E 鉴定确认。

表1 肠杆菌科和克罗诺杆菌在生产过程中的污染状况

Table 1 Contamination of *Enterobacteriaceae* and *Cronobacter* spp. during the manufacturing process

分类	样品种类	样品份数	肠杆菌科		克罗诺杆菌		PFGE 型别
			阳性样品份数	检出率/%	阳性样品份数	检出率/%	
食品样品	原料	16	8	50.0	6	37.5	Crono-1, Crono-2, Crono-3, Crono-4
	中间产品	14	5	35.7	5	35.7	Crono-5, Crono-6
	终产品	10	6	60.0	5	50.0	Crono-3, Crono-5, Crono-6
海绵拭子样品	环境	22	16	72.7	8	36.4	Crono-1, Crono-3, Crono-5
	人员	12	6	50.0	1	8.3	Crono-3
	设备	20	11	55.0	4	20.0	Crono-1, Crono-2, Crono-3, Crono-4
	工具	7	2	28.6	1	14.3	Crono-3
合计	—	101	54	53.5	30	29.7	—

注:—表示该项不进行统计

2.2 PFGE 聚类分析

克罗诺杆菌的基因组核酸经 *Xba* I 酶切后可得到 9~20 条 PFGE 条带, 分子量在 40~1 000 kbp 之间。利用 Bionumerics 软件进行聚类分析显示, 克罗诺杆菌分离株的多样性程度较高, 共得到 20 个 PFGE 带型(如图 1 所示)。将聚类图中相似系数 80% 以上的各个菌株归为一簇, 可以得到 6 个优势簇型(Crono-1~Crono-6), 每个簇包含 2~11 株菌。Crono-3 为最

大的簇, 包含 11 株菌, 这些分离株来源于生产过程 4 个环节(原料、和面、压面、包装)中的 6 种样品, 包括原料、工具、终产品以及环境、设备、人员等。Crono-1 是第二大簇, 由 6 株菌株组成, 分离自原料、设备和环境样品。Crono-5 的 5 株菌来自食品样品和环境。此外, Crono-4 和 Crono-2 这两簇中的菌株均分离自原料和设备, 分别包含 3 株菌和 2 株菌。Crono-6 中的菌株则来自于中间产品和终产品。

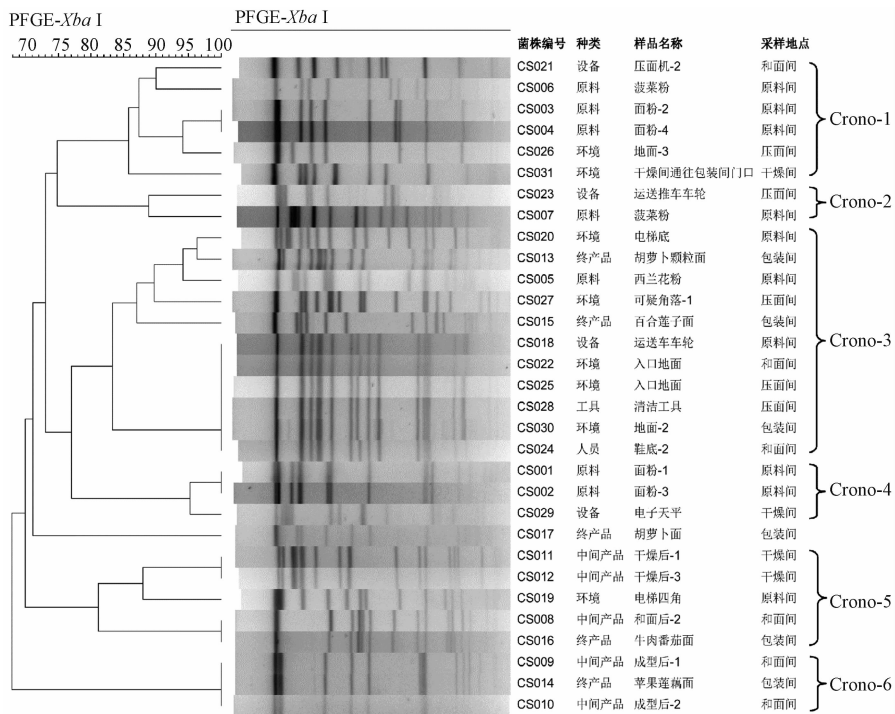


图1 31株克罗诺杆菌分离株的PFGE聚类图

Figure 1 Dendrogram of PFGE results for total 31 *Cronobacter* spp. isolates investigated in this study

将菌株的 6 个优势 PFGE 簇型在各个生产环节中的分布标示出来, 如图 2 所示, 生产过程中原料间环节的簇型最具多样性, 共包含有 5 种 PFGE 簇型(Crono-1~Crono-5)。食品样品包含 4 种簇型, 海绵拭子样品包含 2 种簇型。值得注意的是, 这些簇型在下游生产加工过程以及终产品中均有发现。此外, 簇型 Crono-6 仅在和面间中间产品和包装间终产品中出现。

3 讨论

本研究中的肠杆菌科检出率(53.5%, 54/101)要高于克罗诺杆菌检出率(29.7%, 30/101)。肠杆菌科为常见菌, 其作为卫生指示菌, 常用于卫生状况评价。营养面条生产加工过程中的许多环节上存在肠杆菌科污染, 终产品的肠杆菌科检出率为 50.0% (5/10), 环境样品检出率高达 72.7%

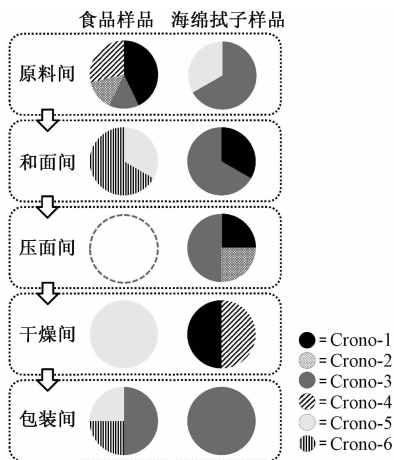


图2 营养面条生产加工过程中克罗诺杆菌 PFGE 优势聚类簇 (Crono-1 ~ Crono-6) 的分布状况

Figure 2 Distribution of *Cronobacter* spp. clones (Crono-1 to Crono-6) at various stages of nutritious noodles manufacturing process

(16/22),此外,原料、人员、设备样品的检出率都在50.0%以上,高于 AKINEDEN 等^[14]报道的意大利面中肠杆菌科的检出率(38.6%)。此外,克罗诺杆菌在终产品中的检出率高达50.0%(5/10),高于国外报道^[14]的检出率(10.6%),低于国内研究^[15]中营养面条克罗诺杆菌污染的检出率(71.4%)。尽管当前国内相关卫生标准中对生产环节肠杆菌科污染未做要求,且对于面条中克罗诺杆菌污染也暂无国家标准规定,但就风险而言不容忽视。

营养面条作为婴幼儿食品的一种,具有克罗诺杆菌污染风险。克罗诺杆菌在食品生产中的主要污染途径有两个:一是生产过程中的污染,如使用污染的机器与设备;二是污染原料的使用。在本研究中,克罗诺杆菌 PFGE 带型具有较高多样性,与国外相关报道^[7]一致。利用聚类簇进一步分析 PFGE 图谱可得,来自于原料、终产品、环境、设备、人员、工具的菌株能够聚为同一个聚类簇(如 Crono-3),并且,生产起始环节(原料间)中分离株的 PFGE 簇型,在接下来的加工过程中及各类产品中都会出现,这就意味着原料污染可能是造成营养面条产品污染的一大因素。

关于原料中的克罗诺杆菌污染,一方面为淀粉类原料的污染,面条的主要原料成分是淀粉类作物,有报告^[16]显示该类作物受到克罗诺杆菌污染的风险较大,是造成婴幼儿面条污染的重要因素。在本研究中的所有原料面粉中均分离出克罗诺杆菌。另一方面为营养添加物的污染,为了提高面条的营养需求和增加口味种类,生产中会添加奶粉、谷物粉、蔬菜粉等原料,这些原料也都存在克罗诺杆菌污染的可能^[16-17]。本研究在生产原料菠菜粉和西

兰花粉中均检出克罗诺杆菌。此外,需要注意的是,在菠菜粉中发现了2种 PFGE 带型的菌株,提示同一种原料可能会受到多种克罗诺杆菌的污染。

本研究中,一些 PFGE 簇型在各个环节中的分布缺乏连续性。如 Crono-1 在原料间、和面间、压面间和干燥间都有检出,但在终产品中并未检出。Crono-3 在除干燥间以外的其他生产环节均可检出此簇型菌株。归其原因,一方面可能是采样数量不够造成的,另一方面,面条在干燥间需经过长达2 h 的加热干燥(50~60℃),该处理环节可能对面条中的克罗诺杆菌有一定杀灭作用。除此之外,在面条生产的中间流程(和面、压面、干燥)中,海绵拭子样品中的菌株簇型种类多于食品样品,这意味着生产过程中环境、设备和人员方面的卫生控制效果不理想,污染状况复杂,因此,在生产中要及时对车间环境、生产设备和工具进行消毒、杀菌。此外,还需针对人员和移动设备制定卫生消毒措施,以限制克罗诺杆菌在各生产区域之间的交叉污染。

总之,营养面条生产加工过程中的肠杆菌科和克罗诺杆菌污染均较为严重,需引起食品安全管理部门关注,有必要进一步加强面条类产品及其生产过程中克罗诺杆菌污染监测,并制定相关措施予以控制,提升食品安全水平。

参考文献

- [1] 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 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]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58 (6):1442-1447.
- [2] NORBERG S, STANTON C, ROSS R P, et al. *Cronobacter* spp. in powdered infant formula [J]. *J Food Prot*, 2012, 75 (3): 607-620.
- [3] PATRICK M E, MAHON B E, GREENE S A, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003 to 2009 [J]. *Emerg Inf Dis*, 2014, 20(9):1520-1523.
- [4] LOU X Q, SI G J, YU H, et al. Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) via wheat flour [J]. *Food Control*, 2014, 43(5):258-262.
- [5] LI Y H, CHEN Q M, ZHAO J F, et al. Isolation, identification, and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China [J]. *Food Control*, 2014, 37 (1):109-114.
- [6] PAN Z, CUI J W, LYU G P, et al. Isolation and molecular

- typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11 (6):456-461.
- [7] MÜLLER A, STEPHAN R, FRICKER-FEER C, et al. Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility [J]. *J Food Prot*, 2013, 76 (5): 883-887.
- [8] 周少君, 邓小玲, 朱海明, 等. 2010年—2013年广东省婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(15):2248-2251.
- [9] 孙建云, 胡晓宁, 兰光, 等. 婴儿配方粉及生产加工环节微生物污染情况调查[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(4): 474-477.
- [10] 乔雪飞, 邱香, 吴佳瑾, 等. 2016年上海市松江区婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染状况分析[J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(7):612-616.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验:GB 4789.41—2016[S]. 北京:中国标准出版社, 2016.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 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:GB 4789.40—2016[S]. 北京:中国标准出版社, 2016.
- [13] BRENGI S P, O'BRIEN S B, PICHEL M, et al. Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2012, 9(9):861-867.
- [14] AKINEDEN Ö, MURATA K J, GROSS M, et al. Microbiological quality of raw dried pasta from the German market, with special emphasis on *Cronobacter* species [J]. *J Food Sci*, 2015, 80(12):M2860-M2867.
- [15] 姜琛璐. 重庆市婴幼儿食品中阪崎肠杆菌的检测及表型、基因型特征的研究[D]. 重庆:西南大学, 2014.
- [16] SANI N A, ODEYEMI O A. Occurrence and prevalence of *Cronobacter* spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis [J]. *Springerplus*, 2015, 4(1):545.
- [17] KIM K, JANG S S, KIM S K, et al. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 122(1/2):196-203.

· 资讯 ·

解读《关于食品用香料新品种 2-乙酰氧基-3-丁酮、食品添加剂 β -环状糊精等 4 种扩大使用范围的公告(2017 年第 10 号)》

一、2-乙酰氧基-3-丁酮

(一)背景资料。2-乙酰氧基-3-丁酮的分子式是 $C_6H_{10}O_3$ 。欧盟委员会、美国食用香料和提取物制造者协会、国际食品用香料香精工业组织等允许其作为食品用香料在各类食品中按生产需要适量使用。

(二)工艺必要性。该物质配制成食品用香精后用于各类食品(GB 2760《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》表 B.1 食品类别除外),改善食品的味道。该物质的质量规格按照公告的相关内容执行。

二、 β -环状糊精

(一)背景资料。 β -环状糊精作为食品添加剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760),允许用于胶基糖果、方便米面制品、预制肉制品、熟肉制品、碳酸饮料、风味饮料等食品类别。本次申请其使用范围扩大到除胶基糖果以外的其他糖果(仅限压片糖果)(食品类别 05.02.02)。国际食品法典委员会、欧盟委员会、日本厚生劳动省等允许其作为食品添加剂用于食品。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会评估结果,该物质的每日允许摄入量不超过 5 mg/kg bw。

(二)工艺必要性。该物质用于除胶基糖果以外的其他糖果(仅限压片糖果)(食品类别 05.02.02),保护产品的色泽和风味。其质量规格应执行《食品添加剂 β -环状糊精》(GB 1886.180—2016)。

三、纽甜

(一)背景资料。纽甜作为食品添加剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760),允许用于调制乳、风味发酵乳、干酪类似品、脂肪类甜品、水果罐头、果酱、蜜饯凉果、加工蔬菜、腌渍的蔬菜、胶基糖果、焙烤食品、水产品罐头、醋、复合调味料、含乳饮料等食品类别。本次申请其使用范围扩大到方便米面制品(食品类别 06.07)。国际食品法典委员会、美国食品药品监督管理局、澳大利亚和新西兰食品标准局等允许其作为甜味剂用于食品。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会评估结果,该物质的每日允许摄入量不超过 2 mg/kg bw。

(二)工艺必要性。该物质作为甜味剂用于方便米面制品(食品类别 06.07),调节产品口味。其质量规格应执行《食品添加剂 N-[N-(3,3-二甲基丁基)]-L- α -天门冬氨酸-L-苯丙氨酸 1-甲酯(纽甜)》(GB 29944—2013)。