

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1409–1417; 4 November 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150081

冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复机制

黄忠民^{1,2,3}, 吕海鹏¹, 艾志录^{1,2,3}, 王娜³, 谢新华¹, 范会平³, 潘治利¹, 索标^{1,2,3*}

¹河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002

²河南粮食作物协同创新中心, 河南 郑州 450002

³速冻面食及调制食品河南省工程实验室, 河南 郑州 450002

摘要:【目的】研究冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中的细胞修复机制。【方法】本文以冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 为研究对象, 探讨了不同修复时间细胞的修复情况; 利用透射电子显微镜观察修复启动过程中超微结构的变化; 通过实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 方法测定了修复过程中转录弱化子 (*msrR*)、铁离子 ABC 转运 ATP 结合蛋白 (*fhuC*)、细胞色素 b (*cytB*) 基因表达量的变化, 通过紫外分光光度法测定细胞外泄漏物含量、细胞活性氧 (ROS) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。【结果】修复 3 h 后, 99% 以上冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌完成修复, 修复后细胞对高盐胁迫抗性恢复。Real-time PCR 分析结果表明, *msrR* 和 *fhuC* 基因表达量显著下调, 而 *cytB* 表达量显著上调。修复过程中冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌细胞表面超微结构变化比较明显, 细胞表面从光滑透明变得致密结实, 细胞内紫外吸收物质泄漏速度也在逐渐变慢, 同时细胞中的 ROS 含量降低, SOD 酶活性减弱。【结论】冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中, 可能是通过细胞膜完整性的修复, 细胞恢复对高盐胁迫的抵抗能力; 通过基因调控降低细胞内 ROS 的含量, 降低活性氧 (O_2^-) 对细胞的毒害作用。同时通过产能代谢相关基因 (*cytB*) 的调控为细胞提供修复所需要的能量, 最终冷冻致亚致死损伤的细胞得到修复。

关键词: 冷冻致亚致死损伤, 金黄色葡萄球菌, 细胞膜完整性, 修复启动

中图分类号: Q93 **文章编号:** 0001-6209(2015)11-1409-09

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 能够引起人类各种各样的疾病, 从轻微的皮肤感染到严重的如败血症、中毒性休克、心内膜炎和肺炎等疾病^[1]。金黄色葡萄球菌是一种革兰氏阳性致病菌, 能够生长在一个广泛的温度范围从 7 °C 到 48.5 °C 之间, pH 范围在 4.0 到 10.0 之间^[2], NaCl 浓度小于 25% 的条件下都能够正常生长^[3], 这些特征能够确保金黄色葡萄球菌在广泛的食物环境和胁迫条件

下长时间存活下去。

低温被广泛应用于确保食品的质量与安全, 但是金黄色葡萄球菌在低温贮藏时能够处于冷冻致亚致死损伤状态^[4,5] (菌体细胞受到外界不利环境胁迫如冷冻、高压、干旱、饥饿时, 造成自身细胞损伤但并未死亡), 这种受损细胞不易被检出, 待食品置于适宜环境下时, 亚致死休眠细胞便可修复^[6-7], 为食品安全监测与控制带来很大隐患。

基金项目: 国家自然科学基金 (U1204331); “十二五”国家科技支撑计划 (2012BAD37B07); 河南省科技攻关重点项目 (152102110055); 郑州市重大科技专项 (131PZDX075)

* 通信作者。Tel: +86-371-63558150; E-mail: suobiao1982@126.com

作者简介: 黄忠民 (1965-), 男, 河南人, 教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: zmhuang2000@163.com

收稿日期: 2015-02-13; **修回日期:** 2015-04-24

Brashears 等通过对大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌的研究发现,亚致死损伤细胞表现为细胞壁和细胞膜的结构性损伤,进而影响了细胞膜渗透调节能力^[8]。Estefania 等研究了细胞固定化对热诱导亚致死损伤的大肠杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌的影响,发现累积的亚致死损伤能够引起细胞的失活,而亚致死损伤细胞能够在适宜的条件下修复为正常细胞^[9]。

目前的研究大多集中在胁迫失活条件下金黄色葡萄球菌的细胞生理变化,但是对于冷冻致亚致死损伤细胞的修复机制还鲜有研究,本文以冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌 ATCC6538 为研究对象,研究冷冻致亚致死损伤细胞修复过程中细胞活性变化规律,通过透射电镜(TEM)观察细胞超微结构的变化、细胞内外核酸及蛋白质的泄漏情况,细胞中 ROS 和 SOD 含量的变化以及相关基因的转录表达水平,从而探讨冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复机制,旨在为食品中冷冻致亚致死损伤致病菌的检测提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和试剂:金黄色葡萄球菌(ATCC6538),来源于美国标准菌种收藏所;添加了酵母浸膏的胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂培养基(TSA+0.6% YE),添加了酵母浸膏的胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基(TSB+0.6% YE),购自北京路桥生物公司。

1.1.2 主要仪器:-18℃冰箱,上海市美菱有限公司;恒温恒湿培养箱,上海鸿都电子科技有限公司;透射电子显微镜,JEM-1400,日本 JEOL 公司;紫外可见分光光度计-722 型,上海光谱仪器公司;日本 SANYO:3-30K 台式高速离心机,Sigma。

1.2 金黄色葡萄球菌的培养及其冷冻处理

从-80℃冰箱中取出保藏的金黄色葡萄球菌菌种,在 TSA+0.6% YE 平板划线培养 1 d 后获得单菌落,挑取一个单菌落于 5 mL 的 TSB+0.6% YE 中,37℃、200 r/min 摇床培养 6 h,使细菌生长到对数期,调整细菌浓度达到大约 10⁹-10¹⁰ CFU/mL,直接置于-18℃冰箱中,冻藏 90 d 备用。

1.3 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复规律

冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌在 TSA+0.6% YE 培养基上能够正常生长,而在添加 10% NaCl 的高盐度 stressingTSA+0.6% YE 培养基中不能生长^[4,10],因此,在这两种培养基上所得或细胞数目的差值为亚致死损伤细胞数目。样品在室温下解冻后置于 37℃培养箱中,在 0、0.5、1.0、2.0 和 3.0 h 分别用这两种培养基计数冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌。

亚致死损伤率通过公式(1)^[11]计算。
% Sublethaldamage =
$$1 - \frac{(\text{CFU/mL})_{\text{stressingTSA} + 0.6\% \text{ YE}}}{(\text{CFU/mL})_{\text{TSA} + 0.6\% \text{ YE}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 总 RNA 的提取及 *msrR*、*fhuC*、*cytB* 基因的转录表达量测定

参照 Xie 等^[12]的方法进行,分别通过离心的方法收集 1 mL 冷冻 90 d 和修复 1 h 的金黄色葡萄球菌细胞,采用 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取总 RNA,经 Dnase I 处理后,用反转录试剂盒将 mRNA 反转录成 cDNA。cDNA 的 Real-time PCR 定量测定采用 ABI Stepone plus 型实时荧光 PCR 仪进行,扩增程序为:50℃ 2min,95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。本实验所采用的各扩增引物如表 1 所示,根据各扩增曲线的 C_t值,以 16S rRNA 基因的表达为内参,计算各基因转录表达的相对量,结果用 2^{-ΔΔC_t}法表示^[17]。

表 1. Real-time PCR 引物设计
Table 1. Primers designed for real-time PCR

Gene names (Abbreviation)	Gene function	Primers	Sequences (5'→3')	References
Transcriptional attenuator MsrR (<i>msrR</i>)	Encoding the cell membrane synthesis related protein	F	AAGCACAAGGTGGACAAT	[13]
		R	ATATCACGCATGACAGAC	
Iron (Fe ³⁺) ABC transporter ATP-binding protein (<i>fhuC</i>)	Encoding antioxidant stress related protein	F	TATTGAGCGTCCTCCTTT	[14]
		R	GATACTCGTCTGTGTTGC	
Cytochrome b (<i>cytB</i>)	Encoding capacity metabolism related protein	F	TTTGGTGGAACITTTGGGTC	[15]
		R	TATCCTCATGGGCCGTAT	
16S ribosomal RNA (16S rRNA)	Encoding 16S ribosomal RNA	F	GCTCGTGTCTGAGATGTTG	[16]
		R	GCTGCCCTTTGTATTGTCCA	

1.5 修复过程中金黄色葡萄球菌细胞内核酸物质泄漏量的测定

将 37 ℃ 修复 0、0.5、1.0、2.0、3.0 h 的样品于 4 ℃、2616 × g 离心 15 min, 收集上清液, 置于石英比色皿中, 使用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光值^[18]。

1.6 冷冻亚致死修复启动过程中细胞超微结构变化

分别取 -18 ℃ 贮藏 90 d 的冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌和 1 h 修复启动过程中的金黄色葡萄球菌菌液各 10 mL, 4 ℃、7267 × g 离心 15 min, 弃去上清液, 将重悬的菌体细胞转移至 1.5 mL 的离心管中, 再次 4 ℃、7267 × g 离心 5 min, 最后将菌体置于 4% 戊二醛溶液固定 4 h, 用 0.2 mol/L, pH7.2 的磷酸缓冲液(PBS)漂洗 4 次, 每次 10 min, 然后用 1% 的锇酸固定 1.5 h, 倒掉固定液, 用 PBS 缓冲液漂洗 4 次, 每次 10 min, 用梯度浓度(30%、50%、70%、90%、100%)的丙酮对样品进行脱水处理, 每种浓度处理 10 min, 再用 100% 的丙酮处理样品 2 次, 每次 45 min, 用环氧树脂包埋剂处理样品 4 h, 最后置于 37 ℃、12 h, 45 ℃、12 h 和 60 ℃、24–48 h 聚合。样品在 Reichert 超薄切片机中切片, 获得 70–90 nm 的切片, 该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧钼 50% 乙醇饱和溶液分别染色 15 min 后, 使用透射电镜观察细胞超微结构的变化。

1.7 活性氧(ROS)的测定

参考文献[19]的方法, 分别取 -18 ℃ 贮藏 90 d 的冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌和修复 0.5、1.0、2.0、3.0 h 的细菌悬浮在 PBS 缓冲液中, 加入 0.5 mL 氮蓝四唑(NBT)(1 mg/mL) 37 ℃ 培养 30 min, 接着添加 0.1 mL HCl(0.1 mol/L) 在 164 × g 离心 10 min。蓝色的悬浮液(ROS 胞外组分)在 575 nm 测定。分离的菌体用 0.6 mL DMSO 处理去提取减少的 NBT, 最后加入 0.8 mL PBS 缓冲液在 575 nm 下测定胞内活性氧(ROS)。

1.8 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

参考文献[19–20]的方法, 分别取 -18 ℃ 贮藏 90 d 的冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌和修复 0.5、1.0、2.0、3.0 h 的细菌, 分别 4 ℃、16350 × g 离心 15 min, 分离菌体(胞内组分)和上清液(胞外

组分)。菌体在功率 50 W 超声 1 min 后, 在 pH7.8, 含 5 mg/mL 溶菌酶的 PBS 缓冲液中 37 ℃ 培养 30 min。分别取 100 μL 胞内和胞外组分, 加入 13 mmol/L 的甲硫氨酸 0.5 mL、75 μmol/L NBT 0.5 mL、100 nmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)0.5 mL、50 mmol/L 的 PBS 缓冲液 3.5 mL, 最后加入 2 μmol/L 的核黄素 0.5 mL, 混匀后将对照管包于双侧锡箔纸中避光, 其他各管均于日光灯下反应 15 min。反应结束以后, 用黑布盖上终止反应。以避光管作为空白调零, 以未加酶液的光照管作为对照, 在 560 nm 波长下测定各管吸光度。以抑制 NBT 光还原反应所需酶量作为酶活性的单位。SOD 总活计算公式^[20]如下:

$$\text{SOD 活性} [U/(g \cdot F_w \cdot h)] = (A_0 - A_s) \times V_t \times 60 / (A_0 \times 0.5 \times F_w \times V_s \times t)$$

式中 A_0 – 照光对照管的光吸收值; A_s – 样品管的光吸收值; V_t – 样液的总体积(mL); V_s – 测定时样品用量; F_w – 样品鲜重(g); t – 反应时间(min)。

1.9 数据分析

文中数据为 3 次平行测定的平均值。采用 Origin 8.0 绘图, 显著性分析采用 SPSS 18.0 的单因素方差分析(One-Way ANOVA, Turkey), 在显著性水平 $P < 0.05$ 下进行数据分析与统计。

2 结果和讨论

2.1 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌活性修复规律

从图 1 可以看出, 通过公式计算得到在 -18 ℃ 贮藏 90 d(修复 0 h)之后, 金黄色葡萄球菌的冷冻致亚致死损伤率达到 99% 以上, 因此我们选择 -18 ℃ 贮藏 90 d 的冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌做为对照菌株。冷冻致亚致死损伤的细胞在 0–1 h 修复速度比较快, 随后逐渐减慢, 3 h 后大部分冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌都完成修复。随着细胞的修复, 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌的耐盐胁迫能力逐渐增强, 我们推测可能是冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌的细胞膜逐渐修复, 细胞膜渗透调节能力逐渐增强^[7]。

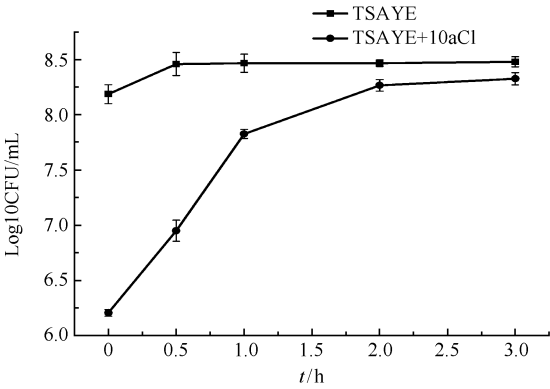


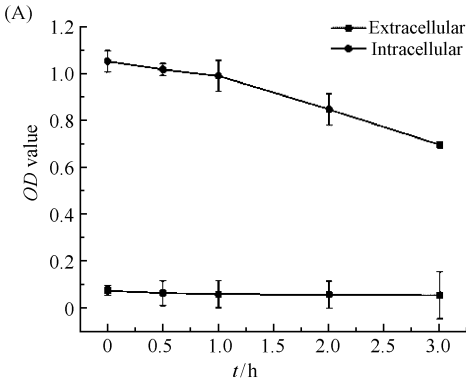
图 1. 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌亚致死损伤修复规律

Figure 1. The regulation of sublethal repair of frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus*.

2.2 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中 ROS 含量及 SOD 活性变化

活性氧(ROS)参与了许多重要的生命活动,比如信号转导、细胞凋亡、组织损伤等^[20]。从图 2-A 可以看出,细胞 NBT 的减少量表明冷冻致亚致死损伤修复过程中细胞内的活性氧的含量远远大于细胞外,细胞内活性氧的含量随着细胞活性的修复而逐渐减少,而胞外活性氧的含量无明显变化($P > 0.05$)。本研究结果表明,在冷冻致亚致死损伤修复过程中,细胞活性氧含量的逐渐减少,其所遭受的氧化胁迫也逐渐减弱,细胞活性得以恢复^[21]。

在生物体内的 SOD 功能主要是催化超氧化物的阴离子自由基(O_2^-)产生歧化反应生成 H_2O_2 ,而 H_2O_2 可再由谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)转化为 H_2O ,SOD 能专一地清除超氧阴离子自由基,从而防



止 O_2^- 对细胞和细胞膜系统造成损伤^[22]。从图 2-B 可以看出,冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中,细胞 SOD 活性表现出逐渐下降的趋势。在冷冻致亚致死损伤修复前细胞内 SOD 活性为 $647.3 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{Fw} \cdot \text{h})$,修复前期 SOD 活性变化幅度较大,随着修复时间的延长,细胞 SOD 活性减少的幅度明显降低,说明随着细胞修复的进行,细胞质基质中活性氧的含量逐渐减少,细胞中 SOD 活性也相应降低。

2.3 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复相关基因 *msrR*、*fhuC*、*cytB* 相对表达量

本实验以金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 基因表达为内参,研究了冷冻致亚致死损伤的细胞修复过程中,细胞膜相关基因 *msrR*、抗氧化应激相关基因 *fhuC*、产能代谢相关基因 *cytB* 的相对表达量。*msrR* 基因编码的 MsrR 蛋白,属于细胞膜相关蛋白 LytR-CpsA-Psr 家族的成员之一^[23],该蛋白在细胞中主要参与细胞分裂和隔膜的形成^[13,24],同时该蛋白还参与金黄色葡萄球菌毒力因子的合成^[25]。*fhuC* 基因编码一个 ATP 结合蛋白,该蛋白主要参与促进宿主细胞对 Fe^{3+} 离子的吸收, Fe^{3+} 与 Mn^{2+} 构成致病菌抗氧化应激酶(过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶等)的辅酶因子^[26],研究发现金黄色葡萄球菌缺失该基因片段后发现高铁离子吸收系统出现损伤^[27-28]。*cytB* 是与能量代谢相关的细胞色素类遗传因子,作为氧化还原和能量代谢的媒介来实现细胞内能量供给的偶联反应^[29-30]。

如图 3 所示,冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄

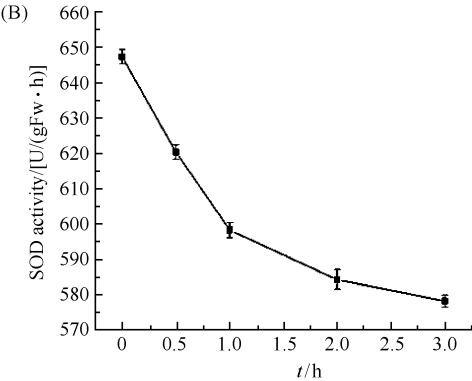


图 2. 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中 ROS 含量(A)和 SOD 活性的(B)变化

Figure 2. Changes in cellular ROS content (A) and SOD activity (B) during resuscitation of frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus*.

球菌修复启动 1 h 后, *msrR* 和 *fhuC* 基因表达量分别显著下调 2.11 和 1.46 倍, 而 *cytB* 基因表达量显著上调 3.93 倍. *msrR* 基因作为膜蛋白调控基因的一员表达量下调, 可能与亚致死损伤细胞膜对冷冻胁迫的耐受性减弱有关^[13], 说明冷冻对金黄色葡萄球菌的损伤作用主要在于细胞结构的破坏, 细胞通过调节膜相关基因的表达而达到对这种破坏的耐受性, 即可长期抵御冷冻胁迫, 而在修复启动过程中该基因的表达量下降, 这可能与细胞膜的修复有关. 亚致死损伤修复过程中抗氧化应激相关基因 *fhuC* 表达量下调促进了细胞中 ROS 的减少, 有助于降低修复后 ROS 对细胞的毒害作用. 亚致死损伤修复过程中产能代谢相关基因 *cytB* 表达量显著上调, 表明在细胞修复过程中细胞的耗能在逐渐增加, 细胞从休眠状态逐渐恢复到正常状态, 需要大量的能量供应. 因此, 在这些相关基因的调节作用下, 冷冻致亚致死损伤的细胞活性逐渐恢复.

2.4 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中细胞超微结构变化

冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程

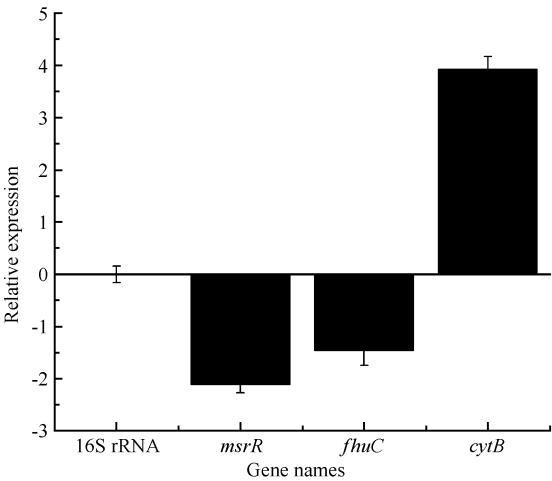


图 3. 冷冻致亚致死损伤的细胞修复启动过程中 *msrR*、*fhuC* 和 *cytB* 基因的相对表达量

Figure 3. The relative expression of *msrR*, *fhuC* and *cytB* genes in frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus* during repair start (1 h).

中细胞超微结构的变化如图 4 所示, 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌细胞呈球形, 表面光滑、透明, 细胞壁膜出现破损同时伴有细胞内的物质出现

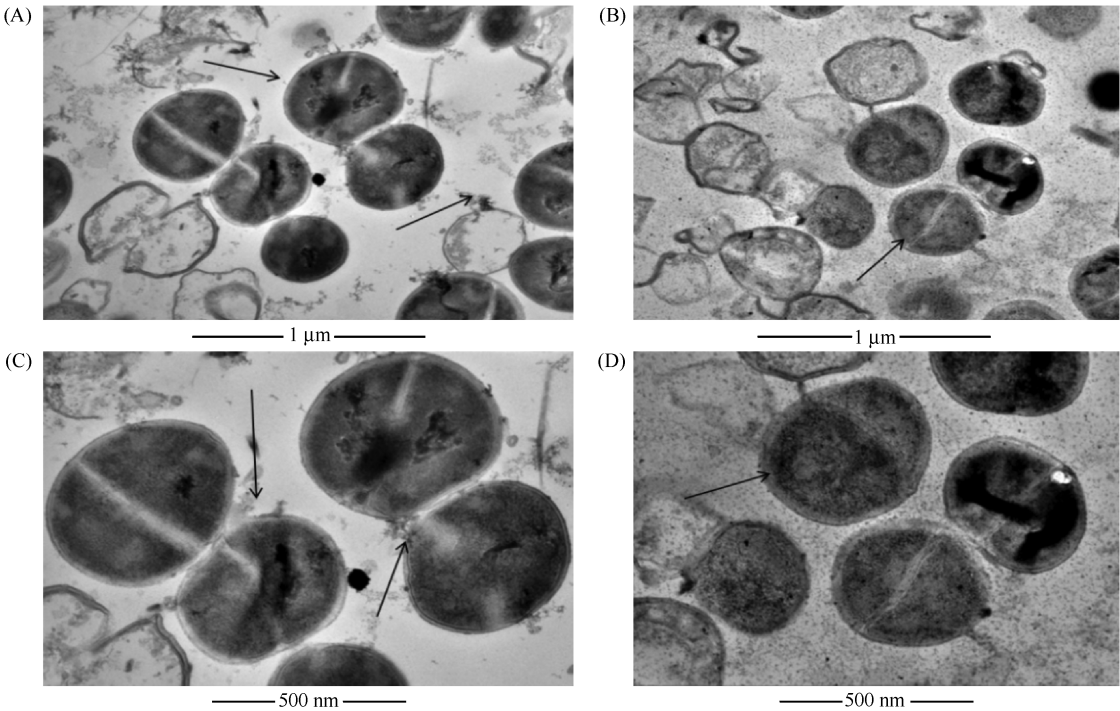


图 4. 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中细胞超微结构的变化 (A/B:30000 × ,C/D:50000 ×)

Figure 4. The cell ultrastructure changes of frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus* during resuscitation (A/B: 30000 × , C/D: 50000 ×).

泄露(图 4-A, C), 而修复 1 h 后虽然细胞形态变化不明显, 但细胞表面变得粗糙、模糊, 同时细胞壁膜的破损和泄露明显减少(图 4-B, D)^[31-32]。致病菌细胞遭受冷冻致亚致死损伤时, 细胞内的自由水形成冰晶, 导致细胞光滑、透明, 但是细胞膜的完整性遭到破坏, 部分出现缺口, 出现细胞内物质的泄露, 而在适宜条件下细胞修复过程中, 冰晶融化, 细胞膜逐渐修复, 说明冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中细胞膜的修复是非常重要的环节。

2.5 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中细胞内紫外吸收物质泄漏量的变化

由于致病菌细胞组成中含有嘌呤、嘧啶碱基, 蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环, 这些结构都具有共轭双键, 所以在紫外区有强烈的光吸收作用, 核酸和蛋白质的最大吸收峰分别在 260 nm 和 280 nm 附近^[33]。因此可以通过测定 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收强度来确定细胞内核酸和蛋白质物质的泄露情况。

从图 5 中可以看出, 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中, 细胞外液中核酸(OD_{260})、蛋白质(OD_{280})两种物质的含量随时间的延长逐渐增加, 尤其是在 0-1 h 内核酸和蛋白泄露速度较快, 而随后细胞内紫外物质泄露速度逐渐变慢并趋于稳定。已知冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌的细胞膜受到严重损伤, 因而在修复前期细胞内核酸和蛋白质的泄露量较大, 而随着修复时间的增加, 细胞内的核酸和蛋白质的泄露速度明显变慢, 可能与细胞膜的修复有重要的联系, 这也与细胞膜超微结构的研究结果相一致(图 4)。

3 结论

本文以修复过程中的冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌为研究对象, 采用 Real-time PCR 方法测定了细胞膜相关基因 *msrR*、抗氧化应激相关基因 *fhuC* 和产能代谢相关基因 *cytB* 表达量变化, 并测定了细菌超微结构、细胞膜的完整性、细胞 ROS 含量、SOD 活性以及紫外吸收物质泄漏量等生理指标, 从而探讨了冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复机制。(1) 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌在

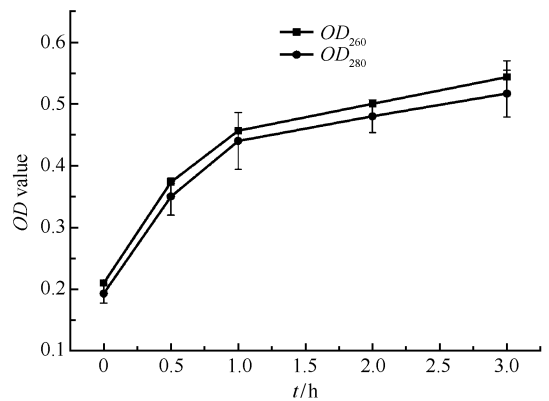


图 5. 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复过程中细胞外紫外吸收物质的泄漏量

Figure 5. Ultraviolet absorption material leakage of frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus* during resuscitation.

适宜的条件下是可以在短时间内得到修复的。(2) 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复启动过程中细胞膜相关基因 *msrR* 和抗氧化应激相关基因 *fhuC* 表达量显著下调, 而产能代谢相关基因 *cytB* 表达量显著上调。(3) 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌细胞表面出现缺口, 细胞膜完整性被破坏, 修复过程中细胞的超微结构逐渐恢复, 因而细胞耐盐胁迫能力也逐渐回复为正常状态。(4) 金黄色葡萄球菌修复过程中细胞内的核酸、蛋白质等物质流出, 随着修复过程的进行, 细胞膜完整性得以恢复, 细胞内物质泄露速度逐渐减慢。(5) 细胞修复过程中细胞中的 ROS 含量和 SOD 活性逐渐降低, 说明细胞在修复过程中降低了活性氧的毒害作用, 有利于细胞的正常生长。

综上所述, 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌的修复可能与细胞表面的修复、细胞中活性氧含量降低以及产能代谢活动逐渐增强有关, 随着细胞膜的逐渐修复, 细胞的耐盐胁迫能力逐渐增强, 对维持细胞内外渗透压的稳定性起到非常重要的作用。细胞内超氧阴离子逐渐减少, 降低了对细胞的毒害作用, 同时细胞的产能代谢逐渐增强, 有助于为细胞活动加强提供足够的能量。然而, 冷冻致亚致死损伤的金黄色葡萄球菌修复机制是一个复杂的过程, 可能包含多个相关基因表达的参与。因此, 该机制有待从分子水平上做进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339(8): 520-532.
- [2] Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmidt-Lorenz W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1990, 11(1): 1-19.
- [3] van Schothorst M, Zwietering MH, Ross T, Buchanan RL, Cole MB. International commission on microbiological specifications for foods (ICMSF). Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives. *Food Control*, 2009, 20(11): 967-979.
- [4] Suo B, Wang XJ, Pan ZL, Wang N, Ai ZL, Yu SJ, Salazar JK. Inactivation and sublethal injury kinetics of *Staphylococcus aureus* in broth at low temperature storage. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(10): 1689-1695.
- [5] Sale AJH, Hamilton WA. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1967, 148(3): 781-788.
- [6] Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(5): 1121-1138.
- [7] Mastronicolis SK, Diakogiannis I, Berberi A, Bisbiroulas P, Soukoulis C, Tzia C. Effect of cold adaptation on the survival of *Listeria monocytogenes* in ice-cream formulations during long-term frozen storage. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(4): 931-937.
- [8] Brashears MM, Amezcua A, Stratton J. Validation of methods used to recover *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. subjected to stress conditions. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(10): 1466-1471.
- [9] Noriega E, Vellieu E, Van Derlinden E, Mertens L, Van Impe JFM. Effect of cell immobilization on heat-induced sublethal injury of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria innocua*. *Food Microbiology*, 2013, 36(2): 355-364.
- [10] Suo B, Shi CL, Shi XM. Inactivation and occurrence of sublethal injury of *Salmonella Typhimurium* under mild heat stress in broth. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2012, 7(2): 125-131.
- [11] Zhao W, Yang RJ, Zhang HQ, Zhang WB, Hua X, Tang YL. Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on *Escherichia coli* cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques. *Food Control*, 2011, 22(3/4): 566-573.
- [12] Xie YP, He YP, Irwin PL, Jin T, Shi XM. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(7): 2325-2331.
- [13] Hübscher J, McCallum N, Sifri CD, Majcherczyk PA, Entenza JM, Heusser R, Berger-Bächi B, Meier PS. MsrR contributes to cell surface characteristics and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Microbiological Societies*, 2009, 295(2): 251-260.
- [14] Sebulsky MT, Hohnstein D, Hunter MD, Heinrichs DE. Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(16): 4394-4400.
- [15] Zwiers PB, Borgia G, Fleischer RC. Plumage based classification of the bowerbird genus *sericulus* evaluated using a multi-gene, multi-genome analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 46(3): 923-931.
- [16] Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 32-39.
- [17] Loewen PC, Hengge-Aronis R. The role of the sigma factor sigmas (KatF) in bacterial global regulation. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48(1): 53-80.
- [18] Lu HX, Huang XM, Zhu JL. Effect of ultra high pressure on cell membrane destruction and death of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(7): 746-753. (in Chinese)
陆海霞, 黄小鸣, 朱军莉. 超高压对单增李斯特菌细胞膜的损伤和致死机理. *微生物学报*, 2014, 54(7): 746-753.
- [19] Becerra MC, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications*, 2002, 297(4): 1003-1007.
- [20] Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Goldstein S, Dafni H, Samuni A. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O_2^- or as SOD mimics? *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(42): 26026-26031.
- [21] Vir P, Gupta D, Agarwal R, Verma I. Immunomodulation of alveolar epithelial cells by *Mycobacterium tuberculosis* phosphatidylinositol mannosides results in apoptosis. *APMIS*, 2014, 122(4): 268-282.
- [22] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973, 179(4073): 588-590.
- [23] Over B, Heusser R, McCallum N, Schulthess B, Kupferschmied P, Gaiani JM, Sifri CD, Berger-Bächi B, Meier PS. LytR-CpsA-Psr proteins in *Staphylococcus aureus* display partial functional redundancy and the deletion of all three severely impairs septum placement and cell separation. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 320(2): 142-151.
- [24] Dengler V, Meier PS, Heusser R, Kupferschmied P, Fazekas J, Friebe S, Stauffer SB, Majcherczyk PA, Moreillon P, Berger-Bächi B, McCallum N. Deletion of hypothetical wall teichoic acid ligases in *Staphylococcus aureus* activates the cell wall stress response. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 333(2): 109-120.
- [25] Rossi J, Bischoff M, Wada A, Berger-Bächi B. MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus* *sarA* attenuation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(8): 2558-2564.
- [26] Agranoff DD, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(3): 403-412.
- [27] Cabrera G, Xiong AM, Uebel M, Singh VK, Jayaswal RK. Molecular characterization of the iron-hydroxamate uptake system in *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 1001-1003.
- [28] Burkhardt R, Braun V. Nucleotide sequence of the *fhuC* and *fhuD* genes involved in iron (III) hydroxamate transport: Domains in FhuC homologous to ATP-binding proteins. *Molecular and General Genetics*, 1987, 209(1): 49-55.
- [29] Wallis MG, Groudinsky O, Slonimski PP, Dujiardin G. The NAM1 protein (NAM1p), which is selectively required for *coxI*, *cytB* and *alp6* transcript processing/stabilisation, is located in the yeast mitochondrial matrix. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 222(1): 27-32.
- [30] Taylor CT, Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010, 30(4): 643-647.
- [31] Mihoub M, Aloui A, El May A, Sethom MM, ben Ammar A, Jaafoura MH, Kacem R, Landoulsi A. Effects of garlic extract on cell wall of *Corynebacterium glutamicum*. *Annual of Microbiology*, 2010, 60(4): 637-643.
- [32] Carranza P, Grunau A, Schneider T, Hartmann I, Lehner A, Stephan R, Gehrig P, Grossmann J, Groebel K, Hoelzle LE, Eberl L, Riedel K. A gel-free quantitative proteomics approach to investigate temperature adaptation of the food-borne pathogen *Cronobacter turicensis* 3032. *Proteomics*, 2010, 10(18): 3248-3261.
- [33] Zhou W, Liu GR, Li PL, Dai YQ, Zhou K. Mode of action of plantaricin L-1, an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2): 260-264. (in Chinese)
- 周伟, 刘国荣, 李平兰, 戴蕴青, 周康. 植物乳杆菌素 L-1 对单核细胞增生李斯特氏菌作用机理的研究. *微生物学报*, 2007, 47(2): 260-264.

Repair mechanism of frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus*

Zhongmin Huang^{1,2,3}, Haipeng Lv¹, Zhilu Ai^{1,2,3}, Na Wang³, Xinhua Xie¹,
Huiping Fan³, Zhili Pan¹, Biao Suo^{1,2,3*}

¹College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

²Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

³Henan Engineering Laboratory of Quick-Frozen Flour-Rice Food and Prepared Food, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

Abstract: [**Objective**] To study the repair mechanisms of frozen sublethally damaged *Staphylococcus aureus* cells. [**Methods**] We resuscitated frozen sublethally damaged *S. aureus* at 37 °C for different time within 3 h. Meanwhile, we compared the morphological changes of the frozen sublethally damaged cells after 1 h of resuscitation using transmission electron microscopy assay (TEM). The expressions of the transcriptional attenuator MsrR (*msrR*), iron (Fe^{3+}) ABC transporter ATP-binding protein (*fhuC*), and cytochrome b (*cytB*) genes were quantitatively analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) method. The content of cells outside leakage, active oxygen (ROS), and superoxide dismutase (SOD) activity were also determined by ultraviolet spectrophotometry. [**Results**] More than 99% of the frozen sublethally damaged *S. aureus* repaired after 3 h. The resuscitated cells expressed an equal resistance to high concentration of NaCl. Real-time PCR results showed that the *msrR* and *fhuC* genes expressions were down-regulated, whereas the *cytB* gene expression was up-regulated significantly. The frozen sublethally damaged *S. aureus* cellular surface ultrastructure significant changed during resuscitation. The cell surface became compact and sturdy from smooth and transparent. The cell leakage rate of ultraviolet absorption material gradually decreased. Meanwhile, the intracellular ROS level declined along with the decrease of SOD activity. [**Conclusion**] Frozen sublethally damaged cells may regain the capability of resistance to high salt stress by repairing cell membrane integrity, reducing the content of ROS through gene regulation, inhibiting the toxicity of active oxygen to the cells. Meanwhile, the regulation of metabolism related genes (*cytB*) provides the energy for the requirement of cells, therefore, the frozen sublethally damaged cells were repaired finally.

Keywords: frozen sublethally damaged, *Staphylococcus aureus*, cell membrane integrity, repair

(本文责编: 李磊, 王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U1204331), by the 12th Five-Year National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant (2012BAD37B07), by the Science and Technology Department of Henan Province (152102110055) and by the Science and Technology Bureau of Zhengzhou City (131PZDZX075)

* Corresponding author. Tel: +86-371-63558150; E-mail: suobiao1982@126.com

Received: 13 February 2015/Revised: 24 April 2015