

## *Salmonella typhimurium*의 혐기적 산내성도 평가

김영찬 · 이 선 · 이경미 · 임성영 · 박용근\* · 백형석\*\* · 박경량 · 이인수<sup>†</sup>

한남대학교 미생물학과  
\*고려대학교 생명공학원  
\*\*부산대학교 미생물학과

### Anaerobic Acid Tolerance Response in *Salmonella typhimurium*

Young-Chan Kim, Sun Lee, Kyoung-Mi Lee, Sung-Young Lim, Yong-Keun Park\*,  
Hyung-Suk Baik\*\*, Kyeong-Ryang Park and In-Soo Lee<sup>†</sup>

Department of Microbiology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea

\*Graduated School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

\*\*Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

*Salmonella typhimurium* can encounter a wide variety of environments during its life cycle. In nature, *S. typhimurium* can experience and survive dramatic acid stresses that occur in diverse ecological niches ranging from pond water to phagolysosomes. These survival mechanism is aquired by the Acid Tolerance Response(ATR) in *Salmonella*. The ATR of *S. typhimurium* is a complex inducible phenomenon in which exposures to slight or moderate low pH will produce a stress response capable of protecting the organism against more severe acid challenges. ATR in *Salmonella* has two different systems that are called RpoS dependent and independent. We found that ATR in anaerobic was showed RpoS independent because *rpoS*ΔAp had ATR as *S. typhimurium* UK1. Using the P22 MudJ(Km, lacZ) operon fusion technique and a lethal selection procedure combining low pH(pH4.5) and sodium acetate(10mM, pH4.5), we isolated LF487 *aatA*::MudJ which showed acid sensitive in anaerobic condition. *aatA* locus was determined at 12 min on *Salmonella* Genetic Map. The survival rate of *aatA* mutant was showed significantly diminished at pH4.3 than virulent wild type *Salmonella* in anaerobic condition(5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>). Therefore isolated gene was confirmed important gene for anaerobic ATR system.

**Key words** – *Salmonella*, Acid tolerance, Anaerobic, RpoS

#### 서 론

*Salmonella* 속에 존재하는 2,200 종류 이상의 serovar들

은 인간과 동물을 숙주로 이용하는데, *S. typhi* 및 *S. choleraesuis*를 포함하는 일부 serotype들은 특히 인간에 대해서만 병원성을 나타낸다. Host-adapted *Salmonella*의 감

<sup>†</sup> Corresponding author

염은 주로 오염된 육류와 우유 등의 음식물 및 물의 섭취를 통해 이루어지며, *Salmonella*가 인간에 대해 병원균으로 작용할 때 그 병원성은 단순한 설사병 또는 위장염으로부터 치명적인 장티푸스에 이르기까지 다양하다.

*Salmonella*는 다른 종류의 병원 미생물들과 마찬가지로 그들의 생활사동안 외부환경의 다양한 변화로 인한 생리적 스트레스들을 경험하게 된다. 자외선 조사, 영양분의 결핍, 호기적 상태에서 혐기적 상태로의 전이, 열충격, 및 pH 변화 등이 그 주요한 스트레스로 알려져 있으며, 미생물들은 세포 외부 환경으로부터 밀려드는 다양한 스트레스에 적응하여 생존할 수 있는 보호기전(protective mechanism)을 가지고 있다[10,14]. 특히 pH 스트레스에 대한 세균의 적응양태는 *Escherichia coli*나 *Shigella flexneri* 등의 병원성 장내세균을 대상으로 현재 점진적으로 진행되고 있다[13,15]. *S. typhimurium*은 pH 스트레스를 위, 소장 그리고 *E. coli*와는 달리 거대식세포(macrophage) 등에서 각각 접하게 되는데[7], *Salmonella*의 산저항능은 세균의 성장기에 따라서 독특한 양상을 보인다. 즉, 대수성장기(log phase) *S. typhimurium* 세균세포들의 산저항성은 pH5.8 또는 pH4.4 조건에서의 산적응기(acid adaptation)를 통하여 pH3.3의 조건에서 산저항능을 갖는데, 이와 같은 산저항능은 *S. typhimurium*이 소유한 acid tolerance response(ATR)의 결과로 알려져 있다[8]. ATR의 유지는 약 40개의 산성 pH 충격 단백질(acid shock protein : ASP)들이 관여한다고 알려져 있으나[9], 각 단백질들의 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 다만, 이들 중 RpoS, H-NS, OmpR 등 몇몇 단백질들이 ATR에 필수적이라는 결과만이 알려져 있다[3,5,18]. ATR의 유도는 단순히 산성의 조건에서만 유도되는 것만은 아님이 최근에 밝혀졌는데, 일반적으로 *Salmonella*의 성장단계에서 발생하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 starvation 등의 스트레스에도 ATR은 작동될 수 있다[17]. 따라서 *Salmonella*의 ATR 계는 일종의 통합적 조절계에 의해서 조절됨을 알 수 있다. 즉 *E. coli*, *S. flexneri* 및 *S. typhimurium* 등의 세균들은 성장정지기 단계(stationary phase)에서 산성조건에 대한 저항능이 대수성장기보다 높게 나타내었으며[19], 아울러 대수성장기에서는 관찰되지 않았던 단백질군이 참여한다는 사실을 2차원 단백질 전기영동을 통하여 확인된 바 있다[18]. 따라서 *Salmonella*의 산저항성 반응은 성장단계에 따라서 독특하게 진행된다.

이와 같은 산적응 및 산저항 기전에 관련된 연구 중에서 아직까지 알려지지 않은 분야가 바로 혐기적 환경조건에서의 산저항 반응이다. 지금까지의 ATR 계는 호기적 조건에서 유도되는 현상이며, 이같은 ATR 계가 혐기적 환경에서는 어떻게 유도되는지에 관해서는 전혀 알려져 있지 않았다. 그러므로 본 연구는 대수성장기와 혐기적 조건에서 *Salmonella*의 산적응 및 산저항능을 조사하였으며, 아울러 혐기적 조건에서 산저항유전자를 분리하여 그 특성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양 배지

본 실험에 사용된 세균은 병원성 *Salmonella typhimurium* UK1이며, *S. typhimurium* UK1을 대상으로 MudJ(Km, lacZ) 형질도입을 수행하여 제작된 돌연변이체들과 그 조절관계를 확인하기 위한 조절유전자들은 표 1에 표기되었다. 세균배양을 위한 증균배지는 Luria Bertani(LB)를 사용하였으며, 최소배지(salt glucose, SG)는 Vogel과 Bonner [20]의 E 배지에 최종 농도가 0.4%가 되도록 glucose를 첨가하여 준비하였다. MudJ나 Tn10 삽입 돌연변이 균주 그리고 항생제에 저항능을 소유한 균주들은 ampicillin(50µg/ml), kanamycin(50µg/ml) 및 tetracycline(20µg/ml) 등이 각각 함유된 배지상에서 증균시켰다. 혐기적 배양은 파라핀 오일을 배양액에 증충하는 방법과 anaerobic chamber (5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)를 사용하여 수행하였다.

### 돌연변이체의 준비

돌연변이체 제작은 P22 HT 105/1-int를 이용한 Holly와 Foster[16] 그리고 Aliabadi 등[1,2]의 방법을 변형하여 사용하였다. 준비된 약 30,000개의 MudJ 형질도입체들을 대상으로 sodium acetic acid(10mM, pH4.5)를 처리하여 산민감성 여부를 조사함으로써 산저항성 유전자를 분리하였다(그림 1). 또한 MudJ 인접한 위치에 Tn10을 삽입하거나 MudJ를 Tn10으로 치환하기 위하여 필수적으로 사용되는 돌연변이체들의 mini Tn10tet pool은 Aliabadi 등의 [1,2] 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, transposase 유전자를 갖는 플라스미드 pNK972를 소유한 SF464의 highly transducing phage를 사용하여 MudJ 돌연변이체에 플라

Table 1. Bacterial strains

Strain	Source	Relevant genotype	Reference/Source
SF530(UK1)		virulent	Dr. J. Foster
JF2690	UK1	<i>rpoS::Ap</i>	Dr. J. Foster
LF487	UK1	<i>aatA::MudJ</i>	P22(SF261)×UK1
LF520	UK1	<i>zxx::Tn10</i> of <i>aatA</i> 90.7% linked to <i>aatA</i>	Tn10pool(LF487)×UK1
LF567	UK1	<i>zxx::Tn10</i> 90.7% linked to <i>aatA</i> <sup>+</sup>	P22(LF520)×UK1
SF464	SF1	pNK972 transposase( <i>Ap</i> <sup>r</sup> )	Dr. J. Foster
SF463	SF1	mini Tn10 <i>dtet</i> ( <i>Tet</i> <sup>r</sup> )	Dr. J. Foster

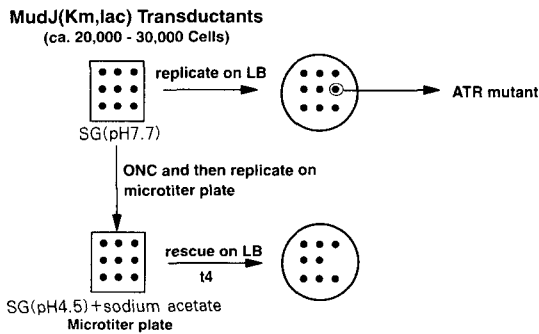


Fig. 1. The screening strategy for isolation of mutants that participated acid tolerance response.

P22-mediated *MudJ*(*Km*, *lacZ*) insertion transductants were cultured in microtiter plates at 37°C for overnight, and then transferred in microtiter plates containing SG minimal media(pH4.5) supplemented with Na-Acetate. After four hours, acid-challenged transductants at pH4.5 were rescued on LB plates. Soild circle mean no growth on LB plate.

스미드를 형질도입시키고, 형질도입된 균주를 mini Tn10-*dtet*을 소유한 SF463의 phage와 형질도입시켜서 생성된 모든 콜로니들을 5ml의 LB 액체배지에 현탁(약 10<sup>10</sup>cell/ml)시켰다. 현탁액 전량을 500ml의 LB 액체배지에 접종하여 1시간 진탕 배양(37°C, 250rpm)하고, 여기에 1ml의 HT SF1 phage 용액을 첨가하여 20시간 진탕 배양하였다. 배양 후 1/100의 농도로 chloroform을 넣고 세균세포들을 파쇄한 다음, 원심분리(3,000rpm, 30min)하여 각 돌연변이체들의 Tn10*dtet* pool을 제조하였다.

유전자의 mapping

*MudJ*가 삽입된 유전좌의 확인은 Tn10이 *MudJ*에 인접된 또는 *MudJ* 내부에 삽입된 균주를 대상으로 Youderian 등[22] 그리고 Benson과 Goldman의[4] 방법을 변형하여 수행하였다. *MudJ*의 인접한 위치에 Tn10이 삽입된 균주의 확보는 각각의 돌연변이체 Tn10 pool과 UK1의 형질도입을 통하여 kanamycin과 tetracycline 모두에 저항성을 소유한 colony들을 선별하고, 선별된 균주들을 대상으로 highly transducing phage를 제조한 다음, 이 phage와 UK1의 형질도입을 수행하여 *MudJ*와 Tn10이 약 70% 이상 연관된 균주를 선택함으로써 이루어졌다. 선별된 *MudJ* 인접 Tn10 또는 *MudJ*내 Tn10 균주를 OD<sub>600nm</sub>=0.2까지 배양하고 배양액 1ml을 원심분리(12,000rpm, 2min)하여 세균세포들을 회수한 다음, 세포들은 E 완충용액으로 3회 세척하고 1ml의 동일한 완충용액에 현탁시켰다. 준비된 현탁액 0.1ml을 Nunn 평판배지(trypton; 10g, yeast extract; 5g, NaCl; 10g, glucose; 2g, chlorotetracycline hydr-ochloride; 0.05g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 10g, fusaric acid(2mg/ml); 6ml, zinc chloride(20uM); 5ml, agar; 15g, dDW; 1L)에 도말하고, *Salmonella* 염색체상에서 약 3min 간격으로 이미 유전좌의 위치가 알려진 *MudP*와 *MudQ* phage들을 약 5~10μl씩 떨어뜨려 Tn10이 *MudP/Q*와 교차된 colony들의 생장을 육안으로 확인하여 유전좌를 결정하였다.

Acid Tolerance Response 조사

분리된 산저항성 돌연변이체들을 대상으로 산에 대한 내성도를 조사하기 위한 acid tolerance response(ATR) 조

사는 Foster와 Hall[8,9]의 방법을 변형하여 사용하였다. Adapted ATR 조사는 SG 최소배지(pH7.7)에서 성장시킨 돌연변이체의 전배양액을 1/300의 농도로 동일한 배지에 접종하여 OD<sub>600nm</sub>=0.2가 되도록 진탕 배양한 다음, inorganic acid를 사용하여 배양액을 pH5.8로 조정하고, 계속 배양하여 OD<sub>600nm</sub>=0.4가 되었을 때, 다시 배양액을 pH3.3으로 조정하고 후 시간별로 생존율을 조사함으로써 수행되었다. 또한 pH4.4에서의 acid shock ATR 조사는 돌연변이체의 SG 최소배지(pH7.7) 전배양액을 1/300의 농도로 동일한 배지에 접종하여 OD<sub>600nm</sub>=0.4가 되도록 진탕 배양한 다음, inorganic acid를 사용하여 pH4.4로 배양액의 pH를 조정하고 1시간 30분동안 재배양한 후, 다시 pH3.3으로 조정하여 시간별로 세균의 생존율을 조사함으로써 측정되었다. Adapted ATR 및 acid shock ATR 조사의 대조군 unadapted 조건은 세균세포들을 OD<sub>600nm</sub>=0.4까지 배양시킨 다음, 배양액을 pH3.3으로 조정하여 시간별로 생존율을 조사함으로써 결정되었다.

Anaerobic Acid Tolerance Response 조사

혐기적 조건에서의 ATR 조사는 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub>의 대기로 조정된 anaerobic chamber(Sheldon Manufacturing, Inc.)에서 수행되었다. 돌연변이 균주의 SG 최소배지(pH8.5) 전배양액을 1/300의 농도로 동일배지에 접종하고 OD<sub>600nm</sub>=0.4에서 배양액을 pH5.8로 조정하고 다음 1시간 30분 동안 재배양하고, 다시 pH4.3으로 조정하여 시간별로 세균의 생존율을 조사함으로써 anaerobic ATR 조사가 수행되었다. 본 실험의 대조군 unadapted는 OD<sub>600nm</sub>=0.4에서 배양액을 pH4.3으로 조정하고 시간별로 생존율을 조사함으로써 결정되었다.

결과 및 고찰

*S. typhimurium*의 anaerobic acid tolerance response

야생형 *S. typhimurium* UK1과 *rpoS*를 대상으로 산저항성 조사를 수행한 결과는 그림 3에 나타나 있다. 그림 3에서 보는 바와 같이, 호기적 조건에서 pH5.8과 pH4.4의 산적응기를 경험한 *S. typhimurium* UK1은 pH3.3의 조건에서 높은 생존능을 보여주었다. 그러나 산적응기를 경험하

지 않은 세균세포들은 pH3.3의 산성조건에 노출된 후 4시간만에 약 10,000배의 생존율 감소를 나타내어, *S. typhimurium*은 pH5.8 및 pH4.4와 같은 약산성 조건에서 산저항능을 생성할 수 있는 능력을 소유하고 있는 세균으로 밝혀졌다. 그러나 산적응기를 경험한 *rpoS* 돌연변이 균주는 야생형 균주에 비하여 4시간 후에 약 10,000배 이상의 생존율 감소를 나타내어, 산저항능이 상실된 것으로 확인되었다. 즉 호기적 조건에서 대수생장기 *Salmonella*의 산저항성 유도는 *rpoS* 의존적 현상이라고 해석될 수 있다. 혐기적 조건에서 산성 pH에 대한 *S. typhimurium*의 반응성은 호기적 조건과는 다른 양태를 보여주었다. 즉, 산적응기 및 산저항도를 조사하기 위한 pH가 호기적 조건과는 달리 산적응의 유도는 pH5.8에서 그리고 산저항도는 pH4.3에서 각각 측정되었다(그림 2). 이와 같은 pH의 상승요인은 SG 최소배지상에서 *S. typhimurium*의 혐기생장시 acetate 및 fumarate 등의 유기산들이 다량 생성되고 [12,21], 따라서 생성된 유기산들이 inorganic acid와 함께 세균의 pH 저항능을 감소시키기 때문으로 해석된다.

RpoS 비의존적 anaerobic acid tolerance response JF2690 *rpoS::Ap*를 대상으로 ATR 조사를 수행한 결과는 그림 3에 나타나 있다. 그림 3에서 보는 바와 같이 호

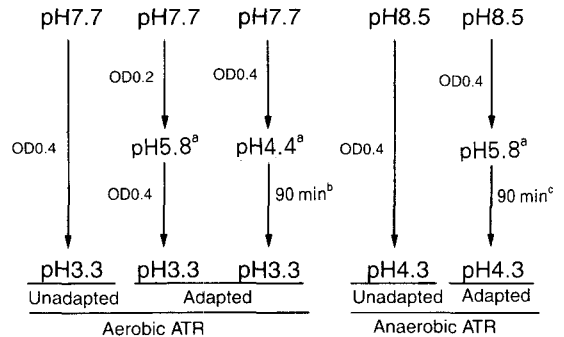


Fig. 2. Schematic representation of acidification tolerance response test.

Cells were grown in SG minimal media(pH7.7 for aerobic ATR or pH8.5 for anaerobic ATR). (a); The pHs of cultures were adjusted pH5.8 or pH4.4 with inorganic acid. (b); For aerobic acid adaptation in pH4.4, cells were incubated in shaking incubator for 90 min. (c); pH-adjusted cells were cultured in anaerobic chamber without shaking for 90 min.

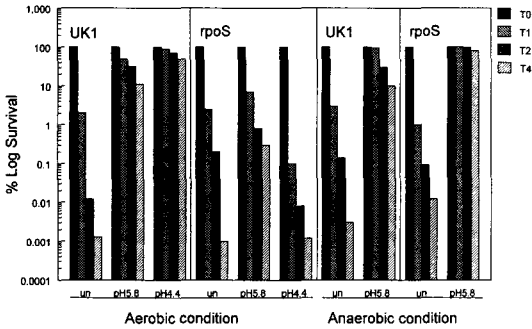


Fig. 3. Log-phase acid tolerance responses of *rpoS* and UK1.

Cells grown to mid log phase in minimal glucose medium were subjected to various adaptation protocols prior to acid challenge at pH3.3 for aerobic or pH4.3 for anaerobic. Unadapted cell cultures were adjusted directly to challenge pHs. Adaptation to pH5.8 in aerobic was allowed to occur for one cell doubling prior to acid challenge. Acid shock adaptations at pH4.4 for aerobic and pH5.8 for anaerobic were conducted for 90min before acid challenge, respectively. The bars represent average percent survival at pH3.3 condition after 0, 1, 2, and 4h(in the case of anaerobic ATR, at pH4.3, after 0, 2, 4, and 6h).

기적 조건과는 달리 혐기적 조건의 pH5.8에서 90분간의 산적응기를 경험한 *rpoS* 돌연변이체는 pH4.4의 산성조건에서 4시간 노출 후에도 약 70%이상의 생존율을 보여주었다. 이와 같은 산저항능은 야생형 *S. typhimurium* UK1과 비교하여 전혀 차이가 나타나지 않는 높은 내성도를 보여준 것이다. 즉 혐기적 조건에서 RpoS는 *Salmonella*의 산적응을 수반하는 산저항 반응에 관여하지 않는 것으로 여겨지며, 이같은 사실은 *S. typhimurium* UK1의 혐기적 acid tolerance response에 고유의 산적응 기전이 존재한다는 것을 의미한다. 호기적 조건의 ATR에서 산 및 oxidative 스트레스는 상호 교차효과가 존재하는 것으로 알려졌는데 [17], 혐기적 조건에서 *rpoS*가 산에 대하여 적응할 수 있었던 가능한 요인들은 세균세포들의 성장에 필수적으로 작용하는 housekeeping sigma factor로써 알려진  $\sigma^{38}$  효과 및 혐기적 생장의 전단계에서 발생하는 유기산들로 비롯되는 산적응 효과 등으로 추정된다. 또한 RpoS는 성장정지기에서 그 발현이 급격히 증가하는 sigma factor로써 알려져 있으며, 더욱이 성장정지기에서 ATR은 *rpoS* 비의존적 산적응 반응으로 해석되었는데 [17], 이와 같은 현상이

본 연구의 *S. typhimurium* UK1의 혐기적 산적응 반응에서 동일하게 관찰되었다. 그러므로 *Salmonella*의 산저항능의 유도는 환경 조건 및 생장조건에 따라서 RpoS 의존적 그리고 RpoS 비의존적 ATR로 구분될 수 있으며, 본 연구를 통하여 혐기적 ATR은 RpoS 비의존적 산적응 기전을 갖는 것으로 확인되었다.

*aatA*의 anaerobic acid tolerance response

P22가 증개하는 *MudJ*(Km, *lacZ*) gene fusion 방법을 이용하여 약 30,000개의 형질도입체들을 얻었고, 이들을 대상으로 그림 1의 돌연변이체 분리방법에 의거하여 산민 감성을 나타내는 *aatA::MudJ*를 분리하였다. 대조구 *S. typhimurium* UK1과 *aatA::MudJ*를 대상으로 산저항성 조사를 수행한 결과는 그림 4에 나타나 있다. 그림 4에서 보는 바와 같이 혐기적 조건에서 *aatA::MudJ* 돌연변이체는 산적응기를 갖는 adapted(pH5.8)와 대조구 unadapted 세균세포들 모두 pH4.3의 산성 조건에 노출된지 2 시간 이후부터 급격한 생존율 감소를 보여주었으며, 6 시간에서는 완전히 사멸되는 결과를 보여주었다. 즉, *aatA*는 혐기적 조건에서 산적응 반응에 필수적으로 관여하는 유전자임이 밝혀졌다. 반면에 호기적 조건에서 *aatA*는 *S. typhimurium* UK1과 유사한 산내성도를 보여주어, 호기적 조건의 산적응 반응에는 관여하지 않는 것으로 확인되었다.

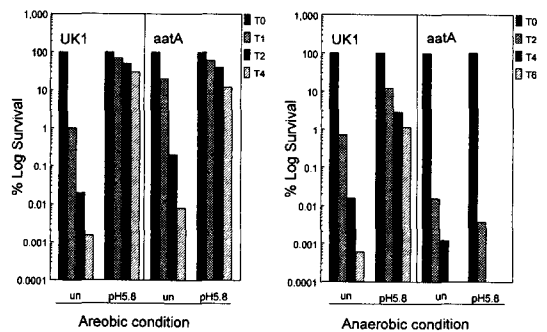


Fig. 4. Log-phase acid tolerance responses of *aatA* and UK1.

In aerobic, adaptation to pH5.8 was allowed to occur for one cell doubling prior to acid challenge at pH3.3. In anaerobic, acid shock adaptation at pH5.8 was conducted for 90min before acid challenge at pH4.3. The bars represent average percent survival at pH4.3 after 0, 2, 4 and 6 hours, respectively.

aatA의 유전자 조사

LF487 aatA::MudJ의 Tn10dtet pool을 이용하여 aatA와 약 90.7% 연관된 위치에 Tn10이 존재하는 LF567 균주를 제작하고, 이 균주의 P22 lysate를 사용하여 염색체상의 aatA<sup>+</sup> 근처에 Tn10만 존재하는 LF520을 얻었다. LF520을 대상으로 MudP/Q rapid mapping을 시도한 결과, Tn10-dtet이 12.0 min의 위치에 존재하는 MudP와 MudQ로 치환되어 Nunn 배지상에서 세균들이 성장되었다. 따라서 aatA의 유전좌는 Salmonella의 physical map 상의 12.0 min에 위치하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리된 aatA는 이미 호기적 조건에서 산적응 반응에 관여한다고 알려진 12.0 min 영역의 유전자들 fur, atrD 및 atrF 등[11]과는 다른 표현형을 소유하고 있기 때문에 기존의 산 내성 유전자들과는 상이한 유전자로 밝혀졌다.

적 요

Salmonella typhimurium은 생활사 동안에 다양한 환경과 접하게 된다. S. typhimurium은 오염된 웅덩이에서 숙주의 phagolysosome에 이르기까지 생태계에 널리 분포하면서 산성 스트레스를 경험하며 또한 생존할 수 있다. Salmonella에서 이와 같은 산저항능은 Acid Tolerance Response (ATR)에 의해 획득된다. 약산의 pH에 적응된 S. typhimurium은 낮은 pH 영역에서 생존할 수 있는 일종의 저항능을 갖게되며, 이런 생존 능력은 복잡한 유전적 유도현상 결과로 해석된다. Salmonella에 있어서 ATR은 RpoS 의존적 그리고 RpoS 비의존적 현상으로 구분되며, 특히 혐기적 조건(5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)에서 rpoS ΔAp는 UK1과 동일한 ATR을 나타내어, 혐기적 조건의 ATR은 RpoS 비의존적인 것으로 판명되었다. P22와 MudJ (Km, lacZ)를 이용한 gene fusion기법과 sodium acetate (pH4.5)를 이용한 돌연변이체 분리방법을 병행하여 산민감성의 형질을 나타내는 LF487 aatA::MudJ를 얻었다. aatA는 Salmonella의 유전자 지도상에서 12min에 위치하는 것으로 조사되었다. aatA는 혐기적 조건(5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)하의 pH4.3 조건에서 야생형 Salmonella에 비해서 매우 높은 산민감성을 보여주었다. 그러므로 aatA는 혐기적 ATR에 있어서 산적응 기전에 관여하는 중요한 유전자로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(1997 002 F00029)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Aliabadi, Z., Warren, F., Mya, S. and Foster, J. W. 1986. Oxygen regulated stimulon of Salmonella typhimurium identified by MudJ(Ap, lacZ) operon fusions. J. Bacteriol. 165, 780.
2. Aliabadi, Z., Park, Y. K., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W. 1998. Novel regulatory loci controlling oxygen and pH regulated gene expression in S. typhimurium. J. Bacteriol. 170, 841.
3. Atlung, T. and Ingmer, H. 1997. H-NS : A modulator of environmentally regulated gene expression. Mol. Microbiol., 24, 7.
4. Benson, M. R. and Goldman, B. S. 1992. Rapid mapping in Salmonella typhi with MudJ-P22 prophages. J. Bacterio. 174, 1673.
5. Bourret, R. B., Bordovich, K. A. and Simon, M. I. 1991. Signal transduction pathways involving proteins phosphorylation in procaryotes. Ann. Rev. Biochem., 60, 401.
6. Fang, F. C., Kruase, M., Roudier, C., Fierer, J. and Guiney, D. G. 1991. Growth regulation of a Salmonella plasmid gene essential for virulence. J. Bacteriol., 173, 6783.
7. Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. and Heffron, R. 1986. Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 5189.
8. Foster, J. W. and Hall, H. K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 172, 771.
9. Foster, J. W. and Hall, H. K. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 173, 5129.
10. Foster, J. W., Park, Y. K., Bang, I. S., Karem, K., Bettes, H., Hall, H. K. and Shaw, E. 1994. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in Salmonella typhimurium. Microbiol., 140, 341.
11. Frederick C. Neidhardt. 1996. Escherichia coli and Salmonella. pp.153, ASM press.

12. Gleister, I. E. and Bauer, S. 1981. Growth of *Escherichia coli* to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1015.
13. Goodson, M. and Rowbury, R. J. 1989. Habituation to normal lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sublethal acid pH value *Appl. Microbiol. Lett.* **8**, 77.
14. Gottesman, S. 1984. Bacterial regulation; Global regulatory networks. *Ann. Rev. Genet.*, **18**, 415.
15. Gordon, J. and Small, P. L. C. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.*, **61**, 364.
16. Holly, E. A. and Foster, J. W. 1982. Bacteriophage P22 as a vector for Mu mutagenesis in *Salmonella typhimurium*; isolation of *nad-lac* and *pnc-lac* gene fusions. *J. of Bacteriol.*, **152**, 959.
17. Lee, I. S., Lim, J., Hall, H. K., Bearson, B. and Foster, J. W. 1995. The Stationary-phase sigma factor Rpos is required for sustained induction of acid tolerance in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **17**, 155.
18. Lee, I. S., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W. 1994. A low-pH-inducible, stationary -phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 1422..
19. Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. and Slonczewski, J. L. 1994. Acid and Base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*; The role of rpoS and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**, 1729.
20. Vogel, H. J. and Bonner, D. M. 1956. Aethylornithase of *Escherichia coli*; partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, **93**, 237.
21. Yee, L. and Blanch, H. W. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *BioTechnology.*, **10**, 1550.
22. Youderian, P., Braier, P., Sugino, K. L., Higgins, N. P. and Elliot, T. 1998. Packaging specific segments of the *Salmonella* chromosome with lacked in Mud- P22 prophages. *Genetic.*, **118**, 581.