

## 调查研究

## 市售婴幼儿配方奶粉和婴幼儿米粉中梭状芽胞杆菌的分离和综合鉴定分析

陆峥,刘玉竹,张鹏航,张诣,陈倩,张晓媛

(北京市疾病预防控制中心营养与食品卫生所,北京市预防医学研究中心,食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室,北京 100013)

**摘要:**目的 对57件市售婴幼儿配方奶粉、50件婴幼儿米粉进行梭状芽胞杆菌分离鉴定分析及毒素基因检测,获得梭状芽胞杆菌的污染水平数据,并评估各鉴定方法。方法 通过分离菌株的生长特性、革兰染色、普通显微镜下形态特征等表型特征,应用微生物飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)、16S rRNA基因测序技术、全基因组测序技术对分离菌株进行综合鉴定,通过PCR对分离的梭状芽胞杆菌进行肉毒毒素基因检测,对肉毒毒素基因PCR阳性片段进行测序和比对分析。结果 57份市售婴幼儿配方奶粉中有26份样品中检出38株梭状芽胞杆菌,其中9份样品中同时检出超过两种细菌。50份市售婴幼儿米粉中有5份样品检出5株梭状芽胞杆菌。奶粉中分离的一株楔形梭菌E型肉毒梭菌毒素基因PCR扩增阳性,扩增片段测序比对结果显示这段序列并不是E型肉毒梭菌毒素基因,全基因组测序结果也证实。43株梭状芽胞杆菌均未检出肉毒梭菌的毒素基因。结论 梭状芽胞杆菌鉴定需要多种方法的综合分析。市售婴幼儿配方奶粉、婴幼儿米粉中存在梭状芽胞杆菌的污染,应加强婴幼儿配方食品中重要梭状芽胞杆菌的监测,为风险评估提供数据支持。

**关键词:**梭状芽胞杆菌;婴幼儿配方奶粉;婴幼儿米粉;肉毒毒素基因;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)04-0433-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.04.011

### Isolation and comprehensive identification of *Clostridium* sp. in commercially available infant formula milk powder and infant formula rice flour

LU Zheng, LIU Yuzhu, ZHANG Penghang, ZHANG Yi, CHEN Qian, ZHANG Xiaoyuan

(Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing Center for Disease Preventive Medical Research, Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

**Abstract: Objective** *Clostridium* sp. isolation, identification and analysis and toxin gene detection were carried out on 57 pieces of commercially available infant formula milk powder and 50 pieces of commercially available infant rice noodles sold in Beijing. The data of *Clostridium* sp. contamination level was obtained, and the identification methods were evaluated. **Methods** The isolates were comprehensively identified by their growth characteristics, Gram staining, morphological characteristics under ordinary microscopy, combined with the results of mass spectrometry identification, 16S rRNA gene sequencing and whole-genome sequencing (WGS). The botulinum toxin genes of isolated *Clostridium* sp. were detected by PCR. Then, sequencing and comparative analysis of PCR positive fragments were carried out. **Results** Thirty-eight *Clostridium* sp. in 26 samples of the 57 commercially available infant formula milk powder samples were detected. More than two types of isolates were detected in 9 samples. Five *Clostridium* sp. were detected in 5 samples of 50 commercially available infant rice flour. PCR amplification of the *Clostridium botulinum* type E toxin gene of a *Clostridium sphenoides* was positive, the amplified fragment sequencing comparison results showed that this sequence was not an E-type *Clostridium botulinum* toxin gene, and the WGS results also confirmed it. There were no toxin genes of *Clostridium botulinum* in all the 43 isolates. **Conclusion** Identification of *Clostridium* sp. requires comprehensive analysis by

收稿日期:2023-04-04

基金项目:首都高层次公共卫生人才建设项目(学科骨干-01-027)

作者简介:陆峥 女 副主任技师 研究方向为食品微生物 E-mail:luzheng0715@163.com

通信作者:张晓媛 女 研究员 研究方向为食源性致病菌的分子流行病学 E-mail:zhangxiaoyan\_0922@163.com

multiple methods. The contamination of *Clostridium* sp. exists in commercial infant formula milk powder and infant formula rice flour. It is necessary to strengthen the monitoring of important *Clostridium* sp. in infant formula food to provide data support for risk assessment.

**Key words:** *Clostridium* sp.; infant formula milk powder; infant rice flour; botulinum toxin gene; foodborne disease

梭状芽胞杆菌是一群革兰阳性、厌氧或微需氧的产芽胞杆菌,广泛分布于自然界,由于其能形成芽胞,对外界有较强的抵抗力,因此可在外环境中长期存留。致病的梭状芽胞杆菌主要有破伤风梭菌、艰难梭菌、肉毒梭菌、产气荚膜梭菌等。除此之外,丁酸梭菌、第三梭菌、巴氏梭菌和尸毒梭菌等梭状芽胞杆菌与婴儿肉毒中毒、新生儿坏死性小肠结肠炎、婴儿腹泻及菌血症等疾病相关<sup>[1-3]</sup>。

2013年食品安全局网络通报了“新西兰乳制品企业在浓缩乳清蛋白粉中检出肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)”的消息,由此引发全球范围内该企业生产的问题乳及用问题乳清粉生产的婴幼儿配方奶粉产品的大批量召回,后受污染的产芽胞微生物经鉴定为生胞梭菌(*Clostridium sporogenes*)。生胞梭菌与肉毒梭菌在基因组上极其相似,16S rRNA不能将其区分开来,但是生胞梭菌的代谢产物腹腔注射小鼠后,在短时间内小鼠死亡,在动物死亡事件、中毒表现和耐热性等方面均不同于肉毒毒素中毒。有研究显示,肉毒毒素基因能在菌株间不稳定地平行转移,从而产生不产毒的变种,或是携带部分或未知肉毒毒素基因的菌株<sup>[4-5]</sup>。梭菌属中的丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)和巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)可以获得肉毒毒素基因产生毒素<sup>[6]</sup>。生胞梭菌、丁酸梭菌及巴氏梭菌等又是婴儿配方奶粉中常见污染菌。这些菌既可产生不同于肉毒毒素的其他有毒代谢产物,又具备可接受肉毒梭菌平行转移的肉毒毒素基因而产生肉毒毒素的潜力,引起人或动物中毒反应,因此是需要监测和检测的重要食源性致病菌。

本研究对市售婴儿配方奶粉及婴幼儿米粉进行梭状芽胞杆菌检测,结合传统分离培养、染色形态识别与微生物飞行时间质谱、16S rRNA基因测序、全基因组测序的鉴定手段,建立婴幼儿配方奶粉和婴幼儿米粉中重要梭状芽胞杆菌的协同分离及精准鉴定方法,获得婴幼儿配方奶粉及婴幼儿米粉中重要梭状芽胞杆菌的污染水平数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品数量及来源

研究食品样本共计107份,包括57份市售婴幼儿配方奶粉、50份市售婴幼儿米粉。

### 1.2 主要仪器与试剂

生物安全柜、离心机(美国 Thermo 公司);均质器(英国 Seward);MIR-254 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司);厌氧罐(荷兰 Mart 公司);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司);SW22 水浴摇床(德国 Julabo 公司);Gel Doc 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);609824 显微镜(日本 Olympus 公司);Veriti 96 well Thermal cycler 普通 PCR 仪(美国 Life 公司);电泳仪(中国六一生物科技有限公司)。

明胶磷酸盐缓冲液、胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤(TPGYT);庖肉肉汤培养基(北京陆桥技术有限责任公司);无水乙醇(上海沃凯生物科技有限公司);革兰氏染液(北京索莱宝科技有限责任公司);哥伦比亚血琼脂培养基(美国 Thermo);DNA 提取试剂盒(美国 Qiagen);厌氧袋(日本三菱);Premix Taq™试剂(北京宝生物生物技术有限公司);琼脂糖(西班牙 Biowest)。所有培养基试剂均在有效期内使用。

### 1.3 标准菌株

生胞梭菌标准株(CICC 10385)购自中国工业微生物菌种保藏中心。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 样品前处理和增菌

参考 GB 4789.12—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》要求进行样品前处理和增菌培养。接种前,先将培养基隔水煮沸 10~15 min 后迅速放入冰上冷却。取 25 g 奶粉样品加入 35 mL 明胶磷酸盐缓冲液、取 25 g 米粉样品加入 100 mL 明胶磷酸盐缓冲液,均质器混匀,取混匀后的样品稀释液 2 mL 分别接种庖肉培养基和 TPGYT 培养基各 2 管,庖肉培养基 35 °C 厌氧培养 5 d、TPGYT 培养基 28 °C 厌氧培养 5 d。

#### 1.4.2 菌株分纯培养

吸取 1 mL 增菌液至无菌螺旋帽试管中,加入 1 mL 无水乙醇,混匀,在室温下放置 1 h。无菌接种环挑取试管中用无水乙醇处理过的增菌液接种至哥伦比亚血琼脂平板,37 °C 厌氧培养 48 h。挑取单个典型梭状芽胞杆菌菌落,再次接种哥伦比亚血琼脂平板分纯,37 °C 厌氧培养 48 h。

### 1.4.3 典型菌落形态特征识别

观察血平板上二次分离菌株的菌落形态及溶血情况,同时挑取单菌落进行革兰氏染色,在显微镜下观察其染色形态。

### 1.4.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定

取适量分离纯化后的新鲜菌涂于靶板上,加 1  $\mu$ L 的 HCCA 基质溶液,室温晾干后进行 MALDI-TOF-MS 的检测,用 MALDI biotype 软件进行分析,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,若得分在 2.000~2.299 表示对所鉴定的细菌在种水平可信,若得分在 1.700~1.999 表示对所鉴定的细菌在属水平可信,若得分 <1.700 表示鉴定结果不可信。

### 1.4.5 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序

按照革兰氏阳性菌 DNA 试剂盒操作说明书提取 DNA。通用引物对细菌 16S rRNA 进行 PCR 扩增。扩增产物送生工生物工程股份有限公司进行测序。

### 1.4.6 全基因组测序

使用商品化细菌 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,提取步骤见其说明书;将提取的 DNA 低温寄送至赛默百合生物科技有限公司,进行全基因组测序。

全基因组测序数据经过质控后,使用 Edena 工具进行组装;之后上传至 Center for Genomic Epidemiology 网站(网址: <http://www.genomicepidemiology.org>) 的 KmerFinder 3.1 中进行比对,得到鉴定结果。

### 1.4.7 毒素基因检测

针对 A、B、E、F 肉毒梭菌毒素基因进行 PCR 扩增<sup>[7]</sup>。PCR 引物见表 1。PCR 反应参数为:预变性 95  $^{\circ}$ C, 5 min;变性 94  $^{\circ}$ C, 1 min;退火 60  $^{\circ}$ C, 1 min;延长 72  $^{\circ}$ C, 1 min;30 个循环,再延长 72  $^{\circ}$ C, 10 min。阳性对照为插入了肉毒毒素基因序列的合成质粒(生工生物工程股份有限公司合成),阴性对照为水。取扩增产物 5  $\mu$ L 在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,染色后用凝胶成像仪成像。肉毒梭菌毒素基因阳性的 PCR 扩增产物送生工生物工程股份有限公司进行测序。

表 1 肉毒梭菌毒素基因的 PCR 扩增引物

Table 1 PCR amplification primers for *Clostridium botulinum* toxin genes

| 引物名称    | 引物序列(5'~3')                         | 片段长度/bp |
|---------|-------------------------------------|---------|
| TypeA-F | GTG ATA CAA CCA GAT GGT AGT TAT AG  | 983     |
| TypeA-R | AAA AAA CAA GTC CCA ATT ATT AAC TTT |         |
| TypeB-F | GAG ATG TTT GTG AAT ATT ATG ATC CAG | 492     |
| TypeB-R | GTT CAT GCA TTA ATA TCA AGG CTG G   |         |
| TypeE-F | CCA GGC GGT TGT CAA GAA TTT TAT     | 410     |
| TypeE-R | TCA AAT AAA TCA GGC TCT GCT CCC     |         |
| TypeF-F | GCT TCA TTA AAG AAC GGA AGC AGT GCT | 1 137   |
| TypeF-R | GTG GCG CCT TTG TAC CTT TTC TAG G   |         |

## 2 结果

### 2.1 菌株分离结果

57 份市售婴幼儿配方奶粉中有 30 份样品中检出厌氧可培养的细菌,其中 9 份样品中检出超过两种形态的细菌。50 份市售婴幼儿米粉中有 6 份样品检出厌氧可培养的细菌。

### 2.2 鉴定结果

#### 2.2.1 质谱鉴定结果

30 份市售婴幼儿配方奶粉样品中检出 43 株菌,质谱鉴定结果为:18 株生孢梭菌、3 株拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、5 株酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)、3 株速生梭菌(*Clostridium celerecrescens*)、2 株丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、2 株二醇梭菌(*Clostridium diolis*)、1 株耐酸梭菌(*Clostridium aciditolerans*)、1 株匙形梭菌(*Clostridium cochlearium*)、1 株特氏梭菌(*Clostridium tertium*)、1 株煎盘梭菌(*Clostridium sartagoforme*)、1 株粪肠球菌、1 株加米那类芽胞杆菌、3 株环状芽胞杆菌、1 株质谱未鉴定菌种。

6 份市售婴幼儿米粉中检出 6 株菌,质谱鉴定结果为:5 株均为拜氏梭菌、1 株为蜡样芽胞杆菌。

所有样品中共检出 43 株疑似梭状芽胞杆菌(42 株质谱鉴定梭状芽胞杆菌,1 株质谱未鉴定菌种)。42 株菌质谱分值都大于 1.800,其中 2 株菌的质谱分值大于 2.300,32 株菌的质谱分值 2.000~2.29 之间,8 株菌质谱分值在 1.800~1.999 之间,见表 2。

表 2 市售婴幼儿配方奶粉与婴幼儿米粉中疑似梭状芽胞杆菌菌株的鉴定情况

Table 2 Identification of suspected *Clostridium* isolated from infant formula milk powder and infant formula rice flour

| 样品来源 | 样品编号 | 菌株编号  | 有氧是否生长 | 菌落形态               | 质谱鉴定结果 | 质谱分值  | 16S rRNA 结果   | 肉毒毒素基因 PCR 结果 |
|------|------|-------|--------|--------------------|--------|-------|---|---------------|
| 米粉   | M34  | MF34+ | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则 | 拜氏梭菌   | 2.015 | 拜氏梭菌/二醇梭菌( <i>Clostridium beijerinckii/Clostridium diolis</i> ) | 阴性            |
| 米粉   | M38  | MF38  | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则 | 拜氏梭菌   | 1.966 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性            |
| 米粉   | M39  | MF39  | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则 | 拜氏梭菌   | 2.011 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性            |

续表2

| 样品来源 | 样品编号 | 菌株编号    | 有氧是否生长 | 菌落形态                | 质谱鉴定结果 | 质谱分值  | 16S rRNA 结果   | 肉毒素基因 PCR 结果 |
|------|------|---------|--------|---------------------|--------|-------|---|--------------|
| 米粉   | M47  | MF47    | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 拜氏梭菌   | 1.895 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 米粉   | M48  | MF48    | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 拜氏梭菌   | 1.992 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N1   | 1       | 否      | 光滑圆形细小透明菌落、边缘规则     | 酪丁酸梭菌  | 1.856 | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌( <i>Clostridium tyrobutyricum/Clostridium butyricum</i> )                        | 阴性           |
| 奶粉   | N11  | 11-2    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.062 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N11  | 11t-1   | 否      | 光滑圆形细小透明菌落、边缘规则     | 酪丁酸梭菌  | 2.096 | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌  | 阴性           |
| 奶粉   | N14  | 14T     | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 拜氏梭菌   | 2     | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N15  | 15-2    | 否      | 光滑圆形细小透明菌落、边缘规则     | 酪丁酸梭菌  | 2.062 | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌  | 阴性           |
| 奶粉   | N16  | 16-1    | 是      | 光滑圆形白色小菌落、边缘光滑      | 特氏梭菌   | 2.034 | 特氏梭菌( <i>Clostridium tertium</i> )  | 阴性           |
| 奶粉   | N19  | 19      | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.192 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N19  | 19TX    | 否      | 光滑圆形细小透明菌落、边缘规则     | 酪丁酸梭菌  | 2.009 | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌  | 阴性           |
| 奶粉   | N2   | 2-da    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.104 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N2   | 2T-1    | 否      | 光滑圆形白色小菌落、边缘有假性根状生长 | 煎盘梭菌   | 2.259 | 煎盘梭菌( <i>Clostridium sartagoforme</i> )   | 阴性           |
| 奶粉   | N22  | 22      | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.25  | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N24  | 24T-2   | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.072 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N24  | 24-2X   | 否      | 光滑圆形细小透明菌落、边缘规则     | 酪丁酸梭菌  | 2.104 | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌  | 阴性           |
| 奶粉   | N24  | 24T-1   | 否      | 光滑圆形白色半透明菌落、边缘光滑    | 无鉴定结果  | —     | 巴氏梭菌( <i>Clostridium pasteurianum</i> )   | 阴性           |
| 奶粉   | N26  | 26T-1CU | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.079 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N29  | 29-1    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.154 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N30  | 30-1    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.211 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N30  | 30-3    | 否      | 奶油色圆形菌落,边缘略不规则,稍突   | 丁酸梭菌   | 2.25  | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌  | 阴性           |
| 奶粉   | N34  | 34-1    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.159 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N35  | 35-3    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.016 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N35  | 35-2    | 否      | 奶油色圆形菌落,边缘略不规则,稍突   | 丁酸梭菌   | 2.336 | 酪丁酸梭菌/丁酸梭菌  | 阴性           |
| 奶粉   | N41  | 41-3    | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 二醇梭菌   | 2.136 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N43  | 43-1    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.169 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N43  | 43-3    | 否      | 光滑圆形白色半透明小菌落、边缘呈微波状 | 速生梭菌   | 2.057 | 毛螺菌属两种菌/梭状菌属( <i>Lacrimispora sphenoides/Lacrimispora celerecre-scens/Clostridium sp.</i> ) | 阴性           |
| 奶粉   | N43  | 43-4    | 否      | 光滑圆形白色半透明小菌落、边缘呈微波状 | 速生梭菌   | 2.009 | 毛螺菌属两种菌/梭状菌属( <i>Lacrimispora sphenoides/Lacrimispora celerecre-scens/Clostridium sp.</i> ) | 阴性           |

续表 2

| 样品来源 | 样品编号 | 菌株编号 | 有氧是否生长 | 菌落形态                | 质谱鉴定结果 | 质谱分值  | 16S rRNA 结果   | 肉毒素基因 PCR 结果 |
|------|------|------|--------|---------------------|--------|-------|---|--------------|
| 奶粉   | N45  | 45-4 | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.014 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N45  | 45-3 | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 拜氏梭菌   | 2.286 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N45  | 45-2 | 否      | 光滑圆形白色菌落            | 耐酸梭菌   | 1.834 | 耐酸梭菌( <i>Clostridium aciditolerans</i> )  | 阴性           |
| 奶粉   | N47  | 47-1 | 否      | 光滑湿润菌落、成片状生长、菌落大小不一 | 匙形梭菌   | 2.039 | 匙形梭菌( <i>Clostridium cochlearium</i> )  | 阴性           |
| 奶粉   | N5   | 5T-2 | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.189 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N50  | 50   | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.259 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N51  | 51-3 | 否      | 光滑圆形白色半透明小菌落、边缘呈微波状 | 速生梭菌   | 2.205 | 毛螺菌属两种菌/速生梭菌( <i>Lacrimispora sphenoides/Lacrimispora celerecre-scens/Clostridium celerecre-scens</i> ) | 可疑阳性         |
| 奶粉   | N54  | 54-1 | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 1.915 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N56  | 56-3 | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 二醇梭菌   | 2.381 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N57  | 57-3 | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 1.808 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N57  | 57-1 | 否      | 灰白色半透明圆形光滑菌落、边缘不规则  | 拜氏梭菌   | 2.164 | 拜氏梭菌/二醇梭菌   | 阴性           |
| 奶粉   | N7   | 7    | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 2.189 | 生胞梭菌/肉毒梭菌/第三梭菌( <i>Clostridium sporogenes/Clostridium botulinum/Clostridium tepidum</i> )               | 阴性           |
| 奶粉   | N8   | 18T  | 否      | 白色粗糙菌落、边缘不规则、根状生长   | 生胞梭菌   | 1.959 | 生胞梭菌/肉毒梭菌   | 阴性           |

### 2.2.2 16S rRNA 测序鉴定结果

43 株菌的 16S rRNA 测序结果为 17 株生胞梭菌/肉毒梭菌、1 株生胞梭菌/肉毒梭菌/第三梭菌、10 株拜氏梭菌/二醇梭菌、7 株酪丁酸梭菌/丁酸梭菌、3 株毛螺菌属/速生梭菌(*Lacrimispora sphenoides/Lacrimispora celerecre-scens/Clostridium sp.*)、1 株巴氏梭菌、1 株匙形梭菌、1 株特氏梭菌、1 株耐酸梭菌、1 株煎盘梭菌、见表 2。一株菌的 16S rRNA 鉴定结

果会有多种可能,但质谱的鉴定结果都被包含在 16S rRNA 鉴定的可能性结果之中。

### 2.2.3 基因组测序鉴定结果

将质谱无法鉴定的菌株(24T-1)、16S rRNA 测序鉴定结果是两个种属的菌株(43-3、43-4、51-3)进行全基因组测序,鉴定结果见表 3。其中,24T-1 为巴氏梭菌,43-3、43-4、51-3 这三株菌均为楔形梭菌。

表 3 全基因组测序的鉴定结果

Table 3 The identification results of the WGS

| 菌株编号  | 鉴定比对结果   | 模板长度      | 相似度/% |
|-------|--|-----------|-------|
| 24T-1 | CP013019.1 <i>Clostridium pasteurianum</i> strain M150B, complete genome                       | 4 351 863 | 91.28 |
| 43-3  | LT630003.1 [ <i>Clostridium</i> ] <i>sphenoides</i> JCM 1415 strain ATCC 19403 genome assembly | 5 300 235 | 76.41 |
| 43-4  | LT630003.1 [ <i>Clostridium</i> ] <i>sphenoides</i> JCM 1415 strain ATCC 19403 genome assembly | 5 300 235 | 76.62 |
| 51-3  | LT630003.1 [ <i>Clostridium</i> ] <i>sphenoides</i> JCM 1415 strain ATCC 19403 genome assembly | 5 300 235 | 84.24 |

### 2.2.4 鉴定结果的综合分析

57 份婴幼儿配方奶粉样品中,26 份奶粉中检出梭状芽胞杆菌,检出率为 45.61%,18 份奶粉中检出生胞梭菌,检出率为 31.58%。50 份婴幼儿米粉样品中 5 份米粉检出梭状芽胞杆菌,检出率为 10%。

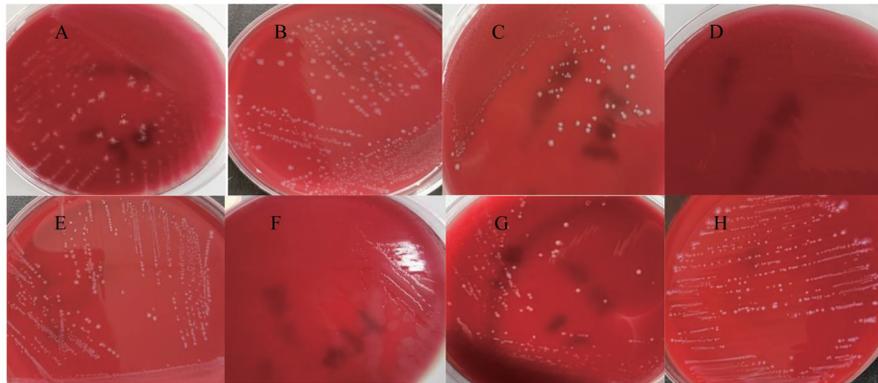
### 2.3 梭状芽胞杆菌菌落形态特征

梭状芽胞杆菌严格厌氧或兼性厌氧,在血平板

上的形态多样,见图 1。有的菌落呈白色、边缘不规则根状生长,不溶血,菌落紧紧附着于培养基表面生长,不易刮取(图 1A);有的菌落光滑、呈灰白色半透明状、边缘不规则(图 1B);有的菌落光滑,呈白色或奶油色的不规则圆形菌落,稍突(图 1C);有的菌落呈光滑圆形细小透明菌落,边缘规则(图 1D);有的菌落光滑,圆形白色半透明小菌落,边缘呈微波状,菌落凸起(图 1E),有的菌落光滑湿润,略透明,

成片状生长,菌落大小不一(图 1F);有的呈白色、圆形光滑小菌落,边缘规则(图 1G);有的呈白色光滑

圆形小菌落,边缘有假性根状生长(图 1H),具体见表 2。



注:A为生孢梭菌;B为拜氏梭菌;C为丁酸梭菌;D为酪丁酸梭菌;E为速生梭菌;F为匙形梭菌;G为特氏梭菌;H为煎盘梭菌

图1 梭状芽胞杆菌血平板形态

Figure 1 Morphology of *Clostridium* sp. on blood plate

### 2.4 梭状芽胞杆菌革兰染色结果

所有的梭状芽胞杆菌均为革兰阳性杆菌。显微镜下菌体形态大小不一,有的芽胞为卵圆形,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;有的菌体成短或长链,芽胞圆形或柱形,中生或近中生,见图 2。

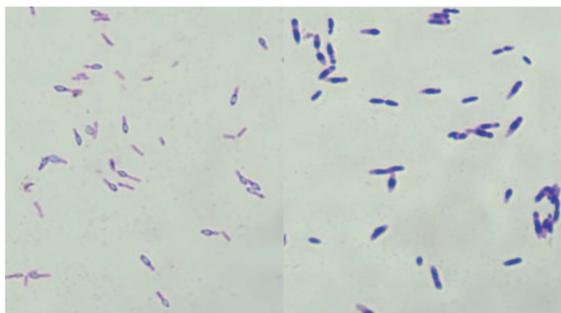


图2 梭状芽胞杆菌革兰染色结果(1 000×)

Figure 2 Gram staining of *Clostridium* sp.

### 2.5 肉毒毒素基因检测结果

对 43 株疑似梭状芽胞杆菌进行 A、B、E、F 型肉毒梭菌毒素基因 PCR 扩增,电泳结果显示一株楔形梭菌(全基因组测序鉴定结果,菌株编号:51-3)的菌株 E 型肉毒梭菌毒素基因阳性(图 3)。将扩增产物测序并与 NCBI 数据库中的 E 型肉毒毒素基因进行比对,发现此扩增产物并不是 E 型肉毒毒素基因,而是 *Lacrimispora sphenoides/Lacrimispora celerecrescens/Clostridium celerecrescens* 染色体上的一段序列。43 株疑似梭状芽胞杆菌都不含有肉毒毒素基因。

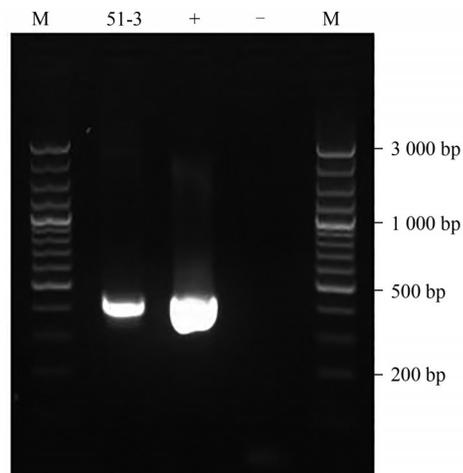


图3 菌株 51-3 E 型肉毒梭菌毒素基因 PCR 扩增结果

Figure 3 PCR amplification results of *Clostridium botulinum* type E toxin gene in strain 51-3

### 3 讨论

16S rRNA 因其具有高度的保守性和特异性以及该基因序列足够长而被广泛应用于细菌的鉴定中,但是 16S rRNA 的鉴定只能精确到属的水平。

在本研究中,16S rRNA 的鉴定结果往往是几种可能的菌,其结果包含了质谱鉴定的结果。比如 16S rRNA 并不能把生孢梭菌与肉毒梭菌、拜氏梭菌与二酵梭菌、酪丁酸梭菌与丁酸梭菌区分开来,但质谱鉴定结果可以把菌株明确为其中的一种菌,这与以往的研究结果也是一致的<sup>[8]</sup>。质谱是近年来被广泛应用的一种细菌鉴定技术,可完成种水平的鉴定和分型<sup>[8]</sup>。但质谱鉴定结果准确性依赖于质谱的数据库。全基因组测序可以用于菌株的鉴定,本研究中 1 株质谱无法鉴定的菌株用全基因组测序的方法鉴定出来,另外 3 株菌无法用 16S rRNA 明确到种水平,用全基因组测序的方法明确为梭状芽胞杆菌。随着全基因组测序技术的广泛应用,在传统表型和生化鉴定的基础上,可以应用全基因组测序技术对梭状芽胞杆菌菌株进行鉴定或者将多种鉴定方法相结合进行综合判断,可获得精准的鉴定结果。

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<sup>[4-5]</sup>。本研究中,本文对分离到的43株梭状芽胞杆菌进行A、B、E、F型肉毒梭菌毒素基因的PCR检测,电泳结果发现一株全基因组测序鉴定为楔形梭菌的菌株E型毒素基因阳性,但随后的片段测序比对结果证实此扩增片段并不是E型肉毒毒素基因,也提示在做PCR肉毒毒素基因检测时需要加做测序进行最终结果的判断。

婴幼儿配方奶粉和婴幼儿米粉是婴儿主要食品来源,是婴儿梭状芽胞杆菌感染的高危食品。在英国、我国均有因食用了被肉毒梭菌污染的婴幼儿配方奶粉而发生的中毒事件的报道<sup>[9-10]</sup>。本研究中,婴幼儿配方奶粉中梭状芽胞杆菌的检出率为45.61%,其中检出最多的是生孢梭菌。婴幼儿配方奶粉中梭状芽胞杆菌的检出率明显高于婴幼儿米粉,可能与原料、生产加工工艺等相关。婴幼儿米粉中梭状芽胞杆菌的检出率为10%,均为拜氏梭菌。以往对婴幼儿配方奶粉中重要梭状芽胞杆菌的研究显示,梭状芽胞杆菌的分离率在14%~30.8%不等,但是生孢梭菌都是检出最多的<sup>[1,11-12]</sup>,这与本文研究结果一致。由于生孢梭菌与肉毒梭菌具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<sup>[4]</sup>,也有研究报道称生孢梭菌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<sup>[5,13-14]</sup>。我国目前尚未颁布对食品中除肉毒梭菌外的重要梭状芽胞杆菌等的官方检测方法和限量标准,建立食品中梭状芽胞杆菌的检测鉴定方法、加强监测、对评估食品中梭状芽胞杆菌的风险有重要的意义。

## 参考文献

- [ 1 ] KIU R, CAIM S, ALCON-GINER C, et al. Preterm infant-associated *Clostridium tertium*, *Clostridium cadaveris*, and *Clostridium paraputrificum* strains: Genomic and evolutionary insights [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(10): 2707-2714.
- [ 2 ] SHELLY E B, O'ROURKE D, GRANT K, et al. Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin: A novel environmental association with pet terrapins [J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(3): 461-469.
- [ 3 ] LAUFER HALPIN A, KHOURI J M, PAYNE J R, et al. Type F infant botulism: Investigation of recent clusters and overview of this exceedingly rare disease [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 66(S1): S92-S94.
- [ 4 ] BARASH J R, HSIA J K, ARNON S S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas [J]. *The Journal of Pediatrics*, 2010, 156(3): 402-408.
- [ 5 ] HARA-KUDO Y, YAMAKAWA Y, KUMAGAI S. Purification and some properties of *Clostridium sporogenes* Hemorrhagic toxin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 227(2): 413-418.
- [ 6 ] HAUSER D, GIBERT M, MARVAUD J C, et al. Botulinal neurotoxin C1 complex genes, clostridial neurotoxin homology and genetic transfer in *Clostridium botulinum* [J]. *Toxicon*, 1995, 33(4): 515-526.
- [ 7 ] 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 肉毒梭菌及肉毒毒素检验: GB 4789.12—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard- Microbiological examination of food-Examination of *Clostridium botulinum* and botulinus toxin: GB 4789.12—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [ 8 ] 董银苹, 徐进, 王伟, 等. 浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽胞杆菌的分离及鉴定 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(5): 494-498.  
DONG Y P, XU J, WANG W, et al. Isolation and identification of *Clostridium* from whey protein concentrate and its products [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2015, 27(5): 494-498.
- [ 9 ] BRETT M M. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: Evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54(8): 769-776.
- [ 10 ] PING D Y, WEI W, TAO J, et al. Molecular and epidemiological characterization of infant botulism in Beijing, China [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2017, 30(6): 460-464.
- [ 11 ] XIN G, YINPING D, SHAOFEI Y, et al. Contamination and characterization of multiple pathogens in powdered formula at retail collected between 2014 and 2015 in China [J]. *Food Control*, 2018, 87: 40-45.
- [ 12 ] 李颖, 李凤琴, 江涛, 等. 我国部分地区婴幼儿人群梭状芽胞杆菌暴露水平调查 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(2): 165-170.  
LI Y, LI F Q, JIANG T, et al. A study on *Clostridium* spp. exposure level on infant population in some parts of China [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(2): 165-170.
- [ 13 ] HARA-KUDO Y, OGURA A, NOGUCHI Y, et al. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1997, 22(1): 31-38.
- [ 14 ] 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]. *Journal of Medical Microbiology*, 1997, 46(4): 270-275.