

# 基于 MALDI-TOF MS 技术快速检测 产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌

陈楷, 黄志深, 曾羲, 雷燕, 林秀敏, 蒋佳希, 陈贤驰, 肖剑\*  
(广州市食品检验所, 广东广州 511400)

**摘要:** 该研究探讨了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪快速鉴别产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的方法。通过对标准品进行分析, 重新对特征峰进行定位并测定其灵敏度, 并用正交试验分析不同培养条件下检验结果的差异, 用优化后的培养条件对 49 株野生蜡样芽胞杆菌及 3 株标准菌株进行特异性检验。研究表明, MALDI-TOF MS 可检测到产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌中呕吐毒素相应  $m/z$  值为 1 175 的  $[M+Na]^+$  和  $m/z$  值为 1 191 的  $[M+K]^+$  加合物特征峰, 具有较高的灵敏度 (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ), 经极差分析显示, 选用 MYP 培养基 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 后的菌落能获得最稳定、响应值高 ( $>10^4$ ) 的检验结果; 方法应用验证表明, 49 株野生菌株中 2 株含 *ces* 基因的蜡样芽胞杆菌均检出, 其余未含有 *ces* 基因的菌株均未检出。该研究建立的 MALDI-TOF MS 检测方法能直接快速准确检出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌, 该方法检测特异性强 (100%), 灵敏度高 (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ), 对于食品安全事故快速精准分析研判有重要的意义。

**关键词:** MALDI-TOF MS; 蜡样芽胞杆菌; 呕吐毒素

文章编号: 1673-9078(2022)11-351-357

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.1389

## Rapid Detection of Cereulide-Producing *Bacillus Cereus* Based on MALDI-TOF MS

CHEN Kai, HUANG Zhishen, ZENG Xi, LEI Yan, LIN Xiumin, JIANG Jiayi, CHEN Xianchi, XIAO Jian\*  
(Guangzhou Institute for Food Inspection, Guangzhou 511400, China)

**Abstract:** The rapid identification of cereulide-producing *Bacillus cereus* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry was investigated. The characteristic peak was located and the sensitivity was determined through analyzing the standard substances. The differences between the test results under different culture conditions were analyzed by the orthogonal test, and the specificity of 49 wild *B. cereus* and 3 standard strains were tested under the optimized culture conditions. The results showed that MALDI-TOF MS could detect the characteristic peaks of  $[M+Na]^+$  and  $[M+K]^+$  adducts with 1 175 and 1 191  $m/z$  values respectively, corresponding to the cereulide produced in *B. cereus*, with a high sensitivity (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ). The range analysis showed that the typical colony cultured in MYP medium at 30  $^{\circ}\text{C}$  for 12 hours could lead to the most stable test result with the highest response value ( $>10^4$ ). The method application verification revealed that among 49 wild strains, 2 *Bacillus cereus* strains containing *ces* gene were detected, whilst the other strains without the *ces* gene were not detected. The MALDI-TOF MS detection method established in this study can directly, rapidly and accurately detect cereulide-producing *B. cereus*. This method has strong specificity (100%) and high sensitivity (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ). Thus, it is of great significance for rapid and accurate analysis and judgment of food safety accidents.

**Key words:** MALDI-TOF MS; *Bacillus cereus*; cereulide

引文格式:

陈楷, 黄志深, 曾羲, 等. 基于 MALDI-TOF MS 技术快速检测产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 351-357

CHEN Kai, HUANG Zhishen, ZENG Xi, et al. Rapid detection of cereulide-producing *Bacillus Cereus* based on MALDI-TOF MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 351-357

收稿日期: 2021-12-10

基金项目: 广州市市场监督管理局科技项目 (2020kj53); 广东省市场监督管理局科技项目 (2020CS01)

作者简介: 陈楷 (1990-), 男, 工程师, 研究方向: 食品微生物检验技术, E-mail: ekward-ck@qq.com

通讯作者: 肖剑 (1980-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物检测技术, E-mail: xjq521@163.com

蜡样芽胞杆菌作为食品中重要防控的致病菌之一,也是食源性疾病中常见的条件致病菌。研究发现,蜡样芽胞杆菌在即食肉制品、乳制品及各种生鲜食品中均有一定的检出率,其中最为典型的是米面制品,作为主要污染源的湿粉类食品,蜡样芽胞杆菌检出率达到43.17%<sup>[1]</sup>。据统计,环境中的蜡样芽胞杆菌仅有1%~2%的菌株会产生呕吐毒素<sup>[2]</sup>,但在食品和临床样品中产呕吐毒素菌株的流行率却高达32.8%<sup>[3]</sup>。

蜡样芽胞杆菌呕吐毒素(Cereulide,以下简称呕吐毒素)的结构为[D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val]<sub>3</sub>,如图1,是一种十二环形多肽,分子量为1,153.38 u<sup>[4,5]</sup>,由位于巨质粒上的*ces*基因簇(Cereulide Synthetase Gene Cluster)编码的非核糖体肽合成酶(Networked Robot Perceptual System, NRPS)合成的,该毒素由携带*ces*基因的菌株在食物中预先产生且非常稳定,进入人体后在胃中与其受体结合,导致呕吐反应<sup>[6]</sup>。目前,国内蜡样芽胞杆菌的检测方法是GB 4789.14-2014《食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽胞杆菌检验》<sup>[7]</sup>,该方法只进行蜡样芽胞杆菌的鉴定,无法区分菌株是否产呕吐毒素,而区分该菌株的方法通常用聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)检测<sup>[8]</sup>,通过检测菌株是否携带*ces*基因进行辨别,但无法确定呕吐毒素是否产生,要测定呕吐毒素生成量还需通过液相色谱-质谱联用等仪器进行检测<sup>[9]</sup>,前处理复杂、基质效应大。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)技术被广泛运用于微生物鉴定,该技术通过高度复杂的统计软件自动生成实验结果,具有快速便捷、操作相对简单、运行成本低等特点<sup>[10]</sup>。目前,Ulrich等<sup>[11]</sup>通过MALDI-TOFMS测量700~3 500 u质量范围内的蛋白,确定了呕吐毒素的两个特定生物特征峰分别为 $m/z$  1 171和 $m/z$  1,187,Doellinger等<sup>[12]</sup>在MALDI-TOF MS反射模式下测得呕吐毒素的钠和钾加合物信号峰为 $m/z$  1 175 ( $[M+Na]^+$ )和 $m/z$  1 191 ( $[M+K]^+$ ),MALDI-TOF MS在检测产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌方面的潜力得到了检验。

但由于呕吐毒素的合成不仅受细菌内部基因的调控,还受所在环境因素的影响,研究显示,蜡样芽胞杆菌合成呕吐毒素的最适温度为20~30 °C<sup>[13]</sup>。此外,营养条件、pH值、湿度和NaCl等也会影响呕吐毒素的产生<sup>[14,15]</sup>。为此,本研究通过对呕吐毒素标准品进行分析,对特征峰进行定位并测定其灵敏度,评估国内常用于培养蜡样芽胞杆菌不同培养基和其他条件之间检测结果的差别,优化实验方案,并采用已确定含有

*ces*基因型的蜡样芽胞杆菌菌株进行方法特异性验证,建立一种能简单、快速、高通量直接进行产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的鉴别方法,为食品中病原微生物靶标性监测和食品安全事件应急检验提供一种快捷鉴别技术。

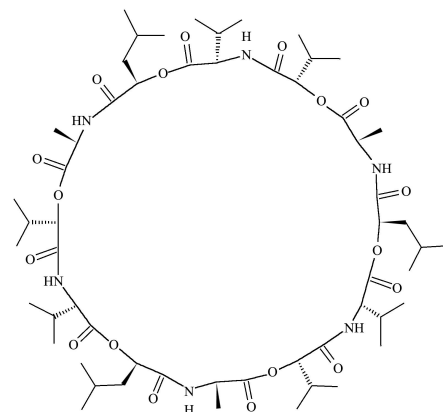


图1 呕吐毒素的分子结构

Fig.1 Molecular structure of cereulide

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验用菌株

蜡样芽胞杆菌标准菌株(CICC 10352)、蕈状芽胞杆菌标准菌株(CICC 21473),来自于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);苏云金芽胞杆菌标准菌株(ATCC 10792),来自于广东环凯微生物科技有限公司;49株野生蜡样芽胞杆菌菌株<sup>[6]</sup>(编号BC-1~49,其中BC-43、49携带*ces*基因,实验室分离)。

#### 1.1.2 主要试剂

呕吐毒素标准品,荷兰Chiralix公司;甘露醇卵黄多黏菌素琼脂(Mannitol Yolk Polymyxin Agar Base, MYP)、胰酪胨大豆羊血琼脂平板(Trypticase Soy Sheep Blood Agar Plate, TSSB)、胰酪大豆胨琼脂(Tryptic Soytone Agar, TSA),广东环凯微生物科技有限公司;乙腈(色谱纯),德国Meker公司;甲酸(色谱纯),美国Fisher Scientific公司;三氟乙酸(色谱纯),美国Sigma-Aldrich公司; $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)、Bacterial Test Standard,德国Bruker公司。

### 1.2 主要仪器设备

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Ultrafle Xtreme),德国Bruker公司;生化培养箱,宾德环境试验设备(上海)有限公司;生物安全柜,赛默飞世尔(上海)有限公司;高压灭菌器,致微(厦门)仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 呕吐毒素标准品的检测

将呕吐毒素标准品(2 mg)用纯乙腈溶解后定容至200 μg/mL制成标准储备液,用φ=75%乙醇进行梯度稀释,分别制备10、5、1、0.1、0.01 μg/mL的稀释液,从这些稀释液中分别吸取1 μL至MTP 384靶板上,在室温下风干,覆盖1 μL基质HCCA,待基质干燥后进行MALDI-TOF MS检测。

#### 1.3.2 不同培养条件菌株的检测

表1 因素水平表

Table 1 Factor level table

水平	试验因素		
	培养时间 A/h	培养温度 B/°C	培养基 C
1	12	30	MYP
2	18	36	TSA
3	24		TSSB
4	48		

表2 试验方案

Table 2 Test scheme

试验号	因素			试验结果	
	A	B	C	m/z 1175 响应值	m/z 1191 响应值
1	2	1	2	x <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>
2	4	3 (1)	1	x <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>
3	1	1	1	x <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>
4	3	4 (2)	4 (1)	x <sub>4</sub>	y <sub>4</sub>
5	1	3 (1)	4 (1)	x <sub>5</sub>	y <sub>5</sub>
6	3	3 (1)	2	x <sub>6</sub>	y <sub>6</sub>
7	2	4 (2)	1	x <sub>7</sub>	y <sub>7</sub>
8	1	2	3	x <sub>8</sub>	y <sub>8</sub>
9	4	1	4 (1)	x <sub>9</sub>	y <sub>9</sub>
10	2	3 (1)	3	x <sub>10</sub>	y <sub>10</sub>
11	3	2	1	x <sub>11</sub>	y <sub>11</sub>
12	4	2	2	x <sub>12</sub>	y <sub>12</sub>
13	4	4 (2)	3	x <sub>13</sub>	y <sub>13</sub>
14	2	2	4 (1)	x <sub>14</sub>	y <sub>14</sub>
15	1	4 (2)	2	x <sub>15</sub>	y <sub>15</sub>
16	3	1	3	x <sub>16</sub>	y <sub>16</sub>

依据GB 4789.14<sup>[7]</sup>中蜡样芽胞杆菌分离鉴定使用的培养基及培养温度,将携带ces基因的蜡样芽胞杆菌菌株分别接种到TSA、TSSB和MYP三种培养基平板,并将每种培养基平板分别放置于30 °C和36 °C条件下进行培养,分别培养12、18、24和48 h后用1 μL的一次性接种环直接从培养基中挑取典型菌落,均匀

的涂抹到MTP 384靶板上,用1 μL体积分数70%甲酸覆盖菌苔,在室温下风干,再覆盖1 μL基质HCCA,待基质干燥后上机进行MALDI-TOF MS检测。

根据试验要求,试验指标为特征峰的响应值,不考虑交互作用,试验因素水平如表1,其中因素A为四水平,而因素B、C由于受试验条件的限制,分别只取二水平和三水平,为此把因素B虚拟二个水平,因素C虚拟一个水平,虚拟结果相当于把L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)表2作了改造,第2列为1→1, 2→2, 3→1, 4→2, 第三列为1→1, 2→2, 3→3, 4→1,通过正交试验对结果进行极差分析。

#### 1.3.3 方法特异性检验

将实验室现有的49株蜡样芽胞杆菌野生菌株(其中2株含ces基因)和标准菌株蜡样芽胞杆菌(CICC 10352)、蕈状芽胞杆菌(CICC21473)、苏云金芽胞杆菌(ATCC10792),使用1.3.2的最优培养条件培养后,用1 μL的一次性接种环直接从培养基中挑取典型菌落,均匀的涂抹到MTP 384靶板上,用1 μL φ=70%甲酸覆盖菌苔,在室温下风干,再覆盖1 μL基质HCCA,待基质干燥后上机进行MALDI-TOF MS检测。

#### 1.3.4 质谱条件

正离子反射模式;检测范围:700~3 500 u;激光强度:30%;激光点击数:每图谱200次(8次激光累积);激光频率:2 000.0 Hz;离子源加速电压:20 kV;采用速率:5.00 GS/s。

### 1.4 数据处理

#### 1.4.1 K值和k值的计算

以第一列A因素为例:

$$K_1 = x_3 + x_5 + x_8 + x_{15}$$

$$K_2 = x_1 + x_7 + x_{10} + x_{14}$$

$$K_3 = x_4 + x_6 + x_{11} + x_{16}$$

$$K_4 = x_2 + x_9 + x_{12} + x_{13}$$

$$k_i = \frac{K_i}{n}$$

式中:

$K_i$ ——各因素同一水平之和;

$i$ ——第*i*个水平;

$k_i$ ——各因素同一水平的平均值;

$n$ ——该水平的总试验数。

#### 1.4.2 极差R的计算

$$R = \max(k_i) - \min(k_i)$$

式中:

$R$ ——该因素在其取值范围内试验指标变化的幅度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 呕吐毒素标准品的检测结果

分别吸取 1  $\mu\text{L}$  质量浓度为 10、5、1、0.1、0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的呕吐毒素标准溶液进行 MALDI-TOF MS 检测, 试验结果如图 2 所示, 每个浓度均可以检测到呕吐毒素相应  $m/z$  值为 1 175 的  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  和 1 191 的  $[\text{M}+\text{K}]^+$  加合物特征峰, 峰高响应值均大于  $10^4$ , 检验结果与 Doellinger 等<sup>[12]</sup>在 MALDI-TOF MS 反射模式下测得的呕吐毒素钠和钾加合物信号峰位置和响应值结果一致, 均检测到响应值大于  $10^4$  的  $m/z$  值为 1 175  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  和  $m/z$  值为 1 191  $[\text{M}+\text{K}]^+$ 。Ulrich 等<sup>[11]</sup>在线性正模式下测得呕吐毒素的两个特征峰为  $m/z$  1 171 和 1 187, 最高响应值均大于  $10^4$ , 但因仪器和检测模式条件不同, 故特征峰出峰位置存在一定差异。

本次检验结果中, 在最低质量浓度 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的稀释液 1  $\mu\text{L}$  中仍可以检测到相应的加合物特征峰, 响应值大于  $10^4$ , 说明该方法具有较高的检测灵敏度, 达到 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Ulrich 等<sup>[11]</sup>使用 MALDI-TOF/TOF MS (Bruker Daltonics GmbH) 在线性正模式 ( $m/z$  800~1 800) 下, 对不同浓度的呕吐毒素标准溶液测量的检出限为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Doellinger 等<sup>[12]</sup>使用 MALDI-TOF/TOF MS 在正离子反射模式 ( $m/z$  700~3 500) 下, 对不同浓度的呕吐毒素标准溶液测量精密度的为 0.25 ng, 均低于本次试验结果的灵敏度 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将各个质量浓度的呕吐毒素特征峰响应值与质量浓度做折线图, 如图 2 所示, 从趋势线上看, 两个呕吐毒素特征峰  $m/z$  值为 1 175  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  和  $m/z$  值为 1 191  $[\text{M}+\text{K}]^+$  的响应值与标准溶液浓度梯度不成线性关系, 这也反映了 MALDI-TOF MS 在定量检测方面存在一定的局限性。

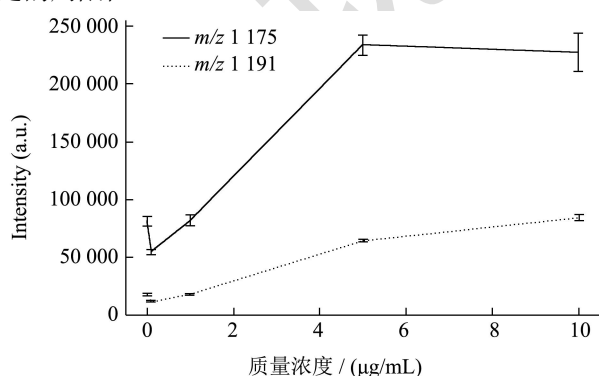


图 2 呕吐毒素标准品的浓度曲线 ( $n=2$ )

Fig.2 Concentration curve of cereulide standard ( $n=2$ )

### 2.2 不同培养条件的检测结果

通过表 2 的试验方案进行 16 次试验, 检测分析结果如表 3 所示。其中,  $K$  为第  $j$  列因素  $m$  水平所对应的试验指标和,  $k$  为  $K$  的平均值。由  $k$  的大小可以判断第  $j$  列因素优水平和优组合。故在  $m/z$  1 175 因素 A (培养时间) 的优水平:  $k_4 > k_1 > k_3 > k_2$ , 因素 B (培养温度) 的优水平:  $k_1 > k_2$ , 因素 C (培养基) 的优水平:  $k_1 > k_2 > k_3$ , 优组合为  $A_4B_1C_1$ , 即 MYP 培养基 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 的培养物; 在  $m/z$  1 191 因素 A (培养时间) 的优水平:  $k_1 > k_4 > k_2 > k_3$ , 因素 B (培养温度) 的优水平:  $k_1 > k_2$ , 因素 C (培养基) 的优水平:  $k_1 > k_2 > k_3$ , 优组合为  $A_1B_1C_1$ , 即 MYP 培养基 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 的培养物。

$R$  为第  $j$  列因素的极差, 反映了第  $j$  列因素水平波动时, 试验指标的变动幅度。 $R$  越大, 说明该因素对试验指标的影响越大。因此, 根据表 3 中极差  $R$  的大小, 判断本次试验各因素的影响主次顺序分别是  $m/z$  1 175: 因素 A (培养时间) > 因素 C (培养基) > 因素 B (培养温度);  $m/z$  1 191: 因素 C (培养基) > 因素 B (培养温度) > 因素 A (培养时间)。

以上对  $m/z$  1 175 响应值和  $m/z$  1 191 响应值两项指标单独分析出的优化条件中, 除了因素 A (培养时间) 不一致, 因素 B (培养温度)、C (培养基) 均一致, 综合快速鉴别的时效性考虑, 为了在食品监督控制过程中尽快找出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌, 故因素 A 取  $A_1$  (12 h), 选定最优培养条件组合为  $A_1B_1C_1$ , 即接种 MYP 培养基在 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 后进行检验。

Ulrich 等<sup>[11]</sup>用 5wt% 羊血哥伦比亚琼脂上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 的培养物, 在线性正模式下进行 MALDI-TOF MS 检测, 虽然可以检测到  $m/z$  1 171 和 1 187 的两个特征峰, 但响应值低于  $10^4$ ; Doellinger 等<sup>[12]</sup>用 Caso 琼脂和血平板上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 的培养物, 在反射模式下进行 MALDI-TOF MS 检测, 可直接检测到呕吐毒素相应  $m/z$  值为 1 175 的  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  和 1 191 的  $[\text{M}+\text{K}]^+$  加合物特征峰, 但响应值均小于  $10^4$ , 只有经过溶剂提取处理后再进行检测, 测量数据响应值才大幅提高 ( $>10^5$ )。Carroll 等<sup>[13]</sup>研究显示, 蜡样芽胞杆菌合成呕吐毒素的最适温度为 20~30  $^{\circ}\text{C}$ 。故笔者认为, 使用 MYP 培养基上 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 的培养物直接进行检测, 与 CB 4789.14<sup>[7]</sup>中样品分离培养使用的培养基及培养温度高度契合, 有利于产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的生长产毒, 可以更快速高效的对产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌进行区分。

表 3 试验结果及极差分析

Table 3 Test results and range analysis

试验号	因素			试验结果	
	A	B	C	<i>m/z</i> 1 175 响应值	<i>m/z</i> 1 191 响应值
1	2	1	2	3 030	18 692
2	4	3 (1)	1	22 370	21 534
3	1	1	1	7 897	31 433
4	3	4 (2)	4 (1)	2 039	5 112
5	1	3 (1)	4 (1)	7 897	31 433
6	3	3 (1)	2	1 068	7 025
7	2	4 (2)	1	1 061	3 407
8	1	2	3	0	0
9	4	1	4 (1)	22 370	21 534
10	2	3 (1)	3	0	2 200
11	3	2	1	2 039	5 112
12	4	2	2	785	1 057
13	4	4 (2)	3	0	0
14	2	2	4 (1)	1 061	3 407
15	1	4 (2)	2	389	4 445
16	3	1	3	452	1 101
<hr/>					
<i>m/z</i> 1 175 响应值	<i>K</i> <sub>1</sub>	16 183	65 084	66 734	
	<i>K</i> <sub>2</sub>	5 152	7 374	5 272	
	<i>K</i> <sub>3</sub>	5 598		452	
	<i>K</i> <sub>4</sub>	45 525			
	<i>k</i> <sub>1</sub>	4 046	8 136	8 342	
	<i>k</i> <sub>2</sub>	1 288	922	1 318	
	<i>k</i> <sub>3</sub>	1 400		113	
	<i>k</i> <sub>4</sub>	11 381			
	<i>R</i>	10 093	7 214	8 229	
	<hr/>				
<i>m/z</i> 1 191 响应值	<i>K</i> <sub>1</sub>	67 311	134 952	122 972	
	<i>K</i> <sub>2</sub>	27 706	22 540	31 219	
	<i>K</i> <sub>3</sub>	18 350		3 301	
	<i>K</i> <sub>4</sub>	44 125			
	<i>k</i> <sub>1</sub>	16 828	16 869	15 372	
	<i>k</i> <sub>2</sub>	6 926	2 818	7 805	
	<i>k</i> <sub>3</sub>	4 588		825	
	<i>k</i> <sub>4</sub>	11 031			
	<i>R</i>	12 240	14 051	14 547	

### 2.3 方法特异性检验结果

将 49 株野生蜡样芽胞杆菌和 3 株标准菌株, 蜡样芽胞杆菌(CICC 10352)、蕈状芽胞杆菌(CICC 21473)、苏云金芽胞杆菌(ATCC 10792)接种到 MYP 琼脂平板上经过 30 °C 培养 12 h 后, 挑取培养物进行 MALDI-TOF MS 检测, 试验结果如表 4、图 3、图 4

所示, 其中 2 株含 *ces* 基因的蜡样芽胞杆菌均检测到呕吐毒素相应的 *m/z* 值为 1 175 的[M+Na]<sup>+</sup>和 *m/z* 值为 1 191 的[M+K]<sup>+</sup>加合物特征峰, 响应值均大于 10<sup>4</sup>, 其他未携带 *ces* 基因的菌株均未检测到相应的特征峰; 标准菌株蜡样芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌均不携带 *ces* 基因, 试验结果均未检测到相应的 *m/z* 值为 1 175 的[M+Na]<sup>+</sup>和 *m/z* 值为 1 191 的[M+K]<sup>+</sup>

加合物特征峰, 特异性达到 100%。

表 4 菌株的检测结果

Table 4 Detection results of strains

编号	基因名称	m/z	
	<i>ces</i> <sup>[16]</sup>	175	191
BC-1~42、44~48	-	-	-
BC-43、49	+	+	+
CICC 10352、21473、ATCC 10792	-	-	-

注：“+”表示检出阳性，“-”表示检出阴性。

Ulrich 等<sup>[11]</sup>对产呕吐毒素和非产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌分离株的区分研究中, 121 株测试菌株中有 120

株 MALDI-TOF MS 测定结果和 PCR 分析的比对结果一致, 只有一株产呕吐毒素菌株在 MALDI-TOF MS 中呈假阴性, 主要是因为该菌株产毒能力极低, 无法被检测到, 作者认为该低产毒菌无法构成公共卫生危害, 故 MALDI-TOF MS 对产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的检测方法具有较强的特异性 (>99%)。Doellinger 等<sup>[12]</sup>共测试了 8 株蜡样芽胞杆菌, 包括高产毒菌 2 株, 中产毒菌 1 株, 低产毒菌 3 株, 非产毒菌 2 株, 但未给出 8 株菌全部的检测结果和谱图, 未进行特异性判断。因此, 笔者认为后续若有条件仍可增大样本量对该方法的特异性再进一步验证。

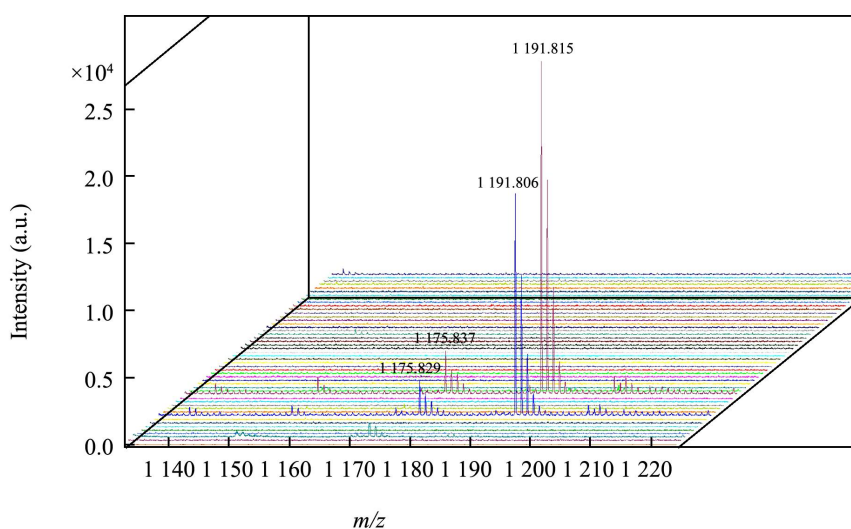


图 3 49 株阳性蜡样芽胞杆菌的 MALDI-TOF MS 检测结果

Fig.3 MALDI-TOF MS detection results of 49 positive strains of *Bacillus cereus*

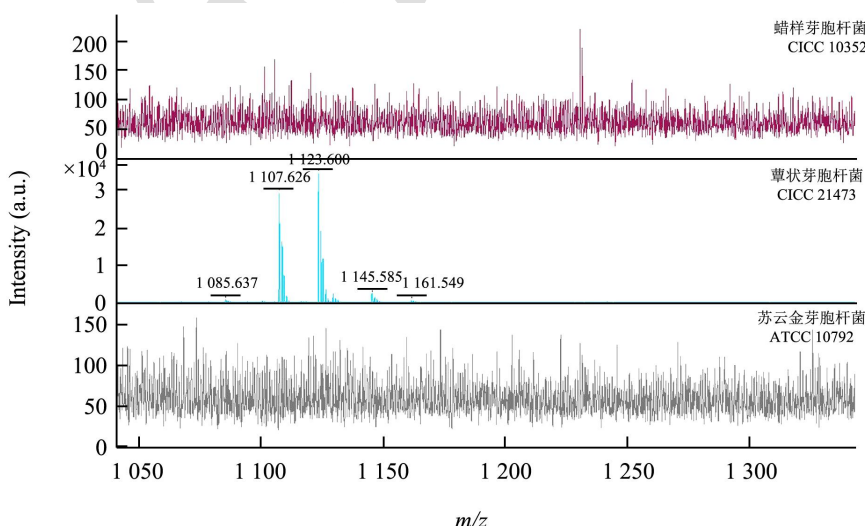


图 4 标准菌株的检测结果

Fig.4 Detection results of standard strains

### 3 结论

蜡样芽胞杆菌是食品生产过程中污染食物的一个

主要来源, 是食物中毒的主要致病因子之一。虽然目前有国标方法可以检测食品中的细菌污染, 但该方法不能区分产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌。MALDI-TOF MS

技术的易用性和广泛可用性有助于在常规鉴定中检出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌, 实验结果表明, 运用MALDI-TOF MS 技术检测呕吐毒素相应  $m/z$  值为 1 175 的 $[M+Na]^+$ 和 1 191 的 $[M+K]^+$ 加合物特征峰, 可以有效的区分产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌, 该方法的检测灵敏度可达到 0.01  $\mu\text{g/mL}$ 。通过正交试验极差分析结果, 选用样品培养条件为接种 MYP 培养基在 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h, 培养后直接挑取典型菌落进行MALDI-TOF MS 检测, 这与国标检测方法 GB 4789.14 中对食品中蜡样芽胞杆菌检验的分离条件刚好契合, 且培养时间减少一半以上, 仅需 12 h, 且上机检测结果响应值高 ( $>10^4$ )。该方法对产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌检测特异性强 (100%), 灵敏度高 (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ), 因此可在食品样品检测过程中, 使用 MYP 培养基平板上的典型菌落直接进行 MALDI-TOF MS 检测, 如果检测到  $m/z$  值为 1 175 的 $[M+Na]^+$ 和  $m/z$  值为 1 191 的 $[M+K]^+$ 加合物特征峰且响应值大于  $10^4$ , 即可判断该菌为疑似产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌, 从而锁定该样品并进行进一步的传统细菌鉴定和毒力基因检测确认。该方法是一种适合产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的高通量筛查技术, 操作简单、灵敏, 可为食品生产危害控制及快速监管提供技术支持, 可实现对消费者的保护和食品加工质量的保障, 应用前景广阔。

### 参考文献

- [1] 周璐. 湿粉类食品中蜡样芽胞杆菌污染状况、毒力和菌株生长抑制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2021
- [2] Carroll L M, Wiedmann M. Cereulide synthetase acquisition and loss events within the evolutionary history of Group III *Bacillus cereus* sensu lato facilitate the transition between emetic and diarrheal foodborne pathogen [J]. *BioRxiv*, 2020, 2020: 090951
- [3] Messelh usser U, Frenzel E, Bl ochinger C, et al. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013) [J]. *Biomed Research International*, 2014, 2014: 465603
- [4] L ucking G, Frenzel E, R utschle A, et al. *Ces* locus embedded proteins control thenon-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1101
- [5] Makarasin A, Yoza K, Isobe M. Higher structure of cereulide, an emetic toxin *Bacillus cereus*, and spcial comparison with valinomycin, an antibiotic from *Streptomyces fulvissimus* [J]. *Chemistry-an Asian Journal*, 2009, 4(5): 688-698
- [6] R onning H T, Asp T N, Granum P E. Determination and quantification of the emetic toxin cereulide from *Bacillus cereus* in pasta, rice and cream with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2015, 32(6): 911-921
- [7] GB 4789.14-2014, 食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽胞杆菌检验 [S]
- [8] 张玲艳, 宋丽丽, 贾伟娟, 等. 蜡样芽胞杆菌检测方法的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1360-1372
- [9] 张秀尧, 蔡欣欣, 李毅. 超高效液相色谱串联质谱法检测食品中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素 Cereulide[J]. *分析化学*, 2012, 40(8): 1267-1273
- [10] 杨伟玮, 汪曦, 孙传强. 数据处理和分析方法在 MALDI-TOF MS 鉴定微生物中的应用[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(3): 368-373
- [11] Ulrich S, Gottschalk C, Dietrich R, et al. Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS [J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 75-81
- [12] Doellinger J, Schneider A, Stark T D, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid detection of cereulide from *Bacillus cereus* cultures [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 2020: 511674
- [13] Carroll L M, Wiedmann M, Mukherjee M, et al. Characterization of emetic and diarrheal *Bacillus cereus* strains from a 2016 foodborne outbreak using whole-genome sequencing: addressing the microbiological, epidemiological, and bioinformatic challenges [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 144
- [14] Gu erin A, R onning H T, Dargaignaratz C, et al. Cereulide production by *Bacillus weihenstrphanensis* strains during growth at different pH values and temperatures [J]. *Food Microbiology*, 2017, 65: 130-135
- [15] Geng P L, Hu Y M, Zhou G P, et al. Characterization of three autolysins with activity against cereulide producing *Bacillus* isolates in food matrices [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 241: 291-297
- [16] 张明明, 梁美丹, 肖剑, 等. 即食米面制品中蜡样芽胞杆菌分离鉴定及毒力基因研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(22): 144-150