DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260122001
引用格式: 朱晓旻, 李郑晖, 郭升阳, 等. *betA* 和 *betB* 基因对克罗诺杆菌耐抗逆性及毒力的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 33–41.
ZHU XM, LI ZH, GUO SY, *et al*. Effects of *betA* and *betB* genes on the stress resistance and virulence of *Cronobacter*. [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 33–41. (in Chinese with English abstract).

betA 和 *betB* 基因对克罗诺杆菌耐抗逆性及毒力的影响

朱晓旻[1#], 李郑晖[2#], 郭升阳[3], 杨捷琳[1*], 钮 冰[4]

(1. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 201210; 2. 上海大学钱伟长学院, 上海 200444; 3. 上海海关后勤管理中心, 上海 200135; 4. 上海大学生命科学学院, 上海 200444)

摘 要: 目的 探究 *betA* 和 *betB* 基因对克罗诺杆菌耐抗逆性及毒力的影响。**方法** 以阪崎克罗诺杆菌为实验对象, 使用 *betA*、*betB*、*betAB* 基因敲除及回补菌株, 探究 *betA*、*betB* 基因对克罗诺杆菌生物膜形成能力、抗逆性及细胞毒力的影响。**结果** 检测各菌株生物膜形成能力, 发现 *betA*、*betB* 基因的缺失会导致生物膜形成量下降, 推测 *betA* 和 *betB* 基因通过控制甜菜碱合成促进克罗诺杆菌生物膜形成。用荧光显微镜和流式细胞仪检测不同温度及 pH 对克罗诺杆菌的影响, 结果显示高温及酸性环境下各克罗诺杆菌的存活率均下降, 其中 pH=7 和 pH=9 条件下克罗诺杆菌存活率显著高于 pH=5 (P<0.05), 温度为 48 ℃时存活率显著低于温度为 25 ℃与 37 ℃ (P<0.05)。克罗诺杆菌侵染细胞的毒力评估结果显示, 细菌侵染会导致细胞中紧密连接蛋白含量发生变化, CS 34、Δ*betB*、Δ*betAB*、*cpbetA*、*cpbetB*、*cpbetAB* 菌株干燥处理对细胞造成的损伤显著强于干燥处理前, 造成细胞活力下降并导致紧密连接相关蛋白含量显著减少(P<0.01)。当 *betA* 基因缺失时, 相比于干燥处理前, 干燥处理后的克罗诺杆菌未导致细胞活力明显下降。**结论** 本研究发现 *betA*、*betB* 基因的缺失导致克罗诺杆菌生物膜形成能力减弱, 对酸和高温的耐受力减弱; 同时发现 *betA* 基因存在时在干燥条件下存活的细菌往往具有更强的毒力, 对细胞造成的损伤更大。

关键词: 克罗诺杆菌; 生物膜; 抗逆性; 毒力

Effects of *betA* and *betB* genes on the stress resistance and virulence of *Cronobacter*

ZHU Xiao-Min[1#], LI Zheng-Hui[2#], GUO Sheng-Yang[3], YANG Jie-Lin[1*], NIU Bing[4]

(1. *Shanghai Customs Animal*, *Plant and Food Inspection and Quarantine Technology Center*, *Shanghai* 201210, *China*; 2. *QianWeiChang College*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444, *China*; 3. *Shanghai Customs Logistics Management Center*, *Shanghai* 200135, *China*; 4. *School of Life Sciences*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444, *China*)

收稿日期: 2026-01-22
基金项目: 国家重点研发计划国家质量基础设施体系专项(2024YFF0619400)
#朱晓旻和李郑晖为共同第一作者
第一作者: 朱晓旻(1989—), 女, 工程师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: 327194544@qq.com
李郑晖(2005—), 男, 主要研究方向为微生物。E-mail: lizhenghui@shu.edu.cn
***通信作者:** 杨捷琳(1978—), 女, 研究员, 主要研究方向为食品检验。E-mail: 15900893603@qq.com

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of the *betA* and *betB* genes on stress resistance and virulence of *Cronobacter*. **Methods** Using *Cronobacter sakazakii* as the experimental subject, this study emplored *betA*, *betB*, and *betAB* gene knockout and restoration strains to invesitage the effects of *betA* and *betB* on biofilm formation ability, stress resistance and cellular virulence of *Cronobacter*. **Results** The biofilm formation ability of each strain was detected, and found that deletion of *betA* and *betB* led to a decrease of biofilm formation. It was speculated that *betA* and *betB* promote biofilm formation in *Cronobacter* by controlling betaine synthesis. The effects of different temperatures and pH on *Cronobacter* were examined using fluorescence microscopy and flow cytometry. The results showed that under high temperature and acidic conditions, the survival rates of all *Cronobacter* strains decreased. Specifically, survival rates at pH 7 and pH 9 were significantly higher than at pH 5 (P<0.05), and survival rates at 48 ℃ were significantly lower than at 25 ℃ and 37 ℃ (P<0.05). The assessment of *Cronobacter* virullence in cell infection revealed that bacterial infection was led to changes in the levels of tight junction proteins within cells, for the CS 34, Δ*betB*, Δ*betAB*, *cpbetA*, *cpbetB* and *cpbetAB* strains caused significantly greater damage to cells after drying treatment compared to before drying, resulting in a decrease in cell viability and leading to a significant decrease in tight junction-associated proteins (P<0.01). When the *betA* gene was deleted, desiccated *Cronobacter* did not cause a significant decrease in cell viability compared to non-desiccated bacteria. **Conclusion** This study finds that deletion of the *betA* and *betB* genes weakens the biofilm formation ability of *Cronobacter* and reduces its tolerance to acid and high temperature. It is also observed that when the *betA* gene is present, bacteria that survive under desiccated conditions tend to have stronger virulence and cause greater cellular damage.

KEY WORDS: *Cronobacter*; biofilm; stress resistance; virulence

0 引 言

克罗诺杆菌(*Cronobcter*)是一种革兰氏阴性、条件性食源致病菌。2012 年 JOSPEH 等[1]利用 16S RNA 基因序列分析和多位点测序技术对克罗诺杆菌进行分类研究, 最终将克罗诺杆菌属分为 7 个种, 包括阪崎克罗诺杆菌(*Cronobcter sakazakii*)、丙二酸克罗诺杆菌(*Cronobcter malonaticus*)、苏伊士克罗诺杆菌(*Cronobcter turicensis*)、莫氏克罗诺杆菌(*Cronobcter muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*Cronobcter dublinensis*)、康蒂蒙提克罗诺杆菌(*Cronobcter condimenti*)和尤尼沃斯克罗诺杆菌(*Cronobcter universalis*)。克罗诺杆菌通常会感染新生儿、免疫力低下的人群及老年人, 引发脑膜炎、败血症及坏死性小肠结肠炎等疾病, 在新生儿中, 感染克罗诺杆菌导致的致死率高达 40%~80%, 且治愈后也会留下严重的神经系统后遗症[2]。ZENG 等[3]报道了阪崎克罗诺杆菌感染导致的新生儿脑膜炎案例, 虽然通过治疗后临床症状好转, 但该新生儿身心发育明显受损。

克罗诺杆菌广泛分布在环境中, 在婴儿辅食[4]、临床[5]、香料[6]等基质中均有发现。从中国多个省份中采集的 12105 个食物样本中的克罗诺杆菌检出率达到了 8.7%[4]; GARBOWSKA 等[7]从波兰植物性即食食品中分离出多株克罗诺杆菌并发现这些菌株具有较大的基因型多样性; DAS 等[8]从印度鱼类与贝类中检出克罗诺杆菌, 其中干鱼表面克罗诺杆菌的检出率高达 55.6%。尽管克罗诺杆菌在多种基质中均有分布, 但造成婴幼儿疾病发生的克罗诺杆菌往往来源于婴儿配方奶粉(powdered infant formula, PIF), PIF 由于具有丰富的营养物质, 可以作为克罗诺杆菌生存生长的栖息地。相关研究表明, 食品加工与家庭环境中都可能出现克罗诺杆菌的分布[9]。GB 29921—2021《预包装食品中致病菌限量》(现行有效)规定婴儿(0~6 月龄)配方食品、特殊医学用途婴儿配方食品中不得检出克罗诺杆菌。

克罗诺杆菌具有极强的耐干燥能力, 使得克罗诺杆菌可以在干燥的奶粉中长期存活。甜菜碱是细菌在渗透压力下首选的相容性溶质, 作为最有效的渗透保护剂之一, 甜菜碱除了维持细菌体内的渗透平衡外, 还可以保护细菌细胞中的酶和蛋白质。细菌体内甜菜碱主要有两种获取方式, 一种是通过甜菜碱转运蛋白从外界环境中摄取, 另一种是通过胆碱氧化合成途径和甘氨酸甲基化途径自身合成[10]。当细菌处于高渗环境时, 细菌胆碱转运蛋白 BetT 上调并促进外部胆碱摄取, 胆碱脱氢酶 *betA* 将胆碱转化为甜菜醛, 而后在甜菜醛脱氢酶 *betB* 的作用下转化为甜菜碱[11−12]。ANGELIDIS 等[13]构建了甘氨酸和甜菜碱转运蛋白, 发现在高渗环境中的细菌生长速率显著低于野生型菌株, 表明甜菜碱使细菌应对高渗环境不可或缺的。因此, 甜菜碱可作为细菌生长的渗透保护剂, 帮助细菌克服干燥带来的高渗环境。在先前的研究中通过代谢组学和转录组

学筛选了克罗诺杆菌干燥处理前后的差异表达代谢物及基因, 将 *betA*、*betB* 确定为主要研究对象, 使用基因敲除手段验证其在克罗诺杆菌耐干燥过程中发挥的作用, 发现 *betA*、*betB* 基因的缺失导致克罗诺杆菌干燥环境中的存活能力大大降低[14]。

除了在耐干燥过程中发挥作用, 甜菜碱还可能与细菌生物膜形成、温度和 pH 耐受、毒力相关, 已有的研究发现 *betA*、*betB* 基因在干燥处理后的克罗诺杆菌中显著上调, 推测其在克罗诺杆菌耐干燥过程中发挥了重要作用, 但并未切实确定该基因的功能, 因此本研究使用 *betA*、*betB* 基因缺失及回补菌株来检测探究甜菜碱在克罗诺杆菌耐逆性及毒力中发挥的作用, 揭示 *betA* 在干燥条件下可能维持或增强致病潜力的新机制。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

本研究使用的野生型菌株阪崎克罗诺杆菌 CS 34 由上海上海海关动植物与食品检验检疫技术中心提供, 基因敲除及回补型菌株均由上海生工生物工程有限公司提供, 保存于–80 ℃冰箱中。实验所用人脑微血管内皮细胞 hCMEC/D3 细胞系购自上海中乔新舟生物科技有限公司。阪崎克罗诺杆菌菌株 CS 34; Δ*betA*、Δ*betB*、Δ*betAB*: *betA*、*betB*、*betAB* 基因敲除后的 CS 34 菌株; *cpbetA*、*cpbetB*、*cpbetAB*: 基因回补后的 CS 34 菌株。

人脑微血管内皮细胞(Human brain microvascular endothelial cells, hCMEC/D3)专用培养基(ZM0961)、0.25%胰酶(0103)(上海中乔新舟生物科技有限公司); 细胞裂解液(PC102)、二喹啉甲酸 BCA 法蛋白定量试剂盒(ZJ101)、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfonate-polyacrylamide, SDS-PAGE)凝胶试剂盒(PG221、PG222、PG223)、蛋白分子量标准(marker, WJ103)、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色液(SQ203)(雅酶生物医药科技有限公司); 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(IPFL00010)(德国 Merck 公司); 一抗、二抗(武汉三鹰生物技术有限公司)。

含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)(CM501A)、含 0.6%酵母膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)(CM502A)、克罗诺杆菌显色培养基(PBE015)(北京陆桥技术股份有限公司); 甘油(G810574, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 结晶紫(GBW06420)、甜菜碱含量检测试剂盒(BC3130)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(北京索莱宝科技有限公司); 细胞、细菌总 RNA 提取试剂盒(9109)、TB Green 嵌合荧光法反应试剂(RR091Q)、逆转录酶(去基因组核酸)PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A)(日本 TaKaRa 公司); 碘化丙啶(propidium iodide, PI)/SYTO9 活死细菌染色试剂盒(MX4234, 上海懋康生物科技有限公司); 胆碱、乙酰胆碱荧光法测试盒(MAK056)(美国 Sigma 公司); 无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司); 庆大霉素(上海源叶生物科技有限公司); 三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水-吐温 20 (trihydroxymethylaminomethane buffered brine-Tween 20, TBST)(上海雅酶生物医药科技有限公司)。

1.2　仪器与设备

PB602-N 电子天平[精度 0.01, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; 85-2 恒温磁力搅拌器(上海志威电器有限公司); 4530R 低温高速离心机[艾本德(上海)国际贸易有限公司]; NanoDrop 2000 超微量分光光度计、EMax Plus 多功能光吸收酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; CFX Real-time 聚合酶链式反应仪(美国 BIO-RAD 公司); UV759CRT 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司); IX73 荧光倒置显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]; 0270501198 –80 ℃冰箱 (中国海尔公司); XCT 恒温培养箱(中国康恒公司); BSI 恒温摇床(上海 Being 公司); 离子溅射仪 108AUTO(英国 Cresstington 公司); SU8010 扫描电子显微镜[日立(上海)贸易有限公司]; FB50 超声细胞破碎仪(美国赛默飞世尔科技公司); Venus 2502 真空冷冻干燥机(杭州富睿捷科技有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　菌株的培养

克罗诺杆菌菌株均在甘油中保存于–80 ℃冰箱。将–80 ℃冰箱中保存的克罗诺杆菌取出, 化冻后划线培养于克罗诺杆菌显色培养基中, 放置于恒温培养箱中 37 ℃培养 12~16 h, 挑取蓝绿色菌落于 TSB-YE 培养基中, 放置于恒温摇床 200 r/min, 37 ℃, 5 h 培养至对数生长期备用。

1.3.2　生物膜形成能力的检测

根据 KONG 等[15]的方法培养克罗诺杆菌生物膜, 将活化好的菌液按照体积比 1:100 比例转入新鲜培养基混匀, 取 200 μL 混合好的菌液于 96 孔板中, 37 ℃培养 5 d, 每个样品重复 6 次, 不加菌液的 TSB-YE 培养基为对照孔。将培养完成的生物膜上清液吸出, 使用 PBS 轻轻冲洗 2 次, 以便将未黏附在孔底的细菌洗去; 而后每孔加入 0.1%结晶紫溶液, 室温静置 45 min 染色, 使用 PBS 清洗两次, 将多余的结晶紫染料洗去, 55 ℃, 30 min 烘干; 向每个孔中加入 200 μL 95%乙醇脱色 30 min, 测定 OD_{595} 处的吸光值。

1.3.3　温度、pH 对克罗诺杆菌的影响

根据 1.3.1 方法获得克罗诺杆菌菌悬液, 细菌初始浓度均为一致, 吸取 3 mL 菌液于 6 孔板中, 放置于恒温培养箱中, 25、37、48 ℃培养 6 d。

使用 pH 为 5、7、9 的 TSB-YE 培养基培养克罗诺杆菌, 吸取 3 mL 菌液于 6 孔板中, 放置于恒温培养箱中

37 ℃培养 6 d。

将在此过程中克罗诺杆菌的存活率作为评估指标, 6 d 后菌株的存活率越高, 则表明该菌株的对不利环境的抵抗能力。

1.3.4 毒力相关基因表达量的检测

将活化好的菌液以体积比 1:100 接种至新鲜的 TSB-YE 培养基中, 置于摇床 37 ℃, 200 r/min 培养 5 h 至对数生长期此为干燥处理前的菌液; 吸取 2 mL 活化好的菌液于 96 孔板中, 将 6 孔板放置于装有 500 g 无水硅胶的玻璃干燥器中, 放置于恒温培养箱中 37 ℃培养 6 d, 培养结束后吸取 2 mL 新鲜 TSB-YE 培养基对细菌进行复苏, 此为干燥处理后的菌液。取 2 mL 菌液于离心管中, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 向菌体沉淀中加入 100 μg/mL 的溶菌酶振荡混匀对细菌细胞壁进行裂解。反应结束后, 提取克罗诺杆菌 RNA, 并逆转录获得 cDNA 后进行实时荧光聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)。实验所用引物如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 所用引物列表

Table 1 Table of primers used for qRT-PCR

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
16sRNA F	CCAGGGCTACACACGTGCTA	16sRNA R	TCTCGCGAGGTCGCTTCT
alr-F	CGCCTATGGACACGGTCTTCTTG	alr-R	GGGTTGGGTAATGCCGCCTTC
pssA-F	TGGCGGCAAAGGCGTGTTG	pssA-R	CGGCAATACCAGTCGGCGTTAG
patA-F	CTTGGCGGCGGCGTGATG	patA-R	GGTGTGCAGGAACGGGTTGTC
pxpA-F	GGCGGGCAGCGAGCTTATTC	pxpA-R	GCCTCGTCGTCATCCTCAATCAAC
cpdB-F	GGTAAAGATTTCGCCGCCATCAAAG	cpdB-R	TCCACTTGCCGCTGTCGTTATTC

1.3.5 hCMEC 细胞的培养

(1)细胞复苏

将细胞从液氮中取出, 1500 r/min 离心 3 min, 弃上清后加入完全培养基, 轻轻吹打混匀并移至细胞培养皿, 37 ℃, 5% CO_2 培养。

(2)细胞传代

细胞覆盖细胞培养皿底部面积达 80 %以上时, 吸取细胞培养皿中培养基, PBS 冲洗 2~3 次, 加入 2 mL 胰酶消化, 加入 4 mL 细胞培养基终止消化, 1500 r/min 离心 3 min, 弃上清并加入 1 mL 新鲜细胞培养基, 分别传至 2~4 个细胞培养皿中并加入 5 mL 新鲜培养基。

(3)细胞冻存

同细胞传代步骤, 离心后弃上清并加入细胞冻存液, 分装置冻存管中置于液氮保存。

1.3.6 细胞活力的检测

96 孔板中每孔加入 100 μL 含 hCMEC 细胞的培养液, 使得孔内细胞密度为 10^4 个, 培养 24 h 待细胞完全贴壁后, 吸弃培养基, PBS 冲洗, 加入含克罗诺杆菌的完全培养基继续培养 2 h, 培养结束后每孔加入 10 μL CCK-8 细胞活力检测液, 反应 45 min 后, 测 OD_{450}, 细胞存活率计算如公式(1)所示:

$$细胞活力/\%=A(菌)-A(空)A(0\ 菌)-A(空)\times 100\% \quad (1)$$

式中: A(菌)为细菌感染后添加 CCK-8 反应后小孔吸光度; A(0 菌)为正常培养细胞添加 CCK-8 反应后小孔吸光度; A(空)为细胞培养液与 CCK-8 反应后小孔吸光度。

1.3.7 细胞蛋白的提取及 Western Blot

正常培养细胞至细胞贴壁且覆盖培养皿底面达 80%, 用含克罗诺杆菌培养基共培养感染细胞 2 h, 吸弃培养基并用 PBS 冲洗 2 次。加入含 100 μg/mL 庆大霉素的细胞完全培养基培养 1 h 以杀死细菌。培养结束后用 PBS 冲洗 2 次, 置于冰上, 每皿加入 200 μL 细胞裂解液, 用细胞刮刀将细胞刮下, 吸入离心管中反复吹打, 冰浴 30 min, 每隔 10 min 振荡一次。4 ℃、14000 r/min 离心 30 min 以去除杂质, 弃沉淀, 上清为细胞蛋白。

用 BCA 蛋白定量试剂盒对所提取蛋白浓度进行检测并进行归一化处理, 100 ℃加热蛋白 10 min, –20 ℃保存备用。

用 SDS-PAGE 试剂盒配置 10%、1 mm 凝胶, 每孔蛋白上样量为 20 μg, 电泳条件为电压 80 V, 时间 20 min, 随后改为电压 120 V, 时间 60 min。电泳结束后, 根据 marker 裁去凝胶多余部分, 采用三明治夹心法将目的条带转移至 PVDF 膜上, 转膜条件为电流 400 mA, 时间 65 min, 反应结束后 TBST 冲洗 5 min。封闭 3 h 并使用一抗孵育, 4 ℃过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min。二抗孵育 1 h, 孵育结束后 TBST 冲洗 3 次, 每次 10 min。用超敏 ECL 显色液曝光显影目的条带, ImageJ 1.54g 软件进行灰度分析。

1.3.8 SYTO/PI 染色

荧光显微镜观察: 取 1 mL 菌液 8000 r/min 离心 5 min, 弃上清收集菌体, 用 PBS 清洗并重悬, 振荡混匀, 加入 1.5 μL PI 染料与 SYTO9 染料避光反应 15 min, 放置于荧光倒置显微镜观察。

1.4 数据处理

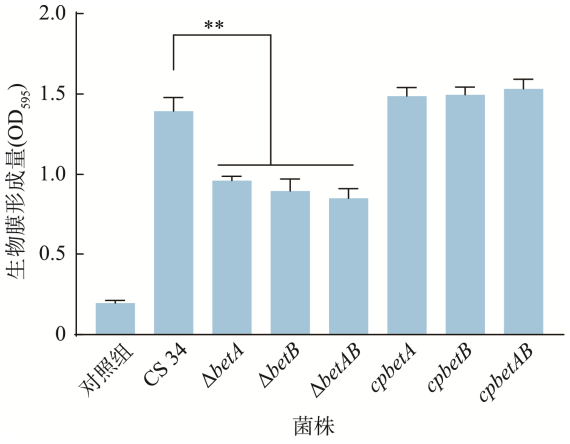
数据结果均至少重复 3 次, 用 GraphPad 6.01 计算平均值与标准偏差, SPSS v.20.0 进行显著性分析, 检验方法为双因素方差分析, $P\leqslant 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 基因敲除对克罗诺杆菌生物膜形成能力的影响

将基因敲除前后的克罗诺杆菌置于 96 孔板中培养 3 d,

通过结晶紫染色法评估基因敲除及回补后克罗诺杆菌生物膜的形成能力, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 克罗诺杆菌野生型菌株 CS 34 与基因回补菌株 *cpbetA*、*cpbetB*、*cpbetAB* 生物膜形成能力较强, 生物膜形成量分别为 1.39、1.48、1.48、1.53; Δ*betA*、Δ*betB* 和 Δ*betAB* 菌株生物膜形成量分别减少了 30.92%、35.58%、38.88% (P<0.01), 推测甜菜碱能够帮助克罗诺杆菌形成生物膜。



注: **表示具有极显著差异, P<0.01, 图 2、4、6、7 同。

图 1　克罗诺杆菌生物膜形成能力的检测

Fig.1　Detection of *Cronobacter* biofilm-forming capacity

2.2　环境因子对基因敲除克罗诺杆菌的影响

用 pH 分别为 5、7、9 的培养基培养克罗诺杆菌, 测定其在 6 d 处理后的存活率, 结果如图 2A 所示。6 d 处理后, 所有细菌均发生不同程度的死亡。pH=5 时, 克罗诺杆菌在干燥环境中的存活率分别为 50.26%、10.95%、11.92%、9.87%、47.83%、46.59%、51.32%, 相比于 pH=7 时下降了 31.64%、47.23%、45.55%、58.12%、33.73%、33.76%、32.32% (P<0.05)。pH=9 时, 克罗诺杆菌的存活率与 pH=7 时没有显著差异。与此同时, 在不同温度下对克罗诺杆菌进行处理, 由图 2B 可知, 当温度逐渐升高到 48 ℃, 克罗诺杆菌的存活率显著低于及 37 ℃, 细菌存活率分别下降了 15.11%、41.26%、36.09%、45.95%、15.63%、14.83%、14.90%; 而 25 ℃与 37 ℃细菌在干燥条件下的存活率没有显著差异。表明酸性、高温环境不利于克罗诺杆菌生长, 高温、酸处理会降低克罗诺杆菌对环境的抵御能力。

将不同处理的克罗诺杆菌置于培养皿中, 用 SYTO9 与 PI 进行染色并放置于荧光倒置显微镜下观察, 结果如图 3 所示。在 pH=7, 37 ℃下培养的克罗诺杆菌均呈现绿色荧光, 表明细菌生长状态良好。然而, 酸处理或高温处理后, 各培养皿中均出现红色与黄色荧光, 表明均有受损或死亡细菌出现。当 pH=5 或培养温度为 48 ℃时, 干燥处理后各菌株均出现红色与黄色荧光面积增大, 表明受损、死亡细菌数量增加。其余处理下, 克罗诺杆菌在干燥处理后的黄色与红色荧光与正常培养条件(pH=7, 37 ℃)没有明显差异, 表明酸处理与高温处理会导致克罗诺杆菌在干燥环境中的耐受性下降。

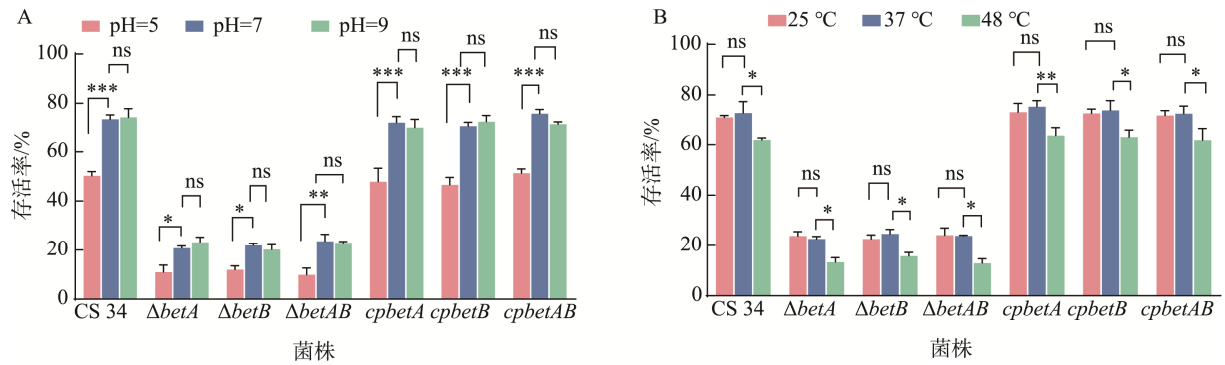
用流式细胞仪检测不同 pH 和温度对克罗诺杆菌的影响, 各菌株存活如表 2 所示。处理后, 各细菌均发生不同程度的损伤。pH=5 培养条件下细菌存活率显著低于 pH=7 和 pH=9, Δ*betA*、Δ*betB*、Δ*betAB* 的存活率仅有 11.35%、10.74%、10.94%, pH=9 与 pH=7 时细菌存活率无显著差异。同样, 48 ℃时细菌存活率显著低于 37 ℃、25 ℃, Δ*betA*、Δ*betB*、Δ*betAB* 的存活率仅有 10.58%、10.74%、9.73%, 37 ℃与 25 ℃时细菌存活率无显著差异。

2.3　基因敲除对克罗诺杆菌毒力的影响

已有的研究表明, 克罗诺杆菌在干燥处理后再进行补液复苏会导致对细胞的侵袭、黏附能力加强[16], 因此本研究探索了 *betA*、*betB* 基因敲除及干燥处理对克罗诺杆菌毒力的影响。

2.3.1　基因敲除后干燥处理对克罗诺杆菌毒力相关基因的影响

分别提取干燥处理前后克罗诺杆菌 RNA, 用 qRT-PCR 方法检测毒力相关基因的表达量。结果如图 4 所示, 双组分系统 *phoQ*、肠毒素合成相关基因 *entA*、鞭毛相关基因 *flhA* 等基因表达量在干燥处理后显著上调,



注: *表示差异显著, P<0.05; ns 表示不显著, 图 4、6、7 同。

图 2　pH (A)、温度(B)对基因敲除前后克罗诺杆菌的影响

Fig.2　Effects of pH (A) and temperature (B) of *Cronobacter* species before and after gene knockout

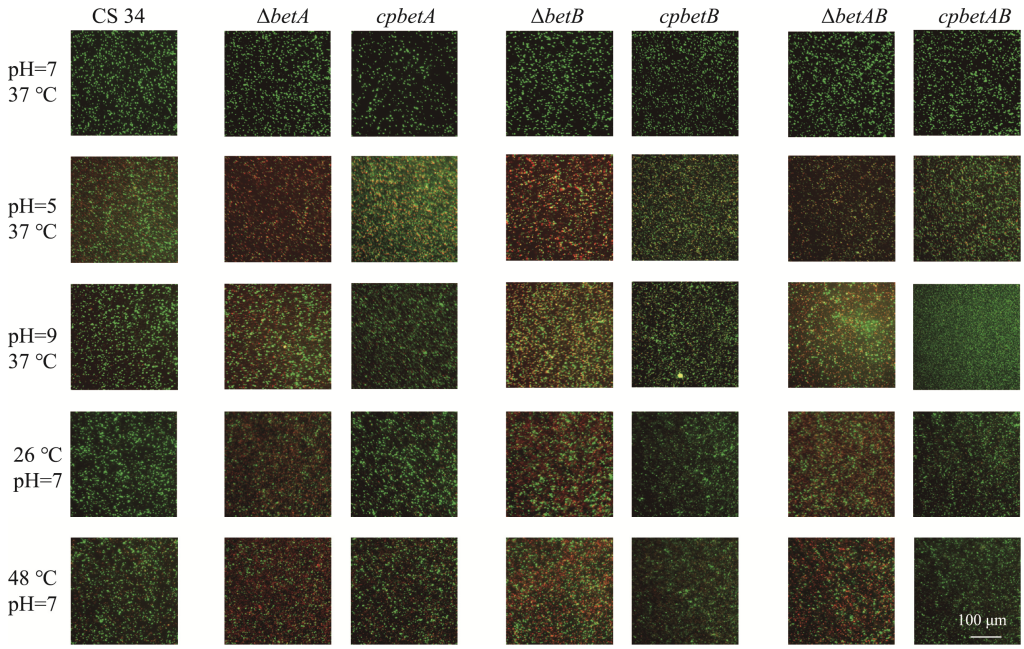


图 3 pH、温度对克罗诺杆菌形态的影响

Fig.3 Effects of pH and temperature on the morphology of *Cronobacter*

表 2 pH、温度对基因敲除克罗诺杆菌存活率的影响

Table 2 Effects of pH and temperature on the survival rate of gene knockout *Cronobacter*

温度/℃	pH	CS 34	Δ*betA*	Δ*betB*	Δ*betAB*	*cpbetA*	*cpbetB*	*cpbetAB*
37	7	73.85±1.74^{a}	23.75±0.85^{b}	24.67±1.79^{b}	23.89±0.63^{b}	71.69±0.74^{a}	72.84±1.74^{a}	73.89±3.85^{a}
	5	55.74±0.96^{a}	11.35±0.89^{b}	10.74±0.37^{b}	10.94±1.47^{b}	53.26±2.85^{a}	54.76±2.33^{a}	51.76±1.96^{a}
	9	75.62±0.46a^{a}	22.75±0.16^{b}	24.67±0.16^{b}	22.58±1.73^{b}	72.48±3.15^{a}	73.16±0.38^{a}	74.56±4.87^{a}
25	7	75.84±0.26a^{a}	22.74±1.23^{b}	23.59±0.77^{b}	23.46±0.85^{b}	73.59±3.56^{a}	72.45±0.99^{a}	75.83±0.74^{a}
48		60.34±0.89^{c}	10.58±0.73^{d}	10.74±0.89^{d}	9.73±0.96^{d}	61.33±3.88^{c}	62.59±0.74^{c}	59.73±4.27^{c}

注：显著性为同行比较，不同小写字母之间具有显著性(P<0.05)，相同字母之间没有显著差异

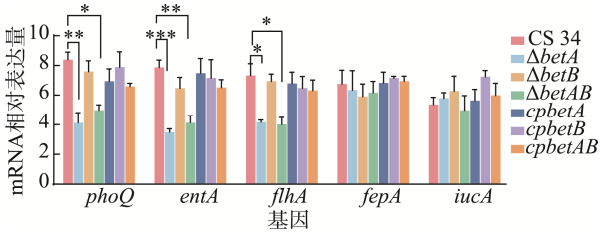


图 4 基因敲除后干燥处理对克罗诺杆菌毒力相关基因的表达量的影响

Fig.4 Effects of drying treatment after gene knockout on the expression levels of virulence related genes in *Cronobacter*

但 *betA*、*betB* 基因缺失时，*phoQ*、*entA*、*flhA* 表达量显著低于 CS 34。其中 *phoQ* 基因在 *ΔbetA*、*ΔbetAB* 菌株中分别下调了 2 倍、1.68 倍；*entA* 基因在 Δ*betA*、Δ*betAB* 菌株中分别下调了 2.25 倍、1.91 倍；*flhA* 基因在 Δ*betA*、*ΔbetAB* 菌株中分别下调了 1.76 倍、1.83 倍，这些基因已经被发现在克罗诺杆菌毒力中发挥作用。同时，当 *betA*、*betB* 基因缺失时，*phoQ*、*entA*、*flhA* 等毒力相关基因表达量上调程度显著低于其他菌株，猜测 *betA* 基因可能在一定程度上促进克罗诺杆菌毒力因子的表达，帮助克罗诺杆菌侵袭、黏附、毒力释放。

2.3.2 hCMEC 细胞的培养

将 hCMEC 细胞复苏，传代 2 d 后观察细胞形态如图 5 所示，40 倍镜下观察到细胞形成较为致密的贴壁细胞团且覆盖培养皿底面达 80%以上，100 倍镜下观察到细胞形成不规则的梭形，表明细胞活力旺盛，可用于后续实验。

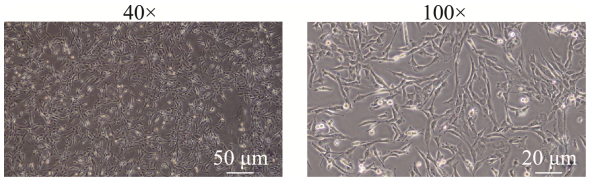


图 5 hCMEC 细胞培养

Fig.5 hCMEC cell culture

2.3.3　细胞的活力检测

克罗诺杆菌侵染，并用 CCK-8 法测定 hCMEC 细胞活力，结果如图 6 所示。使用细菌侵染细胞时，细胞活力下降。当 *betA* 基因缺失时，即用 Δ*betA* 与 Δ*betAB* 菌株侵染细胞时，无论是否干燥处理，细胞活力无显著变化，表明克罗诺杆菌 Δ*betA* 和 Δ*betAB* 在干燥处理后毒力变化不大。使用野生型菌株 CS 34、Δ*betB* 及 3 株基因回补型菌株侵染细胞，细胞活力显著低于干燥处理前，表明干燥处理导致其毒力增强。上述实验结果表明，干燥处理导致克罗诺杆菌毒力增强，细菌侵染细胞能力增加，同时 *betA* 基因可能在克罗诺杆菌毒力中发挥作用，*betA* 基因存在时干燥处理会导致克罗诺杆菌毒力增强。

2.3.4　细胞的蛋白提取及 Western Blot

用 Western Blot 检测干燥处理前后克罗诺杆菌侵染细胞中紧密连接相关蛋白含量(图 7)。相比于对照组，图 7A 中细菌侵染细胞组紧密连接相关蛋白闭合蛋白、密蛋白均发生不同程度的下降，细菌侵染导致细胞死亡，紧密连接被破坏。通过计算各处理组蛋白含量与总蛋白比值可知(图 7B、C), CS 34、Δ*betB*、*cpbetA*、*cpbetB*、*cpbetAB* 侵染细胞导致闭合蛋白蛋白含量分别下降 26%、24%、25%、38%、40%; 密蛋白蛋白含量分别下降 0.34、0.35、0.61、0.61、0.60 倍。

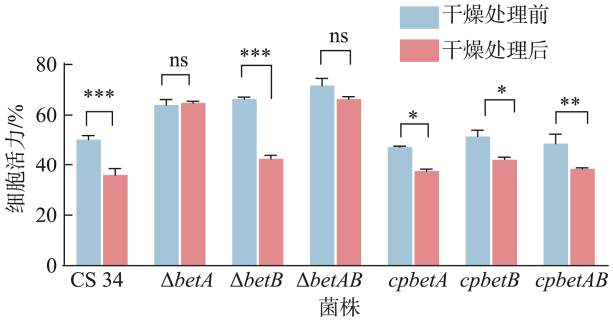


图 6　克罗诺杆菌基因敲除前后对细胞活力的影响

Fig.6　Effects of *Cronobacter* gene knockout on cell viability before and after

Δ*betA*、Δ*betAB* 干燥处理前后闭合蛋白与密蛋白蛋白均无显著变化，进一步证明 *betA* 基因存在时，干燥处理导致细菌毒力增强。

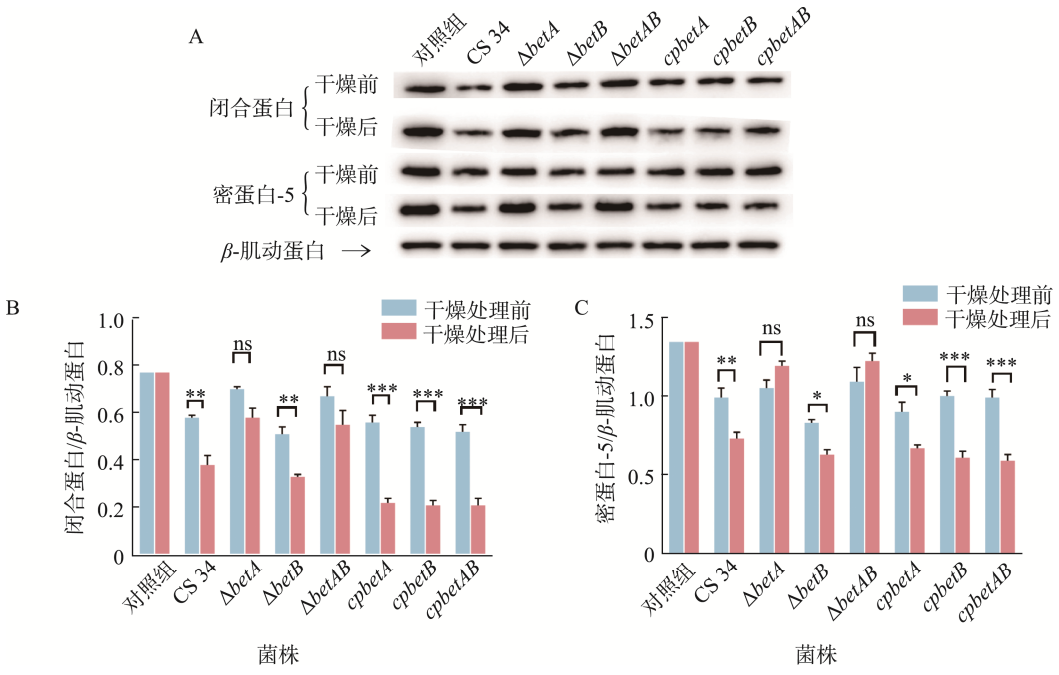


图 7　克罗诺杆菌基因敲除前后对 hCMEC 细胞紧密连接蛋白表达量的影响

Fig.7　Effects of *Cronobacter* gene knockout on the expression of tight junction protein in hCMEC cells before and after gene

3　讨论与结论

betA 和 *betB* 是催化胆碱氧合成甜菜碱的关键基因[17]，甜菜碱作为渗透保护剂，几乎存在于所有生物体内，可以帮助细菌及其成分免受脱水影响，在响应渗透应激时保持稳定，或在干燥环境中帮助细菌维持蛋白质及酶的功能正常功能[18–21]。BREISCH 等[12]提出 *betA* 基因编码的胆碱脱氢酶可以将甘氨酸甜菜醛氧化为甜菜碱，而 *betA* 基因缺失的突变体在高渗环境中生长受到阻碍。甜菜碱除本身作为相溶性物质外，还可能通过增强生物膜的形成帮助克罗诺杆菌抵御干燥环境，KAPFHAMMER 等[22]发现外源添加甜菜碱可促进细菌生物膜的形成。CHOUDHARY 等[23]在 78 种鲍曼不动杆菌临床分离株中检查了生物膜形成与耐干燥性之间的关系，发现生物膜的形成使细菌在干燥条件下存活长达 48 d。本研究敲除

betA、*betB* 和 *betAB* 基因后发现克罗诺杆菌耐干燥能力相比于野生型菌株与基因回补菌株显著降低，与甜菜碱相对表达量变化趋势一致，同时基因缺失型菌株生物膜形成能力大幅度下降，推测 *betA* 和 *betB* 基因控制甜菜碱合成后，甜菜碱含量的增加可以帮助克罗诺杆菌形成生物膜来抵御干燥环境。

克罗诺杆菌可以在喷雾干燥器等奶粉生产设备中大量存活，导致婴幼儿配方奶粉的污染。已有研究发现，何首乌、紫锥菊等天然药物的提取物可以通过影响克罗诺杆菌增加细胞膜通透性和细胞内活性氧水平、减少生物膜形成等机制显著降低克罗诺杆菌的存活率，并可能作为生产设备、包装材料和家庭器具等的有效杀菌剂，但这些物质提取物成分复杂，批次间可能会出现较大差异导致杀菌效果有差别[24–25]。生物膜是细菌存活的一种形式，是细菌生长或附着在各类物质表面的由自身胞外聚合物包裹而形成的组织聚集体[26]，细菌成膜后对不利环境的抵抗能力大幅度增强[27–30]。*DsbA* 和 *pepP* 等关键基因的缺失会导致阪崎克罗诺杆菌生物膜形成能力减弱，对干燥环境的耐受性降低[31]；荚膜多糖等多种胞外聚合物的分泌能够通过促进生物膜形成来增强细菌的干燥耐受性[32]。本研究发现了 *betA* 和 *betB* 基因在克罗诺杆菌抗干燥过程中的作用，后续可探究是否有物质能够直接抑制该通路的正常表达并开发针对该通路的消毒剂，并将其应用于生产设备与包材的消毒，帮助减少喷雾干燥器表面的克罗诺杆菌数量，减少克罗诺杆菌能够在奶粉中存活的概率，降低婴幼儿感染克罗诺杆菌的可能性。

温度、pH 是影响细菌生存、生长的关键因素，高温处理导致克罗诺杆菌生长速率显著降低、细胞形态变化和细胞内容物泄露[33]。克罗诺杆菌具有较强的耐酸性，能够在胃的酸性条件下存活[34]。已有研究表明，甜菜碱可以帮助细菌在高温环境中存活并通过参与质子泵作用抵御过酸或过碱环境[35–36]。本研究对不同温度下克罗诺杆菌耐干燥能力进行检测，发现高温条件下克罗诺杆菌存活率显著降低。荧光显微镜观察显示，相比于正常培养条件(37 ℃)，48 ℃培养时细菌受损、死亡比例增加。本研究使用不同 pH 处理克罗诺杆菌，发现在 pH=5 时，干燥处理后克罗诺杆菌存活率大幅度下降，仅有少量菌存活，荧光显微镜观察显示红色荧光增加，细菌大量死亡。碱性及室温条件下对克罗诺杆菌进行干燥处理，存活率均没有显著变化。

betA 和 *betB* 基因在干燥过程中所发挥的作用已经得到充分研究，此外，有研究表明干燥处理再水化后的克罗诺杆菌对肠道和脑细胞的黏附和侵袭能力增加、毒力增强[16]，为了探究 *betA* 和 *betB* 基因是否在克罗诺杆菌毒力中发挥作用，本研究检测毒力相关基因在干燥处理后的表达量，发现 *phoQ*、*entA*、*flhA* 等毒力相关基因在干燥处理后的克罗诺杆菌中显著上调，其中 *ΔbetA* 与 *ΔbetAB* 菌株中的上调倍数显著低于其他菌株。相关研究发现，*phoP*/*phoQ* 基因的存在会促进克罗诺杆菌在肠道中的定植，并使回肠炎症基因(*IL-1β*、*TNF-α*)表达量显著上调，导致小鼠死亡[37]。HOEFLINGER 等[38]发现 *flhA* 基因的缺失导致鞭毛结构缺失，细菌自聚集能力下降，该能力的缺失可能在细菌定植、黏附中发挥重要著作用。推测 *phoQ*、*entA*、*flhA* 等毒力相关基因的表达可能受到 *betA* 基因的调控，*betA* 基因可能在克罗诺杆菌毒力中发挥作用。同时，本研究使用干燥处理前后克罗诺杆菌侵染 hCMEC 细胞并检测其密蛋白与闭合蛋白蛋白含量，发现克罗诺杆菌侵染细胞会导致两种蛋白含量下降，当 *betA* 基因存在时，干燥处理后细菌侵染导致细胞活力、紧密连接蛋白含量均显著低于干燥处理前细菌侵染；使用 *betA* 基因缺失菌株即 Δ*betA*、Δ*betAB* 侵染细胞，干燥处理前后细胞活力与紧密连接蛋白含量无显著差异，表明 *betA* 基因可能在克罗诺杆菌毒力中发挥作用。当 *betA* 基因存在时，干燥处理会导致克罗诺杆菌毒力增强。这可能是由于干燥处理后存活的克罗诺杆菌更容易黏附和侵袭大脑和肠道细胞，从而增强毒力[16]。

总体来说，本研究使用 *betA*、*betB* 基因敲除及回补菌株测定了克罗诺杆菌生物膜形成能力、环境耐受力的变化情况，并检测了干燥处理后各菌株毒力变化。发现 *betA*、*betB* 基因的缺失导致克罗诺杆菌生物膜形成能力减弱、对酸和高温的耐受力减弱；同时发现 *betA* 基因缺失后在干燥条件下存活的细菌往往具有更强的毒力，对细胞造成的损伤更大。

参考文献

[1] JOSEPH S, FORSYTHE S. Multilocus sequence typing (MLST) for *Cronobacter* spp. [J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1616: 241–248.

[2] CECHIN CDF, CARVALHO GG, BASTOS CP, *et al*. *Cronobacter* spp. in foods of plant origin: Occurrence, contamination routes, and pathogenic potential [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(33): 12398–12412.

[3] ZENG H, LEI T, HE W, *et al*. Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* Causing Meningitis in Neonate, China, 2015 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(11): 2121–2124.

[4] GAN X, LI M, XU J, *et al*. Emerging of multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* isolated from infant supplementary food in China [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(5): e0119722.

[5] HOLÝ O, ALSONOSI A, HOCHEL I, *et al*. Antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from clinical samples [J]. Polish Journal of Microbiology, 2019, 68(1): 5–14.

[6] LIU M, HU G, SHI Y, *et al*. Contamination of *Cronobacter* spp. in Chinese retail spices [J]. Foodborne Pathogens And Disease, 2018, 15(10): 637–644.

[7] GARBOWSKA M, BERTHOLD-PLUTA A, STASIAK-RÓŻAŃSKA L,

et al. The genotyping diversity and hemolytic activity of *Cronobacter* spp. isolated from plant-based food products in Poland [J]. Foods, 2023, 12(20): 3873.

[8] DAS SK, KUMAR SH, NAYAK BB, *et al*. Isolation and identification of *Cronobacter* spp. from fish and shellfish sold in retail markets [J]. Current Microbiology, 2021, 78(5): 1973–1980.

[9] KANDHAI MC, REIJ MW, GORRIS LG, *et al*. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households [J]. Lancet, 2004, 363(9402): 39–40.

[10] 张英杰, 廖子亚, 赵百锁. 嗜盐菌中甘氨酸甜菜碱的合成途径及其生物学功能[J]. 微生物学报, 2020, 60(6): 1074–1089.
ZAHNG YJ, LIAO ZY, ZHAO BS. The synthetic pathway of glycine betaine in halophilic bacteria and its biological functions [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(6): 1074–1089.

[11] YANG T, NIAN Y, LIN H, *et al*. Structure and mechanism of the osmoregulated choline transporter *betT* [J]. Science Advances, 2024, 10(33): eado6229.

[12] BREISCH J, BENDEL M, AVERHOFF B. The choline dehydrogenase *BetA* of *Acinetobacter baumannii*: A flavoprotein responsible for osmotic stress protection [J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(3): 1052–1061.

[13] ANGELIDIS AS, SMITH GM. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1013–1022.

[14] YANG Y, WANG W, MENG X, *et al*. The *betA*/*B* genes as a key factor in *Cronobacter sakazakii* survival under desiccation stress [J]. Journal of Dairy Science, 2025, 108(8): 8205–8221.

[15] KONG X, LI C, SUN X, *et al*. The maltose transporter subunit IICB of the phosphotransferase system: An important factor for biofilm formation of *Cronobacter* [J]. International Journal of Food Microbiology , 2022, 370: 109517.

[16] LING N, LI Z, WANG Y, *et al*. LuxS-deficiency reduces persistence of *Cronobacter* to low-moisture but contributes to virulence after rehydration [J]. Food Research International, 2023, 174(Pt 1): 113642.

[17] ROTHSCHILD HA, BARRON ES. The oxidation of betaine aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1954, 209(2): 511–523.

[18] ZOU H, CHEN N, SHI M, *et al*. The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(9): 3865–3876.

[19] LE RUDULIER D, STROM AR, DANDEKAR AM, *et al*. Molecular biology of osmoregulation [J]. Science, 1984, 224(4653): 1064–1068.

[20] KEMPF BBE. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments [J]. Archives of Microbiology, 1998, 170(5):319–330.

[21] STADMILLER SS, GORENSEK-BENITEZ AH, GUSEMAN AJ, *et al*. Osmotic shock induced protein destabilization in living cells and its reversal by glycine betaine [J]. Journal of Molecular Biology, 2017, 429(8): 1155–1161.

[22] KAPFHAMMER D, KARATAN E, PFLUGHOEFT KJ, *et al*. Role for glycine betaine transport in Vibrio cholerae osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3840–3847.

[23] CHOUDHARY M, SHRIVASTAVA R, VASHISTT J. Acinetobacter baumannii biofilm formation: Association with antimicrobial resistance and prolonged survival under desiccation [J]. Current Microbiology, 2022, 79(12): 361.

[24] FEI P, YU Y, LIANG C, *et al*. *Echinacea purpurea* (L.) Moench crude extract combined with citric acid inactivates *Cronobacter sakazakii* isolated from powdered infant formula [J]. Journal of Dairy Science, 2025, 108(2): 1351–1366.

[25] CHANG Y, ZHAI Y, MA Y, *et al*. *Polygonatum sibiricum* extract inactivates *Cronobacter sakazakii* isolated from powdered infant formula [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2025(4): 239–245.

[26] YIN W, WANG Y, LIU L, *et al*. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in extreme environments [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3423.

[27] COSTA OYA, RAAIJMAKERS JM, KURAMAE EE. Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1636.

[28] WANG XY, LI P, DU X J, *et al*. Effect of glutathione-transport-related gene *gsiD* on desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* and its related regulatory mechanism [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(2): e0156223.

[29] GAO J, HAN Z, LI P, *et al*. Outer membrane protein f is involved in biofilm formation, virulence and antibiotic resistance in *Cronobacter sakazakii* [J]. Microorganisms, 2021, 9(11).

[30] TONG L, ZHANG M, ZHANG X, *et al*. Exploration of factors in response to low acid tolerance using random mutagenesis in *Cronobacter malonaticus* [J]. Food Research International, 2019, 116: 994–999.

[31] JIN T, PANG L, YUE T, *et al*. The role of *dsbA* and *pepP* genes in the environmental tolerance and virulence factors of *Cronobacter sakazakii* [J]. Food Research International, 2024, 190: 114555.

[32] WANG H, SHEN J, MA K, *et al*. Transcriptome analysis revealed the role of capsular polysaccharides in desiccation tolerance of foodborne *Staphylococcus aureus* [J]. Food Research International, 2022, 159: 111602.

[33] YAN Y, CAO M, MA J, *et al*. Use of proteomics to elucidate characteristics of *Cronobacter sakazakii* under mild heat stress [J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 425: 110885.

[34] ALVAREZ-ORDÓÑEZ A, CUMMINS C, DEASY T, *et al*. Acid stress management by *Cronobacter sakazakii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 178: 21–28.

[35] MONDAL N, ROY C, CHATTERJEE S, *et al*. Thermal endurance by a hot-spring-dwelling phylogenetic relative of the *Mesophilic Paracoccus* [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e0160622.

[36] GUTIERREZ JA, CROWLEY PJ, CVITKOVITCH DG, *et al*. *Streptococcus mutans* ffh, a gene encoding a homologue of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle, is involved in resistance to acid stress [J]. Microbiology (Reading), 1999, 145(Pt 2): 357–366.

[37] MA Y, ZHANG Y, WANG Y, *et al*. PhoP/PhoQ two-component system contributes to intestinal inflammation induced by *Cronobacter sakazakii* in neonatal mice [J]. Foods, 2024, 13(17): 2808.

[38] HOEFLINGER JL, MILLER MJ. *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 autoaggregation requires flic flagellation, not motility [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 301.

(责任编辑: 曹岱琳 韩晓红)