

- [12] 林荣溪,陈磊,谢承昌,等. 福建乌龙茶稀土来源初探[J]. 中国茶叶,2010,32(11):10-11.
- [13] 汪东风,赵贵文,叶盛. 茶叶中稀土元素的组成及存在状态[J]. 茶叶科学,1999,19(1):41-46.
- [14] 杨秀芳,孔俊豪,赵玉香,等. 不同稀土含量水平茶叶中稀土浸出率研究[J]. 中国茶叶加工,2012(1):14-17.
- [15] 朱为方,徐素琴,邵萍萍,等. 赣南稀土区生物效应研究——稀土日允许摄入量[J]. 中国环境科学,1997,17(1):63-66.
- [16] 杨秀芳,徐建峰,翁昆,等. 茶树成熟新梢不同部位元素含量研究[J]. 中国茶叶加工,2008(3):18-20.
- [17] 郭俊明,杜瑛. 植物体中稀土元素的含量分布及其某些影响因素(续完)[J]. 四川稀土,1996(1):10-12.
- [18] 陈照喜,王晓蓉,田笠卿,等. 土壤和茶树对稀土元素的富集作用[J]. 中国环境科学,1995,15(2):45-47.

风险监测

鉴定乳制品中厌氧芽胞杆菌的3种方法比较

刘慧玲,葛丽雅,吉彩霓,黄李华,洪小柳,黄欣迪,马淑棉,吕敬章

(深圳出入境检验检疫局 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室,广东 深圳 518045)

摘要:目的 鉴定乳制品中的革兰氏阳性厌氧芽胞杆菌。方法 采用生化鉴定、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定和16S rDNA测序三种方法,对乳制品中5株革兰氏阳性厌氧芽胞杆菌进行鉴定。结果 生化方法鉴定出3株菌,而飞行时间质谱鉴定和16S rDNA测序法对5株菌都给出了鉴定结果。3种方法仅对其中1株菌的鉴定结果一致;飞行时间质谱鉴定和16S rDNA测序的鉴定结果一致性程度高,共有4株菌的鉴定结果一致;而生化方法的鉴定结果与这两种方法差异较大。结论 飞行时间质谱鉴定和16S rDNA测序可作为生化方法的补充,用于革兰氏阳性厌氧芽胞杆菌的快速鉴定。

关键词:乳制品;厌氧芽胞杆菌;鉴定;16S rDNA测序;基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

中图分类号:R155.5;TS252.53;S852.61⁺6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0615-04
DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.024

Identification of anaerobic sporeforming *Bacillus* in dairy product by three methods

LIU Hui-ling, GE Li-ya, JI Cai-ni, HUANG Li-hua, HONG Xiao-liu, HUANG xin-di,
MA Shu-mian, LU Jing-zhang

(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen Key Laboratory of Detection
Technology R&D on Food Safety, Guangdong Shenzhen 518045, China)

Abstract: Objective To identify the anaerobic sporeforming *Bacillus* in dairy products. **Methods** Five strains of gram-positive anaerobic sporeforming *Bacilli* in dairy product were identified by three methods, including Biochemical identification, MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing techniques. **Results** The biochemical method could identify three strains, whereas MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing techniques could identify all five *Bacilli*. The three methods gave the same identification results on only one of the five *Bacilli*. By contrast, MALDI-TOF MS and 16S rDNA methods gave the same identification results on four of the five *Bacilli*, indicating that the two methods are highly identical in identifying the *Bacillus*. However, biochemical method had big variation in comparison with the other two methods. **Conclusion** MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing methods can be used as supplemental methods to the biochemical method in rapid identification of anaerobic sporeforming *Bacillus*.

Key words: Dairy product; anaerobic sporeforming *Bacillus*; identification; 16S rDNA sequencing; matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry

收稿日期:2014-04-25

基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20120618172144503);质检公益项目(201410025)

作者简介:刘慧玲 女 主管技师 研究方向为食品安全与检验 E-mail:hlliu2007@163.com

通讯作者:吕敬章 男 副主任医师 研究方向为食品安全与检验 E-mail:jz_lu@yahoo.com.cn

厌氧芽孢杆菌在自然界分布广泛,常存在于土壤、人和动物肠道以及腐败物中,多为腐物寄生菌。少数致病菌因能分泌外毒素和侵袭性酶类,引起人和动物致病,如破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)和艰难梭菌(*Clostridium difficile*)等。其中导致食物中毒的主要有产气荚膜梭菌和肉毒梭菌,大量的产气荚膜梭菌随食物进入肠道并产生肠毒素而引起中毒;食物中的肉毒梭菌在合适条件下繁殖产生肉毒毒素,人摄入肉毒素后可致肌肉麻痹,严重者可导致死亡。婴儿由于肠道菌群不健全,可因喂食被肉毒梭菌污染的食物而感染致病^[1]。致病性梭菌的传统鉴定方法主要包括细菌培养、生化鉴定以及检测毒素,对产气荚膜梭菌采用生化方法即可进行鉴定;而对于肉毒梭菌、艰难梭菌和破伤风梭菌,还需结合采用动物试验和细胞培养进行毒素检测。但这些试验操作繁琐,试验周期长,并且还有很多因素影响其结果的可靠性和重复性^[2]。目前国内外也报道了一些方法,如免疫学方法^[3]、PCR方法^[4]等用于致病性梭菌检测,但进出口乳制品的致病性梭菌检验需要更加快速和准确的方法,本文采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定、16S rDNA测序结合生化鉴定方法,对进口乳制品中分离得到的5株革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌的鉴定进行了比较研究,以期寻找快速检测致病性梭菌的准确方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

由本实验室在进口黄油、干酪、芝士等乳制品中自行分离得到的革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌5株,大肠埃希菌标准菌株(ATCC 8739)、产气荚膜梭菌标准菌株(ATCC 13124),均购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK[®] MS 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(法国 Biomerieux)、ATB[®] Expression 细菌快速鉴定仪(法国 Biomerieux)、3500 基因分析仪(美国 ABI)、Veriti[®] Thermal Cycler PCR 仪(美国 ABI)、MARKII 智能厌氧培养系统(荷兰 MARK)、KB240 恒温培养箱(德国 Binder)。

庖肉培养基、胰蛋白胍葡萄糖酵母浸膏肉汤(TPGYT)、厌氧卵黄琼脂均购自英国 Oxoid, RAPID ID 32 A 厌氧菌鉴定试剂盒、VITEK MS DS 靶板、MALDI 基质 CHCA 均购自法国 Biomerieux, 核酸提取试剂盒 PrepMan[®] Ultra kit、PCR 扩增试剂盒

rDNA FAST MicroSEQ[®] Identification Kit、PCR 产物纯化试剂盒 ExoSAP-IT[®] reagent、测序反应试剂盒 FAST MicroSEQ[®] Identification Kits、测序产物纯化试剂盒 EdgeBio Performa[®] DTR cartridge、POP-6[™] 性能优化高分子聚合物均购自美国 ABI。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离

按照 SN/T 2525—2000《食品中肉毒梭菌的 PCR 检测方法》进行^[5]。在 15 ml 灭菌后煮沸的庖肉培养基中接种样品 2 g, (35 ± 1) °C 厌氧培养 5 d, 同时在 TPGYT 中接种样品, (28 ± 1) °C 厌氧培养 5 d。吸取 2 ml 培养液, 加入等量过滤除菌的无水乙醇作用 1 h, 在厌氧卵黄琼脂上划线接种, (35 ± 1) °C 厌氧培养 48 h, 挑取可疑菌落进行革兰氏染色。

1.2.2 生化鉴定

用棉拭子挑取用血平板厌氧纯培养待测菌株的单个菌落, 制备浊度为 4 个麦氏单位的菌悬液, 将混匀的菌悬液接种在 RAPID ID 32 A 试剂条上, 置 (36 ± 1) °C 培养 4 h 后滴加辅助试剂, 放入 ATB[®] Expression 细菌快速鉴定仪自动判读。

1.2.3 MALDI-TOF MS 鉴定

挑取新鲜纯培养的待测菌株和作为校准菌株的大肠埃希菌标准菌株(ATCC 8739)的菌苔, 涂在 VITEK MS DS 靶板的相应孔位, 加 1 μl 试验标配基质 CHCA, 待干燥后放入 VITEK MS 进行检测。将待鉴定菌质谱图与 Saramis 数据库的质谱图进行比较、分析从而获得鉴定结果。

1.2.4 16S rDNA 测序鉴定

根据试剂盒说明书进行核酸提取、PCR 扩增、PCR 产物纯化、测序反应和测序产物纯化 5 个步骤, 最后取 10 μl 离心后液体加入 96 孔板中, 用 POP6 胶进行上机检测, 经 MicroSEQ[®] 软件分析获得鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 生化鉴定

乳制品中厌氧分离得到的 5 株菌, 染色显示为革兰氏阳性的芽孢杆菌, 其生化鉴定结果见表 1。RAPID ID 32 A 的厌氧菌鉴定, 鉴定百分率(% ID)是指不同菌类的比较, 越接近 100%, 鉴定结果越好; T 值代表同一菌类的相似程度, T 值越接近 1, 个体与总体越接近。对鉴定百分率 ≥ 80.0 及 T 值 ≥ 0 者, 才给出鉴定结果, 并按鉴定百分率和 T 值的大小对鉴定的可信度作出评价。5 株菌株中有 3 株给出了鉴定结果, 其中 26065 样品中分离的菌株鉴定

表1 乳制品中厌氧芽胞杆菌生化鉴定结果

Table 1 Dairy products of anaerobic *Bacillus* biochemical identification results

样品	鉴定分类	鉴定百分率/%	T值	鉴定评价
ATCC 13124	产气荚膜梭菌	99.9	0.91	极好的鉴定
26065	产气荚膜梭菌	99.9	0.61	非常好的鉴定
26252	双酶梭菌	87.4	0.50	好的鉴定
26253	拜氏/丁酸梭菌	89.4	0.92	可接受的鉴定
25736	—	—	—	不可接受的生化谱
25220	—	—	—	不可接受的生化谱

注:—为用该方法未能鉴定出结果

为产气荚膜梭菌,其可信度最高,样品 25736 和 25220 中分离的菌株,未给出鉴定结果。

2.2 MALDI-TOF MS 鉴定结果

MALDI-TOF MS 鉴定结果见表 2。MALDI-TOF MS 鉴定数据库软件的超级图谱和参考图谱都可以作为细菌鉴定依据,样品的质谱图首先会与数据库中的超级图谱进行比对,匹配率高于 70% 的给出鉴定结果,为一级鉴定水平;对匹配率低于 70% 的结果,则会与数据库中的参考图谱进行比对,为二级鉴定水平。匹配率在 50% 以上者,是可接受的鉴定结果。乳制品中分离的 5 株菌株中均给出了鉴定结果,其中 26065 样品中分离的菌株鉴定为产气荚膜梭菌,匹配率为 86%,为一级鉴定水平,质谱图见图 1,其他菌株的鉴定结果为二级鉴定水平。

表2 MALDI-TOF MS 鉴定结果

Table 2 Identification results of MALDI-TOF MS

样品	鉴定分类	匹配率/%
ATCC 13124	产气荚膜梭菌	88.0
26065	产气荚膜梭菌	86.0
26252	索氏梭菌	68.2
26253	艰难梭菌	55.6
25736	双酶梭菌	64.6
25220	双酶梭菌	52.0

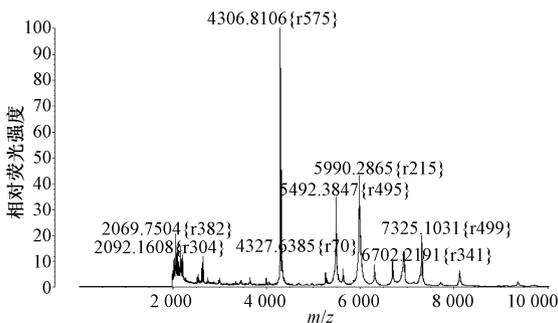


图1 26065 样品菌株的质谱图

Figure 1 MALDI-TOF MS results of sample 26065

2.3 16S rDNA 测序鉴定结果

16S rDNA 测序鉴定结果见表 3,分离的 5 株菌株均给出了鉴定结果,而且匹配率都在 99.5% 以上,其中 26065 样品中分离的菌株鉴定为产气荚膜梭菌,匹配率为 99.87%,测定的 16S rDNA 序列为:

AGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGT GCTTAACACATGCAAGTCCGAGCGATGAAGTTTCCTT CGGGAAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACcTGCCTCATAGAGTGAATAGCCTTC CGAAAGGAAGATTAATACCGCATAAGGTTGAAAGA TGGCATCATCATTCAACCAAAGGAGCAATCCGCTA TGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA CCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG AATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAA CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAG CTCTGTCTTTGGGAAGATAATGACGGTACCCAAGG AGGAAGCCACGGCT。

表3 16S rDNA 测序鉴定结果

Table 3 Results of 16S rDNA sequence

样品	鉴定分类	匹配率/%
ATCC 13124	产气荚膜梭菌	99.87
26065	产气荚膜梭菌	99.87
26252	索氏梭菌	99.60
26253	拜氏梭菌	99.81
25736	双酶梭菌	99.91
25220	双酶梭菌	99.57

2.4 3种鉴定方法结果比较

生化鉴定、MALDI-TOF MS、16S rDNA 测序 3 种方法鉴定结果的比较见表 4,3 种方法只对 26065 号样品中分离的菌株给出了相同的鉴定结果,均鉴定为产气荚膜梭菌。MALDI-TOF MS 与 16S rDNA 测序的鉴定结果比较接近,而与生化鉴定结果的区别较大。

表4 3种鉴定方法结果比较

Table 4 Results comparison of three identification methods

样品	生化鉴定	MALDI-TOF MS	16S rDNA 测序
ATCC 13124	产气荚膜梭菌	产气荚膜梭菌	产气荚膜梭菌
26065	产气荚膜梭菌	产气荚膜梭菌	产气荚膜梭菌
26252	双酶梭菌	索氏梭菌	索氏梭菌
26253	拜氏/丁酸梭菌	艰难梭菌	拜氏梭菌
25736	—	双酶梭菌	双酶梭菌
25220	—	双酶梭菌	双酶梭菌

注:—为用该方法未能鉴定出结果。

3 小结

近来研究发现, MALDI-TOF MS 将细菌蛋白质、脂类等成分离子化后,在时间飞行质谱仪中分析其质荷比,并以此作为生物标志分子实现对不同细菌属、种、亚种的快速区分和鉴定^[6]。已有研究将传统方法难以鉴别的梭菌如气肿疽梭菌 (*Clostridium chauwoei*) 和腐败梭菌 (*Clostridium septicum*) 成功进

行了鉴定^[7],但有试验证明^[8],同样条件下革兰氏阳性菌图谱的蛋白峰信号弱于革兰氏阴性菌。

另外,16S rDNA 近来也被用来作为细菌分类鉴定的重要依据^[9],而且应用越来越广泛^[10]。比如 MicroSEQ 快速微生物鉴定系统,对一些难以培养、生化鉴定无法确定细菌的鉴定能力甚至强于实验室常用的 Vitek、Rapid、API3 种自动细菌鉴定方法^[11],对于用 Phoenix 全自动细菌鉴定仪不能鉴定的一些细菌,该系统也能正确鉴定^[12]。

目前,食品微生物的 MALDI-TOF MS 标准蛋白质量指纹图谱数据库正在完善^[13-14],MicroSEQ 快速微生物鉴定系统的数据库不断升级,本文采用 MALDI-TOF MS 蛋白鉴定、16S rDNA 测序核酸鉴定和传统的生化鉴定 3 种方法,对乳制品中 5 株革兰氏阳性厌氧芽胞杆菌进行了鉴定。结果发现,生化方法只对其中的 3 株革兰氏阳性厌氧芽胞杆菌给出鉴定结果,而 MALDI-TOF MS 蛋白鉴定、16S rDNA 测序对乳制品中 5 株革兰氏阳性厌氧芽胞杆菌都给出了鉴定结果,后两种方法的鉴定结果比较匹配,特别是对生化方法无法确定的细菌也给出了明确且相同的结果,这与文献报道^[11]的一致,但本试验中并没有发现革兰氏阳性菌蛋白峰信号减弱的情况。

对于致病性梭菌的鉴定,MALDI-TOF MS 方法和 16S rDNA 测序方法,克服了动物试验和细胞培养试验周期长、重复性差的缺点,具有速度快、重现性好、准确性高的特点。可结合经典生化方法从蛋白、核酸和表型三个不同层面对菌株进行鉴定,作为致病性梭菌实际检测的重要依据。随着数据库的不断充实和完善,MALDI-TOF MS 鉴定和 16S rDNA 测序将是今后细菌分类与鉴定方法的重要发展方向。

参考文献

[1] 林修光,寇运同.肉毒梭菌与食物中毒[J].食品科学,2003,24(8):194-196.
 [2] 康琳,王景林.神经毒素检测技术的研究进展[J].军事医学科学院院刊,2008,32(4):386-388.
 [3] Scotcher M C, CHENG L W, CHING K, et al. Development and

characterization of six monoclonal antibodies to hemagglutinin-70 of *Clostridium botulinum* and their application in a sandwich ELISA[J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2013, 32(1):6-15.

- [4] Pradeep K M, June P, Clare F, et al. Detection limit of *Clostridium botulinum* spores in dried mushroom samples sourced from China [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(1):72-76.
 [5] 中华人民共和国厦门出入境检验检疫局. SN/T 2525—2000 食品中肉毒梭菌的 PCR 检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2000.
 [6] Fenselau C, Demirev P A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20(4):157-171.
 [7] Herrenthey G A, Maier T, Gessler F, et al. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. *Anaerobe*, 2008, 14(4):242-249.
 [8] Barbuddhe S B, Maier T, Schwarzet G, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17):5402-5407.
 [9] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1):143-169.
 [10] Pontes D S, Lima-Bittencourt C L, Chartone-Souza E, et al. Molecular approaches; advantages and artifacts in assessing bacterial diversity [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(7):463-473.
 [11] Woo P C, Ng K H, Lau S K, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5):1996-2001.
 [12] Fontana C, Favaro M, Pelliccioni M, et al. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 43(2):615-619.
 [13] Camara J E, Hays F A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(5):1558-1565.
 [14] Demirev P A, LIN J S, Pineda F J, et al. Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification; proteome-wide post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(19):4566-4573.