

GABA 旁路在阪崎克罗诺杆菌耐干燥胁迫中的作用

黎丽, 曹怡芳, 张艳, 肖性龙*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 阪崎克罗诺杆菌是婴幼儿配方奶粉 (Powdered Infant Formula, PIF) 中常见的食源性致病菌, γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric Acid, GABA) 是一种广泛存在于各种生物体内的非蛋白氨基酸, 而 *gabT* 控制的氨基丁酸转氨酶是 GABA 代谢旁路的关键酶。该研究通过构建阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 *gabT* 基因敲除菌株 (Δ *gabT*), 探讨 *gabT* 控制的 GABA (γ -氨基丁酸) 代谢旁路对阪崎克罗诺杆菌抵抗干燥的作用。结果表明, Δ *gabT* 在干燥胁迫下处理一周后存活率可达到 28.64% 显著高于野生型菌株 (WT) 的存活率 1.57%。此外, GABA 在 Δ *gabT* 中积累量高于 WT, 与存活率结果呈正相关, 表明 GABA 积累能帮助阪崎克罗诺杆菌抵御干燥胁迫。扫描电子显微镜检测结果也显示 Δ *gabT* 菌株具有较完整的细胞形态, 进一步验证了 GABA 积累有助于阪崎克罗诺杆菌在干燥环境胁迫下的生存。该研究为阪崎克罗诺杆菌中基于 GABA 旁路的靶向调控奠定了基础, 为阪崎克罗诺杆菌防控提供新思路。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌; *gabT*; GABA; 耐干燥

文章编号: 1673-9078(2023)02-297-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0375

The Role of γ -Aminobutyric Acid Shunt in *Cronobacter sakazakii* Resistance to Desiccation

LI Li, CAO Yifang, ZHANG Yan, XIAO Xinglong*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Cronobacter sakazakii* is a food-borne pathogen commonly found in powdered infant formula (PIF). γ -aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid widely present in various organisms. 4-aminobutyrate transaminase, encoded by *gabT*, is a key enzyme in the GABA shunt. This study constructed a *gabT* gene knockout strain (Δ *gabT*) of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to investigate the effect of the GABA shunt controlled by *gabT* on the resistance of *Cronobacter sakazakii* to desiccation. The results showed that the survival rate of Δ *gabT* under one-week desiccation stress was 28.64 %, significantly higher than that of the wild-type strain (WT) which was 1.57%. In addition, GABA accumulation in Δ *gabT* was higher than that in WT, and was positively correlated with survival rate, suggesting that GABA accumulation can help *Cronobacter sakazakii* resist desiccation stress. The results of scanning electron microscopy also showed that the Δ *gabT* strain had relatively intact cell membrane morphology, further confirming that GABA accumulation contributes to *Cronobacter sakazakii* survival under the stress of dry environments. This study lays a foundation for the targeted inhibition of *Cronobacter sakazakii* based on its GABA shunt and provides new directions for research into prevention and control of *Cronobacter sakazakii*.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; *gabT*; GABA; desiccation tolerance

引文格式:

黎丽,曹怡芳,张艳,等.GABA 旁路在阪崎克罗诺杆菌耐干燥胁迫中的作用[J].现代食品科技,2023,39(2):297-302

LI Li, CAO Yifang, ZHANG Yan, et al. The role of γ -aminobutyric acid shunt in *Cronobacter sakazakii* resistance to desiccation [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 297-302

阪崎克罗诺杆菌是一种杆状的革兰氏阴性能严重危

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172320); 广东省自然科学基金 (2021A1515011068)

作者简介: 黎丽 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 1551867830@qq.com

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: fexxl@scut.edu.cn

害特定人群生命安全的条件致病菌^[1]。它可导致新生儿严重的脑膜炎、小肠结肠炎、败血症和菌血症, 死亡率高达 27%^[2]。出生后两个月内的新生儿, 尤其是体重不足的早产儿^[3], 胃酸较少, 免疫能力不足, 他们的细菌感染风险更高^[4], 病死率可达到 40%~80%^[5]。相对于其它常见食源性致病菌大肠杆菌 O157:H7、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和单核细胞增生李斯特菌, 阪崎克罗诺杆菌具有更强耐干燥胁迫能力^[6]。在

高温干燥的生产环境中, 阪崎克罗诺杆菌在 PIF 基质成分的保护作用下, 依旧能表现出较强的存活能力^[7], PIF 在生产过程中通常采用巴氏杀菌, PIF 生产设施中与克罗诺杆菌污染较高相关的区域包括喷雾干燥器、流化床和空气过滤设施^[8], 巴氏灭菌只能在 PIF 生产的早期阶段灭活阪崎克罗诺杆菌, 但在控制来自下游成分、过滤器、喷雾干燥塔和其他加工设备的污染方面无效, 阪崎克罗诺杆菌能在喷雾干燥中存活并长期存在^[9]。由此可能形成巨大的食品安全隐患, 成为食品微生物污染与控制的难点。综上所述, 研究阪崎克罗诺杆菌耐干燥, 最重要的一个原因是其污染的传播途径是水分活度低级的食品-PIF, 因此研究阪崎克罗诺杆菌耐干燥特性有重要意义。

γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric Acid, GABA) 是一种广泛存在于微生物和动物、植物中的非蛋白氨基酸。 γ -氨基丁酸转氨酶基因 *gabT* 是阪崎克罗诺杆菌代谢 GABA 分支的关键基因之一。在植物方面, 在高等植物中, 很多研究报导表明 GABA 旁路是植物耐受干旱胁迫的重要机制, 逆境胁迫会导致植物体内大量积累 GABA^[10]。Bao 等^[11]通过沉默番茄中 *gabT* 基因, 导致番茄中 GABA 含量增加, 琥珀酸含量降低, 提高番茄耐盐性。Renault 等^[12]研究表明, *gabT* 是耐盐拟南芥 GABA 代谢调控的关键。GABA 代谢旁路在微生物对环境胁迫如耐酸^[13]、应激反应^[14]和致病性细菌毒力^[15]的响应中起着重要作用。研究表明, 突变的 *gabT* 基因降低了丁香假单胞菌^[16]的致病性。Hu 等^[17]通过使用 iTRAQ 等蛋白组学方法系统性研究了阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 的耐干燥胁迫机制, 发现在干燥胁迫下腐胺 (Putrescine) 代谢相关的酶 *PuuR*、*PuuA*、*PuuD* 大幅上调表达, 表明菌体内 GABA 的合成被大幅激活, 因而显示了腐胺等多胺降解积累的 GABA 可能是阪崎克罗诺杆菌耐干燥胁迫的重要机制, 合成路径如图 1 所示。因此, GABA 对生物体耐受逆境胁迫有重要作用, 然而相关研究多见于植物, 但在细菌方面的研究很少。*gabT* 基因是否能通过调节 GABA 代谢影响阪崎克罗诺杆菌的活性, 干燥应激环境对 GABA 合成量有什么影响尚不清楚。

鉴于阪崎克罗诺杆菌较其他肠杆菌具有较强的干燥环境耐受性, 能够长期生存于 PIF 中, 且对新生儿有潜在的危害性, 因此对于阪崎克罗诺在干燥环境耐受机制的研究有重大意义。为了探究 *gabT* 基因是否能通过调节 GABA 代谢影响阪崎克罗诺杆菌的活性, 干燥应激环境对 GABA 合成量的影响, 本研究通过基因敲除技术获得阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 的 *gabT* 基因缺失株即 Δ *gabT* 菌株, 以阪崎克罗诺杆菌野生株

WT 和 Δ *gabT* 菌株为研究对象, 开展干燥逆境胁迫下菌体存活率测定、细胞内 GABA 含量测定实验, 同时借助扫描电子显微镜分析干燥胁迫条件下野生株 WT 和 Δ *gabT* 菌株的形态变化, 从而验证 GABA 代谢旁路在阪崎克罗诺杆菌耐干燥胁迫响应中的重要作用。为阪崎克罗诺杆菌中基于 GABA 旁路的靶向调控奠定了基础, 从而为阪崎克罗诺杆菌防控提供新思路。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 原料与试剂

惠氏婴幼儿配方奶粉, 上海惠氏; 无水乙醇 (分析纯)、2.5%戊二醛固定液 (电镜专用) 均购于上海艾妍生物科技有限公司; GABA 试剂盒 (项目编号 69-99842) 购于 Merck Biotech 公司。

1.1.2 培养基及菌种

胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA)、胰酪大豆胨液体培养基 (TSB) 购于广东环凯微生物科技有限公司; 阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心; Δ *gabT* 突变株在实验中获得; 菌种均在 37 °C, 180 r/min 摇床 TSB 中培养活化 24 h, 调整菌悬液浓度为 6 lg CFU/mL 后备用。

1.1.3 主要仪器设备

XW-80A 微型漩涡混合仪, 上海泸西分析仪器有限公司; UV-7500 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司; LRH-250A-2 恒温培养箱, 韶关市泰宏医疗器械有限公司; LEO1530VP 扫描电子显微镜, 德国 Zeiss 公司; HZQ-F100 恒温振荡培养箱, 哈尔滨市东联仪器有限公司; 5424 小型离心机, 德国 Eppendorf 公司; YXQ-LS-100 II 立式压力蒸汽灭菌器, 郑州南北仪器设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因敲除突变体的构建

利用 Luo 等^[18]的方法构建了阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 的 *gabT* 敲除突变体, 敲除位点如图 1 所示。使用表 1 中的引物。将 *gabT* 基因上下游 DNA 片段进行 PCR 融合, 克隆到自杀载体质粒 pLP12cm 中。将重组自杀载体从 β 2163 转移到阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 进行同源重组。用 0.4% L-阿拉伯糖筛选 *gabT* 基因突变体。用相同的引物对进行测序, 通过 PCR 确认缺失突变体。在含有 20 μ g/mL 氯霉素 (Chloramphenicol, Cm) 和 0.3% D-葡萄糖的 LB 平板上, 选择整合质粒到特定染色体位点的阪崎克

罗诺杆菌单交叉细胞。在添加 0.4% L-阿拉伯糖的反选择 LB 平板上选择双交叉重组突变体。缺失突变体

检测采用两种外部引物分别锚定 *gabT* 基因的上下游区域。

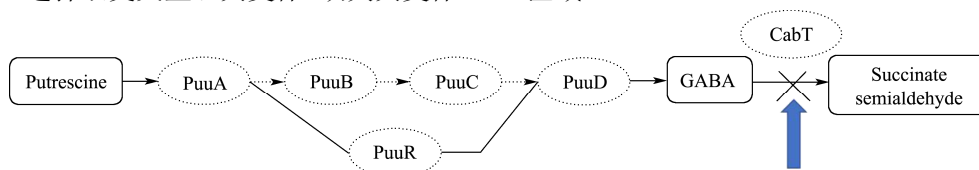


图 1 敲除基因位置示意图

Fig.1 Schematic diagram of knockout gene location

注：矩形图标表示物质，椭圆图标表示相关酶。

表 1 基因敲除的引物设计

Table 1 Primer design

Primers	Sequence(5'-3')
GabT-MF1	GGAATCTAGACCTTGAGTCGCTGCCGTTTCGGGTTCACTTC
GabT-MF1	GCACCACCTTAAAGGCAGGATGACTGCCACTGCTGATTGCTTTG
GabT-MF2	CAAAGCAATCAGCAGTGGCAGTCATCCTGCCTTAAAGTGGTGC
GabT-MR2	ACAGCTAGCGACGATATGTCAGCAGCACCACGAAAATCCA
GabT-TF	ATAGCCTCAATCAGCCCCTCG
GabT-TR	CGCAACACCGTAAATCACCAI
pLP-UF	GACACAGTTGTAAGTGGTCCA
pLP-UR	CAGGAACACTTAACGGCTGAC

1.2.2 干燥胁迫下 WT 和 $\Delta gabT$ 突变菌株存活率测定

将 10^6 CFU/mL 的 WT 和 $\Delta gabT$ 突变株菌悬液重悬于复配婴幼儿乳粉中，惠氏婴幼儿配方奶粉（上海惠氏）已按照 GB 4789.40-2016 所述检测，证明无阪崎克罗诺杆菌污染。在无菌培养皿中制备 0.5 mL 点重悬的细菌培养物。将无盖培养皿置于含脱水硅胶的 40 °C 培养箱中培养 4 h，干燥后盖上盖，在干燥皿中 25 °C 保存。每隔一周用平板计数法测定存活细胞数量。本研究以 37 °C TSB 培养 12 h 的阪崎克罗诺杆菌为对照样品。

$$A = \frac{n_1}{n_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

A——存活率，%；

n_1 ——实验组菌落数；

n_0 ——对照组菌落数。

1.2.3 干燥胁迫下 WT 和 $\Delta gabT$ 菌株 GABA 含量的测定

GABA 含量按照 GABA 试剂盒操作说明进行。试剂盒购于 Merck Biotech 公司（项目编号 69-99842）。本试剂盒采用酶联免疫吸附法测定标本中 GABA 含量。GABA 抗体、GABA 与辣根过氧化物酶（HRP）标记的 GABA 抗体形成抗体-抗原-酶标记的抗体复合物，经彻底洗涤后与底物四甲基联苯胺（TMB）着色。TMB 经辣根过氧化物酶（HRP）催化，在酸的作用下

转化为蓝色和最终的黄色。颜色的深度与 GABA 呈正相关。用酶标仪检测培养物的 OD₄₅₀ 根据标准曲线计算样品中 GABA 的浓度。

1.2.4 干燥胁迫对 WT 和 $\Delta gabT$ 菌株细胞形态的影响

参照 Paula 等^[19]的方法，使用扫描电子显微镜观察干燥胁迫对 WT 和 $\Delta gabT$ 突变菌株细胞膜形态的影响。使用生理盐水溶出方法 1.2.2 中干燥后的盖玻片上的细胞，加入 2.5% 的戊二醛溶液中固定过夜（4 °C）。后用不同浓度梯度（10%、30%、50%、70%、90%、100%）的乙醇溶液依次洗脱菌体，每次 10 min。真空干燥后，将盖玻片粘贴在扫描电镜专用载物台上，待样品脱水镀金后，在 Zeiss 扫描电子显微镜下观察细胞微观形态结构。

1.3 数据处理

使用和 Origin 2021 软件对实验结果进行统计分析并绘图，使用 SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析， $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果与讨论

2.1 干燥胁迫对 WT 菌株和 $\Delta gabT$ 菌株存活率的影响

实验前已证明, $\Delta gabT$ 菌株在适宜环境中能正常生长。通过平板计数法测定 WT 和 $\Delta gabT$ 菌株干燥后的存活率, 如图 2 所示, WT 与 $\Delta gabT$ 菌株在干燥条件处理一周后的存活率均显著下降。干燥一周后野生株存活率为 1.57%, $\Delta gabT$ 菌株存活率为 28.64% ($P < 0.05$), 可以看出, 在干燥条件胁迫后, $\Delta gabT$ 菌株存活率更高。随着干燥时间的增加, 在干燥第二周后, WT 菌株存活率下降至 0.18%, $\Delta gabT$ 菌株存活率下降至 20.66% ($P < 0.05$), 由此可见, 随着干燥时间的增加, $\Delta gabT$ 菌株存活率情况更显优势, 且证明在干燥环境中, 阪崎克罗诺杆菌具有一定的存活能力并且能够长期存活, 这与易萌等^[20]研究结果一致。在此之后, 菌株的存活情况维持在较稳定的状态, 干燥五周后 WT 和 $\Delta gabT$ 菌株存活率分别为 0.15% 和 19.34% ($P < 0.05$)。说明 $gabT$ 基因的缺失使得阪崎克罗诺杆菌在干燥胁迫条件下更易存活, 且存活率相比野生型菌株大幅提升, 表明 $gabT$ 基因的缺失可能在一定程度上有助于细胞抵御干燥环境。

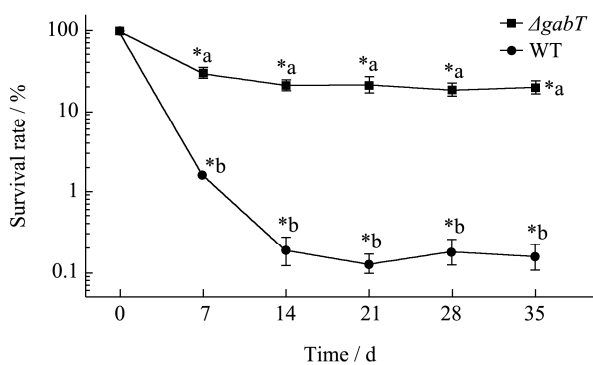


图 2 干燥处理后细菌存活率的变化

Fig.2 Changes of bacterial survival rate after drying treatment

注: *表示与空白组相比差异显著, 不同字母表示同一时间 GABA 含量间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 干燥胁迫对 WT 和 $\Delta gabT$ 菌株中 GABA 含量的影响

$\Delta gabT$ 菌株和 WT 菌株中 GABA 含量结果如图 3 所示, 干燥两周后, $\Delta gabT$ 菌株 GABA 含量由 6.54 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 8.54 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), WT 菌株 GABA 含量由 4.41 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 5.56 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), 在应对干燥条件胁迫时, $\Delta gabT$ 菌株和 WT 菌株中 GABA 含量都有所增加。干燥被认为是一种高渗透的胁迫状态, 对于阪崎克罗诺杆菌在干燥环境中的调控机制由两级相应完成, 第一级主要的反应是积累电解质, 如钾, 谷氨酸等, 由转运蛋白进入细胞内, 通过提高细胞内离子浓度使渗透压升高来抵消

升高的外部渗透压^[21]。但长时间的维持较高的离子浓度可能会对细胞造成高浓度离子毒害作用, 因此第二级反应是基于吸收或合成其他种类具对细胞损伤较小且能长时间存在于细胞内的相容性物质, 随着相容性物质的累积, 导致细胞内渗透压升高, 以此来抵御外界环境对细胞的损伤^[22]。GABA 是一种四碳非蛋白氨基酸, 在正常生理 pH 条件下为两性离子, 易溶于水。它的生化特性类似于小的渗透分子, 如脯氨酸和甜菜碱。因此, GABA 可以作为一种小分子渗透调节物质, 增加细胞质中的渗透水势, 提高细胞的保水性能, 减缓干燥对细胞的损害。Shabarinath 等^[23]的相关研究表明, 干燥环境下海藻糖在阪崎克罗诺杆菌中积累。且强调了其他次生渗透物质如脯氨酸、胆碱等物质在干燥生存中的潜在辅助作用。在干燥环境下, $\Delta gabT$ 菌株和 WT 菌株都可能通过累积 GABA 来抵御干燥胁迫。

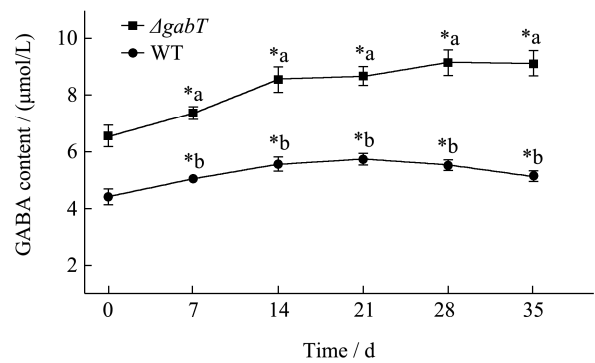


图 3 干燥处理后细菌 GABA 含量的变化

Fig.3 Changes of GABA content of bacteria after drying

注: *表示与空白组相比差异显著, 不同字母表示同一时间存活率间差异显著 ($P < 0.05$)。

干燥五周后, $\Delta gabT$ 菌株 GABA 含量达到 9.12 $\mu\text{mol/L}$, WT 菌株在干燥 2~5 周期间 GABA 含量保持相对稳定, 在干燥 5 周后 GABA 含量为 5.56 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), 由此可见, 在干燥胁迫下 $\Delta gabT$ 菌株 GABA 含量显著高于 WT 菌株, $\Delta gabT$ 菌株由于 $gabT$ 基因的缺失, 其对应的 GABA 转氨酶功能缺失使得其具有更强的 GABA 累积能力。Du 等^[22]的研究也表明阪崎克罗诺杆菌的干燥阻力的调节机制与钾积累和流出以及相容溶质的吸收和合成有关, 与相容性物质合成与转运相关的 $betAB$ 、 $proVW$ 等基因在耐干燥性强的菌株中的水平高于弱干燥耐受性菌株中的基因水平, 这些基因的较高水平可能使菌株对干燥环境更具抵抗力。在本研究中, $\Delta gabT$ 菌株在干燥胁迫下积累了更高的 GABA (图 3), 这一结果与推测是吻合的。在 $\Delta gabT$ 中, 由于 $gabT$ 基因的缺失, GABA 代谢受阻, 导致 GABA 积累。GABA 的积累有助于细胞抵抗干燥胁迫, $\Delta gabT$ 菌株较于 WT 菌株更高水平的 GABA 累

积导致 $\Delta gabT$ 的存活率高于 WT。

2.3 干燥胁迫对 WT 和 $\Delta gabT$ 菌株细胞形态的影响

影响

通过扫描电子显微镜观察了干燥一周后野生型菌株和 $\Delta gabT$ 突变株菌体形态的变化, 结果如图 4。从图 4 中可以看出, 未经处理的 WT 菌体无褶皱, 菌体表面光滑(图 4a), 菌体形态轮廓正常; 未经处理的 $\Delta gabT$ 菌体呈现出轻微皱缩情况(图 4c), 经干燥条件处理后, 野生型菌株与 $\Delta gabT$ 突变株菌体均出现皱缩现象(图 4b 和 4d), 表面轮廓不完整现象。相比与 $\Delta gabT$ 菌株而言, WT 菌体部分出现皱缩、粘连、破裂现象, 菌体变形更加严重(图 4b)。上述结果表明, 干燥环境对于阪崎克罗诺杆菌 WT 菌株和 $\Delta gabT$ 菌株细胞形态会造成一定的破坏和损伤, 但菌体依然具有存活能力, 依旧具有一定的危害性。

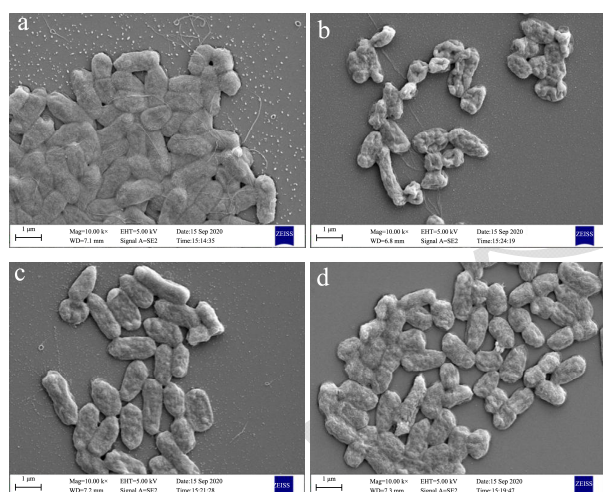


图 4 干燥处理后细菌细胞形态的变化

Fig.4 Changes of bacterial cell microstructure after drying

注: a 为 WT 对照组; b 为 WT 干燥处理; c 为 $\Delta gabT$ 对照; d 为 $\Delta gabT$ 干燥组。

由细胞形态变化可以发现, 干燥对于 $\Delta gabT$ 突变株菌体形态影响更小, 由此推测出 $gabT$ 基因的缺失使得细胞内 GABA 代谢受阻进一步累积, 维持细胞内渗透压在一定程度上保护细胞膜的完整性。微生物细胞膜的完整性是保证其维持自身新陈代谢等正常生理活动的重要因素^[24]。胡心怡等^[25]研究发现百里香酚与肉桂醛通过破坏沙门氏菌细胞膜的完整, 从而抑制了沙门氏菌的增殖。失水干燥引起细菌的细胞质的渗透性失衡, 膨胀压力的损失导致水在细胞膜上的位移, 并导致细胞收缩^[26]。 $\Delta gabT$ 菌株中 GABA 的大量累积, 在一定程度上保护了细胞失水收缩, 相对于 WT 菌株而言使菌体的细胞膜不易造成破坏和损伤, 菌体形态

不易发生改变。细胞膜是细菌与环境间的半透膜屏障, 当其结构和完整性被破坏, 将会导致细胞失去正常的生理代谢活动, 进而使菌体失活和死亡^[27,28], 该过程往往伴随着细胞膜的通透性的变化以及胞内成分的流失^[29]。因此, 在干燥条件下 GABA 的累积在有助于维持阪崎克罗诺杆菌的胞内渗透压, 维持菌体形态的基础上一定程度保证细胞正常生理代谢活动, 进而防止其因细胞膜通透性变化导致的内容物泄露以及细胞收缩导致菌体的死亡。

3 结论

本文通过基因敲除手段, 构建 $\Delta gabT$ 菌株, 同时对 WT 菌株和 $\Delta gabT$ 菌株耐干燥能力及 GABA 含量测定。干燥条件下 $\Delta gabT$ 菌株存活率明显高于 WT 菌株, 且 $\Delta gabT$ 菌株干燥中 GABA 含量也远高于 WT 菌株, 说明 GABA 的积累与 $gabT$ 基因缺失有关, 且 GABA 累积在耐干燥胁迫中具有关键作用, 在干燥条件下通过调控 GABA 的代谢, 保护阪崎克罗诺杆菌抵抗干燥胁迫, 结合扫描电子显微镜检测进一步证实了 GABA 累积有助于阪崎克罗诺杆菌抵御干燥胁迫。故经基因敲除手段获得的 $\Delta gabT$ 菌株由于 GABA 代谢受阻, GABA 累积使得干燥后阪崎克罗诺杆菌更耐干燥。总结得出 $gabT$ 基因在干燥胁迫下的功能特性以及 GABA 含量与菌体耐干燥胁迫关系, 在已有传统物理化学致病菌防控手段基础上为探究阪崎克罗诺杆菌逆境胁迫机制提供新的思路, 为预防和控制食品(特别是婴幼儿配方奶粉)中阪崎克罗诺杆菌污染奠定基础。

参考文献

- [1] Ling Na, Jiang Xiuting, Forsythe Stephen, et al. Food safety risks and contributing factors of *Cronobacterspp* [J]. Engineering-Prc, 2022, 12: 128-138
- [2] Chauhan Rajni, Bansal Saurabh, Azmi Wamik, et al. Increased thermal tolerance in *Cronobactersakazakii* strains in reconstituted milk powder due to cross protection by physiological stresses [J]. Journal of Food Safety, 2020, 40: e12810
- [3] Chandrasekaran S, Burnham C A D, Warner B B, et al. Carriage of *Cronobactersakazakii* in the very preterm infant gut [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(2): 269-274
- [4] 曹怡芳,周爱莲,白泓,等.牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌可形成活的非可培养状态[J].现代食品科技,2022,38(3): 56-62,124
- [5] 陈雪峰,郭玉曦,曾海燕,等.阪崎克罗诺杆菌物理和化学防控方法的研究进展[J].现代食品科技,2022,38(1):1-10,421
- [6] Arku Benedict, Mullane Niall, Fox Edward, et al.

- Enterobacter sakazakii survives spray drying [J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 61: 102-108
- [7] Ling Na, Forsythe Stephen, Wu Qingping, et al. Insights into *Cronobacter sakazakii* biofilm formation and control strategies in the food industry [J]. Engineering-Proc, 2020, 6(4): 393-405
- [8] Lu Y, Liu P, Li C. G, et al. Prevalence and genetic diversity of cronobacter species isolated from four infant formula production factories in China [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1938
- [9] Fei P, Man C X, Lou B B, et al. Genotyping and source tracking of cronobactersakazakii and c. malonicus isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China [J]. Appl Environ Microb, 2015, 81(16): 5430-5439
- [10] Bouche N, Fait A, Bouchez D, et al. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(11): 6843-6848
- [11] Bao H X G D L, Chen X Y, Lv S L, et al. Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by gamma-aminobutyric acid metabolic pathway [J]. Plant Cell Environ, 2015, 38(3): 600-613
- [12] Renault H. Fiat lux! Phylogeny and bioinformatics shed light on GABA functions in plants [J]. Plant Signal Behav, 2013, 8(6): e24274
- [13] Feehily C, O'Byrne C P, Karatzas K A G. Functional gamma-aminobutyrate shunt in *Listeria monocytogenes*: role in acid tolerance and succinate biosynthesis [J]. Appl Environ Microb, 2013, 79(1): 74-80
- [14] Metzner M, Germer J, Hengge R. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex sigma(S)-dependent csiD-ygaF-gabDTP operon in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2004, 51(3): 799-811
- [15] Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, et al. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(19): 7460-7464
- [16] Goel S, Mishra P. Thymoquinone inhibits biofilm formation and has selective antibacterial activity due to ROS generation [J]. Appl MicrobiolBiot, 2018, 102(4): 1955-1967
- [17] Hu S, Yu Y, Wu X, et al. Comparative proteomic analysis of *Cronobacter sakazakii* by iTRAQ provides insights into response to desiccation [J]. Food Research International, 2017, 100(1): 631-639
- [18] Luo P, He X Y, Liu Q T, et al. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in vibrio species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480 [J]. Plos One, 2015, 10(12): e0144465
- [19] Fernández-Gómez Paula, López Mercedes, Prieto Miguel, et al. The role of the general stress response regulator RpoS in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation [J]. Food Res Int, 2020, 136
- [20] 易萌,王丽,张竟丰,等. 婴幼儿奶粉中阪崎克罗诺杆菌隐性污染状况分析及针对性检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2022,43(7):365-372
- [21] Beagle Sarah D, Lockless Steve W. Unappreciated roles for K^+ channels in bacterial physiology [J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(10): 942-950
- [22] Du Xinjun, Wang Xiaoyi, Dong Xuan, et al. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobactersakazakii* strains [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9
- [23] Jang H, Woo J, Lee Y, et al. Draft genomes of *Cronobactersakazakii* strains isolated from dried spices bring unique insights into the diversity of plant-associated strains [J]. Stand Genomic Sci, 2018, 13: 35
- [24] Ohayagi Noboru, Morita Takayuki, Sugita-Konishi Yoshiko. Case study: identification of microbial distribution and contamination source by PDCA cycle at a boiled noodles factory [J]. Food Hygiene and Safety Science, 2021, 62(3): 79-84
- [25] 胡心怡,胡郁汉,潘振辉,等. 百里香酚和肉桂醛联用对沙门氏菌的协同抑菌效应及其应用[J]现代食品科技,2021,37(12):112-119
- [26] Greffe V R G, Michiels J. Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production [J]. Appl MicrobiolBiot, 2020, 104(9): 3757-3770
- [27] Kong J, Zhang Y, Ju J, et al. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes [J]. Food Chem, 2019, 285: 380-388
- [28] Zou L, Hu Y Y, Chen W X. Antibacterial mechanism and activities of black pepper chloroform extract [J]. J Food Sci Technol-Mysore, 2015, 52(12): 8196-8203
- [29] Ultee A, Bennik M H J, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1561-1568