

冲调谷物制品污染菌相的调查分析

杨嘉^{1*}, 丁娟芳², 何旭东¹, 周元元¹, 王帅¹, 朱庆丽¹, 吕晴³

(1. 扬州市食品药品检验检测中心, 扬州 225000; 2. 扬州市职业大学生物与化工工程学院, 扬州 225009;
3. 扬州大学食品科学与工程学院, 扬州 225000)

摘要: 目的 研究冲调谷物制品中的微生物污染情况及主要污染菌种类, 探讨传统形态学鉴定法、分子生物学鉴定法和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)鉴定微生物的适用效果。**方法** 以流通领域抽取的冲调谷物制品为研究对象, 采用 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》和 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》对其菌落总数和霉菌进行计数, 分离纯化不合格产品中的污染菌, 以 MALDI-TOF-MS 结合 16S rRNA 序列分析方法对污染细菌进行鉴定, 以 MALDI-TOF-MS 方法结合传统形态学鉴定方法对污染霉菌进行鉴定。**结果** 110 批次冲调谷物制品的菌落总数不合格率为 3.6%, 霉菌计数不合格率为 4.5%; 分离得到的 159 株细菌可归于 28 个种, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌为优势菌群, 分离频率达到 71.7%; 分离得到的 98 株霉菌可划分至 25 个属, 青霉属(*Penicillium*)和曲霉属(*Aspergillus*)为优势菌群, 分离频率分别为 12.4%和 7.1%。污染菌中含有克罗诺杆菌(*Cronobacter*)等条件致病细菌和多种常见产毒真菌, 存在一定的食品安全风险。**结论** 冲调谷物制品的微生物污染情况较为严重。生产企业应重视生产加工过程中的微生物污染问题, 相关部门应加强对冲调谷物制品的食品安全监管。MALDI-TOF-MS 方法在鉴定细菌时具有较大优势, 受限于真菌数据库的不足, 其用于食品来源霉菌鉴定的准确率有待提高。

关键词: 冲调谷物制品; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 污染菌相; 鉴定

Investigation and analysis of contaminated microflora in reconstituted cereal products

YANG Jia^{1*}, DING Juan-Fang², HE Xu-Dong¹, ZHOU Yuan-Yuan¹, WANG Shuai¹,
ZHU Qing-Li¹, LV Qing³

(1. Yangzhou Center for Food and Drug Control, Yangzhou 225000, China; 2. College of Biological and Chemical Engineering, Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou 225009, China; 3. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

ABSTRACT: Objective To understand the microbial contamination and main types of contaminating microorganisms in the reconstituted cereal products, and explore the applicable effects of traditional morphological identification, molecular biology identification and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in identifying microorganisms. **Methods** The total bacterial colonies and moulds of

基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ204139)、扬州市职业大学“优秀青年骨干教师”培养项目(2021)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan Project of Market Supervision Administration of Jiangsu Province (KJ204139), and Excellent Youth Backbone Teachers of Yangzhou Polytechnic College Project (2021)

*通信作者: 杨嘉, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物学。E-mail: jiajia82112001@163.com

*Corresponding author: YANG Jia, Master, Senior Engineer, Yangzhou Center for Food and Drug Control, Linjiang Road, No.205, Guangling District, Yangzhou 225000, China. E-mail: jiajia82112001@163.com

the reconstituted cereal products extracted from the circulation field were detected according to GB 4789.2—2016 *National food safety standard-Food microbiological examination-Aerobic plate count* and GB 4789.15—2016 *National food safety standard-Food microbiological examination-Enumeration of moulds and yeasts*. The contaminated microorganisms in the unqualified products were isolated and purified, bacteria were identified by MALDI-TOF-MS and sequence analysis of 16S rRNA, moulds were identified by MALDI-TOF-MS and traditional morphological identification methods. **Results** The unqualified rate of the total bacterial colonies of 110 batches of reconstituted cereal products was 3.6%, and the unqualified rate of moulds count was 4.5%; the isolated 159 strains of bacteria could be classified into 28 species, among which *Bacillus* were the dominant bacterial group, with the isolation frequency at 71.7%; 98 strains of moulds could be classified into 25 genus, among which *Penicillium* and *Aspergillus* were the dominant mould groups, with the isolation frequency 12.4% and 7.1%. The contaminated bacteria contained some conditional pathogenic bacteria such as *Cronobacter* and common toxin-producing fungi, which posed a certain food safety risks. **Conclusion** The microbial contamination of the reconstituted cereal products is serious. Production enterprises should pay attention to the microbial pollution in the production and processing process, and relevant departments should strengthen the food safety supervision of the reconstituted cereal products. MALDI-TOF-MS method has great advantages in identifying bacteria, but due to the deficiency of fungal database, its accuracy in identifying molds from food sources needs to be improved.

KEY WORDS: reconstituted cereal products; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; contaminated microflora; identification

0 引言

冲调谷物制品是指以谷物或其他淀粉质类原料为主,添加或不添加辅料,经熟制和/或干燥等工艺加工制成,直接冲调或冲调加热后食用的食品,包括麦片、芝麻糊、莲子羹、藕粉、杂豆糊、粥等。冲调谷物制品的生产环境参差不齐,产品原料构成复杂,生产工艺中往往不涉及独立的杀菌工序,这些因素易导致产品的菌落总数、霉菌计数等微生物指标不合格,同时也加大了该类产品的潜在食用风险^[1]。近年来的食品安全抽检上报数据中,冲调谷物制品的微生物不合格项目占比一直居高不下^[2],微生物及相关生物毒素的污染情况是该类产品的重点监测内容^[3-4],但目前对冲调谷物制品中污染菌相及其风险分析的研究鲜有报道。

微生物污染是影响食品安全和卫生的重要因素,对污染菌进行分离鉴定是对微生物进行危害风险识别的基础。传统微生物鉴定方法主要依赖于形态学及生理生化反应,操作烦琐且耗时较长,由此衍生出的各类自动生化鉴定系统也较难覆盖工作中的所有微生物^[5-6]。现代分子生物学鉴定方法可通过测序获得目标微生物的基因序列信息以确定微生物的种属,如 16S rRNA 和 rDNA 基因内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)分析作为“金标准”已广泛应用于微生物的鉴定^[7-8]。分子生物学鉴定方法相对传统方法大大提高了鉴定的灵敏度和时效性,但操作人员的技术要求和检测成本也相应提高。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization

time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的通过对微生物特征蛋白质指纹图谱从而对微生物进行快速区分和鉴定的一种新技术^[9-10],该技术具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点,现已成功运用于各种细菌和临床真菌的鉴定^[11-13],但其对非临床真菌的鉴定效果还有待进一步确认。本研究对流通环节随机抽取的冲调谷物制品进行菌落总数和霉菌项目检验,从不合格样品中分离、纯化污染菌菌株,采用 MALDI-TOF-MS、分子生物学方法和传统形态学鉴定方法对主要污染菌菌相进行调查与分析,探讨不同鉴定方法的优势、特点和适用性,以期对冲调谷物制品的食品安全监管及生产管理改进提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

在扬州市全域范围内的超市、批发市场、农贸市场等流通领域按随机抽样方式抽取 110 批次冲调谷物制品,其中麦片类产品 43 批次,藕粉类产品 38 批次,芝麻糊类产品 17 批次,其他类产品 12 批次。同品牌同批次样品仅抽取一次,采样方案为三级采样方案(参考 GB 4789.1—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》)。

1.1.2 培养基与试剂

平板计数琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(广东

环凯微生物科技有限公司); KOD FX DNA 聚合酶(1.0 U/ μ L, 日本 TOYOBO 公司); DNA 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司); PCR 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 ACS 恩科化学公司); 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 三氟乙酸乙腈水溶液(50:2.5:47.5, *V:V:V*)(色谱纯, 美国 Honeywell 公司); 基质溶液(α -氰基-4-羟基肉桂酸, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)(德国 Bruker 公司)。

1.2 仪器与设备

AL104 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; SQ510C 灭菌锅(日本 YAMATO 公司); BIO II ADVANCE PLUS 4 生物安全柜(西班牙 Telstar 公司); SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); SPX-250B-Z 生化培养箱、MJX-250B-Z 霉菌培养箱(上海博讯实业有限公司); Microflex LT/SH 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司); ECLIPSE 生物显微镜(日本尼康公司); FC-08 拍打式均质器(杭州赛普科学仪器有限公司); 9700 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪(美国 ABI 公司); DYY-8C 电泳仪、WD-9413B 凝胶成像分析仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌落总数和霉菌计数

菌落总数按照 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》进行检测, 霉菌计数按照 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》进行检测。

1.3.2 污染菌株的分离和纯化

挑取 1.3.1 中不合格样本检测平板上的细菌和霉菌单菌落, 分别接种平板计数琼脂和马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 纯化后按照 1.3.3 方法进行鉴定。挑取单菌落时选择单份样品中同稀释度菌落数之和最接近 20 CFU 的平皿, 选取 20~30 个不同类型的典型菌落进行分离, 样品最低稀释度菌落数之和均少于 20 CFU 的全部挑取。

1.3.3 菌种鉴定

分离得到的污染菌株均活化 2 代后进行鉴定。细菌菌株 36 °C 培养后以 MALDI-TOF-MS 方法和分子生物学方法(16S rRNA 序列分析)进行鉴定, 霉菌菌株 28 °C 培养后以传统鉴定方法(形态学鉴定)和 MALDI-TOF-MS 方法进行鉴定。

(1)MALDI-TOF-MS 鉴定方法

甲酸覆盖法(细菌): 挑取少量纯化后的细菌新鲜培养物涂抹于靶板上, 在靶位中形成均匀涂层, 自然干燥。在单菌落涂层上直接覆盖 1 μ L 70% (*V:V*)的甲酸溶液, 干燥后再覆盖 1 μ L 基质溶液, 自然干燥后放入质谱仪进行检测。

甲酸提取法(细菌和霉菌): 在 1.5 mL Eppendorf 管中加入 300 μ L 纯水, 挑取细菌新鲜单菌落或霉菌菌落外围新

鲜菌丝抖落在纯水中, 加入 900 μ L 无水乙醇, 充分混匀后 12000 r/min 离心 2 min。弃去上清液后, 向 Eppendorf 管中加入 50 μ L 70%甲酸和 50 μ L 乙腈, 充分混匀后 12000 r/min 离心 2 min, 取 1 μ L 上清液点样在靶板靶位中心, 干燥后再覆盖 1 μ L 基质溶液, 自然干燥后放入质谱仪进行检测, 检测结果与仪器自带数据库进行比对后形成分值。

鉴定分值在 2.00 及以上为满足种鉴定; 1.70~1.99 满足属鉴定, 种可接受; 分值在 1.70 以下不可信。细菌鉴定时优先选择甲酸覆盖法, 鉴定分值在 2.00 以下的菌株用甲酸提取法重新进行提取鉴定; 霉菌直接用甲酸提取法进行提取鉴定。细菌最终鉴定分值不满足种鉴定水平的菌株活化后按照 16S rRNA 序列分析方法重新进行分子生物学鉴定。

(2)分子生物学鉴定(16S rRNA 序列分析)

按照文献^[14]方法提取菌株的基因组, 以通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')、1492r (5'-TACG GYTACCTTGTACGACTT-3')对分离菌株的 16S rRNA 序列进行 PCR 扩增^[14], PCR 扩增产物纯化后进行测序。引物合成和测序均送至南京生物医药谷完成。

将测序结果与美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 GenBank 数据库进行局部比对算法搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)比对, 分析目标菌株与已知菌株的同源性以鉴定菌种归属。

(3)霉菌的传统形态学鉴定

根据菌落的形态、颜色、菌丝和产孢器结构查阅《真菌鉴定手册》^[15]、《真菌分类学》^[16]和 BARNETT 等^[17]的分类系统鉴定到属。

2 结果与分析

2.1 污染菌计数结果

从 110 批次冲调谷物制品中共检出不合格样品 9 批次, 其中菌落总数不合格样品 4 批次(藕粉类产品 1 批次, 芝麻糊类产品 3 批次), 霉菌计数不合格样品 5 批次(全部为藕粉类产品)。检验项目统计结果显示, 110 批次冲调谷物制品的菌落总数不合格率为 3.6%, 霉菌计数不合格率为 4.5%。不合格样品统计结果见表 1。芝麻糊类产品的不合格项目全部为菌落总数, 产品不合格率为 17.6%; 藕粉类产品的不合格项目以霉菌计数为主, 产品不合格率为 15.8%。麦片类和其他类产品未发现菌落总数和霉菌计数超标。

2.2 污染菌分离鉴定结果

2.2.1 细菌分离鉴定结果

从不合格样品中共分离得到 159 株细菌, 对其进行 MALDI-TOF-MS 鉴定, 共获得 148 株有效鉴定结果(鉴定分值在 1.70 及以上)。对 70 株鉴定分值在 1.70~1.99 和未

得到可信鉴定结果的菌株进行 16S rRNA 测序, 将序列结果在 NCBI 上进行 Blast 相似性分析。结果如表 2 所示, 70 株菌株中的 58 株 16S rRNA 测序鉴定结果和

MALDI-TOF-MS 的鉴定结果一致, 11 株(涉及到 3 个种)不在菌种主库范围内, 另有 1 株鉴定至种的结果不一致, 最终鉴定结果以 16S rRNA 测序鉴定结果为准。

表 1 不合格项目检验结果
Table 1 Inspection results of unqualified items

不合格项目	产品类别	样品编号	检验结果/(CFU/g)	标准值
菌落总数	藕粉类	O21	1.7×10 ⁴ 、1.5×10 ⁴ 、1.7×10 ⁴ 、1.4×10 ⁴ 、1.5×10 ⁴	n:5 c:2 m:10 ⁴ M:10 ⁵
		Z4	2.4×10 ⁴ 、2.2×10 ⁴ 、2.4×10 ⁴ 、2.3×10 ⁴ 、2.4×10 ⁴	
	芝麻糊类	Z5	5.2×10 ⁴ 、4.5×10 ⁴ 、5.7×10 ⁴ 、7.1×10 ⁴ 、6.9×10 ⁴	
		Z13	1.5×10 ⁴ 、1.6×10 ⁴ 、1.8×10 ⁴ 、1.4×10 ⁴ 、1.6×10 ⁴	
霉菌计数	藕粉类	O9	75、60、90、90、50	n:5 c:2 m:50 M:10 ²
		O19	1510、100、110、110、140	
		O20	95、120、80、130、120	
		O28	140、150、130、130、160	
		O32	75、90、60、120、200	

表 2 污染细菌的鉴定结果
Table 2 Identification results of contaminated bacteria

分类单元(种)	菌株数	鉴定方式	相对频率/%	产品种类			
				藕粉类		芝麻糊类	
				菌株数	相对频率/%	菌株数	相对频率/%
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	7	MALDI-TOF-MS	4.4	2	1.3	5	3.1
抗辐射不动杆菌 <i>Acinetobacter radioresistens</i>	16	MALDI-TOF-MS	10.1	0	0	16	10.1
高山芽孢杆菌 <i>Bacillus altitudinis</i>	4	MALDI-TOF-MS	2.5	4	2.5	0	0
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	13	MALDI-TOF-MS	8.2	13	8.2	0	0
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	12	MALDI-TOF-MS	7.5	12	7.5	0	0
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	14	MALDI-TOF-MS	8.8	0	0	14	8.8
巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	17	MALDI-TOF-MS	10.7	17	10.7	0	0
莫海威芽孢杆菌 <i>Bacillus mojavensis</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0
短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	5	MALDI-TOF-MS	3.1	5	3.1	0	0
沙福芽孢杆菌 <i>Bacillus safensis</i>	6	MALDI-TOF-MS	3.8	6	3.8	0	0
索诺拉沙漠芽孢杆菌 <i>Bacillus sonorensis</i>	2	MALDI-TOF-MS	1.3	2	1.3	0	0
枯草芽孢杆菌斯氏亚种 <i>Bacillus spizizenii</i>	4	16S rRNA 序列分析	2.5	2	1.3	2	1.3
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	29	MALDI-TOF-MS	18.2	21	13.2	8	5.0
贝莱斯芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>	6	16S rRNA 序列分析	3.8	5	3.1	1	0.6
魏登施泰芽孢杆菌 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0

表 2(续)

分类单元(种)	菌株数	鉴定方式	相对频率/%	产品种类			
				藕粉类		芝麻糊类	
				菌株数	相对频率/%	菌株数	相对频率/%
鼠李糖小短杆菌 <i>Brachybacterium rhamnosum</i>	1	16S rRNA 序列分析	0.6	1	0.6	0	0
克罗诺杆菌 <i>Cronobacter</i> sp	2	MALDI-TOF-MS	1.3	0	0	2	1.3
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	0	0	1	0.6
尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	5	MALDI-TOF-MS	3.1	2	1.3	3	1.9
鸪鸡肠球菌 <i>Enterococcus gallinarum</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0
耐硼赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	0	0	1	0.6
球形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0
巴氏微杆菌 <i>Microbacterium barkeri</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	0	0	1	0.6
膝黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	5	MALDI-TOF-MS	3.1	0	0	5	3.1
解聚糖类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0
多食鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium multivorum</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0
田地绿芽孢杆菌 <i>Viridibacillus arvi</i>	1	MALDI-TOF-MS	0.6	1	0.6	0	0

鉴定结果显示, 分离得到的 159 株污染细菌可归于 28 个种。从属级水平的相对分离频率来看, *Bacillus* (71.7%) 为优势菌群, 从种级水平的相对分离频率来看, *B. subtilis* (18.2%)、*B. megaterium* (10.7%)、*A. radioresistens* (10.1%)、*B. licheniformis* (8.8%)、*B. amyloliquefaciens* (8.2%)和 *B. cereus* (7.5%)为优势菌群。

冲调谷物制品在生产过程中大多经过了熟制、干燥等工序, 故能够对高温、低水活度等不良环境有较高耐受性的芽孢杆菌(*Bacillus*)会在生产过程中保留下来, 并在终产品中占得一定优势。分离得到的细菌中 *B. cereus* (7.5%)、*A. baumannii* (4.4%)、*B. pumilus* (3.1%)、*E. faecium* (3.1%)、*Cronobacter* sp (1.3%)、*E. cloacae* (0.6%)、*K. pneumoniae* (0.6%)都对人体有一定的条件致病性, 其中克罗诺杆菌(*Cronobacter*)能够在免疫低下人群中引起脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎等疾病, 是食品中的高风险致病菌^[18]。方友林等^[4]对冲调类方便食品中的克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)进行了针对性监测, 检出率为 10.17%, 显示出较高的污染率。本次污染菌相调查分离到 2 株克罗诺杆菌, 也佐证了冲调类谷物制品中存在相关食品安全风险。

2.2.2 霉菌分离鉴定结果

从不合格藕粉样品中共分离得到 98 株霉菌, 对其进行 MALDI-TOF-MS 鉴定, 共获得 28 株有效鉴定结果(鉴

定分值在 1.70 及以上)。对所有霉菌按照形态学方法进行鉴定并结合 MALDI-TOF-MS 分析结果可将菌株划分至 *Aspergillus*、*Penicillium*、*Torula* 等 25 个属。结果见表 3。从属级水平的分离率看, *Penicillium* (12.4%)、*Aspergillus* (7.1%)、*Botrytis* (6.2%)、*Coremium* (6.2%)、*Rhizopus* (6.2%)、*Torula* (6.2%)为优势菌群, 其他霉菌菌株也多以腐生菌为主。

冲调谷物制品的主要原材料极易受到霉菌及其毒素的污染^[19-20], 近年来的抽检数据和相关研究也显示, 冲调谷物制品的霉菌及相关毒素的污染比例相对较高^[2-3]。本研究中的霉菌不合格情况全部来自于藕粉类产品, 该类产品的霉菌不合格率达到了 15.8%, 其霉菌污染状况不容乐观。相关研究显示, 莲藕在采摘前后的主要致病真菌为镰刀菌属(*Fusarium*)^[21], 贮藏期的致病真菌有镰刀菌属、青霉属、链格孢霉属和芽枝霉属^[22]。本研究从藕粉类产品分离得到的霉菌中占比最高的是青霉属(12.4%)和曲霉属(7.1%), 也分离到了一定比例的链格孢霉属(5.2%)和芽枝霉属(5.2%), 说明终产品中的部分污染霉菌可能来源于生产原料。藕粉的生产加工工艺对环境的整体要求不高, 生产企业如不能维持对不同清洁作业区的严格管理, 则极易造成交叉污染。同时, 藕粉生产环境一般湿度较大, 高湿条件下霉菌的增殖也会加大环境带入污染菌的风险。

表 3 污染霉菌的鉴定结果
Table 3 Identification results of contaminated moulds

分类单元(属)	鉴定方式	菌株数	相对频率/%	分类单元(属)	鉴定方式	菌株数	相对频率/%
枝顶孢霉属 <i>Acremonium</i>	形态学鉴定	2	2.1	结实串孢霉属 <i>Hormiscium</i>	形态学鉴定	1	1.0
链格孢霉属 <i>Alternaria</i>	MALDI-TOF-MS 形态学鉴定	5	5.2	串珠霉属 <i>Monilia</i>	形态学鉴定	2	2.1
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	MALDI-TOF-MS 形态学鉴定	7	7.1	卵形孢霉属 <i>Oospora</i>	形态学鉴定	5	5.2
葡萄孢属 <i>Botrytis</i>	形态学鉴定	6	6.2	峡串孢霉属 <i>Paepalopsis</i>	形态学鉴定	5	5.2
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	形态学鉴定	1	1.0	青霉属 <i>Penicillium</i>	MALDI-TOF-MS 形态学鉴定	12	12.4
暗梗单孢霉属 <i>Chloridium</i>	形态学鉴定	2	2.1	根霉属 <i>Rhizopus</i>	MALDI-TOF-MS 形态学鉴定	6	6.2
芽枝霉属 <i>Cladosporium</i>	形态学鉴定	5	5.2	短链孢霉属 <i>Selenotila</i>	形态学鉴定	3	3.1
球孢霉属 <i>Coccospora</i>	形态学鉴定	5	5.2	穗霉属 <i>Spicaria</i>	形态学鉴定	2	2.1
镶孢霉属 <i>Coniothecium</i>	形态学鉴定	3	3.1	圆酵母属 <i>Torula</i>	形态学鉴定	6	6.2
束梗霉属 <i>Coremium</i>	形态学鉴定	6	6.2	木霉属 <i>Trichoderma</i>	形态学鉴定	4	4.1
单梗头孢霉属 <i>Corethrospis</i>	形态学鉴定	2	2.1	轮枝霉属 <i>Verticillium</i>	形态学鉴定	1	1.0
刺葡萄孢霉属 <i>Echinobotryeae</i>	形态学鉴定	3	3.1	无孢菌属 <i>Mycelia Sterilia</i>	—	3	3.1
稀丝头孢霉属 <i>Haplotrichum</i>	形态学鉴定	1	1.0				

真菌毒素是由部分丝状真菌产生的有毒次生代谢产物,在谷物中的污染比较普遍,谷物制品中的真菌毒素污染是产品质量安全风险管控的重点内容。我国对于小麦、玉米等主要粮食作物的相关监测非常严格,但针对其他杂粮作物中真菌毒素污染状况的研究还较少见^[19]。本次分离到的霉菌中包含了青霉属、曲霉属等常见产毒真菌,藕制品中相关毒素的污染情况及其食品安全潜在风险有待进一步研究。

3 结论与讨论

MALDI-TOF-MS 在细菌鉴定领域具有较高的准确性和可信性,多项研究对 16S rRNA 序列分析和 MALDI-TOF-MS 方法进行了对比,结果显示 MALDI-TOF-MS 分值在 2.00 及以上的鉴定结果与 16S rRNA 序列分析结果有较高的一致性^[23-25]。本研究针对鉴定分值在 2.00 以下的细菌菌株以 16S rRNA 序列分析方法对最佳匹配结果进行验证,结果质谱方法的种水平鉴定准确率为 82.9% (58/70)、属水平鉴定准确率为 100%(70/70),仍然保持着较高的准确性。相较传统生理生化鉴定方法和分子生物学鉴定方法, MALDI-TOF-MS 具有操作简单、低样品量、高通量、速度快、成本低等优点,在大批量细菌

鉴定时具有不可替代的优势。MALDI-TOF MS 技术在丝状真菌鉴定领域的应用还有待提高,目前较多的研究集中在临床丝状真菌的鉴定方法^[26-28]。受现有数据库内丝状真菌菌种涵盖范围限制,本研究分离得到食品来源霉菌的属水平鉴定准确率仅为 28.6%(28/98)。丝状真菌的形态学鉴定需要检验人员具有较高的专业知识水平及丰富的真菌鉴定经验,当大批量非临床丝状真菌仅需鉴定至属时,由具备能力的检验人员首先进行形态学鉴定是效率较高的方式, MALDI-TOF MS 技术可作为传统形态鉴定方法的补充手段。当丝状真菌需要鉴定至种时,基因序列分析鉴定仍然是丝状真菌鉴定的金标准^[8]。

现阶段 MALDI-TOF-MS 技术的应用仍存在一些限制因素,主要集中在数据库的开发、更新和不同样本的前处理^[29-31]。结合实验室自身特点和研究目的,建立、完善和扩大个性化数据库有利于进一步提高质谱方法的微生物鉴别能力,而不断探索和优化不同类别样本的前处理方法和操作步骤,可以规范操作流程,提高鉴定准确率,更好地发挥质谱在快速鉴定中的作用。

冲调谷物制品因其易于携带和食用,在一定程度上满足了消费者对于方便快捷、营养美味的需求,故消费群体广泛,老少皆宜。本研究对流通领域的冲调谷物制品进行了抽

检, 结果显示, 菌落总数的不合格率为 3.6%, 霉菌计数的不合格率为 4.5%, 微生物污染情况较为严重。污染细菌以芽孢杆菌属为优势菌群, 同时检出克罗诺杆菌等多种条件致病菌; 污染霉菌以青霉属和曲霉属为优势菌群, 并包含多种常见产毒真菌, 存在一定的食品安全风险。冲调谷物制品的基本生产流程包括原辅料处理、熟制、成型或粉碎、干燥、混合、包装等过程, 合理的生产工艺设计是减少微生物污染的基础, 而严格落实工艺流程、加强不同清洁作业区的管理是控制污染的关键。本研究对冲调谷物制品中的污染菌相进行了识别, 为进一步分析污染菌的来源及危害、强化食品安全监管提供了技术数据, 也为生产企业有针对性地采取有效控制措施、改进生产管理提供了依据。

参考文献

- [1] 李闻, 王源, 于爱萍, 等. 天津市婴幼儿食品和冲调谷物制品中阪崎肠杆菌污染状况[J]. 中国热带医学, 2021, 21(4): 315-319.
LI W, WANG Y, YU AIP, *et al.* Pollution status and PFGE typing of *Enterobacter sakazakii* from infant food and processed cereal products in Tianjin [J]. J China Trop Med, 2021, 21(4): 315-319.
- [2] 中国市场监管报. 2019 年上半年方便食品抽检分析报告[EB/OL]. [2019-07-18]. http://www.cmrmn.com.cn/news/content/2019-07/18/content_119269.html [2021-08-10].
China Market Supervision. Analysis report on sampling inspection of convenience food in the first half of 2019 [EB/OL]. [2019-07-18]. http://www.cmrmn.com.cn/news/content/2019-07/18/content_119269.html [2021-08-10].
- [3] 黄彬红. 冲调谷物制品霉菌和黄曲霉毒素污染调查分析[J]. 质量技术监督研究, 2020, 68(2): 2-5.
HUANG BH. Investigation and analysis of moulds and aflatoxins contamination in instant cereal products [J]. Res Qual Technol Superv, 2020, 68(2): 2-5.
- [4] 方友林, 罗辉, 代志远, 等. 十堰市冲调类方便食品阪崎肠杆菌污染状况调查[J]. 公共卫生与预防医学, 2015, 26(6): 106-108.
FANG YL, LUO H, DAI ZY, *et al.* Investigation on *Enterobacter sakazakii* contamination of instant foods in Shiyan city [J]. J Pub Health Prev Med, 2015, 26(6): 106-108.
- [5] 钟丽琪, 郭亚辉, 曹进, 等. 食源性致病菌检测技术的研究概述[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4387-4393.
ZHONG LQ, GUO YH, CAO J, *et al.* Review on the detection technology of foodborne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(13): 4387-4393.
- [6] 姬莉莉, 闫雪. 食品中微生物限量要求及检测技术发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 459-465.
JI LL, YAN X. Requirements of microbial limit and development trend of detection technology [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(2): 459-465.
- [7] 王深垒, 马盼盼, 江天珂, 等. 食源性病原微生物分子鉴定的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(2): 129-135.
WANG SL, MA PP, JIANG TK, *et al.* Molecular identification and research progress of three foodborne pathogenic microorganisms [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2021, 42(2): 129-135.
- [8] 何郁菲, 刘淑娟, 黄浩, 等. 杨梅贮藏期真菌的分离鉴定及基于 ITS 序列的聚类分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(18): 4846-4850.
HE YF, LIU SJ, HUANG H, *et al.* Separation and identification of fungi from bayberry in storage period and its clustering analysis based on ITS sequence [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(18): 4846-4850.
- [9] DUBOIS D, GRARE M, PRERE MF, *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]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2568-2576.
- [10] SENG P, DRANCOURT M, GOURIET F, *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(4): 543-551.
- [11] ALMOGBEL MS. Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for identification of *Clostridium* species isolated from Saudi Arabia [J]. Braz J Microbiol, 2016, 47: 410-413.
- [12] CASSAGNE C, NORMAND AC, L'OLLIVIER C, *et al.* Performance of MALDI-TOF-MS platforms for fungal identification [J]. Mycoses, 2016, 59: 678-690.
- [13] PAN YL, CHOW NH, CHANG TC, *et al.* Identification of lethal *Aspergillus* at early growth stages based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, (70): 344-354.
- [14] 丁娟芳, 杨嘉, 孙长花. 扬州稀甜酱中乳酸菌的分离鉴定及抑菌活性初探[J]. 中国酿造, 2020, 39(9): 86-90.
DING JF, YANG J, SUN CH. Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from Yangzhou thin sweet sauce [J]. China Brew, 2020, 39(9): 86-90.
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
WEI JC. Handbook of identification of fungi [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979.
- [16] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984.
SHAO LP, SHEN RX, ZHANG SX, *et al.* Fungal taxonomy [M]. Beijing: China Forestry Press, 1984.
- [17] BARNETT HL, HUNTER BB. Illustrated genera of imperfect fungi [M]. Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1998.
- [18] 陈启明, 刘战民, 陆兆新. 克罗诺杆菌检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9281-9287.
CHEN QM, LIU ZM, LU ZX. Research progress of detection methods of *Cronobacter* spp [J]. J Food Saf Qual, 2020, 12(24): 9281-9287.
- [19] 李雅静, 秦曙, 杨艳梅, 等. 中国谷物真菌毒素污染研究现状[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(3): 186-194.
LI YJ, QIN S, YANG YM, *et al.* Research status of mycotoxin contamination in grains in China [J]. J Cere Oils Ass, 2020, 35(3): 186-194.
- [20] HAO S, HU J, SONG S, *et al.* Selenium alleviates aflatoxin B-1-induced immune toxicity through improving glutathione peroxidase 1 and selenoprotein expression in primary porcine splenocytes [J]. J Argic Food Chem, 2016, 64(6): 1385-1393.
- [21] 唐慧. 莲藕采后主要腐败菌的分离鉴定及空气放电对其抑菌机理的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
TANG H. Isolation and identification of main spoilage fungi on the post-harvest lotus roots and antimicrobial mechanisms of air discharge [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.

- [22] 罗海莉, 李洁, 严守雷, 等. 莲藕贮藏期主要致病真菌分离鉴定及其致病相关酶学特性研究[J]. 长江蔬菜, 2011, (16): 68–72.
LUO HL, LI J, YAN SL, *et al.* Research on isolation and identification of pathogens from lotus root during storage and properties of pathogenic-related enzymes [J]. Yangtze River Veg, 2011, (16): 68–72.
- [23] MCELVANIA TE, SHUEY S, WINKLER DW, *et al.* Optimizing identification of clinically relevant gram-positive organisms by use of the bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1421–1427.
- [24] DELPHINE M, LAURENT B, INGRID W, *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]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1313–1325.
- [25] NIVES MR, AGNOLETTI F, LOLLAI S, *et al.* Comparison of PCR-RFLP, API 20 strep and MALDI-TOF MS for identification of *Streptococcus* spp [J]. Small Ruminant Res, 2019, 18(5): 35–40.
- [26] REEVE MA, CAINE TS, BUDDIE AG. Spectral grouping of nominally *Aspergillus versicolor* microbial-collection deposits by MALDI-TOF MS [J]. Microorganisms, 2019, 7(1): 235–450.
- [27] SANGUINETTI M, POSTERARO B. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(2): 369–379.
- [28] 曹敬荣, 王岩, 谢威, 等. 质谱技术快速鉴定临床分离丝状真菌的应用[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2020, 14(5): 374–379.
CAO JR, WANG Y, XIE W, *et al.* Application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in rapid identification of clinical filamentous fungi [J]. Chin J Exp Clin Infect Dis, 2020, 14(5): 374–379.
- [29] 刘莉, 韩笑, 王紫薇, 等. 霍乱弧菌基质辅助激光解吸飞行时间质谱数据库的建立与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4773–4782.
LIU L, HAN X, WANG ZW, *et al.* Establishment and application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry database for the detection of *Vibrio cholerae* [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(14): 4773–4782.
- [30] KHAENDA B. *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant isolated from clinical and environmental sources in northeastern Thailand [J]. Chiang Mai J Sci, 2017, 44(2): 338–349.
- [31] 邓穗燕, 郭旭光, 林丽英, 等. 丝状真菌 MALDI-TOF MS 鉴定中三种样品前处理方法比较[J]. 现代预防医学, 2020, 47(22): 4144–4147.
DENG SY, GUO XG, LIN LY, *et al.* Comparison of three sample pretreatment methods in MALDI-TOF MS identification of filamentous fungi [J]. Mod Prev Med, 2020, 47(22): 4144–4147.

(责任编辑: 李磅礴 郑 丽)

作者简介



杨 嘉, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物学。

E-mail: jjajia82112001@163.com