

食品工业中阪崎克罗诺杆菌生物膜形成的影响因素与控制策略研究进展

景春娥, 李 萍, 杜欣军, 王 硕*

(天津科技大学食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要: 阪崎克罗诺杆菌是一种食源性条件致病菌, 它可以引起不同年龄段人群的感染, 对于新生儿和免疫功能不全的婴幼儿的威胁尤为严重, 引起的症状包括坏死性小肠结肠炎、菌血症、脑膜炎和术后骨髓炎等。在食品生产环境以及设备表面由阪崎克罗诺杆菌形成的生物膜是持久性污染食品的重要来源。因此本文主要综述了在食品工业中阪崎克罗诺杆菌流行病学、生物膜形成的机制以及生物膜控制的策略, 旨在为建立安全的无生物膜食品生产环境体系, 控制阪崎克罗诺杆菌所致食品的潜在污染以及临床感染提供理论指导。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌, 流行病学, 生物膜形成, 生物膜控制

Progress on influence factors for *Cronobacter sakazakii* biofilm formation and its control strategies in food industries

JING Chun-e, LI Ping, DU Xin-jun, WANG Shuo*

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Cronobacter sakazakii* was an opportunistic food-borne pathogen causing infections in a wide range of age groups. Especially, the bacterium was a serious threat to neonates or immune-compromised infants, which may give rise to different symptoms, such as septicemia, meningitis, necrotizing enterocolitis, and postsurgical osteomyelitis. Biofilm of *C. sakazakii* on the surfaces of equipment and processing environments was the important source of persistent contamination in food. The epidemiology, biofilm formation mechanisms and biofilm control strategies of *C. sakazakii* were summarized in this review. The aim of this review was to provide a theoretical guidance, which could be used for establishing biofilm-free food processing systems and the control of potential food contamination, as well as clinical infections caused by this pathogen.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; epidemiology; biofilm formation; biofilm control

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0371-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.073

阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)属于肠杆菌科克罗诺杆菌属, 是一种无芽孢, 有周生鞭毛、能运动、兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌^[1-2]。最近研究表明, 克罗诺杆菌属包括十个种, 分别为阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*C. malonicus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、穆汀斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*)、康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condimentii*)、粉尘克罗诺杆菌(*C. pulveris*)、瑞典克罗诺杆菌(*C. helveticus*)以及朱瑞陈克罗诺杆菌(*C. zurichensis*)^[3-5]。

由于阪崎克罗诺杆菌不是动物和人类肠道内正常菌群, 因此, 它的主要生境被认为是土壤、水和植

物原料(即小麦、大米、药草和香料等)^[6-7]。已经有研究表明, 阪崎克罗诺杆菌具有生存温度范围广^[8], 抗渗透压能力强^[9]以及高效的生物膜形成能力^[10-12], 这些特征是其在食品加工环节成功传播并且成为潜在污染源的重要原因。因此, 了解阪崎克罗诺杆菌的流行病学, 研究其生物膜形成和发展的分子机制以及寻找新的生物膜控制和清除策略是目前研究的重点。本文主要综述了在食品工业中阪崎克罗诺杆菌流行病学研究现状、生物膜形成的影响因素与分子机制以及生物膜控制的策略。

1 阪崎克罗诺杆菌流行病学研究

控制婴幼儿食品中阪崎克罗诺杆菌的负载量和

收稿日期: 2015-05-11

作者简介: 景春娥(1985-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品安全与检测技术, E-mail: jingchunekl@163.com。

* 通讯作者: 王硕(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全和免疫学检测, E-mail: s.wang@tust.edu.cn。

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2014BAD04B03)。

对其流行病学的理解将有助于降低弱势个体被感染的风险。由于巴氏消毒法能灭活阪崎克罗诺杆菌,因此它在婴儿配方奶粉中的出现可能归因于在生产加工过程中添加了被污染的配料或使用了没有经过灭菌处理的加工设备^[13]。Schmid等^[7]发现阪崎克罗诺杆菌可能来源于植物原料。Lou等^[14]的调查发现小麦粉可能是阪崎克罗诺杆菌的潜在传播途径,因此在婴幼儿食品的准备过程中应予以高度的重视,避免对婴幼儿食品的交叉污染。Mohammed等^[15]抽样调查了埃及的曼苏拉城市中出售的肉制品,在90个检测样本中,阪崎克罗诺杆菌的污染率为15.6%。这些研究报告为阪崎克罗诺杆菌流行病学的研究提供了新的证据。

另外,阪崎克罗诺杆菌是食源性条件性致病菌,它能感染不同年龄组的人,主要导致早产儿或婴幼儿以及免疫功能低下的成年人患病^[16-17]。Ravisankar等^[18]报道了一个被专门喂非强化牛乳的早产儿,出生18 d后,临床症状被确诊为脑膜炎,并且为阪崎克罗诺杆菌阳性败血症。目前存在的问题是婴儿如何获得了这种感染。有研究报道许多刚出生的婴儿中发生的感染可能是经由母亲的产道感染所致^[19]。在1999~2007年间,在英国被克罗诺杆菌属的菌感染的病例超过了500例,其中90%发病群体为15岁以上的人。此外,一些患有中风症或重症感染的老年人,由于吞咽困难,需要配方奶粉作为日常饮食的一部分,从而可能增加了被来源于奶粉中的阪崎克罗诺杆菌感染的几率^[20]。Gosney等^[21]的研究发现阪崎克罗诺杆菌可以粘附在急性脑卒中患者的口腔里,由于老年人免疫力低下,更易引起吸入性肺炎。随着世界人口的老齡化,这种现象可能会变得更为普遍,因此,寻找更好的预防与控制策略将是亟待解决的问题。

2 阪崎克罗诺杆菌生物膜形成的影响因素

阪崎克罗诺杆菌生物膜的形成不仅与粘附介质表面的性质有关而且与细菌细胞的特性以及环境因素有关。Hurrell^[10-11]和Kim^[22]的研究发现阪崎克罗诺杆菌能够在不锈钢的表面形成生物膜。由于阪崎克罗诺杆菌具有在非生物材质的餐饮器具以及操作设备表面形成生物膜的能力,从而提高了新鲜配制的婴幼儿配方奶粉以及其他食品被交叉污染的可能性。Ye等^[23]报道了在不同的pH、温度和培养时间的条件下,23株阪崎克罗诺杆菌的生物膜形成能力具有菌株的特异性,并且生物膜中多糖的性质受菌株所生长的环境因素的影响。Bae等^[24]在研究中发现,阪崎克罗诺杆菌在被污染的食品加工设备(不锈钢材质)表面的存活能力取决于环境相对湿度的变化以及菌体在材质表面的粘附形式。Dancer等^[25]在研究中发现,与碳源相比较,氮源对阪崎克罗诺杆菌生物形成能力具有决定性的作用,并且强生物膜形成能力的菌株导致了大量脱脂牛奶的凝结。

细胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)在生物膜结构的建立中起重要的作用。Jung等^[26]在研究中发现阪崎克罗诺杆菌生物膜的形成能力和EPS的产量取决于细菌所获得的营养成分和生长的环境条件。而且,有必要进一步研究EPS的产量

与生物膜细菌抗不同环境压力的抗性之间的相关性。Walsh等^[27]比较了阪崎克罗诺杆菌临床分离株与环境分离株在婴儿配方奶粉以及配料中的生存特性。在干燥的菊粉和卵磷脂中进行了长达338 d的阪崎克罗诺杆菌存活能力测试实验,研究发现,与临床分离株相比较,环境分离株似乎在干燥的原料中生存能力更强,但是,临床分离株更耐热。这种耐热性可能与EPS的产生有关。

3 阪崎克罗诺杆菌生物膜形成的分子机制

利用分子遗传学技术研究食品工业中阪崎克罗诺杆菌生物膜形成的机制,目的在于鉴定出与生物膜形成和发展有关的基因,并且剖析控制阪崎克罗诺杆菌从游离细菌过渡为生物膜的基因调节途径。

阪崎克罗诺杆菌的毒力作用与生物膜的形成密切相关^[28-29],并且生物膜细菌对恶劣环境,如干燥、极端温度、极端pH以及抗菌剂等,具有更高的抵抗能力^[25,30]。Feeney和Sleator^[31]在研究中发现阪崎克罗诺杆菌能够在水活度(a_w)为0.2的婴儿配方奶粉中存活,而一般细菌存活常规的水活度为0.4,这种现象表明它具有广泛的抗压存活机制。事实上,KuceroV等^[32]通过对阪崎克罗诺杆菌BAA-894的基因组分析,发现了53个假定的耐渗性基因座,其中包含了与低渗和高渗压力反应系统相关的基因。Feeney等^[33]的研究证明渗透调节物质摄取系统ProP在阪崎克罗诺杆菌的耐高渗透反应过程中起重要的作用。

细菌细胞表面的荚膜多糖在生物膜形成中发挥关键的作用。在阪崎克罗诺杆菌中基因*wzABCKM*能够编码产生荚膜异多糖^[4]。另外,纤维素是生物膜细菌胞外基质组成成分之一^[12,34-35]。Grimm等^[34]的研究发现阪崎克罗诺杆菌具有表达纤维素所需要的操纵子*bcsABZC*。Wang等^[36]在研究中发现基因ESA_04107编码甲硫酰基转移酶(heptosyltransferase D),该酶能够通过裂解脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)破坏阪崎克罗诺杆菌细胞外膜结构的稳定性,却提高了其生物膜形成的能力。这些研究发现可能有助于更好的理解阪崎克罗诺杆菌的生物膜形成机理并且对其采取有效的控制策略。

阪崎克罗诺杆菌具有鞭毛并且能够运动。Hartmann等^[35]的研究发现阪崎克罗诺杆菌鞭毛与生物膜的形成有关,并且有助于其粘附到上皮细胞Caco-2。另外,还发现两个假定蛋白ESA_00281和ESA_00282,它们可能是粘附素,并且与阪崎克罗诺杆菌在非生物材料表面形成生物膜有关。Hfq是转录后全局调节子,参与调控细菌外膜蛋白质,群体感应因子以及各种应激反应因子的生物合成^[37-39]。有许多研究发现Hfq与鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌等病原菌的致病性有关^[40-42]。Kim等^[43]的研究证明,Hfq也是阪崎克罗诺杆菌的毒力因子,它能够调控多种基因的表达。通过基因缺陷研究发现,与野生株相比较,Hfq-缺陷菌株具有更高的运动能力,而这种能力能够促进细菌生物膜的形成,并且增强其对环境压力的适应性。Choi等^[44]在研究中发现由质粒基因*mcp*编码的甲基受体趋化性蛋白

(MCP), 是阪崎克罗诺杆菌ATCC 29544的毒力因子, 并且参与了细菌的趋化运动以及生物膜的形成。

此外, 已经有研究表明革兰氏阴性病原菌生物膜的形成过程受到群体感应系统的调控^[45-46]。许多的食源性肠杆菌科致病菌能够产生群体感应调控信号分子, 酰基高丝氨酸内酯化合物 (acyl-homoserine lactone, AHL)^[47-48]。AHL类分子具有一个共同的高丝氨酸内酯环头部, 不同的AHL分子具有不同的酰基侧链尾巴, 差异可能在于侧链长短和取代基不同, 这也造成了微生物在利用AHL信号分子时具有一定的特异性。Lehner等^[12]的研究发现阪崎克罗诺杆菌中具有生物膜形成能力的菌株能够通过表达群体感应信号分子N-酰基高丝氨酸内酯 (N-acylated homoserine lactones; AHLs) 调控生物膜的形成。但是, 群体感应系统对阪崎克罗诺杆菌生物膜形成与发展的调控机制还有待进一步的研究, 将有利于从群体感应入手进行病原菌防控新策略的探索。

4 阪崎克罗诺杆菌生物膜的控制

由于阪崎克罗诺杆菌在惰性表面形成了生物膜, 因此使用热水或消毒杀菌剂无法将其彻底清除^[49]。Kim等^[50]在研究中发现, 与不锈钢表面浮游的阪崎克罗诺杆菌相比较, 其生物膜对消毒剂的抗性明显增加。Bayoumi等^[51]在研究中发现, 在埃及, 奶制品工厂使用的设备大多数是由不锈钢和聚丙烯为材质的, 而从奶制品中分离的阪崎克罗诺杆菌能够在不锈钢和聚丙烯的表面形成生物膜, 并且使用食品加工厂的常规杀菌浓度为250 mg/L的次氯酸钠无法将其彻底清除。最近一些研究发现, 从食品中分离的阪崎克罗诺杆菌菌株已经对一些抗生素或杀菌剂表现出了不同程度的抗性^[52-53]。

在整个现代工业体系中, 为了确保食品安全和改善卫生措施, 广泛使用以杀菌剂和化学性药剂为基础的消毒方案来控制食品环境中的微生物。Al-Holy等^[54]在研究天然抗微生物剂、乳酸(LA)、硫酸铜和单月桂酸甘油酯作为食品添加剂, 对食品中阪崎克罗诺杆菌的控制效果时发现, 乳酸和硫酸铜的联合使用表现出了协同抑菌效果, 因此这两种物质作为食品添加剂的联合使用将有可能利于婴儿配方奶粉加工行业控制阪崎克罗诺杆菌对奶粉的潜在污染。虽然这些杀菌剂作为食品添加剂在食品控制中发挥着很重要的作用, 但是对其广泛的不合理使用可能会带来一些潜在的危险。已经有科学文献报道, 由于杀菌剂在食品加工行业和家庭环境中过度使用, 导致了耐药菌株耐药性不断增加, 以致于这些耐药菌株对临床使用的重要抗生素出现了交叉抗药性^[55]。抗生素耐药性, 尤其是多重耐药, 是一个公共健康问题, 因为它可能会导致常规治疗的失败, 从而引起长期慢性疾病和更大的死亡风险。因此, 从原料的获取到后期食品加工设备和环境的杀菌处理都需要制定更有效的控制策略, 从而降低食品被污染的风险。

为了解决细菌的抗药性与食品添加剂安全性的问题, 一些新的控制策略被陆续提出。植物或动物源

性抗菌化合物, 如精油、多酚类化合物、益生元以及乳铁蛋白, 这些物质能有效抑制阪崎克罗诺杆菌。

4.1 精油对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用

从植物中提取的芳香性精油能抑制食源性病原体^[56]。精油对阪崎克罗诺杆菌的抑菌效果已经在一些科学文献中有所报道。反式-肉桂醛(trans-cinnamaldehyde, TC)是肉桂树皮提取物中的主要组成成分, 它是由美国食品和药物监督管理局批准的食品级物质^[57]。Amalaradjou等^[58]的研究发现, 反式-肉桂醛能有效地失活保存在不同储藏温度的奶粉中的阪崎克罗诺杆菌。另外, Amalaradjou和Venkitanarayanan^[59-61]通过多次研究发现, 反式-肉桂醛能抑制阪崎克罗诺杆菌生物膜的形成, 降低细菌耐干燥、酸和渗透压的能力以及提高热处理的杀伤作用。反式-肉桂醛能下调阪崎克罗诺杆菌生物膜相关的基因^[59]以及许多与致病性有关的重要的调控基因的表达, 如基因*rpoS*、*phoP/phoQ*和*ompR*^[60]。反式-肉桂醛对阪崎克罗诺杆菌的控制, 还表现出了多重的抑菌机制, 包括干扰细菌的运动能力、侵袭能力以及抗氧化应激的防御能力^[61]。Amalaradjou等^[62]于2014年报道了反式-肉桂醛的亚抑菌浓度(sub-inhibitory concentrations)的抑菌功效。在研究中发现反式-肉桂醛衰减了阪崎克罗诺杆菌中重要的毒力基因, 主要有与运动、宿主组织的粘附和侵袭、巨噬细胞中的存活以及脂多糖合成有关的基因。通过这些研究取得的进展凸显了反式-肉桂醛预防或控制阪崎克罗诺杆菌感染的潜在的价值。最近, Al-Nabulsi等^[63]在研究中发现肉桂精油和冷杉精油的联合使用表现出了更有效的抗菌活性。Obaidat等^[64]的研究发现香草醛能有效使婴儿配方奶粉中以不同生理状态存活的阪崎克罗诺杆菌失活。因此, 这些抗菌物质可能有利于控制阪崎克罗诺杆菌对婴儿配方奶粉的潜在污染。

4.2 多酚类化合物对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用

自然界中含有大量的多酚类化合物, 并且动物和植物都可以产生多酚类化合物。Manach等^[65]的研究发现植物产生的多酚能够用于防御病原菌感染, 因此, 植物源性的多酚类化合物通常具有抗菌活性。多酚类物质添加到食品中, 一方面具有很强的抗氧化能力可以清除人体内过量的自由基, 从而有益于人体健康^[66], 另一方面能够抑制食品中病原性微生物的生长繁殖, 从而有利于延长食品的货架期。Kim等^[67]在研究中发现红麝香葡萄汁对阪崎克罗诺杆菌具有很强的抑菌效果, 原因在于红葡萄汁中含有丰富的多酚类化合物, 而且红葡萄汁与鞣酸的联合使用表现出了更强的协同抑菌效果。Pina-Pérez等^[68]也在研究中发现将可可粉与高压脉冲电场杀菌技术相结合对婴儿配方奶粉中的阪崎克罗诺杆菌进行杀菌处理后, 二者表现出了协同杀菌的作用效果。这是由于可可粉中含有的多酚类物质能减弱阪崎克罗诺杆菌对外界环境压力的耐受性, 从而增强了高压脉冲电场对细菌细胞的杀菌效果。此外, Huang等^[69]的研究发现蓝莓中含有的大量多酚类化合物, 如, 木槲草

素、花青素、原花青素等,使其既具有很强的抗氧化能力又具有抑制病原菌活性的作用。Joshi等^[70]的研究也提到蓝莓果汁与蓝莓原花青素都能抑制阪崎克罗诺杆菌的生长繁殖。因此,植物源性多酚类化合物可能有利于控制阪崎克罗诺杆菌对食品的潜在污染。

4.3 益生元对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用

益生元(Prebiotics)是一种膳食补充剂,通过选择性的刺激益生菌的生长与活性从而改善寄主健康状况的不可被消化的食品成分^[71]。最重要的是它只是刺激有益菌群的生长,并且能抑制细菌粘附到宿主细胞表面^[72]。由于细菌粘附于宿主细胞表面,是细菌导致宿主致病的一个重要阶段,因此寻找能有效抑制细菌粘附能力的抑菌物质可能有助于预防感染的发生。Quintero等^[73]在体外粘附实验的研究中发现,单独使用聚葡萄糖(polydextrose, PDX)或聚葡萄糖与低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)的联合使用都能有效地抑制阪崎克罗诺杆菌粘附到体外培养的肠上皮细胞表面。因此,它们在预防阪崎克罗诺杆菌相关的感染中具有潜在的应用价值。

4.4 乳铁蛋白对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用

乳铁蛋白是一种重要的非血红素铁结合糖蛋白,属于铁转运蛋白家族^[74]。乳铁蛋白不仅参与铁的转运,而且具有广谱抗菌、抗氧化、抗癌、调节免疫系统强大生物功能,被认为是一种新型抗菌、抗癌药物和极具开发潜力的食品和饲料添加剂^[75]。由于几乎所有的细菌在生长的过程中都需要铁元素,而乳铁蛋白通过络合铁的方式,阻碍了细菌对铁の利用,从而抑制了细菌的生长^[74]。此外,乳铁蛋白能与细菌细胞壁的脂多糖结合,其氧化型铁离子能够通过形成过氧化物将细菌氧化从而影响细胞膜的通透性并导致细菌细胞裂解^[74]。Quintero等^[76]的研究发现乳铁蛋白能够抑制阪崎克罗诺杆菌粘附到人肠上皮细胞(HEp-2)表面。Harouna等^[77]在研究中发现天然的牛奶乳铁蛋白(bovine milk lactoferrin, bLF)对阪崎克罗诺杆菌具有抑菌活性,并且随着浓度和培养时间的增加而抑菌效果增强。但是其抑菌效果受到不同因素的影响,如乳铁蛋白中铁的饱和度和浓度、被抑制细菌的干燥程度以及热处理温度等,其中热处理对乳铁蛋白抑菌活性影响很大,若乳清蛋白由于热处理失活,将导致乳铁蛋白的生物学功能丧失。通过热处理实验发现,对天然牛乳乳清蛋白72℃处理15 s; 85℃处理15 s; 63℃处理30 min后,仍然保持了几乎全部的抑菌活性。此外,中国《食品安全国家标准——食品营养强化剂使用标准》将乳铁蛋白列入GB14880-2012,认定为食品营养强化剂,而且乳铁蛋白也是母乳中含有的特有的成分。因此,将乳铁蛋白有效合理地应用于普通婴幼儿配方奶粉中,既可满足婴儿生长发育的需要,又可以抑制阪崎克罗诺杆菌的潜在污染。

5 结论与展望

阪崎克罗诺杆菌生物膜是食品污染和临床婴幼儿感染的主要原因。生物膜的形成不仅与生物膜相

关基因的表达与调节有关,而且与惰性物体或机体粘膜表面和细菌细胞表面的性质以及外界环境因素的影响有关。对食品工业中生物膜的预防与控制的研究可以从如下几个方面考虑:利用高通量测序技术和双向电泳技术进行基因组和蛋白组学研究,筛选和鉴定与阪崎克罗诺杆菌及其生物膜形成和发展相关的基因,全面了解生物膜形成的分子机制,并且构建体内与体外模型,了解其致病机理,从而控制其在食品工业中的潜在污染以及减少对人类的危害。从原料的获取到终产品产出的一系列过程中,实施有效的环境监管程序,如,良好的生产规范(good manufacturing practice, GMP)和食品安全管理体系(hazard analysis and critical control point, HACCP),从而将阪崎克罗诺杆菌进入食品加工环节的几率降至最低。通过研究阪崎克罗诺杆菌及其生物膜的生理机能和对抗菌物质产生抗性的机理,开发有效的、低成本的、满足食品安全的抑菌物质,用于食品加工环境的清洁以及预防和治疗阪崎克罗诺杆菌所致的相关疾病。

参考文献

- [1] Drudy D, Mullane N, Quinn T, et al. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 42(7):996-1002.
- [2] Yan Q, Condell O, Power K, et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(1):1-15.
- [3] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a 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(Pt 6):1277-1283.
- [4] Joseph S, Desai P, Ji Y, et al. Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species[J]. PLoS One, 2012, 7(11):e49455.
- [5] Brady C, Cleenwerck I, Venter S, et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA)[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(5):309-319.
- [6] Friedemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1):1-10.
- [7] Schmid M, Iversen C, Gontia I, et al. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp[J]. Research in Microbiology, 2009, 160(8):608-614.
- [8] Iversen C, Lane M, Forsythe S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38(5):378-382.
- [9] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, et al. Desiccation and heat

- tolerance of *Enterobacter sakazakii*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(5):967-973.
- [10] Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, et al. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(2):227-231.
- [11] Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, et al. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*[J]. BMC Infectious Diseases, 2009, 9(1):146.
- [12] Lehner A, Riedel K, Eberl L, et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(11):2287-2294.
- [13] Al-Nabulsi A A, Osaili T M, Al-Holy M A, et al. Influence of desiccation on the sensitivity of *Cronobacter* spp. to lactoferrin or nisin in broth and powdered infant formula[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(2):221-226.
- [14] Lou X, Si G, Yu H, et al. Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) via wheat flour[J]. Food Control, 2014, 43:258-262.
- [15] Mohammed M A, Sallam K I, Tamura T. Prevalence, identification and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* isolated from retail meat products[J]. Food Control, 2015, 53:206-211.
- [16] Holý O, Forsythe S. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection[J]. Journal of Hospital Infection, 2014, 86(3):169-177.
- [17] Hunter C, Bean J. *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis[J]. Journal of Perinatology, 2013, 33(8):581-585.
- [18] Ravisanakar S, Syed S, Garg P, et al. Is *Cronobacter sakazakii* infection possible in an exclusively breastfed premature neonate in the neonatal intensive care unit? [J]. Journal of Perinatology, 2014, 34(5):408-409.
- [19] Townsend S, Forsythe S. The neonatal intestinal microbial flora, immunity and infections. In *Enterobacter sakazakii* ed[M]. Washington, DC: ASM Press, 2008:61-100.
- [20] FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae[R]. Rome, Italy: Microbiological Risk Assessment Series No.15, 2008:7-8.
- [21] Gosney M A, Martin M V, Wright A E, et al. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia[J]. European journal of internal medicine, 2006, 17(3):185-188.
- [22] Kim H, Ryu J H, Beuchat L R. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9):5846-5856.
- [23] Ye Y, Ling N, Jiao R, et al. Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(1):1-6.
- [24] Bae Y M, Baek S Y, Lee S Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3):465-473.
- [25] Dancer G, Mah J H, Rhee M S, et al. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5):1606-1614.
- [26] Jung J H, Choi N Y, Lee S Y. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions[J]. Food Microbiology, 2013, 34(1):70-80.
- [27] Walsh D, Molloy C, Iversen C, et al. Survival characteristics of environmental and clinically derived strains of *Cronobacter sakazakii* in infant milk formula (IMF) and ingredients[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3):697-703.
- [28] Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(9):881-890.
- [29] Yi K, Rasmussen A W, Gudlavalleti S K, et al. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(10):6132-6138.
- [30] Scher K, Romling U, Yaron S. Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella* enterica serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3):1163-1168.
- [31] Feeney A, Sleator R D. An in silico analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen *Cronobacter sakazakii* [J]. Bioengineered bugs, 2011, 2(5):260-270.
- [32] Kucerova E, Clifton S W, Xia X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species[J]. PLoS One, 2010, 5(3):e9556.
- [33] Feeney A, Johnston C D, Govender R, et al. Analysis of the role of the *Cronobacter sakazakii* ProP homologues in osmotolerance [J]. Gut pathogens, 2014, 6(1):15.
- [34] Grimm M, Stephan R, Iversen C, et al. Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(1):13-18.
- [35] Hartmann I, Carranza P, Lehner A, et al. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7):2251-2261.
- [36] Wang L, Hu X, Tao G, et al. Outer membrane defect and stronger biofilm formation caused by inactivation of a gene encoding for heptosyltransferase I in *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(5):985-997.
- [37] Guillier M, Gottesman S, Storz G. Modulating the outer membrane with small RNAs[J]. Genes Development, 2006, 20(17):2338-2348.
- [38] Lenz D H, Mok K C, Lilley B N, et al. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing

- in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*[J]. *Cell*,2004,118(1):69–82.
- [39] Repoila F, Majdalani N, Gottesman S. Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(4): 855–861.
- [40] Christiansen J K, Larsen M H, Ingmer H, et al. The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11):3355–3362.
- [41] Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, et al. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium* [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(1):193–217.
- [42] Kulesus R R, Diaz-Perez K, Slechta E S, et al. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(7):3019–3026.
- [43] Kim S, Hwang H, Kim K P, et al. hfq Plays Important Roles in Virulence and Stress Adaptation in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(5):2089–2098.
- [44] Choi Y, Kim S, Hwang H, et al. Plasmid-encoded MCP is involved in virulence, motility, and biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(1):197–204.
- [45] Smith J L, Fratamico P M, Novak J S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists[J]. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(5):1053–1070.
- [46] Whitehead N A, Barnard A M, Slater H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(4):365–404.
- [47] Gram L, Christensen A B, Ravn L, et al. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the *Enterobacteriaceae* isolated from foods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8):3458–3463.
- [48] Van Houdt R, Aertsen A, Jansen A, et al. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(1):177–184.
- [49] Kim H, Bang J, Beuchat L R, et al. Fate of *Enterobacter sakazakii* attached to or in biofilms on stainless steel upon exposure to various temperatures or relative humidities [J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(5):940–945.
- [50] Kim H, Ryu J H, Beuchat L R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4):1256–1265.
- [51] Bayoumi M A, Kamal R M, El Aal S F A, et al. Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 158(3):225–231.
- [52] Li Y, Chen Q, Zhao J, et al. Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China[J]. *Food Control*, 2014, 37:109–114.
- [53] Xu X, Li C, Wu Q, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 204:17–23.
- [54] Al-Holy M A, Castro L F, Al-Qadiri H. Inactivation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in infant formula using lactic acid, copper sulfate and monolaurin[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(3):246–251.
- [55] Condell O, Iversen C, Cooney S, et al. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella*—links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9):3087–3097.
- [56] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3):223–253.
- [57] Adams T B, Cohen S M, Doull J, et al. The FEMA GRAS assessment of cinnamyl derivatives used as flavor ingredients[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(2):157–185.
- [58] Amalaradjou M A R, Hoagland T A, Venkitanarayanan K. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(2):146–149.
- [59] Amalaradjou M A R, Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces[J]. *Journal of Food Protection*, 2011, 74(2):200–208.
- [60] Amalaradjou M A R, Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on reducing resistance to environmental stresses in *Cronobacter sakazakii*[J]. *Foodborne pathogens and disease*, 2011, 8(3):403–409.
- [61] Amalaradjou M A R, Venkitanarayanan K. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of trans-cinnamaldehyde against *Cronobacter sakazakii* 415[J]. *Foodborne pathogens and disease*, 2011, 8(10):1095–1102.
- [62] Amalaradjou M A R, Kim K S, Venkitanarayanan K. Sub-Inhibitory Concentrations of Trans-Cinnamaldehyde Attenuate Virulence in *Cronobacter sakazakii* in Vitro[J]. *International journal of molecular sciences*, 2014, 15(5):8639–8655.
- [63] Al-Nabulsi A A, Awaisheh S S, Osaili T M, et al. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant milk formula by plant essential oils[J]. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2015, 88(1):97–101.
- [64] Obaidat M M, Alu'Datt M H, Salman A E B, et al. Inactivation of nondesiccated and desiccated *Cronobacter Sakazakii* and *Salmonella* spp. at low and high inocula levels in reconstituted infant milk formula by vanillin[J]. *Food Control*, 2015, 50:850–857.
- [65] Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability[J]. *The American journal of clinical nutrition*, 2004, 79(5):727–747.

- [66] Tomas-Barberán F A, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, et al. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(10):3926-3935.
- [67] Kim T, Weng W, Silva J, et al. Identification of natural antimicrobial substances in red muscadine juice against *Cronobacter sakazakii*[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(3): M150-M154.
- [68] Pina-Pérez M, Martínez-López A, Rodrigo D. Cocoa powder as a natural ingredient revealing an enhancing effect to inactivate *Cronobacter sakazakii* cells treated by Pulsed Electric Fields in infant milk formula[J]. *Food Control*, 2013, 32(1):87-92.
- [69] Huang W Y, Zhang H C, Liu W X, et al. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2012, 13(2):94-102.
- [70] Joshi S S, Howell A B, D'Souza D H. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins[J]. *Food Microbiology*, 2014, 39:127-131.
- [71] Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [J]. *Journal of nutrition*, 1995, 125:1401-1412.
- [72] Gibson G, McCartney A, Rastall R. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections[J]. *British Journal of Nutrition*, 2005, 93(S1):S31-S34.
- [73] Quintero M, Maldonado M, Perez-Munoz M, et al. Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by prebiotic oligosaccharides[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(5):1448-1454.
- [74] Sanchez L, Calvo M, Brock J H. Biological role of lactoferrin [J]. *Archives of Disease in Childhood*, 1992, 67(5):657.
- [75] Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives[J]. *BioMetals*, 2004, 17(3):189-196.
- [76] Quintero-Villegas M I, Wittke A, Hutkins R. Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Lactoferrin[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(4):574-579.
- [77] Harouna S, Carramiñana J, Navarro F, et al. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: Effect of media and heat treatment[J]. *Food Control*, 2015, 47:520-525.

(上接第370页)

- [39] Candela M, Perna F, Carnevali P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(3):286-292.
- [40] Neeser J R, Granato D, Rouvet M, et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria[J]. *Glycobiology*, 2000, 10(11):1193-1199.
- [41] Dallal M M S, Yazdi M H, Hassan Z M. *Lactobacillus casei* ssp. *casei* Induced Th1 Cytokine Profile and Natural Killer Cells Activity in Invasive Ductal Carcinoma Bearing Mice[J]. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 2012, 11(2):183-189.
- [42] Bleau C, Monges A, Rashidan K, et al. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(2):666-675.
- [43] Dong H, Rowland I, Yaqoob P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function *in vitro*[J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 108(3):459-470.
- [44] Elmadfa I, Klein P, Meyer A L. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria *in vivo* and *in vitro*[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2010, 69(3):416-420.
- [45] Hiramatsu Y, Hosono A, Konno T, et al. Orally administered *Bifidobacterium* triggers immune responses following capture by CD11c(+) cells in Peyer's patches and cecal patches[J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(3):307-317.
- [46] 陈卫. 乳酸菌—研究热点、产业近况及发展趋势[A]. 乳酸菌与营养健康: 第九届乳酸菌与健康国际研讨会摘要汇编[C]. 2014.
- [47] Guo L, Karpac J, Tran S L, et al. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan[J]. *Cell*, 2014, 156(1-2):109-122.
- [48] 周晓莹, 陈晓琳. 乳酸菌的益生作用及其应用研究进展[J]. *中国微生物学杂志*, 2011, 23(10):946-949.
- [49] Kim H S, Park D W, Youn Y K, et al. Liver abscess and empyema due to *Lactococcus lactis cremoris* [J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2010, 25(11):1669-1671.

《食品工业科技》愿为企业铺路、搭桥!