

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.04.016

文章编号:2095-6002(2018)04-0105-06

引用格式:魏超,代晓航,郭灵安,等. MALDI-TOF MS对草莓中铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌的检测[J]. 食品科学技术学报, 2018,36(4):105-110.



WEI Chao, DAI Xiaohang, GUO Ling'an, et al. Research on identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in strawberry by MALDI-TOF MS[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018,36(4):105-110.

MALDI-TOF MS对草莓中铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌的检测

魏超, 代晓航, 郭灵安, 刘炜

(四川省农业科学院 分析测试中心, 四川 成都 610066)

摘要:为了评价基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)在草莓微生物风险监测的应用价值,确定草莓的危害识别微生物及其特征,采用选择性培养方法对50份草莓样品中铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌进行分离, MALDI-TOF MS对分离微生物进行鉴定,应用SARAMIS Premium软件对这2种食物感梁性病原微生物的蛋白质图谱进行分析和加权修正。结果表明,铜绿假单胞菌在草莓中的检出率为18%,黏质沙雷氏菌检出率为20%,实验获得草莓中分离铜绿假单胞菌完全拟合特征峰12组,标识峰聚类分析结果表明,分离铜绿假单胞菌差异较大;获得草莓分离黏质沙雷氏菌完全拟合特征峰有8组,标识峰加权聚类分析结果可认定分离的2株黏质沙雷氏菌同源。MALDI-TOF MS方法可标识草莓分离微生物的蛋白质特异性特征,且对微生物的溯源及特异性分析有一定优势,表明其在农产品复杂微生物环境中具有应用潜力。

关键词: MALDI-TOF MS; 草莓; 铜绿假单胞菌; 黏质沙雷氏菌; 标识峰

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

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)是一种软电离质谱,可以通过检测微生物蛋白质的特异性达到鉴定微生物的目的^[1-2]。微生物蛋白质体系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,所以微生物蛋白具有稳定性和特异性^[3]。MALDI-TOF MS采用基质解析电离的方式获得微生物特异性蛋白质指纹图谱,对图谱中蛋白质标识峰信息与标准数据库进行多重比较达到对微生物鉴定的目的,因此MALDI-TOF MS在微生物检测上可以获得更多微生物的信息^[4]。国外已经将MALDI-TOF MS方法用于人类致病菌的快速检测鉴定中^[5-6]。草莓为蔷薇科多年生草本植物,在园艺学上将其划分为浆果类,是当今消费量十大水果之

一^[7]。草莓食用肉质部分为花托发育,可食用部分占98%,高含糖量、高含水量的特点使其成为微生物的天然培养基,且草莓表面凸凹,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^[8],微生物的大量附着且较难清洗干净增加了其食用风险。在欧盟HACCP体系中草莓表面致病微生物的监测是其关键控制点,国际食品法典对多种生食果蔬微生物的检测方法及限量进行了规定,速冻草莓相关检测也在其中,且鲜果草莓微生物检测也进入国际标准化优先名录^[9]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为条件致病菌,可引成人及免疫力低下婴幼儿起呕吐、腹泻、头痛等症状^[10],且极易产生耐药性,是人和动物常见的感染菌^[10-13]。此菌生长温度范围较宽,该菌具有4℃不生长而在42℃可以生长的特点^[9],这一特点可以用来对其进行选择性

收稿日期:2017-07-26

基金项目:农业部农产品风险评估专项(GJFP2017013)。

作者简介:魏超,女,助理研究员,主要从事微生物的检测及相关风险评估方面的研究。

培养。黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)属于肠杆菌科沙雷菌属,一般见于水、土壤、腐烂的蔬菜、肉和淀粉丰富的食品上,是住院病人重要条件致病菌^[10],可引起败血症和尿道感染^[14-15],黏质沙雷氏菌在普通营养琼脂培养基上可以产生灵菌红素(prodigiosin)和吡啶酸(pyrimine)两种不同的色素,最适的生长温度37~40℃,NaCl水溶液质量浓度0~7g/L^[13]。本实验根据两种微生物的特性设计分离方法,采用MALDI-TOF MS对分离的黏质沙雷氏菌和铜绿假单胞菌进行鉴定和蛋白质图谱特异性筛选,旨在对草莓的食用风险分析、卫生事件溯源及农产品微生物检测方法优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

草莓50份,基地样品25份,采自成都的新津、大邑、双流、郫县、天府新区25个草莓基地;超市及菜市场样品25份,采自成都5个超市和8个菜市场,抽样方式离散型随机分布,基本覆盖成都城区。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、营养琼脂、铜绿假单胞菌杆菌显色培养基、四硫磺酸盐煌绿增菌培养基(tatrathionate broth, TTB),北京陆桥生物技术有限公司;乙腈、乙醇,均为色谱纯,美国Fisher Scientific公司;甲酸,色谱纯,美国Tedia公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸(2-cyano-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid, CHCA),美国Sigma公司;实验用水均为去离子水;生理盐水、ID 32 E 肠杆菌科微生物鉴定试剂条,生物梅里埃公司。

1.2 仪器与设备

AXIMA Confidence型MALDI-TOF MS仪,日本岛津公司;ATB微生物鉴定仪、比浊仪,生物梅里埃公司;DHP-9082型生化培养箱,宁波东南生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 铜绿假单胞菌与黏质沙雷氏菌的分离

铜绿假单胞菌分离:称取25g样品,225mL BPW均质后36℃培养18h,取1mL BPW增菌液于TTB中42℃选择性增菌培养24h,增菌液划线于铜绿假单胞菌显色平板36℃培养24h,选取表现阳性菌划线于营养琼脂培养基,36℃培养24h后进行质谱鉴定和生化鉴定。

黏质沙雷氏菌分离:称取25g样品于225mL无

菌水中均质,40℃培养16h,取0.25mL涂布于营养琼脂培养基,38℃培养24h,对红色或粉色菌落进行营养琼脂纯化,36℃培养24h后进行质谱鉴定和生化鉴定。

1.3.2 微生物的生化鉴定

挑取1.3.1节纯化单菌落至生理盐水电浊管中,在比浊仪调至0.5麦氏浊度(梅里埃标准管校正),用移液器移取55 μ L至ID 32 E试剂条样杯中,36℃培养24h后由ATB微生物检定仪读出鉴定结果。

1.3.3 MALDI-TOF MS鉴定与相关分析

用10 μ L接种环取2个单菌落菌量加入1.0mL φ (乙醇)=70%的水溶液 φ (乙醇)=70%的溶液中,震荡30s,离心1min弃上清液,加入 φ (乙醇)=75%的水溶液75 μ L震荡20s,常温40kHz超声10min,加入75 μ L乙腈震荡均匀,离心1min取上清液1 μ L点至靶板,加入1 μ L CHCA,晾干。

质谱条件:检测器线性模式-电子倍增管(multiple dynode),MALDI离子源,正离子模式固定聚焦337nm,激光束能频75~80Hz,收集范围 m/z 2000~20000u,每样品收集200次峰叠加,校准品为ATCC 8739大肠杆菌。

数据分析:收集质谱图谱导入MALDI SARAMIS微生物鉴定系统中指纹数据库与数据库的标准谱图进行多重比较,采用SARAMIS Premium软件中的Superpectrum和Taxonomy的进行标记峰足迹图绘制、标识峰整理与微生物聚类分析。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌的分离与鉴定

在50个草莓样品中9份样品分离到铜绿假单胞菌,检出率为18%;10份样品中检测到黏质沙雷氏菌,检出率20%。生化鉴定结果见表1,质谱见图1,质谱鉴定结果与生化鉴定结果一致,可以验证质谱鉴定准确性。实验结果显示铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌在草莓中检出率较高,且检出结果仅与草莓成熟程度有关,与样品取样地点无关,表明这两种条件致病菌是草莓表面的常见微生物。

2.2 铜绿假单胞菌的MALDI-TOF MS相关分析

9份草莓中分离的铜绿假单胞菌的质谱足迹图显示小分子量区域的标识峰较密集,随着分子量增大,识别标识峰逐渐减少。分离的铜绿假单胞菌足

表1 铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌生化鉴定结果

Tab. 1 Biochemistry map of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in strawberry

生化项目	实验结果		生化项目	实验结果	
	铜绿假单胞菌	黏质沙雷氏菌		铜绿假单胞菌	黏质沙雷氏菌
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>
ODC(鸟氨酸脱羧酶)	+	+	SAC(蔗糖)	-	+
ADH(精氨酸双水解酶)	+	-	LARA(L-阿拉伯糖)	-	-
LDC(赖氨酸脱羧酶)	-	+	DARL(D-阿拉伯醇)	-	-
URE(尿素酶)	-	+	α GLU(α -葡萄糖苷酶)	-	+
LARA(L-阿拉伯醇)	+	-	α GAL(α -半乳糖苷酶)	-	-
GAT(D-半乳糖酸盐同化)	-	+	TRE(D-海藻糖)	-	+
5KG(5-酮基-葡萄糖酸钠)	-	+	RHA(L-鼠李糖)	-	-
LIP(酯酶)	-	-	INO(肌醇)	-	+
RP(酚红)	-	+	ADO(侧金盏花醇)	-	+
β GLU(β -葡萄糖苷酶)	-	+	PLE(古老糖)	-	-
MAN(D-甘露醇)	-	+	β GUR(β -葡萄糖醛缩酶)	-	-
MAL(D-麦芽糖)	-	+	CEL(D-纤维二糖)	-	-
IND(吲哚)	-	-	SOR(D-山梨醇)	-	+
β NAG(β -氨基乙酰葡萄糖胺)	-	+	α MAL(α -麦芽糖苷酶)	-	-
β GAL(半乳糖苷酶)	-	+	MNT(丙二酸盐)	+	-
GLU(D-葡萄糖)	+	+	AspA(L-天门冬素芳胺酶)	-	-

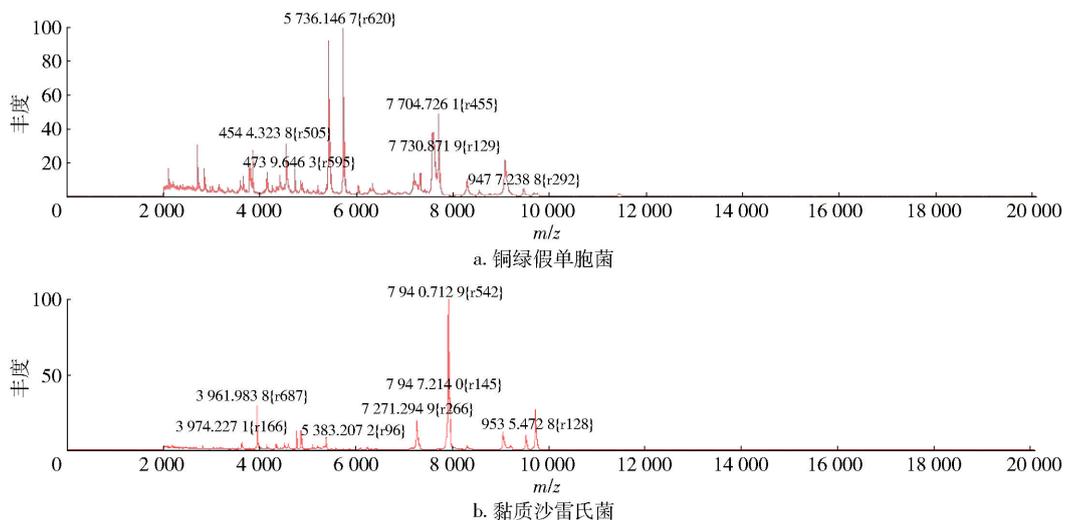


图1 微生物鉴定质谱

Fig. 1 Microorganism masspectrum of MALDI-TOF MS

迹图表明,鉴定同为一种菌,同种处理方法下标识峰数目和轨迹仍差异较大。对9份铜绿假单胞菌的所有标识峰进行拟合运算, $m_i(1 \pm 0.08\%)$ 内被认定为同个标识峰,铜绿假单胞菌共有标识峰12组见图2,认定为草莓铜绿假单胞菌的特征标识峰。

对分离的铜绿假单胞菌标识峰进行聚类分析,

分析图谱见图3a,以标识峰为测量点在用马氏算法计算微生物之间的距离时,默认权重 $W_i(i=1,2,3 \dots p)$,为标识峰分子量的倒数,对12组特征峰进权重 W 乘以自然常数 e 以增加权重,重新计算聚类分析图谱见图3b,由图可以看出对特征峰进行加权后样品间的相关位置有一定变化,相关系数有所提高,

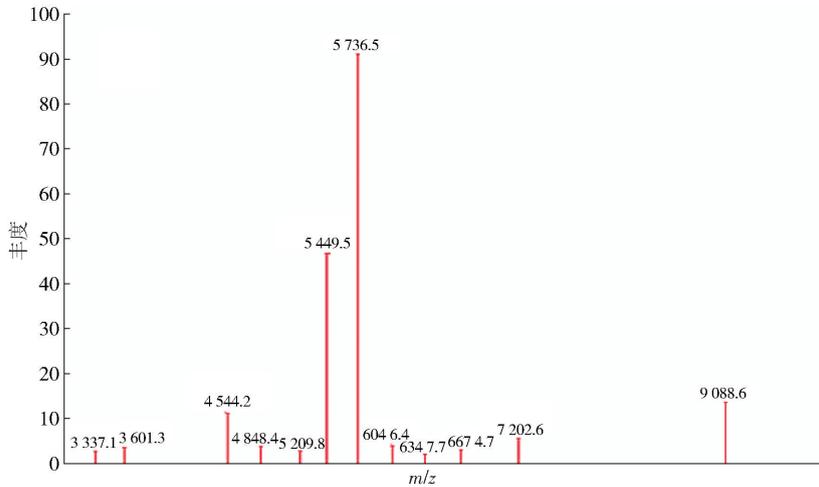


图2 铜绿假单胞菌特征标识峰质谱

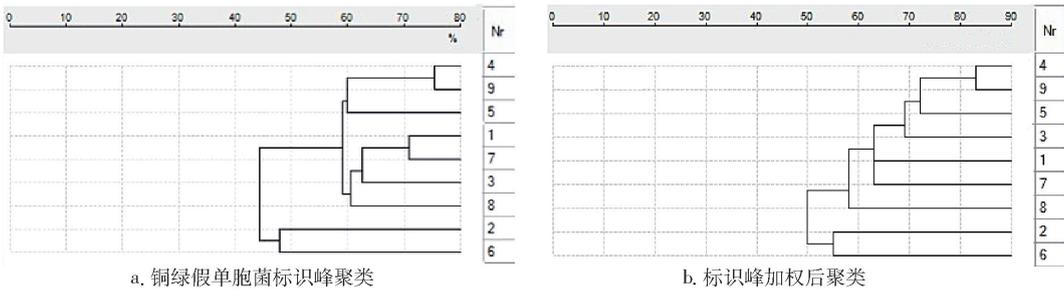
Fig. 2 *Pseudomonas aeruginosa* characteristic peaks of MALDI-TOF MS mass spectrum

图3 铜绿假单胞菌 MALDI-TOF MS 聚类分析

Fig. 3 *Pseudomonas aeruginosa* cluster dendrogram by MALDI-TOF MS

但一级分支位置基本没变,4号和9号相关系数最高,表明两株铜绿假单胞菌种间差异小,经调查2份样品来自基地,且基地位置毗邻。

2.3 黏质沙雷氏菌的 MALDI-TOF MS 相关分析

草莓分离的黏质沙雷氏菌的质谱图见图1b,对分离10份样品黏质沙雷氏菌进行全标识峰拟

合运算,同株标识峰范围为 $m_i(1 \pm 0.08\%)$,10株黏质沙雷氏菌共有8组完全拟合的特征峰(见图4),对分离的10株黏质沙雷氏菌进行全标识峰进行聚类分析,见图5a,其中5号和10号、6号和9号、1号和8号黏质沙雷氏菌在一级分支中,但其相关系数均小于60%,对特征峰进行加权后重新

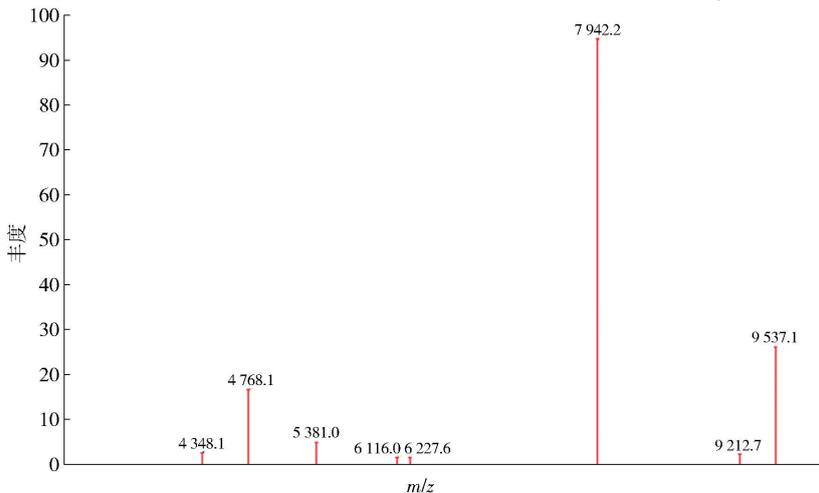


图4 黏质沙雷氏菌特征标识峰质谱

Fig. 4 *Serratia marcescens* characteristic peaks of MALDI-TOF MS

聚类,见图 5b,聚类结果可见一级分支中 6 号和 2 号黏质沙雷氏菌的相关位置发生改变,且相关系数提高到大于 90%,其余一级分支的相关系数也有提高,经溯源 6 号和 2 号分离草莓来自同一市场

不同摊位,1 号和 8 号分离草莓样品为毗邻基地样品。可见 MALDI-TOF MS 可以用来微生物的溯源和种间特征性分析,但若提高其准确性,还需要进一步优化数据库。

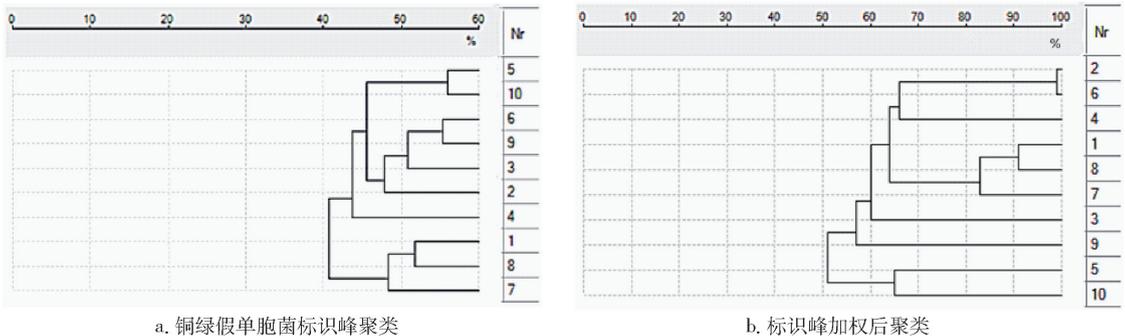


图 5 黏质沙雷氏菌聚类分析树状图

Fig. 5 *Serratia marcescens* cluster dendrogram by MALDI-TOF MS

3 结论

草莓中微生物群落较多样^[16-17],铜绿假单胞菌分离方法的设计是根据铜绿假单胞菌 42 ℃ 可以生长的特点,其中连四硫磺酸阴离子可抑制大肠菌群,且显色培养基可以分辨铜绿假单胞菌,该分离方法对草莓中铜绿假单胞菌有较好的分离效果;黏质沙雷氏菌分离方法设计是根据沙雷氏菌对营养要求低,可以在水中生存营养琼脂培养基上产色素的特点设计,实验中分离多种沙雷氏菌,经质谱鉴定黏质沙雷氏菌的检出率最高。

MALDI-TOF MS 对草莓中纯化的微生物有很好的识别率,经生化试验验证,鉴定完全一致,但质谱图谱给予微生物蛋白质的信息量较高,可用于溯源分析等相关应用,但提高其准确性还需要进一步优化数据库。MALDI-TOF MS 为开放平台,可对于农产品中复杂且有一定特性的微生物种类进行记录,寻找其中特征性规律,便于对农产品微生物进行监测和研究。

参考文献:

[1] RICHARD J S. Proteins and proteomics; a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

[2] 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.

- [3] HUMPHERY S I, HECKER M. Microbial proteomics: functional biology of whole organism[M]. Hoboken: John Wiley and Sons, 2006.
- [4] MARTINY D, BUSSON L, WYBO I, 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] WIESER A, SCHNEIDER L, JUN J J, et al. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics: identification of microorganisms and beyond [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 93(3): 965 - 974.
- [6] HSIEHS Y, TSENG C L, LEE Y S, et al. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS [J]. Molecular & Cellular Proteomics Mep, 2008, 7(2): 448.
- [7] 雷世俊, 赵英兰. 草莓种好不难 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [8] GERALD M S, JAMES R G, YOUSEF A E. Microbiology of fruits and vegetables [M]. CRC: Taylor & Francis, 2011.
- [9] FORSYTHE S J. Microbiological risk assessment of food [M]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2002.
- [10] 柳增善, 任洪林, 孙鸿斌. 食品病原微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [11] LIU Z S, REN H L, SUN H B. Food pathogenic microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007.
- [11] FALAGAS M E, KOPTERIDES P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*

- and *Pseudomonas aeruginosa*; a systematic review of the literature[J]. The Journal of Hospital Infection, 2006, 64(1): 7-15.
- [12] DONG L, YIN Q S, SHI B, et al. Multidrug-resistant of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* [J]. Chinese Journal of Clinical Healthcare, 2013(6): 227-228.
- [13] 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 H, CHEN C Z, ZHANG X J. Pathogenic bacteria of *Enterobacteriaceae* [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2011.
- [14] PASSARO D J, WARING L, ARMSTRONG R, et al. Postoperative *Serratia marcescens* wound infections traced to an out-of-hospital source [J]. Journal of Infectious Diseases, 1997, 175(4): 992-995.
- [15] MARAGAKIS L L, WINKLER A, TUCKER M G, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Serratiamarcescens* infection in a neonatal intensive care unit [J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2008, 29(5): 418-423.
- [16] 魏超, 郭灵安, 代晓航, 等. 草莓表面典型微生物鉴定 16S rDNA 同源性分析及附着能力研究(II) [J]. 西南农业学报, 2017, 30(3): 650-653.
WEI C, GUO L A, DAI X H, et al. Research on the homology and adhesion of typical microorganisms on the surface of strawberry(II) [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(3): 650-653.
- [17] 魏超, 郭灵安, 代晓航, 等. 草莓表面典型微生物鉴定 16s rDNA 同源性分析及附着能力研究(I) [J]. 西南农业学报, 2016, 29(12): 2939-2943.
WEI C, GUO L A, DAI X H, 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): 2939-2943.

Research on Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in Strawberry by MALDI-TOF MS

WEI Chao, DAI Xiaohang, GUO Ling'an, LIU Wei

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

Abstract: To evaluate the value of MALDI-TOF MS for the risk monitoring of microorganism in strawberry and determine the hazards identification microorganism and their characteristics. *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* were isolated from 50 strawberry samples by the selective culture method. The matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method was adopted to identify the microorganisms and SARAMIS Premium software was used to analyze and modify the protein mass spectrum of the two microorganisms by weighting. The results showed that the detection rate of *Pseudomonas aeruginosa* in strawberry was 18% and that of *Serratia marcescens* was 20%. About 12 characteristic peaks of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from strawberry completely fitted, and cluster analysis of identified peaks indicated that there were significant differences between the isolated *Pseudomonas aeruginosa*. There were 8 completely fitted characteristic peaks of *Serratia marcescens* isolated from strawberry, and weighted clustering results of the identified peaks confirmed that the two isolated *Serratia marcescens* were homologous. The MALDI-TOF MS method can identify the specific characteristics of the protein isolated from strawberries and complicated microbial environment of agricultural products.

Keywords: MALDI-TOF MS; strawberry; *Pseudomonas aeruginosa*; *Serratia marcescens*; identified peak