

常见食源性致病菌胞外代谢轮廓分析

李玉冬^{1, 2, 3}, 吴清平², 张菊梅², 韦献虎^{1, 2, 3}, 张友雄^{1, 2, 3}, 郭伟鹏²

(1. 中国科学院广州化学研究所, 广东广州 510650) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070)

(3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 寻找常见食源性致病菌间特征性代谢产物, 是研发食品安全快速高效监控技术的基础。本文直接利用常见食源性致病菌发酵液冻干, 经硅烷化试剂衍生, 并采用气相色谱-质谱技术 (GC-MS) 对代谢产物进行分析, 同时进行 NIST11 谱图库检索并分类, 并对数据进行热图和主成分 (PCA) 分析。研究发现, 发酵液中有大量有机酸、醇类和胺类等物质产生, 且菌种间各代谢产物种类和相对含量差异显著; 同时各菌间含有丰富的特有代谢产物, 其中部分特有代谢产物在其他菌株中未见报道。通过热图和 PCA 分析各菌株胞外代谢轮廓可知, 24 h 时各菌株间能够明显区分, 同时去除糖类和氨基酸后, PCA 区分鉴定效果明显提高, 尤其在 24h 时最好。研究表明, 胞外代谢轮廓分析可以用于寻找常见食源性致病菌生物标志物和菌种区分鉴定, 同时部分菌种间特有的代谢产物有望成为常见食源性致病菌潜在生物标志物。

关键词: 食源性致病菌; 多元分析; 代谢组学; 气相-质谱联用; 生物标志物

文章编号: 1673-9078(2016)1-37-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.006

Extracellular Metabolic Profiling of Common Food-borne Pathogens

LI Yu-dong^{1, 2, 3}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², WEI Xian-hu^{1, 2, 3}, ZHANG You-xiong^{1, 2, 3}, GUO Wei-peng²

(1. Guangzhou Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China The Ministry-Province Jointly Development, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China) (3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: This study aims to determine the characteristic metabolites of common food-borne pathogens and develop fast and efficient techniques for food safety monitoring. In this study, the zymotic fluid of food-borne pathogens was freeze-dried and derivatized with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), followed by analysis using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). An NIST11 database search and classification were also performed, and the acquired data were analyzed using heatmapping and principal component analysis (PCA). The results showed that there were a large number of substances, such as organic acids, alcohols, and amines that were formed in the culture broth. Significant differences were observed between different bacterial species based on the types and relative metabolic contents. Many specific metabolites for each bacterial species were found, some of which have never been reported in other strains. The extracellular metabolic profiles of all bacteria were analyzed by heatmapping and PCA, and the results showed that the strains could be differentiated at 24 h; the differentiation effect of PCA was significantly enhanced after the removal of amino acid and sugars, and the optimal effect was found at 24 h. Our results show that extracellular metabolic profile analysis can be used to determine the biomarkers of food-borne pathogenic bacteria and distinguish between bacterial species. Further, some of the characteristic metabolites may be potential biomarkers of common food-borne pathogens.

Key words: foodborne pathogen; multivariate analysis; metabolomics; gas chromatography-mass spectrometry; biomarker

收稿日期: 2015-02-11

项目基金: 国家自然科学基金项目 (U1031003, 31371780); 粤港关键领域重点突破项目 (2011A011303001)

作者简介: 李玉冬 (1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为常见食源性致病菌代谢组学研究

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为生物安全监测与控制

近年来, 食源性致病菌导致的食品安全事件频发, 由此带来的食品安全问题越来越成为国内外关注的重点, 因此必须建立健全科学、准确、快速的食源性致病菌检测技术, 以保障食品安全, 预防和控制食源性致病菌中毒事件发生^[1, 2]。食源性致病菌代谢组学研究由于其特征性代谢产物和代谢指纹图谱可用于快速、灵敏准确检测和鉴定食源性致病菌, 近年来成为微生物

物新型检测方法的研究热点^[3]。通过对常见食源性致病菌进行代谢组学研究,建立常见食源性致病菌代谢指纹图谱库,并对特征性代谢产物进行代谢途径研究,寻找特异性酶和底物用于新型荧光或显色培养基的合成,进而完善目前常见食源性致病菌检测技术上存在的缺陷,在食品药品安全检测、临床鉴定及环境监测等方面具有广泛的应用前景。

在微生物代谢组学分析中,由于不同代谢产物丰度水平反映了最终环境改变及微生物基因表达水平,因此适当的样品前处理方法尤为重要,快速淬灭一切生化反应也成了样品前处理的首要工作。目前微生物细胞内代谢产物研究并没有找到一种普适的前处理方法,且胞内代谢产物在淬灭时容易发生泄漏,胞内含有大量高活性酶导致较大部分代谢产物半衰期较短,稳定性和重复性较差,对于系统地研究食源性致病菌代谢组和寻找特征性代谢产物造成较大局限性^[3]。然而微生物胞外代谢组学^[4,5]研究前处理简单,便于操作,且利于高通量检测,同时可以通过细胞外代谢产物评估胞内代谢通量^[6]。目前,微生物胞外挥发性代谢产物^[7-9]研究较为透彻,已经有较为完善的挥发性代谢产物数据库^[10],而针对常见食源性致病菌细胞外代谢轮廓系统性研究未见报道。本文主要研究常见食源性致病菌细胞外代谢轮廓,以获得常见食源性致病菌细胞外代谢指纹图谱,同时寻找各菌种潜在的生物标志物,为进一步完善食源性致病菌鉴定系统提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922, 阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*) ATCC51329, 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CMCC63301, 伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica serovar Typhi*) CMCC50071, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC15442, 宋内氏志贺菌(*Shigella sonnei*) CMCC51592, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538, 小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*) ATCC52204, 粪链球菌(*Streptococcus faecalis*) ATCC29212, 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* 315-B2) 315-B2, 单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) 798-1 均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.2 培养基及试剂

培养基^[4]: 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、胰蛋白胨

大豆琼脂培养基(TSA)、半合成培养基(成份(g/L): 蛋白胨 1.7, 大豆蛋白胨 0.3, NaCl 5.0, 磷酸氢二钾 2.5, 葡萄糖 2.5)。

磷酸氢二钾、氯化钠、葡萄糖和吡啶均为分析纯, 甲氧胺盐酸盐、硬脂酸甲酯和 N,O-双(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(BSTFA)(含 1% TMS)。

1.1.3 主要仪器(型号和生产厂商)

空气摇床恒温培养箱: HZQ-F100, 哈尔滨市东联生化仪器有限公司; 冻干机: FD-1C-50, 北京博医康实验仪器有限公司; 气相色谱-质谱联用仪: 7890-5975C, 美国 Agilent 科技有限公司产品。

1.2 实验方法

将上述甘油保藏菌种接种至胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)上活化, 然后接种至 10 mL TSB 中培养过夜, OD₆₀₀ 在 0.2~1.2 时, 分别将上述菌液 100 μL 转移至含 100 mL 半合成培养基的 300 mL 锥形瓶中, 37 °C 摇床 130 r/min 培养。在 24 h、48 h 后分别取样, 取 5 mL 发酵液置于 10 mL 无菌离心管中, 低温 4 °C 条件下, 8500 r/min 离心 10 min。迅速将上清液 1 mL 分别置于 3 个 1.5 mL 的无菌离心管中, -40 °C 冷藏。-56 °C 冷冻干燥, 然后置于 -40 °C 条件保藏备用。

将上述冻干粉加入 400 μL 含有 2 mg/mL 的甲氧胺盐酸盐吡啶溶液(含有 1.6 μg 硬脂酸甲酯作为内标物) 40 °C 反应 90 min, 然后加入 200 μL 的 BSTFA 置于 40 °C 反应 30 min, 然后 GC-MS 进样分析。

气相色谱条件: HP-5MS 毛细管色谱柱(30 m×250 μm, 0.25 μm); 载气为高纯 He, 流速: 1.0 mL/min; 柱温升温程序: 初始温度 35 °C, 保持 3 min, 然后以 8 °C/min 升温至 45 °C, 再以 4 °C/min 升温至 140 °C, 最后以 8 °C/min 升温至 280 °C, 保持 10 min。自动进样器进样 2 μL, 分流比为 10:1, 进样口温度 280 °C。

质谱条件: 色谱-质谱接口温度 280 °C; 电子轰击源(EI); 离子源温度 230 °C; 全扫描模式, 质量扫描范围 50~1000 m/z。

1.3 数据处理方法

利用 Origin9.0 软件作图, 同时使用 R 软件进行热图分析, 并用 past 软件进行主成份分析。

2 结果与讨论

2.1 常见食源性致病菌细胞外代谢产物

通过 NIST11 质谱数据库检索及文献资料分析确认化学组成。通过化学成份分类和峰面积归一化鉴定

了各类代谢产物的种类和相对含量如图 1 所示。从图 1 可知, 培养 24 h 和 48 h 的代谢产物总种类数相似, 但有机酸种类差异较大。与对照相比较, 各菌种发酵液成分和总量均发生较大改变, 主要特征为糖类及氨基酸类物质减少, 有机酸、醇类、胺及酰胺类和脂类物质增加, 特别是铜绿假单胞菌、沙门氏菌和阪崎肠杆菌等菌种表现的尤为明显。

金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、粪链球菌及单增李斯特菌发酵液中含有较为丰富的游离氨基酸和糖类, 且两次取样分析发现, 小肠结肠炎耶尔森氏菌、粪链球菌和单增李斯特菌糖类及氨基酸类物质前后变化不大, 但 24 h 后有大量有机酸产生。对于伤寒沙门氏菌而言, 24 h 产胺类物质最多, 占 25% 以上, 主要为尸胺和腐胺, 而副溶血性弧菌和大肠杆菌则在 24 h 后产生大量的胺类物质, 此外, 24 h 后其余菌株发酵液中胺类物质含量均增加。在代谢产醇类物质上, 除小肠结肠炎耶尔森氏菌不代谢产生醇类物质, 其余上述菌株均代谢产生醇类, 其中金黄色葡萄球菌和阪崎肠杆菌代谢产生醇类较丰富, 特别是阪崎肠杆菌在 24 h 内产生醇类物质达 30% 以上, 但由于培养基中的碳水化合物含量较低, 阪崎肠杆菌开始代谢醇类物质, 导致 48 h 后醇类物质含量迅速下降, 而金黄色葡萄球菌产生的醇类物质含量变化不大。

从积累有机酸过程可以发现, 24 h 时铜绿假单胞菌、沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌和阪崎肠杆菌体系中的有机酸含量较低, 且糖类、氨基酸利用率较高, 因此有机酸占体系百分比比较高。

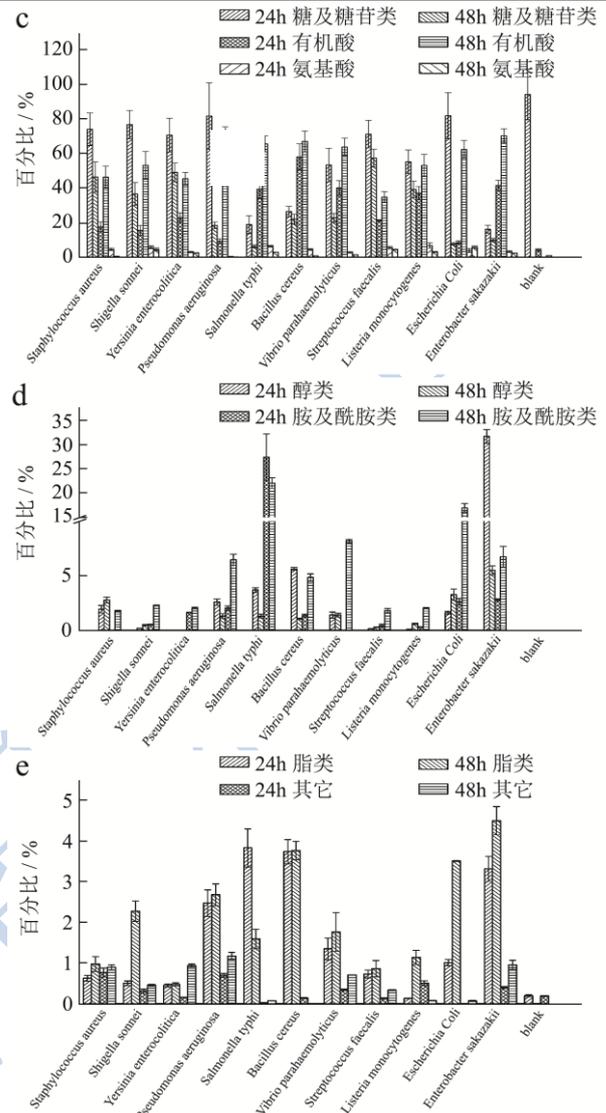
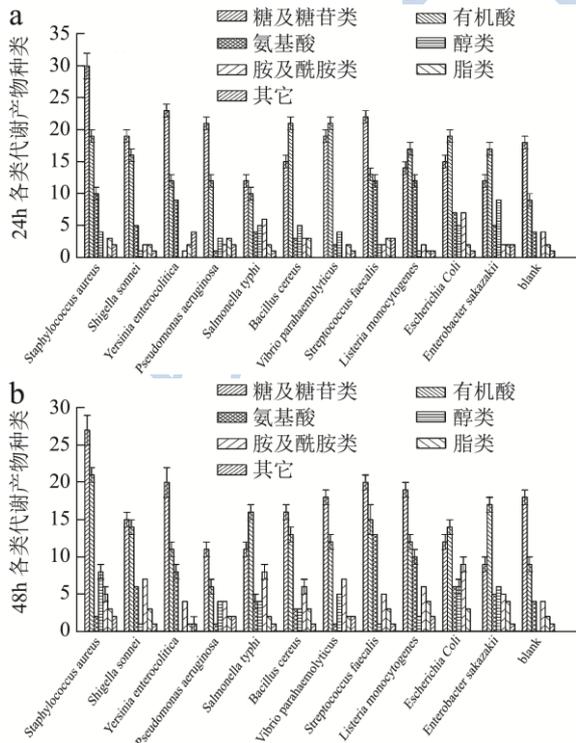


图 1 常见食源性致病菌不同采样时间胞外代谢产物各成分的种类及各类成分占百分比

Fig.1 Types and proportions of each extracellular metabolic component from common food-borne pathogenic bacteria at different sampling times

注: a 为 24 h 发酵液中各类物质种类; b 为 48 h 发酵液中各类物质种类; 24 h/48 h 各类代谢产物占百分比变化情况 (c、d、e)。

同时 24 h 时大肠杆菌和宋内氏志贺菌有机酸积累较少, 糖类利用率一般, 金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌则在 24 h 积累较多的有机酸, 而糖类利用率较低。小肠结肠炎耶尔森氏菌和粪链球菌代谢消耗少量的糖类同时, 积累大量有机酸。发酵 48 h 后, 几乎所有发酵体系中的糖类物质持续减少, 有机酸含量不断增加, 特别是大肠杆菌和铜绿假单胞菌表现的尤为明显。

2.2 样品中特有的胞外代谢产物

由于菌株之间遗传信息存在较大差异，导致各菌株间新陈代谢过程中，代谢产物必然存在一定差异，而菌株间特异性表达的基因及其产生的代谢产物也必

然存在^[11]。从上述各菌胞外代谢轮廓可知，各菌间胞外代谢轮廓存在较大差异，而且含有较丰富的特征性代谢产物，其中各菌株间特征性代谢产物如表 1 所示。

表 1 常见食源性致病菌 24 h/48 h 寡营养培养胞外特征性代谢产物

Table 1 Characteristic extracellular metabolites from common food-borne pathogenic bacteria after culturing for 24 h/48 h

菌种	24 h 特有代谢产物	48 h 特有代谢产物
金黄色葡萄球菌	2-甲基-1, 2-丁二醇、D-2-脱氧-核糖	3-甲基丁酸-2-酮、L-(-)-阿拉伯醇、2-甲基-1, 2-丁二醇、反式-3-己二烯酸、丙二酸、2-甲基-2-羟基丁酸、3-羟基丙酸、3-溴-4, 5-二羟基-苯乙腈
宋内氏志贺菌	2-甲基-1, 2-丙二醇、甘露糖酸内酯	乙基胺、 α -羟基苯乙酸、乳清酸
小肠结肠炎耶尔森氏菌	十四烷酸、丙二酸	L-葡萄糖酸-2-酮
铜绿假单胞菌	2-脱氧-核糖酸、2-甲基-1, 3-丁二醇、D-山梨醇、6-羟基-3-吡啶羧酸 2-脱氧-d-赤氏戊糖	1, 3-丁二醇
沙门氏菌	2-氨基苯甲酸、4-氨基丁酸	乙二酸、3-甲基-3-羟基丁酸、2-氨基苯甲酸、4-氨基丁酸
蜡样芽孢杆菌	3-羟基丁酸、4-氨基苯乙酸、2-甲基-3-氨基丙酸、阿拉伯醇、乙酰胺、1,3-丁二醇	半乳糖醇、6-Azaestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-17-one, 3-methoxy-
副溶血性弧菌	3-甲基丁酸-2-酮、3-羟基丙酸、1, 13-二羟基十三烷、(R*,S*)-3, 4-二羟基丁酸 3-甲基-3-羟基丁酸	无
粪链球菌	反式巴豆醇、桃叶珊瑚苷	3-甲基-2-羟基戊酸、4-甲基-戊酸-2-酮、氨基丙二酸、核糖酸
单增李斯特菌	无	无
大肠杆菌	2-脱氧-赤氏戊糖酸、1, 4-丁二醇、5-甲基-2, 4-二羟基嘧啶、2-酮-葡萄糖酸	蔗糖醇、苯丙酮酸、2-甲基-1, 3-丁二醇、2, 4-二羟基嘧啶、5-甲基-2, 4-二羟基嘧啶
阪崎肠杆菌	2-甲基-2-羟基丁酸、反式-4-羟基-环己基甲酸、2-羟基己酸、5-羟基吡啶-3-丙酸、乙二酸、2, 3-丁二醇构象异构体、1, 3-丙二醇、己二酸二异辛酯、2, 4-二羟基嘧啶、6-脱氧-甘露糖	3-羟基肉豆蔻酸、5-羟基吡啶-3-丙酸、2, 3-丁二醇构象异构体、戊酸、己二酸二异辛酯、2-羟基己酸

从表 1 中可以发现，主要的特征性代谢产物为醇类、酸类和杂环化合物等，其中细胞外各菌株特有代谢产物在微生物代谢组研究中未报道的有：金黄色葡萄球菌产生的 2-甲基-1, 2-丁二醇、反式-3-己二烯酸和 3-溴-4, 5-二羟基-苯乙腈；宋氏志贺菌产生的 2-甲基-1, 2-丙二醇、甘露糖酸内酯（大多数肠杆菌科细菌能代谢糖酸类物质，但糖酸内酯类代谢产物未见报道）和 α -羟基苯乙酸；铜绿假单胞菌产生的 6-羟基-3-吡啶羧酸；蜡样芽孢杆菌产生的 4-氨基苯乙酸、2-甲基-3-氨基丙酸和乙酰胺（乙酰胺形成一般需要胍水解酶存在，但代谢乙酰胺需要含有酰胺水解酶，例如部分假单胞菌可利用乙酰胺作为碳源和氮源进行生长^[12]）和 6-Azaestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-17-one, 3-methoxy；副溶血性弧菌产生的 3-羟基丙酸、1, 13-二羟基十三烷和 (R*,S*)-3, 4-二羟基丁酸；粪链球菌产生的反

式巴豆醇、3-甲基-2-羟基戊酸和 4-甲基-戊酸-2-酮；大肠杆菌产生的 1, 4-丁二醇；阪崎肠杆菌产生的反式-4-羟基-环己基甲酸、2-羟基己酸、5-羟基吡啶-3-丙酸、己二酸二异辛酯和 3-羟基肉豆蔻酸。由于上述各菌发酵液中特有的代谢产物并未在其他菌株中报道，因此上述特征性代谢产物可作为上述各菌间的潜在生物标志物或特征性代谢底物，为常见食源性致病菌区分鉴定提供新的检测靶标。虽然在大肠杆菌和沙门氏菌发酵液中发现较多特征性代谢产物，但大多在其他肠杆菌科细菌中有见报道，例如伤寒沙门氏菌产生的 2-氨基苯甲酸和 4-氨基丁酸，宋氏志贺氏菌产生的乳清酸在大肠杆菌代谢组数据库^[13]中均可以找到。在阪崎肠杆菌特有代谢产物中，一株基因重组后的大肠杆菌厌氧培养时可产生高浓度 1, 4-丁二醇^[14]，阪崎肠杆菌产生的戊酸在金黄色葡萄球菌细胞内发现^[15]

等。此外,在 24 h 时被认为是特征性代谢产物,但在 48 h 其他菌株发酵液中同样能发现的有 2-甲基-1,3-丁二醇、3-羟基丁酸、阿拉伯醇、3-甲基-3-羟基丁酸、3-甲基丁酸-2-酮、2-脱氧-赤氏戊糖酸、2-甲基-2-羟基丁酸、3-羟基丙酸、2,4-二羟基嘧啶和丙二酸;在 24 h 多种菌能产生的代谢产物在 48h 被认为是特征性代谢产物的有乙基胺、氨基丙二酸、核糖酸、L-苏糖醇。在上述特征性代谢产物中,沙门氏菌产生的氨基丁酸为谷氨酸脱羧产生的,据相关数据库报道^[16],目前主要产氨基丁酸有 50 多种菌,其中有报道的常见食源性致病菌有大肠杆菌 O157、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌和宋氏志贺菌等,但在半合成培养基生长过程中,只在伤寒沙门氏菌发酵液中检出,同时维生素 L 也为沙门氏菌特有。5-羟基-3-吡啶丙酸为阪崎肠杆菌特有代谢产物,而其代谢途径在 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 数据库 (KEGG) 中并没有检索到,而色氨酸经脱氨基后代谢产生 5-羟基-3-吡啶丙酸- α -酮,并不能产生 5-羟基-3-吡啶丙酸。尸胺和腐胺为动物尸体发出腐败臭味的主要物质,主要由肠杆菌科细菌代谢赖氨酸、鸟氨酸产生^[17]。在此半合成培养基发酵过程中,24 h 时大肠杆菌、伤寒沙门氏菌和阪崎肠杆菌产腐胺,而只有伤寒沙门氏菌产尸胺;在 48 h 时几乎全部的肠杆菌科细菌均产腐胺,但只有大肠杆菌和伤寒沙门氏菌产尸胺。目前致病微生物胞外代谢轮廓分析主要针对胞外挥发性代谢产物研究,并建立较为完善的挥发性代谢产物数据库,分析致病菌产生的挥发性代谢产物也已被建议用于致病微生物鉴别的替代方法^[8]。随着进一步完善致病微生物代谢组及生物标志物研究,可通过监测多种生物标志物来鉴别常见食源性致病菌^[9]。

2.3 常见食源性致病菌胞外代谢产物热图分析与主成分分析 (PCA)

通过 R 软件将上述样品中常见食源性致病菌所有胞外代谢产物进行热图聚类分析 (见图 3), 其中各代谢产物颜色由棕红色到亮绿色其丰度依次增加。由于颜色的梯度变化代表各种代谢物的丰度变化,因此可结合热图重建各种常见食源性致病菌的胞外代谢指纹图谱,同时根据各菌间代谢产物的丰度及其种类可以将上述常见的食源性致病菌进行聚类分析。

通过热图重建上述常见的食源性致病菌进行代谢指纹图谱,并结合聚类分析对上述菌种进行分类区分发现,聚类区分结果与常见分类结果存在一定差异,效果并不理想,分析主要原因可能为发酵液中物质总

量和种类差异与菌种之间相对生长速度相关,例如粪链球菌、单增李斯特菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌在半合成培养基上发酵生长缓慢,存在大量游离氨基酸和糖类,而其他代谢产物含量相对较低;大肠杆菌、阪崎肠杆菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌和铜绿假单胞菌代谢旺盛,存在少量的氨基酸、有机酸及糖类物质;其他菌株虽然代谢糖类的能力一般,但积累大量有机酸。综合上述原因,从而产生图 2 的聚类分析结果。

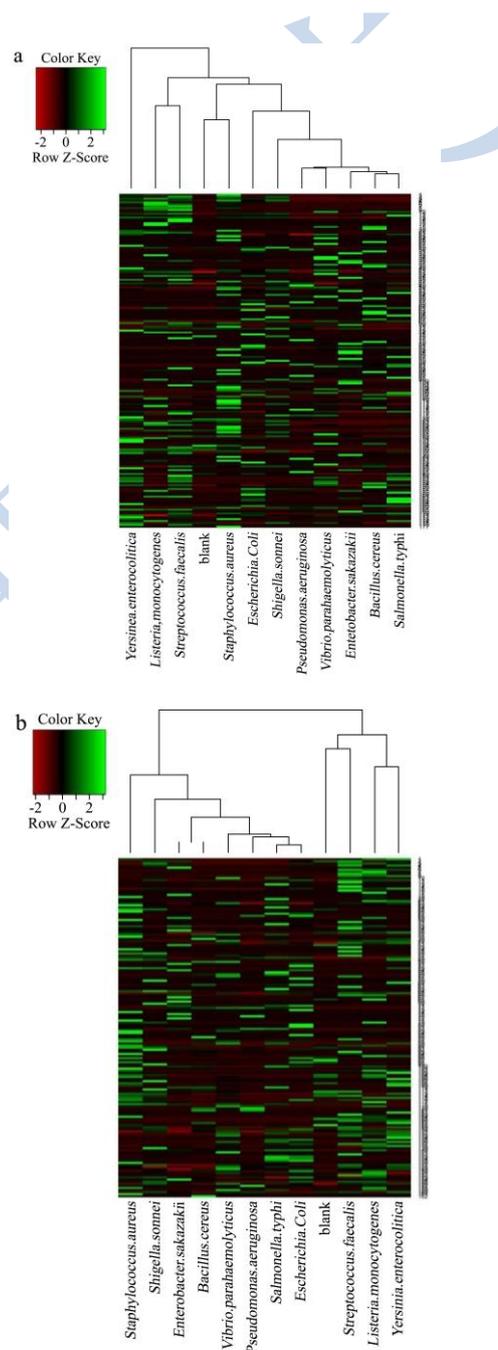


图 2. 常见食源性致病菌胞外代谢产物热图分析

Fig.2 Heatmap analysis of the extracellular metabolites from common food-borne pathogens

注: a 为培养 24 h, b 为培养 48 h。

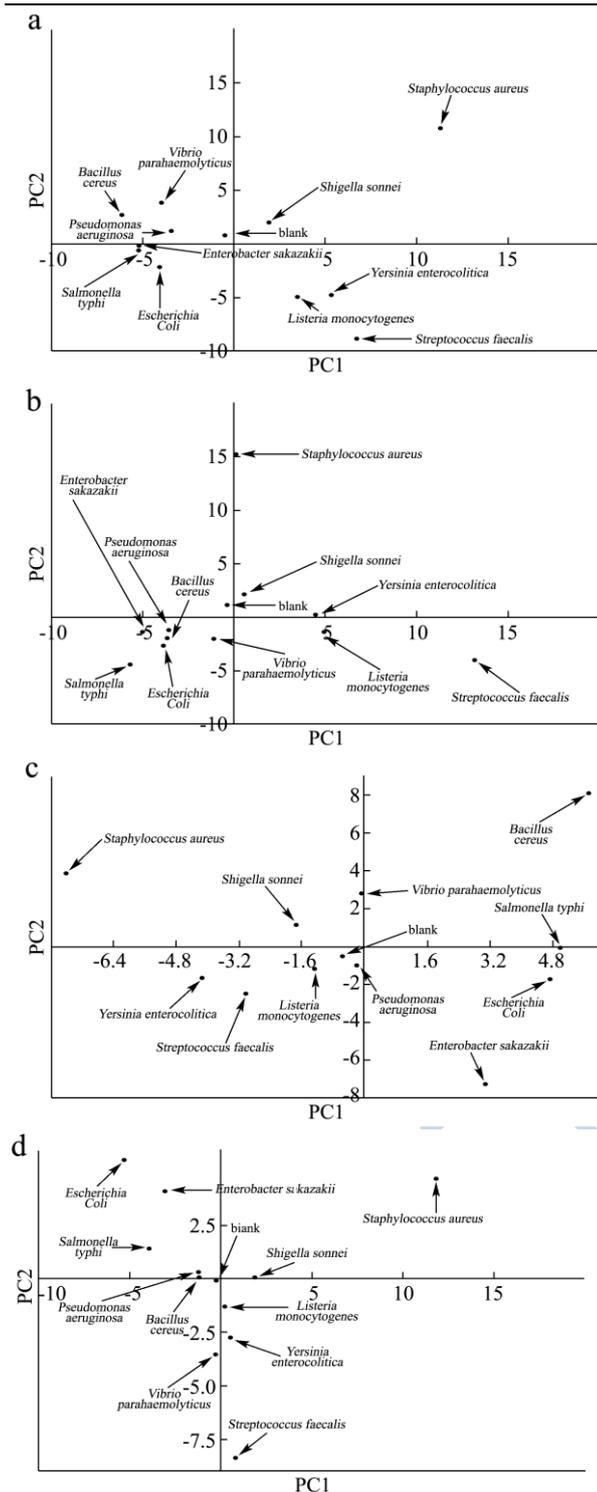


图3 常见食源性致病菌胞外代谢产物PCA分析图

Fig.3 PCA analysis of extracellular metabolites from common food-borne pathogenic bacteria

注: a为24 h胞外代谢PCA分析图; b为48 h胞外代谢PCA分析图; c为24 h胞外代谢产物中除氨基酸和糖类以外的所有代谢产物PCA分析图; d为48 h胞外代谢产物中除氨基酸和糖类以外的所有代谢产物PCA分析图。

将上述常见食源性致病菌胞外代谢产物进行PCA分析(如图3所示),从图3a和3b可知,上述

菌种可通过各菌间代谢产物进行鉴别区分,尤其在24 h时区分鉴别效果明显。此外,从图3a可以看出,经过24 h培养后,大肠杆菌,阪崎肠杆菌和沙门氏菌的相似性较高,而其他菌种间代谢产物差异较大,其中金黄色葡萄球菌与各菌种间的差异最大。经过48 h培养(图3b),蜡样芽孢杆菌、阪崎肠杆菌、铜绿假单胞菌与大肠杆菌的相似性增加,较难分开,以上PCA分析结果与热图分析相似。由于致病菌代谢过程中主要产胺类、有机酸、脂类和醇类等其他物质,因此考虑去除上述培养基中氨基酸和糖类化合物再进行PCA分析,结果发现各菌间差异明显增加,区分鉴别效果显著提高,几乎所有的菌种之间均具有较大差异。同时在特征性代谢产物研究中可以发现大多数的潜在的生物标志物主要为有机酸类、醇类、胺类和杂环化合物等,因此,可直接利用致病菌代谢产生的有机酸类、醇类、胺类等物质对常见食源性致病菌进行鉴别区分。

对比图a与图b,图c与图d可知,24 h时各菌种胞外代谢轮廓更有利于菌种间鉴别区分,特别是图c的分离效果最好,即24 h时产生的有机酸类、醇类和胺类等之间的差异最为显著,最利于菌种间鉴别区分。分析48 h区分效果较差原因可能为经过48 h培养,体系中大多数菌体已处于衰亡期,且生长环境恶劣,代谢产生一些次级代谢产物开始干扰菌体代谢生长,同时部分致病菌也会出现二次生长现象,利用一些在24 h之前不发酵的底物,产生一些24 h前其他菌株产生的特征性代谢产物,导致48 h后部分菌间的代谢产物相似性增加而难以区分。

3 结论

3.1 本文利用GC-MS对常见几种食源性致病菌进行胞外代谢轮廓分析,在24 h/48 h分别获得了175/160种代谢产物信息。对比空白培养基,发酵液中有大量有机酸、醇类和胺类等物质产生,且菌间各代谢产物种类和相对含量差异显著,其中以伤寒沙门氏菌产胺类物质含量最高,主要为尸胺和腐胺,小肠结肠炎不产醇类物质,阪崎肠杆菌产醇类物质达35%以上。

3.2 胞外代谢轮廓分析过程中发现各菌间代谢产生较丰富的特有代谢产物,其中部分代谢产物在其他菌中未见报道,可作为各菌间的潜在生物标志物或特征性代谢底物,为食源性致病菌鉴定区分提供新的检测靶标。

3.3 结合热图进行胞外代谢指纹图谱重建和聚类分析,发现各菌间24 h/48 h代谢指纹图谱均存在明显差异,但聚类分析结果与常规分类结果不同,分析原因

可能为培养基基底物质干扰和各菌种生长速度差异影响聚类结果。通过 PCA 分析各菌种胞外代谢轮廓发现可以通过菌间代谢产物鉴别区分不同菌种,同时当分析除糖类和氨基酸以外的胞外代谢产物时,区分鉴定效果明显提高,尤其在 24 h 时最好,为常见食源性致病菌区分鉴定提供方法学参考。

参考文献

- [1] 魏子淇,李汴生.食源性致病微生物的快速检测方法及其研究现状[J].现代食品科技,2013,29(2):438-442
WEI Zi-hao, LI Bian-sheng. Reviews of rapid detection methods for foodborne pathogenic microorganisms [J]. Modern Food Science & Technology, 2013, 29(2): 438-442
- [2] 黄宇锋,刘冬虹,聂炎炎,等.肉和肉制品中肠杆菌科细菌的检测和计数[J].现代食品科技,2013,29(2):409-412
HUANG Yu-feng, LIU Dong-hong, NIE Yan-yan, et al. Detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* in meat and meat products [J]. Modern Food Science & Technology, 2013, 29(2): 409-412
- [3] Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D. Mass spectrometry-based metabolomics [J]. Mass Spectrom Rev., 2007, 26(1): 51-78
- [4] Azizan K A, Baharum S N, Mohd Noor N. Metabolic profiling of *Lactococcus lactis* under different culture conditions [J]. Molecules, 2012, 17(7): 8022-8036
- [5] 袁艺,郭强,李多云,等.链球菌和放线菌的胞外代谢物代谢组学鉴定[J].国际口腔医学杂志,2011,38(4):399-402
YUAN Yi, GUO Qiang, LI Ming-yun, et al. Application of metabolomics for analysis of extracellular metabolites of *Streptococcus* and *Actinomycetes* [J]. International Journal of Stomatology, 2011, 38(4): 399-402
- [6] Mo M L, Palsson B O, Herrgard M J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast [J]. BMC Systems Biology, 2009, 3(37)
- [7] 陈雪,倪鹏,喻勇新,等.李斯特属细菌特征挥发性代谢物的鉴定分析[J].食品科学,2013,34(10):231-237
CHEN Xue, NI Peng, YU Yong-xin, et al. Characterization of volatile metabolites of *Listeria spp.* strains [J]. Food Science, 2013, 34(10): 231-237
- [8] Tait E, Perry J D, Stanforth S P, et al. Use of volatile compounds as a diagnostic tool for the detection of pathogenic bacteria [J]. TrAc Trends in Analytical Chemistry, 2014, 53: 117-125
- [9] Bos L D, Sterk P J, Schultz M J. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(5): e1003311
- [10] Lemfack M C, Nickel J, Dunkel M, et al. mVOC: a database of microbial volatiles [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D744-D748
- [11] Harrigan G G, Goodacre R. Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis: its role in biomarker discovery and gene function analysis [M]. Springer Science & Business Media, 2003
- [12] Firmin J L, Gray D. The biochemical pathway for the breakdown of methyl cyanide (acetonitrile) in bacteria [J]. Biochem. J., 1976, 158: 223-229
- [13] Guo A C, Jewison T, Wilson M, et al. ECMDB: the *E. coli* metabolome database [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D625-D630
- [14] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1, 4-butanediol [J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(7): 445-452
- [15] Meyer H, Liebeke M, Lalk M. A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome [J]. Analytical Biochemistry, 2010, 401(2): 250-259
- [16] 杨胜远,陆兆新,吕凤霞,等.微生物谷氨酸脱羧酶研究进展[J].食品科学,2007,28(1):354-360
YANG Sheng-yuan, LU Zhao-xin, LV Feng-xia, et al. Research progress review on microbial glutamate decarboxylase [J]. Food Science, 2007, 28(1): 354-360
- [17] Cevallos - Cevallos J M, Danyluk M D, Reyes - De - Corcuera J. I. GC - MS based metabolomics for rapid simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Muenchen*, and *Salmonella Hartford* in ground beef and chicken [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(4): M238-M246