

## 不同培养条件下 *sigB* 对单增李斯特菌生物被膜形成的影响

付娇娇<sup>1</sup>, 王旭<sup>1</sup>, 刘海泉<sup>1</sup>, 孙晓红<sup>1,2,3</sup>, 谢晶<sup>1,2,3</sup>, 潘迎捷<sup>1,2,3</sup>,  
赵勇<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

**摘要:** 本研究比较分析了不同温度(4、15、25 和 37 °C)、pH(4、5、6 和 7)及 NaCl 浓度(0.5%、2.5%、4.5% 和 6.5%)对单增李斯特菌野生型菌株(*WaxI2*)及 *sigB* 缺失突变型菌株(*WaxI2-ΔsigB*)生物被膜形成能力的影响。结果表明,相比于 *WaxI2* 菌株,*WaxI2-ΔsigB* 菌株生物被膜的形成量显著降低( $P < 0.05$ )。变异系数分析显示,不同培养条件对 *WaxI2* 菌株及 *WaxI2-ΔsigB* 菌株生物被膜形成能力均有影响,其中温度的影响最大,NaCl 浓度次之,pH 最弱;且 *WaxI2-ΔsigB* 菌株生物被膜形成能力更易受到培养条件的影响。其次,分别选取了 *WaxI2* 菌株与 *WaxI2-ΔsigB* 菌株生物被膜形成量差异最显著的培养条件(37 °C、pH 6 及 2.5% NaCl)进行后续分析。结果发现 *WaxI2-ΔsigB* 菌株胞外多糖及胞外蛋白的相对含量均显著降低( $P < 0.05$ ),而其活菌数略有降低。本研究为深入探讨 *sigB* 参与单增李斯特菌生物被膜形成的分子机制提供科学依据。

**关键词:** 单增李斯特菌; 生物被膜; *sigB*

**中图分类号:** TS 201.3      **文献标志码:** A

细菌生物被膜(biofilm)是无柄微生物群落在各种载体上的附着,通过分泌多糖、纤维蛋白、脂蛋白等胞外基质,将其自身包绕其中而形成的大量高度组织化、系统化的膜样聚合物<sup>[1]</sup>。在细菌生物被膜的保护下,细菌可以增强自身对抗生素、环境压力及宿主免疫系统攻击的耐受能力。DAVIES<sup>[2]</sup>研究发现成膜后的细菌,其对化学试剂的敏感程度只有浮游菌的 1/10 ~ 1/1 000。由于膜状态的细菌耐受性增强,使得常规杀菌方法不能有效彻底地灭菌,给食品安全造成极大的隐患。生物被膜内的细菌表面附着由自身分泌产生的胞外多聚物(extracellular polymeric substances, EPS),既能增强微生物细胞对外界环境的抵抗能力,又是影响生物被膜稳定的关键因素<sup>[3]</sup>。胞外多糖是 EPS 主要组成成分之一, DANESE 等<sup>[4]</sup>研究发现对不能合成胞外多糖的

突变体纯菌属只能形成短暂的小菌落,难以形成成熟稳定的生物被膜。此外,EPS 中胞外蛋白在生物被膜形成及稳定阶段也起着重要的作用,JOHANSSON 等<sup>[5]</sup>研究表明海藻结合型胞外蛋白是假单胞菌生物被膜形成及稳定的必要组成部分。

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种人畜共患病食源性致病菌,可引发败血症、胃肠炎和脑膜炎等疾病,病死率高达 20% ~ 30%,被 WHO 列为关系食品卫生安全的重要病原细菌之一<sup>[6]</sup>。LM 能广泛存在于土壤、污水、动物性食品及饲草等环境中,这与其内部环境调节因子  $\sigma$  家族有密切关系<sup>[7]</sup>。其中  $\sigma$  家族中的  $\sigma^B$  因子是最重要的环境调控因子; $\sigma^B$  由 *sigB* 基因编码,可使 LM 在多种逆境下生存,并且较快地适应外界环境<sup>[8]</sup>。张强<sup>[9]</sup>、STIJN 和 TJAKKO<sup>[10]</sup>等

收稿日期: 2015-12-07      修回日期: 2016-02-27

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(31271870, 31571917); 国家科技支撑计划(2015BAD17B01); 上海市科委计划项目(14DZ1205100, 14320502100); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2014 第 3-5 号, 2015 第 4-8 号); 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心(11DZ2280300)

**作者简介:** 付娇娇(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全风险评估。E-mail: shallwe1234@163.com

**通信作者:** 赵勇, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

研究表明 *sigB* 参与 LM 生物被膜的形成,但其具体的分子机制尚未见完整报道。本研究首先利用结晶紫染色法比较分析了不同温度(4、15、25 和 37 °C)、pH(4、5、6 和 7)及 NaCl 浓度(0.5 %、2.5 %、4.5 % 和 6.5 %) 对 LM 野生型菌株 (*WaX12*) 与 *sigB* 缺失突变型菌株 (*WaX12-ΔsigB*) 生物被膜形成能力的影响。其次,为进一步揭示 *sigB* 影响单增李斯特菌生物被膜形成的初步机制,比较了 *WaX12* 菌株与 *WaX12-ΔsigB* 菌株生物被膜活菌数、胞外多糖及胞外蛋白形成的差异,从而为深入研究 *sigB* 影响 LM 生物被膜形成的途径和分子机制提供新的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

单核细胞增生李斯特菌野生型菌株 *WaX12* 由本实验室于生猪肉中分离而得,血清型为 4b,经过形态学分析、生化特性以及分子生物学鉴定,由上海海洋大学农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室保藏。*sigB* 缺失突变型菌株 *WaX12-ΔsigB* 由本实验室构建并保存。

#### 1.1.2 试剂和设备

戊二醛、结晶紫、无水乙醇及 98 % 浓硫酸均购自上海国药化学试剂有限公司;氯化钾购自天津市鼎盛鑫化工有限公司;苯酚购自上海展云化工有限公司;福林-酚及 lowry reagent 均购自 Sigma 公司;脑心浸液培养基(BHI 培养基)、PALCAM 培养基及脑心浸液琼脂均购自北京陆桥技术有限责任公司;24 孔板、96 孔微孔板均购自 Corning 公司;BioTeK 酶标仪,购自美国柏腾仪器有限公司;振荡培养箱,购自上海知楚仪器有限公司;JYP2 - IIN 超声波细胞粉碎机,购自宁波新芝生物科技股份有限公司;离心机、金属浴,购自美国 Eppendorf 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 生物被膜的形成与测定

参照文献[11]的方法并稍作改进。具体步骤:将 *WaX12* 和 *WaX12-ΔsigB* 在 PALCAM 选择性培养基平板上划线,37 °C 静置过夜培养。分别挑取单菌落至 5 mL BHI 液体培养基于 37 °C、180 r/min 震荡培养 4 ~ 4.5 h 至  $OD_{600} = 0.2$  左右。将  $V(\text{菌悬液}):V(\text{BHI 液体培养基}) = 1:100$ ,按

每孔 1 mL 加入到 24 孔细胞培养板中,测定培养 72 h 形成的生物被膜。24 孔板用封口膜封口,防止培养基蒸发。每组 3 个平行样,以无菌 BHI 为空白对照。培养结束后,小心弃去孔中的培养基,用无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次,除去尚未形成生物被膜的浮游菌体。室温干燥 45 min 后,向每个样品孔内加入 1 mL 0.1 % 结晶紫溶液,染色 30 min。染色结束后,用无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次。室温风干后,加入 1 mL 95 % 的乙醇溶液脱色 30 min,移取 200 μL 洗脱液于 96 孔微孔板,最后用酶标仪检测生物被膜菌的光吸收值 ( $OD_{600}$ )。

#### 1.2.2 胞外多糖(polysaccharide)及胞外蛋白(extracellular protein)的测定

菌株按 1.2.1 培养,分别测定 *WaX12* 和 *WaX12-ΔsigB* 在 37 °C、pH = 6 及 NaCl 浓度为 2.5 % 条件下培养 72 h 的生物被膜胞外多糖及胞外蛋白的相对含量。参照文献[14]的方法并稍作改进。具体步骤:培养结束后,首先用酶标仪测定菌液  $OD_{595}$  的光吸收值。然后小心弃去孔中的培养基,用无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次,以除去尚未形成生物被膜的浮游菌体。加入 1 mL 0.01 mol/L 的氯化钾溶液重悬 5 min,然后每个样品孔超声 5 s,间隙 5 s,循环 5 次。超声结束后,将菌液转移至 1.5 mL 无菌离心管内,于 4 °C 条件下,转速为 4 000 r/min,离心 20 min。随后用直径 0.22 μm 的滤膜过滤上清液,以除去杂质。胞外多糖的测定:吸取 100 μL 滤液于 1.5 mL 无菌离心管内,加入 200 μL 98 % 的浓硫酸,室温静置 30 min。随后加入 25 μL 6 % 的苯酚溶液,置于 90 °C 金属浴中,温育 5 min。移取 200 μL 样品于 96 孔微孔板内,最后用酶标仪检测  $OD_{490}$  的光吸收值,计算  $OD_{490}/OD_{595}$  即为样品多糖相对含量。胞外蛋白的测定:吸取 40 μL 滤液于 1.5 mL 无菌离心管内,加入 200 μL lowry reagent 溶液,室温静置 10 min。然后加入 20 μL 福林-酚溶液,室温静置 30 min。移取 200 μL 样品于 96 孔微孔板内,最后用酶标仪检测  $OD_{750}$  的光吸收值,计算  $OD_{750}/OD_{595}$  即为样品胞外蛋白的相对含量。

#### 1.2.3 生物被膜活菌计数

菌株按 1.2.1 培养,分别测定 *WaX12* 和 *WaX12-ΔsigB* 在 37 °C、pH = 6 及 NaCl 浓度为

2.5 % 条件下培养 72 h 的生物被膜活菌数。培养结束后,用 0.85 % 的生理盐水稀释生物被膜菌,取不同稀释液各 0.1 mL,涂布于 3 个 BHI 平板上,37 °C 培养 24 h,进行平板计数。重复实验 3 次。

#### 1.2.4 不同培养温度、pH 及 NaCl 浓度对李斯特菌生物被膜形成的影响

将培养温度设定为 4、15、25 和 37 °C,按 1.2.1,检测不同温度对生物被膜形成的影响。配制 pH 分别为 4、5、6 和 7 的 BHI,按 1.2.1,比较不同起始 pH 的生物被膜形成情况。分别配制终浓度为 0.5 %、2.5 %、4.5 % 和 6.5 % NaCl 的 BHI,按 1.2.1,比较不同 NaCl 浓度下生物被膜的形成情况。

#### 1.3 数据处理

采用 Origin 8.0、SPSS 17.0 软件处理,对相关数据进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 不同温度、pH 及 NaCl 浓度对 *WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜形成能力的影响

由图 1a 中可知,LM 生物被膜的形成与其生长温度密切相关。在 25 °C 和 37 °C 李斯特菌形成的生物被膜量大,表现出 OD<sub>600</sub> 值大,显著高于 4 °C 条件下的 OD<sub>600</sub> ( $P < 0.01$ )。而在 4 °C 条件下,*WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜的形成明显受到抑制。另外,在 15 °C、25 °C 和 37 °C 条件下,*WaxI2-ΔsigB* 生物被膜形成量与 *WaxI2* 相比显

著降低 ( $P < 0.05$ )。

图 1b 显示,当 pH = 7 时,李斯特菌形成生物被膜的 OD<sub>600</sub> 最大;当 pH = 4 时,李斯特菌几乎不形成生物被膜。此外,当 pH 为 7 及 6 时,*WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜量存在显著差异 ( $P < 0.05$ ),而 pH = 5 时,两者生物被膜量并无显著差异 ( $P > 0.05$ )。从图 1c 中可知,NaCl 浓度对李斯特菌生物被膜的形成影响显著。当 NaCl 浓度为 0.5 % 时,李斯特菌生成的生物被膜量最大;当 NaCl 浓度在 2.5 % 和 4.5 % 时生成的生物被膜量次之;当 NaCl 浓度达到 6.5 % 时,其 OD<sub>600</sub> 值极显著减少,李斯特菌几乎不能形成生物被膜。此外,*WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜形成量在 NaCl 浓度为 0.5 %、2.5 % 和 4.5 % 时,均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

进一步利用变异系数分析不同培养条件对 *WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜形成能力的影响,图 2 结果显示,温度、pH 及 NaCl 浓度对两者生物被膜形成能力均有影响,其中温度的影响最大,NaCl 浓度次之,pH 最弱。图 3 分析结果进一步表明,*WaxI2-ΔsigB* 生物被膜的形成能力更易受到培养条件的影响。计算 *WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 分别在温度、pH 及 NaCl 浓度培养条件影响下成膜能力的 CV (%) 差值可得:  $\Delta CV$  (温度) % = 3.25;  $\Delta CV$  (pH) % = 1.16;  $\Delta CV$  (NaCl) % = 2.10,可见,温度对 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜形成能力的影响最大。

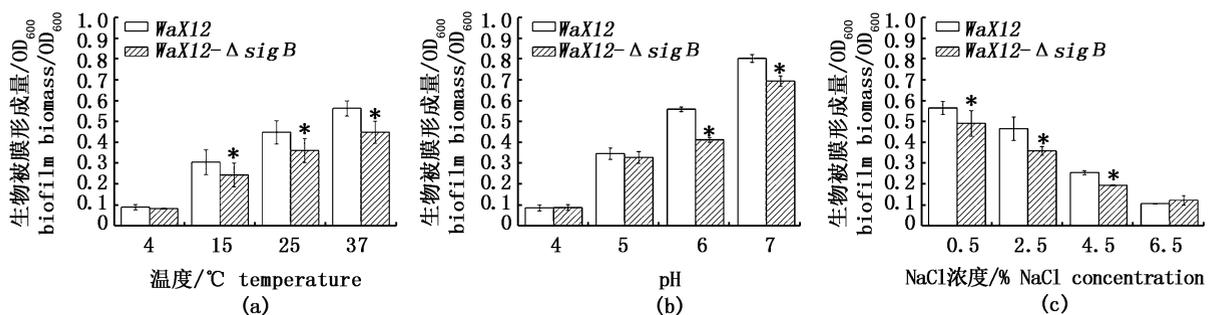


图 1 不同培养条件下 *WaxI2* 与 *WaxI2-ΔsigB* 生物被膜形成情况

Fig. 1 Biofilm formation by *WaxI2* and *WaxI2-ΔsigB* under various conditions

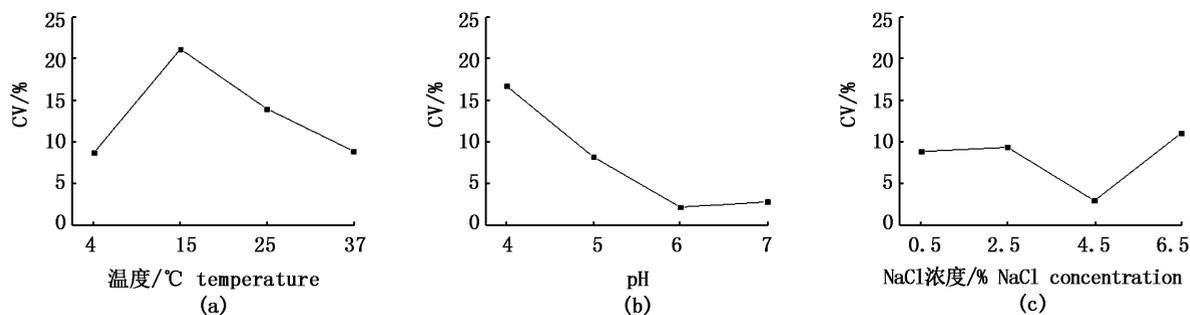
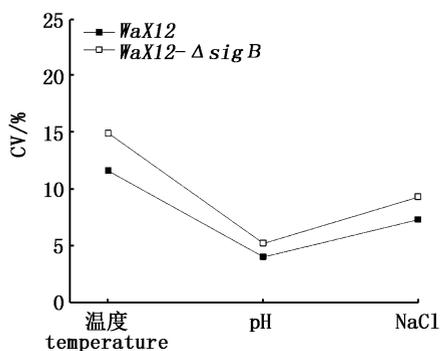


图 2 不同培养条件对 LM 生物被膜形成能力影响的变异系数分析

Fig. 2 Coefficient of variation of LM biofilm formation under various conditions

图 3 不同培养条件分别对 *WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 生物被膜形成能力影响的变异系数分析Fig. 3 Coefficient of variation of biofilm formation by *WaX12* and *WaX12-ΔsigB* under various conditions

最后,由表 1 可知,*WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 分别在 37 °C、pH = 6 及 2.5 % NaCl 培养条件下,两者生物被膜的形成量差异最显著( $P < 0.05$ )。

表 1 不同培养条件下 *WaX12-ΔsigB* 与 *WaX12* 生物膜形成量比例  
Tab. 1 The proportion of biofilm biomass by *WaX12-ΔsigB* under various conditions

培养条件 culture conditions	温度/°C temperature				pH				NaCl 浓度/% NaCl concentration			
	4	15	25	37	7	6	5	4	0.5	2.5	4.5	6.5
( <i>WaX12-ΔsigB</i> )/ <i>WaX12</i> (%)	99	81	82	80	82.7	77.5	92.8	97	85.4	72.9	79.4	86.4

图 4b 显示,*WaX12-ΔsigB* 胞外蛋白的相对含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。在 pH = 6 条件下,*WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 胞外蛋白的相对含量差异显著 ( $P < 0.05$ ),且与 37 °C 及 2.5 % NaCl 条件相比,两者的胞外蛋白相对含量最高;而在 37 °C 及 2.5 % NaCl 条件下,*WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 胞外蛋白的相对含量差异极显著 ( $P < 0.01$ )。最后,由图 4c 结果可知,*WaX12-ΔsigB* 生物被膜活菌数略低于 *WaX12*,但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 *WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 生物被膜胞外多糖、胞外蛋白及活菌数的测定

*WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 分别在 37 °C、pH = 6 及 2.5 % NaCl 条件下,培养 72 h 的生物被膜活菌、胞外多糖及胞外蛋白的测定结果如图 4 所示。图 4a 显示,*WaX12-ΔsigB* 胞外多糖的相对含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。在 pH = 6 条件下,*WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 胞外多糖的相对含量差异显著 ( $P < 0.05$ ),且与 37 °C 及 2.5 % NaCl 条件相比,两者的胞外多糖相对含量最高;在 2.5 % NaCl 条件下,*WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 胞外多糖的相对含量差异极显著 ( $P < 0.01$ );而在 37 °C 条件下,虽然两者的胞外多糖含量无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但 *WaX12-ΔsigB* 胞外多糖相对含量略低于 *WaX12*。

## 3 讨论

$\sigma^B$  因子是 *sigB* 基因编码的产物,它是革兰氏阳性菌对环境胁迫产生应答反应的主要调控因子。在 LM 中, $\sigma^B$  介导特定基因的表达,使其能在低 pH、氧化环境、乙醇、高渗透压、高温、低温和高胆汁酸盐等环境胁迫压力下生存<sup>[8]</sup>。近年来,有关 LM 生物被膜的研究主要建立在实验室培养和检测 LM 生物被膜的标准方法以及分析培养条件(营养、温度、接触面材料性质等)对 LM

生物被膜形成的影响,另一方面则是利用各种转座系统获得生物被膜形成的突变株,研究 LM 生物被膜形成的相关基因。然而,有关环境压力应

激因子 *sigB* 在 LM 生物被膜形成过程中的调节机制仍不清楚。

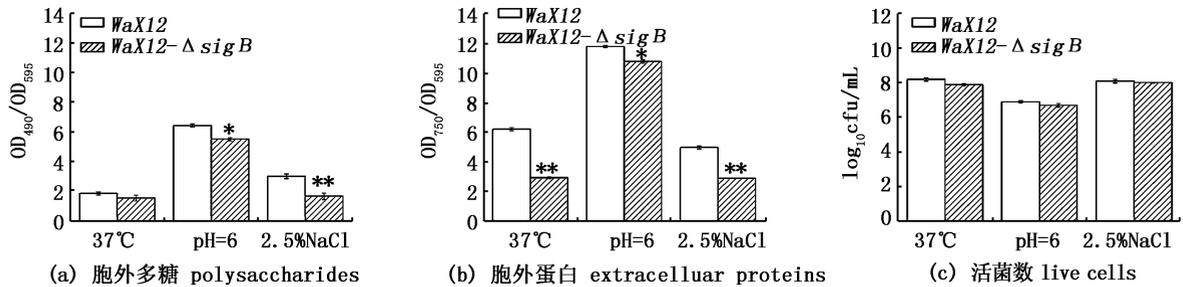


图4 *WaX12* 与 *WaX12-ΔsigB* 分别在 37 °C、pH = 6 及 2.5 % NaCl 条件下生物被膜胞外多糖、胞外蛋白及活菌数的测定结果

Fig. 4 Polysaccharides, extracellular proteins and live cells in biofilm of *WaX12* and *WaX12-ΔsigB* at 37 °C, pH = 6 and 2.5 % NaCl, respectively

众所周知,细菌的粘附和生物被膜的形成受到许多因素的影响,如生长环境中的营养物质、物体接触表面的状况、微生物种类、pH 与温度等<sup>[15]</sup>。LM 易在不锈钢片、玻璃及聚苯乙烯等常见食品加工材料表面聚集形成生物被膜,SACHIN 等<sup>[16]</sup>研究发现温度降低,LM 生物被膜形成能力也随之降低,而且在营养贫瘠的培养基中 LM 生物被膜形成能力反而强于营养富集的培养基,可见细菌生物被膜的形成能力易受到环境条件的影响。本研究利用结晶紫法比较分析了不同培养条件(温度、pH 及 NaCl 浓度)对 LM 野生型菌株(*WaX12*)及 *sigB* 缺失突变型菌株(*WaX12-ΔsigB*)生物被膜形成能力的影响,通过变异系数分析结果显示,LM 生物被膜形成能力受温度的影响最大。ALEXANDRA 等<sup>[17]</sup>研究发现肠炎沙门氏菌生物被膜形成能力更易受到 pH 的影响,可见不同种类细菌成膜能力的变异性受外界环境条件的影响是有很大差异的。目前,有关培养条件对 LM 生长的影响报道颇多,研究表明 0 ~ 20 °C 范围内,LM 菌液的 OD<sub>600</sub> 增长极慢,其最适生长温度为 37 °C;LM 在 NaCl 浓度为 0.5 % ~ 3.5 % 范围内生长良好,而当 NaCl 浓度高于 5.5 % 时,LM 的生长明显受到抑制;LM 在低酸环境中不易生长,其最适生长 pH 为 7.5<sup>[18]</sup>。结合本研究结果可知,LM 在不同培养条件下的生长特性与其生物被膜的形成有一定对应关系,可见细菌的生长速率可能直接影响其生物被膜的形成。此外,图 3 结果表明,*sigB* 缺失突变型菌

株 *WaX12-ΔsigB* 生物被膜的形成更易受到培养条件的影响,可见其对外界的耐受力减弱。与浮游菌相比,LM 生物被膜内细菌对外界的环境刺激敏感性显著降低,尤其是对抗菌剂的敏感性。目前研究表明,生物被膜内细菌的耐受机制可能是由于生物被膜深层的细菌体积较小并且繁殖能力弱,被胞外聚合物(EPS)包裹,基本处于低营养、低氧分压及高代谢产物的微环境,生长速度相对迟缓<sup>[19]</sup>。早期研究发现,作为生物被膜骨架的 EPS 是微生物自身代谢产物,是构成生物被膜三维结构的关键因子,其在生物被膜形成过程中起主要作用的组成成分为多糖、蛋白和胞外 DNA<sup>[3]</sup>。胞外多糖及蛋白在细胞初始粘附及维持生物被膜稳定中起着关键作用,SUTHERLAND 等<sup>[20]</sup>研究混合菌属生物膜结构发现,只要存在能合成胞外多糖的微生物菌属,就能形成成熟稳定的生物膜,而 BRANDA 等<sup>[21]</sup>研究表明假单胞菌细胞结合型胞外蛋白 CdrA 可促进更多的细胞与胞外多糖结合,从而加快其生物被膜的形成。为了进一步揭示 *sigB* 影响 LM 生物被膜形成的初步机制,我们发现缺失突变型菌株 *WaX12-ΔsigB* 胞外多糖及胞外蛋白的相对含量显著降低( $P < 0.05$ ),推测 *sigB* 的缺失可能降低了细胞的粘附性,从而降低了生物被膜的形成,其具体的分子机制仍需进一步研究。

细菌生物被膜的形成一般分为五个阶段:初始粘附(initial attachment),不可逆粘附(irreversible attachment),微菌落形成

(microcolony formation), 成熟生物被膜 (biofilm maturation), 播散期 (cell dispersion) [22]。近年来,从基因水平分析细菌生物被膜的形成机制是揭示其致病机理的重要研究方向,目前,已报道与 LM 鞭毛合成及运动相关的基因 (*flaA*、*fliG*、*filE*、*motA*、*motB*、*degU*、*mogR* 等), 群体感应因子转录调节子 (*agrA*、*agrB*、*agrC* 等)、主要毒力基因 *prfA* 等及热激蛋白转录因子 *dnaK* 等 [12], 这些基因在 LM 生物被膜形成的初始粘附及成熟稳定阶段都起着重要的作用。LEMON 等 [23] 研究发现在 LM 细胞初始粘附阶段, 鞭毛运动对生物被膜的形成起着至关重要的作用。细菌的运动性在细菌致病过程中发挥着重要的作用, 而鞭毛有助于细菌运动性, 并且通过趋化运动对宿主细胞发挥粘附或侵袭作用。细菌一旦完成粘附, 成熟生物被膜的形成主要依赖复杂的群体感应系统 (Quorum sensing, QS) 的调节, 多数细菌生物被膜的形成、发展及功能调节需要 OS 信号分子参与。AURÉLIE 等 [24] 研究表明在 LM 生物被膜形成的早期, 与野生菌株相比, *agrA* 突变菌株在聚苯乙烯上形成生物被膜的能力明显降低。近年来, 研究主要毒力基因 *prfA* 在 LM 生物被膜形成过程中的调节机制也是一大热点, 这对于揭示其致病原理, 具有重要的意义。然而, 细菌的毒力和环境适应能力是密切相关的, 并不是独立的。研究发现  $\sigma^B$  对众多的毒力因子也具有调节作用, 并且与 *prfA* 的关系密切, 也是重要的毒力调节因子 [25]。细菌生物被膜的形成是多基因共同参与调节的复杂体系, LM 生物被膜形成过程中, *sigB* 与其生物被膜相关基因之间是否存在一定的调控关系? 下一步本实验室的工作重点将从转录组学水平上具体分析 *sigB* 影响 LM 生物被膜形成的分子机制。

#### 参考文献:

- [1] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623–633.
- [2] DAVIES D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2(2): 114–122.
- [3] JANISSEN R, MURILLO D M, NIZA B, et al. Spatio-temporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9856.
- [4] DANESE P N, PRATT L A, KOLTER R, et al. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(12): 3593–3596.
- [5] JOHANSSON E M V, CRUSZ S A, KOLOMIETS E, et al. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin lecB[J]. Chemistry & Biology, 2008, 15(12): 1249–1257.
- [6] WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, MRA Series 4 & 5 [EB/OL]. 2004. [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra\\_listeria/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html).
- [7] OKADA Y, OKADA N, MAKINO S I, et al. The sigma factor RpoN ( $\sigma^{54}$ ) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 263(1): 54–60.
- [8] WIEDMANN M, ARVIK T J, HURLEY R J, et al. General stress transcription factor *sigmaB* and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(14): 3650–3656.
- [9] 张强, 冯飞飞, 王莉, 等. 单核细胞增生李斯特菌 *SigmaB*、*PrfA* 因子对生物被膜形成影响的研究 [J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 19–22.
- [9] ZHANG Q, FENG F F, WANG L, et al. Effect of *SigmaB*, *PrfA* on biofilm formation in *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Medical Research, 2010, 39(10): 19–22.
- [10] WAN DER VEEN S, ABEE T. Importance of *SigB* for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(23): 7854–7860.
- [11] CHOPRA L, SINGH G, JENA K K, et al. Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13412.
- [12] CHANG Y H, GU W M, FISCHER N, et al. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 2051–2062.
- [13] MATTILA M, LINDSTRÖM M, SOMERVUO P, et al. Role of *flhA* and *motA* in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(3): 177–183.
- [14] KIM H S, PARK H D. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e76106.
- [15] DONLAN R M. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(9): 881–890.
- [16] KADAM S R, DEN BESTEN H M W, VAN DER VEEN S, et al. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain

- origin[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 165(3): 259–264.
- [17] LIANOU A, KOUTSOUMANIS K P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 160(2): 171–178.
- [18] SAUCEDO-REYES D, CARRILLO-SALAZAR J A, REYES-SANTAMARÍA M I, et al. Effect of pH and storage conditions on *Listeria monocytogenes* growth inoculated into sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq) H. E. Moore & Steam) pulp[J]. Food Control, 2012, 28(1): 110–117.
- [19] JONES W L, SUTTON M P, MCKITTRICK L, et al. Chemical and antimicrobial treatments change the viscoelastic properties of bacterial biofilms[J]. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 2011, 27(2): 207–215.
- [20] SUTHERLAND I W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(5): 222–227.
- [21] BRANDA S S, CHU F, KEARNS D B, et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(4): 1229–1238.
- [22] MONDS R D, O'TOOLE G A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(2): 73–87.
- [23] LEMON K P, HIGGINS D E, KOLTER R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(12): 4418–4424.
- [24] RIEU A, WEIDMANN S, GARMYN D, et al. Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(19): 6125–6133.
- [25] KAZMIERCZAK M J, WIEDMANN M, BOOR K J. Contributions of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  and *prfA* to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth[J]. Microbiology, 2006, 152(6): 1827–1838.

## Effects of *sigB* on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* under various culture conditions

FU Jiaojiao<sup>1</sup>, WANG Xu<sup>1</sup>, LIU Haiquan<sup>1</sup>, SUN Xiaohong<sup>1,2,3</sup>, XIE Jing<sup>1,2,3</sup>, PAN Yingjie<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2,3</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 Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The role of *sigB*, a major transcriptional regulator of stress response genes of *Listeria monocytogenes*, was assessed in biofilm formation of wild type strain (*WaX12*) and *sigB* deletion mutant (*WaX12-ΔsigB*) as affected by temperatures (4 °C, 15 °C, 25 °C and 37 °C), pH values (4, 5, 6 and 7) and NaCl concentrations (0.5 %, 2.5 %, 4.5 % and 6.5 %). Results showed that the biofilm biomass was significantly reduced in *L. monocytogenes* mutant lacking *sigB* ( $P < 0.05$ ). According to the coefficient of variation analysis, all three of the culture conditions tested (i. e., temperature, pH and NaCl concentration) appeared to affect the strain variability of the biofilm formation of *WaX12* and *WaX12-ΔsigB*, and the increase in the strain variability of biofilm formation caused by temperature is much greater than that caused by NaCl or pH. The ability of forming biofilm by *WaX12-ΔsigB* was more vulnerable to the effects of external culture conditions. There was a significant difference of biofilm biomass between *WaX12* and *WaX12-ΔsigB* at 37 °C, pH 6 and 2.5 % NaCl, respectively, so the further research was observed under these culture conditions. Notably, results showed that the relative amounts of total polysaccharides and extracellular proteins were much lower in *WaX12-ΔsigB* biofilm ( $P < 0.05$ ). However, there was little influence on live cells. In conclusion, this study could provide a scientific basis for further investigation of the important role of *sigB* in *L. monocytogenes* biofilm formation.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; biofilm; *sigB*