

使用 MALDI-8020 快速鉴定牛奶中微生物

MALDI-033

摘要：在微生物鉴定领域，与传统的平板计数法、生化反应法相比，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 法具有快速、准确、使用成本低、操作简便等特点。本文使用岛津 MALDI-8020 结合毅新博创微生物数据库，对牛奶中微生物进行了快速鉴定，检测到的微生物主要包括不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 牛奶中微生物 微生物鉴定

刚挤出的牛奶中含有的微生物较少，但储存条件、运输过程及管理不当等可能会引起微生物污染。如运输过程中没有保温措施使温度过高、储存容器不卫生、剧烈震荡等，都可能加速微生物的繁殖，从而导致牛奶变质。

牛奶会进入千家万户的餐桌，对牛奶中的微生物检测非常有必要。传统的牛奶微生物检测法有平板计数法、生化反应法、PCR 法、DNA 探针技术等。传统方法耗时较长，试剂耗材成本较高。基质辅助激

光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 作为近年兴起的微生物鉴定技术，鉴定过程耗时只需数分钟、日常使用成本低廉，已在临床及科研中得到广泛应用。

本文利用岛津台式飞行时间质谱 MALDI-8020，结合毅新博创微生物数据库，对牛奶中微生物进行快速鉴定。经过与数据库中的标准谱图对比，成功鉴定不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等，主要为有益微生物，结果与预期相符。



图 1 岛津台式飞行时间质谱 MALDI-8020

■ 实验部分

1.1 仪器及数据库

质谱仪：岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

数据库：毅新博创微生物鉴定平台 BE3.1.6.1

1.2 试剂与样品

样品：本次实验共测试牛奶样品培养得到的 16 个微生物，均采用固体培养基培养。

基质： α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA)，5 mg/mL。

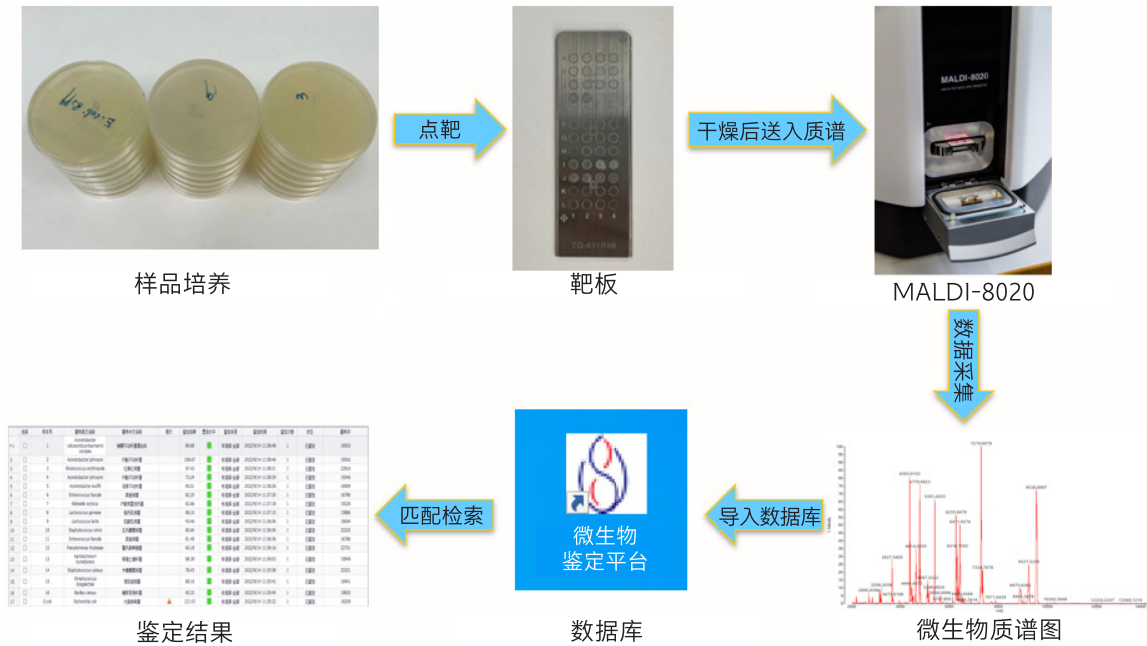


图2 牛奶中微生物鉴定流程图

1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8099 及 16 个样品，均采用乙醇甲酸提取法前处理。

1.3.1 乙醇甲酸提取法

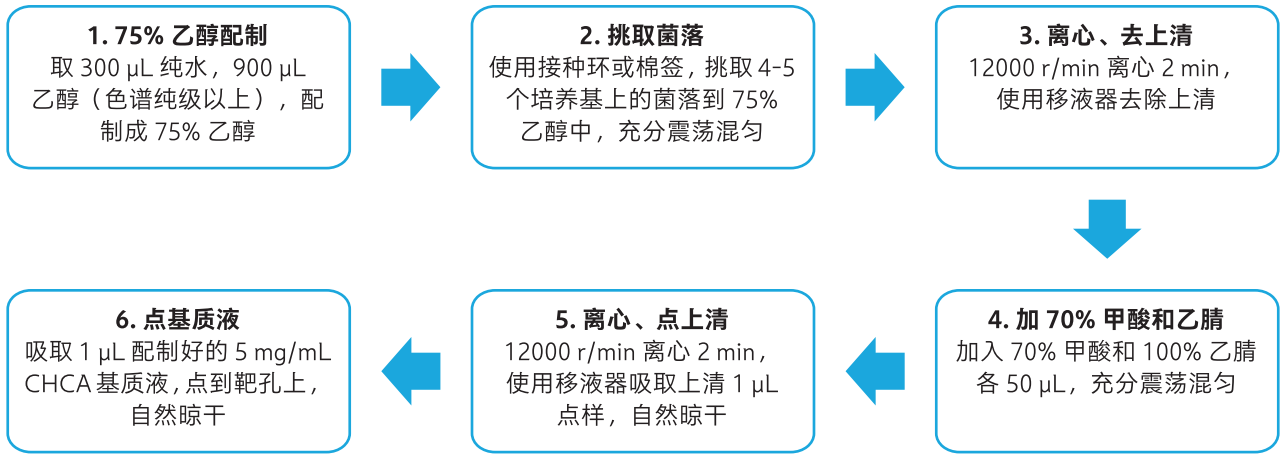


图3 乙醇甲酸提取法流程图

1.4 分析条件

- 调谐模式：Linear Positive
- 激光器：355 nm 固体激光器
- 扫描范围：m/z 2000-20000
- 激光频率：50 Hz
- 脉冲引出质量：8330 Da
- 激光能量：70-80

■ 结果与讨论

将样品前处理后进行质谱分析，使用 MALDI-8020 采集质谱图，将数据导入微生物数据库鉴定。标准菌株 ATCC 8099 及部分测试样品使用 MALDI-8020 采集的质谱图如下所示（图 4-7）。

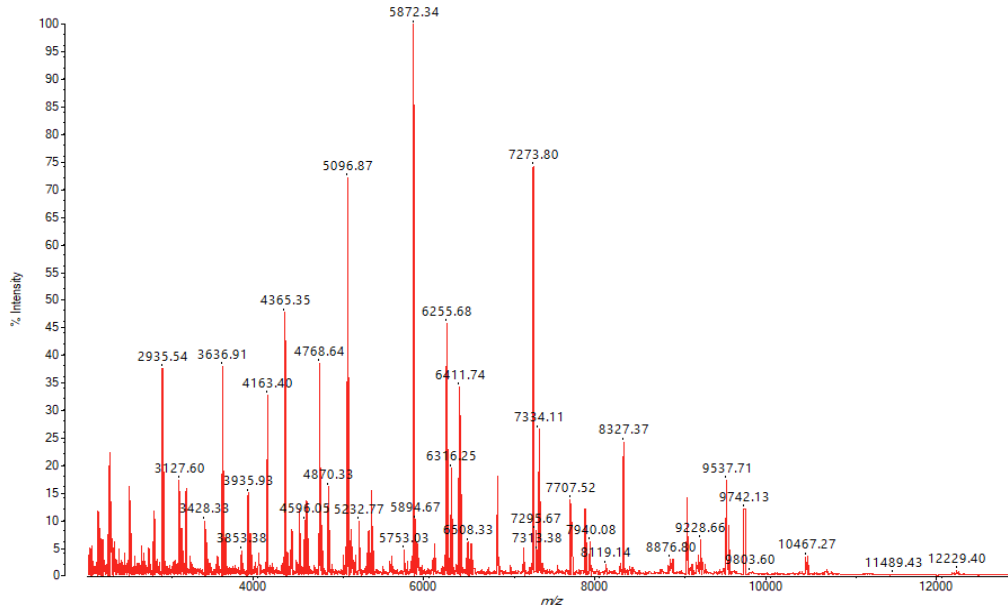


图 4 ATCC 8099 标准菌株的质谱图

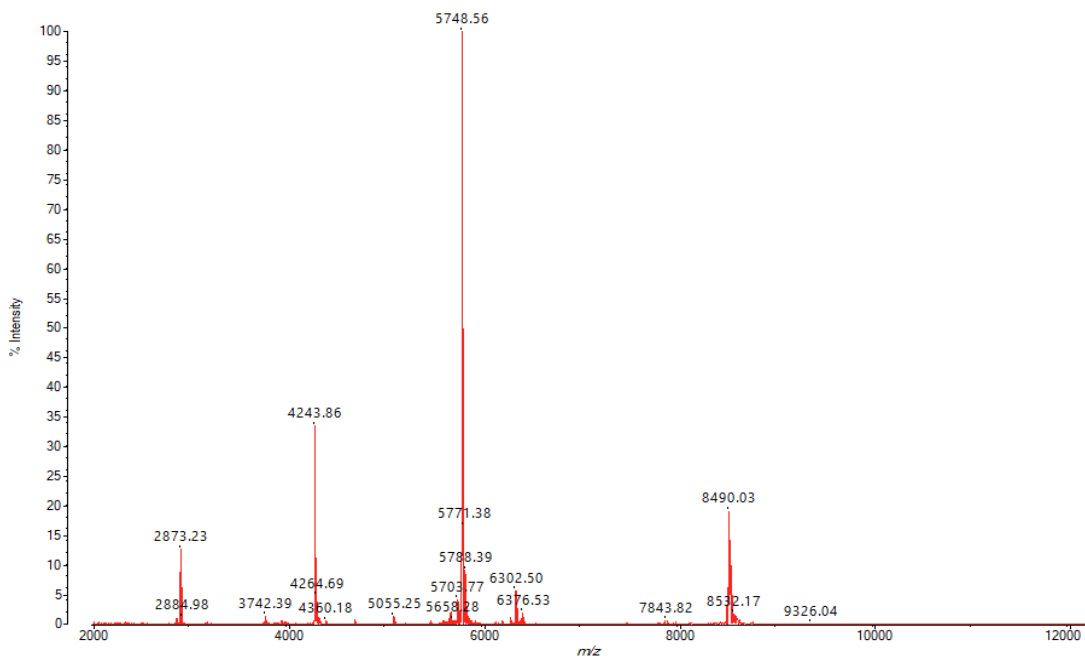


图 5 样品 1 的质谱图

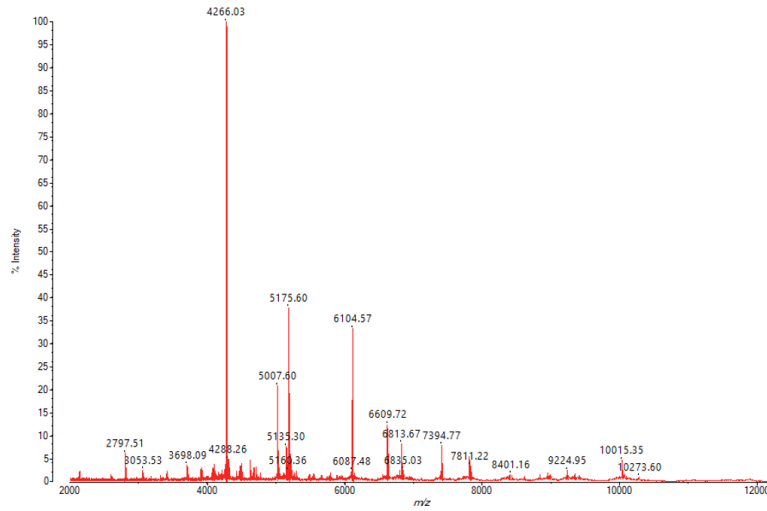


图 6 样品 2 的质谱图

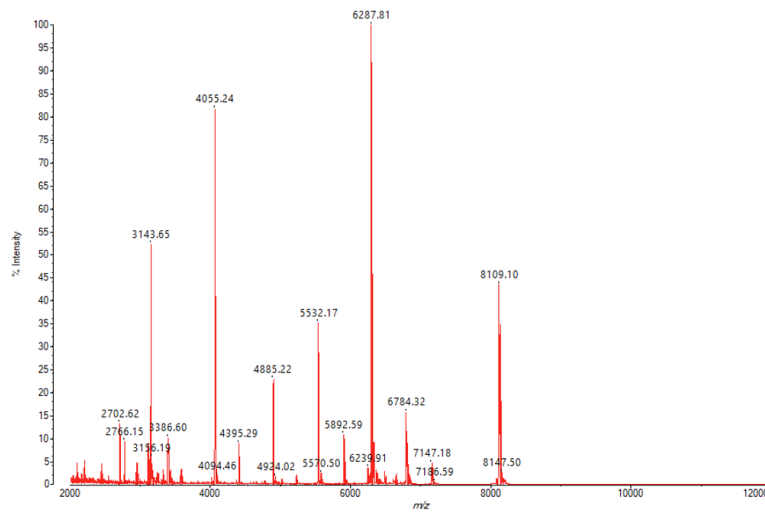


图 7 样品 3 的质谱图

选择	样本号	菌株英文名称	菌株中文名称	提示	鉴定结果	置信水平	鉴定来源	鉴定时间	鉴定次数	状态	菌株ID
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex	鲍曼不动杆菌复合体		89.68	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:48	1	已鉴定	19303
<input type="checkbox"/>	2	Acinetobacter johnsonii	约翰不动杆菌		109.67	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:46	1	已鉴定	19342
<input type="checkbox"/>	3	Rhodococcus erythropolis	红单红球菌		97.42	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:31	1	已鉴定	22816
<input type="checkbox"/>	4	Acinetobacter johnsonii	约翰不动杆菌		73.24	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:29	1	已鉴定	19346
<input type="checkbox"/>	5	Acinetobacter lwoffii	洛菲不动杆菌		90.51	■	标准库-全部	2022/9/14 11:38:26	1	已鉴定	16909
<input type="checkbox"/>	6	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		82.25	■	标准库-全部	2022/9/14 11:37:20	1	已鉴定	16786
<input type="checkbox"/>	7	Klebsiella oxytoca	产酸克雷伯氏菌		62.66	■	标准库-全部	2022/9/14 11:37:18	1	已鉴定	19226
<input type="checkbox"/>	8	Lactococcus garvieae	格氏乳球菌		68.10	■	标准库-全部	2022/9/14 11:37:15	1	已鉴定	15886
<input type="checkbox"/>	9	Lactococcus lactis	乳酸乳球菌		45.46	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:56	1	已鉴定	18064
<input type="checkbox"/>	10	Staphylococcus cohnii	孔氏葡萄球菌		80.64	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:54	1	已鉴定	23220
<input type="checkbox"/>	11	Enterococcus faecalis	粪肠球菌		81.48	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:36	1	已鉴定	16786
<input type="checkbox"/>	12	Pseudomonas rhodesiae	霍氏假单胞菌		60.18	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:16	1	已鉴定	22701
<input type="checkbox"/>	13	Agrobacterium tumefaciens	根癌土壤杆菌		68.39	■	标准库-全部	2022/9/14 11:36:03	1	已鉴定	19549
<input type="checkbox"/>	14	Staphylococcus xylosus	木糖葡萄球菌		78.43	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:58	1	已鉴定	23331
<input type="checkbox"/>	15	Streptococcus dysgalactiae	停乳链球菌		68.16	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:42	1	已鉴定	16941
<input type="checkbox"/>	16	Bacillus cereus	蜡样芽孢杆菌		65.33	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:40	1	已鉴定	19820
<input type="checkbox"/>	E.coli	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	121.43	■	标准库-全部	2022/9/14 11:35:22	1	已鉴定	18209

图 8 数据库检索结果界面

质谱数据经软件处理后，导入数据库检索（图8）。数据库鉴定结果置信度阈值为25，高于25即为阳性结果。经鉴定16个样品均为阳性结果，详细鉴定结果见表1。

牛奶中的微生物主要分为病原微生物、有害微生物和有益微生物。病原微生物，如沙门氏菌、布氏杆菌、阪崎杆菌等不会影响牛奶品质，但是会引起人体疾病。有害微生物如假单胞菌，不会引起人体疾病，却会引起牛奶变质的腐败菌。有益微生物是指能对肠道代谢起有效调节作用的菌群，如乳酸菌、链球菌、乳杆菌、大肠菌群等。本次实验牛奶中检测到的微生物主要为不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等有益微生物，以及可能引起牛奶变质的假单胞菌，未检测到强致病性的沙门氏菌、布氏杆菌等病原微生物。

表1 牛奶中微生物鉴定结果

菌株编号	鉴定菌种名称		鉴定得分
	英文名	中文名	
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex</i>	鲍曼不动杆菌复合体	89.68
2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	约翰不动杆菌	109.67
3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	红串红球菌	97.42
4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	约翰不动杆菌	73.24
5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	洛菲不动杆菌	90.51
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	82.25
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	产酸克雷伯氏菌	62.66
8	<i>Lactococcus garvieae</i>	格氏乳球菌	68.10
9	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌	45.46
10	<i>Staphylococcus cohnii</i>	孔氏葡萄球菌	80.64
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	81.48
12	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	霍氏假单胞菌	60.18
13	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	根癌土壤杆菌	68.39
14	<i>Staphylococcus xylosus</i>	木糖葡萄球菌	78.43
15	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	停乳链球菌	68.16
16	<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	65.33
ATCC8099	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	121.43

■ 结论

本文采用岛津公司台式飞行时间质谱MALDI-8020，结合毅新博创微生物数据库，快速准确鉴定牛奶中的微生物菌群，本次实验检测到的微生物为不动杆菌、乳酸菌及大肠菌群等。MALDI-TOF 指纹图谱法高效、灵敏、快速、操作简便，是微生物鉴定的有力分析方法。

岛津应用云

