

*fliE*基因对单增李斯特菌持留能力形成的作用分析

冯瑞珍^{1,2}, 叶志伟¹, 蔡佳怡², 程健恒², 张颖^{1,2}, 陈谋通^{2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东广州 510070)

摘要: 为了分析 *fliE* 基因对单增李斯特菌持留能力形成的影响, 利用基因同源重组技术成功构建了单增李斯特菌 *fliE* 基因缺失株。生长能力测定发现, 缺失株在 OD₆₀₀ 值为 0.64 时达到稳定期, 亲本株在 OD₆₀₀ 值为 0.66 时达到稳定期, 表明亲本株与 $\Delta fliE$ 缺失株生长能力无显著差异 ($P>0.05$)。运动性测定结果表明, 亲本株和 $\Delta fliE$ 缺失株在半固体琼脂培养基中迁移直径分别为 6.00 mm、6.03 mm, 运动性无显著差异 ($P>0.05$)。利用结晶紫染色法测定其生物被膜形成能力, 与亲本株相比, $\Delta fliE$ 缺失株与混淆魏斯氏菌 W4-1、WL5-1 形成混合生物被膜能力分别下降至 71.55%、74.77% ($P<0.01$)。利用耐消毒剂能力和激光共聚焦显微镜分析显示 $\Delta fliE$ 基因缺失株与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜中单增李斯特菌存活能力显著降低。综上结果表明 *fliE* 基因的缺失不仅影响单增李斯特菌生物被膜形成能力, 还降低其对季铵盐类消毒剂耐受能力。本研究结果为进一步阐明高毒力持留基因型单增李斯特菌菌株持留能力形成的分子机制提供理论基础。

关键词: 单增李斯特菌; 鞭毛; *fliE* 基因; 生物被膜; 季铵盐类消毒剂

文章编号: 1673-9078(2026)04-85-93

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0407

Role of the *fliE* Gene in the Formation of Persistence in *Listeria monocytogenes*

FENG Ruizhen^{1,2}, YE Zhiwei¹, CAI Jiayi², CHENG Jianheng², ZHANG Ying^{1,2}, CHEN Moutong^{2*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology, Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Guangzhou 510070, China)

Abstract: To analyze the impact of the *fliE* gene on the persistence of *Listeria monocytogenes*, a *fliE* deletion mutant was successfully constructed using homologous recombination technology. Growth capacity assays demonstrated that the $\Delta fliE$ strain reached the stationary phase at an OD₆₀₀ of 0.64, whereas the parental strain reached the stationary phase at an OD₆₀₀ of 0.66. No significant difference in growth capability was observed between the parental and $\Delta fliE$ strains ($P>0.05$). Motility assays demonstrated that the migration diameters of the parental and $\Delta fliE$ strains in a semi-solid agar medium were 6.00 ± 0.05 mm and 6.03 ± 0.05 mm, respectively, suggesting no significant difference in motility ($P>0.05$). The biofilm formation capability of the $\Delta fliE$ strain was assessed using the crystal violet staining method. Compared with the parental strain, the ability of the $\Delta fliE$ strain to form mixed biofilms with *Weissella confusa* W4-1 and WL5-1 decreased to 71.55% and 74.77% ($P<0.01$), respectively.

引文格式:

冯瑞珍,叶志伟,蔡佳怡,等.*fliE*基因对单增李斯特菌持留能力形成的作用分析[J].现代食品科技,2026,42(4):85-93.

FENG Ruizhen, YE Zhiwei, CAI Jiayi, et al. Role of the *fliE* gene in the formation of persistence in *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 85-93.

收稿日期: 2025-03-21; 修回日期: 2025-05-07; 接受日期: 2025-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32222068); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022B1515020068); 广东省科学院青年人才专项 (2023GDASQNR-0102)

作者简介: 冯瑞珍 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌控制, E-mail: bottle2017@163.com

通讯作者: 陈谋通 (1984-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全与健康, E-mail: cmttoon@163.com

Disinfectant tolerance assays and analysis based on confocal laser scanning microscopy (CLSM) suggested that the survival ability of *L. monocytogenes* in mixed biofilms formed by co-culturing the $\Delta fliE$ strain with *Weissella confusa* was significantly reduced. These results demonstrated that deletion of the *fliE* gene not only affected the biofilm formation ability of *L. monocytogenes* but also reduced its tolerance to quaternary ammonium disinfectants. The findings of this study provide a theoretical foundation for further understanding the molecular mechanisms underlying the persistence of hypervirulent, persistent-genotype *L. monocytogenes* strains.

Key words: *Listeria monocytogenes*; flagellum; *fliE* gene; biofilm; quaternary ammonium compounds

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是在自然界广泛存在的重要食源性致病菌, 适应能力强, 生长温度为 $-1.5\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 值范围为 4.3~9.6, 可在食品加工的各种逆性环境下繁殖, 造成奶及奶制品、水产品、肉制品等食品污染, 其还存在于食品加工、运输、保藏各个环节^[1]。单增李斯特菌可以穿透人体的小肠屏障、血脑屏障和胎盘屏障, 感染单增李斯特菌可能是无症状的, 或者表现为轻微发烧, 严重者可引发败血症、脑膜炎, 造成孕妇流产、胎儿死亡等严重李斯特菌病^[1], 死亡率高达 20%~30%^[2,3]。

单增李斯特菌能产生生物被膜 (Biofilm), 并倾向于以生物被膜的形式生长^[4]。生物被膜的形成增强了细菌对环境的抗逆性, 而食品接触面和设备表面为生物被膜的形成提供了良好的条件, 使得单增李斯特菌在各种食品生产过程中容易与其他细菌形成混合生物被膜, 有助于增强单增李斯特菌在食品加工环境中的持留能力^[5], 进而持续污染食品加工环境及产品, 给食品工业及公众健康带来严重的安全隐患^[6,7]。

实验室前期从广东省两家大型金针菇工厂中分离到一株高毒力持留基因型单增李斯特菌菌株 1031-1FLM, 并且对关键生产环节分离的微生物优势菌株进行筛选发现混淆魏斯氏菌 (*Weissella confusa*) 与 1031-1FLM 共培养形成的双菌种生物被膜能增强 1031-1FLM 对季铵盐类消毒剂的耐受能力, 增强其持留性能, 转录组测序结果显示鞭毛钩基体复合蛋白编码基因 *fliE* 表达差异显著 (未发表数据)。鞭毛是单增李斯特菌的重要运动器官, 其介导的运动性对于单增李斯特菌的生物被膜形成非常重要^[8]。但是, 有关 *fliE* 基因对单增李斯特菌生物被膜以及持留性影响的研究尚未见报道。

本试验以分离株 1031-1FLM 为研究对象, 通过基因同源重组技术构建 *fliE* 基因缺失株, 研究亲本株和缺失株在单菌、混菌培养条件下抗逆性环境能力和生物被膜形成的表型变化, 分析 *fliE* 基因在调控单增李斯特菌生物被膜形成过程中的作用, 为进一步阐明单增李斯特菌高持留能力形成的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

单增李斯特菌 1031-1FLM 菌株、混淆魏斯氏菌株 W4-1、混淆魏斯氏菌株 WL5-1 均由所在研究组实验室分离纯化并保藏于广东省科学院微生物研究所; 重组质粒 pKSV7 由法国巴斯德研究所 Pascale Cossart 教授惠赠; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α 感受态细胞购买于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

脑心浸液 (Brain Heart Infusion, BHI) 培养基、溶菌肉汤 (Lysogeny Broth, LB) 培养基、细菌基因组 DNA 纯化试剂盒、PBS 缓冲液, 购买于广东环凯生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒、质粒小提试剂盒, 购于广州美津生物科技有限公司; 限制性内切酶 *Xba* I、限制性内切酶 *Kpn* I、PrimeSTAR Max 高保真 PCR 酶, 购于 TaKaRa 公司; DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、电泳级琼脂糖、Gold View 核酸染料、HEPES、氯霉素 (Chloramphenicol, Cam)、青霉素 G (Penicillin G, P)、氨苄青霉素 (Ampicillin, AMP), 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; ClonExpress II 一步克隆试剂盒, 购于 Vazyme 公司; 苯扎溴铵 (Benzalkonium Bromide, BB)、苯扎氯铵 (Benzalkonium Chloride, BC), 购于上海源叶生物科技有限公司; 细菌生物膜染液 LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (L7007), 购自美国 Thermo Fisher 公司。

PowerPac basic 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; Tanon-2500UV 凝胶图像处理系统, 上海天能科技有限公司; Nanodrop 2000 微量分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; Microfuge 20R 小型高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特有限公司; Biometra TOne 96G PCR 仪, 德国 Biometra 公司; Epoch™ 2 微孔板分光光度计, 美国 Bio-Tek 公司; Spark 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; LSM700 激光共聚焦显微镜, 德国 ZEISS 公司。

表 1 本研究用到的引物序列
Table 1 The primer sequences in this study

引物	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃	扩增产物大小/bp
<i>fliE</i> -up-F	TTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAAATCTTCAAACAGCCAACCAAGTAGT	59	846
<i>fliE</i> -up-R	TCCCCCGACTAGTCTAACC GTTCTTAAACACTCCTTTATACTTTGCCAATTCT	59	
<i>fliE</i> -down-F	AGAAATTGGCAAAGTATAAAGGAGTGTTTAAAGACGGTTAGACTAGTCGGGGGA	59	918
<i>fliE</i> -down-R	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGAGACATTTGTATTACGCGG	60	
<i>fliE</i> -F	ATGGCAATTGAAAGTATTAATGCAGCAAG	60	297
<i>fliE</i> -R	CTACACTTGCATATTTAAAAGCTGTTGTAGCT	60	
Pe194-F	ACATCTACACCGCCATAAACTA	56	652
Pe194-R	ATGTTGGGAGGTACAGTGATG	56	

注：下划线表示酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

基于研究组前期获得的 1031-1FLM 菌株全基因组序列及基因注释结果，使用 SnapGene 软件设计扩增 *fliE* 基因上游同源臂引物 *fliE*-up-F/R、扩增 *fliE* 基因下游同源臂引物 *fliE*-down-F/R。引物 *fliE*-F/R 用于鉴定基因缺失株，引物 Pe194-F/R 用于鉴定 pKSV7- Δ *fliE* 阳性转化子。引物序列信息见表 1。引物由北京华大基因公司合成。

1.2.2 *fliE*基因同源臂扩增

根据细菌基因组 DNA 纯化试剂盒说明书提取亲本株 1031-1FLM 基因组 DNA，使用引物 *fliE*-up-F/R、*fliE*-down-F/R 扩增 *fliE* 基因上、下游同源臂，反应条件设为：94℃ 5 min；94℃ 10 s，60℃ 5 s，72℃ 10 s，30 个循环；72℃ 10 min。纯化的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，将条带大小正确的产物送至北京华大基因公司进行测序鉴定，于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 pKSV7- Δ *fliE*质粒的构建

使用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 将纯化后的温敏型穿梭质粒 pKSV7 进行双酶切并纯化回收后，使用 ClonExpress II 一步克隆试剂盒使其与 *fliE* 基因上下游同源臂进行连接。然后将连接产物转化至大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞中，取适量培养物涂布于含质量浓度为 100 μ g·mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板，37℃ 培养过夜。挑取单菌落进行菌落 PCR，将条带大小正确的产物送至北京华大基因公司测序，测序正确的 pKSV7- Δ *fliE* 质粒于 -80℃ 保存备用。

1.2.4 1031-1FLM菌株电转用感受态细胞的制备

1031-1FLM 菌株感受态的制作方法参照陈谋通^[9]方法并略作修改。具体步骤如下：将 -80℃ 保存的

菌株 1031-1FLM 使用新鲜配置的 BHI 液体培养基活化后划线于 BHI 固体培养基上，37℃ 培养过夜；挑取单菌落于 10 mL BHI 液体培养基中，37℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养过夜；然后，取 2 mL 菌液接种于 200 mL BHIS（含摩尔浓度为 0.50 mol·L⁻¹ 蔗糖）中扩大培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.20~0.25，加入 200 μ L 质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 青霉素 G 到该培养物中，37℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养 2 h，立即于超净工作台分装至合适大小的离心管中，置于冰水混合物中冷却；将冷却菌液于 4℃、5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，弃上清；使用 solution I（摩尔浓度为 0.50 mol·L⁻¹ 蔗糖 + 摩尔浓度为 1 mmol·L⁻¹ HEPES）充分洗涤一次菌体，离心并弃上清；然后往 50 mL 离心管每管加入 1 mL 预冷的 solution II（摩尔浓度为 0.50 mol·L⁻¹ 蔗糖 + 摩尔浓度为 1 mmol·L⁻¹ HEPES+ 体积分数为 15% 甘油），温和重悬菌体，分装至预冷的 1.50 mL 离心管，每管分装 100 μ L，可立即用于后续实验或立即存放于 -80℃ 备用。

1.2.5 1031-1FLM- Δ *fliE*基因缺失株的构建及其鉴定

利用电转化的方法将重组质粒 pKSV7- Δ *fliE* 导入到 1031-1FLM 感受态细胞中，方法参照陈谋通^[9]方法并略作修改。30℃ 下静置孵育 1~2 h 后，取适量培养物涂布于含质量浓度为 10 μ g·mL⁻¹ 氯霉素 BHI 琼脂平板中，37℃ 培养 2 d 后挑取阳性克隆子进行菌落 PCR 验证，随后送至北京华大基因公司进行测序比对。将构建成功的阳性转化子在 42℃、氯霉素为选择压力下连续传代进行第一轮交换，然后转入无抗性的 BHI 液体培养基中 30℃ 培养进行第二轮交换。取适量末代培养物涂布于不含抗生素的 BHI 琼脂平板中，37℃ 过夜培养后，挑取单菌落分别影印接种于含质量浓度为 10 μ g·mL⁻¹ 氯霉素和不含氯霉素的 BHI 琼脂平板中培养，采用菌落 PCR 法和序列测定的方法鉴定 1031-1FLM- Δ *fliE* 基因缺失株。

1.2.6 生长曲线测定

为考察 *fliE* 基因缺失对单增李斯特菌生长的影响, 利用酶标仪测定亲本株和缺失株在 BHI 液体培养基中的生长曲线。将过夜活化后的菌液 OD₆₀₀ 值调整一致后, 按体积分数为 1% 的接种比例接种于 BHI 液体培养基中, 37 °C 振荡培养, 每 30 min 测定一次菌液 OD₆₀₀ 值, 进行 3 次重复实验, 平行实验取平均值。

1.2.7 运动性测定

参照汪国俊等^[10]方法并略作修改。具体步骤如下: 将过夜活化后的菌液 OD₆₀₀ 值调整一致后, 按体积分数为 1% 的接种量稀释菌液, 取适量菌液滴于质量分数为 0.3% BHI 半固体琼脂培养基上, 30 °C 培养亲本株和缺失株 24 h, 使用游标卡尺测量不同菌株在半固体琼脂培养基中迁移直径大小。

1.2.8 生物被膜形成能力测定

共培养生物被膜方法参照 Sterniša 等^[11]方法并略作修改。将活化的菌液涂布于 BHI 琼脂平板上, 挑单菌落于 BHI 液体培养基中, 37 °C 培养过夜, 将过夜活化后的菌液 OD₆₀₀ 值调整一致后, 按体积分数 1% 的接种量稀释菌液, 然后按体积比 1:1 分别加入混淆魏斯氏菌与 1031-1FLM、1031-1FLM-Δ*fliE* 的稀释菌液于 96 微孔板中, 37 °C 培养 48 h。

利用结晶紫染色法测定生物被膜形成能力, 方法参照陈谋通^[9]方法并略作修改。先吸弃细菌培养液的上清, 并用 1×PBS 清洗 3 次以洗去游离菌体, 注意动作轻柔, 轻轻拍干水分, 放置 65 °C 烘箱固定 1 h; 固定完成, 加入 150 μL 质量分数为 0.1% 结晶紫染液, 37 °C 避光放置 30 min, 染色结束吸弃结晶紫染液, 并使用蒸馏水充分清洗未附着的结晶紫染液, 纸上拍干并烘干; 最后每孔加入 200 μL 体积分数为 95% 的乙醇, 在 4 °C 冰箱中放置 15~30 min, 充分溶解结合在生物被膜上的结晶紫染料, 随后用 Epoch™ 2 微孔板分光光度计测定样品的 OD₅₉₅ 值。实验进行 3 个重复。

1.2.9 耐消毒剂能力测定

亲本株、缺失株与混淆魏斯氏菌共培养生物被膜方法见 1.2.8。弃去 96 微孔板上清并且用 1×PBS 冲洗 3 次; 加入质量浓度为 200 μg·mL⁻¹ BB/BC 消杀 2.50 min (工厂消杀浓度^[12]); 弃去消毒剂并且用 1×PBS 冲洗 3 次; 用无菌棉签刮拭单个培养孔上的生物被膜并将其涂布于单增李斯特菌显色平板上, 37 °C 培养 48 h, 拍照记录。

1.2.10 激光共聚焦显微镜表征

利用激光共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 观察混合菌种生物被膜内细胞活力情况, 参照陈月桃^[13]方法并略作修改。具体如下: 将活化后的菌液 OD₆₀₀ 值调整一致后, 按体积分数为 1% 的接种量稀释菌液, 在 12 孔板中加入细胞爬片 (Φ=14 mm), 将稀释菌液加至 12 孔板中, 37 °C 下培养 48 h, 形成生物被膜。去除上清液, 用 1×PBS 清洗爬片 3 次去除浮游细菌, 使用质量浓度为 200 μg·mL⁻¹ 的季铵盐类消毒剂 (BB、BC) 消杀处理 2.50 min 后, 将爬片转移至新的 12 孔板中; 再加入 750 μL 的 LIVE/DEAD™ BacLight™ 混合染液于 12 孔板中, 室温避光染色 30 min; 最后用 1×PBS 洗去多余的荧光染液。荧光染液产生双色标记, 使活细胞被标记为绿色, 死细胞被标记为红色。

1.2.11 数据处理

所有实验均进行 3 次重复, 每次重复测定 3 个平行, 使用 Graphpad Pism 9.5 和 Microsoft Excel 2016 对试验结果进行统计分析, 采用单因素方差 (ANOVA) 分析不同菌株的生物被膜形成能力差异显著性, 差异显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 *fliE* 基因缺失株的构建及鉴定

fliE 基因上、下游同源臂 PCR 扩增产物片段进行电泳, 结果表明目的片段位于 850 bp 和 900 bp 附近, 与预期片段 846 bp、918 bp 一致 (图 1a), 并且测序结果正确。抽提重组质粒, 使用 *fliE*-up-F、*fliE*-down-R 引物进行 PCR 扩增, 检测上、下游同源臂是否成功融合并导入到 pKSV7 质粒上。结果表明重组质粒 PCR 鉴定片段大小正确 (图 1b), 扩增出 1 709 bp 左右的片段, 测序结果正确, 成功构建重组质粒 pKSV7-Δ*fliE*。将重组质粒 pKSV7-Δ*fliE* 电转化 1031-1FLM 感受态细胞中, 采用 Pe194-F/Pe194-R 引物对挑取阳性克隆子进行菌落 PCR 鉴定, 结果显示阳性克隆子均扩增到 652 bp 的目的片段 (图 1c), 重组质粒 pKSV7-Δ*fliE* 成功导入 1031-1FLM 感受态细胞中。同源重组传代后菌落 PCR 验证结果显示 (图 1d), 扩增出大小为 1 709 bp 的目的片段, 表明大小为 297 bp 的 *fliE* 目的基因成功缺失, 成功构建 *fliE* 基因缺失株 1031-1FLM-Δ*fliE*。

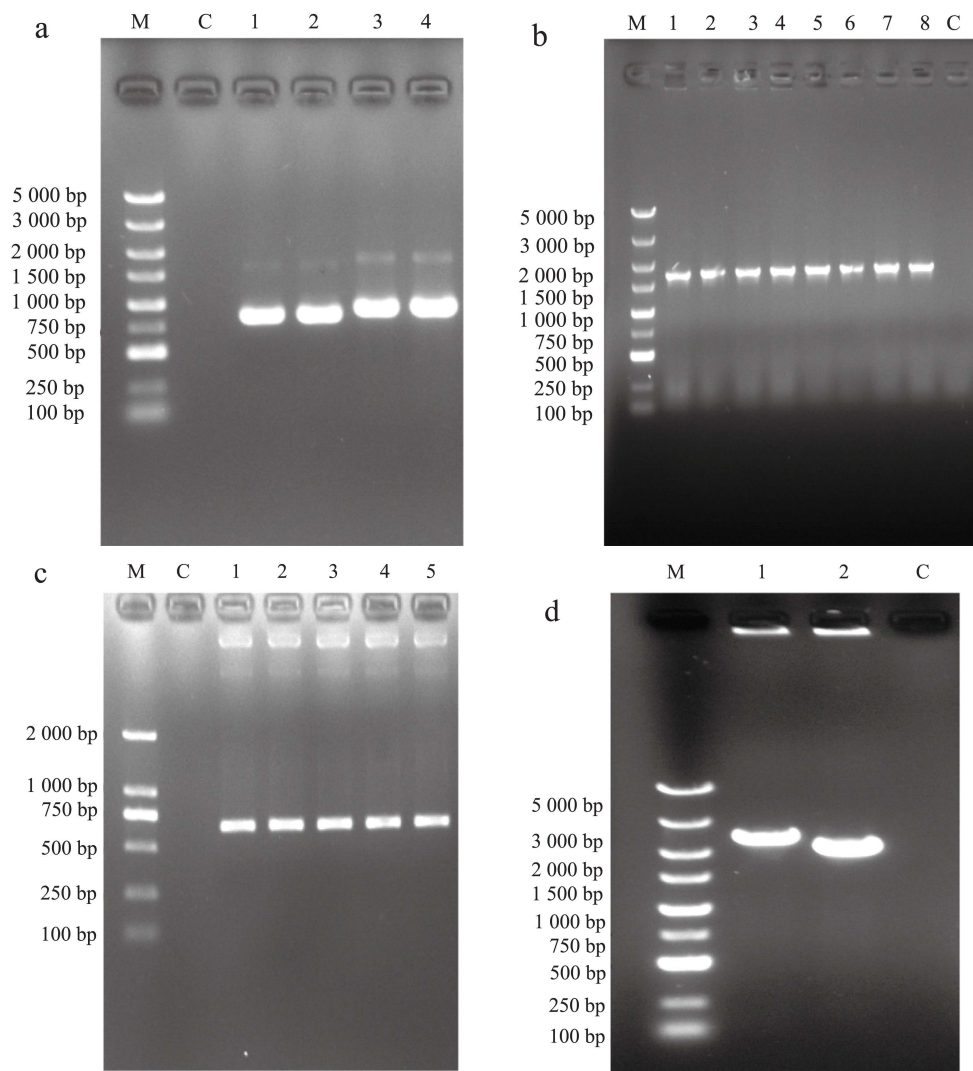


图 1 *fliE* 基因缺失株构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of the *fliE* gene deletion mutant

注:(a) *fliE* 基因上、下游同源臂扩增结果,其中 M 为 DL 5000 DNA Marker,1、2 为上游同源臂,3、4 为下游同源臂,C 为空白对照。(b) 重组质粒 pKSV7- $\Delta fliE$ PCR 鉴定,其中 M 为 DL 5000 DNA Marker,1~8 为重组质粒 pKSV7- $\Delta fliE$ PCR 扩增产物,C 为空白对照。(c) 重组质粒 pKSV7- $\Delta fliE$ 电转入 1031-IFLM 感受态细胞鉴定,其中 M 为 DL 2000 DNA Marker,1~5 为 pKSV7 质粒特异性引物 PCR 扩增产物,C 为空白对照。(d) 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 基因缺失株鉴定,其中 M 为 DL 5000 DNA Marker,1 为 1031-IFLM,2 为 1031-IFLM- $\Delta fliE$,C 为空白对照。

2.2 *fliE*基因缺失对生长和运动性影响

对缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 与亲本株 1031-IFLM 的生长能力和运动性进行测定。由图 2a 可知,缺失株和亲本株在 3~8 h 时,OD₆₀₀ 值均在 0.01~0.60 之间,处于对数生长期;缺失株在 OD₆₀₀ 值为 0.64 时达到稳定期,亲本株在 OD₆₀₀ 值为 0.66 时达到稳定期。生长能力测定结果表明,缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 与亲本株 1031-IFLM 在 BHI 培养基中生长趋势无显著差异 ($P>0.05$),*fliE* 基因的缺失不影响菌株生长。由图 2b 可知,在 30 ℃ 培养条件下,亲本株在半固体琼脂培养基中迁移直径为 (6.00±0.05) mm,缺失株在半固体琼脂培养基中迁移直径为 (6.03±0.05) mm。运动能

力测定结果发现不同菌株在半固体琼脂培养基中迁移直径大小无显著差异 ($P>0.05$),表明 *fliE* 基因的缺失对 1031-IFLM 菌株的运动性无显著影响。

单增李斯特菌是一种周身鞭毛细菌,鞭毛是其重要的运动器官,每个细菌有 4~6 个鞭毛^[14]。根据原核操纵子数据库,单增李斯特菌的鞭毛基因主要分布在 394、397、398 操纵子上,是以温度依赖性方式产生鞭毛^[15]。鞭毛介导的运动性是影响单增李斯特菌致病性的因素之一^[8]。前期有研究发现,*fliE* 基因缺失会导致肠沙门氏菌鞭毛表型缺陷^[16],而 Cheng 等^[17]利用基因同源重组法构建了 *flhB*、*fliM*、*fliY* 和其他鞭毛相关基因单增李斯特菌缺失突变体,发现在 *flhB*、*fliM* 或

fliY 缺失的情况下,运动性和鞭毛的合成能力完全消失,但其生长能力无显著差异,其他一些鞭毛相关蛋白的表达和分泌,如 MogR、GmaR、GTP 酶在 *fliB*、*fliM* 和 *fliY* 突变体中不受影响。这表明 FlhB、FliM 和 FliY 蛋白参与单核细胞增生李斯特菌的鞭毛合成,它们是运动和其他鞭毛相关蛋白分泌所必需的。但在本研究中发现, *fliE* 基因的缺失对 1031-IFLM 菌株的生长能力和运动性均无显著影响,表明 *fliE* 基因部分影响鞭毛功能,但不是其运动所必需的,在单增李斯特菌中还有其他鞭毛控制机制,调控单增李斯特菌运动性能。

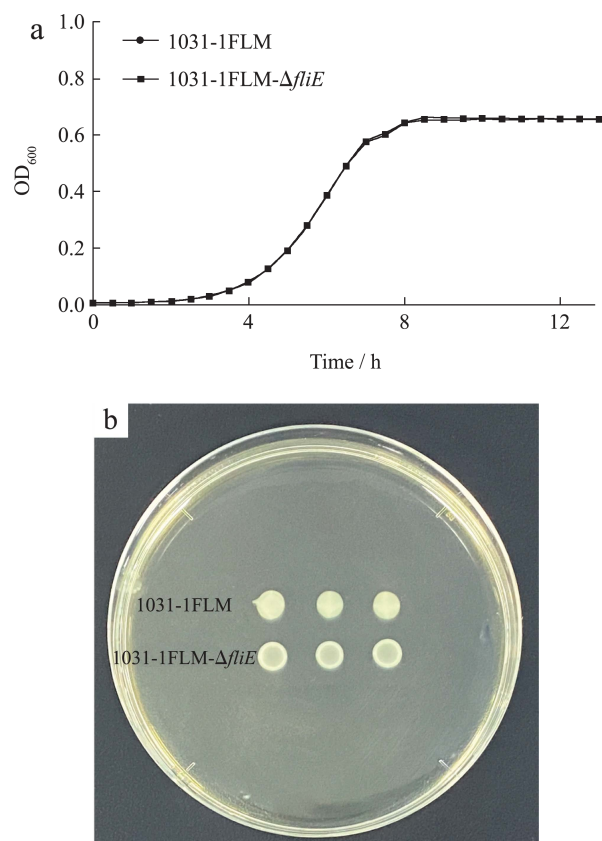


图2 *fliE* 基因缺失对单增李斯特菌生长和运动性影响

Fig.2 Effects of *fliE* gene deletion on the growth and motility of *L. monocytogenes*

注:(a) 亲本株 1031-IFLM 和缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 的生长曲线,(b) 亲本株 1031-IFLM 和缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 在 30 °C 下的运动能力。

2.3 生物被膜形成能力差异分析

鞭毛介导的运动性不仅是影响单增李斯特菌致病性的因素之一,对于单增李斯特菌最初的表面附着和随后的生物被膜形成至关重要^[8]。从图 3 可以看出,单菌种生物被膜培养 48 h 时,亲本株 1031-IFLM 生物被膜测定的 OD₅₉₅ 值为 0.50,而缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 生物被膜测定的 OD₅₉₅ 值为 0.44,表明亲本株 1031-IFLM 与缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 之

间的生物被膜形成量没有显著性差异 ($P > 0.05$);与亲本株相比, $\Delta fliE$ 缺失株生物被膜形成能力下降至 88.00%。在混合菌种生物被膜中,1031-IFLM+W4-1、1031-IFLM+W5-1 测定的 OD₅₉₅ 值分别为 1.16、1.11,1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W4-1、1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W5-1 测定的 OD₅₉₅ 值均为 0.83,表明混合生物被膜形成量极显著高于与单菌种生物被膜 ($P < 0.01$);而与亲本株混合生物被膜相比, $\Delta fliE$ 基因缺失株与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜形成量极显著减少 ($P < 0.01$), $\Delta fliE$ 缺失株与混淆魏斯氏菌 W4-1、W5-1 形成生物被膜能力分别下降至 71.55%、74.77%。

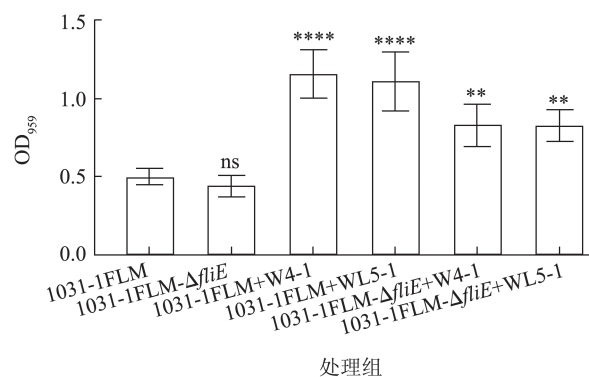


图3 不同菌株的生物被膜形成能力比较

Fig.3 The ability of biofilm formation of different strains

注: $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义 (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$), $P > 0.05$ 表示差异没有统计学意义 (ns)。

目前对于鞭毛系统的研究主要集中在鞭毛阻遏蛋白 MogR、GmaR、鞭毛基因 *fliN*、*fliB*、*fliG*、*fliM*、*fliK*、*fliF*、*fliY* 等中^[17]。Cho 等^[18]研究发现, MogR 阻遏物和 GmaR 抗阻遏物在单增李斯特菌中调节鞭毛运动的结构基础,影响其生物被膜形成能力。Wang 等^[19]通过构建鞭毛突变体 ($\Delta fliG$ 和 $\Delta fliC$) 探究鞭毛运动对鼠伤寒沙门氏菌生物被膜发育过程的影响,发现 *fliG* 和 *fliC* 基因的缺失抑制了鞭毛运动并减少生物被膜形成。在铜绿假单胞菌中也发现鞭毛钩蛋白 FlgE 的突变极大地影响其生物被膜形成能力和生物被膜结构^[20]。这些研究结果表明鞭毛系统调控细菌生物被膜的形成。而在单增李斯特菌中, *fliE* 基因编码鞭毛钩基体复合蛋白 FliE,而 FliE 蛋白是第一种通过鞭毛 III 型分泌系统 (F3SS) 分泌的蛋白质,它能够自组装到生长的细菌细胞器中^[21]。Minamino 等^[22]报道了 *fliE* 的突变等位基因导致鞭毛形成和群聚能力变差,而本研究利用结晶紫法测定单增李斯特菌 *fliE* 鞭毛基因缺失株生物被膜形成能力,发现 *fliE* 基因的缺失会影响单增李斯特菌的生物被膜形成能力,表明 *fliE* 基因在单增李斯特菌生物被膜形成过程中起重要作用。

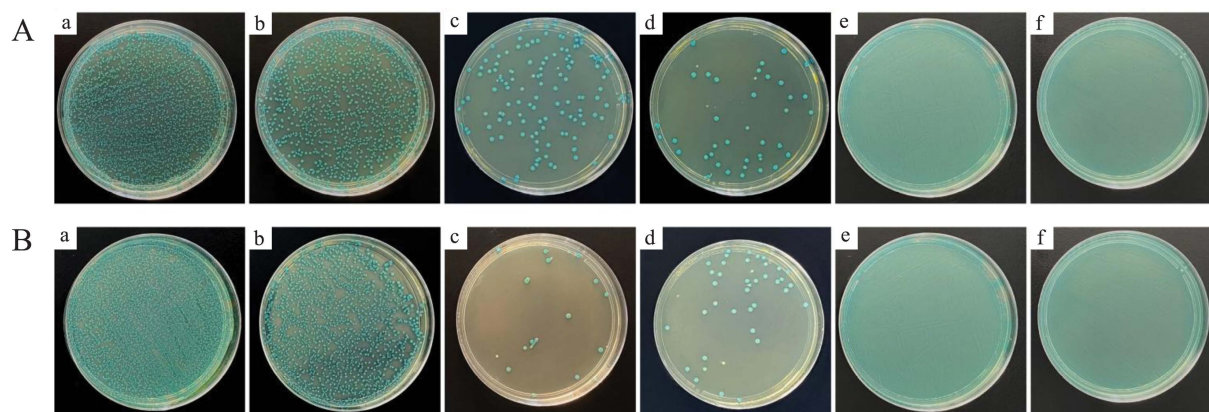


图4 混合生物被膜耐季铵盐类消毒剂能力分析

Fig.4 Analysis of the quaternary ammonium compounds tolerance of dual-species biofilms

注：(A) 混合生物被膜耐消毒剂 BB 能力分析，其中 a~d 为经质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BB 消毒剂消杀处理 (a: 1031-IFLM+W4-1; b: 1031-IFLM+W5-1; c: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W4-1; d: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W5-1); e~f 为未经消毒剂消杀处理 (e: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W4-1; f: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W5-1)。(B) 混合生物被膜耐消毒剂 BC 能力分析，其中 a~d 为经质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BC 消毒剂消杀处理 (a: 1031-IFLM+W4-1; b: 1031-IFLM+W5-1; c: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W4-1; d: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W5-1); e~f 为未经消毒剂消杀处理 (e: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W4-1; f: 1031-IFLM- $\Delta fliE$ +W5-1)。

2.4 混合菌种生物被膜耐消毒剂能力差异分析

为探究缺失株与亲本株形成的混合菌种生物被膜耐消毒剂能力差异，利用质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 季铵盐类消毒剂 (BB、BC) 对其消毒剂耐受能力进行测定。由图 4a 所示，经质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BB 消毒剂消杀处理亲本株 1031-IFLM 与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜，发现仍有大量单增李斯特菌存活 (多不可数)，而缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 分别与混淆魏斯氏菌 W4-1、W5-1 共培养形成的混合生物被膜中存活的单增李斯特菌菌落数分别为 124 菌落形成单位 (Colony Forming Unit, CFU)、38 CFU，但缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜在未经消毒剂消杀情况下有大量单增李斯特菌存活 (多不可数)。由图 4b 所示，经质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BC 消毒剂消杀处理亲本株 1031-IFLM 与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜，发现仍有大量单增李斯特菌存活 (多不可数)，而缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 分别与混淆魏斯氏菌 W4-1、W5-1 共培养形成的混合生物被膜中存活的单增李斯特菌菌落数分别为 18 CFU、38 CFU，但缺失株 1031-IFLM- $\Delta fliE$ 与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜在未经消毒剂消杀情况下有大量单增李斯特菌存活 (多不可数)。利用 CLSM 进行生物被膜内细胞活力分析发现 (图 5)，与亲本株和混淆魏斯氏菌形成的混合菌种生物被膜相比，缺失株与混淆魏斯氏菌形成的混合菌种生物被膜经质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BB/BC 消杀后，生物被膜的活细胞 (绿色标记) 减少，死细胞 (红色标

记) 增多。

生物被膜是微生物在自然界中生存的主要手段，占微生物总数的 95% 到 99%^[23]。生物被膜的形成能增强细菌对环境的抗逆性^[5]。而大多数生物被膜由细菌的混合菌种组成，许多研究表明混合菌种生物被膜对化学和生物抗菌剂具有更强的抵抗能力^[24,25]。Thomassen 等^[26]在对含有或不含有单增李斯特菌菌株的假单胞菌进行的双物种生物被膜实验中，发现假单胞菌生物被膜协同增强单增李斯特菌抵抗消毒剂消杀能力。尽管混合菌种生物被膜是食品工业污染的主要来源，但目前报道的研究大多基于对单一物种生物被膜的研究。本研究从混合菌种生物被膜出发，探究食品环境中持留型单增李斯特菌耐受季铵盐类消毒剂的分子机制。

季铵盐类消毒剂 (Quaternary Ammonium Compounds, QACs) 是广泛用于卫生保健、农业、家庭和食品工业中消毒剂，食品工业中 QACs 通常使用的质量浓度为 $200\sim 1\,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[12]。针对食品接触表面，通过增加 QACs 浓度或者作用时间，可以增强消除单增李斯特菌生物被膜的作用^[27]。据报道，QACs 外排泵基因缺失可以增加大肠杆菌生物被膜对 QACs 的敏感性^[28]。本研究发现， $\Delta fliE$ 基因缺失株与混淆魏斯氏菌形成的混合菌种生物被膜经过质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BB/BC 消杀 2.50 min 后，生物被膜中存活的单增李斯特菌明显减少，表明 $fliE$ 基因缺失也能增强单增李斯特菌生物被膜对 QACs 的敏感性。Poimenidou 等^[29]发现，单增李斯特菌生物被膜形成能力越强，对 QACs 的耐受性越强。本研究发现， $fliE$ 基因的缺失导致单增李

斯特菌生物被膜形成能力下降，这也解释了 *fliE* 基因缺失使混合生物被膜中的单增李斯特菌对 QACs 的耐

受能力下降。综上结果表明，*fliE* 基因对单增李斯特菌高持留能力具有调控作用。

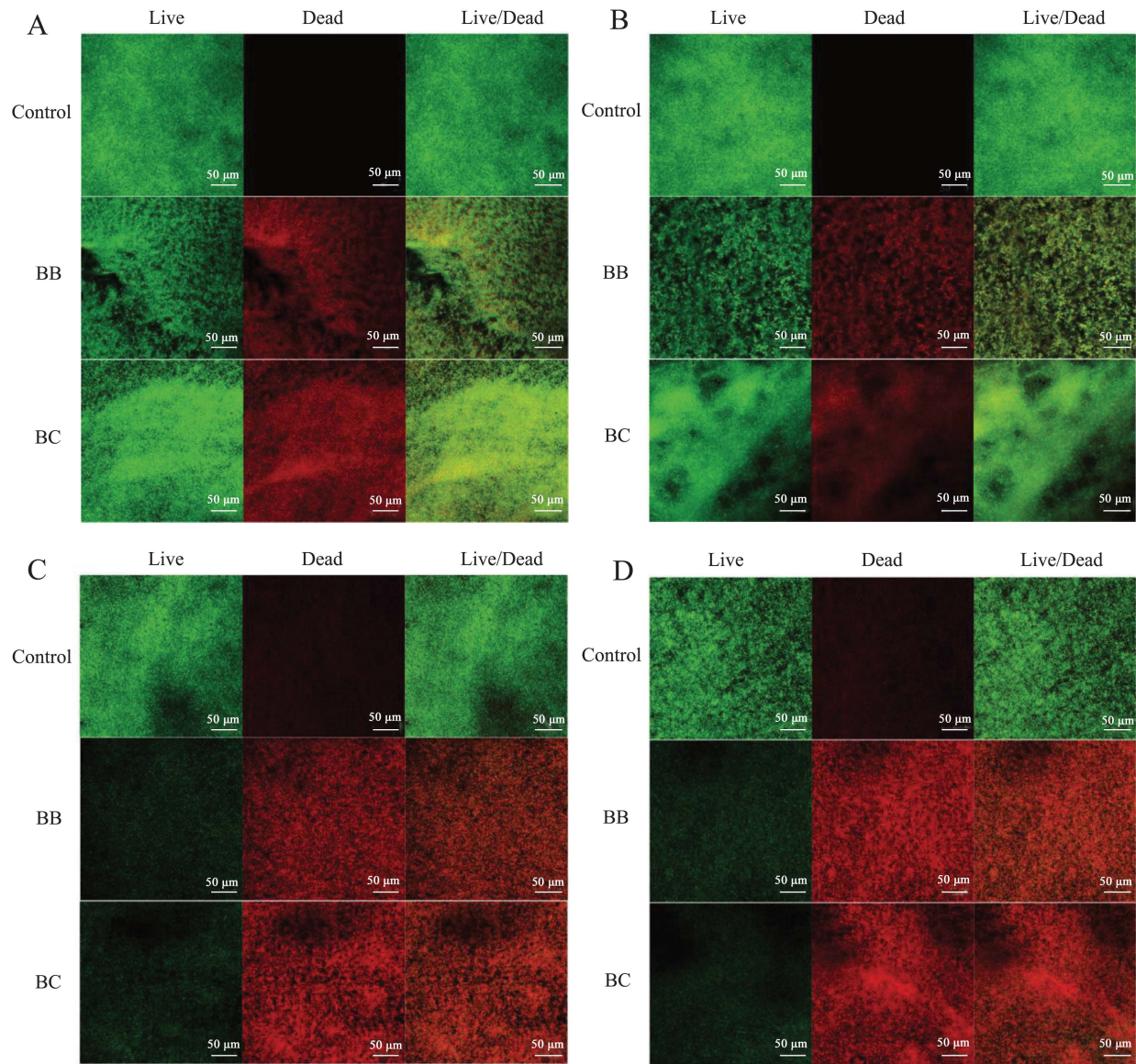


图 5 CLSM 观察生物被膜细胞的存活情况

Fig.5 Assessment of biofilm cell viability by CLSM

注：SYO9/PI 荧光染液产生双色标记，SYO9 使活细胞被标记为绿色，PI 使死细胞被标记为红色。显微镜图片在 20× 物镜下采集，比例尺为 50 μm。Control 为未经消毒剂消杀处理，BB 为经质量浓度为 200 μg·mL⁻¹ BB 消毒剂消杀处理，BC 为经质量浓度为 200 μg·mL⁻¹ BC 消毒剂消杀处理。A：1031-IFLM+W4-1；B：1031-IFLM+W5-1；C：1031-IFLM-Δ*fliE*+W4-1；D：1031-IFLM-Δ*fliE*+W5-1。

3 结论

本研究以高毒力持留基因型单增李斯特菌 1031-IFLM 菌株为亲本株，运用同源重组法构建鞭毛基因 *fliE* 缺失株，探究其对细菌生物表型的影响。结果表明，基因 *fliE* 缺失并不影响细菌生长能力和运动能力，但会影响其生物被膜形成能力，导致其与混淆魏斯氏菌共培养形成的混合生物被膜形成量显著下降，并且使混合生物被膜中的单增李斯特菌对季铵盐类消毒剂的耐受能力显著下降。本研究结果为揭示食品生产环境

中菌间相互作用下参与调控高毒力持留基因型单增李斯特菌菌株持留能力形成的分子机制提供了数据基础，对高效防控单增李斯特菌持续污染食品生产环境具有重要意义。

参考文献

[1] BUCHANAN R L, GORRIS L G M, HAYMAN M M, et al. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments [J]. Food Control, 2017, 75: 1-13.

- [2] VAZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584-640.
- [3] LOMONACO S, NUCERA D, FILIPELLO V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States [J]. Infection Genetics and Evolution, 2015, 35: 172-183.
- [4] PANG X Y, SONG X Y, CHEN M J, et al. Combating biofilms of foodborne pathogens with bacteriocins by lactic acid bacteria in the food industry [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(2): 1657-1676.
- [5] ABDALLAH M, BENOLIEL C, DRIDER D, et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments [J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(7): 453-472.
- [6] BARBOSA J, BORGES S, CAMILO R, et al. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Microbiology, 2013, 2013: 524975.
- [7] THOMAS J, GOVENDER N, MCCARTHY K M, et al. Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat [J]. New England Journal of Medicine, 2020, 382(7): 632-643.
- [8] LEMON K, HIGGINS D, KOLTER R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(12): 4418-4424.
- [9] 陈谋通. 食源性单核细胞增生李斯特菌遗传多样性分析和群体感应研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [10] 汪国俊, 邓霞, 栗绍文, 等. 低温下阻遏蛋白MogR对单增李斯特菌鞭毛形成的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1506-1520.
- [11] STERNIŠA M, GRADIŠAR C U, DRNOVŠEK A, et al. *Pseudomonas fragi* biofilm on stainless steel (at low temperatures) affects the survival of *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* and their control by a polymer molybdenum oxide nanocomposite coating [J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 394: 110159.
- [12] MØRETRØ T, SCHIRMER B C T, HEIR E, et al. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 241: 215-224.
- [13] 陈月桃. 单增李斯特菌遗传多样性分析和LadR在生物膜形成中的功能[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
- [14] 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[J]. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3151-3161.
- [15] CORDERO N, MAZA F, HEIR E, et al. Different transcriptional responses from slow and fast growth rate strains of *Listeria monocytogenes* adapted to low temperature [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 229.
- [16] SASÍAS S, MARTÍNEZ-SANGUINÉ A, BETANCOR L, et al. A naturally occurring deletion in FliE from *Salmonella enterica* serovar dublin results in an aflagellate phenotype and defective proinflammatory properties [J]. Infection and Immunity, 2018, 86(1): e00517.
- [17] CHENG C, WANG H, MA T, et al. Flagellar basal body structural proteins FlhB, FliM, and FliY are required for flagellar-associated protein expression in *Listeria monocytogenes* [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 208.
- [18] CHO S Y, NA H W, OH H B, et al. Structural basis of flagellar motility regulation by the MogR repressor and the GmaR antirepressor in *Listeria monocytogenes* [J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(19): 11315-11330.
- [19] WANG F, DENG L, HUANG F, et al. Flagellar motility is critical for *Salmonella enterica* serovar typhimurium biofilm development [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1695.
- [20] VALENTIN J D P, STRAUB H, PIETSCH F, et al. Role of the flagellar hook in the structural development and antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. ISME Journal, 2022, 16(4): 1176-1186.
- [21] HENDRIKSEN J J, LEE H, BRADSHAW A J, et al. Genetic analysis of the *Salmonella* FliE protein that forms the base of the flagellar axial structure [J]. Mbio, 2021, 12(5): e0239221.
- [22] MINAMINO T, YAMAGUCHI S, MACNAB R. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(11): 3029-3036.
- [23] COSTERTON J W, CHENG K J, GEESEY G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease [J]. Annual Review of Microbiology, 1987, 41: 435-464.
- [24] IÑIGUEZ-MORENO M, GUTIÉRREZ-LOMELÍ M, Javier Guerrero-Medina P J, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2018, 49(2): 310-319.
- [25] KOCOT A M, OLSZEWSKA M A. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 118: 108736.
- [26] THOMASSEN G M B, REICHE T, HJORUNGNES M, et al. High disinfectant tolerance in *Pseudomonas* spp. biofilm aids the survival of *Listeria monocytogenes* [J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1414.
- [27] LUO Y, LAI Y, ZHENG C, et al. Increased expression of antibiotic-resistance genes in biofilm communities upon exposure to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and other stress conditions [J]. Science of the Total Environment, 2021, 765: 144264.
- [28] SLIPSKI C, JAMIESON-DATZKIWI T, ZHANEL G, et al. Characterization of proteobacterial plasmid integron-encoded qac efflux pump sequence diversity and quaternary ammonium compound antiseptic selection in *Escherichia coli* grown planktonically and as biofilms [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021, 65(10): e0106921.
- [29] POIMENIDOU S, CHRYSADAKOU M, TZAKONIATI A, et al. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 164-171.