

武汉市售茶中2种食源性致病菌的检测与分析

窦玉淼, 张 飞, 张 翼, 陈雅衡, 周帼萍*

(武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 为了解市售茶叶中菌落总数和2种食源性致病菌(蜡样芽孢杆菌和克罗诺杆菌)的检出情况, 根据国标对武汉地区市售的46份茶叶样品进行菌落总数和2种食源性致病菌的初步分离和鉴定, 分别用16S rDNA内转录间隔区-聚合酶链式反应方法鉴别蜡样芽孢杆菌, 用16S rDNA和*fusA*序列分析对疑似克罗诺杆菌的分离株进行鉴定, 进而比较和分析不同产地和类别间微生物的检出情况。结果发现, 蜡样芽孢杆菌在市售茶叶中检出率极高, 达97.9%, 而且其数量约占细菌总数的6.0%。鉴定出3株阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter*), 其检出率达6.5%, 仅占细菌总数的0.1%~3.2%。花草茶中细菌总数最高, 也是唯一检出克罗诺杆菌的茶类; 发酵茶中蜡样芽孢杆菌数量最高, 均超过1 100 MPN/g。不同产地茶叶在这3个微生物指标上有显著差异。当茶及其深加工产品和其他食品原料混搭成新产品时, 这2种食源性致病菌可能带来风险隐患。

关键词: 茶; 细菌总数; 蜡样芽孢杆菌; 克罗诺杆菌; 检测; 鉴定

Detection and Analysis of Two Food-Borne Pathogens in Tea Samples from Wuhan Market

DOU Yumiao, ZHANG Fei, ZHANG Yi, CHEN Yaheng, ZHOU Guoping*

(School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The objective of this study was to detect the aerobic plate count, and isolate and identify two food-borne pathogens (*Bacillus cereus* and *Cronobacter*) in tea samples collected from local markets in Wuhan according to the Chinese national standards. *Bacillus cereus* was identified by PCR analysis of 16S rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequence and *Cronobacter* by 16S rDNA and *fusA* sequence analysis. We further compared the detection rates of both bacterial pathogens in tea samples from different producing areas and in different kinds of tea. *Bacillus cereus* was detected in 97.9% of the investigated tea samples accounting for about 6.0% of the total bacterial population. Three strains of *Conobacter* spp. were identified in 6.5% of these tea samples accounting for only 0.1%~3.2% of the total bacterial population. The highest aerobic plate count and *Conobacter* spp. were found only in herbal tea. Fermented tea had the highest *B. cereus* counts, exceeding 1 100 MPN/g in all samples. There were significant differences in the three microbial indicators among different tea-producing regions. Thus, the food safety hazards of these food-borne pathogens cannot be ignored, especially when tea is mixed with other materials.

Key words: tea; aerobic plate count; *Cronobacter*; *Bacillus cereus*; detection; identification

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 10-0195-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201510039

随着茶叶深加工技术的发展, 茶不仅作为传统饮品, 也以各种形式(浸提物、膏、粉、汤等)添加到多种食品中, 特别是各种抹茶糕点、冰激凌等在市场上广受欢迎; 同时向茶汤中添加多种配料, 成为奶茶、珍珠奶茶等成为风尚。传统的饮用方法, 因茶叶水分活度低、冲泡温度高、冲泡后一般立即饮用, 不含糖类或蛋白质类营养物(或含量极为低微), 一般不存在微生物

方面的食品安全隐患。但是一旦混搭其他食品, 特别是糕点、奶制品就可能带入微生物隐患。

因水分活度低, 茶叶及其深加工产品中芽孢杆菌、耐干燥的细菌和霉菌为其中优势菌群^[1]。以往的研究比较重视茶叶中真菌、毒素的检测以及肠杆菌超标等有害微生物污染^[2-3]。但是研究发现茶叶中有2种食源性致病菌: 蜡样芽孢杆菌和克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)检出

收稿日期: 2014-08-09

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划项目中青年项目(Q20111703); 武汉轻工大学研究生创新基金项目(2013cx020); 2014年武汉轻工大学大学生科研立项项目

作者简介: 窦玉淼(1992—), 女, 学士, 研究方向为生物工程。E-mail: 735359310@qq.com

*通信作者: 周帼萍(1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为微生物发酵与食品安全。E-mail: wjczgp@163.com

率较高,而且部分样品中含菌量很高^[4]。这2种条件致病菌在传统饮茶习惯中危害很小,但是一旦和淀粉、乳制品混搭,这两者就可能导致很高的安全风险。为此,特收集市售茶以调查菌落总数及这两种食源性致病菌的情况。

蜡样芽孢杆菌的鉴定目前有很大争议。蜡样芽孢杆菌群细菌(*B. cereus* group)原来包括了蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)和假蕈状芽孢杆菌(*B. pseudomycoides*)、韦氏芽孢杆菌(*B. weihenstephanensis*)6个种,2013又增加了*B. cytotoxicus*^[5]。由于该群内各种间在基因组上的高度一致,必须采用非常复杂的生理生化反应结合分子生物学技术才能鉴定,加上一些新种的定义还存在很大争议,要准确鉴定蜡样芽孢杆菌几乎成为非常复杂任务;现行的国家标准和美国食品药品监督管理局标准都未与最新分类系统接轨,同时很多研究者也质疑标准中所采用生理生化法的繁琐和准确性^[6];同时因为蜡样芽孢杆菌的很多毒素基因,除呕吐毒素合成相关基因外,都位于基因组内,并广泛分布在蜡样芽孢杆菌群各种菌株中,所以很多学者在探讨食品安全问题时也将蜡样芽孢杆菌群细菌一起讨论^[7-8]。本研究鉴定的蜡样芽孢杆菌,严格意义上仅鉴定到蜡样芽孢杆菌群,排除了苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌和假蕈状芽孢杆菌,但是未区分其他4个种。

Iversen等^[9-10]根据表型和基因型特征将阪崎肠杆菌成立一个新属-克罗诺属*Cronobacter*,并分为6个种,2013年7月又改为10个种^[11-12]。阪崎肠杆菌的常规鉴定和分类主要依据生理生化性质,但已发现生化分型与分子分型结果有偏差,已不再适用于鉴别该属下种的划分。我国国标与国际最新分类体系出现了偏离,这不仅是分类学的问题,也涉及到安全性评价。因为目前发现只有阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*),*C. turicensis*和*C. malonaticus*对人类有感染力,尤其值得重视的是*C. sakazakii*与婴幼儿脑膜炎密切相关^[13-14]。克罗诺杆菌对婴幼儿危害很大,所以对婴幼儿食品中克罗诺杆菌的监控和检测很多,但是国内尚未重视其他食品原辅料中克罗诺杆菌的检出情况,而国外研究发现该类细菌实际上在食品和环境广泛存在。

1 材料与方法

1.1 材料、培养基及试剂

于2013年9—12月购自湖北省武汉市大型茶叶批发市场。共采集46个样,包括不发酵茶、半发酵茶、发酵茶及花草茶。

培养基:平板计数琼脂(plate count agar, PCA)、胰酪胨大豆多黏菌素肉汤、甘露醇卵黄多黏菌素琼脂

(mannitol-egg-yolk-polymyxin agar, MYP)、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)、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)。

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂(2×Taq PCR MasterMix) 北京Aidlab公司;PCR反应产物由苏州金唯智公司进行测序,对测序结果进行编辑和修正后提交给GenBank数据库。

1.2 仪器与设备

T-Gradient Thermoblock PCR仪 德国Biometra公司;DYY8B型稳压电泳仪 北京市六一仪器厂;GBOX-H12-E-M自动凝胶图像分析系统 英国Syn-gene公司;80i正置荧光相差显微镜(YS100) 日本Nikon公司。

1.3 方法

1.3.1 样品中微生物的检测与计数

克罗诺杆菌的检测:参照GB 4789.2—2010《食品微生物学检验:阪崎肠杆菌检验》^[15];蜡样芽孢杆菌的测定:参考GB/T 4789.14—2003《食品卫生微生物学检验:蜡样芽孢杆菌检验》^[16];菌落总数的测定:参考GB 4789.40—2010《食品微生物学检验:菌落总数测定》^[17]。菌落总数采用梯度稀释用PCA培养基检测;蜡样芽孢杆菌和克罗诺杆菌采用MPN法。

1.3.2 克罗诺杆菌疑似菌株的16S rDNA及*fusA*序列分析
*fusA*序列分析(<http://pubmlst.org/cronobacter/>)数据库网站所列*Cronobacter*细菌的管家基因中的*fusA*进行PCR扩增。PCR反应产物由苏州金唯智公司进行测序。对16S rDNA的测序结果进行编辑和修正后提交给GenBank并获得编号,并用Mega 6.0软件进行聚类分析;*fusA*序列提交MLST数据库,获得等位基因号,并用Splitstree4软件进行聚类分析。

1.3.3 蜡样芽孢杆菌群细菌的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)-PCR检测

16S-23S rDNA 间隔区引物:ITS-16S-1392-S-15 (GNACACACCGCCCGT);ITS-23S-206-A-21 (NCTTAGATGTTTCAGTTCVCY)。PCR扩增体系:2×Taq PCR Mix 25 μL;上下游引物各1 μL;DNA模板5 μL;加水至50 μL。扩增条件:95℃、1 min;95℃、45s;55℃、1 min;72℃、1 min 30 s;循环30次;后延伸72℃、5 min^[12-13]。

1.3.4 蜡样芽孢杆菌群细菌的形态观察

染色后用显微镜观察有无伴孢晶体排除苏云金芽孢杆菌;在PCA和溶菌肉汤平板上是否根状生长,排除蕈状和假蕈状芽孢杆菌;确定蜡样芽孢杆菌的管数,由最大或然数(most probable number, MPN)表计算蜡样芽孢杆菌的MPN值。

1.4 统计分析

采用SPSS 20.0进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 蜡样芽孢杆菌的鉴定

挑取在MYP培养基上具有典型蜡样芽孢杆菌落特征的分离株进行16S/23S rDNA ITS-PCR, 如图1所示, 在500、750 bp有2条特征带, 和标准株一致, 视为蜡样芽孢杆菌。



1、36. Marker; 2. 空白对照; 3. 阳性对照
B. cereus ATCC 33018; 4~35. 本实验中分离株。

图1 部分*Bacillus cereus*分离株的16S/23S rDNA ITS-PCR结果

Fig.1 PCR analysis of 16S/23S rDNA ITS of *Bacillus cereus* isolates

2.2 克罗诺杆菌的鉴定

克罗诺杆菌在mLST-Vm培养基上具有典型菌落同时在TSA培养基上产黄色菌落者, 视为疑似菌株, 通过16S rDNA序列分析进行属的鉴定, 进而用*fusA*序列分析对已经鉴定为克罗诺杆菌的菌株进行种的鉴定。

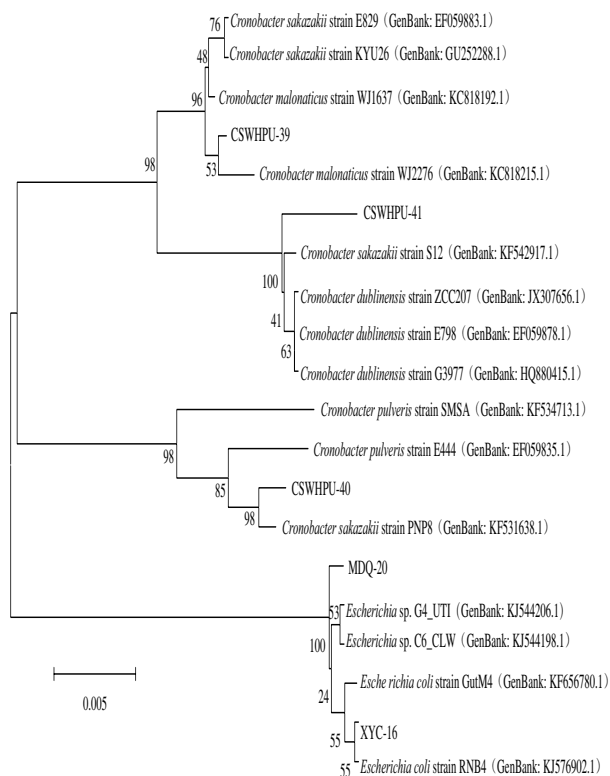


图2 5个疑似克罗诺杆菌分离株的16S rDNA系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of five *Cronobacter*-like isolates based on their 16S rRNA gene sequences

图2是Mega 6.0用邻近法构建的基于16S rDNA序列分析的系统进化树, 图中Bootstrap为200, 图下标尺表示每200个碱基序列中有一个碱基替换, 括号中为GenBank登录号。

从5个花草茶样品中共分离到5个疑似克罗诺杆菌的分离株, 进行16S rDNA序列分析, 发现来自16和20号样本中的2个菌株可以鉴定为埃希氏菌属(*Escherichia* spp.), 有3个菌株CSWHPU-39、40、41(分别来自21、22、23样品)可鉴定为克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)。

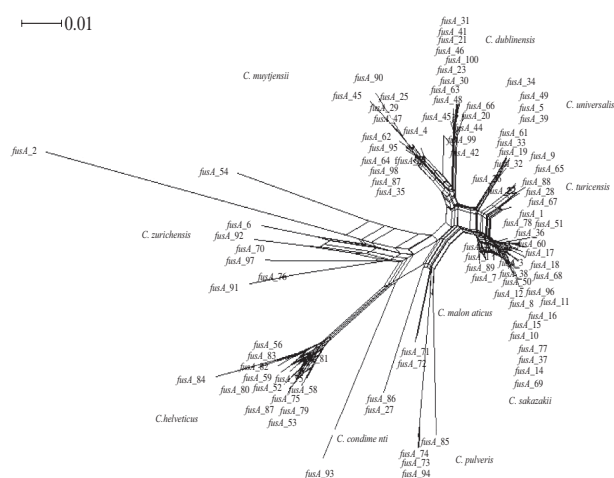


图3 *fusA*管家基因的Splitree 4分析及3株克罗诺杆菌的鉴定

Fig.3 Splitree 4 analysis of housekeeping gene *fusA* in MLST database and identification of three *Cronobacter* spp. isolates

16S rDNA序列分析被公认为微生物鉴定的金标准, 但是其结果只能准确到属, 种的鉴定还需要参考其他方法。截至2014年7月19日在*Cronobacter* MLST数据库中收集了自1950年以来全球超过36个国家812个菌株共293个ST(sequence type)型的信息, 是该属细菌最大、最全面的数据库。用Splitree 4分析数据库中7个管家基因的所有序列, 发现*fusA*基因是进化最稳定的基因, 但其序列多样性又可区分最新分类系统中克罗诺杆菌的10个种及其进化关系, 所以选用*fusA*基因序列分析做菌种鉴定。用数据库中所有100个*fusA*等位基因做出进化树如图3所示。据此, CSWHPU-39为*fusA*_7, 鉴定为丙二酸盐克罗诺杆菌*C. malonaticus*; CSWHPU-40为*fusA*_73, 鉴定为*C. pulveris*; CSWHPU41为*fusA*_41, 鉴定为都柏林克罗诺杆菌*C. dublinensis*。

2.3 市售茶叶中细菌总数和2种食源性致病菌的检出情况

从表1可见, 蜡样芽孢杆菌在46份茶叶样品中检出率高达97.9%, 仅有一个产自安徽的桂花茶样品中低于MPN检测下限(3 MPN/g), 33份样品(71.7%)含菌量都超出MPN检测上限(1 100 MPN/g), 最高可超过细菌总数的33.4%, 是茶叶样品中不可忽视的优势

菌；而另一个食源性致病菌-阪崎肠杆菌则检出率仅为6.5%（3/46），只有3份样品安徽出产的花草茶样品检出了阪崎肠杆菌，仅为细菌总数的0.1%~3.2%，并非优势菌群。

表1 样品来源及微生物检测情况
Table 1 Detection of two food-borne pathogens in tea samples

样品	茶叶名称	产地	种类	细菌总数/ (CFU/g)	蜡样芽孢杆菌		克罗诺杆菌/ (MPN/100 g)
					总数/(MPN/g)	占比/%	
1	绿茶	广西	不发酵茶	8×10^3	>1 100	>13.8	<3
2	毛尖	河南	不发酵茶	1×10^4	1 100	10.5	<3
3	苦荞茶	四川	不发酵茶	2×10^4	>1 100	>5.4	<3
4	龙舞茶	吉林	不发酵茶	8.4×10^3	>1 100	>13.0	<3
5	龙井	浙江	不发酵茶	2.6×10^4	460	1.7	<3
6	碧螺春	江苏	不发酵茶	6.3×10^3	21	0.3	<3
7	碧峰	湖北	不发酵茶	1.1×10^4	36	0.3	<3
8	五峰绿茶	湖北	不发酵茶	5.3×10^3	>1 100	>20.5	<3
9	苦丁	福建	不发酵茶	1.1×10^4	290	2.8	<3
10	绞股蓝	湖北	花草茶	1.3×10^4	16	0.1	<3
11	桃花	湖北	花草茶	3.6×10^4	>1 100	>3.1	<3
12	茉莉花茶	湖北	花草茶	2.6×10^4	>1 100	>4.2	<3
13	玫瑰	湖北	花草茶	2.2×10^4	>1 100	>4.9	<3
14	大麦茶 ^a	湖北	花草茶	3×10^4	>1 100	>3.7	<3
15	雪菊	湖北	花草茶	4×10^4	>1 100	>2.8	<3
16	薰衣草	安徽	花草茶	4×10^4	>1 100	>2.8	<3
17	桂花	安徽	花草茶	2.3×10^4	<3	≈0.0	<3
18	洛神花	安徽	花草茶	4.5×10^3	>1 100	>24.7	<3
19	月季花	安徽	花草茶	1.4×10^4	>1 100	>8.0	<3
20	牡丹球	安徽	花草茶	2.9×10^4	460	1.6	<3
21	迷迭香	安徽	花草茶	7.2×10^3	>1 100	>15.4	230
22	柠檬草	安徽	花草茶	1×10^4	>1 100	>10.8	94
23	马鞭草	安徽	花草茶	3.1×10^4	>1 100	>3.5	30
24	金骏眉	福建	发酵茶	7.6×10^3	>1 100	>14.5	<3
25	宜昌红茶	湖北	发酵茶	6.8×10^3	>1 100	>16.3	<3
26	信阳红茶	河南	发酵茶	1.7×10^4	>1 100	>6.5	<3
27	普洱	云南	发酵茶	2.7×10^4	>1 100	>4.1	<3
28	滇红金针	云南	发酵茶	2.7×10^4	>1 100	>4.1	<3
29	正山小种	福建	发酵茶	8.9×10^3	>1 100	>12.4	<3
30	黑茶	湖北	发酵茶	5.9×10^3	>1 100	>18.7	<3
31	祁山红茶	安徽	发酵茶	3.3×10^4	>1 100	>3.4	<3
32	铁观音	福建	半发酵茶	2×10^4	>1 100	>5.6	<3
33	乌龙茶	福建	半发酵茶	1.4×10^4	>1 100	>8.1	<3
34	大红袍	福建	半发酵茶	2.3×10^4	>1 100	>4.7	<3
35	东方美人	台湾	半发酵茶	1.1×10^4	>1 100	>10.0	<3
36	黄金桂	福建	半发酵茶	9.5×10^3	>1 100	>11.5	<3
37	单枞	广东	半发酵茶	3.3×10^3	>1 100	>33.4	<3
38	奇兰	福建	半发酵茶	1.3×10^4	160	1.2	<3
39	肉桂	福建	半发酵茶	1.3×10^4	160	1.3	<3
40	水仙	福建	半发酵茶	1.5×10^4	290	1.9	<3
41	猴魁	安徽	不发酵茶	3×10^4	>1 100	>3.7	<3
42	毛峰	安徽	不发酵茶	1.1×10^4	>1 100	>9.8	<3
43	云雾	湖北	不发酵茶	1.5×10^4	>1 100	>7.3	<3
44	至尊贡芽	湖北	不发酵茶	5.4×10^4	>1 100	>2.0	<3
45	伯爵茶	斯里兰卡	发酵茶	1.2×10^4	>1 100	>8.9	<3
46	高山茶	台湾	半发酵茶	1.7×10^4	120	0.7	<3
均值				$1.79\times 10^4\pm 1.13\times 10^4$	881 ± 403^a	5.9 ± 6.6	

注：*：将>1 100 MPN/g计为1 100 MPN/g；#：大麦茶应该是谷物类茶，因为样品数量少，并入花草茶类。

2.4 不同种类茶叶之间的比较

根据茶叶原料和加工工艺，可以大致把茶分为：花草茶、不发酵茶、半发酵茶和发酵茶4种类别。为方便计算，将所有蜡样芽孢杆菌数量中大于1 100 MPN/g，都按照1 100 MPN/g来计算。比较这4种不同种类茶叶中微生物的数量，发现花草茶的细菌总数明显高于其他品种，达到（23 264±11 919）CFU/g，蜡样芽孢杆菌数量仅次于发酵茶（（898±414）MPN/g），花草茶也是4种茶叶中唯一检出克罗诺杆菌的种类；发酵茶的蜡样芽孢杆菌数量显著高于其他品种，均大于1 100 MPN/g，而半发酵茶细菌总数和蜡样芽孢杆菌数量都低于其他品种，不发酵茶其次。详见图4、5。

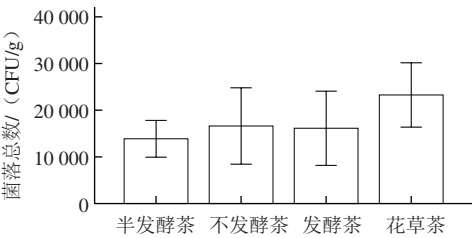


图4 不同种类茶叶菌落总数的比较

Fig.4 Comparison of aerobic plate counts among four types of tea

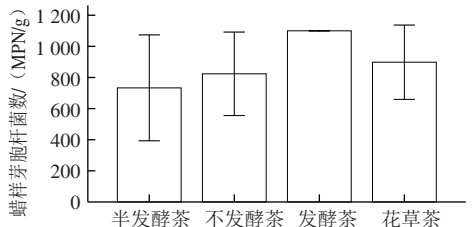


图5 不同种类茶叶蜡样芽孢杆菌数量比较

Fig.5 Comparison of *B. cereus* counts among four types of tea

2.5 不同产地之间的比较

因为我国茶叶产地甚多，武汉市售茶叶的采样过程中安徽（10）、湖北（12）和福建（11）样本数量相当，其他10个省（地区）样本数量过低（≤2），所以仅比较这3个产地的情况。由图6、7可知，这3个产地的茶叶间在3个微生物指标上有着显著差异，福建茶叶在细菌总数和蜡样芽孢杆菌数上都比其他2个产地低，湖北茶叶在细菌总数（（22 083±15 503）CFU/g）略微高于安徽茶叶（（21 154±12 191）CFU/g），但是其蜡样芽孢杆菌数量（（921±418）MPN/g）却略微低于安徽茶叶（（942±367）MPN/g）。而安徽又是所有产地中唯一检出克罗诺杆菌的省份。

微生物指标不仅与产地有关，与各地生产的品种也有很大的关系，如福建生产半发酵类茶（铁观音等），而湖北和安徽的不发酵茶和花草茶品种较多。正如2.4节所讨论，茶叶的种类对微生物指标影响很大。

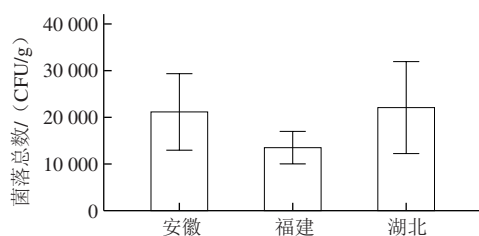


图6 不同地区菌落总数比较

Fig.6 Comparison of aerobic plate counts among tea samples three different producing regions

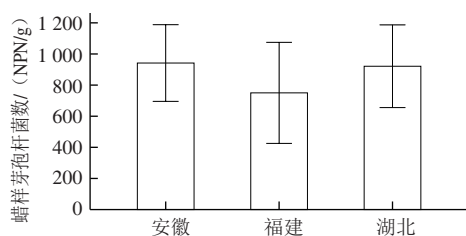


图7 不同地区蜡样芽孢杆菌数比较

Fig.7 Comparison of *B. cereus* counts among tea samples from different producing regions

3 讨论

前期实验中曾同时采用MYP和PCA培养基直接稀释平板计数计算细菌总数和蜡样芽孢杆菌数量,发现部分样品中蜡样芽孢杆菌数量高于细菌总数。可能是因为MYP培养基是一种营养物质丰富的鉴别培养基,非常适合蜡样芽孢杆菌类细菌生长,而PCA是常规培养基的缘故。但是这样的结果没法测算蜡样芽孢杆菌占细菌总数的比例,故此改用了MPN法。MPN法中多数样品中蜡样芽孢杆菌数量都超出了MPN法的上限1 100 MPN/g,也不能精确计量蜡样芽孢杆菌数量。这2种情况都反映出蜡样芽孢杆菌在茶叶样品数量变化较大,某些样品中所占比例非常高,属于优势菌群。特别是所有的发酵茶样品中蜡样芽孢杆菌均高于1 100 MPN/g,远远高于不发酵茶和半发酵茶,说明茶叶的发酵过程中蜡样芽孢杆菌数量有增长^[18]。

本实验发现武汉地区市售茶叶中克罗诺杆菌检出率不高,阳性样品中含菌量也不高,未发现对婴幼儿高毒力的阪崎克罗诺杆菌,但是存在对成人(免疫力差人群)有感染能力的丙二酸盐克罗诺杆菌 *C. malonaticus*^[19]。

虽然本实验没有研究茶叶中大肠菌群的数量和类别,但是在鉴定5株疑似克罗诺杆菌过程中发现其中2株(也是花草茶样品分离株),并非克罗诺杆菌而是埃希氏菌属,可见一般认为对干燥敏感的肠杆菌科细菌在茶叶检出率并不低。

花草茶(包括谷类茶)现在品种越来越多,也受到市场追捧。但是实验发现,花草茶无论在细菌总数、蜡样芽孢杆菌和肠杆菌科细菌数量上都很高,甚至比传统的茶叶类还高。

传统饮茶习惯中极少发生微生物食物中毒的报道,但是随着各种花式茶(特别是奶茶)普及和茶粉等深加工产品添加到糕点等食品中,由于大量的糖、淀粉、蛋白质等营养丰富的原料加入,加上保质期的延长,可能给食源性致病菌提供了生长、产毒的机会,比如:蜡样芽孢杆菌在富含淀粉质食品中容易生长,并产生非常稳定的呕吐毒素引起呕吐型食物中毒^[19];而克罗诺杆菌食物中毒多数因乳品引起^[20]。

参考文献:

- [1] 朱金国, 莫瑾, 谭建锡, 等. 出口茶叶生产加工中有害微生物危害分析[J]. 现代农业科技, 2014(2): 304-307.
- [2] 朱建一, 肖宏儒, 钟成义. 绿茶加工过程中有害微生物污染试验研究[J]. 农业装备技术, 2010, 36(1): 23-27.
- [3] 沈佐民. 中国茶叶质量安全问题的分析与对策[J]. 南京农业大学学报: 社会科学版, 2005, 5(4): 56-60.
- [4] 陈雅衡, 赵炜, 王洋, 等. 部分茶饮料原辅料中优势菌-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.
- [5] GUINEBRETIERE M H, AUGER S, GALLERON N, et al. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(1): 31-40.
- [6] ZHOU G, ZHENG D, DOU L, et al. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(2/3): 143-146.
- [7] GUINEBRETIERE M H, THOMPSON F L, SOROKIN A, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(4): 851-865.
- [8] OH M H, HAM J S, COX J M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 152(1/2): 1-8.
- [9] 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 Evolutionary Biology, 2007, 7: 64.
- [10] 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]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 1442-1447.

- [11] 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]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 1277-1283.
- [12] BRADY C, CLEENWERCK I, VENTER S, et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(5): 309-319.
- [13] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections[J]. Emerging Infections Diseases, 2011, 17(9): 1713-1715.
- [14] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 397.
- [15] 卫生部. GB 4789.40—2010 食品微生物学检验: 阪崎肠杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] 卫生部. GB/T 4789.14—2003 食品卫生微生物学检验: 蜡样芽胞杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [17] 卫生部. GB 4789.12—2010 食品微生物学检验: 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [18] 许波, 洪涛, 唐湘华, 等. 普洱茶发酵过程中微生物及其应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010(1): 334-336.
- [19] 周帼萍, 袁志明. 蜡状芽胞杆菌及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-361.
- [20] 裴晓燕, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌的生物学性状与健康危害[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(6): 550-555.