

## *pmrA* 影响酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜的形成能力

杨克慧, 董鹏程, 刘昀阁, 张一敏, 毛衍伟, 梁荣蓉, 罗欣, 朱立贤\*

(山东农业大学食品科学与工程学院 山东泰安 271018)

**摘要** 为探究 *pmrA* 基因对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜形成能力的影响,以鼠伤寒沙门氏菌野生株(WT)和 *pmrA* 基因缺失株( $\Delta pmrA$ )为研究对象,对其诱导耐酸能力、菌株特性、生物膜形成能力以及影响生物膜形成的内在因素进行研究。结果:pH 5.4 胁迫后  $\Delta pmrA$  的诱导耐酸能力为 WT 的 53.92%;生物膜培养至第 4 天,经酸胁迫(pH 5.4)后  $\Delta pmrA$  的生物膜形成量仅为 WT 的 54.68%;经酸胁迫后, $\Delta pmrA$  的泳动能力、疏水性分别为 WT 的 35.20%,59.10%; $\Delta pmrA$  经酸胁迫后其生物膜代谢活性、胞外多糖和蛋白的生物合成量与未酸胁迫处理相比虽有一定程度升高,但仍显著低于酸胁迫后的 WT( $P < 0.05$ ),同时酸胁迫后 *pmrA* 基因缺失株生物膜的三维立体结构仍较为分散,且膜内活细胞数量显著低于 WT。结论:*pmrA* 基因与鼠伤寒沙门氏菌的耐酸能力及生物膜形成能力密切相关。

**关键词** 沙门氏菌; *pmrA* 基因; 酸胁迫; 生物膜; 耐酸性; 菌株特性

**文章编号** 1009-7848(2023)03-0147-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.03.016

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)是一种常见的食源性致病菌,宿主极为广泛,人类感染后可引起腹泻、呕吐、发热及腹部痉挛等疾病。2017 年,欧盟食品安全局报道了沙门氏菌是引起人类疾病的第二大食源性致病菌,其五大优势血清型依次为:肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、非典型鼠伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌以及纽波特沙门氏菌<sup>[1]</sup>。沙门氏菌中毒是引起我国细菌性食物中毒的主要原因<sup>[2]</sup>。在肉牛屠宰加工时,新鲜胴体的微生物通常来源于粪便、皮毛<sup>[3]</sup>。肉牛屠宰后胴体肌糖原降解产生乳酸,ATP 分解产生磷酸根离子等会使胴体 pH 值下降到 5.4 左右,这种弱酸环境易使沙门氏菌产生酸适应<sup>[4]</sup>。酸适应后的沙门氏菌不仅能提高对强酸环境的抵抗,产生诱导耐酸响应(Acid Tolerance Response,ATR),还可能会促进生物膜(Biofilm)的形成<sup>[5]</sup>,给肉品加工业和食品安全构成严重威胁。

生物膜是指在各种胁迫条件下,由细菌及自身分泌的胞外多糖、胞外蛋白及胞外 DNA 等胞外聚合物组成的一种附着于物体表面且具有三维立体结构的特殊生存状态<sup>[6]</sup>。生活中细菌性感染以及食物中毒部分原因是持续存在的生物膜,在食品工业中生物膜的形成也是引起食源性疾病的重要元凶<sup>[7]</sup>。生物膜内的细菌对消毒剂及其它恶劣环境(高渗透压、紫外线、高温等)的耐受能力也远高于浮游菌<sup>[8]</sup>。Liu 等<sup>[9]</sup>研究表明,柠檬酸(pH 5.5)胁迫 2 h 后的海德堡沙门菌生物膜形成能力和运动能力都显著提高,相关的内在反应机理还需进一步探索。

沙门氏菌含有很多双组分系统(Two-component regulatory system, TCS),如 PhoP/Q、EnvZ/OmpR、PmrA/B 等,其中 PmrA/B 组分系统是由位于胞质内的反应调控蛋白(Reaction Regulatory protein, RR protein)PmrA,与感知外界环境信号的组氨酸蛋白激酶(Histidine protein Kinase, HK)PmrB 共同构成的双组分调控系统,该系统能够将外界环境信号传导至菌体内部,进而激活相应的反应调控机制,提高对酸胁迫的抗性。Freitas 等<sup>[9]</sup>研究表明, *N*-十二烷基高丝氨酸内酯(C12-HSL)促进了 *pmrA* 和 *pmrB* 的表达,并提高了肠炎沙门氏菌的耐酸性。Hua 等<sup>[10]</sup>研究表明,阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)PmrA/B 组分系统参与脂质 A 的结构修饰、细胞膜通透性和疏水性的

收稿日期: 2022-03-19

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项(SDAIT-09-09);现代农业产业技术体系建设专项资金资助-肉牛项目(CARS-37);国家自然科学基金青年科学基金项目(31801609);国家重点研发政府间国际科技创新合作专项(2019YFE0103800)

第一作者: 杨克慧,女,硕士生

通信作者: 朱立贤 E-mail: zhlx@sdaa.edu.cn

调控。同时,*pmrA* 基因的缺失会使 PmrA/B 双组分调控系统的磷酸化转移过程失衡,导致其相应的反应调控机制不能激活,降低对环境压力的抵抗能力。

目前对于鼠伤寒沙门氏菌的研究大多集中于酸胁迫后产生的诱导耐酸机制,及其对温度、消毒剂以及渗透压等环境压力的交叉保护作用,对酸胁迫后是否影响生物膜形成以及 *pmrA* 基因是否参与该过程尚不清楚。本试验以鼠伤寒沙门氏菌野生株 (WT) 和前期构建的 *pmrA* 基因缺失株 ( $\Delta pmrA$ ) 为研究对象,探究酸胁迫对鼠伤寒沙门氏菌耐酸性和生物膜形成能力的影响,分析 *pmrA* 调控酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜形成的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* ATCC14028) 野生株 (WT) 及 *pmrA* 基因缺失株 ( $\Delta pmrA$ ), 山东农业大学食品科学与工程学院畜产品加工实验室保存。 $\Delta pmrA$  的构建参见郎晨晓等<sup>[1]</sup>的方法。

LB 肉汤 (LB Broth)、胰蛋白胨大豆琼脂 (Tryptic Soy Ager, TSA), 北京陆桥技术股份有限公司; 盐酸 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 结晶紫染料、95%乙醇, 天津凯通化学试剂有限公司; PBS 缓冲液、CCK-8 试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 北京康为世纪生物科技有限公司; LIVE/DEAD 染料, 赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.2 主要仪器与设备

G154DWS 灭菌锅, 厦门致微公司; 多道移液枪, 德国 Eppendorf 公司; BioTek Epoch2 型酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; HF safe-MJQ1 型红外线灭菌器, 上海力申科学仪器有限公司; LSM880 激光共聚焦显微镜, 德国 Carl zeiss 公司; 96 孔微孔板、24 孔微孔板、细菌培养皿, 美国康宁公司。

### 1.3 方法

1.3.1 菌种活化及酸胁迫处理 将保存于-80℃的 WT 及  $\Delta pmrA$  按 1% 的比例接种于新鲜的 LB

培养基中, 37℃ 震荡培养 18 h 活化 2 次。取活化后的菌液接种于 pH 7.2 的 LB 培养基 (未胁迫组) 及 pH 5.4 的 LB 培养基 (用 3 mol/L 盐酸调节 pH 值, 酸胁迫组) 中, 37℃ 震荡培养 4 h, 10 000×g 4℃ 离心 10 min, 去除上清, 用无菌 PBS 洗涤菌体 2 次, 调整菌悬液浓度约为 6 lg(CFU/mL), 备用<sup>[2]</sup>。

1.3.2 耐酸性的测定 按照 1.3.1 节方法对菌株进行胁迫处理, 胁迫 pH 值分别为 5.4、5.0 和 4.5 (3 mol/L 盐酸调节)。调整菌液浓度约为 6 lg (CFU/mL), 取 1 mL 各菌悬液接种于 9 mL pH 3 (模拟胃液酸环境) 的 LB (3 mol/L HCl 调节) 中, 37℃ 酸激 2 h。取酸激 0 h 和 2 h 菌液, 适当稀释后涂布于 TSA, 置于 37℃ 恒温培养箱培养 24 h 后对菌落计数, 计算存活率。存活率为酸激 2 h 后菌落数 (CFU/mL) 与初始菌落数之比 (%)。

1.3.3 生长曲线的测定 取活化后的 WT 及  $\Delta pmrA$  菌液分别接种于新鲜 LB 及 pH 5.4 的微酸培养基中, 37℃ 震荡培养, 每隔 2 h 吸取 1 mL 菌液样品, 适当稀释后涂布于 TSA, 置于 37℃ 恒温培养箱培养 24 h 后进行菌落计数, 并绘制生长曲线<sup>[3]</sup>。

1.3.4 生物膜的定量测定 取 1.3.1 节中酸胁迫和未酸胁迫菌液调整浓度约为 6 lg (CFU/mL), 取 200  $\mu$ L 接种于 96 孔板, 空白 LB 肉汤作为阴性对照, 每个样本重复 6 个孔, 于 25℃ 恒温培养箱培养 1~7 d。采用结晶紫染色法对生物膜定量测定, 将培养好的 96 孔板从培养箱取出, 弃菌液, 无菌生理盐水洗板 3 次, 除去浮游菌, 室温下自然风干 45 min; 将 200  $\mu$ L 0.25% (质量分数) 的结晶紫染液加入 96 孔板, 避光染色 30 min; 弃染液, 无菌生理盐水洗板 3 次, 室温风干 45 min; 将 200  $\mu$ L 95%乙醇加入 96 孔板, 脱色 30 min; 酶标仪测定 OD<sub>570nm</sub> 值<sup>[14]</sup>。

1.3.5 泳动能力的测定 取 1.3.1 节菌液调整 OD<sub>600nm</sub> 值为 1.0±0.2, 取 3  $\mu$ L 菌液, 点种于软琼脂平板, 室温放置 20 min 使菌液充分吸收, 将平板置于 25℃ 培养 24 h。每个菌株重复 3 次。游标卡尺测定生长直径。软琼脂平板配方: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L 葡萄糖, 0.3% 细菌琼脂粉<sup>[15]</sup>。

1.3.6 表面疏水性及自聚性的测定 取 1.3.1 节菌液调整 OD<sub>600nm</sub> 值为 1.0±0.2, 测定菌液初始浓度

OD<sub>600nm</sub> 值( $A_0$ );取 2 mL 各菌悬液加入 2 mL 二甲苯,涡旋震荡 2 min,室温下静置 15 min,弃有机相,取水相测定 OD<sub>600nm</sub> 值( $A_1$ );取相同体积各菌悬液,37 °C 静置培养 6 h,取上清液测定 OD<sub>600nm</sub> 值( $A_2$ ),每个菌株重复 3 次。表面疏水性(%)=( $A_0-A_1$ )/ $A_0 \times 100$ ,自聚性(%)=( $A_0-A_2$ )/ $A_0 \times 100$ <sup>[16]</sup>。

1.3.7 生物膜代谢活性的测定 按照 1.3.4 节方法制备培养 4 d 的生物膜。弃孔内培养液,PBS 冲洗 3 次除去浮游菌,每个孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂及 100  $\mu$ L PBS 缓冲液,37 °C 避光培养 4 h,然后用酶标仪测定 OD<sub>450nm</sub> 值<sup>[17]</sup>。

1.3.8 胞外聚合物(EPS)的测定 按照 1.3.4 节方法制备培养 4 d 的生物膜,弃培养液,PBS 冲洗 3 次除去浮游菌,用细胞刮刀将生物膜刮下并重悬于 1 mL PBS 缓冲液。向 1 mL 样品内加入 1 mol/L NaOH 溶液 0.4 mL,150 r/min 4 °C 震荡 3 h,加入 0.85% NaCl 溶液 0.6 mL,6 000 $\times g$  4 °C 离心 20 min,0.45  $\mu$ m 水系滤膜过滤得上清液,分析胞外多糖、蛋白含量。胞外多糖测定采用苯酚-硫酸法建立葡萄糖标准曲线,用酶标仪测定 OD<sub>490nm</sub> 值;胞外蛋白测定采用 BCA 蛋白定量试剂盒,建立蛋白标准曲线,酶标仪测定 OD<sub>562nm</sub> 值<sup>[18]</sup>。

1.3.9 激光共聚焦显微镜观察鼠伤寒沙门氏菌生物膜结构 取 1.3.1 节中酸胁迫和未酸胁迫菌液,调整浓度为 lg(CFU/mL),接种于细菌培养皿中,于 25 °C 恒温培养箱培养 4 d,弃培养液,PBS 冲洗 3 次除去浮游菌,室温风干后用 LIVE/DEAD 染料对生物膜避光染色 30 min,弃多余染料后用 PBS 洗去多余探针,室温风干后滴加少量无菌水并加盖玻片。LIVE/DEAD 染料包含使活细胞在激光下呈现绿色的探针 SYTO-9 和使死细胞呈现红色的 PI 探针。显微镜观察时,SYTO-9 探针的激发波长为 485 nm,发射波长 498 nm;PI 探针的激发波长为 535 nm,发射波长 637 nm,使用 20 $\times$ 物镜及 63 $\times$ 油镜观察,使用 ZEN Blue Lite 2\_3 软件的 z-stacks 简易 3D 功能进行三维投影图像的构建<sup>[19]</sup>。

1.3.10 数据统计分析 各试验重复 3 次,试验数据采用 SAS (Version 9.0, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2006)软件的混合模型进行统计分析,使用 Origin 2018 软件绘图。试验结果用平均值 $\pm$ 标准误表示,差异显著水平  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生长曲线的影响

为了评价 *pmrA* 基因缺失对菌株的生长性能是否有影响,对 WT 及  $\Delta pmrA$  在 pH 5.4 和 pH 7.0 的 LB 中的生长曲线进行测定。WT 及  $\Delta pmrA$  的生长曲线如图 1 所示,无论是否在酸环境下生长,与 WT 相比, $\Delta pmrA$  的生长性能均没有明显缺陷;当 WT 和  $\Delta pmrA$  在 pH 5.4 的 LB 培养基中生长时,前 2 h 的生长能力明显低于 pH 7.0 的 LB 培养基,而随着培养时间的延长,其菌落数逐渐趋于一致。这些结果表明,*pmrA* 基因缺失不影响鼠伤寒沙门氏菌的生长性能。类似的,Mendoza-Mejía 等<sup>[20]</sup>构建了 37 株不同的单基因突变体,探究其不同 pH(4.5,5.5,6.5 和 7.5)下的生长性能,研究表明这些单基因突变体与野生菌株的生长速率无明显差异,与本试验结果一致。

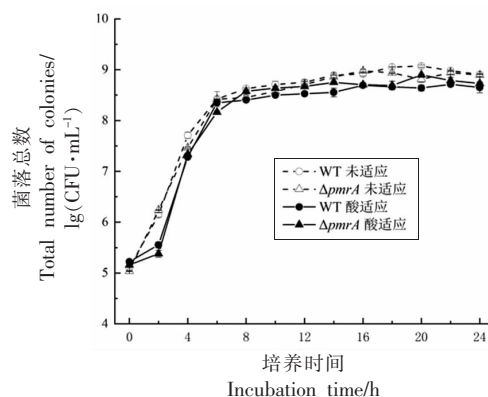


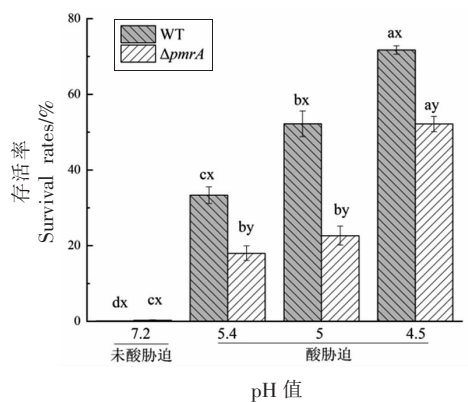
图 1 生长曲线

Fig.1 Growth curves

### 2.2 *pmrA* 基因缺失对鼠伤寒沙门氏菌耐酸性的影响

图 2 显示不同胁迫 pH 处理对 WT 及  $\Delta pmrA$  的耐酸能力的影响,存活率越高鼠伤寒沙门氏菌的耐酸能力越强。*pmrA* 基因缺失和不同胁迫 pH 值之间的交互作用对耐酸能力影响显著( $P < 0.05$ )。经 pH 5.4,5.0,4.5 酸胁迫后 WT 及  $\Delta pmrA$  的耐酸能力显著高于对照组( $P < 0.05$ ),表明酸胁迫处理使鼠伤寒沙门氏菌产生诱导耐酸。Tiwari 等<sup>[21]</sup>将伤寒沙门氏菌置于 pH 5.5 酸环境培养至 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.4,酸激,结果表明:经酸胁迫培养后该菌的存活率显著提高,与本试验结果一致。





注:a-d:不同小写字母表示同一菌株不同胁迫pH值下差异显著( $P<0.05$ );x-y:不同字母表示同一胁迫pH值下WT和 $\Delta pmrA$ 差异显著( $P<0.05$ )。

图2 不同酸胁迫处理对WT和 $\Delta pmrA$ 耐酸性的影响  
Fig.2 Effect of different acid stress treatments on acid tolerance of WT and  $\Delta pmrA$

在酸胁迫处理(pH5.4,5.0和4.5)下 $pmrA$ 基因缺株的耐酸能力显著低于WT( $P<0.05$ ),而在未酸胁迫组中二者差异不显著( $P>0.05$ )。这些结果表明,酸胁迫处理和双组分系统PmrA/B的协同作用是鼠伤寒沙门氏菌产生耐酸响应的重要因素,酸环境中的 $H^+$ 通过PmrA/B组分影响沙门氏菌的耐酸能力。Perez等<sup>[22]</sup>研究表明, $pmrB$ 能够感应环境中 $H^+$ ,并将信号传导至 $pmrA$ ,进而调控沙门氏菌的耐酸能力。本试验中有类似结果。

酸胁迫处理后, $\Delta pmrA$ 的耐酸能力仍显著高于对照组( $P<0.05$ ),这表明除了PmrA/B组分外还存在其它的耐酸保护机制,比如细胞膜系统、pH值稳态系统、质子外排系统以及其它双组分系统等。有研究表明,RpoS( $\sigma^s$ )、Fur和双组分调节系统PhoP/Q都与对数期的沙门氏菌产生ATR有关<sup>[23]</sup>。

表1 WT和 $\Delta pmrA$ 的生物膜形成能力

Table 1 Biofilm formation ability of WT and  $\Delta pmrA$

时间/d	WT		$\Delta pmrA$	
	未胁迫	酸胁迫	未胁迫	酸胁迫
1	0.15 <sup>cmx</sup> ±0.00	0.16 <sup>dmx</sup> ±0.01	0.16 <sup>dmx</sup> ±0.00	0.16 <sup>dmx</sup> ±0.01
2	0.22 <sup>cmx</sup> ±0.03	0.19 <sup>dmx</sup> ±0.00	0.19 <sup>dmx</sup> ±0.00	0.21 <sup>dmx</sup> ±0.01
3	0.40 <sup>cmx</sup> ±0.04	0.42 <sup>dmx</sup> ±0.02	0.33 <sup>dmx</sup> ±0.02	0.38 <sup>dmx</sup> ±0.02
4	0.42 <sup>cmx</sup> ±0.03	1.36 <sup>dmx</sup> ±0.04	0.41 <sup>cmx</sup> ±0.03	0.79 <sup>amy</sup> ±0.08
5	1.20 <sup>lmx</sup> ±0.05	1.65 <sup>cmx</sup> ±0.05	1.08 <sup>lmx</sup> ±0.09	1.44 <sup>lmx</sup> ±0.03
6	1.96 <sup>amx</sup> ±0.04	2.61 <sup>lmx</sup> ±0.08	1.96 <sup>amx</sup> ±0.06	1.97 <sup>amy</sup> ±0.11
7	2.14 <sup>amx</sup> ±0.01	3.10 <sup>amx</sup> ±0.09	2.10 <sup>amx</sup> ±0.06	2.14 <sup>amy</sup> ±0.06

注:a-e:不同小写字母表示同一菌株、同一胁迫处理不同培养时间差异显著( $P<0.05$ );m-n:不同小写字母表示同一菌株、同一培养时间不同胁迫处理间差异显著( $P<0.05$ );x-y:不同小写字母表示同一培养时间、同一胁迫处理WT和 $\Delta pmrA$ 间差异显著( $P<0.05$ )。

由于对WT和 $\Delta pmrA$ 进行酸胁迫处理(pH 5.4, 5.0和4.5)均产生诱导耐酸响应,且pH 5.4为生鲜牛肉的极限pH值,因此选择pH 5.4作为培养生物膜的前期酸胁迫条件开展后续试验。

2.3  $pmrA$ 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜形成能力的影响

结晶紫染色法测定生物膜形成能力的结果见表1。基因缺失、培养时间及胁迫处理之间的交互作用对鼠伤寒沙门氏菌生物膜的形成能力影响显著( $P<0.05$ )。生物膜形成量均随培养时间的延长而增多( $P<0.05$ )。经酸胁迫后 $\Delta pmrA$ 的生物膜形成量显著低于WT,而未经酸胁迫的 $\Delta pmrA$ 的生物膜形成量与WT无明显差异( $P>0.05$ ),这表明 $pmrA$ 缺失和酸胁迫均影响鼠伤寒沙门氏菌的生物膜形成能力。经酸胁迫的WT和 $\Delta pmrA$ 的生物膜形成量在第4天和第5天显著高于未胁迫组( $P<0.05$ ),而第6天及第7天仅WT生物膜形成量显著高于未胁迫组( $P<0.05$ ),表明 $pmrA$ 基因缺失影响酸胁迫后生物膜的最大形成量。WT和 $\Delta pmrA$ 经酸胁迫后的生物膜在第4天显著高于前3d( $P<0.05$ ),而未胁迫的生物膜在第5天显著高于前4d( $P<0.05$ ),这表明酸胁迫处理可能加快了生物膜的生长速率。从整体试验结果分析,培养至第4天的生物膜形成量在不同处理下均表现出较大差异,因此后续选取生长至第4天的生物膜进行其它相关指标的测定。结晶紫染色法是通过结晶紫染料与生物膜的胞外聚合物(EPS)及生物膜内菌体结合,从而衡量生物膜形成量<sup>[24]</sup>。推测经酸胁迫后WT及 $\Delta pmrA$ 生物膜形成能力的差异,可能是EPS生成量以及生物膜内的活菌数受到影响。

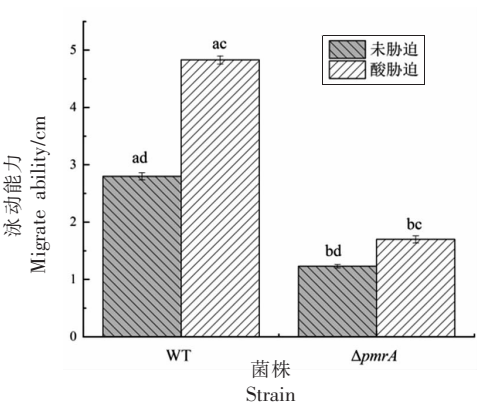
2.4 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌株特性的影响

2.4.1 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌泳动能力的影响 沙门氏菌的运动能力主要由鞭毛和菌毛共同作用,其中鞭毛是细菌的主要运动器官,能够介导细菌趋化,使细菌获得环境优势,同时在生物膜初始黏附过程中负责寻找合适的附着位点<sup>[25-26]</sup>。图 3 是酸胁迫处理对鼠伤寒沙门氏菌泳动能力的影响。*pmrA* 基因缺失和酸胁迫处理间的交互作用对鼠伤寒沙门氏菌泳动能力影响显著( $P < 0.05$ )。酸胁迫处理显著提高了 WT 和  $\Delta pmrA$  的泳动能力( $P < 0.05$ ),其中酸胁迫后 WT 的泳动能力是  $\Delta pmrA$  的 2.80 倍,这表明酸胁迫和 *pmrA* 基因均能够提升沙门氏菌的泳动能力,这可能是 *pmrA* 基因缺失使菌株对于  $H^+$  压力的感受降低,进而使得调节趋化性和鞭毛蛋白装配的相关基因表达下降<sup>[27-28]</sup>,影响鼠伤寒沙门氏菌的泳动能力,进而影响生物膜的形成。

2.4.2 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌表面疏水性及自聚性的影响 细菌的表面疏水性及自聚性与生物膜的形成密切相关。沙门氏菌生物膜形成的第 1 阶段(初始黏附),即与生物或非生物表面接触并附着于其表面,这个过程与菌体的表面疏水性相关。表面疏水性越高细菌越容易发生自聚及黏附,也就越容易聚集成细菌簇,进而促进生物膜的形成<sup>[29]</sup>。表 2 为酸胁迫处理和 *pmrA* 基因缺失对菌株表面疏水性和自聚性的影响。无论是否酸胁迫,WT 的表面疏水性均显著高于  $\Delta pmrA$  ( $P < 0.05$ )。Balaure 等<sup>[30]</sup>研究表明 *pmrA* 缺失会影响脂多糖途径中与糖链合成相关代谢途径,从而影响菌株的表面疏水性<sup>[10]</sup>,与本试验相一致。而 *pmrA* 基因缺失和酸胁迫处理对鼠伤寒沙门氏菌自聚能力无明显影响( $P > 0.05$ ),可能是由于鼠伤寒沙门氏菌自身的表面黏附蛋白较少,导致其自聚能力无明显差异<sup>[31]</sup>。

2.5 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜代谢活性的影响

CCK-8 试剂中的水溶性四唑盐 WST-8 能被细胞中的脱氢酶还原为橙黄色甲臜物,其中活细胞数量与甲臜物成正相关,通过酶标仪测定各样品的  $OD_{450nm}$  值,便可检出各菌株生物膜的代谢活



注:a-b:不同小写字母表示同一处理 WT 和  $\Delta pmrA$  之间差异显著( $P < 0.05$ );c-d:不同小写字母表示同一菌株不同酸胁迫处理之间差异显著( $P < 0.05$ )。

图 3 酸胁迫处理对 WT 和  $\Delta pmrA$  泳动能力的影响

Fig.3 The influence of acid stress treatment on the migrate ability of WT and  $\Delta pmrA$

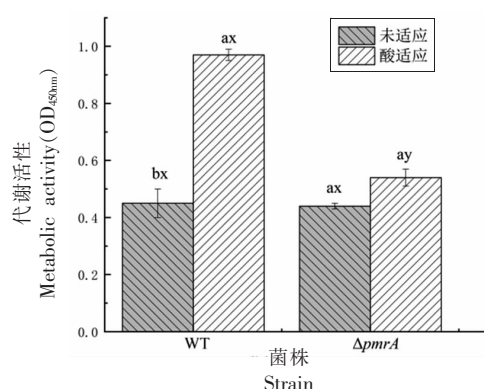
表 2 酸胁迫处理对 WT 和  $\Delta pmrA$  表面疏水性  
和自聚性的影响

Table 2 The influence of acid stress treatment on the surface hydrophobicity and self-aggregation of WT and  $\Delta pmrA$

菌株特性	胁迫处理	WT	$\Delta pmrA$
表面疏水性	未胁迫	22.75 <sup>a</sup> ± 1.95	15.47 <sup>b</sup> ± 0.52
	酸胁迫	22.37 <sup>a</sup> ± 2.04	13.32 <sup>b</sup> ± 1.78
自聚性	未胁迫	7.09 ± 0.48	10.43 ± 1.37
	酸胁迫	9.35 ± 0.47	9.59 ± 0.27

注:a-b:不同小写字母表示 WT 和  $\Delta pmrA$  之间差异显著( $P < 0.05$ )。

性<sup>[32]</sup>。图 4 显示酸胁迫处理对 WT 及  $\Delta pmrA$  代谢活性的影响。结果表明,*pmrA* 基因缺失和胁迫处理间的交互作用对鼠伤寒沙门氏菌生物膜代谢活性影响显著( $P < 0.05$ )。未经酸胁迫处理的  $\Delta pmrA$  代谢活性与 WT 基本一致,而酸胁迫后 WT 代谢活性显著高于  $\Delta pmrA$  ( $P < 0.05$ ),为  $\Delta pmrA$  的 1.81 倍。Bao 等<sup>[33]</sup>通过 XTT 法研究发现,与 *pmrA* 基因缺失株相比,野生阪崎克罗诺肠杆菌的细胞活性在整个生物膜形成过程中均更高,这表明 *pmrA* 基因参与阪崎克罗诺肠杆菌的生物膜形成过程,与本试验结果一致。代谢活性试验结果表明酸胁迫和 *pmrA* 基因能够协同提高鼠伤寒沙门氏菌生物膜内细胞的代谢活性。



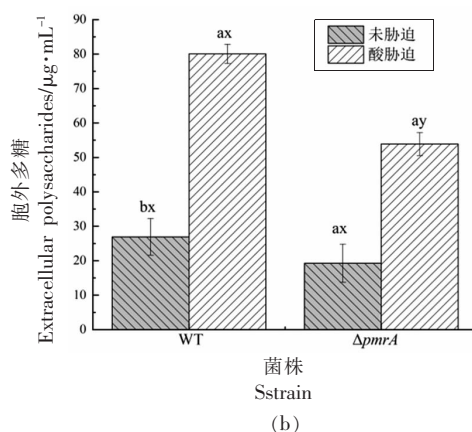
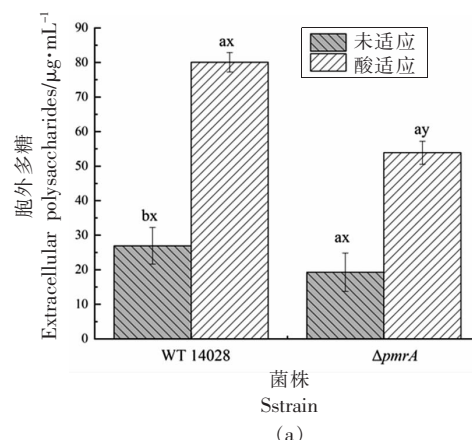
注:a-b:不同小写字母表示同一菌株不同胁迫处理间差异显著( $P < 0.05$ );x-y:不同小写字母表示同一胁迫处理 WT 和  $\Delta pmrA$  间差异显著( $P < 0.05$ )。

图4 酸胁迫处理对 WT 和  $\Delta pmrA$  生物膜代谢活性的影响

Fig.4 Effect of acid stress treatment on metabolic activity of biofilm of WT and  $\Delta pmrA$

## 2.6 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜胞外多糖和蛋白的影响

胞外聚合物(EPS)是由胞外多糖、胞外蛋白等物质共同构成的一种三维立体结构,是生物膜的重要组成部分<sup>[34]</sup>,其中胞外多糖和蛋白主要由纤维素(*adrA*)和卷曲菌毛(*csgA* 和 *csgD*)组成,能够促进细胞间相互作用和表面定植<sup>[35]</sup>。图5和图6分别为酸胁迫后培养至第4天不同菌株生物膜胞外多糖及胞外蛋白的含量。经酸胁迫后 WT 和  $\Delta pmrA$  的胞外多糖和蛋白含量都显著升高( $P < 0.05$ ),而  $\Delta pmrA$  在相同培养时间内其胞外多糖和蛋白含量显著低于 WT( $P < 0.05$ )。未经酸胁迫的 WT 和  $\Delta pmrA$  的胞外多糖和蛋白含量无明显差异( $P > 0.05$ )。由此表明,酸胁迫处理和 *pmrA* 基因对鼠伤寒沙门氏菌生物膜胞外聚合物的形成有一定促进作用,这也与鼠伤寒沙门氏菌的菌株特性及生物膜代谢活性结果一致。推测酸胁迫处理对鼠伤寒沙门氏菌生物膜胞外聚合物的促进作用一方面可能是细菌对环境信息做出应激响应,促进相关基因的表达<sup>[36]</sup>,另一方面可能是 *pmrA* 基因感应到环境压力后信号传导过程中产生交叉调节,促进了生物膜相关基因的表达,其相关调节机制有待研究。此外,胞外聚合物也是一种物理屏障,能够增强沙门氏菌对外界不利环境的抵抗,并促进生物膜的初始黏附及生物膜的稳定<sup>[37-38]</sup>。



注:a-b:不同小写字母表示同一菌株不同处理间差异显著( $P < 0.05$ );x-y:不同小写字母表示同一处理 WT 和  $\Delta pmrA$  间差异显著( $P < 0.05$ )。

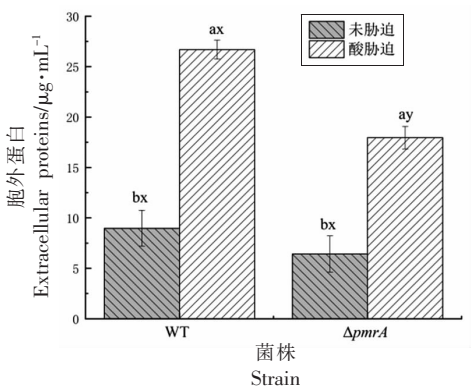
图5 酸胁迫处理对 WT 和  $\Delta pmrA$  生物膜胞外多糖含量的影响

Fig.5 The influence of acid stress treatment on the extracellular polysaccharides of WT and  $\Delta pmrA$  biofilm

## 2.7 *pmrA* 基因缺失对酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜微观结构的影响

图7为激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察酸胁迫对 WT 和  $\Delta pmrA$  生物膜微观结构的影响,其中 SYTO-9 及 PI 探针分别穿过活细胞和死细胞使其呈现绿色和红色荧光<sup>[39]</sup>。未经酸胁迫处理时,  $\Delta pmrA$  生物膜内的活菌数量显著低于 WT,且菌体结构较为分散;经酸胁迫后,WT 和  $\Delta pmrA$  生物膜内活菌数量显著增多,特别是 WT 生物膜内菌体结构更加致密,而  $\Delta pmrA$  的活菌数仍低于 WT,膜内菌体结构较为分散,这表明酸胁迫和





注:a-b:不同小写字母表示同一菌株不同处理间差异显著( $P < 0.05$ );x-y:不同小写字母表示同一处理 WT 和  $\Delta\text{pmrA}$  间差异显著( $P < 0.05$ )。

图 6 酸胁迫处理对 WT 和  $\Delta\text{pmrA}$  生物膜胞外蛋白含量的影响

Fig.6 The influence of acid stress treatment on the extracellular proteins of WT and  $\Delta\text{pmrA}$  biofilm

*pmrA* 基因均能够通过增加生物膜内活菌数量来提升鼠伤寒沙门氏菌的生物膜形成能力,这也与结晶紫染色法测定生物膜的结果一致。

TCS 存在于细菌中,在动物界不存在,这使得它们成为新的抗菌化合物的作用靶点<sup>[40]</sup>。Fihn 等<sup>[41]</sup>阐述细菌双组分系统中 HK-ATP 结合域是高度保守的结构域,因此将 HK-ATP 结合域作为靶点开发细菌抑制剂,破坏菌体内 TCS 的信号传递是可行的。目前以 PmrA/B 系统为靶点的抑制剂鲜有报道,可以结合 PmrA/B 系统的信号传导机制及其对鼠伤寒沙门氏菌菌株特性、生物膜形成过程中代谢活性、胞外聚合物及微观结构的影响,再结合实际生产寻求有效的抑制剂来预防和消减生物膜的形成。本研究结果表明 *pmrA* 能调控鼠伤寒沙门氏菌的耐酸能力及生物膜形成能力,为进一步通过 PmrA/B 系统消减该菌奠定了一定的基础。

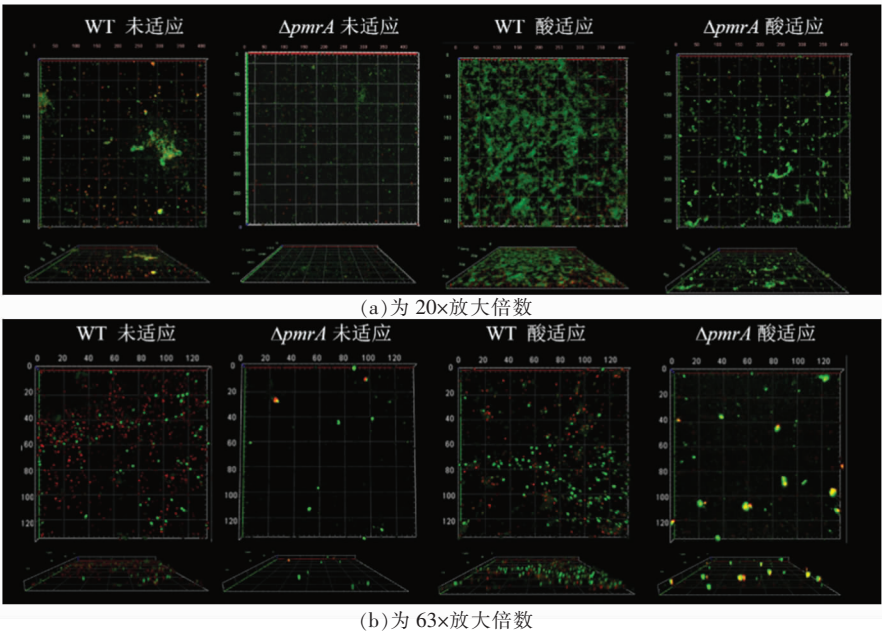


图 7 酸胁迫处理对 WT 和  $\Delta\text{pmrA}$  生物膜微观结构的影响

Fig.7 The influence of acid stress treatment on the microstructure of WT and  $\Delta\text{pmrA}$  biofilm

### 3 结论

本研究表明,酸胁迫会使鼠伤寒沙门氏菌产生酸适应并引发诱导耐酸响应,同时会导致生物膜形成能力增强。而 *pmrA* 基因缺失会降低其耐酸及生物膜形成能力,这也就揭示了鼠伤寒沙门氏菌的双组分系统 PmrA/B 参与对外界酸环境的

感知,可以调控生物膜的形成。本试验所探究的酸胁迫及 *pmrA* 基因缺失对鼠伤寒沙门氏菌生物膜的形成机制是:酸胁迫和 *pmrA* 基因可以促进浮游菌的初始黏附过程,增强生物膜内细菌的代谢活性,通过增加生物膜内菌体数量及胞外多糖和胞外蛋白的生物合成来调节鼠伤寒沙门氏菌生物膜

的形成。此外,还需进一步分析 *pmrA* 基因缺失影响鼠伤寒沙门氏菌与酸胁迫和生物膜形成相关基因表达的情况,并结合转录组测序技术分析 *pmrA* 基因缺失影响的主要代谢途径,目前相关研究正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] EFSA. 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): 29-67.
- [2] 王霄晔,任婧寰,王哲,等. 2017年全国食物中毒事件流行特征分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(5): 359-364.  
WANG X Y, REN J H, WANG Z, et al. Epidemiological characteristics of food poisoning events in China, 2017[J]. Disease Surveillance, 2018, 33(5): 359-364.
- [3] DONG P C, ZHU L X, MAO Y W, et al. Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants[J]. Food Control, 2014, 38(4): 54-60.
- [4] PRADHAN D, NEGI V D. Stress-induced adaptations in *Salmonella*: a ground for shaping its pathogenesis[J]. Microbiological Research, 2019, 229(2): 126311.
- [5] 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.
- [6] O'LEARY D, MCCABE E M, MCCUSKER M P, et al. Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 206: 7-16.
- [7] ZHAO X, ZHAO F, WANG J, et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives[J]. RSC Advances, 2017, 7(58): 36670-36683.
- [8] CAPITA R, RIESCO P F, ALONSO H A, et al. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(4): 1268-1280.
- [9] FREITAS L, SANTOS C, CARNEIRO D G, et al. Nisin and acid resistance in *Salmonella* is enhanced by *N*-dodecanoyl-homoserine lactone[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104320.
- [10] HUA J, JIA X, ZHANG L, et al. The characterization of two-component system PmrA/PmrB in *Cronobacter sakazakii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 903.
- [11] 郎晨晓,张一敏,朱立贤,等. 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[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 68-74.  
LANG C X, ZHANG Y M, ZHU L X, et al. Acid tolerance response of *Salmonella* in beef and its formation mechanism during chilled storage[J]. Food Science, 2021, 42(6): 68-74.
- [12] HU S, YU Y, ZHOU D, et al. Global transcriptomic acid tolerance response in *Salmonella enteritidis*[J]. Food Science and Technology, 2018, 92: 330-338.
- [13] GU D, XU E H, YUAN X, et al. Genome-wide identification of genes involved in acid stress resistance of *Salmonella* Derby[J]. Genes, 2021, 12(4): 1-18.
- [14] YIN B, ZHU L, ZHANG Y, et al. The characterization of biofilm formation and detection of biofilm-related genes in *Salmonella* isolated from beef processing plants[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(10): 660-667.
- [15] WU L, LIU Y, DONG P, et al. Beef-Based medium influences biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from beef processing plants[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(6): 1060-1068.
- [16] LING N, ZHANG J, LI C, et al. The glutaredoxin gene, *grxB*, affects acid tolerance, surface hydrophobicity, auto-aggregation, and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 133.
- [17] 闫玉卿,张一敏,董鹏程,等. 次氯酸钠对德尔卑沙门氏菌生物被膜的抑制作用及机制[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 1-9.  
YAN Y Q, ZHANG Y M, DONG P C, et al. Biofilm inhibition activity and mechanism of action of sodium hypochlorite against *Salmonella* Derby[J]. Food Science, 2021, 42(13): 1-9.



- [18] QIAN H, LI W, GUO L, et al. Stress response of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* biofilms to different modified atmospheres[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 23.
- [19] WANG H, WANG X, YU L, et al. Resistance of biofilm formation and formed-biofilm of *Escherichia coli* O157:H7 exposed to acid stress[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 118: 108787.
- [20] MENDOZA-MEJÍA B D, MEDINA-APARICIO L, SERRANO-FUJARTE I, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi genomic regions involved in low pH resistance and in invasion and replication in human macrophages[J]. Annals of Microbiology, 2021, 71: 18.
- [21] 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.
- [22] PEREZ J C, GROISMAN E A. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica* [J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(1): 283-293.
- [23] GAVRIIL A, PARAMITHIOTIS S, SKORDAKI A, et al. Prior exposure to different combinations of pH and undissociated acetic acid can affect the induced resistance of *Salmonella* spp. strains in mayonnaise stored under refrigeration and the regulation of acid-resistance related genes[J]. Food Microbiology, 2021, 95: 103680.
- [24] BANSAL M, NANNAPANENI R, KODE D, et al. Rugose morphotype in *Salmonella typhimurium* and *Salmonella heidelberg* induced by sequential exposure to subinhibitory sodium hypochlorite aids in biofilm tolerance to lethal sodium hypochlorite on polystyrene and stainless steel surfaces[J]. Front Microbiology, 2019, 10: 2704.
- [25] GUPTA P, SARKAR S, DAS B, et al. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review[J]. Archives of Microbiology, 2016, 198(1): 1-15.
- [26] SHAMSUN N, RAHAMAN M, JIE-WON H A, et al. Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018, 17(6): 1484-1502.
- [27] ZHOU A, CAO Y, ZHOU D, et al. Global transcriptomic analysis of *Cronobacter sakazakii* CICC 21544 by RNA-seq under inorganic acid and organic acid stresses [J]. Food Research International, 2020, 130: 108963.
- [28] XU Z, LIU Z, TS D, et al. Impact of *pmrA* on *Cronobacter sakazakii* planktonic and biofilm cells: A comprehensive transcriptomic study[J]. Food Microbiology, 2021, 98: 103785.
- [29] LATHER P, MOHANTY A K, JHA P, et al. Contribution of cell surface hydrophobicity in the resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents[J]. Biochemistry Research International, 2016, 2016: 1091290.
- [30] BALAURE P C, GRUMEZESCU A M. Recent advances in surface nanoengineering for biofilm prevention and control. part I: molecular basis of biofilm recalcitrance. passive anti-biofouling nanocoatings[J]. Nanomaterials, 2020, 10(6): 1-30.
- [31] 王虎虎. 肉源沙门氏菌生物菌膜的形成及转移规律研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- WANG H H. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella* and its transferring[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [32] LIU Y, WU L, HAN J, et al. Inhibition of biofilm formation and related genes expression of *Listeria monocytogenes* by four natural antimicrobials compounds and sodium hypochlorite[J]. Frontiers in microbiology, 2020, 11: 617473.
- [33] BAO X, JIA X, CHEN L, et al. Effect of polymyxin resistance (*pmr*) on biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 106: 16-19.
- [34] BAI X, NAKATSU C H, BHUNIA A K. Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety[J]. Foods, 2021, 10: 2117.
- [35] YANG Y, MIKS-KRAJNİK M, ZHENG Q, et al. Biofilm formation of *Salmonella enteritidis* under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment[J]. Food Microbiology, 2016, 54: 98-105.
- [36] ROY P K, HA J W, MIZAN M, et al. Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype kentucky and virulence gene expression[J]. Poultry Science, 2021, 100(1): 101209.

- [37] HAHN M M, JF GONZÁLEZ, GUNN J S. *Salmonella* biofilms tolerate hydrogen peroxide by a combination of extracellular polymeric substance barrier function and catalase enzymes[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 683081.
- [38] LIU Y, WU H, SUN Z, et al. Contamination and biofilm formation of foodborne and opportunistic pathogens in yellow-feathered chicken carcass[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(3): 210–218.
- [39] KIM M J, KIM J S. Enhanced inactivation of *Salmonella enterica enteritidis* biofilms on the stainless steel surface by proteinase K in the combination with chlorine[J]. *Food Control*, 2022, 132: 108519.
- [40] BEM A E, VELIKOVA N, PELLICER M T, et al. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(1): 213–224.
- [41] FIHN C A, CARLSON E E. Targeting a highly conserved domain in bacterial histidine kinases to generate inhibitors with broad spectrum activity[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2021, 61: 107–114.

### The Effect of *pmrA* on Biofilm Formation Ability of Acid Stressed *Salmonella typhimurium*

Yang Kehui, Dong Pengcheng, Liu Yunge, Zhang Yimin, Mao Yanwei, Liang Rongrong, Luo Xin, Zhu Lixian\*  
(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong)

**Abstract** In order to explore the role of *pmrA* gene in acid tolerance resistance and biofilm formation of *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) induced after acid stress. Measuring the growth curve, acid tolerance response, and biofilm formation ability of the wild-type (WT) strain of *S. typhimurium* and *pmrA* deletion mutant strain ( $\Delta pmrA$ ) to preliminarily confirm whether acid stress and the lack of *pmrA* affect the biofilm formation ability of *S. typhimurium*. Further determined the strain characteristics of WT and  $\Delta pmrA$  such as swimming ability, surface hydrophobic ability and self-aggregation. At the same time, metabolic activity, extracellular polymeric substance (EPS) content and biofilm microstructure of the biofilm formation also should be analyzed to explore the mechanism of *pmrA* deletion on the biofilm formation ability of acid stressed *S. typhimurium*. The result: After acid stress, the acid tolerance of  $\Delta pmrA$  was 53.92 % of WT. On the 4th day of biofilm culture, the biofilm formation of  $\Delta pmrA$  was only 54.68% of WT. The swimming ability and hydrophobicity of  $\Delta pmrA$  were 35.20% and 59.10% of WT, respectively. After acid stress, the biofilm metabolic activity and the extracellular polymeric substances content of  $\Delta pmrA$  were increased to a certain extent compared with those which had not experienced, however, they were dramatically lower than those of the WT strain ( $P < 0.05$ ). In the meantime, the three-dimensional structure of the biofilm of the  $\Delta pmrA$  was still relatively scattered and the number of living cells in the membrane were prominently less than the WT strain ( $P < 0.05$ ). Conclusion: *pmrA* gene was closely associated with *S. Typhimurium*, especially in acid tolerance response and biofilm formation.

**Keywords** *Salmonella typhimurium*; *pmrA* gene; acid stress; biofilm; acid tolerance response; strain characteristics