

一株林麝源丙二酸盐克罗诺杆菌的分离鉴定及其全基因组序列分析

丁慧¹, 伍茜¹, 程建国², 吴杰², 龚杭¹, 刘洁¹, 杨凯惟¹, 周磊², 付文龙², 罗燕^{*1}

1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川养麝研究所, 四川 都江堰 611800

丁慧, 伍茜, 程建国, 吴杰, 龚杭, 刘洁, 杨凯惟, 周磊, 付文龙, 罗燕. 一株林麝源丙二酸盐克罗诺杆菌的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4212-4229.

DING Hui, WU Xi, CHENG Jianguo, WU Jie, GONG Hang, LIU Jie, YANG Kaiwei, ZHOU Lei, FU Wenlong, LUO Yan. Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Cronobacter malonaticus* from forest musk deer[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4212-4229.

摘要:【背景】克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)作为食源性致病菌,常出现在新生儿患病的报道中,目前尚无在林麝中检出克罗诺杆菌的报道。【目的】对分离自林麝肾脏的一株丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)进行鉴定和全基因组测序,为林麝相关疾病的预防治疗奠定基础。【方法】将病原菌分离纯化后,依次进行生化试验、药敏试验、小鼠致病性试验及全基因组测序,以测序结果为基础,进一步分析群体进化、物种分型及基因功能注释。【结果】该病原菌经过平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分类和系统发育树分析可知属于丙二酸盐克罗诺杆菌,生化结果符合克罗诺杆菌的一般特性。该菌株被命名为 Dcc0527,对部分喹诺酮类药物、酰胺醇类药物、氨基糖苷类药物和 β -内酰胺类药物敏感,对部分磺胺类药物和大环内酯类药物耐药;全基因组测序结果表明该菌株包含1个环状染色体和4个环形质粒,全基因组大小为1 257 547 026 bp, G+C含量为57.08%,多位点序列分型显示该菌株属于ST211序列类型。在菌株Dcc0527基因组内存在阿尔法毒素、氟喹诺酮、四环素等多种耐药基因,同时该菌株还存在Type IV pili、kpsD、iroN等多种毒力基因。菌株Dcc0527基因组的染色体和质粒中还存在3个比较完整的噬菌体区域。【结论】从林麝肾脏分离得到一株丙二酸盐克罗诺杆菌,并获得了该ST211型菌株的全基因组序列,为林麝细菌性疾病的防治提供参考。

关键词: 林麝; 丙二酸盐克罗诺杆菌; 全基因组序列分析

资助项目: 四川省级科研院所科技成果转化项目(2023JDZH0029)

This work was supported by the Sichuan Provincial Research Institute Science and Technology Achievement Transformation Project (2023JDZH0029).

*Corresponding author. E-mail: Lycjg@163.com

Received: 2024-01-25; Accepted: 2024-03-28; Published online: 2024-04-28

Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Cronobacter malonaticus* from forest musk deer

DING Hui¹, WU Xi¹, CHENG Jianguo², WU Jie², GONG Hang¹, LIU Jie¹, YANG Kaiwei¹, ZHOU Lei², FU Wenlong², LUO Yan^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611800, Sichuan, China

Abstract: [Background] As foodborne pathogens, *Cronobacter* spp. often appear in the reports of neonatal illness. So far, there has been no report of *Cronobacter* spp. in forest musk deer. [Objective] We identified and sequenced a strain of *Cronobacter malonaticus* isolated from the kidney of forest musk deer, aiming to lay a foundation for the prevention and treatment of related diseases in forest musk deer. [Methods] After the pathogen was isolated, biochemical tests, drug susceptibility tests, pathogenicity test in mice, and whole genome sequencing were conducted. Based on the sequencing results, the population evolution analysis, species typing, and gene function annotation were performed. [Results] The pathogen was identified as *C. malonaticus* based on the average nucleotide identity (ANI) and phylogenetic tree, with the biochemical test results consistent with the general characteristics of *C. malonaticus*. The strain, named Dcc0527, was sensitive to some quinolones, amphenicols, aminoglycosides, and β -lactams and resistant to some sulfonamides and macrolides. The results of whole genome sequencing showed that the strain contained one ring chromosome and four ring plasmids, with the whole genome size of 1 257 547 026 bp and the G+C content of 57.08%. The multilocus sequence typing showed that the strain presented the sequence type ST211. The genome of strain Dcc0527 carried the genes conferring resistance to several antibiotics, such as elfamycin, fluoroquinolone, and tetracycline and several virulence genes, such as *Type IV pili*, *kpsD*, and *iroN*. In addition, there were three complete phage regions in the chromosome and plasmids of strain Dcc0527. [Conclusion] We isolated a strain of *C. malonaticus* from the kidney of forest musk deer and obtained the whole genome sequence of this strain (ST211). The findings provide reference for the prevention and control of bacterial diseases in forest musk deer.

Keywords: forest musk deer; *Cronobacter malonaticus*; whole genome sequencing

克罗诺杆菌(*Cronobacter* sp.)原本被称为阪崎肠杆菌,是一种革兰氏阴性、无芽孢、可运动的兼性厌氧菌^[1],属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),为条件性致病菌。克罗诺杆菌属包括丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condiment*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、尤尼沃斯

克罗诺杆菌(*C. universalis*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)和苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)^[2-4]这7个种,前两者在临床中最为常见^[5]。克罗诺杆菌感染的临床症状包括坏死性小肠结肠炎、菌血症和脑膜炎,对新生儿危害较大,尤其是早产等免疫力低下的婴幼儿,同时也有免疫力低下的老年人感染克罗诺杆菌病例

的报道^[6], 丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)中毒在老年人中更常见^[7-8]。目前, 克罗诺杆菌常在零售食品、饮用水、蔬菜等家庭环境和土壤、水等自然环境中检出, 其中以婴幼儿奶粉中最常见^[9]。

林麝 (*Moschus berezovskii*) 属偶蹄目 (*Artiodactyla*) 麝科 (*Moschidae*) 麝属 (*Moschus*) 反刍动物, 俗称獐子^[10]。成年雄麝腹部的香囊腺可以分泌麝香 (musk), 麝香具有极高的药用及经济价值。生态环境恶化不利于野生林麝生存且过度捕猎使得野生林麝数量急剧降低。由于麝香的需求极大, 在麝香供需矛盾突出的情况下^[11], 我国开始建立麝类养殖场, 同时研究“活麝取香”技术, 人工养麝是实现资源保护和可持续利用最有效的途径之一^[12]。目前, 肾炎等泌尿系统疾病也是圈养麝群中发病率较高的疾病之一^[13], 引起该类疾病的病因复杂^[14-15], 但是目前尚无对丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*) 感染的报道。

本研究对从病死林麝中分离出一株丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*) 进行了药敏检测等试验和全基因组测序, 根据测序结果分析其毒力与耐药基因等, 探究林麝丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*) 的致病和耐药机制, 以期在林麝的疾病防治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

四川某林麝养殖场死亡的 6 月龄林麝, 雌性, 无生病记录, 死亡前日采食, 活动正常, 死亡时口吐鲜血, 呈睡态姿势, 无挣扎痕迹, 无其他症状。发病后养殖场用药为头孢他啶、卡那霉素和丁胺卡那等, 该养殖场平时的生物安全措施多为消毒, 包括对圈舍、饲料库房及

养殖场通道等的定期消毒。50 只雌雄各半的 6 周龄 SPF 级昆明小鼠均购自成都达硕实验动物有限公司, 由四川农业大学动物福利委员会审查通过, 批准编号为 20230389。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基、兔血琼脂培养基、TSA 培养基和细菌染色试剂, 青岛海博生物技术有限公司; 药敏纸片、细菌微量鉴定生化管, 杭州微生物试剂有限公司; 2×*Taq* PCR Master Mix 和 DNA 分子质量标准, 天根生化科技(北京)有限公司。凝胶成像分析仪、凝胶电泳仪和 PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 全自动高压蒸汽灭菌锅, 三洋公司; 恒温培养箱、恒温水摇床, 赛默飞世尔科技有限公司; 微量高速冷冻离心机和台式高速离心机, Eppendorf 公司。

1.2 病原菌的分离

无菌解剖病死林麝, 将各脏器病变部位分别划线接种于 LB 培养基和兔血琼脂培养基, 37 °C 培养 24 h, 根据菌落形态特征和革兰氏染色结果, 挑取单菌落进一步纯化、保存, 并对分离菌株初步进行 16S rRNA 基因测序鉴定^[16]。

1.3 分离菌株的生化试验

以参考文献[17]为依据, 按照细菌微量生化反应管说明书, 将分离菌株接种到生化管中进行生化试验。

1.4 分离菌株的药敏试验

挑取单菌落于 LB 液体培养基中在 37 °C、150 r/min 的条件下培养, 将菌液浓度调整至 1.5×10^8 CFU/mL, 选取青霉素、阿莫西林、头孢氨苄、氨苄西林、头孢唑林、头孢他啶、头孢噻肟、头孢哌酮、亚胺培南、链霉素、丁胺卡那、妥布霉素、阿奇霉素、红霉素、四环素、氟苯尼考、氯霉素、环丙沙星、氧氟沙星、磺胺异噁唑和呋喃妥因共 21 种抗生素按照美国临床实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory

Standards Institute, CLSI)的推荐标准进行药敏试验并判定药物的敏感性^[18]。

1.5 小鼠致病性试验

挑取肾脏分离的单菌落接种于 6 mL LB 液体培养基中, 在 37 °C、150 r/min 条件下培养 12 h 后按 1%接种量接种于 25 mL LB 液体培养基, 相同条件扩大培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8。将菌液于 8 000 r/min 离心 10 min, 仅保留菌体沉淀, 用无菌的 PBS 溶液重悬菌体沉淀, 用平板计数法计算菌液浓度^[19], 用 PBS 溶液稀释菌液, 将菌液稀释成 10^4 – 10^9 CFU/mL, 共 6 个梯度。根据小鼠的体重随机将小鼠分为 6 组, 每组 8 只(雌雄各半), 分别腹腔注射经过 10 倍稀释的 6 个浓度梯度的菌液, 同时注射等量的 PBS 溶液作为对照组。

1.6 分离菌株的全基因组测序

基因组测序工作由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。该测序采用全基因组鸟枪法(whole genome shotgun, WGS)策略, 同时利用第 2 代测序技术(基于 Illumina NovaSeq 测序平台)和第 3 代单分子测序技术(基于 Oxford Nanopore ONT 测序平台), 将 3 代下机数据使用 unicycler、flye 软件进行组装, 纠错校正最终得到完整序列。

1.7 基因组分析

选取 NCBI 上的 30 株相关菌株, 进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)比对, 使用 OrthoANI^[20]进行分析; 在 PubMLST 数据库(<https://pubmlst.org>)测定菌株的基因类型, 基于各基因组的管家基因型, 利用 MEGA 7.0, 将分离菌株与 NCBI 中的相关菌株进行多基因联合建树分析, 使用邻接(neighbor-joining, NJ)法, bootstrap 检验设置 1 000 次重复。

使用 BLAST 软件, 根据毒力因子数据库

(virulence factor database, VFDB) (www.mgc.ac.cn/VFs/)注释分离菌株的毒力基因, 使用综合抗生素耐药性数据库(the comprehensive antibiotic resistance database, CARD) (<https://card.mcmaster.ca>)进行耐药基因的注释, BLAST 比对的设定参数 $E\text{-value} \leq 1e-5$, 进行毒力因子预测比对时要求氨基酸序列的一致性在 60%以上, 序列比对的长度与其对应的毒力因子相关基因长度的比值应达到 70%及以上, 比对的 gap 长度应当小于序列比对长度的 10%, 耐药基因的预测比对则要求默认一致性 $\geq 45\%$, 覆盖率 $\geq 70\%$ 。

选择提供注释的通用功能数据库 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)和 clusters of orthologous groups (COG), 将预测基因与各功能数据库进行 BLAST 比对, 其中 COG 功能预测蛋白质序列比对时的临界值为 $1e-6$, 比对的方式为 diamond blast, 选取最佳 hits 的 eggNOG 编号对相应的蛋白编码基因赋值。通过 (PHAge search tool enhanced release, PHASTER 网站(<http://phaster.ca>))在线进行原噬菌体的预测。

2 结果与分析

2.1 菌株分离结果

如图 1 所示, 林麝被解剖后可见肺部与胸腔粘连, 肺部肿大出血, 气管切开有出血和较多泡沫。肝脏肿大充血, 肾脏不成形, 比较严重的一侧肾已经溶解, 出血严重。

将肾脏接种于兔血琼脂培养基出现白色菌落; 挑取单菌落进行革兰氏染色镜检, 镜检结果显示为革兰氏阴性短杆菌。对分离菌株初步进行 16S rRNA 基因测序鉴定。16S rRNA 基因序列测序结果在 NCBI 进行比对, 可以初步判断该菌株为克罗诺杆菌属, 与丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)的相似性较高。

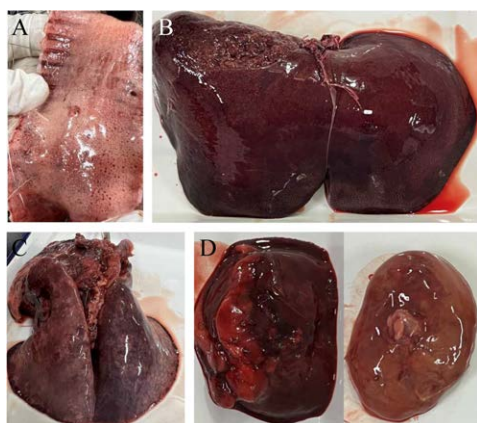


图1 死亡林麝剖检情况 A: 气管. B: 肝脏. C: 肺脏. D: 肾脏

Figure 1 Necropsy of dead forest musk deer. A: Trachea. B: Liver. C: Lungs. D: Kidneys.

2.2 菌株的形态及染色特性

菌株 Dcc0527 在 TSA 平板上菌落呈米白色, 边缘规则, 表面光滑湿润, 圆形(图 2A), 在 LB 固体培养基上菌落呈黄色, 表面光滑湿润, 圆形微凸, 边缘整齐(图 2B)。挑取单菌落进行革兰氏染色并且镜检显示菌体呈长短不一的红色短杆状, 两侧平行, 末端钝圆(图 2C)。

2.3 生化试验结果

生化试验结果表明: 该菌株黄色素试验阳

性、柠檬酸水解阳性(蓝色)、L-鸟氨酸脱羧酶阳性(紫色)、L-精氨酸双水解酶阳性(紫色)、D-蔗糖发酵阳性(黄色)、L-鼠李糖发酵阳性(黄色)、D-蜜二糖发酵阳性(黄色)、苦杏仁甙发酵阳性(黄色), 氧化酶试验阴性、L-赖氨酸脱羧酶阴性(黄色)、D-山梨醇发酵阴性(红色), 菌落形态和生化结果与克罗诺杆菌的鉴别特征一致。

2.4 药敏试验结果

如表 1 所示, 药敏结果表明菌株 Dcc0527 对喹诺酮类药物(氧氟沙星、环丙沙星)、酰胺醇类(氯霉素、氟苯尼考)、部分氨基糖苷类药物(庆大霉素、丁胺卡那)和 β -内酰胺类药物(阿莫西林、头孢他啶、头孢曲松)敏感, 对部分磺胺类药物(复方新诺敏)、 β -内酰胺类药物(青霉素, 头孢氨苄)和大环内酯类药物(红霉素)耐药。

2.5 分离菌株对小鼠的致病性

菌株 Dcc0527 对小鼠攻毒后, 7 d 内小鼠的存活情况如表 2 所示, 其中高浓度组小鼠有明显的精神沉郁, 食欲下降并且伴随体重降低。4 只小鼠 4 h 内精神萎靡, 8 h 时呈抱团昏睡并且毛发杂乱无光泽, 在 12 h 内死亡, 对照组小鼠无异常症状。对死亡小鼠进行剖检, 在肝脏、脾脏、肺脏和肾脏均可见不同程度的瘀血, 脏器

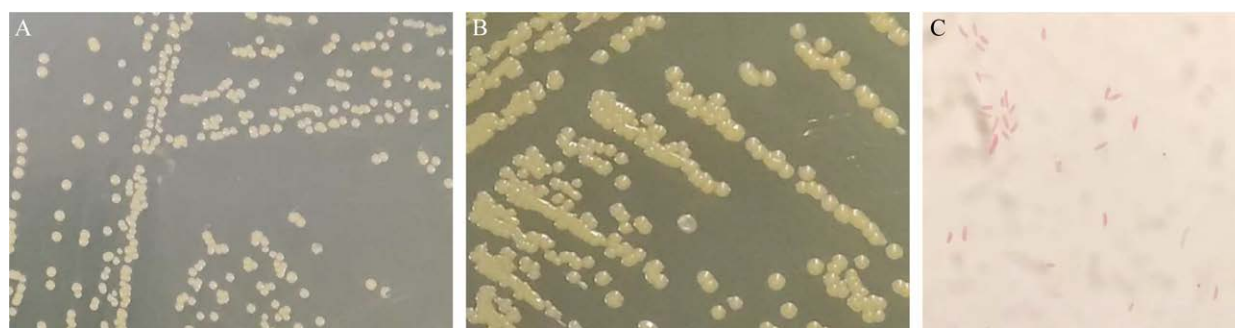


图2 菌株 Dcc0527 的形态特征 A: TSA 平板上的菌落形态. B: LB 平板上的菌落形态. C: 革兰氏染色镜检结果(1 000 \times)

Figure 2 Morphological characteristics of strain Dcc0527. A: Colony morphology on the TSA medium. B: Colony morphology on LB agar medium. C: Gram staining of strain Dcc0527 (1 000 \times).

表 1 药敏试验结果

Table 1 Antibiotic susceptibility test results

抗生素类别	抗生素	抑菌圈直径	结果	
Antibiotics category	Antibiotic	Antibacterial circle diameter (mm)	Result	
β-lactam antibiotics	Penicillins	Penicillin	R	
		ampicillin	I	
		Amoxicillin	S	
	Cephalosporins	Cefalexin	12	R
		Cefazolin	16	I
		Ceftazidime	19	S
		Ceftriaxone	25	S
	Carbapenems	Imipenem	14	I
		Aztreonam	19	S
		Gentamicin	16	S
Aminoglycosides	Streptomycin	13	I	
	Amikacin	17	S	
	Tobramycin	15	I	
	Furantoin	15	I	
	Erythromycin	11	R	
Macrolide	Azithromycin	17	I	
	Doxycycline	15	I	
Tetracyclines	Tetracycline	18	I	
	Chloramphenicol	22	S	
Amphenicols	Florfenicol	23	S	
	Ofloxacin	31	S	
Quinolones	Ciprofloxacin	32	S	
	Sulfonamides	Sulfamethoxazole	14	I
Trimethoprim sulfamethoxazole		24	S	

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistance.

表 2 攻毒后 7 d 内小鼠的死亡数量

Table 2 Number of mice that died within 7 days of challenge

菌液浓度	死亡数/总数
Concentration of bacterial (CFU/mL)	Number of deaths/Total
2×10^9	4/8
2×10^8	2/8
2×10^7	0/8
2×10^6	0/8
2×10^5	0/8
2×10^4	0/8

中都分离到了大量的丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)。各个脏器的病理切片如图 3 所示: 肝脏局部肝细胞坏死, 形态崩解, 伴有中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞及棕黄色色素沉积; 脾索排列不整齐, 肺呼吸部肺泡隔增厚; 肾小球毛细血管及间质血管瘀血, 肾小管结构模糊, 上皮细胞变性坏死, 胞核固缩、胞质溶解。采用 Bliss 法计算, 该菌对小鼠的 LD_{50} 为 6.40×10^8 CFU/mL。

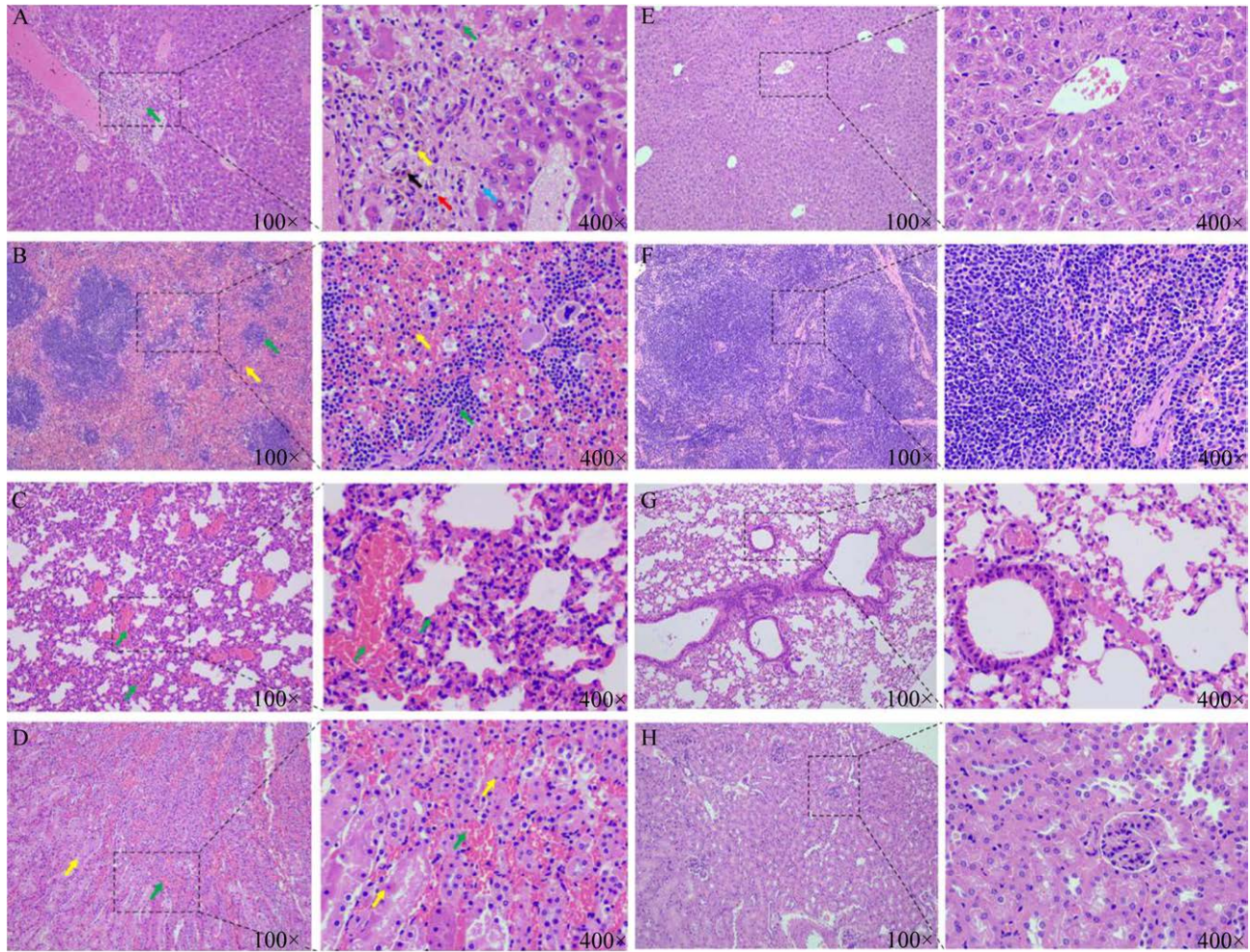


图 3 小鼠病变器官的病理切片图 A: 肝脏病理切片, 肝细胞坏死伴有少量炎性细胞浸润: 肝细胞坏死(绿色箭头)、淋巴细胞(蓝色箭头)、中性粒细胞(红色箭头)、巨噬细胞(黄色箭头)、色素沉积(黑色箭头). B: 脾脏病理切片, 白髓萎缩, 淋巴细胞减少(绿色箭头), 脾血窦瘀血(黄色箭头). C: 肺脏病理切片, 血管瘀血(绿色箭头). D: 肾脏病理切片, 血管瘀血(绿色箭头), 肾小管变性坏死(黄色箭头). E: 阴性对照组小鼠的肝脏切片. F: 阴性对照组小鼠的脾脏切片. G: 阴性对照组小鼠的肺脏切片. H: 阴性对照组小鼠的肾脏切片

Figure 3 Pathological section of diseased organs in mice. A: Pathological section of liver. Hepatocyte necrosis was accompanied by a small amount of inflammatory cell infiltration. Hepatocyte necrosis (green arrow), lymphocytes (blue arrow), neutrophils (red arrow), macrophages (yellow arrow), pigmentation (black arrow). B: Pathological section of spleen. White pulp atrophy, lymphocytopenia (green arrow), splenic sinus congestion (yellow arrow). C: Pathological section of lung. Blood vessel congestion (green arrow). D: Pathological section of kidney. Vascular congestion (green arrow), degeneration and necrosis of renal tubules (yellow arrow). E: Liver sections from negative control mice. F: Spleen sections from negative control mice. G: Lung sections from negative control mice. H: Kidney sections from negative control mice.

2.6 全基因组测序及分析结果

2.6.1 菌株 Dcc0527 全基因组的基本信息

菌株 Dcc0527 基因组由一条环状染色体 (4 258 131 bp) 和 4 个环状质粒组成, 染色体和质粒的 coverage 均为 259 倍, 基因组数据以 FASTQ 的格式上传到 NCBI 数据库, 获得的登录号为 CP141992–CP141996。该菌株的全基因组大小为 1 257 547 026 bp, G+C 含量为 57.08%, 编码 4 064 个基因, 包含 tRNA 82 个, rRNA 22 个, 基因组的具体信息见表 3。

2.6.2 ANI 分析结果

分别选取了 8 株丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、2 株康帝蒙提克罗诺杆菌 (*C. condiment*)、12 株阪崎克罗诺杆菌 (*C. sakazakii*)、2 株莫金斯克罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)、3 株尤尼沃斯克罗诺杆菌 (*C. universalis*) 和 3 株都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*) 进行比较分析。如图 4 所示, 丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*) 与菌株 Dcc0527 的相似度最高, 其代表菌株与菌株 Dcc0527 的 ANI 值都在 98% 以上, 其次是阪崎克罗诺杆菌 (*C. sakazakii*) 代表菌株与菌株 Dcc0527 的 ANI 值较高, 均大于 94%。根据 ANI 比对结果, 可以判断菌株 Dcc0527 属于丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)。

2.6.3 多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 和系统发育分析结果

对菌株 Dcc0527 采用 7 个管家基因 (*atpD*、

fusA、*glnS*、*gltB*、*gyeB*、*infB*、*pps*) 进行 MLST 分析, 结果显示, 该菌株 ST 分型为 ST211, 克隆复合体类型为 CC200, 与 MLST 数据库中 4 株丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*) 的 ST 型相同, 这 4 株分别是 2012 年在中国从婴幼儿配方中分离得到 (ID: 577)、2005 年在德国从食品成分和奶粉中分离得到 (ID: 1625、ID: 1637)、2013 年在日本从香料中获得 (ID: 3348)^[21]。将管家基因串联建立系统发育树, 如图 5 所示, 该菌株与 2020 年在德国发现的一株丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*) 菌株 MOD1_GK1356 与菌株 Dcc0527 的亲缘关系最近。

2.6.4 毒力因子注释结果

菌株的毒力因子检测结果见表 4, 其中菌株 Dcc0527 检测到的毒力基因与细胞系中的黏附和侵袭、菌毛 (type IV pili, 菌毛黏附蛋白)、鞭毛 (*fli*)、荚膜 (*kpsD*, 荚膜多糖转运蛋白底物结合蛋白) 和编码铁载体生物合成 (*iroN*, 铁载体 salmochelin 受体外膜蛋白) 等相关, 一些基因还可能参与细菌代谢。

2.6.5 耐药基因注释结果

菌株 Dcc0527 中检测到多种耐药基因, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 包含氨基香豆素、头孢菌素、二氨基嘧啶类、阿尔法霉素、氟喹诺酮、类异烟肼、大环内酯、肽类、膦酸类、利福霉素、磺胺和四环素类等耐药基因,

表 3 菌株 Dcc0527 基因组的基本信息

Table 3 Basic information of strain Dcc0527 genome

序列名称 Sequence ID	GenBank 登录号 GenBank accession number	序列长度 Sequence length (bp)	G+C 含量 G+C content (%)	开放阅读框数量 Number of open reading frame
Chromosome	CP141992	4 258 131	57.12	3 949
Plasmid 1	CP141993	135 840	56.58	115
Plasmid 2	CP141994	110 326	50.12	122
Plasmid 3	CP141995	80 186	52.40	98
Plasmid 4	CP141996	61 266	52.25	81

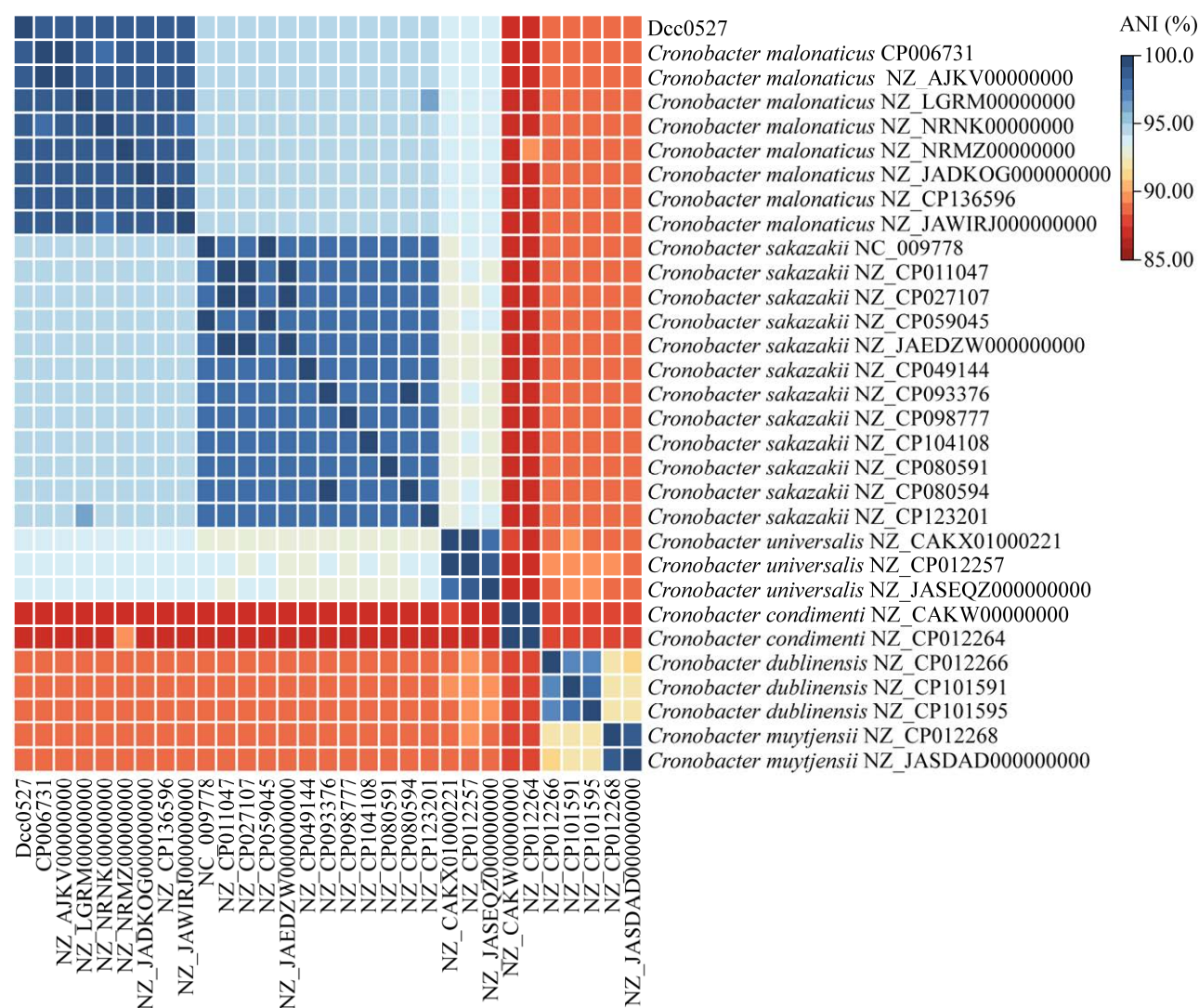


图 4 菌株 Dcc027 与克罗诺杆菌群的菌株平均核苷酸一致性比对

Figure 4 Comparison of average nucleotide identity results between strain Dcc0527 and *Cronobacter* spp. group.

部分耐药基因与多药耐药外排泵、抗生素失活基因和抗生素靶点改变相关(表 5)。

2.6.6 eggNOG 和 KEGG 注释结果

菌株 Dcc0527 通过与数据库的比对注释, 共有 3 876 个基因分别被注释到 20 组 COG 功能中, 2 833 个蛋白与已知蛋白或已知的假设蛋白同源, 1 043 个蛋白功能未知。其中与碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and

metabolism)及转录(transcription)有关的基因数量最多, 分别是 303 个和 301 个, 其次是用于氨基酸运输和代谢(amino acid transport and metabolism)的蛋白为 276 个(图 6)。

菌株 Dcc0527 共有 5 012 个蛋白被注释到 KEGG 功能分类中, 一级分类中与信号传导和细胞过程有关的蛋白最多, 有 457 个注释到的蛋白不被包含于通路和 Brite 数据库中, 结果如图 7 所示。

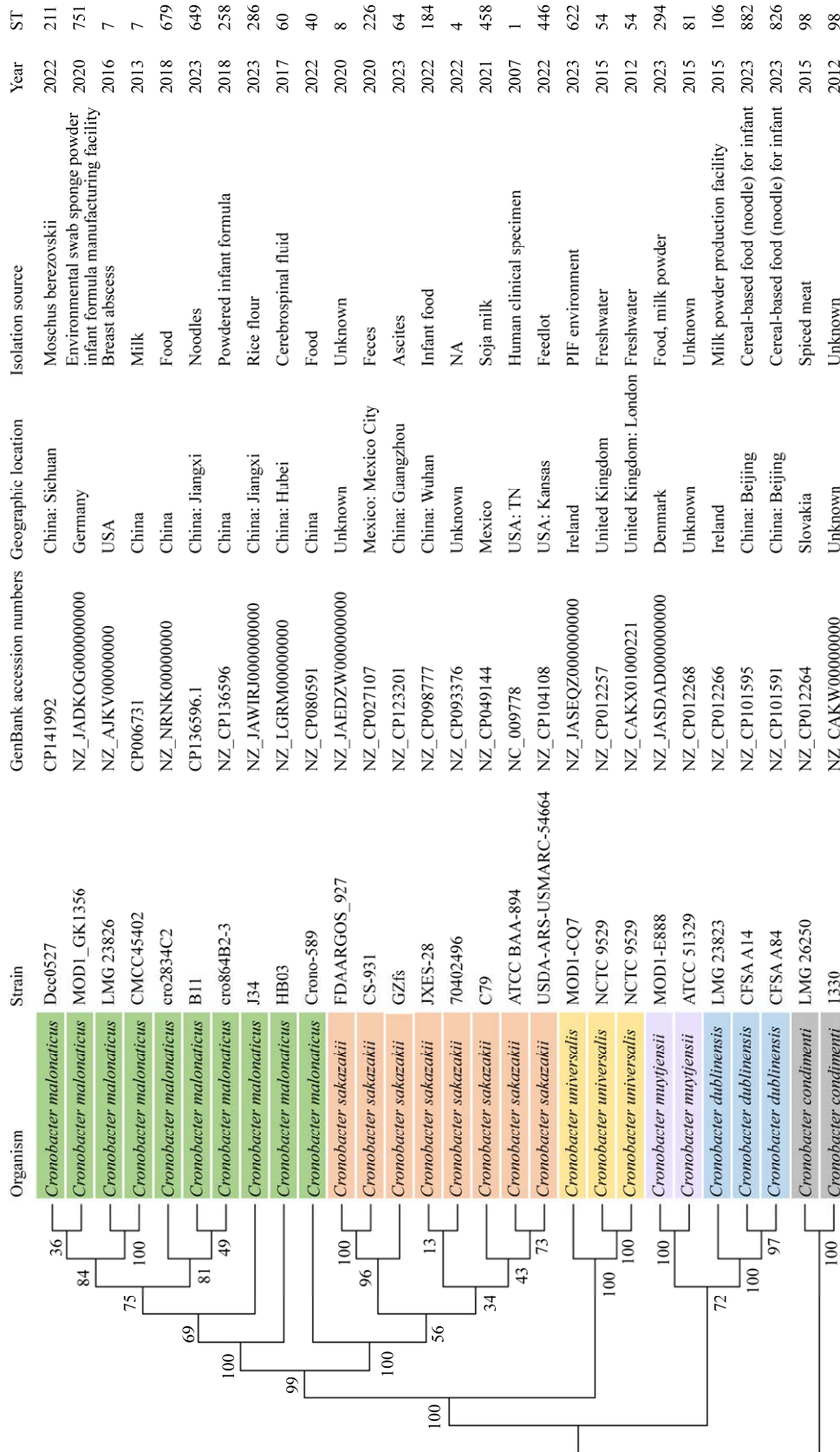


图 5 克罗诺杆菌的系统发育树 ST: 序列类型
Figure 5 Phylogenetic tree of *Cronobacter*. ST: Sequence type.

表 4 菌株 Dcc0527 基因组中的毒力因子

Table 4 Virulence factors in strain Dcc0527 genome

毒力因子类别 VF category	毒力因子 Virulence factor	相关基因 Related gene
Adherence	Agf	<i>csgD, csgF, csgG</i>
	Curli fibers	<i>cgsD, cgsF, cgsG, cgsB</i>
	EF-Tu	<i>tufA</i>
	GroEL	<i>groEL</i>
	Hsp60	<i>htpB</i>
	IlpA	<i>IlpA</i>
	Type IV pili	<i>rpo, Svfr</i>
Antimicrobial activity	AcrAB	<i>acrA, acrB</i>
Biofilm	AI-2	<i>luxS</i>
	Alginate	<i>algU</i>
Effector delivery system	HSI-I	<i>clpV1, tssB, tssC</i>
	T6SS	<i>tssA, tssB, tssC, tssD, tssF, tssH</i>
Immune modulation	Capsule	<i>cap8E, cps4J, galF, gmd, gndA, rfbK1, rpe, wcaJ</i>
	LOS	<i>lpxC, galU, lpcA, kdsA, kdsB, lpxA, lpxB, lpxD, msbA, rfaD, rfaE, rfaF, rffG</i>
	LPS	<i>acpXL, gmd, gtrA, gtrB, rfbD, wbtL</i>
	O-antigen	<i>cpsG, gmd</i>
Invasion	K1 capsule	<i>kpsC, kpsD, kpsE, kpsM, kpsS, kpsT</i>
	OmpA	<i>ompA</i>
Motility	Flagella	<i>cheA, cheB, cheD, cheR, cheW, cheY, cheZ, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flgJ, flhA, flhB, flhC, flhD,fliA, fliE, fliF, fliG, fliI, fliJ, fliL, fliM, fliN, fliP, fliQ, fliR, fliS, motA, motB</i>
	Polar flagella	<i>cheY, fliI, flmH, nueA</i>
Nutritional	Enterobactin	<i>entA, entB, entC, entE, entF, entS, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes</i>
	Sal	<i>iroN</i>
	Salmochelinsiderophore	<i>iroN</i>
	Aerobactin	<i>iutA, iuc, iucC, iucA</i>
	MgtBC	<i>mgtB</i>
Others	Isocitrate lyase	<i>icl</i>
Regulation	CsrA	<i>csrA</i>
	Fur	<i>fur</i>
	PhoPQ	<i>phoP, phoQ</i>
	RcsAB	<i>rcaA, rcsB</i>
	RpoS	<i>rpoS</i>
Stress survival	ClpP	<i>clpP</i>

表 5 菌株 Dcc0527 耐药基因预测

Table 5 Prediction of antibiotic resistance gene in strain Dcc0527

耐药基因种类	耐药基因
Antibiotic type	Resistant gene
Aminocoumarin-resistance	<i>gyrB, mdtA, mdtB, mdtC, acrD</i>
Diaminopyrimidine-resistance	<i>dfrA3, dfrE, folA</i>
Elfamycin-resistance	<i>EF-Tu</i>
Fluoroquinolone-resistance	<i>gyrA, emrA, emrB, emrR, mdtH, mdtK, parC, parE</i>
Peptide-resistance	<i>bacA, basR, basS, eptA, rosB, rpoC</i>
Phosphonic acid-resistance	<i>fosA, mdtG</i>
Rifamycin-resistance	<i>rpoB, rpoC</i>
Cephalosporin-resistance	<i>SRT-2</i>
Isoniazid-like-resistance	<i>katG</i>
Macrolide-resistance	<i>macB</i>
Sulfonamide-resistance	<i>folP</i>
Tetracycline-resistance	<i>tet34</i>
Efflux pump conferring antibiotic resistance	<i>acrA, acrB, acrE, acrF, acrR, acrS, baeR, baeS, cpxA, cpxR, crp, emrD, emrE, hns, marA, marR, mdfA, omp36, ompF, phoP, phoQ, ramA, ramR, robA, sdiA, soxR, tolC</i>

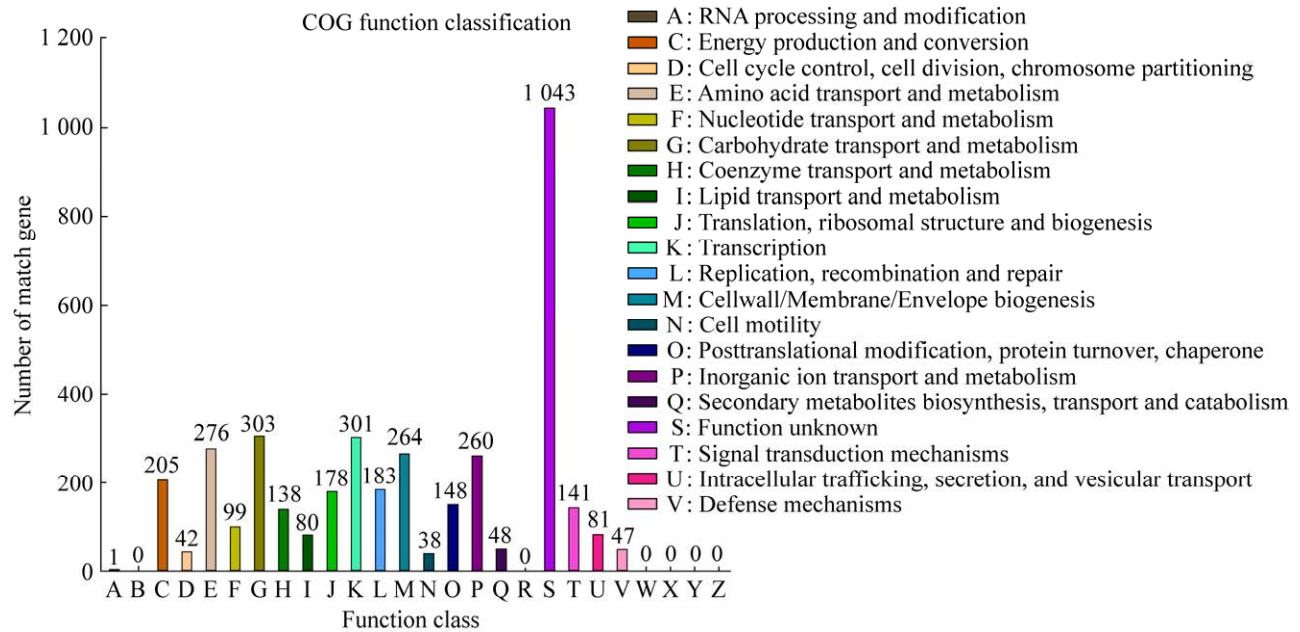


图 6 菌株 Dcc0527 的 eggNOG (COG)功能分类图

Figure 6 eggNOG (COG) function classification map of strain Dcc0527.

2.6.7 原噬菌体预测结果

如图 8 所示，菌株 Dcc0527 基因组中，chr 序列预测到 4 个原噬菌体，其中有 2 个区域的完整性评分大于 90，可以判断为完整的噬菌体，

评分分别为 150 和 140，其对应的 G+C 含量分别为 59.28%和 50.24%；plasmid 1 序列和 plasmid 4 序列未预测到原噬菌体；plasmid 2 序列预测到 2 个原噬菌体，只有一个区域是完

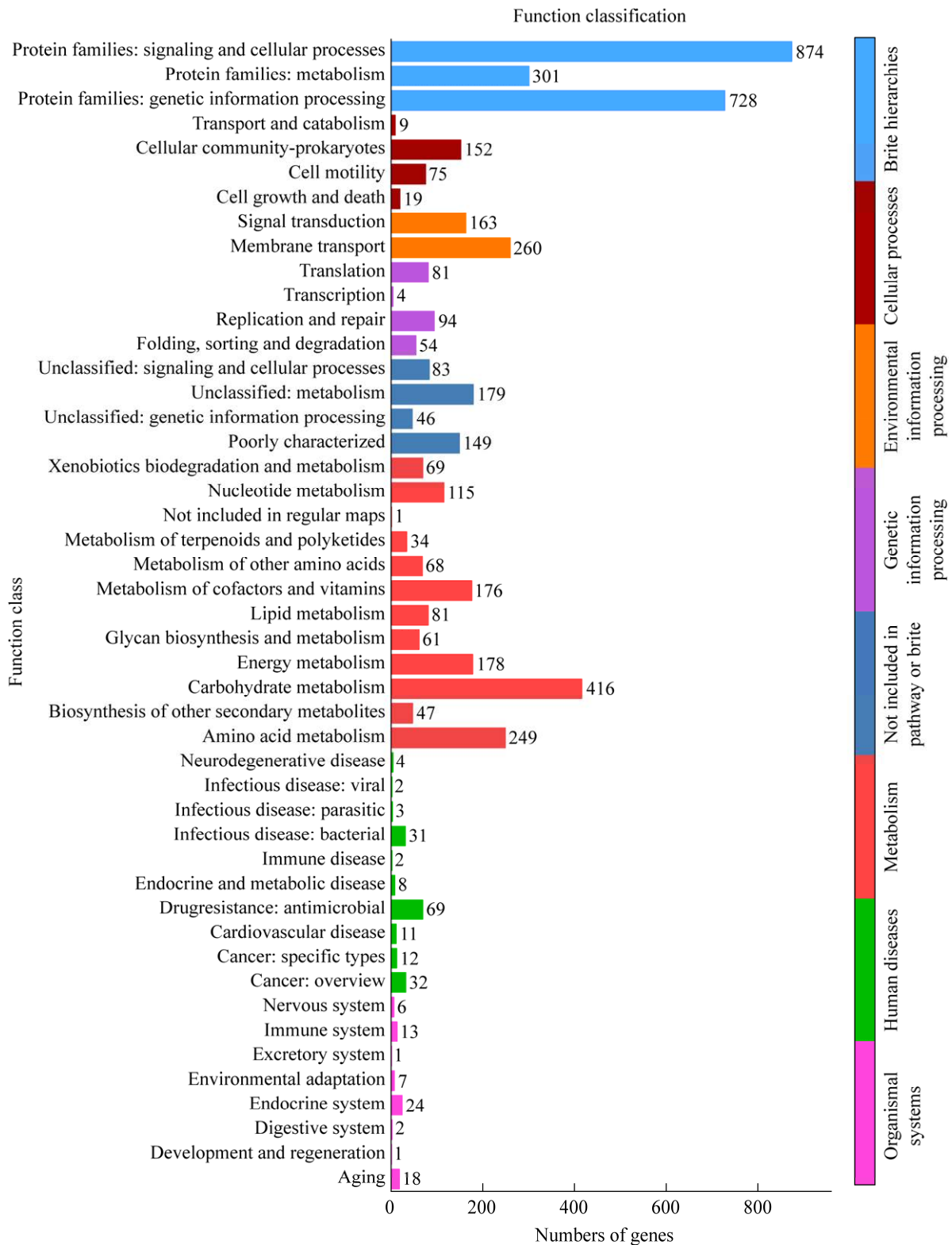


图 7 菌株 Dcc0527 的 KEGG 统计图

Figure 7 KEGG cartogram of strain Dcc0527.

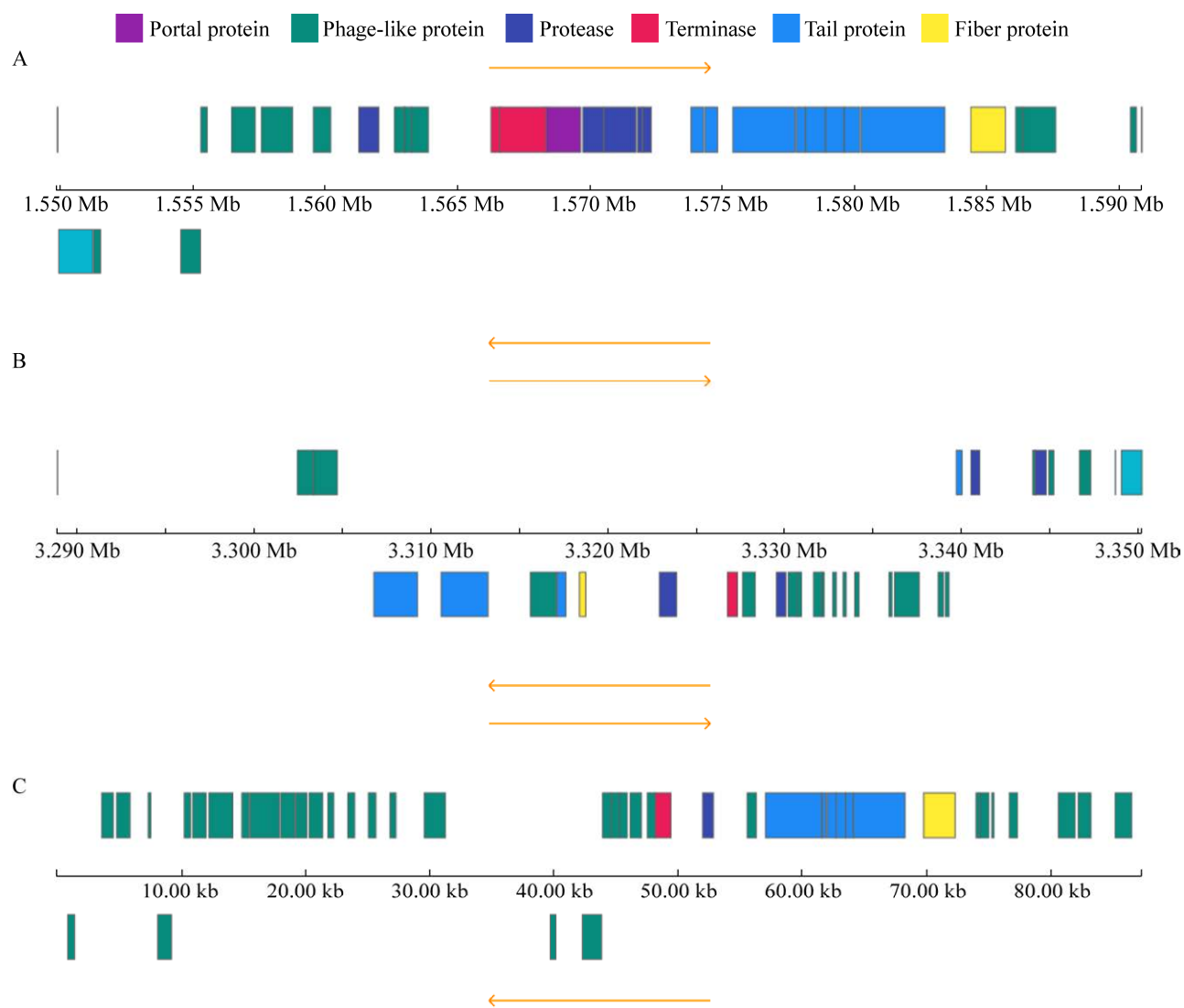


图 8 菌株 Dcc0527 原噬菌体视图和噬菌体元件注释 A: 染色体预测到的完整噬菌体 1. B: 染色体预测到的完整噬菌体 2. C: 质粒 2 预测到的完整噬菌体

Figure 8 The prophage view and phage elements annotation of strain Dcc0527. A: Chromosome predicted intact phage 1. B: Chromosome predicted intact phage 2. C: Complete phage predicted by plasmid 2.

完整的噬菌体，完整性评分为 140，G+C 含量为 51.06%；plasmid 3 序列预测到 2 个原噬菌体，但这 2 个区域都不完整。

3 讨论与结论

目前 PubMLST 数据库中关于克罗诺杆菌的分离株有 4 505 株，主要分布于亚洲和北美洲，

非洲和大洋洲等地区的分离株较少。美洲大陆的分离菌株中阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)占比 80.4%，其次就是丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)，占比 8.8%，分离来源主要为食品和环境^[22]。我国有 1 491 株克罗诺杆菌分离株，其中阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)的数量最多，占 66.5%，分离源大多来自食品。Fei 等^[23]

在 2018–2020 年对中国 9 个省商业婴儿配方奶粉中的克罗诺杆菌流行的调查结果中, ST4 型、ST1 型和 ST64 型分离株较多。

根据全基因序列的 ANI 分析结果, 阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)和丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)较相似, 与菌株 Dcc0527 的 ANI 值均高于 94%, 不能较为明确地区分二者。Baldwin 等^[24]在 2009 年提出的 MLST 方案可以明确区分这 2 个物种, 按照该方法将菌株 Dcc0527 与其他 27 株克罗诺杆菌进行多位点序列分型, 可以确定该菌株为丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)。构建系统发育树显示克罗诺杆菌各种在进化上独立成簇, 并且阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)与丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)的亲缘关系比较接近。

克罗诺杆菌作为肠道致病性细菌中的一个属, 是一种食源性机会致病菌, 常在奶粉及其生产环境中被检出, 这可能是由于 capsule 有助于生物膜的形成, 该生物膜有助于保持其在干燥环境中的存活, 从而形成了克罗诺杆菌在奶粉中的高存活率^[25-26]。本次分离的菌株也携带了多种毒力基因, 包括外膜蛋白(*fep*)、鞭毛蛋白(*che*、*flg* 等)、VI 型分泌系统蛋白(*imp*)、铁载体(*salmochelin* 受体外膜蛋白, *iroN*)、荚膜(荚膜多糖转运蛋白底物结合蛋白, *kpsD*)等, 还有一些基因参与了细菌的代谢, 如黏附细胞(*ompA*)参与生物膜的合成; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是组成革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 属于细菌的部分耐热结构, 通过肠上皮进入血液循环引起疾病或者通过 LPS 受体 TLR4 (toll-like receptor 4)依赖性途径及其他方式诱导炎症, 对肝脏产生损伤^[27]; VI 型分泌系统(T6SS)在黏附、侵袭等方面与其他细菌进行竞争。这些毒力因子在帮助细菌通过肠上皮黏附、侵入

并移动到组织与血液产生毒性的同时, 也为细菌适应环境提供了条件。结合该菌株的毒力因子预测与小鼠致病性试验, 死亡小鼠剖检后切片观察其肝脏、肾脏均有病变, 并且肾小球瘀血及肾小管变性坏死等状况与林麝剖检时肾脏不成形, 出血严重情况相对应。

根据耐药基因检测结果, 菌株 Dcc0527 的耐药基因主要与抗生素外排、降低抗生素渗透性、抗生素失活等相关, 同时还存在参与细菌代谢的基因。该菌株的多个外排泵也表示其具有多重耐药性。结合药敏试验, 尽管该菌株基因存在编码喹诺酮类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类抗生素和氯霉素类的耐药基因, 但依旧存在对该类别抗生素中某些药物的敏感性, 如对环丙沙星、氯霉素、头孢他啶和丁胺卡那等敏感, 基因型与表型不相符, 这也许是因为抗生素的过度使用及宿主个体间的差异^[28-29], 也有研究表明克罗诺菌株可以产生 β -内酰胺酶, 赋予了菌株不寻常的耐药表型^[30]; *tolC* 基因的缺失可能导致胆盐抗性降低, 生长抑制、变形及运动性下降。胆盐浓度较低时, 促进生物膜形成^[31], 外膜蛋白 F (*ompF* 编码)可以通过减少 LPS 的量而影响生物膜的形成, 与生物膜的形成与黏附侵袭作用呈正相关, 在细菌的渗透性和耐药性中具有重要的作用^[32], 而细菌生物膜的形成会对菌株的表型产生一定影响, 导致耐药基因型和表型有差异。

COG 和 KEGG 的预测结果显示该菌株在新陈代谢方面的能力较强, 同时能够依靠其信号转导系统感知并且适应环境的变化从而更好地生存繁殖。对原噬菌体的预测结果表明在该菌株的染色体和质粒上存在一些完整或者不完整的原噬菌体的插入片段, 而噬菌体与细菌之间相互作用从而协同进化^[33], 其关系包括噬菌

体可以改变菌株之间的竞争, 维持细菌多样性并介导细菌之间的水平基因转移^[34]。这些原噬菌体片段可能推动细菌基因组多样化同时介导细菌的毒力基因转移, 推动细菌的进化。

本研究对菌株 Dcc0527 的 ANI 分析和系统发育分析都表明了克罗诺杆菌种群之间的高度相关性, 其多种毒力因子的存在解释了其在环境中的高存活力及其对动物的致病性, 耐药基因的预测为该类菌株感染的治疗提供了参考。克罗诺杆菌作为在所有年龄段都有可能感染的机会性致病菌, 常常在婴幼儿患病及婴幼儿产品相关领域被报道, 在成人的感染方面多为高龄或者具有基础性疾病的免疫力低下者, 临床表现有菌血症、肺炎、胆囊炎及尿路感染等^[35]。除了 2014 年报道从恒河猴粪便中分离出了一株阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)^[36], 在兽医方面对该菌感染的报道上还存在较多空白, 对菌株 Dcc0527 的全基因组测序和注释有助于将环境中的克罗诺杆菌与动物疾病防控联系起来, 为其防治提供依据与帮助。

REFERENCES

- [1] BLACKWOOD BP, HUNTER CJ. *Cronobacter* spp.[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2): 1.
- [2] IVERSEN C, MULLANE N, McCARDELL B, TALL BD, LEHNER A, FANNING S, STEPHAN R, JOOSTEN H. *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(Pt 6): 1442-1447.
- [3] JOSEPH S, CETINKAYA E, DRAHOVSKA H, LEVICAN A, FIGUERAS MJ, FORSYTHE SJ. *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] STEPHAN R, GRIM CJ, GOPINATH GR, MAMMEL MK, SATHYAMOORTHY V, TRACH LH, CHASE HR, FANNING S, TALL BD. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the Genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 10): 3402-3410.
- [5] FORSYTHE SJ. Updates on the *Cronobacter* genus[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9: 23-44.
- [6] HEALY B, COONEY S, O'BRIEN S, IVERSEN C, WHYTE P, NALLY J, CALLANAN JJ, FANNING S. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(4): 339-350.
- [7] JARADAT ZW, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, AL NABULSI A, TALL BD. *Cronobacter* spp.: opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, 63(Pt 8): 1023-1037.
- [8] PARRA-FLORES J, FLORES-SOTO F, FLORES-BALBOA C, ALARCÓN-LAVÍN MP, CABAL-ROSEL A, DAZA-PRIETO B, SPRINGER B, CRUZ-CÓRDOVA A, LEIVA-CARO J, FORSYTHE S, RUPPITSCH W. Characterization of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* strains isolated from powdered dairy products intended for consumption by adults and older adults[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(12): 2841.
- [9] 甘辛, 李凤琴. 克罗诺杆菌属致病性研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(6): 663-667.
GAN X, LI FQ. Advances in the study of pathogenicity of *Cronobacter*[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2018, 30(6): 663-667 (in Chinese).
- [10] 韩增胜, 杨长锁, 李青旺, 胡建宏, 王立强, 陈晓宇. 林麝生殖生理和繁殖性能观察研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2003, 31(6): 103-106.

- HAN ZS, YANG CS, LI QW, HU JH, WANG LQ, CHEN XY. Study on reproduction physiology and reproduction performance in musk deer (*Moschus berezovskii*)[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2003, 31(6): 103-106 (in Chinese).
- [11] 王海燕, 刘文华, 钟凌, 王伟峰. 人工养麝现状及发展前景[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2006, 34(S1): 203-206.
- WANG HY, LIU WH, ZHONG L, WANG WF. Present situation and development prospect of artificial musk deer breeding[J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2006, 34(S1): 203-206 (in Chinese).
- [12] 丁宇晶, 刘志霄, 康发功, 潘世成, 张学炎, 徐正强, 盛和林. 我国人工养麝研究进展及养麝效益问题[J]. 生命科学研究, 2009, 13(6): 558-564.
- DING YJ, LIU ZX, KANG FG, PAN SC, ZHANG XY, XU ZQ, SHENG HL. A brief review on the musk deer farming and its benefits in China[J]. Life Science Research, 2009, 13(6): 558-564 (in Chinese).
- [13] 祁佳丽. 凤县人工养殖林麝常见疾病调查及呼吸道病原菌的检测分离[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2022.
- QI JL. Investigation on main diseases of artificially cultured forest musk deer in Fengxian and detection and isolation of respiratory pathogens[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2022 (in Chinese).
- [14] 闫敏, 颜其贵, 杨光友. 圈养麝的群发性疾病[J]. 经济动物学报, 2016, 20(2): 112-117.
- YAN M, YAN QG, YANG GY. The mass diseases of captive musk deer[J]. Journal of Economic Animal, 2016, 20(2): 112-117 (in Chinese).
- [15] 罗燕, 程建国, 王建明, 康纪平, 蔡永华, 李秋波, 贾炼. 林麝肺炎及化脓性疾病的病理组织学观察[J]. 动物医学进展, 2009, 30(11): 122-123.
- LUO Y, CHENG JG, WANG JM, KANG JP, CAI YH, LI QB, JIA L. Histopathological observations of forest musk deer died in pneumonia and suppurative diseases[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(11): 122-123 (in Chinese).
- [16] WOO PCY, LAU SKP, TENG JLL, TSE H, YUEN KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2008, 14(10): 908-934.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验: GB 4789.40—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the PRC, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety, Food Microbiology Test, *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) test: GB 4789.40—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 16 (in Chinese).
- [18] BOBENCHIK AM, DEAK E, HINDLER JA, CHARLTON CL, HUMPHRIES RM. Performance of vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia* with vitek 2 (2009 FDA) and CLSI M100S 26th edition breakpoints[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(2): 450-456.
- [19] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- National Health and Health Commission of the People's Republic of China; State Administration for Market Regulation. National Food Safety Standard, Food Microbiological Examination, Aerobic plate count: GB 4789.2—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022: 12 (in Chinese).
- [20] LEE I, KIM YO, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [21] OGIHARA H, FUKUDA N, FUJIWARA A, SUZUKI H, YAMAMOTO H, KYOUI D, OKADA Y, IGIMI S. Prevalence of *Cronobacter* spp. in Retail Foods and Farm-associated Environments in Japan[J]. Food Science and Technology Research, 2019, 25(2): 265-275.
- [22] COSTA PV, VASCONCELLOS L, FORSYTHE SJ, BRANDÃO MLL. Diversity of *Cronobacter* genus isolated between 1970 and 2019 on the American continent and genotyped using multi-locus sequence typing[J]. FEMS Microbiology Letters, 2021, 368(5): fnab027.
- [23] FEI P, JING H, MA Y, DONG GG, CHANG YH, MENG ZX, JIANG SL, XIE QG, LI SZ, CHEN X, YANG WW. *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula collected from nine provinces in China: prevalence, genotype, biofilm formation, and

- antibiotic susceptibility[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 900690.
- [24] BALDWIN A, LOUGHLIN M, CAUBILLA-BARRON J, KUCEROVA E, MANNING G, DOWSON C, FORSYTHE S. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 223.
- [25] IVERSEN C, LANE M, FORSYTHE SJ. 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.
- [26] ALMAJED FS, FORSYTHE S. Virulence traits in the *Cronobacter* genus[M]//*Foodborne Pathogens*. Cham: Springer, 2017: 123-150.
- [27] WU HM, WANG Y, YAO QQ, FAN LL, MENG L, ZHENG N, LI HY, WANG JQ. Alkaline phosphatase attenuates LPS-induced liver injury by regulating the miR-146a-related inflammatory pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101(Pt A): 108149.
- [28] HOLÝ O, ALSONOSI A, HOCHÉL I, RÖDEROVÁ M, ZATLOUKALOVÁ S, MLYNÁRČIK P, KOLÁŘ M, PETRŽELOVÁ J, ALAZRAQ A, CHMELAŘ D, FORSYTHE S. Antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from clinical samples[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2019, 68(1): 5-14.
- [29] FEI P, JIANG YC, GONG SY, LI R, JIANG Y, YUAN XJ, WANG ZY, KANG HB, ALI MA. Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast China[J]. *Journal of Food Protection*, 2018, 81(3): 456-460.
- [30] MÜLLER A, HÄCHLER H, STEPHAN R, LEHNER A. Presence of AmpC beta-lactamases, CSA-1, CSA-2, CMA-1, and CMA-2 conferring an unusual resistance phenotype in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2014, 20(4): 275-280.
- [31] WANG X, WANG YP, LING N, SHEN YZ, ZHANG DF, LIU DY, OU DX, WU QP, YE YW. Effects of tolC on tolerance to bile salts and biofilm formation in *Cronobacter malonaticus*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(9): 9521-9531.
- [32] GAO JX, HAN ZH, LI P, ZHANG HY, DU XJ, WANG S. Outer membrane protein F is involved in biofilm formation, virulence and antibiotic resistance in *Cronobacter sakazakii*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2338.
- [33] KOSKELLA B, BROCKHURST MA. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(5): 916-931.
- [34] PENADÉS JR, CHEN J, QUILES-PUCHALT N, CARPENA N, NOVICK RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 23: 171-178.
- [35] TAMIGNIAU A, VANHAECKE J, SAEGEMAN V. *Cronobacter sakazakii* bacteremia in a heart transplant patient with polycystic kidney disease[J]. *Transplant Infectious Disease: an Official Journal of the Transplantation Society*, 2015, 17(6): 921-925.
- [36] 禹文海, 赵远, 鲁帅尧, 乞素冬, 沈冬, 李艳艳, 杨凤梅, 陈丽雄, 王俊斌, 和占龙. 一株恒河猴克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)的分离鉴定及序列分析[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2014, 26(4): 377-381.
- YU WH, ZHAO Y, LU SY, QI SD, SHEN D, LI YY, YANG FM, CHEN LX, WANG JB, HE ZL. Identification and sequence analysis on a *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) from rhesus monkey[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2014, 26(4): 377-381 (in Chinese).