

小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜和浮游态的蛋白质组学对比分析

徐天翔^{1,2}, 刘鸣², 丁郁², 吴清平², 张菊梅², 王梓萌^{1,2}, 王涓^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 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: 小肠结肠炎耶尔森氏菌是革兰氏阴性食源性致病菌, 能够在食物以及食品加工设备表面形成生物膜。生物膜可以增强菌株的生存能力并危害食品安全。该文以分离自速冻食品且具有强生物膜形成能力的小肠结肠炎耶尔森氏菌 C1967-1 作为出发菌株。通过蛋白质组分析生物膜与浮游态细菌中的蛋白表达差异。GO 富集分析表明富集程度最大的前 9 个 GO 条目中, 7 个条目在生物膜中呈现下调趋势。仅 GO:0046873 (金属离子跨膜转运蛋白活性) 条目在生物膜中未呈现明显上下调趋势。KEGG 富集结果表明富集程度最大的前 20 个 KEGG 通路主要涉及碳水化合物、氨基酸和脂质的代谢过程。亚细胞定位分析结果表明, 45.65% 的差异蛋白位于细胞质内。为进一步验证蛋白质组数据, 从 GO:0046873 条目中筛选出生物膜上调蛋白 MgtA 并敲除基因 *mgtA*。结果表明, *mgtA* 的敲除没有抑制菌株的生长, 但 $\Delta mgtA$ 的生物膜量下降约 80% 且生物膜结构松散。综上所述, 研究结果为小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜形成机制以及其在食品行业生物膜防控提供重要理论依据。

关键词: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 生物膜; 蛋白质组学; *mgtA*

文章编号: 1673-9078(2024)07-53-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0868

Comparative Proteomics Analysis Between Biofilms and Planktonic Cells of *Yersinia enterocolitica*

XU Tianxiang^{1,2}, LIU Ming², DING Yu², WU Qingping², ZHANG Jumei², WANG Zimeng^{1,2}, WANG Juan^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, 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, Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, National Health Commission, Guangzhou 510070, China)

引文格式:

徐天翔, 刘鸣, 丁郁, 等. 小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜和浮游态的蛋白质组学对比分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7):53-63.

XU Tianxiang, LIU Ming, DING Yu, et al. Comparative proteomics analysis between biofilms and planktonic cells of *Yersinia enterocolitica* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 53-63.

收稿日期: 2023-07-19

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目 (2020B0301030005); 广东特支计划项目 (2021TQ06N119); 广东省重点实验室 (2020B121201009)

作者简介: 徐天翔 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物安全, E-mail: 2250654942@qq.com; 共同第一作者: 刘鸣 (1995-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食品微生物安全, E-mail: 1124136790@qq.com

通讯作者: 王涓 (1986-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全与健康, E-mail: wangjuan@scau.edu.cn

Abstract: *Yersinia enterocolitica* is a gram-negative foodborne pathogen that can form biofilms on the surfaces of food and food processing equipment. Biofilms can enhance strain viability and affect food safety. In this study, *Y. enterocolitica* strain C1967-1 isolated from quick-frozen food, which has a strong ability to form biofilms, was evaluated. Proteomics analysis was used to analyze the differences in protein expression between the biofilms and planktonic bacteria. Gene Ontology (GO) enrichment analysis demonstrated that, among the top nine GO categories with the highest degree of enrichment, seven showed downregulation trends in biofilms. Only GO:0046873 (metal ion transmembrane transporter activity) did not show significant upregulation or downregulation trends in biofilms. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment results suggested that the top 20 KEGG pathways with the highest degree of enrichment mainly involved metabolism of carbohydrates, amino acids, and lipids. The subcellular localization analysis results revealed that 45.65% of differential proteins were located in the cytoplasm. The upregulated protein *MgtA* of the biofilm was selected from GO:0046873, and the gene *mgtA* was knocked out to further verify the proteomics data. The results indicated that the knockout of *mgtA* did not inhibit strain growth. However, the biofilm amount of $\Delta mgtA$ was reduced by approximately 80%, and the structure of the biofilm was loosened. In summary, these results provide an important theoretical basis for the biofilm formation mechanism of *Y. enterocolitica* and the prevention of bacterial biofilm formation in the food industry.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; biofilm; proteomics; *mgtA*

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 是一种能够引起耶尔森菌病的革兰氏阴性菌, 在食物以及食物加工厂中均有广泛传播^[1], 能够引起胃肠炎、血流感染和关节炎等疾病^[2-4]。小肠结肠炎耶尔森氏菌在肉制品中的污染范围较广, 2009年至2011年从来自于中国11个省份猪屠宰场的8773份样品中分离出1132株小肠结肠炎耶尔森氏菌, 其中大部分为致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌, 生物血清型为3/O:3的有844株, 生物血清型为2/O:9和4/O:3的分别有3株^[5]。本团队于2015年至2016年在中国采集1588份食物样品, 在37份(2.33%)食物样品中检出小肠结肠炎耶尔森氏菌, 总共分离出51株小肠结肠炎耶尔森氏菌, 其中85%的菌株能够耐受氨苄西林、阿莫西林和克拉维酸抗生素^[6]。在美洲、欧洲以及非洲的肉制品中均能够分离出小肠结肠炎耶尔森氏菌^[7-9], 表明小肠结肠炎耶尔森氏菌在肉制品特别是猪肉中能够广泛传播, 且其中大部分分离株能够耐受抗生素。

生物膜是由细菌群落和胞外基质组成的一种可以附着于生物或者非生物体表面的集合体, 可以起到抵御外界威胁和起到保护群落的作用, 其中生物膜胞外基质 (EPS) 主要由一种或多种细胞外多糖、DNA和蛋白质组成^[10,11]。生物膜的形成过程分为可逆附着、不可逆附着、结构初始形成、成熟和分散五个步骤^[12]。生物膜能够附着于食品工业的加工设备中, 进而污染食品, 给食品的生产安全带来巨大的威胁^[13]。本团队前期发现外膜囊泡

(OMV) 中的脂多糖能够抑制小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜的初始形成^[14], 但目前对小肠结肠炎耶尔森氏菌的生物膜形成机制研究较少, 主要是涉及鞭毛以及运动能力在生物膜形成中的作用, 如影响鞭毛结构和旋转的基因突变会减少生物膜的形成^[15]。蛋白质组学能够为生物膜机制研究带来新的方向和思路, 目前已通过蛋白质组学分析方法发现许多菌株在生物膜和浮游态两种不同状态下的蛋白表达存在差异, 如维罗尼气单胞菌、结核分枝杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌^[16-18]。

本研究以分离自速冻食品的强生物膜形成能力菌株 C1967-1 作为出发菌株, 对 C1967-1 的生物膜与浮游态细菌进行蛋白质组分析。筛选出生物膜形成相关的差异表达蛋白, 对差异表达蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并对差异表达蛋白进行亚细胞定位分析。通过基因敲除等方法对差异表达蛋白编码基因的功能进行验证。该研究旨在为探明小肠结肠炎耶尔森氏菌的生物膜形成机制提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

小肠结肠炎耶尔森氏菌 C1967-1 (*Yersinia enterocolitica* C1967-1)、大肠杆菌 S17 λ pir (*Escherichia coli* S17- λ -pir)、pDS132 质粒由本团队保藏。

表 1 引物列表

Table 1 The list of primers

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
<i>16S-F2</i>	GATGACCAGCCACACTGGAA	<i>budB-R</i>	CCTGGCCGTTGTTCCATAGT
<i>16S-R2</i>	GGAGTTAGCCGGTGCTTCTT	<i>treB-F</i>	ATTACGCTGGTTTCTCCGCA
<i>citD-F</i>	GAACGTTGGAATCGAGCGAC	<i>treB-R</i>	CCGGCCAGAATTGAAGGGAT
<i>citD-R</i>	ATACTGTTCCAGCAACGCCA	<i>mgtA-F1</i>	CTTCTAGAGGTACCGTCGCGACTCACGGAAAAGAACAAG
<i>gpmI-F</i>	CAGGCAAAAGGCGAGTTCAC	<i>mgtA-R1</i>	AGTAAGGTTTGAACCTTCGGATTTAGTTAT
<i>gpmI-R</i>	GCATCACCATCGTTCATGGC	<i>mgtA-F2</i>	ATAACTAAATCCGAAGGTTCAAACCTTACT
<i>kdpC-F</i>	CGGGCTGGCTAAACTGATGT	<i>mgtA-R2</i>	ACAATTTGTGGAATTCCCGGGAGCGAGCATTTCCGGCGGT
<i>kdpC-R</i>	AGGCATATCAGCTGTCACGG	<i>mgtA-F3</i>	TGGGTTTGGAGCGCCATTAC
<i>mgtA-F</i>	AACAGGGCGTGATAGAAGGC	<i>mgtA-R3</i>	GGCAGTAATCGAGATAAGAC
<i>mgtA-R</i>	GCAGCATCGGTAAGAAGGGT	pDS132-F	ACCCGCGCGATTTACTTTTC
<i>budB-F</i>	ACCAGGCACATTTGACCAT	pDS132-R	CGCACTGAGAAGCCCTTAGA

1.1.2 培养基

培养基：LB 肉汤、LB 琼脂和 SOC 培养基，购于广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、TB Green® Premix Ex Taq™、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、RNAiso Plus、快切酶、In-Fusion 无缝连接酶，购于宝日医生物技术（北京）有限公司；细菌质粒、DNA 提取试剂盒，购于广州美基生物科技有限公司；氯霉素，购于生工生物工程（上海）有限公司；LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit，购于赛默飞世尔科技；PCR 引物，购于华大基因。

1.1.4 引物

引物名称及序列如表 1 所示。

1.2 仪器与设备

电热恒温培养箱，广东环凯微生物科技有限公司；PCR 热循环仪，德国 Analytik Jena 公司；Lightcycler 96 荧光定量 PCR 仪，Roche 公司；凝胶成像系统，广州誉维生物科技仪器有限公司；知楚控温摇床，广州虎符科学器材有限公司；离心机，美国贝克曼库尔特公司；酶标仪，美国 Bio-Tek 公司；LSM700 激光共聚焦扫描显微镜，德国蔡司公司。

1.3 方法

1.3.1 生物膜的培养观察

从甘油保种管吸取 30 μL 保种液转接至 3 mL 的

LB 肉汤，28 °C 200 r/min 培养过夜。第二日以 1:100 的比例稀释菌液至 3 mL LB 肉汤中，28 °C 静置培养两天后进行观察。

1.3.2 蛋白质组学测序分析

从甘油保种管吸取 30 μL 保种液转接至 3 mL 的 LB 肉汤，28 °C 200 r/min 培养过夜。第二日以 1:100 的比例稀释菌液至 200 mL LB 肉汤中，28 °C 静置培养两天后将生物膜与浮游态细菌收集于 1.5 mL 的离心管中，10 000×g 离心 1 min，弃去上清，使用 1×PBS 溶液清洗菌体 3 次，将菌体送去诺禾致源公司进行蛋白质组测序。在对蛋白质进行提取、定量、检测、酶切与除盐、标记、修饰肽段富集、馏分分离和质谱检测后，基于质谱检测得到的 Raw 文件，进行对应数据库的搜索，然后基于数据库搜索的结果进行蛋白质鉴定，同时进行肽段、蛋白和母离子质量容差分布分析来评定质谱检测数据的质量；对鉴定到的蛋白进行常见功能数据库注释，包括 GO 数据库和 KEGG 数据库；接下来进行蛋白质的定量分析，包括鉴定到的蛋白质总体差异分析和差异蛋白的筛选及表达模式聚类分析；最后针对筛选出来的差异蛋白进行 GO 和 KEGG 功能富集分析，并基于 Cell-mPLOC 2.0 网站 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 的革兰氏阴性菌数据库对差异蛋白进行亚细胞定位分析。

1.3.3 蛋白质组数据的 RT-qPCR 验证

按照 1.3.1 的方法进行培养，分别收集约 1×10⁹ CFU 的生物膜和浮游态细菌进行 RNA 的提取。使用 RNAiso 试剂分别对生物膜与浮游态细菌进行

RNA 的提取。对提取后的 RNA 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂进行 DNA 的去除并反转录为 cDNA。使用 TB Green 染料进行实时荧光定量 PCR，反应体系（总共 20 μL）：TB Green 10 μL；引物 F 0.4 μL；引物 R 0.4 μL；cDNA 2 μL；ddH₂O 7.2 μL，扩增的条件为：95 °C 1 min 预变性；95 °C 10 s，65 °C 30 s 进行 35 个循环扩增；95 °C 10 s、65 °C 60 s、97 °C 1 s 熔解曲线，每个样品做三个重复，使用 LightCycler 96 进行 qPCR 检测。

1.3.4 敲除株的构建

以小肠结肠炎耶尔森氏菌 C1967-1 的基因组 DNA 为模板，分别以 NCBI 设计的 *mgtA*-F1/R1 和 *mgtA*-F2/R2 为引物，PCR 扩增基因 *mgtA* 的上、下游同源臂 DNA 片段，PCR 扩增体系（50 μL）：上下游引物各 1 μL（10 μmol/L）、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 25 μL、模板 DNA 0.3 μL、ddH₂O 22.7 μL。反应条件：95 °C 预变性 10 min；95 °C 45 s，55 °C 30 s，72 °C 1 min，35 个循环；72 °C 延伸 10 min。使用 *Sac* I 和 *Sph* I 对质粒 pDS132 进行双酶切，酶切体系（20 μL）：*Sac* I 快切酶 1 μL、*Sph* I 快切酶 1 μL、Buffer(10×) 2 μL、质粒 4 μL、ddH₂O 12 μL。酶切反应条件：37 °C 40 min。将上、下游同源臂片段和线性化载体进行无缝连接，连接体系（10 μL）：上、下游同源臂各 1 μL、连接酶 2 μL、Buffer（5×）2 μL、ddH₂O 4 μL。连接反应条件：50 °C 15 min。将连接的载体在 42 °C 45 s 条件下热激转化进 S17λpir 感受态细胞中，加入 SOC 培养基恢复培养 1 h 后，利用氯霉素（34 μg/mL）的平板进行筛选。提取平板上单菌落的质粒使用引物 pDS132-F/R 进行 PCR 验证，将扩增产物送去华大基因公司测序。通过接合转移的方法将含有敲除载体转入小肠结肠炎耶尔森氏菌 C1967-1 中，利用同源重组的原理对 C1967-1 的 *mgtA* 基因进行敲除，使用 *mgtA*-F3/R3 引物对敲除株进行 PCR 验证，并将扩增产物送去华大基因公司进行测序。

1.3.5 细菌生长曲线的测定

以 1:100 的比例稀释培养至对数期的菌液，并在 96 孔板中每孔滴加 200 μL 稀释后的菌液，置于酶标仪中每隔 1 h 测定 OD₆₀₀ 值，酶标仪内的培养条件为 28 °C 200 r/min，培养时间为 16 h，绘制生长曲线。

1.3.6 结晶紫染色法测定生物膜

将菌株培养至对数期，第二日以 1:100 的比例进行稀释菌液，并在 96 孔板中每孔滴加 200 μL 稀释后的菌液，将 96 孔板置于 28 °C 培养箱中静置培养 2 d，用结晶紫染色法进行测定。将培养 2 d 的菌液倒弃，用清水清洗 3 遍，置于烘箱中烘干。加入 230 μL 的甲醇，固定 15 min，倒弃甲醇，清洗 3 遍，置于烘箱中烘干。加入 230 μL 的质量分数 0.5% 的结晶紫染液，静置染色 15 min，倒弃结晶紫染液，清洗 3 遍，置于烘箱中烘干。加入 230 μL 的体积分数 33% 乙酸，静置 15 min，测定 OD₅₉₀ 值。

1.3.7 激光共聚焦显微镜观察生物膜

将菌株培养至对数期，第二日以 1:100 的比例稀释菌液，并在 12 孔板中每孔滴加 1.2 mL 稀释后的菌液，将 14 mm 的细胞爬片放入孔板中，28 °C 培养 2 d。培养完成后将细胞爬片取出置于新的 12 孔板中，使用 SYTO9 和 PI 染料对爬片染色 15 min 后，在无菌 PBS 中清洗三次，每次 15 min，使用激光共聚焦显微镜观察生物膜。

1.3.8 数据分析

实验数据采用 Excel 统计软件处理，绘图采用 Graphpad 8.0 绘制。

2 结果与讨论

2.1 小肠结肠炎耶尔森氏菌 C1967-1 的生物膜表型观察

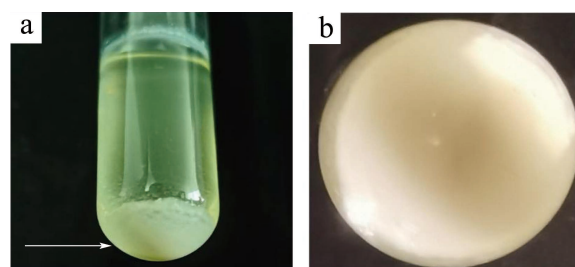


图 1 C1967-1 的生物膜形成观察

Fig.1 The observation of biofilm formation of C1967-1

注：a 图：试管中 C1967-1 的生物膜观察，红色箭头所指的试管底部白色物质为 C1967-1 的生物膜；b 图：试管底部 C1967-1 的生物膜观察。

如图 1 所示，在试管的 LB 肉汤中培养两天后观察到 C1967-1 能够在试管底部形成明显的生物膜，为深入探究生物膜与浮游态中的蛋白表达差异，挖掘调控生物膜形成的关键蛋白，将 C1967-1 的生物膜及浮游态细菌进行蛋白质组学分析。

表 2 蛋白质组学中验证蛋白的相关信息

Table 2 Information about proteins of verification in proteomics data

名称	基因描述	生物膜表达量	浮游态表达量	log ₂ FC
CitD	柠檬酸裂解酶酰基载体蛋白	181.07	39.67	2.19
GpmI	2,3-二磷酸甘油酸非依赖性磷酸甘油酸变位酶	555.37	126.27	2.14
KdpC	钾转运 ATP 酶 KdpC 亚基	594.77	174.97	1.77
MgtA	镁离子转运 ATP 酶	162.43	50.87	1.67
BudB	乙酰乳酸合成酶	6 050.30	1 997.17	1.60
TreB	PTS 系统海藻糖 (麦芽糖) 特异性转运蛋白亚基 IIBC	4 158.37	1 375.63	1.60

2.2 蛋白质组数据质控分析

为验证蛋白质组数据质量的可靠性,对蛋白质组学数据进行质控分析。如图 2 所示,检测到的肽段长度主要在 6~30 之间,表明蛋白质组测序数据质量可靠性高,为后续的差异表达蛋白的分析提供了科学的依据。

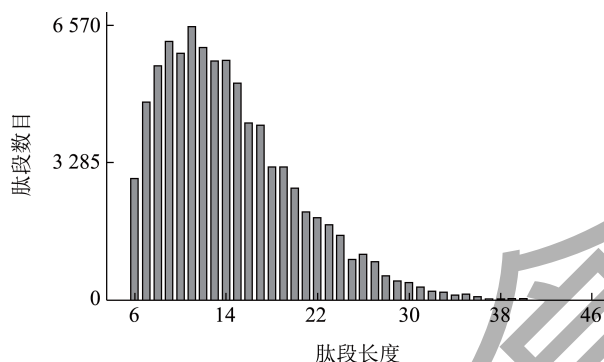


图 2 肽段长度范围分布图

Fig.2 The distribution plot of peptides length

注:横坐标为肽段氨基酸残基数,纵坐标为该长度肽段的个数。

2.3 蛋白质组数据的差异表达蛋白分析及 RT-qPCR 验证

在蛋白质组学数据中,生物膜和浮游态总共鉴定出的蛋白数量为 3 502 个,根据 $P < 0.05$ 筛选出差异表达蛋白。以 Fold Change (FC; 生物膜 / 浮游态) > 2.0 筛选上调差异表达蛋白,FC (生物膜 / 浮游态) < 0.50 , 筛选下调差异表达蛋白。如图 3a 生物膜和浮游态细菌差异表达蛋白的火山图所示,与浮游态相比,生物膜的差异表达蛋白有 164 个,其中表达上调的蛋白 67 个,表达下调的蛋白 97 个。从蛋白质组学数据中根据生物膜与浮游态的表达差异倍数 (FC) 从大至小,在差异表达蛋白中筛选出 6 个蛋白编码基因 *citD*、*gpmI*、*kdpC*、*mgtA*、*budB* 和 *treB* 进行 RT-qPCR 验证。6 个蛋白在蛋白质组学

中的相关信息如表 2 所示,在生物膜中的表达量均比浮游态高,FC 值均大于 2,属于上调蛋白。图 3b 为 RT-qPCR 的验证结果,这 6 个基因在生物膜中表达量与在浮游态中表达量之间的比值 FC 均大于 2,属于上调蛋白,与蛋白质组数据的趋势一致。参与海藻糖转运的 *treB* 是 6 个基因中唯一被证实与生物膜形成呈正相关的基因,根据研究表明单核细胞增生李斯特菌中 *treB* 基因的突变影响海藻糖的转运,进而抑制生物膜的形成^[19],根据 RT-qPCR 验证结果,其中 FC 值最大的是 *gpmI*,FC 值最小的是参与 Mg^{2+} 转运的 *mgtA*^[20]。

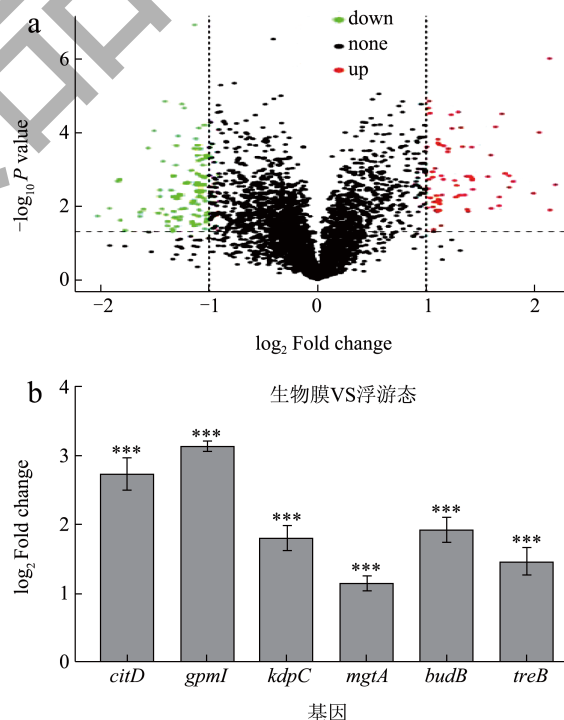


图 3 差异蛋白火山图及蛋白质组 RT-qPCR 验证

Fig.3 Volcano map of differential proteins and RT-qPCR validation of proteomics data

注:a 图:差异蛋白比较的火山图,横坐标表示差异蛋白的差异倍数 (\log_2 值),纵轴表示 P 值 ($-\log_{10}$ 值),黑色代表差异不显著的蛋白,红色代表上调蛋白,绿色代表下调蛋白;b 图:蛋白质组学的 RT-qPCR 验证,*** 指 $P < 0.000 1$ 。

表 3 GO富集相关信息

Table 3 Information about GO enrichment

序号	GO 条目	GO 术语	GO 分类	校正后 P 值	差异蛋白数
1	GO:0016491	氧化还原酶活性	MF	0.001 399	26
2	GO:0003857	3- 羟基酰基辅酶 A 脱氢酶活性	MF	0.001 399	4
3	GO:0006631	脂肪酸代谢过程	BP	0.004 026	7
4	GO:0032787	单羧酸代谢过程	BP	0.006 394	10
5	GO:0016614	氧化还原酶活性	MF	0.006 394	8
6	GO:0006007	葡萄糖分解代谢过程	BP	0.006 394	3
7	GO:0055114	氧化还原过程	BP	0.008 086	26
8	GO:0044712	单生物体分解代谢过程	BP	0.008 086	7
9	GO:0046873	金属离子跨膜转运蛋白活性	MF	0.008 509	6

注: BP 表示生物过程类别, MF 表示分子功能类别。

2.4 GO富集分析

对生物膜和浮游态细菌的差异表达蛋白进行 GO 注释, 共注释到 114 个差异表达蛋白。对这些差异表达蛋白进行功能分类分析, 其中富集程度最显著的前 9 条 GO 条目相关信息如表 3 所示。在这 9 个 GO 条目中, 有 3 个 GO 条目与氧化还原代谢过程有关, 分别为 GO:0016491、GO:0016614 和 GO:0055114, 包含差异蛋白数最多的 GO 条目是 GO:0016491 和 GO:0055114, 各有 26 个差异表达蛋白, 表明氧化还原反应在生物膜与浮游态中起到重要的调控作用, 在戈多尼链球菌中表达氧化还原酶 *sdbA* 基因的敲除增强了生物膜形成能力^[21], 这与本研究蛋白质组学的结论相似。包含差异蛋白数最少的 GO 条目是 GO:0006007, 含有 3 个差异表达蛋白, 表明细菌生物膜和浮游态的两种不同状态涉及到葡萄糖代谢过程的改变。

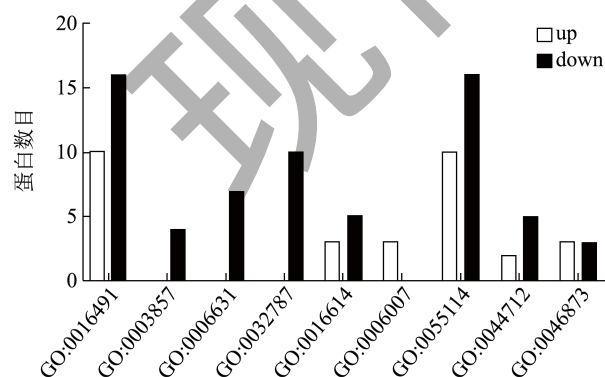


图 4 GO 条目的上下调蛋白比对

Fig.4 Comparison of the upregulated and downregulated proteins of GO terms

对上述 9 个 GO 条目中的上下调蛋白数目进行统计, 结果如图 4 所示, 富集程度最大的前 9 个

GO 条目中, 7 个条目在生物膜中整体呈现下调趋势, 仅 GO:0006007 条目生物膜中的上调蛋白多于下调蛋白。GO:0006007 条目涉及葡萄糖分解代谢过程, 该条目中的 3 个差异表达蛋白全部在生物膜中上调, 推断细菌通过上调葡萄糖代谢相关基因的表达, 加快葡萄糖的代谢过程, 为机体提供大量能量以形成生物膜。有研究报道表明, 培养基中添加葡萄糖能促进粪肠球菌的生物膜形成^[22], 这与本研究的观点相似。

在 9 个 GO 条目中, 仅 GO:0046873 条目中的上调蛋白等于下调蛋白, 不呈现明显上下调趋势。GO:0046873 条目涉及金属离子跨膜转运蛋白活性, 存在 3 个在生物膜中上调的差异表达蛋白 HoxN、KdpC 和 MgtA, 其中的蛋白 HoxN 负责镍离子与钴离子的转运, 根据前人的研究, 镍离子能够促进大肠杆菌形成生物膜^[23], 钴离子目前尚无与生物膜直接相关的研究报道。KdpC 参与细菌体内钾离子的转运, 有研究报道, 钾离子通道的缺失抑制细菌生物膜的形成^[24], 表明钾离子的转运在生物膜形成中具有重要的作用。根据 RT-qPCR 的验证结果, *citD*、*gpmI*、*kdpC*、*mgtA*、*budB* 和 *treB* 基因在生物膜中的表达量均高于浮游态, 其中基因 *treB* 已被证实与生物膜形成呈正相关^[19], 基因 *citD*、*gpmI*、*kdpC* 和 *budB* 所涉及的基因功能未发现与生物膜形成有直接关联。据研究表明, 嗜水气单胞菌中负责 Mg^{2+} 转运调控基因 *mgtE* 的突变使得细菌的粘附能力以及生物膜的形成减弱^[25], 表明 Mg^{2+} 的转运调控基因与生物膜形成之间存在紧密联系。MgtA (镁转运 ATP 酶) 在细胞体内负责 Mg^{2+} 的转运^[20], 为探究在小肠结肠炎耶尔森氏菌中 Mg^{2+} 的转运调控

基因是否同样能参与生物膜的形成并进一步验证蛋白质组数据，在后续实验中选取在生物膜中显著上调的 *mgtA* 进行敲除验证。

2.5 KEGG富集分析

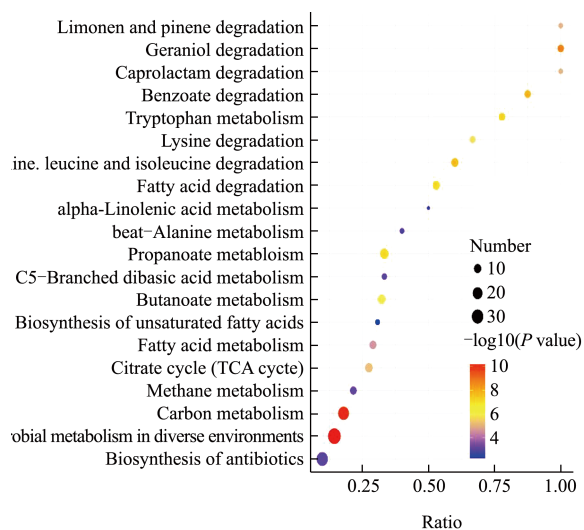


图 5 KEGG 富集气泡图

Fig.5 The bubble chart of the KEGG pathway enrichment

注：图中横坐标为相应通路中差异蛋白的数目与该通路鉴定出的总蛋白数目的比值；点的颜色代表超几何检验的 P 值，颜色由蓝至红，颜色越红，值越小；点的大小代表相应通路中差异蛋白的数目，点越大，该通路内差异蛋白就越多。

为进一步研究生物膜形成的生物学通路，对生物膜和浮游态细菌的差异表达蛋白进行 KEGG 富集分析。图 5 和表 4 分别为 KEGG 富集程度前 20 的气泡图和条目表。其中富集程度最显著的前 2 条 KEGG 通路分别是 map01120（不同环境中的微生物代谢）和 map01200（碳代谢），共有 62 个差异表达蛋白分布在这两个 KEGG 途径中。map01120 通路中含有数量最多的差异表达蛋白，为 38 个，在生物膜中的上调表达蛋白 16 个，下调表达蛋白 22 个。其中 *UreC*（脲酶亚基 α ）属于通路中的上调蛋白，有研究报道，*ureC* 与奇异变形杆菌的生物膜形成能力正相关^[26]，这与蛋白质组数据一致。map01200 通路中含有 26 个差异表达蛋白，在生物膜中的上调表达蛋白 8 个，下调表达蛋白 18 个，其中 *AceA*（异柠檬酸裂解酶）属于通路中的下调蛋白，根据前人的研究，*aceA* 的缺失在厌氧条件下能够增强了铜绿假单胞菌的生物膜形成^[27]，这与蛋白质组数据一致。

表 4 KEGG富集相关信息

Table 4 Information about KEGG enrichment

序号	KEGG 条目	通路名称
1	map01120	不同环境中微生物代谢
2	map01200	碳代谢
3	map00281	香叶醇降解
4	map00362	苯甲酸降解
5	map00280	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解
6	map00380	色氨酸代谢
7	map00640	丙酸酯代谢
8	map00071	脂肪酸代谢
9	map00650	丁酸酯代谢
10	map00310	赖氨酸降解
11	map00020	柠檬酸盐循环
12	map00903	柠檬烯和蒎烯降解
13	map00930	己内酰胺降解
14	map01212	脂肪酸代谢
15	map00680	甲烷代谢
16	map00660	C5 支链二元酸代谢
17	map00410	β - 丙氨酸代谢
18	map00592	α - 亚麻酸代谢
19	map01040	不饱和脂肪酸的生物合成
20	map01110	次生代谢物的生物合成

如表 4 所示，富集程度最大的前 20 个 KEGG 通路均属于代谢通路，主要涉及碳水化合物、氨基酸和脂质的代谢过程，表明生物膜的形成与碳水化合物、氨基酸以及脂质有密切的联系。在涉及氨基酸代谢的 map00280（缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解）通路中含有 9 个差异表达蛋白，在生物膜中上调蛋白仅 2 个，下调蛋白 7 个，通路整体呈现下调的趋势，该通路中的差异蛋白参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解，表明生物膜细菌体内下调缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解代谢活动，有研究人员通过实验证明缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸能够促进铜绿假单胞菌的生物膜形成^[28]，因此推测细菌通过减少缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解来促进生物膜的形成。在涉及碳水化合物代谢的 map00020（柠檬酸盐循环）通路中含有 11 个差异表达基因，表明柠檬酸盐循环与生物膜的形成密切相关，在枯草芽孢杆菌中的研究结果证明了这一点，枯草芽孢杆菌中参与柠檬酸盐循环的基因 *gltA* 的敲除抑制生

物膜的形成^[29]。在涉及脂质代谢的 *map01040* (不饱和脂肪酸的生物合成) 通路中有 4 个差异表达蛋白, 且全部为下调蛋白, 表明生物膜细菌体内的不饱和脂肪酸的生物合成代谢活性下降, 根据文献报道, 不饱和脂肪酸能够抑制金黄色葡萄球菌的生物膜形成^[30], 这与本研究中蛋白质组学的结论相似, 推测细菌通过抑制不饱和脂肪酸的合成来促进生物膜的形成。

2.6 差异表达蛋白亚细胞定位分析

为了解差异表达蛋白在细胞中的定位, 对差异表达蛋白进行亚细胞定位分析, 结果如图 6 所示, 45.65% 的差异表达蛋白为细胞质蛋白, 30.43% 的差异表达蛋白为细胞内膜蛋白, 15.22% 的差异表达蛋白为周质蛋白, 6.52% 的差异表达蛋白为细胞外膜蛋白, 2.18% 的差异表达蛋白为细胞外蛋白。以上结果表明, 差异表达蛋白大部分位于细胞质内, 位于细胞内膜的差异表达蛋白占比第二, 位于细胞外的差异表达蛋白占比最小。根据前人研究表明, 流产布鲁氏菌的生物膜和浮游态之间 74.3% 的差异表达蛋白是细胞质蛋白, 位于细胞外的差异表达蛋白最少, 仅为 8.2%^[31]。这与本研究的蛋白质组学数据相似, 占比最高的均是细胞质蛋白, 占比最小的均是细胞外蛋白。

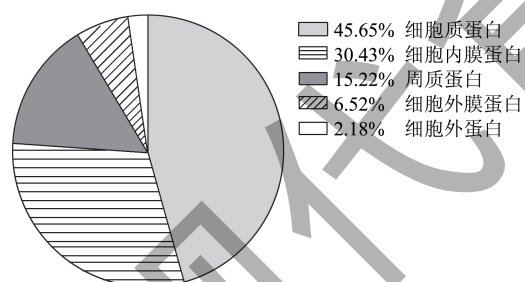


图 6 差异蛋白亚细胞定位分析

Fig.6 The subcellular localization analysis of differential protein

2.7 $\Delta mgtA$ 突变株的构建及生长曲线的测定

蛋白质组学数据及 RT-qPCR 验证结果显示生物膜中 *MgtA* 在蛋白质水平和 mRNA 水平上的表达量显著高于浮游态, 为探究 *mgtA* 在小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜形成中的作用并进一步验证蛋白质组数据, 构建 $\Delta mgtA$ 敲除株。图 7a 为 $\Delta mgtA$ 的琼脂糖凝胶的电泳结果, 条带大小与预期结果一致, 测序结果正确, 表明 $\Delta mgtA$ 构建成功。为探究基因 *mgtA* 的缺失是否对小肠结肠炎耶尔森氏菌的生长造

成影响, 对野生株和敲除株的生长曲线进行测定。实验结果表明 (图 7b), $\Delta mgtA$ 的生长曲线与野生株一致, 表明基因 *mgtA* 的缺失不会对菌株的生长产生影响。据报道, 细菌体内有三种 Mg^{2+} 转运系统 (CorA、MgtE 和 MgtA/B)^[32], CorA 和 MgtE 被认为是细菌主要的 Mg^{2+} 转运蛋白且具有广泛的系统发育分布^[33], 同属于 P 型 ATP 酶的 MgtA 和 MgtB 表达量受外部 Mg^{2+} 浓度的调控, 在低 Mg^{2+} 浓度下表达量提高^[20]。在沙门氏菌的研究中发现当细菌处于高 Mg^{2+} 浓度环境中时, 没有观察到 MgtA/B 的表达, 承担 Mg^{2+} 转运的是 CorA 转运系统, 而当细菌处于低 Mg^{2+} 浓度环境中时, 需要 ATP 的水解提供能量以保持 Mg^{2+} 的转运, MgtA/B 被诱导表达并替代 CorA 成为主要的 Mg^{2+} 转运系统^[33], 表明 MgtA/B 转运系统对处于低 Mg^{2+} 浓度环境中的细菌至关重要。推测 $\Delta mgtA$ 中尽管 MgtA 的转运功能缺失, 但可以通过其它转运系统吸收 Mg^{2+} , 维持细菌的生长活动。因此 *mgtA* 的缺失并没有影响细菌的生长。

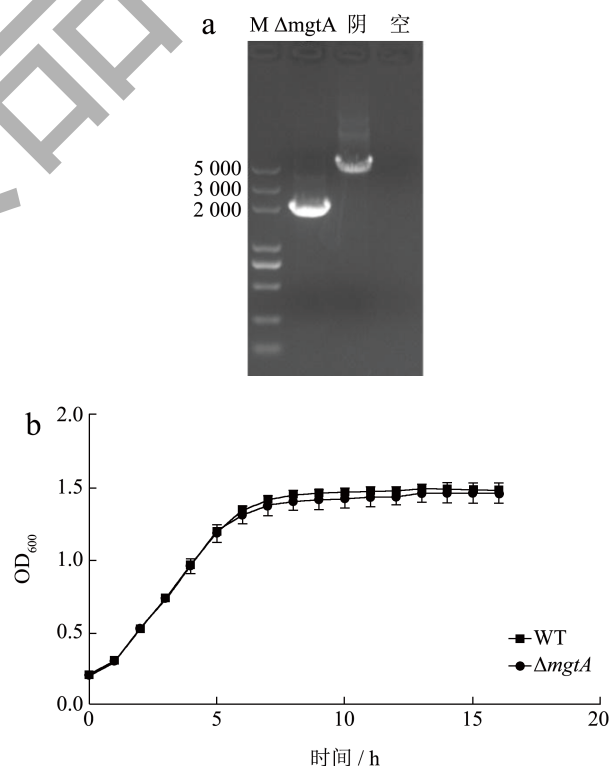
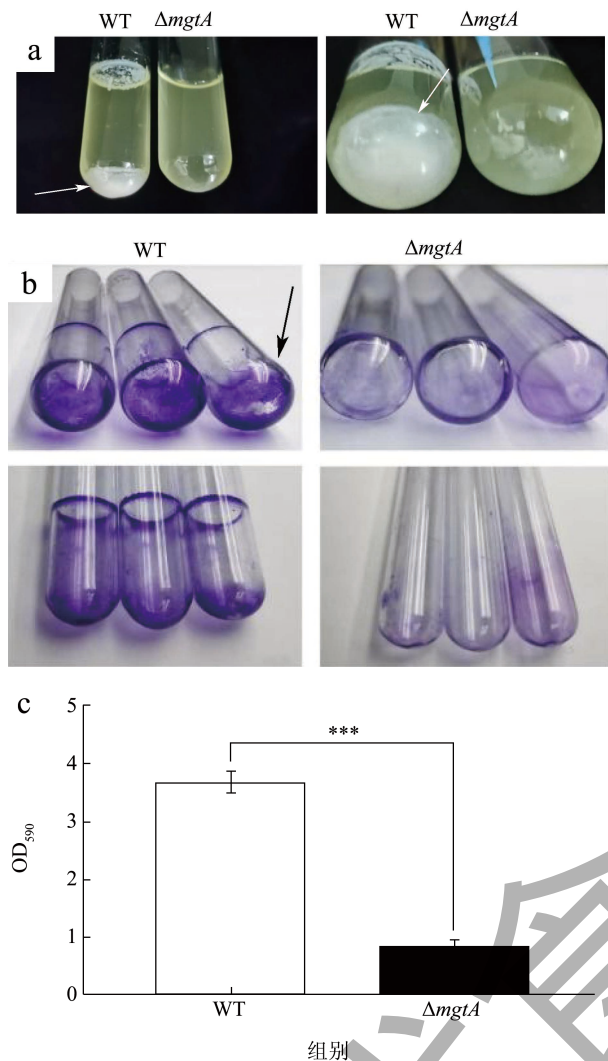


图 7 敲除株的构建和生长曲线的测定

Fig.7 The construction of $\Delta mgtA$ and determination of growth curves

注: a 是敲除株的 PCR 验证结果, 目的条带大小为 1 989 bp; b 是野生株和敲除株的生长曲线测定。

2.8 野生株和 $\Delta mgtA$ 生物膜表型观察图8 野生株 C1967-1 和 $\Delta mgtA$ 生物膜形成观察Fig.8 Observations of biofilm formation by wild strain C1967-1 and $\Delta mgtA$

注: a 是野生株和敲除株试管中生物膜形成能力观察。其中白色箭头指向为野生株的生物膜; b 是野生株和敲除株试管中生物膜的结晶紫染色观察结果; c 是野生株和敲除株生物膜形成能力的定量测定。*** 指 $P < 0.0001$ 。

为探究基因 $mgtA$ 的缺失对小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜形成能力的影响, 对 $\Delta mgtA$ 在 LB 肉汤中的生物膜形成能力进行定性观察。如图 8a 所示, 野生株在试管底部形成明显生物膜, $\Delta mgtA$ 的试管底部则没有观察到明显的生物膜形成。在试管中使用结晶紫染色法观察, 发现野生株同样在试管底部有明显的生物膜形成, 而 $\Delta mgtA$ 无明显的生物膜形成 (图 8b)。以上结果表明 $mgtA$ 的缺失抑制小肠结肠炎耶尔森氏菌的生物膜形成。同时, 通过 96 孔板培养并进行结晶紫染色定量观察, 结果如图 8c 所

示, 野生株在 96 孔板中的生物膜形成量显著大于 $\Delta mgtA$ ($P < 0.05$), $mgtA$ 的敲除能够减少约 80% 的生物膜形成。据研究表明, 细菌体内的双组分调控系统 PhoP/PhoQ 受胞外 Mg^{2+} 浓度的调控, 低 Mg^{2+} 浓度能够通过促进 PhoP 的磷酸化来上调 $mgtA$ 和 $mgtB$ 的转录表达^[34,35]。PhoP/PhoQ 是各种细菌病原体毒力因子包括生物膜形成所必需的双组分调控系统^[33,36], 有研究表明低 Mg^{2+} 浓度能够促进生物膜的形成^[37], 推测低 Mg^{2+} 浓度通过诱导 PhoP/PhoQ 参与生物膜的形成过程。MgtB 在生物膜形成中的作用已被证实, MgtB 的失活使得单核细胞增生李斯特菌和阪崎克罗诺杆菌的生物膜形成能力显著下降, 特别是在阪崎克罗诺杆菌中, MgtB 的缺失能够减少 77% 的生物膜形成, 这与本研究的结果相似^[38,39]。综上所述, 推测低 Mg^{2+} 浓度激发 PhoP 的磷酸化, 从而上调 $mgtA$ 的表达参与到生物膜的形成过程中, 本研究的 RT-qPCR 结果表明生物膜中的 $mgtA$ 表达量显著高于浮游态, 因此 $mgtA$ 的缺失能够抑制小肠结肠炎耶尔森氏菌的生物膜形成。

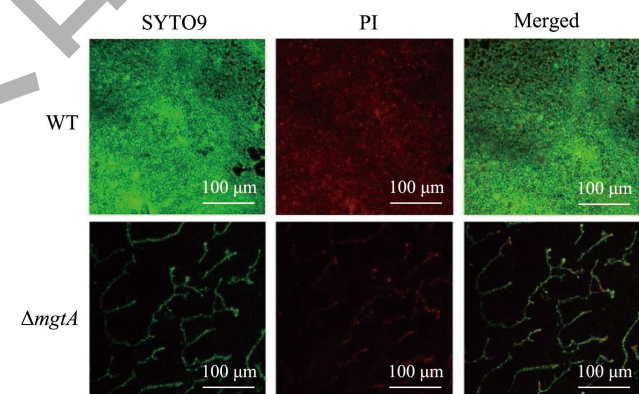
2.9 激光共聚焦显微镜观察野生株和 $\Delta mgtA$ 的生物膜

图9 生物膜在激光共聚焦显微镜下观察结果

Fig.9 The observation of biofilm by confocal laser scanning microscopy

注: SYTO9 染料下的绿色细胞为活细胞, PI 染料下的红色细胞为死细胞。

定性实验和定量实验的结果已证实野生株的生物膜形成显著强于 $\Delta mgtA$, 需从微观角度对野生株和 $\Delta mgtA$ 的生物膜进行分析观察。激光共聚焦显微镜的观察结果如图 9 所示, 野生株的生物膜厚且结构致密, $\Delta mgtA$ 的生物膜单薄且疏松, 表明 $\Delta mgtA$ 的生物膜形成能力显著下降, 与上文结果一致。粘附于基质表面是细菌生物膜形成的重要步骤^[12], 嗜

水气单胞菌中 MgtE 的敲除显著降低了细菌的粘附和生物膜形成能力^[25], 本研究结果表明, 在激光共聚焦观察结果中, $\Delta mgtA$ 的生物膜覆盖度显著低于野生株, 推测 $\Delta mgtA$ 的粘附能力下降进而抑制生物膜的形成。

3 结论

本研究运用蛋白质组学技术对小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜和浮游态的差异表达蛋白进行分析。总共筛选出 164 个差异表达蛋白, 在生物膜中上调蛋白有 67 个, 下调蛋白有 97 个, 45.65% 的差异表达蛋白位于细胞质内, 位于细胞外的差异表达蛋白最少, 仅为 2.18%。KEGG 富集分析结果表明富集程度最大的前 20 个 KEGG 通路主要涉及碳水化合物、氨基酸和脂质的代谢过程。富集程度最高的前 9 个 GO 条目仅 GO:0046873 在生物膜中不呈现明显上下调趋势。在 GO:0046873 条目筛选出生物膜中的显著上调蛋白 MgtA 进行功能验证, 发现 MgtA 的缺失并不影响菌株的生长, 但敲除株的生物膜形成能力显著下降且生物膜结构疏松, 表明参与 Mg^{2+} 转运的 MgtA 能够促进小肠结肠炎耶尔森氏菌的生物膜形成。综上所述, 本研究的蛋白质组学能够为小肠结肠炎耶尔森氏菌生物膜形成机制提供理论依据。

参考文献

- [1] PIRAS F, SIDDI G, LE G AS, et al. Traceability, virulence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in two industrial cheese-making plants [J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 398: 110225.
- [2] AHMED-KHAN M A, MOIN K, HANIF M, et al. A gut-wrenching feeling: overcoming cognitive biases in an atypical presentation of chronic mesenteric ischemia [J]. Cureus, 2023, 15(3): e36416.
- [3] LIU Y X, ZHONG H, LE K J, et al. Bloodstream infection caused by *Yersinia enterocolitica* in a host with ankylosing spondylitis: a case report and literature review [J]. Annals of Palliative Medicine, 2021, 10(5): 5780-5785.
- [4] WALLET F, LE G AS, PENVEN M, et al. *Yersinia enterocolitica* biotype 1B case report: an unusual pathogen in an osteoarticular infection on device [J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 498.
- [5] LIANG J R, WANG X, XIAO Y C, et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(8): 2949-2956.
- [6] WANG J, LIU M, WANG H X, et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail food samples in China [J]. LWT, 2021, 150: 111876.
- [7] PEGORARO K, SERENO M J, VIANA C, et al. Pathogenic potential and antibiotic resistance of *Yersinia enterocolitica*, a foodborne pathogen limited to swine tonsils in a pork production chain from Southern Brazil [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(4): 2335-2342.
- [8] CENTORAME P, SULLI N, DE F C, et al. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pig tonsils at slaughterhouse in central Italy [J]. Veterinaria Italiana, 2017, 53(4): 331-344.
- [9] SEAKAMELA E M, DISEKO L, MALATJI D, et al. Characterisation and antibiotic resistance of *Yersinia enterocolitica* from various meat categories, South Africa [J]. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2022, 89(1): e1-e11.
- [10] NYANASEGRAN P K, NATHAN S, FIRDAUS-RAIH M, et al. Biofilm signaling, composition and regulation in *Burkholderia pseudomallei* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 33(1): 15-27.
- [11] PENG N, CAI P, MORTIMER M, et al. The exopolysaccharide-eDNA interaction modulates 3D architecture of *Bacillus subtilis* biofilm [J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 115.
- [12] LIU X L, YAO H Y, ZHAO X H, et al. Biofilm formation and control of foodborne pathogenic bacteria [J]. Molecules, 2023, 28(6): 2432.
- [13] ASHRAFUDOULLA M, NA K W, BYUN K H, et al. Isolation and characterization of *Salmonella* spp. from food and food contact surfaces in a chicken processing factory [J]. Poultry Science, 2021, 100(8): 101234.
- [14] MA G X, DING Y, WU Q P, et al. *Yersinia enterocolitica*-derived outer membrane vesicles inhibit initial stage of biofilm formation [J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2357.
- [15] KIM T J, YOUNG B M, YOUNG G M. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5466-5474.
- [16] LI Y, YANG B T, TIAN J X, et al. An iTRAQ-based comparative proteomics analysis of the biofilm and planktonic states of *Aeromonas veronii* TH0426 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1450.
- [17] WANG C, ZHANG Q L, WANG Y, et al. Comparative proteomics analysis between biofilm and planktonic cells of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Electrophoresis, 2019, 40(20): 2736-2746.
- [18] DI B G, PICCIANI C, LUPETTI V, et al. Comparative proteomic analysis of protein patterns of *Stenotrophomonas maltophilia* in biofilm and planktonic lifestyles [J].

- Microorganisms, 2023, 11(2): 442.
- [19] WU J, MCAULIFFE O, O'BYRNE C P. Trehalose transport occurs via TreB in *Listeria monocytogenes* and it influences biofilm development and acid resistance [J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 394: 110165.
- [20] SNAVELY M D, GRAVINA S A, CHEUNG T T, et al. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: regulation of *mgtA* and *mgtB* expression [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(2): 824-829.
- [21] DAVEY L, NG C K W, HALPERIN S A, et al. Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Streptococcus gordonii* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(23): 16416-16429.
- [22] KIM M A, ROSA V, MIN K S. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 21867.
- [23] PERRIN C, BRIANDET R, JUBELIN G, et al. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(6): 1723-1733.
- [24] JING X Y, CHEN S S, LIU X, et al. Potassium channel mediates electroactive biofilm formation via recruiting planktonic *Geobacter* cells [J]. The Science of the Total Environment, 2022, 850: 158035.
- [25] MERINO S, GAVÍN R, ALTARRIBA M, et al. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 198(2): 189-195.
- [26] SUN Y D, WEN S S, ZHAO L L, et al. Association among biofilm formation, virulence gene expression, and antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates from diarrhetic animals in Northeast China [J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 176.
- [27] CHUNG J C, RZHEPISHEVSKA O, RAMSTEDT M, et al. Type III secretion system expression in oxygen-limited *Pseudomonas aeruginosa* cultures is stimulated by isocitrate lyase activity [J]. Open Biology, 2013, 3(1): 120131.
- [28] BERNIER S P, HA D G, KHAN W, et al. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling [J]. Research in Microbiology, 2011, 162(7): 680-688.
- [29] KIMURA T, KOBAYASHI K. Role of glutamate synthase in biofilm formation by *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(14): e00120-20.
- [30] YUYAMA K T, ROHDE M, MOLINARI G, et al. Unsaturated fatty acids control biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria [J]. Antibiotics, 2020, 9(11): 788.
- [31] TANG T S, XU Y, WANG J F, et al. Evaluation of the differences between biofilm and planktonic *Brucella abortus* via metabolomics and proteomics [J]. Functional & Integrative Genomics, 2021, 21(3-4): 421-433.
- [32] MAGUIRE M E. Magnesium transporters: properties, regulation and structure [J]. Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library, 2006, 11: 3149-3163.
- [33] GROISMAN E A, HOLLANDS K, KRINER M A, et al. Bacterial Mg²⁺ homeostasis, transport, and virulence [J]. Annual Review of Genetics, 2013, 47: 625-646.
- [34] SHIN D, LEE E J, HUANG H, et al. A positive feedback loop promotes transcription surge that jump-starts *Salmonella* virulence circuit [J]. Science, 2006, 314(5805): 1607-1609.
- [35] SONCINI F C, GARCÍA V E, SOLOMON F, et al. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(17): 5092-5099.
- [36] WU Z, ZHENG R, ZHANG J, et al. Transcriptional profiling of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in response to anti-biofilm and anti-infection agent exopolysaccharide EPS273 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(1): 265-277.
- [37] COFFEY B M, AKHAND S S, ANDERSON G G. MgtE is a dual-function protein in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology, 2014, 160(Pt 6): 1200-1213.
- [38] NOWAK J, VISNOVSKY S B, PITMAN A R, et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* 15G01, a persistent isolate from a seafood-processing plant, is influenced by inactivation of multiple genes belonging to different functional groups [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(10): e02349-20.
- [39] HARTMANN I, CARRANZA P, LEHNER A, et al. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2251-2261.