



冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制机制

纠敏¹ 闫鹏¹ 李晶晶¹ 汪伦记^{*1,2}

1 河南科技大学食品与生物工程学院 河南 洛阳 471023

2 河南省食品微生物工程技术研究中心 河南 洛阳 471023

摘 要:【背景】金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病菌,易在食品及加工器具表面形成生物膜,引起食品腐败和疾病的传播,威胁食品安全。【目的】研究冬凌草甲素抑制金黄色葡萄球菌生物膜形成的作用机制。【方法】使用结晶紫染色法和扫描电镜观察冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用,刚果红平板法定性检测冬凌草甲素对细胞间多糖黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)合成的影响,分光光度法测定冬凌草甲素对供试菌株胞外 DNA (eDNA)释放量的影响,RT-PCR 技术检测冬凌草甲素对供试菌株 *icaA*、*cidA*、*agrA* 和 *sarA* 基因表达量的影响。【结果】冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成有较强的抑制作用;冬凌草甲素能显著抑制 PIA 的合成,且呈浓度剂量依赖;冬凌草甲素能抑制供试菌株 eDNA 的释放量,其中 1/4 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 16 h 后,与对照组相比, eDNA 的释放量降低了 48.62%;冬凌草甲素可显著抑制金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因的表达,其中 1/2MIC 的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 16 h 后, *icaA*、*cidA*、*agrA* 和 *sarA* 基因的表达量分别比对照降低了 91.6%、94.7%、77.6%和 70.4%。【结论】冬凌草甲素通过抑制 *icaA* 和 *cidA* 基因的表达,影响 PIA 的合成和 eDNA 的释放,进而干预生物膜的形成。

关键词: 生物膜, 金黄色葡萄球菌, 冬凌草甲素, 生物膜相关基因

Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by oridonin

JIU Min¹ YAN Peng¹ LI Jing-Jing¹ WANG Lun-Ji^{*1,2}

1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

2 Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Luoyang, Henan 471023, China

Abstract: [Background] *Staphylococcus aureus* is a type of common food-borne pathogenic bacteria that can easily form biofilm on the surface of food and processing equipment, leading to food corruption and disease spread, and threatening food safety. [Objective] To study the inhibition of *S. aureus* biofilm formation by oridonin. [Methods] The inhibition of biofilm formation by oridonin was studied using crystal violet staining assay and scanning electron microscopy. The influence of oridonin on the formation of polysaccharide intercellular adhesion and the release of extracellular DNA (eDNA) was detected by Congo red agar and spectrophotometer. RT-PCR analysis was used to determine the effect of oridonin on

Foundation item: Natural Science Foundation of Henan Province (182300410081)

***Corresponding author:** E-mail: wanglunji7215@163.com

Received: 26-08-2019; **Accepted:** 18-12-2019; **Published online:** 06-01-2020

基金项目: 河南省自然科学基金(182300410081)

***通信作者:** E-mail: wanglunji7215@163.com

收稿日期: 2019-08-26; **接受日期:** 2019-12-18; **网络首发日期:** 2020-01-06

the expression of genes, including *icaA*, *cidA*, *agrA* and *sarA*. **[Results]** Oridonin showed strong antimicrobial activity on *S. aureus* biofilm formation. Polysaccharide intercellular adhesion formation and eDNA release were greatly inhibited by oridonin. eDNA release decreased by 48.62% after incubated with oridonin at 1/4MIC for 16 h. Oridonin could significantly inhibit the expression of biofilm forming related genes in *S. aureus*. After incubated with of oridonin at 1/2MIC for 16 h, the relative expression of *icaA*, *cidA*, *agrA* and *sarA* of *S. aureus* were reduced by 91.6%, 94.7%, 77.6% and 70.4%, respectively. **[Conclusion]** Oridonin can significantly inhibit the biofilm formation of *S. aureus* via the reduction of *icaA* and *cidA* expression, so as to influence the synthesis of polysaccharide intercellular adhesion and the eDNA release.

Keywords: Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Oridonin, Biofilm-related genes

生物膜(biofilm)是由微生物在一些载体表面通过黏附生长并用自身分泌的细胞外基质(extracellular polymeric substances, EPS)包裹所形成的高度组织化的多细胞群落^[1]。食品含有丰富的营养物质,为细菌提供了适宜的生存环境,在一些食品加工设备的表面极易附着微生物形成生物膜。研究表明 *Salmonella*、*Listeria monocytogenes*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Staphylococcus aureus*^[2-7]等食源致病菌能黏附到食品及加工器具表面形成生物膜。食源性病原菌在食品加工设备表面形成生物膜不仅会对食品加工设备、输送管道造成表面损伤,更是一种潜在的污染源,引起食品腐败和疾病传播,威胁食品安全。

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)是一种常见的食源性致病菌,易污染禽类、肉类和奶制品等蛋白含量丰富的食品。金黄色葡萄球菌在食品中大量繁殖会产生金黄色葡萄球菌肠毒素,误食后可造成严重的胃肠炎,引发恶心、呕吐、腹部痉挛等症状,已成为仅次于沙门氏菌和副溶血弧菌引起细菌食物中毒的第三大重要病原菌^[8]。

冬凌草甲素为对映-贝壳杉烷类二萜化合物,是冬凌草(*Rabdosia rubescens*)的主要活性成分。冬凌草甲素具有抗肿瘤、抗菌、抗炎和抗氧化等多种药理活性^[9]。我们前期的研究结果显示,冬凌草醇提物对金黄色葡萄球菌生物膜有显著的抑制作用^[10],但目前关于冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用机制尚缺乏系统的研究。因此,

本文对冬凌草甲素抑制黄色葡萄球菌生物膜的作用机制进行研究,以期为其在医药、食品和畜牧等行业的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC6538)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;冬凌草甲素,上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),青岛海博生物技术有限公司;96孔细胞培养板、24孔细胞培养板、细菌基因组DNA快速抽提试剂盒、细菌总RNA快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。刚果红培养基(g/L):营养琼脂粉 53.0,刚果红 4.0,蔗糖 36.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 备用。

低温超速离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;全自动酶标仪、荧光定量PCR仪, Bio-Rad 公司;扫描电镜, Hitachi High-Technologies 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计, ThermoFisher 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化和菌悬液制备

将 -80°C 贮藏的甘油菌种接种于TSB培养基中, 37°C 、150 r/min 活化过夜后,于TSB培养基中二次活化, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,沉淀物用适量无菌生理盐水洗涤 2 次,然后用无菌生理盐水调整菌悬液浓度为 $OD_{600}=0.1$ (约 0.5 麦氏单位, 5×10^8 CFU/mL)备用。

1.2.2 最小抑菌浓度测定

将冬凌草甲素溶解于甲醇中, 经 0.22 μm 膜过滤后稀释到合适浓度。参考 Silván 等^[11]方法, 取 1 mL 制备的菌悬液接种于 99 mL TSB 培养基中, 加入冬凌草甲素使其终浓度分别为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床培养 24 h 后测定 600 nm 处吸光值, 每个浓度梯度组设 3 个平行, 取平均值。以添加等量溶剂甲醇为对照组。

1.2.3 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响

采用 96 孔细胞培养板进行生物膜制备。将金黄色葡萄球菌接入 TSB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床培养过夜, 稀释 100 倍后每孔加入 100 μL 含菌培养基, 然后再分别添加 100 μL 含药物的新鲜 TSB 培养基, 使冬凌草甲素终浓度分别为 1/8MIC、1/4MIC 和 1/2MIC, 同时以不含冬凌草甲素的 TSB 培养基作为空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 取出 96 孔细胞培养板, 参照 O'Toole 等^[12]方法进行结晶紫染色, 酶标仪检测 OD_{595} 对生物膜进行定量。实验重复 3 次, 取平均值。

同时取上述稀释后的含菌培养基加入 24 孔板, 每孔 1.5 mL, 然后加入无菌玻璃片(1 \times 1 cm), 再分别添加 500 μL 含药物的新鲜 TSB 培养基, 使冬凌草甲素终浓度分别为 1/8MIC、1/4MIC 和 1/2MIC, 同时以不含冬凌草甲素的 TSB 培养基作为空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h, 取出玻璃片, 参照 Kim 等^[13]方法进行样品制备, 扫描电镜观察。

1.2.4 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 PIA 合成的影响

将上述制备的菌悬液接种到刚果红平板上。刚果红平板中冬凌草甲素的含量分别为 1/8MIC、1/4MIC 和 1/2MIC, 同时以不含药物平板作为阳性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 16 h, 观察冬凌草甲素对 PIA 合成的影响。其中菌落颜色呈黑色的为 PIA 阳性菌株, 菌落呈红色的为 PIA 阴性菌株^[14]。

1.2.5 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 eDNA 分泌的影响

将金黄色葡萄球菌接入 TSB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 16 h 后, 稀释 100 倍, 加入冬凌草甲素使其终浓度分别为 0、1/8MIC、1/4MIC 和 1/2MIC。将含有冬凌草甲素的菌液加入 96 孔板中, 每孔 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 16 h, 按 Rice 等^[15]的方法提取 eDNA, 用分光光度计检测 eDNA 的浓度, eDNA 的表达水平用 eDNA 含量 $\mu\text{g}/OD_{595}$ 表示。试验重复 5 次, 取平均值。

1.2.6 RNA 提取及实时定量 RT-PCR

取培养至对数期(16 h)的金黄色葡萄球菌菌液 0.5 mL 接种至 49.5 mL 新鲜 TSB 培养基中, 加入冬凌草甲素, 使其终浓度分别为 0、1/8MIC、1/4MIC 和 1/2MIC, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 16 h, 取 10 mL 菌悬液, 根据细菌总 RNA 快速抽提试剂盒说明书提取细菌 RNA, 用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计进行 RNA 的定量, 然后采用两步反转合成 cDNA, 根据 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明书进行 RT-PCR, 引物如表 1 所示, 以 16S rRNA 基因为内参。RT-PCR 反应体系(20 μL): 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , cDNA 模板 2 μL , 无 RNA 酶的 ddH₂O 6.4 μL 。RT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 39 个循环。每个样品重复 3 次, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对数据进行分析。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used in RT-PCR

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	片段大小 Size (bp)
<i>icaA</i> -F	AGTGCAGTTGTGCGATGTTGGCTAC	822
<i>icaA</i> -R	CAACACATGGCAAGCGGTTTCATAC	
<i>cidA</i> -F	ATCTTCCCTTAGCCGGCAGT	396
<i>cidA</i> -R	TGCACCGTCTTCTACCCAAG	
<i>agrA</i> -F	TGCCCTCGCAACTGATAATCC	343
<i>agrA</i> -R	ACCAACTGGGTCATGCTTACG	
<i>sarA</i> -F	CGCTGTATTGACATACATCAGCGA	294
<i>sarA</i> -R	TGCTTTAACAACCTGTGGTTGTTTG	
16S rRNA-F	TACACACCGCCCGTCACA	79
16S rRNA-R	CTTCGACGGCTAGCTCCTAAA	

2 结果与分析

2.1 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

采用试管倍比稀释法测定了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度, 试验结果见图 1。由图 1 可知, 质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 冬凌草甲素显著抑制了金黄色葡萄球菌的生长($P<0.01$), 浓度越高抑制活性越强, 当冬凌草甲素的质量浓度大于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时完全抑制了金黄色葡萄球菌的生长。MIC 是指经 24 h 培养后实验组无明显生长的最低浓度, 由此可知冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 25 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响

采用结晶紫染色法研究了 1/8MIC、1/4MIC 和 1/2MIC 三种不同质量浓度的冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响, 试验结果见图 2。由图 2 可知, 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制活性随着冬凌草甲素质量浓度的升高而提高。与对照组相比, 在 1/2MIC 和 1/4MIC 冬凌草甲素作用下, 金黄色葡萄球菌生物膜形成量分别下降了 61% 和 50%, 差异极显著($P<0.01$); 在 1/8MIC 冬凌草甲素作用下, 金黄色葡萄球菌生物膜形成量也下降了 19%, 差异显著($P<0.05$)。

扫描电镜观察结果也显示(图 3), 冬凌草甲素

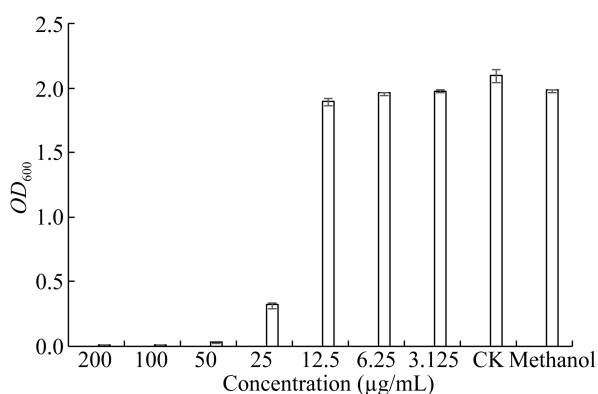


图 1 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度的测定

Figure 1 Determination of the MIC of oridonin on *S. aureus*

能抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成, 未添加冬凌草甲素的对照组菌体聚集成团, 连成一片; 药物处理组金黄色葡萄球菌生物膜的形成量则随着冬凌草甲素浓度的增大而降低, 当冬凌草甲素含量达到 1/2MIC 时, 细菌多呈分散状态, 部分聚集在一起, 但没有出现堆叠成团的现象。

2.3 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 PIA 合成的影响

采用刚果红平板研究了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 合成的影响, 试验结果见图 4。由图 4 可知, 未添加冬凌草甲素的对照组, 金黄色葡萄球菌的菌落呈现黑色, 而药物处理组随着冬凌草甲素浓度的增加, 金黄色葡萄球菌的菌落逐渐变小, 黑色逐渐变浅, 当冬凌草甲素浓度达到 1/2MIC 时黑色区域几乎消失。实验结果表明, 冬凌草甲素能够抑制金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 的合成, 且随着冬凌草甲素含量的增加, 对金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 的合成抑制作用越强。

2.4 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 eDNA 分泌的影响

采用分光光度计法研究了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 eDNA 分泌的影响, 试验结果见图 5。

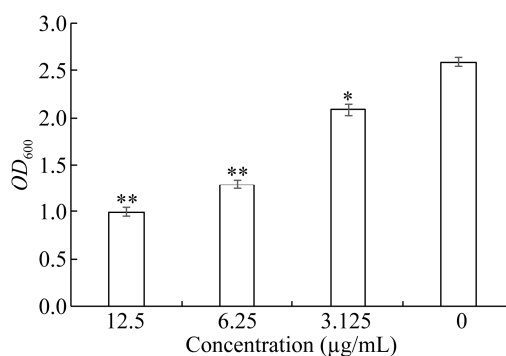


图 2 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响
Figure 2 Effect of oridonin on the biofilm formation of *S. aureus*

注: *: 与对照组相比, 差异显著($P<0.05$); **: 与对照组相比, 差异极显著($P<0.01$). 下同.

Note: *: Significant difference as compared with the control group ($P<0.05$); **: Extremely significant as compared with the control group ($P<0.01$). The same in following figures.

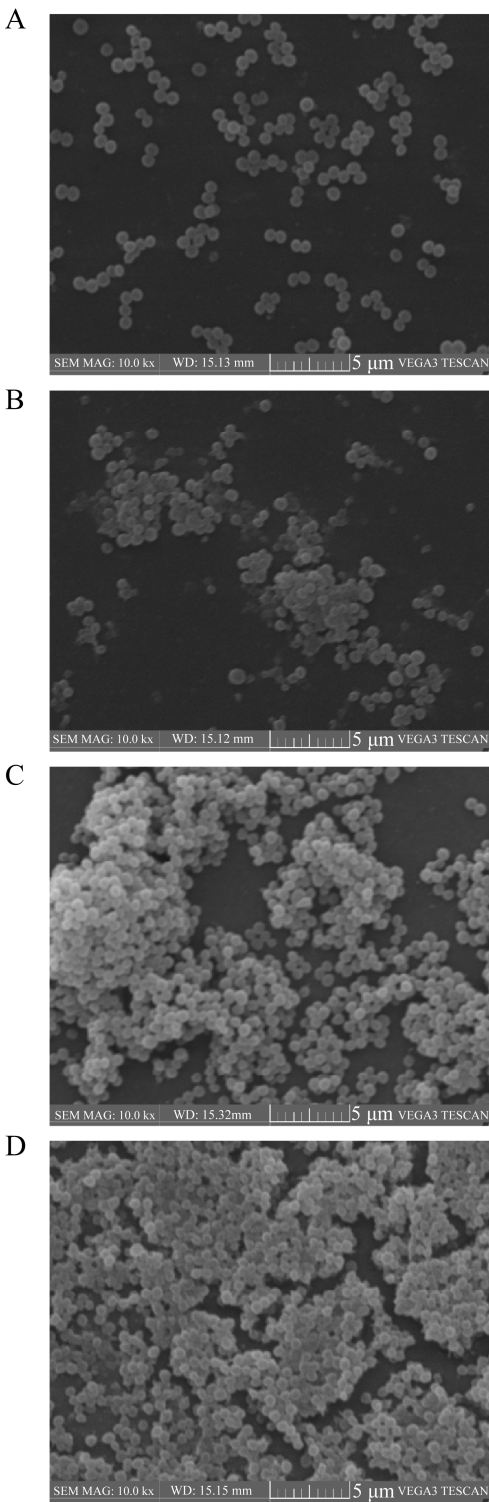


图 3 冬凌草甲素抑制金黄色葡萄球菌生物膜形成的扫描电镜图
 Figure 3 SEM of the *S. aureus* biofilm treated by oridonin at different concentrations
 Note: A: 1/2MIC; B: 1/4MIC; C: 1/8MIC; D: CK.

由图 5 可知，金黄色葡萄球菌 eDNA 释放量随着冬凌草甲素含量的增加而逐渐降低，与对照组相比，1/4MIC 冬凌草甲素作用 16 h 后，金黄色葡萄球菌 eDNA 的释放量降低了 48.62%，差异极显著 ($P<0.01$)，表明冬凌草甲素能抑制金黄色葡萄球菌 eDNA 的分泌，并且随冬凌草甲素含量的增加抑制程度逐渐增强。

2.5 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 *icaA*、*cidA*、*agrA* 和 *sarA* 基因表达的影响

采用 RT-PCR 技术检测了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌 *icaA*、*cidA*、*agrA* 和 *sarA* 基因表达的影响，试验结果见图 6。由图 6 可知，亚抑制浓度的冬凌草甲素可显著降低供试菌株的 *icaA*、*cidA*、*agrA* 和 *sarA* 基因的相对表达量 ($P<0.01$)。其中 1/2MIC 的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌

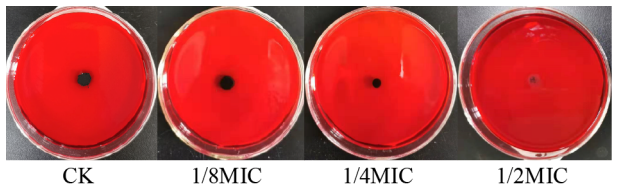


图 4 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 的影响
 Figure 4 Effect of oridonin on the PIA production in the *S. aureus* biofilm

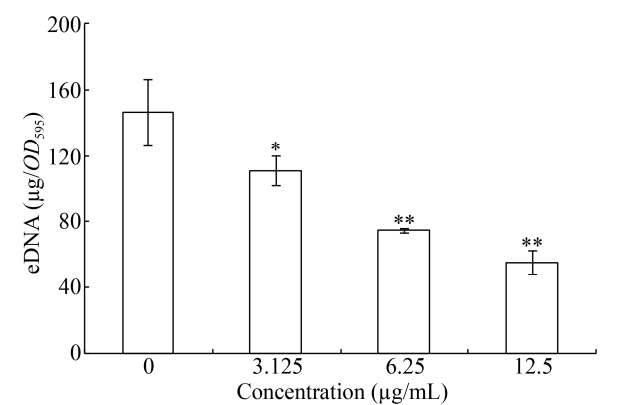


图 5 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜 eDNA 分泌的影响
 Figure 5 Effect of oridonin on the eDNA release in the *S. aureus* biofilm

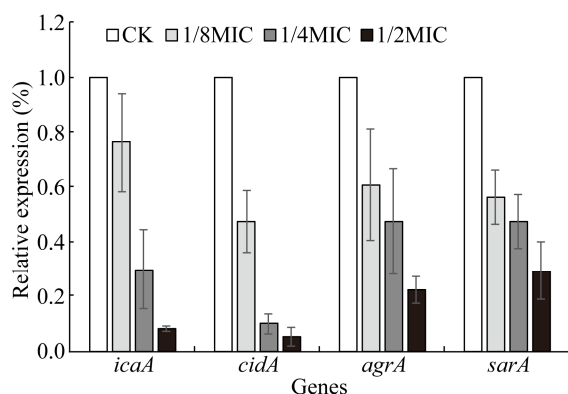


图6 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物被膜形成相关基因表达的影响

Figure 6 Effect of oridonin on expression of biofilm forming related genes in *S. aureus*

16 h 后, 与对照组相比, *icaA* 基因的表达量降低了 91.6%, *cidA* 基因的表达量降低了 94.7%, *agrA* 基因的表达量降低了 77.6%, *sarA* 基因的表达量降低了 70.4%。

3 讨论与结论

本文研究了冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用。实验结果表明, 冬凌草甲素能够抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成, 在 1/2MIC 和 1/4MIC 冬凌草甲素作用下, 金黄色葡萄球菌生物膜形成量分别显著下降了 61% 和 50% ($P < 0.01$)。金黄色葡萄球菌生物膜的形成分为黏附、聚集、成熟和脱落 4 个阶段^[16]。研究表明, PIA 在细菌聚集阶段发挥重要作用, 其不仅能介导细菌间黏附形成生物膜, 而且参与细菌感染宿主的过程。本研究结果显示, 冬凌草甲素能够抑制金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 的合成, 且冬凌草甲素的含量越高, 对金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 的合成抑制作用越强, 呈剂量依赖性。eDNA 也参与细菌生物膜的形成且与细菌的初始黏附密切相关。细菌黏附至基质表面后, 通过聚集因子进行聚集, 增殖形成微菌落。本研究结果显示, 冬凌草甲素能够抑制金黄色葡萄球菌生物膜中 eDNA 释放, 与对照组相比, 1/4MIC 冬凌草甲素作用 16 h 后, 金

黄色葡萄球菌 eDNA 的释放量降低了 48.62%, 并且随药物浓度增高其抑制程度逐渐增强。

细菌从游离状态到聚集形成成熟的生物膜是一个非常复杂的过程, 涉及多种基因的表达与调控。目前发现多个与生物膜形成相关的基因, 如 *ica* 操纵子。*icaA* 基因编码乙酰葡萄糖胺转移酶, 其负责细胞间多糖黏附素 PIA 的合成^[17]。本文采用 RT-PCR 技术对金黄色葡萄球菌 *icaA* 基因相对表达量的检测结果显示, 当 1/2MIC 冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 16 h 后, 与对照组相比, *icaA* 基因的表达量降低了 91.6% ($P < 0.01$), 表明冬凌草甲素可通过降低 *icaA* 基因的表达抑制金黄色葡萄球菌生物膜中 PIA 的合成。

研究表明, 金黄色葡萄球菌生物膜中的 eDNA 主要来源于由 *cidA* 基因介导的细菌细胞程序化死亡和细胞裂解^[16]。本研究利用 RT-PCR 技术检测了促进菌体自溶的 *cidA* 基因的表达量。结果显示, 冬凌草甲素显著抑制了 *cidA* 基因的表达, 在 1/8MIC 冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 16 h 后, 与对照组相比, *cidA* 基因的表达量降低了 52.6% ($P < 0.01$), 并且随药物浓度增高其抑制程度显著增强, 1/2MIC 的冬凌草甲素作用金黄色葡萄球菌 16 h 后, 与对照组相比, *cidA* 基因的表达量降低了 94.7%, 呈剂量依赖性。但相比于 *cidA* 基因表达量的下降趋势显著, 金黄色葡萄球菌 eDNA 释放量的下降趋势平缓, 这表明还有其他途径参与金黄色葡萄球菌 eDNA 释放的调控。

ica 操纵子和 *cid* 操纵子的表达受群感效应附属基因调节子 (accessory gene regulator, *agr*) 二元调控系统中 *agrA* 基因和葡萄球菌附属蛋白调节系统中 *sarA* (staphylococcal accessory regulator A) 基因的调控^[18]。采用 RT-PCR 技术对金黄色葡萄球菌 *agrA* 和 *sarA* 基因相对表达量的研究结果显示, *agrA* 和 *sarA* 基因的表达趋势与 *icaA* 和 *cidA* 基因的表达趋势相同, 都随冬凌草甲素浓度的增加逐渐受到抑制, 这表明冬凌草甲素可能通过抑制 *agrA*

和 *sarA* 基因的表达来调控 *ica* 操纵子和 *cid* 操纵子, 影响金黄色葡萄球菌 PIA 的合成和 eDNA 释放, 干预生物膜的形成。

综上所述, 冬凌草甲素能显著抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成, 其作用机制是通过抑制 *agrA* 和 *sarA* 基因的表达来调控 *icaA* 和 *cidA* 的基因表达, 进而影响金黄色葡萄球菌 PIA 合成和 eDNA 的释放, 干预生物膜的形成。本研究为冬凌草在食品防腐和保鲜及无抗饲料的广泛应用方面提供理论基础, 也为进一步研究冬凌草甲素的作用机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] DeFrancesco AS, Masloboeva N, Syed AK, et al. Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by *Staphylococcus aureus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(29): E5969-E5978
- [2] de Abreu Abeyesundara P, Dhowlaghar N, Nannapaneni R, et al. *Salmonella enterica* growth and biofilm formation in flesh and peel cantaloupe extracts on four food-contact surfaces[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 280: 17-26
- [3] Poimenidou SV, Chrysadaku 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
- [4] Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation[J]. Pathogens, 2014, 3(3): 596-632
- [5] Meesilp N, Mesil N. Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(1): 289-296
- [6] Klinger-Strobel M, Stein C, Forstner C, et al. Effects of colistin on biofilm matrices of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017, 49(4): 472-479
- [7] Manohar CM, Kundgar SD, Doble M. Betanin immobilized LDPE as antimicrobial food wrapper[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 80: 131-135
- [8] Zhang Y, Qiao MY, Wang X. Prevalence of *Staphylococcus aureus* contamination in infant foods and the detection of antibiotic resistance genes and new enterotoxin genes[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 280-285 (in Chinese)
- 张阳, 乔明宇, 王新. 婴幼儿食品中金黄色葡萄球菌污染情况及其耐药基因和新型肠毒素基因的检测[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 280-285
- [9] Li DH, Han T, Liao J, et al. Oridonin, a promising ent-kaurane diterpenoid lead compound[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(9): 1395
- [10] Wang LJ, Xu MQ, Jiu M, et al. Inhibition activity of *Rabdosia rubescens* extract on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(6): 1000-1005, 1019 (in Chinese)
- 汪伦记, 许美秋, 纠敏, 等. 冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(6): 1000-1005, 1019
- [11] Silván MJ, Mingo E, Hidalgo M, et al. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp.[J]. Food Control, 2013, 29(1): 25-31
- [12] O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(3): 449-461
- [13] Kim JE, Choi NH, Kang SC. Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2007, 18(10): 1198-1203
- [14] Qiao RH, Xie KP, Xie MJ, et al. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm by honokiol[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(8): 1266-1272 (in Chinese)
- 乔瑞红, 谢鲲鹏, 谢明杰, 等. 和厚朴酚抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜形成[J]. 微生物学报, 2016, 56(8): 1266-1272
- [15] Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(19): 8113-8118
- [16] Zhou XD, Shi WY. Microbial Biofilm and Infection[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2012 (in Chinese)
- 周学东, 施文元. 微生物生物膜与感染[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012
- [17] Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(52): 54881-54886
- [18] Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(14): 4665-4684