

进口鸡翼中单核细胞增生李斯特菌的鉴定及其挥发性产物分析

李正义^{1*}, 贾俊涛¹, 唐静¹, 马云¹, 姜英辉¹, 李兆杰², 赵丽青¹

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002; 2. 威海出入境检验检疫局, 威海 264200)

摘要: **目的** 对从进口鸡翼中分离的菌株 F7-10 进行种属鉴定, 并通过顶空气相色谱-质谱联用法 (headspace gas chromatography-mass spectrometry, HS-GC-MS) 分析其液态培养代谢的挥发性产物。 **方法** 通过 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统分析菌株的生理生化特征, 结合 16S rRNA 基因和 *prfA* 基因 PCR 扩增测序鉴定分离菌株, 通过 HS-GC-MS 分析分离菌株 F7-10 代谢的挥发性产物, 并与单核细胞增生李斯特菌 ATCC 13932、格氏李斯特菌 ATCC 700545 和英诺克李斯特菌 ATCC 33090 的代谢挥发性产物进行比较分析。 **结果** 菌株 F7-10 为革兰氏阳性菌, 生理生化特征与单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的相似性为 98%, 协同溶血实验在靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强; 16S rRNA 基因序列与单增李斯特菌标准菌株的相似性为 99%, *prfA* 基因特异性扩增出现预期大小的目的片段。菌株 F7-10 在营养肉汤中代谢的挥发性产物主要有乙醇、3-羟基-2-丁酮、乙酸、丁酸、3-甲基戊酸、十二醇等, 与单增李斯特菌标准菌株的代谢挥发性产物种类相似, 但含量有差别。 **结论** 进口鸡翼中分离的菌株 F7-10 鉴定为单核细胞增生李斯特菌, 该菌产生的挥发性产物可为单核细胞增生李斯特菌的鉴定提供参考。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 鉴定; 挥发性产物; 顶空气相色谱-质谱联用法

Identification of *Listeria monocytogenes* from imported chicken wings and analysis of its volatile compounds

LI Zheng-Yi^{1*}, JIA Jun-Tao¹, TANG Jing¹, MA Yun¹, JIANG Ying-Hui¹, LI Zhao-Jie², ZHAO Li-Qing¹

(1. Technology Center for Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;
2. Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264200, China)

ABSTRACT: Objective To identify and characterize a bacterial strain F7-10 isolated from the imported chicken wings and analyze its volatile compounds (VCs) of liquid-state fermentation by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS). **Methods** The physiological and biochemical characteristics of the strain were elucidated by using VITEK 2 compact automated microbiology system. The 16S rRNA gene was sequenced and *prfA* gene from F7-10 was amplified by PCR to detect strain F7-10. Volatile compounds from F7-10 cultured with nutrient broth were detected by HS-GC-MS. The VCs emitted from four strains, including *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Listeria grayi* ATCC 70054, *Listeria innocua* ATCC33090 and F7-10, were analyzed and compared. **Results**

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2015IK203, 2015IK204)

Fund: Supported by Science and Technology Plan Projects of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (2015IK203, 2015IK204)

*通讯作者: 李正义, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测, E-mail: lizhengyisdcq@163.com

*Corresponding author: LI Zheng-Yi, Ph.D, Senior Engineer, Technology Center for Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China. E-mail: lizhengyisdcq@163.com

Strain F7-10 was identified as gram-positive bacteria and exhibited the highest levels of 98% probability to be *Listeria monocytogenes* based on the conventional physiological test. An enhanced zone of β -haemolysis at the intersection of *Staphylococcus aureus* was found. The sequence analysis of 16S rRNA gene of F7-10 isolation showed that it was very close to *Listeria monocytogenes* and the similarity was 99%. The purposed gene fragment was detected based on *prfA* gene amplification. The main VCs produced by F7-10 in nutrient broth were detected to be ethanol, acetoin, acetic acid, butanoic acid, 3-methylvaleric acid and dodecyl alcohol. The varieties of VCs behaved similarly between F7-10 and *Listeria monocytogenes* standard strain, but the content behaved differently. **Conclusion** Bacterial strain F7-10 isolated from the imported chicken wings is identified as *Listeria monocytogenes*. The VCs produced by F7-10 can provide basis for the identification of *Listeria monocytogenes*.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; identification; volatile compounds; headspace gas chromatography-mass spectrometry

1 引言

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)简称单增李斯特菌,是一种能够引起人兽共患病的食源性致病菌。单增李斯特菌可污染许多食品,包括禽、畜肉、发酵香肠和海产品等^[1]。单增李斯特菌的鉴定多采用传统的生化反应实验和溶血试验等,其他方法如 PCR、核酸探针、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)等为快速检测单增李斯特菌提供了关键性的技术手段^[2-4]。

传统生物学分离培养与生化鉴定是病原菌检测的金标准,其中协同溶血试验(christie, atkins and munch-petersen, cAMP)是鉴定单核细胞增生李斯特菌的重要步骤之一。16S rRNA 基因的高保守性使其作为标记基因广泛应用于细菌分类学研究中。然而,16S rRNA 基因也表现出了不容忽视的缺点:高保守性使其不能很好地区分属内不同的物种。PrfA(positive regulatory factor A)是李斯特菌最重要的毒力调节因子,由 *prfA* 基因编码^[5]。该因子调节李斯特菌毒力岛 I、毒力岛 II 上的毒力基因及其它潜在基因的表达,从而对李斯特菌的侵袭起到调控作用。通过比较 *prfA* 基因在李斯特菌属内的种间差异,可以建立单增李斯特菌的普通 PCR 鉴定方法。

细菌正常生理代谢过程中会产生挥发性化合物(volatile compounds, VCs),包括烃类、脂肪族醇类、酮类、芳香族化合物、含氮化合物等。Thorn 等^[6]在含 1%胰蛋白酶-0.5%酵母粉的肉汤中培养细菌,在绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分别鉴定出 9、10、11、12、12、15、19 种挥发性化合物,主要挥发性化合物(浓度 > 100 ng/mL)为乙醇、甲醛、2-甲基丁醛、2-甲基丙醛等。Bunge

等^[7]在线监测研究大肠杆菌、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、热带念珠菌(*Candida tropicalis*)在德国菌种保藏中心(Culture Collection Center in Germany, DSMZ)培养基中产生的挥发性代谢产物,分别鉴定出 9、8、9、10 种已知挥发性化合物。细菌代谢产生的挥发性化合物可以查询在线的数据库(<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>)^[8]。大多数细菌释放的挥发性化合物都具有细菌种属特异性,因此在某些情况下,挥发性特征或某些典型化合物能够作为检测和鉴别细菌的生物标志^[9-11]。

目前,细菌的 VCs 的检测方法主要有气相色谱法(gas chromatography, GC)、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、电子鼻法(electronic nose, EN)和质谱法(mass spectrometry, MS)等。气相色谱-质谱联用技术可以高通量、快速检测细菌挥发性代谢物^[12],一针进样完成对细菌挥发性代谢物的定性、定量分析。GC-MS 在食品微生物污染检测、室内微生物污染分析等方面有较多应用^[13]。

本研究采用 VITEK 快速鉴定系统结合 16S rRNA 基因测序和 *prfA* 基因特异性扩增对分离自鸡翼中的单增李斯特菌进行快速鉴定,利用静态顶空气质联用技术分析单增李斯特菌分离菌株和李斯特菌属标准菌株在营养肉汤中发酵产生的挥发性产物,以期为进一步通过统计学方法研究李斯特菌属间的 VCs 差异或找到单增李斯特菌特异性挥发性产物提供数据参考。

2 材料和方法

2.1 材料与试剂

菌株 F7-10 分离自进口冷冻鸡翼。单核细胞增生李斯特菌 ATCC 13932、格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)ATCC 700545、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)ATCC 33090 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 29213,购自美国菌种保藏中心。

营养肉汤(nutrient broth)、李氏增菌肉汤、PALCAM 琼脂、李斯特菌显色培养基和血琼脂平板(北京陆桥技术责任有限公司); G^+ 细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司); *Taq* DNA 聚合酶(天根生化科技北京有限公司); PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

2.2 仪器与设备

Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司); Infinity 3000 全自动凝胶成像系统(法国 Vilber 公司); Eppendorf AG 22331PCR 仪(德国艾本德股份公司); Agilent 7890B-5977A 气相色谱/质谱联用仪(美国安捷伦公司)。

2.3 形态观察及生理生化实验

无菌操作取进口鸡翼 25 g, 置于装有 225 mL 李氏增菌肉汤 LB₁ 的无菌均质杯中, 30 °C 恒温培养 24 h, 移取 0.1 mL, 转种于 10 mL LB₂ 增菌液内, 30 °C 恒温培养 18 h, 划线接种于 PALCAM 琼脂平板和李斯特菌显色培养基上, 36 °C 培养 24 h ~ 48 h, 观察菌落形态, 并穿刺和划线血平板观察溶血情况及其与金黄色葡萄球菌的协同溶血试验^[14]。使用全自动微生物鉴定仪和革兰氏阳性菌鉴定卡进行鉴定。

2.4 16S rRNA 基因序列测定

纯化的菌株 F7-10 在血琼脂平板上 36 °C 培养 24 h, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3') 和 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')。PCR 热循环条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物测序在北京六合华大基因科技股份有限公司青岛测序部完成。

2.5 *prfA* 基因 PCR 特异性扩增

采用 G^+ 细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒说明书提取分离菌株基因组 DNA。引物参照出入境检验检疫行业标准 SN/T 1869-2007^[15], 正向引物 *prfA*-F (5'-GATACAGAAAC ATCGGTTGGC-3'), 反向引物 *prfA*-R (5'-GTGTAATCTTGA TGCCATCAG-3'), PCR 扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 74 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应体系为 25 μ L, 上下游引物各加入 10 pmol, *Taq* DNA 聚合酶 2 U, 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 加入 2 μ L, 模板 2 μ L, 最后加去离子水至 25 μ L。PCR 产物由北京六合华大基因科技股份有限公司青岛测序部完成进行测序。

2.6 挥发性产物分析

2.6.1 细菌培养物的制备

菌株 F7-10 在营养肉汤培养基中, 36 °C, 120 r/min 条件下振荡培养 20 h, 进入对数生长期后期。吸取该培养物 5 mL 转入 20 mL 顶空瓶内, 加盖密封, 作为测试样品。每个

菌株培养物制备 3 份, 用于下面顶空气质分析试验。

2.6.2 顶空气质分析

顶空进样条件: 加热箱温度 55 °C, 定量环温度: 85 °C, 传输线温度: 100 °C, 样品平衡时间: 50 min; 色谱柱压力: 7.7 psi; 填充压力: 15 psi; 加压时间: 0.2 min; 进样持续时间: 1.0 min, 拔针时间: 0.5 min。

GC 条件: HP-INNOWax 色谱柱(30 m \times 250 μ m, 0.25 μ m); 分流进样, 分流比为 5:1, 隔垫吹扫流量为 3 mL/min; 升温程序: 初始温度 50 °C 保持 2 min, 以 7 °C/min 升至 180 °C; 再以 10 °C/min 升至 250 °C, 保持 2 min, 进样口温度: 250 °C; 载气: 高纯氦(He), 流速: 1 mL/min。

MS 条件: 电子轰击离子源, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, 电子能量 70 eV, 传输线温度 280 °C, 采集模式全扫描, 质量扫描范围 m/z : 33~300, 溶剂延迟: 2.2 min。

2.6.3 定性与定量

MS 结果经计算机检索谱库(NIST11.L)进行定性分析, 同时由 NIST MS Search 2.0 软件系统完成手动对照检索, 要求正反向匹配因子(Match)都大于 800, 可能性(Prob.%) 大于 60。采用提取离子流方式报告代表性挥发性物质的峰面积, 利用面积归一法计算挥发性化合物的相对含量。

3 结果与分析

3.1 形态和生理生化特征

菌株 F7-10 在 PALCAM 琼脂培养基上形成的菌落为灰绿色, 圆形, 周围有棕黑色水解圈, 在李斯特菌显色平板上为蓝色菌落, 圆形, 周围有白色晕圈。菌细胞革兰氏染色阳性, 杆状, 大小为 0.5 μ m \times 2.0 μ m。采用 VITEK 2 Compact 革兰氏阳性菌鉴定卡鉴定该菌株, 结果显示该菌株的生理生化特征与单增李斯特菌相似性为 98% (表 1), 处于鉴定卡置信水平极好的范围内(96%~99%)。在血琼脂上刺种, 刺种点周围产生狭小的透明溶血环, 与金黄色葡萄球菌的协同溶血实验发现菌株 F7-10 靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强。

3.2 PCR 扩增产物分析

分离菌株 F7-10 的 16S rRNA 测序序列长 1441 bp, 将菌株 F7-10 16S rRNA 序列在 NCBI 网站在线的 BLAST 比对工具进行序列比对分析, 发现菌株 F7-10 与单增李斯特菌标准菌株 ATCC 19117、ATCC 19114、ATCC 19113 和 ATCC 13932 的 16S rRNA 序列(GenBank No. CP013288.1, JF967620.1, JF967619.1 和 JF967617.1)相似性都为 99%。菌株 F7-10 和单增李斯特菌 ATCC 13932 的 *prfA* 基因的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示, 标准菌株和分离菌株 F7-10 都出现了预期大小的扩增条带, 测序结果显示, 该基因长为 274 bp, 其序列与单增李斯特菌 ATCC 13932 的 *prfA* 基因 100% 同源。综合菌株 F7-10 的形

表 1 分离菌株 F7-10 和单增生李斯特菌 ATCC13932 表型特征的比较
Table 1 Phenotypic feature comparison between isolated strain F7-10 and *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

鉴定项目	分离菌株 F7-10	标准菌株 ATCC 13932	鉴定项目	分离菌株 F7-10	标准菌株 ATCC 13932
苦杏仁苷\AMY	+	+	多粘菌素 B 耐受\POLYB	+	+
磷脂酰磷脂酶 C\PIPLC	+	+	D-半乳糖\dGAL	—	—
D-木糖\dXYL	—	—	D-核糖\dRIB	—	—
精氨酸双水解酶 1\ADH 1	—	—	L-乳酸盐产碱\ILATk	—	—
β -D-半乳糖苷酶\BGAL	—	—	乳糖\LAC	—	+
α -葡萄糖苷酶\AGLU	+	+	N-乙酰-D-氨基葡萄糖\NAG	+	+
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶\APPA	—	—	D-麦芽糖\dMAL	+	+
环式糊精\CDEX	+	+	杆菌肽耐受\BACI	+	+
L-天冬氨酸芳胺酶\AspA	—	—	新生霉素耐受\NOVO	+	+
β -半乳糖吡喃糖苷酶\BGAR	—	—	6.5%NaCl 生长\NC6.5	+	+
α -甘露糖苷酶\AMAN	—	+	D-甘露醇\dMAN	—	—
磷酸酶\PHOS	—	—	D-甘露糖\dMNE	+	+
亮氨酸芳胺酶\LeuA	—	+	支链淀粉\PUL	—	—
L-脯氨酸芳胺酶\ProA	—	—	D-棉子糖\dRAF	—	—
β -葡萄糖醛酸酶\BGURr	—	—	O/129 耐受\O129R	+	+
α -半乳糖苷酶\AGAL	—	—	水杨素\SAL	+	+
焦谷氨酸芳胺酶\PyrA	—	—	蔗糖\SAC	—	—
丙氨酸芳胺酶\AlaA	—	—	D-海藻糖\dTRE	+	+
酪氨酸芳胺酶\TyrA	+	+	精氨酸双水解酶 2\ADH2s	—	—
D-山梨醇\dSOR	—	—	奥普托欣耐受\OPTO	+	+
尿素酶\UREASE	—	—			

注: + 表示阳性; — 表示阴性。

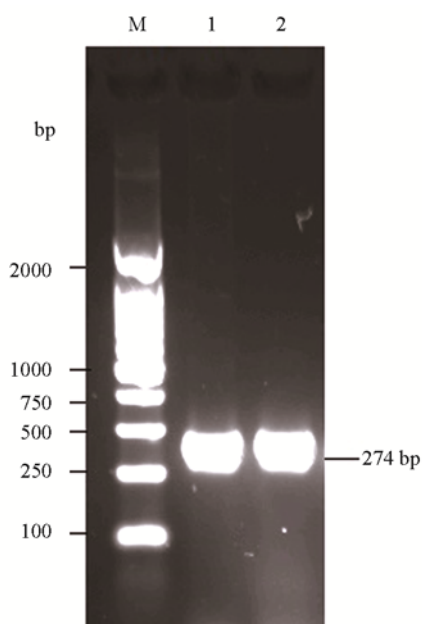


图 1 *prfA* 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 The agarose gel electrophoresis of *prfA* PCR products

注: M: Marker DL2000; 1: 单增李斯特菌 ATCC 13932; 2: 分离菌株 F7-10.

态特征, VITEK 2 Compact 革兰氏阳性菌鉴定卡测定的生理生化特征, 协同溶血实验以及 16S rRNA 和 *prfA* 基因序列比对结果, 鉴定 F7-10 菌株为单增李斯特菌, 命名为单增李斯特菌 F7-10。

3.3 分离菌株 F7-10 挥发性产物分析

以营养肉汤为培养基, 经过 20 h 培养, 不同李斯特菌属的细菌产生的挥发性产物采用顶空气相色谱-质谱联用法分析, 经 NIST 谱库检索和资料分析, 其结果见表 2。由表 2 可知, 分离菌株 F7-10 的主要挥发性产物为乙醇、3-羟基-2-丁酮、乙酸、丁酸、3-甲基戊酸、十二醇, 这和单增李斯特菌 ATCC 13932 产生的主要挥发性产物相同; 英诺克李斯特菌 ATCC 33090 产生的主要挥发性产物为乙醇、3-羟基-2-丁酮、乙酸、丁酸、3-甲基戊酸, 未检测到十二醇; 格氏李斯特菌 ATCC 700545 产生的主要挥发性产物为乙醇、异戊醇、3-羟基-2-丁酮、乙酸、丁酸, 未检测到 3-甲基戊酸和十二醇, 但检测到异戊醇(又名 3-甲基-1-丁醇)。十二醇, 又名月桂醇, 具有微弱但很持久的油脂气息, 在大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的 VCs 中存在^[16], 研究人员在金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的挥发性产物中检测到异戊醇^[11,16], 本研究从格氏

李斯特菌 ATCC 700545 的挥发性产物中也检测到大量异戊醇,而在单增李斯特菌和英诺克李斯特菌未检测到。这些 VCs 能否成为该细菌的特异性挥发性产物仍有待下一步扩大细菌种类及大样本量的研究,毕竟李斯特菌属还包括其他菌种: 绵羊李斯特菌(*Listeria iuanuii*), 威尔斯李斯特菌 (*Listeria welshimeri*), 莫氏李斯特菌 (*Listeria*

murrayi), 西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*)等。

本研究中 4 株李斯特菌属的细菌的挥发性产物中还有其他化合物,含量较低,比如 2-甲基哌嗪、正十五烷、正十六烷、苯甲醛、正十七烷等。苯甲醛和正十六烷也存在于单增李斯特菌污染冷藏牛肉的挥发性物质中,作为主要气味物质来表征牛肉是否被单增李斯特菌污染^[17]。

表 2 培养 20 h 后不同细菌菌株产生的各种挥发性物质
Table 2 Volatile compounds produced by various bacterial strains after 20 h incubation

化合物	分子式	挥发物产物相对含量 (%)				CAS 编号
		单核细胞增生李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>) ATCC 13932	分离菌株 F7-10	英诺克李斯特菌(<i>Listeria innocua</i>) ATCC 33090	格氏李斯特菌(<i>Listeria grayi</i>) ATCC 700545	
乙醇(ethanol)	C ₂ H ₆ O	19.95	4.72	4.08	13.75	000064-17-5
奎诺二甲基胺酯(isoamylaminel)	C ₅ H ₁₃ N	—	—	1.29	—	000107-85-7
异戊醇(3-methyl-1-butanol)	C ₅ H ₁₂ O	—	—	—	12.99	000123-51-3
3-羟基-2-丁酮(3-hydroxy-2-butanone)	C ₄ H ₈ O ₂	21.86	16.98	42.8	30.29	000513-86-0
2-甲基哌嗪(2-methylpiperazine)	C ₅ H ₁₂ N ₂	0.7	0.46	0.53	—	000109-07-9
乙酸(acetic acid)	C ₂ H ₄ O ₂	22.23	41.17	28.28	24.33	000064-19-7
庚醛(heptaldehyde)	C ₇ H ₁₄ O	—	0.68	—	—	000111-71-7
2-乙基己醇(2-ethylhexanol)	C ₈ H ₁₈ O	—	—	2.04	—	000104-76-7
N-丙基-1,3-丙二胺 (N-propyl-1,3-propanediamine)	C ₆ H ₁₆ N ₂	0.55	—	—	—	023764-31-0
2-丙基-1-戊醇(2-propyl-1-pentanol)	C ₈ H ₁₈ O	—	—	—	0.86	058175-57-8
正十五烷(pentadecane)	C ₁₅ H ₃₂	0.77	—	—	0.94	000629-62-9
苯甲醛(benzaldehyde)	C ₇ H ₆ O	1.55	0.82	—	0.83	000100-52-7
异丁酸(Isobutyric acid)	C ₄ H ₈ O ₂	—	1.39	1.44	1.48	000079-31-2
正十六烷(hexadecane)	C ₁₆ H ₃₄	2.84	1.85	2.15	1.88	000544-76-3
N-甲基己内酰胺 (n-methylcaprolactam)	C ₇ H ₁₃ NO	—	—	—	0.38	002556-73-2
丁酸(butanoic acid)	C ₄ H ₈ O ₂	5.72	8.4	7.74	6.37	000107-92-6
3-甲基戊酸(3-methyl-pentanoic acid)	C ₆ H ₁₂ O ₂	4.39	6.58	6.16	—	000105-43-1
3,3-二甲基哌啶 (3,3-dimethylpiperidine)	C ₇ H ₁₅ N	—	—	—	0.37	001193-12-0
异戊酸(isovaleric acid)	C ₅ H ₁₀ O ₂	—	—	—	2.96	000503-74-2
正十七烷(heptadecane)	C ₁₇ H ₃₆	2.15	1.7	1.97	1.63	000629-78-7
十二醇(dodecyl alcohol)	C ₁₂ H ₂₆ O	16.12	14.45	—	—	000112-53-8
1-甲基戊胺(1-methylpentylamine)	C ₆ H ₁₅ N	0.55	0.35	0.83	—	005329-79-3
(2S)-2-氨基-6-甲胺基己酸 ((2S)-2-amino-6-methylamino-hexanoic acid)	C ₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	—	—	—	0.49	001188-07-4

注: “—”表示未检出。

4 结 论

本研究从进口冷冻鸡翼中分离得到的菌株 F7-10, 采用全自动微生物鉴定系统结合 16S rRNA 基因测序和 *prfA* 基因特异性扩增技术即传统的生化试验结合分子生物学方法两者结合鉴定分离菌株 F7-10 为单增李斯特菌。本研究还采用顶空气相色谱-质谱联用法快速分析单增李斯特菌分离菌株和李斯特菌属标准菌株在营养肉汤中发酵产生的挥发性产物, 发现单增李斯特菌 F7-10 在营养肉汤中代谢的挥发性产物主要有乙醇、3-羟基-2-丁酮、乙酸、丁酸、3-甲基戊酸、十二醇等。随着研究工作的深入, 分离得到的李斯特菌属菌株逐渐增多, 从而得到更多的李斯特菌属细菌挥发性产物的数据信息, 从而为找到单增李斯特菌特异性挥发性产物或者通过统计学方法区分不同的李斯特菌奠定基础。

参考文献

- [1] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis [J]. *Microb Infect*, 2007, 9(10): 1236–1243
- [2] Ingiani A, Floris M, Palomba P, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods by a combination of PCR and DNA probe [J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15(5): 275–280
- [3] Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(5): 851–875
- [4] 于丰宇, 李林, 王红, 等. 应用 PCR 技术快速测定食品中单核细胞增生李斯特氏菌毒力[J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 164–168.
Yu FY, LI L, WANG H, *et al.* Rapid PCR detection of *Listeria monocytogenes* virulence in food [J]. *Food Sci*, 2010, 31(23): 164–168
- [5] 白春光, 殷月兰, 贾艳艳, 等. 单核细胞增生性李斯特菌 *prfA* 基因缺失株的构建及其生物学特性[J]. *微生物学报*, 2011, 51(11): 1555–1560.
Bai CG, Yin YL, Jia YY, *et al.* Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* $\Delta prfA$ mutant strains [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(11): 1555–1560.
- [6] Thorn RMS, Reynolds DM, Greenman J. Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro [J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 84(84): 258–264.
- [7] Bunge M, Araghipour N, Mikoviny T, *et al.* On-Line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction mass spectrometry[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(7): 2179–2186.
- [8] Lemfack MC, Nickel J, Dunkel M, *et al.* mVOC: a database of microbial volatiles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D744–D748.
- [9] Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24: 814–842.
- [10] Dhaisne A, Guellerin M, Laroute V, *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of dairy *Lactococcus lactis* biodiversity in milk: volatile organic compounds as discriminating markers [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(15): 4643–4652.
- [11] 史辉, 唐俊妮, 陈娟, 等. 顶空固相微萃取分析金黄色葡萄球菌挥发性代谢产物的条件优化[J]. *食品科学*, 2015, 36(12): 185–190.
Shi H, Tang JN, Chen J, *et al.* Optimization of headspace solid phase micro-extraction conditions for GC-MS analysis of volatile metabolites from *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Sci*, 2015, 36(12): 185–190.
- [12] 刘阳, 邓静, 吴华昌, 等. 柑橘果皮中生香酵母的筛选及挥发性香气成分分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 12(5): 4050–4055.
Liu Y, Deng J, Wu HC, *et al.* Isolation, identification and volatile compound analysis of an aroma-producing yeast from kimchi [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 12(5): 4050–4055.
- [13] 梁华正, 张雯, 饶军, 等. 微生物挥发性代谢产物的产生途径及其质谱检测技术[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(1): 124–133.
Liang HZ, Zhang X, Rao J, *et al.* Microbial volatile organic compounds: generation pathways and mass spectrometric detection [J]. *J Chin Biotechnol*, 2008, 28(1): 124–133.
- [14] GB 4789.30–2010 食品安全国家标准食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
GB 4789.30–2010 National food safety standard- Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes* [S].
- [15] SN/T 1869-2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S].
SN/T 1869-2007 Rapid detection methods for pathogens in foods—PCR method [S].
- [16] 黄冬薇, 张德明, 王露露, 等. 革兰阴性菌挥发性有机物的检测与分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(11): 1224–1226.
Huang DW, Zhang DM, Wang LX, *et al.* Determination of head space volatile organic compounds from cultured gram-negative bacteria [J]. *Chongqing Med J*, 2013, 42(11): 1224–1226.
- [17] 金伟平, 黄志强, 刘群群, 等. 顶空固相微萃取-气质联用法分析单增李斯特菌污染冷藏牛肉的挥发性物质[J]. *食品科学*, 2012, 33(2): 243–247.
Jin WP, Huang ZQ, Liu QQ, *et al.* Analysis of volatile components from beef contaminated with *Listeria monocytogenes* by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectroscopy [J]. *Food Sci*, 2012, 33(2): 243–247.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



李正义, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测。

E-mail: lizhengyisdcq@163.com