

单增李斯特菌生物膜形成调控机制的研究进展

李孟华, 闫帅帅, 李德志, 刘箐

上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093

李孟华, 闫帅帅, 李德志, 等. 单增李斯特菌生物膜形成调控机制的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3151-3161.

Li MH, Yan SS, Li DZ, et al. Advances on the mechanisms regulating the formation of the biofilm of *Listeria monocytogenes*. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3151-3161.

摘要: 单增李斯特菌是一种重要的食源性病原菌。单增李斯特菌的分布和存活与其形成生物膜的能力有关, 生物膜对逆性环境有抵抗力, 细菌会从生物膜中分离导致食品持续性的污染。生物膜的形成、成熟和结构取决于多种外部和内部因素, 并且多种调控机制起着重要作用。文中旨在阐述单增李斯特菌生物膜形成过程中的调控机制(包括胞内作用、胞间作用和种间作用), 以控制食品加工环境中致病性生物膜的形成, 从而为食品安全提供新的干预策略。

关键词: 单增李斯特菌, 生物膜形成, 胞内, 胞间, 种间

Advances on the mechanisms regulating the formation of the biofilm of *Listeria monocytogenes*

Menghua Li, Shuaishuai Yan, Dezhi Li, and Qing Liu

School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract: *Listeria monocytogenes* is an important food-borne pathogen. The distribution and survival of *L. monocytogenes* are related to its ability to form biofilms. Biofilms are resistant to adverse environments, and bacteria separated from the biofilms may lead to persistent food contaminations. The formation, maturation and structure of biofilms depend on a variety of external and internal factors, among which a variety of regulatory mechanisms play important roles. This review summarizes the regulatory mechanisms (including intracellular, intercellular and interspecific interactions) involved in the biofilm formation of *L. monocytogenes* in order to control the biofilm formation in food processing environments, thus providing new intervention strategy for food safety.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm formation, intracellular, intercellular, interspecies

单核细胞增生李斯特氏菌(以下简称单增李斯特菌) (*Listeria monocytogenes*, Lm) 是目前鉴

定出的 17 种李斯特菌中唯一一种对人类有致病性的^[1]。单增李斯特菌属于厚壁菌门李斯特菌属

Received: November 17, 2020; **Accepted:** March 1, 2021

Supported by: Science and Technology Innovation Plan of Shanghai, China (No. 19391902000).

Corresponding author: Qing Liu. Tel/Fax: +86-21-65710368; E-mail: liuq@usst.edu.cn

上海市科技创新行动计划 (No. 19391902000) 资助。

的革兰氏阳性短杆菌，兼性厌氧无芽孢，能够在低温、高盐和低氧条件下生长，可在免疫功能低下的个体中引起严重的李斯特菌病，是重要的食源性病原体之一。尽管发病率较低，但单增李斯特菌能够跨越人体内的关键保护屏障（如肠道、胎盘和血脑），并导致严重疾病（如败血症和脑膜炎）^[2-3]。孕妇、免疫功能低下和其他高危患者易患侵袭性李斯特菌病，并且有着高死亡率（20%–40%）^[4-5]。在美国，大约 20%–65% 的食源性感染死亡病例都是由李斯特菌引起的^[6-8]。

生物膜是由微生物细胞和大量自生的胞外聚合物（Extracellular polymeric substances, EPS）组成的，包括多糖、核酸和蛋白质^[9-10]。与浮游细胞相比，这些被生物膜包裹的细胞群对抗菌剂的敏感性要低得多，多种分子机制导致了生物膜群落特

有的高度顽固性，从而难以清除。在过去几十年中，细菌病原体形成的生物膜引起了人们的广泛关注，主要是由于其潜在的风险，包括抗生素耐药性、持久性和致病性因子的产生（图 1）^[11-12]。生物膜可以是单物种或多物种，但稳定成熟的生物膜的形成总是通过多物种适应进化而来的。大多数对生物膜的研究都是针对单一物种的生物膜，然而生物膜在体内外的形成是一个动态过程，期间面临外界复杂的微生物环境，物种间的相互作用可以影响这些群落的发育、结构和功能^[13-14]。因此，近年来，研究者们将重点转移到多物种生物膜的复杂性和相互作用等方面。随着高通量组学和高分辨率技术的日益成熟，可以根据生物信息学计算、推断并揭示微生物之间复杂的相互作用，包括有生物膜群落中微生物的遗传、代谢物质作用和群体信号感应等^[15-16]。

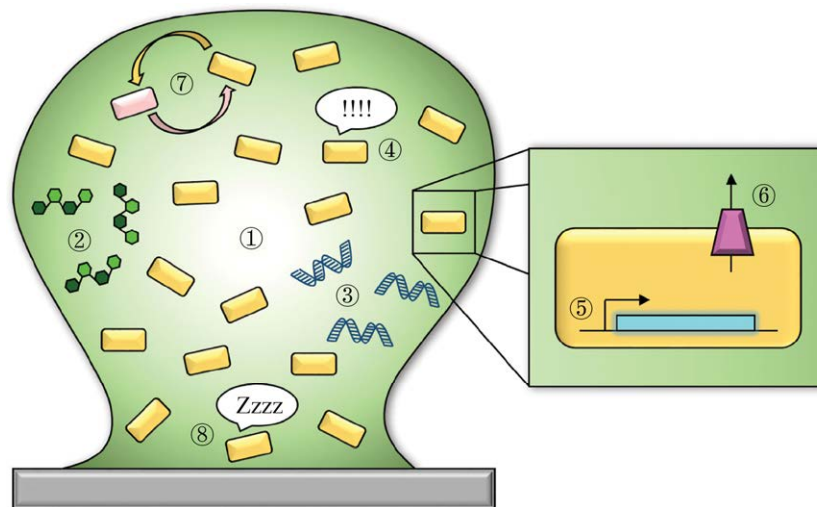


图 1 生物膜介导的细菌主要抗生素耐药性和耐受性机制示意图^[11] (生物膜细胞 (黄色矩阵) 嵌入蘑菇型生物膜 (绿色) 中。生物膜附着在表面 (灰色矩阵) 上, 该表面可以是生物或非生物的。耐药机制的图示编号如下: ① 营养物浓度梯度 (此处用颜色深度表示), 在生物膜的中心营养成分较少; ② 胞外聚合物多糖; ③ 胞外 DNA; ④ 应激反应; ⑤ 通过基因表达降低生物膜敏感性; ⑥ 药物外排泵; ⑦ 细胞间相互作用 (水平基因转移、群体感应和多物种交流等); ⑧ 存留细胞)
Fig. 1 Schematic overview of the major antimicrobial resistance and tolerance mechanisms employed by bacterial biofilms. Biofilm cells (yellow rectangles) are embedded in a mushroom-shaped matrix (shown in green). The biofilm is attached to a surface (grey rectangle), which can be biotic or abiotic. Pictorial representations of the resistance mechanisms are numbered as follows: ① nutrient gradient (demonstrated here as a colour-intensity gradient) with less nutrient availability in the core of the biofilm; ② matrix exopolysaccharides; ③ extracellular DNA; ④ stress responses (oxidative stress response, stringent response, etc.); ⑤ discrete genetic determinants that are specifically expressed in biofilms and whose gene products act to reduce biofilm susceptibility via diverse mechanisms (ndvB, brlR, etc.); ⑥ multidrug efflux pumps; ⑦ intercellular interactions (horizontal gene transfer, quorum sensing, multispecies communication, etc.); ⑧ persister cells.

群落中微生物的多样性导致各种复杂的关系,涉及胞内作用、胞间作用和种间作用。只有不同微生物之间建立起自然平衡,才能实现微生物群落的稳定。胞内作用(例如基因调控)和胞间作用(例如鞭毛、胞外聚合物基质以及群体感应等)可以影响细菌与细菌之间以及细菌与表面之间的附着。生活在生物膜中细菌物种之间的相互作用,大致可分为合作性和竞争性^[17]。例如,通过提供生物膜的形成能力、生产可以被其他物种所利用的营养物质或者通过去除代谢产物从而降低生长速度等实现长久的附着。其中常见的竞争性关系是指细菌间的拮抗作用,它们为了得到更多的氧气、营养源和可用的定植空间,细菌可通过产生一些代谢物,例如细菌素、有机酸、酶等来抑制其他物种的生长^[18]。近些年来,生物膜的形成和消除引起了人们的广泛关注,尤其是在生物膜的去除方面。由于细菌生物膜的调控机制对生物膜的形成、维持和功能有着极其重要的作用,本文旨在更好地了解胞内、胞间和种间作用对单增李斯特菌生物膜形成的调控机制,从而进一步为抑制单增李斯特菌生物膜的形成提供新的策略。

1 胞内作用对单增李斯特菌生物膜形成的影响

胞内作用对生物膜的调控是微观层面的,即基

因水平的调控,目前研究单增李斯特菌生物膜形成相关基因的方法一般是构建基因缺失或部分突变的菌株,基因重组技术的运用极大地促进了生物膜形成相关基因的研究。表1总结了单增李斯特菌生物膜形成过程中相关功能基因。

1.1 PrfA 促进生物膜的形成

PrfA 是一种转录激活因子,可调节大多数与单增李斯特菌毒力有关的基因,包括 *inlA*、*inlB*、*hly*、*plcA*、*plcB* 和 *actA*^[19-20]。PrfA 在细菌指数增长期间和稳定期开始时表达,在宿主体内肠腔中被选择性激活,是单增李斯特菌跨越胃肠道屏障、发挥其致病性的关键基因。此外,有研究发现 PrfA 参与了生物膜的形成, $\Delta prfA$ 的黏附能力及生物膜形成能力显著降低^[21]。Luo 等^[22]进一步利用全基因组微阵列技术,鉴定了与单增李斯特菌生物膜形成相关并且同时和 PrfA 相互作用的基因的表达差异。从转录组分析可以看出,单增李斯特菌 EGDe 菌株中有 21.9% 的基因在生物膜的表达中发生了变化,并且这些基因有着不同的功能类别,说明单增李斯特菌生物膜的形成是由一个复杂的调控网络所控制的,这些调控网络涉及不同生物途径所需的可变基因。通过进一步比较单增李斯特菌 EGDe 及其 $\Delta prfA$ 菌株的生物膜基因表达谱,发现有 185 个基因与 PrfA 和生物膜形成有关。在生物膜

表1 单增李斯特菌生物膜形成过程中相关功能基因/蛋白

Table 1 Functional genes/proteins involved in the biofilm formation of *Listeria monocytogenes*

Regulation types	Related genes/proteins	The roles of biofilm formation
Virulence factors	<i>prfA</i>	Mutants of $\Delta prfA$ have defects in the process of biofilm formation; <i>prfA</i> and other virulence genes under its control, such as <i>hly</i> , <i>mpl</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> and <i>actA</i> , have higher transcription levels at 37 °C
Flagella movement	<i>flaA</i>	The main genes involved in the attachment of <i>L. monocytogenes</i> include genes related to flagella synthesis and movement
EPS synthesis	<i>dltABCD</i>	The <i>dltABCD</i> mutant has a reduced ability to form biofilms
	<i>lmo1386</i>	Metabolism related genes, DNA transferase, can promote the adhesion of some <i>L. monocytogenes</i>
Quorum sensing (QS)	<i>LuxS</i>	Participate in the synthesis of autoinducin AI-2, negatively regulate <i>L. monocytogenes</i> biofilm
	<i>Agr</i>	The <i>Agr</i> operon can regulate the expression of virulence factors and positively regulate the formation of <i>L. monocytogenes</i> biofilm
Stress-response factor	<i>sigB</i>	$\Delta sigB$ mutant strain has reduced biofilm formation ability

形成过程中,除 10 个基因外,其余 175 个基因的转录水平与野生型完全相反,即 $\Delta prfA$ 中表达上调的基因在野生型菌株中下调,反之亦然,这表明 $prfA$ 的缺失显著改变了单增李斯特菌生物膜的基因表达模式,导致生物膜形成能力的降低。

1.2 ActA 促进生物膜的形成

自 1992 年以来,研究者们相继提出了 ActA 对单增李斯特菌运动的重要作用陆续被报道,例如基于肌动蛋白的运动和细胞间扩散的分子机制^[23-24],以及吞噬体逃逸和避免自噬等描述^[25-27]。随后 Travier 等^[28]的研究证明了 ActA 这种细菌表面蛋白是单增李斯特菌最关键、最具特征的毒力因子之一,能够在体外和体内介导单增李斯特菌的聚集和生物膜的形成,并在肠腔长期定植。同时该研究发现, $\Delta prfA$ 和 $\Delta actA$ 缺失突变体的聚集和生物膜表型是无法区别的,这表明 $actA$ 是主要的 PrfA 调控基因,解释了单增李斯特菌的聚集和生物膜形成对 PrfA 有依赖性。实际上, ActA 包含的大量带电氨基酸对肌动蛋白的聚合至关重要。ActA 通过直接 ActA-ActA 相互作用介导单增李斯特菌聚集从而促进其细胞的运动性和细胞间扩散,并且说明了 ActA 除了有助于其在宿主中的传播外,还对宿主中单增李斯特菌的持久性以及从宿主向环境的传播中起关键作用,这对于细菌聚集和生物膜形成至关重要^[20]。

1.3 SecA2 (分泌) 途径失活促进生物膜的形成

单增李斯特菌生物膜结构具有多样性,例如片层、蜂窝状、蘑菇状^[29-30], Renier 等^[31]揭示了一种新型的单增李斯特菌生物膜结构。单增李斯特菌中 SecA2 蛋白输出途径的失活导致粘附力降低,并形成了具有中空结构的丝状生物膜,它比野生型生物膜更粗糙、更厚,并且不均匀地定植在表面。这种形态变化主要是由于两种依赖于单增李斯特菌中 SecA2 (分泌) 途径的细胞壁水解酶减少。与野生型菌株相比, SecA2 途径的失活影响了广泛的细胞聚集和沉淀。虽然有多种蛋白

质的分泌依赖于 SecA2,但单增李斯特菌 SecA2 的这种表型变化主要归因于细胞外细胞壁水解酶 CwhA 和 MurA,同时删除 CwhA 和 MurA 会导致菌落形态粗糙。在室温下, SecA2 蛋白输出途径的失活导致细胞伸长,减少运动性并促进聚集和细胞沉降,进而促进无柄生长。这种表型变化为单增李斯特菌在环境条件下的表面定植提供了决定性的优势。

1.4 应激反应基因影响生物膜的形成

$sigB$ 是单增李斯特菌重要的调控基因,主要负责调控单增李斯特菌在不利环境中的抗逆反应,如针对高渗透压、强酸碱条件下的生理代谢。研究表明转录因子 $sigB$ 参与了单增李斯特菌在低温环境下的适应过程并促进生物膜的形成^[32-33]。但笔者团队的研究^[34]表明 $sigB$ 基因缺失使生物膜形成能力增加,其生物膜粘附面积大、长时间培养不易脱落、裂解,且在 pH 5.0 的条件下生物膜形成能力上升最为明显。当 $sigB$ 基因缺失菌株呈现出生物膜形成能力上升时,可以检测到编码鞭毛相关蛋白的基因有显著的表达上调;毒力基因的表达水平也受到了 $sigB$ 基因缺失的影响,具体体现在侵袭细胞能力的变化上。 $sigB$ 与重要的毒力调节因子 PrfA 关系密切,而前文阐述过 $\Delta prfA$ 的突变体在生物膜的形成过程中存在缺陷。 $sigB$ 在单增李斯特菌环境适应和生物膜形成过程中具有重要的作用。

2 胞外作用对单增李斯特菌生物膜形成的影响

生物膜的形成是一个复杂的过程,涉及多种信号通路。其中细菌黏附因子(鞭毛)、胞外聚合物基质和群体感应可以影响细菌与细菌之间以及细菌与表面之间的附着。

2.1 鞭毛促进生物膜的初始形成

常见的细菌附着表面不仅受细胞表面特性的影响,还受到鞭毛和菌毛等特殊表面附属物的影响。鞭毛是细菌的运动器官,主要介导细菌的运

动、粘附和趋化,帮助细菌附着于生物或非生物表面并迁移到营养丰富的位置^[35-37],运动性不仅是影响细菌致病性的因素之一,还影响生物膜的形成。单增李斯特菌是一种周身鞭毛细菌,可产生4-6个鞭毛,但是依赖于鞭毛的运动性受温度的限制,因为鞭毛运动性基因(包括编码鞭毛蛋白的*flaA*)在37℃时转录下调^[38]。虽然鞭毛对许多细菌生物膜的形成很重要,但是鞭毛对单增李斯特菌生物膜形成的作用颇有争议。有研究表明^[39]鞭毛对单增李斯特菌的作用取决于环境的影响,尤其是生长介质、pH和温度,以及静态和动态条件。O'Neil等^[40]研究表明,鞭毛起不到粘附素的作用,不能增强单增李斯特菌与靶细胞的粘附,而是通过鞭毛的运动性使细菌实现快速定殖和侵染,并且这种作用似乎只出现在表面附着的初始阶段^[41-43]。与此结论一致的是,无鞭毛或者非运动性单增李斯特菌突变体的初始附着均受损^[44]。

2.2 胞外聚合物促进细菌的附着

分泌聚合物是生物膜的一个重要特征。细胞通常会分泌并嵌入由多糖、少量蛋白质和DNA组成的EPS基质中。EPS是促进细菌附着在介质表面并提高其对逆性环境耐受性的常见成分之一,不能产生EPS的突变体通常在生物膜形成方面存在缺陷。然而,单增李斯特菌合成EPS的能力仍然存在争议^[45]。有研究针对单增李斯特菌的c-di-GMP信号通路的关键成分和主要靶点进行了表征,确定了一种新的c-di-GMP诱导的胞外多糖,该多糖具有抑制运动、细胞聚集和增强对逆性环境的耐受性的作用,但是未发现该多糖可以促进非生物表面上生物膜的形成。单增李斯特菌EPS的组成很难预测,因为一些胞外多糖合成蛋白与某种纤维素合成酶的组分相似,并且该纤维素合成酶能促进生物膜的形成^[46]。破坏EPS基质是消除和预防生物膜的有效途径。例如,eDNA广泛存在于多种生物膜中,DNase治疗被认为是控制生物膜相关感染的一种方法。Harmsen等^[47]

的研究表明,在单增李斯特菌中,eDNA可能是生物膜基质的唯一核心成分,并且对于初始附着和早期生物膜形成都是必需的。DNase I处理不仅在微量滴定板测定中导致生物膜分散,而且在流通池生物膜测定中也会造成生物膜的分散。Nguyen等^[48]也提出类似的观点,在生物膜形成过程中添加DNase I可减少聚苯乙烯的附着。Chang等^[49]进一步假定是DNA转移酶(*lmo1386*)将DNA运出细胞外,产生eDNA,从而在生物膜的形成中起作用。但事实上在单增李斯特菌中并非如此,DNA转移酶突变体仍然对DNase I敏感,且野生型和突变型细胞周围都有eDNA,但*lmo1386*突变体的初始粘附能力降低,证明是这种假定的DNA转移酶基因的破坏影响了单增李斯特菌在非生物表面上的生物膜形成。

2.3 群体感应对单增李斯特菌生物膜的影响

许多细菌通过一种称为群体感应(Quorum sensing, QS)的机制来调节它们的合作活动和生理过程。在这种机制中,细菌细胞通过释放、感知和响应可扩散的小分子信号来相互交流。细菌基于群体感应进行交流和反应的能力,有利于细菌在宿主定植、形成生物膜、抵御竞争对手和适应不断变化的环境^[50]。在细菌中,许多重要基因表达变化的调节是通过QS细胞之间的信号系统介导的^[51]。已有研究表明,单增李斯特菌有2种QS系统:(1)在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中均广泛存在的autoinducer-2(AI2)信号系统;(2)由肽介导的只在革兰氏阳性菌之间进行的Agr信号系统。在革兰氏阳性菌和阴性菌中,最广泛的QS信号是AI2,这是一种由LuxS产生的信号分子,LuxS是一种在许多细菌物种中发现的酶,因此AI2被认为能够促进种间交流。在一些致病细菌中,发现LuxS参与生物膜形成^[52-53],特别是对单增李斯特菌, $\Delta luxS$ 突变体显著地促进了生物膜的形成^[54]。利用QS抑制剂干扰群体信号如AI-2干扰QS信号,被认为是一种有前途的病原体控

制方式^[55]。有研究创建 *argD* 缺失突变体 (假定的群体感应肽的结构基因) 来分析单增李斯特菌 Agr 肽感应系统。 $\Delta agrD$ 突变体显示出明显的生物膜减少, 这一缺陷可以通过遗传或物理回补来修复。对于 $\Delta agrD$ 突变体, 细胞中 InlA 的水平降低, 同时观察到 Caco-2 肠上皮细胞的侵袭减少, 而 THP-1 巨噬细胞的吞噬作用不受影响。另外, 毒力基因 (*hlyA*、*actA*、*plcA*、*prfA* 和 *inlA*) 的表达受到影响, 导致 $\Delta agrD$ 突变体的毒力响应受损^[56], 这与前文所述部分毒力基因会影响生物膜形成的观点一致。

3 种间作用对单增李斯特菌生物膜形成的影响

在食品加工环境中, 有多种不同的微生物附着在食品或器械表面, 其中细菌存活、生长并形成固着生物膜群落^[57-58]。物种间的空间和代谢相互作用有助于多物种生物膜组织和动态局部环境的产生^[59-60]。混合生物膜通常比单物种生物膜更厚、更稳定, 而不同物种之间的细胞的相互作用和交流的能力已被证明在宿主定植、生物膜形成、抵御竞争对手以及适应不断变化的环境等方面起着关键作用^[61-62]。这种生物膜厚度的增加可能是由于生物膜内一个物种增强另一个物种稳定性的结果^[63-64]。

3.1 重要食源性细菌病原体生物膜内物种间的相互作用

食品加工环境中的浮游单增李斯特菌细胞在粘附过程中很可能会遇到驻留的生物膜, 而不是粗糙的固体表面。据研究, 其他细菌物种 (包括假单胞菌和黄杆菌属) 的预先存在会提高表面单增李斯特菌的数量以及细胞对消毒剂的抵抗^[65], 据推测这种现象可能是由于初始定植物种产生了更多的胞外多糖, 单增李斯特菌细胞被掺入胞外多糖基质中, 从而增加其附着量^[66]。在 Giaouris 等^[67]的研究中, 单增李斯特菌与恶臭假单胞菌共

培养后, 形成的双物种生物膜显著增加。该作者推测恶臭假单胞菌产生多种细胞外聚合 (例如纤维素、藻酸盐和胞外多糖) 促进共培养细菌在表面上形成强大的生物膜群落。相反, 在与莓实假单胞菌的共培养后, 单增李斯特菌形成的生物膜减少了^[68]。与各种革兰氏阴性菌 (包括沙雷氏菌、气单胞菌和荧光假单胞菌) 的共培养显示出相似的减少。此外, 在湿度较低的环境中, 经常会出现葡萄球菌和其他革兰氏阳性菌。在有预先存在葡萄球菌的干燥环境中共培养表现出单增李斯特菌生物膜的减少, 推测是营养竞争和葡萄球菌生物膜产生的胞外多糖阻止单增李斯特菌的粘附以及改变单增李斯特菌浮游细胞和生物膜之间存在的平衡造成的^[69]。

3.2 乳酸菌抑制单增李斯特菌生物膜的生长

有益的功能细菌 (例如乳酸菌) 形成的细菌生物膜能够通过竞争作用或者合成有机酸和细菌素来抑制单增李斯特菌的生长。病原体与其环境之间的相互作用 (与常住物种的相互作用、营养物质的竞争、pH 值、水活性、温度以及清洁和消毒程序) 控制着固定在表面病原体的长期沉降和持久性。研究表明, 天然的“保护性”生物膜可以抑制单增李斯特菌的发育, 并且营养竞争已被证明是抑制病原体生长的主要机制^[70-71]。同时, 研究表明抗菌剂 (细菌素、酸和过氧化氢) 的产生对这种相互作用也很重要^[72-73]。例如, 有研究证明乳酸乳球菌通过竞争排斥或细菌素的产生对控制食品加工表面上的单增李斯特菌的生长是非常有效的^[74-76]。乳酸杆菌是人类和动物肠道菌群中的优势菌种。Woo 等^[77]研究了益生菌和病原菌的自聚集和粘附特性 (疏水性、电子供体和电子受体特性), 发现益生菌通过竞争、排斥和置换等机制有效地抑制了单增李斯特菌的生物膜形成。Minei 等^[78]评估了乳酸链球菌素对培养于 BHI 肉汤和不锈钢表面的单增李斯特菌的生物膜形成的影响。结果表明, 在乳链菌肽存在的情况下, 单

增李斯特菌细胞显著减少,但是在 24 h 后检测到新的生物膜的形成。

3.3 肠道菌群及代谢物对单增李斯特菌生物膜的影响

单增李斯特菌被健康人群摄入体内后,会造成腹泻等症状,但很难穿过肠道屏障入侵至宿主体内,其中肠道菌群在抵御单增李斯特菌入侵过程中起到了重要作用^[79]。Becattini 等^[80]将人和小鼠粪便中分离的厚壁菌门下的梭状芽孢杆菌目共生菌群接种于无菌 (Germfree, GF) 小鼠体内,与对照组相比,接种后的 GF 小鼠体内单增李斯特菌的感染数量显著降低。在这之前,曾有研究^[81]利用梭菌目和拟杆菌属中两个选定的细菌菌株保护 GF 小鼠免受单增李斯特菌的感染,但两个选定的共生细菌菌株并不能有效地代替肠道菌群为宿主提供完全保护。这些研究证明了肠道菌群在抵御单增李斯特菌感染中发挥着重要作用,但其作用机制尚不清楚。随后笔者团队研究发现,在厌氧条件下,小鼠肠道菌群和肠道代谢物分别能够抑制单增李斯特菌 EGDe 菌株生物膜的形成和在生物膜形成后消除生物膜。在有氧条件下,肠道菌群无法抑制 EGDe 生物膜形成,可能是由于有氧环境下肠道菌群大部分细菌无法存活,部分在有氧环境中能够生长的菌如大肠杆菌等大量繁殖并自身产生生物膜,同时菌群失衡也破坏了肠道菌群抑制 EGDe 生物膜形成的能力。另外,肠道菌群营养竞争抑制单增李斯特菌生长的同时也在一定程度上抑制了生物膜的形成。

4 展望

单增李斯特菌是一种环境病原体,在外部环境腐生的同时依然能够保持对哺乳动物细胞的侵袭能力^[82]。单增李斯特菌能形成生物膜,从而大大提高其对恶劣环境条件的抵抗力,尤其是对清洁和消毒处理的抵抗力。在实际环境中,单增李斯特菌往往以多物种菌株状态形成混合生物膜而

存在,并且胞内、胞间和种间作用都起着重要作用^[83]。因此,研究各种条件下单增李斯特菌生物膜的形成和消除机制对于食品加工中微生物的控制与食品安全具有重要意义。

在此领域的深入研究,将来可从以几个方面开展:(1) 现有研究表明胞内、胞间和种间作用对单增李斯特菌生物膜都起着重要作用,但它们的确切机理和各自的潜在机制并没有被足够清晰地表征。可以通过多组学联合分析,以更好地理解复杂的生物膜结构。例如,比较单物种和多物种的转录组、代谢组和蛋白质组,分析鉴定出受其他物种影响的基因和蛋白质,揭示出合作性共存的潜在机理。(2) 食品工业中倾向于将重点放在病原微生物的检测和控制上,例如沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌等。但是,食品加工环境中的大多数微生物是非致病性的。生物膜中病原微生物的生存可能会受到其他类型微生物的影响,因此,需要深入探究生物膜中群落的组成以及这些群落对病原微生物的存活和生长的作用。(3) 对于生物膜形成相关基因的研究,还应该深入研究多个基因之间的协同作用,以及对基因编码蛋白的生理功能研究,使单增李斯特菌的生物膜形成调控分子机制和作用通路更加明确,并探究单增李斯特菌的各种生理代谢途径与抗逆反应之间的关系。(4) 生物膜的形成增强了对抗菌剂的抵抗力,并且当多种细菌共存于生物膜时,通常抗性会增强,这种协同的保护作用可以使细菌耐受更高浓度的杀菌剂。因此,需要有控制它们的新策略,例如通过靶向细胞外基质或增加细菌对抗菌药物的敏感性使生物膜分散。eDNA 存在于大多数生物膜基质中,可作为靶标,eDNA 的酶促降解可以抑制、分散生物膜以及增强对抗菌剂的敏感性。此外,QS 抑制剂(例如卤代咪喃酮和酰化酶)也可以抑制生物膜的发育。尽管这类化合物具有影响单物种生物膜形成和致病性的能力,但是它们对多物种生物膜的影响仍未得到充分探索。

REFERENCES

- [1] Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(12): 5273-5287.
- [2] Jones D. Foodborne listeriosis. *Lancet*, 1990, 336(8724): 1171-1174.
- [3] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(1): 32-46.
- [4] Xie MM, Ding CC, Guo L, et al. Evaluation of Caco-2 cells response to *Listeria monocytogenes* virulence factors by RT-PCR. *Microb Pathog*, 2018, 120: 79-84.
- [5] Bortolussi R. Listeriosis: a primer. *Canad Med Associat J*, 2008, 179(8): 795-797.
- [6] Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2008. *MMWR Surveill Summ*, 2013, 62(2): 1-34.
- [7] Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ*, 2018, 67(10): 1-11.
- [8] Lee BH, Cole S, Badel-Berchoux S, et al. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2698.
- [9] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(2): 95-108.
- [10] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann Rev Microbiol*, 2002, 56: 187-209.
- [11] Hall CW, Thien-Fah M. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(3): 276-301.
- [12] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 2001, 358(9276): 135-138.
- [13] Yang L, Liu Y, Wu H, et al. Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci*, 2011, 3(2): 74-81.
- [14] Jahid IK, Ha SD. The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. *Comprehens Rev Food Sci Food Saf*, 2014, 13(5): 990-1011.
- [15] McLean RJC, Kakirde KS. Enhancing metagenomics investigations of microbial interactions with biofilm technology. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 22246-22257.
- [16] Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, et al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65(2): 183-195.
- [17] Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33(1): 206-224.
- [18] Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(5): 972-989.
- [19] De Las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK, et al. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(2): 118-127.
- [20] Travier L, Guadagnini S, Gouin E, et al. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog*, 2013, 9(1): e1003131.
- [21] Zhou QC, Feng FF, Wang L, et al. Virulence regulator PrfA is essential for biofilm formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. *Curr Microbiol*, 2011, 63(2): 186-192.
- [22] Luo Q, Shang JL, Feng XQ, et al. PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol*, 2013, 67(3): 372-378.
- [23] Kocks C, Gouin E, Tabouret M, et al. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell*, 1992, 68(3): 521-531.
- [24] Domann E, Wehland J, Rohde M, et al. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J*, 1992, 11(5): 1981-1990.

- [25] Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ. Actin polymerization is induced by Arp 2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 1997, 385(6613): 265-269.
- [26] Van Troys M, Lambrechts A, David V, et al. The actin propulsive machinery: the proteome of *Listeria monocytogenes* tails. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(2): 194-199.
- [27] Welch MD, Way M. Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(3): 242-255.
- [28] Travier L, Lecuit M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 17: 53-60.
- [29] Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, et al. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 728-737.
- [30] Rieu A, Briandet R, Habimana O, et al. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(14): 4491-4497.
- [31] Renier S, Chagnot C, Deschamps J, et al. Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition. *Environ Microbiol*, 2014, 16(4): 1176-1192.
- [32] Hu YW, Oliver HF, Raengpradub S, et al. Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and σ^B in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(24): 7981-7991.
- [33] Zhou QC, Wang L, Yin XJ, et al. SigB-dependent tolerance to protein synthesis-inhibiting antibiotics in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Curr Microbiol*, 2012, 64(3): 234-241.
- [34] Chen GW, Liu WK, Ding CC, et al. Construction of attenuated *Listeria monocytogenes* strain EGD-e-sigB and preliminary identification of biological activity of sigB. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(09): 102-108 (in Chinese).
陈国薇, 刘武康, 丁承超, 等. 单增李斯特菌(EGD-e)sigB 基因缺失株的构建及其生物特性的初步鉴定. *现代食品科技*, 2017, 33(09): 102-108.
- [35] Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol*, 2007, 189(12): 4418-4424.
- [36] Hölscher T, Bartels B, Lin YC, et al. Motility, chemotaxis and aerotaxis contribute to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development. *J Mol Biol*, 2015, 427(23): 3695-3708.
- [37] Gründling A, Burrack LS, Bouwer HGA, et al. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12318-12323.
- [38] Tresse O, Lebreton V, Benezech T, et al. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *J Appl Microbiol*, 2006, 101(1): 53-62.
- [39] Kamp H D, Higgins D E. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*, 2011, 7(8): e1002153.
- [40] O'Neil HS, Marquis H. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infect Immun*, 2006, 74(12): 6675-6681.
- [41] Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, et al. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(2): 860-863.
- [42] Gorski L, Duhé JM, Flaherty D. The use of flagella and motility for plant colonization and fitness by different strains of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5142.
- [43] Kumar S, Parvathi A, George J, et al. A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(3): 527-531.
- [44] Todhanakasem T, Young GM. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol*, 2008, 190(17): 6030-6034.
- [45] Hoelzer K, Pouillot R, Dennis S. *Listeria monocytogenes* growth dynamics on produce: a

- review of the available data for predictive modeling. *Foodborne Pathog Dis*, 2012, 9(7): 661-673.
- [46] Chen LH, Köseoğlu VK, Güvener ZT, et al. Cyclic di-GMP-dependent signaling pathways in the pathogenic Firmicute *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*, 2014, 10(8): e1004301.
- [47] Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(7): 2271-2279.
- [48] Nguyen UT, Burrows LL. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol*, 2014, 187: 26-32.
- [49] Chang YH, Gu WM, Zhang FJ, et al. Disruption of *lmo1386*, a putative DNA translocase gene, affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* on abiotic surfaces. *Int J Food Microbiol*, 2013, 161(3): 158-163.
- [50] Guo L, Zhang C, Chen GW, et al. Reactive oxygen species inhibit biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog*, 2019, 127: 183-189.
- [51] Swift S, Downie JA, Whitehead NA, et al. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol*, 2001, 45: 199-270.
- [52] Cole SP, Harwood J, Lee R, et al. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 2004, 186(10): 3124-3132.
- [53] Daines DA, Bothwell M, Furrer J, et al. *Haemophilus influenzae luxS* mutants form a biofilm and have increased virulence. *Microb Pathog*, 2005, 39(3): 87-96.
- [54] Sela S, Frank S, Belausov E, et al. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(8): 5653-5658.
- [55] Grandclément C, Tannières M, Moréra S, et al. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40(1): 86-116.
- [56] Riedel CU, Monk IR, Casey PG, et al. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 2009, 71(5): 1177-1189.
- [57] Carpentier B, Chassaing D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int J Food Microbiol*, 2004, 97(2): 111-122.
- [58] Bagge-Ravn D, Ng Y, Hjelm M, et al. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int J Food Microbiol*, 2003, 87(3): 239-250.
- [59] Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol*, 2000, 40(2): 75-84.
- [60] Remis JP, Costerton JW, Auer M. Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. *ISME J*, 2010, 4(9): 1085-1087.
- [61] Burmølle M, Webb JS, Rao D, et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 3916-3923.
- [62] Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, et al. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(8): 2586-2595.
- [63] James GA, Beaudette L, Costerton JW. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1995, 15(4): 257-262.
- [64] Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(3): 255-261.
- [65] Bremer PJ, Monk I, Osborne CM. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *J Food Prot*, 2001, 64(9): 1369-1376.
- [66] Sasahara KC, Zottola EA. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *J Food Prot*, 1993, 56(12): 1022-1028.
- [67] Giaouris E, Chorianopoulos N, Doulgeraki A, et al.

- Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. PLoS ONE, 2013, 8(10): e77276.
- [68] Norwood DE, Gilmour A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. Lett Appl Microbiol, 2001, 33(4): 320-324.
- [69] Leriche V, Carpentier B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. J Appl Microbiol, 2000, 88(4): 594-605.
- [70] Gnanou BN, Beaufort A, Rudelle S, et al. Evaluation of an enumeration method for *Listeria monocytogenes* at low contamination levels in cold-smoked salmon. Int J Food Microbiol, 2008, 124(3): 271-274.
- [71] Guillier L, Stahl V, Hezard B, et al. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. Int J Food Microbiol, 2008, 128(1): 51-57.
- [72] Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. Curr Protein Pept Sci, 2005, 6(1): 61-75.
- [73] Gálvez A, Abriouel H, López RL, et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol, 2007, 120(1/2): 51-70.
- [74] Liu L, O'Conner P, Cotter PD, et al. Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. J Appl Microbiol, 2008, 104(4): 1059-1066.
- [75] Zhao T, Doyle MP, Zhao P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(7): 3996-4003.
- [76] Leriche V, Chassaing D, Carpentier B. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. Int J Food Microbiol, 1999, 51(2/3): 169-182.
- [77] Woo J, Ahn J. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol, 2013, 56(4): 307-313.
- [78] Minei CC, Gomes BC, Ratti RP, et al. Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. J Food Prot, 2008, 71(3): 634-638.
- [79] Green BT, Brown DR. Interactions between bacteria and the gut mucosa: do enteric neurotransmitters acting on the mucosal epithelium influence intestinal colonization or infection?//Lyte M. Microbial endocrinology: interkingdom signaling in infectious disease and health. Cham: Springer, 2016, 874: 121-141.
- [80] Becattini S, Littmann ER, Carter RA, et al. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. J Exp Med, 2017, 214(7): 1973-1989.
- [81] Nikitas G, Deschamps C, Disson O, et al. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. J Exp Med, 2011, 208(11): 2263-2277.
- [82] Xayarath B, Freitag NE. Optimizing the balance between host and environmental survival skills: lessons learned from *Listeria monocytogenes*. Fut Microbiol, 2012, 7(7): 839-852.
- [83] Renier S, Hébraud M, Desvaux M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic gram-positive foodborne pathogen. Environ Microbiol, 2011, 13(4): 835-850.

(本文责编 郝丽芳)