牛肉低温贮藏环境中沙门氏菌诱导耐酸响应的存在程度及其产生机制

郎晨晓[1]，张一敏[1]，朱立贤[1]，梁荣蓉[1]，毛衍伟[1]，杨啸吟[1]，韩广星[2]，
罗欣[1*]，董鹏程[1,*]

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院，山东泰安 271018；
2. 国家肉牛牦牛产业技术体系临沂站，山东临沂 276000)

摘 要：冷鲜牛肉生产过程中弱酸的压力环境能够引发沙门氏菌产生诱导耐酸响应（Acid tolerance response, ATR），危害肉品安全。但该现象一旦产生，其在牛肉低温成熟与贮藏过程中的消长规律仍不明确、调控机制尚不清楚。为了探究牛肉生产和销售过程中沙门氏菌 ATR 的存在程度及其产生机制，本实验探究了微酸诱导、双组分基因敲除、低温长期贮藏对沙门氏菌耐酸能力的影响，同时借助 λRed 同源重组、RT-qPCR 及氨基酸添加实验探索菌株耐酸性产生的内在机理。结果表明微酸诱导能够显著增强沙门氏菌的耐酸能力（$P < 0.05$），并且 ATR 一旦形成，在牛肉低温贮藏（4 ℃）的过程中至少可以维持 1 周，对食品安全有极大危害。牛肉培养基作为微酸的细菌生长介质，在低温下其本身并不能引发沙门氏菌产生诱导耐酸反应，说明低温处理可能是抑制沙门氏菌 ATR 的重要方法。RT-qPCR 和氨基酸添加实验表明，沙门氏菌的双组分系统 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 均参与酸性环境的感知，并能通过调控精氨酸脱羧和赖氨酸脱羧系统来提高菌株的耐酸性，这从氨基酸代谢角度解释了沙门氏菌 ATR 的产生机制，同时也揭示了食品基质提升微生物耐酸性这一表观现象的内在机理。

关键词：牛肉；沙门氏菌；诱导耐酸响应；双组分调控系统；PhoP/PhoQ；PmrA/PmrB；食品安全

Study on the Existence of Acid Tolerance Response of *Salmonella* and its Mechanism during Beef chilled Storage

LANG Chenxiao[1], ZHANG Yimin[1], ZHU Lixian[1], LIANG Rongrong[1], MAO Yanwei[1], YANG Xiaoyin[1], HAN Guangxing[2], LUO Xin[1,*], DONG Pengcheng[1,*]

(1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China；2. National Beef Cattle Industrial Technology System, Linyi Station, Linyi 276000, China)

Abstract: Mild acidic and nutrient environment of chilled beef may induce acid tolerance response (ATR) of *Salmonella*, posing a great risk to meat quality and safety. But the existence and mechanism of this phenomenon during the aging and storage of beef was still unclear. The influence of acid induction, two-component systems and the low-temperature storage on the formation of ATR were evaluated, λRed recombination system, RT-qPCR and amino acid addition experiments were also conducted to explore the mechanism. The results showed that mild acid induction significantly enhanced the acid tolerance of *Salmonella* ($P < 0.05$), and once induced, it could be

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31801609）；现代农业产业技术体系建设专项资金资助（CARS-37）；山东省现代农业产业技术体系牛产业创新团队（SDAIT-09-09）；山东省自然科学基金青年项目（ZR2017BC064）

第一作者简介：郎晨晓（1995—）（ORCID: 0000-0001-9374-9245），女，硕士研究生，研究方向为畜产品加工。E-mail：1213297892@qq.com

*通讯作者：罗欣（1961—）（ORCID:0000-0002-8583-8093），男，教授，博士，研究方向为畜产品加工。E-mail：luoxin@sdau.edu.cn

董鹏程（1986—）（ORCID: 0000-0001-8994-2608），男，讲师，博士，研究方向为畜产品加工。E-mail: dpch@dpch.cn

maintained for at least 1 week at 4 ℃. As a mild acidic incubation medium, beef does not induce the ATR at 4 ℃, indicating that low-temperature treatment may be an important method to inhibit ATR in *Salmonella* typhimurium. RT-qPCR and amino acid addition experiments showed that PhoP/PhoQ and PmrA/PmrB are involved in the perception of the acidic environment, improving the bacterial acid resistance by regulating arginine decarboxylation and lysine decarboxylation systems. This explains the formation of the ATR from the aspect of amino acid metabolism, which may also reveal an explanation of why substrates enhance the acid resistance of some bacteria in food.

Key words: Beef; *Salmonella*; acid tolerance response; two-component regulatory system; PhoP/PhoQ; PmrA/PmrB; food safety

中图分类号：TS251.5+2　　文献标志码：A

DOI：10.7506/spkx1002-6630-20191128-287

沙门氏菌（*Salmonella*）能够引起腹痛、腹泻、肠胃炎和发烧等疾病，是世界范围内造成人类感染和经济损失的重要食源性致病菌[1]。据欧盟食品安全局统计，沙门氏菌在 2017 年引发 93583 例人类感染，并在 2013-2017 年间始终是引发欧盟食源性疾病的第二大食源性致病菌[2]。在我国，动物性食品的消费是引发沙门氏菌病的首要原因[3]。诱导耐酸响应（Acid tolerance response, ATR）是指细菌在微酸条件下生存一段时间后（即诱导过程），对于普遍致死的强酸性环境（即酸激介质）的抵抗能力增强的现象，又称作酸耐受应答反应[4]。ATR 一旦形成，不仅能提高细菌对酸的抵抗，还能增强菌株毒力基因的表达，增强细菌耐热、耐盐、耐氧化等能力，使细菌轻易越过食品加工过程中的各类栅栏因子，危害终端食品的安全[4-5]。针对肉类生产，冷鲜牛肉的生产及成熟（aging）过程具有诱发沙门氏菌 ATR 的可能，这些诱导因素包括酸性消毒减菌剂的广泛应用在工厂内部形成的弱酸环境、宰后胴体 pH 的降低、高蛋白的营养成分等[6-8]。然而目前沙门氏菌 ATR 被引发后，其在肉牛的屠宰过程及牛肉贮藏过程中的消长规律仍不明确，并且，外界的弱酸性环境具体是如何诱发细菌的 ATR？相关反应机理仍需进一步探索。

细菌诱导耐酸现象的产生是多重生理生化作用的共同结果，如双组分调控系统（Two-component regulatory system, TCS）、酸休克蛋白（Acid shock proteins, ASPs）、细胞膜脂肪酸组成的调节、膜系统对质子的阻挡及外排以及基于氨基酸代谢的细胞内 pH 平衡的维持等过程[9]。其中，TCS 对于酸性信号的感知至关重要[10]，它由一个跨膜的组氨酸蛋白激酶（histidine protein kinase, HK）和一个位于胞质内的调控蛋白（reaction regulatory protein, RR protein）组成，是细菌感知外界环境信号，并将信号分子传导至菌体内部，从而激发相应调控机制的重要结构[11]。多个研究表明，作为 TCS 体系中的一种，PhoP/PhoQ 可以响应酸性信号，激活下游的耐酸响应，产生小分子 ASPs 来增强细菌的酸耐受能力[12-14]。然而，除 ASPs 外，PhoP/PhoQ 与氨基酸代谢等机制的相互作用仍鲜见报道。氨基酸代谢能够通过脱羧作用消耗质子并产生碱性物质，是细菌维持胞内 pH 稳定的重要生化过程，沙门氏菌的精氨酸脱羧和赖氨酸脱羧系统也被广泛报道[15-16]。Tran 等[10]通过定量蛋白质组对沙门氏菌 PhoP/PhoQ 正常及缺失菌株进行对比，发现缺失组中与精氨酸代谢相关的约 10 种蛋白质表达出现差异，说明沙门氏菌的精氨酸代谢与 PhoP/PhoQ 调控有关。鉴于精氨酸代谢是细菌耐酸响应的重要机制[15]，本研究推测，除了 ASPs 途径，氨基酸代谢可能也是 PhoP/PhoQ 调控的重要靶过程。与此同时，除 PhoP/PhoQ 外，双组分系统有着多元化的信号感应体系，如 PmrA/PmrB、EvgS/EvgA 也能对 H^+作出响应[17-18]，有可能在调节氨基酸代谢方面存在协同或拮抗作用。

因此，本研究模拟了沙门氏菌在牛肉生产、贮藏过程中经历的弱酸、低温、高蛋白的环境，辅以 λRed 基因敲除技术，探究了微酸诱导、低温长期贮藏、双组分调控对沙门氏菌耐酸响应的影响，以明确耐酸响应在牛肉加工与贮藏过程中的存在程度与消长规律。并通过 RT-qPCR、氨基酸添加实验等技术建立双组分系统与氨基酸代谢的联系，提出并验证沙门氏菌的双组分系统 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 能够感应细胞外 H^+浓度，并调控氨基酸代谢系统以获得更高的耐酸性这一理论假设，旨在进一步解释细菌诱导耐酸反应产生的内在机理。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

鼠伤寒沙门氏菌标准菌株（*S. Typhimurium* ATCC 14028）由山东农业大学食品科学与工程学院肉品实验室保存。

脑心浸液培养基 （Brain Heart Infusion medium，BHI） 北京陆桥技术股份有限公司；脑心浸液琼脂 （Brain Heart Infusion Agar，BHIA） 北京陆桥技术股份有限公司；MiniBEST Universal RNA 提取试剂盒 宝生物工程（大连）有限公司；PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real time） 宝生物工程（大连）有限公司；L-精氨酸 北京博奥拓达科技有限公司；L-赖氨酸 北京博奥拓达科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

5804R 离心机 德国 Eppendorf 公司；G154DWS 灭菌锅 厦门致微；移液枪 德国 Eppendorf 公司；T100 PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司；CFX96 实时 PCR 检测系统 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 TCS 缺陷菌株的构建

参照姜娜等[19]的方法，利用 λRed 重组系统，分别构建 TCS PhoP/PhoQ 缺失菌株*⊿phoP* 和 TCS PmrA/PmrB 缺失菌株*⊿pmrA*。首先，利用 PCR 技术构建 *phoP* 和 *pmrA* 基因的同源打靶片段，片段的上下游为目的基因的同源臂，中间为卡那霉素抗性基因。同时，为制作感受态细胞，将质粒 pKD46 转化至鼠伤寒沙门氏菌 14028，并用 L-阿拉伯糖诱导 Red 重组蛋白的表达。而后将 PCR 扩增的同源片段电转化至宿主细胞，使打靶片段与菌体基因组发生同源重组，并同时获得氨苄抗性，立刻孵育重组细胞，复苏后用卡那霉素和氨苄青霉素抗性平板筛选突变子。最后将质粒 pCP20 转化入鉴定成功的突变子，利用其表达的 FLP 翻转酶去除重组菌的抗性，获得*⊿phoP* 和*⊿pmrA* 菌株。

1.3.2 肉质培养基（meat medium, ME）的制备

参照 Álvarez-Ordóñez 等[20]的方法，将牛肉去除脂肪和筋腱后切碎，375 g 牛肉与 750 mL 去离子水在烧杯中混匀后灭菌（121℃、15min），然后用无菌纱布过滤出肉汤，分装于 100 mL 离心管并置于-20 ℃备用。

1.3.3 低温贮藏过程中沙门氏菌耐酸能力的测定

参照 Buchanan 等[21]的方法，利用添加葡萄糖的方式激发出细菌的 ATR。添加了 10 %（*w/v*）葡萄糖的 TSB 培养基（TSBG）的 pH 在培养过程中缓慢下降，能够为细菌提供一个温和的酸性适应环境，达到酸诱导的目的。

将-20 ℃保存的正常沙门氏菌 14028 和*⊿phoP*（20 μL）接种于 10 mL NTSB 培养基（TSB 去除葡萄糖）中 37 ℃过夜活化，然后取 100 μL 的培养物分别接种于 50 mL NTSB（对照组）和 50 mL TSBG（微酸诱导组），37 ℃过夜培养。将培养物离心（10000 × g、4 ℃、5min）得到的菌体转移至 4±2 ℃的 100 mL ME 中低温贮藏 7 天。贮藏过程中菌株耐酸能力的测定参照 Liu 等[22]的方法，在第 1 天和第 7 天从 ME 中取出适量菌液，根据提前测定的培养基中的活菌浓度，通过蛋白胨缓冲液稀释后接种于 9 mL 的 pH 值为 3 的 BHI（用 HCl 调节）中，统一细胞浓度为 5 log CFU/mL，37 ℃下酸激 2h。在酸激前和酸激后，梯度稀释并涂布于 BHIA 平板，37 ℃过夜培养后进行菌落计数。进行三次独立重复实验。

参照 Skandamis 等[23]的方法，用△log 表示的耐酸能力。△log 是指菌株在酸激前与酸激后的菌落对数值的差，单位表示为△log CFU/mL。计算公式为：$\triangle\log = (\log N)_{0h} - (\log N)_{2h}$，其中，$(\log N)_{0h}$ 为酸激前的菌落数的对数值，$(\log N)_{2h}$ 为酸激结束后的菌落数的对数值，△log 值越大，代表菌株的耐酸能力越弱。

1.3.4 氨基酸代谢相关基因表达量的测定

将沙门氏菌 14028、*ΔphoP* 和*ΔpmrA*（20 μL）接种于 10 mL NTSB 中活化后，取 20 μL 培养物接种于 10 mL 的 pH 值为 5.4 的 NTSB（牛肉的极限 pH 值为 5.4[24]）中，37 ℃过夜诱导。

按照 RNA 提取试剂盒（TaKaRa，中国大连）的说明提取三种菌的 RNA，将符合浓度和纯度的 RNA 反转录成 cDNA，置于-20 ℃保存。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real time，TaKaRa，中国大连）的说明进行 RT-qPCR，一个 PCR 体系包括 2 μL cDNA、12.5 μL 2 × SYBR *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus)、9.5 μL RNase Free Water 和 0.5 μL 浓度为 10 μM 的上下游引物。PCR 程序为：1）95 ℃ 30 s；2）39 个循环：95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s； 3）95 ℃ 10 s；4） Melt Curve 65 ℃ to 95 ℃ 5s。

本实验所用的基因为精氨酸代谢中编码精氨酸脱羧酶的 *adiA*、赖氨酸代谢中编码赖氨酸脱羧酶的 *cadA* 以及内参基因 *rrsA*，引物的碱基序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-qPCR

基因名称	引物名称	碱基序列 (5'-3')	参考文献
rrsA	*rrsA*-F	CAACGAGCGCAACCCTTATC	Álvarez-Ordóñez 等[25]
	rrsA-R	TCCCCACCTTCCTCCAGTTT	
adiA	*adiA* -F	AACAGTCCGCAGGTGGGTTA	Álvarez-Ordóñez 等[25]
	adiA -R	AATTTCCGTGCCTTCGGTTT	
cadA	*cadA* -F	ACGCCTGAAAAGCGAATCTG	Álvarez-Ordóñez 等[25]
	cadA -R	CATGCCATGCGCTATCTGAA	

参照 Livak 等[26]的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行基因相对表达分析，将组分系统正常的沙门氏菌的基因表达量作为对照，最终结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。实验进行三次独立重复。

1.3.5 添加氨基酸实验的菌株 ATR 的测定

参照 Jonge 等[27]的方法，取 1 mL 的 1.3.4 中过夜诱导后的三种菌液（细胞浓度约为 7.5 log CFU/mL），分别接种于 9 mL 的 pH 值为 2.5（用 HCl 调节）的纯矿物质培养基（MM）、添加 0.01 %（*w/v*）的 L-精氨酸的矿物质培养基（MM+Arg）、添加 0.01 %（*w/v*）的 L-赖氨酸的矿物质培养基（MM+Lys）中，置于 37 ℃酸激 2 h。在酸激前和酸激后分别进行菌落计数，最终用△log 表示菌株的耐酸能力。实验进行三次独立重复。

1.4 数据分析

RT-qPCR 的数据用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件处理。用 SAS 9.0 软件的混合模型（MIXED Procedure）进行耐酸性分析，在低温贮藏的耐酸性测定实验中，双组分系统、微酸处理、贮藏时间和它们的交互作用作为影响耐酸性的固定因素，实验重复作为随机因素，在酸激介质中添加氨基酸的耐酸性测定实验中，酸激介质、双组分系统和它们的交互作用作为影响耐酸性的固定因素，实验重复作为随机因素，数据用平均值±标准误表示，差异显著水平 $P < 0.05$。用 Sigmaplot 10.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 微酸诱导、双组分基因敲除及长时间低温贮藏对沙门氏菌耐酸性的影响

表 2 显示了经过不同诱导处理的 PhoP/PhoQ 正常菌（14028）和缺失菌（*△phoP*）在不同贮藏时间点的耐酸情况，△log 值越大代表细菌的耐酸能力越弱。由分析结果看出，双组分系统、微酸诱导处理、低温贮藏时间三因素的交互作用对耐酸能力影响不显著（$P > 0.05$）。双组分系统和微酸处理、微酸处理和贮藏时间的交互作用对耐酸能力有显著影响（$P < 0.05$）。

表 2 低温贮藏（4±2℃）过程中不同诱导处理的菌株耐酸能力的测定（△log CFU/mL）

Table 2 The acid tolerance of strains of different induction treatments during the storage at 4 ± 2 ℃

微酸处理	双组分系统 PhoP/PhoQ	贮藏时间（d）		SE	*P* 值			
		1	7		双组分系统×贮藏时间	贮藏时间×微酸处理	双组分系统×微酸处理	双组分系统×微酸处理×贮藏时间
未诱导	正常（14028）	4.75	4.74	0.31	0.450	0.006	0.032	0.173
	缺失（⊿*phoP*）	4.23	5.15					
诱导	正常（14028）	2.21	1.44					
	缺失（⊿*phoP*）	3.31	2.26					

注：△log CFU/mL：酸激处理 2h 后沙门氏菌的菌落下降数

如图 1 所示为沙门氏菌 ATR 的产生以及在低温贮藏过程中的消长变化，及贮藏前微酸处理和贮藏时间的交互作用对沙门氏菌耐酸性的影响。经过 TSBG 微酸诱导的菌株的耐酸能力显著高于对照组（$P < 0.05$），说明沙门氏菌分解其中的葡萄糖形成的微酸环境能够激发细菌的 ATR，与 Malheiros 等[28]和 Samelis 等[29]的研究结果一致。诱导菌株在第 7 天的耐酸性仍显著高于未诱导组（$P < 0.05$），这说明，沙门氏菌的 ATR 一旦产生，在低温环境中至少可以维持 7 天，该结果表明，致病菌的 ATR 可能会贯穿牛肉的整个分割、运输和贮藏过程，并且其产生的耐酸、耐渗透压、耐盐等交叉保护作用可能随原料一直进入下游产品（如发酵肉制品），突破栅栏因子，对食品安全造成极大的危害，但目前这种现象在牛肉产业的存在却很少受到重视。

相对于微酸诱导组，对照组菌株在 7 天低温贮藏过程中的耐酸能力无显著变化（$P > 0.05$），说明虽然在长期贮藏过程中沙门氏菌一直处于微酸的肉汤培养基中（pH 值为 5.2-5.7），但该低温环境并未引发对照组菌株耐酸性的增强，其原因可能是沙门氏菌的诱导耐酸应激状态的产生需要蛋白质的从头合成以及能量的大量消耗[30]，而低温的贮藏环境可能抑制了相关酶的活性，进而抑制了贮藏过程中 ATR 的产生。与之形成对比的是，诱导菌株在第 7 天的耐酸能力显著高于第 1 天（$P < 0.05$），这可能是因为贮藏期之前的微酸处理已经激发了细菌的包含诱导耐酸在内的某些应激机制，产生酸休克蛋白，在贮藏过程中持续调节沙门氏菌生理过程，进而表现出逐步增强的耐酸性现象。类似的，Tiwari 等[30]的研究表明贮藏前诱导的沙门氏菌从外界酸性信号的感知到 ATR 相关蛋白的合成仅需要 1 小时，在 1 小时后添加四环素和氯霉素等抑制蛋白产生的抗生素对于诱导耐酸的抑制已经失去效果，同时，温度因素对于 ATR 的影响极大，并且显著高于培养基中营养成分对耐酸性的影响。

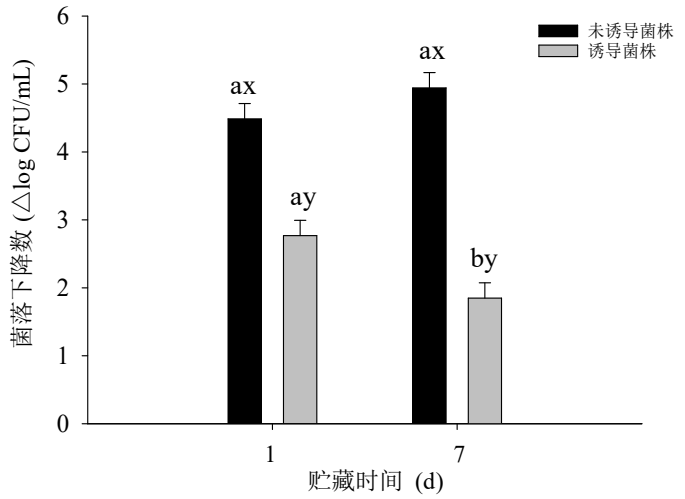


图 1 低温贮藏（4±2℃）过程中沙门氏菌耐酸能力的测定（△log CFU/mL）

Fig. 1 The acid tolerance of *Salmonella* during the incubation at 4 ± 2 ℃

注： a-b：表示不同贮藏时间内差异显著（$P < 0.05$）；x-y：表示不同诱导条件间差异显著（$P < 0.05$）；△log CFU/mL：酸激处理 2h 后沙门氏菌的菌落下降数

为研究双组分系统 PhoP/PhoQ 对菌株诱导耐酸能力的贡献，分析微酸处理和敲除双组分基因的交互作用对耐酸性的影响，结果如图 2 所示。结果显示，PhoP/PhoQ 对耐酸性的提升与细菌贮藏前微酸处理（诱导）有显著的交互影响（$P < 0.05$）。*phoP* 基因的敲除能够显著降低微酸处理组沙门氏菌的耐酸能力（$P < 0.05$），但对对照组的影响并不显著（$P > 0.05$）。该结果表明微酸处理和双组分系统能够协同提升沙门氏菌的耐酸能力，是沙门氏菌 ATR 系统的两个重要组成成分，并证实了微酸环境中的 H^+通过 PhoP/PhoQ 启动沙门氏菌内部的耐酸机制。Soncini 等[17]的研究结果表明 PhoP/PhoQ 能够感应环境中的 H^+，当环境中的 Mg^{2+}浓度较高时，被 PhoP/PhoQ 激活的下游基因的表达反而出现下调，出现拮抗效应，但本实验中 PhoP/PhoQ 调控耐酸响应的过程是否受金属离子影响仍待研究。

当 *phoP* 缺失后，经过诱导的沙门氏菌的耐酸能力虽然降低，但仍显著高于未经诱导的菌株（$P < 0.05$），这说明在诱导菌株抵抗酸性胁迫的过程中，除了 PhoP/PhoQ，还有其他耐酸机制的保护作用，如其他双组分信号感应体系、细胞膜系统和质子外排系统等。已有研究表明，细菌的 PmrA/PmrB、OmpR/EnvZ 等双组分系统也能够对外界的酸性信号作出响应[17,31]。

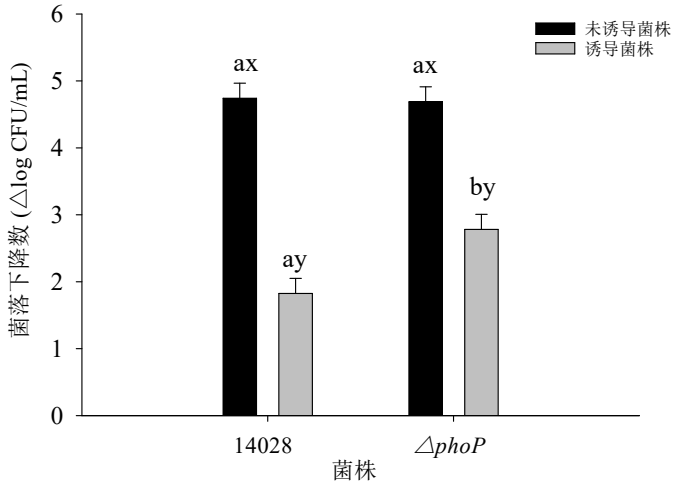


图 2 不同菌株的耐酸能力的测定（△log CFU/mL）

Fig. 2 The acid tolerance of different strains

注： a-b：表示不同菌株间差异显著（$P < 0.05$）；x-y：表示不同诱导条件间差异显著（$P < 0.05$）；△log CFU/mL：酸激处理 2h 后沙门氏菌的菌落下降数

2.2 TCS 缺失对精氨酸和赖氨酸代谢相关酶基因表达量的影响

氨基酸脱羧反应能够消耗细胞内部的质子，配合细胞膜上的氨基酸转运体系，维持细胞内部的 pH，减少外界酸性环境对细胞的损伤，提高细菌在酸性胁迫下的残存率，其中，精氨酸脱羧系统和赖氨酸脱羧系统是重要的组成部分[15-16]。为了研究 PmrA/PmrB 是否跟 PhoP/PhoQ 一样，也能调控沙门氏菌 ATR，并且该过程是否是通过精氨酸和赖氨酸两种脱羧代谢途径来实现的，本研究对比了 PmrA/PmrB 和 PhoP/PhoQ 缺失前后，沙门氏菌的两种脱羧酶编码基因（*adiA* 和 *cadA*）的表达水平。

图 3 结果显示，沙门氏菌的 *phoP* 和 *pmrA* 缺失后，精氨酸脱羧酶编码基因 *adiA* 的表达量显著降低（$P < 0.05$）。该结果表明，除了 PhoP/PhoQ，PmrA/PmrB 也能被环境中的 H^+信号激活，进而对 ATR 产生调控，精氨酸脱羧系统是它们的正向调控靶系统。Brenneman 等[32]发现当菌株的 *adiA* 和 *adiC*（编码逆向转运蛋白）被诱导表达时，PhoP/PhoQ 缺失沙门氏菌在 pH 3.0 的环境中的存活能力显著提升，间接证实了双组分系统对氨基酸代谢的调控。Tran 等[10]发现沙门氏菌的 PhoP/PhoQ 缺失后，与精氨酸代谢相关的 10 种蛋白质表达出现差异，说明精氨酸代谢与 PhoP/PhoQ 有关，与本实验的结果是一致的。

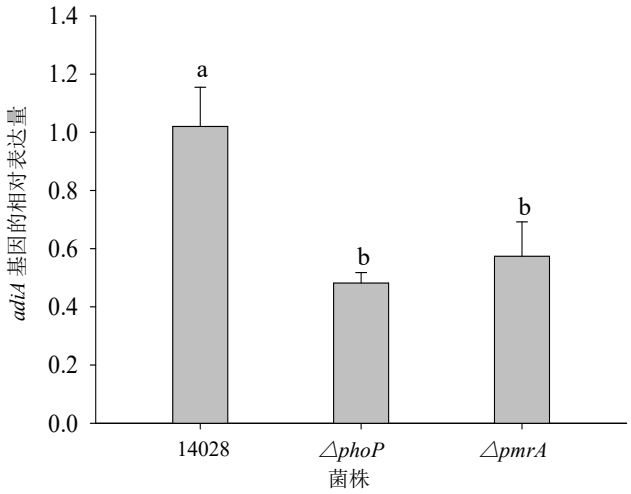


图 3 组分系统基因缺失后精氨酸脱羧酶编码基因 *adiA* 的表达量变化

Fig.3 The change of *adiA* (encoding arginine decarboxylase) expression after the deficiency of TCS-related gene

注：a-b：表示不同菌株间差异显著（$P < 0.05$）

图 4 结果显示，与 *adiA* 结果类似，*△phoP* 和*△pmrA* 的赖氨酸脱羧酶编码基因 *cadA* 的表达也显著低于正常菌（$P < 0.05$）。该现象说明，除了精氨酸脱羧通路外，赖氨酸脱羧系统也能够受到 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 的正向调控。值得注意的是，沙门氏菌的 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 在应激调控的过程中可能存在协同作用，如 Kato 等[33]和 Spector 等[5]的研究表明，当菌株的 PhoP/PhoQ 被环境中的 Mg^{2+}信号激活后，能够促进下游 PmrD 蛋白的表达，而 PmrD 又能够进一步激活 PmrA/PmrB，两种 TCS 进而共同调控下游机制，如对脂多糖上脂质 A 进行修饰等。但本实验中的两种氨基酸代谢的调控过程中，PmrA/PmrB 与 PhoP/PhoQ 是否存在联系，仍需进一步研究与验证。

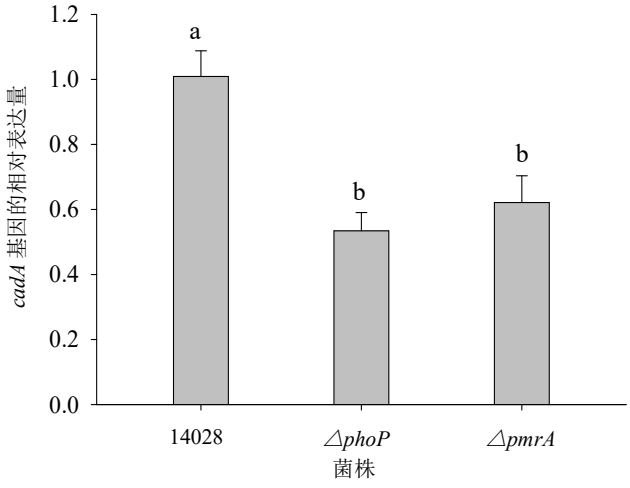


图 4 组分系统基因缺失后赖氨酸脱羧酶编码基因 *cadA* 的表达量变化

Fig.4 The change of *cadA* (encoding lysine decarboxylase) expression after the deficiency of TCS-related gene

注：a-b：表示不同菌株间差异显著（$P < 0.05$）

2.3 酸激介质中添加精氨酸和氨基酸对菌株 ATR 的影响

为了从表观现象验证 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 能够通过精氨酸代谢和赖氨酸代谢进一步调控沙

门氏菌的诱导耐酸现象，本研究通过在酸激介质中添加精氨酸和赖氨酸，对比了 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 正常与缺陷菌株的诱导耐酸能力（表 3），结果显示双组分系统、氨基酸的添加的交互作用能显著影响沙门氏菌的耐酸性（$P < 0.05$）。

对于同一菌株，在作为酸激介质的纯矿物质培养基 MM 中添加精氨酸和赖氨酸后，三种双组分系统处理（正常菌、*△phoP*、*△pmrA*）的耐酸性均显著升高（$P < 0.05$），该结果说明精氨酸和赖氨酸代谢都是沙门氏菌提高自身耐酸性的重要途径，同时，在 MM 中双组分系统突变菌的耐酸性显著低于正常菌（$P < 0.05$），说明除氨基酸代谢外，PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 可能还调动了其他的耐酸机制来帮助细菌应对酸性胁迫。Álvarez-Ordóñez 等[25]发现向 MM 中添加精氨酸和赖氨酸能显著提高正常沙门氏菌的耐酸能力，Park 等[34]也发现赖氨酸的存在能使正常沙门氏菌在 pH 值为 3 的环境中的残存率显著上升，与本实验结论一致。此外，MM+Arg 组和 MM+Lys 组的耐酸能力差异不显著（$P > 0.05$），即不同的氨基酸种类对耐酸性的提高并无显著影响。但 Liu 等[22]发现在酸激培养基中添加赖氨酸后沙门氏菌的存活能力高于添加精氨酸的实验组，这种差异可能是不同血清型菌株（*S.* Typhimurium 与 *S.* Heidelberg）对氨基酸代谢能力的不同所致。

虽然 MM+Arg 和 MM+Lys 组中添加了精氨酸和赖氨酸，但 *phoP* 或 *pmrA* 基因敲除后菌株的耐酸性仍显著低于正常组（$P < 0.05$），说明氨基酸虽然有助于细菌提高酸耐受能力，但并不能改变 TCS 缺失导致的耐酸缺陷，该结果从表观水平上验证了前述 RT-qPCR 的结论，即 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 能够通过控制氨基酸代谢增强沙门氏菌的耐酸能力。该发现进一步解释了前期学者们在富含营养的食物中的耐酸实验结果：如 Álvarez-Ordóñez 等[20]将微酸诱导后的沙门氏菌接种在肉汤中，发现肉汤培养基能够显著延长沙门氏菌在 pH 值为 3 的盐酸中存活的时间；Waterman 等[8]将沙门氏菌涂抹于富含蛋白质的蛋清上也发现了类似的现象。此外，有学者将沙门氏菌中 PhoP/PhoQ 的反应调控蛋白 PhoP 结合磷酸基团的天冬氨酸位点作为药物作用的目标，验证了药物控制细菌毒力的可行性[35]，这提示可以通过破坏 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 的结构或阻断其作用途径来减弱沙门氏菌的 ATR，增强杀菌剂效果，减少其对食品安全的危害。

表 3 不同酸激条件下菌株的诱导耐酸能力的测定（△log CFU/mL）

Table 3 The acid tolerance of different strains at different acid challenge conditions

酸激条件	双组分系统			SE
	正常（14028）	PhoP/PhoQ 缺失（*△phoP*）	PmrA/PmrB 缺失（*△pmrA*）	
MM	1.30^{cx}	1.83^{ax}	1.72^{bx}	0.03
MM+Arg	0.05^{cy}	0.46^{ay}	0.32^{by}	
MM+Lys	0.08^{cy}	0.49^{ay}	0.31^{by}	

注： a-c：表示不同菌株间差异显著（$P < 0.05$）；x-y：表示不同酸激培养基间差异显著（$P < 0.05$）；△log CFU/mL：酸激处理 2h 后沙门氏菌的菌落下降数

3 结论

本研究表明微酸诱导过程能显著增强沙门氏菌的耐酸能力（$P < 0.05$），并且菌株的 ATR 一旦形成，在牛肉低温贮藏（4 ℃）的过程中可以维持至少 1 周，其产生的交叉保护作用可能会严重威胁以牛肉为原料的下游产品的安全性。随着贮藏保鲜技术的发展，冷鲜牛肉的货架期也逐步延长，沙门氏菌耐酸性的存续时间与不同包装、贮藏方式下货架期的关系仍待进一步确定。微酸性肉质介质（pH 值为 5.2-5.7）的低温贮藏环境不能引发沙门氏菌的耐酸反应，说明低温处理可以作为抑制沙门氏菌诱导耐酸反应的方法。基因敲除和氨基酸添加实验揭示了沙门氏菌的双组分系统 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 均参与了外界酸性环境的感知，并可以通过调节精氨酸和赖氨酸的代谢水平来提高细菌的耐酸性，因食品中丰富的氨基酸含量，该推论进一步解释了食品基质在强酸环境下能为沙门氏菌

提供保护的内在机理。除 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 外，是否有其他组分系统参与沙门氏菌 ATR 的调控，以及这些系统能否通过酸休克蛋白和氨基酸代谢外的其他机制影响 ATR 仍待研究。

参考文献

［1］ KURTZ J R, GOGGINS J A, MCLACHLAN J B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system[J]. Immunology letters, 2017, 190:42-50. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.07.006.

［2］ EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017[J]. EFSA Journal, 2018, 16(12): 5500. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5500.

［3］ WANG J, ZHENG R Z, WANG J Y. Risk assessment of *Salmonella* in foods of animal production[J]. China Journal Of Animal Quarantine, 2007, 24: 23-25. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2007.04.012.

［4］ FOSTER J W, HALL H K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(2):771-778. DOI: 10.1128/jb.172.2.771-778.1990.

［5］ SPECTOR M P, KENYON W J. Resistance and survival strategies of *Salmonella* enterica to environmental stresses[J]. Food Research International, 2012, 45(2):455-481. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.06.056.

［6］ STOPFORTH J D, SKANDAMIS P N, GEORNARAS I, et al. Acid tolerance of acid-adapted and nonacid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue[J]. Food Microbiology, 2007, 24(5):530-538. DOI: 10.1016/j.fm.2006.05.007.

［7］ VAN BA H, SEO H W, PIL-NAM S, et al. The effects of pre-and post-slaughter spray application with organic acids on microbial population reductions on beef carcasses[J]. Meat Science, 2017, 137:16-23. DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.11.006.

［8］ WATERMAN S R, SMALL P L C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(10):3882. DOI: 10.1016/S1080-8914(97)80063-4.

［9］ 田牧雨，张一敏，董鹏程，等. 沙门氏菌和单增李斯特菌诱导性耐酸响应机制的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 316-322. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180129-406.

［10］ TRAN T K, HAN Q Q, SHI Y, et al. A comparative proteomic analysis of *Salmonella* typhimurium under the regulation of the RstA/RstB and PhoP/PhoQ systems[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, 1864(12):1686-1695. DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.09.003.

［11］ ZSCHIEDRICH C P, KEIDEL V, SZURMANT H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(19):3752-3775. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.003.

［12］ BEARSON B L, WILSON L, FOSTER J W. A Low pH-Inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella* typhimurium against inorganic acid stress[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180 (9):2409-2417.

［13］ 任洁， 赵明文， 姚玉峰. 沙门菌对酸压力的应答及其与毒力的关系[J]. 微生物学报， 2014， 54(4):367-375. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.002.

［14］ CHOI J, GROISMAN E A. Acidic pH sensing in the bacterial cytoplasm is required for *Salmonella* virulence[J]. Molecular Microbiology, 2016, 101(6):1024-1038. DOI: 10.1111/mmi.13439.

［15］ DEKA G, BHARATH S R, SAVITHRI H S, et al. Structural studies on the decameric *S.* typhimurium arginine decarboxylase (ADC): pyridoxal 5'-phosphate binding induces conformational changes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 490(4):1362-1368. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.032.

［16］ HU S, XIAO X, WU X, et al. Comparative transcriptomic analysis by RNA-seq of acid tolerance response (ATR) in EHEC O157:H7[J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 79:300-308. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.01.043.

［17］ SONCINI F C, GROISMAN E A. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(23):6796-6801. DOI: 10.1128/jb.178.23.6796-6801.1996.

［18］ SEN H, AGGARWAL N, ISHIONWU C, et al. Structural and functional analysis of the *Escherichia coli* acid-sensing

histidine kinase, EvgS[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199 (18):e00310-17. DOI: 10.1128/JB.00310-17.

［19］ 姜娜，王芃，王艳春，等. 利用λRed 重组系统敲除伤寒沙门氏菌 *rfaH* 基因[J]. 生物技术通讯, 2009, 02:34-37. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2009.02.007.

［20］ ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ A, FERNÁNDEZ A, BERNARDO A, et al. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella* typhimurium, consequences for food safety[J]. Meat Science, 2009, 81(1):65-70. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.06.019.

［21］ BUCHANAN R L, EDELSON S G. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1996, 62(11):4009. DOI: 10.1016/S0027-5107(96)00126-1.

［22］ LIU J, ZHAI L, LU W, et al. Amino acid decarboxylase-dependent acid tolerance, selected phenotypic, and virulence gene expression responses of *Salmonella* enterica serovar Heidelberg[J]. Food Research International, 2017, 92:33-39. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.12.006.

［23］ SKANDAMIS P N, GOUNADAKI A S, GEORNARAS I, et al. Adaptive acid tolerance response of *Listeria* monocytogenes strains under planktonic and immobilized growth conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(2):160-166. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.027.

［24］ 周光宏. 肉品加工学[M]. 北京：中国农业出版社, 2002:76.

［25］ ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ A, FERNÁNDEZ A, BERNARDO A, et al. Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 136(3):278-282. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.024.

［26］ LIVAK K, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-△△Ct method[J]. Methods, 2000, 25(4):402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.

［27］ JONGE R D, RITMEESTER W S, LEUSDEN F M V. Adaptive responses of *Salmonella* enterica serovar typhimurium DT104 and other *S.* typhimurium strains and *Escherichia coli* O157 to low pH environments[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(4):625-632. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01875.x.

［28］ MALHEIROS P S, BRANDELLI A, C P Z NOREÑA, et al. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks[J]. Journal of Food Safety, 2009, 29(2):302-317. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2009.00158.x.

［29］ SAMELIS J, IKEDA J S, SOFOS J N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria* monocytogenes and *Salmonella* typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(3):563-575. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02013.x.

［30］ TIWARI R P, SACHDEVA N, HOONDAL G S, et al. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella* enterica serovar typhimurium and *Salmonella* enterica serovar typhi[J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(2):137-146. DOI: 10.1002/jobm.200310333.

［31］ BANG I S, KIM B H, FOSTER J W, et al. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella* enterica serovar typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(8):2245-2252. DOI: 10.1128/JB.182.8.2245-2252.2000.

［32］ BRENNEMAN K E, WILLINGHAM C, KONG W, et al. Low-pH rescue of acid-sensitive *Salmonella* enterica serovar typhi strains by a rhamnose-regulated arginine decarboxylase system[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(13):3062-3072. DOI: 10.1128/JB.00104-13.

［33］ KATO A, GROISMAN E A. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor[J]. Genes & Development, 2004, 18(18):2302-2313. DOI: 10.1101/gad.1230804.

［34］ PARK Y K, BEARSON B, BANG S H, et al. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium[J]. Molecular Microbiology, 1996, 20(3):605-611. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.5441070.x.

［35］ QING X, WEERDT A D, MAEYER M D, et al. Rational design of small molecules that modulate the transcriptional function of the response regulator PhoP[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 495(1):375-381. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.037.