

MALDI-TOF-MS 对金桔表面肠杆菌科微生物分布的研究

魏超, 郭灵安, 代晓航

(四川省农科院分析测试中心, 四川成都 610066)

摘要: 为了评估金桔的食用风险, 试验采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS)调查金桔表面肠杆菌科微生物分布情况, 筛选致病微生物, 同时采用与生化鉴定和 16S rDNA 测序鉴定辅助鉴定结果。实验共分离 6 种的肠杆菌科细菌, 分别为日沟维肠杆菌、分散泛菌、肺炎克雷伯菌、阪崎肠杆菌、生癌肠杆菌、阴沟肠杆菌, 其中分散泛菌、阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌出现频率较高; 对三种鉴定方法进行比较分析, MALDI-TOF-MS 鉴定结果与另外两种与属水平一致, 种水平有偏离; MALDI-TOF-MS 对分离微生物进行聚类分析表明同属微生物亲缘较近, 同种微生物峰谱图仍有差异。试验结果表明, 金桔表面具有肠道致病微生物, 有一定食用风险, 建议加强农产品致病菌常规的检测及风险评估力度; MALDI-TOF-MS 方法可分辨率高且能提供基于蛋白质水平归类分析可以用于农产品微生物的快速检测。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 金桔; 肠杆菌科微生物; 阪崎肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2017)11-219-223

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.031

Distribution of Enterobacteriaceae on Kumquat Surface by MALDI-TOF-MS

WEI Chao, GUO Ling-an, DAI Xiao-hang

(Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: To evaluate the consumption risk of kumquat, MALDI-TOF-MS was adopted to investigate the distribution of *Enterobacteriaceae* on kumquat surface by screening the pathogenic microorganisms, which were identified by biochemical identification and 16S rDNA sequencing identification to confirm the results. Six species of *Enterobacteriaceae* were isolated and identified as *Enterobacter gergoviae*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter sakazakii*, *Pantoea dispers*, *Enterobacter cloaca* and *Enterobacter cancerogenus*, among which *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cancerogenus* and *Enterobacter sakazakii* had high detection rates. The results of MALDI-TOF-MS were consistent with those of the two other methods on genus but partly different on species. The cluster analysis of isolated microorganisms by MALDI-TOF-MS showed that the microorganisms of the same genus were comparatively close relatives; however, microorganisms of the same species had some differences in mass spectrums. The results indicated that there were *Enteropathogens* on the surface of kumquats, which resulted in a consumption risk. Enhancing the routine detection and risk assessment of pathogens in agricultural products was suggested. MALDI-TOF-MS could be used for rapid detection of agricultural microorganisms with the advantages of high resolution and classification analysis on the basis of protein level.

Key words: MALDI-TOF-MS; kumquat; *Enterobacteriaceae*; *Sakazakii*

肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 细菌分布广范, 由许多形态特征、培养特征、理化特征等表现分类学指征及遗传信息等方面具有高度关联性, 但又有一定差别的属及菌种构成^[1], 部分菌属为人类致病菌和条件致病菌, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

(Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 方法在鉴定临床肠杆菌方面有一定的应用^[2-4]。MALDI-TOF-MS 技术是近年来发展起来的一种软电离新型有机质谱, 可以通检测鉴定微生物多肽、蛋白质达到鉴定微生物的^[5]。微生物核糖体蛋白和外周蛋白具有特异性, 其主要受遗传因素控制, 受培养基组份、培养时间以及培养条件等外部因素影响较小。质谱鉴定是利用基质解析电离的方式获得微生物蛋白质片段组指纹图,

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估重大专项 (GJFP201601302)

作者简介: 魏超 (1985-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 微生物相关检测及风险评估

通过测定微生物蛋白质组成,与标准数据库进行比对,完成对微生物的鉴定,因此 MALDI-TOF-MS 在微生物检测上具有很好的稳定性和重复性^[6]。阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)就是肠杆菌科致病菌,具有毒力多样性,可在巨噬细胞中定殖并能黏附和侵入血管内皮细胞^[7],内毒素打乱宿主细胞间的紧密联系引起细胞功能障碍^[8,9],导致早产儿患上脑膜炎和败血症等疾病。

金桔是芸香科植物的果实,其表面有蜡质结构,且有一定挥发性芳香油,其成分为柠檬萜和橙皮甙等^[10],一般认为其会减少微生物的附着,有研究表明金桔多糖有一定的杀菌作用,但剂量依赖性较大^[11]。金桔的可食部主要为外果皮及果肉,食用方式为清洗后直接食用,果蔬表面存在微观疏水区,大部分清洗方法无法将果蔬表面的微生物彻底清除^[12],因为肠杆菌科微生物是即食果蔬主要的风险因子^[13],所以本实验采用 MALDI-TOF-MS 对金桔表面肠杆菌进行分离鉴定和归类分析,旨在对金桔的食用风险分析及即食农产品卫生事件溯源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料

金桔 20 份,来自成都不同超市和市场。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂

孟加拉红培养基 (EMB)、营养琼脂、阪崎肠杆菌显色培养基和大肠杆菌显色培养基, TSA (北京路桥)。乙腈、甲酸 75%和 75%乙醇 (分析纯),基质 CHCA (岛津)。DNA 提取试剂盒 (Takara 公司),正向引物 (F27): 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',反向引物 (R1492): 5'-TACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3',引物合成及测序 (成都擎科)。0.75% NaCl ID32E (法国梅里埃)。

1.2.2 主要仪器设备

MALDI-TOF-MS 仪 (岛津); PCR 扩增仪 (SimpliAmp); 微生物 ATB 鉴定仪 (梅里埃); 生化培养箱 MJX-500 (上海新中)。

1.3 方法

1.3.1 微生物的分离纯化

称取 25 g 样品,225 mL 生理盐水进行 1:10 浸泡,浸泡液分别涂布与 EMB 和大肠杆菌显色培养基和阪崎肠杆菌显色培养基,置于 36 °C 培养 18~24 h 后挑取

EMB 培养基的单菌落,大肠杆菌显色培养基的蓝色菌落和白色菌落,阪崎肠杆菌的蓝色菌落和白色菌落于营养琼脂平板上进行纯化,革兰氏染色阴性显菌于营养琼脂二次纯化。

1.3.2 MALDI-TOF-MS 鉴定与相关分析

前处理:取菌适量加入 75%乙醇 1 mL,震荡 20 s,离心 1 min 弃上清,加入 70%乙酸 0.75 mL 震荡 20 s 后加入 100%乙腈震荡均匀,离心 2 min 取上清 1 μL 点至靶板,加入 1 μL CHCA,晾干。质谱条件:Mode liner SARAMIS 模式,能量 75 Hz,收集相对分子量 2000~20000,200 次/样品收集峰叠加,采用大肠杆菌 ATCC 8739 对 MALDI-TOF-MS 出峰保留时间进行校正,每 16 个样品自动校正 2 次。收集质谱图谱导入 Myla 指纹数据库与数据库中标准菌株的谱图进行多重比较,鉴定相关结果,根据收集蛋白质的分子量和保留时间进行微生物之间的相关分析。

1.3.3 16S rDNA 鉴定

PCR 扩增体系为 25 μL 反应体系^[3,14]。PCR 产物测序结果与 NCBI 网站 16S rDNA 序列进行比对。

1.3.4 微生物生化鉴定

挑取营养琼脂培养菌落至 0.85%生理盐水比浊管,振荡分散,将菌液调至 0.5 麦氏单位,每孔 55 μL 分装于 ID32E 试剂条 32 个试剂杯,36 °C 培养 24 h,ATB 系统读取鉴定结果。

1.3.4.1 微生物的分离纯化

称取 25 g 样品,225 mL 生理盐水进行 1:10 浸泡,浸泡液分别涂布与 EMB 和大肠杆菌显色培养基和阪崎肠杆菌显色培养基,置于 36 °C 培养 18~24 h 后挑取 EMB 培养基的单菌落,大肠杆菌显色培养基的蓝色菌落和白色菌落,阪崎肠杆菌的蓝色菌落和白色菌落于营养琼脂平板上进行纯化,革兰氏染色阴性显菌于营养琼脂二次纯化。

1.3.4.2 MALDI-TOF-MS 鉴定与相关分析

前处理:取菌适量加入 75%乙醇 1 mL,震荡 20 s,离心 1 min 弃上清,加入 70%乙酸 0.75 mL 震荡 20 s 后加入 100%乙腈震荡均匀,离心 2 min 取上清 1 μL 点至靶板,加入 1 μL CHCA,晾干。质谱条件:Mode liner SARAMIS 模式,能量 75 Hz,收集相对分子量 2000~20000,200 次/样品收集峰叠加,采用大肠杆菌 ATCC 8739 对 MALDI-TOF-MS 出峰保留时间进行校正,每 16 个样品自动校正 2 次。收集质谱图谱导入 Myla 指纹数据库与数据库中标准菌株的谱图进行多重比较,鉴定相关结果,根据收集蛋白质的分子量和保留时间进行微生物之间的相关分析。

1.3.4.3 16S rDNA 鉴定

PCR 扩增体系为 25 μL 反应体系^[3,14]。PCR 产物测序结果与 NCBI 网站 16S rDNA 序列进行比对。

1.3.4.4 微生物生化鉴定

挑取营养琼脂培养菌落至 0.85%生理盐水比浊管，振荡分散，将菌液调至 0.5 麦氏单位，每孔 55 μL 分装于 ID32E 试剂条 32 个试剂杯，36 °C 培养 24 h，ATB 系统读取鉴定结果。

2 结果与讨论

2.1 金桔表面微生物的分离

经筛选分离在 20 份金桔样品中筛选到 53 株革兰

氏染色阴性，显微观察为短杆菌，在营养琼脂培养基上菌落形态不同的微生物样品，对其进行 MALDI-TOF-MS 鉴定，鉴定获得 6 种肠杆菌科微生物了有效的鉴定结果，经 16S rDNA 测序和生化反应辅助鉴定结果见表 1。6 种微生物在 20 份金桔样品分布见图 1，分散泛菌，阴沟肠杆菌，肺炎克雷伯菌出现频率较高为金桔表面常见肠杆菌科微生物，其中阪崎肠杆菌为食源性致病菌，虽然只检出一次但存在一定食用安全隐患。三种方法的鉴定结果属间一致，但在种间部分微生物有所偏离，这与不同类型数据库中分类系统的认定有关，不为鉴定结果偏差。

表 1 金桔表面分离 10 株微生物的鉴定结果

Table 1 Identification results of 10 *Enterobacteriaceae* from kumquat

编号	MALDI-TOF-MS		16S rDNA		生化鉴定	
	鉴定结果	出峰情况	描述	置信率	鉴定结果	置信率
1L1	肺炎克雷伯菌	169	克雷伯菌	100	产酸克雷伯菌	99.6 0.83
1B1	大肠杆菌	177	肠杆菌属	99	阿氏肠杆菌	80.1 0.44
1B4	日沟维肠杆	199	日沟维肠杆菌	99	日沟维肠杆菌	99.9 0.98
1L4	肺炎克雷伯菌	199	肺炎克雷伯菌	99	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	82.0 0.89
1I2	阪崎肠杆菌	215	阪崎肠杆菌	99	阪崎肠杆菌	99.9 0.66
1C3	分散泛菌	200	分散泛菌	99	泛菌属 1	96.4 0.41
1A2	大肠杆菌	195	肠杆菌属	99	阿氏肠杆菌	89.2 0.51
1H3	生癌肠杆菌	248	生癌肠杆菌	99	生癌肠杆菌	85.2 0.62
1C1	阴沟肠杆菌	196	阴沟肠杆菌	99	阴沟肠杆菌	99.9 0.98
2A1	阴沟肠杆菌	179	阴沟肠杆菌	99	阴沟肠杆菌	82.0 0.73

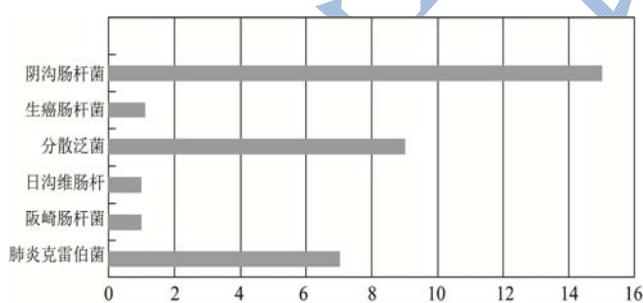


图 1 20 份金桔样品 6 种微生物的出现率

Fig.1 Incidence of 6 *Enterobacteriaceae* sp. on 20 copies of kumquat samples

2.2 MALDI-TOF-MS 鉴定与相关分析结果

微生物鉴定质谱图见图 2，标识峰足迹图见图 3，鉴定结果见表 1。MALDI-TOF-MS 将 8 株微生物鉴定为 6 种，分别为日沟维肠杆菌、分散泛菌、肺炎克雷伯菌、阪崎肠杆菌、生癌肠杆菌、阴沟肠杆菌，2 株

微生物编号为 1B1 和 1A2 只能鉴定到属。对分离微生物的 10 株微生物的出峰时间和质荷比 (3000~20000) 根据 Myla 数据提供方法进行聚类分析结果见图 2 (相对相差<0.08%)。此分析方法是基于蛋白质水平的系统发育学分析，研究微生物蛋白质水平的相似性和差异性从而计算其的亲缘关系。图 3 和 4 的结果表明金桔中分离的肠杆菌科微生物之间有一定的相关度与差异性，表现在 1L1 和 1B1 的同株微生物在不同的前处理条件下峰型不同，但聚类结果为最近亲缘；1L1 和 1L4 都鉴定为肺炎克雷伯菌，1C1 和 2A1 都鉴定为阴沟肠杆菌，但标识峰足迹仍有一定差异，在聚类结果上表现相似度较高但仍分辨出差异，图 2 中总体上看表现分散泛菌与其他菌株分为 2 个支线，与其余肠杆菌科微生物蛋白质水平差异较大。从试验结果可以看出 MALDI-TOF-MS 方法为高分辨方法，可以取得较为细致的蛋白质信息数据，可以用于更深层次的微生物学研究。

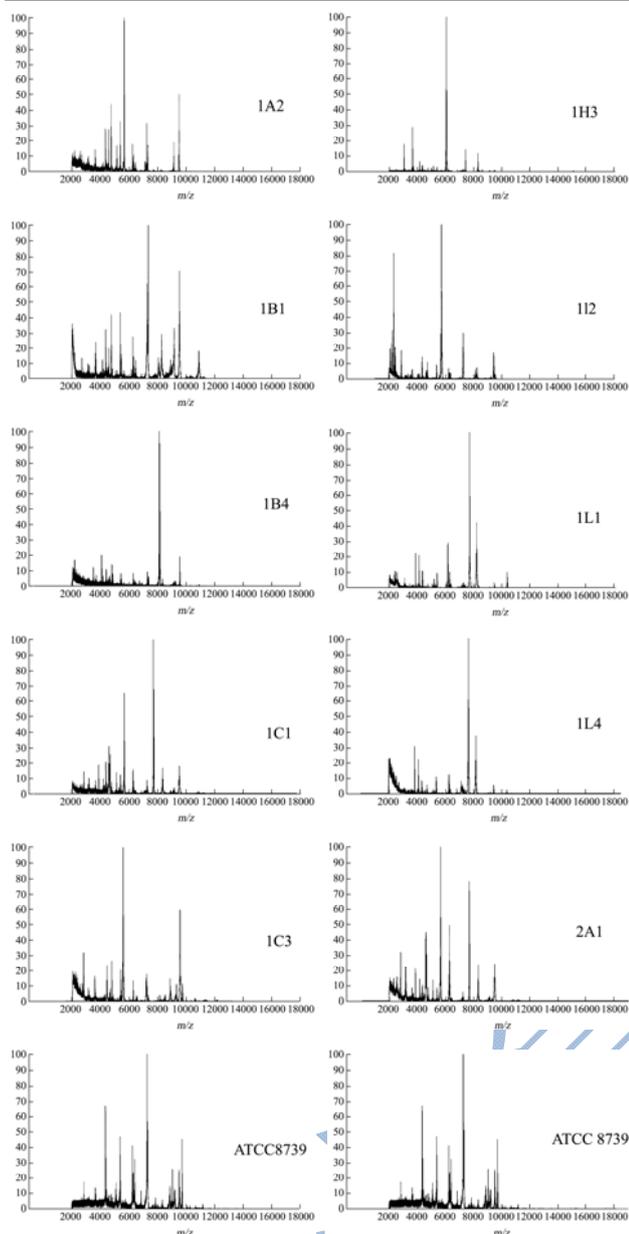


图2 10株肠杆菌科细菌质谱图

Fig.2 Microorganism mass spectrum of 10 *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF-MS

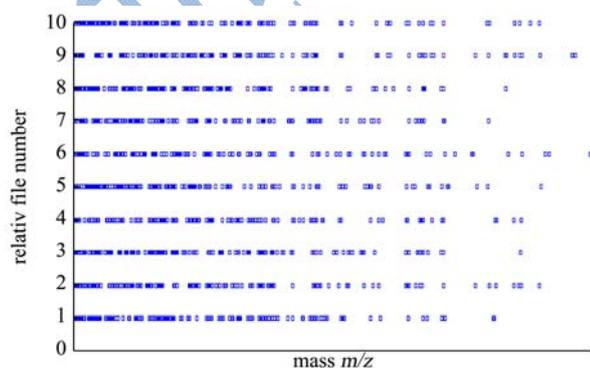


图3 肠杆菌科细菌标识峰足迹图

Fig.3 Footprint map of microorganism identification peak

注: 1表示 1L1, 2表示 1B1, 3表示 1B4, 4表示 1L4, 5

表示 1I2, 6表示 1C3, 7表示 1A2, 8表示 1H3, 9表示 1C1, 10表示 2A1。

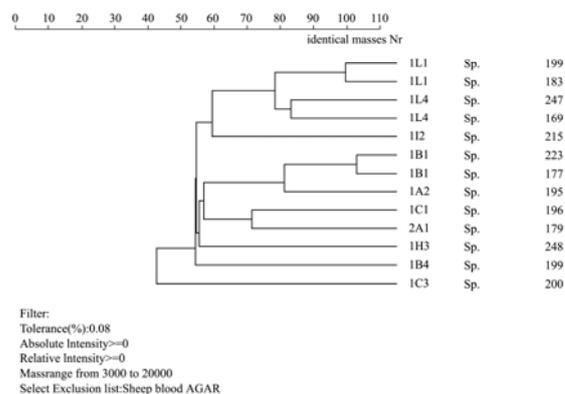


图4 肠杆菌科微生物相关分析图谱

Fig.4 Graph of MALDI-TOF-MS cluster-analysis profiles of *Enterobacteriaceae*

2.3 金桔表面分离肠杆菌生化与 16S rDNA 鉴定结果

采用生化方法和 16S rDNA 测序方法得到 10 株肠杆菌科微生物鉴定结果见表 1, 生化图谱见附表 1。生化结果中 ID%>80%表示可以接受的鉴定结果。实验结果可以看出生化与 16S rDNA 鉴定结果与 MALDI-TOF-MS 结果由一定差异, 具体为 3 种鉴定方法对 1L1 的种鉴定结果均不相同, MALDI-TOF-MS 和生化鉴定给予种水平鉴定但结果分别为肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌, 16S rDNA 鉴定结果只在属水平; 1B1 和 1A2 生化鉴定到种水平, 但 MALDI-TOF-MS 和 16S rDNA 只给予属水平鉴定; 1C3 生化鉴定到属水平, 另外两种方法给予种水平鉴定为分散泛菌。可见虽然同为肠杆菌科微生物不同方法对不同种属细菌鉴定能力还有所差异, 其鉴定原理不同不能单纯判断其优劣。

3 结论

金桔因其果皮独特特点经常被认为具有杀菌作用而不易受微生物污染, 但本研究中金桔表面分离出多种条件致病菌和致病菌。金桔挥发性成分对微生物的附着控制能力有限, 金桔多糖等杀菌成分存留在果肉中, 对其表面微生物附着影响甚微, 金桔在生产和销售过程长时间暴露空气环境下, 肠杆菌的鞭毛蛋白易于对果蔬表皮凸凹区域进行附着^[15]。金桔的食用方式为清洗后直接食用, 本实验检测出的食源性病原菌-阪崎肠杆菌, 克雷伯氏菌等都是可识别的风险因子引起过广泛的卫生事件^[16], 建议加强微生物风险监测, 同时建议消费者在食用金桔前合理清洗消毒以保证食

用安全。

MALDI-TOF-MS 基于周蛋白及核糖体蛋白的多样性达到对微生物的鉴定,也可用于其蛋白质峰谱图对微生物亲缘进行相关分析,试验中采用的三种鉴定方法得到的有效鉴定结果中种水平有所偏离,但属水平基本一致,但相较于另外两种方法 MALDI-TOF-MS 前处理简单且检测速度快,且可以进行蛋白质水平的相关性分析,对于检测农产品表面大量复杂的微生物,获得微生物之间的相互关系上具有独特的优势。

参考文献

- [1] 房海,陈翠珍,张晓军.肠杆菌科病原细菌[M].北京:中国农业科学技术出版社,2011
FANG Hai, CHEN Cui-zhen, ZHANG Xiao-jun. Pathogenic bacteria of *Enterobacteriaceae* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011
- [2] Fang H, Ohlsson A K, Ullberg M, et al. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolate [J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, 31(11): 3073
- [3] 姜岩,魏忠杰,钱铮.解读 2002 年诺贝尔化学奖成果[J].中国科技奖励,2002,3:56-57
JIANG Yan, WEI Zhong-jie, QIAN Zheng. Interpretation of 2002 nobel prize in chemistry [J]. *China Awards for Science and Technology*, 2002, 3: 56-57
- [4] Martiny D, Busson L, Wybo L, et al. Comparison of the Microflex LT and VITEK MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(4): 1313-1325
- [5] Dubois D, Grare M, Prere M F, et al. Performances of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(8): 2568-2576
- [6] Krishnamurthy T, Davis M T, Stahl D C, et al. Liquid chromatography/microspray mass spectrometry, for bacterial investigations [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999: 145
- [7] Gillian A Turnbull, J Alun W Morgan, J M Whipps, et al. The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots [J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, 35: 57-65
- [8] Singamsetty V K, Wang Y, Shimada H, et al. Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. *Microbial Pathogenesis* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(3): 181-191
- [9] Dancer G I, 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
- [10] 刘学仁,张莹,林志群.橙皮苷和橙皮素生物活性的研究进展[J].中国新药杂志,2011,4:329-333
LIU Xue-ren, ZHANG Ying, LIN Zhi-qun. Advances in studies on the biological activities of hesperidin and hesperetin [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2011, 4: 329-333
- [11] 曾红亮.金柑多糖提取、分离纯化及抑菌抗氧化活性的研究 [D].福州:福建农林大学,2012
ZENG Hong-liang. Extract, isolation, purification, antibacterial and antioxidative activity of polysaccharides from *Fortunella margarita* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012
- [12] Seo K H, Frank J F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy [J]. *Food Prot.*, 1999, 62(1): 3-9
- [13] Stephen J Forsythe. Microbiological risk assessment of food [M]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2002
- [14] 魏超,郭灵安,代晓航.草莓表面典型微生物鉴定、16SrDNA 同源性分析及附着能力研究(I)[J].西南农业学报,2017,1: 235-237
WEI Chao, GUO Ling-an, DAI Xiao-hang, et al. Research on the homology and adhesion of typical microorganisms on the surface of strawberry (I) [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(12): 2939-3943
- [15] Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, et al. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats [J]. *American Journal of Pathology*, 2005, 267(4): 1071-1079
- [16] Bunning V K, J A Lindsay, D L Arche, et al. Chronic health effects of foodborne microbial disease [J]. *World Health Stat. Quart.*, 1997, 50: 51-56