

不同胁迫条件对食品源 MRSA 菌株生长、毒力和抗性基因表达的影响

屈云^{1,2}, 贺苏皖^{1,2}, 朱成林^{1,2}, 赵燕英², 陈娟^{1,2},
刘骥^{1,2}, 刀筱芳^{1,2}, 唐俊妮^{1,2*}

(¹西南民族大学食品科学与技术学院 成都 610041

²青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室 成都 610041)

摘要 模拟是研究食品加工过程中亚致死条件对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的影响。选取携带不同背景基因的 2 株猪肉源 MRSA 菌株(MRSA6 和 MRSA18),对其进行常用消毒剂、低温、酸碱及渗透压环境胁迫处理,探究处理前、后菌株生长及毒力和抗性基因表达的变化情况。结果表明,消毒剂新洁尔灭胁迫后菌株携带的毒力及抗性基因表达增加,过氧乙酸对菌株不同抗性基因表达的影响存在差异,而对毒力基因表达有抑制作用,次氯酸钠对菌株携带抗性和毒力基因表达有不同程度的抑制作用;低温、高渗及碱胁迫均抑制菌株相关基因表达;酸胁迫处理除对 MRSA 6 的 *mecA* 表达起到明显促进作用外,对其它抗性基因均呈抑制作用。过氧乙酸对菌株的最小抑菌浓度(MIC)为 0.03%,次氯酸钠对菌株的 MIC 为 0.17%,新洁尔灭对菌株的 MIC 为 0.0005%,均低于消毒剂推荐使用浓度。低温胁迫对菌株生长无明显影响,55℃胁迫对菌株生长有较好抑制作用,60℃高温可达到较好杀灭效果。菌株表现出对高渗环境的耐受性,在体积分数 35%的氯化钠作用下菌株生长受到抑制。低酸环境(pH 2)对菌株生长有较好抑制效果,碱性环境对菌株生长未有明显影响。通过探究不同胁迫条件对 MRSA 菌株生长及携带毒力和抗性基因表达的影响,发现食品加工中有些亚致死环境条件会使菌株的毒力和抗性表达增加。本研究结果为食品加工过程中抑菌方法的选择及可能对菌株生长及毒力和抗性的影响提供参考。

关键词 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 胁迫条件; 亚致死损伤; 毒力和抗性基因表达

文章编号 1009-7848(2022)03-0008-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.002

细菌的应激反应是指细菌对外界环境胁迫表现出的各种特定的、高度调节的适应性反应^[1]。这些反应常可以保护细菌不受环境胁迫影响,还可能改变细菌,特别是致病菌对抗生素的耐受性^[2]。从食品安全的角度来看,传统食品保鲜和灭菌方法主要依赖于对微生物施加物理或化学压力来限制其生长和存活,常通过加热和冷冻,调节酸、碱值,盐浓度胁迫,清洁剂和消毒剂等的使用对食物携带的微生物施加压力。通常这一系列压力胁迫不一定起到对微生物完全的致死作用,亚致死条件可能会诱导细菌发生应激反应,导致其抵抗力或抗性增加^[3]。不断暴发的由致病菌引起的食品安全事件,引起人们对这些环境胁迫下微生物的亚

致死、失活以及相关胁迫耐受的重视^[4]。

作为食品污染的主要致病菌之一的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,缩写 *S. aureus*),特别是被称为“超级细菌”的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),可引起人和动物各种急、慢性感染^[5]。2017 年世界卫生组织将其列为对人类健康最具威胁的 12 种细菌之一^[6]。金黄色葡萄球菌的毒力与抗性均促进其在全球范围内的流行与感染。MRSA 对甲氧西林耐药性取决于获得性遗传决定因子 *mecA*,其编码青霉素结合蛋白 PBP2a,导致 MRSA 几乎对所有 β -内酰胺抗生素耐受。即使在高浓度抗生素的存在下,这些外来 PBP 的表达也能发挥作用,使得细胞能够继续完成细胞壁的生物合成^[7]。值得关注的是,这些获得性因子具有在细菌中诱导应激反应的能力,在应激反应下,MRSA 菌株 *mecA* 的转录和 PBP2a 的产生增加^[8-9]。本文研究两株不同基因背景 MRSA 菌株,在不同胁迫条件下生长及其对菌株抗性和毒力基因表达

收稿日期: 2021-03-09

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFD0500500); 四川省科技计划项目(2019YJ0261, 2019JDJQ0017)

作者简介: 屈云(1996—),女,硕士生

通信作者: 唐俊妮 E-mail: junneytang@aliyun.com

的影响,以期为食品加工过程不同环境中菌株生长及毒力和耐药性变化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基、7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parker 琼脂培养基、胰酪胨大豆肉汤(TSB)培养基,青岛高科园海博生物技术有限公司;1%亚碲酸钾卵黄增菌液,青岛日水生物技术有限公司;过氧化乙酸(15%),成都科龙化工试剂厂;次氯酸钠(有效氯 5.5%),成都科隆化学品有限公司;新洁尔灭(有效氯 5%),南昌白云药业有限公司;氢氧化钠、浓盐酸、氯化钠,成都市科龙化工试剂厂;Spin Column Bacteria Total RNA Purification Kit 试剂盒、2X SG Fast qPCR Master Mix 试剂盒、M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,生工生物工程股份有限公司。

1.2 仪器与设备

CFX96 荧光定量 PCR、BioSpec-nano230V 核酸测定,美国 Bio-Rad;5840R 型冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;MOF-4086S 低温冰箱,日本三洋公司;HZQ-F160 全温振荡培养箱,江苏太仓市实验设备厂;隔水式恒温培养箱 GHP-908,上海齐欣科学仪器有限公司;洁净通风工作台,苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 菌株来源

以本实验室在 2017 年 9 月-2018 年 6 月分离于成都市猪肉样本中的 MRSA6 与 MRSA18 菌株作为研究对象,MRSA6 携带的背景基因为:耐药基因(*tetM*、*ermB*、*mecA*、*norA*、*aac6'*、*lapH2''*),耐消毒剂基因(*qacG*),肠毒素基因(*sei*、*seo*、*seu*、*sen*、*sem*);MRSA18 携带的背景基因为:耐药基因(*ermB*、*mecA*、*norA*、*aac6'*、*lapH2''*),不携带耐消毒剂基因和肠毒素基因。所有试验参考菌株均由本实验室保存。

1.4 方法

1.4.1 最小抑菌浓度(MIC)的测定 将纯化的菌株接种到 TSB 培养基中,37℃振荡培养 18~24 h,采用文献报道方法提取菌株 DNA^[10],对菌株携带的背景基因情况进一步进行 PCR 扩增确认。两株 MRSA 菌株对 3 种不同消毒剂的最小抑菌浓度

(minimum inhibitory concentration, MIC)测定参考美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)^[11]指南,采用营养肉汤稀释法配制菌悬液。具体操作为:取过夜培养后浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液 50 μ L 分别加入到 4.5 mL 的 TSB 的试管中,另加入 450 μ L 稀释后消毒剂。设置阳性对照组为 50 μ L 菌液+4.5 mL TSB+450 μ L 去离子水;阴性对照组为:去离子水 50 μ L+4.5 mL TSB+450 μ L 过氧化乙酸。37℃恒温振荡培养 18~24 h。根据消毒剂推荐使用浓度用去离子水配置消毒剂浓度梯度分别为过氧化乙酸:0.0038%,0.0075%,0.015%,0.03%;次氯酸钠(按有效氯计算):0.0425%,0.085%,0.17%,0.34%;新洁尔灭(按有效氯计算):0.0000625%,0.000125%,0.00025%,0.0005%,0.001%的受试液。结果判定:阳性对照组由清澈透明变浑浊,阴性对照依旧清澈,试验组中无菌生长对应的最低消毒剂浓度即为受试 MRSA 菌株对该种消毒剂的 MIC。

挑取单菌落于 Baird-Parker 琼脂平板上纯化培养后接入 TSB 培养液中 37℃,150 r/min 过夜培养后再次以 1%比例接种到新的 TSB 培养液中,37℃恒温培养留作原始菌液备用。

1.4.2 不同胁迫条件对菌株生长的影响 模拟食品加工过程中常遇到的胁迫环境,观察 MRSA 的生长变化趋势。

高低温胁迫:取 30 支试管设置 5 个试验组,每组设置 3 个平行,分别加入 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 2 mL,一组置于 4℃冰箱中,低温胁迫 24 h。另 4 组分别放入 45,50,55,60℃水浴处理 30 min,同时取原始菌液 2 mL 作为对照,平板稀释涂布,测定活菌数。

酸碱胁迫:同样设置 5 个试验组,每组设置 3 个平行,分别加入 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 2 mL,6 000 r/min 离心 5 min,去上清液,每组分别加入使用 HCl 或 NaOH 将 pH 值调为 2,4,6,8,10 的 TSB 培养基,混匀,室温静置培养 1 h,同时取原始菌液(pH 7.2)2 mL 作为对照,平板稀释涂布,测定活菌数。

高渗透压胁迫:取 24 支试管设置 4 个试验组,每组设置 3 个平行,分别加入 MRSA6 与 MR-

SA18 菌液各 2 mL, 同上条件离心, 去上清, 分别向 TSB 培养基加入体积分数为 0.75%, 25%, 30%, 35% 的氯化钠模拟高渗透压环境, 0.75% 盐浓度为对照组, 室温静置培养 1 h。平板稀释涂布, 测定活菌数。

1.4.3 胁迫处理对 MRSA 抗性基因及毒力基因表达影响

1.4.3.1 胁迫处理 消毒剂胁迫处理: 取 18 支无菌试管设置 3 个试验组, 每组设置 3 个平行, 分别加入 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 4.5 mL。再向每组分别加入过氧乙酸、次氯酸钠或新洁尔溶液, 使其终浓度为 1/2 MIC, 37 °C 恒温振荡培养 24 h。培养结束后, 收集菌体。对照组 3 个平行 4.5 mL TSB 菌液+500 μ L 去离子水。

低温胁迫处理: 取 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 5 mL, 低温胁迫 24 h, 收集菌体。

酸胁迫处理: 取 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 5 mL, 6 000 r/min、离心 5 min, 吸去上清液后加入等体积用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节成 pH 4 的 TSB 培养基, 37 °C 培养 24 h, 收集菌体。

碱胁迫处理: 取 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 5 mL, 6 000 r/min、离心 5 min, 吸去上清液后加入等

量 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节至 pH 10 的 TSB 培养基, 37 °C 培养 24 h, 收集菌体。

MRSA 的高渗透压胁迫: 取 MRSA6 与 MRSA18 菌液各 5 mL, 6 000 r/min、离心 5 min, 吸去上清液后加入等体积 NaCl 体积分数为 20% 的 TSB 培养基, 模拟 MRSA 在食品加工过程中可能遇到的高渗透压环境, 37 °C 培养 24 h, 收集菌体。

1.4.3.2 提取细菌总 RNA 按照试剂盒说明书, 使用细菌总 RNA 抽提试剂盒提取胁迫前后细菌的总 RNA, 收集所得的 RNA 溶液于 -80 °C 保存, 防止其降解。

1.4.3.3 反转录第一条链的合成 采用核酸浓度测定仪测定核酸浓度, A_{260}/A_{280} 比值评估核酸纯度, 再按照试剂盒提供的 M-MuLV 第一条 cDNA 链合成试剂盒操作方法配制对应的体系, 反转录得到 cDNA, -80 °C 保存。

1.4.3.4 相关基因的表达量检测 按照 2X SG Fast qPCR Master Mix (SYBR Green) 试剂盒操作说明, 测定 MRSA 菌株胁迫前后相关的表达量。反应程序为: 95 °C, 3 min; 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 40 个循环。相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因类别	引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C	片段长度/bp	参考文献
内参基因	16S rRNA-F	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	55	156	[12]
	16S rRNA-R	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA			
耐消毒剂基因	qacA/B-F	GCTGCATTTATGACAATGTTTTG	53	630	[13]
	qacA/B-R	AATCCCACCTACTAAAGCAG			
	qacC-F	ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT	50	260	[13]
	qacC-R	TTCCGAAAATGTTTAACGAAACTA			
	qacG-F	TTTCGTTTGGAATTTGCTTTT	50	213	[13]
	qacG-R	AATGGCTTTCTCCAAATACA			
	qacH-F	CAATAGTCAGTGAAGTAATAGGCAGTG	55	295	[13]
	qacH-R	TGTGATGATCCGAATGTGTTT			
耐药基因	mecA-F	TGGCTCAGGTACTGCTATCC	56	556	[14]
	mecA-R	CACCTTGTCGGTAACCTGAA			
	norA-F	TATCGGTTTAGTATTACCAGTC	53	406	[15]

(续表 1)

基因类别	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	片段长度/bp	参考文献
	norA-R	AACTTCTGCCATAAAATCCAC			
	ermB-F	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC	55	359	[16]
	ermB-R	GAATCGAGACTTGAGTGTGC			
	tetM-F	GTGTGACGAACCTTACCGAA	55	501	[16]
	tetM-R	GCTTTGTATCTCCAAGAACAC			
	aac6'/apH2''-F	CCAAGAGCAATAAGGGCAT	45	220	[16]
	aac6'/apH2''-R	CACTATCATAACCACTACCG			
肠毒素基因	sei-F	TGCCTTTACCAGTGTATT	55	176	[17]
	sei-R	AGGACAATACTTAAATTCTGCT			
	sem-F	AATCACCTGCTAATGTAAGTC	50	159	[17]
	sem-R	ATCATCTTTCGCATCAATTAG			
	sen-F	TCATGCTTATACGGAGGAGTTACGATACATGATGGAAATC	60	103	[18]
	sen-R	AACCTTCTTGTGGACACCATCTTTAAATACATTAACGC			
	seo-F	GTGGAATTTAGCTCATCAGCGATTTCTAAAGAATTTCTAGG	55	116	[18]
	seo-R	GTACAGGCAGTATCCACTTGATGCTCACCATGACAATGTGC			
	seu-F	TGAAAAACATAACAGCACAAG	55	100	[17]
	seu-R	CCAGACTCATAAGGCGAAC			

1.4.4 数据处理与统计分析 胁迫处理前后菌株生长计数结果换算成菌株生长对数值加以分析,数据采用 SPSS19.0 统计软件处理,采用 Microsoft Excel 绘制图表。相关基因表达量检测通过胁迫前后对应的 Ct 值,以金黄色葡萄球菌 16S rRNA 为内参基因进行归一化,并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 3 种消毒剂对 MRSA 的最小抑菌浓度

选取食品加工环节及工厂环境中 3 种常见的消毒剂:过氧乙酸、次氯酸钠和新洁尔灭测定其对菌株的最小抑菌浓度,3 种消毒剂对 MRSA6 和 MRSA18 的 MIC 值无差异,并且测定结果均远小于消毒剂推荐使用浓度,结果详见表 2。

2.2 不同胁迫环境对菌株生长影响

2.2.1 温度对 MRSA 生存状况的影响 分别在 4℃低温环境以及 45,50,55,60℃高温水浴环境对 MRSA 进行胁迫,并与常温(37℃)培养下 MRSA 菌株的生长情况作对照。结果如图 1 所示,在经过 5 h 的 4℃低温胁迫后,MRSA6 菌株生长对数值

表 2 消毒剂对 MRSA 的最小抑菌浓度

Table 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) value of disinfectant

菌株编号	过氧乙酸/ %	次氯酸钠/ %	新洁尔灭/ %
MRSA6(qacG ⁺)	0.03	0.17	0.0005
MRSA18(qacG ⁻)	0.03	0.17	0.0005
推荐浓度	0.2~0.5	0.05~1	0.005~0.5

为 9.1,与之前(9.127)相比无明显差异($P>0.05$);MRSA18 在胁迫后出现增殖现象,生长对数值从 8 次方(8.727)达到了 9.014,差异明显($P<0.05$)。在 45℃的胁迫环境下,MRSA6 的生长对数值为 8.991,MRSA18 的生长对数值为 8.952,差异不明显($P>0.05$);在 50℃时,MRSA6 的生长对数值为 8.885,MRSA18 生长对数值为 8.881,差异不明显($P>0.05$);在 55℃时,两菌株生长均受到抑制,出现显著变化($P<0.05$);60℃胁迫 30 min 后,菌株存活率均为 0,达到了杀菌效果。

2.2.2 酸碱胁迫对 MRSA 菌株的影响 以 pH 2,4,6,8,10 模拟 MRSA 在食品加工过程中可能遇到的酸碱环境,与在普通培养基环境(pH 7.2)下

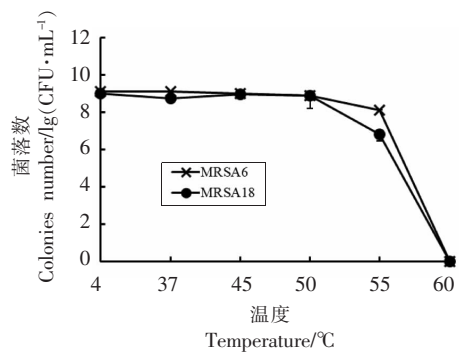


图1 低温及高温胁迫对 MRSA 菌株生长的影响

Fig.1 Effects of low temperature and high temperature stress on the growth of MRSA strains

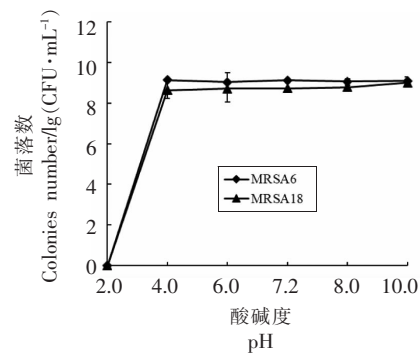


图2 酸碱胁迫对 MRSA 菌株生长的影响

Fig.2 The effect of acid-base stress on the growth of MRSA strains

生长的菌株作比较。结果如图2所示。在pH值为2的低酸环境,菌株均不能生长,在pH值为4时,菌株生长对数值无明显变化($P>0.05$),但在pH6的胁迫环境下,MRSA6的生长出现了降低,但仍在9次方以上。在pH值为8时,菌株生长趋势无明显变化($P>0.05$)。在pH10的环境下胁迫1h后,MRSA18出现增长,生长对数值为9.008($P<0.05$),而MRSA6生长趋势保持不变。除pH2外,弱酸和弱碱对MRSA的生长影响不大。

2.2.3 高盐浓度环境对 MRSA 生长的影响 本研究以盐体积分数分别为25%、30%、35%的培养环境模拟MRSA在食品加工过程中可能碰到的高渗透压环境,观察高压胁迫可能对其生长造成的影响。并以普通培养环境(盐体积分数0.75%下MRSA的生长对数值为参考。在盐体积分数为25%和30%的环境下胁迫1h观察到MRSA生长对数值下降,维持在 10^9 与 10^8 存活,胁迫后与胁迫前的存活率不存在显著差异($P>0.05$)。但在盐体积分数为35%的环境作用下,MRSA6的生长对数值从 10^9 下降为 $10^{8.758}$,MRSA18为 $10^{8.591}$,两菌株的生长对数值均有所下降,且差异显著($P<0.05$)。结果表明MRSA对氯化钠的耐受度较高。

2.3 胁迫处理对 MRSA 抗性基因表达影响

荧光定量PCR检测不同胁迫条件前后MRSA6与MRSA18携带抗性基因的表达差异,结果如图4所示。经过新洁尔灭胁迫后MRSA6和MRSA18的*mecA*基因表达水平增加($P<0.05$),且经过低浓度酸(pH4)胁迫的MRSA6菌株*mecA*基因的表达也出现上调。经过氧乙酸以及新洁尔

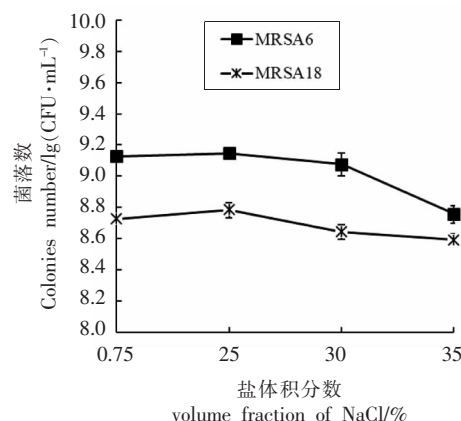


图3 高盐胁迫对 MRSA 菌株生长的影响

Fig.3 The effect of high salt stress on the growth of MRSA strain

灭胁迫后,MRSA6的*qacG*基因表达上升($P<0.05$)。但低温胁迫及过氧乙酸胁迫后MRSA6菌株的抗性基因表达无明显变化,除新洁尔灭刺激作用外的所有胁迫方式均对MRSA18的*mecA*基因表达产生抑制作用。

经过氧乙酸胁迫作用后,MRSA6菌株的*norA*、*ermB*和*tetM*基因分子表达水平明显上调($P<0.05$),次氯酸钠胁迫后,MRSA6的各耐药基因表达量均明显减小($P<0.05$),新洁尔灭刺激下,MRSA6的*norA*及*aac6'/apH2'*基因表达水平上调,但*tetM*和*ermB*影响不大。冷胁迫和高渗透压对耐药基因的表达起抑制作用,MRSA6的*ermB*基因在碱环境下表达有所上升。MRSA18在新洁尔灭胁迫刺激下,*norA*和*ermB*基因表达上升,其它基因表达均受胁迫环境抑制。

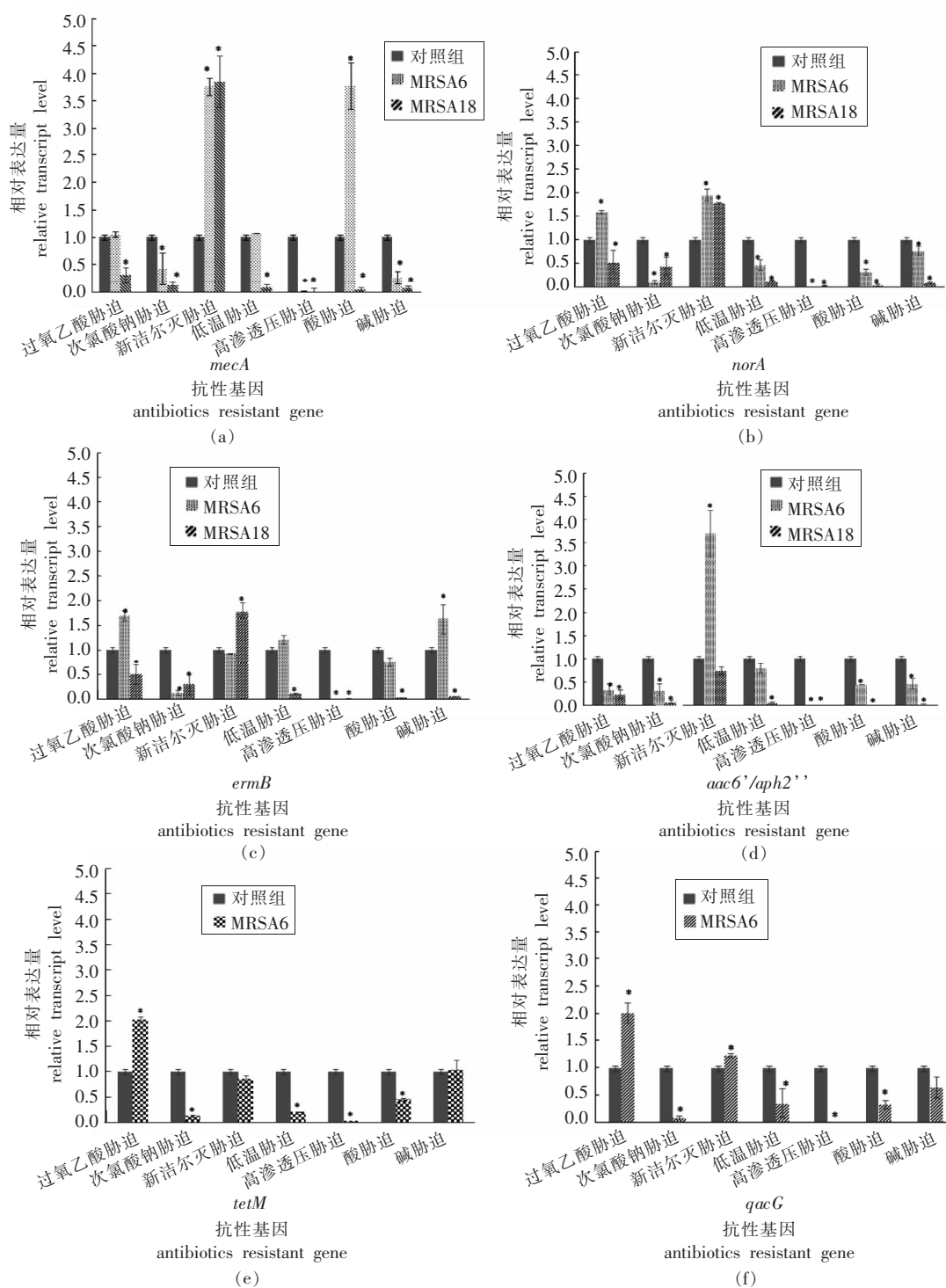


图 4 不同胁迫条件下两株 MRSA 菌株抗性基因相对表达量

Fig.4 Relative expression of resistance genes of two MRSA strains under different stress conditions

2.4 不同胁迫环境对菌株肠毒素基因表达影响
胁迫对 MRSA6 携带的 5 种肠毒素基因表达

的影响结果见图 5,结果表明:除 sen 在胁迫环境下表达水平无明显变化外,其它肠毒素基因在新

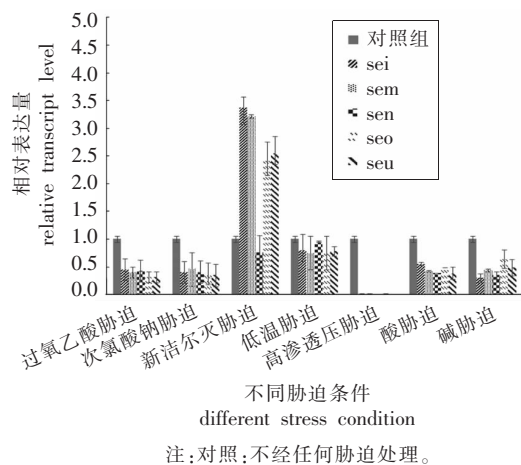


图5 不同胁迫下 MRSA6 菌株肠毒素基因相对表达量
Fig.5 Relative expression of enterotoxin gene in MRSA6 strain under different stress

洁尔灭胁迫环境下均出现表达水平上调($P<0.05$), 低温胁迫对 5 种肠毒素基因的表达影响不大, 在高渗透压影响下, 所有的肠毒素基因表达均被抑制, 显著下降($P<0.05$), 其它环境胁迫对 MRSA 的肠毒素基因分子表达水平均有不同程度抑制作用。

3 讨论

食品加工环境中亚损伤细菌仍然具有生物活性, 在一定的条件下能够修复并增殖, 为食品安全保障带来隐患^[19-20]。本研究以 MRSA 菌株作为研究对象, 通过模拟不同胁迫条件对金黄色葡萄球菌的生长及毒力和抗性基因表达影响, 为食品加工过程病原菌的控制提供参考。

首先, 采用食品加工过程常使用的 3 种消毒剂过氧乙酸、次氯酸钠和新洁尔灭, 测定 MRSA 菌株对消毒剂的 MIC 值, 检测结果均小于消毒剂推荐使用浓度, 说明正确规范使用消毒剂可有效杀灭 MRSA 菌株。在本研究中, 0.03% 的过氧乙酸可以充分抑制 MRSA 菌株生长。张友平等^[21] 采用 0.2% 的过氧乙酸浓度擦拭 MRSA 1 min 后, 其存活率为 0。说明过氧乙酸能够有效杀灭 MRSA 菌株, 并且其使用浓度和作用时间成反比, 结合本研究结果也可适当延长作用时间降低过氧乙酸使用浓度达到有效杀菌抑菌效果。季铵盐类消毒剂较小浓度可起到较好杀菌作用, 两株 MRSA 菌株(qac^+

和 qac^-) 对季铵盐类消毒剂新洁尔灭的 MIC 值测定结果均为 $5 \mu\text{g/mL}$ 。Seier-Petersen 等^[22] 检测出苯扎溴安对 MRSA 的 MIC 为 $1\sim 8 \mu\text{g/mL}$, 与本研究检测结果相符。由于细菌携带 qac 基因家族可表达多种外排泵, 使细菌对季铵化合物的敏感性降低^[23]。但本研究中, 两株 MRSA 菌株(qac^+ 和 qac^-) 对新洁尔灭的 MIC 值一致, 推测编码季铵盐类抗性的耐消毒剂基因对表型影响依赖于多种因素, 其抗性机制还需深入探讨。

金黄色葡萄球菌对低温具有良好的适应性^[2]。本研究中, 低温胁迫后, 两株菌株生长均不受影响。随着温度的升高, MRSA18 在 45°C 及 50°C 出现短暂增殖, 但在 55°C 和 60°C 时明显被抑制。有研究表明, 金黄色葡萄球菌在 45°C 处理一段时间后, 对极端环境的耐受能力会增长^[24]。猜测 MRSA18 也可能对苛刻环境表现出一定的应激反应。受试菌株对氯化钠的耐受性较高, 在盐体积分数 35% 情况下依旧可存活。该浓度下, MRSA 的生长对数值虽明显下降但其生长被抑制程度不高。pH 2 的酸环境中 MRSA 基本不生长。但碱性环境有可能促进 MRSA 的生长, pH 4、pH 6 和 pH 8 时, 菌株生长趋势差异不大, 当 pH 值到达 10 时, MRSA18 出现了明显的增殖。目前关于金黄色葡萄球菌对于碱的耐受性的报道较少, 有研究表明, 金黄色葡萄球菌对盐和碱性 pH 值环境具有高耐受性主要是由于在质膜中发现反向转运蛋白的活性, 可从细胞质中除去有毒阳离子, 并使金黄色葡萄球菌在不同的胁迫条件下存活^[25]。关于在碱性环境下细菌的增殖机制尚未明确, 仍需进一步的研究和探讨。

MRSA 具有特有的 $mecA$ 基因, 存在于移动遗传元件葡萄球菌染色体盒 $mec(\text{SCCmec})$ 上。 $mecA$ 基因的表达主要由调控因子 $MecI$ (DNA 结合阻遏蛋白) 和 $MecR1$ (信号转导子) 调控^[26]。新洁尔灭作为一种阳离子季铵盐类消毒剂, 其主要作用机制是通过改变菌体菌膜的通透性, 使菌体破裂, 蛋白质变性从而起到杀菌效果^[27], 这种与 β -内酰胺类抗生素杀菌模式相似的消毒剂胁迫可能是本研究中 $mecA$ 基因表达上升的主要原因。也可能是阳离子对 $mecR1$ 蛋白的表达产生影响, 介导了 $mecA$ 的表达与转录。同时, MRSA6 菌株的 $qacG$

抗性基因表达也显示出明显的升高, 猜测这两种外排机制相似的转运系统可能会发生相互作用。过氧乙酸作为一种广谱、高效的灭菌剂, 在过氧化氢的协助下可顺利通过细菌通透性屏障, 进而使细菌的 RNA、DNA 和蛋白质等物质破坏漏出, 致细菌死亡。Chang 等^[28]的研究发现, 金黄色葡萄球菌暴露在过氧乙酸亚致死剂量后, 诱导许多毒力基因的表达, 提示金黄色葡萄球菌的毒力可能会发生变化以响应过氧乙酸的刺激。本研究发现, 在过氧乙酸 1/2MIC 的胁迫下, MRSA6 的 *norA*、*ermB* 及 *tetM* 基因表达水平均显著上调, 说明过氧乙酸可能对 MRSA 外排因子调控存在影响, 但菌株 MRSA18 并没有表现出上述现象, 具体机制尚不明确, 仍需进一步追踪研究。编码抵抗喹诺酮外排蛋白质的 *norA* 基因, 编码抗四环素跨膜蛋白 *tetM* 基因等与 *qac* 基因互为功能合作伙伴^[29], 推测 MRSA6 在新洁尔灭及碱性环境刺激下, 耐药基因的表达水平上升的原因可能是各种外排蛋白泵共同参与结果。

在肠毒素基因分子表达检测中, 除 *sen* 外, 大部分的肠毒素基因在新洁尔灭刺激下表现出表达量相对上升的现象。结合之前报道中金黄色葡萄球菌在抗生素作用下毒力水平会发生改变^[30], 推测肠毒素基因与耐药基因外排蛋白等机制之间可能也存在相互联系。本研究表明不同的消毒剂亚抑制胁迫对菌株的毒力及抗性基因的表达有促进也有抑制。新洁尔灭对 MRSA 菌株的毒力及抗性基因几乎都有促进作用。综上, 本研究揭示了食品加工过程中常规胁迫处理方式对 MRSA 的生长及相关基因表达的影响, 为食品行业病原菌的控制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] KEITHPOOLE. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(9): 2069–2089.
- [2] ALRESHIDI M M, DUNSTAN R H, MACDONALD M M, et al. Metabolomic and proteomic responses of *Staphylococcus aureus* to prolonged cold stress[J]. Journal of Proteomics, 2015, 121: 44–55.
- [3] 李鹏飞, 武瑞赞, 李平兰. 细菌群体感应及其调控应激反应的研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(3): 310–315.
- [4] LI P F, WU R Y, LI P L. Advances in bacterial quorum sensing and its regulation of stress responses[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(3): 310–315.
- [4] 史贤明, 施春雷, 索标, 等. 食品加工过程中致病细菌控制的关键科学问题[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 194–208.
- [5] SHI X M, SHI C L, SUO B, et al. Key scientific issues on the control of foodborne pathogens during food processing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(9): 194–208.
- [5] 于旭红, 王冬, 王睿. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(4): 306–310.
- [6] YU X H, WANG D, WANG R. Progress in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2011, 27(4): 306–310.
- [6] ANJUM M F, MARCO-JIMENEZ F, DUNCAN D, et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from animals and animal products in the UK.[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2136.
- [7] JONGE B L M D, CHANG Y S, GAGE D, et al. Peptidoglycan composition in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(16): 11255–11259.
- [8] TASI J, JARVIE T P, MWANGI M M, et al. Whole-genome sequencing reveals a link between β -lactam resistance and synthetases of the alarmone (p)ppGpp in *Staphylococcus aureus*[J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(3): 153–159.
- [9] CHOONKEUN K, MICHAEL M, MARILYN C, et al. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: Key role of the stringent stress response.[J]. Plos One, 2013, 8(12): e82814.
- [10] 唐俊妮, 龙飞, 史贤明, 等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1467–1469.
- [10] TANG J N, LONG F, SHI X M, et al. Evaluations on DNA extraction methods of *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technolo-

- gy, 2008, 18(8): 1467–1469.
- [11] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 2019.
- [12] ATSHAN S S, SHAMSUDIN M N, KARUNANIDHI A. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2013, 18: 106–112.
- [13] WASSENAAR T, USSERY D, NIELSEN L, et al. Review and pHylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species.[J]. European Journal of Microbiology and Immunology, 2015, 5(1): 44–61.
- [14] XIE Y P, HE Y P, GEHRING A, et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China[J]. PloS one, 2011, 6(12): e28276.
- [15] 马伊萨兰, 张荣, 王洪志, 等. 食品中金黄色葡萄球菌生物被膜形成基因分析及影响因素研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 135–139, 145.
MA Y S L, ZHANG R, WANG H Z, et al. Analysis of biofilm formation related genes and its influence factors for *Staphylococcus aureus* food isolates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(15): 135–139, 145.
- [16] LINA G, QUAGLIA A, REVERDY M, et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci.[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5): 1062–1066.
- [17] 王琼, 唐俊妮, 汤承, 等. 6种食品防腐剂对金黄色葡萄球菌抑菌效果及肠毒素基因表达的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 151–156.
WANG Q, TANG J N, TANG C, et al. Inhibitory effect of six food antiseptics on the growth and *Staphylococcal enterotoxin* (SE) Gene Expression of *Staphylococcus aureus*[J]. Food Science, 2016, 37(21): 151–156.
- [18] HWANG S Y, KIM S H, JANG E J, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1): 99–105.
- [19] 王晓杰, 王娜, 宋金丽, 等. 冷冻胁迫下金黄色葡萄球菌的亚致死及失活规律[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 5–9.
WANG X J, WANG N, SONG J L, et al. Sublethal injury and inactivation of *Staphylococcus aureus* under freezing stress[J]. Food Science, 2013, 34(19): 5–9.
- [20] 宣晓婷, 丁甜, 刘东红. 食品中亚致死损伤单增李斯特菌的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 280–284.
XUAN X T, DING T, LIU D H. Progress in understanding sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes* in food[J]. Food Science, 2015, 36(3): 280–284.
- [21] 张友平, 王凯, 徐敏丽, 等. 医务人员手耐甲氧西林金黄色葡萄球菌带菌状况及消毒效果的研究[J]. 护理学报, 2011, 18(24): 65–67.
ZHANG Y P, WANG K, XU M L, et al. MRSA-carrying hands of medical staff and its disinfection[J]. Journal of Nursing, 2011, 18(24): 65–67.
- [22] SEIER-PETERSEN M A, NIELSEN L N, INGMER H, et al. Biocide susceptibility of *Staphylococcus aureus* CC398 and CC30 isolates from pigs and identification of the biocide resistance genes, qacG and qacC.[J]. Microbial Drug Resistance, 2015, 21(5): 527–536.
- [23] 吴舜, 周燕. 细菌对消毒剂的检测方法 with 耐药机制研究进展[J]. 海南医学, 2018, 29(8): 1142–1145.
WU S, ZHOU Y. Research progress of detection methods and drug resistance mechanism in bacterial resistance to disinfectants[J]. Hainan Medical Journal, 2018, 29(8): 1142–1145.
- [24] CEBRIAN G, SAGARZAZU N, PAGAN R, et al. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(1): 26–33.
- [25] VAISH M, PRICE-WHELAN A, REYES-ROBLES T, et al. Roles of *Staphylococcus aureus* Mnh1 and Mnh2 antiporters in salt tolerance, alkali tolerance and pathogenesis[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(5): e00611–17.
- [26] 凌保东, 雷军. 葡萄球菌对甲氧西林耐药性表达及其影响因素[J]. 国外医药(抗生素分册), 1996, 17(5): 347–349.
LING B D, LEI J. Expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its influencing factors[J]. Foreign Medicine (Antibiotics), 1996, 17

- (5): 347–349.
- [27] 潘明明, 陈枉枉, 王艳, 等. 实验动物屏障设施常用的6种消毒剂[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(6): 489–495.
- PAN M M, CHEN W W, WANG Y, et al. Six kinds of commonly used disinfectants for laboratory animal barrier facilities[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2019, 39(6): 489–495.
- [28] CHANG W, BENTLEY W E, TOGHROL F. Toxicogenomic response of *Staphylococcus aureus* to peracetic acid[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(16): 5124–5131.
- [29] ANITHA P, ANBARASU A, RAMAIAH S. Gene network analysis reveals the association of important functional partners involved in antibiotic resistance: A report on an important pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*[J]. Gene, 2016, 575(2 Pt.1): 253–263.
- [30] SALEH S, COLLIER P J, BUULTJENS T E J, et al. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(4): 1281–1291.

Effects of Stress Conditions on the Growth, Virulence and Resistance Gene Expression of Food-sourced MRSA Strains

Qu Yun^{1,2}, He Suwan^{1,2}, Zhu Chenglin^{1,2}, Zhao Yanying², Chen Juan^{1,2},
Liu Ji^{1,2}, Dao Xiaofang^{1,2}, Tang Junni^{1,2*}

¹College of Food Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041

²Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource and Utilization, Chengdu 610041)

Abstract The purpose of this study is to simulate the effect of sublethal conditions on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) during food processing. In the experiment, two MRSA strains (MRSA6 and MRSA18) from pork with different background genes were selected, and they were treated with common disinfectants, low temperature, acid-base, and osmotic stress. The growth, virulence and resistance genes expression changes of the two strains before and after the treatment were investigated. The experimental results showed that the expression of virulence and resistance genes carried by the strains increased to varying degrees after benzalkonium bromide stress. Peracetic acid could promote and inhibit the expression of strain resistance genes, and inhibit the expression of virulence genes. Sodium hypochlorite could inhibit the expression of genes carried by the strain; low temperature, hypertonicity and alkali stress all could inhibit the expression of related genes of the strain; after acid stress treatment, the expression of *mecA* in MRSA 6 could be significantly promoted. The resistance genes all showed inhibitory effects. The minimum inhibitory concentration (MIC) of peracetic acid on the strain was 0.03%, the MIC of sodium hypochlorite on the strain was 0.17%, and the MIC of tricetamide on the strain was 0.0005%, which were all lower than the recommended concentration of disinfectant. Low temperature stress had no obvious effect on the growth of the strains; 55 °C stress had a good inhibitory effect on the strain, and 60 °C high temperature could achieve a better killing effect. The strains showed tolerance to hypertonic environment, and the growth of the strains was inhibited at a concentration of 35% sodium chloride. Low acid environment (pH 2) had a good inhibitory effect on the growth of strains. The alkaline environment had no obvious effect on the growth of the strains. In this study, it was found that the sublethal environmental conditions of conventional food processing might increase the virulence and resistance of strains by exploring the effects of different stress conditions on the growth of MRSA strains and the expression of virulence and resistance genes. The results of this study provided references for the selection of antibacterial methods during food processing and the possible influence on bacterial growth and changes in virulence and resistance.

Keywords Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); stress conditions; sublethal damage; virulence and resistance genes expression