

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.06.012

高温胁迫对德尔卑沙门氏菌抗逆性的影响

Effects of high temperature stress on stressresistance of thermotolerant *Salmonella* Derby stresses

翟立公 杜传来 杨晴 陈晨 王俊颖

ZHAI Li-gong DU Chuan-lai YANG Qing CHEN Chen WANG Jun-ying

(安徽科技学院,安徽 滁州 233100)

(Anhui Science and Technology University, Chuzhou, Anhui 233100, China)

摘要:以德尔卑沙门氏菌(*Salmonella* Derby, SD)为研究对象,通过高温培养驯化获得高温耐受性SD,研究其在环境胁迫条件下的耐受性。经高温驯化后,55℃处理20 min,高温耐受菌株的存活率是对照菌株存活率的1.5倍。在pH 3.0, 2.4环境下,高温耐受菌株存活率高于对照组,但处于碱胁迫过程中,高温耐受菌株变得更加敏感,pH 12处理30 min,对照组存活率为33.83%,高温耐受菌株完全被杀灭。在乙醇、NaClO环境下,高温耐受菌株相较于对照组更加敏感;但在125 mmol/L H₂O₂条件下,高温耐受菌株存活率高于对照组(30.05%)存活率;对-20℃冷冻处理前期,其耐受性明显高于对照组。SD经高温胁迫后提高对酸、H₂O₂、低温的交叉抗性,同时也增加对碱、乙醇、NaClO等胁迫的敏感性,联合使用有助于提高灭菌效果。

关键词: 德尔卑沙门氏菌; 高温耐受性; 胁迫抗性

Abstract: The application of high temperature treatment to food is one of the most common methods for eliminating microbial contamination. In this study, high temperature tolerance of *Salmonella* Derby (SD) was obtained by high temperature culture and the effect of the heat-stressed SD on its response to environment stresses. The survival rate of high temperature domesticated SD was 1.5 time higher in 55℃ for 20 min than the control group. The survival rate of high temperature domesticated SD was better in pH 3.0 and pH 2.4 acid challenge. The high temperature tolerant bacteria had enhanced sensitivity to alkali, ethanol and NaClO. The survival of the control group was 33.83%, but the

high temperature tolerance SD did not survive in pH 12 for 30 min. On the other hand, The survival rate of thermotolerant SD was 30.05% better than the control group under 125 mmol/L H₂O₂ stress. The control group was more susceptible to -20℃. Temperature stress enhance tolerant SD to acid, H₂O₂ and -20℃ low temperature and sensitivity to alkali, ethanol and NaClO. The combination of environmental stress helps to improve the sterilization effect of thermotolerant SD.

Keywords: *Salmonella* Derby; high temperature tolerant; stress resistance

在世界范围内,每年由沙门氏菌引起的食物中毒事件达到8030万件,造成15.5万人死亡^[1];在中国,细菌性食物中毒事件中,70%~80%是由沙门氏菌引起的^[1-3]。沙门氏菌感染人体后潜伏期短,发病突然,能引起感染者的腹泻、发热等症状,严重者会引起菌血症^[4]。沙门氏菌致病主要是通过食源性感染引起的,全球沙门氏菌病例中有85.6%是食源性感染^[5]。沙门氏菌包括2600多个血清型,但污染食品的血清型主要集中在肠炎沙门氏菌亚种中的部分血清型^[6]。德尔卑沙门氏菌(*Salmonella* Derby)在中国的猪肉、鸡肉类食品中检出率较高^[7-8]。食品在加工过程中,不同胁迫条件的复合作用,有助于提高食源性致病菌的抵抗能力,降低杀菌效果,将引起重要的食品安全问题^[9]。Fong等^[10]发现,当沙门氏菌经过亚致死(45℃、3 min)处理后,其耐热性明显提高。有研究^[10-12]表明,热适应性沙门氏菌对UV辐射的抗性增加;当沙门氏菌处于干燥环境下,其高温的耐受性也会相应增强。经过亚致死高温胁迫能改变沙门氏菌毒性基因的表达,提高宿主细胞的被感染率^[13]。

在食品加工及贮藏过程中,沙门氏菌会受到多种胁迫因子的交叉协同作用,造成其对环境耐受性的改变。研究^[14]发现,酸适应性沙门氏菌当遇到低温、高温、高渗等环境下,其存活率显著高于非适应性菌,但对NaClO等

基金项目:安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016219);安徽科技学院人才引进项目(编号: SPYJ201602)

作者简介: 翟立公,男,安徽科技学院讲师,博士。

通信作者: 杜传来(1968—),男,安徽科技学院教授,硕士。

E-mail: ducl@ahstu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-18

消毒剂却更为敏感。在食品加工过程中,加热处理是最常用的一种灭菌手段,可有效消除食品及加工器具上的食源性致病菌,防止致病菌的传播。当加工过程中加热温度及时间未达到灭菌要求时,会造成污染的沙门氏菌处于亚致死状态,促使其开启热胁迫应答机制维持其正常的生命活动,从而提高其对高温胁迫的耐受性^[15]。然而,在食品加工过程中沙门氏菌常处于多种胁迫因子的共同作用。因此,针对高温耐受沙门氏菌对其他胁迫因子交叉抗性的研究将变得非常重要。本试验拟以德尔卑沙门氏菌(SD)为对象,主要研究沙门氏菌经高温胁迫后,对其他环境胁迫因子的耐受性影响,为食品加工业针对高温耐受沙门氏菌选择合适灭菌、保藏技术提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

德尔卑沙门氏菌(*S. Derby*):中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC50719)。

柠檬酸、NaClO:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

乙酸、NaCl、30%过氧化氢、乙醇(95%):分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

LB培养基:青岛海博生物技术有限公司;

胰蛋白酶大豆蛋白胨培养基(TSB):青岛海博生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

二级生物安全柜:BSC-1100 II A2-X型,济南鑫贝西生物技术有限公司;

台式恒温培养箱:THZ-92A型,上海跃进医疗器械有限公司;

智能恒温恒湿培养箱:LHP-160型,上海三发科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 德尔卑沙门氏菌高温耐受株驯化 德尔卑沙门氏菌(CMCC50719)经LB液体培养基活化后,划线培养,挑取单菌落,转接到LB液体培养基,43℃、180 r/min培养36 h,再转到LB固体培养基,43℃培养,如此反复进行多轮驯化。将驯化获得的高温耐受菌株和对照菌株分别接入LB液体培养基,37℃、180 r/min培养10 h,平板菌落计数法获得以上菌株的初始浓度。同时,各取1 mL培养液,10 000 r/min离心1 min,弃上清,分别加入1 mL无菌生理盐水,重悬。将两管菌液置于55℃,处理20,25,30 min,用无菌生理盐水10倍梯度稀释,取适宜稀释度平板菌落计数。按式(1)计算存活率,评价德尔卑沙门氏菌高温耐受株的耐受性^[14]。

存活率=(处理后菌落数对数值/处理前菌落数对数

值)×100%。(1)

1.3.2 高温耐受稳定性分析 将德尔卑沙门氏菌高温耐受菌株连续培养10代,经55℃水浴,处理30 min,测定高温耐受菌株和对照菌株的存活率。

1.3.3 高温耐受SD菌株环境胁迫抗性分析 高温耐受菌株和对照菌株,分别经LB液体培养基,过夜培养,取1 mL菌液离心,弃上清,根据以下方法处理,测定高温耐受SD的环境胁迫性分析。酸胁迫:用柠檬酸或乙酸分别将生理盐水的pH调整到2.4,3.0,各取1 mL加入,重悬菌体(处理30 min);碱胁迫:用NaOH将生理盐水的pH调整至10,11,12,各取1 mL加入,重悬菌体(处理30 min);乙醇胁迫:配置60%,65%,70%的乙醇溶液,各取1 mL加入,重悬菌体(处理3 min);过氧化氢胁迫:将30% H₂O₂与无菌水配置成25,75,125 mmol/L的溶液,各取1 mL,重悬菌体(处理30 min);次氯酸钠胁迫:用无菌水分别配置0.1%,0.5%,1.0% NaClO溶液,各取1 mL,重悬菌体(处理15 min);低温胁迫:用1 mL生理盐水重悬菌体后,置于-20℃冰箱冷冻处理22 d。以上菌体经过环境胁迫处理后,10 000 r/min离心1 min,弃上清液,加入1 mL生理盐水重悬,利用平板菌落计数法对胁迫前后菌落计数,计算胁迫后菌体存活率。

1.3.4 数据统计分析 每组试验设3次重复,利用SPSS 19.0和Origin 7.0软件对数据进行分析 and 绘图。

2 结果与分析

2.1 高温耐受SD菌株驯化及高温耐受稳定性

SD经长时间43℃驯化培养,获得的菌株,在55℃胁迫条件下的存活率如图1所示。当胁迫时间仅为20 min时,高温耐受菌株的存活率达到61.9%,而对照菌株的存活率仅达到41.19%,差异显著;当胁迫时间增加到25 min后,高温耐受菌株的存活率也显著高于对照菌株

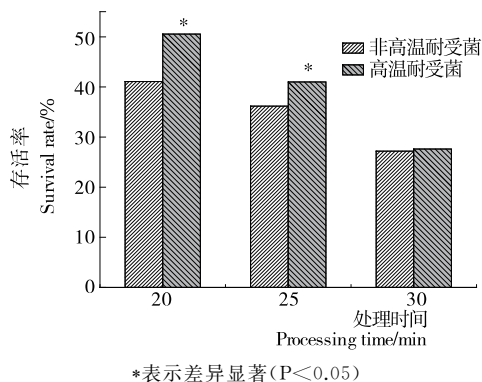


图1 高温耐受SD菌株和对照菌株在55℃不同处理时间的存活率

Figure 1 Survival rate of high temperature SD resistant strain and control strain at 55℃ for different treatment time

株;但随着胁迫时间的延长,驯化菌株的存活率略高于对照菌株。表明经高温驯化后,对高温胁迫的耐受性具有胁迫时间的相关性,随着胁迫时间延长,耐受性降低。

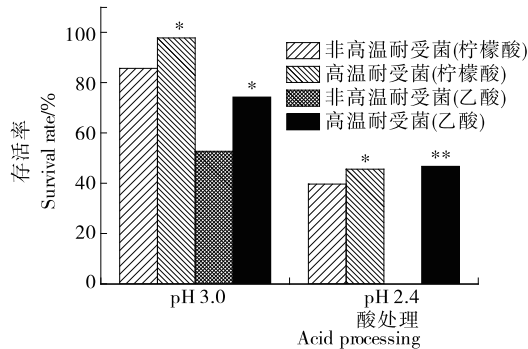
高温耐受菌株和对照菌株分别经 10 次传代后,在 55 °C 胁迫条件下,高温耐受菌株的存活率为 47.3% 仍高于非耐受菌株的 38.73%,该结果表明,驯化后的菌株仍保持较好的高温耐受性。

2.2 高温耐受 SD 菌株酸胁迫抗性

利用柠檬酸或乙酸配置 pH 3.0,2.4 的无菌生理盐水溶液,重悬高温耐受菌株和非高温耐受菌株,室温放置 30 min,存活率结果见图 2。当菌体处于柠檬酸配置的 pH 3.0 胁迫条件下,高温耐受菌株和非高温耐受菌株的存活率均最高,但驯化后菌株的存活率(97.79%)仍高于未被驯化的菌株(85.91%)。当处于 pH 3.0 环境下,柠檬酸处理后的高温耐受菌株和对照菌株的存活率要高于乙酸处理后的高温耐受菌株和对照菌株,表明在此条件下乙酸对 SD 的杀菌效果更好。当菌株处于 pH 2.4 胁迫条件下,柠檬酸处理的高温耐受菌株的存活率略高于非高温耐受菌株的存活率;乙酸处理后,非高温耐受菌株完全灭活,高温耐受菌株的存活率达到 46.7%,具有显著性。以上结果表明,SD 的高温耐受性增强,同时也提高了对酸环境胁迫的抗性。但有研究^[16]结果显示,当沙门氏菌长期处于低酸环境,反而降低沙门氏菌对高温的耐受性。

2.3 高温耐受 SD 菌株碱胁迫抗性

如图 3 所示,当沙门氏菌处于低碱环境下,高温耐受菌株和对照菌株的存活率均较高;在 pH 10 胁迫条件下,对照菌株(91.02%)的存活率仅高于高温耐受菌株(86.21%)存活率 4.81%,差异不显著;在 pH 11 胁迫条件下,高温耐受菌株和对照菌株存活率相差 7.16%,与 pH 10 胁迫条件的结果相似。当 SD 处于 pH 12 时,对照



*表示差异显著(P<0.05);**表示差异极显著

图 2 高温耐受 SD 菌株和非高温耐受菌株在酸胁迫的存活率

Figure 2 Survival rate of high temperature resistant SD strain and non-high temperature resistant strain at acid stress

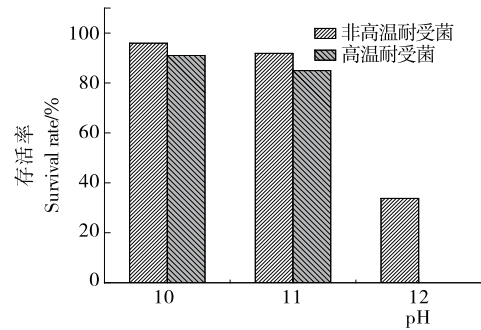


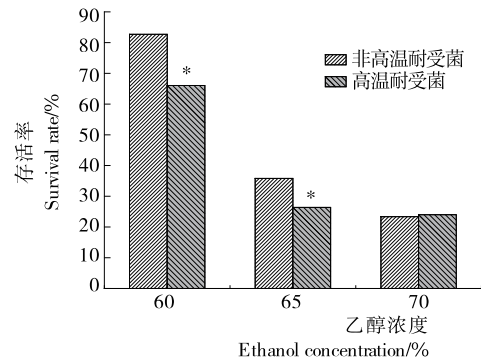
图 3 高温耐受 SD 菌株和非高温耐受菌株在碱胁迫的存活率

Figure 3 Survival rate of high temperature resistant SD strain and non-high temperature resistant strain at alkaline stress

菌株的存活率下降明显达到 33.83%,而高温耐受菌株甚至全部死亡。该结果表明,高温耐受 SD 对碱环境较为敏感,其抗性较差,可以采取碱处理方式提高对高温耐受 SD 的灭菌效果。

2.4 高温耐受 SD 菌株乙醇胁迫抗性

在相同胁迫时间下,乙醇浓度从 60% 增加到 65% 时,对照菌株和高温耐受菌株的存活率均大幅下降,对照菌株和高温耐受菌株的存活率分别下降了 47.03%, 39.66%。当 60% 乙醇胁迫时,对照菌株的存活率(82.93%)是高温菌株存活率(66.04%)的 1.26 倍,差异显著;当 65% 的乙醇溶液短时处理后,对照菌株的存活率(35.90%)是高温耐受菌株存活率(26.38%)的 1.36 倍,差异显著。但当处于 65%,70% 乙醇浓度时,高温耐受菌株存活率变化较小。本研究发现,高温耐受 SD 对乙醇的敏感度更大,且随着乙醇浓度的升高,其消毒效果也更加明显。但有研究^[17]表明,沙门氏菌经低浓度的酒精(5%)胁迫



*表示差异显著(P<0.05)

图 4 高温耐受 SD 菌株和非高温耐受菌株在乙醇胁迫的存活率

Figure 4 Survival rate of high temperature resistant SD strain and non-high temperature resistant strain at ethanol stress

迫,有助于提高肠炎沙门氏菌的酒精耐受性,但对 55 °C 高温胁迫影响较小。当微生物的胁迫顺序发生改变,将直接影响沙门氏菌的耐受性。

2.5 高温耐受 SD 菌株过氧化氢胁迫抗性

过氧化氢利用活性氧的氧化能力,破坏原生质体,实现对微生物消毒灭菌的目的,多用作食品及加工器械的消毒剂^[18]。如图 5 所示,随着环境中 H₂O₂ 浓度的提高,高温耐受菌株的存活率影响不大,基本稳定在 90%左右;但对对照菌株的存活率影响较大,当 H₂O₂ 浓度从 75 mmol/L 提升到 125 mmol/L 时,对照菌株的存活率下降了 27.76%。以上结果表明,高温胁迫有助于提高 SD 对 H₂O₂ 氧化胁迫的耐受性,降低 H₂O₂ 对 SD 的消毒灭菌效果。刘佳玫等^[14]发现酸适应性海德堡沙门氏菌对 H₂O₂ 的耐受性增强。

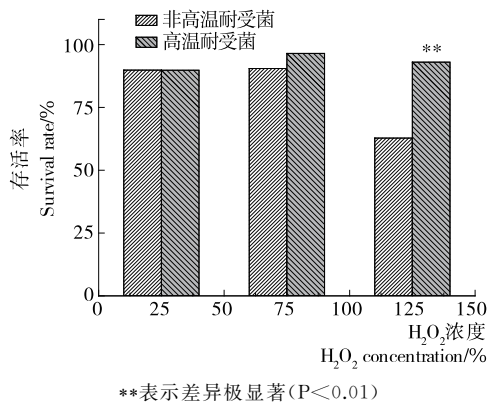


图 5 高温耐受 SD 菌株和非高温耐受菌株在过氧化氢胁迫的存活率

Figure 5 Survival rate of high temperature resistant SD strain and non-high temperature resistant strain at H₂O₂ stress

2.6 高温耐受 SD 菌株次氯酸钠胁迫抗性

选用 0.1%,0.5%,1.0%的次氯酸钠溶液对高温耐受菌株胁迫处理,结果见图 6。在不同浓度 NaClO 溶液处理 30 min,高温耐受菌株的存活率低于对照菌株。该结果表明,经高温耐受性处理后 SD 对 NaClO 的敏感性增加,增加了高温耐受菌株的死亡速率。有研究^[19]发现,酸适应性鼠伤寒沙门氏对 NaClO 胁迫条件的敏感性也有显著提高。通过高温和酸处理,有助于提高 NaClO 对 SD 的灭菌效果。

2.7 高温耐受 SD 菌株冷冻胁迫抗性

-20 °C 冷冻保藏是食品冷藏,延长货架期常用的一种食品保藏手段。将 SD 高温耐受菌株和对照菌株放置 -20 °C 冰箱冷冻保藏 2~22 d,测定两种菌株的存活率,结果见图 7。当冷冻 2 d 时,对照菌株存活率(65.86%)下降明显,相比于高温耐受菌株的存活率(89.7%)下降了

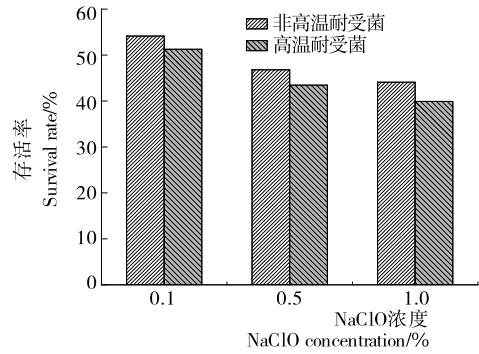


图 6 高温耐受 SD 菌株和非高温耐受菌株在 NaClO 胁迫的存活率

Figure 6 Survival rate of high temperature resistant SD strain and non-high temperature resistant strain at NaClO stress

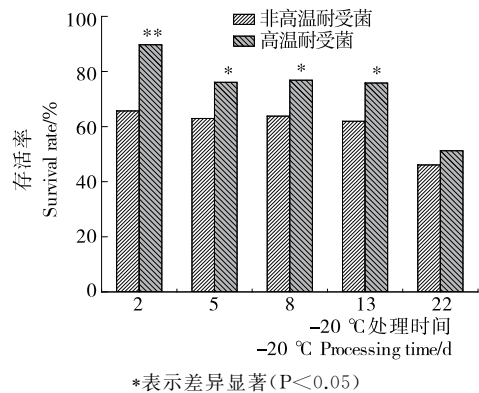


图 7 高温耐受 SD 菌株和非高温耐受菌株在冷冻胁迫的存活率

Figure 7 Survival rate of high temperature resistant SD strain and non-high temperature resistant strain at low temperature stress

23.83%,差异极显著;随着冷冻时间延长到 13 d,对照菌株存活率基本保持稳定,但延长到 22 d 时,对照菌株的存活率下降到 46.22%。在相同时间的冷冻胁迫下,高温耐受菌株的存活率均高于对照菌株的存活率。该结果表明,未经过高温处理的 SD 对冷冻胁迫较为敏感,高温胁迫能够增加 SD 对低温冷冻环境的抗性。

3 结论

沙门氏菌的最适生长温度在 37 °C,本研究在 43 °C 条件下进行传代培养,经过多轮驯化后发现该菌株在 55 °C 处理下的存活率明显高于对照菌株。因此,在实际生产过程中,为达到消毒灭菌的效果,应采取足够的温度和时间进行处理。

当沙门氏菌暴露在压力环境下能产生对其他胁迫条件的联合耐受性^[20-21]。本试验揭示了高温耐受菌株对其他食品加工、贮藏等胁迫环境下的存活状态,当沙门氏

菌经过高温驯化后,对低酸、低温和 H_2O_2 等胁迫条件具有较好的耐受性,但对乙醇、碱和 $NaClO$ 等环境的耐受性降低。沙门氏菌经高温胁迫后,启动自身的热胁迫抗性调节网络,能够维持细胞正常的生命活动,但对其他环境胁迫的耐受性表现存在较大差异。因此,对热抗性的调控机制仍有待进一步的深入研究。

参考文献

- [1] PARK S H, RICKE S C. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Salm.* Enteritidis, *Salm.* Heidelberg and *Salm.* Typhimurium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(1): 152-160.
- [2] LI Hai-yan, XIN Hong-yi, LI S F Y. Multiplex PMA-qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella* typhimurium, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(24): 14 249-14 256.
- [3] MASERATI A, LOURENCO A, DIEZ-GONZALEZ F, et al. iTRAQ-based global proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in response to desiccation, low water activity, and thermal treatment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(18): 1-17.
- [4] GYAWALI P, AHMED W, SIDHU J P S, et al. Quantitative detection of viable helminth ova from raw wastewater, human feces, and environmental soil samples using novel PMA-qPCR methods [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(18): 18 639-18 648.
- [5] 韩哈, 韦晓婷, 魏朕, 等. 沙门氏菌对食品的污染及其导致的食源性疾病[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 15-20.
- [6] KUMAR P P, AGARWAL R K, THOMAS P, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* Subspecies enterica serovar typhimurium by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) test from field chicken meat samples[J]. Food Biotechnology, 2014, 28(1): 50-62.
- [7] 王欢. 合肥地区鸡肉中沙门氏杆菌的食品安全风险评估[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013: 38-41.
- [8] 吕素玲, 韦程媛, 姚雪婷, 等. 2010年广西食品中沙门氏菌污染状况和血清型分布及耐药谱的研究[J]. 应用预防医学, 2012, 18(3): 137-141, 170.
- [9] GABRIEL A A, NAKANO H. Influences of simultaneous physicochemical stress exposures on injury and subsequent responses of *E. coli* O157: H7 to resuscitative and inactivative challenges[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(3): 182-192.
- [10] FONG Ka-ren, WANG Si-yun. Heat resistance of *Salmonella enterica* is increased by pre-adaptation to peanut oil or sub-lethal heat exposure[J]. Food Microbiology, 2016, 58: 139-147.
- [11] SMET C, NORIEGA E, VANMIERLO J, et al. Influence of the growth morphology on the behavior of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* under osmotic stress[J]. Food Research International, 2015, 77: 515-526.
- [12] BEUCHAT L R, MANN D A, KELLY C A, et al. Retention of viability of *Salmonella* in sucrose as affected by type of inoculum, water activity, and storage temperature[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(9): 1 408-1 414.
- [13] SIRSAT S A, BURKHOLDER K M, MUTHAIYAN A, et al. Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3): 813-822.
- [14] 刘佳玫, 栗军杰, 陆兆新, 等. 酸适应海德堡沙门氏菌对环境胁迫耐受性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 209-213.
- [15] LI H, BHASKARA A, MEGALIS C, et al. Transcriptomic analysis of *Salmonella* Desiccation resistance[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2012, 9(12): 1 143-1 151.
- [16] KANG I B, KIM D H, JEONG D, et al. Heat resistance of *Salmonella* Enteritidis under prolonged exposure to acid-salt combined stress and subsequent refrigeration[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 285: 165-172.
- [17] 何守魁, 周秀娟, 施春雷, 等. 酒精胁迫对肠炎沙门氏菌抗逆性的影响[C]//中国食品科学技术学会第十一届年会论文摘要集. 北京: 中国食品科学技术学会, 2014: 16-17.
- [18] 汪永超. 食品级双氧水及其在食品行业中的应用[J]. 食品工业科技, 2004, 25(3): 141-142.
- [19] LEYER G J, JOHNSON E A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* typhimurium [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1 842.
- [20] HIRAMATSU R, MATSUMOTO M, SAKAE K, et al. Ability of shiga toxin-producing escherichia coli and salmonella spp. To survive in a desiccation model system and in dry foods [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6 657-6 663.
- [21] ROWBURY R J. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and other enterobacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 1995, 20(6): 333-337.