



# 不同胁迫条件下产志贺毒素大肠杆菌生长及产毒能力异质性分析

钱江<sup>1</sup>, 孟媛媛<sup>1</sup>, 赵伟<sup>1</sup>, 费福林<sup>1</sup>, 余曼<sup>1</sup>, 江春铃<sup>1</sup>, 殷振杰<sup>1</sup>, 赵勇<sup>1,2,3\*</sup>, 刘海泉<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

- 1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306
- 2 上海市水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306
- 3 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306
- 4 上海海洋大学 食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306
- 5 上海海洋大学食品学院 食品产业链生态循环研究所, 上海 201306

钱江, 孟媛媛, 赵伟, 费福林, 余曼, 江春铃, 殷振杰, 赵勇, 刘海泉. 不同胁迫条件下产志贺毒素大肠杆菌生长及产毒能力异质性分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1501-1513.

QIAN Jiang, MENG Yuanyuan, ZHAO Wei, FEI Fulin, YU Man, JIANG Chunling, YIN Zhenjie, ZHAO Yong, LIU Haiquan. Heterogeneity of growth and toxigenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* under different stress conditions[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1501-1513.

**摘要:**【目的】本文旨在探究产志贺毒素大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)在不同胁迫条件下的生长情况以及产毒状况的变化, 为 STEC 菌株在胁迫压力下应激机制研究提供基础数据参考。【方法】选取 3 株 STEC 菌株分别在不同 pH 值、不同盐浓度、不同温度下进行适应性传代培养, 使用一级生长模型 Gompertz 模型分析其在胁迫环境下的生长异质性; 通过 Vero 细胞毒性实验分析胁迫条件下菌株的产毒状况。【结果】除了 pH 5.0 条件下的 ST462 菌株, 在 pH 5.0 和 9.0、较高盐浓度 1.5% NaCl 和 2.5% NaCl 以及低温 10 °C 胁迫条件下 STEC 菌株都表现出最大比生长速率( $\mu_{\max}$ )降低、迟缓期( $\lambda$ )延长, 差异显著( $P < 0.01$ ); 不同胁迫条件下提取的 STEC 菌株毒素感染细胞后测得的细胞存活率均低于对照最适条件, 而 pH 5.0 条件下相反。【结论】STEC 菌株在碱性、较高浓度盐以及低温环境胁迫压力下响应应激机制, 生长虽受到抑制, 但其所产毒素

资助项目: 上海市科委上海市“科技创新行动计划”农业领域项目(22N31900600); 上海市优秀学术带头人(21XD1401200); 上海市科技兴农项目(沪农科推字 2017 第 4-4 号)

This work was supported by the Shanghai “Science and Technology Innovation Action Plan” Agricultural Field Project of Shanghai Science and Technology Commission (22N31900600), the Outstanding Academic Leader in Shanghai (21XD1401200), and the Shanghai Science and Technology Agricultural Development Project (2017 No. 4-4).

\*Corresponding authors. E-mail: LIU Haiquan, hqliu@shou.edu.cn; ZHAO Yong, yzhao@shou.edu.cn

Received: 2022-08-18; Accepted: 2022-10-30; Published online: 2022-11-04

对 Vero 细胞造成的损伤加重，毒性增强。本研究通过胁迫环境下生长和产毒状况的异质性分析，将有助于全面了解 STEC 菌株应激反应下的生物学特性；对完善食品安全措施和食品加工过程中检测、杀菌、预防具有重要的指导意义。

关键词：产志贺毒素大肠杆菌；胁迫；生长特性；产毒能力；异质性

## Heterogeneity of growth and toxigenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* under different stress conditions

QIAN Jiang<sup>1</sup>, MENG Yuanyuan<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>1</sup>, FEI Fulin<sup>1</sup>, YU Man<sup>1</sup>, JIANG Chunling<sup>1</sup>, YIN Zhenjie<sup>1</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2,3\*</sup>, LIU Haiquan<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

1 College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

3 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

4 Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

5 Institute of Food Industry Chain Ecological Recycling, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** [Objective] This paper aims to explore the growth and toxigenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) under different stress conditions, and to provide basic data reference for the study of the stress response mechanism of STEC strains under stress. [Methods] Three STEC strains were selected for adaptive subculture at different pH values, different salt concentrations, and different temperatures, and their growth heterogeneity under stress was analyzed via the Gompertz model. The toxigenicity of the strains under stress was analyzed by the Vero cytotoxicity assay. [Results] Except the ST462 strain at pH 5.0, other STEC strains showed decrease in the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) and extension of the lag period ( $\lambda$ ) under stress conditions (pH 5.0 or 9.0, 1.5% NaCl or 2.5% NaCl, 10 °C) ( $P < 0.01$ ). The viability of the cells treated with the toxins extracted from STEC strains under different stress conditions was lower than that under the optimal control conditions, while the opposite trend was observed at pH 5.0. [Conclusion] STEC strains activated the stress response mechanism under alkaline stress, higher salt concentrations, and low temperatures. Although the growth was inhibited, the toxins produced by the strains exposed to stress aggravated the damage to Vero cells, demonstrating increased toxicity. By analyzing the heterogeneity of the growth and toxigenicity in a stressful environment, this study helps to comprehensively understand the biological characteristics of STEC strains under stress and has guiding significance for improving the detection, sterilization, and prevention measures during food processing to ensure food safety.

**Keywords:** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; stress; growth characteristics; toxigenicity; heterogeneity

产志贺毒素大肠杆菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)是一种通过产生志贺毒素引起人畜共患病的肠道致病菌,能够导致人体水样腹泻、出血性肠炎等轻度肠道疾病,严重时可导致溶血性尿毒综合征,甚至死亡<sup>[1-2]</sup>。STEC 菌株属大肠埃希氏菌属,为革兰氏阴性菌,最适生长条件为 37 °C、pH 为 7.2-7.4、盐浓度为 0.5% NaCl,对营养条件的要求不高,可在常规营养琼脂培养基上生长。*stx* 是 STEC 中最主要的毒力基因,具有细胞毒性、肠毒性以及神经毒性等多种毒性<sup>[3]</sup>。

STEC 的传播途径多样,主要有食源传播、动物传播、水源传播等<sup>[4]</sup>,从而导致大多食品原材料中携带此致病菌株。存在于食品加工环境中的病原体面临许多应激源,包括酸碱、干燥、低温冷冻和高渗透压等<sup>[5]</sup>,面对不同胁迫环境压力,它们采用多种应激防御系统,以适应不同的生理状态和应激水平<sup>[6]</sup>。比如,经过长期进化过程,STEC 菌株进化出耐酸系统,使其在酸性环境下能够长时间生存<sup>[7]</sup>;面对低温环境,STEC 菌株仍能牢固地黏附在食品表面进行定殖<sup>[8]</sup>。这些致病性菌株依靠自身应激机制,得以在食品加工过程中面对多种胁迫环境仍能长时间生存,且保持一定的致病力,从而对食品安全造成严重的安全隐患<sup>[9-10]</sup>。

本文以产志贺毒素大肠杆菌为研究对象,选取了 3 株 STEC 菌株(ST462、ST378、D3146)研究其在不同 pH 值(pH 5.0、7.0、9.0)、不同盐浓度(0.5%、1.5%、2.5% NaCl)以及不同温度(10、25、37 °C)生长环境条件下的生长状况以及不同条件下产生的毒素对细胞造成的损害程度,来探究不同胁迫环境对产志贺毒素大肠杆菌造成的应激反应,为 STEC 菌株在不良环境胁迫下的应激响应机制研究提供基础数据参考,同时也为食品行业在加工保藏方面如何避免或减少

由 STEC 菌株感染引起的食品安全事件提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源和细胞来源

3 株产志贺毒素大肠杆菌(编号为 STEC 11、STEC 17、STEC 36)是本实验室筛选自市场零售牛肉,经形态学分析、生化特性以及分子生物学鉴定,由农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海)保藏。菌株基本信息见表 1<sup>[11]</sup>。

Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)购于上海启达生物科技有限公司。

#### 1.1.2 试剂

LB 固体培养基(Luria-Bertani agar, LB)、EC 液体培养基(*E. coli* broth, EC)购于北京陆桥技术责任有限公司;磷酸盐缓冲液、DMEM (1×)培养基、澳洲胎牛血清、0.25%胰酶购于 Thermo Fisher 公司;CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;24 孔板、96 孔板购于 Thermo Fisher 公司。

#### 1.1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱(Herocell 180)购自上海润度生物科技有限公司;Bio Tek 多功能酶标仪(Synergy2)购自伯腾仪器有限公司;恒温振荡器(bluepard HZQ-X300C)购自上海一恒科学仪器有限公司;研究级倒置显微镜(OLYMPUS IX71)购自上海江文国际贸易有限公司。

表 1 产志贺毒素大肠杆菌菌株信息

Table 1 Strain information of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

No.	Strain	Serotype	Virulence gene
STEC11	ST378	O116:H21	<i>stx1a/stx2a</i>
STEC17	ST462	O157:H7	<i>stx2a</i>
STEC36	D3146	O128:H2	<i>stx2f</i>

## 1.2 菌株活化及生长曲线的测定和拟合

将-80 °C冻存的菌株接种于 LB 固体培养基上, 37 °C条件下振荡培养 12 h, 挑取单菌落于新鲜 EC 液体培养基中 37 °C、200 r/min 条件下振荡培养 6 h, 再次接种在 LB 固体培养基上培养 12 h, 完成 3 次活化。

挑取完全活化的单菌落于配制好的不同胁迫条件(pH 5.0、7.0、9.0, 盐浓度为 0.5%、1.5%、2.5% NaCl)的 EC 液体培养基中, 在恒温摇床中 37 °C振荡培养至菌液浓度达到  $8 \times 10^8$  CFU/mL, 其中低温胁迫条件为挑取单菌落于 pH 7.0、盐浓度为 0.5% NaCl 的 EC 液体培养基, 在恒温摇床中 10、25、37 °C条件下振荡培养至菌液浓度达到  $8 \times 10^8$  CFU/mL。将菌液进行 10 倍梯度稀释后, 移取定量 1 mL 菌液于装有 9 mL 新鲜相同胁迫条件 EC 液体培养基的试管中, 于摇床中振荡培养, 每隔 2 h 取出一支试管进行菌落平板计数, 记录数据。每个生物学重复 3 次, 每次 3 组平行实验。

通过微生物风险模型网站<sup>[12]</sup>, 采用一级生长模型中 Gompertz 模型对生长曲线数据进行拟合, 记录最大比生长率( $\mu_{\max}$ )和迟缓期( $\lambda$ )值。

## 1.3 STEC 毒素的提取

参照绘制的生长曲线, 以相同的实验方法将菌株培养到对数期中期, 取含有相同数量级菌量的菌液于离心管中, 4 °C、12 000×g 条件下离心 5 min; 用 0.22 μm 过滤器过滤菌液, 取上清, -20 °C保存, 备用<sup>[13]</sup>。

## 1.4 细胞毒性实验<sup>[14]</sup>

将液氮冻存条件下的 Vero 细胞复苏传代至旺盛状态, 制备  $1 \times 10^5$  cell/mL 的单细胞悬液, 于 96 孔板中铺板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件的培养箱中过夜培养; 取出 96 孔板, 弃去培养基用 1×PBS 洗涤 3 次, 加入 100 μL 新鲜细胞完全培养基, 加入 10 μL 上清液待测样品 37 °C、5%

CO<sub>2</sub> 条件下培养 12 h; 加入 10 μL CCK-8 溶液后放入培养箱培养 2 h, 待显色后在 450 nm 处测量其吸光值并记录。以无细胞且仅有完全培养基作为空白对照; 以细胞和完全培养基为实验阴性对照。每个处理生物学重复 3 次。结果分析: 细胞存活率  $C$  计算公式如下:

$$C(\%) = 100 \times (T - T_0) / (T_C - T_0)$$

式中:  $T$  为检测孔 OD 值,  $T_0$  为空白组 OD 值,  $T_C$  为对照组 OD 值; 检测孔 OD 值  $T$  为去除 6 个重复孔最值后的平均值, 空白组  $T_0$  即为细胞完全培养液和 CCK-8 试剂, 无细胞; 对照组即为单细胞悬液和 CCK-8 试剂。

## 1.5 观察细胞损伤程度

将检测完吸光值的细胞孔板放置在倒置显微镜的载物台上, 用 40×物镜、10×目镜进行观察, 并记录数据。

## 1.6 数据处理

实验数据均为 3 组平行, 采用平均值±标准差表示。用 MS Excel 2019 对数据进行整理, 用 SPSS 25.0 软件进行显著性分析( $P < 0.01$ ), 通过微生物生长模型网站进行数据拟合, 通过 Origin 2021 软件进行作图分析及图片的整理。

# 2 结果与分析

## 2.1 不同胁迫下菌株的生长状况

在预测微生物学中, 最大比生长率( $\mu_{\max}$ )、迟缓期( $\lambda$ )和最大菌浓度是一些模型的参数, 用来描述单一环境条件下微生物生长随时间变化的数学模型, 具有生物学意义<sup>[15]</sup>。

### 2.1.1 pH 胁迫

不同 pH 值胁迫生长环境下, STEC 菌株的  $\mu_{\max}$ 、 $\lambda$ 、最大菌浓度受到显著影响。如图 1 所示, 相对于最适生长条件 pH 7.0, 在 pH 5.0 和 pH 9.0 胁迫条件下的 STEC 菌株中, 除 pH 5.0 条件下菌株 ST378 的  $\mu_{\max}$  和 pH 9.0 条件下菌株

ST462 的  $\lambda$  无差异显著, 菌株的  $\mu_{\max}$  降低且  $\lambda$  延长, 差异显著( $P<0.01$ )。此外, 不同 pH 值条件下 STEC 菌株生长的最大菌浓度差异显著, 在 pH 5.0 和 pH 9.0 胁迫条件下 STEC 生长的最大菌浓度均低于 pH 7.0 条件下的值(图 2)。其中 pH 5.0 条件下菌株生长受到抑制, 最大菌浓度只达到 pH 7.0 条件下的一半甚至更少; 而 pH 9.0 胁迫下菌株的生长状态处于两者之间。结果表明菌株在偏酸、偏碱的胁迫环境中生长受到抑制, 但仍能够生长。

### 2.1.2 盐胁迫

不同浓度盐胁迫生长环境下, 随着盐浓度的增加, STEC 菌株  $\mu_{\max}$  降低、 $\lambda$  延长, 且最大菌浓度降低(图 3)。相较于 0.5% NaCl 条件, 在 1.5% NaCl 和 2.5% NaCl 条件下, 除了 1.5% NaCl 条件下 ST378 菌株的  $\mu_{\max}$  和 2.5% NaCl 条件下 ST462 的  $\lambda$  无差异显著, STEC 菌株的  $\mu_{\max}$  降低和  $\lambda$  延长, 差异显著( $P<0.01$ ); 此外, 1.5% NaCl 和 2.5% NaCl 胁迫条件下 STEC 菌株受到不同程度抑制, 其中菌株 ST462、ST378

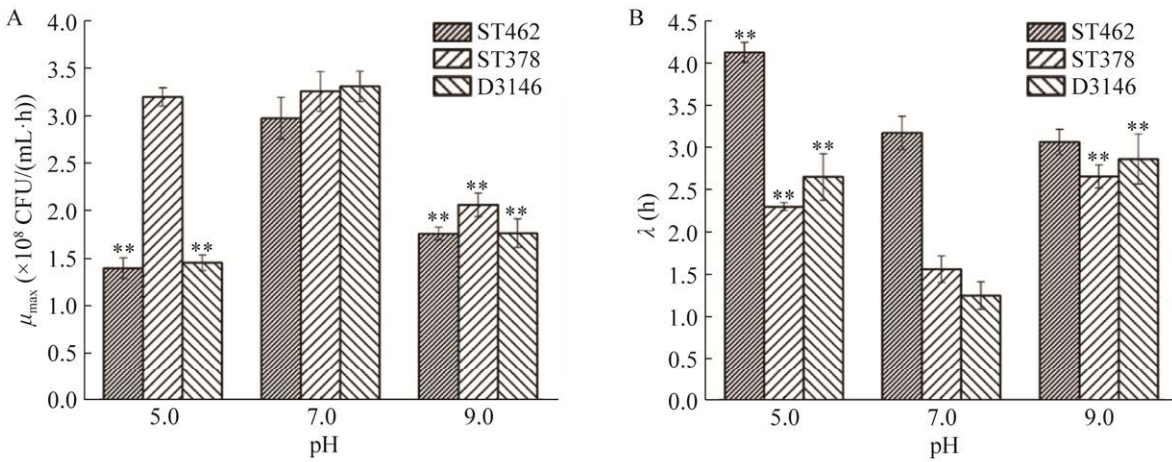


图 1 不同 pH 条件下菌株生长的最大生长速率(A)和迟缓期(B)

Figure 1 Maximum specific growth rate (A) and lag period (B) of strain growth under different pH conditions. Compared with pH 7.0. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

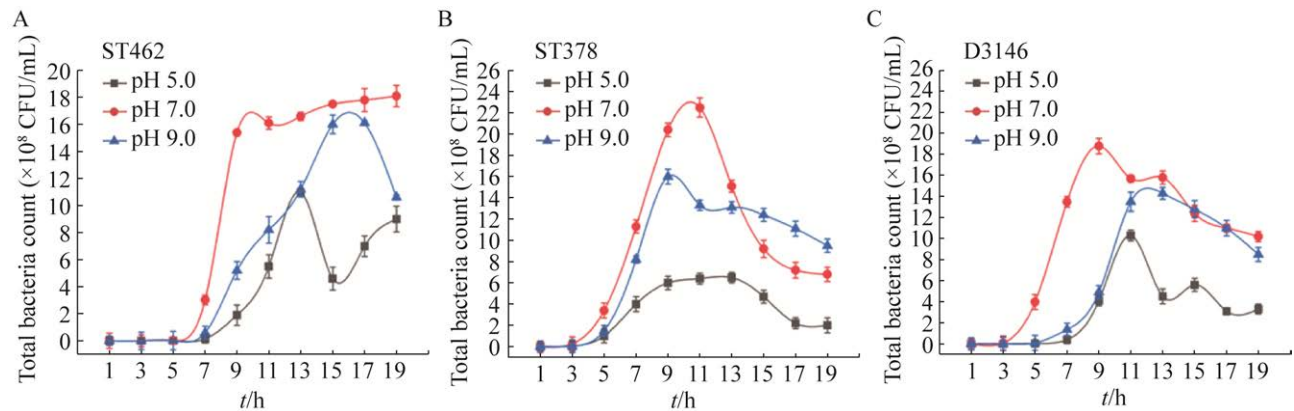


图 2 不同 pH 值胁迫条件下菌株的生长状态

Figure 2 Growth status of strains under different pH. A: ST462. B: ST378. C: D3146.  $P<0.05$ .



的最大菌浓度低于 0.5% NaCl 条件下的值, 其中 2.5% NaCl 条件下 STEC 的最大菌浓度只达到最适条件 0.5% NaCl 条件下最大菌浓度的一半(图 4)。结果表明, STEC 能在一定浓度盐胁迫环境下生长, 但随着盐浓度增加生长抑制加重。

### 2.1.3 温度胁迫

环境温度的变化对 STEC 菌株生长同样具有一定的影响, 低温环境下 STEC 菌株主要表现为  $\mu_{\max}$  降低、 $\lambda$  变长。经过较长时间的迟缓

期, STEC 适应低温环境后能够继续生长, 且最大菌浓度高于最适温度 37 °C。如图 5 所示, 相较于 37 °C 生长条件, 10 °C 和 25 °C 条件下 STEC 菌株的  $\mu_{\max}$  降低和延长, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。此外, 不同温度条件下, STEC 菌株生长达到的最大菌浓度不同, 10 °C 和 25 °C 条件下 STEC 菌株的最大菌浓度均明显高于 37 °C 条件下的值。另外, 除了菌株 ST462, 25 °C 条件下菌株的最大菌浓度高于 10 °C 条件下的值(图 6)。结果表明, 生长环境温度对 STEC 菌株生长具有一定的

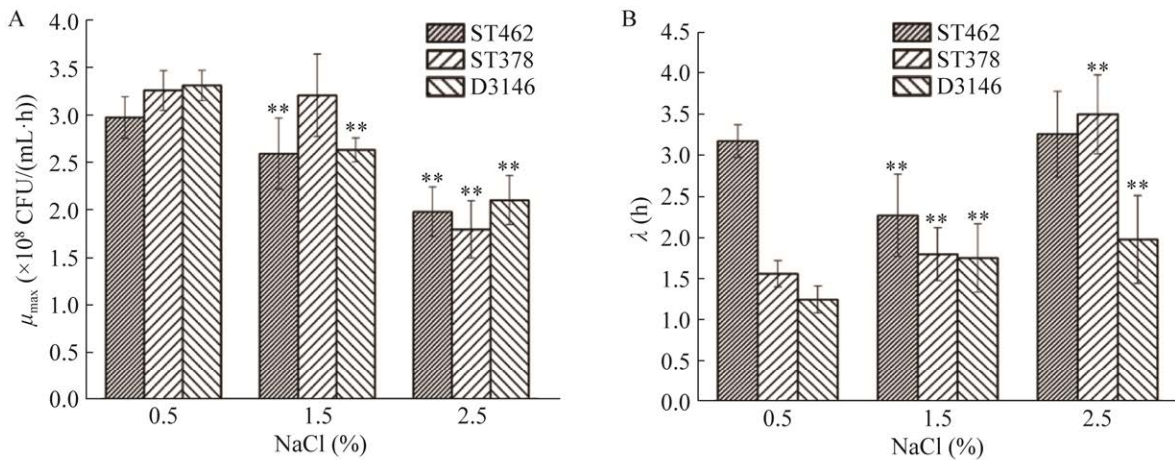


图 3 不同盐浓度条件下菌株生长的最大生长速率(A)和迟缓期(B)

Figure 3 Maximum specific growth rate (A) and lag period (B) of strain growth under different salt concentrations. Compared with 0.5% NaCl. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

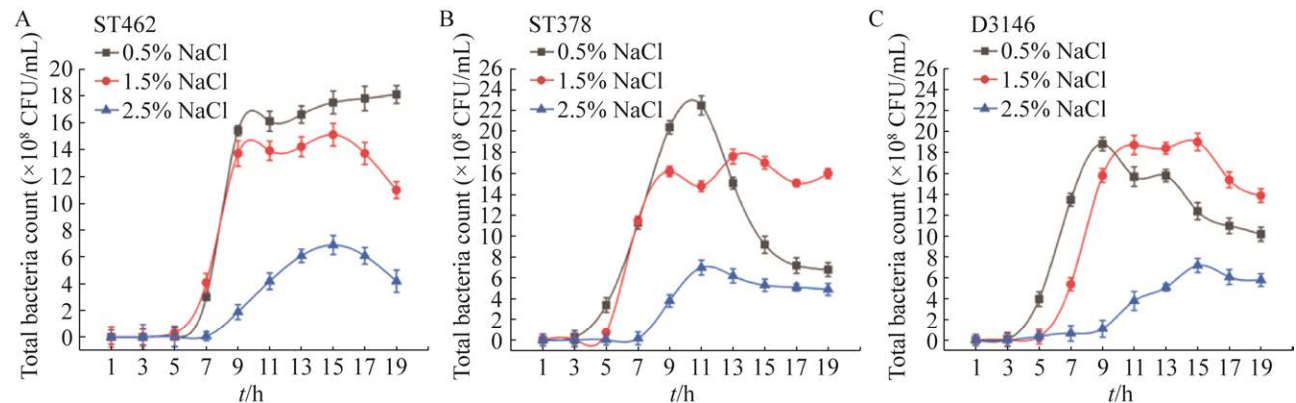
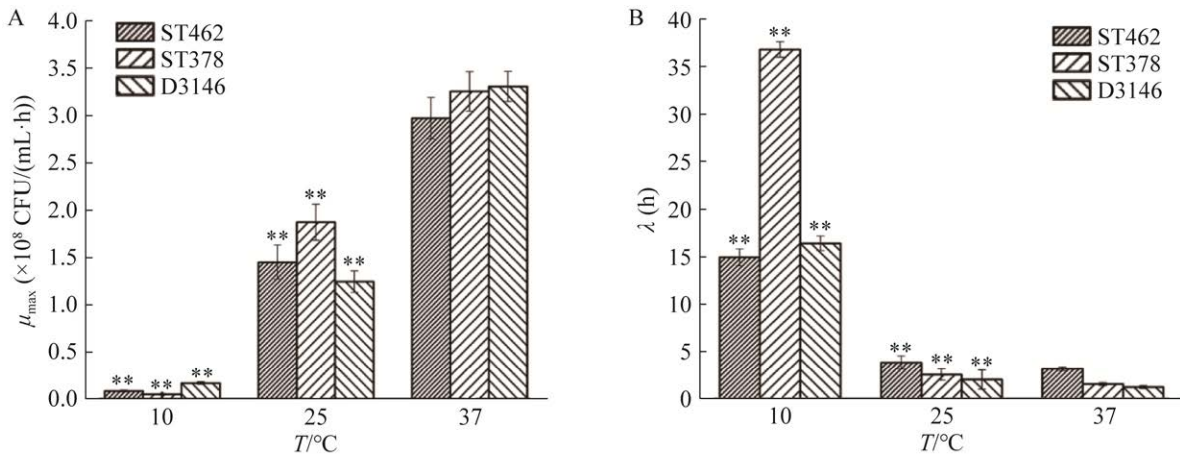
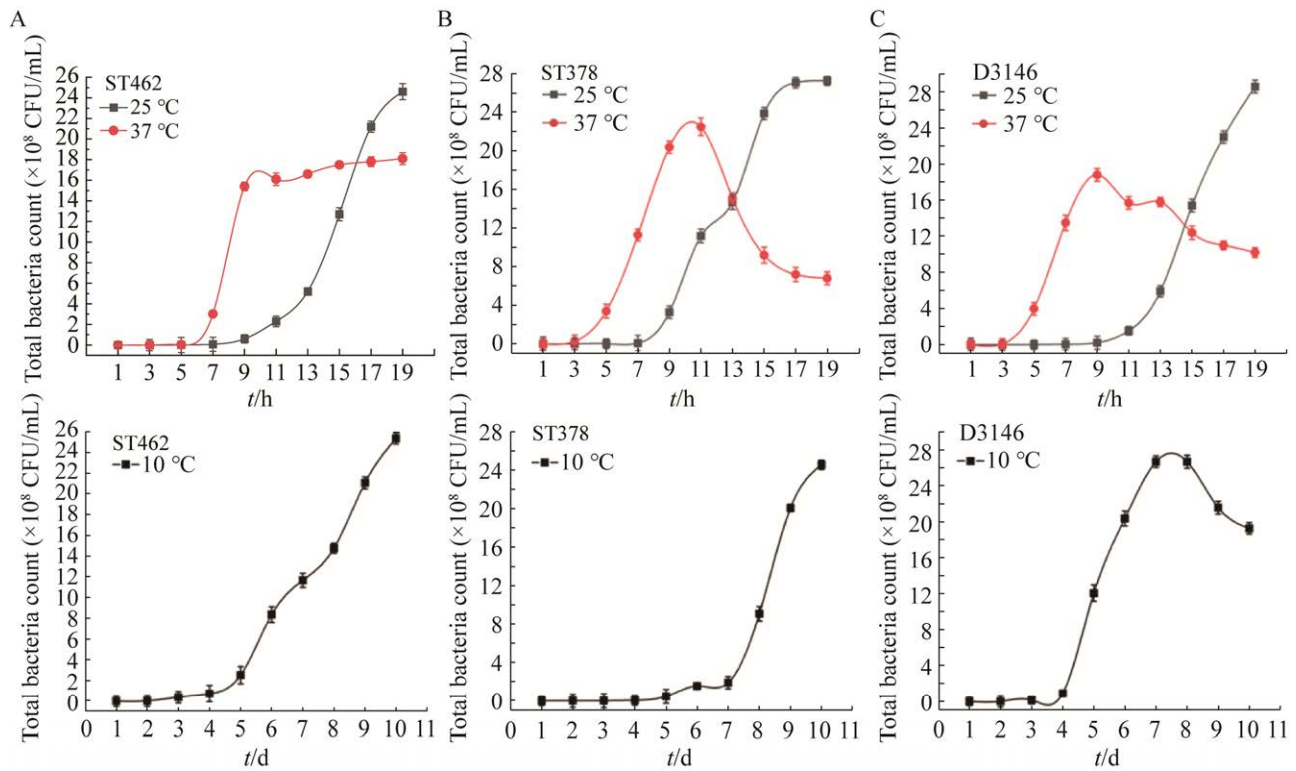


图 4 不同浓度盐胁迫条件下菌株的生长状态

Figure 4 Growth status of strains under different concentrations of salt. A: ST462. B: ST378. C: D3146.  $P < 0.05$ .



**图 5** 不同温度条件下菌株生长的最大生长速率(A)和迟缓期(B)  
 Figure 5 Maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) and lag period ( $\lambda$ ) of strain growth under different temperature conditions. Compared with 37 °C. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .



**图 6** 不同温度条件下菌株的生长状态  
 Figure 6 Growth status of strains under different temperatures. A: ST462. B: ST378. C: D3146.  $P<0.05$ .

影响, 且低温环境胁迫后, STEC 菌株的最大菌浓度有所增长。

## 2.2 细胞毒性实验

本研究提取了不同胁迫生长环境下 STEC

菌株所产生的毒素来侵染 Vero 细胞, 测定细胞活力并观察细胞的损害程度。

### 2.2.1 pH 胁迫

不同 pH 值条件下 STEC 菌株产生的毒素均

能对 Vero 细胞造成不同程度的伤害, 且酸性环境和碱性环境下 STEC 所产毒素对 Vero 细胞造成的影响不同(图 7 和图 8)。与 pH 7.0 条件相比, 在 pH 5.0 条件下 STEC 菌株测得细胞存活率高, 菌株 D3146 除外; 在 pH 9.0 条件下 STEC 菌株测得细胞存活率低, 菌株 ST462 除外。与最适条件 pH 7.0 相比, pH 5.0 和 pH 9.0 条件下 STEC 菌株所测细胞存活率差异显著 ( $P < 0.01$ )。此外, 从图 8 毒素对细胞损伤程度中同样可以发现相同的现象, 在 pH 9.0 条件下菌株 ST378、D3146 所产毒素对细胞侵害作用最为严重, 细胞边缘萎缩, 末端膨大, 甚至出现凋亡现象; 而在 pH 5.0 条件下, 菌株 ST462、ST378 所产毒素对细胞侵害作用弱于 pH 7.0 条件下, 细胞生长仅仅出现轻微影响, 细胞呈略微收缩状态。结果表明, 酸性条件下 STEC 菌株所产毒素对细胞的损害程度小于对照, 而碱性条件下相反。

### 2.2.2 盐胁迫

不同浓度盐胁迫条件下 STEC 产生的毒素侵袭 Vero 细胞, 细胞存活率随着盐浓度的增加

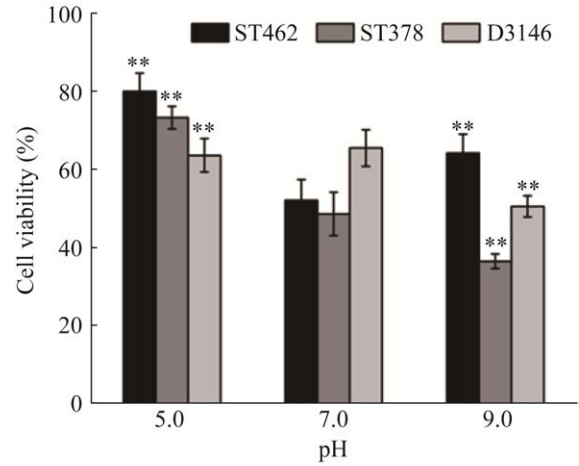


图 7 不同 pH 条件下 STEC 的产毒能力

Figure 7 Toxicogenicity of STEC under different pH conditions. Compared with pH 7.0. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

而降低, 细胞损害程度加重(图 9 和图 10)。在 1.5% NaCl 条件下, 菌株 ST462 和 D3146 所产毒素测得的细胞存活率低于 0.5% NaCl 条件下的值; 在 2.5% NaCl 条件下, STEC 菌株所产毒素测得的细胞存活率低于 1.5% NaCl 条件下的值, 与最适条件 0.5% NaCl 相比, 1.5% NaCl 和 2.5% NaCl 条件下 STEC 菌株所测细胞存活

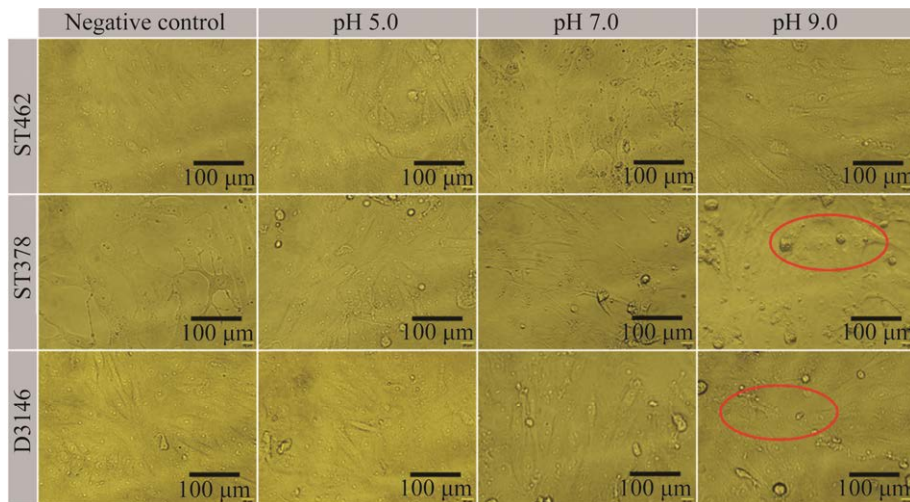
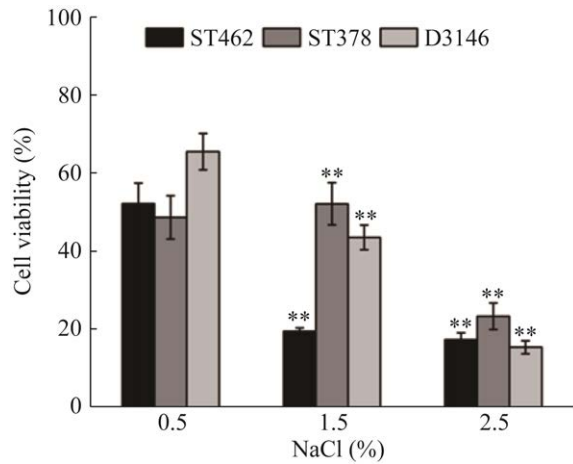


图 8 不同 pH 条件下毒素造成的细胞损伤程度

Figure 8 Degree of the cell damage caused by toxins at different pH conditions (400 $\times$ ). The red part of the figure refers to the site of cell damage.



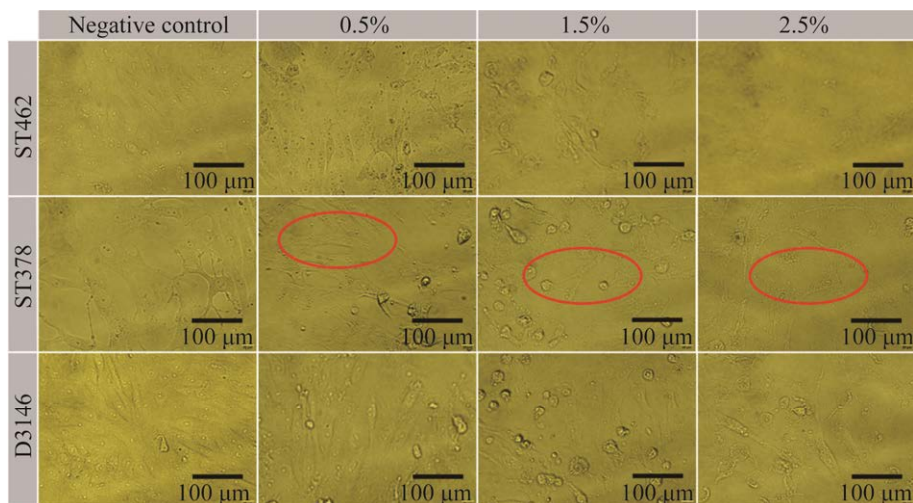


**图 9 不同盐浓度条件下 STEC 的产毒能力**  
Figure 9 Toxigenicity of STEC under different concentrations of salt. Compared with 0.5% NaCl. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

率差异显著( $P < 0.01$ )。此外,从图 10 中可以看出,随着盐浓度增加,细胞受到的损伤增加,细胞从圆润饱满变得边缘收缩、形态细长、末端膨大。结果表明,在一定浓度盐胁迫环境下,STEC 对盐具有耐受性,且盐浓度越高,菌株受到的胁迫越大,所产毒素对细胞造成的伤害越大。

### 2.2.3 温度胁迫

不同温度条件下 STEC 产生的毒素侵染 Vero 细胞,细胞存活率随着温度的降低而降低,细胞损害程度加重,结果见图 11 和图 12。在 25 °C 条件下,STEC 菌株所产毒素测得的细胞存活率均低于 37 °C 条件下的值;在 10 °C 条件下,除菌株 ST462 外 STEC 菌株所产毒素测得的细胞存活率低于 25 °C 条件下的值。与最适条件 37 °C 相比,25 °C 和 10 °C 条件下 STEC 菌株所测细胞存活率差异显著( $P < 0.01$ )。从图 12 中可以看出,与 37 °C 条件下 STEC 所产毒素造成的细胞状态相比,在 10 °C 和 25 °C 条件下 STEC 所产毒素造成的细胞形态发生显著变化。低温环境下,细胞形态收缩且变得细长,破裂细胞明显增多。当生长环境温度低于最适生长环境温度,STEC 生长受到抑制,其内部调控机制可能会发生改变,以分泌毒素形式提高适应能力。结果表明,低温环境对 STEC 生长有一定的胁迫作用,菌株经过长时间的适应后,所产毒素对 Vero 细胞造成的损害加重。



**图 10 不同浓度盐胁迫条件下毒素造成的细胞损伤程度**

Figure 10 Degree of the cell damage caused by toxins at different concentrations of salt (400×). The red part of the figure refers to the site of cell damage.

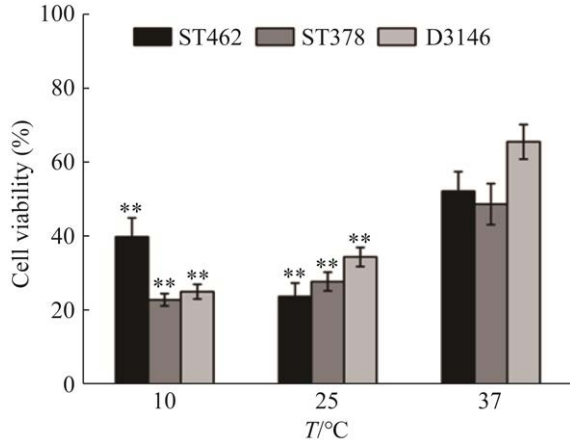


图 11 不同温度条件下 STEC 的产毒能力  
Figure 11 Toxigenicity of STEC under different temperatures. Compared with 37 °C. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

### 3 讨论与结论

本研究选取 3 株属于不同血清型、携带不同毒力基因的 STEC 菌株(ST462、ST378、D3146), 在不同 pH 值、不同盐浓度、不同温度下进行 STEC 菌株适应性传代培养, 通过拟

合生长曲线和 Vero 细胞毒性实验来分析胁迫环境下 STEC 菌株的生长应激状况及产毒情况。

大肠杆菌本身具有耐酸、耐冷、耐热、耐高压等特点, 在自然界中广泛地存在于各种环境中, 即使是在高酸、高盐以及低温的食品加工环境中同样存在着大量的大肠杆菌<sup>[16]</sup>。本研究中, STEC 菌株在 pH 5.0 条件下生长受到抑制, 且其在抑制过程中所产毒素对 Vero 细胞造成的伤害低于最适条件 pH 7.0。但 Li 等<sup>[17]</sup>的研究发现 STEC 菌株在 pH 5.0–7.0 之间生长状态良好, 且在 pH<4.0 时, STEC 菌株的生长受到抑制, 尤其是 pH<2.0 时, 菌株将完全不能够生长。这可能是由于不同 STEC 菌株之间的耐酸性存在着异质性<sup>[18]</sup>。面对酸性环境, STEC 菌株能够快速调节其毒力蛋白来提高生存能力。但有研究表明, 低于一定 pH 值的酸性环境, STEC 菌株可能会存在损伤或致命情况, 导致其菌株状态受到较大影响, 从而降低其产毒<sup>[19]</sup>。目前在 STEC 菌株的耐酸机制方面已有足够的探究, 但其在酸性环境下的产毒研究仍有较大空白。

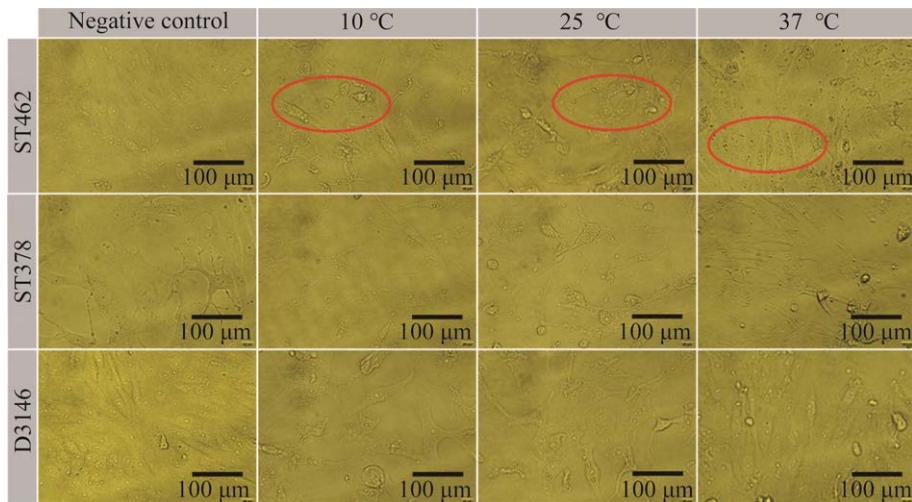


图 12 不同温度条件下毒素造成的细胞损伤程度

Figure 12 Degree of the cell damage caused by toxins at different temperatures (400×). The red part of the figure refers to the site of cell damage.

Yan 等<sup>[20]</sup>在探究泡菜发酵过程中指出, 不同浓度盐胁迫对 STEC 菌株生长造成的影响尤为重要。本文研究结果显示, STEC 菌株耐盐能力强, 在高浓度盐 2.5% NaCl 胁迫条件下仍能生长, 且所产毒素对 Vero 细胞造成的损害程度大于 1.5% NaCl 条件下。在高渗透压条件下, 大肠杆菌在初期生长受到抑制, 但通过短暂诱导 RpoE、RpoH 和 RpoS 来调节对高渗透压的长期适应使大肠杆菌在生长后期仍保持在生长范围内<sup>[21]</sup>, 但其在盐胁迫条件下产毒能力的应激机制有待进一步研究。但我们推测, 对于不同盐浓度胁迫压力, 菌株响应应激机制来诱导蛋白的基因或者方法不同, 致使 STEC 菌株所产毒素强弱不同。

除了 pH 值和盐浓度, 生长环境的温度也是影响 STEC 菌株生长状态的因素之一<sup>[22]</sup>。Zhao 等<sup>[23]</sup>通过研究发现冷藏温度 5 °C 或 10 °C 条件下可能无法控制食源性致病菌生长风险。本研究中发现 STEC 菌株在 10 °C 胁迫条件下经过长时间适应后仍能生长, 且菌株 ST378 和 D3146 在生长过程中所产毒素对 Vero 细胞造成严重的损害。低温条件下 STEC 菌株表现出具有强被膜形成能力和产志贺毒素能力, 从而更好地适应环境<sup>[13]</sup>。结合研究结果, 我们可以推测低温环境下 STEC 菌株通过响应其内部应激机制, 一段时间适应后, STEC 菌株仍能够继续生长, 同时以增强其产毒来适应低温环境, 这需要进一步的研究。STEC 菌株面对多种胁迫环境进化出了复杂的应激反应机制, 促进了生存, 但也有助于定殖和增强致病性<sup>[7]</sup>。

值得注意的是在本研究中 pH 5.0 条件下菌株 ST378、pH 9.0 条件下菌株 D3146、1.5% NaCl 条件下菌株 ST378、2.5% NaCl 条件下菌株以及 10 °C 条件下菌株 ST462 表现出不同的表型, 这可能是由于菌株之间所存在的异质性造成的。

菌株对环境反应的多样性和差异性增加了对大肠杆菌的致病性和微生物食品安全控制的难度。Murphy 等<sup>[24]</sup>最早提出菌株异质性能真实地反映种群的差异性。后续研究提出, 微生物异质性一般指同一微生物即使在通过单克隆培养后, 种群中的每个细胞都可能在遗传、生理和生长行为等方面表现出广泛的差异性<sup>[25]</sup>。

调查研究发现在一些加工或未加工的食品中检测出 STEC, 说明食品在经过高温、高压、盐处理以及低温冷藏等处理过程中并不能够完全除去 STEC 以及其产生的毒素, 从而引发了多起食品安全事件<sup>[26-28]</sup>。结合本研究结果, 这可能是由于食品原材料中的 STEC 菌株在经过一系列常规的灭菌、保鲜操作后仍存活。面对不适的生存环境, 细菌会通过改变细胞结构、细胞膜蛋白分子质量等一系列调控反应来抵抗外界生存环境所带来的胁迫压力, 提高对胁迫环境的反应和适应能力<sup>[29-30]</sup>。

综上所述, 面对外界胁迫环境的压力, STEC 菌株通过调控相关蛋白基因来响应应激机制, 经过一段时间的适应能够继续生长, 且所产毒素毒性增强。食品加工行业中, 大多通过跨栏技术来实现对食源性致病菌的控制, 使菌株处于一种亚致死状态, 一旦菌株经过长时间的适应后, 仍然释放毒素, 从而对食品健康安全留下隐患。因此, 本研究结果为更好地了解胁迫环境下 STEC 菌株的应激响应机制和生物学特性研究提供基础数据参考, 同时也为食品行业在食品加工过程中消毒、除菌环节提供数据参考。

## 参考文献

- [1] STHAPIT N, MALLA B, GHAJU SHRESTHA R, TANDUKAR S, SHERCHAND JB, HARAMOTO E, KAZAMA F. Investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in groundwater, river water, and fecal

- sources in the kathmandu valley, Nepal[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2020, 231(12): 1-8.
- [2] 韦德源, 陆泽宁, 张聪, 葛晨玲, 王晓晔. 产志贺毒素多重耐药大肠杆菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(2): 352-362.  
WEI DY, LU ZN, ZHANG C, GE CL, WANG XY. Biological characteristics and genome analysis of Shiga toxin-producing and multidrug-resistant *Escherichia coli* phages[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(2): 352-362 (in Chinese).
- [3] 吴文文, 丁雪燕, 洪天旗, 羊扬, 段强德, 朱国强. 猪源产肠毒素性大肠杆菌主要毒力因子研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(7): 1403-1409.  
WU WW, DING XY, HONG TQ, YANG Y, DUAN QD, ZHU GQ. Research progress on the main virulence factors of enterotoxin-producing *Escherichia coli* from pigs[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39(7): 1403-1409 (in Chinese).
- [4] FAYEMI OE, AKANNI GB, ELEGBELEYE JA, ABOABA OO, NJAGE PM. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Shiga toxigenic *Escherichia coli* serogroups isolated from fresh beef and locally processed ready-to-eat meat products in Lagos, Nigeria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 347: 109191.
- [5] van ELSAS JD, SEMENOV AV, COSTA R, TREVORS JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(2): 173-183.
- [6] 高璐, 欧阳敏, 张辉, 饶胜其, 尹永祺, 杨振泉, 沈明君. 胁迫生长条件下副溶血性弧菌的生物特性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(6): 177-182.  
GAO L, OUYANG M, ZHANG H, RAO SQ, YIN YQ, YANG ZQ, SHEN MJ. Biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* during growth in adverse environment[J]. *Food Science*, 2018, 39(6): 177-182 (in Chinese).
- [7] AUDIA JP, WEBB CC, FOSTER JW. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2001, 291(2): 97-106.
- [8] UNRUH DA, UHL BC, PHEBUS RK, GRAGG SE. Attachment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to pre-chill and post-chill beef brisket tissue[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2320.
- [9] SUO B, WANG YX. Evaluation of a multiplex selective enrichment broth SEL for simultaneous detection of injured *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 44(3): 737-742.
- [10] HUANG CY, SHEEN S, SOMMERS C, SHEEN L. Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7 under hydrostatic pressure, process temperature, time and allyl isothiocyanate stresses in ground chicken meat[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1871.
- [11] NONG FL, ZHANG P, MENG J, XIE QC, LI YF, PAN YJ, ZHAO Y, LIU HQ. Characterization of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail raw meats in Southeast China[J]. *Food Control*, 2021, 126: 108061.
- [12] LIU YT, WANG X, LIU BL, YUAN SL, QIN XJ, DONG QL. Microrisk lab: an online freeware for predictive microbiology[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(8): 607-615.
- [13] 张萍, 农芳丽, 杜明, 赵勇, 刘海泉. 3株被膜态产志贺毒素大肠杆菌产志贺毒素能力的分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 1: 1-12.  
ZHANG P, NONG FL, DU M, ZHAO Y, LIU HQ. Analysis of Shiga toxin-producing ability of 3 biofilms strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 1: 1-12 (in Chinese).
- [14] 胡夏佩, 王惠, 孔学维, 佟盼盼, 田睿, 刘茂军, 马勋, 张海燕, 张炜. 反刍动物产志贺毒素大肠杆菌的分离鉴定和致病潜力分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(8): 2495-2505.  
HU XP, WANG H, KONG XW, TONG PP, TIAN R, LIU MJ, MA X, ZHANG HY, ZHANG W. Isolation, identification and pathogenic potential analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ruminants[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8): 2495-2505 (in Chinese).
- [15] LONGHI DA, DALCANTON F, de ARAGÃO GMF, CARCIOFI BAM, LAURINDO JB. Microbial growth models: a general mathematical approach to obtain  $\mu$  max and  $\lambda$  parameters from sigmoidal empirical primary models[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2017, 34(2): 369-375.
- [16] 陶森, 林对俭, 阮世勇, 杨华. 大肠杆菌对酸的抗性变化研究[J]. *食品安全导刊*, 2021(S1): 64-65.  
TAO S, LIN DJ, RUAN SY, YANG H. Study on the resistance of *Escherichia coli* to acid[J]. *China Food Safety Magazine*, 2021(S1): 64-65 (in Chinese).
- [17] 李小媚, 桂荣, 钟俊良, 李凌甫, 黎学宗, 李煜, 赵喜红. 大肠杆菌 O157:H7 耐酸性及酸胁迫下菌体形

- 态变化的初步研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1501-1506.
- LI XM, GUI R, ZHONG JL, LI LF, LI XZ, LI Y, ZHAO XH. Preliminary study on the acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and the morphological changes under acid stress[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(7): 1501-1506 (in Chinese).
- [18] MCKELLAR RC, KNIGHT KP. Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(12): 1466-1469.
- [19] RIVERA-REYES M, CAMPBELL JA, CUTTER CN. Survival of acid-adapted and non-adapted Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using an *in vitro* model[J]. Food Control, 2019, 104: 28-33.
- [20] 闫鸣霄, 吴正云, 司育雷, 全江龙, 张文学. 泡菜发酵中不同蒜浓度、pH和盐度组合对大肠杆菌生长影响的模拟研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 44-46, 54. YAN MX, WU ZY, SI YL, QUAN JL, ZHANG WX. A simulation study on the effect of different combinations of garlic concentration, pH and salinity on the growth of *Escherichia coli* in pickle fermentation[J]. China Condiment, 2019, 44(9): 44-46, 54 (in Chinese).
- [21] KING T, KOCHARUNCHITT C, GOBIUS K, BOWMAN JP, ROSS T. Global genome response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai during dynamic changes in growth kinetics induced by an abrupt temperature downshift[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99627.
- [22] BALAMURUGAN S, AHMED R, GAO A. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in broth as influenced by pH, water activity and temperature[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(4): 341-346.
- [23] ZHAO BC, HANSON EJ, INGHAM BH. Holding fresh-cut produce under refrigeration may not prevent pathogen growth: implications for time-temperature control to reduce risk[J]. Food Protection Trends, 2021, 41(1): 46.
- [24] MURPHY BL. Dealing with uncertainty in risk assessment[J]. Human and Ecological Risk Assessment: an International Journal, 1998, 4(3): 685-699.
- [25] SHI J, ZHAO W, XIE J, ZHU YH, PAN YJ, OU J, ZHAO Y, LIU HQ. Comparison on the growth heterogeneity of *Vibrio parahaemolyticus* coupled with strain source and genotype analyses in different oligotrophic conditions[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(11): 1904-1910.
- [26] BELL BP, GOLDOFT M, GRIFFIN PM, DAVIS MA, GORDON DC, TARR PI, BARTLESON CA, LEWIS JH, BARRETT TJ, WELLS JG. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience[J]. JAMA, 1994, 272(17): 1349-1353.
- [27] FRANK C, WERBER D, CRAMER JP, ASKAR M, FABER M, der HEIDEN MA, BERNARD H, FRUTH A, PRAGER R, SPODE A, WADL M, ZOUFALY A, JORDAN S, KEMPER MJ, FOLLIN P, MÜLLER L, KING LA, ROSNER B, BUCHHOLZ U, STARK K, KRAUSE G, TEAM HUSI. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany[J]. The New England Journal of Medicine, 2011, 365(19): 1771-1780.
- [28] BOYD E, TRMCIC A, TAYLOR M, SHYNG S, HASSELBACK P, MAN S, TCHAO C, STONE J, JANZ L, HOANG L, GALANIS E. *Escherichia coli* O121 outbreak associated with raw milk Gouda-like cheese in British Columbia, Canada, 2018[J]. Canada Communicable Disease Report, 2021, 47(2): 11-16.
- [29] NANDAL K, SEHRAWAT AR, YADAV AS, VASHISHAT RK, BOORA KS. High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* sp. (*Cajanus*)[J]. Microbiological Research, 2005, 160(4): 367-373.
- [30] WANG F, XIAO X, OU HY, GAI YB, WANG FP. Role and regulation of fatty acid biosynthesis in the response of *Shewanella piezotolerans* WP<sub>3</sub> to different temperatures and pressures[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(8): 2574-2584.